

## 인간 배아 줄기세포의 초자화 동결 및 초급속 융해에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>1</sup>, 의학연구원 인구의학연구소<sup>2</sup>  
문신용<sup>1,2</sup> · 박용빈<sup>2</sup> · 김희선<sup>2</sup> · 성기청<sup>2</sup> · 오선경<sup>2</sup> · 천대우<sup>2</sup>  
서창석<sup>1,2</sup> · 최영민<sup>1,2</sup> · 김정구<sup>1</sup> · 이진용<sup>1</sup> · 김석현<sup>1,2</sup>

### The Study on Vitrification and Ultrarapid Thawing of Human Embryonic Stem Cells

Shin Yong Moon<sup>1,2</sup>, Yong Bin Park<sup>2</sup>, Hee Sun Kim<sup>2</sup>, Ki Chung Sung<sup>2</sup>, Sun Kyung Oh<sup>2</sup>,  
Dae Woo Chun<sup>2</sup>, Chang Suk Suh<sup>1,2</sup>, Young Min Choi<sup>1,2</sup>, Jung Gu Kim<sup>1</sup>,  
Jin Yong Lee<sup>1</sup>, Seok Hyun Kim<sup>1,2</sup>

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine<sup>1</sup>, Institute of Reproductive Medicine  
and Population, Medical Research Center<sup>2</sup>, Seoul National University, Seoul, Korea*

**Objective:** This study was carried out to establish the effectiveness of the vitrification method and the optimal cryoprotectants in the cryopreservation of human embryonic stem cells (ESC).

**Materials and Methods:** Human ESC clumps established at Seoul National University Hospital (SNUhES 1) were cryopreserved with the vitrification method using the EM grid. EDS and EFS40 were used as vitrification solutions.

**Results:** Between the EDS and EFS40 groups, there was no significant difference in the recovery rate after cryopreservation of human ESC. The formation rates of ESC colonies in the vitrified groups were significantly lower than those in the control ESC group ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ). In addition, the formation rate of ESC colonies in the EDS group was significantly higher than that in the EFS40 group ( $p < 0.05$ ). The ESC colonies in the vitrified groups were significantly smaller after culture duration of 2 and 4 days, respectively, compared with the control ESC group ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). However, these effects could be reduced to nonsignificant level by the additional culture of ESC colonies. The vitrified human ESC retained the properties of pluripotent cells, including the expression of cell surface markers for the undifferentiated cells such as alkaline phosphatase and SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen-4), and the expression of transcription factor Oct-4 (octamer-binding transcription factor-4), and the normal karyotype.

**Conclusion:** The vitrification method using the EM grid and EDS solution was confirmed to be very effective for the cryopreservation of human ESC.

**Key Words:** Human embryonic stem cells (ESC), Cryopreservation, Vitrification, EDS solution, EFS40 solution, EM grid

주관책임자: 문신용, 우) 110-744 서울특별시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실  
Tel: (02) 760-2384, Fax: (02) 762-3599, e-mail: shmoon@snu.ac.kr

본 연구는 보건복지부 바이오보건기술개발사업 우수핵심사업연구비 (01-PJ10-PG8-01EC01-0007)의 지원에 의하여 이루어진 것임.  
This study was supported by a grant (01-PJ10-PG8-01EC01-0007) of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea.

배아 줄기세포 (embryonic stem cell, ESC)는 착상 전 포배기 배아의 내세포괴 (inner cell mass, ICM)에 존재하는 다잠재성 세포 (pluripotent cell)에서 유래한 세포로서 체외 배양시 원시적인 배아 상태로 무한히 증식할 수 있으며, 장기간의 체외 배양에도 불구하고 정상적인 핵형 (karyotyping)을 유지할 뿐만 아니라 적절한 배양 조건을 조성하여 주면 3종류의 배엽층 (embryonic germ layer), 즉 외배엽, 중배엽, 내배엽에서 유래되는 다양한 기능을 지닌 세포로 분화할 수 있는 특성을 지닌 세포이다.<sup>1</sup>

