



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0107958
(43) 공개일자 2010년10월06일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/42 (2006.01) *C12Q 1/04* (2006.01)
G01N 27/26 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0026353

(22) 출원일자 2009년03월27일

심사청구일자 2009년03월27일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교

(72) 발명자

최정우

서울특별시 용산구 한강로3가 63-389(2/9) 용산
시티파크 103-603

예철현

서울특별시 영등포구 여의도동 대우트럼프월드 2
차 B-2802

(74) 대리인

양부현

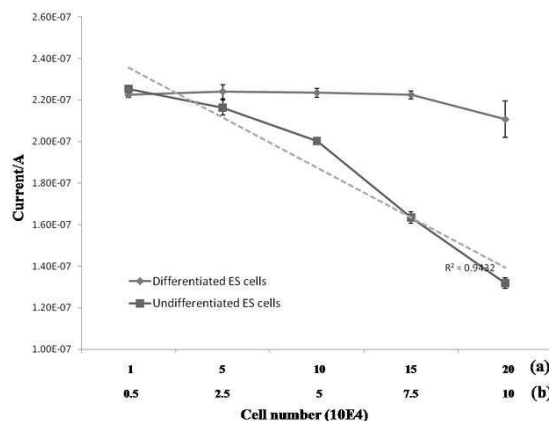
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 전기검출기반 줄기세포 분화 측정용 센서

(57) 요약

본 발명은 (a) 전극; 및 (b) 알칼린 포스파타아제의 기질을 포함하는 줄기세포 분화 측정용 센서에 관한 것이다. 본 발명의 센서는 줄기세포의 미분화 상태의 표지인자로서의 알칼린 포스파타아제가 그 기질을 탈인산화하는 것을 이용하여, 기질의 탈인산화 및 비탈인산화를 전기적 신호로 측정하여 줄기세포의 상태를 전기적인 방법으로 신속하게 검출할 수 있으며, 줄기세포의 분화 여부를 판단할 수 있다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 전극; 및 (b) 알칼린 포스파타아제의 기질을 포함하는 줄기세포 분화 측정용 센서.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 전극은 금, 구리, 유리 탄소, 백금 및 Ag/AgCl 전극으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 측정용 센서.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 기질은 1-나프틸 포스페이트, 칼슘 포스페이트, 페닐 포스페이트, 2-아미노페닐 포스페이트, 4-아미노페닐 포스페이트, p-아미노페닐 포스페이트, 3-인독실 포스페이트, 5-브로모-4-클로로-3-인독실 포스페이트, 4-메틸 럼벨리페틸 포스페이트, 6-클로로-3-인독실 포스페이트 및 하이드로퀴논 다이포스페이트로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 측정용 센서.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 생식 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 측정용 센서.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 미분화 줄기세포인 경우 알칼린 포스파타아제를 포함하고, 분화 줄기세포인 경우 알칼린 포스파타아제를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 측정용 센서.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 센서는 세포에 의한 알칼린 포스파타아제의 기질의 탈인산화 또는 비탈인산화를 전기적 신호로 측정하여 줄기세포의 분화 여부를 확인하는 줄기세포 분화 측정용 센서.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 탈인산화 된 기질은 1-나프톨, 칼슘이온, 페놀, 2-아미노페놀, 4-아미노페놀, p-아미노페놀, 3-인독솔, 5-브로모-4-클로로-3-인독솔, 4-메틸 럼벨리페톨, 6-클로로-3-인독솔 및 하이드로퀴논으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 줄기세포 분화 측정용 센서.

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 줄기세포의 분화 여부를 확인하는 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 줄기세포 분화 측정용 센서를 준비하는 단계;

(b) 상기 센서에 분석대상의 세포를 접촉시키는 단계; 및

(c) 상기 세포에 의해 상기 알칼린 포스파타아제의 기질이 탈인산화 또는 비탈인산화를 전기적 신호로 측정하는 단계.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 (a) 전극; 및 (b) 알칼린 포스파타아제의 기질을 포함하는 줄기세포 분화 측정용 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포 칩 기술은 세포기반 기법 가운데 가장 유망한 도구이다. 세포 칩은 두 가지 종류의 세포 검출 시스템을 가진다. 그 중 하나는 광학 시스템이며, 다른 하나는 전기적(전기화학적) 검출 시스템이다. 광학 시스템은 세포의 시각적인 변화를 감지하며 높은 민감도와 선별도를 가지는 한편, 소형화의 한계와 광학신호를 전기적인 신호로 변환하는 과정에 한계를 지니고 있다(1-2).

[0003] 반면에 전기적인 세포 검출 시스템은 광학적인 검출 시스템보다 상대적으로 덜 개발되어졌지만 소형화가 쉽고 전기신호 분석이 용이하다는 강점을 가지고 있다. 따라서 세포 계면에서의 전자 발생과 전자 전달 등을 전기화학적으로 검출하여 살아있는 세포를 분석하려는 시도가 지속되어져오고 있다(3).

[0004] 살아있는 세포는 세포의 전자 활성 중심부에서의 전자전달, 세포/센서 계면에서의 개방 회로 전위차(open circuit potential), ECIS(electric cell-substrate impedance sensing) 또는 SECM(scanning electrochemical microscopy) 등과 같은 많은 전기화학적 상황에 의해 연구되어 왔다(4-11).

