

Application note

Cell culture application에 사용한 Roche Recombinant Trypsin

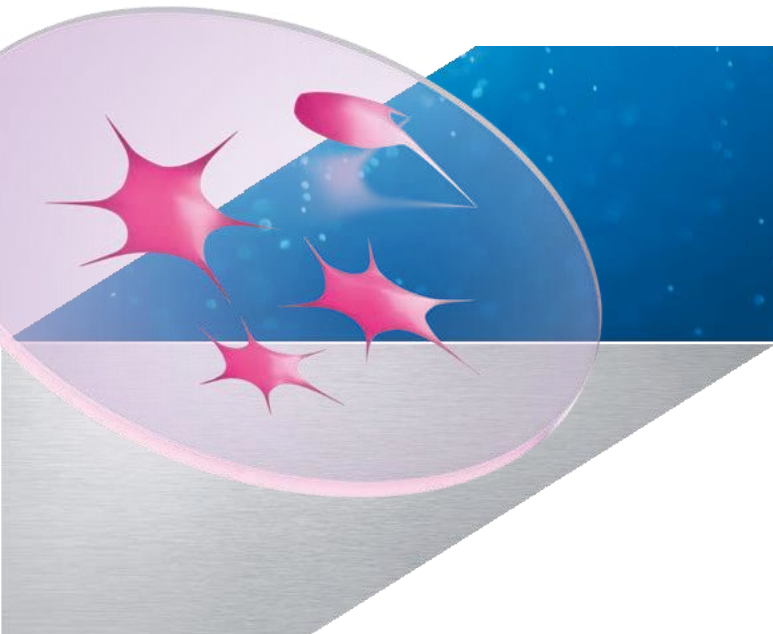
January 2018

Dr. Andrea Normann

Mediagnost Gesellschaft für Forschung und Herstellung von
Diagnostika GmbH, Reutlingen, Germany

Dr. Manuela Poignee-Heger, Dr. Peter Hloch

Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany



머릿말

2004년 부터, GMP(Good Manufacturing Practice) 가이드라인에 따라 생산되고 있는 Roche의 recombinant trypsin은 *Pichia pastoris*에서 발현시킨 효소이며, 배양, 정제, 최종 산물에 이르기까지 동물 유래 성분이 전혀 사용되지 않습니다. 또한 Active Pharmaceutical Ingredient (API)의 생산에 자주 사용되는 효소인 만큼 생산과정은 인슐린 제조의 선두 업체들로 부터 감사를 받고 있습니다.

최근 인체 용으로 사용되는 제품의 모든 제조 공정에서 천연 효소를 재조합 단백질로 교체하고자 하는 요구가 증가하고 있습니다. 이 application note에서 우리는 부착성 세포의 분리와 같이 세포 배양에서의 Roche recombinant trypsin에 대한 유용성을 검증하였으며 특히 백신의 생산에 자주 사용이 되는 세포주에 대한 검증에 집중하였습니다.

이를 위해, Trypsin의 처리로 세포를 분리하는 경우 손상에 특히 민감한 것으로 알려져 있는 MRC-5 세포주를 사용하였고, MRC-5 세포의 손상을 최소화하면서 가능한 모든 세포를 분리할 수 있도록 Roche Recombinant Trypsin의 농도와 반응 buffer의 조성을 먼저 최적화하였습니다.

다음으로, 백신을 생산하는 제약사에서 일반적으로 사용하는 FRhK-4, Vero, MDCK 그리고 CHO 세포와 같은 다른 세포주에 대한 프로토콜도 최적화하는 작업도 진행하였습니다.

마지막으로는 희석된 Roche Recombinant Trypsin 용액의 열에 대한 안정성을 확인하였습니다.

재료 및 방법

세포주, 시약, 소모품

세포주

세포주 이름	출처	배양 배지
MRC-5	ATCC, Mediagnost	Hank's/Earles (1:1), 10% FCS, 1% PS, 1% NaPy, 1% NEA
MDCK	Mediagnost	DMEM, 10% FCS, 1% PS, 1% NaPy, 1% NEA
FRhK-4	Prof. Dr. Bertram Flehmig, University of Tuebingen	Hank's/Earles (1:1), 10% FCS, 1% PS, 1% NaPy, 1% NEA
Vero	Prof. Dr. Bertram Flehmig, University of Tuebingen	Hank's/Earles (1:1), 10% FCS, 1% PS, 1% NaPy, 1% NEA
CHO	Roche, BMTU50104 Ch 1/27.04.09	DMEM/Ham's F12, 10% FCS, 1% PS, 1% NaPy, 1% NEA

시약

시약명	시약 공급사	제품번호	로트번호
Roche Recombinant Trypsin sample #6	Roche	0358658103	12857800
PBS w/o CaCl ₂ , MgCl ₂ (DPBS)	Gibco	14190	368185
PBS w/o CaCl ₂ , MgCl ₂	PAA	H15-002	H00209-1906
EDTA 0.5M pH 8 ultrapure	Gibco	15575	626351
Trypsin-EDTA 0.25%	Gibco	25200	318266A
Trypsin-EDTA 0.25%	PAA	L11-660	L66008-2494
Hank's	PAA	E15-838	E83808-2145
Earles	PAA	E15-825	E82509-1029
DMEM/Ham's F12	PAA	E15-813	E81309-1600
DMEM	Gibco	22320	483937
FCS	PAA	A15-511	A51106-0392
Pen/Strep (PS)	PAA	P11-010	P01007-1842
AA, non-essential (NEA)	PAA	M11-003	M00307-1836
Sodium pyruvate (NaPy)	PAA	S11-003	S00309-0713
Hematoxylin Solution, Mayer's	Sigma-Aldrich	51275	
Aquatex			

소모품

소모품명	공급사	제품번호
6well Plate	Nunc	140675
Tissue Culture Flask 125 cm ² (25 ml)	BD Falcon	353107
Tissue Culture Flask 25 cm ² (50 ml)	Greiner Bio-One	690175
Tissue Culture Flask 75 cm ² (250 ml)	Greiner Bio-One	668170
Tissue Culture Flask 175 cm ² (500 ml)	Nunc	159910
2ml Stripette pipette	Corning	4021
5ml Stripette pipette	Corning	4051
10ml Stripette pipette	Corning	4101
epT.I.P.S. 2-200 µL	Eppendorf	0030 000.870
epT.I.P.S. 0.1-10 µL	Eppendorf	0030 000.811
epT.I.P.S. 50-1000 µL	Eppendorf	0030 000.919
CryoTubes 1 ml	Nunc	3-75353
PP Tubes, 50ml, conical	Sarstedt	62.547.254
High Clarity PP Centrifuge Tube, Conical Bottom, 15 ml	BD Falcon	352096

Roche Recombinant Trypsin (Roche 제품번호 03358 658/ 로트번호 12857800) 은 단백질 농도 70mg/ml 인 stock solution 으로 제공됩니다. 이 효소는 autocatalytic digestion 을 방지하기 위해 산성의 storage buffer (10 mM HCl/20 mM CaCl₂, pH 2.0) 에 담겨 있습니다. Roche Recombinant Trypsin 을 0.5ml 과 50 µl 로 분주하여 -20°C 에 보관하였고, 사용하기 직전에 녹였습니다.

