(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0082226
(43) 공개일자 2013년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12N 5/0797* (2010.01)
C12N 13/00 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0003301
(22) 출원일자 2012년01월11일
심사청구일자 2012년01월11일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 한강로3가 63-389(2/9) 용산시티파크 103-603
예철헌
서울특별시 영등포구 여의도동 대우트럼프월드2차 B-2802
(74) 대리인
양부현

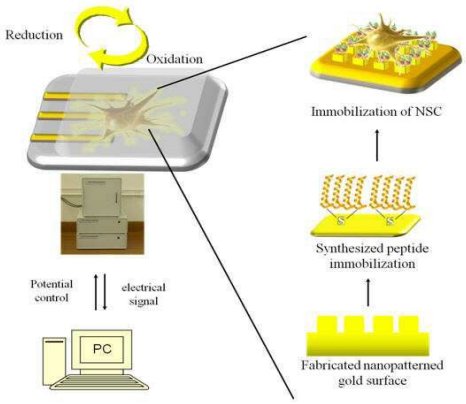
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **신경 줄기세포 분화 검출용 칩**

(57) 요 약

본 발명은 전기화학 시스템에 기반한 신경줄기세포분화의 검출방법에 관한 것으로, 기질(substrate) 상에 있는 금(Au) 작동전극(working electrode)을 포함하는 신경 줄기세포 분화 검출용 칩을 제공한다. 본 발명의 신경 줄기세포 분화 검출용 칩은 실시간 및 온-사이트(on-site)로 신경 줄기세포의 분화를 검출할 수 있으며 FACS의 분석 결과에 대응하는 신뢰도를 갖는다. 이러한, 신경 줄기세포 검출용 세포 칩은 임상적 줄기 세포 치료제를 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0000384
부처명	교육과학기술부
연구사업명	중견연구자지원사업(도약연구)
연구과제명	나노 신경줄기세포 전자칩 기술 개발
주관기관	서강대학교
연구기간	2009.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

기질(substrate) 상에 있는 금(Au) 작동전극(working electrode)을 포함하는 신경 줄기세포 분화 검출용 칩.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 칩은 상대전극(counter electrode), 기준전극(reference electrode) 또는 상기 두 전극 모두를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 칩.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 상대전극은 백금 전극인 것을 특징으로 하는 칩.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 기준전극은 Ag/AgCl 전극인 것을 특징으로 하는 칩.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 금 작동전극은 상기 기질 상에 나노패턴화 되어 있는 것을 특징으로 하는 칩.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 칩은 상기 금 작동전극 상에 RGD 펩타이드가 정렬되어 있는 것을 특징으로 하는 칩.

청구항 7

상기 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 칩을 포함하는 신경 줄기세포 분화 검출용 센서.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 센서는 신경 줄기세포의 분화를 전류의 세기의 증가로 측정하여 신경 줄기세포의 분화 여부를 분석하는 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 신경 줄기세포의 분화를 확인하는 방법:

(a) 상기 제 7 항의 신경 줄기세포 분화 검출용 센서의 상기 신경 줄기세포 분화 검출용 칩 상에 분석대상의 세포를 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 신경 줄기세포에 의한 전류 변화를 측정하는 단계.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경 줄기세포 분화 검출용 칩에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신경줄기세포(Neural Stem Cells; NSCs)는 자기 재생능(self-renewing)을 갖는 다분화능(multipotent) 세포로 신경계의 주요 표현형을 발생시킨다. 1989년, Sally Temple은 마우스 뇌의 뇌실하 부위(subventricular zone)에 존재하는 다분화능, 자기-재생 전구 및 줄기세포를 설명하였다(Temple et al. 1989). 1992년, Brent A. Reynolds 및 Samuel Weiss는 어덜트 마우스 뇌 조직의 뇌실하 부위 및 어덜트 선조체 조직으로부터 신경 전구 및 줄기세포를 처음으로 분리하였다(Weiss et al. 1992). 1992년, 최초로 마우스의 소뇌로부터 다분화능 줄기세포를 분리하여 종양유전자 v-myc를 안정하게 트랜스펙션하였다(Cepko et al. 1992). 상기 분자는 현재 어덜트 비-줄기세포를 전분화능(pluripotent) 세포로 리프로그래밍하는데 널리 이용되는 유전자 중 하나이다. 이후, 신경 전구 및 줄기세포는 인간을 포함하는 다양한 종의 어덜트 뇌의 척수와 같은 비-신경 부위를 포함한 다양한 부위에서 분리되었다(Gage et al. 2002). 신경 줄기 세포는 뉴런(neuron), 성상세포(astrocyte) 및 희돌기교세포(oligodendrocyte)의 3 종류 리니지(lineage)로 분화하게 된다.

[0003] 세포 기반의 검출 분야에 있어 세포-기반 칩은 우수한 가능성을 갖는다. 상기 칩은 최소 두 부분으로 구성되어있다(El-Ali et al. 2006). 한 부분은 살아있는 세포를 분석하기 위한 미세유체(microfludic) 장치이다. 예컨대, PDMS(polydimethysiloxane)에 기반한 미세유체 장치는 기저유량 채널(base flow channel)로 연결되는 미세주사기가 배열된 구성을 갖는다. 미세유체 장치는 세포 배양물로의 약물 주입을 조절한다. 칩의 다른 부분은 세포 기반 센서(cell based sensor)라 부르는 검출장치이다. 세포 기반 센서에서, 살아있는 세포는 검출기로 작용한다. 살아있는 세포의 상태를 관찰하는 것은 세포 칩의 매우 중요한 요소이다(Choi et al. 2005; Kim and Choi. 2007). 살아있는 세포의 상태를 관찰하기 위한 시스템에는 시각적 검출 시스템 및 전기적(전기화학적) 검출 시스템이 있다. 시각적 검출 시스템은 Octamer-4(Oct-4) 면역조직화학 염색법 및 알카라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase; AP) 염색법과 같은 세포의 시각적 또는 형광 반응에 기반한 시스템이다. 시각적 검출 시스템은 세포의 변화를 가시화할 수 있는 장점을 갖는다. 그러나, 이는 기기의 소형화가 어렵고, 시각적 신호는 전기적 신호로 전환될 수 없다(Michalet et al. 2005; Zhu et al. 2007). 반면, 전기적 검출 시스템은 전체 검출 센서 기기를 소형화할 수 있고 세포 신호를 쉽게 감시 및 관찰하여 분석할 수 있다. 이러한 장점에도 불구하고, 전기적 세포 검출 시스템은 시각적 검출 시스템과 비교하여 상대적으로 덜 개발되었다. 전기적 세포 검출 시스템은 살아있는 세포의 산화환원 반응에 의한 전자 발생 및 전자 전송을 전기화학적 동적 시스템으로 분석하게 된다(Matsunaga and Namba 1984). 온전한 살아있는 세포의 세포 내 전기활성 센터의 전기 전송, 세포/센서 인터페이스의 개회로전위, 전기 세포-물질 임피던스 센싱(Electric Cell-substance Impedance Sensing; ECIS), 콜라겐-임베딩된 살아있는 세포의 호흡 활성의 이미지를 위한 스캐닝 전기화학 현미경(Scanning electrochemical microscopy; SECM), 전기화학 임피던스 분광법(Electrochemical Impedance Spectroscopy; EIS) 및 산소 전극(oxygen electrode)과 같은 많은 전기화학적 환경을 연구되었다(Bard et al. 2006; Lu and Gratzl 1999; Cui et al. 2006; Fasching et al. 2006; Kaya et al. 2003; Kasai et al. 2006; Zhang et al. 2006; Bard et al. 1989).

