

## 고감도 압저항 외팔보 센서를 이용한 Liposome의 검침

현석정 · 김현석 · 김용준 · 정효일<sup>†</sup>

### Rapid detection of liposome by piezoresistive cantilever sensor

S. J. Hyun, H. S. Kim, Y. J. Kim, and H. I. Jung<sup>†</sup>

#### Abstract

Liposomes are microscopic spherical vesicles that form when lipids are hydrated and have been widely used for biochemical assay, drug delivery and molecular imaging. In particular, they are well known for artificial cell membranes to study cellular functions such as cell fusions and membrane proteins. Here, we firstly report the detection of liposomes by the highly sensitive microfabricated piezoresistive cantilever sensor chip and the phosphatidylserine recognition protein C2A which is chemically immobilized on the sensor surface. The signal created from the bending motion of piezoresistive cantilever after the liposome attachment has been monitored in real time.

**Key Words** : liposome, piezoresistive cantilever, protein C2A

#### 1. 서 론

Liposome 또는 lipid vesicles는 지름이 5 - 50  $\mu\text{m}$ 인 구형의 유기체이다. 이는 친수성 부분(phosphate group)과 소수성 부분(lipid group)을 동시에 가진 phospholipid가 액체에 용해되면서 나타나는 현상의 결과물이다. 즉 phospholipid는 액상에서 친수성 부분은 물과 접하게 되고 소수성 부분은 물을 멀리하기 위해 자체적으로 non-covalent 결합을 하게 되어 열역학적으로 안정한 이중막을 형성한다. 이러한 이중막은 실제 동물 세포막과 구조적, 화학적으로 유사하여 세포간 융합반응 연구, 막 단백질(membrane protein)연구 등 기초 생명과학 연구에 많이 이용되어 왔다<sup>[1]</sup>. 특히 의학적인 측면에서는 이중막 내부에 많은 양의 백신, 유전자, 치료약물 등을 함유시킬 수 있기에 체내에 약물을 효과적으로 전달할 수 있는 전달체(carrier)로 자주 이용되고 있다<sup>[2,3]</sup>. 최근에 liposome 표면에 형광물질이나 magnetic nanoparticle 등을 붙여 molecular imaging<sup>[4]</sup> 용으로도 사용되고 있어 그 중요성이 한층 증가되고 있다.

하지만 이러한 중요성에도 불구하고 liposome을 정

량적으로 측정할 수 있는 방법은 광학 현미경을 이용하여 liposome의 개수를 육안으로 측정하는 방법에 국한되어 있어 고속, 실시간에 liposome을 정량화 할 수 있는 측정시스템이 요구되어 왔다.

따라서, 본 연구팀은 미세 가공된 압저항 외팔보 센서를 이용하여 liposome의 정량적 분석을 시도하였으며, 그 결과 압저항 외팔보 센서 표면에 부착된 liposome의 개수와 압저항 외팔보 표면의 기계적 변형과의 상관 관계를 유도할 수 있었다.

#### 2. 외팔보 센서의 제작

압저항 외팔보 센서는 이미 잘 정립된 미세가공기술을 이용하여 제작되었다. 먼저, 질화규소막 ( $\text{SiNx}$ )과 polysilicon 층을 LPCVD를 이용하여 각각 1  $\mu\text{m}$ , 0.3  $\mu\text{m}$  씩 실리콘 표면위에 연속적으로 증착한다. 다음으로, 적층된 polysilicon에 boron을 ion implantation 방법으로 주입한다. 센서를 정의하기 위하여 polysilicon 층을 패터닝하고, 이후 후면의 벌크 식각 작업을 위한 에칭홀을 패터닝하고 건식 식각한다. 정의된 polysilicon 센서의 전기적 신호측정을 위한 전극형성을 위하여 Ti/Au 층을 sputtering으로 증착하고 패터닝한다. 마지막으로 전면의 전극과 센서를 보호하기 위한 산화규소막 ( $\text{SiO}_2$ )을 0.5  $\mu\text{m}$  적층하고 패터닝한 후 KOH를 이용한

연세대학교 기계공학부(School of Mechanical Engineering, Yonsei University)

<sup>†</sup>Corresponding author: uridle7@yonsei.ac.kr

(Received : January 24, 2005, Accepted : February 3, 2005)

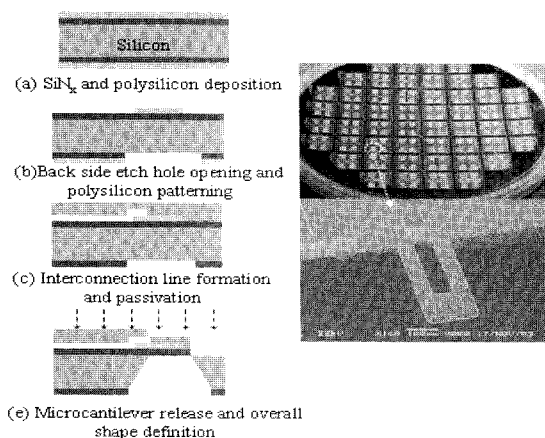


그림 1. 압저항 외팔보의 구현과정(왼쪽), 구현된 외팔보 샘플이미지(오른쪽)  
 Fig. 1. Cantilever fabrication process(left), Fabricated sample image(right).

