

혼성 아가로즈젤 스탬프를 이용한 박테리아 마이크로 컨택트 프린팅

심 현 우 · 이 지 혜 · † 이 창 수
충남대학교 공과대학 바이오응용화학부 생명화학공학과
(접수 : 2006. 3. 6., 게재승인 : 2006. 7. 28.)

Microcontact Printing of Bacteria Using Hybrid Agarose Gel Stamp

Hyun-Woo Shim, Ji-Hye Lee, and Chang-Soo Lee†
Department of Chemical and Biological Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
(Received : 2006. 3. 6., Accepted : 2006. 7. 28.)

The noble method of hybrid agarose gel microstamp fabricated by replica molding against PDMS master to make bacteria patterns on agar surface was presented. After the fabricated hybrid agarose gel microstamp was inked with *E. coli*, we could obtain 2 dimensional bacterial arrays with 50 μm circular spots. And the various shaped patterns based on experimental design were easily generated. The analysis of mean fluorescent signal was showed that bacterial pattern have high contrast between spots and background and homogeneity of pattern. Our proposed method solved the problem of wetting and handling with small soft agarose gel microstamp when bacteria were used for ink. The agarose gel stamp provides appropriate environment to inked bacteria, which is essential technology for cell patterning with high retaining viability during the patterning process. This method is reproducible, convenient, rapid, and could be applied to screening system, study of cell-surface interaction, and microbial ecology.

Key Words : Bacterial patterning, microcontact printing, agarose gel

서 론

마이크로 컨택트 프린팅 (microcontact printing)은 표면 위에 마이크로 크기의 패턴을 형성하는 범용적인 방법 중의 하나이다 (1, 2). 이 방법을 통하여 단백질(3-5), 동물 세포(6, 7) 및 유전자 등(8, 9)의 다양한 생체 물질들을 표면에 패턴링을 할 수 있다. 특히, 대부분의 박테리아 및 세포들이 마이크로 크기를 가지고 있으므로 세포들간의 상호 작용 및 세포의 운동성등과 같은 세포를 바탕으로 하는 연구에 매우 유용한 핵심 기술이다.

특히, 박테리아 패턴링은 박테리아 유전학, 바이오 필름 형성 및 미생물 생태학등의 연구에 있어서 최근 많은 관심을 받고 있다(10-12). 대표적인 박테리아 패턴링 방법은 replica plating(13)와 pin array(14, 15) 방법이 있다. Lederberg 등이 제안한 replica plating은 섬유를 표면에 코팅하여 박테리아 콜로니 (colony)를 옮기는 방법으로 섬유에 흡착된 박

테리아를 다른 표면에 쉽게 패턴링을 할 수 있으나 전사되는 박테리아 패턴링의 크기가 매우 큰 단점이 있다. 다른 방법은 pin array를 통하여 96 well plate에 배양되는 박테리아의 용액을 pin으로 흡수한 후 박테리아를 패턴링 하는 방법이다. 하지만 pin array 방법은 고가의 장비를 필요로 하며 실험자가 원하는 다양한 크기 및 모양의 박테리아 패턴을 구현할 수 없는 단점이 있다.

따라서, 본 연구에서는 지금 현재 패턴링 방법으로 가장 많이 사용되는 마이크로 컨택트 프린팅을 이용하여 실험실에서 손쉽게 박테리아 패턴링을 할 수 있는 새로운 마이크로 스탬프 제작 방법을 제시하고자 한다. 가장 널리 사용되는 Microfabrication 공정으로 제작된 poly-(dimethylsiloxane) (PDMS) 마이크로 스탬프는 표면이 소수성이어서 생체 물질과 같은 극성 물질을 잉크로 사용할 경우 낮은 젖음성으로 인해 프린팅 시 문제점을 유발한다(16-18). 더불어, 소수성 표면으로 인해 매우 낮은 수분 함유량을 지니고 있어 생리활성 유지가 매우 중요한 세포를 패턴링시 프린팅된 세포의 생리활성이 매우 적어 활용 가치가 현저하게 떨어지는 문제점을 지니고 있다(16-18).

상기의 문제점을 해결할 수 있는 방법은 다량의 수분을 함유한 하이드로젤 재료를 사용하는 것이 좋은 방법이다. 하지만 순수한 하이드로젤만으로 만들어진 마이크로 스탬프

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biological Engineering, Chungnam National University, Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Korea

Tel & Fax : +82-42-821-5896

E-mail : rhadam@cnu.ac.kr

프는 그 표면이 매우 수분이 많고 매끄러워 취급이 매우 어렵다. 따라서 본 연구에서는 미세구조물을 지닌 하이드젤 스탬프를 제작한 후 그 바깥면을 PDMS를 이용하여 다시 둘러싸는 새로운 형태의 혼성 하이드젤 마이크로 스탬프를 제작하였다. 제작된 스탬프를 이용하여 대장균을 잉크로 사용하여 다양한 형태 및 크기를 가지는 박테리아 패터닝을 할 수 있음을 보였다.

