

Produksi *Embryonic Stem Cell (Esc) Line* dari *Blastosis Mencit* dengan Metode *Immunosurgery*

Ratih Rinendyaputri¹, Nike Susanti²

¹⁻²Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes, Kemenkes RI
email: ratih79@yahoo.com

Abstract

Embryonic Stem Cells (ESC) are pluripotent stem cells which has the ability to self renew and differentiate into form all cells in the body. Inner Cell Mass (ICM) as a source of ESC that can be obtained from blastocyst stage of embryos. Isolation can be done by several methods such as mechanical, enzymatic and immunosurgery. This study aimed to observe the effectiveness of usage immunosurgery method to obtain the ICM from the blastocyst stage of embryo. Blastocyst stage of embryos were obtained from a strain of Swiss Webster female mice that had been stimulated using pregnant mare 's gonadotropin (PMSG) and human chorionic gonadotropin (hCG). Inner Cell Mass (ICM) were cultured and observed of the attachment level (attachment rate/AR), the rate of primary colony formation (primary colony/PC) and the morphology of ESC line. The results showed that the ICM were isolated using methods immunosurgery have AR and PC respectively 78,57% and 71,00%. Embryonic Stem Cell (ESC) can differentiate after several passages by forming embryoid body (EB). This study shows that immunosurgery is an effective method for producing ESC line from mice embryos of blastocyst stage.

Key words: *Blastocyst, Inner cell mass, ICM, ESC*

Abstrak

Embryonic Stem Cell (ESC) merupakan sumber stem cell yang bersifat pluripoten, yaitu sel yang mampu membelah dan berdiferensiasi menjadi semua tipe sel di dalam tubuh. Inner Cell Mass (ICM) sebagai sumber ESC dapat diperoleh dari embrio tahap blastosis. Isolasi ICM dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti mekanik, enzimatik dan immunosurgery. Penelitian ini bertujuan mengamati efektifitas penggunaan metode immunosurgery untuk memperoleh ICM dari embrio tahap blastosis. Embrio tahap blastosis diperoleh dari mencit betina strain Swiss Webster yang telah distimulasi menggunakan pregnant mare's gonadotropin (PMSG) dan human chorionic gonadotropin (hCG). Inner Cell Mass (ICM) dikultur dan dilakukan pengamatan terhadap tingkat perlekatan ICM (attachment rate/AR) serta tingkat pembentukan koloni primer ESC (primary colony/PC) serta morfologi ESC line yang terbentuk. Hasil menunjukkan bahwa ICM yang diisolasi menggunakan metode immunosurgery memiliki AR dan PC masing-masing 78,57% dan 71,00%. Embryonic Stem Cell (ESC) dapat mengalami diferensiasi setelah beberapa pasase dengan membentuk embryoid body (EB). Penelitian ini menunjukkan bahwa metode immunosurgery merupakan metode yang efektif untuk memproduksi ESC line dari embrio mencit tahap blastosis.

Kata kunci : *Blastosis, Inner cell mass, ICM, ESC*

Pendahuluan

Embryonic Stem Cell (ESC) merupakan sumber sel punca (*stem cell*) yang bersifat pluripotensi. Kemampuan ESC berdiferensiasi menjadi berbagai tipe merupakan potensi sangat besar untuk dapat dimanfaatkan sebagai sumber terapi sel, sel diagnostik dan mempelajari perkembangan embriogenesis.^{1,2} Namun sumber untuk memperoleh ESC sangat terbatas, sehingga memotivasi pengembangan metode dalam memproduksi ESC.

Embryonic Stem Cell (ESC) dapat diperoleh dari isolasi dan kultur *inner cell mass* (ICM) embrio tahap blastosis. Metode isolasi yang digunakan untuk mendapatkan ICM dapat dilakukan secara mekanik menggunakan jarum dan laser, serta enzimatis dan *immunosurgery*.^{i,ii} Pada metode mekanik dibutuhkan jarum syring dan *micro-dissection* atau laser, sedangkan metode *immunosurgery* atau enzimatis membutuhkan antiserum, komplemen serta tripsin untuk mendapatkan ICM.^{3,5} Meskipun keberhasilan isolasi ICM dengan metode mekanik dengan *micro-dissection* lebih tinggi, metode ini tidak dapat dilakukan oleh setiap laboratorium mengingat peralatan mikromanipulator yang mahal dan operator yang menguasai alat tersebut harus tersedia. Pada metode enzimatis dan *immunosurgery* merupakan metode yang lebih mudah sehingga dapat menjadi pilihan yang tepat.^{6,7}

