



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0080139

(43) 공개일자 2015년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0167407

(22) 출원일자 2013년12월30일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

남형진

인천 남구 재념이길 147-21, 201동 204호 (용현동, 문화네트빌)

김동일

인천 연수구 청능대로 124, 109동 403호 (동춘동, 금호동아아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

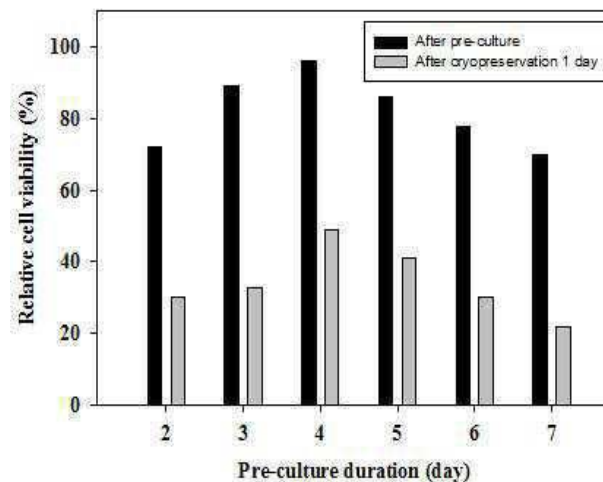
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 식물세포 동결보존방법

(57) 요약

본 발명은 식물세포의 동결보존방법에 관한 것으로, 식물세포의 동결보존시 세포의 손상을 방지하여, 세포의 생존률을 향상시킬 수 있어, 형질전환 세포의 세포주의 저장에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

**권준영**

인천 부평구 안남로 272, 107동 1702호 (청천동, 금호아파트)

**최홍열**

경기 성남시 중원구 산성대로452번길 8-1, (금광동)

**이선미**

서울 송파구 풍성로25다길 12, 5동 302호 (풍납동, 유천파크맨션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 ITAH1302130110010001000200200

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 사단법인 한국바이오협회

연구사업명 바이오전문인력양성사업

연구과제명 바이오전문인력양성사업 의약바이오특성화대학원 운영

기 여 율 10/100

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013M3A9B6075887

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 차세대응용오믹스사업

연구과제명 글리칸 변이 바이오의약품의 생산을 위한 글리칸 조절 및 제어 원천기술 개발

기 여 율 90/100

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.20 ~ 2018.11.19

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

식물세포를 3 내지 6일 동안 배지에서 배양하는 예비 배양 단계;

상기 예비 배양된 식물세포를 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 로딩 용액으로 1분 내지 30분 동안 처리하는 로딩 단계; 및

상기 로딩 처리된 식물세포를 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 유리화 용액으로 1분 내지 10 동안 처리하는 유리화 단계;를 포함하는 식물세포 동결보존방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 로딩 용액은 세포는 글리세롤 및 수크로오스를 포함하고, 전체 배지 조성물에 대하여 25% 농도로 식물세포에 처리되고,

상기 유리화 용액은 세포는 글리세롤 및 수크로오스를 포함하는 것인; 식물세포 동결보존방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 식물세포는 RAmy3D 유도성 프로모터(RAmy3D inducible promoter)를 포함하는 형질 전환된 벼(*Oryza sativa*)인 것인, 식물세포 동결보존방법.

#### 청구항 4

글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 식물세포 동결보존용 배지 조성물.

## 발명의 설명

### 기술분야

[0001]

본 발명은 식물세포의 동결보존방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002]

최근 형질전환 식물세포 배양을 통한 생산 시스템을 이용한 고부가가치 치료용 재조합 단백질 생산을 위한 연구가 이루어지고 있다. 식물에서 유래된 치료용 단백질을 식물유래 생물의약품(plant-made pharmaceuticals, PMPs)이라고 부르며, 이 시스템은 동물세포와 유사한 post-translational modification(PTM)이 가능하며, 경제와 같은 downstream 공정 측면에서 경제적이고 동물유래 virus로부터 감염과 같은 위험성 측면에서 안전하다는 장점을 가지고 있다.

