Korean Chem. Eng. Res., Vol. 46, No. 6, December, 2008, pp. 1100-1106

다양한 기판 위에서 고분자 전해질 다층 막과 폴리에틸렌글리콜 미세 구조물을 이용한 세포 패터닝 방법

심현우 · 이지혜 · 최호석 · 이창수†

충남대학교 공과대학 바이오응용화학부 화학공학과
305-764 대전 유성구 궁동 220
(2008년 4월 23일 접수, 2008년 8월 1일 채택)

Cell Patterning on Various Substrates Using Polyelectrolyte Multilayer and Microstructure of Poly(Ethylene Glycol)

Hyun-Woo Shim, Ji-Hye Lee, Ho-Suk Choi and Chang-Soo Lee†

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received 23 April 2008; accepted 1 August 2008)

요 약

본 연구는 표면에 세포를 부착하는데 있어서, 다양한 기판 표면에 보편적인 플랫폼으로써 적용될 수 있는 세포 부착을 위한 기능성 표면의 제작 기술 및 이를 이용한 세포의 선택적인 고정과 편리한 세포 패터닝의 방법을 보여주었다. 세포 부착에 적합한 기능성 표면의 제작은 산소 플라즈마 처리를 이용한 다양한 기판의(유리, PMMA, PS, PDMS) 표면 활성화 및 상반되는 고분자 전해질의(PAH, PDAC, PSS, PAA) 정전기적 인력을 통한 증착으로 이루어진 다층의 고분자 전해질 층을 통해 제작될 수 있었다. 또한, 고분자 전해질로 증착된 표면 위로 마이크로 몰딩 인 케필러리 방법을 사용하여 PEG 마이크로 구조물을 제작함으로써 세포의 선택적인 고정이 이루어질 수 있었다. 다층의 고분자 전해질로 증착된 표면은 세포와의 강한 정전기적 인력으로 세포 부착에 유리한 표면을 제공하였다. 반면에, 제작된 PEG 마이크로 구조물은 물리적, 생물학적인 장애물의 역할로써 세포의 비 특이적인 흡착을 방지하였다. 세포 부착을 위한 기능성 표면을 제작하는 동안 표면의 특성은 접촉각 측정을 통해 이루어 졌다. 다양한 기판 상에서 개질된 표면은 세포 부착을 위한 적합한 환경의 제공과 함께 세포의 마이크로 패터닝 기술에서 높은 수율의 세포 패터닝을 제공한다. 상기의 제안된 세포 부착을 위한 기능성 표면 제작 기술 방법은 제작 과정이 매우 간단하고, 편리하여 손쉽게 구현이 가능하며, 제작 공정에서 어떠한 해로운 용매도 사용하지 않기 때문에 친환경적이다. 또한, 이를 이용하여 세포를 이용하는 바이오 칩 및 바이오 센서, 세포를 기반으로 하는 시스템 등에서 기본이 되는 기술로 사용될 수 있는 넓은 응용 범위를 갖는다.

Abstract – In this study, we presented rapid and simple fabrication method of functionalized surface on various substrates as a universal platform for the selective immobilization of cells. The functionalized surface was achieved by using deposition of polyelectrolyte such as poly(allyamine hydrochloride) (PAH), poly(diallyldimethyl ammonium chloride) (PDAC), poly(4-ammonium styrene sulfonic acid) (PSS), poly(acrylic acid) (PAA) and fabrication of poly(ethylene glycol) (PEG) microstructure through micro-molding in capillaries (MIMIC) technique on each glass, poly(methyl methacrylate) (PMMA), polystyrene (PS) and poly(dimethyl siloxane) (PDMS) substrate. The polyelectrolyte multilayer provides adhesion force via strong electrostatic attraction between cell and surface. On the other hand, PEG microstructures also lead to prevent non-specific binding of cells because of physical and biological barrier. The characteristic of each modified surface was examined by using static contact angle measurement. The modified surface onto several substrates provides appropriate environment for cellular adhesion, which is essential technology for cell patterning with high yield and viability in the micropatterning technology. The proposed method is reproducible, convenient and rapid. In addition, the fabrication process is environmentally friendly process due to the no use of harsh solvent. It can be applied to the fabrication of biological sensor, biomolecules patterning, microelectronics devices, screening system, and study of cell-surface interaction.

Key words: Surface Modification, Cell Immobilization, Micro-molding In Capillaries, Polyelectrolyte Multilayer

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: rhadum@cnu.ac.kr

1. 서 론

최근 미세전기기계시스템(Mciro-Electro Mechanical System, MEMS)의 급속한 발전과 생명공학 분야의 높아진 관심은 질병의 조기 진단 및 치료, 신약 후보 군의 검출 등과 같은 연구 분야의 필요성을 크게 증가시키고 있다. 무엇보다도, 바이오 칩이나 바이오센서 등을 제작하는데 있어서 기존의 DNA 칩, 단백질 칩으로 대표되던 것에서 최근에는 세포를 기반으로 하는 칩을 구현함으로써 실제 질병의 진단과 발현, 치료에 관해 세포 단계에서 조사가 이루어지는 연구가 활발히 진행되고 있다[1-3]. 세포를 이용한 칩을 구현하기 위해서는 선택적 세포 고정화 기술과 세포의 부착이 용이할 수 있는 표면을 제작하는 기술이 절대적으로 요구된다. 특히, 가격이 저렴한 다양한 플라스틱 기판 상에서 보편적으로 적용 가능한 방법으로써 세포 부착에 유리한 기능성 표면을 구현하는 일은 세포를 이용한 바이오 칩, 바이오센서, 그리고 세포를 기반으로 하는 마이크로 시스템들을 제작하는데 있어서 요구되는 중요한 기술 중의 하나이다[4-6]. 하지만, 하나의 플랫폼(Platform)으로써 세포 부착을 위한 표면을 다양한 기판에 적용하여 제작하는 일은 쉽지 않을 뿐만 아니라, 사용되는 기판에 따른 표면 처리 방법이 다양하고 세포를 부착하기까지 복잡한 단계 절차로 인해 경제적, 시간적으로 단점을 갖는다[7, 8]. 특히, 동물 세포를 표면에 부착하기 위해 사용한 경우, 세포와 표면 사이의 부착 향상을 위해 섬유상 단백질(Fibronectin)과 같은 부착 단백질(Adhesive protein; extracellular matrix, ECM) 또는 이들의 상보적인 펩타이드(Peptide) 유도체를 이용한 표면 처리처럼 복잡한 과정이 동반되기 때문에 세포 부착 시 오염될 확률을 높일 수 있는 문제점이 있다[9-12]. 따라서, 사용되는 기판의 종류와 특성에 구애 받지 않으며 쉽고, 빠르게 세포 부착을 위한 기능성 표면을 제작하여 일반적으로 적용될 수 있는 플랫폼 제작 기술이 필요하다[13-17].