[0005] 하지만, 전기적 혹은 전기화학적 방법을 이용하여 줄기세포의 분화도를 측정하려는 시도는 아직 이루어지지 않았다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명자들은 줄기세포의 분화도를 전기화학적 방법으로 측정하는 센서 및 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 줄기세포의 미분화 상태의 표지인자로서의 알칼린 포스파타아제가 그 기질을 탈인산화하는 것을 이용하여, 기질의 탈인산화 또는 비탈인산화를 전기적 신호로 측정하여 줄기세포의 분화 여부를 전기화학적으로 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 줄기세포 분화 측정용 센서를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 줄기세포의 분화 여부를 확인하는 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 전극; 및 (b) 알칼린 포스파타아제의 기질을 포함하는 줄기세포 분화 측정용 센서를 제공한다.

- [0012] 본 발명자들은 줄기세포의 분화도를 전기화학적 방법으로 측정하는 센서 및 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 줄기세포의 미분화 상태의 표지인자로서의 알칼린 포스파타아제가 그 기질을 탈인산화하는 것을 이용하여, 기질의 탈인산화 또는 비탈인산화를 전기적 신호로 측정하여 줄기세포의 분화 여부를 전기화학적으로 확인하였다.
- [0013] 본 발명의 줄기세포 분화 측정용 센서는 당업계에 공지된 통상의 삼-전극 시스템으로 구성되고, 상기 삼-전극 시스템은 작업 전극(working electrode), 상대 전극(counter electrode) 및 기준 전극(reference electrode)으로 구성되어 디자인된다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 센서에 포함되는 전극은 금, 구리, 유리 탄소, 백금 및 Ag/AgCl 전극으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는, 작업 전극은 금, 구리 또는 유리 탄소, 상대 전극은 백금 및 기준 전극은 Ag/AgCl이며, 가장 바람직하게는 작업 전극은 금, 상대 전극은 백금 및 기준 전극은 Ag/AgCl이다.
- [0015] 본 발명에 이용되는 알칼린 포스파타아제는 탈인산화 효소로서, 줄기세포의 미분화 상태를 나타내는 표지인자를 의미한다.
- [0016] 본 발명의 센서에 포함되는 알칼린 포스파타아제의 기질은 포스페이트기를 포함하는 당업계에 공지된 다양한 화합물을 포함하고, 바람직하게는 1-나프틸 포스페이트, 칼슘 포스페이트, 페닐 포스페이트, 2-아미노페닐 포스페이트, 4-아미노페닐 포스페이트, p-아미노페닐 포스페이트, 3-인독실 포스페이트, 5-브로모-4-클로로-3-인독실 포스페이트, 4-메틸 럼벨리페릴 포스페이트, 6-클로로-3-인독실 포스페이트 또는 하이드로퀴논 다이포스페이트이고, 보다 바람직하게는 1-나프틸 포스페이트, 페닐 포스페이트, 2-아미노페닐 포스페이트, 4-아미노페닐 포스페이트 또는 3-인독실 포스페이트이며, 가장 바람직하게는 1-나프틸 포스페이트이다.
- [0017] 알칼린 포스파타아제의 기질로서 특히, 1-나프틸 포스페이트는 두 개의 벤젠링에 포스페이트기가 결합되어 있는 화합물이며(도 1), 미분화 줄기세포에 존재하는 알칼린 포스파타아제에 의해 탈인산화되어 1-나프톨로 변환되며, 변환된 물질은 변환 전과 전혀 다른 전기화학적 특성을 나타낸다(도 2).
- [0018] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 센서가 이용되는 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 생식 줄기세포이고, 보다 바람직하게는, 배아 줄기세포이다.
- [0019] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 센서가 이용되는 줄기세포는 인간 또는 마우스 유래 줄기세포이고, 보다 바람직하게는 마우스 유래 줄기세포이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 센서가 이용되는 줄기세포가 미분화 줄기세포인 경우 알칼린 포스파타아제를 포함하고, 분화 줄기세포인 경우 알칼린 포스파타아제를 포함하지 않는다.
- [0021] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 센서는 세포에 의한 알칼린 포스파타아제의 기질의 탈인산화 또는 비탈인산화를 전기적 신호로 측정하여 줄기세포의 분화 여부를 확인한다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 알칼린 포스파타아제에 의해 탈인산화되는 기질은 1-나프톨, 칼슘이온, 페놀, 2-아미노페놀, 4-아미노페놀, p-아미노페놀, 3-인독솔, 5-브로모-4-클로로-3-인독솔, 4-메틸 럼벨리페롤, 6-클로로-3-인독솔 또는 하이드로퀴논이고, 보다 바람직하게는 1-나프톨, 페놀, 2-아미노페놀, 4-아미노페놀 또는 3-인독솔이며, 가장 바람직하게는 1-나프톨이다.
- [0023] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 줄기세포의 분화 여부를 확인하는 방법을 제공한다: (a) 상술한 본 발명의 줄기세포 분화 측정용 센서를 준비하는 단계; (b) 상기 센서에 분석대상의 세포를 접촉시키는 단계; 및 (c) 상기 세포에 의해 상기 알칼린 포스파타아제의 기질이 탈인산화 또는 비탈인산화를 전기적 신호로 측정하는 단계.

