



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0050901

(43) 공개일자 2015년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0132128

(22) 출원일자 2013년11월01일

심사청구일자 2013년11월01일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

장재원

부산광역시 남구 용소로 45 부경대학교 자연과학
대학 물리학과 나노공정 및 물성 연구실

(74) 대리인

김홍석, 김동용, 문경진, 이강녕

전체 청구항 수 : 총 12 항

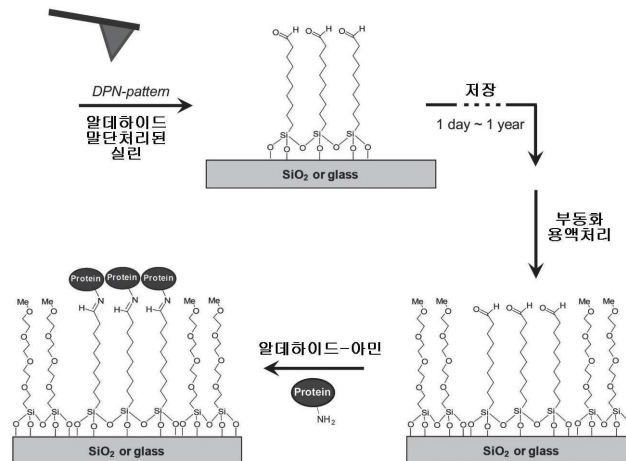
(54) 발명의 명칭 단백질 어레이 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 기판을 준비하는 단계; 기판상에 Dip-Pen 리소그래피 (DPN) 방식으로 알데하이드-말단 처리된 실란을 패터닝하는 단계; 및 상기 패터닝된 부분 상에 단백질을 도입하는 단계;를 포함하는 단일층 또는 복층의 단백질 어레이의 제조방법 및 이에 의해 제조된 단백질 어레이 및 세포 어레이에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 액체 상태의 알데하이드-말단 처리된 실란을 사용함으로써, Dip-Pen 리소그래피 방식으로 기판상에 손쉽게 패터닝이 가능하고, 또한 패터닝된 기판은 상온에서 안정하여 보관 기간이 증가하는 장점이 있으며, 향후 알데하이드 말단기에 단백질의 고정화가 높은 효율로 이루어질 수 있어, 본 발명을 사용하여 제조된 단백질 어레이는 단백질 칩, 나아가서는 단백질에 세포를 결합시켜 세포 칩으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A1041394

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 나노렌즈의 근접장 초점 모임 메커니즘 규명과 기능성 나노렌즈 제작 및 응용연구

기 여 율 1/3

주관기관 부경대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013K1A3A1A32035429

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미공군협력사업

연구과제명 플라즈몬-광전기 상호작용 연구

기 여 율 1/3

주관기관 부경대학교

연구기간 2013.07.01 ~ 2016.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013K2A2A4003362

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 MOU근거 한-일협력사업

연구과제명 선택적인 방법에 의한 밴드갭-고분자 부착 반도체 탄소나노튜브 재료의전기-광학적 물성
및 응용 연구

기 여 율 1/3

주관기관 부경대학교

연구기간 2013.07.01 ~ 2015.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

기관을 준비하는 단계;

기관상에 Dip-Pen 리소그래피 (DPN) 방식으로 알데하이드-말단 처리된 실란을 패터닝하는 단계; 및

상기 패터닝된 부분 상에 단백질을 도입하는 단계;를 포함하는 단일층 또는 복층의 단백질 어레이의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 기관은 SiO_2 -도포된 실리콘 또는 유리 기관인 것인 단백질 어레이의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 알데하이드-말단 처리된 실란은 11-(트리에톡시실릴) 운데카날인 것인 단백질 어레이의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 패터닝하는 단계 후 이를 3분 내지 1년간 보관하는 단계를 추가로 포함하는 단백질 어레이의 제조방법

