

미세 격자가 형성된 배양 접시를 이용한 새로운 세포 계수 방법

손상욱[†] · 최요한^{**} · 이승섭^{*}

(2004년 1월 24일 접수, 2004년 5월 24일 심사완료)

A Novel Cell Count Method Using Micro Lattice Engraved On A Culture Dish

Sang Uk Son, Yo Han Choi and Seung Seob Lee

Key Words : Cell Count(세포 계수), Culture Dish(배양 접시), Micro Lattice(미세 격자), Hemocytometer(헤모사이토미터), Hot Embossing(핫 엠보싱)

Abstract

A novel cell count method, which can improve the count efficiency and reduce contamination problem, was presented using micro lattice engraved on culture dish. The micro lattice has feature of $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ rectangular shape, $2\ \mu\text{m}$ line width, and $2\ \mu\text{m}$ depth in $3\ \text{mm} \times 3\ \text{mm}$ area. In this paper, nickel mold was fabricated with thickness of 3 mm and diameter of 80 mm, and transcription of the micro lattice on a polystyrene cell culture dish was performed by hot embossing at $200\ ^\circ\text{C}$. The tedious and error-prone harvest/load processes of conventional cell counts with a hemocytometer could be omitted, and these advantages became magnified during periodical counts involving long-term cultures. SupT1 cells and HeLa cells were cultivated with the dish for 7 days in CO_2 incubator and counted as $371.84/\text{mm}^2$ and $123.36/\text{mm}^2$, respectively, during the cultivation without harmful effects on the cells.

1. 서 론

세포 계수는 생물학 연구, 의료 진단, 또는 신약 개발과 같은 세포를 이용한 연구 분야에서 실험 결과의 정량적인 근거를 제공하기 위해 주기적으로 수행되는 작업이다.^(1,2) 일정한 부피의 샘플에 들어 있는 세포의 수 (밀도)를 구하는 세포 계수에는 고가의 자동화된 장비(Fig. 1)를 이용하는 방법^(3,4) 있는데, 이 방법은 형광 마커 (fluorescence marker)가 부착된 세포가 액적 (droplet)에 싸여서 감지부를 지날 때 조사된 레이저에 의해 형광 마커로부터 발광된 빛을 감지하여 계수한다. 이 방법은 높은 정밀도와 초당 5,000 개 이상의 고속 계수가 가능한 장점이 있지만 형광 마커의 부착에 따른 경비와 작업의 복잡성 그리고 장비 조작의 숙련도를 필요로 하는

단점이 있다.

또 다른 방법은, 헤모사이토미터 (hemocytometer, Fig. 2)라고 하는 유리 기판에 샘플을 주입하고 현미경을 이용해서 사람이 눈으로 보면서 계수하는 방법이 있다.⁽⁵⁻⁷⁾ 헤모사이토미터는 재사용이 가능한 유리 기판 위에 폭 $2\ \mu\text{m}$ 의 금속선으로 미세 격자(micro lattice, $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$)가 표시되어 있으며 세포 주입을 위해 $0.1\ \mu\text{l}$ 의 공간이 형성되어 있다.

헤모사이토미터를 이용하는 경우는, 자동화된 장비를 구비하고 있지 않거나 세포의 원형을 보존하면서 계수를 해야 하는 경우 또는, 장시간의 세포 배양 도중 주기적으로 신속하게 계수를 해야 하는 경우에 주로 해당된다. 실제 실험에서는, 편의상 또는 경제적인 이유로 후자의 방법이 이용되고 있다. 이 방법은, 배양 접시(culture dish) 바닥에 붙어서 성장하는 부착 세포는 약품으로 떼어내는 과정을 거치고, 배양액 속을 떠다니며 성장하는 부양 세포는 별도의 과정 없이, 피펫(pipette)으로 헤모사이토미터에 주입한 후 격자를 보면서 계수한다. 이 과정에서 밀도 (세포 수/ $0.1\ \mu\text{l}$)를 계산하여, 배양 접시 내의 세포 수를 구하는 것이 가능하다.

