



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0000142
(43) 공개일자 2017년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/65 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/658 (2013.01)
G01N 33/53 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0088958
(22) 출원일자 2015년06월23일
심사청구일자 2015년06월23일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 서빙고로 35 (2/9) 용산시티파크 103-603 (한강로3가, 용산시티파크1단지)
조현열
서울특별시 마포구 신수로9길 14 (신수동)93-97 302호
후세인 칼레드
서울특별시 마포구 대흥동 17-50
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

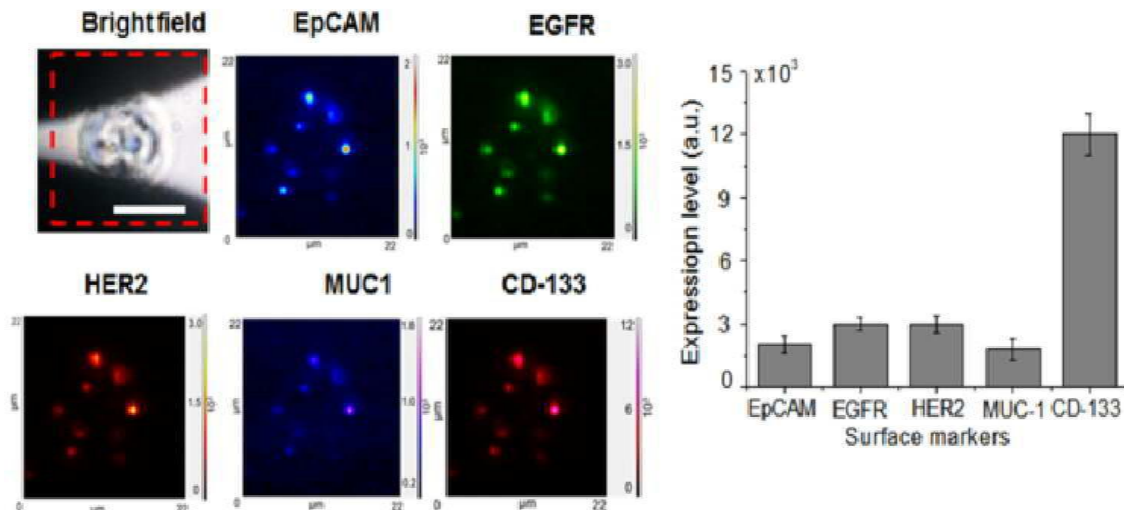
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 표면 증강 라만 산란 방법(SERS)을 이용하여 순환 종양세포 및 순환 종양 줄기유사세포를 검출하는 방법 및 이를 이용한 시스템

(57) 요약

본 발명은 SERS 나노텍을 이용하여 순환 종양 줄기유사세포 및 순환 종양세포를 검출할 수 있는 방법 및 이를 이용한 시스템에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, SERS 나노텍으로 표지한 혈액 샘플을 미세유체칩에 적용하고 라만 분광법으로 스펙트럼을 분석하는 경우, 효과적으로 순환 종양 줄기유사세포 및 순환 종양세포를 검출할 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 방법 및 시스템은 순환 종양 줄기유사세포 및 순환 종양세포의 검출이 필요한 암 치료분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

G01N 33/574 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013K1A4A3055268

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 해외우수연구기관 유치사업

연구과제명 서강-하버드 질병 바이오통리 연구 센터

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A10051725

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 도약연구지원사업

연구과제명 뇌질환 약물 스크리닝 기능 나노구조체 기반 뇌 기저핵칩

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 순환 종양세포(circulating tumor cell, CTC) 또는 순환 종양 줄기유사세포(stem-like circulating tumor cell, SCTC)를 검출하는 방법:

- (a) 생체로부터 분리한 혈액 샘플에 SERS 나노태크(Surface Enhanced Raman Scattering Nanotag)을 접촉시키는 단계; 상기 SERS 나노태크는 (i) 나노입자; (ii) 상기 나노입자의 표면에 결합된 라만 리포터; (iii) 상기 나노입자의 표면에 결합된 종양세포 표면 항원-특이적인 항체; 및 (iv) 상기 나노입자의 표면에 결합된 비공유결합 파트너(non-covalent binding partner)를 포함하고;
- (b) 상기 SERS 나노태크와 접촉된 시료용액을 미세유체칩(microfluidic chip) 표면의 채널(channel) 내에 주입하는 단계;
- (c) 상기 미세유체칩으로부터 SERS 스펙트럼을 획득하는 단계; 및
- (d) 상기 SERS 스펙트럼을 분석하여 순환 종양세포 또는 순환 종양 줄기유사세포를 검출하는 단계.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 순환 종양세포 또는 순환 종양 줄기유사세포는 유방 순환 종양세포 또는 유방 순환 종양 줄기유사세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 단계 (a)의 나노입자는 금인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단계 (a)의 라만리포터는 티오펜올(thiophenol, TP), 나일블루 A(nile blue A, NBA), 1-나프탈렌티올(1-naphthalenethiol, NPT), 4-머캅토피리딘(4-mercaptopyridine, MPy) 또는 2-퀴놀린에티올(2-quinolinethiol, QTH)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단계 (a)의 종양세포 표면 항원-특이적인 항체는 순환 종양세포 또는 순환 종양 줄기유사세포의 표면 항원에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 단계 (a)의 종양세포 표면 항원-특이적인 항체는 유방 순환 종양세포 또는 유방 순환 종양 줄기유사세포의 표면 항원에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 유방 순환 종양세포 또는 유방 순환 종양 줄기유사세포의 표면 항원은 MUC1, EpCAM,

EGFR, HER2 또는 CD-133인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 단계 (a)의 항체는 링커에 의해 나노입자의 표면에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 단계 (a)의 비공유결합 파트너는 바이오틴인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 단계 (a)의 비공유결합 파트너는 링커 및 이중나선 DNA에 의해 나노입자의 표면에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 단계 (b)의 미세유체칩(microfluidic chip)은 표면이 스트렙타아비딘(streptavidin)으로 코팅되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 단계 (a)의 종양세포 표면 항원-특이적인 항체는 MUC1 및 CD-133에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하며, 상기 단계 (d)의 SERS 스펙트럼을 분석한 결과, CD-133의 발현에 따른 신호가 MUC1의 발현에 따른 신호보다 2배 내지 6배 높게 나타나는 경우, 유방 순환 종양 줄기유사세포로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

다음을 포함하는 순환 종양세포(circulating tumor cell, CTC) 또는 순환 종양 줄기유사세포(stem-like circulating tumor cell, SCTC)를 검출하는 시스템:

(a) SERS 나노택(Surface Enhanced Raman Scattering Nanotag); 상기 SERS 나노택은 (i) 나노입자; (ii) 상기 나노입자의 표면에 결합된 라만 리포터; (iii) 상기 나노입자의 표면에 결합된 종양세포 표면 항원-특이적인 항체; 및 (iv) 상기 나노입자의 표면에 결합된 비공유결합 파트너(non-covalent binding partner)를 포함하고;

(b) 미세유체칩(microfluidic chip).

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 순환 종양세포 또는 순환 종양 줄기유사세포는 유방 순환 종양세포 또는 유방 순환 종양 줄기유사세포인 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 15

제 13항에 있어서, 상기 나노입자는 금인 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 16

제 13항에 있어서, 상기 라만리포터는 티오펜올(thiophenol, TP), 나일블루 A(nile blue A, NBA), 1-나프탈렌티올(1-naphthalenethiol, NPT), 4-머캅토피리딘(4-mercaptopyridine, MPy) 또는 2-퀴놀린에티올(2-quinolinethiol, QTH)인 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 17

제 13항에 있어서, 상기 종양세포 표면 항원-특이적인 항체는 순환 종양세포 또는 순환 종양 줄기유사세포의 표면 항원에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 18

제 13항에 있어서, 상기 종양세포 표면 항원-특이적인 항체는 유방 순환 종양세포 또는 유방 순환 종양 줄기유사세포의 표면 항원에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 유방 순환 종양세포 또는 유방 순환 종양 줄기유사세포의 표면 항원은 MUC1, EpCAM, EGFR, HER2 또는 CD-133인 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 20

제 13항에 있어서, 상기 항체는 링커에 의해 나노입자의 표면에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 21

제 13항에 있어서, 상기 비공유결합 파트너는 바이오틴인 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 22

제 13항에 있어서, 상기 비공유결합 파트너는 링커 및 이중나선 DNA에 의해 나노입자의 표면에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 23

제 13항에 있어서, 상기 단계 (b)의 미세유체칩(microfluidic chip)은 표면이 스트렙타아비딘(streptavidin)으로 코팅되어 있는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 24

제 13항에 있어서, 상기 단계 (a)의 종양세포 표면 항원-특이적인 항체는 MUC1 및 CD-133에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하며, SERS 스펙트럼을 분석한 결과, CD-133의 발현에 따른 신호가 MUC1의 발현에 따른 신호보다

2배 내지 6배 높게 나타나는 경우, 유방 순환 종양 줄기유사세포로 판단하는 것을 특징으로 하는 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표면 증강 라만 산란 방법(SERS)을 이용하여 순환 종양세포 및 순환 종양 줄기유사세포를 검출하는 방법 및 이를 이용한 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 연구 결과에 의하면 암은 빠르게 증식하는 세포의 군집 집단이 아니며, 증식, 분화의 정도가 일정하지 않은 불균질한 세포 집단이라는 것이 제시된 바 있다[1]. 일부 악성 종양의 경우, 종양 줄기유사세포(stem-like cancer cell, SCC)라고 하는 작은 개체군의 세포로부터 암이 발생하고 유지된다는 것이 알려져 있다[2]. 종양 줄기유사세포는 정상적인 줄기세포와 같이 자가복제가 가능하며, 증식, 분화하는 다양한 세포 집단을 만들어냄으로써 거대 종양을 형성하는데 기여한다. 종양 줄기유사세포는 보통 줄기세포가 위치하고 있는 곳에서 줄기세포와 유사한 상태를 유지한다. 또한, 종양 줄기유사세포는 휴지 상태에 있는 경우가 많기 때문에 빠르게 증식하는 세포를 표적으로 하는 항암제의 영향을 받지 않을 수 있으므로, 항암제 치료 이후에도 암의 재발과 전이에 중요한 역할을 할 수 있다[3]. 그러므로 암환자에서 종양 줄기유사세포를 발견하고 그 특징을 파악하는 것은 암 환자의 치료에 있어서 매우 중요하다.

[0003] 종양세포는 혈류로 들어가 혈액순환계를 따라 순환하는데, 이를 순환 종양세포(circulating tumor cell, CTC)라고 한다. 종양 줄기유사세포도 상피간엽이행(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 경로를 통하여 순환계로 들어가는 경우가 있는데, 이를 순환 종양 줄기유사세포(stem-like CTC, SCTC)라고 한다.

