



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월15일
(11) 등록번호 10-2477568
(24) 등록일자 2022년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 1/30 (2006.01) G01N 1/36 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 1/30 (2013.01)
G01N 1/36 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0073270
(22) 출원일자 2020년06월16일
심사청구일자 2020년06월16일
(65) 공개번호 10-2021-0155870
(43) 공개일자 2021년12월24일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020190094509 A*
JP2020513573 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
박순현
대전광역시 유성구 가정로 63, 109동 106호 (신성동, 럭키하나아파트)
김기석
대전광역시 서구 둔산로 155, 111동 301호 (둔산동, 크로바아파트)
(74) 대리인
이원희
(덧면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 9 항

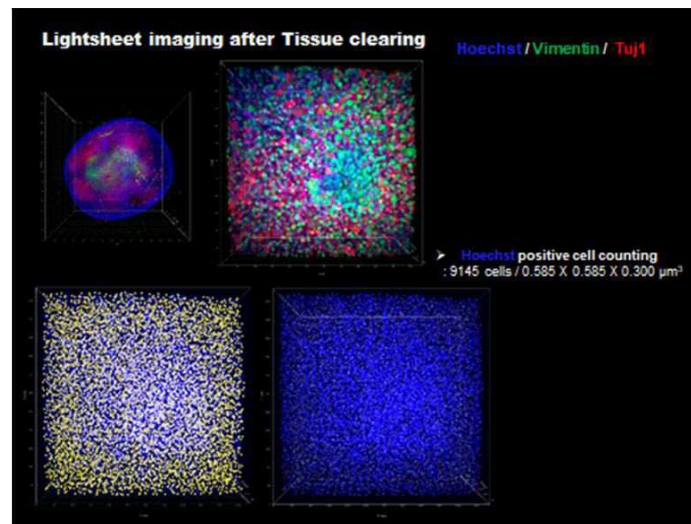
심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리 방법 및 이를 포함하는 생체 시료의 투명화 방법

(57) 요약

본 발명에 따른 1 mm 이하 크기의 생체 시료, 즉 스페로이드나 오가노이드의 투명화 전처리 방법은, 전처리 용액으로 종래 수크로오스(sucrose) 용액이 아닌 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 사용함에 따라, 전처리 과정에서 스페로이드나 오가노이드가 밀도 차이로 인해 수면 위로 떠올라 샘플 구조가 손상되던 문제점을 해결하여, 스페로이드나 오가노이드의 원형을 유지한 채 투명화가 가능하여 심부까지 이미징이 가능한 효과가 있다.

대표도 - 도7



(72) 발명자
이재면
 경상남도 양산시 물금읍 아리로 75 힐데스하임
 801-502호
이재혁
 충청북도 청주시 상당구 계산2길 26-33
박성훈
 대전광역시 유성구 가정로 63, 103동 801호 (신성
 동, 럭키하나아파트)

이지연
 서울시 동작구 서달로 123 103-402
박진주
 경북 영천시 고경면 동도길 64-6

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415164698
 과제번호 P0010219
 부처명 산업통상자원부
 과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
 연구사업명 R&D 재발견
 연구과제명 투명화 기법을 활용한 암 조직 유래 오가노이드의 3차원 신약 스크리닝 키트 개발
 기 여 율 60/100
 과제수행기관명 안전성평가연구소
 연구기간 2019.06.01 ~ 2020.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415168212
 과제번호 10067737
 부처명 산업자원통상부
 과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
 연구사업명 바이오산업핵심기술개발(R&D)
 연구과제명 신약 실패율 감소를 위한 사전 예측 평가 플랫폼 구축 및 서비스
 기 여 율 10/100
 과제수행기관명 안전성평가연구소
 연구기간 2020.04.01 ~ 2021.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-2003
 과제번호 KK-2003
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 안전성평가연구소
 연구사업명 첨단 독성예측기술 개발
 연구과제명 동물실험대체평가기술개발(in vitro 발암성 대체시험법 개발)
 기 여 율 10/100
 과제수행기관명 안전성평가연구소
 연구기간 2019.06.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711104121
 과제번호 2018M3A9H3021707
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
 연구과제명 신경교종에서 크리스퍼 유전체 염기 편집 및 나노 기술 기반으로 텔로미어 조절을
 통한 항암치료 전략 수립
 기 여 율 20/100
 과제수행기관명 서울대학교 의과대학
 연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

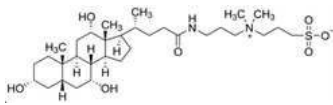
고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에,

인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)로 이루어진 전처리 용액을 처리하는 단계; 및

하기 화학식 2로 표시되는 CHAPS 화합물 또는 이의 수화물을 2 내지 55 w/v%; 및 우레아 10 내지 70 w/v%를 유효성분으로 포함하는 투명화제와 접촉시켜 투명화시키는 단계;를 포함하는,

1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 방법.

[화학식 2]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생체 시료는 스페로이드 또는 오가노이드인 것을 특징으로 하는,

1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 스페로이드 또는 오가노이드는,

뇌(brain), 혈관(blood vessel), 간(liver), 폐(lung), 신장(kidney), 췌장(pancreas), 위(stomach), 또는 장(intestine) 유래 세포에서 형성된 스페로이드 또는 오가노이드인 것을 특징으로 하는,

1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 생체 시료는 0.05 내지 1 mm 범위의 평균 직경을 갖는 생체 시료인 것을 특징으로 하는,

1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료는,

파라포름알데하이드(paraformaldehyde), 에틸렌글리콜 디글리시딜에테르(ethylene glycol diglycidyl ether), 디프로필렌 글리콜 디글리시딜에테르(dipropylene glycol diglycidyl ether), 1,4-부탄디올 디글리시딜에테르

(1,4-butanediol diglycidyl ether), 글리세롤 폴리글리시딜 에테르(glycerol polyglycidyl ether), 글루타르알데하이드(glutaraldehyde) 및 폴리아크릴아마이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상으로부터 고정화 된 생체 시료인 것을 특징으로 하는,

1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 있어서,

전처리 단계를 수행한 후,

투명화제와 접촉시켜 투명화시키는 단계를 수행하기 이전에,

아가로스(Agarose)를 처리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는,

1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 방법.

청구항 12

삭제

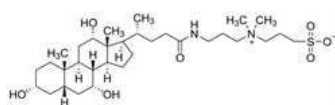
청구항 13

인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)로 이루어진 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리용 조성물; 및

하기 화학식 2로 표시되는 CHAPS 화합물 또는 이의 수화물을 2 내지 55 w/v%; 및 우레아 10 내지 70 w/v%를 유효성분으로 포함하는 투명화제;를 포함하는,

1 mm 이하 크기 생체 시료 투명화용 키트:

[화학식 2]



청구항 14

삭제

청구항 15

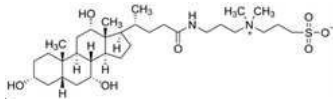
고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에,

인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)로 이루어진 전처리 용액을 처리하는 단계; 및

하기 화학식 2로 표시되는 CHAPS 화합물 또는 이의 수화물을 2 내지 55 w/v%; 및 우레아 10 내지 70 w/v%를 유효성분으로 포함하는 투명화제와 접촉시켜 투명화시키는 단계;를 포함하는,

1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 효율을 개선시키는 방법.

[화학식 2]



청구항 16

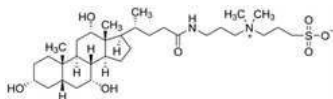
고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에,

인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)로 이루어진 전처리 용액을 처리하는 단계; 및

하기 화학식 2로 표시되는 CHAPS 화합물 또는 이의 수화물을 2 내지 55 w/v%; 및 우레아 10 내지 70 w/v%를 유효성분으로 포함하는 투명화제와 접촉시켜 투명화시키는 단계;를 포함하는,

1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 과정에서 생체 시료의 손상을 저감시키는 방법.