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단백질을 도입하는 단계 전, 패터닝된 부분 외의 기관상의 영역을 부동화 용액을 처리하여 블로킹시키는 단계를 추가로 포함하는 단백질 어레이의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 부동화 용액은 단백질-무반응 실란 용액인 것인 단백질 어레이의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 단백질-무반응 실란 용액은 2-메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필트리메톡시실란 용액인 것인 단백질 어레이의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 단백질은 피브로넥틴, 콜라겐(Collagen), 라미닌(Laminin), 엘라스틴(Elastin), 테넥신(Tenascin C) 또는 빅트로넥틴(Vitronectin)의 세포외물질과 IgG물질이며, 단백질 도입 후 세포가 도입되는 단계가 추가로 포함되는, 단백질 어레이의 제조방법.

청구항 9

기관;

기관 상에 형성된 알데하이드-말단 처리된 실란층; 및

상기 알데하이드-말단 처리된 실란층의 알데하이드 작용기와 결합된 단백질층;을 포함하는 단일층 또는 복층의 단백질 어레이.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 기관은 SiO_2 -도포된 실리콘 또는 유리 기관인 것인 단백질 어레이.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 알데하이드-말단 처리된 실란층은 11-(트리에톡시실릴) 운데카날을 포함하는 것인 단백질 어레이.

청구항 12

기관;

기관 상에 형성된 알데하이드-말단 처리된 실란층;

상기 알데하이드-말단 처리된 실란층의 알데하이드 작용기와 결합된 피브로넥틴 층; 및

상기 피브로넥틴에 결합된 세포층;을 포함하는 세포 어레이.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단백질 어레이, 이의 제조방법 및 이를 통해 제조된 세포 어레이에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이오칩은 생물에서 유래한 효소, 단백질, 항체, DNA, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포 및 기관, 신경 세포 등과 같은 생체 유기물과 반도체나 유리 같은 무기물을 조합하여 기존의 반도체칩 형태로 만든 혼성소자 (Hybrid device)이다. 생체분자의 고유한 기능을 활용하고 생체의 기능을 모방함으로써 감염성 질병을 진단하거나 유전자를 분석하고 새로운 정보처리용 신기능 소자의 역할을 하는 특징이 있다.

[0003] 바이오칩의 종류에 대해서는 생체분자와 시스템화된 정도에 따라 DNA칩, RNA칩, 단백질 칩, 세포칩, 뉴런칩 등으로 구분될 수 있으며, 시료의 전처리, 생화학 반응, 검출, 자료 해석까지 소형 집적화되어 자동분석기능을 갖는 실험실칩(Lab on a chip)과 같은 각종 생화학물질의 검출 및 분석 기능을 할 수 있는 '바이오센서'를 포함하여 광범위하게 정의될 수 있다.

[0004] 바이오칩 중, 단백질 칩은 특히 조직공학, 바이오센서, 진단 및 세포외물질(ECM)에의 결합을 통한 세포의 연구에 매우 유용한 바, 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 단백질 칩의 개발을 위해서는, 이하의 몇가지 점을 고려하여야 한다. 1) 단백질 및 세포는 금속 산화물에 매우 민감하기 때문에, 기관으로 SiO_x 표면을 사용하는 것이 유용하다. 2) 또한, 단백질은 탈수에 의한 변성이 잘 일어나므로, 단백질을 변성없이 오래 보관하기 위한 패터닝 기술이 필요하다. 종래 머캅토실란을 이용한 단백질 패터닝 기술이 보고된 바 있으나(H. Jung, R. Kulkarni, C. P. Collier, J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 12096 - 12097), 이는 습기 있는 환경에서 패터닝 형성 및 유지가 힘들다는 단점이 있었다.

