

힘 피드백 기반의 세포조작을 위한 세포막 침습력 측정

김덕호* · 김병규† · 윤 석* · 강현재*

(2003년 5월 23일 접수, 2003년 10월 15일 심사완료)

Cellular Force Sensing for Force Feedback-Based Biological Cell Injection

Deok-Ho Kim, Byungkyu Kim, Seok Yun, and Hyunjae Kang

Key Words : Cellular Force Sensing(세포력 센싱), Force Feedback(힘 피드백), Piezoelectric Polymer(압전폴리머), Biomanipulation(바이오 조작), Egg Cell(난자 세포)**Abstract**

In biological cell manipulation, manual thrust or penetration of an injection pipette into an embryo cell is currently performed by a skilled operator, relying on visual feedback information only. Accurately measuring cellular forces is a requirement for minimally invasive cell injections. Moreover, the cellular force sensing is essential in investigating the biophysical properties for cell injury and membrane modeling studies. This paper presents cellular force measurements for the force feedback-based biomanipulation. Cellular force measurement system using piezoelectric polymer sensor is implemented to measure the penetration force of a zebrafish egg cell. First, measurement system setup and calibration are described. Second, the force feedback-based biomanipulation is experimentally carried out. Experimental results show that it successfully supplies real-time cellular force feedback to the operator at tens of μN and thus plays a main role in improving the reliability of biological cell injection tasks.

1. 서 론

최근 바이오 분야에 대한 관심이 고조되고, 다양한 과학기술분야의 접목이 시도되는 동향에도 불구하고, 기존의 불임시술 IVF(In Vitro Fertilization)에 사용되어 왔던 ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection)와 같은 세포조작시스템은 현미경을 통해 얻는 시각 정보만을 사용하여 매니플레이터를 조작자가 수동으로 조작하고 있다. 따라서, 이러한 기존의 배아복제, 유전자발현 등의 의학 및 생명공학 분야에서의 세포 조작 작업은 조작자의 경험에 의존하여 이뤄짐으로써 효율성

및 생산성이 많이 떨어졌다.⁽¹⁻³⁾ 한편, 생체 세포는 형상이 불균일하고, 조작시 쉽게 변형이 되며, 손상되기 쉽다.⁽¹⁾ 보통 액체상태에서 세포를 조작해야 하는데, 이는 미세 피펫 조작시 유동(flow)에 의한 외란 등이 발생하는 불안정한 작업환경이라 작업시 상당한 숙련성과 주의가 요구된다.^(5,6) 따라서, 조작 세포의 형상, 세포막의 물리적 특성, 발생분화단계, 액체환경 등을 고려한 자동화된 세포조작 방법이 필요하다.

세포조작 시스템의 자동화와 관련된 선행연구 사례를 보면, Tan 과 Ng⁽¹⁾는 압전 구동 액추에이터를 이용한 세포조작시스템을 개발하였고, 컴퓨터를 통한 페루프 제어를 시도하였다. Yanagida *et al.*⁽²⁾은 압전 구동 마이크로 매니플레이터를 ICSI 시스템에 통합하여 인간의 난자세포 조작 작업에 유용함을 검증하였다. Nakayama *et al.*⁽³⁾은 압전 구동 매니플레이터를 이용하여 IVF 작업 효율을 향상시킬 수 있음을 실험결과를 통해 증명하였다. Sun 과 Nelson⁽⁶⁾은 조작 대상인 난자세포와

† 책임저자, 회원, 한국과학기술연구원

E-mail : bkim@kist.rekr

TEL : (02)958-6730 FAX : (02)958-6910

* 한국과학기술연구원 마이크로시스템센터

미세피펫 끝단의 특징형상을 광학현미경의 비전인식 정보를 이용하여 추정하고, 페루프 위치제어할 수 있는 세포조작 시스템을 개발하였다.