본 연구실에서는 최근 고분자 전해질을 이용하여 박테리아부터 동물 세포까지 부착이 가능한 표면을 구현하였다. 또한, 세포 부착이 가능한 표면 위로 PEG 마이크로 구조물을 제작함으로써 세포의 선택적인 고정이 가능하게 되었다[18]. 따라서, 본 연구에서는 간단한 산소 플라즈마를 이용한 다양한 플라스틱 기판의 활성화 및 각기 개발된 기존의 기술 방법들을 통해 선택적으로 세포의 고정화가 적용 가능한 플랫폼을 개발할 수 있는 기반 기술을 개발하였다. 본 연구에서 제안하는 방법은, 표면의 세포 부착을 위해 기존의 사용되었던 유리 및 실리콘 기판뿐만 아니라, 가격이 저렴한 다양한 플라스틱 기판에까지 적용될 수 있는 가용 범위를 넓힐 수 있으며, 종래의 복잡한 화학적인 표면 처리 과정 및 세포의 비 특이적인 흡착을 막기 위한 처리 과정 등의 요구 없이, 제작 과정의 간소화, 매우 간단한 기능성 마이크로 표면 공정, 비용의 절감의 효과, 친환경 공정, 다양한 모양 및 크기의 패턴 패턴의 조절을 통해 세포를 기반으로 하는 바이오 센서, 바이오 칩 및 초고속 스크리닝 시스템(HTS; High Throughput Screening Systems), 세포와 표면 사이에 관한 거동을 연구하는 학문 분야 등에서 넓은 응용 범위를 갖고 유용하게 적용될 수 있을 것이다.

2. 실 험

2-1. 재료

Poly(dimethyl siloxane) (PDMS)는 Dow corning sylgard 184를 구입하여 사용하였으며, 광 투과율 94, 굴절률 1.49, 비중 1.18, 흡수율 0.3, 성형 수축률 0.2~0.6인 특성을 갖는 poly(methylmethacrylate)(PMMA) 및 polystyrene(PS)은 (주)LG에서 제공받아 사용하였다. 표면 개질을 위해 사용된 고분자 전해질은 각각 분자량이, poly(allyamine hydrochloride)(PAH, Mw 70,000), Poly(4-ammonium styrene sulfonic acid)(PSS, Mw 200,000), poly(diallyldimethyl ammonium chloride)(PDAC, Mw 100,000~200,000), poly(acrylic acid)(PAA, Mw 100,000)인 것을 사용하였으며, 마이크로 구조물의 제작을 위해 사용된 poly(ethylene glycoldimethacrylate)(PEG-DMA)은 분자량이 Mn=330인 것을 사용하였다. 모든 시약은 시그마-알드리치(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 광중합을 위한 개시제는 Darocure D1173(Ciba-Geigy, USA)을 사용하였다. 그 밖의 LB 배지, ampicilin 항생제, DMEM 배지, FBS 등 기타 세포 배양을 위한 시약은 시그마에서 구입하였다.

2-2. 실험 방법

2-2-1. 세포 배양

2-2-1-1. 박테리아 배양

본 연구에서 제안된 기능성 표면의 세포 부착 여부를 간단히 확인하기 위해 사용된 박테리아 균주는 대장균 BL21 및 녹색형광단백질을 발현하는 재조합 균주인 BL21-pET23b-EGFP를 사용하였다. 대장균 배양은 50%(v/v) 글라이세롤(Glycerol)에 냉동 보관되어 있는 것 중 한 개를 선택하여 50 mg/ml의 ampicillin 항생제를 포함하는 Luria-Bertani(LB) broth(5 g/l yeast extract, 10 g/l tryptone, 10 g/l NaCl) 배지에 접종한 후 37 ºC, 150 rpm의 진탕 배양기에서 배양하였다. 사용된 대장균 용액은 배양된 대장균 용액의 흡광도가 1($O.D._{600\,nm}$-1.0)에 도달했을 때 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리 후 인산 완충 용액에 다시 현탁된 것을 사용하였다.

2-2-1-2. 동물 세포 배양

세포의 표면 부착 확인 여부와 표면에 선택적인 고정을 위해 사용된 동물 세포는 광범위하게 사용되는 섬유상 부착성 세포인 NIH-3T3와 HEK 293 cell을 사용하였다. 각각의 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 penicillin-streptomycin 항생제를 포함하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's mininlum essential medium(DMEM) 배지를 사용하여, 5%의 이산화탄소가 공급되는 37 ºC 배양기 안에서 배양하였다. 24시간 동안 배양된 세포는 제작된 표면 위로 세포의 로딩을 위해 배양 플라스크 바닥에 부착된 세포로부터 trypsin-EDTA를 사용하여 탈착시킨 후, 800 rpm에서 5분간 원심 분리하고 얻은 배양액을 사용하였다.

2-2-2. 기판 표면의 활성화

세포 부착의 용이한 표면을 제작하기 위해 사용된 유리, PMMA, PS, PDMS 기판(가로×세로, 2.5 cm×2.5 cm)은 고분자 전해질로 증착하기 전에 산소 플라즈마를 이용하여 먼저 표면을 활성화 시켰다. 유리 기판의 경우는 50% 황산 용액과 30% 과산화수소를 4 대 1의 비율로 섞은 혼합물인 피라나(Piranha) 용액에 30분간 담그고 활성화 시킨 후 산소 플라즈마를 이용하여 한 번 더 표면을 활성화 시켰다. 본 연구에 사용된 산소 플라즈마 장치는(Model PDC-002, HARRICK PLASMA Ithaca. USA)을 사용하였으며, 100 w, 0.2 torr에서 30초 동안 수행하였다.