재료 및 방법

재료

Poly(dimethyl siloxane) (PDMS)는 Dow Corning Sylgard 184를 구입하여 사용하였으며, LB 배지, Ampicilin 항생제, 및 기타 시약은 시그마에서 구입하여 사용하였다. 고강도 아가로즈젤 (Agarose MP)은 Roche에서 구입하여 사용하였다.

박테리아 배양

박테리아 패터닝을 위해 사용된 균주는 대장균 BL21 및 녹색 형광 단백질을 발현하는 재조합 균주인 BL21-pET23b-EGFP를 사용하였다. 먼저 LB plate에서 도말된 콜로니 중 한 개를 선택하여 LB (5 g/l yeast extract, 10 g/l tryptone, 10 g/l) 배지에 접종한 후 37°C, 150 rpm의 진탕 배양기에서 배양을 하였다.

산소 플라즈마 처리

산소 플라즈마 장치 (Model EPPS 2000, PLASMART Inc. Korea)를 사용하였고 산소 플라즈마 장치에 주입되는 산소는 질량유량계 (MFC, Model 5850E, Brooks, Japan)으로 유량을 조절하였다. 진공 챔버의 압력은 진공 게이지 (vacuum gauge) (Model IMR 265, Balzers AG, Germany)으로 측정하였다. 먼저 PDMS를 증류수, 이소프로필 알코올 (isopropyl alcohol), 에탄올 순으로 세척하고 건조한 후, Plasma 장치에 넣어 표면 개질을 시도하였다.

혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프 제작

실리콘 웨이퍼 위에 감광제인 SU-8을 스핀 코팅하여 50 μm 두께를 지니도록 한 후 일반적인 사진공정 (photolithography)을 통해 실리콘 몰드를 먼저 제작한다. 완성된 실리콘 몰드위에 PDMS prepolymer와 중합 촉진제를 10대 1 비율로 붓고 65도에서 적어도 5시간 이상 방치하여 중합을 촉진하여 PDMS 몰드를 완성시킨다(Fig. 1A). 완성된 PDMS 몰드는 산소 플라즈마를 이용하여 소수성 표면을 친수성으로 개질 한 후 바로 그 위에 뜨거운 아가로즈젤 용액을 붓는다(Fig. 1B). 만일 친수성으로 개질하지 않으면 아가로즈젤의 젖음성이 매우 낮아 미세 구조물 (100 μm 크기 이하)을 제작하는데 매우 큰 제약이 따를 수 있었다(data not shown). 아가로즈젤 마이크로 스탬프는 상온에서 1시간 안에 빠르게 고형화된다. 완성된 아가로즈젤 스탬프는 실험실용 칼로 정리한 후 PDMS prepolymer와 중합 촉진제를 10 대 1 비율로 붓고 상온에서 하루 동안 방

치하면 최종적으로 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 완성하게 된다(Fig. 1C). 이 PDMS 커버는 실험자의 취급성을 매우 향상시켜 재현성이 높은 마이크로 콘택트 프린팅을 수행할 수 있으며, 아가로즈젤의 빠른 수분의 휘발을 방지할 수 있어 세포 패터닝의 경우 매우 중요한 수분 환경 조성에 매우 이롭다. 또한, 완성된 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프는 손으로도 쉽게 취급할 수 있으며 작은 크기 (1 cm \times 1 cm 이하)의 스탬프인 경우는 핀셋으로도 쉽게 취급할 수가 있어 정교한 패턴을 쉽게 형성할 수 있는 장점이 있었다.

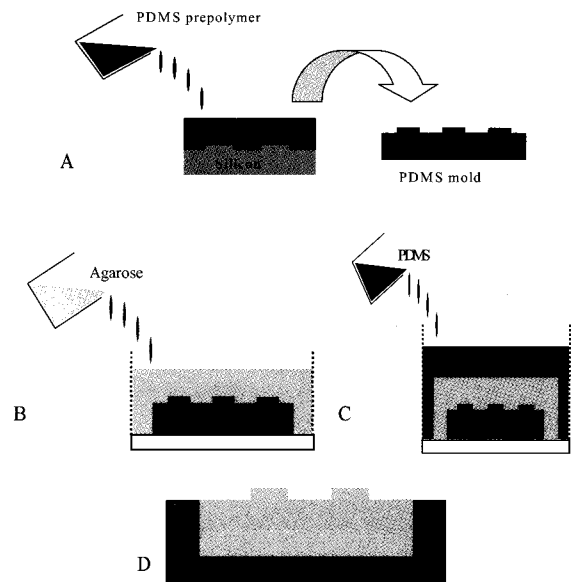


Figure 1. Schematic diagram of fabrication for hybrid agarose microstamp; A. the preparation of PDMS mold from silicon master. B. the fabrication of agarose gel microstamp. C. the generation of hybrid agarose gel microstamp. D. the finally assembled hybrid agarose gel microstamp.

