

세포 분비 단백질의 검출을 위한 마이크로시스템

Microsystems for Detection of Cell-Secreted Proteins

신동식 | Dong-Sik Shin

Department of Medical & Pharmaceutical Sciences, Sookmyung Women's University,
100, Cheongpa-ro 47-gil, Yongsan-gu, Seoul 140-742, Korea
E-mail: dshin@sookmyung.ac.kr

1. 서론

최근 표면 화학, 바이오 공학, MEMS(microelectromechanical systems) 기술을 아우르는 융합 학문의 발달로 세포의 미세 패터닝 및 어레이화를 가능케하였다.¹ 또한 MEMS 기술을 이용하여 표면 위에 세포를 패터닝시킴과 동시에 세포 주변에 바이오센싱 플랫폼을 씌워서 세포로부터 분비되는 생체 물질을 빠르게 실시간으로 검출하는 방법이 개발되고 있다. 이는 자극물질로부터 유발된 세포의 행동 또는 세포-세포 간의 교신 및 상호작용을 감지하여 조직 내에서의 특정 세포의 행태 등을 가늠케한다. 세포로부터 분비되는 단백질을 검출하는 방법으로는 세포 주변에 분석하고자 하는 단백질의 항체를 고정한 뒤, 이후 단백질이 결합된 후에 검출 항체를 이용하여 sandwich 어세이 방법에 의하여 간접적으로 정량할 수 있다.²⁻⁶ 또 다른 방법으로 항체를 대신할 수 있는 DNA 또는 RNA 앵타머를 이용하거나 단백질 분해 효소 검출을 위한 펩타이드를 이용할 수도 있다.⁷⁻¹⁰ 본 특집에서는 세포의 미세 패터닝 방법, 세포로부터 나오는 물질의 검출 방법 및 단일 세포 검출에 대해서 소개하고, 향후 연구 방향에 대해서 논의하고자 한다.

2. 본론

2.1 세포의 미세 패터닝

세포가 결합할 수 있는 extracellular matrix(ECM) 단백질의 프린팅을 이용하거나 세포-표면간 상호작용을 이용하여 원하는 위치에만 세포를 고정화시키는 방법이 있다.¹¹⁻¹²

세포 미세 패터닝의 대표적인 방법으로는 photolithography, soft lithography, protein printing 방법이 있으며, 세포가 결합할 수 있는 표면을 선택적으로 만들어 구획화시킬 수 있다(그림 1). 최근에는 실제 조직에 최대한 가까운 환경을 만들어주고자, 단일 세포의 배양이 아닌 혼합 세포의 배양(co-culture)의 형태로 미세패터닝을 디자인할 수 있다.¹³⁻¹⁵

2.1.1 Photolithography

주로 UV를 이용하여 구획을 만들어 세포를 패터닝하는 방법이다. 포토마스크를 이용하여 단백질 또는 세포

Author



신동식

1999 서울대학교 응용화학부 (학사)
2001 서울대학교 응용화학부 (석사)
2006 서울대학교 응용화학부(현 화학생명공학부) (박사)
2007-2009 UC Berkeley 박사후 연구원
2010-2015 UC Davis 박사후 연구원-프로젝트 연구원
2015-현재 숙명여자대학교 의약과학과 조교수

와 같은 생체 고분자의 흡착을 방해하는 polyethylene glycol-diacrylate(PEG-DA) 또는 acrylamide를 선택적으로 가교시켜 PEG-DA 또는 acrylamide가 가교되지 않은 부분에만 세포를 올리는 방법이다(그림 2).¹⁶⁻¹⁷ 유리 또는 실리콘 표면에 3-acryloxypropyltrichlorosilane을 이용하여 표면을 아크릴화 시킨 후, 고분자의 acryl 기능기와 동시에 가교되면서 공유 결합으로 표면과의 결합을 유도한다. Microwell의 크기는 사용되는 포토마스크의 크기에 의하여 결정되며, 작게는 단일 세포를 결합시킬 수 있도록 설계될 수 있다.

