

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 33/497 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0058664

(43) 공개일자 2006년05월30일

(21) 출원번호 10-2005-7011920

(22) 출원일자 2005년06월23일

번역문 제출일자 2005년06월23일

(86) 국제출원번호 PCT/DK2003/000935

(87) 국제공개번호 WO 2004/056265

국제출원일자 2003년12월23일

국제공개일자 2004년07월08일

(30) 우선권주장

60/439,450

2003년01월13일

미국(US)

PA 2002 02001

2002년12월23일

덴마크(DK)

(71) 출원인

유니센스 에이/에스

덴마크 디케이-8000 아루스 씨 구스타프 비즈 베이 10 포르스커파르켄

유니센스 퍼틸리테크 에이피에스

덴마크 디케이-8000 아루스 씨 구스타프 비즈 베이 10 포르스커파르켄

(72) 발명자

오토센 라르 디틀레브 모르크

덴마크 디케이-8200 아루스 엔 쿠누드 라스무센 베이 8

람싱 닐 비.

덴마크 디케이-8240 리스코프 엘르베르그베이 23

담가르드 라르 알.

덴마크 디케이-8000 아루스 씨 1 스크트 파울 키르케플라즈 15

군더센 얀 케이.

덴마크 디케이-8260 바이비 제이 소에스크라엔텐 29

(74) 대리인

박장원

심사청구 : 없음

(54) 실질적인 구형 대사 입자의 개별 대사율의 비침해적 측정방법 및 기구

요약

본 발명은 배아와 같은 실질적인 구형 대사 입자의 대사율을 측정하는 비침해적, 비교란적 방법 및 기구에 관한 것이며, 배아 수준에서의 산소 분압을 조절하는 방법 및 기구에 관한 것이다. 또한, 실질적인 구형 대사 입자에 대사산물의 공급을 조절하는 방법 뿐만 아니라 예정된 특질의 실질적인 구형 대사 입자를 선별하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 기구의 격실 내부의 실질적인 구형 대사 입자와 격실 외부환경 사이에 대사산물의 확산 구배를 형성할 수 있는 기구 내에서 수행된다. 상기 대사율은 대사산물 확산 구배에 대한 정보를 기초로 하여 결정된다.

대표도

도 1

색인어

확산, 대사 입자, 배아, 대사율

명세서

기술분야

본 발명은 실질적인 구형 대사 입자의 개별 대사율의 비침해적, 비교란적 측정 방법 및 기구, 및 입자 수준의 대사 농도의 조절을 위한 방법 및 기구에 관한 것이다.

배경기술

IVF (In Vitro Fertilization) 및 그 관련 기술들과 같은 배아 이식(ET) 기술을 사용하는 것은 선택된 배아가 재이식되기 전의 기간 동안 발달중인 배아를 시험관내 배양하는 것과 관련이 있다. 이상적인 성장조건에서도, 재이식을 위한 가장 생존이 가능한 배아를 선택하는 도구로서의 선별기준이 필요하다. 배아의 생존성은 배아의 이식 적합성을 결정하는데 있어 중요한 변수이다. 현재는, 이하의 조작에서 배아의 생존가능함을 평가하는데 사용되는 실제단계에서 응용될 객관적인 수단이 없다. 실제에 있어, 배아 평가는 형태학적 기준에 기초한 다소 주관적인 등급부여로 제한된다.

배아의 호흡률은 객관적인 생존성에 대한 지표가 될 좋은 후보로 증명되었다. 소, 쥐, 인간 배아의 호흡률(산소 소비를 나타냄)이 배아 생존의 유용한 지표가 됨은 이미 증명되었다. [Shiko 외. 2001. Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy. Anal. Chem 73:3751-3758 또는 Trimarchi 외. 2000. Oxidative phosphorylation dependent and independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. Biology of reproduction 62: 1866-1874 또는 Overstrom EW 외. 1992. Viability and oxidative metabolism of the bovine blastocyst. Theriogenology 37(1): 269 또는 Magnusson C 외. 1986. Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. Human Reproduction 1: 183-184 참조]. 이러한 연구에서 특정(높은) 호흡률은 진행된 시험관 발달(증가된 포배 빈도를 나타냄)과 같은 진행된 발달 상태와 상관되어 있다는 것을 입증하였다.

배아 호흡률을 결정하는 많은 방법이 알려졌다. Mills 및 Brinster [Mills and Brinster 1967. Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. Exp. Cell. Res., 47: 337-344 참조]는 쥐 배아 회분에 대한 Cartesian diver 기술을 사용하는 방법을 설명하였다. 이는 배아의 성장배지에 직접 접촉하여 산소 기체 기포의 부피변화를 측정하는 것이다.

Magnusson 외. 1986 [Oxygen consumption by human oocytes and blastocytes grown in vitro. Human Reproduction 1, 183-184] 및 later Houghton 외. 1996 [Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. Molecular reproduction and development 44:476-485]는 미세 분광광도분석 기술을 사용하여 개별 배아의 산소 소비량을 측정하는 방법을 설명하였다. 여기서 배아는 작은 밀폐실에 놓이고, 산소 소비량은 산소 분압 감소로 측정되며, 광학 흡광도가 산소의 존재에 민감한 물질의 흡광도 변화로 감지된다. 밀폐실 내외에서 배아에 대한 과도한 조작 때문에, 이런 측정법은 시간 낭비가 될 뿐만 아니라 배아를 교란하게된다.

또 다른 기술은 배아가 얇은 모세관에 고정되고, 구형 확산이라는 가정하에 진동 산소 미세전극을 매우 정밀하게 위치시켜 산소 농도 구배를 측정한다 [Shiko 외., 2001. Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy. Anal. Chem 73: 3751-3758, 또는 Trimarchi JR, 외., 2000. Oxidative phosphorylation dependent and independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. Biology of reproduction 62: 1866-1874 참조]. 이 기술은 조작하기가 어려워 배아에 심각한 교란을 야기하는 비교적 복잡한 실험 디자인이 특징이다. 더욱이, 측정을 시행하는데 걸리는 시간 및 실험을 위한 가정은 준수되기 어렵다.

일반적으로, 개별 배아 호흡을 측정하기 위한 상기한 연구 및 관련 연구는 복잡함, 배아의 교란, 시간 소비 등의 문제를 안고 있고, 따라서, 이러한 방법은 시험관 배양시 배아의 개별 호흡률을 감시하는데 일상적으로 적용되기 힘들다. 그러므로 배아 생존성을 측정하기 위한 개별 배아의 호흡률을 측정하는 빠르고, 간단하고, 비교란적인 방법 및 기구에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

이러한 필요성은 배아의 시험관 배양과 관련한 배아 이식 기술의 시술자 및 연구자에 의해 널리 표현되었다. Overstrom 1996.[Overstrom EW 1996, In vitro assessment of embryo viability. Theriogenology 45:3-16 참조]은 배아의 생존성의 표현인 개별 배아의 호흡율을 측정하기 위한 단순하고 객관적인 방법에 대한 수요를 수집하여 논문으로 발표하였다. ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection), 클로닝 및 냉동 주기를 포함한 시험관 배아 기술이 더욱 복잡해져감에 따라, 이러한 수요도 더욱 소리높아질 것으로 기대된다. 인간 불임 치료의 분야에 있어서 다중 배아 이식의 결과로 원치않는 다중 임신을 피하기 위해 단일 배아 이식에 초점을 맞출 필요가 있었다. 그러므로 단일 배아 이식은 최상의 배아를 선택하여 임신 성공확률을 높이기 위해서 면밀한 생존성 평가가 요구된다. 이에 따라 일상적인 수준에서 적용 가능한 단순하고 객관적인 생존성 지표에 대한 수요가 다시 강조된다.

이 새로운 방법은 아래의 Overstrom 1996 [In vitro assessment of embryo viability. Theriogenology 45:3-16 1996 참조]이 윤곽을 잡은 핵심요소를 포함하여야 한다.

- 동시에 다중 개별 배아를 객관적으로 측정할 수 있는 능력.
- 개별 배아/난모세포를 측정할 수 있는 감도와 분해능.
- 신속한 평가(~30분 이하)
- 생존성 시험은 비교란적이고, 이상적으로 비침해적일 것.
- 기술적으로 단순하고, 사용자 친화적일 것.
- 비용이 적절할 것.

일상적인 수준에서 적용 가능한 호흡 측정을 위한 방법 및 기구에 대한 상기의 필요성 뿐만 아니라, 배아의 시험관 배양은 발달 배아가 경험하는 산소 분압을 충분히 조절하지 못하는 문제를 안고 있다. 배아의 시험관 배양은 조절된 환경(온도, 상대습도 및 기체조성)을 가진 배양기에서 수행된다. 대기는 21%의 산소(분압 210 hPa)를 함유하나, 생체(수란관 및 자궁) 내에서 산소 압력은 약 5-10%의 산소포화(50-100 hPa)로 여겨진다. 그러므로 일반적으로 배아 발생은 공기에서 보다 5-10%의 환경이 더 낮다고하는 것은 놀랄 일이 아니다. Lim 외. 및 Thompson 외. [Lim 외. 1999 Development of in vitro bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. Human reproduction 7(4):558-562 또는 Thompson JGE 외. 1990 Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. J. Reprod. Fert. 89, 573-578 참조] 및 이전의 다른 연구들은 포유류 배아 발달에 있어 감소된 산소분압의 긍정적 효과를 입증하였다. 따라서 어떤 경우에 배아는 산소가 저감된 환경(예를 들면 5% 포화)에서 배양된다. 배지 상의 환경만을 직접 조절함으로써 배아의 산소 노출을 조절하는 것으로는 불충분하다. 시험관 배양의 초기에 배지는 전형적으로 산소가 포화된 상태(21%)이고, 시험관 성장계에 따라 다른 배지와 이를 덮고 있는 기체 환경 사이의 평형시간은 12-24시간이 될 수 있다. 시험관 배양의 중요한 시기동안 배아는 현재에는 최적(5-10%)이라고 여겨지는 분압을 크게 초과하는 산소분압을 경험하게 된다. 배아의 호흡의 결과로 배지로부터 배아까지의 안정상태의 산소 분압 구배에 기인하여 배아 표면의 마지막 정상 상태 분압은 (예를 들어 5%)상부 환경보다 더 낮다.

그러므로 배아의 시험관 배양은 발달 배아에서 경험했던 산소분압을 조절하는 단순하고 신속한(< 1 h) 방법에 대한 필요성은 존재한다.

그러한 응용 및 본 응용에서 언급한 모든 환자 및 비환자 자료는 전부 여기에 참고자료로서 결합되어 있다

발명의 요약

본 발명은 실질적인 구형 대사 물질의 대사율을 측정하는 쉽고 신속한 방법에 적합한 기구에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 실질적인 구형 대사 물질의 개별 대사율을 측정하는 비침해적인 기구에 관한 것이다. 이러한 기구는 아래와 같이 구성된다.

a) 적어도 한 격실, 상기 격실은 확산 장벽에 의해 특정되고, 실질적인 구형 대사 입자를 가진 배지를 함유할 수 있고, 상기 확산장벽은 확산에 의해 실질적인 구형 대사 물질로부터 및/또는 실질적인 구형 대사 입자로 대사산물을 전달할수 있는 것이다. 여기서 대사산물 확산 구배는 실질적인 구형 대사 입자와 배지를 통해서 형성되는 것이다.

b) 적어도 하나의 격실 내부의 대사산물의 농도를 측정할 수 있는 검출기

상기 기구는 실질적인 구형 대사 입자의 대사율 뿐만 아니라, 입자의 감시, 입자의 특정 상태를 선택하는 데 적합하다. 그러므로, 본 발명은 실질적인 구형 대사 입자의 대사율을 결정하는 비침해적인 방법에 관한 것으로서, 아래와 같이 구성된다.

- a) 상기와 같이 정의된 적어도 하나의 기구를 제공하고,
- b) 격실의 배지 내의 실질적인 구형 대사 입자를 배열하여,
- c) 대사산물 농도 수치를 얻어 격실 내의 대사산물 농도 측정을 하는 것, 및
- d) 상기 실질적인 구형 대사 입자의 대사율을 상기 대사산물 농도 수치와 상관짓는 것.

그리고, 본 발명은 또한 배양 중에 실질적인 구형 대사 입자에 대사산물을 공급하는 것을 조절하는 방법으로서, 아래와 같이 구성된다.

- a) 적어도 하나의 배지가 있는 격실으로 구성된 기구를 제공하여,
- b) 격실의 배지 내에서 실질적인 구형 대사 입자를 배양하고, 선택적으로
- c) 대사산물 농도 수치를 얻어 격실 내의 대사산물 농도 측정을 하고, 선택적으로
- d) 상기 실질적인 구형 대사 입자의 대사율을 상기 대사산물 농도 수치와 상관짓는 것, 및 선택적으로
- e) 상기 실질적인 구형 대사 입자의 대사율, 및/또는 대사 농도 수치에 의존하는 대사산물 공급을 조절하는 것.

생존 배아를 선택하는 방법과 관한 발명의 다른 태양은,

- a) 적어도 한번 이상 배양되는 동안 배아의 대사산물을 결정하는 것, 및
- b) 최적의 대사율을 갖는 배아를 선택하는 방법으로 이루어진다.

본 발명은 외부와 통하는 열린 계 내의 입자의 대사율을 결정하는데 특히 적합하다. 그러나, 본 발명의 상기한 기구는 닫힌 계에서 대사율을 측정하는데에도 사용될 수 있다.

따라서, 대사 입자의 대사율을 결정하는 비침해적 방법에 관한 본 발명의 또 다른 태양은 아래와 같이 구성된다.

- a) 상기와 같이 정의된 적어도 하나의 기구를 제공하고,
- b) 격실의 배지 내에서 대사 입자를 배양하여,
- c) 배양기간 중 적어도 한 부분 동안 배지에 대사산물 공급을 감소시키는 것,
- d) 대사산물 공급이 감소한 뒤 대사산물 농도 수치를 얻는 격실내 대사산물 농도측정을 하는 것, 및
- e) 상기 실질적인 구형 대사 입자의 대사율을 상기 대사산물 농도 수치와 상관짓는 것.

또한, 본 발명은 최적화된 배양 기구에 관한 것이다. 상기 기구는 적어도 하나의 격실, 상기 격실은 상기 격실은 확산 장벽에 의해 특정되고, 실질적인 구형 대사 입자를 가진 배지를 함유할 수 있고, 상기 확산 장벽은 확산에 의해 실질적인 구형 대사 물질로부터 및/또는 실질적인 구형 대사 입자로 대사산물을 전달할 수 있는 것이다. 여기서 대사산물 확산 구배는 실질적인 구형 대사 입자 및 배지를 통해서 형성되는 것이다.

여기에 정의된 입자의 배양 방법에 관한 본 발명의 다른 태양은

- a) 적어도 하나의 배지가 있는 격실로 구성된 기구를 제공하여,
- b) 격실의 배지 내에서 실질적인 구형 대사 입자를 배양하고, 선택적으로
- c) 상기 실질적인 구형 대사 입자로 부터 및/또는 실질적인 구형 대사 입자로의 대사산물의 공급을 조절하는 것이다.

용어 정의

전류측정방식 산소 센서(amperometric oxygen sensor): 내부 기준에 대해 분극된 금 음극을 갖는 클락형 전기화학 센서 (Clarck type electrochemical sensor)로서, 음극 표면에서는 산소가 감소한다. 전류계는 감소된 전류 결과치를 신호로 변환시킨다.

격실의 저부부: 본 발명과 관련하여 "격실의 저부부"라는 용어는 구형의 대사 입자에 비해 임의의 대사산물 투과성 개구로부터 보다 더 멀리 떨어져 있는 격실의 부분을 의미한다. "저부부"라 함은, 실질적인 구형 대사 입자 아래의 수직 위치를 나타내야만 하는 것은 아니고 개구에 대향되는 격실의 측면을 나타내기도 한다.

벌크 배지(bulk medium): 격실 외측의 주위에 있거나, 혹은 입자의 대사가 벌크 배지의 대사산물 농도에 영향을 미치지 않도록 하는 정도의 일정 거리에서 대사 입자로부터 떨어져 있는 배지.

확산(diffusion): 열 교반에 의해 야기된 랜덤 분자 운동의 결과로서 액체, 기체, 또는 고체의 입자들이 혼합되는 과정으로서, 그 결과 용해된 물질의 고농도 영역으로부터 저농도 영역으로의 순이동(net transport)이 이루어진다.

확산 장벽(diffusion barrier): 본 발명과 관련하여 "확산 장벽"이라는 용어는 대사산물로부터 대사 입자로의 확산 유동을 제한하는 비투과성 물질과, 대사 입자에서 취해진 대사산물이 분자 확산에 의해 통과할 수 있는 투과성 물질을 모두 의미한다. 경우에 따라서는, 투과성 및 비투과성 물질을 수용하는 공간 및 특별한 기하학적 형상을 지칭하기도 한다. 양호한 실시예에서, 확산 장벽은 비투과성 벽에 의해 구획된 개구를 채우는 하나 이상의 배지로 구성되는데, 실리콘 또는 기타 다른 폴리머(전술 내용 참조)와 같은 기타 다른 투과성 물질도 포함할 수 있다. 대사산물에 의해서 벌크 배지로부터 대사 입자까지 취해지는 확산 경로가 도 2의 삽입체 혹은 도 8의 뚜껑과 같은 축소된 단면 및/또는 축소된 투과성을 갖는 제한 영역을 지나게 되면, 면적 적분 흐름(area integrated flow)은 이 영역에 의해 특히 제한되게 된다. 따라서 그 영역은 가장 크고 가장 예리한 대사산물 농도 구배를 포함하게 되는데, 그에 따라 장치의 그 부분을 "확산 장벽"이라 부르는 경우가 종종 있다.

확산 격실: 외부 환경을 향하여 구획된 개구를 구비하며 내부 치수를 가지고 경계가 정해진 공간 또는 격실. 확산 격실 내측의 액상 물질은 기본적으로는 액체와 격실 벽 사이의 마찰력으로 인해 정체되어 있다. 본 발명의 장치 및 방법에 있어서는 상기 확산 격실을 "격실"이라고 칭하기도 한다.

비투과성 물질: 본 발명과 관련하여 "비투과성 물질" 또는 "실질적으로 비투과성인 물질"라는 용어는 당해 대사산물에 의한 투과성이 물에 비해서 현저하게 감소된 물질, 바람직하기로는 물과 대비한 당해 대사산물에 의한 투과성이 1% 미만까지 감소되고, 보다 바람직하기로는 0.2% 또는 0.05% 미만까지 감소된 물질을 의미하는 것으로, 이에 따라 대사 대상까지 이 물질을 통과한 면적 적분 흐름(area integrated flux)은 투과성 물질(일례로, 개구, 투과성 막 및/또는 확산 장벽)를 통과하는 플럭스(flux)보다 훨씬 더 적다. 비투과성 또는 실질적으로 비투과성인 물질을 통과하는 면적 적분 플럭스(area integrated flux)은, 대사 입자로의 총 면적 적분 플럭스의 10% 미만, 바람직하기로는 1% 미만, 보다 바람직하기로는 0.01% 미만이 되어야 한다.

발광(luminescence): 광 생성을 의미함. 본 발명과 관련하여 "발광"은 발광체에 의해 광이 흡수되고 후속해서 긴 파장의 광을 방출한 후에 기저 상태로 되돌아감에 따라 발생된다. 이러한 과정을 감쇠(decay)의 형태 및 지속 시간의 여하에 따라 형광(fluorescence) 또는 인광(phosphorescence)이라고 칭하기도 한다.

배지: 유체 성장 물질, 바람직하기로는 액체 성장 물질과 같이 배아용 액체 성장 물질을 의미한다.

막 유입 질량 분광(MMIS: membrane inlet mass spectrometry): 질량 분광계의 인입부에 연결되어 있으며 기체 투과성 막이 설치된 튜브에 기초하여 산소 및 기타 다른 용해 기체를 측정하는 기술. 튜브 내의 진공(질량 분광계에 의해 가해짐)으로 인해, 기체는 기체 투과성 막을 통하여 질량 분광계 내로 들어간다.

대사산물(metabolite): 본 발명과 관련한 "대사산물"이라는 용어는 대사 입자를 받아들이거나 혹은 방출한 화합물을 의미하는 것이다. 대사산물의 예로는 산소, 이산화탄소, 아미노산, 글루코스, Ca^{++} 이온 및 H_3O^+ 와 같은 이온이 있다.

대사율(metabolic rate): 대사 입자에 의해서 당해 대사산물이 소비되거나 방출되는 비율. 대사율은 당해 대사산물과 유기체의 활성도 모두에 의존한다.

대사(metabolizing): 본 발명과 관련하여 "대사"라는 용어는 대사산물을 받아들이거나 방출하는 과정을 칭하는 것이다. 대사된 바람직한 대사산물은 호흡에 의해 흡수되거나 방출된 산소이다.

대사산물 투과성 개구: 본 발명과 관련하여 격실 내의 "대사산물 투과성 개구"라는 말은 덮이지 않은 개구(즉, 배지만 수용하고 있는 것)와 덮여 있는 개구 모두를 나타내는 데 사용된다. 덮여 있는 개구는 막(일례로, 실리콘 층)과 같은 투과성 물질로 덮여서 격실의 다른 벽들보다 더 투과성이 있는 확산 장벽을 구성한다.

대사 입자: 본 발명과 관련하여 "대사 입자"라는 용어는 일정 시간 동안 대사산물을 받아들이거나 방출하는 입자를 의미한다. 바람직한 형태의 대사 입자는 호흡에 의해서 산소를 소비하는 호흡 입자이다. 대사 입자는 바람직하기로는 단위 세포 또는 세포군인데, 산소를 소비하는 합성 입자도 대사 입자라 할 수 있다.

마이크로 분광 광도법(microspectrophotometric technique): 산소 분압의 감소 또는 증가로 인한 산화 헤모글로빈(oxyhemoglobin)의 해리(dissociation)에 영향을 미치는 435nm에서의 흡수성의 증가 또는 감소에 기초하여 산소를 측정하는 기술. 이와 다른 흡수 특성을 갖는 기타 다른 산소 결합 분자를 사용할 수도 있다.

비침해적 방법(noninvasive method): 어떠한 파괴적인 교란 요소가 없이, 혹은 표피나 몸체를 관통하는 기기 혹은 장치를 삽입하지 않아도, 대상 몸체와 관련된 파라미터를 측정할 수 있는 방법.

광학적 산소 검출: 발광체의 동적 발광 광안정제(dynamic luminescence quencher)로서 작용하는 산소의 능력에 기초한 측정 원리. 발광체는 정해진 과정에서 여기되고, 발광은 발광 지시자(luminescent indicator)에 의해 산소 농도의 함수로서 방출된다. 이러한 과정을 "형광" 또는 "인광"이라고도 한다. 산소가 존재하면, 발광의 강도 및 감쇠 시간은 광안정 과정(quenching process)으로 인해 예상가능한 방식으로 감소한다. 2차원의 광학적 산소 검출은 발광 수명 영상 기술(luminescence lifetime imaging)에 기초할 수 있는데, 이는 경우에 따라서는 발광 강도 영상 기술(luminescence intensity imaging)에 기초하는 것에 비해서 유리하다.

산소 분압: 산소가 단일 성분으로서 발휘하는 압력. 총 기체 압력은 개별 기체의 압력의 합이다. 정상 기압 조건하에서, 총 실제 기체 압력은 1atm 또는 1000hPa에 근접한다. 대기압 하의 산소 분압은 약 21% 또는 210 hPa이다. 산소 농도 C는 산소 분압 P에 산소 용해도 S를 곱한 값과 같다($C=PS$). 여기서, S는 온도, 염도, 및 총 기체 압력의 함수이다.

호흡률(respiration rate): 배아를 포함한 대부분의 생명체들은 에너지 대사시에 산소를 소비한다. 호흡하는 유기체의 산소 소비율을 호흡률이라고 명명하기도 한다. 인간 배아의 호흡률은 이전에는 0.34 내지 0.53 $nl O_2$ 배아 $^{-1} h^{-1}$ 의 범위에 있는 것으로 측정되었으나, 배아 호흡률은 난모 세포(oocyte)에서부터 상실배(morula)를 지나 배반포(blastocyst) 단계까지 발전하는 동안에 상당히 변동될 수 있다[마그누손 시(Magnusson C) 등의 공저, 1986년 출판, 시험관 내에서 성장한 인간 난모 세포 및 배반포에 의한 산소 소비(Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro), 인간 호흡(Human Respiration) 1, 183-184.참조].

