

Hybridoma 배양을 위한 저혈청 배지의 개발 제 2 부 : 혈청 대체 물질 선정을 통한 저혈청 배지 제조

*제 훈 성·최 차 용
서울대학교 공과대학 공업화학과, *릭키바이오텍중앙연구소

Development of Low-serum Medium(LSM) for Mouse-mouse Hybridoma Part II. Development of Low Serum Medium by Screening for Serum Replacement

*Hoon Sung Jeh and Cha Yong Choi

Department of Chemical Technology, College of Engineering,
Seioul National University.

*Central Reasearch Laboratory, Lucky Biotech Inc.

ABSTRACT

A low serum medium(LSM) suitable for the growth of a self-constructed hybridoma cell line, KA112, was established by selecting ingredients to replace serum. Insulin and sodium pyruvate were important for the growth of cell line KA112. Various basal media were tested and DMEM gave the most favorable result.

Low serum medium(LSM) developed in this work showed cell line stability in the culture for more than 6 months and exhibited cell growth equivalent to that carried out in medium supplemented with 7 % FBS. LSM was found to be applicable to the suspension culture of KA112. The reduction of serum level down to 1%(V/V) FBS in LSM resulted in a substantial saving in the cost of media preparation for large scale culture.

재료 및 방법

사용균주

안질환과 비임질성 성병을 유발하는 그람양성 병 원균인 *Chlamydia trachomatis* L2 type에 대한 항체를 분비하는 hybridoma KA112가 사용되었다. KA112는 *Chlamydia trachomatis*를 생쥐에 면역하여 얻은 지라(spleen)의 임파세포와 mouse myeloma P3U1(다나구찌 박사, 일본 쯤바 대학)을 세포 융합하여 제조하였다(1) KA112는 무한 희석법에 의해 클로닝된 5가지 클론 중 성장과 항체 생산이 가장 뛰어난 것으로 선택 사용하였다.

사용 배지

Hybridoma의 대량생산 및 배지 개발시에 사용된

기저배지는 RPMI-1640 medium과 Dulbecco's Modified Eagle medium(DMEM No. 240-6309 : GIBCO, NY, U.S.A.) 이었으며 sodium bicarbonate(2.0g/L)와 수용성 황산 가나마이신 (0.3g/L : kanamycin, 동아제약, 서울)을 첨가한 후 0.22 μ m 47mm 필터로 2회 멸균여과하여 사용하였다. 균주 유지를 위한 계대배양과 저혈청배지 개발시 첨가된 물질은 Table 1과 같다.

세포 배양

배지개발시에는 소규모로 24well tissue culture plate(NUNC, Denmark)를 사용하였으며 균주 유지와 장기적응시험을 위하여 ϕ 60 및 ϕ 100 tissue culture dish(녹십자 의료공업, 서울)가 사용되었다. 세

Table 1. List of Supplemented Compounds

supplement	maker
insulin	SIGMA
sodium pyruvate	SIGMA
oxaloacetate	SIGMA
Pluronic F-68	BASF
2-mercaptoethanol	Merck
Primatone RL	Humko-Sheffield
Peptone	DIFCO
fetal calf serum	GIBCO

포배양은 온도 36.5–37°C, 수분포화상태의 CO₂ incubator 내에서 수행하였다. 부유배양에의 적합성 검토를 위해서는 250ml와 1L spinner flask(Bellico, U. S. A.), 2L Celligen Bioreactor(New Brunswick Scientific Co., U. S. A.)가 사용되었다.

첨가물의 검색

모든 인자가 포함된 배지(control medium)로 2-3일간 적응시킨 세포를 원심분리하여 적정농도로 재현탁, 동일분량으로 24well plate에 분주한 다음 1일 후에 폐배지(spent medium)를 각 well로부터 제거하고 한가지씩의 인자가 제거된 각각의 배지를 동일한 양(1-2ml)투입하였다. 매 24시간마다 농도와 생존도를 측정하여 성장곡선을 얻었다.