[0003]

세포배양을 통해 생산된 생물의약품이 산업적으로 이용되기 위한 허가를 받기 위해서는 제품의 안전성과 효능에 대한 평가가 필수적이다. 이를 위해서 배양에 사용된 세포의 특성분석, 세포의 배양방법, 세포은행에 대한 평가가 이루어져야 한다. 이 중 세포은행은 생물의약품의 생산을 위한 출발물질을 제공하며, 따라서 일관성이 있는 세포주의 공급이 가능하게 한다. 식물세포 배양의 경우, 계대배양에 따른 세포주 유지가 일반적이다. 하지만 이는 장기간 계대에 따른 세포주의 오염 및 유전적 불안정성을 유발할 수 있다. 이에 대한 대안으로서 장기적으로 세포주의 안정적인 공급을 위하여 동결보존법을 이용한 세포주의 저장이 이루어지고 있다. 하지만 식물세포의 경우에는 아직 연구가 미비한 상황이다.

[0004] 이에 따라, 식물세포에 있어서 동결보존법을 이용한 세포주의 저장방법에 대한 연구가 필요하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 식물세포의 생존률을 향상시킬 수 있는 동결보존방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0006] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 식물세포를 3 내지 6일 동안 배지에서 배양하는 예비 배양 단계; 상기 예비 배양된 식물세포를 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 로딩 용액으로 1분 내지 30분 동안 처리하는 로딩 단계; 및 상기 로딩 처리된 식물세포를 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 유리화 용액으로 1분 내지 10 동안 처리하는 유리화 단계;를 포함하는 식물세포 동결보존방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 식물세포 동결보존용 배지 조성물을 제공한다.

[0008] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0009] 본 발명은 식물세포를 3 내지 6일 동안 배지에서 배양하는 예비 배양 단계; 상기 예비 배양된 식물세포를 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 로딩 용액으로 1분 내지 30분 동안 처리하는 로딩 단계; 및 상기 로딩 처리된 식물세포를 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 유리화 용액으로 1분 내지 10 동안 처리하는 유리화 단계;를 포함하는 식물세포 동결보존방법을 제공한다.

[0010] 상기 예비 배양 단계는 식물세포를 동결보존하기 전에 배양하는 모든 단계를 포함하는 것으로, 전배양 등으로도 지칭할 수 있다.

[0011] 상기 예비 배양 단계에서 배양 배지는 본 발명이 속하는 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 범위 내에서 식물세포의 종류 및 목적에 따라서 선택하여 사용할 수 있다.

[0012] 상기 식물세포는 식물세포로부터 유도된 세포를 의미하고, 가장 바람직하게는 벼(*Oryza sativa*)로부터 유래된 세포를 의미한다. 상기 세포는 유전학적 처리를 거치지 않은 세포 및 형질 전환과 같은 유전공학적 처리를 거친 세포도 모두 포함한다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 식물세포는 벼(*Oryza sativa*)세포, 형질 전환된 벼(*Oryza sativa*)세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 일 수 있다.

[0014] 상기 형질 전환된 벼(*Oryza sativa*)세포는 RAmy3D 유도성 프로모터(RAmy3D inducible promoter)를 포함하는 어느 하나 일 수 있다.

[0015] 상기 로딩 단계는 고농도의 유리화 용액으로 인해 세포가 받는 독성을 완화시키기 위해 전처리하는 단계를 의미하며, 상기 로딩 용액은 고농도의 유리화 용액으로 인해 세포가 받는 독성을 완화시킬 수 있도록 사용되는 전처리 용액으로, 유리화 용액보다 저농도로 세포에 처리하는 방법으로 수행하는 것이 바람직하다.

[0016] 상기 로딩 용액은 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함하고, 바람직하게는 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드 및 수크로오스를 포함하는 것 또는 글리세롤 및 수크로오스를 포함하는 것 일 수 있다.

[0017] 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드 및 수크로오스를 포함하는 경우(A 계열 용액), AA 배지의 구성에, 전체 배지용액에 있어서 글리세롤 30 %(v/v), 에틸렌 글리콜 5%(v/v), DMSO 15%(v/v) 및 0.4M 수크로오스를 포함하는 것 일 수 있고, 이 경우 로딩 용액을 세포에 처리하는 로딩 단계에는 20% 내지 30%로 희석하여 사용할 수 있다.

