

## Pluronic F-680이 동결보존된 형질전환 담배세포의 해동 후 세포생장에 미치는 영향

전 수 환 · 이 경 훈 · 권 준 영 · 류 현 남 · † 김 동 일  
인하대학교 공과대학 생물공학과  
(접수 : 2007. 2. 20., 게재승인 : 2007. 9. 8.)

## Effect of Pluronic F-68 on the Post-thaw Growth of Cryopreserved Transgenic *Nicotiana tabacum* Cells

Su-Hwan Cheon, Kyoung-Hoon Lee, Jun-Young Kwon, Hyun-Nam Ryu, and Dong-Il Kim†  
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
(Received : 2007. 2. 20., Accepted : 2007. 9. 8.)

To enhance the growth of cryopreserved cells of transgenic *Nicotiana tabacum*, Pluronic F-68 was supplemented in a recovery medium during post-thaw period. As cryoprotective agents, 1 M sucrose, 0.5 M glycerol and 0.5 M dimethyl sulfoxide (DMSO) were added before freezing steps. The post-thaw growth of the cells was improved with Pluronic F-68, ranged from 0.1 to 10 g/L. The interactions of Pluronic F-68 with the cells were confirmed by the changes of hydrophobicity or permeability of the cells. Pluronic F-68 did not show any effect on the activity of  $\beta$ -glucuronidase (GUS) in all treatments. Therefore, the addition of Pluronic F-68 in a recovery medium was found to be beneficial to enhance the post-thaw growth of cryopreserved transgenic tobacco cells without affecting the production of recombinant protein.

**Key Words** : Pluronic F-68, cryopreservation, *Nicotiana tabacum*, post-thaw growth, transgenic plant cell cultures

### 서 론

식물세포배양은 유용한 이차 대사산물과 재조합 단백질을 효율적으로 생산하기 위한 시스템으로 알려져 있다(1). 형질전환된 식물세포배양은 다른 재조합 단백질 생산시스템에 비해 여러 가지 장점들을 가지고 있다. 그 예로 미생물 발현시스템에 비해 단백질 번역 후 수식이 가능하고, 동물 발현시스템에 비해 낮은 생산 단가, 쉬운 정제 공정, 바이러스 유래의 감염에 대한 안전성 등을 들 수 있다(2). 한편, 경제적으로 가치 있는 식물세포주를 유지하는 방법으로는 단기간 보존을 위한 캘러스 및 세포의 계대배양법과 장기보존을 위한 완만성장법 및 동결보존법이 있다. 반복적인 계대배양방법은 식물세포주의 자발적인 변이, 산물 생성능력 손실뿐만 아니라 조작 실수에 의한 오염, 시간과 공간 제약 등의 문제점이 있다(3). 최근 애기장대, 담배, 인삼, 벼 등의 세포를 장기간 보존하기 위한 연구가 활발히

진행 중이다(4-6).

동결보존은 세포를  $-196^{\circ}\text{C}$ 의 액체질소에 동결하여 대사 활동을 정지시켜, 장기간 생존하게 하는 식물세포 보존법 중 하나이다. 세포 생존력을 최대한 유지하기 위해 고려되어야 할 인자로는 동결시기, 삼투압조절제 및 동결보호제의 종류와 농도, 동결속도, 해동 후 회복배지의 조성, 저장 장소 등이 있다(7). 일반적으로, 식물세포의 동결보존시, 해동 후 과정으로 세포를 고체배지에 장기간 배양시킨다. 그 이유는 세포생장에 해로운 DMSO를 고체배지 위에 놓인 여과지에 흡수시킬 수 있기 때문이라고 알려져 있다(8). 또 다른 이유로는 동결과 해동 과정을 통해 약해진 세포가 고체배지에 배양되면서 적응되는 기간을 부여하기 위함이다(8). 그러나 해동 후의 이러한 과정은 식물세포를 대량 현탁배양하기 위해 1개월 이상의 시간소모와 조작 실수에 의한 오염 등을 야기할 수 있다(3).

Pluronic F-68은 비이온 계면활성제로서 1960년대부터 생물체 유래의 유용한 물질을 상업적으로 생산하기 위해 동물세포와 곤충세포 배양에서 사용되어 왔다(9, 10). 그 기작으로 세포막과 상호 작용하여 막 투과성을 변화시키거나, 세포배양기 운전시 통기과정 중에 발생하는 기포의 파괴로 인한 전단력에 의한 충격으로부터 세포를 보호하기

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
Tel : +82-32-860-7515, Fax : +82-32-875-0827  
E-mail : kimdi@inha.ac.kr