[0005] 이에 따라, 본 발명의 발명자들은 리소그래피 기술을 이용하여, SiO_x 표면에 단백질을 패터닝하여 단백질 어레이를 제조하는 기술을 연구하였고, 이로 인해 알데하이드 말단 처리된 실란 패터닝된 기관의 단백질과의 결합능이 1년 이상 지속됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서 본 발명은 리소그래피 기술을 이용한 단백질 어레이의 제조방법 및 이를 통해 제조된 단백질 어레이 및 세포 어레이를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 기판을 준비하는 단계; 기판상에 Dip-Pen 리소그래피 (DPN) 방식으로 알데하이드-말단 처리된 실란을 패터닝하는 단계; 및 상기 패터닝된 부분 상에 단백질을 도입하는 단계;를 포함하는 단백질 어레이의 제조방법을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 기판; 기판 상에 형성된 알데하이드-말단 처리된 실란층; 및 상기 알데하이드-말단 처리된 실란층의 알데하이드 작용기와 결합된 단백질층;을 포함하는 단일층 또는 복층의 단백질 어레이를 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 기판; 기판 상에 형성된 알데하이드-말단 처리된 실란층; 상기 알데하이드-말단 처리된 실란층의 알데하이드 작용기와 결합된 피브로넥틴 층; 및 상기 피브로넥틴에 결합된 세포층;을 포함하는 세포 어레이를 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, 액체 상태의 알데하이드-말단 처리된 실란을 사용함으로써, Dip-Pen 리소그래피 방식으로 기판상에 손쉽게 패터닝이 가능하고, 또한 패터닝된 기판은 상온에서 안정하여 보관 기간이 증가하는 장점이 있으며, 향후 알데하이드 말단기에 단백질의 고정화가 높은 효율로 이루어질 수 있어, 본 발명을 사용하여 제조된 단백질 어레이는 단백질 칩, 나아가서는 단백질에 세포를 결합시켜 세포 칩으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 알데하이드-말단 처리된 실란 DPN 프린팅 및 단백질 결합의 모식도이다.

도 2는 알데하이드-말단 처리된 실란 템플레이트 보관 기간에 따른 단백질 결합능에 대한 실험 결과이다(a: 1일 보관된 샘플, b: 1년 보관된 샘플, c: 각 샘플당 표준화된 형광 강도의 비교 그래프).

도 3은 알데하이드-실란 템플레이트에의 FN 결합 실험에 대한 결과이다. 반응 모식도를 도 3a에, 실험 결과를 도 3b 및 c에 나타내었다.

도 4는 FN 이 결합된 단백질 어레이상의 세포결합 실험에 대한 결과이다. 반응 모식도를 도 4a에, 광학 현미경 분석 결과를 도 4b에, AFM 분석 결과를 도 4c 및 4d에 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 기판을 준비하는 단계; 기판상에 Dip-Pen 리소그래피 (DPN) 방식으로 알데하이드-말단 처리된 실란을 패터닝하는 단계; 및 상기 패터닝된 부분 상에 단백질을 도입하는 단계;를 포함하는 단백질 어레이의 제조방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 발명자들은 안정화된 단백질 패터닝 방법을 연구하던 중, 알데하이드-말단 처리된 실란기를 패터닝 용액으로 사용하는 경우, 액상으로 사용이 간편하고, 상온에서 보관이 가능하며, 이에 단백질과의 결합능도 보관 후 1년 이상 유지됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다. 특히 이하의 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 미세한 조절이 가능한 Dip-Pen 리소그래피 방식을 사용함으로써, 피브로넥틴을 이용한 단백질 어레이에의 세포 부착도 용이하게 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0014] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 기판은 SiO_2 -도포된 실리콘 또는 유리 기판일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 부착된 단백질 및 세포의 거동에 영향을 미치지 않는 기판이라면 제한 없이 사용이 가능하다.

