

서로 다른 밀도의 유체 내 바이오 물질이 받는 중력과 부력 차를 이용한 연속적 세포 분리기

오애경* · 이동우* · 조영호*†

* 한국과학기술원 세포벤치연구센터 바이오및뇌공학과

A Continuous Cell Separator Based on Gravity and Buoyant Forces in Fluids of Dissimilar Density

Ae Gyoung Oh*, Dong Woo Lee* and Young-Ho Cho*†

* KAIST, Cell Bench Research Center, Dept. of Bio and Brain Engineering

(Received July 27, 2011; Revised January 4, 2012; Accepted January 19, 2012)

Key Words : Density(밀도), Gravity Force(중력), Buoyant Force(부력), Dissimilar Density Fluids(다른 밀도유체)

초록: 본 논문에서는 서로 다른 밀도의 유체 내 바이오 물질이 받는 중력과 부력 차를 이용한 연속적 세포 분리를 제안하였다. 종래의 크기별 세포분리는 서로 다른 크기의 동일한 밀도를 가지는 세포를 분리하는데 한계가 있다. 반면, 본 논문에서 제안하는 세포 분리는 미소유로 상하부에 밀도가 다른 다층 유체층 내에서 세포가 받는 중력과 부력 차이로 크기는 다르지만 동일한 밀도를 가지는 세포를 효율적으로 분리할 수 있다. 밀도가 다른 유체층(PBS, 밀도=1.0g/ml, Ficoll, 밀도=1.1g/ml) 내에서 전혈로부터 백혈구(직경=6-10 μ m, 밀도=1.06~1.1g/ml), 적혈구(직경=4-6 μ m, 밀도=1.09~1.2g/ml)를 밀도에 따라 분리한 효율이 각각 90.9 \pm 9.1%와 86.4 \pm 1.99%로 측정되었다 따라서, 본 세포 분리는 크기 편차가 있는 동일 밀도의 세포를 크기에 둔감하고 밀도에만 민감한 분리가 가능하다.

Abstract: We present a continuous cell separator that achieves density-dependent and size-independent cell separation based on the net force of gravity and buoyancy forces on the cells in dissimilar density fluids. Previous cell separators are, based on the size or dielectrophoretic property of the cells and, are suitable for size-dependent and density-independent cell separation. However, these properties can make it difficult to collect the same types of cells with the same density but with size variations. The present separator, however, is capable of collecting the same types of cells based on the cell density in the fluid. Regardless of cell size, the proposed chip isolates low density cells, (white blood cells, or WBCs) at the upper outlet while obtaining high-density cells (red blood cells, or RBCs) from the lower outlet based on density. Efficiency levels for separation of WBCs and RBCs were 90.9 \pm 9.1% and 86.4 \pm 1.99%, respectively. The present separator therefore has the potential for use in the pretreatment of whole blood.

1. 서론

최근 생화학, 의료 분야에서 세포나 미세입자와 같은 미소 생화학 입자의 분리가 요구되고 있다.⁽¹⁾ 미소입자의 분리에는 입자의 크기, 표면 특성, 자성, 유전영동 특성 등 다양한 물질의 특성을 이용하는 방법들이 연구되고 있다.⁽²⁻²³⁾ 특히, 혈구 세포는 일반적으로 중복되는 크기편차가 큰 (4-

10 μ m) 반면, 상대적으로 균일한 밀도편차 (1.06~1.2g/ml)를 가진다.^(24,25) 따라서 기존의 크기별 세포분리는 서로 다른 크기의 동일한 밀도를 가지는 세포를 분리하는 데 한계가 있다. 본 논문에서 제안하는 세포 분리는 미소유로 상하부에 밀도가 다른 다층 유체층을 형성하여, 유체 내에서 밀도에 따라 세포가 받는 중력과 부력 차를 이용해 세포를 분리하는 방법을 제안한다. 혈액세포 중 적혈구와 백혈구는 동일한 종류라도 각각 크기편차가 있으나 고유의 밀도에 따라 중력을 받게 되고, 중력이 부력보다 크면 가라앉는 반면, 중력이 부력보다 작으면 가라앉지 못하여 다층 유체층의

† Corresponding Author, nanosys@kaist.ac.kr
© 2012 The Korean Society of Mechanical Engineers

경계 면에 모이게 된다. 따라서, 본 세포 분리기는 세포의 크기와는 상관없이 적혈구와 백혈구를 밀도의 차로 분리할 수 있어, 크기 편차가 큰 유사 밀도의 혈구세포(적혈구, 백혈구)를 분리하는 데 보다 적합하다.

