

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0073756 (43) 공개일자 2016년06월27일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 21/3563 (2014.01) G01N 21/59 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)	(71) 출원인 한밭대학교 산학협력단 대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동)	(72) 발명자 신상모 대전광역시 유성구 노은동로 111 열매마을10단지 아파트 1003동 206호
(21) 출원번호 10-2014-0182467 (22) 출원일자 2014년12월17일 심사청구일자 2014년12월17일	(74) 대리인 김중호, 이은철	

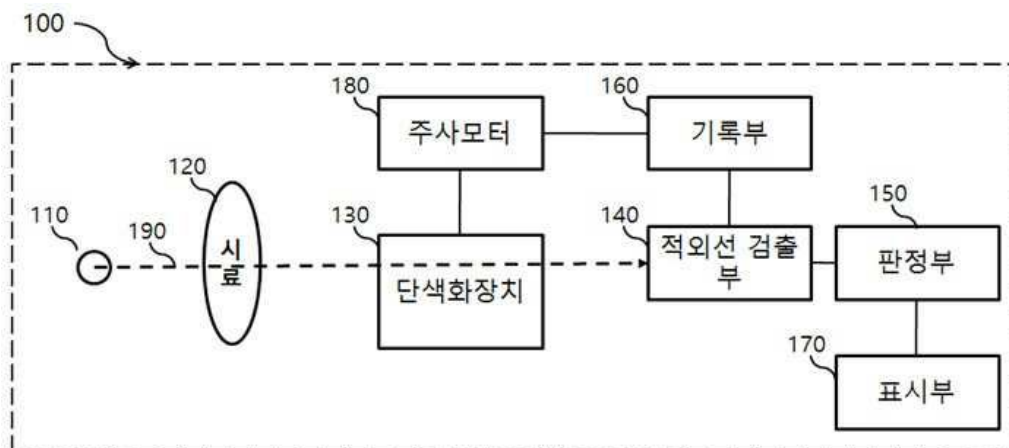
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 유기물의 존재 또는 생물의 생사 측정 장치 및 방법

(57) 요약

본 발명은 적외선흡수분광분석을 이용하여 유기물의 존재나 생물(세포나 조직)의 생사를 측정하기 위한 장치 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 측정장치는 시료에 적외선을 조사하는 적외선 광원과, 상기 시료에서 투과 또는 반사된 적외선을 검출하는 적외선 검출부와, 상기 검출된 적외선을 이용하여 상기 시료의 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하고, 상기 식별된 아미드 적외선 흡수 피크로부터 상기 시료 내 유기물의 존재 또는 생물의 생사를 판단하는 판정부 포함한다. 본 발명은 시약을 사용하지 않고, 측정이 간단하며, 정량이 가능하고, 동일 시료의 세포 또는 조직의 존재 여부 및 생사 변화 과정을 연속적으로 측정할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2005-2000222

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 사이토믹스기반진단 및 분자감지기술개발사업

연구과제명 세포의 물리적 특성 연구 및 이에 기반한 무표지 측정 방법 연구 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한밭대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

적외선 흡수흡광 분석을 통해 유기물의 존재 또는 생물의 생사를 측정하는 장치에 있어서,
시료에 적외선을 조사하는 적외선 광원과,
상기 시료에서 투과 또는 반사된 적외선을 검출하는 적외선 검출부와,
상기 검출된 적외선을 이용하여 상기 시료의 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하고, 상기 식별된 아미드 적외선 흡수 피크로부터 상기 시료 내 유기물의 존재 또는 생물의 생사를 판단하는 판정부를 포함하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
상기 아미드 적외선 흡수 피크는 단백질의 아미드 I, 아미드 II, 아미드 III 적외선 흡수 피크 중 적어도 하나인 것을 특징으로 하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 존재 여부로 상기 시료 내 유기물의 존재를 판단하는 것을 특징으로 하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 위치로 상기 시료 내 생물의 생사를 판단하는 것을 특징으로 하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치.

청구항 5

제 4 항에 있어서,
상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 최대값의 파수값으로 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 위치를 측정하는 것을 특징으로 하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치.

청구항 6

제 1 항에 있어서,
상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 변화로 상기 시료 내 생물의 생사를 판단하는 것을 특징으로 하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 변화는 1640 내지 1660 cm^{-1} 의 파수 범위에서 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하고, 사전에 정해진 시간 후 1610 내지 1640 cm^{-1} 의 파수 범위에서 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하여 피크의 이동을 확인하는 것을 특징으로 하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치.

청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 최대값의 파수값의 변화로 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 변화를 측정하는 것을 특징으로 하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치.

