

형질전환된 *Nicotiana tabacum* 배양에 있어서 glutathione과 ascorbic acid가 세포생장과 생존율에 미치는 영향

김용훈, 이상윤, 김동일*

인하대학교 공과대학 생명화학공학과

전화 (032) 860-7515, FAX (032) 872-4046

Abstract

Glutathione and ascorbic acid have been shown to fulfill many essential functions in animal and plant growth, development, defence and protection against oxidative damage. Effects of glutathione and ascorbic acid were examined in transgenic *N. tabacum* cells producing hGM-CSF to determine the effects of the vitamins on growth and cell viability. In lag phase, cell viability was preserved by glutathione and ascorbic acid. Therefore, recombinant protein productivity was increased. The purpose of present study is to investigate the role of antioxidants in cold stress-induced apoptosis in plant suspension cells. Cold stress lowered cell viability and increased total genomic DNA fragmentation. Supplementing the cell cultures with glutathione and ascorbic acid inhibited cold stress-induced decrease in cell viability and increase in total genomic DNA fragmentation.

서 론

식물세포배양을 통한 유용 생리활성 단백질 생산은 기존의 동물세포나 미생물배양이 가지고 있던 문제점들을 해결하기 위한 대체 수단으로써 그 중요성이 부각되고 있다. 유전자 재조합 기술의 발전으로 인해 형질 전환된 식물세포의 현탁 배양이 가능하게 되고, 최근에는 이를 통한 항원, cytokine, 단일클론 항체 등의 의약품 단백질 생산에 관심이 집중되고 있다¹⁾. 특히 avidin, aprotinin 등은 상업적 생산 공정이 이미 개발되었으며, 여러 경구용 백신이 임상실험 중에 있다²⁾. 이러한 단백질의 생산성은 세포의 생존율과 직접적으로 비례한다. 최근에는 동물세포와 식물세포의 죽음에 이르는 경로의 유사성이 밝혀지고 있으며, 재조합 단백질을 생산하는 형질전환 식물세포의 경우도 이와 유사할 것으로 판단된다. 따라서 재조합 단백질의 생산성을 높이기 위해서 여러 외부 스트레스로 인한 세포 생존율 저하의 억제 및 세포사멸 방지기술의 개발이 더욱 필요하다.

본 연구에서는 항산화제로 알려진 glutathione과 ascorbic acid를 배지에 첨가함으로써 세포의 생존율 변화와 그로인한 재조합 단백질 생산성의 변화를 확인하였다. 또한 저온에서의 배양을 통해, 식물세포에서도 DNA 절편화와 같은 apoptosis 특징이 나타나는지를 확인하는 실험을 수행하였다^{3,4}. 동시에 glutathione과 ascorbic acid를 첨가한 세포의 생존율과 total genomic DNA를 확인하였다^{5,6}.

재료 및 방법

세포주

본 연구에 사용한 형질 전환된 현탁세포는 전북대학교로부터 분양 받은 *Nicotiana tabacum* 세포주이다. 이는 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 형질 전환되었으며, hGM-CSF를 생산한다.

배양

생장배지로는 Murashige와 Skoog(MS) 기본배지에 0.2 mg/L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid(2,4-D), 0.02 mg/L kinetin, MS vitamin, 0.1 g/L myo-inositol, 30 g/L sucrose를 첨가하여 사용하였다. pH는 5.9로 맞추는 뒤 121°C, 1.2기압에서 가압 증기 멸균한 뒤 0.2 mm filter로 여과한 kanamycin 농축용액을 100 mg/L의 농도가 되도록 첨가하였다. 배양조건은 회전식 진탕 배양기에서 25°C, 120 rpm, 암조건을 유지하였다.

