

세포분리시스템

이 글에서는 세포 연구를 위한 마이크로 기술 중에서 분자생물학(molecular biology), 약물시험(drug screening), 진단(diagnosics) 그리고 세포대체치료법 등 연구의 필수적인 장치인 세포분리시스템에 대하여 소개하고자 한다.

김 병 규 / Microsystem Center, KIST, PhD

e-mail : bkim@kist.re.kr

휴먼 게놈 프로젝트가 예상된 시간보다 빨리 종료된 이후, 생명과학에서의 연구테마는 급격히 변화하고 있다. 연구자들은 단백질공학(proteomics), 세포공학(cellomics)과 같은 소위 포스트 게놈 분야에 관심을 두고 있으며, 그 중에서도 최근에는 세포공학분야가 많은 주목을 받고 있다. 마이크로 테크놀로지는 세포의 선별 및 분리, 소량의 세포 배양 시스템, 고속대량약물시험(high-throughput drug screening), 단일 세포 조작 및 분석, 기초적인 세포의 생물학적인 연구 및 조직 공학에 이르기까지 다양한 분야에서 세포연구에 많은 도움을 주고 있다. 이 글에서는 세포연구를 위한 마이크로 기술 중에서 세포분리시스템에 대하여 다루고자 한다. 세포분리시스템은 분자생물학(molecular biology), 약물 시험(drug screening), 진단(diagnosics) 그리고 세포대체치료법 등의 연구를 위해서 필수적인 장치이다. 세포분리시스템은 세포표면에 극성과 세포가 존재하는 공간의 전기장을 이용하는 유전영동 분리법(DACS), 항원항체반응을 이용 세포에 자성을 띠는 비드(bead)를 붙여서 분리하는 자력이용세포분리법(MACS), 세포 표면에 형광물질이 부착된 것을 감지하여 분리하는 형광세포분리법(FACS)로 크게 분류할 수 있다.

유전영동을 이용한 세포분리법 (Dielectrophoretically Activated Cell Sorter)

유전영동(dielectrophoresis)이라는 용어는

1978년 Pohl의 의해서 처음 사용되었으며, 전기영동(electrophoresis)은 극성을 띠고 있는 입자에만 적용이 가능하나, 유전영동은 중성 입자도 조작이 가능하다는 측면에서 전기영동과 구별된다. 그림 1은 유전영동의 기본원리를 설명하고 있다. 일정 전기장 내에서 분극이 가능한 입자는 한 쪽 면에는 양극전하를 다른 면에는 음극전하를 띠게 된다. 만약에 균일한 전기장 내에 입자가 존재할 때에는 양극과 음극 전하가 균일하게 분포하게 되어 서로 다른 방향으로 동일한 힘이 작용함으로써 입자에는 특정방향으로의 힘이 작용하지 않는다. 반면에 그림 1에서 보는 바와 같이 균일하지 않은 전기장 내 입자가 존재할 때에는 입자의 위치에 따라 양극과 음극 전하의 분포가 달라지게 되어 입자 전체적으로 봤을 때, 작용하는 힘의 균형이 깨지게 되어 한 쪽 방향으로 입자가 이동하게 된다.

위 상황을 간단한 수식으로 표시하면 아래와 같다.

$$F=Q^+E(x+d)-Q^-E(x) \quad (1)$$

비균일한 전기장의 크기에 비해 입자의 직경은 상대적으로 작다고 가정하면

$$F(x+d)=E(x)+d \cdot \nabla E(x) \quad (2)$$

입자에 작용하는 순수 힘(net force)은

$$F=Qd \cdot \nabla E(x) \quad (3)$$

Qd 은 dipole moment로 정의하므로, 입자에 작용하는 유전영동에 의한 힘은

$$F=m \cdot \nabla E(x) \quad (4)$$

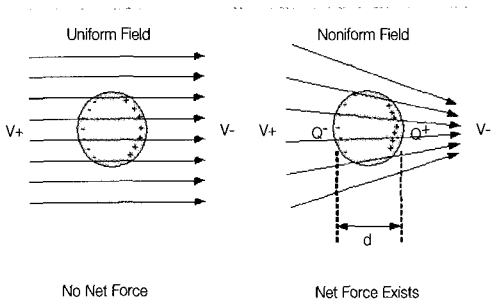


그림 1 유전영동의 기본 원리

매질 내에 떠있는 구형의 입자에 대한 dipole moment의 크기는 식 (5)를 이용하여 계산할 수 있다.

