

PDMS 스텐실이 내재된 마이크로 웰 플레이트 제작 및 신경줄기세포의 마이크로 패터닝

Fabrication of PDMS stencil embedded micro well plate for micropatterned neural stem cell culture

*최진호¹, #김규만¹, 이현², 진희경², 배재성³

*J. H. Choi¹, #G. M. Kim(gyuman.kim@knu.ac.kr)¹, H. Lee², H. K. Jin², J. S. Bae³

¹경북대학교 기계공학과, ²경북대학교 수의과대학 실험동물학교실, ³경북대학교 의학전문대학원 생리학교실

Key words : Neural stem cell, PDMS stencil, Micropattern, Micro well plate

1. 서론

마이크로 패턴 세포 배양기술은 마이크로 제작기술과 세포 배양기술의 융합기술로 포토리소그라피, 마이크로 컨택트 프린팅, 잉크젯 프린팅 등 다양한 마이크로 제작기술이 사용되고 있다. 이러한 마이크로 패턴 세포 배양 기술은 세포의 점착을 국부화 함으로써 세포의 크기 및 형상 제어를 가능하게하고 실험관내에서의 세포연구에 유용한 도구로 사용되고 있다.

PDMS 스텐실은 화학적으로 안정하며 독성이 없는 생체 적합성 탄성중합체를 이용하여 제작된 얇은 멤브레인으로 미리 정의된 패턴만이 개방되어 있고 나머지 부분은 막혀있는 형상을 가진다. 이러한 PDMS 스텐실은 생체 연구 분야에서 세포나 단백질 거동 관찰 등에 활용되어지고 있다.

웰 플레이트는 수 마이크로 리터의 작은 부피의 시약을 담을 수 있는 많은 테스트 튜브를 지닌 판으로 의학진단이나 분석용으로 사용되고 있으며, 고가의 시약 사용을 최소화하고 분석 자동화를 통한 고속분석 기술 등에 적용되고 있다.

본 연구에서는 PDMS 스텐실이 내재되어 있는 마이크로 웰 플레이트를 펀칭 공정과 플라즈마 본딩 공정 없이 PDMS 캐스팅을 사용하여 일체형으로 제작하고 이를 통하여 동일한 배양조건하에서 각각의 웰을 분리할 수 있는 세포배양용 마이크로 웰 플레이트를

제작하였다. 또한, 마이크로 제작기술과 세포 배양기술을 융합하여 동일한 환경에서 신경줄기세포를 국부적으로 배양하고 배양된 신경줄기세포들을 다르게 염색하여 제작된 장치의 실효성을 검증하였다.

2. PDMS 스텐실이 내재된 마이크로 웰 플레이트 제작

2.1 PDMS 스텐실 제작

PDMS 스텐실 제작은 마이크로 제작기술인 포토리소그라피로 마스터 몰드를 제작 후 스핀코터를 이용하여 PDMS를 얇게 코팅한다. 얇게 코팅된 PDMS는 마스터 몰드의 마이크로 패턴 위에 얇은 막을 형성하는데 이러한 막 제거를 위해 가스블로잉 공정을 이용하여 질소가스를 마이크로 패턴 위로 분사한다. 막이 제거된 스텐실은 오븐에서 일정시간 경화 후 마스터 몰드에서 분리하여 PDMS 스텐실을 제작한다. Fig.1은 PDMS 스텐실 제작공정과 제작된 스텐실의 실제 모습을 보여주고 있으며, 패턴 형상은 500 μm 크기를 가지는 원 모양이다.

2.2 마이크로 웰 플레이트 제작

마이크로 웰 플레이트는 PDMS 스텐실과 웰 플레이트가 결합된 형상을 의미하며 제작과정은 아크릴을 CNC 장비를 이용하여 가공하고 가공된 형틀에 PDMS 스텐실을 넣고 아크릴 형틀의 상판과 하판을 닫는다. 그리고 PDMS를 아크릴 형틀에 채워서 제작한다.

