



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0033971
(43) 공개일자 2024년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 15/14 (2024.01) G01N 15/00 (2024.01)
G01N 15/10 (2024.01)
(52) CPC특허분류
G01N 15/1433 (2024.01)
G01N 15/1429 (2024.01)
(21) 출원번호 10-2022-0112951
(22) 출원일자 2022년09월06일
심사청구일자 2022년09월06일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이창수
대전광역시 유성구 대학로 99, 충남대학교 공과대
학 1호관 258호(궁동)
김진경
대전광역시 서구 복수동로 21-20, 207동 102호(복
수동, 초록마을2단지)
(74) 대리인
김원준

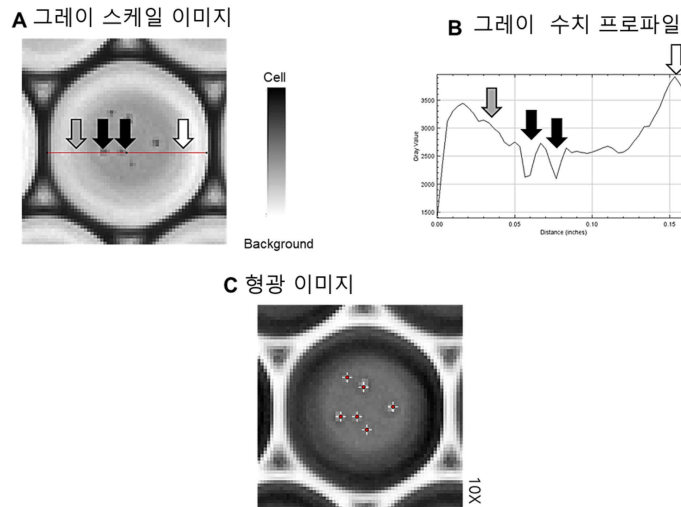
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 미세액적 내 세포 계수 방법

(57) 요약

본 발명은 세포가 들어 있는 액상 시료를 액적화하고 이 액적의 광학현미경 이미지를 활용하여 단순하고 경제적으로 세포를 계수하는 방법 및 이를 활용하여 상기 액상 시료 내의 세포 농도를 계산하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 미세액적 내 세포 계수 방법(제1발명) 및 이를 활용한 미세액적 내 세포 수 변화 추적 방법(제2 발명)에 관한 것이다.

대표도 - 도5a



(52) CPC특허분류

G01N 15/1434 (2024.01)

G01N 15/147 (2013.01)

G01N 2015/0053 (2013.01)

G01N 2015/1006 (2013.01)

G01N 2015/1481 (2024.01)

G01N 2015/1486 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711138088

과제번호 KMDF_PR_20200901_0073-01

부처명 다부처

과제관리(전문)기관명 (재단)범부처전주기의료기기연구개발사업단

연구사업명 범부처전주기의료기기연구개발사업(R&D)(과기정통부, 복지부, 산업부)

연구과제명 (주관)병원균 진단 및 약제 내성 동시 검사용 현장 진단 플랫폼 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 충남대학교 산학협력단

연구기간 2020.09.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (A) 액상 시료를 미세액적화하는 단계;
- (B) 상기 미세액적으로부터 위상차 이미지를 획득하는 단계;
- (C) 상기 위상차 이미지를 그레이스케일 이미지로 전환하는 단계;
- (D) 상기 그레이스케일 이미지로부터 그레이 수치 프로파일을 획득하는 단계; 및
- (E) 상기 그레이 수치 프로파일로부터 피크 수를 계산하여 미세액적 내 세포 수를 결정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세액적 내 세포 계수 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,
상기 단계(E)에서, 피크는 하방 피크인 것을 특징으로 하는 미세액적 내 세포 계수 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,
상기 단계(C)와 단계(D) 사이에,
상기 그레이스케일 이미지를 흑백반전하여 반전 이미지를 획득하는 단계(C')가 추가되며,
상기 단계(E)에서, 피크는 상방 피크인 것을 특징으로 하는 미세액적 내 세포 계수 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서,
상기 미세액적은 미세액적 소자에 형성된 그리드 내에 인접하여 단일 층으로 복수개 형성되는 것을 특징으로 하는 미세액적 내 세포 계수 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서,
상기 미세액적의 직경은 1 mm 미만인 것을 특징으로 하는 미세액적 내 세포 계수 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서,
상기 미세액적의 상면은 소정의 증발방지 커버로 덮히는 것을 특징으로 하는 미세액적 내 세포 계수 방법.

청구항 7

하나 또는 복수개의 미세액적에 대하여 시차를 두고 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 의한 미세액적 내 세포 계수 방법을 적용하는 것을 특징으로 하는 시간 경과에 따른 미세액적 내 세포 수 변화 추적 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 미세액적은 미세액적 소자에 형성된 그리드 내에 인접하여 단일 층으로 복수개 형성되는 것을 특징으로 하는 시간 경과에 따른 미세액적 내 세포 수 변화 추적 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서,

상기 미세액적의 직경은 1 mm 미만인 것을 특징으로 하는 시간 경과에 따른 미세액적 내 세포 수 변화 추적 방법.

청구항 10

청구항 7에 있어서,

상기 미세액적의 상면은 소정의 증발방지 커버로 덮히는 것을 특징으로 하는 시간 경과에 따른 미세액적 내 세포 수 변화 추적 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 액적 기반의 세포 계수 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 세포가 들어 있는 액상 시료를 액적화하고 이 액적의 광학현미경 이미지를 활용하여 단순하고 경제적으로 세포를 계수하는 방법 및 이를 활용하여 상기 액상 시료 내의 세포 농도를 계산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포를 이용한 생물학적 연구나 임상에서 정확한 세포의 수 또는 농도를 아는 것 즉, 세포를 계수하는 것이 매우 중요하다. 특히 미생물 계수는 세포 기반 연구의 필수적인 부분으로 식품 및 의약품 안전성 시험, 생물 의학 시험 및 환경 모니터링에 널리 사용되어 오고 있다.

[0003] 종래 세포를 계수하는 방법으로, 현미경 측정법(microscopic count)과 입자계수기(electronic particle counter) 사용법과 같은 총 균수(total cell number) 측정법과, 평판배지법(plate culture method), 막막여과법(membrane filtration), 최확수법(MPN, most probable number) 등과 같은 생존균(viable cell number) 측정법이 알려져 있다. 그러나 이들 방법은 많은 양의 샘플을 한 번에 분석할 수 없으며 신속한 결과를 얻기 어려울 뿐 아니라 정확하고도 균일한 데이터를 얻기 어렵다는 단점이 있다.

[0004] 근래 다수의 샘플을 빠르게 계수하는 자동화 장비나 수천 개의 이미지에서 세포를 계수할 수 있는 프로그램이 제시되고 있으나, 장비가 고가이고 세포를 고정하거나 염색하는 등의 물리화학적 변형을 가하는 과정이 필요하다.

