

회전하는 나선형 미니채널 카트리지를 이용한 미세입자 정렬

김수빈* · 비빈프라사드* · 김중경†

Alignment of Microbeads Using Spinning Helical Minichannel Cartridge

Subin Kim, Bibin Prasad and Jung Kyung Kim

Abstract Separation of particles based on different sizes, detection of pathogenic bacteria and isolation of leukocytes from whole blood are typical applications of spiral or helical microchannels. The present study focuses on developing a CD4+ T-cell counting device for monitoring HIV/AIDS patients with the aid of a helical minichannel used for a sample cartridge. For the experiment, 10 μm sized microbeads were used for visualization with a fluorescence imaging system. Alignment of microbeads was investigated in a stationary and spinning sample cartridge filled with glycerol-water mixtures of different densities. The helical minichannel was spun using a DC motor controlled by an Arduino board with a Bluetooth shield. It was found that when the sample cartridge was made stationary, no bead alignment was achieved for a medium with density (0% and 20% glycerol) lower than that of the beads, but when it was spun at 2000-3000 rpm for 1-4 min, an alignment was obtained at the top of the channel facilitating optical detection and enumeration of those microbeads. Since an alignment of microbeads was achieved for a medium with density as that of blood plasma, the same approach can be applied for aligning and counting CD4+ T-lymphocytes in whole blood samples collected from patients.

Key Words : Helical Minichannel(나선형 미니채널), Spin(회전), Centrifugal Force(원심력), Alignment(정렬), Microbead(미세입자)

1. 서론

HIV는 인체면역 결핍 바이러스로 후천성면역 결핍증세인 AIDS를 유발하는 바이러스이다. HIV/AIDS는 여전히 전 세계적으로 이슈가 되고

있는 질병이며 특히 아프리카의 주된 사망원인이 다.⁽¹⁾ HIV/AIDS 감염 후 진행 경과를 확인하는 것은 ART(antiretroviral therapy) 치료의 유효성을 평가하는데 사용된다. 따라서 HIV/AIDS의 표준검사법 중의 하나인 CD4+ 림프구의 농도를 적시에 측정하는 것이 ART 치료 시기와 경과를 확인하는데 중요하다.⁽²⁾ 그러나 현재 사용되고 있는 표준검사법인 유세포분석법은 장비가 고가이며 샘플 채취에서 결과획득 및 통보까지 시간이 오래 걸리므로 자원이 부족한 지역에서는 활용하기 힘들다. 최근에 이러한 문제를 해결하고자 소형화 구조로 유동

† School of Mechanical Systems Engineering,
Kookmin University, Seoul 02707, Korea
E-mail : jkkim@kookmin.ac.kr

* Department of Mechanical Engineering,
Graduate School, Kookmin University

현상을 관찰할 수 있는 마이크로유체공학 (microfluidics) 기반의 현장검사기가 활발히 개발되었으나 1회용 카트리지가 가격이 여전히 비싸고 적은 시료 양으로 인해 세포계수 결과의 정밀도가 낮다는 단점이 있다.⁽³⁻⁵⁾