청구항 9

제 6 항에 있어서,

상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크에서의 특정 파수값의 세기의 변화로 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 변화를 측정하는 것을 특징으로 하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 판정부는 1600 내지 1700 cm^{-1} 의 파수 범위에서 상기 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하는 것을 특징으로 하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 적외선 광원은 1600 내지 1700 cm^{-1} 의 파수 범위의 적외선만 출력하는 것을 특징으로 하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치.

청구항 12

적외선 흡수흡광 분석을 통해 유기물의 존재 또는 생물의 생사를 측정하는 방법에 있어서,

시료에 적외선을 조사하는 단계와,

상기 시료에서 투과 또는 반사된 적외선을 검출하는 단계와,

상기 검출된 적외선을 이용하여 상기 시료의 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하는 단계와,

상기 식별된 아미드 적외선 흡수 피크로부터 상기 시료 내의 유기물의 존재 또는 생물의 생사를 판단하는 단계를

포함하는 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유기물의 존재나 생물의 생사를 측정하는 장치 및 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 적외선 흡수분광분석을 이용하여 간단한 측정 과정을 통해 유기물의 존재나 생물(세포나 조직)의 생사를 측정할 수 있는 장치 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유기물의 존재나 생물의 사멸 여부를 측정하는 것은 생물학에서 중요한 부분이며, 신약개발 또는 치료기술개발에 있어 핵심적이다. 전 세계의 생물학 연구실, 병원 또는 제약회사 등에서 세포사멸의 측정을 위해 사용하는 MTT (Tetrazolium-based colorimetric) 검색법은 마이크로플레이트 리더 장비를 이용하여 시료를 간단히 빠르고 객관성 높게 판독할 수 있어 세포사멸 검색법으로서 널리 사용되고 있다. 또한 MTT의 변형 색소인 XTT, MTS 등을 이용한 방법 또한 사용되고 있다. 다른 방법은 세포사멸 관련 단백질의 발현량을 형광염색 후 형성된 이미지를 촬영하고 이를 바탕으로 각 세포별 흡광도를 정량적으로 분석하는 세포사멸 정량분석법과 함께 세포를 떼어내 용해하여 단백질을 분리한 다음 특정 단백질의 발현량을 특수 단백질 검사(Western blot)방법으로 상대적인 발현량의 변화를 측정한다. 보다 간편한 방법은 OD₆₀₀을 측정하는 것으로 600 nm 대역의 스펙트럼 흡수량을 이용하여 미생물의 사멸을 측정하는데 주로 이용하고 있다.

[0003] 전통적으로 세포사멸을 측정하는 방법은 다음과 같은 단점을 가지고 있다. MTT 분석법은 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트라졸리움(tetrazolium)을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT 포자잔(formazan (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide))으로 환원시키는 세포내 미토콘드리아의 활성을 측정하는 검사법으로써 다양한 화학물질의 독성 뿐만 아니라 세포사멸 측정 시험하는 데에 널리 이용된다. 이 기술은 최소한 물리적 처리로 재현성 있는 광학 농도를 얻을 수 있기 때문에 많이 사용된다. 하지만 세포 밖의 무생물적인 요인들이 테트라졸리움염(tetrazolium salts)의 환원 과정에 영향을 미치는 경우 분석결과에 치명적인 오류가 발생할 수 있다. 이와 같이 세포사멸 측정은 비용이 드는 염색시약을 사용하고, 측정 시간과 노동력이 많이 소요된다. 또한, 염색하는 방법에 따라 염색되는 부위가 달라질 수 있으며 정량이 쉽지 않은 문제점이 있다. 특히 염색된 시료로부터 시간의 경과에 따른 사멸과정을 볼 수 없어, 동일 시료가 아닌 복수의 시료를 만들어서 시간의 경과에 따라 다른 시료를 염색해서 세포 시료를 측정하는 간접적인 방법을 사용해야 한다. 특히 유체 세포측정법(Flow Cytometry, FACS)은 형광 시약을 이용한 시료 표지를 수반하고 부착세포들을 플레이트(plate) 표면에서 떼어낸 후 분석해야하는 비가역적인 전처리가 필요하므로 부착세포의 성장 및 사멸 과정 모니터링시에 어느 정도의 불가피한 오류를 수반하게 된다. 마지막으로 상기 언급한 특수 단백질 검출 검사법을 사용하는 경우 많은 시료와 실험절차를 준비 및 수행해야 하는 단점이 있었다.

