

무혈청 배지를 이용한 CHO 세포의 단기 저온보존

¹변 순 휘 · ²박 흥 우 · † 최 태 부
¹건국대학교 미생물공학과, ²한양대학교 화학공학과
(접수 : 2006. 6. 16., 게재승인 : 2006. 8. 22.)

Short-term Hypothermic Preservation of CHO Cells Using Serum-Free Media

Soon-hwi Byoun¹, Hong-woo Park², and Tae-boo Choe^{1†}

¹Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea

²Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea

(Received : 2006. 6. 16., Accepted : 2006. 8. 22.)

Cell preservation is indispensable in animal cell culture process and should be established according to the cell characteristics. In this study, we experimented hypothermic preservation of CHO cells that is widely used in pharmaceutical industry to produce therapeutic proteins and established a stable method of preservation. The highest viability of CHO cells was obtained when the cells were preserved using rolling tube, which means the cells should be suspended to avoid the cell lumping during the preservation. Also, we obtained superior preservation result under the anaerobic condition. To evaluate the serum-free media as a preservation solution, we investigated cell growth after hypothermic preservation using serum-free media. High cell viability and normal cell growth was observed during 10 days using serum-free media. Moreover, we found that more effective preservation when α -tocopherol and retinoic acid is added to media as an additive. In the case of 1 liter large scale hypothermic preservation using established protocol, cell viability and growth rate was obtained as good as small scale one. This study is considered to be helpful for hypothermic preservation of CHO cells and large scale hypothermic preservation may be available through the further studies.

Key Words : Hypothermic preservation, CHO cells, serum-free media

서 론

동물세포 배양방법의 발전과 더불어 동물세포는 다양한 분야의 생물학적 연구와 함께 현재 단백질 의약품의 생산에 활발히 이용되고 있다(1). 의약품 생산에 있어서 동물세포는 생산 batch의 처음에서부터 끝까지 동일한 성분의 단백질을 생산해야 하며, 모든 batch는 동일한 성분으로 구성되어야 한다(2). 동물세포를 이용한 단백질 생산에 있어 장기간 동안 세포의 특성을 유지할 수 있는 보존방법이 필수적인데, 이러한 세포주의 보존 방법으로 동결보존이 주로 사용되고 있다. 동결보존을 통해 세포 배양 및 유지의 어려움을 극복할 수 있고, 세균이나 mycoplasma 등으로부터의 오염을 방지할 수

있다. 또한 세포주의 형질전환을 방지할 수 있을 뿐만 아니라 실험 및 생산의 재현성을 확립하는데 중요한 역할을 한다(3, 4). 세포의 보존은 생물학적 공정의 중간 원료나 최종 산물을 보관하고 운반하는데 사용되는 정도의 간단한 개념으로 인식되지만 실제로는 공정 전체에 걸쳐 많은 영향을 미치고 있다. 또한 그 보존방법은 지난 반세기 이상 거의 변하지 않은 것이 사실이다.

일반적으로 세포를 보존하는 데에는 4°C 저온보존과 -80~-196°C 동결보존의 두 가지 방법이 사용되고 있다. 역사적으로 이 분야에서는 두 방법 모두 생체시계를 늦추기 위해 저온을 사용하는 것으로 여겨져 왔다. 그러나 최근 세포의 분자수준에서 더욱 정확한 두 방법의 유사성이 관찰되었다(5-7). 이러한 연구는 세포의 생존율과 기능이 보존과정에 의해 상당히 영향을 받으며, 보존액의 조성 등에 의해 보존효과가 개선될 수 있음을 제시했다. 저온보존과 동결보존은 세포나 조직의 보존이라는 같은 목적을 위해 사용되는 서로 다른 두 방법이다. 두 방법의 가장 큰 차이점은 액체와 고체라는 물리적인 보존상태의 차이이고, 이로 인해 보존할 수 있

† Corresponding Author : Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Hwayang-dong 1, Kwangjin-gu, Seoul, 143-701, Korea

Tel : +82-2-450-3523, Fax : +82-2-3436-5594

E-mail : tbchoe@konkuk.ac.kr

는 기간이 달라진다. 이론적으로 저온보존을 통해 수일에서 수 주간 세포보존이 가능하고, 동결보존의 경우는 몇 달에서 몇 년간의 보존이 가능하다. 세포의 생체활동은 동결 상태에서 멈추지만 세포의 결합수가 완전히 동결되는 온도 이상에서는 분자생화학적 변화를 꾸준히 겪게 되어 이러한 결과는 세포의 생존율과 기능에 큰 영향을 미치게 된다. 이 과정에서 활성산소 생성, 생화학 경로의 변화, 세포내 대사산물 축적, 이온균형 파괴, 단백질 변성 및 분해, 효소 분리 및 활성화 등 세포반응이 일어나게 된다(5, 6).

