



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월27일
(11) 등록번호 10-2244778
(24) 등록일자 2021년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/447 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 27/447 (2021.01)
G01N 33/483 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0108212
(22) 출원일자 2019년09월02일
심사청구일자 2019년09월02일
(65) 공개번호 10-2020-0026167
(43) 공개일자 2020년03월10일
(30) 우선권주장
1020180103525 2018년08월31일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
JP2006510020 A*
고관휘, 연세대학교 석사학위논문.(2018.02.28.)*
JP2003505106 A
JP2017134020 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
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
김보정

전체 청구항 수 : 총 15 항

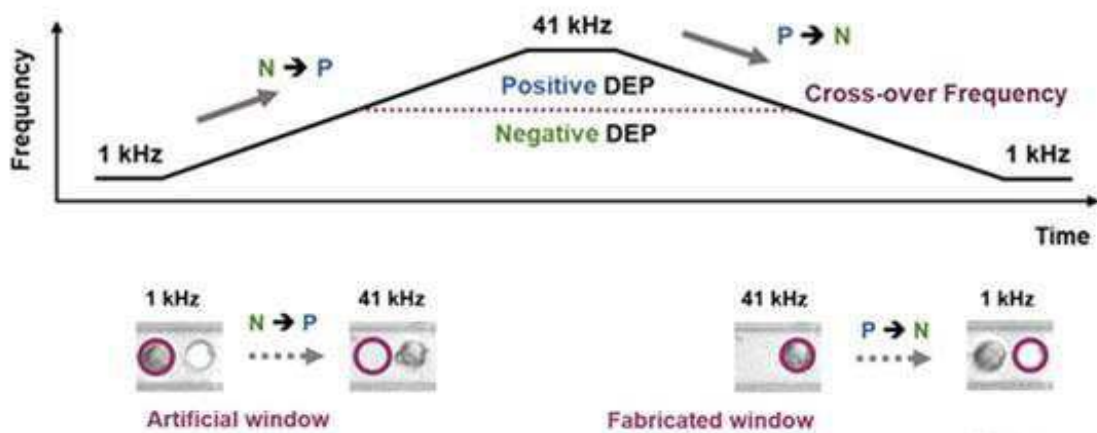
심사관 : 박성철

(54) 발명의 명칭 유전영동힘에 반응하는 세포의 위치변화를 이용한 세포의 교차주파수 측정방법

(57) 요약

본 발명은 세포의 교차주파수(cross-over frequency) 측정방법으로, 구체적으로 (a) 세포에 인가하는 교류주파수(AC frequency)를 선정하는 단계; (b) 선정된 교류주파수에서 각 세포를 촬영하여 분석하는 단계; (c) 분석된 세포의 그레이스케일 강도(grayscale intensity)를 측정하는 단계 (d) 인가하는 교류주파수를 변화시키면서 주파수 변화에 따른 그레이스케일 강도를 측정하는 단계; 및 (e) 단계 (a)에서 선정된 교류주파수의 그레이스케일 강도와 단계 (d)에서 측정된 그레이스케일 강도를 비교하는 단계를 포함하는, 세포의 교차주파수(cross-over frequency) 측정방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이상현

강원도 원주시 흥업면 세동길 10-9, 202호

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)

양세정

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 백운관 406호(연세대학교 원주캠퍼스)

고관휘

서울특별시 서대문구 연세로4길 46-7, 307

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2B2002076

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 Nucleic acid 복합체부터 세포특성 분석을 위한 DEP tweezers 기반 신개념 미세유체

칩 플랫폼 개발 및 응용연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 세포에 인가하는 교류주파수(AC frequency)를 선정하는 단계;
- (b) 선정된 교류주파수에서 각 세포를 촬영하여 분석하는 단계;
- (c) 분석된 세포의 그레이스케일 강도(grayscale intensity)을 측정하는 단계;
- (d) 인가하는 교류주파수를 변화시키면서 주파수 변화에 따른 그레이스케일 강도를 측정하는 단계; 및
- (e) 단계 (a)에서 선정된 교류주파수의 그레이스케일 강도와 단계 (d)에서 측정된 그레이스케일 강도를 비교하는 단계를 포함하는, 세포의 교차주파수(cross-over frequency) 측정방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)는 하기 식 (1)을 이용해 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor)의 값을 -1 내지 0으로 하는 교류주파수를 선정하는 것을 특징으로 하는 세포의 교차주파수 측정방법:

식 (1) : $CM = (\epsilon_{cell}^* - \epsilon_{medi}^*) / (\epsilon_{cell}^* + 2\epsilon_{medi}^*)$ (ϵ_{cell}^* , ϵ_{medi}^* 는 각각 세포, 미디움(medium)의 복합유전율).

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 단계 (a)는 상기 식 (1)을 이용해 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor) 실수부의 값을 가장 낮게 하는 교류주파수를 선정하는 것을 특징으로 하는 세포의 교차주파수 측정방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)는 각 세포를 촬영하여 세포의 위치를 분석하는 것을 특징으로 하는 세포의 교차주파수 측정방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)는 각 세포를 촬영하여 세포의 위치를 분석하여 각 세포의 구심점과 세포의 반지름을 사용하여 인위 윈도우 마스크(artificial window mask)를 정의하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포의 교차주파수 측정방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)는 각 세포를 촬영하여 세포의 위치를 분석하여 칩 표면 위에 식각 과정으로 제작한 원형구조물

내로 진입하는 특정 공정윈도우(fabricated window)를 정의하는 단계를 포함하는 것을 특징으로하는 세포의 교차주파수 측정방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 단계 (d)는 인가하는 교류주파수를 증가시키는 것을 특징으로 하는 세포의 교차주파수 측정방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 단계 (e)는 단계 (d)에서 교류주파수를 증가시키며 측정되는 그레이스케일 강도가 단계 (a)에서 선정된 인가 교류주파수에서의 그레이스케일의 평균값에 표준편차 3배를 더한 값보다 커지는 주파수(effective f_{co_NP})를 측정하는 단계인 세포의 교차주파수 측정방법.

청구항 9

제2항에 있어서,

상기 단계 (a)는 상기 식 (1)을 이용해 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor)의 값을 0.5 내지 1.5로 하는 교류주파수를 선정하는 것을 특징으로 하는 세포의 교차주파수 측정방법.

청구항 10

제2항에 있어서,

상기 단계 (a)는 상기 식 (1)을 이용해 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor) 실수부의 값이 가장 큰 값에서 교류주파수를 선정하는 것을 특징으로 하는 세포의 교차주파수 측정방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 단계 (d)는 인가하는 교류주파수를 감소시키는 것을 특징으로 하는 세포의 교차주파수 측정방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 단계 (e)는 단계 (d)에서 교류주파수를 감소시키며 측정되는 그레이스케일 강도가 단계 (a)에서 선정된 인가 교류주파수에서의 그레이스케일의 평균값에 표준편차 3배를 더한 값보다 커지는 주파수(effective f_{co_PN})를 측정하는 단계인 세포의 교차주파수 측정방법.

