

산소 민감 발광 염료를 이용한 마이크로 채널 내에서 배양되는 세포 주변의 산소 농도 측정

이 승 열* · 진 승 완**†

* 한국산업기술대학교 지식기반에너지 대학원, ** 한국산업기술대학교 기계공학과

Method for the Measurement of Dissolved Oxygen in a Cell Culture Microchannel Using Oxygen-Sensitive Luminescence

SeungYoul Lee* and Songwan Jin**†

*Dept. of Mechanical System Engineering, Graduate School of Knowledge-Based Technology and Energy, Korea Polytechnic Univ.,

**Dept. of Mechanical System Engineering, Korea Polytechnic Univ.

(Received December 30, 2011; Revised February 14, 2012; Accepted February 20, 2012)

Key Words: Oxygen Sensitive Luminescent Dye(산소 민감 발광 염료), Tris(Bipyridine)Ruthenium(II)(Tris(Bipyridine) Ruthenium(II)), Calcein(칼세인), Dissolved Oxygen Concentration(용존 산소농도), Hypoxia(저산소증)

초록: 본 논문에서는 산소 민감 발광 염료를 이용하여 마이크로 채널 내에서 세포가 배양되고 있을 때 산소농도를 측정하였다. 현재까지 알려진 여러 산소 민감 발광 염료 중 본 논문에서는 물에 잘 녹으며 장 시간 동안 사용하여도 독성이 없는 것으로 알려진 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 를 사용하였으며 이와 더불어 산소 민감 염료 측정법의 단점을 보완하기 위하여 칼세인 염료를 이용하여 두 염료의 밝기 비율을 구하여 농도를 측정하였다. SCOMS 카메라와 마이크로 채널을 이용하여 캘리브레이션을 실시하고 농도와 밝기와의 관계를 구하였으며 이 관계를 이용하여 세포가 배양되는 조건에서의 배양액의 산소농도를 측정하였다. 실험 결과 채널입구에서 점점 멀어질수록 마이크로 채널 내에서 산소농도는 점점 낮아진다는 것을 관찰할 수 있었다.

Abstract: In this study, we used an O_2 -sensitive luminescent dye to measure the O_2 concentration of culture media around HeLa cells cultured in a microchannel. $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, which dissolves easily in water and which has no phototoxic effect, was used as the O_2 -sensitive dye. The ratiometric sensing method was applied by introducing calcein as the O_2 -insensitive dye, in order to overcome the disadvantages of intensity-based sensing. By performing calibration with an amperometric O_2 sensor, we could calculate the exact concentration of O_2 in the culture media. We applied this technique to measure the O_2 concentration around the cultured cells in the microchannel. As expected, the O_2 concentration gradually decreased as the cells moved farther away from the channel. This method is expected to be applicable to the investigation of hypoxia, which occurs commonly in scaffolds.

- 기호설명 -

1. 서론

- $I_{[Ru(bpy)_3]^{2+}}$: $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 의 밝기
- $I_{Calcein}$: 칼세인의 밝기
- C_{O_2} : 배양액내의 용존 산소농도
- R_0 : C_{O_2} 0%에서의 $I_{[Ru(bpy)_3]^{2+}} / I_{Calcein}$
- R : 각각의 C_{O_2} 에서의 $I_{[Ru(bpy)_3]^{2+}} / I_{Calcein}$

조직 공학은 일반적으로 환자의 몸에서 확보된 세포를 세포 배양을 통해 개체 수를 증폭시키고 인공지지체(scaffold)를 이용하여 3 차원적 조직으로 재생한 후 환자의 몸에 이식하는 과정을 통하여 이루어지게 된다. 이러한 과정 중 반드시 필요한 인공지지체는 파종된 세포를 지지하고 재생될 조직의 틀이 되는 것으로 이러한 인공지지체의 개발 및 제작은 기계공학적인 가공 및 해석 기술이 매우 중요한 역할을 차지하는 분야라 할 수 있다.

