(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월24일
(11) 등록번호 10-1767195
(24) 등록일자 2017년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) *C07K 14/765* (2006.01)
C12N 1/04 (2017.01) *C12N 1/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/021 (2013.01)
C07K 14/765 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0054751
(22) 출원일자 2015년04월17일
심사청구일자 2015년04월17일
(65) 공개번호 10-2015-0121667
(43) 공개일자 2015년10월29일
(30) 우선권주장
1020140046507 2014년04월18일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130132966 A*
JP2011505152 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한양대학교 산학협력단
서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)
(72) 발명자
진언선
서울특별시 종로구 동망산길 47 104동 1203호 (숭인동,종로센트레빌아파트)
정주연
서울특별시 동대문구 사가정로 148 102동 1503호 (전농동,SK아파트)
백광열
서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교 제2학생생활관 416호 (사근동)
(74) 대리인
특허법인다나

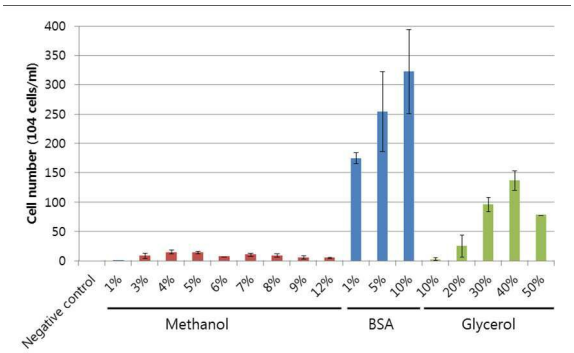
전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 유진오

(54) 발명의 명칭 **세포 동결보존용 조성물 및 이를 이용한 세포 동결보존 방법**

(57) 요 약

본 발명은 세포 동결 보존용 조성물 및 이를 이용한 세포 동결 보존 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물을 사용함으로써, -70℃ 정도의 온도에서도 세포를 장기간 높은 생존율로 보존할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 1/04 (2013.01)
C12N 1/12 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2011-0031999
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 재단법인 한국이산화탄소포집및처리연구개발센터
연구사업명 거대과학기술개발사업/기후변화대응기술개발사업/KCCS2020사업
연구과제명 분자생물학적 개량을 통한 고효율 이산화탄소고정 미세조류 개발
기 여 율 1/1
주관기관 한양대학교 산학협력단
연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

동결보존제(cryoprotectant)로서 소혈청알부민 및 DMSO를 포함하고,

상기 소혈청알부민은 전체 조성물 100 %(w/v) 대비 10 %(w/v) 초과 내지 40 %(w/v) 미만으로 함유되며 DMSO는 5 %(v/v) 초과 내지 15 %(v/v) 이하로 함유되는 미세조류의 세포 동결 보존용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 소혈청알부민은 세포의 동결/해동(freezing/thawing) 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 -70℃ 환경에서 미세조류의 단기 동결보존 생존율이 50% 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 -70℃ 환경에서 미세조류의 장기 동결보존 생존율이 50% 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 미세조류는 녹조류(Chlorophyta), 크립토조류(Cryptophyta), 황금색조류(Chrysophyta), 유글레나조류(Euglenophyta), 규조류(Bacillariophyta), 갈조류(Phaeophyta), 홍조류(Rholophyta) 및 차축조류(Charophyta)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 미세조류는 녹조류인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 녹조류는 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 미세조류는 지수기(exponential phase)의 세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

다음 단계를 포함하는 세포 동결보존 방법:

(a) 제 1 항, 제 3 항, 제 6 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 보존액에 세포를 첨가하는 단계; 및

(b) 상기 세포를 첨가한 보존액을 -60℃ 내지 -80℃에서 동결 보존하는 단계.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 세포는 미세조류 유래의 진핵세포 또는 원핵세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

다음 단계를 포함하는 세포의 동결보존 및 생존성 세포의 수득방법:

(a) 제 1 항, 제 3 항, 제 6 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 보존액에 세포를 첨가하는 단계;

(b) 상기 세포를 첨가한 보존액을 -60℃ 내지 -80℃에서 동결 보존하는 단계; 및

(c) 상기 동결 보존된 세포를 해동시켜 생존성 세포(live cell)를 수득하는 단계.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 세포는 미세조류 유래의 진핵세포 또는 원핵세포인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포 동결 보존용 조성물 및 이를 이용한 세포 동결 보존 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포를 보존하기 위해 배양하는 경우, 유전적인 변이나 세대적 변이에 의해 그 특성이 변화될 가능성이 높은 것

으로 알려져 있으며, 주변 환경 요인에 의해 원치않는 오염이 발생할 수도 있다. 이러한 유전적 변이나 세대적 변이를 최소화하고, 주변 환경 요인에 의한 오염을 차단하면서 세포를 보존하기 위해 종래 초저온 냉동(ultra freezing) 보존법이 이용되어 왔다. 세포에 대한 초저온 냉동 보존법은 -195℃ 정도의 낮은 온도 조건을 요하고, 세포의 동결/해동(freezing/thawing) 손상을 방지하기 위한 동결보존제를 필요로한다. 종래 15% 글리세롤이 일반적인 동결보존제로 사용되어 왔다. 그러나 -195℃의 낮은 온도를 유지하기 위하여는 많은 제약이 따른다. 또한, 동결보존제로 사용되어온 글리세롤의 동결/해동 손상 방지 효과도 미흡한 바, 상대적으로 높은 온도에서도 세포의 보존 효과가 우수하면서도, 세포 동결/해동 손상을 최소화할 수 있는 동결보존제의 필요성이 대두되어 왔다.