분석방법

세포 생장은 dry cell weight(DCW)를 측정하여 확인하였다. 100-mL Erlenmeyer flask에서 배양한 현탁세포를 Buchner funnel을 이용하여 여과지 상에서 시료의 배양액을 걸러내었다. 증류수로 2-3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 미리 무게를 측정한 weighing dish에 세포를 옮겨담아 화학저울로 fresh cell weight(FCW)를 측정하였다. FCW 측정 후 60°C의 drying oven에서 24시간 동안 항량이 될 때까지 건조하여 DCW를 측정하였다. 세포 생존율은 원형질막을 자유로이 투과하는 비형광성이며, 비극성 물질인 fluorescein diacetate(FDA)를 이용하여 세포내 가수분해 효소인 esterase의 활성을 매개변수로 하여 응집체를 형성하고 있는 *N. tabacum* 세포의 상대적 생존율(%)을 측정하였으며, 시료간 형광도를 표준 곡선과 비교하여 상대적인 세포 생존율을 측정하였다⁷. hGM-CSF의 양은 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

정상적인 형질전환 담배세포의 경우 배양초기, 급격한 환경인자(삼투압, pH 등) 변화로 인해 세포 생존율이 떨어졌으며(Fig. 1a), 이는 세포크기지수(FCW/DCW) 변화를 통해서도 알 수 있었다(Fig. 1b). 배양중반, 세포 생존율은 회복되어 배양 6일째 최대치에 도달했으며 배양후반, 배지의 영양분(당, 염류) 고갈로 인해 세포 생존율은 떨어졌다(Fig. 1a). Glutathione과 ascorbic acid의 첨가는 세포 생존율의 저하를 억제하였으며, 그로 인해 재조합 단백질인 hGM-CSF의 생산성을 증대시킬 수 있었다(Fig. 2a). 또한 glutathione과 ascorbic acid의 첨가는 저온(4°C, 120 rpm) 배양에서의 세포 생존율 감소를 억제시킴으로써 대조구에 비해 높은 생존율을 유지시킬 수 있었다(Fig. 2b). Cold stress로 인한 식물세포의 apoptosis 정도를 확인하기 위하여 전체 genomic DNA 전기영동을 수행한 결과, 저온배양 6일째부터 DNA 절편화 현상을 보였으며, 저온 배양 시간이 경과함에 따라 그 정도가 심해짐을 알 수 있었다(Fig. 3). 또한 glutathione과 ascorbic acid의 첨가는 cold stress로 인한 DNA 절편화를 감소시킴으로써 apoptosis를 억제시키는데 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

요 약

본 연구에서는 형질전환된 *N. tabacum* 배양에 있어서 glutathione과 ascorbic acid가 세포 성장과 생존율에 미치는 영향을 비교하여 실험하였다. Glutathione과 ascorbic acid의 첨가는 배양초기 세포 생존율의 감소를 완화시켰으며, 그로인한 재조합 단백질의 생산성 증대를 확인할 수 있었다. 또한 glutathione과 ascorbic acid를 첨가하여 배양한 세포는 cold stress로 인한 세포 생존율의 감소와 DNA 절편화를 억제시키는데 효과가 있었다. 변형시킨 FDA법에 의한 세포 생존율은 배양 6일째 최대를 보였으며, 고삼투압 배지와 저온의 환경은 세포 생존율을 저하시켰다. 반면 cold stress 전에 glutathione과 ascorbic acid를 첨가하여 배양한 세포의 생존율은 cold stress 후, 대조구 세포보다 높게 유지되었으며, DNA 절편화 현상도 cold stress 후, 대조구 세포보다 적게 일어남을 확인하였다. 따라서 glutathione과 ascorbic acid는 cold stress로 인한 세포 생존율 저하를 완화시키며, apoptosis 억제 효과가 있다고 판단된다.

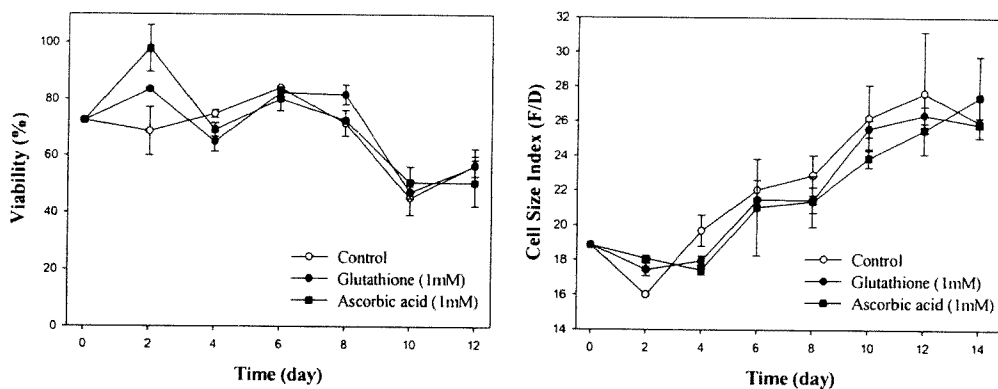


Fig. 1. Effects of glutathione and ascorbic acid on (a) cell viability and (b) cell size index.