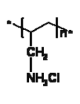
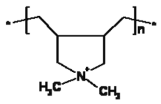
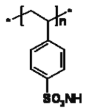
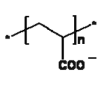
2-2-3. 고분자 전해질의 표면 증착

피라나 용액 및 산소 플라즈마에 의해 표면 처리된 기판은, 표면에 OH^-혹은 산소 라디칼 등의 관능기들이 도입되게 되고, 이로 인해서 각 기판의 표면들은 양이온성 고분자 전해질을 첫 층으로 하여 서로 상반된 전하를 갖는 고분자 전해질로 증착하였다. 각각의 상반된 전하를 갖는 고분자 전해질은 정전기적 인력을 통해 증착됨으로써 다층의 박막을 형성하였다[19-22]. 고분자 전해질을 증착하기 위한 방법으로는 스핀 코팅을 이용하였다(Model SC-60P, Shinumst Inc. Korea). 다층의 박막을 형성하는 고분자 전해질 증착에 관해 간략하게 정리하면, 먼저 활성화된 기판 표면 위로 양이온성 고분자 전해질 550 μl을 파이펫(Pipette)을 사용해 기판 표면을 덮고 3분 동안 기다린 후 4,000 rpm으로 15초간 스핀 코팅을 시행한다. 15초가 지나면 3차 증류수를 이용해 동일한 조건에서 2회 세척 과정을 수행한다. 증류수의 세척이 끝나면, 앞서 증착한 고분자 전해질과 상반되는 전하의 고분자 전해질을 동일한 과정을 통해 증착한다. 상기의 과정을 반복하여 원하는 층의 고분자 전해질 층이 증착될 때까지 반복 수행한다. 본 연구에서는 선행 연구의 결과를 바탕으로 세포 부착 및 선택적 고정을 위해 고분자 전해질의 표면 증착은 9층으로 고정하였다. 사용된 고분자 전해질의 분자 구조식을 Table 1에서 정리하였다.

2-2-4. 세포 부착의 적합성 평가

제작된 표면의 세포 부착에 대한 적합성의 평가는 대장균 박테리아 및 NIH - 3T3 세포의 표면 부착 유무에 따라 확인하였다. 명확한 구별을 위해 평평한 PDMS 기판(가로×세로, 5 cm×2.5 cm)의 반쪽 부분은 알루미늄 호일로 가린 후, 나머지 반쪽 부분만을 산소 플라즈마 처리 및 고분자 전해질로 증착하였다. 세포 부착을 위한 표면 제작 시에, 고분자 전해질로 증착된 가장 상층 부위는 항상 양이온성 고분자 전해질의 층이 나타나도록 하였다. 고분자 전해질의 표면 증착이 끝난 샘플은 세포의 로딩 전에 클린 벤치(Clean bench) 내에서 멸균 후 사용하였다. 샘플 위로 성장기에 있는 대장균 배양액에서 300 μl을 떨어뜨려 대장균 용액이 기판의 표면을 모두 덮도록 한 후 클린 벤치 내에서 40분 정도 방치하였고, 같은 방법으로 24시간이 지난 NIH - 3T3 세포 배양액 또한 표면을 덮은 후 5%의 이산화 탄소가 공급되는 37 ºC 배양기 안에서 24시간 동안 방치하였다. 시간이 지나면 샘플들은 인산 완충 용액 안에 5회 정도 담그고, 들어올리는 과정을 반복하여 세척을 한 후 초 순수 질소를 이용하여 표면의 물기를 제거하였다. 모든 과정을 마친 샘플은 광학 및 위상 차 현미경을 사용하여 분석하였다. 대장균 박테리아 및 NIH - 3T3 세포의 경우 고분자 전해질로 증착된 표면 위에만 다수의 세포

Table 1. Chemical structure of polyelectrolyte and its type

	Polyelectrolyte			
	(+) charge type		(−) charge type	
	PAH	PDAC	PSS	PAA
Chemical structure				

·PAH: poly(allylamine hydrochloride)
·PDAC: poly(diallyldimethyl ammonium chloride)
·PSS: poly(4-ammonium styrene sulfonic acid)
·PAA: poly(acrylic acid)

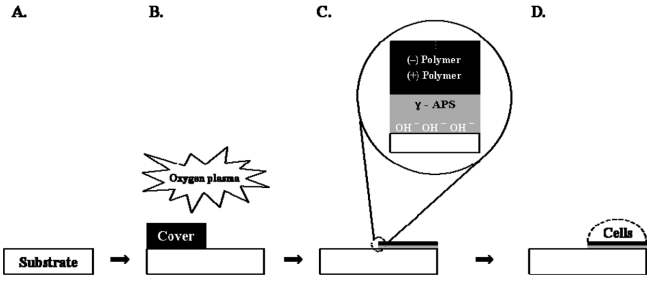


Fig. 1. A schematic diagram of simply functionalized surface for the confirmation of cell adhesion; A. the preparation of flat PDMS slab (5 cm × 2.5 cm), B. covering half of the PDMS slab and surface activation through oxygen plasma, C. the treatment of 3-aminopropyltriethoxy-silane (γ-APTS) and the assembly with polyelectrolyte, D. loading of cell suspension.

부착이 이루어 졌음을 확인할 수 있었다. 제작된 표면의 세포 부착의 적합성 평가에 관한 공정 간략도를 Fig. 1에서 나타내었다.

2-2-5. 마이크로 구조물의 제작 및 세포의 선택적 고정

세포의 선택적인 고정을 위해 고분자 전해질로 증착된 다양한 기판의 표면 위로 PEG 마이크로 구조물을 제작하였다. 마이크로 구조물의 제작은 소프트리소그래피(Soft-lithography)의 한 방법인 마이크로 몰딩 인 케필러리(Micro-molding in capillaries, MIMIC) 방법을 이용하였으며, 구조물의 제작을 위해 사용된 마이크로 몰드는 사진식각(Photolithography) 공정을 통해 모양과 크기의 조절이 가능하였다. 본 연구에서는 마이크로 구조물을 만들기 위해 패턴 높이가 20 μm인 마이크로 몰드를 사용하였다. 제작된 마이크로 구조물은 0.5%(v/v)의 광 개시제를 포함한 PEG 혼합물을 마이크로 몰드의 한 쪽 끝 부분에 위치시키면 혼합물은 모세관 현상에 의해 몰드와 기판의 표면으로 생긴 빈 공간을 빠르게 채우게 되고, 그 후 15분간의 자외선 조사(250~400 nm, 100 mJ/cm^2)를 통해 광중합하고 몰드를 제거하는 것으로 제작되었다. 그 후 마이크로 구조물이 형성된 표면 위로 세포를 로딩하고 세포의 선택적 고정 여부를 확인하였다.