$$m = 4\pi r^3 \epsilon_m \left[\frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m} \right] E \text{ with } \epsilon' = \epsilon - i \frac{\sigma}{\omega} \quad (5)$$

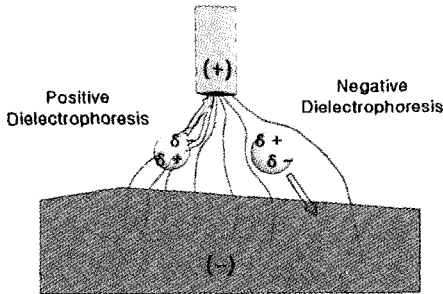


그림 2 불균일한 전기장 내에서의 두 입자의 이동

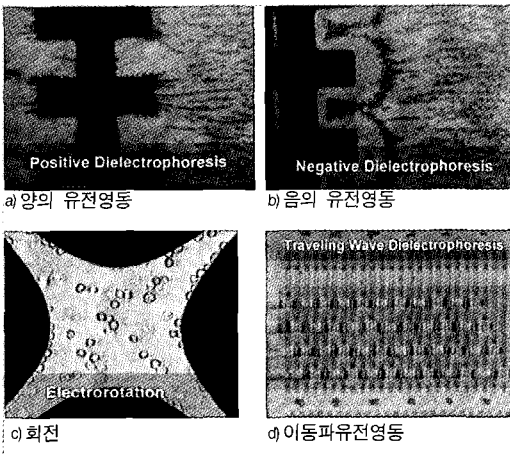


그림 3 AC 전기동역학현상

여기서 r 은 입자의 반경, ϵ_m 는 주위 매질의 유전율, ϵ_p and ϵ_m 입자와 매질의 복합유전율(complex permittivities)을 각각 의미하며, ϵ 은 절대유전율, σ 는 전도도, ω 는 전기장의 the radian frequency을 나타낸다.

만약에 Clausius-Mossotti 인자(f_{CM})를

$$f_{CM} = \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m} \text{로 정의하면, 식 (4)와 (5)를 이용하여}$$

여, 입자에 작용하는 시간평균 유전영동힘(F_{DEF})을 다음과 같이 표시할 수 있다.

$$F_{DEF} = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re}(f_{CM}) \nabla |E_{ms}|^2 \quad (6)$$

여기서 $\text{Re}(f_{CM})$ 은 Clausius-Mossotti 인자의 실수부를 의미하며, E_{ms} 는 전기장의 root mean square magnitude이다. Clausius-Mossotti 인자는 -0.5에서 1의 값을 갖는다. 이것이 힘의 방향을 결정하게 된다. 만약에 양수이면, 전기장의 gradient가 증가하는 방향으로 입자가 이동하게 되며, 음수이면 전기장이 높은 곳으로부터 낮은 곳으로 입자가 밀려 나게 된다. 이것을 음의 유전영동이라고 한다.(그림 2)

Clausius-Mossotti 인자의 물리적인 의미를 설명한다면 입자와 매질 사이의 상대 분극화(relative polarizability)이다. 만약에 입자가 매질에 존재하는 매질보다 분극화가 잘 된다면, 입자에 작용하는 힘은 전기장의 분포가 조밀한 방향으로 작용하게 된다(양의 유전영동). 반면에, 입자가 매질보다 분극화가 잘 되지 않으면, 입자는 전기장의 분포가 조밀하지 않은 방향으로 이동하게 된다. 이러한 특성을 이용하면 세포를 전극이 위치한 지점에 고정(그림 3a)하거나, 밀어내거나(그림 3b), 회전(그림 3c)시키거나, 이동(그림 3d)시키는 것이 가능하다.(<http://www.dielectrophoresis.org>.)

이러한 유전영동 기술을 이용 미국 텍사스 대학의 Anderson 암연구센터에서는 혈액에서 암세포를 분리한 바 있으며, Purdue 대학의 Bashir 교수는 *Listeria Innocua* 죽은 세포는 음의 DEP힘을 이용하여 밀어내고 산 세포는 양의 DEP 힘을 이용하여 전극에 고정함으로써 죽은 세포와 산 세포를 분리하였다. 세포분리효과를 극대화하기 위한 노력

테마기획 □ 세포의 역학과 조작 및 응용

의 일환으로 종래의 장흐름 분획법(field flow fraction)에 유전영동을 결합하여 분리 효율을 높이고자 하였으나 분리 후 세포를 수집이 어렵다는 단점을 가지고 있다. 최근에는 이러한 방법들의 단점을 보완하기 위한 많은 연구가 진행 중이다.

