



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0119210
(43) 공개일자 2021년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 1/30 (2006.01) G01N 1/34 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 1/30 (2013.01)
G01N 1/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0035842
(22) 출원일자 2020년03월24일
심사청구일자 2020년03월24일

(71) 출원인
주식회사 바이나리
대구광역시 북구 경대로17길 47, 608호 (북현동,
아이티융합빌딩)
(72) 발명자
원중순
경상북도 경주시 승삼2길 30, 101동 102호
금상일
경상북도 포항시 남구 연일읍 유강길10번길 42,
202동 301호(유강 코아루 2단지)
박영일
대구광역시 북구 경대로 17길 47, IT 융합산업빌
딩 608호
(74) 대리인
이명진

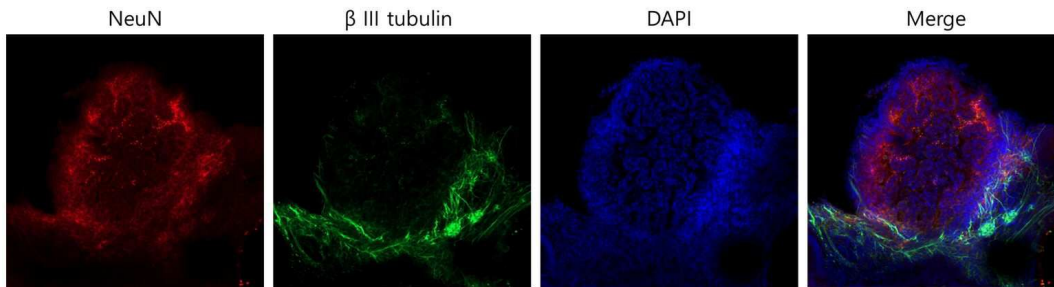
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 오가노이드 투명화 키트, 이를 이용한 오가노이드 투명화 방법 및 3차원 이미지화를 위한 면역염색 방법

(57) 요약

본 발명은 오가노이드 투명화 용액 키트, 이를 이용한 오가노이드 투명화 방법 및 3차원 이미지화를 위한 면역염색 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 투명화 용액 키트는 높은 투명도로 오가노이드를 투명화하고 면역염색 시 선명한 3차원 형광 이미지를 제공하는 효과가 있다. 따라서, 본 발명에 따른 투명화 용액 키트는 실제 조직 또는 기관과 유사한 형태인 오가노이드를 투명화함으로써 다양한 질환의 정확한 진단 또는 치료를 위한 연구 및 신약 개발 분야에서 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 2001/302 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415164698
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술진흥원
연구사업명	R&D 재발견
연구과제명	투명화 기법을 활용한 압 조직 유래 오가노이드의 3차원 신약 스크리닝 키트 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	바이나리
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

수크로오스(sucrose)를 포함하는 고정 용액(fixing solution);

3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS), 우레아(urea), 및 염화나트륨(NaCl)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 조직 클리어링 용액(tissue clearing solution);

인산완충식염수(phosphate buffer saline; PBS) 및 아지드화나트륨(sodium azide)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 세척 용액(washing solution); 및

3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS), 우레아(urea), 및 염화나트륨(NaCl)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 마운팅 용액(mounting solution)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 오가노이드 투명화 용액 키트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 고정 용액에서 수크로오스는 농도가 20%(w/v) 내지 50%(w/v)인 것을 특징으로 하는, 오가노이드 투명화 용액 키트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조직 클리어링 용액에서 CHAPS는 농도가 10%(w/v) 내지 40%(w/v)이고, 우레아는 농도가 30%(w/v) 내지 70%(w/v)이고, 염화나트륨은 농도가 0.001%(w/v) 내지 1%(w/v)인 것을 특징으로 하는, 오가노이드 투명화 용액 키트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 세척 용액에서 아지드화나트륨은 농도가 0.001%(w/v) 내지 1%(w/v)인 것을 특징으로 하는, 오가노이드 투명화 용액 키트.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 마운팅 용액에서 CHAPS는 농도가 20%(w/v) 내지 60%(w/v)이고, 우레아는 농도가 20%(w/v) 내지 60%(w/v)이고, 염화나트륨은 농도가 0.001%(w/v) 내지 1%(w/v)인 것을 특징으로 하는, 오가노이드 투명화 용액 키트.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 오가노이드는 뇌 오가노이드, 간 오가노이드, 결장 오가노이드, 소장 오가노이드, 폐 오가노이드, 내피 오가노이드, 심장 오가노이드, 신장 오가노이드, 혈관 오가노이드, 및 상피 오가노이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 오가노이드 투명화 용액 키트.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 오가노이드는 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포 유래인 것을 특징으로 하는, 오가노이드 투명화 용액 키트.

