

Hybridoma 배양을 위한 무혈청 배지의 개발 제 1 부 : Key Component의 Screening

제 훈 성 · 최 차 용*
(주) 럭키 중앙연구소
*서울대학교 공과대학 공업화학과

Development of Serum-Free Media for Mouse-mouse *Hybridoma* Part I. Screening for Key Component

Hoon Sung Jeh and Cha Yong Choi*

Central Research Laboratory, Lucky Biotech Inc.

*Department of Chemical Technology, College of Engineering, Seoul National University

서 론

동물세포 배양에 있어서 가장 중요한 문제점들은 고농도 배양(4), 저혈청 배지 개발(1, 2), 배양기 개발 및 무혈청 배지 개발(4, 5) 등이 있을 수 있다.

혈청 배지는 그 자체의 높은 가격 뿐만 아니라 여러 가지 문제점을 갖고 있어서 동물세포 배양의 장애요인 대부분이 배지 내의 혈청 성분으로부터 발생된다. 동물세포 배양에서 효과적이고 널리 쓰여 온 것은 FCS(Fetal Calf Serum)인데 이는 소의 태아에서 채혈하여 혈청을 분리한 것으로 그 가격이 비싼 동시에 안정적인 공급에 문제가 있으며 각각의 stock에 따라 동일한 품질을 보장받을 수가 없다(9). 또한 mycoplasma나 virus 등에 오염되어 있을 경우에는 여과 공정으로 제거할 수 없을 뿐 아니라 오염 여부의 인지도 어려워 큰 문제가 될 수 있다. 또한 혈청내에는 세포에 대하여 독성을 나타내는 polyamine oxidase와 같은 inhibitory protein이 포함되어 있으며 이로 인하여 과량의 혈청 사용은 세포성장을 저해할 수도 있다. 분리 정제 공정에 있어서 혈청이 끼치는 악영향 또한 배지 가격 자체만 큼이나 문제가 되고 있다. 단백질 의약품의 제조에서 세포배양 비용과 거의 동일하거나 훨씬 더 많은

비용이 요구되는 과정이 분리 정제인데 이 분리 정제 비용을 낮추는 것 또한 매우 중요하다. 따라서 무혈청 배지 개발은 배지 비용의 절감, 분리 정제 과정의 단순화 및 비용 절감, 세포의 물리화학적 성질(예: 표면 부착성 등)의 조절, 비 생산속도의 조절 등 다양한 면에서 중요성을 띠고 있다.

본 논문에서는 앞서 보고한 연구내용에 이어서 위에 열거한 목적에 걸맞는 무혈청 배지의 개발에 관한 연구결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주

안질환과 비 임질성 성병을 유발하는 그람양성 병원균인 *Chlamydia trachomatis* L2 type에 대한 항체를 분비하는 hybridoma KA-112가 사용되었다. KA-112는 *Chlamydia trachomatis*를 생쥐에 면역하여 얻은 지라(spleen)의 임파세포와 mouse myeloma P3U1(다니구찌 박사, 일본 쥘바대학)을 본 연구실에서 세포융합하여 자체 제작하였다(3).

KA-112는 무한 회색법에 의해 클로닝된 5가지 클론 중 성장과 항체 생산이 가장 뛰어난 것으로 선택 사용되었다.

사용 배지

Hybridoma의 무혈청 배지 개발에 사용된 기준배지는 RPMI-1640 medium과 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM No. 240-6309 : GIBCO, NY, U.S.A.)이었으며 sodium bicarbonate(2.0 g/L)와 수용성 황산 가나마이신(0.3g/L : kanamycin, 동아제약, 서울)을 첨가한 후 0.22 μ m 47mm 필터로 2회 멸균 여과하여 사용하였다.

세포 배양

배지 개발시에는 소규모로 24 well tissue culture plate(NUNC, Denmark)를 사용하였으며 균주 유지와 장기 적응시험을 위하여 ϕ 60 및 ϕ 100 tissue culture dish(녹십자 의료공업, 서울)가 사용되었다. 부유배양에의 적합성 검토를 위해서는 250m ℓ 와 1 L spinner flask(Bellco, U.S.A.), 2L Celligen Bioreactor(New Brunswick Scientific Co., U.S.A.)가 사용되었다.

항체 역가의 분석

분비된 항체의 역가는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)법으로 측정되었다. Peroxidase-labelled goat anti-mouse Ig M(Kirkegaard and Perry Laboratories, U. S. A.)이 사용되었으며 항원은 *Chlamydia trachomatis*를 McCoy 세포를 숙주로 하여 배양한 다음 초원심 분리하여 사용하였다. 항원의 초원심 분리 농축액은 희석하여 micro-well plate에 분주, 건조하여 ELISA에 사용하였다.

