

Fetal Bovine Serum을 포함한 세포 배양액에 담근 Indium Tin Oxide 전극 계면의 전기화학적 특성

최원석 · 조성보

가천대학교 보건과학대학 의공학과

Electrochemical Properties of Indium Tin Oxide Electrodes Immersed in a Cell Culture Medium with Fetal Bovine Serum

Won Seok Choi and Sungbo Cho

Department of Biomedical Engineering, College of Medical Science, Gachon University
(Received January 15, 2013. Accepted March 26, 2013)

Abstract: For the biocompatibility test of implantable devices or for the sensitivity evaluation of biomedical sensors, it is required to understand the mechanism of the protein adsorption and the interaction between the adsorbed proteins and cells. In this study, the adsorption of proteins in a cell culture medium with fetal bovine serum onto an indium tin-oxide electrode was characterized by using linear sweep voltammetry and impedance spectroscopy. We immersed the fabricated ITO electrodes in the culture medium for 30, 60, or 90 min, and then measured the electrochemical properties of electrodes with 10 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ and 0.1 M KCl electrolyte. With an increase of contacting time, the anodic peak current was decreased and the charge transfer resistance was increased. However, both parameters were recovered to the values before contact with the medium after the treatment of Trypsin/Ethyl-enediaminetetraacetic acid hydrolyzing proteins.

Key words: Adsorption, Electrode interface, Impedance spectroscopy, Linear sweep voltammetry, Protein

1. 연구 배경

동물 세포 배양액은 세포의 대사활동과 유지 및 성장을 위해 조성한 용액으로 배양액 성분과 조성에 따라 결정되는 세포의 흡착, 증식, 복제 및 분화와 같은 세포 반응과 활성을 이해하고 생체 내 조건과 유사한 세포 외 기질(extracellular matrix) 환경을 조성하기 위해 사용된다[1,2]. 일반적으로 세포 증식을 위해서 생체 내에 존재하는 호르몬, 성장인자 및 단백질 등을 포함한 혈청을 배지에 추가하는데 매우 낮은 수준의 항체와 풍부한 성장인자를 갖는 fetal bovine

serum (FBS) 또는 fetal calf serum이 선호된다[3]. 혈청 내 albumin, vitronectin, laminin과 fibronectin 등의 단백질들은 세포 흡착 및 증식에 관여하고[4-6], collagen 성분들은 중간엽 성체줄기세포의 흡착과 골아 세포로의 분화에 기여하기도 한다[7]. 따라서 혈청 단백질의 흡착 기전과 흡착 정도에 대한 정량 분석은 체내 이식형 의료 도구 및 바이오 센서 개발 시 생체적합성 평가 및 표면에 흡착된 단백질과 세포와의 상호작용 연구를 위해 필요하다.

단백질은 양쪽성 고분자전해질로 단백질의 흡착 경향은 단백질 표면에 존재하는 결사슬의 특성 때문이라 여겨지는데 특히 흡착되는 면의 전하와 반대 극성으로 하전된 아미노산 결사슬 사이에 강력한 정전기적 인력이 작용하는 것으로 알려져 있다[8,9]. 단백질 흡착과 관련한 응용 연구로 콘택트 렌즈 표면에 단백질 흡착에 따라 저하될 수 있는 투명도와 산소투과성 문제 해결을 위해 렌즈용 공중합체 재료를 다양한 성분비로 제작한 뒤 표면에 흡착되는 단백질 량을

Corresponding Author : Sungbo Cho
Department of Biomedical Engineering, College of Medical Science, Gachon University
TEL: +82-32-820-4433 / FAX: +82-32-820-4059
E-mail: sbcho@gachon.ac.kr
“이 논문은 2013년도 가천대학교 교내연구비 지원에 의한 결과임 (GCU-2013-M005).”

최소화 하는 공중합체 성분비를 찾거나[10], 생체 이식 재료로 사용되는 Titanium 및 Molybdenum 계열 합금의 체내 안전성을 평가하기 위해 금속을 FBS가 포함된 황산나트륨 용액에 담그고 장기간 전기 임피던스 측정을 통해 금속 면의 부식 정도를 측정한다[11,12]. 또한 생체조직공학을 이용한 피부상처조직의 재생을 위해 다공성 구조의 고분자 표면에 세포 접착 및 증식을 유도하고 항바이러스, 항박테리아 및 항응고에 효과적인 glucan 처리[13] 및 신경세포 네트워크 연구에서 신경전달물질 또는 신약후보물질 주입 후 신경세포들의 반응으로서 전기생리신호를 측정하기 위한 신경 세포 패터닝[14] 등은 표면에 단백질 흡착 여부 판단 및 농도 분석이 선행된다.

