

절피원심법으로 대규모 채취한 누에체액의 곤충세포 증식효과

최지영 · 김종길 · 최영철 · 김삼은 · 한명세¹
농촌진흥청 농업과학기술원 농업생물부, ¹경북대학교 농업생명과학대학

Effect of Silkworm Hemolymph Collected Large-scale Bleeding Method in Insect Cell Culture

Ji-young Choi, Jong-gill Kim, Young-cheol Choi, Sam-eun Kim and Myung-Sae Han¹

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, R.D.A. Suwon, Republic of Korea
¹Kyungpook National University, Taegu, Republic of Korea

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the utilization of hemolymph of silkworm, *Bombyx mori*, as a substitute for fetal bovine serum (FBS) in the insect cell culture. Hemolymph is collected on a small scale by clipping the abdominal leg; however, this method is not appropriate for large scale collection. The hemolymph was collected from 5 th instar larva by centrifugation after cutting of the abdominal legs was more appropriate procedure for large scale collection. The cell growth in the medium supplemented with hemolymph (Baekokjam) collected in large scale was almost same as that in the medium hemolymph supplemented with hemolymph collected in small scale. However, the mutant (wE^b) hemolymph collected in large scale was still less effective in the cell growth, as compared to the Baekokjam hemolymph collected in large scale. The optimum centrifugation condition for large-scale bleeding was 500 rpm and 15 min.

Key word : *Bombyx mori*, hemolymph, insect cell, FBS, Silkworm

서 론

세포배양은 생명체의 최소단위인 세포를 단순한 시스템 내에서 취급할 수 있기 때문에 생물이 영위하는 물질대사, 세포 간 상호작용, 노화, 암화 등 각종 생명현상을 해명하는 중요한 수단이 된다(Agathos *et al.*, 1990; Tramper *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1992). 이들 세포를 배양함에 있어 우선적으로 중요한 것이 배양액이다. 배양액이 갖추어야 할 필수조건은 배양하고자 하는 세포의 생체 내 환경과 흡사한 침투압 및 pH의 안정화, 영양분의 공급 등 물리화학적 제반 조건을 갖추어야 한다(Clements *et al.*, 1967; Maiorella *et al.*, 1988). 따라서 생체 내 환경과 유사한 조건을 부여함과 동시에 세포를 정상에 가까운 상태로 발육시키기 위하여 배양액에 소태아혈청(FBS)과 송아지혈청(FCS) 등의 혈청을 첨가하는 경우가 일반적이다(Mitsuhashi, 1982; 日本 組織培養學會, 1992). 그러나 혈청은 상당히 고가이기 때문에 혈청 첨가배지의 70~90%

가 혈청 값이며, 혈청에는 lot마다 원인불명의 특성차이가 있어 일관성 있는 실험결과가 얻어지지 않는 사례가 종종 발생하는 문제점이 있다.

한편, 누에는 약 2000년 전부터 사육되어져 온 부피가 큰 곤충으로 체액(hemolymph) 얻기가 용이하고, 누에의 체액은 FBS에 비하여 그 화학적 조성이 단순하고 잘 알려져 있어(Higashihashi *et al.*, 1991), 세포가 생산하는 유용물질의 분리·정제면에서 유리할 뿐 아니라, 소를 도살하여 태아의 혈청을 채취하는 것에 비하면 경제적으로도 값싼 혈청을 얻을 수 있다. 또한 누에는 유전적으로 계통간 특성이 잘 보존되어 있기 때문에 동일계통의 누에로부터 체액을 채취하는 한 생산되는 lot간 성분차이가 생길 우려가 적다는 장점도 가지고 있다.

위에서 언급한 곤충세포 배양액의 문제점을 개선하고자 FBS 대체물질로서 누에체액을 이용한 결과 누에체액에서 곤충세포증식 촉진효과가 있는 것으로 확인되었다(최 등, 1997). 그러나 누에의 배발(腹肢)에 상처를 내어 채혈하는

