



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월09일
(11) 등록번호 10-2086716
(24) 등록일자 2020년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
G01N 33/92 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6851 (2013.01)
G01N 27/622 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0087198
(22) 출원일자 2017년07월10일
심사청구일자 2017년09월15일
(65) 공개번호 10-2019-0006334
(43) 공개일자 2019년01월18일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020120016150 A*
KR1020140133554 A*
US20130214150 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인대구경북과학기술원
대구 달성군 현풍면 테크노중앙대로 333,
(72) 발명자
문대원
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 307동 1308호(전민동, 엑스포아파트)
김재영
대구광역시 달성군 현풍면 테크노상업로 33, 106동 101호(대구테크노폴리스 서한이다음)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 5 항

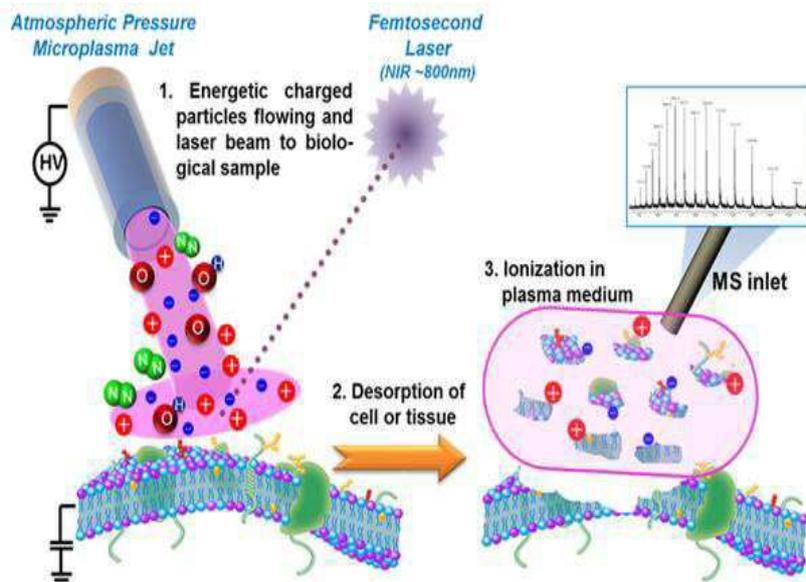
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 살아있는 생체 시료의 분석을 위한 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 살아있는 생체시료의 분석을 위한 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 금 나노입자와 근적외선 펄스 레이저를 탈착원으로 이용하여 시료로부터 분석물질을 탈착시키고, 탈착된 분석물질을 저온 대기압 플라즈마젯 또는 전기 분무원으로 이온화시켜 질량분석과 이미징 분석(뒷면에 계속)

대표도 - 도11



석을 수행하는 단계를 포함하는 금 나노입자가 보조된 대기압 조건에서의 질량분석 이미징 방법 및 근적외선 레이저를 조사하는 레이저부; 저온 대기압 플라즈마 제트를 시료에 공급하는 플라즈마 공급부; 시료가 안착되고 스캐닝 스테이지가 장착되어 자동 스캐닝이 가능한 시료 스테이지부; 상기 시료 스테이지부가 상단에 탑재된 도립형 광학현미경부; 상기 시료로부터 탈착 및 이온화된 분석물질을 질량분석기 내부로 전달하는 이온 전달부; 이온화된 분석물질을 분석하는 질량분석부; 및 분석 결과를 수집, 저장 및 해석하는 프로그램이 장착된 모니터부;를 포함하는, 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/5038 (2013.01)

G01N 33/92 (2013.01)

H01J 37/252 (2013.01)

G01N 2001/4038 (2013.01)

H01J 2237/05 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	17-BD-06
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	대구경북과학기술원
연구사업명	DGIST 일반사업
연구과제명	신경세포 노화 재생 기전 연구
기여율	1/2
주관기관	대구경북과학기술원
연구기간	2016.07.01 ~ 2016.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	17-01-HRMA-02
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	대구경북과학기술원
연구사업명	DGIST 기관고유사업(HRHR)
연구과제명	암 조직 분자 진단을 위한 다중 모달 융합 내시경 개발
기여율	1/2
주관기관	대구경북과학기술원
연구기간	2016.07.01 ~ 2016.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

근적외선 레이저를 조사하는 레이저부;

저온 대기압 플라즈마 제트를 시료에 공급하는 플라즈마 공급부;

시료가 안착되고 스캐닝 스테이지가 장착되어 자동 스캐닝이 가능한 시료 스테이지부;

상기 시료 스테이지부가 상단에 탑재된 도립형 광학현미경부;

상기 시료로부터 탈착 및 이온화된 분석물질을 질량분석기 내부로 전달하는 이온 전달부;

이온화된 분석물질을 분석하는 질량분석부; 및

분석 결과를 수집, 저장 및 해석하는 프로그램이 장착된 모니터부;를 포함하는, 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 이온화된 물질이 질량분석부 내부로 유입될 수 있도록 상기 질량분석부 내부에 펌핑부(pumping system)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템.

청구항 6

제4항에 있어서,

시료로부터 분석물질을 근적외선 레이저 조사로 탈착시킬 때, 상기 시료는 금 나노입자가 처리된 것을 특징으로 하는, 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 금 나노입자는 금 나노로드, 금 나노구체, 금 나노와이어 및 금 나노튜브로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나의 형태인 것을 특징으로 하는, 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 저온 대기압 플라즈마 제트는 비열 대기압 헬륨 플라즈마 제트인 것을 특징으로 하는, 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 살아있는 생체 시료의 분석을 위한 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 분석화학분야에서 다양하게 쓰이는 질량분석법은 유기화합물 이온의 원자 조성과 원자량의 정밀 측정을 통해 유기물의 성분과 구조를 파악하는 매우 유용한 분석방법으로 유기물의 복합체인 세포나 생체조직 또한 질량분석법을 통해 그 물질의 분자정보를 얻을 수 있다. 그러나 일반적인 질량분석법은 고진공 조건에서 시료를 탈착 및 이온화하는 방법을 사용하므로, 수분을 많이 함유하고 있는 생체시료는 복잡한 전처리과정 없이 분석할 수 없다. 따라서 주로 생체시료를 파괴하여 용매에 넣어 분석을 하는 액체 크로마토그래피 또는 전기분무 이온화 질량분석법을 주로 사용하거나, 전처리 과정을 거쳐 시료를 진공 챔버에 넣어 분석하는 이차이온질량분석법 (secondary ion mass spectrometry: SIMS)이나 매트릭스 레이저 탈착이온화 질량분석법 (matrix assisted laser desorption ionization: MALDI)을 사용한다.

[0003] 그러나 이러한 방법은 진공기반의 기술이며 이 때문에 생체 시료를 진공 챔버에 넣기 위해 수분을 없애거나 다른 물질로 치환하는 등 여러 가지 전처리가 필요하며 이 과정에서 시료의 훼손이 발생하여 정확한 분석결과를 얻을 수 없다.

[0004] 이에 이러한 문제점을 극복하고자 최근 미국과 유럽을 중심으로 대기압 질량분석기술을 개발하기 위한 연구가 시작되었고, 그 예로 종이 분무 이온화방법 (paper spray ionization: PSI), 중적외선 레이저 (mid-IR lasers)를 이용한 탈착 이온화방법, 기체 방전을 이용한 실시간 직접 분석법 (direct analysis in real-time, DART), 표면 탄성과 소자를 이용한 시료 분무법 (surface acoustic wave nebulization: SAWN) 등이 개발되었으나 이러한 방법들은 여전히 생체시료 분석 시 오염 문제와 검출 한계 등을 가지고 있으며, 시료의 공간정보를 더해 질량분석 이미징을 구현하는 데에는 전혀 사용할 수 없을 뿐만 아니라 높은 해상도의 이미징을 얻을 수 없어 새로운 대기압 탈착이온화 기술이 요구되고 있는 실정이다.

[0005] 이에 본 발명자들은 생체시료의 대사체 (metabolites), 지질체 (lipids) 및 단백질 체 (proteins)를 연구함에 있어서 수분을 포함하고 있는 훼손되지 않은 생체 시료로부터 직접 여러 생체분자 정보를 얻어 세포나 조직을 구성하는 대사 물질, 지질과 단백질의 조성과 구조를 화학적으로 분석하고 이에 공간정보를 더하여 질량분석 이미징화가 가능한 살아있는 생체시료의 분석을 위한 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1748525호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서 본 발명의 목적은 금 나노입자와 근적외선 펄스 레이저를 탈착원으로 이용하여 시료로부터 분석물질을 탈착시키고, 탈착된 분석물질을 저온 대기압 플라즈마젯 또는 전기 분무원으로 이온화시켜 질량분석과 이미징 분석을 수행하는 단계를 포함하는 금 나노입자가 보조된 대기압 조건에서의 질량분석 이미징 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템을 제공하는 것이다.
- [0009] 또한 본 발명의 다른 목적은 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템을 이용하여 시료의 생체분자 정보를 분석하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한 본 발명의 다른 목적은 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템을 이용한 약물 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 금 나노입자와 근적외선 펄스 레이저를 탈착원으로 이용하여 시료로부터 분석물질을 탈착시키고, 탈착된 분석물질을 저온 대기압 플라즈마젯 또는 전기 분무원으로 이온화시켜 질량분석과 이미징 분석을 수행하는 단계를 포함하는 금 나노입자가 보조된 대기압 조건에서의 질량분석 이미징 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 금 나노입자는 금 나노로드, 금 나노구체, 금 나노와이어 및 금 나노튜브로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 시료는 개체 유래의 살아있는 시료일 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은, 근적외선 레이저를 조사하는 레이저부; 저온 대기압 플라즈마 제트를 시료에 공급하는 플라즈마 공급부; 시료가 안착되고 스캐닝 스테이지가 장착되어 자동 스캐닝이 가능한 시료 스테이지부; 상기 시료 스테이지부가 상단에 탑재된 도립형 광학현미경부; 상기 시료로부터 탈착 및 이온화된 분석물질을 질량분석기 내부로 전달하는 이온 전달부; 이온화된 분석물질을 분석하는 질량분석부; 및 분석 결과를 수집, 저장 및 해석하는 프로그램이 장착된 모니터부;를 포함하는, 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 이온화된 물질이 질량분석부 내부로 유입될 수 있도록 상기 질량분석부 내부에 펌핑부(pumping system)를 더 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 시료로부터 분석물질을 근적외선 레이저 조사로 탈착시킬 때, 상기 시료는 금 나노입자가 처리된 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 금 나노입자는 금 나노로드, 금 나노구체, 금 나노와이어 및 금 나노튜브로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 저온 대기압 플라즈마 제트는 비열 대기압 헬륨 플라즈마 제트일 수 있다.
- [0019] 또한 본 발명은 본 발명의 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템을 이용하여 시료의 생체분자 정보를 분석하는 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 생체분자는 살아있는 상태에서 시료 내에 존재하는 대사물질, 지질 및 단백질로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명은 본 발명의 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템을 이용한 약물 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법은 후보 약물을 시료에 처리하고 상기 시료 내에서의 대사물질, 지질 또는 단백질의 성분, 함량 및 공간적 이동 변화를 후보물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명은 살아있는 생체시편의 분석을 위한 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템에 관한 것으로, 본 발명

에 따른 시스템을 이용한 물질 분석방법은 근적외선 펄스 레이저와 금 나노입자를 탈착원으로 이용하였고, 저온 대기압 플라즈마를 이온화원으로 사용함으로써 대기압 조건 하에서 살아있는 상태의 시료 분석이 가능하고, 다량의 생체분자 정보를 한 번의 분석과정으로 얻을 수 있으며, 고해상도의 질량분석 이미징과 광학 이미징을 얻을 수 있고, 나아가 이러한 시스템을 약물의 효능분석과 약물 스크리닝을 위한 용도로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024]

도 1a는 본 발명에 따른 고정세 대기압 질량분석 이미징 시스템을 나타낸 것으로, ① QE Orbitrap 질량분석기, ② fs 레이저부, ③ 가스 실린더, ④ 5 ch. 가스 유속 제어기, ⑤ 비열 대기압 플라즈마 제트, ⑥ 기류 보조 이온 전달부, ⑦ 자동 스캐닝부(시료 스테이지), ⑧ 인버트 현미경, ⑨ HV driving circuit 및 HV 프로브, ⑩ 자동 스캐닝부의 조이스틱, ⑪ 현미경 이동을 위한 긴 드라이브 스코프 스테이지(long drive scope stage), ⑫ 현미경 이미징 모니터, 스캐닝 소프트웨어 및 MS 소프트웨어를 위한 PC를 각각 나타낸 것이다.

도 1b는 본 발명에 따른 시료 분석의 전반적인 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 대기압 nanoPALDI 질량분석 시스템에서 fs 레이저 발진기, 대기압 플라즈마 제트 및 기체흐름 보조용 이온 전송 장비와의 연결된 모습을 나타낸 것으로, (a)는 대기압 MS 시스템의 사진을 나타낸 것이고, (b)는 스테이지 상에서 대기압 하에서의 탈락 및 이온화 과정을 모식도로 나타낸 것이고, (c)는 이색성 거울을 이용한 가시광선 및 근적외선 간의 다른 빛 경로를 나타낸 것이다.

도 3에서 (a)는 이온 이송관, 챔버 및 건조펌프로 구성된 기체흐름 보조 이온 전달 장비에 관한 것이고, (b)는 맞춤형 챔버를 나타낸 것으로, 챔버는 챔버의 측면 홀에 연결되며, 이온 이송관을 통해 MS 입구 안쪽으로 공기를 흐르게 한다. (c)는 샘플 스테이지 상에서 질량분석 동안의 분석과정을 나타낸 사진이고, (d)는 분석과정의 모식도를 나타낸 것이다.

