

## 두 가지 곤충 세포주에 대한 배양 및 바이러스 증식을 위한 최적 FBS 농도 결정

이재경 · 구현나 · 우수동\*

충북대학교 농업생명환경대학 응용생명환경학부

### Determination of the Optimal Concentration of Fetal Bovine Serum for the Growth of Two Insect Cell and Viruses

Jae-Kyung Lee, Hyun-Na Koo and Soo-Dong Woo\*

School of Applied Life Science & Environment, College of Agriculture Life & Environment Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**ABSTRACT** : To determine the optimal concentration of fetal bovine serum (FBS) on the growth of insect cells and the multiplicity of viruses, the growth of cells (Sf21 and Bm5) and viruses were examined on the various concentrations of FBS. In view of the viability, growth speed, proliferation of cells and the amount of FBS, the most proper concentration for the cell culture were 7% and 5% for Sf21 and Bm5, respectively. The multiplicity of viruses at the various concentrations of FBS was similar in both cell lines at 5 days post-infection (p.i.). However, it differed significantly at 2 and 3 days p.i. The proper concentration of FBS were 10% and 3% for Sf21 at 2 and 3 days p.i., respectively, and 5% for Bm5 at both 2 and 3 days p. i. These results suggested that the optimal concentration of FBS should be determined according to the used cell lines and viruses for their optimum production.

**KEY WORDS** : Insect cell, Nucleopolyhedrovirus, Fetal bovine serum, Cell growth, Virus multiplicity

**초 록** : 곤충 세포주 Sf21과 Bm5 세포주에 대해 세포 배양과 바이러스의 증식을 위한 최적 FBS의 농도를 결정하기 위하여 다양한 FBS 농도에서 세포 및 바이러스의 증식 곡선을 비교하였다. 세포의 생존율, 증식속도, 증식량 그리고 FBS 함량을 모두 고려할 때 Sf21에 대해서는 7%, Bm5에 대해서는 5% FBS가 최적 농도로 결정되었다. 바이러스의 증식은 감염 후 5일째에 두 세포주 모두 모든 FBS 농도에서 유사한 증식량을 보였으나, 감염 후 2일과 3일에 있어서는 Sf21은 각각 10%와 3%가 Bm5에 대해서는 양일 모두 5% FBS 농도에서 가장 증식량이 높았다. 이러한 결과는 목적에 따라 세포 및 바이러스 증식을 위한 적정 FBS 농도의 결정이 필요함을 제시하는 것이다.

**검색어** : 곤충 세포주, 핵다각체병 바이러스, FBS, 세포 증식, 바이러스 증식

---

곤충 바이러스인 핵다각체병 바이러스(nucleopolyhedrovirus: NPV)를 이용한 baculovirus 발현벡터계(baculovirus

expression vector system: BEVS)는 산업적으로 유용한 단백질을 안정적으로 대량생산 할 수 있으며, 동물, 박테

---

\*Corresponding author. E-mail: sdwoo@cbnu.ac.kr

리아, 식물 등을 이용한 기존의 여러 가지 다른 발현백터계의 단점을 극복할 수 있는 것으로 인정되어 현재 그에 대한 연구 및 활용이 활발히 이루어지고 있다(Ikonomou *et al.*, 2003; O'Reilly *et al.*, 1992). 현재 BEVS는 *Autographa californica* NPV (AcNPV)와 *Bombyx mori* NPV (BmNPV)를 주축으로 곤충 세포주를 이용하는 것과 곤충 생체를 이용하는 두 가지 발현백터계가 개발되어 의약산업을 중심으로 농업 및 기타 생명공학적인 연구를 위한 목적으로 활발히 이용되고 있다(Smith *et al.*, 1983; Maeda *et al.*, 1985; O'Reilly *et al.*, 1992). BEVS를 이용하기 위해서는 다른 동물세포 배양계를 이용하는 발현시스템과 동일하게 바이러스의 증식이나 순수한 분리를 위해 곤충 배양 세포주의 이용이 필수적이다.

