



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0128593
(43) 공개일자 2010년12월08일

(51) Int. Cl.

A01N 1/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0047077

(22) 출원일자 2009년05월28일

심사청구일자 2009년05월28일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김동일

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남119호

전수환

인천광역시 부평구 십정2동 동암신동아아파트 10
7동 2207호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 16 항

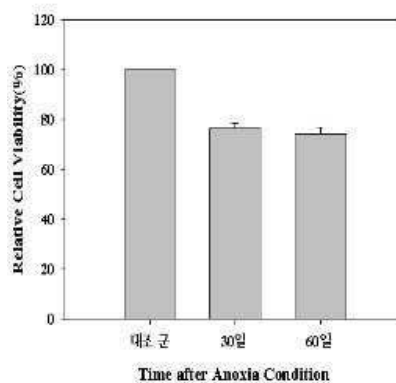
(54) 형질전환 식물세포에서의 장기 보존 방법

(57) 요약

본 발명은 형질전환 식물세포의 장기보존 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 질소기체 등을 사용하여 배지 내의 산소농도를 무산소 상태로 유지하고, 여기에 특정농도의 당을 첨가하여 형질전환 식물세포를 장기 보존하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포의 배지에 특정농도의 당을 첨가하여 세포 생존도를 최대화함으로써, 형질전환 식물세포의 장기 보존 시 세포의 오염 없이 저비용 및 고효율 보존이 가능하게 되어 식물세포를 통한 재조합 단백질의 산업화에 활용될 수 있다.

대표도 - 도6b



(72) 발명자

권준영

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

한지연

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

양용석

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 당 고갈시 작동하는 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합벡터로 형질전환된 형질 전환 식물체, 조직 또는 세포를 제조하는 단계;
- (b) 배양 배지 중에 1~300mM의 농도로 당을 포함하는 식물세포 배지를 준비하는 단계; 및
- (c) 무산소 조건하에 (b)단계의 배지에 식물세포를 장기 보존하는 단계를 포함하는 형질전환 식물체, 조직 또는 세포를 무산소 조건하에 장기 보존하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식물세포 배지는 배양 배지 중에 30~180mM의 농도로 당을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 당은 수크로즈, 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 당 대체제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 당은 배양 배지 중에 174 mM 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 식물세포 배지는 AA(Amino acid) 배지, MS(Murashige & Skoog), N6, WHITE 또는 SH(Schenk & Hiderbrandt)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 형질전환 식물체는 무산소 조건에 저항성(anoxia-tolerant plants)을 갖는 식물체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 옥수수, 밀, 또는 보리인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 목적 단백질은 G-CSF, GM-CSF, SA, AAT, INF-gamma 또는 사람 CTLA4Ig인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당 고갈시 작동하는 프로모터는 α -아밀라아제의 RAmy3D 프로모터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

당 고갈시 작동하는 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합벡터로 형질전환된 형질전환 식물체, 조직 또는 세포를 무산소 조건에서 장기 보존하는 배지 조성물에 있어서, 배양 배지 중에 1~300mM의 농도로 당을 포함하는 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 당은 수크로즈, 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 당 대체제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 당은 배양 배지 중에 174 mM 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 배지는 AA(Amino acid) 배지, MS(Murashige & Skoog), N6, WHITE 또는 SH(Schenk & Hiderbrandt)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서, 형질전환 식물체는 무산소 조건에 저항성(anoxia-tolerant plants)을 갖는 식물체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 옥수수, 밀, 또는 보리인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 목적 단백질은 G-CSF, GM-CSF, SA, AAT, INF-gamma 또는 사람 CTLA4Ig인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포에서 질소기체 등을 사용하여 배지 내의 산소농도를 무산소 상태로 유지하고, 여기에 특정농도의 당을 첨가하여 세포 생존도를 최대화함으로써, 형질전환 식물세포를 장기 보존하는 방법 및 상기 장기 보존 배지 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일상생활에서 필요로 하는 단백질을 대량으로 수득하기 위하여 목적세포를 발현벡터로 형질전환하여 원하는 재조합 단백질을 대량생산하는 시스템이 존재한다. 일반적으로 동물세포와 미생물에의 형질전환을 통한 재조합 단백질 수득 시스템이 구축되어 왔으나, 최근 대량생산에서의 비용 문제 및 FDA 허가 시 동물유래 바이러스나 독소(toxin) 등의 감염 문제가 발생할 수 있기 때문에 식물세포와 식물체 배양을 통한 연구와 산업화가 활발히 진행 중에 있다.

[0003] 식물세포에서 재조합 단백질을 생산하는 것은 식물세포에서 발현할 수 있는 프로모터 및 목적유전자를 포함하는 발현벡터로 식물세포를 형질전환 하는 것으로서, 식물세포배양에 사용할 수 있는 기본배지로는 AA, MS, N6, WHITE 및 SH 배지 등이 있으며, (Ge, X. *et al.*, *Plant cell Rep.*, 25: 392-402, 2006; Terashime *et al.*, *Biochem. Eng. J.*, 4: 31-36, 1999). 식물세포배양은 동물세포배양에 비해 동물유래의 바이러스와 독소 등을 포함하지 않으며, 동물세포배양에 비해 그 정제과정이 간단하고 경제적이란 점(Doran, P. M., *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 199-204, 2000), 저비용 고효율 생산이 가능하다는 점 및 미생물에 비하여 동물과 유사한 단백질 생성 후 수식(post-translational modification)등의 장점을 바탕으로 식물세포를 통한 재조합 단백질 생산에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Larrick, J. W. and W. T. David, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 411-418, 2001). 특히 유전자 재조합된 식물 세포는 재조합 미생물 발효에 의한 생산에서 불가능한 단백질 생성 후 수식(post-translational modification)이 가능하므로, 중요한 생물의약 단백질 기능에 손상이 없이 생산할 수 있으며 단백질이 전혀 함유되어 있지 않은 배지를 사용하므로 분리 및 정제 공정에 큰 도움을 줄 수 있다.