[0005] 한편, 직경 수~수백 μm 크기 미세액적 기반의 미세유체 시스템은 단일~복수 세포 수준의 분석에 유용하게 활용되고 있다. 이 경우에도 미세액적 내 세포를 감지하고 계수할 필요성이 있는데, 종래 액적 내 세포 감지 방법으로 형광 이미지 분석법과 레이저 유도 형광(LIF: laser-induced fluorescence) 분석법이 활용되고 있다. 형광 이미지 분석법은 정확한 세포의 계수가 가능하지만 검출 시약(예를 들면, 형광이 태깅된 항체)을 처리해야 하는 문제가 있고, LIF는 연속적인 레이저 스캔으로 신속하게 세포를 계수할 수 있지만, 액적 내에 단일 세포가 존재

할 경우에 이를 감지하기 어렵다는 단점이 있다. 또한 이들 종래 방법에 의하면 미세액적 내 세포를 경시적으로 관찰하기가 실질적으로 불가능하다는 문제도 있다.

[0006] 미국특허 10267726은 액적의 입자 회절패턴 2D이미지를 얻고 이로부터 3D이미지를 재구성한 후 액적 내의 입자를 계수하는 방법을 제시하고 있다. 그러나 이때 액적은 직경이 수 mm 단위로 직경이 μm 단위의 미세액적이 아니며, 액적 내 입자를 계수하기 위하여 고가의 장비와 복잡한 과정이 요구된다.

[0007] 한국 공개특허 10-2022-0079727은 액적 이미지로부터 딥러닝 방법으로 세포를 계수하는 셀 농도 측정장치에 관한 것이지만, 인공지능의 구조나 학습데이터 등에 대한 설명이 없다. 따라서 이로부터 미세액적 내 세포를 구체적으로 어떻게 측정하는 지는 알 수 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 미국특허 10267726
(특허문헌 0002) 한국 공개특허 10-2022-0079727

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 종래 세포 계수법의 단점인 자동화된 분석을 보완하여 시간 경과에 따른 위상차 이미지에서의 액적 내 세포의 변화를 자동으로 계수하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 미세액적 내 세포 계수 방법(제1발명) 및 이를 활용한 미세액적 내 세포 수 변화 추적 방법(제2발명)인 것을 특징으로 한다.

[0011] 제1발명은, (A) 액상 시료를 미세액적화하는 단계; (B) 상기 미세액적으로부터 위상차 이미지를 획득하는 단계; (C) 상기 위상차 이미지를 그레이스케일 이미지로 변환하는 단계; (D) 상기 그레이스케일 이미지로부터 그레이 수치 프로파일을 획득하는 단계; 및 (E) 상기 그레이 수치 프로파일로부터 피크 수를 계산하여 미세액적 내 세포 수를 결정하는 단계;를 포함하는 **미세액적 내 세포 계수 방법**에 관한 것이다. 이때 상기 단계(E)에서, 피크는 하방 피크일 수 있다. 이때 상기 그레이 수치 프로파일의 획득, 피크 수의 계산 등은 종래 알려진 이미지 분석 프로그램, 예를 들면 하기 실시예에서처럼 "Image J"를 활용하여 자동으로 수행할 수 있을 것이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 종래 널리 활용되는 소프트웨어에서 본 발명을 활용할 수 있도록, 본 발명은 상기 단계(C)와 단계(D) 사이에, 상기 그레이스케일 이미지를 흑백반전하여 반전 이미지를 획득하는 단계(C')가 추가되며, 상기 단계(E)에서, 피크는 상방 피크로 하는 것도 가능할 것이다. 이때 이미지의 흑백반전은 "Image J"와 같은 분석 프로그램을 이용할 수 있을 것이다.

[0013] 본 발명에서 상기 미세액적은 하나 또는 복수개일 수 있다. 복수개인 경우, 상기 미세액적은 미세액적 소자에 형성된 그리드 내에 인접하여 단일 층으로 복수개 형성될 수 있다.

[0014] 본 발명에서 상기 미세액적의 직경은 1 mm 미만, 바람직하게는 수~수백 μm , 더욱 바람직하게는 수~수십 μm 이다.

[0015] 본 발명에서 상기 미세액적은 '미세'하기 때문에 대기에 노출될 경우 빠르게 증발될 수 있다. 따라서 상기 미세액적의 상면은 소정의 증발방지 커버로 덮는 것이 바람직하다.

[0016] 제2발명은, 하나 또는 복수개의 미세액적에 대하여 시차를 두고 상기 제1발명에 의한 미세액적 내 세포 계수 방법을 적용한, 시간 경과에 따른 **미세액적 내 세포 수 변화 추적 방법**에 관한 것이다.

[0017] 제2발명은 제1발명과 동일한 방법으로 시간 간격을 두고 세포를 계수하여 그 시간 동안 세포의 증가여부를 추적하는 방법에 관한 것이므로, 미세액적의 수용구조, 미세액적의 크기, 세포 계수 방법 등은 제1발명에서와 동일할 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 세포 수 계수 방법에 의하면, 종래 기술에서는 불가능하였던 이미지 기반 액적 내 세포 수 계수가 가능하여, 시간의 경과에 따른 세포 수 변화도 간편하고 정확하게 확인할 수 있다. 또한 액적 내에 단일 세포가 존재하는 경우 단일세포 수준에서 그 수의 변화를 관찰할 수 있을 뿐 아니라 군주가 뭉치는 성장 양상으로 인한 계수의 오류 역시 해결할 수 있어 별도의 염색이나 표지가 없이도 빠르고 정확한 결과를 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명에서 사용된 미세유체장치의 개념도 및 부분 사진.
 도 2a, 2b는 각각 본 발명의 실시예에서 고정된 액적의 상면 사진과, 그리드와 커버글라스 사이에 고정된 액적 및 세포의 수직단면 개념도.
 도 3은 액적의 광학 이미지(왼쪽)와, 이를 소정의 임계값으로 변환한 이진 흑백 이미지(오른쪽).
 도 4는 동일한 미세액적에 대한 광학 이미지, 위상차 이미지 및 형광 이미지.
 도 5a는 그레이스케일 이미지와, 이로부터 획득된 그레이 수치 프로파일의 일예.
 도 5b는 흑백 반전된 그레이스케일 반전 이미지와, 이로부터 획득된 반전 그레이 수치 프로파일의 일예.
 도 6a는 복수 액적의 경시적 관찰을 위한 예시적 순서도이고, 도 6b는 이를 위한 알고리즘의 일예.
 도 6c는 본 발명에 의한 방법의 진행과정에서 이미지의 변환과정 및 관련 프로그램의 화면의 예.
 도 7a, 7b는 각각 본 발명에 의한 세포 계수 방법의 정확도를 보여주는 예시적 이미지와 분석 도표.
 도 8은 본 발명에 의한 미세액적 내 세포 계수 방법이 안정성이 있음을 보여주는 도표.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0021] 발명을 설명함에 있어서 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.