2-2-6. 이미지 분석

모든 이미지 사진은 높은 분해능의 CCD 카메라 (Coolsnap, Roper Science, USA)를 갖춘 형광 현미경(NIKON, TE-2000, Japan)을 사용하여 측정하였다. 측정된 이미지들은 이미지 프로그램 Image-Pro Plus(Media Cybernetics, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

2-2-7. 접촉각 측정

기판의 표면 성질을 측정하는 방법으로 본 연구에서는 sessile drop 방법을 이용한 접촉각 분석기(Drop shape analyzer, DSA100, Krüss, Germany)를 사용하였다. 모든 기판의 접촉각 측정은 산소 플라즈마 전, 후 그리고 9층으로 증착된 고분자 전해질의 표면 위에서 측정하였다. 연구에 사용된 접촉각 분석기는 마이크로 실린지를 통해 일정량의 probe liquid를 떨어뜨릴 수 있고, 접촉각 측정은 컴퓨터에 의해 자동으로 측정된다. 접촉각 측정 전에 모든 시료는 초 순수 질소를 이용하여 깨끗한 표면을 얻은 후 분석하였다. 본 연구에서 측정된 값은 한 시료의 여러 곳을 측정하였고(Intra-variation), 독립적인 다른 시료를 3번 이상 측정하여(Batch to batch variation) 그 평균값을 보고하였다.

3. 결과 및 토의

3-1. 기능성 표면의 제작 및 접촉각 측정

세포의 부착이 용이한 표면을 구현하는 일은 세포를 기반으로 하는 바이오 센서나 바이오 칩 등의 제작에 있어서는 기본이 되는 중요한 요건이다. 하지만, 사용하는 기판과 무관하게 세포 부착을 위해 보편적으로 적용될 수 있는 표면을 제작하는 방법은 쉽지 않다. 이에 본 연구에서는 매우 간단한 산소 플라즈마의 표면 처리를 이용하고, 수용액 상에서 전하를 나타내는 고분자 전해질을 이용한 다층의 증착을 통해서 세포 부착을 위한 표면 제작 방법의 플랫폼을 제시할 수 있었다. 산소 플라즈마에 의한 표면 처리는 기판 표면에 산소 라디칼 혹은 하이드록실기(OH^-)의 관능기를 도입하는 것이 가능하였고, 이를 통해 양이온성 고분자 전해질의 첫 번째 증착을 유도할 수 있었다. 또한, 고분자 전해질의 증착으로 이루어진 다층의 박막은 서로 상반되는 전하를 갖는 고분자 전해질들 사이에 정전기적 인력을 통한 조합으로 가능하였다. 중요한 점은, 고분자 전해질을 이용해 표면을 증착할 경우, 첫 번째 층의 안정성이라고 할 수 있다. 첫 층이 불안정하게 되면 고분자 전해질의 균일한 증착이 이루어 지지 않고, 이 경우 계속적인 고분자 전해질의 증착이 이루어질 때 증착하는 고분자 층이 서로 엉기어 뿌옇게 표면이 변화되는 것을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 본 연구에서는 고분자 전해질로 증착된 기판 위로 마이크로 구조물을 제작함으로써 표면에 세포의 선택적 고정 또한 가능함을 보였다. 제작된 마이크로 구조물은 광중합을 통해 결과적으로 높은 가교를 형성하여 구조물이 완충 용액과 같은 수용액에 의한 처리에 있어서도 안정된 상태를 유지할 수 있었다.

세포 부착을 위한 기능성 표면을 제작하는데 있어서 표면 성질의 분석은 기판의 표면 처리가 이루어지는 각 단계에서마다 접촉각을 측정함으로써 확인할 수 있었다(Fig. 2). 사용된 기판 중, 유리 기판을 제외한 나머지 PMMA, PS, PDMS 기판들은 산소 플라즈마 처리 전의 경우, 높은 소수성의 표면을 갖지만(Fig. 2(a)), 산소 플라즈마 처리 후의 경우는 친수성의 표면으로 바뀐 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2(b)). 하지만, PMMA 기판의 경우 접촉각의 변화 정도가 PDMS나 PS 기판에 비해 상대적으로 작았다. 이는 사용되는 PMMA 기판이 산소 플라즈마 처리에도 불구하고 표면 활성화가 매우 어려움을 보여주고 있다. 본 실험에서는 사용된 기판에 대해 동일한 조건에서 산소 플라즈마 처리를 하였으며, 이에 따라 각각의 기판 표면은 활성화 된다고 가정하였다. 적용된 산소 플라즈마 처리 조건은 본 연구진의 선행 연구 결과에서 보여준 처리 조건을 사용하였다[23]. Fig. 2(c)는 PAH와 PSS 조합의 고분자 전해질로 9층 증착된 표면 위에서 측정된 접촉각을 보여준다. 세포 부착을 위한 표면으로 선행 연구 결과에서 여러 고분자 전해질 층의 두께에 따른 최적 세포 고정화 조건은 고분자 전해질의 9층으로 구성된 표면으로 확인하였고 본 연구에서는 9층의 고분자 전해질이 증착된 조건을 사용하였다[18]. 측정된 접촉각은 각각의 기판에서 그 값의 차이가 적었으며, 이는 본 표면 개질 방법이 매우 신뢰성이 있고 안정적인 방법임을 반증한다. 또한, 선행 연구의 결과들에서 보여진 PAH 층의 값(47~51°)과 매우 잘 일치함을 보여주었다[18]. 이는 각 기판의 표면 위로 고분자 전해질의 증착이 제대로 이루어 졌음을 보여주는 결과이다.