[0004] 기존에는 면역형광법을 이용하여 순환 종양세포(CTC)와 순환 종양 줄기유사세포(SCTC)를 검출하였는데[7], 이 방법은 형광물질이 광퇴색(photobleaching)되는 단점이 있다. 또한, 동시에 다수의 세포 표면마커를 검출하기 위하여 여러 가지 형광물질을 초과하여 사용하는 경우, 형광 스펙트럼이 서로 겹치게 되어 각 형광물질 별로 신호의 구분이 어렵게 되는 문제점이 있다[8]. 이러한 한계를 극복하기 위하여 동시에 여러 표면마커를 검출할 수 있으며, 민감도, 특이성 및 재현성이 높은 세포 검출 방법의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 금 나노 프로브(gold nano probe)는 세포독성이 없고 수용성이며 장기간 안정성과 뛰어난 생체적합성을 가지고 있으므로 세포 검출 방법의 좋은 대안으로 고려되고 있다[9-12]. 이와 같은 종류의 나노입자는 기존의 라만 분광법의 문제였던 낮은 민감도를 극복할 수 있는 가능성을 보여주었기 때문에 이를 이용한 표면증강 라만산란(Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS) 기술은 라만 분광법의 새로운 응용가능성을 보여주고 있다[13-14]. 또한, SERS 나노태크(nanotag)는 스펙트럼 피크가 좁고 특이성이 높으며, 광퇴색이 적고 다중화 성능이 뛰어나다는 장점을 가지고 있다[15-21]. 따라서 SERS 나노태크를 이용하여 순환 종양 줄기유사세포와 순환 종양세포를 검출할 수 있는 방법을 개발할 수 있다면 암 치료에 있어 많은 도움을 줄 수 있을 것이다.

[0006] 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

[0007] 본 발명자들은 SERS 나노태크를 이용하여 순환 종양 줄기유사세포 및 순환 종양세포를 검출할 수 있는 방법을 발굴하고자 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 SERS 나노태크로 표지한 혈액 샘플을 미세유체칩에 적용하고 라만 분광법으로 스펙트럼을 분석하는 경우, 효과적으로 순환 종양 줄기유사세포 및 순환 종양세포를 검출할 수 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 본 발명의 목적은 SERS 나노태크 및 미세유체칩을 이용하여 순환 종양 줄기유사세포 및 순환 종양세포를 검출할 수 있는 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법을 이용하여 순환 종양 줄기유사세포 및 순환 종양세포를 검출할 수 있는 시스

템을 제공하는 데 있다.

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

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 순환 종양세포(circulating tumor cell, CTC) 또는 순환 종양 줄기유사세포(stem-like circulating tumor cell, SCTC)를 검출하는 방법을 제공한다:

[0012] (a) 생체로부터 분리한 혈액 샘플에 SERS 나노텍(Surface Enhanced Raman Scattering Nanotag)을 접촉시키는 단계; 상기 SERS 나노텍은 (i) 나노입자; (ii) 상기 나노입자의 표면에 결합된 라만 리포터; (iii) 상기 나노입자의 표면에 결합된 종양세포 표면 항원-특이적인 항체; 및 (iv) 상기 나노입자의 표면에 결합된 비공유결합 파트너(non-covalent binding partner)를 포함하고;

[0013] (b) 상기 SERS 나노텍과 접촉된 시료용액을 미세유체칩(microfluidic chip) 표면의 채널(channel) 내에 주입하는 단계;

[0014] (c) 상기 미세유체칩으로부터 SERS 스펙트럼을 획득하는 단계; 및

[0015] (d) 상기 SERS 스펙트럼을 분석하여 순환 종양세포 또는 순환 종양 줄기유사세포를 검출하는 단계.

[0016] 각 단계를 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0017] (a) 생체로부터 분리한 혈액 샘플에 SERS 나노텍(Surface Enhanced Raman Scattering Nanotag)을 접촉시키는 단계

[0018] 본 발명에서 “SERS 나노텍”은 SERS(Surface Enhanced Raman Scattering)에 의한 스펙트럼을 이용하여 특정한 생체물질의 존재 및 양적 레벨을 분석하기 위한 나노 프로브(probe)를 의미한다. 구체적으로, SERS 나노텍은 (i) 나노입자; (ii) 상기 나노입자의 표면에 결합된 라만 리포터; (iii) 상기 나노입자의 표면에 결합된 종양세포 표면 항원-특이적인 항체; 및 (iv) 상기 나노입자의 표면에 결합된 비공유결합 파트너(non-covalent binding partner)를 포함한다.

[0019] 상기 나노입자로는 금, 은, 구리 등 금속이 사용될 수 있다. 본 발명의 구체적인 예에 따르면, 금(Au)을 사용하였으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 상기 라만 리포터는 라만 스펙트럼의 특정 파장대에서 강한 신호를 내는 물질을 의미하는 것으로서 벤젠 고리를 가진 방향족 화합물, 그래핀 등의 물질을 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 예에 따르면, 티오펜올(thiophenol, TP), 나일블루 A(nile blue A, NBA), 1-나프탈렌티올(1-naphthalenethiol, NPT), 4-머캅토피리딘(4-mercaptopyridine, MPy) 또는 2-퀴놀린티올(2-quinolinethiol, QTH)을 라만리포터로 사용하였으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 나노입자의 표면에 결합된 종양세포 표면 항원-특이적인 항체는 종양세포의 표면에 발현하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 검출하고자 하는 종양의 종류에 따라 각 종양 세포에서 특이적으로 발현 레벨이 높은 단백질을 선택할 수 있다. 구체적으로는 유방 순환 종양세포를 검출하고자 하는 경우, MUC1, EpCAM, EGFR, HER2 또는 CD-133 등을 선택할 수 있다. 한편, 항체를 나노입자에 결합시키기 위해 링커를 사용한다. 링커는 공유결합에 의해 항체와 나노입자를 연결시키는 역할을 한다.

[0022] 상기 비공유결합 파트너(non-covalent binding partner)는 나노입자가 미세유체칩을 통과할 때 미세유체칩에 결합될 수 있도록 하기 위한 것으로서, 미세유체칩에 코팅된 물질의 종류에 따라 이와 비공유결합을 통해 미세유체칩에 결합할 수 있는 물질을 선택한다. 본 발명의 구체적인 예에 따르면, 미세유체칩을 스트렙타아비딘으로 코팅하였으며, 이에 대한 비공유결합 파트너로서 바이오틴을 사용하였다.

[0023] 본 발명에서 “접촉시키는”은 생체로부터 분리한 혈액 샘플과 SERS 나노텍을 하나의 용기에 넣어 샘플과 SERS 나노텍 사이에 반응이 일어날 수 있도록 하는 것을 의미한다. 구체적으로, SERS 나노텍의 표면에 결합된 항체와 샘플내의 종양세포 등의 표면에 발현된 단백질 항원 사이에 특이적인 결합이 일어나도록 함으로써, 종양 세포 등이 SERS 나노텍에 의해 표지가 된다.

- [0024] (b) SERS 나노택과 접촉된 시료용액을 미세유체칩(microfluidic chip) 표면의 채널(channel) 내에 주입하는 단계
- [0025] 미세유체칩을 이용하여 시료를 분석하는 일반적인 방법에 따라 상기 단계 (a)에서 SESS 나노택에 의해 표지된 시료용액을 미세유체칩 표면의 채널에 주입하는 단계이다.
- [0026]
- [0027] (c) 미세유체칩으로부터 SERS 스펙트럼을 획득하는 단계
- [0028] 상기 단계 (b)에서 미세유체칩의 채널에 주입된 시료용액이 채널을 통과하면서 시료용액 중 SERS 나노택에 의해 표지된 세포의 경우, 미세유체칩의 표면에 포획되게 된다. 상기 단계 (a)에서 상술한 바와 같이, SERS 나노택의 비공유결합 파트너와 미세유체칩의 표면에 코팅되어 있는 물질 사이에 비공유결합이 일어나기 때문이다. 따라서, SERS 스펙트럼을 분석할 수 있는 기기를 이용하면 미세유체칩의 표면에 포획된 세포로부터 SERS 스펙트럼을 획득할 수 있다. 이때, 미세유체칩 표면을 구획화하여 분석을 한다면, 포획된 각각의 하나의 세포로부터 SERS 스펙트럼을 획득할 수 있다.
- [0029]
- [0030] (d) 상기 SERS 스펙트럼을 분석하여 순환 종양세포 또는 순환 종양 줄기유사세포를 검출하는 단계
- [0031] 상기 단계 (c)에서 획득한 각 세포의 스펙트럼을 분석하면, SERS 나노택에 결합되어 있는 항체의 종류에 따라 이들 항체와 특이적으로 결합하는 세포 표면 단백질의 발현레벨을 분석할 수 있다. 이와 같이 분석된 세포 표면 단백질의 발현레벨을 기존에 알려진 순환 종양세포 또는 순환 종양 줄기유사세포의 표면 단백질 발현레벨과 비교함으로써, 분석한 세포가 순환 종양세포인지 또는 순환 종양 줄기유사세포인지 또는 다른 종류의 세포인지 여부를 확인할 수 있다. 본 발명의 구체적인 예에 따르면, MUC1, EpCAM, EGFR, HER2 또는 CD-133에 대한 항체를 사용하여 SERS 나노택을 제작하였으며, 이를 이용하여 SERS 스펙트럼을 분석한 결과 유방 순환 종양세포와 유방 순환 종양 줄기유사세포를 구별하여 검출할 수 있었다. 보다 구체적으로, CD-133의 발현에 따른 신호가 MUC1의 발현에 따른 신호보다 2배 내지 6배 높게 나타나는 경우, 유방 순환 종양 줄기유사세포로 판단할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 다음을 포함하는 순환 종양세포(circulating tumor cell, CTC) 또는 순환 종양 줄기유사세포(stem-like circulating tumor cell, SCTC)를 검출하는 시스템을 제공한다:
- [0033] (a) SERS 나노택(Surface Enhanced Raman Scattering Nanotag); 상기 SERS 나노택은 (i) 나노입자; (ii) 상기 나노입자의 표면에 결합된 라만 리포터; (iii) 상기 나노입자의 표면에 결합된 종양세포 표면 항원-특이적인 항체; 및 (iv) 상기 나노입자의 표면에 결합된 비공유결합 파트너(non-covalent binding partner)를 포함하고;
- [0034] (b) 미세유체칩(microfluidic chip).
- [0035] 본 발명의 시스템은 상기 설명한 본 발명의 방법을 구현하기 위한 시스템으로서 구체적인 내용은 상기 방법에서 기술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0036] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0037] (a) 본 발명은 SERS 나노택 및 미세유체칩을 이용하여 순환 종양 줄기유사세포 또는 순환 종양세포를 검출할 수 있는 방법 및 이를 이용한 시스템을 제공한다.
- [0038] (b) 본 발명의 방법을 이용하면, 신속하고 정확하게 순환 종양 줄기유사세포 및 순환 종양세포를 검출할 수 있으며, 순환 종양 줄기유사세포를 검출한 이후에도 순환 종양 줄기유사세포의 계속적인 배양이 가능하므로 순환 종양 줄기유사세포의 특징을 분석하기 위한 추가적인 연구가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 5개의 서로 다른 SERS 나노택(SNT)의 컨쥬게이션을 보여주는 모식도이다.
- 도 2는 투과 전자현미경, 자외-가시광 분광법 및 동적 광산란법을 이용하여 SERS 나노택의 컨쥬게이션을 확인한

투과 전자현미경 사진, 자외-가시광 스펙트럼 및 동적 광산란 크기 데이터를 정리한 도표이다.