박테리아 패터닝

성장기 (O.D. = 0.5)에 있는 대장균 배양액 (10 μl)를 패턴이 위로 향하도록 놓은 완성된 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프 위에 떨어뜨린 후 10분 정도 방치하여 배양액이 스탬프에 완전히 흡수되도록 한다. LB-Agar 용액을 스핀 코팅한 페트리디쉬에 스탬프를 살며시 올려 놓고 약 3분간 프린팅을 시도한다.

이미지 분석

이미지 사진은 500 μm 이하의 박테리아 패턴은 cooled CCD 카메라 (Roper science, USA)가 장착된 형광 현미경 (Nikon, Japan)을 이용하여 측정하였다. 한편 500 μm 이상의 박테리아 사진은 니콘 디지털 카메라 (Coolpix, Nikon, Japan)을 이용하여 얻었다. 측정된 이미지 사진은 IPlab3.6 (Scanalytics, MD, USA)을 사용하여 분석하였다.

접촉각 측정

표면 성질은 sessile drop 방법을 이용한 접촉각 분석기

(Drop shape analyzer, DSA100, Krüss, Germany)를 이용하였다. 접촉각 측정 전에 모든 시료는 여러 번 세척을 한 후, 마지막으로 초 순수 질소를 이용하여 깨끗한 표면을 얻은 후 분석을 하였다. 본 실험에서 측정된 값은 한 시료의 여러 곳을 측정하였고 (intra-variation) 및 다른 시료를 3번 이상 측정하여 (batch to batch variation) 그 평균값을 보고하였다.

결과 및 고찰

산소 플라즈마를 이용한 PDMS 마이크로 스탬프 처리

현재 가장 널리 사용되는 생체물질 패터닝 방법 중 하나인 microcontact printing은 실리콘 고무 재질인 PDMS를 도장으로 사용하는 방법이다. 하지만, 실리콘 고무 (silicon elastomer)인 PDMS는 소수성 성질이 매우 강하여 젖음성 (wetting property)이 매우 안좋다. 특히, 이런 PDMS를 이용하여 친수성 생체물질을 패터닝하려면 표면 성질을 친수성으로 바꾸는 공정이 필요하다. 이에 본 연구에서는 가장 널리 사용되는 산소 플라즈마 (Oxygen plasma) 처리(19, 20)를 이용하여 PDMS 표면을 친수화시키는 최적 조건을 먼저 찾아 보았다. 산소 플라즈마 처리시에 중요한 변수로는 플라즈마 Power, 압력, 주입되는 산소 및 플라즈마 처리 시간 등이다. 예비 실험을 통하여 플라즈마 처리 시간을 제외한 모든 변수값 들을 최적하였다 (power- 100 W, 압력-0.25 Torr, 산소 유량- 60 cc/min). PDMS 표면은 산소 플라즈마를 처리하자 급속하게 친수성 표면으로 변함을 알 수 있었다(Fig. 2). 5초 이상 산소 플라즈마를 처리한 결과, 소수성 PDMS 표면 (접촉각 109도)이 물을 이용한 접촉각 기준으로 10도 이하로 낮아져 매우 강한 친수성 표면으로 개질 되었음을 보여준다. 하지만, 플라즈마 처리 시간을 증가시켜도 표면 성질은 더 이상 친수화를 진행하지 못하였다. 오히려 플라즈마 처리 시간을 증가시키면 마이크로 스탬프의 표면이 경화되어 딱딱해지고 취성 (brittleness)이 증가함을 알 수 있었다.

PDMS 마이크로 스탬프 표면 성질의 회복

소수성 PDMS 표면을 친수성으로 개질시키는 공정은 친수성 생체물질을 잉크로 사용하는 경우 절대적으로 요구된다. 수 나노미터의 친수성 박막 도입 방법 중 가장 쉬운 방법이 상기의 산소 플라즈마를 처리하는 것이다. 하지만, 처리된 PDMS 표면은 시간이 지나감에 따라 점차 본래의 소수성 표면으로 전환된다(Fig. 3). 산소 플라즈마 처리 후 약 10시간이 지나면 본래의 고유의 PDMS 성질인 소수성 표면으로 바뀌음을 알 수 있었다. 이는 일반적으로 저분자의 실리콘 분자들이 내부로부터 공기와 스탬프 표면의 계면으로 이동하기 때문이다(21, 22). 이런 PDMS 고유의 성질은 생체물질과 같은 극성분자들을 잉크로 사용하여 프린팅할 경우 적절하지 못하다. 실제로 Native PDMS를 이용한 박테리아 패터닝 (패턴 크기 500 μm)이 구현할 수 없었다(data not shown). 최근 여러 문헌 보고(23-25)에 의하면 화학적 처리를 통하여 친수성 관능기를 공유결합을 통하