Metode *immunosurgery* untuk isolasi ICM dan memperoleh ESC *line* telah dilakukan pada embrio manusia maupun hewan. Metode ini mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan metode lain. Namun keberhasilan isolasi ICM dan produksi ESC *line* tidak hanya tergantung pada metode isolasi yang digunakan tetapi juga kualitas embrio blastosis yang menjadi sumber ICM serta kondisi kultur *in vitro* yang perlu diperhatikan.^{3,6}

Isolasi dengan metode *immunosurgery* dan mekanik dapat digunakan untuk memproduksi ESC *line* dengan

keberhasilan yang tinggi jika kualitas embrio tahap blastosis merupakan kualitas yang baik.^{6,7} Metode *immunosurgery* telah dilakukan dengan tujuan mengamati diferensiasi sel ICM, saat ini metode tersebut digunakan untuk memperoleh ICM sebagai sumber ESC *line*.⁸ Metode *immunosurgery* banyak digunakan untuk produksi ESC *line* karena metode ini lebih mudah dan efektif untuk memperoleh ICM dari embrio blastosis dengan jumlah yang banyak.³

Penggunaan metode tersebut sudah dilakukan pada berbagai spesies embrio, mengingat setiap spesies embrio memiliki karakteristik yang berbeda-beda maka perlu dilihat efektifitas metode tersebut pada embrio hewan coba seperti embrio mencit. Oleh sebab itu penelitian ini akan menganalisis efektifitas metode *immunosurgery* dengan mengamati perkembangan ICM yang diperoleh dari embrio blastosis mencit menjadi ESC *line* serta kualitas ESC *line* yang terbentuk.

Metode

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell* Pusat Teknologi Dasar Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan – Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dari bulan Maret-Desember 2010.

Superovulasi dan Produksi Blastosis

Produksi blastosis menggunakan mencit betina dan jantan strain *Swiss Webster* berumur tujuh minggu dengan pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Sinkronisasi dan superovulasi dilakukan pada 10 ekor mencit betina. Mencit betina yang menunjukkan *vagina plug* dilakukan euthanasia menggunakan eter empat hari kemudian.³ Pembedahan pada bagian *abdomen* dan dilakukan isolasi uterus. Uterus yang telah diisolasi dimasukkan ke dalam medium *phosphate*

buffer saline tanpa serum (PBS(-)). Koleksi blastosis dilakukan dengan membilas bagian dalam uterus, menggunakan *syringe* 1 cc 27 G dengan PBS di bawah mikroskop stereo.

Isolasi *Inner Cell Mass* (ICM) dengan *immunosurgery*

Embrio tahap blastosis dimasukkan dalam drop PBS 10% *fetal bovine serum* (FBS) sebanyak 2 kali, kemudian dicuci dalam PBS (-) sebelum dimasukkan dalam larutan pronase 0,25%. Pronase akan mendegradasi protein *zona pellucida* (ZP) pada blastosis. Inaktivasi pronase Blastosis tanpa ZP dicuci dalam PBS 10% FBS.

Blastosis tanpa ZP dicuci dalam PBS (-), selanjutnya dipaparkan dalam drop *rabbit antimouse serum* selama 60 menit dalam inkubator dengan 5% CO₂ dan suhu 37⁰C. Blastosis tanpa ZP kemudian dicuci dalam PBS (-) 1 kali selanjutnya dimasukkan dalam komplemen dari *guinea pig* selama 30 menit pada suhu ruang untuk melisis sel-sel trofoblasnya.³ Setiap 5 menit diamati untuk menghindari lisisnya ICM pada saat pemaparan komplemen. Hasilnya adalah ICM yang terbebas dari trofoblas.

