

전해질 고분자 코팅 표면을 이용한 세포칩 제작

정현호, 송환문, 이창수*

충남대학교 화학공학과
305-764 대전광역시 유성구 궁동 220

(2010년 11월 17일 접수; 2010년 12월 29일 수정본 접수; 2011년 1월 3일 채택)

Fabrication of Cell Chip through Eco-friendly Process

Heon-Ho Jeong, Hwan-Moon Song and Chang-Soo Lee*

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-Dong, Yu-Seong Gu, Daejeon, 305-764, Korea

(Received for review November 17, 2010; Revision received December 29, 2010; Accepted January 3, 2011)

요 약

본 연구 논문은 수용액 기반의 청정 표면 개질 기술을 이용하여 세포칩을 제작하는 방법에 관한 것이다. 세포칩의 활용범위는 유전학, 의생물학, 세포생물학등과 같은 기초학문과 더불어 암 진단 및 치료에 대한 유용한 도구로 응용 가능성을 가지게 된다. 기존의 세포 칩 제작을 위해서는 다량의 유기용매의 사용, 반도체 공정의 복잡성, 고가의 장비등을 사용함으로써 인해 경제적 손실과 환경적 악영향을 주었다. 본 연구에서는 수용액 기반의 청정 표면 개질 기술과 마이크로컨택트프린팅 방법을 이용한 세포패터닝 기술을 융합하여 매우 손쉬운 세포칩 구현을 하는 기반 기술을 제시하였다. 이 세포칩을 이용하여 암세포와 정상 세포간의 세포표면에서 발현되는 다양한 탄수화물 및 그의 유도체의 발현양의 차이를 분석할 수 있었다. 이를 바탕으로 새로운 암진단 기술 및 기초 의공학 기술에 활용하고자 한다.

주제어 : 세포 패터닝, 청정기술, 표면개질, 세포칩, 암진단

Abstract : This study presents a fabrication method of cell-chip using aqueous solution based surface modification. The applications of cell-chip have potential for fundamental study of genetics, cell biology as well as cancer diagnostics and treatment. Conventional methods for fabrication of cell-chip have been limited in economic loss and environmental pollution because of the use of harsh organic solvent, complex process of silicon technology, and expensive equipment. In order to fabricate cell chip, we have proposed simple and eco-friendly process combined polyelectrolyte multilayer coating with microcontact printing. For the proof of concept, the cell chip can be applied to analyze the different expression of cell surface glycans and derivatives between cancer and normal cells. Our proposed method is useful technique for the application of novel cancer diagnostics and basic medical engineering.

Keywords : Cell patterning, Clean technology, Surface modification, Cell-chip, Cancer diagnostics

1. 서 론

세포를 표면에 마이크로 수준으로 어레이(array) 시키는 세포 패터닝(cell patterning) 기술은 세포를 기반으로 하는 기본적인 세포생물학, 의생물학, 조직공학 등과 같은 연구를 효과적으로 수행할 수 있는 중요 기술이다. 최근, 세포 패터닝 기술을 이용하여 제작된 세포칩은 바이오센서(biosensor)와 생체 전자공학(bioelectronics)의 발전을 이룩하였다[1,2].

세포는 표면과 상호작용을 하기 때문에 세포를 손쉽게 다루기 위해서는 부착되는 표면의 환경이 중요하다. 표면의 환

경에 따라 단 세포에서 다세포까지 패터닝이 가능하며 세포-세포, 세포-표면 간의 상호작용을 조절할 수 있게 된다. 또한, 부착된 세포는 주변 환경에 의해 성장, 증식 분화, 자연사가 달라지기 때문에 세포-표면 간의 안정적인 상호작용을 위한 적합한 환경을 제공하는 것은 중요하다[3]. 따라서 세포 패터닝을 위해서는 표면 개질 기술이 중요함을 나타낸다.

세포 패터닝을 위한 기존의 표면 개질 기술은 마이크로컨택트프린팅(microcontact printing) 방법에 의해 금 표면 위에 자가조립단분자막(self assembled monolayer, SAM)을 형성하여 수행되어 왔다[4]. 마이크로컨택트프린팅 방법을 이용한 패턴 형성은 소프트리소그래피(softlithography) 공정에 의해 제작된 마이크로구조를 가진 PDMS 스탬프를 이용하여 구현하

* To whom correspondence should be addressed.
E-mail: rhadum@cnu.ac.kr

고자 하는 물질을 잉크로 이용하여 손쉽게 표면에 패턴을 형성할 수 있다. 표면에 형성된 SAM은 표면에 카르복실과 알데하이드 그룹등 다양한 기능을 나타내며, 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 단백질과 공유결합을 한다. 세포외기질은 세포가 부착 및 성장할 수 있는 환경을 제공하여 안정적인 세포 패턴링을 수행할 수 있다. 그러나 기존의 방법은 복잡한 반도체 공정과 고가의 장비를 필요로 하며, SAM은 알칸 티올(alkane thiol) 물질로서 다량의 유기용매가 요구될 뿐만 아니라 금 표면을 사용하여 환경적 악영향과 경제적 손실을 가져온다. 따라서, 친환경적이며 자원을 절약할 수 있는 청정 기술이 요구된다.