[†] 책임저자, 회원, 한국과학기술원 기계공학과
E-mail : chairson@kaist.ac.kr

TEL : (042)869-3086 FAX : (042)869-5046

* 회원, 한국과학기술원 기계공학과

** 한국과학기술원 기계공학과

세포 계수 작업에 소요되는 시간이 짧고 방법이 간단한 장점이 있지만, 배양 접시로부터 세포를 추출하는 과정에서 사용하는 트립신 (trypsin) 같은 약품이나 피펫 같은 외부 환경에의 노출 그리고 세포 추출 과정에서 유발되는 오염 등에 의해 세포에 유해한 영향이 가해질 가능성이 높다.⁽⁷⁾ 특히, 반복되는 트립신 처리는 세포의 생장에 나쁜 영향을 주는 경우도 많으며 세포를 추출할 때 배양액 속의 세포가 불균일(heterogeneous)하게 분포할 가능성이 높아서 계수 결과 오류의 원인이 된다.

본 연구에서는, 미세 격자가 형성된 배양

접시를 제작하고 그 접시로 세포를 배양하면서 계수하여, 기존의 헤모사이토미터 사용 과정에서 내포되는 세포의 오염 가능성을 최소화하고 계수 작업 효율을 높일 수 있는 새로운 방법을 제안한다.

2. 개념 및 방법

미세 격자가 형성된 배양 접시를 이용한 세포 배양과 계수 방법을 헤모사이토미터를 이용한 기존의 방법과 비교하여 Fig. 3에 도식적으로 나타내었다.

기존의 방법은, 배양 접시에서 세포를 배양 (cultivation) 한 후, 피펫으로 추출 (harvest)하고, 헤모사이토미터에 주입 (load)하여, 현미경으로 계수 (count)하는 네 단계로 구성되어 있다[Fig. 3(a)]. 이 중, 추출 과정이 세포가 각종 오염원에 노출되는 원인이 되며 많은 시간이 소요된다.

제안된 방법은, 세포를 배양 중인 접시를 현미경에 올리고, 바닥의 격자를 이용해서 계수하므로 [Fig. 3(b)] 추출과 주입 과정을 생략할 수 있다. 그러므로, 헤모사이토미터 사용의 장점인 신속한 작업과 저렴한 비용을 유지하면서, 단점인 세포의 오염과 계수 오차 가능성을 줄일 수 있다.

제안된 방법을 실현하기 위해서는, 배양 접시에 미세 격자를 형성하는 과정이 선행되어야 하고 이로 인해 세포의 생장에 유해한 영향을 주지 않아야 하는 조건을 동시에 만족해야 한다. 아울러, 현미경 관찰시에 동일한 초점 높이에 위치해야 한다.

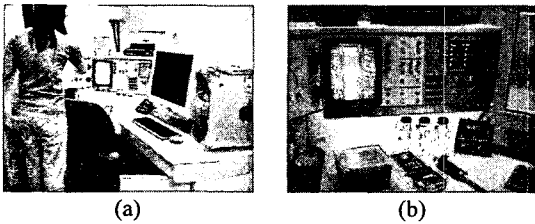


Fig. 1 (a) Automated cell counter; (b) operating view

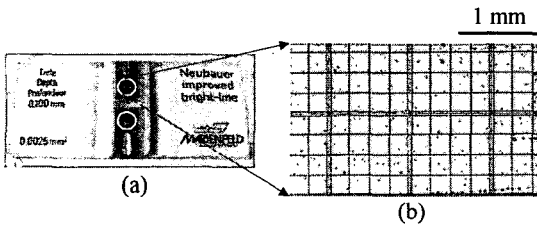


Fig. 2 Hemocytometer: (a) commercial product (MARIENFELD, German, 2 cm × 7 cm); (b) lattice

