JKIICE Journal of the Korea Institute of Information and Communication Engineering

한국정보통신학회논문지 Vol. 23, No. 3: 261~266, Mar. 2019

형광 발현 암세포 탐지를 위한 맞춤형 검출시스템 개발

조경래[1] · 서정혁[1] · 최세운[2*]

Design of a customizable fluorescence detection system for fluorescently labeled tumor cells

Kyoungrae Cho[1] · Jeong-hyeok Seo[1] · Se-woon Choe[2*]

[1]Graduate Student, Department of Medical IT Convergence Engineering, Kumoh National Institute of Technology, Gumi 39253, Korea

[2*]Assistant Professor, Department of Medical IT Convergence Engineering, Kumoh National Institute of Technology, Gumi 39253, Korea

요 약

유동 세포 분석법은 세포나 입자에 대하여 정밀하고 다양한 광학적 특성을 제공해주는 전기적 탐지 기술이다. 형광 처리된 세포나 미립자에 특정한 파장의 빛을 가함으로써 발생 되는 광 산란과 형광 방출을 통해 세포의 크기와 입상도를 포함한 다차원적인 정보를 제공해주는 유동 세포 분석법은 생체 의학 분야 또는 생물 물리학 분야에서 중요한 역할을 수행한다. 그러나 유동 세포 분석법은 고가이며 장비 설치에 있어 적절한 공간이 필요하고 형광 염료 선택에 제한적이라는 단점을 가지고 있다. 따라서 본 논문에서는, 상용화된 유동 세포 분석에 사용되는 고가의 레이저와 운영시스템 대신 발광 다이오드, 마이크로 컨트롤러와 광 검출기를 사용한 저가의 형광세포 측정 시스템을 개발하여 사용자가 원하는 형광 염료에 대한 자유도를 높였다. 또한, 3D 프린터를 사용하여 모듈별 소형화 및 경량화를 통한 사용자 맞춤형 제작이 가능하도록 하였다. 그 결과, 형광처리 한 세포의 양에 변화를 주어 발광도를 측정하였을 때, 높은 선형성이 보임을 확인할 수 있었다.

ABSTRACT

Flow cytometry is an electrical detection system that provides precise and diverse optical properties to cells and micro particles. Flow cytometry, which provides multidimensional information including cell size and granularity through light scattering and fluorescence emission generated by the induction of light of a specific wavelength to the fluorescently treated cells or micro particles, plays an important role in biomedical and biophysical fields. However, it has some drawbacks such as high cost, size of the instrument and limitation in selecting fluorescent dyes. Therefore, in this paper, a low cost compact fluorescent detection system is developed using light-emitting diode and microcontroller. The proposed fluorescence detection system has a replaceable the light source/fluorescence filter/photodetector and constructed by 3D printer, so that the user can design a customized system according to the selected fluorescent dyes. The fluorescence intensity was measured by varying the number of fluorescently labeled cells, and the measured intensities showed a high linearity within the tested concentration ranges.

키워드 : 형광 탐지, 발광다이오드, 마이크로컨트롤러, 유동 세포 분석법, 3D 프린터

Keywords : Fluorescence detection, Light-emitting diode, microcontroller, flow cytometry, 3D printer

Received 3 December 2018, **Revised** 24 December 2018, **Accepted** 28 December 2018

*** Corresponding Author** Se-woon Choe (E-mail:sewoon@kumoh.ac.kr, Tel:+82-54-478-7781)
Assistant Professor, Department of Medical IT Convergence Engineering, Kumoh National Institute of Technology, Gumi 39253, Korea

Open Access http://doi.org/10.6109/jkiice.2019.23.3.261 print ISSN: 2234-4772 online ISSN: 2288-4165

ⓒThis is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/li-censes/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright Ⓒ The Korea Institute of Information and Communication Engineering.

