P303

Insect cell-baculovirus system을 이용한 TGF-β_1의 최적 생산전략

이창진, 채종석, 차상훈, 전계택*, 정연호
강원대학교 생명과학부*, 식품생명공학부
전화(033)250-6484, 팩스(033)254-3835

서론

TGF-β_1(Transforming Growth Factor-β_1)은 각종 세포의 증식 및 분화에 중요한 역할을 하는 growth factor이다. TGF는 다양한 생리적 기능에 관여하는데 예를 들면 다양한 종류의 세포성장 억제(간세포, 상피세포), 다양한 세포분화 촉진(호흡상피세포, 연골모세포, 간충아세포 등), matrix protein(collagen, elasin proteoglycan 등)의 생산 및 분해 억제, 뼈의 성장과 remolding, 골세포 성장 촉진, lymphocyte의 기능과 증식 억제 등의 여러 가지 중요한 기능을 나타내고 있다.[1] Baculovirus는 생물학적 살충제로서 주로 연구되었으나 최근에는 유용 단백질의 발현을 위한 expression vector로써 recombinant protein 개발에 많이 이용되고 있다. Insect cell-baculovirus system은 포유동물세포에서 복제가 되지 않음에 의한 안정성과 polyhedrin과 p10등의 바이러스의 복제와는 무관한 단백질을 coding하는 유전자가 외부 유전자와 대체될 수 있다는 점, polyhedrin과 p10 유전자 등의 강한 프로모터가 바이러스의 life cycle중 늦은 시기에 작동하는 점 등 여러 가지 장점을 가지고 있다.[2] 본 연구에서는 TGF-β_1을 insect cell-baculovirus system을 이용하여 생산할 경우의 최적 생산 전략을 수립하기 위하여 배양액에 glucose, fructose, sucrose, glutamine, 농축배지의 공급에 따른 세포성장을 비교하였고, 유가식 배양과 흡착제에 의한 노폐물의 제거에 따른 세포성장과 TGF-β_1 의 생산성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 virus

Spodoptera frugiperda(Sf)-21, pAcGHLT-A-TGF-β_1 baculovirus expression vector

2. Sf-21 세포 배양 배지

Grace's insect medium 45.7g/ℓ, (50x) Yeastolate solution 20mℓ/ℓ, (50x) Lactalbumin Hydrolysate solution 20mℓ/ℓ, Fungizone 10mℓ/ℓ, Gentamicin 50mg/ℓ, 10% serum

3. 세포농도 및 viability 측정

세포농도는 hemocytometer를 이용하여 측정하였고, viability는 0.4% trypan blue exclusion method를 이용하여 측정하였다.

4. TGF-β_1의 측정

Anti-TGF-β_1(1.2μg/mℓ, 0.01M carbonate buffer, pH 9.3)을 96 well plate에 50μℓ/well이 되도록 넣고 4℃에서 하루동안 coating한 다음 세척액으로 3번씩 씻어주고, blocking solution을 처리하여 1시간 배양한 후 세척액으로 씻어주었다. 그 다음에 sample을 넣고 2시간 배양한 후, 세척액으로 씻어주고 chicken anti TGF-β_1을 넣어주어 1시간 배양하고, 세척액으로 다시 씻어준 후 horseradish peroxidase- conjugated anti-chicken IgG를 넣고 다시 한

시간 배양하였다. 그후 ABTS(2,2-azino-di(3- ethylbenzoithiazoline-6-sulgonate))를 넣어 발색시킨 뒤 405nm의 파장에서 흡광도를 ELISA reader를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

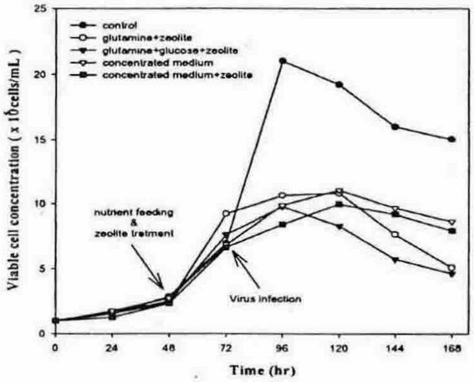

Fig.1 Comparison of cell growth kinetics of Sf-21 between various fed-batch culture modes.

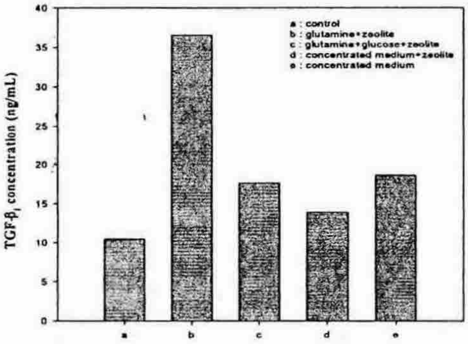

Fig.2 Comparison of TGF-β_1 concentrations between various fed-batch culture modes.

Fig.1은 Sf-21 cell을 spinner flask에서 배양하면서, 48 시간 후에 영양액을 보충해주거나 배양액 중의 암모니아를 제거하기 위해 합성 zeolite를 투입하였고, 72 시간 후에 1 M.O.I 의 baculovirus로 infection하였을 경우의 세포성장곡선을 보여주고 있다. Fig.2는 infection한 후 48 시간이 경과한 후의 배양액 중에 분비된 TGF-β_1의 농도를 나타내고 있다. Fig.1과 Fig.2에서 glutamine의 공급과 흡착제가 결합된 경우에 세포성장과 TGF-β_1의 농도가 가장 높음을 알 수 있었다.

요약

TGF-β_1을 insect cell-baculovirus system을 이용하여 생산하였으며, 이 경우 낮은 세포밀도와 암모니아 같은 노폐물에 의한 생산성 저해 문제를 해결하기 위해 유가식 배양과 흡착제에 의한 암모니아 제거를 동시에 수행함으로써 TGF-β_1의 생산성을 향상시킬 수 있었다.

참고문헌

1) Rik Derynck and Lisa Choy "Transforming Growth Factor-β_1 and its Receptors" (1998), The cytokine handbook, Academic press, 593-636.

2) Maeda, S., "Expression of foreign genes in insect cells using baculovirus vectors " (1994), Insect cell biotechnology, CRC press, 1-31.