

<학술논문>

DOI:10.3795/KSME-A.2008.32.10.831

한 쌍의 전극으로 전기 삼투 유동과 세포 분쇄 기능을 동시에 구현한 연속적인 세포 분쇄기

이 동 우* · 조 영 호†

(2008년 2월 1일 접수, 2008년 7월 24일 수정, 2008년 9월 8일 심사완료)

A Continuous Electrical Cell Lysis Chip using a DC Bias Voltage for Cell Disruption and Electroosmotic Flow

Dong Woo Lee and Young-Ho Cho

Key Words : Electrical Cell Disruption (전기적 세포파괴), Electrical Cell Transport (전기적 세포이송)

Abstract

We present a continuous electrical cell lysis chip, using a DC bias voltage to generate the focused high electric field for cell lysis as well as the electroosmotic flow for cell transport. The previous cell lysis chips apply an AC voltage between micro-gap electrodes for cell lysis and use pumps or valves for cell transport. The present DC chip generates high electrical field by reducing the width of the channel between a DC electrode pair, while the previous AC chips reducing the gap between an AC electrode pair. The present chip performs continuous cell pumping without using additional flow source, while the previous chips need additional pumps or valves for the discontinuous cell loading and unloading in the lysis chambers. The experimental study features an orifice whose width and length is 20 times narrower and 175 times shorter than the width and length of a microchannel. With an operational voltage of 50 V, the present chip generates high electric field strength of 1.2 kV/cm at the orifice to disrupt cells with 100% lysis rate of Red Blood Cells and low electric field strength of 60 V/cm at the microchannel to generate an electroosmotic flow of $30 \mu\text{m/s} \pm 9 \mu\text{m/s}$. In conclusion, the present chip is capable of continuous self-pumping cell lysis at a low voltage; thus, it is suitable for a sample pretreatment component of a micro total analysis system or lab-on-a-chip.

기호설명

- E : 전기장
- I : 전류
- w : 미소 유로의 폭
- h : 미소 유로의 높이
- V : 전압
- A : 미소입자의 반지름

1. 서론

최근 질병 진단이나 일반적인 생화학 실험을 위한 도구로써 집적화된 생화학적 분석 시스템의 개발이 활발히 진행되고 있다. 이러한 생화학적 분석 시스템의 구성요소 중 세포 분쇄기는 DNA, RNA, Protein 과 같은 바이오 물질을 추출하여 전처리 하는 과정⁽¹⁾에서 반드시 필요한 소자이다.

기존의 세포 분쇄기는 세포 분쇄 원리에 따라서 기계적,^(2,3) 화학적,⁽⁴⁾ 전기적⁽⁵⁻⁷⁾ 방법으로 나눌 수 있다. 세포분쇄를 위해 높은 압력을 요구하는 기계적 방법과 별도의 시약을 사용하는 화학적 방법 보다는 전기장을 이용한 세포분쇄기가 랩온어칩과 같은 집적화된 시스템에 적용이 용이하여 많은 연구가 진행되고 있다.

기존의 전기적 세포 분쇄기^(8,9)는 세포를 분쇄하

† 책임저자, 회원, 한국과학기술원 바이오및뇌공학과 및 기계공학과, 디지털나노구동연구단

E-mail : nanosys@kaist.ac.kr

TEL : (042)869-8691 FAX : (042)869-8690

* 한국과학기술원 바이오및뇌공학과, 디지털나노구동 연구단

는데 필요한 1 kV/cm 이상의 높은 전기장을 얻기 위해, 미소 전극의 폭을 줄여서 낮은 AC 전압에서 높은 AC 전기장을 형성함으로써 세포를 분쇄하고, 유체와 세포를 별도의 펌프와 밸브를 사용하여 이송하였다. 그러나, 본 연구에서는 전극의 폭을 줄이지 않고 미소유로의 폭을 조절하여 세포분쇄에 필요한 높은 전기장을 생성하여 세포를 분쇄하고, 별도의 펌프와 밸브 없이 유로에 형성된 전기장으로 전기삼투유동(Electroosmotic Flow)을 생성하여 유체와 세포를 이송하는 새로운 방법을 제안한다.