- [0018] 또한 글리세롤 및 수크로오스를 포함하는 경우(B 계열 용액), 2 M 글리세롤과 0.4 M 수크로오스를 포함하는 것 일 수 있다.
- [0019] 상기 로딩 단계는 1 분 내지 30분, 바람직하게는 5 분 내지 25 분 동안 수행할 수 있다. 바람직하게는 A 계열 용액을 사용하는 경우, 18분 내지 23분 동안 수행할 수 있고, B 계열 용액을 사용하는 경우 8 분 내지 13분 동안 수행할 수 있다.
- [0020] 상기 유리화 단계를 거쳐서 세포를 동결보존하는 경우 고농도의 유리화 용액을 이용하여, 세포 내 수분 빼내는 탈수과정을 통해서, 세포 동결 시에도 수분에 의한 세포의 손상을 방지하는 효과가 있다.
- [0021] 상기 유리화 용액은 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함하고, 바람직하게는 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드 및 수크로오스를 포함하는 것 또는 글리세롤 및 수크로오스를 포함하는 것 일 수 있다.
- [0022] 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드 및 수크로오스를 포함하는 경우(A 계열 용액), AA 배지를 기본 구성으로 하여, 전체 유리화 용액에 있어서 글리세롤 30%(v/v), 에틸렌 글리콜 %(v/v), DMSO 15%(v/v) 및 0.4M 수크로오스를 더 포함하는 것 일 수 있다.
- [0023] 상기 유리화 단계는 유리화 용액을 로딩 단계를 거친 식물세포에 1 분 내지 10 분 동안 처리하는 방법으로 수행할 수 있고, 바람직하게는 6분 내지 10 분 동안 처리할 수 있다. 특히 유리화 용액이 A 계열을 사용하는 경우 8 분 내지 10 분 동안 처리할 수 있고, B 계열을 사용하는 경우 5분 내지 8분 동안 식물세포에 처리하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 식물세포 동결보존용 배지 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 배지 조성물은 본 발명의 동결보존용 성분 외에도, 식물세포의 생존 또는 성장에 필요한 성분을 부가적으로 포함할 수 있다. 상기 성분은 본 발명의 속하는 기술분야에서 통상을 지식을 가진 자에게 자명한 범위 내에서 선택적으로 포함될 수 있다.
- [0026] 상기 배지 조성물은 바람직하게는 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드 및 수크로오스를 포함하는 것 또는 글리세롤 및 수크로오스를 포함하는 것 일 수 있다.
- [0027] 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 디메틸설폭사이드 및 수크로오스를 포함하는 경우(A 계열 조성물), AA 배지의 구성에, 전체 배지 조성물에 있어서 글리세롤 30%(v/v), 에틸렌 글리콜 5%(v/v), DMSO 15%(v/v) 및 0.4M 수크로오스를 포함하는 것 일 수 있다.
- [0028] 글리세롤 및 수크로오스를 포함하는 경우(B 계열 조성물), 2 M 글리세롤과 0.4 M 수크로오스를 포함하는 것 일 수 있다.

### 발명의 효과

- [0029] 본 발명의 동결보존방법을 이용하는 경우 식물세포의 동결보존 시 세포의 손상을 방지하여, 세포의 생존률을 향상시킬 수 있어, 형질전환 세포의 세포주의 저장에 효과적으로 사용될 수 있다

### 도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 본 발명의 일 실시예 따른 식물세포 동결보존방법을 도식화한 도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예 따라, 예비 배양 기간에 따른 세포의 생존률을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 예비 배양기간(일)을 나타내고, 그래프의 세로축은 세포의 생존률(%)을 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라, 글리세롤, 수크로오스, 에틸렌 글리콜 및 DMSO를 포함하는 로딩 용액을 이용하는 경우, 로딩 단계의 시간에 따른 세포의 생존률을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 로딩 시간(분)을 나타내고, 그래프의 세로축은 세포의 생존률(%)을 나타낸다.
- 도 4은 본 발명의 일 실시예에 따라, 글리세롤, 수크로오스, 에틸렌 글리콜 및 DMSO를 포함하는 유리화 용액을 이용하는 경우, 유리화 단계의 시간에 따른 세포의 생존률을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 유리화

시간(분)을 나타내고, 그래프의 세로축은 세포의 생존률(%)을 나타낸다.