청구항 13

제8항에 있어서, effective f_{co_NP} 를 측정 직후 연속하여 effective f_{co_PN} 를 측정하는 단계를 실행하고,

여기에서, effective f_{co_PN} 는 단계 (d)에서 교류주파수를 감소시키며 측정되는 그레이스 케일 강도가 단계 (a)에

서 선정된 인가 교류주파수에서의 그레이스케일의 평균값에 표준편차 3배를 더한 값보다 커지는 주파수인, 교차 주파수 측정방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 교차주파수 측정방법에 따라 측정된 교차주파수를 분석하는 단계를 더 포함 하여 세포의 전기생리학적 특성을 분석하는 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 교차주파수 측정단계; 및

측정된 교차주파수를 초과하거나 또는 그 미만의 주파수를 인가하는 단계를 포함하는 세포의 흡착·분리 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전영동힘에 반응하는 세포의 트랩(trap) 위치변화를 이용한 세포의 교차주파수(cross-over frequency) 측정방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 살아있는 세포가 전기장에 노출이 되면, 세포안에 쌍극성(dipole)이 형성된다. 형성된 쌍극성과 전기장 사이의 상호작용으로 힘이 발생하게 되고, 그러한 힘은 세포를 di-polarized하게 만든다. 지금까지 설명한 현상을 유전 영동이라고 부르며, 그러한 힘을 유전영동힘(dielectrophoretic force, DEP force)이라고 한다. 유전영동 현상 에서 세포를 움직이게 하는 힘의 방향을 결정하는 요소는 Clausius-Mossotti factor의 실수부이다(Re[CM]). DEP force에 영향을 받는 세포의 반응을 추정하기 위하여, 세포의 모양은 구라고 가정한다. 구형태를 가지는 입 자에 대한 DEP force 식은 다음과 같다.

[0004] 살아있는 세포가 전기장에 노출이 되면, 세포안에 쌍극성(dipole)이 형성된다. 형성된 쌍극성과 전기장 사이의 상호작용으로 힘이 발생하게 되고, 그러한 힘은 세포를 di-polarized하게 만든다. 지금까지 설명한 현상을 유전 영동이라고 부르며, 그러한 힘을 유전영동힘(dielectrophoretic force, DEP force)이라고 한다. 유전영동 현상 에서 세포를 움직이게 하는 힘의 방향을 결정하는 요소는 Clausius-Mossotti factor의 실수부이다(Re[CM]). DEP force에 영향을 받는 세포의 반응을 추정하기 위하여, 세포의 모양은 구라고 가정한다. 구형태를 가지는 입 자에 대한 DEP force 식은 다음과 같다.

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_{medi}r_{Cell}^3Re[CM]\nabla|E_{RMS}|^2 \quad (1)$$

where ϵ_{medi} is the medium permittivity, r_{Cell} is the radius of a cell, CM is the Clausius-Mossotti (CM) factor, and

E_{RMS} is the RMS electric field.

[0005]

[0007] 이 때, Re[CM]에서 The CM factor model에서 세포에 대한 전기모델을 single shell model이라고 가정한다. 가 정했을때의 CM factor 식은 다음과 같다.

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

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

where ϵ_{cell}^* , ϵ_{medi}^* , ϵ_{memb}^* , and ϵ_{cyto}^* are the complex permittivity of the cell, the medium, cell membrane, and the cytoplasm and $\epsilon^* = \epsilon + j(\sigma/\omega)$ where ϵ , σ , and ω are the relative permittivity, conductivity, and angular frequency, respectively. λ is the scaling of cells described as $\lambda = r_{cell} / (r_{cell} - t)$, where t is the thickness of the cell membrane.

[0008]

[0010]

Re[CM]의 값은 인가하고 있는 전기장에 대해 세포와 세포를 둘러싸고 있는 액체(medium)가 각각 dielectric polarization이 되는 정도의 차이에 의하여 값이 결정되며, 인가하는 전기장의 주파수 변화에 의존하여 세포와 medium이 dielectric polarization이 되는 정도가 각각 다르게 반응한다. Re[CM]값이 양의 값을 가지면 세포는 주변을 둘러싸는 medium보다 강하게 dielectirc polarization되어 주어진 공간내에서 전기장의 세기가 가장 강한 곳으로 이동하려는 경향을 보이며, 반대로 Re[CM] 값이 음수를 가지면, 세포는 medium보다 약하게 dielectirc polarization이 되어 전기장의 세기가 가장 약한 곳으로 이동하려는 경향을 가진다.

[0011]

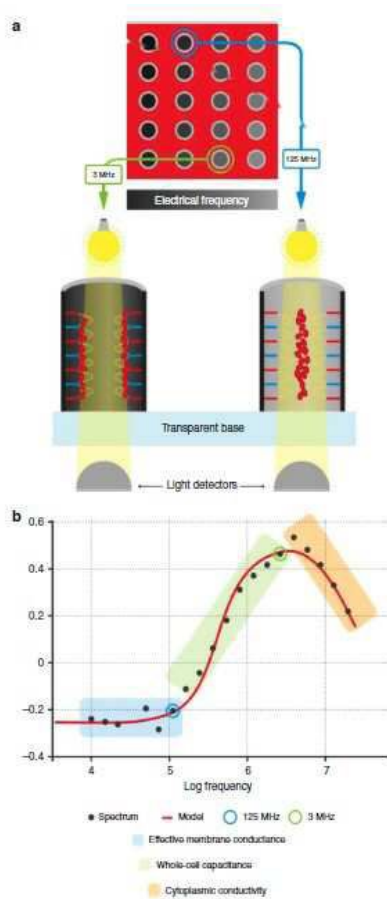
이러한 Re[CM]의 값을 결정하는 세포의 dielectric polarization은 세포를 구성하는 물질의 구성성분에 의존하기 때문에, 만약 세포가 외부환경요인에 의하여 세포를 구성하고 있는 성분의 변화가 발생한다면, 유전영동 기술을 이용하여 변화가 발생된 세포들을 구별할 수 있다. 예를 들어, 다양한 세포계(cancer cells, stem cells, bacteria 등)에서 각 세포가 가지고 있는 고유한 전기생리학적 특성 (electrophysiological properties)을 확인하였을 뿐만 아니라 apoptosis 기전물질, 세포막 이온채널의 기능 조절, medium 내 이온 농도에 따라 세포의 전기생리학적 특징 변화가 발생되었는지 여부를 확인하는 연구가 존재하였다.

[0012]

위의 진행된 연구에서 세포의 전기생리학적 특징 변화를 정량적으로 관측하기 위해 반드시 거쳐야 할 과정은 세포의 Re[CM]이 0이 되는 frequency(=cross-over frequency, f_{co})를 찾는 것이다. 세포의 f_{co} 를 찾게 되면, 세포의 membrane conductance를 모델을 통하여 추론할 수 있으며, Re[CM] 값의 경향성을 확인하여, 주어진 외부적 자극(예를 들어, 세포이온채널 활성 억제제)에 반응하여 세포의 세포막에서 발생하는 변화에 대한 해석이 가능해진다. 따라서 세포의 cross-over frequency를 정확하게 찾기 위한 방법을 정립하는 것은 중요하다고 볼 수 있다. 지금까지 세포의 움직임 변화를 분석하여 세포의 cross-over frequency를 정확하게 찾는 방법으로 크게 2가지로 분류할 수 있다.

[0014]

첫 번째 방법은 인가하는 AC 전기 주파수 변화에 따른 세포들의 전체적인 움직임 변화를 통해 관측하는 방법이 있다.