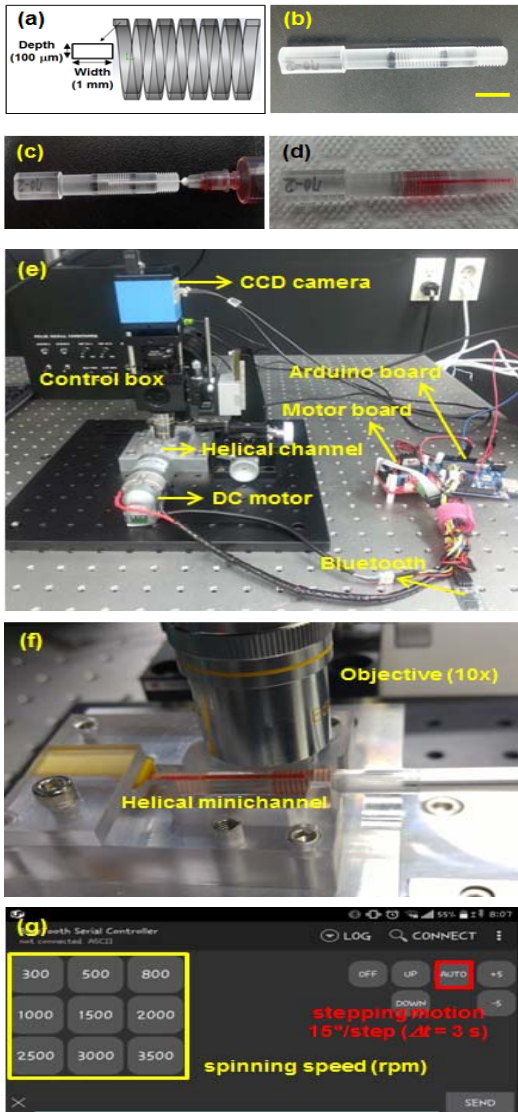


Figure 1. (a) 3D physical model of helical minichannel (b) Overall view of sample cartridge (scale bar = 10 mm) (c) Sample injection using a syringe (d) Helical minichannel filled with a red-colored sample solution (e) Fluorescence imaging setup and motor control system (f) Magnified view of helical minichannel cartridge (g) Smartphone application for motor control

카메라로 얻은 입자상 시료 영상을 분석하여 입자 농도를 측정하기 위해서는 일정한 부피의 시료를 담을 수 있는 샘플 카트리지가 필요하며, 입자 농도(개수/ μL) = (시료에 포함된 입자의 총 개수)/(시료 부피)로 계산된다. 일반적인 광학계의 초점깊이(depth of focus)를 고려하면 시료 검출부 채널의 높이는 $100 \mu\text{m}$ 이하로 제한되므로 시료 한 방울에 해당하는 $20\text{-}30 \mu\text{L}$ 를 담으려면 최소 $200\text{-}300 \text{mm}^2$ 이상의 면적이 필요하고, 저농도 시료 측정값의 통계적 유의성 확보를 위해 시료 부피를 증가시키려면 이 보다 더 큰 면적에 포함되는 시료를 촬영해야 한다. 따라서 필연적으로 시료 검출부 채널을 스캐닝하기 위한 2축 이상 장치가 설치되어야 한다. 모터 2개와 이상 스테이지는 차세대 휴대용 분석기인 스마트폰과 같은 모바일 기기에 장착하기에는 부피가 크고 2개의 모터 제어 및 구동을 위한 인터페이스 앱 개발 환경 및 배터리 용량이 아직은 충분히 지원되지 않고 있는 실정이다. 그러므로 모바일 기기를 분석기로 활용하는 차세대 현장검사기 개발을 위해서는 이에 특화된 새로운 형태의 샘플 카트리지가 고안되어야 한다.

최근 주목받고 있는 나선형 미세유동채널에서는 입자 및 세포의 크기에 따른 분리 기능을 구현할 수 있으므로 병원균 검출 및 전혈 중 백혈구 분리 등의 응용분야에 적용되고 있다.⁽⁶⁻⁸⁾ 본 연구진은 3차원 나선형 미니채널 기반의 시료 카트리지를 제작하여 일반적인 2차원 평면 채널 기반의 시스템과 다르게 2축 이상 스테이지를 사용하지 않고 DC 모터 1개를 이용하여 기구부 설계를 단순화 하였고 긴 나선형 채널을 따라 여러 장의 세포영상을 얻을 수 있는 시료 카트리지를 고안하였다.^(9,10) 최근에는 다양한 플라스틱 재질의 나선형 채널과 같은 볼트를 저렴하게 구할 수 있고 투명하므로 바이오/환경 입자상 시료를 분석하는 일회용 샘플 카트리지로 사용할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한 현재 상용화 되어 있는 현장검사기의 카트리지의 경우 약 $5 \mu\text{L}$ 의 시료를 분석하지만 긴 나선형 채널의 경우 채널 개수를 늘려 2배 이상의 시료를 분석하여 분석의 정확도를 향상시켰다. 개념증명 실험을 위해 CD4 림프구 대신

밀도와 크기가 유사한 형광입자를 사용하여 나선형 미니채널 카트리지의 고속회전 시 나타나는 입자 정렬 현상과 입자 계수 성능을 평가하였다.