[0004] 최근 형질전환 식물세포배양을 이용한 외래단백질 생산에 벼, 담배, 애기 장대 등이 주로 이용되고 있으며, 대표적인 예로서, 벼세포에서 RAmy3D 프로모터를 이용해 재조합 단백질인 G-CSF, GM-CSF, SA, AAT, INF-gamma, hCTLA4Ig 등을 생산하고 있다(Hellwig, S., *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 22: 1415-1422, 2004).

[0005] CTLA4Ig는 T cell의 활성화를 일으키는 공조자극신호에 관여하는 CTLA-4(cytotoxic lymphocyte antigen4)와

Immunoglobulin의 Fc부분을 융합한 단백질로 장기이식 시에 면역 기능을 억제하고 자가 면역질환과 같은 염증성 질환을 치료하는데 사용된다. 면역반응을 유발하는 T 세포의 활성화는 APC(Antigen Presenting Cell)의 MHC(Major Histocompatibility Complex)와 TCR(T cell receptor)간의 상호작용으로 인한 활성화 신호를 세포 내로 전달함으로써 시작되며, TCR에 의한 항원인식 후에 T세포의 CD28과 APC표면의 B7수용체(CD80과 CD86)간의 결합에 의한 자극 신호에 의해 항원반응이 일어나게 된다. CTLA4는 CD28에 비해 B7수용체와 약 20배 높은 친화력을 나타내며 CD28과 달리 T세포의 활성을 억제 하거나 감소하는 신호를 전달하는 역할을 하게 된다. 인위적으로 CTLA4의 C말단에 면역글로불린 IgG의 Fc부분을 융합시킨 CTLA4Ig 융합 단백질을 제조하였으며, Ig부분은 affinity chromatography column에서 효과적인 정제와 dimeric CTLA4 단백질의 생산 그리고 생체 내에서 긴 반감기를 가능하게 한다.

[0006] 식물세포배양은 여러 유용한 이차대사산물 및 유용단백질 생산을 위한 공급원으로 여겨지고 있다. 그러나 일반적으로 사용되는 식물세포의 유지 방법은 반복적인 계대배양을 통해 세포의 분열 상태를 계속 유지하는 것으로 고비용, 조작의 실수로 인한 오염 가능성, 시간 및 인력의 소비, 배수체의 증가, 자발적인 변이, 형태 형성능 및 산물 생성 능력의 손실 또는 감소, 선택 세포주 및 형질전환 세포주의 wild-type으로의 전환, 원하지 않는 표현형의 배양 내 독점 등의 문제점이 있다.

[0007] 제조합된 식물세포의 보존방법으로는 대표적으로 계대 배양, 저온 보존 및 동결보존 방법을 들 수 있으며, 계대 배양은 현탁(suspension) 세포와 캘러스(callus) 세포의 계대배양으로 구분될 수 있다. 계대배양을 통한 세포 보존은 일주일 또는 한달 간격의 세포주 유지가 지속적으로 이루어져야 하므로, 시간과 노동이 소요된다는 점과 유지 과정에서 오염이 발생할 수 있다는 문제점이 있다. 저온보존 방식으로는 0℃에서의 보존은 세포 생존도(viability)가 현저히 저하되고, 이 방식으로는 1~2개월 정도의 보관이 가능하다. -20℃에서의 보존 방법 역시 세포 생존도가 저하되고 이 방식으로는 2~3개월 정도의 보관이 가능하다.

[0008] 식물세포의 동결보존(-196℃)은 최초 성공이 보고된 이래로(Quatrano, 1968; Nag와 Street, 1973) 지금까지 다양한 세포주에서 여러 가지 방법이 고안되어왔으나, 동결보존 후의 세포 생존도가 낮고, 동결보존 후의 세포가 원래의 세포와 다른 특성을 보이는 등의 위험성이 있어 일반적인 방법으로 사용되지 못한다. 동결보존은 세포에 osmotic stress, cold shock, chemical shock, ice crystals 형성, membrane의 overstretch, 해동시의 busting등의 심각한 stress를 가하여, 세포에 심각한 손상을 주게 된다. 이러한 손상정도에 따라 동결보존된 세포들(cryopreserved cells)은 물리화학적으로나 구조적으로 정상세포와 다를 수 있다. 또한 동결보존 방법으로는 전배양 단계나 동결보존액 처리 및 해동 작업, 작은 용기(cryotube)에서 일일이 수행하는 수작업 등으로 인해 노동이 소요되며 이 역시 복잡한 단계 중에 오염의 요소가 있어 산업적으로 적용하기에 문제가 있다.

[0009] 상기에서 살펴본 바와 같이, 유용한 제조합 단백질을 생산할 수 있는 형질전환된 식물세포의 유지 및 보존을 위한 종래의 방법들은 세포주의 유지는 오염 및 조작의 실수 등을 야기 할 수 있고, 세포주의 자발적인 변이 및 제조합 단백질 생성 능력의 손실 등을 일으킬 수 있으며, 이러한 산물의 생산능 및 인위적으로 형질 전환된 획득 성질의 손실은 식물 세포배양을 이용한 유용산물 생산의 산업화에 저해요인으로 작용하게 된다. 따라서, 동물 세포나 미생물과 마찬가지로 식물 세포주의 경우도 장기간 보존할 수 있는 무오염 및 저비용 고효율 식물세포 장기 보존방법 개발의 필요성이 증가하고 있다.

