

# 3D 프린터를 활용한 맞춤형 휴대용 형광측정 장치 개발

조경래 · 서정혁 · 최세운

금오공과대학교 메디컬IT융합공학과

## Development of Customizable Fluorescence Detection System using 3D Printer

Kyoung-rae Cho · Jeong-hyeok Seo · Se-woon Choe

Department of Medical IT Convergence Engineering, Kumoh National Institute of Technology

E-mail : jkl6464@kumoh.ac.kr / whiteneco@kumoh.ac.kr / sewoon@kumoh.ac.kr

### 요 약

유세포 분석법은 단일 세포나 미세 입자에 대한 다양한 광학적 특성을 측정하여 이를 매개 변수로 나타내는 측정법이다. 이러한 매개 변수에는 세포의 크기, 입상도, 형광 강도 등이 있으며 이는 세포와 광원에서 조사한 빛의 물리적이고 광학적인 상호 작용에 의해 방사되는 빛에 따라 결정된다. 하지만 유세포 분석법은 고가이며 크기가 크고 다양한 형광염료의 사용이 제한적이라는 단점이 있다. 또한, 측정할 수 있는 다양한 데이터에 비해 사용자가 원하고자 하는 데이터는 한정적일 수도 있다. 이러한 특징은 비용/공간적으로 제한적인 연구 환경을 가진 연구자에게 있어서 어려운 점으로 다가오고 있다. 이에 본 연구는 소형의 발광다이오드와 포토다이오드를 이용하여 저가의 휴대용 형광측정 장치를 개발하고자 한다. 이는 누구나 제작하기 쉽도록 3D 프린터로 설계되었으며 광원과 필터 그리고 광센서의 교체가 가능하도록 설계하여 표적 세포 및 형광염료의 다양한 선택이 가능하다. 제안된 형광측정 장치를 통하여 형광처리가 된 세포를 다양한 세포 수로 분류하여 측정하였으며 그 결과, 측정된 형광의 세기가 세포의 농도에 따라 비례한 것을 보였으며 또한 높은 선형성을 보여주었다.

### ABSTRACT

Flow cytometer is one of the instrument that can measure various optical properties of a single cell or microparticle. These parameters including size, granularity, and fluorescence intensity are determined by the physical and optical interaction of the cells with excitation light source. However, users have some difficulties such as high cost, size of instrument, and limited fluorescence selectivity. In addition, abundant data is also unintentionally acquired even though user wants to have a single optical parameter. For these reasons, the use of flow cytometer is more challenging for researchers to apply their study. Therefore, the proposed study aims to develop a low-cost portable fluorescence acquisition system using a commercially available light-emitting diode and photodiode. It is designed by a 3D printer, and fluorescence selectivities are increased by changing of the light source / optical filter / detection sensor. Various number sets of fluorescently labeled cells were measured, and its feasibility was evaluated through the proposed system. As a result, acquired fluorescence intensities were proportional to the concentration of the cells and showed high linearity.

