

**다공성 알루미나 필터 표면에 형성된 나노구조물의 형상에 따른
찢어짐에 의한 세포파쇄 특성 평가**이용훈^a, 한의돈^a, 김병희^a, 서영호^{a*}**Evaluation of Mechanical Tearing based Cell Disruption Capability to
Shape Nanostructures formed on Nanoporous Alumina Filter**Yong-Hun Lee^a, Eui-Don Han^a, Byeong-Hee Kim^a, Young-Ho Seo^{a*}^a Department of Advanced Mechanical Engineering, Kangwon National University,
1, Gangwondaehak-gil, Chuncheon, Gangwon-do, 24341, Korea**ARTICLE INFO***Article history:*

Received	11	October	2016
Revised	28	December	2016
Accepted	10	January	2017

Keywords:

Nano-scale spikes
Mechanical cell disruption
Aluminum anodizing
Alumina filter

ABSTRACT

This study investigated the mechanical tearing of a cell membrane using a nanostructured alumina filter for easy and quick mechanical cell disruption. Nanostructured alumina filters were prepared by a multi-step aluminum anodizing process and nanopore etching process. Six different types of nanostructures were formed on the surface of the nanoporous alumina filters to compare the mechanical cell disruption characteristics according to the shape of the nanostructure. The prepared alumina filter was assembled in a commercial filter holder, and then, NIH3T3 fibroblast cells in a buffer solution were passed through the nanostructured alumina filter at a constant pressure. By measuring the concentration of proteins and DNA, the characteristics of mechanical cell disruption of the nanostructured alumina filter were investigated.

1. 서론

분자생물학, 의료, 바이오 분야 등에서 세포 내에 존재하는 DNA, RNA, 바이러스, 단백질 등을 추출하여 연구하기 위해서는 세포파쇄(cell lysis or cell disruption)는 필수적인 과정이며 원리에 따라 화학적, 전기적, 기계적인 방법으로 나눌 수 있다^[1,2]. 화학적 세포파쇄 방법은 일반적으로 세포 용해액을 통해 세포 외피 및 세포핵을 화학적으로 분해시켜 세포를 파쇄 하지만 과정이 복잡하며, 용해액 이외의 잔여물이 발생하고, 용해 과정 중 DNA와 단백질 등이 오염될 수 있는 단점을 가지고 있다^[2,3]. 전기적 세포파쇄 방법으로는 전기장을 이용하여 세포를 파쇄 하는 방법이 있으며,

세포파쇄에 필요한 1 kV/cm 이상의 높은 전기장을 얻기 위한 외부 전기장치가 필요하고, LOC(lap on a chip)을 위한 소규모 파쇄에 적합하다^[4]. 기계적 세포파쇄 방법으로는 마이크로 비드에 의한 충격이나 블레이드 회전에 의한 전단력으로 세포를 파쇄^[5]하는 등 다양한 방법이 있는데, 세포파쇄를 위한 별도의 장치가 필요하고 파쇄시간이 길며 파쇄 후 용출액에 파쇄 되지 않은 세포들이 존재하는 단점을 가지고 있다. 이러한 기계적 파쇄의 단점을 보완하기 위하여 화학약품이나 외부장비의 도움 없이 실리콘의 습식 식각을 통해 제작된 마이크로, 나노 구조물을 이용하여 세포를 파쇄 하는 연구들이 진행되고 있다^[6,7]. 이는 다른 장치 없이 간단하게 유입되는 다량의 세포를 기계적으로 파쇄하고 화학적인 단계를 거

* Corresponding author. Tel.: +82-33-250-6378

Fax: +82-33-255-5551

E-mail address: mems@kangwon.ac.kr (Young-Ho Seo)

치지 않기 때문에 DNA와 단백질을 오염 없이 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다. 하지만 마이크로 채널 또는 필터의 간격이 평균 3 μm 이상이기 때문에 10~20 μm 크기의 세포가 변형이 되어 마이크로 채널을 통과하거나 5~10 μm 크기의 세포핵이 파쇄되지 않는 단점이 있다⁸⁻¹⁰⁾.