곤충세포의 배양에 필요한 물질은 동물배양세포에서 요구되는 것처럼 매우 복잡한 영양물질을 필요로 하며 곤충의 생리 대사에 대한 연구를 통하여, Grace가 곤충의 혈림프(hemolymph) 구성성분을 기초로 하여 배지를 처음 개발한 이후 이를 기초로 매우 다양한 배지가 개발되어 있다(Ikonomou *et al.*, 2003). 그러나 이러한 곤충 세포 배양용 배지들은 그 자체만으로는 세포의 증식에 필요한 비타민, 성장요소, 그리고 여러 가지 세포증식에 필요한 불분명한 성장인자를 모두 만족시키지는 못하며 이러한 문제를 해결하기 위하여 동물배양세포에서 요구되어지는 것과 같은 FBS (fetal bovine serum)의 첨가가 필요한 것이 일반적이다(Yunker *et al.*, 1967; Goodwin, 1975). 최근에는 몇몇 곤충 세포주에 대해 FBS의 첨가가 필요하지 않은 배지가 개발되어 있으나 이는 매우 제한적이며 대부분의 곤충 세포 배양에는 여전히 FBS가 필수적인 첨가제로 이용되고 있다. 그러나 곤충 세포배양을 위해 필수적인 존재인 FBS는 바이러스의 증식에 있어서는 매우 불리하게 작용하는 것으로 보고되고 있다(Broussard and Summers, 1989; Taticek and Shuler, 1997). 그 예로써 곤충 바이러스의 접종 실험이나 DNA의 세포내 전이를 위한 transfection 실험 등에서도 바이러스의 접종 또는 transfection 효율을 높이기 위해서는 FBS가 함유되지 않은 배지를 우선적으로 사용할 것을 권장하고 있으며(O'Reilly *et al.*, 1992), 이러한 바이러스의 낮은 효율은 세포에 대한 바이러스의 초기 부착 능력이 저해되어 일어나는 것으로 보고되고 있다(Taticek *et al.*, 2001).

AcNPV 및 BmNPV 발현계로 인하여 매우 빈번하게 이용되고 있는 곤충 세포주로는 *Spodoptera frugiperda*에서 유래된 Sf21과 Sf9 그리고 누에(*Bombyx mori*)에서 유래된 Bm5 및 BmN4 세포주 등이 있다. 따라서 이들

세포주에 대한 FBS의 영향에 대해 많은 보고가 있으나 그 중 Sf21과 Bm5에 대해서는 현재까지 FBS의 영향에 대해 세포 및 바이러스의 증식과 관련한 보고가 미진한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이들 두 세포주에 대해 다양한 FBS 농도에서 증식양상을 조사하고 이를 바탕으로 바이러스의 증식을 위한 최적 FBS 농도를 결정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 곤충세포 및 바이러스

곤충 세포주는 *S. frugiperda*의 난소에서 유래된 Sf21과 누에(*B. mori*)의 난소에서 유래된 Bm5 세포주를 곤충 세포 배양용 TC-100 배지에서 5% FBS 농도로 27°C에서 계대배양 중이던 것을 이용하였다. 바이러스는 다각체 단백질 유전자(polyhedrin gene) 대신에 표지 유전자로써 대장균 유래의  $\beta$ -galactosidase 유전자를 가진 재조합 AcNPV인 BacPAK6 (Clontech)와 재조합 BmNPV인 BmK1-LacZ (Hong *et al.*, 2000)를 일반적인 바이러스 증식법(O'Reilly *et al.*, 1992)에 따라 각각 Sf21 및 Bm5에서 증식시키고 바이러스 농도를 결정한 후 실험에 이용하였다.

### 세포 증식곡선

다양한 FBS 농도에서의 세포 증식곡선을 작성하기 위하여 5% FBS 농도에서 계대배양 중이던 각 세포주를 3%, 5%, 7%, 10% 그리고 15% FBS 농도에서 5회 이상 계대배양하여 각 FBS 농도에 충분히 적응시킨 후 실험에 이용하였다. 세포 증식곡선은 8개의 60 mm culture plate에 각 배양세포를 초기 농도  $2 \times 10^5$  cells/ml로 2 ml 분주하고 1일 간격으로 plate를 수거하여 8일까지 증식곡선을 작성하였다. 세포 계수는 수거한 배양 세포에 0.4% trypan blue를 1:1로 처리한 후 hemocytometer를 이용하여 조사하였으며 염색여부에 따라 생존율을 계산하였다.

