

하이브리도마 세포증식과 단일클론항체 생산에 미치는 혈청 종류의 영향

전복환·박송용·조의철·정경환·*김동일·문홍모
목암생명공학연구소
*인하대학교 생물공학과

Effect of Serum Type on Hybridoma Growth and Monoclonal Antibody Production

Chun Bok-Hwan, Song-Yong Park, Eui-Cheol Jo, Kyung-Hwan Jung,
*Dong-Il Kim and Hong-Mo Moon

Mogam Biotechnology Research Institute
Yongin-Kun, Kyonggi-Do, 449-910, Korea
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT

We have studied the effects of serum concentration and initial cell density on hybridoma cell growth and monoclonal antibody (MAb) production at various media supplemented with different types of serum. The types of serum were fetal bovine sera, newborn bovine calf sera, calf sera including supplemented calf sera, horse serum, and goat serum. The concentrations of each serum were 0.5, 1.25, 2.5, and 5% (v/v) and the inoculum densities were 5×10^4 , 1×10^5 , and 2×10^5 cells/ml. The hybridoma cell growth and anti-Hepatitis B surface antigen (anti-HBsAg) MAb production were found to be enhanced by increasing the serum concentration and by increasing inoculum density regardless of serum type. We found that test sera purchased from different companies show different effects on cell growth and MAb production, although they are the same type of serum.

서론

세포배양 생산 시스템에서 세포배양 배지의 조성은 상호 연관되어 있는 여러 가지 인자에 의해 달려 있어서 세포 증식과 생산에 크게 영향을 미치므로 목적에 맞는 세포배양 시스템에 최적인 조건을 개발하여야 한다. 이들 중 가장 중요한 인자는 세포주의 성장을 지지하는 혈청이다. 혈청은 동물세포 배양을 이용한 단일클론항체, 인터페론, 인터루킨, 백신, 성장인자, TPA (Tissue Plasminogen Activator)와

같은 고부가가치의 의약품 물질들의 생산을 위하여 거의 필수적으로 사용되고 있다. 호르몬, 성장인자, 부착성 인자, 영양소, carrier 단백질, 기타 미량원소들의 복잡한 혼합물인 혈청은 세포의 생존과 증식에 적합한 환경을 조성하는데 기여하는 매우 다양한 역할을 가지고 있다(1, 2). 그러나 높은 가격과 제한된 공급, 각 생산분마다의 조성의 변화, 완전하게 밝혀지지 않은 성분, 바이러스, 마이코플라스마, 미생물 등에 의한 감염 위험성, 성장과 대사의 저해물질 함유 등의 혈청의 문제점으로 인하여, 배지 중 혈

청의 농도를 줄이거나 혈청 대체물로 대체하기 위한 폭넓은 연구들이 진행되고 있다(2-5). 특히, 대량 배양에서는 이러한 문제점들이 좀 더 극명하게 대두 되므로, 효과적이고 값싼 혈청 대체물이 개발될 때까지 혈청은 생산물의 생산 비용을 줄이기 위하여 효율적으로 이용되어야 할 것이다. 혈청은 엄격하게 제한된 환경에서 여러 공정을 거쳐 제조되고 무균 조건에서 포장된다. 이렇게 제조된 혈청은 다시 완벽한 검사를 거치고 사용자들에게 공급되게 된다. 그러나 여러 종류의 혈청은 각 제조사마다 특별한 방법으로 생산되며, 같은 종류의 혈청이라도 원재료의 성분이나 제조사의 생산공정에 따라서 그 품질에 차이가 있게 되므로 일정한 성분을 가진 혈청을 일정하게 사용하는 것이 세포 배양에서 가장 중요한 요소가 되며, 대량배양을 고려할 경우에는 더욱 중요하다(6). 공여동물군(donor herd)의 원료 혈청은 사용자에게 가장 높은 질의 혈청을 공급한다. 공여동물군은 일정한 질의 혈청을 공급하기 위하여 일반적으로 알려진 일정한 혈청성분을 유지하도록 고안되어진 제한된 사료를 먹이며, 또한 동물들을 사육하기전 검역하고, 바이러스 감염 여부를 광범위하게 시험한 후 사육하여 채혈하는 doner calf 혈청도 생산되고 있다. 혈청의 종류는 다양하므로 세포 배양에 맞는 혈청의 선택은 쉬운 일이 아니다. 혈청 사용자들은 혈청을 선택하기 전 각 제조사에서 분석한 혈청의 분석 내용을 필히 검토하여 사용 목적에의 적합 여부를 결정해야 한다. 분석 내용 중 특별히 endotoxin과 헤모글로빈 농도 및 바이러스에 대한 부정시험 유무가 중요하며, 또한 혈청 제조회사에서 특별한 목적을 위하여 제조된 혈청인지를 확인해야 한다. 현재까지 세포배양에서 사용되고 있는 혈청은 주로 fetal calf 또는 calf에서 채취한 혈청이다. 혈청내에 존재하는 동물세포의 배양을 저해하는 생체방어 요소들의 양이 동물의 나이와 더불어 증가하므로 가급적 어린 동물에서 채취한 혈청이 세포배양에 유리한 것으로 알려져 왔다. 이런 이유로 fetal calf에서 채취한 Fetal Bovine Serum (FBS)이 가장 많이 사용되는 표준혈청이지만, 태어난 지 수주일 안에 송아지에서 채취한 calf serum에 비하여 3배 정도 가격이 높기 때문에 newborn calf serum이나 calf serum, 또는 미량 원소나 기타 세포 성장 촉진요소를 첨가한 supplemented calf serum의 사용도 배양 비용의 절감면에서 고려되어지고 있다. 그러나 배양하려는 세포와 바이러스의 종류에 따라서는 다른 동물에서 분리한 혈청을 사용해서도 배양이 가능

한 경우도 있다(7).

본 연구에서는 하이브리도마 세포 증식과 단일클론항체 생산에 미치는 혈청 종류의 영향을 조사하기 위하여 세포배양에 일반적으로 사용되거나 사용 가능하다고 알려진 혈청인 fetal bovine serum, newborn bovine calf serum, calf serum (supplemented serum 포함), horse serum, goat serum 등의 20가지의 혈청을 비교하였다. 모델 시스템으로 하이브리도마 2c3.1세포를 이용하여 각 혈청이 첨가된 배양 배지에서 혈청 농도와 초기 세포농도를 변화시켜 세포의 증식 특성과 단일클론 항체 생산에서의 차이를 비교하여 하이브리도마 세포 배양에 최적인 혈청을 선택하고 각각의 농도 및 세포의 초기 접종 농도의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

배지와 혈청

하이브리도마 2c3.1 세포의 증식을 위하여 RPMI1640배지 (Gibco, U. S. A.)를 사용하였고, 실험에 사용된 혈청의 종류와 제조사는 Table 1에 정리하였다.

세포주

본 실험에 사용한 하이브리도마 세포주는 mouse 유래의 하이브리도마 2c3.1 세포이다. 이 세포주는 본 연구소에서 정제한 사람의 간염 표면항원 (HBsAg)으로 면역시킨 BALB/c mouse의 비장세포에 CRL 1580 myeloma 세포 (P3-X63-Ag8.653)를 융합시켜 클론하였다. 이 2c3.1 세포는 간염표면항원에 대한 단일클론항체(subtype, IgG₁)를 생산한다. 이 세포는 5% CO₂가 유지되는 CO₂ 배양기(Napco, U. S. A.)에서 5%(v/v) 농도의 bovine calf serum, defined/supplemented(sBCS)를 첨가한 RPMI 1640 배지에서 40rpm의 속도로 spinner flask에서 현탁배양하였으며, 배양온도는 37°C 이었다. 낮은 rpm의 정확한 유지를 위해서는 Cellgro™ stirrer(Thermolyne, U. S. A.)를 사용하였다. 본 실험에 사용한 하이브리도마 2c3.1 세포를 안정하게 유지 배양하기 위하여 seed-lot system을 사용하였다.