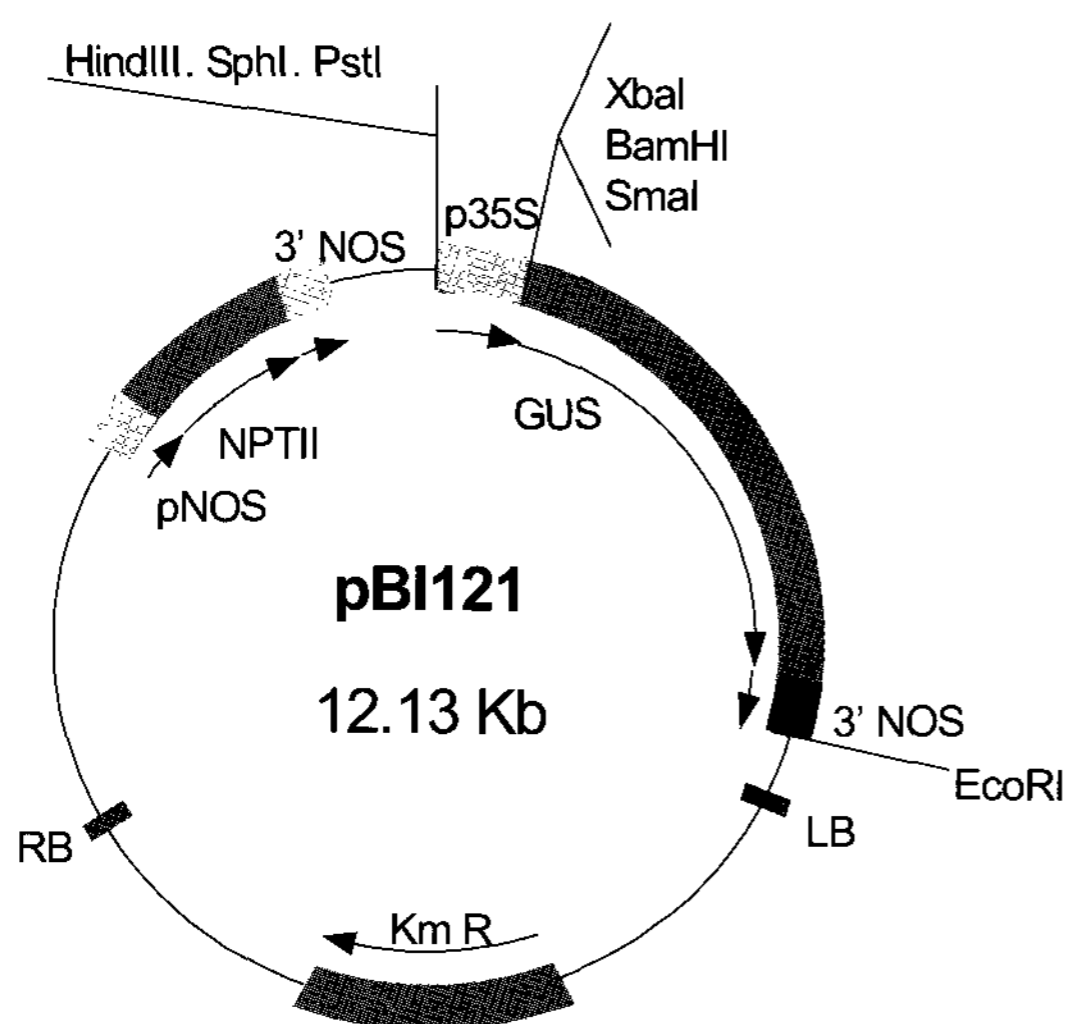
위해 이용된다(11). Pluronic F-68은 비이온성 삼중합체 고분자 (triblock copolymer)이다. 내부에 소수성 부분이 20% 정도 차지하고 있는 polyoxypropylene (POP) block과 양측에 친수성 부분이 80%인 polyoxyethylene (POE) blocks이 POE-POP-POE 형태로 구성되어 있으며, 평균분자량이 8,350이다. Anthony 등(12)은 *Oryza sativa* 식물세포주를 동결 보존한 후 해동시 회복배지에 Pluronic F-68을 첨가한 후, 세포주의 생존력을 관찰하였는데 Pluronic F-68을 0.01~0.2% (w/v)로 첨가한 경우, 첨가하지 않은 것보다 2배 이상의 생존력을 갖는다고 보고하였다.

본 연구에서는 동결보존된 형질전환 담배세포의 해동 후 세포생장을 향상시키기 위해, Pluronic F-68을 회복배지에 적용하였다. 이를 위해 Pluronic F-68이 담배세포에 직접적으로 상호작용하여 세포생장에 영향을 줄 수 있는지 확인하고자 하였다. 특히, 고체배지가 아닌 현탁배지에서의 해동 후 신속한 세포생장을 도모하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포배양 및 배지

본 연구에 사용된 형질전환 현탁세포는 *Nicotiana tabacum* 세포주였으며, *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 형질전환에 이용된 vector는 Fig. 1과 같다. 성장배지로는 MS 기본배지에 30 g/L sucrose, 0.02 mg/L kinetin, 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 100 mg/L myo-inositol을 첨가하여 사용하였으며 pH를 5.9로 맞추는 뒤, 121°C, 1.2 기압에서 가압증기멸균한 뒤, 0.2 mm filter로 여과한 kanamycin 농축용액을 100 mg/L의 농도가 되도록 첨가하였다. 현탁세포는 회전식 진탕배양기에서 25°C, 120 rpm, 암조건에서 배양하였고, 계대배양은 7일 간격으로 수행하였다.



**Figure 1.** The plant expression vector, *pBI121*, containing b-glucuronidase (GUS) gene. The cauliflower mosaic virus 35S promoter was used to express the GUS gene. Arrows indicate the direction of transcription and closed bars represent the coding genes.

