

총 설

원자간력 현미경을 이용한 단일세포 조작 및 고효율 유전자 도입기술

한성웅* · Nakamura Chikashi** · Miyake Jun** · 김우식*** · 김종민 · 장상목†

동아대학교 화학공학과
604-714 부산시 사하구 하단 2동 840
*일본이화학연구소 세포시뮬레이션팀
Riken Headquarters, 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama, 351-0198, Japan
**일본산업종합기술연구소 세포엔지니어링연구부문
Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 105-8566, Japan
***경희대학교 화학공학과
446-701 경기도 용인시 기흥구 서천동 1번지
(2009년 7월 8일 접수, 2009년 8월 3일 채택)

Atomic Force Microscopy(AFM) based Single Cell Manipulation and High Efficient Gene Delivery Technology

Sung-Woong Han*, Chikashi Nakamura**, Jun Miyake**, Woo-Sik Kim***, Jong-Min Kim and Sang-Mok Chang†

Department of Chemical Engineering, Dong A University, 840 Hadan2-dong, Saha-gu, Busan 604-714, Korea
*Computational Cell Biomechanics Team, VCAD System Research Program, Riken Headquarters, 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan
**Research Institute for Cell Engineering, AIST, Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 105-8566, Japan
***Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, 1 Seocheon-ri, Kiheung-up, Yongin, Gyeonggi 446-701, Korea
(Received 8 July 2009; accepted 3 August 2009)

요 약

본 총설에서는 주사형프로브현미경의 원리와 응용에 관하여 간략히 설명하고 최근 본 그룹에 의하여 활발하게 연구되고 있는 나노탐침과 AFM(원자간력현미경 atomic force microscopy)을 이용한 저침습성(low-invasive) 단일세포 조작기술과 고효율 유전자 도입기술을 소개하고자 한다. 시판 AFM 탐침을 침상구조로 가공한 나노탐침과 AFM을 이용하였을 경우, 탐침의 세포삽입의 성공여부를 force-distance curve 상의 척력소실의 유무로 판단할 수 있다. 침상 나노탐침을 사용하면 대부분의 세포에서 80~90%의 고효율 세포삽입이 가능하여 마이크로인젝션용 미세관을 이용하는 경우보다 세포삽입효율이 높았다. 또한 나노탐침의 직경이 400 nm 이하의 경우에는 세포 종류에 관계없이 장시간 나노탐침의 삽입에도 세포활성에 큰 영향이 없었다. 침상나노탐침을 이용하여 DNA를 도입하였을 경우에도 기존의 DNA 도입방법과 비교하여 높은 도입효율과 유전자 발현율로 DNA를 도입할 수 있는 가능성을 확인하였다.

Abstract – The principle and application of a scanning probe microscopy(SPM) are reviewed briefly, and a low-invasive single cell manipulation and a gene delivery technique using an etched atomic force microscopy(AFM) probe tip, which we call a nanoneedle, are explained in detail. The nanoneedle insertion into a cell can be judged by a sudden drop of force in a force-distance curve. The probabilities of nanoneedle insertion into cells were 80~90%, which were higher than those of typical microinjection capillaries. When the diameter of the nanoneedle was smaller than 400 nm, the nanoneedle insertion into a cell over 1 hour had almost no influence on the cell viability. A highly efficient gene delivery and a high ratio of expressed gene per delivered DNA compared the conventional major nonviral gene delivery methods could be achieved using the gene modified nanoneedle.

Key words: Single Cell Manipulation, Cell Surgery, Gene Delivery, Nanoneedle, AFM

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: smjang@dau.ac.kr

‡이 논문은 KAIST 장호남 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

1. 서 론

종래의 대표적 현미경 관찰기술로는 광학현미경과 전자현미경이 있다. 광학현미경은 파장의 회절한계 때문에 해상도가 광 파장의 1/2 정도로 제한되어지며, 전자현미경은 나노미터 정도의 분해능을 얻을 수 있지만, 세포 등의 생물 시료를 수중에서 유지하면서 계속 관찰하는 것은 극히 곤란하다. 최근 주사형프로브현미경(Scanning Probe Microscopy: SPM)이라고 불리는 주사형터널현미경(Scanning Tunnelling Microscopy: STM)과 원자간력현미경(Atomic Force Microscopy: AFM)이 개발되어 급속히 응용되고 있다. STM과 AFM의 기본원리는 끝이 뾰족한 탐침을 시료표면에서 일정한 거리를 유지하면서 주사하여 그 궤적으로부터 표면형상에 대한 정보를 얻는 것이다. 이때 거리제어에는 시료와 탐침 사이에 작용하는 터널전류와 반데르발스힘을 이용하고 있다. 이 STM과 AFM을 이용함으로써 원자 레벨의 분해능을 공기 중이나 용액 중에서 얻을 수 있게 되었다. 이들 주사형프로브현미경은 금속이나 반도체 표면관측 이외에, 유기분자의 흡착상태, LB막, 액정, DNA, 단백질, 세포막, 지질 이중막, 항체 등 생체관련 물질에 걸친 광범위한 응용이 보고되고 있다[1,2].

최근 본 그룹을 중심으로 나노탐침과 AFM을 저침습성(low-invasive) 단일세포 조작기술과 고효율 유전자도입기술에 응용하고자 하는 연구가 활발하게 수행되고 있다. 세포조작은 바이오테크놀로지분야에서 중요하다. 특히 세포에 유전자도입기술은 세포의 특징과 상태를 연구하는 세포생물학분야뿐만 아니라, 원하는 세포를 환자에게 사용하려는 미래의 새로운 의료분야의 기반기술로 발전할 가능성을 가지고 있기 때문에 더욱 더 발전이 기대된다. IPS(induced pluripotent stem cell)는 체세포에 Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc의 네 가지 유전자를 도입하여 세포의 유전자발현시스템을 리프로그래밍함으로써 분화유도가 진행된 세포를 미분화상태로 돌려놓은 세포를 말한다[3]. IPS의 분화유도 또한 in-vitro에서 성공적으로 이루어짐으로써 환자 자신의 줄기세포를 이용한 조직이식의 가능성도 높아지고 있다. 이러한 IPS는 장기수여자에 의한 면역반응이 없으므로 더욱더 의료분야에서 그 가치가 높다고 할 수 있다[4].

IPS의 개발로 인하여 세포에 유전자도입기술 또한 그 가치가 높아질 것이라 예상된다. 유전자도입기술은 크게 생물화학적 방법과 화학적인 방법, 그리고 물리적인 방법의 세 가지로 구분할 수 있다. 생물화적으로는 레트로바이러스(retrovirus)와 아데노바이러스(adenovirus)를 이용하는 방법이 있다. 레트로바이러스를 이용한 유전자도입 방법은 모든 종류의 세포에 이용할 수 있으며 효율이 높고 장시간 유전자발현에 이용될 수 있다[5,6]. 그러나 이 방법은 분열하는 세포에만 이용할 수 있고, in vivo에서는 효율이 낮으며, 유전자 게놈(genome)의 삽입에 의한 돌연변이의 문제점도 내포하고 있다[7,8]. 아데노바이러스를 이용한 유전자도입은 효율이 높고 분열하지 않는 세포에도 사용할 수 있지만, 면역원성의 문제점과 장시간 유전자발현이 불가능하다[9-11].