- [0024] 줄기세포의 분화 여부를 확인하는 본 발명의 방법을 단계별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0025] (a) 줄기세포 분화 측정용 센서의 준비
- [0026] 우선, (a) 전극; 및 (b) 알칼린 포스파타아제의 기질을 포함하는 줄기세포 분화 측정용 센서를 준비한다.
- [0027] 센서의 전극 및 알칼린 포스파타아제의 기질은 상술하였으므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0028] (b) 상기 센서에 분석대상 세포의 접촉
- [0029] 그 다음, 분화 여부를 확인하고자 하는 분석대상 줄기세포를 상기 센서에 접촉한다.
- [0030] (c) 기질의 탈인산화 또는 비탈인산화를 전기적 신호로 측정
- [0031] 미분화 줄기세포에 존재하는 알칼린 포스파타아제에 의해 그 기질은 탈인산화되어 변환되며, 변환된 물질은 변환 전과 전혀 다른 전기화학적 특성을 나타내며, 이를 사이클릭 볼타메트리를 이용하여 측정한다.
- [0032] 알칼린 포스파타아제의 기질의 전기화학적인 특성을 이용함으로써 알칼린 포스파타아제의 기질의 전기화학적인 신호를 추적하여 미분화된 줄기세포에 대한 데이터를 정량화하고, 분화로 인하여 변화하게 되는 알칼린 포스파타아제의 기질의 신호를 추적함으로써 줄기세포의 분화여부를 전기화학적인 방법을 이용하여 판단한다.
- [0033] 그리고, 미분화된 줄기세포에서의 알칼린 포스파타아제의 기질의 신호를 줄기세포의 세포량에 따라서 정량화시키고, 분화된 줄기세포에서의 알칼린 포스파타아제의 기질의 신호를 줄기세포의 세포량에 따라서 정량화시킨 다음, 그 결과를 비교하여 줄기세포의 분화여부를 측정한다.
- [0034] 바람직한 구현예로서, 마우스 배아 줄기세포(MES)의 분화 여부를 확인하는데 있어, 분화 MES 세포는 전기적 신호 및 증가하는 세포 수 사이에 독립적인 관계를 보여준 반면에, 미분화 MES 세포는 신호 및 세포 수 사이에 선형 관계를 나타낸다. 미분화 MES 세포의 선형성을 나타내는 결정계수(R^2) 값은 0.9432를 나타내어 유의한 결과를 보여주면, 이를 통하여 전기화학적 방법을 이용하여 세포 상태(cell status)를 확인할 수 있고 검출 한계가 50,000개의 미분화 MES 세포임을 나타낸다(도 4).

효 과

- [0035] 이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 (a) 전극; 및 (b) 알칼린 포스파타아제의 기질을 포함하는 줄기세포 분화 측정용 센서를 제공한다. 본 발명의 센서는 줄기세포의 미분화 상태의 표지인자로서의 알칼린 포스파타아제가 그 기질을 탈인산화하는 것을 이용하여, 기질의 탈인산화 및 비탈인산화를 전기적 신호로 측정하여 줄기세포의 상태를 전기적인 방법으로 신속하게 검출할 수 있으며, 줄기세포의 분화 여부를 판단할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0036] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0037] 실시예

[0038] 실험재료 및 방법

[0039] 실험재료

- [0040] 1-나프틸 포스페이트 및 PBS(phosphate buffered saline)(pH 7.4, 10 mM) 용액을 시그마-알드리치로부터 구입

하였다. 본 발명의 실시예에 이용되는 모든 다른 화학 물질은 시약급(reagent grade)으로 구입하여 이용하였다.

[0041] 미분화 MES 세포 배양 및 배아체(embryonic body) 형성

[0042] J1 세포 및 마우스 배아 줄기(MES) 세포를, 37°C and 5% CO₂에서, 15% FBS, 1mM의 소듐 피루베이트, 10⁻⁴ M의 2-머캅토에탄올, 1 x 비필수 아미노산, 및 1,000 U/ml의 LIF(leukemia inhibitory factor)로 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)으로 배양하였다. EB 형성은 알려진 방법으로 J1 ES 세포를 가지고 실시하였다(13). ES 세포(2 × 10⁶ 개)를 LIF 없이 10% FBS를 포함하는 DMEM의 bacterial-grade 페트리 디쉬에 씨딩하였다. 현탁 배양 2일 후, EB를 수집하고 트립신을 처리하였다. 동일 배지를 포함하는 0.2% 젤라틴-코팅 6-웰 플레이트에 총 1.37 × 10⁶ 개의 세포를 리플레이트하였다. 세포의 수는 3일 후에 측정하였다.

[0043] 전기화학 셀의 제조

[0044] 배양 챔버로 한 변의 길이가 2 mm인 정사각형 챔버를 이용하였다. 금을 작업전극(working electrode)(CHI101), Ag/AgCl를 기준전극(reference electrode) (CHI111) 그리고 백금을 상대전극(counter electrode)(CHI115)으로 이용하였다. 신선한 배양 배지와 함께 주입하여 알려진 세포 밀도로 J1 세포를 챔버로 옮겼다. 세포 수는 트리판 블루 용액으로 염색한 다음 헤마사이토미터를 이용하여 측정하였다.

