



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0094188
(43) 공개일자 2018년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 1/40 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 1/4077 (2013.01)
C07K 1/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0019783
(22) 출원일자 2017년02월14일
심사청구일자 2017년02월14일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
경운대학교 산학협력단
경상북도 구미시 산동면 강동로 724-5 내 (인덕리, 경운대학교)
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
(72) 발명자
권오유
대전광역시 서구 둔산북로 160, 9동 303호(둔산동, 한마루아파트)
최지영
전라북도 전주시 덕진구 출판로 87, 201동 1201호(장동, 호반베르디움 2차 더클래스)
(74) 대리인
특허법인 공간

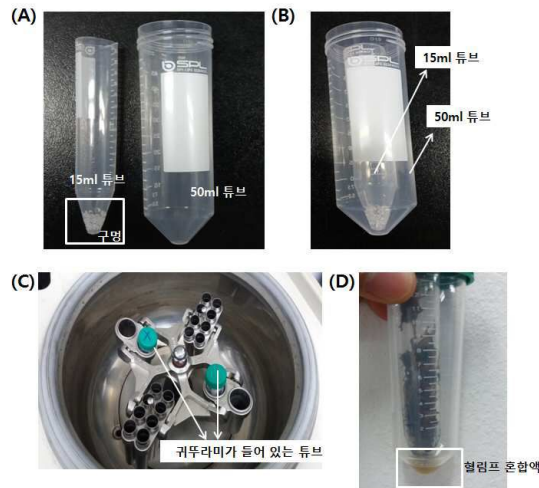
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 귀뚜라미 혈림프의 대량 분리방법

(57) 요약

본 발명은 귀뚜라미 혈림프를 대량으로 분리하는 방법에 관한 것으로, 혈림프 분리 과정 중에 산화를 방지하면서, 대량으로 혈림프를 분리함으로써 귀뚜라미의 질병 진단, 신약개발 및 새로운 식품재료개발을 위한 연구에 필요한 혈림프를 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 1/34 (2013.01)

G01N 2001/4088 (2013.01)

(72) 발명자

권기상

대전광역시 중구 산서로 81-55, 103동 202호(사정
동, 상당한솔빌라)

이정훈

대전광역시 서구 괴정로165번길 31, 501호(용문동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01086401

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 국립농업과학원

연구사업명 국책기술개발사업

연구과제명 곤충 엑소좀의 기능연구 및 진단법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

귀뚜라미를 마취시킨 후 세척하는 제1단계;

상기 세척한 귀뚜라미의 목을 제거하고 몸통을 밑 부분에 구멍이 뚫려 있는 15ml 튜브에 넣는 제2단계;

50ml 튜브에 산화방지제를 넣는 제3단계;

상기 제2단계의 15ml 튜브를 제3단계의 50ml 튜브에 넣고 원심 분리하여 혈림프와 산화방지제가 혼합된 혈림프 혼합액을 얻는 제4단계;

상기 제4단계의 혈림프 혼합액을 56℃에서 25분 내지 35분간 처리하여 산화방지제를 비활성 시킨 후 원심 분리하여 혈림프 상층액을 얻는 제5단계; 및

상기 제5단계의 혈림프 상층액을 인산완충용액으로 투석한 후 여과하여 혈림프를 수득하는 제6단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 귀뚜라미 혈림프의 대량 분리 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 귀뚜라미는 성충인 것을 특징으로 하는 혈림프의 대량 분리 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 귀뚜라미는 쌍별 귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*), 왕귀뚜라미(*Teleogryllus emma*), 알락귀뚜라미(*Loxoblemmus arietulus*), 먹귀뚜라미(*Nigrogryllus sibiricus*), 뚱보귀뚜라미(*Duolandrevus ivani*), 방울벌레(*Homoeogryllus japonicus*, *Meloimorpha japonica*), 알락방울벌레(*Dianemobius nigrofasciatus*), 풀종다리(*Paratrigonidium bifasciatum*), 먹종다리(*Trigonidium japonicum*), 솔귀뚜라미(*Xenogryllus marmoratus*), 청솔귀뚜라미(*Truljalia hibinonis*) 및 홀쭉귀뚜라미(*Euscyrtus japonicus*)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 혈림프의 대량 분리 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 마취는 이산화탄소 가스 마취인 것을 특징으로 하는 혈림프의 대량 분리 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 밑 부분에 구멍이 뚫려 있는 15ml 튜브는 구멍의 직경이 1mm 내지 1.5mm인 것을 특징으로 하는 혈림프의 대량 분리 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제3단계의 산화방지제는 곤충 1마리당 30 μ l 내지 40 μ l의 혈림프를 얻는 것을 기준으로 총 혈림프 부피의 8% 내지 15%를 넣는 것을 특징으로 하는 혈림프의 대량 분리 방법.