[0004] 생물 시료 상태에 대해 분광학적 방법으로 측정하는 선행 기술의 예로서, 일본 등록특허공보 특허 제3712132호(발명의 명칭 : 生物學的材料の特性の分光學的決定)이 있는데, 이 기술에서는 특정한 활성화제를 접촉시키고 그 효과에 대해 적외선분광 분석을 하며 세포기능 향상여부를 확인하기만 했을 뿐, 세포사멸과 관련된 적외선 스펙트럼의 변화에 대해서는 확인한 바가 없다는 한계점이 있다.

[0005] 본 발명에서 연구자들은 이러한 기존 측정방법과 분광학적 분석방법의 문제점들을 최대한 극복하기 위해, 유기물의 존재 및 생물체의 생사 전후에 변화하는 적외선 흡수스펙트럼의 특성을 이용하여 간단한 방법으로 유기물의 존재나 생물(세포나 조직)의 생사를 측정하기 위한 장치 및 그 측정방법을 개발하여 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 국제등록특허공보 92/14134 (1992.08.20.).
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허공보 1272884 (2013.06.03.).

(특허문헌 0003) 일본 등록특허공보 3712132 (2005.11.02.).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서 본 발명은 세포나 조직을 포함하는 생물체의 생사 확인을 위해, 시약을 사용하지 않거나 최소한으로 사용하는 측정 장치 및 방법을 제공하는 것을 일 목적으로 한다.
- [0008] 또한 본 발명은 간단한 측정 과정을 통해 유기물의 존재 또는 생물의 생사를 측정할 수 있는 장치 및 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [0009] 또한 본 발명은 생물체의 사멸 여부를 확인하는 것을 넘어 정량이 가능한 측정 장치 및 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0010] 또한 본 발명은 동일 시료의 세포 변화 과정을 연속적으로 측정할 수 있는 측정 장치 및 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명은 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치에 있어서, 시료에 적외선을 조사하는 적외선 광원과, 상기 시료에서 투과 또는 반사된 적외선 스펙트럼을 검출하는 적외선 검출부와, 상기 검출된 적외선 스펙트럼을 이용하여 상기 시료의 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하고, 상기 식별된 아미드 적외선 흡수 피크로부터 상기 시료 내 유기물의 존재 또는 생물의 생사를 판단하는 판정부를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0012] 바람직하게는, 상기 아미드 적외선 흡수 피크는, 단백질의 아미드 I, 아미드 II, 아미드 III 적외선 흡수 피크 중 적어도 하나 이상의 적외선 흡수 피크일 수 있다. 상기 생물은, 동물, 식물, 미생물에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 존재 여부로 상기 시료 내 유기물의 존재를 판단한다. 상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 위치로 상기 시료 내 생물의 생사를 판단할 수 있다. 상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 최대값의 파수값으로 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 위치를 측정할 수 있다. 또한 상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 변화로 상기 시료 내 생물의 생사를 판단할 수 있다. 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 변화는 1640 내지 1660 cm^{-1} 의 파수 범위에서 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하고, 사전에 정해진 시간 후 1610 내지 1640 cm^{-1} 의 파수 범위에서 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하여 피크의 이동을 확인하여 판단할 수 있다. 또한 상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 최대값의 파수값의 변화로 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 변화를 측정할 수 있다. 또한 상기 판정부는 상기 아미드 적외선 흡수 피크에서의 특정 파수값의 세기의 변화로 상기 아미드 적외선 흡수 피크의 파수값 변화를 측정할 수 있다.
- [0014] 바람직하게는, 상기 판정부는 1600 내지 1700 cm^{-1} 의 파수 범위에서 상기 아미드 적외선 흡수 피크를 식별한다. 상기 적외선 광원은 1600 내지 1700 cm^{-1} 의 파수 범위의 적외선만 출력한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정방법에 있어서, 시료에 적외선을 조사하는 단계와, 상기 시료에서 투과 또는 반사된 적외선 스펙트럼을 검출하는 단계와, 검출된 스펙트럼을 이용하여 상기 시료의 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하는 단계와, 상기 식별된 아미드 적외선 흡수 피크로부터 상기 시료 내의 유기물의 존재 또는 생물의 생사를 판단하는 단계를 포함하는 것을 다른 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0016] 상기와 같은 본 발명에 따르면, 시약을 사용하지 않고, 측정이 간단하며, 정량이 가능하고, 동일 시료의 세포