도 4a는 공기 보조 이온 이송 장비로 분석한 결과를 나타낸 것으로, 상단 그래프는 펌프 작동 이전과 이후의 MS 소프트웨어 상에서 TIC(총 이온 흐름)을 나타낸 것이며, (A)는 펌프 작동 이전을 나타낸 것이고, (B)는 펌프 작동 이후를 나타낸 것이다.

도 4b는 mPEG-AuNRs의 광학적 특성 분석 결과를 나타낸 것으로, (a)는 mPEG-AuNRs를 증류수에 용해시켜 UV-Vis 스펙트럼을 얻은 것이고, (b)는 mPEG-AuNRs의 HR-TEM 사진을 나타낸 것이다.

도 5는 마우스 해마의 조직 절편의 질량분석 이미지 및 광학 이미지를 나타낸 것으로, 상단의 두 개의 도면은 DIC(differential interference contrast) 이미징 사진을 나타낸 것이고(Before: 분석 전, After: 분석 이후), 하단의 이미지들은 특정 물질의 특정 m/z 위치에서 확인된 이온의 이미지들을 나타낸 것이다.

도 6은 MS 이미징에 의해 마우스의 해마 조직의 서브 영역에 대한 검출된 이온들의 공간 분포도를 분석한 결과를 나타낸 것으로, CA1, CA3, DG 영역에서의 분석 결과를 나타낸 것이다. (a)는 MS 분석 이전의 것을 나타낸 것이고, (b)는 MS 분석 이후의 사진을 나타낸 것이며, (c) 및 (d)는 분석된 이온 이미지들을 CA1, CA3, DG와 비교한 것을 나타낸 것이고, (e)는 Biomap 소프트웨어에서 ROI 분석기능을 이용하여 6개의 동일한 ROI가 CA3의 아테닌 경계를 기준으로 양측에 할당한 것을 나타낸 것이고, (f)는 분석된 이온들의 상대적인 분포정도를 나타낸 것이며, (g)는 CA3에서 MAG (18:1) 및 아테닌의 이온 강도의 분포를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 nanoPALDI 분석 후의 해마 조직 시편의 형태학적 변화를 나타낸 것으로, (a)~(e)는 대기압 질량분석 후, 2750 cm^{-1} ~ 2950 cm^{-1} 의 진동모드에 대한 CARS(Coherent anti-stokes Raman scattering) 이미지를 나타낸 것이다. 구체적으로 (a)은 상단 평면도를 나타낸 것이고, (b)는 주황색 사각형의 측면도를 나타낸 것이며, (c)는 빨간 사각형을 확대한 사진이고, (d)는 CARS 강도 프로파일을 나타낸 것이며, (e)는 (a)의 수평과선 점선을 가로지르는 횡단면을 나타낸 것이며, (f)는 3D 공초면 이미징에 의한 선형 패턴 프로파일을 나타낸 것이고, (g)는 헬륨 이온 마이크로스코피 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 진공 기반의 이차 이온 질량 분석기(SIMS)으로 측정된 본래의 콜레스테롤 분포도의 왜곡을 나타낸 것으로, (a)는 HIM 이미지 분석 사진을 나타낸 것이고, (b)는 SIMS 이미지 분석 사진을 나타낸 것이다.

도 9는 약물영향 조사를 위해 2가지 다른 조건 처리에 따른 이온 이미지 분석 결과를 나타낸 것으로, (a)는 정상 해마 조직을 나타낸 것이고, (b)는 β -cyclodextrin ($m\beta$ CD)가 처리된 해마조직을 나타낸 것이다.

도 10은 HEK 세포주에서 레이저로 유도된 탈착 과정을 나타낸 사진이다.

도 11은 본 발명에 따른 고정세 대기압 질량분석 시스템에 의한 물질 분석의 원리를 모식도로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 세포나 생체 조직을 파괴하지 않고 살아있는 상태에서 대사물질, 지질 및 단백질 등 세포 내 대사물질들의 질량과 조성을 분석하고 영상화할 수 있는 고해상도 대기압 질량분석 이미징 기술을 제공하는 점에 특징이 있다. 이를 위해 대기압 탈착원 및 이온화원을 개발하고, 기체흐름 이온 입자 전달 장치를 통해 단일 세포 수준 (single cellular level)의 대기압 질량 분석 기술을 개발하였으며, 스캐닝 장치를 추가하여 생체 분자정보에 공간적인 분포 정보를 더해 시료 내 지질, 단백질 등 대사물질에 대한 질량분석 이미징을 고해상도로 획득하였다.
- [0026] 종래 개발되어 사용되고 있는 대표적인 질량분석 이미징 기술인 이차이온질량분석법(SIMS)은 진공 챔버에 시료를 넣기 위한 별도의 전처리 과정이 필요하고 높은 분자량에 대해서는 분석이 불가하며(800Da 미만의 것만 분석 가능), 살아있는 시료에 대한 분석은 불가능하다. 또한 다른 기술인 매트릭스 레이저 탈착이온화 질량분석법(MALDI)은 대기압 하에서 분석 수행을 위해 자외선 대역의 레이저를 사용해야 하므로 레이저의 위치가 시료와 가까워야 하기에 시스템 구성에 불편이 있으며, 매트릭스 처리가 필요하여 살아있는 시료의 분석이 어렵다. 또한 탈착전기분무 이온화법(DESI)은 질량분석 이미징의 공간분해능이 낮은 문제점이 있고 용액으로 시료를 닦아 내면서 분석하는 방식이기에 이 또한 살아있는 시료에 대한 분석은 불가능하다. 한편, 본 발명의 경우 살아있는 시료를 대상으로 고해상도로 질량분석 및 이미징 분석을 동시에 수행할 수 있는 새로운 분석 시스템을 개발한 것으로, 이를 위해, 대기압 분위기에서 시료에 열적 손상이 최소화되는 조건으로 시편의 이온화 및 탈착 과정이 이루어져야 하므로 저온 대기압 탈착/이온화원이 필요하여 근적외선 펄스 레이저를 이용하여 광학경로를 거쳐 렌즈를 통해 시료의 아주 작은 영역에 집중하여 생체시료로부터 분석물질을 탈착시키고 이를 대기압 플라즈마젯이나 전기분무원을 이용하여 이온화시켜서 고성능 질량분석기를 통해 분석할 수 있도록 하였다. 또한, 이온화된 분석물질이 질량분석기까지 잘 전달되도록 하는 이온전달 시스템을 제작하고 높은 해상도의 질량분석 이미징을 구현하기 위한 자동 스캐닝 장치를 스테이지에 결합하여 새로운 대기압 질량분석 이미징 시스템을 개발함으로써 생체시료 내의 다양한 대사체, 지질체, 단백질체에 대한 분자정보를 얻고 그 정보를 영상화시켰다.
- [0027] 본 발명에서 개발한 고해상도 대기압 질량분석 이미징 기술을 이용한 생체시료 내 대사물질의 분석과정을 하기에서 보다 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명은 금 나노입자와 근적외선 펄스 레이저를 탈착원으로 이용하여 시료로부터 분석물질을 탈착시키고, 탈착된 분석물질을 저온 대기압 플라즈마젯 또는 전기 분무원으로 이온화시켜 질량분석과 이미징 분석을 수행하는 단계를 포함하는, 금 나노입자가 보조된 대기압 조건에서의 질량분석 이미징 방법을 제공함에 특징이 있다.
- [0029] 또한 본 발명은 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템을 제공하는데 특징이 있는데, 상기 시스템은 근적외선 레이저를 조사하는 레이저부; 저온 대기압 플라즈마 체트를 시료에 공급하는 플라즈마 공급부; 시료가 안착되고 스캐닝 스테이지가 장착되어 자동 스캐닝이 가능한 시료 스테이지부; 상기 시료 스테이지부가 상단에 탑재된 독립형 광학현미경부; 상기 시료로부터 탈착 및 이온화된 분석물질을 질량분석기 내부로 전달하는 이온 전달부; 이온화된 분석물질을 분석하는 질량분석부; 및 분석 결과를 수집, 저장 및 해석하는 프로그램이 장착된 모니터부;를 포함한다.
- [0030] 상기 레이저부는 대기압 하에서 시료의 탈착원으로 사용할 근적외선 펄스 레이저를 조사하는 곳이며, 근적외선은 대기압에서 빔이 산란되지 않아 대기압 하에서 시료 탈착을 위한 소스로 사용하였다.
- [0031] 상기 근적외선 레이저는 고배율의 대물렌즈를 통해 빔을 집중하여 스 마티크로미터 크기의 빔으로 형성될 수 있다.
- [0032] 또한 본 발명에서는 더욱 효과적인 탈착을 위해, 근적외선 대역을 흡수하는 나노입자를 함께 사용하였는데, 상기 나노입자로는 금 나노입자를 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용할 수 있는 상기 금 나노입자는 이에 제한되지는 않으나, 금 나노로드, 금 나노구체, 금 나노와이어 및 금 나노튜브로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있으며, 본 발명의 일실시예에서는 금 나노로드를 제조하여 사용하였다.
- [0034] 상기 플라즈마 공급부는 저온 대기압 플라즈마젯(plasma jet)을 시료에 공급하는 곳으로, 상기 플라즈마젯은 2mm의 내경과 3mm의 외경을 갖는 석영관에서 발생된다.

- [0035] 상기 공급부를 통해 발생된 대기압 플라즈마젯은 시료로부터 탈착된 분석물질을 이온화시키는 역할을 한다.
- [0036] 또한 본 발명의 일실시예에서는 상기 플라즈마젯으로 비열 고순도 헬륨 플라즈마젯을 사용하였고, 분석 시료에 대해 30도의 입사각을 갖도록 배치시켰다.
- [0037] 상기 시료 스테이지부는 분석대상의 시료를 안착시키는 곳이며, 명확하고 빠른 이미징 분석을 위해 스캐닝 스테이지가 장착되어 있어 자동 스캐닝이 가능하다. 상기 스캐닝 스테이지는 x-y축의 좌표가 설정되어 있으며, 상기 시료 스테이지부는 독립형 광학현미경부의 상단에 탑재된 형태로 위치한다.
- [0038] 상기 독립형 광학현미경부는 광학현미경 분석을 통해 시료를 광학 이미징화하여 형태를 관찰할 수 있도록 하였고, 또한 다이크로익 미러를 장착시켜 근적외선 레이저 빔의 경로와 가시광의 경로를 분리하여 광학 이미징과 질량분석 이미징을 동시에 얻을 수 있도록 하였다.
- [0039] 또한 이색성 빔 스플리터(dichroic beam splitter; FF720-SDi01, Semrock)을 설치하여 독립형 광학현미경에 fs 근적외선 레이저 빔을 도입시켰으며, 따라서 별도의 대물렌즈 없이도 생물학적 시료에서 광학 이미징 모니터링과 레이저에 의한 탈착이 동시에 가능하도록 하였다.
- [0040] 상기 이온 전달부는 시료로부터 탈착 및 이온화된 분석물질을 질량분석기 내부로 전달하는 역할을 하며, 상기 이온전달부는 구체적으로 챔버, 건조펌프 및 이온 이송관으로 구성되어 있다(도 3 참조). 상기 챔버는 질량분석기 입구에 장착되며, 상기 이온 이송관은 스테인레스 스틸 관을 사용하였고 시료 스테이지에 대해 30도의 하향 굴곡을 갖도록 위치시켰다. 상기 건조펌프는 이온 이송의 증진을 위해 보조 기체흐름을 제공하기 위해 장착된 것으로 챔버 측면의 구멍으로 연결되어 있다.
- [0041] 플라즈마젯에 의해 시료 유래 탈착/이온화된 분석물질은 이온 전달부를 통해 질량분석기 내부로 전달되어지며, 상기 전달은 질량분석기 내부에 설치된 펌핑부에 의한 기체흐름의 보조에 의해 이온화된 분석물질이 이송된다.
- [0042] 본 발명의 일실시예에서는 기체흐름이 보조된 이온전달부에 의한 분석물질의 총 이온을 측정하였는데, 도 4a에 나타낸 바와 같이, 펌핑 작동 이전과 이후의 TIC의 차이가 약 40배나 되는 것으로 나타났고, 즉 펌핑 작동에 의한 기체흐름 보조작용으로 질량분석기에서 분석된 총 이온이 펌핑 작동 없이 분석한 결과에 비해 약 40배 증가된 이온 강도를 나타내었다.
- [0043] 이온화된 분석물질을 분석하는 질량분석부는 종래 물질의 질량을 측정할 수 있는 질량분석기를 이용할 수 있으며, 본 발명의 일실시예에서는 Thermo Fisher Scientific사에서 구입한 질량분석기를 사용하였다.
- [0044] 또한 상기 분석 결과를 수집, 저장 및 해석하는 프로그램이 장착된 모니터부는 상기 질량분석부에서 분석한 결과 및 독립형 광학현미경 분석한 이미징 결과들을 모두 수집하고 저장하며 해석하는 프로그램을 통해 분석 결과를 도출하는 곳이다.
- [0045] 상기 본 발명에서 고안한 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템은 시료의 생체분자 정보를 분석하는 것에 사용될 수 있다.
- [0046] 즉, 살아있는 상태에서 시료 내에 존재하는 대사물질, 지질 및 단백질 등 다양한 생체분자를 분석하고 그에 대한 정보를 얻을 수 있다.
- [0047] 따라서 본 발명은 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템을 이용하여 시료의 생체분자 정보를 분석하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0048] 상기 생체분자는 살아있는 상태에서 시료 내에 존재하는 모든 생체분자를 의미하는 것이며, 구체적으로는 이에 제한되지는 않으나, 대사물질, 지질 또는 단백질일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일실시예에서는 마우스의 해마조직을 시료로 하여 해마조직 내에 존재하는 생체분자들의 함량, 분포도, 위치 등을 분석할 수 있음을 확인하였다.
- [0050] 뿐만 아니라 본 발명은 고해상도 대기압 질량분석 이미징 시스템을 이용한 약물 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.
- [0051] 구체적으로, 상기 방법은 후보 약물을 시료에 처리하고 상기 시료 내에서의 대사물질, 지질 또는 단백질의 성분, 함량 및 공간적 이동 변화를 후보물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일실시예에서는 본 발명의 시스템을 활용하여 약물 스크리닝이 가능한지를 확인하기 위해, 메틸-β-

시클로텍스트린을 처리한 조직 및 처리하지 않은 조직에서의 콜레스테롤 고갈 현상을 분석하였다.