세포배양

하이브리도마 2c3.1 세포를 5%(v/v) sBCS으로 첨가된 RPMI 1640배지에 5×10^4 cells/ml의 초기

Table 1. Serum types and producer used in this experiment.

Serum type* (Abbreviation)	Producer
Fetal Bovine Serum	
Fetal Bovine Serum, defined(FBSh)	Hyclone, U. S. A.
Fetal Bovine Serum(FBSf)	Flow Laboratories, Australia
Fetal Bovine Serum, certified(FBSg)	Gibco, U. S. A.
Fetal Bovine Serum(FBSs)	Sigma, U. S. A.
Fetal Calf Serum(sIFCS)	Sera-Lab, England
Fetal Calf Serum(ssbFCS)	Salmond Smith Biolab, New Zealand
Fetal Calf Serum(biFCS)	Biological Industries, Israel
Newborn Bovine Calf Serum	
Newborn Bovine Calf Serum(NBCS)	Central Biomedica, Inc., U. S. A.
Newborn Calf Serum(NCSma)	M. A. Bioproducts, U. S. A.
Newborn Calf Serum iron supplemented(NCSis)	Biological Industries, Israel
Bovine Calf Serum	
Calf Serum(CS)	Gibco, New Zealand
Bovine Calf Serum, defined/supplemented(sBCS)	Hyclone, U. S. A.
Calf Serum, supplemented(CSs)	Gibco, U. S. A.
Calf Supreme(Cs)	Gibco, U. S. A.
Alpha Calf Serum(aCS)	Hyclone, U. S. A.
Horse Serum	
Horse Serum heat inactivated(HS)	Sigma, U. S. A.
Goat Serum	
Goat Serum(GS)	Gibco, Australia

접종농도로 spinner flask(Belco, U. S. A.)에 현탁 배양한 후 대수증식기가 끝나기 바로 전에 1500rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 수확한다. 이 세포를 혈청을 첨가하지 않은 RPMI 1640배지로 2회 세척한 후 Table 1에 정리한 혈청을 각 5% 포함한 배지로 spinner flask에서 24시간 동안 40rpm의 배양속도로 현탁배양하였다. 각각의 혈청을 함유한 배양으로부터 채수확된 세포를 여러 가지 농도의 각 혈청이 포함된 배지로 1회 세척한 후 각 배양에 맞는 혈청농도와 초기 세포농도로 세포를 100ml 배지를 함유한 250ml spinner flasks에 접종하고, 37°C CO₂ 배양기에서 40rpm으로 현탁배양하였다. 배지의 pH는 멸균된 0.5N sodium hydroxide 용액으로 배양 동안 7.0~7.2 사이로 유지하였다.

하이브리도마 2c3.1 생존 세포의 농도는 trypan blue exclusion 방법에 의하여 측정하였다. 배양액의 glucose 농도는 Industrial analyzer(YSI model 27, Yellow Springs, U. S. A.)를 이용하여 분석하였다. Lactate 농도는 340nm에서 lactate dehydroge-

nase를 이용한 UV방법으로 정량하였다(8).

항체의 ELISA 분석

하이브리도마 2c3.1 세포배양 배지에서의 간염표면항원에 대한 단일클론항체(anti-HBsAg Mab)의 양은 효소-표지 면역흡착분석(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) 방법에 의하여 결정하였다. Affinity 방법으로 정제된 표준 anti-HBs를 1% bovine serum albumin(BSA)을 포함하는 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)으로 희석하여 4.5-300ml.U./ml의 표준용액을 준비하였다. 이 표준용액과 1% BSA용액으로 희석된 배양액의 상등액을 96well plate(Nunc, Denmark)의 polystyrene strip에 100 μ l씩 넣어 두 시간 동안 방치한 후 strips를 0.1% PBST (phosphate buffered saline tween 20)로 세 번 세척하고, 혈청으로 희석된 100ng의 HBsAg-HRP conjugate를 첨가하여 37°C에서 한 시간 동안 방치하고 0.1% PBST로 다섯 번 세척하였다. Chromogenic peroxidase substrate 용액을 상온에서 100 μ l의 정지액을 가하여 각 well에서 발색된 정도를 405nm에서 plate reader (EAR 300, SLT Lab., Austria)로 측정하였다. 생산된 항체의 정량을 위해 사용한 표준 anti-HBs는 하이브리도마 2c3.1 세포의 대량배양으로부터 정제하여 얻은 것이며, 한 시료에 대한 정량분석은 세 가지의 희석배율로 두 번씩 반복 실험한 후 평균하여 시행하였다.

결과 및 고찰

혈청의 농도가 세포 증식에 미치는 영향

하이브리도마 세포의 배양배지에서 혈청농도에 따라 세포 증식에 미치는 혈청 종류의 세포 증식 지지 특성을 비교하여 혈청농도를 줄이기 위한 가능성을 조사하기 위하여, 하이브리도마 2c3.1 세포를 각각의 혈청농도가 첨가된 RPMI 1640배지에 1×10^5 cells/ml의 일정한 초기 세포농도로 접종하여 spinner flask에서 현탁배양하였다. Table 1에 정리된 여러가지 혈청들을 0.5%, 1.25%, 2.5%, 5%(v/v)의 농도로 배지에 첨가하여 사용하였으며, 각각의 혈청 농도에서 혈청 종류에 따른 2c3.1 세포 성장을 비교하였다.

혈청 농도가 0.5%(v/v)인 경우에 FBSf와 sIFCS를 제외한 다른 혈청에서는 세포 성장이 크게 저하되어 2회 미만의 증식을 하였고, 특히 생체 방

