

광학 집계를 이용한 생물학적
세포의 라만 분광과
탄성 계수 분석

연세대학교 대학원
의 공 학 과
주 성 빈

광학 집계를 이용한 생물학적
세포의 라만 분광과 탄성 계수 분석

지도 김 범 민 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함


2008년 월 일


연세대학교 대학원

의 공 학 과

주 성 빈

주성빈의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 김 범 번 

심사위원 윤 대 성 

심사위원 김 수 기 

연세대학교 대학원

2008년 8월 일

감사의 글

가슴 뛰는 기대감과 설렘으로 시작한 대학원 생활, 이제 이 논문을 마지막으로 마무리 하고자 합니다. 마무리는 항상 아쉬움과 후회를 남기는 것 같습니다. 되돌아 보면 더 열심히 하지 못한 것과 조금 더 노력했다면 좋은 결과를 보고 졸업할 수 있지 않았을까라는 아쉬움과 후회가 남습니다. 대학원 생활 동안 많은 것들을 배우고 느끼고 나갑니다.

2년의 연구 기간 동안 수많은 좌절도 경험했으며 수많은 성취에 대한 기쁨도 느껴 보았습니다. 이 지면을 빌어 저를 여기 있게 해주신 모든 분들께 감사 드리고자 합니다. 우선 2년 동안 지도해 주시고 격려해 주신 김법민 교수님께 감사드립니다. 또한, 부족한 제 논문을 심사해 주시고 검토해 주신 윤대성 교수님, 김수기 교수님께 감사드립니다. 학부 과정부터 지금까지 많은 가르침을 주신 윤형로 교수님, 이윤선 교수님, 이경중 교수님, 김동윤 교수님, 김영호 교수님, 신태민 교수님, 김한성 교수님, 김지현 교수님, 이상우 교수님, 임창환 교수님, 서종범 교수님, 권기윤 교수님께 감사드립니다. 라만 연구에 많은 도움을 주신 라만 연구소의 최민경 선생님, 표준과학연구소의 이은성 박사님, 이재용 박사님께 감사드립니다. 참된 연구자의 모습을 보여 주신 강빈형, 졸업해서도 저를 걱정해주는 현이형(요즘도 밥잡이 없으신지...), 항상 고마운 수민형, 용희선배, 상륜선배, 화준선배, 기윤이, 진호에게 감사합니다. 그리고 졸업해서도 제게 고통을 안겨주는 문식이, 재영이... 고맙다... 연구실의 만형으로 친형처럼 잘 해주신 동수형, 연구에 많은 도움을 주신 상원형, 어려운 얘기 많이 들어주신 용진형 감사합니다. 그리고 나보다 더 고통스러운 승덕이, 나보다 더 시끄러운 승환이와 창근이, 연구실 홍일점 지영이, 알다가도 모를 듯 현우, 오묘한 정신세계의 소유자 달권, 고통의 세계로 들어 온 진우 그동안 연구실 생활 같이 해 온 사랑하는 연구실 식구들 모두에게 감사드립니다. 그

리고 언제 어떻게 이 논문을 보게 될지도 모르는 성사모 동생들과 202호와 그 동
기들에게 감사합니다.

마지막으로 저를 항상 믿고 격려해 주신 세상에서 제가 가장 사랑하고 존경하는
어머님께 감사드립니다.

2008년 8월 논문을 마무리 하며...

주 성 빈 울림

차 례

차례	· · · · ·	
그림 차례	· · · · ·	
표 차례	· · · · ·	
국문 요약	· · · · ·	
제 1장 서론	· · · · ·	1
제 2장 이론	· · · · ·	3
2.1. Optical tweezers	· · · · ·	3
2.1.1. Rayleigh Regime ($r \ll 10\lambda$)	· · · · ·	4
2.1.2. Ray Optics Regime ($r \ll 10\lambda$)	· · · · ·	8
2.2. 라만 분광법(Raman spectroscopy)	· · · · ·	10
2.3. 포획힘 측정	· · · · ·	14
2.3.1. Drag-force method	· · · · ·	14
2.3.2. Power spectrum method	· · · · ·	15
제 3장 Optical tweezers 시스템 설계	· · · · ·	20
3.1. 시스템 설계	· · · · ·	20
3.1.1. LTRS(Laser Tweezers Raman Spectroscopy) 시스템	· · · · ·	21
3.1.1.1. 챔버 제작	· · · · ·	24
3.1.1.2. 신호 분석	· · · · ·	25
3.1.2. Force measurement 시스템	· · · · ·	27
제 4장 LTRS 실험 및 검증	· · · · ·	31
4.1. 유전체 구의 Raman spectrum	· · · · ·	31
4.2. 적혈구의 Raman spectrum	· · · · ·	33
4.3. 적혈구 손상에 따른 Raman spectrum 분석	· · · · ·	36

제 5장 포획힘 측정	41
5.1. Power spectrum	41
5.2. Trap stiffness 측정	46
5.3. 시스템 평가	46
제 6장 결론	51
참고문헌	53
Appendix A	58

그림 차례

그림 2.1	평행광이 입자에 입사되어 질 때의 힘의 합력	7
그림 2.2	집속된 광이 입자에 입사되어 질 때의 힘의 합력	7
그림 2.3	광 포획 원리	8
그림 2.4	입사광에 의한 시료에서의 산란광	11
그림 2.5	Rayleigh 산란과 Raman 산란에서의 에너지 준위	13
그림 2.6	유체의 흐름 속에서 포획된 입자에 가해지는 힘	15
그림 2.7	포획된 입자의 진동 주파수 측정 원리(좌)와 가해지는 힘(우)	16
그림 2.8	Power spectrum	17
그림 2.9	포획된 입자의 위치 변위 전압 출력 신호	18
그림 3.1	전체 시스템 개략도	20
그림 3.2	LTRS 시스템 개략도(상)와 사진(하)	22
그림 3.3	노치필터를 통과한 빔의 스펙트럼(좌)과 통과하지 못한 빔의 스펙트럼(우)	23
그림 3.4	챔버 설계도	24
그림 3.5	fused silica 재질의 커버슬립에 대한 스펙트럼(좌)과 일반 커버슬립의 스펙트럼(우)	25
그림 3.6	파장 영역의 라만 스펙트럼(좌)과 주파수 영역으로의 변환 후의 라만 스펙트럼(우)	26

그림 3.7	Smoothing 전의 라만 스펙트럼(좌)과 smoothing 후의 라만 스펙트럼	27
그림 3.8	Force measurement 시스템 개략도(상)와 사진(하)	28
그림 3.9	QPD의 회로도	29
그림 3.10	Labview 윈도우 (상) power spectrum, (하) QPD 출력신호	30
그림 4.1	상용화된 라만 현미경(좌)과 제작한 LTRS(우)에서의 Bulk silicon의 라만 스펙트럼	31
그림 4.2	상용화된 라만 현미경(좌)과 제작한 LTRS(우)에서의 polystyrene bead의 라만 스펙트럼과 포획된 bead의 사진(우)	32
그림 4.3	polystyrene의 분자 구조(좌)와 구조식(우)	32
그림 4.4	LTRS로 획득한 적혈구의 라만 스펙트럼과 포획한 적혈구의 사진	34
그림 4.5	상용화된 라만 현미경에서 획득한 전혈(whole blood)의 신호	35
그림 4.6	CW 레이저와 femtosecond 레이저의 시간에 따른 레이저 파워	37
그림 4.7	CW 레이저에서의 라만 스펙트럼 변화와 적혈구의 형태학적 변화	38
그림 4.8	femtosecond 레이저에서의 라만 스펙트럼 변화와 적혈구의 형태학적 변화	38
그림 4.9	시간에 따른 CW 레이저(좌)와 femtosecond 레이저(우)의	

I_{1210} / I_{1543} ratio 변화	39
그림 5.1 포획된 유전체 구	41
그림 5.2 QPD에서 측정된 시간에 따른 출력 신호	42
그림 5.3 측정된 power spectrum과 fitting에 의한 corner frequency (f_c)	43
그림 5.4 Condensor의 NA에 따른 Power spectrum	
(좌) NA : 0.8 (우) NA : 1.4	43
그림 5.5 60Hz 노이즈 제거 전의 스펙트럼(좌)와 제거 후의 스펙트럼(우)	44
그림 5.6 포획된 polystyrene bead의 높이에 따른	
corner frequency(좌)와 calibration factor(우)	45
그림 5.7 포획된 polystyrene bead의 레이저 파워에 따른	
corner frequency(좌)와 calibration factor(우)	46
그림 5.8 polystyrene bead의 높이에 따른 stiffness 측정값	47
그림 5.9 입사된 레이저 파워에 따른 stiffness 측정값	48
그림 5.10 trap depth에 따른 측정된 viscosity	49

표 차례

표 4.1 라만 피크에 따른 polystyrene의 vibrational group	· · · · · 33
표 4.2 라만 피크에 따른 적혈구의 vibrational group	· · · · · 35

국 문 요 약

광학 집계를 이용한 생물학적 세포의 라만 분광과 탄성 계수 분석

세포막으로 둘러싸인 살아 있는 단일 세포 안에는 많은 수의 복잡한 생체 분자가 존재한다. 이 생체 분자는 핵이나 리소솜과 같은 세포 기관을 구성한다. 이 세포 기관의 다양한 세포 대사 과정을 이해하기 위해서는 이 고분자 물질들을 정확히 분석해야 한다. 세포의 이해뿐만 아니라, 질병을 유발하는 세포의 이상과 같은 현상을 치료 혹은 진단하기 위해서는 생체분자와 관련한 분석이 피할 수 없는 일이 되었다.

최근 LTRS(Laser Tweezers Raman Spectroscopy)라고 알려진 Raman microscopy와 optical tweezers의 결합은 단일 세포를 검출 및 분석하는 새로운 길을 열어주었다. 단일 세포의 복잡한 화학 정보를 분석하는데 있어서 LTRS는 가장 빠르며 가장 간단한 기술이다.

본 논문에서 LTRS 시스템을 제작하였으며 유전체 구의 Raman spectrum을 관찰하였다. 또한 광손상(optical damage)의 표지로 적혈구(RBC)의 Raman 신호를 관찰하였다.

또한 power spectrum method를 통하여 포획된 입자에 가해지는 힘을 직접적으로 측정하고자 하였다. 실험을 통하여 포획 힘의 측정을 위한 stiffness와 calibration factor를 측정하였다.

본 논문에서는 단일 세포의 화학적, 기계적 분석 장비의 개발 및 검증을 목표로 하였으며, 본 논문의 결과는 세포의 화학적, 구조적 분석뿐만 아니라 biological motor 분석에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

핵심되는 말 : optical tweezers, LTRS(Laser Tweezers Raman Spectroscopy),
power spectrum method

제 1 장 서 론

단일 세포는 고분자 물질로 이루어져 있으며 이 고분자 물질은 핵, 미토콘드리아, 리포솜과 같은 소기관을 이룬다. 세포의 다양한 대사과정을 이해하기 위해서는 이들의 정확한 분석이 요구된다. 이들의 대사과정은 외부 요인에 민감하여 환경이나 유전적 요인 등으로 인한 작은 변화에도 세포의 생화학적 활동에 영향을 받게 되어 암과 같은 심각한 질병을 초래하게 된다. 치명적 질병을 유발하는 세포 단위의 이상 변화를 감지하기 위해서는 세포 단위 또는 생체 고분자 단위의 분석이 필요로 하게 된다. Optical tweezers는 단일 세포의 분석을 위한 강력한 도구 중 하나로 본 논문에서는 Optical tweezers를 이용한 생화학적, 물리적 분석법에 대하여 논의하고자 한다.

Optical tweezers는 강하게 집속된 레이저 빔을 이용하여 물리적 접촉 없이 마이크로 크기의 입자를 포획하고 제어할 수 있는 기술로 물리학, 생물학 등 여러 분야에서 강력한 실험 분석 도구로서 이용되어 왔다. 외부 환경보다 굴절률이 높은 입자에 강하게 집속된 레이저 빔을 조사하게 되면 레이저 빔이 가지고 있던 모멘텀은 변하게 되며 최종적으로 입자의 모멘텀을 변화시켜 입자는 빔의 초점 위치로 포획되게 된다. 포획된 입자에서 산란된 빛은 입자에 대한 정보를 지니고 있으며, 이 산란광을 분광기로 입사시킴으로써 입자의 분광학적 정보를 획득할 수 있게 된다. 본 논문에서는 입자의 산란광 중 라만 산란(Raman scattering)에 초점을 두었다.

라만 산란은 빛이 시료에 조사되어 질 때 크게 탄성 산란광과 비탄성 산란광으로 나누어 볼 수 있으며, 이 중 비탄성 산란광은 입사된 파장과 다른 파장을 가지고 산란을 하게 되며, 이 산란광을 Raman 산란광이라고 한다. 이 라만 산란광의 스펙트럼을 분석함으로써 시료에 대한 고유한 특성, 즉 시료의 분자 구조를 추론할 수 있다. 이미 이러한 특성을 이용하여 암과 진단에 대한 응용의 가능성이 보고되어 왔다.[1,2] 2002년 Changan Xie에 의해서 Optical tweezers와 라만 분광법

(Raman spectroscopy)이 결합된 형태인 LTRS(Laser Tweezers Raman Spectroscopy)가 생물학 분야에 도입되어졌다.[3,4] 이후 yeast cell, E. coli, cancer cell, 적혈구 그리고 염색체에 이르기까지 다양한 단일 세포 분석이 시도 되었다. [5-10]

Optical tweezers는 비 침습적, 비 접촉적인 방법으로 포획된 입자의 산란광 중 탄성 산란광의 분석을 통하여 입자에 가해진 힘을 pN까지 측정 할 수 있다.[11,12] 이러한 optical tweezers의 또 다른 능력은 DNA의 응력 및 탄성 측정, myosin, 콜로이드 유동 등 다양한 분야에서 나노 크기의 물리적 힘에 관한 연구에 응용되어 왔다.[12-16] 포획된 입자가 유체 내에 있을 때 유체 분자와의 충돌에 의하여 입자는 완벽하게 정지해 있지 않고 포텐셜 우물 안에서 진동을 하게 된다. Position sensor를 이용한 입자에서의 산란광을 추적하는 방법이 제안되었고, 진동하는 입자의 진동 주파수를 획득할 수가 있게 되었다.[17] 이 진동 주파수나 주파수의 크기는 포획힘의 크기와 관계하며 진동 주파수 성분 분석을 통해 포획힘을 특정할 수 있게 된다. 이와 같은 방법을 power spectrum method라고 한다.[18] 본 논문에서는 power spectrum method를 이용하여 포획힘 측정에 필요한 stiffness와 calibration factor를 측정하였다.

본 논문에서는 라만 분광법과 optical tweezers를 결합한 LTRS를 제작하였으며 이미 상용화된 라만 현미경과의 비교를 통하여 성능 평가와 RBC 세포의 신호를 분석하여 보았다. 또한 power spectrum method를 통하여 포획된 입자의 stiffness를 측정하였다.

제 2 장 이 론

제작된 시스템은 수용액 상에서 빛에 의해 단일 입자를 포획하고 조작할 수 있는 Optical tweezers를 이용하여 산란된 빛의 라만 스펙트럼과 Lorentzian power spectrum 분석을 통하여 포획된 단일 입자의 화학적 특성과 포획 힘을 분석 및 측정을 가능하게 한다.

빛이 굴절률이 다른 입자에 입사될 때, 입자의 내부와 외부에서는 빛의 산란과 흡수가 발생하게 된다. 대부분의 빛은 입사된 빛과 동일한 주파수를 띠게 되며, 이것을 탄성(elastic) 혹은 Rayleigh scattering이라 부르며 일부의 빛은 입사된 빛과 다른 주파수 성분을 띠게 되는데 이것을 비탄성(inelastic) 혹은 라만 산란이라고 부른다. 입사된 빛이 입자의 내부나 외부에서 산란되는 현상은 최종적으로 입자의 모멘텀의 변화를 가져오게 되며 이것이 Optical tweezers의 물리적 근원이 된다.