[0053] 분석 결과, 본 발명의 시스템 분석으로 확보된 이미징에서 콜레스테롤의 피크 변화를 명확히 확인할 수 있었다 (도 9 참조).

[0054] 따라서 이를 통해 본 발명자들은 본 발명의 시스템을 약물 효능 분석을 위한 용도, 질환 치료제를 스크리닝 하는 용도 등에 모두 사용할 수 있음을 알 수 있었고, 나아가 약물에 대해 살아있는 상태의 시료(조직) 내에서 생물학적 물질의 변화를 질량분석 결과와 이미징 결과를 한 번에 다량으로 얻을 수 있는 효과가 있다.

[0056] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0058] <재료 및 실험방법>

[0060] ① 질량분석기

[0061] 질량분석기는 Thermo Fisher Scientific사에서 구입한 Q-Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer를 이용하였다. 질량분석을 위해 분석기의 작동 요건을 다음과 같은 조건에서 수행하도록 하였다.

[0062] - 양이온 모드(positive ion mode)

[0063] - 질량 해상도: 35000

[0064] - 질량 범위: 1001000 m/z

[0065] - 1 마이크로스캔

[0066] - 100 ms의 최대 주입 시간

[0067] - 10⁶ AGC(automatic gain control)

[0068] - 질량분석관 온도: 350° C

[0070] ② 근적외선 레이저(Near infrared fs lasers)

[0071] fs 근적외선 레이저 발진기(oscillator)는 MS(질량분석기) 시스템에서 탈착 소스(source)로 사용하였다. fs 근적외선 레이저는 75 MHz, 802nm에서 20 펨토초 미만의 5nJ 최대 단일 펄스 에너지를 갖는 mode-locked Ti-Sapphire oscillator (Synergy 20, Femtolasers)로 되어 있다. fs 레이저 시스템의 에너지는 시료의 분석 단계에서 사용되는 도립형(inverted) 광학 현미경의 후면 포트(rear port) 앞에 등급이 매겨진 중성 밀도(neutral density (ND)) 필터로 조절된다. fs 레이저 빔은 현미경의 대물렌즈 주입용 조리개(input aperture) 앞에 다이 크로익 빔 스플리터(FF720-SDi01, Semrock 사)를 위치시켜 도립현미경(inverted microscope)에 통합되도록 하였다. 시료에 대한 최종 펄스 에너지는 802nm에서 2nJ이 되도록 하였다.

[0072]

[0073] ③ 대기압 플라즈마젯(Atmospheric pressure plasma jet)

[0074] 대기압 플라즈마젯은 DBD(dielectric barrier discharge)젯을 위해 일반 듀얼 전극 배열을 사용하였다. 비열(nonthermal) 플라즈마젯은 2mm의 내경 및 3mm의 외경을 갖는 석영관(quartz tube)에서 발생하도록 하였다. 6mm 크기의 전극은 석영관을 구리 테이프로 싸서 제조하였고, 안쪽 끝과의 간격이 7mm가 되도록 하였다. 접지 전극(ground electrode)는 상부를 향하도록 하였고, 전력공급전극은 하부를 향하도록 하였으며, 관 오리피스(orifice)로부터 5mm의 거리가 되도록 하였다. 이것은 소량 방전 전류를 갖는 DBD(dielectric barrier discharge) 장치이다. 5kV의 입력전압 및 27 kHz의 진동수를 갖는 정현파 전압(sinusoidal voltage)을 플라즈마 제트 장치에 공급하였다. 고순도 헬륨 가스는 0.5slm의 유속을 갖는 고순도 헬륨가스를 방전가스(discharge gas)로 사용하였다. 상기 플라즈마 장치는 시료에 대해 30°의 입사각을 갖는 방향이 되도록 위치시켰다.

[0076] ④ 기체흐름 보조를 위한 이온 전달부

[0077] 기체흐름 보조를 위한 이온전달부는 챔버, 이송관 및 건조펌프로 구성된다. 상기 챔버는 맞춤형 챔버로서 이송관(transfer tubing)이 질량분석기 입구에 설치되어 있고 챔버 옆면에 펌프 연결이 가능하도록 설치되어 있다. 스테인레스 스틸 관(stainless steel tubing)(i.d. 4.57 mm, o.d. 6.35 mm, length 120 mm)은 시료 스테이지(stage)에 대해 30도의 하향 굴곡 밴드를 갖도록 위치시켰고, 60도의 커브형 유리관(i.d. 2 mm, o.d. 2.5 mm,

length 20 mm)는 시료 유래의 분자들과 이온들의 효율적인 수집을 위해 이송관에 연결시켰다. 건조 펌프(WOB-L pump 2546, Welch Vacuum)는 이송관의 이온 이송 향상을 위해 보조 기체흐름을 제공하기 위해 사용하였으며, 펌프는 o.d. 6.35 mm (1/4 inch)를 갖는 실리콘 관을 챔버의 측면 구멍에 연결시켰고, 펌프의 펌핑용량은 30 l/min이 되도록 하였다.

[0079] ⑤ 프로그래밍이 가능한 자동 스캔

[0080] 질량 스펙트럼 데이터는 라인 스캔의 다발(bundles) 형태로 획득된다. 프로그래밍이 가능하도록 모터화된 X-Y 스캐닝 스테이지(AS-MIX73-C, iNexus)에서 스테퍼 모터(stepper motor)는 조이스틱 및 모션 조절 프로그램을 통해 외부에서 조절되도록 하였다. 스캐닝의 모든 요소인 X-Y 좌표, 스캔 속도, 스캔 방향, 중단 시간 및 스캔수는 맞춤형 스테이지 제어 소프트웨어를 이용하여 프로그래밍하였다. 또한, 모션 제어 프로그램은 로직 신호를 스캐닝 스테이지와 질량 분석기에 동시에 전달하였다. 이를 통해 스캐닝 과정에서 높은 정확도로 MS 데이터를 수집하고 동기화 할 수 있다. 시료 스테이지는 X 방향으로 이동되면서 라인 스캐닝 되고, MS 이미징을 위해 Y 방향으로 보내진다. X 방향의 각 단일 라인 스캔은 하나의 데이터 파일로 저장하도록 하였다. 이러한 질량분석기는 데이터 수집 프로그램의 시퀀스 모드를 이용하여 하나의 실험에서 수백개의 데이터 파일을 얻을 수 있다. 분석 영역 유래의 다수 스캔 라인의 데이터 파일들은 X 방향 및 제공된 Y 방향에서 라인 스캔이 세팅되도록 X 및 Y좌표에 대해 MS 이미지 플롯을 하나의 데이터로 어셈블 하였다.

[0082] ⑥ MSI를 위한 소프트웨어

[0083] Thermo (Prosolia)용 FireFly 2.2.00는 이미지 시각화 및 처리 소프트웨어 프로그램인 BioMAP와 호환되는 MS 이미징 파일 형식으로 데이터 세트를 추출하고 결합하는데 사용하였다(Novartis Institutes for BioMedical Research, <http://www.maldi-msi.org>). BioMAP은 모든 영상을 재구성하고 본 연구에서 이온 분포 영상의 표시에 사용되었다. 강도 맵(Intensity maps)은 분석물질의 m/z값에 해당하는 강도 범위를 선택하여 표시하였다.

[0085] ⑦ mPEG-modified gold nanorods (mPEG-AuNRs) 제조

[0086] 다음의 방법으로 CTAB-AuNRs ($\lambda_{max}=800nm$)을 합성하였다. 이를 위해 먼저 씨드 용액(seed solution)을 0.25ml의 HAuCl₄(0.01M)을 함유한 CTAB (0.1 M) 9.75ml 및 차가운 NaBH₄(0.01M) 용액 0.6ml을 혼합하여 제조하였다. 혼합한 용액은 2분 동안 28°C의 온도에서 3시간 동안 격렬하게 교반시켰다. 다음 단계로 성장용액을 제조하였는데, 성장 용액은 3 mL의 AgNO₃(0.01M), 20mL의 HAuCl₄(0.01M) 및 3.2mL의 아스코르빅산(0.01M)을 CTAB (0.1 M)에 첨가하고 혼합하여 제조하였다. 이후 3.2ml의 씨드 용액을 첨가하여 반응 혼합물을 제조하였고, 이를 몇초 동안 부드럽게 흔들어 준 다음, 28°C에서 6시간 동안 그대로 유지시켰다. AuNRs이 형성되면 용액의 색상이 자주색으로 변하였다. 형성된 AuNRs은 평균길이 41.9 (± 4.4)nm, 너비 12.2(± 1.3)nm, 표면 플라즈몬 공명 피크(λ_{max})는 약 765nm 인 것으로 관찰되었다(도 4b 참조). mPEG-modified AuNRs의 제조를 위해, 20 mL의 CTAB-AuNRs 용액을 15,000rpm에서 15분 동안 원심분리 하였고, 상등액을 제거한 후, AuNRs를 10ml의 증류수로 재분산시켰다. 상기 용액에 mPEG-SH (2.0 mg)을 첨가하고 이어 10ml의 에탄올을 첨가하였다. 용액을 몇초 동안 격렬하게 교반한 다음, 12시간 동안 부드럽게 교반시켰다. 비-반응된 mPEG은 12000rpm으로 15분간 원심분리하여 제거하였고, mPEG-modified AuNRs을 물에 현탁시켰으며, 제조된 섬유화된 mPEG-AuNRs의 광학적 특성을 분석하였다.

[0087] ⑧ 해마 뇌 절편의 제조

[0089] 6주령의 수컷 ICR 쥐를 Koatech(Pyeongtaek, Korea)으로부터 구입하였고, 무균 상태에서 사육하였다. 모든 실험은 대구경북과학기술원에서 승인한 동물 실험 안전 교육 지침에 따라 수행하였다. 쥐로부터 뇌를 추출한 다음, 해마를 분리하였고 조직용 칼(McIlwain tissue chopper, Cavey Laboratory Engineering)을 이용하여 200um의 두께가 되도록 조직을 절편화시켰다. 절편들은 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM KH₂PO₄, 26mMNaHCO₃, 2mMMgSO₄, 2.5mM CaCl₂, 10mMD-glucose 및 4mM D-수크로스를 함유한 산화된 수크로스 인공 대뇌 척수액으로 32° C에서 2시간 동안 아쿠라이리움 버블러를 이용하여 95%의 산소 및 5% 이산화탄소로 버블화하여 통기화시켰다. 콜레스테롤의 제거를 위해, 각 절편들은 수크로스가 없는 인공 대뇌 척수액(ACSF)으로 세척한 다음, 32° C에서 6시간 동안 25 mg/ml methyl β-Cyclodextrin (mβCD, Sigma-Aldrich)가 처리된 수크로스가 없는 인공 대뇌 척수액으로 반응시켰다. 이때 대조군으로는 mβCD를 처리하지 않은 군을 사용하였다. 6시간 통기화 시킨 후, AuNRs(Optical density 10.0 at 800 nm, 200 μl)을 함유한 인공 대뇌 척수액 5ml으로 각 절편들을 침수시켰고, AuNRs로 1시간 동안 반응시킨 후, 해마 절편들을 10번 세척한 후, 0.1% polyethylenimine

(PEI, in 25 mM borate buffer)가 코팅된 슬라이드에 위치시켜 조직인 부착되도록 하였다. 준비된 조직 시료들은 본 발명의 시스템으로 분석할 경우, 완전히 건조시킬 필요가 없으므로 분석을 20분 이내에 시작할 수 있다.

[0090]

[0091] ⑨ 3D CARS 이미징

[0092] 질량분석 이미징 분석 후, 시료들은 4% 파라포름알데히드로 4°C에서 밤새도록 고정시켰다. 이후, 이미징 챔버에 고정시키기 전에 물과 에틸알코올로 철저하게 세척하였다. 광학이미지는 초고속 펄스(~ 120fs) 레이저 소스 (Insight deepsee dual, Spectra physics) 및 xy 방향 갈바노 메트릭 스캐너(FV-1000, Olympus)를 조합하여 제작한 Coherent Anti-Stokes 라만 산란 스캐터링(CARS) 현미경으로 수집하였고, 이때 상기 갈바노 메트릭 스캐너는 20× 대물렌즈(UPLSAP020X, NA:0.75)가 구비된 변환된 microscopic system (IX-83, Olympus)이 장착되어 있다. 지질(지방)에 민감한 화학적 대조는 802nm의 펌프와 2860 cm⁻¹의 중앙 진동 모드로 조정된 1041 nm의 Stokes pulse trains (80 MHz)의 혼합으로 생성되었다. 획득된 CARS 이미지들은 Olympus Fluoview 1.7a 소프트웨어를 이용하여 분석 및 프로세스화 하였다. Z-방향으로 스캔된 이미지들은 0.5um의 축 스텝 사이즈로 쌓여 단면적 뿐만 아니라 3D 이미지가 생성되도록 하였다. 축적된 이미지들은 Amira® 5.3.3 이미지 분석 소프트웨어 (Visualization Sciences Group)를 사용하여 더 많은 그래픽 효과를 위해 3D 구조가 되도록 하였다.