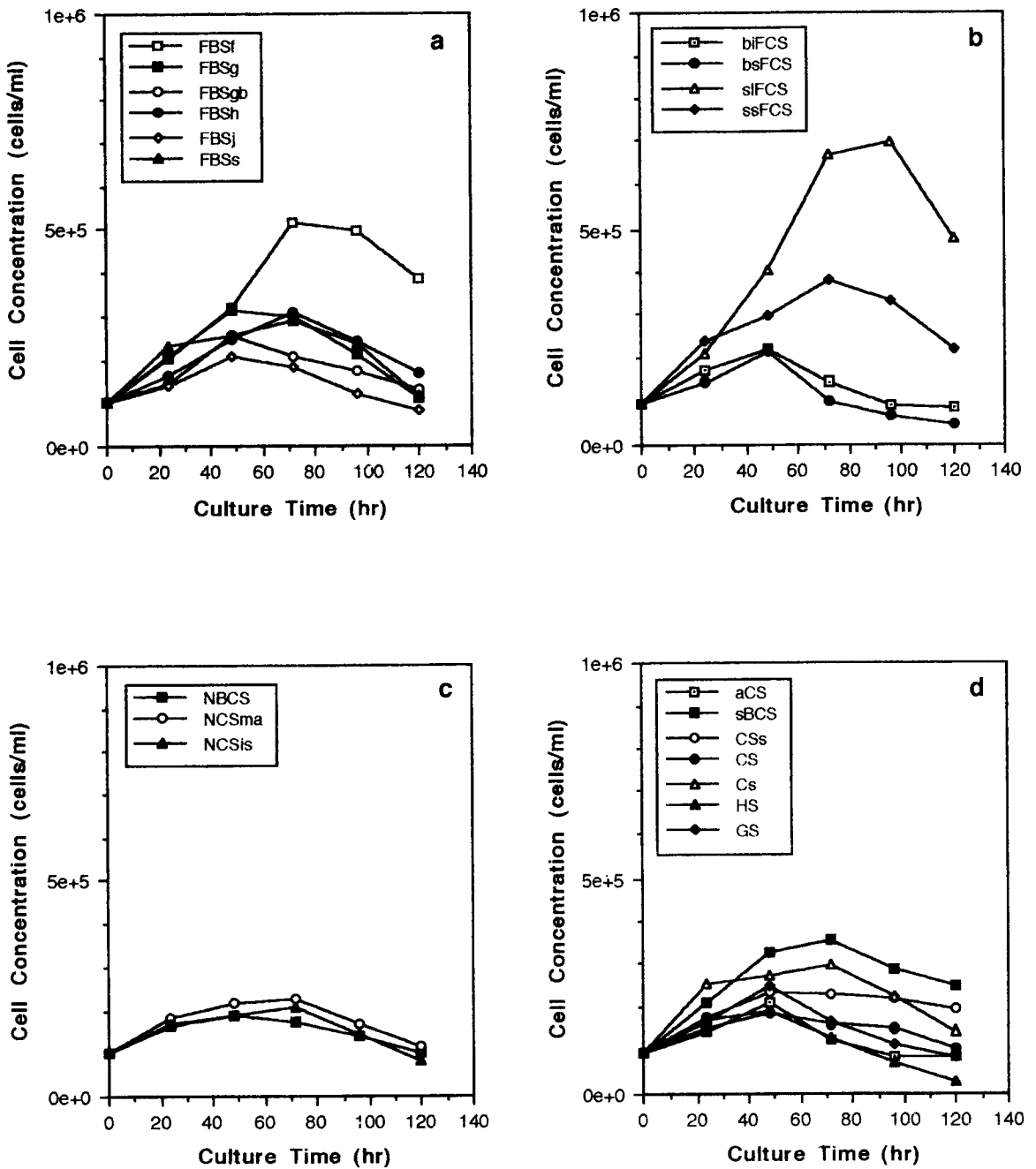


Fig. 1. Growth of hybridoma 2c3.1 cells in RPMI 1640 medium supplemented with 0.5% (v/v) serum: a), b) fetal bovine sera; c) newborn bovine calf sera; d) calf sera, horse serum and goat serum. The inoculum density was 1×10^5 cells/ml.

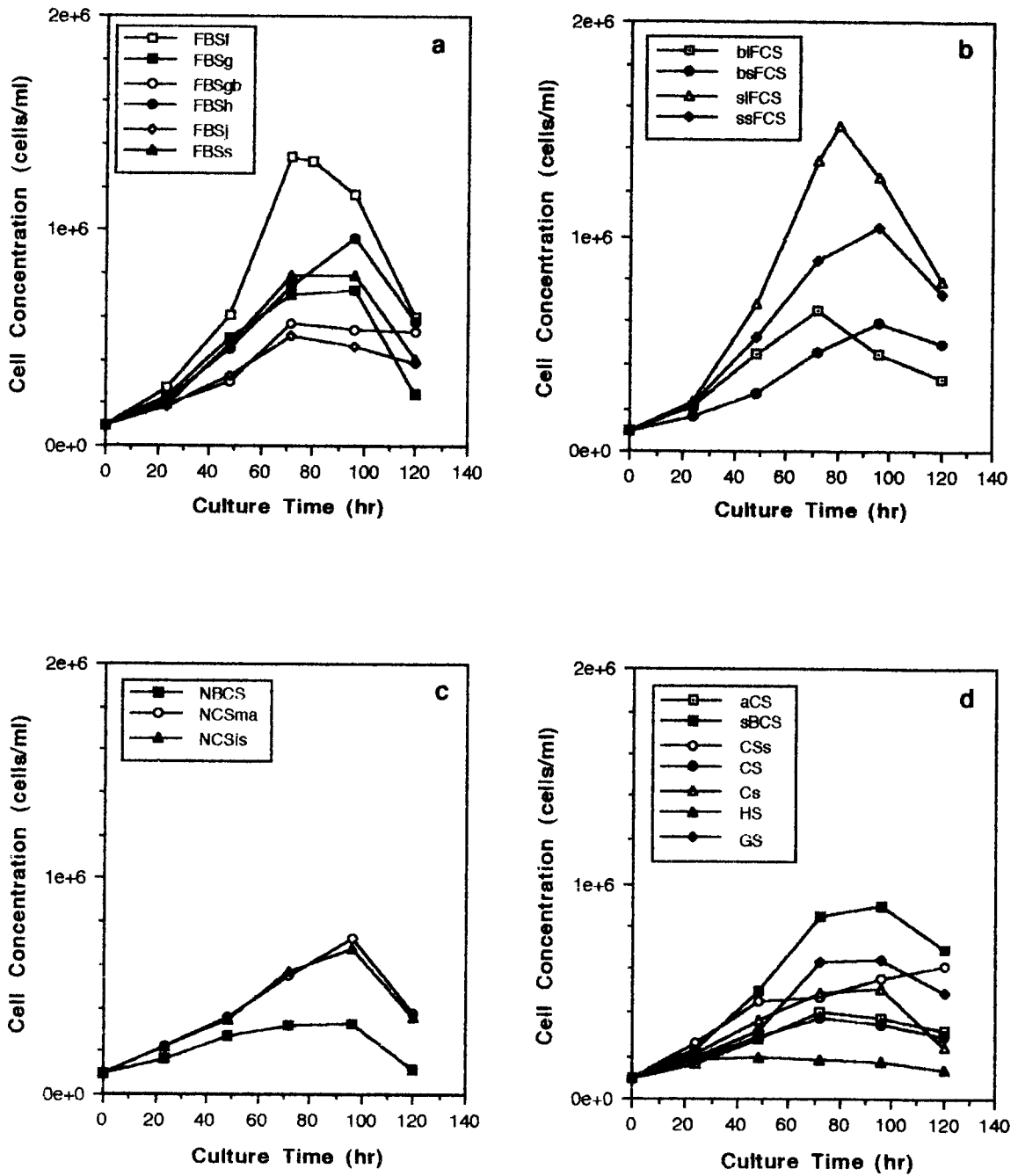


Fig. 2. Growth of hybridoma 2c3. 1 cells in RPMI 1640 medium supplemented with 1.25%(v/v) serum: a), b) fetal bovine sera; c) newborn bovine calf sera; d) calf sera, horse serum and goat serum. The inoculum density was 1×10^5 cells/ml.