실리콘 벌크 식각을 통해 외팔보를 구현하였다.

### 3. Liposome 제작

Liposome 제작을 위해 소의 머리에서 추출한 L- $\alpha$ -phosphatidylserine(PS), L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine(PE), L- $\alpha$ -phosphatidylcholine(PC)(sigma-aldrich Korea ltd.)을 chloroform에 용해시킨다. 용해시킨 뒤 각각의 phospholipid, 즉 PS:PE:PC를 35:50:15의 mole 비율로 혼합한 뒤에 glass tube에 넣고 질소 가스로 chloroform을 완전히 말린다. 잘 말려진 phospholipid으로부터 liposome 용액을 만들기 위해 2.6 ml의 HBS buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.4)를 phospholipid가 있는 glass tube 넣고 vortexing을 5 - 10초 동안 해주면 하얀색의 현탁액이 만들어지는데 이로서 lipo-

some이 생성되었음을 알 수 있다. Liposome 용액에서 10  $\mu$ l를 추출하여 haemacytometer(Paul Marienfeld GmbH & Co. KG Germany)와 광학 현미경을 이용하여 liposome의 개수를 결정한다.

### 4. 실험 및 결과

외팔보의 제작 후 liposome을 검침하기 위하여 외팔보의 반응면에 Cr/Au층을 0.1  $\mu$ m 증착한다. Liposome을 외팔보에 흡착시키기 위해 liposome표면의 phosphatidylserine(PS)을 특이적으로 인식하는 C2A 단백질을 N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate(SPDP)를 이용해 외팔보 gold surface에 coating한다. 외팔보 표면에 SPDP가 화학적으로 결합된 C2A 단백질(10  $\mu$ l)을 처리하고 C2A 단백질과 외팔보의 Au층과의 adhesion을 통해 발생하는 전기적 신호 변화를 관찰한다. C2A 단백질이 고정화된 외팔보에 미리 준비된 liposome (10  $\mu$ l)을 처리한 후 전기적 신호변화를 실시간으로 관찰한다. 반응 종결 후 C2A 단백질과 liposome간의 결합을 제거하기 위해 EDTA (10  $\mu$ l)를 처리한 후 시스템의 regeneration를 확인 한다. 신호의 실시간 측정을 위하여 제작된 외팔보와 일체화된 on chip electrode로 부터의 입·출입 전류 신호를 1V의 입력 전압 하에서 1-V meter (KEITHLEY Semiconductor characterization 4800)로 측정하였다.

### 5. 결론 및 고찰

기초 생명과학 연구와 의학 연구에서 매우 중요한 liposome을 미세 가공된 압저항 외팔보 센서를 이용하여 정량적으로 분석할 수 있는 가능성을 확인 할 수 있었다.

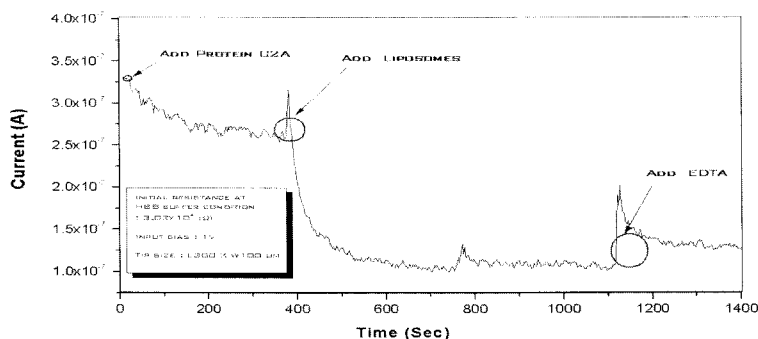


그림 2. 압저항 외팔보를 이용한 리포솜 검침 결과  
 Fig. 2. Liposome detection using piezoresistive cantilever.

그림 2는 liposome 흡착과 그에 따른 외팔보 표면 변형에서 오는 전기적 신호변화의 양상을 명확히 보여 준다. 이는 외팔보 표면에 liposome 흡착이 외팔보에 뚜렷한 기계적 변형 즉 surface stress의 변화를 유발하고, 이러한 변화는 결국 외팔보에 실장된 압저항 물질의 저항 변화를 통한 전기적 신호변화로써 확인되었다.

