

< 논문 >

유체동역학적 유전영동법을 이용한 극소형 연속 세포분리기

도 일* · 조 영 호*
(2004년 6월 21일 접수, 2004년 12월 2일 심사완료)

A Continuous Cell Separation Chip Using Hydrodynamic Dielectrophoresis Process

Il Doh and Young-Ho Cho

Key Words: Dielectrophoresis(유전영동), Hydrodynamic Process(유체동역학적과정), Continuous Cell Separation(연속세포분리)

Abstract

We present a high-throughput continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process. The continuous cell separation chip uses three planar electrodes in a separation channel, where the positive DEP cells are moved away from the central streamline while the negative DEP cells remain in the central streamline. In the experimental study, we use the mixture of viable (live) and nonviable (dead) yeast cells in order to obtain the continuous cell separation conditions. For the conditions of the electric fields frequency of 5MHz and the medium conductivity of $5\mu\text{S}/\text{cm}$, the fabricated chip performs a continuous separation of the yeast cell mixture at the varying flow-rate in the range of $0.1\sim 1\mu\text{L}/\text{min}$.; thereby, resulting in the purity ranges of 95.9~97.3% and 64.5~74.3% respectively for the viable and nonviable yeast cells. present chip demonstrates the constant cell separation performance for varying mixture flow-rates.

기호설명

- r : 입자 반지름
 ϵ_m : 용액 유전율
 ϵ_p : 입자 유전율
 ϵ^* : 복소 유전율
 f_{CM} : Clausius-Mossoti 인자
 $\text{Re}[f_{CM}]$: Clausius-Mossoti 인자의 실수부
 σ : 전도도
 ω : 인가 전기장 주파수

1. 서론

최근 현장 검진(point-of-care diagnostics), 병원균 검출, 환경감시 및 신약 개발 등 생의학 연구를 위하여 집적화된 생물학적 분석 시스템 개발에 관한 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 분석 시스템을 구성하는 핵심요소 중 하나는 분석 시료의 전처리를 위한 세포분리기이다.

일반적인 세포분리 방식은, 크게 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)⁽¹⁾와 같이 형광 물질을 이용하여 서로 다른 세포를 분리하는 방식과 유전영동(dielectrophoresis, DEP)⁽²⁻⁵⁾을 이용한 분리방식으로 나눌 수 있다. 유전영동 방식은 표식과정(labeling process)이 필요치 않고, 분석 시스템의 다른 요소들과 동일한 제작방법으로 손쉽게

* 책임저자, 회원, 한국과학기술원 바이오시스템학과 및 기계공학과, 디지털나노구동연구단

E-mail : nanosys@kaist.ac.kr

TEL : (042)869-8691 FAX : (042)869-8690

* 한국과학기술원 바이오시스템학과, 디지털나노구동 연구단

제작될 수 있기 때문에, 미소분석시스템에서의 세포 분리에 널리 적용되어 왔다. 또한, 유전영동은 세포 구성물의 전도도(conductivity), 유전율(permittivity), 막막(membrane)특성 등 세포 자체 특성의 차이에 근거를 둔 분리방식⁽²⁾이기 때문에, 다양한 세포의 분리에 적용이 가능하다는 장점이 있다.

그러나 기존의 유전영동을 이용한 세포분리기⁽³⁾는 세포혼합물을 미소밸브에 의해 불연속적으로 주입하여 분리하는 과정을 반복하는, 유체정역학적(hydrostatic) 불연속 세포분리 방식이었다. 이러한 유체정역학적 불연속 세포분리 방식은 미소밸브와 같은 부가적인 미소유체 요소의 집적이 필요하고, 분리해야할 세포수의 변화에 따라 세포 분리의 크기 및 분리전극의 면적이 변화가 필요하다는 단점이 있다.

본 연구에서는 Fig. 1에서와 같이 유체동역학적(hydrodynamic) 방식의 유전영동을 이용하여 미소밸브에 의한 세포혼합물의 불연속적인 단속없이 연속적이고도 고속 분리가 가능하며, 분리해야할 세포수의 변화에 따라 세포분리의 크기나 전극 면적의 변화없이 공급하는 세포혼합물의 유량을 변화시킴으로써 세포의 용량변화를 수용할 수 있는 새로운 형태의 세포분리기를 제안한다.