[0022] 본 발명은, 액적 내 세포 수를 자동으로 계수하는 방법 및 이를 활용한 액적 내 세포 수 변화 추적 방법에 관한 것으로, 위상차 이미지를 기반으로 세포 수를 계수하는 것을 특징으로 한다. 액적의 이미지를 얻기 위해서, 액적은 그리드에 고정된 상태로 위상차 이미지를 측정하며 이를 역상으로 변환한 후 액적을 분석하는 것에 의해 세포 수를 계수할 수 있는데, 이에 제한되는 것은 아니다. 아래 상세히 설명되어 있듯이, 본 발명에 의한 세포의 계수를 종래의 가장 계수에 정확한 것으로 알려진 형광 이미지에서 얻어진 세포 수 계수 결과와 비교한 결과 종래기술과 오차가 적고 안정적인 계수가 가능하여 세포 수 계수 방법으로서 효용성을 확인할 수 있다.

[실시예]

1. 미세액적의 제작

[0025] 세포가 함유된 미세액적(이하 단순히 '액적'이라고도 표현함)을 제작하기 위하여 도 1과 같은 미세유체장치(microfluidic device)를 이용하였다. 미세유체장치는 수십에서 수백 마이크로미터 영역의 크기를 가진 미세 유로를 사용하여 매우 적은 양의 유체를 생산하는 기술을 이용한 장치이다. 도 1에서 A는 미세유체장치를 이용하여 미세액적을 제작하는 개념도이고, B는 본 발명에서 사용한 glass-PDMS 마이크로채널의 부분 사진이다. 도면에서 C는 액적 고정을 위해 포토레지스터를 적용하여 제작한 유리 그리드 사진인데, 예시된 사진에서는 직사각형의 그리드가 7×9개 형성되어 있다. D는 C에 형성된 그리드 하나의 확대 사진인데, 예시된 것처럼 각 그리드에는 소정의 구별 표식(여기서는 "B4")이 되어 있는 것이 좋다.

[0026] 도 1에 예시된 것과 같은 구조를 가진 장치를 이용하여, 오일(oil)과 수용액(aqueous)와 같이 섞이지 않는 유체들을 주입할 경우, 두 유체가 교차하는 지점에서 연속상의 전단력(shear stress)에 의해 분산상(disperse

phase)이 끊어진다. 결과적으로 액적기반 미세유체 장치를 통해 연속상(continuous phase)으로 주입된 수용액의 구성을 갖는 액적이 생성된다. 이러한 액적들은 단분산성을 가지며, 부피 조절을 통해 나노 리터(nano-liter)부터 피코 리터(pico-liter)까지 제작이 가능하다. 또한 액적 각각은 하나의 마이크로 사이즈의 화학 반응기가 될 수 있다. 본 발명에서는 연속상에 적색 형광 단백질을 발현하는 세포를 추가하여 세포를 포함한 미세액적을 제작함으로써 세포가 자랄 수 있는 환경을 조성해 주었다.

[0027] 그리드 안에 액적을 분주한 후 미네랄 오일을 분주하고 그 위를 커버 글라스로 덮어 증발을 방지하였다. 이에 따라 장시간동안 액적을 관찰할 수 있었다.

[0028] 활용된 소재와 규격 등을 아래 표에 나타내었다.

연속상	- 3M™ Novec™ 7500 Engineered Fluid (MN, USA)에 - Krytox (MW: ~5000)와 oxalyl chloride 과 Jeffamine XTJ 501 (MW: 900)를 통해 합성된 2 wt%의 Perfluoropolyether-polyethylene glycol-perfluoropolyether triblock copolymer surfactant (PFPE-PEG-PFPE) 첨가
미생물	형광 단백질을 발현하는 포도상구균 <i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325-4
배지	Cation-adjusted Muller-Hinton broth (Sigma-Aldrich, MO, USA)
액적 직경	55 ± 10 μm

[0029]

[0030] 이렇게 그리드에 고정된 복수개 액적의 초기 및 100분 경과 후 평면 사진 및, 그리드와 커버글라스 내부에 고정된 액적과 세포의 수직단면 개념도를 각각 도 2a, 2b에 도시하였다.

[0031] 2. 이미지의 획득 및 분석

[0032] (1) 광학 이미지 획득 및 분석

[0033] 먼저, 통상적인 광학 현미경을 이용하여 일반적인 광학 이미지를 얻어 액적과 세포를 관찰하였다. 도 3에 광학 현미경으로 촬영한 광학 이미지(Bright field image)와, 이를 소정의 임계값으로 변환한 이진 흑백 이미지(Binary image)를 첨부하였다. 도면에서 볼 수 있듯이, 단순 광학 이미지는 흑백의 깊이(심도)의 구분이 어려워 이로부터 액적 내 세포를 구분할 수 없었다. 변환된 이진 이미지도 문제가 있었다. 참고로, 본 실시예에서는 일반 광학, 위상차 및 형광 이미지를 흑백 카메라(CCD/sCMOS)로 촬영하여 얻었는데, 컬러 카메라로 촬영하더라도 이를 흑백 또는 그레이스케일로 전환하면 흑백 카메라로 촬영한 것과 동일한 이미지가 되므로, 실제 사용된 카메라의 흑백 또는 칼라 여부는 중요하지 않다.

[0034] 즉, 앞서 커버 글라스로 덮여서 고정된 액적은 도 2b에서처럼 위아래가 커버글라스와 그리드 바닥면 사이에서 눌리게 된다. 그런데 이진 이미지 사진(도 3에서 오른쪽 사진)에서 볼 수 있듯이, 그리드와 맞닿은 액적 부분(눌린 회색 부분; 도 3 왼쪽 사진에서 검은색 원으로 표시한 내부 부분)은 흑과 백, 어느 쪽에도 해당석이 어렵다는 단점이 확인되었다.

[0035] (2) 위상차 이미지 획득 및 분석

[0036] 배경대비 세포의 신호를 높이고자 위상차 현미경으로 위상차 이미지를 얻어 액적과 세포를 관찰하였다. 구체적으로는 위 (1)에서 사용한 광학 현미경에서 집광기를 빼고 그 대신 위상판이 든 대물 렌즈와 집광기를 부착하여 위상차(phase contrast) 현미경으로 변경하여 사용하였다.

[0037] 획득된 위상차 이미지는 동일한 액적에 대해서 위 (1)에서 획득한 일반 광학 이미지에 비해 세포의 경계가 더 어둡고 선명하게 보이는 것을 확인하였다. 도 4에 동일한 미세액적에 대한 광학 이미지, 위상차 이미지 및 형광 이미지를 도시하였다. 도면에서 형광 이미지는 형광이 발현된 세포가 흰색으로 표시되었다.

[0038] 도 4에서 볼 수 있듯이, 세포를 정확히 표현하고 있는 형광 이미지와 비교할 때, 광학 이미지보다 위상차 이미지가 훨씬 액적 내 세포의 존재가 선명하게 표시되었다. 이에 위상차 이미지를 종래 알려진 이미지 분석 프로그램인 "Image J"를 활용하여 자동으로 세포 계수를 진행하였다. 그런데 시각적으로는 세포의 위치와 수가 명확히

인식됨에 반하여 "Image J"에서는 위상차 이미지에서 회색부분(미세액적의 상하 압착으로 발생하는 노이즈)이 노이즈로 작용하여 세포 계수가 이루어지지 않았다.