Protocol: Roche Recombinant Trypsin 를 이용한 세포의 Trypsinization

각 세포주는 confluent monolayer 가 되도록 배양하였습니다. 배양배지를 제거한 세포는, 37°C 로 데워진 5.0 ml PBS 로 2번 헹구 주었습니다. 그리고 1:10⁴ 배율로 PBS/0.5mM EDTA 로 희석한 Roche Recombinant Trypsin 1ml 을 37°C 로 미리 데워준 후 첨가해 주었습니다. 세포는 현미경으로 관찰하여 완전히 탈착될 때까지 incubation 해 주고, 재현탁 시켰습니다. Trypsin 의 활성을 멈추고 세포 탈착을 중단시키기 위해 세포의 현탁액은 10% FSC 가 포함된 각 세포주의 적절한 배양 배지 (2페이지 참고) 로 희석한 후 1,300 rpm 에서 10분 동안 원심분리 하였습니다. 상층액은 제거하고, 결과 부분의 표5에 명시된 바와 같이 적절한 splitting ratio 에 따라 세포는 신선한 배양 배지로 재현탁 시켰습니다.

Protocol: 세포 고정 및 염색

세포는 6-well plates (12.5 cm²) 에 접종 후, Confluency 에 다다르면 1ml PBS 로 씻어주었습니다. Roche Recombinant Trypsin 을 처리하지 않은 Control 세포는 행균 단계 후 바로 PBS 에 녹인 2.5% formaldehyde 2ml 을 각 well 당 추가하여 고정시켰습니다. Roche Recombinant Trypsin 을 처리한 세포는 기술된 (결과 부분 확인) incubation 시간 후 2.5% formaldehyde 로 고정하였습니다. 고정된 세포는 Mayer's Hematoxylin Solution 으로 10분 동안 incubation 하여 염색시키고 물로 헹구 주었습니다. 고정 및 염색시킨 세포는 Aquatex solution 으로 덮어준 후 Axioskop microscope (Zeiss) 에서 100 배율로 사진 촬영 하였습니다.

결과

MRC-5세포 탈착을 위한 Roche Recombinant Trypsin 농도 최적화

2004년 부터 로슈는 good manufacturing practice (GMP) 가이드라인에 따라 Recombinant Trypsin을 생산해 왔으며, 제품 생산을 위한 배양, 정제, 최종산물에 이르기까지 동물유래 성분은 일체 사용되지 않습니다.

Roche Recombinant Trypsin은 Active Pharmaceutical Ingredient (API) 처럼 높은 수준으로 규제되는 제조공정에 사용됩니다. 효소는 고순도의 제품으로 검출이 될만한 활성을 가지는 다른 단백질 분해 효소는 전혀 들어 있지 않습니다. (그림 1).

Roche Recombinant Trypsin은 고순도로 제공되므로(그림 1), 일반적인 품질의 Trypsin 보다 낮은 농도에서 최적의 효율을 보일 것으로 기대 되었습니다. 따라서 trypsinization protocol의 최적화를 위해 저희는 단백질의 다양한 희석 배수와 buffer에 대한 실험을 진행 하였습니다.

Roche Recombinant Trypsin은 10 mM HCl, 20 mM CaCl_2 가 포함된 pH 2.0 산성 buffer에 들어 있습니다. 70 mg/ml의 농도로 제공되는 stock solution은 PBS/1 mM EDTA buffer에 Serial dilution 하였습니다. (표 1)

용액 속에 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 이온들이 포함되어 있으면 세포의 응집을 유발시키기 때문에, 희석과정에서는 MgCl_2 나 CaCl_2 가 없는 PBS Buffer를 사용했습니다. 희석 용액의 EDTA 농도는 다음 장에 기술된 바와 같이 순차적으로 최적화하였습니다.

희석된 효소 용액은 사용하기 전에 37°C 에서 10분간 예열해 주었습니다.

실험에는 사용한 세포는 Trypsin 처리에 따른 손상에 특히 민감한 것으로 알려져 있는 MRC-5 세포를 사용 하였습니다.

25 cm^2 (50 ml) 의 tissue culture flask 5개에 MRC-5 세포를 접종해 주고 Confluent monolayer가 될 때 까지 배양했습니다.(그림 2) 이후, 배양 배지를 모두 제거 하고, 세포는 5.0 ml PBS로 두 번 헹구 주었습니다.

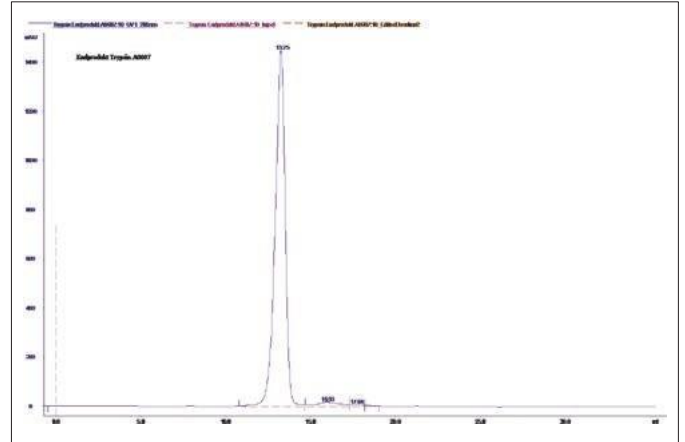


그림 1: Final fomulation buffer 상에서 Roche Recombinant Trypsin의 HPLC Superdex 75™ 분석결과 (Roche internal data).