*Corresponding author. E-mail: choijy@rda.go.kr

방법으로 대량으로 채취하기가 어렵기 때문에 24시간 절식시킨 누에를 마쇄하여 원심한 후 그 상층액을 채액으로 사용하는 채혈법을 이용하게 되었다(최 등, 1998). 그러나 이 채혈방법은 채혈과정 중 채액의 산화발생과 소화액 혼입에 따른 문제로 기존의 소규모 채취채액의 세포증식 촉진효과보다 약 40%가 떨어졌다. 이에 본 연구에서는 이러한 대량채혈시의 문제점을 해결하기 위하여 채액의 산화 발생 및 소화액의 혼입을 최소화 할 수 있는 새로운 대규모 채혈법을 개발하는데 그 목적을 두고 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시누에 품종

본 실험에서는 백옥잠(잠123 × 잠124) 및 백안E^b과잉지를 사용하였고, 사육은 농촌진흥청 농업과학기술원의 누에육종잠실에서 표준사육관리법에 준하였다(강 등, 1999). 산화지연계통인 백안E^b과잉지 선발을 위해서는 보존계통 총 275계통을 대상으로 누에체액을 채취하여 1 ml 씩 튜브에 넣어 경과시간별로 산화정도(변색)를 육안으로 확인하여 선발하였다.

2. Cell line 및 배지

본 실험에 사용된 세포주는 IPLB-SF-21_AEII에서 유래한 Sf-9로서, 거염벌레(*Spodoptera frugiperda*: fall armyworm) 번데기의 난소조직에서 수립된 세포주이다(Summer and Smith, 1987). 세포배양 배지는 Grace's Insect Medium (Gibco) 분말을 증류수에 46.3 g/l로 녹여서 사용하였다. Sodium bicarbonate(NaHCO₃, Sigma)를 0.35 g/l 녹여서 buffer 작용을 하게 하였으며, 1N Sodium hydroxide(NaOH, Sigma)를 사용하여 pH를 6.2로 맞추는 후 0.2 μm millipore filter(녹십자)로 여과하여 멸균한 후 antibiotic-antimycotic (Gibco)을 첨가하여 사용하였다.

3. 세포의 배양 및 세포수의 계수

세포는 10% FBS가 첨가된 Grace 곤충세포배양액으로 25°C 항온기내에서 25 cm² culture flask(Falcon)를 사용하여 배양 및 유지하였다. 세포는 mid-exponential phase로 성장하는 세포를 새로운 culture flask에 1 × 10⁵ cell/ml의 밀도를 넣어 배양하여 3-4일 간격으로 세포수를 세어 세포성장을 측정하였다. 세포수는 haemocytometer를 사용하여 도립현미경(Inverted microscope)으로 관찰하여 결정하였다. 생존율은 0.4% trypan blue solution을 배지와 10:1로 섞어서 염색된 세포는 죽은 세포로, 그렇지 않은 세포는 살아 있는 세포로 구분하였다.

4. 소규모 채혈법

5령 5일째 누에 배발에 상처를 내어 얼음 위에서 냉각된 튜브에 채액을 채취하고, 60°C, 45분 열처리한 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심하여 상층액을 취하고 0.2 μm millipore filter로 여과하였다.

5. 대규모 채혈법

5령 5일째 누에를 동결시킨 후 해부하여 중장을 제거한 뒤 원심하여 그 상층액을 채액으로 채취하는 방법과 누에 머리부분, 꼬리부분 그리고 배발에 상처를 낸 후 원심하여 채액을 채취하는 방법으로 하였다. 채취한 채액은 60°C, 45분 열처리한 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심하여 상층액을 취하고 0.2 μm millipore filter로 여과하였다.

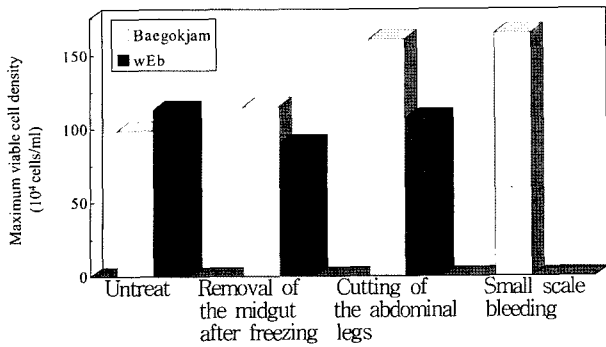
6. 누에체액의 분말화 및 이용

대규모 채혈법으로 얻은 누에체액을 -70°C에서 동결시킨 다음 진공동결건조기(Ilshin Co.)를 이용하여 분말을 제조하였다. 채액분말은 4°C에서 보관한 후 실험에 사용하였으며, 세포배양 및 조사법에 준하여 세포증식에 미치는 영향을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 곤충세포 배양을 위한 누에체액의 대규모 채혈법