[0039] 본 발명에서 활용된 "Image J"는 미국 국립보건원(National Institutes of Health)과 광학 및 전산 계측 연구소(LOCI, University of Wisconsin)에서 개발한 Java 기반 이미지 처리 프로그램이다. 이 프로그램은 다양한 형식의 이미지 파일로부터 사용자가 정의한 신호 임계 값 및 픽셀 값 통계를 계산할 수 있으며, 내장 편집기와 Java 컴파일러가 제공되어 맞춤형 수집, 분석 및 처리 플러그인을 개발할 수 있다.

[0040] (3) 위상차 이미지의 변환 및 분석

[0041] 그레이스케일은 각 화소의 값이 빛의 양을 나타내기 때문에 광도의 정보만을 전달한다. 이 광도는 빛이 많을수록 세며 그레이스케일에서 흰색으로 나타난다. 반면에 빛의 양이 적은 경우에는 광도 세기도 작으며 검은색으로 나타난다. 이를 앞선 위상차 이미지와 연결시키면 위상차 이미지에서는 굴절률과 두께의 차를 명암의 제공으로 바꾼다.

[0042] 위상차 이미지에서 회색부분을 "Image J"가 분석하지 못하는 문제를 개선하기 위하여, 이미지 프로그램에서 위상차 이미지를 그레이스케일로 변환한 다음 전환된 그레이스케일 이미지로부터 그레이 수치 프로파일을 획득하였다. 도 5a에 관련 이미지와 그래프를 첨부하였다. 도면에서 A는, 미세액적의 위상차 이미지에서 변환된 그레이스케일 이미지이고, B는 이 그레이스케일 이미지에서 획득된 그레이 수치 프로파일의 일례이고, C는 위 A에서와 동일한 미세액적에서 세포의 수와 위치가 명확히 표시되는 형광 이미지이다.

[0043] 도면에서 B의 프로파일은 A 이미지에서 적색선으로 표시된 가로행 픽셀의 그레이 수치 프로파일인데, 형광 이미지인 C를 참조하여 A에서 검은색 화살표로 표시된 것이 세포이며, B에서 해당 위치 픽셀이 검은 색에 가까워 하방 피크를 나타냄을 알 수 있다. 즉, 도 5a의 A에서와 같이 세포는 그레이스케일로 변환하더라도, 빛이 투과하는 양이 적기 때문에 동일하게 검은색으로 나타나고, 미세액적은 투명하며 빛 또한 잘 투과하기 때문에 흰색으로 나타난다. 이를 통해, 그레이스케일 값을 프로파일로 나타내면 세포가 있는 부분은 그레이스케일이 0에 가까운 아래 방향으로 피크 값을 보이며 반면에 액적 부분은 회색부분부터 그레이스케일 값이 높아짐을 보인다. 이를 통해 미세액적 내의 세포를 정확하게 계수할 수 있음이 확인되었다.

[0044] 한편, "Image J"는 프로파일에서 상방피크를 찾는 기능('Find Maxima')은 있지만 하방피크를 찾는 기능이 존재하지 않아 위 그레이 수치 프로파일로부터 하방피크의 계수를 자동화하지 못한다. 따라서 본 발명에서는 상기 그레이스케일 이미지를 흑백반전하여 반전 이미지를 획득한 다음 이로부터 그레이 수치 프로파일을 획득하고 프로파일에서 상방피크를 계수함으로써 자동으로 미세액적 내 세포를 계수하는 방법을 선택하는 것도 가능하다. 도 5b에 흑백 반전된 그레이스케일 반전 이미지와, 이로부터 획득된 반전 그레이 수치 프로파일의 일례를 도시하였다. 도면에서 볼 수 있듯이, 반전에 의해 프로파일의 상하가 뒤집히면서 세포가 검은색에서 흰색으로 변환된다. 따라서 이미지 소프트웨어의 'Find Maxima' 기능을 이용하면 피크 값의 개수를 계수하게 되고 자동으로 흰색(흰색 화살표로 표시되는 세포 부분) 값을 계수할 수 있게 된다.

[0045] 3. 복수개 미세액적의 동시 분석

[0046] 위 1에서 설명하였듯이, 본 발명의 방법에 따라 그리드 안에 고정된 복수의 미세액적은 시간이 경과하더라도 융합되거나 변형됨 없이 그 형태가 유지되었다(도 2a 참조). 이러한 특성을 활용하여, 제작된 복수개의 미세액적 각각을 구분하여 분석하였다. 전체적인 분석은 도 6a의 순서도에 따른 순서로 진행되었으며, 도 6b에 분석을 위한 알고리즘의 일례를 도시하였는데, 기본 이미지 분석 프로그램은 전술한 "Image J"를 이용하였다.

[0047] 이 알고리즘을 통해 광학 이미지들은 도 6c에 예시된 것과 같은 변환과정을 거친다. 도 6c에서, A는 그리드에 고정된 액적의 광학 이미지, B는 명시야 이미지의 특정 임계값을 기반으로 하는 ROI(관심 영역) 설정된 이미지, C와 D는 미세액적이 각각 구분번호가 부여된 것과, 임계값(Prominence) 설정을 보여주는 프로그램 화면의 예, E와 F는 각각의 미세액적에서 특정 임계값을 초과하는 픽셀의 위치가 표시된 이미지와, 이 중 한 예시적 미세액적의 확대 이미지이다. F는 '50'으로 번호가 부여된 미세액적이며 표시된 점이 세포이다.

[0048] 먼저, 광학 이미지에서 현미경에서 촬영된 RGB 이미지가 검은 배경을 가진 그레이스케일(8 또는 16비트)로 변환된다. 이후 프로그램의 기능(예, "Despeckle" "Watershed" "Analyze Particles" 기능 등)을 활용하여 노이즈를 제거하고 미세액적의 경계면만을 분리한 다음 노이즈들로 인해 끊긴 액적 부분을 연결하고, 분석에 이용할 미세액적의 특성을 정의하였다. 이때 액적의 구형 특성을 고려하여 구형도의 최소값을 0.70으로 지정하였다. 위의 명령과정을 거치면 프로그램은 해당 조건에 부합하는 분석 구역을 분석하고자 하는 영역인 관심영역(Region Of Interest, ROI)으로 지정하게 된다. 이 ROI의 구역 별로 프로그램이 자동으로 번호를 매기며 이를 통해 각각의

액적들은 각각의 고유 번호를 가지게 된다. 고유 번호가 매겨진 액적들은 여러 시간대의 촬영 이미지를 쌓아 올리더라도 동일한 구역 번호를 유지하기에 시간별에 따른 분석 영역의 변화를 동일하게 관찰할 수 있다. 이후 앞선 지정된 구역은 결과 창에 결과가 남아 다음 형광 이미지 분석에 혼선을 줄 수 있다. 따라서 프로그램의 기능(예, "Clear results")을 이용하여 ROI에 대한 결과를 삭제한다.

[0049] 다음으로 배양 시간별로 촬영된 여러 장의 형광 이미지들에 대하여 프로그램의 기능(예, "Images to Stack")을 통하여 이미지들을 한 개의 창에 여러 장 쌓아 올리는 이미지 세트인 스택을 제작하였다. 스택에 대해 앞서 지정한 ROI를 ROI manager를 이용하여 올렸으며 이후 여러 장의 이미지에 대해 작업을 반복하는 루프를 시작하였다. 앞선 이미지 스택을 구성하는 각각의 이미지를 슬라이스라고 한다. 따라서 n번째 슬라이스에 대해서 아래의 작업을 수행하고 다음 슬라이스로 넘어가면 반복하게 제작되었다.