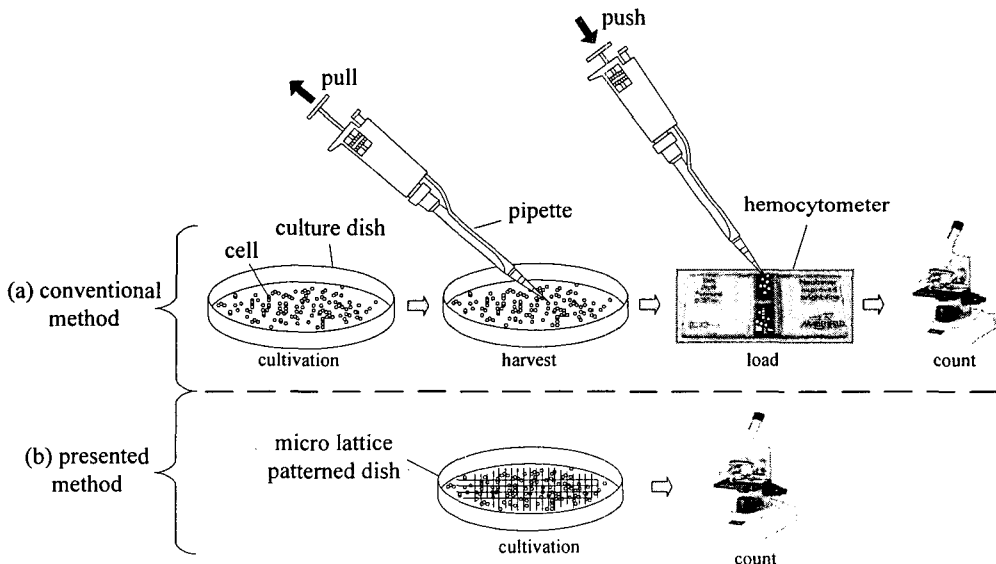


Fig. 3 Comparison of cell count method: (a) conventional method; (b) presented method

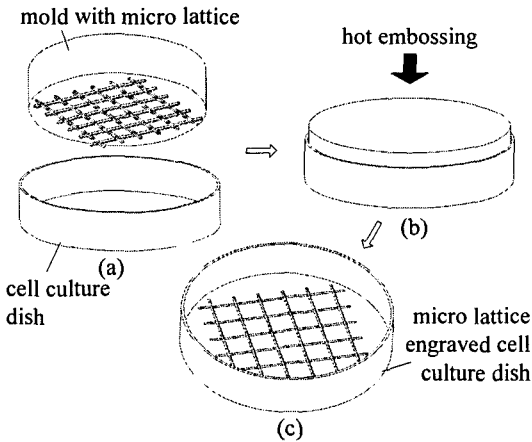


Fig. 4 Process for micro lattice transcription on culture dish: (a) mold fabrication; (b) hot embossing; (c) micro lattice engraved culture dish

배양 접시에 미세 격자를 형성하는 과정은 Fig. 4와 같다. 미세 격자를 몰드로 제작하고, 핫 엠보싱으로 몰드와 배양 접시를 압착하여, 격자를 형성한다. 그리고 나서, 표면을 에탄올로 소독해서 오염 미생물을 제거하고 세포의 부착성을 높이는 약품을 처리한다.

본 연구에서는, 실제 헤모사이토미터와 동일한 크기와 형상의 미세 격자를 몰드로 제작하였고, 지름 85 mm 인 polystyrene 재질의 세포 배양 접시 (Falcon, USA)에 핫 엠보싱으로 미세 격자를 전사하였다. 또한, 배양액 속을 떠다니며 자라는 SupT1 세포(human lymphoma cell)와 바닥에 붙어서 자라는 HeLa 세포(cervical carcinoma cell) 두 종류를 배양하면서 계수하여 본 연구에서 제안한 방법을 검증하였다.

몰드 제작의 자세한 과정과 세포 배양 및 계수 결과를 다음에 기술하였다.

3. 몰드 제작과 미세 격자의 핫 엠보싱

몰드 제작은 실리콘 웨이퍼를 기관으로 하는 방법과, 두께 3 mm 의 니켈을 기관으로 하는 두 가지 방법으로 제작하였다. 첫 번째 방법은, 미세 격자의 몰드 제작 가능성을 확인하기 위해, 두 번째 방법은, 실리콘 웨이퍼 몰드의 문제점을 보완하기 위해 제작하였다.

3.1 실리콘 웨이퍼 몰드 제작과 미세 격자의 핫 엠보싱

실리콘 웨이퍼 몰드는 Fig. 5와 같은 공정 순서로 제작하였다. 우선, 500 μm 두께의 4" 실리콘 웨이퍼에 양성(positive) 폴리머 감광재 (AZ5214, Clariant, Switzerland)를 1.4 μm 두께로 스핀 코팅하고 UV 노광을 하여, 폭 2 μm , 가로 세로 길이 50 μm 인 미세 격자를 패터닝 하였다.

