



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0086811
(43) 공개일자 2021년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0659 (2013.01)
C12N 2506/1323 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0178474

(22) 출원일자 2019년12월30일
심사청구일자 없음

(71) 출원인

(주)진바이오텍

충청남도 공주시 계룡면 경천리 311-3

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

이찬호

서울특별시 서초구 신반포로 270, 104-302(반포동, 반포자이APT)

강정선

경기도 용인시 수지구 신봉2로 26, 123-1703(신봉동, 신봉마을엘지자이APT)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

조현중

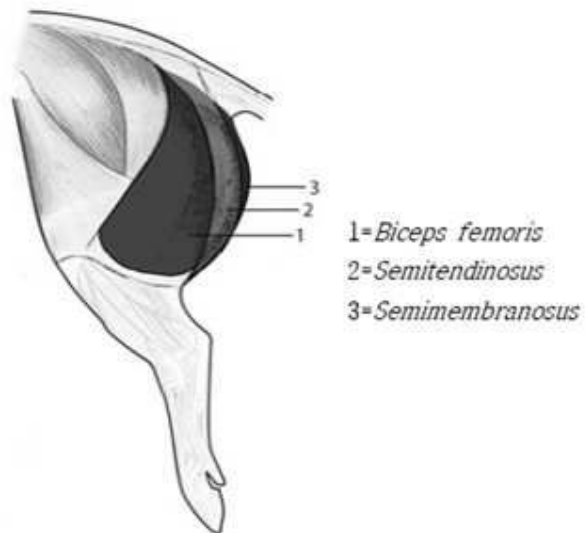
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **효과적인 세포 배양 방법**

(57) 요약

본 발명은 대량생산에 적합한 세포 배양 방법에 관한 것이다. 본 발명은 자동으로 분쇄기를 이용해 조직을 세절할 수 있어 효율적으로 세포를 배양할 수 있는 것이 특징이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2527/00 (2013.01)

박성권
서울특별시 천호대로 1152 105동302호

(72) 발명자
조원탁
서울특별시 마포구 새창로8길 72, 202동 101호(도
화동, 현대홈타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	118042-03
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품개발사업
연구과제명	고부가 식품소재 개발을 위한 배양돈육 생산 기반기술 확립
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)진바이오텍
연구기간	2018.04.30 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(1) 돼지로부터 근육 샘플을 수집하는 단계, (2) 수집된 근육 샘플을 세절하는 단계, (3) 세절된 근육 샘플을 배양하는 단계 및 (4) 근육위성세포를 분리하는 단계를 포함하는 돼지의 근육위성세포 배양 방법으로서, (2) 단계에서 분쇄기를 이용하여 한 번의 크기가 0.5 - 0.7 cm 의 크기가 되도록 자동으로 세절하는 것을 특징으로 하는 돼지의 근육위성세포 배양 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, (2) 단계에서 4 °C의 항생제를 분쇄기에 추가로 공급하며 세절하는 것을 특징으로 하는 돼지의 근육위성세포 배양 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, (2) 단계에서 총 2회 분쇄 과정을 반복하여 세절하는 것을 특징으로 하는 돼지의 근육위성세포 배양 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, (2) 단계 진행하기 전에 (1) 단계에서 수집한 근육에서 미리 결체조직, 피막, 혈관 및 지방을 제거하고 4 °C의 항생제에 넣는 과정을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 돼지의 근육위성세포 배양 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 효과적인 세포 배양 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 돼지의 근육위성세포 및 지방전구세포를 효과적으로 배양할 수 있다.

배경 기술

[0002] [돼지의 근육위성세포]

[0003] 근육위성세포(muscle satellite cell)는 근섬유 바깥쪽 표면에 자리 잡고 있는 세포로서, 근육가장자리인 근섬유막(sarcolemma)과 기저막(basal lamina) 사이에 존재하며, 격렬한 운동과 같은 물리적 자극으로 근섬유가 충격이나 손상 또는 파괴되었을 때, 활성화 및 분화되어 근육을 신장시켜주는 성체줄기세포이다.

