



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0044445
(43) 공개일자 2020년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/32 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)
C12Q 1/18 (2006.01) G01N 15/02 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 23/12 (2013.01)
C12M 41/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0125218
(22) 출원일자 2018년10월19일
심사청구일자 2018년10월19일

(71) 출원인
주식회사 이지다이하텍
충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교
창업보육센터 301호(안서동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정용균
서울특별시 중랑구 봉화산로3길 62-9
김주호
경기도 용인시 기흥구 중부대로746번길 21, 201동
303호(상하동, 지식마을 진흥더루벤스)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박현규, 이성하

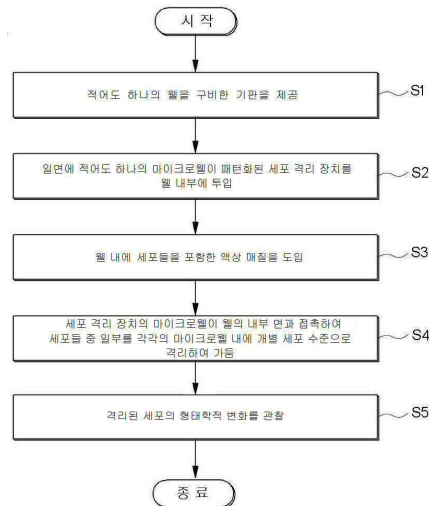
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법

(57) 요약

적어도 하나의 웰을 구비한 기판을 제공하는 단계; 일면에 적어도 하나의 마이크로웰이 패턴화된 세포 격리 장치를 상기 웰 내부에 투입시키는 단계; 상기 웰 내에 세포들을 포함한 액상 매질을 도입하는 단계; 상기 세포 격리 장치의 상기 마이크로웰이 상기 웰의 내부 면과 접촉하여 상기 세포들 중 일부를 각각의 상기 마이크로웰 내에 개별 세포 수준으로 격리하여 가두는 단계; 및 격리된 상기 세포의 형태학적 변화를 관찰하는 단계를 포함하는 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 41/38 (2013.01)

C12M 41/46 (2013.01)

C12Q 1/18 (2013.01)

G01N 15/10 (2013.01)

G01N 2015/0294 (2013.01)

G01N 2015/1006 (2013.01)

(72) 발명자

박옥

경기도 수원시 영통구 에듀타운로 65, 5206동 260
3호(이의동, 자연앤자이)

윤진식

경기도 수원시 영통구 청명북로 2, 202호(영통동)

송석홍

경기도 용인시 기흥구 용구대로2152번길 7, 104동
303호(신갈동, 고현마을고려에센스빌)

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 하나의 웰을 구비한 기판을 제공하는 단계;

일면에 적어도 하나의 마이크로웰이 패턴화된 세포 격리 장치를 상기 웰 내부에 투입시키는 단계;

상기 웰 내에 세포들을 포함한 액상 매질을 도입하는 단계;

상기 세포 격리 장치의 상기 마이크로웰이 상기 웰의 내부 면과 접촉하여 상기 세포들 중 일부를 각각의 상기 마이크로웰 내에 개별 세포 수준으로 격리하여 가두는 단계; 및

격리된 상기 세포의 형태학적 변화를 관찰하는 단계를 포함하는 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법.

청구항 2

제1 항에 있어서,

상기 기판은 상용 멀티 웰 플레이트인 것인 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법.

청구항 3

제1 항에 있어서,

상기 액상 매질은 생리활성물질을 더 포함하는 것인 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법.

청구항 4

제1 항에 있어서,

상기 세포 격리 장치는 외부 자극에 의해 부피가 변형되는 팽윤성 물질을 포함하는 것인 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법.

청구항 5

제1 항에 있어서,

상기 외부 자극에 따른 상기 팽윤성 물질의 부피 증가에 의하여 상기 마이크로웰이 패턴화된 표면이 상기 웰의 내부 면에 밀착하는 것인 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법.

청구항 6

제4 항에 있어서,

상기 팽윤성 물질은 하이드로겔인 것인 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법.

청구항 7

제1 항에 있어서,

상기 세포들의 상기 개별 세포 수준으로의 격리를 통해 상기 세포들이 상기 웰 바닥에 대해 2차원적으로 분포하는 것인 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법.

청구항 8

제1 항에 있어서,

상기 개별 세포 수준으로의 격리를 위해 상기 세포들의 농도가 제어된 것인 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법.

청구항 9

적어도 하나의 웰을 구비한 기관을 제공하는 단계;

일면에 적어도 하나의 마이크로웰이 패턴화된 세포 격리 장치를 상기 웰 내부에 투입시키는 단계;

상기 웰 내에 세포들 및 생리활성물질을 포함한 액상 매질을 도입하는 단계;

상기 세포 격리 장치의 상기 마이크로웰이 상기 웰의 내부 면과 접촉하여 상기 세포들 중 일부를 각각의 상기 마이크로웰 내에 개별 세포 수준으로 격리하여 가두는 단계; 및

격리된 상기 세포의 생리활성물질에 따른 형태학적/대사적 변화를 시간 경과에 따라 관찰하여 세포독성, 세포 증식/생존/사멸, 또는 세포내 대사물질량 변화 여부를 결정하는 세포반응 검사 단계를 포함하는 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법.

청구항 10

적어도 하나의 웰을 구비한 기관을 제공하는 단계;

일면에 적어도 하나의 마이크로웰이 패턴화된 세포 격리 장치를 상기 웰 내부에 투입시키는 단계;

상기 웰 내에 미생물 세포들, 영양성분 및 항생제를 포함한 액상 매질을 도입하는 단계;

상기 세포 격리 장치의 상기 마이크로웰이 상기 웰의 내부 면과 접촉하여 상기 미생물 세포들 중 일부를 각각의 상기 마이크로웰 내에 개별 세포 수준으로 격리하여 가두는 단계; 및

격리된 상기 미생물 세포의 형태학적 변화를 시간 경과에 따라 관찰하여 최소억제농도(MIC)를 결정하는 단계를 포함하는 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법.

청구항 11

세포의 분석을 위한 세포 격리 장치로서,

상기 세포 격리 장치는 외부 자극에 의해 부피의 변화를 갖는 팽윤성 물질로 이루어진 몸체부; 및 상기 몸체부의 적어도 일면에 패턴화된 적어도 하나의 마이크로웰을 포함하며,

적어도 하나의 웰을 구비한 기관의 웰 내부에 삽입될 수 있는 크기를 가지되,

상기 외부 자극에 의한 상기 팽윤성 물질의 부피팽창으로 상기 웰 내부의 적어도 일면에 상기 마이크로웰의 입구 부분이 밀착됨으로써 상기 세포를 상기 마이크로웰 내부에 개별 세포 수준으로 격리하여 가둘 수 있는 것인 세포 격리 장치.

청구항 12

제11 항에 있어서,

상기 외부 자극은 전기, 빛, 소리, 열, 전기, 자기 및 특정 물질로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상인 것인 세포 격리 장치.

청구항 13

제11 항에 있어서,

상기 팽윤성 물질은 하이드로겔인 것인 세포 격리 장치.

청구항 14

제11 항에 있어서,

상기 몸체부의 상부 표면이 오목한 형상을 갖는 것인 세포 격리 장치.

청구항 15

제11 항에 있어서,

상기 몸체부는 팽윤 과정에서 상기 웰의 내측 벽에 밀착되는 상단부; 및 상기 내측 벽으로부터 이격된 공간부를 갖도록 상기 상단부의 직경보다 축소된 직경을 갖는 하단부를 포함하는 것인 세포 격리 장치.

청구항 16

제11 항에 있어서,

상기 상단부의 측부에 상기 팽윤성 물질의 팽윤 과정에서 상기 공간부에 생성된 기포를 배출하기 위한 통기부를 더 구비한 것인 세포 격리 장치.

청구항 17

제11 항에 있어서,

상기 마이크로웰이 상기 하단부의 바닥에 형성된 것인 세포 격리 장치.

청구항 18

적어도 하나의 웰을 구비한 기관; 및

상기 웰 내에 삽입되어 배치된 제11 항 내지 제17 항 중 어느 한 항에 따른 세포 격리 장치를 포함하는 세포의 격리 및 형태학적 분석용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 명세서에 개시된 기술은 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포 군체(cell colonies)를 단일 세포들로 분리하고 세포들의 형태학적 변화를 효과적으로 분석하기 위한 방법, 장치 및 키트 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

세포의 성장변화, 형태 또는 움직임을 효과적으로 관찰하기 위해서는 세포를 고정시키는 과정이 필수적이다. 특히 부유하는 세포들을 단일 세포 단위로 고정시키고 그 세포의 형태변화 및 움직임을 시간대별로 효과적으로 관찰하기 위해 세포고정화기술이 쓰이고 있다. 현재까지 세포를 관찰 고정시키는 기술은 세포크기의 미세유체 제작하여 미세유체 속으로 세포를 흘려보내 세포를 고정 시키는 방법, 미세유체의 크기를 공기압을 이용하여 임의적으로 미세유체 간격을 좁게 만들어 세포를 고정시키는 방법, 아가로즈를 포함한 하이드로겔과 세포를 섞어 세포를 하이드로겔 매트릭스 안으로 고정시키는 방법 등이 시도되고 있다. 그러나, 미세유체를 이용한 방법은 미세유체에 세포를 흘려보내거나 미세유체에 공기압을 제공할 수 있는 정밀하고 비싼 펌프시스템이 필수적으로 필요하여 그 구입비용도 비싸고 실험절차가 복잡해 세포형태 분석실험에 많은 제약이 있다. 세포와 하이드로겔을 섞고 하이드로겔 매트릭스 안에 세포고정을 시키는 방법은 세포가 전반적으로 뭉쳐 자라기 때문에 다양한 세포 형태학적 분석에는 적합하지 않다. 또한 이러한 기존의 세포 고정 방법들은 하이쓰루풋(high throughput)의 실험을 구현하기에 많은 장애를 가지고 있다. 따라서 기존 시행되고 있는 세포고정기술의 문제점들인 1) 별도의 시스템 필요, 2) 높은 가격, 3) 실험절차의 복잡성, 4) 쓰루풋(throughput)의 한계 등을 극복하고 개선된 형태학적/세포내 대사적 분석 방법을 제공하는 새로운 기술이 요구된다.

[0003]

한편 세포 고정 방법 및 형태학적 분석 방법의 유용한 적용분야 중 하나로 항생제 감수성 시험이 있다. 패혈증은 박테리아 감염에 의한 증상으로서 생명을 위협하는 요인이고 병원의 중환자실에 보내진 많은 수의 환자가 사망에 이르고 있다. 패혈증 사망률의 급격한 증가에 의해 신속 진단과 함께 적절한 치료의 중요성이 커지고 있다. 항생제 감수성 시험이란 치료에 사용되는 항생제에 대한 병원균의 저항성 또는 감수성을 진단하는 방법이다. 그렇지만, 기존의 항생제 감수성 시험은 18-24h의 작업 시간이 걸리는 문제가 있어 패혈증에 신속히 대응하지 못하고 있다. 장시간의 감수성 작업 시간 때문에 최초의 항생제 처치는 내과의사의 신중함에 따라 결과가 달라지고 있어, 항생제의 오남용에 대한 가능성이 남아있다. 항생제 감수성 시험 방식이 몇 시간 내에 항생제 저항성 및 감수성을 정확하게 진단한다면, 패혈증과 오진에 의한 환자의 사망률은 의료계에서 받아들일 수 있는 범위에서 감소할 수 있다.