2.1. Optical tweezers

Optical tweezers라 알려져 있는 Single-beam optical trap은 1996년 AT & T Bell 연구소에서 A. Ashkin과 S. Chu에 의해서 제안되었다.[19,20] Optical tweezers는 강하게 집속되어진 빔에 의해서 수십 나노미터에서 수십 마이크론 사이즈의 단일 입자를 포획하고 조작할 수 있는 기술이다. 일반적으로 Optical trap을 위해서는 빛의 모멘텀의 변화를 발생시켜야 하며, 이것을 위해서는 포획할 입자의 굴절률이 주위의 굴절률보다 높아야 한다.[21]

Optical tweezers에서 빛이 입자와 상호 작용을 할 때 크게 두 가지 성분으로 나누어 볼 수 있다. 첫 번째는 입자의 표면에서의 굴절이나 반사이며, 두 번째는 입자와 빛의 상호작용 후의 파면(wavefront)의 재배열에 의해 발생하는 회절 현상이다. 입사된 빛이 입자에서 굴절과 반사에 의하여 산란되어 질 때에는 모든 방향으로 산란하며 굴절률에 의하여 결정되어 진다. 그러나 회절에 의한 산란 형태는 빛의 진행 방향에 우선하며 입자의 기하구조(geometry)에 의하여 결정되어 진다. Optical trapping의 원리는 입자의 크기에 따라 설명되어 질 수 있다. 입자의 크기

를 r , 입사광의 파장을 λ 라고 할 때, 입사광의 파장보다 작은 입자는($r \ll 10\lambda$) Rayleigh regime에서[22], 파장보다 큰 입자는($r \gg 10\lambda$) Ray optics regime에서[5], $r \approx \lambda$ 일 경우에는 Mie regime에 의하여 각각 설명이 가능하다. 본 논문에서 사용한 파장은 785nm와 1064nm이며 사용한 입자의 크기는 $5\mu\text{m}$ 이상이므로 Ray optics regime로 근사 가능하다. 따라서 입자의 크기가 파장에 비하여 작은 경우와 큰 경우에 관한 이론에 관하여 설명하고자 한다.

2. 1. 1. Rayleigh Regime ($r \ll 10\lambda$)

Rayleigh regime에서는 입자의 크기는 입사광의 파장에 비하여 매우 작다. 그러므로 위에서 언급한 빛과 입자의 상호작용에서 굴절, 반사 그리고 회절의 효과는 무시되어 질 수 있다. 그러나 입사광의 경로 위에 놓인 입자는 입사광에 의한 전자장에 영향을 받으며 유도 쌍극자(induced dipole)처럼 행동하게 된다. 입자의 크기가 작을 경우 전자기장(electromagnetic fields)에 의하여 입자에 힘이 작용되게 되므로 전자기장 관점에서 바라볼 필요가 있다. Optical tweezers에서는 크게 입자를 밀어내는 힘인 scattering force와 입자를 당기는 힘인 gradient force로 나누게 된다.

Scattering force

Scattering force의 근원은 광압(radiation pressure)에 의하여 발생하게 된다. 입사광은 분자에 의해 흡수되며 등방향으로 재방출 될 수 있다. 방출된 빛은 벡터의 관점에서 보았을 때, 입사광과 동일한 방향으로 방출되거나 그와 반대되는 방향으로 방출 될 수 있다. 광자(photon)의 방출은 방향성이 없기 때문에 합력은(net force) 입자에 입사되는 광자 총량(photon flux)의 방향에 의해 결정된다. 이때의 힘은 입사광의 방향과 같으며 다음 식에 의해 표현되어 질 수 있다.

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

n_m 은 입자 주위의 굴절률을 말하며, $\langle S \rangle$ 는 시간 평균화된 포인팅 벡터(Poynting

vector), c 는 광속 그리고 σ 는 입자의 단면적을 의미한다. 입자의 형태가 구형이라고 가정하면 단면적 σ 는 다음과 같이 표현된다.

$$\sigma = \frac{8}{3}\pi (kr)^4 r^2 \left(\frac{n^2-1}{n^2+2}\right)^2 \quad (2.2)$$

여기에서 r 은 입자의 반지름, n 은 굴절률을 의미한다.

gradient force

Gradient force는 전자장에 의하여 유도된 쌍극자가 받는 로렌츠 힘(Lorenz force)에 의하여 발생한다. α 를 편극률(polarizability)이라고 할 때, 유도 쌍극자(induced dipole)에서의 gradient force는 다음과 같다.

$$\vec{p}(\vec{r}, t) = \alpha \vec{E}(\vec{r}, t) \quad (2.3)$$

$$\vec{F}(\vec{r}, t) = [\vec{p}(\vec{r}, t) \nabla] \vec{E}(\vec{r}, t) \quad (2.4)$$

$\vec{E}(\vec{r}, t)$ 는 입사광의 전기장 벡터를 나타내며 다음과 같이 다시 표현되어 질 수 있다.

$$\nabla \vec{E}^2 = 2(\vec{E} \nabla) \vec{E} + 2\vec{E} \times (\nabla \times \vec{E}) \quad (2.5)$$

그리고, Maxwell's equation은 다음과 같으며,

$$\nabla \times \vec{E} = 0 \quad (2.6)$$

식 (2.4)는 다음과 같이 표현 된다.

$$\vec{F}(\vec{r}, t) = \frac{1}{2} \alpha \nabla \vec{E}(\vec{r}, t)^2 \quad (2.7)$$

입자가 받는 gradient force는 시간과 관련하며, 시간 평균화하면 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$\langle \vec{E}(\vec{r}, t)^2 \rangle_T = \frac{1}{2} |E(\vec{r})|^2 \quad (2.8)$$

$$\vec{F}(\vec{r}) = \langle \vec{F}(\vec{r}, t) \rangle_T = \frac{1}{2} \alpha \nabla \langle \vec{E}(\vec{r}, t)^2 \rangle_T = \frac{1}{4} \alpha \nabla |E(\vec{r})|^2 \quad (2.9)$$

빛의 강도(intensity)는 식 (2.5)에 의해서 다음과 같이 다시 쓸 수 있으며,

$$I(\vec{r}) = \frac{n_m \epsilon_0 c}{2} |E(\vec{r})|^2 \quad (2.10)$$

n_m 은 입자의 굴절률을 나타내며, ϵ_0 은 유전율(permittivity), c 는 광속(speed of light)을 각각 나타낸다. 최종적으로 gradient force는 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$\vec{F}(\vec{r}) = \frac{1}{2n_m \epsilon_0 c} \alpha \nabla I(\vec{r}) \quad (2.11)$$

식 (2.11)에 따라 gradient force는 빛의 강도가 강한 방향으로 작용하게 된다. 가우시안 빔(Gaussian beam)의 경우 광축의 방향으로 작용하며, 빛이 강하게 집속(focussing)될 경우 집속된 지점으로 gradient force가 작용하게 된다.

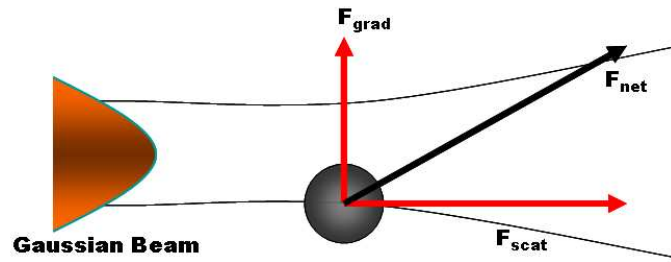


그림 2.1 평행광이 입자에 입사되어 질 때의 힘의 합력

그림 2.1과 같이 가우시안 빔이 평행하게 입자에 입사할 경우 gradient force는 빔의 강도(intensity)가 높은 빔의 중심 방향으로 향하게 되나, 광압에 의한 scattering force가 빔의 진행 방향으로 강하게 작용하기 때문에 입자는 빔의 진행 방향으로 밀려나게 된다. 입자를 포획하기 위해서는 scattering force의 효과를 감소 시켜야 한다.

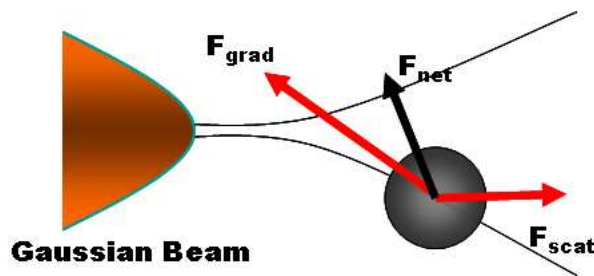


그림 2.2 집속된 광이 입자에 입사되어 질 때의 힘의 합력

그림 2.2와 같이 강하게 빔을 집속시킬 경우 빔의 초점에 빛의 강도가 강하게 되어 초점 부위로 gradient force가 작용하게 되며, 최종적으로 합력은 입자를 포획할 수 있도록 작용한다. 가우시안 빔을 강하게 집속시켜 입자에 조사할 경우 3차원 공간상에서의 힘의 분포를 관찰하면 빔의 초점으로 작용하게 되며 입자를 포획하는 힘의 근원이 된다.

2. 1. 2. Ray Optics Regime ($r \gg 10\lambda$)

입자의 크기가 파장과 비교하여 크다면 회절의 효과는 무시할 수 있으며, 굴절과 반사의 산란 패턴을 평가할 수 있는 기하광학적(geometrical optics) 접근이 필요하다. Ray optics model에서는 입자를 포획하는 원리를 빔을 개개의 광선(ray)로 구분하여 해석하며, 하나의 광선이 입사하여 입자와 상호 작용하여 굴절과 반사에 의한 운동량의 변화를 추적한다. 입사광이 굴절률이 다른 입자에 조사되어 질 때 입자의 표면에서는 Snell's law에 따라 굴절과 반사가 일어나게 된다. 굴절과 반사는 입사광의 경로를 변화시키며 경로의 변화는 입사광의 모멘트의 변화를 발생시켜 최종적으로 입자의 모멘트 변화를 유도하여 힘으로 작용하게 된다. 그림 2.3은 입사광이 굴절과 반사에 의한 입자에 대한 영향을 보여주는 개략도이다.

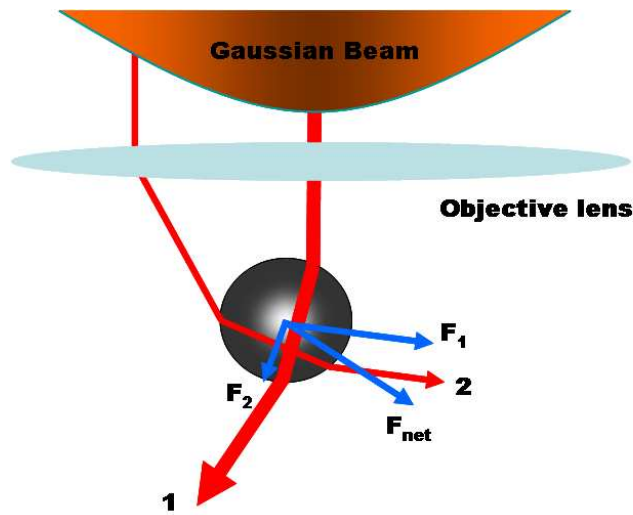


그림 2.3 광 포획 원리

입사광에 의하여 입자에 작용하는 힘은 크게 scattering force와 gradient force로 나누어 볼 수 있으며, 전자는 입사광의 진행 방향과 동일한 방향으로 작용하여 입자를 밀어내는 힘을 의미하며 후자는 입사광의 진행 방향에 수직인 힘으로 입자를 포획하는 힘으로 작용한다. 일률(power)이 P 인 입사광이 굴절률 n_m 인 입자에

입사되어 질 때, 초당 입사되는 운동량은 $n_m P/c$ 이다. 입사광은 입자의 표면에서 반사와 굴절이 일어나며, 내부에서 다시 무한한 굴절과 반사를 일으킨다. 이 모든 과정에서의 빔의 모멘트 변화는 입자의 모멘트 변화로 작용한다. 입사광과 평행한 방향의 힘인 scattering force는 다음과 같이 표현 될 수 있다. [23,24]

$$F_{scatt} = \frac{n_m P}{c} \left\{ 1 + R \cos 2\alpha - \frac{T^2 [\cos(2\alpha - 2\beta) + R \cos 2\alpha]}{1 + R^2 + 2R \cos 2\beta} \right\} \quad (2.12)$$

$$= \frac{n_m P}{c} Q_{scatt}$$

그리고 gradient force는 다음과 같이 표현 될 수 있다.

$$F_{grad} = \frac{n_m P}{c} \left\{ R \sin 2\alpha - \frac{T^2 [\sin(2\alpha - 2\beta) + R \sin 2\alpha]}{1 + R^2 + 2R \cos 2\beta} \right\} \quad (2.13)$$

$$= \frac{n_m P}{c} Q_{grad}$$

P 는 입사광의 일률을 나타내며, c 는 광속을, α 와 β 는 입사각과 굴절각을 각각 나타낸다. 또한 R 과 T 는 프레넬 반사 계수와 투과 계수를 나타낸다. T 와 R 값은 프레넬 방정식으로부터 유도 될 수 있으며 다음과 같다.

1) 수직 편광일 경우 $T=T_{\perp}$, $R=R_{\perp}$

$$T_{\perp} = \left(\frac{n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i} \right)^2 \left(\frac{2n_i \cos \theta_i}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t} \right)^2 \quad (2.14)$$

$$R_{\perp} = \left(\frac{n_i \cos \theta_i - n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t} \right)^2$$

2) 수평 편광일 경우 $T=T_{\parallel}$, $R=R_{\parallel}$

$$T_{\parallel} = \left(\frac{n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i} \right)^2 \left(\frac{2n_i \cos \theta_i}{n_i \cos \theta_t + n_t \cos \theta_i} \right)^2 \quad (2.15)$$

$$R_{\parallel} = \left(\frac{n_i \cos \theta_i - n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_t + n_t \cos \theta_i} \right)^2$$

R과 T는 광선의 편광에 의존하기 때문에, 위의 식 (2.12), (2.15)에 따라 포획힘은 입사광의 편광에 영향을 받는다. 일반적으로 평행광이 입사될 경우 scattering force가 gradient force보다 크기 때문에 밀어내는 힘이 강하게 되지만, NA(numerical aperture) 값이 큰 대물렌즈를 사용하여 입사광을 강하게 집속시켜 용액의 굴절률 보다 큰 굴절률을 가진 입자에 입사시킬 경우 gradient force가 scattering force보다 크게 되어 입사광의 초점 부근으로 입자는 포획되게 된다.

2.2. 라만 분광법(Raman spectroscopy)

진동 분광학의 하나로 1928년 인도의 물리학자 C. V. Raman이 용액에 푸른빛을 입사시켰을 때 녹색의 빛이 산란되는 현상을 발견한 것이 지금의 라만 분광법이 되었다.[25] 시료에 빛이 입사될 때 분자의 진동에너지를 변화시켜 산란광의 일부분이 입사된 빛의 파장과 다른 파장이 나오는 현상을 라만 산란이라고 부른다.[26] 빛이 어떠한 매질을 통과할 때 빛은 매질에 의해 산란되며 이때 대부분의 빛은 입사된 빛의 에너지를 유지하나 일부의 빛의 에너지는 입사광의 에너지보다 적거나 클 수가 있다. 입사광의 에너지와 동일한 산란광을 탄성 산란광(elastic scattering) 혹은 레일리 산란광(Rayleigh scattering)이라고 부르며, 입사광의 에너지와 다른 에너지를 갖는 산란광을 그림 2.4와 같이 비탄성 산란광(inelastic scattering) 혹은 라만 산란광(Raman scattering)이라고 부른다.

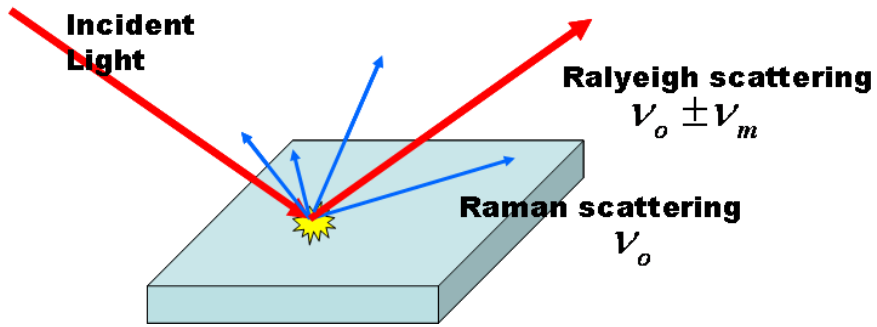


그림 2.4 입사광에 의한 시료에서의 산란광

라만 산란광은 입사광의 전기장 E 와 매질의 유도 쌍극자(induced dipole)간의 상호작용에 의하여 발생하는 현상이다. 입사광의 전기장은 입사된 시료의 쌍극자 모멘트를 유도하며 유도된 쌍극자 모멘트의 크기는 전기장의 크기에 비례하기 때문에 α 를 편극률(polarizability)이라고 하면 다음과 같이 1차식으로 표현 할 수 있다.[26-28]

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad (2.16)$$

입사광의 전기장은 시간에 따른 주파수 ν_0 의 함수로 표현 될 수 있다. 따라서 입사광의 전기장 함수는 다음과 같다.