[0010] 벼는 무산소 저항 식물체(anoxia-tolerant plant)로, 이는 산화환원(redox) 상태를 유지할 수 있어 무산소 조건 하에서도 견딜 수 있다고 알려져 있다(Mocquot, B. et al., *Plant Physiol.* 68: 636-640, 1981). 무산소 조건이 되면 세포는 대사적인 변화를 가지게 된다. 즉 세포내 pH 감소, 지질의 과산화(lipid+peroxidation), NADH 과량화(excess of NADH) 등이 발생한다. 벼는 산화환원 상태인 NADH/NAD⁺ 비율을 유지하여 무산소 조건에서 세포생존도를 장기간 지속할 수 있다.

[0011] 이에 본 발명자들은 종래의 식물체, 조직 또는 세포의 장기보존 방법의 오염, 제조합 단백질 생성 능력의 손실, 세포주의 자발적인 변이 등의 단점을 개선할 수 있는 저비용 고효율의 식물세포 장기보존 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 당이 첨가된 무산소 조건 하에서 형질전환 식물세포가 장기보관에도 높은 생존도를 가지며, 세포의 제조합 단백질 생성 능력을 유지할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0012] 따라서 본 발명의 목적은 형질전환된 형질전환 식물체, 조직 또는 세포를 무산소 조건 하에서 장기 보존하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 무산소 조건 하에서의 형질전환 식물체, 조직 또는 세포의 최적화된 장기 보존 배지 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0015] (a) 당 고갈시 작동하는 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 형질전환 식물체, 조직 또는 세포를 제조하는 단계;
- [0016] (b) 배양 배지 중에 1~300mM의 농도로 당을 포함하는 식물세포 배지를 준비하는 단계; 및
- [0017] (c) 무산소 조건하에 (b)단계의 배지에 식물세포를 장기 보존하는 단계를 포함하는 형질전환 식물체, 조직 또는 세포를 무산소 조건하에 장기 보존하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에서, 형질전환 식물세포의 보존 시작단계에 기존 AA 배지에 질소기체를 사용하여 무산소 조건을 조성하여, 보존 기간 동안 세포의 생존도 및 pH를 측정된 결과, 기존 동결보존의 방법(도 4)보다 당을 첨가한 무산소 조건에서에서의 세포 생존도가 더 오랜 기간 동안 유지(도 5b)되는 것을 확인함으로써 간단한 방법으로 세포를 장기보존 할 수 있음을 확인하였다.
- [0019] 또한 당을 첨가하지 않은 무산소 조건의 경우 약 8일 정도의 생존 유지력을 보이고 있으나(도 5a), 특정 농도의 당을 첨가한 경우, 형질전환 식물세포가 장기간 유지될 수 있음을 확인하였다.(도 5b)
- [0020] 본 발명의 배지는 AA(Amino acid) 배지, MS(Murashige & Skoog), N6, WHITE 또는 SH(Schenk & Hiderbrandt) 등이 가능하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명에서, 형질전환 식물체는 벼, 옥수수, 밀, 또는 보리 등의 무산소 조건에 저항성(anoxia-tolerant plants)을 갖는 식물체로서, 바람직하게는 벼 또는 옥수수이며, 보다 바람직하게는 벼세포이다.
- [0022] 본 발명에서 당 고갈시 작동하는 프로모터는 바람직하게는 α -아밀라아제의 RAm3D 또는 RAm3E 프로모터이며, 보다 바람직하게는 RAm3D프로모터이고, 목적 단백질은 G-CSF, GM-CSF, SA, AAT, INF-gamma 또는 hCTLA4Ig이며, 보다 바람직하게는 사람 CTLA4Ig이다.
- [0023] 본 발명은 무산소 조건에 특정농도의 당을 첨가하여 형질전환 식물세포를 장기 보존하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명에 따른 당은 바람직하게는 수크로즈, 글루코즈, 프럭토즈, 갈락토즈 또는 TCA 사이클 중간체(피루베이트, 숙신산 등), 단백질유래 가수분해물(phytone peptone), 글리세롤, 소비톨, 만니톨 등의 당 대체제이며, 보다 바람직하게는 수크로즈 또는 글루코즈이고, 배양 배지 중에 1~300mM의 농도로 포함될 수 있으며, 보다 바람직하게는 30~180mM, 가장 바람직하게는 174mM 로서 포함될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에서 무산소 조건 시 87 mM(30g/L), 174 mM(60g/L), 261 mM(90g/L) 농도별의 당을 첨가하고 TTC(triphenyl tetrazolium) 환원법으로 상대적인 생존도를 측정된 결과, 세포 생존도는 당을 첨가하지 않은 경우보다 당을 첨가한 무산소 조건에서 모두 높은 세포 생존도를 보였고, 특히, 174 mM의 당 농도에서 보존 두 달 경과시까지 70% 이상의 상대 세포 생존도를 보임을 확인할 수 있다(도 6). 또한 본 발명의 일 실험예에서 무산소 조건에 특정농도의 당을 첨가한 배지에서 장기간 보존된 형질전환 식물세포의 경우 재조합 CTLA4Ig 단백질을 고효율로 수득할 수 있음을 확인하였다.(도 7)
- [0026] 따라서, 본 발명에 따른 특정 농도의 당을 첨가한 무산소 조건은 형질전환 식물세포의 사멸을 억제하면서도 세포의 재조합 단백질 생성 능력을 유지할 수 있는 최적화된 형질전환 식물세포의 장기간 보존 방법임을 알 수 있다.
- [0027] 본 발명은 당 고갈시 작동하는 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합백터로 형질전환된 형질전환 식물체, 조직 또는 세포를 무산소 조건에서 장기 보존하는 배지 조성물을 제공하며, 상기 배지 조성물은 배양 배지 중에 1~300mM의 농도로 당을 포함할 수 있고, 보다 바람직하게는 30~180mM, 가장 바람직하게는 174mM(60g/L) 농도의 당을 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 배지 성분 외에도 형질전환 식물세포의 생존도를 증진시킬 수 있는 배지 조성물 및 배양방법이 본 발