최근 인간 포배기 배아로부터 배아 줄기세포를 분리, 배양하는데 성공하였으며,<sup>2</sup> 이들 세포로부터 유연히 분화된 신경전구세포 (neural progenitor cell)를 분리, 배양하여 완전한 신경세포로 분화시키는데 성공하였다.<sup>3</sup> 이러한 배아 줄기세포를 이용하여 지금까지 윤리적 문제 등으로 수행할 수 없었던 많은 기초 및 임상 연구에 활용할 수 있게 되었다. 첫째, 윤리적 문제 때문에 배아, 태아 등의 생체 상태에서 인간의 발생 및 분화 과정에 관여하는 여러 가지 인자 등을 연구하기는 힘들었지만, 미분화 상태의 인간 배아 줄기세포에서의 분화 과정을 연구함으로써 발생 및 분화시 작용하는 유전자 및 인자들을 체외에서 연구 규명할 수 있다. 둘째, 다른 동물의 조직이나 세포가 아닌 인간 배아 줄기세포로부터 분화된 조직이나 세포를 대상으로 약물 및 독성 검사를 시행함으로써 상대적으로 인간에게 더 안정적인 약품을 개발할 수 있다. 셋째, 질병, 사고 등으로 훼손된 조직을 대체할 수 있는 조직이나 세포를 인간 배아 줄기세포로부터 얻을 수 있다.

한편 인간 배아 줄기세포를 임상에서 이용하기 위해서는 선결하여야 할 문제점이 많이 있다. 순수하게 분리된 배아 줄기세포를 장기간 동안 미분화 상태를 유지하면서 대량으로 배양하는 기술, 배아 줄기세포로부터 특정 세포로 분화될 수 있는 세포를 분리 배양하는 기술 등을 우선적으로 개발하여야 한다. 배아 줄기세포의 분화를 억제하거나, 성장을 용이하게 하는 유전자 및 인자 뿐만 아니라 그 작용 기전을 규명하여야 한다. 또한 세포 및 조직 이식 치료 (transplantation therapy)를 위하여 특정 세포를 생산하는 경우 이식된 세포 및 조직에 대한 면역거부반응 (immune rejection)을 최소화하기 위하

여 MHC (major histocompatibility complex)가 다양한 세포은행을 설치하거나, 유전자 조작을 이용하여 면역거부반응을 극복할 수 있는 세포를 만들어야 하며, 이식 후 주변 조직과 잘 융화되도록 하여 이식 치료의 효율성을 증가시킬 수 있는 기술을 연구하여야 한다.

그러므로 배아 줄기세포의 기능, 분화 등을 규명하기 위하여 배아 줄기세포를 다루거나 조작하는 기술이 우선적으로 증진되어야 하며, 확립된 배아 줄기세포를 장기간 보존하고, 타 연구기관과 서로 공유하기 위해서는 효과적인 세포 동결, 용해 등의 동결보존 기술 개발이 매우 시급하다.

일반적으로 세포주 (cell line)의 동결보존 방법으로는 완만 동결-급속 용해 (slow freezing-rapid thawing) 방법이 주로 사용된다.<sup>4</sup> 이 방법은 생쥐 배아 줄기세포의 동결보존시에는 효과적이라고 알려져 있지만,<sup>5</sup> 인간 배아 줄기세포의 동결보존시 미분화된 배아 줄기세포의 생존율이 매우 낮으며, 대부분의 세포들이 분화되거나 죽는 경향이 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 최근 Reubinoff 등<sup>6</sup>은 일반적인 완만 동결-급속 용해 방법이 아닌 straw를 이용한 초자화 동결 (vitrification) 방법에 의한 인간 배아 줄기세포의 동결보존 방법을 개발하였다. 초자화 동결은 세포를 고농도의 동결보존제에 단시간 노출시켜 탈수시키고, 점도 (viscosity)의 증가로 세포 내외가 유리화 상태로 되어 분자운동이 정지되고, 세포 손상을 유발하지 않는 상태로 만드는 동결 방법이다.<sup>7</sup> 따라서 초자화 동결은 시행 방법이 간단하고, 시간이 적게 걸리며, 결빙 형성을 방지할 뿐만 아니라 자동 세포동결기를 이용하지 않으므로 경제적인 장점 등을 지니고 있다.

