

토끼수정란으로부터 배아세포의 분리

강희성 · 임경순¹ · 최화식² · 신영수³ · 진동일[†]

선문대학교 응용생물과학부

Establishment of Embryonic Stem Cells Derived from Rabbit Embryos

Kang, H. S., K. S. Im¹, W. S. Choi², Y. S. Shin³ and D. I. Jin[†]

Department of Applied Biological Science, Sun Moon University

ABSTRACT

To establish rabbit Embryonic Stem (ES) cells, rabbit one-cell embryos were collected and cultured *in vitro* to blastocysts. Blastocysts were co-cultured with mouse embryonic fibroblasts (MEF), rabbit embryonic fibroblasts (REF) or STO cells expressing LIF (SNL). Although rabbit ES cells were isolated with low efficiencies, total 8 ES cell lines were kept *in vitro* with normal colony shape. The MEF was the best feeder for rabbit ES cell isolation in regard to growth rate and undifferentiated morphology. The doubling time of rabbit ES cells in MEF was about 84 hours and the undifferentiated morphology was maintained following passing and freezing processes. These rabbit ES cells were differentiated into embryoid body following the culture in the uncoated dishes, indicating that they were undifferentiated stem cells.

(Key words : Rabbit, ES cells, MEF, REF, LIF)

I. 서 론

배아세포(ES cell)는 수정란으로부터 분리되어 미분화상태로 유지시킬 수 있는 세포로, 적절한 배양조건하에서 분화상태를 유도시킬 수 있는 cell line을 의미한다(Evans와 Kaufman, 1981; Martin, 1981; Robertson, 1987). 이 미분화 세포를 초기 수정란과 aggregation 시키거나 배반포의 blastocoel cavity로 주입시킨 후 대리모의 자궁으로 이식하면

수정란의 세포와 ES cell로 구성된 chimeric animal을 생산할 수 있다. 생식세포에 ES cell을 가진 chimeric animal을 교미시킨다면 ES cell의 genome을 다음 세대에도 전달할 수 있는 germline transmission을 얻을 수 있다. 이 미분화 상태의 ES cell에 유전자의 조작이 가능한데 유전자가 조작된 ES cell만을 선발하여 chimeric animal을 만들고 그 유전자에 대한 heterozygous와 homozygous animal을 만들 수 있다(Robertson, 1987). 또한 최근 동물복제 방법에 의해서 chimera 동물을 생산하는 것 없

본 연구는 농림기술개발사업 연구지원(296089-5)에 의해 수행되었음.

[†] Corresponding author : Department of Applied Biological Science, Sun Moon University, Asan City, Chungnam, 336-708, E-mail : dijl@omega.sunmoon.ac.kr

¹ 서울대학교 동물자원학과(Dept. of Animal Resources and Technology, Seoul National University)

² 김천대학 임상병리과(Dept. of Clinical Pathology, Kim Chun College)

³ 신구대학 자원동물산업과(Dept. of Animal Science, Shin Gu College)

이 곧바로 heterozygous animal의 생산이 가능하다. 그러므로 기존의 유전자 이식방법보다 *in vitro*에서 미리 screening이 가능하여 정교하고 효율적인 animal genome의 조작이 가능하다. 특히 DNA의 homologous recombination현상을 이용한 유전자적 중기술은 특정 gene을 변형시킨 animal을 생산할 수 있으며 ES cell system이 잘 정립되어 있는 생쥐에서는 특정 gene을 파괴시켜 그 gene의 기능이 없는 생쥐(knock-out mice)를 생산하여 *in vivo* 상태에서 gene의 기능을 규명하는데 이용되고 있으며 최근에는 gene duplication과 같은 특정 gene을 정확하게 3배체, 4 배체 등의 여분으로 갖는 생쥐를 생산하여 gene product의 증가에 따른 표현형의 변화를 추정하는데 이용되고 있다(Capocchi, 1989; Smithies와 Maeda, 1995).

