



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0109591
(43) 공개일자 2011년10월06일

(51) Int. Cl.

G01N 1/00 (2006.01) B82B 3/00 (2006.01)

B82B 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0029381

(22) 출원일자 2010년03월31일

심사청구일자 2010년03월31일

(71) 출원인

전북대학교산학협력단

전주시 덕진구 덕진동1가 664-14

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이상권

충청남도 계룡시 두마면 두계리 포스터더샵 APT
108-1503

김동주

전라북도 전주시 완산구 효자동 휴먼시아아파트
106-906

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 8 항

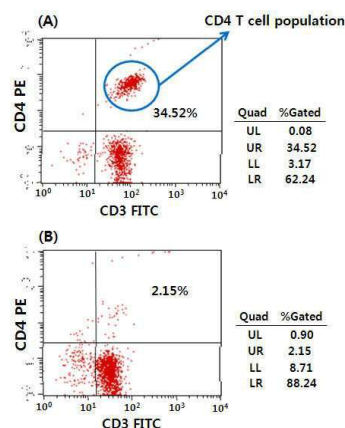
(54) 실리콘 나노선을 이용한 세포 분리칩

(57) 요약

본 발명은 실리콘 나노선을 이용한 세포 분리칩에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 기관; 상기 기관 상에 성장된 실리콘 나노선(silicon nanowire); 상기 실리콘 나노선 표면에 고정화된 스트렙타비딘(streptavidin)을 포함하는 세포 분리칩에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 세포독성이 적으며, 생체적합성(biocompatibility)이 뛰어난 실리콘 나노선(silicon nanowire)을 이용하여 특정 세포의 선택적 분리가 가능한 세포 분리칩을 제조할 수 있으며, 상기 세포 분리칩은 자성을 이용하지 않으며, 별도의 키트와 장치가 필요하지 않으며, 적은 수의 세포도 분리 가능할 뿐만 아니라, 고수율의 세포 분리능을 얻을 수 있다. 본 발명의 실시예에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 세포 분리칩을 이용하여 마우스의 비장세포로부터 면역세포(CD4+ T cell)를 성공적으로 분리하였다. 이와 같이 세포 분리방법에 있어서 그 방법이 간단하며 재사용할 수 있으므로 기존의 세포 분리 방법을 대체할 수 있는 기술이 될 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

이승용

전라북도 전주시 완산구 삼천동 오성대우아파트
103-505

이경미

서울특별시 서초구 서초1동 극동 스타클래스 101동
904호

김성태

서울특별시 서대문구 연희동 30-30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0075729

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 네트워크로 구현된 뉴런셀과 나노칩 사이의 전기·화학적 상호작용 규명 연구

기여율 25/100

주관기관 전북대학교

연구기간 2009.05.01 ~ 2010.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0094032

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 학술진흥재단

연구사업명 중점연구소지원(기초과학)

연구과제명 차세대 반도체 물성 연구

기여율 25/100

주관기관 전북대학교

연구기간 2009.12.01 ~ 2010.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 K20704000007-09A0500-00710

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌연구실사업

연구과제명 종양 및 장기이식모델에서 자연 살상세포와 조절 T세포의 면역 방어/조절 연구를 통한

세포치료기술의 확립

기여율 20/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2010.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 K20601000002-09E0100-00210

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바텔연구소 유치활용을 통한 급성 호흡기 감염 및 중증 패혈증 조기진단용 나노바이오

시스템 개발

연구과제명 해외우수연구기관유치사업

기여율 15/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2009.07.01 ~ 2010.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090078714

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 원자력연구개발사업

연구과제명 저준위 방사선의 면역세포에 대한 영향 연구를 통한 장수인자 발굴

기여율 15/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2009.04.01 ~ 2010.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

기관; 상기 기관 상에 성장된 실리콘 나노선(silicon nanowire); 상기 실리콘 나노선 표면에 고정화된 스트렙타비딘(streptavidin)을 포함하는 세포 분리칩.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 기관은 실리콘 웨이퍼(silicon wafer)인 것을 특징으로 하는 세포 분리칩.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 실리콘 나노선은 bottom-up 방법으로 성장된 것을 특징으로 하는 세포 분리칩.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 실리콘 나노선은 SiH_4 를 실리콘 전구체로 금(Au)을 촉매로 사용하여 핫월 화학기상증착장비(HW-CVD)에서 VLS(vapor-liquid-solid) 방법을 이용하여 성장시키는 것을 특징으로 하는 세포 분리칩.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 스트렙타비딘(streptavidin)은 실리콘 나노선에 O_2 플라즈마를 처리하고, APTES(Aminopropyltriethoxysilane)를 콘쥬게이션하고, GA(Glutaraldehyde)를 콘쥬게이션하고, 스트렙타비딘(streptavidin)을 콘쥬게이션함으로써 고정화되는 것을 특징으로 하는 세포 분리칩.

청구항 6

하기 단계들을 포함하는 세포의 분리방법:

- a) 제 1항에 따른 실리콘 나노선 표면에 고정화된 스트렙타비딘(streptavidin)을 갖는 세포 분리칩을 준비하는 단계;
- b) 바이오틴(biotin)이 결합된 항체(antibody)를 이용하여 특정세포를 결합시키는 단계; 및
- c) 상기 바이오틴과 스트렙타비딘의 결합을 이용하여 실리콘 나노선 표면에 특정세포를 부착시키는 단계.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 항체는 CD3, CD4, CD19 및 CD8로 이루어진 군에서 선택된 항체이고, 상기 특정세포는 면역세포인 것을 특징으로 하는 세포의 분리방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 바이오틴과 스트렙타비딘의 결합을 가역적으로 분리함으로써 세포 분리칩을 재사용하는 것을 특징으로 하는 세포의 분리방법.

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 실리콘 나노선을 이용한 세포 분리칩에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 기관; 상기 기관 상에 성장된 실리콘 나노선(silicon nanowire); 상기 실리콘 나노선 표면에 고정화된 스트렙타비딘(streptavidin)을 포함하는 세포 분리칩에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 나노물질은 작은 크기로 인해 혈관이나 림프를 따라 흘러 다니기 용이하며, 표면에 특정 물질을 붙이거나 그 크기를 조절함으로써 나노물질을 특정부위에 축적 및 전달이 가능하다. 최근 이러한 특성을 이용하여 질병 진단에 유용한 분자영상조영제로 이용하거나, 치료용 약물을 전달하는 약물수송체 등의 나노의학분야로 이용가능하다. 이러한 나노물질의 장점은 기존의 상대적으로 큰 크기의 벌크(bulk)물질에 비해 뛰어난 독자적인 특성을 갖는다. 특히, 난치성 질병 중에서 암의 조기진단 및 치료를 위해 최근의 연구들이 많은 응용가능성을 보여주고 있으며, 이를 위해 양자점(quantum dot)을 활용한 분자영상을 위한 조영제 개발, 암의 조기진단을 위한 바이오센서 개발, 그리고 조기 진단된 종양에 대한 약물전달 연구 등이 이루어지고 있다. 특히 near IR 양자점을 이용하여 MRI의 조영제로 사용함과 동시에 특정 지역의 암세포만을 선별적으로 죽이는 새로운 표적지향형 치료방법은 최근 나노물질의 에너지를 흡수하여 열을 내는 성질을 이용한 항암치료가 가능하다는 것을 보여주는 대표적인 예이다 [Hirsch et al., PNAS, Vol. 100, 13549 (2003)].
- [0003] 세포연구 및 세포치료분야에서 세포분리는 각각의 면역세포의 분석 및 진단, 치료에 응용이 가능한 매우 중요하고 필수적인 공정이다. 현재 Miltenyi Biotec사의 microbead는 마이크로 크기의 자성 입자를 이용한 특정세포분리기법이 상용화된 상태이지만, 자기장(magnetic field) 등의 별도의 키트가 필요하다는 번거로움이 있다. 그럼에도 불구하고 자성입자를 이용한 다양한 연구가 진행되고 있다. 최근에는 자성나노선(Magnetic nanowire)을 이용한 연구가 진행되고 있으며 이러한 자성나노선은 기하학적으로 이방성을 가지고 있으며, 자성 나노입자와 비교하였을 때, 높은 aspect ratio를 나타내기 때문에 높은 자성 특성을 보인다. 이러한 특성을 갖는 자성 나노선을 이용하여 세포 분리 진행에 응용한 연구결과가 발표된 바 있다 [Anne Hultgren et al., Biotechnol. Prog. Vol. 21, 509 (2005); Prina-Mello et al., Journal of Nanobiotechnology, Vol. 4, 9 (2006); Choi et al., Biomed Microdevices, Vol. 9, 143 (2007)].
- [0004] 현재까지 자성을 이용하지 않는 나노선을 이용한 선택적 세포분리, 나노선과 생물체와의 상호작용, 나노선에 대한 독성 연구 등에 대한 연구는 거의 발표된 바 없다. 지금까지 보고된 나노선 기반의 세포분리에 대한 연구는 모두 금속성질을 가진 니켈(Ni) 나노선을 이용한 포유류의 세포분리에 대한 결과를 나타내었으나, Ni 금속은 세포독성(cytotoxicity)을 가지고 있으며, 발암 물질(Nickel carcinogenesis)로 작용한다는 연구결과들이 함께 보고되었다. 이러한 문제점을 극복하고자 나노바이오분야에 적합한 세포독성이 적고 생체적합성이 높은 나노선에 대한 연구가 진행되고 있다. 대표적인 예로 실리콘나노선(Si Nanowire)은 살아있는 세포의 증식, 유전인자 증식 등 세포 기능을 방해하지 않는 적합한 물질로 주목 받고 있다 [Bauer et al., Langmuir, Vol. 19, 7043 (2003); Birenbaum et al., Langmuir, Vol. 19, 9580 (2003); Salem et al., Nat. Mater. Vol. 2, 668 (2003)].
- [0005] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 세포독성이 적은 실리콘 나노선(silicon nanowire)을 이용하여 세포 분리칩을 제조하는 경우, 자성을 이용하지 않으며, 별도의 키트와 장치가 필요하지 않으며, 적은 수의 세포도 분리 가능하므로 고수율의 세포 분리능을 얻을 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 세포독성이 적으며, 생체적합성(biocompatibility)이 뛰어난 실리콘 나노선(silicon nanowire)을 이용한 세포 분리칩을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 세포 분리칩을 이용한 특정 세포의 분리방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 기관; 상기 기관 상에 성장된 실리콘 나노선(silicon nanowire); 상기 실리콘 나노선 표면에 고정화된 스트렙타비딘(streptavidin)을 포함하는 세포 분리칩을 제공한다.