[0050] 이후 이미지를 8 비트로 변환하고 앞서 지정한 i번째 ROI 구역 내부에 대해 다음의 계수 작업을 진행한다. 사용자는 ROI 구역 내에서 배경 대비 구분되는 세포의 유의미한 형광 신호의 임계값을 지정한다. 이에 프로그램의 기능(예, "Find maxima")을 이용하여 지정된 임계값을 넘는 형광 신호를 파악하고 그 개수를 계수하기 위하여 동일 명령 행에 `output=[Count]`를 삽입하였다. 추가적으로 다음 행에 `output=[Point Selection]` 명령을 삽입하여 사용자가 프로그램이 계수한 형광 신호가 옳은 것인지를 육안으로 확인할 수 있도록 계수한 신호를 프로그램이 계수 후 표기된 포인트로도 확인하도록 하였다. 또한 계수한 포인트가 다음 번호를 가진 액적으로 계수가 넘어가더라도 사용자가 확인할 수 있도록 "Add Selection"을 추가하였다. 마지막으로 루프의 마지막에 "Next Slice [>]"를 추가하여 동일한 작업을 스택의 다른 슬라이드에서도 동일하게 수행될 수 있도록 하였다. 추가로, 사용자의 편의성을 더하는 방법으로는 Image J의 플러그인 실행 시 키보드 단축키("플러그인>단축키>단축키 만들기")에 할당할 수 있다. 따라서 세포 계수는 사용자가 키보드에 지정한 단축키 버튼을 누르면 시작되는 절차로 시간을 더 절약할 수 있다.

[0051] 4. 본 발명의 정확도 분석

[0052] 본 발명에 의한 계수 방법의 신뢰도를 확인하기 위하여 형광 이미지와 비교하여 교차 검증하였다.

[0053] 위 1에 언급된 방법에 따라 그리드에 136개의 미세액적을 고정하고 소정의 환경에서 배양하고 배양 시간에 따라 위상차 이미지와 형광 이미지를 각각 촬영하였다. 본 실시예에서 이용된 균주는 적색 형광 단백질을 발현하기 때문에 세포가 성장하면 형광신호가 증가한다. 즉, 형광 이미지의 형광 신호는 세포에서만 나오기 때문에 형광 신호로부터 액적 내 세포 수를 정확히 측정하고, 본 발명에 의한 방법으로 동일한 액적에서 측정된 세포 수의 정확도/신뢰도를 분석하였다.

[0054] 본 발명에 의한 액적 내 세포 수 분석 이미지와, 동일한 액적에 대한 형광이미지에서의 세포 수 분석 이미지의 일례를 도 7a에, 배양시간 경과에 따른 본 발명에 의한 세포 계수의 정확도를 보여주는 분석 그래프를 7b에 도시하였다.

[0055] 총 136개의 액적에 대해서 분석을 진행하여 동일한 그리드의 이미지에서 동일한 번호의 액적에 대해 계수된 화소 값의 지점을 육안으로 정확하게 계수 되었는가를 확인하였고(도 7a), 위 3에서 제시된 방법(자동화 프로그램)을 이용하여 시간의 경과 따른 세포 계수 값을 파악하였다(도 7b).

[0056] 육안으로 계수된 지점과 그 개수를 확인하였을 때 그 액적 각각당 위상차와 형광 이미지가 그 개수와 계수된 지점이 일치하는 것을 확인할 수 있었다(도 7a). 또한 도 7b에서 볼 수 있듯이 1시간 간격으로 동일한 그리드에 대해 계수한 결과 모든 시간 지점에서 두 방법 간 액적 내 세포의 평균 개수가 2개 이내의 오차를 보였다. 각 방법의 표준편차 값도 유사하여 앞선 방법이 계수하는 방법으로서 이용이 가능함을 확인하였다. 따라서 본 발명에 의한 계수 방법의 효용성과 신뢰성이 확인되었다.

[0057] 5. 본 발명의 안정도 분석

[0058] 본 발명에 의한 계수 방법의 안정도를 분석하였다.

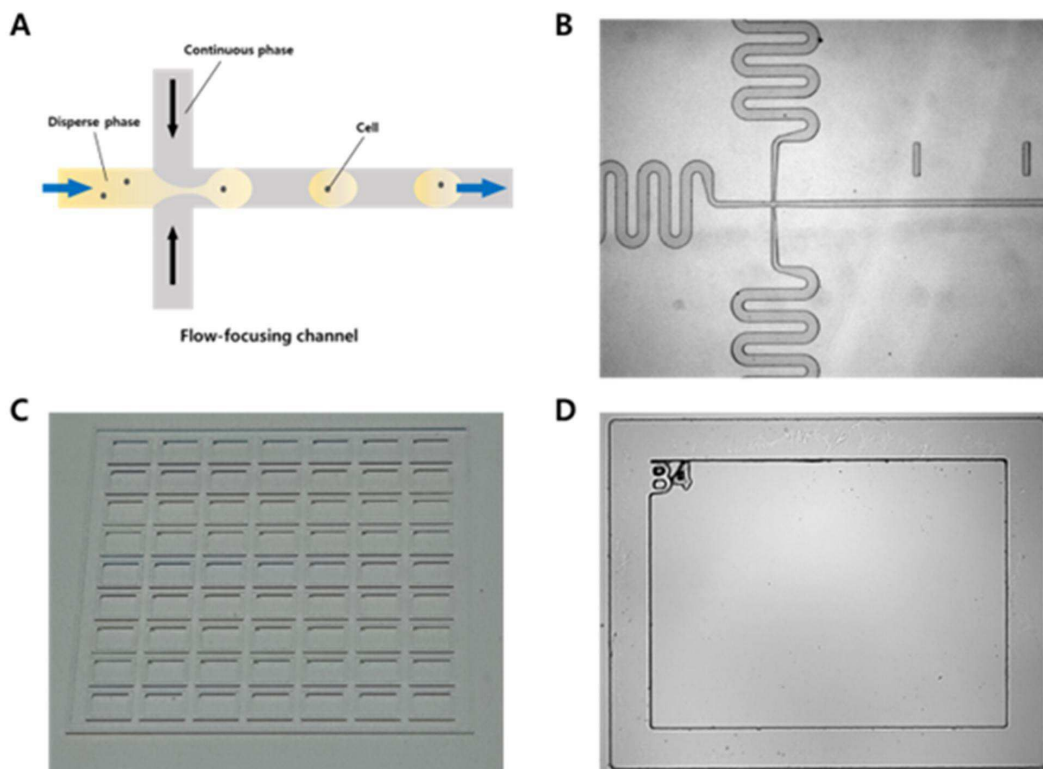
[0059] 계수 방법의 안정도 확인을 위해 형광 이미지에서 계수된 세포의 수를 기준으로 동일한 수의 액적에 대해서 25회 반복적으로 계수를 진행하였다. 계수의 진행은 본 발명 과정에서 완성된(개발된) 프로그램을 활용하였지만 그 원리는 본 발명에 의한 세포 계수 방법에 따른 것이다.

