미세유체장치를 이용한 표적세포의 무렌즈 이미징

Point-Of-Care monitoring using lensless microfluidic chip

*#문상준 [1]

*#S. J. Moon[1] (nanobiomems@dgist.ac.kr)[1]

[1] 대구경북과학기술원 로봇공학 전공

Key words : lensless imaging, microfluidic chip, immunoassay

개요

마이크로 및 나노 크기에 대한 미세 가공 기술의 최근 발전은 유체역학과 광학을 합쳐 높은 해상도 및 넓은 광학 면적 (Field Of View: FOV)을 가지는 생물학적 이미징 및 모니터링을 가능하게 하고 있다. 무렌즈 이미징 기술은 그 장치의 간단함으로 인해 감염증 진단과 질병의 현장 진단 (Point-Of-Care: POC) 을 가능하게 하고 있다. 이 기술은 나노미터 스케일 에서부터 밀리미터 크기 가지 적합한 해상도를 가지는 이미지를 검출할 수 있어 넓은 응용 범위에서 그 적용이 가능하다. 응용 범위를 확대하면 세포 그림자와 홀로그램 이미지에 의해 세포의 갯수를 CCD 센서로 감지하여 저해상도에게 넓은 이미지가 검출될 수 있어 렌즈 없이 단시간에 표적 세포의 유무를 검출할 수 있게 한다.

복강 내부 감염확인을 위한 Nuetrophil 의 무렌즈 이미징

세계적으로 약 8,000 환자가 최종 단계 신장병 (ESRD)을 발전하여 매년 그 증가율이 약 7 %에 달한다. 전통적인 혈액 투석 치료에 비해, 복막 투석은 비용, 이동성 및 의료적 편이 측면에서 높은 환자 만족도를 제공한다. 그러나, 복막 투석의 주요 위험 요인 중 하나는 복막염의 발생, 즉 복막에서의 염증이다. 현재 복막에서의 염증의 진단은 거의 감염의 최종 단계에서야 수동적으로 확진이 가능하다. 복막 염증과 그 합병증을 피하기 위해 환자가 조기에 치료의 개시 시기를 평가할 수 있도록 하는 장치가

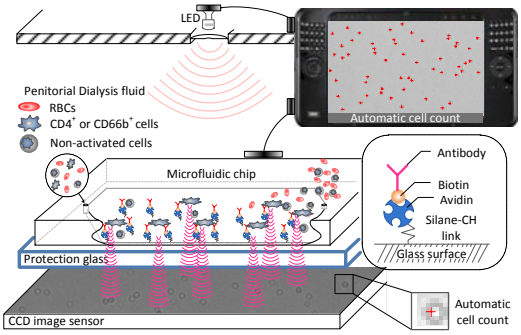

Fig. 1 Schematic description for a point-of-care (POC) monitoring platform. Target cells express specific surface markers, CD4 or CD66b. The POC monitoring platform utilizes an immunoassay based microfluidic chip. Target cells, $CD4^+CD3^+$ or $CD66b^+$, are captured in microfluidic channel. A lensless wide field-of-view (FOV) CCD sensor performs cell shadow imaging and a portable microprocessor automatically counts the cell images.

필수적으로 요구되고 있다. 복막 염증 방어의 첫 번째 목표는, neutrophil과 같은 방어 세포가 복막 내부의 감염 사이트에서 미생물을 분쇄함으로써 중요한 역할을 수행함에 따라 이 특정 세포를 계수 하여 POCT로 사용한다. 그러나 현재 대상 세포를 현미경을 사용하여 염색, Wright - Giemsa이 염색법, 한 후 수동으로 검사 하여 개별적으로 각 세포의 개수를 파악하기 때문에 POC로의 적용이 불가하다 [1,2].