그러한 노력의 일환으로 마이크로 채널 내에 전극을 설치하여 위에서 언급한 유전영동현상으로 인한 세포에 작용하는 유전영동력(dielectric-phoresis force)과 항력(drag force)의 균형을 적절히 이용하여 다종의 세포에서 특정한 세포를 분리해 낼 수 있는 방법이 한국과학기술연구원의 마이크로시스템연구센터에 의해 개발되었다. 그림 4는 채널 내의 전극의 형상을 변화시켜 세포들의 채널 내 위치 결정이 가능하다는 것을 예시해 보여주고 있다. 그림 4b에서 보는 바와 같이 3차원 구조의 채널 내에 3차원 형상의 전극을 효과적으로 배치하면 세포를 분리 후 수집하기가 쉬어져 기존의 DACS를 이용한 세포분리법 및 DACS와 장흐름 분획법을 통합한 방식의 문제점을 해결할 수 있을 것으로 기대된다.

자력이용세포분리법(Magnetically-Activated Cell Sorting)

자력을 이용한 세포 분리 방법 가운데 하나로 최근에 널리 사용되고 있는 것이 MACS(Magnetically-Activated Cell Sorting) 기술이다. 현재, 이 기술을 상용화하여 독점 판매하고 있는 Miltenyi Biotec은 1989년 Cologne University에서 회사를 설립한 후, 자력에 의한 세포 분리를 통해 독일에서 제일 성공한 신 기술 회사 중에 하나가 되었으며, 전 세계적으로도 넓은 수요 층을 형성해가고 있다. 사용되는 분야는 주로 유전자 치료나 줄기세포 이식을 통해 암이나 AIDS 및 기타 자가 면역 질병의 약물 개발 연구를 위한 Tool로서 이용되고 있다.

이 기술은 50 ~ 200nm 정도의 직경을 가지고 있는 입자(MACS microBeads)를 항원 항체 반응에 의해 특정 세포 표면에 부착(magnetic labeling)시킨 뒤, 컬럼(column)을 통과시켜서

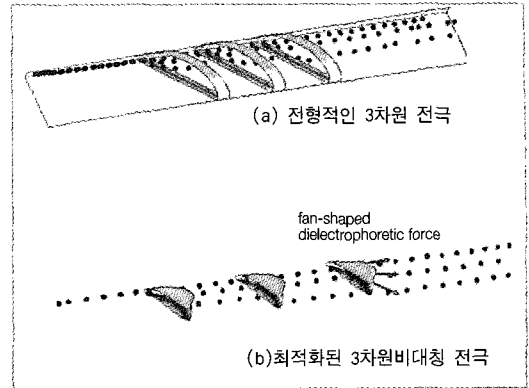


그림 4 채널 내에서의 세포 이동

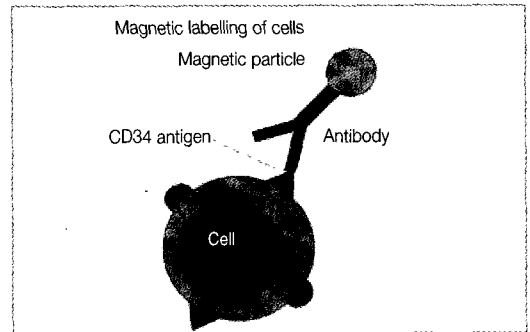


그림 5 항원항체 반응을 통한 세포표면의 magnetic bead 부착 원리

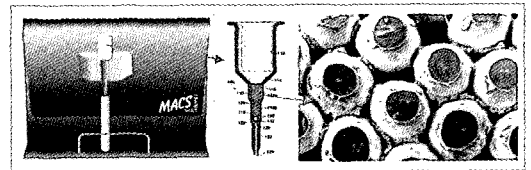


그림 6자력을 이용한 세포 분리 장치의 구조(<http://www.miltenyibiotec.com>)

특정 입자가 부착된 세포만을 분리하는 기술이다. 기본적으로 사용되는 입자의 크기가 작아 광학 현미경으로 식별이 되지 않으며, 세포에 의해 자가 분해될 수 있다는 특징을 가지고 있다. (<http://www.miltenyibiotec.com>)

특정 세포를 분리하기 위한 컬럼은 분리 방법과 분리하고자 하는 양에 따라 종류가 다양하며, 그 기본적인 구조는 그림 6과 같다.