또는 조직의 존재 여부 및 생사 변화 과정을 연속적으로 측정할 수 있는, 유기물의 존재나 생물(세포나 조직)의 생사를 측정하기 위한 장치 및 그 측정방법을 개발함으로써 기존 방법의 단점으로 지적되었던 비용, 노동력의 소모, 재현성의 문제, 정량의 어려움, 시간의 경과에 따른 측정이 불과했던 점을 효과적으로 극복할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 유기물의 존재 또는 생물(세포나 조직)의 생사를 측정하는 전용 장치의 구성도이다.
- 도 2는 전용 장치 또는 기존 적외선 분광분석기를 이용해, 유기물 존재 또는 생물의 생사를 측정하는 방법에 대한 순서도이다.
- 도 3은 돼지고기, 돼지 껍질 및 생채 생체조직에 대해 가열한 후 해당 시료에 대한 적외선 흡수분광분석 결과이다.
- 도 4는 미생물 세균에 대해 가열 살균 및 항생제 투여를 한 후 해당 시료에 대한 적외선 흡수분광분석 결과이다.
- 도 5는 정상, 암 또는 악성 유방 세포에 대해 가열한 후 해당 시료에 대한 적외선 흡수분광분석 결과이다.
- 도 6은 포도상구균에 대해 가열 살균 및 항생제(카나마이신) 처리를 한 후 해당 시료에 대한 적외선 흡수분광분석 결과이다.
- 도 7은 환자로부터 확보한 대장균에 대해 항생제(엠포실린)를 처리한 후 해당 시료에 대한 적외선 흡수분광분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 실시예들을 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0019] 실시예 1. 생체조직의 가열

- [0020] 돼지고기(대형마트, 한국), 돼지 껍질(대형마트, 한국) 및 생채(대형마트, 한국) 시료를 각각 10 g씩 준비하여 각 시료를 채취하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, USA)에서 피크를 측정한다. 각 시료를 실험용 고온반응기(FINEPCR, 한국)에 올려놓고 95°C의 온도 조건에서 30 분간 가열하였다. 가열이 완료된 각 시료를 다시 채취하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, USA)에서 피크를 측정한다.

- [0021] 도 3에 도시된 바와 같이, 돼지고기 시료를 가열한 경우 α -helix rich의 파수에서 β -sheet rich의 파수로 피크의 이동이 일어났음을 확인하였다. 돼지 껍질 시료의 경우, 가열하기 전에 이미 Amide I 피크가 이미 이동되어 있음을 확인하였고, 상기 돼지고기 시료에 비해 피크 이동의 범위가 좁은 것을 확인하였다. 생채 시료의 경우에도 상기 돼지고기 시료와 마찬가지로 Amide I 피크의 이동이 일어남을 확인하였는데, 이는 어류인 생채의 단백질과 육상 포유류인 돼지고기의 단백질의 변화과정에 유사성이 있음을 의미한다.

- [0022] 적외선은 자외선 가시선에서 거론된 전자 전이를 일으킬 정도로 충분한 큰 에너지를 갖지 못한다. 따라서 적외선의 흡수는 여러 가지 진동 상태(vibration state)와 회전 상태(rotation state) 사이에 작은 에너지 차가 존재하는 분자화합종에만 한정하여 일어난다. 적외선을 흡수하기 위하여 분자는 진동이나 회전운동의 결과로 쌍극자 모멘트(dipole moment)의 알짜 변화를 일으켜야 한다. 이러한 상황에서 복사선의 교류 자기장은 분자와 상호 작용하고, 그 운동 중 한 개의 진폭을 변화 시킨다. 쌍극자 모멘트는 두 개의 전하중심 사이의 전하차이와 그 거리의 크기에 의해 결정된다. 분자가 진동하면 쌍극자 모멘트의 주기적인 변동이 일어나고, 복사선의 전기장과 상호 작용하는 장이 수립된다. 만일 복사선의 주파수가 분자의 자연 진동수와 정확하게 일치하면 에너지의 알짜 전이가 일어나서 분자진동의 진폭을 변화 시킨다. 결과적으로 복사선의 흡수가 일어난다. 마찬가지로, 질량중심 주위에서 비대칭 분자의 회전이 일어나면 복사선과 상호 작용할 수 있는 주기적인 쌍극자변동을 유발한다.

- [0023] 정제된 한 종류의 단백질 2차 구조(주로 α -helix와 β -sheet)를 알기 위해 주로 적외선 흡광분석방법을 사용한

다. 확보한 스펙트럼 중 아미드 I 피크(파수 $1600\sim 1700\text{cm}^{-1}$)의 형태 변화나 디콘볼루션(deconvolution)을 통해 2차 구조의 구성비를 알 수 있다. 본 발명에서는 한 종류의 단백질 대신 배양된 세포나 생체조직을 적외선 흡광 분석하고 아미드 피크 I을 분석함으로써 세포나 조직의 사멸에 따라 아미드 피크 I의 형태가 변화하거나 위치가 이동한다는 점을 발견하였다. 이를 이용하여 세포나 조직의 사멸을 측정할 수 있다.