여 PDMS 표면에 도입할지라도, PDMS 스탬프 자체의 수분 함유량이 매우 적어 박테리아 혹은 세포와 같은 생물학적 활성도를 유지시켜 줄 필요가 있는 경우 사용하는 큰 제약이 따른다. 따라서, 가장 이상적인 마이크로 스탬프 재료는 다량의 수분을 함유할 수 있으며 동시에 마이크로 구조물을 자유롭게 구현할 수 있는 가공성이 매우 좋은 재료가 좋은 후보 물질이 된다.

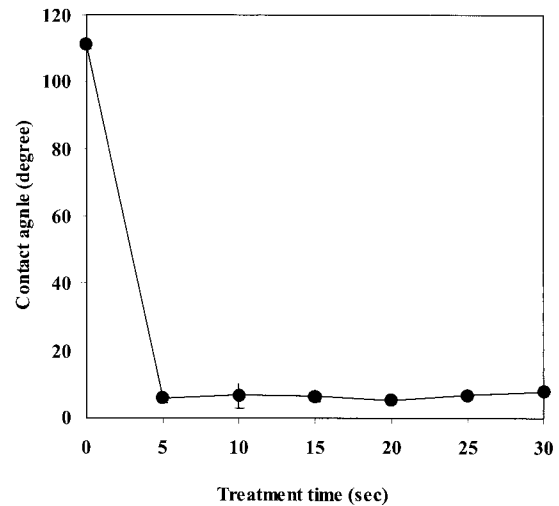


Figure 2. The change of contact angle on PDMS with the variation of oxygen plasma treatment time.

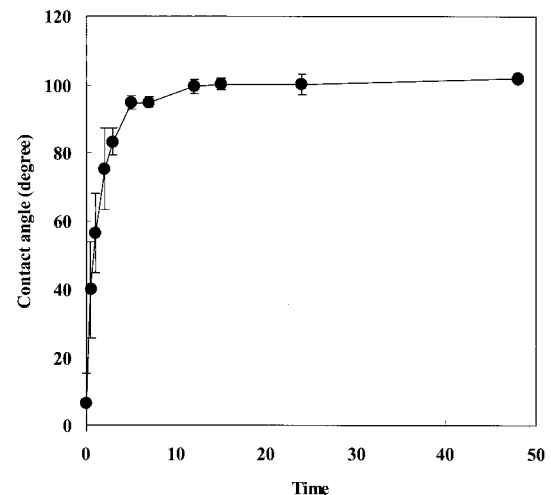


Figure 3. Effect of aging time after the oxygen plasma treatment.

아가로즈젤 마이크로 스탬프 제작

먼저 PDMS master를 이용한 replica micromolding 공정을 이용하여 아가로즈젤 스탬프를 제작하였다. 그 상세한 공정 간략도는 Fig. 1에 도시하였다. 인산완충 용액 (10 mM, pH 7.4)에 7% 아가로즈 용액을 녹인 후 PDMS 몰드에 붓는다. 상온에서 젤화 (gelation)시켜 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 만든 후 PDMS 몰드를 서서히 벗겨낸다. PDMS 표면의 소수성 성질과 아가로즈젤 표면의 친수성 성질로 인해 쉽게 떼어낼 수 있었다. 상기의 방법을 통하여 대면

적의 마이크로 패턴을 다양하게 구현할 수 있었다. Fig. 4는 아가로즈젤 마이크로 스탬프의 디지털 카메라 사진이다. 아가로즈젤 마이크로 스탬프에 다양한 패턴이 정확하게 전사됨을 알 수 있었다. 그리고 Fig. 5는 현미경을 이용하여 측정된 PDMS 몰드로부터 전사된 아가로즈젤 마이크로 스탬프와 PDMS 몰드의 사진이다. PDMS 몰드의 50 μm 사각형 모양과 50 μm 원 모양의 마이크로 구조물이 정확하게 아가로즈젤 스탬프에 전사됨을 알 수 있다. 완성된 아가로즈젤 마이크로 스탬프의 기계적 성질은 사용된 젤 종류 (gel strength, 아가로즈 용융점, 아가로즈 농도)에 매우 의존하게 된다. 기초 실험 결과에 의하면 낮은 농도 (1%-3%)의 아가로즈를 사용하게 되면 기계적 내구성이 매우 약하여 마이크로 구조물을 얻을 수가 없었다. 따라서, 본 연구에서는 고강도 젤을 5~10% 농도로 인산 완충 용액에 녹여 사용하였으며 최적 농도는 7%로 맞추어 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 제작하였다. 이와 같은 방법에 의하여 50 μm 로부터 1 cm 크기의 마이크로 구조물을 갖는 아가로즈젤 스탬프를 만들 수 있었다.