[화학식 2]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리 방법 및 이를 포함하는 생체 시료의 투명화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 조직 투명화 기술은 생체 조직 내부 구조 및 단백질 분포를 확인할 수 있고 기존 기술의 관찰 한계를 뛰어넘어 더 깊은 곳까지 조직 구조를 관찰하고 다양한 기관계(system)로부터 통합적인 구조와 분자 정보의 접근을 가능하게 하므로 최근 다양한 방법으로 조직을 투명화하는 기술이 개발되었다.

[0005] 종래의 조직 투명화 기술로는 유기 용매를 이용한 조직투명화 과정인 Spatleholz, BABB, Scale S, iDISCO 법과, 폴리머 주입법인 ACT(active CLARITY technology)법에 의해 처리된 조직의 항원 보존성이 보고된 바 있다. ACT를 제외한 다른 방법의 경우, 형광과 항원의 보존성이 감소하는 문제를 가지고 있다. ACT의 경우 90% 이상의 항원 보존성이 있으며, 이는 CLARITY와 같이 고정된 단백질에 추가로 하이드로젤 폴리머와의 결합을 필요로 하는 방법에 비하면 보다 높은 보존성을 보인다. 그러나 강한 조직 고정 과정은 항원성의 손실을 유발하며, 사용할 수 있는 항체가 감소하는 등의 문제점을 고려해야 하므로, 여러 가지 기술의 개선이 필요하다.

[0007] 한편, 1 mm 이하의 크기를 가지는 스페로이드 또는 오가노이드 활용 생체 조직의 투명화에는 더욱 큰 문제점이 있다. 조직 투명화 방법을 수행하기 위해서는 40% 수크로오스(sucrose) 전처리를 이용한 단백질 보존(특허문헌 1, KR 10-2017-0105551)이 중요한데, 크기가 작은 1 mm 이하 크기의 스페로이드나 오가노이드는 40% 수크로오스(sucrose)보다 밀도가 낮아서 수크로오스(sucrose) 용액 위로 올라와 버린다. 이는 스페로이드 또는 오가노이드의 조직이 연약하여 샘플을 shaking 할 때 심각한 손상을 유발하고, 더 나아가 연구자가 스페로이드 또는 오가

노이드의 작은 크기로 인해 육안으로 관찰할 수 없어 샘플을 분실하는 경우가 발생한다. 이를 해결하기 위해 40% 수크로오스 전처리 용액의 대체 물질을 찾기 위한 요구가 증가하고 있다.

- [0009] 또한, 스페로이드 및 오가노이드 스크리닝 키트의 신약 효과 및 독성을 평가하기 위한 인증체제를 구축하기 위해서는 빠른 3차원 이미징과 정량이 가능한 기술이 필요한데, 현재 오가노이드에 대한 빠른 3차원 이미징 구축과 정량화에는 어려움이 있다.
- [0011] 인체 유래 암 조직 오가노이드의 3차원 이미지를 획득하기 위해서는 일반적으로 공초점 현미경 등을 이용해야 하며, 이 경우 일반적으로 수십 마이크로미터 수준의 두께 정보를 획득할 수 있다. 대략적으로 이 두께는 광원이 침투할 수 있는 깊이에 의하여 한계가 그려진다. 그러나 오가노이드 구조물들은 수백 마이크로미터 이상의 크기를 가지고 있으므로, 이와 같은 방법으로는 일부의 정보만을 취득할 수 있다. 따라서, 보다 두꺼운 조직 내 정보를 획득하기 위해서는 수십 마이크로미터의 두께를 가지는 연속적인 절편을 제작하고, 이를 일일이 현미경을 통하여 이미징한 후, 다시 재구성하는 일련의 과정을 필요로 한다. 하지만 오가노이드는 샘플이 연약하기 때문에 자르고 붙이는 일련의 과정을 진행하면서 일어날 수 있는 문제점이 기하급수적으로 발생한다.
- [0012] 더 나아가 생 세포에서 3차원적으로 신약의 약효와 독성 평가를 수행하기 위해서는 새로운 방식의 이미지 관찰 기술이 필요하다.
- [0014] 본 발명은 1 mm 이하 크기의 스페로이드나 오가노이드를 투명화 할 때, 40% 수크로오스 전처리 과정에서 스페로이드 또는 오가노이드 등의 조직이 연약하여 샘플의 심각한 손상이 유발되는 점과, 연구자가 스페로이드 또는 오가노이드의 작은 크기로 인해 육안으로 관찰되지 않아 샘플을 분실하는 문제점을 해결하기 위한 대체 용액의 개발에 대한 것이다.
- [0016] 밀도에 의해 조직이 상층으로 부유하는 현상을 억제하기 위해 밀도가 낮으면서 투명화 용액에서의 단백질 손상을 보호할 수 있는 용액을 실험을 통해 관찰해 본 결과, 4% PFA로 조직을 고정한 후, 1×PBS로 24시간 동안 조직을 인큐베이션하면 40% 수크로오스와 같은 효과를 형광 유전자 조직 마우스 뇌에서 관찰할 수 있었다. 이를 스페로이드 또는 오가노이드의 작은 샘플에 적용하면 조직이 상층으로 부유하는 현상을 해결하여 조직의 손상을 해결하고 연구자가 시료의 위치를 확인할 수 있어 기존에 유발된 문제를 해결할 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 인체 유래 암 오가노이드의 빠른 3차원 이미지를 위해서 최근에 개발된 Leica THUNDER imager 3D 현미경을 이용하여 기존 공초점 현미경보다 빠르게 생세포의 3차원 이미지를 구축하고 정량화까지 가능하게 하였고, 또한 조직 투명화 기술은 인체 유래 암 오가노이드의 손상 없이 조직 내부 구조 및 단백질 분포를 확인할 수 있어, 기존 기술의 관찰 한계를 뛰어넘어 더 깊은 곳까지 조직 구조를 관찰하고 다양한 기관계(system)로부터 통합적인 구조와 분자 정보의 3차원 이미지에 접근이 가능한 기술이다. 더 나아가, 본 발명의 인체 유래 암 오가노이드 키트는 투명화 과정 중에 일어날 수 있는 암 오가노이드 구조의 손상을 억제하는 방법이 포함되어 있다.
- [0020] 이에 인체 유래 암 오가노이드에 high throughput 이미지 기술과 투명화 기술을 적용하여 연구자가 쉽게 신약의 효능 및 독성을 스크리닝 할 수 있는 프로토콜을 확립하고, 투명화를 인체 유래 암 오가노이드에 적용하여, 보다 정밀한 분석 및 평가를 동시에 편리하게 할 수 있는 키트의 발명을 완성하였다.
- [0022] 한편, 특허문헌 2(KR 10-2018-0013747)에는 투명화제(CHAPS+Urea)를 사용하여 스페로이드를 투명화하는 방법을 제공하며, 투명화제(CHAPS+Urea)를 포함하는 투명화용 조성물은 스페로이드를 편리하고 빠르게 투명화시킬 수 있어 스페로이드의 이미징에 유용하게 사용될 수 있으며, 다양한 질환 원인의 규명, 치료 및 약물의 효과 및 독성을 예측하는데 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있음을 개시하고 있다. 여기서, 본 발명은 스페로이드를 대상으로 투명화제(CHAPS+Urea)를 사용해 투명화된 스페로이드의 선명한 형광 이미지를 얻고, 이러한 스페로이드의 선명한 형광 이미지로부터 다양한 질환 원인의 규명, 치료 및 약물의 효과 및 독성을 예측하는데 유용하게 사용할 수 있음을 개시하고 있으나, 투명화제를 처리하여 투명화를 유도하기 이전에, 스페로이드나 오가노이드의 손상(변성)을 최소화하고, 투명화를 더욱 잘 유도하여 이후 심부까지 이미지 확보가 가능하게 하며, 기존 전처리 용액(당류 용액, sucrose)에서 떠오르는 문제를 극복하기 위한 목적으로 PBS 용액을 사용한 전처리 단계를 추가적으로 수행하는 구성이 있어 앞서 언급한 종래기술 내용과는 차별성이 있다.
- [0024] 즉, 본 발명은 밀도 차이로 인해 스페로이드나 오가노이드가 전처리 용액에 떠올라 전처리 과정이 수월하지 않고, 연약한 조직의 파손 유발 문제점이 극복될 수 있다는 효과가 있으므로, 이를 스페로이드 및 오가노이드의 투명화에 유용하게 사용될 수 있음을 입증하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