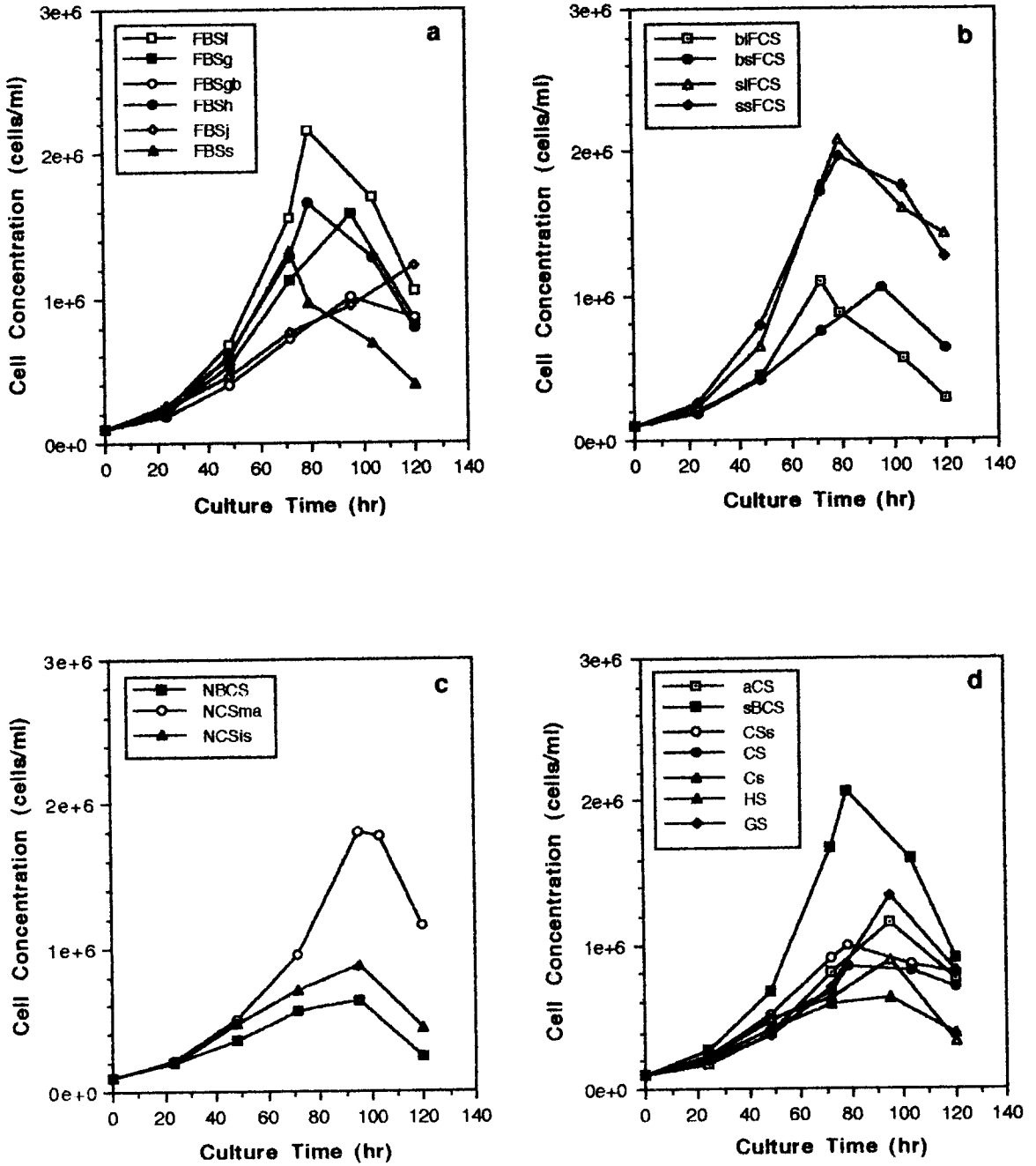


Fig. 3. Growth of hybridoma 2c3. 1 cells in RPMI 1640 medium supplemented with 2.5%(v/v) serum: a), b) fetal bovine sera; c) newborn bovine calf sera; d) calf sera, horse serum and goat serum. The inoculum density was 1×10^5 cells/ml.

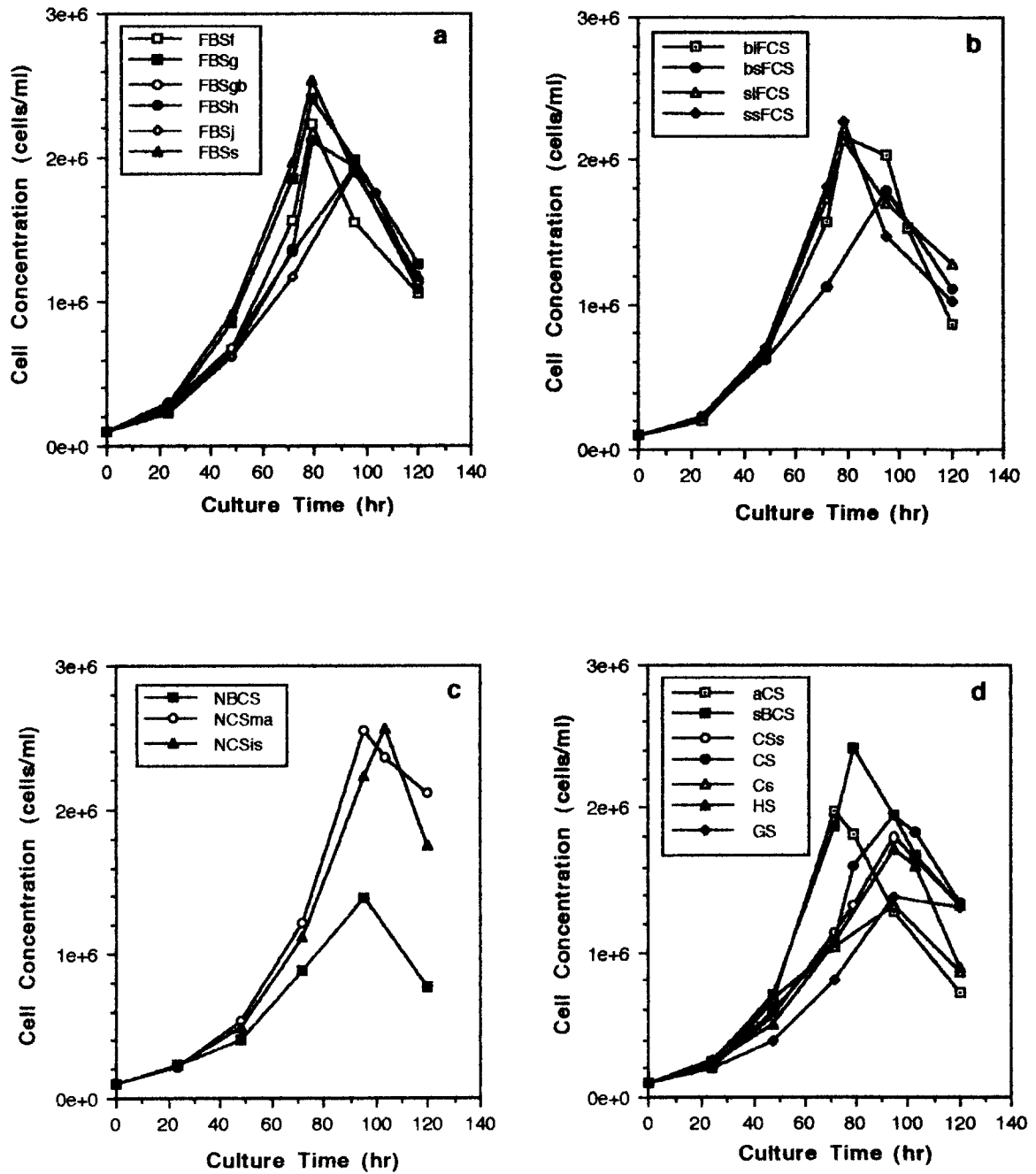


Fig. 4. Growth of hybridoma 2c3. 1 cells in RPMI 1640 medium supplemented with 5.0%(v/v) serum : a), b) fetal bovine sera; c) newborn bovine calf sera; d) calf sera, horse serum and goat serum. The inoculum density was 1×10^5 cells/ml.

