

특 별 기 고 1

유전영동(dielectrophoresis)을 이용한 미세유체제어 기술

박 제 균 한국과학기술원 바이오시스템학과

1. 개요

최근 나노기술과 MEMS 기술의 발전으로 이를 생명공학 및 의료공학 분야 에 적용하고자 하는 노력이 활발히 이루어지고 있다 [1, 2]. 의료분야에서의 MEMS 기술 응용은 이미 미세 수술기구 및 초소형 내시경, DDS (drug delivery system) 로 활용하기 위한 미세캡슐, 체내 삽입형 바이오센서 개발 로 이어지고 있고, 생명공학 응용분야로는 시스템 생물학의 주요 수단(tool)으 로서 유전자와 단백질을 스크리닝하거나 진단 할 수 있는 DNA 칩과 단백질 칩, 그리고 실험실에서 사용하는 생화학반응용 랩온어칩(lab-on-a-chip) 등이 대표적이다. 특히, 이러한 나노/마이크로 칩 기술에 있어서 수 나노리터에 해 당하는 적은 양의 생체시료를 단위 소자 상에서 다루기 위한 미세유체공학 (micro/nanofluidics)이 주요한 요소기술로서 인식되고 있다 [3].

미세유체공학 분야는 미세종합분석시스템 (micro total analysis system) 즉, μ-TAS 분야 또는 랩온어칩의 상용화에 기초가 되는 기반, 핵심기술을 연구, 개발하는 분야이다 [4]. 여기서 μ-TAS는 여러 실험 단계와 반응을 거치는 화 학 및 생물학 실험과 분석이 한 실험대 위에 놓인 한 유니트에서 종합적으로 구현되는 시스템을 의미한다. 이러한 μ-TAS는 시료 채취 영역, 미세유체회 로, 검출기 및 이들을 제어할 수 있는 제어부 (controller)로 구성될 수 있다. 한편 랩온어칩이란 "칩 위의 연구실"이란 의미를 갖는 것으로 μ-TAS 개념과 기능을 작은 칩(chip) 상에서 구현한 것이다. 따라서 랩온어칩을 개발하기 위 해서는 플라스틱이나 유리, 실리콘 등의 표면에 용액이 흐를 수 있는 미세채 널로 회로를 만들어 시료의 전처리, 분리, 희석, 혼합, 생화학반응, 검출 등을

Electrorotation Lab-on-achip Programmable Manipulation Trapping/ Focusing/ Fractionation Separation/ Fractionation Sorting

[그림 1] 유전영동을 이용한 DEP 소자의 응용 분야

하나의 칩에 소형화, 집적화 시킬 수 있어야 한다. 현재까지 이러한 모든 기능 이 통합된 랩온어칩 개발 보다는 몇 가지 기능을 수행할 수 있는 랩온어칩, 정 확한 의미로는 특정기능을 수행하는 바이오유체소자(bio-fluidic device) 분야 의 개발이 활발한 실정이다. 이 경우 바이오유체를 이송시킬 수 있는 미세유 체공학의 역할은 매우 중요하다.

본 고에서는 시료 전처리의 중요성이 더해지는 바이오센서, 바이오칩, 랩온 어칩(lab-on-a-chip) 분야에 널리 적용되고 있는 유전영동(dielectrophoresis) 에 의한 미세유체공학 응용에 대해서 논하고자 한다. 그림 1은 유전영동을 이 용한 소자의 대표적인응용분야를 보여주고 있다. 유전영동을 이용한 생물학 적 입자 분리 및 분석을 위한 마이크로플루이딕 시스템 (microfluidic system) 은 시료의 전처리가 필요 없고, 빠른 시간 안에 분석 및 측정할 수 있으며 자 동화에 용이하다는 점 등 기존의 생화학 실험실에서 수행되는 방법들에 비해 많은 장점을 제공한다.

2. 유전영동 (dielectrophoresis)의 원리

극성이 없는 입자가 불균일한 교류 전기장에 노출되었을 때 쌍극성(dipole) 이 입자에 유도되며, 유도된 극성의 크기와 방향은 인가된 전기장의 주파수와 전도도(conductivity, σ) 및 유전율 (permittivity, ε)과 같은 유전특성 (dielectric properties)에 따라 달라진다 [5, 6]. 이때 입자가 놓인 주변 환경에 따라 입자의 극성이 결정되기 때문에 입자는 전기장의 구배가 큰 쪽 또는 작 은 쪽으로 힘을 받게 된다 (그림 2). 이러한 현상을 각각 양(positive)과 음 (negative)의 유전영동 (dielectrophoresis, DEP) 이라고 한다.

