



공개특허 10-2024-0144409



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0144409
(43) 공개일자 2024년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/42 (2017.01) *C12M 3/06* (2006.01)
C12N 13/00 (2017.01) *G01N 15/10* (2024.01)
G01N 15/1031 (2024.01)

(52) CPC특허분류
C12M 35/02 (2013.01)
C12M 1/42 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7030391(분할)

(22) 출원일자(국제) 2016년09월02일
심사청구일자 2024년09월10일

(62) 원출원 특허 10-2018-7008870
원출원일자(국제) 2016년09월02일

심사청구일자 2021년09월01일

(85) 번역문제출일자 2024년09월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/050201

(87) 국제공개번호 WO 2017/040995
국제공개일자 2017년03월09일

(30) 우선권주장
62/214,665 2015년09월04일 미국(US)

(71) 출원인
롯거스, 더 스테이트 유니버시티 오브 뉴저지
미국 뉴저지주 뉴 브룬스윅 소머셋 스트릿 올드
퀸즈

(72) 발명자
잔, 제프리
미국 뉴저지 08540, 309 스노우덴 레인 프린스턴
정, 밍데
미국 뉴저지 08904, 306 웨인 스트리트 하이랜드
파크
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
허용록

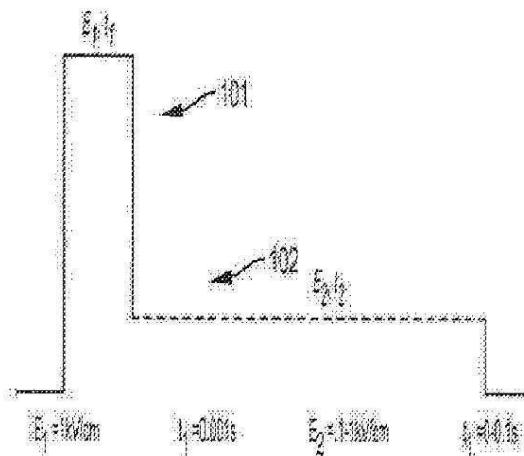
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 단일 세포로의 효율적인 문자 전달을 위한 고효율, 피드백-제어된 전기천공 마이크로디바이스

(57) 요 약

단일 세포를 형질감염하기 위한 지능형, 피드백 제어된, 마이크로규모 전기천공 시스템을 이용한 세포 전기천공 및 문자 전달을 위한 시스템 및 방법.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12M 23/16 (2013.01)

C12N 13/00 (2013.01)

G01N 15/1023 (2024.01)

G01N 15/1031 (2024.01)

G01N 2015/1006 (2013.01)

(72) 발명자

슈라이버, 데이비드, 아이.

미국 뉴저지 08889, 9 엔 허니맨 로드 화이트하우스 스테이션

린, 하오

미국 뉴저지 08854, 143 뉴블라 로드 피스캐타웨이

샨, 제리, 더블유.

미국 뉴저지 08854, 98 브렛 로드 룸 # 디-158 피스캐타웨이

명세서

청구범위

청구항 1

생물학적 세포(biological cell)를 전기천공하는 시스템으로서,

완충 용액 중에서 복수의 생물학적 세포의 흐름을 수용하도록 구성된 마이크로유체 채널 - 상기 마이크로유체 채널은 검출 영역을 포함함 -;

상기 검출 영역을 가로질러 전계를 인가하도록 구성된 한 쌍의 전극;

신호 생성기 유닛 - 상기 신호 생성기 유닛은 상기 한 쌍의 전극을 통해 제1 신호 및 제2 신호를 생성하고, 상기 제1 신호는 세포 검출 신호이고 상기 제2 신호는 투파화 신호임 -;

감지 유닛 - 상기 감지 유닛은 상기 검출 영역의 임피던스 값을 지속적으로 모니터링하도록 구성됨 -; 및
제어기 유닛 - 상기 제어기 유닛은:

완충 용액만이 흐르는 제2 검출 영역의 임피던스 값을 연속적으로 모니터링하여 기준선 문턱값을 결정하고,

상기 제1 신호의 존재 하에 상기 기준선 문턱값 이상으로 증가하는 상기 검출 영역의 임피던스 값을 모니터링하여 상기 복수의 생물학적 세포 중 단일 세포가 상기 검출 영역에 진입한 것으로 결정하고,

상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포가 상기 검출 영역에 진입한 것으로 결정한 것에 응답하여 상기 신호 생성기 유닛을 제어하여 상기 제2 신호를 생성하도록 구성됨 -;

을 포함하는, 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신호 생성기 유닛이 상기 세포 검출 신호 및 상기 투파화 신호를 동시에 생성할 수 있는, 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 감지 유닛이 록-인(lock-in) 증폭기를 포함하는, 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 감지 유닛이 상기 검출 영역 내 세포의 형광을 측정할 수 있는 영상화 디바이스를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 마이크로유체 채널이 상기 검출 영역을 통해 상기 복수의 생물학적 세포의 흐름을 유체역학적으로 집중시킬 수 있도록 하는, 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 시스템이 세포 없이 완충액의 흐름을 수용하도록 구성된 제2 마이크로유체 채널을 추가로 포함하고, 상기 제2 마이크로유체 채널은 상기 제2 검출 영역을 포함하는, 시스템.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 감지 유닛은 상기 제2 검출 영역의 임피던스 값을 검출하도록 구성되고,

상기 제2 검출 영역의 상기 임피던스 값은 상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포가 상기 검출 영역에 진입했음을 결정하기 위한 기준 신호를 제공하는, 시스템.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 신호 생성기 유닛은 상기 검출 영역 내의 상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포로 분자 전달을 야기하는 전달신호인 제3 신호를 더 생성하는, 시스템.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제어기 유닛은 상기 검출 영역의 모니터링된 임피던스 값 및 포획된 세포 실험 또는 수학적 모델로부터의 관련 데이터에 기초하여 선택된 복수의 펠스 파라미터를 갖는 상기 제2 신호를 생성하도록 상기 신호 생성기 유닛을 제어하는, 시스템.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 제어기 유닛은 투과화 문턱값보다 더 크게 증가하는 상기 검출 영역의 상기 임피던스 값을 모니터링하여 상기 제2 신호의 생성을 중지시키고, 상기 감지 유닛에 의해 검출된 상기 임피던스 값에 따라 상기 제3 신호를 생성시키도록 상기 신호 생성기 유닛을 제어하는, 시스템.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 제어기 유닛은 상기 모니터링된 임피던스 값에 기초하여 상기 제3 신호의 적어도 하나의 파라미터를 동적으로 조정하여, 세포 사멸을 나타내는 임피던스의 과도한 변화에 도달하지 않으면서 분자 전달이 가능하도록 상기 신호 생성기 유닛을 제어하는, 시스템.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 제어기 유닛은 상기 검출 영역의 상기 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값과 동일한지 여부를 결정하고,

상기 검출 영역의 상기 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값과 동일하지 않다는 결정에 응답하여, 세포 사멸을 나타내는 임피던스의 과도한 변화에 도달하지 않으면서 분자 전달이 가능하도록 상기 제3 신호의 적어도 하나의 파라미터를 동적으로 조정하도록 상기 신호 생성기 유닛을 제어하는, 시스템.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 제어기 유닛은 상기 검출 영역의 모니터링된 임피던스 값 및 포획된 세포 실험 또는 수학적 모델로부터의 관련 데이터에 기초하여 선택된 복수의 펠스 파라미터를 갖는 상기 제3 신호를 생성하도록 상기 신호 생성기 유닛을 제어하는, 시스템.

청구항 14

제8항에 있어서,

상기 제어기 유닛은,

상기 검출 영역의 모니터링된 임피던스 값이 상기 기준선 문턱값보다 작음에 따라 상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포가 상기 검출 영역을 벗어난 것으로 결정하거나, 또는 상기 검출 영역의 모니터링된 임피던스 값이 과다 노출에 대한 생존력 문턱값과 동일하다고 결정한 것에 적어도 응답하여 상기 제3 신호의 생성을 중지하도록 상기 신호 생성기 유닛을 제어하는, 시스템.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 투과화 문턱값이 세포 사멸을 일으키지 않는 최적의 세포 투과화에 대응하는, 시스템.

청구항 16

완충액 중에서 생물학적 세포를 전기천공하는 방법으로서,

상기 생물학적 세포를 검출 영역에 유체역학적으로 집중시키는 단계;

제1 전기 신호를 생성하는 단계 - 상기 제1 전기 신호는 세포 검출 신호임 -;

상기 제1 전기 신호를 이용하여 상기 검출 영역의 임피던스 값을 지속적으로 모니터링하는 단계;

완충 용액만이 흐르는 제2 검출 영역의 임피던스 값을 연속적으로 모니터링하여 기준선 문턱값을 결정하고, 상기 제1 전기 신호의 존재 하에 상기 기준선 문턱값 이상으로 증가하는 상기 검출 영역의 임피던스 값을 모니터링하여 복수의 생물학적 세포 중 단일 세포가 상기 검출 영역에 진입한 것으로 결정하는 단계;

상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포가 상기 검출 영역에 진입한 것으로 결정한 것에 응답하여, 제2 전기 신호를 생성하는 단계 - 상기 제2 전기 신호는 투과화 신호임 -;

상기 제2 전기 신호가 생성된 이후에 상기 검출 영역의 모니터링된 임피던스 값이 투과화 문턱값보다 큰지 여부를 판단하는 단계; 및

상기 검출 영역의 상기 모니터링된 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값보다 작은 것으로 결정한 것에 응답하여 상기 제2 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터를 조정하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 검출 영역의 상기 모니터링된 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값 이상이라는 결정에 응답하여 상기 제2 전기 신호를 정지시키는 단계; 및

제3 전기 신호를 생성하는 단계 - 상기 제3 전기 신호가 상기 검출 영역 내의 상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포로 문자 전달을 야기함 -;

를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 검출 영역의 상기 모니터링된 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값과 동일한 지의 여부를 판단하는 단계; 및

상기 검출 영역의 상기 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값과 동일하지 않다는 결정에 응답하여 상기 제3 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터를 조정하는 단계;

를 추가로 포함하고,

상기 제3 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터를 조정하는 단계는 세포 사멸을 나타내는 임피던스의 과도한 변화에 도달하지 않으면서 문자 전달이 가능하도록 하는 단계인, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 검출 영역의 모니터링된 임피던스 값이 상기 기준선 문턱값보다 작음에 따라 상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포가 상기 검출 영역을 벗어난 것으로 결정하거나, 또는 상기 검출 영역의 모니터링된 임피던스 값이 과다 노출에 대한 생존력 문턱값과 동일하다고 결정한 것에 적어도 응답하여 상기 제3 전기 신호를 정지시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 20

제16항에 있어서,

상기 제2 검출 영역의 임피던스 값은 상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포가 상기 검출 영역에 진입한 것으로 결정하기 위한 기준 신호를 제공하는, 방법.

청구항 21

제18항에 있어서,

상기 제2 전기 신호 또는 상기 제3 전기 신호의 상기 적어도 하나의 파라미터가: 전계 진폭, 펄스 지속 시간, 펄스 트레イン 주파수, 둑티 사이클 및 사이클 수의 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 22

제16항에 있어서,

상기 투과화 문턱값이 실험적으로 결정되는, 방법.

청구항 23

제16항에 있어서,

상기 투과화 문턱값이 수학적 모델을 사용하여 결정되는, 방법.

청구항 24

제16항에 있어서,

상기 투과화 문턱값이 세포 사멸을 일으키지 않는 최적의 세포 투과화에 대응하는, 방법.

청구항 25

복수의 생물학적 세포의 전기천공 방법으로서,

복수의 생물학적 세포의 연속적인 유동을 단일-파일 유동(single-file flow)으로 유체역학적으로 짐중시키는 단계 - 상기 단일-파일 유동이 상기 복수의 생물학적 세포 각각을 검출 영역을 통해 통과시킴 -; 제1 전기 신호를 생성하는 단계 - 상기 제1 전기 신호는 세포 검출 신호임 -;

상기 제1 전기 신호를 이용하여 상기 검출 영역의 임피던스 값을 지속적으로 모니터링하는 단계;

완충 용액만이 흐르는 제2 검출 영역의 임피던스 값을 연속적으로 모니터링하여 기준선 문턱값을 결정하고, 상기 제1 전기 신호의 존재 하에 상기 기준선 문턱값 이상으로 증가하는 상기 검출 영역의 임피던스 값을 모니터링하여 상기 복수의 생물학적 세포 중 단일 세포가 상기 검출 영역에 진입한 것으로 결정하는 단계;

상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포가 상기 검출 영역에 진입한 것으로 결정한 것에 응답하여 제2 전기 신호를 생성하는 단계 - 상기 제2 전기 신호는 투과화 신호임 -;

상기 제2 전기 신호가 생성된 이후에 상기 검출 영역의 모니터링된 임피던스 값이 투과화 문턱값보다 큰지 여부를 판단하는 단계; 및

상기 검출 영역의 상기 모니터링된 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값보다 작은 것으로 결정한 것에 응답하여 상기 제2 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터를 조정하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 검출 영역의 상기 모니터링된 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값 이상이라는 결정에 응답하여 상기 제2 전기 신호를 정지시키는 단계; 및

제3 전기 신호를 생성하는 단계 - 상기 제3 전기 신호가 상기 검출 영역 내의 상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포로 문자 전달을 야기함 -;

를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 검출 영역의 상기 모니터링된 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값과 동일한 지의 여부를 판단하는 단계; 및

상기 검출 영역의 상기 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값과 동일하지 않다는 결정에 응답하여 상기 제3 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터를 조정하는 단계;

를 추가로 포함하고,

상기 제3 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터를 조정하는 단계는 세포 사멸을 나타내는 임피던스의 과도한 변화에 도달하지 않으면서 문자 전달이 가능하도록 하는 단계인, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 검출 영역의 임피던스 값이 상기 기준선 문턱값보다 작음에 따라 상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포가 상기 검출 영역을 벗어난 것으로 결정하거나, 또는 상기 검출 영역의 모니터링된 임피던스 값이 과다 노출에 대한 생존력 문턱값과 동일하다고 결정한 것에 적어도 응답하여 상기 제3 전기 신호를 정지시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 29

제23항에 있어서,

상기 제2 검출 영역의 임피던스 값은 상기 복수의 생물학적 세포 중 상기 단일 세포가 상기 검출 영역에 진입한 것으로 결정하기 위한 기준 신호를 제공하는, 방법.

청구항 30

제25항에 있어서,

상기 제2 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터가: 전계 진폭, 펄스 지속 시간, 펄스 트레인 주파수, 둑티 사이클 및 사이클 수의 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 31

제27항에 있어서,

상기 제3 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터가: 전계 진폭, 펄스 지속 시간, 펄스 트레인 주파수, 둑티 사이클 및 사이클 수의 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 32

제25항에 있어서,

상기 투과화 문턱값이 실험적으로 결정되는, 방법.

청구항 33

제25항에 있어서,

상기 투과화 문턱값이 수학적 모델을 사용하여 결정되는, 방법.

청구항 34

제25항에 있어서,

상기 투과화 문턱값이 세포 사멸을 일으키지 않는 최적의 세포 투과화에 대응하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2015년 9월 4일자로 출원된 미국 특허출원 제62/214,665호의 우선권을 주장하며, 그 전체가 본원에 참고로서 통합된다.

[0003] 연방 후원 연구에 관한 진술

[0004] 본 발명은 IDBR 어워드 #1959918 및 CBET 어워드 #0967598을 통해 국립과학재단(NSF)에 의해 일부 후원받았다.

[0005] 기술분야

[0006] 본 발명은 연속-흐름 방식으로 단일 세포를 형질감염시키기 위한 지능형 피드백-제어된, 마이크로규모 전기천공 시스템을 사용한, 일반적으로 세포 전기천공 및 문자전달 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 예를 들어 DNA, 약물 분자, 영상화제(imaging agent), 펩타이드, 항체 및 효소를 비롯한 소형 및 거대분자를 세포에 전달하는 것이 광범위한 연구 및 치료 응용 분야에서 충분한 잠재력을 발휘하는데 중요하지만, 세포내 전달 및 형질감염은 어려운 과제로 남아있다. 성공적인 형질감염은 생물약제(biopharmaceuticals), RNA 간섭 스크리닝 및 줄기 세포 연구를 포함한 시장을 관리하는 다양한 유형의 생의학 연구 및 생체 생산 워크플로우에서 속도-제한 단계이다. 그러나, 대부분 이 잠재력은 세포를 안전하고 효과적이며, 효율적으로 형질감염시키는 것이 어렵기 때문에 실현되지 못했다. 당면 과제는 발달 동력학, 신약 개발 및 재생 의학 연구에 중요한 관심을 갖는 1차 세포주 및 줄기 세포주와 같은, 감염이 어려운 세포주에서 특히 가변적이고, 불량한 형질감염 효율을 포함한다.

[0008] 전기천공 중에, 유전자 또는 다른 거대분자가 완충액 내에서 살아있는 세포와 혼합되고, 높은 전계의 짧은 펄스가 인가된다. 세포막은 일시적으로 다공성으로 만들어지며, 유전자 또는 거대분자가 세포에 들어간다. 그러나, 전기천공은 크게 2개의 결점때문에, 원하는 효율과 신뢰성에 미치지 못하는 경우가 많다. 첫째, 전기천공에 따른 분자 수송을 지배하는 메커니즘이 잘 알려져 있지 않다. 둘째, 전기 신호에 대한 과다-노출로 인해 투과화를 견딜 수 있는 세포의 능력과 마찬가지로, 투과화 문턱값은 모집단 내의 다른 세포와 다른 종류의 세포에 따라 다르다. 또한, 모집단내 개별 세포들 사이에서 특성들이 다른 많은 세포 집단에서 절차가 수행되기 때문에, 전기천공 조건은 세포 집단의 평균 품질을 다루기 위해서만 선택될 수 있으며; 현재 실시되는 절차는 개별 세포의 특정 특성에 적응될 수 없을 뿐만 아니라 고효율 및 자동화를 위해 동시에 맞춤화될 수 없다.

[0009] 따라서, 상기 과제를 해결할 수 있는 새롭고 개선된 마이크로유체 전기천공 장치가 필요하다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0010] 일 양태에서, 본 발명은 생물학적 세포(biological cell)를 전기천공하는 시스템을 제공하며, 상기 시스템은: 완충액 중에서 복수의 생물학적 세포의 흐름을 수용하도록 구성된 마이크로유체 채널로서, 검출 영역을 포함하는 마이크로유체 채널; 검출 영역을 가로질러 전계를 인가하도록 구성된 한 쌍의 전극; 상기 전극들을 통해 세포 검출 신호 및 투과화 신호를 생성할 수 있는 신호 생성기 유닛; 상기 검출 영역의 임피던스를 검출하도록 구성된 감지 유닛; 및 상기 감지 유닛에 의해 검출된 임피던스에 따라 상기 신호 생성기 유닛을 제어하도록 구성

된 제어기 유닛을 포함한다.

[0011] 일 구현예에서, 신호 생성기 유닛은 세포 검출 신호 및 투과화 신호를 동시에 생성할 수 있다. 다른 구현예에서, 신호 생성기 유닛은 교류(AC) 파형 및 단일 또는 일련의 직류(DC) 펄스 파형을 생성할 수 있다. 일 구현예에서, 신호 생성기 유닛은 한 쌍의 전극에 걸쳐 저-진폭의 사인파-기반 감지 전계를 생성할 수 있다. 일 구현예에서, 신호 생성기 유닛은 단일 및 일련의 DC 펄스들을 생성할 수 있다.