† Corresponding Author, songwan@kpu.ac.kr
© 2012 The Korean Society of Mechanical Engineers

인체내의 조직은 모세혈관이 조직의 내부에 그물처럼 분포되어 있으며 이를 통하여 산소 및 영양분이 공급되고 노폐물이 수거된다. 하지만 인공지지체를 통하여 배양되는 조직은 이러한 모세혈관이 없어 산소와 영양분은 오로지 외부 환경으로부터 확산을 통해서만 공급되게 된다. 그러므로 인공지지체 내부의 확산 현상을 관찰하거나 산소 분포를 측정하고 시뮬레이션을 통하여 예측하는 것은 조직 재생의 성공률을 높이는 중요한 연구라 할 수 있다. 특히 인공지지체를 이용한 조직 재생 중 현재까지 가장 큰 문제가 되는 것은 지지체 내부 세포의 저산소증으로 인한 괴사이다. 그러므로 지지체 내부의 확산현상 중에서도 산소의 확산 및 농도를 관찰하는 것이 가장 시급한 문제라 할 수 있다. 하지만 시판중인 대부분의 산소 센서는 산소 검출부의 크기가 수 mm 내외 이며 많은 경우 센서에서 산소가 소모되기 때문에 이러한 센서를 이용하여 인공지지체 내부의 산소 분포를 측정하는 것은 매우 힘들다.

산소 민감 발광염료를 이용한 산소농도 측정은 이와 같은 산소 센서의 문제점을 극복하고 인공지지체 내부의 산소 분포 측정을 가능하게 할 수 있는 실험 방법이다.⁽¹⁾ 산소 민감 발광 염료는 산소의 농도에 따라 발광 강도가 바뀌는 염료로 Tris (2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II) hexahydrate ($[Ru(bpy)_3]^{2+}$), PtOEPK, PdOEPK, PtOEP 등이 있으며 일반적으로 산소의 농도가 낮아질수록 발광 강도가 증가하는 특징을 가지고 있다.^(2,3) 산소 민감 발광염료를 이용하여 산소농도를 측정하기 위해서는 염료를 배양액에 혼합하여 사용하거나^(1,4) 필름이나⁽⁵⁻⁷⁾ 입자의 형태로 만들어 사용하기도 한다.⁽⁸⁾ 이러한 방법 중 염료를 배양액에 혼합하여 사용하는 방법은 필름 형태의 센서로 만들어 측정하는 방법과 달리 삼차원적인 분포를 측정할 수 있으며 산소 민감 발광염료를 포함한 입자 형태의 센서를 이용한 방법보다 공간 분해능이 더 높다는 장점이 있어 삼차원적이며 최소 공극의 크기가 작은 인공지지체 내의 산소 분포를 측정하는데 있어 가장 적합한 방법이라 할 수 있다.

그러므로 본 논문에서는 세포 배양액의 산소농도를 산소 민감 발광염료를 사용하여 측정하였으며 특히 산소 민감 발광 염료 외에 산소의 농도에 영향을 받지 않는 염료를 동시에 사용하여 염료의 농도 분포 및 빛의 강도로 인하여 발생할 수 있는 문제점을 최소화 하였다. 또한 개발된 산소농도 측정법을 인공지지체 내의 산소농도 측정을 위한

선행연구라 할 수 있는 마이크로채널에서 배양되고 있는 세포 주변의 산소농도 측정에 적용하였다.

2. 실험장치

2.1 산소 민감 발광 염료

산소농도 측정 실험을 수행하기 위해서는 실험의 목적에 맞는 산소 민감 발광 염료를 선정하는 일이 중요하다. 현재 다양한 산소 민감 발광 염료가 확인되고 있으며 다양한 실험에 사용되고 있다. 본 연구에서는 물에 잘 녹으며 장 시간 동안 사용하여도 독성이 없는 것으로 알려진 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 을 사용하였다. 일반적으로 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 는 손상되지 않은 생물학적 세포막을 통해서 쉽게 통과되지 않는다고 알려져 있지만 염료를 높은 농도에서 장시간 사용하게 되면 세포막에 손상이 생기게 되고 이로 인해 세포에 염료가 침투하여 염색될 수 있다. 하지만 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 의 농도가 $0 \sim 2 \times 10^{-4}$ M의 범위일 때 장시간 사용하여도 광독성(phototoxic)의 영향이 없어 세포막의 손상이 없었으며 침투도 발생하지 않는 것으로 알려져 있다.⁽¹⁾