Ⅰ. 서 론

유동 세포 분석법 (Flow cytometry; FCM)은 흐르는 유체 안의 형광 처리한 세포나 미생물, 핵 및 염색체와 같은 단일 입자에 특정한 파장의 빛을 인가하였을 때 발현하는 특정 파장의 발광도를 측정하여 세포 또는 미세 입자의 개수를 세거나 분류가 가능한 전기적 탐지 기술이다 [1]. FCM을 이용하면 형광 처리된 세포나 미세입자의 광 산란과 형광 방출의 특징을 측정하여 크기 및 입상도를 포함한 다차원적 정밀분석이 가능하며, 지난 50년간의 기술발전을 통해 최대 14가지 이상의 광학적 분석데이터가 동시 측정이 가능하게 되었다 [2]. 이렇게 측정된 데이터는 생체 의학, 생물 물리학 등 여러 분야에서 중요한 정보로 사용되어 진다 [3]. 이러한 FCM은 크게 두 가지 형태로 구분할 수 있는데, 그 첫 번째는 일반적으로 흔히 사용되는 비 분류형 방식으로 세포나 입자에서 방출되는 형광에 기초하여 다변수 분석만 가능하다. 두 번째 방식은 분류형으로, 다변수 분석뿐만이 아니라 이를 통해 다수의 세포에서 특정 세포를 분류/수집할 수 있는 특징을 가지고 있다 [4].

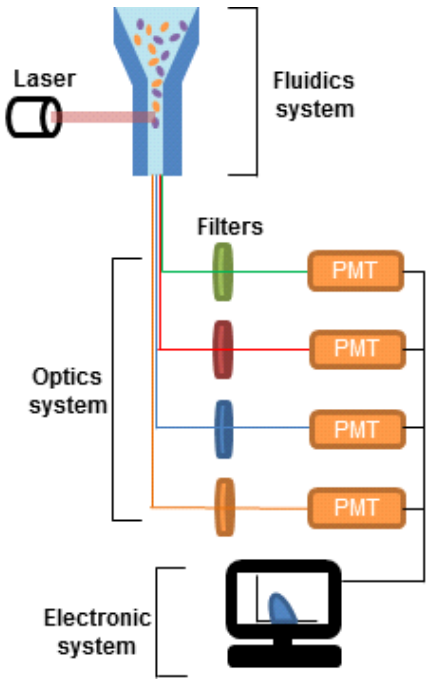

Fig. 1 Schematic design of a general FCM

그 중, 일반적으로 비 분류형 유동 세포 분석법은 그림 1과 같이 준비된 샘플을 미세 관을 통해 천천히 흘려보내어 광원을 통과하게 하는 유동 모듈과 형광의 효율적인 집적을 위한 광학 모듈, 광 검출기에서 받아드린 신호를 분석하여 시각적으로 표현하는 전기적 분석 모듈로 구성되어있다 [5]. 광원을 통과할 때 형광 처리된 세포에서는 그림 2와 같이 빛이 산란 되는데, 이 산란 되는 빛은 두 가지 종류가 있다. 전방에 산란 되는 빛을 Forward scatter (FSC)라 하며 수직으로 산란 되는 빛을 Side scatter (SSC)라 한다. FSC의 경우, 세포의 표면적의 크기에 비례하고 SSC의 경우, 세포 내의 골지, 핵, 중심체 등에 의해 수직 방향으로 반사되는 빛으로서 세포 내부의 미소체 또는 입상도에 비례하게 된다 [6].

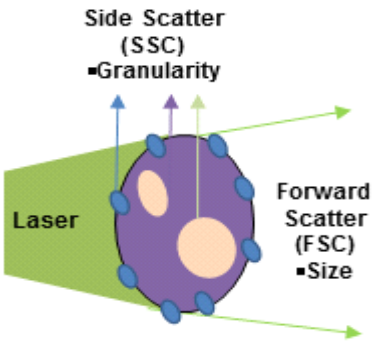

Fig. 2 Types of light scattering from a single cell.