[0012] 일 구현예에서, 감지 유닛은 록-인(lock-in) 증폭기를 포함한다. 다른 구현예에서, 감지 유닛은 세포 검출 신호와 투과화 신호 모두를 동시에 분석할 수 있다. 다른 구현예에서, 감지 유닛은 검출 영역내 세포의 형광을 측정할 수 있는 영상화 디바이스를 추가로 포함한다.

[0013] 일 구현예에서, 마이크로유체 채널은 검출 영역을 통해 복수의 생물학적 세포의 흐름을 유체역학적으로 센터링 할 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 시스템은 완충액의 흐름을 수용하도록 구성된 제2 마이크로유체 채널을 추가로 포함하고, 제2 마이크로유체 채널은 제2 검출 영역을 포함한다. 일 구현예에서, 감지 유닛은 제2 검출 영역의 임피던스를 검출하도록 구성된다.

[0014] 일 구현예에서, 신호 생성기 유닛은 전달 신호를 생성할 수 있다. 일 구현예에서, 제어기 유닛은 감지 유닛에 의해 검출된 임피던스에 따라 투과화 신호를 생성하도록 신호 생성기 유닛을 제어한다. 다른 구현예에서, 제어기 유닛은 신호 생성기 유닛을 제어하여 투과화 신호의 생성을 중지시키고, 감지 유닛에 의해 검출된 임피던스에 따라 전달 신호를 생성시킨다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 완충액 중에서 생물학적 세포를 전기천공하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 생물학적 세포를 검출 영역에 유체역학적으로 집중시키는 단계; 제1 전기 신호를 생성하는 단계; 상기 제1 전기 신호를 이용하여 상기 검출 영역의 임피던스 값을 모니터링하는 단계로서, 기준선 문턱값을 넘는 상기 검출 영역의 임피던스 값 증가는 상기 생물학적 세포의 존재를 가리키는 단계; 상기 검출 영역의 임피던스의 증가에 응답하여, 제2 전기 신호를 생성하는 단계; 상기 검출 영역의 임피던스 값이 투과화 문턱값보다 큰지 여부를 판단하는 단계; 및 상기 검출 영역의 상기 임피던스 값을 결정하는 것에 응답하여 상기 제2 펄스 신호의 적어도 하나의 파라미터를 조정하는 단계를 포함한다.

[0016] 일 구현예에서, 제1 전기 신호는 연속적인 저-진폭 사인 파형을 포함한다. 다른 구현예에서, 제2 전기 신호는 DC 펄스 파형을 포함하며, 상기 DC 펄스 파형은 한정된 주파수에서 하나의 펄스 또는 다중 펄스를 포함한다.

[0017] 일 구현예에서, 상기 방법은 상기 측정된 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값과 거의 동일하다고 판단하는 것에 응답하여 상기 제2 전기 신호를 정지시키는 단계; 및 제3 전기 신호를 생성하는 단계로서, 상기 제3 전기 신호가 상기 검출 영역 내에서 집중된 상기 세포내로의 분자 전달을 용이하게 하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 방법은 검출 영역의 임피던스 값이 투과화 문턱값과 거의 동일한 지의 여부를 판단하는 단계; 및 상기 검출 영역의 상기 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값과 거의 동일하지 않다는 판단에 응답하여 상기 제3 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터를 조정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0018] 일 구현예에서, 상기 방법은 검출 영역의 임피던스 값이 생존력 문턱값 이하라고 또는 기준선 문턱값과 동일하다고 판단하는 것에 응답하여 제3 전기 신호를 정지시키는 단계를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 제3 전기 신호는 검출 영역의 임피던스 값이 생존력 문턱값 이하라고 판단하는 것에 응답하여 정지된다. 다른 구현예에서, 제3 전기 신호는 검출 영역의 임피던스 값이 기준선 문턱값과 동일하다는 판단에 응답하여 정지된다.

[0019] 일 구현예에서, 기준선 문턱값은 완충 용액만이 흐르는 제2 검출 영역의 임피던스 값을 연속적으로 모니터링함으로써 결정된다.

[0020] 일 구현예에서, 제2 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터는 전계 진폭, 펄스 지속 시간, 펄스 트레인 주파수, 듀티 사이클 및 사이클 수의 그룹으로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 제3 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터는 전계 진폭, 펄스 지속 시간, 펄스 트레인 주파수, 듀티 사이클 및 사이클 수의 그룹으로부터 선택된다.

[0021] 일 구현예에서, 투과화 문턱값은 실험적으로 결정된다. 또 다른 구현예에서, 투과화 문턱값은 수학적 모델을 사용하여 결정된다. 일 구현예에서, 투과화 문턱값은 세포 사멸을 일으키지 않는 최적의 세포 투과화에 대응한다.

[0022] 또 다른 양태에서, 본 발명은 복수의 생물학적 세포의 전기천공 방법을 제공하며, 상기 방법은 복수의 생물학적 세포의 연속적인 유동을 단일-파일 유동(single-file flow)으로 유체역학적으로 집중시키는 단계로서, 단일 파일 유동이 상기 복수의 생물학적 세포 각각을 검출 영역을 통해 통과하는 단계; 제1 전기 신호를 생성하는

단계; 상기 제1 전기 신호를 이용하여 상기 검출 영역의 임피던스 값을 모니터링하는 단계로서, 상기 기준선 문턱값을 넘는 상기 검출 영역의 임피던스 값의 증가가 상기 복수의 생물학적 세포 각각의 존재를 나타내는 단계; 상기 검출 영역의 임피던스 증가에 응답하여, 제2 전기 신호를 생성하는 단계; 상기 검출 영역의 임피던스 값이 투과화 문턱값보다 큰지 여부를 판단하는 단계; 상기 검출 영역의 임피던스 값을 결정하는 것에 응답하여 상기 제2 펄스 신호의 적어도 하나의 파라미터를 조정하는 단계를 포함한다.

[0023] 일 구현예에서, 상기 방법은 상기 측정된 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값과 거의 동일하다는 판단에 응답하여 상기 제2 전기 신호를 정지시키는 단계; 및 제3 전기 신호를 생성하는 단계로서, 상기 제3 전기 신호가 상기 검출 영역 내에 집중된 상기 복수의 생물학적 세포들 각각으로의 분자 전달을 야기하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 방법은 검출 영역의 임피던스 값이 투과화 문턱값과 거의 동일한 지의 여부를 판단하는 단계; 및 상기 검출 영역의 임피던스 값이 상기 투과화 문턱값과 동일하지 않다고 판단하는 것에 응답하여 상기 제3 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터를 조정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0024] 일 구현예에서, 상기 방법은 상기 검출 영역의 임피던스 값이 생존력 문턱값 이하라고 또는 기준선 문턱값과 동일하다고 판단하는 것에 응답하여 상기 제3 전기 신호를 정지시키는 단계를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 제3 펄스는 검출 영역의 임피던스 값이 생존력 문턱값 이하라고 판단하는 것에 응답하여 정지된다. 다른 구현예에서, 제3 전기 신호는 검출 영역의 임피던스 값이 기준선 문턱값과 거의 동일하다고 판단하는 것에 응답하여 정지된다.

[0025] 일 구현예에서, 기준선 문턱값은 완충 용액만이 흐르는 제2 검출 영역의 임피던스 값을 연속적으로 모니터링함으로써 결정된다.

[0026] 일 구현예에서, 제2 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터는: 전계 진폭, 펄스 지속 시간, 펄스 트레인 주파수, 뉴티 사이클 및 사이클 수의 그룹으로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 제3 전기 신호의 적어도 하나의 파라미터는: 전계 진폭, 펄스 지속 시간, 펄스 트레인 주파수, 뉴티 사이클 및 사이클 수의 그룹으로부터 선택된다.

[0027] 일 구현예에서, 투과화 문턱값은 실험적으로 결정된다. 또 다른 구현예에서, 투과화 문턱값은 수학적 모델을 사용하여 결정된다. 일 구현예에서, 투과화 문턱값은 세포 사멸을 일으키지 않는 최적의 세포 투과화에 대응한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 이하의 도면을 참조하여 구현예가 설명될 것이며, 도면 전체에서 동일한 번호는 동일한 항목을 나타낸다.

도 1a 및 도 1b는 일 구현예에 따른 투과화 및 전달 전기천공 신호의 개략도를 도시하며;

도 2a, 도 2b 및 도 2c는 일 구현예에 따라 세포가 검출 영역에 진입할 때 및 세포가 투과화될 때 시간에 따른 임피던스의 변화를 도시하며;

도 3a 내지 도 3g는 복수의 구현예에 따른 스마트 전기천공 시스템의 개략도를 도시하며;

도 4a는 일 구현예에 따라, 연속 흐름으로 세포를 전기천공하는 흐름도 방법을 도시한다.

도 4b는 일 구현예에 따라, 도 4a의 단계들을 수행하기 위한 자동 전기천공 제어 알고리즘의 동작을 도시한 상태도를 나타낸다.

도 5a 및 도 5b는 일 구현예에 따른, 세포 검출에 대한 임피던스 플롯의 변화를 나타내는 전류 크기 대 시간 선도를 도시한다.

도 6a는 포획된 세포 실험에 대한 연속 임피던스 추적 하에 세포막 투과화 전류 크기의 현저한 증가를 나타내는 전류 크기 대 시간 플롯을 도시한다.

도 6b는 단일 세포를 트랩하고 임피던스 정보를 스캔하도록 설계된 마이크로유체 세포 트랩 채널을 도시한다.

도 7a 및 도 7b는 일 구현예에 따른 문턱 임피던스 모델링 및 대응하는 실험 데이터를 각각 나타낸다.

도 7c는 일 구현예에 따른 모델 세포/전해질 등가 회로를 나타낸다.

도 8a 내지 도 8d는 일 구현예에 따른 세포 검출, 투과화 및 전달에 대한 임피던스 플롯의 변화를 나타내는 전류 대 시간 선도를 도시한다.

도 9는 본원에 기술된 방법을 구현할 수 있는 예시적인 컴퓨터 하드웨어를 이해하는데 유용한 블록도이다.

도 10은 일 구현예에 따라, 지속 시간에 따른 세포막 반응의 특성분석을 나타낸다.

도 11은 일 구현예에 따라, 전계 강도 및 지속 기간 모두에 따른 세포막 반응의 전체 특성분석을 도시한다.

도 12는 일 구현예에 따른, 광학 프로피디움 요오드화물 형광 검증과 함께, 전계 강도 및 지속 기간 둘 다에 따른 세포막 반응의 특성분석을 도시한다.

도 13a 내지 도 13f는 일 구현예에 따라, 다양한 전계 강도 및 지속 시간 파라미터로 처리된 세포 집단의 세포 집단 히스토그램을 도시한다.

도 14는 일 구현예에 따른, 다양한 전기천공 조건에 대한 세포의 생존력을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029]

유동 단일 세포를 형질감염하기 위한 지능형, 피드백 제어된, 마이크로규모 전기천공 시스템을 사용한, 세포 전기천공 및 문자 전달을 위한 방법 및 시스템이 개시된다.

[0030]

본 명세서에 일반적으로 기술되고 첨부된 도면에 도시된 구현예의 구성 요소는 매우 다양한 상이한 구성으로 배열되고 설계될 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 따라서, 도면들에 도시된 다양한 구현예들의 이하의 더 상세한 설명은 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니라 단지 다양한 구현예들을 나타내는 것이다. 구현예의 다양한 양태가 도면에 제시되어 있지만, 도면은 구체적으로 지시되지 않는 한 반드시 축척대로 도시되지는 않는다.

[0031]

본 발명은 그 사상 또는 본질적인 특성을 벗어나지 않으면서 다른 특정 형태로 구현될 수 있다. 기술된 구현예들은 모든 면에서 예시적인 것으로 간주되어야한다. 그러므로, 본 발명의 범주는 첨부된 청구범위에 의해 표시된다.

[0032]

본 명세서 전반에 걸쳐 특징, 이점 또는 유사한 표현을 참조하는 것은 본 발명과 함께 실현될 수 있는 모든 특징 및 이점이 본 발명의 임의의 단일 구현예에 있어야 하거나 있다는 것을 의미하지는 않는다. 오히려, 특징 및 이점을 나타내는 표현은 구현예와 관련하여 기술된 특정 특징, 이점 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 구현예에 포함됨을 의미하는 것으로 이해된다. 따라서, 명세서 전체에 걸쳐, 특징 및 이점, 그리고 유사한 표현에 대한 논의는 동일한 구현예를 지칭할 수도 있지만, 반드시 그런 것은 아니다.

[0033]

또한, 본 발명의 설명된 특징, 이점 및 특성은 하나 이상의 구현예에서 임의의 적당한 방식으로 결합될 수 있다. 관련 기술 분야의 당업자는 본 명세서의 설명에 비추어, 특정 구현예의 하나 이상의 특정 특징 또는 이점 없이 본 발명이 실시될 수 있음을 인식할 것이다. 다른 경우들에서, 본 발명의 모든 구현예들에 존재하지 않을 수 있는 특정 구현예들에서 추가적인 특징들 및 이점들이 인식될 수 있다.

[0034]

본 명세서 전체에 걸쳐 "일 구현예", "구현예" 또는 유사한 표현을 참조하는 것은 기술된 구현예와 관련하여 설명된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 구현예에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸쳐 "일 구현예에서", "구현예에서"라는 어구 및 유사한 표현은 모두 동일한 구현예를 지칭할 수도 있지만, 반드시 그런 것은 아니다.

[0035]

본 명세서에서 사용된 단수 형태는 문맥에 달리 명시되어 있지 않는 한, 복수 인용을 포함한다. 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서 사용된 "포함하는"이란 용어는 "포함하지만, 이에 한정되지 않는"을 의미한다.

[0036]

전기천공은 문자 전달을 위해 세포의 세포질에 접근하는 수단이다. 이 기술에서, 시험관내 또는 생체내에서 인가될 수 있는 전계는 DNA, RNA 및 아미노산과 같이 생물학적으로 활성인 분자가 세포로 들어갈 수 있는 세포막을 일시적으로 투과시킨다. 본 발명은 세포를 검출하고 전기천공하기 위한 플로우-기반, 자동화된 세포 검출-및-전기천공 신호 시스템을 위한 시스템 및 방법을 기술한다.

[0037]

일 구현예에서, 본 발명의 시스템은 전기천공 이전, 도중 및 이후에 마이크로유체 채널을 통해 흐르는 단일 세포의 세포막 임피던스를 결정하기 위해 검출 영역을 가로질러 흐르는 전류를 연속적으로 모니터링한다. 상기 시스템은 제1 전기 검출 신호를 사용하여 상기 마이크로유체 채널의 검출 영역의 임피던스를 모니터링하여 단일 세포가 상기 검출 영역에 들어가는 시점을 결정하는 세포막 투과화 피드백 제어 투프를 포함할 수 있는 감지 유닛을 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 제1 전기 검출 신호는 저-진폭의 AC 사인 파형이다. 검출 영역에 진입하는 단일 세포는 예를 들어 콜터 카운터(coulter counter)에서 펠스 저항 센서와 유사한 기준선 문턱값을 넘는

임피던스 상승으로 재현될 수 있다. 제2 전기 투과화 신호의 인가는 단일 세포의 세포막을 투과화한다. 시스템은 소정의 준-치사성(sub-lethal) 투과화 문턱값이 충족될 때까지 제2 투과화 신호의 파라미터를 자동으로 조정할 수 있다. 검출된 세포의 임피던스는 지속적으로 모니터링되어 준-치사성 투과화 문턱값이 달성되는 시점을 결정한다. 제3 전기 전달 신호는 분자를 세포 세포질에 전달하도록 인가된다. 제3 전달 신호의 파라미터는 시스템에 의해 자동으로 조정될 수 있다. 이 프로세스 동안, 검출 영역 및 검출된 단일 세포의 임피던스는, 임피던스 변화가 가능한 비가역적인 세포 손상을 야기할 수 있는 소정의 최대 문턱값을 초과하는지를 검출하기 위해 연속적으로 모니터링될 수 있고, 이로써 피드백 제어 루프가 제3 전기 전달 신호를 턴오프(turn off)하고, 다음 통과 세포를 위해 시스템을 재설정한다. 상기 문턱값은 검출된 세포의 세포 크기 및 세포집단 유형에 기초하여, 미리 수행된 보정 결과의 데이터 세트 및/또는 계산 모델을 사용하여 유도된 실시간을 포함하는 데이터베이스로부터 선택될 수 있다.

[0038] 일 구현예에서, 연속-흐름 마이크로채널의 한 쌍의 전극은 저진폭의 AC 사인파를 인가하여 전극들 사이의 검출 영역에서의 임피던스 변화를 감지한다. 통과 세포로부터의 전류 변위로 인한 임피던스의 증가시, 신호 생성기 유닛은 DC 펄스 파형을 출력하여 세포의 세포막을 투과성으로 만든다. 감지 유닛은 막이 투과성 DC 펄스 파형의 결과로 그의 막의 투과화때문에 더 전도성이 됨에 따라 세포의 임피던스 변화를 모니터링한다. 이 막 투과화는 전기 임피던스 관독 값으로 반영되어, 특정 세포에 대한 세포 사멸과 관련된 임피던스 문턱값이 초과되지 않았다는 것을 보장하기 위해 미리 결정된 문턱값에 대해 모니터링되고 검사된다. 피드백 루프는 문턱값을 초과하지 않는지 모니터링하고, 투과성 DC 펄스 파형이 인가되고, 문턱값에 도달하면 투과성 DC 펄스 파형이 정지된다. 외인성 분자를 세포 내로 유도하기 위해 전달 DC 펄스 파형이 그 다음 인가되며, 막 투과성 DC 펄스 파형에 비해 진폭이 더 낮지만, 막 개방을 유지하고 전기영동으로 전달을 유도하기 위해, 지속 시간을 길게 한다. 이 과정 동안, 감지 유닛은 세포의 임피던스를 지속적으로 모니터링하여 투과화 관독값이 임박한 세포 사멸을 나타내는 문턱값을 초과하지 않았다는 것을 확실하게 하도록 온 상태로 유지된다.

[0039] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 신호는 임의의 시변 파형이며, 예를 들어, 교류(AC) 파형 또는 직류(DC) 파형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 신호는 AC 사인파 파형, 단일 DC 펄스 파형 또는 일련의 DC 펄스 파형일 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 전기 검출 신호는 AC 파형일 수 있다. 다른 구현예에서, 제1 전기 검출 신호는 일련의 DC 펄스 파형일 수 있다. 다른 구현예에서, 제2 전기 투과화 신호는 DC 펄스 파형 또는 일련의 DC 펄스 파형일 수 있다. 일부 구현예에서, 제3 전기 전달 신호는 DC 펄스 파형 또는 일련의 DC 펄스 파형일 수 있다.