세포 조작 작업에 성공적으로 사용되기 위한 엔드 이펙터 필요조건을 정리해 보면 중량 대비 높은 힘 출력, 높은 정밀도, 피드백 센싱 기능이 있다. 그러나, 기존에 개발된 대부분의 세포조작용 미세피펫에 힘센서를 통합하여 조작력을 센싱하기에는 제한이 있고, 실제적으로 세포조작 시스템에서 센서정보에 기반한 조작이 제대로 이뤄지지 못했다. 따라서, 본 연구에서는 힘센싱이 가능한 세포 조작용 엔드이펙터(end-effector)를 개발하여 세포 인젝션 작업시에 세포막을 투과(penetration) 하는 힘정보를 실시간으로 조작자에게 전달하므로써 작업자의 편의성과 작업속도를 높일 수 있도록 하였으며, 이를 통하여 세포 최소 침습 인젝션 (minimally invasive injection)이 가능토록하여 궁극적으로 세포에 물리적인 해(damage)를 줄이고 발생 성공률을 높일 수 있을 것으로 기대된다. 센싱 메커니즘은 PVDF 압전폴리머 센서를 이용한 센서부와 미세 피펫, 캐필러리 홀더(capillary holder)로 구성하였다. 실제로 제브라피쉬 난자세포 (zebrafish embryonic cell) 조작 시 조작시스템에 통합하여 세포 인젝션 시 실시간으로 역각 피드백을 하는 실험을 수행하여 유용성을 검증하였다.

2. 세포조작력 측정센서

2.1 1-D 압전폴리머 센서

본 연구에서는 세포조작력 측정을 위해 PVDF (Poly VINYLIDENE FLUORIDE) 압전폴리머 센서(LDT1-028K, MSI Inc)를 이용하였다. 다른 압전재료와 마찬가지로 기계적인 접촉에 의한 압력, 음향 및 열에 의해 전기적인 신호를 발생하게 된다.⁽⁷⁾ 상용 스트레인 게이지 센서와 비교할 때 특히 선형성이 좋고, 넓은 대역폭을 지니며, 신호대 노이즈 비(S/N 비)가 높아 세포침습력 측정과 같은 고정밀도를 요구하고 민감한 계측분야에서 신뢰성이 높다.^(8,9)

이러한 특성을 활용하여 Fig. 1 에서 보는 바와 같이 미세피펫을 부착한 PVDF 센서를 고정지그(clamping fixture)에 탑재한 생체세포 조작 엔드이펙터를 제작하였다.

2.2 캘리브레이션 실험

Fig. 2 에서 보는 바와 같이 캘리브레이션을

위해 실제 세포를 침습하기 위한 미세 피펫을 PVDF 필름의 끝단에 부착하고, 초정밀 로드셀 (모델: GSO-10, Transducer technique)에 수직인 방향으로 일정한 선형적 힘을 인가 시 발생하는 로드셀의 출력 신호와 PVDF 센서의 출력신호를 측정하여 비교하였다. 센서의 출력신호는 실제 세포력 측정 실험시의 조건과 동일하게 전하증폭기 (모델: KISTLER 5015A) 회로를 거쳐서 저주파역 필터를 사용하여 잡음을 제거한 후 DAQ 보드 (모델: dSPACE 1103) 로 전달되어 획득된다. PVDF 경우 동적 특성이 강하여 주파수가 다를 경우 PVDF 센서의 출력 전압 신호는 다르게 나타날 수 있으나 연구 대상으로 하는 배아세포의 침습 작업은 보통 1 Hz 내외에서 수 Hz 의 작동범위(range)를 가지므로 이러한 캘리브레이션 방법은 실제 실험시의 작동범위 안에서 역시 유효하다.

실험결과 Fig. 3 에서 보듯이 유리 미세 피펫이 부착된 PVDF 센서에서의 출력전압이 인가되는 외력에 비례해서 선형적으로 증가되는 것을 알 수 있으며, 측정된 범위에서의 분해능은 14.5 mN/V 이다.