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (2.17)$$

그리고 식 (2.17)에 의해서 식 (2.16)은 다음과 같이 다시 쓸 수 있다.

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} = \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (2.18)$$

시료의 분자는 계속해서 진동운동을 하며 이 진동운동은 핵 간의 거리의 함수로

서 나타낼 수 있다. 만약 분자의 진동운동의 주파수를 ν_m , 핵 간의 거리를 q 라고 할 때,

$$q = q_o \cos 2\pi\nu_m t \quad (2.19)$$

q_o 은 진동모드의 평형위치(equilibrium position)에서의 크기를 나타낸다. 분자간의 진동의 크기가 크지 않을 때, 편극률은 분자간의 거리에 선형적으로 증가한다. 따라서 다음과 같이 1차원 함수로서 근사적으로 표현될 수 있다.

$$\alpha = \alpha_o + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_o q \quad (2.20)$$

α_o 은 진동모드의 평형위치에서의 편극률을, $(\partial \alpha / \partial q)_o$ 는 핵 사이의 거리에 따른 편극률의 변화율을 나타낸다.

식 (2.18), (2.19), (2.20)에 의하여 쌍극자 모멘트 P 는 다음과 같이 쓸 수 있다.

$$\begin{aligned} P &= \alpha E_o \cos 2\pi\nu_o t \quad (2.21) \\ &= \alpha_o E_o \cos 2\pi\nu_o t + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_o q E_o \cos 2\pi\nu_o t \\ &= \alpha_o E_o \cos 2\pi\nu_o t + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_o q_o E_o \cos 2\pi\nu_o t \cos 2\pi\nu_m t \\ &= \alpha_o E_o \cos 2\pi\nu_o t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_o q_o E_o [\cos \{2\pi(\nu_o + \nu_m)t\} + \cos \{2\pi(\nu_o - \nu_m)t\}] \end{aligned}$$

식 (2.21)에서 첫 번째 항은 ν_o 의 주파수로 산란광을 방출하는 쌍극자를 나타내며, 두 번째 항은 라만 산란에 상응하는 항이다. 입사광의 파장을 중심으로 입사광의 파장보다 짧은 산란광을 anti-Stokes 산란광이라 부르며, 입사광의 파장보다 긴 산란광을 Stokes 산란광이라고 부른다. 이에 관한 에너지 다이어그램은 그림 2.5

에 나타내었다.

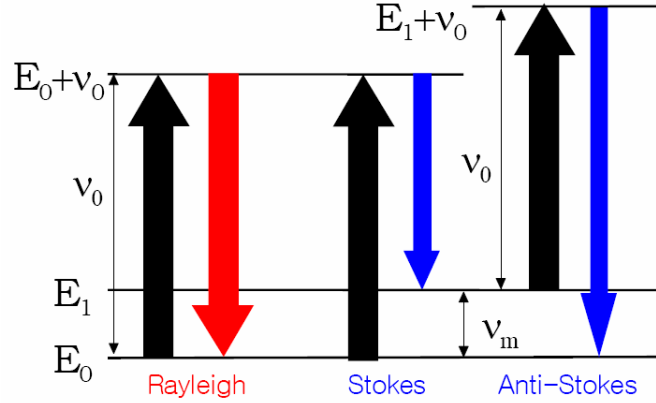


그림 2.5 Rayleigh 산란과 Raman 산란에서의 에너지 준위

v_0+v_m 는 anti-Stokes 산란광에 해당하며, v_0-v_0 는 Stokes 산란광에 해당한다. 만일 편극률의 변화율이 없다면, 즉 $(\partial \alpha / \partial q)_0=0$ 이라면 식 (2.21)에 따라 라만 산란은 나타나지 않는다. 라만 산란은 편극률의 변화율에 의해 나타날 수 있는 현상이며, 변화율의 크기에 비례한다.

라만 산란광의 세기는 미소 다이폴(Hertzian dipole)의 산란 이론으로부터 유추해 볼 수 있으며, 다음과 같이 표현될 수 있다.[27-28]

$$I_{raman} = KI_i(\omega_o - \omega_m)^4 \alpha^2 \quad (2.22)$$

K는 상수이며, I_i 와 ω_o 은 입사광의 세기와 주파수, ω_m 은 분자 진동 주파수를 각각 나타낸다. 식 (2.22)에서와 같이 라만 신호의 세기는 입사광의 주파수와 분자 진동 주파수 차이에 4승에 비례하며, 분자간의 편극률의 2승에 비례한다. 식 (2.22)에서 볼 수 있는 것처럼 입사광의 주파수가 클 수록 더욱 강한 신호를 획득할 수 있다. 하지만 높은 주파수, 즉 큰 에너지를 갖는 짧은 파장의 광원은 흡수에 의한 시료의 변형을 가져올 뿐만 아니라, 높은 에너지 흡수에 의한 형광의 문제점을 가지고

있다. 특히, 일반 라만 산란광의 분석은 그림 2.5에서 볼 수 있듯이 Stokes 산란의 경우 산란 밀도의 크기 때문에 Stokes 산란광을 분석한다. 중심 입사광의 파장 보다 높은 Stokes 산란은 형광 신호의 대역과 중첩되기 쉬우며 이것은 라만 신호 분석의 문제점이 된다.

2.3. 포획 힘 측정

Optical tweezers는 작은 입자의 포획뿐만 아니라 입자에 가해지는 힘을 pN까지 측정할 수 있다.[29-30] 입자에 가해지는 방법으로는 drag-force method와 power spectrum method가 있다. 이 중 본 논문에서 사용한 방법은 power spectrum method로 이 방법을 중점으로 설명하고자 한다.

2.3.1. drag-force method

Optical tweezers를 이용하여 유체 내에서 포획된 입자를 이동시킬 때 입자는 그림 2.6에서와 같이 유체의 점성에 의해서 힘을 받게 된다. 이 힘을 drag force 또는 Stokes force라 부르며 입자를 포획하는 힘은 drag force와 평형을 이루게 된다.

입자가 이동하는 속도와 유체의 점도에 의한 drag force는 비례하여 증가하며, 임계 속도 v_c 가 될 때 drag force는 포획 힘보다 커지게 되어 포획된 입자는 떨어지게 된다. 다음 식에 의하여 drag force와 포획힘을 각각 표현할 수 있다. [21]

$$F_{trap} = \frac{n_s P}{Q} \quad (2.23)$$

$$F_{drag} = \gamma v = 6\pi\eta r v$$

여기서 n_s 는 유체의 굴절률을 나타내며, P 는 입사광의 일률, Q 는 포획 효율, γ 는 viscous drag coefficient, η 는 유체의 점도, r 은 입자의 반지름, v 는 입자의 이동

속도를 나타낸다.

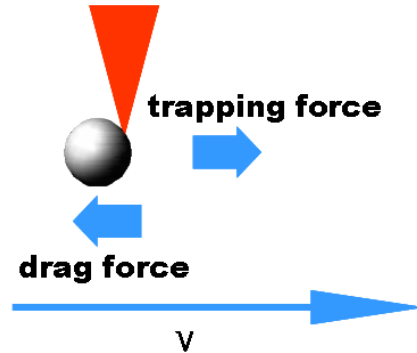


그림 2.6 유체의 흐름 속에서 포획된 입자에 가해지는 힘

2.3.2. Power spectrum method

수용액 안에 입자는 물 분자와의 상관관계를 가지며 optical tweezers에 의해 포획된 입자는 물 분자의 브라우닝 운동(Brownian motion)에 의한 충돌 때문에 입자는 정지해 있지 않고 포텐셜 우물(Potential well) 안에서 진동을 하게 된다. 포획된 입자는 매우 작은 레이놀드 수(Reynold number)를 가지며, 이것은 입자에 작용하는 내부의 힘은 무시될 수 있음을 의미한다. 포획된 입자를 x 만큼 이동시킬 때 입자가 받게 되는 힘은 그림 2.7에서 보는 것과 같이 크게 세가지로 나누어 볼 수 있으며 다음과 같다.

Restoring force : optical tweezers에 의하여 발생하는 힘으로 초점 부위로 입자를 당기는 힘을 의미한다. $F=kx$

Drag force : 입자를 일정 속도로 끌어당김에 의하여 발생하는 힘이며 $F=\gamma(dx/dt)$ 로 나타낼 수 있다.

Thermal force : 온도 에너지(thermal energy : $k_B T$)에 의하여 발생하는 힘이며, 온도에너지 혹은 브라우닝 운동이라고 알려져 있는 힘에 의하여 발생하며 이 힘

의 크기는 임의의(random) 크기를 가진다.

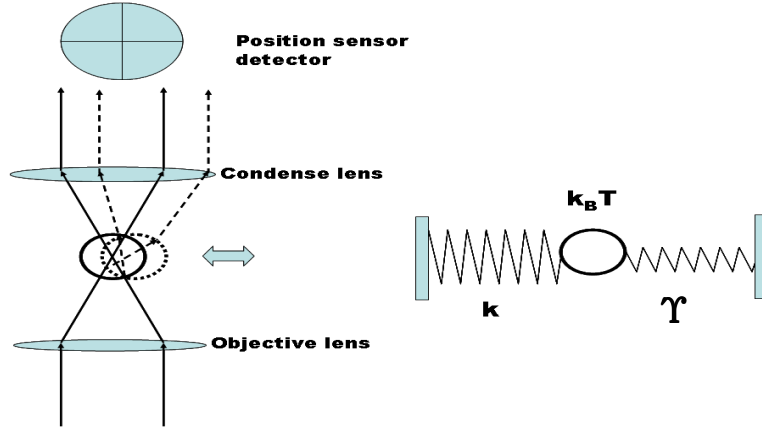


그림 2.7 포획된 입자의 진동 주파수 측정 원리(좌)와 입자에 가해지는 힘(우)

포획된 입자에 가해지는 힘은 입자의 위치 변화로 나타나며 위치 변위의 추적을 통해 간접적으로 포획된 입자에 가해지는 힘을 측정할 수 있다. [31-33] 그림 2.7에서와 같이 condense lens에 의하여 수집된 입사광은 position sensor에 의하여 그 위치 변위를 역으로 추적할 수 있게 된다.

Optical tweezers에 의해 포획된 입자가 한 방향 x 로 속도 v 를 가지고 이동되어 진다고 가정하고, r 을 입자의 반지름, η 를 수용액의 점도(viscosity)라고 할 때 입자의 운동 방정식은 랑주뱅 방정식(Langevin equation)에 의하여 다음과 같이 표현될 수 있다.[34-35]

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = -kx - \gamma \frac{dx}{dt} + F(t) \quad (2.24)$$

이 때, m 은 입자의 질량을 나타내며, k 는 trap stiffness, $\gamma = 6\pi\eta r$ 는 drag coefficient, $F(t)$ 는 random thermal force를 각각 나타낸다. power spectrum은 식 (2.24)의 푸리에 변환의 켈레콧을 통하여 얻을 수 있으며 그 과정은 부록 A에 첨

부하였다. power spectrum은 다음과 같이 표현될 수 있으며, k_B 는 볼츠만 상수 (Boltzmann constant), T 는 수용액의 온도를 각각 나타낸다.

$$S_x(f) = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2 (f_c^2 + f^2)} \quad (2.25)$$

식 (2.25)에서 f_c 는 corner frequency를 나타내며 다음과 같다.

$$k = 2\pi\gamma f_c \quad (2.26)$$

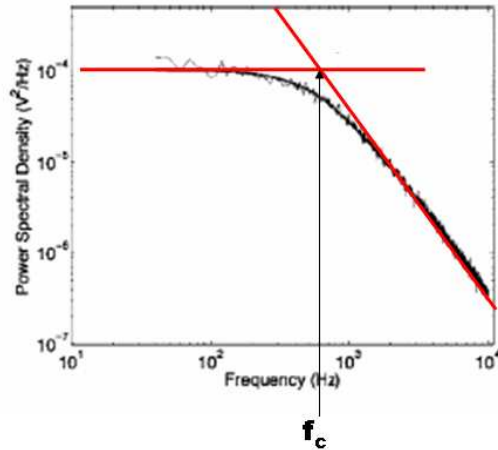


그림 2.8 Power spectrum

그림 2.8은 power spectrum과 corner frequency를 각각 나타낸다. [18] 부록 A에 나타낸 것과 같이 낮은 주파수에서는 $S_x(0) = \frac{4\gamma k_B T}{k^2}$ 로 근사하며, corner frequency를 넘어서는 $\frac{1}{f^2}$ 로 감쇄한다.

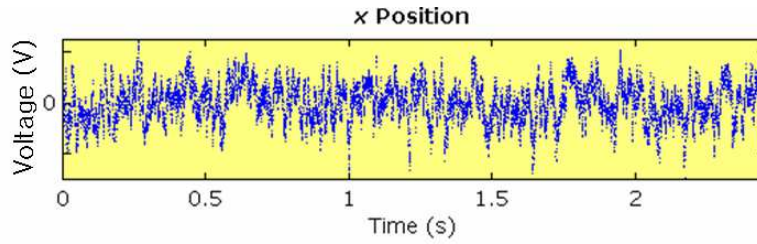


그림 2.9 포획된 입자의 위치 변위 전압 출력 신호

Position detector에서 발생하는 신호는 그림 2.9에서와 같이 시간에 따른 전압 값으로 나타나며 이 전압 값은 optical tweezers에 의해 포획된 입자의 변위와 선형 관계를 가진다. 따라서 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$x = \beta V \quad (2.27)$$

변위 x 를 측정하기 위해서는 calibration factor β 값을 알아야 하며, 이것을 구하기 위하여 많은 방법들이 제안되어 왔으나 본 논문에서는 A. Buosciolo가 사용한 알고리즘을 사용하였다.[35]

power spectrum을 식 (2.25)와 (2.27)에 의하여 전압으로 표현하면 다음과 같다.

$$S_V(f) = \frac{k_B T}{\gamma \beta^2 \pi^2 (f_c^2 + f^2)} = \frac{A}{(f_c^2 + f^2)} \quad (2.28)$$

입자의 이동속도 v 가 임계속도 보다 낮다면 스톡스 힘(Stoke's force)은 포획힘과 동일하며 다음과 같다. [21,35]

$$|\vec{F}_{stokes}| = |\vec{F}_{trap}| = 6\pi\eta r\epsilon v = kx \quad (2.29)$$

따라서, 식 (2.27)과 (2.29)에 의해서 다음과 같이 표현될 수 있으며,

$$V = \frac{6\pi\eta r\epsilon}{k\beta}v = Mv \quad (2.30)$$

최종적으로 calibration factor는 아래와 같이 구해질 수 있다.

$$\beta = \frac{1}{2\pi f_c M} \quad (2.31)$$

β 를 구하기 위해서는 수용액의 점도 η 를 알아야 한다. 일반적으로 점도값이 알려진 증류수를 수용액으로 사용하나, 혼합용액의 경우 η 값을 구하기가 어렵다. 다음 과정을 통하여 η 를 구할 수가 있다. 식 (2.28)에서 A 는,

$$A = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2} (2\pi M f_c)^2$$

이며 drag coefficient Υ 를 대입하면 최종적으로 다음과 같이 η 를 구할 수가 있다.

$$\eta = \frac{2k_B T}{3r} \frac{M^2 f_c^2}{A} \quad (2.32)$$

제 3 장 Optical tweezers 시스템 설계

3.1. 시스템 설계

수용액 상의 작은 입자나 세포를 포획 및 조작하고 특성 분석을 하기 위하여 optical tweezers를 기본으로 하고 여기에 Raman spectroscopy와 position sensor를 결합하였다. 그림 3.1은 전체적인 시스템 장치에 대한 개략도이다.