Kultur *Inner Cell Mass* (ICM)

Inner Cell Mass (ICM) dikultur dalam cawan dengan dasar gelatin 1% dan diinkubasi dengan aliran 5% CO₂, suhu 37⁰C. Medium kultur yang digunakan DMEM *high-glucose* yang disuplementasi dengan *fetal bovine serum* 20% (FBS, Sigma), natrium bikarbonat 3.7g/l (Sigma), L-glutamine, *non-essential amino acids* 1% (Sigma), *mercaptoethanol* 0.1mM

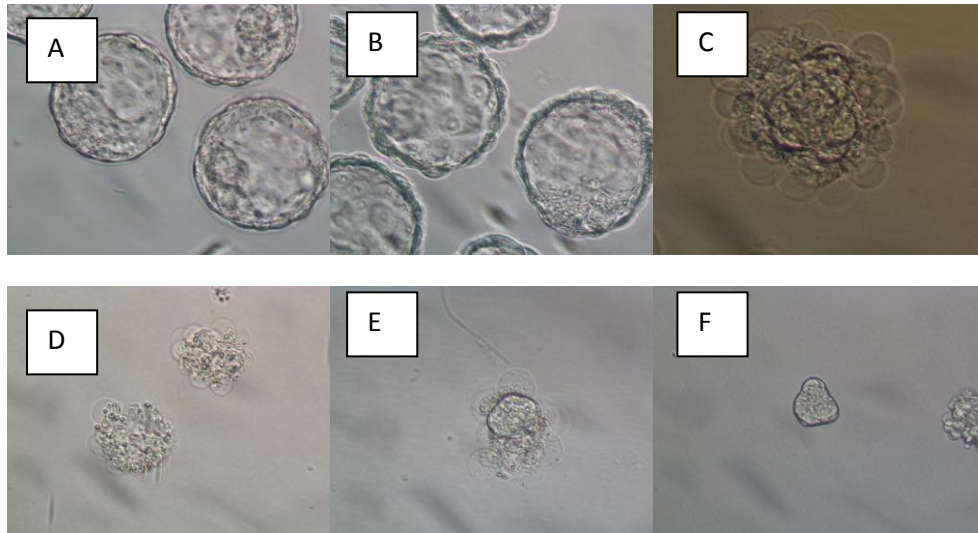
(Sigma), *leukemia inhibitory factor* 10ng (LIF, Sigma), *basic fibroblast growth factor* 20 ng/ml (Sigma), dan gentamicin 50 µg/ml (Sigma). Penggantian medium kultur ICM dilakukan setiap dua hari.³

Analisis Data

Pengamatan dilakukan secara mikroskopis dan disajikan secara deskriptif. Tingkat perlekatan ICM (*attachment rate/AR*) diukur pada hari pertama dan kedua kultur. AR adalah jumlah ICM yang melekat pada cawan dibagi jumlah ICM yang dikultur. Pengamatan untuk mendapatkan tingkat pembentukan koloni primer ESC (*primary colony/PC*) dilakukan setelah tujuh hari kultur. PC adalah jumlah ICM yang berkembang menjadi koloni primer ESC dibagi jumlah ICM yang melekat pada cawan.

Hasil

Sebanyak 75 buah embrio tahap blastosis dengan rongga blastoesol dilakukan isolasi untuk memperoleh ICM. Blastosis dengan grade A dan B mempunyai ciri-ciri adanya rongga blastoesol, trofoblast dan zona pelusida yang utuh. Isolasi ICM dari blastosis dilakukan dengan menggunakan metode *immunosurgery* sehingga diperoleh 70 ICM yang bebas dari sel-sel trofoblast (Gambar 1).



Keterangan : (A) blastosis dengan zona pelusida (ZP), (B) blastosis tanpa ZP setelah diinkubasi dengan protease 0,25%, (C) blastosis setelah dipaparkan dengan complement, (D) ICM yang telah terpisah dari trofoblas, (E) ICM dengan sisa sel trofoblas, (F) ICM. B: blastoesol, T: trofoblast Bar: 50µm

Gambar 1. Proses Isolasi *Inner Cell Mass* (ICM) dengan Metode *Immunosurgery*.

