

광학집계를 이용한 알지네이트
비드의 특성 연구와 유전영동의 힘
측정

연세대학교 대학원
의 공 학 과
표 진 우

광학집계를 이용한 알지네이트
비드의 특성 연구와 유전영동의 힘
측정

지도 윤 대 성 교수
이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2009년 월 일

연세대학교 대학원

의 공 학 과

표 진 우

표진우의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2009년 12월

감사의 글

부푼 기대와 설렘을 안고 대학 이라는 울타리에 첫 걸음을 내딛지도 벌써 10년이 다 되어 갑니다. 열심히 앞만 보며 달려왔다고 생각하지만 뒤돌아보면 그래도 좀 더 잘 할 수 있었을 것이라는 아쉬움과 후회가 남는 것도 사실입니다. 하지만 학사와 석사 과정을 거치면서 배움에 대한 즐거움과 노력의 결과물들을 보면서 할 수 있다는 자신감과 열정을 얻었다는 것은 앞으로 더 큰 세상에 받을 내밀 때 저의 중심을 잡아줄 중요한 버팀목이 될 것이라고 생각합니다. 석사 논문을 마치면서 부족한 제가 여기 까지 올 수 있도록 지켜봐 주시고 도움을 주신 분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저 아무것도 모르고 시작한 저를 석사 논문이 나올 때 까지 지켜봐 주시고 조언해 주시며 학문의 의미를 깨닫게 지도해 주신 김법민 교수님께 감사드립니다. 단순한 스승과 제자 사이가 아닌 정말 따뜻한 마음으로 돌봐 주신 김법민 교수님께 다시 한 번 감사드립니다. 그리고 연세대학교 학생으로서 논문을 끝마칠 수 있도록 허락 해 주신 윤대성 교수님, 연구자로서 지녀야 할 자세나 마인드에 대해 끊임없이 조언 해 주신 이상우 교수님, 권태윤 교수님께도 진심으로 감사드립니다. 또한 그동안 많은 지식을 지도 편달 해 주신 윤형로 교수님, 이윤선 교수님, 이경중 교수님, 윤영로 교수님, 김영호 교수님, 신태민 교수님, 김한성 교수님, 임창환 교수님, 이용흠 교수님, 권기운 교수님, 정병조 교수님, 김지현 교수님, 김경환 교수님께도 감사드립니다.

같이 고생 하고 즐거워하며 대학원 생활을 하며 맺어진 소중한 인연인 연구실 사람들: 큰 형님으로 많은 것을 배울 수 있었던 상원이형, 동수형, 힘들 때 많이 의지하며 지낼 수 있었던 진짜 친 형 같았던 승덕이형, 오래 뵈진 못했지만 즐거운 연구실 생활을 할 수 있게 해 주신 재영이형, 기윤이형, 승환이형, 진호형, 지영이, 학부때부터 오랜 인연인 창근이형, 저를 학문의 세계로 안내 해 주신 그래서 너무 감사한 성빈이형, 언제나 많은 것을 깨닫게 해준 뭐든 다 아는 현우형, 그리고 연구실 동기이자 정말 많이 고생한 그래서 앞으로 누구보다도 더 잘되길 바라는 달권이에게 감사의 마음을 전합니다. 또한 나이가 같아서 더 깊은 이야기를 할 수 있었던 유부남 상현이, 항상 웃을 수 있게 만들어준 승학이, 대학생활 동안 가장 오래 옆에 있어준 휘현이, 까칠하신 우혁이, 직장 생활 열심히 하고 있을 원협이, 현호, 진이, 그 외에 01학번 동기들, 그리고 2년 동안 나와 함께 같은 길을 걸

어 준 유찬이, 지극히 정상적인 규도, 연구실 살림꾼 기환이, 앞으로 대학원 생활을 하게 될 수호, 인수, 대산이, 군대 다녀온 범준이, 대학원 생활을 더욱 즐겁게 해준 현애, 일일이 다 말 할 수는 없지만 나와 함께 대학 생활을 만들어 간 수많은 인연들 에게도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

평생 함께 할 사람들, 지금까지도 변치 않는 우정으로 만날 때 마다 고마운 내 친구들: 뭐든 다 받아주는 원일이, 영화 감독 창석이, 멀리 떨어져 있어 아쉬운 민철이, 수많은 자아를 가진 석환이, 이유는 알 수 없지만 우리 어머니가 제일 좋아하는 용주, 직장 가까워 부러운 준호, 결혼한지 오래된 우성이, 믿음직한 진영이, 못본지 꽤 오래되 보고 싶은 반장 형근이, 동철이, 상진이, 아름다운 추억을 만들어준 1학년 7반 아이들 그리고 박병철 선생님 모두 진심으로 감사드립니다.

마지막으로 이 자리에 저를 있게 해 주신 제가 살아가는 원동력인 저희 가족: 누구보다도 표현을 하시지는 않지만 누구보다도 가족들을 사랑하고 책임져 주신 우리 아버지, 항상 아들이 원하는 방향으로 저를 이끌어 주신 우리 어머니, 존경하고 사랑합니다. 그리고 나와 함께 사회로 나가게 된 내 동생 진영이, 어떤 가정 보다도 화목한 우리 가족들 이 모든 분들로 인해서 제가 이 자리 까지 올 수 있었던 것 같습니다.

스스로 자신을 책임 질 수 있는 성인으로서의 첫 페이지를 함께 해 준 연세대학교 의공학과에 다시 한 번 감사하며 글을 줄입니다.

2009년 12월
표진우

차 례

차례	1
그림차례	3
국문요약	5
제1장 Introduction	6
제2장 Theory	8
2.1 Optical Tweezers	8
2.1.1 Rayleigh Regime	9
2.1.2 Ray Optics Regime	12
2.2 Force Measurement	14
2.2.1 Calibration Methods	14
2.2.2 QPD(Quadrant photo diode)	18
2.3 Calcium Alginate Beads	20
2.4 Dielectrophoresis	21
제 3 장 Experimental System	24
3.1 Optical Tweezers System	24
3.2 Chip Design	26
3.3 Preparation of Hydrogel Alginate Bead	27
제 4 장 Results 29	
4.1 Calibrations	29
4.1.1 Trap Stiffness	29
4.1.2 Displacement	31
4.1.3 Optical Tweezers System calibration	33
4.2 Alginate Beads Experiments	36
4.3 Dielectrophoresis Force	40

제 5 장 Conclusion 44
참고문헌 46

그림 차례

그림 2.1	평행광이 입자에 가해질 때 발생하는 힘의 합력	11
그림 2.2	빛이 집속된 경우 입자가 받는 힘의 합력	11
그림 2.3	수평 방향의 광 포획 원리	12
그림 2.4	수직 방향의 광 포획 원리	13
그림 2.5	Corner frequency	17
그림 2.6	QPD 의 원리	18
그림 2.7	QPD 의 회로도	19
그림 2.8	알지네이트 비드의 구조(개략)와 실제 알지네이트 비드	21
그림 2.9	불균일한 전기장 내에서 입자가 받는 Positive DEP 와 Negative DEP	22
그림 3.1	Optical Tweezers System(개략도)	24
그림 3.2	Optical Tweezers System(사진)	25
그림 3.3	제작된 Chip의 모습	26
그림 3.4	포획된 알지네이트 비드	28
그림 4.1	레이저 파워에 따른 corner frequency 의 변화	29
그림 4.2	레이저 파워에 따른 Trap stiffness 의 변화	30
그림 4.3	입자의 속도를 인가하였을 때 QPD 에 들어오는 전기적 신호	31
그림 4.4	레이저 파워에 따른 calibration factor 값의 변화	32
그림 4.5	비드의 위치(cover glass로부터의 높이) 에 따른 corner frequency 의 변화	34
그림 4.6	oil immersion type(a) 과 water immersion type(b) 인 경우의 굴절률의 차이	35
그림 4.7	viscosity 값을 이용해 다시 확인한 최적의 포획 높이	36
그림 4.8	시간에 따른 PBS 용액에서 알지네이트 비드가 크기변화(농도별)	37
그림 4.9	시간에 따른 pH 1.2에서 알지네이트 비드가 크기변화(농도별)	37

그림 4.10	각각의 용액속에서 알지네이트 농도에 따른 Peak Time	39
그림 4.11	pH 1.2에서 알지네이트 농도에 따른 Degradation ratio	39
그림 4.12	비드 크기에 따른 DEP force 실측값과 시뮬레이션	40
그림 4.13	용액의 전도도차이에 따른 DEP force 의 실측값과 시뮬레이션	41
그림 4.14	전압의 세기와 전극으로 부터의 거리에 따른 DEP force 의 실측값과 시뮬레이션 값	43

국 문 요 약

광학 집계를 이용한 알지네이트 비드의 특성 연구와 유전 영동의 힘 측정

세포는 생물을 이루는 기본 물질이며 세포를 통하여 여러 가지 생명 현상에 대한 이해를 할 수 있기 때문에 다양한 분야에서 활발히 연구가 진행 중이다. Optical Tweezers 는 물리적인 접촉 없이 세포를 다룰 수 있고 외부에서 세포에 작용하는 아주 미세한 힘(pN) 까지 측정을 할 수 다는 장점을 가지고 있기 때문에 세포를 다루는데 유용한 도구로 각광을 받고 있다.

본 논문에서는 이러한 Optical Tweezers를 바탕으로 세 가지 실험을 진행 하였다. 첫째로 외부에서 가해지는 힘을 측정하기 위해 Optical Tweezers의 성능 평가를 하여 최적의 조건에서 실험을 하기 위한 calibration 작업을 하였다. 두 번째로는 약물 전달 물질로 사용되는 alginate beads의 특성을 관찰하여 보고 서로 다른 환경에서 alginate beads 가 어떠한 변화를 보이는지에 대해 실험을 진행 하였다. 마지막으로 비 균일한 전기장 내에서 중성 입자가 받는 힘인 유전 영동력(Dielectrophoresis Force)을 Optical Tweezers를 이용하여 측정해 보았다.

Optical Tweezers 는 미래에 발전 가능성이 더욱 큰 기술이다. 본 논문에서 실험한 결과를 토대로 세포 자체의 분석 뿐만 아니라 의학, 화학, 생물학적등 다양한 분야와의 접목을 통하여 생명 현상 연구의 밑바탕이 될 수 있을 것이라고 기대한다.

핵심 되는 말: Optical Tweezers ,Alginate Beads, Dielectrophoresis Force

제 1 장 Introduction

지구상에 존재하는 생물은 모두 세포로 이루어져 있으며 세포는 생명체를 구성하는 기본 단위이다. 이러한 세포는 정교하고 복잡한 체계를 이루고 있으며 이것의 대사 과정은 외부의 환경이나 유전적인 요인에 의해 쉽게 달라지기 때문에 돌연변이나 암과 같은 심각한 질병을 초래 하게 된다. 이렇듯 세포를 이해하는 것은 생명체계의 중요한 역할을 하며, 물리, 화학, 생물학 등 여러 가지 분야에서 세포 단위의 연구가 활발히 진행 중이다. Optical Tweezers 는 이러한 세포단위의 연구를 하기 위한 강력한 도구로 각광 받고 있으며 본 논문에서는 Optical Tweezers를 이용하여 생체분자의 특성을 알아본다.

Optical Tweezers는 주변 환경보다 높은 굴절률을 가진 입자에 강하게 집속된 레이저빔이 투과 되게 되면 빛이 가지고 있던 모멘텀이 변하게 되고 이것이 결국 입자의 모멘텀에도 영향을 주게 되어 집속된 초점 근처로 입자를 포획 할 수 있게 된다. 이것을 이용하여 단일 분자 단위의 크기(수 μm ~ 수십 μm)를 가진 세포들을 어떠한 물리적인 접촉 없이 다룰 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한 포획된 세포의 정보를 이용하여 외부에서 힘이 가해 졌을 때 얼마만큼의 힘이 가해졌는지 직접적으로 알 수 있기 때문에 아주 작은 힘(수 pN ~ 수십 pN)을 측정 할 수 있다는 장점[1,2]을 가지고 있어 분자단위의 생명연구 (DNA, RNA, 단백질)를 진행 하는데 매우 유용하게 사용되고 있다[3-6].

이러한 연구 중 하나인 약물 전달 체계(Drug Delivery System)는 우리가 원하는 곳에 필요한 약물을 전달 할 수 있어 최근 여러 분야에서 각광 받고 있다. 칼슘 알지네이트 비드(Calcium Alginate Beads)는 그중에서도 약물 전달 체계에 가장 많이 사용하는 물질로 생체 친화적이고 만들기 쉬우며 젤 형태로 되어있어 다루기 쉽다는 장점을 가진다.[7] 알지네이트 비드는 수용액 속에서 시간이 지남에 따라 팽창을 하였다가 수축을 하는 특징을 가지고 있다.[8,9] 본 논문에서는 이러한 알지네이트 비드의 특징을 이용하여 Optical Tweezers를 이용하여 시간에 따

큰 알지네이트 비드의 크기변화를 알아보고 수용액 뿐만 아니라 pH변화에 따라서, 알지네이트 비드의 농도에 따라서 어떠한 특징을 가지는가에 대하여 알아본다. 그리고 이 연구를 통하여 다양한 약물 전달 체계에서 어떠한 약물 전달 물질을 사용할 것인가에 대한 기초연구를 제공 할 것으로 기대된다.