[0004]

수많은 항생제 감수성 시험방법이 연구되고 있지만, 분자 및 세포 배양 감수성 시험방법이 일반적이다. 분자 감

수성 시험방법은 몇 시간 내 결과를 얻을 수 있으나, PCR 기기와 같은 분석 장비와 제한된 조건 하에서만 결과를 얻을 수 있고, 의료계에서 널리 사용되기 위해서는 훨씬 많은 연구가 필요하다. 반면, 세포배양방법은 정확하고, 의료 분야에서 널리 사용되고 있어, 표준적 항생제 감수성 시험 방법으로 알려져 있다. 세포배양방법에서 가장 일반적으로 적용되는 항생제 감수성 시험 과정은 액체 마이크로희석방법이다. 이 전통적인 항생제 감수성 시험 방법은 배양 웰의 탁도 변화를 측정하여 적합한 항생제의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration (MIC))를 결정하는 액체 마이크로희석 방법이다. 탁도는 세포 성장에 따라 달라지는 광학밀도(Optical Density (OD))에 의해 간접적으로 측정하고, 이 광학밀도는 배양웰에 있는 박테리아 세포들의 농도에 비례한다. 그렇지만, 이 광학밀도(OD) 평가는 박테리아 세포들의 농도가 현저히 낮을 때에는 박테리아 세포 개체수의 폭발적 증가에 둔감하다. 그리하여, 항생제의 특정 농도에서 박테리아 세포들이 자라는지 자라지 않는지 정확하게 구별하는 데 18-24 시간이 소요된다.

[0005] 전통적인 항생제 감수성 시험 방식의 한계를 극복하기 위하여, 박테리아 성장 초기를 빠르게 진단하기 위한 여러 방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 이전 연구자들은 박테리아 세포 성장을 감지하기 위해 유체 채널 또는 화학신호를 방출하는 구적을 사용하는 다수의 방법을 연구하였다. 이들 방식은 박테리아 세포 성장 초기에 박테리아 변이를 조사하는 것을 가능하게 하나, 보조적인 장비와 정교한 공정을 필요로 한다. 더욱이, 이론적으로 박테리아 세포 성장을 검출하는 가장 신속한 방법은 단일 박테리아 세포들(single bacterial cells)을 관찰하는 것이나, 하지만 앞서 방식들은 개별 박테리아 세포들의 분열을 관찰할 수 없었다. 그러므로, 연구자들은 배양액에서 박테리아 개별 세포들을 분리하여 현미경으로 관찰하고, 그 개별 세포의 형태학적 변화를 분석하고자 하였다. 대부분의 박테리아 세포들이 배양액 내부에서 이동하므로 박테리아 세포 고정화는 단일 세포 형태의 검출에 결정적인 역할을 한다. 박테리아 세포 고정화에 대한 우수한 종래 연구가 지금까지 수행되어 왔지만, 이들 방법은 추가적인 공정 및 성가시고 비싼 장비를 필요로 하였다. 예를 들면, 항생제 투여 조건 하에서 단일 세포 형태를 관찰하기 위해 마이크로채널 시스템을 이용하여 박테리아를 고정하는 방식이 요구되었다.

발명의 내용

[0006] 본 명세서에 개시된 기술의 일 측면에 의하면, 적어도 하나의 웰을 구비한 기관을 제공하는 단계; 일면에 적어도 하나의 마이크로웰이 패턴화된 세포 격리 장치를 상기 웰 내부에 투입시키는 단계; 상기 웰 내에 세포들을 포함한 액상 매질을 도입하는 단계; 상기 세포 격리 장치의 상기 마이크로웰이 상기 웰의 내부 면과 접촉하여 상기 세포들 중 일부를 각각의 상기 마이크로웰 내에 개별 세포 수준으로 격리하여 가두는 단계; 및 격리된 상기 세포의 형태학적 변화를 관찰하는 단계를 포함하는 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법이 제공된다.

[0007] 본 명세서에 개시된 기술의 다른 측면에 의하면, 적어도 하나의 웰을 구비한 기관을 제공하는 단계; 일면에 적어도 하나의 마이크로웰이 패턴화된 세포 격리 장치를 상기 웰 내부에 투입시키는 단계; 상기 웰 내에 세포들 및 생리활성물질을 포함한 액상 매질을 도입하는 단계; 상기 세포 격리 장치의 상기 마이크로웰이 상기 웰의 내부 면과 접촉하여 상기 미생물 세포들 중 일부를 각각의 상기 마이크로웰 내에 개별 세포 수준으로 격리하여 가두는 단계; 및 격리된 상기 세포의 생리활성물질에 따른 형태학적/대사적 변화를 시간 경과에 따라 관찰하여 세포독성, 세포 증식/생존/사멸, 또는 세포내 대사물질량 변화 여부를 결정하는 세포반응 검사 단계를 포함하는 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법이 제공된다.

[0008] 본 명세서에 개시된 기술의 다른 측면에 의하면, 적어도 하나의 웰을 구비한 기관을 제공하는 단계; 일면에 적어도 하나의 마이크로웰이 패턴화된 세포 격리 장치를 상기 웰 내부에 투입시키는 단계; 상기 웰 내에 미생물 세포들, 영양성분 및 항생제를 포함한 액상 매질을 도입하는 단계; 상기 세포 격리 장치의 상기 마이크로웰이 상기 웰의 내부 면과 접촉하여 상기 미생물 세포들 중 일부를 각각의 상기 마이크로웰 내에 개별 세포 수준으로 격리하여 가두는 단계; 및 격리된 상기 미생물 세포의 형태학적 변화를 시간 경과에 따라 관찰하여 최소억제농도(MIC)를 결정하는 단계를 포함하는 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법이 제공된다.

[0009] 본 명세서에 개시된 기술의 또 다른 측면에 의하면, 세포의 분석을 위한 세포 격리 장치로서, 상기 세포 격리 장치는 외부 자극에 의해 부피의 변화를 갖는 팽윤성 물질로 이루어진 몸체부; 및 상기 몸체부의 적어도 일면에 패턴화된 적어도 하나의 마이크로웰을 포함하며, 적어도 하나의 웰을 구비한 기관의 웰 내부에 삽입될 수 있는 크기를 가지되, 상기 외부 자극에 의한 상기 팽윤성 물질의 부피팽창으로 상기 웰 내부의 적어도 일면에 상기 마이크로웰의 입구 부분이 밀착됨으로써 상기 세포를 상기 마이크로웰 내부에 개별 세포 수준으로 격리하여 가둘 수 있는 것인 세포 격리 장치가 제공된다.

[0010] 본 명세서에 개시된 기술의 또 다른 측면에 의하면, 적어도 하나의 웰을 구비한 기관; 및 상기 웰 내에 삽입되

어 배치된 상술한 세포 격리 장치를 포함하는 세포의 격리 및 형태학적 분석용 키트가 제공된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법의 일 구현예를 나타낸 공정순서도이다.

도 2는 본 명세서에 개시된 기술의 일 구현예에 따른 하이드로겔 구조체를 이용하여 세포 군체를 개별 세포 수준으로 격리시킨 후 형태학적 변화를 연속적으로 관찰하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 3은 간단한 하이드로겔 박테리아 분리기구의 제조 공정을 나타낸 것이다.

도 4는 세포 격리 장치의 일 구현예를 나타낸 개략사시도이다.

도 5는 세포 격리 장치의 구조를 하단부의 직경에 따른 차이를 비교하여 나타낸 것이다.

도 6은 실험을 통해 디자인을 최적화하여 제조된 하이드로겔 구조체들의 사진을 나타낸다.

도 8은 여러 농도별 앰피실린 항생제 하의 박테리아 크기 및 개수를 분석하여 대장균과 포도상구균에 대한 MIC를 결정하는 실험 결과이다.

도 9는 여러 농도별 클로람페니콜 항생제 하의 박테리아 크기 및 개수를 분석하여 대장균과 포도상구균에 대한 MIC를 결정하는 실험 결과이다.

도 10은 메티실린-저항성 포도상구균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA))의 앰피실린 항생제의 최소저해농도(MIC)를 결정하기 위해 다양한 앰피실린 농도로 실험한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, "또는"은 "및/또는"을 의미한다. 더욱이, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라, 다른 형태, 예를 들어, "가지는", "이루어지는" 및 "구성되는"은 제한적이지 않다.

본 명세서에서 "세포"는 동물 세포, 식물 세포 및 미생물 세포를 포함한다.

본 명세서에서 사용된 용어 "미생물"은 모든 그람 음성(Gram -) 및 그람 양성(Gram +) 박테리아, 진균 및 고생균 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 미생물은 엔테로코쿠스(*Enterococcus*), 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 살모넬라(*Salmonella*), 대장균(*Escherichia coli*), 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*), 락토코쿠스(*Lactococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 엔테로박테리아(*Enterobacteriaceae*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로비덴시아(*Providencia*), 프로테우스(*Proteus*), 모르가넬라(*Morganella*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 부르크홀데리아(*Burkholderia*), 스테노트로포모나스(*Stenotrophomonas*), 알카리제네스(*Alcaligenes*) 및 미코박테리움(*Mycobacterium*)로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 더욱 구체적으로, 상기 미생물은 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 클레브시엘라속(*Klebsiella* species), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 슈도모나스 애틀루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 엔테로박터속(*Enterobacter* species)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 명세서에서 용어 "생리활성물질"은 항생제, 항암제, 면역억제제와 같은 약물, 영양성분, 세포분비물, 신호전달물질, 바이러스, 세포, micro RNA, 단백질, 항원, 항체, DNA 등 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어 "항생제"는 아미카신(*Amikacin*), 아목시실린(*Amoxicillin*), 앰피실린(*Ampicillin*), 아즈트레오남(*Aztreonam*), 벤질페니실린(*Benzylpenicillin*), 칼부라닌산(*Clavulanic Acid*), 세파졸린(*Cefazolin*), 세페핌(*Cefepime*), 세포타심(*Cefotaxime*), 세포테탄(*Cefotetan*), 세폭시틴(*Cefoxitin*), 세프포독심(*Cefpodoxime*), 세프트라지딤(*Ceftazidime*), 세프트리악손(*Ceftriaxone*), 세푸록심(*Cefuroxime*), 시프로플록사신(*Ciprofloxacin*), 달포프리스틴(*Dalfopristin*), 도리페넴(*Doripenem*), 다프토마이신(*Daptomycin*), 에르타페넴(*Ertapenem*), 아리트로마이신(*Erythromycin*), 젠타마이(*Gentamicin*), 이미페넴(*Imipenem*), 레보플록사신(*Levofloxacin*), 리네졸리드(*Linezolid*), 메로페넴(*Meropenem*), 미노사이클린(*Minocycline*), 목시플록사신(*Moxifloxacin*), 니트로푸란토인(*Nitrofurantoin*), 노르플록사신(*Norfloxacin*), 피페라실린(*Piperacillin*), 퀴누프리스틴(*Quinupristin*), 리팜피신(*Rifampicin*), 스트렙토마이신(*Streptomycin*), 설박탐(*Sulbactam*), 설파메톡시졸(*Sulfamethoxazole*), 테리트로마이신(*Telithromycin*), 테트라사이클린(*Tetracycline*), 티카르실린