2. 구조 및 원리

Fig. 1 은 각각 본 논문에서 제안하는 밀도를 이용한 세포 분리기의 구조와 작동 원리를 나타낸다. 본 세포 분리기는 중앙 분리 채널 양단의 Inlet 과 Outlet 이 상하 별도의 채널 구조로 되어 있다. Fig. 1(a)와 1(b)에서 입자가 유체(ρ_f)에 있을 때, 그 세포는 중력(F_g)과 부력(F_b)을 받게 되고, 세포와 유체의 밀도(ρ_p, ρ_f)에 따라 세포가 받는 합력은 식 (1)으로 나타낼 수 있다.

$$H_f = F_g - F_b = (\rho_p - \rho_f) \times V \times g \quad (1)$$

위의 식에서, V 는 세포의 부피이고, g 는 중력 가속도이며, H_f 는 세포가 받는 합력이다.

세포가 받는 부력이 중력보다 크면 합력이 중력의 방향으로 작용하므로 세포가 가라앉지 않는다. 반면, 세포가 받는 부력이 중력보다 작으면 합력이 중력의 방향으로 작용하므로 세포가 가라앉게 된다. 따라서, 합력이 작용하는 방향은 세포와 유체의 밀도(ρ_p, ρ_f)의 차이에 의해서 결정된다. 이 때 세포의 침강속도는 식 (2)로 나타낼 수 있다.

$$v_v = \frac{gd^2(\rho_p - \rho_f)}{6\pi\mu} \quad (2)$$

위의 식에서, d 는 세포의 직경이고, μ 는 유체의 점성이다.

본 논문에서 낮은 밀도(ρ_{f1} , g/ml)의 유체 1 이 유량 q_1 ($\mu\text{l}/\text{min}$)으로 Upper Inlet(U_i)으로 유입되고, 높은 밀도(ρ_2 , g/ml)의 유체 2 가 유량 q_2 ($\mu\text{l}/\text{min}$)로 Lower Inlet(L_i)를 통해 유입되어 다중 유체층을 형성한다. 세포 1, 2 가 $\rho_{f1} < \rho_{p1} < \rho_{f2} < \rho_{p2}$ 의 조건으로 유체 1 에 포함되어 U_i 로 유입된다. 세포 1 의 밀도(ρ_{p1})는 L_i 의 유체의 밀도(ρ_{f2})보다 낮기 때문에 가라앉지 못하는 반면, 세포 2 의 밀도(ρ_{p2}) L_i 의 유체의 밀도(ρ_{f2})보다 높기 때문에 가라앉는 이동 경로를 가지게 된다. 따라서, Fig. 1c 처럼 가라앉지 않은 세포 1 은 U_o 으로, 가라앉는 세포 2 는 L_o 으로 각각 분리되어 빠져나간다. 이 때, 유체 내에서 세포의 침강거리, h_d , 는 다음과 같이 나타내어진다.

$$h_d = v_v \times \frac{L}{v_h} = \frac{ALgd^2(\rho_p - \rho_f)}{6\pi\mu(q_1 + q_2)} \quad (3)$$

위의 식에서 A 는 미소채널의 단면적이고, q 는 위아래 채널에서의 유량이며, L 은 분리채널의 길이를 의미한다.