응답 시간: 측정을 개시한 때로부터 측정에 적합한 응답 또는 신호가 얻어지기까지의 시간으로서, 측정은 연속한 것으로 본다.

정체액(stagnant liquid): 어떠한 유동, 교란, 또는 이동이 없는 액체. 용해된 물질의 전달은 주로 확산에 의해 발생한다.

정상 상태(steady state): 용해된 물질의 기체 분압 또는 농도 구배가 안정을 이루고 일정 시간에 걸쳐 어떠한 분압 변화나 농도 변화도 발생하지 않는, 이른바 소비와 전달이 평형을 이루는 상태.

실질적인 구형 대사 입자(substantially spherical metabolizing particle): 본 발명과 관련하여 "실질적인 구형 대사 입자"라는 용어는 단일의 대사 입자 또는 대사 입자군을 의미하는 것으로, 여기서 "군"이라 함은 다세포 배아(multi-cell embryo)를 일례로 들 수 있는 세포군(a group of cells)과 같이 실질적 구형 또는 타원형 또는 박스형 대상물(object)을 형성하도록 배열된 것을 의미한다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 실질적인 구형 대사 입자의 대사율을 확립하는 것과 관련된 것이다. 대사율은 대사 입자에 외란을 가하지 않도록 하기 위해 비침해적 방식으로 확립하는 것이 바람직하다. 본 발명은, 대사 입자의 환경이 대사 입자로의 혹은 그로부터의 대사산물의 확산만 허용될 수 있도록 구성된 경우라면, 그 대사 입자의 환경인 작은 공간 내에서 소정의 대사산물의 농도를 측정하게 되면 대사율을 신속하고 비침입 방식으로 측정할 수 있다는 발견에 기초하여 이루어진 것이다. 이와 같은 구성에 의하면, 사전에 정해진 대사산물의 확산 구배는 그 대사 입자의 환경 내에서 진전하게 되므로, 그 환경 외부에 있는 위치로서 농도가 알려져 있는 확산 구배 위치인 한 위치에서만 미리 정해진 대사산물의 농도를 측정해도, 그 입자 위치에서의 대사산물 농도를 계산할 수 있게 되고, 그에 따라 대사 입자의 대사율을 결정할 수 있게 된다.

본 발명은 실질적인 구형 대사 입자에 관한 것이다. 본 발명에서 관심 대상이 되는 대사 입자는 단일의 원핵(prokaryotic) 또는 진핵(eukaryotic) 세포나 그런 세포의 군을 포함하지만, 대사 입자는 산소를 소비하는 합성 입자일 수도 있다. 바람직한 형태의 입자는, 배아; 암세포, 줄기 세포, 배아 줄기 세포와 같은 세포군; 적절한 크기와 대사율을 가지는 생존 중에 있는 예쁜 꼬마 선충(*Caenorhabditis elegans*), 디티오스텔리움 디스코이둠(*Dictyostelium discoideum*), 노랑 초파리(*Drosophila melanogaster*), 제노푸스 래비스(*Xenopus laevis*), 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 다니오 레리(*Danio rerio*), 클라미도모나스 레인하르트티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 검은 반점 돌기 군소(*Aplysia californica*)와 같은 작은 다세포 유기체(일례로, 보다 큰 유기체 중 일부 유기체의 난, 배아, 또는 조직 샘플)를 포함한다. 가장 바람직한 입자는 인간 배아, 소속(bovine) 동물 배아, 또는 쥐과(murine) 동물 배아와 같은 포유 동물의 배아를 포함한다.

위와 같은 입자에 의해 흡수되거나 혹은 방출된 대사산물은 실시예 4에서 설명하는 바와 같은 분자 확산에 의해 새로 보충되거나 이동된다. 본 발명의 장치는 실질적인 구형 대사 입자가 놓여지는 격실을 구비하는 장치를 포함한다. 격실은 대사산물의 대사 입자 쪽으로나 혹은 그 입자로부터의 확산 흐름을 제한하거나 감소시키기 위해 대사 입자 둘레에 배치된 투과성 및 비투과성 물질로 구성된다. 대사산물의 새로운 보충 및 제거가 적당한 대사율을 갖는 구형 확산 효과에 의해 방해받지 않는 환경 내에 실질적인 구형 대사 입자가 배치되는 경우, 이들 대사산물의 농도는 호흡 입자에 근접한 위치에 있는 아주 작은 체적에 대해서 중요치 않을 정도의 영향만 미칠 뿐이다. 그러나 대사 입자가 대사산물의 확산 재공급 또는 제거를 제한하게 되는 격실 내에 배치되면, 격실 내측의 이러한 대사산물의 농도에 있어서의 측정 가능한 정도의 변화가 검출된다. 이와 같은 것은, 본 발명의 기술 사상을 포함하는 장치에 따르면, 대사산물이 비투과성(또는 실질적 비투과성) 표면에 의해 분자 확산을 통해 통과하게 되는 체적을 제한함으로써 달성된다. 이와 같은 표면(또는 벽)은 대사 입자를 완전히 둘러싸지는 않고 투과성 개구를 남겨 놓는데, 상기 투과성 개구를 통해서 대사산물이 확산에 의해 통과하게 된다. 투과성 개구(다수의 투과성 개구)는 배지 또는 기타의 투과성 물질로 채워진다. 투과성 물질과 비투과성 물질을 대사 입자 둘레에 공간적으로 배치하는 것은 확산 장벽을 구성한다. 확산 장벽은 3가지의 목적을 제공한다. 즉, (1) 검출기로 벌크 농도의 국부 편차를 측정할 수 있도록 대사산물의 흐름을 제한하는 목적. (2) 상기 편차의 크기에 기초하여 대사 입자의 대사율을 결정할 수 있게 하는 목적. (3) 대사산물이 난류 유동에 의해 대사 입자로 전달되는 것을 제한하거나 제거하는 목적. 확산 장벽의 후자의 목적은, 액체가 표면들 사이의 난류 유동에 의해 혼합될 수 없게 할 정도로 서로 근접하게 위치된 표면들 사이에 배지를 제한함으로써 달성된다.

본 발명의 장치와 확산 장벽의 가능한 설계예들의 여러 가지 많은 실시예가 실시예 5에 제시되어 있다. 원통형 함몰부를 구비하는 격실로부터 발생하는 실험적 데이터를 실시예 1 및 실시예 6에 나타내었고, 그리고 함몰부를 구비한 비투과성 표면에 배아가 놓여 있는 경우의 실험적 데이터는 실시예 7에, 놓여 있지 않는 경우의 실험적 데이터는 실시예 1에 나타내었다.

다음과 같은 논문에 근거한 확산 이론을 실시예 4에 나타내었다. [크랭크 제이.(Crank J.)저, 1997년, 확산의 수학(The Mathematics of Diffusion), 클레어렌던 프레스(Clarendon Press) 출판]

실질적인 구형 대사 입자에 의한 대사에 의해 야기된 격실 내의 구배의 성질을 완전히 기술할 수 없거나 혹은 격실의 내부 치수를 정확하게 한정하지 못하는 경우, 본 발명의 장치는 대사산물 흡수 및/또는 방출이 알려져 있는 인공의 실질적인 구형 대사 입자를 이용하여 보정할 수 있다. 이와 같은 보정을 위한 인공의 실질적인 구형 대사 입자에는, 관련된 실질적인 구형 대사 입자의 직경을 갖는 작은 구형 입자, 예를 들면 녹말과 같은 안정적 보조 화합물 내에 함침되거나 혹은 유리 비이드와 같은 불활성 구체 상에 피복되어 있는, 비타민 C, 비타민 E, 비타민 A, 카로티노이드, 셀레늄, 염화티타늄, 디티오 나이트(dithionite), 황화제일철(ferrous sulfide)과 같은 산소 소비 물질(산화 방지제)로 제조된 50 내지 200 μm 크기의 인공 배아가 있을 수 있다.

격실 내의 대사산물의 농도 구배가 정상 상태가 아니고 계속해서 진전하는 경우, 실질적인 구형 대사 입자가 격실 내에 배치된 바로 직후의 경우가 이에 해당될 수 있음. 대사율은 여전히 격실 내의 대사 농도 구배의 단위 시간 당 변화를 조사함으로써 결정될 수 있다. 바꾸어 말해, 정상 상태 구배는 시간 경과에 따른 일련의 비정상 상태 구배로부터 수학적으로 정형화시킬 수 있다.

대사산물

본 발명에 따라 측정된 대사산물은 실질적인 구형 대사 입자에 의해 흡수되거나 혹은 그 대사 입자로부터 방출된 것과 관련된 임의의 대사산물일 수 있다. 대사산물의 여러 예들을 위에서 정의하여 설명하였다. 일 실시예에서, 대사산물은 아래에서 설명하는 바와 같은 여러 가지 방법으로 검출할 수 있는 산소와 같은 기체가거나, 혹은 마찬가지로 이하에서 설명하는 바와 같은 여러 가지 방법으로 검출할 수 있는 이산화탄소일 수 있다.

따라서, 양호한 실시예에서, 본 발명은 산소 및/또는 이산화탄소의 기체 분압을 측정하여 실질적인 구형 대사 입자의 호흡률을 결정하는 것과 관련된다.

격실

이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명은, 측정하려고 하는 대사산물의 확산 구배를 확립하는 것, 즉 대사율을 측정하기 위한 관련 시간 동안에는 적어도, 실질적인 구형 대사 입자 둘레의 물리적 조건이 확산 구배를 확립할 수 있게 하는 것에 그 기반을 두고 있다.

실질적인 구형 대사 입자는 미리 설정된 치수를 갖는 격실 내에 배치되거나 그리고/또는 배양된다. 바람직하기로는, 격실은 실질적인 구형 대사 입자를 위하여 관련된 대사산물을 포함하는 것이 좋다. 더욱이, 격실을 격실의 외부와 소통되게 하여 대사산물로 하여금 확산에 의해 격실 안으로 들어가서 배지 안으로 들어 갈 수 있게 하는 것이 바람직하다. 이에 의하면, 호흡률을 결정할 때에 실질적인 구형 대사 입자를 이동시키지 않아도 보다 장시간 동안 실질적인 구형 대사 입자를 배양하는 데에 격실을 사용할 수 있게 된다. 그러나 대사율을 결정할 때에 실질적인 구형 대사 입자를 격실 쪽으로 이동시키고 후속해서 격실로부터 제거하는 것 역시 본 발명의 범주 내에 속하는 것이다.

확산 구배를 확립하기 위한 조건을 확립시키기 위해, 격실은 확산 장벽으로 한정될 수 있으며 배지를 포함할 수도 있는데, 여기서 확산 장벽은 대사산물로 하여금 실질적 구형 대사 물질 입자 쪽으로 그리고/또는 그로부터 확산에 의해 전달되게 하고, 그에 의해 대사산물 확산 구배가 배지 전체에 걸쳐서 실질적인 구형 대사 입자로부터 확립될 수 있다.

격실은, 적어도 하나의 대사산물이 실질적인 구형 대사 입자 쪽으로 그리고/또는 그로부터 오로지 확산에 의해 전달될 수 있게 하는 실질적인 구형 대사 입자를 위한 국부 환경을 확립한다.

실질적인 구형 대사 입자를 둘러싸는 격실 내측의 배지는, 그 배지 내에 용해된 물질들의 전달이 오로지 확산에 의해서 발생될 수 있도록 하기 위해서는, 정체 상태로 유지되는 것이 바람직하다. 격실 밖의 벌크 배지는 정체 상태일 필요가 없다. 정체라는 용어는 앞에서 이미 정의된 바와 같다.

더욱이, 격실은, 내측의 배지가 정체 상태로 유지될 수 있고 게다가 사전에 정해진 대사산물이 격실 쪽으로 이동하는 것이 대사율을 결정하여야 할 실질적인 구형 대사 입자와 관련하여 제어될 수 있도록 설계되어야 한다.

정체

정체 배지의 중요성은 배아의 호흡률과 관련하여 설명할 수 있다: 배아가 격실의 정체 배지 내에 있을 때, 배아의 산소 소비 때문에, 배아 주위의 산소 분압은 격실 외부의 산소 분압에 비해 감소할 것이다. 정상 상태에서, 산소 공급량은 소비량과 같고, 배아 방향으로의 산소 분압 구배는 안정적이다. 확산 공간의 개구부 또는 배아로부터 거리를 두고, 배아 방향으로의 구배의 기울기는 배아의 산소 소비(호흡) 수치이다. 배아의 호흡률은 격실 내의 산소 분압 또는 그 위치의 농도에 의하여 측정된다. 상기 설명한 조건 하에서 호흡률을 결정하기 위해서는 한번의 측정으로 충분하다.

격실 설계 및 물질

격실은 몇가지 방법으로 설계될 수 있고, 이는 아래에서 논의된다.

아래에는 두개의 다른 격실의 원칙이 논의된다. 그러나, 확산 구배를 형성할 수 있는 모든 격실 형태가 본 발명의 범위안에 있다.

두개의 다른 원칙은:

격실은 공간을 둘러싼 벽체로 구성되어 있다.

격실은 적어도 하나의 대사산물의 조절된 확산이 가능한 점성 물질로 만들어지고 채워진다.

그러므로, 첫번째 원칙에 관하여 보면, 격실은 격실의 외부 경계를 구성하는 적어도 하나의 벽체로 정의되고, 실질적인 구형 대사 입자 뿐만 아니라 배지를 보유할 수 있다. 벽체는 측정되는 대사산물에 대하여 불투과성인 것이 좋다. 중합체 또는 공중합체가 실질적으로 불투과성 확산 장벽을 제공하는 물질을 구성하도록 선택되는 경우, 격실을 채운 배지에 관하여 저투과성인 특징을 가져야 한다. 벽체가 투과성이 있다면, 벽체 물질은 격실을 채운 배지에 관하여 저투과성인 특징을 가진다.

벽체와 같은 것들이 측정된 대사산물에 실질적으로 불투과성이라면, 벽체는 상기 실질적인 구형 대사 입자의 전달을 가능하게 하는 적어도 하나의 개구로 구성되어야 한다. 이러한 개구는 주위 환경에 완전히 개방되거나 부분적 또는 전부가 막으로 봉입될 수 있다. 여기서 상기 막은 격실 내부로부터 및/또는 격실 내부로 대사산물을 전달하게 할 수 있는 것이다.

대사 목적물을 둘러싼 확산 구면의 장벽 물질(불투과성 부분)은 일반적으로 그들의 경계를 통한 대사산물 또는 물질의 통과를 제한하는 능력을 보유해야만 한다. 따라서, 격실의 벽체는 그들의 경계를 통하여 대사산물이 통과하는 것을 제한하는 능력을 보유한 적합한 물질로 만들어져야 한다. 플라스틱, 합성물, 도료, 적층 플라스틱, 섬유, 금속, 유리, 세라믹, 아세탈수지, 아크릴 수지, 셀룰로오스 플라스틱, 불소 플라스틱, 아이노머, 팔릴렌스, 폴라미드, 폴리아미드 나노컴포사이트, 폴리카보네이트, 폴리에스테르, 폴리이미드, 폴리올레핀, 폴리페닐 설파이드, 폴리설폰, 스티렌 수지, 비닐 수지, 플라스틱 합금, 다용도 고분자, 에폭시 수지, 올레핀 열가소성 탄성중합체, 폴리에테르 블록 아미드, 폴리부타디엔 열가소성 탄성중합체, 스티렌 열가소성 탄성중합체, 비닐 열가소성 탄성중합체와 같은 중합체들 및 부타디엔 고무, 부틸 고무, 브롬부틸 고무, 염화부틸 고무, 폴리이소부틸렌 고무, 염화설폰 폴리에틸렌 고무, 에피클로로하이드린 고무, 에틸렌-프로필렌 고무, 불화탄성중합체, 천연고무, 네오프렌고무, 니트릴고무, 폴리설파이드 고무, 폴리우레탄고무, 실리콘고무, 스티렌-부타디엔고무와 같은 고무 물질들은 실질적으로 불투과성인 장벽 층으로 사용될 수 있는 물질의 예이다.

물질의 투과성은 장벽을 관통하는 물질 전달의 일반식의 비례상수이다.

$$Q = \Delta m_{\text{gas}} / \Delta t = P(A \Delta P / l)$$

여기서 P는 물질/장벽의 투과율, Q = 는 유속을 적분한 영역(예를 들어, 전달률)이다. A는 영역, l은 두께, ΔP는 장벽을 통한 분압차이고, P는 차원을 갖는다.

$$[P] = (\text{침투한 양} * \text{장벽 두께}) / (\text{영역} * \text{시간} * \text{압력구배})$$

상기 정의된 투과율이라는 용어는 기체에 가장 널리 사용된다. 여기서, 다른 용해된 대사산물로 가장 일반적으로 사용되는 용어는 확산율(실시예 4 참조)이다. 이 경우,

$$Q = JF = D \frac{\Delta C}{\lambda}$$

기체의 확산 전달은 P 는 확산 계수 D 및 용해도 S 의 곱 (환언하면, $P = S * D$)으로 다른 방정식에 의해서 기술된다. 여기서, 용해도는 농도와 분압의 비율로 정의된다(환언하면, $S = C/p$). 확산 계수의 일반적인 단위는 cm^2/s 이다.

투과율 및 확산 계수 양자는 온도에 영향을 받는다. 최초의 근사치로서 양자는 고전 아레니우스 관계를 따르면서 온도에 따라 개략적으로 증가한다.

정체 수성 배지는 37°C 에서 $6700 \text{ cm}^3 \text{ mm}/(\text{m}^2 \text{ day atm})$ 의 산소에 대한 투과율을 가진다.

대사산물 산소의 경우, 불투과성 물질은 많아야 $40 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 많아야 $35 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 많아야 $30 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 많아야 $25 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 많아야 $20 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 많아야 $15 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 많아야 $10 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 많아야 $5 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 많아야 $2 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 많아야 $1 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (23°C)의 투과율을 갖는 물질로 정의 된다.

프라스틱/중합체의 산소 투과율 예는:

스티렌-아크릴로니트릴 공중합체 SAN ($P = 15\text{-}40 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (24°C))

아크릴로니트릴-부타디엔-스티렌 Copolymeres ABS ($P = 39.3 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (25°C))

폴리비닐 클로라이드

폴리부타디엔 테레프탈레이트 PBT ($P = 15.5 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$)

폴리페닐렌 설파이드 PPS ($P = 11.8 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$)

폴리이미드 ($P = 10 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$),

폴리시클로헥실렌디메틸렌 에틸렌 테레프탈레이트 PETG ($P = 9.97 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ (22.8°C))

폴리비닐리딘 플루오라이드 PVDF ($P = 1.96 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$),

폴리에틸렌 테레프탈레이트 PET ($P = 2.4 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$),

폴리에틸렌 나프탈레이트 PEN ($P = 0.525 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$),

나일론/폴리아미드 ($P = 0.4\text{-}1.5 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$),

액체 크리스탈 중합체 LCP ($P = 0.037 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$ at (23°C))

에틸렌-비닐 알콜 공중합체 EVOH 장벽층(예를 들어, 카프란 옥시실드 OB, $P = 0.0021\text{-}24 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$)

아크릴로니트릴-메틸 아크릴레이트 공중합체 AMA ($P = 0.08\text{-}0.64 \text{ cm}^3 \text{ mm}/\text{m}^2 \text{ day atm}$)

격실의 개구는 대사산물 투과성 물질로 만들어진 막으로 봉입될 수 있다. 여기서, 막은 조절된 확산 장벽으로 구성된다. (실시예 5 도 8 도안 L 참고)

다른 실시 태양에서, 격실벽 전체가 대사산물 투과성 물질로 이루어 질 수가 있다. 벽체 물질이 되기 위한 유일한 조건은 격실을 채운 배지에 대하여 저투과율을 특징으로 하는 것이다. 격실 벽체는 조절된 확산 장벽으로 이루어 진다.

투과막 및 투과벽 양자는 대사 입자로부터 및/또는 대사 입자로 산소와 같은 대사산물의 조절된 중요한 전달을 가능하게 하는 막 또는 막성 구조 또는 다른 구조를 가질 수 있다. 조절된 확산 장벽을 허용하는 대사산물 산소 투과 물질의 경우, 투과율은 적어도 $50 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 적어도 $60 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 적어도 $750 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 적어도 $80 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$ (23°C), 적어도 $90 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$ (23°C)인 것이 좋다.

산소 투과 물질에 적합한 물질의 예:

폴리실론 (P = $90.5 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$ (23°C))

폴리프로필렌 PP (P = $59\text{-}102 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$ (23°C))

시클릭 올레핀 공중합체 COC (P = $71 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$)

폴리카르보네이트 (P = $90\text{-}120 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$)

폴리스티렌 PS (P = $117\text{-}157 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$),

폴리에틸렌 PE (P (ULDPE) = 280, P (LDPE) = $102\text{-}188$, P (HDPE) = $35\text{-}110$, P (LLDPE) = $98\text{-}274 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$)

에틸렌-아크릴산 공중합체 EAA (P = $178\text{-}550 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$)

포틸테트라플루오르에틸렌 PTFE Teflon (P = $223 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$ (25°C))

에틸렌-비닐 아세테트 공중합체 EVA (P = $177\text{-}210 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$)

투과성 중합체의 예:

실리콘 (P = $17280 \text{ cm}^3 \text{ mm/m}^2 \text{ day atm}$)

이러한 언급된 물질은 단지 예일 뿐이고, 상기한 호흡 입자 주위의 확산 장벽의 소망하는 조합을 얻기 위해서 적합한 투과율 및 특징들을 지닌 다른 물질도 선택할 수 있다. 중합체에 관한 다른 예들을 아래에서 투과율 계수와 함께 열거하였다: [Liesl K. Massey: Permeability properties of plastics and Elastomeres, a guide to packaging and barrier materials 2nd edition, P 57-507]. 또 다른 예로는:[Brandrup & Immergut, Polymer Handbook 4th edition]이 있다.

어떤 실시 모습에서는 격실은 기체가 소통할 수 있는 적어도 하나의 개구를 가진 기체 불투과성 물질로 만들어진다. 개구는 기체 투과막으로 봉입될 수 있다. 다른 어떤 특정한 실시 모습에서는 측벽 및 저부벽은 기체 불투과성 물질로 만들어져 있다. 적합한 성장 배지 내의 실질적인 구형 대사 입자로 구성된 격실은 개구를 통해 또는 대용량의 배지를 통해 직접적으로 알려진 기체조성의 대기, 조절된 온도 및 습도와 연결되어 있다. 격실 내부의 정체 배지를 통한 확산에 의해 정의된 확산 격실에서 산소 및 다른 용해된 물질은 대기 또는 대기과 평형을 이룬 대용량의 배지를 통해 직접적으로 실질적인 구형 대사 입자에 공급된다. 격실 밖의 산소 분압은 양자 모두 알려졌다. 대기의 조성은 알려졌고, 벌크 배지는 대기 조성과 평형을 이루게 될 것이다.

다른 실시 태양에서는 격실은 고점성 또는 고점도 및/또는 극성에 의해 포워된 배양 배지로 정의된다.

시판되는 배양 배지(예로써, Sigma, Medicult, In vitro Life, Nidacn)는 일반적으로 대략 같은 염도의 물과 같은 확산 계수를 가진다. 이러한 배양배지는 배지 내에서 부유하는 불투과성 입자 또는 목적물 또는 배지의 증가하는 점성에 의하여 변화될 수 있다.

배양 배지들은 다공성 및 확산 계수 D를 감소시키기 위해서 부유하는 불투과성 입자 또는 목적물에 의하여 변할 수 있다. 액체 및 불투과성 입자 혼합물 내에서 기체 또는 다른 대사산물이 확산될 경우, $D_{mixture} = D_{liquid} * \text{다공률}$ 이다.

배양 배지는 고점성 및 실질적으로 감소된 확산 계수를 가진 배지를 달성하기 위해서 증가하는 점성에 의해 변화될 수 있다. 이러한 배지는 텍스트란, 글리세롤, 당분, 카보하이드레이트, 단백질, 유기 중합체와 같은 비활성의 유기용질 또는 무기염을 필수적으로 첨가함으로써 생성된다.

전분, 아가로스 또는 다른 젤 시약과 같은 유기 고분자의 첨가에 의하여 발산 계수에 실질적인 영향을 미치지 않으면서 점성을 변화시키는 것이 가능하다. 이것은 큰 자유 액체 공간에서 난류 혼합을 줄이는 정도에 관한 것이다.