2. 이론적 고찰 및 설계

유전영동(Dielectrophoresis)은 불균일한 전기장에 의한 세포 등 입자들의 이동⁽²⁻⁵⁾을 이용한다. 용액속의 입자들이 불균일한 전기장 하에 있을 때, 입자들의 표면에서 전기장의 방향을 따라 전하가 유도되어 입자의 분극화가 일어난다.

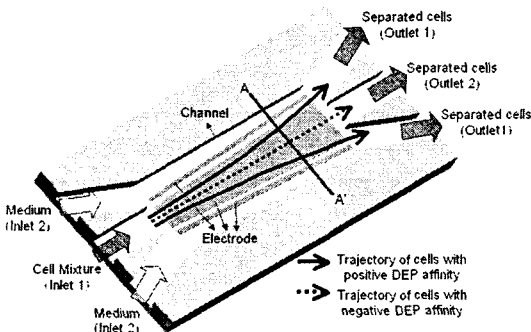


Fig. 1 Conceptual view of hydrodynamic continuous cell separation process

이때, 인가 전기장이 균일하다면, 분극화된 입자의 좌우에서 작용하는 정전기력의 크기는 서로 같기 때문에 입자에 작용하는 합력(net force)은 0이 되어 입자는 이동하지 않는다. 하지만, 입자에 작용하는 전기장이 불균일한 경우에는, 입자에 작용하는 정전기력의 크기가 서로 다르기 때문에 입자는 Fig. 1에서와 같이 전기장의 구배에 따라 병진운동을 하게 된다.

만약 입자의 분극성(polarizability)이 입자 주위를 둘러싼 용액의 분극성보다 클 경우, 입자의 표면에 유도되는 전하의 분포는 Fig. 2(a)에서와 같이 되고, 따라서 입자가 받는 합력의 방향은 오른쪽 방향이 된다. 결국 입자는 전기장이 강한 곳으로 이동하게 된다. 이러한 경우, 입자는 양의 유전영동 친화도(positive DEP affinity)특성을 갖는다고 한다.

반대로 입자의 분극성이 용액의 분극성보다 작을 경우에는 Fig. 2(b)에서와 같이 반대의 표면 전하가 형성되어, 입자가 받는 합력은 전기장의 세기가 약한 왼쪽 방향으로 작용하게 된다. 이 경우, 입자는 음의 유전영동 친화도(negative DEP affinity)를 갖는다고 한다.

일반적으로, 이러한 세포의 분극성⁽⁴⁾은 세포구성 물질과 세포의 표면성질 그리고 세포 주변의 용액물질 등에 의해 결정된다. 따라서 서로 다른 종류의 세포혼합물 또는 같은 종류의 세포 내에서도 서로 다른 생리학적 상태의 세포혼합물은 유전영동에 의해 손쉽게 분리 가능하다.

이러한 유전영동에 의해 입자가 받는 정전기력의 평균값^(2,5)은 다음과 같다.

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re}[f_{CM}] \cdot \nabla |E_{rms}|^2 \quad (1)$$

위 식에서, r 은 입자의 반지름, ϵ_m 은 용액의 유전율(permittivity), f_{CM} 은 Clausius-Mossoti 인자,^(3,4) E_{rms} 는 인가 전기장의 rms(root mean square)값을 말한다. $\text{Re}[f_{CM}]$ 은 다음과 같은 Clausius-Mossoti 인자의 실수부의 값을 일컫는다.

$$f_{CM} = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (2)$$

위 식에서 ϵ^* 은 복소 유전율($\epsilon^* = \epsilon - j\sigma/\omega$, σ 와 ω 은 각각 전도도와 인가전기장의 주파수)이다. 아

래첨자 p 와 m 은 각각 입자와 용액을 일컫는다. $Re[f_{CM}]$ 가 양수를 갖는 경우는, 식 (1)에서 보듯이, 입자에 가해지는 합력의 방향이 전기장 구배의 방향과 같기 때문에 전기장이 강한 방향으로 이동하는 양의 유전영동 상태를 의미하고, 반대로 $Re[f_{CM}]$ 이 음수일 때는 합력의 방향이 전기장 구배의 방향과 반대가 되어 입자는 전기장이 약한 방향으로 이동하는 음의 유전영동 상태를 의미한다.

