

글래스비드 정밀공급기구에 의한 바이오재료평가용 AFM프로브의 개발

권현규[#], 임 건^{*}

(^{#, *} 금오공과대학교 기전공학과)

Development of A New Micro-fabricated AFM Probe for the Measurement of Biomaterials by using the Precision Glass Bead Supply Unit

H. K. Kweon[#], J. Lin^{*}

(Received 16 June 2014; received in revised form 12 October 2014; accepted 3 December 2014)

ABSTRACT

Many different cells types have been found to be highly sensitive to mechanical force imposed by their surroundings. The cellular response to external mechanical forces has very important effects on numerous biological phenomena. In spite of its importance in biological processes, the cell adhesion force remains difficult to measure quantitatively at the cellular level. In this paper, to enhance quantitative measurements of cell adhesive interactions, a new attaching system and a method in which a glass bead can be attached to an AFM cantilever was designed and fabricated, and the degree of range displacement was controlled in the system. In an experiment, the movement of the stage in the attaching system and the attaching process were measured. The effectiveness of this system was confirmed as well in the experiment. In addition, through a commercial AFM system, the spring constant of the modified AFM probe could be measured.

Key Words : Micro-fabricated AFM cantilever, Cell adhesion, Force curve, Glass Bead, Spring Constant.

1. 서 론

세포접착(Cell adhesion)은 세포의 이동, 분화 및 성장 조절 등 많은 생물학적 과정에 필수적인 요소이며, 세포접착은 광범위한 의미에서 cell-cell

및 cell-matrix 상호 작용이 모두 포함된다^{[1]-[7]}. 세포 접착 현상은 동물 세포의 기본적인 속성을 포함하여 다양한 기능을 제공하고 있다. 세포 접착의 손실은 기초적인 질환을 발생하는 원인 중 하나이다. 예를 들어, 암 전이 및 조직 장애세포 접착과 마이그레이션은 정상적인 세포 개발 및 생리학에 결정적인 프로세스이다. 세포의 표면 특성 및 형태에 대한 연구는 그러한 연구 중에서도 AFM(Atomic Force Microscopy)을 이용한 연구가 최근 많은 주목을 받고 있다. AFM은 액체에서 원자와 분자 사이

* Dept. of Mechatronics, Kumoh National Univ.

Corresponding Author :

Dept. of Mechatronics, Kumoh National Univ.

E-mail: hkkweon@kumoh.ac.kr

에 나노미터 크기의 샘플 이미지와 나노 뉴턴 힘을 측정하기 위해서는 매우 성공적인 기구이다. 일반적으로 상업용 AFM 캔티레버는 날카로운 팁을 가지고 있고 주로 원자 표면 계측 실험에 사용되고 있다. 그러나, AFM 캔티레버가 너무 작아 보통 세포접착이나 타 접촉표면 연구에는 사용상 한계가 있어 사용되지 않으나, AFM 캔티레버에 마이크로 물질을 부착(Micro-fabricated AFM probe)시켜 세포 생물학과 기타 재료의 물성에 대한 연구를 하고 있다^{[2][3]}. 그 결과, 캔티레버에 생체재료나 DNA 등 다른 재료를 붙여서 새로운 프로브형태의 캔티레버에 대한 연구는 AFM의 활용도를 확대시키는 계기가 되고 있다. 이러한 연구 과정에서 AFM 캔티레버에 생체재료를 붙일 수 있는 기구를 개발하는 것은 가장 기본적인 과정이며, 본 연구는 이러한 과정을 보다 효과적으로 실현하기 위한 정밀 기구의 설계 및 제작을 목적으로 한다. 따라서 본 논문에서는 상업용 AFM 캔티레버에 마이크로크기의 생체재료물질인 글래스비드(Glass Bead)를 붙일 수 있는 정밀 글래스비드 공급기구를 설계 제작하고, 그 기구의 기본적인 정밀위치특성과 프로브 제작 및 탄성계수검토를 확인하였다.