[0040] 도 1a 및 도 1b는 상기 기술된 바와 같은 투과화 신호 및 전달 신호, 즉 분자 전달을 위한 제2 신호(102)가 제시간에 투과화를 위한 제1 신호(101)를 뒤따르는 것을 도시한다. 제1 높은 필드("HV") 신호의 인가는 일반적으로 막횡단 전위(transmembrane potential)의 임계 문턱값(critical threshold)을 극복하기 위해 막 투과화에 필요한 조건이다. 반면에, 일단 투과화가 달성되면, 낮은 필드("LV") 신호가 작고 큰 분자를 효과적으로 전달하는 동시에 필드 노출로 인한 손상을 감소시키는 데 사용될 수 있다. 따라서, 2-신호 전기천공 시스템은 제1 신호가 고-진폭이고 짧은 지속 시간인 독특한 설계로 세포를 비가역적으로 손상시키지 않으면서 세포막을 투과화하는 역할을 하며, 제2 신호는 지속 시간이 더 길고 막 공극을 계속 열어, 세포 내로 분자들을 전기영동적으로 유도하는 역할을 할 수 있다. 이러한 방식으로 일련의 신호를 사용하면, 세포 전기천공 및 분자 수송 효율이 공지된 전기천공 기술에 비해 증가된 세포 생존력과 동시에 개선된다. 전체 자동 전기천공 시스템과 관련하여, 투과화 신호 및 전달 신호 모두는 상기 신호를 언제 그리고 얼마나 많이 인가할 것인지를 제어하는 중앙 처리 알고리즘을 포함하는 제어기 유닛에 의해 모니터링, 실행 및/또는 조절될 수 있다. 중앙 처리 알고리즘은 또한 관찰중인 단일 세포의 존재가 남아있는 동안 세포막 임피던스 모니터링 기간동안 언제든지 투과화 또는 전달 신호를 개시하거나 종결시키는 것이 가능할 수 있다.

[0041] 전계 강도 및 지속 시간은 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 전체 성능을 향상시키기 위해 표적 분자에 대해 맞추어질 수 있다. 일부 구현예에서, 투과화 신호의 인가된 전계 강도는 0.1 내지 100 ms의 지속 기간을 갖는 0.1 내지 5 kV/cm의 범위일 수 있다. 다른 구현예에서, 전달 신호의 인가된 전계 강도는 0.1 내지 100 ms의 지속 기간을 갖는 0.1 내지 5 kV/cm의 범위일 수 있다. 일 구현예에서, 투과화 신호는 진폭이 크지만(예를 들어, > 1 kV/cm) 지속 시간이 짧은(예를 들어, < 1 ms) 투과화 신호로 설계되어 세포막을 전기침투시키며; 전달 신호는 진폭이 작지만(< 0.6 kV/cm) 지속 기간이 길어, 제1 신호로부터의 공극의 개방을 유지하고 세포 내로 분자를 전기영동적으로 운반하는 역할을 한다. 예를 들어, 일 구현예에서, 상기 전기천공을 수행하는 임의의 선택된 세포 유형에 대해, 두 신호의 초기 출력 진폭 및 지속 시간 정보는 문현에 공지된 설정 값에 기초하여 선택될 수 있고, 시스템 실행 전에 조작자에 의해 입력될 수 있다. 일부 구현예에서, 공통 세포 유형에 대한 파라미터는

시스템에 저장될 수 있다. 다른 구현예에서, 2개의 신호 중 임의의 신호를 인가하는 동안의 세포막 임피던스 정보의 지각 스위프(sweep)에 의존하여, 중앙 제어 알고리즘은 세포 생존력을 보존하기 위해 세포막 상태의 지속적인 추적/스위핑을 기반으로 신호들 중 어느 하나를 변경(예를 들어, 진폭과 같은 파라미터를 변경, 종결 또는 연장)시키는 능력을 보유한다.

[0042] 예를 들어, 일 구현예에서, 제1 신호는 다른 세포 및 분자 유형에 대한 낮은 전달 및 높은 생존력으로 상당한 투파화를 촉진시키기 위해 각각 항상 강도 및 지속 시간에서 $V1 = 100V$ ($E1 = 100,000V/m$) 및 $t1 = 0.001$ 초로 프로그래밍될 수 있다. 제2 LV 신호 파라미터는 분자의 크기 및 전하, 세포 유형 및 HV 신호 파라미터를 표적화하도록 프로그래밍될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 제2 신호는 강도 및 지속 시간에서 1 내지 $10V/m$ 및 $t1 = 0$ 내지 0.1 초로 프로그래밍될 수 있다. 전기 신호 진폭 및 지속 시간 값은 또한 다양한 세포 유형을 다루기 위해 자동으로 동적으로 조정될 수 있다. 자동화된 전기천공 시스템과 관련하여, 상기 전기천공을 겪는 임의의 선택된 세포 유형에 대해, 작동자는 단일 세포의 검출 및 상기 임피던스 판독시에, 세포막 투파화 표시 신호가 시스템에 의해 검출될 때까지, 진폭을 밀리초당 10 kV/cm 전계의 최대 증가율 또는 그 미만으로 0 kV/cm 전계와 같은 기본값에서부터 점진적으로 증가시킴으로써 투파화 신호에 대한 초기 파라미터를 시스템이 결정하도록 하는 옵션을 갖는다. 제1 신호의 전계 및 지속 기간은 이 유형의 세포에 대한 미래의 기준으로서 사용하기 위해 기록 및 저장될 수 있다.

[0043] 또한, 제2 신호의 인가는 제1 신호에 의해 감소된 전계 강도를 갖는 신호가 사용될 수 있는, 제1 펄스의 전계 강도에 기초할 수 있다. 예를 들어, 1 kV/cm 전계 강도가 제1 신호에 의해 세포를 투파화시키는데 사용되면, 시스템은 0.6 kV/cm 전계 강도의 필드를 출력하기 위해 40%와 같은 사용자-정의 가능한 감소로 제2 신호를 개시할 수 있다. 세포막 상태의 지속적인 추적은 또한 세포 생존력에 관한 정보를 제공할 수 있으며, 제2 신호는 비가역적 손상 지점(사전-교정을 통해 결정된 임계점) 또는 전달된 재료의 포화 지점(사전-교정을 통해 결정된 임계점)에 도달하는 것에 가까운 세포 생존력에 기초하여 종결될 수 있다.

[0044] 일 구현예에서, 2-신호 전기천공 시스템은 마이크로규모 수준에서 작동하도록 설계될 수 있으며, 전기분해의 생성없이 전기천공동안 세포막 투파화 반응을 측정하기 위해, 두개의 신호는 투파성 요건을 충족시키기 위해 적절한 진폭 조정과 함께 조절가능한 주파수(1 Hz 내지 1 GHz, 0 내지 100% 뒤틀 사이클)에서, DC 펄스의 트레인으로 "절단(chopped)"될 수 있다. 일 구현예에서, 세포 유형, 구조, 완충제 특성, 마이크로유체 채널 특성 등에 기초한 투파화 신호의 실험적 특성화 및/또는 계산 모델링을 포함하는 데이터베이스가 생성될 수 있다. 이하에서 논의되는 바와 같이, 신호는 데이터베이스 및/또는 데이터베이스를 기반으로 하는 계산 모델링을 사용하여 검출된 세포 및 기타 특성을 기반으로 설계될 수 있다.

[0045] 일부 구현예에서, 본 발명의 시스템은 마이크로유체 채널의 검출 영역 내의 세포를 검출하기 위해 마이크로유체 채널의 검출 영역을 모니터링하고, 임피던스 모니터링을 통해 검출된 세포의 투파화 상태를 모니터링한다. 도 2a 및 도 2b는 세포가 마이크로유체 채널을 통해 이동함에 따른 전체 채널 임피던스의 변화를 도시한다. 교류 검출 신호가 마이크로유체 채널을 가로질러 인가되고, 세포(210)가 마이크로유체 채널(200)을 통해 인출(drawn)될 때, 이는 주변 전해질을 변위시켜 액체의 선택적 전류-기반 센서 검출(202) 하에 전기 임피던스를 잠시 증가시키고(저항성 펄스와 유사), 이것은 옴의 법칙에 따라 채널을 가로지르는 전류(203)의 변화를 통해 모니터링된다. 이것은 저항성 펄스의 수 및 펄스의 크기에 기반한 크기 정보(sizing information)를 통한 세포 열거를 허용하고, 이는 변위된 전해질의 부피에 따라 차례로 달라진다. 임피던스의 증가는 세포막을 포함하는 비전도성 지질 이중층이 손상되지 않고 세포내 및 세포간 용액의 열린 소통을 방해하기 때문에 발생한다. 그러나, 일단 투파화되면(220), 세포는 전도성이 되고, 임피던스는 떨어지게 된다(204)(그리고, 전류 증가함). 임피던스의 변화는 도 2에 도시된 바와 같이 세포의 투파화 상태의 특성을 제공하도록 검출될 수 있으며, 인가된 전계는 동적으로 조절되어 상기 기술된 바와 같이 전달을 최대화하기 위한 특정 세포 유형 및 크기에 대한 저 강도의, 잘 견딜 수 있는 맞춤형 전계로 전환될 수 있다. 도 2c는 유사한 원리를 사용하여 세포 도입 및 투파화를 검출하기 위해, 임피던스 하락을 사용하는 연속 유동 프로세스를 도시한다.

[0046] 또한, 도 3a 내지 도 3c는 각각의 세포의 투파화 상태를 인식하고 투파화 신호를 동적으로 변조하여 고강도 전계에 대한 과다 노출을 방지하고, 그후 원하는 분자(들)를 세포 내로 유도하도록 특별히 설계된 전달 신호를 인가하는 본 발명의 "스마트" 전기천공 시스템의 일 구현예를 도시한다.

[0047] 도 3a는 스마트 전기천공 시스템(300)의 개략도를 제공한다. 상기 시스템은 다른 유형의 세포들을 투파화하기 위한 완전 자율, 동기화된, 임피던스 피드백-제어 마이크로-전기천공 플랫폼을 형성하기 위해, 전기 투파화 측정 장치(320)와 통합된 마이크로유체 세포 핸들링 시스템(310)을 포함할 수 있다.

[0048]

마이크로유체 세포 핸들링 시스템(310)은 완충 용액에서 복수의 생물학적 세포의 흐름을 수용하도록 구성된 마이크로유체 채널을 포함할 수 있으며, 상기 마이크로유체 채널은 검출 영역을 포함한다. 전기 투과화 장치(320)는 검출 영역을 가로질러 전계를 인가하도록 구성된 한 쌍의 전극; 상기 전극들을 통해 세포 검출 신호 및 투과화 신호를 생성할 수 있는 신호 생성기 유닛; 상기 검출 영역의 임피던스를 검출하도록 구성된 감지 유닛; 및 상기 감지 유닛에 의해 검출된 임피던스에 따라 상기 신호 생성기 유닛을 제어하도록 구성된 제어기 유닛을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 전기천공 중에 세포막에서 발생하는 임피던스 변화는 록-인 증폭기(325)를 사용하여 검출되고 모니터링되어, 투과화의 지표로서 사용된다. 일 구현예에서, 신호 생성기 유닛은 하나 이상의 전기 신호 생성기를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 생성기 유닛은 하나 이상의 전기 신호 생성기와 통합된 전기 기록 장치를 포함할 수 있으며, 제어기 유닛(여기서 도시되지 않음)은 중앙 처리 알고리즘에 따라 세포 임피던스 피드백 정보를 사용하여 신호 파라미터를 동적으로 변조하도록 프로그래밍될 수 있다. 일 구현예에서, 전기 투과화 장치(320)는 문자 전달 및 세포 생존력을 향상시키기 위해, 피드백 제어 루프(301)를 이용하여, 임피던스 변화의 중증도에 기반하여 신호의 지속 시간 및 규모를 조절하기 위한 전극(312(a) 및 312(b))으로 상기 제어기 유닛에 의해 생성된 신호 피드백 제어 신호를 송신한다. 일 구현예에서, 제어기 유닛은 록-인 증폭기(325)로부터의 임피던스 판독치 및 신호 생성기 유닛(326)으로부터의 신호 특성을 이용하여, 제어 신호를 생성할 수 있다. 신호 생성기 유닛은 피드백 루프를 통해 신호를 생성시키고/시키거나, 전극과 통신하도록 사용될 수 있다. 투과화 장치(320)는 또한 투과화를 위한 문턱값을 분석하고 결정하기 위한 감지 유닛(327)을 포함할 수 있다. 투과화 장치(320)는 또한 식별 가능한 또는 개선된 세포 전체 임피던스 또는 막 투과화 신호를 허용하도록 한정된 공간을 통한 단일 세포 흐름을 허용하는 다양한 설계의 폐쇄 마이크로유체 채널인 DUT(328)를 포함할 수 있다.

[0049]

세포 핸들링 시스템(310)은 한정된 검출 영역(312)에서 단일 세포를 유체역학적으로 집중시키도록 설계된 마이크로유체 장치(311)를 포함할 수 있다. 신호는 검출 영역(312)내 세포의 검출시에 스마트 전기천공기에 의해서만 인가될 수 있으며, 세포막 임피던스는 모니터링되고, 검출 영역에 세포가 존재하지 않음을 나타내는 기준선 문턱값, 효율 및 세포 생존력을 최대화하는 준-치사 투과화 문턱값, 그리고 세포 생존력이 수용가능한 양보다 낮아진 것을 넘어서는 최대 투과화 문턱값과 같은 다양한 문턱값들과 비교될 수 있다. 전기천공 장치 및 세포 유형에 대한 문턱값은 과도-전기투과화를 방지하기 위해, 교정 중에 미리 확립되거나, 사용 중에 실시간으로 결정될 수 있다. 임계 조건이 일단 충족되면, 다양한 신호를 인가, 종결 또는 변경하도록 시스템이 구성될 수 있다.

[0050]

도 3b는 일 구현예에 따른 스마트 전기천공 시스템의 마이크로유체 세포 핸들링 시스템(310)을 도시한다. 상기 시스템은 당업자에게 공지된 미세가공 기술을 사용하여 설계될 수 있다. 도 3b에 도시된 바와 같이, 마이크로유체 채널(313)은 리소그래피와 같은 기술을 사용하여 유리 슬라이드 상에 패터닝될 수 있으며, 전극 사이에 전달하기 위한 단일 세포(316)를 유체역학적으로 (유체 마이크로채널(315)을 사용하여) 집중시키도록 구성될 수 있다. 측면 유입구로부터의 유체 흐름을 사용하여 세포를 유체역학적으로 단일 파일로 집중시키면, 지속적으로 세포를 도입할 수 있으며, 채널이 막히는 성향 때문에 좁은 단일 채널보다 선호된다. 세포 농도 및 유속은 세포간에 최적의 간격을 제공하도록 조절될 수 있다. 일 구현예에서, 전극(312(a) 및 312(b))은 깨끗한 유리 슬라이드 상의 리프트오프(liftoff) 기술을 이용하여 제조되며, 공동 평면 감지, 세포 투과화, 및 수송-촉진 전계를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 리소그래피 방식으로 정의된 포토레지스트 마스킹 층(EVG620 노광 시스템)을 사용하여 전극을 패터닝하여, 전극 영역을 정의하고, 1000Å 두께의 Ti/Pt 층(Kurt J. Lesker PVD75)을 스퍼터링하고, 아세톤 용액에서 포토레지스트 제거를 수행하였다. 리소그래피 방식으로 패턴화된 SU-8 네거티브 포토레지스트(Microchem, Newton, MA)가 마이크로채널 복제 성형을 위한 네가티브 템플릿으로의 역할을 하는 표준 소프트 리소그래피를 사용하여, 마이크로유체 채널이 제작된다. 폴리(디메틸 실록산)(PDMS)(Dow Corning, Midland, MI) 용액을 마스터 위에 붓고, 60°C에서 구워 네가티브 릴리프를 제조한다. PDMS를 마스터에서 벗기고, 입구와 출구에 구멍을 뚫는다. 표면을 활성화시키기 위해, PDMS 및 스퍼터링된 유리 슬라이드를 산소 플라즈마로 처리하고, 피처 정렬(feature alignment)과 함께 결합시킨다. 마이크로채널은 길이 1 cm, 너비 150 μm , 깊이 10 μm 일 수 있다. 120 내지 400 μm 의 간격을 갖는 한 쌍의 마이크로전극이 각각의 마이크로채널을 따라 지정된 위치에 한정된다. 유입구는 세포 및 샘플 도입을 위해 폴리에틸렌 튜빙(Small Parts, Miami Lakes, FL)을 사용하여 주사기 펌프(Harvard Apparatus, Cambridge, MA)에 연결된다. 전도성 애파서(Circuit Works, Inc., Somerville NJ)는 노출된 전극 패드를 동선과 융합시켜, 외부 전자장치와 연결하는데 사용된다.

[0051]

도 3c에 도시된 바와 같이, 일 구현예에서, 시스템은 또한 전극을 갖는 제2의 동일한 마이크로채널(350)을 포함할 수 있다. 제2의 동일한 마이크로채널은 완충 용액이 흐르게 되지만 세포는 존재하지 않을 수 있으며, 제2의

동일한 마이크로채널의 임피던스 값은 세포가 흐르는 제1 마이크로채널과 평행하게 샘플링되어, 차등을 위한 이상적인 기준 신호를 제공하고, 빠르게 움직이는 단일 세포를 검출하는데 도움을 줄 수 있다. 2개의 마이크로채널 각각으로부터의 마이크로전극은 전류-대-전압 변환기(318(a) 및 318(b))에 각각 연결될 수 있으며, 이는 차례로 록-인 증폭기(325)에 연결된다.

[0052] 시스템은 또한 스마트 전기천공 시스템의 투과화 스테이지 및 전달 스테이지를 영상화할 수 있는 영상화 디바이스(예를 들어, 형광 영상화 디바이스)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 전 영역(2560X2160 픽셀) 에피플루오레스턴트(epifluorescent) 이미지를 100 fps로 캡처할 수 있고, 부분 영역(100X2160)을 2000 fps에 가깝게 캡처할 수 있는 Cooke 과학적 CMOS 카메라가 사용될 수 있다. 세포가 전극 내에 있는 시간 동안에 에피플루오레스턴트 이미지를 캡처하기 위해 카메라가 트리거될 것이다.

[0053] 도 3e 내지 도 3g는 본 발명에 따른 스마트 전기천공 시스템의 다양한 구현예를 도시한다.

[0054] 도 4a는 도 3a 내지 도 3c의 스마트 전기천공 시스템을 사용하여 연속 흐름으로 단일 세포를 투과화하는 방법을 제공한다. 도 4a에 도시된 바와 같이, 단계(401)에서, 연속 유동 시스템의 세포는 단일 세포가 신호 인가를 위한 스마트 전기천공 시스템을 트리거할 수 있는 한정된 검출 영역 및 세포 임피던스를 기록하기 위한 록-인 증폭기로 도입되도록, 유체역학적으로 집중된다. 유체역학적 집중과 관련된 개념은 당업자에게 공지되어 있다.

[0055] 상이한 세포 유형은 본원에 기술된 바와 같은 스마트 전기천공 시스템을 사용하여 전기천공될 수 있다. 예로는 3T3 섬유아세포, 인간 피부 섬유아세포(HDF) 및 림프모구 세포(LCL)가 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 세포는 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 전기천공을 위해 준비될 수 있다. 예를 들어, 3T3 섬유아세포는 완전한 세포 배지에서 유지되고, 실험을 위해 수확되기 전에 80%의 컨플루언시(confluence)로 배양될 수 있다. 전기천공하기 전에, 세포는 트립신화되고 전기천공 완충액에 재현탁되어 있다. 전기천공 완충액은 pH 7.4에서 250mM 수크로스, 10mM HEPES 및 선택된 농도의 $MgCl_2$ 염의 등-삼투성 용액이다. 첨가된 $MgCl_2$ 의 양(0.4 내지 11.2 mM 범위)은 세포의 완충 용액의 최종 전도도(100 내지 2000 $\mu S/cm$ 범위)를 결정한다. 용액의 삼투압은 어드밴스드 삼투압계(Advanced Osmometer) 3D3(Advanced Instrument, Norwood MA)를 사용하여 310 mOsm/kg의 세포 적합성으로 조절된다. 트립신화된 세포를 주사기 펌프(Harvard Apparatus, Cambridge, MA)를 통해 3-유입구 마이크로장치의 중간 유입구에 도입시킨다. 3-유입구 접근법은 세포를 약 20 내지 25 μm 의 폭으로 유체역학적으로 집중시켜, 세포가 장치의 작동 영역 중앙에 단일 파일로 들어가는 것을 보장한다.