더욱이, 배양배지는 예를 들어, 파라핀 오일 또는 실리콘 오일 또는 다른 의료용 오일과 같은 덮개 오일로 포장될 수 있다. 여기서 오일은 배양 배지의 동체에 비해서 같거나 다른 확산 장벽으로 구성된다. 난류 및 확산성 흐름의 용해도와 전달 계수 양자는 오일과 물에서 다를 수 있다.

격실의 형태

격실은 원칙적으로 문제의 대사산물에 확산 구배를 형성할 수 있는 어떤 형태라도 가능하다. 그러나, 격실의 형태는 실질적인 구형 대사 입자를 조작, 특히 실질적인 구형 대사 입자를 삽입 및 제거하는데 있어서 용이하도록 하는 것이 선호된다. 본 문맥에서의 형태는 내부 형태를 나타내는 것이다. 외부 형태는 어떠한 실용적 형태도 가능하다.

따라서, 상기 격실의 내부 모양은 원주형, 다면체형, 원뿔형, 반구형 또는 이들의 조합의 군으로부터 선택할 수 있다. 대표적인 실시예에서 형태는 원주, 원뿔, 원주형 2개 또는 원주형과 원뿔형의 조합이다. 도면에서 예들을 도시하였다. 더 좋은 형태는 원주형이다.

격실의 치수

상기 격실은 상기한 확산 구배를 형성할 수 있는 치수로 만들어진다. 이러한 점에서, 실질적인 구형 대사 입자의 대사산물의 섭취 및/또는 방출에 관하여, 그 치수가 중요하다. 주어진 실질적인 구형 대사 입자의 대사산물의 섭취 및/또는 방출이 실질적인 구형 대사 입자의 크기에 의존하기 때문에, 실질적인 구형 대사 입자에 관하여 격실의 치수는 상대적이다.

이하에서, 치수는 실질적으로 원주형의 격실 및 포유류 배아, 예를 들어 종과 발달 단계에 따라 다른 30-400 μm 의 크기를 갖는 실질적인 구형 대사 입자에 관한 것이 논의된다. 다른 실질적인 구형 대사 입자에 있어서, 당업자는 적합한 치수를 계산해낼 수 있다.

전형적인 격실의 횡치수는 특히 250 μm 미만과 같이 2.5 mm 미만이고, 특히 1.5 mm 미만, 500 μm 미만이다.

격실의 종치수는 하나의 실시 상태에서 2 내지 25mm, 특히 3 내지 15 mm이다. 종치수는 일반적으로 확산 장벽을 구성하는 배지의 수직고이다. 일반화된 용어로서, 이는 대사 입자로 부터 벌크 배지에 이르는 확산 구배에 수직인 거리이다.

치수는 격실과 같은 것들의 치수이거나 실질적인 구형 대사 입자의 몇가지 다른 형태의 대사율을 측정하기 위한 같은 형태의 격실을 사용하는 것을 용이하게하는 것으로서 기준 격실내로 하나 이상의 삽입체를 삽입하여 제공하는 것 일 수 있다.

하나의 실시 상태에서, 격실은 적어도 하나의 격실 횡치수 조절을 위한 삽입체를 가진다. 좀더 선호되는 실시상태에 있어서, 원주형 삽입체의 내부 횡치수는 상기한 바와 같이 특히 300 μm 미만과 같이 2.5 mm 미만이고, 특히 1.5 mm 미만, 500 μm 미만이다

다른 실시 상태에서는, 상기 치수는 조절가능한 저부 예를 들어, 플린저와 같은 저부로 형성된 격실을 제공함으로써 조절된다. 그로인해 격실의 치수가 줄거나 늘수 있게된다.

조절가능한 저부는 특정 상황에 적합하도록 하나 이상의 삽입체를 삽입하는 것의 조합으로 사용된다.

기능적 격실의 치수는 격실내의 배지의 부피 변화에 의해 달라질 수 있다. 격실내의 배지 농도는 정의된 배지의 양의 첨가 또는 제거에 의한 조절 방법에 의해 다양해질 수 있다. 이러한 기능적 원칙은 효과적인 확산 격실의 치수를 변경시키는 것에 일치시키고 또한 일정한 조성의 격실 외부로부터 대사산물의 전달을 조절하여 대사산물 산소가 실질적인 구형 대사 입자로 확산되어야 하는 것을 통한 정체 배지 내의 거리의 증, 감에 관련되어 있다. 실질적인 구형 대사 입자의 대사율은 어떠한 대사 속도에서도, 배지 농도 및 경험한 실질적인 구형 대사 입자에 의해 대사산물 농도를 희망하는 농도로 조절하여 선택하는 것으로 결정할 수 있다.

대사산물 투과층

하나의 실시상태에서, 실질적인 구형 대사 입자는 격실 내에서 대사산물 투과층에 정렬된다. 거기에서, 실질적인 구형 대사 입자는 최적의 조건에 이르는 모든 면으로 부터 대사산물을 공급받는다. 대사산물 투과층의 다른 이점은 아래 설명할 대사산물 농도 측정을 용이하게 할 수 있다는 것이다. 상기 대사산물 투과층은 적어도 하나 이상의 격실의 저부에 정렬되는 것이 좋다. 여기서 저부는 상가한 정의와 같다.

대사산물 투과층은 상기 논의된 대사산물 투과막과 같이, 문제의 대사산물을 투과하는 어떠한 물질로도 만들 수 있다. 특히, 대사산물 투과층은 실리콘, 테프론 불소중합체, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 또는 네오프렌과 같은 플라스틱 화합물로 만들어 진다.

다른 하나의 실시상태에서, 대사산물 투과층은 투과 기재 또는 유리, 세라믹, 미네랄, 유리 또는 미네랄 섬유와 같은 다공성 물질, 또는 금, 백금과 같은 귀금속으로 만들 수 있다.

또 다른 하나의 실시상태에서, 대사산물 투과층은 실리콘을 포함하는 물질로 제조된다.

대사산물 투과층의 두께는 상기한 바와 같이 제공하려는 목적에 맞는 치수로 제작된다. 대표적인 실시예에서, 대사산물 투과층의 두께는 적어도 100 μ m, 특히 적어도 300 μ m, 더욱 특히 적어도 900 μ m와 같이 적어도 실질적인 구형 대사 입자의 직경의 2배가 된다.

검출 방법

격실 내의 대사산물 농도는 비침해적인 방법으로 측정되는 것이 좋다. 상기 방법은 문제의 대사산물에 따라 적절히 선택된다.

하나의 실시상태에서, 대사산물은 실질적인 구형 대사 입자에 의해 산소를 소비한다. 산소검출은 고정화된 발광체를 이용한 광학 감지, 배지 내에 용해된 발광체를 이용한 광학 감지, 클락형 산소 센서를 포함한 산소 센서에 전기적으로 기초한 마이크로 분광 광도법, MIMS(막 유부 질량 분광)기술 또는 당업자가 생각할 수 있는 모든 감지수단에 기초하고 있다. 본 발명의 어떤 실시상태에서는, 산소 분압 또는 농도는 고정화된 발광체층 및 발광 관독기 또는 CCD카메라 또는 광전자 배증관과 같은 카메라를 이용한 발광 기록을 사용하여 측정된다.

광학 산소센서는 기본적으로 발광 소멸의 원리에 기초하고 있다. 산소 농도가 적어질수록, 소멸이 약해지기 시작하고 증가된 발광이 관찰된다. 변형된 Stern-Volmer 방정식에 기초하여, 이하의 식이 도출되었다.

$$C = \frac{I_0 - I}{K_{sv} (I_0 - I\alpha)} \quad (1)$$

여기서 α 는 발광의 비소멸 비율이고, I_0 는 산소 부재시 발광 강도이다.

그리고 K_{SV} 는 고정화된 발광체의 소멸 효율을 나타내는 상수이다(Stern and Volmer 1919, Klimant 외. 1995). 상기 농도는 간단한 3점 측정에 기초하여 측정된다.

대체 광학 감지 원리는 긴 수명의 인광을 가진 발광체로 발전하여왔다. 발광체 주위의 산소 농도가 감소함에 따라 인광의 수명은 규칙적으로 길어진다.

이런 유형의 센서의 인광 의존도는 Stern-Volmer 관계에 의하여 설명된다.

$$t_0/t = 1 + k_q \tau_0 p_{O_2} \quad (2)$$

여기서, t_0 및 t 는 산소 분압 p_{O_2} 에서의 산소 부재시 인광의 수명이고, 개별적으로, k_q (소멸상수)는 산소와 포스페린의 들뜬 3중항 상태의 충돌 및 충돌시 에너지 전달의 확률과 관련한 2차 속도상수이다. 산소 분압 p_{O_2} 를 계산하기 위해서, 소멸 상수 및 산소 부재시 수명을 측정하여야 한다.

더 일반적으로 사용되는 강도-기초 계와 비교하여, 발광 수명 측정은 광표백, 불균등 분포 또는 염료의 거름의 강도 또는 여기된 빛의 강도 변화 등과 같은 이점이 있다. 이러한 것들은 단순한 광학계 또는 광학 섬유를 사용하여 용이하게 한다. 산소-민감 염료의 새로운 즉인 포르페린-케톤은 알려져왔다. 이는 우수한 스펙트럼 성질과 수십 및 수백 마이크로초의 자연 붕괴시간을 보인다. 이는 간단한 광전자 회로의 사용 및 저비용의 전자기구 공정을 허용한다

최근에, 공간 해결 연구에 대한 접근이 이미지 기술과 결합하여 산소에 대한 평면 광학 센서 포일을 사용하는 것에 기초하여 발전하였다. 여기서, 센서 포일은 외부의 투명한 단순 용기위에 장착될 수 있다. CCD 카메라로 외부로부터 센서 포일을 감시하는 것으로써, 센서 포일의 산소 의존 발광의 변화를 감지할 수 있으며, 간단하게 2차원 산소 분포의 측정을 할 수 있다. 이러한 포일은 강도 및 수명, 양자에 기초한 측정이 이용될 수 있다. 이들은 상기한 본 발명의 신규 기구내에서 내부 검출기로써 이용될 수 있다. 산소 발광체의 예에는 유기금속, 예를 들어, 루테튬(II)폴리피리딜 복합체, 루테튬(II)비피리딜 복합체, 루테튬(II)다이민 복합체, 포르핀 복합체, 비스(히스티디나이트)코발트(II), 플래티늄1,2에네디티올레이트와 같은 것이 있으며, 더 좋기로는 폴리스티렌 기재 내의 고정된 루테튬(II)-트랜스-4,7-디페닐-1,10-페나트롤린 과염소산염, 루테튬(II)-트랜스-1,7-디페닐-1,10-페나트롤린 염소산염, 루테튬(II)-트리스(비피리딜)복합체, 트리스(2,2'-비피리딜-디-클로로-루테튬)헥사-하이드레이트, Ru(bpy), 폴리스티렌 내의 플래티늄(II)-옥타-에틸-포르피린, 폴리(메틸-메타크릴레이트)내의 플래티늄(II)-옥타-에틸-포르피린, 폴리스티렌 내의 플래티늄(II)-옥타-에틸-케토-포르피린, 플래티늄(II)-옥타-에틸-케토-포르피린, 폴리스티렌 내의 팔라듐(II)-옥타-에틸-포르피린이다.

광학 산소 센서 및 글루코스, pH 및 이산화탄소와 같은 다른 대사산물의 센서에 관한 더 많은 정보는 아래 열거한 문헌에서 찾을 수 있다.

하나의 실시 상태에서는, 산소 검출기는 광화학적 또는 산소의 다른 검출 원리가 될 수 있다.

특정한 실시 상태에서 산소 농도 결정은 격실의 저부에서 수행될 수 있고 또다른 실시 상태에서는 산소 결정 수단은 대사산물 투과층 밑의 격실의 저부에 설치될 수 있으며 적어도 하나의 실질적인 구형 대사 입자는 기체 투과층위에 놓여져서 대사산물 투과층 실질적인 구형 대사 입자와 대사산물 검출기 사이에 놓여진다.

하나의 실시상태에서, 산소 분압은 격실의 횡직경을 넘지 않는 첨단부 직경을 가지고, 산소 투과성인 격실의 저부벽을 관통한 센서 첨단부를 가진 격실의 저부에 설치된 클락형 전기화학적 산소 미세 센서에 의하여 측정된다. 센서의 첨단부는 산소 투과층에 의해 실질적인 구형 대사 입자로부터 분리된다. 산소 센서는 센서의 분석물(산소)소비가 1%의 실질적인 구형 대사 입자 호흡율과 같은 무시할 만한 비율을 넘지 않아 상기 센서의 측정 활동에 의해서 격실 내의 산소 분압 구배가 교란 받지 않도록 도안되어야 한다.

또 다른 실시상태에 있어서, 클락형 산소 센서는 격실의 산소 투과성 저부벽을 관통하는 MIMS 섬유에 의하여 재배치된다. MIMS 섬유 첨단부는 기체 투과층에 의하여 배아와 분리된다. MIMS 섬유는 센서의 분석물(MIMS 섬유막을 통과하여 이동하여, 질량분석기에 의하여 검출이 가능한 모든 기체)소비가 1%의 실질적인 구형 대사 입자 소비 및 호흡율과 같은 무시할 만한 비율을 넘지 않아 상기 MIMS 섬유의 측정 활동에 의해서 격실 내의 특정 기체의 구배가 교란 받지 않도록 도안되어야 한다.

또 다른 실시 상태에서, 격실 내의 산소 분압 구배는 성장 배지에 첨가된 산소헤모글로빈 또는 산소 의존 흡수 성질을 갖는 다른 분자에 의해서 결정된다. 그리고 격실의 투명한 측벽을 통하여 435 nm 또는 적합한 파장하에서 흡수 구배를 측정하여 격실 내의 산소 분포를 측정한다.

다른 대사산물은 이산화탄소, Ca^{2+} , 및 글루코스에 대한 발광 표지와 같은 그러한 대사산물에 대한 발광 표지에 의하여 측정된다.

더욱이, pH는 격실 내의 대사산물의 농도를 표시하는 주어진 위치에서 측정될 수 있다.

장치

본 발명에 따른 장치는 위에서 설명한 바와 같이 적어도 하나의 격실을 포함한다. 바람직한 실시예에 의하면, 본 장치는 적어도 2개의 격실, 적어도 4개의 격실, 적어도 6개의 격실, 적어도 8개의 격실, 적어도 12개의 격실, 적어도 24개의 격실, 적어도 48개의 격실, 적어도 96개의 격실과 같이 하나 이상의 격실을 포함한다. 이에 의해, 하나 이상의 구형 대사 입자의 대사율이 정해질 수 있으며, 각 격실은 하나의 구형 대사 입자를 포함한다.

격실은 구형 대사 입자를 배양시키기에 적합한 것이 바람직하다. 일 실시예에 따르면, 본 장치는 종래의 세포 배양용 장치로서 48개 또는 96개의 웰(well)을 구비한 장치이다. 하지만, 종래 장치의 웰은, 구형 대사 입자의 측정시 구배가 형성되도록 하기에는 개도가 너무 크다. 따라서, 웰에는 위에서 설명한 바와 같이 삽입체(들)이 구비될 수 있다. 삽입체는, 전체 배양 기간 동안 또는 대사 물질 구배를 형성시키고 대사 물질 농도를 측정하는 기간 동안만 위치될 수 있다.

배양기

본 발명은 또한 위에서 설명한 바와 같이 대사 입자를 배양하는 최적 장치에 관한 것으로서, 본 발명의 상기 장치는 위에서 설명한 바와 같이 적어도 하나의 격실을 포함한다. 따라서, 본 발명은 대사 입자의 배양기에 관한 것으로서, 본 발명의 상기 배양기는 적어도 하나의 격실을 포함하고, 상기 격실은 확산 방지막에 의해 한정되고 대사 입자를 갖는 배지(medium)를 포함할 수 있으며, 상기 확산 방지막은 대사 물질이 확산에 의해 대사 입자 내외로 수송되도록 하여, 대사 물질 확산 구배가 대사 입자로부터 그리고 배지 전체에 걸쳐 형성되도록 한다.

바람직하게는, 격실은, 검출기가 반드시 배양기 내에 포함되지 않는다는 점을 제외하고는 위에서 설명한 바와 같다. 따라서, 본 장치는 적어도 2개의 격실, 적어도 4개의 격실, 적어도 6개의 격실, 적어도 8개의 격실, 적어도 12개의 격실, 적어도 24개의 격실, 적어도 48개의 격실, 적어도 96개의 격실과 같이 하나 이상의 격실을 포함할 수 있다.

본 장치는, 세포와 유기물을 둘러싸는 미환경(microenvironment)이 쉽게 모니터링되어 본 명세서에 개시된 바와 같이 쉽게 최적화된다는 점에서 세포와 유기물의 배양을 위한 최적 조건을 제공하게 된다.

따라서, 본 발명은 또한 대사 입자를 배양하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 상기 배양 방법은,

- a) 본 명세서에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 장치를 마련하는 단계와,
- b) 대사 입자를 격실의 배지에 배치시키는 단계와,
- c) 대사 입자를 배양시키는 단계를 포함한다.

상기 배양 방법과 본 명세서에 개시된 여타 다른 방법들을 조합시키는 것도 본 발명의 범위 내에 속한다.

대사율 결정 방법

본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 본 발명은 구형 대사 입자의 대사율을 결정하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 상기 대사율 결정 방법은,

- a) 본 명세서에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 장치를 마련하는 단계와,

- b) 구형 대사 입자를 격실의 배지에 배치시키는 단계와,
- c) 대사 물질 농도 측정치로부터 격실 내의 대사 물질 농도를 측정하는 단계와,
- d) 상기 대사 물질 농도 측정치와 상기 구형 대사 입자를 상관시켜 구형 대사 입자의 대사율을 정하는 단계를 포함한다.

대사 물질은 위에서 설명한 바와 같을 수 있다. 대사 물질은, 배지을 통한 확산에 의해 구형 대사 입자로 공급된 산소와 같이, 배지을 통한 확산에 의해 구형 대사 입자로 공급되거나 그로부터 제거될 수 있다. 산소가 배지을 통한 확산에 의해 구형 대사 입자로 공급되는 경우에, 대사 물질 농도는, 산소나 이산화탄소의 기체 분압과 같은 기체 분압일 수 있다.

구형 대사 입자가 격실 내에서 배양됨으로써, 대사율의 결정으로 인해 불필요한 교란이 구형 대사 입자에 발생되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

대사 물질 농도는, 격실의 체적 및/또는 배지의 체적보다 작은 체적에서 측정될 수 있다. 바람직하게는, 측정 대사 물질 농도를 기초로 격실의 대사 물질 확산 구배를 결정하여 그 대사 물질 확산 구배를 상기 구형 대사 입자의 대사율과 상관시킴으로써 구형 대사 입자의 대사율을 결정한다.

대사율은 대사 물질 농도를 1회 혹은 2회와 같이 수회 측정함으로써 정해질 수 있다. 또한, 대사율은 구형 대사 입자의 상태를 모니터링할 수 있도록 배양 기간 중에 1회 이상 결정될 수 있다.

위에서 설명한 바와 같이, 대사 물질이 산소와 같은 기체일 경우에, 기체는 대기 또는 대기와 평형 상태에 있는 큰 체적의 배지로부터 직접 정체 배지을 통한 확산에 의해 구형 대사 입자로 공급될 수 있다.

폐쇄 호흡계

본 발명에 따른 장치는 일례로 구형 대사 입자와 같은 입자의 호흡률을 폐쇄 호흡계(closed respirometry)에 의해 측정하는 데 또한 활용될 수 있다. 폐쇄 호흡계는 폐쇄 호흡 세포, 즉 적어도 일시적으로 산소의 공급이 종료된 세포의 호흡률을 측정하는 측정기이다. 본 장치는 일례로 산소와 같은 대사 물질에 대해 비투과성인 물질의 커버를 본 장치의 격실 개구 위에 부착함으로써 폐쇄 호흡 세포로 변환될 수 있다. 커버는 위에서 설명한 임의의 비투과성 물질로 형성될 수 있다.

따라서, 본 발명은 또한 대사 입자의 대사율을 결정하는 비침습적 방법에 관한 것으로, 본 발명의 상기 대사율 결정 방법은,

- a) 본 명세서에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 장치를 마련하는 단계와,
- b) 대사 입자를 격실의 배지에서 배양시키는 단계와,
- c) 배양 기간 중 적어도 일부 기간 동안에 배지에 공급되는 대사 물질을 감소시키는 단계와,
- d) 대사 물질 공급이 감소된 후에 대사 물질 농도 측정치로부터 격실 내의 대사 물질 농도를 측정하는 단계와,
- e) 상기 대사 물질 농도 측정치와 상기 구형 대사 입자의 대사율을 상관시키는 단계를 포함한다.

폐쇄 호흡계에 대해서, 대사 물질은 대부분 산소이며, 대사율은 호흡률이다. 위의 대사율 결정 방법에서, 산소 공급은 바람직하게는 0으로 감소된다.

공급 감소 기간 중에 대사 물질 농도 측정치를 구하는 것이 바람직하다.

대사 물질 공급 조절

본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 본 발명은 일례로 구형 대사 입자와 같은 격실의 입자에 공급되는 대사 물질 공급을 조절하는 방법에 관한 것이다.

따라서, 본 발명은 또한 배양 중에 구형 대사 입자로 공급되는 대사 물질 공급을 조절하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 상기 대사 물질 공급 조절 방법은,

- a) 배지를 구비한 격실을 포함하는 적어도 하나의 장치를 마련하는 단계와,
- b) 구형 대사 입자를 격실의 배지에 배양시키는 단계와,
- c) 대사 물질 농도 측정치로부터 격실 내의 대사 물질 농도를 측정하는 단계와, 선택적으로
- d) 상기 대사 물질 농도 측정치와 상기 구형 대사 입자의 대사율을 상관시키는 단계와,
- e) 대사 물질 농도 측정치 및/또는 상기 구형 대사 입자의 대사율에 따라 대사 물질 공급을 조절하는 단계를 포함한다.

본 방법은 특히 대사 물질이 산소와 같은 기체이고 대사 과정이 호흡 과정인 경우의 측정에 관한 것이다

격실은 바람직하게는 본 명세서에 개시된 바와 같이 대사 물질 확산 구배가 형성되도록 하기에 적합한 격실이다.

대사 물질 공급 조절은 임의의 적절한 방식으로 수행될 수 있다. 일 실시예에 의하면, 대사 물질 공급 조절은 격실 외부에서 대사 물질 농도를 변경시킴으로써 수행된다.

또 다른 실시예에 의하면, 대사 물질 공급 조절은 격실의 크기를 변경시킴으로써 수행된다. 위에서 설명한 바와 같이, 체적은 여러 가지 방식으로 변경될 수 있다. 그 중 한 가지 예를 들면, 삽입체를 삽입하여 격실의 횡방향 크기를 조절하는 것과 같이, 삽입체를 삽입하여 크기를 조절하는 방식이 있다. 종방향 크기도 또한 격실의 조정가능 저부의 위치를 이동시킴으로써 조절될 수 있다.

또 다른 제3 실시예에 의하면, 대사 물질 공급 조절은 격실의 확산 방지막을 변경시킴으로써 수행된다. 이는 격실 벽의 두께를 변경시키거나, 격실 벽의 적어도 하나의 개구의 크기를 변경시킴으로써 수행될 수 있다.

구형 대사 입자의 모니터링

본 발명은 또한, 구형 대사 입자의 모니터링과, 대사율에 의해 측정된 생존가능한 측면에서 높은 품질을 갖는 구형 대사 입자의 선정에 관한 것이다.

일 실시예에 의하면, 본 발명은 생존가능한 배아의 선정, 일례로 생존가능한 배아의 선정 방법에 관한 것으로, 본 발명의 상기 생존가능한 배아 선정 방법은,

- a) 배양 중에 적어도 1회 배아의 대사율을 정하는 단계와,
- b) 최적 대사율을 갖는 배아를 선정하는 단계를 포함한다.

대사율의 결정은 바람직하게는 본 발명에 개시된 장치를 가지고서 본 명세서에 개시된 방법에 의해 수행된다. 또한, 배아는 바람직하게는 상기 장치의 격실 내에서 배양된다.

따라서, 배아의 성장 조건을 변동시키지 않고서 대사율을 정할 수 있게 된다.

도면의 상세한 설명

이하에서는 첨부 도면을 참고로 하여 본 발명의 여러 가지 실시예들을 설명하지만, 이들 실시예들은 단지 포괄적인 발명의 개념에 대한 실시예로서 본 기술 분야의 당업자라면 여타 다른 실시예들을 안출할 수 있다.