(Ticarcillin), 티제사이클린(Tigecycline), 토브라마이신(Tobramycin), 트리메토프림(Trimethoprim) 및 반코마이신(Vancomycin)으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0017] 본 명세서에서 사용된 용어 "세포의 성장 변화"는 세포의 생리활성물질에 대한 반응을 의미하는 것으로 분열(dividing), 무-변화(no-change), 필라멘트 형성(filament formation) 및 팽창 형성(swelling formation)으로 분류될 수 있다. 상기 "세포의 형태학적 변화"는 용어 "세포의 성장 변화 및 움직임 변화"와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다.
- [0018] 상기 "분열(dividing)"은 무-항생제 및 항생제 내성 조건에서의 세포가 2개의 세포들로 나뉘어짐으로써 미생물 세포의 수의 증가뿐만 아니라, BMD 실험의 OD 값이 증가하는 것을 의미한다.
- [0019] 상기 "무-변화(no-change)"는 세포가 생리활성물질에 감수성(susceptible)을 나타내어 성장하지 않음을 의미한다.
- [0020] 상기 "필라멘트 형성(filament formation)"은 세포가 분열되지는 않으나, 길이성장을 하고 있음을 의미한다. 상기 필라멘트 형성은 β -lactam계 항생제에 대한 미생물의 반응을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 필라멘트 형성은 β -lactam계 항생제 중에서 페넬류 약물에 대한 그람-음성 박테리아의 반응을 제외한, 미생물의 반응을 포함할 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 필라멘트 형성은 β -lactam계 항생제 중에서 페넬류 약물에 대한 슈도모나스 에어루지노사(Pseudomonas aeruginosa) 또는 대장균(Escherichia coli)의 반응을 제외한, 미생물의 반응을 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 "팽창 형성(swelling formation)"은 세포가 분열되지는 않으나, 부풀면서 성장하고 있음을 의미한다. 상기 팽창 형성은 β -lactam계 항생제 중에서 페넬류 약물에 대한 미생물 반응을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 팽창 형성은 이미페넴 또는 메로페넴에 대한 그람-음성 박테리아의 반응을 포함할 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 팽창 형성은 이미페넴 또는 메로페넴에 대한 슈도모나스 에어루지노사(Pseudomonas aeruginosa) 및 대장균(Escherichia coli)의 반응을 포함할 수 있다.
- [0022] 이하 본 명세서에 개시된 기술에 대하여 도면을 참조하여 보다 상세하게 설명하고자 한다.
- [0023] 본 명세서에 개시된 기술의 일 측면에 의하면, 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법이 제공된다. 도 1은 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법의 일 구현예를 나타낸 공정순서도이다. 도 1을 참조하면, 단계 S1에서 적어도 하나의 웰을 구비한 기판을 제공한다.
- [0024] 상기 기판은 상용 멀티웰 플레이트일 수 있다. 화학적, 생화학적, 및/또는 생물학적 분석에 있어서 멀티-웰 플레이트는 다수의 샘플을 처리하고 분석하기 위한 표준 도구이다. 멀티-웰 플레이트는 다양한 형태, 크기 및 모양을 취할 수 있는데, 일반적으로 표준 크기 및 모양으로 만들어지고, 웰들의 표준 배열을 가진다. 웰들의 표준 배열은 6-웰 플레이트(3x2의 웰 배열), 12-웰 플레이트(4x3의 웰 배열), 24-웰 플레이트(6x4의 웰 배열), 96-웰 플레이트(12x8의 웰 배열), 384-웰 플레이트(24x16의 웰 배열), 및 1536-웰 플레이트(48x32의 웰 배열)에서 발견되는 것을 포함하며, 기타 다양한 방식의 상용 멀티-웰 플레이트가 있다. 본 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법은 상용 멀티-웰 플레이트를 이용함으로써 종래의 다양한 생물학적 분석 기술과 용이하게 호환될 수 있다.
- [0025] 단계 S2에서 일면에 적어도 하나의 마이크로웰이 패터닝된 세포 격리 장치를 상기 웰 내부에 투입시킨다. 상기 마이크로웰은 상기 세포들을 개별 세포 수준으로 격리하여 가두기 위한 것으로, 대상 샘플의 종류나 분석 목적에 따라 마이크로웰의 갯수나 규격을 정할 수 있다. 예를 들어 상기 마이크로웰의 갯수는 상기 기판의 각 웰에 대하여 1 내지 100만개가 대응되도록 할 수 있다. 또한 상기 마이크로웰의 규격은 2 내지 900 μ m의 직경과 2 내지 900 μ m의 깊이를 가질 수 있다. 상기 마이크로웰의 모양은 특별히 제한되지 않고 원형, 타원형, 다각형 등 목적에 따라 다양하게 설계될 수 있다.
- [0026] 상기 세포 격리 장치는 외부 자극에 의해 부피가 변형되는 팽윤성 물질을 포함하는 것일 수 있다. 비용의 절감과 제작의 편의성을 위해 상기 세포 격리 장치는 몸체부의 거의 전부가 팽윤성 물질로 구성되도록 제작될 수 있다.
- [0027] 상기 팽윤성 물질은 생체적합성이나 부피팽창능력 등을 고려할 때 하이드로겔인 것이 바람직하다. 이때 상기 외부 자극은 상기 팽윤성 물질에 인가되어 부피 변화를 줄 수 있는 에너지나 물질이면 특별히 제한되지 않지만, 빛, 소리, 열, 전기, 자기, 및 특정 물질로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상에 의한 자극일 수 있다. 여기서 특정 물질은 기체, 액체, 고체상의 물질일 수 있으며, 예를 들어 물, 유기 용매, 산 또는 염기 등일 수 있다. 바람직하게는 상기 팽윤성 물질이 하이드로겔인 경우 상기 외부 자극은 바람직하게는 수분일 수 있다. 상기

수분은 세포 배양 배지로부터 공급된 것일 수 있다.

- [0028] 상기 하이드로겔은 유기 폴리머(천연 또는 합성)가, 공유결합, 이온 결합 또는 수소결합을 통해 가교 하고, 수 분자를 포착하고 겔을 형성하는 3차원 개방 격자 구조를 만들어 낼 때 형성되는 물질을 가리킨다. 상기 하이드로겔은 세포에 대해서 독성이 없고, 또한 포착된 세포로의 생존 능력을 유지하기 위한 산소 및 영양소의 충분한 확산을 가능하게 하는 겔을 형성하는 폴리머를 가리킨다.
- [0029] 상기 하이드로겔은 천연 재료 또는 합성 재료일 수 있으며, 적합한 하이드로겔의 재료의 예로서, 알지네이트 등의 다당, 콜라겐, 키토산(chitosan), 황산 셀룰로오스나트륨, 젤라틴 및 아가로오스, 수용성 폴리아크릴레이트, 폴리(포스파젠), 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 폴리(알킬렌 옥사이드), 폴리(비닐아세테이트), 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 및 각각의 코폴리머 및 블렌드가 포함될 수 있다. 상기 하이드로겔은 원료 단량체를 광경화하여 제조할 수 있다. 예를 들어 수용성 폴리아크릴레이트 하이드로겔은 폴리(에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트를 수중에서 개시제로 광경화하여 제조된 것일 수 있다.
- [0030] 단계 S3에서 상기 웰 내에 세포들을 포함한 액상 매질을 도입한다. 상기 액상 매질은 영양성분이나 항생제와 같은 생리활성물질을 더 포함한 것일 수 있다.
- [0031] 상기 세포들은 상기 액상 매질 내에 1 내지 10^{10} CFU/ml의 농도로 존재할 수 있다.
- [0032] 단계 S4에서 상기 세포 격리 장치의 상기 마이크로웰이 상기 웰의 내부 면과 접촉하여 상기 세포들 중 일부를 각각의 상기 마이크로웰 내에 개별 세포 수준으로 격리하여 가둔다.
- [0033] 상기 마이크로웰이 상기 웰의 내부 면, 예를 들어 바닥 면과 접촉함으로써 부유하는 세포들이 상기 마이크로웰의 좁은 공간 안에 가두어지게 됨으로써 실질적으로 떠돌지 않고 고정화되는 효과를 갖게 된다. 결국 시간별 세포의 형태학적 변화의 관찰이 용이해질 수 있다. 상기 마이크로웰이 상기 웰의 내부 면과 접촉하는 방식은 다양한 수단에 의해 달성될 수 있지만, 예를 들어 상기 외부 자극에 따른 상기 팽윤성 물질의 부피 증가에 의하여 상기 마이크로웰이 패턴화된 표면이 상기 웰의 내부 면에 밀착할 수 있다. 상기 부피 증가는 처음의 부피에 비해 1.01 내지 50 배 증가된 것일 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 "개별 세포 수준"이란 것은 세포의 형태학적 변화를 방해받지 않고 측정할 수 있는 수준을 의미한다. "개별 세포 수준"은 형태학적 변화 추적의 용이성을 고려할 때 상기 마이크로웰과 상기 웰 사이의 격리된 공간에 의해서 상기 세포들이 1개 내지 1,000개, 바람직하게는 1개 내지 10 개 존재하는 정도를 의미한다. 바람직하게는 상기 개별 세포 수준으로의 격리를 위해 상기 세포들의 농도가 제어될 수 있다.
- [0035] 상기 세포들의 상기 개별 세포 수준으로의 격리를 통해 상기 세포들이 상기 웰 바닥에 대해 2차원적으로 분포하는 것일 수 있다. 종래의 아가로즈를 이용한 3차원적인 고정화 방식(US9133498, US9920351 등)에 비해 현미경 관찰시 초점을 맞추기 용이할 수 있다.
- [0036] 각 마이크로웰 당 격리되는 세포들의 개수는 액상 매질 내 세포들의 농도, 마이크로웰 패턴의 갯수나 규격, 세포 격리 장치의 디자인 등 다양한 변수에 따라 결정되고 제어될 수 있다. 세포들의 군체로부터 개별 세포 수준으로의 격리를 통해 각 마이크로웰 내에는 동종 또는 이종의 단일 세포들 또는 이종의 단일 세포들을 용이하게 관찰할 수 있다.
- [0037] 단계 S5에서 격리된 상기 세포의 형태학적 변화를 관찰한다. 상기 마이크로웰 내의 대상을 관찰할 수 있도록 외부 광원으로부터 빛이 투과할 수 있도록 상기 세포 격리 장치의 몸체부의 적어도 일부가 광학적으로 투명한 재질로 이루어질 수 있다.
- [0038] 관찰을 위해 광학 측정장치가 사용될 수 있다. 상기 광학 측정장치는 광학 현미경과 같은 관찰도구 외에도 CCD 또는 CMOS 카메라와 같은 이미지화 시스템을 포함할 수 있다. 상기 광학 측정장치는 또한 초점을 맞추고 빛을 이미지화하는 데 필요한 렌즈, 조명 및 빛 가이드 등을 포함할 수 있다. 또한 상기 광학 측정장치는 카메라에 의해 관찰된 이미지 데이터를 가공 및 분석하기 위한 이미지 처리 시스템을 포함할 수 있다. 상기 광학 측정장치는 검사 과정에 나타난 세포들의 형태학적 변화를 빠른 속도로 기록하고 분석하여 검사 결과를 얻는다.
- [0039] 본 명세서에 개시된 기술의 다른 측면에 의하면, 격리된 상기 세포의 생리활성물질에 따른 형태학적/대사적 변화를 시간 경과에 따라 관찰하여 세포독성, 세포 증식/생존/사멸, 세포내 대사물질량 변화 여부 등을 결정하는 세포반응 검사 단계를 포함하는 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법이 제공된다. 이를 위해서 상술한 세포 격리 장치를 적어도 하나의 웰을 구비한 기관의 상기 웰 내부에 투입한 후 상기 웰 내에 세포들 및 생리활성물질을

포함한 액상 매질을 도입한다. 다음 상기 미생물 세포들 중 일부를 각각의 상기 마이크로웰 내에 개별 세포 수준으로 격리하여 가둔 후 격리된 상기 세포의 생리활성물질에 따른 형태학적/대사적 변화를 시간 경과에 따라 관찰하여 세포반응 검사를 수행한다. 이때 격리된 세포의 관찰을 돕기 위해 세포염색약 등의 시약을 사용할 수 있다.