제안하는 분쇄기는 Figure 1 과 같이 전극의 양단에 형성된 미소 유로의 폭을 줄인 오리피스를 형성하여 낮은 DC 전압으로 높은 DC 전기장을 형성하여 오리피스에 집중된 높은 전기장으로 세포를 분쇄하고 폭이 넓은 유로에 형성된 낮은 전기장으로 전기삼투유동 (Electroosmotic Flow)을 생성한다. 그러므로 별도의 펌프와 밸브 없이 연속적으로 세포를 분쇄할 수 있는 장점을 가질 뿐만 아니라 미소 전극 제작공정과 유로와 미소 전극의 정밀한 정렬이 필요 없기 때문에 제작 공정의 단순화를 꾀할 수 있다.

2. 이론 및 설계

2.1 전기장 세기 조절

전극의 양단에 형성된 단일 유로(폭이 넓은 유로와 오리피스)에서 전기장의 세기는 유로에 흐르는 전류와 유로 단면적의 함수이고, 전류는 인가 전압과 전체 유로 저항의 함수로 다음과 같다.

$$E_m = I \cdot \left(\frac{\rho_f}{w_m \cdot h_m} \right), E_o = I \cdot \left(\frac{\rho_f}{w_o \cdot h_o} \right), I = \frac{V_o}{R_t}$$

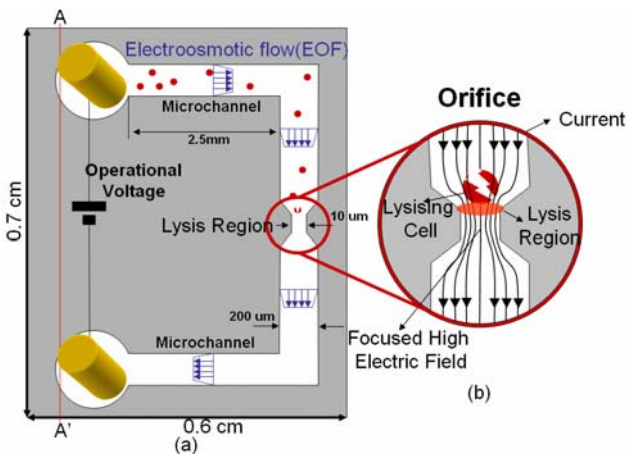


Fig. 1 Structure of the electrical cell lysis device: (a)Top view; (b)Enlarged view of the orifice

위 식에서 E_m 와 E_o 는 각각 폭이 넓은 유로와 오리피스에서의 전기장 세기, I 는 전류, ρ_f 는 유체의 전기 전도도, w_m 과 w_o 는 각각 폭이 넓은 유로와 오리피스의 폭, h_m 과 h_o 는 각각 폭이 넓은 유로와 오리피스의 높이, R_t 는 폭이 넓은 유로와 오리피스를 포함하는 전체 유로 저항, V_o 은 인가전압을 나타낸다.

유로의 높이가 동일할 경우, 유로의 전기장은 유로의 폭에 반비례하므로 폭이 좁은 오리피스를 형성하여 전기장을 증폭할 수 있다.

2.2 세포 분쇄

Figure 2 는 전기적인 세포 분쇄의 원리⁽⁹⁾를 나타낸다. 세포 외부에 인가된 전기장에 의해 세포 막의 안팎에 막전위(Transmembrane potential: Φ)가 생성된다. 막전위와 인가 전기장의 관계는 다음과 같다.

$$\Delta\phi = 1.5aE \cos\theta$$

위 식에서 $\Delta\phi$ 는 막전위의 차이, E 는 인가 전기장의 세기, a 는 미소 입자의 반지름, θ 는 전기장 방향과 미소 입자 표면의 수직 방향과의 각도를 나타낸다.