[0015] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 알데하이드-말단 처리된 실란은 11-(트리에톡시실릴) 운데카날일 수 있으며, Dip-Pen 리소그래피 방식으로 기판에 패터닝될 수 있다. 보다 구체적으로, Dip-Pen 리소그래피 (dip-pen nanolithography)는 펜 형상의 워터메니스커스(water meniscus)를 통해 AFM팁에 부착되어 있는 분자들이 기판 상에 확산되는 방식과 액체상 물질의 직접 전달 방식으로, 이때, 알데하이드-말단 처리된 실란 화합물이 Dip-Pen 리소그래피의 잉크 물질로 사용된다. AFM팁의 기판 상의 체류 시간 또는 잉크 용출량을 조절하는 방식으로

기관 상의 패터닝 패턴을 조절할 수 있다.

- [0016] 상기 패터닝된 기관은 상온에서 매우 안정하여, 별도 처리 없이 최대 1년까지 보관이 가능하며, 장시간 보관 후에도 단백질과의 결합능이 유지됨을 이하의 실시예에서 확인하였다. 따라서, 상기 패터닝된 기관을 3분 내지 1년간 보관 후 이후의 단백질 도입단계가 수행될 수 있다.
- [0017] 상기 패터닝 단계 후, 노출된 알데하이드기에 단백질을 결합하는 방식으로 패터닝된 부분 상에 단백질을 도입하는 단계가 수행된다. 이때, 노출된 알데하이드기에만 단백질이 특이적으로 결합될 수 있도록, 단백질 도입 전, 패터닝된 부분 외의 기관상의 영역을 부동화 용액을 처리하여 블로킹시키는 단계가 추가로 수행될 수 있다. 이때 상기 부동화 용액은 단백질-무반응 실란 용액일 수 있으며, 더욱 구체적으로 2-메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필트리메톡시실란 용액일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 이를 통해 패터닝된 부분의 알데하이드기에만 단백질의 아민기가 공유결합되어 단백질 어레이가 제조될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 도입되는 단백질은 항체, 세포외물질(extracellular material, ECM), 진단용 표적 단백질 등이 이에 해당할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 도입되는 단백질은 세포외물질이며, 이는 세포와의 결합능이 있는 바, 추가로 세포를 도입하여 세포가 결합된 세포 어레이를 제조할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 세포외물질은 피브로넥틴, 콜라겐(Collagen), 라미닌(Laminin), 엘라스틴(Elastin), 테넥신(Tenascin C) 또는 빅트로넥틴(Vitronectin)이며, 도입되는 세포는 섬유아세포일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명은 또한 기관; 기관 상에 형성된 알데하이드-말단 처리된 실란층; 및 상기 알데하이드-말단 처리된 실란층의 알데하이드 작용기와 결합된 단백질층;을 포함하는 단일층 또는 복층의 단백질 어레이를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 기관은 SiO₂-도포된 실리콘 또는 유리 기관일 수 있으며, 상기 알데하이드-말단 처리된 실란층은 11-(트리에톡시실릴) 운데카날을 포함할 수 있다. 이하, 상술한 구체예와 중복되는 설명에 대해서는 생략한다.
- [0022] 본 발명은 또한, 기관; 기관 상에 형성된 알데하이드-말단 처리된 실란층;
- [0023] 상기 알데하이드-말단 처리된 실란층의 알데하이드 작용기와 결합된 피브로넥틴 층; 및 상기 피브로넥틴에 결합된 세포층;을 포함하는 세포 어레이를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 도입되는 세포는 섬유아세포일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 세포의 고정화를 통해 세포어레이가 제조된다. 이때, 전체 어레이의 크기를 조절함에 따라 세포 어레이의 세포수를 조절할 수 있다.

