

## 형질전환된 담배 세포 현탁배양을 이용한 hGM-CSF 생산에서 ultrasound가 미치는 영향

명현중, 이기용, 김동일\*

인하대학교 공과대학 생명화학공학과

전화 (032) 863-5946, FAX (032) 872-4046

### Abstract

Effects of ultrasound on cell growth and the production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) were investigated using transgenic *Nicotiana tabacum* cell suspension cultures. The culture suffered a slight growth depression immediately after the sonication, but gradually recovered to normal growth within 2 days. When the cells were exposed to ultrasound, the level of secreted hGM-CSF was 2.14 times higher than that in normal condition. From the beginning to 6 days of culture, production of secreted hGM-CSF was higher than that of control and then decreased. At the end of culture, however, hGM-CSF was considerably increased up to 36.7%. In the case of intracellular hGM-CSF, the level was slightly higher than that obtained in normal condition. Total hGM-CSF production was 31.5% higher than that of control culture after 6 days. The highest amount of hGM-CSF was 34.9  $\mu\text{g/L}$ .

### 서론

현재까지의 식물세포배양은 식물체로부터 다양한 이차대사산물 및 유용물질의 생산에 사용되어 왔으나 최근 유전자 재조합 기술의 발달로 인해 식물체에서 외래단백질의 생산이 가능해졌다. 이러한 형질전환된 식물세포에서의 단백질 생산은 배지의 가격이 저렴하고 미생물을 숙주로 사용하는 경우보다 glycosylation 등의 post-translational modification과 같은 단백질의 적절한 변형이 가능하므로 생산되는 단백질의 생리적 활성을 높일 수 있다.

Ultrasound는 의학과 생물학의 분야에서 진단 및 치료에 광범위한 적용을 보이며 상당한 관심을 받고 있다. 또한 식물 세포 배양에 있어서도 ultrasound는 비생물학적인 elicitor의 역할을 하여 보다 많은 이차대사 산물의 축적을 야기한다<sup>1)</sup>. 이러한 ultrasound는 그 강도에 따라 미치는 영향이 다르다. 높은 강도의 ultrasound는 세포막을 파괴시키며 생물 분자가 활성을 가지지 못하게 하는 작용을 하지만 이에 반하여

낮은 강도의 ultrasound는 막의 투과성을 높여줌으로써 외부 물질의 유입을 도와주며 세포내 존재하는 대사산물의 배출이 쉽도록 해준다<sup>2)</sup>.

위와 같은 사실을 근거로 본 연구에서는 형질전환된 식물세포인 *Nicotiana tabacum*에서 의료용 단백질인 hGM-CSF의 생산에 미치는 ultrasound의 영향에 대하여 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양 및 배지

본 연구에서는 전북대학교로부터 제공받은 hGM-CSF를 생산하는 형질전환된 *Nicotiana tabacum*을 세포주로 사용하였으며 30 g/L sucrose, 0.1 g/L myo-inositol, 0.2 mg/L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid(2,4-D), 0.02 mg/L kinetin, 100 mg/L kanamycin을 첨가한 Murashige와 Skoog (MS) 기본배지에서 배양하였다. pH는 1 N NaOH를 사용하여 5.9로 조절하였으며 가압 증기 멸균하여 사용하였다. 현탁배양은 회전식 진탕배양기에서 25°C, 120 rpm, 암조건에서 수행하였으며 7일마다 계대하였고 실험에는 7일된 세포를 사용하였다.

### 세포량 측정

세포생체량은 배양액을 Whatman No.1 여과지를 통과시켜 세포와 배지를 분리하여 측정하였다. 이렇게 얻어진 세포를 60°C의 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조 후 세포 건조량을 측정하였다.

### ultrasound 노출 시스템

정격 출력이 185 W인 ultrasonic clean bath에서 적당량의 물을 채운 후 배양 6일째의 세포가 담긴 플라스크를 수면보다 1 cm 낮게 맞추어 3분간 노출시켰다.

### hGM-CSF의 정량분석

분리된 배지 내의 hGM-CSF의 농도는 ELISA 방법을 이용하여 450 nm에서 정량분석하였으며, 세포내 존재하는 hGM-CSF의 농도 경우 0.2 g의 cell sample을 0.15 M NaCl, 50 mM Tris (pH 7.4), 0.25% NP-40의 조성으로 구성된 buffer를 이용하여 추출한 후에 같은 방법으로 정량분석 하였다.

## 결과 및 고찰

대부분의 낮은 강도의 초음파는 세포막의 투과성을 증진시키고 DNA와 단백질의 변성을 가져오며 세포의 형태적 변화를 가져온다. 또한 음파의 미세한 진동에 의하여 전단응력의 원인이 되기도 하며 물질전달에 효과적인 작용을 주어 대사 작용을 촉진

시키기도 한다<sup>3)</sup>. 위와 같은 사실을 근거로 본 연구에서는 낮은 강도의 ultrasound가 형질전환된 담배세포에서 생산되는 hGM-CSF의 생산과 생장에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 실험은 배양 6일째 담배세포를 출력이 185 W인 ultrasonic clean bath에서 3분간 노출시킨 후에 대조구와 같은 조건으로 배양하였다. 초음파에 노출시킨 후 6일째에 세포생장은 대조군에 비해 약간 낮게 나타났으나 2일후에 대조구와 비슷한 수준으로 회복되었다(Figure 1).

