



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0013537
(43) 공개일자 2013년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B29C 39/02 (2006.01) C12M 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0075245
(22) 출원일자 2011년07월28일
심사청구일자 2011년07월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
이상훈
경기도 안산시 단원구 고잔동 호수공원아파트
103-102
정기석
경상북도 경산시 진량읍 공단로 527, 우방힐타운
101-1003
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

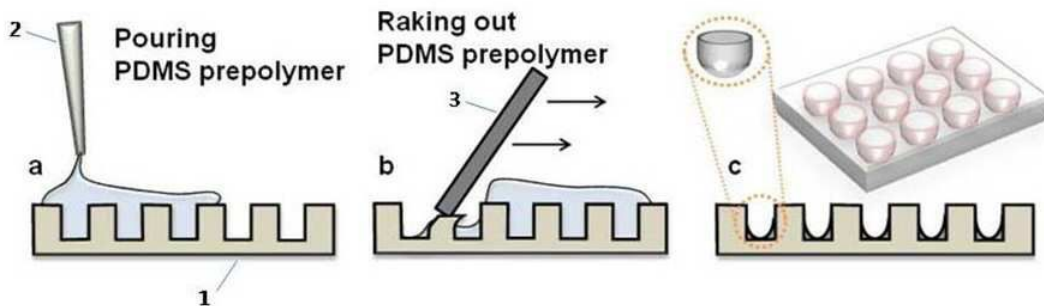
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 표면장력을 이용한 반구형 마이크로웰의 제조 및 이를 이용한 세포 집합체의 형성

(57) 요약

본 발명은 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법, 이에 따라 제조된 마이크로 구조물 및 이를 이용한 세포 집합체의 형성 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면 단순한 메니스커스 효과를 이용하여 값싸고 적은 노동력으로 균일한 크기의 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물을 대면적으로 제조할 수 있다. 따라서 매우 간단하고 신속하게 반구형 마이크로웰을 형성할 수 있어 이를 이용하여 세포 집합체 생산 등에 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

송지훈

서울특별시 용산구 새창로 70, 삼성래미안아파트
112동 304호 (도원동)

전예슬

서울특별시 송파구 가락본동 17-10, 4층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010K001179

부처명 한국연구재단

연구사업명 (국제)글로벌연구네트워크지원

연구과제명 마이크로 혈관을 내포한 3차원 압조직 제작 및 마이크로 농도구배 칩과의 결합을 통한 압
억제제 Screening 시스템의 구현

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

측면이 곡면인 마이크로웰을 복수개 포함하는 마이크로 구조물에 액상의 폴리머를 주입하여 마이크로웰에 액상의 폴리머를 채우고;

상기 액상의 폴리머의 일부를 마이크로웰로부터 제거하여 마이크로웰에 남아 있는 액상의 폴리머가 표면장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하도록 하고;

메니스커스를 형성하고 있는 액상의 폴리머를 경화시키는 것을 포함하는

반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 마이크로 구조물은 마이크로유체 칩 또는 마이크로웰 어레이 플레이트인

반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 측면이 곡면인 마이크로웰은 마이크로웰의 한 단면이 원형 또는 타원형인 것인

반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 액상의 폴리머는 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄인

반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 액상의 폴리머는 폴리디메틸실록산인

반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 액상의 폴리머의 일부는 마이크로 구조물의 상단을 판형 또는 원통형의 밀대로 누르면서 눌러 제거되는 것인

반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

마이크로웰로부터 제거되는 액상의 폴리머는 마이크로웰의 폭에 대하여 깊이 방향으로 200% 미만의 양인

반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따라 제조된 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물.

청구항 9

제8항의 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물에 세포를 포함하는 배양액을 투입하고 배양하는 것을 포함하는 세포 집합체의 형성 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 세포는 배아줄기세포이고 상기 세포 집합체는 배아체인

세포 집합체의 형성 방법.

청구항 11

제8항의 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물을 템플릿으로 이용하여 마이크로 렌즈를 제조하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법, 이에 따라 제조된 마이크로 구조물 및 이를 이용한 세포 집합체의 형성 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세포의 집합체(cell aggregation)은 일반적인 조직을 구성하는 세포나 장기를 이루는 세포, 암세포 및 줄기세포에 대한 연구에서 임상적으로 신약개발을 위해서 또는 줄기세포를 이용한 분화에 대한 연구에 매우 중요한 역할을 담당한다. 예를 들어 암세포 덩어리 (cancer spheroid)는 암세포가 전이하거나 이동하기 전 또는 암세포 덩어리로 새로운 혈관이 생성되기 위해서 필수적으로 발생되기 때문에 항암제의 개발이나 항암 후보물질을 찾는 데 중요한 연구대상이 된다. 장기를 구성하는 세포 -특히 간, 신장, 췌장 등-의 경우 일정한 형태의 단위조직으로 구성되어 있는데 이러한 단위조직을 체외에서 만들고 배양을 위한 연구는 인공장기의 개발을 위한 중요한 후보로 인식되어 최근 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 줄기세포는 스스로 분화를 하여 배아체 (embryoid body)를 형성하고 이 배아체는 다시 세 가지의 고유한 층을 형성하는데 이 고유한 층마다 다른 세포로 분화되는 성질이 다르기 때문에 배아체를 체외에서 만들 수 있는 기술이 몇몇 연구기관을 통하여 활발히 개발되고 있다. 이러한 세포의 집합체 또는 뭉침 특성은 세포마다 조금씩 다르긴 하지만 세포 외부환경이 세포간 결합력보다 상대적으로 낮을 때 나타나는 현상이다. 이러한 기본적 성질을 이용하여 여러 가지 기술들이 개발되