[0094] ⑩ 3D 공초점 레이저 스캐닝 이미징

[0095] 레이저 탈착 과정 후, 상기 조직 절편들을 4% 파라포름알데히드 용액을 이용하여 상기 CARS 방법으로 조직을 고정시켰다. 광학 이미지들은 공초점 레이저 스캐닝 현미경(LSM-700, Carl Zeiss)을 이용하여 수집하였고, 본 발명에서 사용한 상기 공초점 레이저 스캐닝 현미경은 레이저 스캐닝 유닛이 장착된 Zeiss AxioImager Z2m 현미경을 사용하였다. 광학 트레인에는 100×/0.8 HD Zeiss EC Epiplan 대물렌즈가 장착되어 있다. 빛은 405nm의 단색광을 생성하는 5mW 고체 레이저로 조사하였다. Z-방향으로 스캔된 이미지들은 0.7um의 축 스텝 크기로 축적하여 3D 이미지들과 단면적 보기를 생성하도록 하였다. 이미지 자료 및 분석은 LSM Software (ZEN 2010M)를 이용하여 분석하였다.

[0096]

[0097] ⑪ 헬륨 이온 현미경 이미지

[0098] 헬륨 이온 현미경(Helium ion microscopy (HIM)) 분석은 Orion NanoFab (Carl Zeiss)을 이용하여 35keV 및 0.05~0.5p-A프로브 전류에서 수행하였다. 특히 비전도성 코팅은 이미징 분석 이전에 시료에 처리하였다. 헬륨 이온 현미경 분석을 위한 준비사항은, 55도의 경사, 0.244 pA 빔 전류, 평균 128의 스캔수, 10.92 mm 작동거리, 20 μm의 가스 필드 이온 소스 구멍크기, 0.5 μs의 스캔 드웰 시간 및 GFIS field of view 350 μm의 가스 필드 이온 소스 시야각이다.

[0099]

[0100] <실시예 1>

[0101] 고해상도 질량분석 이미지를 위한 대기압 나노 PALDI-MS 시스템 제작

[0102] 본 발명자들은 세포내 생체 조직을 파괴하지 않고 살아있는 상태에서 고해상도로 분석하기 위한 고정세 대기압 질량분석 이미징 시스템을 제작하였다. 본 발명에서 제작한 고정세 대기압 질량분석 이미징 시스템은 도 1에 나타나 있으며, 시스템을 구성하고 있는 각 구성요소에 대해 설명하면 다음과 같다.

[0103] 본 발명에 따른 상기 시스템은 ① QE Orbitrap 질량분석기, ② fs 레이저부, ③ 가스 실린더, ④ 5 ch. 가스 유속 제어기, ⑤ 비열 대기압 플라즈마 제트, ⑥ 기류 보조 이온 전달부, ⑦ 자동 스캐닝부(시료 스테이지), ⑧ 인버트 현미경, ⑨ HV driving circuit 및 HV 프로브, ⑩ 자동 스캐닝부의 조이스틱, ⑪ 현미경 이동을 위한 긴 드라이브 스코프 스테이지(long drive scope stage), ⑫ 현미경 이미징 모니터, 스캐닝 소프트웨어 및 MS 소프트웨어를 위한 PC로 구성되며, 각 구성요소의 위치는 도 1에 표시되어 있다.

[0104] 생물학적 시료를 광학적으로 모니터하고 분석 영역을 결정하기 위해, 독립형 광학 현미경(IX73, Olympus)의 스테이지를 도 2a와 같이 탈착 및 이온화를 위한 시료 스테이지로 사용하였다. 광증폭기가 없는 레이저 발진기(laser oscillator)는 802nm에서 펄스 에너지가 2nJ이고 펄스 반복 속도가 75MHz 초고속 레이저 펄스를 생산한다. 레이저부(lase system)의 세부 사항은 상기 방법 기술란에 기재되어 있으며, 이색성 빔 스플리터(dichroic beam splitter; FF720-SDi01, Semrock)을 설치하여 독립형 광학현미경에 fs 근적외선 레이저 빔을 도입시켰다.

이는 도 2c와 같이 별도의 대물렌즈 없이도 생물학적 시료에서 광학 이미징 모니터링과 레이저 탈착을 동시에 가능하도록 한다.

[0105] 본 실험에서 표시되는 모든 MS 이미지들은 20× 대물렌즈(NA = 0.45; LUCPlanFLN 20X, Olympus)를 이용하여 얻었으며, 초점을 맞춘 레이저 빔의 직경을 1.2μm로 줄일 수 있다.

[0106] 특히 고품질 및 높은 공간 해상도의 MS 이미징은 시료 탈착을 위한 레이저의 빔 크기가 중요한 역할을 한다. 고배율 대물렌즈를 갖는 집속된 레이저 빔은 빛 에너지를 보다 작은 영역에 집중시킬 수 있기 때문에 더 우수한 탈착 효과를 도출할 수 있다. 이를 확인하기 위해, 집속된 레이저 빔의 직경이 500nm 만큼 작은 100× 대물렌즈(UPLSAP0100X0, NA:1.4, Olympus)를 단일 HEK 세포에서 1μm 보다 작은 직경을 갖는 소영역에 레이저를 조사하여 탈착을 유도하였고, 그 결과를 도 10에 나타내었다. 그러나 고배율로 인해 얇은 깊이의 필드는 레이저에 의한 균일한 스캐닝이 되지 않았다. 조직칼로 절편화되고 통기된 살아있는 조직 절편은 이상적으로 평평하거나 균일하지 않기 때문에 레이저에 의한 탈착은 수백 내지 천 또는 이천 평방 마이크로미터와 같은 총 분석 영역의 제한된 영역에서만 수행할 수 있다. 따라서 고배율 렌즈에 의해 집속된 매우 작은 크기의 레이저 빔은 전체 영역에 대해 균일한 샘플링을 제조할 수 없고 MS 이미징을 손상시킨다. 전체 분석 영역에 걸쳐 균일한 샘플링을 위한 필드 깊이의 적절한 만전을 확보하기 위해 본 발명에서는 20배 대물렌즈(LUCPLFLN20X, NA:0.45, Olympus)를 사용하였고, 집속된 레이저 빔의 결과 직경은 1.2 마이크로미터였다. 또한 전체 샘플에 대해 동일한 두께의 생체 조직 절편을 확보할 수 있다면 레이저 빔을 집속하기 위한 고배율 대물렌즈를 서브 마이크로미터 공간 해상도에 사용할 수 있다.

[0107] 마이크로미터 수준에서 관심 영역(region of interest)의 정확한 위치와 래스터 스캐닝을 위한 일정 속도로 움직이는 시료를 위해, 프로그래밍이 가능한 모터 구동화 XY 스캐닝 스테이지가 독립형 광학 현미경에 고정되어 있다.

[0108] 방전 가스와 전극이 있는 튜브(관)로 구성된 비열 대기 헬륨 압력 플라즈마젯의 구성은 도 2b에 나타낸 바와 같이 시료 위에 헬륨 플라즈마 배지를 형성하도록 하였다. 집속된 레이저에 의해 탈착된 중성 분자는 2 개의 탈착/이온화 소스를 위치시켜 헬륨 플라즈마 매질과 강하게 접촉되며, 일부는 19.8 eV의 여기 에너지로 준안정화(metastable) 헬륨 원자에 의해 이온화된다.

[0109] 도 2a, 2b에 나타낸 바와 같이, 기체흐름 보조 이온전달을 위한 펌핑부(pumping system)는 분자 및 이온의 효과적인 이송을 위해 질량분석기 안에 위치시켰다. 기체흐름 보조 이온전달부는 이송관, 챔버, 건조 펌프로 구성되며(도 3a 및 3b 참조), 펌프는 이온 이송관(이송튜브)에서 질량분석기 안쪽으로 기체흐름을 발생시켜 이온화된 분석물질이 질량분석기 안으로 유입되도록 한다(도 3c 및 3d 참조). 기체흐름 보조 이온전달 장치를 사용하면 펌프가 없는 것에 비해 대략 40배로 이온의 강도가 증가되는 것을 확인할 수 있었다(도 4a 참조).

[0110] 또한, 본 발명에서 사용한 금 나노로드(rod-shaped gold nanoparticles, AuNRs)는 근적외선 발진기(oscillator)에 의한 효율적이고 안정한 탈착을 위한 필수적인 요소로 사용하였다. 금 나노로드는 광자 에너지 저장소로서의 역할 뿐만 아니라 열 에너지 전달 물질이다. 대부분의 생물학적 분석물질들은 근적외선(NIR) 빛을 효과적으로 흡수하지 않지만, 금 나노로드는 종횡비에 의한 종 방향의 공명으로 근적외선을 흡수하고 레이저 빔으로부터 광자 에너지를 열 에너지로 변환시킨다. 따라서 살아있는 조직 내의 금 나노로드를 fs 레이저 빛과 접촉시키면 탈착 효과를 증진시킬 수 있고 높은 질량 스펙트럼 강도를 얻을 수 있다. 그러나 금 나노로드를 사용하지 않게 되면 이러한 결과를 얻을 수 없다. 본 발명에서는 금 나노로드로서 mPEG-AuNRs를 사용하였고 이의 사용에 따른 UV-Vis 스펙트럼 결과 및 HR-TEM 이미징 사진을 도 4b에 나타내었다.

[0112] <실시예 2>

[0113] 살아있는 마우스 해마 조직을 이용한 질량분석 이미징 분석

[0114] 살아있는 조직의 이미징 분석을 위해 마우스의 해마 조직을 선택하였는데, 해마조직은 cornu ammonis 1 (CA1), cornu ammonis 3 (CA3) 및 dentate gyrus (DG)과 같은 하위 영역들 사이가 명확하게 구조적으로 떨어져 있고, 단기 기억 정보를 장기 기억과 공간 탐색의 통합에 매우 중요한 역할을 한다. 도 5는 ICR(Institute of Cancer Research) 성인 마우스의 해마 조직에 대한 광학현미경 이미지와 질량분석 이미지를 나타낸 것이다. 상단 2개의 도면은 질량분석 이전과 이후의 광학 현미경 사진을 각각 나타낸 것이다. 분석을 완료한 후에는 분석의 모든 영역에서 탈착이 잘 진행되었고 탈착으로 인한 손상 영역을 확인할 수 있었다. 도 5의 하단 도면들은 해마 조직에서 분자 이온의 공간 분포를 나타내는 사진이고, 이온 이미지는 1800 μm × 1500 μm영역을 커버하는 433 × 300 픽셀(pixels)로 생성되었다. 결과적으로 해당 X 축 및 Y 축 방향 공간 분해능은 각각 4.2 μm 및 5 μm이었

다.

[0115] 질량분석을 위한 측정 범위를 $m/z = 100$ 내지 1,000로 설정하였으나, 마우스 해마 조직으로부터 $m/z = 500$ 이하에서 강한 이온 신호가 대부분 확인되었다. $m/z = 100$ 내지 1,000의 범위에서 분석 영역의 광학 이미징과 일치하는 수백개의 이온 이미지가 관찰되었고, 이중에서도 콜레스테롤, 세라마이드(ceramides), 스프링고리피드(sphingolipids) 및 글리세로포스포리피드(glycerophospholipids)의 절편이 확인되었다. 충분한 이온 강도를 갖는 몇 개의 확인된 이온 이미지들을 도 5에 나타내었는데, MAG(monoacylglycerol; 16:1)의 $m/z = 311.257$ 에서의 이온, MAG 16:0의 $m/z = 313.273$ 에서의 이온, MAG 18:1의 $m/z = 339.289$ 에서의 이온, MAG 18:0 $m/z = 341.305$ 에서의 이온, 콜레스테롤 $m/z = 369.349$ 에서의 이온, 콜레스테롤 $m/z = 385.346$ 에서의 이온, 아데닌 $m/z = 136.062$ 에서의 이온 및 세라마이드 18:0 $m/z = 548.540$ 에서의 이온이 각각 관찰되었다. 또한 CA1, CA3 및 DG 영역은 마우스 해마 조직에서 확실히 구별되어 있음을 확인할 수 있었다. 관찰된 이온들은 아데닌 이온을 제외하고는 해마 조직에서 거의 유사한 공간 분포를 보였다. 흥미롭게도 $m/z 136.062$ 의 아데닌 이온은 별개의 공간분포를 갖는 것으로 확인되었다. DIC 이미지와 비교하여, 아데닌의 공간 분포가 해마 조직에서 뉴런의 세포바디(soma)와 높은 상관관계가 있음을 확인할 수 있었다.