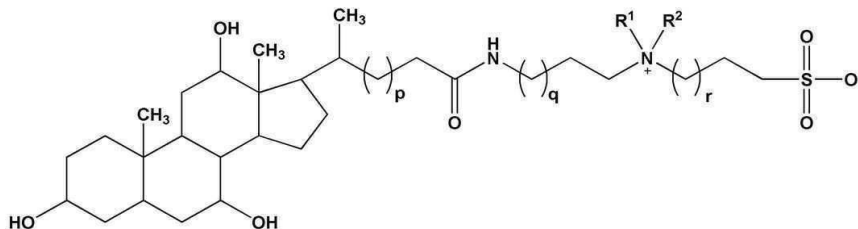
- [0026] (특허문헌 0001) KR 10-2017-0105551
- (특허문헌 0002) KR 10-2018-0013747

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0027] 본 발명의 일 측면에서의 목적은,
- [0028] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에, 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 단계를 포함하는, 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리 방법을 제공하는 것이다.
- [0029]
- [0030] 본 발명의 다른 일 측면에서의 목적은,
- [0031] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에, 인산완충생리식염수(PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 전처리 단계; 및
- [0032] 상기 단계에서 전처리된 생체 시료를, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체, 이의 수화물, 또는 이의 염을 포함하는 투명화제와 접촉시켜 투명화시키는 단계;를 포함하는, 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 방법을 제공하는 것이다.

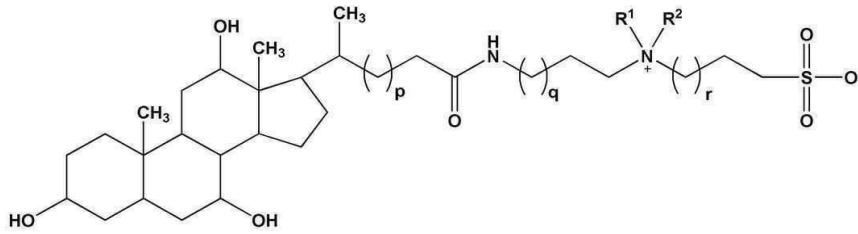
[0033] [화학식 1]



- [0034]
- [0035] 상기 화학식 1에서,
- [0036] R¹ 및 R²는 독립적으로 C₁₋₁₀의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고; 및
- [0037] p, q 및 r은 독립적으로 0 내지 10의 정수이다.

- [0039] 본 발명의 또 다른 일 측면에서의 목적은,
- [0040] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0042] 본 발명의 다른 일 측면에서의 목적은,
- [0043] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리용 조성물; 및
- [0044] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체, 이의 수화물, 또는 이의 염을 포함하는 투명화제;를 포함하는, 1 mm 이하 크기 생체 시료 투명화용 키트를 제공하는 것이다.

[0045] [화학식 1]



[0046]

[0047] 상기 화학식 1에서,

[0048] R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고; 및

[0049] p , q 및 r 은 독립적으로 0 내지 10의 정수이다.

[0051] 본 발명의 또 다른 일 측면에서의 목적은,

[0052] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에,

[0053] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 단계를 포함하는, 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 효율을 개선시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0055] 본 발명의 다른 일 측면에서의 목적은,

[0056] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에,

[0057] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 단계를 포함하는, 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 과정에서 생체 시료의 손상을 저감시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0059] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0060] 본 발명의 일 측면은,

[0061] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에,

[0062] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 단계를 포함하는,

[0063] 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리 방법을 제공한다.

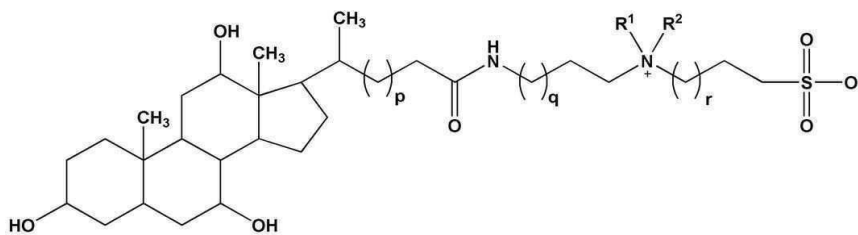
[0065] 또한, 본 발명의 다른 일 측면은,

[0066] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에, 인산완충생리식염수(PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 전처리 단계; 및

[0067] 상기 단계에서 전처리된 생체 시료를, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체, 이의 수화물, 또는 이의 염을 포함하는 투명화제와 접촉시켜 투명화시키는 단계;를 포함하는,

[0068] 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 방법을 제공한다.

[0069] [화학식 1]



[0070]

[0071] 상기 화학식 1에서,

[0072] R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고; 및

[0073] p , q 및 r 은 독립적으로 0 내지 10의 정수이다.

[0075] 나아가, 본 발명의 또 다른 일 측면은,

[0076] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리용 조성물을 제공한다.

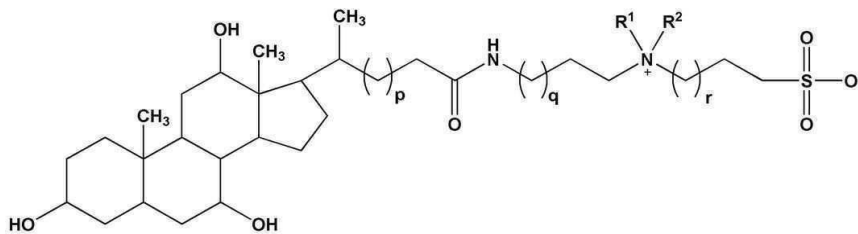
[0078] 또한, 본 발명의 다른 일 측면은,

[0079] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리용 조성물; 및

[0080] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체, 이의 수화물, 또는 이의 염을 포함하는 투명화제;를 포함하는,

[0081] 1 mm 이하 크기 생체 시료 투명화용 키트를 제공한다.

[0082] [화학식 1]



[0083]

[0084] 상기 화학식 1에서,

[0085] R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고; 및

[0086] p , q 및 r 은 독립적으로 0 내지 10의 정수이다.

[0088] 나아가, 본 발명의 또 다른 일 측면은,

[0089] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에,

[0090] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 단계를 포함하는, 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 효율을 개선시키는 방법을 제공한다.

[0092] 또한, 본 발명의 다른 일 측면은,

[0093] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에,

[0094] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 단계를 포함하는, 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 과정에서 생체 시료의 손상을 저감시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0096] 본 발명에 따른 1 mm 이하 크기의 생체 시료, 즉 스페로이드나 오가노이드의 투명화 전처리 방법은, 전처리 용액으로 종래 수크로오스(sucrose) 용액이 아닌 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 사용함에 따라, 전처리 과정에서 스페로이드나 오가노이드가 밀도 차이로 인해 수면 위로 떠올라 샘플 구조가 손상되던 문제점을 해결하여, 스페로이드나 오가노이드의 원형을 유지한 채 투명화가 가능하여 심부까지 이미징이 가능한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0098] 도 1은 전처리 용액 종류에 따른 마우스 뇌 투명화 및 형광밝기 정도를 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2는 실험예 2의 2-1에서 인체 유래 오가노이드 제작과정 중 오가노이드 샘플을 신경세포 배양액에서 배양할

때의 사진을 나타낸다.

