'95 대한전기학회 하계학술대회 논문집(1995. 7. 20~22)

마이크로머시닝을 이용한 세포 융합 기구에 관한 연구

o이 상욱, 김 용권, 김 호성*, 차 현철**
서울대학교 전기공학과, 중앙대학교 전기공학과*, 단국대학교 생물학과**

A Study of Cell Fusion Device Using Micromachining Technology

Sang-Wook Lee, Yong-Kweon Kim, Ho-Seong Kim and Hyun-Chul Cha
Dept. of Electrical Eng., Seoul Nat'l Univ., Dept. of Electrical Eng., Chung-Ang Univ*., and
Dept. of Biology, Dankook Univ.**

Abstract

A cell fusion device is designed and fabricated in order to electrofuse two cells between electrodes. Dielectrophoretic force is used to attract each cell and make a pearl chain of two cells. Two kinds of electrode structure are fabricated and tested the feasibility of the proposed device. The attraction of two radish cells or two Chinese cabbage cells on the electrodes is observed when AC voltage(1MHz, V_{p-p}=8V) is applied to the electrodes. The possibility of cell fusion device is shown through experiments

1. 서론

1970년대 이후 바이오테크놀러지 분야에서는 많은 발전이 이루어지고 있으며, 그 중 세포를 개별적으로 조작하고 두 세포를 융합시키는 연구에 대해 상당한 관심이 집중되고 있다. 세포의 개별 조작에는 일반적으로 마이크로피펫이 많이 이용되고 있으며, 개별적 원형질체의 융합에는 초소형 전극 구조가 많이 이용된다[1]. 세포의 개별 조작 및 일대일 융합에는 세포와 유사한 크기의 기기가 필요한데, 이러한 기기들의 제작에 있어서 마이크로머시닝 기술은 여러가지 장점을 가지고 있다. 여러 연구자들에 의해 마이크로머시닝 기술을 이용한 세포의 개별 조작[2,3] 및 일대일 세포융합[4-6]에 관한 연구가 진행되어 왔다. 일대일 세포융합의 장점은 융합된 세포의 선별과정이 필요하지 않고, 융합율 또한 높다는 것이다.

이전의 마이크로머시닝 기술을 이용한 일대일 세포 융합 방법 연구에는 실리콘 웨이퍼 위에 1600개의 작은 방을 만들어서 각 각의 방에서 A세포와 B세포 1600쌍을 동시에 융합시키는 방법[4]이 있으나 이를 위하여 각각의 세포의 운송 및 융합된 세포의 운송을 위해 복잡한 기계 시스템이 필요하다. 반면에 두개의 유로를 따라오는 각각의 세포를 융합실에 정지시킨 후 융합시키는 방법[5]이 있으나 융합실로 들어오는 세포의 수를 펌프의 동작에 의해서만 조절하므로 어려운 점이 있고, 패터닝된 두개의 기판을 접합하여 만들게 되므로 제작상의 정밀도가 문제시된다. 따라서 정밀도를 향상시키며 융합기와 선별기를 조합하여 세포융합의 효율을 높이는 초소형 미생물체 조작시스템을 저자는 제안하였다[6].

본 논문에서는 제안된 초소형 미생물체 조작시스템에 적합한 새로운 형태의 세포융합기를 제안한다. 이전의 연구에서는 세포를 절연체나 식각된 공동으로 유인하여 융합하는 방법이 이용되었는데, 새로 제안된 융합기에서는 세포가 전극에 모여 융합되며 세포를 전극으로 유인하는 데에는 dielectrophoresis(DEP) 힘이 이용된다. 이러한 융합기는 유리 기판위에 감광성 폴리이미드와 알루미늄을 사용하여 간단히 제작될 수 있다. 제작된 융합기를 사용하여 무 세포와 배추 세포로 융합기로서의 가능성을 알아보았다.