도 3은 각 SNT의 SERS 스펙트럼을 분석한 도표이다. a)는 4-mercaptopyridine(MPy)와 anti-EpCAM 항체의 조합, b)는 1-naphthalenethiol(NPT)와 anti-HER2 항체의 조합, c)는 Thiophenol(TP)와 anti-MUC1의 조합, d)는 Nile blue A(NBA)와 anti-HER2의 조합, e)는 2-quinolinethiol(QTH)와 anti-CD-45의 조합이다.

도 4는 미세유동 칩에 포획된 유방암 세포와 유방암 줄기유사세포(빨간색 화살표)를 보여주는 사진이다.

도 5는 각 세포 유형에 따른 포획 효율(capturing efficiency)을 분석한 도표이다.

도 6은 MDA-MB-231 세포의 SERS map 이미징에 기초하여 표면마커의 발현레벨을 분석한 SERS 매핑 결과 및 도표이다.

도 7은 SK-BR-3 세포의 SERS map 이미징에 기초하여 표면마커의 발현레벨을 분석한 SERS 매핑 결과 및 도표이다.

도 8은 MCF-7 세포의 SERS map 이미징에 기초하여 표면마커의 발현레벨을 분석한 SERS 매핑 결과 및 도표이다.

도 9는 유방 SCC 세포의 SERS map 이미징에 기초하여 표면마커의 발현레벨을 분석한 SERS 매핑 결과 및 도표이다.

도 10은 미세유체칩으로부터 유방 SCC를 분리한 다음, 48시간 동안 배양한 사진이다.

도 11은 미분화(a) 또는 분화된(b) 유방 SCC의 형태를 보여주는 사진이다.

도 12는 미분화 유방 SCC의 SERS map 이미징에 기초하여 표면마커의 발현레벨을 분석한 SERS 매핑 결과 및 도표이다.

도 13은 분화된 유방 SCC의 SERS map 이미징에 기초하여 표면마커의 발현레벨을 분석한 SERS 매핑 결과 및 도표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에 있어 자명할 것이다.

[0041] 실시예

[0042] 실험재료 및 방법

[0043] 실험재료

[0044] 금 콜로이드(colloid)는 BB International-UK로부터 구입하였고, 티오펜올(thiophenol, TP), 나일블루 A(nile blue A, NBA), 1-나프탈렌티올(1-naphthalenethiol, NPT), 4-머캅토피리딘(4-mercaptopyridine, MPy), 2-퀴놀린에티올(2-quinolinethiol, QTH), 에틸디메틸아미노프로필카르보디이미드(ethyl dimethylaminopropyl carbodiimide, EDC), N-하이드록시설포숙신이미드(N-hydroxy sulfosuccinimide), 3-아미노프로필트라이에톡시실레인(3-aminopropyltriethoxysilane), 글루타르알데히드(glutaraldehyde), 스트렙타아비딘(streptavidin), 포름알데히드(formaldehyde), 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4, 10 mM)은 Sigma Aldrich 제품을 이용하였다. MUC1, EpCAM, EGFR, HER2 및 CD-133에 특이적인 마우스 단일클론 항체는 R&D systems(미국)에서 구입하였고, RPMI-1640 배지는 Fresh media TM(대한민국), human breast cancer stem cell culture undifferentiation media는 Celprogen(미국), 소 태아혈청(Fetal bovine serum, FBS), 페니실린-스트렙토마이신(10,000 IU/ml 페니실린나트륨과 10,000 mg/ml 황산스트렙토마이신이 첨가된 0.83% 염류용액), 트립신(TrypsinEDTA 용액, 1X)은 Welgene Inc.(대한민국)의 제품을 이용하였다. mPEG-SH(MW 5 kDa), 이형기능성 링커(heterofunctional linker)인 HS-PEG-COOH(MW 5 kDa)는 Creative PEG Works, NH₂-DNA와 비오틴(biotin)-DNA는 Bioneer(대한민국), 제한효소 Alu I는 Sigma Aldrich, 스트렙타아비딘 결합 양자점(Streptavidin conjugated quantum dots, 525, 545, 565, 625, 705 nm 방사 파장)은 Invitrogen(미국), BD VacutainerCPT™ cell preparation tubes는 BD Franklin Lakes(미국), Ficoll-Paque plus는 GE Healthcare Inc(미국)에서 구입하였다. 다른 화학물질은 모두 분석용 등급(analytical grade)의 제품을 이용하였다. 모든 용액은 Milli-Q

purification system(Branstead)을 이용하여 418 MΩcm의 특정 저항 하에서 정제한 2차 증류수로 제조하였다.

[0045] **미세유체칩(microfluidic chip)의 제작**

[0046] 현탁된 세포를 포획하기 위한 미세유체칩을 제작하였다. 미세유체칩 표면에 현탁된 세포를 포획하기 위하여 지름 5 μm의 채널 2개와 지름 50 μm의 채널 1개를 만들었다. 칩 표면위에 정밀한 기둥 배열(pillar array) 구조를 만들기 위하여, 양극법(anodic method)을 이용하여 실리콘과 유리 웨이퍼(glass wafer)를 붙이는 silicon-on-glass(SOG) 기술로 미세유체칩(microfluidic chip)을 제작하였다. 칩의 실리콘 층을 래핑(lapping)하고 화학적 기계 연마(chemical mechanical polishing)를 하여 필터 높이를 50 μm로 맞추었다. 그 후에, 포토레지스트(photoresist, AZ 4330, Clariant Corp., Muttentz, Switzerland)를 패터닝하고 15분 동안 딥 반응성 이온 에칭(deep reactive-ion etching)을 실시하였다. 유체 통로(fluidic path)를 만들기 위하여, 래미네이트(laminate)한 유리 웨이퍼를 감광성 필름(dry film photoresist, Ordyl BF 410, Tokyo Ohka Kogyo, Kawasaki, Japan)을 이용하여 패터닝하고, 샌드 블라스팅 에칭(sand blasting etching)으로 투입/배출구(in/outlet holes)를 만들었다. 마지막으로, 양극 접합(anodic bonding)을 이용하여 덮개 유리 웨이퍼를 패터닝된 웨이퍼에 연결하였다.

[0047] 상기 제작된 미세유체칩 유리 표면에 스트렙타아비딘(streptavidin)을 코팅하였다. 미세유체칩을 에탄올과 증류수로 세척하고, 60° C에서 하룻밤 동안 건조시켰다. 건조된 미세유체칩을 플라즈마 챔버(plasma chamber, Convance-MP, Femto Science, 대한민국)에 넣고 5분 동안 산소 플라즈마에 노출시켜 표면의 실라놀(silanol)을 활성화하였다. 다음으로, 미세유체칩을 10% 3-아미노프로필트라이에톡시실레인(3-aminopropyltriethoxysilane) 용액에 담근 후, 증류수로 세척하고 110° C에서 1시간 동안 구어 주었다. 실레인 처리된(silanized) 미세유체칩을 2%의 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 포함하는 100 mM 인산 완충액(pH 8.0)에 1시간 동안 담가둔 다음, PBS로 세척하고 질소를 이용하여 건조하였다. 미세유체칩에 10 μM의 스트렙타아비딘을 첨가하여 고정화된 글루타르알데히드와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에, 글루타르알데히드로 변형된 세포 칩 표면에서 스트렙타아비딘 단백질이 부착되지 않은 곳을 블로킹하기 위해, 미세유체칩을 PBS로 세척한 다음, PBS에 녹인 1% 소혈청알부민(bovine serum albumin)을 1시간 동안 처리하였다. 마지막으로, 미세유체칩을 PBS 용액으로 세척한 다음, 질소로 건조시켰다.

[0048] **SERS 나노택(SERS NanoTag, SNT)의 제작**

[0049] 종양세포의 표면마커를 검출할 수 있는 5개의 서로 다른 조합을 가지는 SNT를 제작하였다. 도 1은 금 나노입자(gold nanoparticle, AuNP)/라만 리포터/PEG/항체/DNA 컨쥬게이트의 컨쥬게이션 과정을 단계별로 보여준다. 우선, 활성화된 SERS 프로브를 준비하기 위하여, 빠르게 혼합되고 있는 금 콜로이드에 준비한 1-5 μM의 라만 리포터 용액을 한 방울씩 떨어뜨려 첨가하여 리포터 용액:금 콜로이드의 부피비가 1:6이 되게 하였다. 라만 리포터(TP, NBA, NPT, MPy, QTH)용액은 에탄올에 각각의 라만 리포터를 농도에 맞게 용해시켜 제작하였다.

[0050] 각 SNT의 스펙트럼 피크 강도를 유사하게 맞추기 위하여 각각의 라만 리포터별로 1-5 μM의 서로 다른 농도를 사용하였다. 10분 후, 라만 리포터로 표지된 금 콜로이드에 10 μM의 thiol-PEG 용액을 한 방울씩 떨어뜨려 첨가하였다. 다양한 조건 하에서 안정된 구조를 유지하고 입자 응집이 최소화될 수 있도록, 60 nm의 라만 리포터로 표지된 금 입자 당 PEG-SH 분자의 비율을 최소 30,000개로 하였다. 3 ml의 라만 리포터로 표지된 금 콜로이드 용액에 1 μM의 이형기능성링커(hetero-functional linker)인 HS-PEG-COOH 293 μl를 한 방울씩 떨어뜨려 첨가하였다. 15분 동안 혼합한 후, 다시 1.6 ml의 PEG-SH(10mM)를 처리하여 이형기능성링커에 의해 덮이지 않은 부분을 채움으로써 차폐되고 안정적인 입자 표면이 만들어지도록 하였다. 세 번의 원심분리(1,000g) 및 PBS 현탁과정을 통해 금 나노입자를 정제하였다.