청구항 8

하기 단계를 포함하는, 오가노이드 투명화 방법:

- (a) 고정 용액으로 오가노이드 시료를 고정시키는 단계;
- (b) 조직 클리어링 용액으로 상기 고정된 오가노이드 시료를 투명화 시키는 단계;
- (c) 세척 용액으로 상기 투명한 시료에 부착되어 있는 유기물을 씻어내는 단계; 및
- (d) 마운팅 용액으로 상기 세척된 시료를 고정시키는 단계.

청구항 9

하기 단계를 포함하는, 오가노이드의 3차원 이미지화를 위한 면역염색 방법:

- (a) 고정 용액으로 오가노이드 시료를 고정시키는 단계;
- (b) 조직 클리어링 용액으로 상기 고정된 오가노이드 시료를 투명화 시키는 단계;
- (c) 세척 용액으로 상기 투명한 시료에 부착되어 있는 유기물을 씻어내는 단계;
- (d) 상기 세척된 시료에 형광물질이 부착된 항체를 처리하는 단계; 및
- (e) 마운팅 용액으로 상기 세척된 시료를 고정시키는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 오가노이드 투명화 키트, 이를 이용한 오가노이드 투명화 방법 및 3차원 이미지화를 위한 면역염색 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 현재 질병의 진단은 2차원 스캐닝을 통한 3차원에서의 재구성 기술에 의해 보다 정교하게 진단할 수 있는 기술로 발전하여 왔다. 그러나, 현재 개발된 기술은 밀리미터 수준으로 세포 수준에서의 분석이 가능한 정도의 기술은 매우 미흡한 실정이다.

[0004] 즉, 생검 등의 생체조직을 고정한 후 파라핀 등으로 포매하여 나노미터 두께의 슬라이드를 만들어 광학이나 형광 등으로 미세 구조를 분석한다. 이러한 미세구조에 대한 이미지 기술을 이용하여 3차원 이미지를 구성하기 위해서는 콘포칼과 같은 현미경을 이용해야 하며 이러한 경우 수십 마이크로 미터 수준 두께의 정보를 획득할 수 있다. 그러나 이 모든 것은 광원이 침투할 수 있는 깊이에 의해 제한된다. 따라서, 보다 두꺼운 조직의 3차원 이미지를 획득하기 위해서는 조직을 연속적으로 절편하여 현미경으로 이미징 한 후 다시 재구성하는 과정이 필

요하다.