[0045] MES 세포의 전기화학 센싱

[0046] 사이클릭 볼타메트리(cyclic voltammetry, CV) 실험은 일반적인 전기화학 시스템 소프트웨어에 의해 제어되는 CHI660A 머신을 이용하여 실시하였다. 삼-전극 시스템은 작업 전극(working electrode)으로서 금, 상대 전극(counter electrode)으로서 백금 선, 및 기준 전극(reference electrode)으로서 Ag/AgCl 셀로 구성되어 디자인되었다. 1-NP 및 분화 마커인 알칼린 포스파타아제 사이의 상호작용에 의한 마우스 배아 줄기 세포의 분화를 검출할 뿐만 아니라 MES 세포의 전기적 특성을 연구하기 위하여 측정을 실시하였다. PBS(10 mM, pH 7.4)를 0.1 V/s의 스캔 속도에서 전해질로 이용하였다. 실험 전에, 배양 배지를 제거하였고 PBS를 포함하는 1-NP를 챔버에 주입하였다. 완충액을 바꾼 15 분 후에 실험을 시작하였고, 37°C 및 5% CO₂에서 측정 조건을 유지하였다.

[0047] 알칼린 포스파타아제 염색 면역분석

[0048] 알칼린 포스파테이즈(AP) 염색 면역 분석 키트를 시그마-알드리치로부터 구입하였다. 우선, 고정용액(시트레이트-아세톤-포름알데히드)을 이용하여 세포를 고정하였다. 세포 고정 후에, 암실에서 소듐 나이트레이트, FRV-알칼린 용액 및 나프틸 AS-BI 알칼린 용액을 포함하는 알칼린-염색약 혼합물을 상기 세포에 첨가하였고 15 분 동안 염색하였다. 최종적으로, 헤마톡실린(hematoxylin) 용액을 이용하여 상기 세포를 대조 염색(counterstaining) 하였다.

[0049] 실험결과

[0050] 1-나프틸 포스페이트의 전기적 신호 검출

[0051] 다음과 같은 방법으로 1-NP 신호를 정량화하였다: 10 mM PBS의 전해질 용액에서 1-NP 농도는 1 μM에서 5 mM 까지 범위를 정하였다(도 2a 및 2b). 도 2a는 1-NP의 전기화학적 특성을 나타낸다. 피크는 0.1 V 주위에서 관찰되었고 1-NP의 농도가 감소함에 따라 전위는 음의 전압 값으로 천천히 변화하였다. 도 2b는 1-NP 피크 전류 및 1-NP 농도 사이의 직접 선형 관계를 보여준다. 선형 회귀 분석은 사이클릭 볼타메트리를 이용하여 전기화학적 정량 방법의 신뢰도를 입증하기 위하여 실시하였다(R²=0.9543). 이러한 결과는 1-NP가 사이클릭 볼타메트리 분석에 의해 정량화 될 수 있음을 나타낸다.

[0052] 미분화 MES 세포의 전기화학 응답

[0053] 1-NP를 MES 세포의 기질에 포함시킴으로써, 1-NP에 대한 탈인산화 작용에 의해 알칼린 포스파타아제(배아 줄기 세포 마커)를 추적 할 수 있다. 해리된 1-NP가 1-나프톨로 변화되는 경우, 1-NP를 검출하기 위해서 설정된 경계 조건(boundary conditions)에 의해 1-나프톨이 보여 질 수 없을 때, 전기적 신호에 있어 상응하는 변화가 발생한다. 상기 1-NP가 주입된 15 분 후에 검출을 수행하였다. 도 3a는 1-NP 첨가 후 MES 세포의 전기화학적 특성을 보여준다. 전체 전위는 양의 방향으로 아주 조금 변화하였으나, 환원 피크 전류는 MES 세포의 농도가 증가하는 방향으로 감소하였다. 이러한 전위의 변화는 다양한 물질을 가지는 배지를 포함할 수 있기 때문이라고 판단된다. 선형 플롯은 도 3b에 나타내었고 선형 회귀 분석(linear regression analysis)은 R^2 값, 0.9419로 나타내었다. 이러한 결과는 세포 수 및 1-NP에서 추정되는 CV 환원 전류 피크사이에 좋은 상관관계를 나타낸다.

[0054] MES 세포의 분화 검출

[0055] MES 세포의 분화를 검출하기 위해서, 미분화 MES 세포 및 분화 MES 세포의 전기화학적 신호를 비교하였다. 세포의 각 군은 특정 세포수로 배양 챔버에 접종하였다. 미분화된 MES 세포는 분화된 MES 세포 보다 잘 접촉하고 성장하기 때문에, 미분화된 MES 세포보다 분화된 세포를 두 배 더 접종하였다.

[0056] 도 4는 미분화 MES 세포 및 분화 MES 세포사이의 관계를 보여준다. 분화 MES 세포는 전기적 신호 및 증가하는 세포 수 사이에 독립적인 관계를 보여준 반면에, 미분화 MES 세포는 신호 및 세포 수 사이에 선형 관계를 나타내었다. 미분화 MES 세포의 선형성은 0.9432의 높은 R^2 값으로 나타내었다. 미분화 MES 세포 및 분화 MES 세포 사이의 신뢰도에 대한 P-값은, 세포 수의 두 번째 데이터 포인트로부터 시작하여 각 포인트에 대하여 각각 0.095, 0.001, 0.006 및 0.002이다. 세포의 수가 가장 낮은 두 개를 제외하고는, 다른 모든 포인트는 5% 신뢰도 수준에서 상당히 차이가 있었다. 이는 MES 세포의 분화를 확인하는데 있어, 세포 수의 세 번째 포인트가 검출 한계임을 의미한다. 이러한 결과는 상기 전기화학적 방법을 이용하여 세포 상태(cell status)를 확인할 수 있고 검출 한계가 50,000개의 미분화 MES 세포임을 나타낸다.