[0004] 근육위성세포는 1961년 알렉스 마우로(Alex Mauro)에 의해 발견되었다. 이후 2008년 폼페우 파브라 대학의 연구자들이 근육위성세포로부터 근육이 만들어지는 과정 등을 발표하면서, 근육위성세포는 각종 연구의 대상으로 활발히 사용되고 있다.

[0005] [종래 세포 배양 방법]

[0006] 세포 배양은 바이오 분야 연구에서 가장 기본이 되는 연구 방법으로서 생명체의 기능 연구 등에서 광범위하게 이용되고 있다.

[0007] 세포 배양은 개체로부터 샘플을 수집하는 단계, 수집된 샘플을 적합한 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계 및 수득된 세포를 분리시키는 단계를 포함하여 진행된다.

[0008] 예컨대 아래와 같은 방법이 근육위성세포 배양 방법으로 공지되어 있다.

[0009] 근육으로부터 근육 조직을 도슨(Dodson) 방법을 이용하여 분리한다. 분리한 근육은 PBS 버퍼로 세척하고, 외부의 결합조직과 혈관들은 클린 벤치에서 제거한다. 근육은 1-2 cm³ 세절의 크기로 절단한다. 절단한 근육은 37 °C 워터 배스에서 프로나제 용액 (0.8 mg/ml pronase, type XIV, in PBS)을 처리하여 교반하면서 1시간 동안 배

양한다.

- [0010] 배양 후 조직 혼합물은 1,500 g에서 6분동안 원심분리하고 상층액은 흡출한다. 세포 침전물을 PBS로 한 차례 세척하고, 상기 조건에서 원심분리한 후, 최종 침전물을 PBS에 다시 부유시킨다.
- [0011] 근육위성세포는 400 g에서 10분 동안 3회 세척함으로써 근육세절들로부터 분리한다. 근육위성세포를 함유한 상층액을 모두 합하여 1,800 g에서 10분 동안 원심분리한다. 세포 침전물은 DMEM(Dulbecco's modification of Eagle's MEM) + 10% HS(horse serum) 배양액에 부유시키고, 500um Nitex cloth(Tetko Inc., Elmsford, NY)에 여과한다.
- [0012] 세포 부유물은 직경 15cm 세포배양 용기에 예비 플레팅하고, 37 °C 습윤한 CO₂ 인큐베이터(Forma scientific, USA) (5% CO₂ + 95% air)에서 2시간동안 배양한다.
- [0013] 예비 플레팅의 효과는 부유물에 들어있는 오염을 제거할 수 있다. 예비배양 후 부유물은 1,500 g에서 10분 동안 원심 분리하고, 세포 침전물은 다시 DMEM + 10%HS에 부유시킨다. 세포 부유물을 53um Nitex cloth에 통과 여과시키고, 근육위성세포 부유물을 세포배양용기에 플레팅하고 DMEM + 10%HS에서 배양한다.
- [0014] 그러나 위 종래방법은 산업적 용량의 대량으로 세포를 배양함에 있어서는 생산적이지 못하다. 이유는 분리한 근육을 배양하기 위해 일정한 크기로 절단할 때 작업자가 개별적으로 직접 수작업에 따라 절단해야 하기 때문이다.
- [0015] 예컨대 대한민국 공개특허공보 제 10-2019-0141137호의 실시예를 보더라도 말 골격근을 수집한 후, 근육 조직의 손상을 막기 위해 표본을 매우 조심스럽게 취급하며, PBS 중에서 주의하여, 한 번의 길이가 약 1 mm 가 되도록 아주 작은 세절로 절개하는 과정이 나타나 있다.
- [0016] 교과서에 실려 있는 초대배양 방법에서도 조직편은 1~2 mm² 정도로 수작업으로 작게 세절한 다음 배양을 실시한다. 이는 조직을 너무 크게 세절하면 세포의 성장속도가 매우 느릴 수 있고, 그렇다고 수작업이 아닌 믹서기 등으로 무작위로 세절하면 섬세한 플라스마 막이 파괴되어 세포가 손상될 수 있기 때문이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0017] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제 10-2019-0141137호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 돼지의 근육위성세포는 연구를 위해 산업적으로 대량 생산이 요구되고 있다. 그러나 종래 방법은 작업자가 개별적으로 섬세하게 샘플을 세절하는 과정이 필수적으로 수반되어, 자동화에 따른 대량 생산에 한계가 있다.
- [0019] 본 발명자는 세포 배양에 있어서 수작업에 따른 한계를 개선하고자 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