[0056] 본 명세서에 기술된 시스템 및 방법은 크기가 수백 달톤에서 수십만 달톤에 이르는 다양한 문자를 전달하는데 사용될 수 있다. 더 작은 문자는 높은 수준의 세포 생존을 유지하면서 효율적으로 전달될 수 있다. 반면에 더 큰 문자는 더 큰 세포 사멸의 대가로 세포 내로 유도하기 위해 더 높은 전계 강도 또는 더 긴 펄스를 필요로 할 수 있다. 본 발명의 "스마트" 전기천공기 시스템을 사용함으로써 생존력을 보존하면서 전달을 극대화할 수 있다. 본원에 기술된 시스템 및 방법을 사용하여 세포 내로 전달될 수 있는 문자의 예로는 제한없이, 약물 및 문자 프로브와 같은 소형 유기 화합물, 통상적으로 직접적 형질감염을 위한, 간접 RNA(siRNA), miRNA, 단백질 및 플라스미드 DNA로서 사용되는 작은 가닥의 RNA가 포함된다.

[0057] 단계(402)에서, 제1 세포 검출 신호가 검출 영역을 가로질러 인가되고, 임피던스가 모니터링된다. 일부 구현예에서, 제1 세포 검출 신호는 시뮬레이션 모델 또는 공지 문헌으로부터 얻어진 AC 검출 파형일 수 있다. AC 검출 파형은 검출 영역 내의 세포의 존재 또는 부재를 모니터링하는데 사용될 수 있다.

[0058] 단계(403)에서, 생물학적 세포가 기준선 문턱값을 넘어 증가된 임피던스 값에 의해 검출될 때 검출 영역을 가로질러 제2 투과화 신호가 인가된다. 일부 구현예에서, 제2 투과화 신호는 상기 기술된 바와 같이 짧은 지속 시간의 고주파수 DC 펄스를 포함한다. AC 검출 신호와 DC 펄스 트레인 파형은 두 파형의 단순한 중첩으로 검출 영역에 동시에 인가된다. 이러한 방식으로, 검출 영역의 임피던스 및 검출된 세포의 세포 투과화 상태는 전기천공 신호가 인가됨에 따라 연속적으로 모니터링될 수 있다. 특정 구현예에서, AC 검출 파형은 고주파수 DC 펄스 트레인과 분리될 수 있으며, 고주파수 DC 펄스 트레인은 임피던스 변화에 기초하여 검출 영역 내의 세포의 검출 시에만 인가될 수 있다. 일부 구현예에서, 투과화 신호가 개시될 때, DC 펄스 트레인 인가가 끝날 때까지 검출이 일시적으로 정지된다. 고체 상태 스위치는 신호 경로를 제어하여 투과화 신호에서 록-인 증폭기 센서의 전기 아티팩트(artifact) 생성을 방지할 수 있다.

[0059] 일 구현예에서, AC 검출 파형 및 고주파수 DC 펄스 트레인에 대한 펄스 파라미터는 (특정 세포 타입에 대해) 고정화 세포 상에서 전기천공 시스템을 사용하여 수신된 실험 데이터에 기초하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 적절한 임계 레벨, AC 파형 파라미터 및 DC 펄스 트레인 파라미터는 한 쌍의 전극 내에서 작은 세포 트랩 영역(<

5x5x10 μm)을 갖는 마이크로유체 장치에 있을 수 있으며, 세포가 트랩될 수 있다. 도 6은 트랩된 세포에 대한 록-인 증폭기의 임피던스 검출 응답을 보여준다. 일 구현예에서, 연속적인 2 V_{DC}, 100 kHz, 50% 뉴티 사이클 투과화 펄스 트레인에 중첩된 연속적인 0.2 V_{pp} 15 kHz 검출 신호가 인가될 수 있다. 라인(601)은 단지 용액이 채널을 통해 흐를 때의 임피던스를 나타낸다. 트랩에 세포를 삽입하면 임피던스가 급격히 떨어진다(라인(602)). 낮은 크기(0.2 kV/cm)의 전계가 연속적으로 인가될 수도 있으므로, 몇 초 후에 세포는 비가역적인 전기투과화를 경험하게 된다. 전류 증가(임피던스 감소와 일치)는 펄스가 제거된 후에 유지된다(라인(609)). 삽도(610)는 세포가 트랩된 채널뿐만 아니라 투과화 동안의 전류 증가를 나타낸다. 전기천공 동안 임피던스 변화의 검출 민감도와 일관성을 평가하기 위해 두 가지 별도의 조사가 그 다음 수행될 수 있다. 먼저, 뉴티 사이클 상수를 유지하면서 다양한 강도 및 지속 시간의 전계의 100 kHz 펄스 트레인이 인가할 수 있다. 상기 인가된 전계 강도는 0.1 내지 1 kV/cm의 범위일 수 있고, 인가된 총 펄스의 지속 시간은 이 파라미터 공간 내에서 투과화 결과물의 스펙트럼을 얻기 위해 10 내지 100 ms의 범위일 수 있으며, 투과화가 없는 범위로부터 완전히, 그리고 영구적으로 투과화된 범위까지일 수 있다. 전계 강도 및 지속 시간의 각 조합에 대해 전류 변화의 크기가 기록될 수도 있다. 막 투과화를 나타내는 전류 변화가 각 조건에 대해 식별될 수 있으며, 조건에 걸쳐 일관성이 검사될 수 있다.

[0060]

다음으로, 전기투과화의 검출을 확인한 후에, 펄스 트레인의 인가동안 임피던스 변화를 통해 가역적 투과화를 검출하기 위해 스마트 전기천공기를 교정하는데 세포 트랩이 사용될 수 있다. 1 kV/cm(10VDC, 100kHz, 50% 뉴티 사이클)의 전계 강도에서 일련의 펄스 트레인이 인가될 수 있지만, 각각의 전체 펄스 지속 시간은 1 내지 20 ms로 제한될 수 있으므로, 이 범위의 하한은 가역적인 투과화를 생성할 수 있는 반면, 상한은 상당한 세포 사멸을 일으킬 수 있다. 상기 펄스 파라미터들 및 이들을 발생시키는 방법은 예를 들어 단독으로 제공되며, 본 발명의 원리들을 벗어나지 않으면서 조정될 수 있다.

[0061]

인가된 펄스 트레인이 준-치사성일 때, 막 임피던스는 펄스 트레인동안 떨어져, 세포의 투과화를 나타내지만 펄스가 종결되고 막이 재밀봉되면 회복한다. 그러나 세포가 펄스 트레인에 의해 사멸되면 임피던스가 회복되지 않을 것이다. 따라서, 총 펄스 길이를 변화시킴으로써, 세포 사멸을 나타내는 생존력 문턱값 임피던스 변화가 결정될 수 있다. 생존력 문턱값 임피던스 변화는 연속 흐름 조사를 구현하기 위한 최상의 펄스 파라미터, 즉 AC 검출 과정의 설계를 결정하기 위해 사용될 수 있으며, 특정 세포 유형에 대한 고주파수 DC 펄스 트레인이 결정될 수 있다. 트랩된 세포에서 검사된 파라미터 공간의 서브셋(subset)은 연속 흐름 스마트 전기천공기에 인가될 수 있으며, 세포 행동 및 감도 변화의 임의의 차이를 평가하는데 사용될 수도 있다.

[0062]

트랩된 세포에서, 세포를 둘러싸는 제한된 완충액이 있고, 세포는 전체 임피던스에 대해 높은 비율로 기여한다. 그러나 세포가 유체역학적으로 집중될 때, 상당한 양의 유체가 세포 양쪽에 존재할 수 있다. 따라서 세포막 전류의 변화는 용액 전류 변위로부터 전체 세포의 검출 신호보다 훨씬 더 작은 크기 순으로 있을 수 있다. 전극 내의 용액 완충제에 대한 세포의 상대적인 부피가 클수록, 세포의 기여(또는 세포로의 변화)는 전류 신호로 더 클 것이다. 일 구현예에서, 세포를 둘러싸는 전도성 유체의 총량을 감소시키기 위해, 전기적 및 화학적으로 불활성인, 할로카본 오일과 같은 낮은 표면 장력의 용액이 두개의 측방 유입구에서 외장 스트림(sheathing stream)으로 사용되어, 중앙 유입구내에 있는 세포-함유 전기천공 완충 용액을 유체역학적으로 집중시킬 수 있다(도 3c 참조). 이는 유체역학적으로 제어 가능한 폭을 갖는 채널의 중간에 좁은 전도성 스트림을 제공함으로써 완충 용액으로부터 대부분의 전류 노이즈를 제거할 수 있다. 대안적으로 및/또는 부가적으로, 점진적으로 협착된 수축(constriction)(도 3d)으로 구성된 마이크로채널 설계가 사용될 수 있다. 이 마이크로채널 수축 설계는 세포 부피 분율, 검출 신호 대 노이즈 비율을 증가시킬 뿐만 아니라, 수축을 통한 전계의 집중으로 인해 인가된 전계를 증폭시키는 역할을 한다. 마이크로채널 수축의 길이는 검출 영역에서 세포 이동 시간을 증가시키는 수단을 제공하여, 가역성 또는 비가역성 전기천공 전, 도중 및 후에 세포막으로부터의 상세한 전기적 정보를 특징분석하기 위해 더 긴 시간을 허용하는 역할을 한다. 예를 들어, 총 세포 유속이 0.3 $\mu\text{L}/\text{분}$ 인 250 μm 길이의 수축은 200 내지 400 ms의 통과 시간 범위를 제공할 수 있다. 수축의 폭은 세포 크기에 따라 조정되어, 높은 전해질 전류 변위 및, 협착 채널을 통한 단일 세포의 순조롭고 지속적인 통과를 허용하는 양호한 맞춤을 제공한다. 예를 들어 평균 직경이 10 내지 15 μm 인 NIH 3T3 섬유아세포의 경우, 20 내지 25 μm 의 폭을 사용하여 외장 유체와 세포를 모두 통과시킬 수 있었다. 채널의 폭은 마이크로채널 제조의 포토리소그래피 단계에서 맞춤 가능하다. 채널의 깊이는 또한 검출 및 펄스 영역인 수축 영역에서의 용액 부피를 제한하기 위해 10 μm 깊이로 한정될 수 있다. 평면 전극은 인가된 전계의 증폭을 위해 채널 수축부 외부에 배치될 수 있다. 수축 길이가 250 μm 인 경우, 260 μm 초과의 전극 거리를 사용할 수 있다.

[0063]

실험 데이터에 기초하여, 일 구현예에서, 중첩된 검출/투과화(permabilizing) 과정은 세포 전류 검출을 위한

1Vp-p, 20kHz AC 및 정적 세포-트랩 실험(예를 들어, 1 kV/cm, 10kHz)으로부터 결정된 전계 강도를 갖는 투과화 필스 트레인을 인가함으로써 얻어질 수 있다.

[0064] 단계 401 내지 단계 403을 구현함으로써, 세포막 임피던스 변화를 검출 및 향상시키고, 마이크로채널 내에서 유체역학적으로 집중된 단일 세포의 존재를 식별하고, 유체역학적으로 집중된 세포에 투과화 신호 인가를 트리거하기 위해, 프로토타입 신호 차동 마이크로유체 채널-기반 신호 검출기가 사용될 수 있다. 이러한 검출 및 트리거된 신호를 입증하는 실험 데이터가 도 5a 및 5b에 도시되어 있다. 도 5a는 차동 신호 센서를 사용한 단일 세포 검출 피크를 도시한다. 도 5a의 결과는 0.5 μ L/분의 유속으로 마이크로채널을 통과하는 100 μ S/cm의 용액 전도도를 갖는 세포 완충액에 15 kHz의 AC 전압, 100 mVp-p를 인가함으로써 얻어졌다. 신호의 스파이크는 평면 전극 사이에서 세포에 의한 전도성 완충액의 체적 변위(따라서, 전류의 변위)가 발생하는 결과이다. 일 구현예에서, 세포 검출을 위한 전기적 측정은 또한 스마트 전기천공기와 통합된 시각화 시스템을 통해 세포(도시되지 않음)의 광학 시각화로 확인될 수 있다.

[0065] 도 5b는 연속 흐름에서 각 세포의 검출시 임피던스의 변화를 나타내는, 자동 실시간 단일 세포 검출 및 트리거된 신호 추적 플롯의 또 다른 예를 도시한다. 도시된 전류-시간 플롯에서, 검출 영역(수축 길이)을 통한 각각의 단일 세포의 통과로 높은 37dB의 신호 대 노이즈 비가 얻어졌고, 각각의 딥(501(n))은 세포 상에 지속 시간, 속도 및 임피던스 크기에 대한 정보를 제공한다.

[0066] 도 4를 참조하면, 단계(404)에서, 감지 유닛을 사용하여 임피던스를 지속적으로 모니터링함으로써 세포 임피던스의 변화가 검출될 수 있다. 일부 구현예에서, 감지 유닛은 록-인 증폭기를 포함한다. 주파수 록-인 증폭 기술은 세포 특정 신호를 구별하기 위해 구현될 수 있다. 록-인 증폭기는 기준 신호 주파수 주위의 대역-통과 필터로서 작용한다. 노이즈는 기준 신호에 의해 반송되는 주파수 및 위상에서의 입력 신호에 대해 푸리에 변환을 수행함으로써 제거될 수 있다. 기준 신호는 입력 신호와 곱해져 두개의 출력 성분, 즉 내부 기준과 신호 성분의 주파수 간의 차이($W_R - W_S$)와 동일한 주파수를 가진 성분, 및 두 주파수의 합($W_R + W_S$)과 동일한 주파수를 가진 다른 성분을 생성한다. 주파수가 동일할 때($W_R = W_S$), 첫 번째 성분은 DC 신호를 생성하고, 두 번째 성분은 두 배의 기준 주파수(2WR)를 가질 것이다. 저역 필터는 DC 성분을 제외한 모든 것을 거부한다. 신호는 독립적인 기준 사인 및 코사인 파에 의해 개별적으로 곱해져, 최종 신호의 진폭을 계산하는데 필요한 위상 정보가 추출된다.

[0067] 록-인 증폭기에 대한 최적 감지 주파수를 결정하기 위해, 임피던스 분석기가 사용될 수 있다. 임피던스 분석기는 전기천공 이전 및 이후 모두에 주파수에 따라 세포 임피던스를 결정할 수 있다. 전기천공 전후의 임피던스를 특징분석함으로써, 막 파괴로 인한 임피던스의 최대 변화를 감지하기 위한 록-인 증폭기에 대한 최적 주파수가 결정될 수 있다. 그후 검출 주파수는 예상된 주파수 범위로 설정되어 채널의 세포막 임피던스 변화에 고정되어 전기천공-유도된 세포막 투과화로 인한 막 전도도 증가의 검출 및 정량화를 최적화할 수 있다.

[0068] 중첩된 검출/투과화 필스에 대해, 세포 검출 임피던스 변화를 투과화 검출 임피던스 변화와 구별하기 위해 2개의 별개의 최적 주파수가 사용될 수 있고, 인가된 주파수 범위는 검출 영역에서 세포를 검출하기 위한 최적 주파수로부터, 세포를 감지할 때 투과화를 검출하기 위한 최적의 주파수로 빠르게 변조될 수 있다. 세포 신호가 검출되면, 예를 들어 함수 생성기가 있는 90V N-채널 고속 스위칭 PowerTrench MOSFET(FDS6298, Fairchild Semiconductor, Huntsville, AL) 모듈은 나노초 속도(세포 검출을 위한 20 kHz에서 막 임피던스 변화에 대한 MHz 범위까지)로 2개의 미리결정된 주파수 사이에서 스위칭하도록 구성될 수 있다.

[0069] 본 발명이 세포 임피던스 변화를 모니터링하기 위한 록-인 증폭기를 이용하지만, 임피던스 변화를 모니터링하기 위한 다른 현재의 또는 이후에 알려진 방법이 본 발명의 범주 내에 있다.

[0070] 단계(405)에서, 검출된 임피던스 값은 투과화 문턱 임피던스와 비교될 수 있으며, 상기 문턱 임피던스는 세포의 원하는 투과화 수준을 나타낸다. 문턱 임피던스 값은 세포 생존력(즉, 준-치사 투과화)을 보장하도록 선택될 수 있다. 문턱 임피던스는 특정 세포에 대한 트랩된 세포 실험 데이터를 사용하거나, 수학적 모델을 사용하여 계산될 수 있다. 검출된 임피던스 값이 문턱 임피던스보다 큰 것으로 밝혀지면, 단계(403)의 DC 투과화 신호의 필스 파라미터는 제어 신호를 사용하여 동적으로 제어될 수 있고(406), 상기 단계들은 원하는 문턱 임피던스가 검출될 때까지 반복될 수 있다. 제어 신호는 (상기 논의된 바와 같은) 특정 세포에 대한 트랩된 세포 실험 데이터를 사용하거나 수학적 모델을 사용하여 신호 파라미터를 변경하기 위해 생성될 수 있다. 원하는 문턱 임피던스에서, 세포는 원하는 수준으로 투과화될 수 있으며, 즉 준-치사성 투과화될 수 있다. 원하는 수준의 투과화는 세포 사멸없이 최대 막 투과화에 상응할 수 있다. DC 필스 트레인을 사용하면, 전기천공동안 전달 효율성에 잠재적으로 영향을 줄 수 있는 이하의 여러 상호관련된 파라미터가 있으며, 이는 원하는 투과화를 달성하

기 위해 변경될 수 있다: 전계 진폭, 펄스 지속 시간, 펄스 트레인 주파수, 브리 힐 사이클 및 사이클 수. 예를 들어, 50 kHz 펄스 트레인은 20 μ s 펄스 기간을 가지며, 50% 브리 힐 사이클에서는 각 펄스의 길이가 10 μ s이다. 10 ms 총 펄스 인가를 얻기 위해 50 kHz 주파수에서 20ms 동안 1000 사이클이 인가된다. 브리 힐 사이클은 각 펄스 다음의 휴지 기간량을 제어한다. 세포의 전기분해를 일으키지 않으면서 원하는 투과화 수준을 달성하도록 상기 파라미터 중 임의의 것이 변경될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 브리 힐 사이클은 펄스 트레인이 단일 DC 펄스 와 더 유사해지면서 전기분해의 대가로 전달 시간을 향상시키는 펄스 폭을 증가시키도록 조정되거나, 전기분해를 최소화하기 위해 펄스의 수를 증가시키면서 전달 시간을 감소시키도록 감소될 수 있다.

[0071] 단계(407)의, 단계(405)내 준치사적 투과화의 검출에서, 투과화 신호가 중단될 수 있으며, 별개의 전달 신호가 검출 영역에 도입될 수 있다. 전달 신호는 대전된 종의 유입을 유도하는 저 강도 전계일 수 있다. 일 구현예에서, 전달 신호는 크기가 0.1 내지 1 kV/cm 및 지속 시간이 10 내지 100ms인 DC 펄스 트레인을 포함할 수 있다. AC 검출 신호 및 전달 DC 펄스 트레인 파형은 2개의 파형의 단순한 중첩에 의해 검출 영역에 동시에 인가될 수 있다. 이러한 방식으로, 검출 영역의 임피던스 및 검출된 세포의 세포 투과화 상태는 전달 신호가 인가됨에 따라 연속적으로 모니터링될 수 있다.

