



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월22일

(11) 등록번호 10-2230602

(24) 등록일자 2021년03월16일

(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 10-2019-0108352

(22) 출원일자 2019년09월02일

심사청구일자 2019년09월02일

(65) 공개번호 10-2020-0026171

(43) 공개일자 2020년03월10일

(30) 우선권주장
1020180103531 2018년08월31일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌
US20040112748 A1*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

최승엽

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 산학관 212호
(연세대학교 원주캠퍼스)

여강인

경상북도 영천시 청산길 29, 101동 406호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김보정

전체 청구항 수 : 총 14 항

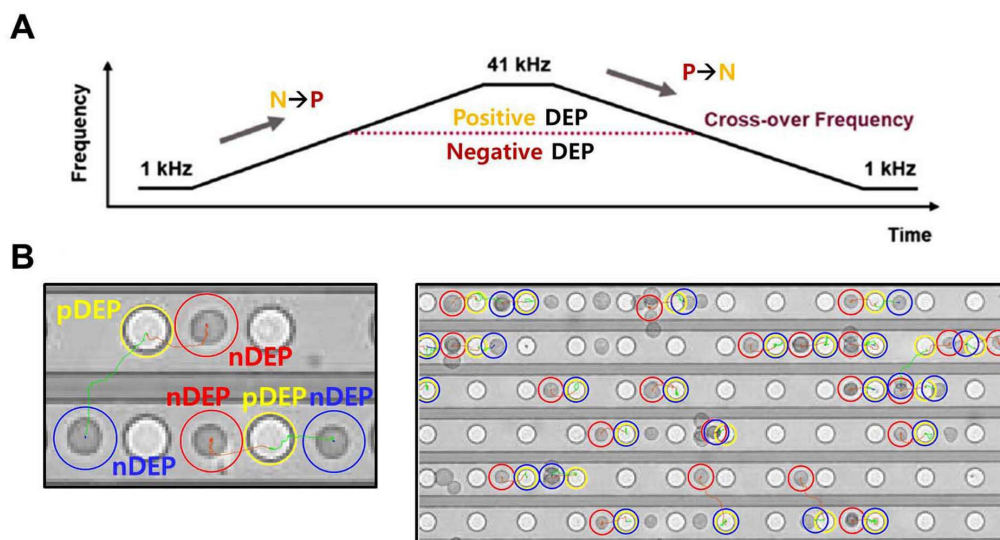
심사관 : 박성철

(54) 발명의 명칭 유전영동힘에 반응하는 세포의 궤적분석을 통한 세포의 cross-over frequency 측정방법

(57) 요약

본 발명은 세포의 교차주파수(cross-over frequency) 측정 방법으로, 구체적으로 유전영동 힘에 반응하는 세포에 유전영동힘을 전달할 수 있는 인가교류주파수(AC frequency)를 변화시키면서 입력한 후, 유전영동힘에 의해 위치가 이동된 세포들을 영상처리프로그램으로 분석하고 히스토그램화하는 단계를 포함하는, 세포의 궤적 분석을 통한 교차 주파수(cross-over frequency) 측정방법에 관한 것으로서, 세포의 전기생리학적 특성을 분석하는 방법 등으로 응용될 수 있다.

대표도 - 도3



(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)

이상우

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

양세정

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

이현우

전라남도 여수시 예울마루로 30, 121동 202호(웅천동, 웅천지웰)

이세나

서울특별시 강서구 강서로56나길 110, 106동 1406호(등촌동, 부영아파트)

김현우

서울특별시 관악구 관악로10길 31-15, 402호

(56) 선행기술조사문헌

JP2017134020 A

JP2018514195 A

W02007091450 A1

W02020081720 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

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(Alternating Current Frequency)를 선정하는 단계;
 (b) 선정된 인가교류주파수를 변화시키면서 주파수 변화에 따른 세포 이동을 촬영하고, 인가교류주파수를 변화시키면서 주파수 변화에 따른 세포의 구심점과의 거리차를 측정하는 단계; 및
 (c) 세포 이동 촬영 이미지를 통해 세포 궤적을 분석하고 이를 히스토그램화하는 단계를 포함하고,
 여기에서, 단계 (b)의 구심점은 단계 (a)의 인가하는 교류주파수에서 분석한 세포위치를 히스토그램화된 세포의 위치좌표에 대한 가우시안분포의 중앙값인, 세포 궤적 분석을 통한 교차주파수(cross-over frequency) 측정방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
 유전영동칩 상 저수조에 세포를 포함하는 조성물을 넣고 측정하는, 세포 궤적 분석을 통한 교차 주파수 측정방법.

청구항 3

제2항에 있어서,
 상기 세포를 포함하는 조성물은 세포 및 버퍼를 함유하는, 세포 궤적 분석을 통한 교차 주파수 측정방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
 상기 (a) 단계의 인가교류주파수는 하기 [수학식 1]로 표기되는 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor)의 값을 -1 내지 0으로 하는 교류주파수를 선정하는, 세포의 궤적 분석을 통한 교차주파수 측정방법 :

[수학식 1]

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

(ϵ_{ccl}^* , ϵ_{medi}^* 는 각각 세포, 미디움(medium)의 복합유전율)

청구항 5

제4항에 있어서,
 상기 (a) 단계에서 입력되는 인가교류주파수는 [수학식 1]을 이용해 클로시우스-모소티 인자 실수부의 값이 가장 작은 값에서 교류주파수를 선정하는, 세포의 궤적 분석을 통한 교차주파수 측정방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 입력되는 인가교류주파수는 하기 [수학식 1]을 이용해 클로시우스-모스티 인자의 값을 0.5 내지 1.5로 하는 교류주파수를 선정하는, 세포의 궤적분석을 통한 교차 주파수 측정방법 :

[수학식 1]

