

형광을 이용한 나노튜브 캔틸레버의 나노미터 급힘 범위 측정

Measurement of the deflection of a nanotube cantilever with nanometer accuracy using epi-fluorescence microscopy

*박호준, 권순근, #김수현

*H. J. Park, S. G. Kwon, #S. H. Kim(soohyun@kaist.ac.kr)
한국과학기술원 기계항공시스템학부 기계공학전공

Key words : deflection measurement, nanotube cantilever, fluorescence microscopy

1. 서론

살아있는 세포내에서 단백질들의 상호작용은 동적이므로 기존의 생체 물질 측정에서 화학적으로 세포를 고정(fixation)시키고 생체물질 간의 작용에 대한 정보를 얻는데 한계가 있다. 또한 최근 단일 생체분자가 관여하는 생물학적 프로세스에 대한 관심의 증가로 단일 생체분자를 조작할 수 있는 마이크로/나노 조작기기의 제작 기술과 함께 생체물질을 조작/변형시킴에 따라 세포 내 물질들의 반응을 감지하고 수 나노미터 정도의 생체물질의 위치변화를 측정하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.^[1] 단일 생체분자의 조작을 위해 필요한 힘의 범위는 수 피코뉴턴(pN)에서 수 나노뉴턴(nN) 정도에 이른다.

나노뉴턴 이하 크기의 힘을 측정하는데 주로 사용되는 센서는 캔틸레버(cantilever) 타입으로 마이크로머시닝 기술을 통해 제작되었다.^[2] 이러한 캔틸레버 형태의 조작기가 가하는 힘의 크기는 캔틸레버의 스프링 상수(spring constant)와 캔틸레버의 굽힘 변위의 곱으로 나타낼 수 있다. 최근 생체분자의 조작에 주로 사용된 방법은 상용의 원자힘 현미경(atomic force microscopy, AFM)에 사용되는 캔틸레버를 이용하는 것인데, 수십 pN/nm 정도의 상대적으로 큰 스프링 상수로 인해 수 pN 정도의 초미세력을 검출하는데 한계를 갖고 있다.^[3]

최근 나노 소재로 주목 받고 있는 탄소나노튜브는 나노미터 수준의 직경, 높은 종횡비 등의 뛰어난 기계적 특성을 갖기 때문에 피코뉴턴 크기의 힘을 측정할 수 있는 유용한 도구로 제시되어 왔으나,^[4] 일반적인 실험 환경(액체나 대기중)에서 굽힘 변위를 나노미터 수준까지 정밀하게 측정하는 것에 대한 어려움으로 널리 사용되지 못하고 있었다.

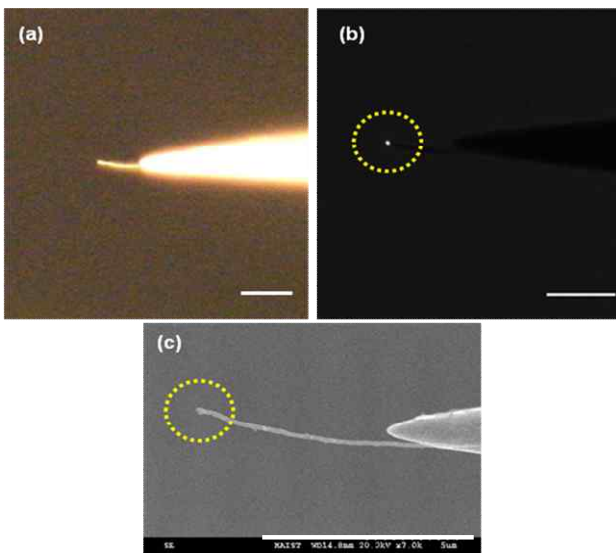


Fig. 1 (a) Optical microscope image, (b) fluorescence microscope image, and (c) SEM image of the fabricated MWNT cantilever. (scale bar : 10 μ m)

본 연구에서는 초미세력 측정을 위하여 탄소나노튜브 캔틸레버의 끝단에 형광입자를 부착시키고 동시형광법(epi-fluorescence microscopy)을 통한 형광 이미지 분석을 통해 이 형광입자의 위치변화를 통해 나노튜브의 굽힘변위를 측정하였다. 형광 측정을 통한 굽힘 변위 측정 정확도를 위해 정전용량센서(capacitive sensor)를 통한 변위와 비교하였다.

2. 나노튜브 캔틸레버의 제작

사용된 탄소나노튜브는 화학기상증착법(chemical vapor deposition method)으로 합성된 것으로 평균 130nm의 평균 직경을 갖는다. 기계적 조립 방법(manual assembly)을 이용하여 마이크로 텅스텐 탐침 위에 탄소나노튜브를 부착시키고, 200nm의 직경을 갖는 형광입자(Invitrogen社, Excitation: 495nm / Emission: 519nm)를 탄소나노튜브 팁 끝단에 부착시킨다.^[5]

Fig. 1은 본 실험에 사용된 나노튜브 캔틸레버를 나타내는 그림인데 다중벽 탄소나노튜브(multi-walled carbon nanotube, MWNT)를 마이크로 텅스텐(Tungsten) 전극에 부착시킨 형태이다.^[26 중간] Fig. 1(a)는 제작된 나노튜브 캔틸레버의 광학 현미경에 의한 이미지이고, (b)는 형광 현미경 이미지, 그리고 (c)는 전자 현미경(scanning electron microscope, SEM)을 통한 이미지를 보여주는데 노란 원 안의 형광입자를 확인할 수 있다.