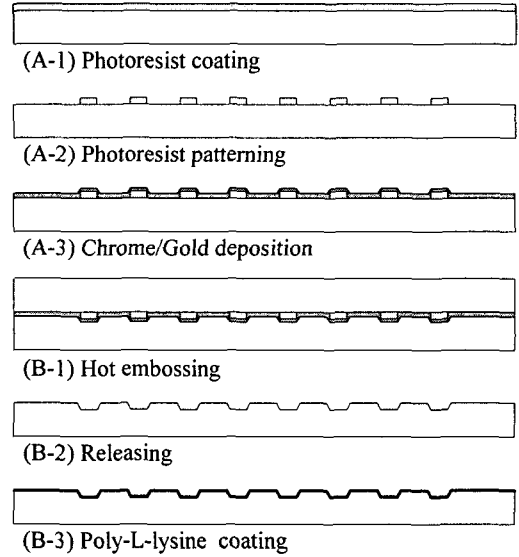


Fig. 5 Fabrication process for silicon wafer mold (A) and lattice transcription on cell culture dish (B)

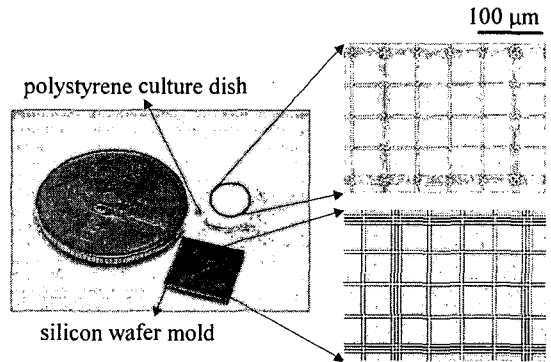


Fig. 6 Diced silicon wafer mold and hot-embossed culture dish

표면에 크롬을 0.3 μm 두께로 증착한 후, 금을 1 μm 두께로 추가 증착하여 실리콘 웨이퍼 몰드를 완성하였다(Fig. 5A).

핫 엠보싱을 위해 몰드를 200 $^{\circ}\text{C}$ 로 가열한 다음, 세포 배양 접시에 눌러서 미세 격자를 형성하였다. 이어서 에탄올로 소독하고, 세포의 부착성을 향상시킬 목적으로 poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, USA)에 접시를 적셔서 얇은 막을 코팅하였다(Fig. 5B).

제작된 몰드와 핫 엠보싱 된 세포 배양 접시의 일부분을 Fig. 6에 나타내었다. 몰드 위 3 mm \times 3 mm 면적에 형성된 미세 격자가 세포 배양 접시 조각에 선명하게 전사되었다.

실리콘 웨이퍼 몰드의 제작, 핫 엠보싱에 의한 미세 격자의 전사, 그리고 5 절의 세포 배양 결과로부터, 본 연구에서 제안한 방법에 의해 효과적으로 세포 계수가 가능함을 확인하였다. 하지만, 실리콘 웨이퍼는 두께가 500 μm 정도로 얇아서 취급하기가 어렵고 부서지기 쉬운 재질의 특성 때문에 몰드로 사용하기에는 적합하지 않았다. 또한, 금속층의 두께가 1.3 μm 로 얇고 금속층 아래에 폴리머가 있어서 압력과 고온에 취약한 구조적인 문제 때문에 반복 사용이 어려웠다. 그러므로, 강도가 높고 반복 사용하기에 적합한 니켈로 몰드를 다시 제작하기로 하였다.

3.2 니켈 몰드 제작과 미세 격자의 핫 엠보싱

니켈 몰드 제작 공정도는 Fig. 7과 같이 실리콘 웨이퍼 몰드 제작 과정과 유사하지만, 금속 증착

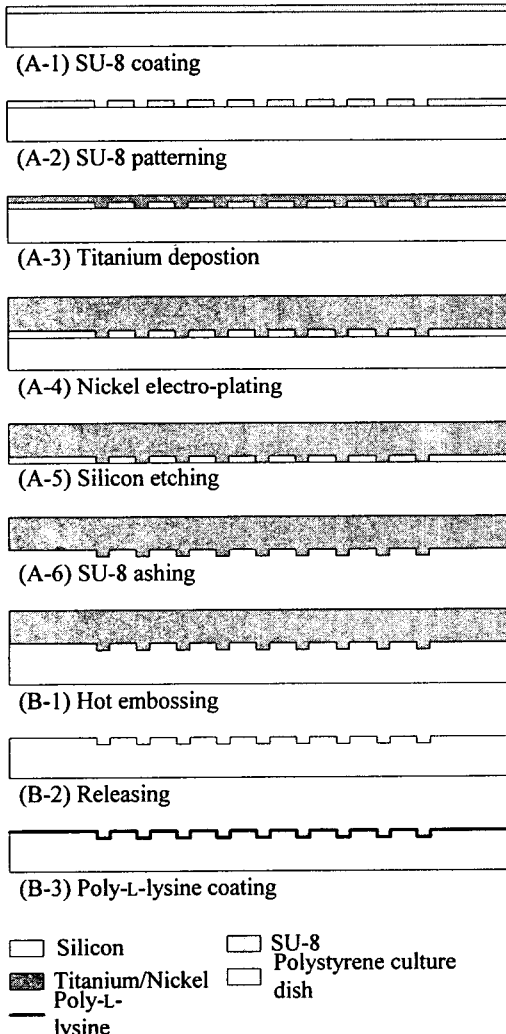


Fig. 7 Fabrication process for nickel mold (A) and lattice transcription on cell culture dish (B)

