



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0026169
(43) 공개일자 2020년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/447 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 27/447 (2013.01)
G01N 33/483 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0108277
(22) 출원일자 2019년09월02일
심사청구일자 2019년09월02일
(30) 우선권주장
1020180103557 2018년08월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
최승엽
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 산학관 212호
(연세대학교 원주캠퍼스)
임종원
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 산학관 212호
(연세대학교 원주캠퍼스)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김보민

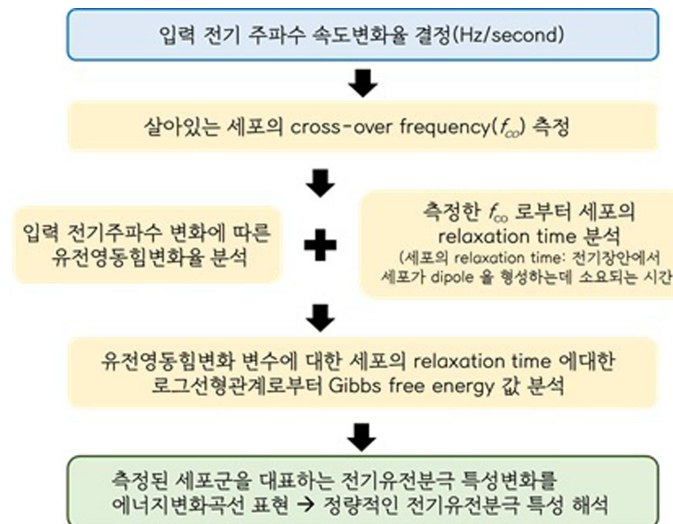
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법

(57) 요약

본 발명은 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 유전영동집에서 교류전기신호에 따른 세포의 움직임을 관측하여 교차주파수(cross-over frequency)를 측정하는 단계, 측정한 교차주파수를 동적 완화 주파수로 변환하여 완화시간을 측정하는 단계, 측정된 세포의 움직임을 통해 유전영동힘변화율을 계산하는 단계 및 상기 완화 시간 및 유전영동 힘 부하율을 회귀분석하여 유전영동에 의한 분극발생에 따른 활성화 에너지를 분석하는 단계를 포함하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법에 관한 것으로, 살아있는 세포의 비선형적인 세포유전반응을 관측 및 세포막투과성의 변화 및 에너지 프로파일 사이의 비교를 통한 세포의 전기분극 특성 분석에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이은진

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 연세대학교 매지3학사

김채원

광주광역시 북구 서하로 120, 2동 604호(용봉동, 삼성아파트)

박인수

서울특별시 강서구 화곡로13길 107, 112동 601호(화곡동, 화곡푸르지오)

기재홍

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 백운관 409호(연세대학교 원주캠퍼스)

이세영

경기도 성남시 분당구 장미로 55, 117동 105호(야탑동, 장미마을)

이상우

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 백운관 401호(연세대학교 원주캠퍼스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2B2002076

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 Nucleic acid 복합체부터 세포특성 분석을 위한 DEP tweezers 기반 신개념 미세유체칩 플랫폼 개발 및 응용연구

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 유전영동칩에서 교류전기신호에 따른 세포의 움직임을 관측하여 교차주파수(cross-over frequency, f_{co})를 측정하는 단계;
- (b) 상기 단계 (a)에서 측정한 교차주파수를 동적 완화 주파수(dynamic relaxation frequency)로 변환하여 완화시간(relaxation time)을 측정하는 단계;
- (c) 상기 단계 (a)를 통해 측정된 세포의 움직임을 통해 유전영동 힘 부하율(dielectrophoretic force loading rate)을 계산하는 단계; 및
- (d) 상기 단계 (b)를 통해 측정된 완화시간과 상기 단계 (c)를 통해 계산된 유전영동 힘 부하율을 회귀분석하여 유전영동에 의한 분극 발생에 따른 활성화 에너지를 분석하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 교류전기신호는 교류전기주파수가 증가 또는 감소하는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포는 유방암 세포(MCF-7), 자궁 경부암 세포(HeLa) 및 폐암 세포(A549)를 포함하는 군 으로부터 선택되는 하나 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 측정한 교차주파수는 세포의 Clausius-Mossotti(CM) factor가 0이 되는 주파수를 의미하는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 CM factor는 아래 수학적 식 2로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

[수학적 식 2]

$$CM = (\epsilon_{cell}^* - \epsilon_{medi}^*) / (\epsilon_{cell}^* + 2\epsilon_{medi}^*)$$

여기서 ϵ_{cell}^* 은 세포의 복소유전율이고,

ϵ^*_{medi} 는 세포를 둘러싼 매질의 복소유전율이다.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 ϵ^*_{cell} 은 아래 수학식 3으로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

[수학식 3]

$$\epsilon^*_{cell} = \epsilon^*_{memb} \frac{[\lambda^3 + \{(\epsilon^*_{cyto} - \epsilon^*_{memb}) / (\epsilon^*_{cyto} + \epsilon^*_{memb})\}]}{[\lambda^3 - \{(\epsilon^*_{cyto} - \epsilon^*_{memb}) / (\epsilon^*_{cyto} + \epsilon^*_{memb})\}]}$$