가축에서의 ES cell system은 ES cell을 분리하고 확인하는 단계이나 앞으로 ES cell이 정립되면 생쥐에서 이용되고 있는 이러한 유전자 조작에 의해 가축을 개량할 수 있을 것으로 기대된다. 특히 열성유전자의 치환(gene replacement), 우성유전자의 복제(gene duplication) 등에 의한 방법으로 가축의 genome 조작이 가능하여 복합적인 유전자에 의해 나타나는 경제형질의 개량에 응용할 수 있다. 이러한 ES cell은 생쥐와 hamster에서는 잘 정립되어 있지만 그 외 동물에서는 아직 유전자 조작에 이용될 수 있을 만큼 정립되어 있지 않는데 그 이유는 미분화된 상태를 유지시키면서 증식시켜야 하는 배양기술이 개발되지 못하고 있기 때문이다. 각 동물마다 수정란의 배양조건이 다르듯이 ES cell의 배양조건이 다를 것으로 추정하고 있다(Pinkert와 Syce, 1995), hamster(Doetschnman 등, 1988), 토끼(Graves와 Moreadith, 19953), 돼지와 양(Piedrahita 등, 1990; Nortarianni 등, 1991), 소(Sim과 First, 1993; Stice 등, 1994), 사람(Thomson 등, 1998) 등에서 ES cell 또는 ES-like cell들이 분리되었다는 보고가 있다. 가축에서 ES cell의 정립을 위해서는 pluripotency까지를 증명하는데 많은 비용과 시간이 소모되었지만 ES cell의 이용성을 고려한다면 개발의 가치가 있다고 사료된다. 현재 이러한 배아세포를 이용한 유전자의 조작은 생쥐에

서만 실용화되고 있는데 생쥐보다 큰 동물에서 배아세포를 이용한 유전자 조작이 실용화 된다면 의학, 약학 그리고 농수산 분야에서 응용효과는 훨씬 더 작용할 것으로 기대된다. 다른 동물에서 배아세포 배양의 문제점으로는 초기 수정란으로부터 미분화의 세포를 추출하는데 어려움을 들 수 있다. 또한 추출된 세포가 미분화의 상태인지를 확인하는 과정이 있는데 현재의 방법으로는 정상 수정란과 접합(aggregation)시켜 chimera를 만들어 보고 다시 교배에 의해 생식세포로의 분화를 확인해야 한다. 다른 동물의 경우 세대간격이 길고 순종의 품종을 얻는데 어려움이 있어 이러한 확인작업을 하는데 시간이 걸린다. 토끼는 실험동물로서 뿐만 아니라 가축으로서 실용적인 면에서 유용한 동물 중의 하나이다. 만약 생쥐에서와 같은 유전자 조작 기술이 토끼에서 이루어질 수 있다면 그 파급효과는 상당할 것으로 예상된다.

그러므로 본 연구에서는 토끼의 배아세포를 추출하여 배양기술을 확립하고 그 특성을 규명하고자 한다. 기존의 생쥐의 배아세포 분리방법을 변형시켜 토끼의 embryonic fibroblast cell line을 만들어 토끼의 blastocyst stage의 수정란을 co-culture하는 방법과 STO cell 및 MEF을 이용하여 비교하였다. 아울러 기존에 생쥐에서 이용되고 있는 feeder cell들과 비교하여 가장 적합한 배양조건을 찾아내고 미분화상태의 토끼 배아세포 system을 정립하고자 하였다. 이 연구를 통해 다른 동물의 배아세포를 추출하는데 이용할 수 있는 기본적인 자료를 얻을 수 있을 것으로 사료되며, 토끼의 배아세포 system이 잘 정립되면 농학분야와 같은 응용분야에서의 가축개량에서 뿐만 아니라 기초분야에서의 동물유전공학 연구에 기여할 것으로 전망된다.