유전영동(Dielectrophoresis, DEP)이란 비선형적인 전기장 내에서 분극 현상으로 인하여 유전체에 가해지는 힘을 말한다. DEP는 전기장에 가해지는 주파수의 크기에 따라, 전기장 안에 있는 유전체의 크기나 유전률, 전도도에 따라 유전체가 각기 다른 힘을 받기 때문에 정상세포와 죽은 세포의 분리, 혹은 크기가 서로 다른 입자를 분리해 내는데 쓰이고 있다.[10-12] 최근 나노 기술과의 결합으로 나노 단위의 세포도 쉽게 분리하고 조절 할 수 있기 때문에 많은 분야에서 여러 가지 형태로 쓰이고 있다. 하지만 이렇게 전기장 내에 유전체에 가해지는 DEP Force도 정량적으로 얼마만큼의 힘이 걸리는지는 아직까지 밝혀진 바가 없다. 따라서 본 논문에서는 Optical Tweezers system을 직접 제작하고 polystyrene beads를 이용하여 힘을 측정하기 위한 calibration 작업을 수행 하였다. 포획된 입자가 유체 내에 있을 때 유체 분자와의 충돌에 의하여 입자는 완벽하게 정지해 있지 않고 임의의 방향으로 진동을 하게 된다. 이렇게 진동하는 입자를 position sensor를 이용하여 입자에서의 산란광을 추적하고 진동하는 입자의 진동 주파수를 획득 할 수 있다.이러한 진동 주파수는 포획 힘의 크기와 관계가 있으며 진동 주파수 성분 분석을 통해 포획 힘을 측정 할 수 있다. 이와 같은 방법을 power spectrum method 라고 하며[13] 본 논문에서는 이 방법을 사용하여 힘의 크기를 측정하였다. 또한 전기장 내에 유전체가 받는 힘을 직접적으로 측정하기 위하여 전극을 포함한 chip을 설계하였고 이것을 이용하여 전기장의 주파수에 따라, beads의 크기에 따라 그리고 용액의 전도도에 따라 유전체가 정량적으로 얼마만큼의 힘을 받는지를 Optical Tweezers system을 통하여 측정해 보았다. 그리고 이 값을 시뮬레이션 결과와 비교해 보고 최종적으로 생체 세포인 yeast cell을 이용하여 여러 가지 상황에서 yeast cell 에 걸리는 힘의 절대적인 크기를 측정하였다.

제 2 장 Theory

Optical Tweezers system 은 수용액 상에서 단일 입자를 포획하고 조작할 수 있으며 외부에서 힘이 입자에 가해질 경우 power spectrum 분석과 position sensor 를 이용하여 단일 입자의 특성과 힘의 정량적인 수치를 계산 할 수 있게 되었다.

본 장에서는 첫 번째로 빛을 이용하여 어떠한 원리에 의하여 입자를 포획 할 수 있는지에 대하여 알아보고, 포획되어진 입자의 특성을 분석하는 방법인 power spectrum method 와 position sensor를 이용한 힘 측정 방법에 대하여 알아본다. 마지막으로 유전 영동(Dielectrophoresis, DEP) 이 무엇인지 살펴보고 Optical Tweezers system 을 통한 유전 영동력을 계산 해 본다.

2.1 Optical Tweezers

Single beam laser Optical Tweezers 는 1978년 AT&T 연구소의 A. Ashikin 과 S. Chu 에 의하여 처음 제안 되었다.[14] Optical Tweezers 는 강하게 집속되어진 빛으로 수십nm~수십 μm 크기의 입자를 포획하고 다룰 수 있는 기술이다. 빛이 입자에 조사되게 되면 빛이 가지고 있던 모멘텀의 변화가 발생하고 이것이 입자의 모멘텀에도 영향을 주게 되어 포획 할 수 있는 힘을 만들어 낸다.

빛과 입자와의 상호작용은 입자의 크기와 빛의 파장에 따라 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 입자의 크기를 r , 입자에 조사되는 빛의 파장을 λ 라고 할 때, 입자의 크기가 파장보다 클 때($r \gg \lambda$) 와 입자의 크기가 파장보다 작을 때($r \ll \lambda$) 로 나눌 수 있는데 이것은 각각 Ray optics regime 과 Rayleigh regime 로 설명 할 수 있다[15,16]. 본 논문에서는 $5 \sim 7 \mu\text{m}$ 비드를 가지고 실험을 진행하였기 때문에 정확한 모델링을 할 수 없지만 Ray optics regime 으로 근사가 가능하다.

2.1.1 Rayleigh Regime($r \ll \lambda$)

입자의 크기가 파장에 비해 아주 작을 때는 입자가 유도 쌍극자(induced dipole)처럼 행동하게 되고 이것은 Maxwell's equation 에 의해 지배를 받는 전자기장(electromagnetic fields)적인 입장에서 해석 할 수 있다[17]. 이것은 입사광에 의해서 입자에 전기장이 작용하고 입자내의 전자가 진동하여 쌍극자 모멘트가 유도되어 생기는 현상이다. 입자의 크기가 아주 작기 때문에 입사광의 굴절이나 회절 반사등의 효과는 무시 할 수 있고 전자기장 안에서 쌍극자들이 안정화를 이루기 위해서는 입자가 받는 힘의 크기가 적절히 조화를 이루어야 한다. 이렇게 빛이 입자에 조사되었을 때 입자에 작용하는 힘은 두 가지 힘으로 나눌 수 있는데 빛의 진행 방향으로 입자를 밀어내는 힘인 scattering force 와 빛의 세기가 센 곳으로 입자를 당기는 gradient force로 나눌 수 있다.

Scattering force

빛이 입자에 조사될 때 입자는 광압(Radiation pressure)이라는 힘을 받게 된다. 이것은 입자를 빛의 진행방향으로 밀어 내려는 힘을 말한다. 입사된 빛은 다시 방출되며 방출 되어진 빛은 백터의 관점에서 볼 때 대부분 입사광과 동일한 방향을 가지고 방출된다. 이때의 힘은 다음과 같이 표현 할 수 있다.

$$F_{scat} = n_m \frac{\sigma \langle S \rangle}{c} \quad (2.1)$$

n_m 은 입자를 둘러싼 용액의 굴절률을 말하며 c 는 빛의 속도, $\langle S \rangle$ 는 시간 평균화 된 포인팅 벡터(Poynting vector), σ 는 입자의 단면적을 의미한다. 다시 말해 전자장의 입장에서 scattering force는 시간 평균화 된 포인팅 벡터 즉 전자장에서 파동의 진행 방향과 일치하기 때문에 입자를 밀어 내려는 힘을 뜻한다.

Gradient force

전자기장에서 유도된 쌍극자가 받는 로렌츠 힘(Lorenz force)에 의하여 발생하는 Gradient force 는 빛이 입자에 조사 될 때 빛의 세기(intensity)가 센 부분으로 입자를 끌어오는 힘이다. 전자기장 내에서 빛의 세기(intensity)는 다음과 같은 식으로 표현 할 수 있다.

$$I(r) = \frac{n_m \epsilon_0 c}{2} |E(r)|^2 \quad (2.2)$$

n_m 은 입자의 굴절률, ϵ_0 은 유전률(permittivity), c 는 빛의 속도 $E(r)$ 은 전기장의 벡터를 나타낸다. 이것을 다시 gradient force 로 표현 하면

$$F(r) = \frac{1}{2n_m \epsilon_0 c} \sigma \nabla I(r) \quad (2.3)$$

로 나타 낼 수 있다. 위 식에서 알 수 있듯이 gradient force 는 빛의 세기(intensity)가 강한 방향으로 작용 한다. 일반적으로 우리가 사용하는 레이저는 가우시안 형태의 빔을 가지고 있기 때문에 이 경우 gradient force 는 광축 방향으로 작용하고 이것을 집속(focusing)시켰을 때는 집속된 곳의 빛의 세기(intensity)가 가장 높기 때문에 이 방향으로 힘이 작용한다.

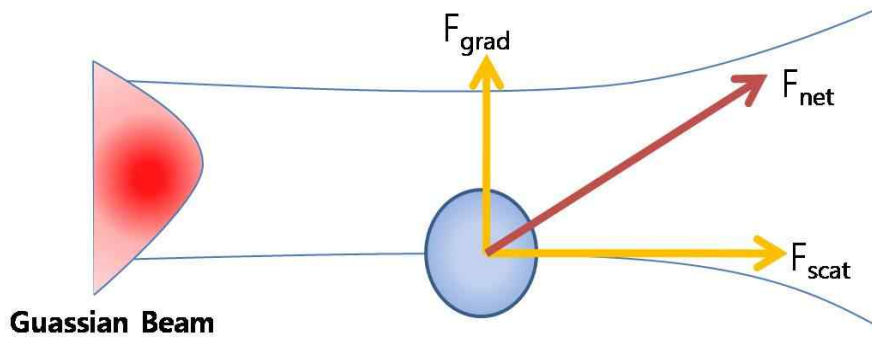


그림 2.1 평행광이 입자에 가해질 때 발생하는 힘의 합력

그림 (2.1)에서 보는 바와 같이 일반적인 가우시안 형태의 빔은 중간이 가장 빛의 강도가 센 부분으로 되어 있으며 이것이 입자에 조사 되었을 때 입자는 빛의 세기가 큰 부분으로 끌려가게 된다. 하지만 광압(radiation pressure)에 의한 scattering도 존재하기 때문에 이 경우 입자가 빛의 진행방향과 동일하게 밀려나게 된다. 따라서 포획을 하기 위해서는 gradient force가 scattering force보다 더 크게 입자에 영향을 미쳐야 안정된 포획을 할 수 있다.

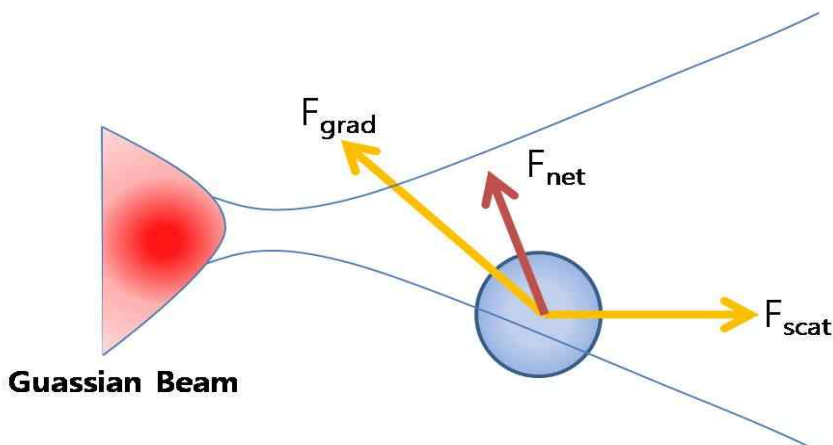


그림 2.2 빛이 집속된 경우 입자가 받는 힘의 합력

그림 (2.2)는 빛을 강하게 집속(focusing)시켰을 경우 입자가 받는 힘을 나타낸

그림이다. 그림에서 알 수 있듯이 빛을 강하게 집속 시키게 되면 집속된 부근에서 빛의 세기가 가장 크게 되고 이곳에서 gradient force 가 scattering force 보다 더 크게 작용하여 입자를 포획 할 수 있게 된다.

2.1.2 Ray Optics Regime($r \gg \lambda$)

입자의 크기가 입자에 조사되는 빛의 파장의 크기보다 훨씬 클 경우 입자의 운동을 Ray optics regime, 다시 말해 기하 광학적 현상으로 설명 할 수 있다.[20] 빛이 입자를 통과 하게 되면 입자의 표면에서는 Snell's law 에 따라 굴절, 반사등이 일어나게 된다. 입자에서 발생하는 굴절과 반사는 빛이 가지고 있는 모멘텀을 변화 시키게 되고 이것이 운동량 보존의 법칙에 따라 입자의 모멘텀에도 영향을 주게 되어 입자를 움직이는 힘이 된다. 만약 ΔP 로 빛의 운동량이 변하게 되면, 운동량 보존의 법칙에 의해 입자는 방향은 반대이고 크기는 같은 즉, $-\Delta P$ 의 운동량 변화가 일어나야 한다. 그림 (2.3), (2.4) 는 입자에 빛이 입사되어질 때 모멘텀의 변화에 따른 수평방향의 포획과 수직방향의 포획 원리를 각각 보여준다.