었는데, 스크래핑 기술(scraping techniques), 행잉드롭(hanging drop), 현탁 배양법(suspension culture methods) 등이 기존에 잘 알려진 기술들이다. 그러나, 이들 세 가지의 기술들은 각각 실험자의 수작업에 의해서 작업이 이루어지기 때문에 대량생산, 일정한 크기, 동시생산성이라는 측면에서 많은 단점을 가지고 있다. 따라서 이러한 기술적 한계를 극복하기 위하여 최근에는 마이크로 제작기술을 이용한 세포 집합체를 만드는 기술들이 개발되고 있으며, 대표적으로 원통형 마이크로 구조물에서 세포를 배양하거나, 피라미드 형태에서 제작하거나 육면체형태의 형태의 구조물에서 세포를 배양하여 세포의 집합체를 제작하였다. 하지만 일반적으로 마이크로 공정에서는 포토리소그래피(photo lithography)의 방법을 이용하여 제작하기 때문에 빛의 직진성으로 인하여 반구형의 모서리가 존재하지 않는 구조물을 제작하기가 곤란하였다. 이러한 모서리는 세포의 접합(cell adhesion)이 상당히 좋아서 세포간 뭉침도 발생하지만 모서리에 접합하는 경향이 많이 나타나서 일정한 크기의 세포 집합체를 만드는데 어려움이 있으며, 뿐만 아니라 세포 집합체가 만들어 졌다고 하더라도 이를 수거하는데 있어서 잘 떨어지지 않거나 떨어진다고 하더라도 집합체가 갈라지는 문제가 발생하였다. 반구형과 같은 마이크로 구조물을 만들기 위해서 반응성 이온 에칭(Deep reactive-ion etching)이나 ice-lithography 이나 얇은 박막을 이용한 방법(특허출원 제10-2010-0117572호) 등이 있으나 그 제작공정이 복잡하고 고비용이 소모되거나 대면적에 적용하기에 한계가 있다(Yoon Young Choi et al., Biomaterials, Volume 31, Issue 15, Pages 4296-4303, May 2010(비특허문헌1); Anthony P. Napolitano et al., BioTechniques 43:494-500, October 2007(비특허문헌2)).

선행기술문헌

비특허문헌

- [0003] (비특허문헌 0001) Yoon Young Choi et al., Biomaterials, Volume 31, Issue 15, Pages 4296-4303, May 2010
- (비특허문헌 0002) Anthony P. Napolitano et al., BioTechniques 43:494-500, October 2007

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 따라서 본 발명에서는 세포집합체의 대량 생산을 가능하게 하는 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법, 이에 따라 제조된 마이크로 구조물 및 이를 이용한 세포 집합체의 형성 방법을 제공하고자 한다. 또한, 본 발명은 상기 마이크로 구조물을 템플릿으로 이용하여 마이크로렌즈를 제조하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0005] 본 발명자들은 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로유체칩이나 마이크로웰 어레이 플레이트를 보다 손쉽게 대면적으로 제조할 수 있는 방법에 대해 거듭 연구한 결과, 액상의 폴리머를 이용하면 액상의 물질이 고유하게 가지는 표면장력에 의해 마이크로웰 내에 반구형의 마이크로구조를 형성할 수 있다는 사실에 주목하였다. 즉, 액상의 폴리머는 표면장력에 의해 마이크로웰의 측면에 메니스커스(meniscus, 표면장력에 의해 모세관과 같은 공간 내에 존재하는 액체의 표면이 만드는 곡선 또는 곡면)를 형성하게 되며, 이 액상의 폴리머를 경화시키게 되면 3차원적으로 반구형의 웰이 형성되게 된다.
- [0006] 이러한 아이디어에 근거하여, 본 발명은
- [0007] 측면이 곡면인 마이크로웰을 복수개 포함하는 마이크로 구조물에 액상의 폴리머를 주입하여 마이크로웰에 액상의 폴리머를 채우고;
- [0008] 상기 액상의 폴리머의 일부를 마이크로웰로부터 제거하여 마이크로웰에 남아 있는액상의 폴리머가 표면장력에 의해 메니스커스(meniscus)를 형성하도록 하고;
- [0009] 메니스커스를 형성하고 있는 액상의 폴리머를 경화시키는 것을 포함하는
- [0010] 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법을 제공한다.

