

전도성 액체기반 정상표면탄성파(CL-SSAW)를 이용한 백혈구로부터의 말라리아 기생충 분리

지현슬¹ · 남정훈^{2,3*} · 임채승^{2*}

¹고려대학교 의과대학 대학원 의과학과, ²고려대학교 구로병원 진단검사의학과

³고려대학교 구로병원 응급의학과 외상연구소

Malaria Parasite Separation from White Blood Cells Using Conductive Liquid-Based Standing Surface Acoustic Wave (CL-SSAW)

Hyunseul Jee¹, Jeonghun Nam^{2,3*} and Chae Seung Lim^{2*}

¹Department of Medical Sciences, Graduate School of Medicine, Korea University

²Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Korea University Guro Hospital

³Department of Emergency Medicine, College of Medicine, Korea University Guro Hospital

(Manuscript received 31 May 2019 ; revised 12 August 2019 ; accepted 10 September 2019)

Abstract: An acoustofluidic device using conductive liquid-based electrodes was developed for malaria parasite separation from white blood cells. In this device, the electrode channels filled with a conductive liquid were used to generate standing surface acoustic waves (SSAWs) in a fluidic channel, which can overcome the limitation of conventional patterned metal electrodes. Separation performance of the device was evaluated using fluorescent polystyrene particles with two different sizes (2 and 10 μm diameters), which were successfully separated. In addition, a mixture of malaria parasites and white blood cells were also efficiently separated with high purity of $\sim 98\%$ in the CL-SSAW device at the flow rate of 12 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Key words: Conductive liquid, Malaria parasite, White blood cell, Standing surface acoustic wave, Separation

1. 서 론

말라리아 감염은 개발도상국의 공중보건을 심각하게 위협하고 있다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 2015년에만 2.14억의 감염이 발생하였으며, 매년 1백만 명

이상이 사망한 것으로 추정하였다[1]. 말라리아의 전염 및 사망률을 줄이기 위하여, 빠르고 신뢰 할 만한 진단이 필수적이다. 그러나 환자 혈액 샘플 중 말라리아에 감염된 적혈구의 농도(≤ 100 parasites/ μl)가 매우 적어, 시기 적절한 진단에 한계가 있다. 기존의 말라리아 진단은 김자염색 혈액도말검사(giems-stained blood smear examination)에 의존하였으나, 이는 시간이 많이 소요되고, 노동집약적이다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 급속진단시험법(rapid diagnostic test, RDT), 질량분광법(mass spectroscopy), 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)이 개발되어, 사용되고 있다[2,3]. 그 중 RDT는 단순성과 높은 감도($\sim 95\%$), 저비용으로 인해 김자염색법의 대안으로 널리 사용되고 있다. 그러나 RDT 키트의 높은 검출감도(40 parasites/ μl)로 인해 적혈구를 포함하는 다른 혈액 세포, 특히 백혈구 오염에 의해 검출 감도에 오류가 날 가능성이 높다. 그러므로, 다른

Corresponding Author: Jeonghun Nam
Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Korea University Guro Hospital, Korea University, Seoul, Korea
Tel : +82-2-2626-3245
E-mail : jhnam77@gmail.com
Corresponding Author: Chae Seung Lim
Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Korea University Guro Hospital, Korea University, Seoul, Korea
Tel : +82-2-2626-3245
E-mail : malarim@korea.ac.kr

본 연구는 보건 복지부 한국 보건 기술 연구 개발 사업(H15C1512)과 고려대학교 구로병원의 재원으로 고려대학교의료원 및 고려대학교 구로병원의 플랫폼 구축 사업 지원에 의하여 이루어진 것임(O1903851).

혈액 구성요소를 제거하고 저농도의 말라리아 감염 세포를 농축하는 샘플 전처리 개발이 필요하다.

최근, 미세유체공학은 샘플/시약을 소량만 필요로 하고, 제작 비용도 저렴한 이점 때문에 입자/세포 조작을 위한 강력한 기술로 부상하고 있다[4]. 미세유체공학의 급격한 발전으로, 관성력[5], 비뉴턴성 유체 기반 점탄성력[6], 자성력[7] 및 전기력[8]을 이용한 다양한 입자/세포 분리용 미세유체 플랫폼이 개발되고 있다. 최근, 표면탄성파(surface acoustic wave, SAW)는 비침습성, 낮은 소비전력, 다른 미세유체 플랫폼과의 쉬운 통합 및 빠른 입자/유체 조작의 장점으로 더욱 관심을 얻고 있다[9,10]. SAW 기반 기술을 이용하여, 입자/세포는 크기, 밀도, 압축성 등 물리적 특성에 의존하는 acoustic radiation force를 통해 조작이 가능하며, 이는 세포에 해를 가하지 않는다. 그러나 미세채널에서 SAW를 발생시키기 위해서는, 압전기판(piezoelectric substrate) 상에 금속 전극 패턴이 필요하며, 이는 비싸고 복잡한 제조 과정이 필요하다는 한계가 있다.