컬럼의 내부에는 작은 구슬들이 적층되어 있어서

특정 세포를 포함한 액을 넣었을 때 구슬과 구슬 사이의 공극으로 이동된다. 이 때 외부로부터 자력을 가하게 되면, 적층된 쇠구슬들이 자화되어 특정 세포만을 흡착시키고 나머지 세포들은 아래로 흘러 내리게 된다. 그 후, 흡착되어 있던 세포들을 수거하기 위해, 외부에서 가해 주었던 자력을 제거하고, 세포가 전혀 포함되어 있지 않은 용액(버퍼)을 흘려준다.(그림 7)

위에서 기술한 특정 세포 분리 방법은 크게 두 가

지로 정의할 수 있고 그 방법은 다음과 같다.

1) Positive Selection

본 방법은 분리하기 위한 세포의 표면에 직접적으로 MACS MicroBeads를 부착시킨 후, 자력에 의해서 특정 세포만을 분리해 내는 방법으로 추가의 과정 없이 부착된 세포를 직접 분리하기 때문에 처리 시간이 빠르며, 시료액 내에 채취하려는 세포의 수가 적을 경우 효과적이다.

2) Depletion

기본적으로 분리하고자 하는 세포를 제외한 나머지의 세포를 제거시켜 주는 방법으로, 특정 세포를 위한 항체가 아직 발견되지 않아 분리할 수 없을 경우 혹은 일부러 붙이지 않으려고 할 때, 사용되는 방법으로 positive selection에 비해 분리 단계가 많아져서 소요 시간의 증가를 초래할 수 있다. 하지만, 분리된 세포 표면에는 특정 항체가 없기 때문에 항체를 제거하기 위한 시약이나 배양 과정 없이도 즉시 사용될 수 있다.

대부분, 의학이나 생물학 분야에서 세포의 분석을 위해 사용되고 있으며, 현재 사용되는 분야는 다음과 같다.

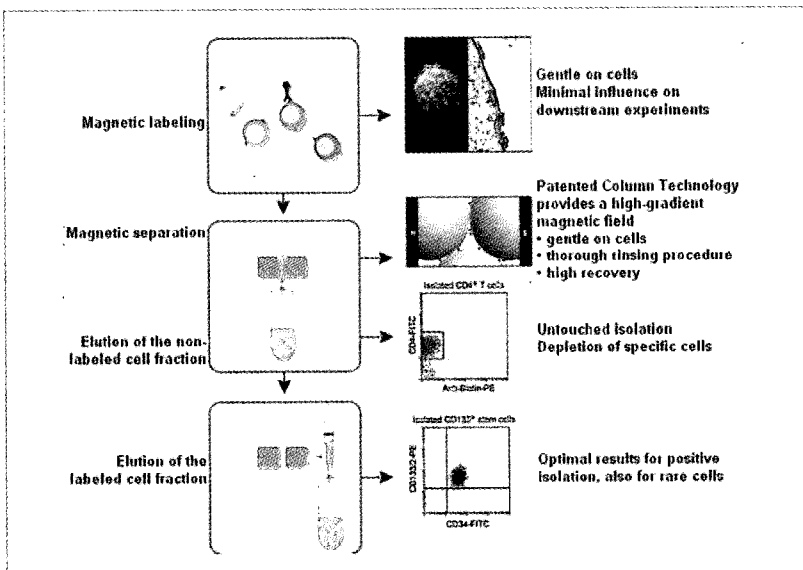


그림 7 세포분리과정(<http://www.miltenyibiotec.com>)