2. 부착기구시스템의 원리 및 구조

2.1 시스템의 동작원리

AFM 기구는 캔티레버팁과 샘플 표면 사이의 접촉력을 측정할 수 있을 뿐만 아니라 물리적인 특성과 샘플 표면의 형태도 측정할 수 있다. 그 중에서도, 수많은 단일 분자 사이의 접촉력에 관한 연구는 이미 많이 진행되었으며, 본 연구에서는 단일 분자 수준에서 세포 수준으로 세포 접착의 상호 작용 등의 정량적인 측정으로 확장하는 것이다. 그러나, 세포 수준에서 AFM 기구를 이용하여 세포 접촉력을 정량적으로 측정하기 어렵다. 왜냐하면 세포 크기가 원자보다 크기 때문이다^{[5][6]}. 구형압입에 대한 헤르츠의 접촉이론(Hertzian contact)식에 의해 세포와 캔티레버팁의 접촉 면적을 이론적으로 평가할 수 있으며, 식(1)과 같다^[8].

$$S = 2\pi R^2 \int_0^\theta \sin\theta d\theta \quad (1)$$

여기서, θ 는 접촉각이며, 접촉면적(S)은 구형 반경 R을 증가하면 할수록 커지게 된다는 것을 알 수 있다. 그러므로 접촉면적(S)을 증가시키면 접착력이 증가하므로, 이를 AFM 기구에 적용하여 세포 접착에 대한 연구범위를 확장시킬 수 있다. 여기서 세포와 캔티레버팁사이의 접촉 면적을 증가시키려면 여러 가지 방법이 있으나, 본 연구팀은 주로 바이오글래스비드를 캔티레버에 붙일 수 있는 방법과 그에 따른 생체재료의 연구에 대해 제안해 왔다^[9]. 상업용 캔티레버 팁의 크기도 이미 정해지고 있기 때문에 접촉면적을 증가할 수 있는 방법은 캔티레버 끝에 구형태의 재료를 부착하면 가능하다. 이 구형태의 재료는 마이크로비드(carboxylated polystyrene micro-bead)를 이용하였으며, 이 경우, AFM의 구조 변화에 의해 탄성계수변화가 나타나므로, 본 논문에서는 부착 후 캔티레버의 탄성계수(Spring constant)를 식(2)를 통해 평가하여^[10], 접착력 크기를 결정할 수 있도록 하였다.

$$k_{test} = k_{ref} \left(\frac{z_p - z_c}{z_c} \right) \cos^2\theta \quad (2)$$

여기서, k_{test} 는 글래스비드가 부착된 AFM 캔티레버의 탄성계수, k_{ref} 는 부착되지 않은 기준 캔티레버, z_p 는 힘구배 선도에서의 y축변위, z_c 는 힘구배곡선에서의 x축변위, θ 는 x축기울기이다.

먼저, 본 연구에서는 캔티레버에 글래스비드를 붙이기 위해, Fig.1과 같은 자동화된 글래스비드부착기구시스템을 구성하였다. 이 시스템은 글래스비드공급 기구(Glass bead supply unit), 접착제공급부(Straight stage unit), AFM 캔티레버 고정 기구(Cantilever fixing unit), 카메라 고정 기구(Camera unit)로 구성하였다. Fig.1에서 글래스비드 공급기구 및 접착제공급부는 Fig.1의 A에 표시된 부분을 나타내며, Fig.2에서 위치관계 및 동작흐름에 대해 나타내고 있다. 먼저, 글래스비드는 글래스비드공급기구의 바(Bar)에 의해 그림에서와 같이 선택적으로 한 개가 바(Bar)위에 놓여지게 된다. 그와 동시에 캔티