결과 및 고찰

첨가물의 선정

실험 및 방법에서 기술한 첨가물의 검색법을 토대로 첨가물들이 선정되었으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 저혈청배지의 개발은 대량배양을 위한 배지개발이 목표이므로 첨가물의 가격이 또한 고려되어야 한다. 고가의 단백질 특히 성장인자(growth factor)의 첨가는 가능한한 피하였다. 현재까지의 연구들에서 성장인자등의 단백질계 첨가물들은 그 중요성이 자주 언급된 반면, 대사물질들에 대한 연구는 미미하였으나 혈청 첨가량에 따른 세포성장 실험에서 고갈성 인자가 결핍되는 현상을 보였고 범용 기저배지들 대신에 사용되어 좋은 효과가 보고된 기저배지들에 pyruvate등이 포함되어 있음을 주시하였다. 이에 착안하여 oxaloacetate등의 대사중간물들을 선정하였다. 부유배양시 계면활성제를 사용하여 shear damage를 줄이고자 pluronic F-68이 선정되었으며 배양액 내의 산화 환원 potential을 유지

Table 2. Composition of low serum medium

Basal medium	RPMI-1640 or DMEM	
Supplement		
	sodium pyruvate	110mg/l
	insulin	76 μg/l
	Pluronic F-68	0.1 g/l
	FBS	1% (V/V)

*Pluronic F-68 was added in order to reduce shear damage in the case of suspension culture.

하기 위하여 첨가의 필요성이 보고되어 있는 2-mercaptoethanol도 선정되었다(2, 3, 4).

핵심인자(key component)의 Screening

제조비용의 경제성을 고려하는 동시에 주요역할을 하는 것으로 추정된 몇가지의 물질을 선정하여 세포를 배양하였다. 앞의 실험으로 얻어진 결과들과(10) 경제성을 고려하여 최초로 선정된 첨가물질들은 insulin, pyruvate, β-mercaptoethanol, oxaloacetate, pluronic F-68등이었다. 목표는 1% FBS첨가로도 세포성장이 가능하게 하는 것이었다. 선정된 모든 첨가물질을 첨가하여 1% FBS농도에서 세포를 배양하였을 때 첨가물질을 첨가하지 않고 1%FBS만 투입한 경우(control)에 비해 상당한 세포성장을 보였다. 새로운 배지 개발시에 종종 보고되는 adaptation의 필요성은 본 실험에서는 나타나지 않았다. Adaptation 기간은 Cell-line마다 매우 큰 차이를 보이는 경우가 많으며 adaptation이 거의 필요없는 경우도 보고되어 있다. 일단 세포의 성장에 성공하였으므로 첨가된 물질 중의 핵심인자를 가리기 위해 다음과 같은 screening을 수행하였다(Figure 1). 세포는 24well tissue culture plate에 접종되었으며 1일 경과 후 첨가물질이 한가지씩 제외된 시험배지(test medium)들로 각각의 well의 배지를 교체한 다음 매일 세포농도와 생존도를 측정하였다. 배양은 7일간 이루어졌으나 대부분의 well에서 3-4일 경과 후 세포사멸이 시작되었다. 한 종류의 시험배지에 7well씩을 배정하여 7일간 매일 새로운 well에서 세포농도를 측정, 폐기하는 방법을 사용하였다. 이는 counting을 위한 pipetting등에서 오는 실험오차를 막기 위해서였다. 각각의 counting결과에서 최고세포농도를 구한 다음 접종농도와 차이를 퍼센트비율로 다시 구하였다. 시험되는 모든 첨가물과 1%(V/V)FBS를 첨가하여 잡은 control(LSM control)을

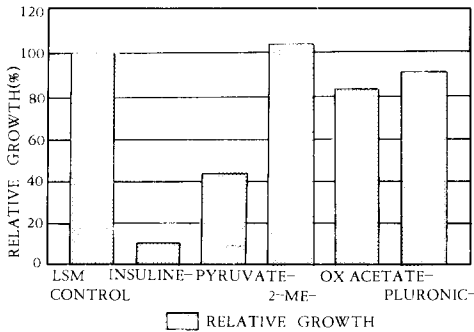


Fig. 1. Effect of each component in LSM on cell growth (Cells were cultured for 7 days in 24-well plate. LSM control includes all of the 5 components listed plus 1% FBS).