단백질 농도를 분석하는 방법으로 UV 흡광법, 형광발현 및 발색 관측법, 편광해석법, 반사광측정법, 표면 플라즈몬 공명, 적외선흡수스펙트럼, 라만 산란, 원편광 이색성 분광 분석, 전반사 형광 분광법, 푸리에 변환 적외선-반사 흡수 분광법 등이 사용된다[15] 고가의 부피가 큰 광학 시스템, 흡착 표면의 개질과 형광표지인자 사용으로 인한 단백질 변성 가능성 등으로 인해 질병진단 및 신약개발 산업에서 상기 문제들을 개선할 수 있는 비표지 및 실시간 분석기술의 수요가 증가하고 있다. 그러한 대체 방법 중 하나로 나노 및 미세 전극을 이용한 전기화학적 분석법이 있는데, 이는 전극 표면에 흡착된 물질의 종류 및 농도에 따라 결정되는 산화, 환원 전압전류 곡선의 형태를 측정하거나 전극 계면 임피던스를 측정하여 흡착되는 물질의 농도 및 변화를 비표지 및 실시간으로 관측하는 방법이다[16]. 나노 및 미세 전극을 이용한 전기화학적 분석법은 전극 표면에서 DNA immobilization 및 hybridization 검출[17], 면역글로불린항체 및 혈청의 albumin 흡착과 ochratoxin-A 검출[18], 혈청 내 간 섬유증 표시자 hyaluronic acid, laminin, collagen Type IV 검출[19], Platinum 전극상에서 바이러스에 감염된 세포의 변형과 탈착[20] 및 줄기세포 분화 시 세포의 전기적 특성 변화 관찰에 활용되었다[21]. 혈청 albumin 또는 fibrinogen 이 Platinum 또는 탄소 금속에 흡착되면서 금속 표면의 전기 이중층 정전용량의 변화를 검출하여 이를 통해 단백질 흡착 동 특성 모델을 제시할 수 있고[22,23], 전극에 인가한 전하 량에 따라 해당 단백질의 흡착 정도가 결정된다는 것이 보고되었다[24]. 또한 혈청 및 면역글로불린항체가 포함된 인산완충액과 접촉한 Au의 경우 단백질 흡착에 따라 계면의 정전용량 성분과 분극 저항이 증가하는 현상이 순환전압전류 및 전기 임피던스 측정을 통해 확인되었다[25,26]. Au 표면에 fibronectin, gelatin, BSA, laminin, vitronectin, 또는 collagen 단백질이 흡착되어 있는 경우 세포의 흡착과 퍼짐이 부착된 단백질에 따라 의존적임이 알려져 있다[27-29].

본 논문에서는 기존 연구에 주로 사용된 Titanium 및

Molybdenum계열 합금, Platinum, Au 전극 보다 광 투과성이 우수한 Indium Tin Oxide (ITO) 도전체를 이용하여 FBS를 포함한 세포 배양액 접촉에 따른 ITO 전극 계면의 전기화학적 특성 변화를 측정하고자 한다. ITO 전극 면에 흡착된 단백질 성분들이 세포의 흡착과 성장, 분열 및 분화 특성에 미치는 영향과 이에 따른 세포 형태의 변화를 광학 및 전기적으로 분석하는 것을 최종 연구 목적으로 삼고, 이를 위한 과정으로 본 연구를 수행하고자 한다.