[0040] 본 명세서에 개시된 기술의 또 다른 측면에 의하면, 격리된 세포의 형태학적 변화를 시간 경과에 따라 관찰하여 최소억제농도(MIC)를 결정하는 단계를 포함하는 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법이 제공된다. 이를 위해서 상술한 세포 격리 장치를 적어도 하나의 웰을 구비한 기관의 상기 웰 내부에 투입한 후 상기 웰 내에 미생물 세포들, 영양성분 및 항생제를 포함한 액상 매질을 도입한다. 다음 상기 미생물 세포들 중 일부를 각각의 상기 마이크로웰 내에 개별 세포 수준으로 격리하여 가둔 후 격리된 상기 미생물 세포의 형태학적 변화를 시간 경과에 따라 관찰함으로써 상기 항생제의 최소억제농도(MIC)를 결정할 수 있다.

[0041] 상기 형태학적 변화는 항생제에 대한 상기 단일 미생물 세포들의 개별적인 반응을 관찰하거나, 상기 미생물 세포들의 콜로니의 형성 여부 또는 콜로니 숫자(colony forming unit, CFU)를 관찰하는 단계를 포함할 수 있다.

[0042] 이때 상기 항생제에 대한 단일 미생물 세포들의 개별적인 반응, 콜로니 형성 여부, 또는 콜로니 숫자 (colony forming unit, CFU)를 이미징하여 얻은 이미지 분석 결과를 취득하는 단계를 더 포함할 수도 있다.

[0043] 항생제에 반응하는 미생물 세포의 형태학적 변화 분석을 이용한 항균제 감수성 검사 방법은 미생물 세포의 형태학적 변화를 시간 경과에 따라 이미징하여 분석할 수 있는데 상기 미생물 세포가 분열(dividing)하는 것으로 관찰된 경우 항균제 내성으로 판정하고, 상기 미생물 세포가 무-변화(no-change), 필라멘트 형성(filament formation) 및 팽창 형성(swelling formation)으로 관찰된 경우 항균제 감수성으로 판정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0044] 도 2는 본 명세서에 개시된 기술의 일 구현예에 따른 하이드로겔 구조체를 이용하여 세포 군체를 개별 세포 수준으로 격리시킨 후 형태학적 변화를 연속적으로 관찰하는 과정을 나타낸 모식도이다. 도 2의 (a)를 참조하면, 일반적인 96 웰 플레이트(conventional 96 well plate)를 준비한 후, 각 웰에 건조상태의 마이크로웰 패턴된 하이드로겔 구조체(microwell patterned hydrogel)를 넣는다. 다음, 도 2의 (b)를 참조하면, 건조상태의 마이크로웰 패턴된 하이드로겔 구조체(hydrogel structure)가 들어있는 각 웰에 박테리아 세포(bacterial cells) 및 영양분과 항생제가 들어있는 세포 배양 배지(culture medium)를 투입한다. 투입 초기에는 마이크로웰 패턴된 하이드로겔의 하부 마이크로웰이 아직 웰 바닥에 안착되지 못하고 약간 부유하는 상태이므로 박테리아 세포가 마이크로웰 패턴 내외로 자유로이 이동할 수 있다.

[0045] 도 2의 (c)를 참조하면, 수 초에서 수십 분이 경과하는 동안 마이크로웰 패턴된 하이드로겔이 팽윤되어 웰 내 벽에 접근한다. 그 결과 마이크로웰 패턴된 하이드로겔의 상부는 웰 내측벽에 밀착되고, 마이크로웰이 있는 하부는 웰 바닥에 안착하여 붙어있는 상태가 된다. 이때, 마이크로웰 패턴된 하이드로겔의 하부 마이크로웰 패턴 각 공간에 들어간 개별 박테리아 세포는 팽윤된 하이드로겔(swollen hydrogel)의 압력에 의해 더 이상 마이크로웰 패턴 내외로 자유로이 이동할 수가 없고 마이크로웰 패턴 영역 내에 격리된다. 하이드로겔이 완전히 팽창된 상태에서 광학 측정장치의 대물 렌즈(objective lense)를 통해 시간 경과에 따른 수시간 동안의 연속적인 박테리아의 형태학적 변화를 관찰할 수 있다. 그 결과 개별 박테리아 세포의 시간 경과에 따른 이미징(time lapse imaging) 결과를 얻을 수 있다.

[0046] 마이크로웰 패턴된 하이드로겔 구조체는 예를 들어 하기와 같은 방식으로 디자인 및 제작될 수 있다. 도 3은 간단한 하이드로겔 박테리아 분리기구의 제조 공정을 나타낸 것이다. 도 3의 (a)를 참조하면, 먼저 상부 폴리디메틸실록산(PDMS) 몰드 및 하부 PDMS 몰드를 제작하기 위하여, 3차원 프린터 및 포토리소그래피 시스템을 사용하여 상부 마스터 몰드 및 하부 마스터 몰드를 제작한다. PDMS 재료를 두 개의 몰드 기관에 붓고 구워서 상부 및 하부 PDMS 몰드를 얻는다. 점선으로 둘러싸인 원형 이미지는 하부 PDMS 몰드 표면의 확대도이다(스케일 바의 크기는 100 μ m).

[0047] 상부 마스터 몰드는 일반적인 96 웰 플레이트의 각 웰 모양에 적합한 크기와 모양으로 3차원 프린팅 시스템(3D printing system)을 이용하여 인쇄하여 제작할 수 있다. 하부 마스터 몰드는 고분자 예비중합체 (폴리우레탄 아크릴레이트, PUA 311) 및 3-(트리메톡시실릴)프로필 메타크릴레이트 코팅된 슬라이드 글라스 기관을 사용하여 포토리소그래피 시스템(photolithography system)으로 제작할 수 있다. 그런 다음, 상부 마스터 몰드 및 하부 마스터 몰드에 정밀하게 PDMS 예비중합체(prepolymer) 및 광개시제 혼합물을 정확한 양만큼 부어 광경화한 후 하룻밤 동안 실온에서 더 경화시킨다.

- [0048] 도 3의 (b)를 참조하면, 제작된 상부 PDMS 몰드(top PDMS mold) 및 하부 PDMS 몰드(bottom PDMS mold)를 합착한 후, 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트 하이드로겔 예비중합체를 합착하여 생성된 상부 및 하부 PDMS 몰드 공간에 붓고 UV 챔버에서 15분 동안 광경화한다. 새롭게 제작된 마이크로웰 패터닝 하이드로겔 구조체를 몰드 어셈블리로부터 벗겨낸 후 99% 에탄올로 세척하고, 실온에서 하룻밤 건조시킨다.
- [0049] 도 3의 (c)를 참조하면, 제조된 하이드로겔 구조체의 마이크로웰 패터닝을 주사 전자현미경(SEM)으로 확인한 결과이다. 오른쪽 이미지는 마이크로웰 패터닝들을 나타내고(스케일바 50 μ m), 왼쪽 이미지는 단일 마이크로웰의 확대도(스케일바 10 μ m)를 나타낸다.
- [0050] 본 명세서에 개시된 기술의 다른 측면에 의하면, 세포의 형태학적 분석을 위한 세포 격리 장치가 제공된다. 도 4는 세포 격리 장치의 일 구현예를 나타낸 개략사시도이다. 도 4를 참조하면, 세포 격리 장치(100)는 외부 자극에 의해 부피의 변화를 갖는 팽윤성 물질로 이루어진 몸체부(120); 및 몸체부(120)의 적어도 일면에 패터닝된 적어도 하나의 마이크로웰(미도시)을 포함한다. 세포 격리 장치(100)는 예를 들어 96 웰 플레이트와 같은 적어도 하나의 웰을 구비한 기관의 웰 내부에 삽입될 수 있는 크기를 가질 수 있다.
- [0051] 몸체부(120)는 팽윤성 상기 웰의 내측 벽에 밀착되는 상단부(121); 및 상기 내측 벽으로부터 이격된 공간부를 갖도록 상단부(121)의 직경보다 축소된 직경을 갖는 하단부(122)를 포함할 수 있다. 상기 웰의 투명한 바닥면을 통해 웰 내부를 관찰하기 용이하므로, 통상적으로 상기 마이크로웰은 하단부(122)의 바닥면(124)에 형성된 것이 바람직하다.
- [0052] 몸체부(120)의 상부 표면(123)은 특별히 그 구조가 제한되지 않지만, 바람직하게는 오목한 형상을 가질 수 있다. 상부 표면(123)이 오목한 형상을 가짐으로써 편평하거나 볼록한 형상을 가질 경우에 비해 두께가 비교적 얇은 바깥쪽 모서리 부분(125)이 존재하게 된다. 이때 외부 자극이 인가되면 바깥쪽 모서리(125) 부분의 팽윤성 물질이 부풀면서 상기 웰의 내벽을 밀착하게 되는데 상부 표면(123)이 편평한 구조나 볼록한 구조인 경우에 비해 빠르게 부풀면서 웰 내벽을 먼저 밀착하게 되고, 오목한 형상으로 말미암아 웰의 수직방향으로 부푸는 과정에서 하단부(122)의 바닥면이 웰 바닥면으로 밀착하는 방향으로의 압력이 커질 수 있다. 그 결과 마이크로웰에 의해 세포를 확실하게 격리시킬 수 있다.
- [0053] 하단부(122)의 바닥면(124) 역시 특별히 그 구조가 제한되지 않지만, 상기 웰의 바닥면과의 밀착성을 고려하고 상기 마이크로웰의 패터닝의 용이성을 고려할 때 대체로 편평한 것이 바람직하다.
- [0054] 일 구현예에서, 상기 상단부(121)의 측부에 상기 팽윤성 물질의 팽윤 과정에서 상기 공간부에 발생하는 기포를 배출하기 위한 통기구(126)를 더 구비할 수 있다.
- [0055] 상기 팽윤성 물질은 하이드로겔인 것이 바람직하다. 단일 박테리아 세포를 관찰하기 위해서 먼저 박테리아 세포 고정 필요한데 이는 예를 들어, 마이크로웰 패터닝 하이드로겔 구조체를 사용함으로써 달성될 수 있다. 마이크로웰 패터닝 하이드로겔 구조체의 직경이 2 내지 900 μ m, 바람직하게는 5 내지 100 μ m, 더 바람직하게는 10 내지 60 μ m일 수 있다. 예를 들어 96 웰 플레이트에 삽입할 경우, 40 μ m, 높이가 5 μ m 정도의 규격을 갖는 하이드로겔 구조체가 개별 박테리아 세포의 시간 경과별 광학 이미지를 분석하는 데 효과적이었다.
- [0056] 상기 외부 자극은 상기 팽윤성 물질에 인가되어 부피 변화를 줄 수 있는 에너지나 물질이면 특별히 제한되지 않지만, 빛, 소리, 열, 전기, 자기, 및 특정 물질로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상에 의한 자극일 수 있다. 여기서 특정 물질은 기체, 액체, 고체상의 물질일 수 있으며, 예를 들어 물, 유기 용매, 산 또는 염기 등일 수 있다. 바람직하게는 상기 팽윤성 물질이 하이드로겔인 경우 상기 외부 자극은 바람직하게는 수분일 수 있다. 상기 수분은 세포 배양 배지로부터 공급된 것일 수 있다. 하이드로겔에 있는 물과 고분자 혼합물의 혼합 비율에 따라 팽창 시간과 팽창 정도가 달라지므로 웰 플레이트 기관의 종류에 따라 그에 맞는 최적 비율을 구할 수 있다.
- [0057] 한편, 세포 격리 장치(100)는 상술한 바와 같이 하단부(122)의 직경이 상단부(121)의 직경보다 축소된 것이 관찰의 용이성 면에서 바람직하다. 도 5는 세포 격리 장치의 구조를 하단부의 직경에 따른 차이를 비교하여 나타낸 것이다. 도 5에서 왼쪽 그림들은 상단부와 하단부의 직경이 동일한 세포 격리 장치를 나타내고, 오른쪽 그림들은 상단부의 직경보다 하단부의 직경이 감소한 세포 격리 장치를 나타낸다. 또한 위의 그림 두 가지는 측면에서 바라본 단면도(lateral view)이고, 아래 그림 두 가지는 위에서 바라본 평면도(top view)이다.
- [0058] 도 5를 참조하면, 하이드로겔 구조체의 상부 표면의 오목한 부분에 부유하는 박테리아 세포들이 시간이 지남에 따라 침전되면서 하이드로겔 구조체의 주변부보다 중심부 쪽의 박테리아 세포들의 밀도가 점점 커질 수 있다.