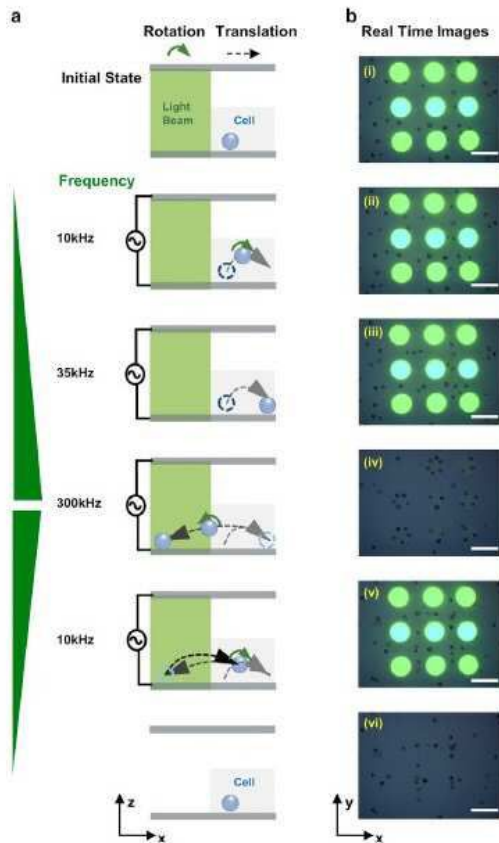
[0015]

[0016]

상기 그림 a와 같이 전극구조 안에 있는 세포들은 상대적으로 낮은 주파수(예를 들어 10 kHz)에서는 negative 유전영동힘에 영향을 받아 전극의 중앙부분에 모이게 되는데, 이때 전극구조를 투과하고 있는 빛의 세기는 세포들이 중앙에서 가리기 때문에, 약해진다. 반대로 상대적으로 높은 주파수(예를 들어 1 MHz)에서는 세포는 positive 유전영동 힘의 영향을 받아 전극의 가장자리 부분에 모이게 되며, 이때 전극 구조를 투과하고 있는 빛의 세기는 중앙부분을 차지하고 하고 있던 세포들이 전극 가장자리로 이동하면서 훨씬 빛이 잘 투과되기 때문에 빛의 세기는 증가하게 된다. 이러한 세포의 움직임에 비례하는 빛의 세기 변화를 정량화하면 상기 그림 b와 같은 곡선을 얻어낼 수 있으며, 이론적인 모델에 근거하여 세포의 cross-over frequency를 찾을 수 있다. 상기 방법의 장점으로서는 한번의 실험으로 유전영동힘에 대한 약 20,000개 세포반응을 알 수 있다고 주장하고 있고, 현재 상용화된 제품으로 출시되고 있다. 하지만, 유전영동힘에 대해 세포반응을 각각을 관측을 하지 못하며, 한 well 내에 존재하는 수백, 수천개의 세포들의 반응에 대하여 대표값으로 확인할 수 밖에 없다는 한계점이 있다.

[0018]

두번째 방법으로는 각 세포 하나하나의 이동하는 좌표를 추적하는 방법이 있다. 이러한 방법은 DEP force에 반응하는 세포의 이동방향이 다르다는 것에 착안한다. 구체적으로 DEP force가 양의 방향일 때는 전기장의 세기가 가장 강한곳으로 가며, DEP force가 음의 방향일 때는 전기장의 세기가 가장 약한 곳으로 가기 때문에 세포가 유전영동 힘에 반응하여 움직이는 궤적을 분석하여 속도를 추정하면, DEP force와 hydrodynamic drag force 식에 근거하여 AC 주파수 변화에 대한 $\text{Re}[CM]$ 파라미터값을 가정할 수 있다(하기 그림 참조).



[0019]

[0020]

하지만, 이러한 세포의 위치 추적 방식으로 구하는 방법의 경우, 상용화된 이미지 분석 프로그램(대표적으로 Image J)를 이용하여 분석하기 때문에, 일반적으로 입자의 궤적을 정확하게 분석하기 위해서는 세포 주변의 배경이 일정한 밝기를 유지해야 한다는 점, 전극모양이 주변에 있을 경우, 촬영한 모든 사진에서 각 세포의 위치를 정확하게 판별하기 위해서는 매우 많은 전처리 과정이 필요하다는 점에서 궤적 분석에 최적화된 환경을 제공하지 못하며, 분석하는 세포 수는 첫 번째 방법에 비해 적게 분석이 된다. 하지만, 유전영동힘에 대하여 각각의 세포에 대한 반응을 직접 관측하고 이를 통계적으로 분석하여 경향성을 확인하기 때문에, 적어도 관측한 세포군에 대한 대표값을 설명하기에는 부족함이 없다고 판단할 수 있다.

[0021]

다만, 첫 번째 방법에 의한 경우, 유전영동힘에 대한 세포 각각의 반응을 관측할 수 없다는 문제점이 있고, 두 번째 방법에 의한 경우, 분석하는 세포의 수가 적으며, 매우 많은 전처리과정이 필요하다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0023]

(특허문헌 0001) 한국특허등록 제10-1599606호

(특허문헌 0002) 한국특허공개 제10-2019-0024175호

비특허문헌

[0024]

(비특허문헌 0001) Rhythmic potassium transport regulates the circadian clock in human red blood cells, Erin A. et al., Nat. Commun. 8 (1), 1978(2017)

(비특허문헌 0002) Determination of Cell Membrane Capacitance and Conductance via Optically Induced Electrokinetics, Wenfeng Liang et al., Biophysical Journal 113 (7), 1531(2017)

(비특허문헌 0003) Label-Free Electric Monitoring of Human Cancer Cells as a Potential Diagnostic Tool. Anal. Chem. 88 (18), 9022(2016)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0025] 본 발명의 목적은 (a) 세포에 인가하는 교류주파수(AC frequency)를 선정하는 단계; (b) 선정된 교류주파수에서 각 세포를 촬영하여 분석하는 단계; (c) 분석된 세포의 그레이스케일 강도(grayscale intensity)을 측정하는 단계 (d) 인가하는 교류주파수를 변화시키면서 주파수 변화에 따른 그레이스케일 강도를 측정하는 단계; 및 (e) 단계 (a)에서 선정된 교류주파수의 그레이스케일 강도와 단계 (d)에서 측정된 그레이스케일 강도를 비교하는 단계를 포함하는, 세포의 교차주파수(cross-over frequency) 측정방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0027] 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여 (a) 세포에 인가하는 교류주파수(AC frequency)를 선정하는 단계; (b) 선정된 교류주파수에서 각 세포를 촬영하여 분석하는 단계; (c) 분석된 세포의 그레이스케일 강도(grayscale intensity)을 측정하는 단계; (d) 인가하는 교류주파수를 변화시키면서 주파수 변화에 따른 그레이스케일 강도를 측정하는 단계; 및 (e) 단계 (a)에서 선정된 교류주파수의 그레이스케일 강도와 단계 (d)에서 측정된 그레이스케일 강도를 비교하는 단계를 포함하는, 세포의 교차주파수(cross-over frequency) 측정방법을 제공함에 의해 달성된다.
- [0028] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (a)는 하기 식 (1)을 이용해 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor)의 값을 -1 내지 0으로 하는 교류주파수를 선정하는 단계이다.
- [0029] 식 (1) : $CM = (\epsilon_{cell}^* - \epsilon_{medi}^*) / (\epsilon_{cell}^* + 2\epsilon_{medi}^*)$ (ϵ_{cell}^* , ϵ_{medi}^* 는 각각 세포, 미디움(medium)의 복합유전율)
- [0030] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (a)는 상기 식 (1)을 이용해 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor) 실수부의 값을 가장 낮게 하는 교류주파수를 선정하는 단계이다.
- [0031] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (b)는 각 세포를 촬영하여 세포의 위치를 분석하는 단계이다.
- [0032] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (b)는 각 세포를 촬영하여 세포의 위치를 분석하여 각 세포의 중심점과 세포의 반지름을 사용하여 인위 윈도우 마스크(artificial window mask)를 정의하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (c)는 인위 윈도우(artificial window)을 통해 그레이스케일 강도를 구하는 단계이다.
- [0034] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (d)는 인가하는 교류주파수를 증가시키면서 그레이스케일 강도를 측정하는 단계이다.
- [0035] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (e)는 단계 (d)에서 교류주파수를 증가시키며 측정되는 그레이스케일 강도가 단계 (a)에서 선정된 인가 교류주파수에서의 그레이스케일의 평균값에 표준편차 3배를 더한 값보다 커지는 주파수(effective f_{co_NP})을 측정하는 단계이다.
- [0037] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (a)는 상기 식 (1)을 이용해 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor)의 값을 0.5 내지 1.5로 하는 교류주파수를 선정하는 단계이다.
- [0038] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (a)는 상기 식 (1)을 이용해 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor) 실수부의 값이 가장 큰 값에서 교류주파수를 선정하는 단계이다.
- [0039] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (d)는 인가하는 교류주파수를 감소시키면서 그레이스케일 강도를 측정하는 단계이다.
- [0040] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (e)는 단계 (d)에서 교류주파수를 감소시키며 측정되는 그레이스케일 강도가 단계 (a)에서 선정된 인가 교류주파수에서의 그레이스케일의 평균값에 표준편차 3배를 더한 값보다 커지는 주파수(effective f_{co_PN})을 측정하는 단계이다.
- [0041] 또한, 본 발명의 일 양태에서, effective f_{co_NP} 를 측정 직후 연속하여 effective f_{co_PN} 를 측정하는 단계를 실행

