

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0033901 (43) 공개일자 2013년04월04일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/071 (2010.01) C12Q 1/34 (2006.01)		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(21) 출원번호 10-2011-0097861		(72) 발명자 신화성 인천광역시 연수구 동춘동 현대대림2차아파트 215동 102호
(22) 출원일자 2011년09월27일		정상명 서울특별시 강남구 논현로51길 25, 304호 (도곡동, 현대그린아파트)
심사청구일자 2011년09월27일		(74) 대리인 김원식

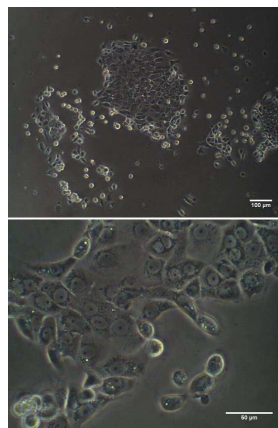
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **까치상어의 코 조직 세포 배양 방법**

(57) 요약

본 발명은 까치상어의 코 조직으로부터 얻은 세포의 배양 방법에 관한 것이다. 본 발명은 번식이 늦고 최근 수요가 증가하는 상어가 함유하는 유익한 물질을 얻기 위한 까치상어의 코 조직 세포 배양 방법을 제공한다. 기존에 확보되어 있지 않은 까치상어(*Triakis scyllium*)의 코 조직에서 세포를 확보하여 초대 배양하는 것으로 해양 동물에서의 새로운 유전자원을 선점하여 확보하고, 연구자원의 지속적인 공급이 가능하고, 상어에 함유된 유익한 물질을 얻을 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

까치상어(*Triakis scyllium*)의 점액질의 코를 절단하여 분리하는 단계;

코의 겹겹질 내에 존재하는 점액질의 조직 부분을 분리하고 잘게 저미는 단계;

저민 조직을 0.25% type II collagenase in HBSS solution에 담가서, 4℃에서 overnight동안 효소 처리하는 단계;

Overnight동안 효소 처리하여 분해된 조직이 포함된 용액에 L-15 배양 배지를 추가하여 효소를 불활성화시키고, 1300rpm로 5min동안 원심 분리하는 단계;

가라앉은 부분을 L-15 배양 배지에 혼합한 후, 세포가 포함된 배지를 cell strainer를 통과시켜 분해가 덜 된 조직을 걸러내고, 세포만 Poly-L-lysine으로 코팅한 cell culture plate에 넣는 단계;

20~28℃의 범위의 incubator에서 배양하며, 배지는 3일에 한 번씩 갈아주며, 배지를 갈 때에는 50%만 제거하고, 50%에 해당하는 새 배지를 넣는 방법을 특징으로 하는 까치상어의 코 조직 세포 배양 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 까치상어의 코 조직으로부터 얻은 세포의 배양 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 까치상어의 외부형태를 보면 몸 빛깔은 연한 흑자색을 띠며, 초콜릿색의 연한 띠가 10줄 정도 수직으로 나 있으며 머리 모양은 강아지와 유사하여 영명으로 Banded dogfish 이라고 불리고, 학명은 *Triakis scyllium* 이다. 몸 군데군데에는 검은색의 작은 반점들이 모여 있고, 체형은 전체가 날씬하며 머리는 좌우로 납작한 모양이고, 꼬리는 약간 상하로 납작한 모양이다.

[0003] 분포지역을 보면 우리나라는 남해안, 서해안 및 제주도 근해이며, 세계적으로는 일본 중부이남, 대만, 중국, 인도양, 호주 등지에 걸쳐 널리 분포하고 있다. 서식지는 연안성 어류로서 연안의 진흙바닥이나 해조류가 무성한 곳에서 단독으로 생활하며 야행성으로 문어와 게를 주로 잡아먹는다. 우리나라 연안에서 채집되는 까치상어의 어미는 전장 120 cm 전후, 체중 15 kg 전후로 새끼를 바로 산출하는 난태생의 습성을 가지고 있으며, 몸에 보통 20여 마리 내외의 새끼를 낳는다.

[0004] 상어는 먹이사슬의 꼭대기에 있는 수명이 긴 육식 동물이어서 상대적으로 그 수가 적고, 일정 수준의 숫자를 유지하기 위해 빠르게 번식시키는 것도 어렵다. 상어의 숫자가 급격히 감소한 것은 최근인데, 지난 20 ~ 30년 동안 보통 70% 이상이 감소되었고, 종류에 따라서는 90% 이상이 되기도 한다. 상어에 대한 다른 위협으로는, 환경 변화, 해안 개발, 해양 오염, 해저 또는 먹이의 어획 등이 있다.