다양한 표면 개질 중 고분자 전해질(polyelectrolyte)을 이용한 수용액 기반의 다층박막 형성은 전기변색 박막(electrochromic thin films), 광전지(photovoltaic) 등과 생물학 분야에서는 조직공학(tissue engineering), 약물전달(drug delivery)에 응용되고 있다[5,6]. 다층박막은 수용성이면서 전하를 가진 고분자를 다양하게 이용하기 때문에 경제적이며 친환경적인 공정이다. 따라서, 기존의 환경오염의 유발 및 생체독성의 문제점이 있는 유기용매를 기반으로 하는 화학반응을 대체할 수 있는 기술로 응용 가능 할 것으로 기대된다. 다층박막으로 형성된 고분자 전해질은 나노구조체를 가지면서 표면의 전하량 조절이 가능하여 관심이 급증하고 있다. 고분자 전해질을 이용한 다층박막은 자가조립에 의해 형성되어 기존의 진공증착(vacuum deposition), Langmuir-Blodgett 기술에 의한 박막 형성보다 균일한 표면 개질이 되며 다양한 장치 제작에 응용이 가능한 이점이 있다. 본 논문에서는 세포칩을 제작하기 위한 표면개질 기술로 고분자 전해질을 이용한 다층박막을 이용하여 세포가 안정적으로 부착될 수 있는 표면을 제공하여 세포패터닝을 수행하여 친환경적인 세포칩을 제작하여 세포의 생물학적 변화를 관찰하는데 응용하고자 한다.

세포생물학에서 탄수화물은 다양한 생물학적 기능을 가지고 있어 관심이 급증하고 있다. 특히, 세포 표면에 발현하는 탄수화물은 단백질과 결합하여 당단백질 복합체를 형성하며 탄수화물은 단백질의 접힘(Protein folding)과 안정성에 영향을 주며, 세포성장, 이동, 신호전달, 분화, 암전이, 세균 감염, 등 생리학 및 병리학적 현상을 조절하여 중요성이 강조되고 있다[7-11]. 특히, 암세포에서 비정상적인 탄수화물의 발현이 나타나면서 그에 대한 기능과 진단 및 치료에 관심이 급증하고 있다[12,13]. 암세포에서의 비정상적인 탄수화물 발현은 크게 구조적인 변화와 과발현(overexpression)형태로 나타나게 되어, 세포에서 발현되는 글리칸의 정량 및 정성 분석은 필수불가결하게 되었다[14].

Lectin 단백질은 탄수화물과 특이적인 결합을 하는 단백질로 세포 표면 탄수화물을 효과적으로 분석할 수 있으며, lectin을 이미징화시키기 위해 형광을 나타내는 반도체 나노 입자인 양자점(Quantum dots, QDs)과 결합하여 더욱 손쉬운 정량 분석이 가능하게 된다. QDs은 기존의 유기염료의 단점인 광표백(Photobleaching) 현상을 해결하여 장시간 검출이 가능하며, 형광소멸이 없어 정확한 분석을 할 수 있다. 또한 다양

한 표면 개질을 통하여 lectin 및 생체분자와 결합이 가능하여 세포생물학 및 바이오센서와 같은 분야에 유용하게 이용될 수 있다[15]. 따라서, 본 논문에서는 고분자전해질을 이용한 표면개질 기술을 기반으로 구현된 세포 패턴링 기술을 이용하여 친환경적인 세포칩을 제작 및 응용하고자 한다.

2. 실험방법

2.1. Fabrication of cell patterned surface

우선적으로 세포가 부착하여 성장할 수 있는 환경을 제공하기 위해 유리 표면을 고분자 전해질(polyelectrolyte)로 표면 개질 수행하였다. 본 실험에서 이용되는 기판은 유리를 이용하였으며 초음파세척기에서 아세톤, 에탄올, 증류수의 물질 순서로 5분간 세척하였으며 질소가스로 수분을 제거한 후 산소 플라즈마(Model PDC-002, HARRIC plasma)로 30초간 처리하여 표면의 젖음성을 증가시켰다. 유리위로 전해질고분자의 코팅은 spin coater (4,000 rpm, 15초)를 이용하여 수행하였으며 양이온고분자물질로써 PAH (20 mM, pH: 9.0) 첫번째 층을 코팅하고 증류수로 세척을 한 후 음이온고분자물질로 PSS (20 mM, pH: 9.0)을 코팅 후 증류수로 세척한다. 이 공정을 4번 반복한 후 최종적으로 PAH 고분자로 (PAH5/PSS4) 코팅하였다. 최상층은 음전하를 띠고 있는 세포와 정전기적 인력을 유도하기 위해 양전하를 띠도록 제작되었다.