산소 민감 발광 염료를 이용해서 산소농도를 측정하는 방법에는 광퇴색(Photobleaching)과 리칭(leaching) 현상이 발생하기 쉬우며, 측정 픽셀의 이물질로 인해 방출되는 빛의 밝기에 변화가 생기며, 광학기기에서의 탐지, 샘플에 의한 빛의 흡수와 분산, 흡수광(excitation light), 염료의 농도 등에 의존해서 방출되는 빛의 밝기가 변화한다는 단점이 있다.⁽⁹⁾ 본 논문에서는 이러한 단점들을 보완하기 위하여 비율 계량 감지법(ratio metric sensing method)을 사용하였다. 이 방법은 서로 다른 스펙트럼을 가지는 산소 민감 발광 염료와 비산소 민감 발광 염료를 이용하게 된다. 산소 민감 발광 염료는 산소농도 변화에 따라 방출되는 빛의 세기가 변하지만 비산소 민감 발광 염료는 빛의 세기의 변화에도 방출되는 빛의 세기가 변하지 않는다. 하지만 비산소 민감 발광 염료 또한

Table 1 Characteristics of $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ and calcein

	Excitation Peaks(nm)	Emission Peaks(nm)	Molecular weight (g/mol)
$[Ru(bpy)_3]^{2+}$	423, 452	613, 627	748.62
Calcein	495	515	622.53

산소 민감 발광 염료와 같이 방출되는 빛의 밝기에 변화가 생기고 광학기기에서의 탐지, 샘플에 의한 빛의 흡수와 분산 등에 의존하여 방출되는 빛의 밝기에 변화가 생긴다. 따라서 이 두 염료의 산소농도 변화에 따라서 방출되는 빛의 밝기 변화의 비율로 산소농도를 측정하게 되면 서로 중첩되는 요인들의 영향이 줄어들어서 좀 더 정확한 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다.⁽¹⁰⁾ 본 논문에서는 비산소 민감 발광 염료로 흡수 및 발산하는 과정이 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 염료와 교차하지 않으며 물질량의 차이가 적은 칼세인 염료를 사용하였다. 형광 측정을 위한 광원으로는 수은 램프를 사용하였으며 수은 램프 앞에 셔터를 설치하여 실험 샘플이 빛에 노출되는 시간을 최소화하여 염료가 소광되는 것을 최소화 하였다. 두 염료의 측정에는 Semrock 사의 필터를 사용하였다.

2.2 보정실험 장치

염료의 밝기와 실제 산소농도와의 관계를 측정하기 위한 보정 실험 장치의 개략도를 Fig. 1 에 나타내었다. 장치 내부에 PDMS 를 이용해서 만든 마이크로 채널을 코로나 분당을 이용해서 부착하였다. 그 후 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 과 칼세인을 실제 실험에 사용될 농도와 같은 각각 $171.5\mu M$ 과 $11.5\mu M$ 로 첨가한 배양액을 장치 내부에 PDMS 채널이 완전히 잠기지 않을 정도로 공급하였다. 마이크로 채널로의 배양액 공급은 마이크로 채널에 연결된 챔버에 튜브를 연결한 후 주사기를 연결하여 PDMS 채널 주변에 특정한 산소농도로 조절된 배양액을 마이크로 채널 내부로 유입시켰다. 산소농도는 장치내부에 이산화탄소(CO₂)를 주입하여 조절하였으며 산소농도의 측정은 amperometric 방식으로 산소 농도를 측정하는 Mettler Toledo 사의 Inpro 6950i O₂ 센서를 사용하였다. 실험에 사용된 센서는 대기

중에 약 6 시간 정도 노출시켜둔 후 대기중의 농도인 21%를 센서 농도 100%로 보정하여 사용하였다. 또한 보정 실험 중에는 그림에서와 같이 전체 장치에 뚜껑을 덮고 이산화탄소를 공급하여 실험 장치 내부의 압력을 외부보다 높게 유지시켜 외부 공기의 유입을 차단하여 공기중의 산소가 PDMS 를 통하여 확산되는 것을 방지하였다.

본 논문의 모든 영상은 Olympus IX71 도립 현미경을 사용하여 획득하였고, 10X 대물렌즈를 사용하였다. 대물렌즈의 개구수(numerical aperture)는 0.3 이며 영상을 획득하기 위한 카메라의 해상도는 2592×2160 이다.

