

초소형 세포융합기구의 제작을 위한 기초연구

(원형질체 준비 및 전기인가방식에 관한 연구를 중심으로)

이상훈[○], 차현철^{*}, 김용욱^{**}, 김용권^{**}

단국대학교 의과대학 의공학과, ^{*}단국대학교 자연과학대학 생물학과, ^{**}서울대학교 전기공학과

A Basic Study for the Fabrication of Micro Cell-Fusion-Device

Lee Sang Hoon, Cha Hyoun Chu[†], Kim Young Uk^{**}, Kim Young Kweon^{**}

Dankook Univ. Dept. of Biomedical Eng., ^{*}Dankook Univ. Dept. of Biology,
^{**}Seoul Nat. Univ. Dept of Electrical Engineering

<ABSTRACT>

Recently semiconductor technology is widely used in biotechnology fields and one of the representatives is electric cell-fusion-device. In this paper, some basic researches required in the development of this fusion system was performed and they are as follows: 1) preparation of protoplast and selection of the fittest plant cell, 2) development of high frequency AC power supply for cell-alignment by using class-E resonant circuit. As a result, cabbage cell is selected and pearl-chain, which shows cell-alignment, can be observed by the applied AC field.

1. 서론

1972년 Carlson 등이 2종의 담배 원형질체(Protoplast)를 세포융합법을 이용하여 체세포 잡종개체를 처음으로 보고한 이후 담배, 흰녹말풀, 페튜니아(Petunia) 등을 중심으로한 많은 종간(種間)잡종이 획득되었다. 이후 1978년 독일의 G. Melchers가 감자와 토마토의 세포융합에 의해 자연적으로는 결코 발생할 수 없는 속(屬) 간의 체세포 잡종인 포마토(Pomato)의 육성(育成)이 보고된 이후 원형질체에 의한 세포융합기술이 관심의 대상이 되어 왔다. 이 식물은 뿌리부에 감자를, 지상에는 토마토를 생산할 수 있으며 농작물의 품종개량이 비약적으로 전진하는데 일조하였다. 이외에도 세포융합기술은 동물, 박테리아, 효모(yeast) 등의 유전자를 전이(Transfer)시키는데 광범위하게 이용되어 왔다.

이와같이 원형질체의 합성에 의한 세포융합을 위해 현재 개발되어 사용되고 있는 방식으로는 바이러스, 화학적, 전기적 방법에 의한 것이 개발되어 사용되고 있으며, 이중 화학적 방법과 전기적인 방법이 실제로 많이 사용되고 있다.

화학적 방법은 Polyethylene Glycol(PEG)과 같은 화학물질을 세포현탁액(Cell Suspension)에 천천히 섞어 가면서 융합을 시작하는 것이다. 이때 PEG는 세포의 표면들이 서로 접촉하여 밀착되도록 하는 역할을 하며, 이 과정을 Agglutination이라고 한다. 밀착된 세포는 그 과정이 완전히 밝혀지지 않은 자극(Perturbation)에 의해 융합이 시작되며, 따라서 융합이 시작

되는 시간도 예측이 불가능하다. 한편 전기적인 방법은 세포막의 접촉을 Dielectrophoresis에 의해 이루어지게 하며, 이후 가해지는 전기적 펄스에 의해 융합이 시작되도록 한다. 이때 전기적 펄스에 의해 순간적으로 세포끼리의 접촉부위에 있는 인지질(Phospholipid)층이 파열되며, 이 공간을 통하여 세포간의 융합이 발생한다. 일단 세포막의 파열이 일어나면 세포표면의 장력에 의해 융합된 세포의 모양이 구형(Spherical Shape)으로 복원된다. 전기적인 융합의 전형적인 방법으로 미소전극에 의한 융합과 평형판 전극에 의한 융합의 2 가지가 있다. 전자는 현미경과 미세조작기(Micromanipulator)를 사용하는 수동적인 방법으로 2 종류의 세포를 일렬로 둔 다음 전기적인 자극을 가하여 융합을 시작하게 하는 방법이며, 후자의 경우는 일종의 배치(Batch)시스템으로 비슷한 수의 A, B 세포를 갖고 있는 세포용액을 전극사이에 떨어뜨린 다음 고주파의 전압을 가하여 Pearl-Chain이 일어나게 하고 이후 직류전압을 펄스형으로 가하여 융합이 일어나게 하는 방법이다.

