〈 논문 〉

다수의 계수구역간의 검사체적을 이용한 소형 세포농도센서

이동우* · 이소연* · 조영호†

(2005 년 6 월 21 일 접수, 2005 년 11 월 22 일 심사완료)

Micro Cell Counter Using a Fixed Control Volume Between Double Electrical Sensing Zones

Dong Woo Lee, Soyeon Yi and Young-Ho Cho

Key Words : Cell Counter(세포 계수기), Coulter Counter(컬터 카운터), Electrical Sensing Zone(전기적 계수구역), Cell Concentration Sensor(세포 농도측정기)

Abstract

We present a novel flow-rate independent cell counter using a fixed control volume between double electrical sensing zones. The previous device based on the single electrical cell sensing in a given flow-rate requires an accurate fluid volume measurement or precision flow rate control. The present cell counter, however, offers the flow-rate independent method for the cell concentration measurement with counting cells in a fixed control volume of $22.9 \pm 0.98\ \mu\ell$. In the experimental study, using the RBC (Red Blood Cell), we have compared the measured RBC concentrations from the fabricated devices with those from Hemacytometer. The previous and present devices show the maximum errors of 20.3% and 16.1%, which are in the measurement error range of Hemacytometer (about 20%). The present device also shows the flow-rate independent performance at the constant flow-rates (5 $\mu\ell$/min and 10 $\mu\ell$/min) and the varying flow-rate (4, 2, and 4 $\mu\ell$/min). Therefore, we demonstrate that the present cell counter is a simple and automated method for the cell concentration measurement without requiring an accurate fluid measurement and precision flow-rate control.

기호설명

ρ_f : 전해질 용액의 전기 저항률
A : 미소유로의 단면적
a : 미소입자의 단면적
D : 미소유로의 직경
D : 미소입자의 직경

† 책임저자, 회원, 한국과학기술원 바이오시스템학과 및 기계공학과, 디지털나노구동연구단
E-mail : nanosys@kaist.ac.kr
TEL : (042)869-8691 FAX : (042)869-8690
* 한국과학기술원 바이오시스템학과, 디지털나노구동연구단

1. 서 론

최근 질병 진단이나 생화학 실험을 위한 도구로써 커다란 잠재력을 가지고 있는 집적화된 생화학적 분석 시스템의 개발과 함께, 그 구성요소로써 소형화된 세포 농도측정기에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나, 기존의 소형화된 자동 세포 농도측정기[1,2]는 단위 시간당 단일 계수구역을 지나간 세포의 수와 유량을 이용하여 세포의 농도를 측정하기 때문에 농도측정기의 정확도가 외부의 유체 제어 시스템의 성능에 많은 영향을 받게 되므로 정밀한 농도 측정을 위해서는 고가의 정밀 유체 제어 시스템이 필수적이다.

특히 랩온어칩(Lab on a chip) 혹은 마이크로타스(μTAS: Micro Total Analysis Systems) 등 집적된 생화학적 분석 시스템에 세포 계수기를 집적 하는 경우, 칩 혹은 시스템 내에 집적화된 마이크로 펌프의 유량 제어 성능한계로 인해 세포 농도 측정이 힘들어 단순한 계수[3,4]만이 가능한 실정이다.

본 논문에서는 Fig. 1 과 같이 일정한 체적을 가지는 검사체적의 입구와 출구에 있는 계수구역을 이용하여 세포 농도를 측정하는 방법을 제안하였다. 제안한 측정법은 유량에 영향을 받지 않고 농도를 정밀하게 측정할 수 있기 때문에, 기존의 세포 농도측정기의 가격과 크기를 크게 줄일 수 있다. 또한 집적된 마이크로 펌프 성능이 농도측정의 정확성에 영향을 미치지 않기 때문에, 집적된 생화학적 분석 시스템에 적용이 용이하다.