이러한 광학적 특성을 이용하여 세포의 크기, 밀도, 입상도를 포함한 다양한 변수를 측정할 수 있는 FCM은 세포 그 자체에 큰 손실을 주지 않으며 정밀하고 다차원적인 분석이 가능하게 한다. 하지만 산란하는 빛을 획득하기 위해서 유동 모듈과 광학 모듈, 전기적 분석 모듈을 포함한 고가의 시스템이 필요하며, 이를 설치하기 위한 적절한 공간이 필수적으로 요구된다 [7]. 광학 모듈의 경우, 각각의 형광 염료에 따라 특정 파장의 빛만을 받아들이기 위한 필터들이 필요하므로 사용자가 형광 염료를 선택하는 것에 제한적이다 [8]. 또한, FCM은 다차원적인 광학적 데이터를 제공하므로, 형광처리를 한 세포나 입자의 수를 측정하는 등의 단순한 데이터만 얻고자 하는 사용자에게 있어서 불필요한 데이터를 제공할 수 있으며, 이는 측정시간의 지연 및 사용금액의 증가 등을 요구하게 된다. 따라서, 본 연구에서는 상용화된 발광다이오드(light-emitting diode; LED)와 마이크

로컨트롤러를 활용하여 저가이며 소형인 형광측정시스템을 설계하였다. 제안된 시스템은 3D 프린터를 이용하여 출력할 수 있으므로 사용 목적에 따라 다양하게 제작할 수 있다는 장점이 있으며, 또한 형광 필터와 광원, 광검출기의 교체가 가능하게 제작되어 다양한 형광 염료에 대한 활용이 가능하다. 그리고, 광원의 입사 방향과 평행하거나 수직인 면에 필터 슬롯을 두어 빛의 경로를 자유롭게 유도할 수 있게 하였다. 시스템의 성능을 평가하기 위하여 calcein-AM으로 형광 처리된 자궁경부암 세포 (Human cervical cancer cells; HeLa cells)의 FSC를 각각 다른 세포 수와 조건으로 측정하였고, 그 결과, 제안된 시스템을 통하여 획득된 FSC는 세포 수와 비례한 선형성 ($r^2 > 0.9$)을 보였다.

Ⅱ. 연구 방법

2.1. 세포 배양

HeLa 세포 (한국 세포주 은행, 대한민국)는 37°C와 5 %의 이산화탄소를 포함한 환경의 배양기에서 증식시켰다. HeLa 세포는 고농도의 글루코스가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 과 10%의 Fetal Bovine Serum (FBS, pH 7.4), 1%의 Penicillin Streptomycin로 구성된 배지 용액에서 3 - 4일 동안 증식 후, Phosphate - buffered saline (PBS, pH 7.4)을 이용하여 3차례 세척 작업으로 세포 부유물과 단백질을 제거해 준 다음 trypsin-EDTA를 이용하여 배지용액에서 분리 하였다. 분리된 HeLa 세포는 37°C의 인큐베이터에서 1uM/ml 농도의 calcein AM (AnaSpec, USA) 용액에 30 분간 담지하여, 세포 내부에서 형광이 발하게 하였다. 형광을 측정하기 전, HeLa 세포는 잔존하는 단백질과 Calcein AM을 제거하기 위해 PBS에 3차례 세척 작업을 거치게 거쳤으며 각각의 다른 세포 수($1,2,3,4,5,6 \times 10^6$cells)로 분리된 후, 2 mL의 PBS와 함께 투명한 유리 큐벳에 담겨진다. 이렇게 만들어진 여섯 가지 실험 군 샘플은 실온의 암실에서 동일한 조건으로 형광이 측정되었다. 각각의 세포 수마다 6회씩 형광이 측정되었으며, 동일한 조건의 형광처리를 하지 않은 대조 군 샘플과 각각 그 값을 비교하였다.