Liposome은 칼슘이온( $Ca^{2+}$ )을 매개로 외팔보 표면의 C2A 단백질과 결합하기 때문에 calcium chelator인 EDTA를 이용하여 sensor를 regeneration하고자 하였다. 그림 2는 센서의 regeneration을 위해 사용되어진 EDTA의 반응 결과를 통해 센서의 재현 경향을 보여준다. 본 실험에서 사용된 liposome의 크기는 지름이 약  $15 \mu m$ 였다. 이러한 거대 유기물질과 마이크로 외팔보의 결합에서 파생되는 mechanical bending요소 (mass change에 따른 변형 등)에 대한 추가적인 해석과정이 필요할 것이다.

이미 많은 연구 그룹들을 통해 외팔보 센서 시스템을 이용한 DNA<sup>[5]</sup>, 단백질<sup>[6]</sup>, 대장균<sup>[7]</sup>, 그리고 효모<sup>[8]</sup>에 관한 측정 결과는 존재하였으나, 아직까지 의학적 응용이 매우 중요한 liposome을 측정하려는 시도나 그 결과는 존재하지 않았었다. 하지만 본 연구팀은 마이크로 외팔보 센서를 이용하여 수십 마이크로 단위의 거대 생체분자의 정량적 검침이 가능성을 처음으로 보임으로써 추후에 혈액 암세포등과 같은 거대 동물세포를 외팔보로 포획 검침할 수 있는 가능성을 제시한다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단(KOSEF)이 지정한 연세대학교 나노 메디칼 국가 핵심연구소 (Nanomedical National Core Research Center)의 재정적 지원으로 이루어졌다. 또한 장비구입을 도와준 연세대학교 BT 사업단의 아낌없는 지원에 감사드린다.

## 현 석 정

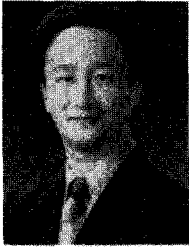
- 2003 연세대학교 기계전자공학부과 졸업
- 2003 ~ 현재 연세대학교 기계공학부 석사과정
- 주관심 분야 : bio MEMS, CNT, nano device, nanobiosensor, flexible packaging

## 참고 문헌

- [1] M. Kinuta and K. Takei, "Utilization of liposomes in vesicular transport studies", *Cell Struct Funct.* vol. 27, no. 2, pp. 63-69, 2002.
- [2] G. K. Khuller, M. Kapur, and S. Sharma, "Liposome technology for drug delivery against mycobacterial infections", *Curr Pharm Des.*, vol. 10, no. 26, pp. 3263-3274, 2004.
- [3] J. Yoshida, M. Mizuno, and T. Wakabayashi, "Interferon-beta gene therapy for cancer: basic research to clinical application", *Cancer Sci.*, vol. 95, no. 11, pp. 858-865, 2004.
- [4] M. L. Matteucci and D. E. Thrall, "The role of liposomes in drug delivery and diagnostic imaging: a review", *Vet Radiol Ultrasound*, vol. 41, no. 2, pp. 100-107, 2000.
- [5] J. Fritz, M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H. Guntherodt, C. Gerber, and J. K. Gimzewski, "Translating biomolecular recognition into nanomechanics", *Science*, vol. 288, no. 5464, pp. 316-318, 2000.
- [6] G. Wu, R. H. Datar, K. M. Hansen, T. Thundat, R. J. Cote, and A. Majumdar, "Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers", *Nat Biotechnol.* vol. 9, no. 9, pp. 856-860, 2001.
- [7] B. Ilic *et al.*, "Mechanical resonant immunospecific biological detector", *App. Phys. Lett.*, vol. 77, pp. 450-452, 2000.
- [8] Jeong W. Yi *et al.*, "In situ cell detection using piezoelectric lead zirconate titanate-stainless steel cantilevers", *J. Appl. Phys.*, vol. 93, pp. 619-625, 2003.

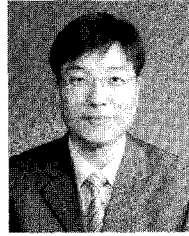
## 김 현 석

- 2004 홍익대학교 기계공학과 졸업
- 2004 ~ 현재 연세대학교 기계공학부 석사과정
- 주관심 분야 : nanobiosensor, bioMEMS, biochip



**김 용 준**

- 1987 연세대학교 전기공학 학사
- 1989 University of Missouri-columbia 전기공학 석사
- 1991 Georgia institute of Tech Ph.D
- 1996. 08. ~ 200. 08. Samsung Electronics Co. Corporate R&D center Senior Engineer
- 2000. 09 ~ 현재 연세대학교 기계공학과 조교수 (Microsystems Laboratory)
- 주관심 분야 : sensors, MEMS



**정 호 일**

- 1993 KAIST 생물공학과 학사
- 1995 KAIST 생물공학과 석사
- 2001 영국 켄브릿지대학 생화학과 박사
- 2001. 06. ~ 2003. 01. 영국 런던대학 의과대학 연구원
- 2003. 02. ~ 2004. 02. 영국 켄브릿지대학 생화학과 연구원
- 2004. 03 ~ 현재 연세대학교 기계공학과 조교수 (Laboratory of Bioengineering)
- 주관심 분야 : nanobiosensor, Lab-on-a-chip