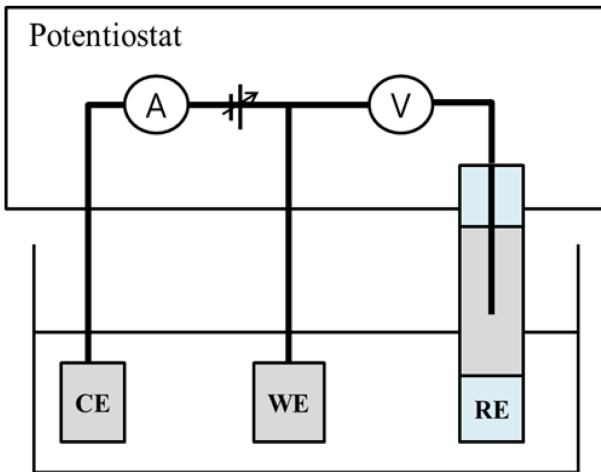
II. 연구 방법

1. ITO 전극제작

Slide glass (75 mm × 25 mm × 1.1 mm) 표면에 ITO를 두께 460 nm로 증착한 후, 광섬유 laser 가공 시스템(μ -Fab, KORTherm Science, 부평) 사용하여 작동전극, 보조전극, 각 전극에 연결된 전송선과 전송선 끝 단자를 제외한 나머지 부분의 ITO 도전체를 제거하였다. Laser patterning 시 사용한 laser 광원의 파장과 세기는 각각 1080 nm 와 10 W 이었다. Pattern된 ITO 도전체 상에 절연층을 형성하기 위해 $2.8 \times 10^{14} \Omega\text{m}$ 의 저항비를 갖는 negative 감광액을(SU-8 2002, Microchem, Newton, USA) 약 2 μm 두께로 spin coating하였다. 이후 작동전극 상에서 반경 200 μm 의 원형과 작동전극보다 상대적으로 큰 면적의 보조전극 및 전송선 끝 단자가 노출되도록 mask와 mask aligner로(MDA-400M, Midas System, 대전) 365 nm 파장의 UV로 노광한 뒤 노출되지 않은 영역을 현상액을(SU-8 Developer, Microchem, Newton, USA) 이용하여 제거하였다. 작동전극과 보조전극 상에서 배양액을 보존 할 수 있도록 polystyrene 재질의 chamber를 ITO 전극 및 절연층 기판 위에 silicone epoxy를 이용하여 붙였다.

2. ITO 전극의 전기화학 특성 평가

전극의 산화, 환원 전압전류 및 전기 임피던스를 측정하기 위해 그림 1과 같이 작동 전극(Working electrode), 상대 전극(Counter electrode) 및 기준 전극으로(Reference electrode) 구성된 3 전극 시스템을 구성하였다. 제작한 ITO 전극의 전류-전압 특성을 평가하기 위해 ITO 전극 기판 상의 chamber 내에 Ag/AgCl 기준전극과 10 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 가 포함된 0.1 M KCl 용액을 넣은 후 전기화학측정기를(CompactStat, Ivium, Eindhoven, Netherlands) 이용해 기준전극에 대한 작동전극의 전위를 -200 mV에서 800 mV까지 일정한 주사속도로 변화시키면서 작동전극과 보조전극 사이에 흐르는 산화 전류를 기록하여 선형홀름전압전류(Linear sweep voltammetry) 곡선을 측정하였다. 가역적인 반응 계에서 peak 전류의 이론적인 값은 $I_p = 2.69 \times$



WE : Working Electrode
 CE : Counter Electrode
 RE : Reference Electrode

그림 1. 전기화학 측정 시스템 모식도
 Fig. 1. Schematic of electrochemical measurement system

$10^5 n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} c$ (n: 이동 전자 수, A: 전극 면적(cm^2), D: 확산 계수($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), v: 주사속도(Vs^{-1}), c: bulk 이온 농도(mol cm^{-3}))로 peak 전류는 주사속도의 제곱근에 비례한다 [16,30]. 다양한 주사속도로 측정된 선형홀름전압전류 곡선들로부터 산화 peak 전류를 추출한 뒤 이론적인 값과 비교하여 ITO 전극이 제대로 제작되었는지 평가하였다.