- [0020] 본 발명은 아래의 수단으로써 전술한 과제를 해결했다.
- [0021] 1. (1) 돼지로부터 근육 샘플을 수집하는 단계, (2) 수집된 근육 샘플을 세절하는 단계, (3) 세절된 근육 샘플을 배양하는 단계 및 (4) 근육위성세포를 분리하는 단계를 포함하는 돼지의 근육위성세포 배양 방법으로서, (2) 단계에서 분쇄기를 이용하여 한 번의 크기가 0.5 - 0.7 cm 의 크기가 되도록 자동으로 세절하는 것을 특징으로 하는 돼지의 근육위성세포 배양 방법.
- [0022] 2. 상기 1 에 있어서, (2) 단계에서 4 °C의 항생제를 분쇄기에 추가로 공급하며 세절하는 것을 특징으로 하는 돼지의 근육위성세포 배양 방법.
- [0023] 3. 상기 1 또는 2 에 있어서, (2) 단계에서 총 2회 분쇄 과정을 반복하여 세절하는 것을 특징으로 하는 돼지의

근육위성세포 배양 방법.

- [0024] 4. 상기 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, (2) 단계 진행하기 전에 (1) 단계에서 수집한 근육에서 미리 결체조직, 피막, 혈관 및 지방을 제거하고 4 ℃의 항생제에 넣는 과정을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 돼지의 근육위성세포 배양 방법.

발명의 효과

- [0025] 본 발명은 종래 작업자가 수동으로 샘플을 세절하는 경우에 비해, 세포배양을 위한 총 세포 추출 시간을 대략 1 시간에서 15분으로 감소시킬 수 있다.
- [0026] 본 발명은 종래 작업자가 가위 등으로 수동으로 샘플을 세절하는 경우에 비해, 작업효율이 우수하여 대량생산 등의 산업화가 가능하다.
- [0027] 참고로 종래 가위로 세절할 때는 손에 무리가 가는 등 작업자에게 육체적인 고충도 상당했으나, 본 발명에 따르면 위와 같은 한계도 극복된다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1 은 자돈 안락사(좌) 및 뒷다리 근육 모식도(우)를 나타낸 도이다.
- 도 2 는 분쇄 횟수에 따른 morphology 를 나타낸 도이다.
- 도 3 은 수작업으로 세절(비교예 1)된 세포 분주 후 24시간 후의 세포 morphology 를 나타낸 도이다.
- 도 4 는 분쇄기로 세절(실시에 1)된 세포 분주 후 24시간 후의 세포 morphology 를 나타낸 도이다.
- 도 5 는 수작업(비교예 1)과 분쇄기를 이용한 경우(실시에 1)의 세포수를 비교한 도이다.