Fig. 2 는 두 개의 계수구역 사이에 있는 검사체적을 이용하여 세포의 농도를 측정하는 원리를 나타낸다. 초기에 검사체적 내에는 세포가 없는 완충용액으로만 채워져 있기 때문에, 유입구에서 계수된 세포 수(N_{in})와 유출구에서 계수된 세포 수(N_{out})의 차이인 검사체적 내의 세포 수(N_{cv}=N_{in}-N_{out})는 처음에는 일정하게 증가하지만 결국 세포의 농도에 따라서 일정한 값에 수렴하게 된다. 이 수렴치를 검사체적 값으로 나누게 되면 유량에 영향을 받지 않고 농도를 실시간으로 측정할 수 있다.

2. 이론적 해석 및 설계

2.1 전기적 계수구역(Electrical Sensing Zone)

본 세포 농도측정기는 Fig. 1 에서와 같이 일정한 체적을 가지는 검사체적과 그 입구와 출구에 위치한 두 개의 계수구역으로 구성된다.

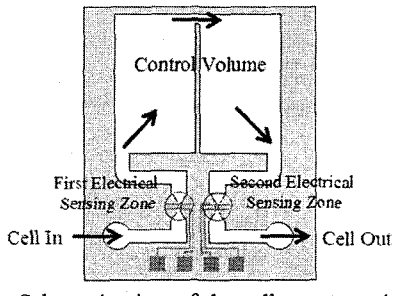

Fig. 1 Schematic view of the cell counter using the control volume between double electrical sensing zones

전기적 계수구역[5]은 전해질로 채워진 미소유로 내에 유전물질인 세포가 지나가게 될 때, 전해질과 세포사이의 분극화 현상으로 인해서 생기는 미소유로의 저항변화를 이용하여 세포의 유무를 판단하는 방법이다. 전해질과 세포사이의 분극화 현상은 미소유로에 흐르는 전류의 흐름을 방해하므로 미소유로의 저항을 증가시키는 역할을 한다. 그러므로 전기적 계수구역을 구성하는 미소유로의 저항변화를 측정하여 전기적 계수구역을 지나간 세포의 수를 측정할 수 있다. 저항변화율은 Fig. 3 에서와 같이 세포와 미소유로의 크기에 따라 달라지며, 요소거리(δl)에 따른 저항변화($\delta(\Delta R)$)는 다음과 같다.

$$d(\Delta R) = dR - dR_0 \approx -\rho_{el,f}\, dl \frac{A_p}{A_o^2}\left(1-\frac{A_p}{A_0}\right)^{-1} \qquad (1)$$

위 식에서 ρ_f 는 전해질 용액의 전기 저항율, A 와 a 는 각각 미소유로와 미소입자의 단면적을 나타낸다.

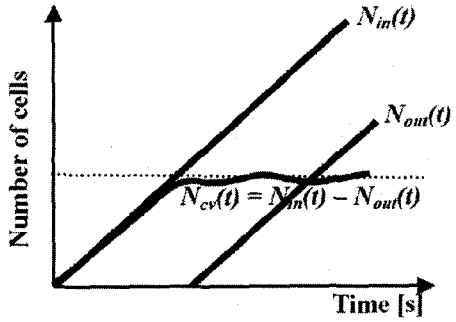

Fig. 2 Cell concentration measurement principle based on the number of cells in the fixed control volume

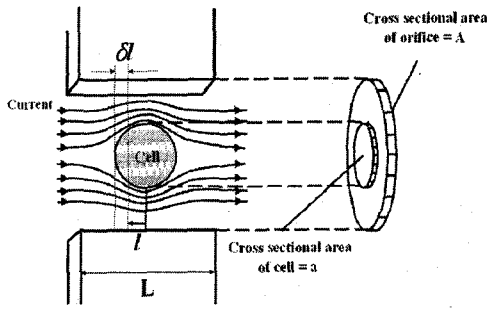

Fig. 3 Principle of electrical sensing zone

미소입자가 구라고 가정하고 식 (1)을 세포의 중심으로부터의 반지름방향(l)으로 적분하게 되면 미소입자의 유무에 따른 저항변화(Δ R) 값을 다음과 같이 얻을 수 있다.

$$\Delta R = 2\rho_{cell}\left(\frac{\arctan\left(r_p / \sqrt{\frac{A_o}{\pi} - r_p^2} \right)}{\pi\sqrt{\frac{A_o}{\pi} - r_p^2}} - \frac{r_p}{A_o} \right) \quad (2)$$

위 식에서 D 와 d 는 각각 미소유로와 미소입자의 직경을 나타낸다.