기존 SAW 소자를 위한 금속 전극 패턴의 한계점을 극복하기 위하여, 전도성 액체(conductive liquid, CL)가 채워진 미세유동채널 기반의 전극 채널이 최초로 개발되었다[11]. 그러한 전극 채널은 간단하고 쉬운 소프트 리소그래피 기술(soft lithographic technique)에 의해 제작될 수 있다. 최근 전도성 액체로 채워진 전극 채널 기반의 SAW 소자는 액체 내의 내부 유동 발생 및 미세유체 혼합, 크기 기반 입자 분리와 크기가 조절된 액적 생성에 활용되었다[11,12]. 그러나 이 기술은 임상적 목적으로 세포 분리에 아직 적용된 바가 없다.

본 연구에서 우리는 백혈구로부터 말라리아 기생충을 분리할 수 있는 전도성 액체기반 정상표면탄성파(conductive liquid-based standing surface acoustic wave, CL-SSAW) 장치를 소개하고자 한다. CL-SSAW 장치의 성능은 2와 10 μm 형광입자를 사용한 크기 기반 분리를 통해 평가되었다. 이후 임상 적용에서, 백혈구로부터 말라리아 기생충을 고회수율, 고순도로 분리하였다.

II. 연구 방법

1. 작동원리(Working principle)

그림 1은 CL-SSAW를 이용하여 용혈된 혈액 시료로부터 말라리아 기생충을 분리하기 위한 소자의 작동 원리를 보여준다. CL-SSAW 장치는 압전기판 위에 polydimethyl-siloxane (PDMS) 미세유체소자를 접합하여 제작한다. PDMS 채널은 표면탄성파 발생을 위한 한 쌍의 깎지형 전극 채널(interdigitated electrode channel)과 처리하고자 하는 샘플을 유동시키기 위한 주유동채널을 포함한다. 전극 채널은 전도성 액체로 채워지며, 이는 기존의 표면탄성파 발생 장치에서 사용되는 금

속의 전극패턴을 대체하였다.

전도성 액체로 채워진 전극 채널에 무선 주파수(radio frequency, RF) 신호를 가하면, 마주보는 방향으로 전파되는 두 개의 동일한 표면탄성파가 발생되며, 두 표면탄성파의 보강과 상쇄간섭으로 정상표면탄성파를 형성한다. 그 결과, 한 쌍의 전극 채널 가운데에 위치한 유체 채널에 압력점(pressure nodes)과 비압력점(pressure anti-nodes)이 생성된다. 유체 채널과 전극 채널은 단일 제작 과정을 통해 같은 PDMS 소자에서 제작되기 때문에 평행 정렬의 높은 신뢰성이 보장된다. 크기가 다른 입자가 분산되거나 말라리아 기생충이 포함된 용혈 혈액 샘플이 주유동채널 내를 흐를 때, 시료 내의 입자 및 세포는 acoustic radiation force와 drag force를 동시에 받는다. 그 acoustic radiation force (F_r)는 다음의 수식으로 표현된다[13].

$$F_r = -\left(\frac{\pi p_0 V_p \beta_m}{2\lambda}\right) \Phi(\beta, \rho) \sin(2kx) \quad (1)$$

$$\Phi(\beta, \rho) = \frac{5\rho_p - 2\rho_m}{2\rho_p + \rho_m} \frac{\beta_p}{\beta_m} \quad (2)$$

p_0 , λ , V_p , k , x , ρ_p , ρ_m , β_p , 및 β_m 는 각각 acoustic 압력, 표면탄성파의 파장, 입자의 부피, 파장벡터, 압력점으로부터의 거리, 입자의 밀도, 부유 유체의 밀도, 입자의 압축성, 부유 유체의 압축성을 나타낸다. 방정식(1)에 따르면, acoustic radiation force의 크기는 입자 및 세포의 크기, 밀도 및 압축성과 같은 물리적 특성에 의해 결정된다. 특히 acoustic radiation force는 입자의 부피에 비례, 즉 입자 직경의 세제곱에 비례한다($F_r \propto V_p \propto r^3$, r 은 입자의 반지름). 따라서 표면탄성파에 의해 작용하는 힘은 입자/세포의 크기의 영향을 지배적으로 받으며, 이에 따라 입자/세포의 크기에 따른 분리가 가능한 것이다. 방정식(2)의 Φ 는 acoustic contrast factor로서, 입자가 정상표면탄성파에 의해 압력점 또는 비압력점 중 어느 쪽으로 이동하는지를 결정한다[13]. 용혈 혈액 내에 포함된 백혈구와 말라리아 기생충은 acoustic contrast factor가 양의 값($\Phi > 0$)을 갖기 때문에 압력점으로 이동한다.