- [0005] 조직 투명화 기술은 조직의 손상 없이 구조 및 단백질 발현 등을 확인 할 수 있으므로 최근에 매우 다양한 방법으로 조직을 투명화 할 수 있는 기술이 개발되었다. 기존의 조직 투명화 기술은 유기용매를 이용한 조직 투명화 방법인 Spatleholz, BABB, Scale S, iDISCO법과, 폴리머 주입법인 ACT(active CLARITY technology)법에 의해 처리된 조직의 항원 보존성이 보고된 바 있다. ACT를 제외한 다른 방법의 경우 형광과 항원의 보존성이 감소하는 문제를 가지고 있다. ACT의 경우 90% 이상의 항원 보존성을 가지며, 이는 클라리티(CLARITY)와 같이 고정된 단백질에 추가로 하이드로젤 폴리머와의 결합을 필요로 하는 방법에 비하면 보다 높은 보존성을 보인다. 그러나 강한 조직 고정 과정은 항원성의 손실을 유발하여, 사용할 수 있는 항체가 감소하는 등의 문제점을 고려해야 하므로, 여러 가지 기술의 개선이 필요하다.
- [0006] 최근에 개발된 클라리티(CLARITY)법은 조직 내 hydrogel을 넣어서 DNA나 단백질 등 진단에 중요한 material 등을 붙잡아 주는 일종의 그물망 지지체를 만든 뒤 지지체를 선택적으로 제거하는 방법을 이용한다. 클라리티(CLARITY) 및 관류 도움 시약 방출방법(PARS)과 같이 광학적으로 투명하고 고분자 투과가 가능한 이미지를 창출할 수 있는 조직투명성 기술은 매우 향상된 기관계 이미징에 있어서 주요한 진전을 제공하였다.
- [0007] 그러나, 상기 클라리티 방법은 hydrogel 농도가 높아지면 단백질과의 결합도가 많아 더 조직이 단단해져서 지지체의 제거가 어려워 지기 때문에 투명화하는데 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 이는 조직 표면에 공기 및 검은 입자의 침착을 야기한다. 또한, 기존의 클라리티 법은 과정이 복잡하고 부가적인 장비가 많이 필요하다. 뿐만 아니라 한번에 한 조직만 투명화 할 수 있어 경제적, 시간적 손실을 유발하며 항체를 이용한 염색이 불안정한 문제가 있었다.
- [0008] 한편, 오가노이드는 생체내 생물학적 물질 및 과정의 3D 시험관내 모델이며, 배아 발생, 조직 재생 및 조직 기능, 약물 독성 및 약물 감수성, 질환 모델링, 성인 줄기 세포 생물학과 관련된 다양한 연구 문제를 해결하기 위한 새로운 플랫폼으로서 작용한다. 이러한 오가노이드는 기관 또는 조직을 구성하는 여러 특이적 세포 집단들을 포함하고 있고, 실제 조직 또는 기관과 유사한 형태 및 구조적 조직화가 이루어져 있으며, 각 기관이 가지는 특수한 기능을 재현할 수 있다.
- [0009] 실험동물 질환 모델은 인간과 여러 가지 면에서 차이가 존재하기 때문에, 이를 이용한 질환 기전 연구나 신약 개발에는 명확한 한계가 존재하는데, 세계적으로 실험동물을 이용한 연구에 제한이 있어, 최근에는 인간 장기를 모사하는 오가노이드가 대안으로 제시되고 있다. 현재 다양한 인체 장기를 모사하는 오가노이드가 개발되고 있으며, 다른 동물 모델이나 배양법으로는 인간의 뇌를 모사하기가 불가능한 반면, 인간의 대뇌, 중뇌, 소뇌를 모사하는 오가노이드가 개발된 바 있다. 오가노이드는 기존의 2차원 또는 3차원 배양법보다 훨씬 생체와 유사하여 약물을 평가함에 있어 정확한 결과를 도출할 수 있으면서 동물을 이용한 평가법보다 훨씬 적은 비용과 시간이 소요되어 차세대 약물 독성 및 유효성 평가에 널리 사용될 것으로 기대되고 있다.
- [0010] 이에, 본 발명자들은 고가의 전기영동 장치를 필요로 하지 않고 다양한 조직의 손상 없이 쉽게 투명화할 수 있는 최적의 용액 조성의 조합 및 이를 이용한 투명화 방법을 실제 조직 또는 기관과 유사한 형태인 오가노이드에 적용하여, 면역염색 시 고해상도의 3차원 형광 이미지 결과를 제공하고, 다양한 질병을 정확하게 진단 또는 치료하기 위한 연구, 및 신약 개발 연구 등에 활용하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2020-0018505호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명자들은 고가의 장치 없이 손쉽게 실제 조직 또는 기관과 유사한 형태인 오가노이드를 투명화 하여 고해상도의 3차원 면역염색 이미지를 제공할 수 있는 오가노이드 투명화 용액 키트를 발명하였는 바, 이에 기초하여

본 발명을 완성하였다.

[0014] 이에, 본 발명의 목적은 오가노이드 투명화 용액 키트, 이를 이용한 오가노이드 투명화 방법 및 3차원 이미지화를 위한 면역염색 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 수크로오스(sucrose)를 포함하는 고정 용액(fixing solution);

[0019] 3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS), 우레아(urea), 및 염화나트륨(NaCl)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 조직 클리어링 용액(tissue clearing solution);

[0020] 인산완충식염수(phosphate buffer saline; PBS) 및 아지드화나트륨(sodium azide)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 세척 용액(washing solution); 및

[0021] 3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS), 우레아(urea), 및 염화나트륨(NaCl)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 마운팅 용액(mounting solution)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 오가노이드 투명화 용액 키트를 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 오가노이드 투명화 방법을 제공한다:

[0023] (a) 고정 용액으로 오가노이드 시료를 고정시키는 단계;

[0024] (b) 조직 클리어링 용액으로 상기 고정된 오가노이드 시료를 투명화시키는 단계;

[0025] (c) 세척 용액으로 상기 투명화한 시료에 부착되어 있는 유기물을 씻어내는 단계; 및

[0026] (d) 마운팅 용액으로 상기 세척된 시료를 고정시키는 단계.