다른 방법으로는 UV에 의하여 반대로 세포가 결합하게끔 표면을 활성화시켜, ECM 단백질 또는 세포를 결합시키는 방법이다. UV에 의하여 활성화 되는 기능기로는 benzophenone, aryl azide, nitrobenzyl group을 가지는 photocaging 기능기 등이 있으며, 표면에서 활성화되어 모두 단백질의 가교에 이용될 수 있다(그림 3).¹⁸⁻²¹

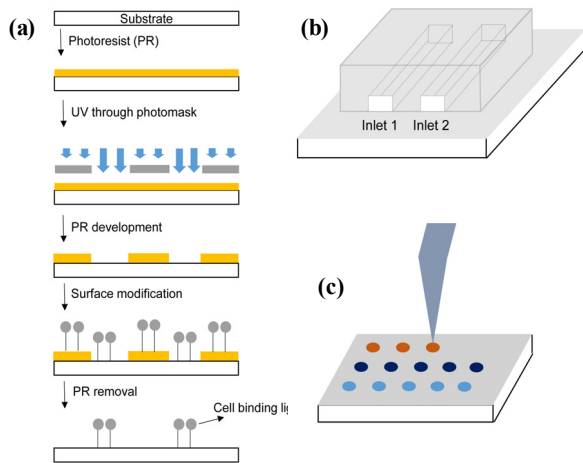


그림 1. 세포 미세패터닝의 방법. (a) photolithography, (b) soft lithography, (c) protein printing 방법.

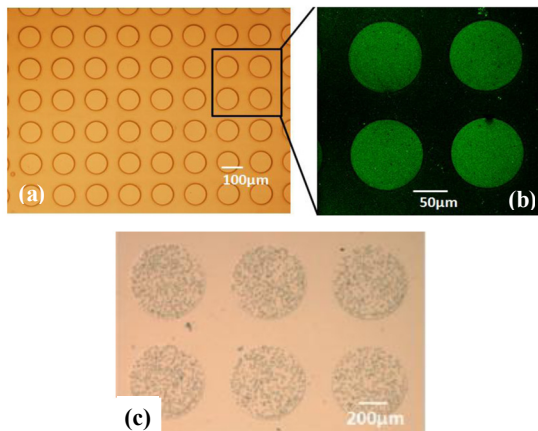


그림 2. Photolithograph를 이용한 세포의 마이크로 패터닝의 예시. 포토마스크의 디자인에 따라 세포가 들어갈 수 있는 구획을 디자인할 수 있다. (a) PEG-DA의 유리 표면 위로의 그래프팅, (b) 형광 단백질의 패터닝, (c) 세포가 PEG microwell에 들어가 있는 모양.¹⁶

2.1.2 Soft Lithography

Soft lithography는 polydimethylsiloxane(PDMS)을 이용하여 단백질 및 세포를 패터닝하는 방법이다.²²⁻²³ PDMS를 이용한 미세 유체 채널을 만들어 구획을 만들고 ECM 단백질을 고정하거나 세포를 직접 고정화시키는 방법이다. 간단한 SU-8이나 실리콘이 식각되어 있는 master mold를 이용하여 반복적으로 PDMS 미세 유체 채널을 제작할 수 있는 장점이 있다. PDMS의 특징은 투명하고 쉽게 휨수 있어 물리적으로 다루기 쉬우며, 공기가 투과할 수 있어 채널 내에서의 세포 배양에도 적합하다. 또한 PDMS를 이용한 microcontact printing(μ -CP) 방법으로 단백질의 미세 패터닝이 가능하다(그림 4).²⁴⁻²⁵