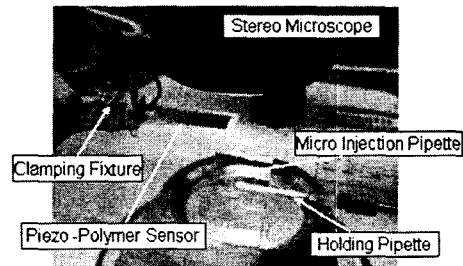


Fig. 1 1-D PVDF force sensing system.

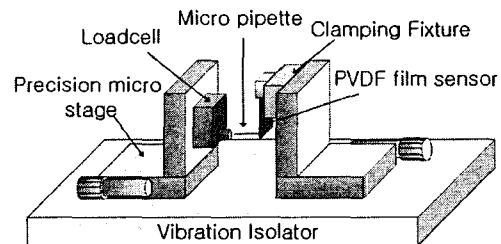


Fig. 2 Experimental setup for calibrating PVDF sensor

3. 바이오매니플레이션 시스템

3.1 바이오매니플레이션 시스템 구성

Fig. 4 는 힘반향이 가능한 세포조작 시스템을 나타내고 있다. 시스템의 구성은 기존의 ICSI 와 같은 세포조작을 위한 시스템을 기반으로 사용자의 조작 능력 향상을 위한 힘반향 기반의 센서를 장착하여 세포조작시의 미세한 힘을 사용자에게 피드백 할 수 있도록 하였다. 세포 조작 시스템은 분산형 8 자유도로서, 세포고정용 3 자유도 미동 매니플레이터, 세포인젝션용 3자유도 미동 매니플레이터, 2자유도 x-y 스테이지, 고정 피펫 및 인젝션 피펫으로 구성되어 있다. 또한 스테레오 현미경, 작업자에게 힘 반향 정보를 제공하는 햅틱 디바이스(모델: 6 자유도 PHANTOM 1.5 Premium, SensAble Technologies, Inc.)로 구성하였다. 제작한 세포조작용 엔드이펙터는 인젝션용 매니플레이터(분해능 0.5um)에 부착된 캐필러리홀더에 연결이 가능하게 설계 제작하여

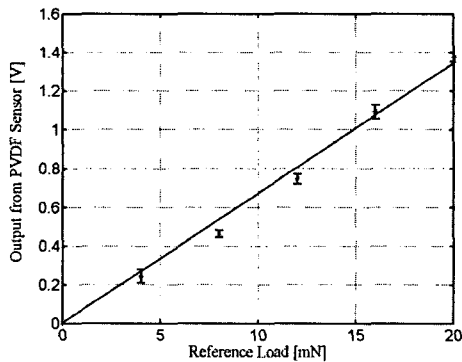
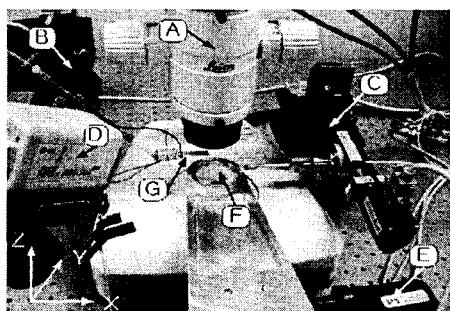


Fig. 3 Calibration result of PVDF force sensor for load input



A: Optical Stereo Microscope
 B: Micromanipulator (injector pipette)
 C: Micromanipulator (Holder pipette)
 D: Global Camera
 E: X-Y Stage
 F: Petridish
 G: PVDF Force Sensor

