

마이크로 스텐실을 이용한 MEF 세포의 마이크로패턴 배양

Micro patterning of MEF cell with microstencil

*최진호¹, 이현^{2,3}, 진희경², 배재성³ #김규만¹

*J. H. Choi¹, H. Lee^{2,3}, H.K. Jin², J.S. Bae³, #G.M. Kim (gyuman.kim@knu.ac.kr)¹

¹ 경북대학교 기계공학부, ² 경북대학교 수의학과, ³ 경북대학교 의학전문대학원 생리학교실

Key words : PDMS stencil, micro pattern, MEF cell

1. 서론

기존의 세포 배양은 표면 전체에 세포를 배양하는 반면, 마이크로 패턴 세포배양은 세포를 국부적인 영역에서만 배양함으로써 미세패턴 형상으로 세포를 배양하는 기술이다. 국부적으로 배양된 세포의 위치, 크기 등을 정확하게 제어함으로써 마이크로 구조를 구현할 수 있고, 제어된 미세 환경을 제공함으로써 체계적이고 공학적인 세포 연구를 가능하게 한다. 이를 위해서는 세포배양기술과 함께, 세포배양의 국부화 기술이 필요한데, 이러한 세포 국부화는 마이크로 패터닝 기술을 이용하여 구현된다. 따라서 마이크로 패턴 세포 배양기술은 마이크로 제작기술과 세포배양기술의 융합기술이라 할 수 있다. 이러한 마이크로 패턴을 이용한 세포배양기술은 미세환경을 제어함으로써 높은 균일도의 크기, 형상 제어가 가능하기 때문에 생체 밖에서의 세포 연구에 유용한 도구로 사용될 수 있다. 이 기술은 세포를 원하는 특정 위치에 국부화 하기 위한 도구인데, 대표적으로 마이크로 웰 어레이와 마이크로 스텐실 방법으로 구분 할 수 있다. 마이크로 웰 어레이는 바닥이 있는 마이크로 챔버형상으로, 마이크로 웰 안에서 세포를 물리적으로 모은 후 배양함으로써 3 차원 구조의 배양을 할 수 있다. 이 방법은 제작이 간단하지만 배양이 되는 세포가 한정되고 세포배양이 마이크로 웰 안에서 이루어진다. 마이크로 웰 배양 방법은 간세포 배양에 활발히 적용되고 있다.^[1-3] 그러나 마이크로 스텐실을 이용한 세포 배양 방법은 관통형상의 멤브레인을 이용하여 세포를 패터닝 후 마이크로 스텐실을 제거하면 기존의 세포 배양 방법과 동일한 환경에서 세포를 배양할 수 있고, 세포를 국부적인 미세패턴 형상으로 제작 할 수 있다.^[4]

본 연구에서는 마이크로 스텐실을 이용하여 MEF(Mouse Embryonic Fibroblast) cell 을 국부적인 미세패턴 형상으로 배양시키는 연구를 수행하였다.

2. 마이크로 스텐실 제작

본 연구에서 사용된 마이크로 스텐실은 포토리소그래피를 이용하여 마스터를 제작하고, 제작된 마스터를 PDMS casting 방법을 이용하여 제작하였다. Fig. 1 은 포토리소그래피를 이용한 마이크로 스텐실 제작공정도 이다. 우선 Si wafer 위에 SU-8(100) 포토레지스트를 250 μm 두께로 스핀코팅 하고, 65℃에서 30min, 95℃에서 90min 핫플레이트(Hot plate)에서 소프트 베이킹(Soft Baking)을 한다. 그리고 정해진 시간에 따라 마스크 얼라이너(Mask Aligner)로 노광(Exposure)을 한 후 65℃에서 15min, 95℃에서 25min Post Exposure Baking 을 거친 후 현상(Development)하는 일련의 과정으로 제작하였다. 이렇게 제작된 마스터에 PDMS(Polydimethylsiloxane)와 크로스링커를 9:1(wt%) 로 배합하여 스핀코팅 한다. 스핀코팅 된 몰드 위에는 얇은 PDMS 층이 존재 하기 때문에 N₂ gas 를 몰드 위로 분사하여 이를 제거한다. 이후 65℃ 오븐에서 60 분 동안 경화시킨 후 마스터와 PDMS 를 분리하여 스텐실을 제작하였다. Fig. 2 는 제작된 PDMS 스텐실의 사진이다. PDMS 스텐실

은 모양은 circle 형태이며 직경은 500 μm 이다.