세포의 경우, 외부의 높은 전기장으로 인하여 막전위가 1V 이상인 경우에 세포막의 이온 채널이 열려 외부 액체와 세포질의 삼투압 차이로 생기는 압력차이 때문에 분쇄가 일어난다. 실험적으로, 세포 분쇄는 1V 이상의 막전위를 형성하는 1 kV/cm^(8,9)의 전기장에서 일어나는 것으로 알려져 있다. 그리고 전기 삼투 유동에 사용되는 전기장의 크기는 대략 10 V/cm ~ 100 V/cm⁽¹⁰⁾로 세포분쇄에 필요한 전기장의 약 1/10 이하인 것으로 알려져 있다.

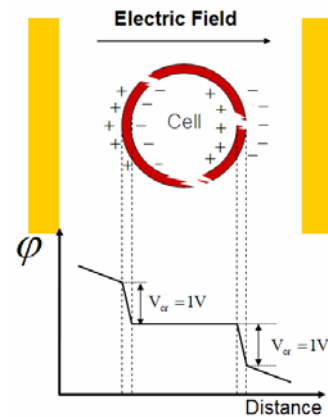


Fig. 2 Distribution of transmembrane potential, Φ , across the cell in the electric field⁽¹⁾: the critical potential($V_{cr}=1V$) is required for cell lysis

Table 1 Simulation results of electric fields

Operation Voltage	Microchannel (200um-wide, 10um-high)	Orifice (10um-wide, 10um-high)
30 V	0.036 kV/cm	0.72 kV/cm
50 V	0.060 kV/cm	1.20 kV/cm
80 V	0.096 kV/cm	1.92 kV/cm

2.3 세포 분쇄기 설계

세포 분쇄에 필요한 전기장의 세기는 1 kV/cm 이상으로 전기 삼투 유동을 이용한 세포 이송에 필요한 전기장(10 V/cm ~ 100 V/cm)의 세기보다 약 10 ~ 100 배 큰 값이 필요하다. 그러므로 본 세포 분쇄기에서는 유로의 폭을 조절함으로써 전기장을 증폭하여 세포를 분쇄하고 전기 삼투 유동으로 유체와 세포의 이송을 동시에 할 수 있는 유로의 구조를 설계하였다.

Figure 1 과 같이 높이 10 μ m, 폭 200 μ m, 길이 7mm의 단일 유로 사이에 폭 10 μ m, 길이 40 μ m의 오리피스를 형성하여 20 배의 폭 감소비로 전기장을 20 배 증폭하여 넓은 유로의 낮은 전기장과 오리피스의 높은 전기장을 동시에 형성할 수 있다. Figure 3은 인가 전압이 50 V였을 때 폭이 넓은 유로와 오리피스에서의 전기장 분포를 MAXWELL9.0 (student version)를 이용하여 시뮬레이션 한 결과를 나타낸다. 오리피스의 확대도에서 보듯이 폭이 좁은 곳에서 전기장의 세기가 폭 감소비와 같이 20 배 커지는 것을 확인할 수 있다.

Table 1은 인가 전압에 따른 넓은 유로과 오리피스에서의 전기장 세기를 나타낸다. 세가지 서로 다른 인가전압에서 오리피스의 전기장 세기가 넓은 유로의 전기장 세기보다 20 배 큰 것을 수치 해석을 통해서 알 수 있다.

3. 실험

3.1 세포 분쇄기 제작

본 세포 분쇄기는 Figure 4에 도시된 바와 같이 PDMS (PolyDiMethyl Siloxane)을 이용한 미소 유로의 제작공정과 유리 기판과의 접합공정을 통해 제작되었다. 미소 유로는 실리콘 웨이퍼 위에 형성된 10 μ m 두께의 AZ9260 (PhotoResist) 패턴을 이용하는 PDMS 마이크로 몰딩으로 제작되었다. 유리 기판과 PDMS 미소 유로를 30W의 RF Power 상태의 대기 플라즈마에 30 초 동안 처리한 후 접합하여 시편의 제작을 완료하였다. Figure 5는 제작이 완료된 시편과 오리피스의 확대 사진이다.