[0027] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 오가노이드의 3차원 이미지화를 위한 면역염색 방법을 제공한다:

[0028] (a) 고정 용액으로 오가노이드 시료를 고정시키는 단계;

[0029] (b) 조직 클리어링 용액으로 상기 고정된 오가노이드 시료를 투명화시키는 단계;

[0030] (c) 세척 용액으로 상기 투명화한 시료에 부착되어 있는 유기물을 씻어내는 단계;

[0031] (d) 상기 세척된 시료에 형광물질이 부착된 항체를 처리하는 단계; 및

[0032] (e) 마운팅 용액으로 상기 세척된 시료를 고정시키는 단계.

[0033] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 고정 용액에서 수크로오스는 농도가 20%(w/v) 내지 50%(w/v)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 조직 클리어링 용액에서 CHAPS는 농도가 10%(w/v) 내지 40%(w/v)이고, 우레아는 농도가 30%(w/v) 내지 70%(w/v)이고, 염화나트륨은 농도가 0.001%(w/v) 내지 1%(w/v)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 세척 용액에서 아지드화나트륨은 농도가 0.001%(w/v) 내지 1%(w/v)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 마운팅 용액에서 CHAPS는 농도가 20%(w/v) 내지 60%(w/v)이고, 우레아는 농도가 20%(w/v) 내지 60%(w/v)이고, 염화나트륨은 농도가 0.001%(w/v) 내지 1%(w/v)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 오가노이드는 뇌 오가노이드, 간 오가노이드, 결장 오가노이드, 소장 오가노이드, 폐 오가노이드, 내피 오가노이드, 심장 오가노이드, 신장 오가노이드, 혈관 오가노이드, 및 상피 오가노이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 오가노이드는 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0040] 본 발명에 따른 투명화 용액 키트는 높은 투명도로 오가노이드를 투명화하고 면역염색 시 선명한 3차원 형광 이미지를 제공하는 효과가 있다. 따라서, 본 발명에 따른 투명화 용액 키트는 실제 조직 또는 기관과 유사한 형태인 오가노이드를 투명화함으로써 다양한 질환의 정확한 진단 또는 치료를 위한 연구 및 신약 개발 분야에서 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 투명화 용액을 이용한 오가노이드의 투명화 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 투명화 용액을 이용한 오가노이드의 면역염색 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 본 발명은 수크로오스(sucrose)를 포함하는 고정 용액(fixing solution);

[0044] 3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS), 우레아(urea), 및 염화나트륨(NaCl)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 조직 클리어링 용액(tissue clearing solution);

[0045] 인산완충식염수(phosphate buffer saline; PBS) 및 아지드화나트륨(sodium azide)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 세척 용액(washing solution); 및

[0046] 3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS), 우레아(urea), 및 염화나트륨(NaCl)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 마운팅 용액(mounting solution)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 오가노이드 투명화 용액 키트를 제공한다.

[0047] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 오가노이드 투명화 방법을 제공한다:

- [0048] (a) 고정 용액으로 오가노이드 시료를 고정시키는 단계;
- [0049] (b) 조직 클리어링 용액으로 상기 고정된 오가노이드 시료를 투명화시키는 단계;
- [0050] (c) 세척 용액으로 상기 투명화한 시료에 부착되어 있는 유기물을 씻어내는 단계; 및
- [0051] (d) 마운팅 용액으로 상기 세척된 시료를 고정시키는 단계.

[0052] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 오가노이드의 3차원 이미지화를 위한 면역염색 방법을 제공한다:

- [0053] (a) 고정 용액으로 오가노이드 시료를 고정시키는 단계;
- [0054] (b) 조직 클리어링 용액으로 상기 고정된 오가노이드 시료를 투명화시키는 단계;
- [0055] (c) 세척 용액으로 상기 투명화한 시료에 부착되어 있는 유기물을 씻어내는 단계;
- [0056] (d) 상기 세척된 시료에 형광물질이 부착된 항체를 처리하는 단계; 및
- [0057] (e) 마운팅 용액으로 상기 세척된 시료를 고정시키는 단계.