[0051] 공유결합에 의한 컨쥬게이션을 위해 입자 표면에 있는 카르복시기(-COOH group)를 활성화하였다. 이를 위해, 신선하게 준비한 에틸디메틸아미노프로필카르보디이미드(ethyl dimethylaminopropyl carbodiimide, EDC) 용액(40 mg/ml) 5 ml과 sulfo-NHS(110 mg/ml) 5 ml을 첨가한 다음, 하여 25°C에서 15분 동안 강하게 섞어주었다. 세 차례의 원심분리(1,000g)로 초과분의 EDC와 sulfo-NHS를 제거한 다음, 금 나노입자를 PBS에 현탁하였다. 활성화된 카르복시기를 가지는 금 나노입자에 마우스 단일클론 항체(11.2 nmol)와 NH₂-dsDNA-biotin(20 nmol)를 첨가하여 25°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 5가지 SNT에 따라 각각 MUC1, EpCAM, EGFR, HER2 및 CD-133에 특이적인 마우스 단일클론항체를 사용하였다. 반응 혼합물을 4°C에서 하룻밤 동안 보관한 후, 세 차례의 원심분

리(1,000g)로 초과분의 항체와 DNA를 제거한 다음, PBS에 현탁하였다. 이와 같은 과정을 통해 다음과 같은 서로 다른 조합을 가진 5가지의 컨쥬게이티드 SERS 나노텍(SNT)을 제조할 수 있었다:

[0052] 4-mercaptopyridine(MPy)와 anti-EpCAM 항체의 조합, 1-naphthalenethiol(NPT)와 anti-EGFR 항체의 조합, Thiophenol(TP)와 anti-MUC1의 조합, Nile blue A(NBA)와 anti-HER2의 조합 및 2-quinolinethiol(QTH)와 anti-CD-133의 조합.

[0053] 완전히 활성화된 SERS 나노텍(SNT)을 투과 전자현미경(transmission electron microscopy, TEM), 자외-가시광 분광법(UV-vis. spectroscopy), 동적 광산란(dynamic light scattering), 표면증강 라만산란(SERS)을 이용하여 그 특징을 분석하였다. 자외-가시광 스펙트럼은 Jasco V-530 UV/VIS 분광기를 이용하여 측정하였다. 투과 전자현미경 사진은 가속전압을 80 kV로 맞춘 JEOL 투과 전자현미경(JEM1010)을 이용하여 촬영하였다.

[0054]

[0055] 세포 배양

[0056] 세 종류의 유방암 세포주(MCF-7, MDA-MB-231 및 SK-BR-3)와 한 종류의 유방암 줄기유사세포주(breast stem-like cancer cell, SCC)를 ATCC(Manassas, VA)로부터 구입하였다. 유방 암세포를 10%의 소 태아혈청과 1%의 항생제(페니실린-스트렙토마이신)를 첨가한 RPMI-1640 배지로 37℃에서 배양하였다. 유방암 줄기유사세포주를 인간 유방 종양 줄기세포 미분화 배지(human breast cancer stem cell undifferentiation media)로 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 80%의 밀집도(confluence)를 보일 때, 유방 암세포는 1×10^5 cells/ml, 유방 줄기유사 세포주는 1×10^6 cells/ml의 농도로 계대배양한 다음, 2-3일 동안 배양하였다. 이후, 트립신을 이용하여 세포를 배양접시로부터 분리한 다음, PBS로 두 차례 세척하여 트립신을 제거하였다. 항체가 컨쥬게이션된 금 나노입자가 세포에 비특이적으로 결합하는 것을 블로킹하기 위해, 세포를 배양액으로 현탁한 다음, 1.5 ml의 1% 소 혈청알부민(bovine serum albumin)을 첨가하고 1시간 동안 배양하였다.

[0057]

[0058] 시험용 샘플의 준비

[0059] 유방암 환자의 혈액샘플을 구하는 것이 힘들었기 때문에, 정상인의 혈액과 유방암 세포주 등을 이용하여 유방 순환 종양세포(breast circulating tumor cell, breast CTC) 또는 유방 순환 종양 줄기유사세포(breast stem-like CTC, breast SCTC)와 유사한 샘플을 만들었다. 우선, 다음과 같은 방법으로 정상인의 혈액 샘플을 준비 하였다: 서강대학교 의료원(Health center of the Sogang University, Seoul, Korea)로부터 정상인의 혈액 샘플(7.5-15 ml)을 입수하였고, 실험계획은 기관 감사위원회(Institutional Review Board, IRB)의 승인을 받았다. 헤파린 나트륨(sodium heparin)과 폴리에스테르 젤(polyester gel)이 든 BD VacutainerCPT™ cell preparation tube(BD Franklin Lakes, NJ)를 이용하여 혈액 샘플을 채취하였다. 가볍게 섞은 다음, 신선한 혈액에 PBS를 넣어 두 배로 희석하였다. 원심분리 튜브 속에 밀도 경사 시약(density gradient reagent)인 Ficoll-Paque plus(GE Healthcare Inc.)를 6 ml 넣고, 8 ml의 희석된 혈액을 Ficoll-Paque plus와 섞이지 않게 첨가한 다음, 실온에서 30분 동안 원심분리(400g)하였다. 원심분리후, 혈장 층을 제거한 다음, 피콜, 적혈구 침전물은 튜브에 남겨두고 림프구(lymphocyte) 및 단핵 백혈구(monocyte)를 포함하는 저밀도의 연막 세포층을 수집하였다. 수집한 세포를 새 튜브로 옮겨 PBS로 세척한 후, 3.7% 포름알데히드로 10분 동안 고정(fixation)하였다. 마지막으로, 세포를 PBS로 세척한 다음, 세포수를 계산하고 이후의 실험을 위하여 4℃에 보관하였다.

[0060] 이와 같이 준비된 백혈구 세포를 현탁한 다음, 여기에 유방암 세포주(MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231) 또는 유방 암 줄기유사세포주를 섞어 줌으로써, 유방 순환 종양세포(breast circulating tumor cell, breast CTC) 또는 유방 순환 종양 줄기유사세포(breast stem-like CTC, breast SCTC)와 유사한 시험용 샘플을 준비할 수 있었다.

[0061]

[0062] 컨쥬게이티드 SERS 나노텍을 이용한 세포의 표지(labeling)

[0063] 상기 방법으로 준비된 시험용 샘플내의 세포를 컨쥬게이티드 SERS 나노텍(conjugated SERS nanotag)을 이용하여 표지하고자 하였다. 유방암 세포주(MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231) 또는 유방암 줄기유사세포주를 각각 100개씩 백혈구 세포와 섞어준 시험용 샘플에 10 pM의 컨쥬게이티드 SERS 나노텍을 첨가한 다음, 계속해서 섞어주면서 실온에서 30분 동안 처리함으로써 세포가 표지되도록 하였다. PBS로 세 차례 세척하여 표지되지 않은 컨쥬

케이티드 SERS 나노텍을 제거한 다음, 배양액 2 ml에 현탁하였다.

[0064]

[0065] 세포 표면 마커 분석을 위한 SERS 매핑(mapping)

[0066] SERS 매핑을 위하여 상기 방법으로 표지된 시험용 샘플을 상기 방법으로 제작한 미세유체칩의 채널에 10 μ l/min 속도로 주입하고, 실온에서 1시간 동안 처리하여 칩 표면에 세포가 부착되도록 하였다. 세포의 파편이나 부착되지 않은 세포를 제거하기 위하여 세포 칩을 배양액으로 세척하였다.

[0067] SERS 매핑을 위하여, 액체질소 냉각 CCD 검출기와 광학 도립현미경(Olympus IX71)이 설치된 NTEGRA spectra(AFM-Raman Spectrometer, NT-MDT, Russia)를 이용하였다. 분석하고자하는 칩의 구역을 나누어서 SERS 매핑을 하였으며, 하나의 세포마다 SERS 결과가 기록될 수 있도록 하였다. SERS 매핑은 샘플 평면(sample plane)상의 레이저 파워가 3 mW인 785 nm NIR 파장의 레이저를 이용하여 기록되었다. SERS 결과는 Nova 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[0068]

[0069] 세포 표면 마커의 형광표지 및 형광 현미경 분석

[0070] 형광 현미경 이미징을 위하여 세포 표면 마커를 양자점(quantum dot, QD)으로 표지(labeling)하였다. 서로 다른 표면 마커(EpCAM, MCU1, EGFR, HER2, CD-133)를 각각 서로 방사파장(525, 545, 565, 625, 705 nm)을 가진 스트렙타비딘 컨쥬게이트 양자점으로 표지하였다.

[0071] 이를 위하여 각각의 세포 표면 마커에 특이적인 비오틴 결합 항체(biotinylated antibody)를 매개체로 이용하였다. 항체-양자점 컨쥬게이트를 만들기 위하여 항체와 양자점을 2.5:1의 분자비로 혼합한 다음, 실온, 암조건에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 원심분리(3,000g, 10분)로 항체-양자점 컨쥬게이트를 정제한 다음, PBS에 현탁하였다.

[0072] 상기 방법으로 제작된 항체-양자점 컨쥬게이트 1 pM을 각각의 세포주(MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231, 유방 SCC)와 섞어준 다음, 실온에서 30분 동안 계속해서 섞어줌으로써 세포를 표지하였다. PBS로 세포를 세 차례 세척한 다음, 형광 신호를 측정하였다.

[0073] 양자점으로 표지된 세포를 96-웰 플레이트로 옮겨 형광 현미경으로 관찰하였다. 형광 이미지는 Nikon ECLIPSE-Ti 현미경을 이용하여 400배 배율로 촬영하였고, NIS-Elements-BR-3.2 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[0074]

[0075] 실험결과

[0076] 컨쥬게이트드 SERS 나노텍(SNT)의 특징 분석

[0077] 5가지의 서로 다른 조합으로 5가지의 SNT를 제작하였다. SNT를 60nm 크기의 금 나노입자와 라만 리포터, 서로 다른 두 작용기를 가지는(heterofunctional) 링커인 SH-PEG-COOH, 항체 및 바이오틴을 연결한 dsDNA(biotinylated dsDNA)을 이용하여 제작하였다(도 1). 도 2의 a는 아무것도 처리하지 않은 금 나노입자(AuNP), 라만 리포터 표지된 AuNP 및 PEG-항체/dsDNA 컨쥬게이트드 AuNP의 투과 전자현미경 사진을 보여준다. 금 콜로이드의 중심입자의 크기는 60 nm이고, 투과 전자현미경 사진에서 PEG 코팅은 얇은 흰색 층으로 관찰되었다.

