

PEBBLE 나노센서란?

김범상 (홍익대학교 화학공학과)

PEBBLE 나노센서

최근 의학적, 생화학적 연구에서 시료의 대상이 단일세포와 같이 살아있고 동시에 그 영역이 마이크로미터 크기로 축소되면서 시료에 손상을 주지 않으면서 시료 내부의 화학적, 물리적 요소들을 실시간으로 측정할 수 있는 방법이 대단히 어렵지만 반드시 필요한 과제가 되었다. 현재까지 널리 사용되고 있는 단일세포의 내부 요소들을 측정하는 방법에는 화학센서를 이용하거나 또는 형광 표시기 (fluorescent indicator)를 이용하는 것 등이 있다. 전기화학적 또는 광학적 화학센서를 이용하는 경우, 생체적합성이 우수한 물질로 센서 표면을 감싸서 가능한 센서가 시료에 야기할 수 있는 생물학적 간섭을 최소화하여야 한다. 그러나 현재 사용되고 있는 초소형 화학센서의 경우, 센서의 세포 내 침투부피는 세포 부피의 약 1% 이상이 되고 이 정도의 침투부피는 세포에 심각한 물리적 손상을 주어서 살아있는 상태에서의 측정을 어렵게 한다. 형광 표시기를 이용하는 방법은 측정요소와 감응하는 형광 표시기를 세포 내부에 주입하고 표시기와 측정요소간의 반응에 따른 변화를 광학적 신호로 감지하는 것이다. 형광 표시기의 경우 크기가 세포에 손상을 주지 않으면서 이식될 수 있을 정도로 충분히 작고, 측정결과를 비교적 쉽게 시각화하여 관찰할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그러나 형광 표시기가 세포 구성요소들에 유독물질로 작용하는 경우가 빈번하고, 원하는 부위뿐만 아니라 세포 전체가 착색되어 검출의 정확도가 감소하는 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 PEBBLE 나노센서의 개념이 제안되어졌다. PEBBLE은 Probe Encapsulated By Biologically Localized Embedding을 의미하는 것으로 생체적합성이 우수한 매트릭스(matrix) 내부에 형광 표시기, 효소와 같은 감응물질을 포획시킨

나노 스케일의 구형 소자들이다. PEBBLE 나노센서의 장점은 다음과 같다. (1) PEBBLE 나노센서의 크기는 일반적으로 500 nm 이하로, 세포에 이식할 경우 침투 부피가 세포 부피의 1 ppb에 불과하다. 따라서 세포에 물리적인 손상을 주지 않고 내부에 이식할 수 있으므로 살아있는 세포의 생화학적 변화과정을 실시간으로 감지할 수 있다. (2) 감응물질을 포획하는 매트릭스는 우수한 생체적합성을 가지고 있기 때문에 세포에 유독할 감응물질로부터 세포 내용물들을 보호해 준다. (3) 매트릭스는 세포가 감응물질에 줄 수 있는 생물학적 간섭, 예를 들면 세포의 면역반응에 의한 감응물질의 단백질 결합, 세포성분에 의한 형광 표시기 반응의 변화 등을 배제시켜 준다. (4) 감응물질이 세포 전체로 자유로이 이동하는 것을 방지하고 공간적 위치를 고정시킨다. (5) 다수의 감응물질을 하나의 매트릭스 안에 함유시킬 경우 동시에 여러 가지 요소를 측정할 수 있는 멀티센서로 사용할 수 있다.

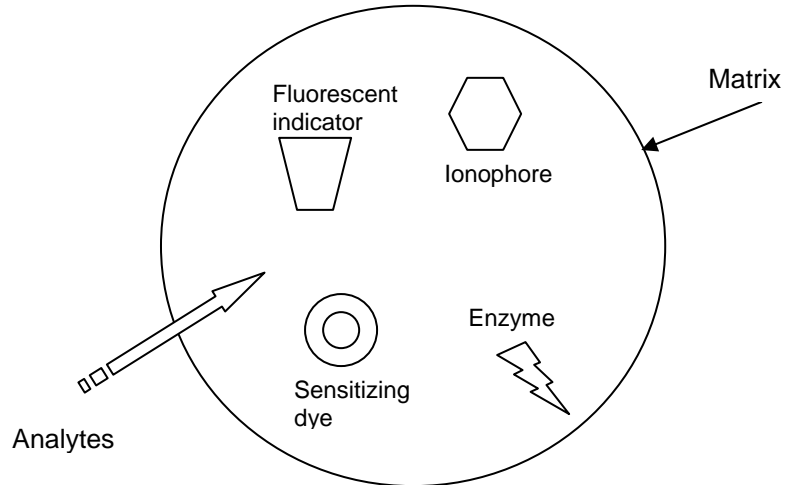


그림 1. 고분자 매트릭스 내부에 감응물질로 사용될 수 있는 fluorescent indicator, ionophore, sensitizing dye, 그리고 enzyme 등이 함유되어 있는 PEBBLE 나노센서의 개략적인 구조