[0060] 형광 개수 대비 얼마나 형광방법과 상관관계가 있는지를 고정된 세포 수(미세액적당 2개의 세포)에 대해서(도 8에서 A), 세포 수를 1~10개로 다양하게 변화시키면서(도 8에서 B) 확인하였다.

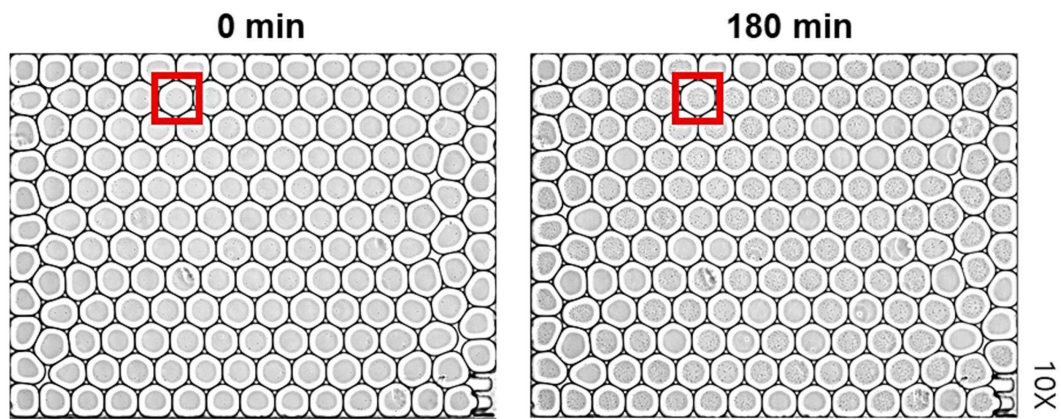
- [0061] 동일한 이미지와 코드를 이용하여 25회 실험을 통해 구한 표준편차에 의해 관리 상한선(upper control line, UCL)과 관리 하한선 (lower control line, LCL)을 지정하였다. 일반적으로 공정에서 관리 한계선인 관리 상, 하한선은 공정을 관리상태로 유지하거나 제조공정이 잘 관리된 상태에 있는가를 조사하고 판정하기 위하여 판단하는 지표로 쓰인다. 따라서 두 한계선 범위의 안쪽에 공정이 있을 때 공정이 잘 관리되고 있음을 의미한다. 이를 본 제안된 방법에 적용하면 도 8의 두 그래프가 모두 관리 한계선 안에 존재하여 제시한 방법이 상당히 신뢰할 만한 방법임을 의미한다.
- [0062] 종래 방법인 형광 이미지와 위상차 이미지를 통해 계수된 세포의 수를 1부터 10까지의 액적 내 세포의 개수에 대해서 상자그림과 관리 한계선을 표기하였다(도 8에서 B). 이를 통해 모든 세포의 개수 범위에서 위상차 이미지를 이용하여 계수된 세포 값의 범위가 관리 한계선 안에 있는 모습을 보여 다음의 제시한 방법이 신뢰할 만한 방법임을 보인다.
- [0063] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의한 미세액적 내 세포 계수 방법은 종래 정확한 세포 계수 방법으로 알려진 형광 이미지 분석법과 비교하여 신뢰성과 안전성이 있음이 확인되었다. 따라서 본 발명에 의해 형광표지와 같은 생화학적 변화가 없더라도 있는 그대로의 실제 병원균이나 다양한 종류의 세포들도 빠르고 정확하게 계수할 수 있을 것이다.
- [0064] 또한 본 발명에 의한 미세액적 내 세포 계수 방법을 응용하여 시간 경과에 따른 미세액적 내 세포 수 변화를 추적하는 것도 가능함을 확인하였다.
- [0065] 또한 벌크한 액상시료의 극히 일부를 분리하여 본 발명에 의한 미세액적 내 세포 계수 방법을 활용하여 상기 액상시료 내 세포 농도/수를 신속하고 정확하게 측정할 수 있음도 당연할 것이다.