[0003] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 세포의 장기간 보존을 위한 동결보존에 있어서, 동결/해동 손상을 최소화할 수 있는 새로운 동결보존제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 동결보존제(cryoprotectant)로서 소혈청알부민을 포함하는 세포 동결 보존용 조성물을 이용하는 경우 -70℃ 정도의 온도에서도 세포를 장기간 높은 생존율로 보존할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0005] 따라서, 본 발명의 목적은 세포 동결 보존용 조성물을 제공하는데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 세포 동결보존 방법을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 세포 동결보존 및 생존성 세포의 수득방법을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 동결보존제(cryoprotectant)로서 소혈청알부민을 포함하는 세포 동결보존용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명자들은 세포의 장기간 보존을 위한 동결보존에 있어서, 동결/해동 손상을 최소화할 수 있는 새로운 동결보존제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 동결보존제(cryoprotectant)로서 소혈청알부민을 포함하는 세포 동결 보존용 조성물을 이용하는 경우 -70℃ 정도의 온도에서도 세포를 장기간 높은 생존율로 보존할 수 있음을 규명하였다.

[0011] 본 발명은 세포의 보존을 위해 종래 사용되어오던 동결보존 방법을 개선하기 위한 것으로서, 소정의 동결보존제를 이용하여, 종래 액체 질소환경(-196℃)에 비하여 비교적 높은 온도인 -70℃에서도 효과적으로 세포를 동결보존할 수 있도록 하는 동결 보존용 조성물에 관한 것이다. -70℃에서 세포의 동결보존은 성공한 사례가 없고, -70℃에서 동결보존을 할 경우, 구입, 보관 과정이 까다로운 액체 질소를 사용하지 않고 동결보존이 가능하며, -70℃의 온도는 연구자들이 일반적으로 보유하고 있는 냉동고(deep freezer)를 사용하는 것만으로 유지할 수 있는 온도이기 때문에 범용성이 넓고 경제적이다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 세포는 미세조류 유래의 진핵세포 또는 원핵세포이다. 본 발명의 "원핵세포"는 원핵생물로부터 유래한 세포를 의미하며, 구체적으로 예를 들면 대장균, 포도상구균 및 콜레라균과 같은 세균, 또는 남조류(Cyanophyta)로부터 유래한 세포이다. 본 발명의 "진핵세포"는 진핵생물에 속하는

미세조류로부터 유래한 세포를 의미한다. 본 발명의 세포 동결 보존용 조성물은 상술한 세포들의 동결건조를 위해 이용될 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 소혈청알부민은 세포의 동결/해동(freezing/thawing) 손상을 억제한다. 세포의 장기간 보존을 위한 동결 및 재이용을 위한 해동 과정에서 세포는 온도 변화에 따른 손상을 입게 된다. 동결이 진행되면 세포 외부의 수분이 먼저 동결 되고 그 결과 세포 외부의 환경은 세포 내부보다 고염의 상태를 형성하게 되는데, 평형상태를 유지하기 위해 세포 내부의 수분의 이동이 발생하고, 그 결과 원형질분리(plasmolysis)가 발생한다. 이를 방지하게 위해 동결보존제를 사용하게 되는데, 동결보존제는 세포보호형 속일성 동결보존제(colligative cryoprotectants)와 세포침투형 동결보존제 두가지로 구분된다. 세포보호형 속일성 동결보존제는 세포 밖의 얼음결정 형성을 억제하는 작용을 하고, 세포침투형 동결보존제는 세포막을 침투하여 세포 내 수분을 치환하고 냉동 시 얼음 결정이 형성되는 것을 억제하는 역할을 한다. 특히 미세조류 세포의 냉동보존에는 세포보호형 속일성 동결보존제는 그 특성 상 이용되지 않고, 세포침투형 동결보존제, 구체적으로 예를 들면, DMSO, 글리세롤이 종래 이용되어 왔다. 하지만, 세포침투형 동결보존제의 경우에는 농도가 높은 경우 세포에 치명적인 단점이 있다. 본 발명자들은 동결보존제로서 소혈청알부민을 사용하는 경우, 세포침투형 동결보존제에서의 유해한 효과 없이도 극적으로 동결보존 세포, 특히 미세조류 세포의 생존율을 높일 수 있음을 규명하였다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 소혈청알부민은 0.5 w/v % 내지 80 w/v %의 함량으로 포함된다. 본 발명의 소혈청알부민은 바람직하게, 1 w/v % 내지 80 w/v %, 더 바람직하게 5 w/v % 내지 50 w/v %, 더욱 더 바람직하게는 10 w/v % 내지 40 w/v %, 가장 바람직하게는 20 w/v % 내지 30 w/v % 함량으로 포함된다. 본 발명의 소혈청알부민이 0.5 w/v %보다 더 적은 양으로 포함되는 경우에는 동결보존제로서의 효과를 유의하게 발휘할 수 없고, 80 w/v % 보다 더 많은 양으로 포함되는 경우에는 본 발명자들이 아는 한(to our best knowledge), 세포 자체에 부정적인 영향을 끼치지는 않지만, 동결 세포의 해동 후 재이용에 비효율적인 면이 있으며, 함유량에 증가에 따른 미세조류 생존율의 증가율이 감소한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 -70℃ 환경에서 미세조류의 단기 동결보존 생존율이 50% 이상이다. 본 발명의 "단기 동결보존 생존율"은 -70℃에서 1.5시간 동결 후, 계속해서 ??196℃에서 7일 동안 동결 한 뒤, 37℃ 수조에서 5분 동안 급속 해동 시켰을 때의 생존율을 의미한다. 종래 동결보존제로 일반적으로 사용되어온 글리세롤의 경우, 사용 농도별 단기 동결보존 생존율 시험에 있어서 가장 높은 생존율을 보이는 농도에서도 40%를 넘지 못했다(참조: 도 1). 그러나 소혈청알부민을 사용된 본 발명의 일 실시예의 경우에는 전체 배지에 대한 1 w/v %의 사용만으로도 50% 정도의 단기 동결보존 생존율을 보였으며, 10 w/v %의 사용시에는 90% 이상의 단기 동결보존 생존율을 보인다(참조: 도 1).