여기서 ϵ^*_{memb} 은 세포막의 복소유전율이고,

ϵ^*_{cyto} 는 세포질의 복소유전율이다.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 ϵ^* 은 아래 수학식 4로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

[수학식 4]

$$\epsilon^* = \epsilon + j(\sigma/\omega)$$

여기서 ϵ 은 비유전율(relative permittivity)이고,

σ 는 전도도(conductivity)이며,

ω 는 각주파수이다.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 λ 는 아래 수학식 5로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

[수학식 5]

$$\lambda = r_{cell} (r_{cell} - t)$$

여기서 t 는 세포막의 두께이다.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 동적 완화 주파수는 아래 수학식 6으로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변

화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

[수학식 6]

$$\tau = \frac{1}{2\pi f_{co}}$$

여기서 f_{co} 는 세포의 Clausius-Mossotti(CM) factor가 0이 되는 주파수이다.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 완화 시간은 전기장 안에서 세포가 쌍극자(dipole)를 형성하는데 소요되는 시간인 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 유전영동 힘 부하율은 유한요소해법을 적용한 유전영동칩에 주어진 초기조건에 따른 세포의 자기장세기의 변화도를 계산하여 추정하는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 초기조건은 교류전기주파수, 교류전압, 세포의 위치, 시간을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 분극의 세포분극과정은 아래 수학식 8로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

[수학식 8]

$$\frac{d}{dt}S(t) = k(t) \cdot S(t)$$

여기서 $S(t)$ 는 온전한 분극조건을 가질 확률이다.

청구항 14

제13항에 있어서, 단위시간 t 에 대한 상기 $S(t)$ 는 세포가 분극하고 있을 확률 $P(t)$ 를 의미하며, 이는 아래 수학식 9로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

[수학식 9]

$$P(t) = k(t) \cdot S(t) = k_0 \exp \left[\frac{\gamma t}{f_0} - \frac{f_0 k_0}{\gamma} \exp \left(\frac{\gamma t}{f_0} \right) \right]$$

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 회귀분석은 선형회귀분석인 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 활성화 에너지는 아래 수학식 11로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

[수학식 11]

$$\Delta G = -k_B T \cdot \ln(\tau_p / \tau_0)$$

여기서 k_B 는 볼츠만 상수(Boltzmann's constant)이고,

T 는 절대 온도이며,

τ_p 는 외력이 존재하지 않을 때 분극에 대한 특징적 완화시간이고,

τ_0 은 자연적인 완화시간이다.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 유전영동은 아래 수학식 1로 표기되는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법.

[수학식 1]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_{medi}r_{cell}^3 Re[CM] \nabla |E_{RMS}|^2$$

여기서 ϵ_{medi} 는 세포를 둘러싼 매질의 유전율이고,

r_{cell} 은 세포의 반지름이며,

CM 은 Clausius-Mossotti(CM) factor이고,

E_{RMS} 은 전기장 세기의 Root Mean Square 값이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 유

전영동 힘 인가변화 조절로 살아있는 세포의 비선형적인 세포유전반응을 관측할 수 있고, 세포막투과성의 변화 및 에너지 프로파일 사이의 비교를 통하여 세포의 전기분극 특성을 분석할 수 있는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 살아있는 세포의 막의 유전특성은 생체전기활동으로 삶이 지속되는 환경에서 근본적인 역할을 한다. 그러한 역할로부터 나타나는 활동은 유전성질을 대표하는 캐패시터로 구성된 전기회로로 세포를 모델링함으로써 묘사된다. 예를들어, 뉴런모델은 뉴런막전위에 대하여 간단한 저항과 캐패시터로 구성할수 있으며, 이는 이온의 흐름을 관장하는 세포막에 의해 단계적으로 조절된다. 최근 바이오나노기술의 발전으로 단일세포수준에서의 실험 및 분석이 가능하게 되었다. (예를들어, 미세유체기술을 활용한 세포계수기, 미세공정 임피던스 센서, 광학으로 유도되는 전기역학반응, 유전영동 세포조작 기술) 그렇게 함으로써 다음과 같은 유전현상들이 밝혀지게 되는데, 구체적으로 약물처리후의 임피던스값에 따른 세포의 불투명함, 세포주기 및 세포 분화에 의한 세포의 유전적 임피던스(dielectrical impedance) 변화, 세포막 캐패시턴스, 약물처리후 세포의 유전특성확인 등을 예로 들 수 있다.
- [0004] 그러나 이러한 접근들은 세포내의 선형적인 동적 유전특성에 초점이 맞춰져 왔다. 많은 이론적, 실험적인 연구들을 통하여 비선형 유전특성은 생체전기활동을 이해하기 위하여 매우 중요한 파라미터임에도 불구하고, 아직까지 살아있는 물체에서 비선형 유전특성을 관측하지 못하였다. 여기서 살아있는 물체는 이온 채널의 작동, 살아있는 세포에서 세포 내외의 전기 신호의 전달과 같은 활동들이 나타나야 한다.
- [0005] 이러한 제한 때문에, 현재 구현되어 있는 측정방법으로는 생체내에서 비선형성을 가지는 유전특성 관측하기가 어렵다. 예를들어, 생물학과 임상적인 응용 측면에서 살아 있는 세포의 임피던스, 캐패시턴스, 유전 상수를 측정하는 방법은 유전특성의 다양성을 관측하기 위한 흥미로운 방법이며 최적화가 되어 있지만, 세포의 유전특성 자체를 조사하기 위한 용도로는 최적화가 미진해왔다. 생물학적인 재료들안에서 비선형 동적 유전 특성 유무를 확인하는 관측 기술은 세포가 살아있지 않은 제한된 환경에서만 구현되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유전영동칩에서 교류전기신호에 따른 세포의 움직임 관측하여 교차주파수(cross-over frequency)를 측정하는 단계, 측정한 교차주파수를 동적 완화 주파수로 변환하여 완화시간을 측정하는 단계, 측정된 세포의 움직임을 통해 유전영동힘변화율을 계산하는 단계 및 상기 완화 시간 및 유전영동 힘 부하율을 회귀분석하여 유전영동에 의한 분극발생에 따른 활성화 에너지를 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명은 유전영동 힘 인가변화 조절로 살아있는 세포의 비선형적인 세포유전반응을 관측할 수 있고, 세포막투과성의 변화 및 에너지 프로파일 사이의 비교를 통하여 세포의 전기분극 특성을 분석할 수 있는 것을 확인하였으므로, 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극의 특성을 분석하는데 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 생체물질의 전기유전분극 특성 분석 방법 절차를 나타낸 도이다.

