



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년11월24일
(11) 등록번호 10-1679406
(24) 등록일자 2016년11월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) G01N 1/40 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6806 (2013.01)
C07K 1/34 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-0123982
(22) 출원일자 2015년09월02일
심사청구일자 2015년09월02일
- (56) 선행기술조사문헌
US20130273544 A1
Dushay MS., Cell. Mol. Life Sci. Vol.66,
pp.2643-2650 (2009)
Moreira C JC, et al. Parasites & Vectors,
Vol.7:23 (2014)
Wang Z., et al., PLoS Pathogens, Vol.6(2),
e1000763 (2010. 2. 1.)

- (73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 완산구 농생명로 300 (중동)
- (72) 발명자
권오유
대전광역시 서구 둔산북로 160, 9동 303호 (둔산
동, 한마루아파트)
- 최지영
전라북도 전주시 덕진구 출판로 87, 201동 1201호
(장동, 호반베르디움 2차 더클래스)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 12 항

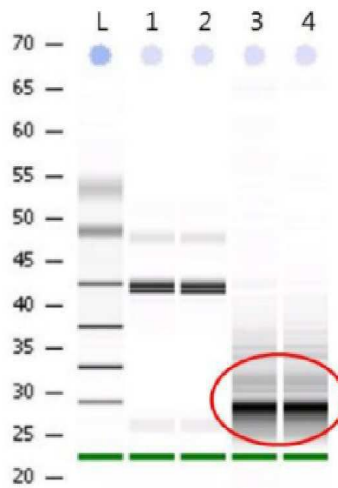
심사관 : 신원혜

(54) 발명의 명칭 곤충의 질병 진단용 혈림프 조성물, 이의 제조방법 및 이로부터의 생체분자 분리방법

(57) 요약

본 발명은 곤충의 질병 진단을 위해 혈림프 조성물을 제조하고, 이로부터 엑소좀을 분리하고, 엑소좀에 존재하는 생체분자를 분리하는 방법에 관한 것으로서, 상기 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물로부터 엑소좀을 분리하고, 분리한 엑소좀으로부터 질병과 관련된 단백질 및 핵산을 포함하는 생체분자들을 분리할 수 있다. 분리한 생체분자들을 이용해 곤충의 질병 진단에 활용함으로써 곤충의 대량 사육 시 질병으로 인한 대규모의 피해를 줄임으로써 곤충 사육 농가의 안정적인 수입원 확보에 기여할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 15/1017 (2013.01)

G01N 1/4005 (2013.01)

G01N 2333/43552 (2013.01)

(72) 발명자

권기상

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

김홍근

전라북도 전주시 완산구 우전로 260, 1412호 (효자동2가)

박관호

전라북도 완주군 이서면 갈산안길 11-1

서현우

대전광역시 유성구 어은로 57, 138동 804호 (어은동, 한빛아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ010864

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 국립농업과학원

연구사업명 국책기술개발사업

연구과제명 곤충질병진단을 위한 엑소좀의 분리법개발과 기능해석

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.01.01 ~ 2017.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

곤충으로부터 혈림프 원액을 채취하는 제1단계;

상기 혈림프 원액에 항산화제 및 트롬빈을 첨가하여 반응시킨 후, 원심분리하여 상층액을 분리하고, 분리한 상층액 내의 항산화제 및 트롬빈을 비활성화 시켜 혈림프 혼합액을 수득하는 제2단계;

상기 혈림프 혼합액을 인산완충용액으로 투석한 후 여과하여 얻은 여액을 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물로서 수득하는 제3단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 곤충은 유충인 것을 특징으로 하는 혈림프 조성물의 제조방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 곤충은 장수풍뎅이 또는 꽃무지인 것을 특징으로 하는 혈림프 조성물의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항산화제는 에리소르빈산 나트륨, 부틸 히드록시아니솔, 디부틸-히드록시톨루엔, 알파-토코페롤, N-페닐티오우레아 및 N-프로필티오우라실로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 첨가하는 것을 특징으로 하는 혈림프 조성물의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 항산화제는 N-프로필티오우라실인 것을 특징으로 하는 혈림프 조성물의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 트롬빈은 인간, 쥐, 토끼, 생쥐, 돼지, 마우스 및 소 유래 트롬빈으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 첨가하는 것을 특징으로 하는 혈림프 조성물의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 혈림프 조성물은 혈림프 원액의 80 내지 95%를 회수하는 것을 특징으로 하는 혈림프 조성물의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 제3단계에서, 여과는 구멍 지름이 0.2 내지 0.5 μ m인 필터를 이용하는 것을 특징으로 하는 혈림프 조성물의 제조방법.