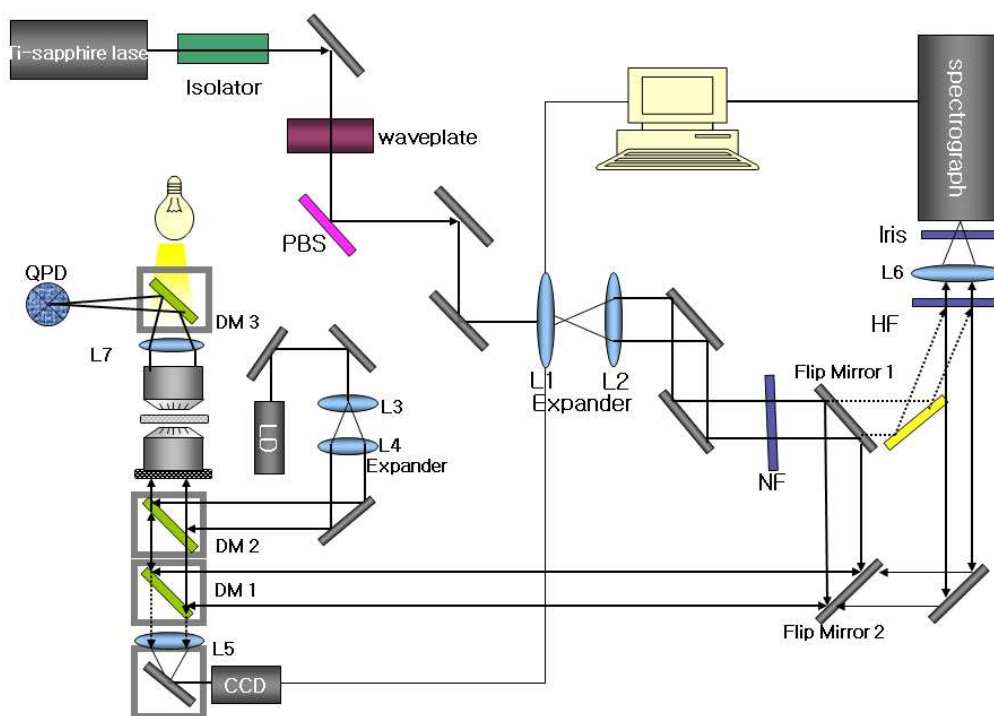
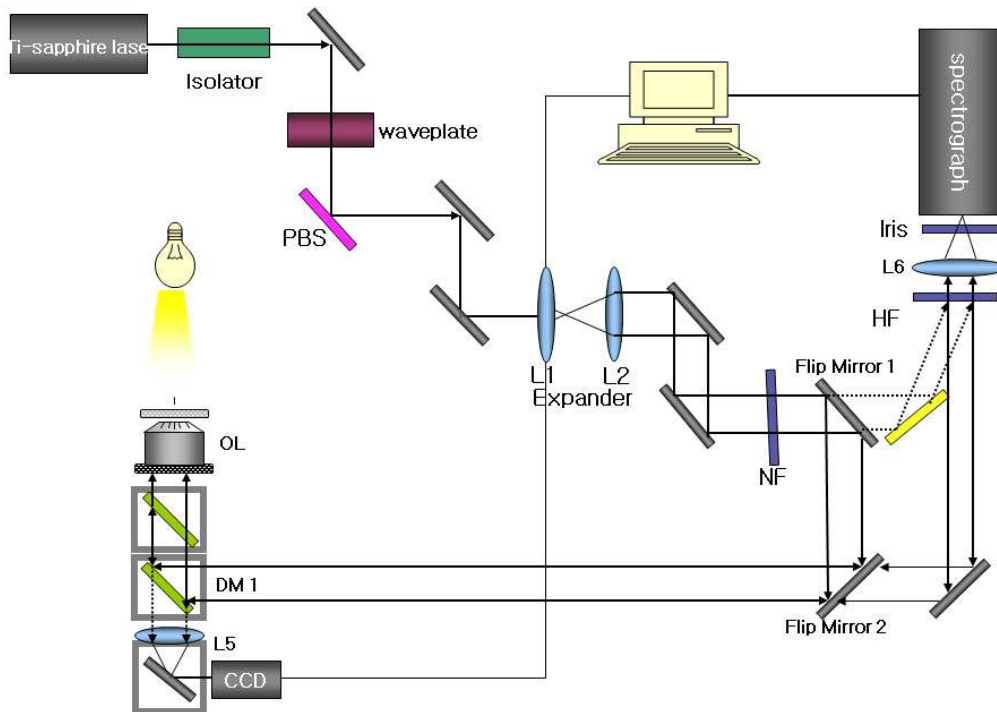
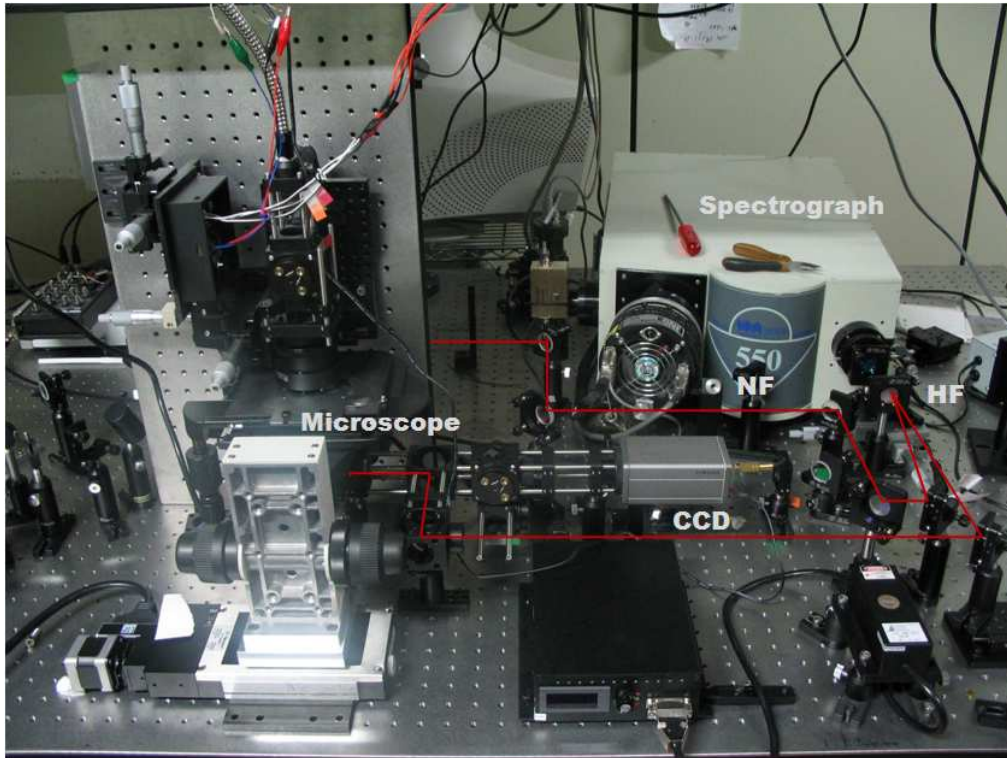


그림 3.1 전체 시스템 개략도

3.1.1. LTRS 시스템

Optical tweezers 시스템과 Raman spectroscopy를 결합한 것을 LTRS(Laser Tweezers Raman Spectroscopy)라고 부르며 본 논문에서 제작한 시스템 중 LTRS 시스템 부분을 그림 3.2에 도시하였다. 광원으로는 Ti-sapphire 레이저 (Coherent, Mira 900)를 사용하였으며 세포를 시료로 할 경우 세포 손상을 최소화하기 위하여 파장은 근적외선 영역인 785nm를 선택하였다. 시스템 제작에 사용된 모든 Optics는 785nm에 최적화 되어 설계 되었다.





BS(Beam splitter) : 광분배기, L(Lens) : 렌즈, NF(Notch filter) : 노치필터, HF(High pass filter) : 장파장 밴드 패스 필터, M(Mirror) : 미러, DM(Dichroic mirror) : 이색거울, OL(Objective lens) : 대물렌즈

그림 3.2 LTRS 시스템 개략도(상)와 사진(하)

하나의 광원으로 Optical tweezers와 라만 여기(excitation) 광원으로 사용하였으며 레이저에서 시료로 입사되어지는 레이저의 출력은 $\lambda/2$ waveplate와 PBS로 구성된 빔 감쇄기(attenuator)에서 조절 하였다. 렌즈에서 후방 산란된 빛에 의한 레이저의 손상과 레이저 모드를 보호하기 위하여 레이저 다음에 isolator를 위치시켰다. L1과 L2의 두 개의 볼록(convex) 렌즈는 빔을 확장시키는 역할을 하며 확장된 빔의 크기는 대물렌즈의 개구의 약 1.2배의 크기로 채워지며 이것은 최적의 포

획 효율을 보장해 준다. 대물렌즈로 빔이 입사되기 전, 노치필터(Semrock, LL01-785-12.5, MaxLine Laser-line Filters : NF)를 두어 빔의 플라즈마를 제거하였고, 785nm를 중심으로 약 3nm의 밴드를 갖는 광원을 확보하였다.

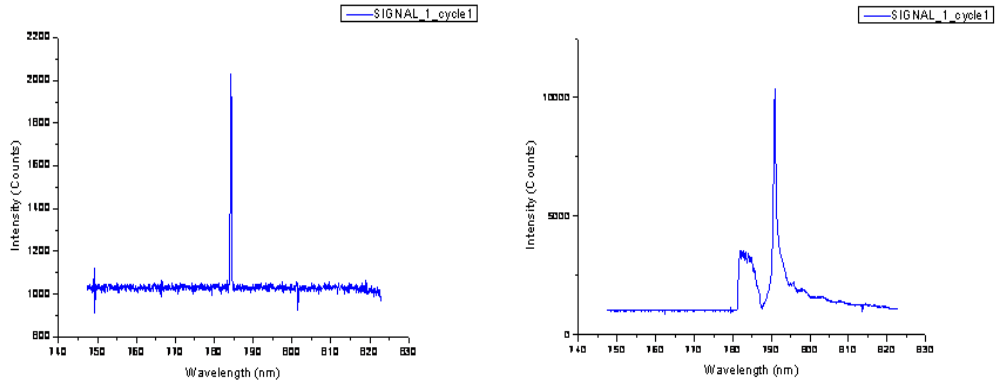


그림 3.3 노치필터를 통과한 빔의 스펙트럼(좌)과 통과하지 못한 빔의 스펙트럼(우)

그림 3.3은 노출시간(exposure time) 10s로 측정한 광원의 스펙트럼이다. 라만 산란 분광에서 광원은 단일 파장일 때가 가장 이상적이다. 오른쪽 그림에서 보는 것과 같이 일반적으로 레이저에서 발진한 빔은 플라즈마가 나타나게 되며 이것은 라만 신호 분석을 어렵게 만든다. 노치필터는 이러한 플라즈마를 제거하여 라만 분광에 이상적인 광원을 제공한다.

노치필터를 통과한 빔은 밴드패스필터(Semrock, LP02-785RU-25, RazorEdge Long Wave Pass Edge Filters : HF)에서 반사되어 최종적으로 대물렌즈로 입사되게 된다. 밴드패스필터의 특성은 다음의 수식을 따르게 된다.

$$\lambda(\theta) = \lambda_o \sqrt{1 - (\sin\theta/n_{eff})^2} \quad (3.1)$$

θ = 입사각, n_{eff} = 굴절률 효율

λ_o 는 설계된 필터의 통과 대역 파장을 의미하며 λ 는 입사각에 따른 통과 대역을

의미한다. 본 논문에서 사용된 필터의 대역은 795.2nm이며 입사각은 5° 이하로 설계하여 약 800nm 이상의 라만 신호는 필터를 통과하며 785nm의 빔은 반사하도록 하였다. 밴드패스필터에서 반사된 빔은 이색거울(DM2)에서 반사되어 최종적으로 대물렌즈로 입사되어 진다. 대물렌즈(Zeiss, X100, NA=1.23 : OL)는 오일 이머전(oil immersion) 타입을 사용하였다. 사용된 이색거울은 785nm이상의 빛을 반사시켜 광원을 시료로 보내고, 시료에서 산란된 라만 신호를 분광기로 보내는 역할을 하며, 할로겐 램프 영역의 빛을 시료로 보내어 포획된 입자의 이미지를 획득할 수 있게 설계 하였다. 시료에서 반사되어진 라만 신호는 밴드패스 필터를 통과하여 분광기(spectroscopy)로 수집되어 진다. 분광기(Jobin Yvon, TRIAX 550)에서 수집되어진 신호와 CCD에서 획득되어지는 영상은 컴퓨터로 보내어져 최종적으로 분석하였다. 분광기에서 사용된 CCD는 thermoelectrically cooled CCD를 사용하였다.

챔버(chamber)의 제작은 자발형광물질이 없는 fused silica재질의 커버 슬립을 사용하였고, 커버 슬립 위에 유전체 구(polystyrene bead)를 증류수에 희석시키거나 배양액에 적혈구(Red Blood Cell)를 떨어뜨렸다. 라만 신호 분석에 있어서 형광에 의한 간섭은 큰 문제로 작용하며 이것을 최소화하기 위하여 특수한 재질의 유리 와 이머전 오일을 사용하였다. 이것에 관하여 다음 장에서 다시 논의 하겠다.

3.1.1.1. 챔버 제작

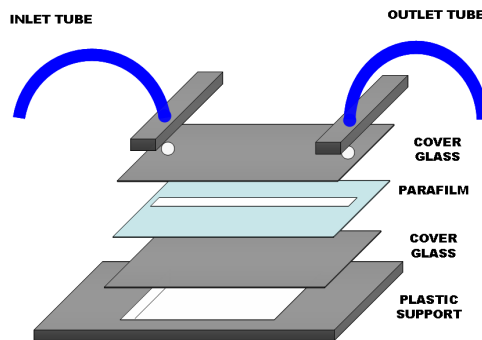


그림 3.4 챔버 설계도

챔버 제작 설계는 그림 3.4에 나타내었다. 두 장의 커버 글라스 사이에 파라필름을 위치시켜 약 250 μ m의 채널을 만들었다. 상단에 위치하는 커버 글라스에 구멍을 내어 두 개의 실리콘 튜브를 연결시켜 시료가 채널을 통과할 수 있도록 하였다. 시료의 통과 속도는 연동펌프(Peristaltic pump, Fisher Scientific)에 의하여 조절되었다.

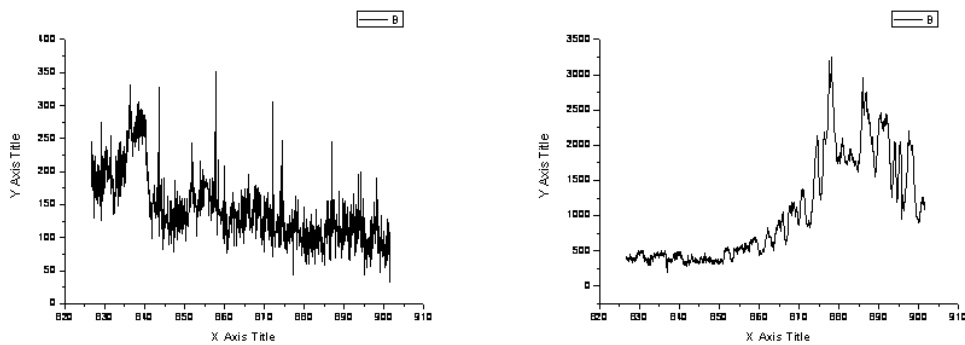


그림 3.5 fused silica 재질의 커버슬립에 대한 스펙트럼(좌)과
일반 커버슬립의 스펙트럼(우)

그림 3.5는 커버글라스의 스펙트럼을 나타내며 노출시간은 1500s로 두었다. 일반적으로 사용하는 BK7 재질의 커버 글라스는 그림 3.5의 오른쪽 스펙트럼과 같이 강한 형광신호가 발생하게 된다. 이는 라만 분석에 있어서 강한 노이즈로 작용한다. 포획된 입자의 효율적인 관찰을 위하여 본 논문에서는 fused silica 재질의 커버슬립을 사용하였으며, 이머전 오일 또한 형광 물질이 없는 오일을 사용하여 형광 신호에 대한 간섭을 최소화 하였다.