2.2 전기적 계수구역 및 검사체적 설계

미소입자의 전기적 검출을 위한 계수구역의 개략도는 Fig. 4 와 같다. 본 소자의 설계를 위한 계수 대상 미소입자 는 전기 전도도가 약 1.6 S/m 인 PBS(Phosphate Buffered Saline) 완충용액 내의 적혈구(RBC)이며, 적혈구는 부피가 대략 60~120$f\ell$ 인 지름 7 ㎛, 높이 2 ㎛인 원기둥 모양이다. 적혈구의 크기를 고려하여 계수구역을 구성하는 미소유로를 높이 10 ㎛, 폭 10 ㎛, 길이 40 ㎛으로 설계하였다. 세포가 미소유로를 지나갈 때 생기는 저항변화의 측정을 위해 간격이 10 ㎛인 Au/Cr 전극(폭:5 ㎛)을 미소유로 내에 집적하여 사용하였다.

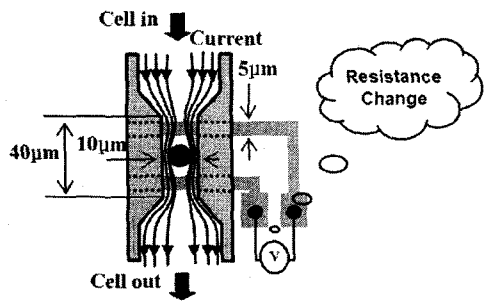

Fig. 4 Schematic view of electrical sensing zone

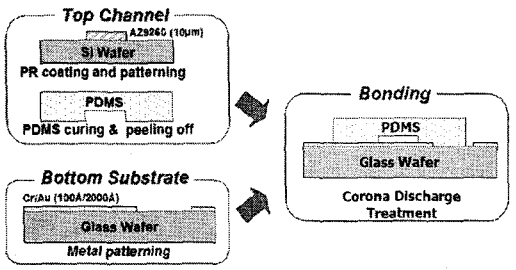

Fig. 5 Fabrication processes of the cell counter

수식 (2)을 이용하여 이론적으로 구한 미소유로의 저항, 저항변화 그리고 저항변화로 인해 생기는 전압변화를 예측하였으며, 그 결과는 Table 1 과 같다.

검사체적은 기존의 적혈구 농도 측정기인 Hemacytometer[6]의 기준 샘플 체적이 0.5 $\mu\ell$인 것을 고려하여 가로 7mm, 세로 6mm, 높이 10 ㎛ 인 유로로 구성된 0.423 $\mu\ell$의 체적으로 설계하였다.

3. 소자 제작

본 세포 농도측정기의 제작공정은 Fig. 5 에 도시한 바와 같이 전극이 형성된 유리기판의 제작, PDMS(PolyDiMethy Siloxane)를 이용한 미소유로의 제작, 제작된 유리 기판과 PDMS 유로의 접합 의 세 가지 단계로 이루어진다.

먼저 전극이 형성된 유리기판 제작을 위해 Pyrex 웨이퍼 위에 전극으로 사용될 Cr 과 Au 를 각각 500Å 과 2000Å 두께로 증착한 후, 이들 금속박막을 습식식각 하여 전극을 형성하였다. 미소유로는 실리콘 웨이퍼 위에 형성된 10 ㎛ 두께의 AZ9260 (PhotoResist) 패턴을 이용하는 PDMS 마이크로 몰딩기법으로 제작되었다. 제작된 유리 기판과 PDMS 미소유로를 30W 의 RF Power 상태의 대기 플라즈마에 30 초 동안 처리한 후 접합하여 시편의 제작을 완료하였다. Fig. 6 는 제작이 완료된 시편과 계수구역의 확대 사진이다.