- 도 6 은 본 발명에 따른 일 구현예의 분쇄기의 칼날 간격을 나타낸 도이다. 도면의 자의 단위는 cm 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 근육위성세포 추출을 위해 2주령 자돈을 준비하여 안락사 시킨 후 뒷다리에서 *Biceps femoris* 근육을 분리 및 적출하였다(도 1).
- [0030] 오염을 방지하기 위해 채취한 근육조직을 4℃의 항생제(2X anti-biotics-antimycotic, 이하 AA, Gibco, Waltham, MA, USA)가 첨가된 Dulbecco's phosphate-buffered saline(이하 DPBS, WELGENE Inc., Gyeongsan, Korea) 용액에 넣어 클린벤치로 운반하였으며, 이후 실험은 멸균된 조건으로 진행하였다.
- [0031] 근육조직에서 결체조직, 피막, 혈관, 지방 등을 제거하고, 이를 분쇄기에 넣고 총 2회 분쇄하였다.
- [0032] 분쇄기는 세절된 조직의 크기의 한 변이 0.5 - 0.7 cm 의 크기가 되도록 칼날의 간격을 설정한다.
- [0033] 분쇄기는 칼날과 자동으로 회전하는 스크루를 포함한다. 본 발명에 따른 일 구현예에서는 자동으로 회전하는 스크루에 따라 조직이 3개 내지 6개의 칼날을 통과하여, 세절된 조직의 크기의 한 변이 0.5 - 0.7 cm 의 크기가 되도록 세절될 수 있다. 이때 3개 내지 6개의 각 칼날의 간격은 점차 좁아지는 식으로 배열할 수 있고, 가장 마지막 칼날의 간격을 0.5 - 0.7 cm 가 되도록 배열할 수 있다(도 6). 이와 같이 칼날의 간격을 순차적으로 좁게 배열함으로써 점진적으로 조직의 크기를 작게 세절할 경우 세포 손상이 최소화되어 배양된 세포의 수가 더 효과적일 수 있음을 확인했다.
- [0034] 또한 1회 분쇄하는 경우에 비해 2회 분쇄하는 것이 조직의 크기 등에 있어서 균일성이 보다 담보될 수 있다. 그러나 3회 분쇄했을 때 2회 분쇄한 경우보다도 더 균일성이 담보될 수 있어 세포 배양에 있어서 효과가 우수할 것으로 기대되었으나, 2회 분쇄한 경우보다 배양 후 세포수에 있어서 오히려 저조했다. 세포 배양 효과 및 효율성 측면에서 3회보다는 횟수가 적은 2회가 보다 바람직할 수 있다.
- [0035] 종래는 세포 배양을 위해 작업자가 직접 세절하는 것이 일반적이었다. 이유는 조직을 세절하는 과정에서 세포에 손상이 가해질 염려가 있었기 때문이다. 하지만 직접 세절하는 경우는 그 시간도 오래 소요될 수 있고, 특히 가위로 세절할 때 손에 가해지는 피로도가 상당하여, 작업 효율이 좋지 못했다. 아울러 작업자가 수동으로 세절하는 경우는 조직의 크기에 있어서도 편차가 발생하여 세포 배양 수가 일정하지 못하는 등의 한계가 존재했다.

