

탄소원이 형질전환된 담배세포의 성장에 미치는 영향

Jin-Ok Lee*, Dong-Geun Lee, Jae-Hwa Lee

Department of Bioscience and Biotechnology, Silla National University, Gwaebop-dong, 617-736

Busan

TEL: +82-51-999-6099, FAX: +82-51-309-5636

Abstract

The effects of sugar on secretion of total protein and protease into the medium were investigated in transgenic tobacco cells. The dry cell weight reached 14.62 g/L. At 60 g/L sugar and 10day, the maximum concentration tested, the total protein, protease was present in the culture medium at 68.6 mg/L, 3645 U/L.

서론

식물세포배양은 동물, 미생물 등을 이용한 이차대사산물을 생산해 내는데 있어 보다 상업적으로 유용한 방법이라 알려져 있다¹⁾. 이 방법은 유용물질을 생산해 내는데 있어 환경 친화적인 생산 방법과 동시에 대량생산하는 시스템으로 이에 대한 연구도 많이 진척된 상태이다. 현재 식물세포를 이용한 재조합 단백질 생산은 많은 연구가 이뤄졌지만 분비된 재조합 단백질을 안정화시키는 방법이나 생산수율을 증대시키는 기술개발은 아직 미비한 상태이나 삼투압을 이용 하여 생산량을 세포 외로 유도시키거나 단백질 안정화제를 넣어 단백질 생산량을 증대시킨 연구결과도 있었다^{2,3)}. 또한 문헌에 보고된 바에 의하면 세포 밖으로 나온 단백질은 여러 protease의 공격을 쉽게 받는다는 단점이 있다^{4,5)}. 재조합 단백질 생산에 있어 protease를 억제시키기 위한 노력도 있었다. Protease억제제의 일종인 bacitracin을 이용하여 단백질 안정성에 기여한 연구도 있었다⁶⁾.

본 연구에서는 식물세포를 이용하여 에너지 공급원으로써 배양시간에 따른 당의 사용여부와 삼투압을 이용하여 재조합 단백질을 세포 밖으로 유도하기 위해 protein과 protease의 생산량을 조사하였다.

재료 및 방법

세포 배양

본 연구에서는 hGM-CSF 유전자가 도입된 *A.tumefaciens* LBA4404를 *Nicotiana tabacum* 세포에 형질전환 시킨 세포주를 사용하였다. 성장배지는 pH 5.8, 2,4-D 1 ml/L, Kinetin 0.02 mg/L, Agar 8 g/L, 카나마이신을 포함한 MS 액체배지⁷⁾에서 배양하였고 당 농도는 10, 30, 60, 90, 120, 150 g/L로 맞춰주었다. 배양 조건은 25 °C, 100 rpm으로 암 조건으로 50 ml Erlenmeyer flask에서 배양하였다.

분석 방법

배양시간에 따른 tobacco 현탁세포를 Vacuum pump를 이용하여 Whatman No.1 여과지 상에서 배양액을 걸러내었다. 세포의 생체중량은 화학저울로, 세포 건조중량은 생체중량을 측정 한 후 60 °C drying oven에서 24시간 향량이 될 때까지 건조, 측정하여 생산량을 측정하였다. Protein 측정은 Bradford assay Kit(Bio-rad, USA)를 사용하여 UV 595 nm에서 측정하였다. Protease 측정에서 기질은 casein을 포함한 0.25 M Tris-HCl (pH 7.0)을 사용하였고 반응액은 0.4 M TCA를 사용하여 UV 280 nm에서 측정하였다. hGM-CSF의 양은 ELISA Kit(Pharming Inc., U.S.A)를 사용하였다.

결과 및 고찰

hGM-CSF 유전자가 도입된 *A.tumefaciens* LBA4404를 *Nicotiana tabacum* 세포에 형질전환 시킨 세포주를 50 ml의 MS액체배지에서 14일 동안 현탁 배양하여 시간에 따라 얻은 생체중량과 건조중량을 측정하였고, Figure 1에서는 이에 따른 배양액을 이용하여 세포 생성량과 protein, protease를 분석하였다. 이와 동일한 세포를 이용하여 Figure 2에서는 당 농도 10, 30, 60, 90, 120, 150 g/L를 변화시켜 삼투압이 미치는 여러 가지 요인을 분석하였다. 배양 5일째 세포생산량은 당의 농도가 30 g/L일 때 dry cell weight가 11.22 g/L로 가장 높았으나 10일째는 60 g/L일 때 dry cell weight가 28.36 g/L로 가장 높았다. 그러나 Protease값은 당의 농도가 120 g/L 일 때 5, 10일 각각 3645, 4579 U/L로 가장 높은 값을 나타내었다.

