

전기 저항법을 이용한 Micro Particle Counter Micro Fluidic Device 개발

이 준*, 윤덕원**, 채호철*, 한창수***

*한양대 대학원 정밀기계공학과, **한양대 대학원 메카트로닉스 공학과,

***한양대 기계정보경영학부

초록

Recently many researches related with biotechnology are processed and it is the situation that research about micro fluidic devices is active. Micro fluidic devices has been one of the most widely used devices for the analysis in biotechnology because they have many advantages, flexibility transparency, thermal and electrical stability, nontoxic, etc. In this study, micro fluidic device with PDMS is developed for particle counter which separates a small quantity of particles. The principle of micro particle counter is electrical-impedance method, and it was also applied hydrodynamic flow focusing. It is more efficient method to analyzing particles furthermore it can be applied to cell counting for biotechnology.

1. 서론

Nanotechnology 의 발달로 반도체 산업뿐만 아니라 그 이외의 분야에서도 손쉽고 빠르게 Micro-device 를 사용할 수 있게 해주고 있다. 특히 중요한 응용분야로 인식되고 있는 Micro Devices 을 주로 사용하는 생물학과 의학 분야의 새롭고 다양한 요구사항들과 문제점들을 만족시키고 풀어나갈 해결책으로 Micro-Bio Chip 이 제시되었다. 때문에 많은 사람들이 연구에 참여하여 그 결과로 매우 다양한 Micro-Bio Chip 이 만들어지고 있다. DNA Chip, 단백질 Chip, Micro Fluidics 를 이용한 Chip 등이 그 예라 할 수 있다. 특히 본 논문에서 연구한 Particle Counter 는 이러한 생물학이나 의학 분야에서 정량적인 실험 분석에 필요한 Cell Counter 로의 응용이 가능하다.

Particle Counting 은 크게 광학적인 방법과 전기 전기적 방법 두 가지로 나눌 수 있다. 레이저 혹은 다른 광원을 사용하여 광경로에 particle 이 지나갈 때 발생하는 신호의 변화를 감지하는 방법 혹은 particle 에 부착된 형광 물질을 센서로 감지하는 광학적인 방법과 교류전기장을 particle 이 지날 때 생기는 신호의 변화 혹은 일정한 전압을 가하고 있는 미세한 틈을 particle 이 지날 때 생기는 신호의 변화를 감지하여 counting 을 하는 전기적인 방법이 있다.

광학적인 방법은 에너지의 세기가 큰 레이저를 주로 이용하기 때문에 세포에 손상을 입힐 가능성이 크고, 또한 형광물질을 사용하는 방법은 시약과 검출하는데 필요한 장비사용에 어려움이 있다. 따라서 본 논문에서는 전기적인 방법을 사용하기로 한다. 물론 전기장을 가하게 되면 세포에 손상이 갈 위험이 있지만, 작은 양의 전압을 가함으로써 손상을 막고자 한다.

또한 전기신호의 검출에 사용되는 전극을 사용하지 않고 전기가 흐를 수 있는 채널을 만듦으로

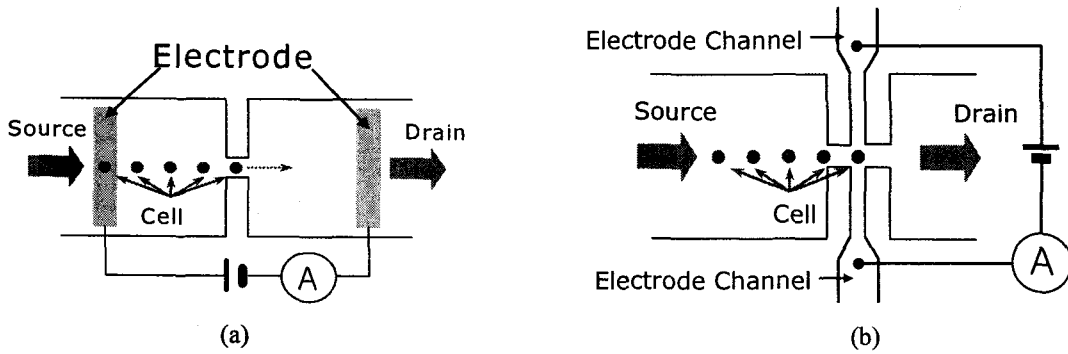


Fig. 1 Scheme of aperture-impedance method(a) and proposed particle counter's principle(b)

써 전극을 올리는데 필요한 여러 가지 공정들을 생략하고자 하였다. 샘플들을 이송하기 위해 생물학 분야에서 널리 사용하는 주사기 펌프를 사용할 것이며, 본 논문에서는 particle counter 제작을 위한 선행실험을 진행하였다.