[0078] SNT의 국소적 표면 플라즈몬 흡광도(Localized Surface Plasmon Absorbance)를 분석하였다. 자외/가시선 분광분도법(UV/Vis Spectroscopy)을 이용하였다. 도 2의 b는 아무것도 처리하지 않은 AuNP, 라만 리포터 표지된 AuNP, PEG-항체/dsDNA 컨쥬게이트드 AuNP의 자외-가시광 스펙트럼을 보여준다. 순수한 AuNP의 스펙트럼은 플라즈몬 공명(plasmon resonance)에 의해 530 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 것으로 알려져 있다[22]. 라만 리포터 표지 AuNP는 약간 감소한 최대 흡광도 피크를 보였는데, 이는 라만 리포터에 의해 금 나노입자가 약간 응집된 결과일 것으로 추정된다. PEG-항체/dsDNA 컨쥬게이트드 AuNP의 최대 흡광도 피크는 좀 더 감소하였으며, 6 nm정도의 적색 이동(red shift)이 나타났다. 이 현상은 PEG 코팅, 세척 단계에서의 AuNP 농도 감소가 원인일 것으로 추정된다.

[0079] SNT의 동적광산란(dynamic light scattering, DLS)을 분석하였다. 도 2의 c는 아무것도 처리하지 않은 AuNP,

라만 리포터 표지된 AuNP, PEG-항체/dsDNA 컨쥬게이트된 AuNP의 동적 광산란 크기를 분석한 결과를 나타내고 있다. 중심입자 크기가 60 nm일 때, 라만 리포터 표지 후 그 크기가 평균적으로 약 5 nm로 증가하였으며, PEG 반응 후에는 그 크기가 평균적으로 약 12 nm 증가하였다.

[0080] SNT의 SERS 스펙트럼 분석

[0081] 도 3은 SNT의 SERS 스펙트럼을 분석한 결과를 보여준다. 항체를 컨쥬게이션하지 않고 라만 리포터 분자만 있는 경우에는 항체 컨쥬게이트된 SNT에 비해 강한 SERS 신호를 보였다. 라만 리포터의 SERS 신호 강도는 산란 차단 효과(scattering shielding effects)로 인하여 코팅층 두께가 증가함에 따라 점차적으로 감소하는 것이 알려져 있으나[23], 항체 컨쥬게이트된 SNT는 여전히 강한 SERS 신호 강도를 보였으므로, 세포의 SERS 이미징 연구에 적합할 것으로 판단되었다.

[0082] SNT-1의 티오펜올(thiophenol, TP)의 SERS 스펙트럼은 1575 cm^{-1} 에서 단일 피크를 나타냈는데(도 3의 c), 이는 티오펜올 분자의 a1 모드에 해당하는 것이다[24]. SNT-2의 AuNP에 결합된 1-나프탈렌티올(1-naphthalenethiol, NPT)의 경우, 1381 cm^{-1} 에서 강한 밴드가 관찰되었는데(도 3의 b), 이는 1-나프탈렌티올 분자의 고리 스트레칭(ring stretching)에 의한 것이다[25]. SNT-3의 나일블루 A(nile blue A, NBA)는 1492 cm^{-1} 에서 강한 피크를 나타내었는데(도 3의 d), 이는 방향족 고리 스트레칭 현상에 일치하는 것이다[26]. SNT-4의 2-퀴놀린에티올(2-quinolinethiol, QTH)의 SERS 스펙트럼은 1369 cm^{-1} 에서 강한 피크를 보였는데(도 3의 e), 이는 ν (CC) 방향족 고리 진동(aromatic ν (CC) vibration)에 의한 것이다[27]. SNT-5의 4-머캅토피리딘(4-mercaptopyridine, MPy)의 경우 1096 cm^{-1} 에서 단일 피크를 보였는데(도 3의 a), 이는 방향족 고리 진동(aromatic ring vibration) 모드에 해당하는 것이다[28].

[0083] 이와 같은 결과를 바탕으로, SNT-1, SNT-2, SNT-3, SNT-4, SNT-5의 1575 , 1381 , 1492 , 1096 및 1369 cm^{-1} 라만 밴드를 각각 MUC1, EGFR, HER2, EpCAM, CD-133의 발현레벨을 탐지하기 위한 라만 밴드로 선택하였다.

[0084] 미세유체칩의 세포 포획효율 분석

[0085] 상기 실험방법에 따라 제작한 미세유체칩의 세포 포획효율을 분석하고자 하였다. SNT로 각각의 100개의 유방암 세포주 또는 유방암 줄기유사세포주를 표지한 다음, PBS 500 μL 에 섞어 칩 상의 채널내로 흘려 보내고, 칩 표면의 스트렙타아비딘과 SNT의 바이오틴 사이에 반응이 일어나도록 30분 동안 인큐베이션한 다음, 반대 방향으로 PBS 5 mL을 흘려보내 세척을 해주었다. 세척한 후, 남아있는 세포의 수를 세어 포획효율(capturing efficiency)을 계산하였다. 서로 다른 3개의 칩에서 반복한 후 평균 및 에러바(error bar)를 계산하고 나온 평균 값을 백분율로 계산하여 포획효율로 나타내었다(도 5).

[0086] 세 종류의 유방암 세포주 중, SK-BR-3 세포는 대부분의 세포 표면 마커(EpCAM, EGFR, HER2)의 발현레벨이 높기 때문에 높은 포획효율(capturing efficiency)을 보였다. 상대적으로 낮은 양의 표면 마커를 발현하는 MDA-MB-231 세포의 경우에도 89%의 높은 포획효율을 나타내었다. 이는 아마도 MDA-MB-231 세포의 지름이 SK-BR-3 세포보다 크기 때문에, 스트렙타아비딘 코팅 기둥과의 접촉 기회가 증가했기 때문일 것으로 생각된다. MCF-7 세포와 유방암 유사줄기세포의 포획효율은 약간 낮았는데, 이는 세포의 크기가 작기 때문인 것으로 생각된다.

[0087] SK-BR-3, MDA-MB-231, MCF-7 및 유방암 유사줄기세포의 포획효율은 각각 91%, 90%, 84% 및 75%로 나타났다.

[0088] 순환 종양세포(CTC) 또는 순환 종양 줄기유사세포(SCTC)의 분리 및 SERS 매핑을 이용한 세포 표면 마커의 특징 분석

[0089] 상기 실험방법에 따라 정상적인 백혈구세포와 유방암세포주 등을 혼합하여 유방 순환 종양세포(breast circulating tumor cell, breast CTC) 또는 유방 순환 종양 줄기유사세포(breast stem-like CTC, breast SCTC)와 유사하게 만든 시험용 샘플을 SNT로 표지한 다음, 유속 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 로 미세유체칩상의 채널에 주입하였다. 미세유체칩 표면의 스트렙타아비딘과 SNT의 바이오틴의 결합에 의해 시험용 샘플에서 유방 순환 종양세포

(breast circulating tumor cell, breast CTC) 또는 유방 순환 종양 줄기유사세포(breast stem-like CTC, breast SCTC)세포에 해당하는 유방암 세포(SK-BR-3, MDA-MB-231, MCF-7) 또는 유방암 줄기유사세포(SCC)를 분리, 포획할 수 있었다. 칩을 배양액으로 세척한 다음, SERS 매핑(mapping)을 수행하였다.

[0090] 세포에 각각의 SNT가 부착되는 정도는 세포 유형에 따른 표면 마커의 발현레벨에 따라 결정되므로, 각 SNT별로 선택된 특정 라만 밴드의 신호강도에 따라 표면 마커의 상대적인 발현레벨을 계산할 수 있었다. 도 6 내지 9는 SERS 매핑을 통하여 측정된 MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231 및 유방 SCTC의 표면 마커 발현레벨을 분석한 결과이다. 각각의 SERS 맵 오른쪽에 있는 수직 스케일바(scale bar)는 표시된 단백질의 발현레벨을 나타내는 것이다. 각 표면 마커의 상대적인 발현레벨을 정리하여 히스토그램으로 나타내었다.

[0091] MDA-MB-231 세포의 경우, EGFR 단백질의 발현레벨이 가장 높았으며, MUC1, EpCAM, CD-133, HER2의 순으로 발현레벨이 높았다(도 6).

[0092] SK-BR-3 세포의 경우, HER2의 발현레벨이 가장 높았고, 그 다음으로 EpCAM, EGFR, MUC1, CD-133의 순으로 발현레벨이 높았다(도 7).

[0093] MCF-7 세포의 경우, EpCAM의 발현레벨이 가장 높았으며, EGFR, HER2, CD-133, MUC1의 순으로 발현레벨이 높았다(도 8).

[0094] 유방 SCC의 경우 CD-133의 발현레벨이 가장 높았으며, HER2, EGFR, EpCAM, MUC1의 순으로 발현레벨이 높았다(도 9).

[0095] 분석한 결과를 기초로 포획된 세포의 검출 정확도(detection accuracy)를 분석하였다. 기존에 보고된 각 세포주에서의 표면마커의 발현레벨[29]을 레퍼런스로 하였으며, 포획된 세포 중 표면마커의 발현레벨이 레퍼런스와 일치하는 세포의 수를 계산한 다음, 이를 포획된 세포의 수로 나누고 100을 곱하여 나온 값을 검출 정확도(detection accuracy)로 계산하였다. 분석결과, 각 세포주의 검출 정확도는 SK-BR-3 세포가 96%, MCF-7 세포가 95%, MDA-MB-231 세포가 90%, 유방 SCC가 89%로 나타났다. 이와 같은 결과는 본 발명의 방법이 기존의 검출방법과 같이 높은 정확성을 가지고 특정 세포를 검출할 수 있다는 것을 의미하며, 이를 이용하여 혈액으로부터 순환종양세포 또는 순환 종양 줄기유사세포를 분리해낼 수 있다는 것을 의미하는 것이다.

[0096] 포획된 암줄기유사세포의 분리 및 배양

[0097] 본 발명의 미세유체칩으로 분리, 포획한 순환종양 줄기유사세포를 계속해서 배양하면서 특징을 분석하는 것이 가능한지를 확인하기 위하여, 포획된 유방 줄기유사암세포(SCC)를 미세유체칩으로부터 분리하고 배양하는 실험을 수행하였다. SNT에서 바이오틴은 dsDNA에 의해 금 나노입자에 연결되어 있으므로, dsDNA를 절단한다면, 미세유체칩으로부터 세포를 분리할 수 있게 된다. 따라서 DNA를 절단할 수 있는 제한효소를 처리하여 dsDNA를 절단하는 방법을 사용하여 칩으로부터 세포를 분리한 다음, 분리된 세포를 페트리 접시에서 배양하였다(도 10).

[0098] 배양을 진행하면서 유방 SCC의 분화가 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 미분화 세포와 분화된 세포 간의 형태 차이를 보이는데, 미분화 세포는 둥근 모양에 가깝고, 분화된 세포는 길쭉한 모양을 나타내었다(도 11).

