

## 쥐 하이브리도마 세포배양을 위한 무혈청 배지개발(I) -최적 배지성분의 결정-

조보연 · 최태부<sup>1\*</sup>

한국과학기술연구원 유전공학센터 <sup>1</sup>건국대학교 미생물공학과

## Development of Serum-free Media for the Culture of Mouse Hybridoma (I) ; Determination of Optimal Media Composition

Cho, Bo-Yeon and Tae-Boo Choe<sup>1\*</sup>

Genetic Engineering Center, KIST, Seoul 136-791, Korea

<sup>1</sup>Department of Microbial Engineering, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea

A serum-free medium that could be used for the large-scale culture of mouse hybridoma to produce monoclonal antibodies was developed. The medium was based on a 1:1 mixture of Iscove's Modified Dulbecco's Medium and Ham's F-12, supplemented with insulin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , transferrin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ethanolamine 10  $\mu\text{M}$  and selenium 30 nM (designated EBM (enriched basal medium) with the supplements). The effect of various supplements of steroid hormones, vitamins, lipid and mineral salts was investigated and their optimal concentration was determined to replace fetal calf serum (FCS). These components were added respectively and then added by way of two or three combination to discern of which component combination was effective to the culture of hybridoma. As a result, serum-free medium KM3 (EBM with BSA 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , mineral cocktail and 0.05% PEG) was determined. The hybridoma Alps 25-3 cultured in this medium showed almost the same growth rate as in medium added with 2% fetal bovine serum. However, the antibody concentration from KM3 cultures was 80% of that obtained from culture with FCS. KM3 was also examined for the culture of other mouse hybridomas, KW, A4W & HCGK, and it was confirmed that it could support the growth of these hybridomas and the production of monoclonal antibodies.

단일클론항체가 면역학적 치료제와 체내 진단시약의 제조 등에 이용되는 등 그 상업적인 이용가치가 증대하면서 그 수요량 또한 급격히 증가하여 이를 뒷받침할 수 있는 대량생산 기술의 개발이 시급하게 요구되어지고 있다(1-3).

단일클론항체를 생성하는 하이브리도마 세포의 대량배양을 위해서 최근 여러 발효조를 이용한 배양법이 개발되고 있으나 배양액 내에 충분한 산소전달 문제와 고농도 세포배양 등의 문제점이 지적되고 있다(4, 5). 또한 배지 내에 동물의 혈청이 supplement로 사용되는 점도 문제점으로 지적되고 있다. 배양액의 5-10%로 첨가되는 혈청의 주요 성분은 albumin, fibronectin 과 같은 단백질과 peptide, lipid

그리고 여러가지 metabolite와 mineral 들이다. 이는 주로 홀몬, 성장인자 외에 여러가지 결합단백질(binding protein)들의 공급원이 되며 배양액의 pH를 조절하거나 trypsin 과 같은 protease의 작용을 억제하는 기능을 가지고 있다(6). 그러나 혈청은 준비한 lot 마다 차이가 나고 여러가지 미확인 성분들이 들어있어 체계적인 배양액의 연구를 어렵게 할 뿐 아니라 배양 후 원하는 미량의 생성물을 분리, 정제하는 과정에서도 많은 어려움을 주고 있다(7, 8). 또한 배지의 가격을 10 배 이상 증가시킴으로써 이 혈청의 농도를 극히 낮추거나 혈청대체물로 대체시킨 무혈청 배지 (serum-free media)의 개발은 단일클론항체의 분리정제 공정에 효율성을 높이고 대량배양

Key words: Mouse hybridoma, serum-free media, monoclonal antibody

\*Corresponding author

시 경제적인 잇점도 제공하고 있다(9, 10). 본 연구에서는 쥐 하이브리도마 Alps 25-3 대량배양을 위한 무혈청 배지 개발을 위해 동물세포 배지의 여러 성분들을 첨가하여 그 효과를 알아보고 혈청과 대체될 수 있는 성분을 조사하여 하이브리도마의 증식과 항체 생성을 알아봄으로써 무혈청 배지 개발 방법을 모색하였다.

## 재료 및 방법

### 세포주와 배양액

$\beta$ -HCG와 w-HCG로 면역시킨 Balb/c 쥐의 비장 세포와 SP 2/0-Ag 14 mouse myeloma을 융합시켜 얻은 쥐 하이브리도마 Alps 25-3, A4W, KW와 HCGK 라는 cell line을 이용하였다. 사용한 배지는 IMDM

과 Ham's F-12(Gibco)를 1:1로 혼합한 배지를 기본으로 2-5% fetal bovine serum 또는 iron-supplemented bovine calf serum(Hyclone)을 첨가하여 배양하였다. 계대배양과 세포배양은 전 보문(11)과 같다.