세포의 부착을 방지하기 위하여 고분자 전해질로 표면 개질된 유리기판 위에 PDMS 구조체를 간편한 마이크로컨택트 프린팅(microcontact printing) 방법으로 제작하였다(Figure 1). 고분자 전해질로 코팅된 기판은 PDMS 스탬프를 이용하여 마이크로 컨택트 프린팅방법에 의해 PDMS패턴을 형성하였다. PDMS 스탬프는 PDMS와 crosslinking 물질을 10:1로 섞어준 후 casting method에 의해 양각의 사각형모양으로 제작된 실리콘 마스터 위에서 열경화(65 °C, 12시간)로 제작되었다.

PDMS 패턴을 제작하기 위한 PDMS용액은 PDMS 고분자 : epoxy-PDMS : cross-linking 물질의 비율을 2 : 1 : 0.3으로 이루어져있으며 클로로포름용매에 200 mg/mL의 비율로 희석시켜 준비되며, 유리기판위에서 2000 rpm / 20초간 스핀 코

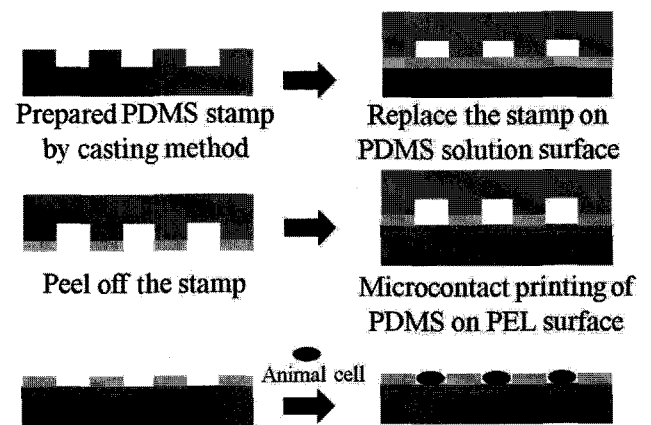


Figure 1. Schematic diagram of cell patterning.

팅하여 얇은 PDMS 용액 막을 형성 시켰다. 이 후 PDMS 스탬프를 PDMS 막으로 형성된 유리 위에 접촉시킨 후 고분자 전해질로 코팅된 기판 위에 위치시킨다. 그 다음 65 °C에서 30분간 일차 경화를 수행했으며 PDMS 스탬프를 제거 후 3시간 최종경화를 하였다. PDMS 용액에는 epoxy-PDMS가 함유되어 있어 PAH 고분자 전해질에 있는 아민 그룹과 공유결합을 하여 안정적인 구조체를 형성 할 수 있다. PDMS는 소수성 성질을 가지고 있어 친수성인 세포와의 친화도(affinity)가 적어 부착이 어렵다.

2.2. Cell patterning

본 실험에서 이용된 세포종류는 암세포 : HCT116, 정상세포 : human dermis fibroblast이다. 세포 패터닝에 앞서 제작된 기판은 외부의 박테리아나 곰팡이균으로부터 오염방지를 위해 클린벤치안에서 UV로 12시간 동안 소독을 마친 후 사용되었다. 세포 패터닝 순서는 다음과 같다. 처음 세포증식기판에서 성장하고 있는 세포의 배지를 제거한 후 PBS buffer (pH 7.2)로 2번 세척하였다. 이 후 trypsin-EDTA 용액을 이용하여 세포를 부유화 시키고 원심분리(1,000 rpm / 3 min)로 침전시켜 trypsin-EDTA 를 제거하였다. 세포의 농도는 100,000 마리/mL로 하였으며 최종적으로 50 μ L를 각 패턴에 주입, 패턴당 5,000마리로 고정하여 실험을 수행하였다.

이 후 기판은 37 °C CO₂ 인큐베이터에서 30분 동안 부착시간을 주어 각 패턴에 세포를 고정화 하였다. 부착하지 못한 세포는 배지로 제거하였다. 이때 배지의 구성은 DMEM : FBS : antibiotics(항생제) = 89% : 10% : 1%로 하였다. 이 후 24시간 동안 세포의 안정화 및 성장시간을 주고 글리칸 분석을 수행하였다.