Inner cell mass (ICM) yang diperoleh dari metode isolasi dikultur dalam inkubator untuk memperoleh koloni primer ESC selama 7 hari. Koloni primer ESC dipasase dan dikultur kembali secara berulang untuk memperoleh ESC line

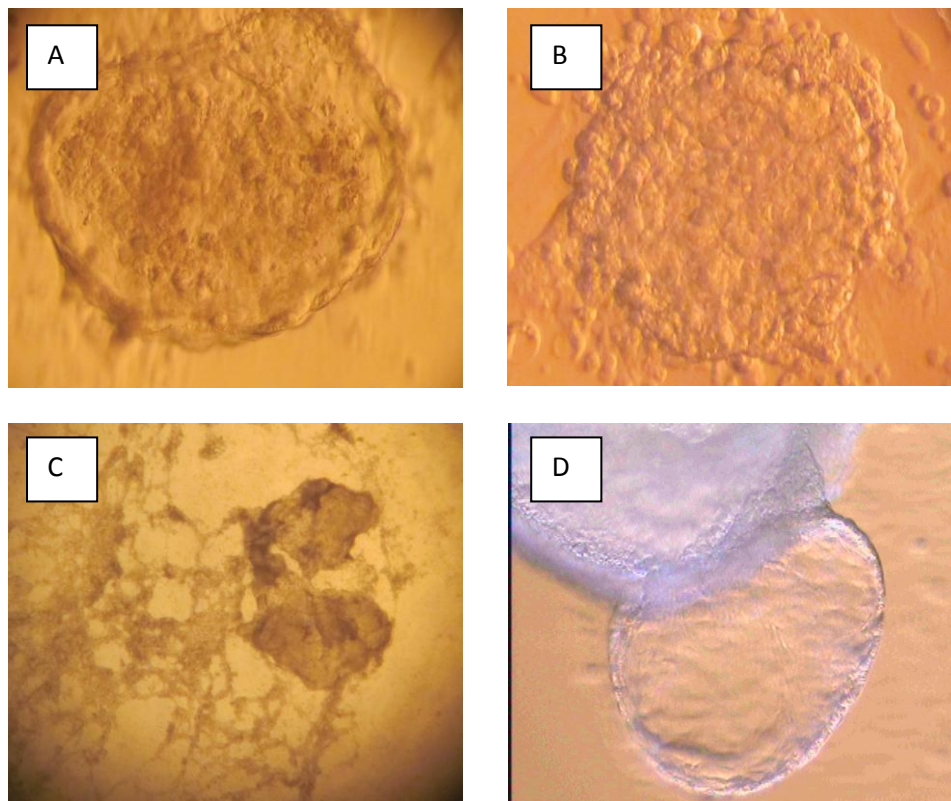
(Gambar 2). Sebanyak 70 buah ICM dikultur dan 55 buah ICM yang mampu melekat pada dasar cawan dan berkembang menjadi koloni primer setelah 7 hari kultur dengan persentase yang tinggi (Tabel 1).

Tabel 1. Persentase *Attachment*

<i>Rate</i> (AR) dan <i>Primary Colony</i> (PC) dari ICM			
Pengamatan	N	Persentase (%)	Keterangan
<i>Attachment rate</i> /AR (%)	70	55/70 (78,57)	ICM yang melekat
<i>Primary Colony</i> /PC (%)	45	32/45 (71,00)	ICM melekat dan menjadi koloni primer

Koloni primer ESC dapat berkembang menjadi ESC line. ESC line mengalami diferensiasi secara spontan setelah mengalami pasase ke 10 (70 hari

kultur). Diferensiasi spontan ESC ditunjukkan dengan adanya perubahan morfologi sel dan koloni (Gambar 3).



Keterangan : Koloni ESC yang dikultur menggunakan gelatin 1% sebagai *coating dish* koloni ESC yang berbentuk *flat* dengan batas yang jelas, (B) koloni ESC dengan jumlah sel banyak dan menumpuk (C) koloni ESC yang mengalami diferensiasi spontan membentuk sel *cobblestone-like*, (D) diferensiasi koloni ESC membentuk *embryoid body* (EB). Bar : 50 μ m.