본 연구에서는 인간 배아 줄기세포의 특성을 잃지 않으면서 동결보존할 수 있는 효과적인 기술을 개발하고자 Reubinoff 등<sup>6</sup>이 이용한 ethylene glycol, DMSO (dimethylsulfoxide) 및 sucrose로 이루어진 E-DS 용액과 ethylene glycol, Ficoll 및 sucrose로 이루어진 EFS40 용액<sup>8</sup>을 동결보존액으로 사용하였으며, 인간 배아 줄기세포의 초자화 동결시 straw에 비하여 냉각 속도가 빨라 냉해를 최소화할 수 있는 EM grid를 사용하였다. 인간 배아 줄기세포의 초자화 동결 및 초급속 용해 후 배아 줄기세포의 회수율,

세포군 (colony) 형성, 성장률, 분화 정도 등을 관찰 분석하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

본 연구에서는 체외수정시술 (IVF-ET)시 배아의 자궁내 이식 후 남은 여분의 잉여 배아를 10년 이상 동결보존한 후 보존 기간의 만료로 인하여 폐기 처분될 배아 중에서 환자 부부의 서면 동의를 받은 배아로부터 확립된 인간 배아 줄기세포 (SNUhES 1, passage 12)를 초자화 동결 및 초급속 용해에 사용하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 인간 배아 줄기세포의 배양

본 연구에 사용된 인간 배아 줄기세포는 서울대학교 의학연구원 인구의학연구소 및 서울대학교병원 산부인과에서 확립된 SNUhES 1으로서 배아 줄기세포의 미분화 특성으로 인지되고 있는 alkaline phosphatase, Oct-4 (octamer-binding transcription factor-4), SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen-4) 등이 모두 발현되는 정상적인 핵형 (46,XY)을 지닌 세포이다.

배아 줄기세포를 gelatin으로 도포된 배양접시에서  $\gamma$ -irradiation시킨 STO fibroblast를 feeder cell layer로 사용하여 배양하였으며, 미분화된 배아 줄기세포군 (colony)을 미세한 glass knife로 세포군 당 100개 이하의 줄기세포가 존재하도록 분획한 후 7일에 한번씩 계대배양하였다. 배양액으로는 knockout Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; high glucose 4.5 gm/L)을 기본 배양액으로 하여, 20% ES qualified FBS, 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acid, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, recombinant LIF 2,000 units/ml를 첨가하여 사용하였다. 배양액의 재조를 위한 시약은 모두 Gibco사와 Sigma사의 제품을 사용하였다.

#### 2) 동결 및 용해액

기본 동결액 및 용해액으로는 20% ES qualified FBS를 첨가한 knockout DMEM을 사용하였다. 동결액 (freezing solution)으로 각각 기본 동결액에 10% ethylene glycol + 10% DMSO 및 20% ethylene glycol

**Table 1.** Recovery and formation rates of human embryonic stem cell (hESC) colonies after vitrification and ultrarapid thawing

Group	No. of hESC clumps	No. of recovered hESC clumps	No. of hESC colonies
Control	32	-	29 (90.6%) <sup>ab</sup>
EDS	48	45 (93.8%)	33 (73.3%) <sup>ac</sup>
EFS40	48	44 (91.7%)	24 (54.5%) <sup>bc</sup>

a:  $p < 0.05$ , b:  $p < 0.05$ , c:  $p < 0.05$

+ 20% DMSO + 0.5 M sucrose를 혼합한 EDS 용액을 2단계의 동결보존액으로 사용하거나 기본 동결액에 40% ethylene glycol + 18% Ficoll + 0.5 M sucrose를 혼합한 EFS40 용액을 사용하였다. 용해액 (thawing solution)으로 모두 기본 동결액에 0.2 M sucrose와 0.1 M sucrose를 혼합한 2단계의 용해액을 사용하였다. 모든 동결액과 용해액은 여과 멸균소독한 후 37°C가 유지되고 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기내에서 1시간 배양한 후 사용하였다.

#### 3) 인간 배아 줄기세포의 초자화 동결 및 초급속 용해

동결보존시 배아 줄기세포군을 계대배양시에 비하여 크게 분획하여, 즉 세포군 당 100~200개의 줄기세포가 존재하도록 분획하여 사용하였다.