[0116] 추가적으로, 해마 조직의 하위 영역(sub-region)인 CA1, CA3 및 DG 영역에 대해 더 높은 공간 해상도로 분석을 수행하였다. 대기압 nanoPALDI-MS 시스템은 현미경 기반의 질량분석 시스템으로 작은 영역을 정확하게 선택할 수 있는 장점이 있다. 탈착 및 이온화를 포함하는 샘플링 단계는 현미경 스테이지에서 일어나므로, 분석 영역은 현미경으로 보는 동안 현미경 스테이지의 x- 및 y- 위치로 직접 확정할 수 있다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 선택된 영역에 대한 특정 분자 이온의 질량분석 이미지를 비교할 수 있다. 이온 이미지는 $600 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ 영역을 커버할 수 있도록 433×100 픽셀들을 생성한다. 그러므로, $1.4 \mu\text{m}$ 의 해당 x 축 공간 해상도는 $10 \mu\text{m} / \text{s}$ 의 샘플 이동 속도에서 분석되었고, y 축 공간 해상도는 $5 \mu\text{m}$ 가 된다. 또한 분석 영역이 감소되었기에, 이온 이미지의 x 축 공간 해상도가 한계치까지 증가될 수 있고 더 높은 해상도의 MS 이미징을 얻을 수 있다. y 축 공간 해상도는 인접한 x 선들 사이의 간격을 감소시켜 증가될 수 있었다. 그러나 y 축 방향 공간 해상도는 분석 시간의 증가를 피하기 위해 $5 \mu\text{m}$ 로 유지하였다.

[0117] 탈착 및 이온화는 대기압 상태에서 계속 진행되기 때문에 시퀀스 모드에서 질량 분석기의 내부 분석속도(스캔 속도)는 획득된 질량 스펙트럼의 속도 및 개수에 크게 영향을 미칠 수 있어 MS 이미징의 공간 분해능에 영향을 준다. 질량분석기의 최적화된 매개 변수를 설정하여 사용하였는데 질량 스펙트럼을 1분당 433회 얻었고 이는 1초당 7.2회에 해당한다.

[0118] 대기압 nanoPALDI 방법으로 얻은 MS 이미징에서 X 축 방향의 공간 분해능은 X 축 방향의 샘플 이동속도(즉, 샘플 스테이지의 이동속도)에 의해 결정되며 Y축 방향의 공간 분해능은 인접한 두 개의 X 축 레이저 빔 경로 사이의 거리에 의해 결정된다. 이것은 MS 영상의 공간 해상도가 관심 영역의 크기와 필요한 총 분석 시간에 따라 조정될 수 있다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 전체 해마 영역을 분석하기 위해 샘플 이동 속도를 $30\mu\text{m}/\text{s}$ 로 설정하였으나, 도 5에 나타낸 바와 같이 해마 조직의 하부 영역을 분석하기 위해서는 $10\mu\text{m}/\text{s}$ 로 설정하였다. 따라서 MS 이미징에서 일치하는 X 축 방향의 공간 분해능은 도 7의 $4.2\mu\text{m}$ 로부터 도 6의 $1.4\mu\text{m}$ 로 향상된 것으로 나타났다. 한편, 인접한 x 축선 사이의 간격은 유사한 분석 시간을 유지하기 위해 2개의 실험 모두에서 $5\mu\text{m}$ 로 고정하였고, 도 6 및 도 7에 모두에서 y 축의 공간 분해능은 $5\mu\text{m}$ 인 것으로 나타났다.

[0119]

[0120] <실시예 3>

[0121] **대기압 nano PALDI 방법에 의한 세포내 공간 해상도 분석**

[0122] 공간 해상도가 높은 질량분석(MS) 이미지를 얻으려면 작은 크기의 집속된 레이저 빔과 전체 조직 표본 내부에 균일하게 분포된 AuNR에 의한 균일하고 강력한 탈착작용이 필요하다. 따라서 질량분석 후, 해마 조직의 형태를 관찰하였다. 표지가 없는 방식으로 초점을 맞춘 레이저로 처리된 생물학적 시료의 형태학적 변화를 정확하게 측정하기 위하여 CARS(coherent anti-stokes Raman scattering) 현미경을 이용하였다. 근적외선(NIR) 파동 펄핑(802 nm 및 1041 nm 파장) CARS 현미경 검사법을 비파괴 3D 생체 영상을 위해 사용하였다. 도 7은 이러한 방법을 기초로 분석된 샘플의 3D 재구성 z-stack CARS 이미지를 나타낸 것이다. 임의로 선택한 질량분석법으로 스캔한 위치에서 CH 늘어난 영역 ($2750\text{-}2960 \text{ cm}^{-1}$)의 95 CARS 이미지를 z 축 스텝 간격 $0.5 \mu\text{m}$ 로 얻은 다음, 3D 시각화 소프트웨어를 사용하여 하나의 피쳐(feature)로 병합하였다. 보다 구체적으로 512×512 픽셀로 구성된 2D CARS 이미지들은 총 $635 \times 635 \times 47 \mu\text{m}^3$ 의 부피를 커버하여 95 개 층으로 z 방향으로 쌓아 수집하였다. 도 7

의 7a~7c은 동일 타겟으로부터 얻어진 것으로, 다른 시야각 및 배율로 다시 포매팅하였다. 집속된 레이저의 스팟 크기 (약 1.2 μm)가 인접한 스캐닝 선들 사이의 간격인 5 μm 보다 작기 때문에 레이저 스캐닝의 트랙을 명확하게 시각화 할 수 있다(도 7b 및 7c 참조). 또한 도 7d는 레이저 스캐닝에 의한 하나의 트랜치(trench) 길이가 5 μm 인 것으로 나타났고, 탈착은 전체 분석 영역에 걸쳐 매우 균일하고 안정한 방식으로 일어난 것을 알 수 있었다. 분석 영역의 가장 자리에서 보여지는 것과 같이(도 7e), 탈착된 부분은 매우 경사진(가파른) 형상을 보였고, 마우스 해마조직(전체 조직층의 약 74%)의 표면으로부터 35 μm 두께의 질량부피가 실제로 탈착되어 질량분석이 사용된 것을 알 수 있었다. 이것은 본 발명의 대기압 질량분석이 시료의 표면 또는 표면 근처에 국한된 분석이 아니라 DESI와는 다른 분석 시료의 벌크 분석(bulk analysis)이다.

[0123] 해마 조직에서 초점화된 레이저 빔으로 발생된 선형 크레이터(crater)의 크기를 분석하기 위해, 레이저빔에 의해 제거된 개별적 스캔 라인의 3D 공초점 이미징들은 공초점 레이저 스캐닝 현미경(LSM-700, Carl Zeiss) 으로부터 수득하였다(도 7f 참조). 크레이터(crater) 바닥은 안정된 상태(plateau)를 명확히 확인할 수 있었다. 제거된 선형 크레이터의 하단 및 상단의 폭은 각각 평균 30점에서 약 3 μm 및 5.5 μm 으로 추정되었다. 위치결정 스테이지(positioning stage)가 10 μm / s의 일정한 속도로 움직일 때, 해마 조직은 2 nJ의 펄스 에너지와 75 MHz의 펄스 반복 속도로 fs 레이저 펄스에 노출되었다. 이것은 해마 조직이 1 μm 움직일 당 750만개의 레이저 샷으로 조사했다는 것을 의미하는 것이다. 도 7f에서 크레이터의 측벽 폭은 약 1 μm 인 것으로 나타났고 이는 1 μm 움직일 내에서 레이저 절제(laser ablation)가 완료됨을 의미하는 것이다. 그러므로 1.4 μm 의 추정된 공간 분해능은 대기압 조건에서 AuNRs와 초고속 레이저의 사용으로 가능함을 알 수 있었다. 헬륨 이온 현미경((HIM, Orion NanoFab, Carl Zeiss)에 의해 관찰된 선형 크레이터는 도 7g에 나타낸 바와 같이 일관되게 매우 가파르게 깨끗하게 나타났다.

[0124]

[0125] <실시예 4>

[0126] **살아있는 조직을 이용한 대기압 nano PALDI의 분석방법**

[0127] 질량분석을 위한 종래 대기압 이온화 방법들은 대상 시료 영역을 가열된 가스 스팀을 이용하여 가열하거나 또는 시료 준비 과정에서 시료를 가열시켜 휘발성 유기 화합물의 탈착과 이온화를 향상시키려고 하였다. 그러나 본원 발명은 열에 의한 시료 손상을 피하기 위해, fs 레이저 발전기와 비열 대기압 플라즈마를 탈착/이온화 소스로 함께 사용하였다. 살아있는 조직에 AuNR을 적용하는 것이 fs 근적외선 레이저 발전기를 사용한 효과적인 탈착 결과를 도출하였다. 중형비가 4.0 ($\lambda_{\text{max}} = 800 \text{ nm}$) 인 AuNR은 근적외선 빛을 흡수할 수 있고 흡수된 에너지를 열 에너지로 빠르게 변환할 수 있다. 시료 조직 막으로 AuNR의 흡수를 통해, 살아있는 조직 내부에서 AuNR은 근적외선 빛과 상호작용하는 핫스팟으로 작용하며 탈착 효율을 향상시키고 더 우수한 질량 스펙트럼 강도를 도출할 수 있었다. 또한, fs 레이저 발전기의 반복속도는 75 MHz이었고, 이는 13ns 간격의 펄스 트레인에 대응하며, 조직 절편은 균일한 모션으로 수많은 레이저 샷에 의해 연속적으로 조사되고 탈착되었다. 따라서 생체시편의 펩토초 근적외선 레이저 발전기에 의한 탈착은 균일하고 안정적인 것으로 확인되었고, 이들의 프로파일은 날카롭고 가파른 형태로 관찰되었고, 세포내 공간 해상도를 질량분석 이미징화 시켰다.

[0128] 고품질의 MS 이미징을 확보하기 위해서는 살아있는 조직 시료(표본)에서 AuNR의 균일한 분포가 매우 중요한 요소이다. 따라서 본 발명자들은 조직 내 AuNR의 균일한 분포를 위해 mPEG-특성의 금 나노로드(nanorod)를 사용하였다. 살아있는 조직은 인공 대뇌 척수액(ACSF)이 포함된 mPEG-AuNR과 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 조직들을 ACSF로 10번만 세척하여 조직 내에 AuNRs가 유지되도록 하였다. 이로서, 펩토초 근적외선 레이저 발전기에 의한 탈착은 분석 전 영역에서 AuNR의 작용으로 인해 균일하고 안정적인 형태로 나타났다(도 7a~7e 참조). 레이저의 작은 빔 크기(직경 1.2 μm)에도 불구하고 도 7e에 나타낸 바와 같이, 탈착된 조직의 두께는 35 μm 인 것으로 나타났다. CARS 측정에서 해마 조직이 질량분석 이후에 건조되었기 때문에 통기 과정에서 조직의 두께는 47 μm 보다 더 두꺼울 것으로 예상하였고, 이는 레이저로 유도된 크레이터의 중형비가 특이적으로 높아졌고 이는 세포내 공간 해상도를 도출하게 된다. 질량분석 이미징을 위한 AuNRs의 처리과정이 없었다면 생체분자의 두드러진 질량이온 피크는 관찰되지 못하였을 것이다. 그러므로 효율적인 탈착을 위해서는 AuNR의 사용이 중요하며 이의 사용으로 인해 고해상도 MS 이미지를 구현하는 대기압 MS 이미징이 가능하다.

[0129] 또한, 본 발명에서 사용된 대기압 플라즈마 제트는 전자, 이온 및 여기된 종(species)을 포함하여 많은 종류의 전하를 띤 종을 함유하고 있더라도 비열 플라즈마를 사용하였고, 비열 플라즈마의 온도는 살아있는 생물학적 샘플을 손상시키지 않는다. 또한 발생된 플라즈마 제트는 시료와 직접적인 접촉이 이루어지지 않는데 이는 샘플 스테이지 상의 샘플링 장비의 구성을 보면, 기체흐름이 흡입되는 형태가 되기 때문이다(도 3c 및 3d 참조). 이

러한 일련의 탈착 및 탈 이온화는 대기압 조건에서 살아있는 시료의 분석에 매우 효과적이다. 요약하면 AuNR을 사용한 집중적인 초고속 레이저 광은 생물학적 시료로부터 명확한 부피를 효과적으로 탈착할 수 있었고, 대기압 헬륨 플라즈마는 대기압 생체조직의 MS 이미징을 위해 19.8eV의 여기된 헬륨원자로 이온화시켰다.

[0130] 나노입자 및 분리된 후속 이온화 소스의 동시 적용으로, 레이저 에너지 펄스는 레이저 소스 단독을 사용한 경우에 비해 감소되었다. 펄스 에너지를 낮추면 시료의 열 손상을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 레이저 조사로 인한 탈착된 물질의 산란 건동을 억제하여 매우 선명하고 명확한 탈착 패턴을 얻을 수 있었다. 이것이 탈착소스로서 fs 레이저 증폭기(several nanojoules vs. several hundred microjoules; for instance, 24 nJ vs. 150800 μJ)를 사용한 것보다 훨씬 낮은 펄스 에너지를 가진 비용 효율적이고 간단한 구조의 fs 레이저 발진기를 사용한 이유이다. 또한, 본 발명에 따른 대기압 nanoPALDI 방법은 대기압 분석 조건에서 살아있는 조직을 분석할 수 있는 특징이 있다. 따라서 대기압 nanoPALDI-MS에 의해 획득된 MS 이미지는 높은 공간 분해능 (~ 1 μm)을 갖는 지질 영상화에 효과적으로 사용된 진공 기반의 2 차 이온 질량 분석기 (SIMS)와 비교할 때 샘플을 준비해야 하는 과정이 거의 없다는 장점이 있다. 진공 기반의 2차 이온질량 분석기(SIMS) 시료(표본)는 동결절편 및 건조과정을 거쳐 제조되는데 이 때문에 지질 이미징의 왜곡이 자주 발견될 수 있다. 본래의 콜레스테롤 분포의 왜곡은 HIM 영상과 콜레스테롤 SIMS 영상에서 명확하게 관찰된다(도 8 참조). HIM 이미지에서 SIMS 시료 제조 과정에서 형성된 분리된 콜레스테롤 결정이 명확하게 확인되는 것을 알 수 있으며(도 8a 참조), SIMS 이미지에서도 본래의 콜레스테롤 분포와 다른 형상을 확인할 수 있었다(도 8b 참조). 도 5 및 도 6에서 살아있는 조직 유래의 콜레스테롤 이미지는 공간적 해상도가 SIMS와 거의 동일함을 유지하면서 시료의 절식 및 건조로 인한 왜곡이 발생되지 않음을 알 수 있었다. 대기압 nanoPALDI의 모든 압력(input)은 대기압 조건에서 광섬유, 플라즈마 제트 관 또는 이온 이송 관과 같은 작은 관을 통해 이송될 수 있기 때문에 새로운 대기압 질량 이미지 기술 개발을 위해 추가적인 기술장벽이 요구되지 않는다.