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

(ϵ_{cell}^* , ϵ_{medi}^* 는 각각 세포, 미디움(medium)의 복합유전율)

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 입력되는 인가교류주파수는 [수학식 1]을 이용해 클로시우스-모스티 인자 실수부의 값이 가장 큰 값에서 교류주파수를 선정하는, 세포의 궤적분석을 통한 교차주파수 측정방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 입력하는 인가교류주파수를 증가시키는, 세포의 궤적 분석을 통한 교차주파수 측정방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 인가교류주파수를 0.01 내지 5 kHz부터 증가시키는, 세포의 궤적 분석을 통한 교차주파수 측정방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 입력하는 인가교류주파수를 감소시키는, 세포의 궤적 분석을 통한 교차주파수 측정방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 입력하는 인가교류주파수를 20 kHz 내지 1 MHz 부터 감소시키는, 세포의 궤적 분석을 통한 교차주파수 측정방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 입력하는 인가교류주파수를 38 내지 43 kHz 부터 감소시키는, 세포의 궤적 분석을 통한 교차 주파수 측정방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 교차주파수 측정단계; 및 측정된 교차주파수를 초과하거나 또는 그 미만의 주파수를 인가하는 단계를 포함하는 세포의 흡착·분리 방법.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법에 따라 교차주파수를 측정하는 단계; 및 측정된 교차주파수를 분석하는 단계를 포함하는, 세포의 전기생리학적 특성을 분석하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전영동합에 반응하는 세포의 궤적분석을 통한 세포의 cross-over frequency 측정방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 살아있는 세포가 전기장에 노출 되면, 세포 안에 dipole이 형성이 된다. 형성된 dipole과 전기장사이의 상호작용으로 힘이 발생이 되고, 그러한 힘은 세포를 di-polarized 하게 만든다. 이러한 현상을 유전영동이라고 부르며, 그러한 힘을 유전영동힘(dielectrophoretic force)라고 한다. 유전영동 현상에서 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. 구 형태를 가지는 입자에 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.

[0004]

[0005] 이때, Re[CM]에서 The CM factor model 에서 세포에 대한 전기모델을 single shell model 이라고 가정한다. 가정했을 때의 CM factor 식은 아래와 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 permittivities 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.

[0006]

[0008] Re[CM]의 값은 인가하고 있는 전기장에 대해 세포와 세포를 둘러싸고 있는 액체 (medium)가 각각 dielectric polarization 이 되는 정도의 차이에 의하여 값이 결정되며, 인가하는 전기장의 주파수의 변화에 의존하여 세포와 medium이 dielectric polarization이 되는 정도가 각각 다르게 반응한다. 그 수치가 양의 값을 가지면 세포

는 주변을 둘러싸는 medium 보다 강하게 dielectric polarization 되어 주어진 공간 내에서 전기장의 세기가 가장 강한 곳으로 이동하려는 경향을 보이며, 반대로 $\text{Re}[\text{CM}]$ 값이 음수를 가지면, 세포는 medium 보다 약하게 dielectric polarization이 되어 전기장의 세기가 가장 약한 곳으로 이동하려는 경향을 가지게 된다.

[0009] 이러한 $\text{Re}[\text{CM}]$ 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 구별 할 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 이온농도 에 따라 세포의 전기생리학적 특징 변화가 발생 되었는지 여부를 확인하는 연구가 존재하였다.

[0010] 위의 진행된 연구에서 세포의 전기생리학적 특징 변화를 정량적으로 관측하기 위해 반드시 거쳐야 할 과정은 세포의 $\text{Re}[\text{CM}]$ 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, [] 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 frequency 를 정확하게 찾는 방법으로 크게 2가지로 분류할 수 있다.

[0012] 첫번째 방법은 인가하는 AC 전기 주파수 변화에 따른 세포들의 전체적인 움직임 변화를 통해 관측 하는 방법이 있다(도 1a 참조).

[0013] 전극 구조안에 있는 세포들은 상대적으로 낮은 주파수(예를 들어 10 kHz) 에서는 negative 유전영동힘의 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 유전영동힘의 영향을 받아 전극의 가장자리 부분에 모이게 되며, 이때 전극 구조를 투과하고 있는 빛의 세기는 중앙부분을 차지하고 있던 세포들이 전극 가장자리로 이동하면서 훨씬 빛이 잘 투과되기 때문에 빛의 세기는 증가하게 된다. 이러한 세포의 움직임에 비례하는 빛의 세기 변화를 정량화하면 도 1a의 b 와 같은 곡선을 얻어낼 수 있으며, 이론적인 모델에 근거하여 세포의 cross-over frequency 를 찾을 수 있다. 장점으로는 한 번의 실험으로 유전영동힘에 대한 약 20,000개 세포반응을 알 수 있다고 주장하고 있고, 현재 상용화된 제품으로 출시되어 있다. 하지만, 유전영동힘에 대해 세포반응 각각을 관측하지 못하며, 한 well 내에 존재하는 수백, 수천개의 세포들의 반응에 대하여 대표값으로 확인 할 수밖에 없다는 한계점이 있다.

[0015] 두 번째 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 강한 곳으로 가며, DEP force가 음의 방향일 때에는 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 $\text{Re}[\text{CM}]$ 파라미터값을 가정할 수 있다(도 1b 참조).

[0016] 하지만, 이러한 세포의 위치 추적 방식으로 구하는 방법의 경우, 상용화된 이미지 분석 프로그램(대표적으로 Image J)를 이용하여 분석하기 때문에, 궤적 분석에 최적화된 환경을 제공하지 못하며 (일반적으로 입자의 궤적을 정확하게 분석하기 위해서는 세포 주변의 배경이 일정한 밝기를 유지해야 한다. 전극모양이 주변에 있을 경우, 촬영한 모든 사진에서 각 세포의 위치를 정확하게 관별하기 위해서는 매우 많은 전처리 과정이 필요한 것으로 알고 있기 때문이다), 분석하는 세포수는 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 판단 할 수 있다.