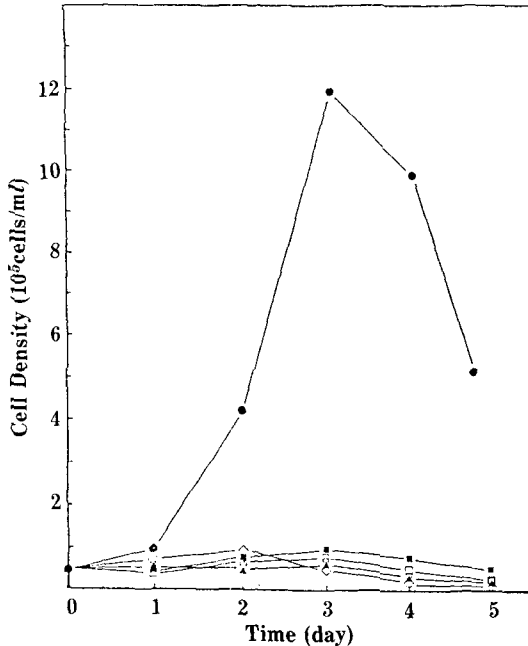
### 무혈청 배지 준비

동물세포 배양액 IMDM과 Ham's F-12를 1:1로 혼합한 배지를 기본으로 하여 여기에 ITES 용액 (insulin 10  $\mu$ g/ml, transferrin 10  $\mu$ g/ml, ethanolamine 10  $\mu$ M, selenium 30 nM)을 첨가하여 일차적으로 결정된 EBM(enriched basal medium)에 steroid hormones, vitamins, lipid 및 mineral을 비롯한 여러 성분들을 각각 첨가하여 그 최적농도를 결정하였다. 다음에 하이브리도마 성장에 기여하는

Table 1. Medium supplements used for the development of serum-free media.

Group	Supplement	Stock solution*	Concentration
1. ITES solution	insulin	0.5 mg/ml	1- 10 $\mu$ g/ml
	transferrin	1.0 mg/ml	10- 100 $\mu$ g/ml
	ethanolamine	10 mM	10- 100 $\mu$ M
	selenium	10 $\mu$ M	10- 100 nM
2. Bovine serum	albumin (BSA)	5 mg/ml	50- 500 $\mu$ g/ml
3. Steroid hormones	progesterone	1.57 $\mu$ g/ml (5 $\mu$ M)	10- 100 nM
	hydrocortisone	1.8 $\mu$ g/ml (5 $\mu$ M)	10- 100 nM
	dexamethasone	0.1mg/ml	0.5- 10 $\mu$ g/ml
4. Vitamins	tocopherol succinate	0.5 $\mu$ g/ml	0.005- 0.05 $\mu$ g/ml
	tocopherol acetate	1 $\mu$ g/ml	0.01- 0.1 $\mu$ g/ml
	ascorbic acid	0.2 mg/ml	1.0- 20 $\mu$ g/ml
	d-biotin	100 $\mu$ g/ml	0.5- 2.0 $\mu$ g/ml
5. Lipid	cholesterol	10 $\mu$ g/ml	0.5- 2.0 $\mu$ g/ml
6. Membrane protection group	$\beta$ -mercaptoethanol	50 mM	10- 50 $\mu$ M
	polyethylene glycol	10% (w/v)	0.05- 0.4%
7. Mineral cocktail	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O, (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O, NaVO <sub>3</sub> NiSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O, SnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O		
8. Others	pyruvate	10 mM	50- 200 $\mu$ M
	putrescine	200 $\mu$ M	2- 20 $\mu$ M
	concanavalin A	2 mg/ml	5- 20 $\mu$ g/ml

\*: in I/F (1:1) medium



**Fig. 1. Effect of supplements on Alps 25-3 growth in basal medium.**

- ; in I/F (1:1) with 2% FCS
- ; in I/F (1:1) with 1, 5 and 10  $\mu\text{g/ml}$  insulin
- ; in I/F (1:1) with 10, 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  transferrin
- ; in I/F (1:1) with 10, 50 and 100  $\mu\text{M}$  ethanolamine
- ◇; in I/F (1:1) with 10, 50 and 100nM selenium
- ▲; in I/F (1:1)

각 성분의 적정량을 첨가한 KM1 혼합물 배지를 만들고 이 혼합물에서 한 가지씩 제거하는 방법으로 최적성분을 결정하여 최종적으로 무혈청 배지 KM3를 결정하였다. 무혈청 배지 개발을 위해 조사한 성분들의 종류와 농도는 다음의 Table 1과 같다.