2.3. Preparation of lectin-labelled quantum dots

2.3.1. Synthesis of quantum dots

Quantum dots (CdSe/ZnS; core-shell 나노입자)은 반도체의 선구자물질을 이용하여 반응기인 삼구 플라스크안에서 합성되었다. 반응기에 12.7 mg의 CdO and 160 mg의 lauric acid를 넣고 연속적인 질소가스 주입하며 교반하였다. 반응기의 온도가 200 °C일 때 1.94 g의 TOPO와 1.94 g의 HDA를 넣어 주고 강하게 교반을 한 후, 온도가 290 °C도 도달될 때 TOP(2 mL)에 녹여져 있는 80 mg의 selenium을 반응기 안에 강하게 주입시킨 후 5분 동안 반응하였다. Shelling 물질로서 1 mL의 Et₂Zn (0.7 mmol), 0.25 mL의 (TMS)₂S (0.6 mmol)를 2 mL의 TOP 용매에 넣어 녹인 후 200 °C의 반응기에 1분 동안 서서히 주입 시켜주었다. 이 후 반응 온도는 180 °C 정도로 1시간 동안 shelling을 하였다. 반응이 끝나면 온도를 상온으로 낮추고 QDs 세척과정을 수행하였다. 세척용액은 클로로포름과 메탄올을 1:1 비율로 섞어 사용하였으며 침전 및 부유화 과정을 3회 반복하여 미반응 물질을 제거하였다. 최종적으로 만들어진 QDs은 클로로포름에 희석하여 밀봉을 한 후 4 °C 냉장고에 보관하였다.

2.3.2. Surface modification of quantum dots

QDs을 친수화하기 위해 리간드 치환방법에 의해 표면에 있는 TOPO를 MAA로 표면 개질을 수행하였다. MAA를 QDs에 뿌영게 될 때까지 넣어준다. 60 °C에서 12시간 동안 반응을 수행하였다. 표면 개질 된 입자는 PBS buffer를 이용하여 클로로포름과 층 분리하였으며, MAA-QDs은 nanospin-centricon filter (Mw. 5 kDa)를 이용 분리 정제 과정을 수행하였다. 이때 얻어진 QDs은 PBS buffer (pH 7.2/ 10 mM)에서 5 μ M의 농도로 희석시킨 후 밀봉을 한 후 4 °C 냉장고에 보관하였다.

2.3.3. Bioconjugation of quantum dots and lectin

표면 개질된 친수성 QDs은 SBA lectin과 결합을 수행하였다. 10 μ M의 QDs과 10 μ M의 SBA lectin 농도로 준비한 후 EDC/sulfo-NHS를 이용하여 입자의 카복실그룹과 SBA lectin의 아민그룹간의 결합을 유도하였다 이때 EDC/sulfo-NHS는 정량적으로 QDs과 SBA lectin의 10배수인 100 μ M (EDC : 200 nL, sulfo-NHS 40 μ g/mL)과 반응하였다. 추가적으로 입자응집을 방지하기 위해 NaCl을 10 μ M의 농도로 넣어주어 적정한 후 상온에서 약한 교반으로 1시간 동안 수행하였다.

SBA-QDs의 반응 후, BSA 용액을 20 μ M의 농도로 맞춘 후 반응기에 넣어 상온에서 1시간 동안 반응을 시켰다. 그 다음 4 °C 냉장고에서 12시간 동안 보관하였다. 미 반응 물질을 제거하기 위해 원심분리기 내에서 300 kDa cut off filter를 이용하여 EDC, sulfo-NHS, BSA를 투과시켰으며 이때 조건은 4,000 rpm, 20분 동안 수행하였다. 최종적을 만들어진 SBA-QDs 복합체의 입자는 4 °C 냉장고에서 보관하였다.

2.4. Glycan analysis from live cell

QDs-Lectins-BSA으로 준비된 입자는 세포 패터닝으로 만들어진 기판 위에서 수행하였다. 앞서 언급한과 같이 세포는 암세포와 일반세포의 대조군으로 세포 패터닝을 하였으며 12시간 동안 안정화 및 성장이 된 후 세포표면의 글리칸 분석을 수행하였다. 세포표면에 발현된 글리칸의 분석을 위해 lectin-QDs 복합체를 배지에 뿌린 후 CO₂ 인큐베이터 안에서 반응을 시켰다. 반응 후 배지를 제거 한 후 PBS buffer로 2번 세척을 수행하였다.

2.5. Instrumentation

QDs과 QDs-lectin의 입자크기 분석은 zeta-sizer analyzer (OTSUKA, ELS-8000, Japan)로 수행하였으며 입자의 흡광 및 형광은 uv-vis spectrometry (PerkinEimer, Lambda35, USA) / photoluminescence (Varian, Cary Eclipse, USA)로 측정하였다. 그리고 QDs-lectins의 세포 글리칸 형광분석은 fluorescence microscopy (NIKON, TE-2000U, Japan)을 이용하였으며 Image-pro 및 Image-J program을 이용하여 데이터 분석을 하였다.