도 3은 실험예 2의 2-1에서 제작한 인체 유래 암 오가노이드 샘플에 테모졸로마이드(Temozolomide)를 처리하기 전, Hoechst/PI 비율을 Thunder imager로 확인한 사진을 나타낸다.

도 4는 실험예 2의 2-1에서 제작한 인체 유래 암 오가노이드 샘플에 테모졸로마이드(Temozolomide)를 처리한 후, Hoechst/PI 비율을 Thunder imager로 확인한 사진을 나타낸다.

도 5는 암 오가노이드 투명화 단계를 수행하기 전과 후, 육안으로 관찰되는 ibidi 8 well에서의 시료 모습을 나타낸다.

도 6은 1×PBS 전처리 과정을 포함하여 투명화한 암 오가노이드의 3차원 바이오 이미지를 얻기 위해 거대시료이미징 평면레이저 현미경 Macro laser light-sheet illumination imaging systemconfocal microscope에서 5X와 20X 대물렌즈를 이용하여 DAPI, Green fluorescence와 Red fluorescence 신호를 확인한 결과를 나타내는 사진이다.

도 7은 1×PBS 전처리 과정을 포함하여 투명화한 암 오가노이드의 3차원 바이오 이미지를 얻기 위해 거대시료이미징 평면레이저 현미경 Macro laser light-sheet illumination imaging systemconfocal microscope에서 5X와 20X 대물렌즈를 이용하여 DAPI, Green fluorescence와 Red fluorescence 신호를 통해, 암 오가노이드의 심부까지 이미지 확보가 가능함을 확인한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0099] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0101] 한편, 본 발명의 실시 형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 실시 형태는 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다.
- [0102] 나아가, 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0104] 본 발명의 일 측면은,
- [0105] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에,
- [0106] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 단계를 포함하는,
- [0107] 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리 방법을 제공한다.
- [0109] 이때, 상기 생체 시료는 스펜로이드 또는 오가노이드일 수 있으며, 상기 스펜로이드 또는 오가노이드는 뇌(brain), 혈관(blood vessel), 간(liver), 폐(lung), 신장(kidney), 췌장(pancreas), 위(stomach), 또는 장(intestine) 유래 세포에서 형성된 스펜로이드 또는 오가노이드일 수 있다.
- [0110] 상기 생체 시료, 즉, 스펜로이드 또는 오가노이드는 0.05 내지 1 mm 범위의 평균 직경을 갖는 생체 시료일 수 있다.
- [0112] 상기 생체 시료의 평균 직경의 몇 가지 예시를 들면,
- [0113] 0.05 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.10 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.15 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.20 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.25 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.30 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.35 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.40 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.45 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.50 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.55 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.60 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.65 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.70 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.75 내지 1 mm 범위일 수 있고, 0.80 내지 1 mm 범위일 수 있다. 본 발명은 평균 직경이 일반 생체 조직보다 작은 생체 시료를 대상으로 투명화를 수행할 때, 전처리 과정에서 전처리 용액 수면으로 부유하는 문제점을 극복하고자 도출된 발명이므로, 투명화하고자 하는 대상이 전술한 크기의 생체 시료일 때, 본 발명에서 입증한 효과, 대표적으로 전처리 과정에서의 구조손상 방지 등의 효과가 발생할 수 있다.
- [0115] 상기 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료는,
- [0116] 파라포름알데하이드(paraformaldehyde), 에틸렌글리콜 디글리시딜에테르(ethylene glycol diglycidyl ether),

디프로필렌 글리콜 디글리시딜에테르(dipropylene glycol diglycidyl ether), 1,4-부탄디올 디글리시딜에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether), 글리세롤 폴리글리시딜 에테르(glycerol polyglycidyl ether), 글루타르알데하이드(glutaraldehyde) 및 폴리아크릴아마이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상으로부터 고정화된 생체 시료일 수 있고, 본 발명 실시예에서는 바람직하게 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 사용하였다.

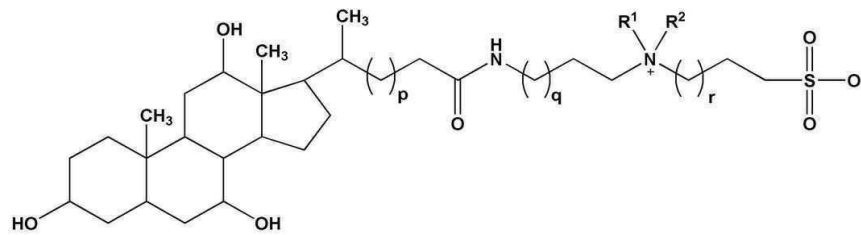
[0118] 본 발명의 다른 일 측면은,

[0119] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에, 인산완충생리식염수(PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 전처리 단계; 및

[0120] 상기 단계에서 전처리된 생체 시료를, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체, 이의 수화물, 또는 이의 염을 포함하는 투명화제와 접촉시켜 투명화시키는 단계;를 포함하는,

[0121] 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 방법을 제공한다.

[0122] [화학식 1]



[0123]

[0124] 상기 화학식 1에서,

[0125] R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고; 및

[0126] p, q 및 r은 독립적으로 0 내지 10의 정수이다.

[0128] 바람직하게는,

[0129] 상기 R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-5} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고; 및

[0130] 상기 p, q 및 r은 독립적으로 0 내지 5의 정수일 수 있다.

[0132] 더욱 바람직하게는,

[0133] 상기 R^1 및 R^2 는 메틸이고; 및

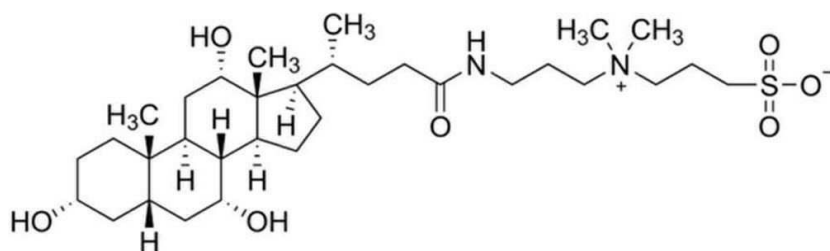
[0134] 상기 p, q 및 r은 1의 정수일 수 있다.

[0136] 가장 바람직하게는,

[0137] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은,

[0138] 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 수화물일 수 있다.

[0139] [화학식 2]



[0140]

[0142] 상기 투명화제는, 상기 화학식 2로 표시되는 CHAPS 화합물 또는 이의 수화물을 2 내지 55 w/v%(중량/부피%)의

농도로 포함될 수 있으며, 4 내지 50 w/v% 농도가 바람직하다. 이때, 상기 농도를 나타내기 위한 용액으로는 통상의 분야에 사용하는 유사 생체 용액(simulated body fluid)일 수 있으며, 보다 구체적으로는 증류수, PBS(phosphate buffer saline), TBS(tris buffer solution) 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 CHAPS 화합물의 농도가 2 w/v% 미만으로 포함되는 경우에는 생체 조직의 투명화 속도가 현저히 느려질 수 있고, 55 w/v% 초과로 포함되는 경우에는 CHAPS 화합물이 투명화제에 완전히 용해되지 않을 수 있다.

