한국정밀공학회지 제 30 권 2 호 pp. 236-240 February 2013 / 236
Journal of the Korean Society for Precision Engineering Vol. 30, No. 2, pp. 236-240 http://dx.doi.org/10.7736/KSPE.2013.30.2.236
ISSN 1225-9071(Print), ISSN 2287-8769(Online)

가스 블로잉을 이용한 PDMS 스텐실 제작 및 3T3 세포의 마이크로 패터닝

Fabrication of PDMS Stencil using Gas Blowing for Micropatterned 3T3 Cell Culture

최진호[1], 김규만[1,✉]
Jin Ho Choi[1] and Gyu Man Kim[1,✉]

1 경북대학교 기계공학부 (School of Mechanical Engineering, Kyungpook National University)
✉ Corresponding author: gyuman.kim@knu.ac.kr, Tel: +82-53-950-7570

Manuscript received: 2012.3.16 / Accepted: 2012.7.19

In this presentation, we propose a fabrication method of PDMS stencil to apply into a localized culture of NIH/3T3 cells. PDMS stencil was fabricated by nitrogen gas blowing and soft lithography from preparing SU-8 master mold by photolithography. PDMS stencil pattern was production of the circle size 20 to 500 μm. In the culture test of PDMS stencil, a stencil was placed on a glass disk. The NIH/3T3 cells were successfully cultured into micropatterns by using the PDMS stencil. The results showed that cells could be cultured into micropatterns with precisely controlled manner at any shapes and specific size for bioscience study and bioengineering applications.

Key Words: Gas Blowing (가스 블로잉), PDMS Microstencil (PDMS 마이크로스텐실), Cell Culture (세포배양), Photolithography (포토리소그라피), Micro Patterning (마이크로 패터닝)

1. 서론

마이크로 패턴 세포 배양기술은 마이크로 제작기술과 세포배양기술의 융합기술이다. 마이크로 패턴을 이용한 세포배양에는 포토리소그라피(Photolithography), 마이크로 컨택트 프린팅(Micro contact printing),[1] 잉크젯 프린팅(Inkjet printing)[2] 등 다양한 마이크로 제작기술이 이용되며, 주로 표면 패터닝을 통한 세포의 점착을 국부화 함으로써 세포를 패터닝 하는 원리를 지닌다. 마이크로 패턴 세포 배양기술은 미세환경을 제어함으로써 높은 균일도의 크기, 형상 제어가 가능하기 때문에 in vitro 하에서 세포연구에 유용한 도구로 사용되고 있다.

스텐실(Stencil)이란 미리 정의된 패턴만이 개방되어 있고 그 나머지 부분은 막혀있는 얇은 막(Membrane) 형상을 말한다. 스텐실의 패터닝 원리는 패턴하고자 하는 표면 위에 스텐실을 올려놓으면 개방부위만 표면에 노출되기 때문에 그 위로 증착(Deposition) 및 식각(Etching)을 시켜 스텐실에 정의된 개방패턴이 그대로 표면 위로 전사되는 방법이다. 스텐실은 단일 공정으로 원하는 패턴을 제작할 수 있고, 패턴하고자 하는 표면위에 직접 증착 및 식각이 가능하고, 감광액(Photoresist)이 필요 없으며, 반영구적으로 사용가능 하다는 장점이 있다.[3-5] 스텐실은 주로 실리콘 웨이퍼(Silicon wafer)를 기반으로 제작되어 금속의 증착 및 식각 마스크로 사용되고 있으나, 최근에는 탄성중합체(Elastomer)를 이용하여 스텐실을 제작하고, 이를 세포연구로 응용하고 있다.[6-8] 탄성중합체를 이용한 스텐실의 제작은 PDMS(Polydimethylsiloxane)를 사용하여 제작