배아 호흡의 측정을 위한 본 발명의 실시예로서 도 1에 도시된 실시예를 보면, 일단이 개방된 종방향 격실(1.4)이 도시되어 있다. 원통형일 수 있는 격실의 저부는 투명 산소 감응성 발광체(1.3)의 최상부에 있는 기체 투과성 기층(1.6)으로 구성된다. 확산 격실의 저부 벽(1.5)은 배아를 확대시켜 육안으로 검사할 수 있도록 하는 투명 물질로 제조된다. 저부 벽(1.5)

은 유리나 플라스틱과 같은 기체 투과성 물질로 제조되어, 산소는 단지 격실(1.7)의 개구를 통해서만 공급된다. 격실 저부의 발광체 층(1.3)에서의 산소 분압은, 외부 발광성 관독기에 의해 투명 저부 벽(1.5)을 통해서 격실 저부의 산소 발광체(1.3)로부터의 발광성을 관독함으로써 측정된다. 일 실시예에서 대형 배지일 수 있는 주변부(1.2)는 공기 또는 미지의 기체 조성을 갖는 대기와 평형 상태에 있다. 본 장치는 기체 투과성 기층(1.6)에 위치된 하나 또는 여러 개의 배아(1.1)를 수용하며, 상기 기층은 일 실시예에 의하면 투명 산소 감응성 발광체(1.3)의 최상부에 있는 실리콘이다. 기체 투과성 기층(1.6)은, 실리콘 합성물이나, 테프론 플루오로폴리머나, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 또는 네오프렌과 같은 플라스틱 합성물이나, 유리, 세라믹 또는 미네랄과 같은 화학적 비활성 물질에 기초한 다공성 물질 또는 투과성 매트릭스나, 유리 또는 미네랄 섬유나, 금 또는 백금과 같은 귀금속일 수 있다.

본 발명의 작용 원리에 의하면, 배아가 산소를 소비함으로써 대형 배지/주변부(1.2)의 산소 분압에 비해서 산소 검출기(발광체)(1.3)의 산소 분압을 저하시키게 된다. 산소 분압 구배(1.8)는 정상 상태에서 안정되게 유지되며, 배아의 산소 소비가 일정하게 유지되는 한 변동되지 않는다. 종방향 원통형 확산 격실을 포함하는 본 실시예에 의하면, 산소 분압 구배는 도 1에 도시한 바와 같이 선형이다. 실제 실험 데이터가 도 4에 도시되어 있다. 따라서, 배아에 의한 산소 소비량은, 픽스(Ficks)의 제1 확산 법칙(식 I)을 이용하여 상기 확산 격실(1.4)의 개구(1.7)와 저부(1.3)에서의 산소 분압 사이의 차이로써 결정된다.

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (I)$$

이때, 개구로부터 저부의 배아(1.1) 쪽을 향해 산소가 선형적으로 감소되는 것으로 가정하며[이론 그래프(1.8) 참조], 상기 식 I에서 J는 정상 상태의 경우에 배아의 소비량과 일치하는 산소 유량이고, D는 배지의 공지된 확산 계수이며, dC/dX는 산소 구배이다. 구배 dC/dX는 격실 개구(1.7)의 소정의 대기 또는 배지와 배아(1.1) 높이의 격실 저부 사이의 산소 분압의 차이이다. 격실(1.4)의 저부를 덮는 광학 산소 발광체(1.3)를 본 실시예에 사용하게 되면, 전체 저부 면적에 대한 산소 신호가 발생되게 된다. 배아의 산소 소비가 불균일함으로써 유발되는 배아 높이의 수평 산소 구배를 평균하여, 마치 산소 소비량이 저부 영역에 걸쳐 균일하게 분포되는 것처럼 함으로써, 배아의 정확한 위치 설정은 호흡 평가에 무관해지게 된다.

따라서, 각 배아의 호흡률은, 격실 내부에 고정된 산소 검출 수단에 의해서 배아를 교란시키지 않고서 확산 격실의 외부로부터 산소 분압을 1회 측정함으로써 결정될 수 있다. 이러한 측정 작업은 배아를 교란시키지 않고서 수초 내에 수행될 수 있다. 검출 수단에 따라서, 측정 작업은, 일례로 배양기나 온실과 같은 배양기 내에서 수행될 수 있거나, 배아의 생장 조건이 심하게 영향을 받지 않도록 배양기 외부에서 아주 짧은 시간 동안 수행될 수 있다.

본 발명의 격실 배치를 활용하게 되면, 다수의 배아들의 각 호흡률을 동시에 검사할 수 있게 된다. 일 실시예에 의하면, 적어도 하나의 격실은, 적어도 5개의 격실, 바람직하게는 적어도 10개의 격실, 더욱 바람직하게는 적어도 24개의 격실, 특히 바람직하게는 적어도 96개의 격실을 포함한다.

또 다른 실시예에 의하면 각 배아는 개별 격실 내에서 생장되며, 또 다른 실시예에 의하면 각 격실은 하나 이상의 배아를 포함한다.

도 2는 제1 실시예 내부의 삽입체(10)을 도시한 도면으로서, 상기 삽입체는 종방향 격실(2.4)의 횡방향 크기(A)를 조절하는 역할을 한다. 횡방향 크기를 줄이거나 늘림으로써, 용해 물질을 확산시켜 수송하는 확산 격실의 용량이 증가되거나 저감될 수 있다. 확산 격실의 수송 용량은 배아 위치에서의 정상 상태 산소 분압으로부터 결정된다.

본 발명의 일 실시예에 의하면, 배아 위치에서의 산소 분압은 격실(2.4)의 크기를 조절함으로써 조절된다. 이는 여러 가지 방식으로 수행될 수 있는데, 예를 들면 조정가능 저부(3.10)(도 3 참조)의 위치를 조절시키거나, 격실 내부의 배지 높이를 증감시키거나, 횡방향 크기(A)를 감소시키게 되는 삽입체(2.9)(도 2 참조)를 격실 내에 삽입시킴으로써 수행될 수 있다.

기체 투과성 층(2.6)의 두께는 일 실시예에 의하면 적어도 100 μ m, 바람직하게는 적어도 300 μ m, 더욱 바람직하게는 적어도 900 μ m이다. 바람직하게는 기체 투과성 층의 두께는 배아 직경의 약 2배 이상이어야 하며, 포유류 배아의 경우에 상기 배아의 직경은 발육 단계와 종에 따라 대체로 30 내지 400 μ m 사이이다.

도 3은 본 발명의 또 다른 실시예를 도시하고 있다. 도 1에 도시된 제1 실시예의 구성 요소와 동일한 구성 요소는 도 1에서와 동일한 도면 부호를 부여하여 표기하였다.(도면 부호 설명 참조). 본 실시예에 의하면, 일례로 원통형인 격실(3.4)로서, 일단에 개구(3.7)가 구비되고, 기체 투과성 층(3.6)이 산소 감응성 발광체(3.3)의 최상부에 있는 이동가능 또는 조정가능 저부(3.10)이 구비되는 격실(3.4)이 마련된다. 저부 벽(3.10)은 기체 비투과성의 밀봉부를 형성하도록 격실 벽(3.5)에 대해 밀봉된다.

본 발명의 제2 실시예에 의하면, 격실의 크기는, 이동가능 저부(3.10)에 의해 격실(3.7) 개구로부터 배아(3.1)로의 산소 확산 길이를 증감시킴으로써 조절가능한 방식으로 변경될 수 있다. 격실(3.4)의 길이를 증감시키게 되면, 배아(3.1) 높이에서의 정상 상태 산소 분압이 호흡 평가 수행 가능성에 영향을 미치지 않고서 소망하는 산소 분압에 도달되도록 증감될 수 있다. 이러한 방식으로 배아의 호흡률이 결정될 수 있으며, 이때 선택적으로는 임의의 호흡률에서 배아에 대한 산소 분압을 소망하는 수준으로 조절할 수 있다.

도 5는 본 발명의 또 다른 실시예를 도시한 도면으로서, 이 실시예에서는 생장 접시 내에 있는 완전 체적의 배양 배지이 격실(5.4)을 형성하며, 이렇게 형성된 격실은 본 발명의 여타 실시예들의 격실보다 훨씬 크다. 생장 접시의 저부(5.5)은 투명하고 발광체(5.3)로 덮여 있으며, 이 발광체의 최상부에는 한 개 또는 여러 개의 배아(5.1)들이 그들 사이의 분압 구배가 중첩되지 않도록 하기에 충분하게(대체로 2mm 이상) 서로로부터 간격을 두고서 위치된다. 본 실시예의 작용 원리에 의하면, 산소는 도 5B에 도시된 바와 같이 배아 위의 격실 외부에서 대기와 접촉하고 있는 주변 배지로부터 배아로 공급된다. 격실이 배아에 비해 아주 큰 경우에는, 배아 쪽을 향한 산소 구배는 도 5B에 산소 분압 등치선(5.11)과 도 6에 실제 데이터로 도시한 바와 같이 구형이 된다. 확산 격실을 구성하는 생장 접시는, 광학 산소 검출기에 의해서 발광체(5.3)의 산소의 수평 분포를 2차원으로 분해하는 CCD 카메라(5.12)에 위치된다. 따라서, 각 배아(5.1) 주위의 영역에 대응되게 CCD 카메라(5.12)로부터 송출된 신호는 각 배아 호흡의 측정치가 된다. 그 결과가 CCD 카메라의 영상으로서 도 5C에 도시되어 있으며, 각 배아 주위의 발광체의 발광 강도가 회색조로 도시되어 있다. 배아 호흡은, 배아 주위의 기록된 산소 분압 구배를 이상적인 구형 확산을 가정하는 이론 모델에 맞추므로써 평가된다. 자유 확산 공간에서 산소 소비원 쪽을 향한 산소 구배를 이론적으로 구할 수 있다. 만일 a(C1)와 b(C2)에서의 농도를 안다면, a와 b 사이에 있는 중공 구의 소정 위치 r(a<r<b)에서의 농도 C를 구할 수 있다[크랭크(Crank), 1997년]. a와 b 사이에서의 산소 소비는 없다.

$$C(r) = \frac{aC_1(b-r) + bC_2(r-a)}{r(b-a)} \quad (\text{식 II})$$

구형 벽 J를 통한 산소 확산량은,

$$J = 4\pi D \frac{ab}{b-a} (C_2 - C_1) \quad (\text{식 III})$$

이고, 여기서 D는 배지의 산소 확산 계수이다.

구배는 산소 소비원 주위로 대칭이며, 그 산소 소비원의 중심을 통하는 임의의 표면에서 거울면 대칭일 수 있다. 따라서, 큰 격실(직경이 1cm보다 크고 높이가 2mm 이상)의 저부에 있는 평면에 위치된 산소 소비원(이 경우에 배아)을 구의 중심으로 간주할 수 있어, 배아에 의해 소비된 산소는 반구로부터 공급되게 된다. 따라서, 기록된 구배를 이론 모델에 맞출 때, 산출된 호흡률(구형 벽을 통한 산소 유량)은 2가지로 분할되어야 한다. 만일 배아 호흡에 의한 확산 격실의 구배 특성을 완전히 나타낼 수 없다면, 본 장치는 산소 소비량이 알려져 있는 인공 배아를 이용하여 보정될 수 있다. 본 실시예는 또한 동일 격실 저부에서 배양된 배아들 사이의 호흡률과 산소 분포의 2차원 기록치를 비교하기에 적합하다.

도면의 간단한 설명

도 1은 저부에 산소 검출기를 구비한 본 발명에 따른 확산 격실의 제1 실시예를 도시한 단면도이다. 이론적인 정상 상태 산소 구배가 도면에 이어 그래프로 도시되어 있다. 투과성 확산 장벽은 이 경우에는 정체성 배지이다.

도 2는 도 1에 따른 제1 실시예에 있어서의 그 실시예의 내부 횡방향 치수를 조정하기 위한 삽입체를 구비한 격실의 단면도이다.

도 3은 조정 가능 저부를 구비한 확산 격실을 포함하는 본 발명의 다른 실시예를 도시하는 단면도이다.

도 4는 배아가 저부부에서 배양되고 있는 원통형 확산 격실의 내측에서 측정된 정상 상태 산소 구배의 예를 나타내는 그래프이다. 도 4에서의 구배의 직선 부분은 도 1의 이론적 그래프에서의 실선 부분에 해당한다. x축의 단위는 hPa이고, y축의 단위는 μm 이다. 구배와 관련된 격실(x.7)의 개구 위치는 수직선으로 표시하였다.

도 5A는 확산 격실이 완전히 개방되어 있고 온도 구배가 배아를 둘레에서 2차원적으로 기록되는 확산 격실의 다른 실시예를 도시하는 도면이다. 도 5B는 배아의 높이에서의 저부부의 단면도이다. 도 5C는 CCD카메라로부터 투시한 가정적 화상을 도시하는 것(평면도 또는 저면도)으로서, 각각의 배아를 둘러싸는 발광체(luminophore)의 예상 발광 강도를 회색조로 가시화시킨 것이다.

도 6A는 도 5에 도시된 바와 같은 개방 격실의 평면 저부부를 따라 가면서 배아를 향하여 측정한 정상 상태 온도 구배의 예를 도시하는 그래프도이다. 도 6B는 실제 구배가 이론상의 이상적 구형 구배에 어떻게 맞추어지는지를 도시하는 그래프도이다. 그래프가 직선인 경우, 구형 확산 시스템의 가정은 만족되는 것이다.

도 7(설계예)은 조사할 대사 입자를 운반 용기로부터 집어 올릴 수 있는 피펫으로서 형성된 설계예를 관통하여 도시한 횡단면도이다. 피펫의 플런저는 기체 검출기를 구비한다는 점에 특징이 있다. 호흡하는 입자를 집어올린 후, 피펫을 뒤집어서 그 첨단부가 위로 향하게 하고서 배지 용기의 저부부의 포트를 통하여 삽입한다. 배지 용기는 후속해서 배지로 채워진다. 피펫의 몸통은 격실의 측벽 역할을 한다.

도 8(설계예)은 대사 입자가 관 내의 얇은 구멍(well)에 위치되어 있는 설계 예를 관통하여 도시한 횡단면도이다. 구멍은, 두께가 가변적이고 그에 따라 대사 전달 용량이 가변적이며 수평으로 변위시키면 각기 다른 단면부로 구멍(well)을 덮을 수 있는, 대사 투과성 뚜껑을 구비한다. 그에 따라 배지와 주위 사이의 확산 장벽은 구멍 바로 위에 뚜껑의 각기 다른 단면부를 배치함으로써 조정될 수 있다. 본 도면에서 구멍 밖의 배지는 액적 형태이지만 그보다 큰 물체 형태로 할 수도 있다.

도 9(설계예)는 비투과성 원판 아래의 검출기 근처에 대사 입자가 놓여지는 설계예를 관통하여 도시한 횡단면도이다. 실질적으로 비투과성인 격실 벽의 상부 부분을 형성하는 원판은 실질적으로 비투과성인 격실 벽의 하부 부분에 대해 정확한 거리를 유지할 수 있게 스페이서에 의해 지지된다. 스페이서가 원판 아래 영역의 아주 작은 부분만을 수용하며 확산에 대해서는 유의적인 장벽을 형성하지 않는다는 점을 나타내기 위해, 스페이서는 점선으로 도시되어 있다. 원판 아래의 중앙에는 얇은 구멍이 위치되고, 그 구멍 내에는 대사 입자가 놓여진다. 투과성 확산 장벽의 투과성은 실질적으로 투과성인 격실 벽의 상부 벽(뚜껑)을 지지하는 스페이서의 높이를 변경함으로써 조정될 수 있다.

도 10(설계예)은 비투과성 관 내의 원추형 오목부 내에 호흡하는 입자가 배치되어 있는 설계예를 관통하여 도시한 횡단면도이다. 검출기는 원추부의 선단 근처 근처에 위치되고 원추형의 비투과성 뚜껑이 원추형 오목부 내에 배치된다. 스페이서는 뚜껑과 오목부 사이의 정확한 거리를 유지한다.

도 11(설계예)은 비투과성 관(11.5) 상에 배치된 비투과성 물질 블록(11.5)을 관통하는 공동(11.4)에 의해 격실이 구성된 설계예를 관통하여 도시한 횡단면도이다. 공동은 큰 원통형(또는 다면체)이며 배지로 채워지고, 관에 대면하는 단부 근처에서 중공으로 형성되어 대사 입자(11.1)용 수용부를 형성한다. 저부 판(11.5) 근처에서 연장된 공동 안에는 발광체(11.3)가 배치된다.

도 12(설계예)는 뚜껑(조정 가능함)이 부분적으로 열려 있는 함몰부를 도시하는 도면이다. 검출기는 대사 입자 아래의 평탄면, 일례로 투시경 판의 형태를 갖는다.

도 13(설계예)은 중앙 구멍(비조정식)을 구비한 함몰부를 도시하는 도면이다.

도 14(설계예)는 대사 입자가 안에 떨어져 있는 입방체로서 이 입방체를 뒤집게 되면 대사 입자가 중력에 의해 떨어져 나와서 배출되게 되는 입방체를 도시하는 도면이다.

도 15(설계예)는 단부에 깔때기를 구비한 절곡된 모세관을 도시하는 도면이다. 검출기는 모세관의 내측에 투시경 층으로서의 역할을 하는 2개의 원형 영역 형태로 구성된다. 호흡하는 입자의 위치 및 그에 따른 확산성 장벽의 길이는 지지체 상에서 모세관의 위치를 변경함으로써 조정될 수 있는데, 이때 모세관의 위치 변경은 대사 입자가 중력에 의해 이동해 내려가게 되는 모세관 내의 최저 지점의 위치를 결정하게 된다.

도 16(설계예)은 다이얼 기구의 조정 가능한 저부부를 도시하는 도면이다. 이 특수 실시예는 체적을 조정할 수 있는 또 다른 형태의 격실을 제공하는데, 이에 따르면 투과성 확산 장벽의 투과성 조절은, 배지이 정체된 물체인 경우에는, 층의 두께를 변경하고 그에 따라 침투 계수를 변경함으로써 할 수 있다. 회전부(16.17)를 클락 방향으로 돌리게 되면 그 회전부(16.17)는 나사부(16.18)에 의해서 주변 배지(16.2)을 수용하고 있는 큰 구멍의 저부부를 향하여 이동하게 되고, 그에 따라 투과성 층의 두께가 감소된다. 격실의 저부부가 큰 구멍의 저부부에 대해 고정되어 있으므로, 그 결과 격실의 체적이 감소되고 이로 인해 침투층의 두께가 감소되고 이에 따라 투과성이 증가하는 결과가 된다. 검출기는 격실의 저부부로부터 주변 배지를 수용하는 큰 구멍의 저부부를 향하여 연장되고, 여기서 검출기는 기록 장치와 접속된다.

도 17(설계예)은 함몰부가 있는 판을 도시하는 도면이다. 이 실시예는, 적절한 각도인 30도(일례로 15도 내지 60도 범위 내에서 적절히 선택)를 이룬 일례로 500 내지 3000 μm 의 깊은 원추형 함몰부로서 친수성 표면을 갖는 또 다른 함몰부 내에 배치되어 있는 원추형 함몰부를 다수 구비하는 판으로 구성된다. 판 표면의 나머지 부분은 소수성이다. 적절한 체적, 즉 10 내지 20 μl 의 액적(17.2)은 2개의 함몰부를 채워서 투과성 확산 장벽을 형성한다. 액적 위의 적절한 오일 층은 액적의 증발과 액적 내부에서의 대류를 방지하고, 그에 따라 실제 목적에서의 배지의 본체는 정체 상태로 유지된다. 선택적으로, 원추형 함몰부 외측의 체적은, 다른 이유로 해서 정체 상태로 유지되지 않는 한은, 주위 배지를 형성하되 실질적으로 투과성 확산 장벽에는 포함되지 않게 한다. 확산 장벽의 투과성은 다른 각도와 깊이를 갖는 원추형 함몰부(격실)를 적용함으로써 조정될 수 있고, 특히 원추형으로 형성된 격실의 투과성은 실시예 4의 관계식에 따라 계산될 수 있다.

도 18(설계예)은 도 11에 도시되고 실시예 6[스코르스텐스(Skorstens)의 예]에서 설명한 기구에서의 쥐 배아의 호흡률을 측정할 것을 도시한 도면이다. 미가공 형광 데이터임. 산소에 의해 안정 가능한 포피린 형광체(oxygen quenchable porphyrin flourphor)(폴리스티렌 내의 플라티늄(II)-옥타-에틸-포피린)가 인큐베이션 챔버 내의 배지와 접촉했을 때에 그로부터 나오는 형광 강도를, 테칸 스펙트라플로 형광판 리더(Tecan Spectrafluor fluorescents plate reader)에서 650nm의 발산광을 기록하고 360 및 550nm의 여기광을 각각 사용하여 기록한 것이다. 형광은 여기후에 0 내지 500 μs 로 기록되었다.

도 19는 도 11에 도시되고 실시예 6[스코르스텐스(Skorstens)의 예]에서 설명한 기구에서의 쥐 배아의 호흡률을 측정할 것을 도시한 도면이다. 산소 농도가 측정되고, 데이터에 보정이 가해짐. 형광 강도는, 대부분의 옵트로즈(optrodes) 광센서의 응답을 적절히 설명하는 것으로서 클리만트(Klimant) 등에 의해 1995년에 수정된 스티븐-볼머 방정식을 이용하여[(Fiber-optic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology, Limnol Oceanogr) 40: 1159-1165 참조], 산소 분압으로 변환되었다.

도 20은 도 17에 도시된 설계예를 이용한 실시예 7에서 설명한 것과 같은 산소 마이크로센서를 가지고 측정할 쥐 배아의 호흡률을 도시하는 도면이다.

도면 부호에 대한 설명

도면 부호는 아래와 같이 각각 x.x 형태의 2개의 숫자로 이루어져 있고, 여기서 첫 번째 숫자는 도면 번호를 나타내고, 두 번째 숫자는 각 도면에서의 내역을 나타낸다.

x.1: 대사 입자

x.2: 주변 배지

x.3: 검출기

x.4: 대사 투과성 확산 장벽

x.5: 실질적으로 대사 투과성인 격실 벽

x.6: 대사 입자를 지지할 수 있는 대사 투과성 층

x.7: 격실 벽의 외측을 주위를 향한 격실 개구

x.8: 이론적인 대사 농도 구배

- x.9: 도 1에 따른 실시예에서의 삽입체
- x.10: 격실의 조정 가능 저부부
- x.11: 농도 구배 등가선
- x.12: CCD 카메라
- x.13: 증발 및 난류를 방지하기 위하여 배지을 덮는 점성층
- x.14: 삽입 포트(도 7에만 해당)
- x.15: 스페이서(도 9 및 도10에만 해당)
- x.16: 지지 구조체
- x.17: 조정 가능 상부(도 16에만 해당)
- x.18: 나사부

실시예

실시예 1

소과의 배아를 직경 1 mm, 깊이 4 mm인 원주형 격실의 저부에 놓는다. 산소 분압이 55hPa인 환경하에서 배양한다. 격실 내의 정상 상태산소 분압 구배는 배아 방향의 격실의 개구로부터 100 μm 간격으로 측정된다. 정상 상태 전의 시간 t (초)는 이하의 공식으로 근사치를 구할 수 있다.

$$t = \frac{0.45^2}{D} \quad (\text{J. Crank 1995, The Mathematics of Diffusion})$$

여기서 l (cm)은 확산 격실의 깊이이고, D 은 배지의 확산 계수이다. 직경 1 mm, 깊이 4 mm인 격실 내의 정상 상태는 D 이 3.5×10^{-5} 라는 가정하에 약 35분 후에 달성된다. 첨단부 크기가 10 μm이고, 미세조절기와 함께 배치된 클락형 산소 미세 센서가 사용된다. 상기 구배를 결정하기 위해서 격실 내의 상부 및 저부 지점의 산소 분압을 아는 것만으로 충분하다. 도 4를 보면 상기 구배가 배아 방향으로의 개구로 부터 격실 내부의 선형 구배를 따른 모든 지점에서의 산소 분압을 측정하여 결정된다는 것은 더더욱 분명하다.

실무적인 목적을 위해서 발광체층을 사용한 경우, 격실의 저부에 산소 검출 수단을 설치하는 것이 더 수월해진다.