DEP를 이론적으로 살펴보면, 반경 r인 입자가 전기장 *E*_{ms}, (전기장의 rms 값)이 인가된 매질에 놓여서 받게 되는 DEP force, *F*는 다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다.

$$F = 2\pi\varepsilon_0\varepsilon_m r^3 \operatorname{Re}[f_{CM}]\nabla |E_{rms}|^2$$

이때 ε_0 는 진공상태하에서의 유전상수, f_{CM} 은 Clausius-Mossotti (CM) factor로서 다음과 같이 정의 된다.



[그림 2] 유전영동 (dielectrophoresis). 전기장의 구배가 균일한 왼쪽 그림과 달리 불균일 한 전기장하에서는 입자가 한쪽 방향으로 힘을 받게 된다.

$$f_{CM} = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}$$



*εp**와 *εm**은 입자와 외부 매질이 받게 되는 상대 복합유전율 [7]이며, Re[*f*_{cM}] 은 *f*_{CM}의 실수부 값을 의미한다. 입자에 미치는 유전상수 값이 매질 보 다 클 경우, 즉 Re[*f*_{CM}]>0 인 경우는 DEP 는 양의 DEP 라 부르게 되고 입자 는 전기장의 구배가 큰 쪽으로 움직이게 된다. 반면 매질 보다 작게 될 경우 (Re[*f*_{CM}]<0)에는 반대로 전기장의 구배가 작은 쪽으로 움직이게 되는 데 이를 음의 DEP 라고 한다. 따라서 분리하고자 하는 입자간 양과 음의 DEP 차이를 이용하면 원하는 입자를 분리 이동할 수 있다. 만일 동일한 조건이라면 입자 를 크기 별로 분리해 낼 수도 있다. 식에서와 같이 DEP의 세기는 입자 반경 의 세제곱에 비례하므로 입자 및 세포의 크기차이가 많이 날 경우 동일한 DEP 조건에서 입자별로 받게 되는 DEP force가 달라질 수 있기 때문이다.

3. 유전영동에 의한 세포의 흡착 및 분리

주파수 범위 5-200 kHz 내에서 세포의 유전특성은 세포막의 형상과 세포내 부의 전도도와 세포 크기 등에 의해 영향 받게 되는 Maxwell-Wagner polarization에 지배를 받는다 [8]. 따라서 세포마다 DEP 특성이 차이가 나는 현상을 이용하게 되면 세포를 조작 또는 분리하는 데 사용할 수 있다. 비슷한 크기의 세포중에서 원하는 세포를 특정 세포군으로부터 분리하고자 한다면 반 드시 DEP가 인가된 특정 주파수 조건에서 분리하고자 하는 세포의 유전특성 이 달라지는 지를 확인해야 한다. 일반적으로 주파수변화에 따른 세포의 유전 특성은 "electrorotation" (4개의 인접한 전극 중앙에 위치한 입자는 각 전극으 로부터 유도되는 위상차를 갖는 교류전압에 의해 쌍극성의 위상차가 생겨 입 자가 회전하게 되는 현상) 방법에 의해 측정가능하다 [9]. 그러나 아직도 세포 의 이러한 물리적 특성에 대한 자료는 많이 알려져 있지 않은 실정이다.

DEP 특성은 세포 구조 및 세포막을 경계로 내, 외부간의 환경적 차이에 크 게 달라진다 (그림 3). 이때 세포 간 영역을 결정짓는 세포의 플라즈마 멤브레 인(plasma membrane)이 세포의 DEP 특성 변화에 중요한 영향을 끼치게 된 다. 세포막의 막 두께, 유효면적, 유전상수, 전기전도도 등에 따라 세포막에서 의 복합유전율이 달라지기 때문이다. 세포막은 단백질 등이 포함된 매우 얇은 두층의 지질(liplid)로 되어있고, 일반적으로 전도도 10⁻⁷ S/m 정도로 절연성 을 보인다. 반면 세포 내부는 전하를 갖는 분자가 많고, 전도도가 1 S/m 에 이 를 정도로 크다. 그러나 세포가 죽게 되면 이러한 세포막은 그 투과성의 기능 을 잃게 되므로 전도도가 10⁴ 배 정도 증가하게 된다. 이와 같이 활성을 잃은 세포는 유전 특성에 큰 차이를 가져오게 되기 때문에 DEP 특성의 변화를 이 용하여 죽은 세포 및 활성이 낮은 세포 등을 정상 세포로부터 분리해 낼 수



[그림 3] DEP에 영향을 주는 세포의 커페시턴스 및 저항 성분 [14]

있게 된다. 지금까지 죽은 세포 [10], 백혈구 세포 (leukemia cells)의 분리 [11], 혈액에서 박테리아의 분리 [12], 그램양성세균의 분리 [13] 등이 보고된 바 있다.

