

유체영동 기반의 입자분리현상을 이용한 세포 크기 측정방법

최성용 · 박제균[†]

Microfluidic cell sizing using hydrophoretic size-based separation

Sungyoung Choi and Je-Kyun Park[†]

Abstract

This paper presents a microfluidic cell sizing method using hydrophoretic size-based separation. By exploiting slanted obstacles in a microchannel, we can generate a lateral pressure gradient so that microparticles can be deflected and arranged along lateral flows induced by the gradient. Using such movement of particles, we discriminated 8 to 15 μm -sized beads. We measured the size of U937 cells by comparing the hydrophoretic response of the cells to those of the size-standard beads whose diameters are known. Due to its simple design and fabrication, the sizing method can be easily integrated with other microfluidic components such as cell culture chambers conducting on-chip sizing and sorting.

Key Words : cell sizing, hydrophoresis, particle separation, microfluidics

1. 서 론

세포는 각기 고유한 분열조절기작을 가지고 있으며, 그 중 하나로써 세포크기가 분열에 영향을 미친다는 사실이 보고되어 왔다. 효모세포의 경우, 임계크기로 성장하기 이전까지 분열이 시작되지 않는다^[1]. 동물세포의 경우에도 세포크기와 분열간의 상관관계에 대해 밝혀져 왔으며, 분자수준에서 크기와 연관된 분열기작을 설명하기 위한 연구가 진행 중이다^[2,3].

레이저 회절방법(laser diffraction method)과 전기적인 측정 방법인 쿨터 카운터(coulter counter)가 세포성장과 분열을 위한 연구에 이용되고 있다. 레이저 회절 방법은 세포크기에 따른 회절 또는 산란정도의 차이를 이용하고, 쿨터 카운터는 임피던스의 차이를 이용하여 세포의 크기를 측정한다. 레이저 회절방법의 경우 가장 정확한 크기측정방법 중에 하나지만 세포의 굴절률에 따라 측정값이 큰 차이를 보일 수 있다는 단점을 갖는다^[4]. 쿨터 카운터는 입자의 다공도 또는 농도에 따라 측정값의 정확도가 달라질 수 있다는 문제점을 갖는다.

미세유체역학(microfluidics)을 통해 상기 측정방법들을 소형화하려는 연구가 진행 중이다^[5,6]. 미세유동 세포분석장비(microflow cytometer)는 개인용 진단기기개발에도 이용될 수 있다. 하지만 상기방법들은 측정방법 고유의 문제점들을 여전히 내세우고 있다. 또한 미세유동 세포분석장비는 기존의 세포분석장비에 비해 적은 분석변수를 제공한다. 따라서 세포크기를 정확하게 측정하면서 세포의 굴절률이나 농도 등의 외부변수의 영향을 받지 않는 새로운 미세유체역학기술이 요구된다.

앞선 연구에서 본 연구그룹은 기존 세포분석장비의 문제점을 극복하기 위해 유체영동기술을 새롭게 제안하였다^[7,8]. 본 연구에서는 상기 유체영동기술을 세포크기측정에 적용하였다. 미세입자(microbead)를 이용하여 세포크기측정을 위한 표준곡선(standard curve)을 얻고 이를 이용해 U937(human leukemic monocyte lymphoma cell line) 세포의 크기를 측정하였다. 본 논문에서 제안한 측정방법은 간단한 미세제조공정을 통해 세포배양칩과 같은 미세유체소자와 집적화될 수 있다는 장점을 갖는다.