또한, 상단부 모서리 부분의 경사가 매우 커서 주변부쪽은 관찰에 필요한 빛이 전파할 때 중대한 문제가 발생할 수 있다. 그 결과 중심부 및 주변부쪽에 존재하는 세포들의 관찰이 용이하지 않을 수 있다.

- [0059] 한편, 상단부와 하단부의 직경이 동일한 하이드로겔 구조체의 경우에는 팽윤시 웰의 내부 측면쪽으로 밀착될 때 지지부(fixation part) 하단 부분에 강한 압력(strong pressure)이 작용하고 대부분의 영역에 걸쳐서 약한 압력(weak pressure)이 작용하는 것을 알 수 있다(왼쪽 그림들). 그 결과 팽윤된 하이드로겔의 외곽 주변부 쪽이 웰의 바닥면과 잘 접촉되므로 가두어진 세포들이 주변부 쪽에 몰려있게 될 수 있다. 그런데 상술한 바와 같이 빛의 투과성 면에서 주변부에 위치한 세포들을 관찰하기가 용이하지 않을 수 있다.
- [0060] 반면에 하단부의 직경이 상단부보다 감소된 하이드로겔 구조체의 경우에는 팽윤시 주변부 쪽에 여분의 공간(extra space)이 생기며 강한 압력이 인가되는 부위가 중심부와 주변부 사이의 영역에 위치하고 약한 압력이 인가되는 부위는 중심부 쪽으로 한정될 수 있다. 그리하여 강한 압력이 인가되는 링 형태의 영역에 세포들이 잘 가두어질 수 있다. 이 경우 빛이 잘 투과하지 못하는 주변부와 중심부를 피하여 세포들을 가둘 수 있으므로 세포들의 형태학적 변화의 관찰이 용이할 수 있다. 측면도에서 관찰 방해영역(areas of disturbing observation)과 세포관찰이 방해받지 않는 영역(undisturbed areas to observe cells)을 점선 영역으로 표시하였다.
- [0061] 따라서 격리된 박테리아를 명확히 관찰하기 위해서는 하이드로겔의 구조를 최적화하여 웰의 바닥에 대하여 압력을 가하는 영역이 주변부 및 중심부에 해당하는 형태를 피하고 링 형태가 되게 하는 것이 바람직하다. 이를 위해 오른쪽 그림들과 같이 하이드로겔 구조체의 하단부의 직경을 감소시키면 주변부에 박테리아가 가두어지지 않는다. 가압부(pressure part)의 영역의 반경이 감소됨으로써 감소된 반경 내에서는 동일한 상단부 및 하단부 직경을 갖는 하이드로겔 구조체의 가압부보다 웰 바닥에 오히려 더 강한 압력을 가할 수 있다.
- [0062] 추가적인 장점은 하이드로겔 팽윤과정에서 웰의 바닥에 밀착되는 과정에서 발생하는 기포(air bubble)를 여분의 공간으로 빼낼 수 있어 마이크로웰이 웰 바닥에 밀착되는 데 유리할 수 있다는 것이다. 바람직하게는 상단부의 지지부 쪽에 통기부를 구비함으로써 기포가 더욱 원활하게 배출될 수 있다. 상기 통기부는 하이드로겔 상단부의 측면에 홈줄 형태로 새겨질 수 있다.
- [0063] 도 6은 실험을 통해 디자인을 최적화하여 제조된 하이드로겔 구조체들의 사진을 나타낸다. 도 6을 참조하면, 바로 세우거나 뒤집어서 세워진 다수의 하이드로겔 구조체들이 배열되어 있음을 볼 수 있다.
- [0064] 본 명세서에 개시된 기술의 또 다른 측면에 의하면, 세포의 격리 및 형태학적 분석용 키트가 제공될 수 있다. 상기 세포의 격리 및 형태학적 분석용 키트는 적어도 하나의 웰을 구비한 기판 및 상기 웰 내에 삽입되어 배치된 상술한 세포 격리 장치를 포함할 수 있다. 상기 세포 격리 장치는 상기 웰 내에서 하단부 바닥면의 마이크로웰이 상기 웰의 바닥면과 대응하도록 배치될 수 있다.
- [0065] 이러한 세포의 격리 및 형태학적 분석용 키트를 이용하면 세포를 분석하고자 하는 사용자의 편의성이 매우 증대된다. 예를 들어 사용자가 96 웰 플레이트의 각 웰들 안에 상술한 하이드로겔 구조체들이 사전에 각각 삽입된 형태의 키트를 구입한 다음 분석하고자 하는 세포들이 함유된 샘플을 적절한 반응물과 함께 웰들에 단지 주입하기만 하면 목적하는 세포들의 반응을 단 시간 내에 이끌어낼 수 있다.
- [0066] 이러한 세포의 격리 및 형태학적 분석용 키트는 항생제의 최소억제농도를 결정하는 데 매우 간편하게 이용될 수 있으며, 세포 군체들을 함유한 샘플을 영양 배지와 혼합하고 다양한 종류 및 농도의 항생제들을 세포의 격리 및 형태학적 분석용 키트의 각 웰들 안에 투입함으로써, 세포 군체들을 개별 세포 수준으로 가둔 상태로 항생제에 따른 형태학적 변화를 신속하게 볼 수 있다.
- [0067] 추가적인 장비와 공정 없이 일반적인 96 웰 플레이트에서 간단한 하이드로겔 박테리아 분리 기구를 사용하여 단일 박테리아 세포의 성장 패턴을 관찰 및 분석하기 위한 빠른 항생제 감수성 시험 배양 방식을 제공한다. 이 빠른 항생제 감수성 시험 배양 방식에서 간단한 하이드로겔 박테리아 분리 장치는 박테리아 세포를 분리하여 스트레스 없는 환경에서 박테리아 세포를 배양하기 위한 충분한 공간에 박테리아 세포를 노출하도록 제작될 수 있다.
- [0068] 상술한 일 구현예에 따른 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법은 의료분야에서 빠른 항생제 감수성 시험 방법으로서의 충분한 가능성을 보여줄 수 있다. 또한 상술한 일 구현예에 따른 세포의 격리 및 형태학적 분석 방법은 다양한 유형의 세포들을 복잡한 공정없이 매우 효과적으로 분리하여 단일 세포 형태를 관찰할 수 있으므로 일반적인 세포 연구에 폭 넓게 사용될 수 있다.
- [0069] 이하 실시예를 통해 본 명세서에 개시된 기술을 보다 상세히 설명하고자 한다.

- [0070] [실시예]
- [0071] 실시예 1: 마스크 없는 광학적 리소그래피 방식 구축
- [0072] 여러 형태의 마이크로웰 패턴을 형성하기 위하여 광유체의 마스크 없는 리소그래피 방식(optofluidic maskless lithography (OFML) system)을 사용하였다. OFML 방식은 자외선 광원으로 광경화형 고분자를 고형화하는 수은-제논 램프(200W bulb, Hamamatsu) 및 디지털 마이크로미러 디바이스(DMD, 1024X768 pixels, Texas Instruments)로 구성되었다. 수은-제논 램프는 연속광원으로 파이버 기반 광 유도체를 갖는다. 디지털 마이크로미러 디바이스(DMD, 1024X768 pixels, Texas Instruments)는 원하는 UV 패턴(마이크로웰 패턴)을 형성하기 위한 마이크로미러 패턴을 생성하기 위한 장치이다. UV 광원과 DMD는 광학 현미경(IX71 Olympus)과 함께 설치되었다. CCD 카메라 (DP73)가 광학 현미경에 설치되어있어 생성되는 마이크로웰 패턴을 영상화하였다.
- [0073] 실시예 2: 상부 PDMS 몰드 및 하부 PDMS 몰드 형성
- [0074] 하부의 폴리디메틸실록산 (PDMS, Dow Corning) 몰드를 형성하기 위하여 먼저 슬라이드 글라스 기판 (스탬프 몰드)을 3-(트리메톡시실릴)프로필 메타크릴레이트 (3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (TMSPMA), Sigma-Aldrich))로 코팅하여 마이크로웰 패턴을 생성하기 전에 슬라이드 글라스 기판과 광경화형 고분자 패턴과의 결합을 증진시킨다. 먼저, 3-(트리메톡시실릴)프로필 메타크릴레이트를 에탄올 (99%, DAEJUNG)에 희석하여 2% 희석액을 만들어 균일하게 혼합하였다. 균일하게 혼합한 후, 이 혼합액을 슬라이드 글라스 기판에 스프레이 코팅한 다음 실온에서 10분간 건조시켰다. 건조된 슬라이드 글라스 기판을 100℃ 핫플레이트에 올려놓고 1분간 열경화시켰다.
- [0075] 상부의 폴리디메틸실록산 (PDMS, Dow Corning) 몰드를 형성하기 위하여 3차원 프린터(From 1+, Formlabs)로 원하는 디자인의 스탬프 몰드를 인쇄하였다. 3차원 스탬프 몰드가 준비된 후, PDMS 용액을 스탬프 몰드에 부어 65℃ 핫플레이트에서 하룻밤 동안 열경화하여 상부의 PDMS 몰드를 제조하였다.
- [0076] 실시예 3: 고분자 재료
- [0077] 광경화형 고분자인 폴리우레탄 아크릴레이트 (PUA 311, Minuta Tech)를 사용하여 마이크로웰 패턴된 기판을 제조하였다. 그리고, 폴리에틸렌글라이콜 디아크릴레이트 (PEGDA, Sigma-Aldrich, Mn=700)와 광개시제 10%로 광경화형 하이드로겔 용액을 제조하였다. 광개시제는 2-히드록시-2-메틸프로피오페논 (2-Hydroxy-2-methylpropiophenone, Irgacure 1173, sigma-Aldrich)을 사용하였다.
- [0078] 실시예 4: 하이드로겔 구조체의 팽창 측정
- [0079] 첫 번째, 하이드로겔 예비중합체를 형성하기 위하여 직경 6 mm 이고 높이 1.12 mm 인 PDMS 몰드를 준비하였다. 앞의 PDMS 몰드를 제작한 후, 폴리에틸렌글라이콜 디아크릴레이트 (PEGDA, Sigma-Aldrich, Mn=700)로 구성된 광경화형 하이드로겔 용액을 PEGDA와 증류수의 비율(v/v; 부피비)이 1:0, 1:1, 1:3, 1:7이 되도록 증류수와 혼합한 후 PDMS 몰드에 부어 UV 챔버에 넣고 1분간 경화시킨 다음, 하룻밤동안 건조시켰다. 조립된 PDMS 몰드들의 잔여 공간에 붓는 예비중합체의 양에 따라 하이드로겔 구조체의 외관이 오목한 모양, 편평한 모양, 볼록한 모양으로 바꿀 수 있으며, 본 실시예에서 사용된 마이크로웰 패턴된 하이드로겔 구조체의 형상은 오목한 모양이 되도록 제조하였다.
- [0080] 제작한 마이크로웰 패턴된 하이드로겔 구조체의 습윤 팽창율의 실험 결과 건조된 구조체의 크기는 고분자 물질과 혼합된 증류수의 비율이 증가할수록 작아지며 짧은 시간 안에 신속하게 팽윤되는 것으로 나타났다. 실험 결과 PEGDA와 증류수의 비율(v/v; 부피비)이 1:1 인 경우 하이드로겔 구조체의 크기와 팽윤 속도가 최적으로 나타났다.
- [0081] 일반적인 96 웰 플레이트에 잘 맞도록 하이드로겔 구조체를 제조하기 위해 상부 PDMS 몰드의 직경은 7.4 mm, 깊이는 3.27 mm가 되도록 디자인하였다.
- [0082] 실시예 5: 박테리아 세포 배양
- [0083] *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) 배양하기 위하여, 각 웰의 최종 세포 접종 농도를 이스트-말트 배지(Yeast-Malt broth, YM broth, Sparks, MD)를 사용하여 3×10^8 CFU/mL로 정하고, 30℃에서 세포 성장을 측정하였다. *Streptomyces atratus* (spore-type actinomycetes) 배양인 경우, 각 웰의 최종 세포 접종농도를 트립틱 소이 배지 (Tryptic Soy broth, TSB, Sparks, MD)를 사용하여 7.5×10^7 CFU/mL로 정하고, 28℃에서 세포 성장을 측정