도 2는 교류전기주파수 변화에 따른 MCF-7 세포의 클라지우스-모조티 인자(Clausius-Mossotti(CM) factor)의 실수부를 나타낸 도이다.

도 3은 교류전기주파수변화에 따른 유전영동칩에서 측정된 세포의 f_{co} 결과 및 주어진 유전영동 힘 부하율에 따른 세포들의 동적 완화 시간 분석결과를 나타낸 도이다.

도 4는 유전영동 힘 부하율에 따른 γ^* 값으로부터 회귀식을 찾는 과정을 나타낸 도이다.

도 5는 세포들의 분극에 대한 에너지변화곡선 분석결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 유전영동(Dielectrophoresis)이란 극성을 띠지 않은 입자가 불균일한 교류 전기장에 노출되었을 때, 입자와 입자를 둘러싸고 있는 유체의 유전특성(전도도+유전율)에 의해서 입자가 힘을 받는 것을 의미한다. 이 때 입자는 외부 환경의 조건에 따라서 전기장의 구배가 큰 쪽 또는 작은 쪽으로 힘을 받게 되고 이를 각각 양의 유전영동, 음의 유전영동 이라고 한다.

[0017] 본 발명은 유전영동칩에서 교류전기신호에 따른 세포의 움직임을 관측하여 교차주파수(cross-over frequency, f_{co})를 측정하는 단계, 측정된 교차주파수를 동적 완화 주파수로 변환하여 완화시간을 측정하는 단계, 측정된 세포의 움직임을 통해 유전영동힘변화율을 계산하는 단계 및 상기 완화 시간 및 유전영동 힘 부하율을 회귀분석하여 유전영동에 의한 분극발생에 따른 활성화 에너지를 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전영동 힘 인가변화 조절에 따른 세포의 전기분극 특성 분석법을 제공한다.

[0018] 상기 교류전기신호는 교류전기주파수가 증가 또는 감소하는 것이 바람직하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0019] 상기 세포는 흑색종, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 신경교종, 간암, 갑상선 종양, 위암, 전립선암, 유방암, 난소암, 방광암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 자궁내막암, 신장암, 결장암, 췌장암, 식도암종, 머리 및 목암, 중피종, 육종, 담관암, 소장 선암, 소아 악성암 및 표피암 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하며, 구체적으로는 유방암 세포(MCF-7), 자궁 경부암 세포(HeLa) 및 폐암 세포(A549)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 보다 바람직하다.

[0020] 상기 측정된 교차주파수는 세포의 Clausius-Mossotti(CM) factor가 0이 되는 주파수를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0021] 상기 CM factor는 아래 수학적 식 2로 표기될 수 있다.

[0022] [수학적 식 2]

$$CM = (\epsilon_{cell}^* - \epsilon_{medi}^*) / (\epsilon_{cell}^* + 2\epsilon_{medi}^*)$$

[0023]

[0024] 여기서 ϵ_{cell}^* 은 세포의 복소유전율이고,

[0025] ϵ_{medi}^* 는 세포를 둘러싼 매질의 복소유전율이다.

[0026] 상기 ϵ_{cell}^* 은 아래 수학적 식 3으로 표기될 수 있다.

[0027] [수학식 3]

$$\varepsilon_{cell}^* = \varepsilon_{memb}^* \frac{[\lambda^3 + \{(\varepsilon_{cyto}^* - \varepsilon_{memb}^*) / (\varepsilon_{cyto}^* + \varepsilon_{memb}^*)\}]}{[\lambda^3 - \{(\varepsilon_{cyto}^* - \varepsilon_{memb}^*) / (\varepsilon_{cyto}^* + \varepsilon_{memb}^*)\}]}$$

[0028]

[0029] 여기서 ε_{memb}^* 은 세포막의 복소유전율이고,

[0030] ε_{cyto}^* 는 세포질의 복소유전율이다.

[0031] 상기 ε^* 은 아래 수학식 4로 표기될 수 있다.

