

곤충세포 배지 개발을 위한 체액산화지연 돌연변이 누에계통 선발

최지영 · 김종길 · 최영철 · 윤형주 · 안미영 · 김삼은 · 황석조
농촌진흥청 농업과학기술원 농업생물부

Selection of Mutant Silkworm with Oxidation-deficient Haemolymph for Insect Cell Culture

Ji-young Choi, Jong-gill Kim, Young-cheol Choi, Hyung-joo Yoon, Mi-young Ahn, Sam-eun Kim and Seok-jo Hwang

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, R.D.A. Suwon 441-853, Republic of Korea

ABSTRACT

Insect cell culture system has been demonstrated the effective means of producing medical and agricultural products. Furthermore, Fetal bovine serum (FBS) is in wide use in insect cell culture. Silkworm hemolymph was tested to develop as a substitute for FBS and was effective in insect cell growth. Hemolymph is oxidized and darkens visibly during the collection from silkworms due to the activity of tyrosinase in it. Toxic quinones are produced by the oxidation and consequently inhibit the cell growth. Heat treatment can be used to prevent the oxidation; however, the oxidation may occur during the collection of hemolymph before it is heat-treated. Hemolymphs collected from 257 different strains of silkworms were examined to select the slowly oxidized hemolymphs. Hemolymphs collected from mutant strains such as Y₄, TBO and wE^b showed relatively slow color changes. Oxidation rates of the hemolymphs were measured by the absorbance change using a spectrophotometer. The absorbance of mutant hemolymph reached the saturation value at 20°C in each 330 min (Y₄), 360 min (TBO) and 450 min (wE^b) min, whereas the total oxidation time of the wild-type (Baekokjam) hemolymph at the same temperature was 120 min. The cell growth in the medium supplemented with mutant species hemolymph was more effective than in the medium supplemented with Baekokjam species hemolymph.

Key word : *Bombyx mori*, Hemolymph, Silkworm

서 론

오늘날 급속한 발전을 보이며 널리 이용되고 있는 세포 배양은 생체의 일부인 세포를 체외로 분리시켜 배양기 내에서 생육시키는 기술이다. 세포배양은 생명현상을 나타내는 실체의 최소단위인 세포를 단순한 시스템 내에서 취급할 수 있기 때문에 세포가 영위하는 물질대사, 세포 간 상호작용, 증식, 분화, 노화, 암화 등 각종 생명현상을 해명하는 중요한 수단이자 방법이다. 또한, 유기 화학적 합성이 곤란하거나 생체 내에서 미량으로 생합성 되는 각종 호르몬 등 유용물질을 효율적으로 생산할 수 있는 시스템으로도 유망하다(Doerfler and Bohm, 1986; Agathos *et al.*, 1990; Tramper *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1992). 동물세포 배양을 위하여 일반적으로 소태아혈청(Fetal Bovine

Serum, FBS)가 첨가 배지로 많이 사용되어져 왔다(Ham and Mckeehan, 1979). 그러나 FBS는 상당히 고가이고 때로 품질이 일정하지 않아 재현성이 낮고, mycoplasma에 의해 오염될 위험이 높으며, 높은 농도의 단백질을 함유하고 있어 분리공정을 어렵게 하는 등의 문제점을 갖고 있다(Zang *et al.*, 1992). 이와 같은 이유로 인해 동물 세포배양을 위한 무혈청배지 개발연구가 수행되기도 했으나(Maiorella *et al.*, 1988) 아직도 FBS가 첨가된 배지가 보편적으로 이용되고 있다.

한편, 누에는 약 2000년 전부터 사육되어져 온 부피가 큰 곤충으로 체액 얻기가 용이하고, 누에 체액은 FBS에 비하여 그 화학적 조성이 단순하고 잘 알려져 있어 세포가 생산하는 유용물질의 분리, 정제면에서 유리할 뿐 아니라 경제적으로도 값싼 혈청을 얻을 수 있는 장점을 가

*Corresponding author. E-mail: choijy@rda.go.kr

지고 있다. 누에 체액은 공기 중의 산소와 접하게 되면 멜라닌 색소가 형성되어 흑화하는데, 이 산화과정 중에 생성되는 도파퀴논(dopaquinone)은 세포의 성장을 저해한다고 알려져 있다(Mitsuhashi, 1982). 체액의 산화를 방지하기 위해서는 일반적으로 열처리에 의해서 효소를 불활성화 시키는 방법이 이용되고 있으나 대량 채혈 시에는 열처리 이전에 이미 산화가 진행되는 문제점이 있다.