EDS 용액을 사용한 초자화 동결은 Reubinoff 등<sup>6</sup>의 방법을 일부 변형하여 시행하였다. 즉 배아 줄기세포군을 분획하여 10% ethylene glycol + 10% DMSO에 1분, 20% ethylene glycol + 20% DMSO + 0.5 M sucrose에 30초 동안 배양하여 평형시킨 후 EM grid에 5개씩 얹어 즉시 액체 질소에 침지시킴으로써 동결보존하였다. EFS40 용액을 사용한 초자화 동결은 40% ethylene glycol + 18% Ficoll + 0.5 M sucrose에 30초 동안 배양하여 평형시킨 후 EM grid에 5개씩 올려놓고 즉시 액체 질소에 침지시킴으로써 동결보존하였다.

동결보존 후 2시간이 지난 다음 액체 질소통에서 꺼낸 EM grid를 0.2 M sucrose가 혼합된 용해액에 1분 동안 노출시켰다. 분리된 배아 줄기세포군을 0.1 M sucrose가 혼합된 용해액에 5분 동안 배양한 후 줄기세포 배양액으로 5분 동안 2회 수세하였다. 용해된 배아 줄기세포를 STO feeder cell layer 위에서

배양하였다.

4) 초자화 동결-초급속 용해 후 인간 배아 줄기세포의 특성 분석

초자화 동결-초급속 용해 후 배양된 인간 배아 줄기세포의 성장은 배양 2일 후부터 9일 후까지 위상차현미경하에서 세포군의 장축 및 단축을 측정 한 후 타원형 공식  $\pi ab/4$  (a: 장축의 길이, b: 단축의 길이)를 이용하여 면적을 측정함으로써 관찰하였다. 인간 배아 줄기세포의 분화 정도는 세포군의 형태학적 특성에 따라 세포내 핵과 세포질의 비가 높고 작은 세포로 치밀하게 구성된 세포군을 미분화 세

포군, 풍부한 세포질을 가진 커다란 세포로 구성된 세포군을 분화 세포군으로 분류하였다.

초자화 동결-초급속 용해 후 배양된 인간 배아 줄기세포의 미분화 특성을 규명하기 위하여 미분화 배아 줄기세포의 세포 표면 표식자 (cell surface marker)인 alkaline phosphatase의 활성도와 SSEA-4의 발현 여부를 관찰하였으며, 내세포외 (ICM)의 다중배성 줄기세포 확립에 필수적인 요소로 알려진 Oct4의 발현 여부를 관찰하였다. 또한 이러한 미분화 배아 줄기세포가 정상적인 핵형을 지속적으로 유지하고 있는지를 확인하기 위하여 G-banding 방법으로 핵형 분석을 실시하였다.

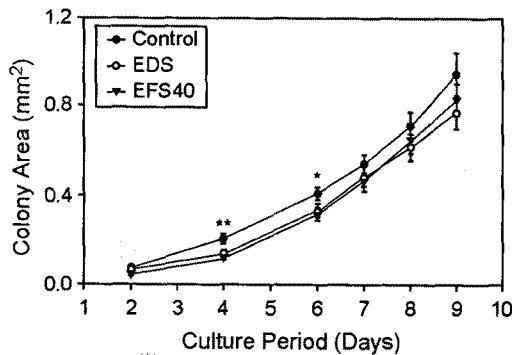


Figure 1. Comparison of area of human embryonic stem cell (hESC) colonies during culture period between vitrified and nonvitrified control groups.