[0057] 마우스 MES 세포에 대한 1-나프틸 포스페이트의 효과

[0058] MES 세포 생존율 또는 분화를 변화시킴으로써 1-NP의 존재가 본 발명의 실시예에 영향을 미치지 않음을 확인하기 위해서, 알칼린 포스파타아제(AP) 염색 분석법을 실시하였다. 도 5a는 1 mM의 1-NP로 세포를 처리한 다음 생존율 시험을 한 결과를 보여준다. 세포 생존율은 대조군과 비교하여 99.65%를 나타내었다. 도 5b 및 5c는 줄기세포에 NP를 처리한 전 및 후의 AP 염색 결과를 보여준다. 각 도면은 잘 염색된 줄기 세포를 보여주고, 이는 1-NP가 줄기 세포의 분화에 영향을 미치지 않음을 의미한다.

[0059] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 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.

[0060] 참조 문헌

- [0061] 1. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA *et al.* Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*;307:538-544(2005).
- [0062] 2. Zhu L, Wu W, Zhu MQ *et al.* Reversibly photoswitchable dual-color fluorescent nanoparticles as new tools for live-cell imaging. *J Am Chem Soc* ;129:3524-3526(2007).
- [0063] 3. Matsunaga T, Namba Y. Detection of microbilal cells by cyclic voltammetry. *Anal Chem*;56:798-801(1984).

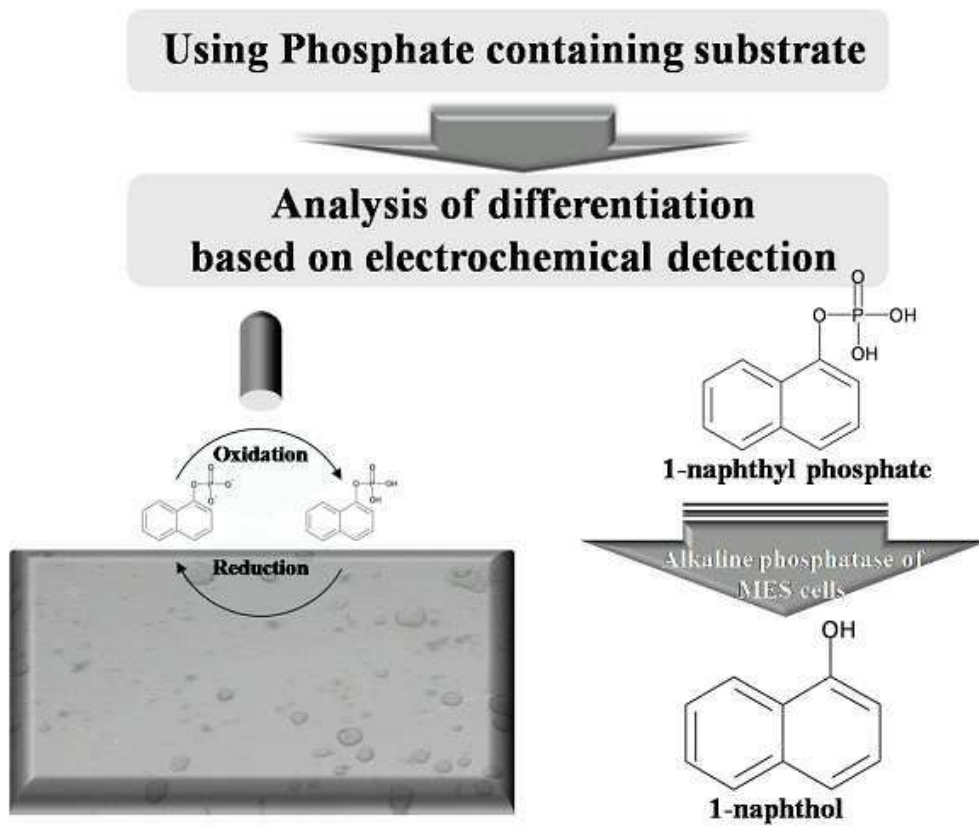
- [0064] 4. Bard AJ, Li X, Zhan W. Chemically imaging living cells by scanning electrochemical microscopy. *Biosens Bioelectron*;22:461472(2006).
- [0065] 5. Lu H, Gratzl M. Monitoring drug efflux from sensitivity and multidrug-resistant single cancer cells with microvoltammetry. *Anal Chem* ;71:2821-2830(1999).
- [0066] 6. Cui HF, Ye JS, Chen Y *et al*. Microelectrode array biochip: Tool for in vitro drug screening based on the detection of a drug effect on dopamine release from PC12 cells. *Anal Chem*;78:6347-6355(2006).
- [0067] 7. Fasching RJ, Bai SJ, Fabian T, Prinz FB. Nanoscale electrochemical probes for single cell analysis. *Microelectron Eng*;83:1638-1641(2006).
- [0068] 8. Kaya T, Torisawa Y, Oyamatsu D *et al*. Monitoring the cellular activity of a cultured single cell by scanning electrochemical microscopy (SECM).Acomparisonwithfluorescenceviabilitymonitoring.*Biosens Bioelectron* ;18:1379-1383(2003).
- [0069] 9. Kasai S, Shiku H, Torisawa Y *et al*. Cytokine assay on a cellular chip by combining collagen gel embedded culture with scanning electrochemical microscopy. *Anal Chim Acta*;566:55-59(2006).
- [0070] 10. Zhang X, Peng X, Jin W. Scanning electrochemical microscopy with enzyme immunoassay of the cancer-related antigen CA15-3. *Anal Chim Acta*;558:110-114(2006).
- [0071] 11. Bard AJ, Fan FRF, Kwak J. Scanning electrochemical microscopy. Introduction and principles. *Anal Chem*;61:132-138(1989).
- [0072] 12. El-Said WA, Yea CH, Kim H *et al*. Cell-based chip for the Detection of Anticancer effect on HeLa Cells Using Cyclic Voltammetry. *Biosens Bioelectron* 2008 in press
- [0073] 13. Abe K, Niwa H, Iwase K *et al*. Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Exp Cell Res* ;229:27-34(1996).
- [0074] 14. Wolf P, Rothermel A, Beck-Sickinger AG *et al*. Microelectrode chip based real time monitoring of vital MCF-7 mamma carcinoma cells by impedance spectroscopy. *Biosens Bioelectron*;24:253-259(2008).
- [0075] 15. Kim BS, Choi JW. Polyelectrolyte multilayer microcapsules : Self assembly and toward biomedical applications. *Biotechnol Bioprocess Eng*;12:323-332(2007).
- [0076] 16. Yea CH, Min J, Choi JW. The fabrication of cell chips for use as bio-sensors. *Biochip J*;1:219-227(2007).