이에 본 연구에서는 누에로부터 대량 채혈시 체액산화 발생의 문제점을 해결하기 위하여 누에 중 체액 산화 지연 계통을 선발하는데 그 목적을 두고 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시누에 품종

본 실험에서는 백옥잠(잠123 × 잠124), TBO, Y₄, 백안E^b 과잉지를 사용하였고, 사육은 농촌진흥청 농업과학기술원의 누에육종잡실에서 표준사육관리법에 준하였다(농촌진흥청, 2000).

2. Cell line 및 배지

본 실험에 사용된 세포주는 IPLB-SF-21 AEII에서 유래한 Sf-9로서, 거염벌레(*Spodoptera frugiperda*: fall armyworm) 번데기의 난소조직에서 수립된 세포주이다(Summer and Smith, 1987). 세포배양 배지는 Grace's Insect Medium (Gibco) 분말을 증류수에 46.3 g/l로 녹여서 사용하였다. Sodium bicarbonate(NaHCO₃, Sigma)를 0.35 g/l 녹여서 buffer 작용을 하게 하였으며, 1N Sodium hydroxide(NaOH, Sigma)를 사용하여 pH를 6.2로 맞춘 후 0.2 μm millipore filter(녹십자)로 여과하여 멸균한 후 antibiotic-antimycotic (Gibco)을 첨가하여 사용하였다.

3. 세포의 배양 및 세포수의 계수

세포는 10% FBS가 첨가된 Grace 곤충세포배양액으로 25°C 항온기내에서 25 cm² culture flask(Falcon)를 사용하여 배양 및 유지하였다. 세포는 mid-exponential phase로 성장하는 세포를 새로운 culture flask에 1 × 10⁵ cell/ml의 밀도를 넣어 배양하여 3-4일 간격으로 세포수를 세어 세포성장을 측정하였다. 세포수는 haemocytometer를 사용하여 도립현미경(Inverted microscope)으로 관찰하여 결정하였다. 생존율은 0.4% trypan blue solution을 배지와 10 : 1로 섞어서 염색된 세포는 죽은 세포로, 그렇지 않은 세포는 살아 있는 세포로 구분하였다.

4. 소량 채혈법

5령 5일째 누에 배발에 상처를 내어 얼음 위에서 냉각

된 튜브에 체액을 채취하고, 60°C, 45분 열처리한 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심하여 상층액을 취하고 0.2 μm milipore filter로 여과하였다.

5. 대량 채혈법

5령 5일째 누에를 동결시킨 후 해부하여 중장을 제거한 뒤 원심하여 그 상층액을 체액으로 채취하는 방법과 누에 머리부분, 꼬리부분 그리고 배발에 상처를 낸 후 원심하여 체액을 채취하는 방법으로 하였다. 채취한 체액은 60°C, 45분 열처리한 후, 4°C에서 12,000rpm으로 30분간 원심하여 상층액을 취하고 0.2 μm milipore filter로 여과하였다.

6. 체액산화지연계통 선발

누에유전자원 275계통을 대상으로 누에체액을 채취하여 1 ml 씩 튜브에 넣어 경과시간별로 산화정도(변색)를 육안으로 확인하여 선발하였다. 육안 검사에서 변색정도가 느린 3품종을 선발한 후, 각각의 체액을 spectrophotometer를 이용하여 정량적으로 분석하였다. 선발된 3계통으로부터 채혈한 체액을 20°C water-bath 내의 96well plate에 150 μl씩 분주하고 일정한 시간간격을 두고 sampling해서 spectrophotometer의 visible range인 400, 500, 600, 700 nm에서 O. D. 측정하였고, 더 이상 O. D. 값이 변하지 않는 시점을 각각의 품종에서 산화반응이 완료된 시간으로 간주하였다.

결과 및 고찰

1. 품종별 체액산화 지연속도 측정

동물세포 배양의 필수첨가물인 FBS를 대체할 수 있는 세포증식 효과가 소규모 채취한 누에체액에서 확인되었으나(최 등, 1997), 누에의 배발에 상처를 내어 채취하는 방법으로 대량 채취가 어렵다. 이에, 다량의 누에를 마쇄하여 원심한 후 그 상층액을 체액으로 이용하는 대규모 채혈법을 검토하게 되었다. 누에전체를 마쇄하여 채취한 대규모 채취체액의 세포증식 효과는 소규모 채취한 체액보다 그 효과가 떨어졌는데, 그 원인은 채혈과정 중 산소접촉으로 인한 체액 산화 발생으로 추정된다. 누에 체액은 공기 중의 산소와 접하게 되면 멜라닌 색소가 형성되어 흑화하는데 이 산화과정 중에 생성되는 도파퀴논(dopaquinone)은 세포의 성장을 저해한다고 알려져 있다(Mitsuhashi, 1982). 체액의 산화를 방지하기 위해서는 일반적으로 열처리에 의해서 효소를 불활성화 시키는 방법이 이용되고 있으나 대량 채혈 시에는 열처리 이전에 이미 산화가 진행되는 문제점이 있다. 이에 본 연구에서는 누에 중 체액이 더디게 산화되는 체액산화지연 돌연변이 계통을 선발하기 위