### 키워드

Flow cytometer, Fluorescence detection, Cancer cell, Cell counting

## I. 서론

유동 세포 분석기(Flow cytometer; FCM)는 정밀한 전기적 탐지를 통한 세포의 광학적 변수를 측정하는 기기이다 [1]. 형광 처리를 한 세포나 미생물의 핵 또는 염색체에 특정 파장의 빛을 인가함으로써 발생하는 물리적, 광학적 특성을 분석하여 세포의 크기, 밀도, 입상도를 포함한 다양한 변수를 측정할 수 있으며 또한 이를 바탕으로 하나의 섞여진 세포 집단에서 특정 변수를 가진 세포만을 분류할 수 있다 [2]. 이러한 특성을 이용하여 유동 세포 분석기는 생체 의학, 생물 물리학 등 여러 분야에서 중요한 데이터 측정기기로써 사용된다 [3]. 일반적으로 FCM은 크게 유동 시스템, 광학 시스템 그리고 분석 및 데이터 처리 시스템으로 구성되어 있다. 유동 시스템은 세포나 입자를 포함한 식염수를 미세관을 통하여 천천히 그리고 일정하게 흘러 보내는 역할을 담당하고 있다. 광학 시스템은 미세관에 흘러가는 세포나 입자에 광원을 통해 특정 파장대의 강한 빛을 가하여, 화학적 또는 물리적 작용에 의해 산란하는 빛을 광 검출기로 측정하는 역할을 한다. 이때 산란하는 빛은 두 가지 종류가 있는데 전방 산란 빛 (Forward scattered light; FSC) 과 측방 산란 빛 (Side scattered light; SSC)이 있다 [4]. 광원과 나란히 산란되는 FSC의 경우 세포의 표면적인 특징에 관여하며, 광원과 수직의 방향으로 산란되는 SSC의 경우 세포 내부의 미소체 또는 입상도에 관련 있다. 분석 및 데이터 처리 시스템은 광 검출기를 통해 받아드린 데이터를 분석하여 시각적으로 표현하거나 이를 바탕으로 유동 시스템에서 세포나 입자를 분류하게 할 수 있다. 이러한 시스템을 이용하여 FCM은 세포에 큰 충격을 주지 않고 다양한 변수를 측정할 수 있으며 소모되는 세포의 손실이 매우 적다. 하지만 이러한 시스템을 사용하기 위해서는 적절한 공간이 필수적으로 요구되며 그 비용 또한 다른 측정 장비에 비하여 높은 편이다. 광학 시스템의 경우, 사용할 수 있는 형광염료의 종류가 광학 시스템의 형광 필터에 따라 결정되므로 사용자의 형광염료 선택의 범위가 매우 제한적이다 [5]. 또한, 단순한 데이터를 획득하는데 있어서 불필요한 시간과 데이터가 소모되므로, 이는 측정시간이 지연되며 비용 지출이 증가하게 되는 원인이 된다. 이에, 본 연구는 일반적인 FCM에서 사용되는 시스템 대신 대체 가능한 발광 다이오드와 마이크로 컨트롤러, 그리고 포토 다이오드를 사용하여 저가의 형광 세포 측정 시스템을 개발하였다. 제안된 시스템은 형광 필터나 광원을 자유롭게 교환할 수 있어 형광염료를 사용하는 데 있어 제한이 없으며 광 검출기 또한 교환 가능해 사용자의 편의에 따라 맞춤형 설계가 가능하도록 제작되었다. 또한, 상용화된 3D 프린터를 사용하여 모듈별로 제작 가능하여 다양한 연구 분야에서도 쉽게 응용 가능 하도록 제작하였다. 세포

로부터 산란 되는 빛은 광원으로부터 평행하거나 수직인 방향으로 검출하도록 네 방향에서 필터 슬롯을 두어 빛의 경로를 유도할 수 있으며 시스템의 평가를 위하여 calcein-AM으로 형광 처리된 자궁경부암세포 (Human cervical cancer cells; HeLa cells)를 470nm의 빛으로 조사하여 산란 되는 빛을 각각 다른 세포 수와 조건으로 측정하였다. 그 결과, 형광의 강도가 세포 수와 비례하여 높은 선형성( $r^2 > 0.9$ )을 보였다.

## II. 연구 방법

자궁경부 암세포(한국 세포주 은행, 대한민국)는 37°C의 5% 이산화탄소 배양기에서 증식시켰다. 자궁경부 암세포는 고농도의 글루코스가 포함된 미디어 (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM) 와 Fetal Bovine Serum (FSB, pH 7.4), 1%의 Penicillin Streptomycin으로 구성된 배지 용액을 사용하여 자궁경부 암세포를 배양하였으며 페트리디쉬의 70%를 차지하였을 때 Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)를 이용하여 3차례 세척한 뒤, trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 부유시켰다. 분리된 세포는 1uM의 calcein AM (AnaSpec, USA) 용액에 30분간 처리된 뒤, 다시 3차례 PBS로 세척 작업을 거치게 된다. 다양한 세포의 농도실험을 진행하기 위하여, 세포 농도를  $1 \times 10^6 cells$  부터  $5 \times 10^6 cells$  까지 증가시키고, 분리된 세포는 2ml의 PBS와 함께 유리 큐벳에 담겨져 실온 암실의 환경에서 동일한 조건으로 형광이 측정되었다. 각각의 세포 수마다 6회씩 형광이 측정되었으며 형광처리를 한 세포와 하지 않은 세포를 각각 실험군과 대조군으로 하여 형광의 강도를 비교하였다.