Gambar 3. Morfologi Koloni ESC

Pembahasan

Metode *immunosurgery* dalam isolasi *Inner Cell Mass* (ICM)

Penelitian ini menunjukkan bahwa metode *immunosurgery* merupakan metode yang efektif untuk isolasi ICM dari embrio tahap blastosis (Gambar 1). Namun kegagalan isolasi juga dapat terjadi disebabkan oleh kualitas embrio blastosis serta kualitas antibodi dan komplemen yang digunakan.³

Kualitas embrio yang mengalami kerusakan pada ikatan antar sel akan dapat menjadi celah masuknya antibodi ke dalam rongga blastosol sehingga mampu berikatan dengan ICM. ICM yang

mengikat antibodi akan berikatan dengan complement pada saat pemaparan complement, kemudian ICM lisis seperti sel trofoblast. Kerusakan embrio dapat terjadi saat poses *handling* pencucian atau pada saat penghilangan zona pelusida.³

Antibodi dan komplemen merupakan enzim proteolitik yang berfungsi melisiskan sel-sel trofoblast yang mengelilingi ICM. Aktifitas enzim sangat ditentukan oleh kualitas enzim tersebut, sehingga penyimpanan dan penggunaan enzim sangat mempengaruhi efektifitas dari kerja enzim.

Keberhasilan isolasi ICM yang menggunakan blastosis mencit dan murine dengan metode *microsurgical* dengan/ tanpa laser sangat beragam, yang menjadi

salah satu penentu keberhasilan adalah operator, karena penguasaan teknik pada metode ini membutuhkan keterampilan dan kecepatan operator.^{3,5} Metode ini membutuhkan berbagai peralatan yang mahal, seperti mikromanipulator untuk *handling* embrio blastosis, sehingga tidak semua laboratorium dapat melakukan metode tersebut.³

Sedangkan pada metode enzimatik waktu yang tepat untuk menghentikan proses degradasi sel-sel trofoblast sangat penting karena pada saat proses tersebut sel-sel pembentuk ICM yang jumlahnya sedikit akan ikut terdegradasi oleh enzim yang digunakan.³ Secara teknik, metode isolasi enzimatik dan immunosurgery merupakan metode yang mudah dan cepat dalam aplikasinya, namun penggunaan bahan asal hewan (*xeno-component*) yang digunakan dalam kedua metode ini menjadi salah satu kendala dalam pemanfaatan untuk aplikasi klinis.⁹ Tetapi saat ini metode *immunosurgery* merupakan metode isolasi ICM dari embrio blastosis dalam jumlah banyak yang paling efektif.³

Perkembangan *Inner Cell Mass* (ICM) menjadi *Embryonic Stem Cell* (ESC) *line*

Persentase AR dalam penelitian ini lebih rendah dibandingkan hasil penelitian lain, namun untuk persentase PC dalam penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan hasil yang dilaporkan oleh Tanaka.^{2,4} Perkembangan ICM menjadi koloni primer ESC sangat dipengaruhi oleh faktor eksternal dan internal. Faktor eksternal seperti kondisi lingkungan yaitu kondisi kultur *in vitro* yang meliputi suhu, pH, penggunaan asam amino serta faktor pertumbuhan dalam medium kultur. Selain itu masih adanya sel-sel trofoblast saat kultur ICM juga dapat menghambat proliferasi ICM.² Sedangkan faktor internal yang paling dominan adalah kualitas embrio yang diperoleh serta proses isolasi ICM.

Sub koloni ESC merupakan ‘social’ sel sehingga dalam perkembangannya

membutuhkan interaksi antar sel maupun sel dengan lingkungan. Kerusakan protein-protein penyusun struktur ekstraseluler ICM seperti *gap junction* dan molekul adhesi (*extracellular matrix/ECM*) dapat menurunkan AR dan PC.¹⁰ Kerusakan tersebut mungkin terjadi pada saat proses isolasi, paparan enzim proteolitik dalam waktu tertentu dapat merusak protein penyusun *gap junction* dan ECM. Untuk mengatasi permasalahan rendahnya AR pada ICM dapat dilakukan dengan menggunakan matriks ekstraseluler seperti gelatin atau polilysin serta sel fibroblast sebagai *feeder layer*.^{13,14} Hal ini diharapkan dengan adanya peningkatan AR dan PC pada ICM maka meningkat juga keberhasilan terbentuknya ESC *line*.