2.3 산소농도 측정 실험

본 연구에서 사용된 세포 배양 챔버는 두 개의 챔버와 두 챔버를 연결하는 마이크로 채널로 구성되어 있다. 마이크로 채널은 MEMS 공정을 거쳐 제작한 몰드를 이용하여 소프트 리소그래피(soft lithography) 공정을 사용하여 제작하였다. 세포가 배양되는 채널의 높이는 약 22 μm , 폭은 200 μm , 길이는 2.5mm 이다. 이와 같이 제작된 PDMS 구조물을 페트리디쉬에 코로나 분당 방법을 사용하여 부착하여 사용하였다.

세포가 충분히 마이크로 채널 내부에 배양되었을 때 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 과 칼세인을 각각 $171.5\mu M$ 과 $11.5\mu M$ 로 첨가한 배양액을 마이크로 채널 내부로 투입하여 인큐베이터 내부에서 10 분을 배양한 후 현미경을 사용하여 형광사진을 촬영하였다. 촬영된 각각의 형광사진을 보정 실험 결과와 비교하여 산소농도를 측정하였다.

본 연구에서 사용된 HeLa cell 은 10%의 FBS (fetal bovine serum)를 포함하고 있는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium)을 사용하여 일반적인 조건 (37°C, 5% 이산화탄소(CO₂))에서 배양되었으며, 이 때 배양 액에는 특정 세포 이외의 증

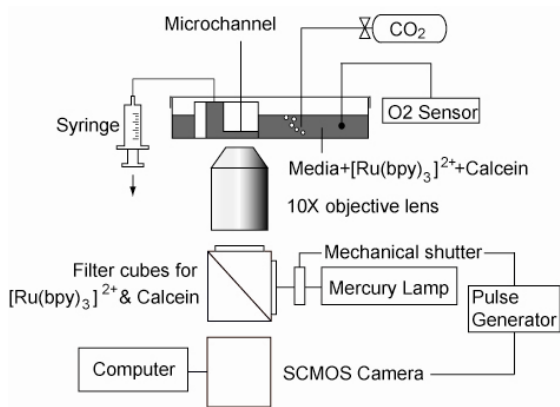


Fig. 1 Schematic diagram of calibration

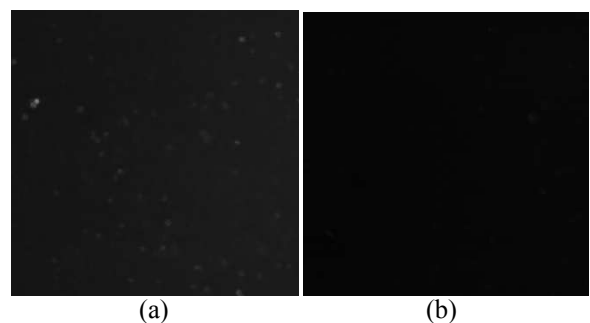


Fig. 2 Coloring test of(a) $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ (b) calcein. Images were taken 70minutes after adding fluorescence dye

식을 막고 오염을 방지하기 위하여 페니실린을 1% 첨가하였다.

3. 실험결과

3.1 염색 및 독성테스트

본격적인 실험에 앞서 실험에 사용한 염료가 세포에 미치는 영향을 파악하기 위하여 독성 및 염색테스트를 실시하였다. 우선 염색테스트를 위하여 정상적인 조건으로 배양된 세포가 90% 이상(약 2300 cells/mm²) 채워진 배양용기에 [Ru(bpy)₃]²⁺과 칼세인 염료를 산소농도 측정 실험에서 사용된 농도와 동일하게 각각 171.5μM 과 11.5μM 로 첨가한 배양액을 공급하고 이후 10 분 간격으로 70 분 까지 배양한 후 염료가 첨가된 배양액을 제거하고 PBS 로 세척한 후 일반 배양액을 다시 첨가하여 바로 관찰하였다. Fig. 2(a), (b)에 각각 [Ru(bpy)₃]²⁺과 칼세인을 첨가한 후 70 분 동안 배양한 세포의 형광사진을 나타내었다. 그림에서 보이듯이 70 분 후에 측정된 형광사진에서 염료에 의해서 염색된 세포들이 발견되지 않는 것을 확인할 수 있었으며, 이 실험을 통하여 70 분 이내에서는 염료가 세포로 침투하거나 세포막에 침착 되지 않는다는 것을 알 수 있었다.