리포솜, 폴리머 등을 이용한 화학적인 유전자도입방법은 매우 간단하게 유전자 도입을 할 수 있으며 모든 종류의 세포에 이용할 수 있고, 면역원성을 가지지 않는다. 그러나 이 방법으로는 특정 세포에만 선택적으로 유전자를 도입하는 것이 불가능하며, 대부분의 복합체들이 독성이 강하기 때문에 효율이 낮을 뿐 아니라 일반적으로 도입유전자수가 적기 때문에 발현효율 또한 매우 낮다는 단점이 있

다[12-16].

물리적인 유전자도입방법으로는 일렉트로포레이션(electroporation)과 마이크로인젝션(microinjection)이 있다. 일렉트로포레이션은 원리적으로는 간단하나 비교적 복잡한 장치를 필요로 하고, 세포막에 상처를 입힐 가능성이 있으며 효율도 낮은 편이다. 마이크로인젝션은 적절한 타이밍의 특정세포에 복수의 유전자를 도입할 수 있는 이상적인 유전자도입법이라고 할 수 있다. 그러나 삽입에 사용되는 팁의 크기가 1 μm 정도로 배양세포와 비교하여 상대적으로 크다고 볼 수 있다. 특히 작은 세포의 경우 그 크기가 2~15 μm 정도로 작고, 평편한 세포의 경우 그 높이가 2~5 μm 밖에 되지 않기 때문에 인젝션에 의하여 세포가 변형되거나 파괴될 가능성이 있다. 따라서 일부 연구그룹에서는 세포의 변형 내지는 손상을 최소화하기 위하여 직경 100~300 nm의 미세관을 이용하여 세포조작을 시도하였다[17,18].

시판 AFM 탐침을 침상구조로 가공한 나노탐침을 사용하여 세포 삽입을 하는 경우, 나노탐침 직경이 약 100~200 nm이고, 이는 마이크로인젝션에 사용되는 미세관 직경의 1/5~1/10 밖에 되지 않으므로 삽입에 의한 세포막과 세포에 침습성(invasiveness)을 최소화할 수 있다. AFM 장치를 이용하면 나노탐침의 정확한 공간제어가 가능하고, force-distance curve를 통하여 나노탐침의 세포에 삽입 여부를 판단할 수 있다는 특징을 갖는다. 생체와 가능한 한 동일한 상태를 유지하도록 세포의 활성을 유지하면서 DNA를 도입할 수 있는 세포조작기술이 개발된다면 ex-vivo의 유전자치료 기술뿐만 아니라 연속적인 세포의 변화과정, 예를 들면 세포분화유도를 제어할 수 있게 될 것이다[19-26].

본 총설에서는 각종 주사형프로브현미경의 기본원리에 대하여 간략하게 설명하고 나노탐침과 원자간력현미경을 이용한 비파괴 및 저변성 단일세포 조작기술과 고효율 유전자 도입기술을 중심으로 간략히 소개하고자 한다.

2. 각종 주사형프로브현미경의 원리

미소전압이 가해지고 있는 상당히 근접한 금속 간에 비접촉전류가 흐르는 현상을 터널효과(tunnelling effect)라고 한다. 이 현상을 이용하여 금속탐침을 도전성시료표면에서 10 Å 이내의 간격으로 접근시켜 터널전류를 측정하는 현미경을 주사형터널현미경이라고 한다. 끝 부분이 굉장히 뾰족한 침봉을 시료표면에 접근하여 가면서 주사하면, 그 때 터널효과에 의해 시료표면의 요철에 따른 전류변화가 일어나게 된다. 여기서 탐침을 주사하면서 이 터널전류를 검출하면, 3차원 표면상을 얻을 수 있다. 이 탐침을 압전소자에 의해 시료표면과 접촉하지 않도록 제어하면 원자레벨의 표면형상측정이 가능하다. 특히 높이 방향의 분해력이 우수하며, 샘플을 비접촉하면서 비파괴로 측정하기 때문에 전자현미경과는 달리 공기 중에서 측정뿐만 아니라 용액 중에서의 측정도 가능하다는 특징을 갖는다. STM에서는 도전성시료표면 관측만 가능하다는 한계점을 가지고 있었으나, 새로운 방법의 AFM은 원자상호간에 작용하는 원자간력을 이용하여 측정하기 때문에 STM과 달리 절연물질의 표면현상도 관측할 수 있게 되었다.

STM과 AFM이 개발된 이래, SPM이라고 하는 전혀 새로운 체계의 현미경이 급속히 응용되고 있다. 이는 종래의 전자파나 전자선 등을 이용하여 관찰하는 것에 비하여 SPM에서는 원자사이에 존재하

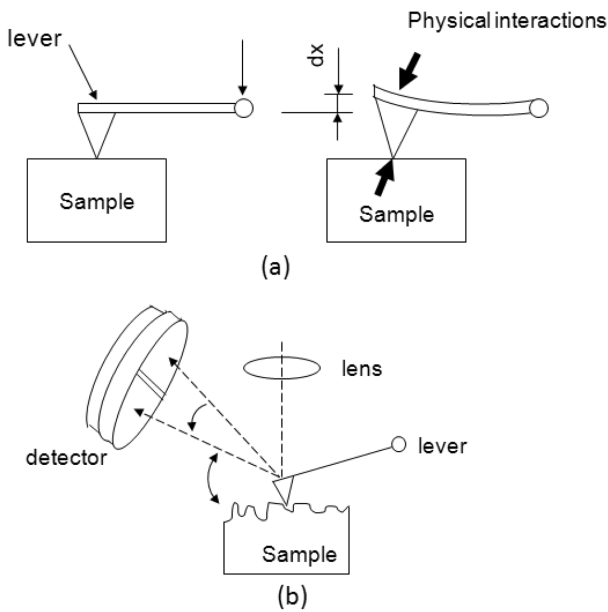


Fig. 1. Principle of SPM detector (a)general mode, (b)with optical mode.

는 척력과 인력으로 대표되는 탐침 간에 작용하는 여러 가지 물리적인 상호작용을 이용하여 관측한다고 하는 획기적인 방법을 확립했기 때문이다. 이와 같이 캔틸레버(cantilever)화한 탐침과 시료표면 간에 작용하는 여러 가지 물리적 상호작용을 검출하여 표면정보를 얻는 SPM의 기본원리는 Fig. 1과 같이 캔틸레버라 불리는 작은 지레를 이용하여 표면형상을 관찰한다. 작은 지레의 변화에 따른 정보를 측정하는 방식에는 물리적인 상호작용을 측정하는 방식과 지레 뒷면에서의 반사각 변위를 측정하는 방식이 있다.

이들의 대표적인 종류로는 시료표면과 캔틸레버 사이에 가해지는 원자간력(척력)을 레이저변위 검출기로 캔틸레버의 상하 방향의 휘는 정도를 측정하여 표면형상을 측정하는 AFM, 시료표면과 캔틸레버 사이에 가해지는 마찰력 변화를 캔틸레버의 횡방향으로 휘는 정도를 검출함으로써 측정하는 마찰력현미경(Friction Force Microscope), 자기화된 침봉과 캔틸레버를 공진시키는 AC 검출법에 의해서 자기력을 검출하는 자기력현미경(Magnetic Force Microscope), 캔틸레버를 공진시키는 AC 검출법에 의해 원자간력(인력)을 검출하여 표면형상을 측정하는 비접촉원자간력 현미경(Noncontact-AFM), 용액 중에서 시료셀과 포텐시오스탯트를 사용하여 용액 중에서 전기화학

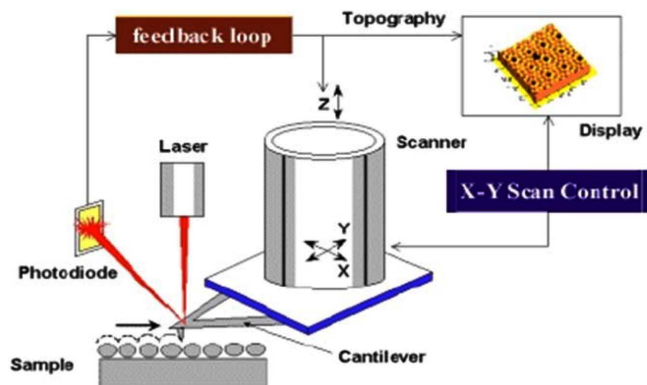


Fig. 2. Schematic diagram of SPM with a functionality mapping.