2. 세포 크기 측정원리

그림 1은 본 논문에 제안된 경사미세구조물을 이용한 유체영동(hydrophoresis) 기반의 미세입자분리 및

KAIST 바이오및뇌공학과(Department of Bio and Brain Engineering, KAIST)

[†]Corresponding author: jekyun@kaist.ac.kr
(Received : January 14, 2008, Revised : February 29, 2008
Accepted : March 11, 2008)

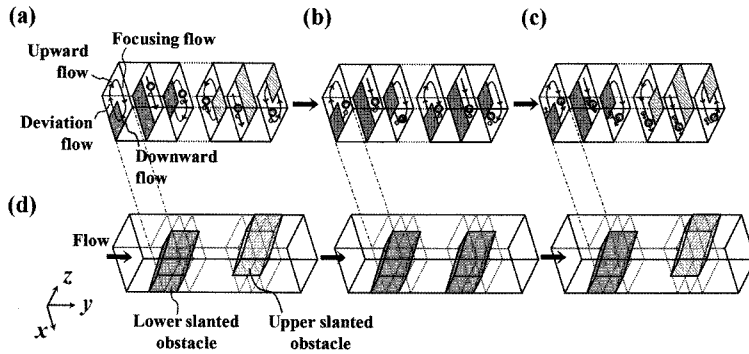


그림 1. 유체영동기반의 입자분리원리. (a) 입자의 x축 정렬과정, (b) 입자의 z축 정렬과정, (c) 입자분리과정, (d) 미세경사구조물의 3차원 입체도

Fig. 1. Hydrophoretic separation principle. (a) x-axis focusing, (b) z-axis positioning, (c) separation procedures, and (d) 3-dimensional view of slanted obstacles.

측정방법의 개념도이다. 그림 1에 도시한 바와 같이, 유체영동기반의 입자분리용 미세유체칩은 입자를 크기에 따라 정렬 및 분리하기 위해 전체 미세유체높이의 절반을 그 높이로 갖는 경사미세구조물로 이루어졌다. 경사미세구조물은 구조물의 비대칭성 때문에 나선형 유동장을 형성한다. 상하부 미세구조물이 각기 반시계와 시계방향의 나선형 유동장을 형성한다. 미세유체칩에 주입된 미세입자는 나선형 유동장 중 정렬유동(focusing flow)을 따라 x축 방향으로 이동한다(그림 1a). 하부 미세구조물은 시계방향의 나선형 유동장을 형성한다. 따라서 x축 방향으로 정렬된 입자는 시계방향 나선형 유동장의 하향유동(downward flow)을 따라 채널의 아랫면으로 이동한다(그림 1b). xz 평면에서 정렬된 입자는 정렬 이후 크기에 따라 서로 다른 유동을 하게 된다(그림 1c). 미세구조물과 유사한 크기를 갖는 입자의 경우, 구조물에 의해 채널 내에서 입자의 위치가 채널 중앙(z축 기준)으로 구속된다. 입자가 구속되는 채널의 중앙영역(z축 기준)은 x축 방향으로 유동장이 형성되어 있지 않아 입자가 정렬된 위치를 유지하게 된다. 그러나 미세구조물보다 작은 크기를 갖는 입자의 경우, 구조물에 의해 입자의 위치가 구속되지 않아 채널 바닥면 가까이에 위치하게 된다. 채널 바닥면에는 x축 방향으로 유동장이 형성되어 있어 입자가 정렬된 위치를 벗어나게 된다. 크기에 따른 입자유동의 차이를 이용하여 입자크기측정을 위한 표준곡선을 얻고 이를 이용해 세포의 크기를 측정할 수 있다.

3. 소자제작

3.1. 미세유체소자 설계

그림 2는 본 논문에서 제안된 유체영동기반 세포크기

측정용 미세유체칩을 개략적으로 도시한 개념도이다. 상기 미세유체칩은 각기 경사 미세구조물이 형성된 상하부 플라스틱 층이 적층된 구조를 갖는다. 미세채널에는 총 53개의 미세구조물이 형성되어 있으며 총 길이는 10 mm로 설계되었다. x축 정렬(그림 1a)을 위해 18개의 미세구조물이 채널 상하면에 교대로 형성되었고 z축 정렬(그림 1b)을 위해 8개의 미세구조물이 채널 아랫면에 형성되었다. 이후 입자분리(그림 1c)를 위해 12개의 미세구조물과 15개의 미세구조물이 채널 상하면에 교대로 형성되었다. 처음 세 영역에 형성된 미세구조물은 50 μm 채널너비(w)를 갖으며 35 μm 의 구조물폭(a), 105 μm 의 구조물거리(b)의 치수로 설계했다. 마지막 영역에 형성된 미세구조물은 100 μm 너비(w)를 갖으며 70 μm 의 구조물폭(a), 210 μm 의 구조물거리(b)의 치수로 설계했다.