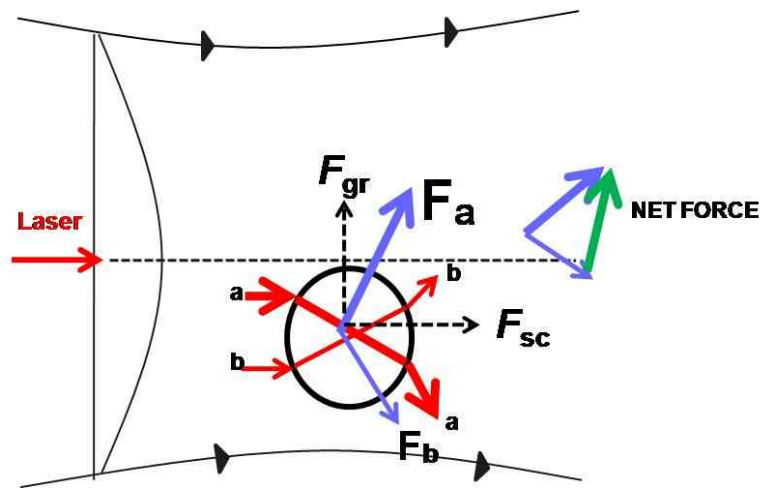


그림 2.3 수평방향의 광 포획 원리

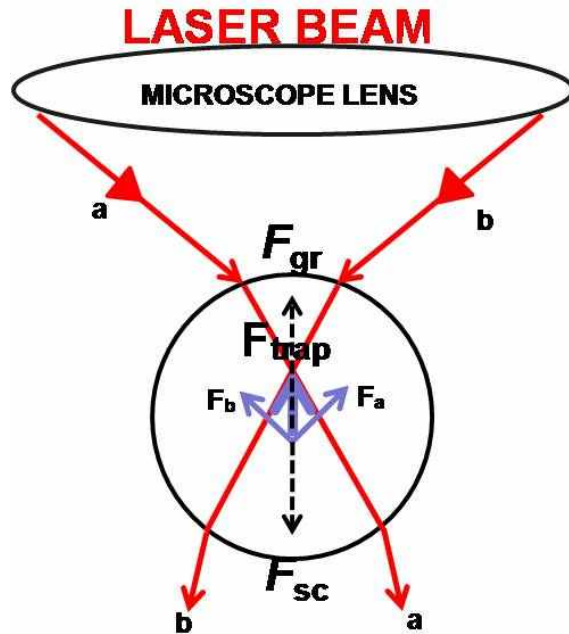


그림 2.4 수직 방향의 광 포획 원리

앞선 Rayleigh regime에서 설명되어진 것과 같이 입사광이 입자에 조사될 때 입자에 작용하는 힘은 scattering force 와 gradient force 로 나눌 수 있다. scattering force 는 입사광의 진행방향과 동일한 방향으로 작용하여 입자를 밀어내는 힘을 가지며 gradient force 는 입사광의 진행방향과 수직인 방향으로 작용하여 입자를 포획하는 힘으로 작용한다.

입자를 포획하기 위해서는 몇 가지 조건이 필요하다. 먼저 입자의 굴절률이 입자를 둘러싸고 있는 용액의 굴절률 보다 커야 한다.[18,19] 만약 입자의 굴절률이 더 작다면 레이저 광선이 입자의 중심으로 굴절하지 않고 밖으로 퍼져 나가기 때문에 힘이 레이저 초점 방향이 아닌 다른 방향으로 작용하게 된다. 또한 gradient force 가 scattering force 보다 더 큰 힘을 가져야 안정적인 포획이 가능하다. 그러기 위해서는 빛을 강하게 집속시켜서 gradient를 크게 만드는 것이 중요하다. 따라서 높은 N.A를 가진 대물렌즈를 사용하여 회절 한계지점(Diffraction limited)

에 빛을 모아야 강한 gradient를 가지게 된다. 마지막으로 입자를 포획하려는 힘이 입자에 작용하는 다른 외부의 힘(중력, 열적 진동에 의한 힘, 액체의 흐름으로 인하여 입자를 움직이는 힘 등)에 비하여 큰 힘을 가져야 포획 할 수 있다.

2.2 Force Measurement

Optical Tweezers 는 어떠한 기계적인 접촉 없이 마이크로 단위의 입자를 다룰 수 있기 때문에 외부에서 입자에 가해지는 아주 작은 힘(pN)을 측정 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 힘을 측정하기 위해서는 설계된 optical tweezers 의 성능 평가가 필요하기 때문에 본 실험을 진행 하기 앞서 calibration을 해야만 한다. 이번 장에서는 calibration 방법과 이것을 이용하여 힘을 측정하는 방법에 대해서 알아본다.

2.2.1 Calibration Methods

힘을 측정하기 위한 calibration methods 는 유체속의 입자를 움직여서 입자에 가해지는 힘을 측정하는 drag force method 와 포획된 입자의 Brownian motion 에 의해 생기는 힘인 thermal noise analysis 즉 power spectrum method 로 나눌 수 있다. 본 논문에서 사용한 방법은 drag force method 와 power spectrum method[20]를 같이 사용하고 있기 때문에 이것을 중심으로 설명하고자 한다.

Drag force method

외부에서 입자에 작용하는 힘을 측정하는 방법 중 하나인 drag force method 는 유체 속에 포획된 입자를 이동시킬 때 유체의 흐름으로 인한 힘의 반대방향으로 입자가 움직이려는 성질을 이용하여 측정한다. 용액이 속도를 가지며 움직일 때 입자는 유체의 점성에 의해 힘을 받게 되고 이 힘은 Drag force 또는 Stokes force 라고 부르며 입자를 포획한 힘은 이 힘과 평형을 이루게 된다. 간단히 설명 하면 용수철을 당길 때 용수철은 돌아가려는 복원력이 작용하는 것처럼 유체내에 입자도 이 힘을 받는다. 유체 내에서 이것을 수식으로 나타내면 다음과 같이 표현 할 수 있다.

$$F_{trap} = \frac{n_s P}{Q} \quad (2.4)$$

$$F_{stokes} = 6\pi\eta r\nu \quad (2.5)$$

여기서 n_s 는 유체의 굴절률을 나타내며, P 는 입사광의 일률, Q는 포획 효율 η 는 유체의 점도(viscosity), r 은 입자의 반지름, 그리고 ν 는 입자의 이동 속도를 나타낸다. 예전의 대부분의 실험에서 이 방법을 사용할 경우 위치 센서에 의해서 비드가 움직인 거리, 다시 말해 힘을 받았을 때 비드가 이동한 거리를 측정하기 위해서 비드를 바닥에 붙인 상태로 실험을 진행 하였다. 하지만 이 방법은 비드가 바닥에 붙어있기 때문에 비드에 의한 마찰력이나 수차문제 등의 시스템적인 에러가 생길 수 있기 때문에 본 논문에서는 power spectrum method 와 같이 사용하여 이 에러를 없애고자 했다.

Power spectrum method

유체 속에 입자가 놓여 있을 때 물 분자의 충돌에 의해 입자도 진동을 하는 Brownian motion 이 일어나게 된다. 이렇게 포획된 입자는 열 진동(Thermal fluctuation)에 의하여 임의의 힘(random force)을 받게 되는데 이렇게 열 진동에 의해서 움직이는 입자는 에너지를 가지고 있기 때문에 power spectrum 으로 나타낼 수 있고 이것을 주파수에 따라 표현한 것이 power spectrum method 이다. 이렇게 임의의 힘을 받는 입자를 모델링 하면 다음과 같은 식으로 표현할 수 있다.

$$\gamma \frac{dx}{dt} + \kappa x = F(t) \quad (2.6)$$

이것을 Optical Tweezers 에 의해 포획된 반지름이 r 인 입자가 x 방향으로 m 의 질량을 가지고 점도(viscosity)가 η 인 수용액을 이동할 때 입자의 운동방정식을 수식으로 표현하면

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = -\kappa x - \gamma \frac{dx}{dt} + F(t) \quad (2.7)$$

로 표현할 수 있으며 이것을 랑주뱅 방정식(Langevin equation) 이라고 한다. 이때 κ 는 trap stiffness, γ 는 drag coefficient, $F(t)$ 는 random thermal force를 각각 나타낸다. 정지해 있는 상태에서는 힘을 받지 않기 때문에 random thermal force 가 0 이 되지만 외부에서 힘이 가해지면 복원력이 작용하게 되어 입자에 걸리는 힘을 측정할 수 있게 된다. 위 식(2.7)을 푸리에 변환의 컬레곱을 하게 되면 power spectrum을 얻을 수 있으며 이것으로 포획하고 있는 입자의 에너지 정보를 알 수 있다. power spectrum 은 다음과 같은 식으로 표현될 수 있다.

$$S_x(f) = \frac{\kappa_B T}{\gamma \pi^2 (f_c^2 + f^2)} \quad (2.8)$$

κ_B 는 볼츠만 상수(Boltzmann constant), T는 용액의 온도를 나타낸다. f_c 는 corner frequency를 나타내며 이것은 포획된 입자의 정보를 가지고 있어 힘을 측정하는데 사용된다. 또한 corner frequency는 포획된 입자의 trap stiffness 와도 관련이 있어

$$\kappa = 12\pi r \eta f_c \quad (2.9)$$

로 표현 할 수 있다. r은 입자의 반지름 η 는 용액의 viscosity를 나타낸다. 다음 그림은 power spectrum 내에 corner frequency를 나타낸다.

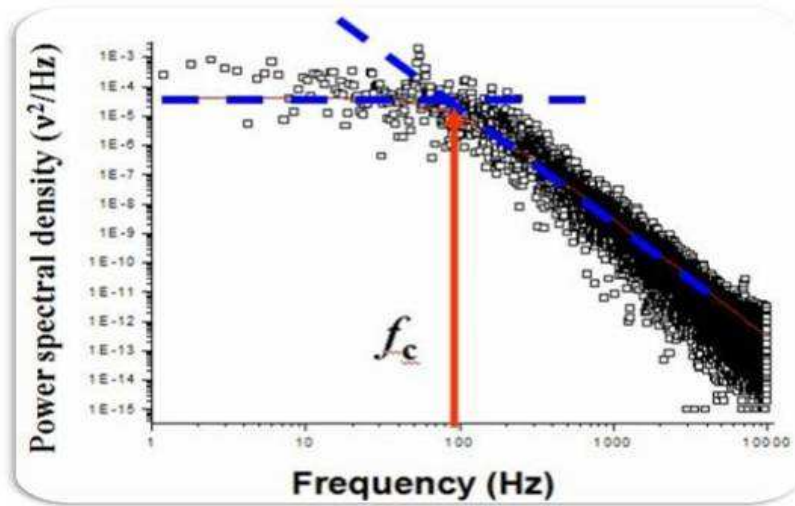


그림 2.5 Corner frequency

2.2.2 QPD(Quadrant photo diode)

외부에서 힘을 받아 움직이는 입자에 가해지는 힘을 측정하기 위해서는 힘을 받았을 때 얼마만큼 움직이는지를 알아야 한다. 변위를 측정하기 위해서 본 실험에서는 위치 센서중 하나인 QPD(Quadrant photo diode)를 사용하였다. 포획된 입자에서 산란된 빛은 condense lens 에 의해 수집되고 수집된 빛은 위치 센서(QPD)에 의해서 움직인 변위를 역 추적 할 수 있게 된다.[21] 위치 센서는 우리가 모르는 신호를 전기적 신호로 바꾸어 주는 역할을 해 주기 때문에 QPD에서 획득한 전기적 신호를 이용하여 힘을 측정하는데 사용할 수 있다. QPD 의 원리는 다음 그림(2.6)과 같으며 그림(2.7)은 이것의 회로도를 보여준다.

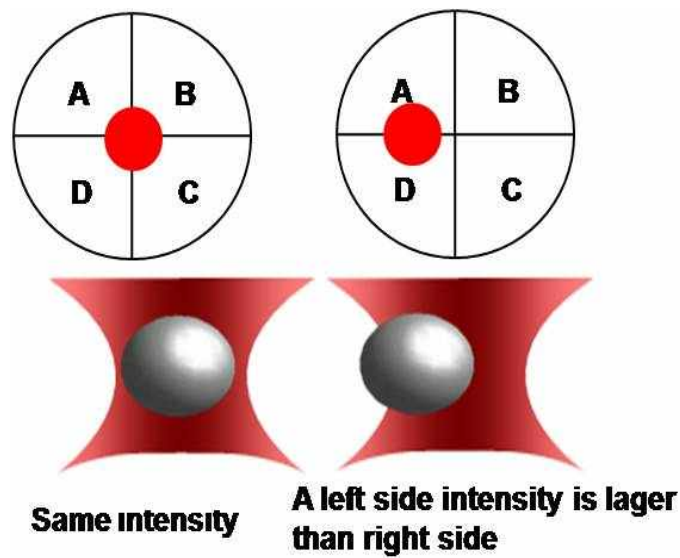


그림 2.6 QPD 의 원리

4개의 사분면으로 나누어진 QPD 는 각각의 사분면 마다 빛의 intensity 의 차이를 계산하여 전기적 신호로 나타내어 x,y 방향의 변위 신호를 나타내며 다음과 같은 식으로 표현 할 수 있다.

$$X = \frac{(i_1 + i_3) - (i_2 + i_4)}{(i_1 + i_2 + i_3 + i_4)} \quad Y = \frac{(i_1 + i_2) - (i_3 + i_4)}{(i_1 + i_2 + i_3 + i_4)} \quad (2.10)$$

1,2,3,4, 는 각 사분면의 intensity를 나타낸다.