**세포의 증식곡선과 세포농도 측정**

측정하고자 하는 무혈청 배지에서 1주일간 전 배양(preculture)하여 배지에 적응시킨 후  $5-6 \times 10^4$  cells/ml 접종규모로 하여 증식곡선(main culture)을 조사하였다. 전 배양시 접종규모는  $7-8 \times 10^4$  cells/ml로 하였으며 2일 간격으로 계대배양하여 적응시켰다.

세포의 농도는 0.4% trypan blue로 염색하여 hemacytometer 상에서 생존세포를 세어 결정하였다.

**항체 역가측정**

배양액에 생성된 항체는 SRID(single radial immunodiffusion)법을 이용하여 측정하였다. Goat

**Table 2. Growth of Alps 25-3 in EBM containing various supplements of hormones and BSA.**

Supplement	Concentration	Doubling time (hr.)	Maximum cell density (cells/ml)	Culture time* (hr.)
Progesterone	10 nM	15.8	$1.3 \times 10^6$	96
	50 nM	21.3	$9.0 \times 10^5$	96
	100 nM	26.9	$3.9 \times 10^5$	96
Hydrocortisone	10 nM	25.5	$3.9 \times 10^5$	96
	50 nM	18.4	$6.22 \times 10^5$	96
	100 nM	15.6	$7.38 \times 10^5$	96
Dexamethasone	0.5 $\mu\text{g/ml}$	38.9	$2.62 \times 10^5$	120
	1.0 $\mu\text{g/ml}$	19.6	$8.78 \times 10^5$	96
	10 $\mu\text{g/ml}$	-	$4.7 \times 10^4$	-
BSA	50 $\mu\text{g/ml}$	18.8	$1.0 \times 10^6$	96
	100 $\mu\text{g/ml}$	14.9	$1.12 \times 10^6$	96
	500 $\mu\text{g/ml}$	18.3	$1.14 \times 10^6$	96
Control**	2% FBS	12.8	$1.2 \times 10^6$	72

\* The culture time when the cell number arrived at maximum  
 \*\* I/F (1:1) containing 2% FBS

anti mouse IgG-antiserum 이 0.5-1% 첨가된 agarose gel(1% w/v)에 배양액 10  $\mu\text{l}$  씩을 첨가한 후 48 시간 상온에서 방치하면 항원-항체 침전형태인 'halo'가 형성된다. 이 halo의 직경을 측정하여 항체의 농도를 계산하였다.

**결과 및 고찰**

**Enriched basal medium(EBM) 결정**

무혈청 배지개발을 위해 타 배지에 비해 불필수 아미노산과 비타민 등을 많이 포함하고 있는 IMDM과 여러가지 미량원소들이 들어있는 Ham's F-12를 1:1로 혼합한 배지(I/F)를 기본으로 하고 무혈청 배지의 필수 성분이라 볼 수 있는 insulin(1-10  $\mu\text{g/ml}$ ), transferrin(10-100  $\mu\text{g/ml}$ ), ethanolamine(10-100  $\mu\text{M}$ )과 selenium(10-100 nM)에 대한 각각의 최적농도를 구하려 했으나 Fig.1과 같이 전혀 증식하지 않았다. 따라서 많은 하이브리도마 무혈청 배지에서 일반적으로 적용되고 있는 농도로 insulin 10  $\mu\text{g/ml}$ , transferrin 10  $\mu\text{g/ml}$ , ethanolamine 10  $\mu\text{M}$ , selenium 30 nM(12, 13)을 첨가한 I/F 배지를 EBM(enriched basal medium)으로 명명하고 이 배지를 토대로 하여 다음 실험을 진행하였다. 한편 우태아 혈청 2%를 포함하는 배지에서 하이브리도마