실시예 2

배아 조작 후에, 각 개별 배아는 피펫에 의해 격실으로 이송된다[시험관 수정, 클로닝, 융해 또는 다른 기술: In vitro fertilization. Kay Elder, Brian Dale, 2nd rep. Ed, Cambridge University Press (2001), 배아 조작 기술의 일반적인 설명을 위해 참조]. 격실은 몇개의 구획을 가진 큰 틀 내부에서 구성된다. 하나 또는 몇몇의 인간 또는 동물로부터 하나 또는 몇 개의 배아 희분이 다중 격실 또는 격실의 균을 가진 단일틀 안에 포함될 수 있다.

상기 틀은 희망하는 조건하에서 배양된다. 인간 배아에 있어 전형적으로 37°C, 5-21% O₂ 및 5% N₂ 내의 CO₂, 100% 습도, 구득할 수 있는 배양 배지에서의 성장을 조건으로한다(예를 들어, IVF-50 Scandinavian IVF Science AB, Goeborg, Sweden). 선택된 배지는 질조절의 수용성 및 다른 특정정보다 배지의 유용성에 달려있다. 배아 배양을 위해 상대적으로 간단히 균형잡힌 염 수용액을 사용할 수 있다. Earle, Tyrode 및 Hepes 배지는 널리 알려져 있다. 이러한 배지는 단일 농도 또는 농축 수용액으로 구득할 수 있다. 호흡 측정은 각 개별 격실의 저부의 발광체로부터 발광 신호를 포착하도록 특수

하게 고안된 발광 관독기안에 상기 틀을 설치하여 수행한다. 상기 틀은 측정 후 즉시 배양기로 돌아간다. 실제 호흡률은 개별 격실의 치수에 대한 정보에 의하여 계산된다. 배아 위치의 산소 분압이 주어진 최적의 간격내에 있지 않다면, 예를 들어, 5-10% 사이, 격실의 치수 및 산소 분압은 적절한 삽입으로 조절된다.

상기 호흡 측정은 시험관 배양기 동안 필요한 만큼 자주 수행한다. 전형적으로, 피이식자에게 이식을 위한 배아 선택의 근거로서 형태학적 평가와 함께 배아 호흡률이 사용된다.

시험관 내의 형태학적 평가는 배아의 몇가지 특징을 근거로 한다. 이러한 평가 방법은 주관적이고, 경험에 많이 의존한다. 배아는 구형이고 젤라틴과 같은 막(투명대로 알려진 무세포 매트릭스)으로 포위되어 있는 세포(분리할구)로 이루어져 있다. 상기 투명대는 배아가 부화할 때까지 다양한 기능을 수행한다. 그리고 이는 배아 평가의 좋은 지표가 된다. 상기 대(zona)는 구형이고 투명하다. 그리고 세포 조각으로부터 분명하게 구분이 가능해야한다. 배아의 형태학적 평가에 있어 중요한 기준은 (1) 배아의 모양; (2) 투명대의 존재; (3) 크기; (4) 색; (5) 발달 단계에 해당하는 배아의 나이에 대한 정보 및 (6) 분리할구 막의 완전성이다.

배아가 발달하는 동안, 분리할구의 수는 기하학적으로 늘어난다(1-2-4-8-16- 등.). 동시 세포 분화는 일반적으로 배아의 16-세포기까지 유지된다. 그 후, 세포 분화는 비동시적이 되며, 마침내 개별 세포는 그들 자신의 세포주기를 가진다. 배아를 형성하는 세포는 구형 세포인 16-세포기에 쉽게 확인된다. 32-세포기(상실기) 이후, 배아는 수축을 겪는다. 결과적으로, 이 시기 이후에는 배아 내의 개개의 세포는 평가하기 어렵다. 불임치료기간 동안에 생성된 인간 배아는 상실기 전에 피이식자에게 이식된다. 반면에 다른 포유류 배아는 피이식자에 이식되거나 유기되기 전까지 실험적으로 종종 다음 단계(확장된 포배기)까지 배양된다.

실시례 3

설계된 반구형 확산: 도 6A는 넓은 격실의 평면 저부에 놓인 소의 배아 방향의 산소의 변화를 보여준다. 도 6B는 같은 데이터의 C(r) 대 a/r를 도시한다. 여기서 a/r은 산소 변화에 대한 구체 중심(배아의 중심)으로부터 선택된 종지점(배아 방향)까지의 거리를 말한다. 배아 표면의 변화의 시작점의 경우, a는 배아의 직경(a는 배아로부터의 거리점으로 선택될 수 있다.)이다. 매우 큰 b 수치에서 C(r) 대 a/r는 선형(C2가 진정한 벌크 농도일 때) 이라는 구형 확산에 대한 가정을 두었다.

구체의 한 점을 통과하는 산소 플럭스는 상기한 것과 같이 계산된다. 도 6B는 완전 구형 확산이라는 가정은 상기 선이 완전히 선형이지 못하기 때문에 이러한 특정한 경C에 완벽하게 적용되지 못한다. 상기 소비 평가는 그러므로 a의 선택에 따라서 영향을 받는다. 이것은 그 경우에 완벽히 맞지 않는다.

실시례 4 확산 이론

1. 지속적 소비원에 대한 확산

대사입자 또는 화합물을 소비하는 목적물을 가진 확산 계에서, 화합물은 확산에 의해 소비원쪽으로 이동될 것이다. 이 확산의 크기-플럭스-은 Fick-First 법칙에 의하여 설명된다:

$$J = -D \frac{dC}{dx}, \quad (4.1.1) \quad (\text{Crank, 1997})$$

여기서 D은 확산 계수이고, C는 농도, x는 플럭스의 축방향이다.

정상 상태에서, 적분된 계내의 일정 지점에서 소비원을 향한 확산 플럭스의 영역은 일정할 것이다. 적분된 플럭스의 영역은 그 확산계의 대칭축과 수직한 단면적 F로 정의된다. 주어진 양성 소비 Q는 다음과 같다:

$$-JF = Q,$$

이것을 식 4.1.1로 치환하면

$$D \frac{dC}{dx} \cdot F = Q \quad (4.1.2)$$

아래의 이러한 방정식은 기하학적 범위(평행면 다각형, 원주형, 구형)에 적용될 수 있으므로 본 발명의 다른 실시 상태에 적용될 수 있다.

예를 들어 계산한다면, 산소호흡 입자는 $3.45 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (38 °C)의 확산 계수를 가지고 물속에서 부유한다.

2.1 차원 계(평행면 다각형 또는 원주형)

확산계는 1차원으로 정의된다. 확산 화합물의 농도 및 물리적 장벽이 1차원상에서만 다양하다면, 무한히 넓은 평면 판은 1차원계의 좋은 예이다. 경계효과가 무시된다면, 저부에 소비원을 가진 평행면은 1차원 확산계로 간주될 것이다.

정상 상태에서, 1차원 확산은 수학적으로 기술될 수 있다:

$$\frac{d^2C}{dx^2} = 0 \quad (\text{Crank, 1997}),$$

이를 적분하면

$$\frac{dC}{dx} = A \quad (4.2.1)$$

이를 다시 적분한 결과,

$$C = Ax + B \quad (4.2.2)$$

여기서 A 및 B 는 적분 상수이다.

$x = 0$ 에서 일정한 소비원 Q 및 $x = h$ 일 때 일정한 농도 C_w 를 가진 길이 h 의 1차원계를 고려해보자. 1차원 확산계에서, 단면적 F 는 x 의 함수로써 일정하다.

방정식 4.2.1을 방정식 4.1.2에 적용하면

$$D \cdot A \cdot F = Q \quad (4.2.3)$$

$x = h$ 일 때 농도는 C_w 와 같다, 식 4.2.2에 따르면:

$$C(h) = Ah + B = C_w \quad (4.2.4).$$

식(4.2.3) 및 (4.2.4)를 결합하여 A 및 B 를 풀어내면, 식(4.2.2)는 다음과 같이 된다:

$$C(x) = C_w + \frac{Q}{F \cdot D}(x-h) \quad (4.2.5)$$

$x = 0$ 일 때 농도 C_0 를 고려하면 식 4.2.5는 다시 정리된다:

$$Q = \frac{(C_w - C_0)F \cdot D}{h}. \quad (4.2.6)$$

따라서 만일 F , D , h , 및 C_w 가 알려졌다면, 소비율은 식 4.2.6을 사용하여 C_0 를 측정함으로써 계산된다.

실시에 6에서 수행된 측정에 이것을 적용하면, 확산계는 깊이가 4 mm, 직경이 0.5 mm인 평행면 원주형이고, 0.00196 cm²의 표면적 F를 나타낸다. 상부 벽에서 측정된 산소 농도는 21%(210μm에 상응)인 것에 비해 저부 벽에서 측정된 산소 농도는 17%(169 μm에 상응)인 것은 소비율로 환산하면 0.546 nanoliters · hour⁻¹에 상응하는 6.77 · 10⁻⁶ nmol · S⁻¹이다.

3. 기본적으로 2차원인 원주형계(원판형).

원주형 확산계에서 확산은 원주의 반경을 따라 발생한다. 반면에, 원주계의 세로축을 따라 변화가 없다. 경계효과가 무시된다면, 중심부에 소비원을 가진 원판형 몸체로 구성된 확산계는 원주계로 간주될 것이다.

정상 상태에서, 원주형 확산은 수학적으로 기술될 수 있다:

$$\frac{d}{dr}\left(r\frac{dC}{dr}\right)=0 \quad (\text{Crank, 1997}),$$

이를 적분하면

$$r\frac{dC}{dr}=A \quad (4.3.1)$$

이를 다시 적분한 결과

$$C = A + B \ln r, \quad (4.3.2)$$

여기서, A 및 B는 적분 상수이다.

r = 0에서 일정한 소비원 Q 및 r = r₁에서 농도 C_w를 갖는 길이 l 및 반지름 r₁ 원주계를 고려하여 보자.

방정식 4.3.1을 방정식 4.1.2에 적용하면

$$D\frac{A}{r}\cdot F=Q \quad (4.3.3)$$

r = r₁ 일 때 농도는 C_w와 같다, 식 4.3.2에 따르면:

$$C(r_1) = A + B \ln r_1 = C_w \quad (4.3.4).$$

원주형 확산계에서, 단면적 F는 r의 함수이다:

$$F = 2\pi \cdot r \cdot l \quad (4.3.5)$$

식 4.3.3, 4.3.4, 및 4.3.5를 결합하여 A 및 B를 풀면, 식(4.3.2)을 다시 쓸수 있다:

$$C(r) = C_w + \frac{Q}{2\pi \cdot l \cdot D} \ln(r/r_1) \quad (4.3.6)$$

확산계의 추가점 r₀에서의 농도 C₀를 고려하여 식 4.3.6 를 다시 정리하면:

$$Q = \frac{(C_w - C_0) \cdot 2\pi \cdot l \cdot D}{\ln(r_1/r_0)}. \quad (4.3.7)$$

그러므로, l, D, r_0, r_1 , 및 C_w 가 알려졌다면, 소비율은 식 4.3.7을 이용하여 C_0 를 측정함으로써 계산될 수 있다.

원주형 확산계는 지름이 10 mm인 원형 불투과성 원판이 불투과성 표면의 50 μm 위에 놓여지고, 지름이 100 μm 의 산소 호흡 입자가 놓이며, 원판 중앙에서 1 nl oxygen hour⁻¹의 호흡률을 가지는 것으로 건조된다. 식 4.3.6에 따르는 입자 표면에서 정상 상태 농도의 결과는 157 μM 이 될 것이다.

4. 3차원의 구형계(원뿔형-반구형)

구형 확산계에서 확산은 구체의 반경 또는 구체의 단면을 따라 일어난다. 경계 효과가 무시된다면, 확산계는 소비원 a 를 가진 원뿔형 몸체로 구성된다. 이들의 첨단부는 구형계로 간주된다.

안정상태에서, 구형 확산은 수학적으로 기술될 수 있다:

$$\frac{d}{dk} \left(r^2 \frac{dC}{dr} \right) = 0 \quad (\text{Crank, 1997}),$$

이를 적분하면,

$$r^2 \frac{dC}{dr} = A, \quad (4.4.1)$$

이를 다시 적분하면,

$$C = B + \frac{A}{r}, \quad (4.4.2)$$

여기서, A 및 B 는 적분 상수이다.

$r = r_1$ 일 때 일정한 농도 C_w 및 $r = 0$ 에서 소비원 Q 를 갖는 반지름 r_1 구형계를 고려해본다.

방정식 4.4.1을 방정식 4.1.2에 적용하면

$$D \frac{A}{r^2} \cdot F = Q \quad (4.4.3)$$

$r = r_1$ 일 때 농도는 C_w 와 같다, 식 4.4.2에 따르면:

$$C(r_1) = B + \frac{A}{r_1} = C_w \quad (4.4.4)$$

구형 확산계에서, 단면적 F 는 반지름 r 의 함수이다. 계가 원뿔형으로 이루어졌다면, F 는 다음과 같다:

$$F = 2\pi \cdot r^2 \cdot \left(1 - \cos \frac{\theta}{2} \right) \quad (4.4.5)$$

여기서, θ 는 원뿔의 첨단부 각도이다. 식 4.4.3, 4.4.4, 및 4.4.5를 결합하여 A 및 B 를 풀면, 식 (4.3.2)을 다시 쓸 수 있다:

$$C(r) = C_w - \frac{Q}{2\pi \cdot D \cdot \left(1 - \cos \frac{\theta}{2} \right)} \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{r_1} \right) \quad (4.4.6)$$

확산계의 추가점 r_0 에서의 농도 C_0 를 고려하여 식 4.4.6를 다시 정리하면:

$$Q = (C_w - C_0) \cdot 2\pi \cdot D \cdot \left(1 - \cos \frac{\theta}{2}\right) \left(\frac{1}{r_0} - \frac{1}{r_1}\right)^{-1} \quad (4.4.7)$$

그러므로, l, D, r_0, r_1, θ 및 C_w 가 알려졌다면, 소비율은 식 4.4.7을 이용하여 C_0 를 측정함으로써 계산될 수 있다.

실시에 에서 수행된 측정에 이것을 적용하면, 여기서, $r_0 = 0.015$ cm (배아표면)에서 $C_0 = 206 \mu\text{M}$ 이고, $D = 3.45 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $r_1 = 0.04$ cm, $\theta = 60^\circ$ 및 $C_w = 210 \mu\text{M}$ 이며, $0.11 \text{ nl hour}^{-1}$ 의 호흡률을 보인다.

참조문헌: Crank, J. 1997. The Mathematics of Diffusion. Clarendon Press.

실시에 5 본 발명에 따라 기술되는 새로운 장치들의 설계에

본 특허 출원의 도면들은 본 명세서에서 기술하는 새로운 장치들에 대한 15개의 서로 다른 설계를 도시한다. 이러한 변형에 중 많은 것은 대사 입자의 최적의 배양 조건을 확보하기 위하여 확산 장벽의 조절과 그리고/또는 물질 대사 입자의 조작용 용이하게 하기 위한 기능적으로 동등한 설계들이다. 그것들은 배지 내에서 그리고 격실에 근접하여 발생하는 대사 산물 농도 구배의 형태에 따라 몇 개의 카테고리로 나누어진다. 4개의 카테고리는 다음과 같다.

1. 선형 대사 산물 농도 구배를 가지는 1차원계
2. 대수(logarithmic) 대사 산물 농도 구배를 가지는 2차원계
3. 쌍곡선 농도 구배를 가지는 3차원계(원뿔-반구)
4. 상기계들의 조합이고 농도 구배를 설명하기 위하여 더 복잡한 모델링이 필요한 불규칙한계

상기 3개의 카테고리에 관한 확산 이론은 이전의 실시예(실시예 4)에서 상세하게 설명하였다. 유도된 식을 이용하여, 주어진 호흡률을 가진 물질 대사 입자를 위한 필요한 센서 신호를 얻기 위하여 각각의 장치 카테고리로부터 하나의 실시예를 어떻게 설계하고 크기를 정하는지에 대한 예를 제공한다. 우리의 표준적인 예는 액체 배지에서 부유 상태에 있는 호흡하는 배아에 대한 산소 확산을 다룬다. 다음과 같은 표준 파라미터들을 사용한다:

- 소비율, $Q = 1.0 \text{ nanoliter} \cdot \text{hour}^{-1}$ (=to $1.24 \cdot 10^{-5} \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1}$)
- 배지 내의 산소 확산 계수 $D = 3.45 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (38°C에서)
- 배지에서의 산소 농도, 38°C에서 $C_w = 210 \mu\text{M}$
- 요구되는 센서 신호는 벌크(bulk)보다 30% 낮음(즉, 38°C에서 $C_0 = 147 \mu\text{M}$)

선형 대사 산물 농도 구배를 가지는 1차원계

그러한 계에 관한 확산식은 실시예 4의 두번째 섹션에서 기술하였다. 실린더의 높이(h)를 3mm로 가정하면, $F = \pi(d/2) \Leftrightarrow d = 2\sqrt{F/\pi}$ 로 주어졌을 때에 식 4.2.6을 이용하여 실린더의 직경(d)을 계산할 수 있다.

$$d = \sqrt{\frac{4Qh}{\pi D(C_w - C_0)}} \quad (5.1)$$

표준 파라미터가 위와 같을 때 기대되는 산소 호흡율을 가진 대상물을 위한 요구되는 신호를 제공하기 위하여 실린더의 직경을 470 μ m로 줄여야 한다는 것을 발견하였다.

도 1에 도시된 설계 A. 불투과성 물질 내의 보어. 이 설계는 불투과성 물질(1.5) 내의 단순한 원통형 보어이다. 이것은 크기가 비슷한 직사각형 또는 다면체로 할 수도 있다. 물질 대사 입자(1.1)는 검출기(1.3) 위의 투과성 물질(1.6) 층 위의 저부에 위치한다(검출기(1.3)는 상부로부터 또는 투명한 저부(1.5)를 통하여 관찰되는 발광체(luminophore)의 층일 수 있으나 이에만 한정되는 것은 아님). 투과층(1.6)의 목적은 물질 대사 입자(1.1)의 근방에서 발견되는 수평방향의 대사 산물 농도 구배를 고르게 하는 것이다. 따라서 검출기(1.3)로부터 관찰되는 신호는 그 표면에 걸쳐서 사실상 균일하게 된다. 물질 대사 입자의 근방에서의 농도 구배는 이상적인 선형 곡선과 약간 차이가 날 것이나, 보어의 종횡비가 높다면(즉, $h \gg d$) 이러한 작은 차이는 중요하지 않다. 개구(1.7)의 외측에는 농도가 벌크 유체의 농도를 신속하게 띠게 되는 반구형 구배가 예상된다. 실용적인 목적을 위하여, 상기계를 상기 식에 의하여 설명되는 특성을 가지고 플럭스는 보어의 종횡비에 의하여 조절되는 1차원계로 간주할 수 있다. 보어의 직경은 작게 유지되기 때문에 물질 대사 입자 위의 배지 지주에서 교란된 혼합이 발생하지는 않는다. 이러한 설계의 이점은 그 단순성에 있다. 이는 실시예 1에서 설명된 산소 미세 전극 실험에 성공적으로 사용되었다. 본 설계의 두 가지 주요한 단점은, 1) 좁고 깊은 보어 내에 침전된 물질 대사 입자를 회수하기가 어렵다는 것과, 2) 물질 대사 입자의 물질 대사율에 기하여 확산 장벽을 조절할 수가 없다는 것이다.

도 11에 도시된 설계 B. 교환 가능한 상부를 구비한 보어. 이 설계는 앞에서 설명한 단순한 보어(설계 A)와 매우 유사하다. 이는 두 개의 불투과성 부분으로 이루어진다. 배지로 채워진 불투과성 물질(예를 들어 유리)로 만들어진 용기가 제공된다. 이러한 용기 위에는 중심을 통과하는 원통형(또는 다면체형) 구멍을 구비한 불투과성 물질로 된 작은 부분품(11.5)이 놓여진다. 용기 표면을 향하는 개구의 단부에는 호흡 입자(11.1)가 놓여지는 작은 중공을 형성하도록 개구가 만들어진다(속이 비게 된다). 상기 중공의 상부 벽은 대사 산물 검출기(11.3)로 덮여 있다. 물질 대사 입자가 위치하는 상기 중공 "챔버"가 작고 상기 구멍의 종횡비가 크다면, 본 설계는 전술한 단순 보어와 동등하게 된다. 산소 민감성 발광체를 가진 유리 부분품으로 된 본 설계의 원형품은 실시예 6에 설명된 바와 같이 쥐의 배아의 호흡율을 측정하는 데에 성공적으로 사용되었다. 전술한 중앙 보어와 비교할 때 본 장치의 이점은 두 개의 불투과성 부분품을 분리시킴으로써(즉, 상부 "굴뚝"을 제거함으로써), 장치로부터 물질 대사 입자를 제거할 수 있다는 점이다. 또한, 중앙 보어의 직경이나 길이가 상이한 다른 확산 장벽을 제공하기 위하여 상부를 교환할 수도 있다. 그러나, 그 주요한 단점은 상기 불투과성 부품들 사이에 대사 산물이 접촉면을 따라 수평으로 확산될 수 있는 접촉면에서의 수평 갭이 존재하지 않도록 불투과성 부품을 매끄럽게 맞추는 것이 어렵다는 점이다.

도 2에 도시된 설계 C. 삽입체를 구비한 보어. 본 설계는 설계 A(도 1)와 동일하다. 유일한 차이점은 보어의 단면적을 도 1의 A로부터 도 2의 B로 줄이는 보어 내의 불투과성 삽입체(2.9)이 있다는 것이다. 감소된 단면적은 확산 장벽을 증가시키고 그에 따라 삽입체 아래의 격실(2.4) 내의 대사 산물 농도를 감소시킬 것이다. 본 설계의 주요 이점은 상이한 보어 직경을 가지는 삽입체들로 교체함으로써 확산 장벽을 조절할 수 있다는 점이다. 보어의 직경을 증가시키고 물질 대사 입자로의 접근을 용이하게 하기 위하여 삽입체가 먼저 제거된다면, 물질 대사 입자를 옮기는 것이 더 용이할 것이다. 단점은, 삽입체과 보어는 매우 작고 대사 산물이 통과하여 확산될 수 있는 삽입체과 보어 사이의 갭을 피하기 위하여 삽입체과 보어는 매우 잘 맞아야 하기에, 삽입체과 보어의 필요한 크기 때문에 그것들을 조작하기가 매우 어렵다는 점이다.

도 15에 도시된 설계 D. 구부러진 모세관. 본 설계는 기능적으로는 설계 A와 동등하다. 이는 하나의 폐 단부(또는 후방 단부로부터의 대사 산물의 확산 운반을 무시할 수 있도록 멀리 떨어져 있는 개구)와 타 단부의 깔때기 부분을 구비한 구부러진 불투과성 모세관(15.5)으로 이루어진다. 물질 대사 입자는 깔때기 단부(15.7)에 놓여지고 배지(15.2)을 함유한 용기 내에 잠긴 두 개의 홀더(도면부호 15.4로 표시한 검정색 삼각형) 상에 놓여진 모세관의 최저점(15.1)에서 중력에 의하여 자리를 잡게 된다. 대사 산물 민감성 검출기는 대사 산물 농도 구배를 검출하기 위하여 두 개의 밴드(band)(15.3)에 배치된다. 두 개의 밴드가 있으면 최외곽 밴드는 기준부로서 기능하고 밴드들이 호흡 입자보다 개구에 더 가까우면 개구(15.7)로부터 대사 산물 입자(15.1)까지의 거리는 알 필요가 없다. 물질 대사 입자(15.1)보다 개구(15.7)에서 더 먼 거리에 밴드가 위치한다면, 물질 대사 입자(15.1)와 개구(15.7) 사이의 거리를 알아야만 한다. 모세관의 직경은 난류를 방지할 수 있을 만큼 작아야 한다. 이러한 설계의 이점은, 중력이 물질 대사 입자(15.1)를 개구(15.7)를 향하여 또는 개구(15.7)로부터 멀어지게 이동시켜서(구르게 하여서) 대사 산물이 확산에 의하여 가로질러야 하는 거리를 변화시키도록 홀더 내의 모세관을 경사지게 함으로써 확산 장벽을 조절할 수 있다는 점이다. 본 장치의 가장 큰 단점은 물질 대사 입자를 모세관 속으로 넣는 일이다. 깔때기 부분이 도움을 주기는 하지만 그로 인하여 그러한 장치를 제조하기가 더 어렵게 될 것이다.