어요소들이 calf serum에 비하여 적은 newborn calf serum을 사용한 배지에서의 2c3.1 세포성장이 오히려 calf serum들에 비하여 낮았다(Fig. 1). 따라서 0.5% 농도의 혈청 사용은 혈청 종류에 관계없이 하이브리도마 2c3.1 세포성장을 지지할 수 없음을 보였다.

혈청 농도를 1.25%, 2.5%, 5%로 증가함에 따라 세포성장도 증가하는 현상을 보여주었다(Fig. 2, 3, 4). Fetal bovine serum 중 FBSf와 sIFCS 혈청은 낮은 농도(0.5%, 1.25%)로 첨가된 배지에서도 다른 혈청에 비하여 높은 세포성장을 보였고, 이 농도에서 sIFCS 혈청이 최대세포농도가 각각 6.87×10^5 cells/ml과 1.51×10^6 cells/ml의 가장 높은 세포성장을 보였다. 또한 이 두 농도에서 염소 혈청(GS)은 말 혈청(HS)에 비하여 높은 세포성장을 보였다.

2.5% (v/v) 농도의 혈청을 사용한 배양에서도 FBSf와 sIFCS가 다른 혈청이 첨가된 배양보다도 높은 세포성장을 보였다(Fig. 3). 철(iron) 이온이 첨가된 sBCS에서의 세포성장도 FBSf 혈청을 제외한 다른 fetal calf serum보다도 높은 세포성장 특성을 보였으며, 이 농도를 첨가한 배양에서도 말 혈청(HS)이 가장 낮은 세포성장을 보였다(Fig. 3). 이 2.5%의 혈청을 첨가한 배양에서는 같은 종류의 혈청임에도 불구하고 2배 이상의 세포성장의 차이는 혈청 성분의 차이에 기인되었다고 할 수 있다.

가장 높은 5% 농도의 혈청을 사용한 배양에서는 세포성장이 모든 혈청에서 전형적인 세포 증식 곡선을 나타내었고(Fig. 4), 최대세포농도도 spinner flask를 이용하여 2c3.1 세포를 회분 배양하여 얻을 수 있는 최대가능치에 접근되었다(9). Newborn bovine calf serum류는 fetal calf serum류에 비하여 배지에 첨가될 때 낮은 세포성장비를 보였으나, 5% 농도를 사용한 배지에서는 NCSma와 NCSis 혈청이 fetal calf serum을 포함한 다른 혈청들에 비하여 가장 높은 세포성장($2.55 \sim 2.56 \times 10^6$ cells/ml)을 지지하였다.

최대세포증식속도와 최대세포농도는 혈청 종류에 무관하게 혈청농도가 증가함에 따라 증가함을 보여주었다(Fig. 5). 세포성장은 5% 농도의 혈청을 사용하였을 때 가장 좋은 결과를 보였고, 이 혈청농도 이하에서는 혈청 종류에 무관하게 세포성장이 크게 낮아지고, 0.5% 혈청을 사용하였을 때는 세포가 거의 성장하지 못함을 보여주었다. 단, 2.5% 농도의 혈청을 첨가한 배양의 경우에 있어서는 FBSf, sIFCS, ssFCS, sBCS 등의 혈청들은 5% 농도를

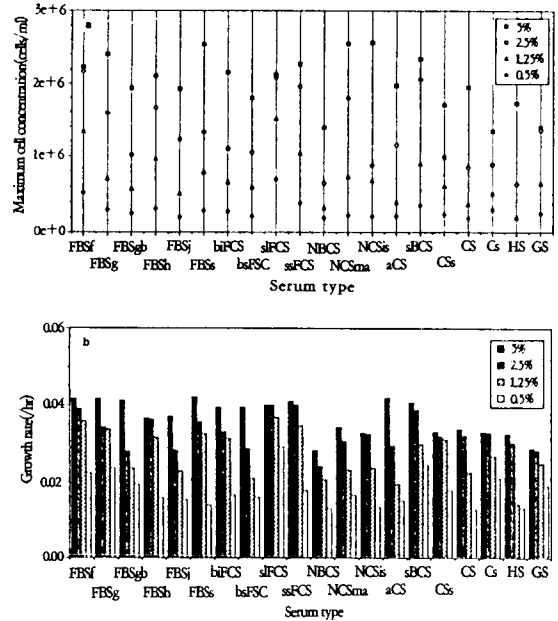


Fig. 5. Comparison of maximum cell concentration and specific growth rate in RPMI 1640 media supplemented with different concentrations of serum at various serum types.

사용한 배지에서의 2c3.1 세포의 최대 세포성장과 비슷한 결과를 보여, 이들 혈청을 사용할 때 혈청 농도를 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

2c3.1 세포는 같은 혈청 형태에서도 다른 성장 특성을 보여주고 있으며, 이런 현상은 같은 종류의 혈청이라도 혈청의 제조원에 따라 세포 성장을 지지하는데 다른 특성을 보여주는 것이다. 이것은 이미 혈청의 특성으로 알려진 혈청 성분의 각 생산회분 마다의 차이로 인한 세포 성장에 미치는 효과중의 하나라고 할 수 있다. 호르몬과 성장인자 등의 농도가 혈청의 생산회분마다 10배 정도 변하며, 이런 변동은 동물의 사료같은 요소에 의해 영향을 받는다는 보고도 있다(10, 11).

결국 혈청제조사의 혈청 조성 및 그 농도에 다소의 차이가 있음을 시사하는 것이며, 혈청 사용자들은 혈청 분석자료를 이용하여 분석한 후 각자의 실험 목적에 맞는 세포 성장과 생산물에 미치는 영향을 비교하여 사용하여야 할 것이다. 특히 대량배양