- [0011] 이에 제한되는 것은 아니나, 이해를 돕기 위해 도 1을 예를 들어 본 발명에 따른 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물의 제조 방법에 대해 설명한다.
- [0012] 도 1은 원통형의 마이크로웰이 복수개 형성되어 있는 마이크로 구조물(1) 상에 액상의 폴리머(2)를 이용하여 반구형의 마이크로웰을 형성하는 방법에 대해 예시하고 있는 모식도이다. 도 1a는 상기 마이크로 구조물(1) 상에 액상의 폴리머(2)를 채우는 단계를, 도 1b는 상기 액상의 폴리머 중 일부를 판형의 밀대(3)를 이용하여 제거하는 단계를, 도 1c는 표면장력에 의해 메니스커스를 형성하고 있는 마이크로웰 내부의 액상의 폴리머를 경화시켜 반구형의 마이크로웰을 형성하는 단계를 보여준다.
- [0013] 본 발명에서 반구형 마이크로웰을 제조하기 위해서는 액상의 폴리머를 투입할 수 있는 마이크로웰을 복수개 포함하고 있는 마이크로 구조물이 먼저 준비되어야 한다. 마이크로웰을 복수개 포함하고 있는 마이크로 구조물은 예를 들어 마이크로유체칩 또는 마이크로웰 어레이 플레이트일 수 있다. 특히 마이크로 유체칩은 내부에 있는 유로에 동일한 유량을 공급함으로써 세포를 거의 동일하게 공급할 수 있어서 세포 집합체를 생산하는데 동일한 크기로 생산 할 수 있으며, 동시에 대량생산이 가능하게 하므로 유리하다.
- [0014] 이러한 마이크로 구조물은 직접 제조하거나 시판되고 있는 제품을 사용해도 무방하다. 기존에 공지되어 있던 마이크로 구조물들은 대부분 마이크로웰의 3차원적 형상이 원통형이거나 펠렛과 같이 마이크로웰의 하단부가 원뿔형인 경우가 많다. 이러한 공지의 마이크로 구조물들은 모서리를 갖고 있기 때문에 세포들이 부착되어 떨어져 나오기 쉽지 않은 경우가 발생한다. 본 발명에서는 이러한 공지의 마이크로 구조물을 이용하여 이들에 형성되어 있는 마이크로웰을 반구형으로 전환시키는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 액상의 폴리머가 표면장력에 의해 메니스커스를 형성하여 반구형의 마이크로웰을 형성할 수 있도록 하기 위해서는 액상의 폴리머가 주입되는 마이크로웰은 그 측면이 곡면인 것이 바람직하다. 액상의 폴리머가 주입되는 마이크로웰의 측면이 곡면이 아니더라도 반구형의 웰을 형성할 수도 있으나, 깊은 반구형의 마이크로웰을 형성하기 위해서는 마이크로웰의 측면이 곡면인 것이 바람직하다. 이에 제한되는 것은 아니나, 한 구체예에서, 측면이 곡면인 마이크로웰은 마이크로웰의 한 단면이 원형 또는 타원형일 수 있다. 한편, 본 발명에 있어서, 반구형, 원형 또는 타원형이란 기하학적으로 완벽한 반구형, 원형 또는 타원형을 의미하는 것이 아니며, 이에 가깝다고 볼 수 있는 도형까지 포함한다.
- [0016] 마이크로 구조물에 미리 형성되어 있는 마이크로웰의 밀면은 액상의 폴리머에 의해 채워지기 때문에 그 모양에 특별히 제한은 없다. 다만, 몰드로 찍어내어 마이크로 구조물을 제작하는 경우 마이크로웰의 밀면은 원통형 또는 원뿔형 형태일 수 있다. 다만 마이크로웰의 밀면에 모서리가 있는 경우 이러한 모서리는 액상의 폴리머로 모두 채워져 있는 것이 바람직하다. 액상의 폴리머 중 일부를 제거하는 과정에서도 액상의 폴리머가 마이크로웰의 밀면의 모서리를 충분히 채울 수 있도록 적당량을 남겨두는 것이 바람직하다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 액상의 폴리머의 종류는 특별히 제한되지 않는다. 표면장력에 의해 마이크로웰 내에 메니스커스를 형성할 수 있으며, 열 또는 UV 등에 의해 경화될 수 있는 것이면 어떠한 것이든 사용할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 한 구체예에서, 상기 액상의 폴리머는 실리콘 폴리머, 폴리부타디엔, 폴리이소부틸렌 또는 폴리우레탄일 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 액상의 폴리머는 폴리디메틸실록산(Polydimethylsiloxane, PDMS)일 수 있다. 본 발명에서 사용되는 액상의 폴리머는 폴리머가 주입되는 마이크로웰과 동종 또는 이종의 물질일 수 있다. 액상의 폴리머와 마이크로웰을 구성하고 있는 물질이 동종일 경우 접촉각으로 인해 메니스커스의 형성에 보다 유리할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 PDMS 마이크로웰에 액상의 PDMS를 주입하여 반구형 마이크로웰을 제조하는 방법을 설명한다.
- [0018] 한편, 마이크로웰 내에 채워진 액상의 폴리머의 일부는 메니스커스의 형성을 위해 적절한 양으로 마이크로웰 내에 남겨지는 것이 바람직하다. 처음부터 메니스커스의 형성을 위해 적절한 양으로 마이크로웰 내에 주입되도록 조절하는 방법도 예상할 수 있다. 그러나, 일정한 크기의 마이크로웰의 제조를 위해서는 마이크로 구조물 내의 마이크로웰을 액상의 폴리머로 전체적으로 채운 후 일부를 제거해 내는 것이 보다 용이하다.
- [0019] 액상의 폴리머 중 일부를 제거하는 방법은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 마이크로 구조물의 상단을 판형 또는 원통형의 밀대로 누르면서 눌러 액상의 폴리머를 마이크로웰로부터 제거할 수 있다. 이러한 방법을 적용하기 위해서는 상기 마이크로 구조물은 탄성 물질로 제조된 것이 바람직할 것이다. 액상의 폴리머로 사용될 수 있는 물질들은 대부분 탄성 물질로서, 마이크로 구조물 역시 액상의 폴리머와 동일한 물질로 제조하여 사용할 수 있다.
- [0020] 제거 후 마이크로웰 내에 남아있는 액상의 폴리머는 마이크로웰 내에 메니스커스를 형성할 수 있을 정도로 남아

있어야 하며 동시에 세포를 배양할 수 있는 공간을 충분히 제공할 수 있도록 마이크로웰 내에 부피를 많이 차지 해서도 안된다. 이에 제한되는 것은 아니나, 한 구체예에서, 마이크로웰에서 제거해야 하는 액상의 폴리머는 마이크로웰 폭에 대하여 깊이 방향으로 200% 미만의 양, 예컨대, 150% 미만, 100% 미만, 80% 미만, 20% 이상 70% 미만의 양일 수 있다. 마이크로웰의 폭에 대하여 깊이가 매우 깊을 경우에는 폭에 대하여 깊이 방향으로 200% 이상의 양을 제거하는 것도 필요하다. 따라서 제거되는 액상의 폴리머의 양은 마이크로웰의 폭과 깊이의 비율에 따라서 적절히 조절할 수 있다.

[0021] 한편, 액상의 폴리머를 경화시키는 방법은 액상의 폴리머의 종류에 따라 달라질 수 있을 것이다. 액상의 폴리머는 열 또는 UV에 의해 경화되며, 경화 전 형성하고 있던 메니스커스를 그대로 유지하면서 경화됨으로써 반구형 마이크로웰의 제조를 가능하게 한다.

[0022] 본 발명은 또한 상기 제조 방법에 따라 제조된 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물을 제공한다. 상기 반구형 마이크로웰은 이에 제한되는 것은 아니나 그 너비가 200 내지 600 μm , 예컨대 300 내지 500 μm 일 수 있다. 또한, 반구형 마이크로웰의 총 깊이는 100 내지 1000 μm , 예컨대, 200 내지 900 μm , 300 내지 800 μm 일 수 있다. 제작하고자 하는 세포 집합체나 배아체의 크기에 따라 먼저 마이크로웰의 너비를 조절하고, 이에 따라 반구형 마이크로웰의 깊이를 조정할 필요가 있다. 마이크로웰의 너비 대 깊이의 비는 1:0.3 에서 1:3인 것이 세포의 생존을 높이는 데 바람직하다.

[0023] 본 발명에서 형성된 반구형 마이크로웰은 마이크로 유체칩 또는 마이크로 웰 어레이 플레이트 상에 원형, 사각형 삼각형 등의 여러 가지 형태로 배열될 수 있으며(웰 모양은 제한되지 않음), Dw(마이크로웰의 지름), Pw(마이크로웰 간 거리)의 비율이 1:1 보다 크면 마이크로웰 간 붙지 않기 때문에 제작이 가능하다[도 4 참조].

[0024] 또한, 본 발명은 상기 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물에 세포를 포함하는 배양액을 투입하고 배양하는 것을 포함하는 세포 집합체의 형성 방법을 제공한다. 본 발명에 따라 제조된 마이크로 구조물을 이용하여 제조되는 세포 집합체의 종류는 특별히 한정되지 않는다. 한 구체예에서, 상기 마이크로 구조물에 도입되는 세포는 배아줄기세포이고, 상기 세포 집합체는 배아체일 수 있다.

