

## Anodic Aluminum Oxide(AAO) template와 나노임프린팅 방법을 이용한 세포배양용 나노패턴 제작 및 응용

신예숙<sup>1,2</sup>, 신경<sup>2</sup>, 이규백<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 의과대학 의공학교실

<sup>2</sup>고려대학교 한국인공장기센터

(kblee@kumc.or.kr\*)

## Fabrication of Nanopatterned Substrates for Cell Culture using Anodic Alumina (AAO) Template and Nanoimprinting

Y.S. Shin<sup>1,2</sup>, K. Sun<sup>2</sup>, K.B. Lee<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, <sup>2</sup>College of Medicine, Korea University, Korea Artificial Organ Center

(kblee@kumc.or.kr\*)

### 서론

세포와 기질(substratum) 또는 세포와 세포간의 상호작용과 같은 메커니즘을 밝혀내는 것은 조직공학을 포함한 생물학적 연구에 있어 핵심적인 부분이라 할 수 있다. 대부분의 세포들은 정상적인 성장과정에서 지지체에 붙어서 자라는 표면부착 의존성(anchorage dependency)을 보이므로<sup>[1]</sup>, 어떠한 형태의 표면을 구현하느냐에 따라 다양한 세포의 반응을 관찰할 수 있다. 마이크로미터 또는 나노미터 단위로 조절된 표면을 구현하는 방법으로는 자기조립단일막(SAM)을 이용한 표면처리를 비롯하여, 마이크로컨택트 프린팅(micro contact printing), 전자빔 리소그래피(E-beam lithography), 레이저 빔 리소그래피(holographic lithography), 전기방사기술(electrospinning)과 같은 방법 등이 있다. 그러나 자기조립단일막이나 마이크로컨택트 프린팅, 전기방사기술 등의 경우 패턴의 크기가 마이크로미터 단위이거나 패턴이 불균일하게 형성되는 단점을 지니고 있고, 나노패턴의 형성을 가장 정교하게 할 수 있는 전자빔 리소그래피(E-beam lithography)의 경우, 매우 고가의 비용이 요구된다. 본 연구에서는 위의 단점들을 보완하기 위하여 알루미늄을 이용한 양극 산화막 (Anodized Aluminum Oxide)으로 제작된 스탬프를 폴리스티렌 평판 위에 임프린트하여 패턴을 형성하는 방법을 이용했다. AAO는 제작하고자 하는 패턴의 종류에 따라 기공의 직경, 기공의 깊이 그리고 기공중심과 기공중심 간의 거리를 손쉽게 조절할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 나노패턴을 만드는 대표적 방법인 전자빔 리소그래피 방법과 비교해 보았을 때, 나노패턴의 정렬 정도는 다소 떨어지지만 패턴전사(pattern transfer)용 스탬프를 쉽고 빠르게 적은 비용으로 제작할 수 있다.<sup>[2]</sup> 세포배양이 가능한

대면적의 나노패턴을 저렴한 가격으로 제작하는 것은 통계적 처리가 필요한 생물학적 메커니즘, 특히 나노구조에 대한 세포의 반응을 연구하는 데 있어 필수 불가결하다. 본 연구에서는 3가지 종류의 산 용액(황산, 옥살산, 인산)을 이용하여 나노구조의 피치(pitch)가 다른 AAO 스탬프를 개발한 후, 습식 식각 과정을 통해 AAO 스탬프의 기공크기를 조절함으로써 구성요소의 크기가 조절된 나노패턴을 제작하고자 하였다.

### 실험

패턴 제작은 알루미늄을 양극산화하여 제작된 AAO 스탬프를 이용하여 폴리스티렌 평판 (PS, Good fellow, UK) 위에 임프린트하는 방법으로 수행하였다. 스탬프는 순도 99.999 % (Good fellow, UK)의 알루미늄을 3가지 종류의 산 용액에서 두 단계의 양극산화를<sup>[3]</sup> 진행하여 제작하였다. 양극산화는 각각 황산 20V, 0°C, 옥살산 40V, 15°C, 인산 193V, 0°C에서 수행하였다. 기공크기의 조절은 5wt% 인산 용액을 사용하여 황산, 옥살산, 인산에서 제작된 AAO를 15분, 25분, 2시간 30분 동안 각각 습식 식각하여 수행하였다. 또한 제작된 AAO 스탬프를 PS에 임프린트하는 과정에서 일어날 수 있는 늘어붙음 현상을 방지하기 위해 AAO 스탬프 표면에 자기조립단일막 (SAM) 형성을 유도하였으며, 황산으로 10분간 세척한 뒤 HDFS (hepatadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl-trichlorosilane, Gelest Inc, USA)로 5분간 처리 후 최종적으로 HFE 7100 (3M, USA)용액으로 세척하여 형성시켰다. 최종적으로 형성된 고분자 나노패턴은 온도와 압력을 이용하여 AAO 스탬프를 PS 위에 hot embossing 함으로써 제작하였다.<sup>[4]</sup> 패턴이 전사된 두께 1mm의 폴리스티렌 평판은 증류수로 초음파 세척을 한 후 사용하였으며 제작된 3가지 종류의 AAO 스탬프 (35 nm, 80 nm, 200 nm)와 임프린팅 결과는 주사전자현미경 (Hitachi 4700, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