[0009] 본 발명의 세포 분리칩에서, 상기 기관은 실리콘 나노선을 성장시키기 위한 것으로써 상기 실리콘 나노선을 성장시킬 수 있는 어떠한 기관도 사용가능하나, 구체적으로 유리 웨이퍼 또는 실리콘 웨이퍼를 사용할 수 있으며, 본 발명의 실시예에서는 실리콘 웨이퍼를 사용하였다.

[0010] 본 발명의 세포 분리칩에 있어서, 상기 실리콘 나노선은 top-down [Peng et al., Angew. Chem. Int. Ed. Vol. 44, 2737 (2005)] 또는 bottom-up [Wagner et al., Appl. Phys. Lett. Vol. 4, 89, (1964)] 방법으로 성장시킬 수 있으며, 본 발명에서는 바람직하게 많은 양의 단결정구조의 나노선을 성장하기 적합한 bottom-up 방법으로 실리콘 나노선을 성장시켰다. 상기 bottom-up 방법으로 실리콘 나노선이 성장된 기관을 이용함으로써 세포와 결합할 수 있는 영역을 증가시켰다.

[0011] 상기 실리콘 나노선은 SiH_4 를 실리콘 전구체로 금(Au)을 촉매로 사용하여 핫월 화학기상증착장비(hot-wall Chemical Vapour Deposition; HW-CVD)에서 VLS(vapor-liquid-solid) 방법을 이용하여 성장시키는 것을 특징으로 한다. 반응로에 촉매물질인 금(Au)을 도포한 뒤 SiH_4 가스를 공급하여 고온으로 올리면 금(Au) 촉매 표면에 SiH_4 가스가 달라붙게 되고, 공융점(eutectic point) 이상에서 Au-Si 혼합용액 방울(liquid droplet)이 형성된 후 과포화(supersaturated)되는 SiH_4 가스에 의해 고체-액체 계면에서 대칭성이 파괴(symmetry breaking)되어 1차원으로 나노선이 형성된다. 이때 성장하는 나노선의 직경은 촉매 결정의 크기를 조절함으로써 제어할 수 있고, 나노선의 길이는 반응시간으로 제어할 수 있다.

[0012] 본 발명의 실시예에서 확인한 바와 같이, 상기의 방법으로 실리콘 웨이퍼 기관에 성장시킨 실리콘 나노선이 단결정이며, 150 ~ 300 nm의 직경과 3 ~ 10 μm 의 길이를 갖는 것을 확인하였다.

[0013] 본 발명의 세포 분리칩에 있어서, 상기 스트렙타비딘(streptavidin)은 실리콘 나노선에 O_2 플라즈마를 처리하고, APTES(Aminopropyltriethoxysilane)을 콘쥬게이션(chemical conjugation)하고, GA(Glutaraldehyde)를 콘쥬게이션하고, 스트렙타비딘(streptavidin)을 콘쥬게이션함으로써 고정화되는 것을 특징으로 한다.

[0014] 상기 스트렙타비딘은 바이오틴(biotin)과 매우 강한 결합을 하는 것으로 알려져 있으며 [Gonzalez et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 272(17), 11288 (1997)], 이와 같이 바이오틴과 스트렙타비딘의 결합을 이용하여 실리콘 나노선 표면에 세포를 부착시켜 특정 세포의 분리를 유도하였다. 따라서 본 발명의 세포 분리칩은 비자기장(non-magnetic field) 내에서 특정 세포를 분리하므로 영구자석과 같은 별도의 키트가 필요하지 않으며, 형광활성세포분류기(fluorescence activated cell sorter; FACS)와 같은 고가의 장비를 필요로 하지 않는 장점을 갖는다.

[0015] 상기 콘쥬게이션은 APTES는 실리콘 표면의 O_2 플라즈마 처리에 의한 OH^- 의 H^+ 3개와 APTES의 Si^{3+} 가 치환되어 화학적 결합을 하며, 이후, 결합된 APTES에 공유결합시킨 GA(Glutaraldehyde)는 APTES의 아민그룹과 반응하여 결합된다.

[0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 세포의 분리방법을 제공한다.

[0017] a) 제 1항에 따른 실리콘 나노선 표면에 고정화된 스트렙타비딘(streptavidin)을 갖는 세포 분리칩을 준비하는 단계;

[0018] b) 바이오틴(biotin)이 결합된 항체(antibody)를 이용하여 특정세포를 결합시키는 단계; 및

- [0019] c) 상기 바이오틴과 스트렙타비딘의 결합을 이용하여 실리콘 나노선 표면에 특정세포를 부착시키는 단계.
- [0020] 본 발명의 세포 분리방법에 있어서, 상기 항체는 바이오틴이 결합된 어떠한 항체도 가능하나, 바람직하게는 CD3, CD4, CD19 및 CD8로 이루어진 군에서 선택된 항체이고, 상기 특정세포는 면역세포인 것을 특징으로 한다. 따라서 바이오틴-항체(biotin-Ab)의 종류를 변화시킴에 따라 세포 분리칩으로부터 다양한 세포의 분리가 가능하다.
- [0021] 본 발명의 실시예에서는 상기 면역세포를 얻기 위해 마우스에서 비장(spleen)을 추출하였다. 비장(spleen)은 면역세포를 생성하는 장기 중에 하나로써, 다양한 종류의 면역세포(B 림프구, T 림프구, 자연 살상세포(NK cell) 등)가 존재한다. 본 발명에서는 구체적으로 상기 마우스의 비장세포로부터 CD4⁺ T cell을 성공적으로 분리하였으며, 도 4에 보이는 바와 같이 기관에 성장시킨 실리콘 나노선 사이에 면역세포가 부착되어 고정되어 있는 것을 확인하였다.
- [0022] 본 발명의 세포 분리방법에 있어서, 상기 바이오틴과 스트렙타비딘의 결합을 가역적으로 분리함으로써 세포 분리칩을 재사용하는 것을 특징으로 한다. 예컨대, 비-이온성 수용액(nonionic aqueous solution)에 넣고 70 ℃ 이상에서 배양시킴으로써 바이오틴과 스트렙타비딘의 결합을 끊음으로써 분리할 수 있다 [Holmberg et al., Electrophoresis, Vol. 26, 501 (2005)].