그러나 이 중에서 화학적인 방식은 여러가지 노하우가 필요하고, AB결합이외의 다른 결합형태를 갖는 불필요한 융합세포들도 동시에 생성되므로 필요한 AB세포만으로 융합된 세포들을 따로 분리해야 한다는 단점을 가지고 있다. 반면 전기적 융합 방식중 미소전극에 의한 융합은 1:1로의 세포융합이 가능한 반면 작업자체가 매우 지리하고 융합되는 세포의 생산성이 매우 낮다는 단점을 가지고 있다. 실제 연구실에서 이 방법을 사용할 경우 하루 200여개 정도의 융합된 세포를 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다. 평형전극을 사용하는 경우는 별도의 노하우가 필요없고 생산성이 미소전극법 보다는 훨씬 우수하지만 필요한 AB세포만이 융합된 세포를 따로 얻기가 어렵다는 단점이 있다.

이러한 기존의 방식이 갖는 문제점들은 새로운 세포융합기술의 탄생에 강력히 필요로 하게 되었으며, 그 결과 최근에 FIC(Fluid Integrated Circuit)에 의한 세포융합기술이 개발되어 보고되고 있다. FIC는 세포융합에 필요한 모든 기구, 예를 들면 융합실(Fusion Chamber), 융합전극, 소형 펌프등을 반도체 공정에서 이용되는 사진식각방식을 응용하여 제작된 것으로 세포 크기로 축소된 융합기구의 동장이 가능하게 되었다. 본 논문은 이러한 FIC를 제작하는데 있어 기초적으로 선행되어야

할 연구로 진행된 원형질체의 준비, 전기인가방식, 용합을 위한 전극의 모형제작에 대한 결과를 정리한 것이다.

2. Dielectrophoresis(DEP)

원형질체에 전계를 가하여 전기적 용합이 일어나게 하기 위하여서는 일차적으로 원형질체끼리 서로 근접하게 하여야 하며, 본 연구에서는 DEP를 이용하여 Pearl-Chain을 만들어 주는 방식을 사용하였다. DEP는 Pohl교수가 개발한 것으로 비균질의 전계효과를 이용하여 물질의 이동이 가능하도록 하는 것이며 그 원리는 그림 1)과 같다. 정전계에서 유전물질이 분극되면 양전하와 음전하가 입자의 좌우에 대전하게 된다. 이 때 만약 가해지는 전계가 비균질하다면 분극된 입자에 가해지는 쿨롱힘(Coulombic Force)의 차이가 발생하게 되며, 따라서 입자의 운동이 일어나게 된다. 반경이 a 인 구형의 입자에 E 라는 외부전계를 가해주면 DEP에 의해 발생하는 힘은 다음식과 같이 쓸 수 있다.

$$F_d = (\rho_{eq} \cdot \nabla)E = 2\pi a^3 \epsilon_a \text{Re}[k^*(\omega)] \nabla(E_{rms}^2)$$

이때

$$k^*(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*}$$

$$\epsilon_p^* = \epsilon_p' - j \frac{\sigma_p}{\omega}$$

$$\epsilon_m^* = \epsilon_m' - j \frac{\sigma_m}{\omega}$$

ϵ_p', ϵ_m' : 입자와 현탁액의 유전상수

σ_p, σ_m : 입자와 현탁액의 전도율

ω : 인가되는 전계의 주파수

3. 방법 및 실험

3.1 원형질체의 준비

전기적 세포용합을 시행하기 위하여서는 우선 원형질체가 준비되어야 한다. 본 연구에서는 양배추, 컵프리, 담배의 염육 세포와 점시꽃 캘러스(Callus)등을 재료로 하여 원형질체를 준비하여 보았으며, 양배추를 이용하여 원형질체를 만드는 과정을 정리하면 다음과 같다.

- 1) 크기가 2cm 이하인 양배추 잎의 하표피(Lower Epidermis)를 벗겨 낸다.
- 2) 준비한 잎을 소독하기 위해 20% Clorox액에 10분간 담궈둔다.
- 3) 소독한 잎을 pH 5.8인 효소용액에 18시간 정도 담궈둔다.
(효소의 성분 : CPW10M + Cellulase 1% + Pectinase 0.2% + 5mM MES buffer)
- 4) 필터를 이용하여 찌꺼기를 걸러낸다
- 5) 현미경으로 관찰하여 세포가 충분히 분리된 것이 확인되면 CPW10M용액으로 효소를 여러번 씻어낸다.