- [0025] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0026] <실시예 1> 알데하이드-말단 처리된 실란 DPN 프린팅 및 단백질 결합

[0027] 1. 알데하이드-말단 처리된 실란 DPN 프린팅

- [0028] 11-(트리에톡시실릴) 운데카날 (Gelest Inc.)이 세척된 SiO₂-도포된 실리콘 또는 유리 기관 상에서 세포 이하 수준의 알데하이드-말단 처리된 실란 DPN 프린팅의 잉크 물질로 사용되었다. 1D parallel DPN 프린팅이 1D pen array cantilevers (M-Exp type, NanoInk Inc.)로 상업적으로 사용가능한 나노리쓰그래피 플랫폼(DPN5000, NLP2000, NanoInk Inc.)을 사용하여 수행되었다. 액상 알데하이드-실란 잉크 물질은 1D 펜 어레이 팁에 DPN 잉크웰(Inkwell)을 사용하여 로딩되었다. 초기 DPN 프린팅의 스팟 크기는 잉크 용출 시간을 통해 조절할 수 있었다. 모든 DPN 프린팅은 상온(25℃, 30% RH)에서, 기관 표면에 0.1-3초간 팁을 체류시키며 수행되었다. SiO₂ 기관 상의 세포 이하 수준의 알데하이드-말단 처리된 실란 템플레이트는 단백질 결합 전, 상온에서 별도 처리 없이 보관이 가능하였다.

[0029]

2. 알데하이드-실란 템플레이트에의 IgG 단백질 결합

[0030]

SiO₂ 기판 표면의 비특이적 단백질 결합을 방지하기 위해, 알데하이드-실란 템플레이트 패턴화된 샘플을 10mM 2-메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필트리메톡시실란(PEG-실란) 에탄올 용액에 1시간 담그는 방법을 통해 단백질-무반응 실란 부동화(passivation)를 수행하였고, 이를 통해 단백질과 비 패턴화된 영역간의 비특이적 반응을 최소화하고자 하였다. 부동화 반응 후, 샘플을 에탄올 및 1× 포스페이트-버퍼 실란(PBS) 용액으로 세척하였다. 알데하이드-실란 템플레이트 영역은 1× PBS 용액 (20 μg/mL)에서 AlexaFluor 546-표지된 당나귀 항-마우스 IgG(Invitrogen)에 2시간 동안 노출되었다. IgG 결합반응 이후, 샘플은 0.1vol% 트윈 20이 첨가된 1× PBS 용액 및 탈이온수로 꼼꼼히 세척되었다.

[0031]

상기 반응의 모식도를 도 1에 나타내었다. 본 반응의 장점은 알데하이드-실란 템플레이트 패턴화된 샘플의 보관이 1일 내지 1년 간 가능하다는 점이고, 이를 통해, 사용자가 샘플을 저장 후 언제든지 필요할 때 단백질 어레이를 제작할 수 있다는 점에 있다.

[0032]

<실시예 2> 알데하이드-말단 처리된 실란 템플레이트 보관 기간에 따른 단백질 결합능 분석

[0033]

Optical microscope (Axio Imager Z1m, Carl Zeiss)를 사용하여 형광 광학 현미경 이미지를 획득하였다. 1일 및 1년 보관된 알데하이드-실란 템플레이트 샘플에 대해 각각 노출 시간을 동일하게 하여 형광 이미지를 촬영하였다. 샘플의 IgG-패터닝된 영역 및 백그라운드간의 형광 강도 차이는 동일한 이미징 프로세스로 측정되었다(즉, 동일한 감마값 및 대비 대역폭). 평균 형광 강도는 10X10 어레이에 관심 부위의 형광 강도에서 백그라운드 강도를 감하여 획득하였다. 1일 알데하이드-실란 템플레이트 샘플의 평균 형광 강도는 1로 설정되었다. 결과를 도 2에 나타내었다(a: 1일 보관된 샘플, b: 1년 보관된 샘플, c: 각 샘플당 표준화된 형광 강도의 비교 그래프).