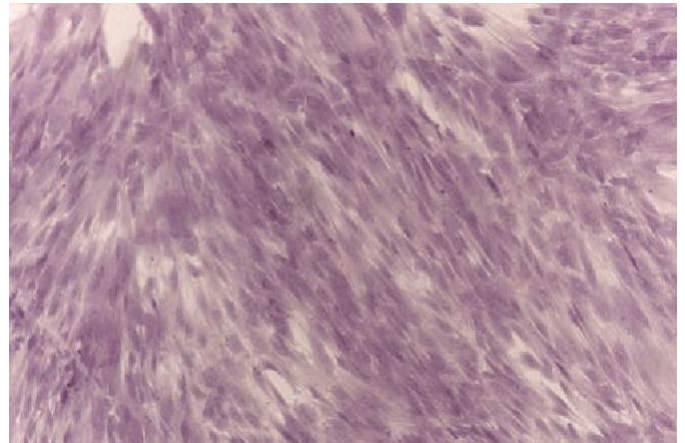


그림 2: Confluent monolayer의 MRC-5 세포. 세포는 재료 및 방법에 기술된 대로 고정하고 염색 됨.

희석 배수	Roche Recombinant Trypsin 양	버퍼의 양 (PBS + EDTA 1 mM)	총 량	단백질 농도	최종 pH
none	5 ml	0 ml	5 ml	70 mg/ml	2
1:10 (10^1)	0.5 ml	4.5 ml	5 ml	7 mg/ml	6.8
1:100 (10^2)	0.5 ml 1:10	4.5 ml	5 ml	700 µg/ml	7.4
1:1,000 (10^3)	0.5 ml 1:100	4.5 ml	5 ml	70 µg/ml	7.4
1:10,000 (10^4)	0.5 ml 1:1,000	4.5 ml	5 ml	7 µg/ml	7.4
1:100,000 (10^5)	0.5 ml 1:10,000	4.5 ml	5 ml	0.7 µg/ml	7.4
1:1,000,000 (10^6)	0.5 ml 1:100,000	4.5 ml	5 ml	0.07 µg/ml	7.4

표 1: Serial dilution한 Roche Recombinant Trypsin stock solution.

각각 10^6 , 10^5 , 그리고 10^4 으로 희석된 Roche Recombinant Trypsin solution 1.0ml을 세포에 첨가 해 주었고, 비교를 위해 다른 공급업체 (PAA, Gibco)에서 구입한 Trypsin-EDTA도 0.25% 농도로 첨가 해 주었습니다. Roche Recombinant Trypsin이 고순도로 제공되기 때문에, 첫 번째 실험에서는 10^1 , 10^2 , 그리고 10^3 의 희석은 사용하지 않았습니다.

세포의 탈착은 현미경으로 관찰하였습니다. 상온에서 30초가 지나자 실험한 세 가지 농도 모두에서 세포가 원형으로 바뀌는 것이 관찰되었고, 10^6 와 10^5 로 희석한 Trypsin에서는 세포의 뭉침이 생기기 시작했습니다. 10^4 으로 희석한 경우는 세포 뭉침이 관찰되지는 않았습니다. 0.25%의 농도로 처리하여 함께 비교한 두 가지 reference trypsin에서도 비슷한 결과가 관찰되었습니다. 2분 간 상온에서 incubation한 후, 10^4 로 희석한 Roche Recombinant Trypsin과 두가지의 reference trypsin은 균일한 양상의 cell suspension이 형성되었습니다. 5개의 cell suspension은 trypsinization 과정을 멈추고 세포 손상을 최소화하기 위해 10% FCS가 포함된 10ml HE-media를 추가하여 10분간 1,300 rpm으로 원심분리하였습니다.

상층액은 제거하고, 세가지 희석 배율의 Roche Recombinant Trypsin과 두 가지의 다른 reference trypsin으로 떼어낸 각각의 MRC-5세포에서 ¼만 따서 적합한 배지와 함께 T25 flask에 접종해 주었습니다. 세포는 4시간 후 현미경으로 관찰하였고, 추후 1, 2, 3, 4일째 되는 날 각각 관찰했습니다.

4시간 후, 5개 실험 세포 모두에서 세포가 잘 뿔어 나가 건강하게 잘 자라고있는 것을 관찰했습니다. 희석한 Roche Recombinant Trypsin을 처리한 세포 뿐만이 아니라, 두개의 다른 reference trypsin을 처리한 세포들에서도 세포 손상은 관찰되지 않았습니다. 다만 10^6 과 10^5 으로 희석하여 처리한 경우, trypsinization 과정 중 관찰된 것과 유사하게 세포의 뭉침 현상이 증가하는 것을 관찰할 수 있었습니다. 그러나 Roche Recombinant Trypsin의 10^4 희석에서는 이런 뭉침이 관찰되지 않았습니다.

4일 후, 다섯 개의 trypsinization 실험을 진행했던 세포들이 모두 confluent monolayer가 된 것을 확인할 수 있었습니다.

Trypsin 출처	Incubation 시간 [min]	Cell suspension	현미경 관찰	포화상태에 도달한 시간
Roche Recombinant Trypsin 10^6 dilution (in PBS EDTA 1 mM)	2 min RT	세포 뭉침	단일 세포 및 세포 뭉침	4days
Roche Recombinant Trypsin 10^5 dilution (in PBS EDTA 1 mM)	2 min RT	세포 뭉침	단일 세포 및 세포 뭉침	4days
Roche Recombinant Trypsin 10^4 dilution (in PBS EDTA 1 mM)	2 min RT	균일한 단일 세포	균일한 단일 세포	4days
Trypsin competitor 1 (Trypsin EDTA 0.25%)	2 min RT	균일한 단일 세포	균일한 단일 세포	4days
Trypsin competitor 2 (Trypsin EDTA 0.25%)	2 min RT	균일한 단일 세포	균일한 단일 세포	4days

표 2: MRC-5 세포의 trypsinization 실험을 위한 trypsin 농도 최적화.

이 실험 결과는, 10^4 의 비교적 낮은 희석 배수인 Trypsin/EDTA 용액이 reference로 사용이 된 0.25%의 Trypsin/EDTA 제품과 부착성 세포의 탈착에 대하여 비슷한 결과를 낼 수 있다는 것을 보여주었습니다. 이 0.25% 농도는 1:28로 희석한 것과 상응하는 농도입니다. (결과 부분 11페이지의 "Roche Recombinant Trypsin, 2.5 mg/ml 농도 평가" 참고)

PBS/EDTA 희석 buffer의 EDTA 농도 최적화

PBS/EDTA 희석 buffer를 이용한 최적의 EDTA 농도를 찾기 위해, Roche Recombinant Trypsin을 PBS/EDTA 0.5mM stock solution을 이용하여 serial dilution하여 다음 실험에 사용하였습니다. (표 2)

희석된 Roche Recombinant Trypsin 은 -20°C에 보관하였습니다.