이러한 문제를 극복하기 위해 면역 분석법 기반의 미세 유체 장치 칩을 빠르고(~ 일분 / 샘플), 싸게(<$ 1/회) 이용 할 수 있는 진단 도구가 무렌즈 이미징을 통해 그림 1과 같은 방식으로 활용된다. 특정 감염에 의해 활성화된 neutrophils은 특정 표면 마커, CD66b

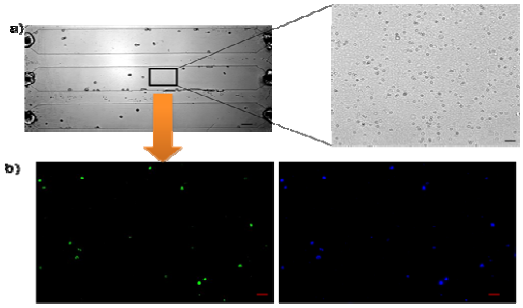

Fig. 2 Captured neutrophils in a microfluidic channel. (a) Bright field image using wide FOV imaging sensor. (b) fluorescent images (Left: anti-CD66b+-FITC, Right: DAPI stain), scale bar: 100um.

를 발현한다. POC 복막염 모니터링 플랫폼은 CD66b+ 세포를 포집하는 면역 분석법을 기반으로 하는 칩을 사용하고 있다. 대면적 관찰 면적(FOV)을 가진 CCD 센서가 CD4 세포에서와 같이 자동으로 셀 이미지를 카운트하여 휴대용으로 제작하여 복막 내 감염에 대한 빠른 진단을 도울 수 있게 된다.

먼저, 복막 내 유체에 대한 샘플로 전 혈액을 이용한 실험을 시행한다. 전 혈액에서 neutrophils을 활성화하기 위해 IL8 단백질 (1 × 25 μg)이 사용되었다. 활성 neutrophils의 수는 IL8 농도 및 배양 시간의 함수로 측정되었다. 활성에 대한 최대량은 100 ng/ml의 IL8 과 Incubation시간 100 분으로 관찰 되었다. 따라서, 모든 neutrophils은 이러한 조건 하에서 모두 활성화된 것으로 이후 neutrophils을 이용한 실험의 기본 활성 조건으로 사용되었다. 특히, 네 가지 실험실 기반의 기존 계수 방법을 활성화된 세포의 총량을 계산하기 위한 방법으로 사용되었다. 기존의 감지 방법과 미세 칩과 무렌즈 이미지를 이용한 방법을 비교하기 위해 각각의 표준 계수 법과 비교되었다.

실험을 위한 마이크로 칩은 면역 분석법을 기반으로 한 표면 화학으로 준비되었다. CD66b의 항원은 칩 표면에 고정되어 neutrophils을 포집 할 수 있으며 형광 항체 CD45와 CD66b+를 각 포집 세포의 식별 사용하였다. 그림 2은 미세 유체 채널에서 포집된 neutrophils를 보여준다. 이는 POCT 플랫폼을 사용하여, 현미경 하에서의 백색광 이미지와 넓은 FOV 이미징 센서의 결과를 비교하여 나타내었다. 또한, CD66b+ - FITC와 DAPI를 이용한 형광 이미지를 통하여 포집 한 세포를 확인 하였다.

실험 결과, Wright - Giemsa 염색법과 같은 일반적인 Nuetrophil 계산 방법은 기본 기준 측정법 (Gold Standard)과 비교하여 낮은 수치를 보여주었을 뿐만 아니라 확률적 측정과 비교하여 다른 직접 계수 법에서 보다 낮은 수치를 보였다. 또한, 샘플 표면의 청결은 CCD는 시스템이 세포와 먼지 입자와 같은 부유물을 제거하는 것이 중요했다. 작은 먼지라도 CCD의 표면에서 확대되어 세포와의 구별을 어렵게 한다. IL8에 의해 활성화된 Neutrophil은 하나의 특정한 CD66b+ 항원-항체 결합을 사용하여 칩의 표면에서 포집할 수 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. K. T. Kotz, et al., "Clinical microfluidics for neutrophil genomics and proteomics," Nat Med, vol. 16, 2010.

2. O. Riggio and S. Angeloni, "Ascitic fluid analysis for diagnosis and monitoring of spontaneous bacterial peritonitis," World J Gastroenterol, vol. 15, 2009.