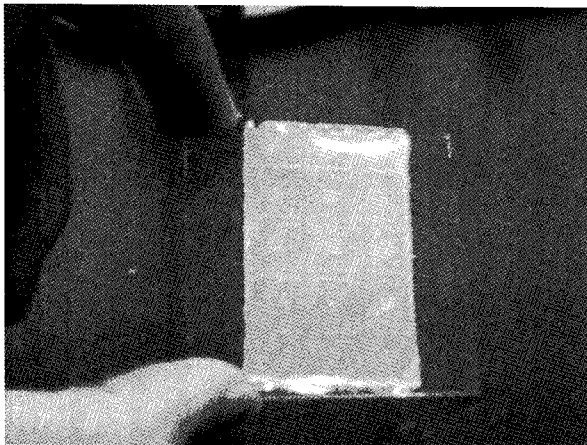


Figure 4. Photography of agarose hydrogel microstamp fabricated by PDMS mold including various sized patterns from 50 to 200 μm .

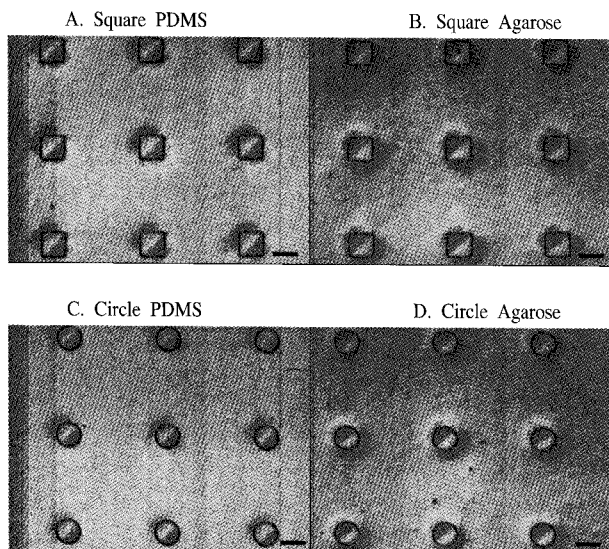


Figure 5. The optical microscopy (OM) images of PDMS mold (A and C) and its replica, agarose microstamp (B and D).

한편, 만들어진 아가로즈젤 마이크로 스탬프는 다량의 수분을 함유하고 있으며 또한 매우 유연하고 미끄러워 마이크로 스탬핑 공정을 수행할 손으로 스탬프를 조작하는데 매우 어려움이 수반되었다. 이 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서는 새로운 방법을 통해 사용자가 수월하게 사용하기 위한 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 제작하고자 하였다. 먼저 상기에 만들어진 아가로즈젤 스탬프에 다시 전구체 PDMS 용액을 부은 후 상온에 하룻동안 경화를 시키면 내부에 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 유지하면서 외부에 PDMS로 둘러싼 새로운 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 완성할 수가 있다. 이 혼성 마이크로 스탬프는 아가로즈젤의 장점을 살리는 동시에 아가로즈젤의 단점을 PDMS를 통하여 극복할 수 있는 새로운 마이크로 스탬프 제작 방법이 될 것이다. Fig. 6A는 완성된 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프의 사진이다.

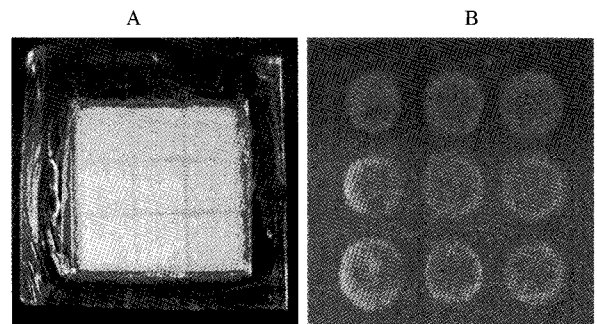


Figure 6. A. photography of hybrid agarose gel microstamp and B. large sized bacterial patterns (500 μm ; 3 X 3).

대장균 패턴닝

상기에 제안한 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 이용하여 박테리아 패턴닝의 가능성 실험을 하였다. 먼저 500 μm 원형 패턴을 가지는 스탬프를 이용하여 대장균 (BL21)을 프린팅하였다(Fig. 6B). 이 방법을 통하여 비교적 큰 박테리아 패턴 (500 μm 원형)도 쉽고 균일하게 프린팅될 수 있음을 보여준다. 이 결과는 본 연구에서 제안된 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 이용한 박테리아 패턴닝의 효율성이 매우 좋음을 간접적으로 증명하고 있다.