2. 실험 장치 및 방법

2.1 나선형 미니채널 및 모터 제어 시스템

Fig. 1(a)는 3차원 나선형 미니채널의 모식도로 단면의 깊이가 100 μm , 폭이 1 mm이 되도록 기계 가공하여 제작했으며 원통형의 중심축을 모터에 연결하여 채널을 회전시킬 수 있다. Fig. 1(b-d)는 각각 제작된 나선형 미니채널 카트리지와 나선형 채널에 시료를 주입하는 모습, 시료가 채워진 나선형 미니채널의 사진을 나타낸다. 3차원 나선형 미니채널은 길이가 66 mm이며 직경 6 mm이고 8회 회전한다. Fig. 1(e)는 형광 영상 획득 장치와 DC 모터 제어 시스템의 구성 요소를 나타낸다. Fig. 1(f)는 나선형 미니채널 카트리지와 대물렌즈의 위치 관계를 보여준다. 카트리지의 한쪽 끝은 고정된 너트에 연결되어 모터가 회전하면 카트리지가 축 방향으로 이동하게 되므로 나선형 채널 내에 분포하는 형광 입자 영상을 카메라로 획득할 수 있게 된다. 아두이노 보드는 마이크로컨트롤러를 내장한 제어용 기관으로 모터 컨트롤러를 쉽게 제어할 수 있다는 특징이 있다. 블루투스 보드를 통해 블루투스 통신으로 모터 보드와 스마트폰을 연결하여 Fig. 1(g)와 같은 스마트폰 앱으로 모터를 무선 제어할 수 있도록 하였다. 모터는 일정한 각도로 회전하는 스텝핑 모드 또는 일정한 속도로 고속 회전하는 연속 모드를 선택하여 구동시킬 수 있다.

Table 1. Viscosities of blood and glycerol-water mixtures

Component	Viscosity (mPa·s)
blood (37°C)	3~4
distilled water (20°C)	1.002
10% glycerol solution	1.310
20% glycerol solution	1.615
40% glycerol solution	3.686

Table 2. Densities of blood components, glycerol-water mixtures and microbead

Component	Density (g/mL)
plasma	1.025
lymphocyte	1.06~1.1
red blood cell	1.09~1.2
distilled water	0.998
10% glycerol solution	1.0221
20% glycerol solution	1.0425
40% glycerol solution	1.097
microbead	1.06

2.2 혈액 대용 유체의 물성 측정

시료 카트리지에 주입되는 용액과 부유 입자의 상대적인 밀도 차이가 입자 정렬에 미치는 영향을 알아보기로 밀도가 조절된 글리세롤 용액을 혈액 대용 유체로 사용하고 밀도가 일정한 형광미세입자를 림프구 대신 사용하였다. 20% 및 40%로 희석된 글리세롤 수용액의 점성계수는 상온에서 점도계(microVISC, RheoSense)로 측정하였다. 글리세롤 용액의 밀도는 글리세롤과 증류수의 혼합 비율을 고려하여 추정하였으며, 혈구와 미세입자의 밀도는 각각 참고문헌과 제조사를 통해 확보하였다.

2.3 나선형 미니채널 내 입자 위치 추정

입자 정렬을 확인하기 위해서 CD4 림프구 대신 밀도와 크기가 유사한 형광 입자를 이용하였다. CD4 림프구의 지름은 보통 10-25 μm 이기 때문에 지름이 10 μm 인 형광 입자(FluoSpheres F8834, ThermoFisher)를 사용하였다. 이 형광 입자를 이용하여 나선형 미니채널 안에 주입한 형광입자의 정렬 현상을 관찰하고 정량적으로 분석하고자 시료 카트리지에 20% 농도로 희석한 10 μm 미세입자 현탁액을 5 mL 주사기로 주입하고 카트리지를 DC 모터 축에 연결한 후, 모터 속도 및 회전 지속 시간에 따른 형광입자의 분포를 영상으로 획득하였다. 모터는 2000 rpm 속도로 회전시켰으며, 1분간 모터 회전 후 형광현미경(IX51, Olympus)에서 10배 대물렌즈(NA = 0.3)로 초점을 채널 윗면에 고정시