할 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 양태에서, 측정된 교차주파수를 분석하는 단계를 더 포함하여 세포의 고유전기생리학적 특성을 분석할 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 측정된 교차주파수를 이용한 바이오센서, 바이오칩, 랩온어칩(lab-on-a-chip)을 제공할 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 측정된 교차주파수를 이용한 세포의 흡착·분리 및 자기조립(self-assembly) 방법을 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0047] 본 발명에 따른 (a) 세포에 인가하는 교류주파수(AC frequency)를 선정하는 단계; (b) 선정된 교류주파수에서 각 세포를 촬영하여 분석하는 단계; (c) 분석된 세포의 그레이스케일 강도(grayscale intensity)을 측정하는 단계; (d) 인가하는 교류주파수를 변화시키면서 주파수 변화에 따른 그레이스케일 강도를 측정하는 단계; 및 (e) 단계 (a)에서 선정된 교류주파수의 그레이스케일 강도와 단계 (d)에서 측정된 그레이스케일 강도를 비교하는 단계를 포함하는 세포의 교차주파수(cross-over frequency) 측정방법은 한 번의 시행을 통해 수백개의 세포에 대하여 유전영동흡 반응을 관찰할 수 있으며, 복잡한 전극위에서 촬영한 사진에 대해 세포배치를 분석할 필요가 없으므로 분석과정이 단순화된다는 현저한 효과를 나타낸다. 또한, 측정된 세포의 교차주파수를 통해 세포의 전기생리학적 특성을 관측할 수 있다는 유용한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 세포의 f_{co} 를 찾기 위한 유전영동흡 인가방법을 나타낸 도이다.

도 2는 f_{co_NP} 를 정의하기 위한 분석방법을 나타낸 도이다.

도 3은 f_{co_PN} 을 정의하기 위한 분석방법을 나타낸 도이다.

도 4는 CM(Clausius-Mossotti) 식에 근거하여 얻은 f_{co} 와 본 발명의 방법으로 얻은 f_{co_NP} , f_{co_PN} 이 유사한 값을 얻을 수 있음을 확인한 도이다.

도 5는 전극 위 높이 9.8 μ m에서의 전기장 세기 분포 및 MCF-7 세포의 DEP force vector 분포를 나타낸 도이다

도 6은 MCF-7 세포의 dielectric property를 기입하여 Clausius-Mossotti factor의 실수값(Re[CM])을 주파수에 따라 나타낸 도이다.

도 7은 인가하는 DEP force에 따른 세포의 위치를 나타낸 도이다.

도 8은 f_{co} 를 분석하기 위한 유전영동 실험 전 후 살아있는 세포의 비율을 나타낸 도이다.

도 9는 f_{co_NP} 또는 f_{co_PN} 의 추정 실험 반복 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 세포의 trap 위치변화를 이용한 세포의 교차주파수 분석결과를 나타낸 도이다.

A : 인가하는 교류주파수의 변화에 따른 인위 윈도우 내 이미지의 grayscale intensity 평균값 분포

B : 인가교류주파수 변화에 따른 원형 모양의 전극 내 이미지의 grayscale intensity 평균값 분포

C : 도 10A에서 분석된 effective cross-over frequency의 히스토그램, 가우시안분포 평균 및 표준편차

D : 도 10B에서 분석된 effective cross-over frequency의 히스토그램, 가우시안분포 평균 및 표준편차

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하에는, 본 발명의 실시예와 각 단계를 상세하게 설명하되, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 발명을 용이하게 실시할 수 있을 정도로 상세하게 설명하기 위한 것이지, 이로 인해 본 발명의 기술적인 사상 및 범주가 제한되지 않는다.

[0052] 본 발명에서, 하기 용어가 의미하는 바에 대해서 설명한다. 이는 발명을 이해하기 위한 것으로, 용어의 의미는

설명되는 바에 의해 제한되지 않고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하는 용어의 의미를 포함한다.

[0053] “유전영동(Dielectrophoresis, DEP)”은 극성이 없는 입자가 불균일한 교류 전기장에 노출되었을 때 쌍극성(dipole)이 입자에 유도되며, 유도된 입자와 전기장 사이의 상호작용으로 인해 힘이 발생하며, 발생된 힘을 통해 세포가 분극화(polarization)되는 것을 말한다. 분극성(polarizability)이 입자 주위를 둘러싼 용액의 분극성보다 클 경우 입자는 전기장이 강한 곳으로 이동하고(양의 유전영동, positive DEP). 반대로 입자의 분극성이 용액의 분극성보다 작을 경우에 입자는 전기장의 세기가 약한 방향으로 이동한다(음의 유전영동, negative DEP).

[0054] “CM factor”는 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor)를 나타내는 것이다. 클로시우스-모소티 인자 모델(The CM factor model)에서 세포에 대한 전기모델을 단일 셸 모델(single shell model)이라고 가정했을 때의 CM factor 식은 다음과 같다.

[0055] 식 (1) : $CM = (\epsilon_{cell}^* - \epsilon_{medi}^*) / (\epsilon_{cell}^* + 2\epsilon_{medi}^*)$

[0056] 식 (2) : $\epsilon_{cell}^* = \epsilon_{memb}^* \frac{[\lambda^3 + \{(\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{memb}^*) / (\epsilon_{cyto}^* + \epsilon_{memb}^*)\}]}{[\lambda^3 - \{(\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{memb}^*) / (\epsilon_{cyto}^* + \epsilon_{memb}^*)\}]}$

[0057] 여기에서, ϵ_{cell}^* , ϵ_{medi}^* , ϵ_{memb}^* , ϵ_{cyto}^* 는 각각 세포, 미디움(medium), 세포막, 세포질의 복합유전율을 나타내고, $\epsilon^* = \epsilon + j(\sigma / \omega)$ 이고, ϵ 은 상대유전율, σ 는 전도도, ω 는 각주파수를 의미한다. λ 는 $\lambda = r_{cell} / (r_{cell} - t)$ 이고, t 는 세포막의 두께를 의미한다.

[0059] “Re[CM]”은 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor)의 실수부를 의미하고, 유전영동현상에서 세포를 움직이게 하는 힘의 방향을 결정하는 요소이다.

