

4장. 배지의 형태와 제조

1절. 배지의 형태

1. 고체배지

Agar가 함유된 배지로 기본 형태이며 반고체 상태이다. 고체 상태이기 때문에 배양체가 공중에 떠 있어 기체 및 빛의 공급이 용이하다. 또한 통기가 좋아 잘 썩지 않는다. 하지만 재료활용도가 떨어지는 단점과 배양체의 성장이 액체배지보다 느리다는 단점이 있다. 일반적인 조직배양에서 가장 많이 사용되며 조직배양에서 일반적으로 배지라고 하면 고체배양을 말하기도 한다.



2. 액체배지

Agar가 함유되지 않은 배지로 진탕기 위에서 계속 교반을 해주어야 한다. 교반을 해주지 않으면 액체 속에 잠겨있기 때문에 무산소상태가 되어 쉽게 썩고 잘 자라지 않는다. 하지만 액체 상태이기 때문에 재료활용도가 높다.

3. 이중배지

한 용기 내에 고체와 액체의 두 가지 상이 존재하는 배지이다.

2절. 배지의 제조

1. 배지의 선택

특정 목적에 따라 배지에 관하여 수많은 공식들이 존재한다. 실험자가 자신의 목적에 맞는 배지의 조성을 정확히 안다면 좋겠지만 그렇지 못할 경우에는 일반적으로 많이 사용되는 MS, SH 혹은 Gambord B5와 같이 널리 알려진 배지로 시작하고, 다음에 식물 성장조절제의 수준을 변경시켜 시험해 보는 것이 좋다. 대부분의 경우에는 auxin과 cytokinin의 수준을 조절한다. 배지를 선택할 때 고려해야 할 사항은 다음과 같다.

- 실험식물체의 종 - 식물체의 종에 따라 배지의 조성이 달라진다.
- 식물체의 나이 - 어린 식물체가 좋다.
- 배양기관의 연령 - 미성숙 기관이 좋다.
- 배양기간의 형태 - 형태에 따르며 특히 뿌리배양에는 B1이 꼭 필요하다.
- 배양기간 - 목적하는 바와 배양체에 따라 배양기간 또한 달라진다.
- 발달과정의 차이 - 어느 발달과정을 이용하느냐에 따라 배지는 달라진다.

2. 배지의 제조법(제조과정)

배지의 제작과정; 여과살균이 가능하면 성장조절제는 autoclave 이후에 넣는다.



▪ 제조할 배지를 선택한 후
필요한 stock solution을
미리 제조한다.

▪ Stock solution 또는 기성
배지를 섞는다. 나머지 부
분은 증류수로 정량한다.

▪ Sucrose와 미리 준비된
→ 식물성장조절물질(stock
solution) 등을 첨가한다.



▪ 잘 녹여 혼합한 후 pH를
각 배지에 맞도록 적정한
다.

▪ Agar를 정량하여 배지에
넣은 후, 전자렌지 또는
가열교반기를 이용하여
완전히 녹인다.

▪ 원하는 배양용기에 분주
→ 분주한 후, 최종으로 au
toclave에서 고압멸균 한
다.

* stock solution 을 사용하여 배지 1ℓ를 만드는 과정 중 한가지 방법
(이 외에도 여러 가지 방법이 있다.)

① 1ℓ 용량의 용기에 500ml의 증류수를 채운 후 각각의 stock solution을 pipette으로 넣는다.

② Myoinositol, sucrose를 넣는다.(myoinositol은 stok solution에 첨가하여 만들 수도 있다.).