이와 같이 세포는 보존과정에서 온도가 감소함에 따라 수많은 스트레스를 받게 된다. 산화체계의 파괴로 활성산소가 생성되고, 이는 세포내에서 지질산화, DNA 및 RNA 손상, 세포골격의 변화 등을 일으킨다. 또한 세포막의 구조나 유동성, 구성성분 등의 변화로 인해 막수용체가 활성화되고, apoptosis를 일으킬 수 있는 일련의 과정이 진행된다. 세포막의 Na^+ - K^+ 펌프와 Ca^{2+} 이온 채널이 멈추면서 세포의 이온 균형이 무너지고, 이는 세포내 칼슘농도의 증가, 삼투압 차이 발생, 세포의 붕괴로 이어진다(8, 9).

저온보존에서의 세포 손상은 추가적인 스트레스 관련 반응을 유발할 수 있다. 온도가 낮아지면서 발생하는 대부분의 반응은 세포에 손상을 일으키지만, 저온에서는 일부 세포의 생존반응이 활성화되기도 한다. 이는 세포가 스스로 스트레스를 줄이고 손상을 최소화하는 방향으로 반응하는 것을 말하는데, 많은 경우에서 이러한 생존반응은 ATP와 같은 에너지를 더욱 빠르게 소비하기 때문에 결과적으로는 더 나쁜 상황이 되고, 결국에는 에너지 부족 등의 원인으로 세포사멸에 이르게 된다.

세포보존과 관련된 세포손상은 그 종류가 많은 반면에 아직 완전히 알려져 있지 않다. 최근 이 분야에 대한 연구가 계속 진행되면서 저온에 의한 스트레스가 apoptosis나 necrosis를 유도하는 과정이 점점 밝혀지고 있는데, 많은 실험에서 세포의 스트레스가 지속되면서 에너지 부족이 발생하고, 세포사멸이 apoptosis에서 necrosis로 전환되는 것이 관찰되었다(7). 이를 바탕으로 최근의 보존과학에 대한 연구는 apoptosis에 초점을 맞추어 진행되고 있다.

세포보존의 궁극적인 목적은 생체시계를 일정 기간 정지시키고 원하는 때에 세포의 생존율과 구조, 기능을 되돌리는 것이다. 보존 전후의 상태는 완전히 같아야 하지만 세포보존에 있어서는 아직 목표에 도달하지 못했다. 세포배양은 세포 치료, 독성검사, 생물공정 등에 필요하지만, 이를 유지하는데 드는 비용에 대한 문제를 갖는다. 보존 후의 생존율을 비롯한 세포기능의 유지를 목적으로 하는 과학자들의 움직임은 새로운 보존액의 개발에 주력하고 있다. 이러한 노력은 개선된 저온 및 동결보존 방법의 개발로 이어지고, 효과적인 세포보존에 기여하고 있다.

최근 개선된 저온보존액의 효과가 cardiomyocyte의 저온보존에 대한 연구에서 밝혀졌는데 저온보존액을 기존의 배양액과 비교한 결과, 세포막의 결손이나 대사능력, 수축기능 등에서 우수한 결과를 보였고, 보존기간 역시 기존의 24시간에서 72시간으로 향상시킬 수 있었다(10). Mathew는 최근 연구에서 caspase inhibitor가 첨가된 보존액을 이용하여 세포 종류에 따른 작용 기작을 연구하였다(11). 이러한 방법은 세포 종

류에 따라 다양한 보존액을 이용하여 최적의 보존 조건을 찾는 새로운 방법을 제시하였다.

최근 이러한 관점에서 다양한 연구가 시도되고 있으나 산업용 동물 세포주인 CHO 세포의 저온보존에 관한 연구는 아직 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 산업현장이나 실험실에서 널리 쓰이는 CHO 세포주의 단기간 저온보존 기술을 다양한 조건을 통해 확립하고 저온보존액으로서 무혈청 배지를 사용하여 그 안정성을 평가하였다. 또한 다양한 물질의 첨가를 통해 저온보존에서 새로운 보존액의 적용을 검토하였고 실제 배양 공정에 적용 가능한 대용량 저온보존의 안정성을 평가하였다.