#### 세포량 측정

세포의 생장을 측정하기 위해서 세포건조량 (DCW, dry cell weight)을 측정하였다. 100 mL 삼각플라스크에서 배양한 현탁세포를 Buchner 깔때기를 이용하여 Whatman No.1 여과지로 배양액을 걸러내었다. 배지와 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 미리 무게를 측정한 측정접시에 세포를 옮겨 담아 60°C의 건조기에서 48시간 동안 항량이 될 때까지 건조하여 DCW를 측정하였다.

#### 동결보존 과정

동결보존을 위해서는 계대 배양 후 3일째 된 세포를 3% (w/v)의 mannitol이 첨가된 MS 배지에서 예비배양을 수행한 후, 0.5 M DMSO, 0.5 M glycerol, 1 M sucrose가 포함된 동결보호제를 첨가하여 단계별로 냉동시켰다. 액체 질소 (-196°C)에 15일간 보관한 후, 회복배지의 조성을 다르게 하여 해동 후 세포의 생장을 관찰하였다.

#### 세포표면 소수성 측정

계면활성제를 처리한 후 식물세포 표면의 소수성을 측정하기 위해서는 미생물의 경우 흔히 사용되는 BATH (bacterial adhesion to hydrocarbon) 방법을 사용하였다. *n*-Hexadecane과 SH 배지를 1 : 1의 부피비로 하여 10 mL을 준비한 후 습윤세포를 2 g 첨가하였다. 이후 15초 동안 vortexing한 후 2시간 정치시킨 다음 형성된 두 상에 존재하는 세포를 분리하여 상대적인 세포농도 즉 상대적 소수성을 측정하였다.

#### 세포투과성 측정 (LDH assay)

세포내 존재하는 LDH (lactate dehydrogenase)는 세포투과성이 증진되면 배지로 방출된다. LDH 활성은 LDH analysis kit (Sigma Diagnostic Ltd., USA)로 측정하였다. 반응은 25°C에 수행하였고, Agilent 8453 spectrophotometer (Agilent Technologies Inc., USA)를 이용하여 340 nm에서 측정하였다.

#### β-Glucuronidase (GUS) assay

추출용 버퍼로는 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM b-mercaptoethanol, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.1% Triton X-100을 사용하였다. GUS 활성 분석에 사용한 형광 기질은 4-methylumbelliferyl β-glucuronide (4-MUG)였으며, 추출용 버퍼에 1 mM의 농도가 되도록 용해시켜 분석에 이용하였다. 추출에 사용할 세포는 Whatman No. 1 여과지를 이용하여, 배지와 동량의 증류수로 2회 세척한 후 진공펌프로 수분을 제거하여 사용하였다. Microcentrifuge tube에 습윤세포 0.4 g씩 담은 뒤 추출용 버퍼 0.8 mL을 첨가하고, vortexing한 후 4°C로 온도를 유지시키며 일정 시간동안 추출하였다. 이 혼합물을 12,000 g로 15분간 원심분리하고 상등액 100 mL를 37°C로 미리 유지시킨 기질용액과 혼합한 뒤 37°C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 반응혼합물로부터 100 mL씩을 각각 반응초기와 반응시간 30분일 때 1.9 mL의 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 수용액과 혼

합하여 반응을 종결시켰다. GUS 효소반응에 의해 기질이 가수분해되어 생성된 4-methylumbelliferone (4-MU)의 양은 spectrofluorometer를 사용하여 정량분석하였다. GUS 활성은 unit (U)로 표현하였으며, 1 U는 1분 동안 1 nmol의 4-MU를 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다.

**결과 및 고찰**

**세포표면 소수성의 변화**

계면활성제가 세포와 직접 상호 작용하는지를 확인하기 위해 Pluronic 계열의 계면활성제인 Pluronic F-68, Pluronic 10R-5, Plurafac A-38을 각각 3 g/L로 첨가하고 세포표면의 소수성 변화를 관찰하였다. Fig. 2에서 볼 수 있는 것과 같이 계면활성제가 첨가되지 않은 대조군의 세포표면의 소수성이 36.8%인데 비해 계면활성제 첨가한 경우, Pluronic F-68이 7.9%, Pluronic 10R-5는 0.3%, Plurafac A-38은 1.8%로 세포표면의 소수성을 감소시킬 수 있었다. 이러한 소수성 감소는 Pluronic F-68이 중심부에 소수성인 POP 부분을 가지고 있기 때문에 세포표면의 소수성부분과 소수성 상호작용에 의해 변화되었다고 판단된다(13). 또한 세포표면을 둘러싼 Pluronic F-68은 상대적으로 친수성 부분이 많은 구조이므로 세포표면의 친수성을 증가시킬 수 있다(14). 일반적으로 식물세포의 배양 도중 세포표면의 소수성은 배양 시기나 세포의 환경에 의해 변화된다고 알려져 있다. Pluronic F-68은 POE-POP-POE 형태의 triblock copolymer인 반면 Pluronic 10R-5는 Pluronic F-68의 소수성 부분과 친수성부분이 서로 바뀐 POP-POE-POP 형태를 가진다. Plurafac A-38은 소수성 부분이 탄화수소 그룹이며 친수성 부분이 POE block인 diblock copolymer이다. 따라서 Pluronic F-68이 세포표면과 직접 상호 작용하여 세포표면의 소수성을 감소시킬 수 있음을 확인하였고 Pluronic 계열의 계면활성제의 종류와 구조에 따라 세포표면에 미치는 영향이 다를 수 있었다.