### 결과 및 토론

Fig. 1은 전해질 종류(황산, 옥살산, 인산) 별로 제작된 임프린팅용 AAO 스탬프의 나노패턴을 보여주는 주사전자현미경 사진이며 각각의 실험 조건에 따른 결과는 Table 1에 나타내었다. 전해질의 종류와 습식 식각 처리 시간에 따라 나노패턴의 기공크기가 조절됨을 확인할 수 있었으며 제작된 나노패턴의 종류와 기공의 크기는 식각 시간에 따라 35 ~ 200 nm의 크기를 갖고 있었다. Fig. 2는 제작된 나노패턴을 PS위에 전사한 후 형성된 표면의 주사전자현미경 사진으로서 각각 다른 모양의 AAO 나노패턴이 PS 표면 위에 잘 전사되었음을 확인할 수 있었으며, 패턴의 구성요소 중심 간 거리는 황산 65 nm, 옥살산 110 nm, 인산 500 nm로 관찰되었다.

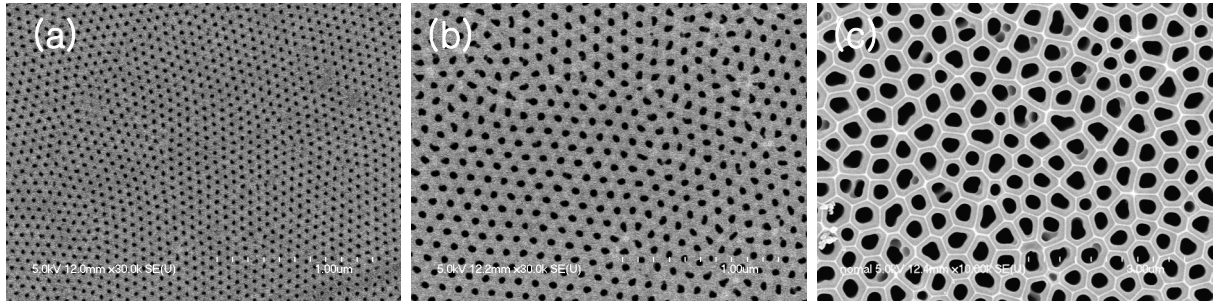


Figure 1. 제작된 AAO 스탬프의 나노패턴 이미지. (a) 황산에서 양극산화 후 15분간 습식식각, (b) 옥살산에서 양극산화 후 25분간 습식식각, (c) 인산에서 양극산화 후 150분간 습식식각

Table 1. 전해질 종류별 습식 식각 처리 시간

제작된 샘플	양극산화 조건			Wet Etching		
	전해질	전압	온도	Etching시간	기공크기	기공간거리
AAO-S-15	0.3M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25 V	0 °C	15min	35nm	65nm
AAO-O-25	0.3M H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	40V	15 °C	25min	70nm	110nm
AAO-P-150	0.1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	193V	0 °C	150min	200nm	500nm

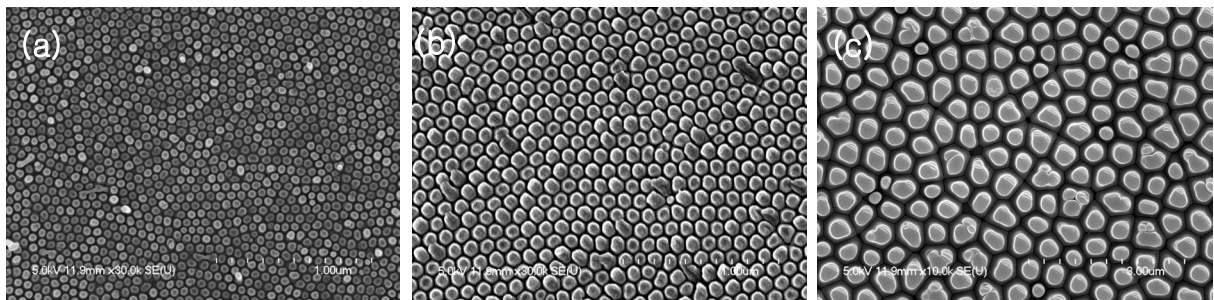


Fig 2. Hot embossing 방법으로 PS sheet위에 임프린트된 나노패턴 이미지. (a)스탬프 AAO-S-15로 PS평판에 임프린트된 이미지 (b)스탬프 AAO-O-25로 PS평판에 임프린트된 이미지 (c) 스탬프 AAO-P-150로 PS평판에 임프린트된 이미지