Fig. 1은 유체동역학적 유전영동을 이용한 극소형 연속 세포분리기의 구조와 연속적인 세포분리 과정을 나타내는 개념도이다. 본 연구에서 제안한 연속적인 세포분리기는 하나의 미소 유로와 유로 바닥면에 유로 길이 방향으로 배치된 3개의 평면 전극으로 구성되어 있다. 본 세포분리기의 유입구로 공급되는 서로 다른 유전영동 친화도를 가지는 세포혼합물은, 완충용액에 의해 Fig. 1에서와 같이 미소 유로의 중앙선으로 유도된다. 세포혼합물은 유로를 따라 흐르면서 다수의 평면 전극에 의해 형성된 불균일 전기장으로 인해 서로 다른 방향의 유전영동 힘을 받아 서로 분리되어 각기 다른 출구로 배출된다.

Fig. 2와 같은 3개의 평면 전극은 미소 유로의 길이방향과 수직인 방향으로 불균일 전기장을 형성한다. 평면 전극에 의한 분리유로내의 전기장 분포는 Fig. 3과 같이 유로 단면 중앙에서 전기장의 최저점이, 유로의 중앙에서 좌우로 벗어난 지점에서 전기장의 최고점이 형성된다. 따라서 양의 유전영동 친화도를 갖는 세포들은 분리유로를 따라 흐르면서 유로의 중앙유선으로부터 벗어나게 되어, 중앙유선을 따라 흐르는 음의 친화도를 갖는 세포들로부터 연속적으로 분리된다.

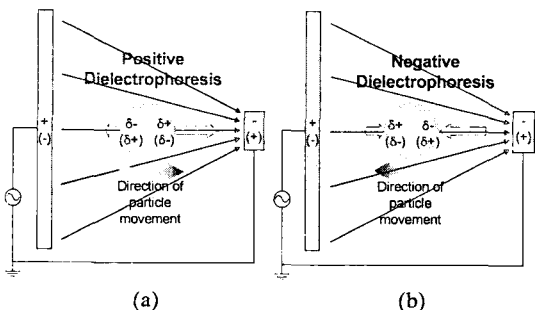


Fig. 2 Direction of cell movement depending on DEP affinity: (a) cells in positive DEP affinity; (b) cells in negative DEP affinity

3. 제작공정

본 세포분리기의 제작공정은 Fig. 4에 도시한 바와 같이 전극이 형성된 유리기판의 제작, PDMS(PolyDiMethyl-Siloxane)를 이용한 미소 유로의 제작, 제작된 유리 기판과 PDMS 유로의 접합 등의 세 가지 단계로 이루어진다.

먼저 전극이 형성된 유리기판 제작을 위해 Pyrex 웨이퍼 위에 전극으로 사용될 Cr과 Au를 각각 200Å과 1000Å 두께로 증착한 후, 이들 금속박막을 습식식각 하여 전극을 형성하였다. 미소 유로는 실리콘 웨이퍼 위에 형성된 50μm 두께의 SU-8 PR(PhotoResist) 패턴을 이용하여 PDMS를 마이크로 몰딩기법을 이용하여 제작되었다. 제작된 유리 기판과 PDMS 미소 유로를 대기 플라즈마에 10초 동안 30W의 RF Power 상태에서 처리한 후 접합하여 시편의 제작을 완료하였다. Fig. 5는 제작이 완료된 시편과 미소유로의 확대 사진이다.

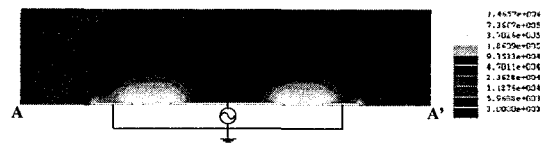


Fig. 3 Numerical simulation of the electric field over the three electrodes at the cross-section, A-A', of Fig. 1

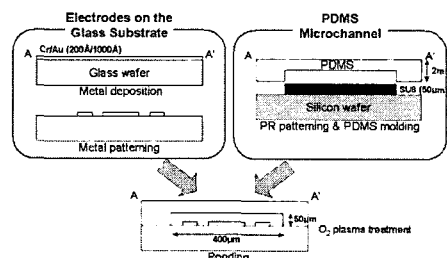


Fig. 4 Fabrication process of the cell separation chip, showing the cross-section, A-A', of Fig. 1