3. 결과 및 토의

3.1. 양자점 나노입자와 렉틴과의 결합

세포 표면에 발현된 글리칸을 분석하기 위해 특정 글리칸에 특이적 결합을 할 수 있는 lectin을 이용하였다. 또한, lectin의 결합을 용이하게 분석하기 위해 QDs 나노입자를 이용하여 lectin을 이미징하여 정량 분석하였다. Figure 2(a)에서는 lectin-QDs 복합체를 형성하여 패터닝된 세포에 적용하는 방법을 나타내었다. 먼저, 본 그룹에서 합성한 QDs (CdSe/ZnS, core/shell)은 605 nm에서 흡수하여 615 nm로 방출하며, DLS를 이용하여 측정된 QDs의 크기는 8.6 ± 2.1 nm이다(Figure 2(b)). TOPO-QDs을 MAA (mercaptopoetic acid)로 표면 개질하여 친수화를 시킨 후, 개질의 여부를 확인하기 위해 입자표면의 제타 전위를 측정된 결과 TOPO-QDs은 -2.26 mV, MAA-QDs은 -45.66 mV로 측정되었다(Figure 2(c)). 이 결과는 MAA로 표면 개질된 QDs은 표면에 카르복실 그룹이 있어 강한 음전하가 나타남을 증명한다. QDs을 친수화 시킨 후, lectin의 결합을 유도하기 위해 아민기(-NH₂)와 카르복실기(-COOH)를 연결시키는 EDC/sulfo-NHS 반응을 이용하였다. MAA로 표면 개질된 나노입자는 카르복실기를 가지고 있으며, lectin 단백질에는 아민기가 포함되어 있어 결합을 유도 할 수 있었다. 또한 비특이적인 결합을 방지하기 위해 QDs 표면의 나머지 결합부위를 BSA와 결합시켜 passivation하였다. 이 또한, DLS로 측정결과 나노입자의 크기는 17.1 ± 3.0 nm로 증가하여 lectin과 BSA에 결합에 의해 증가된 것으로 여겨져 성공적으로 lectin-QDs 복합체를 형성하였다. 따라서, 형성된 lectin-QDs 복합체를 패터닝된 세포에 적용하여 세포 표면에서 발현하는 글리칸을 분석 목적으로 하였다.

3.2. 세포패터닝과 렉틴-양자점 복합체의 반응성

음전하 또는 양전하를 띄고 있는 고분자 전해질은 정전기

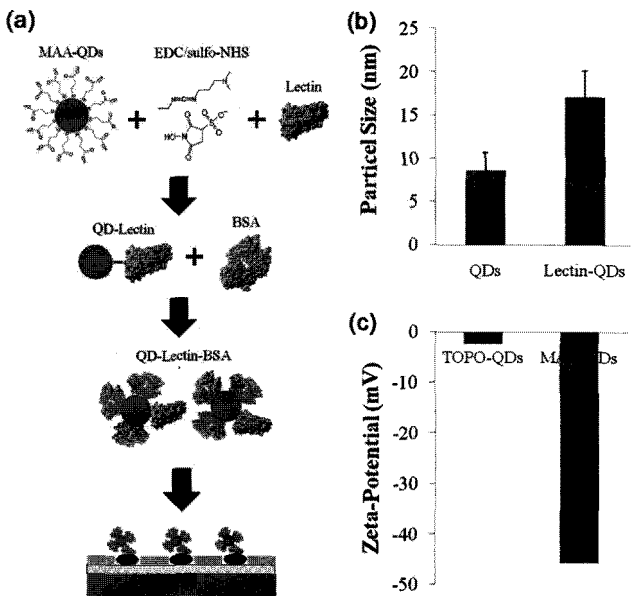


Figure 2. Basic procedure of conjugation of lectin with quantum dots and characteristics. (a) Schematic diagram for conjugation of lectin-QDs complex and its particles size and zeta-potential of water soluble QDs.

적 인력에 의한 LBL(layer-by-layer) 기술에 의해 표면에 다층 박막을 형성할 수 있으며, 최상층의 전하에 의해 다양한 생체 분자 및 세포, 박테리아를 부착시킬 수 있다[16,17]. 본 논문에서는 암세포와 정상세포간의 글리칸 발현의 차이를 확인하기 위해 대장암세포인 HCT116과 정상섬유아세포인 HDF (human dermal fibroblast)를 간편한 마이크로컨택트프린팅 방법에 의해 형성된 PDMS 구조체를 이용하여 세포 패터닝을 성공적으로 수행하였다(Figure 3(a)). HCT116 (upper two images in Figure 3(a))과 HDF (bottom two images in Figure 3(a))는 고분자 전해질 표면에만 선택적으로 안정하게 부착 하였으며, PDMS는 효과적으로 세포의 부착을 방지하였다. 세포가 부착할 수 있는 ECM 단백질은 PDMS 구조체 위에서 단백질 변성(denaturation)이 일어나 세포가 부착할 수 있는 환경을 제공하지 못한다[18]. 따라서, 고분자 전해질을 이용한 손쉬운 세포 부착과 PDMS의 비특이적 결합 방지 성질을 이용하여 세포 패터닝을 수행할 수 있었다.