[0032] [수학식 4]

$$\varepsilon^* = \varepsilon + j(\sigma / \omega)$$

[0033]

[0034] 여기서 ε 은 비유전율(relative permittivity)이고,

[0035] σ 은 전도도(conductivity)이며,

[0036] ω 은 각주파수이다.

[0037] 상기 λ 은 아래 수학식 5로 표기될 수 있다.

[0038] [수학식 5]

$$\lambda = r_{cell} (r_{cell} - t)$$

[0039]

[0040] 여기서 t 는 세포막의 두께이다.

[0041] 상기 동적 완화 주파수는 아래 수학식 6으로 표기될 수 있다.

[0042] [수학식 6]

$$\tau = \frac{1}{2\pi f_{co}}$$

[0043]

[0044] 여기서 f_{co} 는 세포의 Clausius-Mossotti(CM) factor가 0이 되는 주파수이다.

[0045] 상기 완화 시간은 전기장 안에서 세포가 쌍극자(dipole)을 형성하는데 소요되는 시간일 수 있다.

[0046] 쌍극자는 크기가 같은 양의 전하와 음의 전하가 일정거리 만큼 떨어져 있는 전하 배열일 수 있다.

[0047] 상기 유전영동 힘 부하율은 유한요소해법을 적용한 유전영동칩에 주어진 초기조건에 따른 세포의 자기장세기의 변화도를 계산하여 추정하는 것일 수 있다.

[0048] 상기 유한요소해법은 변위 및 변형을 해석하는 수치해법의 일종으로서, 모든 물체가 유한수의 작은 성분 또는 요소로 구성되어 있고, 이 요소들은 유한수의 축점으로 연결되었다고 가정하는 것일 수 있다.

[0049] 상기 초기조건은 교류조건, 교류전압, 세포의 위치, 시간으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0050] 상기 분극의 세포분극과정은 아래 수학식 8으로 표기될 수 있다.

[0051] [수학식 8]

$$\frac{d}{dt}S(t) = k(t) \cdot S(t)$$

[0052]

[0053] 여기서 $S(t)$ 는 온전한 분극조건을 가질 확률이다.

[0054] 단위시간 t 에 대한 상기 $S(t)$ 는 세포가 분극하고 있을 확률 $P(t)$ 를 의미하며, 이는 아래 수학식 9로 표기될 수 있다.

[0055] [수학식 9]

$$P(t) = k(t) \cdot S(t) = k_0 \exp\left[\frac{\gamma t}{f_0} - \frac{f_0 k_0}{\gamma} \exp\left(\frac{\gamma t}{f_0}\right)\right]$$

[0056]

[0057] 상기 회귀분석은 선형회기분석일 수 있다.

[0058] 상기 활성화 에너지는 아래 수학식 11로 표기될 수 있다.

[0059] [수학식 11]

$$\Delta G = -k_B T \cdot \ln(\tau_p / \tau_0)$$

[0060]

[0061] 여기서 k_B 는 볼츠만 상수(Boltzmann's constant)이고,

[0062] T 는 절대 온도이며,

[0063] τ_p 는 외력이 존재하지 않을 때 분극에 대한 특징적 완화시간이고,

[0064] τ_0 은 자연적인 완화시간이다.

[0065] 상기 유전영동은 아래 수학식 1로 표기될 수 있다.

[0066] [수학식 1]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_{medi}r_{cell}^3 Re[CM] \nabla |E_{RMS}|^2$$

[0067]

[0068] 여기서 ϵ_{medi} 는 세포를 둘러싼 매질의 유전율이고,

[0069] r_{cell} 은 세포의 반지름이며,

[0070] CM 은 Clausius-Mossotti(CM) factor이고,

[0071] E_{RMS} 은 전기장 세기의 Root Mean Square 값이다.

[0073] 이하, 본 발명을 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

[0074] 단, 하기 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0076] <실험예 1> 유전영동칩에서 교류전기신호에 따른 세포의 움직임을 관측하여 교차주파수(cross-over frequency, f_{co}) 측정

[0077] 유전영동의 이론적인 힘은 아래의 수학적식 1을 따른다.

[0078] [수학적식 1]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_{medi}r_{cell}^3Re[CM]\nabla|E_{RMS}|^2$$

[0079]

[0080] 상기 수학적식 1에서 ϵ_{medi} 는 세포를 둘러싼 매질의 유전율, r_{cell} 은 세포의 반지름, CM 은 클라지우스-모조티 인자를 나타내고, E_{RMS} 는 칩 위의 전기장 세기의 실효값(Root Mean Square, RMS)을 의미한다.

[0081] f_{co} 는 세포의 클라지우스-모조티 인자(Clausius-Mossotti(CM) factor)가 0이 되는 주파수를 의미한다. 클라지우스-모조티 인자를 나타내는 식은 아래의 수학적식 2를 따르고, 유방암 세포인 MCF-7 세포의 클라지우스-모조티 인자는 도 1에서 나타내는 바와 같다.

[0082] [수학적식 2]

$$CM = (\epsilon_{cell}^* - \epsilon_{medi}^*)/(\epsilon_{cell}^* + 2\epsilon_{medi}^*)$$

[0083]

[0084] 상기 수학적식 2에서 ϵ_{cell}^* 및 ϵ_{medi}^* 는 각각 세포 및 세포를 둘러싼 매질의 복소유전율을 의미하고, ϵ_{cell}^* 를 구하는 식은 아래의 수학적식 3을 따른다.