### 바이러스 증식곡선

다양한 FBS 농도에서 바이러스의 증식율을 비교조사하기 위하여 각 FBS 농도에서 배양된 세포를  $1 \times 10^6$  cells로 25 cm<sup>2</sup> flask (5 ml)에 초기 분주한 후, BacPAK6 및

BmK1-LacZ를 각각 1 MOI (multiplicity of infection)로 접종하고 각각의 FBS 농도로 배양하였다. 접종 후 1일 간격으로 5일까지 100  $\mu$ l씩 세포배양액을 수거하고 O'Reilly *et al.* (1992)의 end-point dilution 방법을 준용하여 바이러스의 PFU (plaque forming unit)를 결정하였다. 바이러스의 농도는 96 well plate에 각 세포를 분주하고 수거한 바이러스액을 단계별로 희석하여 접종한 다음 접종 5일 후에 X-gal 용액(50 mg/ml)을 0.1%로 처리하여 발색여부에 따라 바이러스 감염여부를 결정함으로써 바이러스 농도를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### FBS 함량에 따른 세포 증식

FBS 함량에 따른 세포의 증식양상을 조사하기 위하여 3~15%의 FBS 농도로 세포를 배양하며 증식곡선(Fig. 1A and 2A) 및 생존율(Fig. 1B and 2B)을 조사하였다. 그 결과 두 세포주 모두 FBS 함량이 증가할수록 세포의 증식을 역시 대체적으로 높게 나타냈으며, 특히 7% FBS 농도와 그 이하의 농도 사이에는 그 차이가 더욱 뚜렷하게 나타났다(Fig. 1A, 2A). 그러나 세포의 생존율에 있어서는 두 세포주간에 다소 차이가 있어 Sf21 세포주의 경우에는 7% 이상의 농도에서만 80% 이상의 생존율을 보인 반면 (Fig. 1B), Bm5 세포주의 경우에는 5% 농도까지 유사한 생존율을 보여(Fig. 2B) Bm5 세포주가 낮은 FBS

농도에서는 좀 더 안정적으로 증식하는 것으로 나타났다. 한편 초기 분주 후 두 배로 늘어나는 시간(doubling time)은 Sf21 세포의 경우 7% 이상의 농도에서는 3일 이내에 이루어졌으나 5% 농도에서는 4일 이내 그리고 3% 농도에서는 약 5일 이내에 이루어지는 것으로 조사되었으나, 7% 이상 농도에서만 생존율이 80% 이상 유지되는 것으로 보아 Sf21 세포의 경우 계대배양을 위해서는 7% FBS 함량이 가장 적절한 것으로 여겨졌다. Bm5 세포의 경우에는 Sf21 세포에 비해 다소 느린 증식을 보여 15%인 경우에만 2일 이내에 두 배 증식이 이루어졌고, 10%인 경우에는 3일, 7%인 경우에는 4일, 5%인 경우에는 5일 그리고 3%인 경우에는 7일 이내에 두 배의 증식이 이루어지는 것으로 나타났다(Fig. 2A). 그러나 생존율은 5%의 농도에서도 7일까지 80% 이상 유지되는 것으로 보아 5% FBS 함량만으로도 양호한 계대배양이 가능한 것으로 조사되었다. 이상의 결과에서 계대배양을 위한 조건으로는 두 세포주가 약간 다른 경향을 보여, 세포의 증식량, 증식 속도, 생존율 그리고 FBS 첨가량을 모두 고려할 때 Sf21 은 7%, Bm5는 5%가 최적인 것으로 결정되었다.