또한, 12시간 동안 배양을 한 결과 패터닝의 영역에서만 세포가 안정적으로 성장을 한 것을 확인 하였다. 따라서, 고분자 전해질 위에 형성된 PDMS 구조체를 이용하여 세포 패터닝

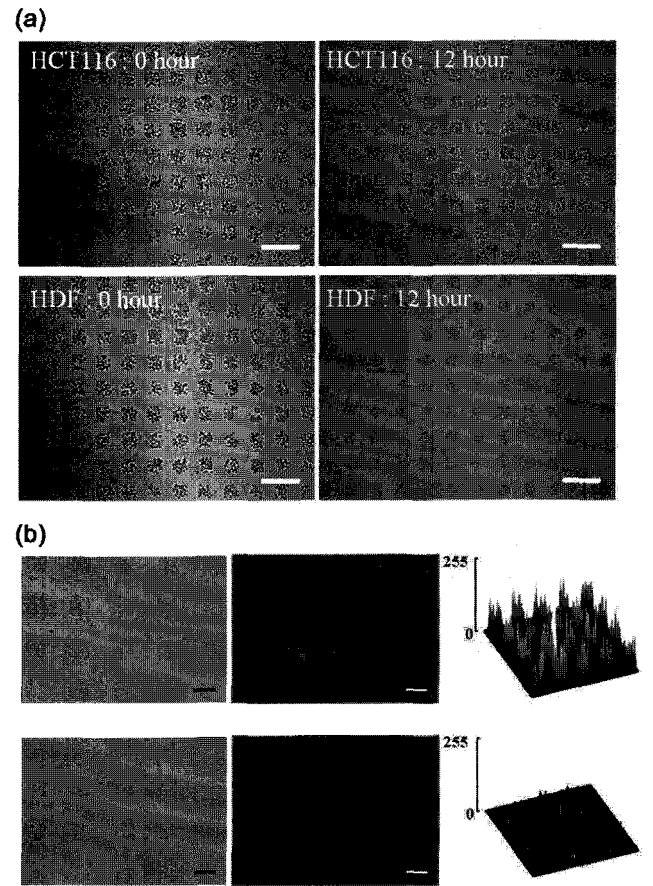


Figure 3. Cell patterning and SBA-QDs assay against HCT 116 and human dermal fibroblast. (a) Optical image of HCT116 (upper) and HDF (bottom) cells. (b) The difference lectin binding behavior; Optical images, fluorescence images, and profiles of fluorescence intensity against HCT 116 (upper) and HDF (bottom) cells. Scale bar indicates 50 μm.

이 가능성을 보였으며, lectin-QDs 복합체를 이용한 세포 표면에서 발현되는 글리칸을 분석 할 수 있는 세포칩을 준비할 수 있었다.

EDC/sulfo-NHS 반응에 의해 형성된 lectin-QDs 복합체는 12시간 동안 배양된 세포 칩에 주입 하여 lectin의 특이적인 반응을 증명하고자 한다. 사용된 lectin은 SBA (soybean agglutinin)로 GlcNAc (N-acetylgalactosamine)과 특이적인 결합을 하는 것으로 잘 알려져 있다. SBA-QDs 복합체를 HCT116과 HDF세포에 50 nM의 농도로 12시간 동안 반응하였다. Figure 3(b)에서 보였듯이 HCT116 (upper image in Figure 3(b))에서는 강한 형광세기가 나타난 반면 HDF (bottom image in Figure 3(b))는 약한 형광세기가 나타났다. 형광세기를 정량화한 결과 암세포와 정상세포간의 형광세기의 차이가 큼을 보여주고