동물세포 배양의 필수첨가물인 FBS를 대체할 수 있는 세포증식 촉진효과가 소규모 채취한 누에체액에서 확인되었으나(최 등, 1997), 누에의 배발에 상처를 내어 채혈하는 방법으로 대량으로 채취하기가 어렵다. 이에, 다량의 누에로부터 많은 양의 채액을 한꺼번에 얻을 수 있는 대규모 채혈법을 검토해 보았다. 누에체액은 채혈과정 중 검게 변하는 현상이 나타나는데, 이는 채액내의 tyrosine이 tyrosinase에 의해 공기 중의 산소와 반응하여 멜라닌화 되는 것이다. 멜라닌은 자연상태에서 동물계에 널리 분포되어 있는 다양한 색소와 관계있는 페놀성 화합물로서 yellow, red-brown의 pheomelanin과 brown, black의 eumelanin의 두 종류가 있다(Sugumaran and Semensi, 1991). 누에체액이 검게 변색되는 것으로 보아 이는 eumelanin으로 생각되며, 채액의 산화반응과정에서 생긴 퀴논화합물은 세포성장을 저해하는 것으로 확인되었다(Mitshhashi, 1982). 이러한 문제점을 해결코자 누에 중 채액의 산화가 더디게 진행되는 계통을 선발하여 채혈 재료로 사용하는 것과 소화액의 혼입을 최소화하는 것에 초점을 맞추어 대규모 채혈방법을 검토하였다. 하나의 방법은 누에를 동결시킨 후 해부하여 중장을 제거한 뒤 원심



Pretreatment method of centrifugation

Fig. 1. Cell growth in the medium supplemented with the hemolymph collected centrifugation.

하여 그 상층액을 채액으로 이용하는 방법(이하, 동결중장제거법)이고, 또 하나는 누에 머리부분과 꼬리부분(배발 포함)에 상처를 낸 후 원심하여 채액을 채취하는 방법(이하, 절피원심법)이다.

동결중장제거법으로 백옥잠 누에로 채액을 채취한 경우 기존의 생체를 모두 마쇄하여 대량채취한 채액의 세포증식 촉진효과보다는 양호하였지만, 소규모 채취채액 수준에는 도달하지 못했다. 채액산화자연계통인 백안^E 누에의 경우는 그 효과가 생체를 모두 마쇄하여 대규모 채취한 채액보다도 그 효과가 떨어졌다(Fig. 1). 이는 동결체로부터 중장을 깨끗이 제거해 내는 것이 불가능하고, 특히 크기가 작은 백안^E 누에의 경우 조작이 어려워 채혈과정 중 채액의 산화가 발생하거나 다른 협잡물의 혼입에 의한 것이 아닌가 추정된다.

한편, 절피원심법으로 채취한 채액의 경우 백옥잠 누에 채액은 기존의 소규모 채취한 채액과 유사한 세포증식 촉진효과를 보였으나, 백안^E 누에채액은 백옥잠 누에를 절피 원심한 채액의 세포증식 효과보다 약 30% 떨어졌다(Fig. 1). 이는 백안^E 누에의 중장막이 상당히 얇아 저속에도 쉽게 터지거나 충체가 약해서 작은 충격에도 쉽게 토액을 하는 것으로 추정되며, 누에 소화액의 경우 소량의 혼입도 세포성장엔 저해 요인으로 작용하는 것으로 확인된 바 있다(최 등 1998).

2. 절피원심법을 이용한 대규모 채혈법

절피원심법을 대규모 채혈법으로 확립하기 위해서 최적 원심조건을 확인해 보았다. 절피원심법으로 채취한 채액의 원심속도에 따른 세포증식효과 및 채액 회수율을 조사한 결과, 원심시간을 5분으로 고정할 경우 세포증식효과는 500 rpm과 1000 rpm에서 양호한 값을 보였다(Fig. 2). 세포증식효과가 양호한 500 rpm으로 원심속도를 고정하여 원심시간을 5분에서 30분까지 달리하여 채액을 채취