[0034]

도 2를 참조하면, 형광(FL) 염료 태그된 IgG 단백질(AlexaFluor 546-labeled donkey antimouse IgG)은 1D parallel DPN 프린트된 알데하이드-실란 템플레이트 상에 결합된 것을 확인할 수 있었다(도 2b의 내부 모식도 참조). 5μm 간격을 두고 프린트된 알데하이드-실란 dot 어레이는 팁을 1초간 체류시켜 프린팅하는 방법으로 제조되었다. 도 2c는 1년 보관된 샘플의 형광이 1일 보관된 샘플과 비교하여 85% 유지됨을 보여준다. 따라서, 1년 보관된 알데하이드-실란 세포이하-수준 어레이는 여전히 충분한 단백질 결합 활성을 보유함을 알 수 있었다.

[0035]

<실시예 3> 알데하이드-실란 템플레이트에의 FN 결합을 통한 단일 세포 결합에의 적용

[0036]

1. 알데하이드-실란 템플레이트에의 FN 결합

[0037]

세포이하-수준의 알데하이드-실란 어레이는 유리 기판(SuperClean2, ArrayIt Corporation) 상에 1D DPN 프린팅을 통해 준비되었다. 알데하이드-실란 어레이-패터닝된 샘플은 PEG-실란 톨루엔 용액(10mg/ml)으로 1시간 동안 처리하여 부동화되었다. 부동화 후, 샘플은 톨루엔, 에탄올, DI(탈이온수)로 순차적으로 세척되었다. 세척된 샘플은 1× PBS 용액(600 μg/mL)에서 FN(인간 플라즈마 피브로넥틴, Millipore)에 1시간 동안 노출되었다. 비특이적으로 결합된 FN을 제거하기 위해, 샘플은 0.1 vol% 트윈 20이 첨가된 1× PBS 용액으로 세척되었다. FN 패턴의 형광 염색 표지를 위해, FN-패터닝된 샘플은 1× PBS 용액(1:200 dilution)에서 α-FN IgG (모노클로날 항-인간 피브로넥틴, Sigma Aldrich) 및 1× PBS 용액(20 μg/mL)에서 형광-표지된 α-IgG (AlexaFluor 568-표지된 당나귀 항-마우스 IgG 항체, Invitrogen)에 노출되었다. 각각의 단계 후 샘플은 0.1 vol% 트윈 20이 첨가된 1× PBS 용액으로 꼼꼼히 세척되었다. 반응 모식도를 도 3a에, 실험 결과를 도 3b 및 c에 나타내었다. FN 마이크로어레이 패턴을 도 3b에, 나노어레이 패턴을 도 3c에 나타내었다. 형광 현미경 이미지를 통해 FN이 알데하이드-실란 템플레이트에 결합됨을 확인할 수 있었다. 도 3b에 나타난 FN-마이크로어레이의 크기 분포는 직경이 $11.2 \pm 0.9 \mu\text{m}$ 였으며, 도 3c에 나타난 FN-나노어레이의 크기 분포는 직경이 $670 \pm 6 \text{ nm}$ 로 나타났다.

[0038]

2. FN 세포이하-수준 어레이의 세포결합

[0039]

FN 세포이하-수준 어레이는 1D DPN-인쇄된(6-pen, 133 μm pitch) 알데하이드-실란 템플레이트를 통해 획득되었다. FN 어레이 상의 세포 결합을 위해, ITS+1 (Invitrogen) 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 상의 3T3 섬유아세포를 $2.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ 로 가하고 30분간 반응시켰다. 반응 모식도를 도 4a에 나타내었다.

3. 결합된 세포의 광학 현미경 분석

패터닝된 세포는 FN, 액틴 필라멘트, 핵을 영상화하기 위하여 형광 현미경(Axio Imager Z1m, Carl Zeiss)으로 시각화되었다. FN은 α -FN IgG 및 이에 형광 표지된 α -IgG가 부착되어 표지되었다. 세포의 액틴 필라멘트 및 핵은 각각 phalloidin-488 (Invitrogen) 및 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)로 표지되었다. 표지된 FN, 액틴 필라멘트 및 핵의 형광 현미경 이미지는 각각 HE-DsRed, FITC, 및 DAPI 필터를 사용하여 획득되었고, 각 필터를 사용하여 얻어진 이미지를 통합한 이미지를 도 4b에 나타내었다. 도 4b를 참조하면, 세포의 액틴은 녹색으로, 핵은 파란색으로 염색되었다.