[0018] 이에, 본 발명자는 유전영동힘에 대하여 각각의 세포를 세포 한 개 단위로 manipulation이 가능하며, 주파수 변화에 따른 유전영동 힘의 방향이 변화되는 것에 의한 세포의 움직임 변화를 관측하였다. 이로부터, 유전영동 힘이 거의 존재하지 않는 구간을 유전영동힘의 식에 근거하여 추정하여, 세포의 cross-over frequency를 측정하는 새로운 방법을 제시하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0020] (특허문헌 0001) 한국특허등록 제10-1599606호
(특허문헌 0002) 한국특허공개 제10-2019-0024175호

비특허문헌

- [0021] (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, Clarisse Vaillier et al., Anal. Chem. 88(18), 9022-9028 (2016)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0022] 기존에 사용되는 세포의 교차주파수(cross-over frequency)를 찾는 방법인 AC 전기 주파수 변화에 따른 세포들의 움직임 변화 관측방법은 유전영동험에 대한 세포 각각의 반응을 관찰하지 못하고 전체 세포들의 반응에 대한 대표값만 확인이 가능하다는 문제점이 있고, 세포 하나만의 좌표를 추적하는 방법은 한 번에 분석하는 세포수가 적다는 문제점이 있다.
[0023] 따라서 한 번의 실험으로 많은 세포수를 분석하는 동시에 세포 각각의 반응을 관찰할 수 있는 방법이 요구되고 있다.

과제의 해결 수단

- [0025] 본 발명은 세포의 교차주파수(cross-over frequency)을 찾기 위해 (a) 세포에 인가하는 교류주파수(Alternating Current Frequency)를 선정하는 단계; (b) 선정된 인가교류주파수를 변화시키면서 주파수 변화에 따른 세포 이동을 촬영하는 단계; 및 (c) 세포 이동 촬영 이미지를 통해 세포 궤적을 분석하고 이를 히스토그램화하는 단계를 포함하는, 세포의 궤적 분석을 통한 교차 주파수 측정방법을 제공함으로써 상기 과제를 해결하였다.
[0026] 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (a)의 인가교류주파수는 아래 [수학식 1]로 표기되는 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor)의 값을 -1 내지 0 또는 0.5 내지 1.5로 하는 교류주파수를 선정할 수 있다.
[0027] [수학식 1]
$$CM = (\epsilon_{cell}^* - \epsilon_{medi}^*) / (\epsilon_{cell}^* + 2\epsilon_{medi}^*)$$

(ϵ_{cell}^* , ϵ_{medi}^* 는 각각 세포, 미디움(medium)의 복합유전율)
[0028]
[0029] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (b)의 변화시키면서 인가시키는 교류주파수는 0.01 내지 5 kHz 부터 증가시킬 수 있고, 바람직하게는 0.8 내지 2 kHz 부터 증가시킬 수 있다.
[0030] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 단계 (b)의 변화시키면서 인가시키는 교류주파수는 20 kHz 내지 1 MHz 부터 감소시킬 수 있고, 바람직하게는 38 내지 43 kHz 부터 감소시킬 수 있다.
[0032] 본 발명의 일 양태에서, 상기 교차주파수를 측정하는 단계에 측정된 교차주파수를 분석하는 단계를 포함하여 세포의 전기생리학적 특성을 관측할 수 있다.
[0033] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 분석된 교차주파수를 이용한 바이오센서를 제공할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 일 양태에서, 상기 분석된 교차주파수를 이용한 세포의 흡착·분리 방법을 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0036] 본 발명에 따른 세포의 궤적분석을 통해 교차주파수를 측정한 경우, 이상적으로 한 번의 실험으로 800개의 세포에 대하여 유전영동힘 반응을 관측할 수 있고, 복잡한 전극 위에서 촬영한 사진에 대하여 세포 궤적을 분석할 필요가 없기 때문에 분석과정이 단순화되어 시간을 절약할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1a 및 1b는 종래 측정 기술을 도식화한 것이다.

도 2는 세포의 교차주파수(cross-over frequency)를 측정하기 위한 유전영동 칩의 구조 및 구성을 나타낸 도이다.

(A) : 유전영동 칩의 구조

(B) : 유전영동 칩 전극의 구조

(C) : 유전영동 칩에 가라앉은 세포의 이동을 관측하기 위한 장비의 구조 및 구성

도 3은 세포의 교차주파수를 측정하기 위한 교류주파수 인가방법을 나타낸 도이다.

(A) : 세포의 교차주파수를 측정하기 위한 인가되는 교류주파수(AC frequency) 변화과정

(B) : 인가교류주파수를 1 kHz → 41 kHz → 1 kHz로 변화시켜주었을 때 세포의 이동궤적 (실험전 및 실험후 세포이미지 합성)

도 4는 유전영동칩에 투입되는 세포의 반지름을 나타낸 도이다.

도 5는 MCF-7 세포를 single-shell model이라고 가정하였을 때 1-50kHz 구간에서의 CM factor를 나타낸 그래프이며, MCF-7 세포에 교류주파수 41 kHz 와 1 kHz가 각각 인가되고 있을 때의 전극위 세포위치를 나타낸 도이다.

도 6은 인가교류주파수에 의한 전극위 세포의 위치를 나타낸 도이다.

도 7은 인가교류주파수가 증가 또는 감소했을 때 구심점과 세포들의 평균값 ($P_{ntrap(x,y)}$, $P_{ptrap(x,y)}$)의 거리차를 나타낸 도이다.

도 8은 유전영동힘에 반응하는 세포의 궤적 분석을 통해 교차주파수를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시형태를 들어 상세히 설명한다. 본 발명의 실시형태는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 따라서 본 발명의 실시형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시형태로 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0041] 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 용어 "~ (하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.