청구항 9

제1항의 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물의 제조 방법으로 제조된 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물.

청구항 10

곤충으로부터 혈림프 원액을 채취하는 제1단계;

상기 혈림프 원액에 항산화제 및 트롬빈을 첨가하여 반응시킨 후, 원심분리하여 상층액을 분리하고, 분리한 상층액 내의 항산화제 및 트롬빈을 비활성화 시켜 혈림프 혼합액을 수득하는 제2단계;

상기 혈림프 혼합액을 인산완충용액으로 투석한 후 여과하여 얻은 여액을 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물로서 수득하는 제3단계;

상기 혈림프 조성물로부터 엑소좀을 분리하는 제4단계;

상기 엑소좀으로부터 생체분자를 분리하는 제5단계; 및

상기 생체분자의 발현 수준을 확인하는 제6단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 곤충 질병 진단을 위한 생체분자 분리방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 제5단계에서, 생체분자는 단백질 또는 핵산인 것을 특징으로 하는 생체분자 분리방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 핵산은 마이크로RNA인 것을 특징으로 하는 생체분자 분리방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 곤충의 질병 진단을 위해 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물을 제조하고, 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물로부터 엑소좀을 분리하고, 분리한 엑소좀에 존재하는 생체분자를 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 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 많은 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 자원으로서 각광 받을 수 있도록 하였다.

[0003] 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*)의 애벌레는 약재로, 어른 벌레는 애완용으로 인기가 많아 농가의 소득을 올려준다. 한의학에서 강량이라 불리는 애벌레는 주로 건조 가루로 이용되며 결석치료, 세균성 이질, 치질 등 치료에 사용된다(김미애 et al., 2014).

[0004] 꽃무지(*Cetonia pilifera*)는 꽃무지과의 곤충을 통틀어 일컫는 말로 풍뎅이과에 속한다. 꽃무지 유충은 일반적으로 굼벵이이라 불리며 간 기능 보호, 파상풍, 이노작용 및 중풍 등에 좋은 것으로 알려져 있다(Chung M. Y. et al., 2013).

[0005] 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 상태로, 곤충의 엑소좀을 이용한 진단 방법은 곤충의 질병 진단을 위한 가장 효과적인 방법이 될 수 있다.