본 연구에서는 나노구조화 기술 중에 저비용 및 대면적 나노패턴 구현에 용이한 알루미늄 양극산화 공정을 전해액의 종류, 전해액의 농도, 전압차, 온도에 따라 알루미늄 나노포어의 직경이 달라지는 것을 이용하여^{11,12)} 다공성 알루미늄 필터 표면에 나노구조물을 제작하고, 주변 전자장치의 도움 없이 단순히 주사기 필터홀더에 연결해 세포가 포함된 완충용액을 이송시켜 세포외피와 세포핵 모두 파쇄 할 수 있는 간단한 기계적 세포파쇄 방법을 제안하였다.

2. 제작 및 실험방법

2.1 나노급 스파이크 알루미늄 필터의 제작

세포파쇄를 위해 다공성 알루미늄 필터 표면에 나노구조물을 제작하였으며 제작된 필터를 나노급 스파이크 알루미늄 필터라 칭하였다. 기계연마 및 전해연마를 통해 경면처리된 고순도 알루미늄 시트(99.999%)를 -5°C의 인산(0.3 M) 수용액에서 180 V의 전압을 인가하여 1차 알루미늄 양극산화 공정을 60분 동안 수행하였다. 1차 알루미늄 양극산화 공정으로 불균일하게 성장된 알루미늄 층은 65°C의 크롬산(1.8 wt%)+인산(6 wt%) 혼합액에서 2시간동안 식각하여 제거한 후 1차 알루미늄 양극산화와 동일한 조건을 인가하여 2차 알루미늄 양극산화 공정을 수행하였다. 그 후 35°C의 인산(0.1 M) 수용액에서 1차 나노포어 확장공정을 수행하여 나노급 스파이크의 기본 형상을 제작하였다. 다음으로 동일한 조건에서 3차 알루미늄 양극산화 공정을 40시간 수행하여 알루미늄

의 지지체 부분을 약 80 μm 두께로 제작한 뒤 35°C의 인산(0.1 M) 수용액에서 2차 나노포어 확장공정을 수행하여 나노스파이크 형상을 제작하였다. 불필요한 알루미늄은 식각용액(HCl+H₂O+CuCl₂·2H₂O)으로 제거 한 뒤 알루미늄 필터의 막혀있는 장벽층은 35°C의 인산(0.1 M) 수용액에서 식각되어 관통형 채널로 제작하였다. 나노급 스파이크 알루미늄 필터의 제작 공정은 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 2(a)는 제작된 나노급 스파이크 알루미늄 필터의 실제 사진이며 직경 15 mm의 디스크 형태로 제작되었다. Fig. 2(b)는 제작된 나노급 스파이크 알루미늄 필터의 단면의 전자현미경 사진으로 강성을 확보하기 위하여 약 80 μm 두께로 제작된 것을 확인할 수 있다. 또한 Fig. 2(c)는 장벽층이 제거된 나노급 스파이크 알루미늄 필터의 바닥 부분이며 관통형 나노채널로 제작된 것을 확인할 수 있다. 다양한 형상 및 크기를 가지는 나노급 스파이크 알루미늄 필터에 대한 세포 파쇄 특성을 비교하기 위하여 Table 1과 같이 2차 알루미늄 양극산화 공정을 통하여 1, 10 μm 높이의 나노급 스파이크를 제작하였고, 2차 나노포어 확장 공정 시간을 조절하여 ridge, ridge spike, spike 세 종류를 제작하여 총 6가지 형상으로 세포 파쇄 실험을 준비하였다. Fig. 3(a)~(f)는 각각 실제로 제작된 ridge, ridge spike, spike 세 종류의 나노급 스파이크 알루미늄 필터의 전자현미경 이미지이다. 각 샘플의 평면과 단면 모습을 통해 나노급 스파이크가 알루미늄 필터 위에 제작된 것을 확인할 수 있다.