그림 1의 (a)와 같이 유체 채널의 입구에서 용혈된 혈액 시료는 가운데 입구로 주입되었고, 뒤쪽 입구에 도움 유체를 주입하여 미세입자/세포를 유체채널의 가운데에 수력학적으로 집중시켰다(그림 1(c)의 (i)). 이를 통해 CL-SSAW 기반 분리 이전에 모든 입자/세포의 위치를 초기화 시킬 수 있다. 이후 CL-SSAW의 작동 구간 내에서 말라리아 기생충(직경 $\sim 1.75 \mu\text{m}$, 보충자료 그림 S1 참고)에 비해 크기가 큰 백혈구(직경 $10\text{-}15 \mu\text{m}$)는 acoustic radiation force를 더 크게 받아 말라리아 기생충보다 유체채널의 벽 쪽에 위치한 압력점으로 더 빠르게 이동한다. 한편 크기가 작은 말라리아 기

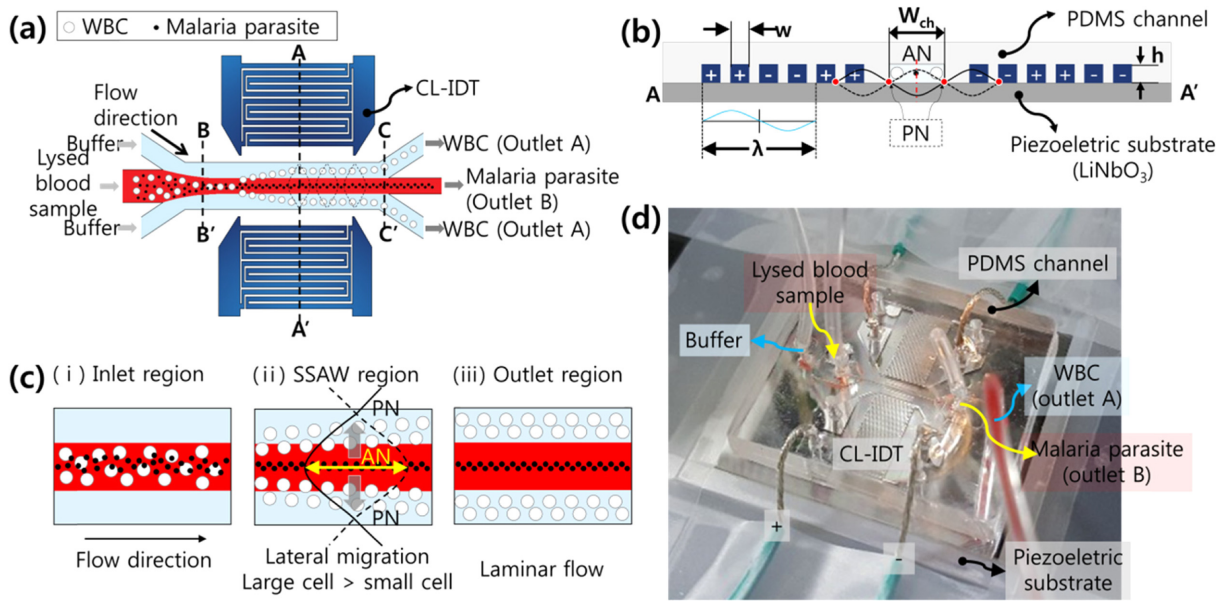


그림 1. 용혈된 혈액시료에서 백혈구로부터 말라리아 기생충을 분리하는 CL-SSAW 소자의 개략도 (a) 전도성 액체를 이용한 정상표면탄성과 기반의 분리 소자의 개략도. (b) CL-SSAW 작동영역에서 소자의 단면도(A-A'). (c) 입구영역, CL-SSAW 작동 영역, 출구 영역에서의 세포 유동 특성. (d) 실제 사용된 CL-SSAW 소자의 사진

Fig. 1. Schematic of the CL-SSAW device that separates malaria parasites from white blood cells in the lysed blood sample. (a) Schematic of the separation device using the conductive liquid-based standing surface acoustic wave (CL-SSAW). (b) Cross-sectional view (A-A') of the device in the CL-SSAW working region. (c) Illustration of the flow characteristics of cells in the Inlet, CL-SSAW working region and outlet. (d) Photograph of the CL-SSAW device