반응을 일으키가면서 전극표면의 구조변화를 AFM으로 관찰하는 전기화학-원자간력현미경(Electrochemical-AFM) 등이 있다. 이들의 기본적인 측정개념도를 Fig. 2에 일반화하여 도식하였다. 척력, 인력, 자기력, 전기력, 마찰력, 흡착력 등 자극을 가하여 가면서 탐침을 표면에 주사할 때 캔틸레버의 변화를 측정하여 시료표면의 기능성 및 형상구조를 해석하는 것이다[1,2].

3. 나노탐침의 세포에 삽입과 Hertz Model

Fig. 3은 나노탐침의 SEM(Scanning Electron Microscopy) 이미지와 본 연구의 모식도를 나타낸 것이다. 0.2 N/m의 단결정실리콘 AFM 탐침(ATEC-CONT, Nanosensors, Neuchatel, Switzerland)을 집속이온빔(FIB, focused ion beam, SMI9200, Seiko Instruments Inc., Chiba, Japan)을 이용하여 나노탐침의 형태로 가공하였다. 먼저 FIB를 이용하여 피라미드형태의 탐침 양끝을 에칭하여 삼각판 형태로 제작하였다. 그 후 팁을 90° 회전시켜 같은 방법으로 양끝을 에칭하여 침상구조를 제작하였다. 탐침은 캔틸레버 홀더의 장착각에 맞게 10~13° 기울인 상태로 제작하였다. AFM 헤드 유니트를 현미경 스테이지에 장치하고 캔틸레버는 홀더를 이용하여 세포가 배양되어 있는 페트리 디쉬에 위치시킨다. 캔틸레버와 세포는 CCD 카메라를 이용하여 관찰하면서 캔틸레버를 세포의 중심부분에 위치시킨다. MFP-1D™, MFP-3D™-Bio System(Asylum Research, Santa Barbara, USA), 그리고 NanoWizardII BioAFM(JPK instruments, Berlin, Germany)을 세포조작 및 force 측정에 이용하였다. 나노탐침을 이용한 탐침의 세포삽입실험에서는 z축 피에조를 약 4 μm/sec의 속도로 탐침에 접근 및 분리하였다. AFM을 이용하여 세포조작할 때 세포를 관찰하기 위하여 도립현미경과 Top View 모듈이 이용되었다. 세포이미지는 고감도 CCD 카메라(DP30/IX71, Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 나노탐침의 세포삽입관찰과 DNA 확산실험관찰은 공집점레이저현미경(CLSM, confocal laser scanning microscopy, FV-300/IX71, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 히터와 CO₂ 레귤레이터를 이용하여 세포활성을 유지하였으며 방음 후드와 방진스테이지를 이용하여 외부로부터의 진동을 차단하였다.

Fig. 4는 나노탐침을 이용하여 세포에 삽입조작하였을 때의 공집점 레이저현미경(CLSM) 이미지와 force-distance curve를 나타낸 것이다. Fig. 4(A-C)는 DsRED2 NES가 발현된 hMSC(human mesenchymal stem cell)를 FITC(fluorescein isothiocyanate) 수식나노탐침으로 삽입 조작한 결과이며, Fig. 4(D-F)는 DsRED2 NES가 발현된 HEK293 (human embryonic kidney 293)에 나노탐침을 삽입 조작한 결과를 나타낸 것이다. Fig. 4(A,D)는 각각의 단면도를, Fig. 4(B,E)는 크로

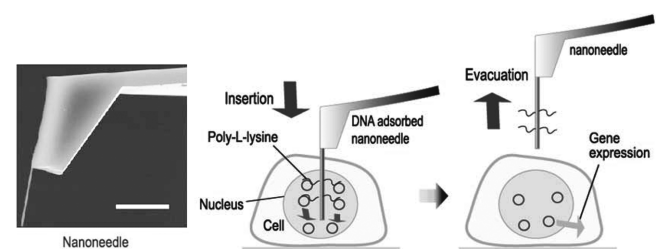


Fig. 3. A SEM image of a nanoneedle (scale bar: 5 μm), schematics of single cell manipulation and gene delivery using a nanoneedle and an AFM.

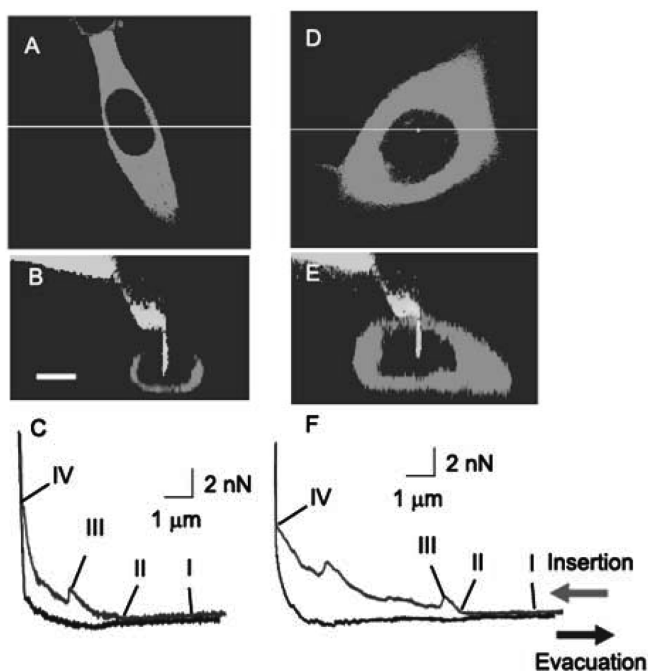


Fig. 4. Observation of nanoneedle insertion into a cell and force distance curve. A hMSC and HEK293 were labeled using DsRed2-NES and the nanoneedles were labeled using FITC. A, A CLSM slice image of nanoneedle inserted hMSC. B, A cross-section image of nanoneedle inserted hMSC. C, A typical force-distance curve of a nanoneedle insertion into a hMSC. D, A CLSM slice image of nanoneedle inserted HEK293. E, A cross-section image of nanoneedle inserted HEK293. F, A typical force-distance curve of a nanoneedle insertion into a HEK293. Scale bar: 5 μm .

스캔이미지를, Fig. 4(C,F)는 force-distance curve를 나타낸 것이다. 시판되는 AFM 탐침을 이용하여 세포를 조작하였을 때의 force-distance curve에서는 세포막에 탐침표면이 접촉한 후부터 척력이 증가하고 연속조작에 의해 척력도 연속적으로 증가하는 형태의 force-distance curve를 나타낸다[24,25]. 그러나 나노탐침의 경우에는 나노탐침 표면이 세포막에 접촉한 후부터 척력이 증가하나(점 II) 연속조작에 의해 척력이 급격히 소실되는 것(점 III)을 알 수 있다. 이것은 나노탐침이 세포막을 통과하면서 캔틸레버에 상정되었던 척력이 급격히 감소하면서 생기는 현상이다[21,24,25].