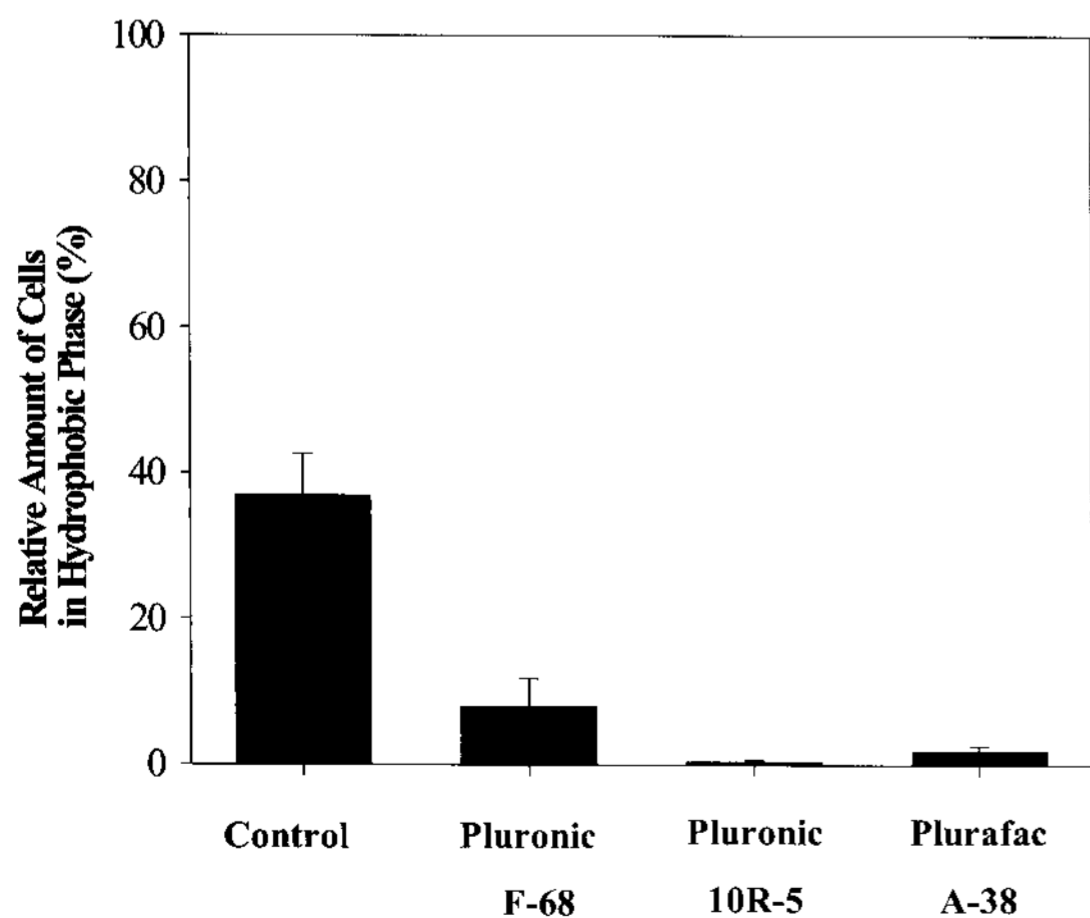


Figure 2. Effect of Pluronic surfactant on the cell surface hydrophobicity of transgenic *N. tabacum*.

**세포표면 투과성의 변화**

Pluronic F-68이 세포표면에 작용하여 투과성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 세포내 존재하는 LDH가 배지로 방출되는 양을 측정하였으며, 투과성 증진제로 널리 쓰이는 Triton X-100을 이용하여 Pluronic F-68의 투과성 정도를 비교하였다. 그 결과는 Fig. 3에 나타난 것과 같다. 대조군인 경우 LDH 활성은 295.8 U/mL이다. Triton X-100을 6% (v/v)로 첨가한 경우, 대조군에 비해 6.9배 많은 2,070 U/mL였으며, Pluronic F-68을 4 g/L로 첨가한 경우 LDH 활성은 대조군보다 5.8배 높은 1,713 U/mL였다. 이와 유사한 결과로서 수성이상계에서 *Morinda citrifolia* 세포주를 이용한 anthraquinone의 생산 연구에서는 second phase에 Pluronic F-68을 첨가하여 산물이 배지내로 방출되는 것을 높였다는 결과가 보고된 바 있다(15). 또한 Triton X-100을 이용하여 효모의 세포투과성을 증대시킨 결과도 알려져 있다(16). 증가된 LDH 활성이 계면활성제 첨가에 의한 세포투과성 증진에 의한 것인지, 아니면 세포의 파괴나 삼투압에 의한 것인지를 확인이 필요하다. 본 연구에서는 계면활성제의 첨가에 의해 삼투압의 변화는 없었으며, 세포의 양의 변화를 측정하고 세포형태를 현미경으로 관찰한 결과 세포의 파괴는 없는 것이 확실하였다. 따라서 Pluronic F-68은 식물세포에서 투과성 증진제로서 사용될 수 있다고 결론내릴 수 있다.