[0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 -70℃ 환경에서 미세조류의 장기 동결보존 생존율이 50% 이상이다. 본 발명의 "장기 동결보존 생존율"은 -70℃로 동결한 상태로 6개월간 보존 후, 37℃ 수조에서 5분 동안 급속 해동하였을 때의 생존율을 나타낸다. 소혈청알부민을 첨가하지 않은 대조군의 경우에는 장기 동결보존 생존율이 5% 미만이었으나, 소혈청알부민을 첨가한 경우에는 장기 동결보존 생존율이 50%이상이다(참조: 도 6).

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 미세조류는 구체적으로 예를 들면 녹조류(Chlorophyta), 크립토조류(Cryptophyta), 황금색조류(Chrysophyta), 유글레나조류(Euglenophyta), 규조류(Bacillariophyta), 갈조류(Phaeophyta), 홍조류(Rholophyta) 및 차축조류(Charophyta)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 특별히 한정되지 않는다.

[0018] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 미세조류는 녹조류이다.

[0019] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 녹조류는 클라미도모나스 속에 속하며, 구체적으로 예를 들면 클라미도모나스 레인하르디티(*Chlamydomonas reinhardtii CW15-*)이다. 본 발명의 클라미도모나스는 길이가 같은 2개의 편모가 있는 단세포녹조이다. 클라미도모나스는 클로렐라와 함께 광합성 연구에 광범위하게 사용되며, 클로렐라에 비하여 단순한 유성생식 단계를 거치므로 최적의 광합성 연구 모델이다. 다만, 장기간 보존에 있어서는 유전적인 변이나 세대적 변이 등에 의한 제한이 따르고, 이와 같은 문제를 해결하기 위하여 효율적인 동결보존이 필요하다. 본 발명자들은 소혈청알부민을 동결보존제로 이용함으로써 상기 문제를 해결할 수 있음을 규명하였다.

[0020] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 미세조류는 지수기(exponential phase)의 세포이다. 본 발명에서

"지수기(exponential phase)"는 미세조류의 발육 과정에서 원형질의 증대가 최대, 또한 일정한 속도가 되는 시기를 의미한다. 세대시간이 가장 짧고 대사 산물이 원형질의 합성에 가장 활발하게 이용되는 시기의 미세조류의 장기간 보존에 본 발명을 이용할 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명인 조성물은 동결보존제로서 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 추가적으로 더 포함한다. DMSO는 종래 세포 침투형 동결보존제로서 알려져 있고 -196℃의 액체질소 조건에서 동결보존제로 사용되어 왔으나, 도 9의 결과에서도 알 수 있듯이, -70℃ 조건에서는 DMSO를 단독으로 사용하는 경우 세포 생존율을 증대시키는 효과를 관찰할 수 없다. 그러나, DMSO 및 소혈청알부민을 함께 동결보존제로 사용하는 경우, DMSO 또는 소혈청알부민을 각각 단독으로 사용하는 경우에 비하여 전혀 예측할 수 없었던 시너지 효과가 발휘되어 우수한 세포 생존 효과가 발휘된다.

[0022] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 DMSO는 0.5 v/v % 내지 50 v/v %로 포함된다. 더 구체적으로 본 발명의 DMSO는 1 v/v % 내지 40 v/v %, 더욱 구체적으로 3 v/v % 내지 35 v/v %, 더욱 더 구체적으로 5 v/v % 내지 30 v/v % 포함될 수 있다. DMSO는 종래 세포 침투의 성질이 있어 다량 사용할 경우, 세포에 부정적인 영향을 줄 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 세포 동결보존 방법을 제공한다:

[0024] (a) 상술한 세포 동결 보존용 조성물을 포함하는 보존액에 세포를 첨가하는 단계;

[0025] (b) 상기 세포를 첨가한 보존액을 -60℃ 내지 -80℃에서 동결 보존하는 단계.

[0026] 본 발명의 "보존액"이란 세포의 배양에 일반적으로 쓰이는 각종 배지를 의미한다. 구체적으로 예를 들면, TAP(Tris-Acetate-Phosphate) 배지, 알렌 배지(Allen's medium), BG11, Waris-H, BBM(Bold's Basal Medium), CM(Modified Closterium Medium, Watanabe 등, 2000, NIES Collection List of Strains. Sixth Edition. 2000. Microalgae and Protozoa), DM(Diatom Medium), 변형 DM(modified DM; mDM), HR-v1 또는 AW-v1을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 TAP 배지를 이용할 수 있으나 특별한 제한은 없다. 본 발명의 단계 (b)에서 세포의 동결 온도는 -60℃ 내지 -80℃일 수 있고, 필요에 따라 적절한 조절이 가능하다. 상기 동결 온도는 바람직하게는 -65℃ 내지 -80℃이고, 더 바람직하게는 -70℃ 내지 -80℃일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 세포는 미세조류 유래의 진핵세포 또는 원핵세포이다. 본 발명의 "원핵세포"는 원핵생물로부터 유래한 세포를 의미하며, 구체적으로 예를 들면 대장균, 포도상구균 및 콜레라균과 같은 세균, 또는 남조류(Cyanophyta)로부터 유래한 세포이다. 본 발명의 "진핵세포"는 진핵생물에 속하는 미세조류로부터 유래한 세포를 의미한다.