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 발명자들은 실시간 및 온-사이트(on-site)로 신경 줄기세포의 분화를 검출하고자 노력하였다. 그 결과, 기질(substrate) 상에 있는 금(Au) 작동전극(working electrode)을 포함하는 세포 칩에 신경 줄기세포를 배양하는 경우, 신경 줄기세포가 분화됨에 따라 일정 전위에서 전류값이 증가함으로써, 신경 줄기세포의 분화를 실시간으

로 검출 할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 신경 줄기세포 분화 검출용 칩을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 신경 줄기세포 분화 검출용 센서를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 신경 줄기세포의 분화를 확인하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 기질(substrate) 상에 있는 금(Au) 작동전극(working electrode)을 포함하는 신경 줄기세포 분화 검출용 칩을 제공한다.

[0011] 발명자들은 실시간 및 온-사이트(on-site)로 신경 줄기세포의 분화를 검출하고자 노력하였다. 그 결과, 기질(substrate) 상에 있는 금(Au) 작동전극(working electrode)을 포함하는 세포 칩에 신경 줄기세포를 배양하는 경우, 신경 줄기세포가 분화됨에 따라 일정 전위에서 전류값이 증가함으로써, 신경 줄기세포의 분화를 실시간으로 검출 할 수 있음을 규명하였다.

[0012]

[0013] 본 발명의 주요한 특징은 기질 상에 금 작동전극을 포함하는 것이다. 바람직하게는, 본 발명은 기질 상에 금 작동전극 이외에 상대전극(counter electrode), 기준전극(reference electrode) 또는 상기 두 전극 모두를 추가적으로 포함한다.

[0014] 상기 상대전극 및 기준전극을 구성하는 물질로는 전류를 통과시킬 수 있는 것이라면 제한 없이 사용될 수 있으나, 예컨대 철, 알루미늄, 니켈, 티타늄, 금, 은, 구리, 백금 등의 금속 또는 전도성 수지를 사용하는 것이 바람직하며 다만 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, 상기 상대전극은 백금 전극이고, 상기 기준전극은 Ag/AgCl 전극이다.

[0015] 본 발명의 세 전극은 기질 상에 위치하며, 이는 기질의 표면에서 일어나는 신경 줄기세포의 전기화학적 변화를 검출하고자 하는 것이다.

[0016] 바람직하게는, 상기 금 작동전극은 상기 기질 상에 나노패턴화 되어 있다.

[0017] 본 명세서에서, 용어 '나노패턴'은 나노크기의 미세패턴이 형성된 것으로, 보다 상세하게는, 알루미늄을 양극산화시켜 알루미늄표면에 오목한 형상이 형성된 미세 패턴위에 금속을 증착하여 구성하거나, 생체분자-친화성 물질을 도포하고 알루미늄을 제거한 다음, 볼록한(convex) 면들의 미세패턴이 형성된 생체분자-친화성 물질을 나노패턴화한 세포 칩이다. 이러한 간단한 공정으로 균일하고 나노크기의 미세패턴이 형성된 세포 칩을 효율적으로 제조할 수 있으며, 이러한 나노패턴에 바이오물질(예컨대, 단백질, 핵산분자 및 세포)을 효과적으로 고정화할 수 있다.

[0018] 본 명세서에서 용어 "양극산화"는 산성의 전해질 용액에서 양극으로 알루미늄을 연결하고 음극으로 백금(Pt) 전극을 연결하여 적정한 전압을 가하면 알루미늄의 표면에서 규칙적인 배열을 이루는 나노다공성 알루미늄 산화피막이 형성되는 과정을 의미한다.

[0019] 본 발명에 이용되는 산성의 전해질 용액은 당업계에 공지된 다양한 산성의 전해질 용액을 포함한다. 바람직하게는 크롬산, 인산, 황산, 옥살산 또는 이들의 혼합용액이며, 보다 바람직하게는 황산 또는 옥살산이고, 가장 바람직하게는 옥살산이다.

[0020] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 양극산화는 24-60 V의 전압을 가하여 실시된다.

[0021] 본 발명에 이용되는 알루미늄을 전해질에 따라 최적의 조건의 전압을 가하여 규칙적인 배열을 갖는 나노다공성 알루미나 층을 형성시켜 알루미나 산화피막을 제거시키면 알루미늄 표면 위에 규칙적인 나노크기의 오목한 모양의 패턴모양이 형성되고 나노동공을 갖는 무기막의 일종인 알루미나 막을 얻을 수가 있다. 나노다공성 알루미

나의 대표적인 특징으로 리소그래피(lithography) 패턴기술에서 얻기 힘든 높은 종횡비(aspect ratio; 직경에 대한 길이의 비)를 얻을 수 있으며, 종횡비는 양극산화 조건에 따라 조절이 가능하다. 즉, 전해질의 종류, 온도, 농도, 전류밀도 및 전압과 같은 양극 산화조건에 따라 나노다공성 알루미나의 동공(pore) 크기, 셀 크기(동공간의 거리), 경계(barrier)층의 두께, 동공을 가지는 알루미나(porous alumina)층의 두께 및 동공 밀도 등을 제어할 수 있고 이러한 조건을 이용하여 알루미늄표면의 패턴모양을 제어할 수 있다.