마이크로 웰 플레이트 제작용 아크릴 몰드는 최대 4 개의 마이크로 웰 플레이트를 제작할 수 있도록 설계하였으며, 마이크로 웰 플레이트의 규격은 15 mm x 15 mm x 5 mm 이다. Fig. 2(a)는 마이크로 웰 플레이트의 제작과정을 보여주고 있다. Fig. 2(b)는 제작된 마이크로 웰 플레이트의 실제 이미지와 염색시약을 넣어 각각의 웰이 분리된 것을 보여주는 결과이다. 제작된 웰의 크기는 직경 5 mm 이다.

3. 신경줄기세포 마이크로 패터닝

신경줄기세포는 마이크로 웰 플레이트를 이용하여 37°C, CO₂ 5% 의 인큐베이터 안에서 5 일 동안 배양되었다. 사용된 신경줄기세포의 cell density 는 1x10⁵/cm이며, 스텐실 패턴의 크기는 500 μm 이다. Fig.3(a)는 신경줄기세포를 마이크로 패턴 형상으로 배양한 결과이며, Fig.3(b)는 신경줄기세포를 마이크로 웰 플레이트에서 동일하게 배양하고 분화시킨 후 neurons, astrocytes, oligodendrocytes 로 각각 염색한 결과 이미지이다.

4. 결론

PDMS 스텐실이 내재되어 있는 마이크로 웰 플레이트를 펀칭과 플라즈마 본딩 없이 쉽고 간편하게 PDMS 캐스팅을 이용하여 일체형으로 제작하였다. 제작된 마이크로 웰 플레이트는 동일한 배양조건에서 미세환경을 제어하여 세포를 국부적으로 배양할 수 있으며, 각각의 웰을 따로 염색할 수 있는 세포배양용 장치이다. 또한, 고가의 세포배양용 시약 낭비를 줄일 수 있는 장점도 가진다.

본 연구에서는 마이크로 웰 플레이트를 이용하여 동일한 배양조건에서 신경줄기세포를 국부적으로 배양하고 이를 분화시킨 후 각각의 웰을 따로 염색하여 신경줄기세포의 분화 상태를 확인하였다.

후기

이 논문은 2011 년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(2011-0016779, 2011-0027234)을 받아 수행된 연구임.

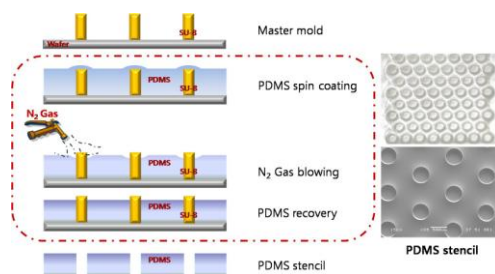


Fig. 1 Schematic process for PDMS stencils fabrication and image of PDMS stencils.

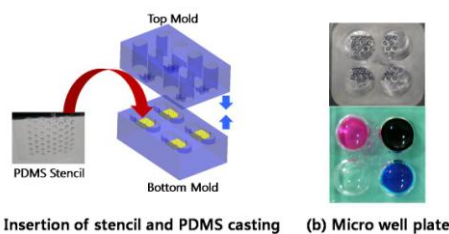


Fig. 2 Schematic process for micro wellplate fabrication and four different dyes in the compartment. (red, black, blue, DIW)

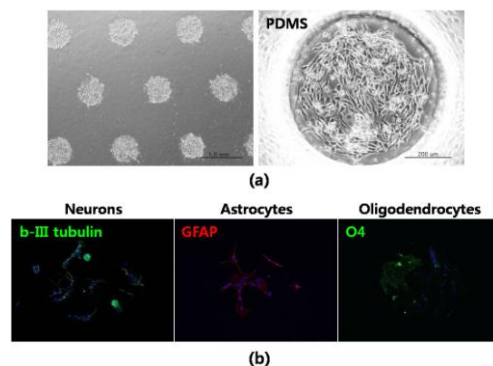


Fig. 3 Neural stem cell culture image and differentiation.

참고문헌

1. Salman R Khetani and Saneeta N Bhatia , "Microscale culture of human liver cells for drug development," nature biotechnology, **26**, 1, 2008.
2. Heungsoo Shin , "Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell-biomaterial interactions," Biomaterials, **28**, 126-133, 2007.