재료 및 방법

세포주 및 세포배양

본 실험에 사용한 세포주는 단백질 의약품 생산에 널리 이용되는 CHO (chinese hamster ovary) DG44 로서 무혈청 배지에 적응된 세포를 한양대에서 분양받아 사용하였다. 배양용 배지는 CHO Protein-free Medium (Sigma, C5467) 1 L에 200 mM L-glutamine 20 mL을 첨가하여 사용하였고, 세포의 배양은 T-flask (SPL, Korea)를 사용하여 37°C, 5% CO_2 습윤 배양기에서 배양하였으며 계대배양은 2~3일 간격으로 실시하였다.

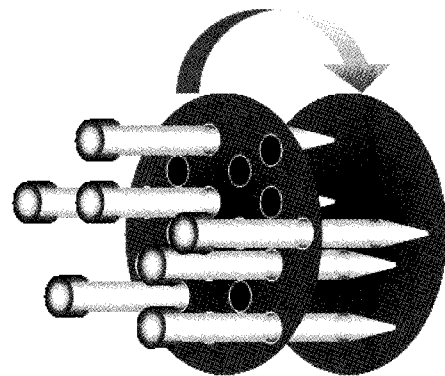


Figure 1. Method of hypothermic preservation using rolling storage vessels.

저온보존 및 세포 생존율 측정

저온보존에 사용한 CHO cells은 serum-free medium에서 부유배양한 것을 원심분리를 통해 회수하여 실험을 통해 확립된 조건으로 저온보존 하였으며, 보존용기는 15 mL conical tube (SPL, Korea)를 사용하였다. Rolling을 통한 현탁 저온보존의 모식도는 Fig. 1과 같다. 세포의 생존율은 trypan blue를 이용해 세포를 계수한 다음 총세포수에 대한 생세포수의 비율로 산출하였다. 세포의 계수는 3회 실행하였으며 평균값을 생존율로 나타내었다.

저온보존 방법

다양한 보존 조건을 통해 세포의 저온보존에서 가장 안

정적이고 우수한 생존율과 성장 회복율을 보이는 방법을 찾고자 보존온도, 세포농도, 보존형태, 배지교환, 첨가제 등 여러 조건을 달리하여 실험을 진행하였다. 우선, 세포의 보존에 가장 큰 영향을 미칠 것으로 생각되는 보존온도에 대한 실험은 배지교환, 보존형태 등 조건을 달리하여 실온(20℃)과 냉온(4℃)에서 보존한 후 생존율을 비교하였다. 저온보존 시 새로운 배지로 교환하지 않을 경우에는 배양에 사용된 배지로 저온보존 하였으며 보존형태는 15 ml tube에 세포를 담은 후 tube를 세워 놓거나 눕혀서 보관하는 방법과 눕힌 상태의 tube를 1.33 rpm의 속도로 돌려 현탁시키는 방법으로 저온보존 하였다. 그리고 저온보존시 공기의 영향을 알아보기 위해 15 ml의 보존용기에 배지를 15 ml로 가득 채우거나 5 ml만 채운 경우로 나누어 실험하였다. 저온보존에 이용할 최적 세포농도는 5.0×10^5 , 1.0×10^6 , 2.5×10^6 , 5.0×10^6 , 1.0×10^7 , 2.0×10^7 cells/ml의 세포를 4℃에서 저온보존하고 생존율을 측정하여 우수한 생존율을 보이는 농도로 결정하였다. 위 실험 결과를 바탕으로 여러 조건 중 가장 우수한 생존율을 보이는 방법을 이용하여 14일간의 저온보존에서 CHO 세포의 생존율과 성장 회복율을 비교하였다.

배지 첨가물

CHO 세포의 저온보존 효과를 향상시키기 위해 대표적인 antioxidant, energy source, apoptosis inhibitor, cell cycle inhibitor 등 다양한 물질을 첨가하여 14일간의 저온보존에서 생존율과 성장 회복율을 측정하였다. 각 물질의 첨가농도는 저온보존액 15 ml을 기준으로 α -tocopherol (Sigma, USA) 100 μ M, D-glucose (Sigma, USA) 10 mg/ml, protease inhibitor (Boehringer mannheim, Germany) 1/2 tablet, all-trans retinoic acid (Sigma, USA) 10 μ M으로 실험하였다.

대용량 단기보존

상기 실험 결과를 바탕으로 실제 공정이나 실험에서 적용할 수 있는 대용량 단기보존 실험을 진행하였다. 보존용기의 용량은 1 L로 하였으며 배양중인 배지를 교환하지 않고 그대로 저온보존에 적용하였다. 보존용기는 4℃ cold chamber 내에서 1.33 rpm으로 회전시켰으며 기간에 따른 저온보존 효과를 알아보기 위해 10일, 14일째의 세포를 취해 생존율과 성장 회복율을 측정하였다.