3. FBS 주입 후 ITO 전극의 전기화학 특성 측정

상기 평가 후 검증된 ITO 전극 칩에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified

eagle medium (DMEM)을 넣고 해당 전극 칩을 5% CO_2 , 36.5°C 의 배양기(VS-9160C, Vision Scientific, 부천) 내에 일정 시간 동안 보존하였다. 이후 배양액을 제거한 뒤 Phosphate buffered saline 용액으로 전극 면을 씻은 후 10 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 과 0.1 M KCl 용액을 chamber에 넣고 주사속도 50 mV/s로 선형홀름전압전류 곡선을 측정하였다. 또한 주파수 10 mHz 에서 10 kHz까지 전기 임피던스를 측정된 뒤 설계한 전기 등가회로 model과 fitting 분석을 통해 등가회로 model의 각 회로 변수들을 추출하였다. ITO 전극 면에 단백질 흡착 유무를 판단하는 비교 실험으로 단백질간 결합을 끊고 단백질을 가수분해하는 Trypsin/Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) $\times 10$ 용액을 전극 면에 접촉시킨 후 선형홀름전압전류와 전기 임피던스를 상기와 같은 조건으로 측정하였다.

III. 실험 결과

가역적인 산화, 환원계인 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 를 포함한 전해질에 제작한 ITO 전극 칩을 담그고 초기전위 -200 mV 부터 최종전위 800 mV 까지 10, 30, 60, 또는 100 mV/s 의 주사속도에서 측정된 선형홀름전압전류 곡선들을 그림 2(a)에 나타내었다. 작동 전극의 전위가 양의 값으로 증가하면서 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 가 전극에 전자를 건네는 산화반응이 시작되어 산화 전류가 흐르다가 전극계면에서 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 의 농도가 감소함에 따라 전류는 peak를 나타낸 후 감소한다. 인가전압이 약 $300\sim 310 \text{ mV}$ 일 때 산화 peak 전류가 관측되었고 그 값은 주사속도가 10 mV/s 일 때 $0.925 \mu\text{A}$, 30 mV/s 일 때 $1.387 \mu\text{A}$, 60 mV/s 일 때 $1.797 \mu\text{A}$, 100 mV/s 일 때 $2.210 \mu\text{A}$ 로 주사속도가 증가할수록 산화 peak 전류도 증가하였

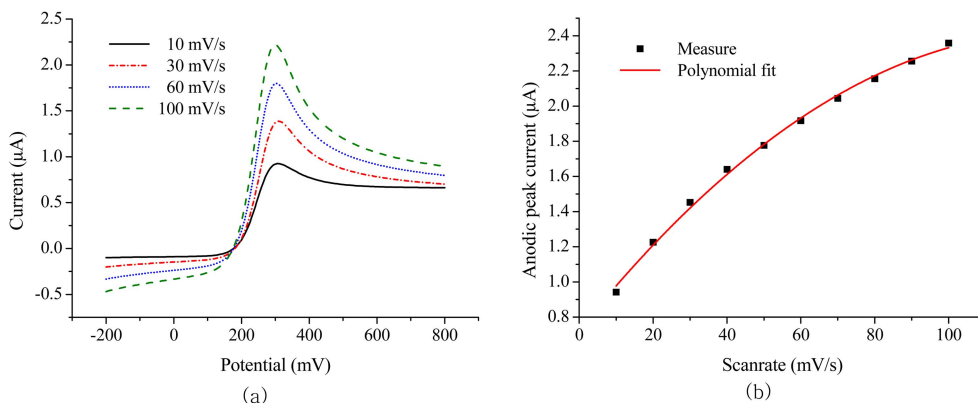


그림 2. (a) 10 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 과 0.1 M KCl 용액을 포함한 ITO 전극의 전위를 -200 mV 에서 800 mV 로 (vs. Ag/AgCl 기준 전극) 10, 30, 60, 또는 100 mV/s 의 속도로 주사할 때 측정된 선형홀름전압전류 곡선, (b) 다양한 주사속도에 따른 산화 peak 전류 측정값과 (Measure) 주사속도를 종속변수로 한 다항식으로 fitting한 곡선(Polynomial fit)

Fig. 2. (a) Linear sweep voltammogram of ITO electrodes with 10 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ and 0.1 M KCl electrolyte measured by applying a potential from -200 mV to 800 mV (vs. Ag/AgCl reference electrode) at a scan rate of 10, 30, 60, or 100 mV/s , (b) Measured anodic peak currents and a fitted polynomial line at different scan rate

다. 주사속도가 증가하면 전극 계면으로부터 $Fe(CN)_6^{4-}$ 의 농도 기울기가 커지고 따라서 확산수송이 빠르게 일어나 산화 전류 량도 증가하게 된다. 그림 2(b)는 측정된 산화 peak 전류 값과(Measured) 다항식 $y = ax^{1/2} + b(x = v, y = I_p, a, b = 상수)$ 로 fitting 한 선을(Polynomial fit) 나타내는데 fitting 결과로부터 산화 peak 전류가 주사속도의 제곱근에 비례함을 알 수 있었다. 따라서 제작한 ITO 전극의 표면이 잘 형성되어 있음을 확인하였다.