PEBBLE 나노센서의 초기 형태는 1996년 Sasaki 등이 용액의 내부와 계면

의 pH 분포를 측정하기 위하여 형광 나노입자를 사용한 것에서 찾아볼 수 있다. 그 후 1998년 Kopelman 등이 PEBBLE이라는 개념을 처음으로 제안하였고 pH, O₂, Ca²⁺, 글루코스, 산화질소 등을 검출할 수 있는 PEBBLE 나노센서 등이 개발되어져 왔다. PEBBLE 나노센서는 살아있는 세포의 생화학적 변화과정을 실시간으로 감지할 수 있기 때문에 세포 자체에 대한 연구뿐만 아니라 여러 가지 질병 또는 유해성분에 대한 치료 및 예방 등을 위한 수단으로 사용될 수 있다.

PEBBEL 나노센서의 이식 방법

PEBBLE 나노센서를 단일세포 연구에 적용할 때 가장 중요한 점 중의 하나는 PEBBLE 센서를 세포에 손상을 주지않으면서 내부에 이식하는 방법이다. 현재 널리 사용되어지고 있는 방법으로는 gene gun, picoinjection, 리포솜을 이용한 이식, phagocytosis 또는 pinocytosis와 같은 macrophage의 활동에 의한 자연적인 이식 등이 있다. Gene gun에 의한 PEBBLE 나노센서의 이식에서 PEBBLE 센서들을 carrier disk 위에서 건조한 후 이 carrier disk를 rupture disk 앞에 위치시킨다. 그리고 rupture disk 뒤에서 헬륨 가스에 의해 고압을 순간적으로 가하면 PEBBLE 나노센서들이 carrier disk로부터 배양되어진 세포로 전달된다. Gene gun은 빠른 시간과 많은 세포에 세포 한 개당 하나에서 수 천개의 PEBBLE 나노센서들을 이식하는데 사용할 수 있다. 헬륨 가스에 의한 압력을 조절하는 것으로 PEBBLE 센서가 세포 내부에 이식되어지는 위치를 결정할 수 있다.

Picoinjection은 PEBBLE 나노센서가 포함된 용액을 피코리터(pl) 단위로 단일세포에 주입하는 것이다. 이 방법에서는 pipette-puller 또는 micro-forge와 pulled capillary needle을 사용하여 PEBBLE 센서 용액을 주입하는데 현재까지 주입되어진 가장 작은 부피는 10 pl이고 pulled capillary syringe를 사용한 가장 고농도의 PEBBLE 센서 용액은 5 mg/ml이었다. 이식할 수 있는 PEBBLE 나노센서의

최대 갯수는 세포에 손상을 주지않으면서 주입되어질 수 있는 용액의 부피에 의해 결정된다. Picoinjection은 넓은 농도 범위의 PEBBLE 나노센서를 세포 내에 이식할 수 있다. 그러나 각각의 세포에 따로 PEBBLE 센서 용액을 주입하여야 하므로 이 식시간이 오래 걸리고 과정이 지루하다는 단점을 가지고 있다.