시판 피라미드탐침의 경우 삽입조작에 의해 세포형태가 심하게 변형되고 탐침표면이 세포에 삽입되어 있는지 여부를 알기가 매우 어렵지만[24], 나노탐침의 경우에는 Fig. 4(B,E)와 같이 세포의 변형이 없이 나노탐침이 세포핵에 삽입되어 있는 것을 알 수 있었다. 또한 force-distance curve 상의 척력소실이 관찰되었을 때에만 나노탐침이 세포에 삽입되어 있다는 것을 확인함으로써 척력소실 유무가 세포삽입여부를 판단하는 척도로 사용될 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서 세포 및 탐침의 형광물질수식 없이도 force-distance curve만으로 세포에 나노탐침의 삽입여부를 판별할 수 있다는 사실을 알았다.

세포에 침상구조물인 탄성재료를 압입할 때 이용되는 Hertz 모델의 적용가능성을 검토하기 위하여 같은 직경의 원뿔형과 원통형 두 가지 형태의 나노탐침을 세포에 압입하여 그 결과를 해석하여 비교하였다. 압입하는 구조물이 원통형일 경우와 압입하는 구조물이 원

추형일 경우 힘 F 와 압입거리 I 사이의 관계식이 Hertz 모델에서 각각 식 (1)과 (2)로 표현할 수 있다.

압입하는 구조물이 원통형일 경우

$$F = \frac{2aE}{(1-\nu^2)} I \quad (1)$$

압입하는 구조물이 원추형일 경우

$$F = \frac{2E \cdot \tan \alpha}{\pi(1-\nu^2)} I^2 \quad (2)$$

여기서 F : 힘, I : 접촉 후의 압입거리, α 원추의 내각(4°), ν : 포아즌 비, a : 나노탐침의 반경, E : 영율을 나타낸다.

원추형 나노탐침의 경우에는 거리에 대하여 척력이 초기단계에서는 2차식으로 증가하다가, 어느 지점부터 1차식으로 증가하는데 2차식에서 1차식으로 변환되는 지점이 나노탐침형태가 원추형에서 원통형으로 변화하는 지점과 정확하게 일치한다. 반면 원통형 나노탐침의 경우에는 척력이 초기부터 1차식으로 증가함을 알 수 있다. 이 결과는 Hertz 모델의 역학응답과 잘 일치하고, 초기의 2차식 척력상승은 탐침의 선단부분이 세포표면을 압입하고 있다는 사실을 나타낸다. Hertz 모델에 의해 계산된 세포의 탄성계수(2~10 kPa)는 기존에 알려진 탄성계수와 잘 일치하였다[27,28]. Melanocyte를 사용하였을 경우, 원통형 나노탐침의 삽입효율은 90%이었고 원뿔형 나노탐침의 삽입효율은 70%로 원통형 나노탐침의 삽입효율이 원추형 나노탐침의 삽입효율보다 높다는 것을 알 수 있었다[24].

세포에 나노탐침의 삽입조작에 있어서 세포높이 변수를 검토하기 위하여 세포높이가 서로 다른 세포에 대하여 나노탐침을 삽입 조작하여 그 결과를 비교하였다. Fig. 4의 CLSM 이미지로부터 두 세포의 높이를 측정된 결과, hMSC의 높이는 $4.9 \pm 0.8 \mu\text{m}$, HEK293의 높이는 $15.1 \pm 2.1 \mu\text{m}$ 이었다($n=20$). Force-distance curve에서 처음 척력이 나타나는 지점(Fig. 4C와 F에서 점 I)에서 나노탐침이 기반에 접촉하여 척력이 크게 증가하는 지점 사이의 거리 결과(Fig. 4C와 F에서 점 II) 사이에는 2~3 μm 정도의 차이가 존재함을 알 수 있었다. 이는 실제로 나노탐침이 세포막에 처음 접촉한 지점과 force-distance curve 상에서 처음 척력상승으로 나타난 지점과는 차이가 있다는 것을 의미하며, 세포의 이중지질막은 경도가 매우 작아서 나노탐침의 압입에 의해 형태가 변화함을 의미한다. 세포막의 형태변화에 의해 세포전체의 응력이 증가하게 되고 2~3 μm 압입된 후에야 캔틸레버에 척력으로 나타난다고 해석되어진다. 여러 종류의 세포에서 나노탐침의 삽입효율을 측정된 결과, melanocyte에서는 92%, HEK293에서는 93%, MCF-7(breast cancer cell)에서는 91%, hMSC에서는 90%로 시험한 대부분의 세포에서 80~90% 이상의 고효율 세포삽입이 가능하였다[20].

세포에 나노탐침의 삽입조작에 있어서 삽입성공률과 세포생존율을 기존의 마이크로인젝션에 의한 삽입성공률과 세포생존율과 비교하여 보았다. Injectman II(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용한 사세포염색색소(DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, ex 360 nm/em 460 nm; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) 배출실험과 acridin orange(3,6-bis(dimethylamino)acridine hydrochloride; DNA and RNA by intercalation, ex 500 nm/em 520 nm, electrostatic attractions; ex 420-460 nm/em 630-650 nm, Dojindo Laboratories) 인젝션실험을 행하였다. 인젝션 삽입성공률은 형광측정을 통하여 “형

광세포수/인젝션한 세포수”로 계산하였다. 조작한 세포는 다시 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 DAPI로 처리하고 15분간 인큐베이터에서 배양한 다음, 세포 생존율은 “형광세포수/인젝션한 세포수”로부터 계산하였다. 마이크로인젝션하였을 때 인젝션 삽입 실험결과 생존율은 약 30%이었으며, DAPI를 이용한 저침습성 나노탐침에 의한 생존율은 약 70%이었다. 이 결과로부터 마이크로인젝션용 미세관을 이용하여 hMSC에 삽입조작하면 미세관이 세포 내에 삽입되지 않고 접촉/압입만 행하여지는 경우가 70% 정도임을 의미한다. 마이크로인젝션용 미세관의 경우 직경이 나노탐침에 비해 클 뿐 아니라 형태가 원뿔형이므로 세포삽입에 필요한 압입거리가 길어지게 됨으로써 hMSC와 같이 높이가 작은 세포삽입에는 불리하다는 것을 알 수 있다.

4. 침상나노탐침 장시간 삽입에 따른 세포활성 측정

세포에 고효율 DNA 도입조건을 도출하기 위하여 나노탐침을 세포에 장시간 삽입하였을 때, 세포에 대한 나노탐침 직경영향을 분석하였다. 나노탐침 직경이 크면 클수록 나노탐침 삽입표면적이 넓어짐으로써 세포에 DNA 도입 가능량은 증가하지만 나노탐침의 세포에 대한 침습성(invasiveness)도 함께 증가한다. 200, 400, 600, 800 nm 직경과 $6 \mu\text{m}$ 길이의 나노탐침을 제작하여 실험한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5A-D는 각 탐침의 형태를 나타낸 것으로 세포에 대한 삽입효율을 높이기 위하여 나노탐침은 원통형으로 제작하였다. 세포에 나노탐침이 삽입된 상태에서 DAPI 배출실험을 하여 세포활성을 분석하였다.