첨가물의 검색

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

결과 및 고찰

Key component의 screening

이미 본 연구실에서 개발한 저혈청 배지(Low Serum Medium : LSM) (1, 2)로부터 나머지 혈청 요구량 1%를 다른 물질로 대체하여 무혈청 배지(Serum Free Medium : SFM)의 개발을 시도하였

Table 1. Difference in essential factors for growth of various hybridoma/myeloma

Components	Hybridoma(partner myeloma)		
	KA-112 (P3U1) this exp.	- (TEPC-1165) 1)	MPC11-BL (SP2/0) 2)
Basal Medium	DMEM	RPMI-1640	DMEM/F12
Transferrin		?	○○○
Insulin	○○○		○○○
BSA	○○○	○○○	
Ethanolamine			○○○
Pyruvate	○○	○	basal
Soybean lipid		○○○	
LDL		○○○	
Selenite		○○	○○
2-ME		○○○	
Gloutathione (reduced)		○○	

1) Shacter. E. (1987) J. Immunol. Methods 99, 259-270

2) Murakami, H. et. al. (1982) Cell Biology 79, 1158-1162

○: degree of essentiality for cell growth

?: included in final composition but untested its essentiality

basal: included in basal medium

Table 2. Composition of low serum medium

Basal medium	RPMI-1640 or DMEM	
Supplement	sodium pyruvate	110mg/L
	insulin	76 μ g/L
	pluronic F-68	0.1 G/L
	FBS	1% (v/v)

* Pluronic F-68 was added in order to reduce shear damage

다. 이미 보고된 무혈청 배지(10)들의 조성에 차이가 있으나 일반적으로 중요하다고 알려진 여러 첨가물들에 대하여 시험하였다(Fig. 1, 2). 무혈청 배지의 조성을 확립하기 위하여 우선, 이미 개발된 저혈청 배지의 조성(Table 2)에서 1% FBS를 제외한 다음, 추가로 포함시키고자 시험 대상에 선정된 성분들을 모두 합하여 제조한 배지를 control SFM으로 하였다. 즉, 저혈청 배지에서 혈청 1%를 시험 대상 물질들로 대체한 것이다. 수 일간(3~4일 이상)의 control SFM에서의 세포 배양 결과 세포 성장이 일어남을 관찰하였고 이에 따라 무혈청 배지의

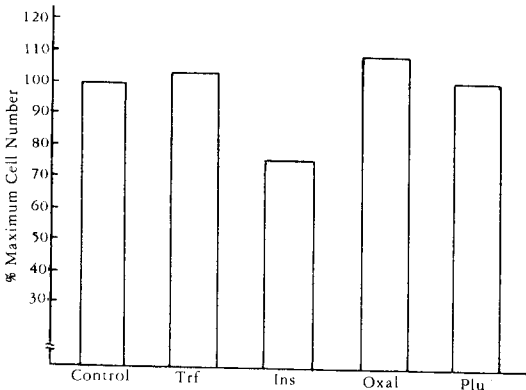


Fig. 1. Effect on cell growth of various components of the serum free medium(12). KA-112 cells were grown in each medium for three days and counted everyday. Maximum cell number was determined and compared with the control SFM. Control SFM includes all components. Abbreviations employed are as follows: Trf, transferrin; Ins, insulin; Oxal, oxaloacetate; Plu, pluronic F-68. The dependence of cell growth on the concentrations were also tested(12).

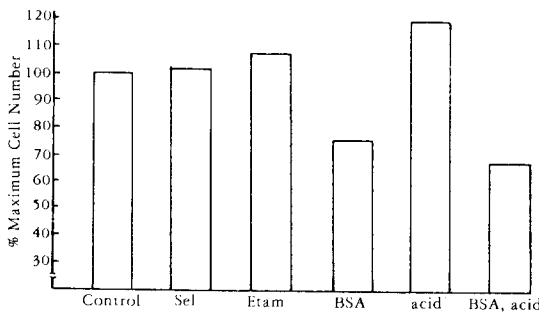


Fig. 2. Abbreviations are employed as follows: Sel, sodium selenite; Etam, ethanolamine; BSA, bovine serum albumin; Acid, linoleic acid in the case of suspension culture.