[0060] DEP force에 영향을 받는 세포의 반응을 추정하기 위하여, 세포의 모양은 구라고 가정하고, 구형태를 가지는 입자에 대한 DEP force 식은 다음과 같다.

[0061] 식 (3) : $F_{DEP} = 2\pi\epsilon_{medi}r_{cell}^3 Re[CM] |E_{RMS}|^2$

[0062] 여기에서, F_{DEP} 는 유전영동힘(DEP force), ϵ_{medi} 는 미디움(medium)유전율, Re[CM]은 클로시우스-모소티 인자의 실수부, E_{RMS} 는 전기장의 제곱평균제곱근(root mean square, rms)을 나타낸다.

[0064] 본 발명은 (a) 세포에 인가하는 교류주파수(AC frequency)를 선정하는 단계; (b) 선정된 교류주파수에서 각 세포를 촬영하여 분석하는 단계; (c) 분석된 세포의 그레이스케일 강도(grayscale intensity)를 측정하는 단계; (d) 인가하는 교류주파수를 변화시키면서 주파수 변화에 따른 그레이스케일 강도를 측정하는 단계; 및 (e) 단계 (a)에서 선정된 교류주파수의 그레이스케일 강도와 단계 (d)에서 측정된 그레이스케일 강도를 비교하는 단계를 포함하는 세포의 교차주파수(cross-over frequency) 측정방법을 제공한다.

[0066] 이어서, 상기에서 언급된 각 단계의 공정에 대하여 보다 상세하게 설명한다.

[0068] 본 발명에 따른 일 양태에서, 상기 단계 (a)에서 세포에 인가하는 교류주파수를 선정하는 단계는, 교류 주파수를 선정하기 위하여 유전영동 칩 위에 저수조를 올려둔 뒤, 세포를 포함하는 용액을 넣은 후 CCD 카메라를 이용하여 유전영동 칩 위에 올려진 세포를 관찰하는 단계를 포함한다. 또한, 상기 저수조는 폴리디메틸실록산(Polymethylsiloxane, PDMS)으로 만들어진 것일 수 있다.

[0069] 본 발명에 따른 일 양태에서, 상기 단계 (a)에서 교류주파수는 하기 식 (1)을 이용해 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor)의 값을 -1 내지 0으로 하는 교류주파수일 수 있다.

[0070] 식 (1) : $CM = (\epsilon_{cell}^* - \epsilon_{medi}^*) / (\epsilon_{cell}^* + 2\epsilon_{medi}^*)$

[0071] 식 (1)에서 ϵ_{cell}^* , ϵ_{medi}^* 는 각각 세포, 미디움(medium)의 복합유전율을 나타낸다.

- [0073] 본 발명에 따른 일 양태에서, 상기 단계 (a)에서 교류주파수는 상기 식 (1)에서 클로시우스-모소티 인자의 실수부($\text{Re}[CM]$) 값을 가장 낮게 하는 교류주파수일 수 있다. 세포의 CM factor의 값이 -0.5에 근접하는 경우 또는 가장 낮은 경우의 교류주파수에서 Negative 유전영동힘을 효과적으로 세포에 전달할 수 있어 세포의 교차주파수를 측정하는데 효율적이다. 보다 구체적으로, MCF-7 세포가 주어진 환경(세포를 둘러싼 버퍼의 전도도, 세포의 건강상태)에서 MCF-7세포의 전도도가 $60 \mu\text{S}/\text{cm}$ 이고, 교류주파수가 1 kHz 일 때 가장 낮은 음의 $\text{Re}[CM]$ 을 나타낸다.
- [0074] 본 발명에 따른 일 양태에서, 상기 단계 (a)에 이어서 인가하는 교류주파수의 조건을 계속 유지하여 세포의 움직임을 촬영 및 분석하는 단계를 통해 인가전압을 정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 인가하는 교류주파수의 조건을 유지하는 시간은 1분 내지 3분일 수 있으며, 인가하는 전압은 1 내지 3 V_{p-p} 일 수 있으며, 하기 기준에 의해 변경될 수 있다. 보다 더 구체적으로, MCF-7 세포에 대하여 교류주파수를 2분동안 2 V_{p-p} 인가하여 세포의 움직임을 촬영 및 분석할 수 있다. 상기 세포의 움직임을 촬영 및 분석하여 세포가 원형모양의 전극 사이에 위치하며, 도 7에서와 같이 구심점을 중심으로 움직이는 것을 확인할 수 있다. 이 때 세포의 예상방향을 유한요소해법을 적용하여 Negative DEP 벡터를 나타낼 수 있다.
- [0075] 상기 인가 전압을 정하는 기준은 1) 세포가 전압에 약 2시간동안 노출된 이후 살아있는 세포들의 수가 약 90% 이상인지 여부, 2) 세포의 모양이 눈에 띄게 변화하지 않는지 여부, 3) 유전영동힘의 방향과 크기에 따라 세포가 잘 이동하는지 여부에 따라 인가 전압을 정할 수 있다. 또한, 인가전압은 세포가 포함된 용액의 구성성분에 따라 변화될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (b)는 유체 내에서 움직이는 세포의 위치를 상용화된 영상처리프로그램을 사용하여 세포의 위치를 분석하는 것을 의미하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 움직이는 세포의 위치좌표(x, y) 각각을 히스토그램으로 표현하고 가우시안분포(Gaussian distribution) 여부를 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있다. 이 때, x, y 좌표에 대한 가우시안분포의 중앙값을 구심점으로 한다.
- [0078] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (b)는 인위 윈도우 마스크(artificial window mask)를 정의하는 단계를 포함할 수 있다. 인위 윈도우 마스크는 각 세포의 구심점과 세포의 반지름을 사용하여 정의되고, '1', '0' 으로 구성되며, 구심점으로부터 세포의 반지름 안에 해당하는 영역을 '1', 그 외의 영역을 '0' 으로 하는 것을 말한다.
- [0080] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (c)의 그레이스케일 강도(grayscale intensity)는 분석된 세포를 이용한 인위 윈도우 마스크(artificial window mask)를 통해 그레이스케일 강도를 측정하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 인위 윈도우 마스크를 원본 세포촬영이미지와 합성하여 각 인위 윈도우 안에서 그레이스케일 강도의 평균과 표준편차를 측정하는 것일 수 있다. 그레이스케일 강도는 그레이스케일(grayscale)을 통해서 측정하며, 인가 교류주파수에서 세포는 인위 윈도우 내에 위치하므로 윈도우 내의 그레이스케일 강도는 가우시안분포를 따르게 된다.
- [0081] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (d)에서 인가하는 교류주파수를 증가시키면서 그레이스케일 강도를 측정하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 인가하는 교류주파수를 증가시키면서 세포의 움직임을 촬영하고 인위 윈도우 마스크와 합성하여, 그레이스케일 강도의 변화를 측정하는 것일 수 있다. 또한, 본 발명의 인가하는 교류주파수의 시작 주파수는 버퍼의 조성이 바뀌어 미디움(medium)의 전도도가 변하는 경우 또는 약물에 의하여 세포의 전도도가 변하는 경우 변경될 수 있다. 시작 주파수는 시작주파수로 정하고자 하는 조건에서 대부분의 세포가 주어진 칩에서 가장 전기장의 세기가 가장 낮은 곳을 중심으로 고정되어 있는지 여부를 통해서 정할 수 있다.
- [0082] 단계 (e)는 추가로 주파수 변화에 따라 측정한 그레이스케일 강도를 상기 단계 (a)에서 인가하는 교류주파수에서의 그레이스케일 강도와 평균 및 표준편차를 각각 비교하는 것을 말한다. 보다 구체적으로 상기 단계 (a)에서의 그레이스케일 평균값에 표준편차를 3배를 더한 값보다 커지는 주파수 선정하는 것을 포함할 수 있다.
- [0083] 본 발명에서 “effective f_{co_NP} ” 는 상기 단계를 통해 측정되는 그레이스케일 강도의 비교를 통해서 측정되는 값으로, 단계 (d)에서 교류주파수를 증가시키며 측정되는 그레이스케일 강도가 단계 (a)에서 선정된 인가 교류주파수에서의 그레이스케일의 평균값에 표준편차 3배를 더한 값보다 커지는 주파수를 의미한다.
- [0085] 본 발명에 따른 일 양태에서, 상기 단계 (a)에서 교류주파수는 상기 식 (1)을 이용해 클로시우스-모소티 인자의 값을 0.5 내지 1.5로 하는 교류주파수일 수 있다.
- [0086] 본 발명에 따른 일 양태에서, 상기 단계 (a)에서 교류주파수는 상기 식 (1)에서 클로시우스-모소티 인자의 실수