Fig. 4 Experimental setup for cellular force sensing

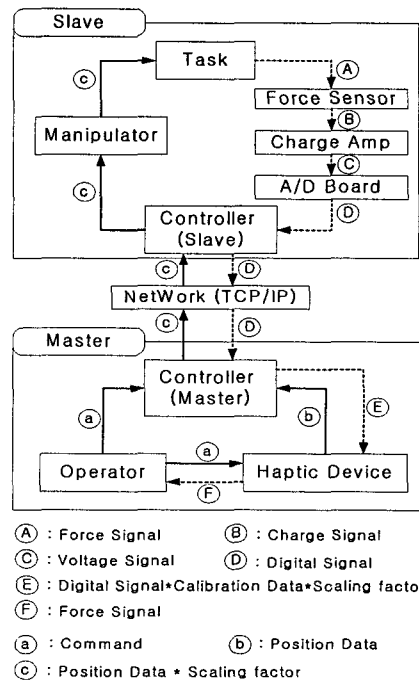
세포조작 시스템에 통합하였다.

3.2 힘반향을 위한 햅틱 인터페이스

Fig. 5 에 도시한 바와 같이 주제어기-종제어기 기반의 마이크로 원격조종 시스템에 의해 세포조작 제어가 이뤄진다. 주제어기는 사용자 인터페이스, 햅틱 디바이스, 햅틱 제어기로 구성되어 있으며 세포조작에 있어 작업자의 교시명령을 생성하여 전달하는 역할을 한다.

종속제어기는 세포 조작용 분산형 8 자유도 매니플레이터, 고정용 피펫 및 힘센서가 통합된 침습용 피펫, 비전 시스템으로 구성되어 있다. 종속제어기는 상위제어기와 하위제어기로 분류되는데, 상위제어기는 주제어기에서 TCP/IP 네트워크 전송방법을 통해 전달된 x, y, z 방향의 작업자의 개루프 교시(teaching) data 명령에 의거한 원격제어기이며, 하위제어 기는 매니플레이터 내부적으로 정밀도를 높이기 위한 PID 제어를 사용하였다. 이러한 종속제어기를 통해 작업자가 의도한 조작 작업을 수행함과 동시에 작업환경의 비전, 힘 센싱 정보를 주제어기를 통해 작업자에게 전달해 주는 기능을 수행한다.

예를 들어, 힘센서가 통합된 침습용 피펫형태의 엔드이펙터가 센싱한 힘의 정보는 작업자에게 햅틱 디바이스를 통해 전달된다. 세포 조작시



(A) : Force Signal (B) : Charge Signal
 (C) : Voltage Signal (D) : Digital Signal
 (E) : Digital Signal*Calibration Data*Scaling factor
 (F) : Force Signal
 (a) : Command (b) : Position Data
 (c) : Position Data * Scaling factor

Fig. 5 Block diagram of force feedback-based biomanipulation system

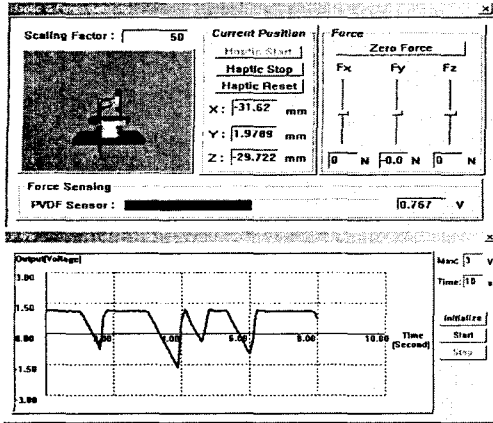


Fig. 6 Graphic user interface for force feedback-based biomanipulation

엔드이펙터와 세포 사이에 작용되는 힘은 힘 센서의 변위로 나타나며, 이 변위는 힘 센서에서 전하 신호로 출력된다.