[0022] 바람직한 구현예에 따르면, 상기 볼록한 나노 패턴이 형성된 수지 기판 위에 위치한 상기 세 개의 전극 또한 볼록한 나노 패턴을 가질 수 있으며, 이 경우 볼록한 나노패턴이 2중으로 형성되어 표면적 확장 효과가 극대화 될 수 있다. 상기 수지 기판이 수 ㎛의 엠보싱 구조를 갖는 그레이 바운더리 구조를 갖는 경우에는 3중 엠보싱 구조의 형성으로 기판 상부의 표면적이 극대화되어 신경 줄기세포의 분화를 가장 정확하게 감지할 수 있는 장점이 있다.

[0023] 상기 전극은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 상기 기판의 표면위에 형성시킬 수 있으며, 바람직하게는 전자빔 증착, 진공 증착, 열증착, 스퍼터링, 저압 화학기상법, 졸-겔 합성법, 전기 도금 또는 무전해 도금법이고, 보다 바람직하게는 통상의 물리적 증착(physical evaporation) 방법으로서 열증착법(thermal evaporation), 스핀코팅(spin coating), 진공 증착 또는 스퍼터링(sputtering) 법을 이용하고, 가장 바람직하게는 열증착법 또는 스퍼터링 법이다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 용어 "전도성 수지"란 전자기기의 패키징이나 어셈블리 분야 등 납땜으로는 접합할 수 없는 세라믹이나 플라스틱, 카본 등의 소재, 또는 납땜으로 접합할 경우 물성저하가 일어나는 현상을 피하기 위해 사용되는 전도성 접착제를 포함하는 저항이 거의 없는 수지를 의미하며 수지에 전도성을 부여하기 위한 재료를 배합한 것이 가장 일반적으로 사용되고 있다. 전도성을 부여하는 재료로는 니켈, 구리, 카본 블랙, 복합재료, 합금, 은과 같은 전도성 필러가 가장 대표적이며, 귀금속 박막을 표면에 형성시킨 구상 입도의 필러를 사용할 수도 있다. 매트릭스로서는 열경화성 수지로서 에폭시 수지, 페놀수지, 실리콘수지, 폴리이미드수지 등을 사용할 수 있으며, 폴리에틸렌 수지, 폴리스티렌 수지와 같은 열가소성 수지를 사용할 수도 있다. 열가소성 수지를 사용할 경우에는 보수가 용이한 장점이 있다. 현재 실용적인 전도성 수지 재료로서는 전도성 접착제(ECA: 등방성 접착제), 이방전도성 필름(ACF: Anisotropic Conductive Film) 및 이방전도성 페이스트(ACP: Anisotropic Conductive Paste)가 있으며, 모두 유기고분자화합물을 매트릭스로 하여 전도성 미립자를 분산시킨 것이다.

[0025] 본 발명의 다른 특징은 Arg-Gly-Asp(RGD) 모티프를 포함하는 서열을 이용하여, 세포 독성 없이 세포를 특이적으로 고상 기질 상에 고정화 시키는 것이다. 바람직하게는, 상기 칩은 상기 금 작동전극 상에 RGD 펩타이드가 정렬되어 있다.

[0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 펩타이드는 다음 일반식 1로 표시되며, N-말단 또는 C-말단에 시스테인 잔기가 추가적으로 결합되어 있는 것이다:

[0027] **일반식 1**

[0028] $(Arg\text{-}Gly\text{-}Asp)_n$

[0029] 상기 일반식에서, n은 1-100의 정수이다.

[0030] 일반식 1의 펩타이드의 구체적인 예는 Cys-Arg-Gly-Asp이다. 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 펩타이드 일반식의 n은 4이고, 이는 $Cys\text{-}(Arg\text{-}Gly\text{-}Asp)_4$이다.

[0031] 예컨대, 본 발명에 이용되는 펩타이드는 Arg-Gly-Asp를 포함하는 다음의 일반식을 갖는 다양한 형태로 이용될 수 있다.

[0032] **일반식 2**

[0033] $(Arg\text{-}Gly\text{-}Asp\text{-}X_{aa1})_n$

[0034] 상기 일반식에서, X_{aa1}은 Gly 또는 Ala이고, n은 1-100의 정수이다.

[0035] 일반식 2에서, X_{aa1}은 펩타이드 서열에서 유연성(flexibility)를 주기 위한 잔기로서, R-기의 크기가 작은 아미노산이 적합하다. 바람직하게는, X_{aa1}은 Gly이다.

[0036] 본 발명에서 이용되는 펩타이드는 일반식 1 또는 일반식 2로 표시되는 2-20개의 펩타이드가 아미노산 링커에 의해 결합되어 있는 것이다. 즉, 여러 개의 펩타이드가 결합되어 있는 펩타이드 맵 형태를 갖는다.

[0037] 펩타이드 맵을 제조하는 경우, 이용되는 링커는 당업계에 공지된 다양한 아미노산 링커를 이용할 수 있다. 링커에 적합한 아미노산 서열은 Maratea et al., *Gene* 40:39-46(1985); Murphy et al., *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 83:8258-8562(1986); 미국 특허 제4,935,233호, 제4,751,180호 및 제5,990,275호에 개시되어 있다. 링커 서열은 1-50 아미노산 잔기로 구성될 수 있다.

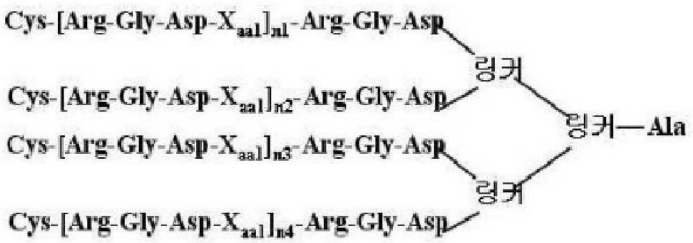
[0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 이용되는 링커는 R-기에 아미노기 또는 카르복실기가 있는 아미노산으로서, Lys, Arg, Asp 또는 Glu이며, 가장 바람직하게는 Lys이다.

[0039] 링커의 크기는 바람직하게는 1-5 아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 1-3 아미노산 잔기, 가장 바람직하게는 1 아미노산 잔기이다.

[0040] 본 발명의 바람직한); 및 O'Brien et al. Biosensors & Bioelectronics, 14:145-154(1999)에 기재되어 있다.