이상과 같이 전기화학적 특성을 평가한 ITO 전극에 세포 배양액 접촉 전(Before contact), 또는 배양액에 30, 60, 및 90 분 동안 접촉시킨 뒤, 이후 Trypsin/EDTA $\times 10$ 용액을 전극 면에 처리한 다음 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 계에서 주사속도 50 mV/s로 측정된 선형흡음전압전류 곡선들을 그림 3에 나타내었다. 세포 배양액 접촉 전 산화 peak 전류는 $1.654 \mu A$ 였으나 세포 배양액을 30, 60, 또는 90 분간 ITO 전극에 접촉시킨 뒤 측정된 산화 peak 전류 값은 각각 $1.566 \mu A$, $1.526 \mu A$, 또는 $1.435 \mu A$ 로 감소하였다. 이후 Trypsin/EDTA $\times 10$ 용액으로 처리한 ITO 전극은 산화 peak 전류가 $1.613 \mu A$ 로 증가하였다. 따라서 FBS 단백질 접촉 시간에 따라 전극 면에 단백질 흡착이 증가할수록 전자 이동을 방해하여 산화 전류의 감소를 일으키는 것으로 판단된다. 유사한 현상으로 Au 전극의 경우에도 인간의 혈청 albumin이나 면역글로불린 G의 전극 면 흡착 정도에 따라 산화 전류가 감소한 결과가 보고된바 있다[25,26].

배양액 접촉 전 또는 배양액 접촉 시간을 달리한 뒤, 이후 Trypsin/EDTA로 처리한 후 측정된 ITO 전극의 임피던스 스펙트럼들과 시스템의 등가회로 model로 측정값에 fitting한 결과를 그림 4와 같이 Bode 선도에 나타내었다.

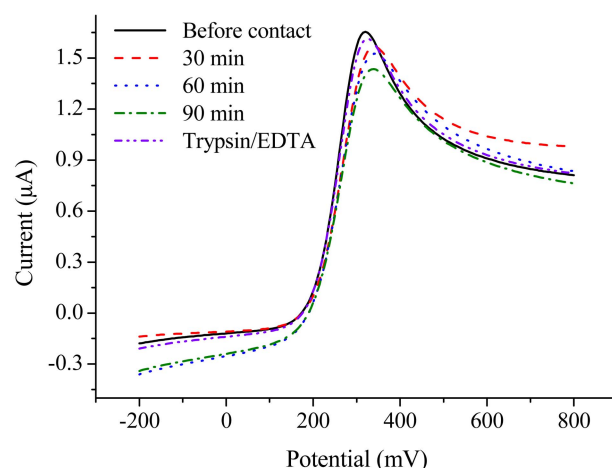


그림 3. ITO 전극 면에 FBS를 포함한 배양액 접촉 전 또는 배양액을 30, 60, 90분간 동안 접촉시킨 뒤, 이후 Trypsin/EDTA $\times 10$ 용액으로 전극 면을 처리한 뒤 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ 와 0.1 M KCl 용액 내에서 측정된 선형흡음전압전류 곡선(-200 mV에서 800 mV까지 vs. Ag/AgCl 기준 전극, 주사속도 50 mV/s)

Fig. 3. Linear sweep voltammograms of the ITO electrode with 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ and 0.1 M KCl electrolyte before contact with the culture medium with FBS or after immersing in the medium for 30, 60, 90 min, and then treated by Trypsin/EDTA $\times 10$ solution (-200 mV to 800 mV vs. Ag/AgCl reference electrode, scan rate: 50 mV/s)

FBS 단백질 흡착에 따른 임피던스 크기 변화는 약 100 mHz와 100 Hz 사이에서 관측되었는데 이러한 저주파수 구간에서는 전극 계면 임피던스가 전체 임피던스의 크기를 좌우한다. 100 mHz와 10 Hz 사이에서 위상은 배양액 접촉 전 또는 Trypsin/EDTA 처리 후 측정된 값들에 비해 0도에 가까웠고 따라서 해당 주파수 구간에서 임피던스 크기의