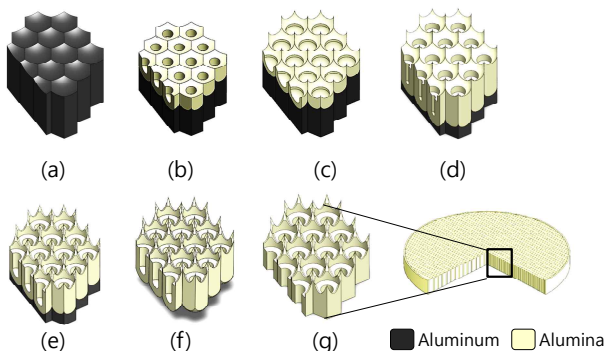


Fig. 1 Fabrication process of nano-scale spikes structured alumina filter; (a) 1st anodic aluminum oxidation and alumina removal, (b) 2-step anodic aluminum oxidation, (c) 1st nanopore expansion, (d) 3rd anodic aluminum oxidation, (e) 2nd nanopore expansion, (f) aluminum removal, (g) barrier layer opening

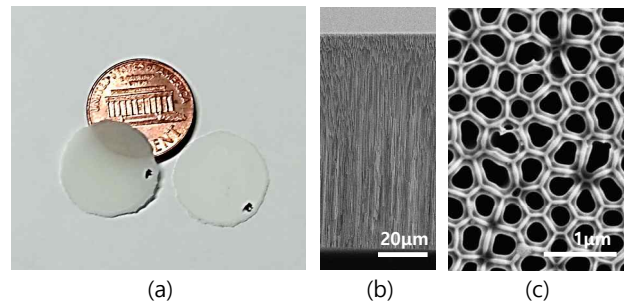


Fig. 2 Fabricated nano-scale spikes structured alumina filter; (a) real image, (b) SEM image of cross section, (c) SEM image of opened side

Table 1 Dimension and shape of the nano-scale spikes structured alumina filters

Specimen	R-1	RS-1	S-1	R-10	RS-10	S-10
Structure type	Ridge	Ridge spike	Spike	Ridge	Ridge spike	Spike
Height of nanospike	1 μm	1 μm	1 μm	10 μm	10 μm	10 μm
Schematic						

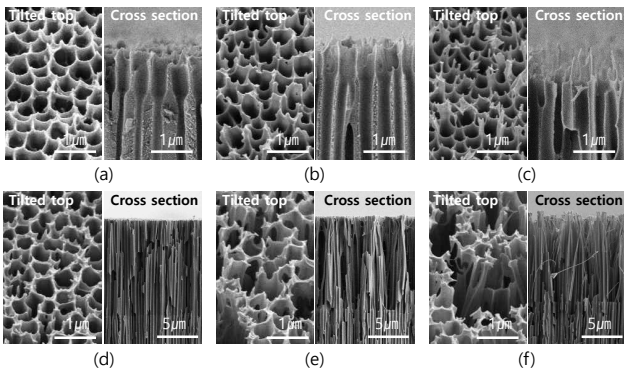


Fig. 3 SEM images of nano-scale spikes on alumina filter: (a) R-1, (b) RS-1, (c) S-1, (d) R-10, (e) RS-10, (f) S-10

2.2 세포배양 및 세포파쇄

제작된 나노급 스파이크 알루미나 필터를 통해 세포를 파쇄하기 위하여 NIH3T3 쥐 섬유아세포를 이용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂의 농도가 유지된 인큐베이터(SANYO, MCO19A/C)에 10%의 FBS(fetal bovine serum, Lonza)와 1%의 Penicillin-streptomycin(Lonza)이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza)에서 배양되었으며, 세포파쇄를 위해 완충액(phosphate buffered saline; PBS) 1 ml에 1×10⁶개의 세포를 준비하였다. 다양한 형상과 크기로 제작된 나노급 스파이크를 가진 알루미나 필터는 상용 필터홀더에 결합된 뒤 주사기에 연결되었으며 공압을 통해 일정한 압력으로 세포가 포함된 PBS 용액을 이송시켰다. 세포 파쇄 후 얻은 용출액 내의 DNA와 단백질의 농도는 정량적으로 측정하여 비교하였다.