[0099] SERS 매핑(mapping)을 이용하여 미분화 유방암세포와 분화된 유방암세포의 표면마커 발현레벨을 분석하였다. 미분화 유방 암세포의 경우, 5개의 표면 마커 중 CD-133의 발현레벨이 가장 높았고, EGFR, HER2, EpCAM, MUC1의 순으로 발현레벨이 높았다(도 12). 분화된 유방 암세포의 경우, 5개의 표면마커 중 HER2의 발현레벨이 가장 많고, EGFR, CD-133, EpCAM, MUC1의 순으로 발현레벨이 높았다(도 13).

[0100] 이와 같은 결과는 본 발명의 방법으로 분리한 암 줄기유사세포를 SERS 매핑으로 그 특징을 분석한 이후에도 계속 배양하여 추가적인 연구가 가능하다는 것을 보여주는 것이다.

[0101] 참고문헌

[0102] [1] Yi, S. -Y., Hao, Yi.-B., Nan K. J. & Fan, T. L.(2013). Cancer stem cell niche: A target for novel cancer therapeutics. Cancer Treatment Reviews, 39, 290296.

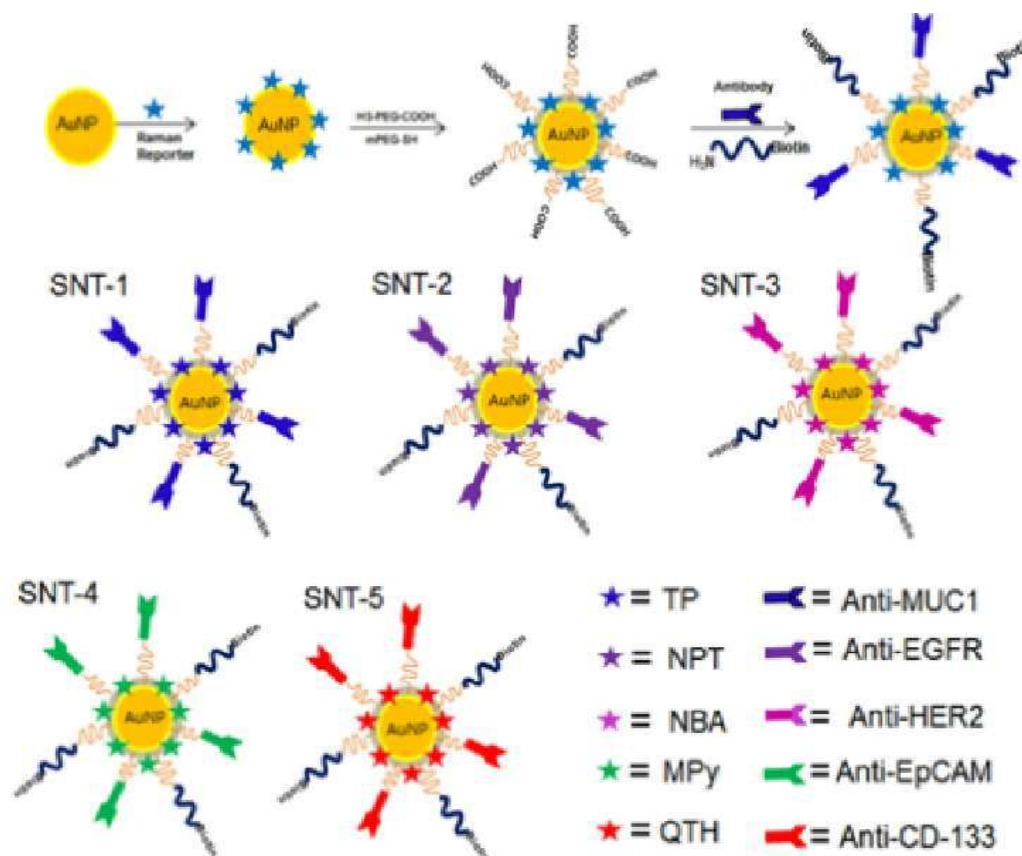
[0103] [2] Visvader, J. E. & Lindeman, J. E.(2008). Cancer stem cells in solid tumors: accumulating evidence and unresolved questions. Nature Reviews Cancer, 8, 755-768.

- [0104] [3] Trumpp, A. et al.(2008). Mechanisms of disease: cancer stem cells-targeting the evil twin. *Nature Clinical Practice Oncology*, 5, 337-347.
- [0105] [4] Gangopadhyay, S., Nandy, A., Hor, P. & Mukhopadhyay, A. (2013). Breast cancer stem cells: A novel therapeutic target. *Clinical Breast Cancer*, 13, 715.
- [0106] [5] Gerges, N., Rak, J. & Jobado, N.(2010). New technologies for the detection of circulating tumour cells. *British Medical Bulletin*, 94, 49-64.
- [0107] [6] Pantel, K & Alix-Panabieres, C.(2010). Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends in Molecular Medicine*, 16, 398-406.
- [0108] [7] Theodoropoulos, P., A. et al.(2010). Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Letters*, 288, 99106.
- [0109] [8] Nguyen, C., T., Nguyen, J., T, Rutledge, S., Zhang, J., Wang, Chen & Walker G.,C.(2010). Detection of chronic lymphocytic leukemia cell surface markers using surface enhanced Raman scattering gold nano particles. *CancerLetters*, 292, 91 -97.
- [0110] [9] Reinhard, B. M., Siu, M., Agarwal, H., Alivisatos, A. P. & Liphardt. (2005). Calibration of dynamic molecular rulers based on plasmon coupling between gold nanoparticles. *Nano Letters*, 5, 2246-2252.
- [0111] [10] Sonnichsen, C. & Alivisatos, A. P.(2005). Gold nanorods as novel nonbleaching plasmon-based orientation sensors for polarized single-particle microscopy. *Nano Letters*, 5, 301-304.
- [0112] [11] Aslan, K., Lakowicz, J. R. & Geddes, C. D.(2005). Plasmon light scattering in biology and medicine: new sensing approaches, visions and perspectives. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 538-544.
- [0113] [12] Sokolov, K. et al.(2003). Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Research*, 63, 1999-2004.
- [0114] [13] Doering, W. E., Piotti, M. E., Nata, M. J. & Freeman, R. G.(2007). SERS as a foundation for nanoscale optically detected biological labels. *Advanced Materials*, 19, 3100-3108.
- [0115] [14] Yonzon, C. R., Haynes, L., Zhang, X., Walsh, J.T., Jr., & R. Van Duyne,R.P.(2004). A glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering: improved partition layer, temporal stability, reversibility, and resistance to serum protein interference. *Analytical Chemistry*, 76, 78-85.
- [0116] [15] Qian, X. M., Zhou, X. & Nie, S.(2008). Surface-enhanced Raman nanoparticle beacons based on bioconjugated gold nanocrystals and long range plasmonic coupling. *Journal of American Chemical Society*, 130, 1493414935.
- [0117] [16] Keren, S. et al.(2008). Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.* 105, 58445849.
- [0118] [17] Kneipp, J., Kneipp, H., Wittig, B. & Kneipp, K.(2010). Novel optical nanosensors for probing and imaging live cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6, 214226.
- [0119] [18] Matschulat, A., Drescher, D. & Kneipp, J.(2010). Surface-enhanced Raman scattering hybrid nanoprobe multiplexing and imaging in biological systems. *ACS Nano*, 4, 32593269.
- [0120] [19] Doering, W. E. & Nie, S.(2002). Single-molecule and single-nanoparticle SERS: examining the roles of surface active sites and chemical enhancement. *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 311-317.
- [0121] [20] Kneipp, J., Kneipp, H. & Kneipp, K.(2008). SERSa single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics. *Chemical Society Review*, 37, 10521060.
- [0122] [21] Yang, J. et al.(2012). Distinguishing breast cancer cells using surface enhanced Raman scattering. *istry*, 402,1093-1100.

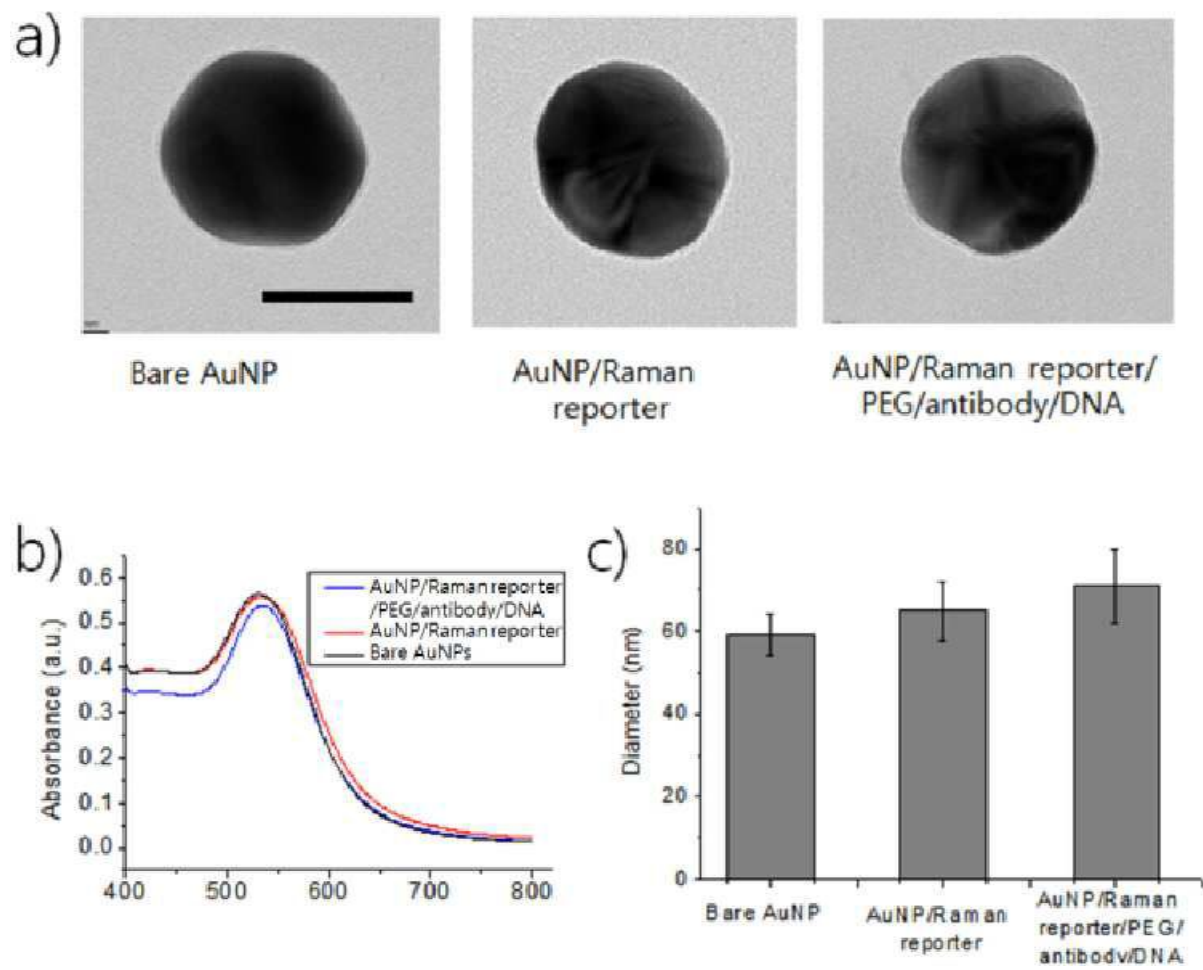
- [0123] [22] Qian, X. et al.(2008). In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. Nature Biotechnology, 26,83-90.
- [0124] [23] Park, H. et al.(2009). SERS imaging of HER2-overexpressed MCF7 cells using antibody-conjugated gold nanorods. Physical Chemistry Chemical Physics, 11, 7444-7449.
- [0125] [24] Carron, K. T. & Hurley, L. G.(1991). Axial and azimuthal angle determination with surface-enhanced Raman spectroscopy: thiophenol on copper, silver, and gold metal surfaces. Journal of Physical Chemistry, 95, 9979-9984.
- [0126] [25] Kim, J., H. et al.(2006). Nanoparticle Probes with Surface Enhanced Raman Spectroscopic Tags for Cellular cancer targeting.. Analytical Chemistry, 78, 7967-7973.
- [0127] [26] Caceres, R. C., Martin, B. S. & Barbero, A. F.(2011). Surface-enhanced Raman scattering sensors based on hybrid nanoparticles. Microsensors, DOI: 10.5772/18735.
- [0128] [27] Dey, P. et al.(2013). SERSbased detection of barcoded gold nano particle assemblies from within animal tissue. Journal of Raman Spectroscopy, 44, 1659-1665.
- [0129] [28] Song, W. et al.(2007). Surface-enhanced Raman scattering of 4-mercaptopyridine on the surface of TiO₂nanofiberscoatedwithAgnanoparticles. Journal of Physical Chemistry C, 111, 12786-12791.
- [0130] [29] Lee H.J. et al.(2013). Simultaneous capture and in situ analysis of circulating tumor cells using multiple hybrid nanoparticles. Biosens Bioelectron. 47, 508514.