4. 결합된 세포의 수율 분석

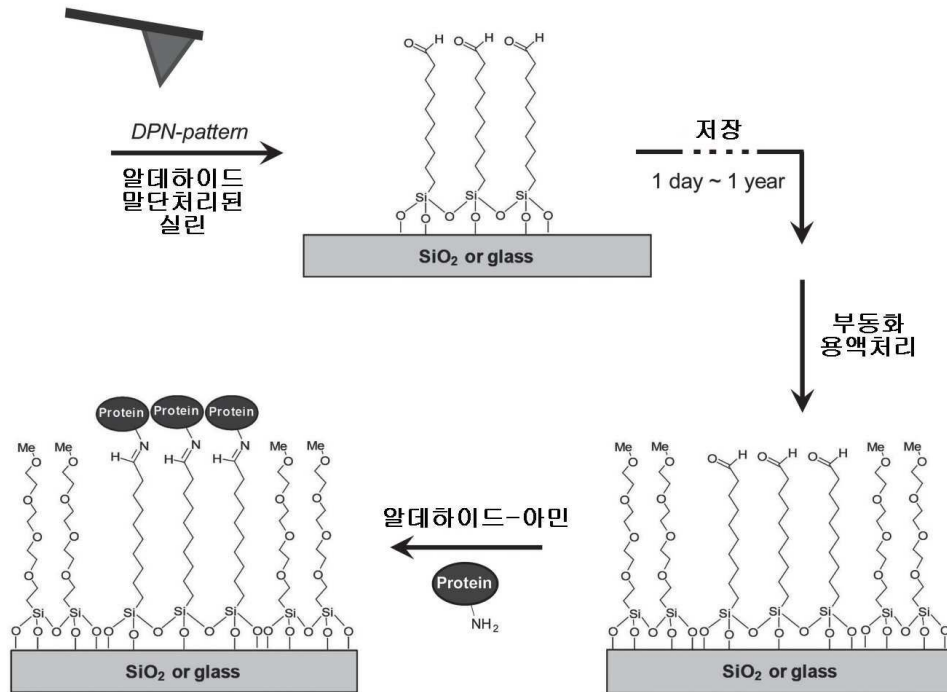
FN 나노어레이의 Topography 및 LFM(lateral force microscopy) 이미지는 상온에서 SiN tip cantilever (A-type, NanoInk, Inc)로 DPN5000 장치 (NanoInk, Inc.)를 사용하여 획득되었다. 알테하이드-실란 템플레이트에의 FN 결합을 확인하기 위해, AFM 측정이 3T3 섬유아세포(fibroblast)를 검출하기 위해 수행되었고, 결과를 도 4c 및 4d에 나타내었다.

도 4c는 $21 \times 21 \mu\text{m}^2$ 및, 도 4d는 $42 \times 42 \mu\text{m}^2$ 크기의 FN나노어레이에 섬유아세포가 결합된 것을 보여준다. 각 크기의 FN 나노어레이에의 세포 결합률을 도 4e에 그래프로 나타내었다. 섬유아세포는 $42 \times 42 \mu\text{m}^2$ 크기의 나노어레이에 $21 \times 21 \mu\text{m}^2$ 크기의 나노어레이 경우보다 더 잘 결합하는 경향을 보였다(약 67%). 그러나, 단일-세포 결합은 $21 \times 21 \mu\text{m}^2$ 크기의 나노어레이에서 더 잘 이루어지는 것으로 확인되었다(약75%). 상기 결과는 FN 나노어레이 상에 결합되는 세포의 수는 나노어레이의 크기를 조절함으로써 면밀히 조절할 수 있음을 시사한다.