세포 외부로 분비되는 hGM-CSF의 경우 초음파에 노출시킨 6일째에 대조구보다 2.14배의 증가를 보였으며 그 이후 대조구보다 감소하다가 배양 후반부인 14일째에 다시 증가를 보였다(Figure 2). 또한 세포내에 존재하는 hGM-CSF는 초음파에 노출시킨 6일 이후 전반적으로 대조구보다 높은 값을 나타내었다(Figure 3).

결과적으로 생산된 총 hGM-CSF는 배양 6일째 34.9  $\mu\text{g/L}$ 로 최대를 보였으며 이때 대조구보다 43.1% 높게 나타났다(Figure 4). 이러한 결과로 볼 때 낮은 농도로 초음파에 노출시키는 것은 세포의 막 투과성을 높여서 외부로 배출되는 hGM-CSF의 양이 늘어난 것 이라기보다는 초음파에 의한 세포내의 형태적인 변화 및 세포의 활성의 변화에 기인한 것이라고 사료된다.

### 요 약

본 연구에서는 hGM-CSF를 생산하는 형질전환된 담배세포배양에서 ultrasound가 세포생장과 hGM-CSF 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 세포의 생장은 ultrasound에 노출된 직후 약간의 저해를 보이지만 2일후에 정상의 세포와 비슷한 수준으로 회복되었다. 세포 외부로 분비되는 hGM-CSF는 ultrasound에 노출된 직후 증가하고 그 이후 감소하다 배양후반에 증가를 보였다. 세포내부에서 생산되는 hGM-CSF는 ultrasound 처리 이후 전반적으로 대조구보다 많이 생산됨을 보였다. 총 생산된 hGM-CSF는 ultrasound에 노출 시킨 배양 6일째 34.9  $\mu\text{g/L}$ 로 최대였으며 대조구보다 31.5%의 증가를 보였다.

### 감사의 글

본 연구는 산업자원부의 차세대신기술개발사업(A18-06-03)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Lin, L., Wu, J., Ho, K.P., and Qi, S., "Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell culture" (2001), *Ultrasound Med. Biol.*,

27(8), 1147-1152

2. Sinisterra, J. V., "Application of ultrasound to biotechnology: An overview" (1992), *Ultrasonics*, 30(3), 180-185
3. Miller, M. W., Miller, D. L., and Brayman, A. A., "A review of *in vitro* bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective" (1996), *Ultrasound Med. Biol.*, 22(9), 1131-1154

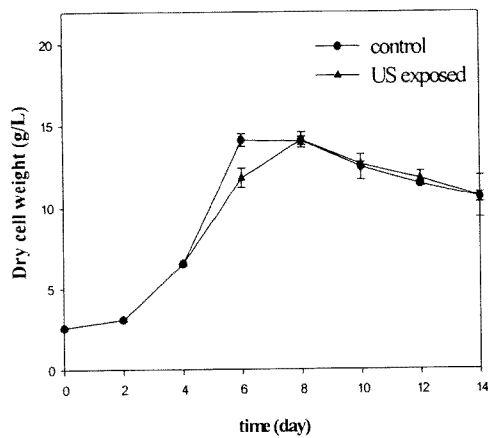


Figure 1. Effect of ultrasound on cell growth of transgenic *Nicotiana tabacum*.

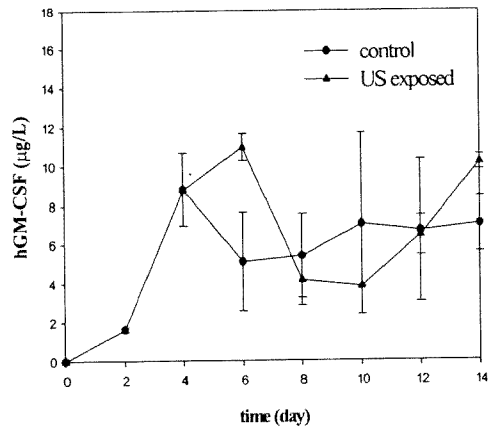


Figure 2. Effect of ultrasound on the production of extracellular hGM-CSF.

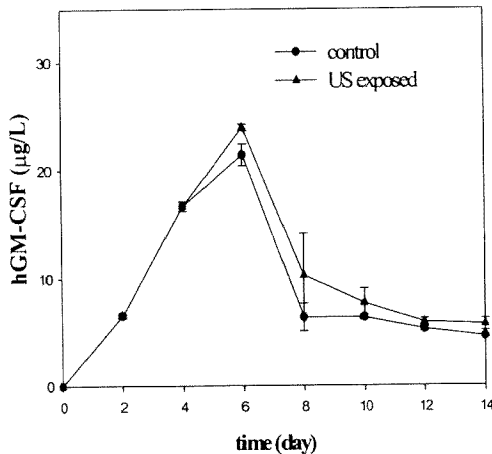


Figure 3. Effect of ultrasound on the production of intracellular hGM-CSF.

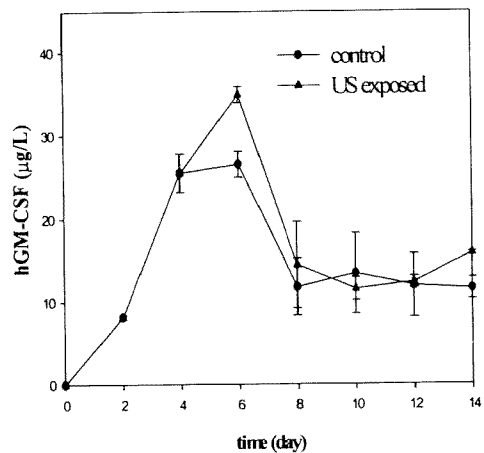


Figure 4. Effect of ultrasound on the production of total hGM-CSF.