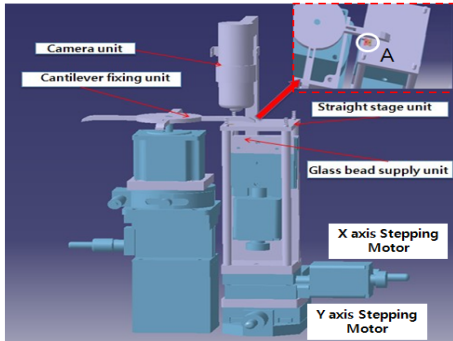
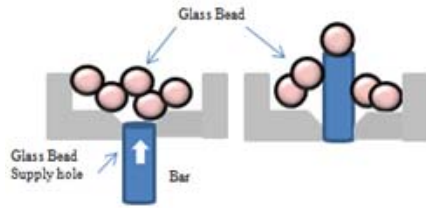


Fig. 1 Configuration of the attaching system

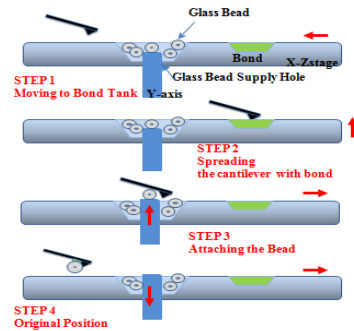
레버는 접착제 공급부의 스테이지의 이동에 의해 접착제가 캔틸레버에 흡착되게 되며, 그 후 초기 위치로 복귀하며, 동시에 바(Bar)를 캔틸레버에 위치시켜 캔틸레버에 글래스비드가 부착되게 된다.

2.2 글래스비드공급기구

캔틸레버에 글래스비드를 붙일 때 주로 바(Bar)를 사용한다. 바(Bar)는 대변위이동이 가능한 스텝모터(분해능: $1\mu\text{m}$)와 미소이동이 가능한 압전소자를 이용하여, Fig.2에서와 같이 Y축 방향으로 결합시켜, 캔틸레버에 마이크로 또는 나노 단위로 이동할 수 있도록 하였다. Fig.3(a)는 스텝모터와 압전소자로 구성된 액추에이터를 나타낸 것이며, Fig.3(b)는 Fig.3(a)를 끼워넣을 수 있는 하우징을 나타내고 있다. 여기서, 상판은 Fig.4와 같은 접착제 탱크와 글래스비드 공급홀(구멍)의 구조로 되어있다. 여기서 바(Bar)는 글래스비드가 접촉시 미소 정전기를 발생하는 특성이 있어, 알루미늄재질을 사용하여 최소화 하였으며, 직경은 글래스비드의 크기를 고려하여 $70\mu\text{m}$ 으로 설계하였다. 그리고, 이 공급기구의 X축 방향에는 접착제탱크가 있다. 카메라(Camera)는 마이크로 단위까지 볼 수 있는 전자현미경을 사용하여 주로 캔틸레버와 글래스비드가 서로 상대적인 위치를 확인하여, 바(Bar)의 움직임을 제어하기 위해 판단할 수 있게 한다. 그리고 다른 구조물도 알루미늄으로 만든 것이다. 본 연구에서 사용하는 글래스비드는 미국 THERMO SCIENTIFC사의 Soda Lime Glass Microsphere이며, 밀도 $2.4\sim 2.6\text{g}/\text{cm}^3$, 무게