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

결 과

1. 동결보존액에 따른 인간 배아 줄기세포군의 회수율과 형성률

인간 배아 줄기세포를 초자화 동결-초급속 용해 한 결과 배아 줄기세포군의 회수율은 EDS군에서 93.8% (45/48), EFS40군에서 91.7% (44/48)로서 통계학적으로 유의한 차이가 없었으나, 배아 줄기세포군의 형성률은 EDS군에서 73.3% (33/45), EFS40군에서 54.5% (24/44)로서 동결보존하지 않은 대조군의 90.6% (29/32)에 비하여 동결보존시 모두 유의하게 낮았다 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ). 초자화 동결-초급속 용해를

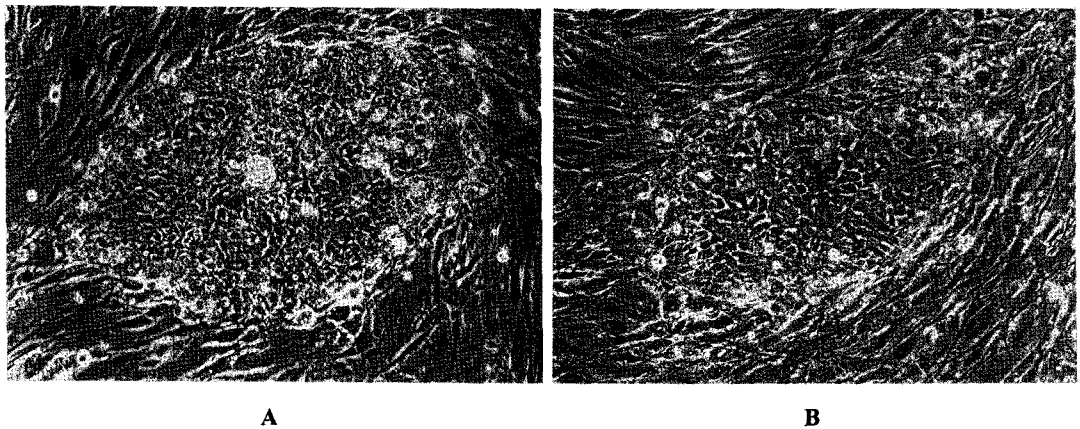
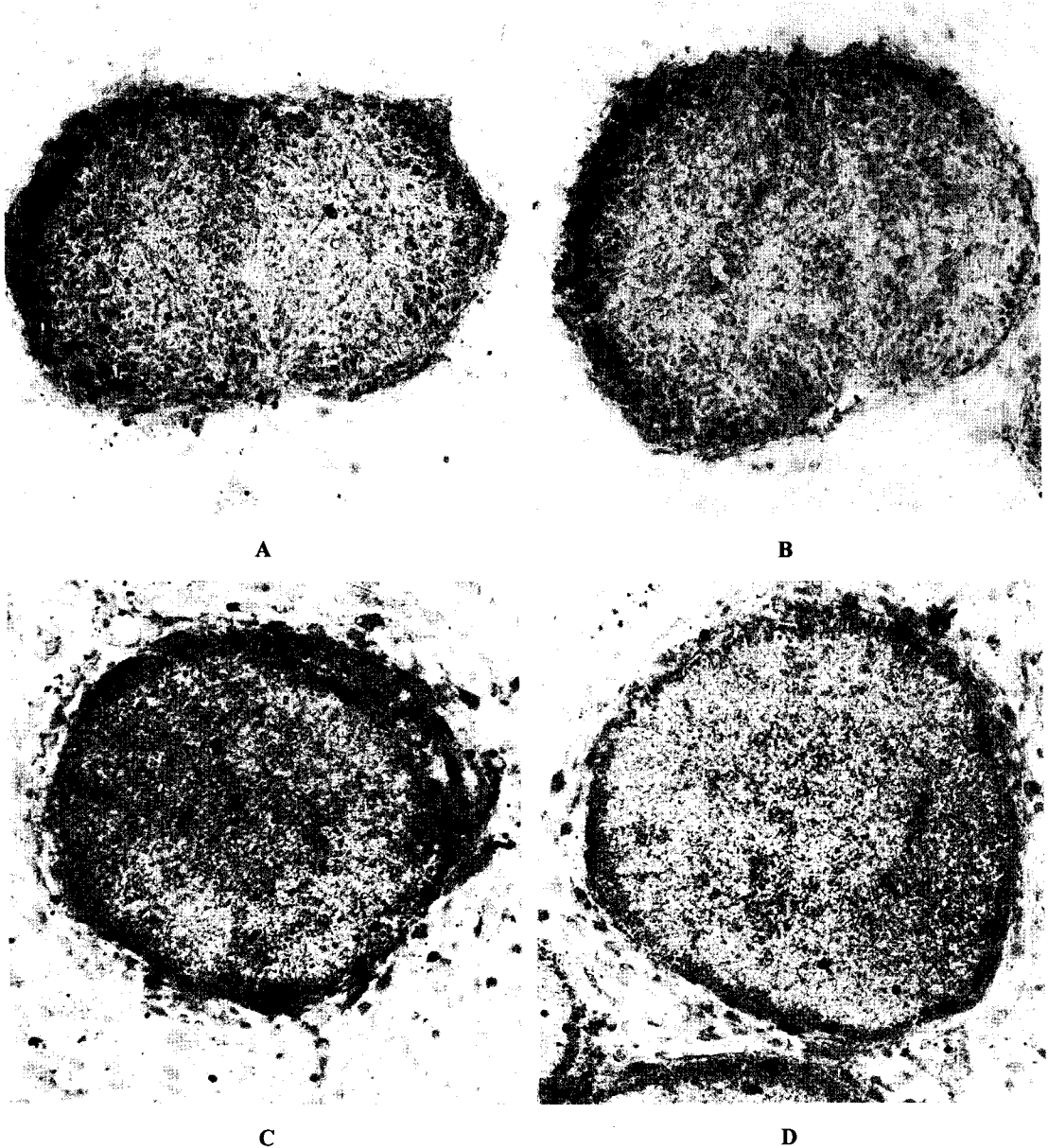