3.2 세포 분쇄기 실험 구성

제작된 세포 분쇄기의 성능 실험을 위해 전기 전도도가 1.6S/m 인 PBS(Phosphate Buffered Saline)

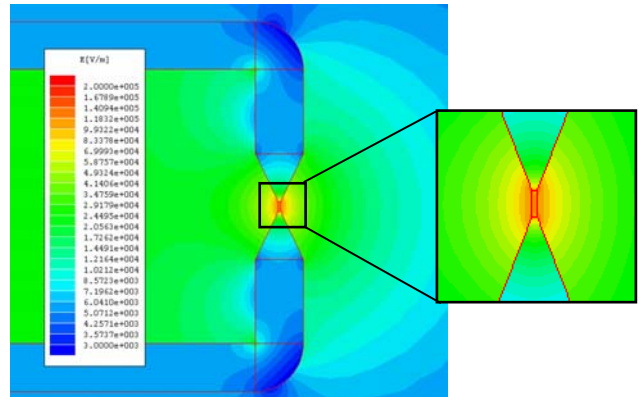


Fig. 3 Numerical simulation of the electric field at the orifice (Fig. 1(b)) for the bias voltage of 50V in Fig. 1(a)

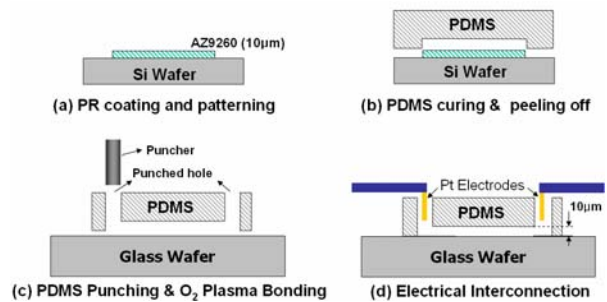


Fig. 4 Fabrication process showing the cross section along A-A' in Fig. 1(a)

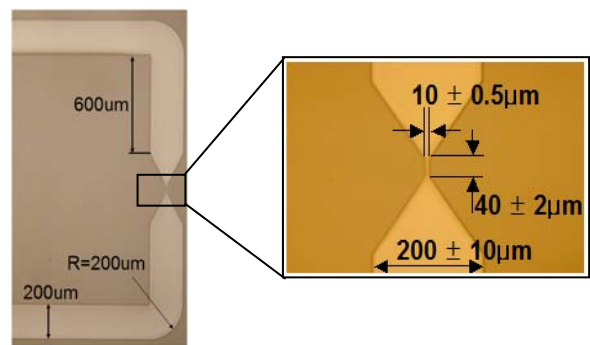


Fig. 5 Fabricated cell lysis device

용액에 1 \times 10⁶ cells/ml로 희석되어 있는 적혈구를 사용하였다. 실험은 전기장에 따른 세포의 분쇄 유무를 보기 위해 30, 50, 80V의 인가전압에서 적혈구의 분쇄율(Lysis Rate)을 각각 CCD 카메라를 이용하여 측정(Fig.6)하였다. 이때, 기계적 전단력에 의한 세포분쇄의 영향을 보기 위해 전압을 인가하지 않은 상태에서 주사기 펌프를 이용하여 세포를 주입하여 세포에 전단력만 인가하는 비교실험을 수행하였다. 마지막으로 전압에 따른 전기삼투유동은 적혈구의 속도 측정을 통하여 정량화 하였다.