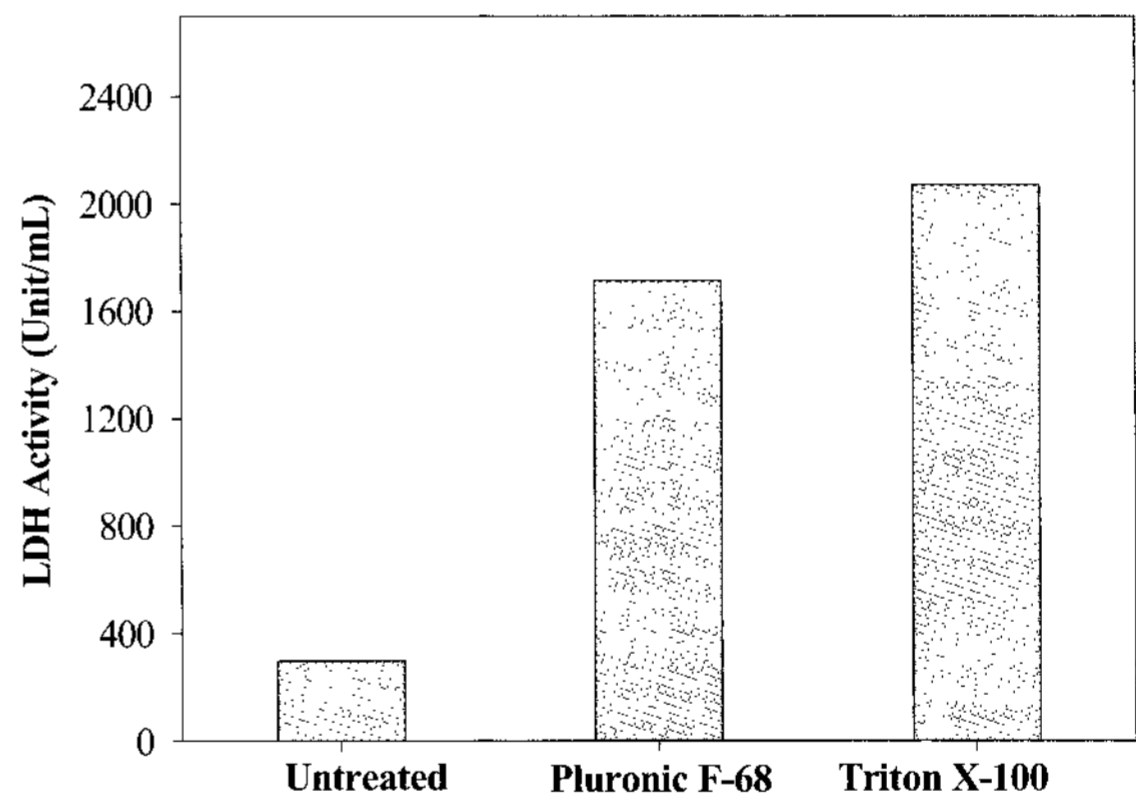


Figure 3. LDH activity of transgenic *N. tabacum* through permeabilization with 4 g/L Pluronic F-68 and 0.6% (v/v) Triton X-100.

**재조합 단백질의 활성의 변화**

Pluronic F-68이 세포생장과 재조합단백질의 생산에 미치는 영향을 확인하였다. Pluronic F-68의 농도를 0~5 g/L로 하여 초기에 첨가한 후, 최대 세포생장일인 8일째, 세포생장과 세포내 GUS의 생산량을 측정하였다(Fig. 4). Pluronic F-68을 0.5 g/L로 첨가하였을 때, 세포 생장과 GUS의 생산을 증대시켰지만, 2 g/L 이상의 농도에서는 GUS의 생산이 감소되는 경향을 관찰하였다. 이후, 0.5 g/L의 Pluronic F-68을 사용하여, 배양기간 동안 세포생장과 세포내 GUS의 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 5). 배양 초기 GUS의 생산은 대조군에 비해 증가하였으나, 지수 생장기에서는

감소하는 경향을 보였다.