기준으로 삼고, 이 LSM control로부터 각각의 해당 성분을 제거했을 때의 상대적인 세포성장 비교를 Figure 1에 도시하였다.

실험에 사용된 세포들은 약 3-4일 이상 LSM control 배지에서 배양하였던 세포들이었다. 결과에서 insulin과 pyruvate가 매우 중요하게 나타났다.

pyruvate의 경우는 특이한 결과를 보였는데 LSM control에서 pyruvate의 첨가만 제외된 경우에 control에 비하여 40%가량의 세포성장을 보였다. 이는 그 결핍에 따라 세포성장이 전혀 일어나지 않는 insulin의 경우와는 대조적인 결과인데 혈청의 농도에 따른 세포성장 실험과도 연관시켜 생각해 볼 수 있다(10). 즉, insulin은 촉매적 기능을 하는 것으로 가정을 해 보면 앞의 실험결과와 일치한다. 혈청첨가농도 3% 근처에서 볼 수 있는 세포성장속도 자체를 조절하는 것은 insulin이고 첨가농도 5%에서 보인 세포성장의 조기정지 및 사멸시작 현상은 pyruvate의 결핍이 그 원인으로 보였다. 이러한 판단이 정확하다면 두가지 물질의 첨가로 인해 혈청 첨가농도 3%와 5%에 보인 두가지 종류의 결핍요인이 해소되어 적어도 3% 혈청 첨가시에는 결핍 현상이 나타나지 않아야 한다.

위의 첨가물들을 첨가한 배지에서 혈청의 농도를 변화시키며 세포를 배양한 결과 결핍현상이 1% 혈청농도 이하에서 나타남을 볼 수 있었다(Figure 2).

즉, 혈청농도 1% 이하가 되면 insulin, pyruvate등을 제외한 제3의 인자가 새로운 결핍요인이 되는 것이다. 다시 말해서 기저배지의 영양소(glucose 또는 아미노산들)가 고갈되기 전에 결핍되는 인자가 생기는 것이다. 이 새롭게 결핍되는 인자는 혈청의 종류

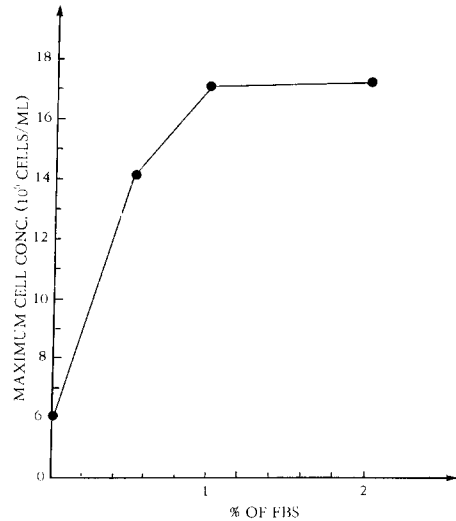


Fig. 2. Effect of serum content in LSM on maximum cell concentration(Inoculum size=6.0×10⁶ cells/ml, culture time=7 days).

에 따라 다를 것으로 생각된다. Data는 보이지 않았으나 혈청을 FBS에서 비교적 저가인 calf serum으로 바꾸었을 경우 1% 첨가하였을 때 FBS 1.5% 첨가의 경우와 거의 동일한 세포성장을 보였다. 간단히 말한다면 새로운 결핍요인이 calf serum보다 FBS에 2배가량 있다고 생각할 수 있다. Pyruvate와 같은 중간 대사물질은 이제까지의 연구에서 그리 중요시되지는 않았다. 주로 단백질계의 조절작용이나 수송작용을 하는 물질들이 시도되어 왔는데 본 실험에서는 pyruvate가 세포성장속도보다는 최고 세포농도에 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 몇몇 보고에서는 pyruvate가 단순한 intermediate로 사용되는 것이 아니라 NADH의 acceptor로 작용한다고 알려져 있다. 본 실험에서는 oxaloacetate가 아무런 효과를 보이지 않았는데 이를 통해 pyruvate가 NADH의 수용체로 작용하여 세포성장을 더 크게 할 수 있었던 것으로 판단하였다. 즉, TCA cycle내의 oxaloacetate가 pyruvate를 대체할 수가 없었음에서 이러한 판단을 하였다.