[0144] 또한, 상기 투명화제는 우레아(urea), CHAPSO(3-([3-Cholamidopropyl]dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propanesulfonate), 수크로오스(sucrose), 프룩토오스(fructose), 글리세롤, 다이아트라이조산(Diatrizoic acid), Triton X-100, Tween-20, 2,2'-싸이오디에탄올, 이오헥솔(Iohexol) 및 클로랄 수화물(Chloral hydrate)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 더 포함할 수 있으며, 우레아(urea)를 더 포함하는 것이 바람직하다. 이 성분은 삼투압을 조절하여 생체 시료의 투명화를 빠르게 촉진시키는 역할을 한다.

[0146] 상기 생체 시료의 투명화를 빠르게 촉진시키는 물질은 상기 투명화제에 5 내지 80 w/v%의 농도로 포함될 수 있으며, 5 내지 75 w/v%의 농도로 포함될 수 있으며, 10 내지 70 w/v%의 농도로 포함될 수 있으며, 5 내지 50 w/v% 농도로 포함될 수 있으며, 35 내지 60 w/v% 농도로 포함될 수 있다. 이때, 상기 농도가 5 w/v% 미만인 경우 조직의 투명화 속도가 느려지며 80 w/v% 초과인 경우 결정이 유발되거나 용액에 녹지 않을 수 있다.

[0148] 하나의 구체적인 일례로, 만약 상기 생체 시료의 투명화를 빠르게 촉진시키는 물질로 우레아(urea)를 사용할 경우, 상기 우레아는 10 내지 70 w/v%의 농도가 포함될 수 있으며, 20 내지 60 w/v% 농도가 보다 바람직하다. 또한, 상기 생체 시료의 투명화를 빠르게 촉진시키는 물질의 농도는 상기 CHAPS 화합물의 바람직한 농도 범위와 함께 적절히 조절할 수 있다.

[0150] 상기 생체 조직의 투명화 방법은 4℃ 내지 50℃ 온도 범위에서 수행할 수 있고, 10℃ 내지 50℃ 온도 범위에서 수행할 수 있고, 12 내지 48℃ 온도 범위에서 수행할 수 있고, 14 내지 46℃ 범위에서 수행할 수 있고, 16 내지 44℃ 범위에서 수행할 수 있고, 18 내지 42℃ 범위에서 수행할 수 있고, 20 내지 40℃ 범위에서 수행할 수 있고, 24 내지 39℃ 범위에서 수행할 수 있고, 28℃ 내지 38℃에서 수행할 수 있고, 30℃ 내지 37℃에서 수행할 수 있고, 33 내지 34℃에서 수행할 수 있다.

[0152] 나아가, 전처리 단계를 수행한 후,

[0153] 투명화제와 접촉시켜 투명화시키는 단계를 수행하기 이전에,

[0154] 아가로스(Agarose)를 처리하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 해당 단계를 더 수행함에 따라 스페로이드 또는 오가노이드의 손상을 최소화하고 구조를 유지할 수 있게 된다.

[0156] 본 발명의 또 다른 일 측면은,

[0157] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리용 조성물을 제공한다.

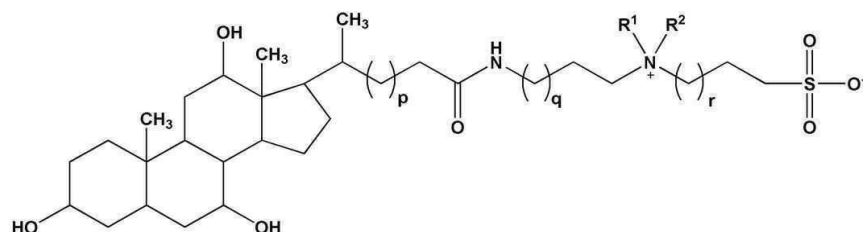
[0159] 본 발명의 다른 일 측면은,

[0160] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 전처리용 조성물; 및

[0161] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학 이성질체, 이의 수화물, 또는 이의 염을 포함하는 투명화제;를 포함하는,

[0162] 1 mm 이하 크기 생체 시료 투명화용 키트를 제공한다.

[0163] [화학식 1]



[0164]

- [0165] 상기 화학식 1에서,
- [0166] R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-10} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고; 및
- [0167] p, q 및 r은 독립적으로 0 내지 10의 정수이다.
- [0169] 이때, 상기 투명화제는 우레아(urea), CHAPSO(3-([3-Cholamidopropyl]dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propanesulfonate), 수크로오스(sucrose), 프룩토오스(fructose), 글리세롤, 다이아트라이조산(Diatrizoic acid), Triton X-100, Tween-20, 2,2'-싸이오디에탄올, 이오헥솔(Iohexol) 및 클로랄 수화물(Chloral hydrate)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 더 포함할 수 있으며, 우레아(urea)를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0171] 본 발명의 또 다른 일 측면은,
- [0172] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에,
- [0173] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 단계를 포함하는, 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 효율을 개선시키는 방법을 제공한다.
- [0175] 본 발명의 다른 일 측면은,
- [0176] 고정화된 1 mm 이하 크기의 생체 시료에,
- [0177] 인산완충생리식염수(Phosphate-buffered saline, PBS)를 포함하는 전처리 용액을 처리하는 단계를 포함하는, 1 mm 이하 크기 생체 시료의 투명화 과정에서 생체 시료의 손상을 저감시키는 방법을 제공한다.
- [0179] 본 발명의 일 측면에서 제공하는 투명화 방법은, 1 mm 이하 크기의 스페로이드 및 오가노이드의 작은 샘플을 투명화 할 때, 조직이 상층으로 부유하는 현상을 해결하여 조직의 손상을 해결하고 연구자가 시료의 위치를 확인할 수 있는 효과가 있다. 또한, high throughput 이미지 기술 및 투명화 기술을 생세포 3차원 이미지에 적용하여 연구자가 쉽게 신약의 효능과 독성을 스크리닝 할 수 있는 프로토콜을 확립하고, 이러한 투명화를 인체 유래 암 오가노이드에 적용하여, 보다 정밀한 분석 및 평가를 동시에 할 수 있는 방법으로, 오가노이드의 3차원 이미지를 얻어 다양한 질환의 원인을 규명하고, 치료법, 더 나아가 신약의 효과 및 독성을 평가하는데 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.
- [0181] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0182] 단, 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0184] **<실험예 1> 전처리 용액 종류에 따른 마우스 뇌 투명화 정도 비교**
- [0185] 전처리 용액 종류(1×PBS, 또는 40 w/v% 수크로오스)에 따른 마우스 뇌 투명화 정도를 비교하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다. 이때, 본 명세서에서 모든 동물 실험 과정은 안전성평가연구소 동물 자원 대학위원회의 지침서(Approval No. RS17003)에 따라 수행하였다.
- [0187] 1-1: 고정화 단계
- [0188] 먼저, 흡입 마취제인 이소플루레인(Isoflurane) 1cc/min을 사용하여 성인 생쥐(8주령)를 마취시키고, 경심 관류로 차가운 1×PBS에 50 mL을 관류시킨 후, 차가운 4% PFA (Paraformaldehyde)를 관류시켰다.
- [0189] 그 다음 기관을 적출하고 4%의 PFA용액(수용액)에 담근 후 4℃에서 24 h 동안 인큐베이션 하였다. 이때, 상기 차가운 온도 범위는 특별히 제한되는 것은 아니지만 0 내지 10℃ 범위일 수 있다.
- [0191] 1-2: 전처리 단계
- [0192] 다음으로, 상기 샘플(기관)을 1×PBS, 또는 40% 수크로오스 용액에 0 내지 10℃ 범위에서 24h 동안 인큐베이션 하여 전처리 단계를 수행하였다. 이때, 상기 1×PBS는 10mM PO_4^{3-} , 137mM NaCl 및 2.7mM KCl의 염분을 가지고, PH가 약 7.4인 인산완충생리식염수 (Phosphate-buffered saline, PBS)이고, 상기 40% 수크로오스 용액은 농도 단위가 w/v%(중량/부피%)이며 수용액을 사용하였다.
- [0194] 1-3: 투명화 단계