[0043] 본 발명에서, 하기 용어가 의미하는 바에 대해서 설명한다. 이는 발명을 이해를 위한 것으로, 용어의 의미는 성명되는 바에 의해 제한되지 않고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하는 용어의 의미를 포함한다.

[0044] 유전영동(Dielectrophoresis, DEP)은 극성이 없는 입자가 불균일한 교류 전기장에 노출되었을 때 쌍극성(dipole)이 입자에 유도되고, 유도된 입자와 전기장 사이의 상호작용으로 인해 힘이 발생하며, 발생한 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).

[0045] CM factor는 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor)를 나타내는 것으로, 클로시우스-모소티 인자 모델(The CM factor model)에서 세포에 대한 전기모델을 단일 셸 모델 (single shell model)이라고 가정했을 때 하기 [수학식 1] 내지 [수학식 2]으로 구할 수 있다.

[0046] [수학식 1]

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

[0047] (ϵ_{cell}^* , ϵ_{medi}^* 는 각각 세포, 미디움(medium)의 복합유전율)

[0048] [수학식 2]

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

ϵ_{cell}^* : 세포의 복합유전율, ϵ_{medi}^* : 미디움(medium)의 복합유전율,

ϵ_{mcm}^* : 세포막의 복합유전율, ϵ_{cyto}^* : 세포질의 복합유전율

[0049]

[0050] 상기 [수학식 2]에서 ϵ^* 는 $\epsilon^* = \epsilon + j(\sigma / \omega)$ 로 계산할 수 있다. 이때, ϵ 는 상대유전율이고 σ 는 전도도이며 ω 는 각주파수이다. 또한, λ 은 scaling of cell로 $\lambda = r_{cell} / (r_{cell} - t)$ 로 계산할 수 있다. 이때, t 는 세포막의 두께이다.

[0051] Re[CM]은 클로시우스-모소티 인자의 실수부를 의미하는 것으로, 유전영동현상에서 세포를 움직이게 하는 힘의 방향을 결정하는 요소이다.

[0052] 유전영동힘(Dielectrophoresis force, DEP force)에 영향을 받는 세포의 반응을 추정하기 위해 세포의 모양을 구라고 가정하고, 구형태를 가지는 입자에 대한 유전영동힘의 식은 하기 [수학식 3]과 같다.

[0053] [수학식 3]

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

[0054]

[0055] 상기 [수학식 3]에서 F_{DEP} 는 유전영동힘이고 ϵ_{medi} 는 미디움 유전율이며 E_{RMS} 는 전기장의 제곱평균제곱근(root mean square, rms)이다.

[0057] 본 발명은 유전영동힘에 반응하는 세포의 궤적 분석을 통해 세포의 교차주파수(cross-over frequency)를 측정하는 방법에 관한 것이다.

[0058] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, (a) 세포에 인가하는 교류주파수(Alternating Current Frequency)를 선정하는 단계; (b) 선정된 인가교류주파수를 변화시키면서 주파수 변화에 따른 세포 이동을 촬영하는 단계; 및 (c) 세포 이동 촬영 이미지를 통해 세포 궤적을 분석하고 이를 히스토그램화하는 단계를 포함하여 세포의 교차주파수를 측정할 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 이용되는 유전영동칩 상 저수조에 세포를 포함하는 조성물을 넣고 할 수 있다. 상기 세포를 포함하는 조성물은 세포 및 버퍼를 함유할 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 (a) 단계의 인가교류주파수는 클로시우스-모소티 인자의 값을 -1 내지 0인 교류주파수를 선정할 수 있고, 구체적으로는 클로시우스-모소티 인자 실수부의 값이 가장 작은 값에서 교류주파수를 선정할 수 있다.

[0062] 상기 클로시우스-모소티 인자의 값이 -0.5에 근접하는 경우 또는 가장 낮은 경우의 교류주파수에서는 Negative 유전영동힘을 세포에 효과적으로 전달할 수 있어 세포의 교차주파수를 측정하는데 효율적이다.