- ③ 증류수를 첨가하여 950ml 정도 되게 한다.
- ④ pH를 NaOH(또는 KOH)나 HCl로 5.8되게 한다.
- ⑤ 증류수를 첨가하여 총용량을 1ℓ로 조정한다.
- ⑥ 배지를 2ℓ 이상의 flask나 유리제품의 냄비 등에 옮기고 한천을 첨가한다(일반적으로 한천은 0.8%를 사용).
- ⑦ 다음의 각각의 방법을 선택적으로 이용할 수 있다.
 - Flask 등을 aluminium foil로 막고 120℃(1.06Kg/cm²)에서 15분간 고압살균
 - Hot plate & magnetic stirrer 위에 배지가 들어 있는 flask 등을 올려놓고 한천이 녹을 때 까지 가열한다.
- ⑧ 배지가 뜨거운 상태에서 배양용기에 일정량씩 분주하여 고압증기 살균하거나, 대량으로 고압 증기 살균된 배지를 무균대위에서 이미 살균된 용기에 분주한다.
- ⑨ Zeatin 이나 gibberellen 등과 같은 열에 약한 성장조절제나 항생제 등은 pH를 조절하여 고압 증기 살균된 배지에 0.22 μ m의 micro filter로 여과 살균하여 첨가한다. 첨가할 때 배지의 온도는 한천이 굳지 않을 정도의 낮은 온도가 좋다(40~59℃).

조직배양에서 실험오차는 거의 전부가 배지의 제조 과정에서 비롯되므로 이것을 최소로 하기 위해서는 모든 규칙을 조심스럽게 준수하여야 한다. 배지에 성분이 첨가될 때는 미리 기록된 것을 하나씩 지우거나 표시해 가면서 하고 중요한 과정을 자세히 기록하여 후에 다시 확인이 가능하도록 한다.

3. 성장조절제의 제조법(기본제조과정)

- 가능한, 멸균수와 멸균된 초자기구를 사용한다.
- 1mM, 100ml제조 사용한다.
- 한달 간 냉장 보관 가능해야 한다. (Foil에 쌓은 상태로 보관)
- KOH, HCL로 녹인다.
- 열을 가해주기도 한다.
- NAA (a-Naphtalene Acetic Acid) : 1N NaOH [or 1M KOD]을 조금씩 가해 녹인다.
- IAA (Indole-3-4-Acetic Acid) : 1N NaOH을 조금씩 가해 녹인다.
- 열에 약하나 일반적으로 Filtration 하지만 Autoclave 하기도 한다.
- Gibberellic Acid : 일반적으로 에틸알콜을 사용하여 녹인다. 그러나, 알콜을 녹일 만큼만 사용하여야 한다. 반듯이 여과방법으로 sterilisation해야 한다.
- Kinetin : 1N NaOH을 조금씩 가해 녹인다. (광에 의해 파괴되므로 Foil에 쌓아 보관, 배양시에도 주의)
- IBP, BA : 물이나 IN, NaOH로 조금씩 넣어 가면서 녹인다.
- 성장조절제를 사용한 Tip, 피펫은 서로 섞이지 않도록 유의 하여야 한다.
- 성장조절제를 만들거나 다룰 때는 사용한 초자류는 세척 시 확실하게 세척한다.

4. 배지의 농도 표시법

- 농도계산의 기본

- 부피백분율 - 부피 100중에 그 물질이 차지하는 비율이다. 예를 들면 야자유 5%는 물 950ml에 야자유를 50ml를 첨가하는 것이다. 좀 더 정확히 말하면 야자유 50ml에 물을 첨가하여 총량이 1000ml되게 하는 것이다.
- 중량백분율 - 무게 100중에 용질이 차지하는 비율이다. 예를 들면 sucrose 3%는 30g의 sucrose에 물을 첨가하여 총량이 1,000ml되게 하는 것이다.
- Molar(M) - 어느 물질의 그램 분자량을 1M로 정하고 이에 비례되는 무게는 M로 나타낸다. 예로서, IAA 1M이란 1ℓ의 물속에 그 분자량 만큼의 무게, 즉 175.18g의 IAA가 용해되어 있는 것이다.
- mg/ℓ - 1ℓ의 용액 중에 들어 있는 물질의 양으로 가장 많이 사용되소 있는 농도 표시방법이다. 이는 주로 성장조절제의 농도를 표시할 때 사용한다. 예로서, IAA 0.1mg/ℓ는 물 1ℓ속에 0.1mg의 IAA가 들어 있음을 의미한다. 1μg/ℓ는 mg/ℓ의 1/1000이다.
- part(s) per million(ppm) - 백만 단위 중에 들어 있는 수이다. IAA 1 ppm은 용액 1ℓ 중에 1mg의 IAA가 용해된 것이다. 그러므로 ppm과 mg/ℓ는 표현을 달리 할 뿐, 실제로는 같은 농도가 된다.