또한, 가라앉는 이동경로를 가지는 세포 2 를 U_o 으로 분리하기 위해서는 침강거리, h_d , 는 $(H/2+d)$ 보다 커야 한다. 여기서 H 는 채널의 높이를 나타낸다. 따라서, $h_d > (H/2+d)$ 와 식 (3)를 이용해 총유량, q_{total} , 을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$q_{total} = q_1 + q_2 < \frac{ALgd^2(\rho_p - \rho_f)}{3\pi\mu(H + 2d)} \quad (4)$$

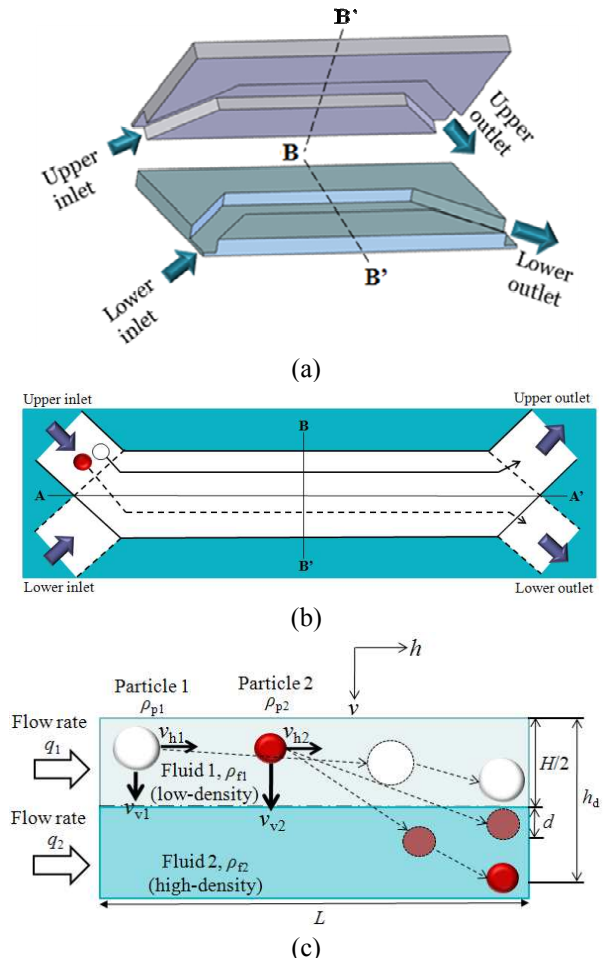


Fig. 1 Working principle of the proposed particle separator: (a) Schematic view of the particle separator before assembly; (b) top view of the separation channel showing the trajectories of the separated particles; (c) cross-section view of A-A' along the separation channel showing the velocity particles and trajectories of the separated particles

위 식을 이용하여 희석한 전혈에서 동중세포라도 각각 크기 편차와 밀도편차가 있는 혈구세포 (백혈구: 직경, $d=6-10\mu\text{m}$, 밀도, $\rho_{p1}=1.06-1.1\text{g/ml}$, 적혈구: 직경, $d=4-6\mu\text{m}$, 밀도, $\rho_{p2}=1.09-1.2\text{g/ml}$)를 분리할 수 있는 유량범위를 최대 $1\mu\text{l/min}$ 으로 도출하였다.

3. 제작공정

제안된 다세포 밀도 기반 연속적 세포 분리칩은 Fig. 2(a)와 같이, 두 개의 PDMS 층을 상하로 접합하여 제작되었다. 먼저 $100\mu\text{m}$ 두께의 SU-8 PR 로 제작된 몰드를 이용하여 세포 분리 채널을 제작하였다. $100\mu\text{m}$ 두께의 SU-8 채널은 Silicon 웨이퍼 위에 Spinning 하여 제작하였다. 이후 제작된 두 개의 PDMS 유체층을 O_2 플라즈마로 처리한 후 상하로 접합하여 Fig. 2(b)와 같이 소자를 제작하였다.

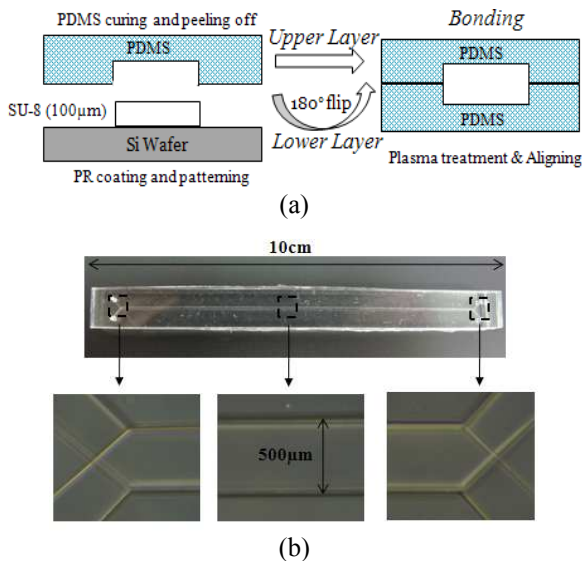


Fig. 2 Fabrication of the separator: (a) Fabrication process illustrating the cross-section of B-B' in Fig. 1b; and (b) a fabricated chip with an enlarged view of the separation channel