- [0063] 또한, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 (a) 단계의 인가교류주파수는 클로시우스-모소티 인자의 값을 0.5 내지 1.5로 하는 교류주파수로 선정할 수 있고, 구체적으로는 클로시우스-모소티 인자 실수부의 값이 가장 큰 값에서 교류주파수를 선정할 수 있다.
- [0064] 상기 클로시우스-모소티 인자의 값이 최소 0.5 이상인 경우 또는 가장 큰 교류주파수에서는 Positive 유전영동 힘을 세포에 효과적으로 전달할 수 있어 세포의 교차주파수를 측정하는데 효율적이다.
- [0066] 또한, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 (b) 단계에서 인가되는 교류주파수를 점차 증가시킬 수 있고, 구체적으로 인가교류주파수를 0.01 내지 5 kHz부터 증가시킬 수 있으며, 바람직하게는 0.8 내지 2 kHz 부터 증가시킬 수 있다.
- [0067] 상기 인가교류주파수의 조건을 유지하는 시간은 1분 내지 3분일 수 있고, 인가하는 전압은 1 내지 3 V_{p-p} 일 수 있다. 상기 인가전압을 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 정할 수 있다. 또한, 인가전압은 세포가 포함된 용액의 구성성분에 따라 변화될 수 있다.
- [0068] 또한, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 (b) 단계에서 인가되는 교류주파수를 점차 감소시킬 수 있고, 구체적으로 인가교류주파수를 20 kHz 내지 1 MHz 부터 감소시킬 수 있으며, 바람직하게는 38 내지 43 kHz 부터 감소시킬 수 있다.
- [0069] 인가교류주파수를 1 kHz에서 41 kHz로 증가시킬 때, 안정된 네거티브 유전영동힘이 인가되는 교류주파수가 증가함에 따라 감소하며 클로시우스-모소티 인자 실수값이 음에서 양으로 넘어가게 되고 반대로 포지티브 유전영동힘이 세포의 움직임에 영향을 주기 때문에 1 kHz에서 위치하고 있던 세포들이 전기장의 세기가 가장 강한 곳으로 이동할 수 있다. 또한, 인가교류주파수를 41 kHz에서 1 kHz로 감소시킬 때, 안정된 포지티브 유전영동힘이 인가되는 교류주파수가 감소함에 따라 감소하며 클로시우스-모소티 인자 실수값이 양에서 음으로 넘어가게 되고 반대로 네거티브 유전영동 힘이 세포의 움직임에 영향을 주기 때문에 41 kHz에서 위치하고 있던 세포들이 전기장의 세기가 가장 강한 곳으로 이동할 수 있다.
- [0071] 또한, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 (c) 단계에서 세포 궤적 분석 및 히스토그램화하는 단계는 상기 (b) 단계의 세포 이동을 촬영하는 단계에서 얻은 이미지를 이용하여 상용화된 영상처리프로그램을 이용할 수 있다. 보다 구체적으로 움직이는 세포의 위치좌표 (x , y) 각각을 히스토그램으로 표현하고 가우시안분포(Gaussian distribution) 여부를 확인하는 것을 포함할 수 있다. 이 때, (x , y) 좌표에 대한 가우시안 분포의 중앙값이 구심점이고, 상기 세포들의 구심점과 인가교류주파수가 변화했을 때 세포들의 위치 x 축 및 y 축의 거리차를 구해 세포의 교차주파수를 측정할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 유전영동 칩 위에 PDMS(Polydimethylsiloxane) 저수조를 올려둔 뒤 세포가 칩 표면 위에 위치할 때 까지 기다렸다. MCF-7 세포가 주어진 환경(세포를 둘러싼 버퍼의 전도도, 세포의 건강상태)에서 전도도가 60 $\mu S/cm$ 임을 확인하고, MCF-7 세포에 2분 동안 2 V_{p-p} 인가 이후 인가교류주파수 조건을 계속 유지하고 약 100초 동안의 움직임을 현미경에 장착된 CCD(Charge Coupled Device) 카메라를 통해 촬영하였다. 이때 인가되는 주파수는 네거티브 또는 포지티브 유전영동힘을 받을 수 있는 교류주파수로, MCF-7 세포가 비교적 작은 양의 클로시우스-모소티 인자 실수값을 나타내는 1 kHz 이고, 비교적 큰 양의 클로시우스-모소티 인자 실수값을 나타내는 41 kHz이다. 상기 MCF-7 세포에 인가하는 교류주파수의 조건을 1 kHz 에서 41 kHz 로 증가시키고 다시 41 kHz 에서 1 kHz 로 감소시킨 후, 촬영한 세포의 이동 이미지를 상용화된 영상처리프로그램을 사용하여 분석하였다(도 3 참조).
- [0074] 이동한 각 세포들의 위치 x , y 에 대한 히스토그램을 만든 뒤, 가우시안분포 형성여부를 확인하였다. 교류주파수 1kHz 를 인가한 MCF-7 세포는 네거티브 유전영동힘에 의해 (0, 0) 좌표에 안정적으로 위치하는 것을 확인하고, 세포 위치 x , y 의 히스토그램 평균값을 $P_{ntrap(x,y)}$ 으로 정의하였다. 또한 교류주파수 41 kHz를 인가한 MCF-7 세포가 포지티브 유전영동힘에 의해 (-15.8354, -2.6358)에 위치하는 것을 확인하고, 세포위치 x , y 의 히스토그램 평균값을 $P_{ptrap(x,y)}$ 으로 정의하였다(도 6 참조). 인가교류주파수가 증가 또는 감소했을 때 각각의 세포와 구심점과의 거리차를 측정하고 분석하여 MCF-7 세포의 교차주파수 값이 4.48kHz 내지 10.50kHz 임을 확인하였고, 수식을 통해 계산된 MCF-7 세포의 교차주파수 7.94 kHz가 상기 범위 사이에 있음을 확인하였다(도 8 참조).
- [0076] 본 발명은 유전영동힘에 반응하는 세포의 궤적 분석을 통해 세포의 교차주파수를 측정한 후 상기 측정된 교차주

파수를 분석하는 단계를 포함할 수 있고, 상기 교차주파수를 분석하여 세포의 전기생리학적 특성을 분석할 수 있다.

[0077] 상기 교차주파수는 맥스웰 응력 텐서(Maxwell stress tensor, MST) 방법을 도입하여, 세포막과 세포질의 전기적 파라미터(세포막 커패시턴스, 세포질 전도도) 변화에 의한 세포표면에서의 국부적인 유전영동 힘에 따른 세포의 생물리학적 특징변화를 연구하고 수치 시뮬레이션으로 제시될 수 있다. 상기 맥스웰 응력 텐서는 τ 로 하기 [수학식 4]로 정의된다.

[0078] [수학식 4]

$$\tau = \tilde{\epsilon} \left[\mathbf{E}\mathbf{E} - \frac{1}{2}(\mathbf{E} \cdot \mathbf{E})\mathbf{I} \right]$$

[0079]

[0080] 이때, E는 전기장이고 I는 단위텐서이다. 또한, 입자부피에 대한 유전영동힘(DEP)은 하기 [수학식 5]으로 정의된다.

[0081] [수학식 5]

$$\mathbf{F} = \int_V \mathbf{f} dV = \int_V \nabla \cdot \tau dV = \oint_S \tau \cdot \mathbf{n} dS$$

[0082]

[0083] 이때, V는 부피이고 S는 부피를 둘러싸는 표면이며 n은 S의 단위벡터이다. 또한, 특정 부피의 전자기력은 하기 [수학식 6]로 정의된다.