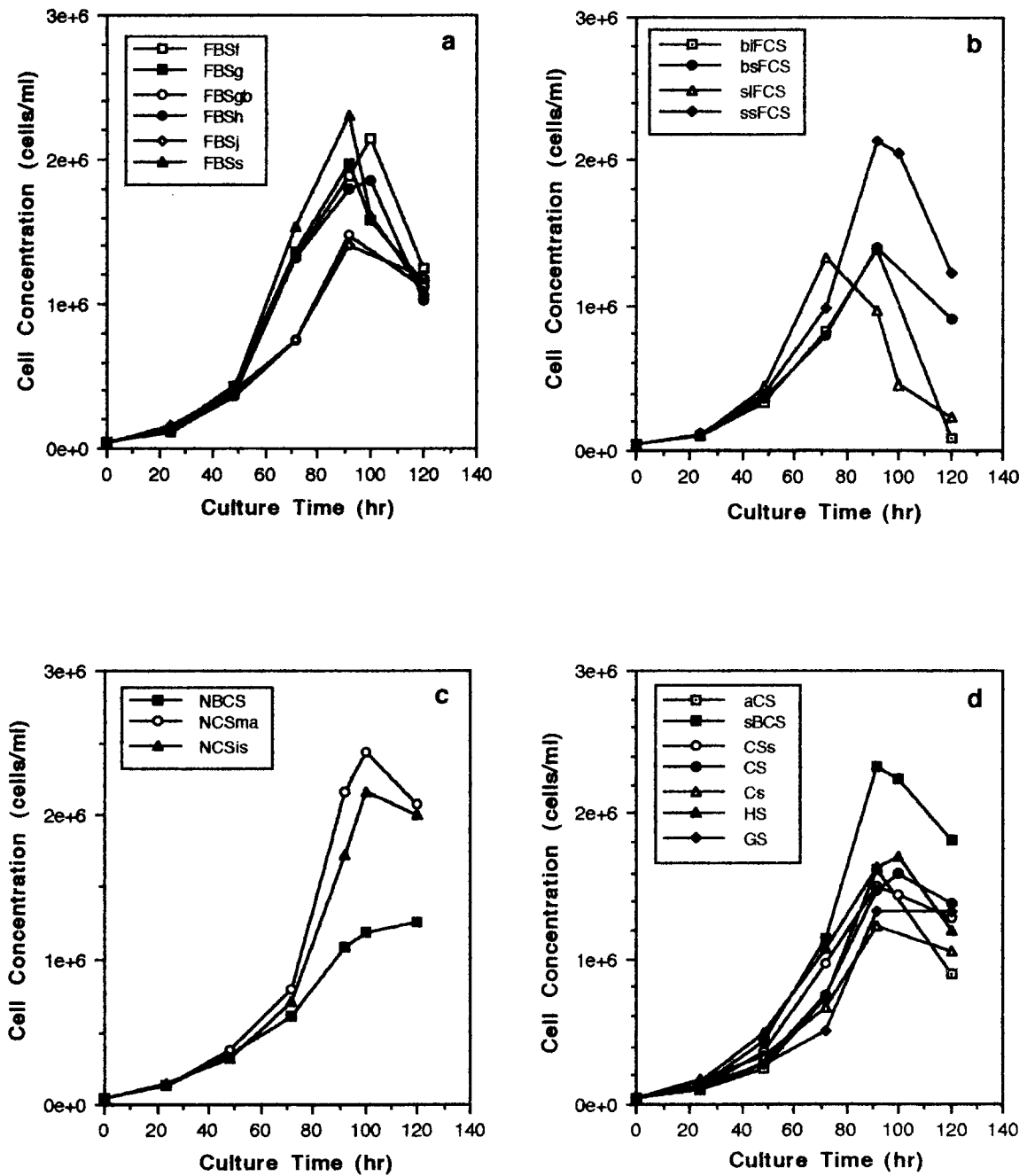


Fig. 6. Growth of hybridoma 2c3.1 cells in RPMI 1640 medium supplemented with 5.0%(v/v) serum at inoculum density of 5×10^4 cells/ml: a), b) fetal bovine sera; c) newborn bovine calf sera; d) calf sera, horse serum and goat serum.

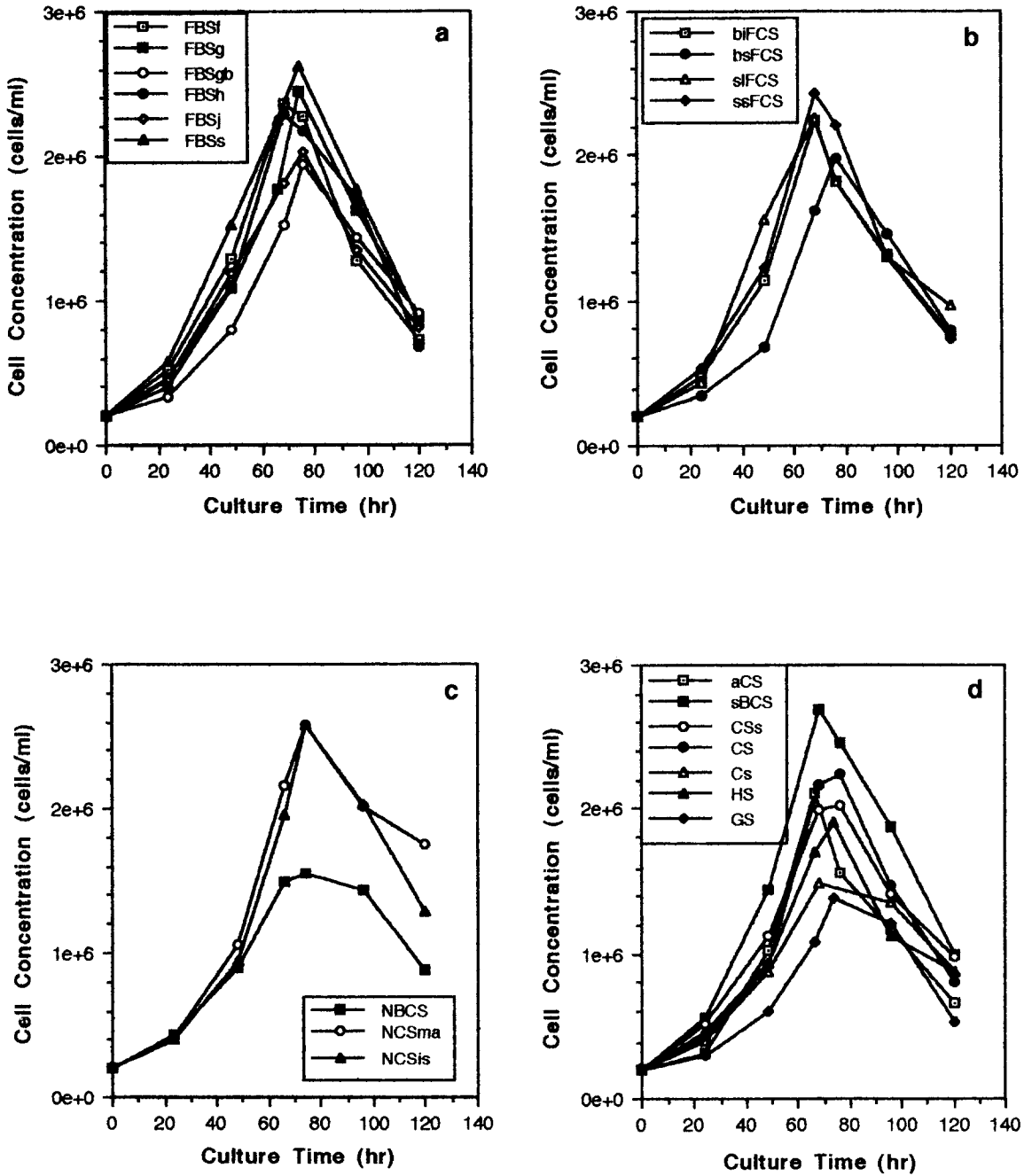


Fig. 7. Growth of hybridoma 2c3. 1 cells in RPMI 1640 medium supplemented with 5.0%(v/v) serum at inoculum density of 2×10^6 cells/ml: a), b) fetal bovine sera; c) newborn bovine calf sera; d) calf sera, horse serum and goat serum.

으로 세포배양 규모를 확장하였을 경우에 이는 더욱 중요하며 필히 수행해야 할 시험이다.