Figure 2. Morphology of human embryonic stem cell colony after vitrification ( $\times 100$ ).

A: Nonvitrified human ES cell colony (passage 12, day 4).  
B: Vitrified human ES cell colony (passage 12, day 4).



**Figure 3.** Cell surface marker expression in nonvitrified (A, C) and vitrified (B, D) human embryonic stem cell colonies ( $\times 100$ ).

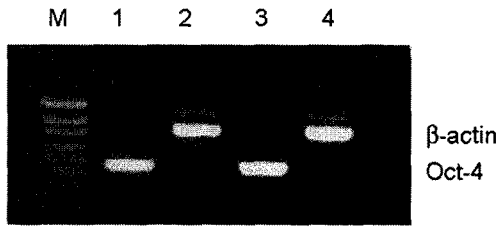
**A, B:** Histochemical staining for alkaline phosphatase.

**C, D:** Immunocytochemical staining for SSEA-4 epitope.

이용한 동결보존시 EDS군에서 EFS40군에 비하여 배아 줄기세포군의 형성률이 유의하게 높았다 ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

2. 동결보존액에 따른 인간 배아 줄기세포군의 성장률

초자화 동결-초급속 용해한 인간 배아 줄기세포군의 성장률을 조사하기 위하여 형성된 세포군의



**Figure 4.** RT-PCR analysis of the expression of Oct-4 and  $\beta$ -actin in nonvitrified and vitrified human embryonic stem cells.

M: 100 bp marker, Lane 1: Oct-4, nonvitrified hESC, Lane 2:  $\beta$ -actin, nonvitrified hESC, Lane 3: Oct-4, vitrified hESC, Lane 4:  $\beta$ -actin, vitrified hESC.

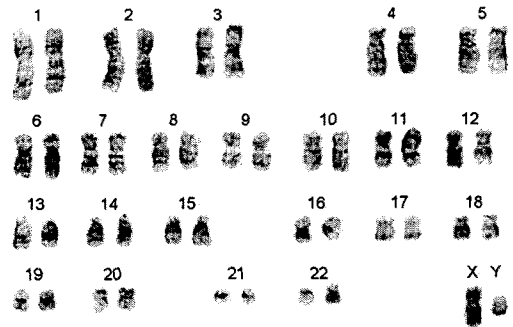
면적을 9일 동안 측정 후 동결보존하지 않은 대조군 세포군의 면적과 비교 분석하였다. 초자화 동결-초급속 용해한 줄기세포군의 면적은 배양 초기, 즉 배양 4일 후와 6일 후에는 대조군에 비하여 각각 유의하게 작았으나 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ), 이러한 차이는 배양 7일 후부터 완전히 극복되어 대조군에 비하여 작았지만 유의성은 없었다 (Figure 1).