[0028] 본 발명인 세포 동결보존 방법은 본 발명의 다른 양태인 세포 동결 보존용 조성물을 이용하는 방법에 해당하므로, 중복되는 내용에 대하여는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

[0029] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 세포의 동결보존 및 생존성 세포의 수득방법을 제공한다:

[0030] (a) 상술한 세포 동결 보존용 조성물을 포함하는 보존액에 세포를 첨가하는 단계;

[0031] (b) 상기 세포를 첨가한 보존액을 -60℃ 내지 -80℃에서 동결 보존하는 단계; 및

[0032] (c) 상기 동결 보조된 세포를 해동시켜 생존성 세포(live cell)를 수득하는 단계.

[0033] 본 발명에 있어서, 생존성 세포란, 세포 본래의 생리학적인 특성(physiological function)을 나타내는 개체를 의미하고, 이는 구체적으로 Evans Blue 염색에 의해 파란색으로 염색되지 않고, 초록색을 나타내는 세포를 의미한다. 본 발명의 "생존성 세포의 수득"은 비-생존성 세포로부터 생존성 세포를 분리하여 수득하는 것 뿐만아니라, 생존성 세포와 비-생존성 세포가 혼재되어 있는 상태 그대로를 수득하는 것을 포함한다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 세포는 미세조류 유래의 진핵세포 또는 원핵세포이다. 본 발명의 "원핵세포"는 원핵생물로부터 유래한 세포를 의미하며, 구체적으로 예를 들면 대장균, 포도상구균 및 콜레라균과 같은 세균, 또는 남조류(Cyanophyta)로부터 유래한 세포이다. 본 발명의 "진핵세포"는 진핵생물에 속하는 미세조류로부터 유래한 세포를 의미한다.

[0035] 본 발명인 세포 동결보존 및 생존성 세포의 수득방법은 본 발명의 다른 양태인 미세조류 동결 보존용 조성물을

이용하는 방법에 해당하므로, 중복되는 내용에 대하여는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

발명의 효과

[0036] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0037] (a) 본 발명은 세포 동결 보존용 조성물을 제공한다.

[0038] (b) 본 발명은 세포 동결보존 방법을 제공한다.

[0039] (c) 본 발명은 세포의 동결보존 및 생존성 세포의 수득방법을 제공한다.

[0040] (d) 본 발명을 이용하는 경우, 세포의 장기간 보존에 있어서 유전적인 변이나 세대적 변이를 최소화할 수 있다.

[0041] (e) 액체 질소 탱크(-196℃)가 아닌 -70℃ 냉동고에서 세포를 냉동 보관할 수 있으므로, 경제적인 측면에서 더욱 효과적이며, 안전성 측면에서도 더욱 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 각 동결보존제를 사용하였을 때 생존하여 계수된 세포 수를 나타낸다.

도 2는 각 동결보존제에 따른 세포 생존율을 나타낸다.

도 3은 각 동결보존제에 따른 세포의 배양 상태를 나타낸다.

도 4는 소혈청알부민을 동결보존제로 사용하여 -70℃에서 일주일과 한 달 간 동결보존한 후 계수된 세포 수와 세포 상태를 나타낸다.

도 5는 소혈청알부민을 동결보존제로 사용하여 -70℃에서 일주일과 한 달 간 동결보존한 후 측정한 세포 생존율을 나타낸다.

도 6은 소혈청알부민을 동결보존제로 사용하여 -70℃에서 6개월 간 동결보존한 후 해동 직후와 일주일 배양한 후 계수한 세포수를 비교한 결과를 나타낸다.

도 7은 소혈청알부민을 동결보존제로 사용하여 -70℃에서 6개월 간 동결보존한 후의 세포의 상태를 나타낸다.

도 8은 소혈청알부민 1 w/v % 내지 50 w/v %를 동결보존제로 사용한 TAP 배지에서 클라미도모나스 레인하르디티 세포를 동결보존 한 경우의 세포 생존율의 결과를 나타낸다.

도 9는 소혈청알부민과 DMSO를 혼합하여 동결보존제로 사용하는 경우의 세포 생존율의 향상 결과를 나타낸다.

도 10은 원핵세포(Escherichia coli DH5-Alpha)를 대상으로 소혈청알부민을 동결보존제로 사용하여 -70℃에서 동결보존한 후 측정한 세포 생존율 및 콜로니 사진을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0044] **실시예**

[0045] **실시예 1: 동결보존제 및 동결보존용 세포 현탁액의 제조**

[0046] 동결보존제는 미세조류에서 가장 많이 사용되는 메탄올과 미생물에서 주로 사용하는 글리세롤, 그리고 새로운 동결보존제인 소혈청알부민을 선택하여 실험에 사용하였다. 소혈청알부민의 경우 Bio Basic사의 소혈청알부민(Cat. no. AD0023)를 증류수에 녹여 50% 소혈청알부민 용액으로 제조한 후 실험을 진행하였다. 다양

한 동결보존제는 0.22 ㎛ 막 필터(membrane filter)를 사용하여 멸균하고 TAP(Tris-Acetate-Phosphate) 배지에 1 w/v %에서 50%까지 다양한 농도로 섞어주었다.