도 5은 본 발명의 일 실시예에 따라, 글리세롤 및 수크로오스 를 포함하는 로딩 용액을 이용하는 경우, 로딩 단계의 시간에 따른 세포의 생존률을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 로딩 시간(분)을 나타내고, 그래프의 세로축은 세포의 생존률(%)을 나타낸다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라, 글리세롤, 수크로오스, 에틸렌 글리콜 및 DMSO를 포함하는 유리화 용액을 이용하는 경우, 유리화 단계의 시간에 따른 세포의 생존률을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 유리화 시간(분)을 나타내고, 그래프의 세로축은 세포의 생존률(%)을 나타낸다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라, 완만 동결보존법과 유리화를 이용한 동결보존법에 있어서 세포의 생존률 차이를 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 완만 동결보존법(slow freezing)과 유리화동결보존법(vitrification)을 나타내고, 그래프의 세로축은 세포의 생존률(%)을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다.

### [준비예] 세포주 준비 및 실험방법

#### [0033] 1. 세포주 형질전환 및 배양조건

[0034] 단백질을 생산하는 세포주로는 벼(Oryza sativa L. Dongjin)를 형질전환하여 실험에 이용하였다. 벼의 알파-아밀라아제( $\alpha$ -amylase) 유전자군(gene family)이며, 탄소원인 sucrose가 고갈된 상태에서만 목적 단백질을 hCTLA4Ig를 생산할 수 있도록, RAmy3D 유도성 프로모터(RAmy3D inducible promoter)를 포함하도록 형질전환하여 실험에 사용하였다.

[0035] 생장배지로는 아미노산(AA) 기본배지(Terashima, 1999)를 사용하였으며, 탄소원으로 30 g/L 수크로오스를 사용하였고, 생장조절제로는 2.0 mg/L 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)와 0.2 mg/L 키네티(kinetin)를 사용하였다. 배지의 pH는 5.8로 조절하고, 500 mL 삼각플라스크(Erlenmeyer flask)에 분주한 후에 121 °C, 1기압에서 가압증기 멸균하였으며, 아미노산 혼합용액(1.0 mM 글리신(glycine), 6.0 mM 글루타민(glutamine), 2.0 mM 아스파르트산(aspartic acid), 1.3 mM 아르기닌(arginine))을 농축한 다음 0.1 mg/L 지베렐린(gibberellin, GA), 50 mg/L 히그로마이신(hygromycin)을 첨가하여 0.22  $\mu$ m 막여과기(membrane filter)로 여과 멸균하였다. 교반 배양기에서 28 °C, 120 rpm, 암조건으로 9일 간격으로 계대 배양을 수행하였다.

#### [0036] 2. 세포의 생존률 측정방법

[0037] 세포의 생존률은 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 환원법을 이용하여 상대적인 생존률을 측정한다. 저온유리병(Cryovials)의 세포생체량(FCW) 세포를 모두 회수하고 1.5% TTC 용액(0.05 M potassium phosphate solution, pH 9.0) 1.6 mL을 첨가하여 20 °C에서 24시간 반응시킨다. 그 후, TTC 용액은 제거하고 세포 내에 생성된 레드 포르마잔(red formazan)을 추출하기 위해 95 % 에탄올(ethanol) 1 mL을 첨가하여 60 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 4 °C, 15,000 rpm에서 30분 동안 원심분리한 후, 상등액 0.6 mL을 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 485 nm에서 O.D.값을 측정하였다. 블랭크(Blank)로는 95 % 에탄올을 사용하였다.