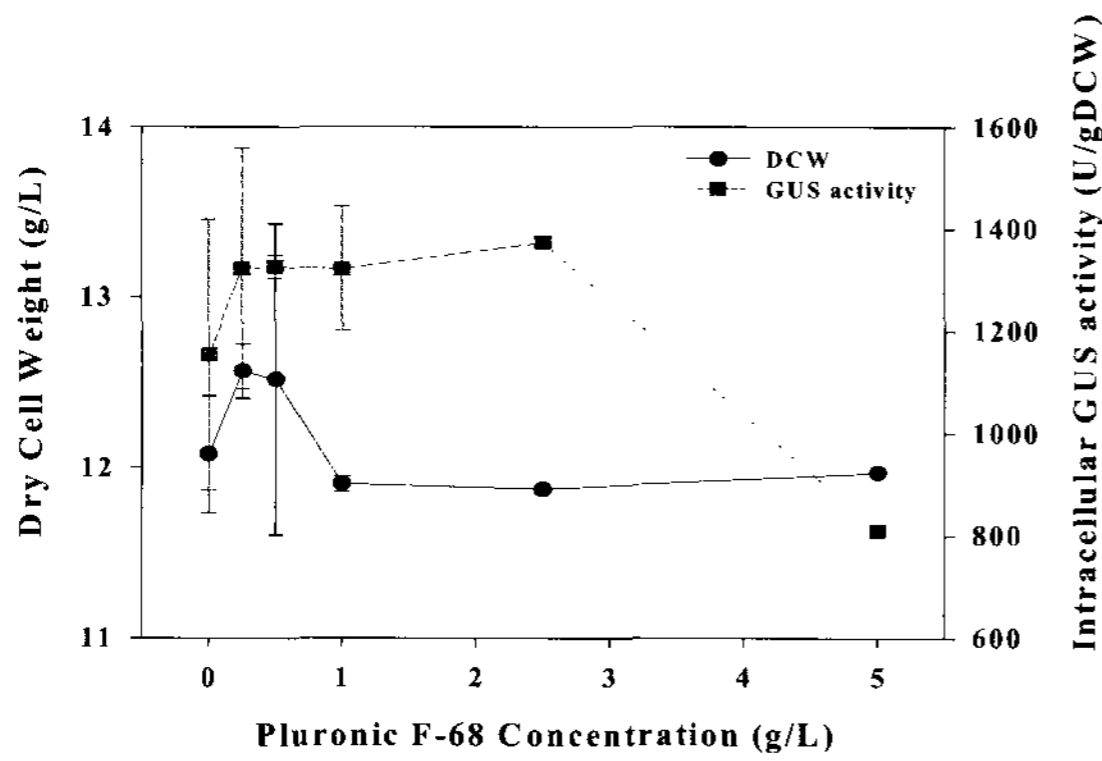


Figure 4. Effect of Pluronic F-68 on GUS activity.

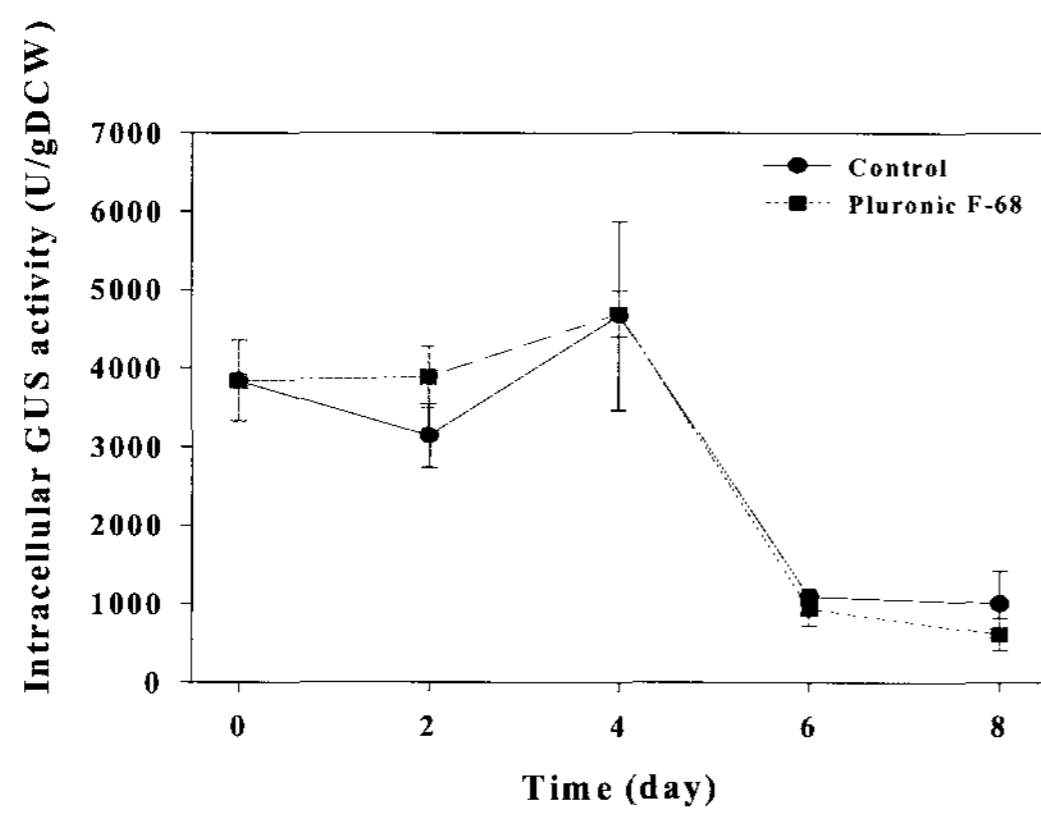


Figure 5. Changes of GUS activity in transgenic *N. tabacum* suspension cultures with 0.5 g/L Pluronic F-68.