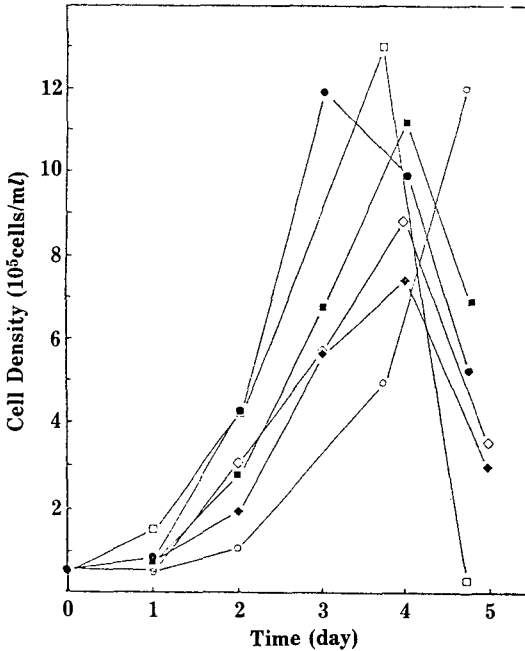


Fig. 2. Effect of various supplements of hormones and BSA on Alps 25-3 growth in EBM.

- ; in I/F (1:1) with 2% FCS
- ; in EBM with 100 μg/ml BSA
- ; in EBM with 10nM progesterone
- ◆; in EBM with 10nM hydrocortisone
- ◇; in EBM with 1.0 μg/ml dexamethasone
- ; in EBM

Alps 25-3의 증식은 접종농도  $5 \times 10^4$  cells/ml 일 경우 20 시간 미만의 성장잠재기와 40-50 시간의 대수 증식기를 거쳐 성장정지기에 도달한 후 곧바로 사멸기에 들어간다(Fig.1). 이 때의 비증식속도( $\mu$ )는  $0.05 \text{ hr}^{-1}$  (doubling time=14 시간)이고 이 기간 동안 세포는 4-5 회 분열하여 최고 생존세포  $1 \times 10^6$  cells/ml 전후로 보여주고 있다.

각 성분에 대한 최적농도 결정

EBM 배지에 여러 cell line에서 그 효과가 보고되어지고 있는 progesterone(10, 50, 100 nM), hydrocortisone(10, 50, 100 nM), dexamethasone(0.5, 1.0, 10 μg/ml)과 BSA(50, 100, 500 μg/ml)을 각각 첨가하여 Alps 25-3 세포의 증식을 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 이 실험에서 progesterone은 첨가하는 양이 감소할수록(최적농도 10 nM) hydrocortisone은 증가할수록(최적농도 100 nM) 세포증식에 대한 효과가 커지는 경향을 보였으며, dexamethasone은 첨가량 1.0 μg/ml에서 최적치를 보였다.

Table 3. Growth of Alps 25-3 in EBM containing various vitamins.

	Concentration (μg/ml)	Doubling time (hr.)	Maximum cell density (cells/ml)	Culture time* (hr.)
Tocopherol	0.005	15.0	$8.50 \times 10^5$	96
succinate	0.01	16.5	$4.86 \times 10^5$	96
	0.05	16.3	$8.02 \times 10^5$	96
Tocopherol	0.01	19.6	$6.90 \times 10^5$	120
acetate	0.05	17.5	$5.22 \times 10^5$	120
	0.1	15.1	$5.32 \times 10^5$	120
Ascorbic acid	1.0	15.5	$6.84 \times 10^5$	72
	10.0	16.0	$6.64 \times 10^5$	72
	20.0	16.0	$8.60 \times 10^5$	72
d-Biotin	0.5	17.2	$7.16 \times 10^5$	72
	1.0	14.3	$8.70 \times 10^5$	72
	2.0	15.4	$8.28 \times 10^5$	72