[0085] [수학적식 3]

$$\epsilon_{cell}^* = \epsilon_{memb}^* \frac{[\lambda^3 + \{(\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{memb}^*)/(\epsilon_{cyto}^* + \epsilon_{memb}^*)\}]}{[\lambda^3 - \{(\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{memb}^*)/(\epsilon_{cyto}^* + \epsilon_{memb}^*)\}]}$$

[0086]

[0087] 상기 수학적식 3에서 ϵ_{memb}^* 및 ϵ_{cyto}^* 는 각각 세포막 및 세포질의 복소유전율을 의미한다. 여기에서 ϵ^* 을 구하는 식은 아래의 수학적식 4를 따른다.

[0088] [수학적식 4]

$$\epsilon^* = \epsilon + j(\sigma/\omega)$$

[0089]

[0090] 상기 수학적식 4에서 ϵ , σ , ω 은 각각 비유전율(relative permittivity), 전도도(conductivity), 각주파수를 나타낸다.

[0091] 상기 수학적식 3에서 λ 을 구하는 식은 아래의 수학적식 5를 따른다.

[0092] [수학적식 5]

$$\lambda = r_{cell}(r_{cell} - t)$$

[0093]

[0094] 상기 수학식 5에서 τ 는 세포막의 두께를 의미한다.

[0095] 세포의 움직임으로부터 f_{co} 값을 측정하는 과정에서 $Re[CM]$ 의 값이 연속적으로 변화할 수 있도록 입력전기 주파수를 증가 및 감소시켜야 한다. 구체적으로, MCF-7 세포의 경우 f_{co} 를 측정하기 위하여 60 μ S/cm의 전도도를 가진 물에 MCF-7 세포를 투여하여 희석하고 유전영동칩 위에 놓은 뒤, 칩의 양 끝단에 연결된 파형 발생기에 2 V_{p-p} 의 전압을 인가했다. 이후 클라지우스-모조티 인자의 실수부 $Re[CM]<0$ 을 가리키는 주파수(예를 들어, 1 kHz)와 $Re[CM]>0$ 을 가리키는 주파수(예를 들어, 41 kHz)를 선택하여 1 kHz부터 41 kHz까지 50, 100, 200, 400, 800, 1600 Hz/second의 비율로 증가시키며 세포의 움직임으로부터 f_{co} 를 관측했다.

[0097] <실험예 2> 측정된 f_{co} 를 동적 완화 주파수(dynamic relaxation frequency)로 변환

[0098] 실험예 1에서 관측한 f_{co} 를 Maxwell-Wagner 이론에 근거하여 동적 완화 주파수(dynamic relaxation frequency)로 변환하기 위해서는 아래의 수학식 6을 따른다.

[0099] [수학식 6]

$$\tau = \frac{1}{2\pi f_{co}}$$

[0100]

[0101] 교류전기주파수변화(예를 들어, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 Hz/second의 비율로 증가 또는 감소)에 의한 세포 유전분극이 시작되는데, 이는 외부전기장에 의한 세포막 안팎으로 유전분극이 발생하는 활성화 에너지(activation energy)와 연관이 있기 때문에, 세포의 유효 분극(effective polarizability)에 대한 완화시간(relaxation time)으로 해석할 수 있다.

[0103] <실험예 3> 세포의 움직임을 통해 유전영동 힘 변화율(dielectrophoretic force loading rate) 계산

[0104] 주어진 시간과 교류전기신호에서 고정된 세포의 위치에서 교류전기주파수변화(예를 들어, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 Hz/second의 비율로 증가 또는 감소)에 따른 세포 이동거리로부터 유전영동 힘 부하율(dielectrophoretic force loading rate)를 계산한다.

[0105] 유한요소해법을 적용한 유전영동칩에 주어진 교류전기주파수, 교류전압, 세포의 위치, 시간(예를 들어, 1초) 중 선택되는 것을 특징으로 하는 초기조건에 따른 세포의 전기장세기 변화도($\nabla |E|^2$)를 계산하여 힘 부하율을 추정했다. 계산 결과, 교류전기주파수변화조건 50, 100, 200, 400, 800, 1600 Hz/second는 0.22524, 0.45048, 0.90097, 1.80194, 3.60388, 7.20776 pN/second와 대응되는 것을 알 수 있다.

[0106] 실험예 2 및 3의 과정에서 유전영동 힘 부하율 정도에 따른 유방암 세포인 MCF-7 세포, 자궁경부암 세포인 HeLa 세포 및 폐암 세포인 A549 세포의 유전분극에 대한 동적 완화 시간은 도 3이 나타내는 바와 같다.

[0108] <실험예 4> 세포에서 유전영동에 의한 분극발생에 따른 활성화 에너지(ΔG) 분석

[0109] 전이 상태 이론(transition state theory) 및 벨 모델(Bell model)은 주어진 외부에너지에 대한 시스템의 반응율이란 관계식을 사용하여, 시스템의 활성화에너지의 변화를 에너지변화곡선(energy landscape)으로 표현할 수 있다.