과정에서 발생하는 열변형이 AZ5214 보다 작아서 정교한 격자 구조물 제작에 유리한, SU-8 (Microchem, USA) 음성(negative) 폴리머 감광재를 사용하였다.⁽⁸⁾

미세 격자 구조물 제작을 위해 SU-8 을 2 μm 높이로 스핀 코팅하고 패터닝하였다. 티타늄(titanium)을 0.3 μm 두께로 SU-8 구조물 표면에 증착한 후 니켈을 3 mm 두께로 전기도금 하였다. 실리콘 층을 tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH, wt. 25 %, 90 °C)로 에칭하고 표면에 남은 SU-8 을 산소 플라즈마(100 W, 30 min)로 제거하였다.(Fig. 8) 일부 SU-8 은 산소 플라즈마나 유기 용매로도 완전히 제거되지 않아서 몰드 표면에 부분적으로 잔류물로 남는 현상이 관찰되었다.

니켈 몰드는 Fig. 9 와 같이 지름 80 mm, 두께 3 mm 로 제작되었고 3 mm \times 3 mm 면적에 미세 격자가 형성되었다. 몰드 표면에 이러한 미세 격자를 모두 12 곳에 형성하여 세포 계수 결과의 편차를 줄이고자 하였다.

핫 엠보싱 결과, 깊이 2 μm , 폭 2 μm , 최소 단위가 가로 세로 50 μm 인 격자가 선명하게 형성되었다.(Fig. 10)

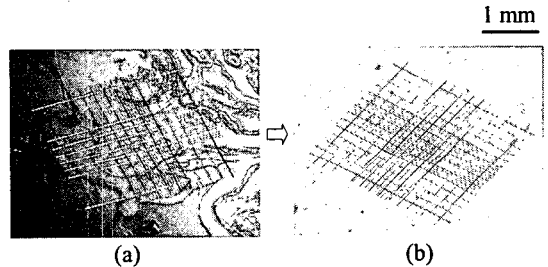


Fig. 8 (a) SU-8 residue on mold after etching silicon wafer; (b) removal of SU-8 residue with oxygen plasma

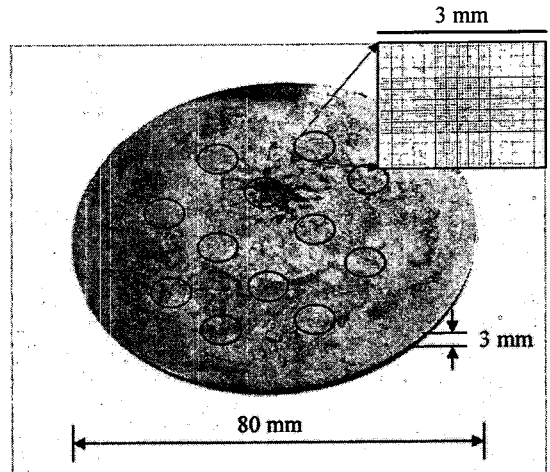


Fig. 9 A nickel mold having micro lattice with diameter of 80 mm and thickness of 3 mm.

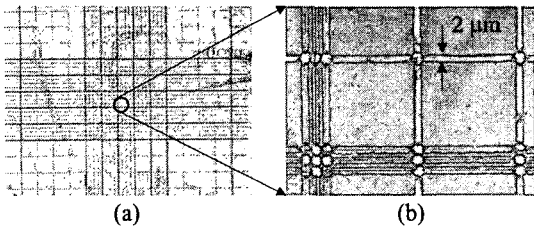


Fig. 10 (a) Micro lattice engraved on a culture dish with nickel mold; (b) magnified view