3.1.1.2. 신호 분석

분광기에 조사되어진 빔은 Jobin Yvon에서 제공한 Synergy 프로그램을 사용하여 분석하였다. 분광기에서 획득되어진 신호는 파장 영역으로 나타난다. 분자의 고유 진동 주파수는 입사광의 주파수와 산란광의 주파수의 차이와 대응하게 된다. 라만 스펙트럼을 얻기 위하여 분광기에서 파장 영역으로 획득되어진 신호는 식 (3.2)에

의해서 주파수 영역으로 변환되어 최종적으로 라만 스펙트럼을 얻었다. ν_c 와 λ_c 는 입사광의 주파수와 파장을 나타내며, ν_m 과 λ_m 은 산란광의 주파수와 파장을 각각 나타낸다. 그리고 ν_{raman} 은 두 성분의 차이에 의해 구해질 수 있는 라만 스펙트럼의 주파수를 나타낸다.

$$\nu_c - \nu_m = \frac{1}{\lambda_c} - \frac{1}{\lambda_m} = \nu_{raman} \quad (3.2)$$

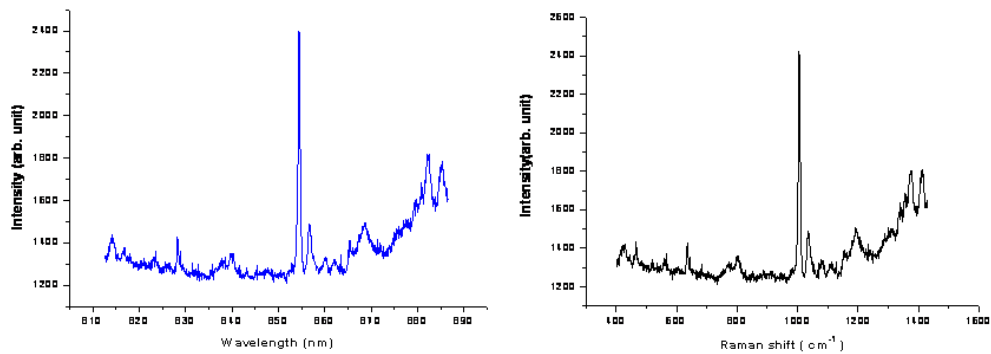


그림 3.6 파장 영역의 라만 스펙트럼(좌)과 주파수 영역으로의 변환 후의 라만 스펙트럼(우)

그림 3.6의 신호는 식 3.2에 의해서 파장 영역의 신호를 주파수 영역의 신호로 변환한 라만 스펙트럼이다. 스펙트럼에서 볼 수 듯이 CCD의 dark noise에 따른 신호의 노이즈 성분을 볼 수 있다. 스펙트럼의 노이즈 성분을 줄이기 위하여 smoothing 과정을 거쳤으며 smoothing 전과 후의 신호에 대해서는 그림 3.7에 나타내었다.

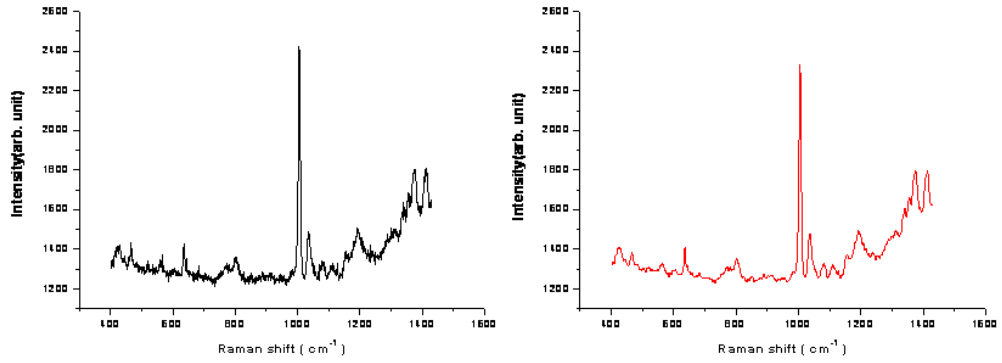
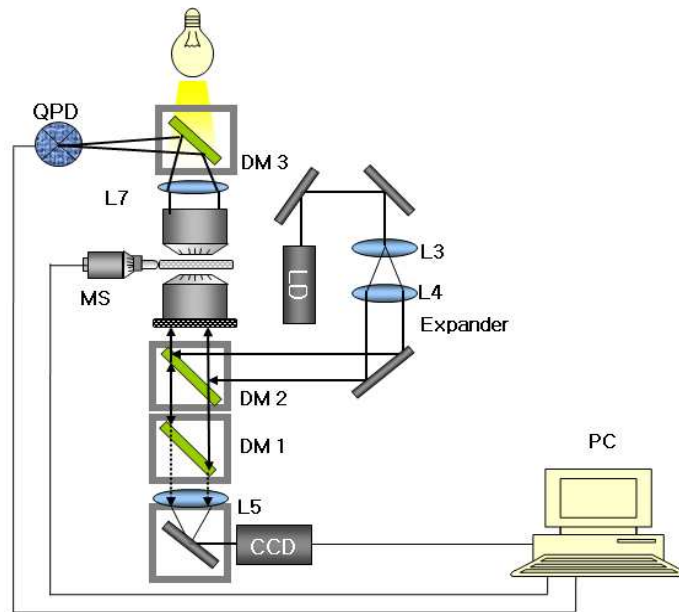
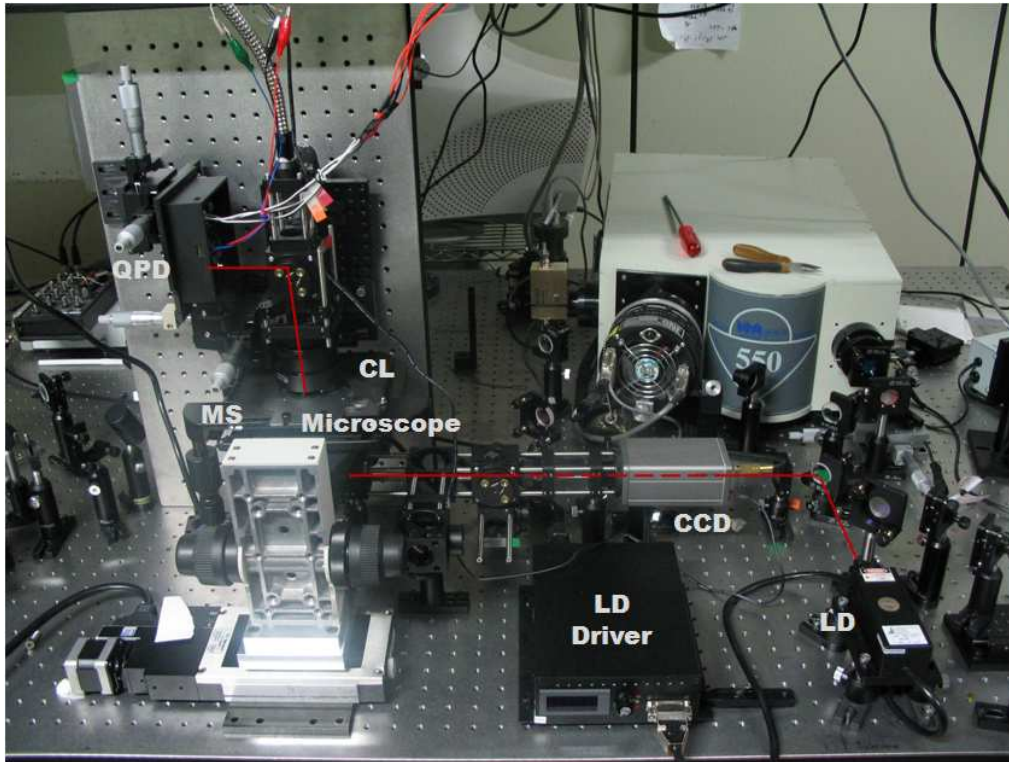


그림 3.7 Smoothing 전의 라만 스펙트럼(좌)과 smoothing 후의 라만 스펙트럼

3.1.2. Force measurement 시스템





L(Lens) : 렌즈, M(Mirror) : 미러, DM(Dichroic mirror) : 이색거울, CL(Condense lens) : 광선 수집 렌즈, OL(Objective lens) : 대물렌즈, MS(Motorized stage), QPD(Quadrant Photo-diode), LD(Laser Diode) : 레이저 다이오드

그림3.8 Force measurement 시스템 개략도(상)와 사진(하)

그림 3.8은 포획 힘을 측정하기 위한 시스템의 일부분이며 광원으로는 1064nm의 다이오드 레이저(Shanghai Dream Lasers Tech, SDL-1064-300T : LD)를 사용하였다. L3, L4 두 개의 볼록 렌즈를 사용하여 빔을 확장시켰으며, 이색거울(DM3)은 1064nm의 빔을 반사시키고 할로젠 램프 영역의 빛을 투과시켜 영상을 획득할 수 있게 한다. 이색거울에서 반사된 빛은 대물렌즈(OL)로 입사되어 챔버 안의 시료를 포획하게 된다. 챔버는 motorized actuator(MS)를 사용하여 입사된 빔과 수

직한 방향으로 챔버를 이동시킬 수 있도록 설계하였다. 시료로 입사된 빛은 수집 렌즈(Olympus, X50, NA 0.85 : CL)를 통하여 모아져 최종적으로 Quadrant Photo Diode(OSI, QD50 : QPD)로 보내어진다. QPD에서 획득한 아날로그 신호는 데이터 수집 장치에서 획득하여 컴퓨터로 보내어지며, CCD에서 보내어지는 영상과 함께 분석하였다. 시료에서 산란된 빛이 QPD로 입사되어 질 때, QPD는 빛의 위치 변위를 그림 3.9와 같이 전압값으로 출력한다.

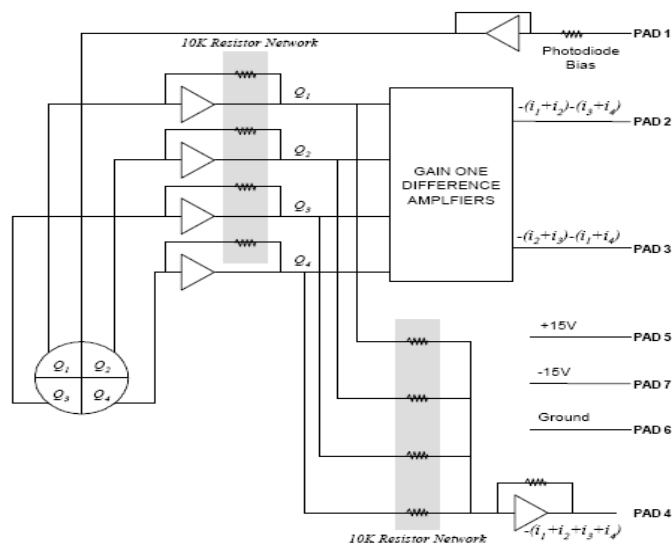


그림 3.9 QPD의 회로도

PAD 2, PAD 3는 각각 x, y변위를 나타내는 신호를 의미하며 PAD 3는 4분할 된 QPD에 조사되어지는 신호의 합을 의미한다. x, y의 변위 신호는 식 3.3와 같으며 이 중 하나의 신호를 Labview를 이용하여 분석하였다.

$$X = \frac{(i_1 + i_3) - (i_2 + i_4)}{(i_1 + i_2 + i_3 + i_4)} \quad Y = \frac{(i_1 + i_2) - (i_3 + i_4)}{(i_1 + i_2 + i_3 + i_4)} \quad (3.3)$$

출력된 신호의 데이터는 그림 3.10에 나타내었다. 하단의 신호는 QPD에서 출력된 신호를 나타내며, 상단의 그래프는 출력된 신호를 power spectrum으로 변환한 신호이다. 획득되어진 신호는 Origin 프로그램을 이용하여 linear fitting하여 corner frequency를 구하였다. 이 부분에 대해서는 5장에서 다시 논의하겠다.

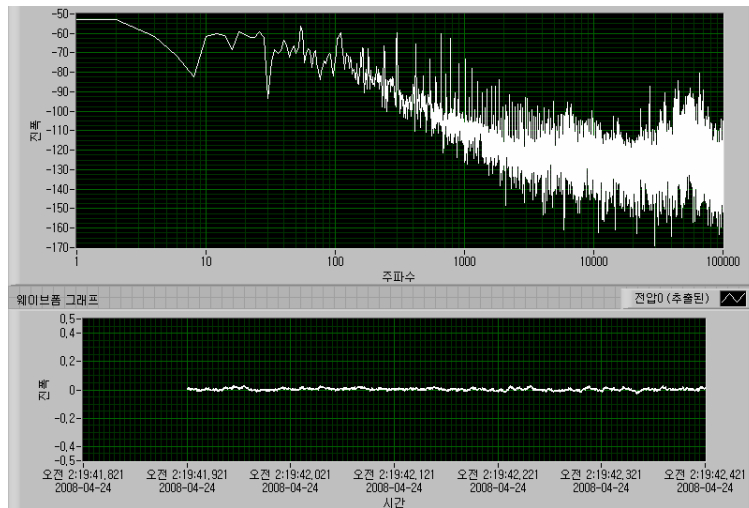


그림 3.10 Labview 윈도우 (상) power spectrum, (하) QPD 출력신호

제 4 장 LTRS 실험 및 검증

4.1 유전체 구의 Raman spectrum

3.1.1.과 같이 시스템을 구성하여 실리콘(Silicon) 조각과 유전체 구(polystyrene bead)의 라만 스펙트럼을 측정하였다. 제작된 시스템을 평가하기 위하여 상용화된 라만 현미경(Jobin-Yvon LabRam HR, Ar-ion laser 514nm)에 의해 획득되어진 신호와 비교하였다. 제작된 LTRS에서 신호를 획득할 때 grating은 600groove/mm를 사용하였고 노출 시간은 2초로 하였다. 시료로 사용된 유전체 구는 크기가 5 μ m(Duke scientific Corp)이며, 순수 유전체구의 신호만을 획득하기 위하여 챔버 바닥에서 약 10 μ m 높이에서 측정되었다. 신호 획득 후 유전체 구를 포획하지 않은 상태에서 동일한 조건으로 background 신호를 획득하였다. 유전체 구의 신호와 background의 신호를 빼서 순수한 유전체 구의 신호를 획득하였다. 그림 4.1은 상용화된 장비와 본 논문에서 제작한 LTRS에 의해 획득되어진 silicon의 라만 스펙트럼을 나타내며, 그림 4.2는 유전체 구의 라만 스펙트럼을 나타낸다.