[0025] 상기 세포 투입 시 마이크로웰의 형태가 도 7(b)에서와 같이 슬로프를 포함하고 있어 세포는 중력에 의해서 마이크로웰 안으로 떨어지게 되며, 이러한 슬로프 외에 도 7(c)와 같이 제작도 가능하다.

[0026] 본 발명은 또한 상기 마이크로 구조물을 템플릿으로 이용하여 마이크로 렌즈를 제조하는 방법을 제공한다. 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물은 마이크로 렌즈를 제조하기 위한 템플릿으로 이용될 수 있다. 도 11에서 보는 바와 같이 마이크로 반구형(concave) 몰드에 그 위에 anti-adhesion 코팅을 하고 이 위에 투명한 액상의 폴리머를 채우고 이를 경화시킨 후에 떼어내면 마이크로 크기의 렌즈의 대량생산이 가능하다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따르면 단순한 메니스커스 효과를 이용하여 값싸고 적은 노동력으로 균일한 크기의 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 구조물을 대면적으로 제조할 수 있다. 따라서 매우 간단하고 신속하게 반구형 마이크로웰을 형성할 수 있어 이를 이용하여 세포 집합체의 생산, 마이크로 렌즈의 생산 등에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 원통형의 마이크로웰이 복수개 형성되어 있는 마이크로 구조물 상에 액상의 폴리머를 이용하여 반구형의 마이크로웰을 형성하는 방법에 대해 예시하고 있는 모식도이다.

도 2는 도 1에 예시한 방법에 의해 형성된 반구형 마이크로웰이 형성된 마이크로웰 어레이 플레이트의 사진을 보여준다.

도 3은 반구형 마이크로웰이 형성된 PDMS 마이크로웰 어레이 플레이트의 단면을 보여주는 주사현미경 사진을 보여준다.

도 4는 반구형 마이크로웰이 형성된 마이크로웰 어레이 플레이트의 배열 형태를 일례로 나타낸 것이다.

도 5는 반구형의 마이크로웰을 포함하는 마이크로유체 칩의 제조 방법에 대해 예시하고 있는 모식도이다.

도 6는 도 5에 예시한 방법에 의해 형성된 반구형 마이크로웰이 형성된 마이크로유체 칩의 사진을 보여준다.

도 7은 도 5에 예시한 마이크로웰을 포함하는 마이크로유체 칩을 제작하기 위하여 사용되는 베이스 몰드의 형태를 나타낸다.

도 8은 형성된 반구형 마이크로웰에 세포를 중력에 의해서 가두는 것을 나타내는 모식도이다.

도 9는 반구형 마이크로웰을 포함하는 마이크로 유체칩에서 배아체가 형성되는 것의 시간에 따른 모습(a-c)과 이를 수확(d)하고 모아둔(e) 사진이다.

도 10은 생(녹색)/사(붉은색) 시험 키트로 염색된 배아체를 보여준다.

도 11은 마이크로 렌즈를 제작하기 위한 과정을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0030] [실시예]

[0031] 실시예 1: 반구형 마이크로웰을 포함하는 PDMS 마이크로웰 어레이 플레이트의 제조

[0032] 대면적의 반구형 마이크로웰이 어레이된 PDMS 플레이트를 PDMS 프리폴리머의 표면장력에 의해 유도된 메니스커스를 이용하여 제작하였다. 우선, SU-8 (MicroChem, MA, USA) 마스터 몰드의 레플리케이션에 의해 마이크로웰이 어레이된 PDMS 플레이트 (베이스-플레이트)를 통상적인 소프트 리소그래피를 통해 제작하였다. 베이스-플레이트는 원통형의 마이크로웰(도 1 참조)을 갖고 있으며, 이 내에 오목한 웰이 형성될 것이다. 베이스-플레이트 상에 반구형 마이크로웰을 제작하기 위해, PDMS 프리폴리머(액상의 폴리머를 지칭함)(10 : 1 실리콘 엘라스토머 (Sylgard 184)와 경화제의 혼합물)를 모든 원통형 마이크로웰에 다 채워질 때까지 베이스 플레이트 상에 부었다(도 1a). 두껍고 딱딱한 플레이트(참고. 유리 플레이트, 두께 $\approx$ 1)를 이용하여 베이스-플레이트의 유연한 윗부분을 가볍게 눌러 마이크로웰의 폭의 50% 정도 되도록 PDMS 프리폴리머를 굽어내었다(도 1b). 원통형 마이크로웰 내에 남아있는 프리폴리머는 표면장력으로 인하여 마이크로웰 내에 메니스커스를 생성하였으며 오목한 모양을 구성하였다. 굽어내는 공정은 대면적이고 많은 수의 PDMS 플레이트 상에 균질한 반구형 마이크로웰을 빠르고 쉽게 제작하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 메니스커스에 의해 자기 조직된 오목한 구조는 열로 경화되었고(80 $^{\circ}$ C, 1시간), 다수의 오목한 웰이 PDMS 베이스-플레이트 상에 제조되었다(도 1c). 각각 300, 500, 및 700 μ m의 폭을 갖는 3종류의 반구형 마이크로웰이 배아체 형성을 위해 사용되었다(도 2). 도 3은 반구형 마이크로웰이 형성된 PDMS 마이크로웰 어레이 플레이트의 단면을 보여주는 주사현미경 사진을 보여준다. 도 3에서, 흰색 삼각형은 마이크로웰 어레이 플레이트에 미리 형성되어 있던 마이크로웰의 흔적을 나타낸다(가장 우측 구조물에서 흰색 점선으로 지시한 부분이다).