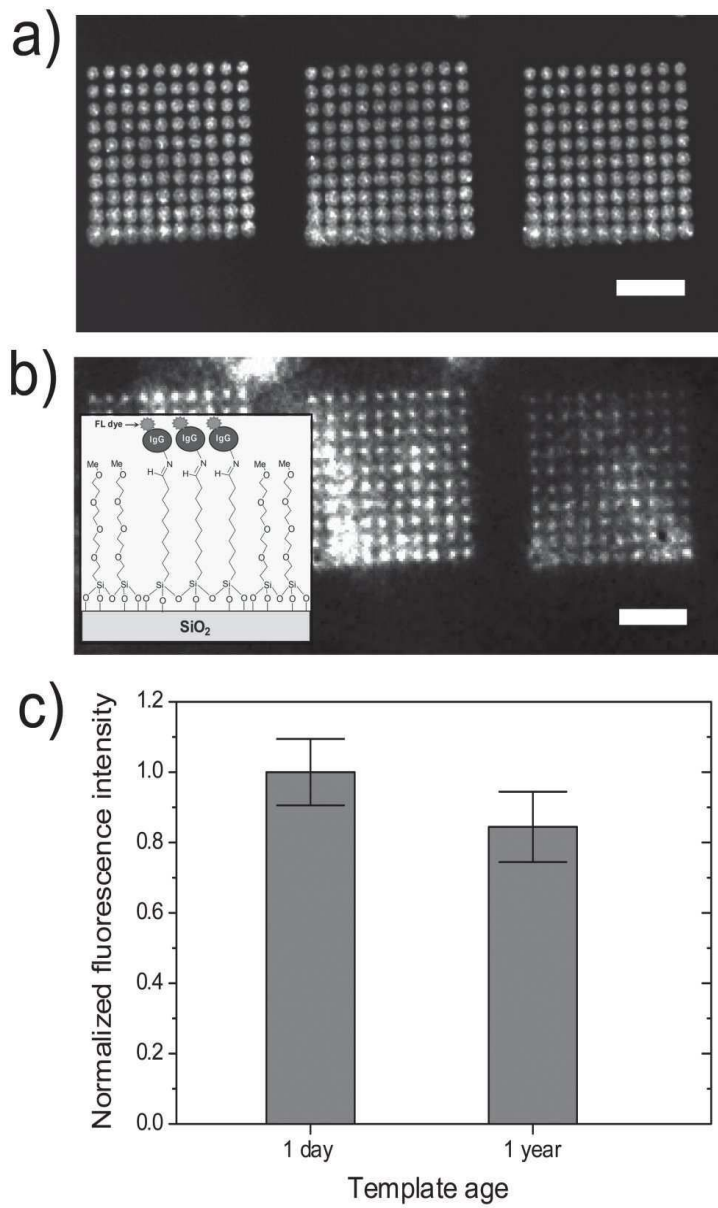
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

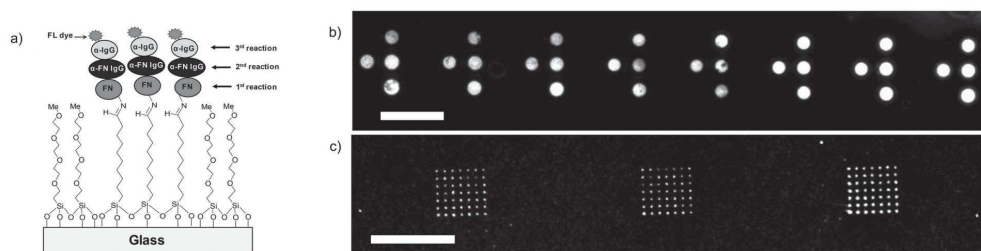
도면1



도면2



도면3



도면4