### FBS 함량에 따른 바이러스의 증식

다양한 FBS 농도에서 바이러스의 증식 양상을 조사하기 위하여 표지유전자로써 lacZ 유전자를 발현시키는 재조합 바이러스를 각 세포주에 접종하고  $\beta$ -galactosidase의 발현여부를 확인하여 바이러스의 증식곡선을 작성하였다. 그 결과, 두 바이러스 모두 접종 4일과 5일 후에는

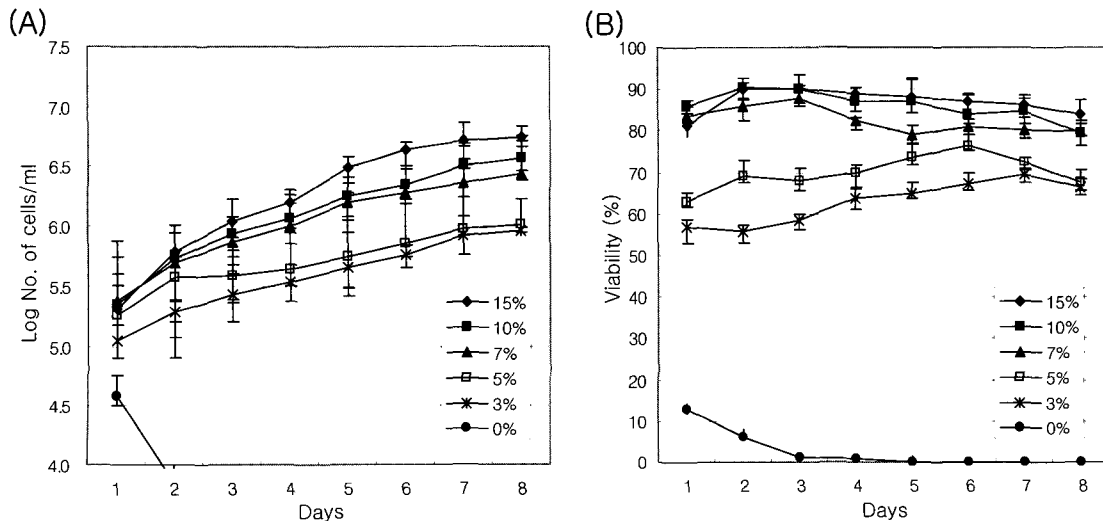


Fig. 1. Cell growth (A) and viability (B) of Sf21 on the various concentrations of FBS. Initial cell density was  $2.0 \times 10^5$  cells/ml.

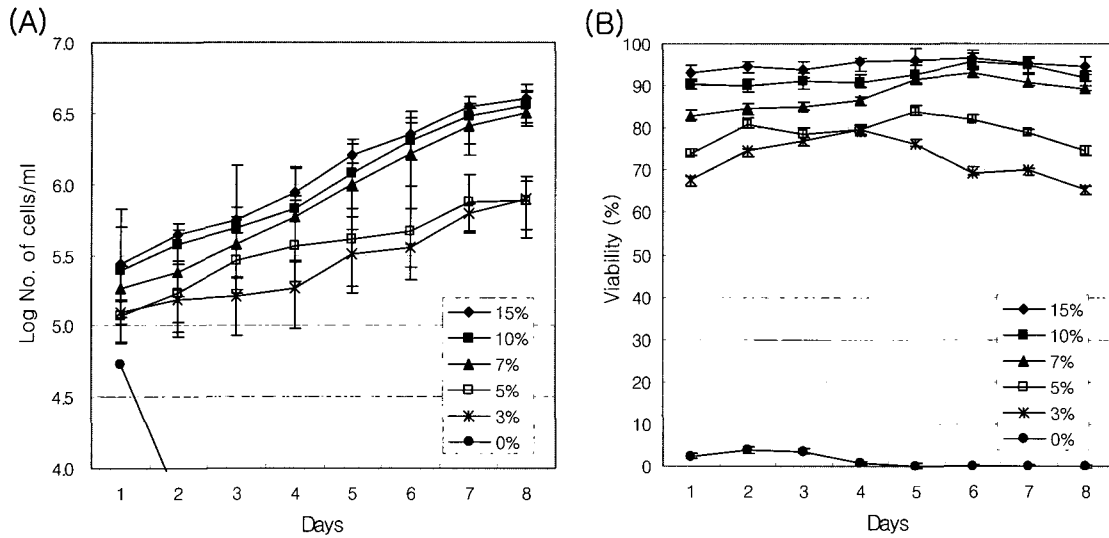


Fig. 2. Cell growth (A) and viability (B) of Bm5 on the various concentrations of FBS. Initial cell density was  $2.0 \times 10^5$  cells/ml.