\* The culture time when the cell number arrived at maximum

각 홀몬의 최적농도치를 첨가한 배지에서 얻어진 Alps 25-3의 증식곡선은 Fig.2와 같으며 이 결과에 의하면 스테로이드 계통 홀몬이 첨가됨으로써 EBM 배지에서 보다는 성장잠재기가 단축되었음을 알 수 있다. 그러나 혈청배지에서 보다는 성장잠재기가 아직도 약 24 시간 연장되어 최고 세포농도에 달하는 시간이 늦추어져 있음을 알 수 있다. 스테로이드 홀몬은 무혈청 배지에 첨가되는 주요 성분으로 여러 cell line에서 그 효과가 보고되어지고 있으나 그 농도와 효과는 cell line에 따라, 또는 홀몬의 종류에 따라 차이를 보여주고 있다(8, 14-16). 첨가된 BSA는 Vitamin, lipid, 홀몬 등 작은 분자량의 여러 물질을 운반하는 결합단백질 중 하나로 본 실험에서도 그 효과가 크게 나타남을 알 수 있다(16, 17). Vitamin 성분으로 기본배지 중에 포함되어 있지 않은 tocopherol acetate(0.01, 0.05, 0.1 μg/ml), tocopherol succinate(0.005, 0.01, 0.05 μg/ml), ascorbic acid(1.0, 10.0, 20.0 μg/ml), d-biotin(0.5, 1.0, 2.0 μg/ml)에 대한 증식효과를 관찰한 결과는 Table 3에 정리되어 있으며 그 최적농도는 각각 0.1, 0.005, 20.0, 1.0 μg/ml로 관찰되었다. 그밖에 막의 생합성에 관여하는 lipid로 무혈청 배지에서 세포의 증식을 도와주는 것으로 알려져 있는 cholesterol(17, 18) 0.5, 1.0, 2.0 μg/ml 비롯하여 대사산물인 pyruvate(50, 100, 200 μM), putrescine(2, 10, 20 μM), 그밖

Table 4. Growth of Alps 25-3 in EBM containing various supplements.

Supplement	Concentration	Doubling time (hr.)	Maximum cell density (cells/ml)	Culture time* (hr.)
Cholesterol	0.5 $\mu\text{g/ml}$	12.3	$6.20 \times 10^5$	72
	1.0	12.5	$6.22 \times 10^5$	72
	2.0	19	$4.09 \times 10^5$	96
Pyruvate	50 $\mu\text{M}$	26.2	$5.28 \times 10^5$	96
	100	22.3	$6.42 \times 10^5$	96
	200	22.1	$7.12 \times 10^5$	96
Putrescine	1 $\mu\text{M}$	20.4	$8.28 \times 10^5$	72
	10	16.7	$8.34 \times 10^5$	72
	20	17.3	$6.84 \times 10^5$	72
PEG	0.05%	17.7	$1.01 \times 10^6$	96
	0.1%	18.7	$9.74 \times 10^5$	96
	0.4%	18.7	$9.96 \times 10^5$	96
$\beta$ -Mercaptoethanol	10 $\mu\text{M}$	17.5	$7.98 \times 10^5$	96
	50	17.2	$8.92 \times 10^5$	96
	100	17.2	$8.84 \times 10^5$	96
Concanavalin A	5 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-
	10	-	-	-
	20	-	-	-
Mineral cocktail		60	$2.6 \times 10^5$	120

\* The culture time when the cell number arrived at maximum

에 세포배양과 융합시 많이 이용되고 있는 polyethylene glycol(PEG) M.W. 1450, (0.05, 0.1, 0.4%),  $\beta$ -mercaptoethanol(10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ), concanavalin A (5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$ )를 EBM에 첨가하여 각 성분에서의 증식효과를 조사한 결과는 Table 4에 나타나 있다. Concanavalin A와 Mineral 용액만을 EBM에 각각 첨가했을 때에는 세포가 거의 증식하지 않았으나 그밖의 성분은 모두 증식에 양향을 주고 있음을 알 수 있다. 이 때 mineral cocktail의 성분은 Cleveland 등의 방법을 따랐다(9).

#### KM 배지의 성분결정

하이브리도마 성장에 기여할 수 있다고 나타난 여러 가지 성분들 중 steroid계 홀몬과 비타민, cholesterol 그리고 Mineral 성분을 앞에서 결정한 농도로 기본배지 EBM에 모두 혼합하여 배지 KM1이라 정하고 이들 성분들 중 그룹별로 하나씩 제외시켜 나가면서 그 성분의 기여도를 검토하였다(Fig.3). KM1 배지의 조성은 EBM 배지에 steroid hormone group(progesterone 10 nM, hydrocortisone 100 nM