초자화 동결-초급속 용해 후 형성된 인간 배아 줄기세포군은 대조군과 동일하게 형태학적으로 미분화된 모양을 나타내었으며 (Figure 2), 배양 9일 후부터 크기가 커진 줄기세포군의 가운데 부분에서 분화된 줄기세포군이 관찰되기 시작하였다.

### 3. 초자화 동결-초급속 용해 후 인간 배아 줄기세포의 특성 분석

초자화 동결-초급속 용해에 사용된 인간 배아 줄기세포는 정상적인 남성 핵형 46,XY를 지닌 세포로서 alkaline phosphatase 및 세포 표면 표식자인 SSEA-4가 각각 강하게 발현되었으며 (Figure 3-A, 3-C), Oct-4 mRNA가 발현되어 (Figure 4) 미분화된 배아 줄기세포의 특성을 지니고 있었다.

초자화 동결-초급속 용해 후 형성된 인간 배아 줄기세포군을 계대배양하여 배아 줄기세포의 미분화 특성을 관찰한 결과 대조군과 동일하게 alkaline phosphatase 및 SSEA-4가 각각 강하게 발현되었으며 (Figure 3-B, Figure 3-D), Oct-4 mRNA도 강하게 발현되었다 (Figure 4). 또한 이러한 미분화 배아 줄기세포에서 초자화 동결-초급속 용해 후에도 정상적인 남성 핵형 46,XY가 지속적으로 유지되었다



**Figure 5.** Normal karyotype (46,XY) of vitrified human embryonic stem cells (hESC).

(Figure 5).

## 고 찰

1998년 Thomson 등<sup>2</sup>이 불임증 치료로서 체외수정 시술을 시행받은 부부로부터 기증된 배아에서 인간 배아 줄기세포를 분리하여 배양에 성공한 이후 퇴행성 질환 및 난치성 질환의 치료를 위한 유전자 치료 (gene therapy), 세포 및 조직 이식 등의 분야에서 배아 줄기세포를 활용하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다. 미분화 배아 줄기세포에서 특정 세포로 분화를 유도하는 연구 뿐만 아니라 유전자 조작 기술의 발달로 다양한 특성을 지닌 배아 줄기세포의 개발 연구 등이 활발히 이루어지고 있다.<sup>9,10</sup>

따라서 배아 줄기세포의 기능, 분화 등을 규명하기 위하여 배아 줄기세포를 다루거나 조작하는 기술이 우선적으로 증진되어야 하며, 확립된 배아 줄기세포를 장기간 보존하고, 타 연구기관과 서로 공유하기 위해서는 배아 줄기세포의 효과적인 동결, 용해 등 동결보존 기술 개발이 매우 시급한 실정이다.

본 연구에서는 인간 배아 줄기세포를 효과적으로 동결보존할 수 있는 기술을 개발하고자 배아의 동결보존 방법 중 하나인 초자화 동결을 적용하여 인간 배아 줄기세포를 초자화 동결-초급속 용해한 후 배양한 배아 줄기세포의 특성을 동결보존하지 않은 배아 줄기세포의 특성과 상호 비교하였다.

일반적으로 배아를 동결보존하는 방법으로는 전통적인 완만 동결-급속 용해,<sup>11,12</sup> 초자화 동결<sup>7</sup>이 주

로 사용되고 있다. 완만 동결-급속 용해 방법은 세포주 및 배아의 동결보존시에 주로 사용되는데, 이 방법은 동결보존시 시간이 많이 소요되고, 고가의 자동 세포동결기가 필요하다는 단점이 있다. 완만 동결-급속 용해 방법은 생쥐 배아 줄기세포의 동결보존시에는 효과적이라고 알려져 있으나,<sup>5</sup> 인간 배아 줄기세포의 동결보존시에는 용해 후 회수율이 낮으며, 대부분의 세포들이 분화되거나 죽는 경향이 있고, 성장률도 저조하여 효율적이지 않은 것으로 보고된 바 있다.<sup>6</sup>