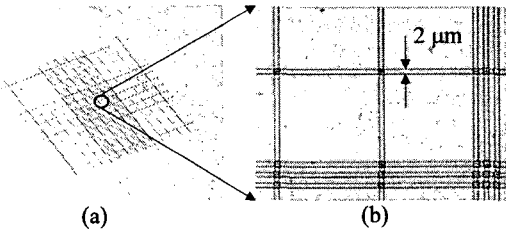


Fig. 11 (a) Micro lattice pattern on a PDMS sheet; (b) magnified view

3.3 Polydimethylsioxane (PDMS)를 이용한 미세 격자 전사

PDMS는 화학적으로 안정하고 생체친화적 (bio-compatible)이며 광학적으로 투명한 성질이 있는 폴리머이다. 핫 엠보싱과 다르게, 상온에서 마스터 (master)에 액체 상태의 PDMS를 부어서 캐스팅 (casting)하는 방법으로 마스터의 구조물을 PDMS에 전사시킬 수 있다.^(9,10)

액체 상태의 PDMS를 만들기 위해, base와 curing agent (Sylgard184, Dow Corning, USA)를 10:1 (w/w)로 섞은 후, 진공 챔버에서 가스를 제거하였다. 마스터로 제작한 SU-8 미세 격자 구조물에 1mm 두께로 액체 PDMS를 부은 후, 오븐 (65 °C)에서 5 시간 동안 경화 시켜서 미세 격자를 PDMS 시트 (sheet)에 전사하였다.

Fig. 11은 미세 격자를 1 mm 두께의 PDMS 시트에 전사시킨 결과이다. 핫 엠보싱에 비해, 더 선명하게 미세 격자가 전사되었음을 확인할 수 있다. 하지만, 실제 세포 배양과 계수 과정에서 배양액과 PDMS 사이에서 발생한 빛의 굴절로 추측되는 현상때문에 격자가 잘 보이지 않는 단점이 있었다.

4. 세포 배양 및 계수

미세 격자가 전사된 세포 배양 접시에 세포를 배양하고 격자를 이용해서 계수하는 실험을 수행하였다. 핫 엠보싱 공정 후, 에탄올 (70%)로 배양 접시를 세척하여 세포의 성장에 유해할 수 있는 미생물에 대해 살균처리 하였고 poly-L-lysine에 적셔서 부착 세포의 성장에 도움이

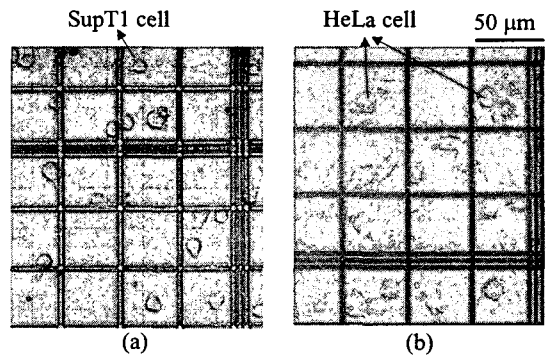


Fig. 12 Cell cultivation using micro lattice engraved on culture dish with silicon wafer mold: (a) SupT1 cell; (b) HeLa cell

되도록 하였다.

세포 배양을 위해, 소 태아 혈청이 10% 함유된 RPMI 1640 배양액 (JBI, Korea) 5 ml을 배양 접시에 담고 세포를 주입한 후, 습기가 포화된 이산화탄소 배양기 (5% CO₂, 95% air)에서 37 °C 조건으로 3~4일간 배양을 하였다.

Fig. 12는 실리콘 웨이퍼 몰드를 핫 엠보싱하여 제작한 배양 접시에 부양 세포인 SupT1 세포와 부착 세포인 HeLa 세포 두 종류를 각각 배양한 결과이다. 두 종류의 세포 모두 잘 증식하였고 격자를 이용해서 배양 도중 수시로 계수를 할 수 있었다. 이로부터, 본 연구에서 제안한 방법이 효과적임을 알 수 있었다. 하지만, 3.1절에서 기술한 바와 같이 실리콘 웨이퍼 몰드는 반복 사용에 어려움이 있었다.

Fig. 13은 니켈 몰드로 제작한 배양 접시를 사용하여 세포를 배양한 결과이다. SupT1 세포를 배양 중인 접시를 현미경으로 옮기자 바닥에 가라 앉은 세포 (흰색)와 배양액 속을 떠다니는 세포 (검은색)의 모습이 초점의 차이에 의해 서로 다르게 보였다 (Fig.13a). 정확성을 높이기 위해 5분 동안 바닥에 가라 앉힌 후에 계수를 하였다.