[0072] 전달 펄스 트레인은 투과화 신호와 관련하여 상기 논의된 바와 같이, 검출 및 투과화 신호의 펄스 특성, 세포 유형, 세포 크기, 완충 특성 및 다른 특성에 기초하여 사전 설계될 수 있다. 세포 사멸을 나타내는 임피던스의 과도한 변화에 도달하지 않으면서 문자 전달이 가능하도록 공극이 열려있는 상황에서 전계 강도를 유지하기 위해, 전달 펄스 트레인은 또한, 임피던스 변화를 지속적으로 모니터링하고(408), 그것을 투과화 문턱 임피던스(준치사성 투과화에 대응함)와 비교하는(409) 피드백 제어를 사용하여 동적으로 제어될 수 있다(410). 이와 같이, 제2 펄스 트레인 특성은 전달 가능성을 최대화하도록 동적으로 변경될 수 있다. 예를 들어, 스마트 전기천 공기 시스템에서, 트랩-세포 실험, 수학적 모델 및/또는 이전에 수행된 연속 흐름 측정을 기반으로 하는 공극 폐쇄, 안정화 및 영구성을 검출하기 위해 임피던스 특성이 모니터링될 수 있다.

[0073] 전계가 낮아짐에도 불구하고 과다 노출에 대한 생존력 문턱값에 접근하거나, 세포가 검출 영역을 통해 흐른 것을 나타내는 기준선 문턱값으로 임피던스 값이 되돌아올 때, 전계는 중단될 것이다(411). 일 구현예에서, 임피던스 변화는 록-인 증폭기에 의해 100 μ V로 샘플링된 세포내 전류 판독을 사용하여 모니터링될 수 있고, 예측된 투과화 상태에 대해 반복적으로 체크될 수 있다.

[0074] 도 4b는 도 4a의 단계들 중 적어도 일부를 수행하기 위한 알고리즘의 상태도를 도시한다.

[0075] 본 발명의 시스템 및 방법을 사용한 예시적인 데이터는 도 8a 내지 도 8d에 도시된다. 또한, 도 8a 내지 도 8d는 전체 세포 전류 변위 및 세포막 임피던스 변화 플롯 및 대응하는 펄스를 도시한다. 도 8a는 상기 시스템 및 방법이 각각의 통과하는 단일 세포를 높은 정확도로 검출하고 전기천공하는 것을 보여주는, 자동 실시간 단일 세포 검출 및 트리거된 펄스 추적 플롯을 도시한다. 각 수직선(801)은 소정의 펄스 파라미터를 갖는 5-ms 펄스 트레인의 자동화된 인가를 나타내며, 이 경우에는 0.6kV/cm 전계 강도의 DC 펄스 트레인이 인가되었다. 임피던스 곡선(802)상의 각 딥(809)은 단일 세포의 통과를 나타내며, 1.3 세포/초의 정확도로 93.7%의 자동 전기천공 정확도를 나타낸다.

[0076] 도 8b는 8초 내지 14초 시간 슬롯에서 도 8a에서의 5개의 세포의 확대도이며, 투과화 신호 인가 전후의 세포 상태에 관한 특유의 정보가 도시되어 있다. 전류-시간 플롯의 경우, 전류 신호의 각 예리한 감소는 펄스 영역 내에 단일 세포가 존재함을 나타내며, 이 하락값(dip)의 원래 기준선으로의 복귀는 펄스 영역에서 세포의 이탈을 나타낸다. 이들 다섯개의 세포에 대해, 신호 인가 후 전류 상승과 함께 900 ms 이하의 평균 통과 시간이 관찰된다.

[0077] 도 8c는 도 8b의 단일 세포의 확대된 플롯을 도시한다. ΔI_c 는 이 경우 0.72 nA인 전류 변위 신호를 나타내며, ΔI_p 는 세포에 인가된 펄스의 크기와 지속 시간에 따라 달라지는 투과화 신호의 변화를 나타낸다. ΔI_r 은 비-치사성 펄스를 수용하는 세포에 대해 막을 재밀봉할 수 있는 막 재밀봉 전류를 나타낸다.

[0078] 도 8d는 유동 단일 세포 내로 전달되는 핵산 결합 염료(프로피디움 요오드화물)의 일시적 추적을 도시한다(하부 스트립). 20ms 타임 마크에서, 0.6kV/cm 전계 진폭의 5ms 펄스 트레인을 인가하였고, 형광 세기의 비율은 막 기공의 개방으로 인해 지속적으로 증가하고, 관찰된 투과화 피크를 통과한 후 세기 비율이 둔화된 것을 나타내도록 연속적으로 추적되었으며, 본 발명자들은 이것이 막 공극 재밀봉을 나타낸다고 믿는다.

[0079] 도 9는 상기 논의된 바와 같이 다양한 컴퓨터 프로세스 및 시스템을 포함하거나 구현하는데 사용될 수 있는 내

부 하드웨어의 예를 도시한다. 예를 들어, 상기 스마트 전기천공은 도 9에 도시된 것과 같은 하드웨어를 포함할 수 있다. 전기 버스(900)는 하드웨어의 다른 도시된 구성 요소들을 상호 연결하는 정보 고속도로소의 역할을 한다. CPU(905)는 프로그램을 실행하는데 필요한 계산 및 논리 연산을 수행하는 시스템의 중앙 처리 장치이다. CPU(905)는, 단독으로 또는 하나 이상의 다른 요소들과 함께, 본 명세서 내에 사용되는 용어들로서 처리 장치, 컴퓨팅 장치 또는 프로세서이다. CPU 또는 "프로세서"는 프로그래밍 명령을 실행하는 전자 장치의 구성 요소이다. "프로세서"라는 용어는 단일 프로세서 또는 다양한 프로세스 단계를 함께 구현하는 다수의 프로세서를 의미 할 수 있다. 문맥이 단일 프로세서가 요구되거나 다수의 프로세서가 요구되는 것을 상세하게 명시하지 않는 한, "프로세서"라는 용어는 단수 및 복수의 구현에 모두를 포함한다. 읽기 전용 메모리(ROM)(910) 및 랜덤 액세스 메모리(RAM)(915)는 메모리 장치의 예를 구성한다. 용어 "메모리 장치" 및 유사한 용어는 단일 장치 구현에, 프로그래밍 또는 데이터를 함께 저장하는 다수의 장치, 또는 상기 장치의 개별 섹터를 포함한다.

[0080] 제어기(920)는 시스템 버스(900)에 날짜 저장 설비로서 서비스하는 하나 이상의 선택적 메모리 장치(925)와 인터페이스한다. 이를 메모리 장치(925)는 예를 들어 외부 또는 내부 디스크 드라이브, 하드 드라이브, 플래시 메모리, USB 드라이브 또는 데이터 저장 설비로서의 역할을 하는 다른 유형의 장치를 포함할 수 있다. 상기 나타내어진 바와 같이, 이러한 다양한 드라이브와 제어기는 선택적 장치이다. 또한, 메모리 장치들(925)은 임의의 소프트웨어 모듈 또는 명령어를 저장하기 위한 개별 파일, 보조 데이터, 부수적 데이터, 우발적 테이블 및/또는 회귀 모델의 그룹을 저장하기 위한 공통 파일, 또는 상기 논의된 바와 같은 정보를 저장하기 위한 하나 이상의 데이터베이스를 포함하도록 구성될 수 있다.

[0081] 상기 기술된 바와 같은 프로세스와 관련된 기능 단계 중 임의의 것을 수행하기 위한 프로그램 명령, 소프트웨어 또는 상호작용 모듈이 ROM(910) 및/또는 RAM(915)에 저장될 수 있다. 선택적으로, 프로그램 명령은 컴팩트 디스크, 디지털 디스크, 플래시 메모리, 메모리 카드, USB 드라이브, 광학 디스크 저장 매체 및/또는 다른 기록 매체와 같은 비-일시적(non-transitory) 컴퓨터 판독가능 매체 상에 저장될 수 있다.

[0082] 선택적 디스플레이 인터페이스(940)는 버스(900)로부터의 정보가 음성, 시각, 그래픽 또는 영숫자 형식으로 디스플레이(945) 상에 디스플레이되도록 허용할 수 있다. 외부 장치와의 통신은 다양한 통신 포트(950)를 사용하여 일어날 수 있다. 통신 포트(950)는 인터넷, 로컬 영역 네트워크 또는 셀룰러폰 데이터 네트워크와 같은 통신 네트워크에 부착될 수 있다.

[0083] 하드웨어는 또한 스캐너의 영상화 센서(960)와 같은 입력 장치, 또는 키보드, 마우스, 조이스틱, 터치스크린, 원격 제어기, 포인팅 장치, 비디오 입력 장치 및/또는 오디오 입력 장치와 같은 다른 입력 장치(965)로부터의 데이터의 수신을 허용하는 인터페이스(955)를 포함할 수 있다.

실시예

[0085] 본 발명은 하기의 비-제한적인 실시예를 통하여 보다 충분하게 기술된다. 이를 실시예의 변형은 당업자에게 자명할 것이다.

실시예 1

[0087] 세포-막 투과화를 검출하기 위해 요구되는 최적의 채널 기하구조 및 감지 주파수를 결정하기 위해, 미세제작된 유동 세포계측기에서 단일-세포 전기-임피던스 응답을 모델링하도록 세포/전해질 등가 회로가 구성되었다. 이 회로 모델은 전기천공 동안 세포막 전도성의 극적인 증가를 설명하기 위해 이전 모델로부터 조정되었다. 이 모델은 도 7c에 도시된 바와 같이 한 쌍의 전극 사이의 완충액에 혼탁된 세포의 임피던스를 결정할 수 있게 하며, 여기서 C_{DL} 은 이중층 커패시턴스(capacitance)이다. R_m 과 C_m 은 각각 세포와 매질의 저항과 커패시턴스이다. C_{mem} 은 세포막의 커패시턴스이고, R_i 는 세포의 내부 저항이다. 전기천공에 의한 세포-막 투과화의 결과로서 전반적인 임피던스 변화를 반영하기 위해, 변수 R_{mem} 은 C_{mem} 과 병행하여 구현되었다. 이중층 효과를 포함하는 막 투과화 세포를 기술하기 위한 결과적인 전체 임피던스 방정식이 수학 식 1에 나타낸다.

수학식 1

$$[0088] |Z| = \frac{1}{j\omega C_{DL}} + \frac{(R_m(1 + R_i(j\omega C_{mem} + \frac{1}{R_{mem}})))}{(R_m(j\omega C_{mem} + \frac{1}{R_{mem}}) + (1 + R_i(j\omega C_{mem} + \frac{1}{R_{mem}}))(1 + j\omega R_m C_m))}$$

[0089] $|Z|$ 는 단일 세포의 임피던스 크기이고, ω 는 각 주파수(angular frequency)이고, R_{mem} 을 제외한 개별 전기 구성 요소의 값을 계산하기 위한 공식은 당업자에게 공지되어 있을 수 있다. R_{mem} 은 막 $R_M = 10000 \Omega/cm^2$ 의 일반적인 패치의 저항을 기반으로 하고, 반지름이 r 인 구형 세포를 다음과 같이 계산할 수 있다고 가정한다: $R_{mem} = \frac{R_M}{4\pi r^2}$. 전기 투과화된 세포막 저항 $R_{porated_mem}$ 은 세포 막의 0.1%만이 천공된다고 가정하여, 이전에 발표된 수치 모델을 기반으로 줄잡아 근사화된다. $G_{mem} = 0.001\sigma_m(\frac{\pi r^2}{2d})$, 여기서 d 는 5 nm의 막 두께이고, σ_m 은 100 $\mu S/cm$ 에서의 완충액 전도도이다.

[0090] 처리되지 않은 세포에 대한 임피던스 크기를 플롯하고, 전기천공된 세포와 중첩시켰다(도 7a). R_{mem} 을 온전한 상태(높은 R_{mem})로부터 투과화된 세포막 상태(낮은 R_{mem})까지 변화하는 결과로서의, 임피던스의 변화 $\Delta |Z|$ 는 1 내지 10 kHz의 주파수 영역에 속한다. 전기천공 전후에 100 $\mu S/cm$ 완충액에 혼탁된 개별 세포에서 주파수 스윕 (100 Hz 내지 100 kHz)이 수행된 상응하는 실험 데이터(도 7b)는 모델에 의해 예측된 주파수 범위에서 비교가능한 임피던스 변화를 증명하였다.

[0091] 전기영동 후, $\Delta |Z|$ 에 영향을 주는 인자를 결정하기 위해, 세포 체적 분율 및 세포외 완충액 전도도는 스위핑 주파수에 따라 체계적으로 변화하였다. 전기천공 후, 가장 큰 $\Delta |Z|$ 는 낮은 주파수 스펙트럼에서 세포 체적 분율 ($V_{세포}/V_{체널}$)과 완충액 전도도 모두에 의해 지시된다고 결정되었다. 마이크로-수축 채널을 사용하여 5%의 세포 체적 분율 및 100 $\mu S/cm$ 에서의 세포외 완충액 전도도를 제공함으로써, 전기천공 후의 세포막 투과화의 가장 큰 변화는 1 내지 10 kHz의 주파수 범위를 사용하여 발견될 수 있다.

실시예 2

방법 및 재료

[0094] 이 장치는 유리 기판상의 한 쌍의 평면 전극 및 소프트 리소그래피를 통해 제조된 폴리디메틸실록산(PDMS) 마이크로채널로 구성된다. 소자 특성을 갖는 실리콘 마스터 몰드는 표준 포토리소그래피 절차를 사용하여 제작하였다. 장치 주 채널은 250 μm (L) X 25 μm (W) X 10 μm (D) 치수의 수축부를 포함하여, 길이 1 mm, 너비 150 μm 및 깊이 10 μm 이다. 간단히 말해, PDMS 폴리머와 경화제의 10:1 혼합물을 몰드에 부어, 네가티브 복제물을 만들고 65°C에서 밤새 경화시켰다. 입구 채널(직경 0.5 mm) 및 출구 저장소(직경 1.5 mm)에 접근하기 위해 PDMS에 구멍을 뚫었다. 티타늄/백금(Ti/Pt) 평면 전극을 금속 '리프트-오프(lift-off)' 공정을 통해 제조하였다. 전극의 트레이스를 유리 기판 위에 리소그래피 방식으로 패터닝하고, 리세스를 약 2000 Å의 깊이로 1분간 10:1 완충된 플루오르화 수소산으로 에칭했다. 물리적 기상 증착(KJL PVD75, Kurt J. Lesker Co.)을 통해 금속을 침착시킨 다음, 아세톤내에 포토레지스트를 용해시켜 전극 트레이스를 남겼다. 생성된 Ti/Pt 전극은 폭이 50 μm 이고, 중심간 간격이 300 μm 였다. 이 거리는 SNR 품질을 손상시키지 않으면서 전기 및 광학 분석을 위한 충분한 세포 통과 시간을 허용했다. PDMS 및, 패터닝된 전극을 갖는 유리 기판의 표면을 100W 전력의 산소 플라즈마, 700mTorr의 250 sccm O₂ 하에서 60초동안 처리하였다(PX-250, March Instruments). 활성화된 기판을 입체현미경 (SZ61 Binocular Stereo Zoom, Olympus)을 사용하여 정렬하고, 비가역적으로 결합시켰다. 구리 와이어는 전도성 에폭시를 통해 평면 전극 패드에 결합되었다.

[0095] 각 실험에 앞서, 마이크로채널을 채널 표면에 원하지 않는 세포 부착을 방지하기 위해 실온에서 1시간 동안 10% 소혈청 알부민(BSA) 용액으로 전처리하였다. 마이크로채널을 배출한 다음 과량의 BSA 용액을 출구 저장소에서 꺼내어, Dulbecco의 변형된 이글 매질(DMEM) 배지 10 μL 로 교체하였다. 10% v/v 소태아 혈청, 1% v/v 페니실

린-스트렙토마이신 및 1% L-글루타민(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)으로 보충된 DMEM에서 NIH 3T3 마우스 섬유아세포를 배양하였다. 세포를 실험을 위해 수화하기 전에 약 70%의 컨플루언시로 배양하였다. 수화된 세포를 250 mM 수크로스, 10 mM HEPES 및 0.4 mM MgCl₂ 염으로 이루어진 등-삼투 전기천공 완충액에 혼탁시켜 100 μ S/cm의 전도도를 제공하였다. 정밀 마이크로유체 주사기 펌프(PicoPlus, Harvard Apparatus)를 사용하여 0.1 μ L/분의 유속으로 세포를 관류시켜, 마이크로채널 수축부를 가로지르는 250 ms의 평균 세포 이동 시간을 얻었다. 일단 단일 세포의 안정된 흐름이 확립되면, 사용자 명령 시에 전기천공 시스템이 개시되었다. 다른 정도의 세포-막 투과화를 부여하기 위해 각각의 5회의 펄스 지속 시간(0.2, 0.8, 1.0, 3.0, 5.0 ms)에서 5개의 전계(세포에서 측정된, 0.44, 0.58, 0.70, 0.87, 1.05 kV/cm)를 조사하였다. 전기천공 시스템을 검증하기 위해 두 가지 세포 분석이 수행되었다. 첫 번째 분석동안 사이토졸 핵산에 결합시 형광을 나타내는 세포막 불투과성 염료인 프로피디움 요오드화물(PI)(P3566, Life Technologies)를 100 μ M 총 농도의 전기천공 완충액에 첨가하여 단일 막 투과화를 광학적으로 나타냈다. 록-인 증폭기(HF2LI 록-인 증폭기, Zurich Instruments)의 전기 신호와 PI 전달의 형광 강도를 각 개별 세포별로 기록했다. 두 번째 분석에서, 단일 세포는 PI 첨가없이 동일한 전기천공 처리를 받았다. 각각의 처방된 펄스 처리 후에, 약 2000개의 세포를 생존력 평가를 위해 출구 저장소로부터 20분에 걸쳐 수집하였다. 수집한 세포를 2000 RPM에서 2분동안 원심분리하여 1XPBS 완충액으로 세척한 다음, 얼음 위에서 7-아미노액티노마이신 D(7AAD)(7AAD, ThermoFisher Scientific) 2 μ M과 함께 20 분 동안 배양하여, 세포-생존력 염색을 허용하였다. 이어서 세포를 형광현미경으로 영상화하기 전에 1XPBS 완충액에서 다시 세척하였다. 수집된 세포의 형광 강도를 처리하기 위해 MATLAB(MATLAB R2012b, Mathworks)으로 작성된 반자동 세포-스캐닝-및-처리 알고리즘을 사용했다.