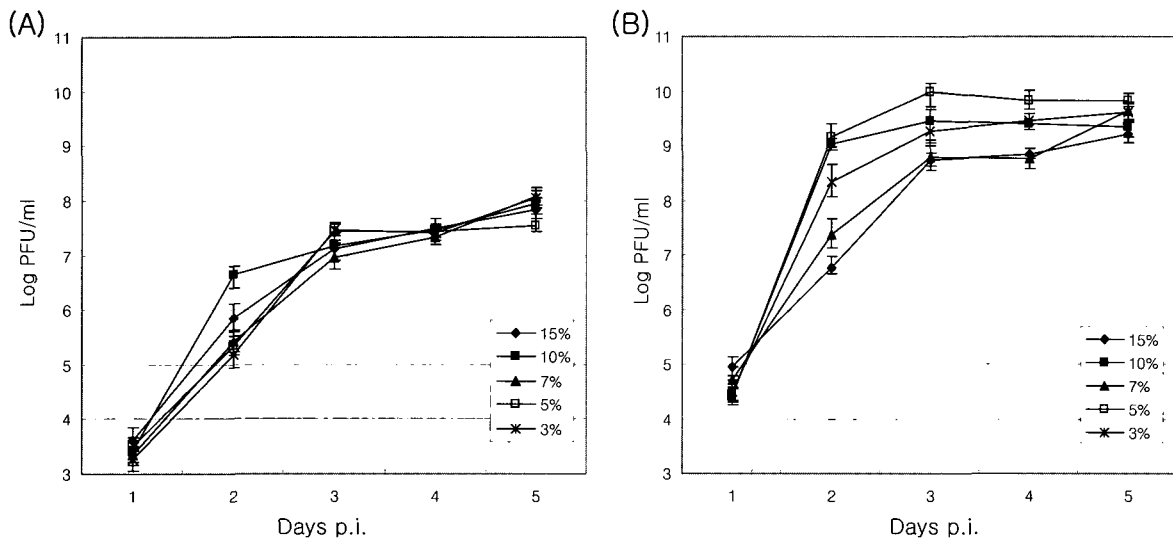


Fig. 3. Infectious virus yields from Sf21 (A) and Bm5 (B) cells infected with BacPAK6 and BmK1-LacZ, respectively, at the various concentrations of FBS. Cells were infected with 1 MOI. Aliquots were sampled at indicated times after infection and the viral titers were determined by end-point dilution method.

증식량이 모두 비슷한 최고치를 보였으나, 일반적으로 특정 단백질질을 발현 후 수거하는 시기인 접종 후 2일과 3일째에는 FBS 함량에 따라 상당한 차이를 보였다(Fig. 3). 재조합 AcNPV인 BacPAK6를 Sf21에 접종 한 경우, 접종 후 2일째에는 10% FBS 농도에서 가장 높은 증식율을 보인 반면, 접종 후 3일째에는 모든 농도에서 큰 차이를 보이지는 않았으나 3%와 5%에서 가장 높은 증식율을 보였다(Fig. 3A). 그러나 가장 양호한 세포증식율을 보인 7% 농도에서는 비교적 낮은 바이러스 증식율을 보였다.

반면 재조합 BmNPV인 BmK1-LacZ를 접종한 Bm5 세포의 경우에는 Sf21에서와는 다른 경향을 보이며 접종 후 2일과 3일에 모두 5%에서 가장 높은 증식율을 보였다(Fig. 3B). 이러한 결과는 FBS의 함량이 높을수록 바이러스의 증식에는 불리한 환경이라는 기존의 보고와 유사한 결과이나, FBS 함량변화에 비례하여 바이러스의 증식정도가 변하지는 않았다. 이러한 결과는 바이러스의 증식이 세포의 증식과 연관되어 영향을 받음으로써 세포주에 따라 FBS의 영향정도도 달라지는 것으로 여겨졌다.