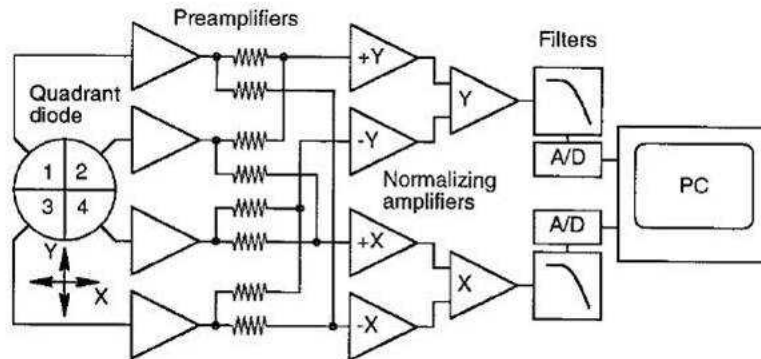


그림 2.7 QPD의 회로도

이렇게 발생한 신호는 포획된 입자의 위치와 선형적인 관계를 가지며 이것을 식으로 표현하면

$$x = \beta V_1 \quad (2.11)$$

$$\beta = \frac{1}{2\pi f_c \frac{V_2}{v}} \quad (2.12)$$

로 표현 할 수 있다. β 는 calibration factor, V_1 은 외부에서 모르는 힘이 가해졌을 때 QPD 에 들어온 전기전인 신호, V_2 는 calibration factor를 구하기 위해 우리가 임의의 속도로 stage를 움직였을 때 QPD 에 들어온 전기적인 신호, v 는 stage 의속도 즉 유체가 움직인 속도를 의미한다. 변위 x 를 측정하기 위해서는 calibration factor 값인 β 값을 알아야 한다. 많은 논문에서 β 값을 구하는 방법들이 제안되어 왔으며 본 논문에서는 A. Buosciolo 가 제안한 알고리즘[26]을 사용하였다.

결국 외부에서 입자에 작용하는 힘은 입자에 걸리는 힘의 반대방향으로도 동일한 힘이 작용을 하고 있기 때문에 복원력 $F = \kappa x$ 를 식(2.9) 와 식(2.11)를 통하여 계산하면 입자에 작용하는 힘의 크기를 절대치로 계산 할 수 있다.

2.3 Calcium Alginate Beads

알지네이트 비드는 기본적으로 β -D mannuronate(M) 이라는 물질과 α -L guluronate residues(G) 라는 두 가지 물질이 결합된 구조를 가지는 구조물로 구성되어 있다. 여기에 Ca^{2+} , Ba^{2+} , 또는 Al^{3+} 같은 물질들이 삽입되어 알지네이트 비드를 이룬다.[22-24] 이 중에서 칼슘을 첨가한 칼슘 알지네이트 비드는 제작하기 용이하고 생체 접합성이 우수하며 다루기 쉽다는 장점을 가지고 있어 알지네이트 비드를 만드는데 가장 많이 사용된다. 이러한 알지네이트 비드가 수용액 속에 놓여지게 되면 수용액 안에 있는 이온들과 알지네이트 비드 속의 칼슘이온과의 상호 작용에 의해서 비드의 크기가 시간이 지남에 따라 변하게 된다. 이렇게 비드의 크기가 커지는 과정을 Swelling 이라 하며 작아지는 과정을 Degradation 이라고 한다. 일반적으로 알지네이트 비드의 크기 변화는 Swelling을 거쳐 Degradation을 한다. Degradation 이 심화되면 알지네이트 비드가 터지면서 안에 들어 있던 약물을 원하는 곳에 전달하게 된다. 지금까지 진행 되어진 알지네이트 비드의 연구는 대부분 젤 형태의 고체 상태로 진행되어졌다. 하지만 본 논문에서는 우리의 몸에서 알지네이트 비드가 전달되어지는 반응과 좀 더 유사한 환경인 수용액 상태에서

서 알지네이트 비드의 크기 변화를 시간에 따라 관찰 하였다,

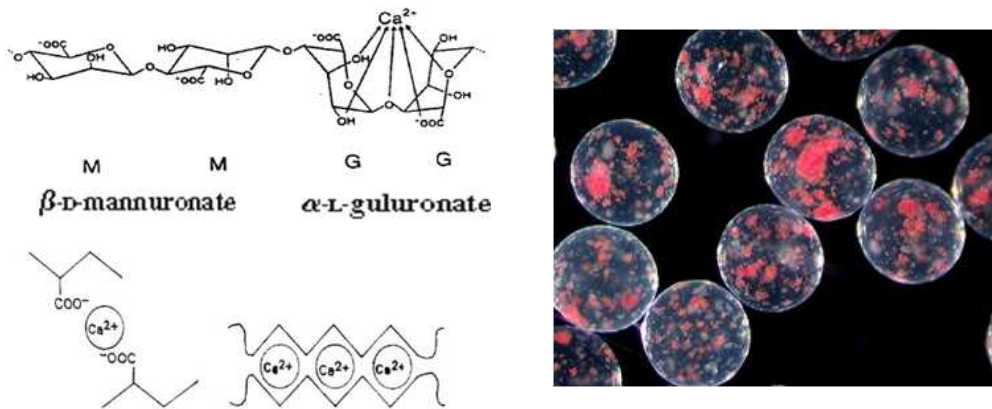


그림 2.8 알지네이트 비드의 구조(개략)와 실제 알지네이트 비드

그림 (2.8) 은 알지네이트 비드의 개략적인 모습과 약물 전달 시스템에 사용된 알지네이트 비드를 나타낸다[25].

2.4 Dielectrophoresis

유전영동(Dielectrophoresis) 이란 불균일한 전기장(Non-uniform field) 내에서 유전체가 움직이는 현상으로 1950년 H. Pohl 에 의해 처음 제안 되었다[26,27]. 유전체란 전하를 띠지 않는 물질로서 내부에 양전하와 음전하를 가지고 있지만 전체적인 전하량의 합은 0인 물질이다. 우리가 실험에 사용하는 대부분의 물질이 유전체 이며 이것이 불균일한 전기장 내에 있을 경우 입자의 크기나 모양 주파수나 전기장의 세기에 따라 유전체에 각각 다른 힘이 작용하는 것이 유전영동력 이다. 만약 이것이 균일한(uniform)전기장 내에 있을 경우 유전체내의 전하가 각각 반대방향으로 같은 크기의 힘을 받기 때문에 그 힘들이 상쇄되어 유전체는 움직이

지 않는다. 하지만 불균일한 전기장의 경우 전기장의 농도 구배가 다르기 때문에 입자와 용액사이의 분극 정도에 따라 전기장의 크기가 큰 부분과 작은 부분으로 나누어지게 된다. 입자가 전기장의 세기가 큰 부분으로 가는 것을 Positive DEP 반대로 전기장의 변화가 가장 작은 방향으로 움직이는 것은 Negative DEP 라고 한다 그림 (2.9) 는 이것을 보여준다[28].

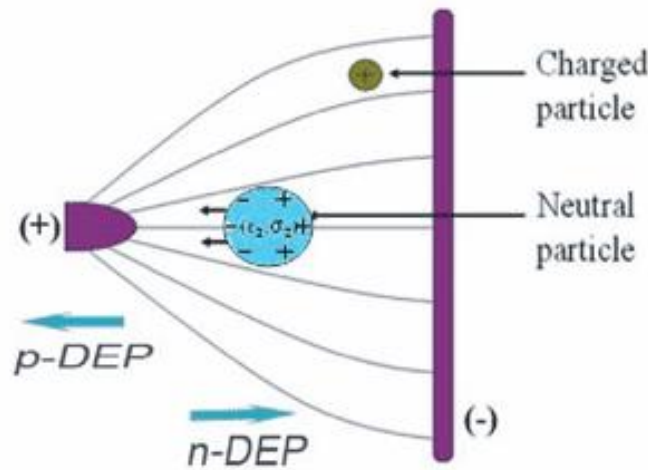


그림 2.9 불균일한 전기장 내에서 입자가 받는 Positive DEP 와 Negative DEP

이때 DEP force 는 인가해준 전압의 극성과는 무관하며 그렇기 때문에 DEP 는 AC field 뿐만 아니라 DC Field 에서도 발생하게 된다. 유전체가 불균일한 전기장 내에서 받는 힘을 모델링 하면 다음과 같은 식으로 표현 할 수 있다.[29]

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m R^3 Re [F_{CM}(\omega) \cdot \nabla |E|^2(r)] \quad (2.13)$$

ϵ_m 은 입자 주변의 용액의 유전률을 말하며, R 은 유전체의 반지름, ω 는 전기장에 인가해준 각주파수 r 은 전기장의 공간좌표 그리고 E 는 인가해준 전기장의 세기를 각각 나타낸다. 여기서 $F_{CM}(\omega)$ 는 따로 Clausius-Mossorri factor 라고 부르는데 이것을 다시 풀어쓰면

$$F_{CM} = \frac{\tilde{\epsilon}_p - \tilde{\epsilon}_m}{\tilde{\epsilon}_p + 2\tilde{\epsilon}_m}, \quad \tilde{\epsilon} = \epsilon + \sigma / (j\omega) \quad (2.14)$$

으로 $\tilde{\epsilon}_m$ 은 용액의 복소유전률, $\tilde{\epsilon}_p$ 는 입자의 복소유전률, σ 는 전도율을 나타낸다. 이 Clausius-Mossorri factor 의 부호가 양이면 positive DEP, 음이면 negative DEP 가 결정 된다. 다시 말해 입자의 유전률과 입자를 둘러싼 용액의 유전률 과의 상관 계에 의해 DEP 방향이 결정이 되는 것이다. DEP force 는 지금까지 단지 시뮬레이션을 이용하여 계산되었지만 본 논문에서는 입자에 작용하는 DEP force를 Optical Tweezers를 이용하여 정량적인 값을 계산해 보고 이것을 시뮬레이션 결과와 비교해 보았다. 더 나아가 살아있는 세포인 yeast cell을 직접 배양하여 이것의 DEP force 도 구해보았다.

제 3 장 Experimental System

3.1 Optical Tweezers System

그림(3.1) 는 우리가 설계한 Optical Tweezers system의 개략도를 보여준다.

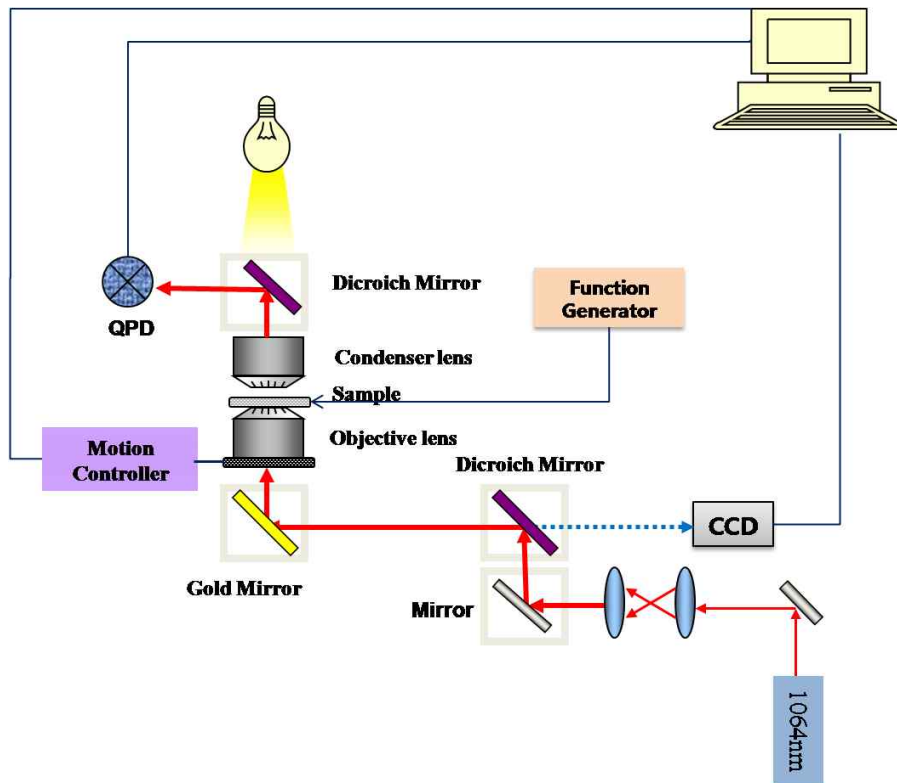


그림 3.1 Optical Tweezers System(개략도)

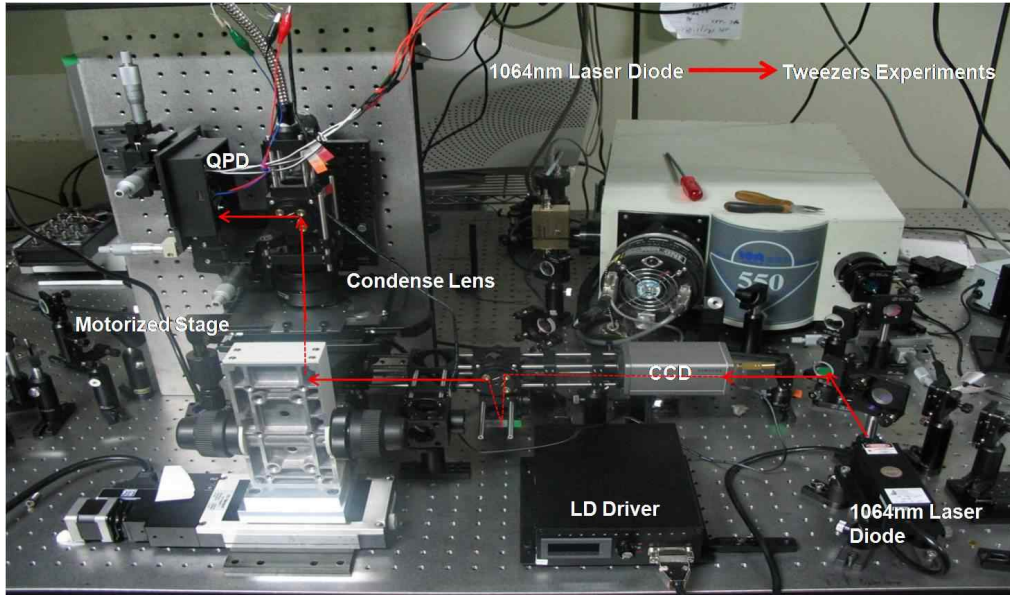


그림 3.2 Optical Tweezers System(사진)