[0058] 본 발명에 있어서, "오가노이드(organoid)"는 3D 입체구조를 가지는 세포덩어리를 의미하며, 동물 등에서 수집, 취득하지 않은 인공적인 배양 과정을 통하여 제조한 축소되고 단순화된 버전의 기관을 의미한다. 이를 구성하는

세포의 유래는 제한되지 않으며, 예컨대 오가노이드는 조직, 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포에서 파생될 수 있고, 자가재생 및 분화능력으로 인해 3차원으로 배양될 수 있다. 상기 오가노이드는 세포의 성장 과정에서 주변 환경과 상호 작용하도록 허용되는 환경을 가질 수 있다. 이에 따라 본 발명에서 3D 오가노이드는 실제로 생체 내에서 상호 작용을 하고 있는 장기를 거의 완벽히 모사하여, 질병의 치료제 개발 및 기전 등을 관찰할 수 있는 훌륭한 모델이 될 수 있다.

[0059] 본 발명에 있어서, 상기 오가노이드는 뇌 오가노이드, 간 오가노이드, 결장 오가노이드, 소장 오가노이드, 폐 오가노이드, 내피 오가노이드, 심장 오가노이드, 신장 오가노이드, 혈관 오가노이드, 및 상피 오가노이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 뇌 오가노이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 본 발명에 있어서, 상기 오가노이드는 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포 유래일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 배아줄기세포 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이 때, 상기 배아줄기세포는 예컨대 인간 배아줄기세포 또는 마우스 배아줄기세포일 수 있으나, 이의 종류에 제한은 없다. 본 발명에 있어서, 상기 세포를 배양하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술분야에서 통상적으로 사용하는 방법을 통해 배양될 수 있다.

[0061] 본 발명에 있어서, "면역조직화학법" 또는 "면역염색"은 세포 또는 조직 등에서 특정한 단백질의 국체를 연구하는 방법으로 개발한 항체를 사용하는 염색법을 말한다. 1차 항체에 형광색소 등의 형광물질을 부가한 2차 항체를 작용시켜 콘포칼로 관찰한다. 세포 또는 조직을 고정하여 관찰하기 때문에 통상 얻게 되는 정보는 정적인 것이지만 형광색이 다른 2차 항체를 사용하면, 복수인 단백질의 공동국체도 연구할 수 있는 점에서 분자세포생물학에 있어서도 매우 중요한 기술로 인식되고 있다. 본 발명에 있어서, 상기 면역조직화학법에 사용되는 항체의 종류에는 제한이 없으며, 예컨대 본 발명의 일 실시예에 따르면 1차 항체로 뉴런의 핵 바이오마커인 NeuN에 대한 항체(항-NeuN 항체) 및 베타-III 튜블린(beta-III tubulin)에 대한 항체(항-Tuj1 항체)를 이용하고, 2차 항체로 Goat anti rabbit(alexa fluor[®] 647) 및 Goat anti mouse(alexa fluor[®] 488)을 이용할 수 있다.

[0062] 본 발명에 있어서, "항체"는 항원에 특이적으로 결합하여 인식하는 면역글로불린 유전자 또는 이의 단편에서 유래하는 프레임워크 영역을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 인식된 면역글로불린 유전자는 카파, 램다, 알파, 감마, 델타, 엡실론, 및 뮤 불변 영역 유전자를 비롯하여, 무수한 면역글로불린 가변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄는 카파 또는 램다로 분류되며, 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론으로 분류되고, 결과적으로 각각 면역글로불린 부류 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 한정한다. 전형적으로, 항체의 항원-결합 영역은 결합 특이성 및 친화성에서 가장 핵심적이게 된다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항체의 단편은 인간, 마우스, 래트, 염소, 토끼, 햄스터, 낙타 등을 포함한, 상이한 유기체에서 유래될 수 있다.

[0063] 본 발명에 있어서, "형광물질"은 특정한 파장의 빛을 흡수하여 검출 가능한 영역의 빛을 방출하는 물질을 의미하며, 예컨대 형광 단백질, 형광 화합물 등이 포함되고, 상기 검출 가능한 영역이라 함은 육안 또는 다양한 계측기기를 사용하여 방출되는 빛의 수준을 정량할 수 있는 영역을 의미한다. 본 발명에 있어서 상기 형광물질의 종류에는 제한이 없다.