희석 배수	Roche Recombinant Trypsin 양	PBS/ 0.5 mM EDTA 양	총 양
110	50µl	450µl	0.5ml
1100	50µl 110	450µl	0.5ml
11,000	50µl 1100	450µl	0.5ml
110,000	0.5 ml 11,000	4.5 ml	5.0ml

표 3: PBS/0.5 mM EDTA를 이용하여 Roche Recombinant Trypsin stock solution 희석.

25cm²(50ml)의 Tissue Culture Flask에 MRC-5 세포를 접종해주고 Confluent monolayer가 될 때까지 배양하였습니다.(그림 2) 세포 배양 상층액은 제거해 주고, 세포는 50ml PBS 로 두 번 행구어 주었습니다.

그리고 아래 용액을 각각 T25 flask에 넣어 주었습니다:

- PBS/EDTA 0.5mM로 10⁴ 배 희석된 Roche Recombinant Trypsin 1.0ml
- PBS/EDTA 1mM로 10⁴ 배 희석된 Roche Recombinant Trypsin 1.0ml
- Reference Trypsin(PAA) 1.0ml

세포는 앞서 기술한 바와 같이 현미경으로 관찰했습니다.(그림 3,4).

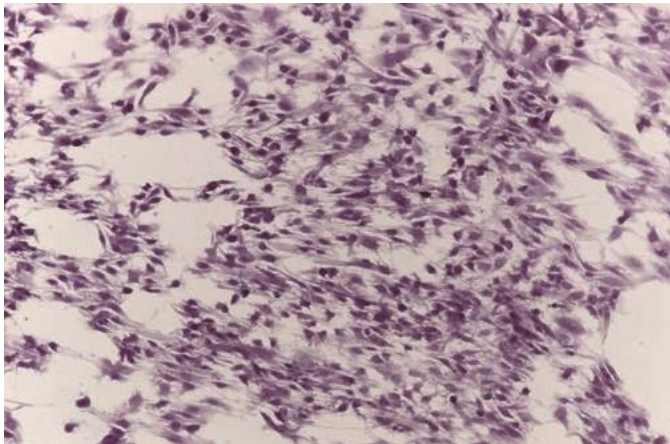


그림 3: PBS/EDTA 0.5mM 로 10⁴ 배 희석된 Roche Recombinant Trypsin 처리 후, 상온에서 1분간 incubation 시킨 MRC-5 세포.

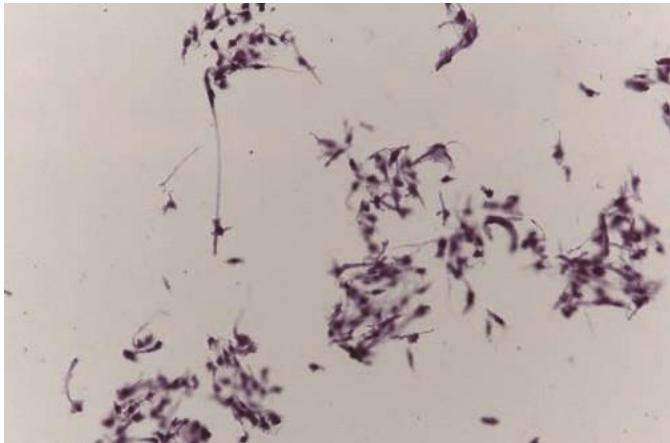


그림 4: PBS/EDTA 0.5mM 로 10⁴ 배 희석된 Roche Recombinant Trypsin 처리 후, 상온에서 3분간 incubation 시킨 MRC-5 세포.

Trypsin 출처	Incubation 조건	Cell suspension	현미경 관찰	Confluency 도달 시간
Roche Recombinant Trypsin 10 ⁴ (in PBS EDTA 0.5 mM)	2 min RT	균일함	세포가 잘 자람	4 일
Roche Recombinant Trypsin 10 ⁴ (in PBS EDTA 1 mM)	2 min RT	균일함	세포가 잘 자람	4 일
Reference Trypsin PAA	2 min RT	균일함	세포가 잘 자람	4 일

Table 4: 희석 버퍼의 0.5mM 과 1mM EDTA 농도 비교.

희석 buffer의 EDTA 농도가 0.5mM 일 때와 1mM 일 때 모두 trypsinization 이나 세포 성장에서의 차이점은 관찰 되지 않았습니다. (표 4) 따라서 이후 실험은 모두 0.5 mM의 EDTA가 포함된 buffer를 사용했습니다.

PBS/EDTA 0.5mM 로 10^4 배 희석한 Roche Recombinant Trypsin 을 이용한 FRhK-4과 Vero 세포의 trypsinization

FRhK-4와 Vero 세포가 T25 Flask에서 confluent monolayer를 형성하면 (그림 5와 6), 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 trypsinization을 수행하였습니다.

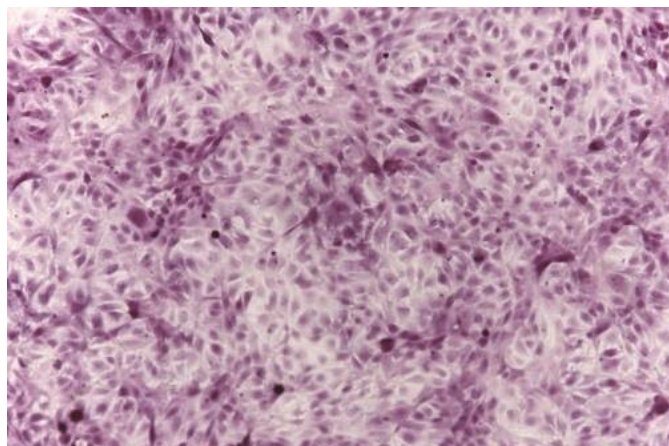


Figure 5: Confluent monolayer 를 형성한 FRhK-4 세포

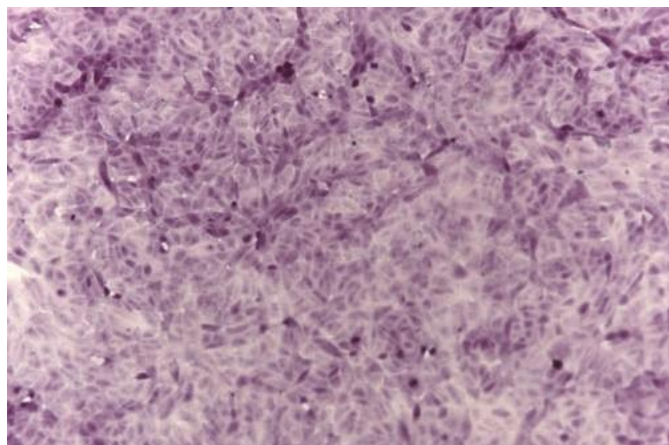


그림 6: Confluent monolayer를 형성한 Vero 세포.