다음으로는 50 μm 크기의 원 모양을 가지는 PDMS 몰드를 이용하여 제안된 방법을 통하여 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 제작하였다. Fig. 7는 패턴닝된 대장균의 광학 사진과 형광 사진을 보여주고 있다. 이 방법을 통하여 50 μm 크기의 패턴을 가지는 고집적, 고밀도 박테리아 2차원 어레이를 만들 수 있었으며, 또한 패턴과 패턴 주변 (background)의 현저한 형광세기 대비를 보이는 프린팅을 만들 수 있었다. 이와 더불어 한 개의 스팟 (spot)에서의 형광세기의 균일성이 매우 높으며 또한 스팟 간의 형광세기도 매우 균일함을 보여주고 있다(Fig. 7C). Fig. 7B의 형광 세기를 이미지 분석 프로그램을 통하여 42개의 패턴을 가지고 정량 분석을 수행하였다. 형광 세기의 표준 편차는 각각의 스팟에서 3.5% 이하의 매우 우수한 균일성을 보였으며 스팟과 스팟 간의 표준 편차는 5.2% 이하의 매우 균일한 형광 세기를 보였다. 따라서 본 연구에서 제안

한 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 이용한 박테리아 패터닝 방법은 매우 재현성과 균일한 프린팅을 할 수 있음을 반증한다.

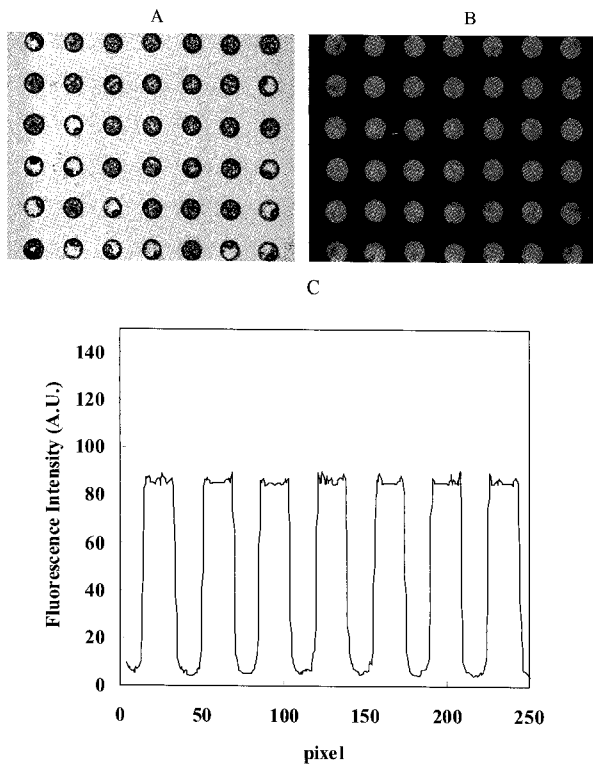


Figure 7. Bacterial patterning with hybrid agarose microstamp (A. optical image of bacterial patterns (50 μm ; circle), B. fluorescent image of bacterial patterns and C. the line profile of the fluorescent image from Fig. B. All of the images were obtained by 10X objective magnification).

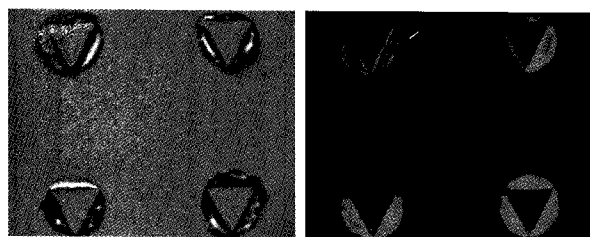


Figure 8. The flexible design of bacterial patterns (A. optical image of bacterial patterns, B. fluorescent image of bacterial patterns (150 μm ; circle containing concaved triangle)).

본 데이터에서는 원형의 박테리아 패턴 어레이를 모델로 보였지만 실제로는 아가로즈젤 마이크로 스탬프로 다양한 모양의 2차원 패턴 어레이를 만들 수 있다. 특히, 정사각형 혹은 삼각형 모양의 패턴은 동물세포의 배양의 경우 cytoskeleton의 구조와 패턴 모양에 따르는 동물세포 성장의 연구에 활용될 수 있을 것이다. 이런 한 예로, 150 μm 크기의 원형 모양 패턴에 음각의 삼각형을 형성한 스탬프를 제작하여 박테리아 패터닝을 시도하였다. Fig. 8에서 보여주듯, 박테리아 패터닝은 양각의 테두리 부분에만 정확하게 프린팅이 되던 원안의 음각 삼각형은 패터닝 되지 않음을 알 수 있었다. 따라서, 상기 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 이용하여 다양한 여러 가지 모양의 패턴 혹은 다양한 크기의 패턴을 실험자가 연구 목적에 맞추어 자유롭게 마이크로 스탬프를 설계하여 박테리아 패턴을 만들 수 있다.