[0132] <실시예 5>

[0133] 질량분석 이미징으로 관찰된 해마 조직의 특정 영역의 분자 조성 분석

[0134] 중추 신경계의 신경세포는 신경 연결성과 밀접한 관련이 있는 다양한 수상 돌기 구조를 나타낸다. 해마 형성에서 CA(cornu ammonis)의 추상세포(pyramidal cell)와 DG(치상회, dentate gyrus)의 과립세포는 구별된 돌기 아브 구조(dendritic arbor structures)를 나타내는 2개의 주요한 신경 유형으로 알려져 있다. 이러한 다른 유형의 신경 타입 및 이들의 구별된 구조는 CA 및 DG 영역에서 다른 분자 분포를 갖도록 한다. 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 모노아실글리세롤, 콜레스테롤 및 세라마이드의 이온 절편들은 DG 영역에서보다 CA1 및 CA3 영역에서 더 높은 신호강도를 나타내었다. 이에 대해 아테닌의 m/z = 136.062 에서의 이온들은 DG 영역에 집중되어 있는 것으로 나타났다. CA 및 DG 영역 사이에서 아테닌의 이온 이미지의 차이는 2개의 신경세포 타입인 추상세포 및 치상회 과립세포로 나타났으며, 마우스의 해마 조직에서 다른 분포 및 다른 세포 표현형으로 나타났다. 실제로 과립 세포체(granule cell body)는 치밀하게 패키징되어 있고 치아 이랑의 세포들 사이에 작은 신경관이 삽입되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 핵에서 일반적으로 관찰되는 아테닌 이온은 DG 영역에 집중되어 있었다.

[0135] 유사한 형태로, CA1 및 CA3 영역에 있는 추상세포는 구조적으로 2개의 다른 수상돌기(dendrites)를 가지는데, 길고 두꺼운 수상돌기와 여러 개의 기저돌기가 소마(soma)의 꼭대기와 바닥으로부터 각각 나온다. 정점 및 기저 돌기가 서로 반대 방향을 향하고 있고, 서로 다른 층으로 존재하고 있어 추상세포의 돌기 구조는 쌍원뿔(biconical)의 모양을 나타낸다. 정점 및 기저 수상돌기는 크기, 기하학, 전기전도 및 신경 영양 인자 또는 보호 분자(guidance molecules)에 대한 반응성 등 많은 성질에서 상이한 것으로 알려져 있다. 게다가 정점 및 기저 수상돌기의 형태학적 차이에 대한 많은 연구가 진행되었고, 이들 간에 상이한 분자 조성에 대해서는 아직 밝혀지지 않았는데, 이는 분자 조성 분석을 위한 적절한 방법이 부재하고 신뢰성 있는 분자 마커가 없기 때문이다. 조직 수준에서 추상 뉴런의 정점 및 기저수상돌기 간의 분자 상이함을 조사하기 위해, 해마 조직의 서브 영역(sub-region)을 높은 공간 해상도로 분석하였다(도 6c 및 6d 참조). 특히 CA3에서 이온 이미지들은 아테닌 위치의 양쪽으로 명확히 나뉘어졌고, 세포체(cell bodies)의 위치(ion image at m/z = 136.062) 는 도 6d 및 6e에서 확인할 수 있었다. CA3에서 이온 이미지의 왼쪽은 정점 수상돌기기의 밀집된 부분을 나타낸 것이고, 오른쪽은 해마 조직의 기저 수상돌기기의 밀집된 부분을 나타낸 것이다.

[0136] BioMap 소프트웨어의 ROI(region of interest) 분석 기능을 사용하여 ROI의 동일한 영역을 왼쪽과 오른쪽 모두에 할당하고, 모노 아실 글리세롤 이온, 콜레스테롤 이온 및 세라마이드 이온의 질량 스펙트럼의 강도를 비교하였다(도 6e, 6f 및 표 1 참조).

표 1

분석된 ROI의 MS 강도분석 결과

Molecule ^o m/z ^o	MAG (16:1) ^o 311.257 ^o		MAG (18:1) ^o 339.289 ^o		MAG (16:0) ^o 313.273 ^o		MAG (18:0) ^o 341.305 ^o		cholesterol ^o 385.346 ^o		ceramide(18:0) ^o 548.540 ^o	
Region ^o	Apical (a) ^o	Basal (b) ^o	Apical (a) ^o	Basal (b) ^o	Apical (a) ^o	Basal (b) ^o	Apical (a) ^o	Basal (b) ^o	Apical (a) ^o	Basal (b) ^o	Apical (a) ^o	Basal (b) ^o
ROI 1 ^o	98566 ^o	69966 ^o	610253	414545	1404000	760950	640499	402091	42666	13238	15461	15219
ROI 2 ^o	97467 ^o	72980 ^o	609936	450191	142661	108521	135638	981433	248473	78181	85203	53168
ROI 3 ^o	98425 ^o	70376 ^o	648821	453971	148740	852381	651979	427409	55000	18571	19904	19150
Average	98152 ^o	71107 ^o	623003	439569	143933	782182	264381	942091	648348	16664	18572	17070
Ratio 1 ^o	1	0.72	1	0.71	1	0.57	1	0.65	1	0.35	1	0.92
Ratio 2 ^o	1.42	1	1.42	1	1.75	1	1.53	1	2.9	1	1.09	1

[0137]

[0138]

분석결과, 기저 수상돌기 쪽에서 MAG 이온(at m/z = 311.257, m/z = 313.273, m/z = 339.289, m/z = 341.305)의 MS 강도는 정점 수상돌기 쪽의 55~75%인 것으로 나타났다. m/z=548.540에서의 세라마이드 이온은 양쪽에서 유사하게 관찰되었다.

[0139]

대기압 nanoPALDI 방법을 이용한 고해상도 MS 이미징은 MAG가 기저 수상돌기 집약 영역보다 정점 수상돌기 집약 영역에서 1.4~1.8배 높은 것으로 분포하고 m/z=548.540에서 세라마이드는 양쪽 수상돌기 영역에서 상대적으로 균등하게 분포하고 있었다. 또한, 정점 수상돌기 집약 영역에서 m/z=385.346에서의 콜레스테롤은 기저 수상돌기 집약 영역에 비해 정점 수상돌기 집약 영역에서 약 3배 높은 신호 강도를 나타내었다. 4개의 모노아실글리세롤 이온을 구체적으로 비교하면, 포화 16:0 및 18:0을 갖는 MAG는 불포화 16:1 및 18:1 지방산을 갖는 MAG 보다 정점에서 기저 수상돌기 영역으로 갈수록 불균형을 보이는 것으로 나타났다(1.8:1 및 1.5:1 대 1.4:1 및 1.4:1). 이러한 고해상된 MS 이미지를 가지고 본 발명자들은 기저 수상돌기에 비해 모노아실글리세롤 및 콜레스테롤이 더 함유한 정점 수상돌기를 확인하였고, 세라마이드는 살아있는 해마 조직의 CA에서 양쪽의 수상돌기 구조에서 균등하게 분포되어 있는 것을 알 수 있었다. 또한 정점 수상돌기 영역과 기저 수상돌기 영역 사이에서의 유사한 차이점을 CA1에서도 확인할 수 있었다(도 6c 참조). CA3의 정점 수상돌기 영역의 세부적인 대기압 nanoPALDI 질량 이미징(도 6c 및 6d)은 투명층(stratum lucidum)에 있는 DG 과립세포가 추상세포 층으로 평행하게 확장되는 이끼 모양의 섬유 다발로 관찰되었다.

[0140]

CA3의 근위 정점 수상돌기 영역에서 MAG의 낮은 강도를 갖는 100um 폭의 영역은 추상세포체의 라인을 따라 확인할 수 있었다(도 6c 참조). CA3 영역에서 이끼 섬유들은 2개의 주요 묶음으로 있었고, 투명층에 있는 주요 상아질 투영(suprapyramidal projection) 및 intra와 infra 추상 투영은 지층 피라미드 및 지층 오리엔티스의 근위 범위 이내에서 최초로 있었으며, CA3에서 투명층을 교차하였다. CA3 추상형 뉴런(pyramidal neurons)은 모집된 등뼈 콜 가지의 이상 성장된 특이한 복합체를 통해 이끼 섬유의 섬과 시냅스 접촉한다. CA1에 근접한 원위 CA3 뉴런에서 가시가 많은 이상 성장물은 세포체(soma)로부터 10~120um의 거리에서 정점 수상돌기에서 주로 발견된다. 도 6g에서 도 6c 및 6d로부터 아데닌 및 MAG(18:1)의 라인 프로파일을 고려할 때, 아데닌 프로파일은 추상 세포체 라인에서 명확히 나타난다. MAG(18:1) 프로파일은 세포체 라인 옆의 정점 수상돌기 영역에서 100um 폭의 낮은 강도를 나타내고 있고, 이는 과립 세포로부터 이끼 모양의 섬유 투영 및 CA3 뉴런 유래의 가시가 있는 이상 성장에 의한 층 구조와 일치한다. 콜레스테롤 및 세라마이드(18:0) 이미지는 유사한 분포가 관찰되지 않았다. 이러한 관찰은 대기압 nano PALDI가 이끼형 섬유 투영 및 다른 정점 수상돌기 영역 간의 분자 조성의 상이함을 나타낸다. CA1 영역에서 도 6c와 같은 정점 수상돌기 영역에서의 유사한 특징은 관찰되지 않았는데 이는 이끼모양의 섬유 투영이 CA1에 도달하지 못했기 때문이다. 이러한 실험결과는 세포내 해상도를 갖는 대기압 nano PALDI 이미징을 항체의 태깅 또는 염색 과정 없이 조직 수준에서 다중 분자 조성의 정보를 얻는데 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0141]

[0142] <실시예 6>

[0143] 살아있는 해마 조직에서 메틸 베타-시클로덱스트린에 의한 콜레스테롤의 제거

[0144] 살아있는 시료에 대한 대기압 nano PALDI MS 이미지는 대사산물에 대한 많은 공간 정보를 제공할 수 있으며 이는 조직 수준에서 약물 스크리닝에 유용하게 사용할 수 있다. 이에 본 발명자들은 본 발명의 시스템을 이용하여 해마 조직에 영향을 줄 수 있는 약물 확인 가능성 여부를 분석하기 위해, 메틸-β-시클로덱스트린(mβCD) 처리에 의한 콜레스테롤 고갈 현상을 대기압 nano-PALDI MS 이미징 분석하였다. 통기 조건에서 mβCD이 처리된 마우스의 해마 조직을 mβCD(25mg/ml)이 함유된 ACSF 용액에 6시간 동안 침지시켰다.