청구항 7

제1항 또는 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 산화방지제는 에리소르빈산 나트륨(erythorbic acid sodium salt), 부틸 히드록시아니솔(butyl hydroxyanisole, BHA), 디부틸-히드록시톨루엔(dibutyl-hydroxytoluene, BHT), 알파-토코페롤(α -tocopherol), N-페닐티오우레아(N-phenylthiourea) 및 N-프로필티오우라실(N-propylthiouracil)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 첨가하는 것을 특징으로 하는 혈림프의 대량 분리 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 항산화제는 N-프로필티오우라실(N-propylthiouracil)인 것을 특징으로 하는 혈림프의 대량 분리 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제3단계의 여과는 구멍 지름이 0.2 μ m 내지 0.5 μ m의 필터를 이용하는 것을 특징으로 하는 혈림프의 대량 분리 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 귀뚜라미 혈림프를 대량으로 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대의 식량문제는 기후변화와 곡물의 생산, 분배, 소비량의 증가로 인한 곡물 공급의 불균형과 동물 단백질의 가격 상승 및 수요 충족 불균형으로 인한 문제로 대두된다. 이에 대한 대안으로서 가축보다 적은 양의 온실가스 및 암모니아를 배출하고 넓은 사육지가 필요 없는 곤충에 대한 관심이 증가하고 있다(Huis A.V., et al. 2013; Kim M.A., et al., 2014).

[0003] 곤충은 현존하는 동물계의 70%를 차지하는 생물군으로, 알려진 종류만 80만 종 이상이다. 곤충은 빠르게 번식하며 많은 개체군을 이룬다는 것이 최대의 강점으로, 농업뿐 만 아니라 의약, 환경, 화학, 생명공학, 기계분야(생체모방) 등과 같은 다양한 분야에서 매력적인 연구 소재가 되고 있다(최영철, 2011). 특히나 식충성(食蟲性)이라 하여 곤충을 식품으로서 먹어오던 습성은 현재에 와서 인류의 식량문제와 기아문제를 해결할 중요한 자원으로 각광 받을 수 있도록 하였고, 최근 국내에서도 곤충에 대한 관심이 높아지고 있으며 식품 원료 및 의약품 등에 대한 소재와 연구 등이 다수 진행되고 있다.

[0004] 곤충 산업의 발달과 함께 곤충의 대량 사육이 요구되고 있으며 곤충의 대량 사육에 따른 질병 발생에 의한 대규모 피해가 만성적으로 발생하고 있다. 그러나 아직까지 곤충 질병의 정확한 진단 및 치료법이 개발되지 못한 상태이다.

[0005] 곤충의 순환계는 개방 혈관계로 혈관이란 것이 없고 포유류에서는 혈액(blood)과 림프(lymph)가 있는데, 곤충은 이 두 가지가 합쳐진 형태의 혈림프(hemolymph)가 있다. 곤충의 혈림프는 병원체의 침입으로 인해 합성이 유도되거나 양적으로 증가되는 항균 단백질들이 존재한다. 또한, 혈림프는 곤충 세포를 비롯한 동물 세포의 성장에 필요한 영양성분을 갖추고 있다.

[0006] 혈림프 내 존재하는 다양한 분자들을 통해 곤충의 대량 사육시 발생할 수 있는 곤충의 질병을 진단하여, 곤충의 집단 폐사를 방지할 수 있을 뿐 만 아니라, 혈림프 내의 항균 단백질이나 다양한 활성 분자들을 이용한 신약 개발 및 영양성분을 통한 새로운 식품재료개발을 위해서는 혈림프에 대한 연구의 진행이 필요하다.

[0007] 그러나, 곤충의 혈림프는 그 양이 적고, 점성이 높으며 공기와의 접촉으로 인해 빠른 산화가 일어나 혈림프 내 물질들이 변성될 확률이 높다. 따라서, 대량의 혈림프를 안정적으로 분리하는 방법의 개발이 필요한 실정이다.