도면의 간단한 설명

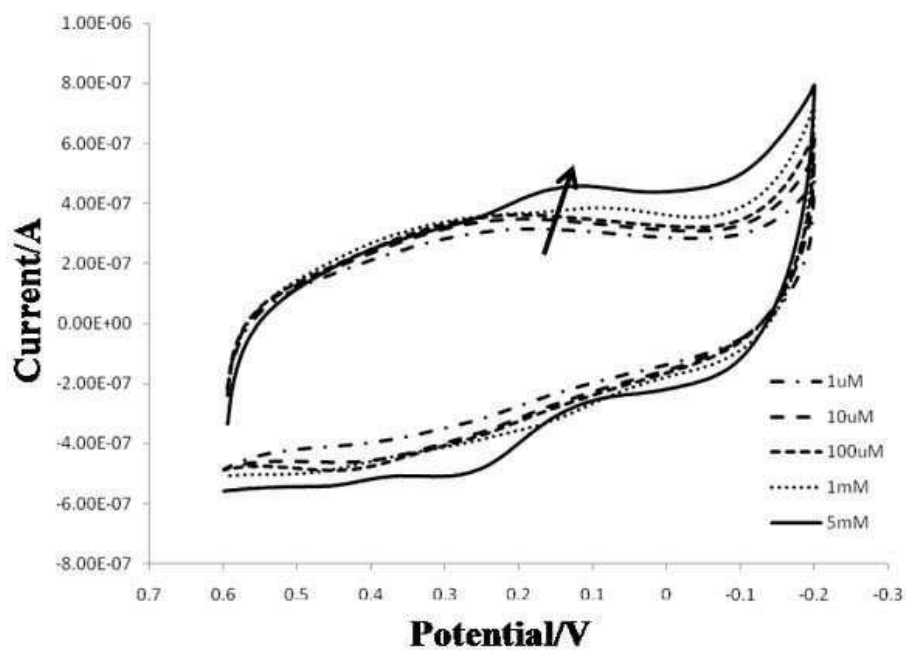
- [0077] 도 1은 본 발명의 센서에 포함되는 알칼린 포스파타아제(alkaline phosphatase, AP)의 기질인 1-나프틸 포스페이트(naphthyl phosphate, NP)가 미분화 마우스 배아줄기세포의 알칼린 포스파타아제에 의해 1-나프톨로 변환되는 것을 보여준다.
- [0078] 도 2a는 본 발명의 센서에 기질로 이용되는 1-NP의 순환성 볼타모그램 이고, 도 2b는 1-NP의 피크 전류 및 농도 사이의 직접 선형 관계를 보여준다.
- [0079] 도 3a는 1-NP 첨가 후 마우스 배아 줄기세포(mouse embryonic stem, MES)의 순환성 볼타모그램이고, 도 3b는 환원 피크 전류와 MES 세포의 수 사이의 선형 플롯을 나타낸다.
- [0080] 도 4는 미분화 MES 세포 및 분화 MES 세포사이의 관계를 보여주는 그래프이다. 분화 MES 세포는 전기적 신호 및 증가하는 세포 수 사이에 독립적인 관계를 보여준 반면에, 미분화 MES 세포는 신호 및 세포 수 사이에 선형 관계를 나타내었다.
- [0081] 도 5a는 1 mM의 1-NP로 세포를 처리한 다음 생존율 시험을 한 결과를 보여주고, 도 5b 및 5c는 줄기세포에 1-NP를 처리한 전 및 후의 AP 염색 결과를 보여준다.