2. 설계

세포 융합기의 개략도를 그림 1에 나타내었다. 세포 융합기는 유체 통로와 전극으로 구성되며, 각 세포들은 세포 주입구와 연결된 유체 통로를 통하여 전극이 있는 융합부로 보내진다. 전극에 교류 전압을 가하게 되면 세포들은 DEP 힘에 의해 전극쪽으로 유인되고, 이 때 전극에 펄스 전압을 가하여 두 세포를 융합하게 된다. 융합된 세포는 세포 출구와 연결된 유체 통로를 통하여 흘러 나가게 된다.

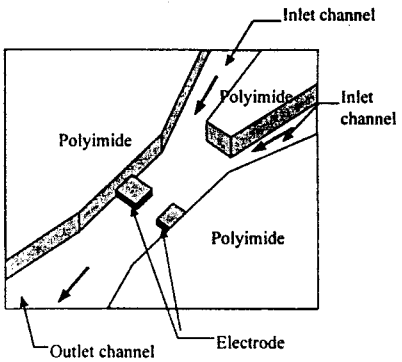

그림 1. 융합기 개략도

유체 통로의 높이와 전극 간격은 세포의 크기에 따라 결정된다. 보통 식물 세포는 지름이 25-35 ㎛ 정도이므로 세포 유체 통로의 높이는 30 ㎛ 이상이 되어야하며, 전극 간격은 두 세포가 나란히 놓이기 위해 50-60 ㎛ 정도가 적합하다.

본 연구에서는 전극 간격을 50 ㎛로 하여 설계하였다. 유체 통로의 폭은 너무 많은 세포가 유체 통로에 공급되지 않고, 두개의 세포가 지날 수 있도록 80 ㎛로 설계하였다. 유체 통로의 높이는 30 ㎛ 정도로 설계하였다. 유체 통로의 높이는 공정상의 제약과 편의를 고려하여 30 ㎛ 정도로 설계하였다. 전극 배열은 마주보는 형태와 엇갈린 형태의 두 가지로 설계하였고 실험의 용이성을 위해 제작은 여러개의 전극 쌍을 가진 구조로 제작하였다.

제안된 융합기를 제작하여 실험할 때, 세포 관찰을 용이하게 하기위하여 파이렉스 유리를 사용하였다. 유체 통로는 절연물로써 반도체 가공 공정에서 사용 될 수 있고 높은 구조물을 얻을 수 있는 감광성 폴리이미드를 사용하였다. 폴리이미드는 기계적 전기적 안정성이 뛰어나므로 유체 통로의 구실을 하는데 적합하다. 전극은 기판과의 접착성 및 이후 실리콘 위에서 제작할 때의 호환성을 고려하여 알루미늄으로 제작하였다.

3. 제작

융합기의 제작 공정은 그림 2 와 같다. 먼저 유리 위에 알루미늄을 1 ㎛ 정도 열 증착 방법에 의해 증착한 후 전극 형상을 패터닝 한다. 감광성 폴리이미드(Toray UR-5100FX)를 40 ㎛ 정도 스핀 코팅한 후 유체 통로가 될 부분을 현상해 낸다. 마지막으로 폴리이미드를 열처리하면 원하는 구조물이 제작된다. 폴리이미드에 관한 자세한 공정은 이전에 발표한 논문과 같다[7].

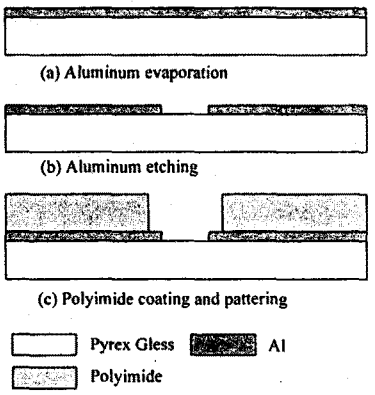

그림 2. 제작 공정

4. 실험

세포 융합기의 실험을 위해 두 가지 형태의 20 개의 전극 쌍을 갖는 융합기를 제작하였다. 한가지는 각 전극 쌍이 서로 일치한 형태로 설계되었으며, 전극 사이에 두 개의 세포를 유인하기 위해 전극간의 간격은 50 ㎛ 정도로 하였다. 다른 한가지는 양쪽이 서로 엇갈려 배치된 형태로 각 전극의 대각선 방향 거리는 46 ㎛ 이다.