격자를 이용하여 계산한 1 mm × 1 mm 면적 내의 SupT1 세포와 HeLa 세포의 수는 각각, 371.84 개/mm²와 123.36 개/mm²이었다. 배양 접시의 지름이 85 mm이므로 전체 세포 수는 약 2.11 × 10⁶ 개와 7.0 × 10⁵ 개로 계산되었다. 이 수치는 배양 초기에 주입된 세포 수와 배양 시간에 따라 달라진다.

5. 고찰

HeLa 세포는 격자 무늬를 따라서 성장하는 경향을 보였다.[Fig. 13(b)] 평면에 비해 격자가 가지는 요철 형상이 영향을 미치는 것으로 추정되며, 이를 이용하면 바닥면에 임의로 생성한 패턴의 형상대로 세포를 배양할 수 있을 것으로 예상

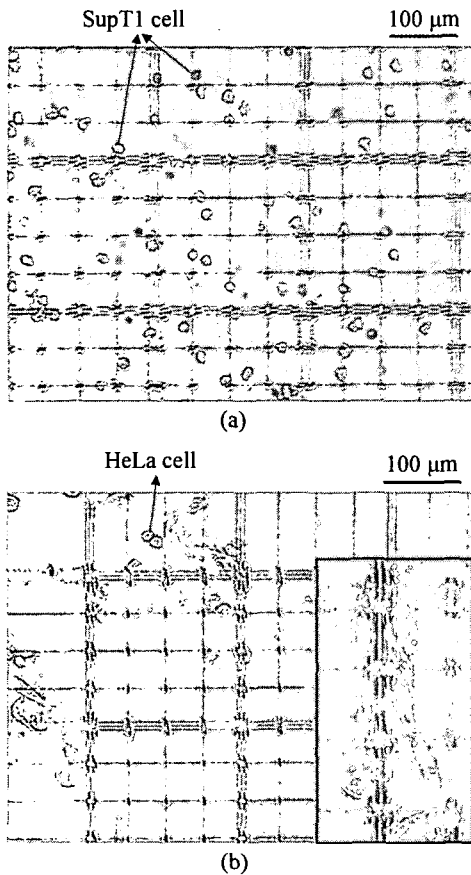


Fig. 13 Cell cultivation using micro lattice engraved on culture dish with nickel mold: (a) SupT1 cell; (b) HeLa cell

된다. 또한, 인공 피부 제작과 같이 세포가 일정한 방향성을 유지하면서 성장하도록 하는 용도에 응용할 수 있을 것으로 판단된다.⁽¹¹⁻¹³⁾

현재까지 진행된 연구에서 다음과 같은 몇 가지 문제점이 발견되었으며 이를 해결하기 위한 연구를 수행 중이다.

첫째, 니켈 몰드 제작의 마지막 과정인 SU-8 구조물 제거를 위해 산소 플라즈마 에칭을 하였으나 부분적으로 잔류물이 남았다. 음성 감광제인 SU-8 계열 감광제가 양성 감광제인 AZ 계열에 비해 경도가 높은 이유로 사용하였으나, 공정 과정 중 변성이 되면 제거가 어려우므로 AZ 계열을 대신 사용하고 제거할 때에는 아세톤 같은 유기 용매를 사용해야 할 것으로 판단된다.

둘째, polystyrene 재질의 세포 배양 접시에 미세 격자가 보다 선명하게 전사되도록 하기 위해 핫 엠보싱 공정 변수인 온도, 압력, 그리고 시간을 최적화해야 한다.

셋째, PDMS 시트에 미세 격자를 전사하였으나 실제 사용에서는 물속에서 격자가 잘 보이지 않는

어려움이 있었다. PDMS 를 이용한 몰드 캐스팅 방법은 상온에서 적용이 가능한 장점이 있으므로, PDMS 시트에 적당한 물질을 코팅함으로써 격자가 물속에서도 보일 수 있도록 하는 방법의 개발이 요구된다.

6. 결론

본 연구를 통해, 높이 2 μm, 폭 2 μm, 가로 세로의 길이가 50 μm 인 미세 격자 구조물이 3 mm × 3 mm 면적에 배열되어 있는 실리콘 웨이퍼 몰드와 니켈 몰드 (지름 80 mm, 높이 3 mm)를 제작하였고, 핫 엠보싱으로 polystyrene 재질의 세포 배양 접시에 미세 격자를 전사하였다.