보고된 결과들 중에서 기저배지를 IMDM 또는 F-12등의 혼합물로 바꾸어 세포성장을 높인 경우가 많은데(5, 6)특기하여야 할 사실은 이같은 기저배지의 조성이 RPMI-1640이나 DMEM등과 큰 차이를 보이지 않으면서 pyruvate가 포함되어 있는 점이다. 기저배지를 DMEM과 F-12의 혼합물로 바꾸고

RPMI-1640등의 배지를 사용한 경우와 세포성장속도면에서 큰 차이를 보이는가를 실험으로 검증해 볼 필요가 있다. 기존의 보고들에서는 최고세포농도에 대한 영향들만 기술되어있으며 기저배지교체의 효과에 대한 원인규명이 미흡하였다. 본 연구에서는 앞의 실험들을 통하여 pyruvate의 역할을 논리적으로 추정하였으며 이에 대한 검증 실험이 요구된다.

기존에 개발되었던 저혈청배지의 하나에서는 Primatone-RL의 첨가가 필수적인 것으로 보고된 바 있다(7). Primatone-RL은 특정한 tissue의 hydrolysate로 복잡한 단백질과 peptide등으로 구성되어 있는 물질이다. 따라서 이 물질의 첨가는 배지내의 불순단백질 함량을 높이는 역할을 하므로 그리 바람직하지 못하다. 앞선 보고에서는 이 Primatone-RL에 미지의 growth factor가 존재하는 것으로 추정하였는데 본 실험에서는 KA-112 hybridoma가 Primatone-RL에 도리어 inhibition만 받는것으로 밝혀졌다.

기저배지(basal medium)의 효과

저혈청배지의 기저배지로 DMEM을 사용할 경우와 RPMI-1640을 사용할 경우를 비교하였다. 두 기저배지의 조성은 구성요소들의 종류에는 큰 차이가 없는 반면 nutrient함량에 있어서 DMEM이 더 높다. 예상한 바와 같이 두 경우의 세포성장속도는 거의 같았으나 최고도달 세포농도가 DMEM을 사용할 경우에 더 컸다(Figure 3). 두 기저배지내에는 세포 성장속도에 영향을 줄만한 조절기능을 가진 단백질이 포함되어 있지 않으며 일반적인 기질(glucose, amino acids, vitamins)로 이루어져 있으므로 이러한 결과는 예상할 수 있었다. 이 결과로부터 한 가지 가능성을 도출할 수 있는데, 기저배지의 glucose, amino acid, vitamin류 등의 농도를 적절히 높여감으로써 세포에 의해 생산되어 성장을 억제하는 waste product의 누적과 용존산소의 공급능력 한계 등으로 무한히 증가시킬 수는 없으나, 본 실험에서는 회분배양 또는 유가배양에서 세포의 성장기간을 연장, 더 높은 최고세포농도를 얻을 수 있으리라고 예상할 수 있었다.

기저배지의 일종으로 범용기저배지(RPMI-1640, DMEM)에 일정량 혼합하여 쓸 수 있는 NCTC-109 배지를 사용, 세포 성장에 미치는 영향을 보았다. NCTC-109는 각종 coenzyme이 풍부하게 함유되어 있으므로 이를 첨가할 경우 혈청투입시와 더욱 비슷한 환경을 세포에 제공할 가능성이 크다. 첨가결과