[0110] 벨 모델에 근거하여 교류신호변화에 대한 세포의 분극과정에서의 운동률(kinetic rate)에 대한 외부힘을 아래의 수학식 7로 나타내었다.

[0111] [수학식 7]

$$k(t) = k_0 \exp\left(\frac{F \cdot \Delta x}{k_B T}\right) = k_0 \exp\left(\frac{\gamma t}{f_0}\right)$$

[0112]

[0113] 상기 수학식 7에서 k_0 은 외력이 존재하지 않는 상황에서의 분극율이며, F 는 외력, Δx 는 에너지 장벽 (energy barrier)의 두께, k_B 는 볼츠만 상수(Boltzmann's constant) 및 T 는 절대온도, γ 는 힘 부하율 ($\gamma = dF/dt$), f_0 은 기준힘(reference force)이다.

[0114] 세포분극과정은 1차 확률적인 과정(first-order stochastic process)으로 표현 가능하며, 이는 아래의 수학식 8로 표현 가능하다.

[0115] [수학식 8]

$$\frac{d}{dt}S(t) = k(t) \cdot S(t)$$

[0116]

[0117] 상기 수학식 8에서 $S(t)$ 는 온전한 분극조건을 가질 확률로, 단위시간 t 에 대한 $S(t)$ 는 세포가 분극하고 있는 확률 $P(t)$ 를 의미하며, 확률 함수 $S(t)$ 를 풀기 위해 상기 수학식 7의 $k(t)$ 를 대입하고 적분하여 $S(t)$ 를 구하면, 이는 하기 수학식 9로 표현할 수 있다.

[0118] [수학식 9]

$$P(t) = k(t) \cdot S(t) = k_0 \exp\left[\frac{\gamma t}{f_0} - \frac{f_0 k_0}{\gamma} \exp\left(\frac{\gamma t}{f_0}\right)\right]$$

[0119]

[0120] 아래의 유도된 수학식 10 및 아레니우스 식(Arrhenius equation)을 표현한 수학식 11를 이용하여 세포의 유전분극(dielectric polarization)에 대한 깁스에너지를 계산한다. 이때의 과정은 세포의 유전분극에 대한 완화시간이 $dP(t)/d(t)=0$ 일 때 대부분 발생한다.

[0121] [수학식 10]

$$\tau = \frac{f_0}{\gamma} \ln\left(\frac{\gamma}{k_0 f_0}\right)$$

[0122]

[0123] [수학식 11]

$$\Delta G = -k_B T \cdot \ln(\tau_p / \tau_0)$$

[0124]

[0125] 상기 수학식 11의 τ_p 는 외력이 존재하지 않을 때 분극에 대한 특징적 완화시간(characteristic relaxation time)을 의미하며, $1/k_0$ 으로 다르게 표현이 가능하다. τ_0 는 자연적인 완화시간(natural relaxation time)으로 $h/k_B T$ 로 근사화가 가능하다. 여기서 h 는 플랑크 상수 6.626×10^{-23} J/K, k_B 는 볼츠만 상수, T 는 절대 온도를 의미한다.

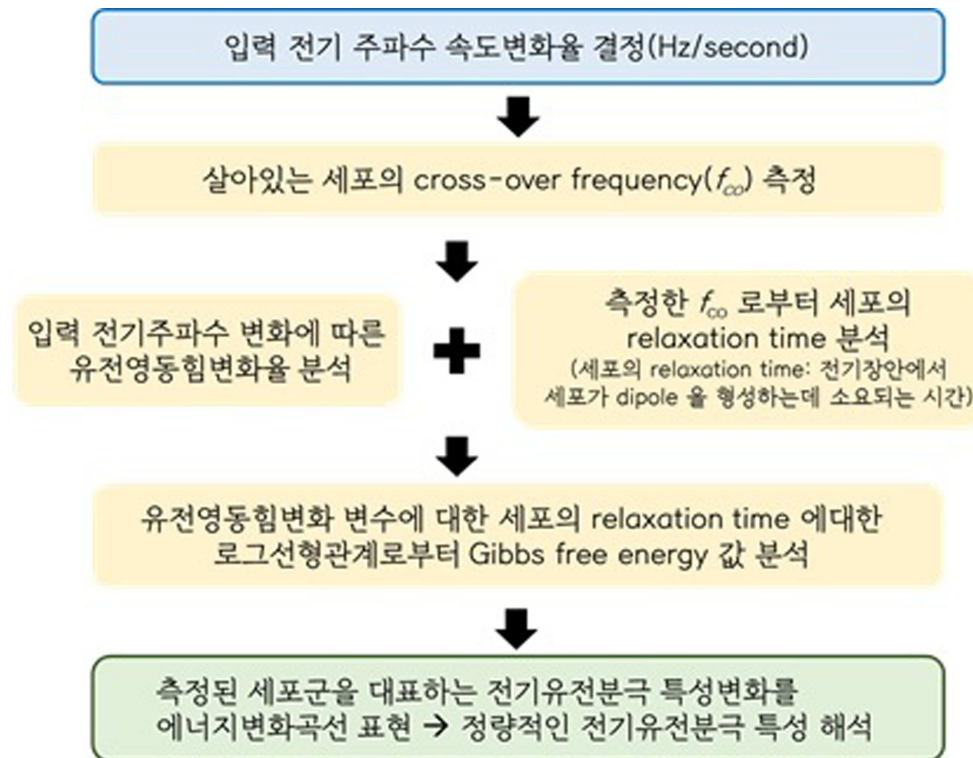
[0126] 상기 수학식 10에서 유전영동 힘 부하율(γ)을 양변에 곱하면, 기울기 f_0 을 갖는 γ 에 대한 1차 로그함수로