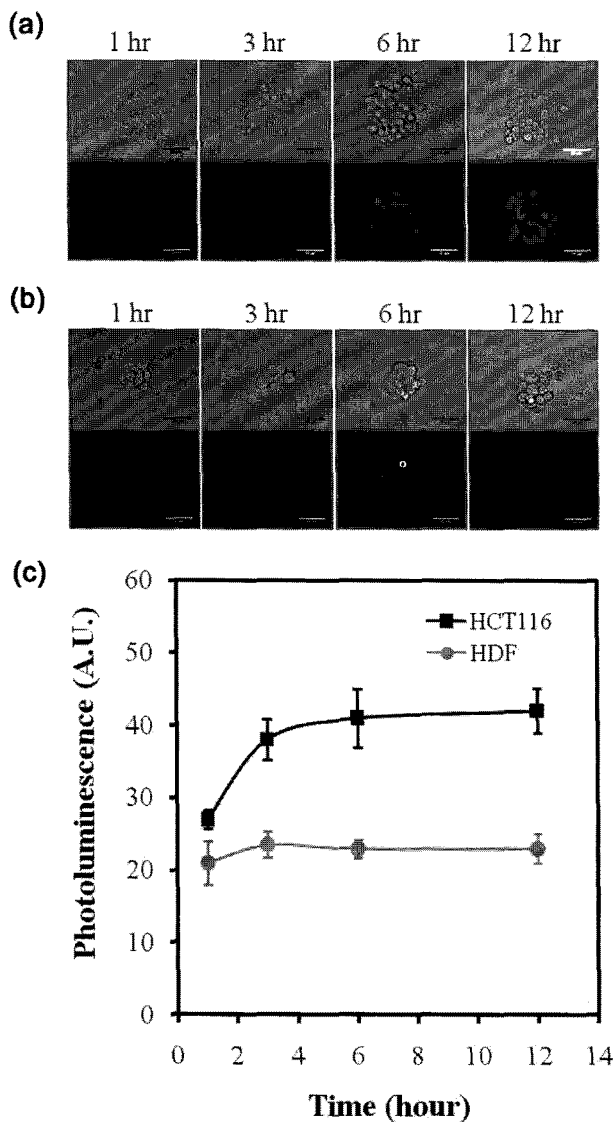


Figure 4. The effect of incubation time of SBA-QDs binding on fluorescence profile. Optical and fluorescence images of SBA-QDs with HCT116 (a) and HDF (b). (c) Quantitative fluorescence profile of HCT116 (cancer) and HDF (normal). Scale bar indicates 50 μ m.

있다. 형광의 세기는 SBA가 세포 표면에 있는 GlcNAc를 인지하여 결합한 결과로서 HDF 정상세포보다 HCT116 암세포에서 GlcNAc가 더욱 많이 발현이 되고 있음을 나타낸다. 결과적으로 본 논문에서 사용된 lectin-QDs 복합체는 세포 표면에 있는 글리칸을 성공적으로 인지하였으며, 세포가 패터닝된 세포칩을 이용하여 더욱 분석이 용이하고 신뢰할 수 있는 정량 데이터를 얻을 수 있었다.

3.3. 암세포와 정상세포의 세포 표면 탄수화물 발현 분석

앞의 결과에서 SBA-lectin이 세포표면에 있는 특정 글리칸과 효과적으로 결합하였음을 증명하였으며, 이에 대한 세포와의 반응을 최적화를 하였다. 패터닝된 HCT116과 HDF 세포에 SBA-lectin 복합체 50 nM을 반응시간(1~12시간)에 따라 비교실험을 수행하였다. Figure 4(a)에서 HCT116과 HDF의 SBA-QDs의 반응시간에 따른 형광이미지에서 보여주고 있다. HCT116 (Figure 4(a-1))에서는 시간에 따라 형광의 세기가 분명하게 증가를 하는 반면, HDF (Figure 4(a-2))는 낮은 형광의 세기를 가지면서 증가 폭이 적음을 쉽게 확인할 수 있다. Figure 4(c)에서는 gray value로 형광의 세기를 측정하여 이를 세포의 면적으로 나누어 정량화한 것을 그래프로 나타내었다. HCT116 암세포에서는 6시간 까지 단위면적당 형광이 증가를 하고 있으며, 이후로는 포화(saturation)상태가 됨을 확인하였다. 하지만, HDF에서는 변화가 거의 없음을 나타내었다. 또한 S/N ratio로 비교를 하였을 때, 1시간이었을 때 암세포는 4.5의 수치를 보였으며, 3시간 일 때는 5.9, 6시간은 6.6, 12시간은 7.0의 S/N ratio을 보였다. 정상세포에서는 4.5~4.6 정도의 S/N ratio를 보였다. 따라서, 본 논문에서는 SBA-QDs 복합체를 형성하여 세포 표면에서 발현되는 글리칸을 패터닝된 세포 칩을 이용하여 성공적으로 분석할 수 있었으며, 정상세포보다 암세포에서 GlcNAc가 더욱 많이 발현이 됨을 증명하였다.

4. 결론

본 연구는 손쉬운 마이크로컨택트프린팅 방법으로 고분자 전해질로 표면 개질된 기관 위에 형성된 PDMS 구조체를 형성하여 친환경적인 공정에 의해 세포칩을 제작하였으며, 이를 이용하여 세포 표면에서 발현되는 탄수화물을 효율적으로 분석하였다. PDMS 구조체는 효과적으로 세포의 부착을 방지하였으며, 고분자 전해질은 정전기적 인력에 의해 세포를 부착하는데 성공하여 세포 패터닝을 구현 할 수 있었다. 세포는 패턴 내에서 안정적으로 성장 및 증식하여 세포에 적합한 환경을 제공해 주었다. 이 세포칩을 이용하여 세포 표면 탄수화물을 분석하기 위하여 SBA lectin 단백질을 형광을 발현하는 QDs에 성공적으로 결합하여 lectin-QDs 복합체를 형성하여 세포 표면에 발현하는 글리칸을 쉽게 형광 분석 할 수 있었다. 제작된 세포칩을 이용하여 SBA-QDs을 반응한 결과 HDF 정상세포 보다 HCT116 암세포에서는 GlcNAc가 과다 발현 함을 알 수 있었다. 이는 암세포의 비정상적인 글리칸을

분석할 수 있는 중요한 분석 방법으로서 효과적으로 다양한 세포 및 lectin을 이용하여 데이터베이스를 구축할 수 있게 된다. 따라서, 친환경적인 공정으로 제작된 세포칩은 세포를 기반으로 하는 다양한 분야에 응용될 수 있으며, 경제적이면서 친환경적인 분석 기술이다.