명의 범주에 포함됨은 당업자에게 자명한 사실이며, 일례로 당이 첨가된 무산소 조건에 항산화 물질을 첨가할 수 있고, 본 발명의 기술분야에 종사하는 자들에게 널리 공지된 세포 배양 성분들이 적절하게 사용될 수 있으며, 공지성분의 첨가는 본 발명의 기술적 사상의 범주에 포함된다.

효 과

[0029] 본 발명에 따르면, 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포의 배지에 특정농도의 당을 첨가하여 세포 생존도를 최대화함으로써, 형질전환 식물세포의 장기 보존 시 세포의 오염 없이 저비용 및 고효율 보존이 가능하게 되어 식물세포를 통한 재조합 단백질의 산업화에 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명은 배지 내의 산소농도를 무산소 상태로 유지하여 형질전환 식물체, 조직 또는 세포를 장기 보존하는 방법 및 여기에 특정농도의 당을 첨가하여 최적화된 형질전환 식물세포 장기 보존하는 방법을 제공한다.

[0031] 또한 본 발명은 재조합벡터로 형질전환된 형질전환 식물체, 조직 또는 세포를 무산소 조건에서 장기 보존하는 배지 조성물로서, 특정 농도의 당을 포함하는 배지 조성물을 제공한다.

[0032] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0033] <실시예 1> 형질전환 식물체 제작 및 배양

[0034] 1-1. 세포 배양 및 배지

[0035] 본 실시예에 사용된 세포주는 도 1의 발현벡터(전북대학교, 보령제약, 대한민국)로 형질전환된 재조합 hCTLA4Ig 단백질을 생산하는 형질전환 벼(*Oryza sativa* L. Dongjin) 세포주이다. 여기에는 벼의 아밀라제 유전자군인 RAmY3D 유도 프로모터를 particle-bombardment 방법(Lee, S. J. *et al.*, *Protein Expres. Purif.* 51: 293-302, 2007)을 이용하여 벡터에 삽입시켜 형질전환하였고, 상기 프로모터는 수크로스가 고갈된 상태에서 작동된다. 생장배지로는 amino acid(AA) 기본배지(Terashima 등, 1999)를 사용하였으며, 탄소원으로는 30 g/L sucrose를 사용하였고, 생장조절제로는 2.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)와 0.2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L gibberellin(GA3)을 사용하였다. pH를 5.8로 맞춘 뒤, 500 mL의 Erlenmeyer flask에 분주한 다음, 121℃ 1기압에서 가압증기 멸균하였으며, 아미노산 혼합용액(1.0 mM glycine, 6.0 mM glutamine, 2.0 mM aspartic acid, 1.3 mM arginine)을 농축한 다음 0.1 mg/L gibberellin (GA), 50 mg/L hygromycin을 첨가하여 0.22 μ m membrane filter로 여과 멸균하였다. Shaking 배양기에서 28℃, 120 rpm, 암 조건에서 9일 간격으로 계대 배양을 수행하였다. 멸균된 100 mL Erlenmeyer flask에 0.22 μ m membrane filter로 여과된 배지혼합용액을 30 mL씩 분주하여 실험을 수행하였으며, 생장시와 같은 조성의 배지를 이용하였다. 목적단백질을 생산하기 위해서 유도(induction) 배지로는 생장배지에서 sucrose만을 제거한 배지를 사용하였으며, 28℃, 120 rpm, 암 조건에서 2일 간격으로 시료를 취하였다.

[0036] 1-2. 세포중량 측정

[0037] 세포의 생장을 측정하기 위해서 세포생체량(FCW, fresh cell weight)과 세포건체량(DCW, dry cell weight)을 각각 측정하였다. 100 mL Erlenmeyer flask 배양한 현탁세포는 Buchner funnel(OMG사, 대한민국)을 이용해 Whatman No. 1 여과지상에서 세포와 배양액을 분리하였다. 배지는 추가적인 분석을 위해 따로 저장한 뒤, 여과지 상의 세포는 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고, 미리 무게를 측정하는 weighing dish(OMG사, 대한민국)에 세포를 담고 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후, 2일 동안 60℃의 drying oven에서 건조시킨 뒤 세포건체량을 측정하였다.

[0038] 1-3. 세포 생존도 측정

[0039] 세포생체량(FCW) 0.1 g에 1.5% TTC(triphenyl tetrazolium chloride, pH 9) 용액 1.6 mL을 첨가한 뒤, 20° C에

서 24시간 동안 반응시켰다. 15° C, 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리한 다음, 상등액은 버리고 95% 에탄올을 1 mL 첨가하였다. 완전히 vortexing 한 뒤, 60° C에서 30분 동안 반응시킨 뒤 세포 내에 생성된 red formazan을 추출하였다. 4° C, 15,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후, 상등액 0.6 mL을 취하고, spectrophotometer를 이용하여 485 nm에서 O.D. 값을 측정하였다. Blank로는 95% 에탄올을 이용하였다.