2. 원리

일반적인 전기 저항법은 1956년에 Coulter에 의해 소개되었다.⁽¹⁾ 특히 이 방법은 혈액 세포를 counting 하는데 널리 사용되는 방법이다. Fig. 1(a)은 설계한 counter의 측정원리를 나타낸 것이다. 두 개의 전극이 source(inlet)측과 drain(outlet) 앞쪽의 reservoir에 올려져 있다. Aperture의 크기는 counting하고자 하는 sample의 크기에 따라 정해지며, 두 전극 사이에는 일정한 직류 전압을 공급한다. 세포가 희석되어 있는 sample 용액이 inlet을 지나 aperture 사이를 통과하고 다시 outlet을 통해 밖으로 배출되게 된다. 이때 sample 용액 안의 세포가 aperture를 지나게 되면 저항값이 변하게 되고, 저항값이 변함에 따라 측정하고 있는 전압이 변하게 되고 이때 생기는 Pulse를 counting 하면 aperture를 지나간 세포의 숫자를 셀 수 있게 된다. 따라서 다음 식(1)로 저항값의 변화를 알 수 있다.

$$\Delta R = \frac{\rho}{A^2} V_{Cell} \quad (1)$$

여기서 ΔR 은 저항값의 변화, ρ 은 전해액의 비저항값, A 는 aperture의 단면의 넓이, V_{cell} 은 통과하는 cell의 부피이다. 따라서 저항값의 변화는 cell의 크기에 비례하게 된다.⁽²⁾ Fig. 1(b)는 새롭게 고안된 전기 저항법을 이용한 Particle Counter의 원리를 보여준다. 일반적인 전기 저항법과 다른 점은 전압을 가하는 전극을 증착시키는 공정을 배제하였다. 따라서 전류는 Electrode channel을 통하여 흐르게 되고 세포가 aperture를 지나가면서 저항값을 변화시켜 Pulse 신호를 만들어 낼 것이다. 이 Pulse 신호를 counting 하여 aperture를 지나간 세포의 개수를 측정한다.

3. 실험 방법

3.1 장치의 세부사항

Particle counter를 만들기 위해 마이크로 몰드를 사용하였다. 마이크로 몰드는 Si wafer 위에 Photo resistor를 도포하여 노광 과정을 거치는 lithography를 거쳐 설계한 Micro-fluidic Channel을 생성하고 필요 없는 부분을 제거해서 mold를 만들었다. Photo resistor는 negative 형태의 MICROCHEM사의 SU-8을 사용하였고 channel의 높이는 50um으로 제작하였다. PDMS는 다우 코닝사의 SYLGARD® 184 silicone Elastomer를 사용하였다.

3.2 제작 과정

아래의 Fig. 3은 counter의 제작 과정을 그림으로 보여준다. (a) Si wafer 위에 Photo

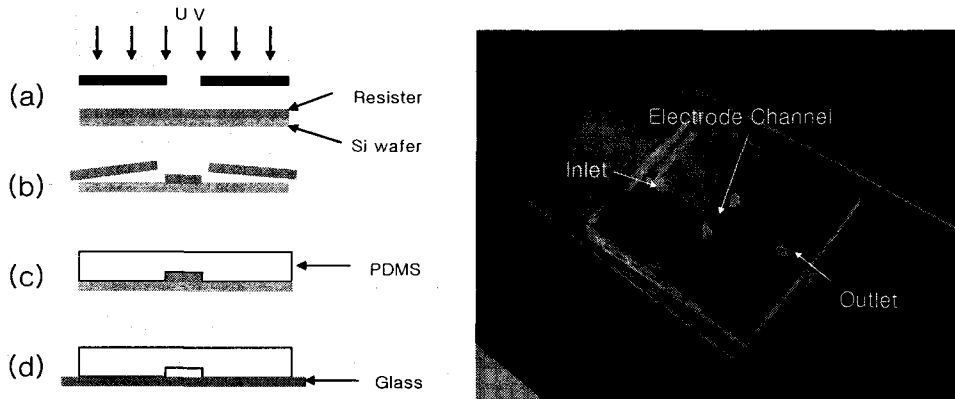


Fig. 2 Fabrication Progress and Picture of particle counter : proto type 2

resister를 코팅한 후 마스크를 씌워 UV를 조사한 후 노광시킨다 (b) developing 과정을 거쳐 channel의 형상을 만든다 (c) PDMS를 부어 오븐에 넣어 경화시킨 다음 몰드(Si wafer와 Resister)와 분리시킨다 (d)유리판 위에 경화시킨 PDMS를 얹어 micro channel을 만든 후 Inlet과 outlet을 뚫고 tubing한다.