이상의 결과는 세포 증식이나 바이러스의 증식 시 목적에 따라 적절한 FBS 농도에서 세포 및 바이러스의 증식이 필요함을 제시하여 주는 결과로써 세포를 증식함에 있어 단순히 계대배양만을 목적으로 하는 경우에는 생존율에 중점을 두고 최소의 FBS 농도로 최대한 천천히 계대배양을 함으로써, 비용 및 시간적인 측면에서 매우 경제적으로 세포를 유지할 수 있을 것으로 기대된다. 그러한 측면에서 본 연구의 결과 제시된 Sf21의 경우에는 80% 이상 생존율을 보이는 7% FBS 농도에서 그리고 Bm5 세포의 경우에는 5% FBS 농도에서 계대배양함이 좋을 것으로 여겨졌다. 그러나 실험을 목적으로한 세포의 빠른 증식과 더욱 높은 생존율이 요구될 경우에는 그 이상의 FBS 농도에서 배양함이 좋을 것을 역시 보여주고 있다. 한편 바이러스의 증식에서도 그 목적에 따라 적절한 FBS 농도를 결정함이 필요함을 보여주어, 외래단백질의 발현을 목적으로 하는 경우에는 목적 단백질의 안정성과 관련지어 빠른 증식이 이루어지는 3~10%의 FBS 농도에서 증식이 필요함을 보여주며, 단순히 바이러스의 증식만을 목적으로 하는 경우에는 두 세포주 모두 최소의 FBS 함량인 3%에서의 증식만으로도 충분함을 보여주었다.

일반적으로 곤충세포의 증식을 위해서는 10% 또는 5% 농도의 FBS를 이용하고 있으며(Ikonomou et al., 2003). 곤충 세포의 이용 초기에는 곤충의 혈림프가 이용되기도 하였으나 그 후 더욱 쉽고 그리고 제어가 가능한 조건에서 FBS를 대량으로 얻을 수 있게 됨으로써 혈림프를 대신하여 현재까지 FBS가 주로 이용되고 있다(Yunker et al., 1967; Goodwin, 1975). 세포의 배양에 있어 FBS의 존재는 세포 증식이라는 측면과 세포를 이용한 바이러스의 증식이라는 이중적인 측면에서 많은 연구가 이루어져 왔다. 두 가지가 연관되어 연구되어 온 이유로는, FBS가 비록 세포배양을 위해서는 필수적인 존재이나 바이러스의 증식이나 바이러스 산물의 생산에 대해서는 유리하게 작용하는지 또는 불리하게 작용하는지에 대해서 논란의 여지가 있기 때문이었다. Zhang et al. (1992)은 FBS가 함유되지 않은 배지에서 BmNPV에 의한 다각체의 생성량이 10% FBS 농도의 세포에서 증식된 경우에 비해 60% 정도 증가함을 보고 한 바 있으며, Sf9 세포에 대해서도 FBS 함량이 줄어든 경우 다각체의 생산량이 역시 증가됨이 보고되었다(Broussard and Summers, 1989; Taticek and Shuler, 1997). 그러나 바이러스 산물인 다각체의 생산량은 FBS 함량의 감소로 증가하는 반면, 바이러스의 증식율은 오히려 낮아지는 것으로 보고되었다. 즉, FBS가 바이러스 산물의 생산에는 유리하게 작용하나 바이러스

자체의 증식에는 불리하게 작용한 것으로 보고되어 실험의 목적이 바이러스의 양적 증식인지 또는 바이러스 산물의 생산인가에 따라 적정 FBS 함량이 결정되어야 함을 보여주어 본 연구의 결과와 유사한 것으로 여겨졌다. 이와는 조금 다른 보고로는 FBS가 많이 함유됨에 따라 바이러스의 초기 부착율이 저하되고 그로 인해 최종적인 바이러스 산물의 감소역시 일어난다는 보고도 있었으며(Taticek et al., 2001; Power et al., 1996; Nielsen, 2000; Petricevich et al., 2001; Wickham et al., 1990), FBS가 함유되지 않은 세포에서 재조합 단백질을 발현시 FBS가 함유된 배지에 비해 생산량이 매우 낮아진다는 보고도 있었다(King et al., 1991). 또한 최근에는 복잡한 당쇄화(glycosylation)가 필요한 재조합 단백질의 발현을 위해서는 FBS가 필수적인 존재임도 보고된 바 있다(Joshi et al., 2000). 이와 같이 곤충 세포주에서 바이러스에 대한 FBS의 영향에 대해서는 조금씩 서로 상반된 결과도 보고되고 있으나 공통적인 사항은 FBS의 존재가 바이러스의 증식율에는 좋지 않은 영향을 미치며, 발현하고자 하는 단백질에 따라 FBS가 유리하게 또는 불리하게 작용할 수 있음을 보여주고 있다. 따라서 본 연구 결과에서도 보여주는 것과 같이 곤충 세포주를 이용하여 실험을 수행하는데 있어서는, 목적에 따라 세포주 및 바이러스에 대해 적절한 FBS의 첨가량이 먼저 결정되어야만 만족스러운 실험 결과를 얻을 수 있을 것으로 여겨진다.