Table 1 Electrical property of electrical sensing zone

	R[MΩ]	ΔR[kΩ]	ΔV[V]
Theoretical	250	5.9(60fl) ~13.8(120fl)	1.8(60fl) ~4.21(100fl)
Experimental	-	-	1.5~5

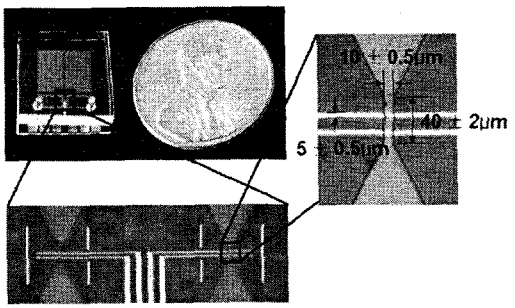

Fig. 6 Fabricated cell counter

4. 실험 결과

검사체적과 두개의 계수구역을 이용한 측정기의 성능 검증을 위해, 제작된 세포농도 측정기의 계수구역 성능을 평가하고, 기존의 단일 계수구역과 유량을 이용한 농도측정기와 비교 실험을 수행하였다. 또한, 유량조건을 다르게 하거나 주사기를 손으로 밀어서 생성한 불균일한 유량조건에서 제안된 세포 농도측정기를 사용하여 농도를 측정함으로써, 제안된 세포 농도측정기의 성능이 유량에 영향을 받지 않는 것을 실험적으로 검증하였다.

세포 농도측정기의 성능평가를 위한 실험장치는 Fig. 7 과 같다. 측정 장치는 크게 유체 공급부분과 전기적인 측정부분으로 이루어진다. 세포 농도 측정을 위해서 측정기에 PBS 완충용액을 채워 놓고, 적혈구 샘플을 주사기 펌프를 사용하여 측정기에 공급하였다. 저항변화를 전압변화로 측정하기 위해서 일정한 전압을 주입구와 유출구에 설치된 전극에 인가하고, 검사체적의 입구와 출구에 있는 각각의 계수구역에 집적된 2 쌍의 전극을 통해서 계수구역의 저항변화를 전압 차이로 측정한다. 이때 전압 차이를 측정하기 위해서 차동 증폭기를 사용하고, 고주파수의 전기적 잡음을 줄이기 위해 필터를 사용한다. 그리고 전기적 신호는 AD board 를 통해서 10kHz 주기로 컴퓨터에 저장하고, 전압 변화가 임계 값보다 높을 신호를 계수하여 각 계수구역을 자나간 세포를 계수한다.

계수구역의 성능을 실험적으로 평가하기 위해서, PBS 완충용액에 희석된 적혈구 샘플을 주입하여 적혈구가 계수구역을 지나갈 때 생기는 전압 변화를 측정하고, 전압 변화의 최소값을 기준으로 적혈구의 계수 조건을 정하였다. 계수구역에 적혈구가 지나갈 때의 전압 변화는 Fig .8 과 같이 측정되었다. Fig. 8 및 Table 1 에서 표시된 것과 같이 적혈구가 계수구역을 지나갈 때의 측정된 최소 전압이 1.5V 이상이므로 임계 전압 (threshold voltage)을 1.5V 로 하여 적혈구를 계수하였다.

제안한 세포 농도측정기의 성능 검증을 위해, Table 2 에서와 같이 단일 계수구역과 유량을 이용한 기존의 측정기와 두 개의 계수구역과 검사체적을 이용한 새로운 측정기에서 서로 다른 농도 값을 가지는 3 종 적혈구(RBC) 샘플의 농도를 측정하였고, 이를 Hemacytometer[6]의 측정 결과와 비교하여 성능을 분석하였다.