부($\text{Re}[\text{CM}]$) 값이 가장 큰 교류주파수일 수 있다. 세포의 CM factor의 값이 최소 0.5 이상인 경우 또는 가장 큰 교류주파수인 경우 Positive 유전영동힘을 효과적으로 세포에 전달할 수 있어 세포의 교차주파수를 측정하는데 효율적이다. 보다 구체적으로, MCF-7 세포가 주어진 환경(세포를 둘러싼 버퍼의 전도도, 세포의 건강상태)에서 MCF-7 세포의 전도도가 $60 \mu\text{S}/\text{cm}$ 이고, 교류주파수가 41 kHz 일 때 비교적 큰 양의 $\text{Re}[\text{CM}]$ 을 나타낸다.

[0087] 또한, 상기 단계 (a)에 이어서 인가하는 교류주파수의 조건을 계속 유지하여 세포의 움직임을 촬영 및 분석하는 단계를 통해 인가전압을 정하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 상기 세포의 움직임을 촬영 및 분석하여 세포가 원형모양의 전극 사이에 위치하며, 도 7에서와 같이 구심점을 중심으로 움직이는 것을 확인할 수 있다. 이 때 세포의 예상방향을 유한요소해법을 적용하여 Positive DEP 백터를 나타낼 수 있다.

[0088] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (d)에서 인가하는 교류주파수를 감소시키면서 그레이스케일 강도를 측정하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 인가하는 교류주파수를 감소시키면서 세포의 움직임을 촬영하고 인위 윈도우 마스크와 합성하여, 그레이스케일 강도의 변화를 측정하는 것일 수 있다. 또한, 본 발명의 인가하는 교류주파수의 시작 주파수는 버퍼의 조성이 바뀌어 미디움(medium)의 전도도가 변하는 경우 또는 약물에 의하여 세포의 전도도가 변하는 경우 변경될 수 있다. 시작 주파수는 시작주파수로 정하고자 하는 조건에서 대부분의 세포가 주어진 칩에서 가장 전기장의 세기가 가장 높은 곳을 중심으로 고정되어 있는지 여부를 통해서 정할 수 있다.

[0089] 단계 (e)는 추가로 주파수 변화에 따라 측정한 그레이스케일 강도를 상기 단계 (a)에서 인가하는 교류주파수에서의 그레이스케일 강도와 평균 및 표준편차를 각각 비교하는 것을 말한다. 보다 구체적으로 상기 단계 (a)에서의 그레이스케일 평균값에 표준편차를 3배를 더한 값보다 커지는 주파수 선정하는 것을 포함할 수 있다.

[0090] 본 발명에서 “effective $f_{\text{co_PN}}$ ” 은 상기 단계를 통해 측정되는 그레이스케일 강도의 비교를 통해서 측정되는 값으로, 단계 (d)에서 교류주파수를 감소시키며 측정되는 그레이스케일 강도가 단계 (a)에서 선정된 인가 교류주파수에서의 그레이스케일의 평균값에 표준편차 3배를 더한 값보다 커지는 주파수를 의미한다.

[0092] 또한, 본 발명의 일 양태에서, effective $f_{\text{co_NP}}$ 를 측정하는 단계 직후 연속하여 effective $f_{\text{co_PN}}$ 를 측정하는 단계를 실행하는 교차주파수 측정방법일 수 있다.

[0094] 본 발명의 일 양태에서, 상기 측정방법으로 측정된 주파수를 분석하여 경향성을 파악하며, 이를 통해 세포의 고유 전기생리학적 특성(electrophysiological properties)을 분석할 수 있다. 주어진 외부적 자극에 반응하여 세포의 세포막에서 발생하는 변화에 대한 해석이 가능하다. 세포체는 암 세포(cancer cell), 줄기세포(stem cell), 박테리아(bacteria), 바이러스(virus) 등 제한이 없으며, 고유 전기생리학적 특성을 밝힘으로써, 외부환경요인에 의한 세포의 변화를 구별할 수 있다.

[0095] 또한, 상기 측정방법에 의해 측정된 주파수 및 세포 고유전기생리학적 특성을 이용하여, 미세 유체 공학, 바이오 센서, 바이오칩, 랩온어칩(lab-on-a-chip)에 이용될 수 있다. 또한, 세포의 흡착 및 분리, 자기조립(self-assembly)에 이용될 수 있다.

[0097] 이하에서는, 본 발명에 따른 교차주파수의 측정방법을 실시예를 들어 설명하기로 한다. 다만, 본 발명이 하기 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0099] <실시예 1> $f_{\text{co_NP}}$ 값의 측정

[0100] <실시예 1-1> 인가하는 교류주파수 선정

[0101] 실험을 위하여 유전영동 칩 위에 PDMS(Polydimethylsiloxane) 저수조를 올려둔 뒤, 세포가 포함된 용액을 넣고 커버글라스로 밀폐시켰다. 이후 Top view 방향에서 CCD(Charge Coupled Device) 카메라를 이용하여 칩 표면에 현미경 대물렌즈의 초점이 맞도록 조정하며, 세포가 칩 표면 위에 위치할 때까지 기다렸다.

[0102] 상기 식(1)에 근거하여 관측하고자 하는 세포의 CM factor 음의값이 -0.5 에 근접하거나 CM factor 값을 가장 낮게 하는 교류주파수를 선정하였다. MCF-7 세포는 주어진 환경(세포를 둘러싼 buffer의 conductivity, 세포의 건강상태)에서 AC 1 kHz 일때 가장 낮은 음의 $\text{Re}[\text{CM}]$ 값을 가진다. (식(1)에서 MCF-7 cell, conductivity $60 \mu\text{S}/\text{cm}$, $\text{Re}[\text{CM}]$ 값 약 -0.5로 추정하였음)

[0103] 해당 주파수(1 kHz)에서의 약 2분동안 $2 V_{\text{p-p}}$ 인가 이후 인가주파수 조건을 계속 유지하고 약 100초동안의 움직임을 촬영 및 분석한 결과, 세포들은 원형모양의 전극 사이에 위치하며 도 2b와 같이 구심점을 중심으로 움직이는 것을 확인할 수 있었다(도7 Negative DEP 촬영사진). 세포가 negative 유전영동힘의 영향력을 받고 있으며,

이때의 세포의 예상방향을 유한요소해법을 적용하여 도 5 Negative DEP 벡터(초록색)으로 나타내었다. 이번 실험에서는 가장 살아있는 세포의 수가 많고, 인가 이후 세포의 모양의 변화가 적으며, 유전영동힘의 방향과 크기에 세포가 잘 반응하는 2.0 V_{p-p}를 설정하였다.