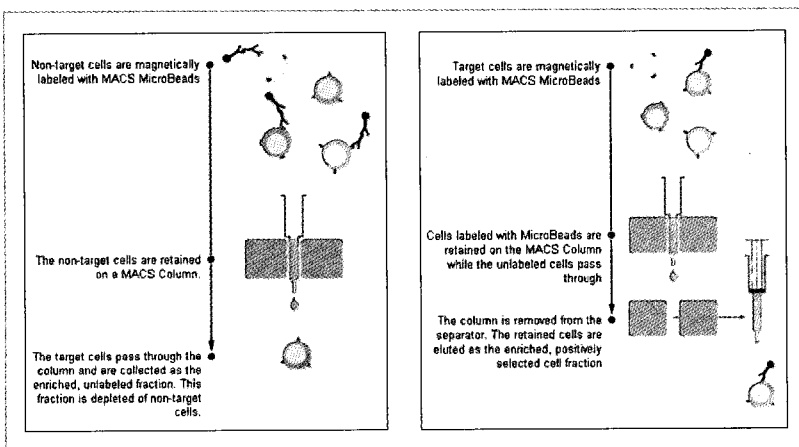


그림 8 세포분리방법(<http://www.miltenyibiotec.com>)

테마기획 □ 세포의 역학과 조작 및 응용

- Cytokine Secretion Assays
- Human Cells Assays
 - Basophils, B cells, CD133(AC133), Dendritic cells, Epithelial cells, Eosinophils and neutrophils, Fetal cells, CD34/Hematopoietic progenitor cells, Monocytes and Macrophages, NK cells, T cells, Tumor cells etc.
- Mouse Cells Assays
 - B cells, Dendritic cells, Hematopoietic progenitor cells, Monocytes and macrophages, NK cells, T cells, etc.
- Other Mammalian Cells Assays
 - Bovine cells, Canine cells, Feline cells, Non-human primate cells, Ovine cells, Porcine cells, Rat cells, etc.
 - Other Animal Cells
- Plant Cells
- Molecular Biology and Protein Biochemistry

그 외에 기구적인 측면의 접근이 몇몇 연구자들에 의해 다루어져 오고 있다. 그림 9는 자기장을 이용한 세포 분리 기술들을 동향에 따라 분류해 놓은 것으로 칩 기술에 근간한 것을 micro device로 분류하였고, 그 외에 나머지는 macro device로 고려하였다.

자석을 이용하여 세포를 분리하기 위해 커다란 실험 장치들이 고안되어 왔지만, 실질적인 부분에 있어서 분리의 효율이 검증되지 못한 채 특허로 남아 있는 것이 대부분이다. 그러나 Miltenyi Biotec 사의 MACS는 꾸준한 개발과 많은 분야에서의 검증을 통해 현재는 널리 사용되는 분리가 되었다. 이런 macro device 측면과 달리 또 다른 그룹들에 의해 micro device 칩 형태의 자석 분리가 고안되어 왔으며, 그 중 구조적 완성도가 높았던 것이 프린스턴 대학의 M. Berger(2001)에 의해 제작된

분리기로, 칩 상에 전극을 제작한 후 전류에 의한 자기장을 발생시켜 백혈구 세포 분리의 가능성을 보여 주었다. 그와 좀더 다른 형태로 자력을 인가할 수 있는 것이 하버드 대학의 Prentiss(2001)에 의해 제시되었고, 3차원 형태의 제어능력을 갖춘 분리용 칩이 신시네틱 대학의 Ahn(2003)에 의해 제안되었다. 하지만, 기존에 사용되어 오고 있는 분리기와 비교되었을 때, 분리 효율이나 기타 채널 내에 세포 흡착으로 인한 문제들로 인해 한계에 부딪혀 있다. 하지만, 최근 한국과학기술연구원의 마이크로시스템연구센터에 의해 macro device의 고 분리효율 장점을 가지면서 micro device의 형태와 같이 칩 타입으로 제조될 수 있는 세포 분리용 플랫폼이 제안되기도 하였다. 상부에 직경 10mm 내외의 자석을 위치시키고 슬라이드 글래스에 액적(droplet)이 일정한 직경을 갖도록 한 후 magnetic bead가 붙어있는 분리하고자 하는 세포 용액과 함께 흘려주면 액적 내에 얻고자 하는 세포