#### [0038] [실험예] 동결보존 조건에 따른 세포 생존률 측정

##### [0039] 1. 예비배양

[0040] 동결(freezing) 과정은 모두 무균상태에서 이루어지며 형질전환 벼 세포내의 수분함량을 줄여주기 위해서 기초 AA배지(0.087 M 수크로오스 포함)에 0.5 M의 수크로오스(sucrose)를 첨가하여 배지를 제조하였다. 생장배지로는

아미노산(AA) 기본배지(Terashima, 1999)를 사용하였으며, 탄소원으로 30 g/L 수크로오스를 사용하였고, 성장조절제로는 2.0 mg/L 2,4-D와 0.2 mg/L 키네티를 사용하였다. 배지 pH는 5.8로 조절하고, 500 mL 삼각플라스크에 분주한 후에 121 °C, 1기압에서 가압증기 멸균하였으며, 아미노산 혼합용액(1.0 mM 글리신, 6.0 mM 글루타민, 2.0 mM 아스파르트산, 1.3 mM 아르기닌)을 농축한 다음 0.1 mg/L 지베렐린(GA)을 첨가하여 0.22 µm 막여과로 여과 멸균하였다. 250-mL 삼각플라스크를 이용하였으며, 기본 AA배지로 배양한 현탁세포를 흡인여과기(Buchner funnel)를 이용하여 여과지(Whatman No. 1) 상에서 배양액을 분리하여 6 g을 예비배양 배지 60 mL와 혼합하여 배양하였다.

[0041] 예비배양 기간을 1일부터 7일까지 나누어서 1일 단위로 예비배양을 수행 하였고, 각각 세포의 생존도를 측정하고 동결하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0042] 도 2에 나타난 바와 같이, 0.5 M 수크로오스를 함유한 예비배양 배지에서의 시간에 따른 세포생장을 측정한 결과 배양 4일째에 가장 높은 세포 생장을 나타내었다

## [0043] 2. 유리화법(Vitrification)에 의한 동결보존방법

[0044] 동결(freezing) 과정은 모두 무균상태에서 이루어지며 형질전환 벼 세포내의 수분함량을 줄여주기 위해서 기초 AA배지(0.087 M 수크로오스 포함)에 0.5 M의 수크로오스를 첨가하여 250-mL 삼각플라스크s서 4일간 예비 배양을 수행하였다. 유리화법은 로딩 용액으로 전처리한 후에 로딩 용액 보다 더 높은 농도의 유리화 용액으로 탈수 하는 단계로 수행하였다. 무균상태에서 1.8 mL 동결튜브(CryoTube™) 유리병(Nunc™)에 0.4 g FCW의 세포와 1.2 mL 동결보호제를 혼합하여 그 저온유리병을 직접 -196 °C 액체질소에 보관하였다.

## [0045] 3. 완만 동결(slow-freezing)법에 의한 세포 동결

[0046] 상기 예비 배양을 수행한 형질전환 세포에 대하여, 완만 동결보존법에 있어서 예비 배양 기간에 따른 세포생존률을 확인하는 실험을 수행하였다.

[0047] 1 M 수크로오스, 0.5 M DMSO 및 0.5 M 글리세롤로 구성된 동결방지제(cryoprotectants)를 사용하여, 무균상태에서 1.8 mL 동결튜브(CryoTube™) 유리병(Vial, Nunc™)에 0.4 g FCW의 세포와 1.2 mL 동결방지제를 혼합하여 2 단계의완만 동결(slow-freezing method)법에 따라 동결보존을 하였다. Mr. Frosty™ Cryo 1 °C Freezing Container(Nalgene®)를 이용하여 -70 °C의 급속냉동냉장고(deepfreezer)에서 2시간 동안 서서히 1°Cmin<sup>-1</sup>로 -70 °C까지 온도를 떨어뜨리면서 동결한 후, 그 저온유리병을 직접 -196 °C 액체질소에 보관하였다.

[0048] -196 °C 액체질소탱크에서 보관한 세포주를 1일 저장 후, 상기 동결된 세포를 해동하기 위하여, 저온유리병을 꺼내 크라이오랙(cryorack)으로 옮겨 43 °C 수조에서 3분간 급해동하였다. 동결보호제를 제거하기 위하여 흡인여과기를 사용하여 2분간 음압처리를 하며 예비배양 배지를 이용하여 세척하였다.

[0049] 상기 실험에 2와 같은 방법으로 세포의 생존률을 측정하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0050] 도 2에 나타난 바와 같이, 예비 배양 기간에 따라 세포의 생존률이 영향을 받으며, 특히 예비 배양을 4일간 진행한 경우 생존률이 가장 우수하였다.