- [0006] 엑소좀(exosome)은 대부분이 세포에서 분비되는 30~120nm 크기의 작은 소낭(Vlassov A. V. et al., 2012)으로 다양한 단백질, 지질 및 핵산(마이크로RNA, 메신저RNA) 등을 함유하고 있다(Koles K. et al., 2012). 엑소좀에 존재하는 단백질들은 GTPases, 아넥신(annexins), 플로틸린(flotillin), CD9, CD63, CD81, CD82, Hsp(heat shock protein)70, Hsp90, 알릭스(Alix), TSG101(tumor susceptibility gene 101) 및 지질관련 단백질 등이 있다(Vlassov A. V. et al., 2012; Szatanek R. et al., 2015). 엑소좀은 혈액, 침, 소변 및 모유와 같은 체액에서 발견된다.
- [0007] 엑소좀의 기능은 명확하게 밝혀지지 않았으나, 면역반응을 위한 세포간의 소통 역할을 한다고 밝혀진바 있다(Kosaka N. et al., 2014). 최근에는 면역반응에서 비자기 유래(nonsel-self-origination)의 핵산 조각 또는 단백질의 검출 및 초기 질병 진단을 위한 엑소좀의 가능성에 대하여 연구가 진행되고 있다(Lane R. E. et al., 2015).
- [0008] 곤충의 순환계는 개방 혈관계로 혈관이란 것이 없고, 포유류에서는 혈액(blood)과 림프(lymph)가 있는 반면, 곤충은 이 두 가지가 합쳐진 형태의 혈림프(hemolymph)로 존재한다. 혈림프는 곤충 세포를 비롯한 동물세포의 성장에 필요한 영양성분을 갖추고 있다. 이를 통해 곤충의 엑소좀을 분리하기 위해서는 곤충의 혈림프의 채취가 필요하다. 그러나 일부 곤충의 경우에는 혈림프의 점성이 높고 공기와 접촉으로 인해 빠른 산화가 일어나 엑소좀의 분리가 어렵다.
- [0009] 한편, 미국공개특허 제2013-0273544호에서는 곤충의 생물학적 유체로부터 엑소좀을 분리하는 방법에 대해 개시하고 있으나, 곤충의 혈림프에 대한 언급이 없었다. 한국공개특허 제2013-0043104호에서는 소낭 및 마이크로RNA를 포함하는 순환하는 생물학적 지표 등을 이용하여 생리학적 상태의 프로파일링 또는 표현형을 결정할 수 있다고 개시되어 있고, 국제공개특허 제2012-020307호에서는 다양한 질병의 치료를 위한 미세소낭에 대해서 개시하고 있다.
- [0010] 이에 본 발명자는, 곤충의 질병 진단을 위해 곤충의 혈림프를 채취하고, 채취한 혈림프로부터 엑소좀을 분리하는 연구를 진행하였다. 이 과정에서 장수풍뎅이 및 꽃무지의 혈림프가 점성이 아주 높고 공기와 접촉하면 쉽게 산화되어 엑소좀을 분리할 수 없다는 단점을 극복하기 위해 곤충의 혈림프 조성물을 제조하고, 이로부터 엑소좀을 분리함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 미국공개특허 제2013-0273544호, Methods and compositions for exosome isolation, 2013. 10. 17. 공개.
- (특허문헌 0002) 한국공개특허 제2013-0043104호, 질병용 순환 생물학적 지표들, 2013. 04. 29. 공개.
- (특허문헌 0003) 국제공개특허 제2012-020307호, Therapeutic uses of microvesicles and related microRNA, 2012. 02. 16. 공개.

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) 김미애 et al., 식의약 시장에 도전하는 곤충, RDA Interrobang, 119, 2014.
- (비특허문헌 0002) 최경철 et al., 곤충의 새로운 가치, RDA Interrobang, 4, 2011.
- (비특허문헌 0003) Chung M. Y. et al., Analysis of General Composition and Harmful Material of Protaetia brevitarsis, Journal of Life Science, 23(5), 664-668, 2013.
- (비특허문헌 0004) Koles K. et al., Exosome go with the Wnt, Cellular logistics, 2, 169-173, 2012.
- (비특허문헌 0005) Kosaka N. et al., Exosome in disease biology, diagnosis, and therapy, Inflammation and Regeneration, 34, 233-239, 2014.
- (비특허문헌 0006) Lane R. E. et al., Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing, Scientific reports, 5, 7639, 2015

(비특허문헌 0007) Szatanek R. et al., Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review), International journal of molecular medicine, 36, 11-17, 2015.

(비특허문헌 0008) Vlassov A. V. et al., Exosome: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials, Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 1820, 940-948, 2012.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 곤충의 질병 진단을 위해 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물, 이의 제조방법 및 이로부터 엑소좀을 분리하고, 분리한 엑소좀에 존재하는 생체분자를 분리하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 곤충으로부터 혈림프 원액을 채취하는 제1단계; 상기 혈림프 원액에 항산화제 및 트롬빈을 첨가하여 혈림프 혼합액을 수득하는 제2단계; 상기 혈림프 혼합액을 인산완충용액으로 투석한 후 여과하여 얻은 여액을 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물로서 수득하는 제3단계; 를 포함하는 곤충의 질병 진단용 혈림프 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 곤충 질병 진단용 혈림프의 조성물 제조방법으로 제조된 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물에 관한 것이다.

[0016] 또한, 본 발명은 곤충으로부터 혈림프 원액을 채취하는 제1단계; 상기 혈림프 원액에 항산화제 및 트롬빈을 첨가하여 혈림프 혼합액을 수득하는 제2단계; 상기 혈림프 혼합액을 인산완충용액으로 투석한 후 여과하여 얻은 여액을 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물로서 수득하는 제3단계; 상기 혈림프 조성물로부터 엑소좀을 분리하는 제4단계; 상기 엑소좀으로부터 생체분자를 분리하는 제5단계; 및 상기 생체분자의 발현 수준을 확인하는 제6단계; 를 포함하는 곤충 질병 진단을 위한 생체분자 분리방법에 관한 것이다.