[0047] 실험 대상 종인 클라미도모나스 레인하르디티(Chlamydomonas reinhardtii CW15-)균주(University of British Columbia, 이재혁 박사 연구실로부터 제공 받음)는 지수기의 건강한 세포로 배양하였다. 배양한 균주는 헤모사이토미터(Haemocytometer)로 세포수를 계수하여 동결보존제가 첨가된 TAP 배지에 350×10^4 세포/㎖ 농도가 되도록 현탁하였다.

[0048] **실시예 2: 기존 동결보존제와 새로운 동결보존제의 동결보존 효율 비교**

[0049] 기존 동결보존제와 새로운 동결보존제의 효율을 비교하기 위하여 동결보존 실험을 진행하였다. 동결보존 및 해동 실험은 클라미도모나스 리소스 센터(Chlamydomonas resource center)에서 제시하고 있는 방법으로 실험하였다(http://chlamycollection.org/cryopreservation/).

[0050] 먼저 앞서 준비한 동결보존용 세포 현탁액을 2㎖ 폴리에틸렌 냉동보관용 튜브에 1.8㎖씩 분주하였다. 이 후 Nalgene사의 'Mr. Frosty' 두-칸막이 동결 컨테이너(two compartment freezing container)(Cat. no. 5100-0001)에 준비된 냉동보관용 튜브를 넣었다. 이 때 동결 컨테이너(freezing container)는 미리 250 ㎖의 이소프로판올을 넣은 후 4℃의 저온 상태에 적응시켰다. 미세조류 균주가 들어 있는 동결 컨테이너는 -70℃ 냉동고에서 1시간 반 동안 보관하여 온도를 떨어뜨렸다. 그 후 튜브만 따로 액체질소 탱크(-196℃ 이하)에 옮겨 7일 동안 동결보존하였다.

[0051] 세포의 생존율을 확인하기 위하여 동결보존한 세포는 37℃ 수조에서 5분 동안 급속 해동시킨 후 3200 rpm, 20℃의 조건으로 원심분리하였다. 회수한 세포 펠릿은 새로운 TAP 배지로 현탁한 후 에반스 블루(Evans Blue) 용액을 동량으로 섞었다. 에반스 블루 용액에 의해 죽은 세포는 파란색으로 염색되고 살아있는 세포는 초록색으로 보이기 때문에 세포 계수 방법을 사용하여 세포 생존율을 확인하였다(참조: 도 1).

[0052] 기존에 알려진 메탄올이나 글리세롤보다 소혈청알부민을 동결보존제로 사용한 세포의 생존율이 더 높은 것을 확인할 수 있었다(참조: 도 2).

[0053] 또한 소혈청알부민의 사용 농도 범위를 더욱 확장하여 세포 생존율을 확인한 결과, 약 25%(w/v) 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였으며, 50%(w/v) 농도의 경우 5% 농도와 유사한 생존율을 보임을 확인하였다(참조: 도 8).

[0054] 또한 해동한 세포를 지속적인 배양하였을 때, 기존에 알려진 메탄올이나 글리세롤을 동결보존제로 사용한 세포는 색깔이 변성되고 음성대조군의 세포와 같이 죽었지만, 소혈청알부민을 동결보존제로 사용한 세포는 원래의 균주 색깔을 보이며 건강하게 유지되는 것을 관찰할 수 있었다(참조: 도 3).

[0055] **실시예 3: -70℃에서 소혈청알부민을 동결보존제로 사용한 동결보존 실험**

[0056] 상기 실시예 2에서 새로 확보한 동결보존제인 소혈청알부민의 우수한 동결보존 효율이 -70℃ 냉동고를 사용할 때에도 유지되는지 확인하기 위해 새로운 동결보존 방법을 사용하여 실험하였다. 소혈청알부민 10 w/v %의 농도를 동결보존 농도로 설정하였다. 상기 실시예 2에서와 같이 -70℃ 냉동고에서 1시간 반 동안 온도를 떨어뜨린 실험군을 액체 질소 탱크로 옮기지 않고 지속적으로 -70℃ 냉동고에 일주일과 한 달 간 보존한 후 해동하여 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 높은 효율의 생존율을 확인할 수 있었다(참조: 도 4 및 도 5).

[0057] 또한, 소혈청알부민 대신 DMSO를 사용하는 경우, 소혈청알부민을 단독으로 사용하는 경우, 및 TAP 배지를 기준으로 10 v/v %의 DMSO를 소혈청알부민에 첨가하여 사용하는 경우에 세포 생존율에 어떠한 영향이 있는지 실험하였다. 그 결과 DMSO를 단독으로 사용하는 경우에는 세포 생존율 증대 효과가 거의 나타나지 않았고, 소혈청알부민을 단독으로 사용하는 경우에는 사용 농도가 증가됨에 따라 상술한 바와 같이 예상되는 세포 생존율 증대 효과가 관찰되었다. 그런데 놀랍게도 소혈청알부민에 DMSO 10 v/v %를 혼합하여 사용한 경우에는 놀라운 세포 생존율 증대 효과가 관찰되었다. 특히 1% 소혈청알부민과 DMSO의 혼합 사용의 경우, 소혈청알부민이나 DMSO 단독 사용시에 보인 10% 미만의 생존율이 80% 이상으로 향상되는 놀라운 결과가 관찰되었다(참조: 도 9). 도 9에 있어서, CPA 농도(%) 1의 경우에는 각각 DMSO 1 v/v %, BSA 1 w/v %, 또는 BSA 1 w/v % + DMSO 10 v/v %를 이용하여 시험한 결과를 나타내고, CPA 농도(%) 5의 경우에는 각각 DMSO 5 v/v %, BSA 5 w/v %, 또는 BSA 5

w/v % + DMSO 10 v/v %를 이용하여 시험한 결과를 나타낸다.