[0064] 본 발명에 있어서, 상기 고정 용액에서 수크로오스(sucrose)는 농도가 20%(w/v) 내지 50%(w/v), 20%(w/v) 내지 40%(w/v), 20%(w/v) 내지 35%(w/v), 35%(w/v) 내지 40%(w/v), 또는 30%(w/v) 내지 50%(w/v)일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 수크로오스의 농도를 35%(w/v)로 하여 시료를 탈수시키고 PFA(paraformaldehyde)로 유기물간 공유결합된 시료를 좀 더 강하게 고정할 수 있으나, 상기 농도에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 본 발명에 있어서, 상기 조직 클리어링 용액에서 CHAPS는 농도가 10%(w/v) 내지 40%(w/v) 또는 10%(w/v) 내지 30%(w/v)일 수 있고, 우레아는 농도가 30%(w/v) 내지 70%(w/v) 또는 40%(w/v) 내지 60%(w/v)일 수 있고, 염화나트륨은 농도가 0.001%(w/v) 내지 1%(w/v), 0.01%(w/v) 내지 1%(w/v), 또는 0.01%(w/v) 내지 0.5%(w/v)일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 상기 조직 클리어링 용액은 20%(w/v)의 CHAPS, 50%(w/v)의 우레아를 포함할 수 있고, 0.1%(w/v)의 염화나트륨을 포함하여 삼투압에 의한 조직의 변형과 ion strength를 안정화시켜 시료에 있는 형광 물질의 변성을 최소화 할 수 있으나, 상기 농도에 한정되는 것은 아니다.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 세척 용액에서 아지드화나트륨(sodium azide)은 농도가 0.001%(w/v) 내지 1%(w/v), 0.01%(w/v) 내지 1%(w/v), 또는 0.01%(w/v) 내지 0.5%(w/v)일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 상기 세척 용액은 0.1%(w/v)의 아지드화나트륨(sodium azide)을 포함하여 투명화 후 탈수된 오가노이드 시료에

최대 30%까지 함수율을 증가시킨 후 15%를 탈수하여 조직에 붙어있는 이미징에 방해되는 유기물을 세척할 수 있으나, 상기 농도에 한정되는 것은 아니다.

[0067] 본 발명에 있어서, 상기 마운팅 용액에서 CHAPS는 농도가 20%(w/v) 내지 60%(w/v) 또는 30%(w/v) 내지 50%(w/v)일 수 있고, 우레아(urea)는 농도가 10%(w/v) 내지 50%(w/v) 또는 20%(w/v) 내지 50%(w/v)일 수 있고, 염화나트륨(NaCl)은 농도가 0.001%(w/v) 내지 1%(w/v), 0.01%(w/v) 내지 1%(w/v), 또는 0.01%(w/v) 내지 0.5%(w/v)일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 상기 마운팅 용액의 굴절률을 1.45로 맞추기 위해 각각 40%(w/v), 40%(w/v)의 CHAPS 및 우레아를 포함할 수 있으며, 0.1%(w/v)의 염화나트륨(NaCl)을 포함할 수 있으나, 상기 농도에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 본 발명의 일 실시예에서는, 오가노이드의 투명화를 위한 고정 용액, 조직 클리어링 용액, 세척 용액, 및 마운팅 용액을 포함하는 오가노이드의 투명화 용액 키트를 제조하였으며(실시예 1 및 표 1 참조), 이를 이용하여 오가노이드를 투명화 할 경우 투명도가 높은 것을 확인함으로써 상기 제조한 투명화 용액 키트의 조성이 오가노이드 투명화 및 3차원 형광 이미징을 위한 최적의 조건임을 확인하였다 (실시예 2 참조).

[0069] 본 발명의 다른 실시예에서는, 상기 투명화 용액 키트를 이용하여 오가노이드를 투명화하고 면역염색을 실시한 결과, 높은 해상도의 3차원 면역염색 이미지를 획득할 수 있음을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0070] 본원 명세서 전체에서 "포함하는" 이라는 용어가 사용될 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.

[0071] 또한, 본 발명에서 "~으로 이루어진" 이라는 용어는 "포함하는" 이라는 용어의 바람직한 실시양태인 것으로 간주된다.