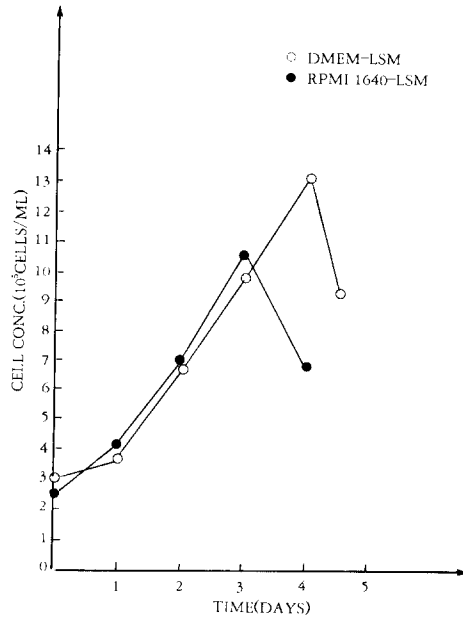


Fig. 3. Effect of basal medium variation on cell growth.

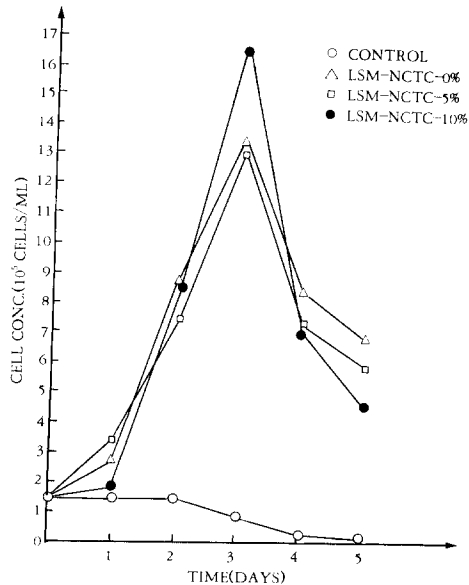


Fig. 4. Effect of NCTC-109 supplemented to LSM on cell growth.

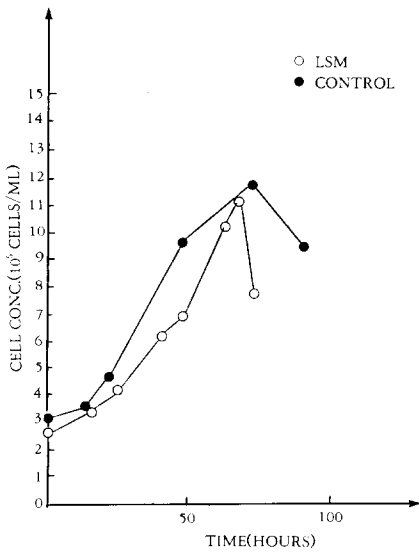


Fig. 5. Cell growth kinetics of suspension culture in LSM(Control culture was in medium supplemented with 7% FBS and both cultures were performed in 300ml spinner flask(Bellco).

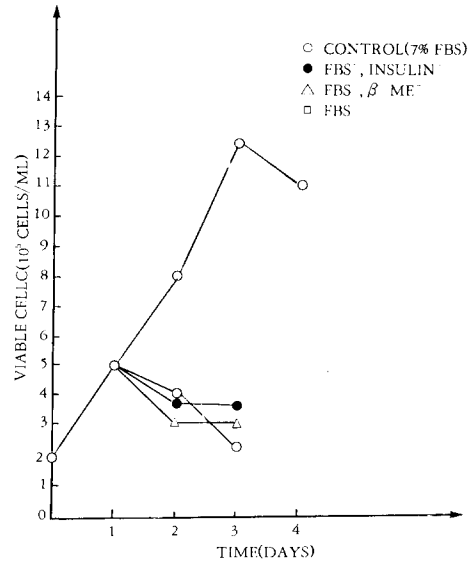


Fig. 6. Essentiality of serum in LSM(Control culture is for medium with EMEM and 7% FBS other cultures are done with media modified from LSM as indicated).

10% 혼합시 20-30%의 최고세포농도 증가가 있었다 (Figure 4). 그러나 NCTC-109 10% 첨가시 배지제조비용이 크게 상승하므로 이후의 배지제조시에는 첨가하지 않기로 하였다. 첨가하여 얻는 세포성장의 증가분에 비해 비용상승부담이 너무 큰 것으로 판단되었다. 그러나 본 실험을 통해 insulin이나 pyruvate 등의 key factor들 이외에도 세포성장에 보조적인 도움을 줄 수 있는 인자들이 다양하게 존재할 가능성을 확인하였다.