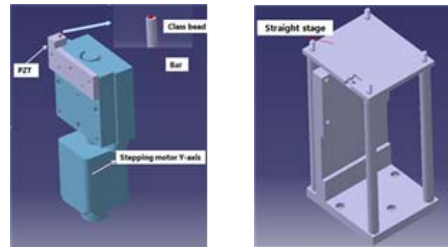


(a) Principal for selecting a Glass Bead



(b) Process for attaching the Glass Bead on the cantilever

Fig. 2 Attachment Process



(a) Actuator (b) Housing

Fig. 3 Glass Bead Supply Unit

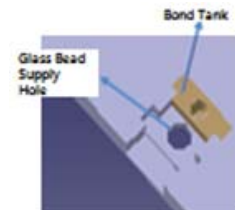


Fig. 4 Upper plate in the Actuator

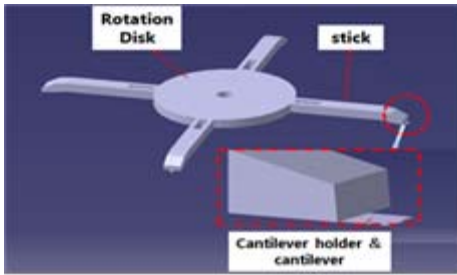


Fig. 5 Cantilever fixing unit

0.052g, 직경 $50\mu\text{m}$ 을 사용하였다. AFM 캔티레버는 팁의 반경이 최소 8nm이고 실리콘으로 제조된 것으로 공진주파수와 탄성계수는 각각 13KHZ, 0.18N/m이며, 크기는 $450\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}\times 2\mu\text{m}$ 를 사용하였다.

2.3 캔티레버고정기구

캔티레버 고정기구는 4개의 캔티레버를 고정할 수 있는 회전원판으로 구성(최소 회전 각도 1.8° , Circular stepping motor)하였다. 그리고 캔티레버가 회전원판에 비해 너무 작기 때문에 원판에 고정봉을 제작하여 사용하였다. 그러나, 4개의 캔티레버가 순차적으로 회전 스텝핑모터에 의해 공급기구 상판의 공급홀의 원점(기준점, 지정된 한점)에 위치시키는 것이 어려움이 있으며, 이러한 점을 해결하기 위해 회전시 광학현미경의 측정범위에 포함되도록 설계하였으며, 원점까지의 거리이동은 공급기구하우징의 하단부위에 위치한 XY스텝핑모터와 공급기구의 Z스텝핑모터에 의해 결정하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1 X, Y 축 이동 오차

캔티레버 고정기구의 회전판의 이동에 의해 원점이동과 캔티레버에 접촉제를 문힐 때, XY축 스텝핑모터를 사용하게 되며, 이때 특히 XY축 스텝핑모터의 이동오차는 캔티레버끝단에 접촉제를 문힐 양에 영

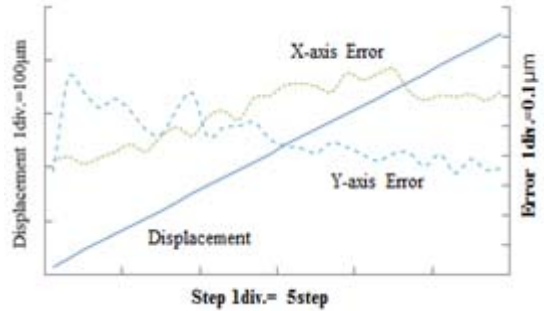


Fig. 6 X&Y-axis displacement characteristics

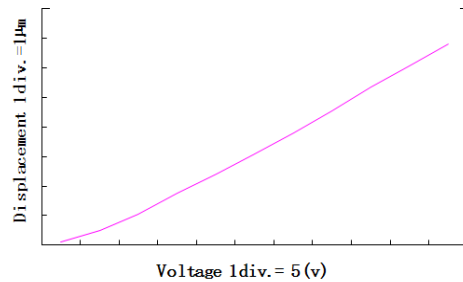


Fig. 7 PZT Displacement(Y-axis direction)