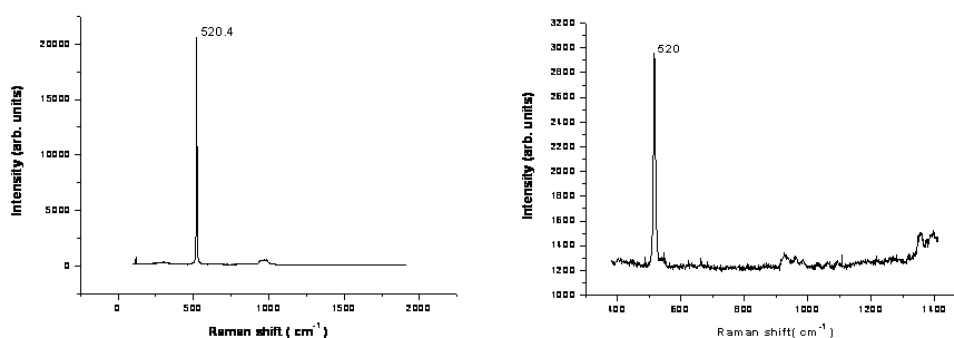


그림 4.1 상용화된 라만 스펙트럼(좌)와 제작한 LTRS(우)에서의 Bulk silicon의 라만 스펙트럼

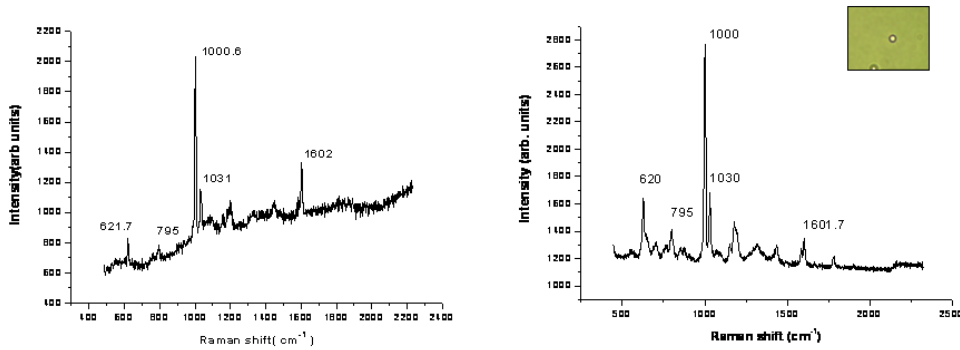


그림 4.2 상용화된 라만 현미경(좌)과 제작한 LTRS(우)에서의 polystyrene bead의 라만 스펙트럼과 포획된 bead의 사진(우)

실리콘은 520cm^{-1} 에서 유전체 구의 신호는 1000cm^{-1} 에서 가장 강한 피크가 나타났다. 제작한 시스템의 보정을 위해서 실리콘을 사용하였으며, 유전체 구의 신호를 통해서 시스템을 평가하였다. 그림 4.2에 각각의 피크 값을 나타내었으며, 상용화된 라만 장비와 유사한 결과를 얻었음을 확인 할 수 있다. 실험에서 확인한 신호는 620cm^{-1} , 795cm^{-1} , 1000cm^{-1} , 1030cm^{-1} , 1601.7cm^{-1} 이며 유전체 구의 분자구조와 실험을 통해서 얻은 각 라만 피크의 vibrational group는 그림 4.3과 표 4.1에 각각 나타내었다.[37]

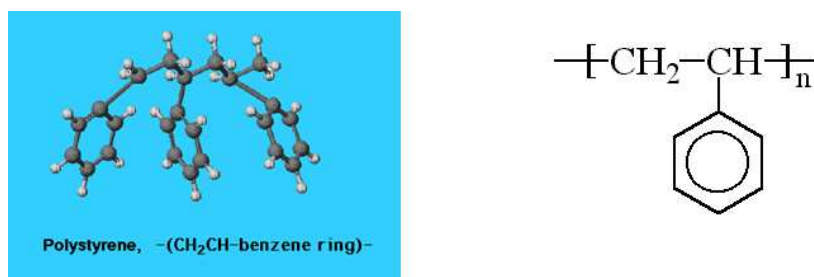


그림 4.3 polystyrene의 분자 구조(좌)와 구조식(우)

표 4.1 라만 피크에 따른 polystyrene의 vibrational group

Raman peak range (cm^{-1})	Vibrational group
620	CH deformation
795-835	C-C valence
990-1007	Ring vibration
990-1010	Trigonal ring breathing of monosubstituted benzene
950-1150	C-C stretch of n-alkane
1028	HSO_4^- (in KHSO_4 crystal)
1030	S=O valence

620cm^{-1} 는 CH 결합의 뒤틀림 신호와 대응하며, 795cm^{-1} 는 C-C valence 구조와 대응한다. 1000cm^{-1} 의 강한 신호는 benzene 구조의 ring vibration을, 1030cm^{-1} 는 S=O valence 신호와 대응한다.

상용화된 장비에서 획득한 신호는 본 논문에서 제작한 시스템에서 획득한 신호보다 높은 바닥선을 가진다. 이는 상용화된 라만 현미경의 광원이 514nm 로 본 논문에서 사용한 785nm 보다 짧은 파장을 갖는다. 짧은 파장의 광원은 높은 에너지에 의해서 시료에서 자발 형광을 유도할 수 있기 때문에 그림 4.2의 왼쪽에서 볼 수 있는 것과 같이 높은 바닥선을 타나내게 된다.

4.2 적혈구의 라만 스펙트럼

Optical tweezers는 단일 입자를 물리적 접촉 없이 포획하고 제어할 수 있다는 장점으로 인하여 생물학적 시료에 대한 분석 장비로 유용하다. 본 논문에서는 생물학적 시료 중 인체의 적혈구(RBC : Red Blood Cell)를 LTRS를 이용하여 포획하고 분석하였다. 샘플은 유전체 구와 동일한 방법으로 제작하여 실험하였으나, 실험이 진행되는 동안 적혈구의 손상을 방지하기 위하여 증류수 대신에 세포 배양 용매인 RPMI에 희석시켰다. 적혈구와 같은 생물학적 시료는 유전체 구와 같은 시료에 비하여 후방 산란되는 광자의 수가 적기 때문에 이에 대한 고려가 필요하다.

작은 광량의 신호를 분석하기 위하여 노출시간은 15초로 하였으며 시료로 입사되는 레이저 파워는 약 30mW로 하였다. 레이저의 높은 에너지로 인한 optical damage를 피하기 위하여 라만 신호 획득 전에 약 5mW의 레이저 파워로 적혈구를 포획하여 포획한 적혈구를 챔버 바닥으로부터 약 20 μ m 높이로 이동시켰다. 적혈구의 위치는 챔버로부터 20 μ m 높이를 유지한 약 30mW로 레이저 파워를 증가시켜 라만 신호를 획득하였다. 레이저 파워의 조절은 그림 3.2의 attenuator에 의해 조절 되었다. Optical tweezers는 강한 집속광을 사용하기 때문에 초점 부위에 높은 에너지가 집속되게 된다. 그에 따른 optical damage에 대한 보고가 있어 왔으며, 라만 신호를 획득하는데 있어서 optical damage를 최소화하기 위하여 본 논문에서는 근적외선 영역의 785nm 파장을 선택하였으며, attenuator로 레이저 파워를 조절하였다. optical damage에 관한 논의는 4.3절에서 자세히 다루겠다. 그림 4.4에 획득한 라만 신호와 포획한 적혈구의 사진을 나타내었다. 포획한 적혈구의 크기는 약 7 μ m이며, 650 cm^{-1} -1150 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} -1850 cm^{-1} 두 구간으로 나누어 신호를 획득하였다. 획득한 신호의 Vibrational group은 표 4.2에 나타내었다.

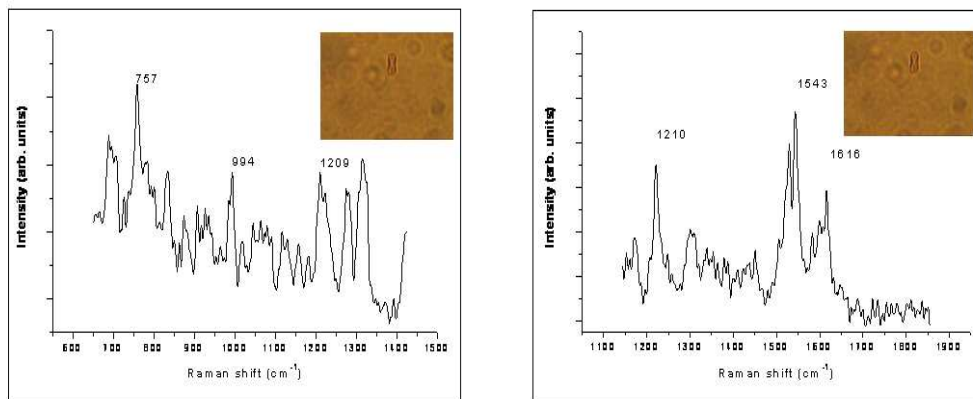


그림 4.4 LTRS로 획득한 적혈구의 라만 스펙트럼과 포획한 적혈구의 사진

표 4.2 라만 피크에 따른 적혈구의 vibrational group

Raman peak range (cm^{-1})	Vibrational group
752	$\nu(\text{pyr breathing})$
999	$\nu(\text{C}\beta\text{C1})\text{asym}$
1210	$\delta(\text{CmH})$
1444	$\nu(\text{CaCm})\text{asym}$
1543	$\nu(\text{C}\beta\text{C}\beta)$
1617	$\nu(\text{Ca}=\text{Ca})$

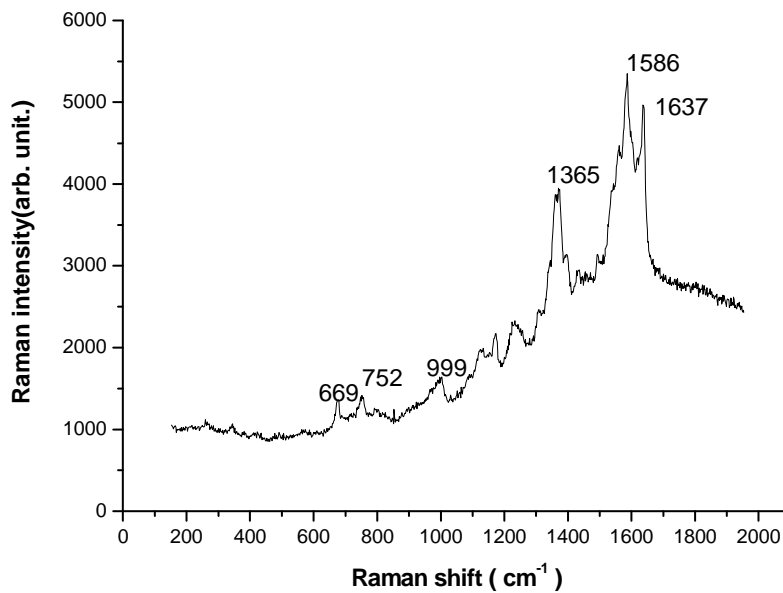


그림 4.5 상용화된 라만 현미경에서 획득한 전혈(Whole blood)의 신호

그림 4.5는 상용화된 라만 현미경에서 획득한 전혈의 신호이다. 일반 라만 분석 장비를 사용한 수용액에 부유하는 단일 세포의 라만 신호 분석을 위해서는 세포를 고정시켜야 한다. 따라서 살아있는 단일 세포의 라만 분석이 어렵다. 전혈의 신호가 실험에서 획득한 단일 적혈구의 신호와 다른 것은 전혈 안의 적혈구를 제외한 성분들의 간섭에 의한 영향으로 보여 진다.

4.3 적혈구 손상에 따른 라만 스펙트럼 분석

4.2절에 언급한 것과 같이 Optical tweezers에서 강하게 집속된 빔에 의해 포획되어진 생물학적 시료는 쉽게 optical damage를 받을 수 있다. CW 레이저를 광원으로 하는 Optical tweezers에서의 optical damage에 관한 연구는 형광이나 세포의 운동성 변화 관찰을 통해 많은 보고가 되어 왔다. 그러나 최근 들어 이차하모닉(second harmonic generation), 다광자 흡수(multi-photon absorption), CARS(Coherent Anti-stokes Raman Scattering)과 같은 비선형 광학 현상을 관찰할 수 있다는 장점으로 인하여 femtosecond laser를 광원으로 하는 Optical tweezers가 제안되고 있으나 이에 관한 damage 연구가 부족하다. [31-33] 이 절에서는 본 논문에서 제작한 LTRS를 통하여 Optical tweezers의 광원으로 CW 레이저와 femtosecond 레이저의 optical damage를 비교, 분석하고자 한다.

샘플은 적혈구를 사용하였으며, 4.2절에 나타낸 것과 동일한 방법으로 샘플을 준비하였다.

CW 레이저에 의한 optical damage를 관찰하기 위하여 그림 4.6 상단의 그림과 같이 레이저 파워를 조절하였다. 실험 시작 전에 발생할 수 있는 optical damage를 최소화하기 위하여 8mW로 적혈구를 포획한 후 챔버 바닥으로부터 약 20 μ m 높이로 이동시켰다. 빔금친 부분은 라만 신호를 획득한 구간이며 노출시간은 15초로 하였다. 실험 시작 후 레이저 파워는 35mW로 유지시켜 약 40분까지 시간에 따른 Raman spectrum의 변화를 관찰 하였다.

femtosecond 레이저에 의한 optical damage를 관찰하기 위하여 그림 4.6 하단의 그림과 같이 레이저 파워를 조절하였다. 과정은 위와 같으며, femtosecond 레이저에 의한 optical damage를 가할 때에는 그림 3.2의 노치필터(NF)에 의한 time dispersion을 없애기 위해 노치필터를 개방하였다. 실제로 짧은 펄스 레이저를 사용할 때, 광 경로 상에 필터와 같은 두꺼운 매질이 있을 경우 dispersion이 발생하는 것을 관찰 할 수 있다. 이것을 피하기 위하여 세포에 손상을 가할 시에 필터를 개방하였다. 레이저 파워의 조절은 그림과 같으며 시간은 총 240초까지 진행하였

다.

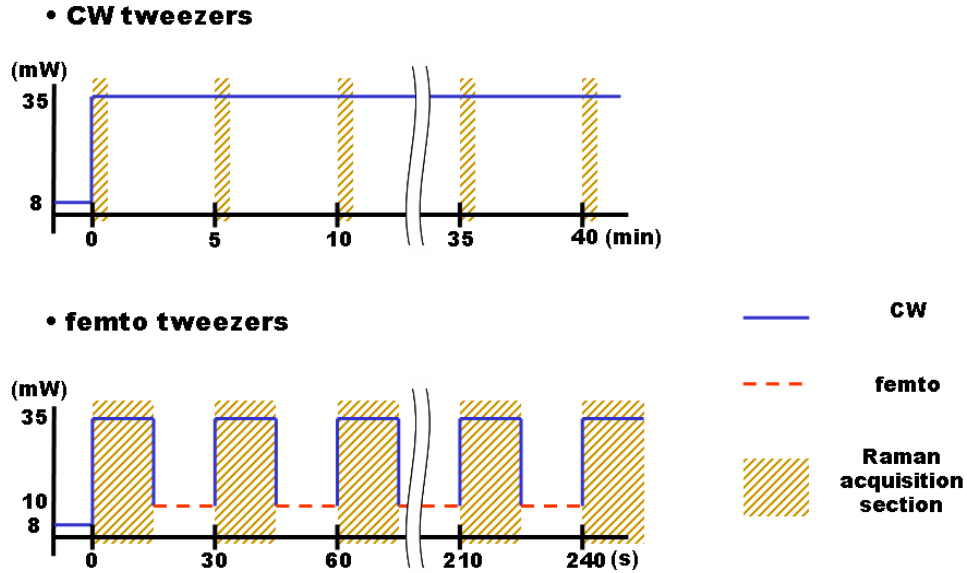


그림 4.6 CW 레이저와 femtosecond 레이저의 시간에 따른 레이저 파워

라만 스펙트럼은 CW에서 40분까지 5분 간격으로 총 8번, femto에서 240초까지 30초 간격으로 8번을 얻었다. 시간이 지남에 따라 두 경우 모두 바닥선이 증가하는 현상이 나타났다. 이는 optical damage에 의한 적혈구 손상이 나타났음을 의미하며, 에너지에 의한 세포의 응고와 같은 geometry나 광학 계수(optical property) 변화로 후방산란된 빛이 증가한 것으로 보인다. 신호의 분석은 가장 강한 피크를 나타낸 1210cm^{-1} 와 1543cm^{-1} 를 관찰하였다.