개발이 가능하다는 판단을 하였다. 첨가물질들 중 혈청을 대체할 수 있는 주요 성분을 가려내기 위해 control SFM에 포함되었던 시험 성분들 중에서 한 가지씩의 시험성분들을 제외시키고 세포를 배양하였다. 배양은 Ø 100 tissue culture dish에서 이루어졌

으며 사용된 hybridoma는 먼저 개발된 저혈청 배지에서 3~4개월간 계대배양하여 오던 것을 다음 3~4일간 control SFM에서 배양하여 사용하였다. 실험 결과 BSA가 LSM의 나머지 혈청 1%를 대체하는데 가장 중요한 인자임을 알았다. 그러나 본 실험의 결과는 dish에서 3~4일간 회분 배양한 결과이므로 long-term cultivation의 결과는 아니다. 따라서 BSA를 제외한 다른 component들의 장기 배양에 미치는 영향이 없다고 단정할 수 없으며 이는 계속 연구 검토되어야 할 것이다. 많은 보고에서 transferrin이 필요한 것으로 알려졌으나 본 실험에서는 적어도 short-term cultivation에서 transferrin이 KA-112 hybridoma의 배양에 필수적이지는 않은 것으로 밝혀졌다. 첨가물질들 중 transferrin이 가격이 비교적 고가이므로 무혈청 배지에 transferrin이 필요하지 않다면 이는 최소한 본 연구에서만은 바람직한 결과로 볼 수 있다. Transferrin은 세포에 필요한 철 성분을 수송하는 carrier protein인데 장기배양에 대한 transferrin의 필요성은 계속 확인되어야 할 것으로 생각된다.

저혈청 배지에서 필수적인 것으로 밝혀졌던 insulin은 무혈청 배지에도 필수적으로 첨가되어야 할 것으로 나타났다. 본 실험에서는 저혈청 배지의 insulin 의존도보다는 다소 낮게 나타났는데 이는 오랜 기간 동안 저혈청 배지에서 적응된 세포로 실험하였기 때문으로 추측된다. 그러나 insulin을 제외할 경우 세포의 상태가 매우 불량하였으므로 insulin은 KA-112 hybridoma에 매우 중요한 것으로 나타났다. 저혈청 배지에서 크게 중요하지 않았던 oxaloacetate와 pluronic F-68은 무혈청 배지에서도 비슷한 결과를 나타내었다.

Selenite는 세포가 redox potential을 적절히 유지하는 데에 매우 필요한 것으로 보고된 경우가 많다(6). Selenium이 glutathione peroxidase의 형성에 필수적이므로 selenium이 redox potential 유지에 중요한 기능을 한다고 보고되어 있다. 이를 검증하기 위하여 reduced glutathione(glutathione peroxidase의 substrate)과 selenium의 연관 관계를 관찰한 연구도 있었다(7).

즉, 세포의 성장에는 두 가지 중 한 가지만의 첨가로도 충분하나 두 가지를 모두 뺐을 때는 성장이 저해됨을 보고하였는데 본 실험에서는 이러한 selenium의 중요성은 발견되지 않았으며 사용된 기준배지(DMEM)에는 glutathione이 포함되어 있지 않았다. 그런데 앞선 보고의 glutathione이나 selenium

의 필수성은 본 실험에서 사용된 세포주 KA-112와는 특성이 매우 다른 hybridoma에서 발견되었다 (Table 1). 즉, β -ME의 필요성에서 매우 큰 차이를 보이는데 본 실험에서 사용된 KA-112 hybridoma는 β -ME를 전혀 필요로 하지 않을 뿐 아니라 도리어 약간의 inhibition을 받는 반면 Shacter(7)의 실험에서는 사용된 세포주가 β -ME에 의하여 가장 큰 영향을 받는 것이었다. β -ME 또한 reducing agent로 redox potential 유지에 중요한 것으로 알려져 있는 만큼 이 β -ME에의 의존도가 selenium 또는 glutathione에의 의존도와 상관성을 가지는 것으로 보인다. 세포성장예 redox potential이 영향을 미칠 것이라는 보고는 전에도 있어 왔는데 (6, 7) 이는 세포주에 따라 매우 다른 양상을 보일 수도 있음을 본 실험에서 관찰할 수 있었다. 그러므로 다른 세포주들에 본 실험에서 개발된 배지를 사용해 본 다음 이런 균주특이성 (cell line specificity)을 더 고찰해야 할 것으로 생각된다.

Ethanolamine은 Murakami 등에 의해 hybridoma 성장에의 필수성이 보고된 바가 있다(8). 즉, Proteose peptone을 사용하여 무혈청 배지의 제조가 가능함을 발견하고 complex hydrolysate의 일종인 proteose peptone을 paper chromatography로 분석, 그 역할이 ethanolamine과 phosphoethanolamine에 의한 것임을 밝혔다. 이러한 보고 후 ethanolamine이 무혈청 배지에 사용되는 경우가 많은데, 이 결과도 cell line에 따라 다를 수 있음이 본 실험에서 다시 한번 밝혀졌다.