향을 미치고 있다. 그리고 Y축스텝핑 모터와 압전소자 변위특성은 수직 방향에 고정된 캔티레버에 접촉제가 있는 부분에 글래스비드를 접촉시킬 때 중요한 요소가 된다. 특히, 수직방향 이동 오차가 너무 크면 이 경우의 접촉에 있어, 캔티레버를 지나치게 밀어서 변형을 발생할 수 있다. 본 실험에서는 이러한 변위발생시의 오차에 대해 검토하였다. 변위측정은 레이저변위 센서(LC-2400A, Keyence in Japan)를 이용하여 실제 X, Y축이동시 이용되어진 이송액추에이터에 대해 반복해서 변위를 측정하였다. Fig.6과 Fig.7은 X-Y축변위에 대한 측정 결과를 나타내며, Fig.7은 글래스비드의 캔티레버 미소근접을 위해 필요한 압전소자의 변위특성을 나타낸 결과이다. 특히, Fig.6의 결과로부터, X방향 및 Y방향으로의 이동 오차는 $0.1\mu\text{m}$ 임을 확인하였다. 이러한 결과는 글래스비드의 크기에 비해 작고, 캔티레버의 크기에 비해 작기 때문에, 실험에 큰 영향을 주지 않는다는 것을 예측할 수 있었다. 또한, Y축에 구성된 미세접근을

위한 압전소자에 인가하는 전압을 증폭하기 위해 AMP(Type2635, B& K)를 사용하였으며, 오실로스코프(TDSB 3012, Tektronix)와 PC를 통하여, 측정데이터가 저장되도록 구성하였다.

3.2 캔티레버와 글래스비드의 위치결정

부착 실험 과정 중에, 가장 중요한 단계는 캔티레버와 글래스비드와의 높이를 조절할 때 서로 상대적인 위치를 확인하는 것이다. 캔티레버 고정기구와 글래스비드를 로딩(loading)할 때마다 서로 상대적인 거리는 다르다. 그래서 Z축 이동 거리는 바(Bar) 위의 글래스비드 위치와 캔티레버 위치에 따라서 그 값도 변한다. 본 실험에서는 실제 거리와 모니터상의 거리관계를 $D=L/(C \times M)$ 으로 나타낼 수 있으며, 여기서, D는 실제 거리로 캔티레버와 글래스비드사이의 거리, L은 모니터상의 측정거리, C는 현미경배율, M은 확대 계수로 모니터 화면 면적에 대한 전체 모니터 화면 면적의 비이다. 물론 이 방법은 약간 오차를 발생하지만 빠른 시간에 글래스비드와 캔티레버의 상대적인 거리를 판정할 수 있다는 장점이 있다. 이 값을 이용하여, Z축에 이동 거리 신호를 줄 수 있다. 실제 실험을 통해서 이 방법을 사용하여 Z-축이동 거리를 판정하는 데 편리하고 빠르게 할 수 있다는 것을 확인하였다. Fig.8은 실제 부착 실험 과정 중에 측정결과이다. 앞식에 따르면 모니터에 실제 측정거리(L)는 22cm, 현미경배율은 630, 확대 계수는 1로서, 실제 거리는 $349.2\mu m$ 을 얻을 수 있다. 따라서, Z축을 $350\mu m$ 이동시키면 캔티레버와 글래스비드의 높이를제어가 가능하다. Fig.9는 Z축변위 특성곡선을 나타낸 결과이며, 이 결과로부터, 5step 입력으로 이동에 필요한 $350\mu m$ 의 변위를 얻을 수 있음을 확인할 수 있다.

3.3 부착 실험 프로세스

본 실험은 캔티레버를 원판에 고정, 컴퓨터에 카메라를 연결, 그리고 접착제 탱크에 접착제투입으로부터 시작된다. 캔티레버 고정을 위한 원판은 4개의 봉으로 90도로 배치시킨 회전스텝모터의 회