and dexamethasone 1.0  $\mu\text{g/ml}$ ), BSA 100  $\mu\text{g/ml}$ , vitamin group(tocopherol succinate 0.005  $\mu\text{g/ml}$ , ascorbic acid 20.0  $\mu\text{g/ml}$  and d-biotin 1.0  $\mu\text{g/ml}$ )과 lipid로 cholesterol 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 그리고 mineral 용액을 첨가한 것으로, 이 때 개별 성분조사에서 거의 효과를 보이지 않은 성분도 다시 조사하였는데 이는 타성분과 혼합될 경우 상승효과를 보일 수 있는 가능성이 있기 때문이다. Fig.3에 따르면 2% 혈청배지에서 배양한 대조구와 비교하여 유사한 증식 곡선과 최대 세포농도를 보인 성분은 KM1에서 vitamin 그룹만을 제외한 배지로 나타나고 있다. 이 밖에 최고 세포농도는 감소하나 세포증식속도와 증식양상이 적어도 BSA와 mineral 또는 cholesterol만이 첨가된 배지에서도 유사하게 나타남을 알 수 있다. 따라서 가장 기본적인 성분으로 EBM에 BSA와 mineral만을 포함하는 배지를 KM2라 결정하였다. 그러나 그 배지만을 이용하였을 경우 혈청배지와 비교하여 볼 때 여전히 세포농도가 낮게 나타났으므로 이것을 보완하기 위한 방편의 하나로 galactose, pyruvate, putrescine, PEG, concanavalin A 등과 같

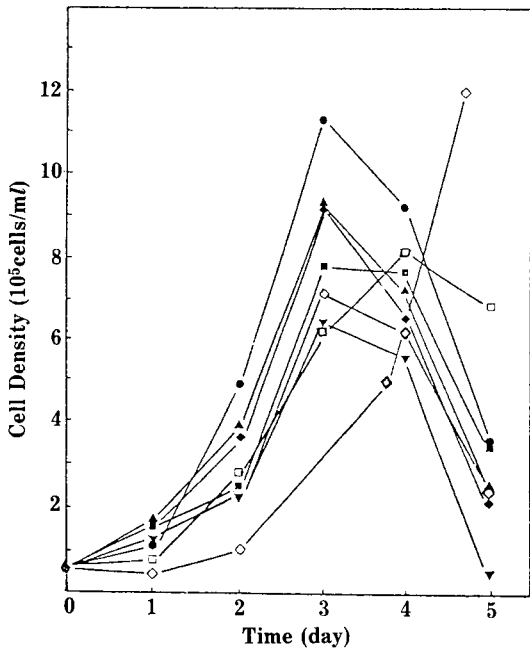


Fig. 3. Growth curves of Alps 25-3 in various media added each supplements.

- ; in I/F (1:1) with 2% FCS
- ◇; in EBM
- ; in EBM with BSA
- ▲; in KM1 without vitamin group
- ; in KM1 without steroid hormone group
- ▼; in KM1 without steroid hormone group, vitamin group and mineral
- ◇; in KM1 without steroid hormone group, vitamin group and lipid
- ◆; in KM1

은 성분들의 영향을 다시 조사하여 보았다(Fig.4). 이 중 PEG가 가장 효과적인 것으로 나타났으며 이것을 KM2에 첨가할 경우 세포증식곡선이 혈청배지와 거의 동일한 양상을 보여주었다(Fig.5 참조). 이로써 최종적으로 쥐 하이브리도마 Alps 25-3의 배양을 위한 무혈청 배지로 KM2에 PEG를 첨가한 KM3 배지를 결정할 수 있었다. 이 배지에서는 여러 세대의 계대배양을 통하여서도 동일한 증식효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다(결과생략).

**KM3 배지에서 기타 cell line의 증식과 항체생성**

앞에서 개발한 무혈청 배지가 쥐 하이브리도마 Alps 25-3 외에 다른 쥐 하이브리도마 cell line에도 적용될 수 있는지 알아 본 결과는 Table 5와 같다. 혈청배지 5%에서 증식하는 A4W, HCGK, KW cell line을 무혈청 배지에서 적응시켜 배양한 결과 A4W

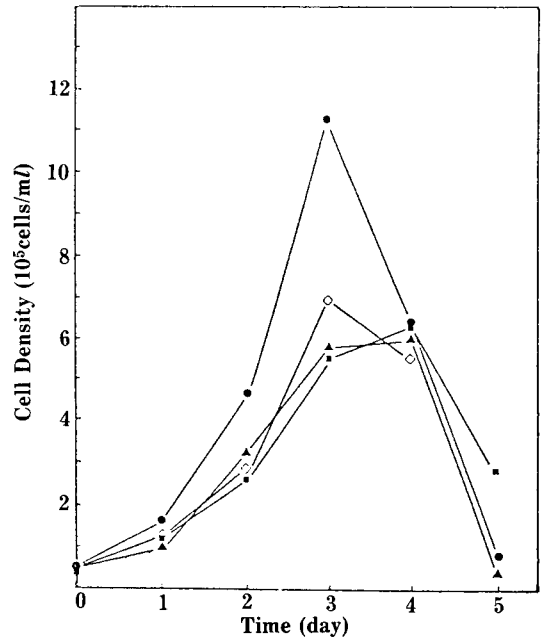


Fig. 4. Effect of various supplements on Alps 25-3 growth in KM2.