Murakami의 실험에 사용한 hybridoma는 insulin, transferrin, ethanolamine에 강한 의존성을 보이고 selenite에는 약간의 의존성을 보였다. 본 실험에서 사용된 균주와 다른 점은 BSA나 acid의 첨가가 필요 없었던 점이다. 이는 Shacter의 실험에서 사용된 균주 (lipid에 큰 의존성을 보임)와도 매우 다른 점이다.

본 실험에서 사용된 균주는 BSA가 매우 큰 역할을 하는 것으로 보여졌다. 즉, 저혈청 배지와 무혈청 배지를 비교하여 볼 때, 1%의 혈청을 완전하지는 못하나 BSA로 어느 정도 대체가 가능함을 알 수 있었다. BSA는 lipid 또는 fatty acid의 수송에 관여한다고 알려져 있으며 혈청내에 가장 많이 포함되어 있는 단백질이다. 본 실험에서는 linoleic acid나 oleic acid만으로는 세포성장을 가져올 수 없었으며 BSA가 필수적인 것으로 나타났다. 이 결과로부터 KA-112 hybridoma는 BSA와 lipid의 수송문제에

가장 결정적인 영향을 받으며 이러한 관점에서 개선이 이루어질 수 있음을 알았다. 본 실험에서는 fatty acid류만 사용되었으나 Shacter 등의 실험에서와 같이 lipid류도 사용해 보아야 할 것이다. 최근의 보고에서는 lipid를 emulsion화 하여 BSA를 쓰지 않고 세포에 수송하려는 시도가 있었다(11). KA-112와 같은 균주에 특히 중요한 접근이 될 수가 있을 것으로 보인다.

이상과 같은 결과로부터 사용되는 균주에 따라 인자들의 영향이 매우 다양한 양상을 띠며 이에 대한 분류가 필요하다는 결론을 내렸다. 또한 무혈청 배지의 균주 특이성을 개선할 수 있는 방법도 이러한 인식으로부터 출발하여야 할 것이라고 판단되었다. 본 연구에서는 자체 제작한 하이브리도마를 모델 시스템으로 이용하여 무혈청 배지 개발의 다양성을 입증하였으며 보다 일반적인 무혈청 배지 개발을 위해서는 여러 가지 세포주들을 사용한 종합적인 연구가 장래에 수행되어야 할 것이다.

감 사

본 연구를 위해 연구비를 제공해 주신 한국 학술진흥재단 및 한국 과학재단에게 심심한 감사의 말씀을 드립니다.

참고 문헌

1. Jeh, H. S. and Choi, C. Y., *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **7**(2), 92-95(1992).
2. Jeh, H. S. and Choi, C. Y., *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **7**(2), 96-101(1992).
3. Yim, G. B., *MS Thesis, Seoul National University, Korea*(1986).
4. Park, S. J., *MS Thesis, Seoul National University, Korea*(1990).
5. Jeh, H. S., *MS Thesis, Seoul National University, Korea*(1989).
6. Stadtman, T. C., : Specific occurrence of selenium in enzymes and amino acid t-RNAs. *78th Annual Meeting of the American Society of Biological Chemist, Pennsylvania, June 9, 1987.*
7. Shacter, E. Serum-free medium for growth factor dependent and independent plasmacytomas and hybridomas. *J. Immunol. Methods*,

- 99, 259-270(1987).
8. Murakami, H., Masui, H., Sato, G., Sueoka, N., Chow, T. P., and Sueka, T. K.: Growth of hybridoma cells in serum free medium: ethanolamine is an essential component, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 1158-1162 (1982).
 9. Freshney, R.L.: *Animal cell culture: a practical approach*, IRL press, N. Y.(1986).
 10. Catalioto, R. M., Negrel, R., Gaillnard, D., and Ailhaud, G.: Growth promoting activity in serum free medium of Kallikreinlike arginylesteropeptidases from rat submaxillary gland, *Journal of Cellular Physiology*, **130**, 352-360(1987).
 11. Maiorella, B., Inlow, D., Shanger, A. and Harano, D.(1989) *Bio/Tech*.
 12. Jeh, H. S. and Choi, C. Y.: Development of Serum-Free Medium for Mouse-mouse Hybridoma: Part II. Hybridoma Culture using Developed Serum Free Media, *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, submitted for publication.