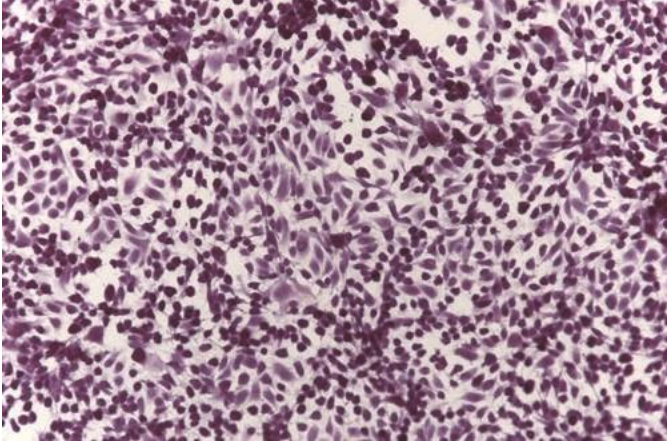


그림 7: Roche Recombinant Trypsin 10⁻⁴으로 처리 후 37°C에서 3분간 incubation 시킨 FRhK-4 세포

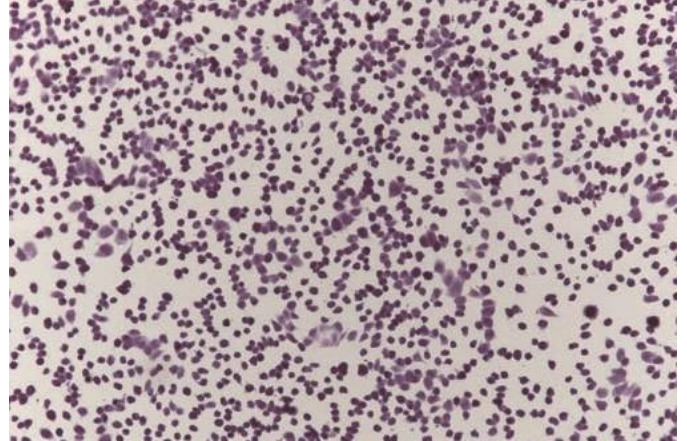


그림 8: Roche Recombinant Trypsin 10⁻⁴으로 처리 후 37°C에서 3분간 incubation 시킨 Vero 세포

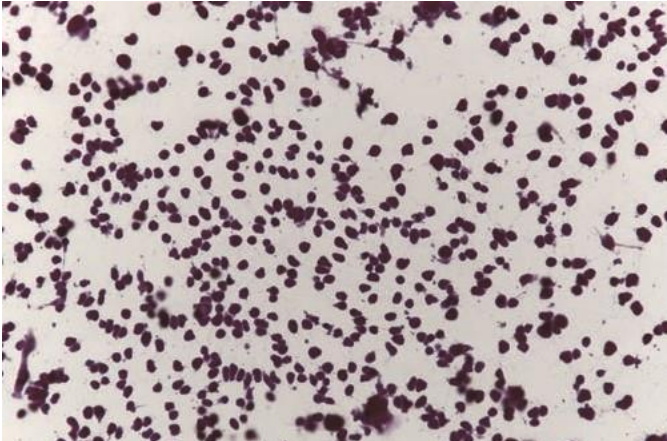


그림 9: Roche Recombinant Trypsin 10⁻⁴으로 처리 후 37°C에서 7분간 incubation 시킨 FRhK-4 세포

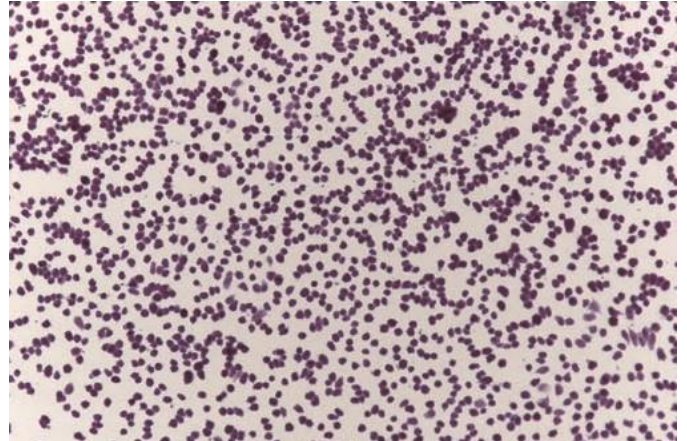


그림 10: Roche Recombinant Trypsin 10⁻⁴으로 처리 후 37°C에서 7분간 incubation 시킨 Vero 세포

10ml의 Roche Recombinant Trypsin 10⁻⁴를 처리한 후 현미경으로 세포를 관찰하였습니다. MRC-5와는 다르게, FRhK-4와 Vero 세포는 37°C에서 3분 incubation 후에야 세포가 라운딩되는 것이 보였습니다. (그림 7, 8) 7분 후에 세포가 거의 떨어져 나온 것을 볼 수 있었습니다. (그림 9, 10)

FRhK-4와 Vero 세포의 현탁액은 재료 및 방법에 기술된 프로토콜에 따라 처리 후, 각 세포 현탁액의 1/8만 T25 flask로 옮겨주었습니다. 4시간 후, 5개 실험 세포 모두에서 세포가 잘 뿔어 나가 건강하게 잘 자라고있는 것을 관찰했습니다.

3일 후, 다섯 개의 trypsinization 실험을 진행했던 세포들이 모두 confluency에 도달한 것을 확인할 수 있었으며, Roche Recombinant Trypsin을 희석하여 넣은 세포와 Reference trypsin을 처리한 세포들은 큰 차이가 없었습니다.

PBS/EDTA 0.5 mM로 10^4 배 희석한 Roche Recombinant Trypsin 을 이용한 CHO 세포와 MDCK 세포의 trypsinization (CHO cell line =BMTU 50104 Ch1/27.04.09)

CHO 세포와 MDCK가 T25 Flask에서 confluent monolayer를 형성하면 (그림 5와 6), 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 trypsinization 을 수행하였습니다.