단일 계수구역에 일정한 유량을 공급하여 세포를 계수한 결과, Fig. 9 와 같이 계수구역을 지나는 누적 세포 수가 시간에 따라 일정하게 증가하는 것을 볼 수 있다. 반면, 두 개의 계수구역을 이용하여 검사체적 내의 세포 수를

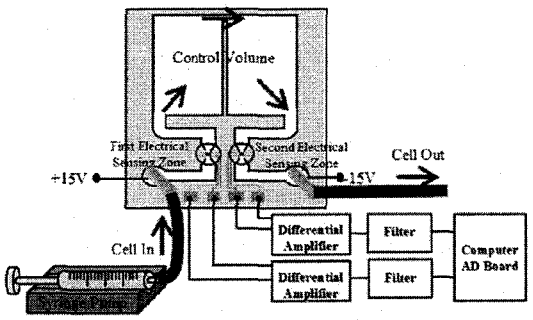

Fig. 7 Experimental apparatus for cell counter using double electrical sensing zones and the control volume

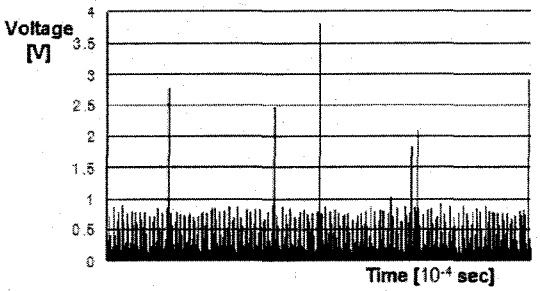

Fig. 8 Measured electrical signals from single electrical sensing zone

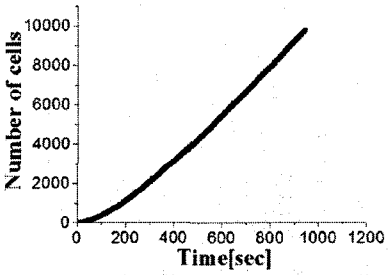

Fig. 9 Measured cell number from cell counters using single electrical sensing zone and flow rate of 71 $\mu\ell$/hr

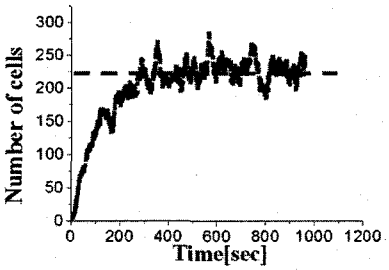

Fig. 10 Measured cell number from cell counters using double electrical sensing zones and the control volume of 0.423 ± 0.01 $\mu\ell$

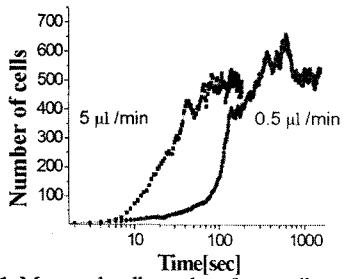

Fig. 11 Measured cell number from cell counters using double electrical sensing zones and the control volume of 0.423±0.01 $\mu\ell$ at the different flow rate

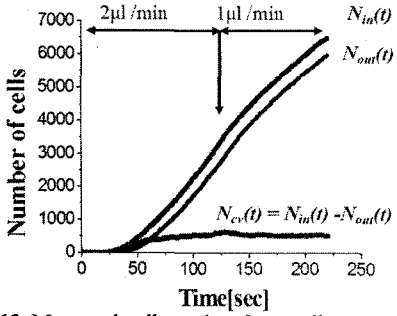

Fig. 12 Measured cell number from cell counters using double electrical sensing zones and the control volume of 0.423±0.01 $\mu\ell$ at the flow-rate variation during cell concentration measurement