2.2. 형광 반응 실험

Calcein AM은 1uM/ml의 농도로 HeLa 세포와 30분간 담지 하면 형광물질이 세포막을 통해 세포의 내부로 들어가게 되어 녹색 형광을 나타내는 calcein으로 변환된다. calcein으로 변환된 calcein AM은 세포막을 통과하지 못하기 때문에 살아있는 HeLa 세포에 축적되어 그림 3과 같이 490 nm 파장의 빛에서 형광 반응을 보이는 것을 확인하였다.

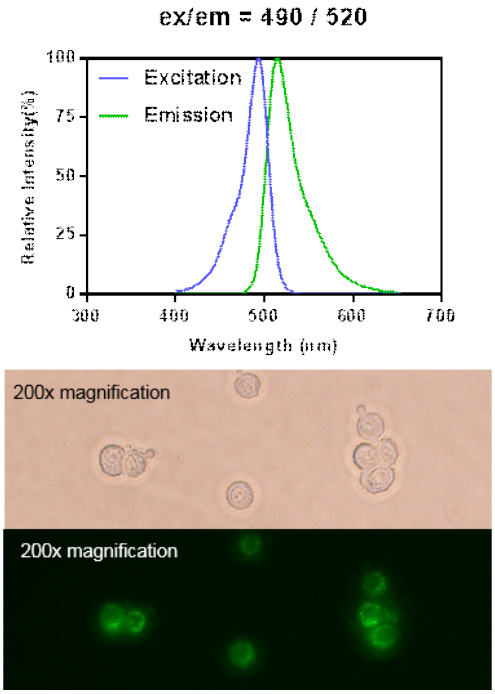

Fig. 3 Calcein AM spectra (top) and fluorescence image of calcein AM-stained HeLa cells (bottom)

2.3. 형광 탐지를 위한 시스템

그림 4와 같이, 형광측정 시스템은 LED의 일정한 발광을 유도하기 위해 안정된 전류를 발생시키는 정전류 모듈과 준비된 샘플을 고정시키고 일정 거리의 투명한 유리 큐벳에 특정파장의 조사가 가능한 발광부, 특정 파장의 측정을 위한 필터교체가 가능한 필터슬롯과 FSC와 SSC의 측정이 가능한 포토다이오드가 설치된 광검출부를 포함한 메인 모듈, 측정된 광량을 디지털로 변환하여 시각적으로 나타내는 디스플레이 모듈로 구성되어 있다. 특히, 광검출부를 포함한 메인모듈은 형광반응으로 반사되는 빛을 아날로그 형태에서 디지털로 변환

하고, 210 의 분해능으로 디스플레이 하도록 설계되었다. 이 모듈을 구성하기 위해 상용 마이크로 컨트롤러(PIC16F877A, Microship, AZ, USA)를 사용하였으며 광검출 센서는 광다이오드(FDS100, 350-110nm, Thorlabs)을 사용하였다. PCB는 마이크로컨트롤러 및 센서의 잡음을 최소화하고 감도 제어를 위한 저항 교체를 위해 디스플레이모듈과 일체형으로 제작되었다.

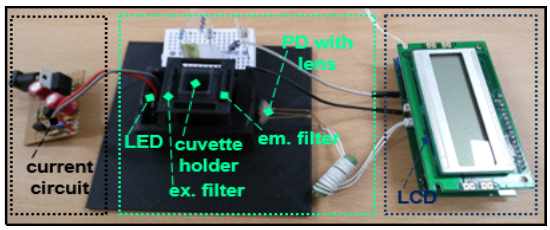

Fig. 4 Proposed fluorescence detection system. Constant current module (left), main module (middle) and display module (right)