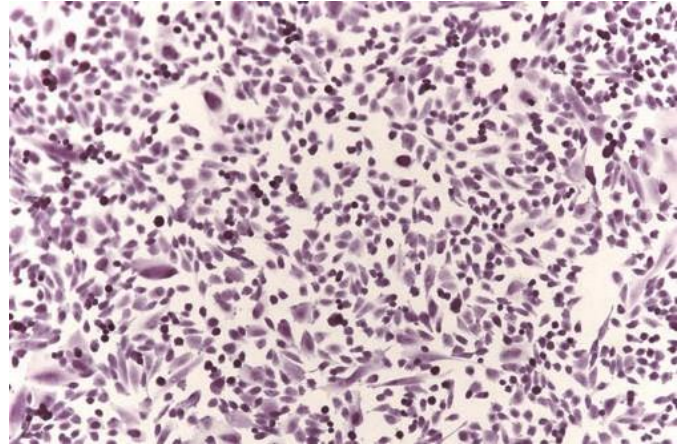


그림 11: Confluent monolayer 를 형성한 CHO 세포.

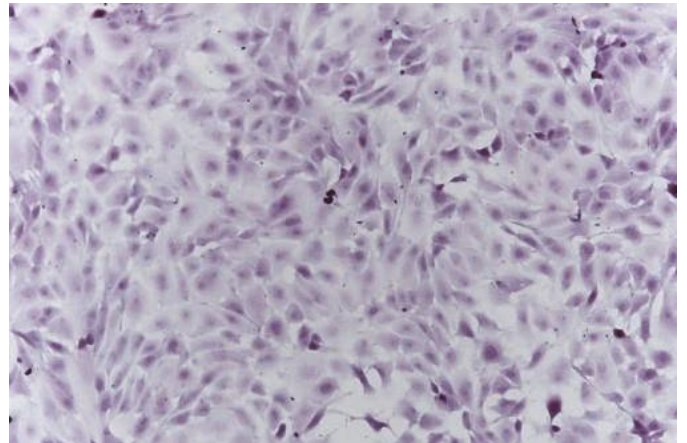


그림 12: Confluent monolayer 를 형성한 MDCK 세포.

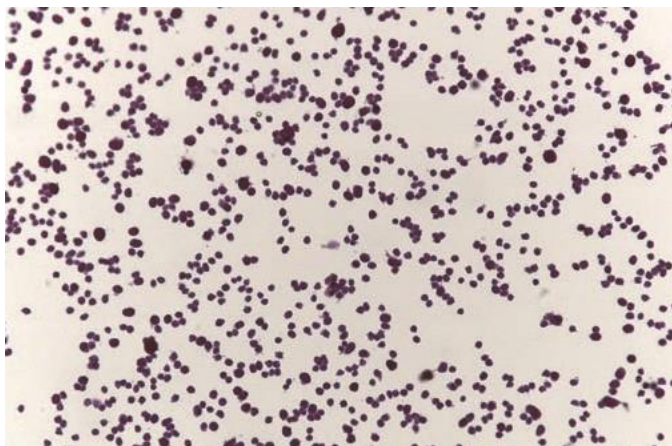


Figure 13: Roche Recombinant Trypsin 10^{-4} 으로 처리 후 상온에서 1분간 incubation시킨 CHO 세포

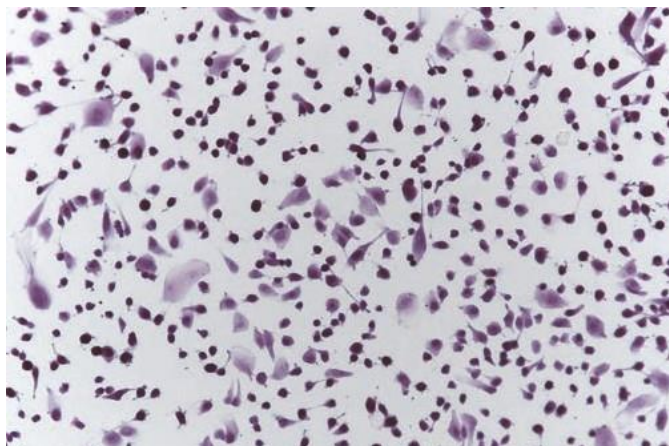


Figure 14: Roche Recombinant Trypsin 10^{-4} 으로 처리 후 상온에서 2.5분간 incubation시킨 MDCK 세포

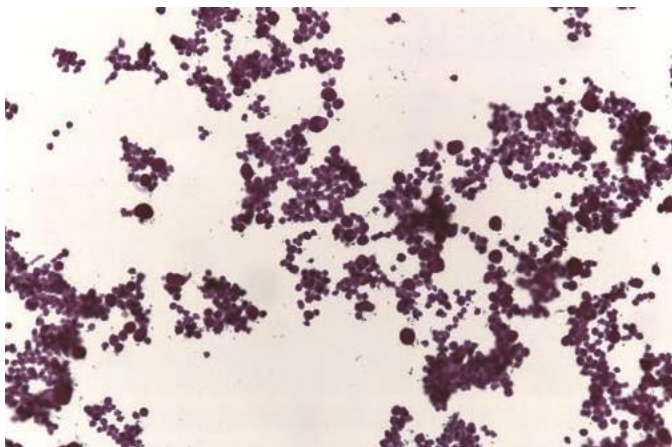


Figure 15: Roche Recombinant Trypsin 10^{-4} 으로 처리 후 상온에서 3분간 incubation시킨 CHO 세포.



Figure 16: Roche Recombinant Trypsin 10^{-4} 으로 처리 후 상온에서 5분간 incubation시킨 MDCK 세포

10ml의 Roche Recombinant Trypsin 10^{-4} 를 처리한 후 현미경으로 세포를 관찰하였습니다. CHO 세포와 MDCK 세포는 상온에서 각각 1분, 2.5분 incubation 후 세포가 라운딩되는 것이 보였습니다. (그림 13, 14) 각각 3분, 5분 후에는 세포들이 거의 떨어져 나온 것을 볼 수 있었습니다. (그림 15, 16)

CHO 세포와 MDCK 세포의 현탁액은 재료 및 방법에 기술된 프로토콜에 따라 처리 후, 세포 현탁액의 1/10만 T25 flask로 옮겨 주었습니다. 4시간 후, 5개 실험 세포 모두에서 세포가 잘 뿔어 나가 건강하게 잘 자라고있는 것을 관찰했습니다.

3일 후, 다섯 개의 trypsinization 실험을 진행했던 세포들이 모두 confluency에 도달한 것을 확인할 수 있었으며, Roche Recombinant Trypsin을 희석하여 넣은 세포와 Reference trypsin을 처리한 세포들은 큰 차이가 없었습니다.

Roche Recombinant Trypsin을 이용하여 탈착 실험을 한 각 세포주의 결과는 표 5에 정리하였습니다.