2.3 DNA, 단백질 농도 정량화

파쇄 후 얻은 용출액 내의 DNA의 농도를 확인하기 위하여 DNA 분리키트(DNeasy DNA isolation kit, Qiagen)를 통해 용출액 내의 DNA를 분리한 후 DNA가 260 nm 파장의 빛을 흡수하는 성질을 이용하여 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 용출액 내의 단백질 농도 정량화를 위해 브래드포드 정량법(Bradford method)을 이용하였으며 세포 내 펩타이드, 티로신 등의 방향족 아미노산이 브래드포드 용액의 쿠마시블루 염색약과 반응을 할 때 최대 흡광 파장이 465 nm에서 595 nm로 바뀌게 된다. 파쇄 후 얻은 용출액과 브래드포드 용액을 반응시킨 뒤 595 nm 파장에서 흡광도를 분광광도계로 측정하였다.

3. 실험 및 결과

다양한 형상 및 크기를 가지는 나노급 스파이크 알루미나 필터에

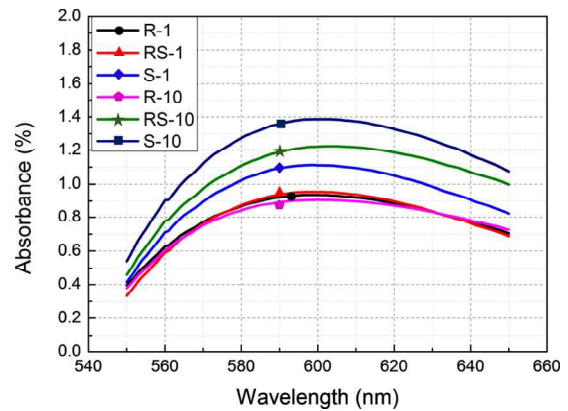


Fig. 4 Protein absorbance curves of eluted lysate after cell disruption using nano-scale spikes structured alumina filter at each sample

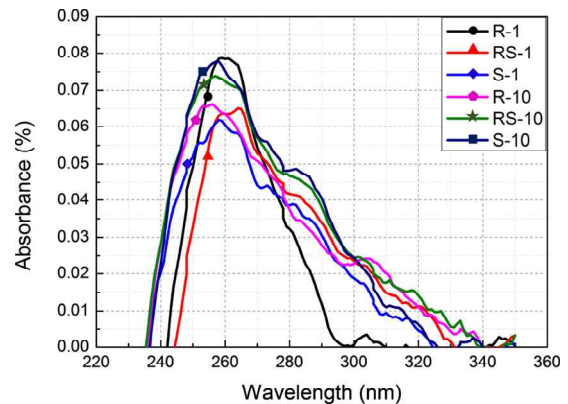


Fig. 5 DNA absorbance curves of eluted lysate after cell disruption using nano-scale spikes structured alumina filter at each sample

대한 세포 파쇄 특성을 비교하기 위하여 제작된 6가지 형상의 나노급 스파이크 알루미나 필터를 이용하여 세포파쇄 실험을 수행하였다. 파쇄 후 얻은 용출액은 각각 DNA, 단백질 정량화 방법을 통하여 용출액 내부의 DNA와 단백질의 농도를 측정하였다. Fig. 4와 Fig. 5는 각각 제작된 나노급 스파이크 알루미나 필터를 이용하여 파쇄 후 얻은 용출액을 분광광도계로 측정한 그래프이며 단백질과 DNA의 농도를 계산하기 위해 단백질의 농도는 단백질 정량비교에 가장 보편적으로 사용되는 BSA(bovine serum albumin)의 표준곡선을 이용하여 비교하였고 DNA는 흡광도가 1일 때 dsDNA가 50 μg/mL 포함되어 있는 원리^[13] 이용하였다.

Fig. 6는 나노급 스파이크를 가진 알루미나 필터를 이용하여 파쇄 후 얻은 용출액 내의 단백질을 BSA의 표준곡선으로 계산하여 나타낸 그래프이며 R-1은 29 μg/ml, RS-1은 30 μg/ml, S-1은 35 μg/ml, R-10은 29 μg/ml, RS-10은 38 μg/ml, S-10은 44 μg/ml 이다. 이를 통해 나노급 스파이크의 구조가 날카로워질수록 세포 외피의 파쇄율이 높은 것을 알 수 있으며, 나노급 스파이크