연구 목적에 부합하는 결과를 얻기 위해서는 같은 혈청이라도 각 생산회분의 차이뿐만 아니라 혈청 제조사별로 혈청 생산의 원산지와 원료에 따라서도 차이가 있음을 주지할 필요가 있으며, 이런 이유로 혈청의 선택은 세포증식이나 생산물의 양에 매우 중요한 영향을 미치는 세포배양에 있어서 가장 중요한 요소 중의 하나라고 할 수 있다.

접종농도가 세포 성장에 미치는 효과

하이브리도마 2c3.1 세포를 5% (v/v)의 각 종류의 혈청이 첨가된 RPMI 1640배지 100ml를 포함한 spinner flask에 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^6 cells/ml의 접종농도로 배양하여 세포의 성장을 비교하였다 (Fig. 4, 6, 7). 세포는 초기 세포농도에 관계없이 5% 농도의 각 혈청을 사용한 배양에서 lag phase없이 대수 증가적으로 성장함을 보였다. 세포의 접종농도가 증가함에 따라서 최대세포증식에 도달되는 시간이 비례적으로 빨라졌으며, 최대세포농도도 초기 접종농도의 증가에 비례하여 증가되었다 (Fig. 8). 이것은 5% (v/v) 농도의 혈청을 사용한 배지에서 혈청의 종류에 관계없이 초기 세포농도와 세포 성장속도가 밀접한 관련이 있으며, 이 혈청농도가 세포 성장에 충분한 지지 역할을 하고 있음을 알 수 있다. sBCS의 혈청이 첨가된 배양은 접종농도와 무관하게 FBSs와 NCSma 혈청들과 비슷한 높은 세포 증식을 보였으며, 2×10^6 cells/ml의 접종농도에서는 사용된 다른 혈청에 비하여 가장 높은 세포농도 (2.69×10^6 cells/ml)를 얻었다. 이것은 동일한 혈청이라도 초기 세포농도에 따라서 세포 증식에 차이를 보임을 의미하는 것이며, 2×10^5 cells/ml의 초기 세포농도를 사용하였을 경우에는 sBCS의 혈청이 2c3.1 세포의 증식에 가장 유리하다. 같은 종류의 혈청에서도 세포의 성장속도와 최대세포농도는 차이를 나타냈으며, 이것은 혈청 성분에서의 차이에 기인된다고 할 수 있다. NBCS 혈청을 제외한 모든 혈청에서 접종농도가 증가할수록 같은 종류의 혈청은 비슷한 성장곡선을 보였으며, 이것은 접종농도가 증가할수록 세포 증식이 증가되어 세포성장의 혈청에 대한 의존도가 줄어들게 되어 같은 종류의 혈청에서의 세포증식 곡선은 비슷한 결과를 보였다. 이것은 일정 농도의 혈청을 사용했을 때 세포의 혈청 의존도가 초기 세포농도의 증가로 감소되어지는 것을 의미한다.

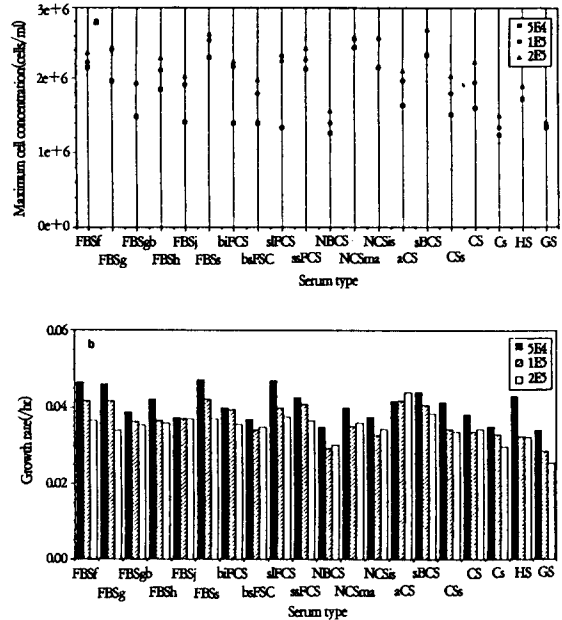


Fig. 8. Comparison of maximum cell concentration and specific growth rate in RPMI 1640 media supplemented with various serum at different inoculum densities. The concentration of each serum was 5.0% (v/v).

세포 대사의 비교

혈청 농도의 감소와 초기 세포농도의 감소는 세포 배양 배지의 원래의 glucose 농도 (2g/l)에 대한 glucose 소비 농도의 비율 (%) 감소를 가져왔다 (Fig. 9). Glucose 소비 비율을 혈청 종류에 따라 평균적으로 보면 fetal calf, newborn bovine calf, calf serum 순으로 다소 감소하는 경향을 보였으나, 세포성장에서 차이를 보인 것과 마찬가지로 같은 혈청에서도 혈청에 따른 glucose 이용 비율은 차이를 보였다. Horse serum은 사용된 혈청 중 가장 높은 비율로 glucose를 이용하였다. 결론적으로 하이브리도마 2c3.1 세포에 의하여 세포 성장의 주요 에너지 원인 glucose의 이용은 동일 혈청에서는 초기 세포농도와 혈청 농도의 증가에 따라서 비례하여 증가함을 보였으나, horse serum을 제외하고는 혈청 종류에 따른 특이한 glucose 이용 형태는 보이지 않았다. 이것은 세포 증식과 glucose 이용에 관련이 있음을 의미하는 것이다.

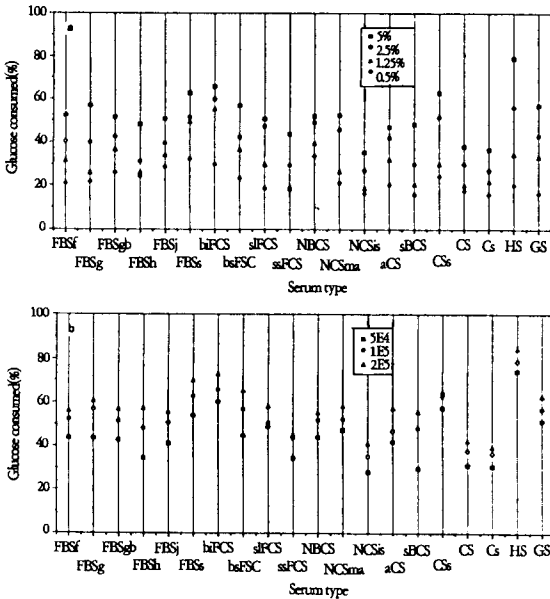


Fig. 9. Comparison of glucose consumption in RPMI 1640 media supplemented with various serum at different concentrations of serum and inoculum density.

Glucose 이용에 따라 부산물인 lactic acid는 glucose 이용 비율이 높을수록 비례하여 높은 농도(%)로 생산되어짐을 보였다(Fig. 10). 단, horse serum을 사용한 배양에서는 lactic acid는 다른 혈청을 사용한 배양에 비하여 glucose 이용 비율이 높은 것에 무관하게 오히려 적은 양이 소모되었다. 이런 현상에 대한 정확한 이유를 알 수 없으나, horse serum 성분상의 특성과 이런 혈청에 적응되지 못한 세포의 세포대사에서의 변화에 기인되었다고 가정할 수 있다.