[0058] **실시예 4: -70℃에서 6개월 이상의 장기 동결보존 실험**

[0059] 상기 실시예 3에서 진행된 실험이 장기 보존을 할 때에도 유효한지 확인하기 위하여 6개월 간 장기 동결보존 실험을 진행하였다. 상기 실시예 3과 같은 실험을 진행하여 세포를 냉동한 후 6개월 이후 해동하여 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 높은 효율의 생존율을 확인할 수 있었다(참조: 도 6 및 도 7).

[0060] 또한 해동 직후로부터 일주일 후에 세포 수를 다시 계수하여 세포가 지속적으로 배양 가능한 건강한 상태인지를 관찰하였고, 관찰 결과 해동 후 7일 경과 후에도 세포가 배양 가능한 건강한 상태를 유지함을 확인하였다(참조: 도 6).

[0061] **실시예 5: -70℃에서 원핵생물(*Escherichia coli* DH5-Alpha)을 대상으로한 동결보존 실험**

[0062] 글리세롤 10 v/v % 또는 소혈청알부민 10 w/v %를 동결보존제로 사용하여 -70℃에서 동결보존한 후 세포 생존율을 측정하였다. 실험 대상 종인 *Escherichia coli* DH5-Alpha의 세포 배양액을 각각 글리세롤 10 v/v % 또는 소혈청알부민 10 w/v %를 동결보존제로 사용하여 현탁했다. 세포 현탁액은 2 mL 폴리에틸렌 냉동보관용 튜브에 1.8 mL씩 분주하였다. 이 후 Nalgene사의 'Mr. Frosty' 두-칸막이 동결 컨테이너(two compartment freezing container)(Cat. no. 5100-0001)에 준비된 냉동보관용 튜브를 넣었다. 이 때 동결 컨테이너(freezing container)는 미리 250 mL의 이소프로판올을 넣은 후 4℃의 저온 상태에 적응시켰다. 미세조류 균주가 들어 있는 동결 컨테이너는 -70℃ 냉동고에서 1시간 반 동안 보관하여 온도를 떨어뜨린 후 ??70℃ 냉동고에서 동결보존하였다.

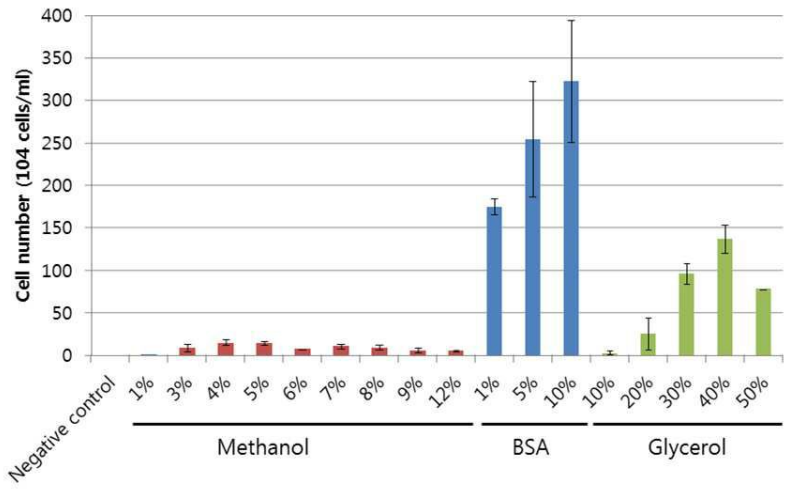
[0063] 세포의 생존율을 확인하기 위하여 동결보존한 세포는 37℃ 수조에서 5분 동안 급속 해동시킨 후 1/100000로 희석하여 고체 LB 배지에 도말하였다. 그 후 37℃ 배양기에서 밤새(Overnight) 배양하여 자라난 콜로니의 개수를 통해 세포 생존율을 확인하였다.

[0064] 그 결과 기존에 사용하던 동결보존제인 글리세롤 10 v/v %와 소혈청알부민 10 w/v %가 세포 생존율의 차이가 크게 없는 것으로 보아, 넓은 범위에서 사용 가능한 동결보존제임을 확인할 수 있었다(참조: 도 10).

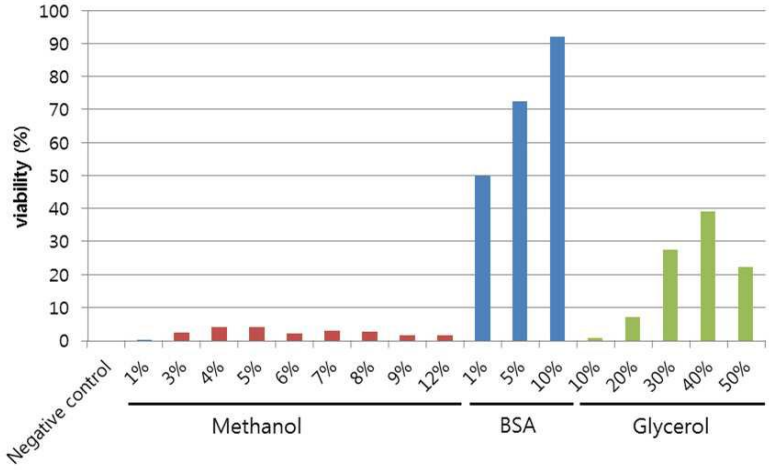
[0065] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