## [0051] 4. 로딩 용액 및 유리화 용액에 따른 동결보존법의 효과확인

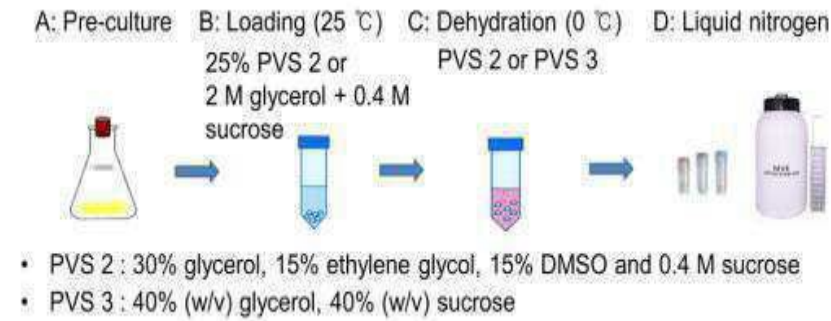
[0052] 로딩 단계와 유리화 단계에서 세포처리에 사용하는 용액을 A계열과 B계열로 나누어 제조하였다. A 계열은 PVS 2 용액으로, 기본 AA배지를 사용하였으며, 전체 배지조성물에 있어서 글리세롤 30%(v/v), 에틸렌 글리콜 5%(v/v), DMSO 15%(v/v) 및 0.4M 수크로오스를 혼합하여 만들었다. B계열은 기본 AA배지를 이용하여 2 M 글리세롤과 0.4 M 수크로오스를 혼합하여 제조하였다. PVS 용액을 로딩 용액으로 사용하는 경우 25% PVS 용액으로 실험에 사용하였고, 유리화 용액으로 사용하는 경우 100% PVS 용액으로 사용 하였다.