생충은 여전히 채널의 가운데를 따라 흐른다(그림 1(c)의 (ii)). 따라서 백혈구와 말라리아 기생충은 크기에 따라 분리되고(그림 1(c)의 (iii)), 후류에 위치한 출구 삼분지를 통해 각각의 출구를 통해 수집된다. 그림 1의 (b)는 CL-SSAW 기반 분리 소자의 A-A' 단면 개략도를 통해 생성되는 정상표면탄성파를 표현한다. 이 때, w , h , w_{ch} , λ 는 전극 채널의 너비, 채널의 높이, 유체 채널의 너비, 발생된 CL-SSAW의 파장을 각각 나타낸다. 그림 1의 (d)는 실제 제작된 CL-SSAW 기반 분리소자의 사진을 보여준다.

2. 소자 제작(Device fabrication)

주유동채널과 전극 채널용 PDMS(SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Kit, DC-184, Dow chemical, Korea) 소자를 위한 SU-8 복제 몰드는 소프트 리소그래피 기술을 통해 제작된다[14]. PDMS 소자는 산소 플라즈마 장비(CUTE, Femto Science Co., Korea)를 이용하여 250 W, 80 mTorr 조건에서 50초동안 노출시킨 후 리튬나이오베이트 압전기판(lithium niobate, LiNbO₃, 128°, Y-cut, X-propagation, NEL Crystal Co., Fukushima, Japan)에 접합된다. 접합 과정 이후 전극 채널은 전도성 액체(eutectic gallium indium, EGaIn, Sigma Aldrich, USA)로 채워진다. 쉽고 효율적인 주입 과정을 위해, 전극 채널은 하나의 입구와 출구를 갖는

구불구불한 형상으로 제작하였다. 전도성 액체가 채워진 전극채널은 2중 전극 IDT와 유사하게 작동한다. 전극 채널의 파장(λ)은 전극채널의 폭(w)을 이용하여 계산할 수 있다($\lambda_{double} = 8w$). 작동 주파수는 $f_w = c/\lambda_{double}$ 로 결정되며, c 는 기판에서 탄성파의 전파 속도이다(~3450 m/s). 전극채널의 높이, 길이 및 폭은 각각 60 μ m, 90 μ m 및 4 mm로 고정된다. 작동 주파수는 2중 전극 모드에서 14.37 또는 28.74 MHz 모두 가능하며, 본 논문에서는 28.74 MHz의 작동 주파수가 사용되었다. 유체 채널은 두 개의 입구와 두 개의 출구를 가진다. 유체 채널의 폭과 높이는 각각 60 μ m, 90 μ m이다.

3. 샘플 준비(Sample preparation)

지름이 2 μ m (B0200, Thermo Fisher Scientific, CA)와 10 μ m (G1000, Thermo Fisher Scientific, CA)인 형광 폴리스티렌(polystyrene) 입자는 생물학적 샘플에 적용하기 이전에 장치의 성능을 특정하기 위해 사용되었다. 입자의 크기는 말라리아 기생충과 백혈구의 유사체로 사용하기 위해 선택되었다.

P. falciparum 3D7 말라리아 기생충은 40 mg/L gentamicin (Invitrogen Co., Carlsbad, CA), 1.36g/L hypoxanthine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 25 mM HEPES {2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid} (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO), 7.5% sodium bicarbonate (Invitrogen Co., Carlsbad, CA), 20% glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1 M NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 및 20% AlbuMAX (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)가 첨가된 RPMI-HEPES 배지에서 37 °C, 5% CO₂, 1% O₂ 및 94% N₂의 조건 하에 3% 헤마토크릿(Hematocrit)의 사람 적혈구 세포와 함께 배양되었다. 세포는 48시간동안 배양한 후 채취하였다.

혈액 시료는 항응고제로서 EDTA가 포함된 진공채혈관을 사용하여 고려대학교 구로병원(Seoul, Korea)에서 건강한 지원자로부터 사전 동의 하에 채혈하였다. 전혈 1 mL에 있는 적혈구는 탈이온수로 1:10으로 희석된 BD FACS lysis buffer (BD Bioscience) 10 mL를 사용하여 상온에서 15분 동안 용해하였다. 이후 원심분리를 통해 용혈된 혈액으로부터 백혈구를 수집하였다(500×g, 5분). 말라리아 기생충은 배양된 말라리아 시료를 사용하여 같은 용해 과정을 통해 얻었다. 말라리아 기생충과 백혈구는 가시성을 위해 형광염료(SYBR Green)를 사용하여 염색하였다. 실험을 위한 혼합 시료는 말라리아 기생충과 백혈구를 phosphate buffered saline (PBS)에 부유하여 준비하였으며, 시료 내의 말라리아 기생충과 백혈구의 최종 농도는 약 1.3×10⁷과 7.4×10⁶ cells/mL