[0024] 적외선 분석용 시료는 기체, 액체, 또는 고체이다. 적외선용 기체 용기는 NaCl, KBr, CaF_2 로 된 원통으로 제작할 수 있다. 액체 시료를 측정하려면 순수 액체의 얇은 필름이나, 액체를 NaCl, KBr, CaF_2 의 판 사이에 주입하여 측정할 수 있다. 이 때 적외선용 시료 용기는 수분과 접촉하지 않도록 하여야 한다. 고체 시료를 측정하기 위하여는 압력을 걸어 KBr 정제로 만들거나 고분자량의 액체와 페이스트(paste) 상으로 하여 측정한다. 적외선 측정용 시료 용기는 광로 투과 길이가 짧고, 또 적외선 흡수 띠는 비교적 작은 물 흡광계수를 갖는다. 따라서, 측정 가능한 흡광도를 얻기 위하여는 흡수 성분의 높은 농도의 용액을 사용하는 것이 바람직하다. 측정 농도는 시료에 따라 다르며 제한되지는 않으나 대략 0.5 내지 10% 정도의 농도가 적외선 스펙트럼의 측정에 사용될 수 있다.

[0025] **실시예 2. 대장균(*Escherichia coli*) 가열 살균 및 항생제(엠포실린) 투여**

[0026] 가. 대장균 세포주의 가열 살균

[0027] 대장균(ATCC25922, 전남대학교 화순병원 진단검사실, 한국)을 LB(Luria-Bertani) 배지에 접종하여 37 °C상에서 16~18 시간 동안 배양한 후 샘플을 채취하여 하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, USA)에서 피크를 측정한다. 시료를 고압증기 멸균기 장치(JEIO TECH, 한국)에 넣고 121 °C의 온도 조건에서 15 분간 가열 살균하였다. 가열 살균이 완료된 각 시료를 다시 채취하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, USA)에서 피크를 측정한다.

[0028] 나. 대장균 세포주에 엠포실린(ampicillin) 투여

[0029] 대장균(ATCC25922, 전남대학교 화순병원 진단검사실, 한국)을 LB 배지에 접종하여 37 °C상에서 16~18 시간 동안 배양한 후 샘플을 채취하여 하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, USA)에서 피크를 측정한다. 상기 시료에 50 µg/ml 농도의 엠포실린을 20 mL의 새로운 LB 배지에 처리하였다. 항생제 처리한 시료를 다시 채취하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, USA)에서 피크를 측정한다.

[0030] 도 4에 도시된 바와 같이, 대장균 시료를 가열 살균한 경우 Amide I 피크가 이동되었음을 확인하였고, 항생제 엠포실린을 처리한 대장균 시료의 경우 상기 가열 살균한 경우에 비교할 수 있을 범위의 피크 이동이 일어나지는 않았으나, 마찬가지로 Amide I 피크의 이동이 측정되었다.

[0031] **실시예 3. 정상, 암 또는 악성 유방 세포의 가열**

[0032] 유방암에 걸리지 않은 여성, 유방암에 걸린 여성 및 악성 유방암에 걸린 여성의 30~60대 여성 3명을 대상으로 하여, 각각 유방 세포를 채취하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, USA)에서 피크를 측정한다. 각 시료를 실험용 고온반응기(FINEPCR, 한국)에 올려놓고 60°C의 온도 조건에서 30분간 가열하였다. 가열이 완료된 각 시료를 다시 채취하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, USA)에서 피크를 측정한다.

[0033] 도 5에 도시된 바와 같이, 각 유방 세포를 가열한 경우 상기 실시예 1 및 실시예 2의 가열 실험 결과에서와 마찬가지로 Amide I 피크의 이동이 일어났음을 확인하였다.

[0034] **실시예 4. 포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 가열 살균 및 항생제(카나마이신) 투여**

[0035] 가. 포도상구균 세포주의 가열 살균

[0036] 포도상구균(ATCC29213, 전남대학교 화순병원 진단검사실, 한국)을 TSB(tryptic soy broth) 배지에 접종하여 37 °C상에서 16~18 시간 동안 배양한 후 샘플을 채취하여 하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, US

A)에서 피크를 측정한다. 시료를 고압증기 멸균기 장치(JEIO TECH, 한국)에 넣고 121 °C의 온도 조건에서 15 분간 가열 살균하였다. 가열 살균이 완료된 각 시료를 다시 채취하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, USA)에서 피크를 측정한다(도 6).