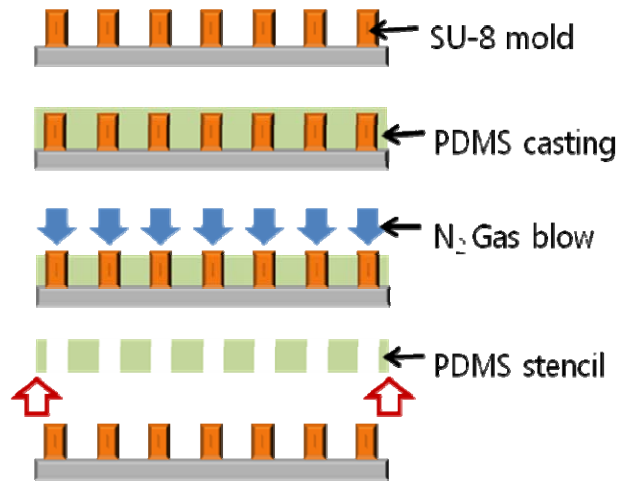


Fig. 1 Schematic diagram of PDMS stencil fabrication.

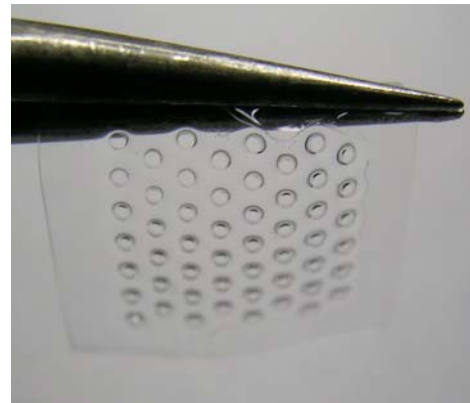
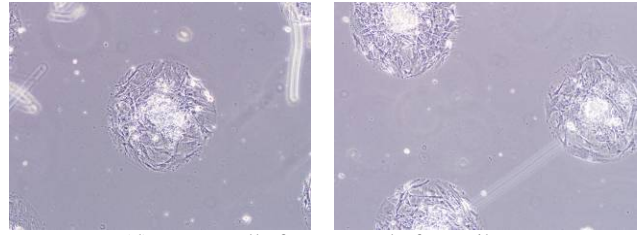


Fig. 2 Fabricated PDMS stencil. (circle, D=500 μm)

3. 마이크로 스텐실을 이용한 MEF cell 배양

스텐실을 이용한 MEF(Mouse Embryonic Fibroblast) cell 배양 방법은 Fig. 3 과 같은 방법으로 실험을 진행하였다. MEF cell 준비는 임신한 마우스를 대략 13.5 일(10~17 일) 동안 자라게 한 후 배아를 자궁에서 분리한다. 분리 된 배아를 몸통만 남기고 전부 제거 후 갈아준다. 이렇게 준비된 배아에 trypsin/EDTA solution 을 넣고 37℃에서 20 분 동안 배양한 후 MEF cell 을 추출한다. 이렇게 추출된 Cell 을 culture 하기 위해 전처리 과정으로 Disk 및 PDMS 스텐실을 Autoclave 를 이용하여 멸균 처리한다. 그리고 Disk 위에 PDMS 스텐실을 붙이고 배양액을 넣어준다. 이때 배양액이 PDMS 스텐실 안으로 침투가 안되고 마이크로 버블이 형성되는데, 마이크로 버블은 cell 배양에 영향을 준다. 이 경우 pipette 으로 배양액을 여러 번 강하게 분사하여 마이크로 버블을 제거한다. 마이크로 버블이 제거된 PDMS 스텐실

위로 MEF cell 을 seeding 하고 8 일간 Incubator 안에서 배양 하였다. Fig. 4 는 8 일간의 배양과정에서의 MEF cell 사진과, 8 일 후 Disk 와 PDMS 스텐실을 분리하고 Disk 위에서 자라고 있는 MEF cell 의 사진이다. MEF cell 들이 PDMS 스텐실 위에는 자라지 않고 스텐실 안(Disk 위)에서만 자라는 것을 확인 할 수 있었다. Fig. 5 는 MEF cell 을 SEM 전처리 공정 후 SEM 으로 촬영을 한 사진이다.



(d) MEF cell after removal of stencil

Fig. 4 Microscope image of MEF(Mouse Embryonic Fibroblast) cell.

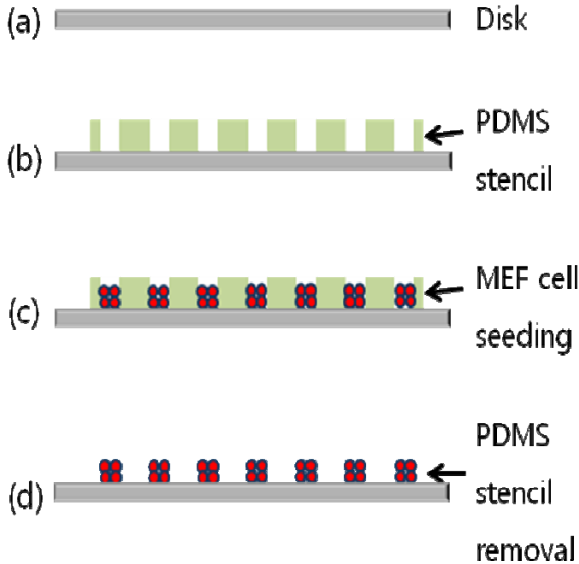


Fig. 3 Schematic diagram of MEF(Mouse Embryonic Fibroblast) cell culture process.