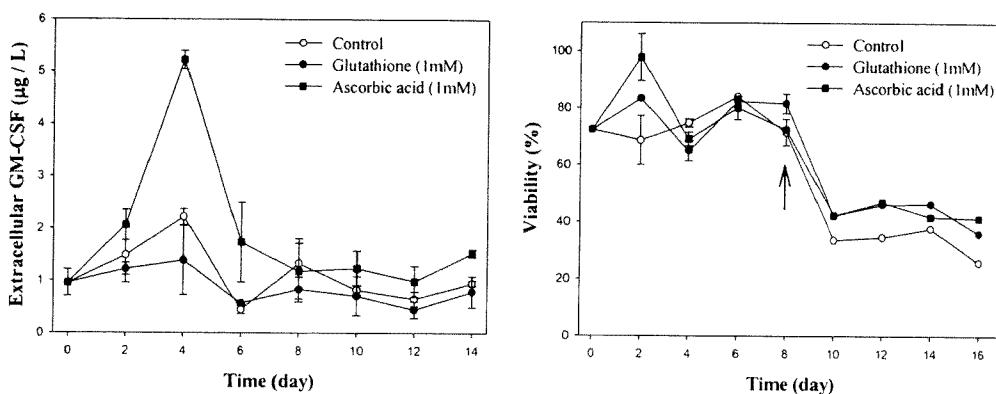


Fig. 2. Effects of glutathione and ascorbic acid on (a) the production of extracellular hGM-CSF and (b) cell viability in cold stress at 8 day.

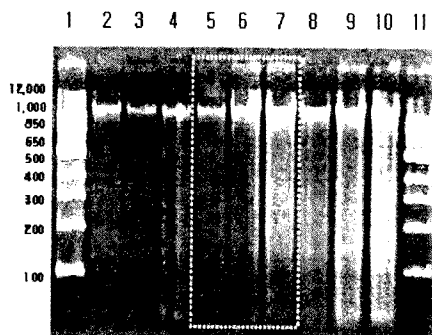


Fig. 3. Inhibition of DNA laddering in cells pre-treated with glutathione and ascorbic acid prior to cold stress. Lane 1 and 11, 1 kb (15 kb~1 kb) DNA Ladder (500 mg/mL) marker. Lane 2-4, 5-7 and 8-10, DNA from cells pretreated with 1 mM glutathione and ascorbic acid prior to cold stress (4°C, 120 rpm) for 4, 6 and 8 days.

참고문헌

1. Kusnadi, A. R., Z. L. Nikolov, and J. A. Howard, "Production of recombinants proteins in transgenic plants: Practical consideration." (1997), *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 473-484.
2. Magnuson, N. S., P. M. Linzmaier, R. Reeves, G. An, K. HayGlass, and J. M. Lee, "Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture." (1998), *Protein Expr. Purifi.* **13**, 45-52.
3. Blazena, K., K. Ales, F. Jiri, and S. Jiri, "Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress." (1997), *FEBS Lett.*, **414**, 289-292.
4. Paul, F. M. and J. L. Christopher, "Programmed cell death in cell cultures." (2000), *Plant Mol. Biol.*, **44**, 359-368.
5. Chamson, A., T. Chepda, M. Cadau, F. Lassabliere, E. Reynaud, C. Perier, and J. Frey, "Synergy between ascorbate and a-tocopherol on fibroblasts in culture." (2001), *Life Sci.*, **69**, 1587-1596.
6. Armin, W., G. Sibylle, and E. T. Wolfgang, "Role of antioxidants in the O-hydroxyethyl-D-(Ser)⁸-cyclosporine A (SDZ IMM125)-induced apoptosis in rat hepatocytes." (2002), *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 1725-1736.
7. Steward, N., R. Martin, J. M. Engasser, and J. L. Goergen, "A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity." (1999), *Plant Cell Rep.*, **19**, 171-176.