[0017] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은 곤충으로부터 혈림프 원액을 채취하는 제1단계; 상기 혈림프 원액에 항산화제 및 트롬빈을 첨가하여 혈림프 혼합액을 수득하는 제2단계; 상기 혈림프 혼합액을 인산완충용액으로 투석한 후 여과하여 얻은 여액을 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물로서 수득하는 제3단계; 를 포함하는 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[0019] 상기 제1단계에서 혈림프 원액의 채취 대상이 되는 곤충은, 혈림프의 점성이 높고 공기 중 산화가 빠르게 일어나는 곤충이면 모두 이용가능하며, 바람직하게는 장수풍뎅이 및 꽃무지를 이용할 수 있다. 또한 상기 곤충은 성충 또는 유충을 이용할 수 있으나, 특히 유충인 것이 바람직하다.

[0020] 상기 제2단계에서 항산화제는 공기와 접촉하면 쉽게 산화되는 곤충의 혈림프의 산화를 억제하기 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.

[0021] 또한, 상기 제2단계에서 트롬빈은 혈림프의 점성을 낮추기 위한 것으로, 인간(human), 쥐(rat), 토끼(rabbit), 생쥐(murine), 돼지(porcine), 마우스(mouse) 및 소(bovine) 유래 트롬빈으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 첨가할 수 있으며, 바람직하게는 소 혈청 유래의 트롬빈을 첨가할 수 있다.

[0022] 상기 혈림프 원액 1mL 당 항산화제 농도가 1 내지 5%가 되도록 첨가하고, 트롬빈은 3 내지 10U이 되도록 첨가할 수 있으며 항산화제와 트롬빈을 잘 섞은 후 상온에서 3 내지 10분간 반응시킬 수 있다.

[0023] 또한, 상기 제2단계에서 항산화제와 트롬빈을 넣고 반응 시킨 다음 항산화제 및 트롬빈의 비활성화를 위해 56℃에서 25 내지 35분간 처리할 수 있다.

- [0024] 또한, 상기 제3단계에서 인산완충용액으로 투석하는 것은 혈림프 혼합액의 용액을 인산완충용액으로 바꾸기 위한 것으로, 4℃에서 10 내지 15시간 동안 투석을 수행할 수 있다.
- [0025] 혈림프 원액의 경우 회수가 불가능한 것에 반해, 상기 혈림프 조성물은 곤충의 혈림프 원액에 항산화제 및 트롬빈을 첨가함으로써 혈림프 원액의 80 내지 95%를 회수할 수 있다.
- [0026] 상기 혈림프 조성물의 제조방법 제3단계에서, 여과는 구멍 지름이 0.2 내지 0.5 μ m인 필터를 이용할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 혈림프 조성물의 제조방법으로 제조된 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물로서, 곤충의 질병 진단에 이용할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 곤충으로부터 혈림프 원액을 채취하는 제1단계; 상기 혈림프 원액에 항산화제 및 트롬빈을 첨가하여 혈림프 혼합액을 획득하는 제2단계; 상기 혈림프 혼합액을 인산완충용액으로 투석한 후 여과하여 얻은 여액을 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물로서 획득하는 제3단계; 상기 혈림프 조성물로부터 엑소좀을 분리하는 제4단계; 상기 엑소좀으로부터 생체분자를 분리하는 제5단계; 및 상기 생체분자의 발현 수준을 확인하는 제6단계;를 포함하는 곤충 질병 진단을 위한 생체분자 분리방법에 관한 것이다.
- [0029] 상기 혈림프 조성물에는 엑소좀이 포함된다. 따라서 혈림프 조성물로부터 엑소좀을 분리할 수 있고, 분리한 엑소좀으로부터 생체분자를 분리할 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 생체분자는 생물체를 구성하는 또는 생물의 기능을 담당하는 특수 분자로, 핵산, 단백질, 고분자 다당류 등을 포함하고 있다.
- [0031] 상기 엑소좀으로부터 분리한 생체분자는 단백질 또는 핵산일 수 있으며, 핵산은 마이크로RNA일 수 있다.
- [0032] 또한, 엑소좀으로부터 분리한 생체분자는 질병과 관련되므로, 생체분자의 발현 수준을 확인함으로써 곤충의 질병을 진단 할 수 있다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명은 곤충의 질병 진단을 위해 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물, 이의 제조방법 및 이로부터 엑소좀을 분리하여 엑소좀에 존재하는 생체분자를 분리하는 방법에 관한 것으로서, 상기 곤충 질병 진단용 혈림프 조성물로부터 분리한 엑소좀에서 질병과 관련된 단백질 및 핵산을 포함하는 생체분자들을 분리하여 곤충의 질병 진단에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 트롬빈을 처리하기 전과 후의 혈림프의 점성을 비교한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 엑소좀 분리 단계에 따른 단백질 변화를 확인한 결과를 나타낸다. 그림에서 L은 단백질 크기 확인을 위한 마커이고, 1레인은 혈림프 원액, 2레인은 혈림프 조성물, 3레인은 혈림프로부터 분리한 엑소좀의 단백질 패턴을 보여주고 있다.
- 도 3은 엑소좀 특이적인 단백질 분석을 통한 엑소좀 분리를 확인한 결과이다.
- 도 4은 엑소좀 RNA를 확인한 결과이다. L은 RNA의 크기 확인을 위한 마커이고, 1 및 2레인은 엑소좀으로부터 분리한 총 RNA를 나타내고, 3 및 4레인은 엑소좀 RNA를 나타낸다. 빨간색 원은 분리된 작은 길이의 RNA를 표시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 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. 장수풍뎅이 유충의 사육>