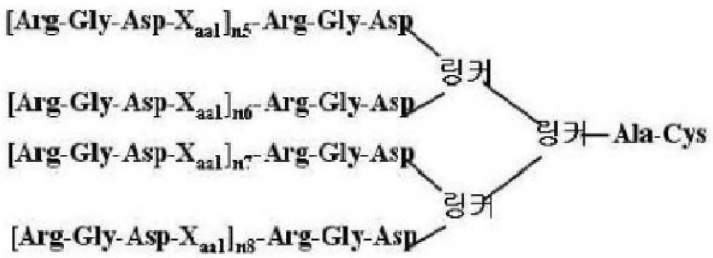
[0041] 구현예에 따르면, 본 발명에 이용되는 펩타이드는 다음 일반식 3 또는 4로 표시되는 펩타이드이다:

[0042] **일반식 3**



[0043]

[0044] **일반식 4**



[0045]

[0046] 상기 일반식에서, X_{aa1}은 Gly 또는 Ala이고, n1-n8은 각각 독립적으로 1-100의 정수이다.

[0047] 본 발명의 세포 칩에 적용될 수 있는 일반적인 설명은, 미국 특허 제5,143,854, 5,242,974, 5,252,743, 5,324,633, 5,384,261, 5,405,783, 5,412,087, 5,424,186, 5,451,683, 5,482,867, 5,491,074, 5,527,681, 5,550,215, 5,571,639, 5,578,832, 5,593,839, 5,599,695, 5,624,711, 5,631,734, 5,795,716, 5,831,070, 5,837,832, 5,856,101, 5,858,659, 5,889,165, 5,936,324, 5,959,098, 5,968,740, 5,974,164, 5,981,185, 5,981,956, 6,025,601, 6,033,860, 6,040,193, 6,090,555, 6,136,269, 6,147,205, 6,262,216, 6,269,846, 6,310,189 및 6,428,752호에 상세하게 기재되어 있다.

[0048] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 신경 줄기세포 분화 검출용 센서를 제공한다.

[0049] 본 발명의 바이오센서에 적용될 수 있는 일반적인 내용은, Myska, *J. Mol. Recognit*, 12:279-284(1999); J. Dubendorfer et al. *Journal of Biomedical Optics*, 2(4):391-400(1997)에 상세하게 기재되어 있다.

[0050] 바람직하게는, 상기 센서는 신경 줄기세포의 분화를 전류의 세기의 증가로 측정하여 신경 줄기세포의 분화 여부를 분석한다.

[0051] 본 발명의 또다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 신경 줄기세포의 분화를 확인하는 방법을 제공한다:

[0052] (a) 상기 제 7 항의 신경 줄기세포 분화 검출용 센서의 상기 신경 줄기세포 분화 검출용 칩 상에 분석대상의 세포를 접촉시키는 단계; 및

[0053] (c) 상기 신경 줄기세포에 의한 전류 변화를 측정하는 단계.

[0054] 본 발명의 방법은 상기 신경 줄기세포 분화 검출용 칩 및 센서를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0055] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0056] (a) 본 발명은 실시간 및 온-사이트(on-site)로 신경 줄기세포의 분화를 검출할 수 있는 신경 줄기세포 검출용 세포 칩을 제공한다.

[0057] (b) 본 발명의 신경 줄기세포 검출 결과는 FACS의 분석 결과에 대응하는 신뢰도를 갖는다.

[0058] (c) 본 발명의 신경 줄기세포 검출용 세포 칩은 임상적 줄기 세포 치료제를 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 NSCs의 전기화학 검출 시스템의 도식 이미지를 보여준다.

도 2는 세포 수에 따른 미분화 NSCs의 3 전기화학 작용을 보여준다. 도 2b는 특정 전위(0.102 V)에서 세포 수에 따른 도 2a의 전류를 비교하여 나타낸 결과이다. N=3으로, ±1의 표준편차를 나타낸다.

도 3은 분화기간 동안의 NSCs의 전기화학 작용으로, 도 3a는 순환전압전류 결과이고, 도 3b는 특정 전위(0.102 V)에서 시간에 따른 도 3a의 전류를 비교한 결과이다. N=3으로, ±1의 표준편차를 나타낸다.

도 4는 NSCs의 분화를 FACS 분석한 결과로, R 제곱 값은 0.96563이다.

도 5는 분화한 NSCs가 뉴런으로 분화된 분화 13일째의 전기화학 신호를 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0061] **실시예**

[0062] **실험 방법**

[0063] *재료*

[0064] PBS(Phosphate Buffered Saline, pH 7.4, 10 mM) 용액은 시그마 알드리치(미국)로부터 구매하였다. 모든 화학제품(황산, 과산화수소, PDMS(Poly-dimethylsiloxane), 알루미늄 호일(Goodfellow, 미국), 크롬산, 이소프로필알코올, 무수알코올, 증류수 및 인산)은 시약등급(reagent grade)으로 사용하였다. 순환전압전류법을 위하여 전기화학장비(CHI660C)를 사용하였다.

[0065] *신경 줄기세포를 위한 금 전극의 제조*

[0066] 실리콘-기반 금 전극을 피란하 용액(30% H_2O_2 및 농축 H_2SO_4를 1:3로 혼합)으로 5분 동안 세척하고 재증류수로 헹구어 준비하였다. 전극을 무수알코올 및 재증류수에 침지하여 5분 동안 초음파 처리하여 연마하였다. 마지막으로, 전극을 안정한 순환 볼타모그램(Cyclic Voltammogram)을 얻을 때까지, 0.5 M H_2SO_4로 전기화학적으로 세척하고 정제 질소 하에 건조하였다. 전기화학적 측정을 위해, 플라스틱 챔버(Lab-Tek, Thermo fisher scientific, 미국)를 PDMS(Polydimethylsiloxane)를 사용한 금 작동 전극에 고정하여 대략 2 ㎝×1 ㎝의 노출 영역을 갖는 2 ㎝×1 ㎝×0.5 ㎝(너비×길이×높이)의 세포 칩 챔버를 제작하였다.