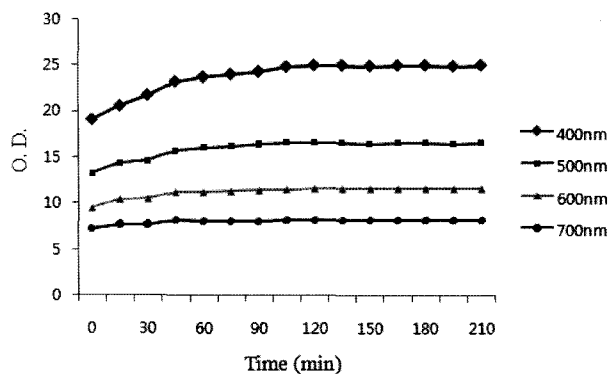


Fig. 1. Absorbance change of silkworm hemolymph in a visible range (Baekokjam).

해서 농촌진흥청 농업과학기술원 보존계통 총 275 계통을 대상으로 누에체액을 채취하여 경과시간별로 산화정도(변색)를 육안으로 확인하여 TBO, Y₄, 백안E^b과잉지 3 품종을 선발하였다. 육안검사에서 변색정도가 느린 3품종에 대해 각각의 체액을 spectrophotometer를 이용하여 산화반응속도를 측정하였다. 체액이 공기 중에 노출되어 산화반응이 일어나면 체액의 색깔이 검게 변하는데, 이 색깔의 변화를 spectrophotometer로 측정하여 변색속도를 관찰하였다. 체액의 색깔변화를 가장 잘 나타내는 파장을 찾기 위하여 백옥잠 체액을 공기 중에 노출시켜 시간에 따라 변하는 체액의 색깔변화를 400 nm, 500 nm, 600 nm, 700 nm에서 O. D.값을 측정하였다(Fig. 1). 가시광선 범위 안에서 O. D.값은 증가하였는데, 이는 계속해서 산화반응이 일어나고 있음을 나타내며, 120분 정도 지나면서 더 이상 O. D.값이 증가되지 않았는데 이는 산화반응이 완료되었음을 나타낸다. 가장 큰 O. D.변화를 보이는 400 nm에서 각 품종별 체액의 색깔변화에 따른 산화속도를 측정해 보았다.

2. 체액산화지연품종 선발

Fig. 2는 백옥잠 체액과 각각의 산화지연 누에체액의 산화속도를 400nm에서 측정한 O. D.값의 변화를 나타낸다. P는 산화가 전혀 일어나지 않는 0시간에서의 O. D.값을 0으로 보았을 때, 산화반응이 완료되었을 때의 O. D.값이고 P는 O. D.값이다. 체액의 산화가 완료되는 시간은 백옥잠은 120분인데 비하여 Y₄는 330분, TBO는 360분 그리고 백안E^b과잉지는 450분으로 이었다. 선발된 3품종 모두 산화가 느리게 일어나는 품종이었으며 대규모 채혈시 소요되는 시간이 대략 60-120분 정도이기 때문에 이 시간에 산화가 더디게 일어나는 품종이 유리하다. 또한 한번에 많은 양의 체액을 얻기 위해서는 유충의 크기도 중요하다. 이러한 점들을 고려해 볼 때 산화지연 누에계통으로 대규모 채혈시에는 Y₄ 계통이 가장 적합한 것으로 확인되었다.

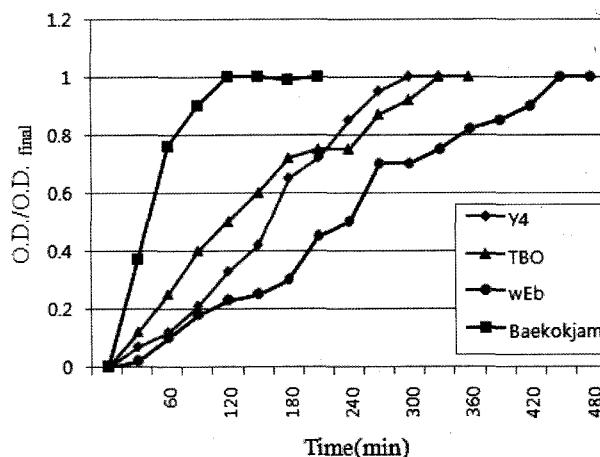


Fig. 2. Oxidation rate of hemolymph.