도 3에 도시된 설계 E. 조절 가능한 저부를 구비한 보어. 본 설계는, 물질 대사 입자(3.1)이 대사 산물 민감성 검출기(3.3) 상부의 저부 투과성 층(3.6)에 놓여 있는 불투과성 물질(3.5)에 형성된 원통형(또는 다면체) 보어인 설계 A와 동일하다. 그러나, 본 설계는 확산 장벽의 조절 가능한 높이(h)를 얻기 위하여 피스톤(3.10)을 채용하고 있어서 보어의 종횡비를 조절

할 수 있고 따라서 보어의 저부에서의 대사 산물 농도를 조절할 수 있다. 여기서 높이의 조절은 벽을 고정시킨 채 저부를 이동시켜서 달성할 수 있지만(이하의 설계 G에서처럼) 저부를 고정시키고 벽을 하방으로 이동시켜도 동일한 효과를 얻을 수 있다. 조절 가능한 저부(3.10)는 1) 확산 장벽을 변경함으로써 호흡 입자에 대한 대사 산물 공급을 조절하고, 2) 장치로부터 물질 대사 입자의 제거를 용이하게 하는 두 가지의 기능을 제공한다. 주요한 단점은 보어의 직경이 작아야 하고 그에 따라 피스톤의 크기도 작아야 한다는 점이다. 대사 산물이 통과하여 확산될 수 있는 피스톤과 보어 사이의 갭이 생기는 것을 막기 위하여 피스톤과 보어가 매우 잘 맞아야 한다는 점도 추가적인 난점이다. 저부로부터, 즉 피스톤(3.10)을 통하여 대사 산물 민감성 검출기(3.3)의 신호를 측정해야 한다는 점도 또한 난점이다.

도 7에 도시된 설계 F. 검출기 피스톤을 구비한 피펫(pipette). 본 설계는 전술한 설계 E가 어떻게 실현될 수 있는가에 대한 하나의 예이다. 이는 조절 가능한 저부가, 연구되는 물질 대사 입자가 운반 용기로부터 채집되는 피펫과 함께 사용되는 특정한 실시예를 나타낸다. 피펫의 플런저(plunger)(7.10)는 대사 산물 검출기(7.3)를 함유한다는 점에서 특별하다. 호흡 입자(7.1)가 선택된 후에 피펫은 침단부가 올려진 상태로 전환되고 배지 용기의 저부에서 포트(7.14)를 통하여 삽입된다. 배지 용기는 후에 배지(7.2)로 채워진다. 피펫의 통(barrel)은 격실의 측벽(7.5)의 역할을 한다.

도 16에 도시된 설계 G. 나사가 형성된 조절 가능한 저부를 구비한 보어. 본 설계는 이전의 두 개의 설계와 기능적으로 동등하지만, 약간 다른 방식으로 조절이 수행된다. 이는 조절 가능한 상부(16.17)를 회전시킴으로써 둘레 벽(16.5)의 높이를 고정 저부(16.10)에 대하여 변경할 수 있는 조절 가능한 치수의 중앙 보어(16.4)를 포함한다. 확산 장벽의 두께, 즉 액체 층(16.4)의 두께는 조절 가능한 상부(16.17)를 클락 방향으로 회전시킴으로써 감소되는데, 이 때 조절 가능한 상부(16.17)는 나사부(16.18)에 의하여 둘러싸는 배지(16.2)를 함유한 대형 웰(well)의 저부를 향하여 움직인다. 격실(16.10)의 저부는 대형 웰의 저부에 대하여 고정되기 때문에, 격실의 체적이 감소되고 투과성 층(16.4)의 두께가 감소하며 투과성이 증가한다. 검출기(16.3)는 격실의 저부로부터 둘러싸는 배지를 함유한 대형 웰의 저부를 향하여 뺀고 기록 장치와 접촉될 수 있다. 검출기 물질(16.3)은 물질 대사 입자(16.1) 아래의 검출기 표면(16.10)을 제외하고 불투과성 용기 물질 내에 묻히기 때문에 모든 검출기 물질 내에서 동일한 대사 산물 농도가 관측된다. 따라서 검출기를 물질 대사 입자 아래의 수평 원판 내로 신장시킬 수 있다. 이 원판은 아래로부터 관찰되는 불투과성 물질 내에 포함된 대사 산물 민감성 발광체를 이용한 광학적 검출 원리에 대한 물리적 신호 증폭기로서 작용할 수 있다. 이러한 형태의 신호 증폭은, 전체 검출기 체적이 정상 상태 신호를 얻기 위해 평형 상태에 있어야 하는 대사 산물용 저장소로서 작용하기 때문에 검출기의 응답이 느려지게 된다. 이러한 형태의 수동 신호 증폭은 다른 설계에서도 유용할 수 있다. 본 설계의 주요한 이점은 상기 상부가 계속 아래로 회전될 때에 확산 장벽을 점진적으로 조절할 수 있고 물질 대사 입자를 용이하게 조작할 수 있다는 점이다. 가장 큰 단점은 보어의 직경을 작게 해야 하고 그에 따라 피스톤의 크기도 작게 해야 한다는 점이다. 대사 산물이 통과하여 확산될 수 있는 피스톤과 보어 사이의 갭을 피하기 위하여 피스톤과 보어가 매우 잘 맞아야 한다는 것도 곤란한 점이다.

대수(logarithmic) 대사 산물 농도 구배를 가지는 2차원계

본 카테고리의 설계에서는, 투과성 물질(예를 들어 배지)가 원판을 구성하도록 물질 입자가 두 개의 불투과성 평면 사이에 위치된다. 원판형 실린더에서는 본질적으로 방사상의 확산이 발생하게 된다. 원통형 확산계에서, 확산은 원통의 반경을 따라 발생하고, 원통형계의 길이 방향 축을 따라서는 변화가 없다. 가장자리 효과가 무시될 수 있다면, 원판으로 구성된 확산계가 전개된다. 그러한 계에 관한 확산식은 실시예 4의 제3 섹션에서 기술하였다. 물질 대사 입자 아래의 검출기 원판의 반경을 $r_0 = 0.5 \text{ mm}$, 물질 대사 입자 위에 놓여 있는 평면의 외부 반경을 $r_1 = 5 \text{ mm}$ 로 가정하면, 요구되는 검출기 신호를 얻기 위하여 불투과성 평면들 사이의 거리(l)를 계산하기 위하여 식 4.3.7을 사용할 수 있다.

$$l = \frac{Q \ln(r_1/r_0)}{2\pi D (C_w - C_0)} \quad (5.2)$$

표준 파라미터가 상기와 같이 주어졌을 때, 기대되는 산호 호흡율을 가진 대상물에 대하여 요구되는 신호를 제공하기 위해서는 상기 평면들 사이의 거리가 20.1 μm 가 되어야 한다는 것을 발견하였다.

도 9에 도시된 설계 H. 불투과성 판들 사이의 확산 원판. 이는 물질 대사 입자(9.1)가 불투과성 원판(9.5) 아래의 검출기(9.3) 근방에 위치하는 설계이다. 본질적으로 불투과성인 격실 벽의 상부를 구성하는 원판은 본질적으로 불투과성인 격실 벽(9.5)의 하부까지의 잘 정의된 거리를 유지하기 위하여 스페이서(9.15)에 의하여 지지된다. 물질 대사 입자(9.1)는 판 내의 얇은 웰(well) 내에 위치한다. 스페이서(9.15)는 그것들이 원판 하의 면적의 단지 작은 부분만을 차지하고 확산에 대한 상당한 장벽을 형성하지 않는다는 것을 표시하기 위하여 점선으로 도시된다. 확산 장벽은 상기 본질적으로 불투과성의 격

실 벽의 상부 벽(뚜껑)을 지지하는 스페이서의 높이를 변경함으로써 조절될 수 있다. 가장 큰 단점은 상기 판들 사이의 거리가 변하지 않도록 매우 평면적인 표면이 필요하다는 점이다. 상기 불투과성 표면들 사이의 갭의 균일성을 양보하는 것을 피하기 위하여, 평면성으로부터의 편차는 상대적으로 큰 직경인 10 mm에 대하여 단지 수 μm 에 그쳐야 한다. 또 다른 단점은 물질 대사 입자를 너무 많이 교란시키는 난류 없이 딱 맞는 뚜껑을 설치하고 제거해야 한다는 점이다.

도 10에 도시된 설계 I. 원뿔의 표면으로서의 감싸진 확산 원판. 이는, 대사 산물의 확산 운반을 위하여 이용 가능한 투과성 공간이 두 개의 불투과성 표면들 사이에서 제한된다는 점에서 이전의 설계와 기능적으로 동등한 설계이다. 그러나, 이 경우 불투과성 표면은 평면이 아니고 불투과성 판(10.5) 내의 원뿔형 중공 내에 삽입된 불투과성 원뿔 뚜껑(10.5)을 구성한다. 물질 대사 입자(10.3)는 배지이 채워진 원뿔형 중공에 놓여지고 중력에 의하여 중공의 저부 침단에서 멈추게 된다. 검출기(10.3)는 중공 말단의 물질 대사 입자 근방에 위치하고, 원뿔형 불투과성 뚜껑은 중공 내에 위치한다. 스페이서(10.15)는 상기 뚜껑과 틀(impression) 사이에 잘 정의된 거리가 유지되도록 해준다. 이전의 설계에 대한 본 설계의 이점은 물질 대사 입자의 밀도로 인하여 물질 대사 입자가 중공의 저부 침단에서 검출기의 위치로 가라앉게 된다는 점이다. 그러나 두 개의 불투과성 부분 사이의 간격이 매우 작은 허용 공차로 조심스럽게 제어되어야 하는데 이는 쉽게 달성될 수는 없는 것이다.

쌍곡선 농도 구배를 가지는 3차원계(원뿔-반구)

본 카테고리의 설계에서는, 물질 대사 입자는 평면의 불투과성 표면에 위치하거나 그러한 표면의 원뿔형 함몰부 내에 위치한다. 두 경우 모두 불투과성 물질이 대사 산물이 물질 대사 입자에 접근할 수 있는 각도를 제한하는 구형 확산계의 예이다. 관찰된 흐름을 원뿔형 함몰부의 각도의 함수로 나타낸다면, 불투과성 표면 상의 물질 대사 입자의 반구형 확산 패턴은 각도(θ)= 180° 로 한 동일한 식의 세트에 의하여 설명될 수 있다. 그러한 계에 관한 확산식은 실시예 4의 제4 섹션에서 기술되었다. 물질 대사 입자의 위치에서의 원뿔의 반경을 $r_0 = 0.5 \text{ mm}$, 원뿔형 함몰부의 외부 반경을 $r_1 = 3 \text{ mm}$ 로 한다면, 요구되는 검출기 신호를 얻기 위하여 원뿔의 침단에서의 원뿔 각(θ)를 계산하는 데에 식 4.4.7을 이용할 수 있다.

$$\theta = 2 \cos^{-1} \left[1 - \frac{Q \left(\frac{1}{r_0} - \frac{1}{r_1} \right)}{2\pi D (C_w - C_0)} \right] \quad (5.3)$$

표준 파라미터가 상기와 같이 주어지면, 기대되는 산소 호흡율을 가진 대상물에 대한 요구되는 신호를 제공하기 위해서는 원뿔 각도가 20° 가 되어야 한다는 것을 알았다. 이는 개구가 1.05 mm이고 저부 폭이 170 μm 인 깊이 2.5 mm의 원뿔 구멍에 해당한다. 원뿔 구멍에서 쥐의 배반포(murine blastocyst)의 경우에 호흡 입자를 향한 대사 산물 농도 구배의 예는 실시예 7에서 제공된다.

도 5a에 도시된 설계 J. 검출기 판 상의 물질 대사 입자. 본 설계는, 확산 격실이 완전히 개방되어 있고, 물질 대사 입자(5.1)가 놓여 있는 표면에 포함된 검출기(5.3)에 의하여 대사 산물 구배가 2차원적으로 기록되는 가능한 가장 간단한 확산 격실이다. 도 5b는 대사 산물을 위한 동심의 등-농도 선(5.11)을 표시하는 물질 대사 입자의 수준에서의 저부의 단면을 도시한다. 도 5c는 CCD 카메라(5.12)로부터 보여지는 (상면 또는 저면의) 가정적인 이미지를 도시하며, 여기서 각각의 개별 물질 대사 입자 주위의 예상되는 검출기 신호는 회색 색조로 도시된다. 소의 배아에 가까운 미세 전극 프로파일은 이러한 형태의 설비에서 측정되었다. 본 실험은 실시예 3에 제공된다. 본 설계의 이점은 그 단순성에 있고, 가장 큰 단점은 물질 대사 입자의 아주 가까운 근방에서 국부적 대사 산물 농도를 결정할 때에 정확성이 요구된다는 점이다. 구형 확산은 단거리에서 있어서는 매우 효율적이기 때문에 공간적인 해결책이 중요하다.

도 17에 도시된 설계 K. 원뿔형 함몰부를 구비한 판. 이 설계는, 친수성 표면을 가진 또 다른 가는 함몰부에 위치한 (15도 내지 60도와 같은) 적당한 각도의 500 - 3000 μm 깊이의 원뿔형 함몰부를 가진 불투과성 판(17.5)으로 구성된다. 상기 판의 표면의 나머지 부분은 소수성이다. 적당한 체적, 즉 10 내지 20 μl 의 소량 액체가 두 개의 함몰부를 채우고 투과성 확산 장벽(17.4)을 이룬다. 물질 대사 입자(17.1)는 그것이 불투과성 물질(17.3) 내에 포함된 검출기 물질(17.3)의 원판과 접촉되도록 원뿔형 함몰부(17.4)의 저부에 위치한다. 검출기가 물질 대사 입자 아래의 수평 원판 내로 신장하기 때문에 원판은 앞서 설계 G에서 설명된 바와 같이 광학적 검출 원리에 대한 신호 증폭기로서 기능할 수 있다. 소량 액체 위의 적당한 오일의 층은 소량 액체(용기 내의 성기계 선이 그려진 액체)로부터의 증발을 방지하고 배지(17.2)의 실제적인 목적의 액체 방울이 퍼어있도록 소량 액체 내부의 대류를 제거한다. 대안적으로, 원뿔형 함몰부(17.4) 외부의 체적은 주위 배지의 부분이

고 따라서 다른 이유 때문에 괴어 있게 유지되지 않는 한 투과성 확산 장벽 내에 특별히 포함되지는 않는다. 확산 장벽의 투과성은 물질 대사 입자를 상이한 각도 및/또는 깊이를 가지는 다른 원뿔형 함몰부(격실)로 이동시킴으로써 조절될 수 있고, 특히 원뿔형으로 형성된 격실의 투과성은 실시예 4에 설명되는 대로 상기 식과 같이 계산될 수 있다.

그러한 설계에 있어서의 실험 결과가 실시예 7에 제공된다. 본 설계의 가장 큰 이점은 그 단순성이다. 그러나 대사 산물 농도의 측정 가능한 차이를 얻기 위해서는 상당히 깊고 좁은 원뿔형 함몰부가 필요하고 따라서 전술한 단순 보어에 근접하게 된다. 그러므로, 장치 형태 A를 위하여 기술된 단순 보어와 비교할 때에 원뿔형 함몰부가 조작성에 있어서(특히 장치로부터 호흡 대상물을 제거하는 면에서) 분명한 개선을 가져오는지는 확실하지 않다.

상기계들의 조합이고 농도 구배를 설명하기 위하여 더 복잡한 모델링이 필요한 불규칙한계

도 8에 도시되는 설계 L. 조절 가능한 두께의 뚜껑을 구비한 격실. 이 설계는 배지보다 대사 산물에 대한 투과성이 더 작지만 격실의 불투과성 벽(8.5)보다는 훨씬 투과성이 높은 물질로 이루어진 비-액체 확산 장벽으로서 뚜껑(8.4)을 채용한다. 물질 대사 입자(8.1)는 불투과성 판 내의 얇은 웰(well) 내에 위치한다. 검출기(8.3)는 상기 웰의 저부에 위치한다. 상기 웰은 두께가 변하는 대사 산물 투과성 뚜껑(8.4)을 구비한다. 뚜껑을 단지 수평으로 옮겨서 상기 웰을 서로 다른 두께를 가지는 뚜껑의 서로 다른 구간으로 덮음으로써 확산 장벽을 조절할 수 있다. 본 도면에서, 상기 웰과 뚜껑은 배지의 액체 방울(8.2)로 덮이고, 액체 방울(8.2)은 증발을 막기 위한 오일 커버(8.13) 하에서 침잠되나, 배지는 오일 없이 용기를 채울 수도 있다. 본 설계의 가장 큰 이점은 단순성과, 비교적 얇은 웰에서의 물질 대사 입자의 조작의 용이성과, 뚜껑을 구비한 조절 가능한 "소형의" 확산 장벽에 있다. 주요한 단점은 뚜껑과 기부 판 사이를 잘 맞게 해야만 한다는 것이다. 맞춤이 적절하지 않다면, 대사 산물이 격실로 수평 확산될 수 있다.

도 12에 도시된 설계 M. 부분적으로 개방된 뚜껑을 구비한 격실. 본 설계는 웰을 부분적으로 덮고 대사 산물을 위한 확산 장벽으로서 작은 개구(12.7)가 생기게 하는 불투과성 뚜껑(12.5)을 채용한다는 점을 제외하고는 이전의 설계와 거의 동일하다. 본 설계의 가장 중요한 이점은 단순성과 확산 장벽을 조절하기 위한 조절 가능한 뚜껑에 있다. 그러나 각 측정에서 뚜껑의 정확한 위치를 정밀하게 추적하지 않고 그러한 불규칙계를 조정(calibration)하는 것이 어려울 것이라는 점이 단점이다.

도 13에 도시된 설계 N. 복부 기공(pore)이 형성된 불투과성 뚜껑을 구비한 격실. 본 설계는 조절 불가능한 확산 장벽으로서 불투과성 뚜껑(13.5) 내의 중앙 기공을 채용한다는 점을 제외하고는 전술한 설계와 기능적으로 동일하다. 확산 장벽을 변경하기 위하여 뚜껑을 기공 사이즈가 더 큰 뚜껑으로 교체할 수 있다. 조정하고 사용하는 것이 매우 간단하고 전술한 설계의 경우보다 더 용이할 것이다. 가장 큰 단점은 뚜껑과 기부 판 사이를 잘 맞게 해야 한다는 것이다. 맞춤이 적절하지 않을 경우, 대사 산물이 격실로 수평 확산될 수 있다.

도 14에 도시된 설계 O. 물질 대사 입자를 위한 입구 및 출구를 구비한 입방체. 본 설계는 중앙 격실에 연결된 두 개의 보어를 포함하는 배지(14.2) 속에 잠긴 불투과성 입방체(14.5)이다. 처음에는 물질 대사 입자(14.1)는 수직 방향의 깔때기 속으로 떨어지고 이어서 중력에 의하여 검출기(14.3) 위로 이동하여 정지하게 된다. 대사 산물은 두 개의 보어를 통하여 공급되기 때문에 결과적인 대사 산물 농도 구배는 다소 복잡하게 된다. 그러나, 장치의 적절한 치수가 주어지면 수치 해석 모델링에 의하여 예상되는 구배를 예측할 수 있다. 일단 설계되면 그것은 알려진 물질 대사율을 가진 물질 대사 입자를 사용하여 조절할 수 있다. 분명한 이점은 입방체를 돌려서 물질 대사 입자가 중력에 의하여 떨어져 나오게 함으로써 물질 대사 입자를 회수할 수 있다는 것이다. 물질 대사 입자는 또한 입방체를 돌림으로써 다른 검출기를 구비한 격실의 다른 측면 상에 놓여질 수도 있다. 필요하다면 입자를 배출하기 위하여 입방체를 통하여 대류 흐름을 발생시킬 수 있다. 본 설계의 단점은 설계가 복잡해진다는 점과 물질 대사 입자가 격실 내에 갇힐 수 있다는 점이다.

실시예 6 쥐의 배아를 포함한 원통형 격실 내에서의 광학적 산소 측정

일반적인 측정 원리가 도 11에 따른 특정한 실시예에서 평가되었다. 배반포(blastocyst) 단계에서의 쥐의 배아의 호흡 활동은 다음의 설명에 따라서 측정되었다.

장치

이에 대해서는 도 11에 도시된 실시예 5, 버전 B의 상세한 설명을 참조하기 바란다. 그것은 유리로 만들어진 두 개의 불투과성 부분으로 구성된다. 유리 판이 저부(11.5)로 형성된다. 상기 판의 위에 높이(h)가 4 mm인 작은 유리 원통(11.5)이 놓여진다. 이 유리 원통의 중심을 관통하여 직경(d)이 0.5 mm인 원통형 구멍(11.4)이 형성된다. 용기 표면에 접하고 있는 구멍의 단부에서 구멍은 드릴 침단부으로 파내어서(속을 비게 하여) 호흡 입자(11.1)가 위치할 수 있는 작은 원뿔형 중공이

형성되게 한다. 상기 원뿔형 중공의 상부 벽은 산소 소멸성 포르피린 플루오로포어(oxygen quenchable porphyrin fluorophore)(11.3)(폴리스티렌 내의 백금(II)-옥타-에틸-포르피린)로 덮여 있다. 유리 원통은 두 개의 유리 부분들 사이의 접촉면에서 산소의 수평 이동을 방지하기 위하여 치과용 왁스(dental wax)로 유리 판에 부착 및 밀봉된다.

배양:

3주 내지 4주된 미성숙 암컷 B6D2F1 쥐(DBA/2J 수컷과 C57BL//6J 암컷 사이의 F1 잡종)가 6I.U.PMSG(덴마크 인터베트(Intervet)의 Folligon® vet)로 0번째 날에 처리되었다. 이틀 후(3번째 날) 그것들은 6I.U. Suigonan® Vet. (덴마크 인터베트의 Suigonan, 400I.E. serumgonadotropin 200I.E. choriongonadotropin)에 의해 처리되었다. 같은 날, 암컷들은 성숙한(생식력 테스트된) 수컷 B6D2F1 쥐와 짝짓기가 되었다. 2-세포 배아들은 배지 M2(미국 세인트루이스의 시그마 케미컬(Sigma Chemical))를 이용하여 짝짓기 이틀 후에(5번째 날) 난관으로부터 플라싱(flushing)되었다. 플라싱 후에, 배아들은 배지 M2(미국 세인트루이스의 시그마 케미컬(Sigma Chemical))로 보내졌고 공기 중의 5% CO₂ 분위기 하에서 37°C로 배양되었다. 동물들은 타입 투 매크롤론 케이지(type II Macrolon cage)(이탈리아 테크니플라스트(Techniplast)) 안에서 길렀고 음식(덴마크 브로가르덴(Brogaarden) 알트로민(Altromin) #1314)과 물을 자유롭게 먹을 수 있게 하였다.

도 11에 따른 장치(실시예 5의 설계 타입 B)는 M2 배지로 채워진 미세 적정량 포맷의 Nunc 12 웰 디쉬(well dish)(덴마크 로스킬데(Roskilde) Nunc A/S)에 놓여지고 60분 동안 인큐베이터 내에서 평형상태가 되도록 하였다. 배반포 단계(짝짓기로부터 5일 후)의 하나의 배아를 중앙 구멍(11.7)의 입구에서 이동 피펫으로부터 배출시키고 중력에 의하여 챔버 내의 저부로 가라앉게 함으로써, 하나의 배아를 장치로 이동시켰다. 챔버 내의 배아의 도착은 반전된 현미경 사용에 의하여 확인되고 아래로부터 챔버의 직접적인 시각적 조사가 가능하도록 하였다. 인큐베이션 챔버(11.3) 내의 배지와 접촉되어 있는 산소 소멸성 포르피린 플루오로포어(oxygen quenchable porphyrin fluorophore)(11.3)(폴리스티렌 내의 백금(II)-옥타-에틸-포르피린)로부터의 형광 강도는 테칸 스펙트라플루오르(Tecan Spectrafluor) 판 리더에서 650 nm의 기록 방출광과 각각 360 nm 및 550 nm의 여기광(excitation light)을 이용하여 기록되었다. 형광(fluorescence)은 여기 후에 0 μs부터 500 μs까지 기록되었다. 형광 강도는, 클리만트(Klimant) 등이 1995년 저술한 "섬유-광 산소 마이크로센서, 수생 생물학의 새로운 툴(Fiber-optic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology)"의 Limnol Oceanogr 40: 1159-1165에 따라 대부분의 옵트로드(optrode)의 응답을 적절히 설명하는 수정된 스테른-볼머(Stern-Volmer) 식을 이용하여 산소 분압으로 전환되었다:

$$I = I_0 \left[\alpha + (1-\alpha) \left(\frac{1}{1 + K_{sv} C} \right) \right]$$

여기서 α는 산란된 포유 광선(stray light)을 포함하는 형광의 비-소멸성 부분(non-quenchable fraction)을 나타내고, I₀는 배아를 장치에 위치시킨 후에 부재 중의 형광 강도를 나타내며, 산소 분압은 21%(분위기 농도)로부터, 장치의 수직 원통형 중공(도 11의 11.4)의 높이(4 mm)에 걸쳐 4% 산소 구배(또는 19% 분위기 포화)를 제공하는 약 17%로 떨어진다. 산소의 용해도는 38°C(인큐베이션 온도)에서 210 μM이고 구배(dC/cX)는 100 μMcm⁻¹이 된다. 38°C에서의 성장 배지 내의 확산 계수는 약 3.45*10⁻⁵ cm²s⁻¹이고, 3.45*10⁻¹² molcm⁻²s⁻¹의 플럭스를 제공한다. 튜브의 단면적은 0.00196 cm²이기 때문에, 배아 특정 호흡율은 0.677*10⁻¹⁴ mol embryo⁻¹ s⁻¹ 또는 0.546*10⁻⁹ l embryo⁻¹ h⁻¹ (0.546 nl O₂ h⁻¹)가 된다.