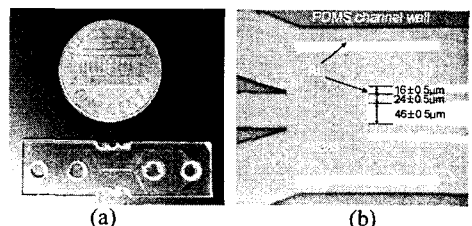


Fig. 5 Fabricated continuous cell separation chip: (a) overall view; (b) enlarged view and electrode dimensions

4. 실험 및 결과

4.1 시료 준비

본 논문에서는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) 세포를 시료로 사용하여, 활성(viable)효모와 비활성(nonviable)효모의 혼합물을 사용하여 분리 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 효모는 30°C에서 24시간 동안 배양하여 탈이온수에 4번 세척(washing)하였다. 용액의 전도도는 소량의 염화나트륨(NaCl)을 첨가하여 조절하였다. 비활성효모는 배양된 효모를 90°C에서 20분 동안 열처리를 통하여 얻은 후 탈이온수에 세척하였다. 효모의 활성도는 메틸렌블루(methylene blue) 염색⁽⁶⁾을 통하여 가시화하였다. 메틸렌블루 염색에 의해 활성효모는 염색되지 않지만, 비활성효모는 염색되어 파란색을 띤다.

4.2 실험장치

실험장치의 구성은 Fig. 6(a)에 도시한 바와 같다. 세포혼합물과 완충용액은 주사기펌프(KDS 200)를 사용하여 공급하였다. 세포분리 과정은 현미경과 연결된 CCD 카메라로 관찰하였다.

전기신호 인가시 전극에 의한 세포 포획(trapping)을 방지하기 위하여, Fig. 6(b)처럼 주기적으로 교류 신호를 단속 제어하였다. 이 경우, 주기의 절반 동안은, 세포에 작용하는 유전영동 힘이 없기 때문에 세포가 전극에 포획되지 않고 유체를 따라 흐를 수 있다.

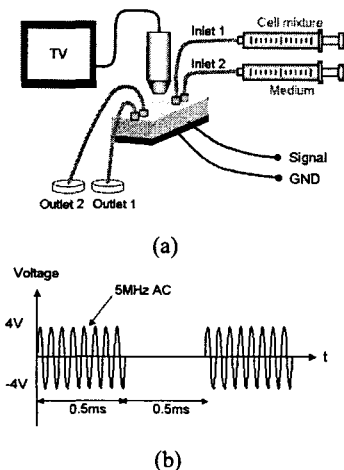


Fig. 6 Continuous cell separation test: (a) Experimental apparatus; (b) Switched AC signal

4.3 예비실험

연속적인 분리를 위한 조건을 얻기 위하여, 용액의 전도도와 인가 전기장의 주파수에 따른 활성효모와 비활성효모의 유전영동 친화도를 관찰하였다. 일례로, Fig. 7은 용액의 전도도를 5 μ S/cm로 고정한 상태에서 인가 전기장의 주파수를 변경하면서 활성효모와 비활성효모의 친화도를 관찰한 사진이다. 활성효모의 경우 10kHz [Fig. 7(a)]와 5MHz [Fig. 7(b)]에서 모두 양의 친화도를 보이는데 비하여, 비활성효모는 10kHz [Fig. 7(c)]에서는 양의 친화도를 보이고 5MHz [Fig. 7(d)]에서는 음의 친화도를 보임을 확인할 수 있다. Table 1에서는 세 가지 서로 다른 용액 전도도(5, 30 and 78 μ S/cm)에 대한 예비실험 결과와 two-shell 모델⁽⁹⁾에 의해 이론적으로 예측된 결과를 서로 비교하여 나타내었다. 이론적으로 예측된 값과 측정값이 대부분의 영역에서 잘 일치함을 확인할 수 있다. Table 1의 결과를 바탕으로, 5 μ S/cm의 용액 전도도와 5MHz의 전기장 주파수를 연속적인 효모혼합물의 분리를 위한 조건으로 결정하였다. 이 조건하에서 활성효모와 비활성효모가 서로 다른 유전영동 친화도를 보이고, 또한 용액의 전도도가 낮을수록 열 발생에 의한 세포의 피해를 최소화 수 있기 때문이다. Fig. 8은 이러한 조건하에서, 활성효모와 비활성효모가 서로 분리되는 상태를 나타낸다.