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1a는 기관 상에 성장된 실리콘 나노선의 SEM 이미지이다.
- 도 1b는 기관 상에 성장된 실리콘 나노선의 TEM 이미지(A) 및 EDS 분석 결과(B)를 나타낸 것이다.
- 도 1c는 온도에 따라 성장된 실리콘 나노선의 직경(A) 및 길이(B)를 분석한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 실리콘 표면의 화학결합 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 면역세포의 분리과정 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 4는 스트렙타비딘이 코팅된 실리콘 나노선에 결합된 면역세포의 SEM 이미지이다.
- 도 5는 유세포 분석기를 이용하여 세포의 개체수를 측정한 결과를 나타낸 것이며, (A)는 wool column을 이용하여 B 세포를 제거시킨 후 면역세포의 개체수 측정 결과이며, (B)는 스트렙타비딘이 결합된 실리콘 나노선을 이용하여 세포분리를 진행한 후 면역세포의 개체수를 측정한 결과이다.
- 도 6은 세포분리에 사용한 기관의 종류에 따른 면역세포의 분리율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 실리콘 나노선이 성장된 기관에서 O₂ 플라즈마 처리 유무에 따른 면역세포의 분리율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 실리콘 나노선이 성장된 기관에서 O₂ 플라즈마의 처리 시간에 따른 면역세포의 분리율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 O₂ 플라즈마를 처리하지 않고 실리콘 나노선을 성장시킨 기관에서 세포분리를 여러번 반복하였을 때의 면역세포 분리율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0025] 실시예 1. 실리콘 나노선(silicon nanowire)의 성장

[0026] 1-1. 성장용 시료 준비

- [0027] 실리콘 나노선 성장을 위하여 (111) 방향의 실리콘 웨이퍼를 사용하였으며, 시료의 표면에 형성된 산화막을 제거하기 위해 BOE(buffered oxide etchant)와 탄이온수(deionized water; DW)를 각각 5 분씩 반응하여 세척하였

다. 또한 아세톤(acetone)과 이소프로판올(isopropanol; IPA)의 혼합용액 및 DW를 각각 5 분씩 반응하여 표면의 유기물질을 제거하였으며, 실리콘 나노선이 성장될 때 촉매제 역할을 하는 금(Au)을 전자빔 증착기를 이용하여 2 nm 증착시켰다. Au가 증착된 실리콘 웨이퍼는 Sawing machine(Aron) 장비를 이용하여 $0.7 \times 0.7 \text{ cm}^2$ 의 크기로 잘랐으며, 시료를 자르는 도중 발생하는 실리콘 파편의 손쉬운 제거를 위해, photoresist(PR, AZ 5214 E)를 실리콘 웨이퍼에 도포한 후 진행하였다. 이후 표면의 PR 제거를 위해 아세톤과 IPA 혼합용액, DW를 이용하였다.

[0028] 1-2. 실리콘 나노선의 성장

[0029] 상기 준비된 기판에의 나노선 성장은 핫월 방식의 화학기상증착장비(hot-wall Chemical Vapour Deposition; HW-CVD)를 이용한 VLS 방법을 이용하였으며, 실리콘 나노선 성장 시간 동안 일정한 온도 유지가 가능하도록 하였으며, 석영관 양쪽에 냉각수 라인을 설치하여 고온에서도 무리가 없도록 설계하였다. 내부에는 2 개의 석영관을 사용하여 안쪽 석영관에 일정한 반응 가스 흐름(gas rate)을 가질 수 있도록 구축하였다. 이러한 이중 석영관의 사용은 외부 석영관의 물리, 화학적 오염을 방지하는 역할을 한다.

[0030] 먼저, 상기에서 준비한 시료(실시에 1-1에서 제조된 실리콘 나노선을 성장시킬 실리콘 웨이퍼)를 안쪽 석영관에 로딩 하였다. 이때 캐리어 가스(carrier gas)로부터 일정한 거리를 유지하기 위해 시료를 안쪽 석영관의 끝 쪽 부터 각각 19, 21, 23, 25, 27, 29 cm의 거리에 6 개의 시료를 위치시켰다. 안쪽 석영관을 HW-CVD 가운데에 위치시킨 후, 반응기 내부의 잔류 불순물을 없애주고, SiH_4 가스관 내에 잔존할 수 있는 가스들을 제거하기 위해 가스관의 밸브를 열고 반응기의 진공도를 로터리 펌프를 이용하여 진공상태를 만들어 주었다. 반응 압력이 5×10^{-2} torr 이하가 되면 SiH_4 가스관의 밸브를 닫고, 30 분 동안 진공상태를 유지시켜 주었다. 이때 진공상태를 계속 유지하며 반응기의 온도를 30 분 동안 상온에서 $500 \sim 600 \text{ }^\circ\text{C}$ 까지 상승시켰으며, 반응 온도에 다다르면 3 sccm의 캐리어 가스인 SiH_4 가스를 반응기 내로 흘려주었다. 이때 반응기의 압력은 5 torr로 고정시켜 주었다. 4 시간 동안 같은 상태를 유지시켜 실리콘 나노선을 성장시켰으며, 반응이 끝난 후 SiH_4 가스의 주입을 막고 상온까지 반응기를 천천히 식혀주었다.

[0031] 1-3. 실리콘 나노선 물질의 특성 분석

[0032] 시료에 성장된 실리콘 나노선 물질의 특성을 분석하기 위해 전계방출주사현미경(FE-SEM, Hitachi S-4300)을 이용하여 성장된 실리콘 나노선의 지름과 길이, 표면 상태를 관찰하였다. 또한 나노선을 구성하는 물질을 알아보기 위해 EDS(Energy Dispersive Spectroscopy)를 이용하였으며, 실리콘 나노선의 결정학적 구조와 합성 방향의 분석을 위해 고분해능 투과전자현미경(HR-TEM, JEOL JEM-2010), 제한시야전자회절(selected area electron diffraction; SAED) 패턴을 통해 분석하였다. 상기 분석 결과는 도 1a, 도 1b 및 도 1c에 나타내었다.

[0033] 먼저 도 1a에 나타낸 SEM 이미지에서 확인할 수 있듯이 실리콘 나노선이 $150 \sim 300 \text{ nm}$ 의 직경과 $3 \sim 10 \text{ }\mu\text{m}$ 의 길이를 갖는 것을 확인할 수 있으며(A), $2 \text{ }\mu\text{m}$ 의 간격으로 수직으로 성장된 것을 확인할 수 있다(B). 또한 도 1b의 HR-TEM 이미지에서 보이는 바와 같이, (111) 방향의 단결정 나노선이 성장되었음을 확인할 수 있으며, 표면에 자연 산화막(native oxide)이 형성되어 있는 것을 확인할 수 있다. 그리고 EDS 결과를 통해, 성장된 나노선이 실리콘을 주성분으로 하는 것을 확인할 수 있다.

[0034] 도 1c는 온도에 따라 성장된 실리콘 나노선의 직경 및 길이를 분석한 결과를 나타낸다. 도 1c에서 확인할 수 있듯이 온도가 증가될수록 성장되는 실리콘 나노선의 직경이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이는 Ostwald ripening 효과에 의한 것으로, 온도가 증가할수록 크기가 큰 입자가 작은 입자보다 표면 에너지가 작기 때문에 작은 입자가 큰 입자가 되려는 자발적인 현상이 나타나기 때문이다 [Lifschitz et al., Phys. Chem. Solids, Vol. 19, 35 (1981)]. 이러한 결과는 성장되는 온도와 시간의 조절에 의하여 실리콘 나노선의 직경 및 길이를 조절함으로써 서로 다른 직경에서의 나노선 특성 분석 연구가 가능하다는 것을 보여준다.