3.2. 미세공정

미세채널은 PDMS, Poly(dimethylsiloxane)를 이용한 몰딩방법으로 제작하였고 몰딩을 위한 주형은 실리콘 웨이퍼 기판 위에 감광물질(photoresist)를 패터닝하는 방법을 이용하였다 (그림 3a). 감광물질로 SU-8을 사용하여 미세 유체채널을 위한 주형을 제작하였다. 이 주형에 PDMS를 경화시킨 후 구멍을 내어 입자의 주입구와 배출구를 제작하였다. 이렇게 제작된 상하부 플라스틱층은 공기플라즈마를 이용하여 산화 및 적층함

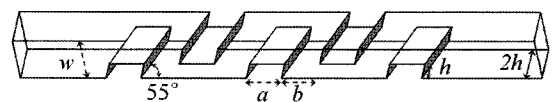


그림 2. 유체영동소자의 설계치수

Fig. 2. Geometric parameters of the microfluidic device.

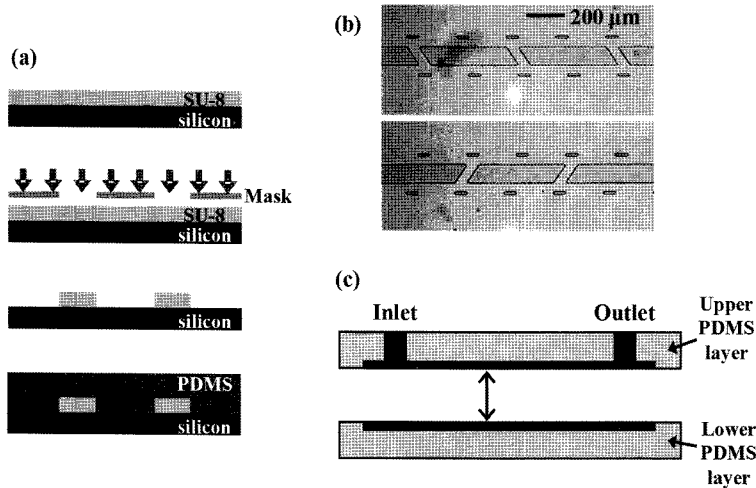


그림 3. (a) 유체영동 소자제작을 위한 미세공정과정, (b) 제작된 미세유체채널, (c) 상하부 플라스틱층을 적층하여 유체칩 접합
 Fig. 3. (a) Microfabrication processes for hydrophoretic sizing device, (b) Fabricated microchannels, The upper and lower layer contain upper and lower obstacles, respectively, (c) Bonding of PDMS layers of upper and lower obstacles.

으로써, 두 층으로 구성된 미세유체칩이 이루어진다(그림 3b, 3c).

3.3. 미세입자의 준비 및 세포배양

세포크기측정용 표준곡선을 얻기 위해 미세입자 (polystyrene bead)를 0.2% Tween[®]20 수용액에 준비하였다. 측정을 위한 세포 모델로 U937세포를 이용하였고 10%(v/v) fetal bovine serum, 1%(v/v) penicillin/streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배양액에서 배양하였다.