[0037]

나. 포도상구균 세포주에 카나마이신(kanamycin) 투여

[0038]

포도상구균(ATCC29213, 전남대학교 화순병원 진단검사실, 한국)을 TSB 배지에 접종하여 37 °C상에서 16~18 시간 동안 배양한 후 샘플을 채취하여 하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, USA)에서 피크를 측정한다. 상기 시료를 둘로 나누어 각각 10 µg/ml, 50 µg/ml 농도의 카나마이신을 20 mL의 새로운 TSB 배지에 처리하였다. 항생제 처리한 시료를 다시 채취하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies)에서 피크를 측정한다.

[0039]

도 6에 도시된 바와 같이, 포도상구균 시료를 가열한 경우 Amide I 피크가 이동되었음을 확인하였고, 항생제 카나마이신을 처리한 포도상구균 시료의 경우 대장균에 항생제를 처리한 경우와 달리 Amide I 피크의 이동이 측정되지 않음을 확인하였다. 이는 대장균에 투여한 항생제는 세포막을 파괴하는 작용을 수행하나, 포도상구균에 투여한 항생제의 경우 세포 내로 침투하여 그 작용점이 다르기 때문이다. 상기 결과에서 피크의 이동은 측정되지 않았으나, 투여한 카나마이신의 농도에 따라 피크의 형태가 각각 달라짐을 확인하였다.

[0040]

실시예 5. 항생제 내성 유/무 대장균에 항생제(엠포실린) 투여

[0041]

전남대학교 화순병원에 입원한 환자들을 대상으로, 대장균 세포주를 분리하여 항생제 엠포실린에 대해 내성 유/무를 기준으로 대장균 세포주를 분리하였다. 기 시료에 각각 50 µg/ml 농도의 엠포실린을 20 mL의 새로운 LB배지에 처리하였다. 항생제 처리한 시료를 다시 채취하여 적외선 흡수분광분석기(Agilent Technologies, USA)에서 피크를 측정한다.

[0042]

도 7에 도시된 바와 같이, 대장균 시료들을 각각 가열 살균하였을 때와 달리 항생제 엠포실린 내성 대장균 세포주의 경우 Amide I 피크의 이동이 없음을 확인하였고, 항생제 엠포실린 감수성을 보유한 대장균 세포주의 경우 Amide I 피크의 이동이 측정됨을 확인하였다.

[0043]

실시예 6. 적외선흡수분광분석을 이용한 유기물의 존재나 생물(세포나 조직)의 생사를 측정하기 위한 전용 장치의 구성

[0044]

적외선 흡수분광분석에서 생물(세포나 조직)의 생사를 측정하기 위해, 적외선 흡수 스펙트럼의 흡수 피크 중 아미드 피크, 그 중에서도 아미드 I(Amide I)의 피크 특성인 피크의 장파장 이동(red shift) 현상을 이용할 수 있음을 확인하여, 이를 이용해 유기물의 존재 또는 생물(세포나 조직)의 생사를 측정하는 전용 장치(100)를 도 1에 도시된 바와 같이 구성할 수 있다.

[0045]

적외선 흡수분광분석을 위해서는, 시료에 적외선을 조사하는 적외선 광원(110)과, 시료에서 투과 또는 반사된 적외선 스펙트럼을 검출하는 적외선 검출부(140)가 필수적으로 필요하다. 또한 검출된 적외선 스펙트럼을 이용하여 시료의 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하고, 식별된 아미드 적외선 흡수 피크로부터 시료 내 유기물의 존재 또는 생물의 생사를 판단하는 판정부(150)가 전용 장치에 필요하다.

[0046]

전용 장치에는 필수적으로 필요한 구성요소 외에도, 광원(110)에서 방출된 빛을 한정된 영역의 과장으로 분산시키고 특정한 파장의 복사선만을 선택적으로 적외선 검출부(140)에 도달하게 만드는 단색화장치(130), 단색화장치 및 기록부와 연결된 상태로 파장의 변화에 맞게 일치되도록 하는 주사모터(180), 적외선 검출부로부터 얻은 투과율(transmittance)을 측정하여 기록하는 기록부(160), 적외선 검출 스펙트럼을 표시하는 표시부(170) 및 시료를 담는 시료용기(120)을 더 갖출 수 있다.

[0047]

적외선 광원(110)에서 방출된 적외선(190)은 시료용기(120)에 담긴 시료를 통과하거나 표면에서 반사된 후, 단색화장치(130)를 통과하여 특정 주파수의 적외선만이 적외선 검출부(140)에 도달한다. 검출된 적외선 데이터는 주파수별로 합쳐져서 적외선 흡수 스펙트럼으로 만들어져 표시부(170)에 전시되고 기록부(160)에 기록된다. 이때 판정부(150)는 적외선 흡수 스펙트럼에서 시료의 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하고, 식별된 아미드 적외선 흡수 피크로부터 시료 내 유기물의 존재 또는 생물의 생사를 판단하게 된다.