**동결보존시, 해동 후 세포생장**

해동 후, Pluronic F-68이 첨가된 회복배지에서의 세포생장을 관찰하기 위해, 먼저 동결보존과정을 최적화하였다. 동결보존시 동결시기, 삼투압증진제 종류 및 농도, 동결보호제, 동결단계 등을 고려하였다. 최적화 결과, 계대 배양 후 3일째 된 세포를 3%의 mannitol을 사용하여 세포의 크기를 줄였고 0.5 M DMSO, 0.5 M glycerol, 1 M sucrose를 첨가하여 동결보호제로서 이용하였다. 그 후 단계별 동결과정을 통해 액체 질소 (-196℃)에 15일간 저장한 후 37℃에서 해동하였다. 해동 후 세포 생장의 변화 여부를 관찰하기 위해 대조군을 두 가지로 설정하였다. 대조군 1은 동결보존을 하지 않은 세포이며, 대조군 2는 동결보존시 해동 후 회복배지에 Pluronic F-68이 첨가되지 않은 세포로 하였다. Fig. 6에 나타난 결과와 같이 회복 배지에 0.5 g/L의 Pluronic F-68을 첨가한 경우, 해동 후 세포의 생장은 대조군 2보다 20.7% 향상되었으며, 동결보존 처리하지 않은 대조군 1과 비교 시 93.2% 상대적인 생존력을 보였다. 알칼로이드를 생성하는 *Catharanthus roseus*의 동결 보존의 경우 해동 후 4~5일 지난 경우의 세포생장이 일어남이 알려져 있다(17). Pluronic F-68은 소수성인 POP 부분이 세포막과 결합하여 세포간 상호작용을 최소화하여 물리적 상해를 감소시키고 대사흐름을 변화시켜 영양분의 흡수를 촉진시켜 세포 성장 및 해동 후 세포의 생존력을 증대시

킨다고 한다(12). Pluronic F-68은 해동 후 회복 배지에서 세포가 팽윤되는 동안 동결보호제로서 사용된 DMSO의 유해한 영향을 점진적으로 줄여줄 수 있으며, 해동 후 세포의 생장을 증대시킬 수 있다. 더욱이 동결보존시 손상된 호흡계에 의해 산소 라디칼이 생성되어 세포 생존도를 저하시킬 수 있는데, 이때 Pluronic F-68의 첨가에 의해 superoxide dismutase의 발현이 증가되어 산소 스트레스를 줄여 세포 생장을 촉진시킨다(12). 또한, Pluronic F-68, perflourochemical과 같은 산소전달물질을 병행 사용하여 산소의 전달을 원활히 하면서 생존도를 증대시킬 수 있다(18). 따라서 해동 후 회복배지에 Pluronic F-68을 첨가하면 높은 농도로 처리된 동결보호제로부터 세포를 보호하고, 물질전달의 증대를 통해 고체배지가 아닌 현탁배양에서의 세포생장에 긍정적인 효과를 주었다고 사료된다.