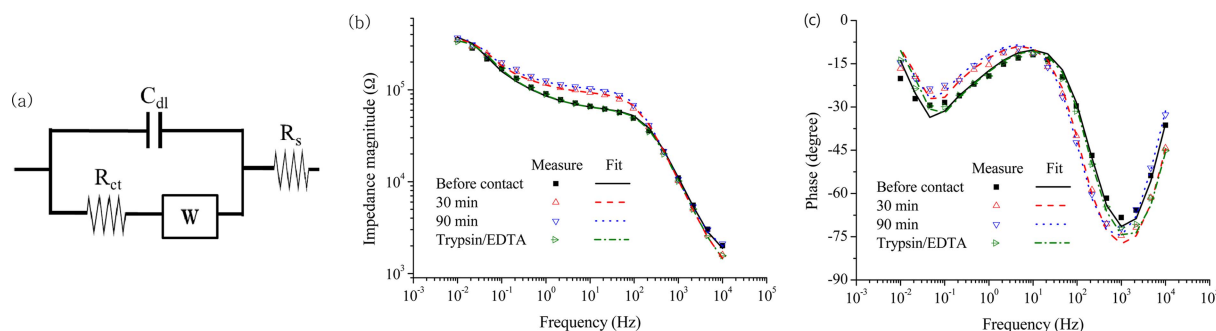


그림 4. (a) 전하 이중층에 의한 capacitance (C_{dl}), 전하이동저항(R_{ct}), 전해질 이온 확산 성분(W), 그리고 용액의 저항(R_s) 성분들로 구성된 등가회로 model, (b) ITO 전극 면에 FBS를 포함한 배양액 접촉 전 또는 배양액을 30, 90 분간 접촉시킨 뒤, 이후 Trypsin/EDTA $\times 10$ 용액으로 전극 면을 처리한 뒤 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ 와 0.1 M KCl 용액 내에서 측정된 임피던스 크기와 (c) 위상(Measure) 및 등가회로 model로 fitting 결과(Fit)

Fig. 4. (a) Electric equivalent circuit including the capacitance of the electric double layer (C_{dl}), charge transfer resistance (R_{ct}), Warburg diffusion element (W), solution resistance (R_s), (b) Impedance magnitudes and (c) phases of the ITO electrode measured in 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ and 0.1 M KCl electrolyte (Measure) and lines fitted by the equivalent circuit model (Fit) before contact with the culture medium containing FBS or after immersing in the medium for 30, 90 min, and then treated by Trypsin/EDTA $\times 10$ solution

증가가 임피던스 실수부 또는 저항 성분에도 영향을 받은 것으로 나타났다. 전극 계면의 전기적 등가회로 model은 non-faradaic 전류 경로를 따라 전극 계면에서 전하 이중층의 capacitance (C_{dl}) 성분과 faradaic 전류에 의한 전하이동저항(charge transfer resistance) R_{ct} , 전해질 이온의 확산에 의한 Warburg 확산(W), 그리고 용액의 저항(R_s) 성분으로 구성하였다(그림 4a). 등가회로 model은 측정된 임피던스 스펙트럼들과 일치하였고 fitting 결과 C_{dl} 성분은 배양액 접촉 전 14.5 nF, 배양을 30, 90 분간 접촉시키거나 이후 Trypsin/EDTA로 처리한 경우 각각 15.4, 15.4 또는 15.3 nF로 큰 변화는 없었다. 그러나 R_{ct} 는 배양액 접촉 전 55.58 kΩ에서 30분 또는 90 분간 배양액 접촉 후 각각 84.85 및 94.74 kΩ으로 증가하였다가 Trypsin/EDTA 처리 후 55.87 kΩ으로 배양액 접촉 전 수준으로 감소하였다.

이상의 결과로부터 ITO 전극과 FBS를 포함한 세포 배양액의 접촉시간이 길어질수록 산화 peak 전류의 크기가 낮아지고 전하이동저항이 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 FBS 단백질들이 작동전극 면에 달라붙을수록 전극 계면에서 전해질 이온의 산화 및 전하이동을 방해하는 것으로 여겨진다. FBS 단백질의 흡착으로 인한 전극 계면의 임피던스 변화는 주파수에 의존적이었으며 이러한 실험 결과는 특히 전기 임피던스 측정법과 ITO 전극 기반의 세포칩을 이용한 연구에[31-33] 활용될 수 있다. 또한 본 실험의 측정 결과들은 향후 다양한 단백질 흡착에 따른 전기적 특성 변화와 비교할 수 있는 기준 자료로 사용될 것으로 기대된다.