힘 정보를 가지고 있는 전하 신호는 전하 증폭기에서 전압 신호를 바뀐 후, A/D Board 에서 디지털 신호로 변경된 후 중속 제어기에서 주 제어기로 전송 된다. 주 제어기에서는 전송 받은 신호에 캘리브레이션 상수(factor) 값을 곱함으로써 전압 신호를 힘 신호 변경하고, 이 신호에 비례 상수를 곱함으로써 작업자가 느낄 수 있는 힘으로 증폭하여 햅틱 디바이스를 통해서 작업자에게

힘 정보를 제공한다. 또한, 본 연구에서는 사용자에게 세포 침습시 힘의 정보를 햅틱 피드백을 통해서 뿐만 아니라 Fig. 6와 같이 그래픽 유저 인터페이스(Graphic User Interface: GUI)를 통하여 시각적으로 전달함으로써 조작시의 편의를 도모하도록 하였다.

4. 실험결과

4.1 실험 대상

본 연구에서 제작한 힘센싱이 가능한 바이오 엔드 이펙터를 세포조작시스템에 통합하여 비전과 햅틱 인터페이스를 이용한 힘 반향(force feedback) 정보기반의 제브라피쉬 (zebrafish) 난자세포 조작실험을 수행하였다.

제브라피쉬는 척추동물로 인간의 유전자와 유사하여 유전학 및 세포발생학 연구의 중요한 모델로 활용되고 있다.⁽¹⁰⁾ 제브라피쉬는 알을 많이 낳고, 번식이 빨라 (세포조작 후 48시간) 발생속도가 매우 신속하여 돌연변이 유기가 용이하다. 또한, 세포 구조가 매우 투명하여

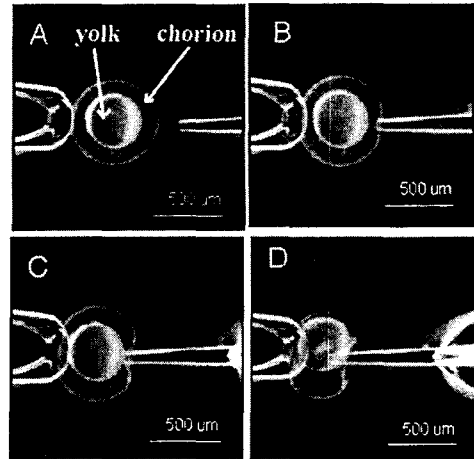


Fig. 7 Micro injection of a zebrafish egg cell

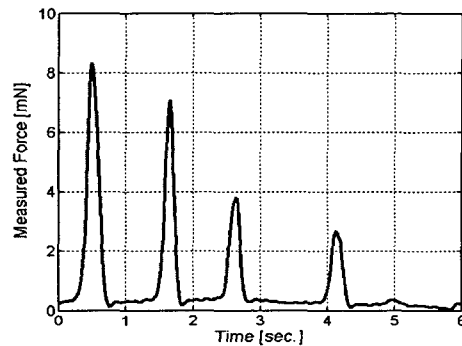


Fig. 8 Experimental result of mechanical injection of a zebrafish egg in blastula stage

각각의 발생단계를 명확히 구분할 수 있다. 현미경을 통해 관찰한 난자세포의 구조는 세포막(chorion)과 난향막 (outer membrane of yolk)으로 구성되어 있고, 직경은 약 700 um 이다.

4.2 실험 결과

Fig. 7 제브라피쉬 난자세포를 인젝션하는 일련의 과정을 나타내고 있다. Fig. 7에서 보듯이 비전정보 피드백을 받으며 인젝션 미세 유리 피펫이 3자유도 매니플레이터의 조종에 의해 부드럽게 세포막에 접근한다 (A과정). 그 다음, 햅틱 인터페이스를 통해 힘반향을 느끼며 1차적으로 세포막을 뚫고 깊이 들어가고 (B과정), 내부의 난향막에 접촉하여 뚫기 시작한 뒤 (C과정), 힘을 좀더 작용하여 난향막내의 핵막을 깊이 뚫는다 (D과정). 대부분의 핵 제거, 핵치환, DNA 주입과 같은 생체의료 분야의 세포조작 작업은 상기와 같은 일련의 조작 과정에 의해 이루어지고 있으며, 본 연구에서는 세포조작시