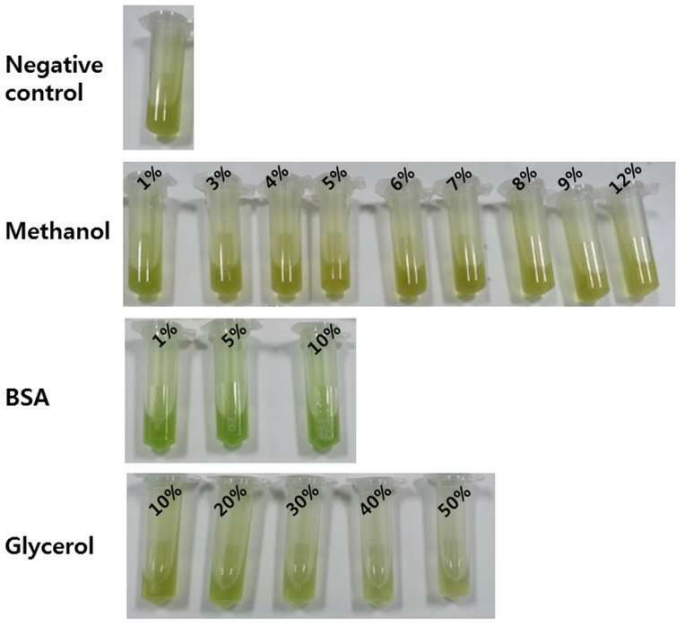
도면1



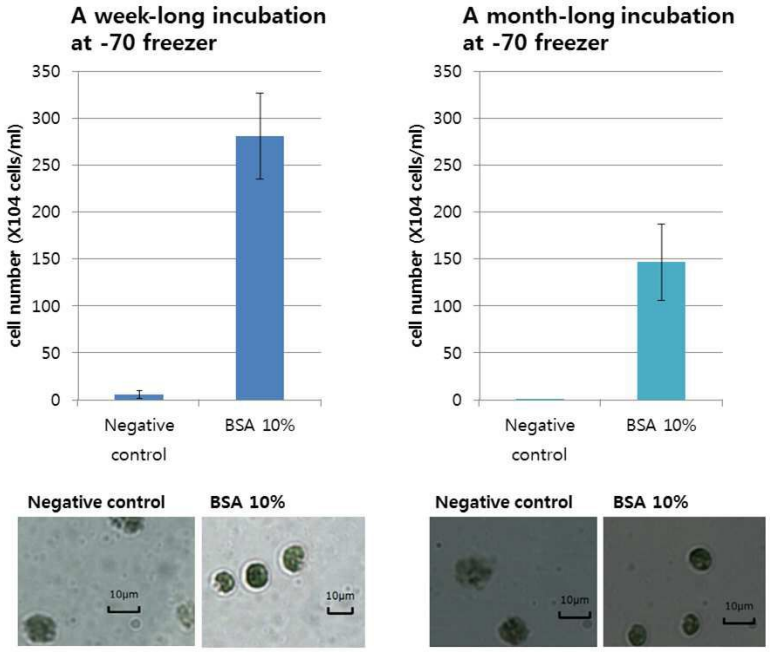
도면2


viability (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Negative control
1%
3%
4%
5%
6%
7%
8%
9%
12%
1%
5%
10%
10%
20%
30%
40%
50%
Methanol
BSA
Glycerol

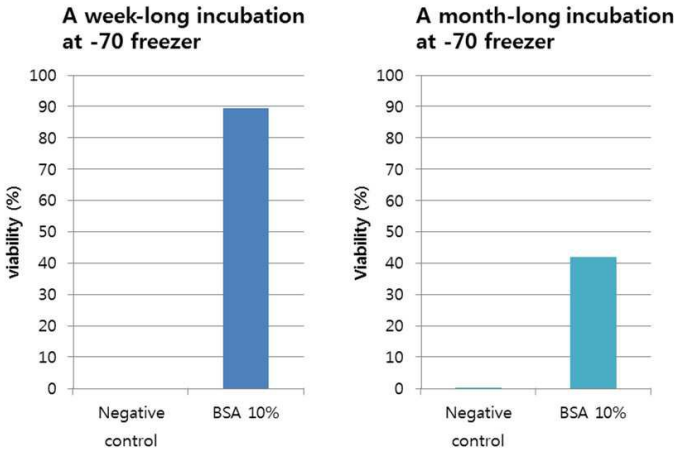
도면3


Negative control
Methanol
1%
3%
4%
5%
6%
7%
8%
9%
12%
BSA
1%
5%
10%
Glycerol
10%
20%
30%
40%
50%

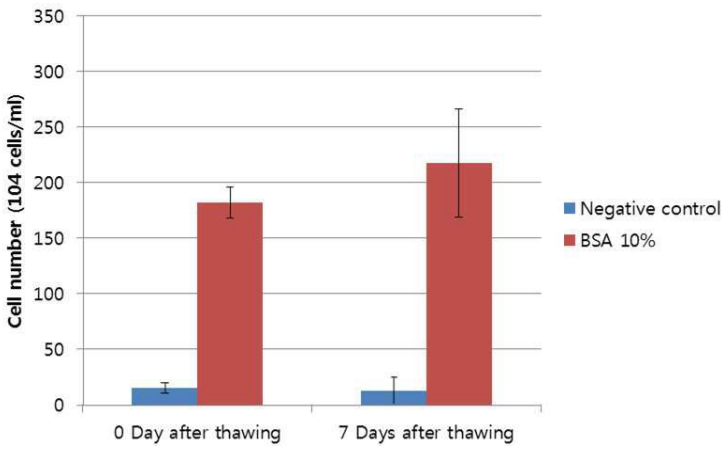
도면4


A week-long incubation at -70 freezer
A month-long incubation at -70 freezer
cell number (X104 cells/ml)
350
300
250
200
150
100
50
0
Negative control
BSA 10%
Negative control
BSA 10%
10μm