3.4. 미세입자의 관찰 및 측정

입자를 포함한 샘플을 미세채널 내로 주입시키기 위해 실린지 펌프(Pico Plus Syringe Pump; Harvard Apparatus, Inc., MA)를 사용하였다. 미세입자와 세포는 1 μL/min 유속 하에서 미세유체칩에 주입하였다. 미세 입자와 세포의 모든 움직임은 마이크로스코프와 연결된 CCD 카메라(DS-2MBWc; Nikon Co., Japan)에 의해 관찰되고 기록되었다. 기록된 미세입자의 위치 정보는 상용이미지분석 프로그램인 i-Solution (IMT i-Solution Inc., Korea)을 이용하여 측정하였다.

4. 실험결과

4.1. 크기측정을 위한 특성곡선

그림 4는 미세입자가 크기에 따라 정렬된 위치를 나

타낸다. 인가된 유속은 1 μL/min이었다. 19 μm 높이의 미세구조물이 형성된 미세유체소자(채널높이: 38 μm)를 이용하였다. 12 μm 크기의 미세입자는 구조물에 의해 그 위치가 채널 중앙(z축 기준)으로 구속되며 정렬된 위치를 유지한다. 반면 9 μm 크기의 미세입자는 정렬된 위치(오른쪽 측면 벽 기준)에서 일정 거리만큼 벗어나있음을 확인하였다. 이는 미세입자의 크기에 따라 z축 위치가 다르기 때문이다. 입자가 클수록 구조물에 의해 채널 중앙(z축 기준)으로 구속될 수 있다. 입자가

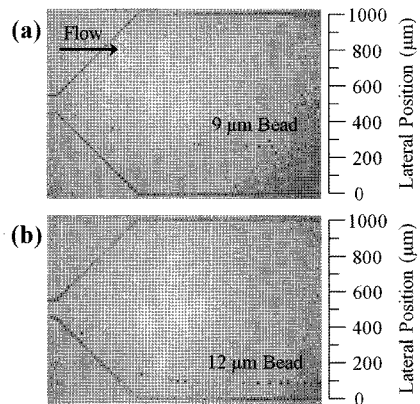


그림 4. (a) 9 μm과 (b) 12 μm 미세입자가 크기에 따라 분리된 위치를 보여주는 그림
 Fig. 4. Size-dependent trajectories of (a) 9 and (b) 12 μm beads in the microfluidic device with the obstacles of 19 μm height.

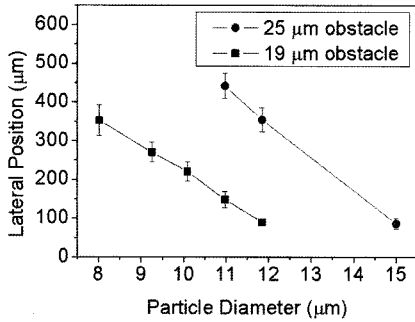


그림 5. 미세입자의 크기 및 미세구조물의 높이에 따른 특성곡선

Fig. 5. Plot of lateral positions of particles as the function of their sizes. 8 to 15 μm -sized beads were injected into the microfluidic devices with the obstacles of 19 and 25 μm height, respectively.

구속되는 채널의 중앙영역(z 축 기준)은 x 축 방향으로 유동장이 형성되어 있지 않아 입자가 정렬된 위치를 유지하게 된다. 미세구조물보다 작은 크기를 갖는 9 μm 크기의 미세입자의 경우, 구조물에 의해 입자의 위치가 구속되지 않아 채널 바닥면 가까이에 위치하게 된다. 채널 바닥면에는 x 축 방향으로 유동장이 형성되어 있어 입자가 정렬된 위치를 벗어나게 된다.