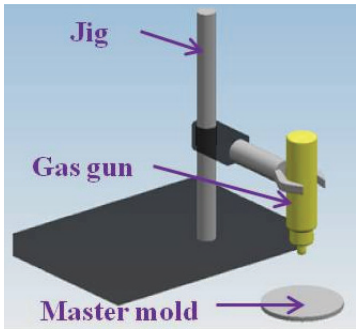


Fig. 1 Schematic image of gas blowing jig

한다. PDMS 는 화학적으로 안정하며 독성이 없는 특성으로 인하여 생체 연구 분야에서 세포나 단백질 거동 관찰 등에 활용되고 있다. PDMS 를 이용하여 제작 된 스텐실은 모재 표면의 상대적으로 넓은 영역에 안정적으로 점착할 수 있고, 성형 가공성 및 빛 투과성이 좋으며, 내구성이 강한 장점이 있다. 또한, PDMS 스텐실은 곡면에 안정적으로 점착이 가능하기 때문에 곡면 패터닝으로도 활용이 가능하다.[9] PDMS 스텐실의 제작은 두꺼운 두 판 사이에 PDMS 와 마스터 몰드(Master mold)를 넣고 가압하여 제작하거나, 마스터 몰드 위에 부착된 흡입판을 이용하여 몰드의 빈공간에 PDMS 를 채워 제작 할 수 있다.[10] 가압식은 마스터 몰드 위에 얇은 PDMS 막이 생성되어 이의 제거가 어렵고, 흡입식은 관통형 패턴 제작이 용이한 반면 PDMS 가 채워지는 과정에서 마이크로 버블이 생기기 쉽고, 이들의 제거가 어려운 단점이 있다. 보다 간편한 방법으로 가스 블로잉(Gas blowing) 방법이 최근 제안 되었다. 가스 블로잉 공정은 마스터 몰드에 PDMS 를 스핀코팅(Spin coating)한 후 그 위로 질소 가스(Nitrogen gas)를 분사하여 마스터 몰드 위에 생성된 얇은 PDMS 막을 제거하는 방법이다.[11,12] 가스 블로잉 공정은 가압이나 흡입을 위한 장치가 필요 없고, 간단한 공정으로 관통형 패턴을 제작 할 수 있는 이점을 지닌다.

본 연구에는 마이크로 제작기술인 포토리소그라피 공정과 가스 블로잉 공정을 이용하여 다양한 크기를 가지는 PDMS 스텐실을 제작하였다. 그리고 제작된 PDMS 스텐실에 NIH/3T3 세포를 국부적으로 배양하여 마이크로 패턴형상의 세포를 배양하였다. 에어건이나 니들(needle)을 통하여 질소가스를 분사하였고, 지그에 고정하거나(Fig. 1) 수작업으로도 가능하였다. 세포를 마이크로 패턴으로 배양하기 위해서는 배양용 판(Culture dish) 위에 PDMS 스텐실을 얹고 그 위에 세포를 배양한 후 PDMS 스텐실을 제거하는 방법을 사용 할 수 있다. (Fig. 2) 이러한 세포의 마이크로 패턴 배양기술은 세포들을 특정 형상과 위치에 동일한 환경에서 배양할 수 있는 장점을 가진다.

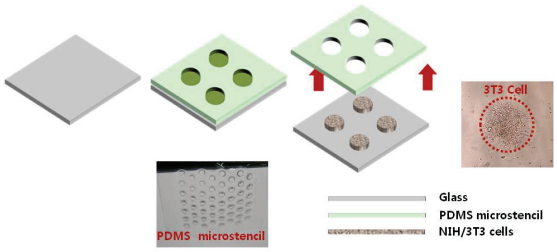


Fig. 2 Schematic image of micropatterned cell culture

2. 제작방법

2.1 마스터 몰드 제작

마스터 몰드의 제작은 오토캐드(AutoCAD)를 사용하여 마이크로 패턴 디자인을 결정 후 필름 마스크(Film mask)를 제작하였다. 그리고, 제작된 필름 마스크를 이용하여 포토리소그라피 공정으로 마스터 몰드를 제작하였다. 제작과정은 다음과 같다. 실리콘 웨이퍼 위에 에폭시(Epoxy) 계열의 감광액인 SU-8_2100(Microchem, USA)을 스핀코터(Spin coater)를 이용하여 도포하였다 (1000-3000 rpm). 도포된 감광액은 핫플레이트(Hot plate)에서 소프트 베이킹(Soft baking)하고 정해진 시간에 따라 마스크 얼라이너(mask aligner)로 노광(exposure) 후 포스트 익스포즈 베이킹(PEB: post exposure baking)을 거쳐 SU-8_2100 현상액(Developer)으로 현상하였다. 이러한 일련의 과정을 거쳐 PDMS 스텐실 제작용 마스터 몰드를 제작하였다. 스텐실 패턴의 크기에 따라 스핀코터의 회전속도를 조정하여 마스터 몰드의 높이를 100 μm 와 250 μm 로 제작하였다.