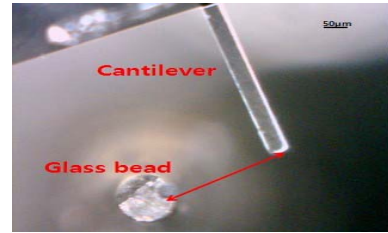


Fig. 8 Distance of Glass bead and cantilever

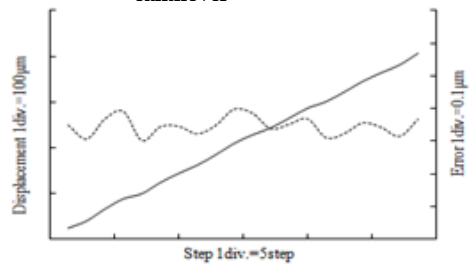


Fig. 9 Z-axis displacement characteristics

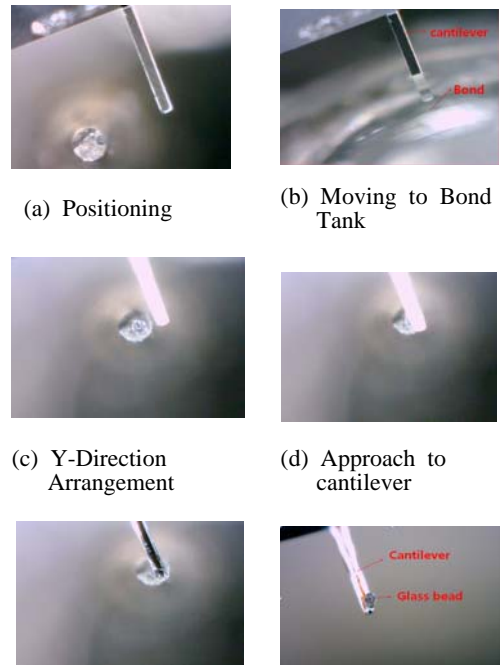


Fig. 10 The experimental process of attaching Glass bead on the cantilever

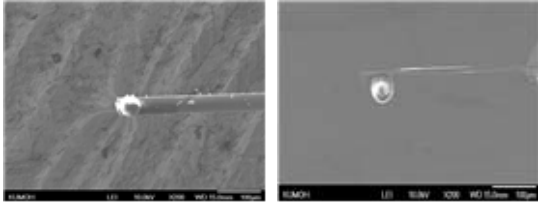


Fig. 11 Experiment results of attached Glass bead on cantilever.

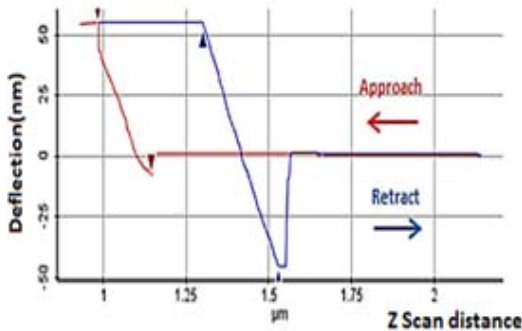


Fig. 12 Force curve of the test cantilever

전에 의해 현미경측정범위내로 들어가게 되며, 초점은 Y축의 스텝모터미세조절에 의해 이루어진다. 동시에 글래스비드 공급홀에 글래스비드가 투입되며, Y축 스텝모터에 의해 바(Bar)위에 비드가 놓여지게 된다(Fig.10(a)).

이때, 글래스비드와 캔틸레버는 Fig.8과 같이 위치하게 되며, 원점으로 설정된다.

이 후 X축의 이동에 의해, 접착제 탱크로 이동하여 접착제를 캔틸레버에 묻히게 된다(Fig.10(b)). 다시 원점으로 되돌아 온 후, Fig.10(c)와 같이 Z축을 이동시켜, Y축 방향으로(높이방향) 캔틸레버와 글래스 비드가 일직선상에 놓이도록 한다. 이후 Y축스텝모터와 압전소자를 이용해 글래스비드를 부착한다.

3.4 실험 결과

Fig.11은 SEM을 통해서 캔틸레버에 글래스비드를 부착한 모습이다. 이 결과로부터, 실험장치의 현미경

의 측정결과에서는 볼 수 없었던 글래스비드의 접촉 상황과 위치제어를 통한 부착기구의 정확성을 정성적으로 평가할 수 있었다.