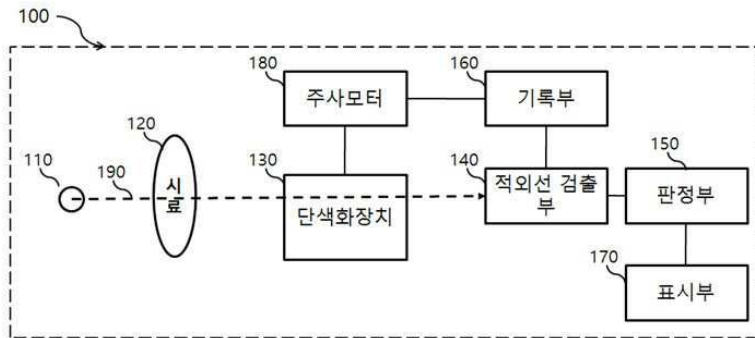
- [0048] 적외선 흡수 분광분석의 원리에 따라 전용장치(100)는, 이중 빔을 사용할 수도 있고, 단일 빔을 사용할 수도 있으며, 분산형 IR 흡수 분광분석 장치일 수도 있고, FT(푸리에변환)-IR 흡수 분광분석 장치일 수도 있다.
- [0049] 이러한 과정은 도 2에 도시된 바와 같이, 전용 장치 또는 기존의 적외선 분광분석기를 이용해, 1) 시료에 적외선을 조사하는 단계(S100), 2) 시료에서 투과 또는 반사된 적외선을 검출하는 단계(S200), 3) 검출된 적외선 스펙트럼을 이용하여 아미드 적외선 흡수 피크를 식별하는 단계(S300), 4) 식별된 아미드 적외선 흡수 피크로부터 시료 내의 유기물의 존재 또는 생물의 생사를 판단하는 단계(S400)를 거쳐 이루어진다.
- [0050] 유기물의 존재나 생물(세포나 조직)의 생사 전후에 따라 변화하는 작용기는 다수의 다양한 작용기가 있을 수 있지만, 생물체의 조직 단백질의 아미드 결합으로 인한 아미드 적외선 흡수 피크는 모든 생물 및 단백질을 포함하는 유기물에 공통적으로 나타나게 된다. 아미드 피크에는 아미드 I, 아미드 II, 아미드 III 적외선 흡수 피크가 있으며, 이들 피크 모두가 유기물의 존재나 생물(세포나 조직)의 생사 전후에 따라 변화하게 된다. 특히 그 중에서도 아미드 I(Amide I)의 피크가 두드러지고 장파장 방향으로 이동(red shift) 현상이 확인되어 이를 이용한 전용 장치 제조 및 측정방법 이용이 가능하다.
- [0051] 아미드 I(파수 $1700\sim 1600\text{cm}^{-1}$), 아미드 II(파수 $1600\sim 1500\text{cm}^{-1}$), 아미드 III(파수 $1400\sim 1200\text{cm}^{-1}$) 적외선 흡수 피크를 포함하는 아미드 피크의 특성에는 피크의 위치인 파수(wave number)값의 위치 및 크기(transmittance의 역수값)와 시간이 지난 후 변화하는 파수값의 변화가 있다. 위치와 크기 및 파수값의 변화는, 유기물 및 생물체 각각에 대해 일정한 값 또는 변화 방향을 가지는 특성이 있으므로 이를 이용해서 유기물의 양 또는 생물체의 사멸 비율을 정량적으로 측정할 수 있는 것이다.
- [0052] 상기 실시예의 결과와 같이 본 발명에서 세포나 조직에 대한 적외선흡수분광분석 방법을 사용하여, 적외선 흡수 스펙트럼의 흡수 피크 중 아미드 피크, 그 중에서도 아미드 I(Amide I)의 피크 특성인 피크의 장파장 방향으로 이동(red shift) 현상을 이용하여, 유기물의 존재나 생물(세포나 조직)의 생사를 측정하기 위한 장치 및 그 측정방법을 확립하여 본 발명을 완성하였다.