이었다. 각 세포의 개수는 hemocytometer (C-chip, INCYTO, Korea)를 이용하여 계수하였다. 본 연구에서 사용된 배양된 말라리아를 포함한 모든 소량의 혈액 샘플은 사전에 고려대학교 구로병원 의학연구심의위원회(Korea University Guro Hospital Institutional Review Board, IRB)의 검토 및 승인을 받았다(IRB Number: 2019GR0080).

4. 실험셋업 및 절차(Experimental set up & process)

혼합 시료와 도움 유체는 실린지 펌프(LSP01-1A, Longer Precision Pump)를 이용하여 유체 채널로 주입되었다. 시료와 도움 유체의 유동율은 각각 2와 10 μl/min였다. 실험 과정은 도립현미경(CKX41, Olympus)과 형광 카메라(CS230B, Olympus)를 이용하여 기록되었다. RF 신호 발생기(8657B, HP)를 통해 발생한 무선 주파수(Radio frequency, RF)신호는 직류 전원 공급기(IPS-18B10, VuPOWER)와 연결된 증폭기(ZHL-1-2W, Mini-circuits)를 통해 전도성 액체가 채워진 전극 채널로 가해졌다.

III. 연구 결과

백혈구로부터 말라리아 기생충을 분리하기 이전에, 그림 2와

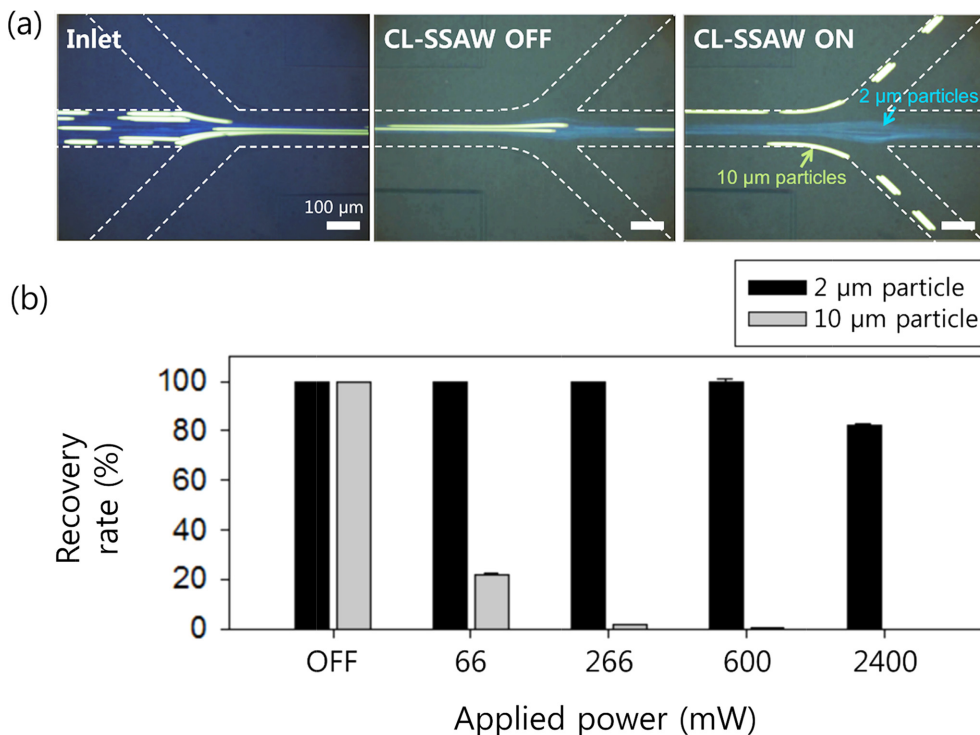


그림 2. (a) 인가전력 600 mW일 때의 CL-SSAW의 작동에 따른 입구와 출구 분지에서의 2와 10 μm 형광입자의 유동. (b) 인가전력에 따른 2와 10 μm 입자의 중앙 출구에서의 회수율. 회수율의 표준편차는 5회의 실험 결과값으로부터 평가되었다

Fig. 2. (a) Separation of 2 and 10 μm fluorescent polystyrene particles at the inlet and the outlet with and without CL-SSAW at the applied power of 600 mW. (b) Recovery rate of 2 and 10 μm fluorescent polystyrene particles at the center outlet depending on the applied power. The standard deviation of the recovery rate depicts the measured values from five different experiments (n=5)