본 연구에서는 박테리아 패터닝의 핵심 기술로 사용되는 새로운 혼성아가로즈젤 마이크로 스탬프를 이용한 프린팅 방법에 관하여 제시하였다. 상기 제안된 방법을 이용하여 주위 표면 (background)와 스팟 (spot) 간의 높은 형광 세기 대조를 이루는 이차원 박테리아 어레이를 구성할 수 있었으며, 사용된 하드로젤은 다량의 수분을 함유하고 있어 기존의 소수성 고분자인 PDMS를 사용시 문제점인 낮은 젖음성, 프린팅의 불균일성 및 수분 부족으로 인한 세포의 활성저하 문제를 동시에 해결할 수 있었다. 또한, 순수한 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 사용할 경우 발생할 수 있는 마이크로 스탬프 취급 시 문제점을 동시에 해결할 수 있다. 이와 더불어 연구 목적에 맞추어 다양한 모양으로 박테리아를 패터닝 할 수 있으며 50 μm 크기로부터 1 cm 크기의 패턴을 다양하게 구현할 수 있었다.

결 론

본 연구에서 제안된 방법은 세포 스크리닝 칩, 미생물 생태학, 박테리아와 표면과의 상호작용 연구, 표면에서의 박테리아의 운동성 및 박테리아와 화학물간의 상호작용 연구 등의 분야에 폭넓게 활용될 수 있다. 이런 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 이용한 박테리아 패터닝 방법의 장점은 값싸고 쉽게 사용이 가능한 재료를 사용하였으며, 대면적 박테리아 패터닝을 구현할 수 있으며, 배지를 함유한 스탬프를 이용할 경우 한번의 박테리아 inking을 통하여 수회 반복적으로 사용할 수 있는 방법으로까지 활용될 것으로 기대된다.

본 연구에서 제안된 방법은 세포 스크리닝 칩, 미생물 생태학, 박테리아와 표면과의 상호작용 연구, 표면에서의 박테리아의 운동성 및 박테리아와 화학물간의 상호작용 연구 등의 분야에 폭넓게 활용될 수 있다. 이런 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 이용한 박테리아 패터닝 방법의 장점은 값싸고 쉽게 사용이 가능한 재료를 사용하였으며, 대면적 박테리아 패터닝을 구현할 수 있으며, 배지를 함유한 스탬프를 이용할 경우 한번의 박테리아 inking을 통하여 수회 반복적으로 사용할 수 있는 방법으로까지 활용될 것으로 기대된다.

요 약

박테리아 패터닝을 위한 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프는 PDMS 몰드를 이용한 replica molding 공정을 이용하여 제작하였다. 완성된 스탬프를 박테리아를 잉크로 사용한 후, 50 μm 원 모양을 가지는 2차원 박테리아 어레이를 구현할 수 있었다. 또한, 상기 방법을 통하여 실험 목적에 적합한 다양한 모양을 가지는 패턴을 쉽게 만들 수 있다. 패터닝된 박테리아의 형광 세기는 스팟과 주변간에 매우 높은 대조를 이루며, 각각의 스팟 및 스팟간의 형광 세기가 매우 균일함을 보여 프린팅 시 매우 균일한 패턴을 얻을 수 있었다.

박테리아 패터닝을 할 경우 큰 문제점인 낮은 젖음성과 미끄럽고 작은 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 취급의 어려움을 본 연구에서 제안한 혼성 아가로즈젤 마이크로 스탬프를 이용하여 해결할 수 있었다. 상기 방법의 가장 큰 장점은 세포를 이용한 패터닝의 경우 세포의 활성을 유지시키는것인데 다량의 수분을 포함하는 아가로즈젤을 사용할 경우 세포의 활성을 유지시키면서 패턴을 구현할 수 있으므로 매우 중요한 기술로 생각된다.