II. 재료 및 방법

1. Feeder cell의 준비

임신 중기의 태아를 회수하여 주로 근조직만을 trypsinization시켜 mono cell로 분리 배양하여 culture dish에서 monolayer로 분열하여 자라는 cell line을 확립하였다. 특히 본 연구에서는 토끼의 배

아세포 확립을 위하여 feeder cell로서 rabbit embryonic fibroblast cells(REF), mouse embryonic fibroblast cells(MEF), STO cells를 비교하고자 이 3가지 cell line을 만들었다. 이들 cell line을 개발하면서 아울러 Stem Cell culture를 위한 기본적인 culture system을 확립을 하였다.

성성숙에 도달한 뉴질랜드화이트 암토끼를 수토끼와 교미시킨 후 교미시킨 날을 임신 0 일령으로 하여 임신 15 일령 및 17 일령의 태아를 자궁으로부터 적출하였다. 각 임신령 태아를 꺼내 양막과 태막을 제거하고 PBS 용액으로 세척하여 각 태아의 붉은 조직과 뇌조직을 제거하고 잘게 절단한 후 trypsin 처리하여 DMEM(5% FBS)에서 37°C, 5% CO₂ incubator로 배양하여 tissue culture dish에 붙어 monolayer로 분열하는 세포단을 키워 confluent 상태의 것을 P₀로 간주하고 1 : 5로 passing 시킨 것은 P₁으로 명하여 freezing medium(11% DMSO, 50% FBS, 39% DMEM)을 이용하여 액체 질소에 보관하였다. 실제 co-culture를 위해서는 1 : 5 나 1 : 10으로 passing 하여 P₃나 P₄의 것을 mitomycin-C로 mitogenic inactivation시켜 이용하였다.

생쥐를 교미시켜 임신 13~15 일령의 태아를 적출하여 trypsin 처리하여 mouse 토끼의 경우와 마찬가지로 DMEM(5% FBS)용액으로 생쥐의 embryonic fibroblast cell line을 확보하였다. stable cell line인 STO cell line에 embryo의 미분화상태를 유지시켜 주는 factor로 알려져 있는 Leukemia Inhibitory Factor(LIF) gene과 유전자 조작시 ES Cell의 selection 을 위해 neomycin resistant gene을 transfection시킨 후 이 두 유전자가 많이 발현하는 clone을 선발하여 키운 SNL cell line을 서울대학교 의대 암연구소로부터 확보하였다.

토끼의 배아세포를 확립하기 위해 rabbit embryonic fibroblast cell(REF), mouse embryonic fibroblast cell(MEF), SNL cell을 100 mm culture dish에 90% confluent한 상태로 37°C, 5% CO₂하에서 배양한 후 세포분열을 불활성화 시키기 위해 mitomycin-C 용액(10ug/ml DMEM)으로 교환하고 약 3 시간동안 배양하여 DMEM(+10% FBS)에 보존하

여 공배양을 위해 준비하였다. 특히 REF와 MEF는 계대배양수가 4번을 초과하지 않은 cell line을 사용하였다. 세포분열을 불활성화시킨 feeder cell은 trypsin을 처리하여 96-well 또는 24-well plate에 옮겨 한 개의 토끼 수정란별 공배양을 위해 준비하였다.

2. 토끼수정란 채취 및 배양

사용된 토끼는 뉴질랜드화이트 종으로 연암축산대학에서 구입하였다. 사양관리는 14 : 10 시간의 light : dark cycle하에서 관리되었고 사료는 Purina의 토끼전용사료가 공급되었다. 성성숙 (5개월령 이상)에 도달한 암토끼에 약 0.3 mg의 FSH (Sigma)를 12시간 간격으로 6번 피하주사하고 75 U의 HCG (Sigma)를 혈관주사한 직후 수토끼와 두 번씩 교미시켜 과배란을 유도하였다.

교미후 18시간 후에 Ketamine-Xylazine을 이용하여 마취시켜 배 정중선을 절개하여 자궁과 난관을 드러내고 난관채 부위로 catheter를 삽입시켜 자궁-난관협부로 부터 20 gauge needle을 사용하여 20%의 fetal calf serum을 함유하는 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS)용액으로 난관을 세류하여 1-cell stage의 난자를 회수했다. 회수된 수정란을 체외에서 배양하는데 본 실험실에서 개발된 RDH (RPMI, DMEM, Ham's-F10 mixture) medium을 이용하여 50 µl drop으로 mineral oil하에 39°C, 5% CO₂ 상태에서 72시간 배양하였다(Jin, 등, 2000).