- [0036] 장수풍뎅이의 3령 유충은 상업적으로 판매하는 유충을 구입하여 사용하였다. 구입한 장수풍뎅이의 유충은 발효된 톱밥에서 사육하였고, 이때 25℃ 온도에 40% 습도를 유지하였다.

<실시예 2. 혈림프 조성물 제조>

- [0039] 장수풍뎡이의 3령 유충을 증류수로 깨끗하게 씻은 다음에 앞다리를 클립으로 고정한 후 주사기를 이용하여 혈림프 원액을 마리당 1ml 정도 채취하였다. 혈림프 원액 1ml 당 10%의 N-프로피티오우레아 200 μ l와 500U/ml의 소 혈청 유래 트롬빈 10 μ l를 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 5분 동안 반응시켰다. 반응 후 혈림프 혼합액을 1,700 $\times$ g로 10분간 원심 분리하여 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하여 N-프로피티오우레아와 트롬빈을 비활성화시켰다. 비활성화시킨 혈림프 혼합액을 20,000 $\times$ g로 30분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 4 $^{\circ}$ C에서 인산완충용액 (PBS)으로 12시간 동안 투석하였다. 투석 후 혈림프를 구멍 지름이 0.45 μ m 및 0.22 μ m인 필터로 여과한 후 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 이때 유충 1마리당 1ml 정도의 혈림프로부터 80 내지 95%의 혈림프 조성물을 얻을 수 있었다.
- [0040] 혈림프 조성물 제조시 항산화제로 N-페닐티오우레아를 사용하였을 때에도, N-프로피티오우레아를 사용하였을 때와 같이 혈림프 원액으로부터 80 내지 95%의 혈림프 조성물을 얻을 수 있었다.
- [0041] 도 1에서는 혈림프 제조를 위해 혈림프 원액에 트롬빈을 처리하여 혈림프의 점성 변화를 확인한 결과를 보여주고 있다. 도 1에서 보여주듯이, 혈림프 원액을 떨어뜨린 결과 점성이 높아 테일링(tailing)이 나타나는 반면에, 트롬빈을 처리한 혈림프 혼합액의 경우에는 테일링이 나타나지 않은 것을 통해, 트롬빈의 처리에 의해 혈림프의 점성이 낮아졌음을 알 수 있었다.
- [0042] <실시예 3. 엑소좀 분리>
- [0043] 실시예 2에서 제조된 장수풍뎡이의 혈림프 조성물로부터 엑소좀을 분리하였다. 이때, Cell Guidance System LLC 사(Carlsbad, CA, USA)의 Exo-spin Exosome Purification kit를 사용하였다.
- [0044] 혈림프 조성물 20ml을 300 $\times$ g로 10분간 원심 분리하여 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 20,000 $\times$ g로 30분간 다시 원심 분리하여 상층액만을 얻었다. 상층액을 새 튜브에 넣고 A 버퍼를 상층액 부피의 1/2정도를 첨가하여 잘 섞어준 후 4 $^{\circ}$ C에서 5분 이상 반응시켰다. 반응물을 20,000 $\times$ g로 30분간 원심분리하고, 상층액을 제거하여 펠릿(pellet)만을 얻었다. 원심 분리하여 얻은 펠릿에 100 μ l의 인산완충용액을 넣어 녹였다. 인산완충용액으로 녹인 엑소좀을 Exo-spin 컬럼에 넣고 50 $\times$ g로 1분간 원심 분리하였다. 컬럼을 새 튜브로 옮긴 후 200 μ l의 인산완충용액을 넣고 50 $\times$ g로 1분간 원심 분리하여 용출된 용액을 얻었다. 이때 용출된 용액에는 정제된 엑소좀이 포함되어 있었다.