- [0036] 그러나 본 발명자는 놀랍게도 분쇄기에서 한 번의 크기가 0.5 - 0.7 cm 의 크기로 샘플이 자동으로 세절될 수 있도록 설정할 경우 충분한 세포 배양이 가능함을 확인했다. 다만 그렇다고 분쇄기로 분쇄하는 경우 모두 세포 배양이 효과적인 것은 역시 아니었고, 위 크기보다 작게 세절하거나 크게 세절하는 경우는 정확한 원리를 모르겠으나 세포 배양 수에 있어서 차이가 발생했으며 효과적이지 않았다.
- [0037] 분쇄기를 통해 자동으로 샘플을 세절하면, 작업자가 세절하는 경우에 비해 시간도 세포 추출에 약 1시간 가량 소요되던 것을 15분 정도로 감축할 수 있으며, 매번 세포 배양시마다 또는 담당자별로 편차도 적어 효과적이다. 특히 산업적 규모로의 대량생산 가능성을 담보한다는 점에서 작업자가 세절하는 점에 비해 본 발명은 현저한 효과 차이가 있다.
- [0038] 분쇄기에서 세절할 때는 필요에 따라 분쇄기에 항생제를 추가로 공급하면 바람직하다. 4 °C의 항생제를 분쇄기에 공급하며 분쇄하는 경우 세포 배양 효과가 보다 우수할 수 있었다.
- [0039] 이후 분쇄한 조직을 10 g 씩 50 mL 튜브에 담아 20 mL 의 pronase(0.8 mg pronase/mL DPBS; Dulbecco's phosphate buffered saline+AA; antimycotic-antibiotic) 용액을 첨가하고, 37°C 항온수조에서 40분간 배양하였다.
- [0040] Pronase 처리가 끝난 조직을 1200 *xg* 에서 15분간 원심분리 하여 상층액을 버리고, 펠렛을 다시 20 mL의 DPBS를 넣어 혼합한 후, 다시 1200 *xg* 에서 15분간 원심분리 하였다.
- [0041] 그 후 가라앉아있는 펠렛을 AA가 포함된 minimum essential medium(MEM, Gibco, Waltham, MA, USA) 용액에 희석하여 300 *xg* 에서 5분간 원심분리 후, 상층액을 모으는 과정을 2회 반복하였고, 상층액을 다시 1200 *xg* 에서 15분간 원심분리하여, 가라앉은 펠렛을 9 mL의 MEM+AA+10% FBS 용액과 혼합하여 100- μ m cell strainer로 필터링해 여과액을 1 mL씩 cryovial에 분주해, 이에 10%가 되도록 DMSO를 첨가하여 freezing container에 담아 -70 °C에 냉동 보관하였다.
- [0042] 냉동된 vial을 37°C 항온수조에서 해동한 후 가온한 MEM에 10% FBS를 가한 배양배지와 섞은 후 300 *xg* 에서 5분간 원심분리하여 가라앉은 펠렛을 배양배지와 섞어 culture flask에 분주하였다.
- [0043] 분주된 세포는 37°C CO₂ incubator에 배양하였으며, 분주 24시간 후 배지를 교체하였고, 그 후 배지는 48시간마다 교체하였다.
- [0044] 세포가 일정수준 이상 자란 뒤(80% 이상 Confluent), 세포를 미리 37°C 항온수조에서 데운 PBS로 washing 한 후, Trypsin-EDTA를 처리하여 5분간 37°C CO₂ incubator에서 배양 후, 배지를 첨가해 trypsin의 활성을 중지시켰다.
- [0045] 그 후 2500 rpm 조건에서 3분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 가라앉은 펠렛을 계대배양을 하였다.
- [0046] 세포 동결을 할 경우 원심분리가 끝난 펠렛을 배지와 섞은 후, 10%가 되게 DMSO를 첨가하여, cryovial에 분주하여, freezing container에 넣어, deep freezer에서 동결하였다.
- [0047] 동결건조할 때 동결건조제로 판매 중인 제품이 다수 있다. 그러나 각 동결배양액으로 동결된 세포에서 세포수 및 성장률 상 유의적인 차이는 없었다. 따라서 간단하고 저렴한 DMSO를 이용한 동결법이 본 발명에서는 효과적이다.
- [0048] 또한, 4°C에서 12시간, -20°C에서 4시간 동결 후, -70°C에서 보관하는 방법과 isopropanol로 채운 container에 세포를 넣고 바로 -70°C에서 동결시키는 방법(cell freezer)을 사용하여 동결한 결과, cell freezer container에 넣는 것이 편차를 줄이고 더 간단한 방법으로 확인되었다.
- [0049] 세포의 상태를 일정하게 하기 위해 계대배양하기 전, 세포의 개수를 counting 하여 plate에 분주 되어질 세포의 수가 일정하게 하였으며, 원심분리된 세포에 배지 10 mL을 혼합하여 잘 풀어준 후, 세포가 포함된 배지 10 μ L와 trypan blue 용액 10 μ L를 섞은 후 hemacytometer에서 세포를 계수하였다.
- [0050] 세포 수를 셀 때 trypan blue에 의해서 활성이 없는 세포는 푸르게 염색되므로 개수에 포함하지 않았고, 분주될 세포의 양은 6 well 2 $\times$ 10⁴ /well 의 세포를 분주하였다.
- [0051] Cell doubling time 또는 population doubling time(PDT)은 세포의 성장속도가 두 배가 되는데 필요한 평균 시간으로 24시간 동안 세포가 증식되는 숫자를 일주일간 count하여 성장곡선을 그리고 다음과 같은 공식으로 PDT