세포를 전극 어레이 위에 떨어뜨린 후, 전극 위를 유리로 덮는다. 세포의 지름은 약 25~30 ㎛ 이다. 교류 전압을 전극에 가하면, DEP 힘에 의해 두 세포가 전극 쪽으로 유인된다. 인가한 전압(V_{p-p})은 8V 이며, 주파수는 1 MHz 이다. 그림 3 과 4 는 현미경 위에 장착된 CCD 카메라로 찍은 실험 결과의 사진이다. 그림 3 에서는 두 배추 세포가 전극 사이에 나란히 모여 있다. 표피 세포여서 엽록소가 적어 거의 투명하게 보인다. 그림 4 에서는 두 세포가 전극의 대각선 방향으로 pearl chain 을 형성하고 있다. 세포는 인가 전압(V_{p-p})이 3V 에서 부터 움직이기 시작하였다. 15V 이상의 전압을 인가하면 세포가 파괴되는 lysis 가 일어났다. 세포의 모양이 비대칭이고 엽록소가 세포 내에 국부적으로 분포할 경우에는 세포의 회전이 원성하게 일어난다. 세포를 전기 융합시키기 위해서 1-3ms 의 폭을 갖는 6V 직류 펄스 전압, 혹은 15V, 40 ㎲을 갖는 펄스 전압을 인가해 보았으나 융합은 일어나지 않았다.

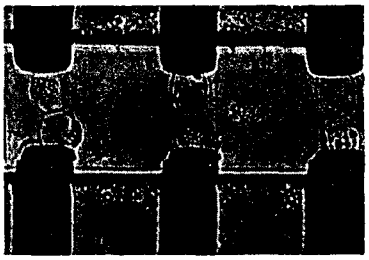

그림 3. 전극에 배추 세포가 모인 사진

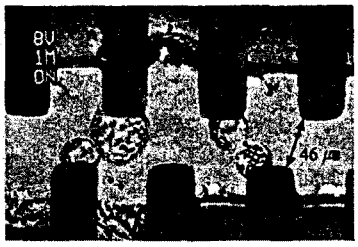

그림 4. 전극에 무 세포가 모인 사진

세포가 유인되는 정도는 세포 상태, 주파수와 밀접한 관련이 있다. 세포 부스러기나 세포벽이 있는 세포의 경우는 전극에서 멀어지는 negative DEP 현상을 나타내었다. 또한 그림 5 에서 보듯이 1MHz 의 교류 전압을 인가했을 경우 세포는 전극에 붙는데 반해, 350kHz 의 교류 전압을 인가하면 그림 6 에서처럼 세포는 전극으로부터 떨어져 절연물인 폴리이미드 벽으로 움직여 간다. 실험에 사용된 세포는 배추세포였다. 500kHz 이하에서 세포가 전극에서 떨어지기 시작하였다. 이러한 negative DEP 는 세포의 전기적 특성과 주파수와의 관계에 의해 결정된다[8].