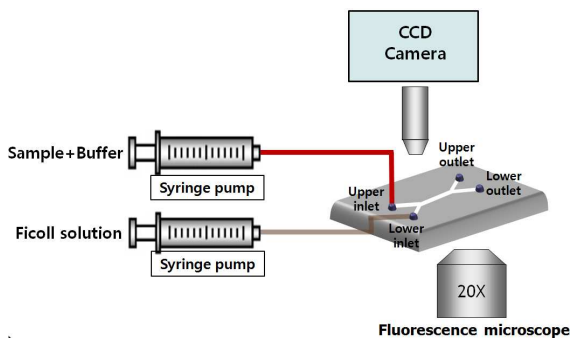


Fig.3 Experimental apparatus and conditions for the cell density separator

4. 실험결과 및 토의

Fig. 3 은 제작된 소자를 이용하여 세포를 분리하여 추출하는 성능검증을 위한 실험장치의 구성도이다.

제작된 소자의 성능을 시험하기 위해 크기가 같고 밀도 편차가 있는 polystyrene(PS) bead(직경, $d=6\mu\text{m}$, 밀도, $\rho_{p1}=1.05\text{g/ml}$, $\rho_{p2}=1.5\text{g/ml}$)의 분리와 백혈구(직경, $d=6-10\mu\text{m}$, 밀도, $\rho_{p1}=1.06-1.1\text{g/ml}$) 적혈구(직경, $d=4-6\mu\text{m}$, 밀도, $\rho_{p2}=1.09-1.2\text{g/ml}$)가 포함된 전혈을 사용한 분리실험을 수행하였다. 그리고 서로 다른 두 유체로서 PBS(Phosphate Buffered Solution, $\rho_f=1.0\text{g/ml}$) 와 Ficoll($\rho_f=1.1\text{g/ml}$)을 사용하여 각각 U_i 과 L_i 을 통해 $q_{\text{total}}=1\mu\text{l/min}$ ($q_1=q_2=0.5\mu\text{l/min}$)의 시료유량으로 유입하였다.

Fig. 4(a)는 크기가 같고, $6\mu\text{m}$, 밀도 편차, 1.05g/ml , 1.5g/ml , 가 있는 PS bead 의 연속적 분리를 보여주는 사진이며, Fig. 4(b)는 두 종류의 PS bead 들의 분리효율을 도표로 나타낸 것이다.

본 실험에서, $6\mu\text{m}$, 1.05g/ml 의 bead 는 유체 2 의 밀도보다 낮기 때문에 ($\rho_{p1} < \rho_{f2}$) 유체 내에서 부력이 중력보다 크게 작용하여 위 채널을 따라

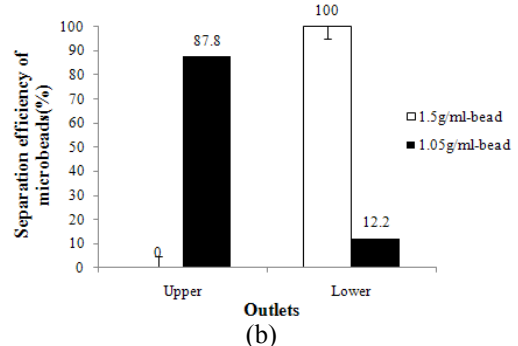
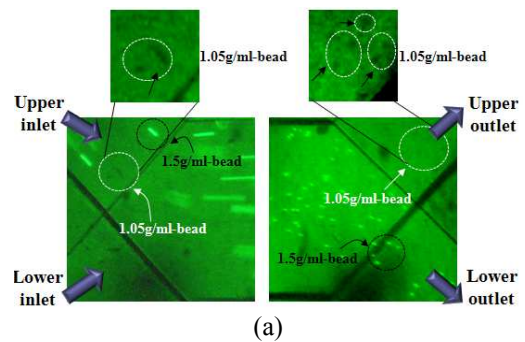