초자화 동결 방법은 최근 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이 방법은 고농도로 농축된 동결보존액이 결빙 형성을 예방하고, 고가의 자동 세포동결기를 사용하지 않으므로 시간이 단축되고, 경제적인 장점을 지니고 있다. 한편 고농도의 동결보존액 자체의 독성 및 삼투압 변화에 의한 세포 손상의 우려가 있다는 단점도 있으나, 이러한 문제점들은 상대적으로 독성이 적은 ethylene glycol을 사용하여 동결보존액의 조성을 변화시키거나,<sup>13</sup> 냉각 속도를 증가시켜 해로운 동결보존액의 노출을 감소시킴으로써 해결할 수 있다. 냉각 속도를 증가시키기 위해서는 EM grid,<sup>14</sup> thin-walled open pulled straw,<sup>15</sup> nylon loop<sup>16</sup> 등 위에 세포가 포함된 배양액을 올려놓고 직접 액체 질소에 침지하는 방법이 많이 이용되고 있다.<sup>14-16</sup> 액체 질소에 직접 세포가 포함된 배양액이 접촉하므로 감염물질의 전달이 가장 문제가 될 수 있지만,<sup>17</sup> 초자화 동결 후 장시간 배양하여도 오염의 증거는 아직 보고된 바 없다.

인간 배아 줄기세포에서 EM grid를 사용하여 초자화 동결 및 초급속 용해를 시행한 본 연구 결과 기존에 인간 포배기 배아의 동결보존에 이용된 EDS군과 EFS40군 상호간에 용해 후 배아 줄기세포군의 회수율은 유의한 차이가 없었으나, 배아 줄기세포군의 형성률은 EDS군에서 유의하게 높게 나타났다. 한편 두 군 모두 대조군에 비하여 줄기세포군의 형성률이 유의하게 낮았으며, 줄기세포군의 성장률은 배양 초기에는 유의하게 작았으나 계대배양을 하는 시기인 배양 7일 후에는 완전히 극복되어 유의한 차이가 없었다. 또한 본 연구 결과 배양 7일 후까지 Reubinoff 등<sup>6</sup>이 배양 초기부터 관찰한 분화된 줄기세포군은 없었으나, 배양 9일 후부터 크기가

커진 줄기세포군의 가운데 부분에서 분화된 줄기세포군이 관찰되기 시작하였다. 그러나 이러한 줄기세포군의 분화는 배양 7일 후에 대부분의 계대배양이 이루어진다는 점을 고려하면 별다른 문제가 되지 않을 것으로 사료된다.

본 연구 결과 동결보존액으로 20% ES qualified FBS가 첨가된 knockout DMEM에 ethylene glycol, DMSO 및 sucrose를 혼합한 EDS 용액을 이용하고, EM grid를 사용하여 인간 배아 줄기세포군을 초자화 동결 및 초급속 용해하는 방법이 용해 후 줄기세포군의 회수율, 형성률, 성장률, 미분화 상태 유지 측면 등에서 효과적일 것으로 사료된다. 본 연구 결과는 확립된 인간 배아 줄기세포의 장기간 보존, 타 연구기관과의 공유 등을 가능하게 함으로써 인간 배아 줄기세포 연구 분야에 획기적인 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2000; 13: 5-10.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
3. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399-404.
4. Freshney RI. A manual of basic technique. In: Freshney RI, editor. *Culture of animal cells*. Wiley-Liss Inc. 1994. p. 255-65.
5. Robertson EJ. Embryo derived stem cell line. In: Robertson EJ, editor. *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1987. p. 71-112.
6. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod* 2001; 16: 2187-94.
7. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of

- mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
8. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 91-7.
  9. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11307-12.
  10. Westmoreland JJ, Hancock CR, Condie BG. Neuronal development of embryonic stem cells: a model of GABAergic neuron differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 674-80.
  11. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305: 707-9.
  12. Kaufman RA, Menezes Y, Hazout A, Nicollet B, DuMont M, Servy EJ. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 1995; 64: 1125-9.
  13. Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv* 1996; 14: 127-49.
  14. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54: 1059-69.
  15. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-8.
  16. Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 1234-6.
  17. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995; 346: 137-40.