- [0195] 상기 전처리가 완료된 샘플을 각각 투명화하기 위하여, 20% CHAPS w/v%, 50 w/v% 우레아(Urea), 50 mM 소듐 아자이드(Sodium azide)의 혼합 수용액을 35℃에서 100 rpm으로 5h, 48h 동안 인큐베이션 하였다. 이때, 상기 CHAPS란 본 명세서 내 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 수화물에 해당한다.
- [0197] 1-4: 결과
- [0198] 전처리 용액 종류에 따른 마우스 뇌 투명화 정도는 형광밝기 정도를 통해 비교하였다. 이때 형광 이미지는 유전자 변형 형광마우스 뇌의 조직 투명화 과정에서 GFP 형광의 손실 차를 비교하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0200] 도 1은 전처리 용액 종류에 따른 마우스 뇌 투명화 및 형광밝기 정도를 비교한 결과를 나타내는 사진이다.
- [0202] 도 1에 나타난 바와 같이, 마우스 뇌 투명화를 위한 전처리 용액으로서, 1×PBS 전처리 용액은, KR 10-2017-0105551 특허문헌에 개시된 40 w/v%(중량/부피%) 농도의 수크로오스(sucrose) 전처리 용액을 대체할 수 있을 정도로, 결과적으로 투명화를 잘 유도하는 것으로 나타났다.
- [0204] 앞서 설명한 바와 같이, 1 mm 이하 크기의 스페로이드나 오가노이드를 투명화 할 때, KR 10-2017-0105551 특허문헌에 개시된 40 w/v%(중량/부피%) 농도의 수크로오스(sucrose) 용액을 사용하여 전처리를 수행하면, 밀도 차이로 인해 스페로이드나 오가노이드가 수면 위로 떠올라, 연약한 스페로이드나 오가노이드 샘플 구조가 손상되어, 이후 투명화를 수행하여도 유의미한 내부 관찰이 불가능한 문제가 있었으나, 1×PBS 전처리 용액은 스페로이드나 오가노이드와 밀도 차이가 크지 않아, 전술한 샘플 구조의 손상이 최소화될 수 있으므로, 1×PBS 전처리 용액은 스페로이드나 오가노이드 투명화 과정에서 전처리 용액으로 유용하게 사용될 수 있음을 본 실험을 통해 확인하였다.
- [0206] **<실험예 2> 인체 유래 암 오가노이드의 면역 염색 및 투명화**
- [0207] 1×PBS(Phosphate buffered saline) 전처리 과정을 포함함에 따라 암 오가노이드의 면역 염색 및 투명화가 실제로 잘 유도되는지 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0209] 2-1: 인체 유래 오가노이드 제작
- [0210] 인체 유래 오가노이드를 만들기 위해서 서울대학교 의과대학에서 교모세포종(glioblastoma) 환자로부터 조직을 단세포 단위로 분리하여 파라핀 필름 위에 20 μl의 매트릭젤(matrigel)과 함께 섞는다. 샘플을 37℃ 인큐베이터에서 배양하면 1 mm 크기의 젤리화된 반구형 모양이 만들어진다. 그 후, 신경세포 배양액에 넣어서 4일 동안 키운다. 4일 이후, 오비탈 셰이커(orbital shaker)에서 60 내지 80 RPM으로 흔들어주면서 샘플을 배양한다(도 2). 도 2는 인체 유래 오가노이드의 제작과정 중 오가노이드 샘플을 신경세포 배양액에서 배양할 때의 사진을 나타낸다. 배양액은 3일에 한번씩 새롭게 교체하여 키우면 4주 후에 인체 유래 암 오가노이드가 만들어진다.
- [0212] 2-2: 투명화를 수행하지 않은 경우의 오가노이드 관찰
- [0213] 암 오가노이드 샘플을 ibidi 8 well로 옮겨 뇌 종양 치료제로 사용되는 테모졸로마이드(Temozolomide) 처리 전과 후의 오가노이드 이미지를 Leica Thunder 현미경을 이용하여 3차원으로 이미징을 한다. 3차원의 형광 이미지를 위한 정상 핵 염색은 Hoechst(blue color)와 죽은 세포 마커로 사용되는 PI(Red color)를 통해 처리하였다. 테모졸로마이드의 처리 전과 후의 Hoechst/PI 비율을 Thunder imager를 사용하여 도 3 및 도 4에 나타내었다.
- [0215] 도 3은 실험예 2의 2-1에서 제작한 인체 유래 암 오가노이드 샘플에 테모졸로마이드(Temozolomide)를 처리하기 전, Hoechst/PI 비율을 Thunder imager로 확인한 사진을 나타낸다.
- [0216] 도 4는 실험예 2의 2-1에서 제작한 인체 유래 암 오가노이드 샘플에 테모졸로마이드(Temozolomide)를 처리한 후, Hoechst/PI 비율을 Thunder imager로 확인한 사진을 나타낸다.
- [0218] 테모졸로마이드(Temozolomide)를 처리하기 전 Thunder imager로 확인한 인체 유래 암 오가노이드 샘플의 Hoechst/PI 비율을 보면 죽은 세포가 거의 발견되지 않으나(도 3), 테모졸로마이드(Temozolomide)를 처리한 후 Thunder imager로 확인한 인체 유래 암 오가노이드 샘플의 Hoechst/PI 비율을 보면(도 4), 테모졸로마이드를 처리하기 전 대비 죽은 세포가 증가한 것을 알 수 있다.
- [0220] 2-3: 1×PBS의 전처리 단계를 포함하는 암 오가노이드 투명화 방법
- [0221] 암 오가노이드에서 테모졸로마이드에 의해 사멸된 세포의 양이 많아지면, 보다 정밀한 분석을 위해 조직 투명화 기법을 적용해야 한다. 또한, 마우스 뇌와 같이 크기가 큰 생체 조직과는 다르게, 오가노이드의 투명화를 용이

하게 유도하기 위해서는 1×PBS(Phosphate buffered saline) 전처리 과정이 필수적이다.

[0223] 암 오가노이드를 대상으로 한 투명화 과정은 하기와 같다.

[0225] A. 고정화 단계

[0226] 먼저, 인체 유래 암 오가노이드에 뇌 종양 치료제로 사용되는 테모졸로마이드(Temozolomide)를 처리해서 36시간 동안 배양한다. 36시간 배양이 끝난 인체 유래 암 오가노이드에 PBS로 배양액을 제거한다. PBS를 제거하고 인체 유래 암 오가노이드에 4% PFA (Paraformaldehyde)를 처리하여 4℃에서 1시간 동안 오가노이드를 고정한다.

[0228] B. 전처리 단계

[0229] 상기 고정된 오가노이드에 1×PBS로 시료를 이동시켜 24시간 4℃에서 오비탈 셰이커(orbital shaker)에 둔다. 암 오가노이드를 ibidi 8 well에 옮기고 0.8% 아가로스(agarose)가 녹아있는 용액을 60℃로 온도를 낮추고, 암 오가노이드가 들어있는 well에 부어서 오가노이드를 고정시켜준다. 이때, 아가로스는 암 오가노이드의 손상을 최소화하고 구조를 유지시켜주는 역할을 한다.