Fig. 4 Experimental results of separation tests with PS beads: (a) photographs showing the separation of beads having an identical diameter of $6\mu\text{m}$ with different densities of 1.05g/ml and 1.5g/ml at a total flow rate of $q_{\text{total}}=q_1+q_2=1\mu\text{l/min}$, where $q_1=q_2=0.5\mu\text{l/min}$: near inlet (left): near outlet (right); (b) measured separation efficiency of ($n_{1.05\text{g/ml-bead}}=165$, $n_{1.5\text{g/ml-bead}}=47$)

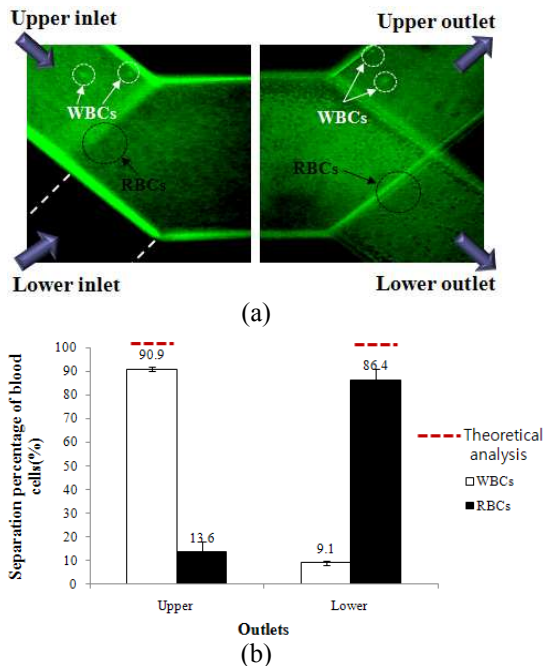


Fig. 5 Experimental results of a separation test with blood cells. (a) Photographs showing the separation of RBCs and WBCs at a total flow rate of $q_{total}=q_1+q_2=1\mu\text{l}/\text{min}$, where $q_1=q_2=0.5\mu\text{l}/\text{min}$: near inlet (left), near outlet (right); (b) separation efficiency of RBCs and WBCs ($n_{RBC}=1519$, $n_{WBC}=20$)

87.8±4.85%의 효율을 보이며 U_o 으로 나간다. 이에 반해, 6 μm , 1.5g/ml의 bead는 유체 2의 밀도보다 더 크기 때문에 ($\rho_{p2} > \rho_{f2}$) 유체 내에서 중력이 더 크게 작용하여 아래 채널을 따라 이동하여 100%의 효율로 L_o 으로 나간다.

Fig. 5(a)는 실시간으로 밀도편차와 크기편차가 있는 적혈구와 백혈구의 연속적 분리를 보여주는 사진이며, Fig. 5(b)는 실험에서 분리된 두 종류의 세포들의 효율을 도표로 나타낸 것이다.

본 실험에서, 백혈구는 유체 2의 밀도보다 낮기 때문에 ($\rho_{p1} < \rho_{f2}$) 유체 내에서 백혈구가 받는 부력이 중력보다 크게 작용하여 가라앉지 않고, U_o 으로 나간다. 반면, 적혈구는 유체 2의 밀도와 비슷하거나 더 크기 때문에 ($\rho_{p2} > \rho_{f2}$) 유체 내에서 적혈구가 받는 중력이 부력보다 크게 작용하여 가라앉아 L_o 으로 나간다. 이를 통해 90.9±9.1%의 백혈구가 U_o 을 통해 추출되고, 86.4±1.99%의 적혈구가 L_o 으로 추출되는 것으로 적혈구와 백혈구의 분리 및 추출이 확인되었다.