[0008] 귀뚜라미(cricket)는 메뚜기목(Orthoptera), 귀뚜라미과(Gryllidae) 곤충을 총칭하는 것으로(Ahn M.Y., et al., 2000), 세계적으로 약 800종이 알려져 있으며, 한국에는 40종 정도가 알려져 있다. 귀뚜라미는 날개를 마찰하여 내는 울음소리로 정서곤충으로 알려져 있으나 잡식성 곤충으로 현재 관상용 어류나 애완 소동물의 사료

로 세계적으로 사용되고 있다(Fast P.G., 1967). 또한, 최근 국내에서는 곤충의 식용화를 위한 연구를 통해 쌍별 귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*)가 식용 곤충으로 인증을 받았다.

[0009] 쌍별 귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*)는 불포화지방산 및 필수지방산을 함유하고, 단백질 함량이 높아 식품으로서 이용 가치가 인정되고 있다(Kim E.M., et al., 2015). 또한, 결석 치료 및 이뇨제로 사용되기도 하였고, 일본에서는 설사, 이질 및 장티푸스를 치료하는데 사용하였으며(Park K.T., 2001), 면역력 증가의 효과적인 원료로도 연구되었다(Seo D.H., et al., 2004).

[0010] 이에 본 발명자는, 귀뚜라미 혈림프를 연구를 진행하는 과정에서, 혈림프의 산화를 방지하고, 대량의 혈림프를 분리함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.

[0011] 한편, 미국공개특허 제5866317호에는 곤충의 혈림프 분리 방법을 기재되어 있으나, 곤충이 나비목 곤충이며, 원심분리 및 투석과 같은 방법이 기재되어 있지 않아 본 발명의 구성과 차이가 있다. 또한, 한국등록특허 제0999858호 및 한국등록특허 제0530506호에는 유충 또는 누에의 체액 채취가 기재되어 있으나, 본 발명의 산화방지제 처리, 원심분리 및 투석과 같은 분리 과정이 기재되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 미국공개특허 제5866317호, Method for collecting hemolymph of insects, 1999. 02. 02. 공개.
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제0999858호, 갈색거저리 유충의 체액으로부터 펩티도글리칸 인식 단백질을 분리하는 방법, 2010. 13. 03. 등록.
- (특허문헌 0003) 한국등록특허 제0530506호, 에이파토시스를 억제하는 누에 체액의 분획 및 그 분리정제 방법, 2005. 11. 16. 등록.

비특허문헌

- [0013] (비특허문헌 0001) 최영철 et al., 곤충의 새로운 가치, RDA Interrobang, 4, 2011.
- (비특허문헌 0002) Ahn M.Y., et al., Effect of Cricket Supplements on the Chicken Meats and Its Eggs, Korean J. Poult. Sci., 27(3), 197-202, 2000.
- (비특허문헌 0003) Fast P.G., An analysis of the lipids of *Gryllus bimaculatus* (DeGeer) (Insecta, Orthoptera), Can. J. Biochem., 45, 503-505, 1967.
- (비특허문헌 0004) Huis A.V., et al., Edible insects: future prospects for food and feed security, FAO Forestry paper, 171, 1-185, 2013.
- (비특허문헌 0005) Kim E.M., et al., Physicochemical properties of edible cricket (*Gryllus bimaculatus*) in different districts, Korea J. Food Preserv., 22, 831-837, 2015.
- (비특허문헌 0006) Kim M.A., et al., Edible & medicinal insects, RDA Interrobang, 119, 5-6, 2014.
- (비특허문헌 0007) Park K.T., Insect resources, World science publishing company, Seoul, Korea, 202, 2001.
- (비특허문헌 0008) Seo D.H., et al., Immune-enhancing activity screening on extracts from two crickets, *Gryllus bimaculatus* and *Teleogryllus emma*, Entomol. Res., 34, 207-211, 2004).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 귀뚜라미 혈림프를 대량으로 분리하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 귀뚜라미를 마취시킨 후 세척하는 제1단계; 상기 세척한 귀뚜라미의 목을 제거하고 몸통을 밑 부분에 구멍이 뚫려 있는 15ml 튜브에 넣는 제2단계; 50ml 튜브에 산화방지제를 넣는 제3단계; 상기 제2단계의 15ml 튜브를 제3단계의 50ml 튜브에 넣고 원심 분리하여 혈림프와 산화방지제가 혼합된 혈림프 혼합액을 얻는 제4단계; 상기 제4단계의 혈림프 혼합액을 56℃에서 25분 내지 35분간 처리하여 산화방지제를 비활성 시킨 후 원심 분리하여 혈림프 상층액을 얻는 제5단계; 및 상기 제5단계의 혈림프 상층액을 인산완충용액으로 투석한 후 여과하여 혈림프를 수득하는 제6단계; 를 포함하는 귀뚜라미 혈림프의 대량 분리 방법에 관한 것이다.

