

담배세포배양을 통한 Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor(hGM-CSF)의 생산

김난선, 홍신영, 이재화, 이미애, 권태호, 장용석, 양문식*
전북대학교 생물과학부 식물분자생물학연구실

Abstract

Tobacco cells transformed with hGM-CSF gene produced $162 \mu\text{g/L}$ of hGM-CSF, a valuable therapeutic protein in seven days after inoculation. The protein concentration decreased after the maximum point. It is evidenced that the environment of cell culture was inappropriate for the stability of the protein(e.g., low osmolarity which can cause cell lysis).

서론

식물세포를 이용한 형질전환은 *Agrobacterium*의 Ti-plasmid 내 T-DNA가 식물체의 염색체 내로 삽입되어 발현되어 진다는 것이 밝혀진 후¹⁾, 많은 연구와 발전이 있었다. 식물을 이용한 외래 단백질의 생산은 미생물이나 동물세포를 이용하는 것에 비해 여러 가지 장점을 지니고 있기 때문에 많은 연구가 수행중에 있다.²⁾

본 연구에서는 고부가가치의 의료용 단백질인 hGM-CSF 유전자가 형질전환된 담배세포를 이용하여 현탁배양을 실시하여 생산된 단백질의 배지내에서 축적되는 양상을 관찰하였다.

재료 및 방법

1) 담배세포의 형질전환 및 세포배양

형질전환된 담배 clone중에서 northern hybridization을 실시하여 signal이 가장 강한 클론을 선택하여 세포배양을 위한 재료로 사용하였다. 1 mg/L 2,4-dichloro phenoxy acetic acid(2,4-D)가 첨가된 MS 배지에서 callus 유도 후 동일 배지하에서 현탁세포를 유도하였고 25°C, 100 rpm, 명조건으로 유지하면서 7일 간격으로 계대배양었다.

2) 세포농도측정

세포의 증식은 세포 생체중량(fresh cell weight, FCW), 세포 건조중량(dry cell weight, DCW)의 측정을 통해 관찰하였다. 생체중량 측정과정을 거친 세포를 60°C로 유지된 dry oven에 넣어 시간에 따른 무게변화가 없을 때까지 건조시켜 측정된 중량은 세포 건조중량으로 사용하였다.

3) 이온 분석

이온분석은 ion chromatography를 이용하였는데 사용한 컬럼은 Ion Pac CS124 column (Dionex, USA)이고 유속은 1.0 ml/min 이었다.

4) hGM-CSF 정량분석

hGM-CSF에 특이적인 항체를 이용하여 ELISA assay로 정량분석을 하였다.

결과 및 고찰

플라스크 배양을 실시한 결과 배양 10일만에 세포건조중량이 14g/L에 도달하였다(Fig. 1). 이때 hGM-CSF의 생산은 7일째에 최대치인 162 $\mu\text{g/L}$ 에 도달하였고 이후에는 생산된 hGM-CSF가 다시 파괴되었다(Fig.3). 이것의 이유는 Fig. 2와 Fig. 3에서 추정할 수 있듯이 배양말기로 가면서 세포의 상태가 lysis되면서 protease를 비롯한 여러 가지 물질이 생산된 단백질의 안정성을 저해하는 것으로 추정할 수 있다.

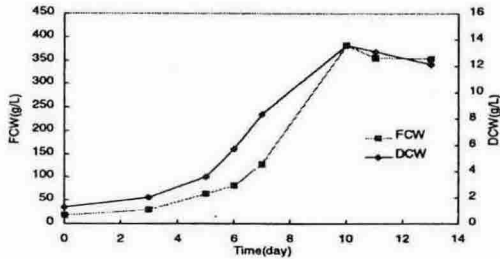


Fig. 1 Time course of cell mass

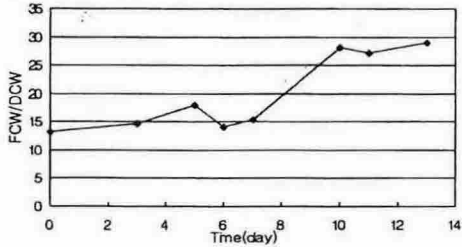


Fig. 2 Time course change of cell size index

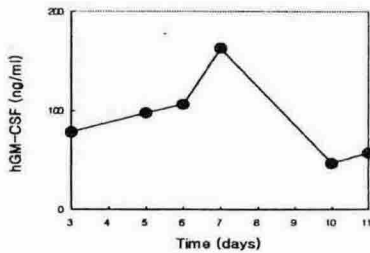


Fig.3 Time course change of hGM-CSF production

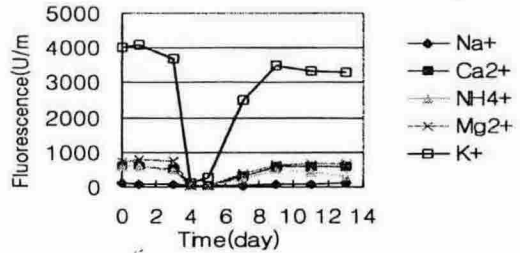


Fig. 4 Time course changes of cations concentration of batch culture in a bubble-column bioreactor

요약

의료용 단백질인 hGM-CSF 유전자가 형질전환된 담배세포를 배양하여 배양 7일째 hGM-CSF가 배지중에서 최대 162 $\mu\text{g/L}$ 의 농도로 축적되었다. 하지만 배양을 계속할수록 생산된 단백질의 양이 다시 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 배양말기로 갈수록 배지의 삼투압이 낮아지고 세포가 분해되는 등의 이유로 hGM-CSF가 안정화되지 않는 배양환경이 조성됨을 알 수 있다.

참고문헌

1. Chilton, M., Drummond M. H., Mero D. J., Sciak D., Montoya A. L., Gordon M. P. and Nester E. W., "Stable incorporation of DNA into higher plants cells : the molecular basis of crown gall tumorigenesis"(1997), *Cell*(11), 263-271
2. P. M. Doran, "Foreign protein production in plant tissue cultures"(2000), *Current Opinion in Biotechnology*, 11:199-204