<실험예 1> 종래 장기 보존 방법

1-1. 현탁세포 배양 및 유지

현탁세포 유지를 위해, AA 배지에 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D), 0.2 mg/L kinetin을 첨가하고, pH를 5.8로 맞춘 뒤 500 mL의 Erlenmeyer flask에 분주한 다음 가압증기 멸균하였다. 그 후 0.22 μ m membrane filter로 여과 멸균한 AA배지 아미노산 혼합용액(1.0 mM glycine, 6.0 mM glutamine, 2.0 mM aspartic acid, 1.3 mM arginine), 0.1 mg/L gibberellic acid(GA)와 50 mg/L hygromycin을 추가하였다. 현탁화 세포 유지 시 계대 배양을 통해 세포주를 유지하며, 그 주기는 도 2에서 알 수 있듯이 10일 정도로, 세포를 유지하고 보존하기 위해, 배지 내 영양소의 고갈로 새 배지로 교환해주는 계대배양 작업이 필요함을 알 수 있다.

1-2. 캘러스 배양 및 유지

캘러스를 준비한 N6SE 배지에 dish마다 적당량을 계대하였다. Autoclave 또는 화염멸균한 핀셋 및 스파출라를 이용하여 캘러스를 배지로 옮겨주고, 28°C에서 암조건으로 캘러스 배양 조건에 따라 3~4주 정도 배양하였다. 캘러스 세포 유지 시, 3~4주 정도의 계대 배양을 통해 세포주를 유지함을 확인하였으며(도 3), 결과적으로 캘러스 배양의 경우 세포가 성장하는 데에 시간이 오래 걸리며, 캘러스 세포 유지동안, 체조합단백질의 유전적 안정성이 떨어지고, 목적 단백질을 생산하기 위한 안정적인 현탁화 세포주를 얻는데도 시간이 오래 걸리게 됨을 알 수 있다.

1-3. 동결보존

(1) 예비배양

예비배양 (Pre-culture)을 위한 배지는 AA 기본배지에 0.5 M의 sucrose를 첨가하고 가압증기 멸균 한 후에 AA배지 아미노산 혼합용액을 추가하였다. 250 mL Erlenmeyer flask에 70 mL씩 분주하고 각 flask에 6 g의 세포를 접종한 후 5일간 배양하였다.

(2) 접종과 동결보호제 (Cryoprotectant)

Buchner funnel을 이용하여 ADVENTEC No. 1 여과지로 배지를 제거하고 세포를 1.8 mL의 cryo vials (nunc)에 0.4 g씩 접종하였고, 1 M sucrose, 1 M DMSO, 1 M glycerol이 첨가된 동결보호제 1.2 mL을 첨가하였다.

(3) 동결보존

Isopropanol로 충전된 Freezing container (NALGENE)를 이용하여 -1°C/min으로 2 시간 동안 deep freezer에서 천천히 냉각한 후 -196°C의 액체질소 탱크로 옮겨 동결보존 하였다.

(4) 해동 (Thawing) 및 재생장 (Regrowth)

42°C의 water bath에 3 분간 해동 한 후 Buchner funnel을 이용하여 ADVENTEC No. 1 여과지로 동결보호제를 제거하고, 세포를 회수하여 AA agar 배지에 옮겨주었다.

동결보존(액체질소, -196°C) 조건으로 본 발명의 실시예 1-1에 따른 형질전환 식물세포를 보존할 경우, 동결 후 30일 경과시에 상대 세포 생존도가 20%미만으로 감소함을 알 수 있다.(도 4)

[0056] <실시예 2> 무산소 조건하의 세포생존도 확인

[0057] 2-1. 무산소 배양에 따른 세포 생존도 측정

[0058] 본 발명자들은 형질전환 벼 세포의 보존 시기 동안 무산소 조건하의 세포 생존도를 측정하였다.

[0059] 구체적으로, 식물세포 배양 시 에어레이션(aeration)이 필수적인데, 일반적인 경우 필터-멸균된 컴프레서를 통해 공급된 공기는 스파저(sparger)에 의해 배양액 내로 공급된다. 반면에, 무산소 조건에서는 필터-멸균된 질소 가스를 스파저를 통해 공급하여 배양액 내를 무산소 상태로 유지하였다.

[0060] 무산소 조건에서의 상대 세포 생존도를 동결건조 방법과 비교한 결과, 도 6a, 도 6b에서 나타나듯이, 무산소 조건에서는 특정 당 농도(30, 60 g/L)에서 두달 후까지 65%이상의 세포 생존도를 보였으며, 결과적으로 동결건조 방법과 비교하면 무산소 조건이 기존 조건보다 상대 세포 생존도를 현저히 높일 수 있음을 확인할 수 있다.

[0061] 2-2. 농도별 당 첨가시의 세포생존도 및 pH 측정

[0062] 실시예 2-1에서의 무산소 조건 배양에, 87 mM(30 g/L), 174 mM(60 g/L), 261 mM(90 g/L) 농도별의 글루코스를 첨가하고, 세포 생존도를 측정하였다. 상대 세포 생존도는 174 mM의 당이 첨가된 경우, 보존 두달째까지는 70% 이상의 상대 세포 생존도를 유지하였다.(도 6a, 6b, 6c)

[0063] <실험예 2> 무산소 보존에 따른 식물세포 재조합 hCTLA4Ig 단백질 생산성 실험

[0064] 60 g/L 당이 첨가된 무산소 조건에서 2달 동안 보존된 세포에 단백질 생산성을 확인하기 위해, 산소를 공급(충진)하였다. 인덕션(induction)을 위해 세포 배지를 당이 없는 배지로 교환 후, 생산시기 12일 동안 hCTLA4Ig의 발현양을 관찰하였다.