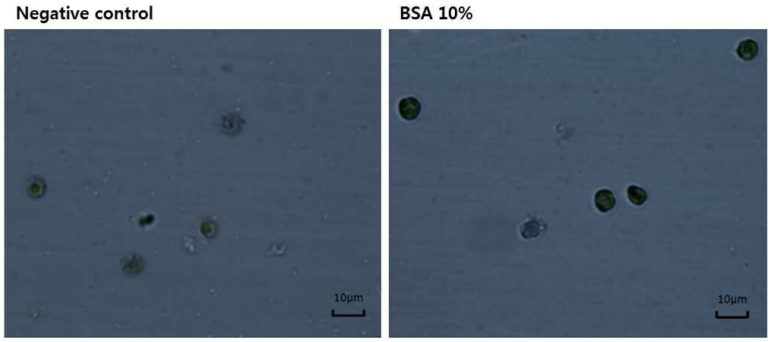
도면5


A week-long incubation at -70 freezer
A month-long incubation at -70 freezer
viability (%)
Viability (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Negative control
BSA 10%

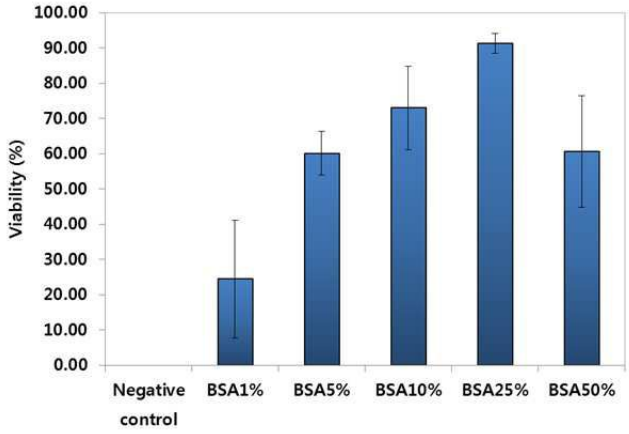
도면6


Cell number (104 cells/ml)
350
300
250
200
150
100
50
0
0 Day after thawing
7 Days after thawing
Negative control
BSA 10%

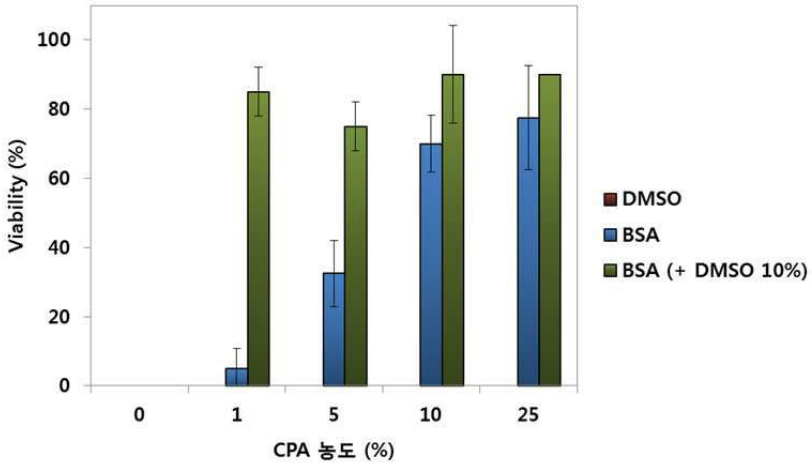
도면7


Negative control
BSA 10%
10μm
10μm

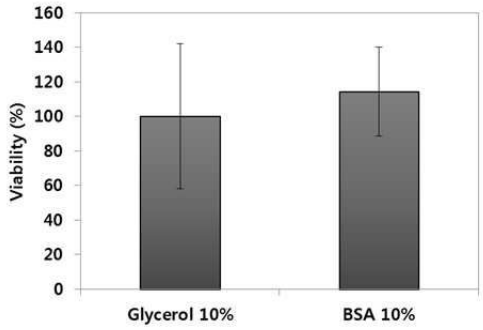
도면8

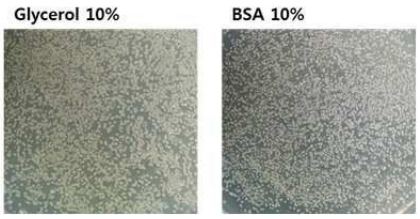

100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
Viability (%)
Negative control
BSA1%
BSA5%
BSA10%
BSA25%
BSA50%

도면9


100
80
60
40
20
0
Viability (%)
0
1
5
10
25
CPA 농도 (%)
DMSO
BSA
BSA (+ DMSO 10%)

도면10





【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 16

【변경전】

제 1 항 내지 제 13 항

【변경후】

제 1 항, 제 3 항, 제 6 항 내지 제 11 항

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 14

【변경전】

제 1 항 내지 제 13 항

【변경후】

제 1 항, 제 3 항, 제 6 항 내지 제 11 항