[0005] 상어는 스쿠알렌 등 인체에 유익한 물질을 함유하여 약물이나 건강식품으로 개발하려는 경우가 많다. 따라서, 번식이 빠르지 못하고 최근 급격히 숫자가 감소하는 상어의 조직으로부터 유익한 물질을 대량으로 얻기 위한 방법이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 상어에 함유된 물질을 얻을 수 있도록 우리나라에 서식하는 까치상어의 코 조직으로부터 세포를 얻어 세포를 배양하는 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 번식이 늦고 최근 수요가 증가하여 그 숫자가 줄어드는 상어로부터 상어가 함유하는 유익한 물질을 용이하게 얻기 위한 한 방법으로서, 까치상어의 코 조직 세포 배양 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 유전자원을 확보하고 미래의 다양한 연구자원으로서 공급하기 위한 까치상어의 코 조직 세포 배양 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 기존에 확보되어 있지 않은 까치상어(*Triakis scyllium*)의 코 조직에서 세포를 확보하여 초대 배양하는 것으로 해양 동물에서의 새로운 유전자원을 선점하여 확보하고, 연구자원의 지속적인 공급이 가능하고, 상어에 함유된 유익한 물질을 용이하게 얻을 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도1은 까치상어의 세포를 얻어낸 조직의 위치를 나타낸 것이다.

도2는 까치상어의 코 조직 세포 배양 10일 째 사진을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은 기존에 확보되어 있지 않은 까치상어라는 종에서의 특정부위(코)에서 세포를 얻어내어 배양하는 방법을 제공한다. 해당 세포를 초대 배양하는 것으로 콜라겐과 다당류 등 상어 체내에서 생산될 것으로 예상되는 생화화적인 활성 물질을 일정한 품질과 양으로 얻어낼 수 있기 때문에 산업화가 용이하다. 또한, 초대 배양을 통해 얻어낸 세포를 기반으로 세포주를 개발할 수 있는 가능성이 나타나며, 이를 통해 추가적인 연구에 이용 혹은 산업적인 이용이 가능하다. 해당 세포의 배양 조건의 변화 혹은 유전자 조작에 의한 형질 변화를 통해서 원하는 물질의 특성을 변화시키거나 수율을 조절할 수 있는 가능성이 제시된다.

실시예 1

[0012] 까치상어(*Triakis scyllium*)를 구입한 후, 수돗물로 상어 피부의 부착생물을 깨끗이 씻어낸 후, 70% ethyl alcohol을 뿌려서 소독한다. 해부를 위해서 얼음에 묻어서 죽이는 동시에, 피부를 단단하게 하여 이후의 해부 과정을 용이하게 한다. 아가미 아래 부분부터 잘라내어 머리와 몸을 분리한다. 잘라낸 머리를 clean bench로 옮겨서 머리의 첨단 부분에 있는 점액질의 코를 절단하여 분리한다. 잘라낸 코는 겔겔질 썬 HBSS solution(1% antibiotic)에 담가서 냉장 보관한다. 보관 중인 코를 꺼내어 겔겔질 내에 존재하는 점액질의 조직 부분만 분리하여 petri dish에 옮기고, 메스, forceps, scissors를 이용하여 잘게 저민다. 저민 조직을 0.25% type II collagenase in HBSS solution에 담가서, 4℃에서 overnight동안 효소 처리를 한다. Overnight동안 효소 처리하여 분해된 조직이 포함된 용액에 L-15 배양 배지를 추가하여 효소를 불활성화시키고, FBS 10%, 1% antibiotic, 0~10 mg/ml NaCl 추가한 후, 1300rpm로 5min동안 원심 분리하여 조직과 세포를 가라앉힌다. 원심 분리 후, 상등액을 제거하고 가라앉은 부분을 L-15 배양 배지에 쏜다. 세포가 포함된 배지를 cell strainer를 통과시켜 분해가 덜 된 조직을 걸러내고, 세포만 Poly-L-lysine으로 코팅한 cell culture plate에 집어넣는다. 20~28℃의 범위의 incubator에서 배양하며, 배지는 3일에 한 번씩 갈아주며, 배지를 갈 때에는 50%만 제거하고, 50%에 해당하는 새 배지를 넣는다. 배지를 교체하면서 불순물을 제거하며, 순수한 세포만 남겨서 배양을 지속한다.

도면

도면1



도면2