세포크기측정을 위한 특성곡선을 얻기 위해 8에서 15 μm 크기의 미세입자를 각기 19와 25 μm 높이의 미세구조물이 형성된 미세유체소자에 주입하였다. 인가된 유속은 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 이었다. 입자의 위치는 1 mm의 너비를 갖는 채널 출구에서 측정되었다. 앞서 설명한 z 축 방향의 입자정렬현상에 의해 입자의 크기가 작을수록 미세입자가 x 축 중앙으로 이동하였다(그림 5). 또한 입자의 크기에 따른 채널 내의 입자위치가 선형적인 관계를 보였다. 11 μm 크기의 미세입자는 z 축 방향의 입자정렬현상에 의해 19 μm 높이의 미세구조물에서 오른쪽 측면 벽으로 정렬되었다. 하지만 미세구조물 높이를 25 μm 로 증가시켰을 때 더 이상 오른쪽 측면 벽으로 정렬되지 못하고 x 축 중앙으로 이동하였다. 19 μm 높이의 미세구조물에서 입자정렬위치에 대한 CV(coefficient of variance)는 8부터 12 μm 크기의 미세입자에 대해 각기 7.2, 4.0, 3.6, 2.8, 0.7%이었다. 25 μm 높이의 미세구조물에서 입자정렬위치에 대한 CV는 11, 12, 15 μm 크기의 미세입자에 대해 각기 3.2, 2.8, 1.0%이었다.

측정된 특성곡선의 안정성을 평가하기 위해서, 유속을 변화시켜 가면서 입자정렬위치를 측정하였다. 19 높이의 미세구조물에서 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유속을 인가하였을

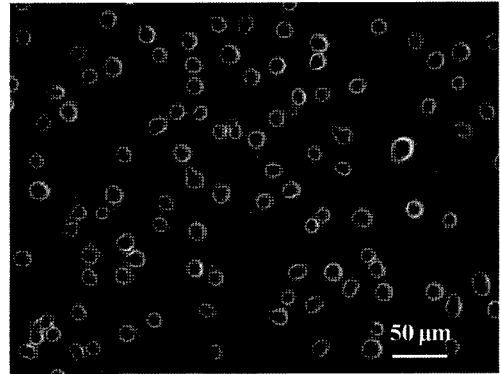


그림 6. U937세포의 광학현미경 사진

Fig. 6. Optical micrograph of U937 cells.

때, 8과 12 μm 크기의 미세입자의 정렬위치는 각기 352.9 ± 39.8 과 89.7 ± 6.0 μm 이었다(그림 5). 유속을 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 로 증가시켰을 때, 8과 12 μm 크기의 미세입자의 정렬위치는 각기 336.5 ± 28.8 과 105.6 ± 10.6 μm 로 유지되었다. 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 이내의 유속 하에서는 유속에 무관하게 특성곡선이 유지되며 안정적으로 세포의 크기를 측정할 수 있다.

4.2. 세포크기측정

19 μm 높이의 미세구조물이 형성된 미세유체소자를 이용하여 U937 세포의 크기를 측정하였다. 인가된 유속은 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 이었다. 세포는 RPMI-1640 배양액으로 CO₂ incubator 속에서 배양하였다(그림6). 참조치로써 입도분석기(LS 13 320; Beckman Coulter, Inc.)를 이용하여 세포크기를 측정하였다. 측정된 세포의 크기는 12.4 ± 2.9 μm 이었다. 그림 7은 19 μm 높이의 미세구조물을 통과한 U937 세포 위치를 나타낸다. 측정된 세포

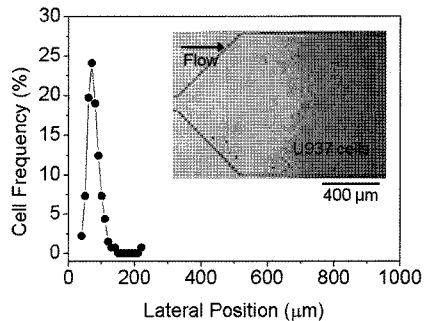


그림 7. 유체영동 채널 내에서 U937 세포의 위치분포

Fig. 7. Position profile of U937 cells in the hydrophoretic device with the obstacles of 19 μm height. The inset shows the position distribution of the cells.

위치를 그림 5의 특성곡선에 대입해 환산한 결과 $12.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 의 세포크기를 얻을 수 있었다. 이는 참조치와 유사한 결과로써 유체영동소자가 세포크기 측정용 소자로 응용될 수 있음을 보여준다.