4. 입자 및 세포 분리용 DEP 소자

마이크로 채널 내에서 세포를 분리하는 방법의 일반적 예는 다음과 같다. IDA (interdigitated electrode) 형태로 배열시킨 DEP 용 전극 상부에 마이크 로채널을 형성시키고 세포 혼합물을 채널 내부로 통과시키게 되면 전극에 의 한 생성되는 DEP force에 의해 양의 DEP를 보이는 세포는 전극상부에 trap 이 되고, 음의 DEP를 보이는 세포의 경우는 유체 흐름에 따라 채널 출구로 빠져나가게 된다. trap 되어 있는 세포는 DEP 전압을 제거하면 채널 출구에 서 수확할 수 있다. 이러한 분리과정은 비 연속적으로 세포 혼합물에서 세포 를 분리할 수 있으나 throughput을 높이기 위해서는 전극면적을 증가시켜야 하는 단점이 있다. 주로 양의 유전 영동력을 이용하여 입자를 분리하는 기존 의 분리 방법은 전극과 미세입자간의 불특정한 흡착현상이 발생한다는 단점 을 갖는다. 게다가 이러한 방법의 대부분은 미세입자를 불연속적으로 분리하 기 때문에 많은 수의 미세입자를 분리하기 어렵다는 한계를 갖고 있다. 이상 의 경우와 다르게 분리하고자 하는 입자의 유전특성이 크게 차이 나지 않을 경우, 즉 동물세포에서와 같이 DEP crossover frequencies 가 매우 비슷할 경 우는 매우 약한 DEP를 갖게 된다. 따라서 이러한 문제점을 극복하고자 DEP 분리 효율을 증진시키기 위한 방안의 하나로서 DEP-FFF (field flow fractionation) 방법이 고안된 바 있다.



[그림 4] 마이크로채널 내에서의 DEP Field Flow Fractionation 방법의 모식도

그림 4 에서와 같이 DEP-FFF 방법은 채널 바닥면에 있는 전극과 입자간에 생기는 DEP force 외에도 입자 무게에 비례하는 침강력(sedimentation force, *F*grav)과 유속에 비례하는 drag force 에 의해 입자가 채널내에서 평형을 이루 게 되는 현상을 이용한다 [15]. 즉, 마이크로채널 내에서 유속이 층류(laminar flow)를 형성하게 되므로 입자별로 침강력에 상응하는 DEP 상승력 (levitation force, *F*DEPZ)을 받아 채널 수직방향으로 서로 다른 위치에 존재하 게 된다. 이때 입자들의 유속은 채널 중앙부에서 가장 빠르게 되므로 (*V*DT >> *V*FFFI) 입자의 종류별로 분리 수확할 수 있게 된다. DEP-FFF 방법은 입자를 별도의 수식과정이 필요없는 비 침습식 (noninvasive technique)방법임과 동 시에 반드시 양의 DEP를 이용할 필요가 없고, 단순히 세포의 물리적 특성과 인가전압 조건하에서 기존 flow cytometry와 다르게 여러 종류의 세포를 빠르고 (1-2분 이내) 연속적으로 분리할 수 있다는 장점이 있다 [16].

최근 본 연구팀은 그림 5A에서와 같은 사다리꼴 전극에 미세입자가 노출되

었을 때 그 입자가 받는 물리력이 비선형적인 전기장에 의해 유발되는 유전영 동에 의한 속도와 유압차에 의해 발생하는 유체력에 의한 속도에 의해 그 운 동이 결정됨을 보여 준 바 있다 [17]. 사다리꼴 전극은 전극의 긴 변의 모서리 에서 강한 전기장을 갖는 반면 짧은 변에서는 약한 전기장의 세기를 갖게 된 다. 이러한 전기장세기의 기울기는 음의 유전 영동력을 갖는 생화학적 입자가 미세유체채널 내에서 사다리꼴의 긴 변에서 짧은 변으로 이동하게끔 한다 (그 림 5B). 이때, 유전영동력에 의해 발생하는 입자의 이동속도는 입자의 크기와 fm의 절대크기에 비례하므로 유전적 차이를 갖는 생화학적 입자를 분리 및 분 석할 수 있다.