3.3 세포 분쇄 실험 결과

Figure 7(a)에서와 같이, 0V의 인가 전압에서는 세포가 파괴되지 않고, 폭 10 μ m의 오리피스를 그대로 통과하는 것을 볼 수 있었다. 이로부터, 오리피스를 통과하는 과정에서 발생하는 기계적인 전단력(shear force)에 의해서는 적혈구가 파괴되지 않음을 확인할 수 있었다.

30V의 인가 전압(Fig. 7(b))에서는 10%의 적혈구가 폭이 10 μ m인 오리피스에서 파괴되는 것을 볼 수 있었지만 대부분의 적혈구(90%)는 폭이 10 μ m인 오리피스를 그대로 통과하였다. 이는 30V의 인가 전압에서 폭이 10 μ m인 오리피스의 이론적 전기장이 0.72 kV/cm로 임계 전기장(1 kV/cm)보다 낮기 때문이다.

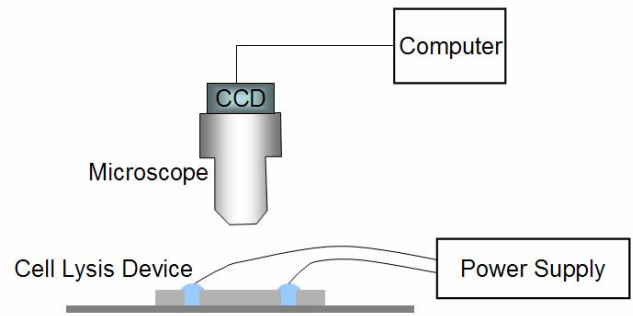


Fig. 6 Experimental apparatus for continuous cell lysis device

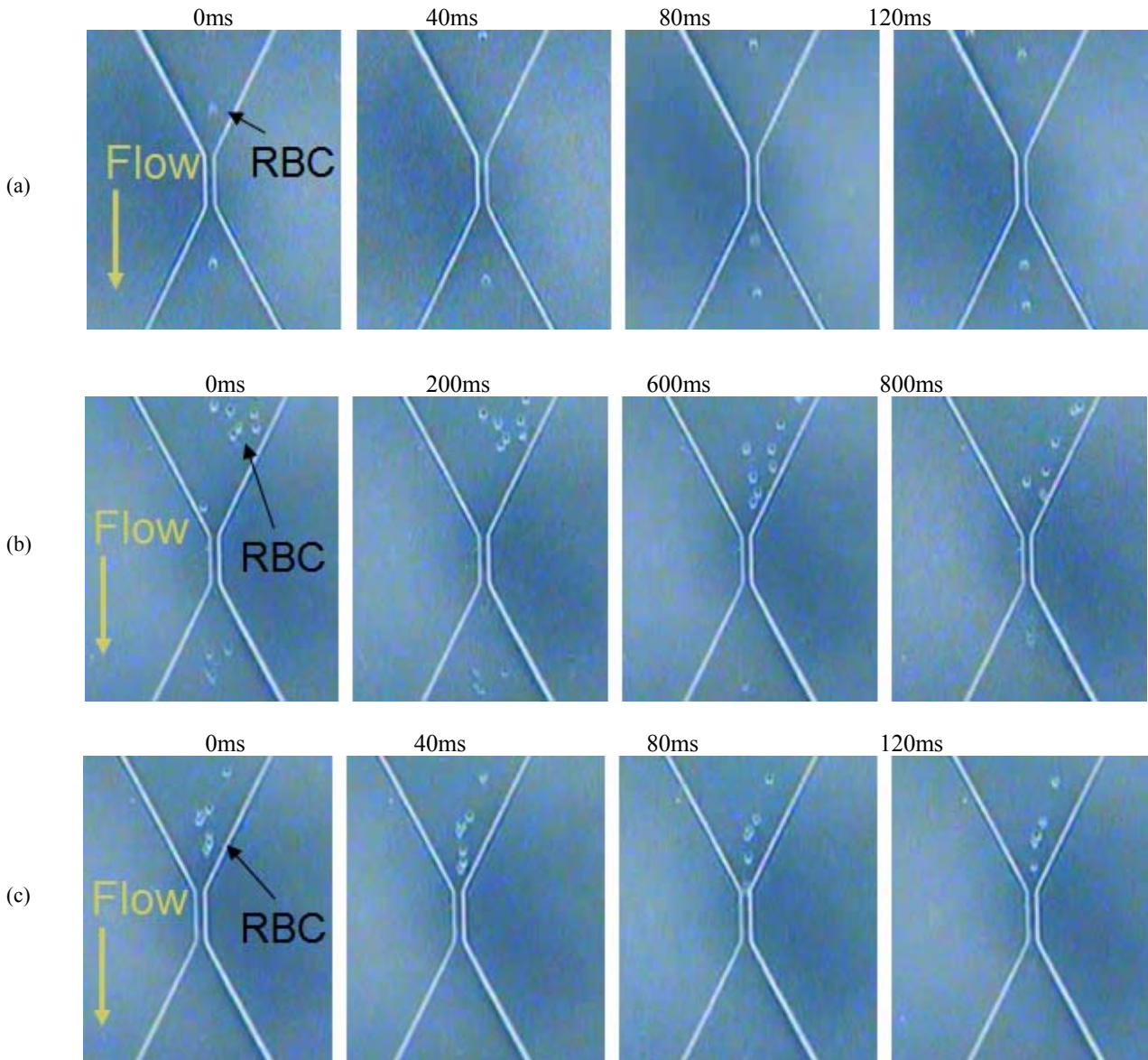


Fig. 7 Movies showing the RBC(Red Blood Cell) lysis at the orifice for three different bias voltages: (a)no RBC(Red Blood Cell) lysis at $V_{\text{bias}} = 0\text{V}$ (syringe pumping); (b)incomplete RBC(Red Blood Cell) lysis at $V_{\text{bias}} = 30\text{V}$ (Electroosmotic flow); (c)complete RBC(Red Blood Cell) lysis at $V_{\text{bias}} = 50\text{V}$ (Electroosmotic flow)

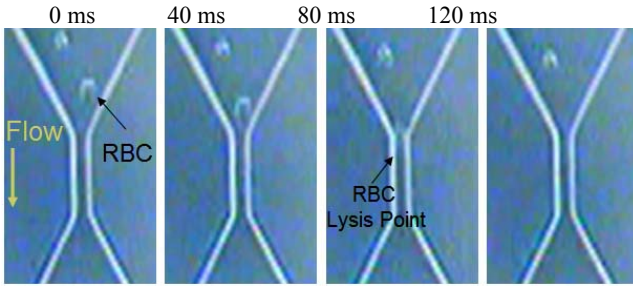


Fig. 8 Enlarged view of the RBC(Red Blood Cell) lysis at the orifice entrance for the bias voltage of 50V

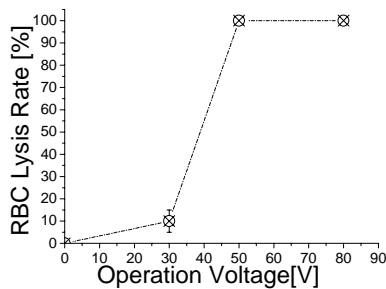


Fig. 9 Measured lysis rate depending on the bias voltage

하지만 이론적으로 1.2 kV/cm 의 집중된 전기장을 생성하는 50V 인 인가 전압에서는 (Fig. 7(c)), 모든 적혈구가 폭이 10 μ m 인 오리피스에서 파괴되었다. Figure 8 은 50V 인 전압에서 적혈구가 파괴되는 순간을 촬영된 비디오에서 발췌한 사진이다. 이 사진에서 보듯이, 적혈구는 Simulation 결과에서와 같이 전기장이 집중되는 폭 10 μ m 의 오리피스의 입구에서 파괴된다.