[0067] *나노패턴 칩 제작*

[0068] 알루미늄 호일에 2단계 양극산화 과정을 거쳐 나노다공성 알루미나 마스크를 준비하였다. 간략하게, 알루미늄 호일을 과염소산(perchloric acid)과 에탄올을 1:4(v/v)로 혼합한 용액에서 전해 연마(electropolishing) 하였다. 첫 번째 양극산화는 3℃의 0.3 M 옥살산 용액에서 40 V의 전압을 인가하여 실시하였다. 정렬된 나노다공성 알루미나 층을 얻기 위해, 첫 번째 양극산화과정을 통해 형성된 알루미나 층을 0.4 M인산과 0.2 M 크롬산의 혼합액에서 65℃, 4시간동안 화학적 습식에칭(wet etching)을 과정을 거쳐 완전히 제거하였다. 그 후, 알루미늄 기질에 첫 번째 양극산화과정과 동일한 조건으로 두 번째 양극산화과정을 진행하였다. 나노다공성 알루미나의 표면을 니트로셀룰로오스 및 폴리에스테르 수지를 부틸 아세테이트, 에틸아세테이트 및 이소프로필 알코올의 혼합물로 구성된 코팅층으로 칠하였다. 스루홀(through-hole) 알루미나 마스크를 준비하기 위해, 남아있는 알루미늄 기질을 포화상태의 $HgCl_2$ 용액에서 제거하였다. 알루미나 층의 기둥 나노채널 바닥면에 위치하는 알루미나 장벽층을 30℃의 5 질량% 인산에서 에칭하였다.

[0069] *기질 표면에 금 나노닷 제조*

[0070] 증발 마스크로서, 양극성 나노다공성 알루미나 막을 사용하여 금 기질 상에 금 나노닷 배열을 제작하였다. 60 ㎚ 사이즈의 구멍을 갖는 양극성 알루미나 마스크를 20 ㎜× 10 ㎜ 크기의 금 기질 위에 정치한 후에, 열증착법(thermal evaporator)에 의한 다공성 알루미나 마스크를 통해 금을 금 기질 위에 놓는다. 50 ㎚의 금 층을 상기 나노구조 상에 20 sccm(standard cubic centimiters/min) 아르곤 가스 하에 7.5×10^{-7} Torr의 압력으로 증착하였다. 스퍼터드(sputtered) 원자를 약 7 mTorr의 감압된 영역을 통해 기질로 전달하였다. 금을 알루미나 마스트 상에 18.7 ㎚/min의 속도로 놓고, 마지막으로, 1 M NaOH에 침지하여 알루미나 마스크를 제거하였다.

[0071] *칩 상의 RGD 자가-조립*

[0072] 티올을 포함하는 화합물과 금 표면이 반응하여 티올(thiol) 자가-조립(self-assembly)을 제조하였다. 분자의 설프히드릴기(sulfhydryl group)는 금 표면에 공유결합하여 2 차원적으로 배열한다. 이는 금이 전기를 전도하고 전기접점을 만드는데 유용하다. 세포 부착 분자의 말단에 티올기를 포함하는 아미노산인 시스테인을 도입하였다. 노출된 금 표면은 시스테인 도입-세포 부착 분자가 결합하여 자가-조립 단일층을 형성하였다.

[0073] 금 표면을 피란하 용액을 세척하고 올리고펩타이드 자가 조립층이 형성되게 한다. 금 기질을 $C(RGD)_4$ 용액을 포함하는 증류수에 침지하여 37℃, 10시간동안 반응시켰다. $C(RGD)_4$ 펩타이드는 0.05 ㎎/㎖ 및 0.1 ㎎/㎖의 두가지 농도로 세포 고정화 플랫폼을 형성하는데 적용하였다. 기질을 재증류수로 세척하고 N_2 가스 하에 건조하였다.

[0074] *칩에서의 NSC 배양*

[0075] NE4C 세포를 열 불활성화된 10 % FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco, 미국) 및 1% 페니실린(Gibco, 미국)을 포함하는 MEM 알파 배지(Gibco, 미국)에서 배양하였다. 세포는 37℃의 습한 5% CO_2 조건에서 배양되었다. 배지

는 2일 간격으로 교체하였다. 세포의 수는 트립판블루 염색하여 혈구계수기로 결정하였다.

[0076] *마우스 신경 줄기세포 배양*

[0077] 마우스 신경 줄기세포(NE4C, ATCC)는 10% FBS(Fetal Bovine Serum, 우태아 혈청), 2 mM 글루타민을 포함하는 MEM(Minimum Essential Medium) 배지에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 세포의 수는 트립판 블루 염색 후 혈구계수기(hemocytometer)를 사용하여 확인하였다.

[0078] *전기화학 세포의 제조*

[0079] 4.2 ㎠/웰의 세포 배양 영역을 갖는 2-챔버 슬라이드(Lab-TekTM, Nunc, 덴마크)에 전기화학 세포를 배양하였다. 작동전극으로 스퍼터드(sputtered) 금 전극을 사용하였다. 전극은 2 nm 플래티늄 부착층을 갖는 50 nm 두께이다. Ag/AgCl 기준 전극(reference electrode) 및 플래티늄 상대 전극(counter electrode)으로 CHI 111 및 CHI 115 전극을 각각 이용하였다. 배지와 혼합된 2 ㎖의 NE4C 세포에 새로운 배양 배지를 투입하여 챔버로 이동하였다. 각 챔버의 세포의 수는 트립판 블루 염색 후 혈구계수기(hemocytometer)를 사용하여 확인하였다.

[0080] *마우스 ES 세포의 전기화학 센싱*

[0081] CHI660C에 대한 전기화학 시스템 소프트웨어에 의해 조절되는 CHI660C 전기화학 시스템을 사용하여 순환전압전류법(cyclic voltammetry)을 수행하였다. 3-전극 시스템은 금 작동 전극, 플래티늄 와이어 상대 전극 및 Ag/AgCl 기준 전극으로 구성된다. 세포 센싱을 위한 전해액으로 PBS(10 mM, pH 7.4)를 사용하였다. 도 1은 NSCs의 전기화학 검출 시스템의 도식 이미지를 보여준다. 순환전압전류법 분석을 0.6 V 내지 -0.2 V 전위창 범위에서 0.1 V/s 스캔속도, 37℃ 및 5% CO_2 조건에서 수행하였다.

[0082] *FACS(Fluorescence activated cell sorting)*

[0083] EPICS Altra(Beckman coulter, 미국)을 이용하여 항체 표지된 세포의 유세포 분석를 수행하였다. FACS 데이터를 분석하기 위해 WinMDI2.9를 피팅 프로그램으로 사용하였다.