### [0053] 4-1. 로딩 용액의 종류에 따른 로딩 단계에서 효과 확인

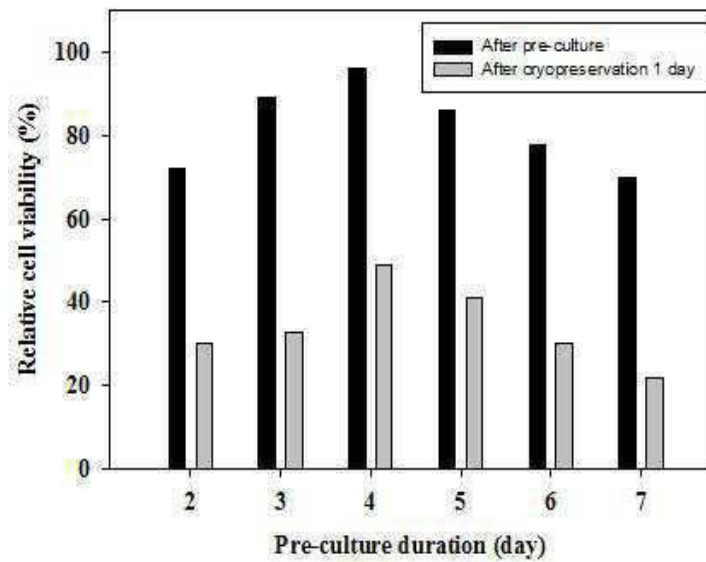
- [0054] 상기 실험에 1에서 예비 배양 처리된 세포를 로딩 용액과 혼합하는 방법으로 세 개의 처리군에 대하여, 5분, 10분, 20분 동안 각각 처리한 후, 상기 실험에 2와 같이 유리화 동결보존단계를 거쳐 해동하여, 세포의 생존률을 측정하였다. 상기 생존률 측정의 결과를 A 계열 로딩 용액을 사용한 경우를 도 3에 나타내었고, B 계열 로딩 용액을 사용한 경우를 도 5에 나타내었다.
- [0055] 도 3에 나타낸 바와 같이, A 계열의 용액을 이용하는 경우 20 분 동안 로딩 처리하는 경우가 가장 우수한 세포 생존률을 나타냈고, B 계열의 용액을 이용하는 경우 10 분 동안 로딩 처리하는 것이 가장 우수한 세포 생존률을 나타냈으며, A용액보다 B 용액을 이용하는 경우가 세포 생존률이 10 % 가량 더 높은 것을 확인 하였다.
- [0056] 4-2. 유리화 용액의 종류에 따른 유리화 단계에서의 효과 확인
- [0057] 유리화 단계는 로딩 용액과 동일한 구성의 A 계열 또는 B계열 로딩 용액을 더 높은 농도로 사용하여 유리화 단계에 사용하였다. A 계열의 로딩 용액을 사용한 경우, 로딩 단계를 20 분간 실시한 후, A 계열의 유리화 용액을 사용하였고, B 계열의 로딩 용액(2 M 글리세롤과 0.4 M 수크로오스)을 사용하여 로딩 단계를 10분간 실시한 후, B계열의 용액으로 유리화 과정을 진행하였다.
- [0058] 유리화 단계는 3분, 6분, 9분으로 처리시간에 따라 실험군을 나누어 실시하였다. 흡인 여과기를 이용하여 여과지(Whatman No. 1) 상에서 로딩 용액을 제거하여 세포를 분리하였다. 유리화 용액과 세포와의 혼합 반응은 0 ℃에서 이루어졌다.
- [0059] 유리화 단계 이후, 무균 상태에서 1.8 mL 동결튜브(CryoTube™) 유리병(Nunc™)에 0.4 g 탈수된 세포와 1.2 mL 유리화 용액을 혼합하여 각각 반응시간 이후에 저온유리병을 직접 -196 ℃ 액체질소에 보관하였다.
- [0060] A 계열의 로딩 용액을 사용한 경우, 세포 생존률을 측정한 결과를 도 4에 나타내었고, B 계열의 용액을 이용한 경우 세포 생존률을 측정한 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0061] 도 4에 나타낸 바와 같이, 9분 동안 유리화를 한 경우가 가장 우수한 생존률을 나타냈고, 도 6에 나타낸 바와 같이, 6분 동안 유리화한 경우 가장 우수한 생존률을 나타냈다. 특히 예비배양을 4일 동안 진행한 세포에 대하여 PVS3 용액으로 10분간 로딩처리한 후 6 분 동안 유리화 처리하는 경우 가장 우수한 동결보존 효과가 나타남을 확인할 수 있었다.
- [0062] **5. 완만 동결보존법과 유리화 동결보존법의 세포생존률에 따른 효과 확인**
- [0063] 동결보존법에 따른 세포 생존률에 따라 유리화 동결보존법의 효과의 우수성을 확인하기 위하여 실험에 2 및 실험에 3의 방법에 따라 동결보존법에 따른 세포 동결을 실시하였고, 완만동결법의 경우 예비배양을 4일 동안 수행하고 완만동결법으로 동결하였고, 유리화법의 경우 PVS3 용액을 이용하여 10분동안 로딩처리 하고, 이를 다시 6 분 동안 유리화 하여 동결하였다. 상기 각각의 실험군의 동결세포를 다시 해동시켜 세포 생존률을 확인 하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0064] 도 7에 나타낸 바와 같이, 유리화 동결보존법에 의하여 세포를 동결 저장 하는 경우 해동 후의 세포 생존률이 완만 동결보존법 보다 우수한 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 세포의 저장 및 보존에 있어서 유리화 동결보존법이 현저히 우수한 효과를 가짐을 확인 하였다.