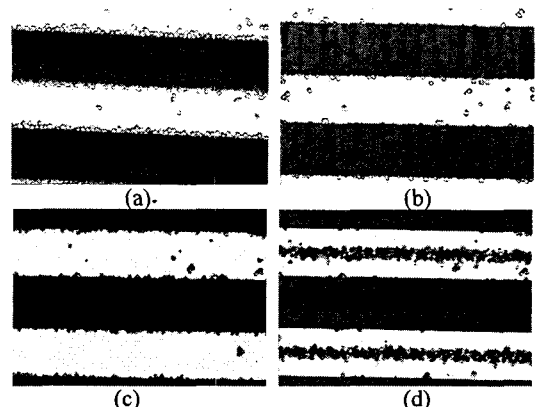


Fig. 7 Separation of viable and nonviable yeast cells by varying the electric field frequency at the sinusoidal potential of 8V_{p-p} across the electrode array of 50 μ m gaps immersed in the medium conductivity of 5 μ S/cm, where the brighter stripes are gold electrodes and the darker are glass substrate: (a) viable yeast cells at 10kHz; (b) viable yeast cells at 5MHz; (c) nonviable yeast cells at 10kHz; (d) nonviable yeast cells at 5MHz

4.4 연속적 세포분리

Table 2와 3은 각각 연속적인 세포분리 실험의 조건과 실험의 결과를 정리한 표이며, Fig. 9는 활성 및 비활성효모 혼합물이 미소 유로 내에서 연속적으로 분리되는 모습을 보여주는 사진이다. Fig. 10은 실험에 사용된 세포혼합물과 분리된 활성효모와 비활성효모의 현미경 사진이다. 분리된 활성 및 비활성효모의 순도는, 효모혼합물의 유량이 0.1~1 μ l/min 범위 내에서 각각 95.9~97.3%와 64.5~74.3%였으며, 10배의 유량에 대해 분리된 효모의 순도 변화는 거의 없음을 확인하였다. 하지만 분리된 비활성효모의 순도가 활성효모의 순도에 비해 낮음을 확인할 수 있는데, 이는 미소 유로를 가로지르는 활성효모의 이동이 비활성효모

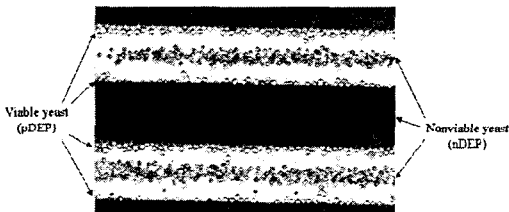


Fig. 8 Separation of viable and nonviable yeast cells by differential DEP affinity at the sinusoidal electric fields of 5MHz, 8V_{p-p} across the electrode array of 50 μ m gaps immersed in the medium conductivity of 5 μ S/cm

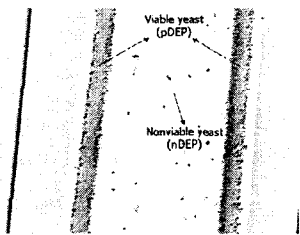


Fig. 9 Continuous separation of viable and nonviable yeast cells at the sinusoidal electric fields of 5MHz, 8V_{p-p} across the 20 μ m electrodes gaps at the medium conductivity of 5 μ S/cm and the mixture flow rate of 0.1 μ l/min

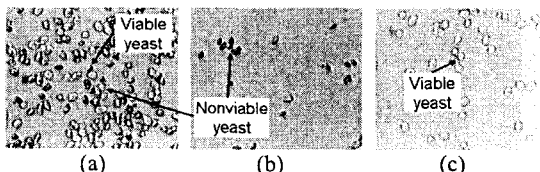


Fig. 10 Microscopic images of yeast cells: (a) yeast cells mixture; (b) separated viable yeast cells; (c) separated nonviable yeast cells

Table 1 Dielectrophoretic affinity* of viable and nonviable yeast cells, depending on the medium conductivity and the electric field frequency for the sinusoidal voltage of 8V_{p-p} across the electrodes with 20 μ m gaps

Medium conductivity of[S/cm]	Cells	Frequency of electric field, f [Hz]								
		1 kHz	5 kHz	10 kHz	50 kHz	100 kHz	500 kHz	1 MHz	5 MHz	10 MHz
5	Viable yeast	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Non-viable yeast	+	+	+	+	+	+	O	-	-
30	Viable yeast	-	-	O	+	+	+	+	+	+
	Non-viable yeast	+	+	+	+	+	+	O	-	-
78	Viable yeast	-	-	-	O	+	+	+	+	+
	Non-viable yeast	+	+	+	+	+	+	O	-	-

* □ positive (theoretical);
 □ negative (theoretical);
 + positive (experimental);
 - negative (experimental);
 O uncertain (experimental).