3.2 전기인가를 위한 구동장치의 제작

최대전압이 100 - 200 볼트 사이의 값이 되며 주파수는 최고 1 MHz정도가 되고, 전류는 최대 1 A 이상인 AC 전원을 용합기에 공급하기 위한 시스템을 본 연구에서는 Class-E 인버터를 사용하여 구현하였다. 여기서 Class-E 공진 인버터의 기본회로

는 그림 2)와 같으며, 단일 스위치와 하나의 인덕터 및 콘덴서로 간단하게 구성되어 있으며 스위칭소자로는 IRF250 MOSFET를 사용하였다. 스위칭의 기본동작은 트랜지스터의 접합 캐패시턴스에 의해 파우어 디바이스로 하여금 유도성 턴 오프와 용량성 턴 온으로 동작한다. VCO 회로는 주파수와 듀티비(Duty Ratio)를 조절할 수 있도록 제작되었으며, 그 출력은 TC4404라는 FET 드라이브 소자의 입력으로 들어 가도록 제작되었다. 한편 발생한 AC전원은 공진 변압기를 통하여 원형질체에 공급되도록 제작되었는데 이는 60 Hz 공급전원이 세포와 직접 접촉하여 치명적인 해(害)를 미치는 것을 방지하기 위함이다.

3.3 용합용 전극의 제작

궁극적으로 용합용 전극은 실리콘이나 유리판위에 제작할 예정이다. 이때 절연체는 Polyamide를 사진식각에 의하여 구성하고 전극은 스퍼터링(Sputtering)에 의해 성장된 알루미늄상에 구리를 전기도금함으로 제작할 것이다. 이러한 전극을 제작하기 위한 기초연구를 진행하고 있으며, 현재 간단한 시제품을 제작하고 있다. 본 논문에서는 반도체 기술에 의하여 제작된 전극대신 연구실에서 많이 사용되는 평형선 전극을 제작하여 전계하에서의 세포특성이나 DEP에 관한 연구를 하였다. 평형선 전극이란 현미경용 슬라이드 글라스위에 구리나 알루미늄선을 예폭사로 고정하여 제작된 것으로, 선간 간격은 0.5 mm에서 1 mm로 하였다. 그리고 전극의 모양에 따른 세포의 움직임을 살펴보기 위하여 구리판을 슬라이드 글라스위에 접착한 후 여러 가지 전극모형을 제작하고, 각각의 경우에 있어 DEP에 의한 세포의 움직임을 관찰하였다.

4. 실험 및 결과

여러 종류의 식물들을 사용하여 원형질체를 분리하기 위한 실험을 해본 결과 양배추로부터 가장 상태가 양호한 원형질체를 얻을 수 있었으며 그림 3)은 준비한 원형질체에 관한 사진이다. 한편 점시꽃 캘러스로부터 얻은 원형질체는 염육세포와는 달리 염색체가 없기 때문에 염색체를 가지고 있는 다른 원형질체들과의 용합상태를 현미경으로 부터 관찰하기에 좋았다. 이들 원형질체들이 용합하는 과정에 관한 이해를 하기 위하여 PEG를 통한 화학적 용합을 여러번 하여 보았다. 한편 준비한 원형질체를 가지고 용합을 하기 위한 전계 인가시스템을 제작하였으며, 실험결과 최대 400 KHz까지의 AC파형을 얻을 수 있었다. 그림 4)는 100 KHz의 AC파형을 오실로스코프로 측정한 결과이다. 여기서 AC 전압이 음으로 되는 부분에 채터링(Chattering)현상이 발견되는데 이는 VOC의 출력단인 ON-OFF 될때 생기는 잡음으로부터 발생하는 것으로 생각된다.

그림 5)는 최종적으로 구성한 시스템을 이용하여 Pearl-Chain을 만든 결과인데, 여기서 a)그림은 전계를 가하기 전이고 b)그림은 전계를 가한 이후의 사진이다. 이 때 체인이 형성되는 시간이나 모양은 가해주는 전압 및 세포의 농도 등에 영향을 받을 수 있었으며, 주파수에 의해서도 많은 영향을 받을 것으로 예상된다.