[0035] 실시예 2. 세포 분리칩 제작

[0036] 면역세포를 분리시키기 위해, 상기 실시예 1에서 성장시킨 실리콘 나노선 표면에 바이오틴(biotin)과 매우 강한 결합력을 가지는 스트렙타비딘(streptavidin, 5.3 kD tetrameric protein)의 화학결합을 유도하였다. 이를 위

해 먼저, 실리콘 나노선에 O_2 플라즈마 처리를 이용하여 APTES(Aminopropyltriethoxysilane)의 화학적 결합을 수행하였다. 상기 APTES는 실리콘 표면의 OH^- 의 H^+ 3개와 APTES의 Si^{3+} 가 치환되어 화학적 결합을 한다. 이후, 결합된 APTES에 GA(Glutaraldehyde)를 공유결합 시킨다. 상기 GA는 APTES의 아민그룹과 반응하여 결합된다. 마지막으로 스트렙타비딘을 GA에 결합시킴으로써 세포 분리칩의 제작을 완성하였다. 상기 화학결합의 모식도는 도 2에 나타낸 것과 같다.

[0037] 상기 과정을 보다 자세히 설명하면 다음과 같다. 실리콘 나노선이 성장된 기판에 O_2 플라즈마를 처리하여 표면에 $-OH$ 이온을 결합시킨다. 상기 O_2 플라즈마는 파워 50 W, 압력 40 Pa, 산소 100 ml/min을 유지하여 5 분간 처리하였다. 상기 O_2 플라즈마를 처리한 기판을 에탄올에 1 % APTES(Sigma-Aldrich, USA)를 섞은 용액에 넣고, 100 rpm의 속도로 30 분간 셰이커(shaker) 위에서 반응시켰다. 30 분 후, 기판을 꺼내어 순수한 에탄올에 넣어 세척한 후, 120 °C 핫-플레이트(hot-plate) 위에서 10 분간 열처리(baking)하였다. 이후, 3차 증류수(ddH₂O)에 50 % GA를 섞은 용액에 상기 열처리한 기판을 넣고 100 rpm의 속도로 4 시간 동안 셰이커 위에서 반응시켰다. 반응이 완료되면 3차 증류수를 이용하여 세척한 후, 500 µg/ml의 스트렙타비딘(Calbiochem, Germany)이 포함된 10 mM Phosphate buffer(pH 8.4) 30 µl를 기판 위에 올려놓고 CO_2 배양기(incubator)에서 밤새도록(overnight) 반응시켰다. 이때 상기 10 mM Phosphate buffer(pH 8.4)는 Monosodium phosphate 0.0039 %와 Disodium phosphate 0.2604 %를 혼합하여 제조하였다. 상기 스트렙타비딘의 합성이 완료되면 1 % BSA(bovine serum albumin)가 포함된 완충용액(PBS, pH 7.4) 용액 내에 30 분간 보관한 뒤, 완충용액으로 세척한 후, 4 °C 완충용액에 보관하였다.

[0038] 실시예 3. 면역세포 분리

[0039] 비장(spleen)은 면역세포를 생성하는 장기 중에 하나로써, 다양한 종류의 면역세포(B 림프구, T 림프구(CD4+ T, CD8+ T), 자연살상세포(NK cell) 등)가 존재한다. 따라서 본 발명에서 상기와 같은 면역세포를 얻기 위해 마우스의 비장을 이용하였다.

[0040] 3-1. 면역세포 추출

[0041] 세포 분리칩에 고정화 시킬 면역세포를 마우스의 비장(spleen)으로부터 분리하였다.

[0042] 먼저, B6 마우스를 CO_2 가스를 이용하여 희생시킨 후 왼쪽 옆구리 쪽에서 비장을 적출하였다. 적출한 비장 조직을 mRPMI 배양액(2 % FBS(fetal bovine serum) 함유된 RPMI 1640)이 담긴 세포배양접시(culture dish)에 옮겨놓은 뒤 슬라이드글라스(slide glass)를 이용하여 비장 조직을 단일세포(single cell)로 분리하였다. 단일세포를 얻기 위해 1,500 rpm의 속도로 3 분간 원심분리한 후 상층액은 제거하였다. 이후, 삼투압을 이용한 적혈구(RBC, red blood cell)의 제거를 위해 3차 증류수 0.5 ml를 튜브에 넣고 3 차례 pipetting 해주었다. 다른 세포에 영향을 적게 주기 위해 곧바로 mRPMI 배양액을 상기 튜브에 가득 채운 후 1,500 rpm의 속도로 3 분간 원심 분리 하였다.

[0043] 적혈구가 제거된 세포를 확인 한 후, 가장 큰 비율을 갖는 B 세포의 제거를 위해 wool column을 이용하였다. 먼저, wool column에 MACS buffer(PBS + 5 % FBS) 7 ml를 기포가 없게 채운 후, CO_2 인큐베이터에 40 분간 보관하였다. 40 분 후, wool column의 MACS buffer를 완전히 제거한 뒤 배양액 안의 세포를 wool column에 올려놓고, mRPMI 배양액을 1 ml 넣어 wool column에 B 세포가 달라붙을 수 있도록 CO_2 인큐베이터에 40 ~ 50 분간 보관하였다. 이후, wool column에 MACS buffer를 elution하여 B 세포 이외의 다른 세포들을 50 ml 튜브에 담아내었으며, 상기 튜브에 35 ml의 MACS buffer가 채워질 때 까지 계속 흘려주었다. 그 후, 1,500 rpm의 속도로 3 분간 원심분리하여 MACS buffer를 제거한 뒤 세포만 분리해내었다. 상기 분리된 세포를 1 ml MACS buffer에 잘 분산 시킨 후, 혈구계수기(hemocytometer)를 이용하여 세포 수를 측정하였으며, 이후 세포를 4 °C에 보관하였다.

[0044] 3-2. 세포 수의 측정

[0045] 상기 비장으로부터 분리된 세포의 세포수를 측정하기 위해 혈구계수기(hemocytometer)를 이용하였다.

[0046] 먼저 상기에서 분리한 면역세포를 1 ml MACS buffer에 잘 분산 시킨 후, 10 μ l를 피펫을 이용하여 분리한 뒤 10 μ l 트립판 블루(Trypan Blue) 세포염색약과 1 : 1(v/v) 비율로 섞은 후, 10 μ l만 분리하여 혈구계수기에 넣은 후 현미경을 이용하여 3 군데 이상의 사각형 안에 있는 세포수를 계산하였다. 상기 사용한 트립판 블루 염색약은 살아있는 세포와 죽어있는 세포를 분리할 때 사용하며, 죽어있는 세포만 파란색으로 염색시키므로 현미경을 이용하여 세포수를 계산할 때 파란색으로 염색이 되어있는 세포를 제외하였다. 이후 하기식을 이용하여 전체 부피인 1 ml안에 있는 세포의 수를 계산하였다. 하기식에서 2를 곱한 이유는 세포 10 μ l와 트립판 블루 10 μ l를 사용하여 2 배 희석되었기 때문이며, 혈구계수기의 작은 사각형 하나의 부피는 가로 1 mm, 세로 1 mm, 깊이 0.1 mm이며, 이것의 부피는 0.1 mm³이다. 이것을 10⁻⁴ cm³으로 환산할 수 있고, 이는 10⁻⁴ ml과 같은 부피가 된다. 이것을 1 ml에 포함된 세포수로 환산해주기 위하여 10⁴을 곱하여 준다. 세포가 너무 많아 세포측정이 어려울 경우에는 10 배, 100 배 희석을 통하여 손쉽게 세포수를 셀 수 있다. 이때 세포수를 계산하는 수식은 하기식에 희석배율을 곱하여 계산한다.

[0047] <수학식 1>

[0048]
$$\text{측정한 세포 수} \times \frac{1}{\text{측정한 사각형 수}} \times 2 \times 10^4 = \text{cells/ml}$$

[0049] 실시예 4. 면역세포 분리율 측정

[0050] 4-1. 세포 분리칩에서 면역세포의 고정화 및 분리

[0051] 상기 마우스의 비장에서 분리한 세포(splenocyte)를 상기 wool column을 이용해 전처리한 후 얻은 세포(T enriched lymphocyte) 중에서 CD4+ T 세포만을 분리하기 위해, 먼저 본 발명의 세포 분리칩에 스트렙타비딘을 고정화시켰다. 여러 T 림프구 중 세포막 표면에 CD4+ 단백질의 발현이 가장 높으며, 이로 인해 항원항체반응이 일어나기에 용이할 것이다.