실시예 7. 원추형 함몰부 내의 마이크로센서

선단이 60도를 이루는 강봉을 폴리스티렌 플라스틱 판의 2cm 폭의 웰의 바닥 표면에 가압하여, 웰의 바닥에 0.04cm 깊이의 원추형 함몰부를 형성시켰다. 얇은 층의 치과용 왁스를 함몰부 주위에 직경 4mm의 원으로서 도포하였다. 약 20μl의 배양 배지를 왁스 원 내측 영역의 함몰부 내에 피펫으로 주입하고, 4일 경과된 약 100μm 직경의 쥐 배아를 함몰부의 저부에 배치한 후에, 5ml의 파라핀 오일을 웰 내에 부어 배지의 액적을 덮었다. 판을 37°C의 수조에 배치하고, 모터-구동 마이크로 조작기 내에 고정된 산소 마이크로센서의 첨단부를 함몰부 상방에 배치하였다. 배아를 향한 수직선을 따라 5μm 간격으로 산소를 측정하기 위하여, 마이크로 조작기를 제어할 수 있고 마이크로센서 증폭기로부터 신호를 수신할 수 있는 PC 소프트웨어를 프로그래밍하였다. 배아까지의 마이크로 센서 거리에 대한 측정 농도를 도 20에 도시하였다. 함몰부의 선단/바닥으로부터 약 0.015cm에 위치하는 배아 표면에서, 농도는 206μM이었고, 공식 4.4.7.을 사용하여 이 농도를 산소 소비량 0.11nl/시간으로 변환할 수 있다. 도면으로부터 알 수 있는 바와 같이, 배아 방향으로의 완전한 농도 프로파일을 측정하였고, 공식 4.4.7.을 사용하여 이 프로파일을 모델링하면 서로 잘 일치하고, 따라서 모델의 유효성을 확인할 수 있다.

참고문헌

오간 엠시.(Hogan MC.) 격리된 골격근 섬유내의 세포내 PO₂ 측정을 위한 인광 소거 방법(Phosphorescence quenching method for measurement of intracellular P_O₂ in isolated skeletal muscle fibers).

저널 어플라이드 피지올로지(J Appl Physiol). 1999 Feb; 86 (2): 720-4.

트레트낙 더블유(Trettnak W), 콜레 시(Kolle C), 레이닝어 에프(Reininger F), 돌레잘 시(Dolezal C), 올레어리 피(O'Leary P), 비노트 알에이(Binot RA). 발광 수명 검출에 기초한 광학 산소 센서 기구(Optical oxygen sensor instrumentation based on the detection of luminescence lifetime).

어드밴스트 스페이스 리서치(Adv Space Res). 1998; 22 (10): 1465-74.

게웨어 피엠(Gewehr PM), 델피 디티(Delpy DT). 폴리머 부동화 금속포르피린 프로브를 소거 및 채용하는 인광 수명에 기초한 광학 산소 센서. 파트 1. 이론과 기구(Optical oxygen sensor based on phosphorescence lifetime quenching and employing a polymer immobilised metalloporphyrin probe. Part 1. Theory and instrumentation). 메디칼 바이올로지컬 엔지니어링 컴퓨팅(Med Biol Eng Comput). 1993 1월; 31(1) : 2-10.

클리만트 아이.(Klimant,I.), 메이어 브이.(Meyer, V.), 쿨 엠.(Kuhl, M.) 1995. 섬유-광학 산소 마이크로센서, 수생 생물학에 있어서의 새로운 툴(Fiber-optic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology). 림놀로지 앤드 오셔노그래피(Limnology and Oceanography), 40 (6) 1159-1165

글루드 알. 엔.(Glud, R. N.), 램싱 엔. 비.(Ramsing, N. B.), 군데르센 제이. 케이(Gundersen, J. K.), 클리만트 아이.(Klimant, I.) (1996). 평판형 오프트로드, 해저 미생물군 내의 2차원 O₂ 분포의 미세 측정을 위한 새로운 도구(Planar optrodes, a new tool for fine scale measurements of two dimensional O₂ distribution in benthic microbial communities). 마린 에콜로지 프로그레스(Marine Ecology Progress). 시리즈(Series) 140: 217-226.

알엔 글루드(RN Glud), 제이케이 군데르센(JK Gundersen), 엔비 램싱(NB Ramsing) (2000) 인-시튜 측정을 위한 전기화학 광학 산소 마이크로센서. 수생계의 인-시튜 감시: 화학 분석 및 종형성(Electrochemical and optical oxygen microsensors for in situ measurements. In in situ monitoring of aquatic systems: Chemical analysis and speciation). 존 윌리 & 손즈 리미티드(John Wiley & Sons Ltd) 제이 버플 & 지 호바이(J Buffle & G Horvai) 편저. 2장 (Chapter 2): 19-73

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- a) 확산 장벽에 의해 정의되고 실질적인 구형 대사 입자를 함유한 배지를 포함할 수 있는 적어도 하나의 격실로서, 상기 확산 장벽은 확산에 의하여 실질적으로 구형인 대사 입자로 및/또는 대사 입자로부터 대사 전달을 가능하게 하고, 그에 따라 실질적으로 구형인 대사 입자로부터 배지까지 대사산물 확산 구배가 형성될 수 있는 적어도 하나의 격실과,
- b) 격실 내부의 대사산물의 농도를 측정하기 위한 적어도 하나의 검출기를 포함하는 것을 포함하는 실질적인 구형 대사 입자의 대사율의 비침해적 측정 장치.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 확산 장벽은 적어도 하나의 대사 물질 투과성 개구 및 배지를 구비하는 격실 벽에 의해 구성되는 장치.

청구항 3.

제2항에 있어서, 상기 격실 벽은 실질적인 대사산물 투과성 물질로 제조되는 것인 장치.

청구항 4.

제3항에 있어서, 실질적인 대사산물 투과성 물질은 대사산물 확산 계수가 수증기 대사산물 확산계수의 1% 미만이고, 바람직하게는 0.2% 미만이고, 가장 바람직하게는 0.05% 미만인 것인 장치.

청구항 5.

제2항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 격실 벽을 통한 실질적인 대사산물 투과성 물질의 대사산물의 플럭스는 격실 벽에 대한 총 대사산물 플럭스의 10% 미만, 바람직하게는 1% 미만, 더욱 바람직하게는 0.1% 미만을 이루는 것인 장치.

청구항 6.

제3항에 있어서, 실질적인 기체 투과성 물질이 플라스틱 물질, 폴리머 물질, 유리 물질, 금속 물질, 세라믹 물질 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 장치.

청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 폴리머 물질은 아세탈 수지, 아크릴 수지, 셀룰로스 플라스틱, 플루오르 플라스틱, 아오노머, 파릴렌, 폴라미드, 폴리아미드, 폴리아미드 나노복합물질, 폴리카포네이트, 폴리에스테르, 폴리이미드, 폴리올레핀, 폴리페닐 황화물, 폴리술폰, 스티렌 수지, 비닐 수지, 플라스틱 합금, 멀티플레이어 폴리머, 에폭시 수지, 올레핀 열가소성 엘라스토머, 폴리에테르 블록 아미드, 폴리부타디엔 열가소성 엘라스토머, 스티렌 열가소성 엘라스토머, 비닐 열가소성 엘라스토머, 부타디엔 고무와 같은 고무 물질, 부틸 고무, 브로모부틸 고무, 클로로부틸 고무, 폴리이소부틸렌 고무, 클로로술폰화 폴리에틸렌 고무, 에피클로로히드린 고무, 에틸렌-프로필렌 고무, 플루오로엘라스토머, 천연 고무, 네오프렌 고무, 니트릴 고무, 폴리설파이드 고무, 폴리우레탄 고무, 실리콘 고무, 스티렌-부타디엔 고무를 폴리머들 또는 이들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 것인 장치.

청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 확산 장벽은 고점성 배지로 구성되는 것인 장치.

청구항 9.

제8항에 있어서, 상기 고점성 배지는, 유기 용질이 고농도이기 때문에, 텍스트란스(dextrans), 글리세롤, 당, 탄수화물, 단백질, 및 무기 염으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 장치.

청구항 10.

전술한 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 격실의 형상은 원통형, 다면체, 원추형, 반구형 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 장치.

청구항 11.

제10항에 있어서, 상기 격실 벽의 일반적 형상은 원통형인 것인 장치.

청구항 12.

전술한 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 격실의 횡방향 치수를 조정하기 위한 삽입체를 포함하는 것인 장치.

청구항 13.

전술한 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 격실은, 치수를 변경하고 격실 벽의 부피를 증가 또는 감소시키기 위하여, 조정 가능한 저부를 구비하는 것인 장치.

청구항 14.

전술한 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 횡방향 치수는 2.5mm 미만, 바람직하게는 1.5mm 미만, 보다 바람직하게는 500 μ m 미만, 예를 들면 250 μ m 미만인 것인 장치.

청구항 15.

제12항에 있어서, 삽입체의 횡방향 치수는 1.5mm 미만, 바람직하게는 1.0mm 미만, 보다 바람직하게는 500 μ m 미만, 보다 더 바람직하게는 300 μ m 미만인 것인 장치.

청구항 16.

전술한 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 격실의 종방향 치수는 2mm 내지 25mm, 바람직하게는 3mm 내지 15mm의 범위인 것인 장치.

청구항 17.

제2항에 있어서, 대사산물 투과성 개구는 대사산물 투과성 막으로 구성되는 것인 장치.

청구항 18.

제17항에 있어서, 대사산물 투과성 막은 실리콘, 테플론 플루오로폴리머, 또는 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 또는 네오프렌과 같은 플라스틱 화합물을 포함하는 물질로 제조되는 것인 장치.

청구항 19.

제17항에 있어서, 대사산물 투과성 막은 투과성 매트릭스 또는 유리, 세라믹 또는 미네랄, 유리 섬유 또는 미네랄 섬유와 같은 다공성 물질 또는 금 또는 백금과 같은 귀금속을 포함하는 물질로 제조되는 것인 장치.

청구항 20.

제17항에 있어서, 대사산물 투과성 막은 실리콘을 포함하는 물질로 제조되는 것인 장치.

청구항 21.

전술한 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 대사산물 투과성 층은 적어도 하나의 격실의 저부에 배치되는 것인 장치.

청구항 22.

제21항에 있어서, 대사산물 투과성 층은 실리콘, 테플론 플루오로포리머, 또는 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 또는 네오프렌과 같은 플라스틱 화합물을 포함하는 물질로 제조되는 것인 장치.

청구항 23.

제21항에 있어서, 대사산물 투과성 층은 투과성 매트릭스, 또는 유리, 세라믹, 미네랄, 유리 섬유 또는 미네랄 섬유와 같은 다공성 물질, 또는 금 또는 백금과 같은 귀금속을 포함하는 물질로 제조되는 것인 장치.

청구항 24.

제21항에 있어서, 대사산물 투과성 층은 실리콘을 포함하는 물질로 제조되는 것인 장치.

청구항 25.

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 대사산물 투과성 층의 두께는 적어도 100 μ m, 바람직하게는 적어도 300 μ m, 보다 바람직하게는 적어도 900 μ m인 것인 장치.

청구항 26.

전술한 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 대사산물 검출기는 격실의 저부에 배치되는 것인 장치.

청구항 27.

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 대사산물 투과성 층은 실질적으로 구형인 대사 입자와 대사산물 검출기 사이에 배치되는 것인 장치.

청구항 28.

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 대사산물 투과성 층은 두께가 실질적으로 구형인 대사 입자의 직경의 적어도 2배인 것인 장치.

청구항 29.

진술한 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 대사산물을 기체인 것인 장치.

청구항 30.

진술한 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 대사산물은 산소 또는 이산화탄소인 것인 장치.

청구항 31.

진술한 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 검출기는 산소 검출기인 것인 장치.

청구항 32.

제31항에 있어서, 산소 농도를 검출하기 위한 장치는 전류 측정식 산소 센서, 막 유입 질량 분광법(membrane inlet mass spectrometry), 마이크로 분광 광도법(microspectrophotometry), 광학 산소 감지를 포함하는 것인 장치.

청구항 33.

제32항에 있어서, 광학 산소 감지는, 발광체, 특히 격실 내에 배치된 고정 발광체, 보다 구체적으로는 격실 내의 저부에 배치된 고정 발광체 및 발광 검출기를 이용하여 실시되는 것인 장치.

청구항 34.

제33항에 있어서, 상기 발광체는 폴리스티렌 기재 내의 고정된 루테튬(II)-트랜스-4,7-디페닐-1,10-페나트롤린 과염소산염, 루테튬(II)-트랜스-1,7-디페닐-1,10-페나트롤린 염소산염, 루테튬(II)-트리스(비피리딜)복합체, 트리스(2,2'-비피리딜-디-클로로-루테튬)헥사-하이드레이트, Ru(bpy), 폴리스티렌 내의 플래티늄(II)-옥타-에틸-포르피린, 폴리(메틸-메타크릴레이트)내의 플래티늄(II)-옥타-에틸-포르피린, 폴리스티렌 내의 플래티늄(II)-옥타-에틸-케토-포르피린, 플래티늄(II)-옥타-에틸-케토-포르피린, 폴리스티렌 내의 팔라듐(II)-옥타-에틸-포르피린, 플래티늄-1,2-엔-디티올레이트 화합물의 군을 포함하는 기구.

청구항 35.

제33항에 있어서, 상기 발광 검출기는 발광 판독기, 광전자 배증관 또는 CCD 카메라(12)인 기구.

청구항 36.

- a) 제1항 내지 제35항 중 어느 하나의 항에서 정의된 적어도 하나의 기구를 제공하고,
- b) 격실의 배지 내의 실질적인 구형 대사 입자를 배열하여,
- c) 대사산물 농도 수치를 얻어 격실 내의 대사산물 농도 측정, 및
- d) 상기 실질적인 구형 대사 입자의 대사율을 상기 대사산물 농도 수치와 상관짓는 것을 포함하는 실질적인 구형 대사 입자의 대사율을 측정하는 비침해적인 방법.

청구항 37.

제36항에 있어서, 대사산물은 확산에 의하여 배지를 통해 실질적인 구형 대사 입자에 공급되는 방법.

청구항 38.

제36항 내지 제37항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 실질적인 구형 대사 입자는 격실 내에서 배양되는 방법.

청구항 39.

제36항 내지 제38항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 대사산물 농도는 격실의 체적 및/또는 배지의 체적보다 작은 체적으로 측정되는 방법.

청구항 40.

제36항 내지 제39항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 실질적인 구형 대사 입자의 대사산물 농도는 측정된 대사산물 농도 및 상기 대사산물 확산 구배와 상기 실질적인 구형 대사 입자의 상관성에 기초한 격실 내의 대사산물 농도를 결정하는 것으로 결정되는 방법.

청구항 41.

제36항 내지 제40항 중 어느 하나의 항에 있어서, 적어도 2 이상의 대사산물 농도 측정 방법을 수행하는 방법.

청구항 42.

제36항 내지 제41항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 대사산물 농도는 기체 분압인 방법.

청구항 43.

제42항에 있어서, 상기 기체 분압은 산소 분압 또는 이산화탄소 분압인 방법.

청구항 44.

제36항 내지 제43항 중 어느 하나의 항에 있어서, 기체는 확산에 의하여 대기 또는 대기와 평형을 이룬 대용량의 배지로부터 직접적으로 격실 내의 정체 배지를 통해 실질적인 구형 대사 입자에 공급되는 방법.

청구항 45.

제36항 내지 제44항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 실질적인 구형 대사 입자는 배아의 균, 암세포, 줄기세포, 배아 줄기세포, 예쁜 꼬마 선충(*C. elegans*) 또는 다른 작은 다세포 생물과 같은 세포의 균으로부터 선택하는 것인 방법.

청구항 46.

제45항에 있어서, 상기 실질적인 구형 대사 입자는 배아인 방법.

청구항 47.

제36항 내지 제46항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 대사산물 농도 측정은 격실 외부로부터 격실으로 대사산물을 확산적으로 공급하는 것을 임시 중단한 후에 수행하는 방법.

청구항 48.

- a) 적어도 하나의 배지가 있는 격실으로 구성된 기구를 제공하여,
- b) 격실의 배지내에서 실질적인 구형 대사 입자를 배양하고,
- c) 대사산물 농도 수치를 얻어 격실 내의 대사산물 농도 측정을 하고, 선택적으로,
- d) 상기 실질적인 구형 대사 입자의 대사율을 상기 대사산물 농도 수치와 상관짓는 것, 및 선택적으로
- e) 상기 실질적인 구형 대사 입자의 대사율 및/또는 대사 농도 수치에 의존하는 대사산물 공급을 조절하는 것을 포함하는 실질적인 구형 대사 입자로 대사산물을 공급하는 것을 조절하는 방법.

청구항 49.

제48항에 있어서, 적어도 하나의 기구는 제1항 내지 제35항 중의 하나에서 정의한 것인 방법.

청구항 50.

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 대사산물은 기체인 방법.

청구항 51.

제50항에 있어서, 상기 대사산물은 산소이고, 그 대사과정은 호흡인 방법.

청구항 52.

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 조절은 격실 외부의 대사산물 농도를 변화시킴으로써 수행하는 방법.

청구항 53.

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 조절은 격실의 치수를 변화시킴으로써 수행하는 방법.

청구항 54.

제53항에 있어서, 상기 체적은 삽입체를 삽입함으로써 조정하는 방법.

청구항 55.

제53항에 있어서, 격실의 횡치수는 삽입체를 삽입함으로써 조정하는 방법.

청구항 56.

제53항에 있어서, 상기 체적은 격실의 조정가능한 저부의 위치를 이동시킴으로써 조정하는 방법.

청구항 57.

제53항에 있어서, 상기 조절은 격실의 확산 장벽을 변화시킴으로써 수행하는 방법.

청구항 58.

제53항에 있어서, 상기 확산 장벽은 격실벽의 두께를 변화시킴으로써 변화시키는 방법.

청구항 59.

제53항에 있어서, 상기 조절은 적어도 1 이상의 개구의 크기를 변화시킴으로써 수행하는 방법.

청구항 60.

- a) 배양 중에 적어도 한번 이상 배아의 대사율을 측정하고,
- b) 최적의 대사율을 갖는 배아를 선택하는 것을 포함하는 생존가능한 배아의 선택 방법.

청구항 61.

제60항에 있어서, 상기 대사율의 결정은 배아가 경험한 성장 환경을 일체 변화시키지 않고 수행하는 방법.

청구항 62.

제60항 내지 제61항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 대사율은 제1항 내지 제35항 중의 하나의 항에서 정의한 기구에 의하여 측정하는 방법.

청구항 63.

제60항 내지 제61항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 대사율은 제36항 내지 제47항 중의 하나의 항에서 정의한 방법에 의해서 결정하는 방법.

청구항 64.

- a) 적어도 하나의 제1항 내지 제35항 중의 하나의 항에서 정의한 기구를 제공하고,
- b) 격실의 배지 내에서 대사 입자를 배양하여,
- c) 배양기간 중 적어도 한 부분 동안 배지에 대사산물 공급을 감소시키는 것,
- d) 대사산물 공급이 감소한 뒤 대사산물 농도 수치를 얻어 격실내 대사산물 농도측정을 하는 것, 및
- e) 상기 실질적인 구형 대사 입자의 대사율을 상기 대사산물 농도 수치와 상관짓는 것을 포함하는 대사입자의 대사율을 결정하는 비침해적인 방법.

청구항 65.

제64항에 있어서, 상기 대사산물은 산소이고, 상기 대사율은 호흡률인 방법.

청구항 66.

제64항에 있어서, 상기 산소 공급이 0 까지 감소하는 방법.

청구항 67.

제64항에 있어서, 격실 내의 상기 기체 분압 수치는 산소 공급이 감소된 기간 동안에 얻는 방법.

청구항 68.

적어도 하나 이상의 격실으로 이루어져 있으며, 상기 격실은 확산 장벽으로 정의되며, 대사 입자를 함유한 배지로 구성될 수 있고, 상기 확산 장벽은 대사입자로부터 배지까지에 형성된 대사산물의 확산 구배에 의하여 대사 입자로 및/또는 대사 입자로부터 대사산물이 전달하는 것을 가능하게 하는 대사 입자를 배양하는 배양기.

청구항 69.

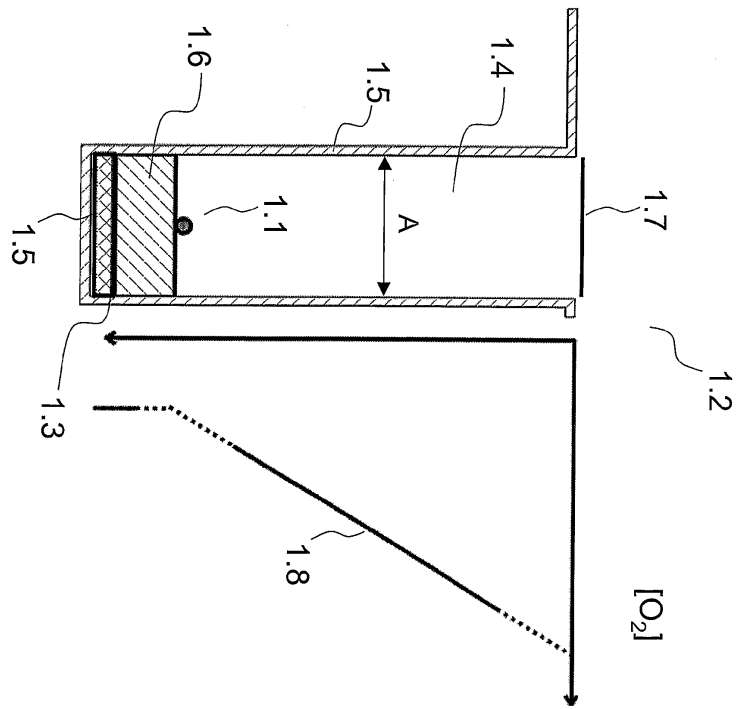
제68항에 있어서, 상기 기구는 적어도 1 이상의 제1항 내지 제35항 중의 하나에서 정의한 특징을 갖는 기구.

청구항 70.

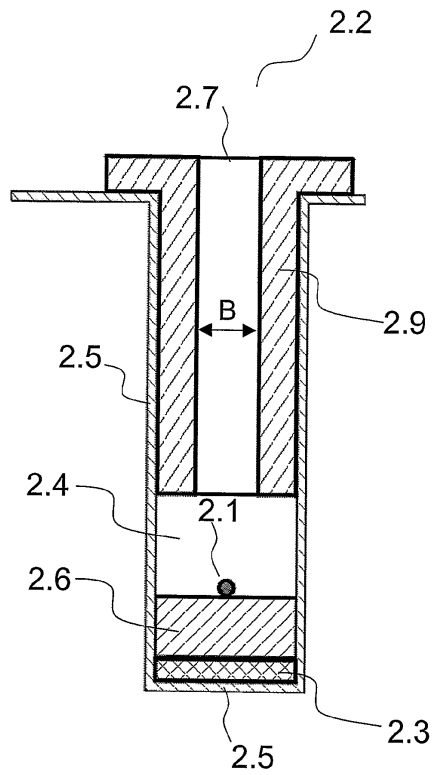
- a) 적어도 하나의 제68항 내지 제69항 중의 하나의 항에서에서 정의한 기구를 제공하여,
- b) 상기 격실의 배지 내에서 대사 입자를 배열하여
- c) 대사 입자를 배양하는 것을 포함하는 대사 입자의 배양 방법.