[0084] [수학식 6]

$$\mathbf{f} = \nabla \cdot \tau = \epsilon_p \left[(\nabla \cdot \mathbf{E})\mathbf{E} + (\mathbf{E} \cdot \nabla)\mathbf{E} - \frac{1}{2}\nabla E^2 \right]$$

[0085]

[0087] 상기 교차주파수를 분석하여 세포의 경향성을 파악하고, 파악한 경향성을 통해 주어진 외부적 자극에 반응하여 세포의 세포막에서 발생하는 변화에 대한 해석이 가능하다. 세포계는 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.

[0089] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 본 발명은 유전영동힘에 반응하는 세포의 궤적분석을 통해 측정된 교차주파수 및 상기 교차주파수를 통해 분석된 세포의 전기생리학적 특성을 이용한 바이오센서를 제공할 수 있다.

[0090] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 본 발명은 유전영동힘에 반응하는 세포의 궤적분석을 통해 측정된 교차주파수 및 상기 교차주파수를 통해 분석된 세포의 전기생리학적 특성을 이용한 세포의 흡착·분리 방법을 제공할 수 있다.

[0092] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통해 보다 상세히 설명한다. 다만 하기 실시예 및 실험예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것이지 본 발명의 권리범위를 이로 한정하는 것을 의도하지 않는다.

[0094] <실시예1> 유전영동힘에 의한 MCF-7의 위치 변화 측정

[0095] 실시예 <1-1> 네거티브 유전영동힘을 받을 수 있는 교류주파수 선정 후 MCF-7 세포에 처리

[0096] 실험을 위하여 유전영동 칩 위에 PDMS(Polydimethylsiloxane) 저수조를 올려둔 뒤, MCF-7 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.

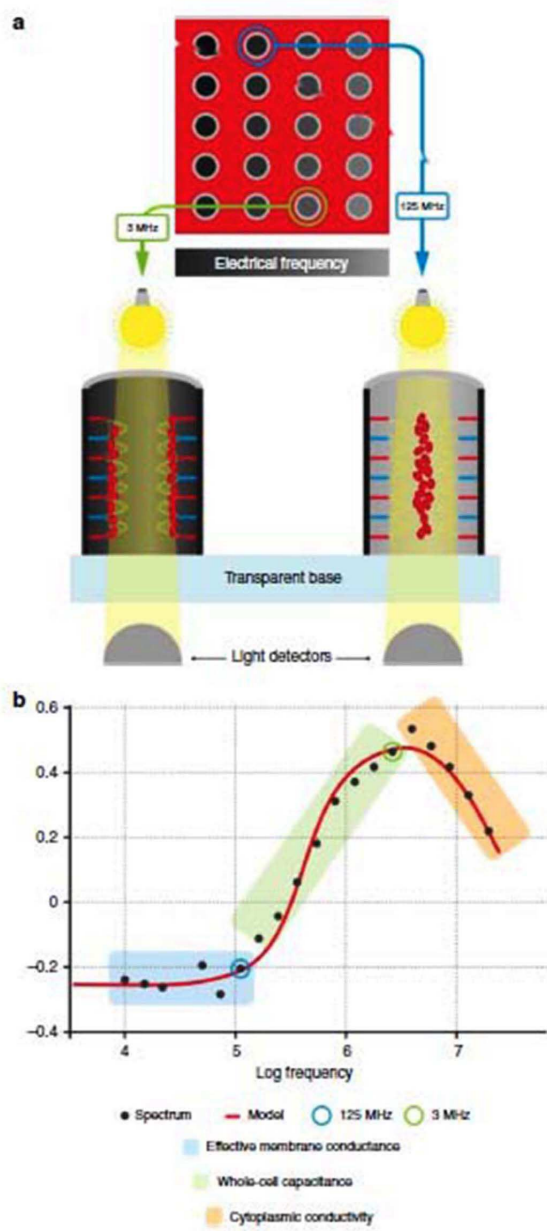
[0097] 칩 표면 위에 MCF-7 세포가 위치한 후 네거티브 유전영동 힘을 받을 수 있는 주파수 AC 1kHz를 MCF-7 세포에 2분 동안 $2 V_{p-p}$ 인가 이후 인가교류주파수 조건을 계속 유지하고 약 100초 동안의 움직임을 현미경에 장착된 카메라로 촬영하였다(도 3의 B 참조).

[0098] 상기 네거티브 유전영동 힘을 받을 수 있는 교류주파수 1kHz는 클로시우스-모소티 인자(Clausius-Mossotti factor, CM factor)의 음의 값이 -0.5에 근접하거나 그 값을 가장 낮게 하는 교류주파수를 선택한 값이다.