3-2. 세포 부착의 적합성

본 연구에서 제시된 세포 부착에 적합한 기능성 표면의 구현 가능성을 검증하기 위하여, PDMS 기판 위에 표면 성질이 다른 두 지역(본래의 기판 표면과 산소 플라즈마 처리 및 고분자 전해질의 증착을 통해 제작된 표면)을 제작하였고, 두 표면에서 보여지는 세포의 부착 유무를 확인하였다. 먼저, 두 개의 다른 표면 성질을 갖도록 제작된 PDMS 기판의 표면에서 두 지역의 경계는 외관상 확인할 수가 없었으나, 대장균 및 NIH-3T3 동물 세포를 로딩하고 난 후 표면에 부착된 세포의 양상을 통해서 두 지역의 명확한 경계 부분 및 세포 부착을 위한 유리한 표면을 확인할 수 있었다. 대장균 및 NIH-3T3 동물 세포 모두의 경우에서 대다수의 세포들이 본 연구에서 제안한 개질된 표면(산소 플라즈마 처리 및 고분자 전해질로 증착된 지역)에만 부착된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이는 본 연구에서 제시된 제작 방법을 통해 제작된 표면에 박테리아 및 동물 세포 모두 세포 부착을 적용하는데 용이한 방법이 될 수 있음을 의미한다. 더불어, 표면의 활성화를 위해 일반적으로 많이 쓰이는 산소 플라즈마 처리를 이용하는 것으로 고분자 전해질의 증착이 가능하게 됨으로써 산소 플라즈마에 의해 표면이 활성화 될 수 있는 다양한 기판에 상기의 방법을 적용하여 세포의 부착이 가능할 수 있음을 의미한다.

세포의 표면 부착 메커니즘은 아직 명확히 이해되진 않았지만, 일반적으로 세포는 ECM과 같은 고분자 형태와 단백질-리간드 (Protein-ligand)의 결합 형태를 통해 표면에 비가역적으로 부착한다고 알려져 있다[24, 25]. 박테리아를 포함한 대부분의 세포들은 인지질 및

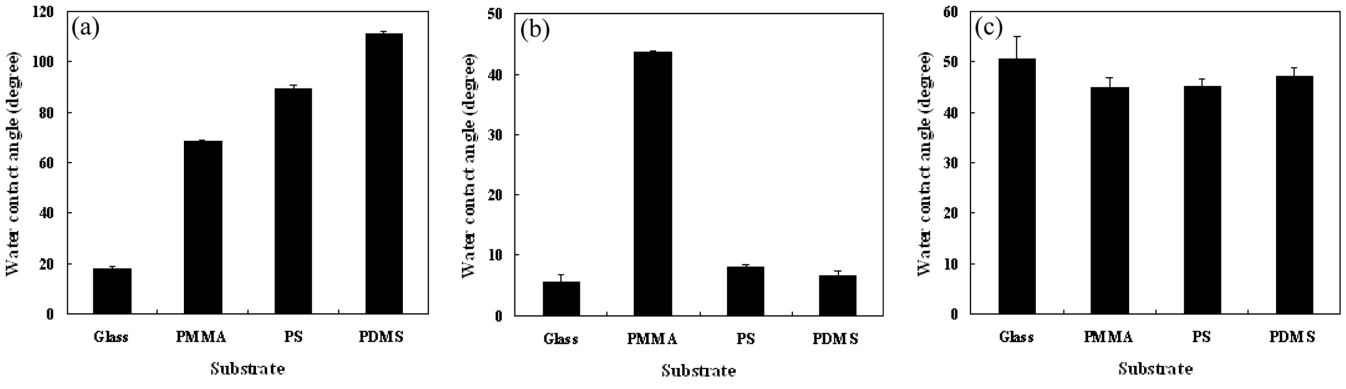


Fig. 2. The static contact angle on various substrates; (a) pristine contact angle of all substrates, (b) after oxygen plasma treatment of 30 sec, (c) contact angle on surface modified by polyelectrolyte, $(PAH/PSS)_4PAH$.

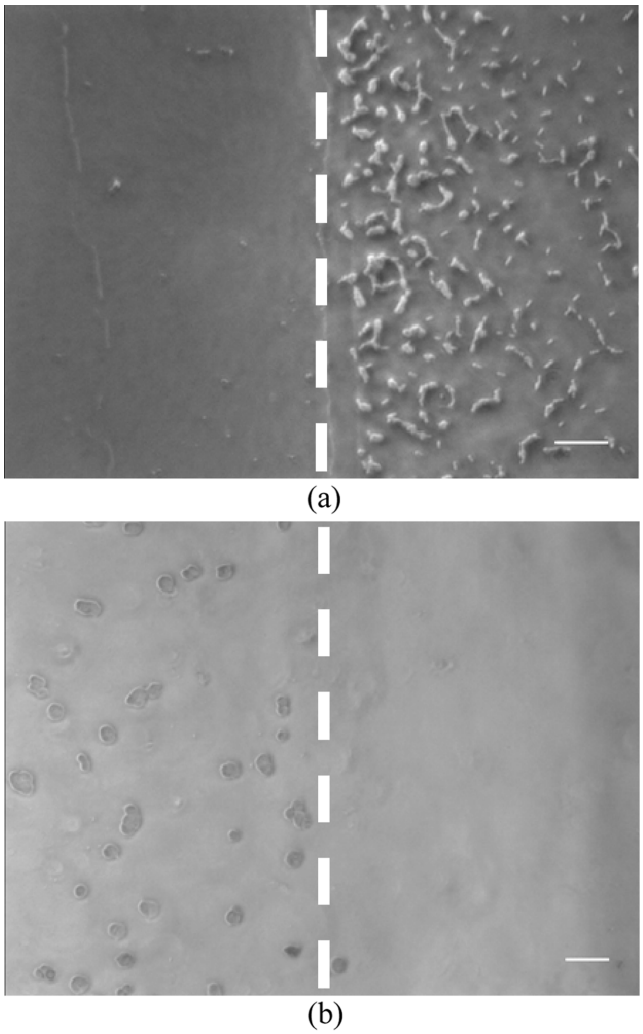


Fig. 3. The optical images of cell adhesion onto PDMS substrate locally modified by polyelectrolyte; (a) phase contrast microscopy image of bacteria, (b) optical microscopy image of NIH-3T3 fibro blast. Dash line is boundary between the modified and nonmodified region. Each scale bar is 50 um.