5. 결 론

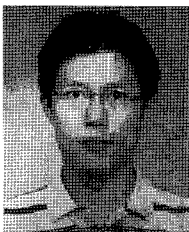
본 연구에서 제작된 유체영동소자는 기존의 세포분석장비와 달리 세포크기를 정확하게 측정하면서 세포의 굴절률이나 농도 등의 외부변수의 영향을 받지 않는다. 또한 간단한 미세제조공정을 통해 세포배양칩과 같은 미세유체소자와 집적화될 수 있다는 장점을 갖는다. 하지만 세포크기측정을 위한 특성곡선의 측정범위가 $5 \mu\text{m}$ 정도로 좁다는 단점을 갖는다. 이는 채널 및 미세구조물의 높이를 조절함으로써 극복가능하다고 사려된다. 즉, 능동적으로 채널 높이를 조절해 가면서 입자의 위치를 측정한다면 지금보다 더 넓은 범위의 크기를 갖는 세포도 측정 가능할 것이다. 새롭게 제안된 유체영동기반의 세포측정방법은 세포크기와 관련된 분열기작을 설명하기 위한 연구에 이용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 KAIST 정문술 바이오정보전자 연구센터의 지원을 받아 수행되었으며, 소자 제작에 필요한 지원을 해주신 KAIST 디지털나노구동 연구센터에 감사드립니다.

참고 문헌

- [1] G. C. Johnston, C. W. Ehrhardt, A. Lorincz, and B. L. A. Carter, "Regulation of cell size in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Bacteriol.*, vol. 137, no. 1, pp. 1-5, 1979.
- [2] P. Jorgensen and M. Tyers, "How cells coordinate growth and division", *Curr. Biol.*, vol. 14, pp. R1014-1027, 2004.
- [3] I. J. Conlon, G. A. Dunn, A. W. Mudge, and M. C. Raff, "Extracellular control of cell size", *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, pp. 918-921, 2001.
- [4] A. Beekman, D. Shan, A. Ali, W. Dai, S. Ward-Smith, and M. Goldenberg, "Micrometer-scale particle sizing by laser diffraction: critical impact of the imaginary component of refractive index", *Pharm. Res.*, vol. 22, no. 4, pp. 518-522, 2005.
- [5] A. Y. Fu, C. Spence, A. Scherer, F. H. Arnold, and S. R. Quake, "A microfabricated fluorescence-activated cell sorter", *Nat. Biotechnol.*, vol. 17, pp. 1109-1111, 1999.
- [6] H. Chun, T. D. Chung, and H. C. Kim, "Cytometry and velocimetry on a microfluidic chip using polyelectrolytic salt bridges", *Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 2490-2495, 2005.
- [7] S. Choi and J. -K. Park, "Continuous hydrophoretic separation and sizing of microparticles using slanted obstacles in a microchannel," *Lap Chip*, vol. 7, pp. 890-897, 2007.
- [8] S. Choi, S. Song, C. Choi, and J. -K. Park, "Continuous blood cell separation by hydrophoretic filtration", *Lap Chip*, vol. 7, pp. 1532-1538, 2007.



최 성 용(Sungyoung Choi)

- 2003년 한양대학교 기계공학과 졸업 (공학사)
- 2005년 KAIST 바이오시스템학과 졸업 (공학석사)
- 현재 KAIST 바이오및뇌공학과 박사과정
- 주관심분야 : Micro/Nanofluidics, BioMEMS



박 제 균(Je-Kyun Park)

- 1986년 서울대학교 식품공학과 졸업 (농학사)
- 1988년 서울대학교 식품공학과 졸업 (농학석사)
- 1992년 KAIST 생물공학과 졸업(이학박사)
- 현재 KAIST 바이오및뇌공학과 부교수
- 주관심분야 : 나노바이오센서, BioMEMS, Microfluidics