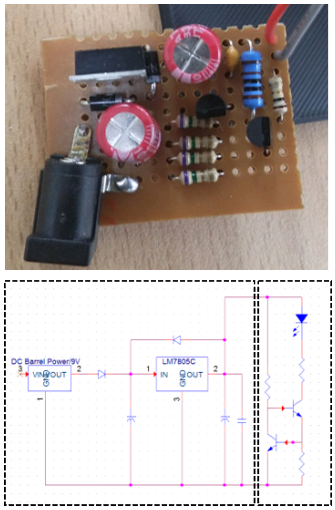

Fig. 5 Proposed constant current module (top) and its design (bottom)

470 nm의 LED (Photron, 3W, USA)에 안정된 전류를 공급하기 위한 정전류 모듈은 그림 5과 같이 두 가지 회로로 구성되어있다. 9V의 교환 방식 전원 공급 장치(Switching mode power supply; SMPS)에서 배럴 잭을 통해 전원을 공급받는 모듈은 전압 레귤레이터를 통해 9V의 전원을 5V로 변환하며 안정된 전압을 출력하는 파워 서플라이 회로와 LED에 360 mA의 정 전류를 흘려주는 정전류 회로로 구성되어있으며, 이중의 잡음 제거로 LED는 1.4 W의 전력을 안정적으로 소비하게 된다. 전압 레귤레이터 발열로 인한 불안정한 출력을 제어하기 위해 모듈의 회로는 외부로 노출되어 있으며 형광을 측정하기 30분 전에 가동되어 예열된다. 그림 6과 같이 LED에서 출력되는 470 nm의 빛은 일차 광학 필터(excitation filter)를 통해 큐벳에 담겨진 HeLa세포를 조사하며, 이차 광학 필터(emission filter)를 통해 여과된 빛은 볼록 렌즈(N-BK7, Plano-Convex Lens, Thorlabs)를 통해 집광되어, 광다이오드를 통해 광전류로 변환된다.

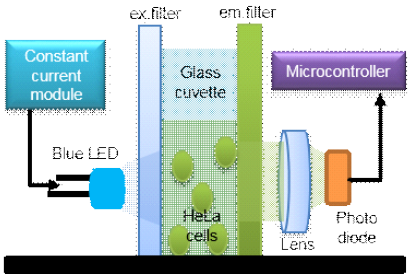

Fig. 6 Schematic design of the main module

Fig. 7 Optical filter booklet (top) and selected excitation with emission filters (bottom)

3D 프린터 (Cubicon DP-310F, Cubicon Inc., Korea)를 통해 메인 모듈의 구조물은 광다이오드와 렌즈의 장착이 쉽고 자유로운 교체가 가능하도록 제작되었으며, 검정색 ABS 플라스틱 필라멘트를 사용하여 불필요한 빛의 산란을 방지하였다. 뿐만 아니라, 유리 큐벳의 각 면의 평행한 위치에 광학필터의 슬롯을 두어 형광 염료에 따라 다른 형광 필터를 선택적으로 사용할 수 있으며 빛의 경로를 제어할 수 있도록 제작하였다.

Table. 1 Total cost of proposed system

Parts	Unit Price(₩)
Microcontroller	4,000
Character LCD display	3,000
Printed circuit board	8,000
Roscolux Filter Booklet	40,000
Photodiode	7,000
Constant current module	5,000
Half convex lens	12,000
LED	2,000
Total amount	**81,000**

