

## Effect of Pluronic F-68 and Oxygen Vectors on Postthaw Growth of Cryopreserved Transgenic *Nicotiana tabacum*

전수환, 이상윤, 조지숙, 김동일\*

인하대학교 공과대학 생물공학과

전화 (032) 860 - 7515, FAX (032) 875 - 0827

### Abstract

Effects of supplementing various 0.1-1.0%(w/v) surfactants and 0.1-1.0%(v/v) oxygen vectors on postthaw growth following cryopreservation of transgenic *Nicotiana tabacum*(GUS) in suspension culture were investigated. The postthaw cell growth was increased 20.68% and 23.66% compared to control when Pluronic F-68 and polyethylene glycol(PEG) were added in recovery medium respectively. Addition of *n*-hexadecane and FC-40 also enhanced the recovered growth by 14.89% and 20.68%. These results demonstrate that the marked protection could be achieved by using surfactants and oxygen vectors for plant cells recovered from cryostorage.

### 서론

식물 세포배양은 여러 가지 유용한 이차대사산물을 생산하기 위한 방법으로 연구가 진행되고 있다. 최근에는 유전자 재조합 기술(recombinant DNA technology)을 식물 세포배양에 적용하여 재조합 단백질을 생산하려는 연구도 시도되고 있다. 유전자 재조합된 식물 세포배양은 재조합 미생물 발효에 의한 생산에서 불가능한 post-translational modification이 가능하므로 중요한 생물의약 단백질 기능에 손상이 없이 생산할 수 있으며 단백질이 전혀 함유되어 있지 않은 배지를 사용하므로 분리 및 정제공정에 큰 도움을 줄 수 있다. 그러나 반복적인 계대 배양을 통한 세포주의 유지는 오염 및 조작의 실수 등을 야기 할 수 있고 세포주의 자발적인 변이 및 산물 생성 능력의 손실 등을 일으킬 수 있다. 이러한 산물 생산능 및 인위적으로 형질 전환된 획득 성질의 손실은 식물세포배양을 이용한 유용산물 생산의 산업화에 저해요인으로 작용하게 된다. 따라서 동물 세포나 미생물과 마찬가지로 식물 세포주의 경우도 장기간 보존할 수 있는 다양한 보존법이 개발되어야 한다.

Pluronic F-68은 polyethylene glycol(PEG)과 유사한 구조를 가진 비이온계의 계면 활성제이며 동물세포배양의 경우에는 성장 촉진 및 전단력에 대한 보호효과를 갖는 것으로 알려져 있다. Anthony 등은 1996년 *Oryza sativa* 식물 세포주를 동결 보존한 후 해동시 회복배지에 Pluronic F-68을 첨가한 후 세포주의 생존력을 관찰하였는데 0.01-0.2%(w/v) Pluronic F-68을 첨가한 것이 첨가하지 않은 것보다 2배 이상의 생존력을 갖는다고 발표하였다<sup>1)</sup>.

식물세포 고농도 배양시 산소 공급 부족의 해결은 bioreactor 운전시 통기와 교반의 조절,

순수한 산소의 사용, 유전 공학을 이용한 대사 조작 방법 등을 사용한다. 그러나 이러한 방법은 복잡하며 비용이 많이 들고 조작의 한계를 갖는다. 반면 산소전달 물질(oxygen vectors)의 사용은 간단하고 95% 이상의 회수성을 가지며 발효 공정중 산소전달 제한 조건을 해결하는데 사용되고 있다. 산소전달 물질의 종류에는 hydrocarbon계의 *n*-hexadecane, *n*-dodecane과 hydrocarbon의 수소원자들이 불소(fluorine)로 치환된 perfluorochemical 등이 있다. *n*-Hexadecane은 순수한 물보다 5-10 배 정도 높은 산소 용해도를 가지며 유화(emulsion)형태로 이용되어 산소전달을 증대시킨다. 산소전달 물질을 유화 형태로 만들어 이용할 경우에는 Pluronic F-68을 첨가하여 유화를 안정화시킨다고 알려져 있다. Anthony 등은 *Oryza sativa* 식물 세포주를 동결 보존한 후 회복배지에 perfluorochemical을 Pluronic F-68과 병행 사용하여 세포의 성장을 증가시켰다고 하는데 회복배지에 Pluronic F-68과 perfluorodecalin을 병행하여 사용했을 때 세포의 생장은 대조구보다 38% 향상되었다<sup>2)</sup>.