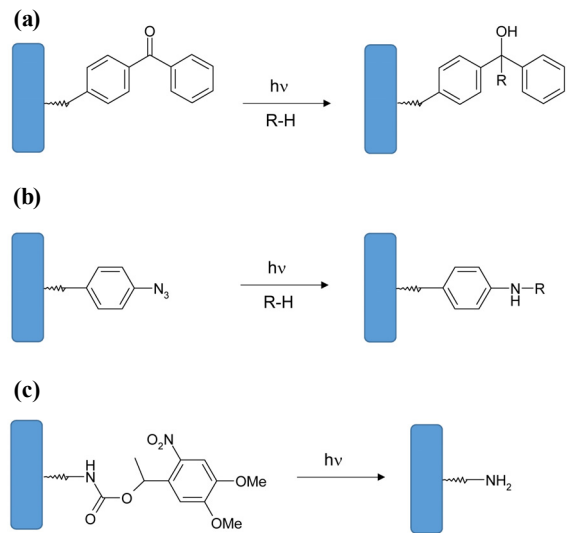


그림 3. UV에 의하여 활성화 되는 기능기들. (a) benzophenone, (b) aryl azide, (c) nitrobenzyl 기능기를 가지는 유도체들.

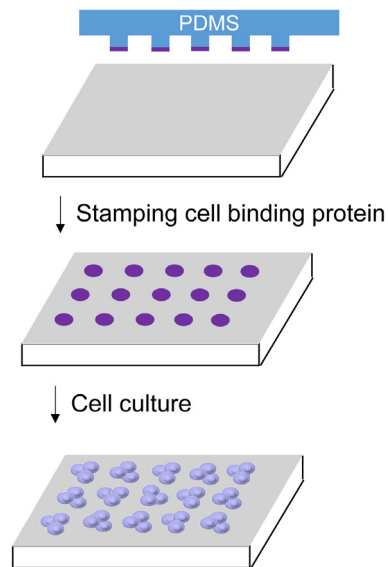


그림 4. Microcontact printing(μ -CP) 방법에 의한 단백질 및 세포의 패터닝.

2.1.3 Protein Printing

Pin을 이용하거나 ink jet 형태의 protein printing이 일반적이다.²⁶⁻²⁷ ECM 단백질 또는 세포와 상호 작용을 할 수 있는 항체를 표면기가 도입된 유리나 실리콘과 같은 표면에 공유 결합 또는 정전기적 결합에 이용하여 패터닝시킨 후 세포를 배양한다. 이러한 과정을 통해 패터닝된 단백질 위에 세포가 올라가는 것을 확인할 수 있다. 최근에는 dip pen nanolithography(DPN)의 발달로 수 마이크로미터 이내의 단백질의 프린팅이 가능하며, 단일 세포 단위의 세포 패터닝을 수행할 수 있다.²⁸⁻²⁹ 이렇게 패터닝된 단일 세포는 세포간의 다른 표현형이 나타나므로 각각의 세포간 형질 차이를 분석하는데 중요하게 쓰일 수 있다.

2.2 세포 분비 단백질의 검출 방법

세포로부터 나온 단백질은 결합 반응에 의하여 또는 그 단백질이 효소인 경우에는 효소 반응에 의하여 검출할 수 있다.³⁰⁻³¹ 가장 일반적으로 항체를 이용한 결합 반응을 이용하여 세포 분비 단백질을 검출하는 방법이 있으며, 항체를 대신하여 항체보다 높은 안정성을 가지는 DNA 또는 RNA 앵타머를 이용하는 방법이 있다. 또한 단백질 분해 효소를 검출하기 위하여 펩타이드 기질을 이용하는 방법이 있다.⁷⁻¹⁰ 이렇게 세포로부터 분비된 단백질을 검출하는 방법으로는 형광 분석법과 전기적인 신호 검출 방법이 있다.