[0065] 배지로 분비된 hCTLA4Ig의 양은 ELISA 분석법을 이용하여 정량하였다. Capture 항체로 Goat anti-human IgG (KPL, USA)를 사용하였으며, capture 항체와 coating 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)를 1 : 1000으로 희석하여 well당 100 mL씩 분주하여 4℃ overnight한 후, blocking 버퍼 (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KH₂PO₄, 1.15 g/L Na₂HPO₄, 0.2 g/L KCl, 2% FBS, pH 7.4)를 well당 200 mL씩 분주하여 1-2시간 상온에서 incubation 시켰다. Standard는 human IgG (Pierce, USA)를 사용하여 assay diluent를 well당 100 mL씩 분주하고 시료 및 standard 200 mL씩 넣고 1/2씩 희석하여 상온에서 2시간 incubation 시켰다. Detection 항체인 peroxidase labeled goat anti-human IgG (KPL, USA)와 assay diluent를 1 : 5000으로 혼합하여 well당 100 mL씩 분주하고 상온에서 1시간 incubation한 후, ABTS peroxidase substrate (KPL, USA)를 well당 100 mL씩 분주하여 상온에서 20분 동안 incubation 시켰다. 그 후, stop 버퍼를 well당 100 mL씩 분주하여 microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 405 nm에서 측정하였다.

[0066] 실험결과, 무산소 조건에 특정농도의 당을 첨가한 배지에서 장기간 보존된 형질전환 식물세포의 경우 재조합 CTLA4Ig 단백질을 고효율로 수득할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명에 따른 형질전환 식물세포의 장기 보존 후에도 재조합 단백질 생산능력을 유지하고 있음을 알 수 있다.(도 7)

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 본 발명에 사용된 재조합 CTLA4Ig 단백질을 생산하도록 벼세포에 형질전환된 발현벡터를 도기한 것이며,

[0068] 도 2는 현탁화 세포 유지 시 계대배양을 통한 시간에 따른 성장 (세포건체중량) 그래프이며,

[0069] 도 3은 캘러스 세포 유지 시 시간에 따른 캘러스 세포 성장을 나타낸 사진이며,

[0070] 도 4는 종래의 형질전환 식물세포의 동결보존(액체질소, -196℃) 방법에 따른 동결보존시간별 세포 생존도 그래프이며,

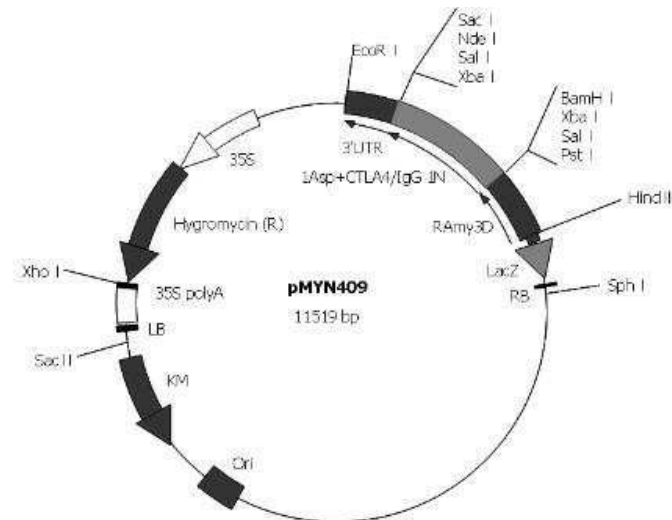
[0071] 도 5는 무산소 조건에 따른 시간별 세포 생존율을 나타내는 그래프로써, (a)는 당이 없는 배지에서 무산소 조건에 따른 시간별 세포 생존율이고 (b)는 30 mM glucose가 첨가된 배지에 무산소 조건을 적용한 시간별 세포 생존율을 나타내는 그래프이며,

[0072] 도 6은 각각 (a)87 mM(30 g/L), (b)174 mM(60 g/L), (c)261 mM(90 g/L)의 당 첨가 농도별 무산소 조건에 따른 시간별 세포생존도 및 (d) 당의 농도별 첨가에 따른 pH를 나타내는 그래프이며,

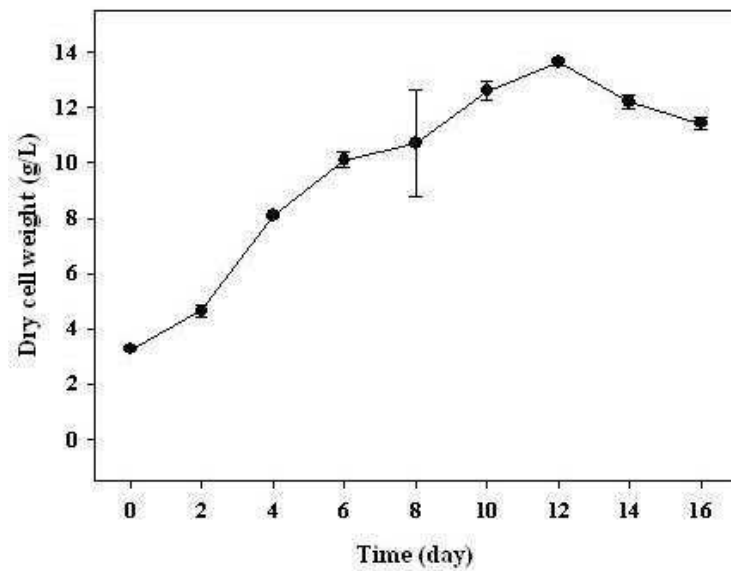
[0073] 도 7은 무산소 보존 후, 식물세포의 재조합 CTLA4Ig 단백질을 생산성을 나타낸 그래프를 나타낸다.