[0105] <실시예 1-2> 선정된 교류주파수에서 각 세포의 구심점과 반지름 분석

[0106] 유체내에서 움직이는 세포의 위치를 상용화된 영상처리프로그램을 사용하여 세포의 위치를 분석하고, 움직이는 세포의 위치좌표(x, y) 각각을 히스토그램으로 표현하고 가우시안분포여부를 확인하였다 (도 2b). 이때의 x, y 좌표에 대한 가우시안분포도의 중앙값을 구심점이라고 정의하였다.

[0108] <실시예 1-3> 세포의 그레이스케일 강도를 측정하여 f_{co_NP} 측정

[0109] 각 세포의 구심점과 세포의 반지름을 사용하여 artificial window mask 를 정의하였다. 정의한 window mask 는 '1' , '0 ' 으로 구성되며, 구심점으로부터 세포의 반지름 안에 해당하는 영역은 '1' , 그외는 '0' 으로 하였다. 정의한 artificial window mask 를 원본 세포촬영이미지와 합성하여 각 artificial window 안에서 그레이스케일 강도 (grayscale intensity)의 평균과 표준편차를 기록하였다.

[0110] 인가교류주파수를 증가시키면서(1 kHz → 41 kHz) 세포의 움직임을 촬영하고, 정의한 artificial window mask와 합성하여, 주파수 변화에 대한 각각의 artificial window 안에서의 그레이스케일 강도의 변화를 측정 및 비교하였다. 주파수변화에 따라 측정한 그레이스케일 강도들을 1 kHz 인가주파수에서의 평균 및 표준편차 그레이스케일 강도와 각각 비교하였다. 구체적으로 1 kHz 인가주파수에서의 그레이스케일의 평균값에 표준편차 3배를 더한 값보다 커지는 인가주파수를 해당 세포가 가지는 effective f_{co_NP} 로 하였다.

[0112] <실시예 2> f_{co_PN} 값의 측정

[0113] <실험예 2-1> 인가하는 교류주파수 선정

[0114] Negative 유전영동힘에 의한 effective f_{co_NP} 측정 실험을 끝낸 직후에 이어서 effective f_{co_PN} 을 정의하기 위한 실험을 진행하였다.

[0115] 식(1)에 근거하여 관측하고자하는 세포의 CM factor 의 양의값이 최소 +0.5 이상 또는 그 값이 가장 큰 교류주파수를 선정하였다. AC 41 kHz는 주어진 환경(세포를 둘러싼 buffer의 conductivity, 세포의 건강상태)에서 MCF-7의 양의 Re[CM] 값이 비교적 큰 주파수에 해당하였다(MCF-7 cell, conductivity 60 μ S/cm, Re[CM] 값 약 0.8 으로 추정함). 해당 주파수(41 kHz)에서 움직임을 촬영 및 분석한 결과, 도 3b 와 같이 세포들은 원형모양의 전극안에 위치 및 움직이는것을 확인할 수 있었다. 이는 세포가 positive 유전영동힘의 영향력을 받고 있으며, 이때의 세포의 예상방향을 유한요소해법을 적용하여 도 5 Positive DEP 벡터(파랑색)으로 나타내었다.

[0117] <실시예 2-2> 선정된 교류주파수에서 각 세포의 구심점과 반지름 분석

[0118] 유체내에서 움직이는 세포의 위치를 상용화된 영상처리프로그램을 사용하여 세포의 위치를 분석하고, 움직이는 세포의 위치좌표(x, y) 각각을 히스토그램으로 표현하고 가우시안분포여부를 확인하였다 (도 2b). 이때의 x, y 좌표에 대한 가우시안분포도의 중앙값을 구심점이라고 정의하였다.

[0120] <실시예 2-3> 세포의 그레이스케일 강도를 측정하여 f_{co_PN} 측정

[0121] 선정된 교류 주파수(41 kHz) 에서 각 원형모양의 전극안에 위치한 그레이스케일 강도의 변화를 측정하였다. 해당 주파수(41 kHz)에서의 약 2분동안 인가 이후 인가주파수 조건을 계속 유지하고 약 100초동안 각 원형모양의 전극안에 위치한 그레이스케일 강도의 평균값을 관측한 결과는 도 3d와 같다. 각각의 평균 그레이스케일 강도의 분포는 가우시안분포를 따라 평균값과 표준편차를 가졌다.

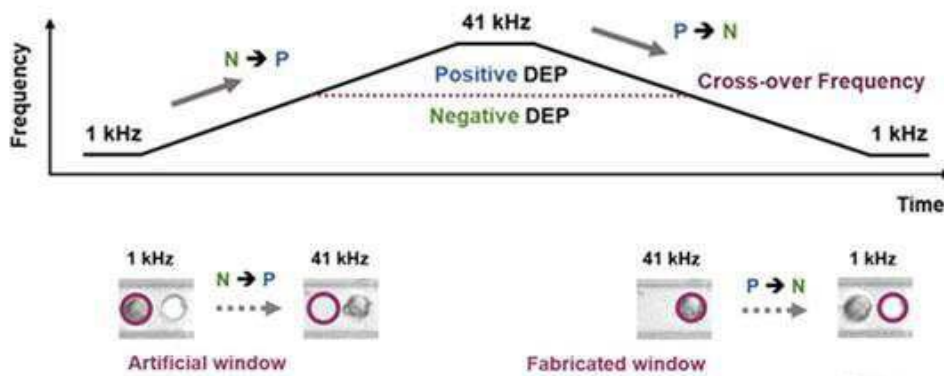
[0122] 인가교류주파수를 감소시키며(41 kHz → 1 kHz) 세포의 움직임을 촬영하고, 교류주파수 변화에 대한 각 원형모양의 전극안에 위치한 그레이스케일 강도의 변화를 측정 및 비교하였다. 주파수변화에 따라 측정한 그레이스케일 강도를 41 kHz 인가주파수에서의 그레이스케일 강도들과 각각 비교하였다. 구체적으로 41 kHz 인가주파수에서의 그레이스케일의 평균값에 표준편차 3배를 더한 값보다 커지는 인가주파수를 해당 세포가 가지는 effective f_{co_PN} 로 하였다.