세포 성장률 측정

저온보존한 세포를 정상적인 배양조건에서 다시 배양하여 세포의 정상적인 성장이 이루어지는지 알아보았다. 저온보존한 세포를 원심분리하여 회수한 후 새로운 배지를 이용해 resuspension하고 1.0×10^6 cells/ml의 초기농도로 35 mm culture dish에서 배양하면서 1일 간격으로 생세포수를 측정하였다.

결과 및 고찰

보존온도에 의한 영향

CHO 세포의 단기 저온보존에서 온도의 영향을 알아보기 위하여 배양중인 세포를 회수하여 15 ml tube에 담은 후 여러 조건으로 4℃ 냉온과 20℃ 실온에서 7일간 보존하고 그 생존율을 비교하였다. 실험결과 4℃에서 보존한 세포는 보존조건에 관계없이 7일 후에도 90% 이상의 생존율을 보였으나 20℃에서 보존한 세포의 경우에는 보존 2일후부터 급격한 생존율의 감소를 보였고 7일후에는 대부분의 세포가 사멸하였다(Fig. 2). 이러한 결과로 볼 때 세포의 단기보존에 있어 생존율에 우선적으로 영향을 주는 요인은 온도이며 4℃ 저온보존에서는 세포가 7일 동안 90% 이상 생존함을 알 수 있었다.

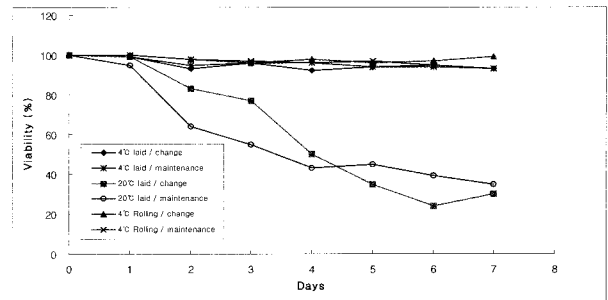


Figure 2. Change of CHO cells viability during short-term cell preservation under the various conditions. Culture media was changed (Change) or maintained (maintenance) during the hypothermic preservation. The storage tube was laid (laid) or rolled (rolling).

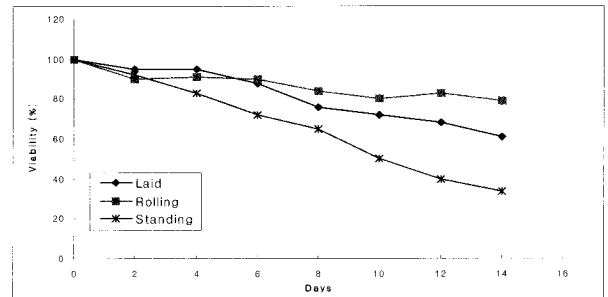


Figure 3. Change of CHO cells viability during the short-term hypothermic preservation according to the pattern of storage. The storage tube was laid (laid), stood (standing) or rolled (rolling) at 4℃.

보존형태에 의한 영향

세포를 담은 보존용기를 어떠한 상태로 보존하는 것이 가장 안정적으로 세포 생존율을 유지할 수 있는지 알아보기 위해 세 가지의 다른 형태로 세포를 보존하면서 실험을 다시 진행하였다. 4℃에서 2.0×10^7 cells/ml의 세포를 15 ml tube에 14일간 보존하면서 2일 간격으로 생존율을 측정한 결과 보존용기를 눕힌 상태로 약하게 돌리면서 (rolling) 보존하는 방법이 가장 좋은 세포 생존율을 보이는 것으로 나타났다. 보존용기를 단순히 눕혀서 보존한 경우에는 rolling에 의한 방법보다 낮은 세포 생존율을 보였으며 용기를 눕히지 않고 세워서 보존한 경우에는 가장 낮은 생존율을 나타내었다(Fig. 3). 이렇게 보존한 세포를 재배양해 보았을 때 세포 성장 회복율에서도 rolling에 의한 방법이 가장 높게 나타났다(Fig. 4). 이상의 결과를 종합해

불 때 세포를 저온에서 보존하는 동안 세포들이 서로 묻치지 않고 현탁된 상태로 보존하는 것이 저온보존 후 우수한 세포 생존율과 성장 회복율을 나타낸다고 판단된다. 따라서 이후 모든 실험에서는 용기를 회전시키면서 보존하는 방법으로 진행하였다.