도면

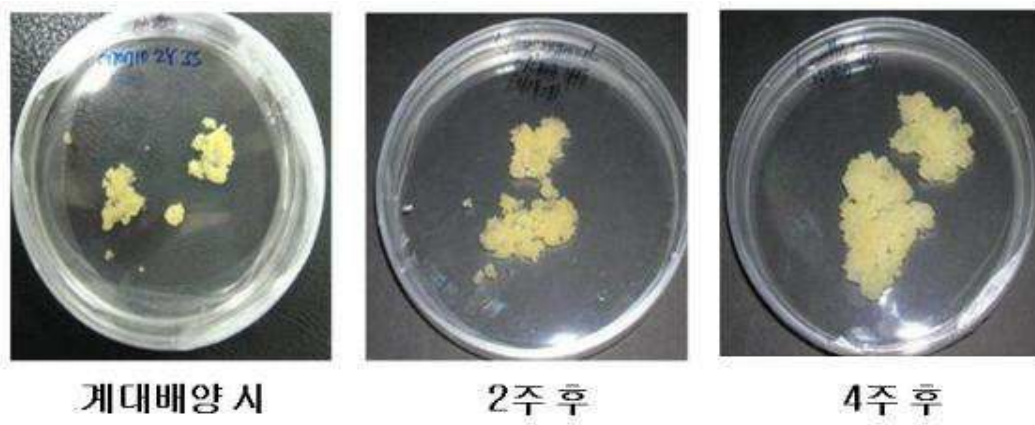
도면1



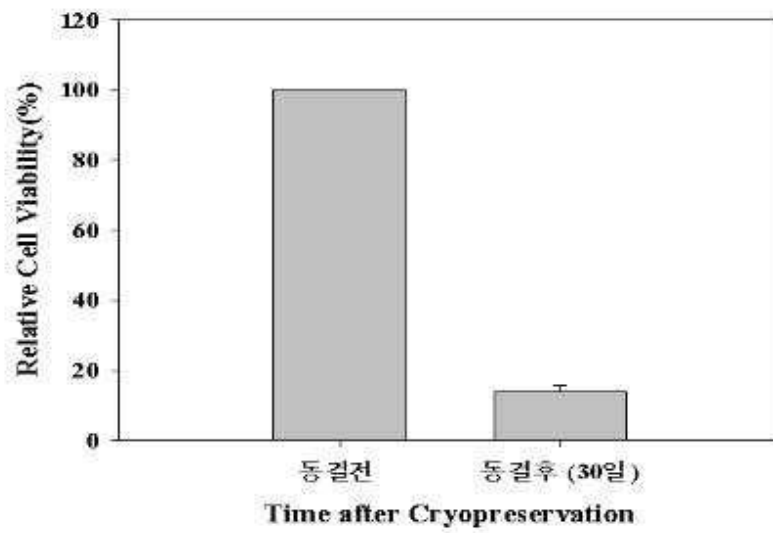
도면2



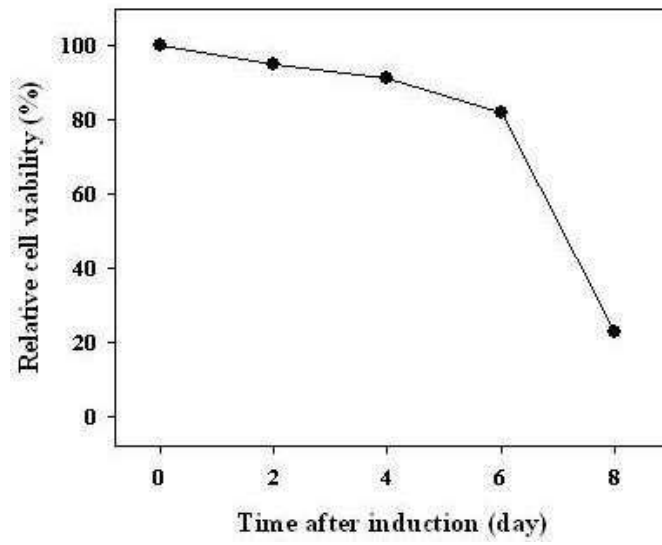
도면3



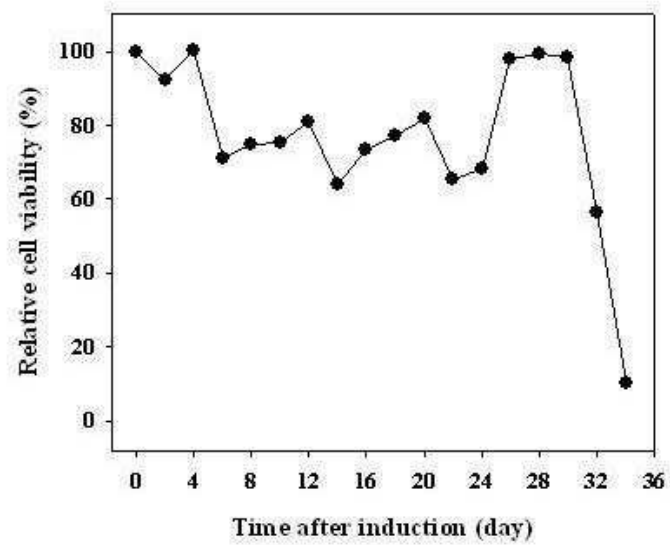
도면4