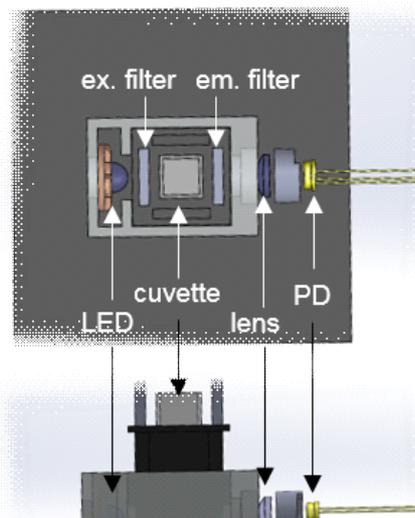


그림 1. 휴대용 형광 측정 장치의 구조

제안된 형광측정 장치는 그림 1과 같이 광원과 광 검출기 그리고 필터가 자유롭게 교체가 가능하도록 제작하였다. 470nm의 LED (Photron, 3W, USA)에서 출력되는 빛은 일차 광학 필터 (excitation filter)를 지나 세포가 담겨진 큐벳에 조사된다. 산개되는 빛은 이차 광학 필터 (emission filter)를 지나 포토다이오드 (Photodiode, PD)에 수집되는데 이때, 볼록 렌즈(N-BK7, Thorlabs)는 포토다이오드에 빛이 집중할 수 있도록 도와준다. 포토다이오드에 수집된 빛은 광전류로 전환되어 마이크로 컨트롤러를 통하여 분석되어 LCD를 통해 시각적으로 표현된다. 포토다이오드는 3가지 부하 저항 (100, 200, 390 K $\Omega$ )을 통하여 증폭 비를 결정하였으며 두 가지 이차 광학 필터 (#74, 480nm with #369, 470nm)와 일차 광학 필터 (#369, 500nm)를 이용해 원하는 파장대의 빛만을 통과시켰다. 제안된 측정 장치는 총 90,000원 이하의 저렴한 가격으로 제작하였다.

### III. 실험 및 결과 분석

제안된 시스템의 정량적인 형광 측정 결과는 다음의 표에 나타내었다. 형광 세기는 형광 처리를 한 실험군과 형광 처리를 하지 않은 대조군의 형광의 세기 차이를 비교하였다. 형광의 차이는 세포 수와 비례한 높은 선형성( $r^2 > 0.9$ )을 보여주었다.

표 1. 실험 군과 대조 군의 형광 세기의 차이

#389 emission filter			
$\times 10^6 cells$	100K $\Omega$	200K $\Omega$	N/A
1	0.12	0.22	-
2	0.47	1.18	-
3	0.85	1.83	-
4	1.07	2.25	-
5	1.10	2.23	-
#74 excitation filter/#389 emission filter			
$\times 10^6 cells$	100K $\Omega$	200K $\Omega$	390K $\Omega$
1	0.008	0.13	0.17
2	0.25	0.48	0.70
3	0.28	0.65	1.17
4	0.37	0.92	1.63
5	0.42	0.97	1.88
#74 excitation filter/#389 emission filter			
$\times 10^6 cells$	100K $\Omega$	200K $\Omega$	390K $\Omega$
1	0.10	0.13	0.60
2	0.40	0.82	1.25
3	0.63	1.20	2.18
4	0.87	2.18	3.03
5	0.92	3.03	4.98

### IV. 결론

본 실험에서는 상업적으로 널리 쓰이는 LED와 마이크로 컨트롤러, 포토다이오드를 이용하여 비용 효율적인 소형 형광 탐지 장치를 설계하였다. 제안된 장치는 광원과 필터, 그리고 광 검출기를 자유롭게 부착가능하며 어느 환경에서도 쉽게 제작할 수 있도록 3D 프린터로 설계 가능하도록 하였다. 장치의 성능을 정량적으로 평가하고자 형광 처리를 한 자궁경부 암세포와 처리하지 않은 암세포의 형광 강도를 비교하였으며 그 결과 세포 수에 비례하여 높은 선형성을 보임을 확인하였다. 따라서 제안된 형광 검출기는 기존의 FCM의 일부분으로서의 기능을 대체할 수 있을 것으로 판단되며 다양한 활용 가능성의 증대를 위한 후속 연구가 진행될 예정이다.

### References

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] V. Pospichalova, J. Svoboda, Z. Dave, A. Kotrbova, K.Kaiser, D. Klemova, L. Ilkovic, 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. 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.
- [5] 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.