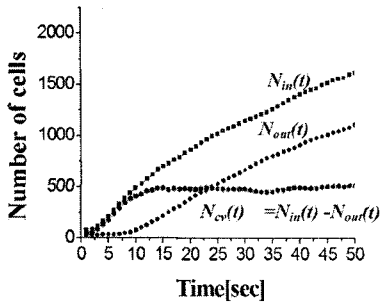

Fig. 13 Measured cell number from cell counter using double electrical sensing zones and control volume of 0.423±0.01 $\mu\ell$ at the unknown and unstable flow-rate generated by hand

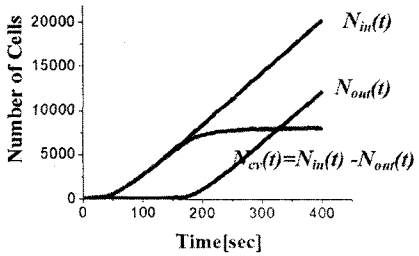

Fig. 14 Measured cell number from cell counter using double electrical sensing zones and control volume of 22.9±0.98 $\mu\ell$

Table 2 Comparison of the experimental results

Hema-cytometer	Single electrical sensing zone + flow-rate of 71μl/hr	Double electrical sensing zones + control volume of 0.423±0.01 μl
5.80±0.7 [10^5 cells/ml]	5.67±0.30 (2.2%)	5.20±0.15 (10.3%)
7.70±0.7 [10^5 cells/ml]	7.30±0.46 (5.2%)	7.49±1.16 (2.7%)
1.5±0.17 [10^5 cells/ml]	1.25±0.12 (8.7%)	1.21±0.05 (5.2%)

(): maximum error of the mean value compared to Hemacytometer

Table 3 Results of different flow-rate conditions

Hema–cytometer	Double Electrical Sensing Zones + Known Control Volume (0.423 ±0.01 μl)			
	5 μl /min	0.5 μl /min	2 μl /min →1 μl /min	Unknown & Ustable Flow Fate
1.15 ±0.17 [10^6 cells/ml]	1.14 ±0.06 (0.8%)	1.24 ±0.08 (7.8%)	1.26 ±0.08 (9.6%)	1.13 ± 0.05 (1.7%)

(): maximum error of mean value compared to Hemacytometer

계수한 결과, Fig. 10 과 같이 초기에는 세포 수가 증가하지만 결국에는 일정한 수렴 값을 기준으로 진동하는 것을 볼 수 있었다. 일정한 수를 기준으로 검사체적 내의 세포 수가 진동하는 것은 공급되는 적혈구의 농도가 이상적으로 균일하게 분포하지 않기 때문에 생기는 현상이다. 하지만 평균치와 검사체적(0.423±0.01 $\mu\ell$)을 이용하여 농도를 계산해본 결과, Hemacytometer 를 기준으로 최대 측정오차가 10.3%로 나타났다. 이 수치는 단일 계수구역과 유량(71±1 $\mu\ell$/hr)을 이용한 기존의 측정기의 오차(8.7%)와 비슷하고, Hemacytometer 의 측정오차 범위(~20%) 보다 작았다.

본 논문에서 제안한 두 개의 계수구역과 검사체적을 이용한 측정기의 성능이 유량에 영향을 받지 않는 것을 실험적으로 검증하기 위하여, 유량을 10 배 변화시킨 조건, 농도 측정 중에 유량을 2 배로 바꾼 조건, 손으로 주사기를 밀어서 형성한 불균일한 유량조건에서 각각 농도 측정을 수행하였다.

유량이 10 배 차이가 나는 조건에서 농도를 측정한 결과, 검사체적내의 세포 수는 Fig.11 과 같이 두 경우 모두 유량 조건에 관계없이 일정한 수에 수렴하였고, 유량에 비례해서 농도 수렴 시간이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

농도 측정 중에 유량을 2 배 바꾸어준 결과에서는 Fig. 12 과 같이 두 개의 계수 구역에서의 세포 수 증가율은 유량 변화에 따라 변하는 것을 볼 수 있었지만 검사체적 내의 세포 수는 유량 변화에 영향을 받지 않고 일정한 범위 내에서 진동하는 것을 볼 수 있었다. 두 경우 모두 Table 3 과 같이 측정한 세포 농도의 최대 오차는 모두 10.3% 보다 낮은 수치를 나타내었다.