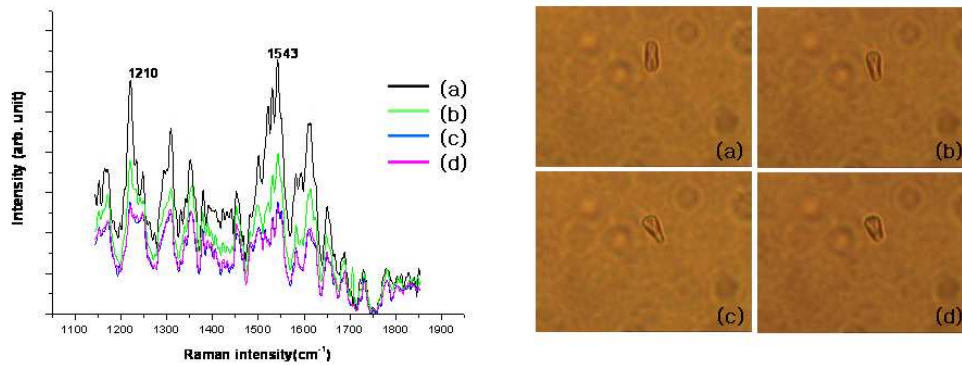


그림 4.7 CW 레이저에서의 Raman spectrum 변화와 적혈구의 형태학적 변화

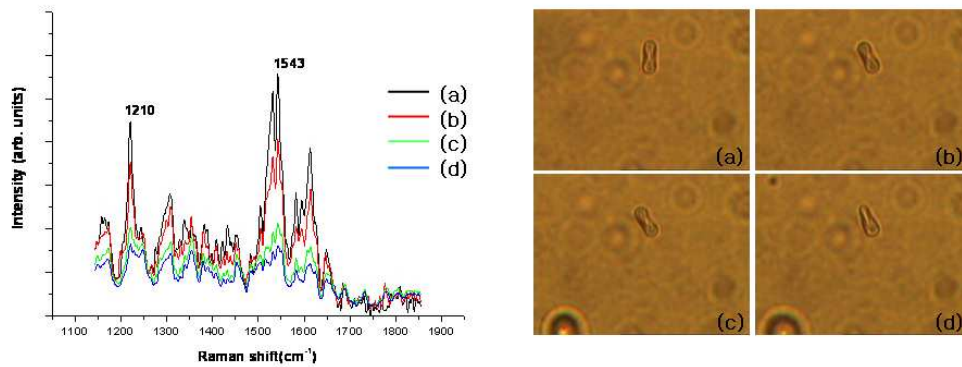


그림 4.8 femtosecond 레이저에서의 라만 스펙트럼 변화와 적혈구의 형태학적 변화

그림 4.7은 CW 레이저에 의한 적혈구의 손상 정도를 관찰한 라만 스펙트럼 변화와 적혈구의 사진이다. (a)-(d)까지의 스펙트럼은 오른쪽의 사진 (a)-(d)까지 대응된다. 또한, 그림 4.8은 femtosecond 레이저에 의한 적혈구의 손상정도를 관찰한 라만 스펙트럼과 적혈구의 사진을 나타내며 위와 동일하게 왼쪽의 스펙트럼은 오른쪽의 적혈구 사진과 대응한다. 라만 스펙트럼의 변화와 적혈구의 모양과의 관계를 좀 더 정량적으로 분석하기 위하여 1210cm^{-1} 와 1543cm^{-1} 의 신호 강도의 비

을 분석하였다.

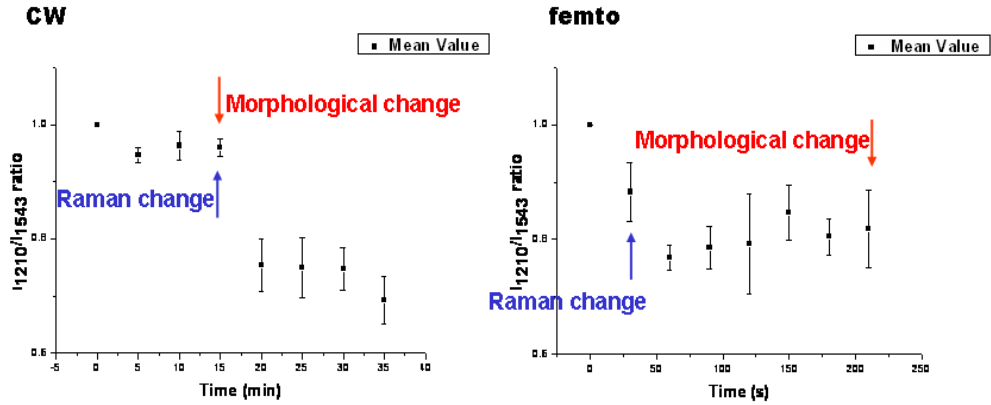


그림 4.9 시간에 따른 CW 레이저(좌)와 femtosecond 레이저(우)의 I_{1210}/I_{1543} ratio 변화

그림 4.9는 그림 4.7과 4.8의 결과에서 1210cm^{-1} 와 1543cm^{-1} 라만 피크의 신호 강도의 비율을 시간에 따라 나타낸 것이다. 그림 4.9에서 볼 수 있듯이 CW에서는 약 15분 이후로 신호 비율의 급격한 변화가 나타났으며, femtosecond 레이저에서는 약 30초 이후에 신호 비율의 변화가 나타났다. CW에서는 신호의 변화 시점과 적혈구 외형의 변화 시점이 거의 일치하는 경향을 보였으나, femtosecond 레이저에서는 두 시점이 일치하지 않고 라만 신호의 변화가 먼저 발생하는 것을 확인하였다. 이것은 CW 레이저와 femtosecond 레이저의 optical damage 과정이 서로 다르다는 것을 나타낸다. femtosecond 레이저의 높은 첨두출력(peak power)은 빔의 초점에서 다광자 흡수(multi-photon absorption)를 유도하며 세포에 국소적인 손상을 가할 수가 있다. 따라서 외형의 변화가 나타나지 않았음에도 적혈구에 손상이 나타난 것으로 보인다. 반면, CW 레이저에 의한 적혈구의 손상은 femtosecond 레이저에 비하여 낮은 에너지로 적혈구 세포 전체에 thermal damage를 주어 외형의 변화와 세포 손상의 정도가 거의 일치하는 것으로 보인다. CW를 광원으로 하는 Optical tweezers는 저출력의 레이저를 사용할 경우 장시간

세포의 손상 없이 세포의 포획이 가능하나 femtosecond 레이저를 광원으로 하는 Optical tweezers에서는 포획 효율을 증가시키고 저출력의 레이저 파워를 사용해야 할 것으로 보인다. 이와 같은 세포의 optical damage에 관한 연구는 최적화된 레이저 파워를 찾는 데 도움을 줄 것이다.

제 5 장 포획 힘 측정

5.1 Power spectrum 측정

power spectrum method를 이용하여 Optical tweezers에서의 포획 힘을 측정하였다. 포획 힘의 측정은 그림 3.8에서 나타낸 시스템을 이용하였으며, 실험에 사용된 시료는 $5\mu\text{m}$ 크기의 유전체 구를 사용하였으며 실험 방법은 4.1절의 유전체 구의 라만 스펙트럼 측정에 사용된 방법과 동일한 방법으로 시료를 제작하였다.

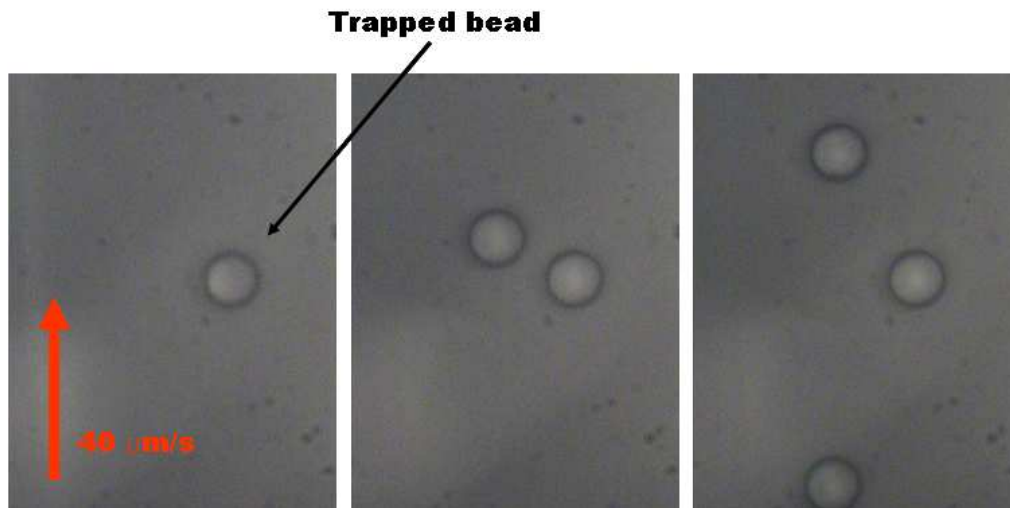


그림 5.1 포획된 유전체 구

그림 5.1은 포획된 유전체 구의 사진을 나타낸 것이며, 초당 $20\mu\text{m}$ 의 속도로 챔버를 이동시켜 포획된 유전체 구에 drag force를 가했다. 그림의 왼쪽부터 오른쪽으로 포획된 유전체구가 화살표 반대 방향으로 이동하는 것을 볼 수 있다. 포획된 입자가 이동함에 따라 유체에 의한 drag force가 가해지게 되며, 유전체구는 초점에서 멀어지게 된다. 이에 대응하는 QPD의 출력 신호는 다음 그림에 나타내었다.

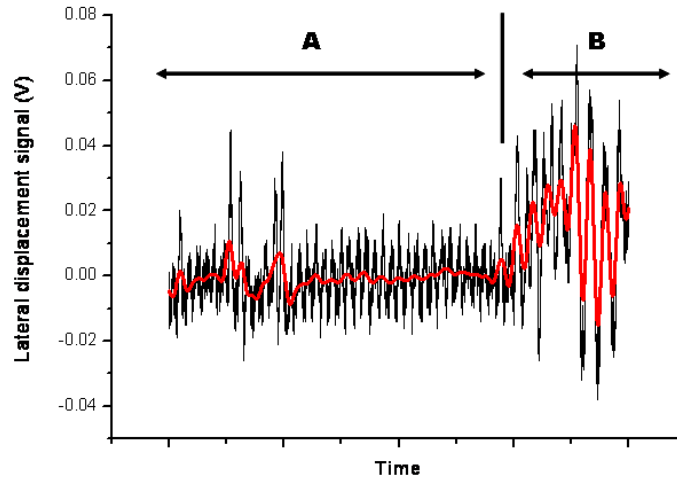


그림 5.2 QPD에서 측정된 시간에 따른 출력 신호

그림 5.2는 QPD에서의 시간에 따른 전압 값의 출력 신호 측정값이다. A 영역은 챔버를 이동시키기 전의 신호를 나타내며, B 영역은 챔버가 이동하기 시작한 후의 신호를 나타낸다. 측정된 전압 값은 포획된 입자가 빔의 초점으로부터 벗어난 거리 x 와 관련하며 식 2.30, 식 2.31에 의하여 x 를 계산하였다. Calibration factor β 를 구하기 위하여 출력된 전압 값은 moving averaging을 통하여 얻어진 평균값을 사용하였다. B 영역의 신호는 포획된 입자에 발생하는 포획힘과 drag force에 관한 정보를 담고 있으며, 이 정보를 획득하기 위하여 본 논문에서는 power spectrum을 구하였다. 위와 같이 Labview에서 획득되어진 신호는 동시에 다음 그림과 같이 power spectrum density로 출력하게 하였다.

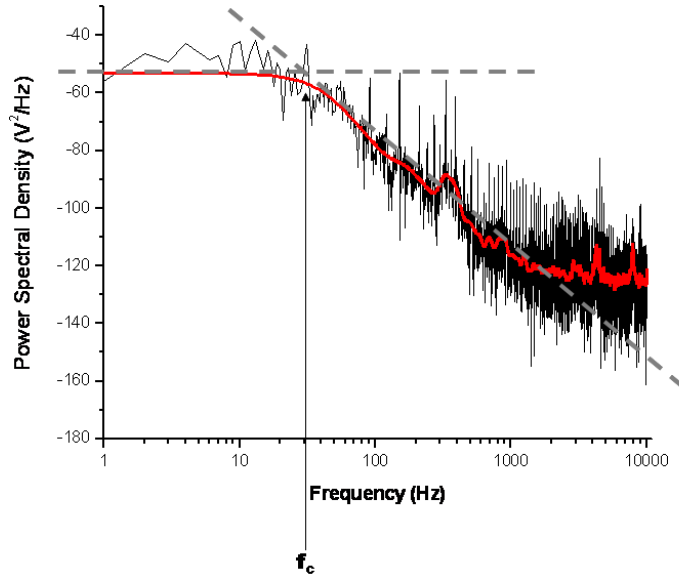


그림 5.3 측정된 power spectrum과 fitting에 의한 corner frequency (f_c)

그림 5.3은 그림 5.2과 같이 획득된 신호를 푸리에 변환을 통하여 획득한 power spectrum이며 Lorentzian fit을 통하여 corner frequency를 측정할 수가 있다. corner frequency는 그림 5.3과 같이 fitting된 두 직선의 교차점으로부터 획득되어 질 수 있다. 측정된 Corner frequency와 전압 값은 식 2.26과 식 2.31을 통하여 trap stiffness와 calibration factor의 계산에 사용되었다.

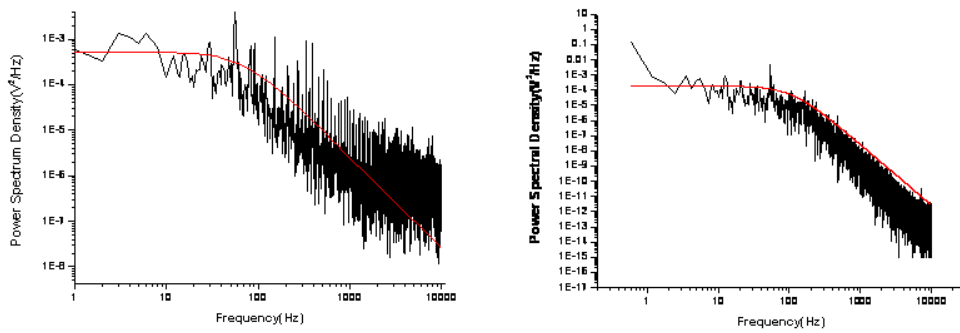


그림 5.4 Condensor의 NA에 따른 Power spectrum, (좌) NA : 0.8 (우) NA : 1.4

먼저 각 factor를 구하기 전에 신호를 획득하기 위한 최적의 조건을 찾기 위하여 Condense lens의 NA에 따른 스펙트럼을 측정하였다. 그림 5.4는 condense lens의 NA에 따른 측정된 power spectrum을 나타낸 결과이다. 그림에서 볼 수 있는 것과 같이 NA에 따라 스펙트럼의 결과가 다른 것을 확인하였다. 시스템 제작에 사용된 대물렌즈의 NA는 1.25이다. 따라서 그림 5.4의 왼쪽 그림과 같이 condense lens의 NA가 0.8로 대물렌즈 보다 작을 경우 포획된 입자에서 전방 산란된 빛을 모두 수집할 수가 없게 된다. 결과적으로 포획된 입자의 위치 변위 추적을 어렵게 할 수가 있다. 실험에 사용한 condense lens는 1.4로 대물렌즈 보다 크게 하였으며, 그림 5.4의 오른쪽과 같이 보다 깨끗한 스펙트럼을 획득할 수가 있다.

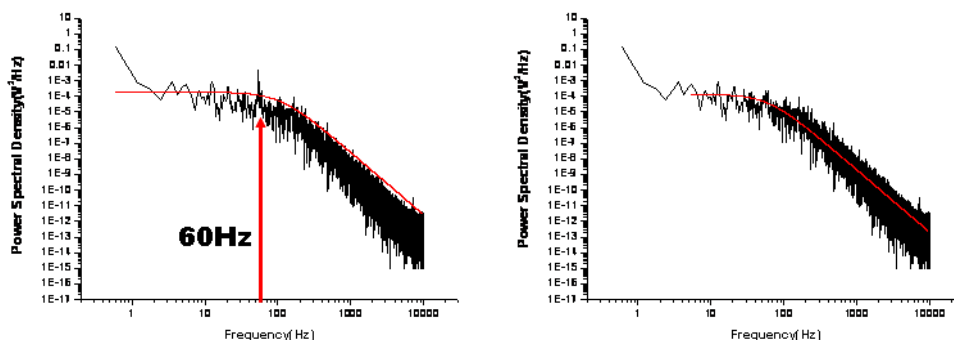


그림 5.5 60Hz 노이즈 제거 전의 스펙트럼(좌)와 제거 후의 스펙트럼(우)

그림 5.5에서 60Hz 노이즈 제거 전과 후의 스펙트럼을 비교하였다. 왼쪽의 스펙트럼에서 볼 수 있는 것처럼 약 60Hz에서 노이즈 성분이 나타나는 것을 볼 수 있다. 이것은 최종적으로 그림에서 볼 수 있는 것과 같이 fitting의 결과의 영향을 주게 된다. 왼쪽의 노이즈 제거 전의 fitting 결과는 측정된 스펙트럼과 일치하지 않는 것을 확인할 수 있으나 노이즈를 제거한 오른쪽의 결과는 측정된 스펙트럼과 fitting 한 결과가 거의 일치하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 실제 측정된 두 스펙트럼의 corner frequency는 89Hz, 60Hz로 계산되었다. 따라서 실험에는 60Hz

노이즈를 평균화하여 제거하였다.