Fig.12는 제작된 캔틸레버의 특성을 파악하기 위해, 프로브 변위와 하중에 대한 측정결과이다. 이 결과와, 식(2)에 따라, 캔틸레버의 기본적인 특성인 탄성계수를 확인할 수 있었다. 식(2)의 기준캔틸레버(Reference cantilever: Contact mode NSC36C)는 탄성계수 (k)=0.6N/m이고, Fig.12에서 z_p (160nm), z_c (63nm)를 측정하여, 이러한 값을 이용하여 계산하면 글래스비드가 부착된 캔틸레버의 탄성계수는 0.7N/m임 확인하였다.

4. 결론

본 연구는 AFM 캔틸레버에 바이오글래스비드를 정밀하게 부착할 수 있는 글래스비드 공급기구개발과 글래스비드에 의해 제작된 AFM프로브의 물리적 특성에 대해 검토한 논문으로서, 그 결과 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 새로운 구조의 글래스비드 공급기구를 제안하였으며, 그 기구의 기본 특성실험과 글래스비드 부착실험을 하였다. 개발된 공급기구는 캔틸레버와 글래스비드 상호간의 위치를 제어할 수 있는 시스템으로 구성되었으며, 350μm 범위의 글래스비드와 캔틸레버팁사이의 위치제어가 가능함을 확인하였다.
2. 제작된 AFM프로브의 변위-하중선도(Force Curve)를 통해 프로브의 탄성계수를 계산하여 0.7N/m의 바이오평가용 AFM프로브를 제작할 수 있음을 확인하였다.

후 기

이 논문은 금오공과대학교 교내학술연구비 지원을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

1. Quy K. Ong, Igor Sokolov, "Attachment of

- nanoparticles to the AFM tips for direct measurements of interaction between a single nanoparticle and surfaces,” *Journal of Colloid and Interface Science* 310, PP385~390, 2007.
2. Tetsuya Yamamoto, Yoshitaka Harada, “ AFM investigation of the surface properties of silica particles dispersed by bead milling,” *Colloids and Surfaces Aspects* 362, PP97~101, 2010.
 3. Shinichi Machida, Takahiro Watanabe Nakayama, Masakazu Saito “Fabricated cantilever for AFM measurements and manipulations: pre-stress analysis of stress fibers,” *Micron* 43, PP1380~1389, 2011.
 4. D. O. Volkov, P. R. Veera Dandu, “Influence of adhesion of silica and ceria abrasive nanoparticles on Chemical-Mechanical Planarization of silica surfaces,” *Applied Surface Science* 257, PP8518~8524, 2011.
 5. Takahiro Watanabe-Nakayama, Shin-ichi Machida, “Direct Detection of Cellular Adaptation to Local Cyclic Stretching at the Single Cell Level by Atomic Force Microscopy”, *Biophysical Journal* Volume 100 February, 564-572, 2011.
 6. Shuhei Nishida, Yutaka Funabash, “Combination of AFM with an objective-type total internal reflection fluorescence microscopy(TIRFM) for nanomanipulation of single cells”, Tokyo institut of Technology, *Ultramicroscopy* 91, PP269~274, 2010.
 7. Tamara K Berdyeva, Craig D Woodworth, “Human epithelial cells increase their rigidity with ageing in vitro: direct measurements”, Institute of Physics Publishing. *Med. Biol.* 50, 8 1~92, 2005.
 8. J. M. Long, G. F. Wang, “Effects of surface tension on axisymmetric Hertzian contact problem,” Xi'an Jiaotong University. *Mechanics of Materials* 56, PP65~70, 2013.
 9. C. Y. Park, Y. H. Chae And H. K. Kweon, “Development of Precision Instrument for attaching Micro-structure(Glass Bead) on the AFM Cantilever”, *J. KSMPE.* Vol.12, No.6, PP117~124, 2013.
 10. Butt HJ, Cappella B, Kappl M, *Surf Sci Rep* 59, PP151~152, 2005.