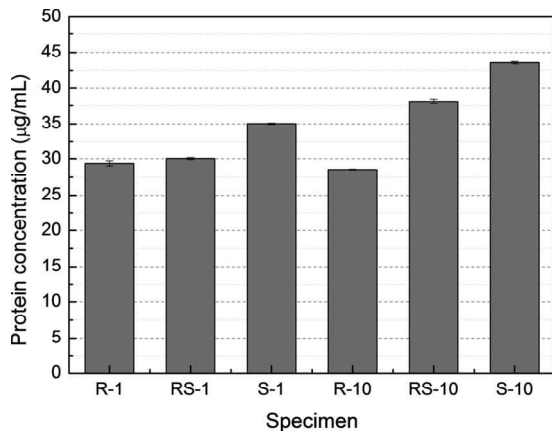


Fig. 6 Protein concentration at each sample quantified by bradfordassay

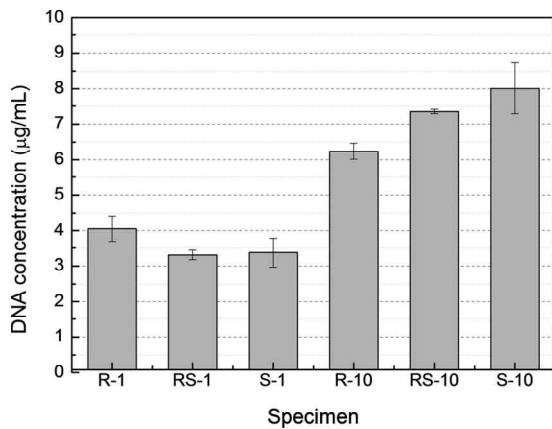


Fig. 7 DNA concentration at each sample quantified by DNA isolation kit (DNeasy, Qiagen)

의 높이가 높을수록 세포 외피 파쇄에 의한 세포막의 적층 후에도 지속적인 세포 외피의 파쇄가 가능한 것으로 판단된다. Fig. 7은 나노급 스파이크를 가진 알루미늄 필터를 이용하여 파쇄 후 얻은 용출액 내의 DNA를 앞서 언급한 dsDNA가 50 µg/mL 포함되어 있는 원리를 이용하여 DNA의 농도를 계산하여 나타낸 그래프이며 R-1은 4.0 µg/ml, RS-1은 3.3 µg/ml, S-1은 3.4 µg/ml, R-10은 6.2 µg/ml, RS-10은 7.3 µg/ml, S-10은 8.0 µg/ml이다. 1µm 높이의 나노급 스파이크의 세포핵 파쇄율은 RS-1, S-1, R-1 순으로 높아지며, 10 µm 높이의 나노급 스파이크는 R-10, RS-10, S-10 순으로 높아지는 것을 볼 수 있다. 1 µm 높이의 나노급 스파이크에 의한 세포핵 파쇄율 차이보다 10 µm 높이의 나노급 스파이크에 의한 세포핵 파쇄율의 차이가 높은 것을 확인할 수 있으며, 이는 1 µm 높이의 나노급 스파이크는 파쇄된 세포막의 적층으로 인해 나노급 스파이크에 의한 세포핵 파쇄율이 낮은 반면, 10 µm 높이의 나노급 스파이크는 파쇄된 세포막의 적층 후에도 나노급 스파이크가 세포에 대한 집중하중을 가할 수 있는 구조이기 때문인 것으로 분석된다. 따라서 세포에 높은 집중하중

을 가할 수 있으며, 세포 외피의 적층 두께보다 높은 길이의 S-10의 나노구조물을 가진 필터에 의한 세포 파쇄의 효율이 가장 높은 것을 확인하였다.