Melanocyte에 직경 800 nm 나노탐침을 1시간 삽입한 상태에서 DAPI 배출실험을 한 이미지(Fig. 5E)로부터 세포에 나노탐침이 삽입됨으로써 세포활성이 저하하고 DAPI 배출능력이 저하되는 것을 확인할 수 있었다. Melanocyte에 각각의 나노탐침과 직경 400 nm와 $1 \mu\text{m}$ 의 마이크로인젝션용 미세관을 삽입한 상태에서 DAPI 배

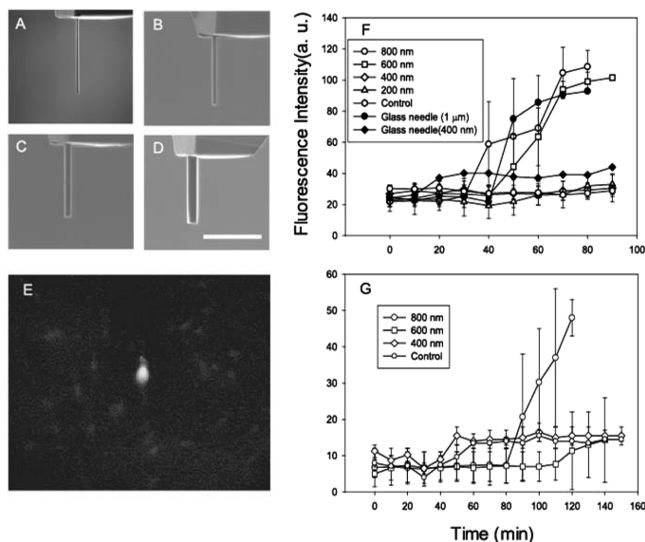


Fig. 5. The cell viability evaluated using nanoneedles of various diameters. The diameters of nanoneedles were controlled: 200 nm, 400 nm, 600 nm, 800 nm A-D, and were $6 \mu\text{m}$ in length. E, A fluorescent image of a melanocyte stained with DAPI by insertion of 800 nm nanoneedle for 1 hour. F, Time course of the fluorescence intensity of a cell stained with DAPI and the nanoneedle kept in the cell. Melanocyte ($n=5$). G, HEK293 ($n=3$). Scale bar: A-D, $5 \mu\text{m}$.

출실험을 한 결과(Fig. 5F)로부터 직경 600과 800 nm 나노탐침, 그리고 직경 $1 \mu\text{m}$ 의 마이크로인젝션용 미세관에서 세포활성이 저하되어짐을 확인할 수 있었다. 반면 세포에 직경 400 nm 이하의 나노탐침과 마이크로인젝션용 미세관이 삽입된 상태에서 DAPI 형광이 관찰되지 않아, 세포막수송이 활발하게 이루어지고 있음을 알 수 있었다. HEK293를 사용하여 동일한 실험을 행한 결과(Fig. 5G)로부터, HEK293에서는 직경 600 nm 이하의 나노탐침에서 DAPI 형광 강도가 증가하지 않음을 알 수 있었다. MCF-7과 C3H10T1/2(mouse embryonic cell)에서도 HEK293와 비슷한 결과를 얻었다[22]. 이 실험결과로부터 침상구조물을 세포에 장시간 삽입할 때 세포활성과 세포막수송에 대한 영향은 침상구조물 재료에 관계없이 직경에 의존한다는 것을 알 수 있었고, 세포에 침상구조물을 장시간 삽입할 때 세포활성에 미치는 영향은 세포의 종류에 따라 차이는 있지만 직경 400 nm 이하 침상구조물이라면 세포의 종류에 관계없이 1시간 이상 삽입하여도 세포활성과 세포막수송에 대한 영향은 미미하다는 것을 알 수 있었다.

Fig. 6은 직경 200 nm와 800 nm 나노탐침을 melanocyte에 장시간 삽입하였을 때에 시간에 따른 세포형태변화를 관찰한 결과이다. 직경 200 nm 나노탐침의 경우, 80분 정도 장시간 삽입하여도 세포 형태변화는 관찰되지 않았지만(Fig. 6A-D), 68시간이 경과하면 삽입 조작한 세포가 분열함을 알 수 있다(Fig. 6H). melanocyte의 세포분열주기가 약 72시간임을 감안한다면 직경 200 nm 나노탐침을 장시간 삽입하여도 세포증식과 분열에 큰 영향이 미치지 않음을 알 수 있다. 반면 직경 800 nm 나노탐침의 경우, 세포에 삽입 조작하여 70분이 지나면 세포형태가 줄어들기 시작하여(Fig. 6K,L) 순간적으로 파괴되었다. 이들 결과는 DAPI 배출실험과 마찬가지로 나노탐침의 직경이 세포활성에 미치는 영향이 크다는 사실을 의미한다.

본 총설에서는 구체적으로 언급하지 않았지만, 세포에 대한 나노탐침 침습성을 체계적으로 조사하기 위하여 나노탐침 삽입조작에 의한 세포의 아포토시스 유도과 세포전사저해유무에 관한 실험도

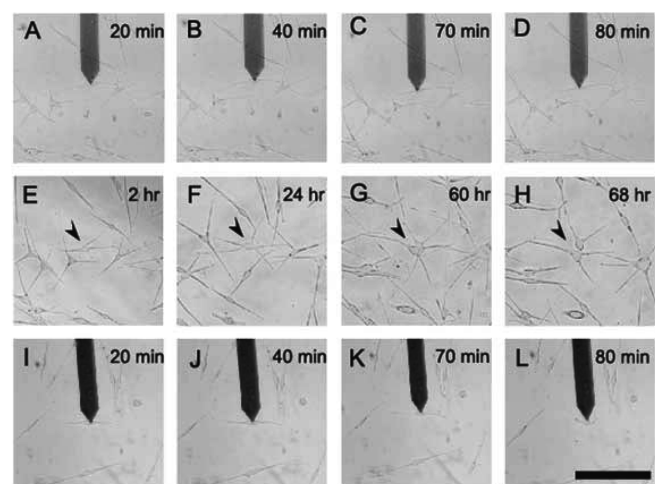


Fig. 6. The time course images of cell division after inserting a 200 nm nanoneedle for 80 minutes in a melanocyte. A, The cell image after insertion for 20 min. B, 40 min. C, 70 min. D, 80 min. E, After 2 hours. F, 24 hours. G, 60 hours. H, 68 hours. Images of the shape changes after inserting an 800 nm nanoneedle in a melanocyte. I, The cell image after insertion times for 20 min. J, 40 min. K, 70 min. L, 80 min. Scale bar: 100 μm .

하였다. 직경 200 nm 나노탐침을 사용하는 경우, 장시간 삽입조작에도 아포토시스로 유도되지 않는다는 것을 알 수 있었고, 나노탐침의 삽입조작이 세포전사저해에 대한 영향이 미미함을 알 수 있었다.

5. 침상나노탐침을 이용한 세포에 DNA도입

나노탐침 표면을 3-mercaptopropyltrimethoxysilane(Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.)으로 실란화하고 폴리라이신(poly-L-lysine, 10~30 mer, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.)으로 반응시킨 다음, 폴리라이신과 DNA의 정전기적 인력을 이용하여 DNA를 나노탐침에 흡착하여 사용하였다. 나노탐침 표면에 폴리라이신의 존재여부는 카르복시메틸레이트 텍스트라인이 수식된 금 표면과의 force-distance curve로 확인하였다. 폴리라이신과 반응한 다음, 100 ng/μL의 phrGFP DNA(Stratagene, North Torrey, U.S.A.) TE 버퍼용액을 처리하여 탐침표면의 폴리라이신과 DNA의 정전기적 인력을 이용하여 phrGFP DNA를 흡착하였다.