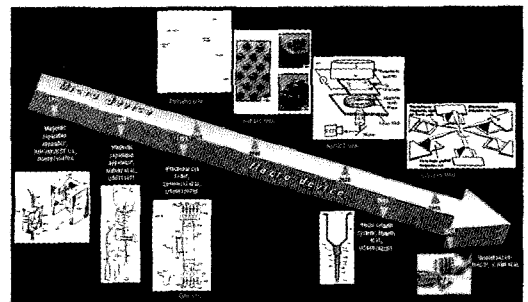


그림 9 자력을 이용한 세포분리 기술 동향

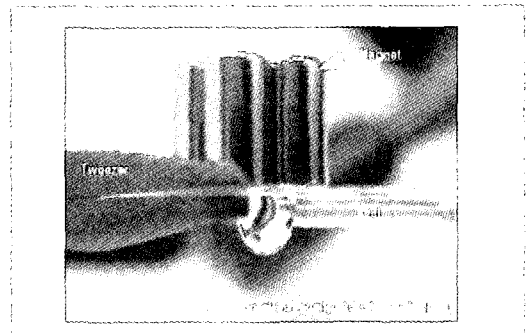


그림 10 액적을 이용한 자력 세포분리장치

포는 자력에 의해 액적의 상부에 붙게 되고, 버리고자 하는 세포는 액적의 하부에 위치하며 이때 추가적인 용액의 흐름에 의해 액적이 떨어질 때 불필요한 세포를 함께 떨어지게 한다. 이 방법은 기존 채널 내에서 세포를 분리할 때 발생하는 채널 내 세포의 부착으로 인해 세포분리 효율을 저하를 방지할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이와 같이 Macro의 장점 즉 고속대량분리가 가능하면서 Micro의 장점 즉 경박 단순한 특성을 갖는 자력이용세포분리기에 대한 연구가 지속적으로 이루어질 것으로 기대된다.

형광세포분리법(Fluorescence Activated Cell Sorter)

최초의 프로토 타입 세포 분리기는 물리학자 Mack J. Fulwyler에 의해 1965년 미국의 로스 알라모스 국립 연구소(Los Alamos National Laboratory(LANL))에서 만들어졌다. 실질적으로 그 장치를 가지고 세포의 면역학적

특성 연구에 이용된 것은 스탠포드 대학의 Leonard Herzenberg에 의해서였다. 그 이후, Mack J. Fulwyler의 추가 제안에 의해 스탠포드의 Genetics Department's Instrumentation Research Laboratory 소속의 공학자들과 Herzenberg는 형광물질을 이용하여 살아있는 세포를 분류하기 위한 공동 연구를 하게 되었다. 그러한 연구과정을 통해 세포 표면에 형광물질이 부착된 것을 감지하기 위한 두 가지 종류의 분리가 소개되었다. 하나는 mercury arc 램프를 소스로 한 1969년 모델과 또 하나는 argon ion laser를 사용하는 1972년 모델이었다. 개발된 모델을 토대로 상품화가 이루어질 수 있도록 National Institutes of Health(NIH)의 자금 지원이 이루어졌으며, 1975년에 그 프로토 타입을 근간으로 한 FACS(Fluorescence Activated Cell Sorter)라는 이름의 첫 상품이 의료 제품 생산업체인 Becton Dickinson(BD)에 의해 나오게 된 것이다.

기본적으로 FACS는 유체 공학, 광학 및 전자 공학 기술의 유기적 결합이 요구되는 시스템으로서, 액체 속에 존재해야 하는 대부분의 세포들을 일정한 흐름으로 이송시키기 위한 제어가 요구된다. FACS 시스템의 경우, 50~300개의 작은 노즐들을 통해 sheath fluid를 형성시켜 세포들을 이송시켜 준다. 이러한 이송 방법을 구현하기 위한 구조는 그림 11과 같다.(Flow Cytometry: First Principles: Alice Longobardi Givan, Wiley-Liss, 2000)