[그림 5] 사다리꼴 전극을 이용한 유전영동 분리소자의 개념도 (A)와 이를 이용한 입자의 분리실험 결과 (B)

5. Programmable manipulation 및 랩온어칩 응용

프로그램화 할 수 있는 유전영동을 구현하기 위해서는 DEP 용 전극의 이차 원 배열이 매우 중요하다. Silicon Biosystems 회사는 CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor) 회로를 이용한 DEP 전극 어레이 (320 x 320)칩 을 이용하여 세포와 마이크로비드 (microbead)들을 dielectrophoretic cage안 에 위치시켜서 전기적으로 세포 또는 마이크로비드의 위치를 조절할 수 있는 기술을 개발한 바 있다 [18]. 이런 기술을 이용하면 마이크로비드에 항체나 세 포에 영향을 줄 수 있는 호르몬과 같은 물질을 붙여서 세포와 미지의 물질간의 상호작용에 대한 연구도 할 수 있다. 이 기술은 전극과의 접촉 없이 또한 채널 이 없는 상태에서도 전기적 변화에 의해 세포와 마이크로비드의 움직임을 조 작할 수 있는 장점이 있다. 이미 알고 있는 세포와 미지의 물질이 붙어있는 마 이크로비드와 상호작용을 관찰하는 신약물질 선별과정과 반대로 미지의 세포 와 이미 기능을 알고 있는 물질이 붙어있는 마이크로비드와의 상호작용 등을 관찰하는 진단에 사용이 가능할 것으로 기대된다 [그림 6].



[그림 6] 세포 생물학 및 비드기반 분석에 사용될 수 있는 DEP 랩온어칩 기술의 개념도 [14]

이와 같은 DEP 전극어레이에 의한 입자 조작기술은 프로그램에 의해 특정 전극 부분에만 선택적으로 DEP를 유발할 수 있어 입자를 개별적, 선택적으로 조절하고, 움직일 수 있는 장점이 있다. 또한 동시에 여러 입자의 조작도 가능 하다. 그러나 궁극적으로는 미리 제작된 전극어레이의 해상도에 DEP 기능이 의존하므로 고해상도의 CMOS 칩이 필요한 단점이 있다.

한국바이오칩학호 The Korean BioChip Society

미리 제작된 전극 대신 optoelectronic tweezers (OET)를 사용하게 되면 좀 더 진일보시킨 프로그램화 할 수 있는 유전영동을 구현할 수 있다. Chiou 등 [19]은 photoconductive layer상에 digital micro-mirror device (DMD)에서 유발되는 광신호로서 가상 전극 (virtual electrodes)을 형성시켜 OET에 의한 DEP를 실험적으로 보여 주었다 (그림 7A). 즉, 빛을 받은 영역은 전도도가 증가하고, 빛을 받지 않는 부분과 비교할 때, 전도도가 뚜렷이 차이 나는 가상 전극이 형성된다. 이러한 방법은 특히 시료처리를 위한 OET 부분만을 일회 용 카트리지 형태로 사용할 수 있도록 고안할 수 있기 때문에 의료용으로도 유리할 수 있다. 그러나 DMD를 사용하는 이유로 아직은 렌즈를 포함하여 광 focusing을 위한 값비싼 광학구조물을 반드시 사용해야만 하는 단점이 있다.



[그림 7] Optoelectronic tweezers (OET)를 사용한 DEP 조작 방법의 예. Programmable light source 로서 (A) Digital micro-mirror device (DMD)를 (B) liquid crystal display (LCD)를 각각 채용함.

최근 본 연구팀 [20]에서는 휴대성이 떨어지는 DMD 대신에 liquid crystal display (LCD)위에 직접 접촉시킨 OET를 사용하여 미소 물체를 조작하는 "Lab-on-a-Display" 라는 기술을 실현시킨 바 있다 (그림 7B). DMD 보다는 약한 광을 이용하기 때문에 LCD의 경우는 light source, 흑백 또는 칼라 LCD 종류, 인가전압, 미세입자의 크기 등이 DEP에 영향을 주었다. 그림 8은 LCD 위에서 조작되고 있는 직경 45 µm 인 폴리스티렌 마이크로비드의 시간에 따 른 영상변화를 보여 주고 있다. 그림에서와 같이 밝은 이미지 부분 (실제 red color)은 LCD에 의한 빛이 OET 층을 통과하여 가상의 전극이 만들어진 상

태이다. 경계 부분에서 받는 음 의 DEP force 에 의해 마이크 로비드가 60초에 걸쳐 1.8 mm × 2.4 mm 크기의 "I" 라는 이 미지를 만들고 있음을 보여 준 다. 만들어진 비드에 의한 형태 는 LCD 신호를 off 해도 그대 로 유지됨을 알 수 있다 (65 초).