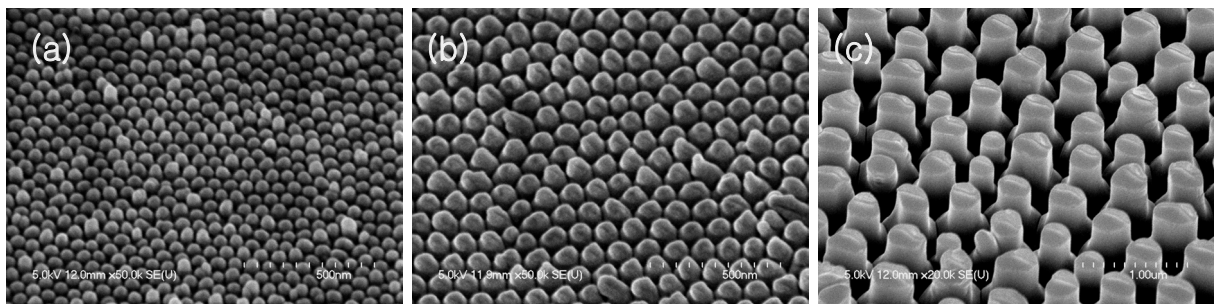


Fig 3. 45° 기울인 SEM 이미지 (a)스탬프 AAO-S-15로 PS평판에 임프린팅한 패턴의 모양 (b)스탬프 AAO-O-25로 PS평판에 임프린팅한 패턴의 모양 (c) 스탬프 AAO-P-150로 PS평판에 임프린팅한 패턴의 모양

전자현미경 상에서 위에서 본 모양은 나노패턴의 구성요소 모양과 크기만을 관찰할 수 있을 뿐 전체적인 대면적의 패턴 모양을 정확히 알 수 어렵기 때문에 45° 기울인 이미지를 획득하였으며 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 측면사진으로부터 나노패턴의 구성요소가 잘 정렬되어 있음을 확인할 수 있었으며 각 구성요소의 높이를 대략적으로 추정할 수 있었다. 특히 인산에서 양극산화 후 150 분간 습식식각한 스탬프를 이용하여 제작된 나노패턴의 경우, 패턴이 약 300~350 nm의 높이의 기둥모양임을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는, AAO 스탬프와 임프린트 방법을 이용할 경우, AAO 스탬프의 제작과 임프린트 방법의 특성으로 인하여 정렬도가 매우 높은 나노패턴을 매우 저가에 손쉽게 그리고 매우 재현성이 높게 넓은 면적으로 제작할 수 있음을 보여준다.

### 결론

광학용 장치, 금속 혹은 반도체 나노와이어를 성장시키는 도구로서 널리 사용되는 AAO template<sup>[5]</sup>를 세포배양용 지지체를 제작하는 데 이용함으로써, 저렴한 비용으로 대면적의 나노패턴을 쉽고 빠르게 대량생산하는 방법을 개발하였고, 세포의 거동 제어를 통한 조직공학 연구에 있어 많은 기여를 할 것이라 예상된다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술 진흥산업 (A05075)과 서울시 산학협력 사업 그리고 2007년 두뇌한국 21사업의 지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사 드립니다.

### 참고문헌

1. Evelyn K.F. Yim, MASc, Kam W. Leong, PhD. , "Significance of synthetic nanostructures in dictating cellular response" *Nanomedicine*. 2005 Mar ;1 (1):10-21
2. Sun-Kyu Hwang, Soo-Hwan Jeong, Hee-Young Hwang, Ok-Joo Lee and Kun-Hong Lee., "Fabrication of Highly Ordered Pore Array in Anodic Aluminum Oxide" *Korean J. Chem. Eng.*, 19(3), 467-473 (2002)
3. Masuda, H. and Fukuda, K., "Ordered Metal Nanohole Arrays Made by a Two-step Replication of Honeycomb Structures of Anodic Alumina" *Science*, **268**, 1466 (1995)
4. L Jay Guo., "Recent progress in nanoimprint technology and its applications" *JOURNAL OF PHYSICS D: APPLIED PHYSICS*.37 (2004) R123-R141
5. Routkevitch, D., Tager, A.A., Haruyama, J., Almawlawi, D., Moskovits, M. and Xu, J.M., "Nonlithographic Nano-wire Arrays: Fabrication, Physics, and Device Applications," *IEEE Trans. Electron Devices*, **43**, 1646 (1996).