부호의 설명

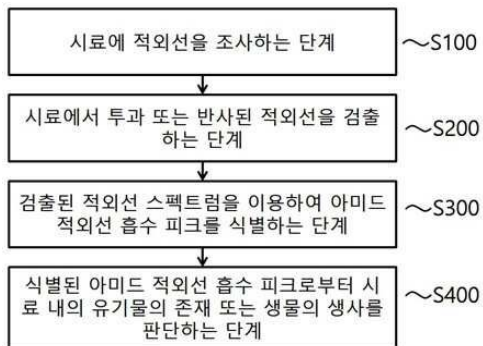
- [0053] 100 : 유기물 존재 또는 생물의 생사 측정장치
 110 : 적외선 광원
 120 : 시료 용기
 130 : 단색화장치
 140 : 적외선 검출부
 150 : 판정부
 160 : 기록부
 170 : 표시부
 180 : 주사모터
 190 : 분광분석용 적외선

도면

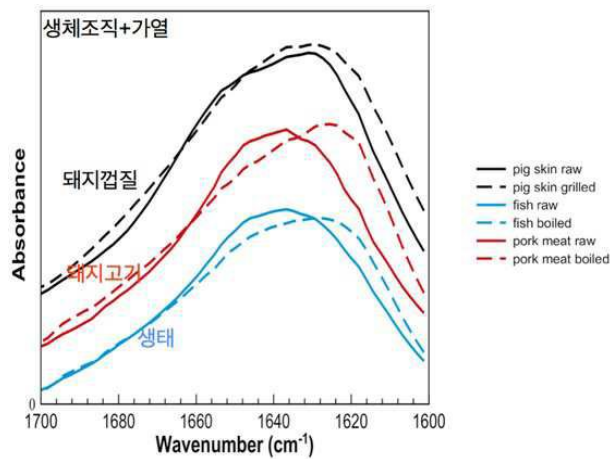
도면1



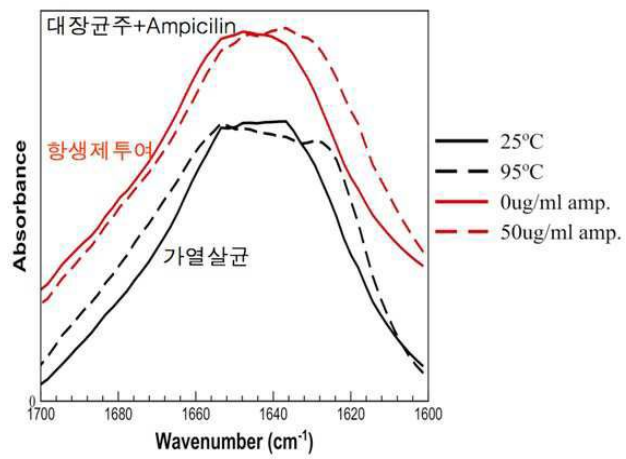
도면2



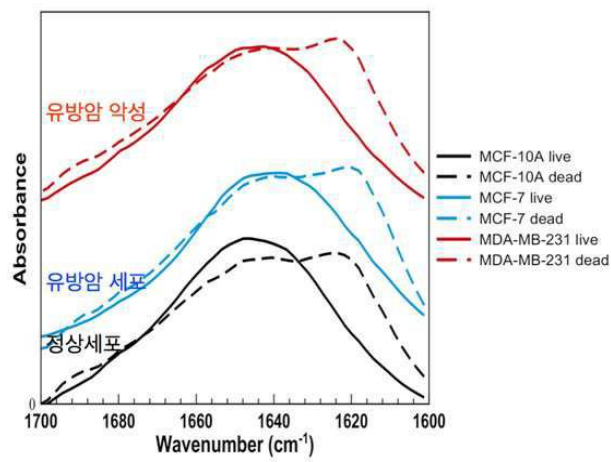
도면3



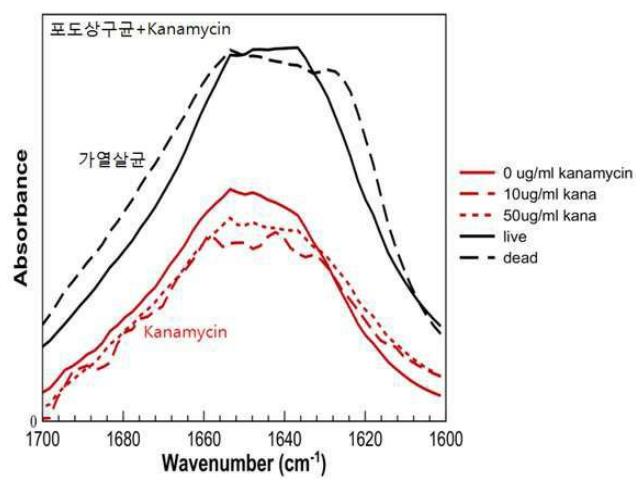
도면4



도면5



도면6



도면7