세포에 DNA를 도입하기 전에 DNA가 흡착된 나노탐침을 0.1 μg/mL 농도의 To-Pro-3 iodide(ex 642 nm/em 661 nm; Molecular Probes, Eugene, Oregon)로 무혈청배지(opti-MEM, Invitrogen, Carlsbad, USA, pH 7.4)에서 30분간 반응하면서 공집점레이저현미경(CLSM)을 이용하여 세포 내의 DNA 확산을 관찰하였다.

DNA가 흡착된 나노탐침을 z방향으로 약 4 μm/sec 속도로 샘플에 접근하였으며, z피에조를 임의조작하면서 DNA 도입과 DNA 확산실험을 행하였다. DNA가 흡착된 세포에 나노탐침의 삽입여부를 force-distance curve로 확인한 후, DNA 도입실험에서 3분, DNA 확산실험에서 12분간 나노탐침을 정지하여 유지하였다. 그 후 z방향으로 같은 속도로 DNA가 흡착된 나노탐침을 세포로부터 분리하였다.

무혈청배지 opti-MEM 용액 속에서 그리고 세포에 나노탐침이 삽입된 상태에서 나노탐침의 1~2 μm 아래쪽에서부터 z방향으로 0.5 μm 단위로 스캔하여 총 25 μm 스캔하여 CLSM 이미지를 관찰하였다. 한 번의 측정시간은 약 1분 정도 소요되었으며, 형광강도와 DNA의 양은 CLSM 이미지를 분석하여 산출하였다. Image Pro(Media Cybernetics, Bethesda, Maryland)를 이용하여 나노탐침 최하단부터 11개의 단면이미지를 Gray 스케일로 변환시킨 후 화이트 픽셀의 숫자를 측정하고 모든 데이터를 가산함으로써 DNA 확산량을 정량분석하였다. To-Pro-3 iodide가 삽입된 phrGFP DNA를 CLSM으로 측정하여 검량선을 구하고 이 검량선으로부터 탐침표면의 DNA 양을 계산하였다.

Fig. 7은 CLSM을 이용하여 HEK293 내에서 DNA 확산을 관찰한 결과이다. Fig. 7A~C는 DNA 흡착 직후의 나노탐침(A), 삽입직전의 나노탐침(B), 삽입 3분 후의 나노탐침(C)의 CLSM 이미지이다. Fig. 7D는 phrGFP DNA 검량선으로부터 구한 시간에 따른 나노탐침 표면의 DNA 양의 변화를 나타낸 것이다. 나노탐침 표면에 흡착되어 있는 DNA 양은 $1.5 \times 10^5 \pm 4.2 \times 10^4$ 이었고 변동계수는 28%이었다. 형광강도는 연속적으로 감소하였지만 DNA 흡착나노탐침을 세포에 삽입하였을 때 opti-MEM 용액에서의 감소보다 기울기가 컸다. Opti-MEM 용액에서는 DNA 흡착나노탐침의 형광강도의 2분간 약 25%가 감소하였고, 세포에 삽입한 후에는 3분 만에 약 50% 감소하였다. DNA 흡착나노탐침이 세포에 삽입하면 형광강도의 감소기울기가 커지는 것은 세포핵 내의 양이온, 히스톤과 같은 DNA 결합단백질[16] 그리고 배지와 DNA 흡착시의 pH 조건은 pH

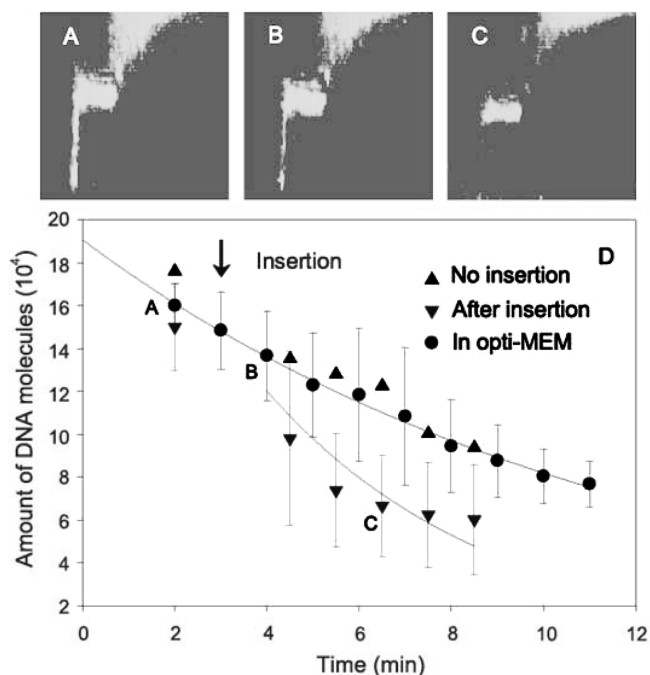


Fig. 7. Real time observation of the diffusion of DNA in a cell using CLSM. A-C, CLSM images of To-Pro-3 iodide intercalated DNA adsorbed nanoneedle before (A, B) and after (C) inserting into an HEK293 cell. The time interval is about 1 min. D, The real time graph of fluorescence intensity change.

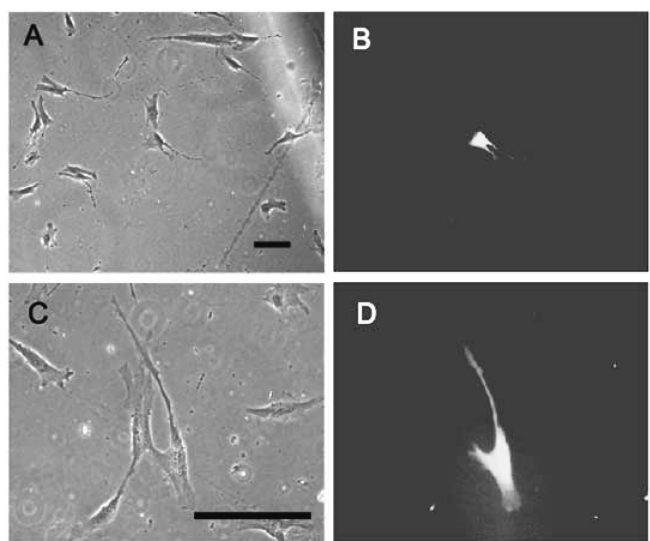


Fig. 8. GFP expression in an hMSC using a DNA adsorbed nanoneedle. A, A hMSC after incubation for 24 hours. B, The fluorescence image of the hMSC. C, The hMSC after incubation for 48 hours. D, The fluorescence image of the hMSC after incubation for 48 hours. Scale bars: 100 μm.

7.4이지만 세포 내의 pH는 약 7.2이므로 pH 변화에 의해 DNA 탈착의 가속화에 의한 것으로 생각된다[27].