[0124] <실시예 3> f_{co_NP} 및 f_{co_PN} 값 측정결과

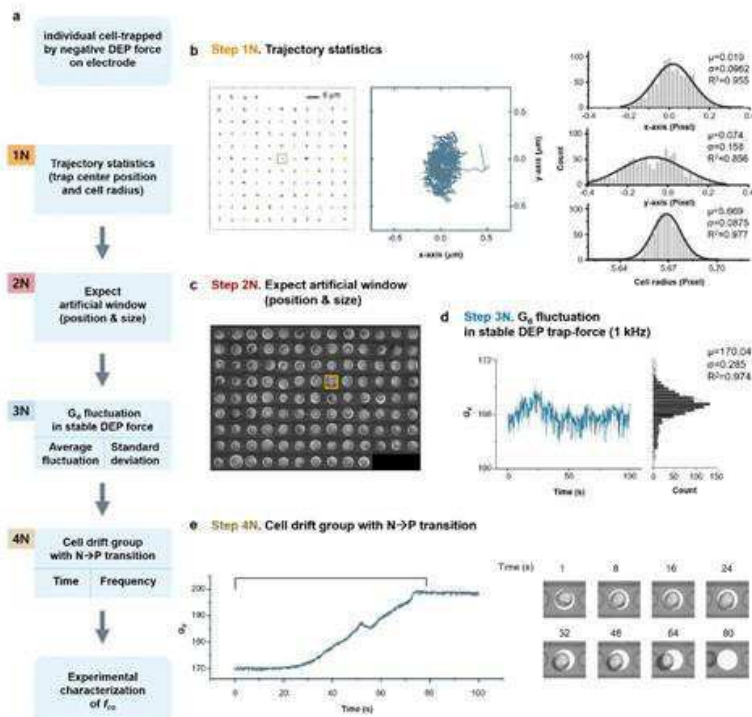
- [0125] 약 150개 이상의 MCF-7 세포의 effective f_{co_NP} 는 10.97 kHz 에서 분포하며, effective f_{co_PN} 는 7.05 kHz 에서 분포하였다. 해당 실험을 서로 다른 chip 에서 3번 반복하고 분석한 결과 역시 같은 값을 가지는 것으로 확인하여 반복되는 결과임을 확인하였다. 또한, 이 결과는 수식(1)에 근거한 f_{co} 값과 유사함을 확인할 수 있다.
- [0126] 해당 실험 및 분석방법을 적용하여 다른 세포(Hela, A549)의 effective f_{co_NP} 및 f_{co_PN} 의 결과는 도 4와 같으며 결과는 식(1)에 근거한 f_{co} 값과 유사한 것을 확인하였다.
- [0128] 따라서, 본 발명에 따라 측정된 MCF-7, Hela, A549 세포의 effective f_{co_NP} , effective f_{co_PN} 값은 수식을 통해 이론적으로 계산된 f_{co} 값과 유사한 것을 확인하였다.

도면

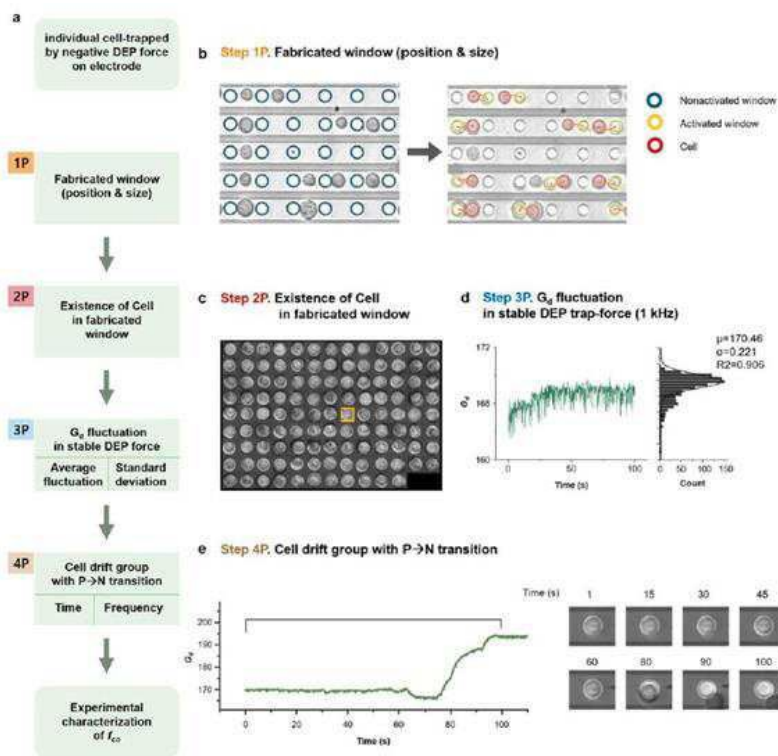
도면1



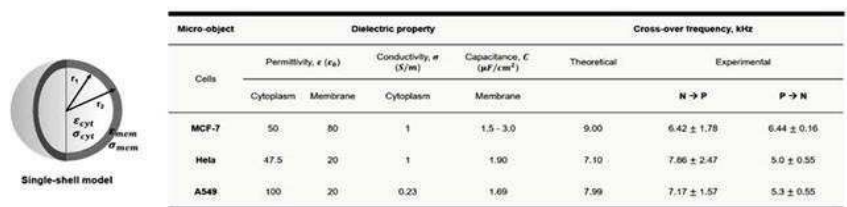
도면2



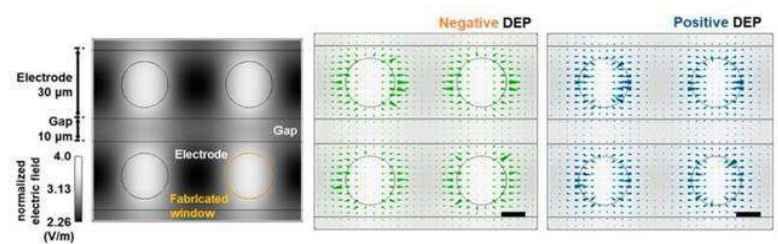
도면3



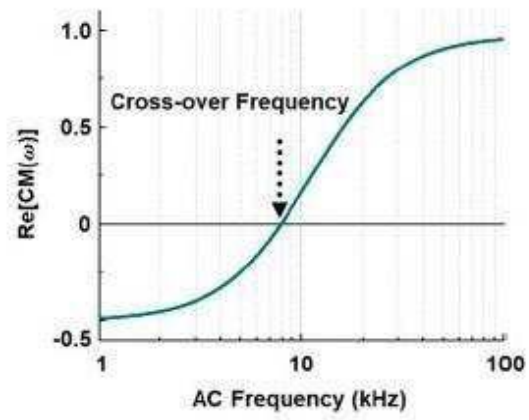
도면4



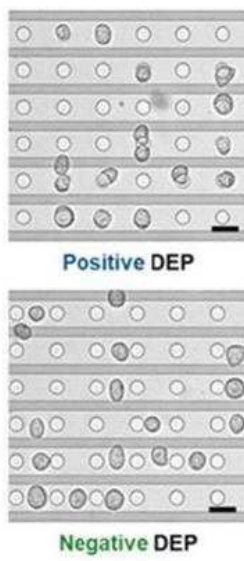
도면5



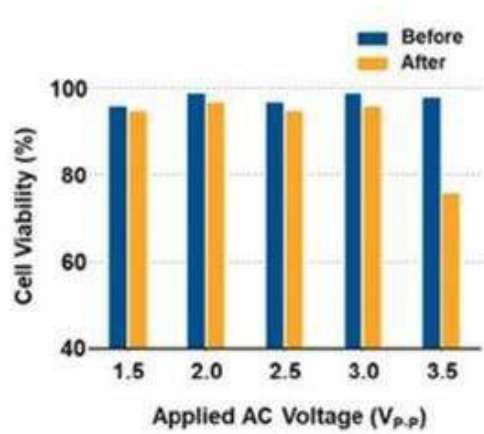
도면6



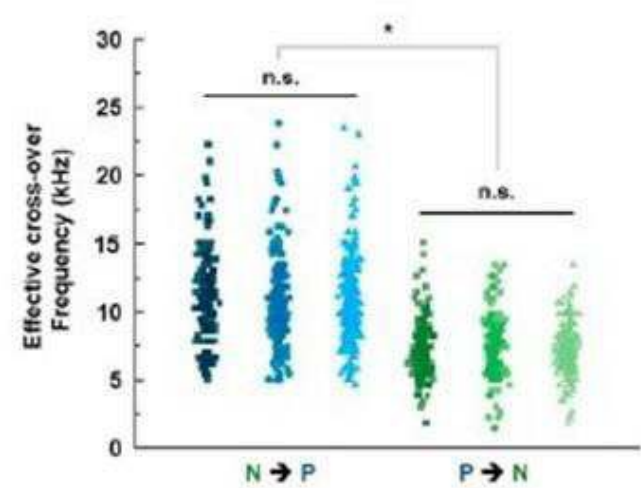
도면7



도면8



도면9



도면10