키고 카트리지를 일정한 각도로 돌려가면서 나선형 채널을 따라 여러 장의 형광입자 영상을 획득하였다. 사용한 대물렌즈의 초점 깊이(depth of field)는 $9\ \mu\text{m}$ 이다. 채널 깊이 방향으로 입자의 위치를 추정하고자 영상 처리 및 분석 프로그램(ImageJ)으로 형광입자의 경계를 검출한 후 입자의 크기를 구하여 채널 내에서 상대적인 입자 위치를 추정하였다. 채널 바깥쪽, 즉 렌즈에 가까운 채널 윗면에 분포하는 입자는 초점이 잘 맞아서 선명하게 관찰되지만 입자 위치가 초점 평면에서 멀어질수록 직경은 더 커지고 형광 강도는 약해진다.

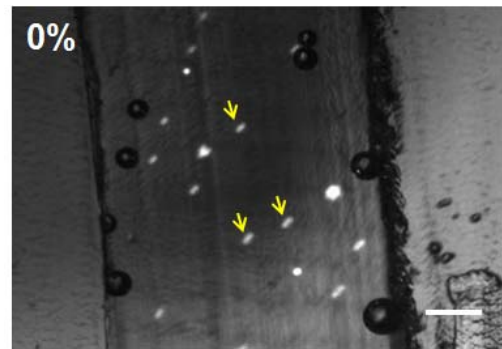
2.4 입자 계수 및 입자 농도 측정

입자 정렬에 따른 입자 계수 성능을 평가하고자 형광입자를 혈액의 플라즈마 밀도와 유사한 10% 글리세롤 용액과 혼합하여 5%, 10%, 20%의 세 단계로 희석하였다. 3개의 다른 농도로 제조된 형광 입자 현탁액을 시료 카트리지에 주입하고 2000 rpm의 속도로 카트리지를 3분 회전시킨 후 나선형 채널을 따라 촬영한 여러 장의 입자 영상을 분석하여 입자를 계수하고 혈구계수용 플라스틱 시료 챔버(C-Chip)에서 얻은 입자 농도와 비교하였다. 2.3절에 기술한 바와 같이 렌즈의 초점을 채널 윗면에 고정시켜서 입자 영상을 획득하였으므로 영상 처리 과정에서 이진화(binazation)를 거치면 설정한 임계 계조치(threshold grey level)보다 낮은 값을 갖는 입자 영상은 제거되어 입자 계수에 반영되지 않게 된다.

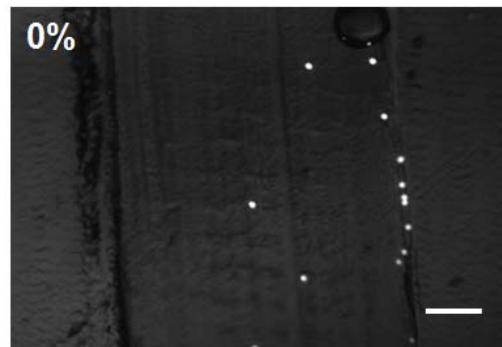
3. 결과 및 토의

3.1 나선형 미니채널 내 입자 분포

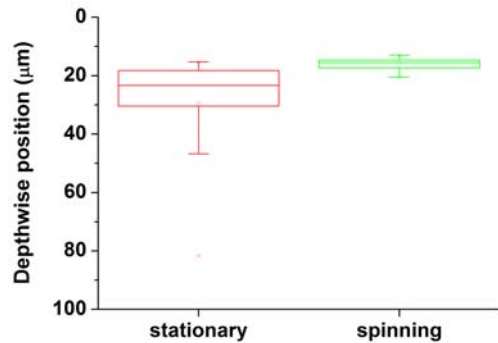
혈액의 구성 성분 및 글리세롤 수용액의 점성계수와 밀도를 Table 1과 Table 2에 각각 나타내었다. 혈액의 점성계수는 실온에서 약 $3\text{--}4\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ 로 알려졌으며 40% 글리세롤 용액의 점성계수인 $3.686\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ 과 유사하다. 혈장의 밀도는 $1.025\ \text{g/mL}$ 로 10% 글리세롤 용액의 밀도인 $1.0221\ \text{g/mL}$ 과 유사