특히, 외부의 유체 제어 시스템 없이 손으로 주사기를 밀어서 형성한 임의의 불균일한 유량조건에서 농도를 측정할 경우, 단일 계수구역과 유량을 이용하는 기존의 농도측정기에서는 농도 측정이 불가능했지만, Fig. 13 에서와 같이 두 개의 계수구역과 검사체적을 이용한 농도측정기에서는 최대 오차가 10.3% 이내로 정확한 농도 측정이 가능했다.

검사체적의 크기에 따른 농도측정 성능을 평가하기 위해서 집적된 0.423 $\mu\ell$의 검사체적 이외에 두 개의 계수구역사이에 Tygon tube 를 연결하여 22.9 $\mu\ell$의 검사체적을 형성하고, 이를 이용하여 농도측정을 수행 하였다. 0.423 ± 0.01 와 22.9 ± 0.98 $\mu\ell$ 인 검사체적을 사용한 측정결과에서 측정 시간은 각각 2 분, 5 분이고, 최소 측정 범위는 각각 5.88×10^5 과 1.10×10^5cells/㎖으로 검사체적이 커짐에 따라 측정 시간은 늘어나지만, 측정 범위는 넓어지는 것을 볼 수 있었다. 뿐만 아니라, Fig. 14 에서와 같이 검사체적이 커지게 되면 검사체적 내의 세포 수가 증가하여 불균일한 적혈구의 분포로 인한 수렴 값에서의 진동이 상대적으로 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다.

5. 결 론

본 연구에서는 외부의 유체 제어 시스템에 영향을 받지 않고 세포의 농도를 측정하는 새로운 형태의 세포 농도측정기를 제안하였다. 실험적으로 적혈구의 저항변화를 전압 변화로 측정하고, 계수조건(1.5V 이상)을 결정하였다. 제작된 세포 농도측정기의 성능은 임의의 불균일한 유량 조건에서도 최대 오차가 10.3%로 Hemacytometer 의 오차 범위(20%)보다 작은 것으로 측정되었다. 본 연구에서 제안한 세포 농도측정기는 유량 변화에 영향을 받지 않아, 정교한 유체 제어 시스템을 필요로 하지 않기 때문에 기존의 세포 농도측정기의 가격을 낮추고 크기를 줄일 수 있다. 뿐만 아니라 집적된 마이크로 펌프의 성능에 영향을 받지 않고 정확한 농도 측정이 가능하기 때문에 집적된 생화학적 분석 시스템에 적용 가능하다.

후 기

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

참고문헌

(1) Koch, M., Evans, A.G.R. and Brunnschweiler, A., 1999, "Design and Fabrication of a Micromachined Coulter Counter," *Journal of Micromechanics and Microengineering*., Vol. 9, pp. 159~161.

(2) Larsen, U.D., Blankenstein, G. and Branebjerg, J., 1997, "Microchip Coulter Particle Counter," *Proceedings of International Solid State Sensors and Actuators Conference 1997*, Chicago, USA, pp. 1319~1322.

(3) Son, S.U., Choi, Y.H. and Lee, S.S., 2003, "Fabrication of Micro Cell Counter Integrated with Oxygen Micropump," *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems 2003*, Boston, USA, pp. 179~182.

(4) Lee, G.-B., Fu, L.-M., Yange, R.-J. and Pan, Y.-J., "Micro Flow Cytometers Using Electrokinetic Forces with Integrated Optical Fibers for On-Line Cell/Particle Counting and Sorting," *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems 2003*, Boston, USA, pp. 45~48.

(5) Allen, T., 1990, *Particles Size Measurements*, Chapman and Hall, London, New York.

(6) Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A., 2002, *Microbiology*, McGraw-Hill, New York.