- ▲; in KM2 with 50 μM pyruvic acid
- ◇; in KM2 with 2 μM putrescine
- ; in KM2 with 0.05% PEG
- ; in KM2 with 10 μg/ml concanavalin A

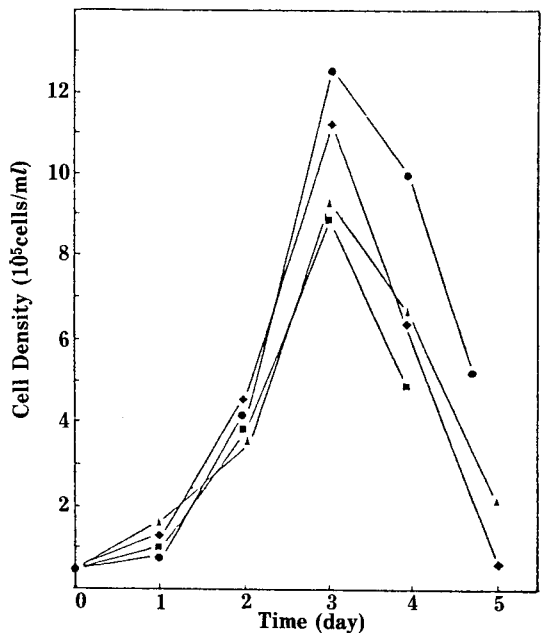


Fig. 5. Growth curves of Alps 25-3 in serum-free media.

- ; in I/F (1:1) with 2% FBS
- ▲; in KM1
- ; in KM2
- ◆; in KM3

**Table 5. Growth of mouse hybridoma and production of monoclonal antibodies in serum containing or in serum-free media\*.**

Cell line	Serum conc. (%)	Doubling time (hr.)	Maximum cell density (cells/ml)	Culture time** (hr.)	Maximum McAb conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )
Alps 25-3	2	11.7	$1.4 \times 10^6$	64	35
	0	11.6	$1.3 \times 10^6$	65	28
A4W	5	14.0	$1.0 \times 10^6$	72	100
	0	18.4	$6.0 \times 10^5$	72	100
KW	2	16.3	$1.2 \times 10^6$	72	68
	0	18.2	$6.7 \times 10^5$	72	61
HCGK	2	16.5	$9.6 \times 10^5$	96	74
	0+	19	$1.28 \times 10^6$	96	82.5

\*KM3, \*\*The culture time when the cell number arrived at maximum, + KM4

와 KW는 증식속도가 다소 느려지고 최고 세포농도도 감소함을 알 수 있었다. 이에 따른 최종 항체의 농도도 20-30% 감소하였음을 확인할 수 있었다. 특히 HCGK는 성장잠재기(lag phase)가 약 24간 정도 연장됨으로써 이를 단축시키기 위해 KM3 배지에 기타 성분으로 조사하였던 pyruvate, putrescine,  $\beta$ -mercaptoethanol, concanavalin A를 다시 조사하여 본 결과 이 중  $\beta$ -mercaptoethanol 성분이 첨가됨으로써 거의 혈청배지에서와 마찬가지로 증식을 보였으므로 KM3에  $\beta$ -mercaptoethanol을 첨가한 배지를 KM4라 결정할 수 있었고 KM4로 배양한 HCGK는 세포농도와 항체  $82.5 \mu\text{g/ml}$ 로 항체 생성량이 크게 증가됨을 알 수 있었다.  $\beta$ -mercaptoethanol은 많은 무혈청 배지에 첨가되는 성분으로 peroxide에 대한 손상을 방지하고 cell cycle을 통해  $G_1$ 에서 S phase로의 전환을 촉진하는 것으로 알려져 있어 하이브리도마와 lymphoma 배양에 효과적인 것으로 보고되어지고 있다. 위의 실험을 통해 하이브리도마 배양을 위한 무혈청 배지는 앞의 배지조성을 기본을 하여 cell line에 따라 한 두 성분만을 더 첨가하면 충분히 하이브리도마 대량 배양에 사용할 수 있으리라 생각되어지며 혈청배지와 동일한 증식속도와 최고 생존 세포수 뿐 아니라 그 생산물인 항체의 생성을 증가시킬 수 있는 성분을 검토한다면, 혈청을 대신하여 효율적인 몇 가지 첨가물에 의한 세포 배양이 가능하리라 본다.