(a) Glass Disk (b) PDMS stencil bonding after micro bubble removal , (c) MEF cell seeding , (d) Removal of PDMS stencil

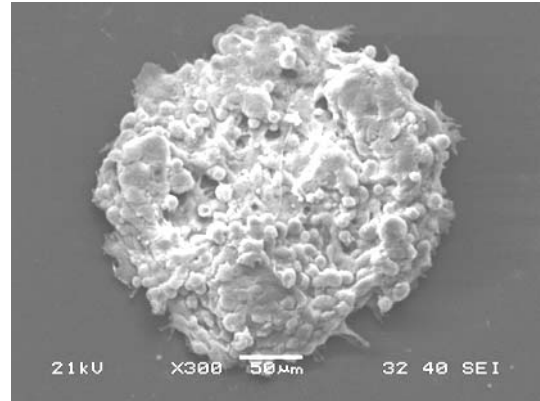


Fig. 5 SEM image of MEF(Mouse Embryonic Fibroblast) cell.

4. 결론

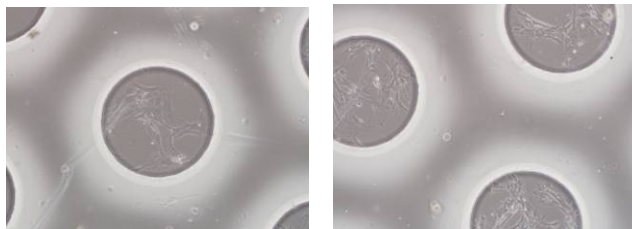
본 연구에서는 기존의 세포배양 방법인 표면 전체에 세포를 배양하는 방법과는 달리 마이크로 스텐실을 이용하여 국부적인 마이크로 패턴 영역에서만 세포를 배양하는 기술 개발을 목적으로 연구를 진행하였다. MEF(Mouse Embryonic Fibroblast) cell 을 PDMS 스텐실을 이용하여 배양해 보았으며, 8 일 후 스텐실을 분리하고 마이크로 패턴 영역에서만 세포가 자라는지 확인해 보았다. 그 결과 PDMS 스텐실을 이용한 마이크로 패턴 cell 배양 방법은 cell 을 물리적으로 PDMS 스텐실 안에서 마이크로 패턴 형태로 배양 할 수 있음을 확인하였다.

후기

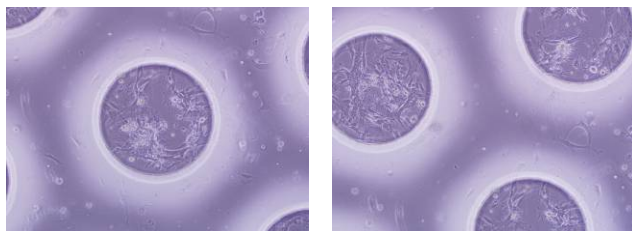
이 논문은 2009 년도 교육과학기술부의 재원으로 한국과학재단의 지원(No. 2009-0087280)과 2010 년 교육과학기술부의 지원(지역거점연구단육성사업/노화극복·웰빙을 위한 융합의료기술개발사업단)을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

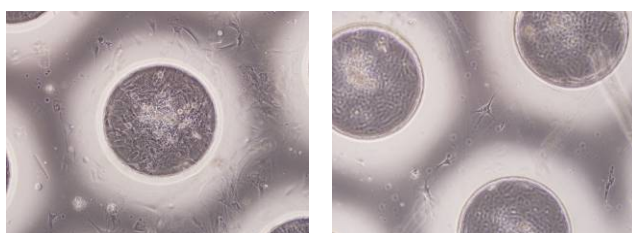
1. Jacqueline R. Retting and Albert Folch , "Large Scale Single Cell Trapping And Imaging Using Microwell Arrays," Anal.Chem, 77, 5628-5634, 2005
2. J Fukuda, R Langer , "Micropatterned cell co-cultures using layer-by-layer deposition of extracellular matrix components," Biomaterials, 27, 1479-1486, 2006
3. Yusuke Sakai, Kohji Nakazawa , "Technique for the control of spheroid diameter using microfabricated chips," Acta Biomaterialia, 3, 1033-1040, 2007
4. Salman R Khetani and Saneeta N Bhatia , "Microscale culture of human liver cells for drug development," nature biotechnology, 26, 1, 2008



(a) MEF cell with stencil (Day 3)



(b) MEF cell with stencil (Day 5)



(c) MEF cell with stencil (Day 8)