도면

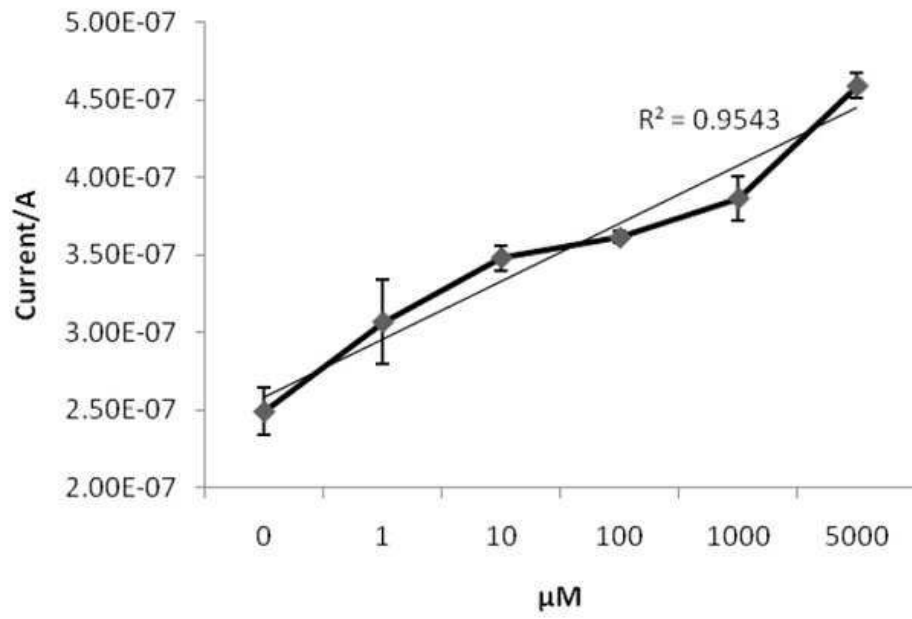
도면1



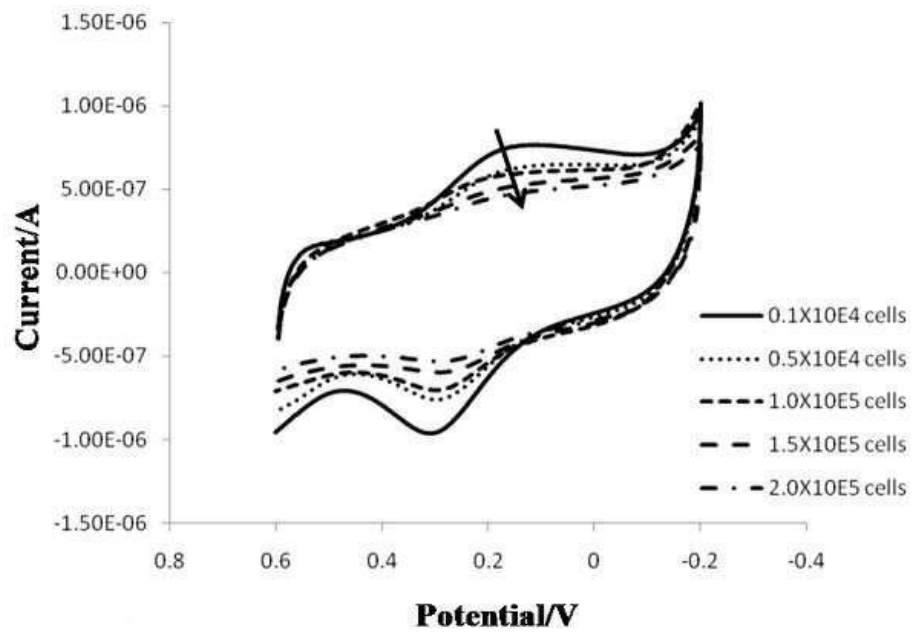
도면2a



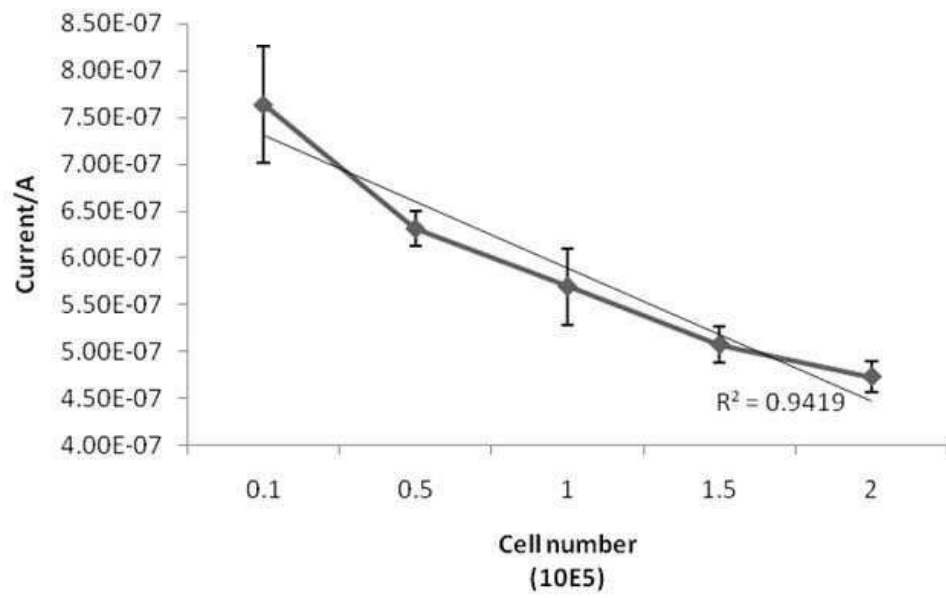
도면2b