(a)



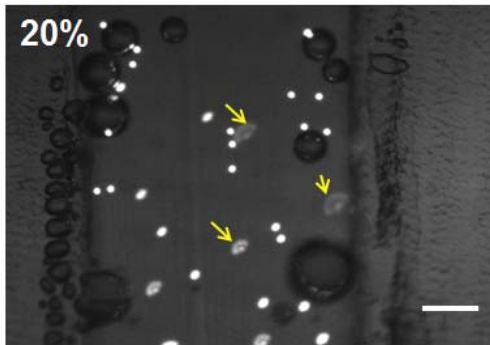
(b)



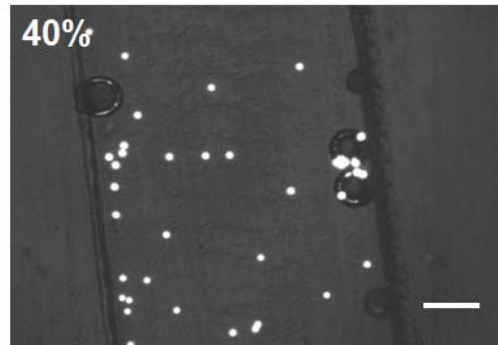
(c)

Figure 2. Particle images (a) before and (b) after spinning (scale bar = 0.2 mm) (c) Estimated distribution of particles across the cross section of helical minichannel filled with distilled water before and after spinning of the sample cartridge

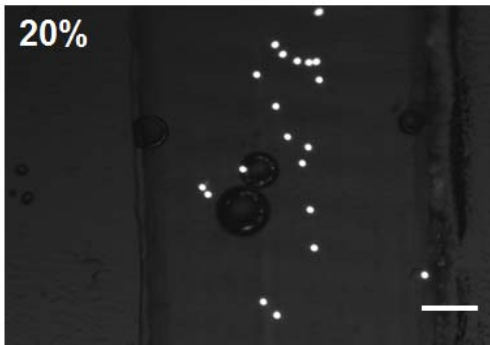
하다. 밀도가 입자 정렬에 미치는 효과를 알아보고자 증류수의 경우에 회전 속도 2000 rpm으로 1분간 회전시켜 회전 전과 회전 후의 형광 입자 분포를 확인하였으며, 20% 및 40% 글리세롤 용액에 혼



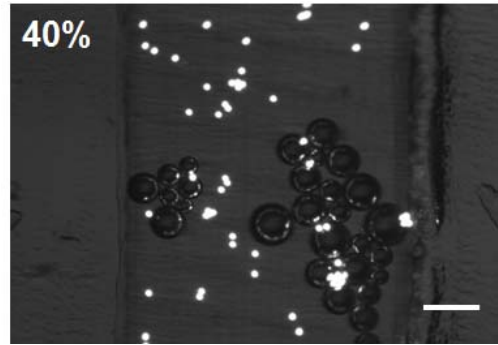
(a)



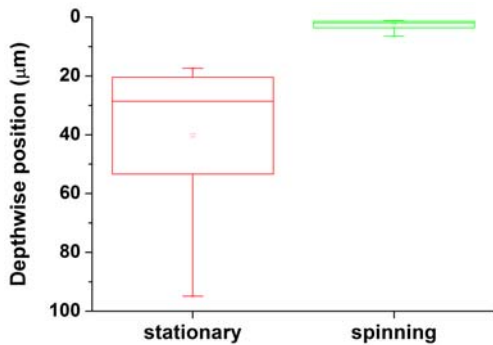
(a)



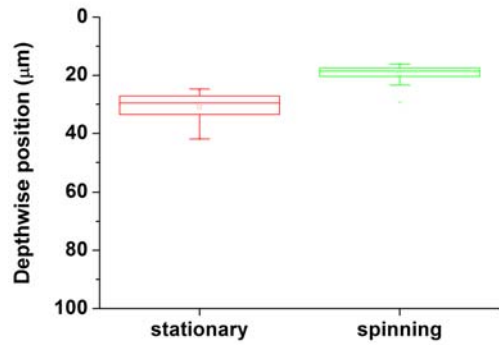
(b)