5. 결론

본 논문에서는 세포의 물리적 특성인 밀도를 이용하여 서로 다른 밀도를 가지는 유체층 내에서

바이오 물질이 받는 부력과 중력 차를 이용하여 세포 밀도에 따라 세포를 분리하는 칩을 제안하였다. 혈구세포는 일반적으로 중복되는 크기편차가 큰 (4-10 μm) 반면, 상대적으로 균일한 밀도편차 (1.06~1.2g/ml)를 가지기 때문에, 기존의 크기별 세포분리는 크기 편차가 크고 동일한 밀도를 가지는 혈구세포를 분리하는데 한계가 있다.

제작된 세포분리기로 혈액내의 적혈구와 백혈구를 성공적으로 분리함으로써 종래 입자 크기만으로 분리하는 입자 분리기보다 동일한 세포 종류라도 각각 크기편차와 밀도편차가 있는 적혈구와 백혈구를 더욱 효과적으로 분리할 수 있음을 입증하였다.

제안된 세포 분리기 성능시험 결과, 총유량 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 조건에서 크기와 상관없이 유체와 입자 또는 세포의 밀도 차이에 따라 동일크기(6 μm)의 밀도편차(1.05g/ml, 1.5g/ml)를 가진 PS bead의 분리와 적혈구와 백혈구의 분리가 성공적으로 이루어졌다. 먼저, 분리된 6 μm , 1.05g/ml bead와 6 μm , 1.5g/ml bead는 각각 87.8±4.85%와 100%의 효율로 분리되었으며, 적혈구와 백혈구의 분리 효율은 각각 90.9±9.1%와 86.4±1.99%로 측정되었다. 따라서 본 논문에서 제안된 방법은 크기에는 둔감하고, 유체와 세포의 밀도에만 민감하게 적혈구와 백혈구를 분리하고, 질병 진단을 위한 혈액 전처리에 응용될 수 있다.

후기

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 바이오제약사업본부-신기술융합형 성장동력사업의 지원을 받아 수행된 연구임 (과제번호 2011K000864)

참고문헌

- (1) Murate, M., Okamoto, Y., Park, Y.-S., Kaji, N., Tokeshi, M. and Baba, Y., 2009, "Cell Separation by the Combination of Microfluidics and Optical Trapping Force on Microchip," *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 394, No. 1, pp. 277~283.
- (2) David, W., Inglis, R., Riehn, R., Austin, R. H. and Sturm, J. C., 2004, "Microfluidic High Gradient Magnetic Cell Separation," *Appl. Phys.*, Vol. 85, No. 8, pp. 5093~5095.
- (3) Jung, J. and Han, K. H., 2008, "Lateral-Driven Continuous Magnetophoretic Separation of Blood Cells," *Appl. Phys. Lett.*, Vol. 93, No. 22, pp. 223~902.