[0016] 상기 귀뚜라미는 성충일 수 있다.

[0017] 상기 귀뚜라미는 귀뚜라미과 해당되는 쌍별 귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*), 왕귀뚜라미(*Teleogryllus emma*), 알락귀뚜라미(*Loxoblemmus arietulus*), 먹귀뚜라미(*Nigrogryllus sibiricus*), 뚱보귀뚜라미(*Duolandrevus ivani*), 방울벌레(*Homoeogryllus japonicus*, *Meloimorpha japonica*), 알락방울벌레(*Dianemobius nigrofasciatus*), 풀종다리(*Paratrigonidium bifasciatum*), 먹종다리(*Trigonidium japonicum*), 솔귀뚜라미(*Xenogryllus marmoratus*), 청솔귀뚜라미(*Truljalia hibinonis*) 및 홀쭉귀뚜라미(*Euscyrtus japonicus*)로 이루어진 군에서 선택할 수 있다.

[0018] 상기 마취는 이산화탄소 가스를 이용한 마취일 수 있다.

[0019] 상기 밑 부분에 구멍이 뚫려 있는 15ml 튜브에서 구멍의 직경은 1mm 내지 1.5mm일 수 있다.

[0020] 상기 산화방지제는 귀뚜라미 1마리당 30 μ l 내지 40 μ l의 혈림프를 얻는 것을 기준으로 총 혈림프 부피의 8% 내지 15%를 넣을 수 있다.

[0021] 상기 산화방지제는 에리소르빈산 나트륨(erythorbic acid sodium salt), 부틸 히드록시아니솔(butyl hydroxyanisole, BHA), 디부틸-히드록시톨루엔(dibutyl-hydroxytoluene, BHT), 알파-토코페롤(α -tocopherol), N-페닐티오우레아(N-phenylthiourea) 및 N-프로필티오우라실(N-propylthiouracil)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 첨가할 수 있다. 바람직하게는 N-프로필티오우라실이다.

[0022] 상기 제3단계의 여과는 구멍 지름이 0.2 μ m 내지 0.5 μ m의 필터를 이용할 수 있다.

[0023] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0024] 상기 혈림프(hemolymph)는 곤충의 개방 혈관계를 순환하고 있는 곤충의 체액으로 포유류에서의 혈액(blood)과 림프(lymph)가 합쳐진 형태로, 병원체의 침입으로 인해 합성이 유도되거나 양적으로 증가되는 항균 단백질 및 동물세포의 성장에 필요한 영양성분들이 포함되어 있다. 따라서, 혈림프 연구는 곤충의 질병 진단을 위해 필요한 과정이며, 또한, 신약개발에 필요한 다양한 유효성분들 및 식품 개발에 있어서 필요한 영양성분들이 포함되어 있어 미래의 신약 및 식품원료 개발을 위해 필요한 과정이다.

[0025] 상기 귀뚜라미의 혈림프는 점성이 아주 높고 공기와 접촉하면 쉽게 산화되어 굳어지므로, 일반적으로는 1마리씩 순차적으로 혈림프를 채취하는 방법을 사용하고 있으나, 본 발명의 원심 분리 방법을 이용하면 한 번에 수십 마리의 귀뚜라미로부터 혈림프를 분리할 수 있다.