Feeder layer merupakan sel yang mampu mensekresikan berbagai faktor pertumbuhan (*growth factor*), sehingga penggunaan sel ini diharapkan dapat menjaga sifat pluripotensi dan mengoptimalkan proliferasi ESC *line*. Sel yang digunakan sebagai *feeder layer* dapat diperoleh dari *mouse embryonic fibroblast* (MEF).⁸ Namun untuk memperoleh ESC yang tidak mengandung bahan asal hewan (*xeno-free medium*) maka penggunaan *human foreskin*, gelatin, produk dari tanaman dan *serum replacement* (SR) dapat digunakan pada produksi ESC manusia. Pada *xeno-free medium*, ESC mampu berproliferasi, menunjukkan viabilitas yang tinggi, mengekspresikan marker pluripotensi serta memiliki kariotipe kromosom yang normal.^{15,16,17,18}

Pada penelitian ini medium kultur ditambahkan serum dan faktor pertumbuhan LIF untuk menjaga pluripotensi ESC *line*. Pada ESC mencent LIF merupakan sitokin anggota interleukin 6 (IL-6) yang akan mengaktifasi *signal transducer and activator of transcription-3* (STAT3) sebagai faktor transkripsi dari gen yang berperan dalam proliferasi dan pluripotensi.^{16,20,21} Sifat pluripotensi dapat diamati dengan menggunakan berbagai

ekspresi marker gen Oct-4, Sox2, Nanog, SSEA-3 dan SSEA-4.¹⁸ Secara morfologi pembentukan *Embryoid body* (EB) dapat digunakan menjadi salah satu indikasi sifat pluripotensi ESC *line*. EB inilah yang selanjutnya dapat berdiferensiasi menjadi beberapa tipe sel baik dari derivat ektoderm, mesoderm dan endoderm.ⁱⁱⁱ Keberhasilan dalam melakukan isolasi ICM, kultur ICM dan memperoleh ESC *line* membuka peluang terhadap produksi berbagai tipe sel secara *in vitro*.

Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa metode *immunosurgery* merupakan metode yang efektif untuk isolasi ICM dari embrio tahap blastosis.

Saran

Metode *immunosurgery* dapat digunakan untuk isolasi ICM dari embrio blastosis mencit dalam memproduksi ESC.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi dasar Kesehatan yang telah memberikan dukungan terhadap penelitian stem cell di Balitbangkes, Prof. Arief Boediono, Ph. D dan Dr. Thomas Mata Hine dari FKH IPB atas masukan dan nasehat selama melakukan penelitian. Teman-teman di laboratorium stem cell PBTDK Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kementerian Kesehatan yang telah membantu berjalannya penelitian, saya ucapkan terimakasih.

Daftar Rujukan

1. Wobus and Loser P. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cell in toxicology research. *Arch Toxicol.* 2011; 85:79 -117.
2. Solter D, Knowless BB. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1975;72:5099-102
3. Matahine T, Supriatna I, Sajuthi D dan Boediono A. Produksi embryonic stem cell dari inner cell mass blastosis yang diisolasi dengan metode enzimatis dan immunosurgery. *Jurnal Veteriner.* 2009; 9(1):13-9.
4. Dwi Agustina, Caroline T Srdjono dan Ferry Sandra. Metode isolasi inner cell mass sebagai sumber embryonic stem cell. *CDK.* 2008;35(1): 32-5.
5. Desai N, Xu J, Tsulata T, Lawson JS, Hafez AF, Goldfarb J and Falcone T. Vitrification of mouse embryo-derived ICM cells: a tool for preserving embryonic stem cell potential? *J Assist reprod Genet.* 2010. DOI 10.1007/s10815-010-9500-x.
6. Ding Y, Gan Y, Feng JB, QiSH, Li RM and Li DS. Efficient isolation inner cell mass from blastocysts by improved microsurgical technique. *Cell Research.* 2008. Poster Session 1.
7. Tanaka N, Takeuchi T, Neri QV, Sills ES and Palermo GD. Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cell in a serum/cell free culture system: application and preliminary results in a murine model. *Journal of Translational Medicine.* 2006;4(20):1-16.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282:1145-7.
9. Kim EY, Lee J B, Park HY, jeong CJ, Riu KZ and Park SP. 2011.The use of Embryonic stem cell derived Bioactive material as a new Protein Supplement for the In Vitro Culture of Bovine Embryos. *Journal of Reproduction and Development* 57(3).
10. Heng BC, Ye CP, Liu H, Toh WS *et al.* Kinetics of cell death of frozen Thawed human embryonic stem cell colonies is reversibly slowed down by exposure to low temperature. *Zygote.* 2006; 14 November: 341-8.
11. Turetsky T, Aizenman E, Gil Y, Weinberg N, Shufaro Y, Revel A, Laufer N, Simon A, Abeliovich D, Reubinoff BE. Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod.* 2008;23:46-53.