실험에 사용한 광원은 1064nm Diode Laser 로써 물에 대한 흡수도가 가장 낮은 파장이기 때문에 입자에 작용하는 손상을 최소화 했다. 또한 실험에 사용한 laser 의 power 도 10mw 로 laser의 세기에 의해 입자에 열이 작용하는 것을 방지 하였다. 빛은 ND(Neutral Density) filter를 이용하여 power를 조절 하였고 ND filter를 통과한 빛은 두 장의 렌즈에 의해 대물렌즈 뒤의 개구수를 가득 채울 수 있을 정도로 확장을 시켰다. 2장에서 살펴봤다시피 포획을 하기 위해서는 강하게 집속된 빔이 필요하기 때문에 N.A 가 큰 대물렌즈를 사용하였으며(100x ,1.23N.A ,Oil Immersion Type, Zeiss) oil immersion type 의 대물렌즈를 사용함으로써 cover glass에서 발생하는 형광이나 반사등의 잡음을 방지하였다.[30] 이색거울을 사용하여 1064nm 의 빔은 반사시키고 할로젠램프에서 나오는 빔은 투과 시켜서 CCD를 통하여 영상을 획득 할 수 있다. 대물렌즈를 통과한 빛은 입자를 포획 하

게 되고 포획된 입자의 정보를 가지고 산란된 빔은 다시 Condense lens(50x, N.A1.25, Olympus) 에 의해서 모아지게 되고 이것이 QPD 로 들어가 입자의 움직임을 전기적 신호로 나타 내 준다. 세포를 포함한 챔버는 Motorized Stage와 연결되어 우리가 원하는 방향과 속도로 움직일 수 있게 한다. 기계적으로 stage를 움직이고 QPD를 통해 빛의 신호를 받아들이는 등의 일련의 작업등은 우리가 직접 설계한 Labview 프로그램으로 동기화 되어 있다. 그림 (3.2) 는 우리가 설계한 Optical Tweezers system의 직접적인 모습이다.

3.2 Chip Design

유전체에 작용하는 DEP force를 구하기 위해서 그리고 calibration을 하기 위해서는 전극을 포함한 chip의 제작이 필요하다. 그림(3.3) 는 우리가 제작한 Chip의 모습이다.

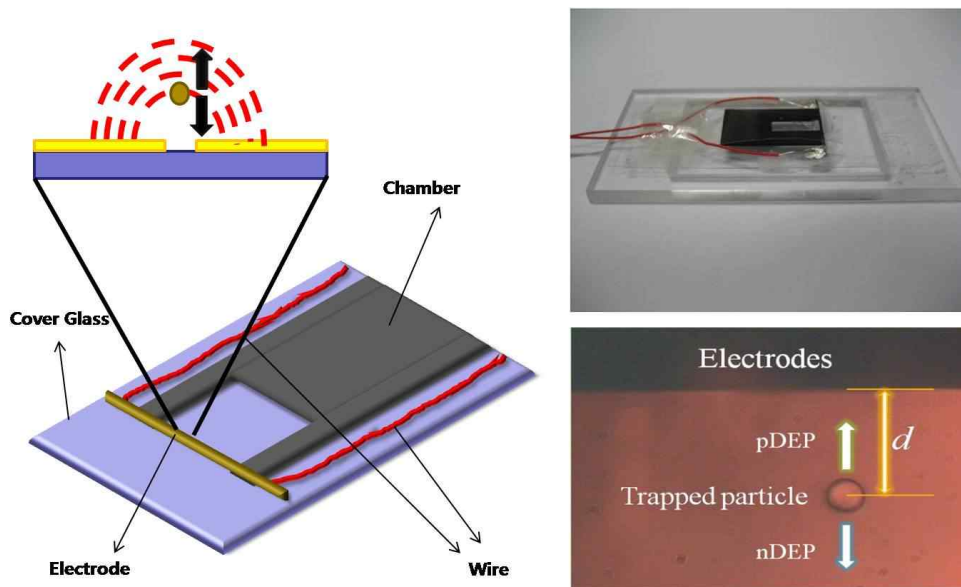


그림 3.3 제작된 Chip의 모습

챔버는 아크릴 재질이며 전극의 높이를 고려해야 하기 때문에 전극 높이와 같은 0.5mm 두께이다. 챔버와 전극이 접촉하는 부분에 공간을 만들어 이곳이 입자를 포함한 용액이 위치하게 된다. 대물렌즈는 이 공간의 아래 부분에 위치하게 되어 입자를 포획하게 되고 이 빛이 condense 렌즈를 거쳐 QPD 로 들어가게 된다. 전극을 포함한 Chip은 Oxided 기반의 실리콘 wafer를 사용하여 제작되었으며 길이는 4cm 높이는 0.5mm 이다. 그림에서 보는바와 같이 이 chip안에는 두 개의 전극이 50 μ m 간격을 두고 독립되어 붙어있다. 전극의 높이는 0.2mm 로 쌓아 올려져 있으며 높은 전압 상황에서 실험을 하는 것이 아니기 때문에 전극에 따로 특별한 처리는 하지 않았다. 이 전극을 Optical Tweezers를 이용하여 힘을 측정 할 수 있도록 옆으로 세워서 제작을 한 것이 이 chip 제작의 핵심이다. 그림(3.3)에서 알 수 있듯이 불균일한 전기장 안에 입자는 일차원적인 힘만 받게 하기 위해 독립된 전극 사이에 위치하게 되고 이것을 통하여 정확한 힘의 크기를 측정 할 수 있다. Chip은 실리콘 그리스를 사용하여 cover glass 에 접착 할 수 있도록 하였고 chip 끝 부분에 silver paste를 이용하여 전선을 부착하였고 이것은 function generator 와 연결이 되어 원하는 주파수와 전압을 전극에 인가 할 수 있다.

3.3 Preparation of Hydrogel Alginate Bead

칼슘 알지네이트 비드를 만들기 위해서 Sodium Alginate powder (61 % L-guluronic) 와 Calcium chloride를 사용하였다(Sigma Aldrich). 알지네이트 비드를 농도별로 만들기 위해 Sodium Alginate powder를 1%, 2%, 3%를 각각 준비하였다. Calcium chloride 1.2g을 50mL isobutanol 에 섞은 후 50°C에서 6시간 동안 가열 하였다. 그 다음 알지네이트를 비드의 모양으로 만들기 위해 50mL oleic-acid를 CaCl₂ 용액에 섞은 후 120°C에서 12시간 동안 혼합을 하였다. 이렇게 완성된 oleic acid-calcium chloride 용액을 Petri dish 에 놓은 후 농도 별로 akse 들어 놓았던 alginate solution을 분무기를 이용하여 oleic acid-calcium chloride용액 위에 뿌려서 일정한 크기의 알지네이트 비드를 제작 하였다. 마지막으로 원심

분리기를 이용하여 알지네이트 이외의 불순물을 제거 한 후 실험에 사용 하였다.
그림 3.4 는 직접 제작한 알지네이트 비드를 Optical Tweezers를 이용하여 포획
한 후 CCD 이미지로 본 것이다.

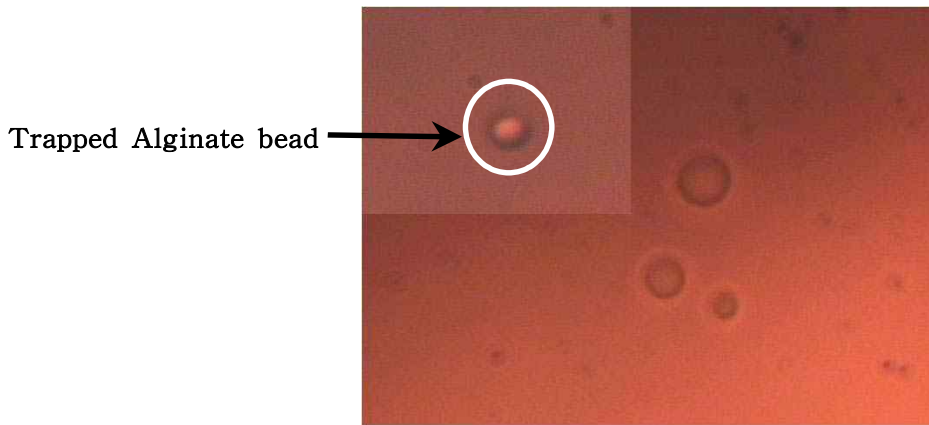


그림 3.3 포획된 알지네이트 비드

제 4 장 Results

4.1 Calibrations

4.1.1 Trap Stiffness

Optical Tweezers를 이용하여 외부에서 입자에 작용하는 힘을 측정하기 위해서는 식 (2.9)와 식 (2.11) 에서 알 수 있듯이 유전체에 작용하는 힘의 반대방향의 힘인 복원력을 구해야 한다. 유체 속에서 입자의 성질을 나타내는 k 는 Trap stiffness 로 표현하며 이것은 다시 식(2.9) 으로 표현 할 수 있다. k 값을 구하기 위해서는 corner frequency(f_c) 값을 먼저 알아야 한다. 앞선 2장에서 알 수 있듯이 힘을 측정하는 방법중 하나인 power spectrum method를 이용하여 corner frequency를 구할 수 있다 그림 (2.5) 는 power spectrum을 이용하여 우리가 구한 corner frequency 값이다. 제작한 system을 검증하기 위해서 레이저의 파워를 달리하면서 corner frequency 가 어떻게 변화하는지를 알아보았다.

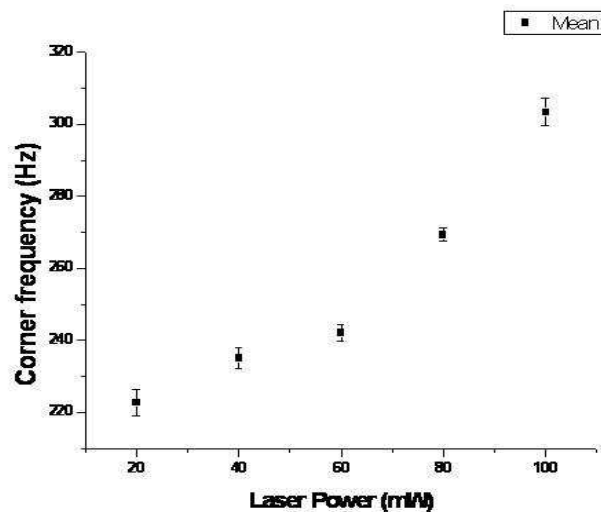


그림 4.1 레이저 파워에 따른 corner frequency 의 변화

그림 (4.1) 는 이것의 결과를 보여준다. 레이저 파워가 커짐에 따라서 포획 하려는 힘이 더 강해지는 것을 예상 할 수 있다. 다시 말해서 입자를 잡고 있으려는 성질이 더 강하다는 의미이므로 이것은 Trap stiffness 가 커지며 입자의 움직임은 작아진다는 의미로 해석 할 수 있다[31]. 식(2.9)에서 알 수 있듯이 corner frequency 값과 trap stiffness 값은 비례 관계에 놓여 있으므로 레이저 파워가 커짐에 따라서 corner frequency 값도 커지고 Trap stiffness 값도 커짐을 알 수 있다. 그림(4.2)는 레이저 파워에 따른 Trap stiffness 의 변화를 나타낸다.

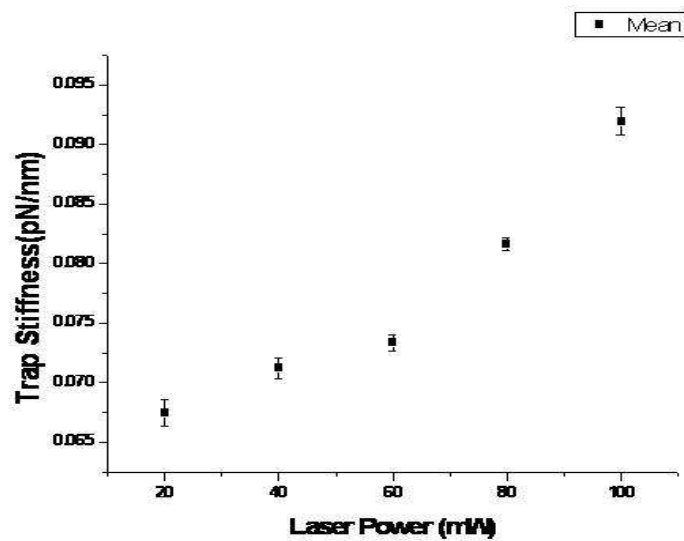


그림 4.2 레이저 파워에 따른 Trap stiffness 의 변화

4.1.2 Displacement

위 식(2.9)을 통하여 trap stiffness 값 k 를 구했다면 나머지 한 항인 x 값을 알면 외부에서 입자에 가해지는 힘을 계산 할 수 있다. 일반적으로 복원력을 구하는 식에서 x 는 물체가 움직인 거리를 나타낸다. 수용액 안의 입자도 마찬가지로 힘을 받았을 때 얼마만큼의 거리를 이동했는지가 x 를 나타낸다. 하지만 pN 단위의 힘이 가해지는 상황에서 입자가 얼마만큼 움직였는지를 영상으로 판단하기는 쉽지 않다. 우리는 이것을 위치 센서인 QPD를 사용하여 간접적으로 구할 수 있다. 앞서 2장에서 설명했다시피 QPD 는 입자가 움직인 거리를 전기적인 신호로 바꾸어 주는 역할을 한다.