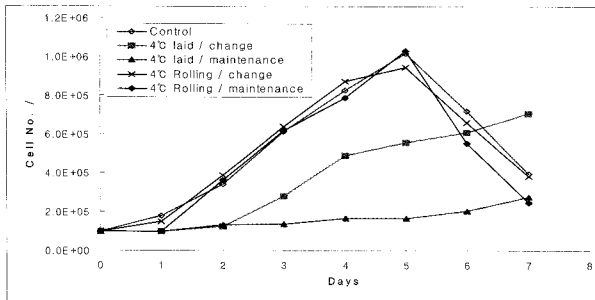


Figure 4. The growth of CHO cells re-cultured after 7 days hypothermic preservation under the various conditions.

배지교환에 의한 영향

저온보존에서 배지의 교환이 세포 생존율에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 회수한 세포를 새로운 배지에 resuspension한 후 보존한 경우와 배양한 배지에 그대로 보존한 경우로 나누어 세포 생존율과 성장 회복율을 측정하였다. 세포 생존율의 경우에는 4°C 냉온보존에서 배지의 교환 유무와 보존형태에 관계없이 7일간 90% 이상의 생존율을 나타내었다(Fig. 2). 하지만 이처럼 유사한 생존율을 보인 보존방법에서도 회복율에서는 각기 다른 경향을 보였다. Rolling하면서 보존한 경우에는 배지의 교환 유무에 관계없이 재배양에서 정상적인 성장이 이루어졌으나 정지 보존을 한 경우에는 배지를 교환하지 않은 세포에서는 성장이 이루어지지 않았으며 배지를 교환한 경우에도 성장이 더디게 나타났(Fig. 4). 이러한 결과로 미루어 불 때 배지의 교환 유무는 세포의 저온보존에 대단히 큰 영향을 미친다고는 볼 수 없으나 새로운 배지로 교환 후 보존하는 것이 그렇지 않은 경우 보다 세포의 성장 회복에 유리할 것으로 사료된다. 하지만 4°C에서 rolling을 통한 저온보존을 할 경우에는 배지의 교환 없이도 세포 저온보존이 안정적으로 이루어질 수 있으리라 본다.

세포농도에 의한 영향

세포 농도가 저온보존에 미치는 영향을 알아보기 위해 다양한 세포 농도로 저온보존을 실시하였다. 4°C에서 다양한 농도의 세포를 1.5 ml microtube에 14일간 저온보존하면서 생존율을 측정할 결과 1.0 × 10⁶, 2.5 × 10⁶, 5.0 × 10⁶ cells/ml 농도로 저온보존한 세포는 비교적 안정적인 세포 생존율을 14일간 유지하였다. 반면에 1.0 × 10⁷, 2.0 × 10⁷ cells/ml의 높은 세포농도로 저온보존한 경우는 상대적으로 세포 생존율이 빠르게 감소하였다. 5.0 × 10⁵ cells/ml의 낮은 세포농도로 저온보존한 경우에는 8일간 안정적인 세포 생존율을 나타내었으나 이후 급격한 생존율 감소가 관찰되었다(Fig. 5). 이러한 결과로 볼 때 CHO 세포의 저온보존에 적절한 세포농도는 1.0 × 10⁶ ~ 5.0 ×

10⁶ cells/ml로 판단되며 이는 일반적인 동결보존에 사용하는 세포농도로써 배양중인 세포를 저온 보존하는데 큰 무리가 없을 것으로 사료된다.

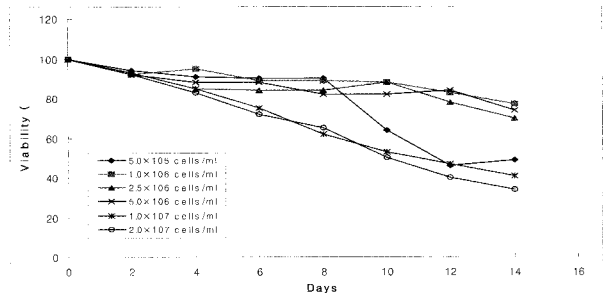


Figure 5. Change of CHO cells viability during the short-term hypothermic preservation in various cell concentrations. The storage tube was rolled at 4°C.