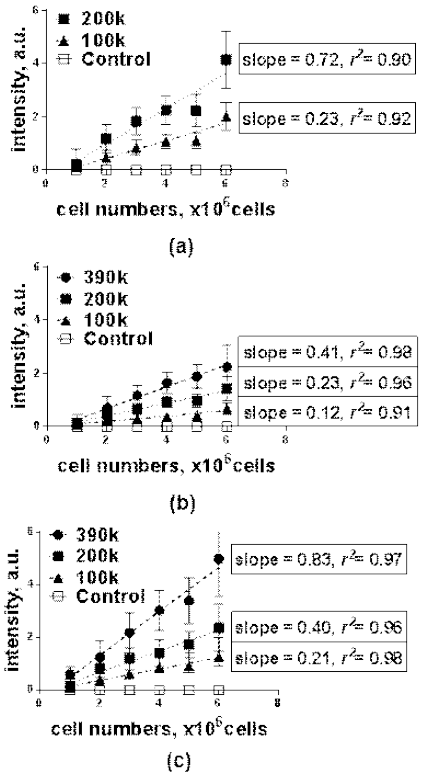

Fig. 8 The experimental results of the emitted light intensities of unstained (control) and stained HeLa cells with different photodiode sensitivities and various filter sets.
(a) No excitation filter with #389 emission filter,
(b) #74 excitation filter with #389 emission filter,
(c) #369 excitation filter with #389 emission filter

그림 7과 같이 일차 광학 필터로 Tahitian Blue (#369, 470 nm)와 Night Blue (#74, 480 nm)를 사용하였으며, 이차 광학 필터로는 Chroma Green (#389, 500 nm)를 사용하여 원하는 파장대의 빛을 선택적으로 획득할 수 있도록 하였다. 형광 필터는 고가의 광학필터 대신, 필터 책자 (filter booklets, Edmund Optics, USA)를 사용하여 필터의 선택이 용이하도록 하였다. 형광 처리된 HeLa 세포는 여섯 가지의 다른 세포 수 ($1, 2, 3, 4, 5, 6 \times 10^6$ cells) 로 준비하여 유리 큐벳에 위치시키고, 유리 큐벳의 내부에 자석 교반기가 회전하게 하여 세포가 샘플 내에서 일정한 속도로 이동하게 하였다. 이차 광학 필터를 통해 볼록 렌즈로 집광된 빛은 광전류로 변환되어 세 종류의 부하저항 (100, 200, 390 KΩ)을 통해 전압으로 출력되는데 이때 부하저항은 전압 증폭 비를 결정하여 광다이오드의 감도조절이 가능하다. 부하저항을 통해 출력되는 전압은 마이크로컨트롤러를 통해 디지털 신호로 변환되며 이를 액정 화면을 통해 표시한다. 제안된 시스템의 제작을 위한 비용은 시스템은 표 1에서 확인이 가능하다.

Ⅲ. 실험 및 결과 분석

HeLa 세포 (n = 6)는 형광처리를 한 실험군과 형광처리를 하지 않은 대조군으로 분류한 뒤 측정하였다. 실험은 동일한 이차 형광 필터(#389)에 일차 형광 필터 (#369 와 #74)와 부하 저항을 각각 교체하며 형광의 세기를 측정하였다. 형광을 측정하기 전, LED의 출력의 안정성을 위하여 30분 전 정전류 모듈을 예열하였으며, 암실에서 실온의 조건으로 실험을 진행하였다. 형광처리를 한 실험군과 형광처리를 하지 않은 대조군의 형광의 세기의 차이를 그림 8과 같이 그래프로 나타내었다. 형광의 차이는 세포 수와 비례하여 높은 선형성 ($r^2 > 0.9$)을 보였으며, 특히 높은 투과율을 가지고 있는 일차 형광 필터 (#389, 470 nm)와 높은 부하저항 (390 KΩ)이 연결된 조건에서 형광의 변화는 준비된 세포의 농도에 가장 민감한 변화를 보였다.

Ⅳ. 결 론

본 논문에서는 저가의 LED와 마이크로 컨트롤러를 활용하여 저렴한 소형 형광 탐지 시스템을 설계하였다. 제안된 시스템은 휴대 또는 이동이 가능하며, 광원과 형

광 필터, 광 검출기의 교체가 용이하도록 3D 프린터로 설계되었다. 제안된 시스템을 통해 형광처리를 한 HeLa 세포와 형광처리를 하지 않은 세포의 형광 강도를 측정한 결과, 전체적으로 세포 수와 비례한 높은 선형성 ($r^2 > 0.9$)을 확인할 수 있었다. 또한, 제안된 형광측정 시스템을 이용하여 형광을 측정하였을 때, 역으로 형광을 발현하는 세포 또는 미세입자의 농도측정 역시 가능하게 된다. 따라서, 제안된 본 장비는 고가이며 이동이 불가능 하며, 사용이 제한적인 기존의 FCM을 대체할 수 있는 장비로 활용이 가능할 것으로 판단되며, 다양한 형광 염료 및 인간 질환 세포의 검출을 위한 활용 가능성 증대와 검출 정확도의 향상을 위한 시스템의 최적화에 관련된 후속연구가 진행될 예정이다.