## 요 약

최근 단일클론항체의 상업적 이용가치가 증대하

면서 그 수요량 또한 급격히 증가, 이를 뒷받침할 수 있는 대량생산 기술이 요구되고 있다. 본 연구에서는 쥐 하이브리도마 Alps 25-3의 대량배양을 위해 우선적으로 무혈청 배지 (serum-free media)의 개발을 시도하였다. 동물세포 배양액 IMDM과 Ham's F-12를 1:1로 혼합한 배지를 기본으로하여 ITES 용액 (insulin  $10 \mu\text{g/ml}$ , transferrin  $10 \mu\text{g/ml}$ , ethanolamine  $10 \mu\text{M}$  and selenium  $30 \text{ nM}$ )을 첨가하여 일차적으로 결정한 EBM (enriched basal medium)에 steroid hormones, vitamins, lipid, mineral 및 여러 성분들을 각각 첨가하여 혈청과 대체될 수 있는 성분들의 최적농도를 조사하였다. 각 성분들의 개별 효과와 함께 그들을 혼합하였을 때의 상호효과를 통해 혈청배지와 거의 동일한 성장을 보이는 무혈청 배지 KM3 (EBM with BSA  $100 \mu\text{g/ml}$ , mineral solution and 0.05% PEG)를 결정할 수 있었으며 이 배지에서의 최고 항체 생성량은 혈청배지의 약 80%로 나타났다. 또한 무혈청 배지에서 여러 cell line의 성장과 그들의 항체 생성을 조사함으로써 다른 쥐 하이브리도마 세포배양에도 적용시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Mizrahi, A.: *Biotechnology*, **4**, 123 (1986).
2. Martin, N., A. Brennan, L. Denome and J. Shaevitz: *Biotechnology*, **5**, 838 (1987).
3. Wolfe, R.A., J.A. Braatz, D.A. Miller and A.H. Heifetz: *Biotechniques*, **6**, 62 (1988).
4. Hu, W.S. and T.C. Dodge: *Biotechnology Progress*, **1**, 209 (1985).

5. Merten, O.W.: *Trends in Biotechnology*, **5**, 230 (1987).
6. Mizrahi, A. and A. Lazar: *Cytotechnology*, **1**, 199 (1988).
7. Baker, P., K. Knoblock, L. Noll, D. Wyatt and B. Lydersen: *Develop. Biol. Standard.*, **60**, 63 (1985).
8. Maurer, H.R., (R.I. Freshney ed.): *Animal cell culture*, IRL Press, 13 (1986).
9. Cleveland, W.L., I. Wood and B.F. Erlanger: *J. Immuno. Methods*, **56**, 221 (1983).
10. Griffiths, B.: *Trends in Biotechnology*, 268 (1986).
11. 최태부, 정용근 : 한국산업미생물학회지, **16**, 335 (1988)
12. Mckehan, W.L., W.G. Hamilton and R.G. Ham: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2023 (1976).
13. Bodeker, B.G.D., G.J. Berg, G. Hewlett and H.P. Schlumberger: *Develop. Biol. Standard.*, **60**, 93 (1985).
14. Hayashi, I. and G.H. Sato: *Nature*, **259**, 132 (1976).
15. Hutchings, S.E. and G.H. Sato: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 901 (1978).
16. Barnes, D. and G. Sato: *Anal. Biochem.*, **102**, 255 (1980).
17. Iscove, N.N. and F. Melchers: *J. Exp. Med.*, **147**, 923 (1978).
18. Chen, H.W. and A.A. Kandutsch: The growth requirements of vertebrate cells in vitro, (C. way mouth *et al.*, eds.) Cambridge Univ. Press, 327 (1981).
19. Chang, T.H., Z. Steplewski and H. Koprowski: *J. Immuno. Methods*, **39**, 369 (1980).
20. Tharakan, J.P. and P.C. Chau: *Biotech. Letters*, **8**, 529 (1986).
21. Glassy, M.C., J.P. Tharakan and P.C. Chau: *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 1015 (1988).

**(Received July 12, 1989)**