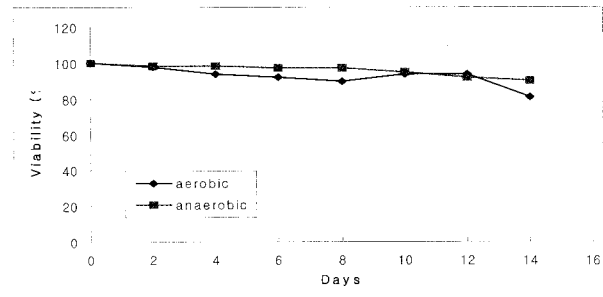


Figure 6. Change of CHO cells viability during the short-term hypothermic preservation under the aerobic or anaerobic condition. The storage tube was rolled at 4°C.

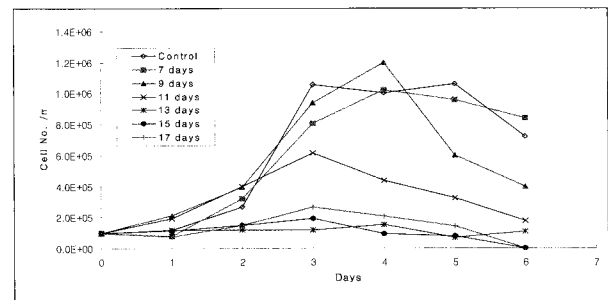


Figure 7. The growth CHO cells re-cultured after the short-term hypothermic preservation under the anaerobic condition. The day means the preservation time.

공기에 의한 영향

세포의 저온보존에서 공기가 미치는 영향을 알아보기 위하여 보존용기로 사용한 15 ml tube에 배지 15 ml을 가득 넣고 저온보존하거나 5 ml만 넣고 보존한 경우로 나누어 세포 생존율과 세포 성장 회복율을 비교하였다. 4°C에서 rolling을 이용하여 저온보존한 결과, 세포 생존율의 경우에는 15 ml의 배지를 넣어 보존용기 내에 공기가 없는 상태에서는 14일간 90% 이상의 생존율을 유지하였으며 5 ml의 배지를 넣어 보존용기 내에 공기가 포함된 상태에서는 12일간 90% 이상의 생존율을 유지하였다(Fig. 6). 세포 성장 회복율의 경우에는 혐기 상태의 저온보존에서

는 13일 이후부터 세포 성장이 이루어지지 않았으며(Fig. 7) 호기 상태의 저온보존에서는 10일 이후부터 세포 성장이 이루어지지 않았다(Fig. 8). 이상에서와 같이 비교적 근소한 차이이긴 하나 공기가 없는 조건에서 저온보존을 할 경우 공기가 있는 조건 보다 세포 생존율과 성장 회복율에서 안정적인 결과를 나타내는 것으로 보인다.

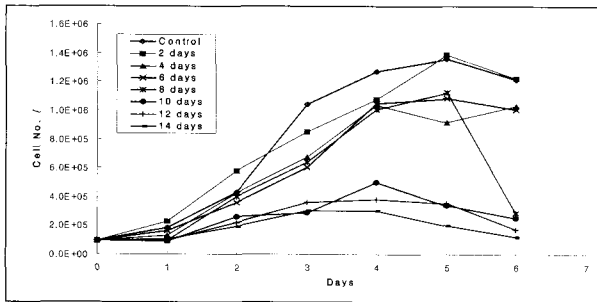


Figure 8. The growth CHO cells re-cultured after the short-term hypothermic preservation under the aerobic condition. The day means the preservation time.

첨가제에 의한 영향

앞선 실험에서 확립된 방법을 이용하여 CHO 세포의 저온보존을 최적화된 조건으로 수행하면서 14일 동안의 세포 생존율, 재배양에서 세포 성장 회복율을 측정하였다. 또한 저온보존의 효과를 향상시키기 위해 보존배지에 추가적으로 다양한 물질을 처리하여 실험하였다. 세포의 보존에서 저온은 생체시계를 늦추기 위한 것으로 알려져 있고 모든 생체활동은 동결 상태에서 멈추지만 세포의 결합수가 완전히 동결되는 온도 이하로 내려갈 때 까지 세포는 분자생화학적 변화를 겪게 된다. 이 과정 동안에 활성산소 생성, 생화학 경로의 변화, 세포내 대사산물 축적, 이온균형 파괴, 단백질 변성 및 분해, 효소 분리 및 활성화 등의 세포반응이 일어나게 된다. 이러한 연구는 세포의 생존율과 기능이 보존과정에 의해 많은 영향을 받으며 보존액의 구성에 의해서도 보존효과가 개선될 수 있음을 나타낸다. 이러한 사실을 바탕으로 본 실험에서는 활성산소를 제거하는 α -tocopherol, 세포주기를 정지시킨다고 알려진 retinoic acid, 에너지원인 glucose, 세포사멸을 억제하는 protease inhibitor를 첨가하여 CHO 세포의 저온보존 개선 효과를 평가하였다. 실험 결과 α -tocopherol과 all trans retinoic acid를 첨가한 보존배지에서 대조군에 비해 높은 세포 생존율을 나타내었는데 보존 14일 후에도 약 95%의 생존율을 보였다. 반면 glucose 와 protease inhibitor를 첨가한 보존배지에서는 대조군과 유사한 생존율을 나타내었다(Fig. 9). 세포의 생존율과 함께 저온보존 기간 동안 세포의 증식 회복율을 측정된 결과는 앞에서 언급한 바와 같이 저온보존 9일까지는 정상적인 증식곡선을 보였으며 13일 이후에는 정상적인 성장이 이루어지지 않는 것으로 나타났다(Fig. 7). 이러한 경향은 각각의 첨가제를 넣은 저온보존의 경우에서 모두 유사하게 나타났으며 대조군에 비해 높은 생존율을 나타내었던 α -tocopherol과 retinoic acid 첨가군도 세포 성장 회복에서는 개선 효과를 보이지 않았다(data not shown). α -tocopherol의 첨가는 저온보존 상황에