ACKNOWLEDGEMENT

This paper was supported by Kumoh National Institute of Technology (2018-104-124)

REFERENCES

[1] Y. Chen, A. A. Nawaz, Y. Zhao, P. H. Huang, J. P. McCoy, S. .J. Levine, L. Wang, and T. J. Huang, "Standing surface acoustic wave (SSAW)-based microfluidic cytometer," *Lab on a Chip*, vol. 14, no. 5, pp. 916-923, Mar. 2014.

[2] R. Lacroix, S. Robert, P. Poncelet, and F. Dignat-George, "Overcoming Limitations of Microparticle Measurement by Flow Cytometry," *Seminars Thrombosis Hemostasis*, vol. 36, no. 8, pp. 807-818, Nov. 2010.

[3] V. Pospichalova, J. Svoboda, Z. Dave, A. Kotrbova, K. Kaiser, D. Klemova, L. Ilkovics, A. Hampl, I. Crha, E, Jandakova, L. Minar, V. Weinberger, and V. Bryja, "Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer," *The Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 4, no. 1, 25530, Mar. 2015.

[4] S. Choe, K. Park, C. Park, J. Ryu, and H. Choi, "Combinational light emitting diode-high frequency focused ultrasound treatment for HeLa cell," *Computer Assisted Surgery*, vol. 22, pp. 79-85, Dec. 2017.

[5] M. J. Wilkerson, "Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine," *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, vol. 42, no. 1, pp. 53-71, Jan. 2012.

[6] S. Cointe, C. Judicone, S. Robert, M. J. Mooberry, P. Poncelet, M. Wauben, R. Nieuwland, N. S. Key, F. Dignat George, and R. Lacroix, "Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 15, no. 1, pp. 187-193, Jan. 2017.

[7] K. Cho, and S. Choe, "Development of low cost module for proliferation control of cancer cells using LED and its therapeutic effect," *Journal of the Korea Information and Communication Engineering,* vol. 22, no. 9, pp. 1237-1242, Sep. 2018.

[8] K. Cho, and S. Choe, "Basic study on proliferation control of cancer cells using combined ultrasound and LED therapeutic module," *Journal of the Korea Information and Communication Engineering*, vol. 22, no. 8, pp. 1107-1113, Aug. 2018.

조경래(Kyoungrae Cho)

2018년 금오공과대학교 메디컬IT융합공학과 공학사
현재: 금오공과대학교 메디컬IT융합공학과 석사과정
※관심분야 : 전자회로설계, 임베디드시스템설계, SMPS

서정혁(Jeong-hyeok Seo)

2006년 한라대학교 컴퓨터공학과 공학사
2014년 연세대학교 의공학전공 석사
현재: 금오공과대학교 메디컬IT융합공학과 박사과정
한라대학교 의료IT융합과 외래교수
※관심분야 : 의용임베디드시스템, 의용회로설계, 의료용로봇시스템

최세운(Se-woon Choe)

2001년 홍익대학교 전자전기공학부 공학사
2004년 University of Florida, Department of Electrical and Computer Engineering, MS
2008년 University of Florida, Department of Biomedical Engineering, MS
2011년 University of Florida, Department of Biomedical Engineering, PhD
현재: 금오공과대학교 메디컬IT융합공학과 조교수
※관심분야 : 의광학, 생체 진단/치료기기, 생체신호처리, 의용임베디드 시스템