2.2 가스 블로잉을 이용한 PDMS 스텐실 제작

Fig. 3 은 가스 블로잉을 이용한 PDMS 스텐실 제작과정을 보여주고 있다. 제작된 PDMS 스텐실은 다양한 크기의 원형 형상의 패턴을 가지며, 크기는 최소 20 μm 에서 최대 500 μm 이다.

우선, PDMS 와 경화제(Curing agent)를 10:1(wt%)로 혼합하고, 진공데시게이터(Vacuum desiccator)를

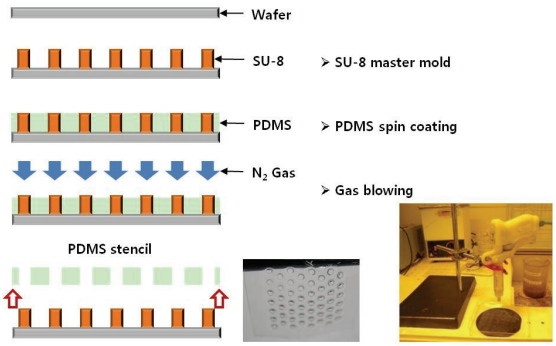


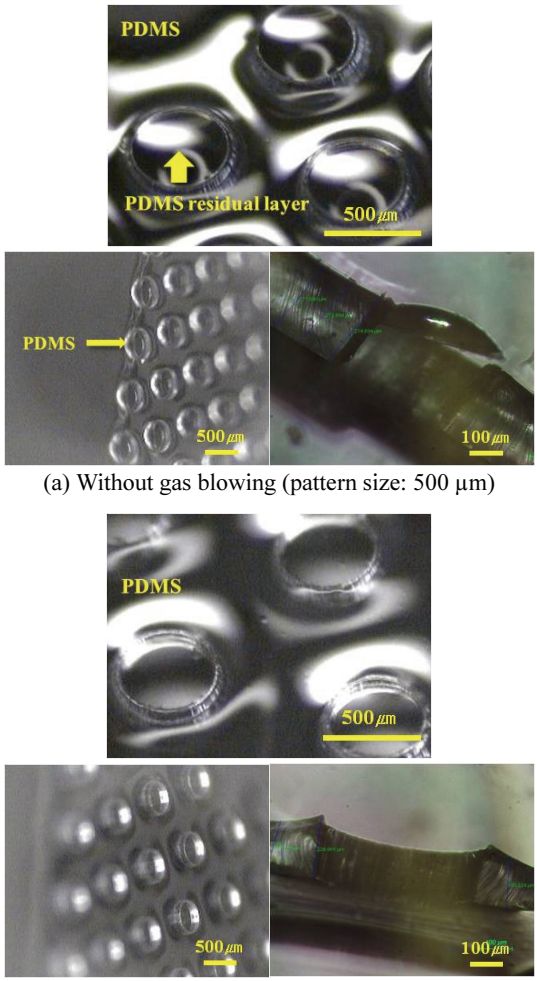
Fig. 3 Schematic processes for PDMS stencil fabrication

이용하여 혼합 시 발생한 미세 버블을 제거하였다. 마스터 몰드로부터 PDMS 를 쉽게 분리하기 위해 tridecafluouro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl-1-trichlorosilane (UCT, USA)을 이용하여 마스터 몰드 표면에 자가조립막(SAM: self assembled monolayer)처리를 하였다. 이를 위하여 마스터 몰드와 슬라이드글라스(Slide glass)를 진공데시게이터 안에 넣고 그 위로 tridecafluouro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl-1-trichlorosilane 을 스포이드를 이용하여 한 방울 떨어뜨린 후 1 분간 공기를 빼고 다시 30 분간 진공상태를 유지하였다. 자가조립막 처리 된 마스터 몰드에 스핀코터로 30 초 동안 3000 rpm (패턴 직경 100 μm 이하)과 1000 rpm (패턴 직경 500 μm) 으로 회전시키면서 PDMS 를 도포하였다. 도포 후에도 마스터 몰드의 마이크로 패턴 위에는 얇은 PDMS 막이 존재하며, 이를 제거하기 위하여 질소 가스를 마이크로 패턴 위로 분사하였다. 사용된 질소의 압력은 1.8 kgf/cm^2 이고, 에어건의 출구 노즐의 내경은 0.46 mm (패턴 직경 100 μm 이하)와 2.0 mm (패턴 직경 500 μm)를 사용하였다. 마스터 몰드 표면과 노즐과의 거리는 2 cm, 3 cm, 4 cm 로 변경하면서 실험한 결과 모두 PDMS 막이 제거되어 거리의 영향은 보이지 않았다. PDMS 를 65℃ 오븐(Oven)에서 1 시간 동안 경화한 후에 PDMS 스텐실을 마스터 몰드로부터 분리하였다. 제작된 PDMS 스텐실은 현미경 (Microscope, Nikon Eclipse E600W) 과 SEM (Scanning Electron Microscope, JSM-5600)으로 형상을 확인하였다.