Table 2 에서는 인가 전압에 따른 폭이 10 μ m 인 오리피스의 입구와 출구에서의 적혈구의 수와 전기 삼투 유동으로 인한 적혈구의 속도를 정리하였다. 전압이 증가함에 따라 적혈구의 속도는 증가하였고, 50V 이상의 인가 전압에서는 폭 10 μ m 좁은 유로의 전기장이 임계 전기장의 값보다 크기 때문에 적혈구의 분쇄율이 100%인 것을 실험적으로 확인(Fig. 9)하였다.

4. 결론

본 연구에서는 한 쌍의 DC 전극 사이에 형성된 유로의 폭을 조절하여, 폭이 좁은 오리피스에 전기장을 집중시켜 세포를 파괴하고 폭이 넓은 유로에 형성된 전기장을 이용하여 세포를 이송함으로써 별도의 펌프와 밸브 없이 낮은 전압(50V)으로 세포를 이송 및 분쇄를 수행하는 새로운 연속적 세포 분쇄기를 제안하고 그 성능을 실험적으로 확인하였다.

Table 2 Performance of cell lysis and electroosmotic flow

Operation Voltage [V]	Cell Velocity [μ m/s]	Number of RBCs(Red Blood Cells) [cells]	
		Inlet of orifice	Outlet of microchannel
0 V	40 \pm 3	100	100
30 V	20 \pm 7	100	90 \pm 5
50 V	30 \pm 9	100	0
80 V	60 \pm 20	100	0

후기

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

참고문헌

- (1) Elizabeth, Y. H., Mather, L., Bell, J. L., 2002, "MEMS-Based Sample Preparation for Molecular Diagnostics," *Anal Bioanal Chem*, Vol. 371, pp. 49~65.
- (2) Graham, J. M. and Rickwood, D., 1997, *Subcellular Fractionation: a Practical Approach*, Oxford University Press, New York, Vol. 175.
- (3) Chandler, D. P., Brown, J., Bruckner-lea, C. J., Olson, L., Posakony, G. J., Stults, J. R., Valentine, N. B. and Bond, L. J., 2001, "Continuous Spore Disruption using Radially Focused, High-frequency Ultrasound," *Analytical Chemistry*, Vol. 73, pp. 3784~3789.
- (4) Schilling, E. A., Kamholz, A. E. and Yager, P., 2002, "Cell Lysis and Protein Extraction in a Microfluidic Device with Detection by a Fluorogenic Enzyme Assay," *Analytical Chemistry*, Vol. 74, pp. 1798~1804.
- (5) Huang, Y., Ewalt, K. L., Tirado, M., Haigis, R., Forster, A., Ackley, D., Heller, M. J., O'Connell, J. P., and Krihak, M., 2001, "Electric Manipulation of Bioparticles and Macromolecules on Microfabricated Electrodes," *Analytical Chemistry*, Vol. 73, pp. 1549~1559.
- (6) Huang, Y. and Rubinsky, B., 2001, "Microfabricated Electroporation Chip for Single Cell Membrane Permeabilization," *Sensors and Actuators A*, Vol. 89, pp. 242~249.
- (7) Lin, Y.-C., J C.-M., Huang, M.-Y., Wu, C.-Y., Lin, X.-Z., 2001, "Electroporation Microchips for Continuous Gene Transfection," *Sensors and Actuators B*, Vol. 79, pp. 137~143.
- (8) Lee, S.-W. and Tai, Y.-C., 1999, "A Micro Cell Lysis Device," *Sensors and Actuators A*, Vol. 73, pp. 74~79.
- (9) Lu H., Schmidt M.A. and Jensen K.F., 2005, "A Micro Fluidic Electroporation Device for Cell Lysis," *Lab on a Chip*, 5, pp. 23~29.
- (10) Li P.C.H. and Harrison D.J., 1997, "Transport, Manipulation, and Reaction of Biological Cells On-Chip using Electrokinetic Effects," *Analytical Chemistry*, Vol. 69, pp. 1564~1568.