또한 염료에 60 분 이상 노출된 샘플에서 살아있는 세포와 죽은 세포를 구분하여 관찰하였다. 세포 생존을 측정하기 위해서 Invitrogen 사의 LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit 제품을 실험에 이용하였으며 실험결과를 Fig. 3 에 나타내었다.

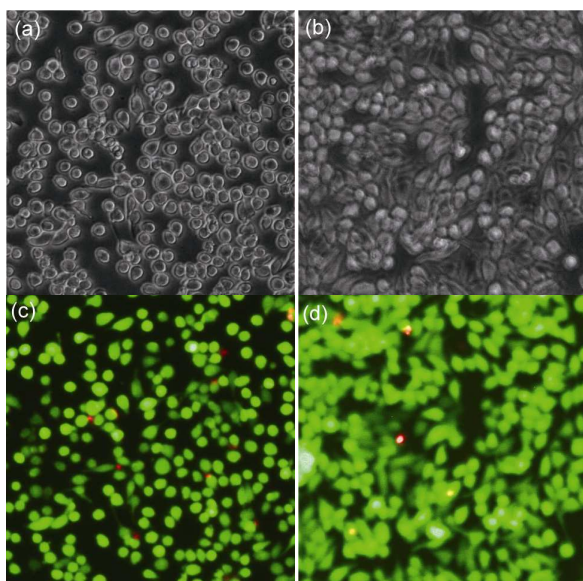


Fig. 3 Toxicity test of [Ru(bpy)₃]²⁺((a),(c))and calcein ((b),(d)). (a) and (b) show phase difference images. (c) and (d) show fluorescence images of live(shown in green) and dead(shown in red) cells

Fig. 3(a), (b)에는 실험후의 위상 차 사진을 나타내었으며 (c), (d)에 살아있는 세포와 죽은 세포를 구분하여 나타내었다. 이 그림에서 녹색으로 나타난 세포는 살아 있는 세포를 나타내며 붉은 색으로 나타난 세포는 죽은 세포를 의미한다. 그림에서 볼 수 있듯이 두 염료 모두 투입한 후 60 분이 지난 샘플에서 대부분의 세포들이 생존해 있는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해서 실험에 두 염료 모두 산소농도 측정 실험에 사용할 수 있다는 결론을 얻었다.

3.2 보정실험

2 장에서 설명한 보정 장치를 이용하여 염료의 밝기와 산소농도와의 관계를 측정하여 Fig. 4(a)에 나타내었다. 이 그림에서 ◆표시는 산소농도에 따른 [Ru(bpy)₃]²⁺의 밝기를 ■표시는 칼세인의 밝기를 나타낸다. 그림에서 볼 수 있듯이 [Ru(bpy)₃]²⁺의 경우 산소의 농도가 감소함에 따라 밝기가 점진적으로 증가하는 것을 알 수 있었으나 칼세인은 산소의 농도와 관계 없이 거의 일정한 것을 알 수 있었다. 하지만 산소의 농도가 30%인 지점에서 칼세인의 밝기가 증가하는 것처럼 보이는데 이 지점에서 [Ru(bpy)₃]²⁺ 역

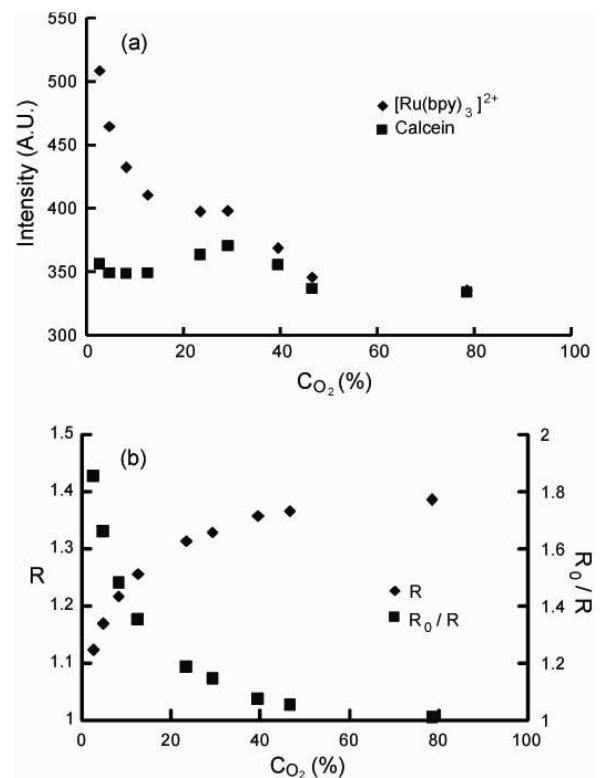


Fig. 4 Calibration result (a) Intensity of [Ru(bpy)₃]²⁺ and calcein (b) Intensity ratio (R) of [Ru(bpy)₃]²⁺ and calcein and Stern-Volmer plot