3. 실험결과 및 응용

3.1 PDMS 스텐실

Fig. 4 는 동일 공정에서 가스 블로잉의 유무에 따른 스텐실 패턴의 관통 효과를 비교한 이미지이다. Fig. 4(a) 는 표면처리 된 마스터 몰드에 PDMS 를 스핀코팅한 후 마이크로 패턴 위에 얇은 PDMS 막이 남아있음을 보이고 있으며, Fig. 4(b) 는 가스 블로잉 후 PDMS 막이 제거되어 패턴이 관통됨을 보여주고 있다. 제작된 PDMS 스텐실의 표면은 굴곡을 가지는 얇은 막 형상을 보인다. Fig. 4(b)의 PDMS 스텐실 단면을 보면 마이크로 패턴 주변에서 PDMS 의 두께가 두껍고, 멀어질수록 얇아지는 것을 확인할 수 있다. 스텐실의 두께는 스핀코팅 공정의 회전속도에 따라 결정되며, 본 실험에서는 50 에서 100 μm 의 범위에서 제작되었다. 가스 블로잉을 이용하여 제작된 PDMS 스텐실은 쉽고 간편하게 제작이 가능한 장점을 가지지만, 표면이 평편하지 않은 단점이 있다.



(a) Without gas blowing (pattern size: 500 μm)

(b) With gas blowing (pattern size: 500 μm)

Fig. 4 Microscope image of PDMS stencil

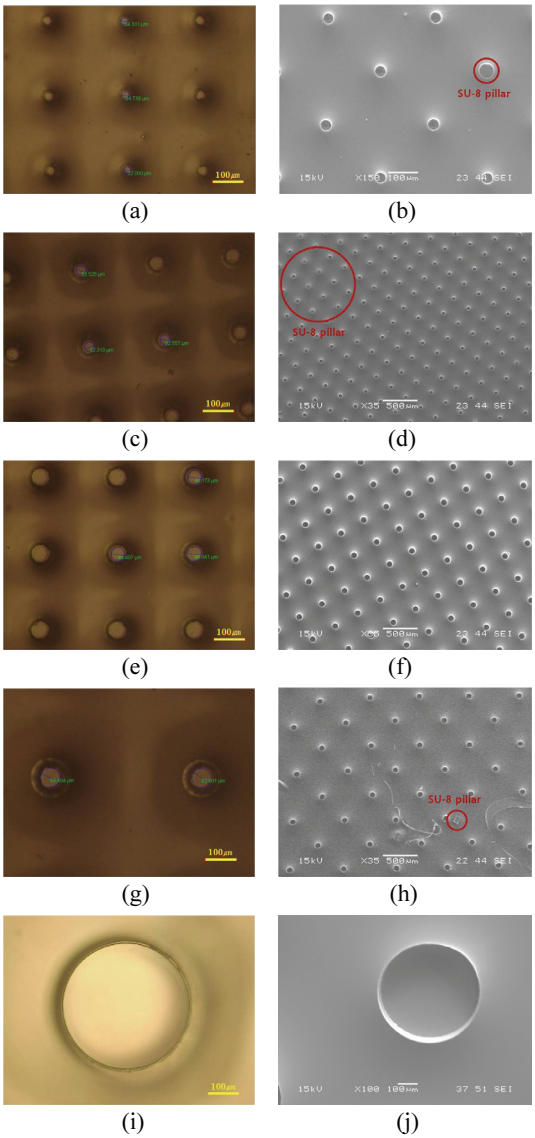
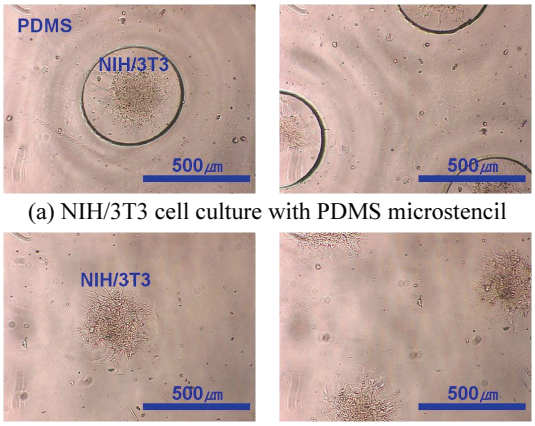