(b)



(c)



(c)

Figure 3. Particle images (a) before and (b) after spinning (scale bar = 0.2 mm) (c) Estimated distribution of particles across the cross section of helical minichannel filled with 20% glycerol solution before and after spinning of the sample cartridge

합된 형광 입자의 경우 회전 속도 3000 rpm으로 각각 4분 및 1분간 회전시켜 입자의 채널 내 분포를 측정하여 Fig. 2, Fig. 3 및 Fig. 4에 나타내었다. 중

Figure 4. Particle images (a) before and (b) after spinning (scale bar = 0.2 mm) (c) Estimated distribution of particles across the cross section of helical minichannel filled with 40% glycerol solution before and after spinning of the sample cartridge

류수를 사용한 경우, 카트리지가 회전 전인 Fig. 2(a)에는 다수의 입자가 초점 평면에서 벗어나 위치하는 반면에 회전 후인 Fig. 2(b)를 보면 형광입자들

이 초점 평면에 가까이 정렬된 것을 관찰할 수 있다. 채널 깊이 방향으로 입자의 위치를 추정하여 나타낸 Fig. 2(c)의 그래프에서 이를 보다 명확하게 확인 가능하다. 카트리지의 고속 회전으로 인해 발생한 원심력이 증류수보다 밀도가 큰 입자를 바깥 쪽으로 밀어내어 입자들이 한 초점 평면에 정렬되었다고 분석할 수 있다.

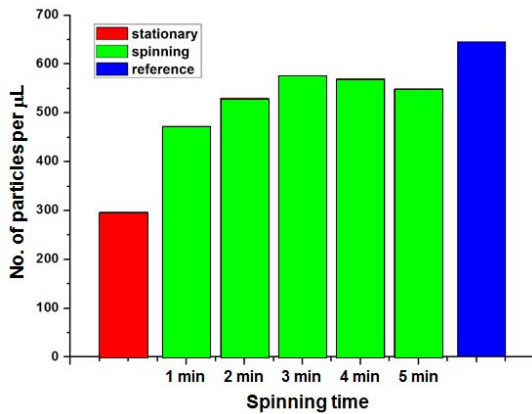


Figure 5. Effect of spinning time on particle count at 20% particle concentrations suspended in 10% glycerol solution. The reference is the particle count measured with C-Chip plastic hematocytometer chamber.

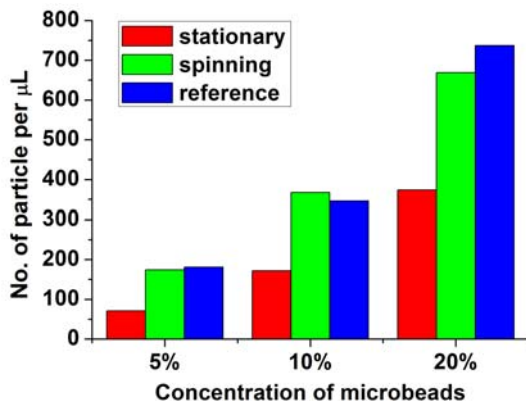


Figure 6. Effect of spinning on particle count at three different particle concentrations. The reference is the particle count measured with C-Chip plastic hematocytometer chamber.

20% 글리세롤 용액을 주입한 경우에는 카트리지를 3000 rpm에서 4분간 회전시킨 후에 앞서 증류수를 주입한 경우와 유사한 입자 분포 경향을 Fig. 3(a)와 Fig. 3(b)에서 관찰할 수 있다. 20% 글리세롤 용액은 증류수에 비해 점성계수가 약 1.6배 크기 때문에 입자가 받는 점성항력이 커져서 입자를 채널 바깥쪽으로 이동시키기 위해서는 보다 큰 원심력으로 더 오랫동안 회전을 시켜야하기 때문인 것으로 분석된다. 카트리지가 회전 전에는 채널 깊이 방향으로 넓게 분포해있던 입자들이 회전 후에는 채널 윗면에 매우 가까이 밀집하여 정렬된 것을 Fig. 3(c)에서 확인할 수 있다. 증류수에 비해 20% 글리세롤 수용액에서는 회전 효과가 매우 뚜렷하게 나타났으나 같은 속도와 시간 조건에서 수행한 실험이 아니므로 직접적으로 정렬 효과를 비교하기는 어렵다. 밀도가 낮은 증류수에서는 회전 시간이 증가하면서 입자 응집이 발생되므로 3분 이상 회전시키는 것은 입자 계수의 목적으로는 적절하지 않다.