도면

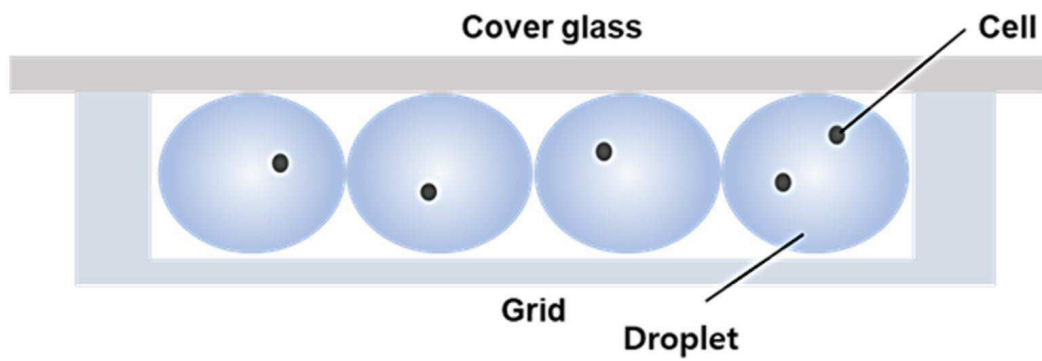
도면1



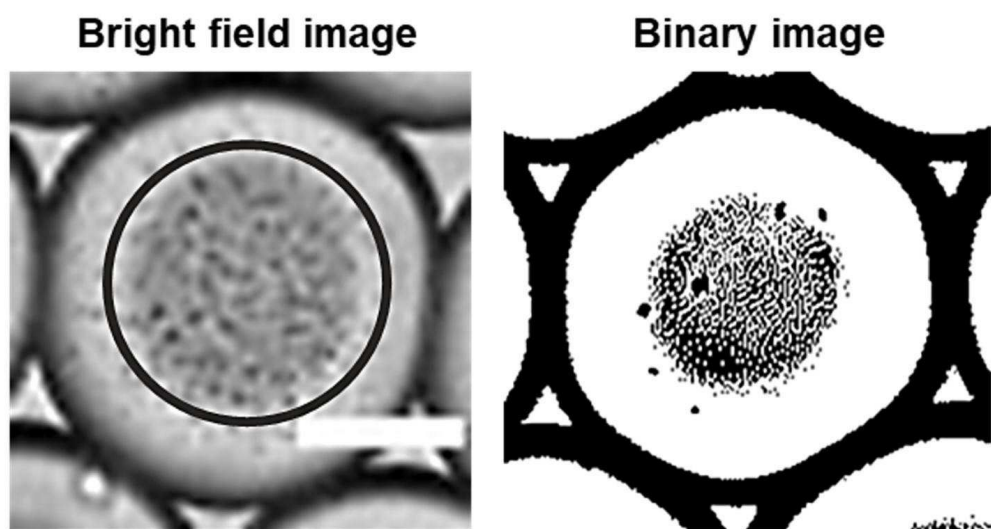
도면2a



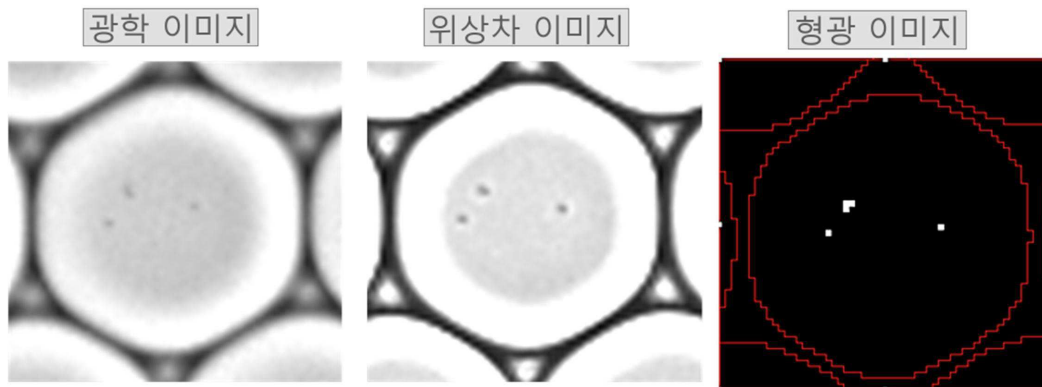
도면2b



도면3

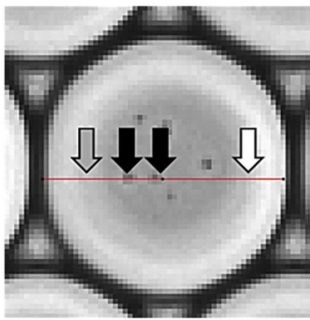


도면4

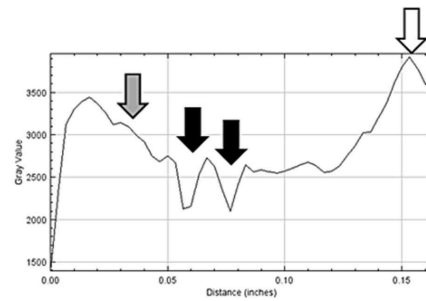


도면5a

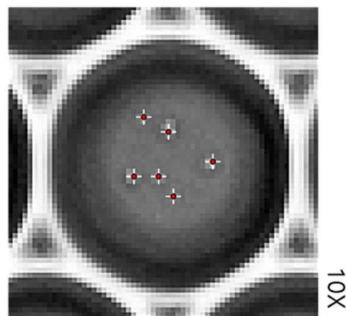
A 그레이 스케일 이미지



B 그레이 수치 프로파일

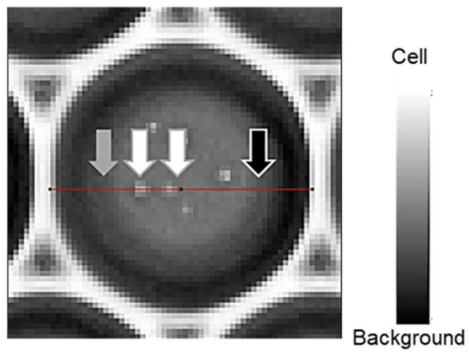


C 형광 이미지

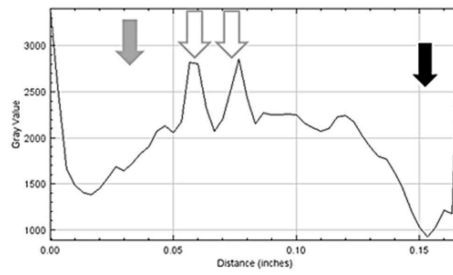


도면5b

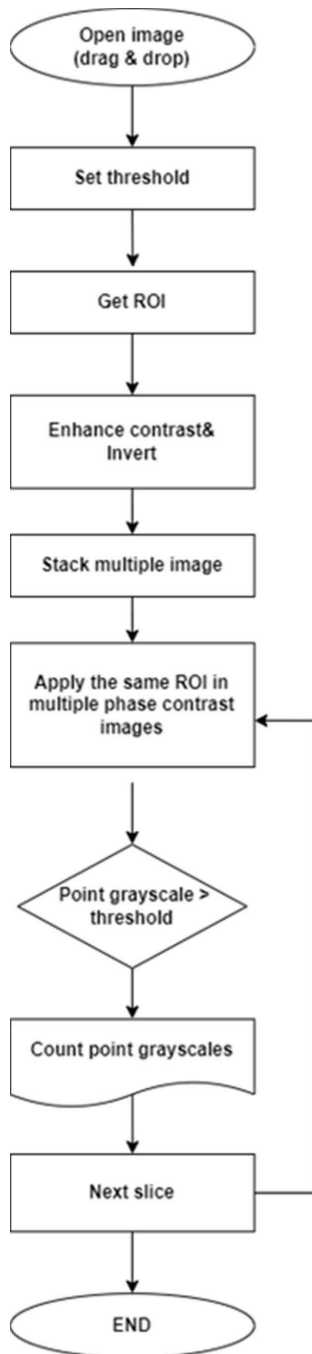
D 반전 이미지



E 반전 그레이 수치 프로파일



도면6a



도면6b

```
//set ROI
//Bright field to binary image
    selectWindow("untitled026.tif");
    setAutoThreshold("Default dark no-reset");

//run("Threshold...");
    setOption("BlackBackground", false);
    run("Convert to Mask");
    run("Despeckle");