Fig. 5 PDMS stencil microscope and SEM image. (a) (b) diameter 20 μm, (c) (d) 30 μm, (e) (f) 40 μm, (g) (h) 50 μm, (i) (j) 500 μm

Fig. 5 는 제작된 PDMS 스텐실의 현미경과 SEM 이미지이다. PDMS 스텐실은 직경 20 μm 에서 500 μm 의 다양한 크기를 가지며 원형 형상의 패턴으로 제작하였다. 가스 블로잉 공정을 이용하여 최소 20 μm 의 직경을 가지는 PDMS 스텐실 제작이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 5(a), (b)는 20 μm 크기의 PDMS 스텐실의 이미지이며, Fig. 5(c), (d) 는 30 μm 크기의 PDMS 스텐실 이미지이다.



(a) NIH/3T3 cell culture with PDMS microstencil

(b) NIH/3T3 cell patterns after removal of PDMS microstencil

Fig. 6 NIH/3T3 cell culture using 500 μm size microstencil image

30 μm 이하 패턴에서 SU-8 몰드 구조가 스텐실과 함께 떨어지는 경우가 관찰되었다. 이는 몰드 구조가 미세하여 실리콘 웨이퍼와 접착력(adhesion force)이 약하기 때문으로 판단되며, 접착력 강화제(adhesion promoter)를 사용하여 개선할 수 있다. Fig. 5(e), (f)는 40 μm 크기의 PDMS 스텐실 이미지이며, Fig. 5(g), (h)는 50 μm 크기의 PDMS 스텐실 이미지이다. (h)에서 SU-8 몰드 구조의 형상을 확인할 수 있다. Fig. 5(i), (j)는 500 μm 크기의 PDMS 스텐실 이미지이며, NIH/3T3 세포의 마이크로 패턴 배양에 사용하였다. Fig. 5 의 결과 가스 블로잉을 이용하면 기존 공정보다 간단하고 쉽게 스텐실 패턴을 관통할 수 있으며, 최소 20 μm 에서 최대 500 μm 직경의 패턴을 가지는 PDMS 스텐실 제작이 가능함을 확인하였다.

3.2 PDMS 스텐실의 세포배양 응용

PDMS 스텐실은 화학적으로 안정하고, 독성이 없는 특성을 가지고 있기 때문에 세포배양으로 응용이 가능하다. 본 연구에서는 NIH/3T3 세포를 이용하여 마이크로 패턴 형상으로 세포배양 실험을 진행하였다. 실험과정은 세포 배양용 판 및 PDMS 스텐실을 멸균기(Autoclave)에서 멸균처리 후 배양용 판 위에 PDMS 스텐실을 붙이고 그 위로 NIH/3T3 세포를 뿌려 37℃, CO_2 5%의 인큐베이터 안에서 4 일간 배양하였다. NIH/3T3 세포의 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium 500 ml (DMEM; Gibco, Grand Island, NY) 와 10% Fetal

bovine serum 50 ml (FBS; Gibco), 1% penicillin-streptomycin 5 ml (Gibco)를 섞어서 사용하였다. Fig. 6(a)는 직경 500 μm 크기의 PDMS 스텐실을 이용하여 NIH/3T3 세포를 4 일간 배양한 결과이며, Fig. 6(b)에서 PDMS 스텐실을 벗긴 후 NIH/3T3 세포가 마이크로 패턴 형상으로 배양 되었음을 확인하였다. PDMS 스텐실은 세포가 배양되는 물리적인 제한된 공간을 제공하므로 미리 정해진 크기 및 위치로 세포를 국부적으로 배양할 수 있다.