도면

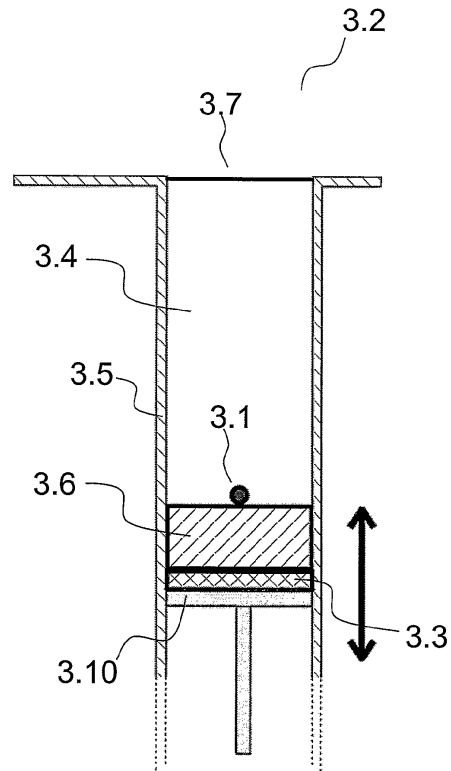
도면1



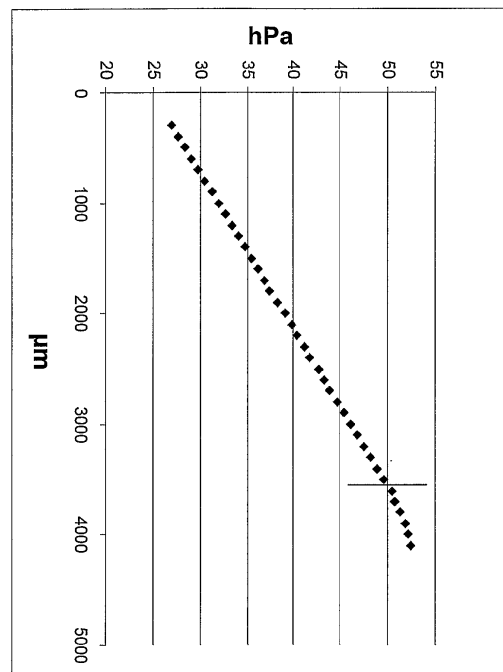
도면2



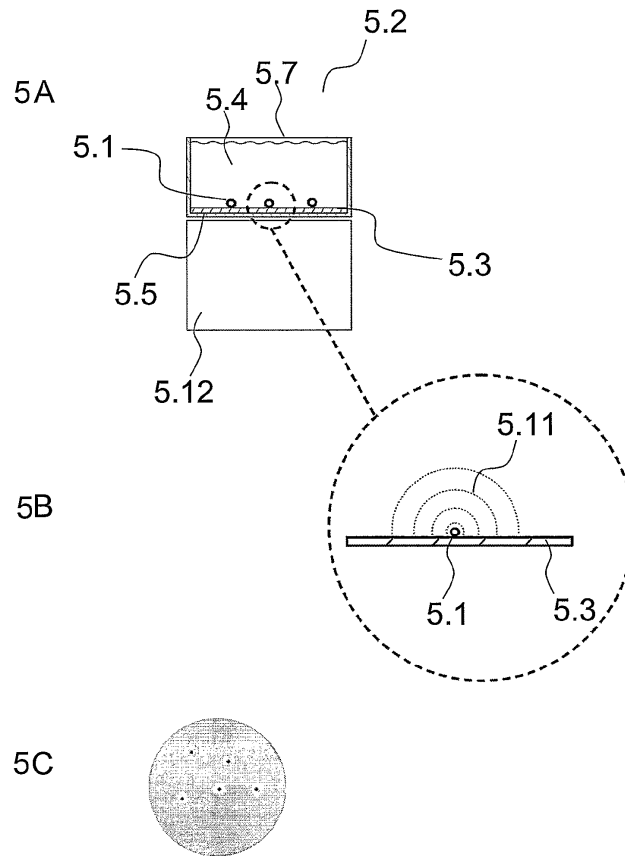
도면3



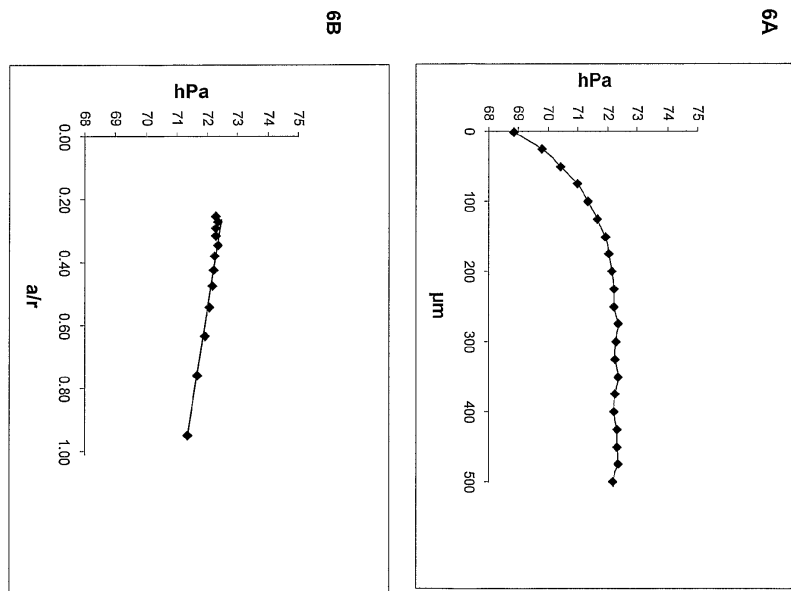
도면4



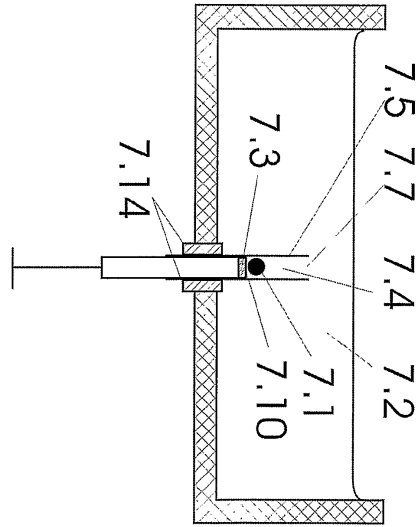
도면5



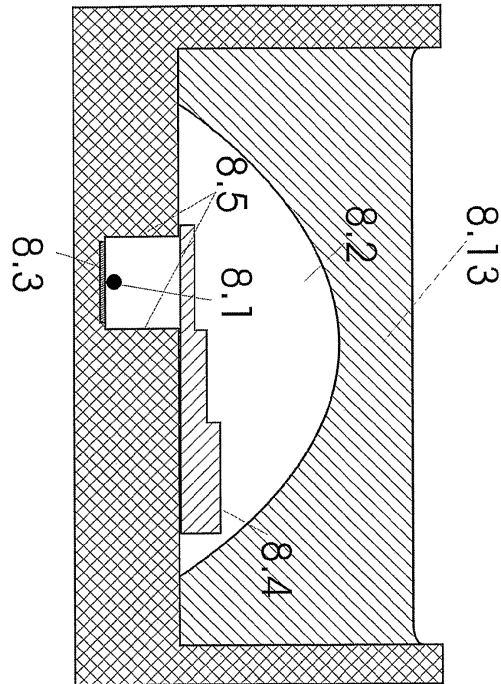
도면6



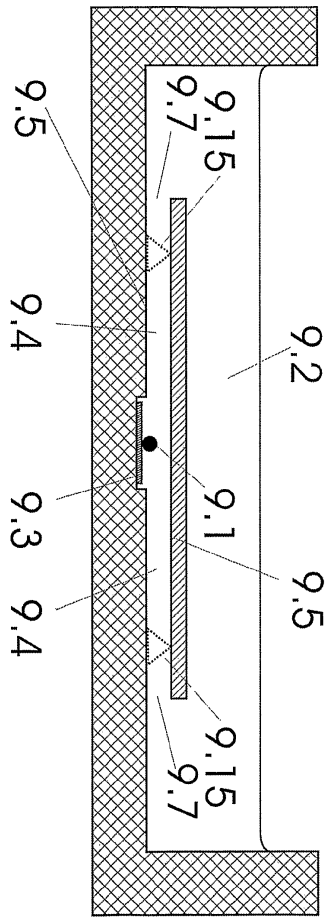
도면7



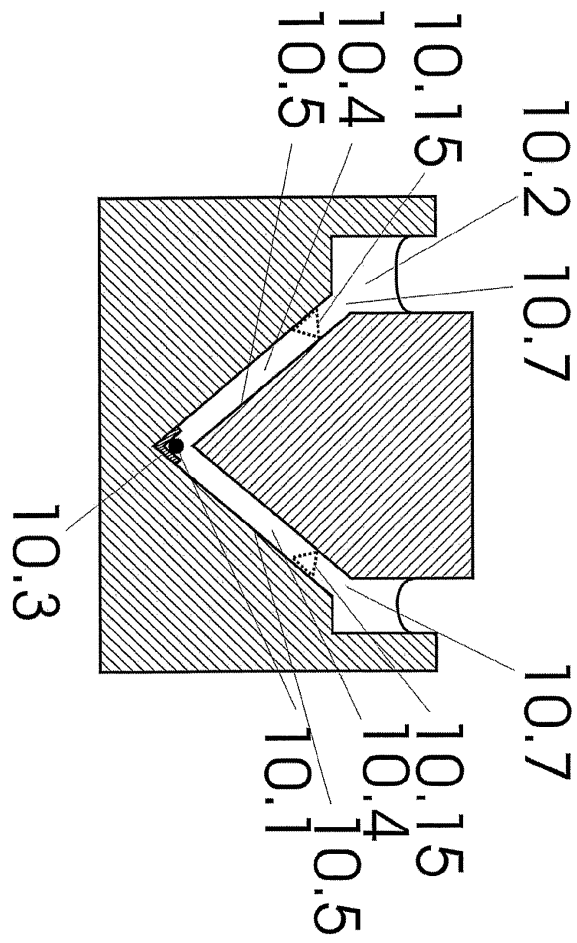
도면8



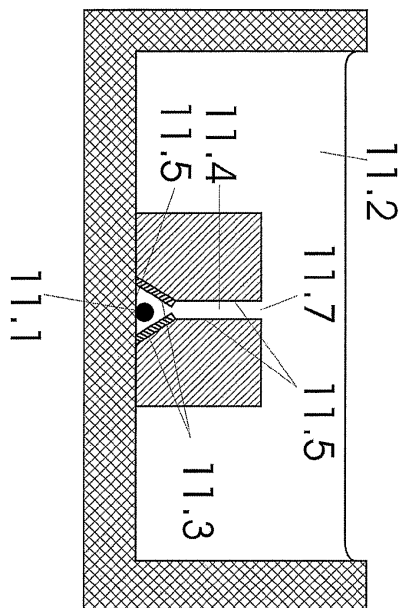
도면9



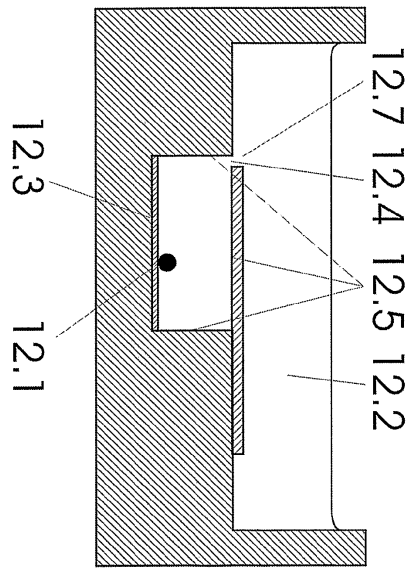
도면10



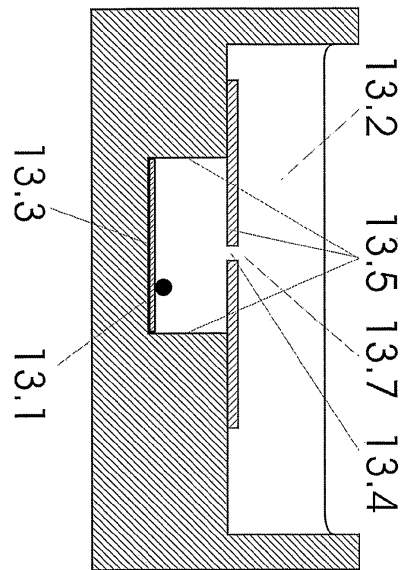
도면11



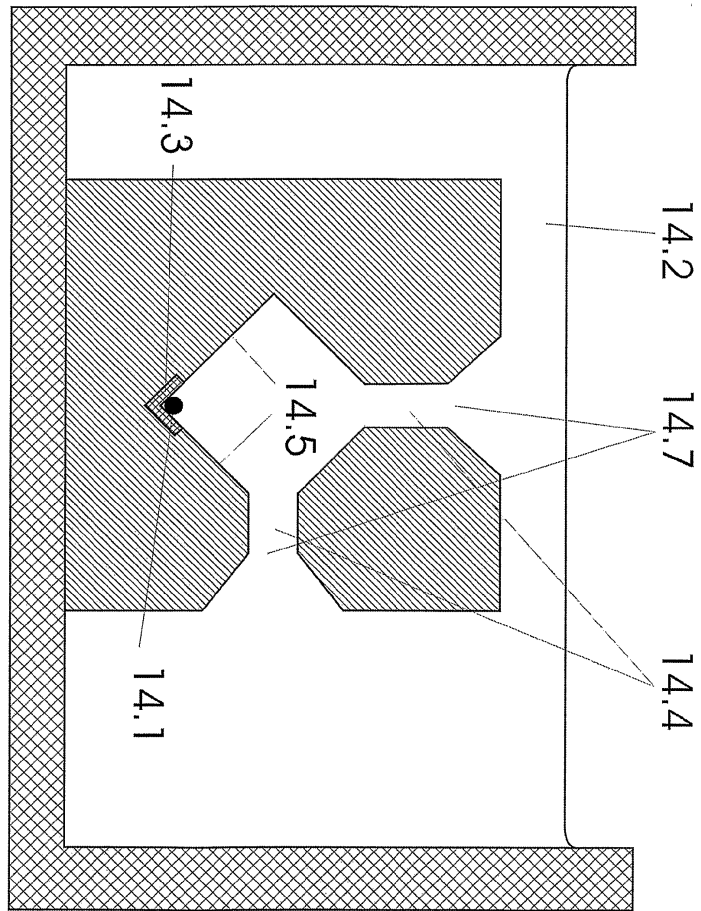
도면12



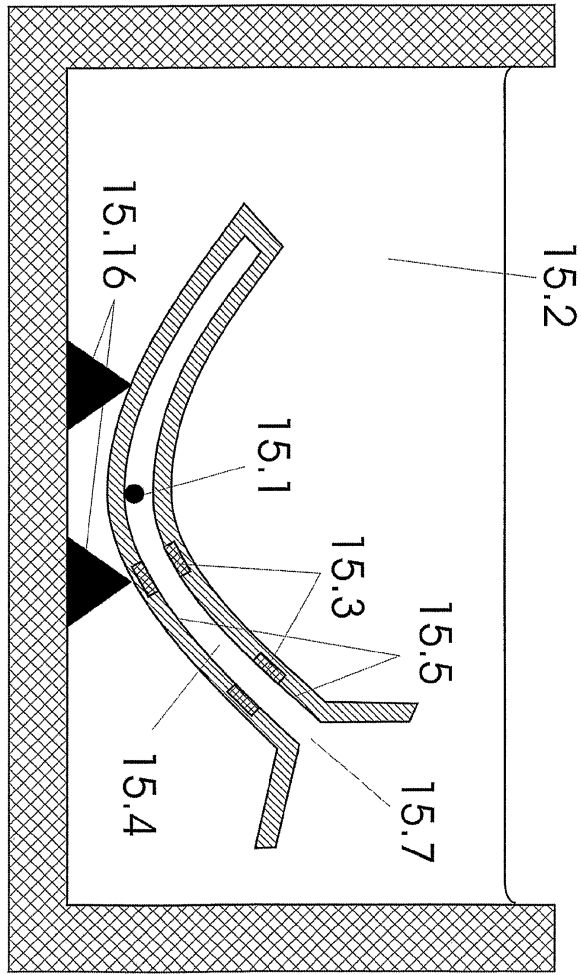
도면13



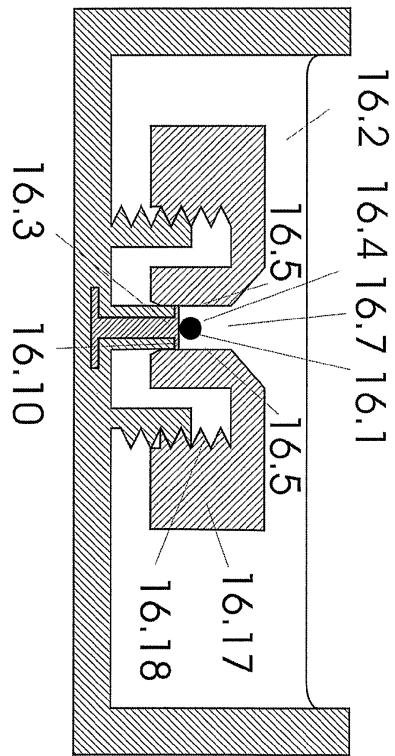
도면14



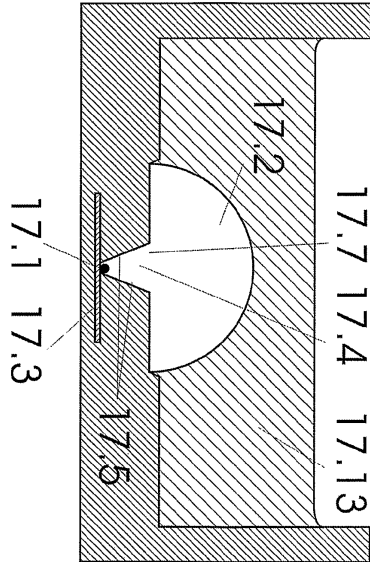
도면15



도면16

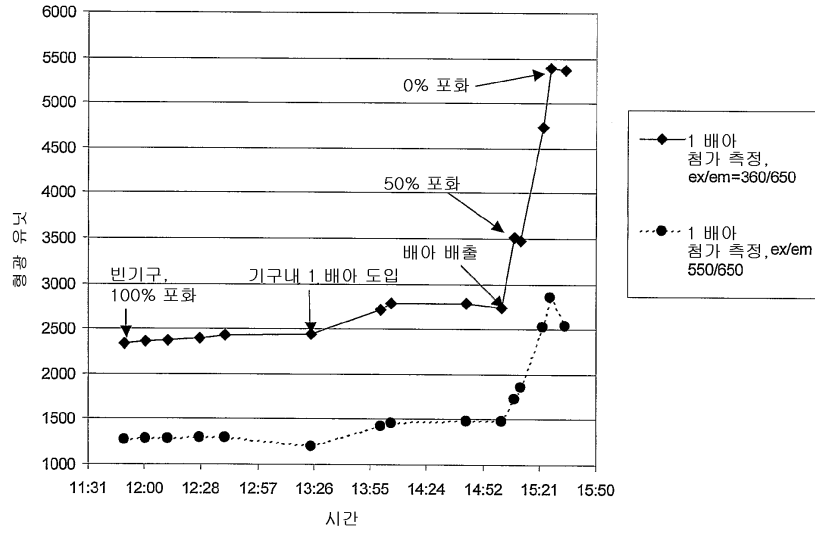


도면17



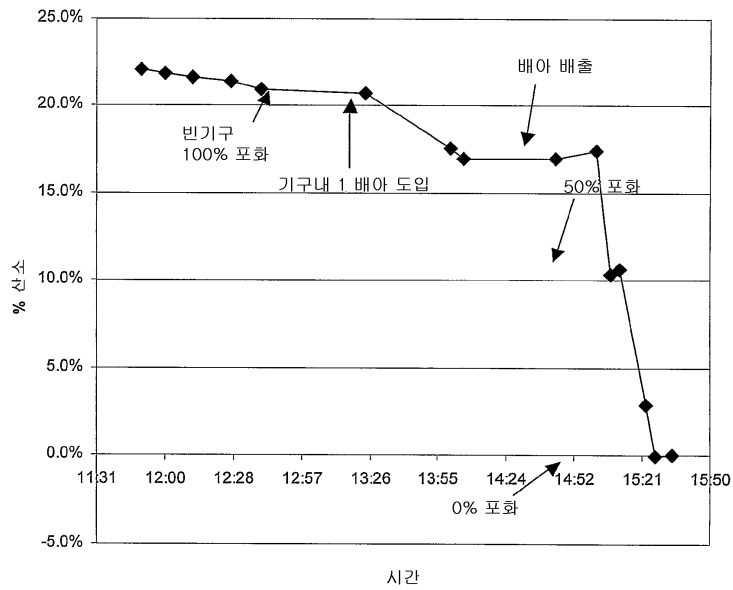
도면18

형광 1 배아 첨가 측정

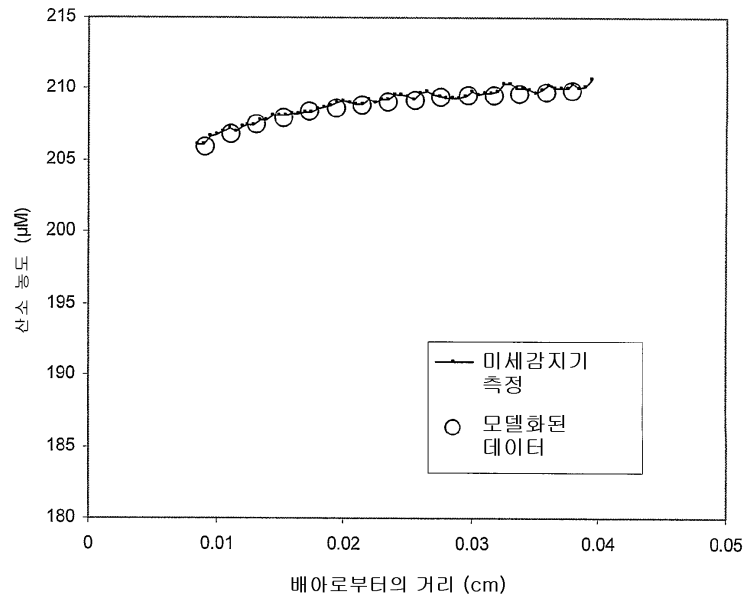


도면19

측정치, 1 배아 첨가 측정



도면20



专利名称(译)	非侵入性测量方法和基本球形代谢颗粒的个体代谢速率的机制		
公开(公告)号	KR1020060058664A	公开(公告)日	2006-05-30
申请号	KR1020057011920	申请日	2003-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	UNISENSE		
申请(专利权)人(译)	你感觉A / S 你感觉舒服联合社上水电技术		
当前申请(专利权)人(译)	你感觉A / S 你感觉舒服联合社上水电技术		
[标]发明人	OTTOSEN LARS DITLEV MORCK 오토센라르디틀레브모르크 RAMSING NIELS B 람싱닐비 DAMGAARD LARS R 담가르드라르알 GUNDERSEN JENS K 군더센얀케이		
发明人	오토센라르디틀레브모르크 람싱닐비. 담가르드라르알. 군더센얀케이.		
IPC分类号	G01N33/483 G01N33/497 A61B5/00 A61B5/083 C12N5/06 C12N5/12 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/5088 G01N33/5091 G01N33/5038 C12M1/34		
代理人(译)	PARK , JANG WON		
优先权	60/439450 2003-01-13 US 200202001 2002-12-23 DK		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于测量基本上球形的代谢颗粒(例如胚胎)的代谢速率的非侵入性比较方法和装置,以及用于调节胚胎水平的氧分压的方法和装置。本发明还涉及控制代谢物向基本上球形的代谢物供应的方法,以及选择具有预定质量的基本上球形的代谢物的方法。本发明在能够在装置的隔室内的基本上球形的代谢颗粒与隔室外部环境之间形成代谢物的扩散梯度的装置中被破坏。代谢率基于代谢物扩散梯度的信息确定。1 指数方面 扩散, 代谢颗粒, 胚胎, 代谢率