[0231] C. 투명화 단계

[0232] 생체 조직 투명화 용액 (40w/v% CHAPS + 40w/v% Urea)을 처리하고, 37℃ 에서 100rpm으로 24h 동안 인큐베이션 해준다. 인큐베이션이 끝나면 증류수로 2시간동안 3번 용액을 교체하면서 생체 조직 투명화 용액을 제거한다. 한번 더 생체조직투명화 용액 (40w/v% CHAPS + 40w/v% Urea)을 처리하고, 37℃ 에서 100rpm으로 24h 동안 인큐베이션 해준다. 인큐베이션이 끝나면 증류수로 2시간 동안 3번 용액을 교체하면서 생체 조직 투명화 용액을 제거한다.

[0233] 도 5에 암 오가노이드 투명화 단계를 수행하기 전과 후, 육안으로 관찰되는 ibidi 8 well에서의 시료 모습을 나타내었다.

[0235] 다음으로, 암 오가노이드 조직에 항체가 들어갈 수 있는 공간을 확보하기 위해서 조직 침투처리 용액 (0.2% TritonX-100, 10% DMSO, 0.1× PBS)을 4℃에서 4시간 동안 처리한다. 인큐베이션이 끝나면 증류수로 2시간 동안 3번 용액을 교체하면서 조직 침투처리 용액을 제거한다. 1차 항체를 0.1× PBS, 0.01% 소듐 아자이드(sodium azide), 0.1% 트윈(Tween) 20으로 구성된 용액에 1:100으로 희석하여 암 오가노이드 시료에 처리하여 2일 동안 4℃에서 인큐베이션 한다. 다음으로 0.1× PBS용액으로 3시간 동안 3번 용액을 교체하면서 1차 항체를 암 오가노이드 조직에서 제거한다. 2차 항체를 0.1× PBS, 0.01% 소듐 아자이드(sodium azide), 0.1% 트윈(Tween) 20으로 구성된 용액에 1:100으로 희석하여 암 오가노이드 시료에 처리하여 2일 동안 4℃에서 인큐베이션 한다. 마지막으로, 0.1× PBS용액으로 3시간 동안 3번 용액을 교체하면서 2차 항체를 암 오가노이드조직에서 제거한다. 핵 염색을 위해 DAPI (sigma Cat#D 9542)를 2h 동안 처리해준다. 증류수로 여분의 염색시약을 제거한다. 생체 조직 투명화 용액 (40w/v% CHAPS + 40w/v% Urea)에 암 오가노이드 시료를 넣고, 37℃ 에서 100rpm으로 24h 동안 인큐베이션 해준다.

[0237] 상기 결과와 같이, 본 발명에 인체 유래 암 오가노이드에 투명화 기술을 적용하여 연구자가 쉽게 암 오가노이드의 투명화를 위한 시료 제작 및 투명화를 동시에 편리하게 할 수 있는 것을 알 수 있다.

[0239] <실험예 3> 투명화된 오가노이드의 면역염색을 통해 오가노이드 세포수준의 구조 및 분포 관찰과, 심부까지의 분석

[0240] 상기 실험예 2의 2-3, A 내지 C 과정을 통해 투명화된 인체유래 암 오가노이드 조직의 구조 및 세포의 분포를 확인하기 위해 간엽(Mesenchymal) 세포의 마커로 사용되는 비멘틴(Vimentin) 항체를 처리하여 확인하였다. 또한, 뇌 종양의 시료이기 때문에 신경세포의 분포를 확인하기 위해 신경세포 마커인 Tuj1 항체를 처리하였다. 3차원 바이오 이미지를 얻기 위해 거대시료이미징 평면레이저 현미경 Macro laser light-sheet illumination imaging systemconfocal microscope에서 5X와 20X 대물렌즈를 이용하여 DAPI, Green fluorescence와 Red fluorescence 신호를 확인하였다(도 6). 도 6은 1×PBS 전처리 과정을 포함하여 투명화한 암 오가노이드의 3차원 바이오 이미지를 얻기 위해 거대시료이미징 평면레이저 현미경 Macro laser light-sheet illumination imaging systemconfocal microscope에서 5X와 20X 대물렌즈를 이용하여 DAPI, Green fluorescence와 Red fluorescence 신호를 확인한 결과를 나타내는 사진이다. 간엽(Mesenchymal) 세포 하나하나의 모양과 신경세포 및 핵의 모양의 해상도가 3차원으로 명확하게 보이고 있다. 더 나아가 암 오가노이드의 심부까지 이미지 확보가 가능함을 보여준다(도 7). 도 7은 1×PBS 전처리 과정을 포함하여 투명화한 암 오가노이드의 3차원 바이오 이미지를 얻기 위해 거대시료이미징 평면레이저 현미경 Macro laser light-sheet illumination imaging

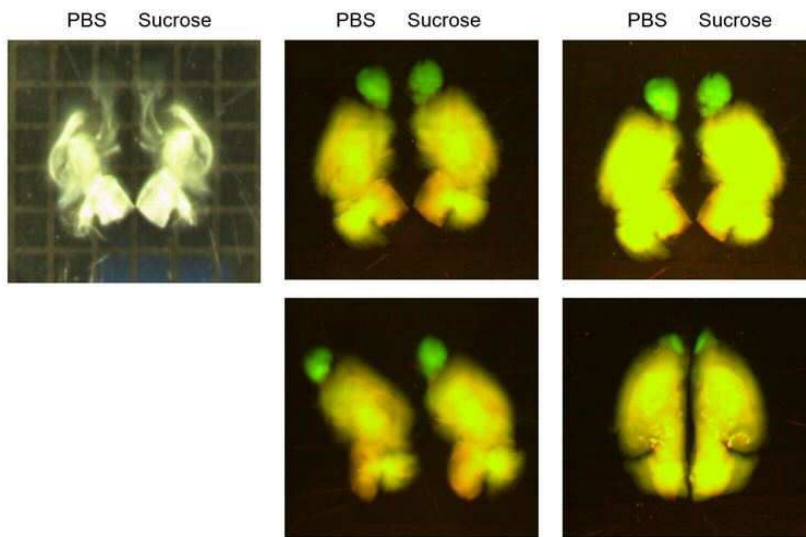
systemconfocal microscope에서 5X와 20X 대물렌즈를 이용하여 DAPI, Green fluorescence와 Red fluorescence 신호를 통해, 암 오가노이드의 심부까지 이미지 확보가 가능함을 확인한 사진이다.

[0242] 나아가, 3차원 구성에 따른 중요성을 보여주기 위해 Imaris 소프트웨어를 사용하면 단위 면적당 세포의 수를 정량까지 가능하게 한다(도 7). 이를 활용하면 신약개발에서 약효 및 독성을 3차원적으로 분석하고 정량화하여 2차원 기반으로 분석하는 것 보다 객관적이고 정량적으로 평가할 수 있다.

[0244] 따라서, 인산완충생리식염수 (Phosphate-buffered saline, PBS)로 전처리하는 단계를 포함하는 본 발명의 투명화 방법은 스페로이드나 오가노이드를 편리하고 빠르게 투명화 시킬 수 있어, 스페로이드나 오가노이드의 이미징에 유용하게 사용될 수 있으며, 또한, 다양한 질환의 원인 규명, 치료, 약물의 효과 및 독성 예측에 유용하게 사용될 수 있다. 나아가, 이를 다양한 의료기기에 접목시켜 사용할 수 있고, 특히 키트로 제작하여 체외 진단 기기로 유용하게 사용될 수 있다.