IV. 결 론

투명 전극 중 하나인 ITO 전극 면에 혈청이 포함된 세포 배양액이 접촉할 때 배양액 내 단백질들이 전극 계면에 흡착될 것이라 가정하고 배양액 접촉에 따른 전극의 전기화학적 특성 변화를 선형흡음전압전류(Linear sweep voltammetry) 및 전기 임피던스 측정법을 이용해 분석하였다. 제작한 ITO 전극의 전기화학적 특성은 가역적인 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 계에서 이론적인 peak 전류와 주사속도의 관계를 만족하였다. ITO 전극 면에 세포 배양액 접촉 시간이 증가함에 따라 산화 peak 전류는 감소하였고 전하이동저항이 증가함을 관측하였다. 이후 단백질을 가수분해하는 Trypsin/EDTA 처리 후 산화 peak 전류와 전하이동저항은 배양액 접촉 전의 수준으로 복귀하였으며 따라서 배양액 내 단백질의 전극 면 흡착이 전극 계면에서 전해질 이온의 산화와 전자 이동을 방해함을 알 수 있었다. 상기 연구 결과를 바탕으로 ITO 전극 면에 흡착된 단백질 성분들이 세포의 흡착과 성장, 분열 및 분화 특성에 미치는 영향과 이에 따른 세포 형태의 변화를 투명 ITO 전극상에서 광학 및 전기적으로 분석할 것이다.

참고문헌

- [1] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, and D.R. Marshak, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells," *Science*, vol. 284, pp. 143-147, 1999.
- [2] C.L. Yao, C.H. Liu, I.M. Chu, T.B. Hsieh, and S.M. Hwang, "Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 33, pp. 343-352, 2003.
- [3] G.M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd ed., Sunderland, USA, Sinauer Associates, 2000.
- [4] I. Giaever, and E. Ward, "Cell adhesion to substrates containing adsorbed or attached IgG", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 75, pp. 1366-1368, 1978.
- [5] E.G. Hayman, M.D. Pierschbacher, S. Suzuki, and E. Ruoslahti, "Vitronectin-A major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum," *Experimental Cell Research*, vol. 160, pp. 245-258, 1985.
- [6] R.P.C. Marano, and S. Vilaro, "The role of fibronectin, laminin, vitronectin and their receptors on cellular adhesion in proliferative vitreoretinopathy," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 35, pp. 2791-2803, 1994.
- [7] R.M. Salasnyk, W.A. Williams, A. Boskey, A. Batorsky, and G.E. Plopper, "Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2004, pp. 24-34, 2004.
- [8] C. Branden, and J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, New York, USA, Garland Publishing, 1991.
- [9] B. Young, W. Pitt, and S. Cooper, "Protein adsorption on polymeric biomaterials: II. Adsorption kinetics," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 125, pp. 246-260, 1988.
- [10] C.S. Cho, Y.I. Jeong, J.W. Na, and S.H. Kim, "A study on protein adsorption-resistant soft contact lens," *Journal of Biomedical Engineering Research*, vol. 17, pp. 291-296, 1996.
- [11] F. Contu, B. Elsener, and H. Böhni, "Characterization of implant materials in fetal bovine serum and sodium sulfate by electrochemical impedance spectroscopy. I. Mechanically polished samples," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 62, pp. 412-421, 2002.
- [12] F. Contu, B. Elsener, and H. Böhni, "Characterization of implant materials in fetal bovine serum and sodium sulfate by electrochemical impedance spectroscopy. II. Coarsely sandblasted samples," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 67, pp. 246-254, 2003.
- [13] S.G. Lee, J.B. Lee, S.M. Yu, J.C. Park, J.B. Choi, and J.K. Kim, "Surface Immobilization of $\beta(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)$ -glucan onto biodegradable polymer for tissue regeneration," *Journal of Biomedical Engineering Research*, vol. pp. 218-223, 2006.
- [14] Y. Nam, "Neuron-on-a-chip technology: Microelectrode array system and neuronal patterning," *Journal of Biomedical Engineering Research*, vol. 30, pp. 103-112, 2009.
- [15] V. Hlady, J. Buijs, and H.P. Jennissen, "Methods for studying protein adsorption," *Methods in Enzymology*, vol. 309, pp. 402-429, 1999.
- [16] A.J. Bard, and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods-Fun-*