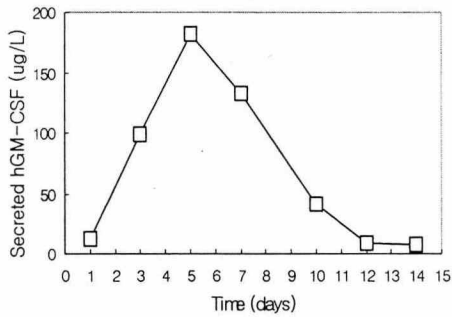
총 protein의 양은 배양 5일째 sucrose 30 g/L일 때 66.89 mg/L, 배양 10일째 scurose 60 g/L일 때 68.59 mg/L로 가장 높은 값을 나타내었다. 이 연구 결과로 볼 때 배양 초기 당의 농도 30 g/L는 세포가 성장함에 있어 에너지 공급원으로 가장 적절히 사용된다는 것을 알 수 있었다. 그러나 배양 후기로 접어들면서 가장 적절한 당의 농도 30g/L는 에너지원으로 대부분 쓰여 세포 생산량에 그다지 영향을 주지 못한 반면 당의 농도가 높을 때 60 g/L는 배양 시간이 길어짐에 따라 에너지원으로 세포 생산량에 있어 크게 영향을 받는다는 것을 확인할 수 있었다.

요 약

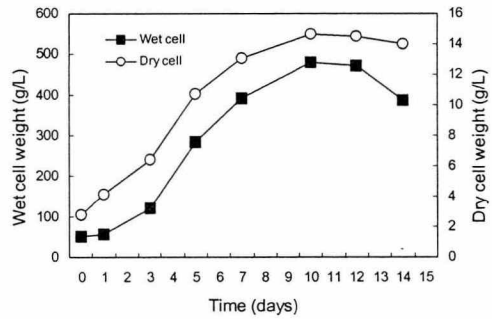
본 논문에서는 hGM-CSF 유전자가 도입된 형질전환 담배세포를 이용하여 당의 농도 10, 30, 60, 90, 120, 150 g/L 변화시켜 에너지 공급원으로써 사용 여부와 삼투압에 따른 protein, protease 양을 관찰 하였다. 총 Protein은 배양 10 일째 세포 생산량은 sucrose 60 g/L일 때 가장 높았고, protease는 배양 10 일째 4610 U/L로 가장 높은 값을 나타 내었다.

References

1. Pauline M Doran, Foreign protein production in plant tissue cultures(2000), *Current Opinion in Biotechnology*, Vol(11), 199-204.
2. Jea-Wha Lee, Effects of osmotic pressure on production of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in plant cell suspension culture(2001), *Enzyme and Microbial Technology*, Vol(30), 768-773.
3. Jea-Wha Lee, Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures(2002), *Journal of Biotechnology*, Vol(96), 205-211.
4. Ceriotti A, Effects of N-glycosylation on the folding and structure of plant proteins(1998), *Journal of Experimental Botany*, Vol(49), 1091-1103.
5. Wright A, Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering(1997), *Trends in Biotechnology*, Vol(15), 26-32.
6. Sang-Yoon Lee, Effect of bacitracin on hGM-CSF production in suspension cultures of transgenic *Nicotiana tabacum* cells(2003), *Enzyme and Microbial Technology*, Vol(33), 353-357.
7. Murashige, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures(1962), *plant physiology*, Vol(13), 473-479

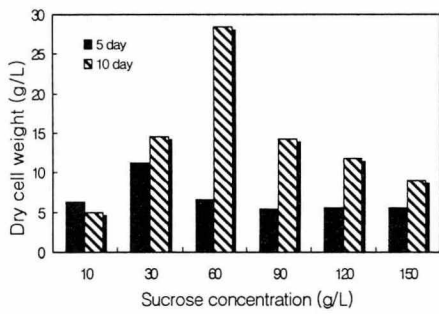


(A)

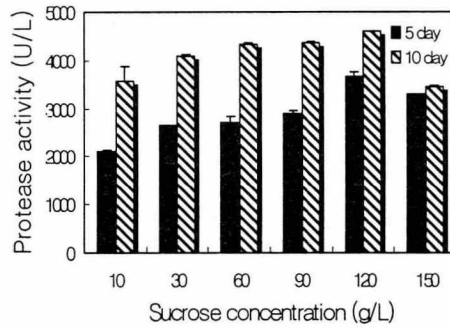


(B)

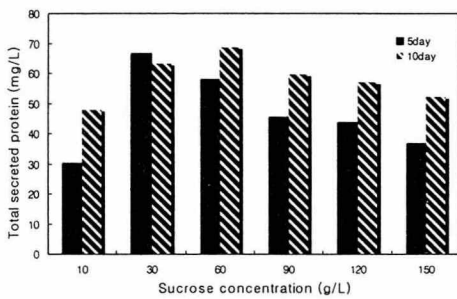
Figure 1. The symbols represent cells cultured in medium containing 30 g/L sucrose(A), hGM-CSF(B). (■: Wet cell weight, ○: Dry cell weight, □: hGM-CSF)



(A)



(B)



(C)

Figure 2. Effect of sucrose on secretion of protein and protease during batch suspension culture. The symbols represent cells cultured in medium containing 10, 30, 60, 90, 120, 150 g/L sucrose(A), protease(B), total protein(C).