같이 2와 10 μm 의 형광 폴리스티렌 미세입자를 사용한 크기 기반 분리를 수행하여 소자의 성능을 평가하였다. 미세입자 분리를 위해 전도성 액체가 채워진 전극채널에 0에서 2400 mW의 인가전력을 통한 RF 신호를 인가하였다. 그림 2(a)는 600 mW를 인가하였을 때 CL-SSAW의 유무에 따른 2와 10 μm 입자의 분리 결과를 보여준다. CL-SSAW의 발생이 없을 경우, 2와 10 μm 입자는 CL-SSAW에 의한 측면이동이 없기 때문에 유체 채널의 가운데에 집중된 상태로 흘러 나가 중앙 출구에서 수집된다. 한편 600 mW 인가전력을 통해 CL-SSAW를 발생시켰을 때에는 크기가 큰 10 μm 입자는 채널 벽 쪽으로 이동하여 측면 출구로 빠져나가며, 2 μm 입자는 유체채널의 가운데로 그대로 흘러 나감을 확인하였다. 그림 2(b)는 인가전압에 따른 2와 10 μm 입자 각각의 중앙 출구에서의 회수율을 나타낸다. 회수율은 중앙 출구 및 측면 출구에서 수집된 전체 입자의 개수 대비 중앙 출구로 수집된 입자의 비율로 정의한다.

$$\text{회수율} = \frac{\text{중앙 출구로 수집된 입자의 개수}}{\text{중앙 및 측면 출구에서 수집된 전체 입자의 개수}}$$

인가전력이 600 mW로 증가할 때까지, ~100%의 2 μm 입자는 중앙 출구에서 수집된다. 하지만 인가전력이 2400 mW까지 증가될 경우 2 μm 입자는 높은 acoustic radiation force에 의한 측면 이동량을 보이게 되며, 전체 중 약 20%의 입자는 측면 출구에서 수집된다. 한편 10 μm 입자는 2 μm 입자보다 크기가 크기 때문에 큰 acoustic radiation force를 받아 더 큰 측면 이동량을 나타낸다. 66 mW의 RF 신호가 전극 채널에 인가되면, 10 μm 입자의 단 20%만이 중앙 출구에서 수집된다. RF 입력 전력이 증가할수록, 측면 출구에서 수집되는 10 μm 입자의 비율이 증가하고, 266 mW의 RF 전력에서는 회수율이 약 100%에 도달하였다.

마지막으로 우리는 개발된 CL-SSAW 소자를 백혈구로부터 말라리아 기생충을 분리하는 데에 활용하였다. 그림 3(a)는 CL-SSAW가 발생하지 않았을 때와 1066 mW의 인가전력으로 CL-SSAW를 발생시켰을 때 출구 분리를 나타낸다. 인가전압이 없는 CL-SSAW OFF 상태에서는 출구 분지에서 모든 말라리아 기생충과 백혈구가 유체 채널의 가운데로 집중된 채로 중앙 출구로 흐른다. 그러나 1066 mW의 전력을 인가하여 CL-SSAW를 발생시켰을 때에는 크기가 큰 백혈구는 탄성파의 영향으로 측면으로 힘을 받아 채널의 벽 쪽으로 이동하게 되어 출구 분지에서 측면 출구로 흘러 나가지만, 크기가 작은 말라리아 기생충은 측면 이동량이 거의 없어 그대로 중앙 출구로 흐른다. 이를 통해 크기를 기반으로 말라리아 기생충과 백혈구를 분리할 수 있다.