[0026] 상기 귀뚜라미는 귀뚜라미과에 포함되는 모든 곤충일 수 있으며, 바람직하게는 쌍별 귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*), 왕귀뚜라미(*Teleogryllus emma*), 알락귀뚜라미(*Loxoblemmus arietulus*), 먹귀뚜라미(*Nigrogryllus sibiricus*), 뚱보귀뚜라미(*Duolandrevus ivani*), 방울벌레(*Homoeogryllus japonicus*, *Meloimorpha japonica*), 알락방울벌레(*Dianemobius nigrofasciatus*), 풀종다리(*Paratrigonidium bifasciatum*), 먹종다리(*Trigonidium japonicum*), 솔귀뚜라미(*Xenogryllus marmoratus*), 청솔귀뚜라미(*Truljalia hibinonis*) 및 홀쭉귀뚜라미(*Euscyrtus japonicus*)의 성충이다.

[0027] 상기 마취는 이산화탄소 가스를 이용할 수 있으며, 귀뚜라미에 이산화탄소 가스를 흡입시키면 순간 마취를 시킬 수 있으며, 대량의 귀뚜라미를 저가로 귀뚜라미에 손상 없이 마취가 가능하다. 또한, 이산화탄소 가스 마취 후 귀뚜라미를 얼음 위에 올려두면 마취가 풀리지 않고 유지된다. 이때, 이산화탄소 가스 마취 없이 처음부터 얼음에 올려 마취시키면 귀뚜라미가 치사할 수 있어 바람직하지 못하다.

[0028] 상기 제2단계의 15ml 튜브는 원심 분리 시 귀뚜라미로부터 빠져나온 혈림프가 50ml 튜브에 모일 수 있도록 튜브

의 밑 부분에 구멍이 뚫려 있는 것을 사용하며, 15ml 튜브를 50ml 튜브에 넣고 뚜껑을 닫을 때 뚜껑이 닫힐 수 있도록 15ml 튜브의 윗부분을 자를 수 있다.

- [0029] 상기 15ml 튜브의 구멍은 직경이 1mm 내지 1.5mm일 수 있다. 구멍의 직경이 1.5mm를 초과하는 경우에는 혈림프에 귀뚜라미로부터 나오는 다른 성분들이 섞일 수 있어 순수한 혈림프를 얻기 힘들다.
- [0030] 상기 제2단계의 귀뚜라미는 15ml 튜브에 10마리 내지 20마리를 넣을 수 있다. 15ml 튜브에 20마리를 초과하여 넣으면 성충이 터져 장내에 존재하는 미생물들로 인해 혈림프가 오염될 가능성이 있어 바람직하지 못하다.
- [0031] 상기 제3단계에서 산화방지제는 공기와 접촉하면 쉽게 산화되는 귀뚜라미의 혈림프의 산화를 방지하기 위한 것으로, 에리소르빈산 나트륨(erythorbic acid sodium salt), 부틸 히드록시아니솔(butyl hydroxyanisole, BHA), 디부틸-히드록시톨루엔(dibutyl-hydroxytoluene, BHT), 알파-토코페롤(α -tocopherol), N-페닐티오우레아(N-phenylthiourea) 및 N-프로필티오우라실(N-propylthiouracil)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 첨가할 수 있으며, 바람직하게는 N-프로필티오우라실을 첨가할 수 있다.
- [0032] 상기 제4단계의 혈림프 혼합액은 원심 분리를 통해 15ml 튜브에 있는 귀뚜라미로부터 빠져나온 혈림프가 50ml 튜브에 담겨있는 산화방지제와 혼합된 것 일 수 있다.
- [0033] 상기 산화방지제는 귀뚜라미 1마리당 30 μ l 내지 40 μ l의 혈림프를 얻는 것을 기준으로 총 혈림프 부피의 8% 내지 15%를 넣을 수 있으며, 바람직하게는 10%이다.
- [0034] 상기 제4단계의 원심 분리는 한 번에 많은 수의 귀뚜라미로부터 혈림프를 채취할 수 있다.
- [0035] 상기 제5단계의 혈림프 혼합액을 56℃에서 25분 내지 35분간 처리하는 것은 산화방지제를 비활성화 시키기 위한 것이다.
- [0036] 상기 제6단계의 투석은 혈림프 상층액을 인산완충용액에 넣고 4℃에서 10시간 내지 15시간 동안 수행할 수 있다.
- [0037] 상기 투석은 혈림프에 포함되어 있는 저분자의 금속이온, 무기질 등을 제거하며, 인산완충용액과 동일한 삼투압을 가지게 되어 *in vivo* 실험에 직접 사용이 가능하도록 하기 위한 것일 수 있다.
- [0038] 상기 제6단계의 여과는 구멍 지름이 0.2 μ m 내지 0.5 μ m의 필터를 이용할 수 있다.
- [0039] 귀뚜라미의 혈림프를 분리하는 과정에서, 원심 분리 방법을 사용하지 않을 경우에는 귀뚜라미 한 마리당 10 μ l 정도의 혈림프를 얻을 수 있는 반면에, 본 발명의 대량분리 방법을 이용할 경우에는 귀뚜라미 한 마리당 30 μ l 내지 40 μ l 정도의 혈림프를 얻을 수 있다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명은 귀뚜라미 혈림프를 대량으로 분리하는 방법에 관한 것으로, 귀뚜라미를 마취시킨 후 세척하는 제1단계; 상기 세척한 귀뚜라미의 목을 제거하고 몸통을 밑 부분에 구멍이 뚫려 있는 15ml 튜브에 넣는 제2단계; 50ml 튜브에 산화방지제를 넣는 제3단계; 상기 제2단계의 15ml 튜브를 제3단계의 50ml 튜브에 넣고 원심 분리하여 혈림프와 산화방지제가 혼합된 혈림프 혼합액을 얻는 제4단계; 상기 제4단계의 혈림프 혼합액을 56℃에서 25분 내지 35분간 처리하여 산화방지제를 비활성 시킨 후 원심 분리하여 혈림프 상층액을 얻는 제5단계; 및 상기 제5단계의 혈림프 상층액을 인산완충용액으로 투석한 후 여과하여 혈림프를 수득하는 제6단계; 를 포함한다.
- [0041] 이와 같은 분리 방법을 이용하여 혈림프 분리 과정 중에 산화를 방지하면서, 대량으로 혈림프를 분리함으로써 귀뚜라미의 질병 진단, 신약개발 및 새로운 식품재료개발을 위한 연구에 필요한 혈림프를 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 본 발명의 귀뚜라미 혈림프 분리에 사용된 재료 및 기기(1A, 1B, 1C)와 이를 이용한 귀뚜라미 혈림프 수집 결과(1D)를 보여주고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게