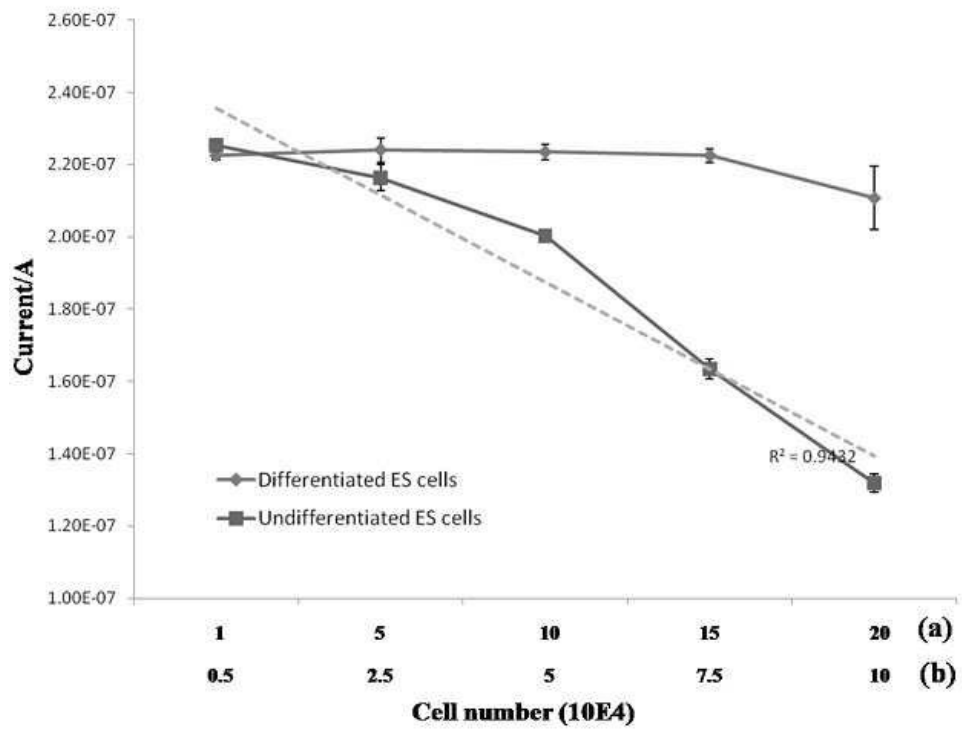
도면3a



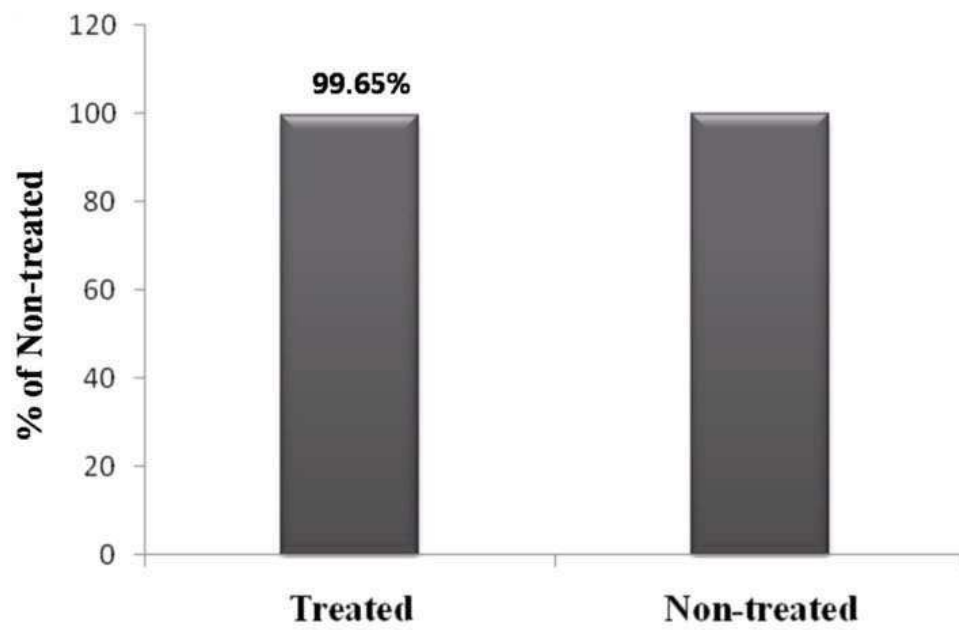
도면3b



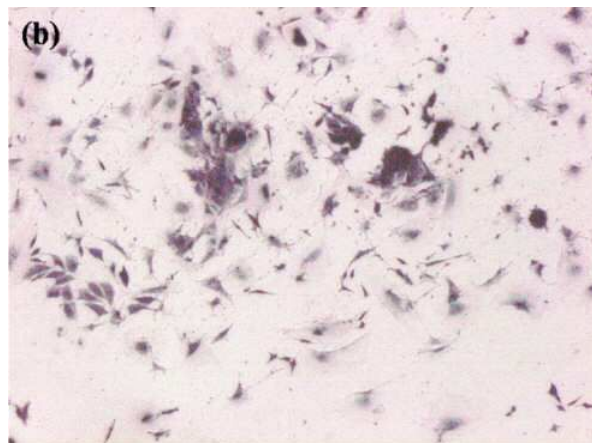
도면4



도면5a



도면5b



도면5c