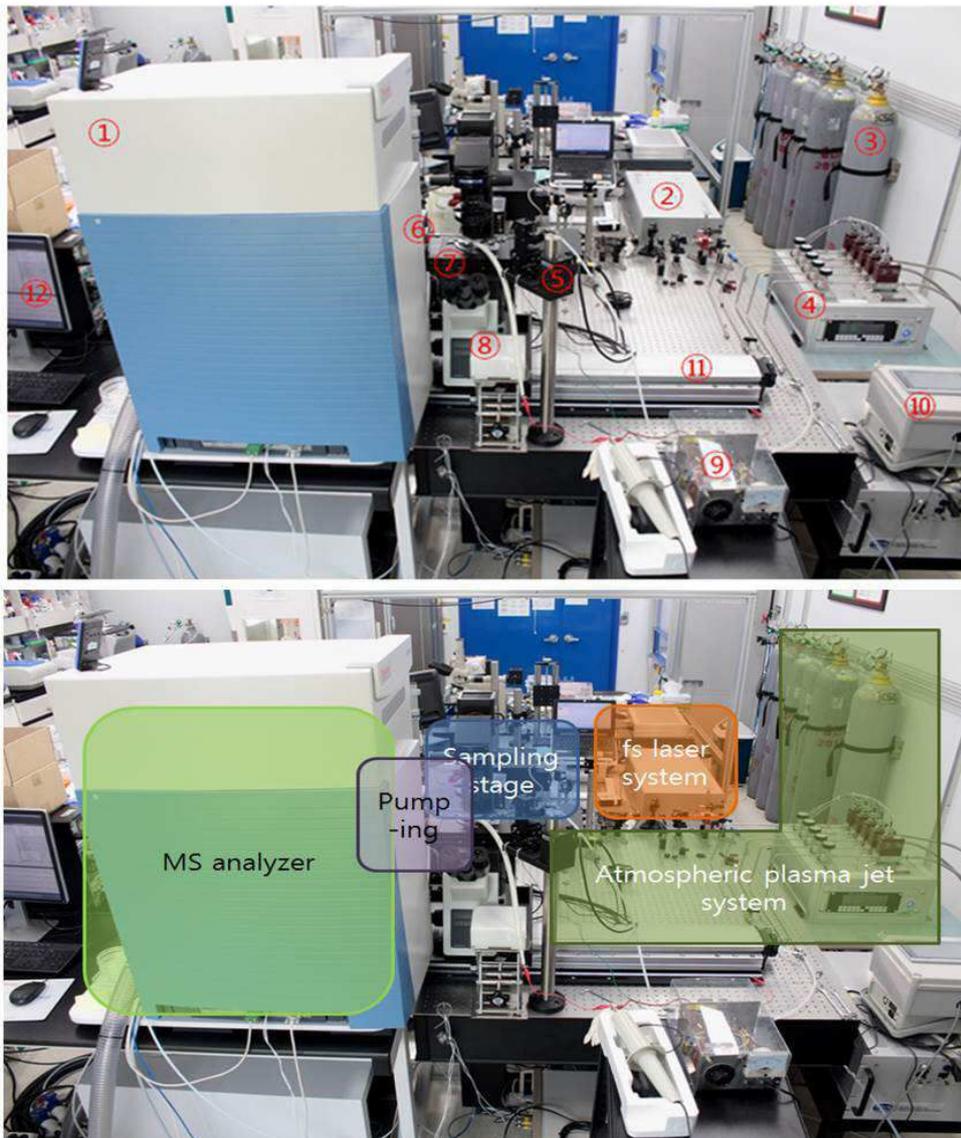
[0145] 이후 2개의 다른 해마 조직으로부터 이온 이미지를 수집하였는데, 2개 다른 이미지는 각각 정상 해마조직(도 9a 참조) 및 mβCD이 처리된 해마조직(도 9b 참조)이다. mβCD가 처리된 해마조직에 대해, 2개의 콜레스테롤 피크인 m/z 369.349 및 m/z 385.346에서의 이온은 도 9b에 나타난 바와 같이 분석 전체 영역에서 억제되고 사라진 것으로 나타났다. 흥미롭게도 m/z 548.540에서의 세라마이드 이온 역시 억제된 것으로 나타났다. 다른 동정된 이온들은 정상군에 비해 약간 감소한 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명에서 고안된 대기압 MS 이미징 분석 방법은 조직 기반의 약물 스크리닝에도 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었고, 실험동물을 죽이는 방법이 적용되는 세포 기반의 약물 스크리닝에 비해 정확도 및 신뢰도가 더 우수함을 알 수 있었다.

[0146]

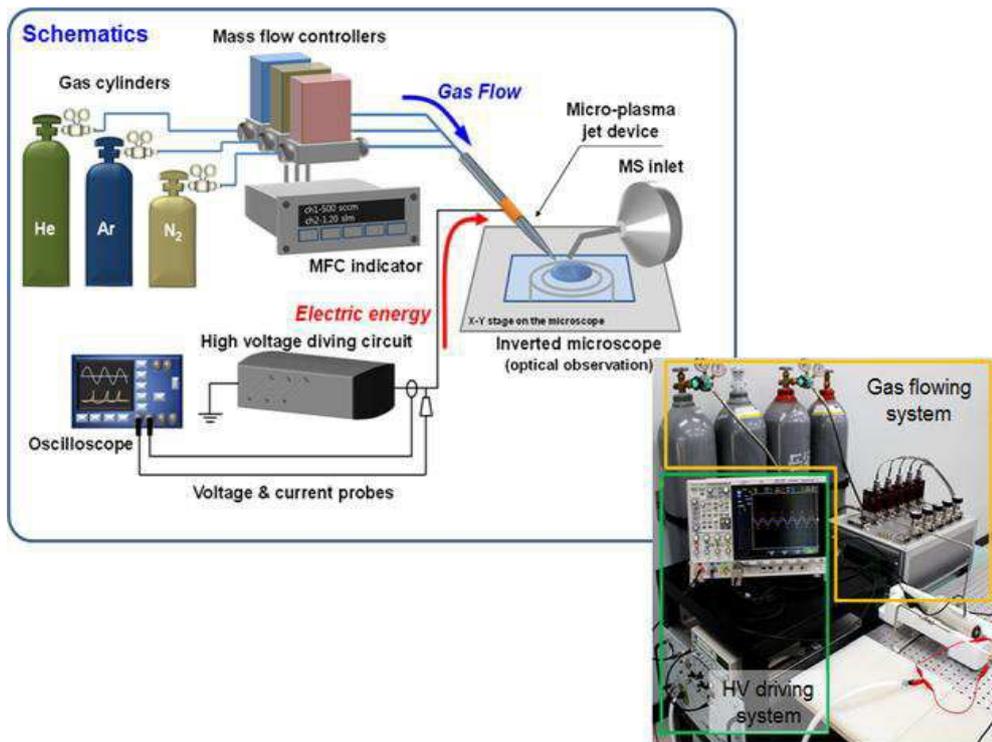
[0147] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