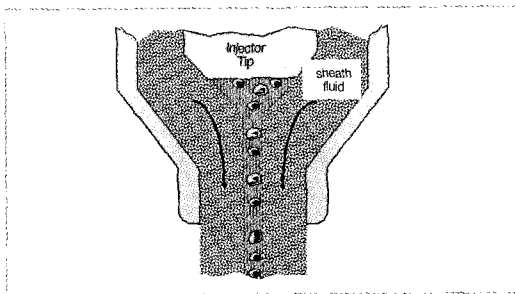


그림 11 세포이송을 위한 유체 이송 개념도

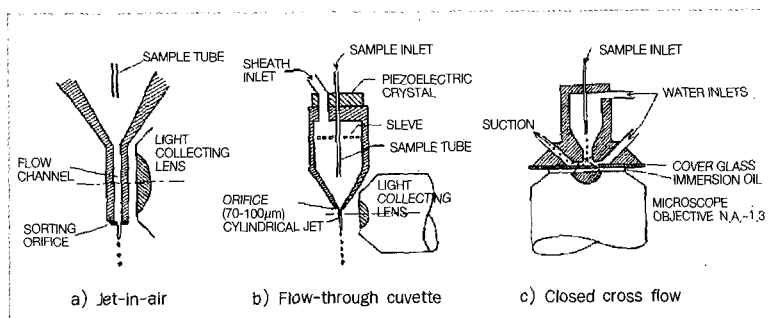


그림 12 유동의 효과적 구현 방법의 예

Injector tip을 통해 세포가 들어있는 세포 혼합액을 분사할 때, 주변의 sheath fluid에 의해 혼합액의 양과 속도를 조절시켜 준다. 이와 같은 유동의 흐름을 좀더 효과적으로 구현시켜서 세포의 특성분석 및 분리를 구현하기 위

테마기획 □ 세포의 역학과 조작 및 응용

해 몇 가지의 flow chamber type(Jet-in-air ; Flow-through cuvette; Closed cross flow)이 소개되었다.(그림 12)

세포의 특성을 분석하기 위한 구성 요소 중에 하나가 광학으로서, FACS의 경우 두 가지의 광 분석 방법(Forward Angle Light Scatter ; FALC), 90 Degree Light Scatter 혹은 Side Scatter라고 함)을 통해 세포의 물리적인 요소(크기, 모양 및 동종성(homogeneity)) 측정이 가능하다. Forward Scatter의 경우, 세포의 표면 특성을 분석하여 사멸된 세포의 유무를 판단하는 수단으로 쓰인다. Side Scatter의 경우, 세포의 함유물을 분석하여 세포 내에 과립 상태를 인지하게 한다.(<http://www.cyto.purdue.edu/lowcyt/educate/pptslide.htm>),(그림 13)

특히, laser를 광원으로 하여 세포 표면에 tagging된 분자들을 파장에 따라 식별할 수 있도록 여러 개의 광 필터를 사용하고 있어서, 여러 종류의 세포들이 섞여 있는 시료로부터 동시에 다종의 세포들을 개별적으로 분리하는 것이 가능하다(그림 14). 현재 사용되고 있는 광 필터에 의해 분석 가능한 형광 물질과 그에 따른 파장 범위는 그림 15와 같다.(<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.htm>)

FACS는 주로 생물학이나 생화학 분야에서 생체 물질의 상태 파악이나 분석을 위해 사용되어 왔다. 특히, 특정 세포에 대한 분리를 통해 각각에 대한 세포개수 및 해석을 가능하게 하였다. 하지만, 시스템에서 사용되는 하드웨어의 속도나 분리에 사용되는 광원 감지기의 응답속도 지연 및 throughput의 측면에서 아직도 개선해야 될 문제들이 산재되어 있다. 이러한 한계점을 LOC(Lab-on-a-Chip) 측면에서 개선하기 위해 몇 가지의 기술들이 최근 몇몇 연구 그룹에 의해 소개가 되었는데, 1999년에 Microfabricated Fluorescence-Activated cell Sorter가 캘리포니아 공대의 Quake에 의해서 제안되었다. 2000년에는 하버드 대학의 Whitesides에 의해 채널 내의 Laminar Flow 이용이 제시되었으며, 2002년 및 2003년에는 아