[0033] 실시예 2: 반구형 마이크로웰을 포함하는 PDMS 마이크로유체칩의 제조

[0034] 반구형 마이크로웰을 PDMS 프리폴리머의 표면 장력에 의해 유도된 메니스커스(모세관 속의 액체 표면이 만드는 곡선)를 통해 제조하였다. 우선, SU-8 (MicroChem, MA, USA) 마스터 몰드의 복제에 의해 PDMS 미세유체 채널(베이스-채널)을 통상적인 소프트 리소그래피를 통해 제작하였다. 베이스-채널은 오목한 웰이 제작될 수 있는 오각형의 챔버로 이루어져 있다. 복제된 PDMS 채널이 형성된 면을 PDMS 막(두께: $\approx$ 1mm)으로 커버하여 메니스커스를 형성하였다. 채널 내에 반구형 마이크로웰을 제작하기 위하여, 모든 오각형 챔버가 가득찰 때까지 PDMS 프리폴리머(10 : 1실리콘 엘라스토머 (Sylgard 184) 및 경화제)를 베이스채널 내에 도입하였다(도 5a). 원통형 바를

이용하여 베이스 채널 또는 PDMS 막의 한 면을 누르고, 3-5회 롤링함으로써, 프리폴리머를 베이스 채널로부터 배출시키고 석션에 의해 제거하였다(진공압 20kPa) (도 5(b)의 좌측). 오각형 챔버 내에 남아 있는 프리폴리머는 표면 장력으로 인해 마이크로채널 내부에 메니스커스를 생성하며, 오목한 구조를 형성하였다(도 5(c)). 누르고 롤링하는 공정은 매우 중요한데, 이 공정이 없으면 오각형 챔버 내의 프리폴리머가 배출구에서 석션에 의해 제거되지 않기 때문이다. 누르고 롤링하는 공정의 상세 내용은 도 5(b)의 우측에서 볼 수 있다. 여기서, 누르고 롤링하는 방법뿐만 아니라 단단한 평판 등으로 형성된 마이크로 채널의 입구쪽에서 누르고 석션되는 방향으로 밀어서 제거할 수 도 있다. 메니스커스에 의해 자발적으로 조직된 오목한 구조를 열로 경화시켰다(80℃, 2시간)[도 5(d)]. 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 많은 수의 오목한 웰이 미세유체 채널 내부에 제작되었다. 웰의 크기와 깊이는 오각형 챔버의 모양에 의해 결정되었다. 300, 500, 및 700 μm 의 깊이를 갖는 3가지 타입의 오각형 챔버가 배아체 크기를 형성하기 위해 사용되었다.

[0035] 도 6(a)는 총 400 개의 오목한 웰(폭: 700 μm)을 갖는 제작된 배아체 형성 칩을 도시한 것이다. 상기 칩의 크기는 24mm x 48mm이고, 두께는 5 mm이며, 이는 슬라이드 글라스의 크기와 비슷한 정도의 크기이다. 모든 칩에서 (오각형 챔버의 폭: 300, 500 및 700 μm), 오목한 구조는 누르고 롤링하는 공정만에 의해 성공적으로 자발적으로 조직되었다. 도 6(b)의 SEM 이미지는 오목한 웰의 매끈한 바닥을 보여주며, 안쪽면 또한 매끈하게 형성된 것을 보여준다. 이러한 모든 결과는 다수 개의 깊고 오목한 웰이 미세유체 채널 내에 재생산 가능하게 제작됨을 보여준다.

[0036] <실험예>

[0037] 실험예 1: 미세유체칩 내에서의 배아체의 발생

[0038] 이 실험에서 사용된 R1 배아줄기세포주(American Type Culture Collection, Manassas, VA)는 Dr. Rudolph Jaenisch (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA)에 의해 확립된 J1 배아줄기세포주의 서브 세포주를 사용하였다. 세포들을 오목한 웰 중에 씨딩하기 위하여, 세포 현탁액을 6.0, 9.0, 및 12.0 $\times 10^6$ cells/ml의 밀도로 만들고 주입 포트를 통해 도입하였다(도 7(a)). 각각의 오목한 웰 내에 세포들의 균일한 농도를 위하여, T-정선 마이크로채널이 도입되었다. 각 농도의 200 μl 의 배아줄기세포 현탁액이 주입 포트를 통해 미세유체 채널 내로 주입되었다. 세포를 채운 후, 미세유체칩을 수직으로 37℃ 인큐베이터에 30분 동안 놓아 두어 중력에 의해서 세포들이 반구형 마이크로웰 내에 가라앉을 수 있도록 하였다(도 8). 반구형 마이크로웰 내의 세포 응집의 모식도는 도 8에 나타내었다. 도 9는 중력으로 인해 반구형 마이크로웰의 바닥에 가워진 세포들과 균일한 크기와 모양을 갖는 반구형의 배아체의 후속적인 형성을 보여준다.

[0039] 도 9(a)는 씨딩 후의 오목한 웰 내의 배아줄기 세포를 보여준다. 균일한 수의 세포들이 각각의 오목한 웰 내에 가라앉아 있다. 씨딩 후 1일째에, 배아줄기세포들은 자기응집하여 웰의 오목한 표면 상에 구형태로 응집되었고(도 9(b)), 배아체가 3일째에 안정적으로 형성되었다(도 9(c)).

[0040] 세포 생존율 시험을 위해, 2 mL의 칼세인 AM 용액을 함유하는 5 mL의 인산 완충 식염수(PBS)과 10 mL의 에티뮴 호모다이어-1 용액을 마이크로 채널에 가한 후 37 °C의 5% CO₂ 인큐베이터에서 40 분 동안 인큐베이션하였다. 염색된 배아줄기세포를 inverted fluorescence microscope (EVOS, AMG, USA)을 이용하여 분석하였다. 칼세인 Calcein AM은 녹색 형광을 가지며 살아있는 세포를 나타내는 반면, 에티뮴 호모 다이머-1은 적색 형광을 가지며 죽은 세포를 나타낸다. 배아줄기 세포의 생존율은 Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)를 이용하여 계산하였다. 생존율 시험 결과는 배아체를 형성한 배아줄기세포의 95% 이상이 생존해 있음을 보여준다(도 9(c)).