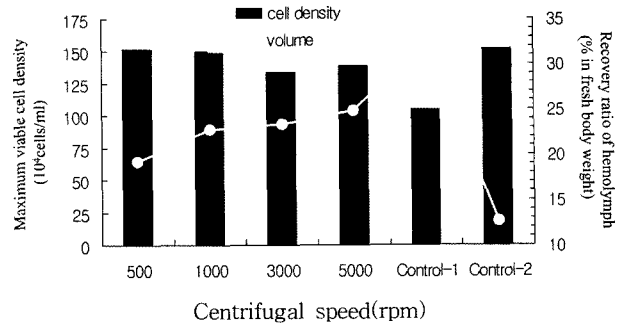


Fig. 2. Cell growth and Recovery ratio of hemolymph of the Baegokjam according to centrifugation speed. Control-1: 5% FBS + 5% hemolymph (large-scale bleeding); Control-2: 5% FBS + 5% hemolymph (small-scale bleeding).

※ Recovery ratio of hemolymph : (volume of hemolymph/ fresh body weight) × 100

※ Baegokjam was used as a hemolymph source, and the hemolymph was heat-treated

※ Centrifugation time : 5 min

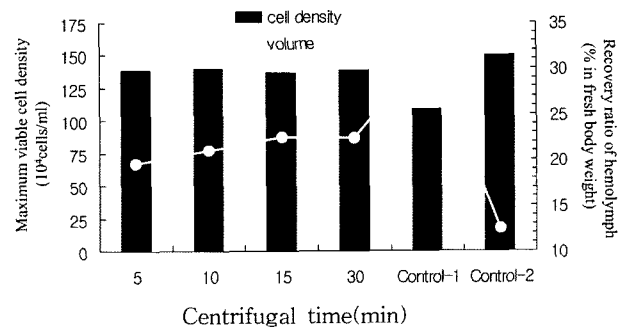


Fig. 3. Cell growth and recovery ratio of hemolymph of the Baegokjam according to centrifugation time. Control-1: 5% FBS + 5% hemolymph (large-scale bleeding); Control-2: 5% FBS + 5% hemolymph (small-scale bleeding).

※ Recovery ratio of hemolymph : (volume of hemolymph/ fresh body weight) × 100

※ Baegokjam was used as a hemolymph source, and the hemolymph was heat-treated

※ Centrifugation speed : 500 rpm

한 뒤 세포증식효과 및 회수율을 조사해 보았다. 그 결과 원심시간을 5분에서 30분으로 달리하여도 세포증식효과는 유사하였고, 채액회수율은 원심시간이 길어질수록 증가하였으나 일정시간 이상은 증가하지 않았다(Fig. 3). 따라서 절피원심법으로 대규모 채취할 경우 500 rpm에서는 15분 정도가 최적의 원심조건임을 확인할 수 있었다.

3. 누에채액의 분말 제조 및 이용

누에채액을 액상으로 장기간 보관할 경우 산화 등 변성이 진전될 수 있으며, 분말이 액상보다 보관이 용이하므로 누에채액의 분말화를 검토하였다. 절피원심법으로 대

Table 1. Recovery ratio of the freeze-dried hemolymph collected by large-scale bleeding method

Fresh body weight of the silkworm ¹ (g/individual)	Volume of the liquid hemolymph (ml/individual)	Weight of the freeze-dried hemolymph (g/individual)	Recovery ratio of the freeze-dried hemolymph per individual (% in fresh weight)
5.5	1.1	0.077	1.4

※ Large-scale bleeding method : hemolymph is collected from 5th instar larva by centrifuging(1000rpm5min) after cutting of the abdominal legs.

※ Baegokjam was used as a hemolymph source, and the hemolymph was heat-treated

Table 2. Cell growth in the medium containing freeze-dried hemolymph (unit : 10⁴cells/ml)

Freeze-dried hemolymph (%)	Viable cell density (Viability, %)							
	1day	5day	9day	13day	17day	21day	25day	29day
0.1	5(63)	12(75)	28(80)	54(64)	88(72)	116(83)	126(77)	88(72)
0.3	5(63)	13(68)	37(79)	64(77)	90(70)	135(78)	151(78)	90(70)
0.5	5(63)	14(74)	44(72)	84(71)	111(67)	140(80)	174(79)	92(61)
5 (liquid)	5(63)	13(76)	46(78)	81(81)	152(80)	156(75)	108(72)	81(81)

※ Baegokjam was used as a hemolymph source, and the hemolymph was heat-treated

규모 채취한 체액의 액상회수율은 누에(백옥잠) 생체중의 19.5%이었고, 분말회수율은 14%이었다(Table 1). 따라서 누에체액을 분말로 제조함으로써 분말 전 체적보다 약 1/14로 부피를 줄일 수 있다. 회수할 누에체액 분말은 5% FBS 첨가배지에 0.1, 0.3, 0.5%로 넣어 세포증식 효과를 비교한 결과, 누에체액 분말 또한 세포증식 촉진효과가 있음이 확인되었고, 첨가량이 증가할수록 그 효과는 증가하였다(Table 2).