다음으로 실제 DNA 흡착나노탐침을 이용하여 세포에 DNA 도입을 실행하였다. DNA 흡착나노탐침을 세포에 삽입 후 DNA 확산을 위하여 3분간 삽입을 유지하였다. Fig. 8은 DNA 흡착나노탐침을 이용한 hMSC 세포에 GFP를 도입한 결과를 나타낸 것이다. GFP DNA를 도입하고 24시간 배양하여 DNA 도입실험을 한 세포에서

Table 1. Comparison of gene expression efficiency, amount of GFP DNA molecules in a single cell, and expression rate of single GFP DNA molecule in three gene delivery methods

	Lipofection (Lipofectamine 2000)	Microinjection (Injectman)	Nanoneedle
Efficiency of gene expression	42%	8%	74%
Amount of GFP DNA molecules in a single cell	2.1×10^6 (n=22)	9.1×10^4 (n=15)	8.0×10^3 (n=16)
Fluorescence intensity in a single cell	4.9×10^5	1.2×10^4	3.7×10^3
Expression rate of single GFP DNA molecule	0.23	0.13	0.46

강한 GFP 형광을 확인할 수 있었다(Fig. 8B). GFP DNA를 도입하고 48시간 배양한 후에는 GFP 형광이 관찰된 세포가 분열되어 있는 것을 확인함으로써 세포활성이 유지되고 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 이 실험에서 DNA 발현 효율은 74%이었다[20].

6. 기존 DNA도입기술과 비교

기존의 리포펙션과 마이크로인젝션법에 의한 DNA 도입과 나노탐침법에 의한 DNA 도입법에서 DNA 도입효율, 단일 세포에 도입된 DNA의 양, 그리고 도입된 한분자의 DNA에 대한 발현율을 상호 비교하여 Table 1에 나타내었다.

리포펙션은 Lipofectamine 2000™(Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)을 이용하여 실험하였다. 리포펙션 실험 24시간 전에 hMSC를 콜라겐 코트 35 mm 디쉬에 2×10^4 배양하여 1 μ g phrGFP와 3 μ l Lipofectamine 2000 복합체를 투입하고 20분간 배양한 다음 통상배지로 교환하여 CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 리포펙션 후 동일 영역에서 형광시야 이미지와 형광시야 이미지를 겹쳐서 GFP 발현세포와 비발현세포의 숫자를 확인하였고 GFP 발현효율은 “GFP 발현세포수/Lipofectamine-DNA 복합체 처리세포수”로 계산하였다. 마이크로인젝션에서는 1 pg/pl phrGFP 1pl를 각각 hMSC에 인젝션한 후 24시간 인큐베이션하였다. 마이크로인젝션의 발현율은 “GFP 발현세포수/인젝션한 세포수”로 계산하였다. 나노탐침을 이용한 DNA 도입에서 GFP 발현율은 DNA 도입 24시간 후 “GFP 발현세포수/나노탐침 삽입성공 세포수”로 계산하였다. GFP 발현세포는 DP30/IX71 CCD와 GFP 필터(ex 470-490 nm/em 505 nm)를 이용하여 측정하였다.

세 가지 방법으로 DNA를 도입한 세포는 Manipulator(IM-9B; NARISHIGE Co., Ltd, Toyo, Japan)와 직경 100 μ m 미세관을 이용하여 회수하였다. 회수한 세포는 정량 PCR을 통하여 도입된 DNA의 양을 측정하였다.

도입직전의 세포수에서 GFP 발현된 세포수를 나누어 산출한 DNA 도입효율은 리포펙션이 42%, 마이크로인젝션이 8%, 나노탐침을 이용한 DNA 도입법이 74%였다. 도입된 DNA 분자수는 리포펙션이 약 2×10^6 , 마이크로인젝션이 9×10^4 , 나노탐침의 경우 8×10^3 이었고, 도입된 한 분자의 DNA에 대한 발현율은 lipofection은 0.23, 마이크로인젝션은 0.13, 나노탐침은 0.46이었다. 리포펙션의 경우 전체 발현율은 높으나 도입된 한 분자의 DNA에 대한 발현율은 낮게 나타났다.

폴리머-DNA의 복합체를 이용하여 DNA 도입할 경우, 세포 내 루트를 연구한 Bieber 등은 엔도사이토시스(endocytosis)경로를 통해 세포내로 도입된 입자-DNA 복합체의 일부만 핵으로 전달되고, 많은 양의 DNA가 엔도솜(endosome) 내부에 존재하고 있다는 사실을 밝혀내었다[10]. 이와 같이 화학적 DNA 도입법에서는 도입되는 DNA 양은 많으나 핵으로 전달되는 DNA 양이 일부분이므로, 도입된 한분자의 DNA에 대한 발현율이 낮게 나타난다고 할 수 있다. 유전자도입기술은 세포와 세포 내 분자상태에 대한 많은 정보를 제

공하고 있지만, 많은 양의 외부 DNA가 도입된 세포에서 정확한 세포의 기능과 세포 내의 다이내믹한 변화를 알기는 상당히 어렵다. 따라서 화학적인 방법을 이용한 DNA 도입은 정확한 세포의 분자생물학적 정보를 얻는 것이 매우 곤란하다.

마이크로인젝션의 경우, hMSC와 같이 편평한 세포에 대한 삽입 효율이 매우 낮으므로 마이크로인젝션을 이용한 유전자도입은 적절하지 못하다고 할 수 있다. 마이크로인젝션의 삽입효율을 향상시키기 위하여 FITC 결합 글루코오스 등을 목적물질과 함께 도입시키거나 직경 200 nm의 초미세관을 이용하거나[18] 혹은 일정 주파수로 진동시키면서 세포에 삽입하는 방법 등을 개발하고 있다[28].

나노탐침을 이용하여 고효율 DNA 도입이 가능한 것은 90%의 높은 삽입효율과 200 nm의 작은 직경에 의한 것으로 생각된다. 나노탐침의 경우 하나의 탐침을 이용한 연속조작이 불가능하며, 탐침 제작과 DNA 수식 등 번잡한 조작을 필요로 하는 단점을 가지고 있으나 줄기세포, IPS 세포 등 치료목적으로 직접 사용되는 중요한 세포를 취급하는 등의 보다 정확한 세포조작기술을 필요로 하는 조작에 이용가능하다고 생각된다.

7. 결 론

본 총설에서는 주사형현미경의 기본원리와 응용, 특히 침상 나노탐침과 AFM을 이용한 저변성/비파괴 및 고효율 DNA 도입법에 관하여 소개하였다. 나노탐침을 세포에 삽입할 때, 삽입여부는 force-distance curve 상의 척력소실로부터 판단할 수 있고 원추형 탐침보다 원통형 탐침이 삽입에 유리하였고 탐침의 직경이 작을수록 유리하였다. 침상 나노탐침의 세포 삽입은 대부분 세포에서 80~90%의 고효율 삽입이 가능하였고 나노탐침의 직경이 400 nm 이하일 경우에는 세포의 종류에 관계없이 장시간 세포에 삽입하여도 세포활성에 큰 영향이 없음을 알 수 있었다. 나노탐침을 이용하여 초대배양 hMSC에서 70% 이상의 고효율 DNA 도입이 가능하였고 기존의 DNA 도입법과 비교하여 가장 높은 발현율을 나타내었다. 침상나노탐침을 이용한 DNA 도입법은 세포의 변성이 적고, 정확한 DNA 도입이 가능하므로 중요한 세포조작이나 세포분화유도 등에 이용 가능할 것으로 생각된다.