당지질(Glycolipid)과 당 단백질(Glycoprotein)이 존재하는 세포막으로 인해 세포의 표면은 음전하를 나타낸다. 본 연구에서 사용된 고분자 전해질 중 PAH와 PDAC는 아민 그룹으로 인해 기판 표면을 양전하로 나타내게 한다. 이로 인해 세포와 고분자 전해질로 증착된 부분 지역 사이에는 정전기적 인력이 발생하고 그로 인해 세포는 고분자 전해질로 증착된 부분에만 부착할 수 있게 된다.

3-3. 다양한 기판 상에 세포의 선택적 고정

일반적으로 표면에 세포의 선택적 고정을 위해서는 크게 세포 부착을 위한 표면을 제작하는 단계와 선택된 세포 부착 부분 외에 세포의 비 특이적인 부착을 방지하는 단계로 이루어진다. 본 연구에서는 표면에 고분자 전해질의 증착과 PEG 마이크로 구조물의 제작을 통해 단계를 간소화함으로써 쉽고, 빠르게 세포의 선택적 고정을 구현하였다. 또한, 다양한 모양과 크기를 갖는 몰드를 사용함으로써 다양한 패턴에서 표면에 선택적으로 고정된 세포의 형태를 얻는 것이 가능하였다. 고분자 전해질로 증착된 기판의 표면에 마이크로 구조물의 제작을 위해 사용된 PDMS 몰드는, 광학적으로 투

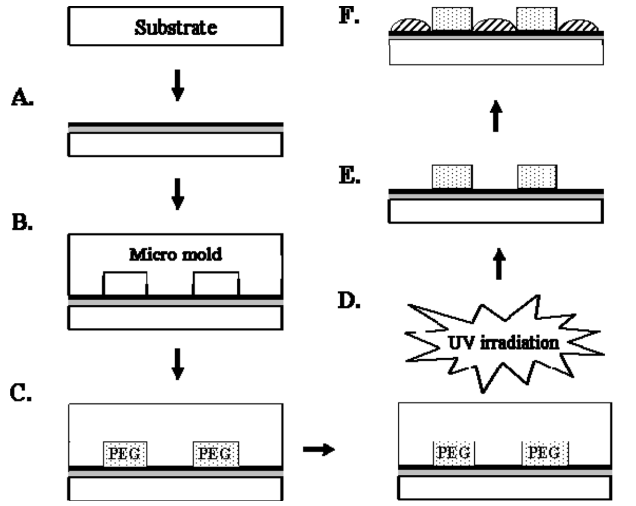


Fig. 4. Schematic diagram of fabrication of functionalized surface for selective immobilization of cell; A. surface activation through oxygen plasma and substrate coating with PELs, B. placement of PDMS micromold by conformal contact, C. MIMIC of PEG prepolymer by capillary action, D. photopolymerization of PEG through UV irradiation, E. removing the PDMS micromold, F. loading of cell suspension onto the fabricated surface and image analysis.

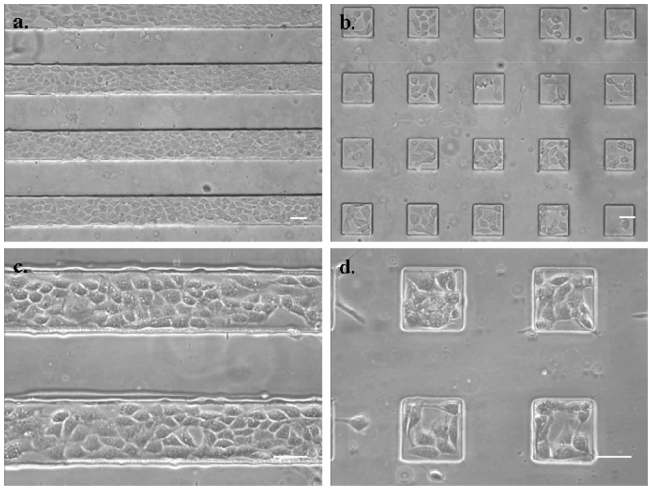


Fig. 5. Optical images of selectively immobilized NIH-3T3 fibroblast on PMMA substrate; (a) and (b) images obtained by 20x objective magnification on PMMA. (c) and (d) enlarged images to 40x objective magnification, respectively. Each pattern size is 100 um and all scale bars are 50 um.

명하고 강한 내구성과 내마모성을 가진 실리콘 고분자로 소프트리소그래피 방법을 이용하여 손쉽게 복제 몰드(Replica mold)를 제작할 수 있는 장점이 있다. 이는 실리콘 웨이퍼를 사진식각 공정에서 모양과 크기의 조절을 통해 정교한 양각의 PDMS 몰드를 얻을 수 있고, 이를 사용하여 다양한 패턴으로 세포의 선택적 고정이 가능할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 각각의 기판 표면 상에 다양한 모양과 크기를 갖는 패턴으로 세포를 선택적으로 고정할 수 있었다. 다양한 기판 표면 위로 세포의 선택적 고정을 위해 기능성 표면을 제작하는 전체 공정 과정을 Fig. 4에 도시화하였다.

Fig. 5 및 Fig. 6는 본 연구에서 사용된 PMMA, PS 기판의 표면에서 선택적으로 고정된 NIH-3T3 세포의 이미지를 보여주며, Fig.

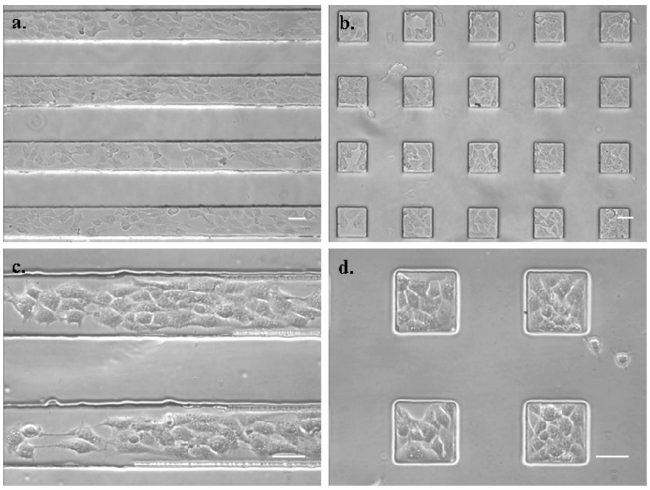


Fig. 6. Optical images of selectively immobilized NIH-3T3 fibroblast on PS substrate; (a, b) and (c, d) images obtained by 20x objective magnification and 40x objective magnification on PS, respectively. Each pattern size is 100 um and all scale bars are 50 um.