본 연구의 목적은 *E. coli*의  $\beta$ -glucuronidase(GUS)유전자를 함유한 transgenic *Nicotiana tabacum* 세포를 이용하여 동결 보존 후 재조합 유전자의 존재 유무 및 변화 여부를 확인하고자 하였다. 해동 후 회복 배지의 조건, 첨가제의 사용 및 외부 인자들을 최적화하여 형질 전환된 식물세포주의 장기 보존을 가능하게 하여 세포주가 산업화에 이용될 경우 생산성의 향상을 도모하고자 하였다.

## 재료 및 방법

형질 전환된 *Nicotiana tabacum* 세포주를 위해서는 3% sucrose가 첨가된 MS 배지에서 25°C, 120 rpm의 조건으로 배양하였다. 동결 보존과정을 위해서는 계대 배양 후 3일째 된 세포를 3%(w/v)의 mannitol이 첨가된 MS 배지에서 preculture를 수행한 후 동결 보호제(0.5 M DMSO, 0.5 M glycerol, 1 M sucrose)를 첨가하여 단계별로 냉동시켰다. 액체 질소(-196°C)에 15일간 보관한 후 회복배지의 조성을 다르게 하여 세포의 성장을 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

동결 보존 후 세포의 성장에 대한 회복 배지의 조성 및 외부인자의 영향을 관찰하기 위해 동결 보존에서 일반적으로 사용되는 방법인 동결 보호처리의 최적화를 수행하였다. *Catharanthus roseus*의 경우 계대 배양후 3-4일 째의 세포들이 며칠 지난 세포들보다도 동결과 해동에 저항성이 크다고 보고되었다<sup>3)</sup>. 동결 보존시 세포내의 수분이 빙결되며 이로 인해 발생하는 피해를 줄여주기 위해 세포의 크기를 줄여주는 과정(preculture)과 동결 보호제(cryoprotectants)의 첨가가 중요하다. 세포의 크기를 줄여주는 삼투압 증진제로는 mannitol, sorbitol, sucrose 그리고 proline이 있다. 동결 보호제는 물에 대한 용해도가 높고 세포에 독성이 낮아야 하며 종류로는 세포벽에 투과성을 갖는 DMSO, glycerol 등이 있고 비투과성인 PEG, PVP, sugar와 sugar alcohol 등이 있다. 해동후 회복 배지의 조성을 최적화하기 위해 동결 보존에서 일반적으로 사용되는 것과 같이 계대 배양 후 3일째 된 세포를 3%의 mannitol을 사용하여 세포의 크기를 줄였고 0.5 M DMSO, 0.5 M glycerol, 1 M sucrose를

첨가하여 동결 보호제로서 이용하였다. 그 후 단계별 동결과정을 통해 액체 질소(-196℃)에 15일간 저장한 후 37℃에서 해동하였다. 해동 후(postthaw)에 세포 생장의 변화여부를 관찰하기 위해 control을 두 가지로 설정하였다. Control 1은 동결 보존을 하지 않은 세포의 생장을 나타내며 control 2는 해동 후 회복배지에 계면 활성제 또는 산소 전달 물질을 첨가하지 않은 세포의 생장을 나타낸다. 해동 후 50 mL flask에 10 mL의 회복배지를 준비한 후 0.5 g FCW를 접종 한 후 5일 째에 세포생장을 측정하였다. 회복 배지에 계면 활성제를 첨가한 경우 Pluronic F-68과 polyethylene glycol(PEG)은 해동 후 세포의 생장을 control 2보다 20.68%, 23.66% 향상시켰으며 동결 보존 처리하지 않은 control 1과 비교시 93.2%, 95.5%의 생존력을 보였다(Figure 1). Kartha 등은 alkaloid를 생성하는 *Catharanthus roseus*의 동결 보존에 관한 결과를 보고하였는데 해동 후 4-5일 지난 경우의 세포생장이 급속히 일어남을 제시하였다<sup>3)</sup>. Pluronic F-68은 소수성 부분인 POP(polyoxypropylene)가 세포막과 결합하여 세포-세포 상호작용을 최소화하여 mechanical damage를 감소시키고 metabolic flux를 변화시켜 영양분의 흡수를 촉진시켜 세포 성장 및 해동 후 세포의 생존력을 증대시킨다고 알려져 있다. 특히 Pluronic F-68은 해동 후 회복 배지내에서 세포가 팽윤(rehydration)되는 동안 동결 보호제로서 사용된 DMSO의 유해한 영향을 점진적으로 줄여준다고 보고되었다<sup>4)</sup>.