4. 결론

표면에 나노구조물이 형성된 나노급 스파이크 알루미늄 필터를 이용해 세포 외피의 파쇄와 세포핵의 파쇄를 한꺼번에 수행할 수 있는 기계적 세포파쇄를 제안하였다. 다단계 알루미늄 양극산화 공정을 통해 1 µm와 10 µm의 높이를 가진 나노급 스파이크를 각각 다른 형상을 가지도록 제작하였다. 제작된 나노급 스파이크 알루미늄 필터를 필터홀더에 결합한 후 주사기로 1×10^6 개의 세포를 포함한 완충용액을 주입하여 세포 파쇄를 수행하였다. 6가지 형상의 나노급 스파이크 알루미늄 필터를 이용하여 세포파쇄 후 얻은 용출액의 DNA와 단백질의 농도는 정량적 방법으로 측정된 뒤 비교하였다. 실험 결과, 세포 외피의 파쇄율은 나노급 스파이크의 형상이 첨예할수록 높았으며, 나노급 스파이크의 길이가 길수록, 파쇄된 세포의 세포막이 적층된 후에도 세포파쇄가 가능하였다. 제안된 나노급 스파이크 알루미늄 필터 중 S-10의 세포 외피 및 세포핵의 파쇄율이 가장 높음을 실험적으로 검증하였다.

후기

본 연구는 2014년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었으며(NRF-2014R1A1A2057692) 부분적으로 2015년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비로 연구하였습니다(520150056).

References

- [1] Lee, D. W., Cho, Y. H., 2008, A Continuous Electrical Cell lysis Chip using a DC Bias Voltage for Cell Disruption and Electroosmotic Flow, *KSME*, 32:10 831-835.
- [2] Ha, S. M., Cho, W., Ahn, Y. M., Hwang, S. Y., 2010, Study on Microbiochip for Buccal Cell Lysis and DNA Purification, *KSME*, 34:12 1785-1791.
- [3] Kim, J., Hong, J. W., Kim, D. P., Shin, Jeniffer H., Park, I. K., 2012, Nanowire-Integrated Microfluidic Devices for Facile and Reagent-free Mechanical Cell Lysis, *Lap Chip*, 12 2914-2921.
- [4] Jen, C. P., Amstislavskaya, Tamara. g., Liu, Y. H., Hsiao, J. H., Chen, Y. H., 2012, Single-cell Electric Lysis on an Electroosmotic-Driven

- Microfluidic Chip with Arrays of Microwells, *Sensors*, 12 6967-6977.
- [5] Yun, S. S., Yoon, S. Y., Song, M. K., Im, S. H., Lee, J. H., Yang, S., 2010, Handheld Mechanical Cell Lysis Chip with Ultra-sharp Silicon Nano-Blade Arrays for Rapid Intracellular Protein Extraction, *Lap chip*, 10 1442-1446.
- [6] So, H. Y., Lee, K. W., Seo, Y. H., Murthy, N., Pisano, Albert. P., 2014, Hierarchical Silicon Nanospikes Membrane for Rapid and High-Throughput Mechanical Cell Lysis, *ACSAMI*, 6 6993-6997.
- [7] Carlo, D. D., Jeong, K. H., Lee, Luke. P., 2003, Reagentless Mechanical Cell Lysis by Nanoscale Barbs in Microchannels for Sample Preparation, *Lap chip*, 3 287-291.
- [8] Brown, R. B., Audet, J., 2008, Current Techniques for Single-cell Lysis, *J. R. Soc. Interface*, 5 S131-S138.
- [9] Tsukada, K., Sekizuka, E., Oshio, C., Minamitani, H., 2001, Direct Measurement of Erythrocyte Deformability in Diabetes Mellitus with a Transparent Microchannel Capillary Model and High-Speed Video Camera System, *Microvascular Research*, 61 231-239.
- [10] Hou, H. W., Li, Q. S., Lee, G. Y. H., Kumar, A. P., Ong, C. N., Lim, C. T., 2009, Deformability Study of Breast Cancer Cells Using Microfluidics, *Biomed Microdevices*, 11 557-564.
- [11] Shin, H. G., Kwon, J. T., Seo, Y. H., Kim, B. H., 2008, Properties of Pore Generation by Variation of Temperature in AAO Process, *Proceeding of KSMTE*, 371-374.
- [12] Park, Y. M., Shin, H. G., Seo, Y. H., Kim, B. H., 2009, Fabrication of Polymer Replica with Nano Patterns Using Porous Alumina Structure, *Proceeding of KSMTE*, 456-459.
- [13] Sambrook, J., Russell, David. W., 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, USA.