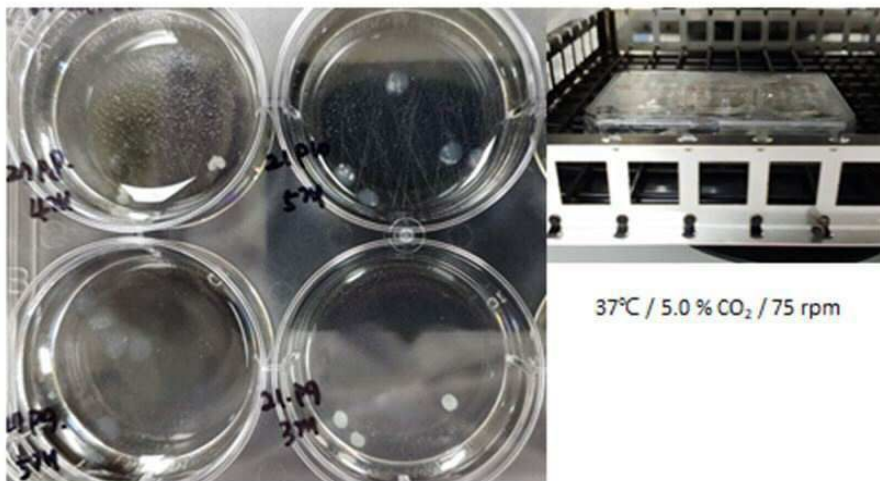
도면

도면1

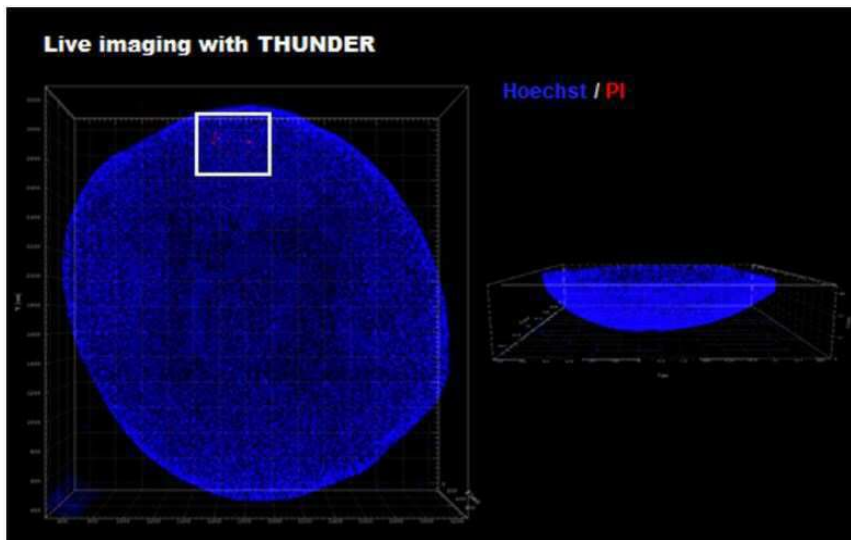


도면2

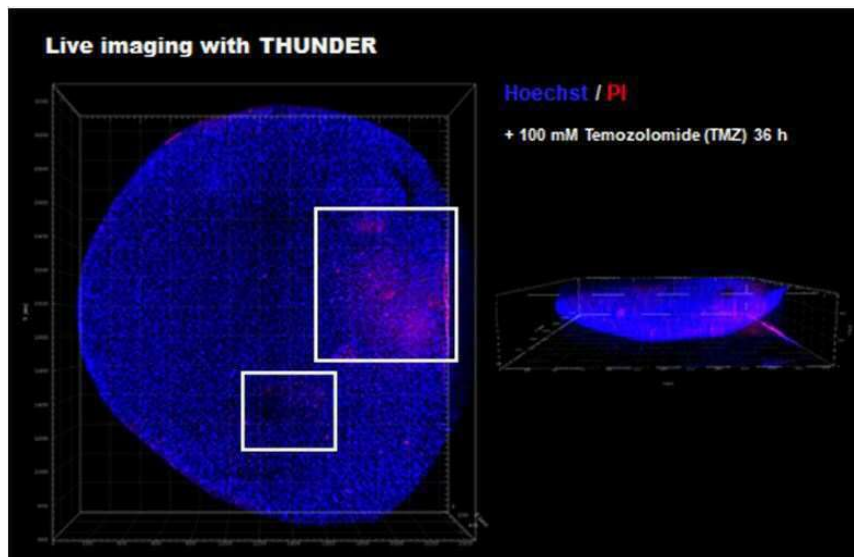
Glioblastoma with Cerebral Organoids



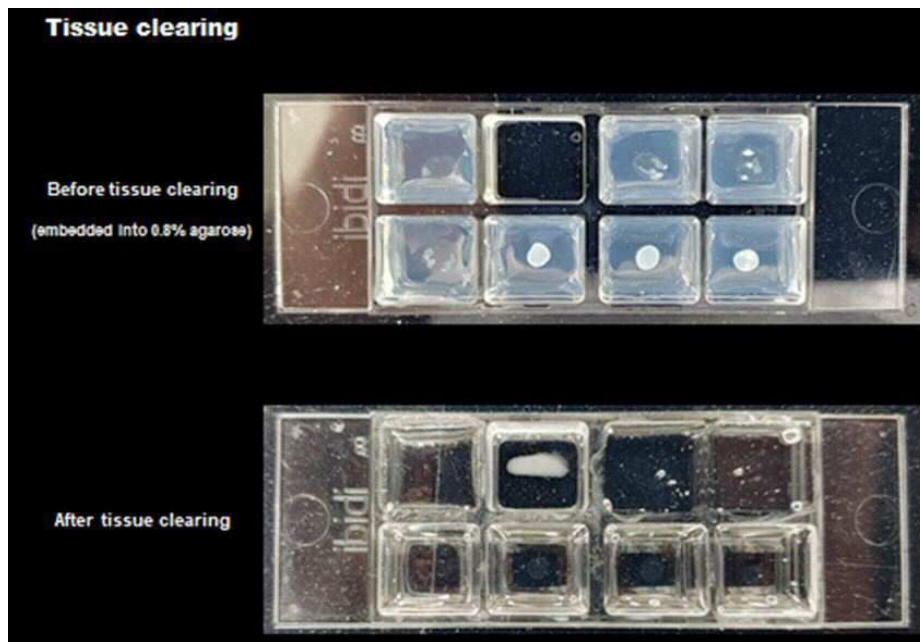
도면3



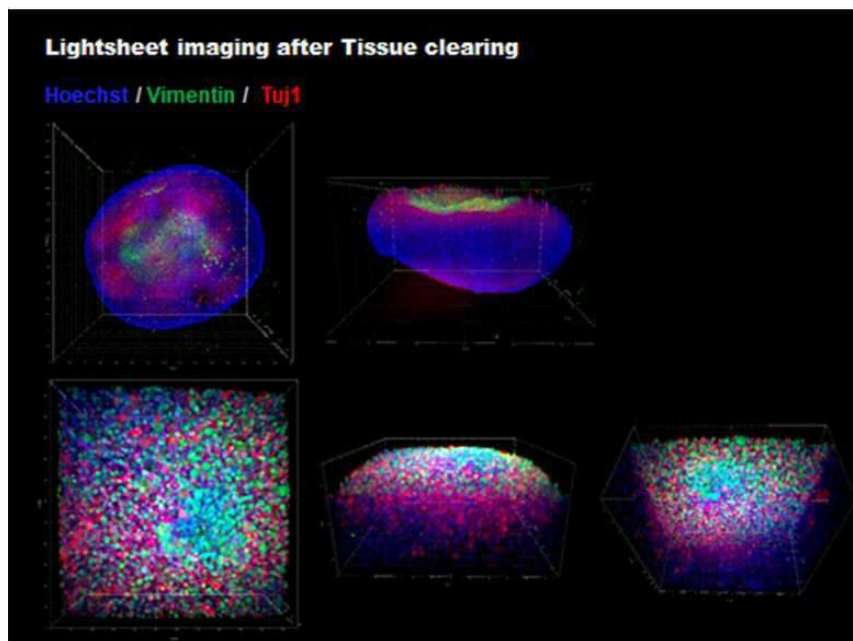
도면4



도면5



도면6



도면7