[0084] **결과**

[0085] *미분화 NSCs의 전기화학 작용*

[0086] 도 2는 세포 수에 따른 미분화 NSCs의 3 전기화학 작용을 보여준다. 도 2a는 세포 수 증가에 따른 NSCs의 순환 볼타모그램(voltammogram)을 보여준다. 실험에 사용된 세포의 수는 2×10^5 내지 6×10^5 이다. 도 2a로부터 산화환원 피크가 발견되지 않은 것은 NSCs 전기화학 신호가 전류 상태에 확인되지 않음을 의미한다. 몇몇의 NSC 단백질은 작동전극과 상호작용할 수 있는 가능성을 갖고 있으나, 전류 상태(금 작동 전극, PBS 10 mM 전해액 및 0.6 V 내지 -0.2 V 전위창)은 산화환원 피크를 나타내지 않았다.

[0087] 도 2b는 특정 전위에서 도 2a의 전류를 정량화한 결과이다. 전위는 후술되는 분화 NSCs 전위인 0.102 V로 결정하였다. 0.102 V에서, 전류는 약간 증가하였으나, 전류 변수는 오차범위 내에 포함되었다. 그러므로, 미분화 NSCs는 주어진 조건에서 어떠한 NSCs 특이적인 전위 피크를 나타내지 않음을 보여준다.

[0088] *분화 NSCs의 전기화학 작용*

[0089] 도 3a은 분화진행에 따른 NSCs의 전기화학 작용을 나타낸다. NSCs는 특정 조건에서 분화하였고 분화는 시간에 따라 진행되었다. 분화하는 9일 동안, 격일로 전기화학 신호를 조사하였다. 도 3에서 확인할 수 있듯이, 전기화학 신호는 시간에 따라 변화하였다. 특히, 전류는 0.102 V 전위에서 시간이 지날수록 증가하였다. NSCs는 분화를 시작하면서 증식하지 않았으므로, 0.102 V 전위에서의 증가한 신호는 분화 NSCs 신호임을 나타낸다.

이는, 도 3a의 증가한 신호는 작동전극이 세포 수와 관련 없으며, NSCs의 특성 변화에 관련함을 보여준다. 도 3b는 도 3a 전류 신호의 정량적 결과이다. 이는 9일 NSCs 분화동안, 0.102 V에서 전류가 일정하게 증가함을 보여준다. R 제곱 값은 0.97721으로, 거의 직선에 근접하며, FACS 결과와 일치한다.

[0090] *NSC 분화의 확인*

[0091] 도 4는 시간경과에 따른 NSCs의 분화를 FACS 분석을 보여준다. NSCs의 분화 경향을 조사하기 위해 NSCs를 11일 동안 분화하였다. FACS 데이터는 대조군에 대하여 백분율로 나타내어, 세로축은 대조군에 대한 분화율을 나타낸다. 도 4에서 확인할 수 있듯이, NSCs는 약간 선상으로 분화하였다. 분화하는 11일 동안의 FACS 분석의 R 제곱 값은 0.96563이다. 상기 값은 데이터가 완전한 직선임을 의미하지 않는다. 그러나, 도 3b 및 도 4를 비교하면, 거의 선형을 나타내며, R 제곱 값도 유사하다. 순환전류전압법에 의한 전기화학적 결과는 FACS 분석과 밀접한 연관성을 가지며, 이는 전기화학 검출 방법이 FACS 분석법만큼 신뢰성이 있음을 보여준다. 결과적으로, 전기화학 방법을 실험에 사용하여 혼합 세포로부터 NSCs의 분화를 확인한 결과, FACS 분석으로 확인한 결과만큼의 신뢰성을 가짐을 확인하였다.

[0092] *뉴런의 전기화학 신호*

[0093] 도 5는 13일째 분화 NSCs와 뉴런의 순환 전압전류법결과를 비교하여 나타낸다. 분화 NSCs로부터 뉴런 β-Ⅲ 마커를 이용하여 뉴런을 FACS로 분류하였다. 뉴런은 같은 전위(0.102 V)에서 두 종류의 전기화학 피크 신호를 나타내었다. 표 1은 NSCs의 분화가 진행됨에 따른 피크신호를 나타낸다.

표 1

[0094]

분화 정도	1.3%	6.3%	13.2%	25.72%
피크 전류(A)	3.74×10^{-7}	4.68×10^{-7}	5.42×10^{-7}	5.78×10^{-7}
100% 분화시 피크전류 추정값(A)	1.217×10^{-6}			
실제 100% 분화시 피크전류(A)	1.225×10^{-6}			

[0095] 도 3b 및 도 4를 조합하여 값을 산출하였다. 분화가 100% 진행된다면, 도 3b 및 도 4의 값에 기초하여 피크 전류는 1.217×10^{-6} A(ampere)일 것이다. 실제 뉴론의 피크신호는 1.225×10^{-6} 로, 추정값과 유사하게 측정되었다. 따라서, 분화 NSCs 신호는 뉴론 신호에서 유래함을 알 수 있다.

[0096] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0097] **참고문헌**

[0098] Abe, K., Niwa, H., Iwase, K., Takiguchi, M., Mori, M., Abe, S. I., Abe, K.,Yamamura, K. I., 1996. Exp. Cell Res. 1, 27-34.

[0099] Bard, A. J., Li, X.,Zhan, W., 2006. Biosens. Bioelectron. 4, 461-472.

[0100] Bard, A. J., Fan, F. R. F., Kwak, J.,Lev, O., 1989. Anal. Chem. 2, 132-138.

[0101] Choi, J. W., Park, K. W., Lee, D. B., Lee, W.,Lee, W. H., 2005. Biosens. Bioelectron. 11, 2300-2305.

[0102] Coleman, B., Fallon, J. B., Pettingill, L. N., de Silva, M. G.,Shepherd, R. K., 2007. Exp. Cell Res. 2, 232-243.

[0103] Cui, H. F., Ye, J. S., Chen, Y., Chong, S. C.,Sheu, F. S., 2006. Anal. Chem. 18, 6347-6355.

[0104] El-Ali, J., Sorger, P. K.,Jensen, K. F., 2006. Nature 7101, 403-411.

[0105] El-Said, W. A., Yea, C. H., Kim, H., Oh, B. K.,Choi, J. W., 2009. Biosens. Bioelectron. 5, 1259-1265.

[0106] Fasching, R. J., Bai, S. -., Fabian, T.,Prinz, F. B., 2006. Microelectronic Engineering 4-9, 1638-1641.

[0107] Hwang, Y. S., Kang, Y.,Mantalaris, A., 2007. Biotechnol. Bioprocess Eng. 1, 15-21.