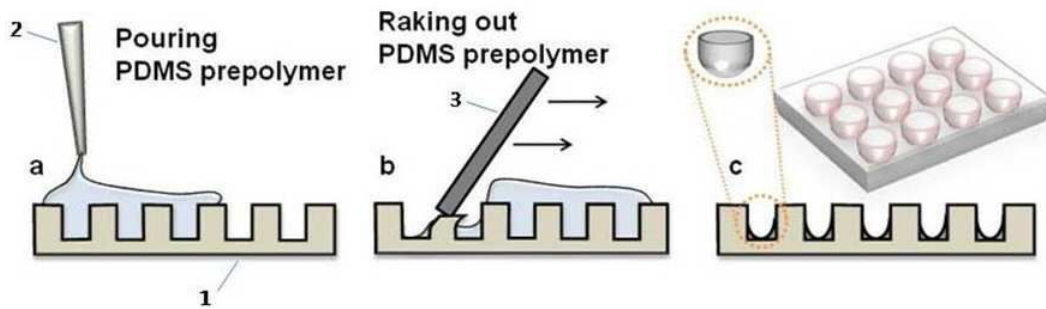
[0041] 배아체는 3일간의 배양 후 오목한 웰로부터 수확되었다. 칩 윗부분을 뒤집고 손가락으로 몇 초간 가볍게 두드림으로써, 모든 배아체들을 오목한 웰로부터 분리하고 채널을 통해 흐르는 배지들을 따라 배출시켰다. 도 9(d)는 채널을 통해 흐르는 떨어진 배아체들을 보여준다. 이 과정을 통하여 대부분의 배아체를 수확될 수 있었다. 도 9(e)는 수확된 배아체의 균일한 크기를 보여준다. 도 9(e)의 삽도는 많은 수의 배아체가 하나의 미세유체칩에서 생성되었음을 보여준다.

[0042] 수확된 배아체의 생존율을 시험하였다. 도 10(a)는 생(녹색)/사(붉은색) 시험 키트로 염색된 배아체를 보여준다. 배아체의 형광 이미지의 대부분은 녹색 형광을 나타내어 생존율이 우수함을 보여준다. 수확된 배아체

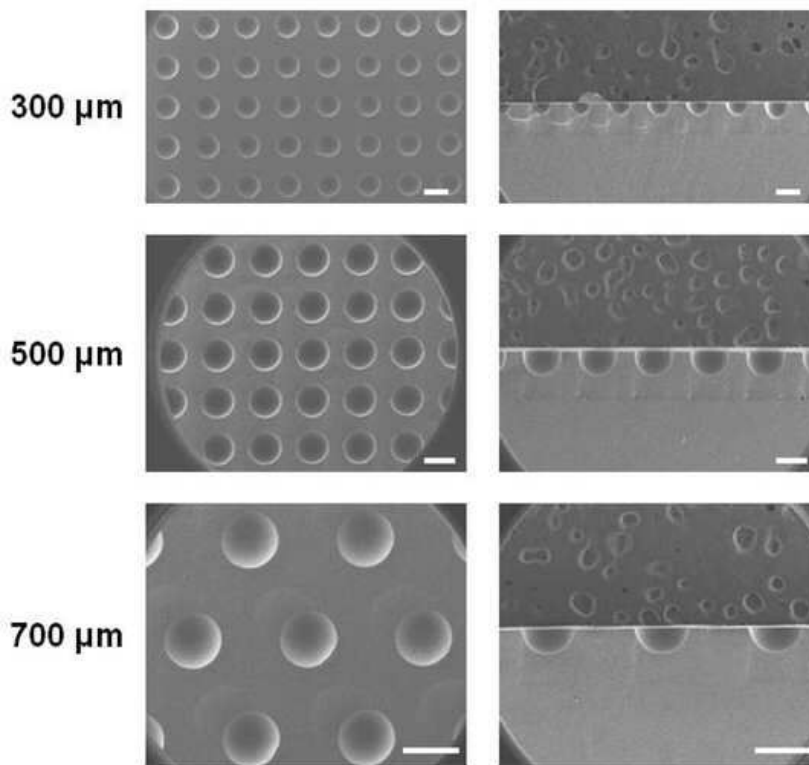
의 생존율은 95% 이상으로, 오목한 웰 내에서의 배아체의 생존율과 유사하였다. 이는 배아체가 수확 공정 동안 손상되지 않았음을 의미한다. 수확된 배아체들은 단분산되었으며, 300, 500 및 700 μm 웰 내에서 형성된 대부분의 배아체들에서 크기의 오차는 10% 미만이었다. 배아체의 크기는 웰 크기 및 세포 밀도에 의해 변동가능하였다(도 10(b)). 배아체의 크기는 그들이 동일한 크기의 오목한 웰 내에서 형성되었더라도 세포 밀도(6.0×10^6 , 9.0×10^6 , and 12.0×10^6 cells/ml)에 따라 민감하게 변화하였다. 특히, 300 및 500 μm 의 오목한 웰 내에서, 배아체의 크기는 세포 밀도와 선형적인 연관성을 나타내었다.