서 발생하는 활성산소를 제거해 세포가 받는 손상을 감소시켜주는 것으로 보이며 retinoic acid의 첨가는 세포주기의 정지를 촉진시켜 대사에너지의 소모에 의한 세포 사멸을 감소시켜주는 것으로 사료되었다. 이러한 물질의 첨가는 성장 회복율에 있어서는 대조군과 유사한 경향을 나타내지만 세포의 생존율을 증가시켜주므로 세포의 증식이 정상적으로 이루어지는 기간 내에서의 적용은 보존효율을 높여 줄 수 있을 것으로 판단된다.

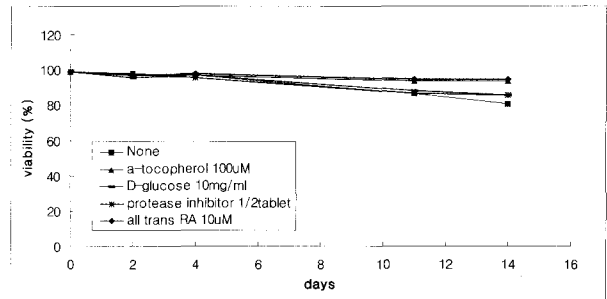


Figure 9. Change of CHO cells viability during the short-term hypothermic preservation with various additives. The storage tube was rolled at 4°C.

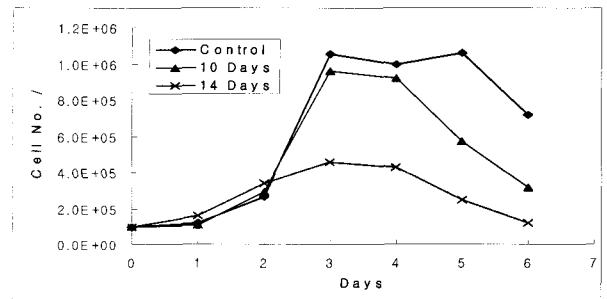


Figure 10. The growth of CHO cells re-cultured after the short-term hypothermic preservation under the anaerobic condition using large storage vessel (1 liter). The day means the preservation time.

대용량 단기보존

CHO 세포의 저온보존 기술을 실제 배양 공정에 적용할 수 있는지 가늠해 보기 위해 1 L 용량으로 저온보존을 수행한 결과, 세포의 생존율은 보존기간 동안 소용량 저온보존과 유사한 경향을 나타내었다(data not shown). 세포 성장 회복율에서도 저용량 저온보존과 유사하게 보존 10일후까지 정상적인 세포 증식을 보였으며 14일후에는 성장이 약간 더디어지는 경향을 나타내었다(Fig. 10). 앞선 실험에서 결정한 저온보존 방법을 대용량 저온보존에 적용한 경우에도 동일한 안정성과 효과를 나타내었으므로 실제 배양 공정에서도 이러한 저온보존 방법이 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

세포의 보존은 세포의 배양에 있어서 필수 불가결한 요건으로서 세포주의 다양한 특성에 따라 적합한 방법이 확립되어야 한다. 본 연구에서는 산업용 세포주인 CHO 세포