3. 배아세포의 분리

공배양의 medium으로는 high-glucose DMEM (+15%FCS)을 이용하였고 공배양 후 완전 hatching 되어 feeder cell에 부착되어 자라던 분화된 모양의 trophoblast cell은 제거하고 inner cell mass 계통의 cell line을 trypsinization한 후 분리하여 계대배양에 의해 stem cell colony의 분리를 시도하였다. 96-well plate에서 24-well plate로 그리고 6 well plate로 확대 배양하여 colony를 확보하고 freezing 하여 cell line을 보관하였다. Freezing 방법으로는 trypsinization한 후 300g으로 10분간 원심분리하고

cell pellet을 freezing medium(50% FBS, 39% DMEM, 11% DMSO)으로 잘 섞어 freezing vial (Nunc)에 분주하고 -70°C 에 18시간 보관한 다음 액체질소에 보관하였다. 냉동보관한 것을 다시 녹여 이용하고자 할 경우에는 액체질소통에서 꺼낸 freezing vial을 37°C water bath에서 녹인 다음 medium이 있는 dish에 잘 섞어 18시간 배양 후 medium을 교환하여 주었다.

blastocyst로부터 96-well dish에서 35mm dish까지 feeder cell 위에서 confluent하게 자란 것은 모두 stem cell로 간주하였다. 96-well dish에서 35mm dish까지 자라는 데는 적어도 3번의 계대배양을 거치게 되는데 그동안 분화된 세포는 거의 사라지고 feeder cell위에서 colony 모양으로 자라는 것만 남게 된다. 분리된 stem cell의 모양은 mouse ES cell과 같이 둥근 모양의 colony로 자라는 것(colony)과 feeder cell위에서 평평한 모양으로 자라는 것(flat)으로 나눌 수 있었다. 세포분열속도는 35mm dish에서 거의 confluent하게 자란 것을 1 : 2로 계대배양하였을 때 다시 confluent되는데 소요되는 시간을 측정하여 cell line 별로 기록하였고 mouse ES cell의 것과 비교하였다.

분리된 토끼 stem cell이 분화될 수 있는 cell line인지를 확인하기 위해 embryoid body로의 분화 가능성 여부를 확인하였다. confluent상태로 자란 stem cell을 약하게 trypsinization시켜 colony를 부수지 않은 상태로 gelatin이 되어 있지 않은 dish (bacteria culture dish)로 옮겨 서로 colony가 엉기도록 하고 10% FBS를 함유하고 있는 DMEM medium에서 37°C , 5% CO_2 로 5~7일간 배양하였다. plate 바닥에 부착되지 않고 부유상태로 배양 후 약 4~5일에 강(腔)이 형성된 전형적인 embryoid body를 관찰할 수 있었고 분화된 내배엽세포와 외배엽세포를 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 토끼 배아세포 분리 및 분열상태 검사

토끼 배아세포를 확립하기 위해 feeder cell로는 rabbit embryonic fibroblast cell(REF), mouse emb-

ryonic fibroblast cell(MEF), SNL cell들을 검사하였다. mitomycin-C 용액(10ug/ml DMEM)에서 약 3 시간동안 배양하여 세포분열을 불활성화시켜 DMEM(+10% FBS)에 보존하였고 토끼 수정란은 FSH와 HCG에 의해 과배란 유도하여 1-cell 수정란을 회수하여 RDH(+taurine+BSA) medium에서 96시간 배양하여 hatching되기 시작하는 blastocyst를 불활성화시킨 cell위에 공배양을 시도하였다. 공배양의 medium으로는 high-glucose DMEM(+15% FCS)을 이용하였고 hatching된 후 분화된 모양의 trophoblast cell은 제거하고 inner cell mass(ICM) 계통의 cell line만을 trypsinization한 후 pasteur pipette를 이용하여 분리하고 배양한 후 계속 잘 자라는 colony를 계대배양에 의해 stem cell colony의 분리를 시도하였다.