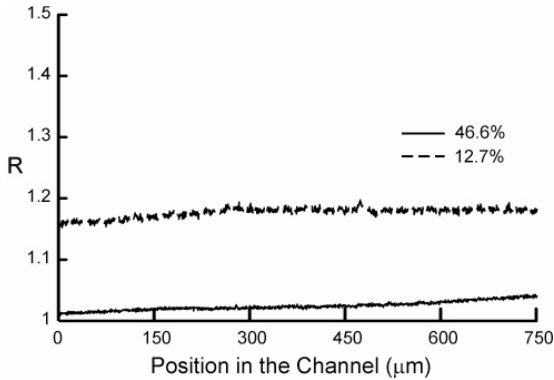


Fig. 5 Spatial distribution of intensity ratio under $C_{O_2} = 46.6\%$ (—) and 12.7% (---)

시 비슷하게 밝기가 증가하는 것을 볼 때 이 현상은 광원 등 외부요인에 의한 것으로 판단할 수 있었다. 이러한 외부요인들의 영향은 비율 계량 감지법을 사용하면 줄일 수 있는데 앞서 측정된 각각의 형광 염료의 밝기를 통해서 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 의 밝기와 칼세인의 밝기의 비율(R)을 계산하여 Fig. 4(b)에 사각형으로 나타내었다. 그림에서 볼 수 있듯이 산소농도가 감소할수록 두 형광염료의 비율은 점차 증가하는 것을 알 수 있으며 Fig. 4(a)에서 관찰되었던 농도 30% 주변에서의 급격한 밝기 증가 현상은 비율 그래프의 경우 거의 관찰할 수 없는 것을 확인할 수 있었다. 또한 산소의 농도가 낮아질수록 변화율이 급격하게 비율이 증가하는 것을 관찰할 수 있는데 이는 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 염료의 특징에 의한 것으로 이미 다수의 연구자들에 의해 관찰되었던 바 있다.^(2,3) 또한 Fig. 4(b)에 마름모로 표시되어 있는 측정된 데이터를 통해서 나타난 Stern-Volmer 곡선의 경우 농도가 상승할수록 증가율이 둔화되는 것으로 나타났는데 이러한 경향은 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 를 이용한 다른 논문들에서도 비슷한 결과가 보고된 바 있다.

산소농도 측정의 공간상의 오차를 알아보기 위하여 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 의 밝기와 칼세인 염료의 밝기 비율의 공간상 분포를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 관찰영역 내에서 공간적으로 큰 오차 없이 일정한 것을 관찰할 수 있었으며 밝기 비를 기준으로 하였을 때 산소의 농도와 관계없이 약 ± 0.01 정도의 차이를 보이고 있음을 알 수 있었다. 이러한 오차를 산소의 농도로 환산하였을 때 산소의 농도가 높은 경우 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 염료의 특징으로 인하여 $\pm 5\%$ 내외의 큰 오차가 발생되게 되지만 농도가 약 20%인 경우 $\pm 1\%$, 약 5%인 경우 $\pm 0.5\%$ 로 산소의 농도가 낮아질수록 정확도가 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 특징은 향후 본 측정법이 산소 결핍현상에 적용될 때