하였다. 대장균 ATCC 25922, 포도상구균 ATCC 29213 및 메티실린 저항성 포도상구균에 대해서는 각 웰에 접종하는 세포 농도를 물러-힌톤 배지 (Mueller-Hinton broth, MHB, Fluka Analytical)를 사용하여 3×10^8 CFU/mL 정하였다. 엠포실린 (Sigma-Aldrich) 및 클로로앰페니콜 (Sigma-Aldrich) 항생제 농도를 맞추기 위하여 20배의 연속 희석 방법을 사용하였다. 그런 다음, 물러-힌톤 배지(Mueller-Hinton broth, MHB, Fluka Analytical) 227.5 μ L (91% v/v), 항생제 2.5 μ L (1% v/v), 박테리아 세포 20 μ L (8% v/v)를 혼합하고 37°C에서 성장을 관찰하였다.

[0084] 실시예 6: 하이드로겔 박테리아 격리 장치를 이용한 하이드로겔 팽윤 및 개별 세포들의 성장 이미징의 최적화

[0085] 도 7은 본 명세서에 개시된 기술의 일 구현예에 따른 하이드로겔 구조체를 9웰 내에 투입하여 이스트의 성장을 관찰한 현미경 사진이다. 위의 두 그림에서 왼쪽은 하이드로겔 구조체를 투입한 후의 초기 상태(initial state)이고 오른쪽 그림은 1시간 이상 지난 후의 작동 상태(operation state)를 각각 나타낸다. 그리고 도 7의 i, ii, iii 및 iv는 하이드로겔 구조체의 하단부 바닥면을 통해 관찰한 마이크로웰 내 격리된 박테리아 세포의 광학현미경 사진이다.

[0086] 도 7을 참조하면, 단일 박테리아 세포 성장의 다른 형상을 보기 위하여 제작한 마이크로웰 패턴된 하이드로겔을 사용하여 일반적인 96 웰 플레이트에서 *S. cerevisiae* (yeasts)의 발아성장과 *S. atratus* (actinomycetes)의 필라멘트 성장을 관찰하였다. 이들 박테리아 세포들, 영양분 및 항생제의 도입 후 첫번째 세포 성장 이미지(도 7의 i 및 도 7의 iii)를 1h 이후 관찰하고, 마이크로웰 패턴된 하이드로겔이 팽창하여 각 웰벽에 접촉할 충분한 시간이 주어진 후 두번째 세포 성장 이미지(도 7의 ii 및 도 7의 iv)를 박테리아 세포의 성장 속도에 따라 2시간 후 또는 하루 후 측정하였다.

[0087] 이스트 세포의 경우, 1시간 내에 여러개의 세포들이 각 웰에 있는 세포군체도 7의 i)로부터 분리되었고, 마이크로웰 패턴된 하이드로겔의 마이크로웰에 가두어진 세포들은 1시간 후 박테리아 성장을 증명하기 위해 관찰되었다. 실험시작 2시간 후에 테스트 중인 이스트 세포를 조사해보니 세포 분화가 진행되어 발아(budding)가 독립적인 모든 단일 세포(도 7의 ii)에서 관찰되었다.

[0088] 방선균(actinomycetes)의 경우, 방선균이 필라멘트 성장을 하고 세포 크기가 일정하지 않아 방선균 박테리아 세포는 개별적으로 분리하기 어렵다. 따라서, 관찰하기 적절한 크기인 직경 0.5-1 μ m 아포(단일 세포) 형태의 방선균(actinomycetes)을 선택하여 세포들이 마이크로웰 패턴된 하이드로겔의 마이크로웰에 개별적으로 들어갈도록 하였다.

[0089] 이스트인 경우, 첫번째 세포 성장 이미지는 1시간 후(도 7의 iii)와 하루 뒤 얻어졌다. 두번째 이미지는 24시간 후 얻어졌다. 그 이유는 이스트 세포의 경우 여러 세포로의 분열이 상대적으로 오랜 시간이 걸리기 때문이다. 방선균은 마이크로웰을 채울 정도(도 7의 iv)로 충분히 성장하였다.

[0090] 이로써 빠른 항생제 감수성 시험 배양 방식은 세포 형태가 다르고 성장율이 다른 여러 세포 유형에 대해 충분히 테스트 되었다.

[0091] 실시예 7: 빠른 항생제 감수성 시험을 위한 항생제의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration (MIC)) 결정

[0092] Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) 표준 균주인 대장균 *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 및 포도상구균 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 29213를 사용하여 엠포실린 및 클로로앰페니콜 항생제의 여러 농도에서 항생제의 최소저해농도를 측정하여 빠른 항생제 감수성 시험 결과와 종래의 항생제 감수성 시험 결과를 비교하였다. 박테리아 세포 개수의 변화와 성장을 나타내는 세포 형태 변화를 관찰하기 위하여 박테리아 세포 성장 광학 이미지를 4시간까지 매시간 마다 기록하였다.

[0093] 엠포실린의 여러 농도에 대한 대장균 세포의 형태학적 반응이 분석되었다. 도 8은 여러 농도별 엠포실린 항생제 하의 박테리아 크기 및 개수를 분석하여 대장균과 포도상구균에 대한 MIC를 결정하는 실험 결과이다. 도 8(a)을 참조하면, 엠포실린 2 μ g/mL 또는 그 이상의 농도에서 대장균은 분열하지 않았고, 필라멘트 모양의 성장을 하였다. 그러나, 엠포실린 2 μ g/mL 미만 농도에서는 대장균은 분열하였다. 이 결과는 종래의 항생제 감수성 시험 결과와 일치하였다. 그리고, 도 8(b)을 참조하면, 엠포실린의 여러 농도에 대한 포도상구균 세포의 형태학적 반응에서는 엠포실린 2 μ g/mL 또는 그 이상의 농도에서 포도상구균은 분열하거나 성장하지 못하였다. 광학 현미경 영상 이미지에서 대장균의 항생제의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration (MIC))는 4 μ g/mL이고, 포도상구균의 항생제의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration (MIC))는 2 μ g/mL 임을

결정하였다. 이 앰피실린 항생제에 대한 대장균 및 포도상구균의 최소저해농도(MIC) 결과는 CLSI의 항생제의 최소저해농도(MIC) 영역 (*E. coli* ATCC 25922인 경우 2-8 $\mu\text{g/mL}$; *S. aureus* ATCC 29213인 경우 0.5-2 $\mu\text{g/mL}$)과 일치하였다.

[0094] 또한 도 9는 여러 농도별 클로암페니콜 항생제 하의 박테리아 크기 및 개수를 분석하여 대장균과 포도상구균에 대한 MIC를 결정하는 실험 결과이다. 도 9(a)를 참조하면, 클로암페니콜 항생제에 대한 대장균 ATCC 25922의 항생제의 최소저해농도(MIC) 결과는 8 $\mu\text{g/mL}$ 이고, 도 9(b)를 참조하면, 클로암페니콜 항생제에 대한 포도상구균 ATCC 29213의 항생제의 최소저해농도(MIC) 결과는 4 $\mu\text{g/mL}$ 이다. 그리고, 이 클로암페니콜 항생제에 대한 대장균 및 포도상구균의 최소저해농도(MIC) 결과는 CLSI의 항생제의 최소저해농도(MIC) 영역 (*E. coli* ATCC 25922인 경우 2-8 $\mu\text{g/mL}$; *S. aureus* ATCC 29213인 경우 2-8 $\mu\text{g/mL}$)과 일치하였다.

[0095] 또한, 메티실린-저항성 포도상구균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA))의 앰피실린 항생제의 최소저해농도(MIC)는 도 10(a) 및 도 10(b)에 나타내었다.

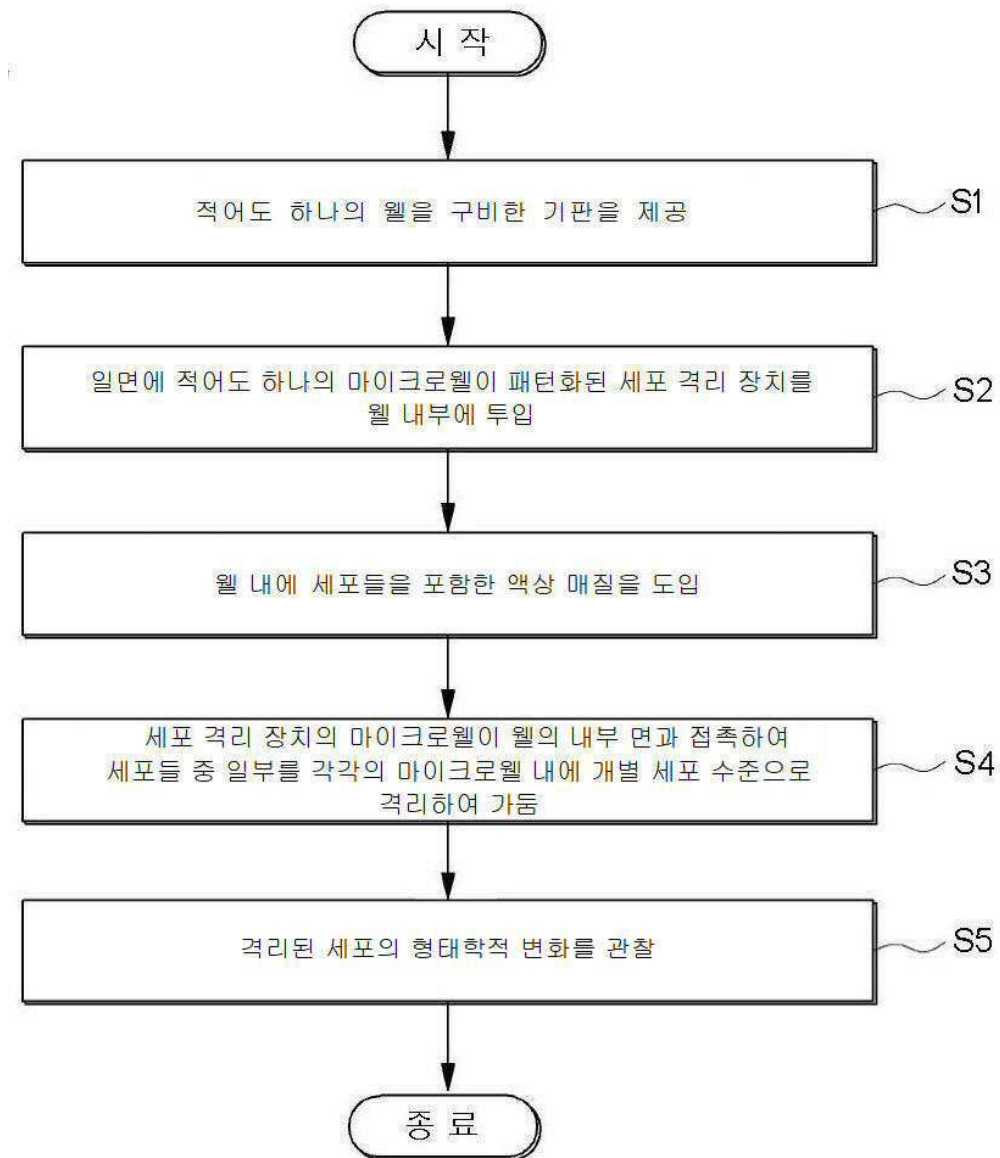
[0096] 도 10은 메티실린-저항성 포도상구균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA))의 앰피실린 항생제의 최소저해농도(MIC)를 결정하기 위해 다양한 앰피실린 농도로 실험한 결과이다. 도 10(a)는 본 명세서에 개시된 기술의 일 구현예에 따른 마이크로웰 패턴된 하이드로겔 구조체를 사용하여 4시간의 작업 시간으로 측정된 빠른 항생제 감수성 시험의 앰피실린 항생제의 최소저해농도(MIC) 결과이고, 도 10(b)는 종래의 일반적인 탁도를 이용하는 18-24h 작업 시간의 항생제 감수성 시험의 앰피실린 항생제의 최소저해농도(MIC) 결과이다. 그 결과 모두 항생제 감수성 시험의 앰피실린 항생제의 최소저해농도(MIC)는 64 $\mu\text{g/mL}$ 을 얻었다.