분리된 배아세포의 자라는 분열속도나 모양면에서 feeder cell에 따라 큰 차이를 나타냈는데 SNL cell에서 보다는 rabbit embryonic fibroblast(REF)나 mouse embryonic fibroblast(MEF)에서 더 좋은 결과를 얻었다. 계대배양 후 MEF에서 모양과 자라는 속도면에서 가장 좋은 결과를 나타냈다. feeder cell별 효율은 SNL과 REF cell에서 각각 236개와 200개의 토끼 blastocyst를 배양하여 2개와 3개의 cell line을 확보하였고 MEF에서는 150개의 blastocyst로부터 3개의 cell line을 얻어 토끼 ES cell을 위해서 MEF가 가장 효율적인 것으로 나타났다(Table 1). 이러한 MEF의 우수성은 다른 동물의 배아세포 분리에서도 보고되었는데(Roberson, 1987; Doetschman 등, 1988; Piedrahita 등, 1990; Graves와 Moreadith, 1993; Sim과 First, 1993; Thomson, 1998) MEF는 배아세포의 분화를 억제하면서 자라게 하는 물질을 생산하는 것으로 추정된다. 전체적인 효율이 낮은 것은 ES cell 분리중 계대배양을 함에 따라 분화되어 버리거나 계대배양 후 colony가 형성되지 않고 자라지 않는 경우가 대부분이었다. 토끼에서 ES cell을 분리하는데 가장 큰 영향을 미치는 것으로는 feeder cell인 것으로 나타났는데 실제 mitomycin-C 처리한 후 feeder cell의 상태에 따라 많은 stem cell들이 분화되어 사라지는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 SNL cell의

경우 LIF(Leukemia Inhibitory Factor)를 생산하는 cell line으로 stem cell 확립에 유리할 것으로 추측되었으나 SNL cell은 토끼 배아세포를 확립하는데는 REF나 MEF보다 좋은 조건을 제공하지 않는 것으로 나타났다. 그 이유로는 Table 1에서와 같이 효율이 낮을 뿐만 아니라 배아세포의 모양을 유지시켜 주지 못하였고 분화가 자주 일어났으며 자라는 속도에 있어서도 다른 두 cell line보다 완만함을 나타내어 분화될 수 있는 시간적 여유를 많이 제공하여 배아세포의 유지에 이롭지 않은 조건을 제공하고 있는 것으로 나타났다. 각 feeder cell에서 배아세포의 자라는 속도도 상당한 차이가 있는 것으로 나타났는데 confluent 상태의 배아세포를 1:2로 passing하였을 때 confluent 상태로 될 때까지의 doubling time을 측정하였을 때 SNL cell에서는 평균 120시간이 소요되고 있고 REF와 MEF에서는 각각 평균 96시간과 84시간이 소요되고 있다 (Table 1).

2. 분리된 배아세포의 분석

분리된 토끼 배아세포의 모양은 생쥐 배아세포와 비슷한 둥근 모양의 colony로 자라고 colony 주

Table 1. Efficiency of rabbit ES cell line establishment using different feeder cells and their cell division rates

Feeder cells	Total no. embryos	No. ES cell lines	Doubling time(hr) ^a
SNL ^b	236	2	120
REF ^c	200	3	96
MEF ^d	150	3	84

^a Average hours for confluent growth following 1 to 2 passing of one confluent dish.

^b STO cells expressing neomycin resistance gene and Leukemia Inhibitory Factor.

^c rabbit embryonic fibroblasts isolated from day 17-fetuses.

^d mouse embryonic fibroblasts isolated from day 13 fetuses.

- A passage number 4 of REF and MEF was used for ES cell establishment.

위에는 거의 분화된 세포는 없었다. 자라는 속도는 생쥐 배아세포에 비해 느리나 약 5번까지의 계대 배양에서도 모양이 유지되었을 뿐만 아니라 동결 보존 후 용해 후에도 거의 같은 모양을 유지하였다.