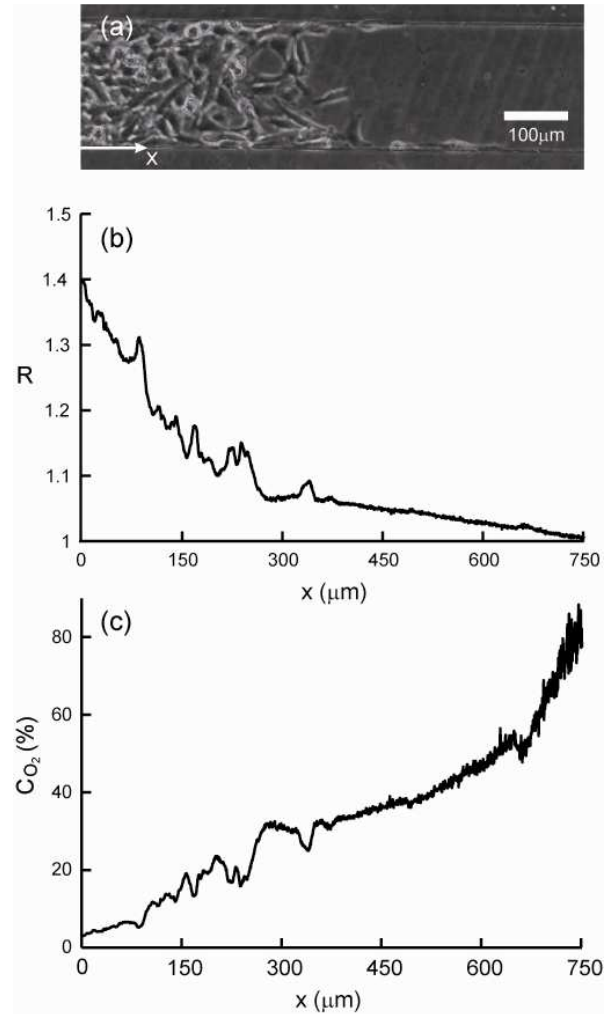


Fig. 6 Oxygen sensing in the microchannel (a) HeLa cell cultured in microchannel (b) Intensity ratio (R) of $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ and calcein (c) Oxygen concentration

매우 유리하게 적용될 수 있을 것이라 판단된다.

3.3 마이크로채널 내 산소농도 분포 측정

개발된 산소농도 측정법을 실제 문제에 적용하기 위하여 마이크로 채널 내에서 배양되는 세포 주변의 세포 주변의 산소농도 측정 실험을 수행하였다. 2.3절에서 설명한 방법으로 폭이 $200\mu\text{m}$ 인 마이크로 채널의 일부분에 HeLa 세포를 Fig. 6(a)와 같이 배양하고 산소농도를 측정하였다. $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 과 칼세인의 밝기를 이용하여 측정된 비율을 Fig. 6(b)에 나타내었다. Fig. 6(b)의 그래프는 Fig. 6(a)에 표시되어 있는 x 방향의 위치에 따른 높이 방향의 평균을 나타내는 것으로 채널의 왼편에 세포가 배양되고 있는 챔버가 있고 오른편에는 배양액만으로 채워져 있는 챔버와 연결되어 있다. 그래프에서 볼 수 있듯이 세포가 들어가는 입구부분에서 측정된 염료의 비율이 가장 높게 나타나

며 반대편으로 갈수록 형광강도의 비율이 점점 감소하는 것을 알 수 있다. 이렇게 측정된 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 과 칼세인의 비율을 보정 실험의 결과와 비교하여 산소 농도를 계산하여 이를 Fig. 6(c)에 나타내었다. 그림에서 볼 수 있듯이 왼쪽의 세포 배양부에서 용존 산소 농도가 가장 낮으며 반대편으로 갈수록 점차 산소 농도가 증가하는 현상이 발생한다. 이는 세포 배양부에서는 세포에 의해 산소가 계속적으로 소모되므로 세포가 많은 부분일수록 주변의 산소량이 가장 적어지며, 세포 배양부에서 멀어질수록 반대편 챔버의 배양액에 의해서 산소량이 점차 회복되는 것이라 해석할 수 있다.

4. 결 론

본 논문에서는 산소 민감 발광 염료를 이용하여 배양액 내의 산소농도를 측정할 수 있는 방법을 제시하고 이를 이용하여 마이크로채널 내에서 세포가 배양되고 있을 때 세포 배양액의 산소농도를 측정하였다. 특히 산소 민감 발광염료를 통해서만 산소농도를 측정할 때 발생하였던 빛의 강도 차이로 인한 밝기 변화와 같은 문제점들을 산소의 농도에 영향을 받지 않는 염료를 동시에 사용하여 최소화하였다. 실제로 보정 실험 중 갑작스럽게 산소 민감 발광 염료의 밝기가 증가하는 현상이 발생하였으나 이 때 산소의 농도에 영향을 받지 않는 염료 또한 밝혀져 두 발광 염료의 비율에는 큰 영향을 미치지 않는 현상을 관찰할 수 있었다.