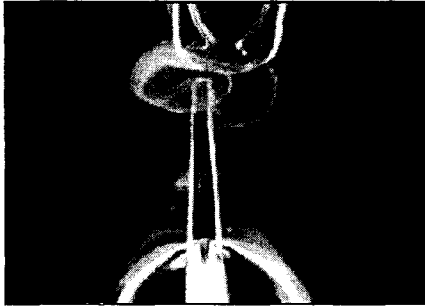


Fig. 9 Rupturing of a zebrafish egg cell during injection task

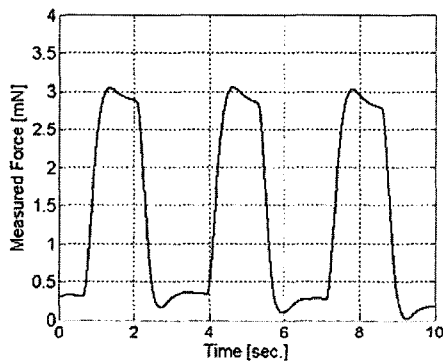


Fig. 10 Experimental result of repeated controlled injection tasks

침습력을 실시간으로 측정할 수 있는 기능을 구현하여 검증하였다.

Fig. 8는 실제 포배기(blastula) 상태의 난자세포를 인젝션하여 세포막을 투과할 때 발생하는 힘 반향 정보를 나타내고 있다. 인젝션용 매니플레이터의 속도에 따라 인젝션 피펫이 세포막을 투과할 때 필요한 힘이 다르다. 매니플레이터의 속도제어를 통해 다양한 인젝션력을 인가한 결과, 인젝션 작업시 난자세포막을 투과하기 위해서 수 mN 정도의 힘이 요구됨을 알 수 있다. 난자세포는 표면막이 약해서 조작시 쉽게 변형이 되고, 손상되기 쉽다. Fig. 9는 인젝션 실험시 과도한 힘을 인가한 경우 난자세포막이 물리적으로 파괴(rupturing)되는 경우를 관찰한 것이다.

이러한 결과를 통해 세포조작 작업시 난자세포막에 최소한 침습을 가하기 위해 힘 피드백 및 최적의 힘제어가 필요함을 알 수 있다. 본 연구에서 구현한 세포침습력 측정기구를 통해 추후 세포막의 최소침습을 위한 힘측정 실험을 수행할 예정이다.

Fig. 10 은 제작한 세포조작 엔드이펙터가 미리

프로그램된 위치를 추적하며 난자세포막, 난향막에 반복적으로 기계적인 인젝션을 가했을 때 침습력 센싱 신호를 측정된 결과이다. 일련의 반복적인 실험에도 재연성 있는 결과임을 알 수 있으며, 신호대 노이즈 비가 우수하고 침습력의 역각 피드백을 조작자에게 줄 수 있는 민감한 센서 신호임을 확인하였다. Fig. 10 의 결과에서 시간이 경과하고 침습이 반복될수록 센서의 출력신호 값이 조금씩 변동되는 현상이 관찰되는데, 매니플레이터의 반복정밀도의 한계와 침습이 반복될수록 세포막에 손상이 가해져서 물성이 변하는 이유에 기인한다. 세포침습실험은 세포배양액 내부상태에서 uN 정밀도의 측정을 요구하는 실험이므로 환경조건 (진동, 환기, 온도, 습도, 세포 배양액 PH) 및 시스템 조건 (피펫의 직경, 매니플레이터의 정밀도) 에 따라 실험결과가 민감하게 변동된다. 따라서, 엄밀한 실험조건에의 조절이 중요하며 각각의 실험조건에 따른 신뢰성 있는 실험결과를 측정하여 통해서만 세포물성에 대한 규명이 가능하다.