를 구하였다.

$$PDT = \frac{\text{duration} \times \log(2)}{\log(\text{final concentration}) - \log(\text{initial conc.})}$$

- [0052]
- [0053] 약 90% 이상 confluent 한 자란 근육위성세포에 분화배지(DMEM + 2% horse serum)를 이용하여 분화를 유도하였다.
- [0054] 배양된 근육세포의 morphology 관찰을 위해서 세포의 핵에 giemsa 염색을 하였다.
- [0055] 근육세포를 PBS로 washing한 후 100% MeOH를 처리하여 세포를 고정시켜 완전히 건조하고, 고정된 셀의 단분자층에 giemsa stain solution을 30분간 처리하였고, 이후 증류수로 세포 핵 외의 염색이 탈색되도록 세척한 후 현미경으로 관찰하였다.
- [0056] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0057] 아래에서는 조직 절제술을 포함하여 나머지 실험방법 및 조건은 전술한 과정과 모두 동일하게 적용했으며, 샘플을 세절하는 방법만 다르게 설정하여 세포 배양 수를 비교하였다. 분쇄기에서 세절할 때는 분쇄기에 4 ℃의 항생제를 공급하며 세절하였다.
- [0058] 수동으로 세절하는 경우는 가위로 세절한 후 자를 이용하여 샘플의 한 변의 길이를 측정하였다.
- [0059] 분쇄기를 이용해 자동으로 세절하는 경우는 분쇄기의 칼날의 간격을 조정하여 분쇄기의 분쇄 조건을 설정한 후 샘플 테스트를 통해 세절된 샘플의 대표 크기를 측정하였다.
- [0060] [비교예 1]
- [0061] 세절된 조직의 한 변이 약 1mm 가 되도록 가위를 이용하여 수동으로 세절하였다.
- [0062] [비교예 2]
- [0063] 세절된 조직의 한 변이 0.1 - 0.3 cm 의 크기로 세절될 수 있도록 칼날의 간격을 조정한 분쇄기를 준비하여 2회 반복 세절하였다.
- [0064] [비교예 3]
- [0065] 세절된 조직의 한 변이 1 - 1.5 cm 의 크기로 세절될 수 있도록 칼날의 간격을 조정한 분쇄기를 준비하여 2회 반복 세절하였다.
- [0066] [실시예 1]
- [0067] 세절된 조직의 한 변이 0.5 - 0.7 cm 의 크기로 세절될 수 있도록 도 6 과 같이 칼날의 간격을 조정한 분쇄기를 준비하여 2회 반복 세절하였다.
- [0068] [실시예 2]
- [0069] 세절된 조직의 한 변이 0.5 - 0.7 cm 의 크기로 세절될 수 있도록 도 6 과 같이 칼날의 간격을 조정한 분쇄기를 준비하여 3회 반복 세절하였다.
- [0070] [실시예 3]
- [0071] 세절된 조직의 한 변이 0.5 - 0.7 cm 의 크기로 세절할 수 있도록 도 6 과 같이 칼날의 간격을 조정한 분쇄기를 준비하여 1회 반복 세절하였다.
- [0072] [실험예 1] 분쇄 횟수에 따른 세포수 비교
- [0073] 근육세포수율은 근육 슬라이스의 분쇄 횟수에 영향을 받았으며, 분쇄를 2회 했을 경우 1회 분쇄한 경우 또는 3회 분쇄한 경우와 대비하여 입자도가 육안으로는 크게 차이가 나지 않았다(도 2).
- [0074] 그러나 세포수율은 1회 또는 3회 분쇄한 경우에 비해 2회 분쇄한 샘플에서 가장 높게 나타났다.

[0075] 그 결과는 아래와 같다.

표 1

[0076]

세포액	실시예 3	실시예 1	실시예 2
100 uL	5.00E+02	6.00E+03	5.00E+03
200 uL	7.00E+03	1.20E+04	1.00E+04
300 uL	9.00E+03	5.00E+04	4.00E+04
400 uL	2.40E+04	9.00E+04	7.50E+04
500 uL	8.33E+05	2.10E+06	1.00E+06
1000 uL	1.20E+06	5.20E+06	3.43E+06

[0077] [실험예 2] 수작업(mincing)과 분쇄기(grinding) 세포수 비교

[0078] 도 3 의 세포 morphology 와 같이, 비교예 1 의 24시간 후 손으로 세절한 조직에서의 세포수율은 1×10^4 (100uL 분주), 4×10^4 (200uL 분주), 7×10^4 (300uL 분주), 1.4×10^5 (400uL 분주), 2.5×10^6 (500uL 분주), 5.9×10^6 (1000uL 분주)로 나타났다.