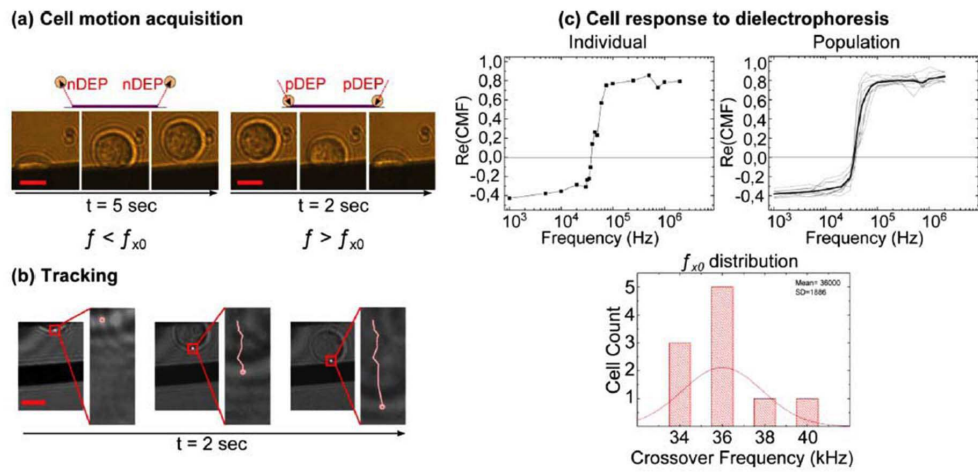
- [0099] 실시예 <1-2> 포지티브 유전영동힘 선정 후 MCF-7 세포에 처리
- [0100] 실시예 <1-1>의 안정적으로 위치한 MCF-7에 포지티브 유전영동 힘을 받을 수 있는 주파수 AC 41kHz까지 증가시킨 후, MCF-7 세포에 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 촬영하였다(도 3의 B 참조).
- [0101] 상기 포지티브 유전영동 힘을 받을 수 있는 교류주파수 41kHz는 클로시우스-모소티 인자의 양의 값이 최소 +0.5 이상 또는 그 값이 가장 큰 교류주파수를 선정한 값이다.
- [0102] 실시예 <1-3> 네거티브 유전영동힘에 의해 이동한 MCF-7 세포의 좌표 확인
- [0103] 상기 실시예<1-1>에서 촬영한 유체내에서 움직이는 세포의 위치를 상용화된 영상처리프로그램을 사용하여 분석한 결과, MCF-7 세포가 (0,0) 좌표에 안정적으로 위치해 있음을 확인하였다.
- [0104] 실시예 <1-4> 포지티브 유전영동힘에 의해 이동한 MCF-7 세포의 좌표 확인
- [0105] 상기 실시예 <1-2>에서 촬영한 유체내 움직이는 세포의 위치를 실시예<1-3>과 동일한 방법으로 분석한 결과, MCF-7 세포가 (-15.8354, -2.6358) 좌표에 위치해있음을 확인하였다.
- [0107] <실험예 1> MCF-7 세포의 교차주파수 확인
- [0108] 실험예 <1-1> 세포위치 평균값 확인
- [0109] 상기 실시예 <1-3>에서 확인한 네거티브 유전영동힘에 의해 이동한 MCF-7 세포의 각각의 위치좌표 (x,y) 및 실시예 <1-4>에서 확인한 포지티브 유전영동힘에 의해 이동한 MCF-7 세포의 각각의 위치좌표 (x,y)를 히스토그램으로 표현하고, 가우시안분포 형성여부를 확인하였다. 이때 x,y 좌표에 대한 가우시안분포의 중앙값을 구심점이라고 정의하고, 확인된 세포위치 x,y 히스토그램 평균값을 $P_{ntrap(x,y)}$ 및 $P_{ptrap(x,y)}$ 라고 정의하였다.
- [0110] 실험예 <1-2> MCF-7 세포의 교차주파수 확인
- [0111] 인가교류주파수가 증가 또는 감소했을 때 각각의 세포와 구심점과의 거리차를 측정된 후, 거리차가 x와 y 위치의 히스토그램의 표준편차의 3배보다 모두 큰 경우의 인가교류주파수를 기록한다. 해당 인가교류주파수 이후에 x축 또는 y축 거리차가 다시 히스토그램의 표준편차의 3배 이하로 감소하는지 확인하고, 없을 경우 상기 인가교류주파수를 세포의 교차주파수로 정의하였다.
- [0112] 구한 교차주파수를 다시 히스토그램으로 표현한 후, 히스토그램에 대한 평균과 표준편차를 계산하여 세포군에 대한 교차주파수를 정의하였다.
- [0114] 그 결과, 본 발명에 따라 측정된 CM factor가 0이 되는 MCF-7 세포의 교차주파수 값은 4.48kHz에서 10.50kHz로, 수식을 통해 이론적으로 계산된 교차주파수 7.94kHz와 유사한 것을 확인하였다.