- [0045] <실시예 4. 엑소좀 분리 확인>
- [0046] 혈림프 조성물로부터 엑소좀 분리가 잘 되었는지 확인하기 위해 총 단백질과 엑소좀 특이 단백질을 분석하였다.
- [0047] 혈림프 조성물로부터 분리한 엑소좀 500 μ l에 용해버퍼(50mM Tris, pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 1mM dithiothreitol, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail) 350 μ l를 넣고 엑소좀을 용해하였다. 용해물에 동일한 양의 2 $\times$ 샘플 버퍼를 넣고 끓였다. 끓인 샘플을 식힌 다음 12,000 $\times$ g로 10분간 원심분리하고, 상층액을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다.
- [0048] 엑소좀의 총 단백질을 확인하기 위해 엑소좀 용해물을 각각 동량으로 SDS-PAGE 겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)을 통해 크기별로 분리한 후, 겔에 있는 단백질을 염색하여 단백질을 확인하였고, 이를 도 2에 나타내었다.
- [0049] 도 2에서 보여주듯이, 혈림프 원액(1레인)과 혈림프 조성물(2레인)의 단백질 패턴이 유사하게 보이는 반면에, 분리된 엑소좀(3레인)의 경우에는 혈림프 원액 및 혈림프 조성물의 단백질 패턴과 다르게 나타났다. 이것을 통해 엑소좀이 제대로 분리되었음을 알 수 있었다.
- [0050] 엑소좀 특이 단백질을 확인하기 위해 SDS-PAGE 겔 전기영동한 단백질을 니트로셀룰로스(nitrocellulose) 멤브레인으로 이동시켰다. 상기 멤브레인들은 상온에서 1시간 동안 5% 탈지분유로 블로킹시킨 다음 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 1차 항체와 반응시켰다. 이후 1차 항체를 세척하고 해당 2차 항체를 반응시킨 후 ECL(enhanced chemiluminescence system)을 이용하여 단백질을 확인하였다. 상기 실험 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0051] 도 3을 참고하면, 엑소좀 특이 단백질인 CD9, CD63, CD81 및 Hsp70의 발현 정도를 확인한 결과 혈림프 원액에 비해 분리된 엑소좀에서 CD9, CD63, CD81 및 Hsp70 단백질의 양이 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 이를 통해 엑소좀이 잘 분리된 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다.
- [0052] <실시예 5. 엑소좀 RNA 분리>
- [0053] 혈림프 조성물로부터 엑소좀 분리가 잘 되었는지 확인하기 위해 엑소좀 RNA를 분리하였다. 엑소좀 RNA는 System

Biosciences사(Mountain view, CA, USA)의 SeraMir Exosome RNA Amplification Kit를 이용하여 분리하였다.