Table 2 Experimental conditions for cell separation

Cell mixture	Composition	Viable yeast : 62% Nonviable yeast : 38%
	Concentration	8 \times 10 ⁷ cells/ml
	Flow rate	0.1, 0.5, 1 μ l/min.
Medium conductivity		5 μ S/cm
Electric field frequency		5MHz
Electric voltage		8V _{p-p} (Sinusoid)
Electrode gap		20 μ m

Table 3 Experimental results of the cell separation

Flow rate of the cell mixture (throughput)	Purity* of the separated cells	
	Outlet1: Viable yeast (pDEP)	Outlet 2: Nonviable yeast (nDEP)
0.1 μ l/min 1.3 \times 10 ² cells/s	97.3 \pm 1.2%	72.7 \pm 3.4%
0.5 μ l/min 6.5 \times 10 ² cells/s	97.0 \pm 1.6%	74.3 \pm 5.9%
1 μ l/min 1.3 \times 10 ³ cells/s	95.9 \pm 1.3%	64.5 \pm 3.3%

*Purity is defined by the number of target cells over the number of total cells in each outlet.

에 의해 가로막혀, 분리된 비활성효모 속에 활성 효모가 포함되어 있기 때문인 것으로 생각된다.

5. 결 론

본 연구에서는 유체동역학적인 유전영동법을 이용하여 미소밸브에 의한 세포혼합물의 불연속적인 제어 없이, 연속적이고도 고속분리가 가능한 새로운 형태의 세포분리기를 제안하였다. 예비실험을 통하여 활성효모와 비활성효모의 분리 조건을 결정하였고, 이 조건에서의 연속적인 세포분리 실험을 통해 제안된 세포분리기는 세포혼합물의 유량이 0.1~1 μ l/min인 범위에서 활성효모와 비활성효모를 각각 95.9~97.3%와 64.5~74.3%의 순도로 분리할 수 있음을 확인하였다. 또한, 세포혼합물의 유량이 증가하여도 분리된 효모세포의 순도는 일정함을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 제안한 극소형 연속 세포분리기는 서로 다른 유전영동 친화도를 갖는 생화학적 미소입자 혼합물의 연속적이고도 고속분리가 가능하고, 집적화된 생물학적 분석시스템의 시료 전처리 및 분리기로의 적용이 가능하다.

후 기

본 연구는 과학기술부의 창의적연구진흥사업의 일환인 "생체모사기법을 응용한 디지털나노구동기관의 구현에 관한 연구" 과제의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- (1) Yang, J., Huang, Y., Wang, X.-B., Becker, F.F. and Gascoyne, P.R., 1999, "Cell Separation on Microfabricated Electrodes Using Dielectrophoretic/Gravitational Field-Flow Fractionation," *Analytical Chemistry*, Vol. 71, No. 5, pp. 911~918.
- (2) Markx, G.H. and Pethig, R., 1995, "Dielectrophoretic Separation of Cells: Continuous Separation," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 45, No. 4, pp. 227~343.
- (3) Huang, Y., Holzel, R., Pethig, R. and Wang, X.-B., 1992, "Difference in the AC Electrodynamics of Viable and Non-viable Yeast Cells Determined Through Combined Dielectrophoresis and Electrotation Studies," *Physics in Medicine & Biology*, Vol. 37, No. 7, pp. 1499~1517.
- (4) Hughes, M.P., 2002, "Strategies for Dielectrophoretic Separation in Laboratory-on-a-chip systems," *Electrophoresis*, Vol. 23, No. 16, pp. 2569~2582.
- (5) Yang, J., Huang, Y., Wang, X.-B., Becker, F.F. and Gascoyne, P.R., 1999, "Cell Separation on Microfabricated Electrodes Using Dielectrophoretic/Gravitational Field-Flow Fractionation," *Analytical Chemistry*, Vol. 71, No. 5, pp. 911~918.
- (6) Stoicheva, N.G., Davey, C.L., Markx, G.H. and Kell, D.B., 1989, "Dielectric Spectroscopy: A Rapid Method for the Determination of Solvent Biocompatibility during Biotransformations," *Bio-catalysis*, Vol. 2, pp. 245~255.