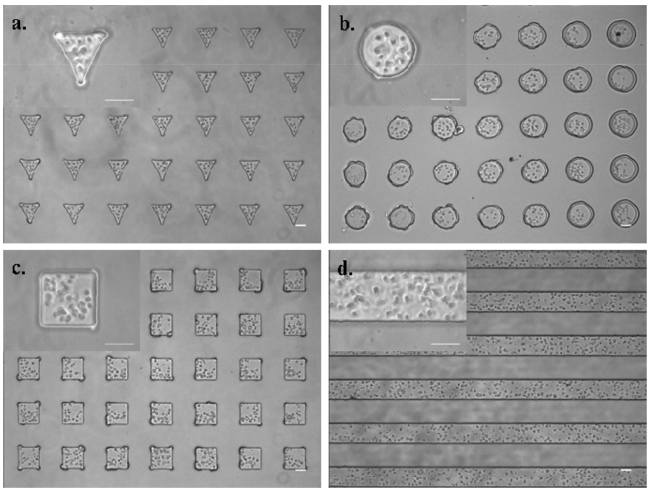


Fig. 7. Optical images of selectively immobilized NIH-3T3 fibroblast onto various shape of patterns on the glass substrate. Each image was obtained by 10x objective magnification. Inserted images were taken to 60x objective magnification. All pattern sizes are 100 um, and scale bars are 50 um.

7에서는 유리 기판 상에 고정된 NIH-3T3 세포의 이미지를 보여준다. 예상과 같이, 기판의 표면 위로 고분자 전해질로 표면 처리되어 노출된 부분에만 세포의 부착이 가능하였고, 그 외의 표면은 PEG 고분자로 제작된 마이크로 구조물의 물리적, 화학적 성질로 인해 세포 부착을 방지하는 장애물 역할을 함으로써 세포의 선택적 고정이 이루어질 수 있도록 했다. 또한, 다양한 몰드의 사용을 통해서 여러 종류의 패턴으로 고정된 세포의 형태를 얻을 수 있었다. 뿐만 아니라, Fig. 8에서는 HEK 293 세포를 사용하여 선택적으로 고정될 수 있는 것을 확인하였다. 따라서, 다양한 종류의 동물 세포에도 상기의 제안된 기술이 적용될 수 있음을 암시하며, PMMA 기판과 PS 기판 위에서 각각 세포가 선택적으로 고정된 모습을 확인할 수 있었다(Fig. 8(a), Fig. 8(b)). 이는 본 연구에서 제안된 세포 부착을 위한 기능성 표면의 제작 방법은 세포의 종류 및 사용된 기판의 종류에 따른 부착의 특이성 없이 보편적으로 적용될 수 있음을 보여준다.

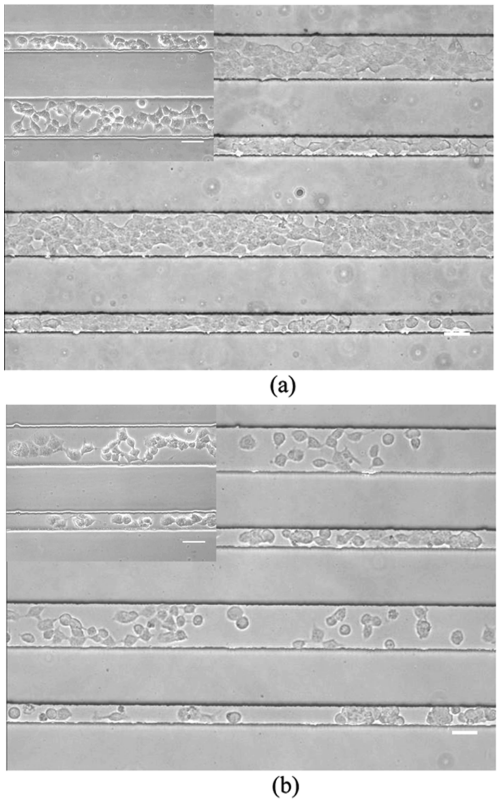


Fig. 8. The optical microscopy images of selectively immobilized HEK 293 (Human Embryonic Kidney) cell on PMMA and PS substrate, respectively; (a, b) images of 20x objective magnification. Inserted images were obtained to 40x objective magnification. Each pattern alternatively consists of 100 um and 50 um pattern size. All scale bars are 50 um.

4. 결 론

본 연구는 특정한 지역에 선택적으로 세포를 부착하는 기술에 있어서, 다양한 기판의 표면 상에 보편적으로 적용될 수 있는 세포 부착에 관한 기능성 표면의 제작 및 이를 활용한 표면에 세포의 선택적 고정의 응용을 보여주었다. 산소 플라즈마 처리를 통한 표면 활성화와 상반된 전하를 나타내는 고분자 전해질의 증착을 통한 표면 개질은 세포의 표면 부착이 사용하는 기판에 관계없이 다양한 기판 상에서 폭넓게 적용될 수 있음을 제시하였다.

뿐만 아니라, 세포 부착이 용이한 표면 위로 PEG 마이크로 구조물을 제작함으로써 표면에 세포의 선택적 고정이 가능하고 이를 통한 손쉬운 세포 패터닝의 가능성을 제시하였다. 더불어, PEG 마이크로 구조물의 제작에 몰드로 사용된 마이크로 스탬프는 사진식각 공정에 의해 그것을 제조 및 이용하였기 때문에 마이크로 스탬프의 모양 및 크기 등을 조절함에 따라 보다 정교하고 다양한 패턴에서 표면에 선택적으로 고정된 세포의 형태 또한 얻을 수 있다. 본 연구에서 제안된 세포 부착을 위한 기능성 표면의 제작 방법은 매우 단순한 화학적 표면 처리 방법을 이용하여 간단하고 편리하며, 종래의 세포 부착을 위한 중간 과정의 간소화로 경제적, 시간적 측면의 장점을 갖는다. 또한, 다양한 기판의 표면 상에 보편적으로 적용될 수 있다는 점에서 세포를 이용하는 바이오 칩 및 바이오 센서, 세포를 기반으로 하는 시스템, 세포와 표면간의 연구 등에서 크게 활용

될 수 있을 거라고 기대된다.