2.2.1 형광 분석 방법

표면에 단백질을 포집할 수 있는 항체를 고정시킨 뒤 sandwich 어레이 방법을 이용하여 형광이 달린 검출 항체를 결합시키면 세포가 분비해 내는 단백질을 검출할 수 있다. 또는 형광 reporter-quencher와 결합되어 있는 앵타머를 이용하여 단백질의 결합으로부터 quencher를 DNA 또는 RNA 가닥으로부터 탈착시키면 형광이 나타나는 것을 확인할 수 있다.³² 또는 단백질 분해효소를 검출하기 위하여 세포의 주변에 형광 reporter-quencher와 결합된 펩타이드를 고정시켜 효소와 펩타이드의 반응에 의하여 quencher를 탈착시킬 수 있다.¹⁰ 상기 앵타머나 펩타이드를 이용하는 방법은 형광이 달린 항체를 다시 결합시킬 필요가 없어 실시간 세포 분비 단백질을 검출할 수 있는 장점이 있다.

2.2.2 전기 신호 검출 방법

금 또는 ITO와 같은 전도성 표면 위에 methylene blue, ferrocene, 또는 anthracene과 같은 redox reporter로 표시된 단백질 검출 물질 고정된 뒤 세포에서 나오는 단백질과 검출 물질의 상호 작용에 의하여 전기적 신호가 달라지는 것을 감지할 수 있다. 이렇게 바뀐 전기적 신호를 단백질의 농도와 비교

하면 세포로부터 분비된 단백질의 양을 정량할 수 있다.^{7,9}

2.3 단일 세포의 검출

단일 세포의 분비 단백질을 분석함으로써 각각의 세포간 형질의 차이를 알아내는 기술이 최근 중요하게 이용되고 있다. 동일한 하나의 세포 군으로부터도 단백질의 분비량이 다르게 나타나는 것이 일반적이므로 단일 세포의 단백질 분비량을 정성-정량화 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

예를 들어, 단일 B 세포로부터 나오는 항체의 양을 계산하여 특정 항체를 많이 분비하는 세포만을 찾아 연구하는 방법이 있다.³³ 또한 단일 T 세포로부터 나오는 사이토카인의 양을 측정하여 각각의 면역 세포로부터 특이한 행동을 취하는

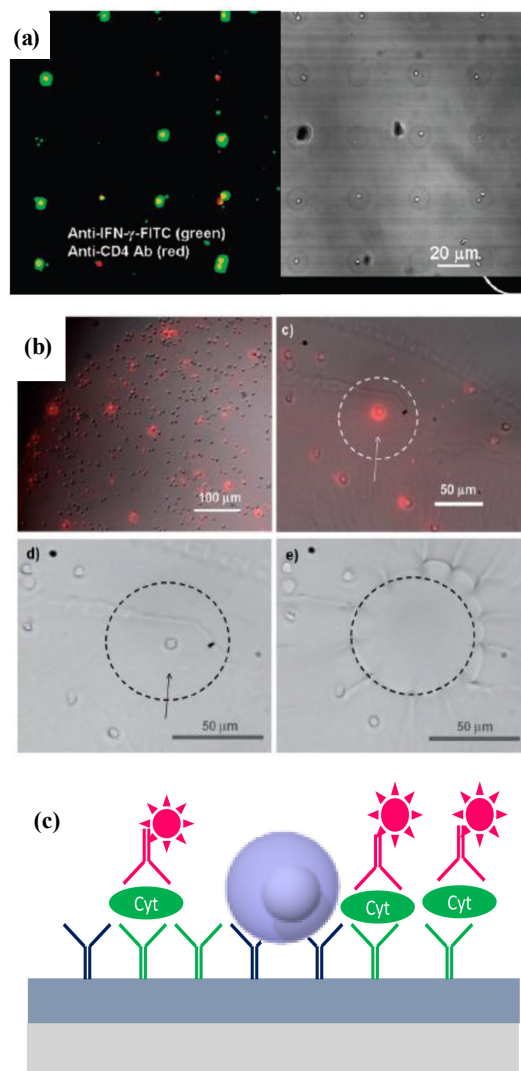


그림 5. 단일세포로부터 분비되는 단백질의 검출. (a) T 세포로부터 사이토카인의 분석,³⁴ (b) T 세포로부터 사이토카인 분석 후, 단일 세포의 분리,³⁶ (c) Sandwich 어레이 방법에 의하여 세포 분비 단백질의 형광 염색 방법. Reproduced with permissions of *Anal. Chem.* Copyright (2009) American Chemical Society and *Angew. Chem. Int. Ed.* Copyright (2014) John Wiley and Sons.