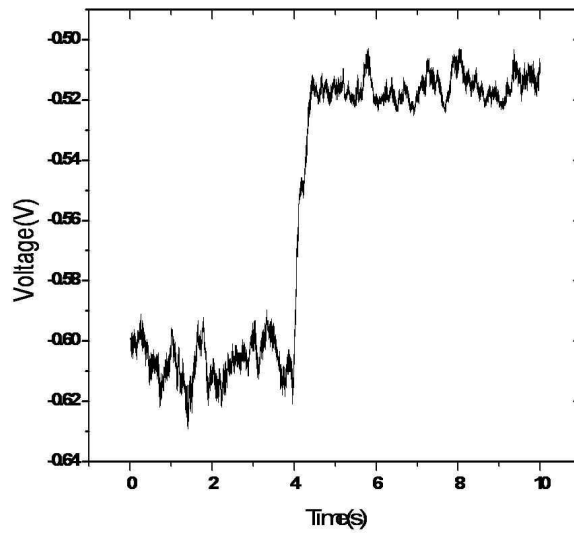


그림 4.3 입자의 속도를 증가하였을 때 QPD 에 들어오는 전기적 신호

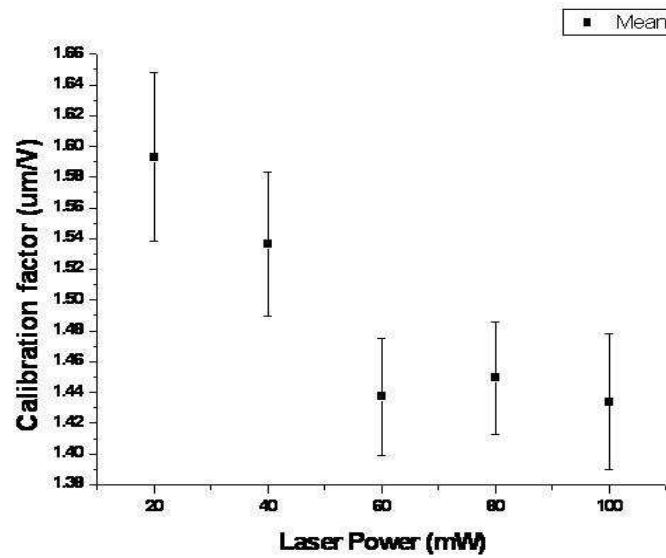


그림 4.4 레이저 파워에 따른 calibration factor 값의 변화

그림(4.3) 는 임의의 속도를 주었을 때 QPD 에 나타나는 전기적인 신호를 나타낸 것이다. 이것은 직접적인 거리가 아닌 전기적 신호(전압) 으로 표현되기 때문에 이것을 거리로 바꿔 줄 수 있는 값이 필요하다. 이것을 calibration factor 라고 하며 식(2.11)를 통해 알 수 있다. 그림(4.4) 은 레이저 파워에 따른 calibration factor를 나타내고 있다. 식(2.11)에서 보듯이 calibration factor 는 corner frequency 값과 반비례하므로 다음과 같은 형태의 그래프를 보임을 알 수 있다.

4.1.3 Optical Tweezers System calibration

전체적인 시스템의 성능을 평가하기 위해 몇 가지 실험을 더 진행 하였다. 먼저 포획된 입자의 포획 위치에 따라, 다시 말해서 cover glass 바닥으로부터 얼마만큼의 높이로 포획이 되어 있는가에 따른 corner frequency 값을 측정해 보았다. 실험에서 사용한 입자는 $5\mu\text{m}$ 크기의 polystyrene beads 이고 포획된 레이저의 power 는 15mW 로 일정하게 유지시켰다. 수용액은 증류수를 사용하였다. 그림 (4.5) 은 비드의 위치에 따른 corner frequency 값을 보여준다. 우리가 실험에 사용한 대물렌즈는 oil immersion type 이다. Oil immersion type 의 대물렌즈는 대물렌즈와 cover glass 사이에 oil 이 들어가서 작은 파워로도 포획 효율을 좋게 할 수 있다는 장점을 가지고 있다.[32] 하지만 oil 과 glass 그리고 입자가 들어있는 수용액 사이의 굴절률의 차이 때문(refractive index mismatch)에 포획 깊이가 깊어질수록, 입자가 바닥에서 멀어질수록 포획 효율이 급격히 떨어진다는 단점을 가지고 있다.[33]

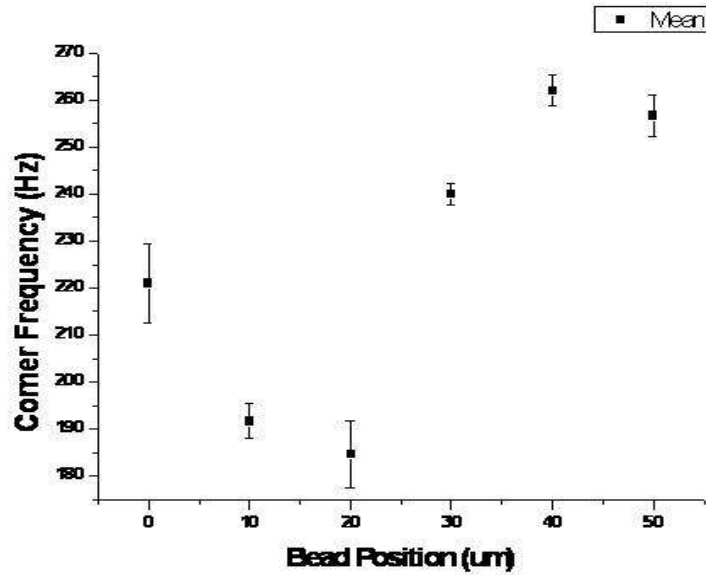


그림 4.5 비드의 위치(cover glass로부터의 높이)에 따른 corner frequency의 변화

그림(4.5)에서 보듯이 30 μm 이상의 높이에서 포획 될 경우 굴절률의 차이에 의한 수차문제(abberation)로 에러가 생긴다. 이러한 문제를 막기 위해서는 water immersion type의 대물렌즈가 필요하다[34]. 이것은 굴절률의 차이가 없기 때문에 깊은 곳 까지 포획이 안정적으로 가능하다. 그림(4.6)은 oil immersion type의 대물렌즈를 사용할 경우(a)와 water immersion type의 대물렌즈를 사용했을 경우(b)의 굴절률의 차이를 보여준다.[34] 또한 입자가 바닥에 아주 가까이 있을 경우에 마찰력이나 glass에 의한 반사작용으로 인하여 올바른 값을 얻을 수 없다. Karen C에 의하면 입자의 반지름을 r 이라고 할 때 포획 위치는 입자의 반지름에 10배 이상이 되어야 한다고 실험을 통해 입증하였다.[34] 따라서 우리는 15-30 μm 사이의 깊이에서 올바른 값을 얻을 수 있었다.

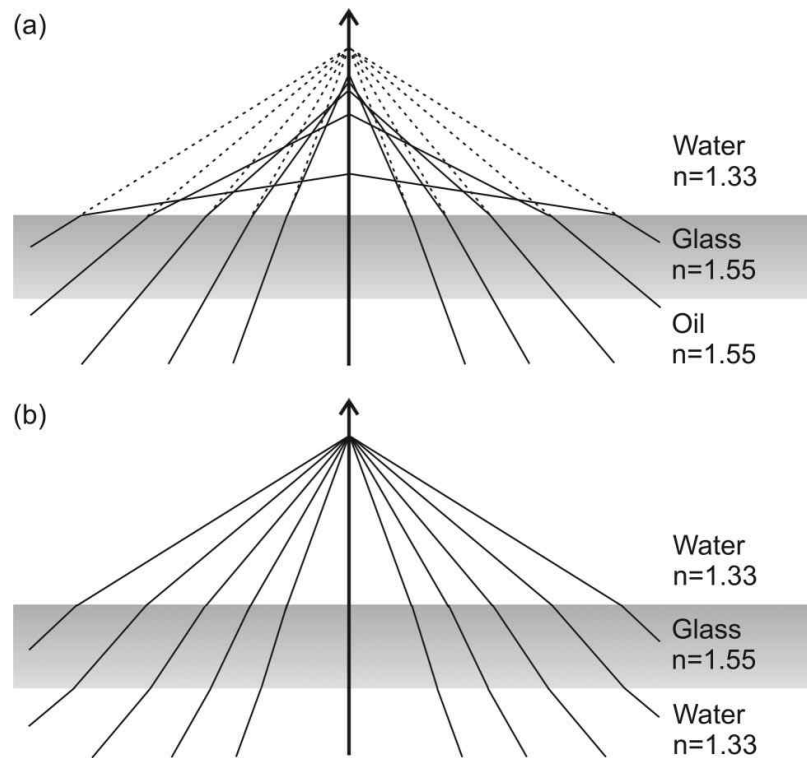


그림 4.6 oil immersion type(a) 과 water immersion type(b) 인 경우의 굴절률의 차이

이것을 한번 더 검증하기 위하여 우리는 포획 깊이에 따른 용액의 viscosity 값을 측정해 보았다. 이미 용액의 viscosity 값을 알고 있는 상태이기 때문에 깊이에 따라 이 값을 측정해 보면서 어느 깊이에서 우리가 문헌을 통해 알고 있는 값과 비교해 보았을 때 유사한 값이 나오는지 알아보았다. 그림(4.7) 는 이 결과를 나타낸다. 실험 결과는 깊이마다 각각 5번씩 측정을 한 후 통계처리 하였으며 0-15 μm 구간과 30 μm 이상의 구간에서 측정값과 실측값의 차이가 있다는 것을 볼 수 있었다. 따라서 본 논문에서 제작한 Optical Tweezers System 은 5 μm 크기의 입자를 사용 할 경우 바닥으로부터 20 μm 전후의 깊이에서 신뢰할 수 있는 결과를 얻을 수 있었다.

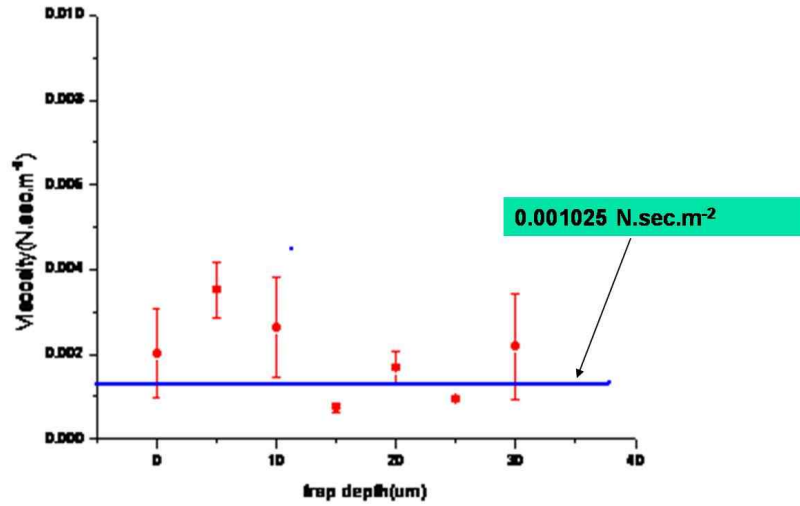


그림 4.7 viscosity 값을 이용해 다시 확인한 최적의 포획 높이

Calibration 에 대한 실험진행은 [35]의 참조문헌과 같이 진행 하였다.

4.2 Alginate Beads Experiments

앞서 설명한 calibration 관계식에서 알 수 있듯이(식 2.9) corner frequency 와 포획된 비드의 크기사이에는 반비례 관계가 성립함을 알 수 있다. 알지네이트 비드는 swelling 과 degradation 작용을 진행 하여 비드의 크기가 달라짐을 알고 있기 때문에 corner frequency 와 알지네이트 비드의 크기와의 관계를 이용하여 실험을 진행 하였다. 그림 4.8 ,4.9 은 각각 1,2,3% 농도의 알지네이트 비드를 포획한 후 PBS 용액(4.8) 와 HCl 용액(4.9) 상태에서 6시간 동안 관찰 한 결과이다. 그림에서 알 수 있듯이 swelling 이 진행되는 구간과 degradation 이 진행되는 구간을 뚜렷히 살펴 볼 수 있다.