감 사

본 연구는 보건복지부 보건의료기술 진흥사업(과제 번호: A062254) 및 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단(KRF-2007-313-D00169)의 지원을 받아 수행하였기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Park, H. G., Ji, H. S., Yim, S. C. and Chang, H. N., "DNA Chip and Immobilization Technologies," *HWAHAK KONGHAK*, **40**(3), 281-288(2002).
2. Kimberly, L. C. and Gary S. S., "Environmental Application of Array Technology: Promise, Problems and Practicalities," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**(3), 311-318(2003).
3. Park, H. K. and Chung, B. H., "Nanobiotechnology," *Korean Chem. Eng. Res.*, **44**(1), 10-15(2006).
4. Lee, C. S., Lee, S. H., Kim, Y. G., Lee, J. H., Kim, Y. K. and Kim, B. G., "A Method of Binding Kinetics of a Ligand to Micropatterned Proteins on a Microfluidic Chip," *Biosens. Bioelectron.*, **22**(6), 891-898(2007).
5. Willner, I. I. and Katz, E., "Integration of Layered Redox Proteins and Conductive Supports for Bioelectronic Applications," *Angew. Chem. -Int. Edit.*, **39**(7), 1180-1218(2000).
6. Choi, J. W. and Lee, B. H., "Biodevice Technology," *Korean Chem. Eng. Res.*, **44**(1), 1-9(2006).
7. Wang, C., Yap, F. L. and Zhang, Y., "Micropatterning of Polystyrene Nanoparticles and Its Bioapplications," *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, **46**(4), 255-260(2005).
8. Lee, C. S., Lee, S. H., Park, S. S., Kim, Y. K. and Kim, B. G., "Protein Patterning on Silicon-based Surface Using Background Hydrophobic Thin Film," *Biosens. Bioelectron.*, **18**(4), 437-444(2003).
9. Falconnet, D., Csucs, G., Grandin, H. M. and Textor, M., "Surface Engineering Approaches to Micropattern Surfaces for Cell-based Assays," *Biomaterials*, **27**(16), 3044-3063(2006).
10. Reyes, D. R., Perruccio, E. M., Becerra, S. P., Locascio, L. E. and Gaitan, M., "Micropatterning Neuronal Cells on Polyelectrolyte Multilayers," *Langmuir*, **20**(20), 8805-8811(2004).
11. Boura, C., Muller, S., Vautier, D., Dumas, D., Schaaf, P., Claude, V. J., Francois, S. J. and Menu, P., "Endothelial Cell--interactions with Polyelectrolyte Multilayer Films," *Biomaterials*, **26**(22), 4568-4575(2005).
12. Chaudhury, M. K., "Self-assembled Monolayers on Polymer Surfaces," *Biosen. Bioelectron.*, **10**(9-10), 785-788(1995).
13. Whitesides, G. M., Ostuni, E., Takayama, S., Jiang, X. and Ingber, D. E., "Soft lithography in Biology and Biochemistry," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **3**, 335-373(2001).
14. Schuy, S. and Janshoff, A., "Microstructuring of Phospholipid Bilayers on Gold Surfaces by Micromolding in Capillaries," *J. Colloid Interface Sci.*, **295**(1), 93-99(2006).
15. Yoo, P. J., Lee, S. H., Park, M. K., Kwon, S. J., Kang, H. W. and Lee, H. H., "New Unconventional Nanolithographic Methods," *HWAHAK KONGHAK*, **41**(1), 1-14(2003).
16. Lee, K. B., Kim, D. J., Yoon, K. R., Kim, Y. and Choi, I. S., "Patterning Si by Using Surface Functionalization and Microcontact Printing with a Polymeric Ink," *Korean J. Chem. Eng.*, **20**(5), 956-959(2003).
17. Suh, K. Y., Jeong, H. E., Park, J. W. Lee, S. H. and Kim, J. K., "Fabrication of High Aspect Ratio Nanostructures Using Capillary Force Lithography," *Korean J. Chem. Eng.*, **23**(4), 678-682(2006).
18. Shim, H. W., Lee, J. H., Hwang, T. S., Rhee, Y. W., Bae, Y. M., Choi, J. S., Han, J. and Lee, C. S., "Patterning of Proteins and Cells on Functionalized Surfaces Prepared by Polyelectrolyte Multilayers and Micromolding in Capillaries," *Biosens. Bioelectron.*, **22**(12), 3188-3195(2007).
19. Porcel, C., Lavalle, P., Decher, G., Senger, B., Voegel, J. C. and Schaaf, P., "Influence of the Polyelectrolyte Molecular Weight on Exponentially Growing Multilayer Films in the Linear Regime," *Langmuir*, **23**(4), 1898-1904(2007).
20. Schonhoff, M., "Self-assembled Polyelectrolyte Multilayers," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **8**(1), 86-95(2003).
21. Cho, J., Kim, S. and Char, K., "Fabrication of Highly Ordered Multilayer Thin Films and Its Applications," *Korean J. Chem. Eng.*, **20**(1), 174-179(2003).
22. Jung, D. Y., "Self-assembled Monolayer (SAM) and Micro-contact Printing," *J. Korea Ind. Eng. Chem.*, **11**(5), 451-457(2000).
23. Shim, H. W., Lee, J. H. and Lee, C. S., "Microcontact Printing of Bacteria Using Hybrid Agarose Gel Stamp," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **21**(4), 273-278(2006).
24. Razatos, A., Ong, Y. L., Sharma, M. M. and Georgiou, G., "Molecular Determinants of Bacterial Adhesion Monitored by Atomic Force Microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**(19), 11059-11064(1998).
25. Vigeant, M. A. and Ford, R. M., "Interactions Between Motile Escherichia Coli and Glass in Media with Various Ionic Strengths, as Observed with a Three-dimensional-tracking Microscope," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(9), 3474-3479(1997).