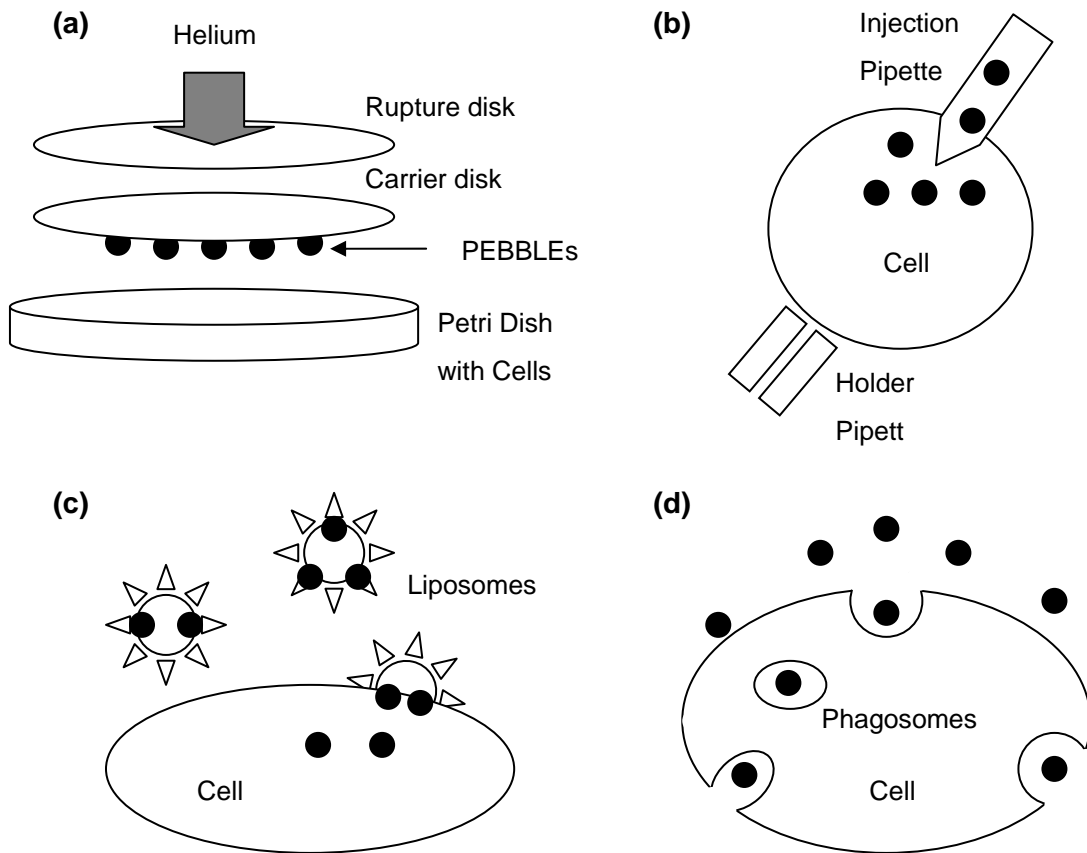


그림 2. PEBBLE 나노센서를 단일세포에 이식하는 방법: (a) Gene gun, (b) Picoinjection, (c) 리포솜을 이용한 이식, (d) phagocytosis 또는 pinocytosis와 같은 macrophage의 활동에 의한 자연적인 이식.

리포솜을 이용한 PEBBLE 나노센서의 이식은 리포솜과 PEBBLE 나노센서가 혼합된 용액을 만들어 배양 세포에 첨가하면 리포솜이 세포막에 융합되면서 내용물인 PEBBLE 센서가 세포 내부로 침투한다. PEBBLE 나노센서의 농도, 배양 세

포에 첨가하는 리포솜의 농도, 그리고 세포와 리포솜의 접촉시간 등의 세가지 요인이 세포 내에 이식되어지는 PEBBLE 나노센서의 갯수를 결정하는 중요한 요인들이다. 따라서 세 가지 파라미터들을 조절하면 원하는 양의 PEBBLE 나노센서를 세포 내에 이식할 수 있다. 리포솜을 이용한 PEBBLE 나노센서의 이식은 동시에 많은 세포에 PEBBLE 나노센서를 이식하는데 유용하다. 그러나 이 방법은 PEBBLE 센서의 세포 내 위치가 세포질까지로 한계가 있고, 한 개의 세포에 한 개의 PEBBLE 나노센서만을 이식하기가 어렵다.

특화된 면역시스템 세포인 macrophage는 PEBBLE 나노센서를 세포 내부로 자연적으로 수용한다. Macrophage가 수용하는 PEBBLE 나노센서의 갯수는 PEBBLE 나노센서 용액의 농도와 macrophage가 PEBBLE 센서 용액과 접촉하는 시간에 의해 결정된다. 이 방법의 장점은 다양한 농도의 PEBBLE 나노센서를 세포에 쉽게 이식할 수 있다는데 있다. 그러나 macrophage에게만 적용할 수 있다는 것과 세포 내 특정 부위로만 PEBBLE 나노센서가 이식되어진다는 단점을 가지고 있다.