- (4) Iliescu, C., Xu, G. L., Barbarini, E., Avram, M. and Avram, A., 2009, "Microfluidic Device for Continuous Magnetophoretic Separation of White Blood Cells," *Microsyst. Technol.*, Vol. 15, No. 8, pp. 1157~1162.
- (5) Carlo, D. D. and Lee, L. P., 2006, "Dynamic Single Cell Analysis for Quantitative Biology," *Anal. Chem.*, Vol. 78, No. 23, pp. 7918~7925.
- (6) Liu, C., Stakenborg, T., Peeters, S. and Lagae, L., 2009, "Cell Manipulation with Magnetic Particles Toward Microfluidic Cytometry," *Appl. Phys.*, Vol. 105, No. 10, pp. 102014.
- (7) Hughes, M. P., 2002, "Strategies of Dielectrophoretic Separation in Laboratory-on-a-Chip Systems," *Electrophoresis*, Vol. 23, No. 16, pp. 2569~2582.
- (8) Do, I. and Cho, Y.-H., 2005, "A Continuous Cell Separation Chip Using Hydrodynamic Dielectrophoresis (DEP) Process," *Sensor. Actuat. A-Phys.*, Vol. 121, No. 1, pp. 59~65.
- (9) Li, Y., Dalton, C., Crabtree, H. J., Nilsson, G. and Kaler, K. V. I. S., 2007, "Continuous Dielectrophoretic Cell Separation Microfluidic Device," *Lab Chip*, Vol. 7, No. 2, pp. 239~248.
- (10) Han, K.-H. and Frazier, A. B., 2008, "Lateral-Driven Continuous Dielectrophoretic Microseparators for Blood Cells," *Lab Chip*, Vol. 8, No. 7, pp. 1079~1086.
- (11) Choi, S. and Park, J. K., 2005, "Microfluidic System for Dielectrophoretic Separation Based on a Trapezoidal Electrode Array," *Lab Chip*, Vol. 5, No. 10, pp. 1161~1167.
- (12) Chen, X., Cui, D. F., Liu, C. C. and Li, H., 2008, "Microfluidic Chip for Blood Cell Separation and Collection Based on Crossflow Filtration," *Sensor. Actuat. B-Chem.*, Vol. 130, No. 1, pp. 216~221.
- (13) Huang, L. R., Cox, E. C., Austin, R. H. and Sturm, J. C., 2004, "Continuous Particle Separation Through Deterministic Lateral Displacement," *Science*, Vol. 304, No. 5673, pp. 987~990.
- (14) Mohamed, H., McCurdy, L. D., Szarowski, D. H., Duva, S., Tuner, J. N. and Caggana, M., 2004, "Tuner and M. Caggana, Development of a Rare Cell Fractionation Device: Application for Cancer Detection," *IEEE. T. Nanobiosci.*, Vol. 3, No. 4, pp. 251~256.
- (15) Yamada, M., Nakashima, M. and Seki, M., 2004, "Pinched Flow Fractionation: Continuous Size Separation of Particles Utilizing a Laminar Flow Profile in a Pinched Microchannel," *Anal. Chem.*, Vol. 76, No. 18, pp. 5465~5471.
- (16) Zhang, X. L., Cooper, J. M., Monaghan, P. B. and Haswell, S. J., 2006, "Continuous Flow Separation of Particles Within Asymmetric Microfluidic Device," *Lab Chip*, Vol. 6, No. 4, pp. 561~566.
- (17) Yamada, M. and Seki, M., 2005, "Hydrodynamic Filtration for on-Chip Particle Concentration and Classification Utilizing Microfluidics," *Lab Chip*, Vol. 5, No. 11, pp. 1233~1239.
- (18) Yamada, M. and Seki, M., 2006, "Microfluidic Particle Sorter Employing Flow Splitting and Recombining," *Anal. Chem.*, Vol. 78, No. 4, pp. 1357~1362.
- (19) Yang, S., Undar, A. and Zahn, J. D., 2006, "A Microfluidic Device for Continuous, Real Time Blood Plasma Separation," *Lab Chip*, Vol. 6, No. 7, pp. 871~880.
- (20) Shevkoplyas, S. S., Yoshida, T., Munn, L. L. and Bitensky, M. W., 2005, "Biomimetic Autoseparation of Leukocytes from Whole Blood in a Microfluidic Device," *Anal. Chem.*, Vol. 77, No. 3, pp. 933~937.
- (21) Kang, J. H., Kim, B. and Park, J. K., 2009, "Microfluidic Pycnometer for in Situ Analysis of Fluids in Microchannels," *Anal. Chem.*, Vol. 81, No. 7, pp. 2569~2574.
- (22) Zhang, S., R., Yung, Tai, W.-C. and Kasdan, H., 2005, "Deterministic Lateral Displacement MEMS Device for Continuous Blood Cell Separation," *Proceedings of the 18th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, pp. 851~854.
- (23) Chang, S. and Cho, Y.-H., 2008, "A Continuous Size-Dependent Particle Separator Using a Negative Dielectrophoretic Virtual Pillar Array," *Lab Chip*, Vol. 8, No. 11, pp. 1930~1936.
- (24) Boym, A., 1983, "Isolation of Human Blood Monocytes with Nycodenz," *J. Immunol.*, Vol. 17, No. 5, pp. 429~436.
- (25) Sorette, M. P., Shiffer, K. and Clark, M. R., 1992, "Improved Isolation of Normal Human Reticulocytes via Exploitation of Chloride-Dependent Potassium Transport," *Blood*, Vol. 80, No. 1, pp. 249~254.