의 단기간 저온보존 기술의 확립을 목표로 진행되었으며 다양한 조건을 통해 가장 안정적인 저온보존 방법을 수립하였다. 저온보존 방법에 있어서 가장 중요한 요인은 온도로서 4℃ 저온보존이 세포 보존에 필수적인 조건으로 나타났다. 20℃ 실온보존에서는 세포의 급격한 사멸이 관찰되었다. 보존형태는 용기를 눕힌 상태로 서서히 회전시켜 현탁 보존하는 방법이 용기를 세우거나 눕혀 보관하는 방법에 비해 높은 생존율을 나타내었다. 또한 저온보존 시 새로운 배지로 교환한 후 보존하는 방법이 배양에 사용된 배지를 그대로 사용한 보존 방법보다 세포의 성장 회복율에서 우수한 것으로 나타났다. 하지만 4℃에서 rolling을 통한 현탁 보존을 할 경우에는 배지의 교환 없이도 안정적으로 세포보존이 가능한 것으로 나타났다. 저온보존에 가장 적합한 세포의 농도는 실험결과 $1.0 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^6$ cells/ml 범위로 나타났으며 혐기적인 상태로 보존하는 것이 공기가 존재하는 보존방법 보다 비교적 우수한 보존 결과를 나타내었다. 이상의 결과를 바탕으로 무혈청 배지의 저온보존액으로서의 안정성과 첨가물에 의한 보존효율의 향상을 평가하였다. 실험결과 저온보존 후 10일간은 높은 세포 생존율과 함께 정상적인 세포 성장 회복을 보이는 것으로 나타났으며 α -tocopherol과 retinoic acid를 첨가한 저온보존액의 경우에는 더욱 우수한 세포 생존율을 보임을 확인하였다. 마지막으로 이렇게 확립된 방법을 이용하여 1 L 용량의 저온보존 실험을 수행한 결과, 앞선 실험에서와 유사한 경향의 세포 보존 능력을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 산업용 세포주로 널리 사용되는 CHO 세포의 저온보존은 본 연구에서 확립된 방법을 통해 단기간 동안 안정적으로 수행될 수 있을 것으로 사료되며 대용량 저온보존의 적용 가능성도 확인하였다. 대용량 배양에서의 단기간 보존기술에 대한 연구가 앞으로 더 많이 수행된다면 실제 배양 공정에서도 저온보존 기술의 적용이 가능할 것으로 판단된다.

감 사

본 연구는 2003년도 산업자원부 중기저점 기술과제의 연구지원에 의해 수행된 것입니다.

REFERENCES

1. Link T., M. Bäckström, and T. Noll (2004), Bioprocess development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium, *Journal of Biotechnology* **110**(1), 51-62.
2. Nam S. W. (1995), Antitumor activities of polysaccharides fractuibuzed from *Zoogloea* sp. against meth a cells, *Korean Journal of Life Science* **5**(2), 90-100.
3. Karlsson J. O. M. and M. Toner (2000), Cryopreservation, In *Principles of Tissue Engineering*, 2nd edition, p293-307, Academic Press, San Diego.
4. Davis John M. (2001), *Basic cell culture*. 2nd edition, p176-186, Oxford University Press, New York.
5. Baust J. M., Van Buskirk R., and J. G. Baust (2002), Genetic Activation of the Apoptotic Caspase Cascade Following Cryogenic Storage, *Cell Preservation Technology* **1**(1), 63-80.
6. Baust, J. M. (2002), Molecular Mechanisms of Cellular Demise Associated with Cryopreservation Failure, *Cell Preservation Technology* **1**(1), 17-32.
7. Mathew, A. J., Van Buskirk R. G., and J. G. Baust (2003), Improved Hypothermic Preservation of Human Renal Cells Through Suppression of Both Apoptosis and Necrosis, *Cell Preservation Technology* **1**(4), 239-253.
8. Taylor, M. J., Bailes J. E., and A. M. Elrifai (1995), A New Solution for Life Without Blood: Asanguineous Low-Flow Perfusion of a Whole-Body Perfusate During 3-hour Cardiac Arrest and Prolonged Hypothermia, *Circulation* **91**(2), 431-444.
9. Taylor, M. J., et al. (1996), Hypothermia in Relation to the Acceptable Limits of Ischemia for Bloodless Surgery. *Advances in Low-Temperature Biology*, Volume 3, Chapter 13. p1-64, Steponkus PL, ed: JAI Press, London, UK.
10. Snyder, K. K., et al. (2005), Enhanced Hypothermic Storage of Neonatal Cardiomyocytes, *Cell Preservation Technology* **3**(1), 61-74.
11. Mathew, A. J., et al. (2005), Cell Preservation in Reparative and Regenerative Medicine: Evolution of Individualized Solution Composition, *Tissue Engineering* **10**(11-12), 1662-1671.