표현이 가능하며 이때의 γ 절편은 $-f_0 \ln(k_0 f_0)$ 이다. 상기 실험에 3에서 구한 세포의 동적 완화 시간 결과를 변형하여, $\gamma\tau$ 에 대한 실험 결과로부터 활성화 에너지(ΔG)를 도출할 수 있다. 상기 수학식 9을 변형한 선형회귀분석을 적용하여 1차 로그함수의 기울기 f_0 을 찾는 과정은 도 4에 나타난 바와 같다. 구체적으로, 유전영동 힘 부하율에 대한 실험결과를 잇는 추세선은 여러 로그 회귀식이 있다고 가정하고, 결과값에 가장 부합하는 로그 회귀식을 찾아낸다. MCF-7, HeLa 및 A549 세포의 경우, 유전영동 실험 결과에 대해서 회귀식의 적합성 정도를 표현하는 R 스퀘어(R-square) 수치가 가장 높은 2개의 로그 회귀식을 발견 및 취합하였다. 이로부터 세포에서 유전영동에 의한 분극발생에 따른 활성화 에너지(ΔG)를 분석한 결과는 도 5로 나타난 바와 같다.

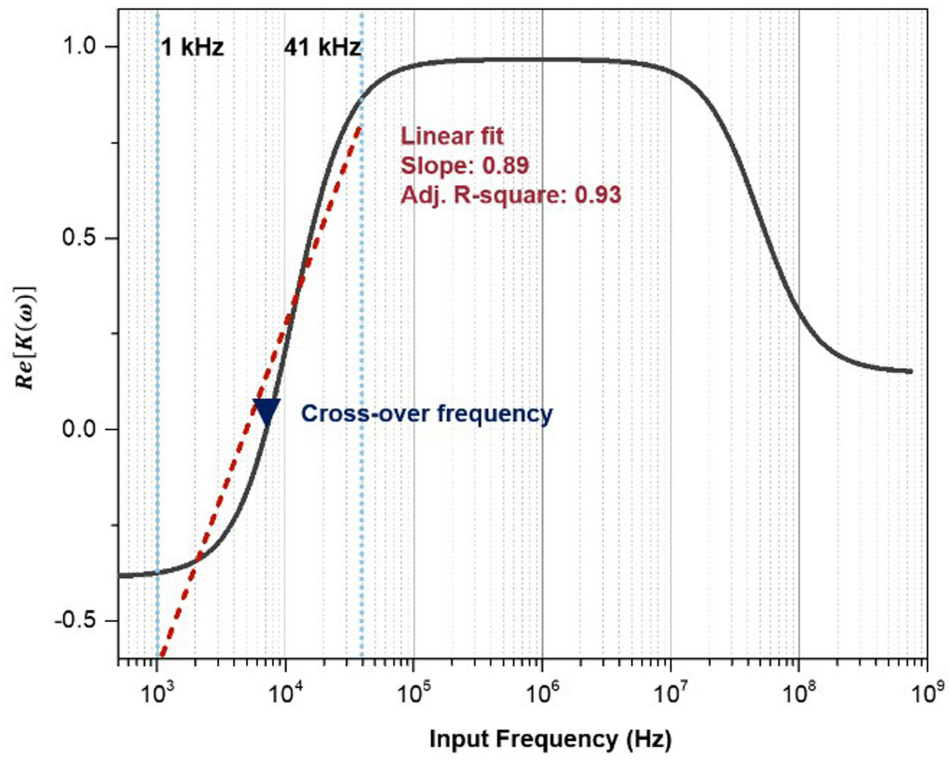
[0127] 주어진 초기조건으로부터 얻은 결과(예를 들어, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 Hz/second의 비율로 교류전기주파수를 증가 또는 감소시켜 얻은 f_0)로부터 계산된 힘 부하율힘 변화율힘 변화율화곡선 비교를 통하여 살아있는 세포가 상유전성(paraelectricity) 또는 강유전성(ferroelectricity)로 존재 여부 및 상태 변이 여부를 판단한다.

도면

도면1

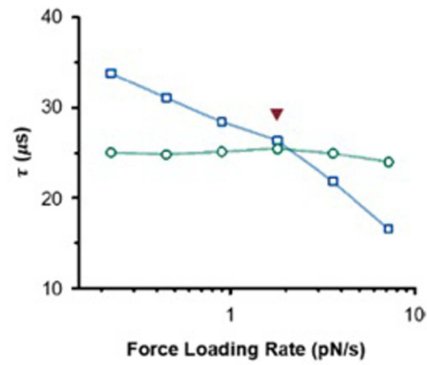
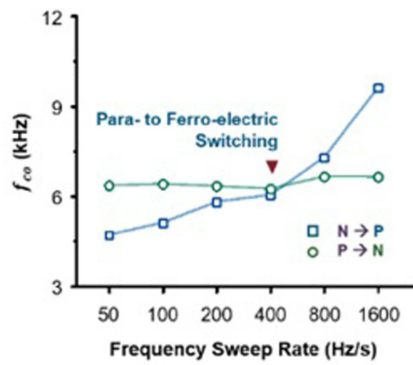