4. 결론

본 연구에는 마이크로 제작기술인 포토리소그라피 공정과 가스 블로잉 공정을 이용하여 다양한 크기의 원형 패턴을 가지는 PDMS 스텐실을 제작하였으며, 직경은 최소 20 μm 에서 최대 500 μm 를 가진다. 이렇게 제작 된 PDMS 스텐실을 이용하여 NIH/3T3 세포를 마이크로 패턴 형상으로 국부 배양하여 보았다. 그 결과 PDMS 스텐실은 세포들이 국부적으로 배양 되도록 물리적인 공간을 제공하였으며, PDMS 스텐실의 크기 및 위치에 의해 세포들이 여러가지 형상의 패턴으로 배양될 수 있었다. 이러한 마이크로 패턴 세포배양 기술은 다양한 형상 및 위치에 국부적인 세포배양을 가능하게 하고, 미세환경을 제어함으로써 체계적이고 공학적인 세포 연구를 가능하게 할 것이다.

후 기

이 논문은 2011 년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 (2011-0016779, 2011-0027234, 2011-0018392)을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

1. Tamura, T., Sakai, Y., and Nakazawa, K., “Two-dimensional microarray of HepG2 spheroids using collagen/polyethylene glycol micropatterned chip,” J. Mater. Sci.: Mater. Med., Vol. 19, pp. 2071-2077, 2008.
2. Ilkhanizadeh, S., Teixeira, A. I., and Hermanson, O., “Inkjet printing of macromolecules on hydrogels to steer neural stem cell differentiation,” Biomaterials, Vol. 28, pp. 3936-3943, 2007.
3. Kim, G. M., van den Boogaart, M. A. F., and Brugger, J., “Fabrication and application of a full wafer size micro/nanostencil for multiple length-scale surface patterning,” Microelectronic Engineering, Vol. 67-68, pp. 609-614, 2003.
4. Kim, G. M. and Brugger, J., “Fabrication of Miniaturized Shadow-mask for Local Deposition,” J. Korean Soc. Precis. Eng., Vol. 21, No. 8, pp. 152-156, 2004.
5. Kim, G. M., Chung, S. I., and Oh, H.-S., “Fabrication of nanostencil using FIB milling for nanopatterning,” J. Korean Soc. Precis. Eng., Vol. 23, No. 3, pp. 56-60, 2006.
6. Khetani, S. R. and Bhatia, S. N., “Microscale culture of human liver cells for drug development,” Nat. Biotechnol., Vol. 26, No. 1, pp. 120-126, 2008.
7. Cho, C. H., Park, J., Tilles, A. W., Berthiaume, F., Toner, M., and Yarmush, M. L., “Layered patterning of hepatocytes in co-culture systems using microfabricated stencils,” BioTechniques, Vol. 48, No. 1, pp. 47-52, 2010.
8. Fukuda, J., Khademhosseini, A., Yeo, Y., Yang, X., Yeh, J., Eng, G., Blumling, J., Wang, C.-F., Kohane, D. S., and Langer, R., “Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures,” Biomaterials, Vol. 27, pp. 5259-5267, 2006.
9. Choi, J. H. and Kim, G. M., “Micro-Patterning on Non-Planar Surface using Flexible Microstencil,” Int. J. Precis. Eng. Manuf., Vol. 12, No. 1, pp. 165-168, 2011.
10. Folch, A., Jo, B.-H., Hurtado, O., Beebe, D. J., and Toner, M., “Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures,” Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 52, pp. 346-353, 2000.
11. Kang, J. H., Um, E., and Park, J.-K., “Fabrlcation of a poly(dimethylsiloxane) membrane with well-defined through-holes for three-dimensional microfluidic networks,” J. Micromech. Microeng., Vol. 19, No. 4, Paper No. 045027, 2009.
12. Choi, J. H., Lee, H., Jin, H. K., Bae, J. S., and Kim, G. M., “Micro patterning of MEF cell with microstencil,” Proc. of KSPE Spring Conference, pp. 149-150, 2010.