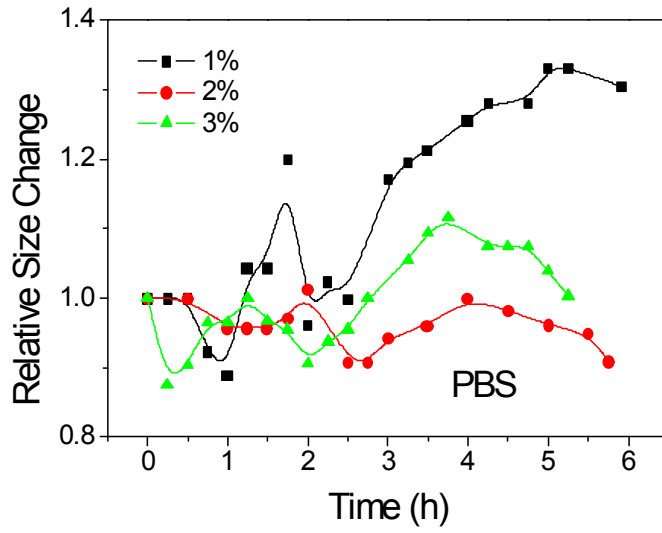


그림 4.8 시간에 따른 PBS 용액에서 알지네이트 비드 크기 변화(농도별)

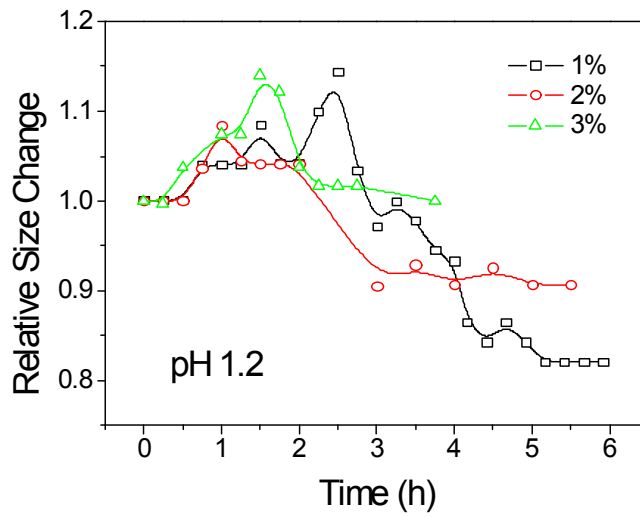


그림 4.9 시간에 따른 pH 1.2에서 알지네이트 비드 크기 변화(농도별)

처음 2시간 동안은 알지네이트 비드가 완전한 형태로 형성 될 때 까지 걸리는 시간으로 볼 수 있으며 그 후로 swelling 과 degradation 이 진행된다. 이것은 알지네이트 비드의 농도에 따라 swelling 되었다가 degradation 이 진행되어지는 시간, 즉 peak time이 다름을 알 수 있다. 이것을 나타낸 것이 그림 4.10 이다. 지금까지 밝혀진 바에 따르면 알지네이트 비드가 정확하게 어떠한 기전을 가지고 swelling 과 degradation 이 되는지는 알려지지 않았지만, 알지네이트 비드가 PBS 용액에 있을 때 알지네이트 비드의 껍질을 구성하고 있는 Ca^{2+} 이온과 PBS 속에 있는 Na^+ 이온의 상호작용이 일어난다. 처음에는 Na^+ 이온이 알지네이트 비드를 구성하는 카르복실 그룹과 결합하여 크기가 커지게 되는 swelling 이 일어난다. 그 후 모든 이온들이 카르복실 그룹과 결합이 끝나게 되면, 다시말해 swelling 작용이 끝나면 알지네이트를 구성하는 egg-box (그림 2.8) 들의 영감이 약해져서 Ca^{2+} 이온이 바깥으로 방출되게 된다. 이것이 degradation 과정이다. 알지네이트 비드를 구성하고 있는 알지네이트 농도가 높을수록 이온들 간의 상호작용이 활발하게 일어나서 swelling 이 끝나는 시간이 점점 빨라짐을 알 수 있다. 그림 4.11 는 swelling 이 끝나는 시점부터 관찰이 끝날 때까지의 알지네이트 비드의 크기 변화를 나타낸다. 농도에 따라 크기의 변화율이 달라지기 때문에 degradation ratio 도 달라지게 된다. PBS 용액일 경우 더 많은 시간을 두고 관찰을 해야 하기 때문에 표에는 표시하지 않았다.

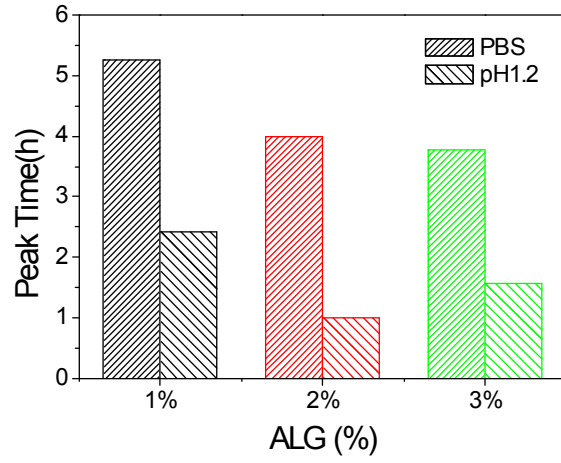


그림 4.10 각각의 용액속에서 알지네이트 농도에 따른 Peak Time

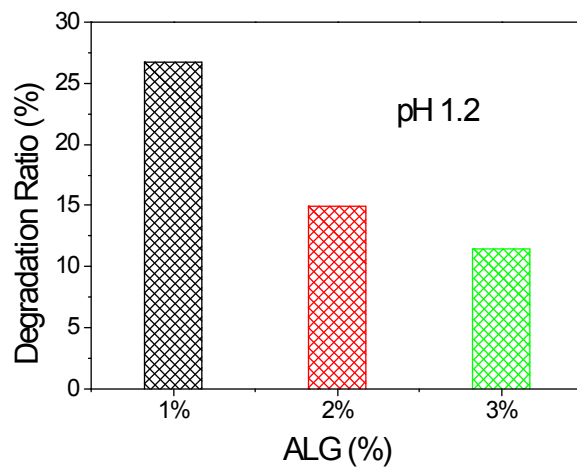


그림 4.11 pH 1.2에서 알지네이트 농도에 따른 Degradation ratio

4.3 Dielectrophoresis Force

앞선 이론들과 calibration 값들을 바탕으로 유전체에 가해지는 Dielectrophoresis force를 구해보았다. 실험은 3가지 서로 다른 변수를 가지고 진행을 하였으며 모든 실험은 각각 3번씩 실험하여 평균 값을 취하였다. 먼저 그림 (4.12) 는 유전체의 크기에 따른 DEP force를 주파수에 따라 나타내어 보았다. 실험에 사용한 비드는 각각 5 μm (Duke Scientific Corp., 4205A), 7 μm (Fluka, 78462) 이며 10 μL De-ionized Water(D.I Water) 와 섞어서 사용하였다. 비드는 바닥으로부터 20 μm 높이에 포획 되었으며 전극으로부터 비드 까지의 거리는 7 μm 로 두 비드 모두 동일한 조건에서 실험 하였다. 또한 비드를 두 전극의 사이에 위치하도록 하여 일차원적인 힘만을 고려하였다. 가해주는 주파수 영역은 300Hz부터 1Mhz 까지 이며 2V_{p-p}으로 전압을 인가하였다.

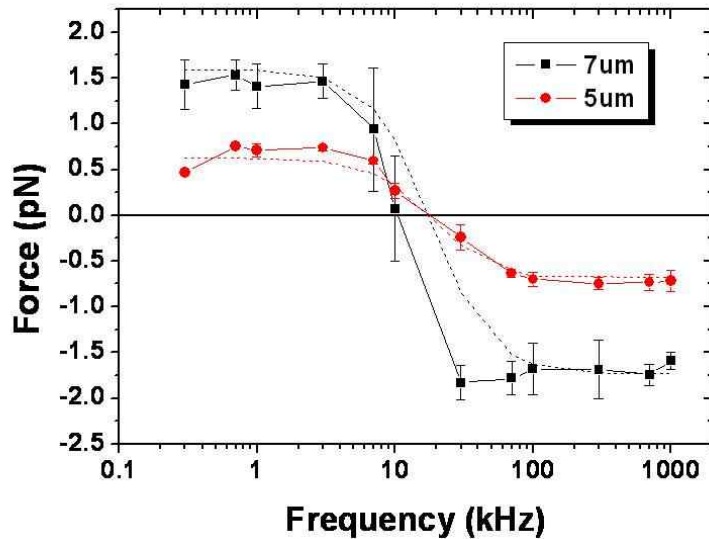


그림 4.12 비드 크기에 따른 DEP force 실측값과 시뮬레이션

식(2.13)에서 보는바와 같이 DEP force 는 입자의 크기에 영향을 받는다. 이번 실험에서는 입자의 크기만을 고려 하여 힘을 구해 보았기 때문에 그림 (4.12)와 같은 결과를 얻을 수 있다. 실선으로 표시 된 것이 직접 계산한 DEP force 이고 점선으로 표시 된 것은 시뮬레이션을 통한 DEP force 의 결과이다. 전체적인 시뮬레이션은 Matlab 프로그램을 이용하여(R12, Mathworks) 계산하였으며 시뮬레이션에 필요한 전기장에 대한 정보는 finite element program을 사용하여 우리 실험에 맞는 조건으로 계산을 하였다. 용액에 대한 정보는 conductivity meter(Thermo Electron Corp., Orion 115A+)를 사용하여 얻을 수 있었고 입자에 대한 정보는 Zeta potential analyzer 를 이용하여 얻을 수 있었다.

다음 실험은 용액의 유전율을 바꿔가면서 실험을 진행 하였다. 식(2.14)에서 알 수 있듯이 용액의 유전율은 Clausius-Mossorri factor 에 영향을 주게 되어 Positive DEP 와 Negative DEP를 결정하는데 중요한 요소가 된다. 또한 이것은 유전율의 값에 따라 DEP force 에도 영향을 미친다. 그림(4.13) 는 DI water, 1mM NaCl 그리고 10mM NaCl 용액에서, 다시 말해서 각각 서로 다른 유전율을 가진 용액에서 주파수에 따른 DEP force 의 변화를 나타내 보았다.

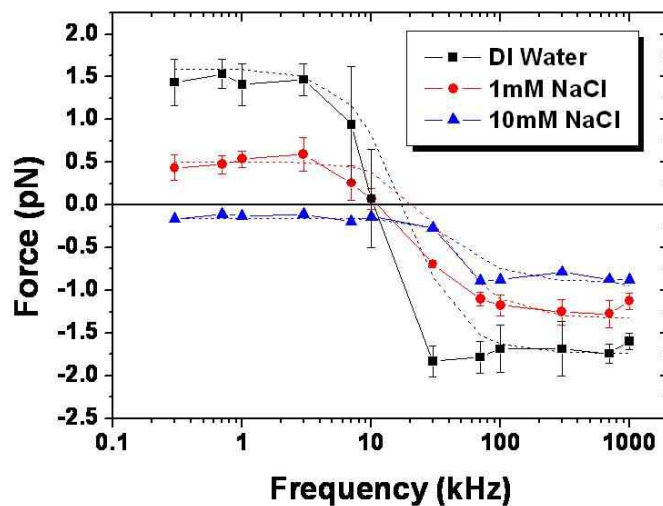


그림 4.13 용액의 전도도차이에 따른 DEP force 의 실측값과 시뮬레이션

유전율은 전도율과 관계가 있으므로 conductivity meter를 사용하여 각각의 용액에 대한 전도율을 측정해 보면 D.I water 에서는 $1.0 \times 10^{-5} \text{S/m}$, 1mM NaCl 에서는 $9.0 \times 10^{-5} \text{S/m}$, 그리고 10mM NaCl 에서는 $9.5 \times 10^{-4} \text{S/m}$ 로 측정되었다. 가해주는 주파수의 범위는 300Hz에서 1Mhz 까지이며 2Vp-p 로 전압을 인가하였다. 시뮬레이션 결과와 비교해 보았을 때 거의 비슷한 결과가 나옴을 알 수 있었고 용액의 전도도에 따른 DEP 의 양상이 직접적으로 얼마만큼의 힘의 차이로 나타나는지를 계산 할 수 있었다. 위 두 가지 실험에서 시뮬레이션 결과와 비교해 보았을 때 crossover frequency 즉 힘의 방향이 바뀌는 주파수 영역이 실제 측정한 값과 차이를 보이는 것을 볼 수 있다. 이것은 실험을 진행 할 때는 아주 작은 공간 안에 용액이 들어 있어서 용액의 전도도가 실제로 측정한 값과 맞지 않는 경우도 발생할 수 있고 외부에서 입자에 가해지는 에너지(포획 빔의 열에너지 혹은 전압을 인가하였을 때 전극에서 발생하는 열에너지)를 완전히 무시 할 수는 없기 때문에 약간 다른 값을 가질 수 있다고 추측 된다.

마지막으로 같은 크기의 비드를 가지고 전극에 인가되는 전압의 세기에 따른 힘의 크기를 전극으로부터 비드 사이의 거리를 바꾸어 가며 실험을 하였다. 비드는 $7\mu\text{m}$ 크기를 사용하였고 바닥으로부터 비드까지의 높이는 $20\mu\text{m}$ 로 D.I water 용액 안에서 포획을 하였으며 주파수는 100Khz를 사용하여 Negative DEP force를 받게 하였다. 식(2.13)에서 알 수 있듯이 전극에 가해지는 전압의 크기가 달라지면 전기장의 세기에 영향을 주어 DEP force 가 달라진다. 또한 전극으로부터 비드까지의 거리는 전기장의 세기와 관련이 있으므로 이것 역시 DEP force의 차이를 보여주는 요인이 된다. 비드가 전극으로부터 가까이 있을 경우 전기장의 세기가 큰 부근에 위치하게 되고 이것은 입자에 작용하는 DEP force를 크게 한다. 그림 (4.14) 는 이것의 결과를 보여준다.