## 도면

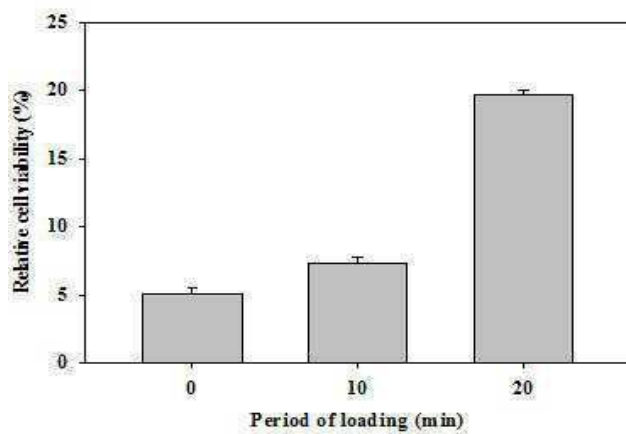
### 도면1



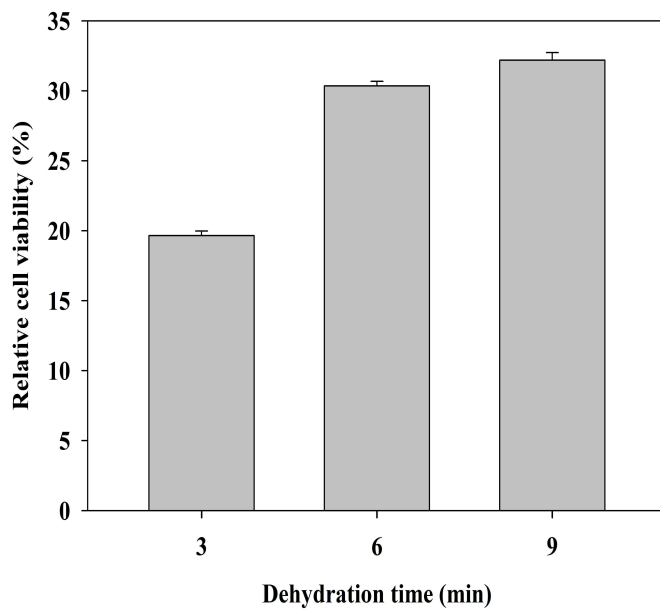
### 도면2



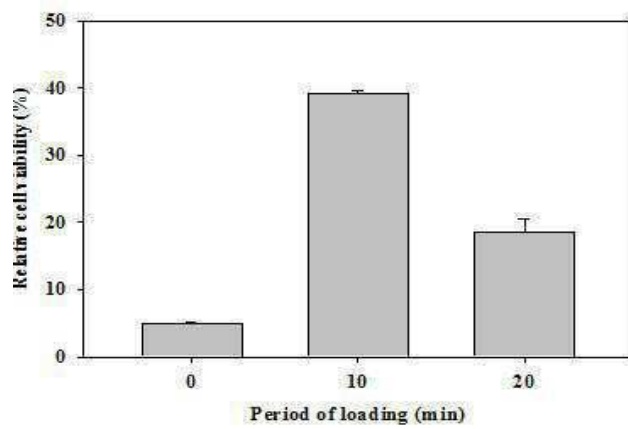
### 도면3



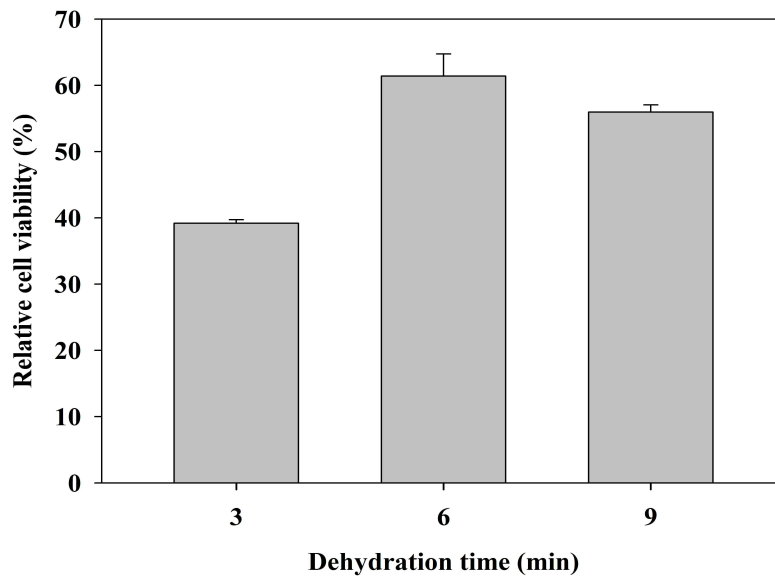
도면4



도면5



도면6



도면7