[0079] 실시예 1 의 분쇄기로 세절한 조직에서의 세포수율(도 4)은 6×10^3 (100uL 분주), 1.2×10^4 (200uL 분주), 5×10^4 (300uL 분주), 9×10^4 (400uL 분주), 2.1×10^6 (500uL 분주), 5.2×10^6 (1000uL 분주)로 나타났다.

표 2

[0080]

세포액	비교예 1	실시예 1
100 uL	1.00E+04	6.00E+03
200 uL	4.00E+04	1.20E+04
300 uL	7.00E+04	5.00E+04
400 uL	1.40E+05	9.00E+04
500 uL	2.53E+06	2.10E+06
1000 uL	5.90E+06	5.20E+06

[0081] 위 표에서와 같이 손 또는 분쇄기로 세절한 조직으로부터 추출된 세포액을 100, 200, 300, 400, 500, 1000uL 분주하여 24시간 후 세포수를 비교한 결과 두 그룹간 통계적 차이는 없는 것으로 나타났다(도 5).

[0082] [실험예 3] 분쇄 크기에 따른 세포수 비교

[0083] 비교예 2 및 3 과 실시예 1 의 세포수를 비교했다.

표 3

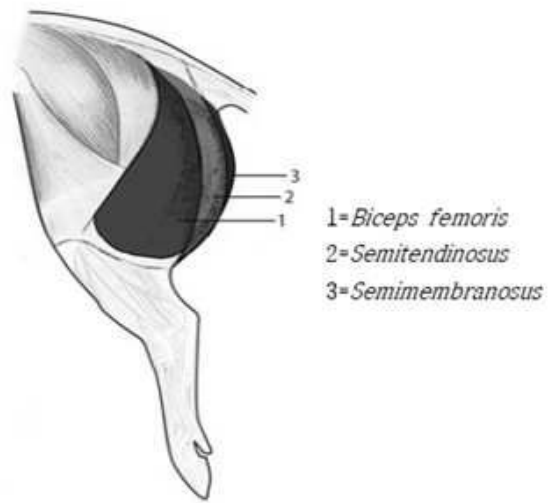
[0084]

세포액	비교예 2	비교예 3	실시예 1
100 uL	4.50E+01	7.00E+01	6.00E+03
200 uL	2.00E+02	5.80E+02	1.20E+04
300 uL	5.00E+02	0.20E+03	5.00E+04
400 uL	9.70E+02	5.00E+03	9.00E+04
500 uL	3.33E+03	9.10E+03	2.10E+06
1000 uL	8.20E+03	1.40E+04	5.20E+06

[0085] 분쇄기를 이용해 자동으로 분쇄하는 경우 모두 세포 배양이 효과적인 것은 아니었고, 실시예 1 에서만 충분한 수의 세포가 배양되고 있음을 확인했다.