3. 나노튜브 캔틸레버의 굽힘 범위 측정 시스템

Olympus社의 도립현미경(IX71)을 기본으로 구조적인 변경을 하여 Fig. 2와 같은 동시 형광 현미경 광학계를 구성하였다. 100X 대물렌즈(NA:0.9)를 장착하고, 광원으로부터 입사된 여기광으로부터 형광을 분리해내기 위해 여기/방출(Excitation/Emission) 필터와 이색거울(dichroic mirror)를 사용하였다. 광원(Mercury lamp, 100W)에서 나온 빛은 투과 파장이 470-495nm인 여기 필터(BP470-495)를 통과하여 형광물질을 여기시키고, CCD 앞쪽에는 여기광을 차단하고 형광입자로부터 나오는 순수한 형광만을 검출하기 위해 투과파장

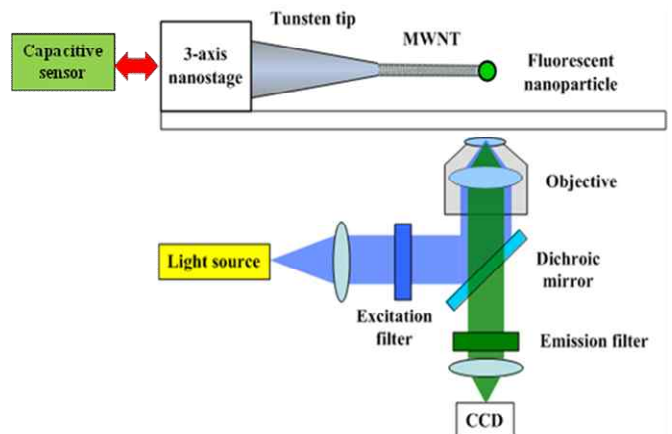


Fig. 2 Experimental setup for verification of the positional accuracy of fluorescence measurement method.

이 510-550nm 인 방출 필터(BA510-550)를 사용하였다. 그 중간에는 이색거울(DM505, high pass filter, $\lambda_{\text{cutoff}} = 505\text{nm}$)을 사용하여 여기광과 형광을 효율적으로 분리해낼 수 있게 하였다. Cooled CCD 카메라(QImaging 社, $4.65 \mu\text{m} \times 4.65 \mu\text{m}$ pixel)를 이용하여 형광 이미지를 측정하였다. 100X 의 대물렌즈를 사용한 경우 이미지 평면상에서 픽셀 하나의 크기가 46.5nm 임을 의미한다. 즉, 단순 이미징을 한 경우 본 시스템의 분해능은 46.5nm 를 넘을 수 없으므로 픽셀 이하의 분해능을 위해 형광 이미지상에서의 세기(intensity)를 피팅(fitting)하는 방법을 이용하였다.

4. 나노튜브의 굽힘 변위 측정

형광입자의 이미지 세기분포는 상평면에서 그 형광입자의 형상과 점퍼짐 함수(point spread function)의 컨볼루션(convolution)으로 주어진다. 그런데 물체의 크기가 점퍼짐 함수에 비해 작은 경우, 점광원으로 가정할 수 있고 그 물체의 이미지는 점퍼짐 함수 자체로 근사할 수 있다. 본 실험에서 사용한 형광입자는 직경이 200nm 정도로 작으므로, 형광 빛의 세기는 상평면에서 다음과 같은 가우시안 분포(Gaussian distribution)로 근사될 수 있다.^[6]

$$I(x, y) = A \cdot \exp\left[-\frac{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}{2\Gamma^2}\right] \quad (1)$$

여기서, (x_0, y_0) 는 가우시안 분포의 중심으로 형광입자의 이미지 평면상의 위치 좌표로 생각할 수 있다. A 는 형광 세기의 진폭이고, Γ 는 가우시안 분포의 폭과 관련된다. CCD 카메라를 통해 형광의 세기 정보를 얻은 후에 x, y 축 각 방향으로 각 픽셀에 감지되는 형광의 세기를 한 축에 대해 나타내면, Fig. 3 의 원모양으로 나타낸 것과 같이 가우시안 분포를 따름을 확인할 수 있다. 이렇게 얻은 1 차원 데이터를 최소자승법(least squared method)을 이용하여 식(1)과 같은 가우시안 함수로 피팅한 결과는 Fig. 3 의 실선과 같다. 연속된 형광 이미지로부터 x, y 축 각각에 대하여 이러한 피팅 과정을 반복 수행하여 매 순간 형광입자의 위치 (x_0, y_0) 를 추정한다.^[7] Fig. 4 는 가우시안 피팅을 통해 형광입자의 위치를 측정 한 결과를 정전용량센서를 이용한 측정결과와 비교한 그래프인데 측정 정확도가 약 4nm 임을 확인할 수 있고, 일반적인 탄소나노튜브의 스프링 상수 0.001N/m 를 고려하면 본 나노튜브 캔틸레버로 측정가능한 힘은 다음과 같음을 예측할 수 있다.