5. 결론 및 고찰

본 연구를 통하여 원형질체를 융합하기 위한 초소형 조작기구를 제작하는데 있어 여러가지 필요한 기초실험을 하였다. 그 결과로 실험에 사용할 식물로 양배추와 접시꽃 캘러스를 선정하였으며, 공진을 이용한 AC 발생회로를 제작하여 본 실험에 충분히 사용될 수 있음을 확인 하였다. 한편 여러가지 모양으로 제작된 전극을 사용하여 앞으로 제작할 초소형 기구의 동작 특성을 사전에 점검할 수 있도록 시스템을 구성할 수 있었던 것도 본 연구의 중요한 결과중 하나로 생각된다. 한편 여러가지 개선하고 앞으로 반드시 진행되어야할 기초적인 연구도 실험하는 과정에서 나타났는데, 이들은 다음과 같다.

- 1) 전계인가 시스템의 잡음 제거 및 융합용 펄스발생기의 설계 및 제작
- 2) 주파수 변화가 용이하도록 시스템을 제작
- 3) 양배추 이외의 식물세포를 원형질체로 만드는데 있어 최적의 조건설정
- 4) 원형질체가 파괴되지 않는 주파수 및 인가전압의 조건 결정

6. 참고문헌

- 1) Masao Washizu, "Manipulation of Biological Objects in Micromachined Structures", Proc. IEEE Micro Electro Mechanical System, pp196-201, 1992
- 2) F.H. Raab, "Idealized Operation of the Class E Tuned Power Amplifier", IEEE Trans on Circuit and Systems, Vol. CAS-24, No.12, Dec., 1977
- 3) 김준철, 이석구, 이광웅, "Nicotiana Tabacum과 Petunia Inflata의 電氣的 原形質體融合에 의한 屬間 體細胞 雜種의 生成", 식물학회지 제30권 제1호, pp1-9, 1987

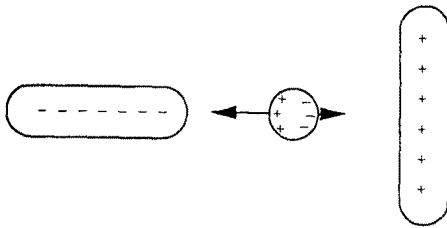


그림 1) 비균질 전계하에서 세포에 가해지는 電氣力

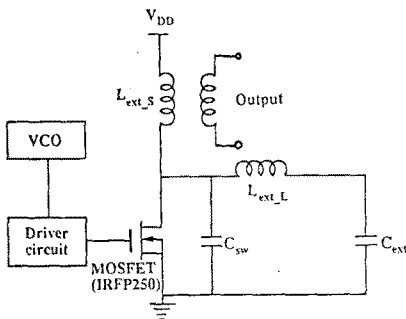


그림 2) Class-E 공진 인버터의 기본회로

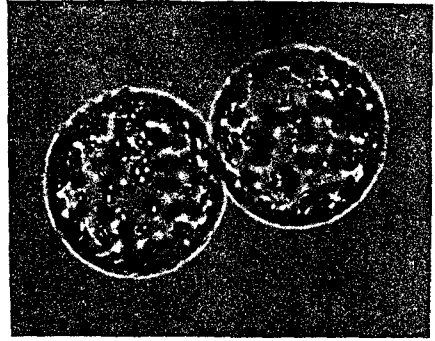


그림 3) 양배추 잎으로 부터 추출한 원형질체

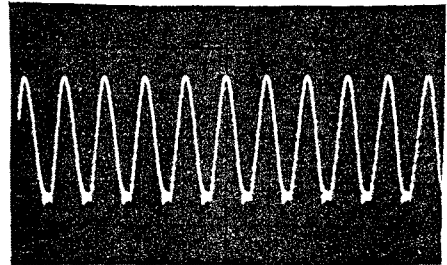
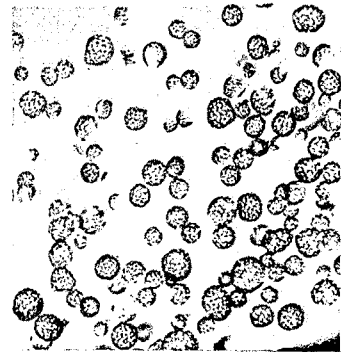


그림 4) 공진 인버터의 출력파형



a) 전계를 가하기전 사진



b) 전계를 가한 후 사진

그림 5) 형성된 Pearl-chain