[0097] 상술한 바로부터 본 명세서에 개시된 기술의 일 구현예에 따른 하이드로겔 박테리아 격리 장치를 사용한 MIC 결과들은 CLSI MIC 결과들과 그 범위가 잘 일치하는 것을 알 수 있었다.

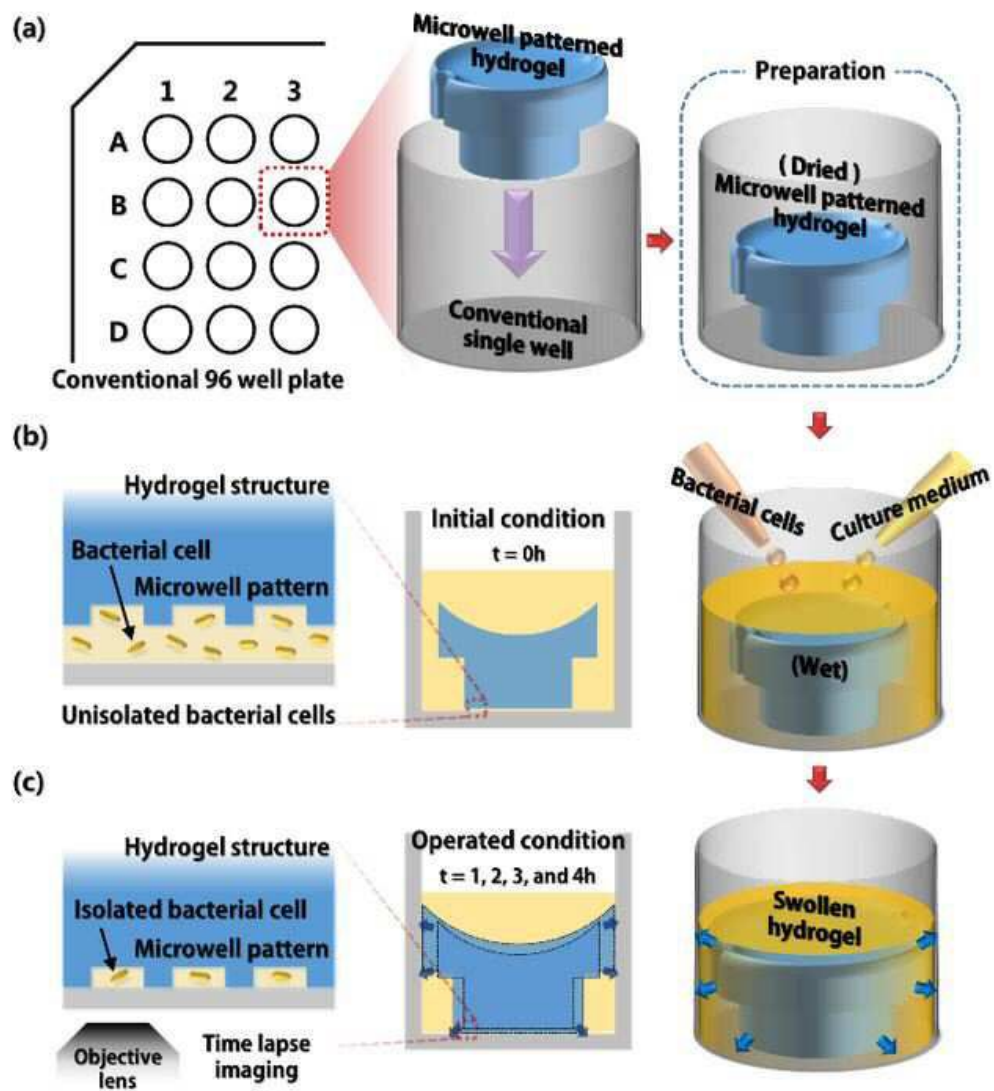
[0098] 이상에서는 다양한 도면 및 구현예들을 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 명세서에 기재된 구현예들을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면