항체 생산의 비교

여러 종류의 혈청을 사용하여 혈청농도와 초기 세포 농도를 변화시킨 하이브리도마 2c3.1 세포의 배양에서 생산된 항체를 비교하였다(Fig. 11). 하이브리도마 2c3.1에 의한 배양에서 간염표면항원에 대한 단일클론항체의 생산은 세포 증식기 중 정지기와 사멸기를 포함하여 전체적으로 일정한 비율로 항체를 분비함을 보고하였다(12, 13). 혈청농도를 변화시켰을 경우에 있어서 동일 혈청에서는 혈청농도를 증가함에 따라 항체 생산이 증가됨을 보였

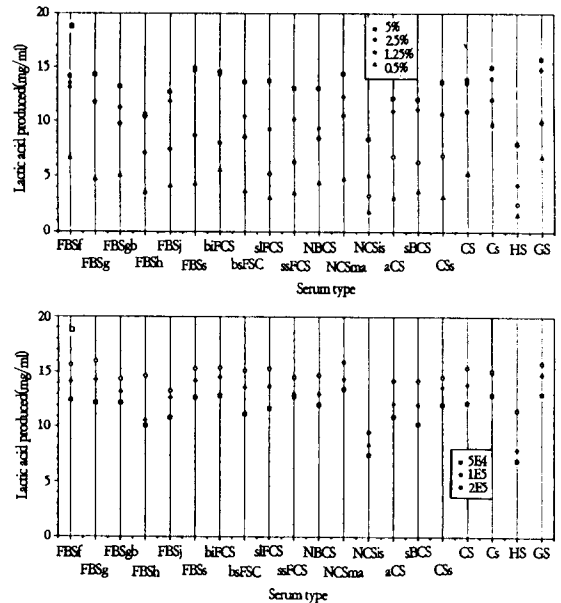


Fig. 10. Comparison of lactic acid production in RPMI 1640 media supplemented with various serum at different concentrations of serum and inoculum density.

다. 이것은 세포 성장이 증가함에 따라 비례하여 항체 생산이 증가됨을 의미하며, 이런 현상은 혈청의 종류와 무관하였다. 혈청 종류에 따른 항체 생산은 fetal bovine serum을 사용하였을 때가 newborn bovine calf serum이나 calf serum을 사용하였을 때보다 다소 높았다. 최대세포농도와 항체 생산과의 정비례의 관계는 혈청농도를 일정하게 하고 초기 세포농도를 변화시킨 경우에서도 같은 결과를 보였다. 즉, 동일 혈청을 사용한 배양에서 초기 세포농도를 증가함에 따라 항체 생산이 증가하였으며, 각 배양 사이의 항체 생산의 차이는 초기 세포농도의 변화비율과 비례하지 않았다. 각 종류의 혈청을 사용하여 혈청농도의 변화와 초기세포농도의 변화로 세포를 현탁배양하여 얻어진 혈청농도는 Fig. 11에 나타난 것과 같다. 동일 혈청에서는 혈청농도의 증가와 초기 세포농도의 증가에 비례하여 항체 생산이 증가됨을 보였으나, 같은 조건에서 얻어진 최대세포농도와 혈청 종류와는 비례하지 않았다. 낮은 농도의 혈청에서도 fetal bovine serum들은 다른 종류의 혈청에 비하여 세포 성장이나 항체 생산에 있어서도 다

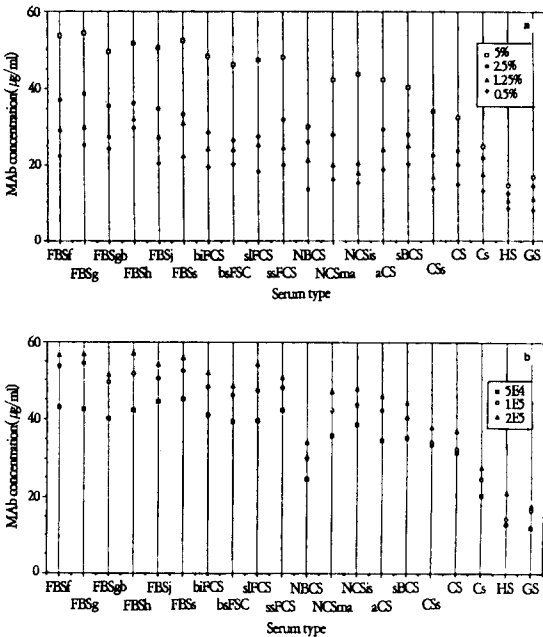


Fig. 11. Comparison of anti-HBsAg MAb production of 2c3. 1 cells at various cultures supplemented with various serum at different concentrations of serum and inoculum density.

소 높았으나, 낮은 농도의 fetal bovine serum이 첨가된 배지를 이용하여 하이브리도마 2c3.1 세포로부터 간염 표면 항원에 대한 단일클론항체 생산에서의 생산 비용을 줄이는 것은 다른 혈청에 비하여 비싼 가격으로 인하여 부적절하다.

요 약

혈청의 종류에 따른 하이브리도마 2c3.1 세포의 성장과 간염 표면 항원에 대한 단일클론항체 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 혈청은 fetal bovine sera, newborn bovine calf sera, including supplemented calf sera, horse serum, goat serum의 종류를 사용하였다. 혈청농도를 0.5%, 1.25%, 2.5%, 5%(v/v)로 변화시키고, 초기 세포농도를 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^6 cells/ml로 변화하여 현탁배양한 후 각각의 배지에서 하이브리도마 세포성장률과 생산된 단일클론항체의 최대값을 비교하였다. 초기 세포농

도를 1×10^6 cells/ml로 일정하게 유지하였을 때 세포성장률은 혈청의 종류에 관계없이 혈청농도의 증가와 밀접한 관련이 있었고, 혈청농도의 증가에 따른 세포성장률 증가로 인하여 항체 생산도 또한 증가되었다. 5%의 혈청농도에서 세포성장률과 항체 생산은 초기 세포농도의 증가함에 따라 증가하였다. 같은 종류의 혈청이라도 혈청 제조사에 따라 세포성장률과 항체 생산에 따른 영향을 끼침을 알았다. 이들 결과로부터 하이브리도마 세포성장률과 항체 생산을 증가시키고 세포배양 비용을 줄일 수 있는 혈청의 종류와 농도를 결정하였다.

참고 문헌

1. R. G. Ham(1981), In; C. Waymouth et al., (Ed.), *The Growth Requirements of Vertebrate Cells in Vitro*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 106.
2. J. B. Griffiths(1987), *Develop. Biol. Standard.*, **66**, 155.
3. L. van der Pol, G. Zijlstra, M. Thalen and J. Tramper(1990), *Bioprocess Engineering*, **5**, 241.
4. S. Renneny, D. Velez, J. D. Macmillan and L. Miller(1986), *J. Immunol. Methods*, **86**, 53.
5. V-J. Schneider(1989), *J. Immunol. Methods*, **116**, 65.
6. Sigma Chem. Co.(1991), *The Sources*, **7**(2).
7. S. A. Sarti, A. K. Gupta and K. Banerjee (1991), *Virus Information Exchange Newsletter* **8**, 162.
8. Sigma Chem. Co.(1984), Sigma Diagnostics, *Lactate Procedure No. 826-UV*.
9. 전복환, 조의철, 김동일, 백승복(1990), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 175.
10. P. J. Price and E. A. Gregory(1982), *In Vitro*, **18**, 576.
11. Hyclone Laboratories, Inc.(1986), *Art to Science in Tissue Culture*, **5**(1), March.
12. 전복환, 조의철, 김동일, 백승복(1990), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **4**, 271.
13. 전복환, 조의철, 김동일, 백승복(1990), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 87.