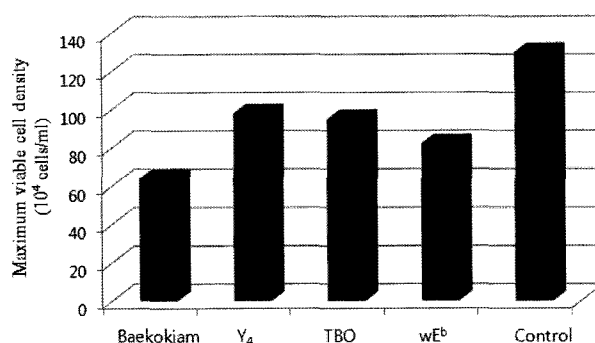


Fig. 3. Cell growth in the medium supplemented with hemolymph collected by large-scale bleeding method from oxidation-deficient mutant. Large-scale bleeding method: Hemolymph is collected by homogenizing after starving for 1 day from 5th instar 5th day larva. Control (Small-scale bleeding method): Hemolymph is collected by dropping after cutting of the abdominal legs of silkworm.

3. 선발된 누에 품종의 체액을 이용한 곤충세포 증식 효과

산화지연 누에계통의 체액을 대규모 채혈법으로 채취하여 곤충세포 증식에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 3). 그 결과 대규모 채혈한 체액산화지연 계통의 체액은 야성형 계통(백옥잠)에서 소규모 채취한 체액에는 미치지 못하였으나 대규모 채취한 체액보다는 우수하였다. 이는 누에체액 대량생산에 있어서 산화지연 누에계통을 이용 가능성을 시사해 주는 결과이다.

적 요

누에 체액은 공기 중의 산소와 접하게 되면 도파퀸one(dopaquinone)이라는 세포 성장을 저해하는 물질을 생성하게 된다. 체액의 산화를 방지하기 위해서는 일반적으로

열처리에 의해서 효소를 불활성화 시키는 방법이 이용되고 있으나 대량 채혈 시에는 열처리 이전에 이미 산화가 진행되는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 누에 중 체액 산화가 더디게 진행되는 누에 계통을 선발하게 되었다. 누에체액을 채취하여 경과시간별로 산화정도(변색)를 육안으로 확인하여 TBO, Y₄, 백안E^b과잉지 3품종을 선발하고 spectrophotometer를 이용하여 산화반응 속도를 측정하였다. 백옥잠 채액과 각각의 산화지연 누에 체액의 산화속도를 400 nm에서 측정한 결과 백옥잠은 120 분인데 비하여 체액산화 지연계통인 Y₄는 330분, TBO는 360분 그리고 백안E^b과잉지는 450분에 산화가 완료되었다. 산화지연 누에계통의 체액의 곤충세포 증식에 미치는 영향을 조사한 결과 대규모 채혈한 체액산화지연 계통의 체액은 야성형 계통(백옥잠)에서 소규모 채취한 체액에는 미치지 못하였으나 대규모 채취한 체액보다는 우수하였다.

인용문헌

- Agathos, S. N., Jeong, Y. H. and Venkat K. (1990) Growth Kinetics of Free and Immobilized Insect Cell Cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **589**: 372~398.
- 최지영, 김삼은, 김종길, 한명세 (1997) 곤충세포 배양을 위한 누에 체액의 이용. *작물보호논문집.* **39**(2): 76~80.
- Doerfler, W. and Bohm, P. (1986) The molecular biology of baculoviruses, *Current topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 131, Springer-Verlag, Berlin.
- Ham, R. G. and Mckeehan, W. L. (1979) Mathematical Descriptions of Hybridoma Culture Kionetics: The Relationship between Thiol Chemistry and the Degradation of Serum Activity, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**: 440~450.
- Maiorella, B., Inlow, D., Shauger, A. and Harano, D. (1988) Large-scale insect cell culture for recombinant protein production. *Biotechnology* **6**: 1406~1410.
- Mitsuhashi, J. (1982) Media for insect cell cultures, *Advances in cell culture*, Maramorosch, K. ed., Academic Press, N. Y., Vol. **1**: 281~295.
- 농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부 (2000) 잠업시험연구사업 편람.
- Summer, M. D. and Smith, G. E. (1987) A manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. *Tex. Agri. Exp. Stn. Bull.*, **1555**: 1~56.
- Tramper, J., End, E. J., Gooijer, C. D., Kompier, R., Lier, F. L. J., Usmany, M. and Vlask, J. M. (1990) Production of Baculovirus in a Continuous Insect-Cell Culture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **589**: 423~430.
- Zhang, J., Kalogerakis, N. and Behie L. A. (1992) Investigation of Reduced Serum and Serum-Free Media for Cultivation of Insect Cells (Bm5) and Production of Baculovirus (BmNPV). *Biotechnol. Bioeng.*, **40**: 1165-1172.