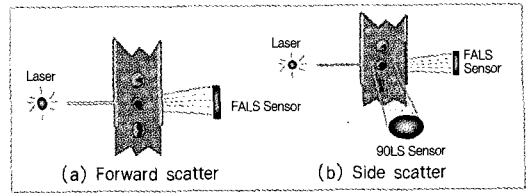


그림 13 FACS의 광 분석 방법

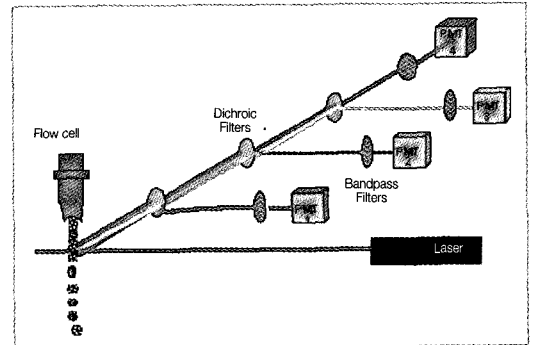


그림 14 다수의 광 필터에 의한 분석

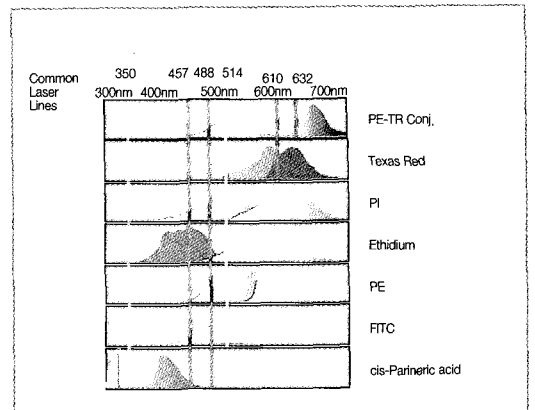


그림 15 분석 가능한 형광물질의 종류 및 관련 파장

일랜드의 NMRC(National Microelectronics Research Centre) 소속의 O'Brien 및 덴마크 공대(DTU)의 Wolff에 의해 FACS의 규모를 줄이면서 최소의 광원에 의해 detection을 수행할 수 있는 micro-FACS칩 개발이 이루어졌다. 전기영동을 이용한 세포분리기 또는 자력이용세포분리기와 마찬가지로 형광세포분리기 관련 연구도 초소형 고속 분리가 가능한 세포분리기 개발이 현재의 연구 추세이다. 또한 분석 가능한 형광물질의 종류 및 관련

파장을 확대하고자 하는 노력이 지속적으로 이루어지고 있다. 좀더 진보된 형광세포분리기를 구현하기 위해서는 세포의 종류에 따라 적절한 파장을 낼 수 있는 형광물질의 개발 선결되어야 한다는 과제를 안고 있다.

맺음말

기존의 FACS(Fluorescence-Activated Cell Sorter)와 MACS(Magnetic-Activated Cell Sorter)는 분리하고자 하는 세포들을 immuno-labeling을 함으로써 분리해 내는 지금까지 사용해온 전형적인 방법으로 폭넓게 사용되고 있다. 하지만 분리하고자 하는 세포에 따라 적절한 marker(즉, FACS의 경우 세포에 따른 적절한 형광, MACS의 경우 magnetic bead를 분리하고

자 하는 세포에 적절히 붙일 수 있는 항원항체반응 단백질)의 개발이 제한적인 관계로 이를 개선하기 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 또한 MEMS기술을 기반으로 한 DACS(Dielectrophoretically Activated Cell Sorter)는 분리하고자 하는 세포에 대한 immuno-labeling이 필요 없다는 장점과 소형제작이 가능하고 장치구성이 간단하다는 점 때문에 많은 연구자들이 이와 관련된 연구를 수행하고 있다. 따라서, 추후에 연구 방향은 생물학자들의 보수적인 장치 사용 또는 안정적인 결과를 보장하는 장치 사용 욕구로 인하여 이미 개발된 marker를 이용한 FACS와 MACS는 지속적인 수요가 기대되나, 새로운 형태의 고속대량 세포 분리 유전영동세포분리기를 개발하기 위한 노력이 한 층 강화될 것으로 예상된다.

기계 용어해설

가속수명시험(Accelerated Life Test)

제품의 실사용조건보다 가혹한 조건(가속조건)에서 시험하여 고장을 촉진시키고, 가속조건에서 관측된 데이터로부터 수명-스트레스 관계를 추정하고, 이를 사용조건으로 외삽(extrapolation)하여 사용조건에서의 수명을 빨리 추정하기 위한 시험이다.

경로차(Retardation Length)

광학적 이방성을 가지게 물질의 경우 횡파인 빛이 진행할 때 진동 방향에 따라 진행 속도가 다르게 된다. 이 때 가장 빠르게 진행하는 축과 가장 느리게 진행하는 축이 생기는데 이 두 축 사이의 속도 차이에 의해 두 파형 사이의 진행 거리의 차이를 경로차라 한다.

고장메커니즘(Failure Mechanism)

물리적, 화학적, 기계적, 전기적, 인간적 원인 등으로 아이템이 고장을 일으키는 것으로서, 설계 및 제조공정에 기인한 대상 아이템 내부의 소재요인이 외부에서 스트레스 및 사용 환경조건의 변화에 따라 물리·화학적으로 변화해서 고장에 이르는 것이다.