[0096]

신호를 동적으로 추출하고 전기천공 펄스를 인가하는데 록-인 증폭기를 사용하였다. 실시간 처리를 위한 록-인 증폭기의 내장 시스템상에 맞춤-제작된 LabVIEW 제어 알고리즘을 로딩하였다. 하나의 소자 전극은 리드(Lead) I을 통해 록-인 증폭기의 과형 발생기 출력과 연결되어 1 V_{p-p}의 감지 여기 신호를 전달한 반면에, 다른 전극은 록-인 증폭기 센서에 신호를 전달하기 전에 리드 II를 통해 저-노이즈 전류 전치증폭기(HF2CA 전류 전치증폭기, Zurich Instruments) 입력에 연결되었다. 미분-기반 피크-검출 알고리즘을 통한 최적 세포 검출과 가장 높은 SNR로의 가장 민감한 세포막 투과화 검출을 모두 제공하기 위해 1.224 kHz의 주파수를 선택하였다. 세포가 전기천공 구역내에서 검출되면, 전기천공 펄스는 리드 I을 통해 함수 발생기(33220 A 과형 발생기, Agilent)에 의해, 리드 III을 경유하여 모니터링 오실로스코프에 순간적으로 전달된다. 이 펄스는 함수 발생기에서 프로그래밍되었으며, 고-전압 증폭기(모델 2350, TEGAM)에 공급되어, 0.2 내지 5.0 ms의 지속 시간을 갖는 0.44 내지 1.05 kV/cm 범위의 전계 펄스를 공급하였다. 함수 발생기와 동기화된 CMOS 스위치(DF419DJ + 아날로그 스위치, Maxim Integrated)를 록-인 증폭기의 전치증폭기 입력과 직렬로 추가하여 전기천공 펄스의 아티팩트 측정을 방지했다. 펄스 트리거 신호는 또한 현미경에 장착된 CMOS 카메라(PowerView 1.4MP, TSI)의 외부 트리거 입력으로 분할되어 각 펄스 다음에 세포로의 PI 입력 이미지를 동시에 캡처한다.

[0097]

결과

[0098]

자동화된 세포 검출 및 전기천공

[0099]

단일 세포의 자동화된 검출 및 1.3 세포/초의 처리량으로 각 세포에 대한 즉각적인 펄스 인가가 수득되었다. 수축 길이를 가로지르는 세포 이동은 채널에서 일정한 체적 변위로 인해 안정된 기준선 전류를 생성한다. 250 ms의 예상 세포-이동 시간은 전기천공 및 포스트-펄스 임피던스 측정을 위한 충분한 시간 윈도우를 제공하였다. 이 대표적인 플롯에서, 수직 적색 선은 소정의 전기천공 펄스의 인가를 나타내며, 이 경우 5.0ms 동안 1.05 kV/cm 전계를 나타낸다. 펄스를 투여한 후 급격한 전류 상승이 즉시 관찰된다. 이러한 전류의 급격한 증가는 세포막 전도성의 증가에 기인하며, 전기천공-유도된 세포막 투과화의 결과로서 공극이 형성되는 것을 특징으로 한다. 세포가 채널 수축으로부터 벗어남에 따라, 전기 신호는 완충-용액 기준선으로 되돌아 간다. 이 과정은 전기천공 영역을 통과하는 각 세포에 대해 반복된다. 37dB의 신호 대 노이즈비(SNR)가 단일-세포 검출에 대해 측정되었다. 시스템은 광학 관찰과 비교하여 각 세포를 검출하고 펄싱하는데 97%의 정확성을 유지했다. 오류는 주로 여러 세포의 가끔의 꼬리끌림(tailgating)으로 인한 것으로, 전송중인 각 세포에 다중-펄스 인가로 이어진다.

[0100]

세포막 투과화 분석

[0101]

전기천공 펄스의 강도 및 지속 기간을 변화시킴으로써, 본 발명자들은 세포-막 투과화 정도의 특징인 세포 임피던스의 변화를 입증한다. 도 10에 도시된 바와 같이, 5개의 대표적인 세포에 대해 측정된 세포 전류 응답은 펄스 인가시에 중첩된다. 펄스 지속 시간을 0에서 5.0 ms로 변경하면서 전계를 1.05 kV/cm로 일정하게 유지함으로써, 더 긴 펄스 지속 시간이 전극 사이의 전류에서 더 큰 점프를 생성하는 것으로 보이며, 막 투과화의 정도가

더 높음을 나타낸다. 전계 강도 및 지속 기간에 따른 세포-막 반응의 전체 특성을 도 11에 나타낸다. 크기 차이로 인한 세포간 변이를 설명하기 위해, 세포 기준선으로부터의 투과화 전류의 변화(ΔI_p)는 먼저 총 세포-전류 변위(ΔI_c)에 의해 정규화되고, 검출된 세포-전류 기준선으로부터의 백분율 증가로 표현하였다. 펄스 지속 시간에 따라 플롯한 경우, 주어진 전계 강도에 대해, 정규화된 투과화 전류($\Delta I_p / \Delta I_c$)와 펄스 지속 시간간에 강한 의존성이 발견되었으며, 더 긴 펄스 지속 시간은 더 큰 투과화로 이어진다. 다른 강도가 동일한 펄스 지속 시간 동안 인가될 때 전계 크기에 대한 강한 의존성이 관찰되었으며, 더 강한 전계가 더 큰 투과화로 이어진다. 전계가 0.58 내지 1.05 kV/cm인 경우, 본 발명자들은 펄스 지속 시간이 1.0 ms에 도달하고, 이를 초과할 때 발생하는 투과화 신호에서 빠른 전이를 관찰하였다. 시스템은 전류의 지속적인 흐름과 동적 측정을 허용하기 때문에, 각 펄스 조건에 대해 최소 200개의 세포를 측정하여 5,000개의 개별 세포를 분석했다.

투과화 검증 - 프로파디움 요오드화물 형광 추적

전기관측된 세포-막 투과화는 또한 PI의 세포간 핵산에 대한 결합시 발생하는 형광 강도의 변화를 기록함으로써 광학적으로 입증되었다(도 12). 광학 카메라는 록-인 증폭기 센서와 동기화되어, 각 펄스 인가 후에 펄스된 세포의 이미지 시퀀스를 캡처하였다. 그런 다음, 이 이미지를 개별 세포 기준으로 형광 강도를 평가했다. 펄스 강도가 커지고, 지속 시간이 길어질수록 세포막 투과화가 커져서, 천공된 세포막을 통한 더 많은 PI 침투가 세포질 공간의 핵산과 결합하는 것을 차례로 허용하여 형광 강도가 높아진다.

전기 시스템의 더 큰 감도로 인해, 광학적으로 구별가능한 형광 강도를 생성하기 위해서는 더 높은 펄스 문턱값이 필요하다. 광학적으로, 1.0 ms보다 긴 펄스 지속 시간은 세포막 투과화 정도를 전기적 파라미터와 신뢰성 있게 연관시키는데 필요했다. 예를 들어, 투과화 신호의 전기적 측정치와 일치하는 0.8 ms 펄스 지속 기간 후에 형광 강도의 상당한 점프가 관찰되었다. 이 관계는 모든 펄스 강도 및 지속 시간에 대한 전기-투과화 신호($\Delta I_p / \Delta I_c$) 대 형광 강도를 플로팅하여 추가로 확인되며, 이는 막 공극 개방 정도와 세포 내부로 전달되는 PI의 양 사이에 선형 및 종속 관계가 존재함을 보여준다. 상당한 정도의 천공은 보다 높은 $\Delta I_p / \Delta I_c$ 값으로 표시되며, 이는 처리된 세포내에서 측정된 더 큰 정도의 PI 형광 강도에 해당한다. 이 데이터는 PI 전달량과 막 투과화 정도 사이의 직접적인 상관 관계를 보여 주며, 둘 다 전기-펄스 파라미터에 비례한다.

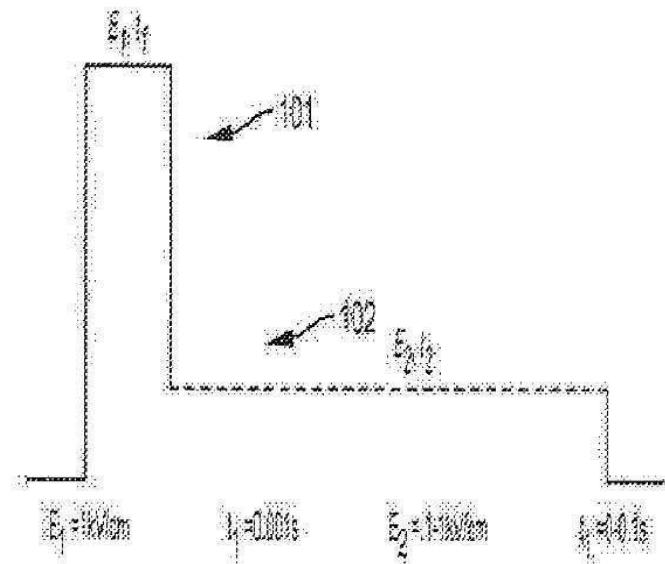
세포 생존력 연구 - 수집

소정의 전기천공 처리를 받는 단일 세포의 생존력은 또한 7AAD 염색을 통한 전기천공-펄스 파라미터와 상호관련되어있다. 세포를 전기천공 펄스에 노출시킨 20분 후에 세포를 회수하여 생존 세포가 막 재밀봉을 위한 시간을 갖도록 하였다. 본 발명자들은 가장 높은 전계 강도(1.05 kV/cm)와 펄스 지속 시간(5 ms)의 조합이 죽은 세포로부터의 분포로 가장 큰 변화를 일으킨다는 것을 발견했다. 이는 강력한 전기천공 처리가 세포막을 둘이킬 수 없게 손상시킬 가능성이 크기 때문에, 재밀봉을 방해할 것으로 예상된다. 펄스 강도 또는 지속 시간을 줄이면, 이동의 규모가 줄어든다. 0.7 kV/cm에서 전기천공 처리를 받은 모든 세포는 대조군의 생세포에 필적할만한 형광을 유지하여, 투과화 후 20분 이내에 세포막의 완전한 재밀봉을 나타내었다. 도 13d 내지 13f에서 수직선으로 도시된 바와 같이, 죽은-세포 집단에 대한 평균 형광 강도의 95% 신뢰 하한을 계산함으로써 각각의 세포 집단에 대한 생존 임계치를 결정하였다. 도 14는 각 전기천공 조건에 대한 세포의 생존력을 나타낸다. 전반적인 세포 생존력은 전계 강도 및 펄스 지속 시간 모두에 따라 단조적으로 감소한다. 더 강한 펄스 조건은 비가역적인 세포-막 손상을 유발하여 세포 사멸을 유도할 가능성이 큰 반면, 중간 조건(0.7 kV/cm)으로 처리된 세포는 회복될 가능성이 커서, 보다 높은 집단 생존력을 보였다.

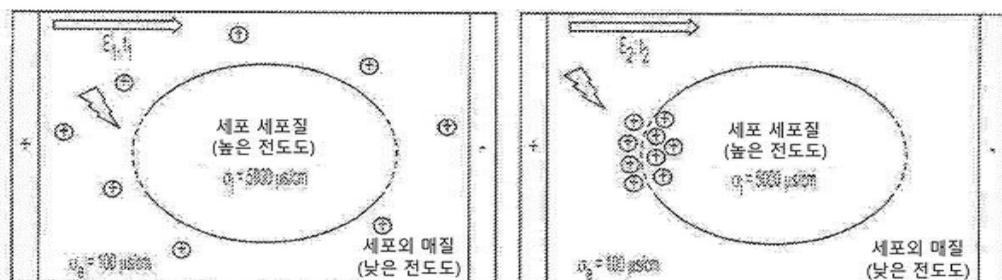
상기 개시된 특징들 및 기능들 뿐만 아니라 대안들은 많은 다른 상이한 시스템 또는 용도로 조합될 수 있다. 현재 다양한 예측할 수 없는 또는 예상하지 못한 대안, 수정, 변형 또는 개선이 당업자에 의해 이루어질 수 있으며, 이들 각각은 또한 개시된 구현예에 의해 포함되도록 의도된다.