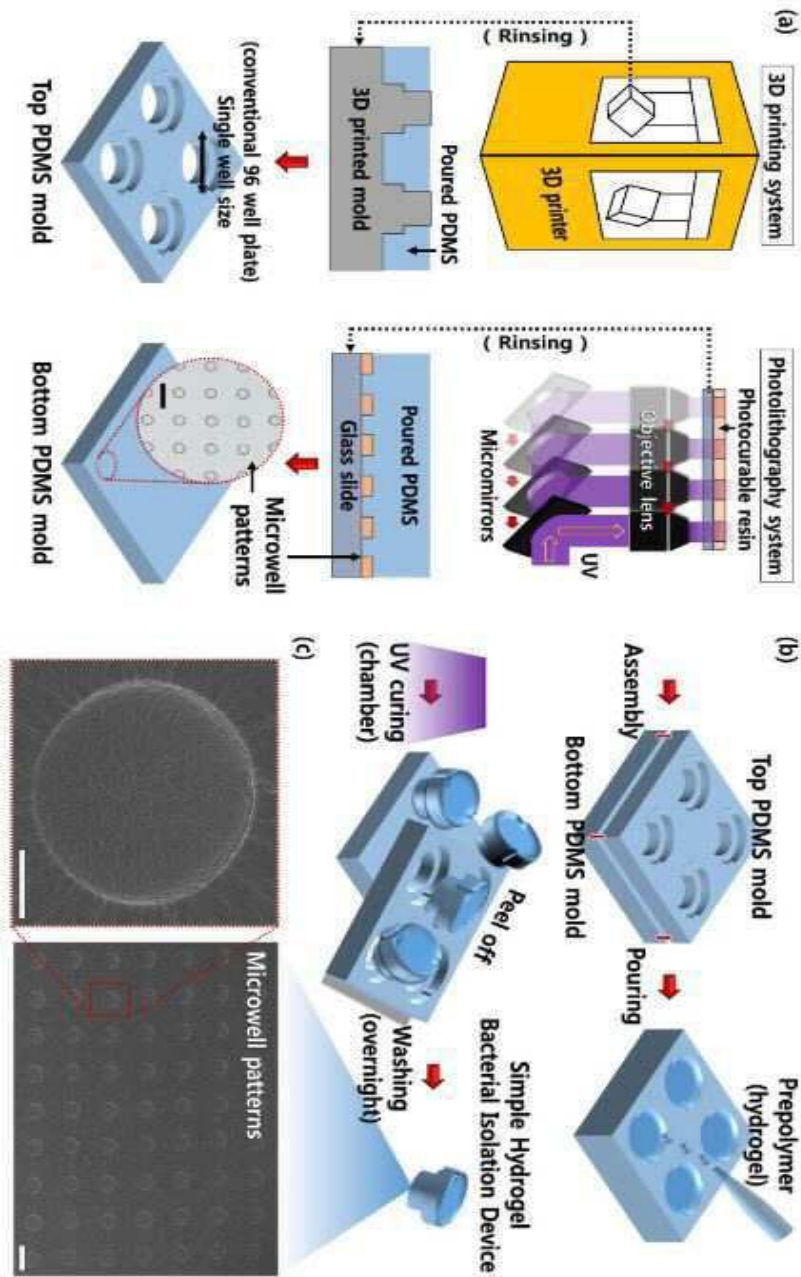
도면1



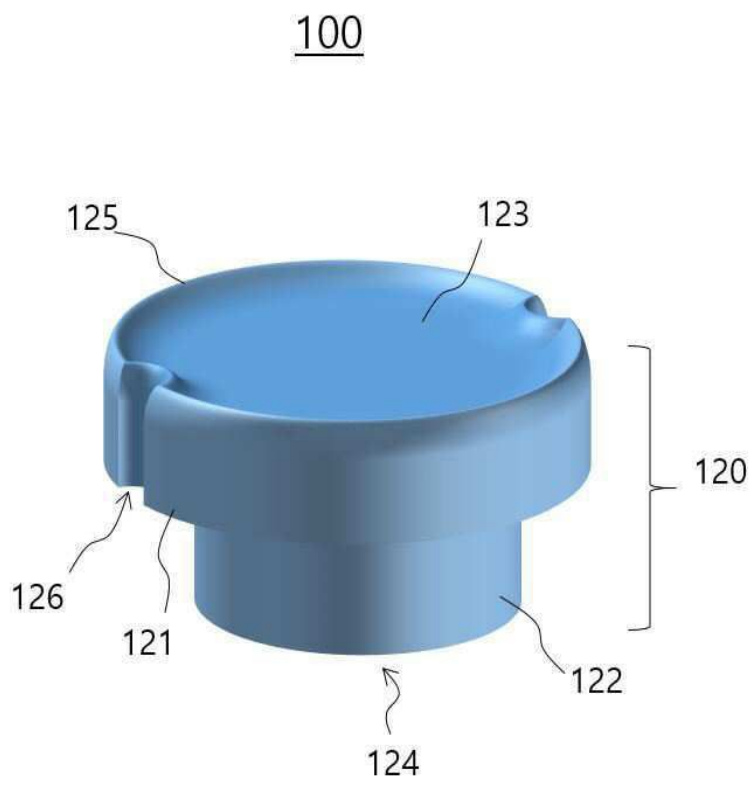
도면2



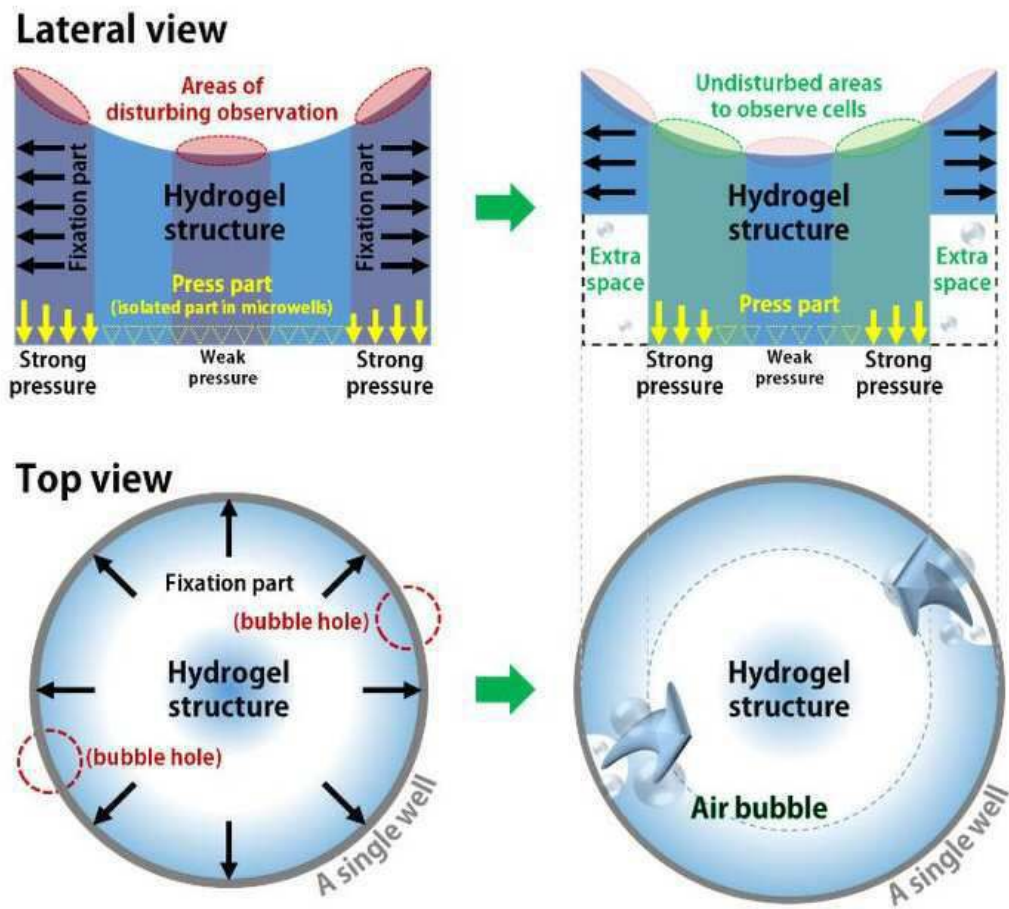
도면3



도면4



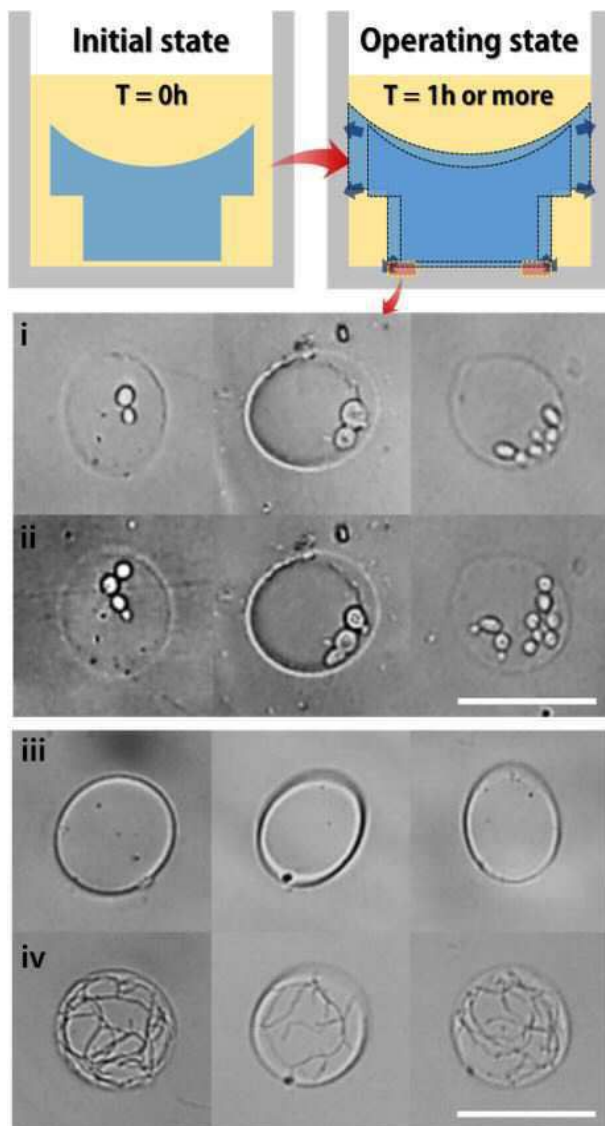
도면5



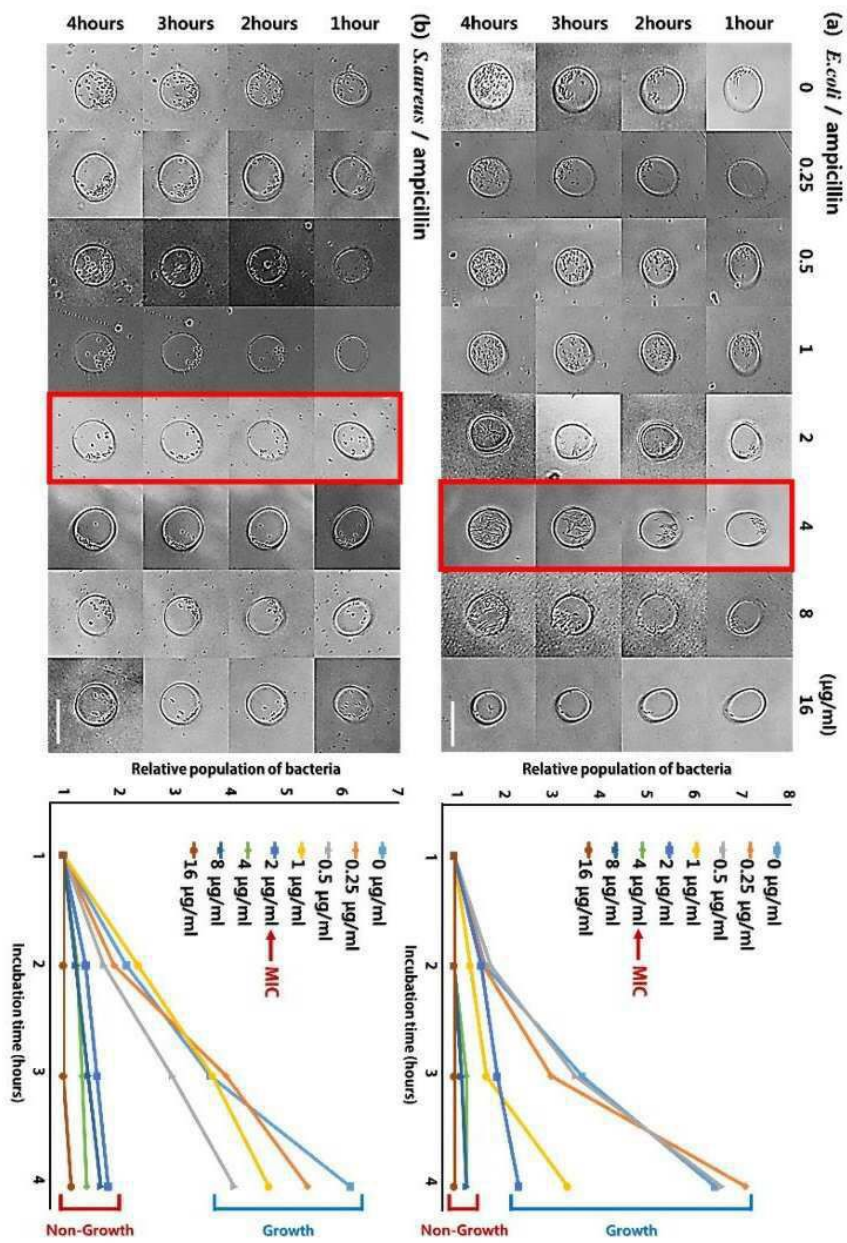
도면6



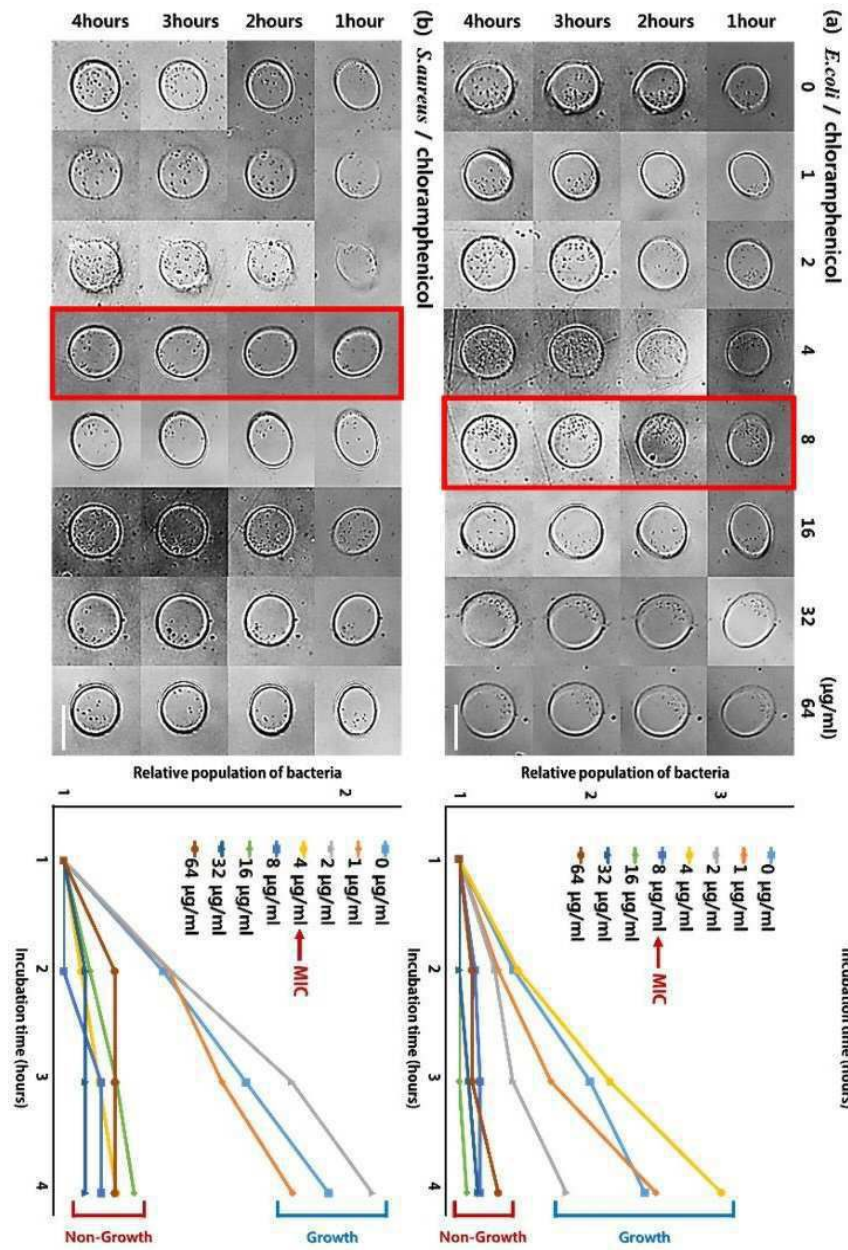
도면7



도면8



도면9



도면10