[0108] Kasai, S., Shiku, H., Torisawa, Y., Nagamine, K., Yasukawa, T., Watanabe, T.,Matsue, T., 2006. Anal. Chim. Acta 1, 55-59.

[0109] Kasai, S., Shiku, H., Torisawa, Y., Nagamine, K., Yasukawa, T., Watanabe, T.,Matsue, T., 2006. Anal. Chim. Acta 1, 55-59.

[0110] Kaya, T., Torisawa, Y. S., Oyamatsu, D., Nishizawa, M.,Matsue, T., 2003. Biosens. Bioelectron. 11, 1379-1383.

[0111] Kim, B. S., Choi, J. W., 2007. Biotechnol. Bioprocess Eng. 4, 323-332.

[0112] Lindvall, O., 2003. Pharmacol. Res. 4, 279-287.

[0113] Lu, H.,Gratzl, M., 1999. Anal. Chem. 14, 2821-2830.

[0114] Matsunaga, T.,Namba, Y., 1984. Anal. Chem. 4, 798-801.

[0115] Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S.,Weiss, S., 2005. Science 5709, 538-544.

[0116] Reynolds B. A., Weiss, S., 1992. Science 255, 1707-1710.

[0117] Singh, R. P., Oh, B. K., Koo, K. K., Jyoung, J. Y., Jeong, S.,Choi, J. W., 2008. BioChip J. 4, 223-234.

[0118] Snyder, E. Y., Deitcher, D.L., Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartwieg, E. A., Cepko, C. L., 1992. Cell 68, 3351.

[0119] Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K.,Yamanaka, S., 2007. Cell 5, 861-872.

[0120] Taupin, P., Gage, F. H., 2002. J. Neurosci. Res. 69, 745749.

[0121] Temple, S. 1989. Nature 340, 471-473.

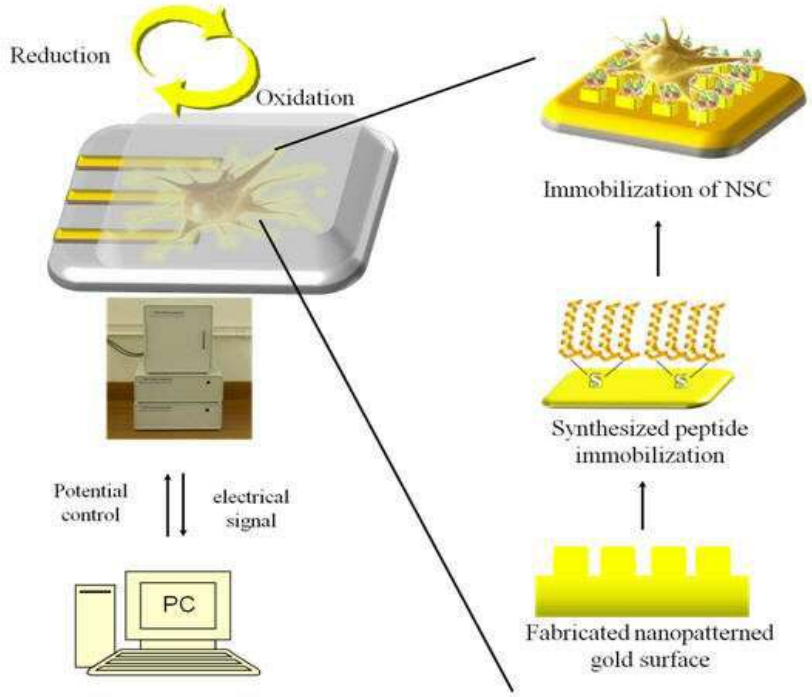
[0122] Wolf, P., Rothermel, A., Beck-Sickinger, A.G.,Robitzki, A. A., 2008. Biosens. Bioelectron. 2, 253-259.

[0123] Yea, C. H., Min, J.,Choi, J. W., 2007. BioChip J. 4, 219-227.

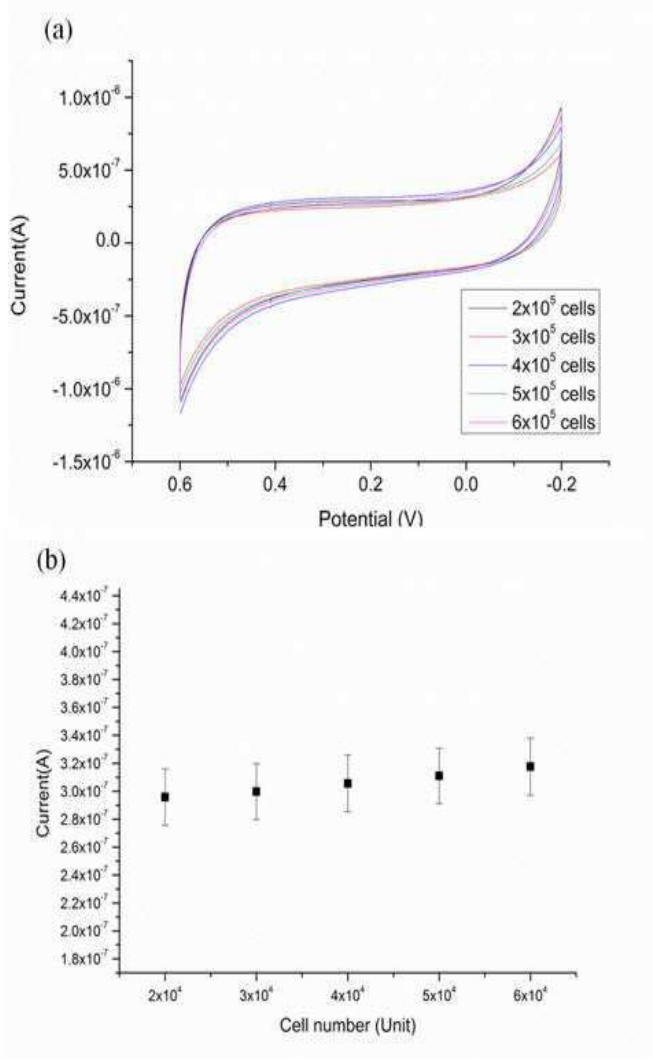
[0124] Zhu, L., Wu, W., Zhu, M. Q., Han, J. J., Hurst, J. K.,Li, A. D., 2007. J. Am. Chem. Soc. 12, 3524-3526.