- damentals and Applications*, 2nd ed., New York, USA, John Wiley & Sons, 2001.
- [17] S. Cho, J. Hong, Y.K. Pak, and J.J. Pak, "Fabrication of a multi-electrode array dna sensor for electrochemical genotyping," *Journal of the Korean Physical Society*, vol. 41, pp. 1054-1057, 2002.
- [18] A.A. Ansari, A. Kaushik, P.R. Solanki, and B.D. Malhotra, "Nanostructured zinc oxide platform for mycotoxin detection," *Bioelectrochemistry*, vol. 77, pp. 75-81, 2010.
- [19] M. Shi, Y. Peng, J. Zhou, B. Liu, Y. Huang, and J. Kong, "Immunoassays based on microelectrodes arrayed on a silicon chip for high throughput screening of liver fibrosis markers in human serum," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 2210-2216, 2006.
- [20] S. Cho, S. Becker, H. von Briesen, and H. Thielecke, "Impedance monitoring of herpes simplex virus-induced cytopathic effect in Vero cells," *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 123, pp. 978-982, 2007.
- [21] C. Hildebrandt, H. Büth, S. Cho, Impidjati, and H. Thielecke, "Detection of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 2D and 3D cultures by electrochemical impedance spectroscopy," *Journal of Biotechnology*, vol. 148, pp. 83-90, 2010.
- [22] P. Bernabeu, L. Tamisier, A. de Cesare, and A. Caprani, "Study of the adsorption of albumin on a platinum rotating disk electrode using impedance measurements," *Electrochimica Acta*, vol. 33, pp. 1129-1136, 1988.
- [23] P. Bernabeu, A. de Cesare, and A. Caprani, "Kinetics of albumin and fibrinogen adsorption onto a rotating disk electrode," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 265, pp. 261-275, 1989.
- [24] P. Bernabeu, and A. Caprani, "Influence of surface charge on adsorption of fibrinogen and/or albumin on a rotating disc electrode of platinum and carbon," *Biomaterials*, vol. 11, pp. 258-264, 1990.
- [25] S.E. Moulton, J.N. Barisci, A. Bath, R. Stella, and G.G. Wallace, "Investigation of protein adsorption and electrochemical behavior at a gold electrode," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 261, pp. 312-319, 2003.
- [26] S.E. Moulton, J.N. Barisci, A. Bath, R. Stella, and G.G. Wallace, "Studies of double layer capacitance and electron transfer at a gold electrode exposed to protein solutions," *Electrochimica Acta*, vol. 49, pp. 4223-4230, 2004.
- [27] C.R. Keese, and I. Giaever, "A biosensor that monitors cell morphology with electrical fields," *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, vol. 13, pp. 402-408, 1994.
- [28] J. Wegener, C.R. Keese, and I. Giaever, "Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces," *Experimental Cell Research*, vol. 259, pp. 158-166, 2000.
- [29] L. Balasubramanian, K.P. Yip, T.H. Hsu, and C.M. Lo, "Impedance analysis of renal vascular smooth muscle cells," *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 295, pp. C954-C965, 2008.
- [30] R.G. Compton, and C.E. Banks, *Understanding Voltammetry*, Singapore, World Scientific Publishing, 2007.
- [31] C.K. Choi, A.E. English, S.I. Jun, K.D. Kihm, and P.D. Rack, "An endothelial cell compatible biosensor fabricated using optically thin indium tin oxide silicon nitride electrodes," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 2585-2590, 2007.
- [32] S. Kim, and S. Cho, "Parylene-C-coated indium tin oxide electrodes for the optical- and electrical-impedance characterization of cells," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 12, pp. 5830-5834, 2012.
- [33] H.S. Jun, W. Choi, J.Y. Kim, and S. Cho, "Electrical impedance characterization of adipose tissue-derived stem cells cultured on indium tin oxide electrodes," *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 9, pp. 699-702, 2013.