세포를 분석할 수 있다.³⁴

또한 단일 암세포로부터 나오는 단백질 분해효소를 검출함으로써 암세포의 전이에 대한 연구를 수행할 수 있다.³⁵ 최근에는 광분해성 하이드로젤을 이용하여 각각의 세포로부터 나오는 단백질을 분석함과 동시에 또한 단일 세포를 분리해 내는 방법이 개발되었다(그림 5).³⁶ 이와 같은 기술들은 추후 항체의 생산 및 생물학적 기전을 유추해 내는데 있어서 중요하게 이용될 수 있다.

3. 결론

본 연구에서 고찰된 기술들을 이용하여 세포로부터 분비되는 단백질을 효과적이고 정확하게 검출할 수 있다. 이는 실시간 분비량을 계산함으로써 단백질 배출의 kinetics를 가늠해 볼 수 있으며, 또한 특이 행동을 보이는 단일 세포를 분리해냄으로써 기존의 세포 군집으로부터의 실험으로는 얻을 수 없는 중요한 생물학적 기전을 유도하는데 도움이 될 수 있다. 향후 더욱 발달된 표면 화학, 바이오 공학, MEMS 기술을 어우르는 융합 기술을 이용하면, 세포 분석을 용이하게 할 수 있을 것이라 기대된다.

참고문헌

1. V. J. Sieben, C. S. Debes-Marun, L. M. Pilarski, and C. J. Backhouse, *Lab Chip*, **8**, 2151 (2008).
2. Y. Lu, Q. Xue, M. R. Eisele, E. S. Sulistijo, K. Brower, L. Han, A. D. Amir el, D. Pe'er, K. Miller-Jensen, and R. Fan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **112**, E607 (2012).
3. N. Varadarajan, D. S. Kwon, K. M. Law, A. O. Ogunniyi, M. N. Anahtar, J. M. Richter, B. D. Walker, and J. C. Love, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 3885 (2012).
4. H. Zhu, G. Stybayeva, M. Macal, E. Ramanculov, M. D. George, S. Dandekar, and A. Revzin, *Lab Chip*, **8**, 2197 (2008).
5. C. N. Jones, J. Y. Lee, J. Zhu, G. Stybayeva, E. Ramanculov, M. A. Zern, and A. Revzin, *Anal. Chem.*, **80**, 6351 (2008).
6. G. Stybayeva, M. Kairova, E. Ramanculov, A. L. Simonian, and A. Revzin, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **80**, 251 (2010).
7. Y. Liu, J. Yan, M. C. Howland, T. Kwa, and A. Revzin, *Anal. Chem.*, **83**, 8286 (2011).
8. Z. Matharu, D. Patel, Y. Gao, A. Haque, Q. Zhou, and A. Revzin, *Anal. Chem.*, **86**, 8865 (2014).
9. D. S. Shin, Y. Liu, Y. Gao, T. Kwa, Z. Matharu, and A. Revzin, *Anal. Chem.*, **85**, 220 (2013).
10. K. J. Son, D. S. Shin, T. Kwa, Y. Gao, and A. Revzin, *Anal. Chem.*, **85**, 11893 (2013).
11. K. Y. Suh, J. Seong, A. Khademhosseini, P. E. Laibinis, and R. Langer, *Biomaterials*, **25**, 557 (2004).
12. H. Jeon, C. G. Simon, Jr., and G. Kim, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **102**, 1580 (2014).