5. 결론

본 연구에서는 센싱이 가능한 바이오 세포 조작용 엔드이펙터를 개발하여 세포 조작시 발생하는 침습력을 실시간으로 측정할 수 있도록 하였다. 센싱 메커니즘으로서 PVDF 압전폴리머센서와 미세 피펫, 및 캐필러리 홀더로 구성되어 있다. 실제 센싱 메커니즘을 제작하고 햅틱 인터페이스를 통해 세포조작시에 역각 피드백을 하는 실험을 수행하였다.

본 연구를 통해 도출해 낼 수 있는 결과는 두 가지로 요약 될 수 있다. 첫째, 조작자의 수동 작업으로 이루어지던 기존의 세포 조작 방법을 개선하여 세포 침습시의 힘의 반력을 센싱하고 피드백 함으로써 세포 조작 시스템의 신뢰성 향상에 기여가 가능하다. 둘째, 세포 침습시 세포막 외벽을 투과할 때 얻어지는 힘의 정보를 분석하여 최소침습을 위한 인젝션 시의 속도와 최적의 힘을 결정짓는데 기여하여 세포에 물리적 해를 적게 주고, 발생율을 높일 수 있는 발생학적인 부분이다.

후기

본 연구는 과학 기술부 21 세기 프론티어 연구

개발 사업인 지능형 마이크로 시스템 개발 사업 (<http://www.microsystem.re.kr>)의 연구비 지원을 받아 수행되었음; 과제협약 번호 MS-02-324-01.

참고문헌

- (1) Tan, K. K. and Ng, S. C., 2001, "Computer-Controlled Piezo Micromanipulation System for Biomedical applications," *Engineering Science and Education Journal*, pp.249~256.
- (2) Yanagida, K., Katayose, H., Yazawa, H., Y., Kimura, K., and Sato, A., 1998, "The Usefulness of a Piezo-Micromanipulator inintracytoplasmic Sperm Injection in Humans," *Human Reproduction*, Vol.14, No.2, pp.448~453.
- (3) Nakayama, T., Fujiwara, H., Tastumi, K., Fujita, K., Higuchi, T., and Mori, T., 1998, "A New Assisted Hatching Technique Using a Piezo-Micromanipulator," *Fertility and Sterility*, Vol.69, No.4.
- (4) Menciassi, A., Scaliari, G., Eisinger, A., Anticoli, C., Francabandiera, P., Carrozza, M.C., and Dario, P., 2001, "An Instrumented Probe for Mechanical Characterization of Ssoft Tissues," *Biomedical Microdevices*, pp. 149~156.
- (5) Kimura, Y., Yanagimachi, R., 1995, "Intracytoplasmic Sperm Injection in the Mouse," *Biology of Reproduction*, vol. 52, no. 4, pp. 709~720.
- (6) Sun, Y., and Nelson, B. J., 2001, "Microrobotic Cell Injection," in *Proceedings of IEEE International Conference on Robotics and Automation*, Seoul, Korea, Vol. 1, pp. 620~625.
- (7) Fung, C. K. M., Elhaji, I., Li, W. J., and Xi, N., 2002, "A 2-D PVDF Force Sensing System for Micromanipulation and Microassembly," in *Proceedings of IEEE International Conference on Robotics and Automation*, Washington DC, USA, pp. 1489~1494.
- (8) Dargahi, J., 2000, "A Piezoelectric Tactile Sensor with Three Sensing Elements for Robotic, Endoscopic and Prosthetic Applications," *Sensors and Actuators*, Vol.80, pp.23~30.
- (9) Nam, Y. S., and Sasaki, M., 2002, "Strain Rate Self-Sensing for a Cantilevered Piezoelectric Beam," *KSME International Journal*, Vol.16, No.3, pp.310~319.
- (10) Lewis, W., Rosa, B., Peter, L., Elliot, M., Jim, S., and Thomas, M. J., 2002, *Principles of development*, Oxford University Press, 2nd edition.