본 연구에서 제안된 방법은 매우 재현성이 높으며, 편리하고, 빠르게 구현할 수 있어서 미생물 생태학, 세포와 표면간의 상호작용 그리고 세포를 바탕으로 하는 스크리닝 시스템에 활용 되어 질것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 충남 대학교 학술연구비 (2005년) 및 한국과학재단 특정 기초 연구 사업 (R01-2005-000-10558-0)의 지원을 받아 수행하였기에 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kane, R. S., S. Takayama, E. Ostuni, D. E. Ingber, and G. M. Whitesides (1999), Patterning proteins and cells using soft lithography, *Biomaterials* **20**, 2363-2376.
- Quist, A. P., E. Pavlovic, and S. Oscarsson (2005), Recent advances in microcontact printing, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **381**, 591-600.
- Kim, H. S., Y. M. Bae, Y. K. Kim, B. K. Oh, and J. W. Choi (2006), Antibody layer fabrication for protein chip to detect *E. coli* O157 : H7, using microcontact printing technique, *Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**, 141-144.
- Park, J. P., K. B. Lee, S. J. Lee, T. J. Park, M. G. Kim, B. H. Chung, Z. W. Lee, I. S. Choi, and S. Y. Lee (2005), Micropatterning proteins on polyhydroxyalkanoate substrates by using the substrate binding domain as a fusion partner, *Biotechnology and Bioengineering* **92**, 160-165.
- Park, J. P., S. J. Lee, T. J. Park, K. B. Lee, I. S. Choi, S. Y. Lee, M. G. Kim, and B. H. Chung (2004), Microcontact printing of biotin for selective immobilization of streptavidin-fused proteins and SPR analysis, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **9**, 137-142.
- Chen, C. S., M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber (1998), Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function, *Biotechnol. Prog.* **14**, 356-63.
- Park, T. H. and M. L. Shuler (2003), Integration of cell culture and microfabrication technology, *Biotechnol. Prog.* **19**, 243-53.
- Thibault, C., V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trevisiol, J. Francois, and C. Vieu (2005), Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications, *J. Nanobiotechnology* **3**, 7.
- Lange, S. A., V. Benes, D. P. Kern, J. K. Horber, and A. Bernard (2004), Microcontact printing of DNA molecules, *Anal. Chem.* **76**, 1641-7.
- Levskaia, A., A. A. Chevalier, J. J. Tabor, Z. B. Simpson, L. A. Lavery, M. Levy, E. A. Davidson, A. Scouras, A. D. Ellington, E. M. Marcotte, and C. A. Voigt (2005), Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light, *Nature* **438**, 441-2.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, and P. Stoodley (2004), Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95-108.
- Davey, M. E. and A. O'Toole G. (2000), Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 847-67.
- Lederberg, J. (1989), Replica plating and indirect selection of bacterial mutants: isolation of preadaptive mutants in bacteria by sib selection, *Genetics* **121**, 395-9.
- Duetz, W. A., L. Ruedi, R. Hermann, K. O'Connor, J. Buchs, and B. Witholt (2000), Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2641-6.
- Minas, W., J. E. Bailey, and W. Duetz (2000), Streptomycetes in micro-cultures: growth, production of secondary metabolites, and storage and retrieval in the 96-well format, *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**, 297-305.
- Singhvi, R., A. Kumar, G. P. Lopez, G. N. Stephanopoulos, D. I. Wang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber (1994), Engineering cell shape and function, *Science* **264**, 696-8.
- Trimbach, D. C., M. Al-Hussein, W. H. de Jeu, M. Decre, D. J. Broer, and C. W. Bastiaansen (2004), Hydrophilic elastomers for microcontact printing of polar inks, *Langmuir* **20**, 4738-42.
- Wang, B., J. Feng, and C. Gao (2005), Printing biomacromolecules on a bovine serum albumin precursor layer, *Macromol. Biosci.* **5**, 767-74.
- Ye, H., Z. Gu, and D. H. Gracias (2006), Kinetics of ultraviolet and plasma surface modification of poly(dimethylsiloxane) probed by sum frequency vibrational spectroscopy, *Langmuir* **22**, 1863-8.
- Hui, A. Y., G. Wang, B. Lin, and W. T. Chan (2005), Microwave plasma treatment of polymer surface for irreversible sealing of microfluidic devices, *Lab. Chip.* **5**, 1173-7.
- Kim, J., M. K. Chaudhury, and M. J. Owen (1999), Hydrophobicity loss and recovery of silicone HV insulation, *Ieee Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* **6**, 695-702.
- Balmer, T. E., H. Schmid, R. Stutz, E. Delamarche, B. Michel, N. D. Spencer, and H. Wolf (2005), Diffusion of alkanethiols in PDMS and its implications on microcontact printing (mu CP), *Langmuir* **21**, 622-632.
- Yu, K., Y. Cong, J. Fu, R. B. Xing, N. Zhao, and Y. C. Han (2004), Patterned self-adaptive polymer brushes by "grafting to" approach and microcontact printing, *Surface Science* **572**, 490-496.
- Makamba, H., Y. Y. Hsieh, W. C. Sung, and S. H. Chen (2005), Stable permanently hydrophilic protein-resistant thin-film coatings on poly(dimethylsiloxane) substrates by electrostatic self-assembly and chemical cross-linking, *Anal. Chem.* **77**, 3971-8.
- Hillborg, H., N. Tomczak, A. Olah, H. Schonherr, and G. J. Vancso (2004), Nanoscale hydrophobic recovery: A chemical force microscopy study of UV/ozone-treated cross-linked poly(dimethylsiloxane), *Langmuir* **20**, 785-94.