도면

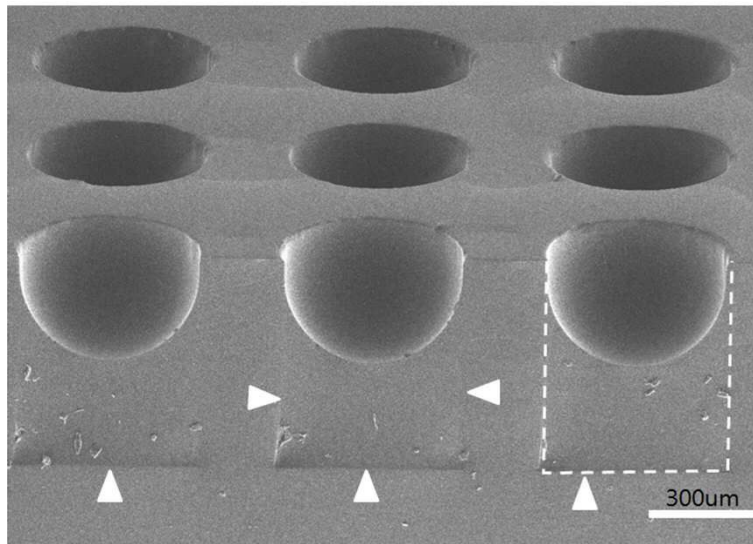
도면1



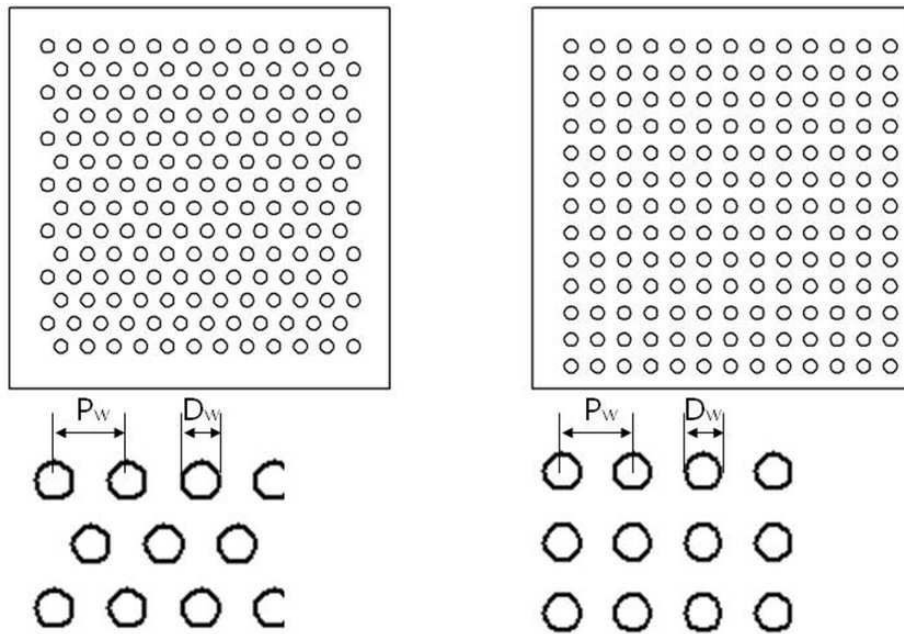
도면2



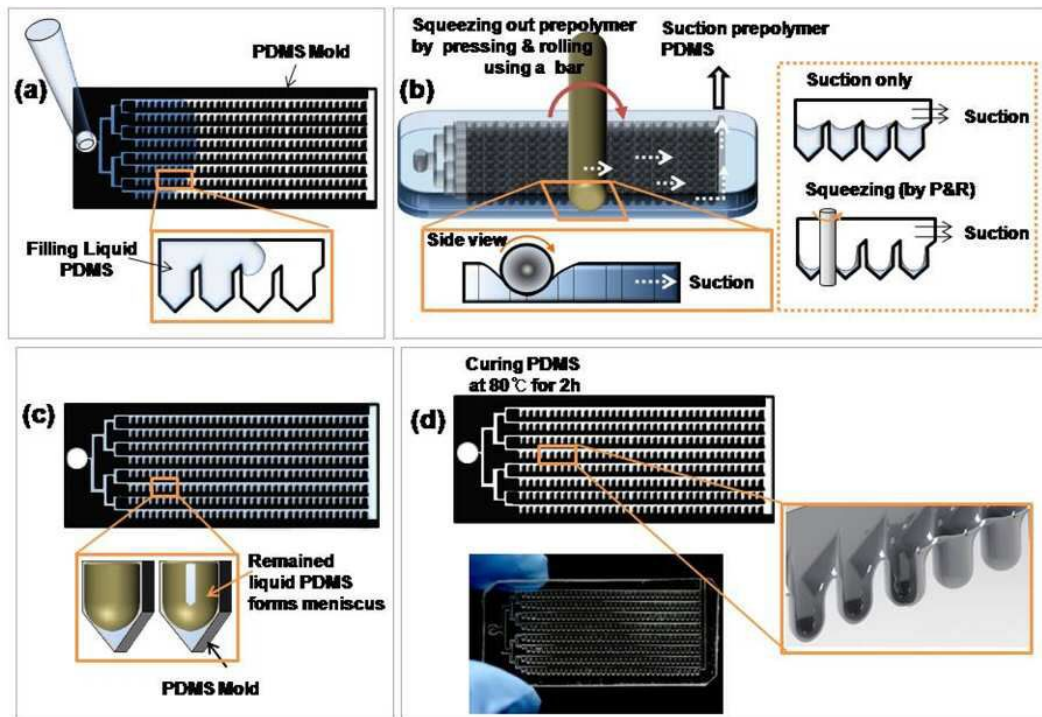
도면3



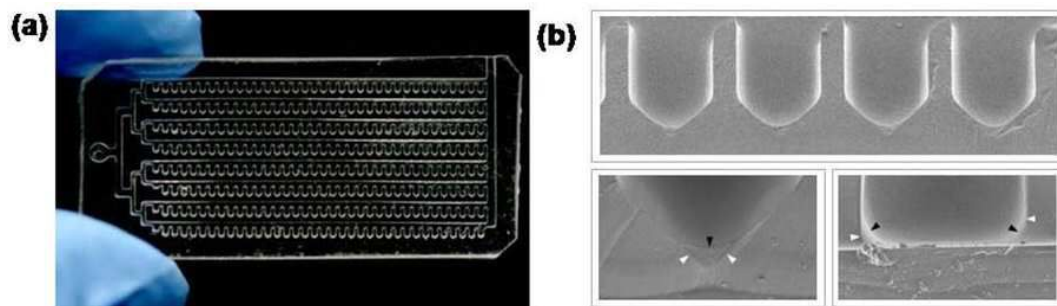
도면4