Fig. 1(a)에서는 MEF에서 분리된 토끼의 배아세포가 전형적인 둥근 모양에 주위가 밝게 나타나 분화된 세포가 없는 것을 알 수 있다. 이와 같이 분리된 토끼 배아세포는 Table 2에서와 같이 feeder cell에 따라 SNL cell의 것은 RESS 1, 2, 그리고 REF와 MEF의 것은 각각 RESR 1, 2, 3, RESM 1, 2, 3로 명명하였고 지금까지의 passage number는 3-5로 유지하고 있다. 분리된 토끼 배아세포는 자라는 속도와 MEF 선호도는 돼지나 면양, 소, 햄스터의 배아세포와 일치하는 것으로 나타났다(Doetschman 등, 1988; Piedrahita 등, 1990; Sim과 First, 1993).

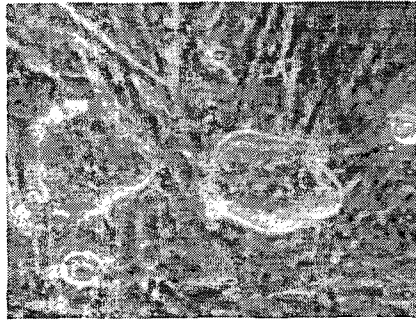
3. Embryoid body 형성 관찰

분리된 토끼 배아세포가 분화될 수 있는 stem cell line인지를 확인하기 위해 embryoid body로의 분화 가능성 여부를 확인하였다. confluent하게 자란 배아세포를 trypsinization시켜 coloy를 부수지 않거나 서로 모여있게 뭉쳐놓은 상태로 gelatin이 coating되어 있지 않은 culture dish로 옮겨 10% FBS를 함유하고 있는 DMEM medium에서 배양하

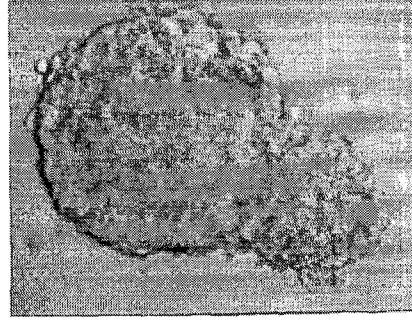
Table 2. Rabbit ES cell lines isolated on 3 different feeder cells

Rabbit ES cells	Feeder cell	Passage no. ^a
RESS1	SNL	3
RESS2	SNL	3
RESR1	REF	4
RESR2	REF	3
RESR3	REF	4
RESM1	MEF	5
RESM2	MEF	4
RESM3	MEF	5

^a Passage number above was counted from the first confluent growth in 60 mm dish.



(a)



(b)

Fig. 1. Rabbit ES Cells (a) and differentiated embryoid body (b).

였다. plate 바닥에 부착되지 않고 부유상태로 약 5~7일간 배양하여 강(腔)이 형성된 전형적인 embryoid body를 관찰할 수 있었다. Fig. 1(b)는 토끼 배아세포의 embryoid body인데 분화되어 강(腔)이 형성되었고 안쪽에 외배엽세포(Ectoderm-like cells)와 안쪽에 내배엽세포(Endoderm-like cells)로 분화되고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 모양은 생쥐와 다른 동물의 배아세포를 분화시킨 것과 아주 유사하였고(Roberson, 1987; Piedrahita 등, 1990) 이렇게 분화된 embryoid body가 형성되는 것을 확인함으로써 분리된 토끼 ES cell이 미분화상태의 stem cell임을 확인할 수 있었다.