도면

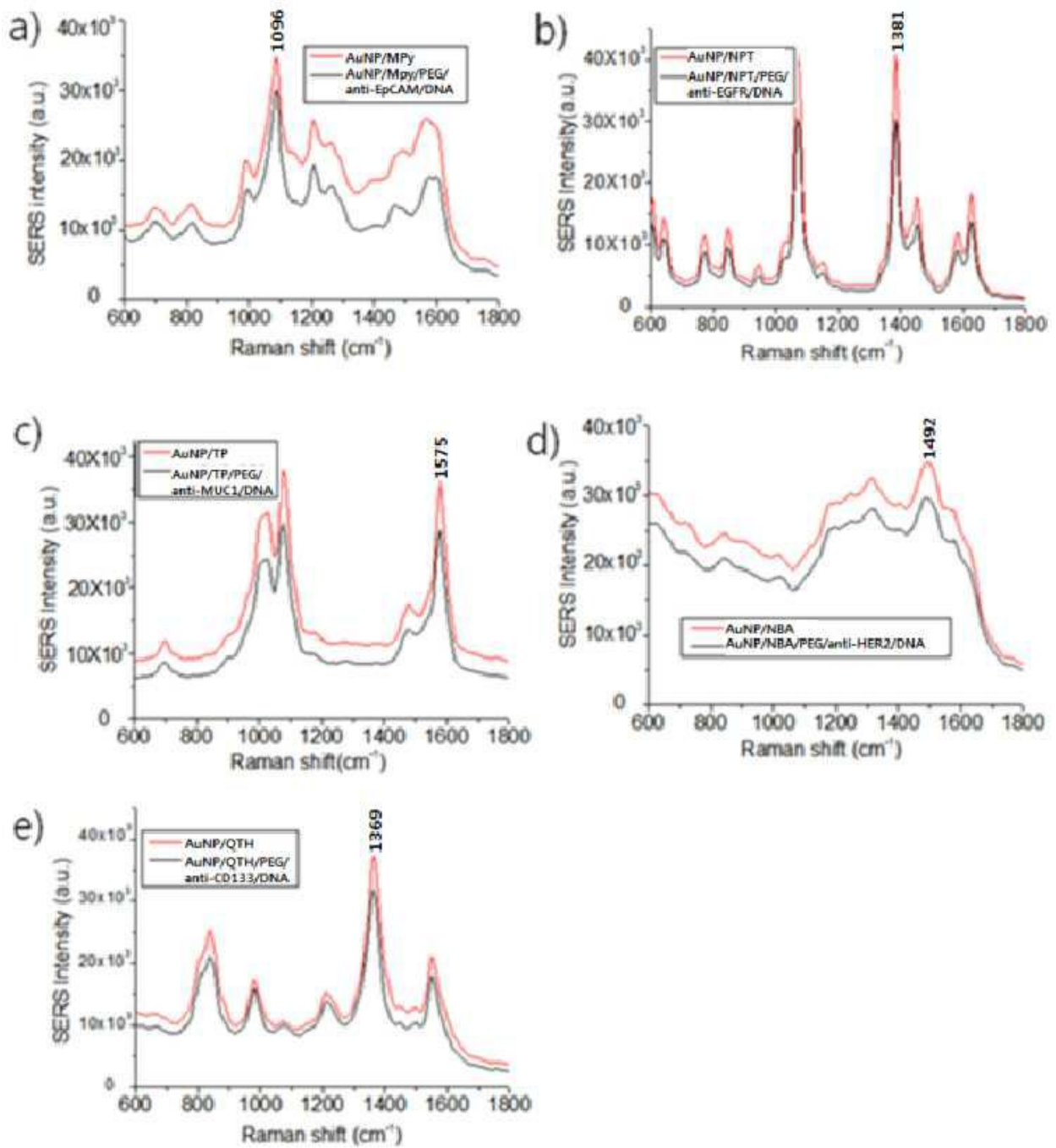
도면1



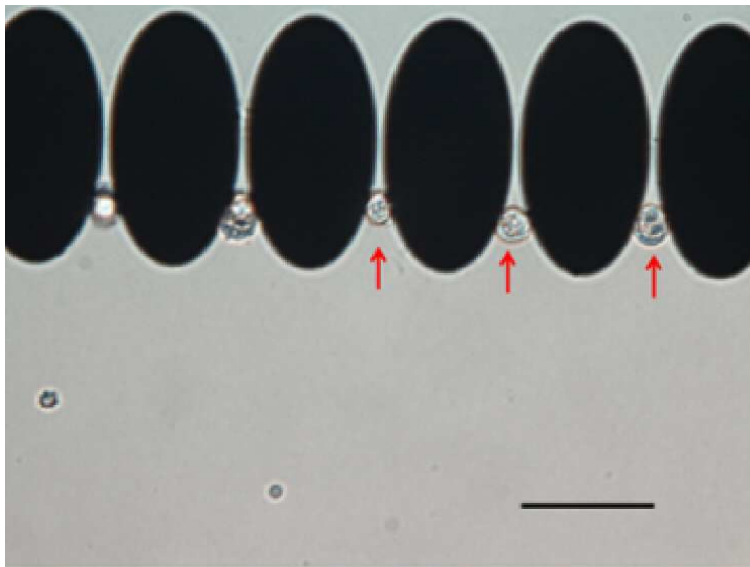
도면2



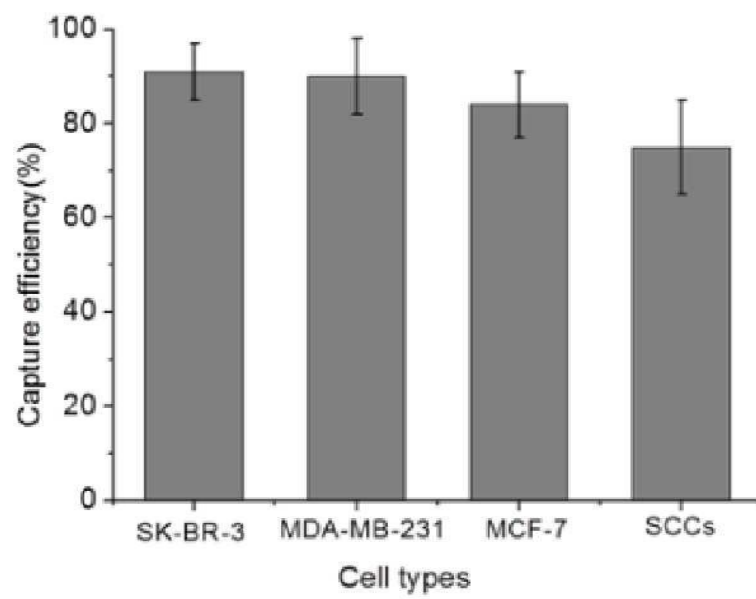
도면3



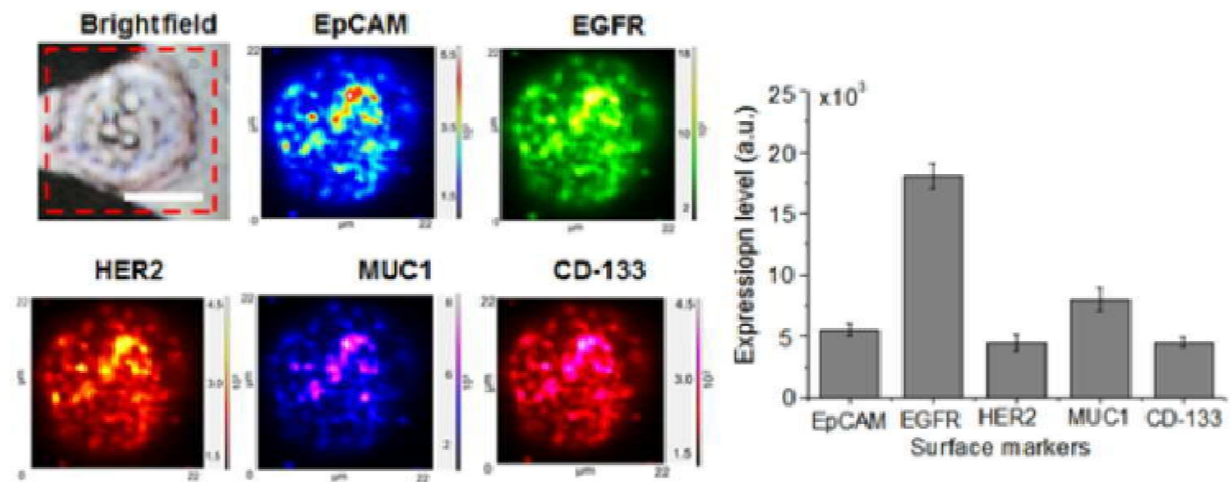
도면4



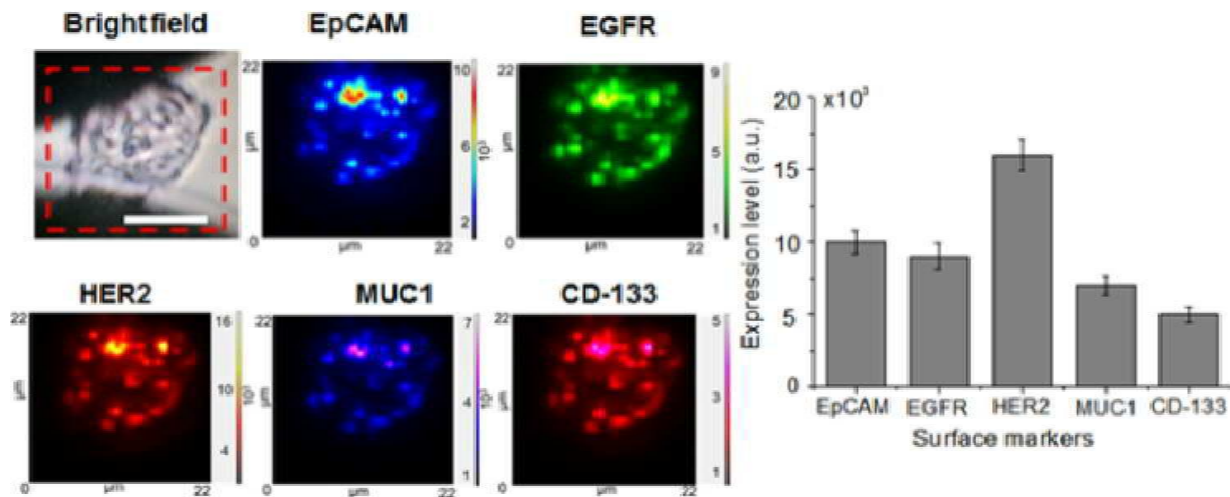