그림 3(b)는 인가전력에 따른 말라리아 기생충과 백혈구의 중앙 출구에서의 회수율을 보여준다. RF 전력이 없으면, 두

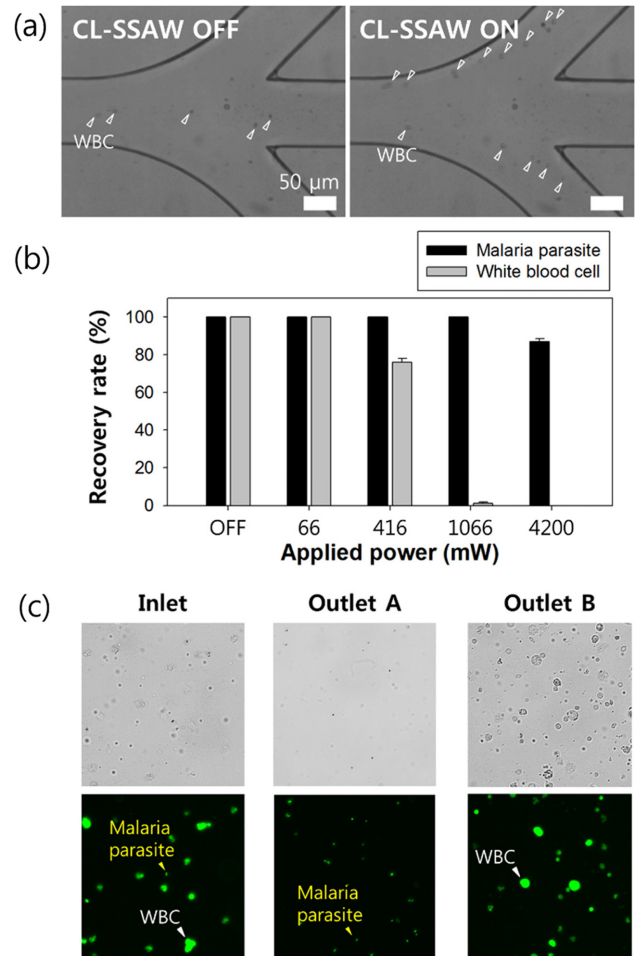


그림 3. (a) 인가전력 1066 mW일 때의 CL-SSAW의 작동에 따른 백혈구와 말라리아 기생충의 분리. 하얀색 화살표는 백혈구를 가리킨다. (b) 인가전압에 따른 백혈구와 말라리아 기생충의 중앙 출구에서의 회수율. (c) 분리 전/후의 시료의 광학 및 형광 현미경 이미지. 하얀색과 노란색 화살표는 각각 백혈구와 말라리아 기생충을 나타냄. 회수율의 표준편차는 5회의 실험 결과값으로부터 평가되었다

Fig. 3. (a) Separation of white blood cells and malaria parasites with and without CL-SSAW application at the applied power of 1066 mW. White arrows indicate white blood cells. (b) Recovery rate of white blood cells and malaria parasites at the center outlet depending on the applied power. (c) (top) Bright-field and (bottom) fluorescent microscopic images of samples at the inlet, outlet A and outlet B, respectively. White and yellow arrows indicate white blood cells and malaria parasites, respectively. The standard deviation of the recovery rate depicts the measured values from five different experiments (n=5)

세포 모두 가운데 출구로부터 수집된다. 인가 전력을 증가시키면, 두 세포의 탄성파에 의한 측면 이동량이 증가하며 중앙 출구에서의 회수율은 감소하기 시작한다. 인가 전력이 66 mW일 때, 모든 백혈구는 10 μm 입자와 달리 여전히 중앙 출구에서 수집된다. 이는 폴리스티렌 입자와 비교하였을 때 백혈구의 압축성이 높기 때문일 수 있다. 1066 mW의 인가 전

력에서 거의 모든 백혈구가 채널 벽으로부터 10 μm 떨어진 지점에 위치하는 출구 분지의 분리 경계를 넘어가기 시작하여 측면 출구로 흐른다. 반대로 말라리아 기생충은 작은 크기로 인해 인가 전력이 1066 mW로 증가될 때까지 ~100%가 중앙 출구에서 수집된다. 이 때, 중앙 출구로 수집되는 전체 세포의 개수 대비 대상 세포의 개수를 순도로 정의하였을 때, 말라리아 기생충은 ~98%의 높은 순도를 가지며 분리됨을 확인하였다. 인가 전력이 4200 mW로 높게 증가하였을 때, 적은 비율(10%)의 말라리아 기생충이 측면 출구에서 수집되었다. 그림 3(c)는 CL-SSAW 소자 기반의 분리 이전과 분리 이후 각 출구에서 수집되는 시료의 광학과 형광 이미지를 나타낸다. 동일한 위치에서 광학과 형광 이미지를 각각 촬영하여 형광 밝기 및 크기를 통해 백혈구와 말라리아 기생충을 구분할 수 있었다. 또한 중앙 출구로 수집된 시료의 경우, 형광 염색의 유무를 통하여 시료 내에 포함된 잔여물로부터 말라리아 기생충을 구별해낼 수 있었다.

본 연구에서 개발된 소자는 기존의 전극공정을 위한 복잡한 공정절차를 최소화하여 구현이 가능하고, 설계단계에서 주유동채널에 전달되는 표면탄성파의 생성을 위한 전극채널의 각도나 배열을 정확하게 결정할 수 있기 때문에 표면탄성파에 영향을 받는 입자 및 세포의 거동현상에 대한 보다 다양하고 정확한 분석연구에 유용할 것이다. 한편 후속 연구로서, 출구 분지 없이 유체 채널의 너비를 확장하여 표면탄성파에 의한 각 세포의 측면 이동량의 차이를 극대화시킨 후, 세포의 크기별로 유동하는 위치에 따라 구별하는 방식을 개발하고 있다. 이를 이용하면 분리 성능을 향상시키기 위한 출구 분지의 설계가 필요하지 않으며, 출구로 빠져 나오는 시료의 수집 없이 이미지 분석을 통해 직접 계수하여 각 세포의 구성비율을 평가할 수 있다는 장점이 있다.