## 사 사

이 논문은 2006학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었음.

## Literature Cited

- Broussard, D.R. and M.D. Summers. 1989. Effects of serum concentration and media composition on the level of polyhedrin and foreign gene expression by baculovirus vectors. *J. Invertebr. Pathol.* 54: 144-150.
- Goodwin, R.H. 1975. Insect cell culture: improved media and methods for initiating attached cell lines from the Lepidoptera. *In Vitro*, 11: 369-378.
- Hong, H.K., S.D. Woo, J.Y. Choi, H.K. Lee, M.H. Kim, Y.H. Je, and S.K. Kang. 2000. Characterization of four isolates of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Arch. Virol.* 145: 2351-2361.
- Ikonomou, L., Y.J. Schneider and S.N. Agathos. 2003. Insect cell

- culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 1-20.
- Joshi, L., T.R. Davis, T.S. Mattu, P.M. Rudd, R.A. Dwek, M.L. Shuler, M. L. and H.A. Wood. 2000. Influence of baculovirus-host cell interactions on complex N-linked glycosylation of a recombinant human protein. *Biotechnol. Prog.* 16: 650-656.
- King, G., J. Kuzio, A. Daugulis, P. Faulkner, B. Allen, J. Wu and M. Goosen. 1991. Assessment of virus production and chloramphenicol acetyl transferase expression by insect cells in serum-free and serum-supplemented media using a temperature sensitive baculovirus. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 1091-1099.
- Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Soto and M. Furusawa. 1985. Production of human  $\alpha$ -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315: 592-594.
- Nielsen, L.K. 2000. Virus production from cell culture, kinetics. pp 1217-1230. *In* The encyclopedia of cell technology, ed. by R.E. Spier. Wiley, New York.
- O'Reilly, D.R., L.K. Miller and V.A. Luckow. 1992. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. 347 pp. Freeman, New York.
- Petrichevich, V.L., L.A. Palomares, M. Gonzalez and O.T. Ramirez. 2001. Parameters that determine virus adsorption kinetics: toward the design of better infection strategies for the insect cell-baculovirus expression system. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 52-61.
- Power, J.F., S. Reid, P.F. Greenfield and L.K. Nielsen. 1996. The kinetics of baculo virus adsorption to insect cells in suspension culture. *Cytotechnology*, 21: 155-163.
- Smith, G.E., M.D. Summers and M.J. Fraser. 1983. Production of human  $\beta$ -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165.
- Taticek, R.A. and M.L. Shuler. 1997. Effect of elevated oxygen and glutamine levels on foreign protein production at high cell densities using the insect cell-baculovirus expression system. *Biotechnol. Bioeng.* 54: 142-152.
- Taticek, R.A., C. Choi, S.E. Phan, L.A. Palomares and M.L. Shuler. 2001. Comparison of growth and recombinant protein expression in two different insect cell lines in attached and suspension culture. *Biotechnol. Prog.* 17: 676-684.
- Wickham, T.J., R.R. Granados, H.A. Wood, D.A. Hammer and M.L. Shuler. 1990. General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces. *Biophys. J.* 58: 1501-1516.
- Yunker, C.E., J.L. Vaughn and J. Cory. 1967. Adaptation of an insect cell line (Grace's *Antheraea* cells) to medium free of insect hemolymph. *Science*, 155: 1565-1566.
- Zhang, J., N. Kalogerakis, L.A. Behie and K. Iatrou. 1992. Investigation of reduced serum and serum-free media for the cultivation of insect cells (Bm5) and the production of baculovirus (BmNPV). *Biotechnol. Bioeng.* 40: 1165-1172.

(Received for publication May 23 2007;  
accepted August 9 2007)