    run("Watershed");
    run("Analyze Particles...", "size=0.01-Infinity circularity=0.70-1.00 display exclude clear add");

// empty the results table
    run("Clear Results");

/*****

//counting macro start
//image to stack
    run("Images to Stack", "name=Stack title=[] use keep");

//start stack macro
    selectWindow("Stack");
    roiManager("Show None");
    roiManager("Show All");

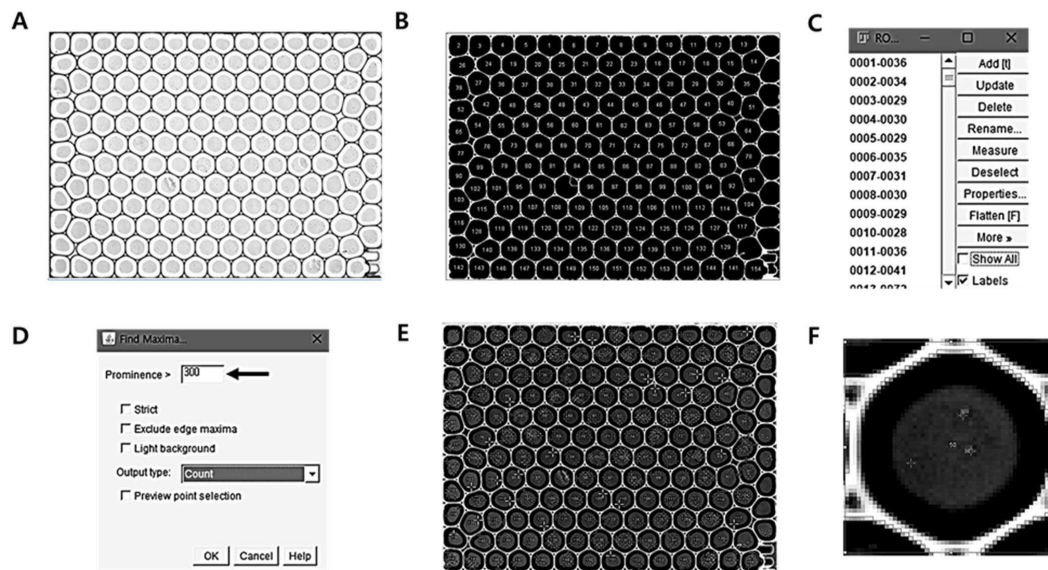
/*****
//loop
for (n=1; n<=nSlices; n++) {
    selectWindow("Stack");
    setSlice(n);

//invert step
    run("Invert");
    run("Enhance Contrast", "saturated=10");

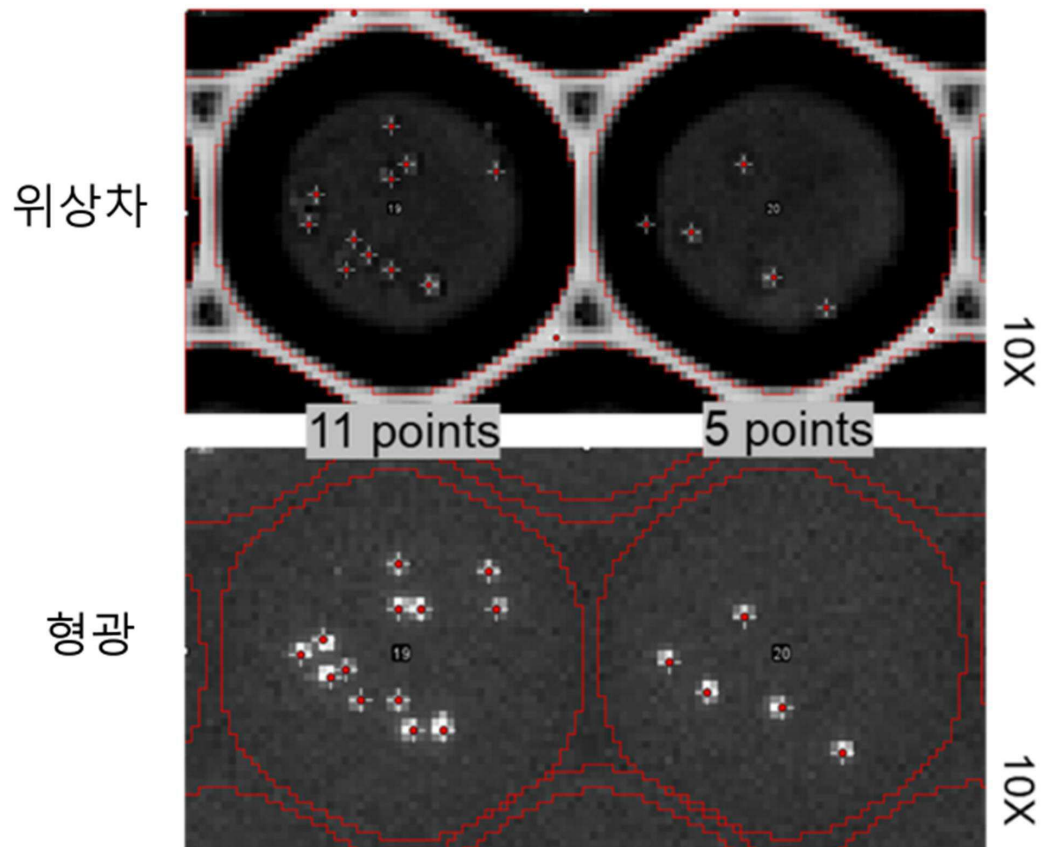
// counting macro
var tolerance = 20;
```

↩

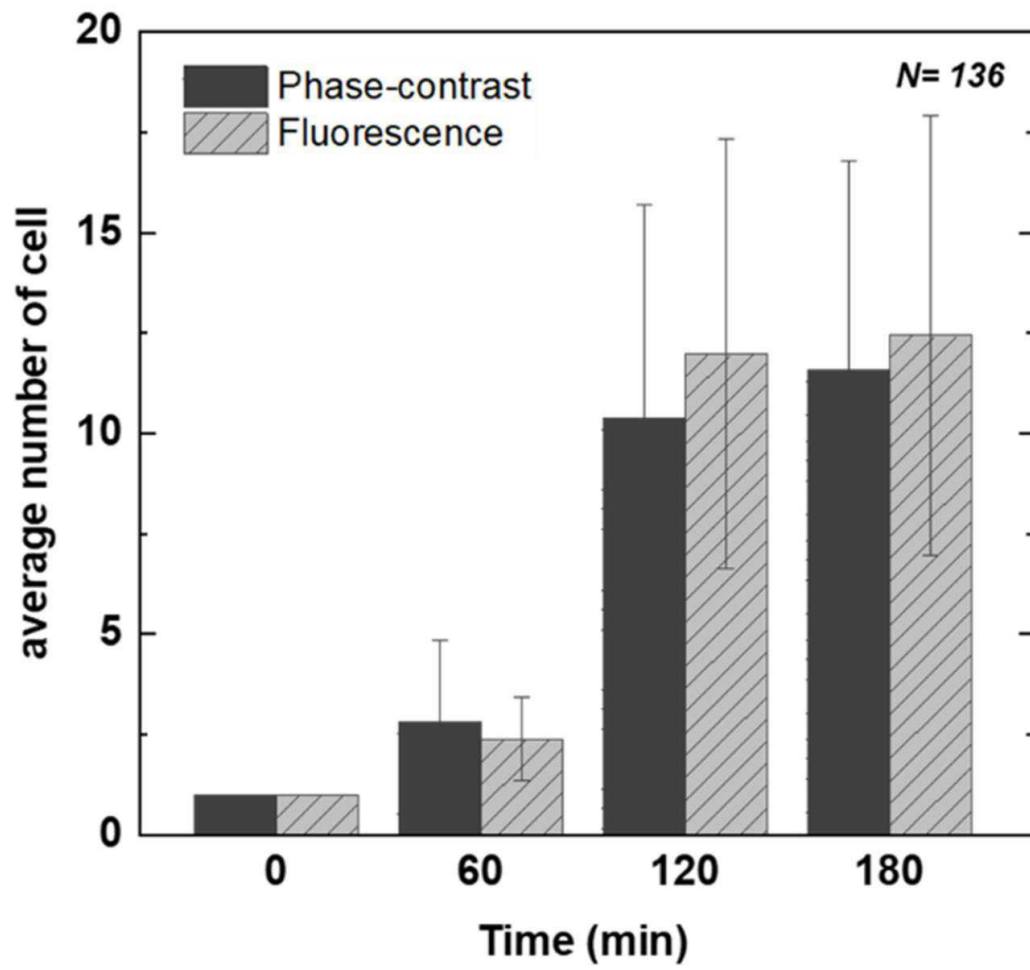
도면6c



도면7a



도면7b



도면8