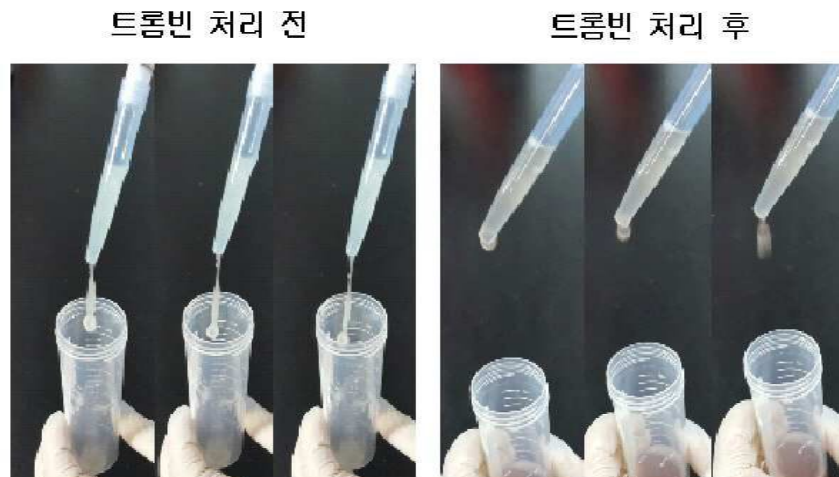
[0054] 혈림프 조성물로부터 분리한 엑소좀 500 μ l에 용해버퍼(Lysis buffer) 350 μ l를 넣고 15초간 볼텍스하고, 상온에서 5분간 반응시켰다. 용해된 엑소좀 혼합액을 스핀 컬럼(spin column)에 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심 분리한 후 빠져나온 용액을 버렸다. 스핀 컬럼에 400 μ l의 세척버퍼(Wash buffer)를 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심 분리하였고, 같은 방법을 한 번 더 반복하였다. 세척이 끝나면 빈 스핀 컬럼을 13,000rpm에서 2분간 원심 분리하여 건조시켰다. 건조한 스핀 컬럼을 RNase가 없는 새로운 튜브에 옮기고 30 μ l의 용출버퍼(Elution buffer)를 넣고 2,000rpm에서 2분간 원심 분리하고, 속도를 높여서 13,000rpm에서 1분간 원심 분리하여 엑소좀 RNA를 분리하였다.

[0055] 분리한 엑소좀 RNA를 확인하기 위해 Agilent Bioanalyzer 2100로 전기 영동하여 RNA를 분석하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

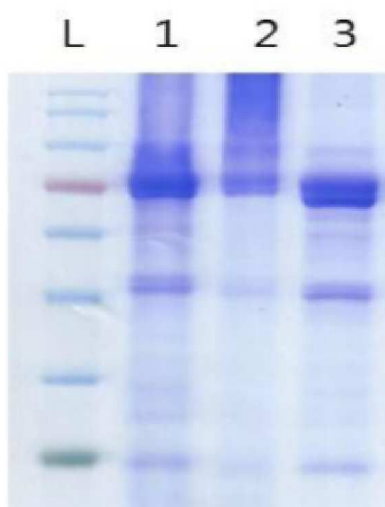
[0056] 도 4에서 보여주듯이, 엑소좀에서 분리한 총 RNA(1 및 2레인)의 경우 43s(18s-28s 복합체)의 밴드가 나타나는 반면에, 엑소좀 RNA(3 및 4레인)의 경우에는 작은 길이의 RNA가 나타남을 알 수 있었다. 이를 통해 엑소좀 RNA가 잘 분리되었음을 알 수 있었다.

도면

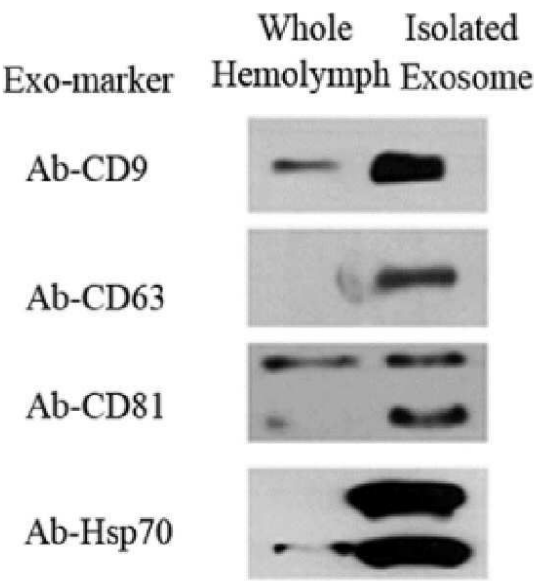
도면1



도면2



도면3



도면4