배양 접시를 에탄올 (70 %)로 소독하고 poly-L-lysine 으로 표면을 적셔서 세포의 부착성을 높인 후, 부양 세포인 SupT1 세포와 고착 세포인 HeLa 세포 두 종류를 이산화탄소 배양기에서 3~4 일간 배양하면서 계수 실험을 수행하였다. 계수 과정에서, 세포의 생장에 유해한 영향을 미치지 않았으며, 계수를 한 후에도 배양을 계속할 수 있었다.

본 연구에서 제안한, 미세 격자 몰드를 제작하고, 세포 배양 접시에 전사하여, 세포를 배양하는 도중에 계수하는 방법은, 기존의 헤모사이토미터를 이용한 방법에 비해 세포의 추출과 주입 단계를 생략하여 세포의 오염 가능성을 최소화하고 계수에 소요되는 시간을 줄일 수 있었다. 또한, 핫 엠보싱을 이용하므로 대량 생산이 가능하고 기존의 세포 배양 접시 제조 과정에도 쉽게 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

후 기

본 연구는 과학기술부가 주관하는 21 세기 프론티어연구개발사업의 일환인 나노메카트로닉스 기술개발사업단의 연구비 지원 (02-K14-01-005-1-2)에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- (1) Coulter, W. H., 1956, "High Speed Automatic Blood Cell Counter and Cell Size Analyzer," *Proc. National Electronics Conf.* 12, pp. 1034~1040.
- (2) Han, K. -H., Landers, J. P. and Frazier, A. B., 2003, "Continuous Paramagnetophoretic Microseparator for Blood Cells," *Proc. Int. Conf. On Solid-State Sensors and Actuators (Transducers'03)*, pp. 1129~1232.
- (3) Sergent-Tanguy, S., Chagneau, C., Neveu, I. and Naveilhan, P., 2003, "Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS): a Rapid and Reliable Method to Estimate the Number of Neurons in a Mixed Population," *J.*

- Neuroscience Methods*, Vol. 129, pp. 73~79.
- (4) Asai, J., Suzuki, R., Fujimoto, T., Nagashima, G., Miyo, T., Takahashi, M. and Hokaku, H., 1997, "Fluorescent Automatic Cell Sorter (FACS) and Immunohistological Investigations of CD-68 Positive Mononuclear Cell Infiltrates in Meningiomas," *Clinical Neurology and Neurosurgery*, Vol. 99, pp. S133~S134.
- (5) Benjumovich, M. S., 2002, "Use of Poisson Units in Radiology," *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 66, pp. 7~9.
- (6) Tezcaner, A., Bugra, K. and Hasirci, V., 2003, "Retinal Pigment Epithelium Cell Culture on Surface Modified Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Thin Films," *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 4573~4583.
- (7) Freshney, R. I., 1994, "Culture of Animal Cells," 3rd ed., Wiley-Liss, pp. 243~252.
- (8) Johnson, D. W., Jeffries, A., Minsek, D. W. and Urditch, R. J., "Improving the Process Capability of SU-8," www.microchem.com/resources/materials.htm.
- (9) Han, M. H., Huh, J. -K., Lee, S. S. and Lee, S. -J., 2002, "Fabrication of a Micro-Riblet Film Using MEMS Technology and Its Application to Drag Reduction," *Transactions of the KSME, B*, Vol. 26, No. 7, pp. 991~996.
- (10) Jo, B. -H., Van Lerberghe, L. M., Motsegood, K. M. and Beebe, D. J., 2000, "Three-Dimensional Micro-Channel Fabrication in Polydimethylsiloxane (PDMS) Elastomer," *J. Microelectromech. Sys.*, Vol. 9, No. 1, pp. 76~81.
- (11) Kaji, H., Nishizawa, M. and Matsue, O., 2003, "Localized Chemical Stimulation to Micropatterned Cells Using Multiple Laminar Fluid Flows," *Lab on a chip*, Vol. 3, pp. 208~211.
- (12) Ephrussi, A. and Pourquie, O., 2003, "Pattern Formation and Developmental Mechanisms from Cell Patterning to Organogenesis," *Current Opinion in Genetics & Development*, Vol. 13, pp. 323~325.
- (13) Li, M., Glawe, J. D., Green, H., Mills, D. K. and Mcshane, M. J. 2000, "Effect on High-Aspect-Ratio Microstructures on Cell Growth and Attachment," *Int. IEEE-EMBS Topic Conf. On Microtech. In Medicine & Biology*, pp. 531~536.