도면

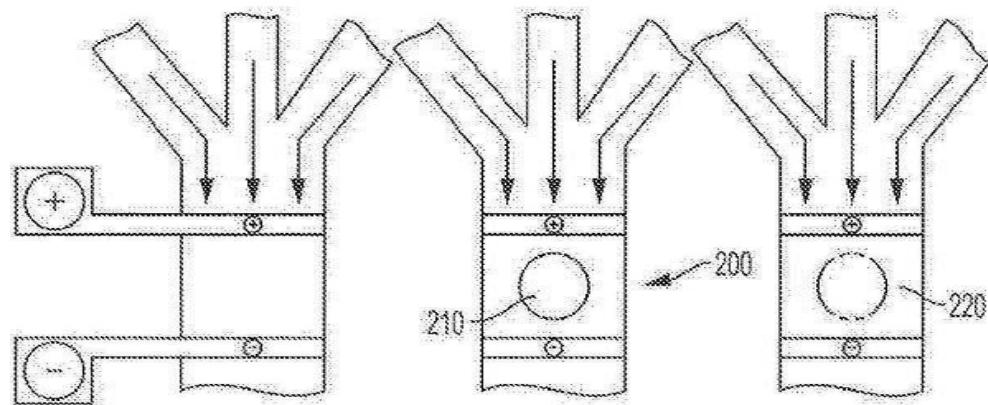
도면 1a



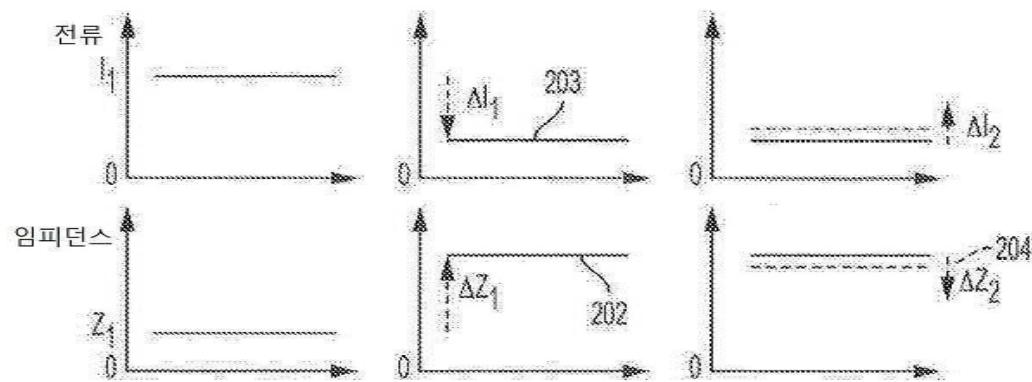
도면 1b



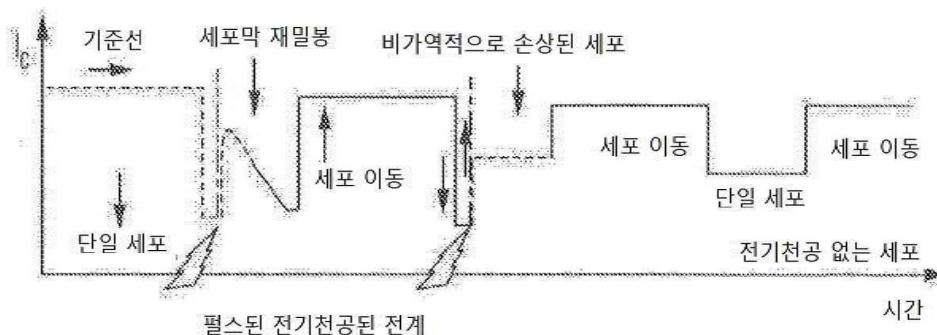
도면 2a



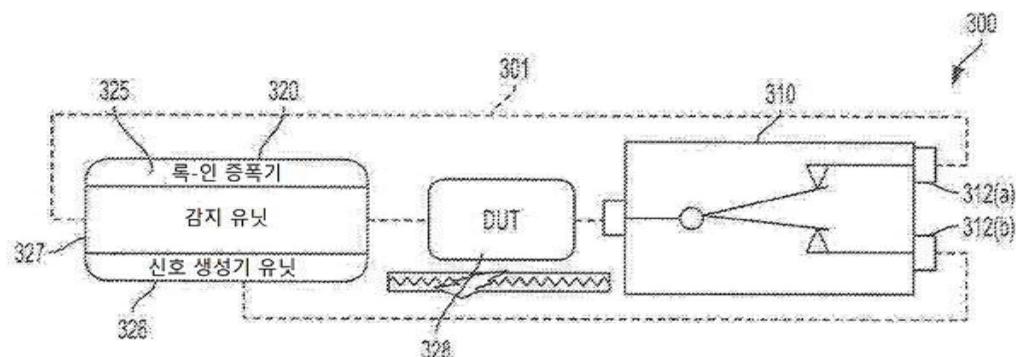
도면2b



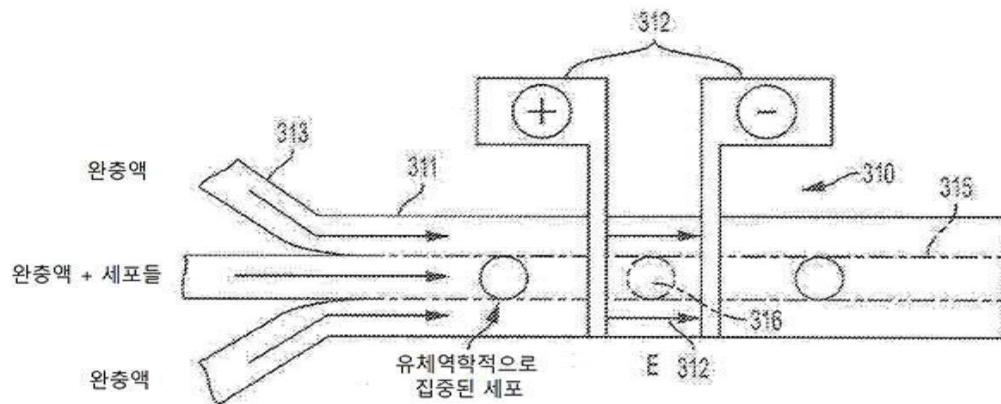
도면2c



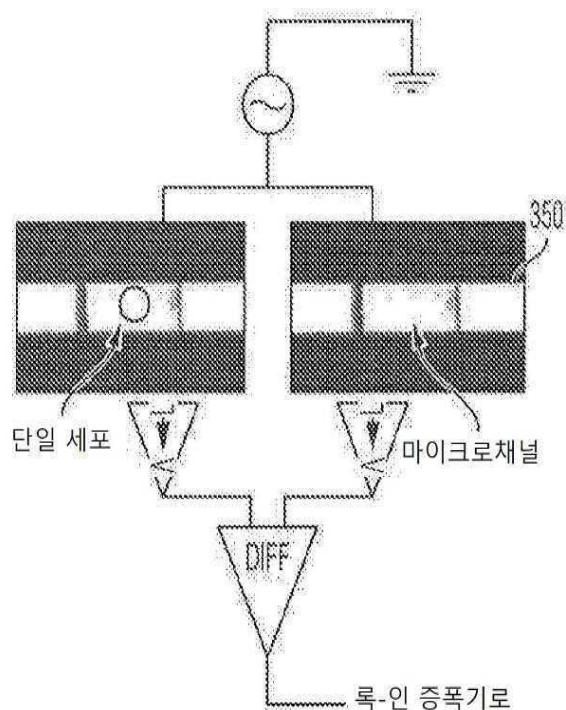
도면3a



도면3b



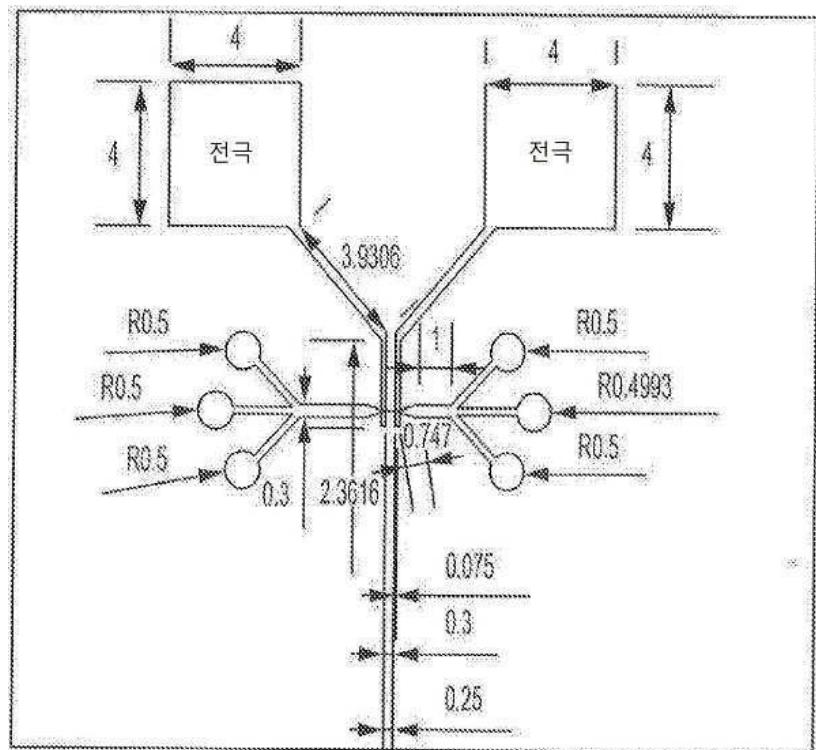
도면3c



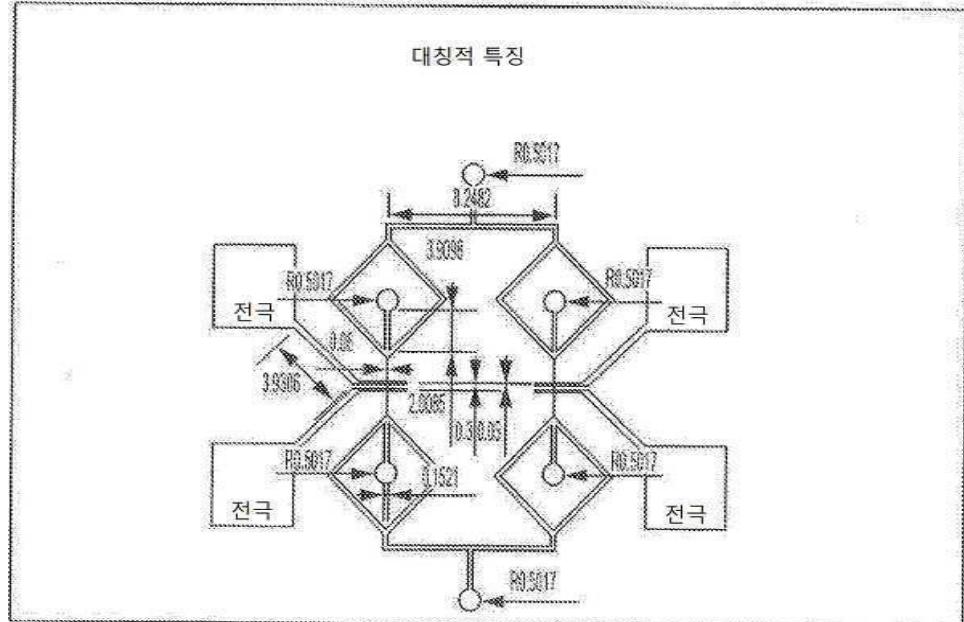
도면3d



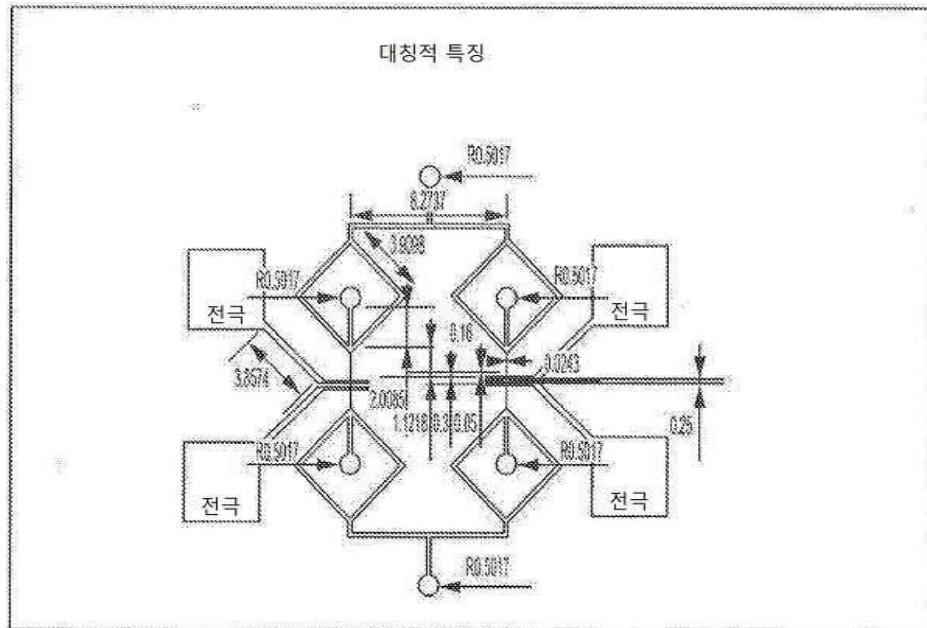
도면3e



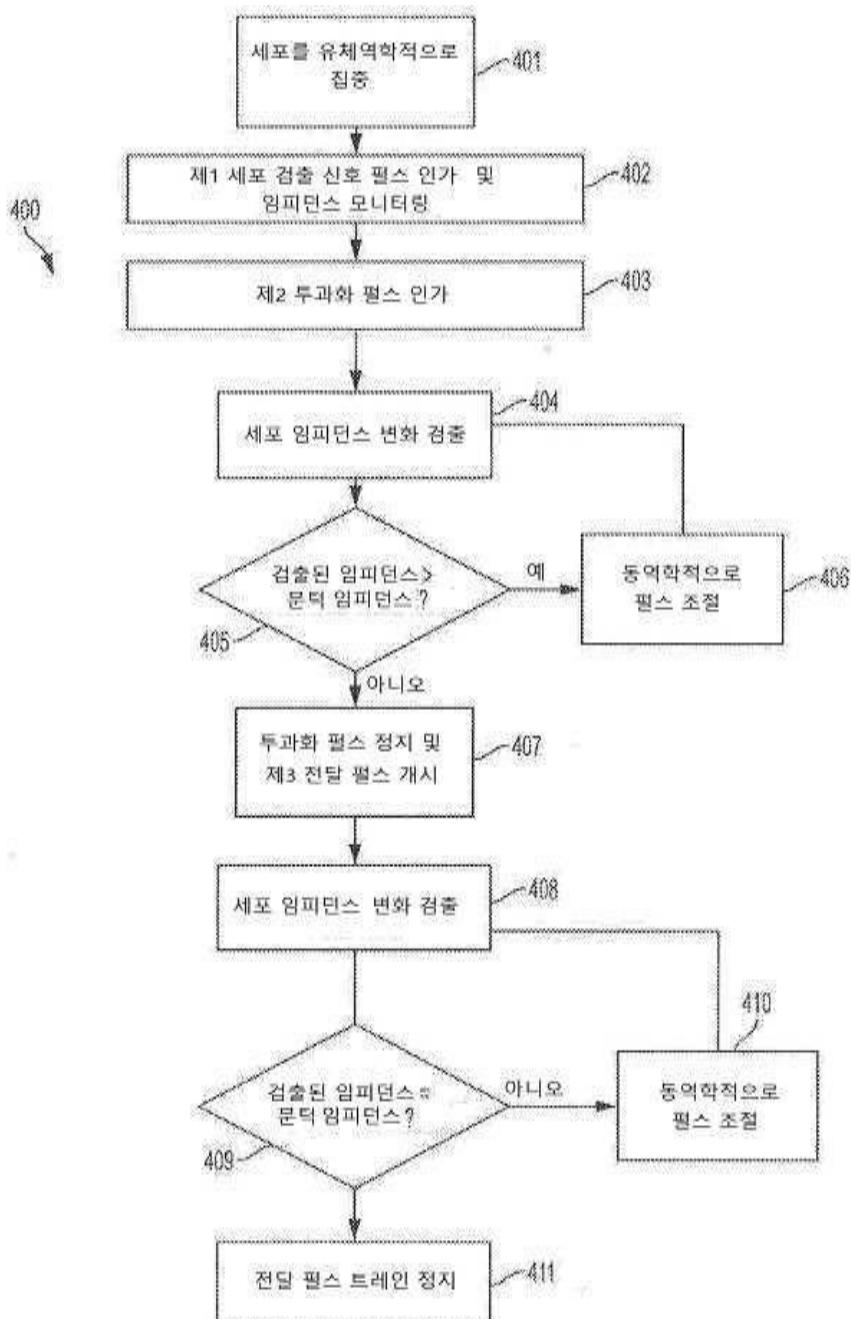
도면3f



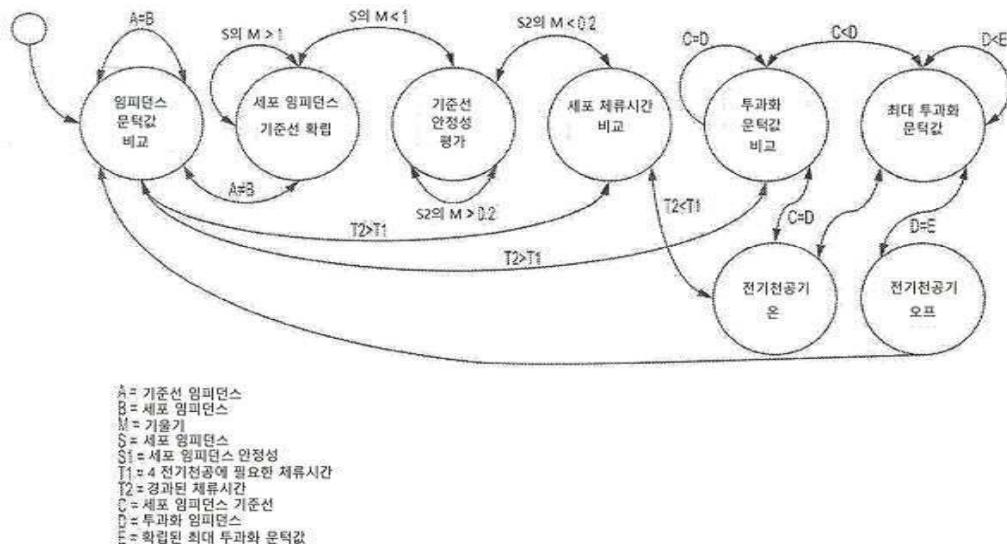
도면3g



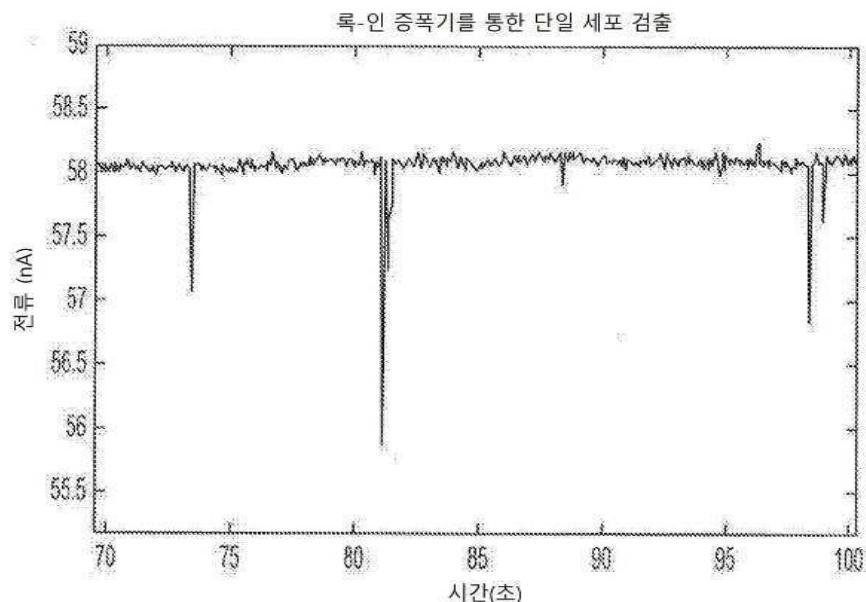
도면4a



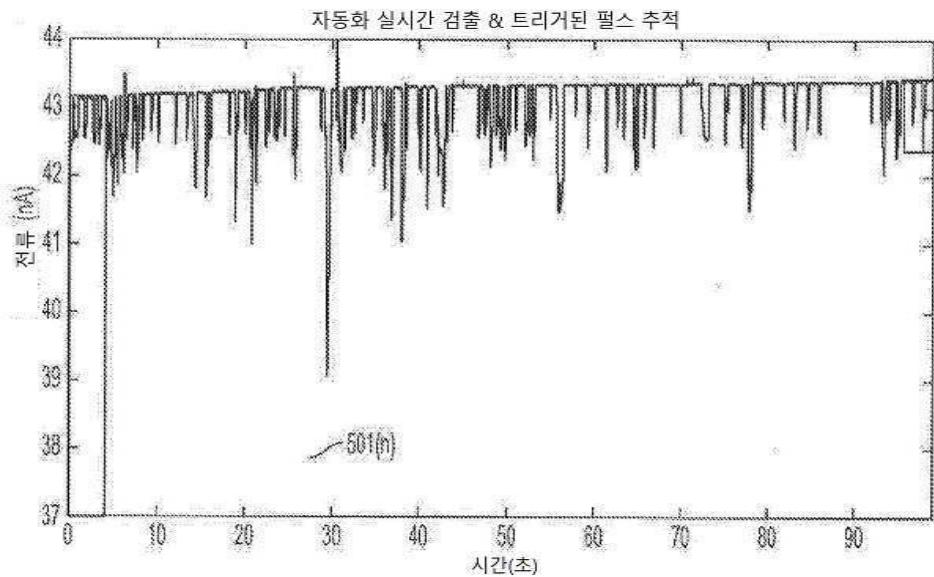
도면4b



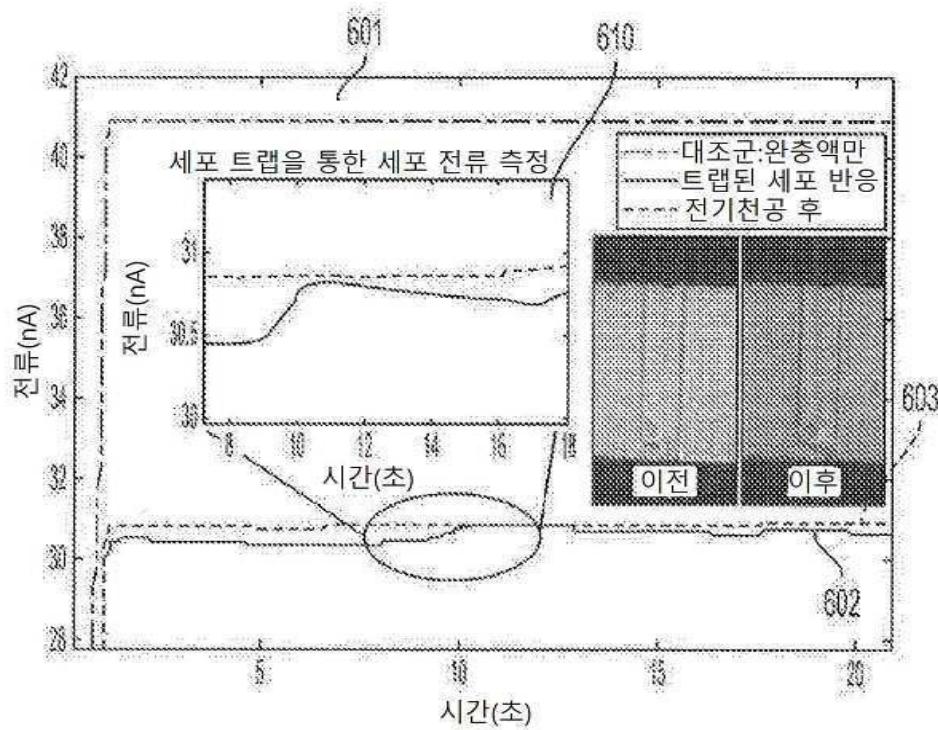