감 사

이 논문은 2010년도 교육과학기술부의 재원으로 첨단의료 기기사업본부-신기술융합형성장동력사업(2010K001055), 한국연구재단 교육과학기술부-신진연구지원사업(R01-2008-000-11260-0) 및 한국연구재단-중견연구자지원사업(2010-0028173) 지원을 받아 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Yamazoe, H., Uemura, T., and Tanabe, T, "Facile Cell Patterning on an Albumin-Coated Surface," *Langmuir*, **24**(16), 8402-8404 (2008).
2. Rosenthal, A., Macdonald, A., and Voldman, J., "Cell Patterning Chip for Controlling the Stem Cell Microenvironment," *Biomaterials*, **28**(21), 3208-3216 (2007).
3. Neff, J. A., Tresco, P. A., and Caldwell, K. D., "Surface Modification for controlled studies of Cell-Ligand Interactions," *Biomaterials*, **20**(23), 2377-2393 (1999).
4. Nishizawa, M., Takahashi, A., Kaji, H., and Matsue, T., "Micro-patterned HeLa Cell Culture on PEG Monolayer-Coated Glass Substrates," *Chem. Lett.*, **31**(9), 905-905 (2002).
5. Tryoen-Toth, P., Vautier, D., Haikel, Y., Voegel, J. C., Schaaf, P., Chluba, J., and Ogier, J., "Viability, Adhesion, and Phenotype of Osteoblast-like Cells on Polyelectrolyte Multilayer Films," *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**(4), 657-667 (2002).
6. Khopade, A. J., and Caruso, F., "Stepwise Self-assembled Poly (amidoamine) Dendrimer and Poly (styrenesulfonate) Microcapsules as Sustained Delivery," *Biomacromolecules*, **3**(6), 1154-1162 (2002).
7. Varki, A., "Biological Roles of Oligosaccharides: All of the Theories are Correct," *Glycobiology*, **3**(2), 97-130 (1993).
8. Raymond A. Dwek, "Towards Understanding the Function of Sugars," *Chem. Rev.*, **96**(2), 683-720 (1996).
9. Saxon, E., and Bertozzi, C. R., "Chemical and Biological Strategies for Engineering Cell Surface Glycosylation," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**, 1-23 (2001).
10. Taniguchi, N., Gu, J., and Takahashi, M., "Functional Glycomics and Evidence for Gain- and Loss-of-Functions of Target Proteins for Glycosyltransferases Involved in N-glycan Biosynthesis: Their Pivotal Roles in Growth and Development, Cancer Metastasis and Antibody Therapy Against Cancer," *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **80**, 82-91 (2004).
11. Taniguchi, N., Miyoshi, E., Gu, J., Honke, K., and Matsumoto, A., "Decoding Sugar functions by Identifying Target Glycoproteins," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**(5), 561-566 (2006).
12. Danielle H. Dube, and Carolyn R. Bertozzi, "Glycans in Cancer and Inflammation - Potential for Therapeutics and Diagnostics," *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **4**(6), 477-488 (2005).
13. Mark M. Fuster, and Jeffrey D. Esko, "The Sweet and Sour of Cancer: Glycans as Novel Therapeutic Targets," *Nat. Rev. Cancer.*, **5**(7), 526-542 (2005).
14. Bharathan, S., Moriarty, J., Moody, C. E., and Sherblom, A. P., "Effect of Tunicamycin on Sialomucin and Natural killer Susceptibility of Rat Mammary Tumor Ascites Cells," *Cancer. Res.*, **50**(17), 5250-5256 (1990).
15. Zhelev, Z., Ohba, H., Bakalova, R., Jose, R., Fukuoka, S., Nagase, T., Ishikawa, M., and Baba, Y., "Fabrication of Quantum dot-Lectin Conjugates as Novel Fluorescent Probes for Microscopic and Flow Cytometric identification of Leukemia Cells from Normal Lymphocytes," *Chem. Commun.*, **41**(15), 1980-1982 (2005).
16. Shim, H.-W., Lee, J.-H., Hwang, T.-S., Rhee, Y. W., Bae, Y. M., Choi, J. S., Han, J.Y., and Lee, C.-S., "Patterning of Proteins and Cells on Functionalized Surfaces Prepared by Polyelectrolyte Multilayers and Micromolding in Capillaries," *Biosens. Bioelectron.*, **22**(12), 3188-3195 (2007).
17. Jeong, H.-H., Song, H.-M., Hwang, Y.-J., Hwang, T.-S., and Lee, C.-S., "Facile Cell Patterning Based on Selectively Patterned Polydimethylsiloxane (PDMS) and Polyelectrolyte Surface," *KSBB J.*, **24**(6), 515-520 (2009).
18. Paul Roach, David Farrar, and Carole C. Perry, "Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes," *J. Am. Chem. Soc.*, **127**(22), 8168-8173 (2005).