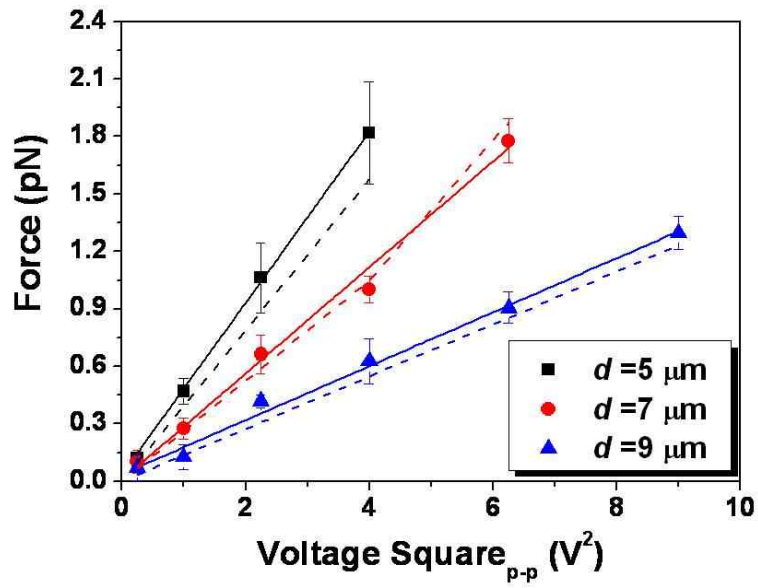


그림 4.14 전압의 세기와 전극으로부터의 거리에 따른 DEP force 의 실측값과 시뮬레이션 값

제 5 장 Conclusion

1976 년 Optical Tweezers 가 처음 제안된 이후로 다양한 분야에서 계속 발전 해 왔으며 생명과학, 의학이 발달함에 따라 급속도로 필요성이 늘어나고 있는 기술 중 하나이다. Dielectrophoresis 역시 최근에 이것을 이용하여 세포를 분류하거나 다루는 기술로 각광을 받고 있다. 본 논문에서는 외부에서 주어진 힘을 측정 할 수 있는 Optical Tweezers을 제작하여 불균일한 전기장 안에서 입자가 받는 힘, 즉 DEP force를 측정하여 보았다. 지금까지 DEP를 이용한 연구들을 살펴보면 단순히 DEP force를 사용하여 입자나 세포 등을 분류 해 내는 연구가 대부분을 차지한다. 하지만 본 논문에서는 입자에 가해지는 DEP force 가 정량적으로 얼마만큼의 크기를 가지는지, 또한 여러 가지 변수들을 고려하였을 때 DEP force 가 어떻게 변하는지를 직접적으로 계산을 하였다.

빛이 입자를 통과하게 되면 굴절에 의하여 빛이 가지고 있는 모멘텀의 변화가 생기게 된다. 이것은 결국 입자의 모멘텀에도 영향을 주게 되어 입자가 빛에 의해 움직일 수 있는 힘의 근원이 된다. 이렇게 입자에 작용하는 힘은 다시 크게 두 가지로 나누어 볼 수 있는데 첫 번째 힘은 입자를 빛의 진행 방향으로 밀어 내려고 하는 힘인 scattering force, 두 번째로는 빛의 세기가 큰 방향으로 입자를 끌어 오려는 힘인 gradient force 로 구분된다. 입자를 포획을 하기 위해서는 입자를 끌어당기는 힘인 gradient force 가 scattering force 보다 큰 힘을 가져야만 안정적인 포획을 할 수 있다. 그러기 위해서는 몇 가지 선행조건이 필요한데, gradient force 는 빛의 세기가 강한 방향으로 작용하는 힘이기 때문에 빛을 강하게 집속시켜 줄 수 있어야 한다. 또한 입자의 굴절률이 입자 주위의 용액의 굴절률 보다 커야만 입자를 끌어당기는 방향으로 힘을 받을 수 있다. 이렇게 포획된 입자는 산란된 빛을 방출하게 되는데 이것은 입자의 정보를 담고 있다. 이것을 이용하여 외부에서 입자에 가해지는 힘을 구할 수 있는 것이다. 본 논문에서는 힘을 구하는 방법 중 하나인 Power spectral density method를 이용하여 힘을 계산하였다. 제

작된 system을 평가하기 위해 레이저 파워에 따른 corner frequency 의 변화, trap stiffness 의 변화 그리고 calibration factor 의 변화 등을 측정하였고 실험에 필요한 최적의 포획 높이를 찾을 수 있었다. Corner frequency 와 비드 크기와 관계를 이용하여 약물 전달 체계에 많이 이용되는 알지네이트 비드를 포획하여 시간에 따른 크기 변화를 관찰 하였다. 각각 PBS, pH1.2 상태의 다른 용액에서 1,2,3% 의 알지네이트 농도를 가지는 비드를 가지고 실험을 진행 하였다. 지금까지 대부분의 연구가 수용액 상이 아닌 마른 상태(dry)에서 연구를 진행하여 왔는데 이번 알지네이트 비드실험은 우리 몸과 조건이 비슷한 수용액 상에서 실험을 진행하여 실제적으로 약물 전달 물질들이 우리 몸에 들어갔을 때 어떠한 작용을 하는지에 대한 기초적인 연구가 될 것이라고 생각한다.

또한 Optical Tweezers 가 pN 단위의 힘을 측정 할 수 있다는 점을 바탕으로 직접 제작한 chip을 가지고 Optical tweezers를 이용하여 DEP force를 측정하였다. DEP force 는 주파수에 따라, 인가된 전압의 세기 즉 전기장의 세기에 따라, 입자의 크기에 따라 그리고 용액과 입자의 전도도에 따라 힘이 달라진다. 본 논문에서는 위에서 설명한 변수들을 고려하여 힘을 측정하고 이것을 시뮬레이션 결과와 비교하여 보았다. 직접 측정한 DEP force 와 시뮬레이션 결과와 비교해 보았을 때 거의 유사한 결과 값을 얻을 수 있었다.

추후에는 비드가 아닌 살아 있는 세포, 예를 들어 yeast cell 이나 E.coli 등을 포획하여 이것의 DEP force를 측정 해 볼 예정이며 또한 전하를 띄고 있는 입자의 DEP force 는 용액의 환경에 따라 어떻게 변화하는지도 알아볼 예정이다. 더 나아가서는 정상 조직과 암조직의 DEP force 가 절대적으로 얼마만큼의 값을 가지고 있는지도 실험을 해 볼 예정이다.

참 고 문 헌

- [1] SB. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, "Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules," Science 271, 795-799 ,1996
- [2] MD. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, SM. Block, "Stretching DNA with optical tweezers," Biophys.J,72, 1335, 1997
- [3] C. Cecconi, EA. Shank, C.Bustamante, S. Marqusee, "Direct observation of the Three-state Folding of a single protein molecule," Science 309, 2057, 2005
- [4] J. Liphardt, B. Onoa, SB. Smith, I. Tinoco, C. Bustamante, "Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force" Science 292, 733, 2001
- [5] RT. Dame, MC. Noom, GL. Wuite, "Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation" Nature 444, 387-390 ,2006
- [6] K. Svoboda, CF. Schmit, BJ. Schnapp, SM. Block, "Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry," Nature, 365, 721-727, 1993
- [7] Tønnesen, H.H. & Karlsen, J. "Alginate in drug delivery systems" Drug Development and Industrial Pharmacy, 28, 621-630 ,2002
- [8] Manojlovic, V., Djonlagic, J., Obradovic, B., Nedovic, V. & Bugarski, "Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine," International Journal of Nanomedicine, 1, 163-171, 2006
- [9] Murua, A. *et al* "Cell microencapsulation technology: Towards clinical application", Journal of Controlled Release, 132, 76-83 ,2008
- [10] J. Yang, Y. Huang, X.-B. Wang, F.F. Becker, P.R. Gascoyne, " Cell separation on microfabricated electrodes using dielectrophoretic/gravitational field-flow fractionation" Analytical Chemistry, 71, 911-918, 1999
- [11] M.P. Hughes, "Strategies for dielectrophoretic separation in laboratory-on-a-chip systems", Electrophoresis ,23, 2569-2582. 2002
- [12] Y. Huang, S. Joo, M. Duhon, M. Heller, B. Wallace, X. Xu, "Dielectrophoretic cell separation and gene expression profiling on microelectronic chip arrays", Analytical Chemistry, 74, 3362-3371, 2002

- [13] K Berg-Sørensen, H Flyvbjerg, "Power spectrum analysis for optical tweezers," *Review of Scientific Instruments*, 75, 594-612, 2004
- [14] A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm, and S. Chu "Observation of a single beam gradient force optical trap for dielectric particles," *Optics Letters*, 11, 288, 1986
- [15] Yasuhiro Harada, Toshimitsu Asakura, "Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime," *Optics Communications*, 124, 529-541, 1996
- [16] A. Ashkin, "Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime," *Biophysics Journal*, 61, 569-582. 1992
- [17] S. Chu, "Laser manipulation of atoms and particles," *Science*, 253, 861-866, 1991
- [18] H. Felgner, O. Muller, M. Schliwa, "Calibration of light forces in optical tweezers", *Applied Optics*, 34, 977-982, 1995
- [19] S. M. Block, "Making light work with optical tweezers," *Nature*, 360, 493-495, 1992
- [20] G. Pesce and A. Sasso, S. Fusco "Viscosity measurements on micron-size scale using optical tweezers" *Review of Scientific Instruments*, 76, 1151-1155, 2005
- [21] Svoboda, K., Schmidt, C.F., Schnapp, B.J. and Block, S.M. "Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry," *Nature*, 365, 721-727, 1993
- [22] Simpson, N.E., Stabler, C.L, Sambanis, A. & Constantinidis, "The role of the CaCl₂-guluronic acid interaction on alginate encapsulated TC3 cells", *Biomaterials*, 25, 2603-2610, 2004
- [23] Bajpai, S.K. & Sharma, S. " Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions, *React. Funct. Polym*, 59, 129-140, 2004
- [24] Blandino, A., Macias, M. & Cantero, D. "Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules", *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 319-324, 2000
- [25] S. Zhou, X. Deng, M. Yuan "Investigation on preparation and protein release of biodegradable polymer microspheres as drug-delivery system", *Journal of Applied Polymer Science*, 84, 778-784, 2002

- [26] H. A. Pohl, "The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields", *Journal of Applied Physics*, 22, 869-871, 1951
- [27] H. A. Pohl, "Dielectrophoresis the behavior of neutral matter in nonuniform electric fields" Cambridge University Press, 1978
- [28] R. Pething, Y. Huang, X.B. Wang, "Positive and negative dielectrophoretic collection of colloidal particles using interdigitated castellated microelectrodes" *Journal of physics D: Applied physics*, 25, 881-888, 1992
- [29] T. B. Jones "Electromechanics of particles" ,Cambridge University Press, 1995
- [30] S. Nader S. Reihani, Mohammad A. Charsooghi, Hamid R. Khalesifard, and Ramin Golestanian "Efficient in-depth trapping with an oil-immersion objective lens" *Optics Letters*, 31, 766-768, 2006
- [31] W. H. Wright, G. J. Sonek, and M. W. Berns "Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers" 33, 1735-1748, 1994
- [32] Erik Fa" lman and Ove Axner "Influence of a glass - ater interface on the on-axis trapping of micrometer-sized spherical objects by optical tweezers" ,*Applied optics* 42, 3915-3926, 2003
- [33] S. Nader, Lene B. Oddershede "Optimizing immersion media refractive index improves optical trapping by compensating spherical aberrations" *Optics Letters*, 32, 1998-2000, 2007
- [34] K.C.Vermeulen,G.J.L.Wuite,G.J.M.Stienen,and C.F.Schmid "Opticaltrap stiffness in the presence and absence of spherical aberrations," *Applied optics*, 1813-1819, 2006
- [35] Sung-Bin Ju "Raman spectroscopic analysis of biological cells and trap stiffness measurements using optical tweezers" Yonsei University, 2008

Abstract

Study on alginate beads and Dielectrophoresis force using optical tweezers

Light carries linear and angular momentum. Hence, it can exert forces and torques on matters, which enables the optical tweezers to trap and manipulate a micro-sized dielectric objects at the focal point of a tightly focused laser beam. Up to the present, optical tweezers technique has been applied to a variety of scientific areas such as single level molecular biology, cell sorting, microfabrications, microrheology, metallic particles.

Alginate beads are commonly used in drug delivery studies such as drug release efficiency test from the alginate matrix during transportation to a target position. Therefore, it is important to investigate the property changes of the alginate beads as a drug or cell carrier.

Dielectrophoresis (DEP), first investigated by Pohl, is the translational motion of neutral matter caused by polarization effects in a nonuniform electric field. It has been applied in various applications such as cell separation, traveling wave dielectrophoresis, electrorotation, optoelectronic tweezers, and dielectrophoretic tweezers. DEP force has been theoretically calculated in many reports and measured using the idealized analytical balance method, the Stokes drag force method, and the null method. However, to the best of our knowledge, the DEP forces have never been measured in absolute unit nor compared to mathematical simulations directly.

In this thesis, we research on alginate beads at various conditions and direct measurement dielectrophoresis force using optical tweezers.

Keywords : Optical tweezers, Alginate beads, Dielectrophoresis Force