[0052] 먼저, 상기 마우스 비장으로부터 분리하여 4 $^{\circ}$ C에 보관시킨 T-enriched splenocyte를 1×10^5 cells로 세포수를 맞춘 뒤, 1.5 ml 마이크로원심관(microcentrifuge tube)에서 MACS buffer 100 μ l에 분산 시킨 후, 바이오틴이 결합된 CD4 마우스 항체(biotin- α CD4 mAb) 2 μ l를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 20 분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 결합하지 못한 항체를 제거하기 위해 MACS buffer 1 ml에서 3,000 rpm의 속도로 3 분간 원심분리한 후 MACS buffer를 제거하고 세척과정을 통해 결합되지 않은 항체를 제거하였다. 상기 분리시킨 세포(biotin- α CD4 mAb가 붙은 CD4+ T cell을 포함한 세포)를 MACS buffer 30 μ l에 잘 분산 시킨 후, 상기 실시예 2에서 제작한 세포 분리칩 위에 올려놓고, 4 $^{\circ}$ C에서 20 분간 반응시켜 면역세포의 바이오틴과 세포 분리칩의 스트렙타비딘이 결합되도록 하였다. 반응완료 후, 고정화되지 않은 세포를 분리하기 위해 MACS buffer 2 ml을 이용하여 세척하였다. 상기 세척은 100 rpm 속도로 5 분간 웨이커 위에서 3번 반복 수행하였으며, 이후 1,500 rpm 속도로 3 분간 원심분리하여 고정화되지 않은 세포를 분리하였으며, 이 세포를 유세포분석기(flow cytometer)를 이용하여 표현형(phenotype)을 분석하였다. 즉, 분리 하려한 세포인 CD4+ T cell을 제외한 세포들의 수를 세어 줄어든 CD4+ T cell을 확인하였다. 상기 면역세포 분리과정의 모식도를 도 3에 나타내었다. 또한 본 발명의 실리콘 나노선을 성장시킨 기판 외에 실리콘 웨이퍼, 유리 웨이퍼를 사용하여 상기와 같이 면역세포의 고정 및 분리를 수행하였으며, 각각의 기판에서 면역세포의 분리율을 측정하였다. 상기 실리콘 웨이퍼와 유리 웨이퍼는 상기 실시예 2와 같은 방법으로 스트렙타비딘을 결합시킨 후 사용하였다.

[0053] 본 발명의 실리콘 나노선이 성장된 기판에 면역세포를 고정화 시킨 후 SEM을 측정하였다. 도 4의 SEM 이미지에서 보이는 바와 같이, 스트렙타비딘이 결합된 실리콘 나노선에 바이오틴 항체가 결합된 CD4+ T 세포가 스트렙타비딘과 바이오틴의 강한 결합력에 의해 고정화되어 있는 것을 확인할 수 있다.

[0054] 4-2. 유세포분석을 위한 세포 염색

[0055] 유세포분석기(flow cytometer)를 이용한 표현형분리(phenotyping)는 형광이 발현된 항체가 붙은 세포에 레이저를 이용하여 자극을 주고, 그에 의해 방출된 빛을 감지하는 방법으로 세포의 수를 측정하는 장비이다. 이를 위

하여 발현된 항체를 세포에 붙이는 염색과정이 필요하다.

[0056] 본 발명에서는 FITC(fluorescein isothiocyanate)(525 nm), PE(phycoerythrin)(575 nm), PerCP(peridinin chlorophyll protein)(675 nm), APC(allophycocyanin)(660 nm)의 4 가지 파장의 형광이 붙은 항체 조합을 이용하여 염색을 진행하였다. 먼저 상기에서 분리한 비장조세포(primary splenocytes)를 FACS buffer(1× PBS 500 ml + FBS 10 ml + 10 % sodium azide 1 ml) 100 μ l에 잘 분산 시킨 후, 2.4G2 항체(1 : 100의 비율로 FACS buffer에 희석시킴) 10 μ l를 넣고 상온에서 5 분간 반응시켰다. 여기서 2.4G2 항체는 비-특이적인 결합(non-specific binding)을 막아주는 역할을 한다. 반응이 끝난 후, 하기 표 1에 나타난 것과 같은 항체 조합으로 항체를 10 μ l씩 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 20 분간 반응시켰으며, 결합하지 않은 항체를 제거하기 위하여 1,500 rpm의 속도로 3 분간 원심분리를 2회 반복하여 수행하였다. 이후 고정액(fix buffer, 10× PBS 500 ml + formaldehyde 15 ml) 250 μ l에 넣고 측정할 때까지 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0057] [표 1. 항체 조합]

항체 조합			
FITC	PE	PerCP	APC
CD3	CD4 RM 4-4	CD19	CD8

[0059] 4-3. 면역세포 분리율 측정

[0060] 유세포분석기(flow cytometer)를 이용하여 세포의 개체수를 측정함으로써 면역세포의 분리율(Separation Efficiency)을 측정하였다. 측정결과는 도 5 ~ 9에 나타내었다.

[0061] 먼저, 도 5에 나타난 것과 같이, X-축은 CD3 FITC, Y-축은 CD4 PE라고 표시하고 있으며 이는 각각 525 nm의 발산파장을 갖는 형광물질(FITC)이 결합된 CD3 항체를 의미하며, 575 nm의 발산파장을 갖는 형광물질(PE)이 결합된 CD4 항체를 의미한다. 도면에서 하나의 점들은 세포들을 의미하여 일반적으로 가운데 축을 기준으로 세포들이 분포하고 있는데, 가운데 축을 기준으로 왼쪽 아래(lower left; LL)의 세포들은 anti-CD4, anti-CD3 항체가 결합되지 않은 세포들의 분포를 나타내고, 오른쪽 아래(lower right; LR)는 anti-CD3 항체와는 결합하지만 anti-CD4 항체와는 결합하지 않은 세포를 나타낸다. 그리고 왼쪽 위(upper left; UL)은 anti-CD4, anti-CD3 항체 두 가지를 모두 결합한 세포들의 분포를 나타낸다. B cell의 경우 CD19라는 단백질을 발현하는 것으로 알려져 있으며, CD4+ T cell은 CD4, CD8+ T cell은 CD8, NKT와 NK cell은 DX5라는 단백질을 발현하는 것으로 알려져 있다. 그리고 T cell의 경우 공통적으로 CD3이라는 단백질을 발현한다. 그러므로 도 5(A)의 UR(upper right) 세포의 분포는 CD4+ T cell임을 확인할 수 있으며, LR(lower right)의 세포의 분석은 CD4+ T cell을 제외한 T cell의 분포임을 확인할 수 있으며, CD4+ T cell이 34.53 %의 분포를 보이는 것을 확인할 수 있다. 또한 도 5(B)는 O₂ 플라즈마 처리를 한 실리콘 나노선을 이용하여 세포 분리 실험을 진행한 후 세포의 분포를 측정한 것이며, 여기서 CD4+ T cell의 분포가 2.15 %인 것을 확인할 수 있다. 이는 초기의 CD4+ T cell(세포 분리 수행전 CD4+ T cell의 분포(34.53 %))과 비교하였을 때 약 93 %의 분리율을 나타낸다.

[0062] 도 6은 기관의 종류(실리콘 웨이퍼, 유리 웨이퍼 및 본 발명의 실리콘 나노선이 성장된 기관(SiNW))에 따른 CD4+ T cell의 분리율 측정 결과를 나타낸 것이며, 그래프에서 확인할 수 있듯이 실리콘 웨이퍼와 유리 웨이퍼의 경우 약 89 % 정도의 CD4+ T 림프구의 분리율을 보인다. 각 군간의 통계처리는 Prism 5 통계 프로그램을 이용하여 *p*-value를 계산하였으며, SiNW와 실리콘 웨이퍼의 경우 0.017, SiNW와 유리 웨이퍼의 경우 0.003의 값을 보인 것으로 보아 각각의 샘플들이 서로 다른 유의성이 없는 결과임을 의미한다. 또한 도 7은 실리콘 나노선에 O₂ 플라즈마 처리의 유무에 따른 CD4+ T 림프구의 분리율을 나타낸 것이며, 각각 약 65 %, 약 89 %의 분리율을 보인다. *p*-value는 0.0013 값을 보인다. 도 8은 O₂ 플라즈마를 처리한 후의 시간별로 CD4+ T cell의 분리율을 나타낸 것이며, O₂ 플라즈마를 처리한지 1일이 지난 기관에서 약 89 %, 3일이 지난 경우 약 80 %, 7일이 지난 경우 약 71 %의 분리율을 보였다. O₂ 플라즈마를 처리한지 7일이 경과한 경우 대기중의 수분과의 결합에 의해 O₂ 플라즈마에 의한 효과가 떨어져 O₂ 플라즈마를 처리하지 않은 샘플과 유사한 결과를 보인 것으로 확인된다. 도 9는 O₂ 플라즈마를 처리하지 않고 실리콘 나노선을 성장시킨 기관에서 세포 분리를 여러번 반복하였을 때의 세포

분리율을 나타낸 것이다. 세포분리를 1번한 샘플의 경우 약 65 %, 3번 반복한 샘플의 경우 약 71 %, 5번 반복한 샘플의 경우 약 90 % 정도의 세포 분리율을 보였다. 상기 세포 분리의 반복시행은 상기 실시예 4-1에 나타난 고 정화 및 분리 방법을 반복 진행하였다.