본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

<실시예 1. 귀뚜라미 혈림프 대량 분리>

도 1의 장비들을 이용하여 귀뚜라미의 혈림프를 대량 분리하였다.

성충이 된 쌍별 귀뚜라미를 이산화탄소 가스로 마취시킨 다음에 차가운 증류수로 2~3회 깨끗하게 세척하였다. 세척 후 귀뚜라미의 목을 제거한 몸통을 밑 부분에 10여개 정도의 구멍이 뚫려 있는 15ml 튜브(도 1A)에 20마리씩 넣었다. 귀뚜라미가 들어있는 15ml 튜브를 50ml 튜브에 넣고(도 1B) 뚜껑을 닫고, 4℃에서 1,000rpm으로 3분간 원심 분리하여 혈림프를 수집하였다(도 1C, 1D). 이때 50ml 튜브의 뚜껑이 닫히지 않는 경우에는 15ml 튜브의 윗부분을 자른다. 또한, 원심 분리하기 전에 50ml 튜브에 귀뚜라미 혈림프의 10%(v/v) 정도(성충 1마리 당 40 μ l의 혈림프로 계산)의 N-프로필티오우라실(N-propylthiouracil)을 넣어두었다. 수집한 혈림프를 56℃에서 30분 처리한 다음, 4℃에서 20,000g로 30분 동안 원심 분리하여 얻은 상층액을 4℃에서 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS)로 12시간 정도 투석(dialysis) 하였다. 투석 후 혈림프를 구멍 지름이 0.45 μ m 및 0.22 μ m인 필터로 순차적으로 여과한 후 -70℃에 보관하였다.

원심 분리 한 경우와 원심 분리 하지 않은 경우에 얻어지는 혈림프 부피를 확인한 결과, 원심 분리 하지 않은 경우에는 귀뚜라미 성충 1마리 당 10 μ l의 혈림프를 얻은 반면에, 원심 분리한 경우에는 귀뚜라미 성충 1마리 당 40 μ l의 혈림프를 얻을 수 있었다.

이를 통해, 본 발명의 혈림프 분리 방법을 이용함으로써 대량의 혈림프를 분리할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

도면1