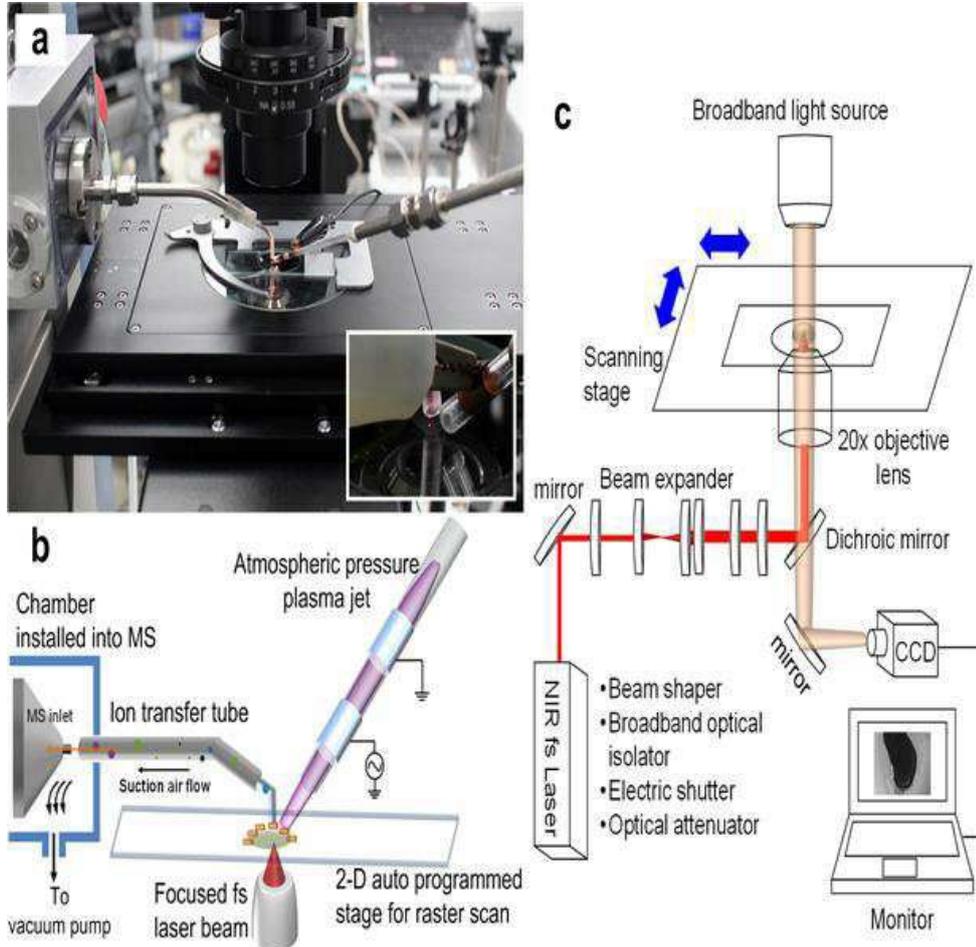
도면1a



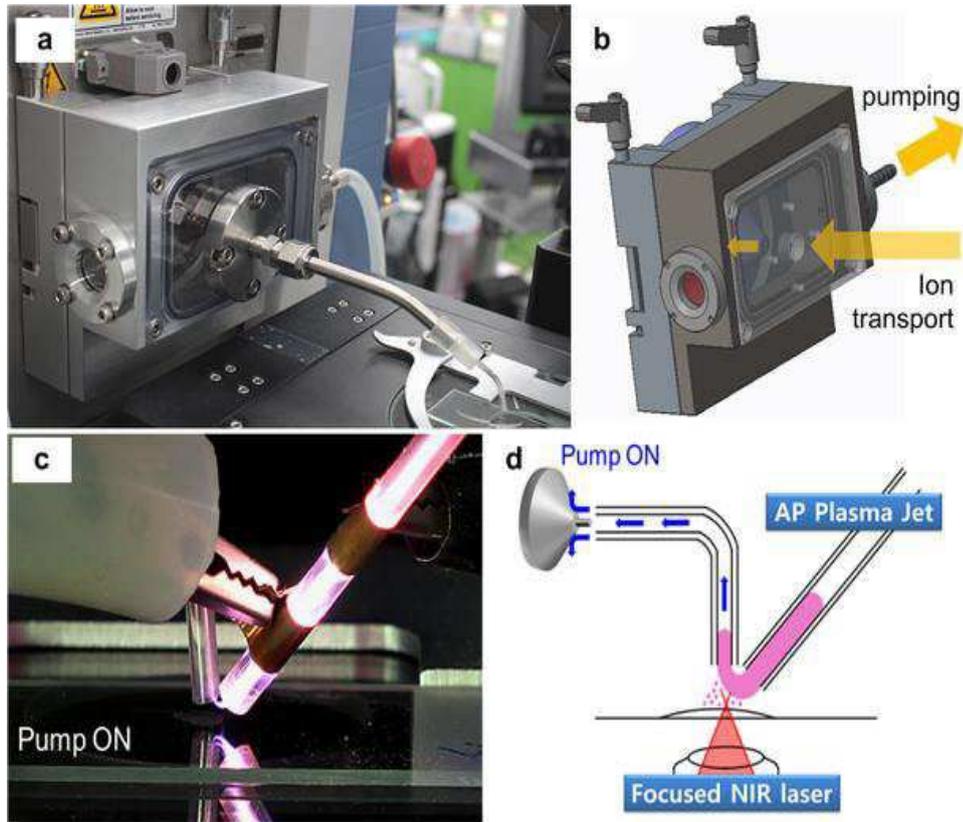
도면1b



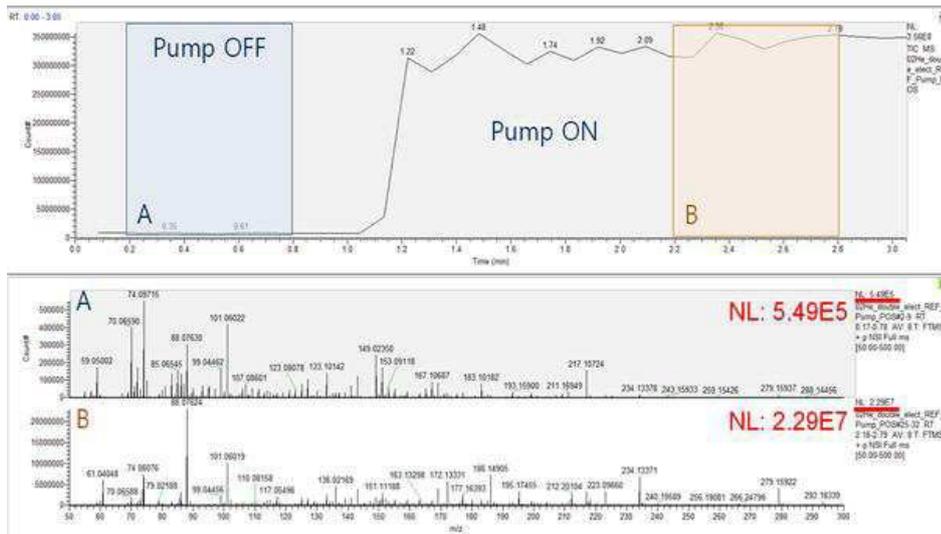
도면2



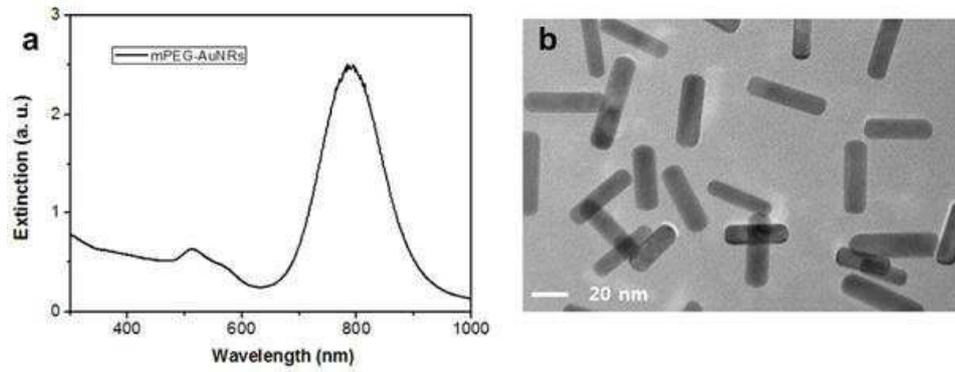
도면3



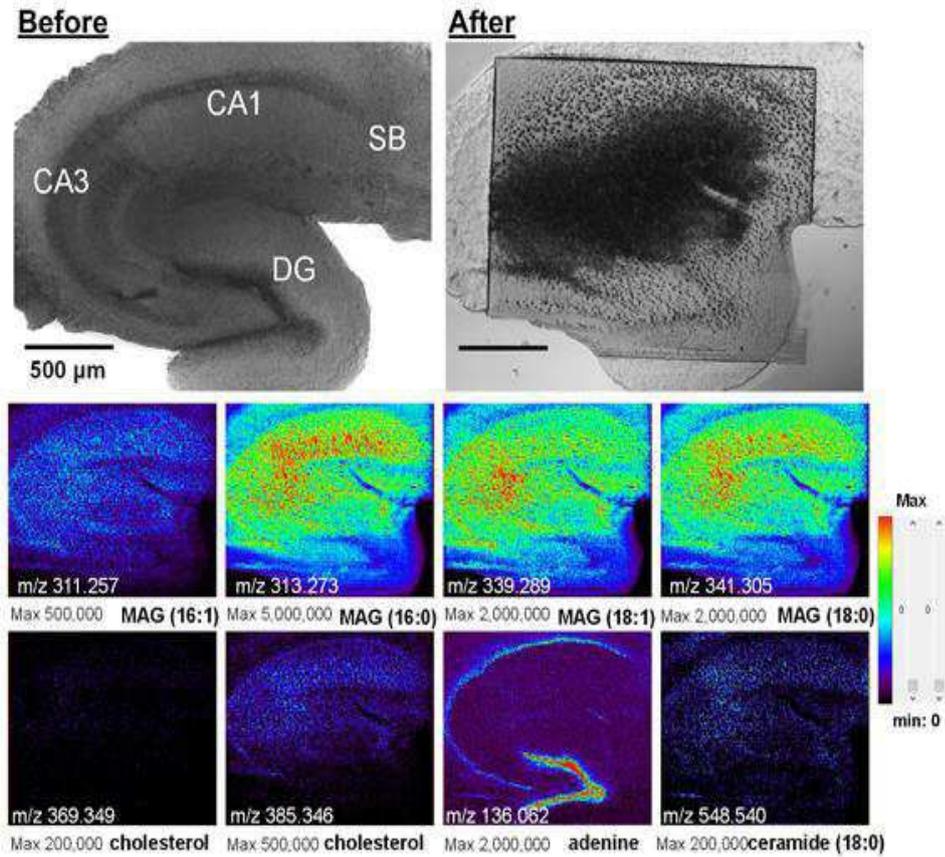
도면4a



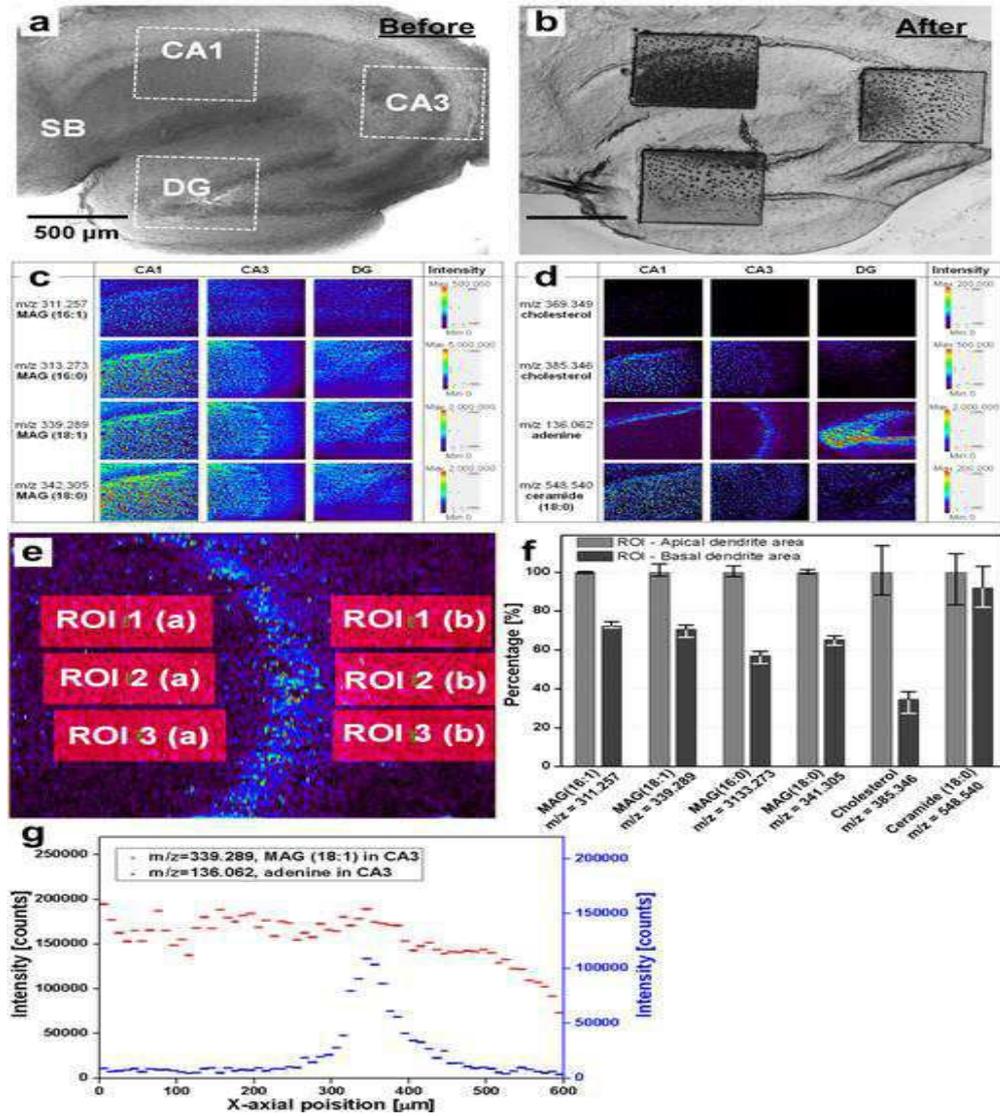
도면4b



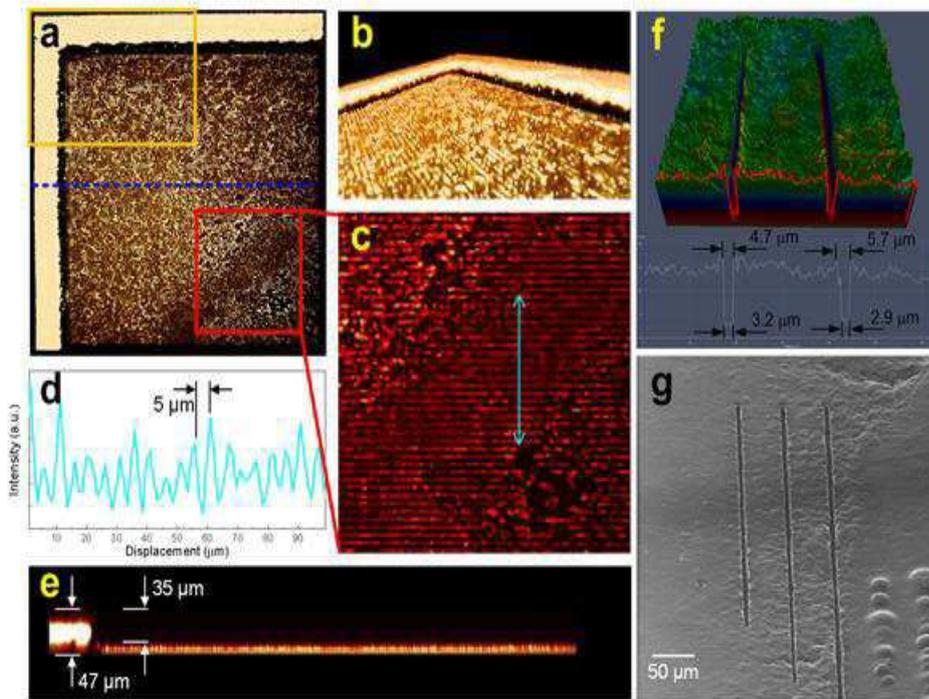
도면5



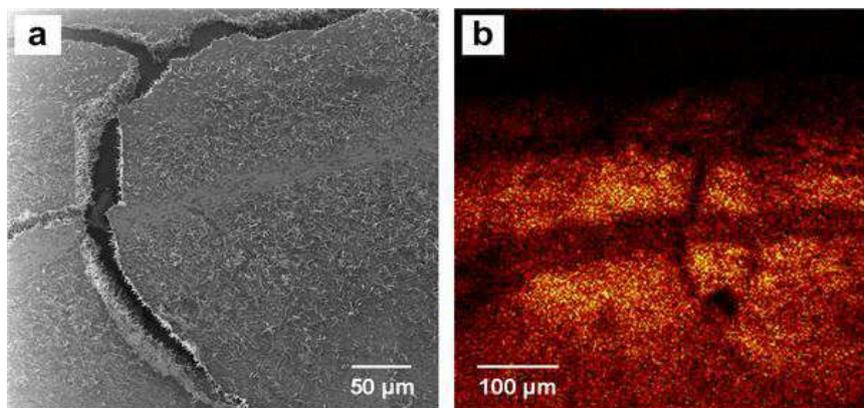
도면6



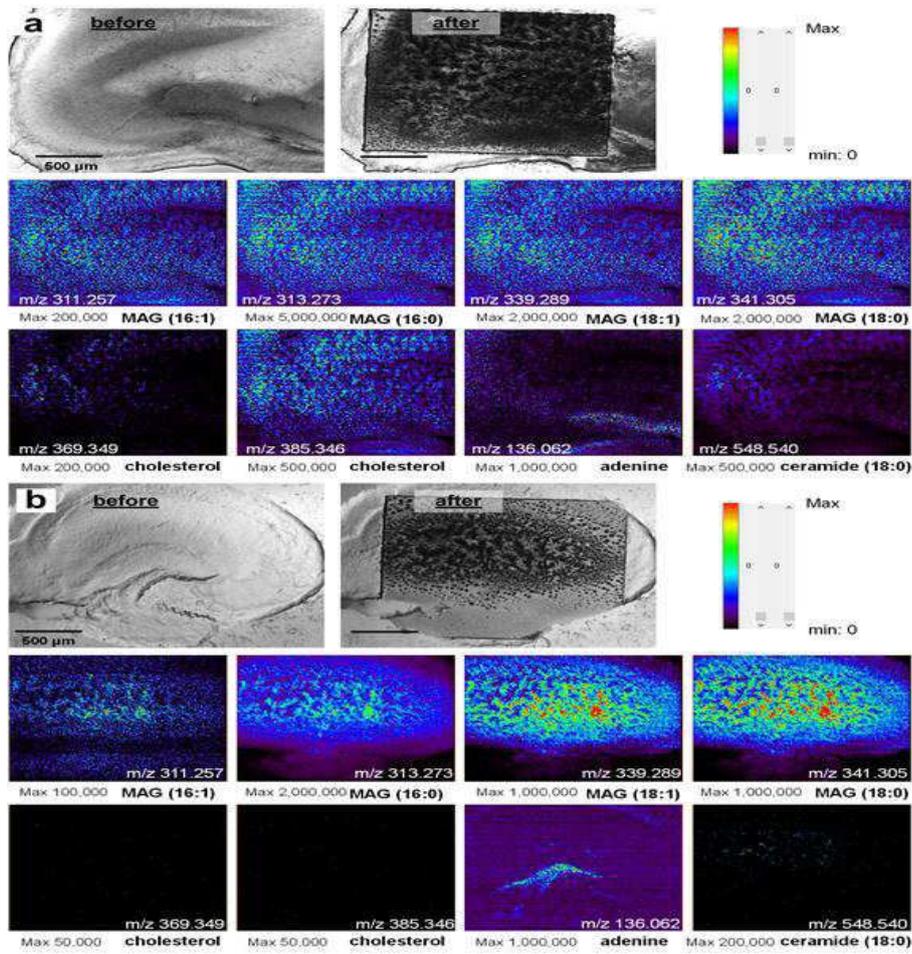
도면7



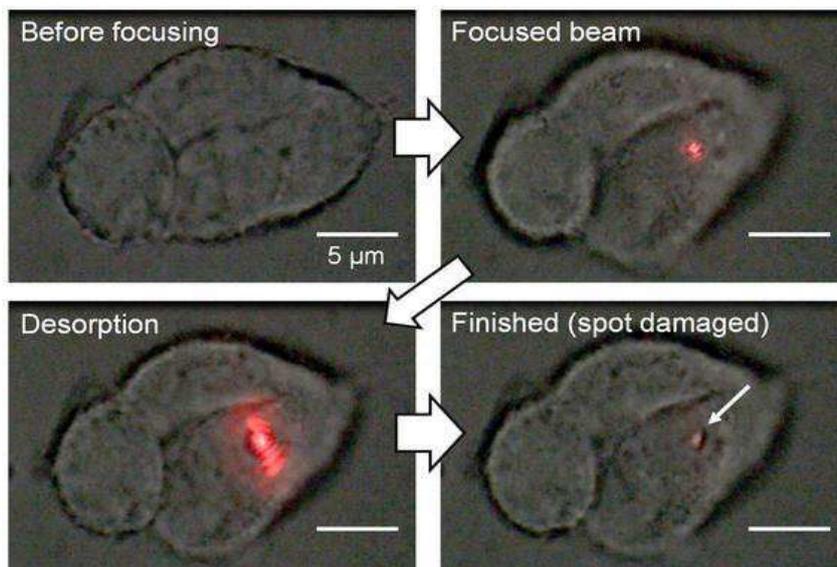
도면8



도면9



도면10



도면11