본 연구에서 사용한 염료의 염색 및 독성 테스트 결과 60 분 이상의 노출에도 세포의 배양에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었으며 세포가 염색되지 않는 것을 알 수 있었다. 마이크로 채널 내의 산소농도 측정 실험의 경우 염료가 포함된 배양액에 세포가 노출된 시간이 30 분 이내였으므로 염료가 세포에 미치는 영향이 매우 미미할 것이라 판단된다.

본 논문에서와 같이 영상을 획득, 분석하여 결과를 얻는 경우 렌즈나 카메라, 광원 등의 광학계의 특징에 따라 공간적으로 오차가 발생할 수 있는데 이를 확인해 보기 위하여 관찰영역 내에서의 밝기 비율 분포를 분석해 본 결과 공간적으로 많게는 $\pm 5\%$ 적게는 $\pm 0.5\%$ 정도의 오차를 확인할 수 있었으며 이러한 오차는 산소의 농도가 낮을수록 줄어드는 것을 알 수 있었다.

본 논문에서는 이러한 측정법을 이용하여 배양액의 산소농도를 측정하는 방법을 확인할 수 있었으며 본 연구의 결과는 실제 3 차원 인공지지체에 세포가 배양될 때 산소의 농도를 측정하는 실험으로 발전될 수 있을 것이다.

후 기

이 논문은 2009 년도(2009-0071117)와 2011 년도(2011-0005814) 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

- (1) Jurek, W. D., 2001, "Interaction of Oxygen-Sensitive Luminescent Probes $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ and $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ with Animal and Plant Cells in Vitro: Mechanism of Phototoxicity and Conditions for Non-Invasive Oxygen Measurements," *Journal of Photo Chemistry and Photobiology B: Biology*, Vol. 65, No.2-3, pp. 136~144.
- (2) Amao, Y. and Okura, I., 2003, "Optical Oxygen Sensing Materials: Chemisorption Film of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes Attached to Anionic Polymer," *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 88, No. 2, pp. 162~167.
- (3) Zhang, P., Guo, J., Pang, W. and Wang, Y., 2002, "Incorporation of Luminescent Tris (Bipyridine) Ruthenium(II) Complex in Mesoporous Silica Spheres and Their Spectroscopic and Oxygen-Sensing Properties," *Materials Letters*, Vol. 53, No. 6, pp. 400~405.
- (4) Wilson, D. F. and Cerniglia, G. J., 1992, "Localization of Tumors and Evaluation of Their State of Oxygenation by Phosphorescence Imaging," *Cancer Research*, Vol. 52, No. 14, pp. 3988~3993.
- (5) Lam, R. H. W., Kim, M.-C. and Thorsen, T., 2009, "Culturing Aerobic and Anaerobic Bacteria and Mammalian Cells with a Microfluidic Differential Oxygenator," *Analytical Chemistry*, Vol. 81, No. 14, pp. 5918~5924.
- (6) Nock, V., Blaikie, R. J. and David, T., 2008, "Patterning, Integration and Characterisation of Polymer Optical Oxygen Sensors for Microfluidic Devices," *Lab on a Chip*, Vol. 8, No. 8, pp. 1300~1037.
- (7) Chang-Yen, D. A., Badardeen, A. and Gale, B. K., 2007, "Spin-Assembled Nano Films for Gaseous Oxygen Sensing," *Sens. Actuators, B*, Vol. 120, No. 2, pp. 426~433.
- (8) O'Donovan, C., Hynes, J., Papkovsky, D. B. and Yashunski, D., 2005, "Phosphorescent Oxygen-Sensitive Materials for Biological Applications," *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 15, No. 27~28, pp. 2948~2951.
- (9) Hartmann, P., Holst, G., Lubbers, D. W. and Ziegler, W., 1997, "Oxygen Flux Fluorescence Lifetime Imaging," *Sens. Actuators B Chem.*, Vol. 38, No. 1-3, pp. 110~115.
- (10) Park, E. J., Kennedy, R. T., Kopelman, R., Reid, K. R. and Tang, W., 2005, "Ratio Metric Fiber Optic Sensors for the Detection of Inter- and Intra-Cellular Dissolved Oxygen," *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 15, No. 27-28, pp. 2913~2919.