[0063] 상기의 결과들로 보아, O_2 플라즈마를 처리한 실리콘 나노선의 경우 상용화된 자성나노입자와 유사한 세포 분리 율을 보이며, 이는 실리콘 나노선의 높은 비표면적(Surface-volume ratio)으로 인한 세포 결합 영역의 증가 때문인 것으로 분석된다. 즉 실리콘 나노선이 성장된 기판은 매우 높은 표면 거칠기를 가지며, ~수 μm 크기를 갖 는 세포가 실리콘 나노선 사이사이에 결합할 수 있는 영역이 많아 높은 분리율을 보이는 것으로 분석된다.

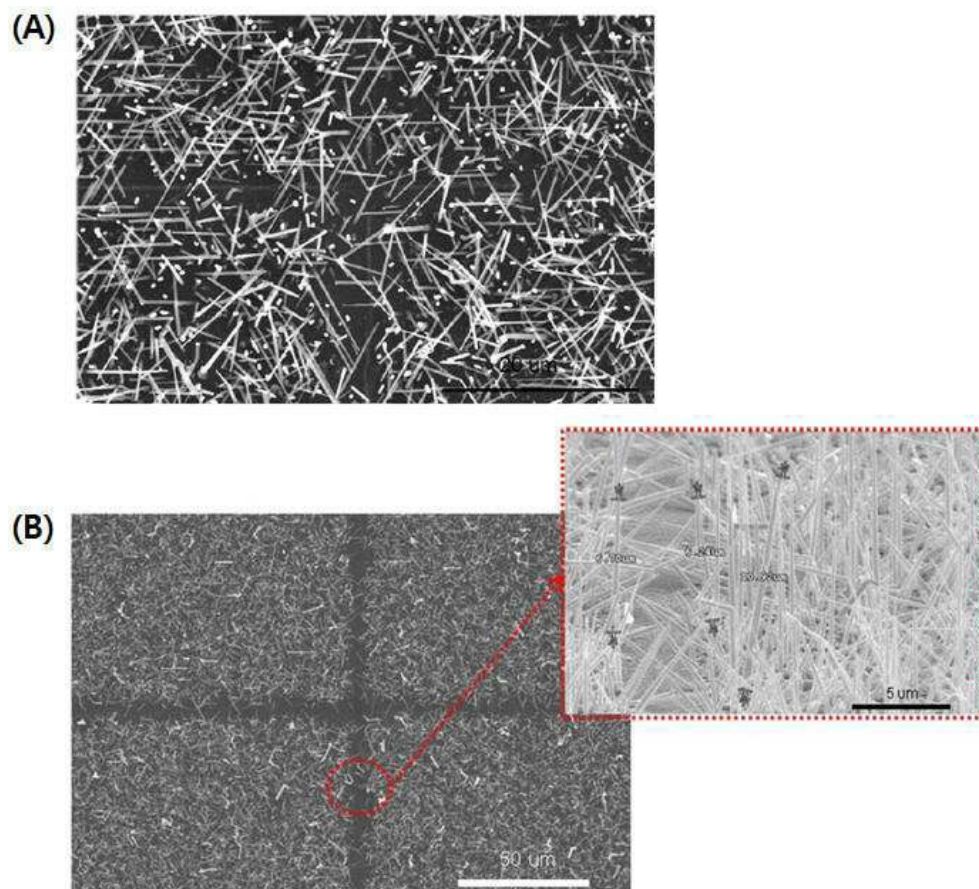
산업상 이용가능성

[0064] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 세포독성이 적으며, 생체적합성(biocompatibility)이 뛰어난 실리콘 나노선(silicon nanowire)을 이용하여 특정 세포의 선택적 분리가 가능한 세포 분리칩을 제조할 수 있으며, 상 기 세포 분리칩은 자성을 이용하지 않으며, 별도의 키트와 장치가 필요하지 않으며, 적은 수의 세포도 분리 가 능하므로 고수율의 세포 분리능을 얻을 수 있다.

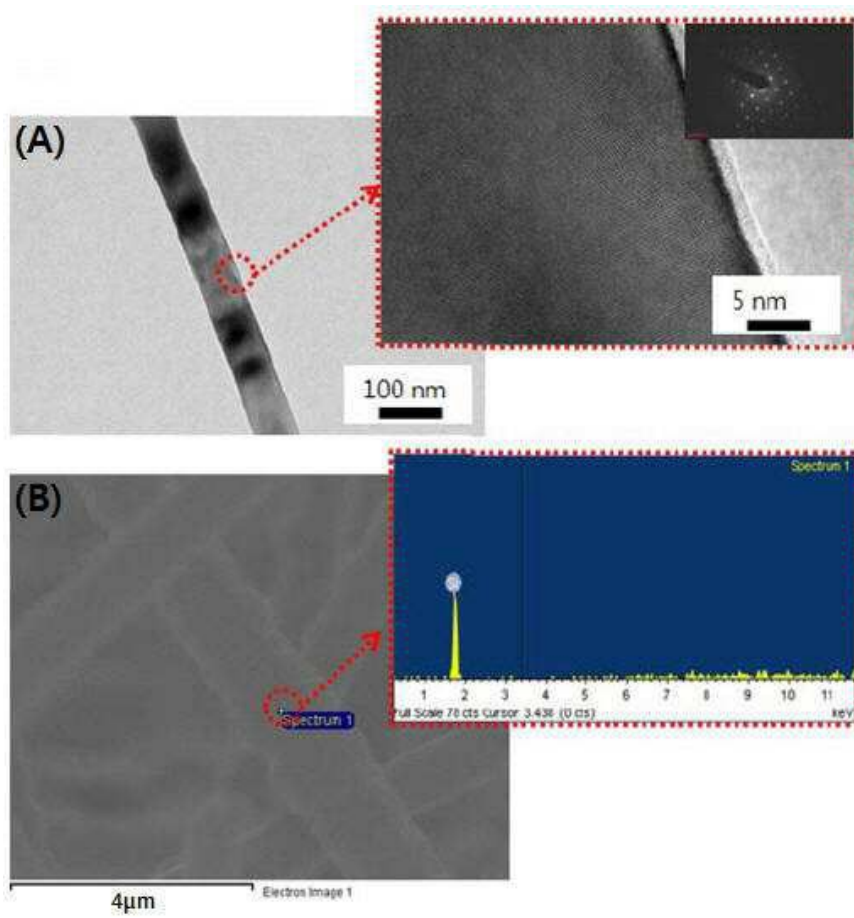
[0065] 상기 실시예에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 세포 분리칩을 이용하여 마우스의 비장세포로부터 면역세포(CD4+ T cell)를 성공적으로 분리하였다. 이와 같이 세포 분리방법에 있어서 그 방법이 간단하며 재사용할 수 있으므 로 기존의 세포 분리 방법을 대체할 수 있는 기술이 될 것이다.