[그림 8] LCD 위에서 조작되고 있는 직경 45 (m) 인 폴리스티렌 마이크로비드의 시간에 따 른 영상 변화



이상에서 유전영동에 의한 입자 및 세포의 분리 기술 및 이를 이용한 유전 영동 분리 소자 등 랩온어칩 응용 예를 기술해 보았다. 무엇보다 유전영동 기 술은 시료를 화학적으로 수식할 필요가 없어 세포를 포함한 생화학적 시료의 분리 및 조작에 매우 유리하다. 다만 아직은 세포 종류별로 DEP 특성이 어떻 게 다른지에 대한 연구가 많이 되어 있지 않아 세포의 크기별 분류나 그 응용 이 제한되고 있는 실정이다. 또한, 유전영동을 유발하기 위해 정확한 유체 조 절이 필요하다는 점 등은 유전영동을 이용한 소자의 실용화에 큰 해결점으로 남아있다. 따라서 다양한 물리, 화학적 force를 접목시킨 유전영동의 변형된 형태의 개발도 요구된다. 이런 점에서 유속을 조절할 필요가 없는 optoelectronic tweezers 에 의한 programmable manipulation은 본문에서 예 시된 바와 같은 적절한 응용 분야를 창출해 낸다면 앞으로 그 응용성이 더욱 커질 것으로 기대된다.

Korean BioChip Society

■ 참고문헌

- 1. L. Mazzola, Nat. Biotechnol., 2003, 21, 1137-1143.
- 2. H. Andersson, A. van den Berg, Sens. Actuators B Chem., 2003, 92, 315-325.
- 3. K. Rubenstein, D&MD Reports, 2003. 04.
- 4. P. S. DittrichS, A. Manz, Nat. Rev. Drug Discov., 2006, 5, 210-218.
- 5. H. A. Pohl, *Dielectrophoresis*, 1978, Cambridge University Press, Cambridge.
- 6. M. P. Hughes, Electrophoresis, 2002, 23, 2569-2582.
- 7. S. Archer, T. -T. Li, A. T. Evans, S. T. Britland, H. Morgan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 257, 687-698.

- X. -B. Wang, Y. Huang, P. R. C. Gascoyne, F. F. Becker, *IEEE T. Ind. Appl.* 1997, 33, 660-669.
- 9. F. F. Becker, X. Wang, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal, P. R. C. Gascoyne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 860-864.
- 10. G. H. Markx, M. S. Talary, R. Pethig, J. Biotechnology, 1994, 32, 29-37.
- Y. Huang, S. Joo, M. Duhon, M. Heller, B. Wallace, X. Xu, Anal. Chem., 2002, 74, 3362-3371.
- J. Cheng, E. L. Sheldon, L. Wu, A. Uribe, L. O. Gerrue, J. Carrino, M. J. Heller, J.P. O'Connell, *Nat. Biotechnol.*, 1998, 16, 541-546.
- G. H. Markx, Y. Huang, X. F. Zhou, R. Pethig, *Microbiology* 1994, 140, 585-591.
- N. Manaresi, *Mainstreaming Microfluidics*, Boston, May 15-16, 2003, U.S.A.
- J. Yang, Y. Huang, X. B. Wang F. F. Becker, P. R. Gascoyne, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 911-918.
- P. Reschiglian, A. Zattoni, B. Roda, E. Michelini, A. Roda, *Trends Biotechnol.*, 2005, 23, 475-83.
- 17. S. Choi, J.-K. Park, Lab Chip, 2005, 5, 1161-1167.
- N. Manaresi, A. Romani, G. Medoro, L. Altomare, A. Leonardi, M. Tartagni, R. Guerrieri, *IEEE J. Solid-St. Circ.*, 2003, 38, 2297-2305.
- 19. P. Y. Chiou, A. T. Ohta, M. C. Wu, Nature, 2005, 436, 370-372.
- 20. W. Choi, S. Kim, J. Jang, J. -K. Park, *Microfluid. Nanofluid.*, 2006, In press.