[0073] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0075] **실시예 1. 고정 용액, 조직 클리어링 용액, 세척 용액, 및 마운팅 용액의 제조**

[0076] 오가노이드의 투명화를 위해 필요한 고정 용액(fixing solution), 조직 클리어링 용액(tissue clearing solution), 세척 용액(washing solution), 및 마운팅 용액(mounting solution)을 제조하여 이들을 포함하는 오가노이드 투명화 용액 키트를 제조하였으며, 각 용액의 구성 성분은 하기 표 1에 나타내었다.

[0077] 구체적으로, 오가노이드 시료를 PFA(paraformaldehyde)로 고정시키고 유기물간 공유결합된 시료를 좀 더 강하게 고정시키기 위해, 농도가 35%(w/v)인 수크로오스(sucrose)를 구성성분으로 하는 고정 용액(fixing solution)을 제조하였다.

[0078] 또한, 삼투압에 의한 조직의 변형과 ion strength를 안정화시켜 오가노이드 시료에 있는 형광 물질의 변성을 최소화 하기 위해, 20%(w/v) CHAPS(3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트) 및 50%(w/v) 우레아(urea)에 0.1%(w/v) 농도의 염화나트륨(NaCl)을 추가하여, 본 발명의 조직 클리어링 용액(tissue clearing solution)을 제조하였다.

[0079] 이어서, 투명화 후 탈수된 오가노이드 시료에 최대 30%까지 함수율을 증가시킨 후 15%를 탈수하여 오가노이드 시료에 붙어있는 이미징에 방해되는 유기물을 세척시킬 수 있도록 인산완충식염수(phosphate buffer saline; PBS)에 0.1%(w/v)의 아지드화나트륨(sodium azide)을 첨가하여 세척 용액(washing solution)을 제조하였다.

[0080] 또한, 40%(w/v)의 CHAPS(3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트), 40%(w/v) 우레아(urea), 및 0.1%(w/v) 염화나트륨(NaCl)으로 마운팅 용액(mounting solution)을 제조하여 굴절률을 1.45로 맞추었다.

표 1

[0081]

	구성	구성 성분
1	Fixing solution	Sucrose(35%(w/v))
2	Tissue clearing solution	CHAPS(20%(w/v)), Urea(50%(w/v)), NaCl(0.1%(w/v))
3	Washing solution	PBS, sodium azide(0.1%(w/v))

4	Mounting solution	CHAPS(40%(w/v)), Urea(40%(w/v)), NaCl(0.1%(w/v))
---	-------------------	--

[0083] 실시예 2. 오가노이드 투명화 및 우수한 3차원 이미지 획득을 위한 용액의 최적의 배합 조건 확인

[0084] 상기 실시예 1에서 제조한 고정 용액, 조직 클리어링 용액, 세척 용액, 및 마운팅 용액을 각각 이용하여 오가노이드를 투명화하였다.

[0085] 구체적으로, 배아줄기세포 유래 세포를 170일 동안 배양하여 제조한 뇌 오가노이드를 이용하여 실험을 진행하였으며, 오가노이드 시료를 1 X PBS로 4℃에서 20분동안 3회에 걸쳐 세척한 다음, 고정 용액(fixing solution)에 넣고 4℃/50 rpm에서 침전될 때까지 밤새 진탕 배양(shaking incubation)하였다. 침전된 상기 오가노이드 시료를 조직 클리어링 용액(tissue clearing solution)에 넣고 37℃/50 rpm으로 1일 동안 진탕 배양하고 세척 용액으로(washing solution) 4℃에서 1시간씩 3회 세척하였다. 상기 세척이 끝난 오가노이드 시료는 마운팅 용액(mounting solution)에 넣고 37℃/50 rpm으로 최소 12시간 이상 진탕 배양하였다.

[0086] 상기 과정을 통해 투명화한 오가노이드를 관찰한 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 상기 실시예 1에서 제조한 오가노이드 투명화 용액을 사용한 경우(우측 도면) 투명화 하기 전보다(좌측 도면) 높은 투명도로 오가노이드가 투명화된 것을 확인하여, 상기 표 1에 나타난 용액의 조성이 오가노이드 투명화 및 3차원 형광 이미지 획득을 위한 최적의 조건임을 확인하였다.