도면

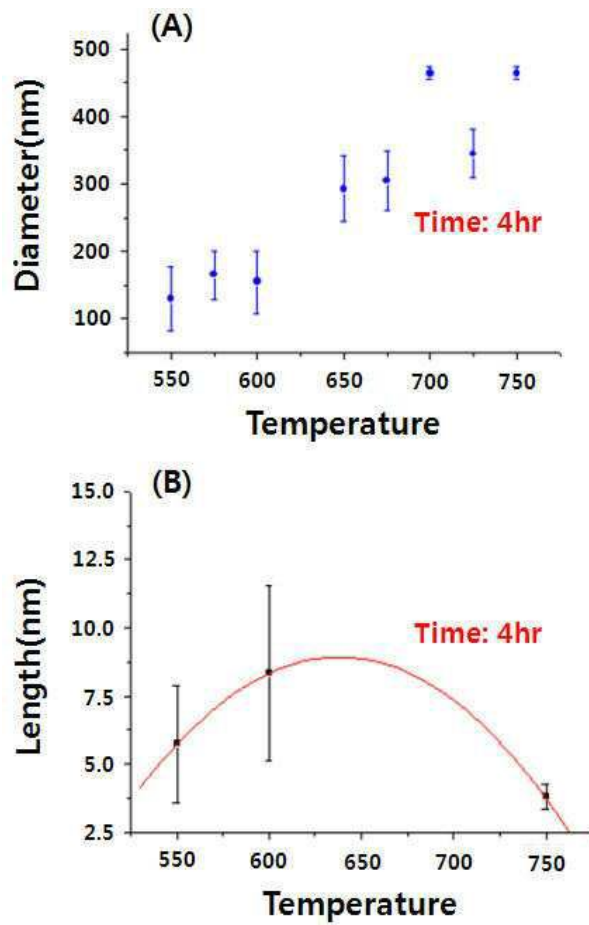
도면1a



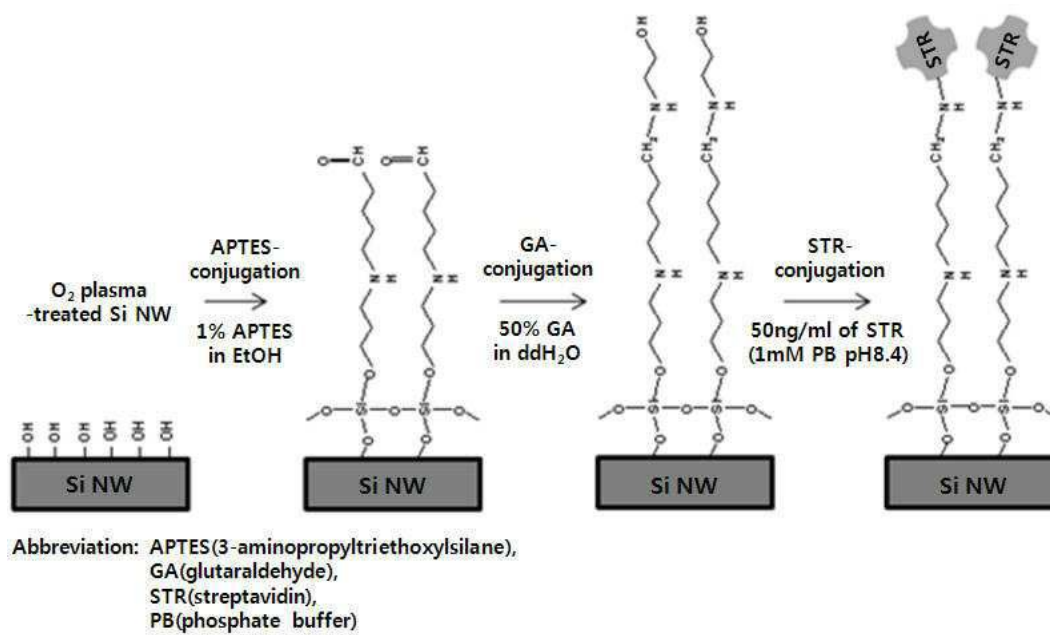
도면1b



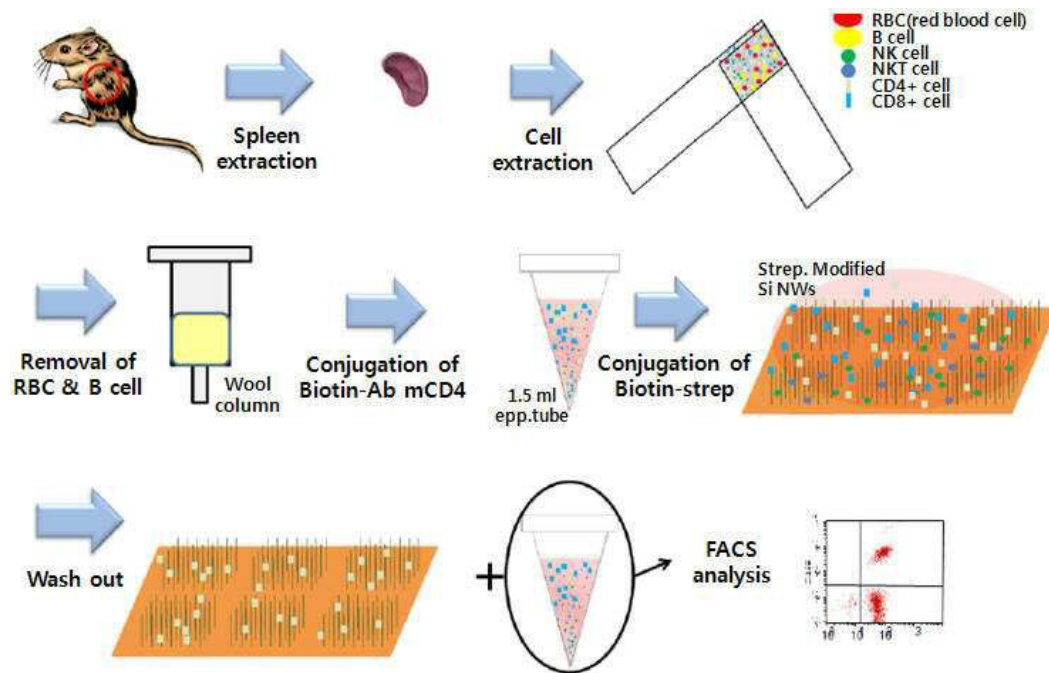
도면1c



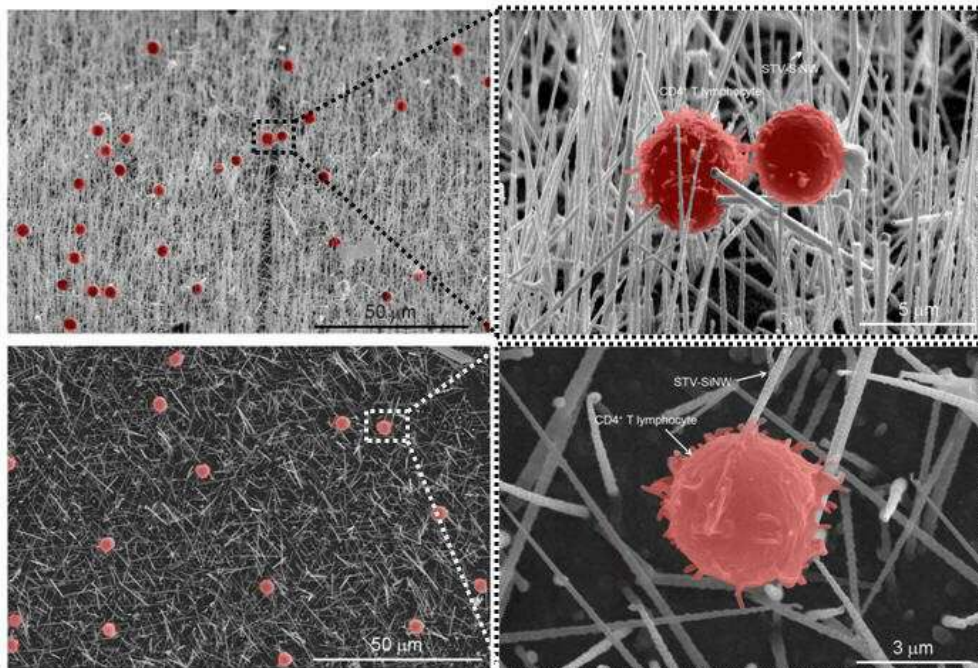
도면2