도면5a



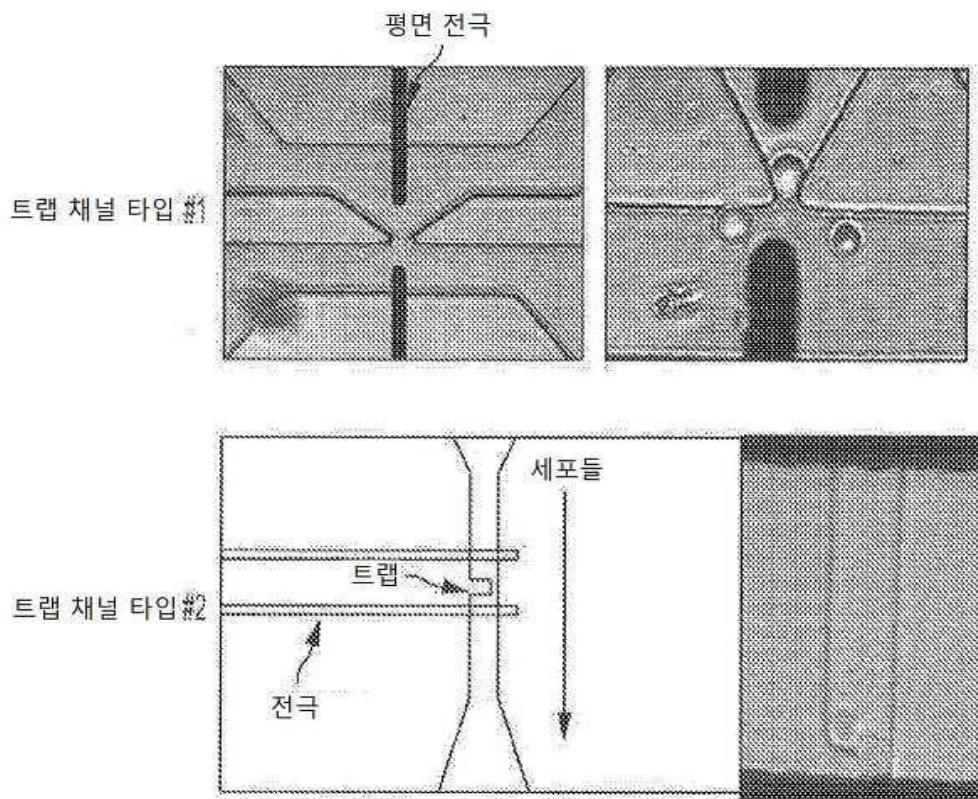
도면5b



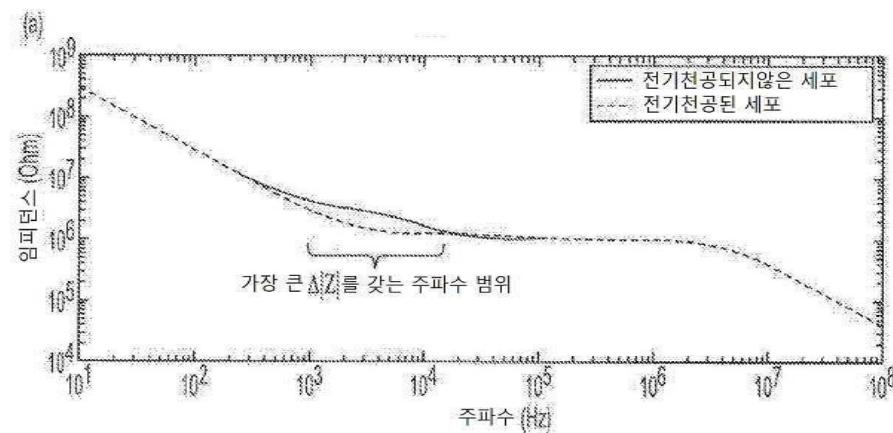
도면6a



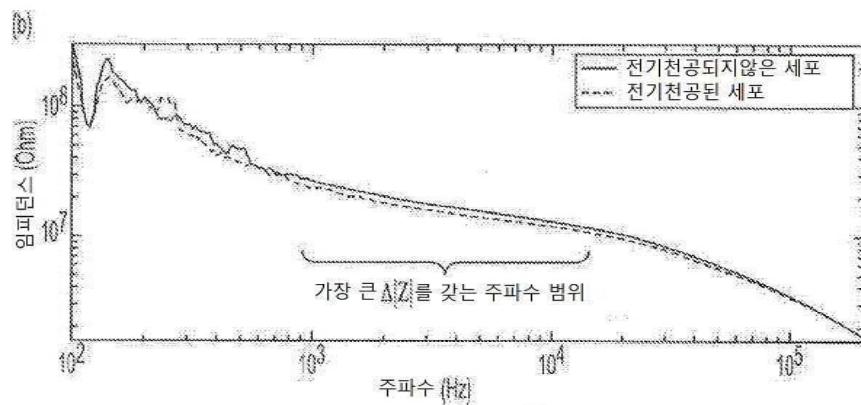
도면6b



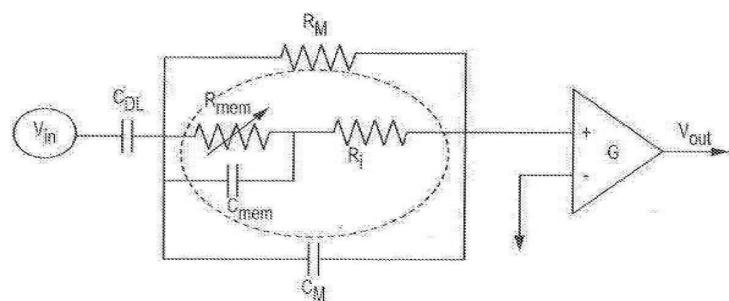
도면7a



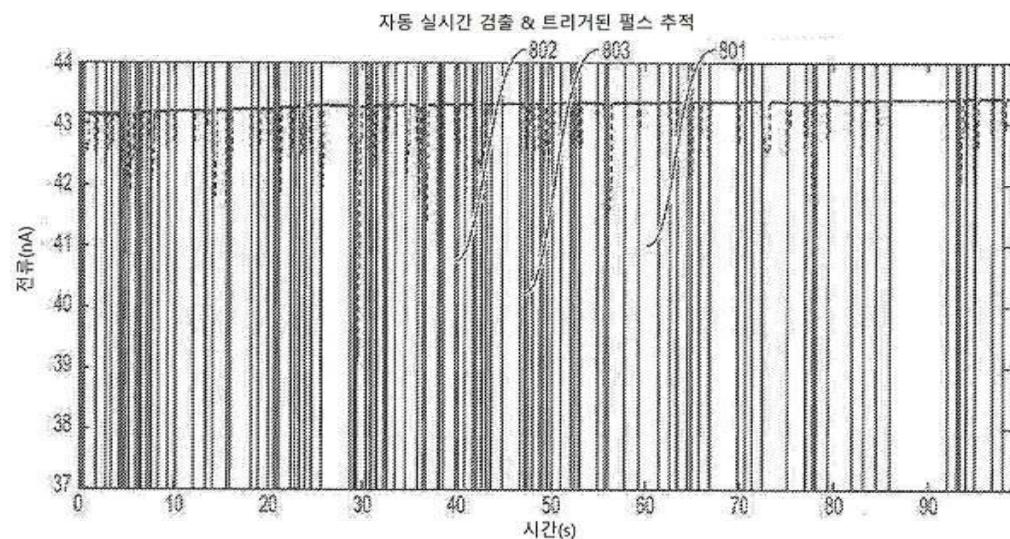
도면7b



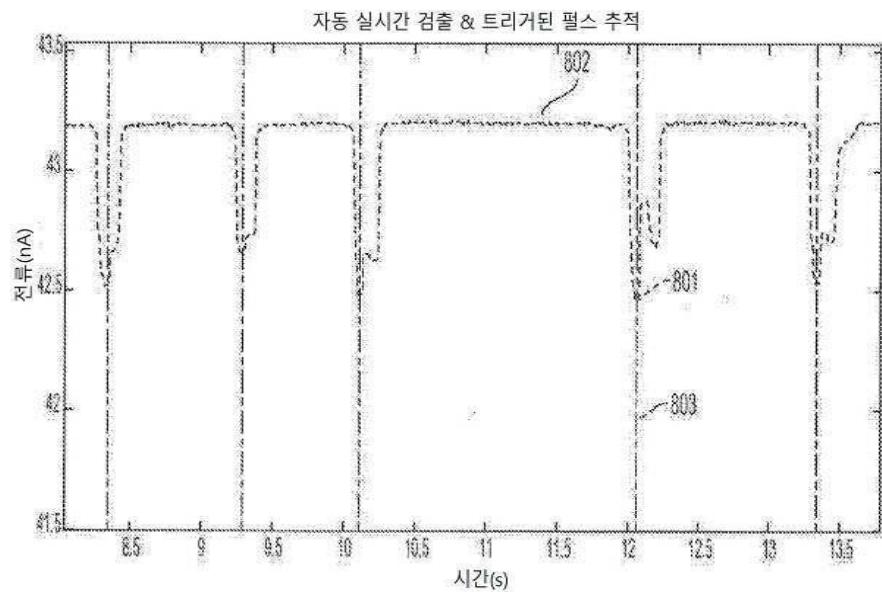
도면7c



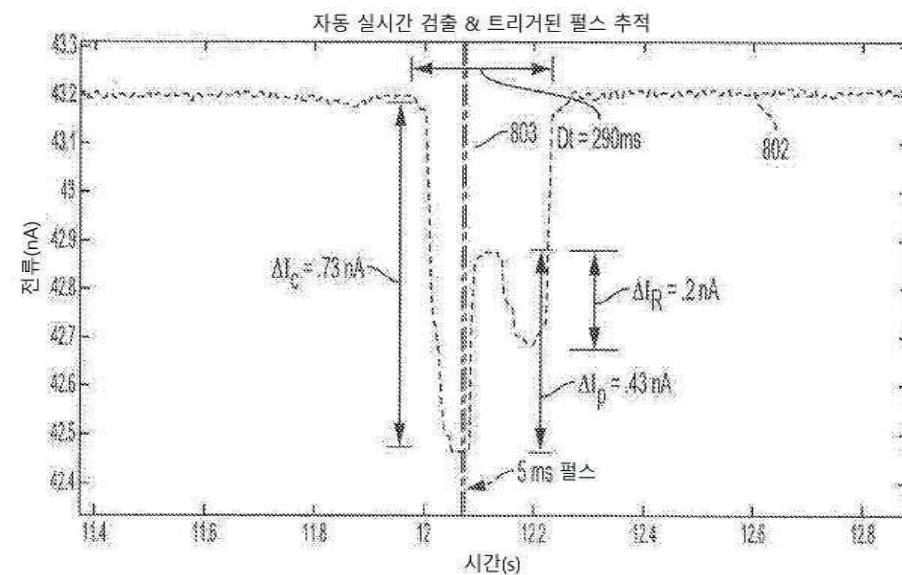
도면8a



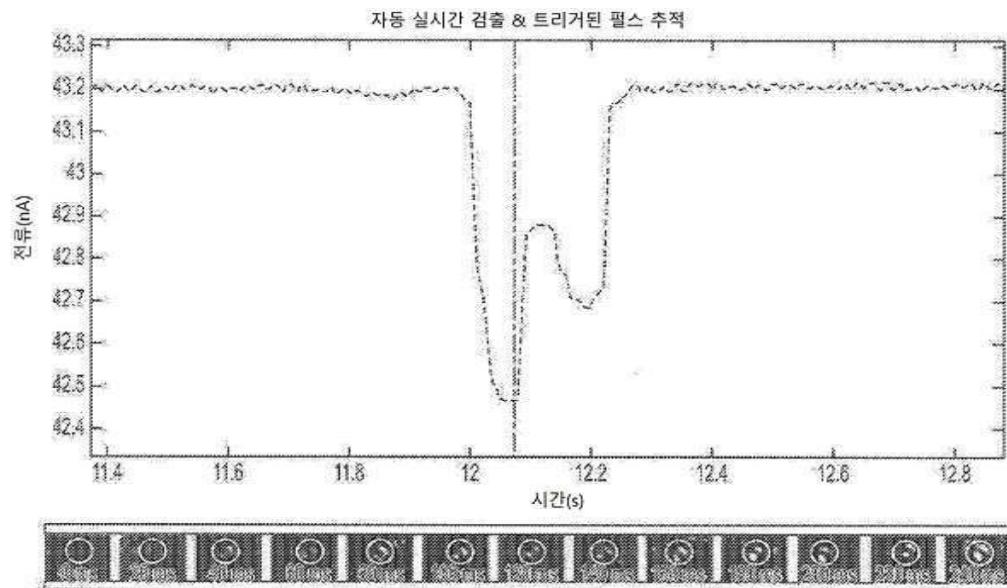
도면8b



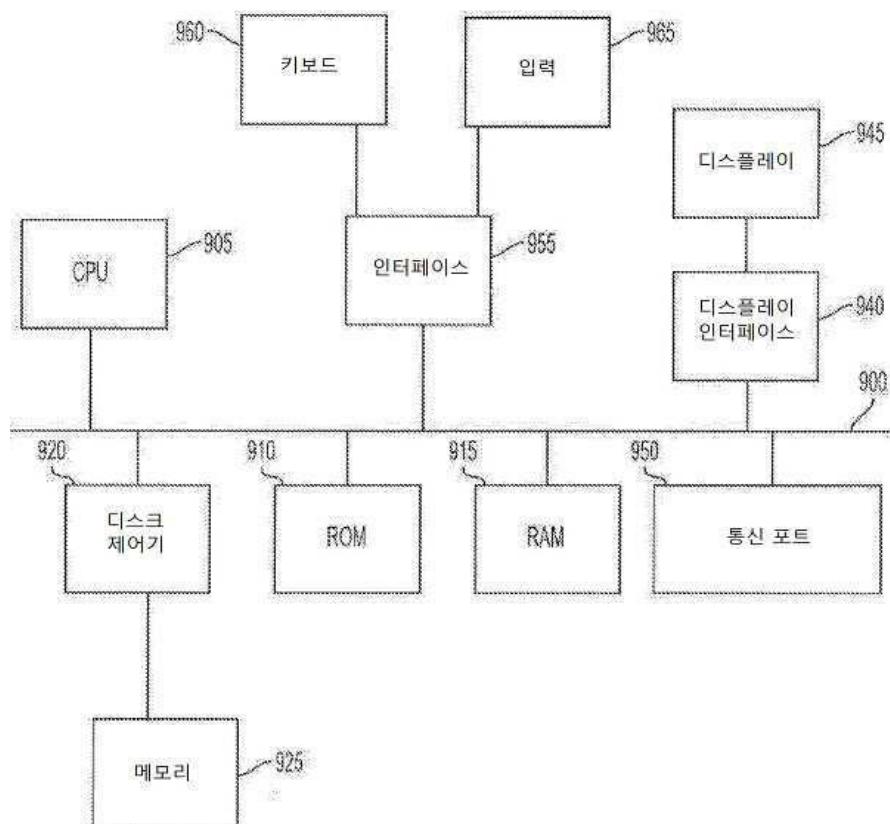
도면8c



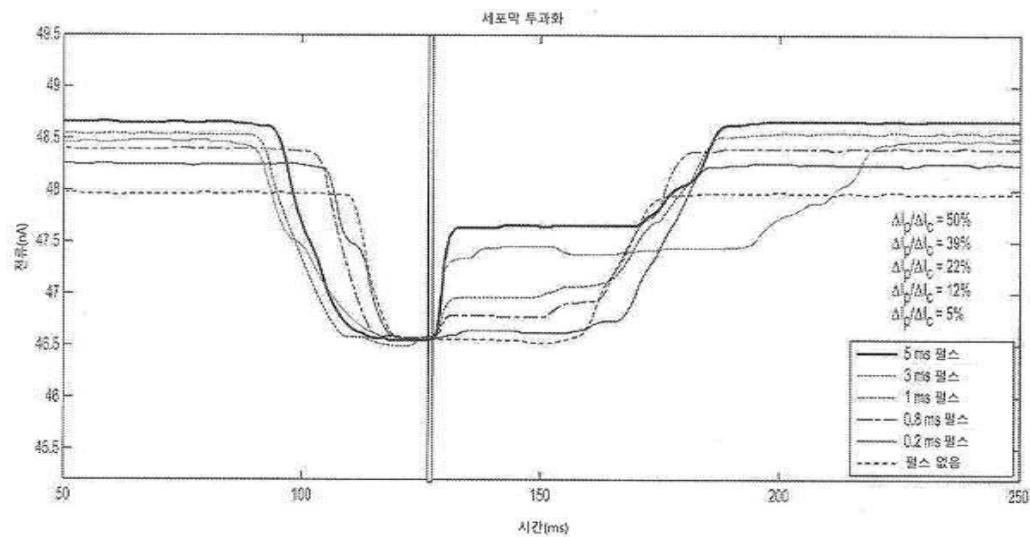
도면8d



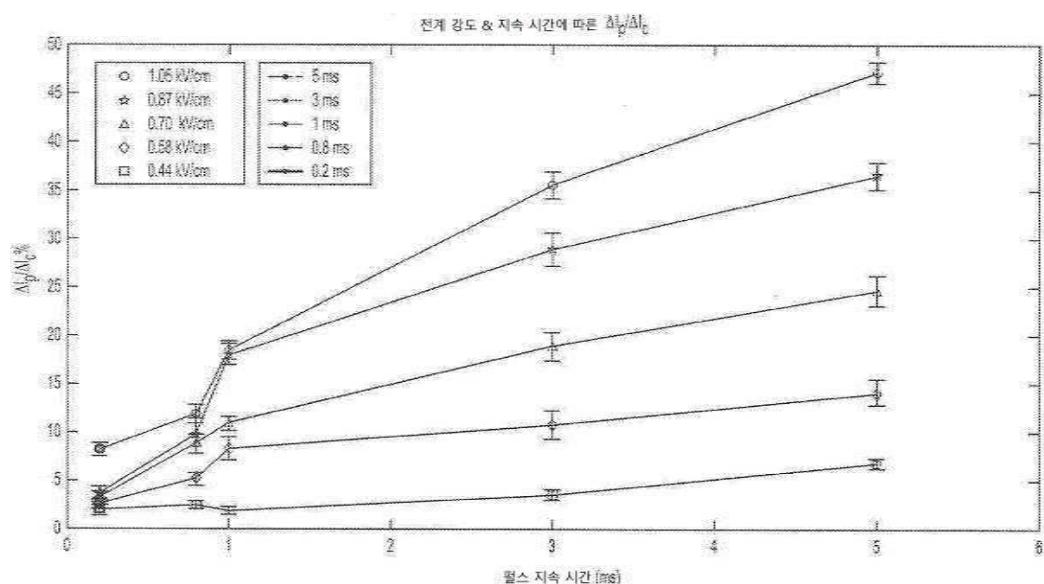
도면9



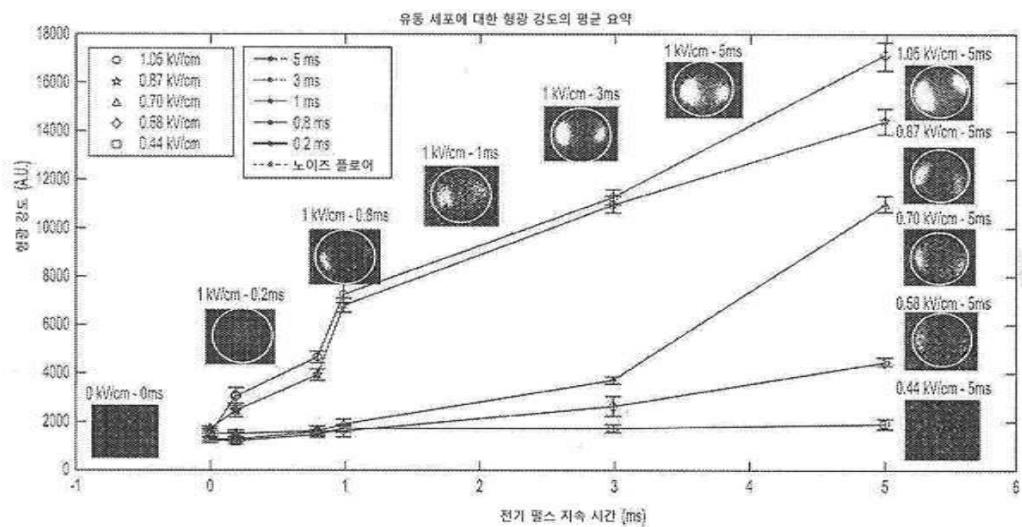
도면10



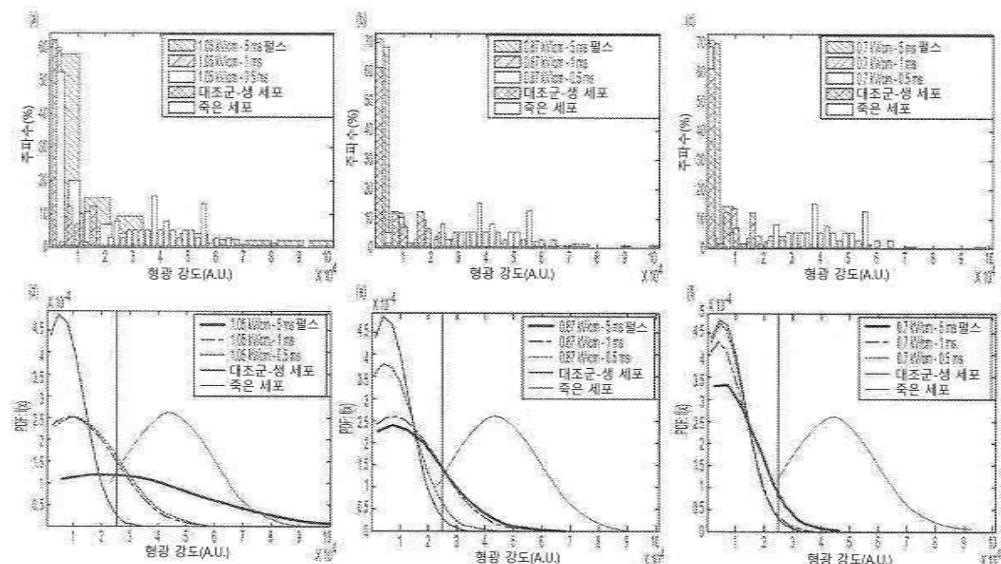
도면11



도면12



도면13



도면14