[0088] 실시예 3. 면역조직화학법에 의한 3차원 이미지 획득

[0089] 1차 항체로 뉴런의 핵 바이오마커인 NeuN에 대한 항체(항-NeuN 항체) 및 베타-III 튜불린(beta-III tubulin)에 대한 항체(항-Tuj1 항체)를 이용하고, 2차 항체로 Goat anti rabbit(alexa fluor[®] 647)(Jackson, Fab) 및 Goat anti mouse(alexa fluor[®] 488)(Jackson, Fab)을 이용하여 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

[0090] 구체적으로, 오가노이드 시료를 1 X PBS로 4℃에서 20분씩 3회에 걸쳐 세척한 다음, 상기 실시예 1에서 제조한 고정 용액(fixing solution)에 넣고 4℃/50 rpm에서 침전될 때까지 밤새 진탕 배양(shaking incubation)하였다. 침전된 상기 오가노이드 시료를 조직 클리어링 용액(tissue clearing solution)으로 42℃/50 rpm에서 3일 동안 배양한 다음, 세척 용액(washing solution)으로 4℃에서 1시간씩 3번 세척하고, 다시 한번 더 조직 클리어링 용액(tissue clearing solution)으로 42℃/50 rpm에서 3일 동안 반응시켰다. 그런 다음, 항체가 잘 침투할 수 있도록, 0.2% Triton X-100 및 20% DMSO가 포함된 1 X TBS로 permeabilization 과정을 37℃/50 rpm에서 3일 동안 진행하였다. 상기 과정을 마친 시료에 1차 항체로 0.2% Tween20 및 5% DMSO가 포함된 1 X TBS 용액에 1:100으로 희석시킨 항-NeuN 항체 + 항-Tuj1 항체를 처리하여 37℃/50 rpm에서 4일 동안 배양한 후, 1 X TBS 용액으로 4℃에서 20분씩 3회에 걸쳐 세척하였다. 그리고 나서, 2차 항체로 0.2% Tween20 및 5% DMSO가 포함된 1 X TBS 용액에 1:100으로 희석시킨 Goat anti rabbit(alexa fluor[®] 647) 및 Goat anti mouse(alexa fluor[®] 488)을 처리하고 37℃/50 rpm에서 4일 동안 배양한 후, 다시 1 X TBS 용액으로 4℃에서 20분씩 3회에 걸쳐 세척하였다. 세척 후 세포 내 핵은 1:50으로 희석된 DAPI를 4℃에서 1시간 동안 처리하여 염색하였고, 또 다시 1 X TBS 용액으로 4℃에서 20분씩 3회에 걸쳐 세척하였다. 상기 과정을 마친 시료에 마운팅 용액을 처리하고 37℃에서 3일 동안 배양하여 고정시킨 다음, 공초점 현미경(confocal microscope) 촬영을 통해 면역염색 결과를 관찰하였다.

[0091] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, NeuN 및 β III tubulin이 각각 붉은색, 녹색 형광으로 선명하게 나타난 것을 확인하였다.

[0092] 이로부터 상기 표 1에 나타난 본 발명의 투명화 용액을 오가노이드를 면역염색 하는데 사용할 수 있으며, 상기 용액을 이용하여 오가노이드를 면역염색 할 경우 선명한 3차원 형광 이미지를 획득할 수 있음을 알 수 있었다.

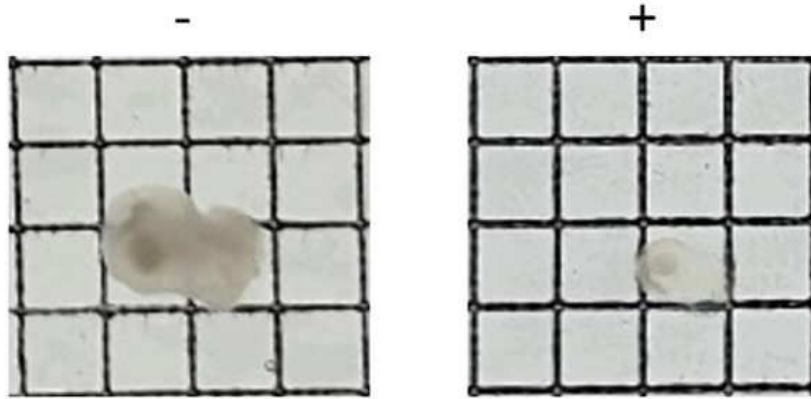
[0094] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로

이해해야 한다.

도면

도면1

Tissue Clearing



도면2