혈액의 점성과 유사한 40% 글리세롤 용액을 주입한 경우에는 카트리지가 회전 효과가 미미했으며 Fig. 4(a)와 Fig. 4(b)에 나타난 회전 전과 회전 후 입자 영상에서 이를 확인할 수 있다. Fig. 4(c)의 입자 분포 분석 결과를 보면 회전 후에 입자의 위치가 채널 윗면으로 조금 더 이동하였으나 회전 전에도 비교적 일정한 위치에 입자가 밀집되어 분포되어 있다. 이는 40% 글리세롤 용액보다 입자의 밀도가 작기 때문에 카트리지를 회전시키지 않고도 채널 내에서 부력에 의해 입자가 채널 윗면 쪽으로 정렬되었다고 분석할 수 있다. 후속 연구를 통해 카트리지가 회전 시 용액과 입자의 상대적인 밀도 및 점도 차이에 의해 발생하는 입자 거동 메커니즘을 규명할 필요가 있다.

3.2 입자 정렬에 따른 입자 계수 정확도 평가

5%, 10%, 20% 농도로 희석한 형광입자 시료를 10% 글리세롤 수용액에 혼합하고 카트리지에 주입한 후에 입자 영상 분석을 통해 계수하여 얻은 입자 농도를 C-Chip에서 측정된 결과와 비교하여 Fig. 5에 나타내었다. 나선형 채널에서 측정된 입

자 농도는 채널의 기계가공 오차를 고려한 시료 부피를 보정하여 계산한 값이다. 나선형 채널에서 측정된 입자 농도가 C-Chip에서 얻은 값과 10% 미만의 오차를 나타내었다. 10% 농도에서 채널 회전 후 얻은 입자의 계수가 C-chip에서 측정된 입자 계수보다 많이 측정된 이유는 자동 입자 영상 분석 시 노이즈가 잘 제거되지 않아 생기는 측정 오차라고 생각된다. 또한 입자의 농도가 증가함에 따라 C-chip에서 얻은 값과 회전 후의 얻은 값의 차이가 커지는 이유는 입자의 농도가 증가하여 몇몇의 입자들이 겹치기 때문에 입자 영상 분석 시 겹치는 입자들이 하나로 계수되어 낮은 농도일 때 보다 큰 차이를 보였다. 입자 영상 분석 방법을 개선한다면 이 차이를 줄일 수 있을 것으로 판단된다. 채널 가장 윗면에 초점을 맞춘 상태에서 입자를 계수한 결과로 카트리지가 회전 전에는 입자들이 채널 깊이 방향으로 넓게 분포되었다가 회전 후에는 채널에 분산되어 있던 입자들이 초점을 맞춘 윗면에 가깝게 정렬되기 때문에 영상 자동 분석을 통한 입자 계수 과정에서 소실되는 입자가 감소하게 되어 결과적으로 입자 계수의 정확도가 향상된다. 이는 렌즈의 초점 깊이보다 큰 높이를 갖는 채널을 사용하더라도 카트리지가 회전을 통해 입자를 정렬시킴으로써 카메라의 자동 초점 조절 기능 없이도 정확하게 입자를 계수할 수 있음을 의미한다.

4. 결론

본 논문에서는 나선형 채널이 포함된 시료 카트리지의 회전을 통해 채널 내에 분산된 미세 입자를 채널 윗면에 형성된 초점 평면으로 정렬시킬 수 있음을 보였다. 입자 밀도가 용액 밀도보다 큰 경우에는 카트리지가 회전에 의한 원심력이 발생하여 입자를 채널의 바깥쪽으로 정렬시키므로 렌즈의 초점을 채널 윗면에 정렬된 입자에 맞춰서 균일한 형광 강도를 얻을 수 있게 된다. 결과적으로 영상 처리 및 분석 과정에서 소실되는 입자가 감소하여 자동 입자 계수의 정확도를 향상시킬 수 있다. 또한 용액의 밀도에 따라 필요로 하는 회전 속도와 시간이 다르며, 용액의 점성이 클수록 빠른