세포주	희석 비율	Roche Recombinant Trypsin 10 ⁴	
		Trypsin과의 incubation 시간*	Confluency에 도달하는 시간
MRC-5	14	2 min RT	4 days
Vero	16	7 min 37°C	3 days
FRhK-4	18	7 min 37°C	3 days
CHO	110	3 min RT	4 days
MDCK	15	5 min RT	3 days

*Incubation 시간: 세포가 완전히 탈착되는 데까지 필요한 시간

표 5: Roche Recombinant Trypsin 10⁴ (data on file) 을 이용한 다양한 세포주의 탈착 실험

계대 배양

Roche Recombinant Trypsin 10⁴ 을 이용하여, MRC-5 세포를 9번 탈착하고 계대 배양하였고, Vero 와 FRhK-4 세포는 6번, CHO 세포는 4번, MDCK는 3번 계대 배양하였습니다. 모든 세포주는 전형적인 건강한 상태의 세포 모양을 하고 있었으며, 꾸준히 잘 자라는 것을 확인할 수 있었습니다. 우리의 실험 결과는, Roche Recombinant Trypsin을 낮은 농도인 7µg/ml (10⁴)을 이용한 경우에도 고농도의 reference Trypsin/EDTA를 사용한 경우와 동일한 결과를 보여주며, 세포 손상도 나타나지 않는다는 것을 보여주었습니다.

Roche Recombinant Trypsin, 25mg/ml 농도 평가

다른 공급 업체들이 일반적으로 제공하는 농도인 0.25% Trypsin/EDTA에 해당하는 농도를 테스트해 보기 위해, Roche Recombinant Trypsin 70mg/ml 을 25mg/ml (0.25%)로 만들기 위해 PBS/EDTA 0.5mM 을 이용하여 1:28로 희석하였습니다. 이 희석물은 Roche Recombinant Trypsin 10⁴와 성능의 평가 및 비교를 위해 다양한 세포주를 이용하여 세포 탈착 실험을 하였습니다. (표 6)

세포주	희석 비율	Roche Recombinant Trypsin/EDTA 0.25%		Roche Recombinant Trypsin 10 ⁴	
		Trypsin과의 incubation 시간*	Confluency 도달 시간	Trypsin과의 incubation 시간*	Confluency 도달 시간
MRC-5	14	0.5 min RT	5 days	3 min RT	4 days
Vero	16	7 min 37°C	3 days	7 min 37°C	3 days
FRhK	18	7 min 37°C	3 days	7 min 37°C	3 days
CHO	110	0.5 min RT	4 days	3 min RT	4 days
MDCK	15	20 min RT	3 days	5 min RT	3 days

*Incubation 시간: 세포가 완전히 탈착되는 데까지 필요한 시간

표 6: 1:28로 희석한 용액과 10⁴로 희석한 Roche Recombinant Trypsin 비교

0.25% Roche Recombinant Trypsin/EDTA solution을 이용한 경우, 세포가 완전히 탈착될 때까지의 incubation 시간은 Roche Recombinant Trypsin 10⁴에 비해 약간 짧아진 것 같지만, 세포가 confluency에 도달하는 시간은 크게 달라지지 않았습니다. MRC-5 세포의 경우는 confluency에 도달하기까지 조금 더 시간이 걸렸기 때문에,

우리는 더 고농도인 0.25% Roche Recombinant Trypsin은 세포의 손상을 다소 주는 것이 아닐까라고 짐작했습니다. 따라서 이런 세포 손상을 피하기 위해서는, 훨씬 낮은 농도인 Roche Recombinant Trypsin 10⁴/EDTA solution을 사용하기를 권장합니다.

Roche Recombinant Trypsin 검증

서로 다른 두개의 로트를 검증 하기 위해 Roche Recombinant Trypsin을 아래의 조건으로 실험하였습니다.;

- PBS/0.5 mM EDTA buffer
- 7 microgram/ml
- pH: 7.3±0.5

“세포 탈착 시간”, “생존력(viability)”, “증식 속도(doubling time)” 그리고 “세포 형태(cell morphology)”와 같은 매개 변수는 일반적으로 사용이 되는 다른 Trypsin 제품과 비교하여 읽었습니다.

실험조건:

- 세포는 적절한 배지 및 조건으로 6-well plates 또는 25cm² Cell culture flasks에서 배양했습니다.
- Confluent culture는 PBS로 행귀주고, Roche Rec. Trypsin과 PAA사의 Accutase® 를 넣고 incubation하였습니다: ~ 1ml/25 cm²
- 세포 탈착 후 해당 배양 배지를 추가하여 trypsin의 반응을 중단시켜 주었습니다: ~ 3 Vol.
- 세포를 200µg에서 3분간 원심분리후, 상층액은 버리고 세포는 배양 배지에 재현탁 시켜주었습니다.
- 세포는 적절한 비율로 나누어 계대배양하였고, 80% confluency에 도달할 때까지 배양해 주었습니다.

Roche Trypsin rec. (ready to use; PBS/0.5 mM EDTA buffer로 희석한 7 microgram/ml Roche Trypsin 최종 용액)

Cell line	Time to detachment [min]		Viability [%]		Expansion [No. of passages]		Doubling time [days]	
	Trypsin rec.	Competitor	Trypsin rec.	Competitor	Trypsin rec.	Competitor	Trypsin rec.	Competitor
hMSCs	3	3	95	91 (Acc.), 92 (Tryp.LE)	p3	p3	2.9	3.3 (Acc.), 2.9 (Tryp.LE)
iPS	3	3	95	89	p3	p3	-	
MDA	3	3	88	82	p4	p4	3.3	2.7
BT474	3	3	92	84	p3	p3	7.9	7.5
HCT116	3	3	96	96	p4	p4	0.9	0.9

표 7: Roche Recombinant Trypsin (Pilot lot 1, ready to use)의 성능 테스트 데이터

Roche Trypsin rec. (ready to use; PBS/0.5 mM EDTA buffer로 희석한 7 microgram/ml Roche Trypsin 최종 용액)

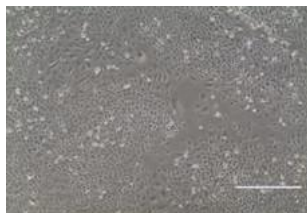
Cell line	Time to detachment [min]		Viability [%]		Expansion [No. of passages]		Doubling time [days]	
	Trypsin rec.	Competitor	Trypsin rec.	Competitor	Trypsin rec.	Competitor	Trypsin rec.	Competitor
HEK293	2	2	96	95	p5	p5	1.3	1.4
HT1080	2	2	97	97	p5	p5	0.8	0.8
NIH3T3	3	3	96	94	p5	p5	1.4	1.3
HCT116	2	2	97	97	p5	p5	0.7	0.7
BT474	3	3	94	93	p5	p5	4	4
CHO	1.5	1.5	98	98	p5	p5	0.6	0.6
iPS	3	3	94	93	p5	p5	1.1	1.0