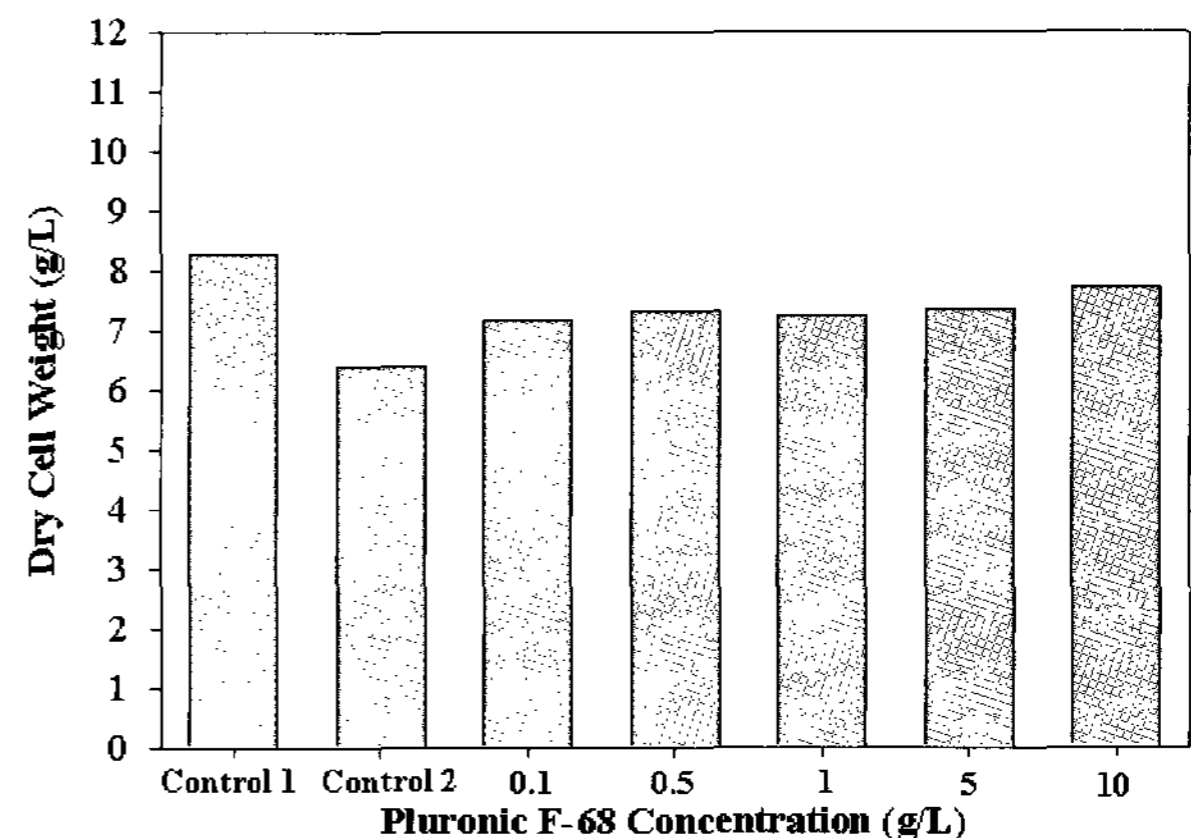


Figure 6. Effect of Pluronic F-68 on the cell regrowth of cryopreserved transgenic *N. tabacum* after post-thawing.

**요 약**

본 연구에서는 Pluronic F-68을 해동 후 회복배지에 적용하여, 동결보존된 형질전환 식물세포의 성장 증진을 도모하였다. Pluronic F-68은 세포표면의 소수성을 감소시켰을 뿐만 아니라, 세포의 투과성을 증진시켜 세포와 직접 상호작용할 수 있음을 관찰하였다. 또한 Pluronic F-68의 첨가에 의해 재조합단백질의 발현에 부정적인 영향을 보이지 않음을 확인하였다. 따라서 동결보존시 해동 후 회복배지에 Pluronic F-68의 첨가는 식물세포의 신속하고 효율적인 대량 현탁배양을 가능하게 할 수 있다.

**감 사**

본 연구는 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터 및 BK21 생물공학융합 해양자원산업화사업단의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Hellwig, S., J. Drossardk, R. M. Twyman, and R. Fisher (2004), Plant cell cultures for the production of recombinant proteins, *Nature Biotechnol.* **22**, 1415-1422.
2. Ma, J. K. C., P. W. M. Drake, and P. Christou (2003), The production of recombinant pharmaceutical protein in plants, *Nature Rev.* **4**, 794-805.
3. Schmale, K., T. Rademacher, R. Fischer, and S. Hellwig (2006), Towards industrial usefulness, cryo-cell-banking of transgenic BY-2 cell cultures, *J. Biotechnol.* **124**, 302-311.
4. Menges, M. and J. A. H. Murray (2004), Cryopreservation of transformed and wild-type Arabidopsis and tobacco cell suspension cultures, *Plant J.* **37**, 635-644.
5. Joshi, A. and W. L. Teng (2000), Cryopreservation of Panax ginseng cells, *Plant Cell Rep.* **19**, 971-977.
6. Kuriyama, A., K. Watanabe, S. Ueno, and H. Mitsuda (1989), Inhibitory effect of ammonium ion on recovery of cryopreserved rice cells, *Plant Sci.* **96**, 231-235.
7. Vajta, G. and M. Kuwayama (2006), Improving cryopreservation systems, *Theriogenology* **65**, 236-244.
8. Harding, K. (2004), Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review, *Cryoletters* **25**, 3-22.
9. Murhammer, D. W. and C. F. Goochee (1990), Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactor, *Biotechnol. Prog.* **6**, 142-148.
10. Murhammer, D. W. and C. F. Goochee (1988), Scaleup of insect cell culture: protective effects of Pluronic F-68, *Bio/technology* **6**, 1411-1418.
11. Palomares, L. A., M. Gonzalez, and O. T. Ramirez (2000), Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production, *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 324-331.
12. Anthony, P., N. B. Jelodar, K. C. Lowe, J. B. Power, and M. R. Davey (1996), Pluronic F-68 increases the post-thaw growth of cryopreserved plant cells, *Cryobiology* **33**, 508-514.
13. Dewez, J. L., V. Berger, Y. J. Schneider, and P. G. Rouxhet (1997), Influence of substrate hydrophobicity on the adsorption of collagen in the presence of Pluronic F-68, albumin, or calf serum, *J. Coll. Interface Sci.* **191**, 1-10.
14. Wu, J., Q. Ruan, and H. Y. P. Lam (1997), Effects of surface-active medium additives on insect cell surface hydrophobicity relating to cell protection against bubble damage, *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 341-348.
15. Bassetti, L. and J. Tramper (1995), Increased anthraquinone production by *Morinda citrifolia* in a two-phase system with Pluronic F-68. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 353-358.
16. Lanouar, L., K. C. Lowe, and B. J. Mulligan (1996), Yeast responses to nonionic surfactants. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 433-438.
17. Chen, T. H., K. K. Kartha, N. L. Leung, W. G. Kurz, K. B. Chatson, and F. Constabel (1984), Cryopreservation of alkaloid-producing cell cultures of Periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Plant Physiol.* **75**, 726-731.
18. Anthony, P., M. R. Davey, J. B. Power, C. Washington, and K. C. Lowe (1994), Synergistic enhancement of protoplast growth by oxygenated perfluorocarbon and Pluronic F-68, *Plant Cell Rep.* **13**, 251-255.