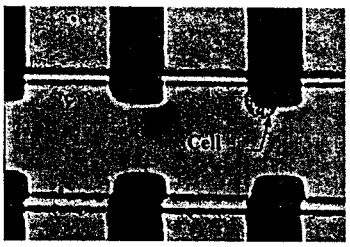

그림 5. 1MHz, 8V 전압인가시 배추 세포 사진

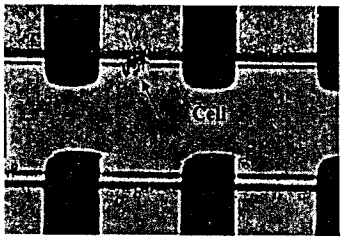

그림 6. 350kHz, 8V 전압인가시 배추 세포 사진

5. 토의

세포를 움직이기 위해 필요한 전계는 이전 논문의 결과와 매우 다르게 나타났다[6]. 이전의 결과에서는 세포의 움직임이나 회전이 70~90V/cm 에서 나타났고, lysis 는 150V/cm 에서 나타났다. 그러나 이번 결과에서는 세포의 움직임 및 회전은 170V/cm, lysis 는 880V/cm 에서 일어났다. 위에서 언급된 전계의 값은 가해진 전압의 실효치를 전극 간격으로 나누어서 얻었다. 이 차이는 세포의 특성과 전극의 구조가 서로 다르기 때문이라고 생각된다. 이전의 논문에서는 지름 0.3mm 의 알루미늄 도선을 1mm 간격으로 평행하게 놓은 것을 전극으로 사용했다. 본 연구에서 사용한 융합기에서의 전계 분포는 이전의 두 개의 평행 도선 전극의 전계 분포와 크게 다르다.

융합이 잘 이루어지지 않은 것은 전극의 높이가 낮아 두 세포간에 충분한 전계가 가해지지 않은 것으로 생각된다. 이의 해결 방안으로 펄스 전압의 크기를 증가시킬 필요가 있으나 이것은 용액의 전기 분해를 일으키게 된다. 따라서 전극에 적당한 전압을 가하려면 펄스의 폭을 줄여야 할 것으로 생각된다. 또다른 해결 방안은 전극의 높이를 높이는 것이다. 전극의 높이를 높이면 두 세포 사이에 가해지는 전계가 균일해지고 보다 낮은 전압으로 융합이 가능해지리라 생각된다. 앞으로 두 식물 세포를 융합하는 실험과 채널 내부의 전계 분포 해석에 관한 지속적인 노력이 필요하다.

6. 결론

전극 상에서의 세포 융합을 위한 세포 융합 기구를 설계, 제작하였다. 제작된 세포 융합기로 두 세포와 배추 세포에 대한 실험을 한 결과 전극에 수 Mhz AC 전압을 인가했을 때, 세포의 유인 및 세포 융합을 위한 전 단계인 pearl chain 형성이 관찰되었다. 실험 결과를 이전의 결과와 비교한 결과, 제안된 세포 융합기에서 세포 융합을 이루기 위해서는 인가 펄스 전압 조건을 조정하거나 전극의 높이를 높여야한다.

참고문헌

[1] Eberhard Neumann, Arthur E. Sowers and Carol Jordan, Electroporation and Electrofusion in Cell Biology, Plenum Press, New York, 1989, pp. 355-366

[2] Masao Washizu, "Manipulation of Biological Objects in Micromachined Structures", Proc. 1992 Micro Electro Mechanical Systems Workshop, pp. 196-201

[3] S.H. Lee, H.C. Cha, S.W. Lee and Y.K. Kim, "Development of Cell-Grabber by Using Piezo Actuator", Proc. of the 16th Annual International Conference of the IEEE Eng. on Medical and Biology Society, 1994, pp. 1021-1022

[4] Sato, K., Kawamura, Y.,Tanka, S., Uchide, K., and Kohida, H., "Individual and Mass Operation of Biological Cells Using Micromechanical Silicon Devices", Sensors and Actuators, A21-A23, 1990, pp. 948-953

[5] Masuda, S., Washizu, M., and Nanba, T., "Novel Method of Cell Fusion in Field Constriction Area in Fluid Integrated Circuit", IEEE Trans. on Industy Applications, Vol. 25, No. 4, IEEE Trans. on IA, Vol 25, No.4, 1989, pp.732-737

[6] Sang-Wook Lee, Jung-Hoon Choi, Yong-Kweon Kim and Ho-Seong Kim, "Analysis and Fabrication of a Biological Cell Fusion Device Using Dielectrophoretic Force", ASME Winter Annual Meeting, DSC-Vol.55-2, 1994, pp.755-759

[7] 이 상욱, 김 용권, "초소형 미생물체 조작기구에 관한 연구", 대한전기학회 논문지, Vol.44, No.2, 1995, pp.186-191

[8] K. V. I. S. Kaler and T. B. Jones, "Dielectrophoretic Spectra of Single Cells Determined by Feedback-controlled Levitation", Biophys. J., Vol. 57, 1990, pp.173-182