IV. 요약

토끼 배아세포(Embryonic Stem Cell)를 분리하기 위해 토끼 1-cell embryo를 채란하여 *in vitro*에서 blastocyst까지 배양한 후 mouse embryonic fibroblasts(MEF), rabbit embryonic fibroblasts(REF) 및 STO cell expressing Leukemia Inhibition Factor gene(SNL) feeder cell과 공배양하였다. 외관상 충실한 토끼 배아세포 8 개를 확보하였고 분리된 토끼 ES cell의 모양은 주위에 분화된 세포가 없는 전형적인 colony모양으로 성장하고 액체질소에 동결보존 및 3~5차례의 계대배양 후에도 이러한 모양은 계속 유지되었다. 충분히 자란 dish를 1:2로 계대배양을 한 후 다시 confluent하게 자라는 데에 걸리는 시간(doubling time)은 빠른 경우 84시간으

로 나타났다. 분리된 토끼 ES cell은 gelatin이 coating되지 않은 culture dish에 이식 배양하였을 때 부유상태로 증식하면서 내부에 강(腔)이 생기고 외배엽과 내배엽이 형성하는 전형적인 Embryoid body 모양을 나타내어 분리된 ES cell이 미분화상태의 stem cell임이 확인되었다.

본 연구를 통해 토끼에서의 수정란 배양을 통해 토끼 배아세포를 분리하여 특성을 규명하였다. 현재까지의 연구성과로는 토끼 수정란의 배양기술을 완벽하게 개발했다는 점과 토끼에서 ES cell을 분리하여 앞으로 유전자 조작의 가능성을 열어 놓은 것이다. 토끼 ES cell system이 완벽히 확립되도록 분리된 ES cell에 대한 미분화상태의 연구 및 미분화상태를 식별할 수 있는 marker 등에 대한 연구에 이용될 것이고 복제토끼 및 형질전환토끼의 생산 등을 위한 연구에 이용될 수 있다.

V. 인용문헌

1. Capecchi, R. M. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-1292.
2. Doetschman, T., Williams P. and Maeda, N. 1988. Establishment of hamster blastocyst derived embryonic stem (ES) cells. *Dev. Biol.* 127:224-227.
3. Evans, M. J. and Kaufman, M. H.. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells

- from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
4. Graves, K. H. and Moreadith, R. W. 1993. Derivation and characterization of putative pluripotent embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 36:424-433.
 5. Jin, D. I., Kim, D. K., Im, K. S. and Choi, W. S. 2000. Successful pregnancy after transfer of rabbit blastocysts grown *in vitro* from single cell zygotes. *Theriogenology* 54:1109-1116.
 6. Martin, G. R. 1981. Establishment of pluripotent cell lines from embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:7634-7634.
 7. Notarianni, E., Galli, C., Laurie, S., Moor, R. M. and Evans, M. J. 1991. Derivation of pluripotent embryonic cell lines from the pig and sheep. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 43:225-260.
 8. Piedrahita, J. A., Anderson, G. B. and Bonduant, R. H. 1990. On the isolation of embryonic stem cells: comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. *Theriogenology* 34:879-901.
 9. Pinkert, C. A. and Stice, S. L. 1995. Embryonic stem cell strategies: beyond the mouse model. In *Strategies in transgenic animal science* Monastersky G. M. and J. M. Robl (Ed.), ASM Press, p. 73-85.
 10. Robertson, E. J. 1987. Embryo-derived stem cell line. In *teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach*, E. J. Robertson(Ed.), IRL, Oxford, pp. 71-112.
 11. Sim, M. M. and First, N. L. 1993. Production of fetuses from totipotent cultured bovine inner cell mass cells. *Theriogenology* 39:313(Abstr).
 12. Smithies, O. and Maeda, N. 1995. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: Atherosclerosis and essential hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5266-5272.
 13. Stice, S. L., Strelchenko, N., Betthausen, J., Scott, B., Jugella, G., Jackson, J., David, V., Keefer, C. and Matthews, L. 1994. Bovine pluripotent embryonic cells contribute to nuclear transfer and chimeric fetuses. *Theriogenology* 41:301 (Abstr).
 14. Thomson, J. A., Itskovitz, J., Shaiopro, S. S., Waknitz, M. A., Swiegiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- (접수일자: 2001. 5. 30. / 채택일자: 2001. 7. 3.)