IV. 고찰 및 결론

본 연구에서는 CL-SSAW 기반 입자/세포의 크기 별 분리 소자를 개발하였으며, 이 소자는 백혈구로부터 말라리아 기생충을 분리하는 데에 활용되었다. SSAW를 발생하기 위한 기존 패터닝 된 금속 전극을 대체하기 위해 개발된 전도성 액체 기반의 전극 채널은 저렴하고 쉬운 제작공정, 전극 채널과 유체 채널 사이의 신뢰성 높은 평행 정렬을 장점으로 한다. CL-SSAW 소자를 이용하여 12 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유동 조건에

서 2와 10 μm 크기의 입자를 성공적으로 분리하였으며, 더 나아가 말라리아 기생충은 ~98%의 고순도로 백혈구로부터 분리되었다. 본 CL-SSAW 소자는 향후 진단 현장(point-of-care, POC)에서 분리와 농축을 포함하는 시료 전처리를 위한 강력한 도구로서 활용될 수 있을 것이라 예상된다.

References

- [1] WHO. World Malaria Report 2015. Switzerland: WHO; 2015.
- [2] Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, Thomas SW, Shindi H, Whitesides GM. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Analytical Chemistry*. 2008;80:3699-707.
- [3] Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, Silva AJD. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(3):1087-9.
- [4] Pamme N. Continuous flow separations in microfluidic devices. *Lab on a Chip*. 2007;7:1644-59.
- [5] Carlo DD. Inertial microfluidics. *Lab on a chip*. 2009;9(21):3038-46.
- [6] Yuan D, Zhao Q, Yan S, Tang SY, Alici G, Zhang J, Li W. Recent progress of particle migration in viscoelastic fluid. *Lab on a chip*. 2018;18:551-67.
- [7] Nam J, Huang H, Lim H, Lim C, Shin S. Magnetic Separation of Malaria-Infected Red Blood Cells in Various Developmental Stages. *Analytical Chemistry*. 2013;85:7316-23.
- [8] Holmes D, Morgan H, Green NG. High throughput particle analysis: Combining dielectrophoretic particle focusing with confocal optical detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006;21:1621-30.
- [9] Ding X, Li P, Lin SCS, Stratton ZS, Nama N, Guo F, Slotcavage D, Mao X, Shi J, Costanzo F, Huang TJ. Surface acoustic wave microfluidics. *Lab on a chip*. 2013;13:3626-49.
- [10] Yeo LY, Friend JR. Surface acoustic wave microfluidics. *Annual Reviews Fluid Mechanics*. 2014;46:379-406.
- [11] Nam J, Lim CS. A conductive liquid-based surface acoustic wave device. *Lab on a chip*. 2016;16:3750-5.
- [12] Nam J, Kim JY, Lim CS. Continuous sheathless microparticle and cell patterning using CL-SSAWs (conductive liquid-based standing surface acoustic waves). *AIP Advances*. 2017;7(1):015314.
- [13] Yosioka K, Kawasima Y. Acoustic radiation pressure on a compressible sphere. *Acta Acustica united with Acustica*. 1955;5(3):167-73.
- [14] Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science*. 1998;28:153-84.

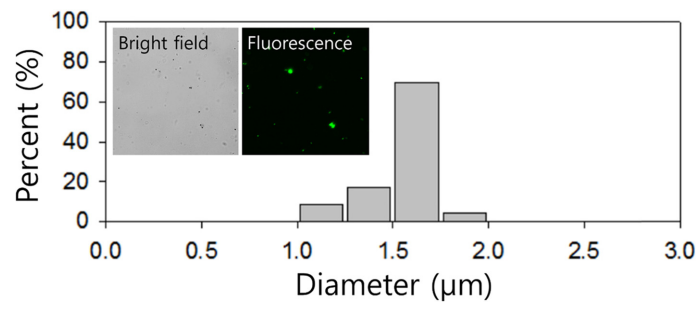


그림 S1. 말라리아 기생충의 크기 분포. (삽입 그림) 말라리아 기생충의 광학 및 형광 현미경 이미지

Fig. S1. Size distribution of malaria parasites. (Inset figure) Bright-field and fluorescent microscopic images of malaria parasites