PDMS를 경화시키기 전 PDMS를 진공 챔버에서 약 60분간 방치하여 공기방울이 생기는 것을 방지하여야 한다. 또한 65°C 오븐에서 4시간 동안 경화시킨 후 슬라이드 글라스와 접착시키기 전 air 플라즈마 처리를 해서 PDMS와 슬라이드 글라스가 완전히 밀착될 수 있도록 한다.

3.3 실험 과정

새로운 particle counter를 제작하기 전 두 가지의 prototype의 channel을 제작하여 새롭게 제안된 particle counter의 제작을 위한 선행 실험을 두 가지 실시하였다. 첫 번째는 새로운 전기 저항법으로 particle counting 결과를 얻을 수 있을지 판단하기 위해 전극을 올리는 종래의 방법 대신 electrode channel로 전류가 흐르는가에 대한 실험을 진행하였다. 좌우의 inlet과 outlet을 통해 PBS용액이 흘러 들어가고 흘러 나오게 된다. 그리고 전극을 대신 할 electrode channel에도 PBS용액을 주입한 뒤 전류가 흐를 수 있도록 연결한다. 용액과 도선을 연결하기 위해서는 전해질 용액인 PBS용액과 반응이 적은 백금(Pt) 와이어를 사용하였다.

두 번째 실험은 counting 하고자 하는 particle들의 밀도를 줄여 일렬로 channel안으로 흘러 보내기 위한 flow focusing 현상을 관찰하는 것이다. sample 용액과 buffer 용액의 flow rate를 조절하여 channel안에서의 유체유동을 측정하기에 적합하도록 조건을 만드는 실험을 진행하였다.

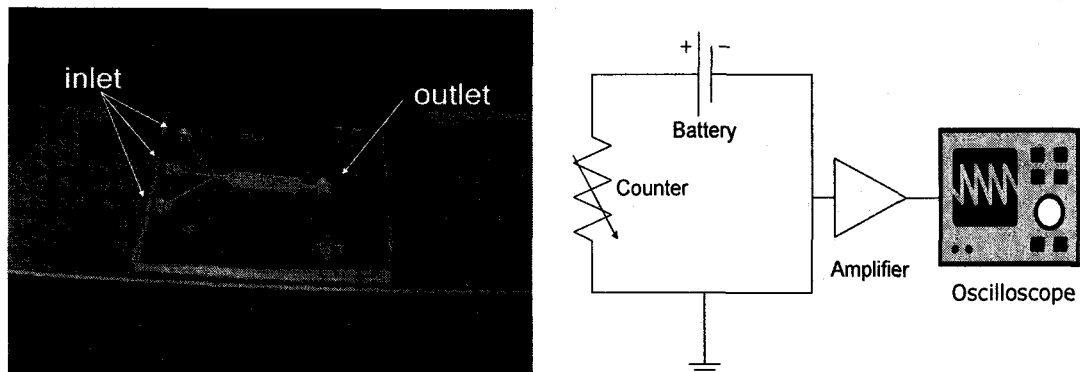


Fig. 3 picture of particle counter : prototype 2 and electric circuit

Table 1 Buffer 와 Sample 용액의 유속 변화

	(단위: ml/hr)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Buffer	1.8	1.8	1.8	3.6	3.6	5.4	16.2	32.4	32.4
Sample	1.8	0.9	3.6	1.8	3.6	1.8	3.6	3.6	32.4

두 개의 syringe 펌프를 사용하여 세 개의 Inlet중 첫 번째와 세 번째 inlet에 buffer 용액을 흘려 보내고, 두 번째 inlet으로는 샘플이 담긴 용액을 흘려 보내면서 Micro channel에서의 유동 흐름을 관찰하고자 하였다. Inlet 과 Outlet에 실제 세포와 배지를 흘려 보내기 전에 유동을 살펴보고자 색을 구분하기 쉬운 붉은색과 푸른색 잉크를 넣고 흐름을 살펴보았다.

4. 실험결과 및 고찰

4.1 Electrode channel

우선 Electrode channel내에서의 전류가 흐를 수 있는지 확인하였다. PBS용액이 차 있는 Electrode channel에 1.4V의 전압을 가하고 이를 amp에 연결하여 전류를 측정하는 방법을 사용하였다. Electrode channel의 저항값은 약 4-8 MΩ정도 나왔으며 PBS용액을 사용하기 때문에 시간에 따라 조금씩 또한 회로를 이용하여 전류를 측정한 값은 약 175nA ~ 340nA 까지 측정되었다.

4.2 Flow focusing

세 개의 inlet을 사용하여 유체를 흘려보았다. 첫 번째와 세번째 inlet으로는 buffer 용액을 의미하는 푸른색 잉크를 가운데 inlet으로는 샘플 용액을 의미하는 붉은 잉크를 주입시켰다.