도면5



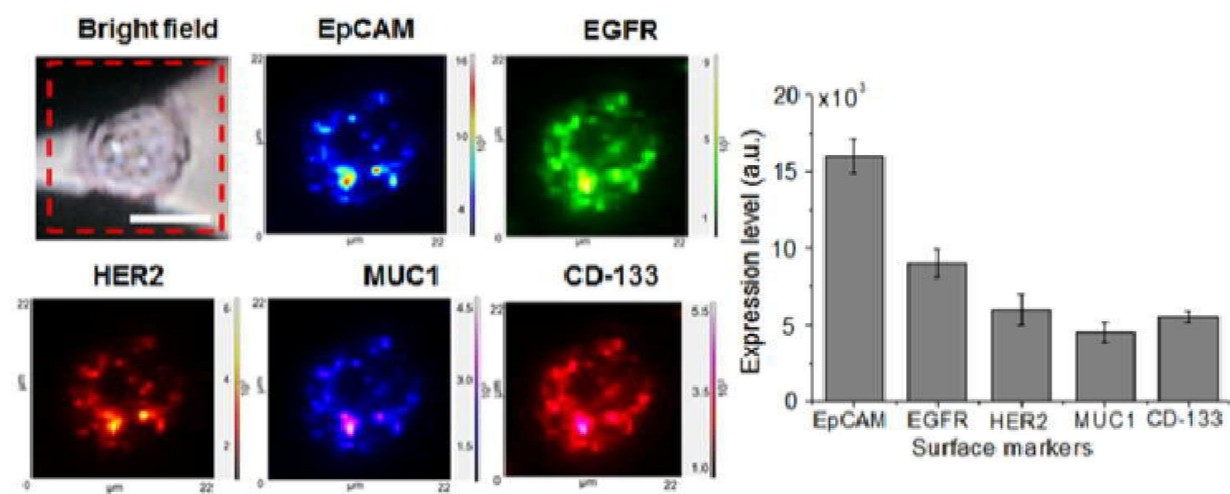
도면6



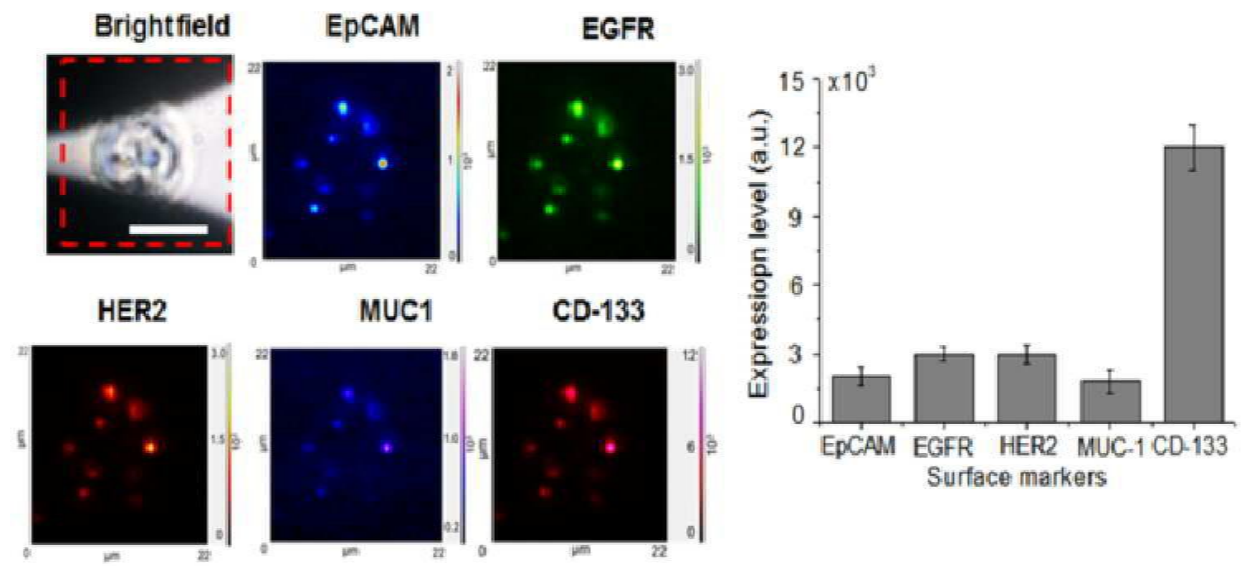
도면7



도면8



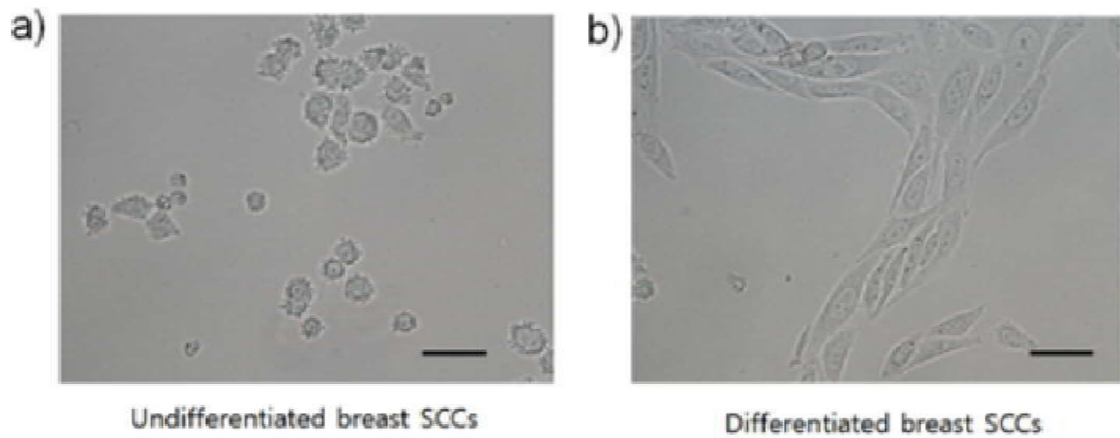
도면9



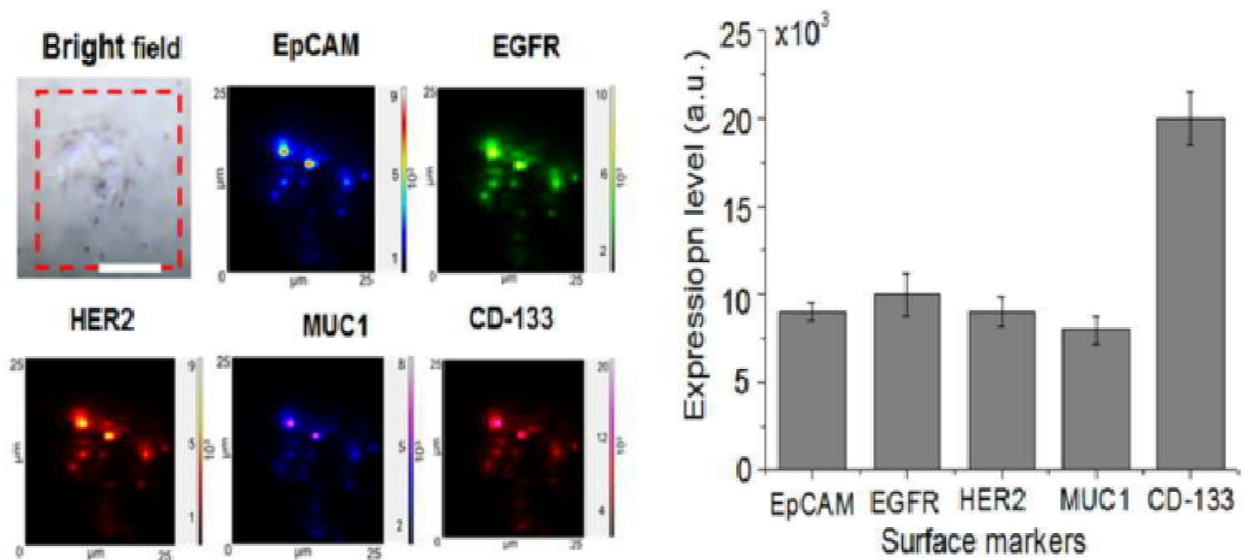
도면10



도면11



도면12



도면13