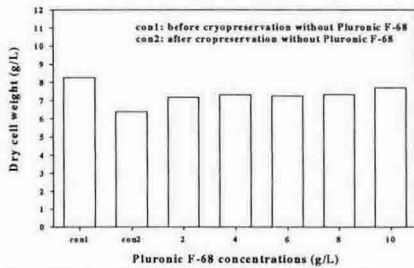


Fig. 1. Effect of Pluronic F-68 concentrations on postthaw growth of cryopreserved transgenic *Nicotiana tabacum* (GUS)

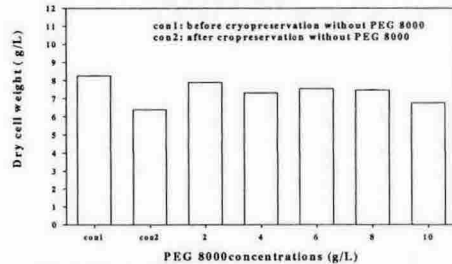


Fig. 2. Effect of PEG concentrations on postthaw growth of cryopreserved transgenic *Nicotiana tabacum* (GUS)

회복 배지에 산소전달 물질을 첨가한 경우 *n*-hexadecane(Figure 3)과 FC-40(Figure 4) 인 경우 control 2 보다 14.89%, 20.68% 세포 생장을 향상시켰으며 control 1과 비교시 88.7%, 93.2%의 생존력을 보였다. Perfluorochemical은 회복배지에 첨가함으로써 SOD 생합성을 증대시켜 동결 과정에서 발생하는 산소 라디칼(oxygen radical)로부터 세포를 보호한다고 알려져 있다<sup>5)</sup>.

동결 보존시 형질 전환된 식물 세포의 성장 및 재조합된 유전자의 보존을 위해 회복 배지의 조성 및 외부 인자를 최적화해야 한다. 이를 위해서는 회복 배지에 계면 활성제 및 산소 전달물질을 병행 사용하여 세포의 생존력에 상승효과를 기대하거나 당 농도의 변화 및 동결 보호제의 제거하는 방법 등이 있다. 회복 배지의 최적화를 통해 해동 후 세포의 성장 및 외래 단백질의 안정성과 수율을 향상시키는 연구가 진행되어야 한다.

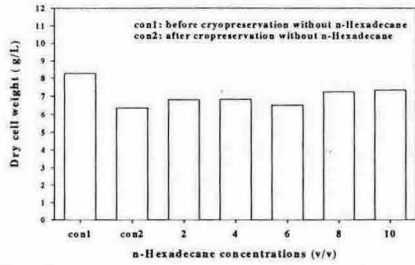


Fig. 3. Effect of n-Hexadecane concentrations on postthaw growth of cryopreserved transgenic *Nicotiana tabacum* (GUS)

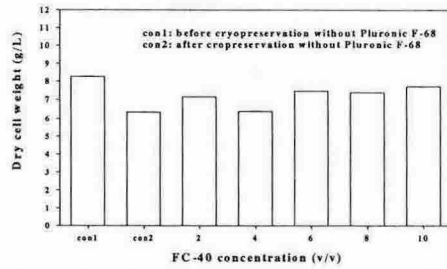


Fig. 4. Effect of FC-40 concentration on postthaw growth of cryopreserved transgenic *Nicotiana tabacum* (GUS)

## 요약

유전자 재조합된 *Nicotiana tabacum*을 이용하여 동결 보존 후의 세포 성장을 관찰하였다. 형질 전환된 *Nicotiana tabacum*의 동결 보존에서 회복배지에 계면 활성제와 산소 전달 물질을 첨가한 경우 첨가하지 않은 경우에 비해 세포 성장을 증대 시켰고 산소 전달 물질 보다 계면활성제의 영향이 크다는 결과를 관찰하였다.

## 참고문헌

1. Anthony P, N. B. Jelodar, K. C. Lowe, J. B. Power, and M. R. Davey, "Pluronic F-68 increases the post-thaw growth of cryopreserved plant cells", *Cryobiology* **33**, 508-514 (1996)
2. Anthony P, K. C. Lowe, J. B. Power and M. R. Davey, "Synergistic enhancement of the postthaw growth of cryopreserved rice cells by oxygenated perfluorocarbon and Pluronic F-68", *Cryobiology* **35**, 201-208 (1997)
3. Kartha, K. K, N. L. Leung, P. Gaudet-LaPrairie, and F. Constabel, "Cryopreservation of periwinkle, *Catharanthus roseus* cells cultured in vitro", *Plant Cell Rep.* **1**, 135-138 (1982)
4. Benson, E. E. and L. A. Withers, "Gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbon production by cryopreserved plant tissue cultures: A non-destructive method for assessing stability." *Cryoletter.* **8**, 35-46 (1987)
5. Fuller, B. J, Gower J. D, and Green, C. J, "Free radical damage and organ preservation: fact or fiction", *Cryobiology* **25**, 377-393(1988)