도면2

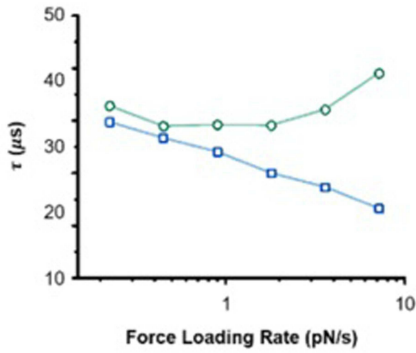
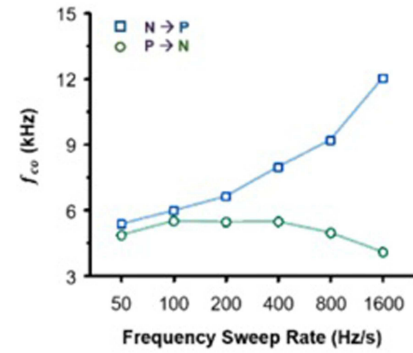


도면3

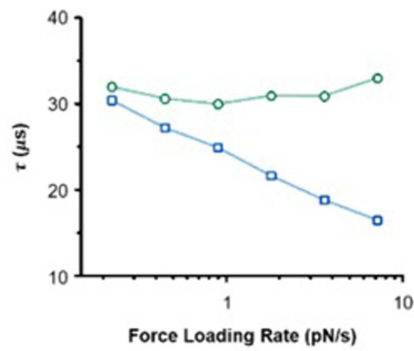
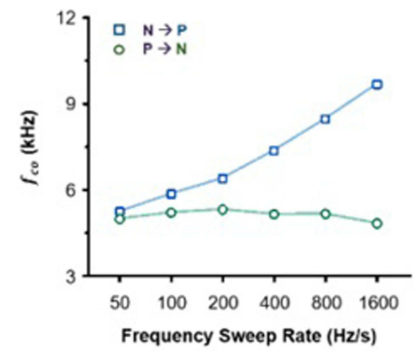
A. MCF-7 cell line



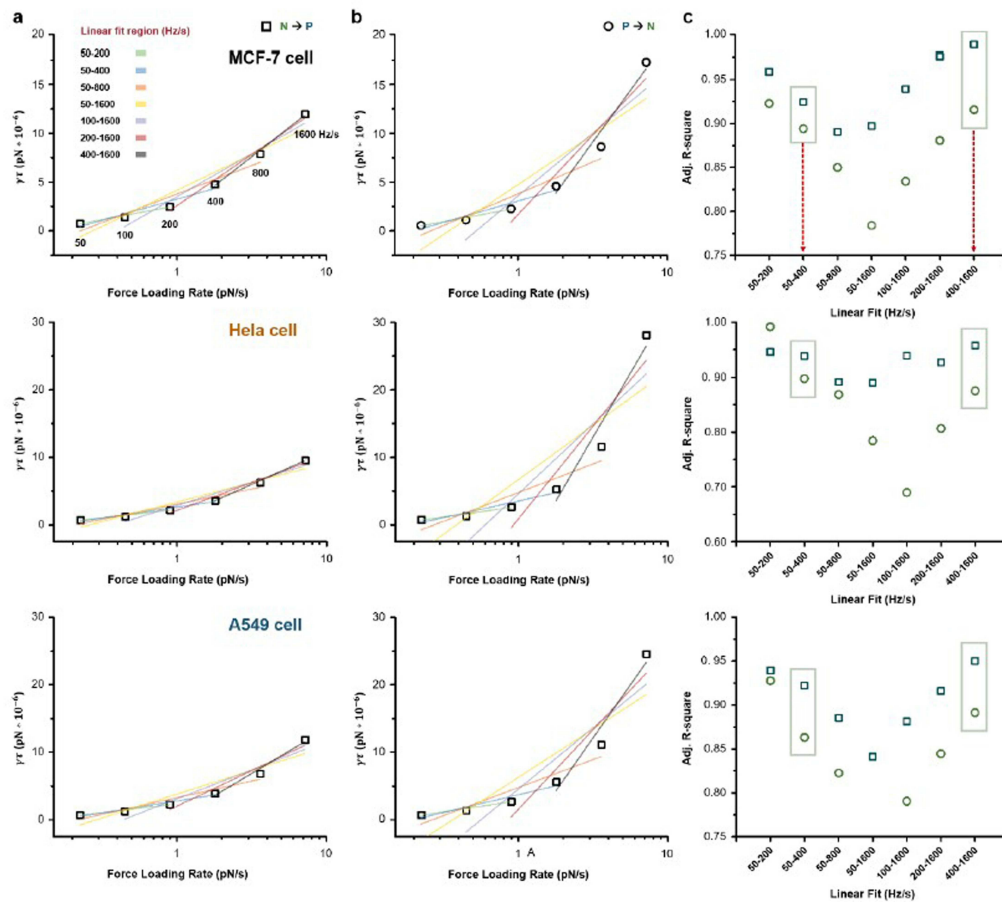
B. Hela cell line



C. A549 cell line



도면4



도면5