적 요

누에체액이 동물세포 배양의 필수첨가물인 FBS를 대체할 수 있는 세포증식 효과가 있는 것으로 확인되었으나, 누에의 배발에 상처를 내어 채혈하는 방법으로는 대량 채취가 어렵다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결코자 대량의 체액을 한꺼번에 얻을 수 있는 대규모 채혈법을 검토하게 되었다.

1. 누에 머리부분과 꼬리부분(배발 포함)에 상처를 낸 후 원심하여 체액을 채취하는 방법(절피원심법)이 기존의 소규모 채취한 체액과 유사한 세포증식 촉진효과를 보였다.
2. 절피원심한 체액의 원심속도에 따른 세포증식 촉진 효과는 500 rpm과 1000 rpm에서 양호한 값을 보였다.
3. 원심속도를 500 rpm으로 고정한 경우 원심시간을 5분에서 30분까지 달리하여도 세포증식 효과는 유사하였고, 체액 회수율은 원심시간이 길어질수록 증가하였으나 일정시간 이상부터는 증가하지 않았다.
4. 절피원심법으로 대규모 채취한 체액의 액상회수율은

누에(백옥잠) 생체중의 19.5%이었고, 분말회수율은 1.4%이였으며, 분말체액에서도 세포증식 촉진 효과가 인정되었다.

인용문헌

- 강필돈, 류강선, 김계명, 손봉희, 손흥대, Akio Murakami (1999) 누에 품종별 누에나방의 수명과 실용형질. 한국잠사학회지 41(3): 154-166.
- 최지영, 김삼은, 김종길, 한명세 (1997) 곤충세포 배양을 위한 누에 체액의 이용. 작물보호논문집 39(2): 76-80.
- 최지영, 김삼은, 박정수, 박태현 (1998) 누에체액을 이용한 동물세포 성장촉진 물질 개발. 농과원 시험연구사업보고서 p. 343-347.
- Agathos, S. N., Y. H. Jeong, and K. Venkat (1990) Growth Kinetics of Free and Immobilized Insect Cell Cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 589: 372-398.
- Clements, A. N. and T. D. C. Grace (1967) The Utilization of Sugars by Insect cells in Culture. *J. Insect Physiol.* 13: 1327-1332.
- Higashihashi, N., Y. Arai, Y. Horiuchi, Y. Saeki, K. Sakano, Y. Sato, K. Takeda, S. Takashina, and T. Takahashi (1991) High-level expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen in silkworm using a baculovirus vector. *J. Virol. Methods* 35: 159-163.
- Mitsuhashi, J. (1982) Media for insect cell cultures, *Advances in cell culture*, Maramorosch, K. ed., Academic Press, N. Y. 1: 281-295.
- Summer, M. D., and G. E. Smith (1987) A manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. *Tex. Agri. Exp. Stn. Bull.* 1555: 1-56.
- Tramper, J., E. J. End, C. D. Gooijer, R. Kompier, F. L. J. Lieber, M. Usmany, J. M. Vlak (1990) Production of Baculovirus in a Continuous Insect-Cell Culture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 589:

423~430.

- Maiorella, B., D. Inlow, A. Shauger and D. Harano (1988) Large-scale insect cell culture for recombinant protein production. *Biotechnology* **6**: 1406~1410.
- Summer, M. D., and G. E. Smith (1987) A manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. *Tex. Agric. Exp. Stn. Bull.* **1555**: 1~56.
- Zhang, J., N. Kalogerakis, and L. A. Behie (1992) Investigation of Reduced Serum and Serum-Free Media for Cultivation of Insect Cells (Bm5) and Production of Baculovirus (BmNPV). *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1165~1172.
- 日本 組織培養學會 編 (1992) 組織培養 技術 第2版 p. 324.