12. Strom S, Inzunza J, Grinnemo K, Holmberg, Matilainen E, Stromberg A, Blennow E and Hovatta O. Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. *Human Reproduction*. 2007;22(12):3051-8.
13. Ellerström C, Strehl R, Moya K, Andersson K, Bergh C, Lundin K, Hyllner J, Semb H. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem Cells*. 2006;24:2170-6.
14. Eiselleova, L., Peterkova, I., Neradil, J., et al. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 2008;4: 353–63.
15. Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, and Itskovitz-Eldor J. Human feeder layer for human embryonic stem cells. *Biology reproduction*. 2013;68:2150-6.
16. Hogan B. And Tilly R. *In vitro* development of inner cell masses isolated immunosurgically from mouse blastocysts. *Embryo exp Morph.* 1978;45:107-21.
17. Inzunza, J., Gertow, K., Stromberg, M.A., et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells*. 2005; 4: 544–9.
18. Kunova M, Matulka K, Eiselleova L, Trckova P, Hampl A and Dvorak P. Development of humanized culture medium with plant-derived serum replacement for human pluripotent stem cells. *Reproductive Bio Medicine Online*. 2010. doi:10.1016/j.rbmo.2010.06.027
19. Trouillas M, Saucourt C, Guillotin B, Gauthereau X, Ding L, Buchholz F, et al. Three LIF dependent signatures and gene clusters with atypical expression profiles identified by transcriptome studies in mouse ES cells and early derivatives. *BMC Genomics*. 2009; 10: 73.
20. Davey RE, Onishi K, Mahdavi A and Zandastra. LIF-mediated control of embryonic stem cell self-renewal emerges due to an autoregulatory loop. *FASEB J*. 2007;21:2020-32.
21. Rao M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Developmental Biology*. 2004;275:269-86.
22. de Freitas ERL, Sanches BV, Gambarini ML, Filho BDO and Guillo LA. Embryonic Stem-like Cells Derived from *in vitro* Produced Bovine Blastocysts. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2011 v.54 n.3: pp. 495-502
23. Dwi Agustina, Caroline T Srdjono dan Ferry Sandra. Metode isolasi inner cell mass sebagai sumber embryonic stem cell. *CDK*. 2008;35(1): 32-5.
24. Desai N, Xu J, Tsulata T, Lawson JS, Hafez AF, Goldfarb J and Falcone T. Vitrification of mouse embryo-derived ICM cells: a tool for preserving embryonic stem cell potential? *J Assist reprod Genet.* 2010. DOI 10.1007/s10815-010-9500-x.
25. Ding Y, Gan Y, Feng JB, QiSH, Li RM and Li DS. Efficient isolation inner cell mass from blastocysts by improved microsurgical technique. *Cell Research*. 2008. Poster Session 1.
26. Tanaka N, Takeuchi T, Neri QV, Sills ES and Palermo GD. Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cell in a serum/cell free culture system: application and preliminary results in a murine model. *Journal of Translational Medicine*. 2006;4(20):1-16.
27. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-7.
28. Kim EY, Lee J B, Park HY, Jeong CJ, Riu KZ and Park SP. 2011. The use of Embryonic stem cell derived Bioactive material as a new Protein Supplement for the In Vitro Culture of Bovine Embryos. *Journal of Reproduction and Development* 57(3).
29. Heng BC, Ye CP, Liu H, Toh WS et al. Kinetics of cell death of frozen Thawed human embryonic stem cell colonies is reversibly slowed down by exposure to low temperature. *Zygote*. 2006; 14 November: 341–8.
30. Turetsky T, Aizenman E, Gil Y, Weinberg N, Shufaro Y, Revel A, Laufer N, Simon A, Abeliovich D, Reubinoff BE. Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 2008;23:46-53.
31. Strom S, Inzunza J, Grinnemo K, Holmberg, Matilainen E, Stromberg A, Blennow E and Hovatta O. Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. *Human Reproduction*. 2007;22(12):3051-8.