도면

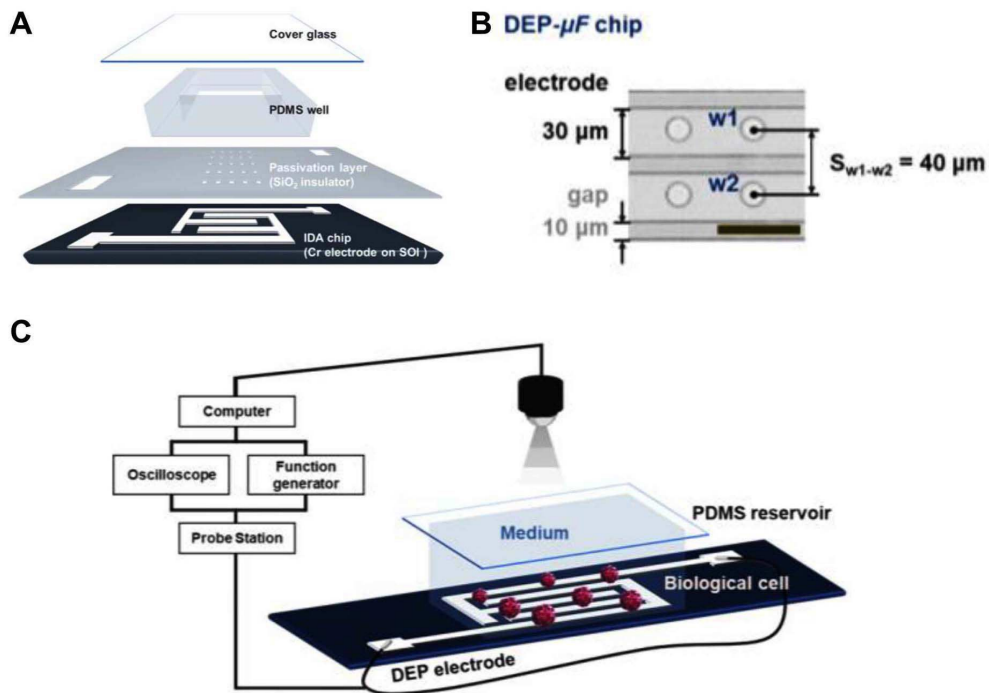
도면1a



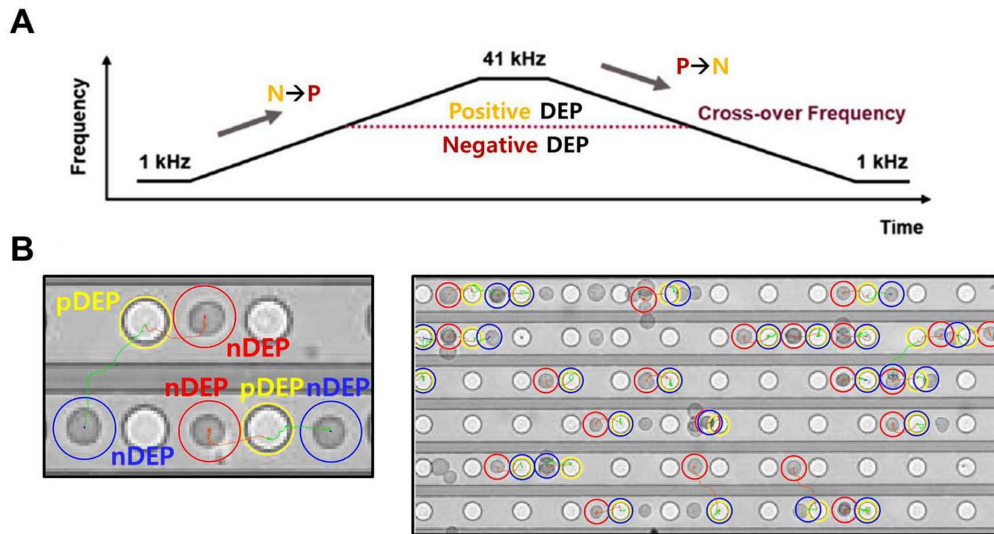
도면1b



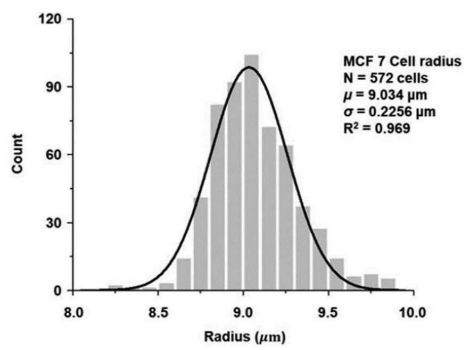
도면2



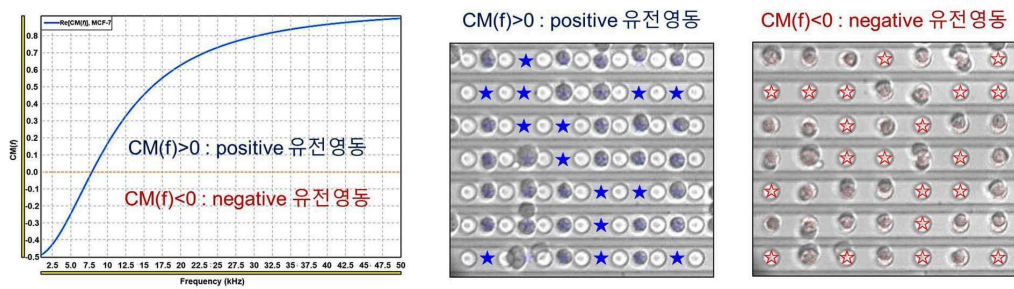
도면3



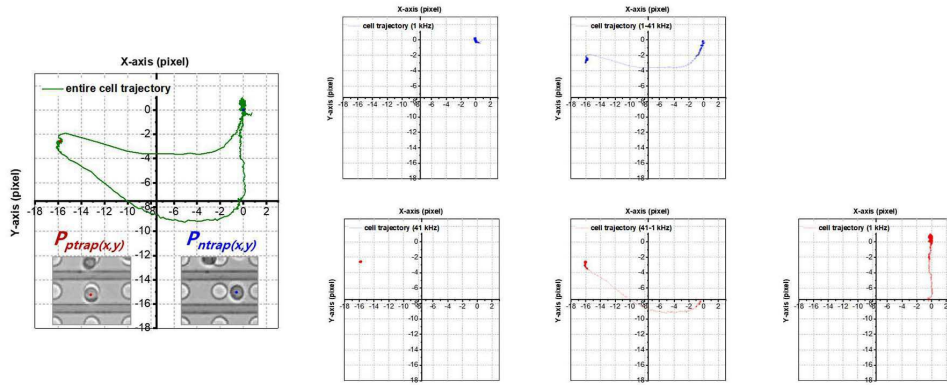
도면4



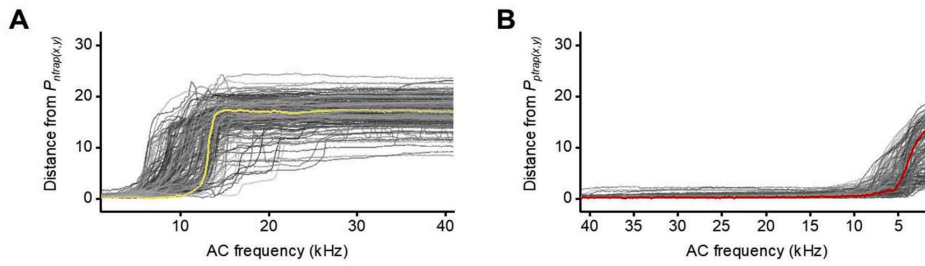
도면5



도면6



도면7



도면8