도면

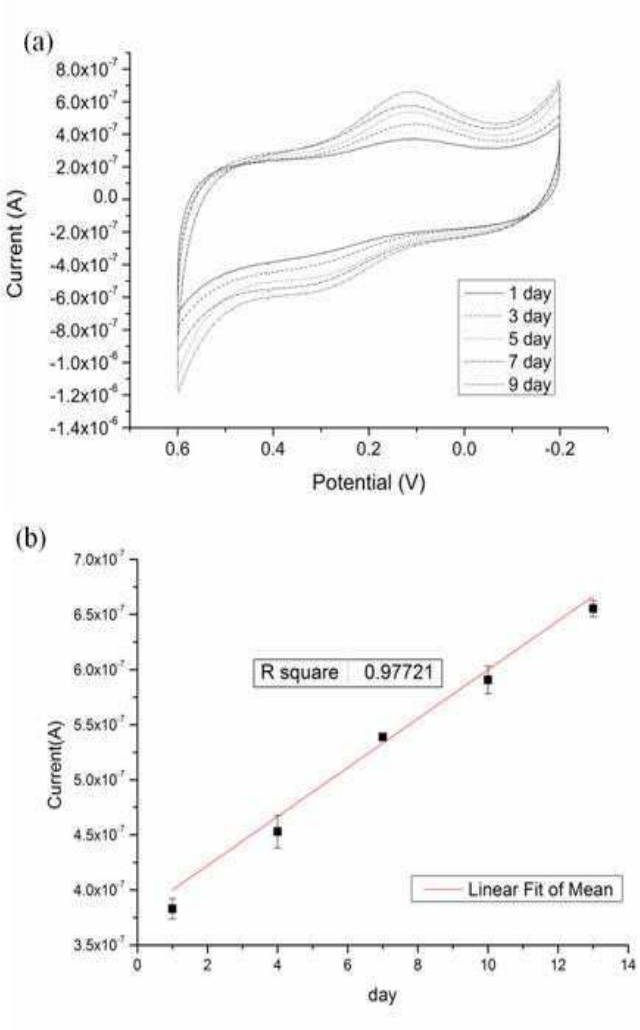
도면1


Reduction
Oxidation
Immobilization of NSC
Synthesized peptide immobilization
Potential control
electrical signal
PC
Fabricated nanopatterned gold surface

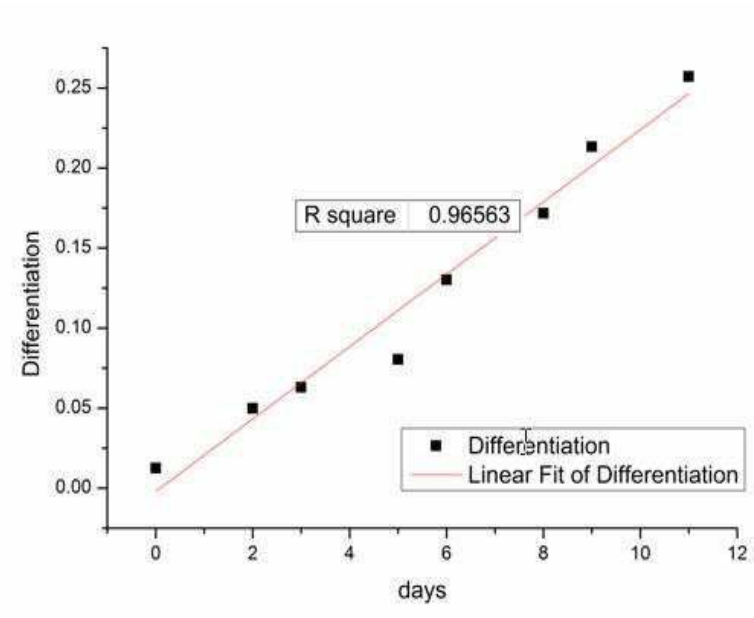
도면2


(a)
1.0x10⁻⁶
5.0x10⁻⁷
0.0
-5.0x10⁻⁷
-1.0x10⁻⁶
-1.5x10⁻⁶
Current(A)
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
Potential (V)
2x10⁵ cells
3x10⁵ cells
4x10⁵ cells
5x10⁵ cells
6x10⁵ cells
(b)
4.4x10⁻⁷
4.2x10⁻⁷
4.0x10⁻⁷
3.8x10⁻⁷
3.6x10⁻⁷
3.4x10⁻⁷
3.2x10⁻⁷
3.0x10⁻⁷
2.8x10⁻⁷
2.6x10⁻⁷
2.4x10⁻⁷
2.2x10⁻⁷
2.0x10⁻⁷
1.8x10⁻⁷
Current(A)
2x10⁴
3x10⁴
4x10⁴
5x10⁴
6x10⁴
Cell number (Unit)

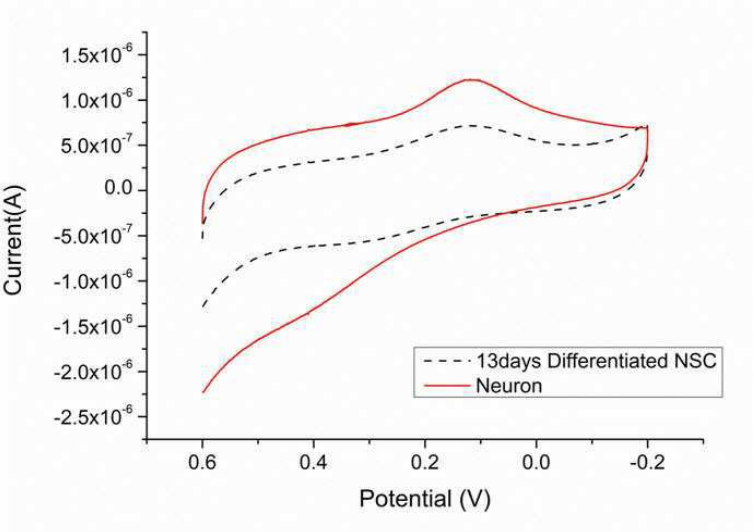
도면3


(a)
Current (A)
Potential (V)
1 day
3 day
5 day
7 day
9 day
(b)
Current(A)
day
R square 0.97721
Linear Fit of Mean

도면4


Differentiation
days
R square 0.96563
Differentiation
Linear Fit of Differentiation

도면5


1.5x10-6
1.0x10-6
5.0x10-7
0.0
-5.0x10-7
-1.0x10-6
-1.5x10-6
-2.0x10-6
-2.5x10-6
Current(A)
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
Potential (V)
13days Differentiated NSC
Neuron