회전속도를 필요로 하며 점성 용액의 경우 용액의 밀도와 입자의 밀도 차이가 작을수록 더 많은 시간을 필요로 하는 것을 확인하였다. 후속 연구를 통해서 회전하는 나선형 미세채널 내 입자의 거동과 정렬에 영향을 주는 밀도, 점도, 원심력, 점성항력 등의 상관 관계를 규명하여 혈액에 포함된 림프구 분리 및 정렬에 적용하고 입자 정렬에 대한 조건 최적화 연구를 수행하고자 한다. 렌즈에 따른 초점 깊이를 고려하여 채널을 납작하게 미세가공할 필요가 없게 되면 채널의 제작 단가를 절감할 수 있게 되므로 의료서비스 소외 지역에 CD4 현장 검사기기를 도입하는 과정에서 가장 큰 걸림돌인 회당 검사비용을 낮추는데 기여할 수 있을 것으로 전망한다.

후 기

이 논문은 교육부 및 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원(NRF-2013R1A1A2059539, NRF-2015K2A1C2067798, NRF-2016RID1A1A09917195)을 받아 수행된 연구임.

REFERENCE

- 1) Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2011, World AIDS Day Report 2011.
- 2) Boyle, D. S., Hawkins, K. R., Steele, M. S., Singhal, M. and Cheng, X., 2012, "Emerging Technologies for Point-of-Care CD4 T-lymphocyte Counting," Trends in Biotechnology, Vol. 30(1), pp.45~54.
- 3) Glynn, M. T., Kinahan, D. J. and Ducrée, J., 2013, "CD4 Counting Technologies for HIV Therapy Monitoring in Resource-poor Settings- State-of-the-art and Emerging Microtechnologies," Lab. Chip, Vol. 13, pp.2731~2748.
- 4) Bae, S. Y., Park, H. C., Oh, J. S., Yoon, S. Y., Park, D. W., Choi, I. K., Kim, H. J., Oh, J. H., Hur, D. S., Chung, C., Chang, J. K., Robinson, J.

- P. and Lim, C. S., 2009, "Absolute CD4+ Cell Count Using a Plastic Microchip and a Microscopic Cell Counter," *Cytometry B Clin. Cytom.*, Vol. 76, pp.345~353.
- 5) Wade, D., Diaw, P. A., Daneau, G., Camara, M., Dieye, T. N., Mboup, S., Kestens, L., 2013, "CD4 T-Cell Enumeration in a Field Setting: Evaluation of CyFlow Counter Using the CD4 Easy Count Kit-Dry and Pima CD4 Systems", *PLoS One.*, Vol. 8, pp. e75484.
- 6) Kuntaegowdanahalli, S. S., Bhagat, A. A. S., Kumar, G. and Papautsky, I. 2009, "Inertial Microfluidics for Continuous Particle Separation in Spiral Microchannels," *Lab Chip.*, Vol. 9, pp.2973~ 2980.
- 7) Lee, W., Kwon, D., Choi, W., Jung, G. Y. and Jeon, S., 2015, "3D-printed Microfluidic Device for the Detection of Pathogenic Bacteria Using Size- based Separation in Helical Channel with Trapezoid Cross-section," *Sci. Rep.*, Vol. 5, pp.7717.
- 8) Wu, L., Guan, G., Hou, H. W., Bhagat, A. A. S. and Han, J., 2012, "Separation of Leukocytes from Blood Using Spiral Channel with Trapezoid Cross-section," *Anal. Chem.*, Vol. 84(21), pp.9324~ 9331.
- 9) Prasad, B. and Kim, J. K., 2014, "CFD Analysis of Geometric Parameters That Affect Dean Flow in a Helical Microchannel," *Journal of the Korean Society of Marine Engineering.*, Vol. 38(10), pp.1269~1274.
- 10) Kim, J. K. and Hugo, J., 2016, "Sample Chamber Cartridge for Counting Particles," *Korea Patent Registration No. 10-1680179.*