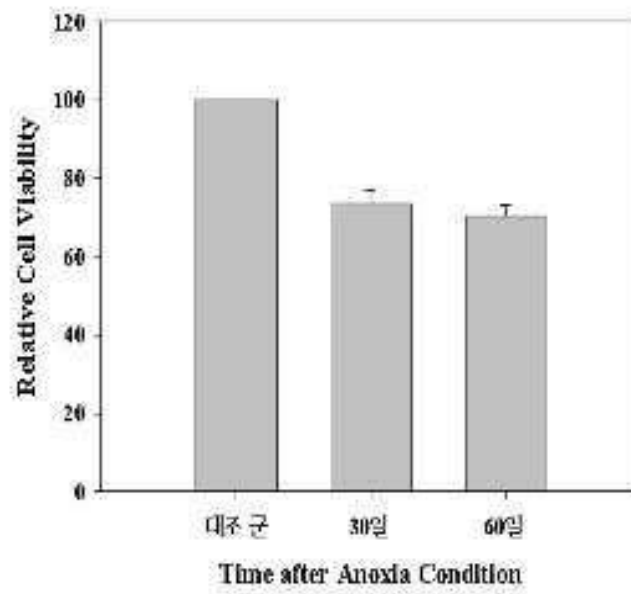
도면5a



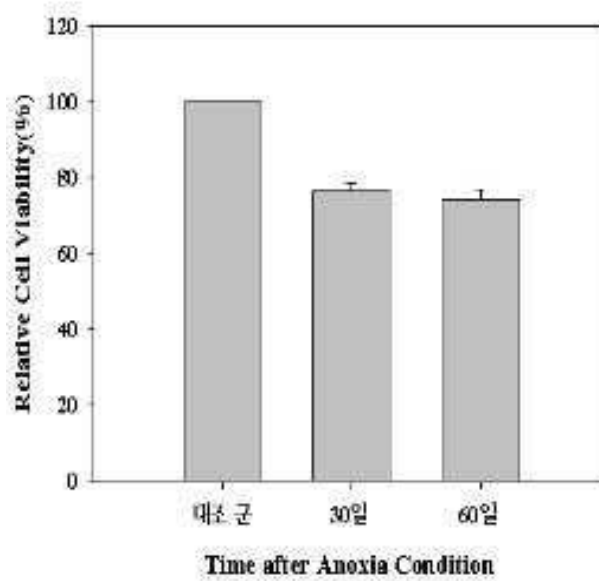
도면5b



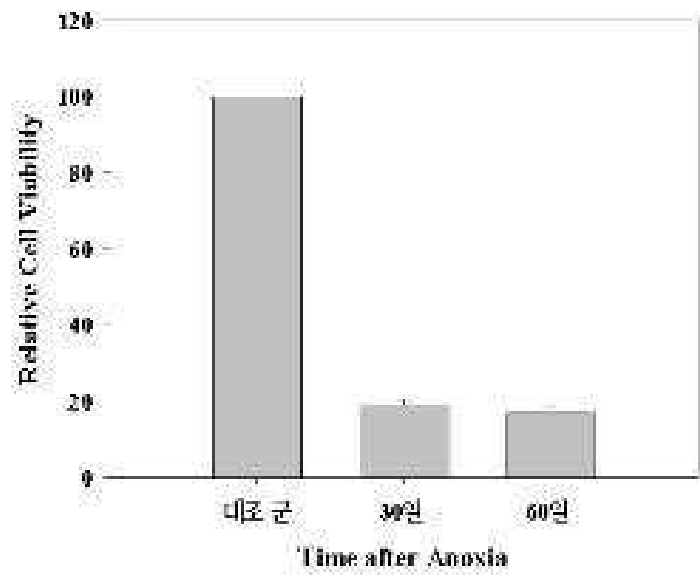
도면6a



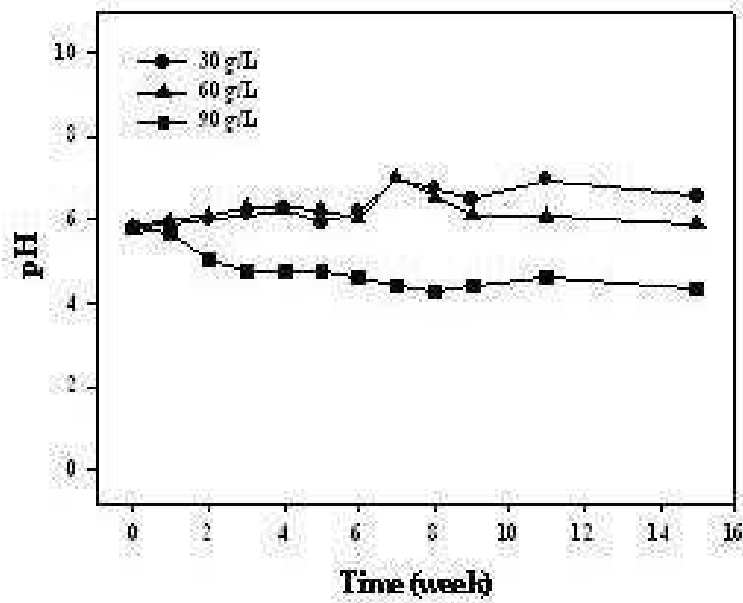
도면6b



도면6c



도면6d



도면7