도면

도면1



도면2



분리된 근육



1회 grind



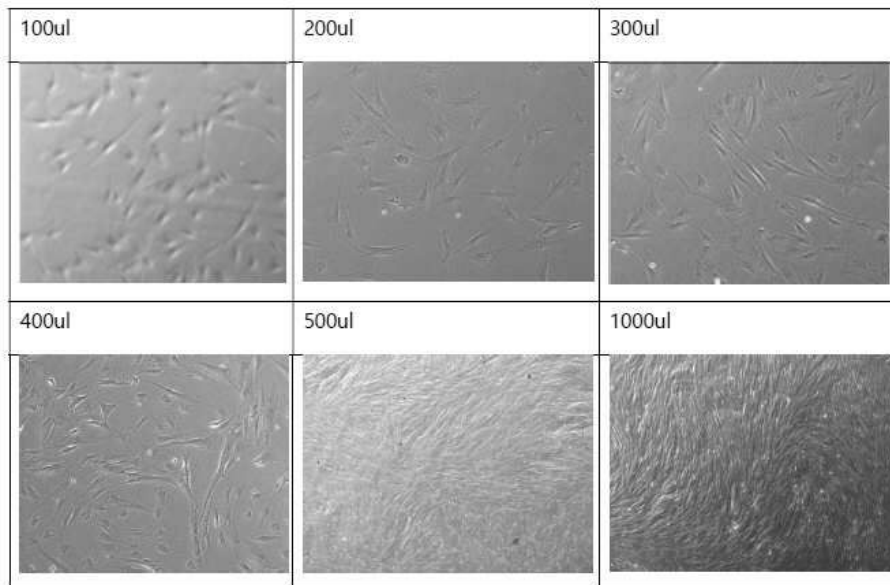
2회 grind



3회 grind

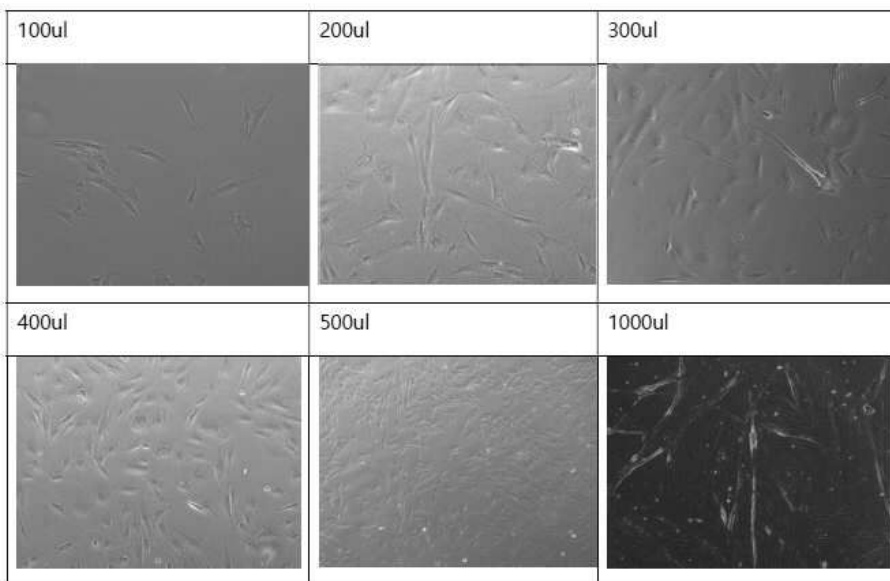
도면3

수작업으로 분쇄된 세포 분주 24 시간 후 세포형태

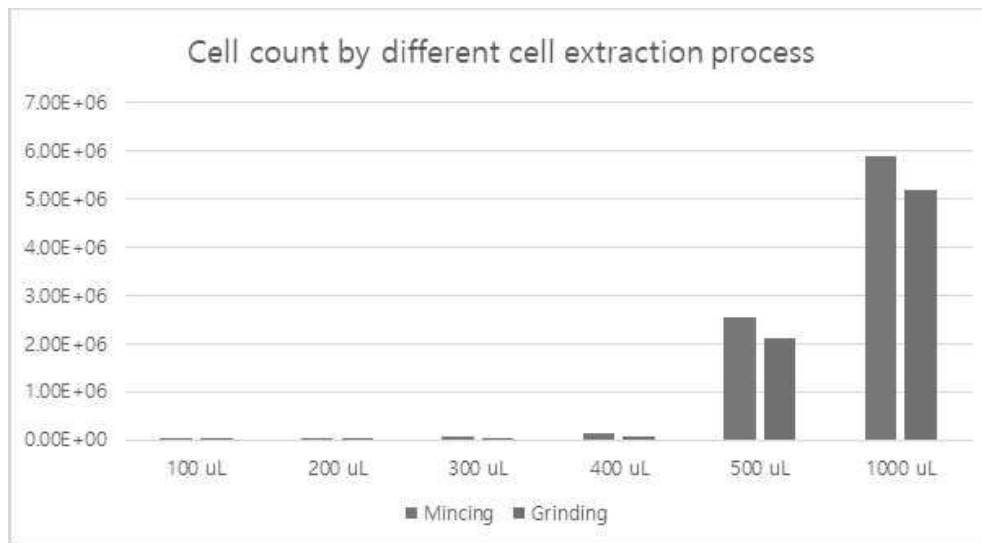


도면4

분쇄기로 분쇄된 세포 분주 24 시간 후 세포형태



도면5



도면6