$$\Delta F = k \cdot \Delta x = (0.001\text{N} / \text{m})(3.92\text{nm}) \approx 4\text{pN} \quad (2)$$

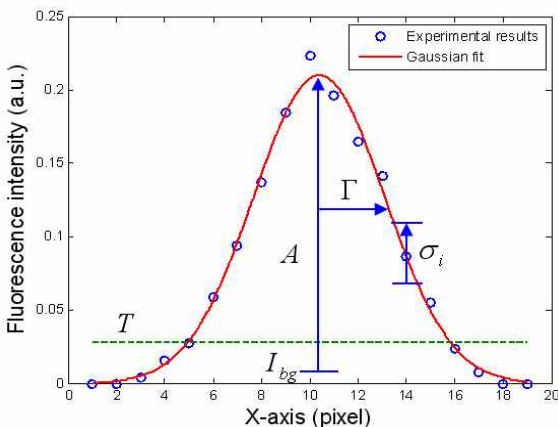


Fig. 3 Fluorescence intensity distribution of the fluorescent particle through the x-axis in the fluorescence image (circles) and its Gaussian fitting result (solid line).

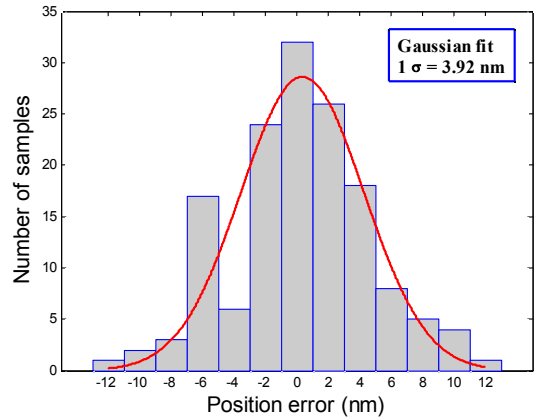


Fig. 4 Histogram of the position error compared to the capacitive sensor measurement. (with 147 samples)

5. 결론

이러한 나노튜브 캔틸레버는 대상 시료를 조작하고 이 때 발생하는 힘의 측정을 통하여 시료의 기계적 특성과 이종시료 간의 결합력 등 관련 물리량을 추출하는 힘 분광법(force spectroscopy)에 적용 가능하다. 본 실험에서 사용한 나노튜브 캔틸레버를 이용한다면 기존에 측정할 수 없었던 수 피코 뉴턴(pN) 크기의 극미세 힘의 측정이 가능하다. 따라서 본 연구에서 제시하는 나노튜브 끝단의 형광입자의 변위 측정을 통한 나노튜브 캔틸레버의 굽힘 변위 측정이 이 분야 연구에 큰 기여를 할 수 있을 것이다.

후기

이 논문은 2008 년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임. (KRF-2008-313-D00032)

참고문헌

1. T. Gutsman, G. E. Fantner, J. H. Kindt, M. Venturoni, S. Danielsen, and P. K. Hansma, "Force spectroscopy of collagen fibers to investigate their mechanical properties and structural organization," *Biophysical Journal*, **86**, 3186-3193, 2004.
2. M. B. Viani, T. E. Schaffer, A. Chand, M. Rief, H. E. Gaub, and P. K. Hansma, "Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules," *Journal of Applied Physics*, **86**, 2258-2262, 1999.
3. M. J. Saxton, and K. Jacobson, "Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics," *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **26**, 373-399, 1997.
4. F. Arai, M. Nakajima, L. Dong, and T. Fukuda, "Pico-Newton order force measurement using a calibrated carbon nanotube probe by electromechanical resonance," *Proceeding of the 2003 IEEE International Conference on Robotics & Automation*, 300-305, Taiwan, Sep. 14-19, 2003.
5. 권순근, 박효준, 이형우, 박윤근, 김수현, "생물학적 초미세력 검출을 위한 탄소나노튜브 프로브의 제작 및 기계적 특성 검출," *한국정밀공학회지*, **25**, 140-147, 2008.
6. M. K. Cheezum, W. F. Walker, and W. H. Guilford, "Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles," *Biophysical Journal*, **81**, 2378-2388, 2001.
7. H. J. Park, S. G. Kwon, and S. H. Kim, "Quantitative displacement measurement of a nanotube cantilever with nanometer accuracy using epi-fluorescence microscopy," *Review of Scientific Instrument*, accepted, 2009.