감 사

이 연구는 동아대학교 학술연구지원에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Chang, S. M. and Kim, J. M., “The Recent Trends of Advanced Scanning Microprobe Microscopy,” *Chem. World.*, **36**(5), 21-25

- (1996).
2. Chang, S. M., Lee, H. J., Kim, J. M. and Muramatsu, H., "AFM Mode Scanning Near-field Optical Microscopy(SNOAM) and Nanotechnology," *Prospectives of Ind. Chem.*, **2**(4), 52-60(1999).
3. Takahashi, K. and Yamanaka, S., "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors," *Cell*, **126**, 663-676(2006).
4. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S., "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors," *Cell*, **131**, 1-12(2007).
5. Hahn, W., Ho, S. H., Jeong, J. G., Hahn, E. Y., Kim, S., Yu, S. S., Kim, S. and Kim, J. M., "Viral Vector-Mediated Transduction of a Modified Thrombospondin-2 cDNA Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis," *Gene Ther.*, **11**, 739-45(2004).
6. Selkirk, S. M., Green, S. J., Plunkett, R. J., Baron, T. A., Lis, A. and Spence, P. O., "Syngeneic Central Nervous System Transplantation of Genetically Transduced Mature, Adult Astrocytes," *Gene Ther.*, **9**, 432-443(2002).
7. Kang, Y., Stein, C. S., Heth, J. A., Sinn, P. L., Penisten, A. K., Staber, P. D., Ratliff, K. L., Shen, H., Barker, C. K., Martins, I., Sharkey, C. M., Sanders, D. A., McCray, P. B. and Davidson, B. L., "In Vivo Gene Transfer Using a Nonprimate Lentiviral Vector Pseudotyped with Ross River Virus Glycoproteins," *J. Virol.*, **76**, 9378-9388(2002).
8. Modlich, U., Bohne, J., Schmidt, M., von Kalle, C., Knöss, S., Schambach, A. and Baum, C., "Cell-Culture Assays Reveal the Importance of Retroviral Vector Design for Insertional Genotoxicity," *Blood*, **108**, 2545-2553(2006).
9. Mathis, J. M., Williams, B. J., Sibley, D. A., Carroll, J. L., Li, J., Odaka, Y., Barlow, S., Nathan, C. O., Li, B. D. and DeBenedetti, A., "Cancer-Specific Targeting of an Adenovirusdelivered Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Suicide Gene Using Translational Control," *J. Gene Med.*, **8**, 1105-1120(2006).
10. Bruder, J. T. and Kovesdi, I., "Adenovirus Infection Stimulates the Raf/MAPK Signaling Pathway and Induces Interleukin-8 Expression," *J. Virol.*, **71**, 398-404(1997).
11. Shifrin, A. L., Chirmule, N., Gao, G. P., Wilson, J. M. and Raper, S. E., "Innate Immune Responses to Adenoviral Vector-mediated Acute Pancreatitis," *Pancreas*, **30**, 122-129(2005).
12. Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A. and Elsasser, H. P., "Intracellular Route and Transcriptional Competence of Polyethylenimine-DNA Complexes," *J. Control. Release*, **82**, 441-454(2002).
13. Hoelters, J., Ciccarella, M., Drechsel, M., Geissler, C., Gulkan, H., Bocker, W., Schieker, M., Jochum, M. and Neth, P., "Nonviral Genetic Modification Mediates Effective Transgene Expression and Functional RNA Interference in Human Mesenchymal Stem Cells," *J. Gene Med.*, **7**, 718-728(2005).
14. Jeschke, M. G., Barrow, R. E., Hawkins, H. K., Yang, K., Hayes, R. L., Lichtenbelt, B. J., Perez-Polo, J. R. and Herndon, D. N., "IGF-I Gene Transfer in Thermally Injured Rats," *Gene Ther.*, **6**, 1015-1020(1999).
15. Pollard, H., Remy, J. S., Loussouarn, G., Demolombe, S., Behr, J. P. and Escande, D., "Polyethylenimine But not Cathionic Lipids Promotes Transgene Delivery to the Nucleus in Mammalian Cells," *J. Biol. Chem.*, **273**, 7507-7511(1998).
16. Vijayanathan, V., Thomas, T. and Thomas, T. J., "DNA Nanoparticles and Development of DNA Delivery Vehicles for Gene Therapy," *Biochemistry*, **41**(48), 14085-14094(2002).
17. Knoblauch, M., Hibberd, J. M., Gray, J. C. and van Bell, A. J., "A Galinstan Expansion Femtosyringe for Microinjection of Eukaryotic Organelles and Prokaryotes," *Nat. Biotechnol.*, **17**, 906-909(1999).
18. Tsalia, T. V., Prokopishyn, N. L., Yao, A., Carsrud, N. D. V., Carou, M. C., Brown, D. B., Davis, B. R. and Yannariello-Brown, J., "Glass Needle-mediated Microinjection of Macromolecules and Transgenes Into Primary Human Mesenchymal Stem Cells," *J. Biomed. Sci.*, **10**, 328-336(2003).
19. Han, S., Nakamura, C., Imai, Y., Nakamura, N. and Miyake, J., "Monitoring of Hormonal Drug Effect in a Single Breast Cancer Cell Using an Estrogen Responsive GFP Reporter Vector Delivered by a Nanoneedle," *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 1219-1222(2008).
20. Han, S., Nakamura, C., Kotobuki, N., Obataya, I., Ohgushi, H., Nagamune, T. and Miyake, J., "High-efficiency DNA Injection Into a Single Human Mesenchymal Stem Cell Using a Nanoneedle and Atomic Force Microscopy," *Nanomedicine*, **4**, 215-225(2008).
21. Han, S., Nakamura, C., Obataya, I., Nakamura, N. and Miyake, J., "A Molecular Delivery System by Using AFM and Nanoneedle," *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2120-2125(2005).
22. Han, S., Nakamura, C., Obataya, I., Nakamura, N. and Miyake, J., "Gene Expression Using an Ultra Thin Needle Enabling Accurate Displacement and Low Invasiveness," *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **332**, 633-639(2005).
23. Nakamura, C., Kamiishi, H., Nakamura, N. and Miyake, J., "A Nanoneedle Can be Inserted into a Living Cell Without Any Mechanical Stress Inducing Calcium ion Influx," *Electrochemistry*, **76**, 586-589(2008).
24. Obataya, I., Nakamura, C., Han, S., Nakamura, N. and Miyake, J., "Nanoscale Operation of a Living Cell Using An Atomic Force Microscope with a Nanoneedle," *Nano Lett.*, **5**, 27-30(2005).
25. Obataya, I., Nakamura, C., Han, S., Nakamura, N. and Miyake, J., "Mechanical Sensing of the Penetration of Various Nanoneedles Into a Living Cell Using Atomic Force Microscopy," *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 1652-1655(2005).
26. Obataya, I., Nakamura, C., Han, S., Nakamura, N. and Miyake, J., "Direct Insertion of Proteins Into a Living Cell Using Atomic Force Microscope with a Nanoneedle," *Nanobiotechnology*, **1**, 347-351(2005).
27. Mathur, A. B., Truskey, G. A. and Reichert, W. M., "Total Internal Reflection Microscopy and Atomic Force Microscopy(TIRFM-AFM) to Study Stress Transduction Mechanisms in Endothelial Cells," *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, **28**, 197-222(2000).
28. Rotsch, C., Jacobson, K. and Radmacher, M., "Dimensional and Mechanical Dynamics of Active and Stable Edges in Motile Fibroblasts Investigated by Using Atomic Force Microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 921-926(1999).
29. Boron, W. F., "Regulation of Intracellular pH," *Adv. Physiol. Educ.*, **28**, 160-179(2004).
30. Doi, A., Mizuno, M., Katafuchi, T., Furue, H., Koga, K. and Yoshimura, M., "Slow Oscillation of Membrane Currents Mediated by Glutamatergic Inputs of Rat Somatosensory Cortical Neurons: In Vivo Patch-clamp Analysis," *Eur. J. Neurosci.*, **26**, 2565-2575(2007).