각각의 유속 변화는 table 1과 같다. Buffer 용액의 속도를 증가하는 방향으로 실험을 진행하였으며, Sample용액도 유속을 증감하면서 실험을 진행하였다. 실험 장치를 현미경위에 설치하고 syringe 펌프를 사용하여 유속을 변화시켰다. 관찰되는 이미지로 sample용액의 너비를 측정하였으며 그 너비를 table 1 에서의 1번 실험에 비교하여 상대적인 수치를 구해 Fig. 4에 나타내었다. Buffer용액의 속도에 대한 sample 용액의 속도의 비가 클수록 sample 용액이 흐르는 너비가 넓어졌다. 따라서 용액의 속도를 조절하여 sample용액의 너비를 좁게 만들어 세포가 aperture를 줄을 지어 일렬로 지나갈 수 있는 flow focusing 현상을 만들 수 있을 것이다.⁽³⁾

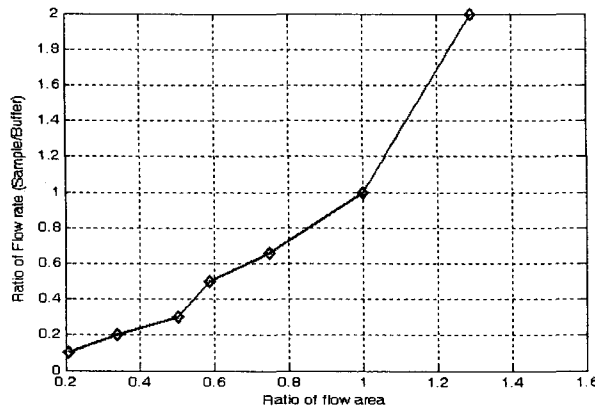


Fig. 4 Graph of sample flow-width ratio

4.3 고찰

본 연구에서는 전기저항법을 이용하여 particle counter microfluidic device를 개발하기 위한 선행실험을 하였다. 종전의 전극을 이용한 전기저항법 counter에 비해 counter를 만드는 공정을 줄이고자 하였으며, particle counting 효과를 높이는데 flow focusing 현상을 이용하고자 한다. 새롭게 제안된 electrode channel은 전류가 흐르는 것이 확인되었으며 이를 토대로 particle counter를 제작하고자 한다. 또한 inlet과 outlet을 통해 흐르는 유체의 속도로 flow focusing 현상을 조절할 수 있었고, 실제 counting에 적용할 수 있으리라 판단된다. 또한 첫 번째 실험결과로 미루어 볼 때 channel내에 아주 작은 기포가 발생하면 회로가 단락되기 때문에 주의가 필요하다. 따라서 본 실험을 통해 새롭게 제안된 전기저항법을 이용한 particle counter microfluidic device를 제작할 가능성을 확인하였고, 실제로 particle를 micro device에 주입하여 실질적인 counter의 성능을 확인하는 연구가 진행중이다.

참고문헌

- [1] W.H. Coulter, 1956, High Speed Automatic Blood Cell Analyzer, Proceedings of the National Electronics Conference, pp. 1034-1040
- [2] Daisuke Satake, Hiroyuki Ebi, Narihiro Oku, Koichiro Matsuda, Hidekuni Takao, Mitsuaki Ashiki, Makoto Ishida, 2002, A sensor for blood cell counter using MEMS technology, Sensors and Actuators B, pp. 77-81
- [3] Wang, Mark M, Tu, Eugene, Raymond, Daniel E, Yang, Joon Zhang, Haichuan, Hagen, Norbert Mo, 2005, Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching, Nature biotechnology, v.23 no.1, pp.83-87
- [4] Sohn, L. L. , Saleh, O. A. , Facer, G. R. , Beavis, A. J., Allan, R. S., Notterman, D. A., 2000, Capacitance cytometry: Measuring biological cells one by one, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.97 no.20, 2000, pp.10687-10690
- [5] Swomitra K. Mohanty¹, Lydia L. Sohn and David J. Beebe, 2004, Hybrid Polymer/Thin Film Impedance System for Label Free Monitoring of Cells, Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS, pp2561-2564
- [6] Saleh, O. A. ; Sohn, L. L.,2003,Direct detection of antibody-antigen binding using an on-chip artificial pore , Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.100 no.3, 2003, pp.820-824
- [7] Gao, J. ; Yin, X.-F. ; Fang, Z.-L., 2004, Integration of single cell injection, cell lysis, separation and detection of intracellular constituents on a microfluidic chip, Lab on a chip, v.4 no.1, pp.47-52)