표 8: Roche Recombinant Trypsin (Pilot lot 2, ready to use)의 성능 테스트 데이터

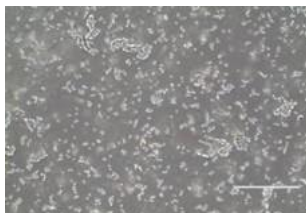
세포의 형태

Trypsin rec. cell culture grade를 계대 배양용 시약으로 사용 한 경우
세포의 일반적인 형태

CHO cells



계대하기 전 CHO 세포



Trypsin rec. cell culture grade로 1.5 분 incubation

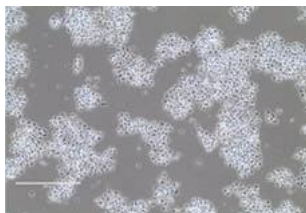


p4에서의 CHO 세포의 형태

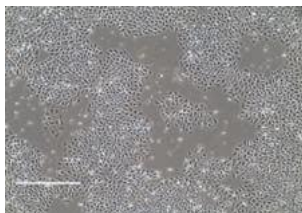
Induced pluripotent stem cells (iPS)



계대하기 전 iPS 세포

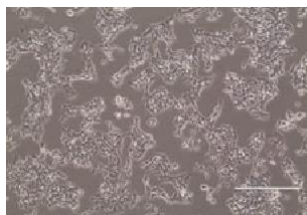


Trypsin rec. cell culture grade로 3분 incubation

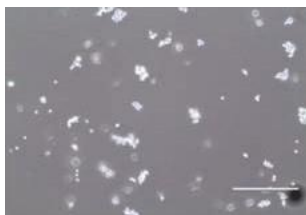


p4에서의 iPS 형태

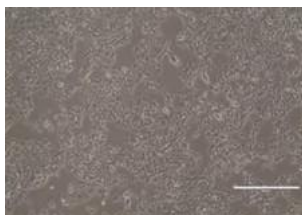
HEK 293



계대하기 전 HEK 293 세포



Trypsin rec. cell culture grade로 2분 incubation



p4에서의 HEK 293 세포의 형태

Roche Recombinant Trypsin 10⁴ 의 온도에 대한**안정성**

희석된 효소 (PBS/0.5 mM EDTA buffer를 이용하여 7µg/ml으로
희석, pH: 7.3±0.5)의 안정성은 DIN/ISO 13485에 따른 로슈 데이터로
증명되었습니다.(data not shown) 제품은 -20°C에서 보관 및
운송하기를 권장합니다. 희석된 효소는 아래의 조건에서
안정합니다:

- -20°C (-15~-25°C)에서 24개월
- 녹인 후에는 4°C (2~8°C)에서 24개월
- 상온(25°C)에서 24시간

결론

Roche Recombinant Trypsin은 부착성 세포의 탈착에 효과적으로 적용할 수 있었습니다. 이 효소의 다양한 활용에 대해 보여주기 위해, 우리는 제약사에서 제품 생산에 주로 사용되는 다양한 종류의 세포주 (예, MRC-5, FRhK-4, Vero, CHO, MDCK)를 사용하여 평가했습니다. 효소 stock solution의 희석은 PBS/EDTA 0.5mM buffer를 사용하였습니다. 우리는 고순도의 Roche Recombinant Trypsin이 매우 낮은 농도인 7µg/ml (70mg/ml의 stock solution을 10⁴으로 희석)에서도 실험한 모든 세포에 대해 높은 효소 활성을 가지고 있다는 것을 입증하였습니다. (표 5) 이 농도로 희석된 효소를 이용하여, 시중에 판매 중인 다른 trypsin/EDTA solution (Gibco, PAA/ 표 2)과 비교한 경우에도 동일한 결과를 얻을 수 있었는데, 비교에 사용된 Trypsin/EDTA는 훨씬 높은 농도인 0.25%로 제공되고 있습니다. 반응 시간이나 온도는 세포주마다 약간씩 달랐지만, 동일 세포주에서는 같은 조건으로 Roche Recombinant Trypsin과 reference trypsin/EDTA solution을 비교 평가 하였습니다.

0.25%로 희석한 Roche Recombinant Trypsin (25mg/ml)을 이용한 실험에서는, MRC-5와 같은 일부 세포에서는 세포가 완전히 탈착되어 라운딩 되는 시간이 10⁴ 배수 희석보다는 줄어들 수 있지만, confluency까지 다시 도달하는데 걸리는 시간은 조금 더 길었습니다. (표 6)

이 결과는 높은 농도의 Trypsin이 세포 손상을 유발 할 수도 있다는 것을 보여줍니다. 반대로, 70mg/ml의 stock solution을 더 많이 희석하였을 때는 (예, 10⁵ or 10⁶) trypsinization 시와 첫 계대 배양 시 세포의 뭉침 현상이 관찰 되었으므로 더 희석하는 것은 추천하지 않습니다. 10⁴으로 희석한 경우는, 반복된 trypsinization이나 계대 배양에서 눈에 띄는 세포 손상은 관찰되지 않았습니다.

우리는 실험 결과를 바탕으로, 세포배양 시 세포 탈착 및 계대 배양이 목적이라면 Roche Recombinant Trypsin을 매우 낮은 농도인 7µg/ml로 사용할 것을 권장합니다. 이렇게 희석된 효소는 더 높은 농도의 reference trypsin/EDTA solution들과 동일한 결과를 얻을 수 있었으며, 동시에 세포 손상의 위험이 현저히 감소되었습니다.

안정성 테스트에서는 Roche Recombinant Trypsin 10⁴은 4°C에서 24개월간 효소 활성이나 성능 감소 없이 보관이 가능하며 이는 세포 탈착 실험으로 확인하였습니다. 상온 보관은 짧은 시간 보관 시에만 권장합니다. (24시간 또는 그 이하)

Regulatory Disclaimer

For further processing only.

custombiotech.roche.com

한국로슈진단(주)



서울특별시 강남구 테헤란로 108길 22 (06174)
TEL : 02-550-3300 Fax : 02-550-1218
E-mail : korea.diagnostics@roche.com
Homepage : <http://custombiotech.roche.com>