저혈청배지의 최종조성

개발된 LSM의 최종조성과 농도는 Table 2와 같다. 간단한 물질의 첨가를 통하여 혈청요구량을 1%로 줄였으며 혈청을 FBS에서 calf serum으로 대체할 경우 더 많은 가격절감을 가져올 수 있을 것으로 기대된다.

최종적인 조성의 배지로 세포를 6개월 이상 계대 배양한 결과 계속적인 세포성장을 관찰하였다. 따라서 장기배양시에도 큰 문제가 없다고 판단하였다.

부유배양에의 적합성 검토

본 실험에서는 300ml spinner flask를 사용하여

working volume 250ml, agitation speed 40 rpm으로 운전하였으며 shear damage(8, 9)를 고려하여 pluronic F-68을 첨가하였다.

Dish level에서 정지배양(stationary culture)으로 개발된 저혈청배지의 부유배양에의 적합성을 검토하였다. 7% FBS첨가배지를 control로 하여 배양한 결과 거의 비슷한 세포성장을 볼 수 있었다. 저혈청배지(LSM)사용시 초기세포 접종농도가 다소 낮음을 고려할 때 만족할 만한 세포성장이 나타났다 (Figure 5). 본 실험의 결과로 대량배양시 채택되는 부유배양에도 개발된 LSM이 적합함을 확인하였다.

혈청의 필수성

개발된 LSM에서 1%의 혈청을 제외하고 세포를 배양하였다(Figure 6). 24well plate에 2.0 x 10⁵ cells/ml로 접종한 다음 1일 경과 후 혈청이 결핍된 LSM으로 배지를 교체하였다. 7% FBS첨가배지를 control로 하였으며 매일 sampling, counting하였다. 이 실험의 결과에서 볼 수 있듯이 혈청이 결핍된 LSM에서는 세포성장이 전혀 일어나지 않았다. 이는 혈청 1%내에 세포성장에 필수불가결한 인자가 분명히 존재함을 확인하여 주는 것이며 이를 찾아냄으로

써 무혈청배지를 개발할 수 있으리라는 가능성을 보여주는 것이었다.

요 약

저혈청 배지의 개발을 위해 혈청 대체 가능성이 있는 물질을 선정하여 각각의 필요성을 검색하였다. 검색 결과 결정된 물질들로 저혈청 배지를 제조하였으며, 기저 배지의 종류와 혼합에 따른 영향을 고찰하였다. 개발된 배지는 1% FBS 첨가만으로 6개월 이상의 계대배양에서 만족할만한 안정성을 보였으며, 부유배양에도 적합한 것으로 판단되었다. 개발된 배지에서 혈청은 필수적이었으나 균주의 장기적응 후에 무혈청 배지의 개발이 보다 용이할 것으로 기대되었다.

참고 문헌

1. Yim, G. B., M. S. Thesis, Seoul National University, Korea (1986).
2. Rha, C. K., *International Biosymposium, Nagoya 88*, Nagoya, Japan (1988).
3. Shacter, E., *J. Immunol. Methods*, **99**, 259-270 (1987).
4. Sugama, K., Namba, Y., Hatanaka, M. and Hanaoka, M., *J. of Cell. Physiol.*, **131**, 23-28 (1987).
5. Shitani, Y., Iwamoto, K. and Kitano, K., *Appl. Microb. Biotechnol.*, **28**, 1466-1473 (1986).
6. Barns, D. and Sato, G., *Anal. Biochem.*, **102**, 155-170 (1980).
7. Velez, D., Reuveney, S., Miller, L. and Macmillan, J. D., *J. Immunol. Methods*, **86**, 45-52 (1986).
8. Dodge, T. C. and Hu, W. S., *Biotechnol. Lett.*, **8**, 683-686 (1986).
9. Croughan, M. S., Hamel, J. F. and Wang, D. I. C., *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 130-141 (1987).
10. Jeh, H. S., and Choi, C. Y., *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, *accepted for publication* (1992).