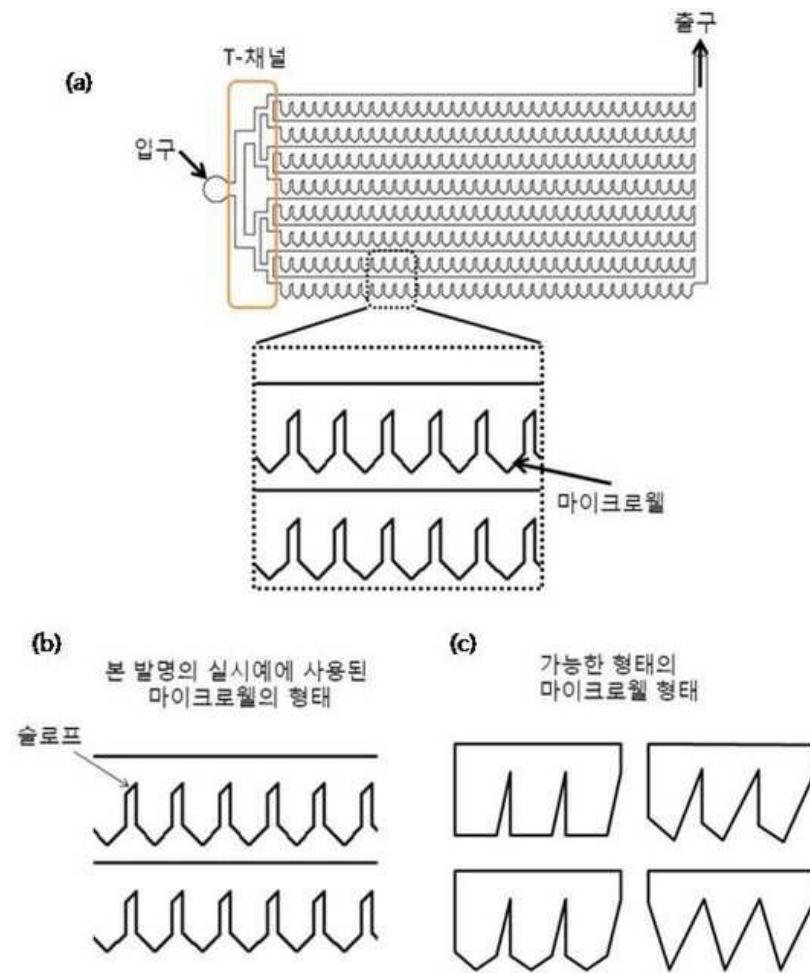
도면5



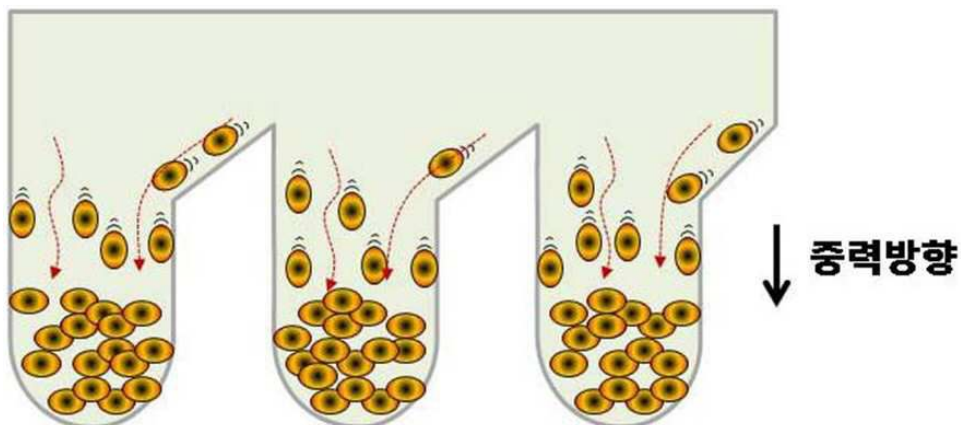
도면6



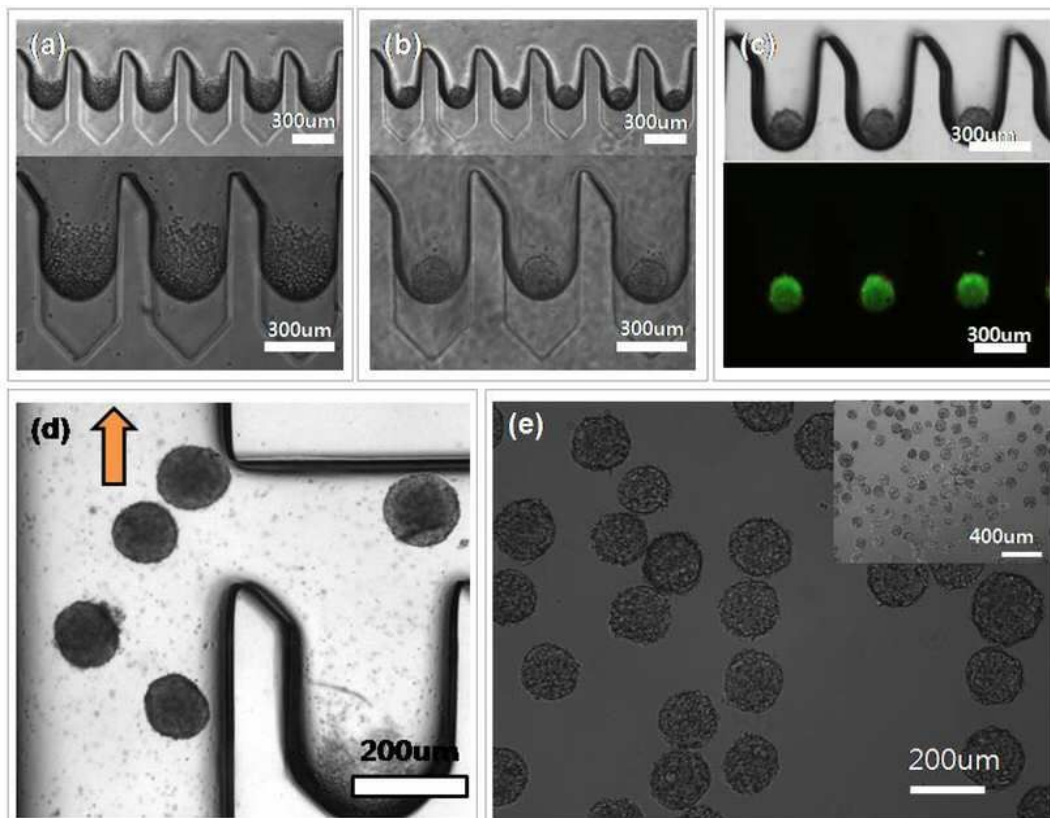
도면7



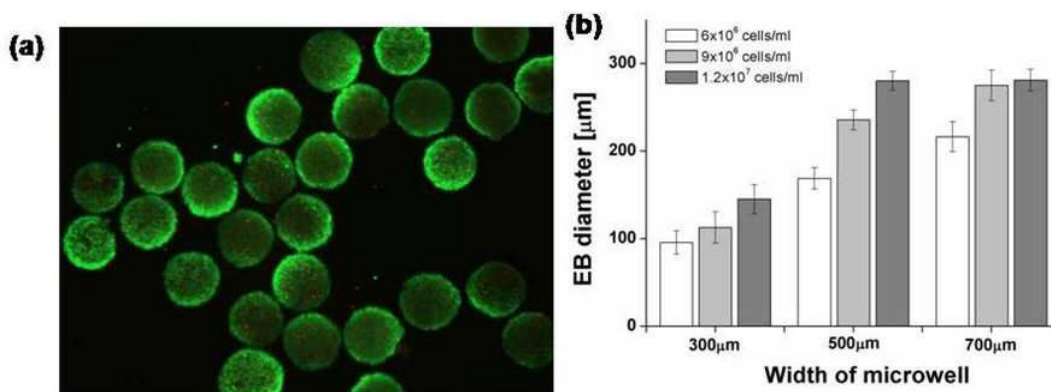
도면8



도면9



도면10



도면11