13. J. Tien, C. M. Nelson, and C. S. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 1758 (2002).
14. J. Fukuda, A. Khademhosseini, J. Yeh, G. Eng, J. Cheng, O. C. Farokhzad, and R. Langer, *Biomaterials*, **27**, 1479 (2006).
15. J. You, D. S. Shin, D. Patel, Y. Gao, and A. Revzin, *Adv. Healthc. Mater.*, **3**, 126 (2014).
16. D. S. Shin, J. H. Seo, J. L. Sutcliffe, and A. Revzin, *Chem. Commun.*, **47**, 11942 (2011).
17. J. Hou, Q. Shi, W. Ye, P. Stagnaro, and J. Yin, *Chem. Commun.*, **50**, 14975 (2014).
18. A. S. Blawas and W. M. Reichert, *Biomaterials*, **19**, 595 (1998).
19. D. S. Shin, K. N. Lee, K. H. Jang, J. K. Kim, W. J. Chung, Y. K. Kim, and Y. S. Lee, *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 485 (2003).
20. I. S. Carrico, S. A. Maskarinec, S. C. Heilshorn, M. L. Mock, J. C. Liu, P. J. Nowatzki, C. Franck, G. Ravichandran, and D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 4874 (2007).
21. L. Marcon, M. Wang, Y. Coffinier, F. Le Normand, O. Melnyk, R. Boukherroub, and S. Szunerits, *Langmuir*, **26**, 1075 (2010).
22. R. S. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, D. E. Ingber, and G. M. Whitesides, *Biomaterials*, **20**, 2363 (1999).
23. R. Singhvi, A. Kumar, G. P. Lopez, G. N. Stephanopoulos, D. I. Wang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber, *Science*, **264**, 696 (1994).
24. J. Lahann, I. S. Choi, J. Lee, K. F. Jenson, and R. Langer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 3166 (2001).
25. G. Csucs, R. Michel, J. W. Lussi, M. Textor, and G. Danuser, *Biomaterials*, **24**, 1713 (2003).
26. M. Jia, E. Belyavskaya, P. Deuster, and E. M. Sternberg, *Anal. Chem.*, **84**, 6508 (2012).
27. E. A. Roth, T. Xu, M. Das, C. Gregory, J. J. Hickman, and T. Boland, *Biomaterials*, **25**, 3707 (2004).
28. R. A. Vega, C. K. Shen, D. Maspoch, J. G. Robach, R. A. Lamb, and C. A. Mirkin, *Small*, **3**, 1482 (2007).
29. J. Kim, Y. H. Shin, S. H. Yun, D. S. Choi, J. H. Nam, S. R. Kim, S. K. Moon, B. H. Chung, J. H. Lee, J. H. Kim, K. Y. Kim, K. M. Kim, and J. H. Lim, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 16500 (2012).
30. H. Filbert, S. Attig, N. Bidmon, B. Y. Renard, S. Janetzki, U. Sahin, M. J. P. Welters, C. Ottensmeier, S. H. van der Burg, C. Gouttefangeas, and C. M. Britten, *Cancer Immunol. Immun.*, **62**, 615 (2013).
31. L. Li, X. Q. Shen, Q. H. Xu, and S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 424 (2013).
32. N. Tuleuova, C. N. Jones, J. Yan, E. Ramanculov, Y. Yokobayashi, and A. Revzin, *Anal. Chem.*, **82**, 1851 (2010).
33. J. C. Love, J. L. Ronan, G. M. Grotenbreg, A. G. van der Veen, and H. L. Ploegh, *Nat. Biotechnol.*, **24**, 703 (2006).
34. H. Zhu, G. Stybayeva, J. Silangacruz, J. Yan, E. Ramanculov, S. Dandekar, M. D. George, and A. Revzin, *Anal. Chem.*, **81**, 8150 (2009).
35. K. J. Son, D. S. Shin, T. Kwa, J. You, Y. Gao, and A. Revzin, *Lab Chip*, **15**, 637 (2015).
36. D. S. Shin, J. You, A. Rahimian, T. Vu, C. Siltanen, A. Ehsanipour, G. Stybayeva, J. Sutcliffe, and A. Revzin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 8221 (2014).