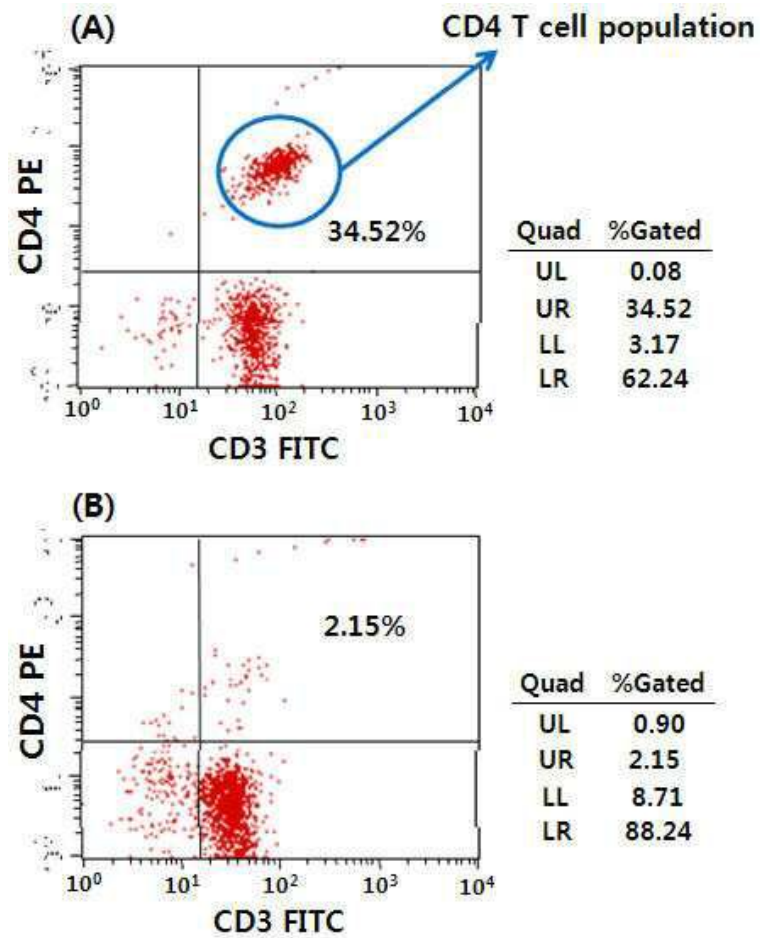
도면3



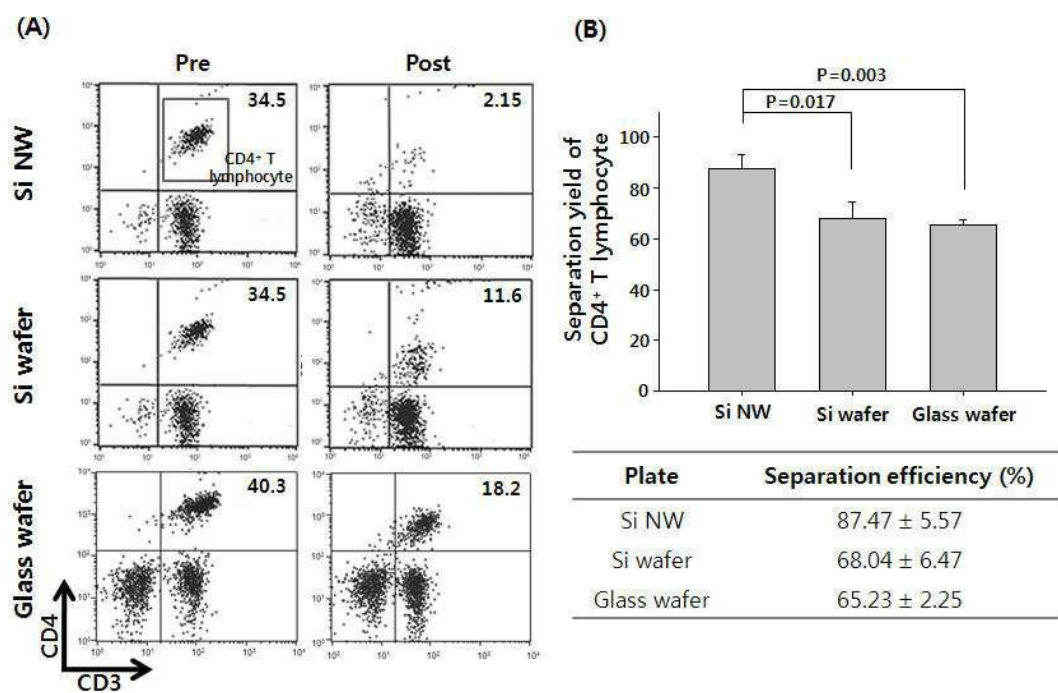
도면4



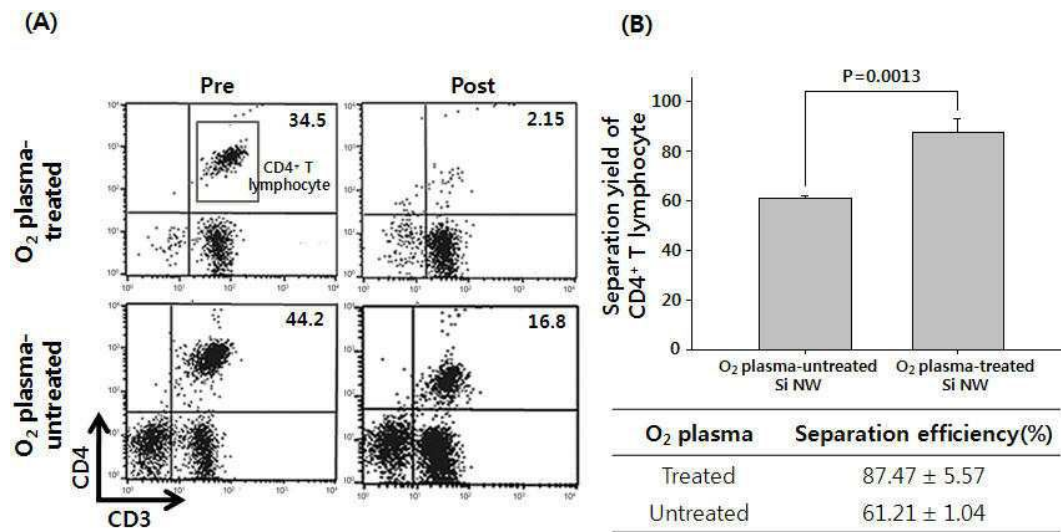
도면5



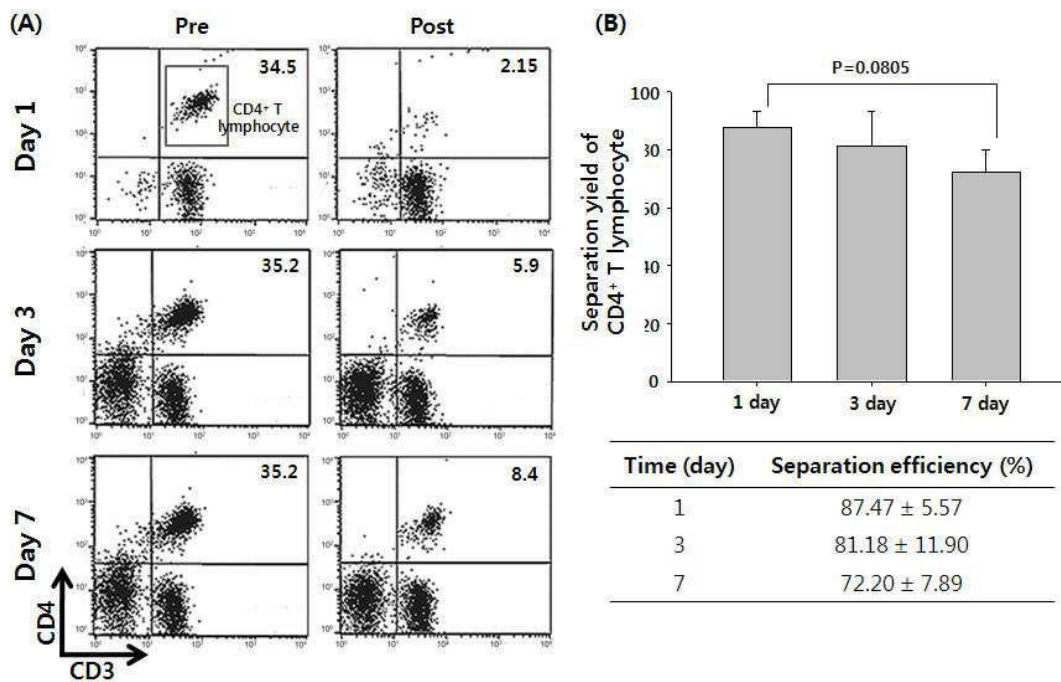
도면6



도면7



도면8



도면9