챔버로부터 포획된 입자의 높이에 따른 각 측정값과 레이저 파워에 따른 각 측정값의 변화를 확인하기 위하여 포획된 입자의 높이와 레이저 파워를 변화시켰다. 계산된 결과는 그림 5.6와 그림 5.7에 각각 나타내었으며, 입자의 높이와 레이저 파워의 변화에 따라 각각 5번의 측정을 통하여 결과값을 획득하였다.

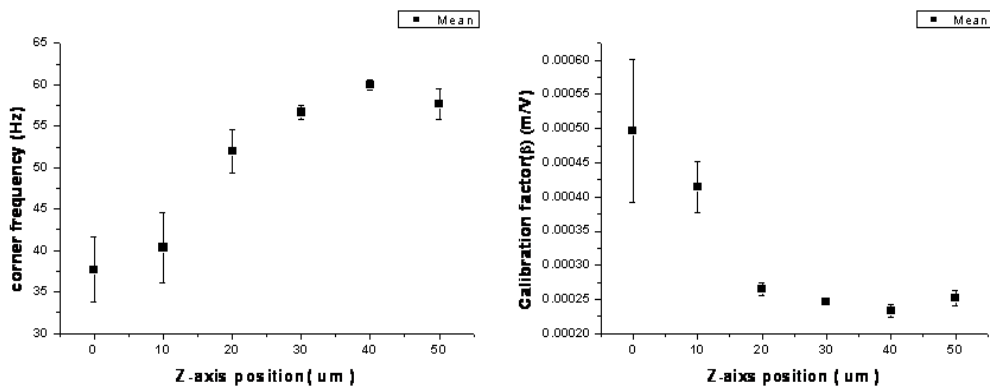


그림 5.6 포획된 polystyrene bead의 높이에 따른 corner frequency(좌)와 calibration factor(우)

그림 5.6는 챔버로부터 포획된 유전체 구의 높이에 따른 corner frequency와 calibration factor 값을 나타낸 것이다. 입사되어진 레이저 파워는 15mW로 하였으며, 챔버의 이동 속도는 초당 40 μ m로 하였다. 챔버 바닥으로부터 높이가 높아짐에 따라 corner frequency는 커지는 것을 볼 수 있으며, calibration factor는 작아지는 것을 볼 수 있다. 참고 문헌 [35, 44]에 의하면, 포획된 입자가 챔버 바닥에 가깝게 되면 포획된 입자에서 산란된 빛이 챔버 유리 표면에서 반사되어 서로 간섭을 일으킨다. 또한, 포획된 입자가 챔버 바닥으로부터 멀리 떨어져 있을 때에는, 이머전 오일의 굴절률 보상 거리보다 멀어져 수차가 발생하게 된다. 이는 water immersion 대물렌즈를 사용함으로써 어느 정도 보상되어 질 수 있다. [36]

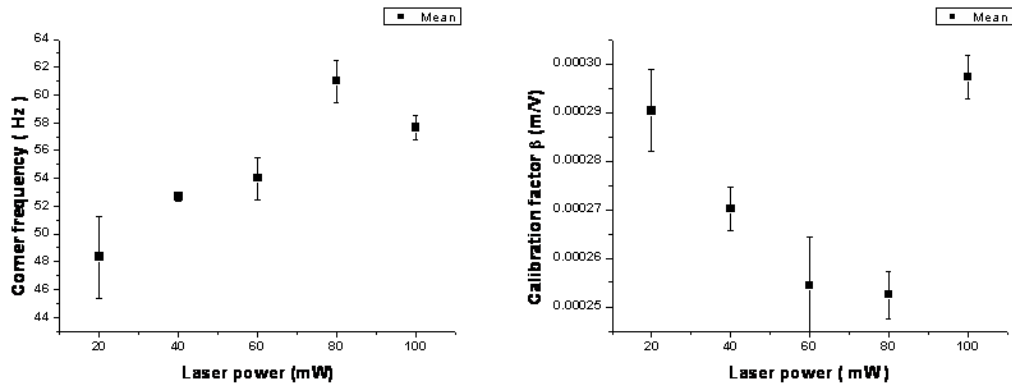


그림 5.7 포획된 polystyrene bead의 레이저 파워에 따른 corner frequency(좌)와 calibration factor(우)

그림 5.7는 유전체 구를 포획하는데 사용된 레이저 파워의 증가에 따른 측정된 corner frequency와 calibration factor의 값이다. 포획된 유전체 구의 바닥으로부터 높이는 $20\mu\text{m}$ 로 유지하였으며, 챔버의 이동 속도는 초당 $40\mu\text{m}$ 으로 하였다. 레이저 파워의 증가에 따라 corner frequency가 증가함을 볼 수 있으며, calibration factor의 값이 감소함을 볼 수 있다. 레이저 파워가 증가하면 식 2.13에서 포획 힘이 증가하게 되며, 포획 힘의 증가는 유전체 구를 초점에 더 강하게 붙잡아 두게 된다. 따라서 포획된 입자의 저주파 대역의 진동의 크기는 파워가 증가함에 따라 감소하게 된다. 결과적으로 레이저 파워가 증가함에 따라 corner frequency는 증가하게 된다.[45]

5.2 Trap stiffness 측정

Trap stiffness를 구하기 위하여 측정된 corner frequency의 값과 2장의 식 2.26을 사용하였다.

$$k = 2\pi\gamma f_c \quad (2.26)$$

여기서 $\gamma = 6\pi\eta r$ 는 drag coefficient로 2장에서 언급하였다. 유전체 구의 크기를 쉽게 고려하기 위하여 실제 계산에 쓰인 $\gamma = 6\pi\eta d$ 로 하였다. 여기에서 d 는 유전

체 구의 지름을 의미하며, η 는 수용액의 viscosity를 의미한다. 유전체 구를 둘러싸고 있는 수용액은 증류수이며, 챔버 내부의 온도는 상온이라고 가정하였다. 상온에서 물의 viscosity는 0.001025Nsec/m^2 이다.[21]

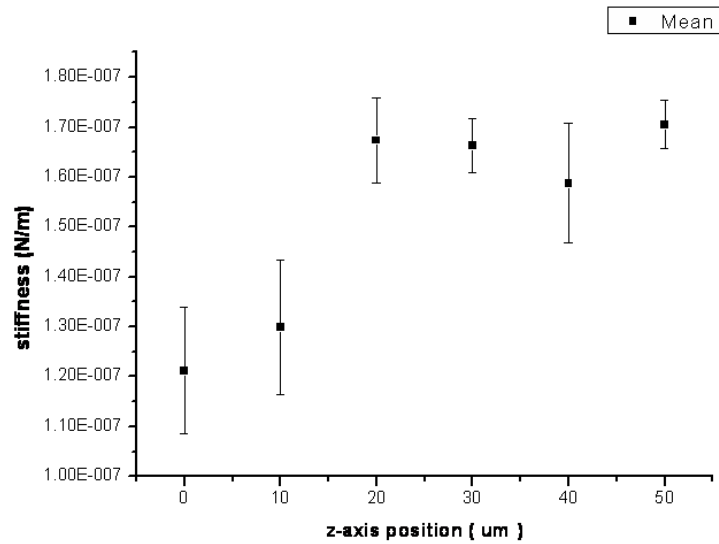


그림 5.8 polystyrene bead의 높이에 따른 stiffness 측정값

그림 5.8은 챔버 바닥으로 부터의 높이 변화에 따른 trap stiffness값이다. 높이가 높아짐에 따라 trap stiffness 값이 증가함을 볼 수 있다. 이것은 5.1절에서 언급한 것과 같이 깊이에 따른 수차에 의한 것으로 생각된다.

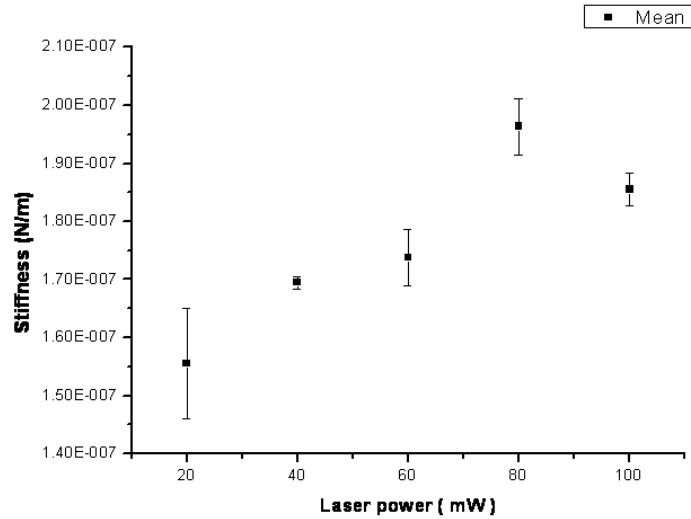


그림 5.9 입사된 레이저 파워에 따른 stiffness 측정값

그림 5.9은 입사된 레이저 파워에 따른 trap stiffness를 나타내며, 레이저 파워가 증가함에 따라 trap stiffness값 또한 증가함을 볼 수 있다.

5.3 시스템 평가

본 논문에서 사용한 A. Buosciolo의 알고리즘은 수용액의 viscosity 측정이 가능하다.[35] viscosity 측정을 통하여 제작한 시스템을 평가하였다. 실험에 사용한 유전체 구는 $5\mu\text{m}$ 로 하였으며, 레이저 파워는 15mW로 일정하게 유지시켰다. 수용액으로는 증류수를 사용하였으며, 증류수의 viscosity는 상온에서 0.001025Nsec/m^2 이다.[21] 측정되는 결과는 trap depth에 따라 다르게 나타날 것이며, 깊이에 따른 결과를 알아보기 위하여 $5\mu\text{m}$ 간격으로 깊이의 변화를 주어 viscosity를 계산하였다. 그림 5.10은 trap depth에 따른 viscosity의 측정 결과이다.

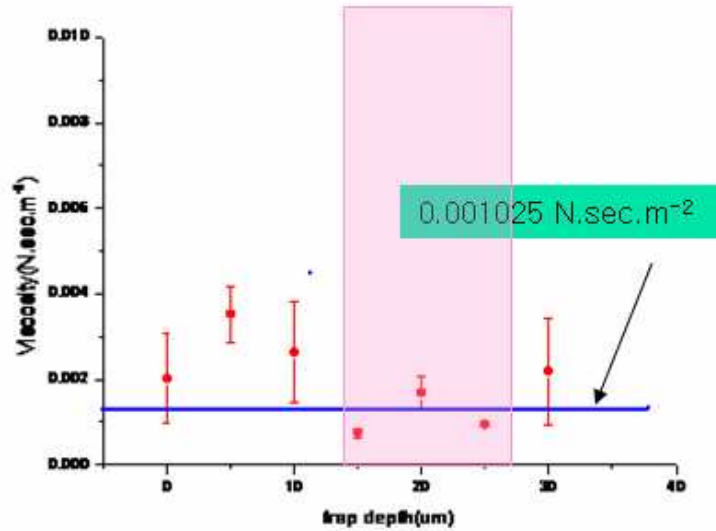


그림 5.10 trap depth에 따른 측정된 viscosity

실험 결과는 깊이 마다 각각 5번의 실험값을 측정 한 후 통계처리 하였다. 그림 5.10에서 0~15 μm 구간과 30 μm 을 벗어난 구간에서는 측정값과 실제값에서 차이가 있다는 것을 볼 수 있다. 그러나 약 15 μm ~30 μm 구간에서는 실제값과 거의 비슷한 값으로 측정되었다. 이는 5.2절에서 이미 언급한 것과 같은 의미를 가지는 결과이다. 실험에 사용된 유전체 구의 크기는 5 μm 이며, oil immersion 대물렌즈를 사용하였다. Karen C에 의하면 유전체 구의 반지름을 a 라고 할 때, 유전체 구의 포획 위치는 a 의 10배 이상이 되어야 한다고 실험을 통해 입증되었다.[46] 30 μm 이 넘는 구간에서는 오일과 물의 굴절률 매칭(matching) 깊이를 넘기 때문에 수차가 발생한 것이다. 실제로 약 80 μm 이 넘어가는 깊이에서는 유전체 구의 포획이 어렵다는 것을 확인했다. 이러한 문제점에 대해서는 이미 보고가 되어 왔으며 깊이에 따른 문제점을 해결하기 위해서 5.2절에서 이미 언급한 것과 같이 water immersion 대물렌즈를 사용함으로써 해결할 수 있다. 본 논문에서 제작한 시스템은 5 μm 크기의 유전체 구를 사용할 경우 약 25 μm 전 후의 깊이에서 신뢰할 수

있는 결과를 얻을 수 있었다.

제 6 장 결 론

Optical tweezers는 그 동안 여러 분야에 응용되어 왔으며, 새로운 분석 기술의 도입에 의한 다른 새로운 분야에 계속해서 그 가능성이 검증되고 있다. 본 논문에서는 Optical tweezers와 Raman spectroscopy를 결합한 LTRS(Laser Tweezers Raman Spectroscopy)를 제작하였으며, 또한 power spectrum method를 통하여 optical tweezers의 포획 힘을 측정하였다. LTRS에서 포획된 입자에서 후방 산란된 빛을 필터를 통하여 분광기에서 시료의 라만 스펙트럼을 획득하였다. 입자의 포획힘을 구하기 위해 1064nm의 다이오드 레이저를 사용하여 포획된 입자에서 QPD(Quadrant Photo Diode)를 이용하여 전방산란된 빛의 변위를 측정하였다.

Raman 분광학은 시료의 고유 분자 진동 주파수를 측정할 수 있다는 장점으로 강력한 분석도구로 그동안 응용되어 왔다. 그러나 적혈구, yeast cell 등과 같이 단일 세포를 살아있는 상태에서 신호를 획득하기에는 다소 어려움이 있었다. 이는 세포를 살아있는 상태로 유지시키기 위해서는 세포를 배양액 속에 두어야 하며 배양액의 물 분자 진동에 의한 부유하는 세포의 움직임에 의하여 세포를 레이저의 초점 위치에 고정시키기가 어렵기 때문이다. 또한 대장균과 같이 운동성을 가진 살아있는 세포의 라만 신호를 획득하는 일은 일반 라만 분광법으로 측정이 어려웠다. 본 논문에서 제작한 LTRS는 Optical tweezers로 수용액에서 부유하는 세포를 세포의 손상과 물리적 접촉없이 포획을 가능하게 하여 단일 세포의 효율적인 라만 신호 분석을 가능하게 하였다. LTRS의 검증을 위하여 유전체구를 포획하여 라만 스펙트럼을 획득하였으며, 상용화된 라만 분석 장비의 유전체구의 신호와 비교 검증하여 제작한 시스템을 평가하였다.

또한, 본 논문에서는 Optical tweezers에서 발생할 수 있는 세포의 손상 정도를 LTRS를 통하여 분석하였다. Optical tweezers는 입자를 포획하기 위하여 강하게 집속된 빔을 사용하며 강하게 집속된 빔에 세포와 같은 시료가 놓이게 될 때 높은 에너지에 의하여 손상을 받게 된다. 최근 포획된 입자의 비선형 현상을 관찰하기 위하여 femto초의 펄스 레이저가 Optical tweezers의 새로운 광원으로 시도가

되고 있다. LTRS를 통하여 일반 CW 레이저를 광원으로 할 때와 femto초 레이저를 광원으로 할 때의 세포의 손상 정도를 관찰하였다. CW 레이저를 광원으로 하였을 때 라만 신호의 변화와 세포의 외형 변화의 시점이 거의 일치하는 것을 관찰하였다. 그러나 femto초 레이저를 광원으로 할 때에는 외형의 변화가 없음에도 불구하고 라만 신호의 변화가 나타나는 것을 관찰하였다. 이는 femto초 레이저의 높은 첨두 에너지에 의하여 세포에 국소적인 손상이 나타난 것으로 생각된다. 또한 femto초 레이저의 경우 낮은 출력에서도 세포의 라만 신호가 변화하는 것을 관찰하였다. Femto초 레이저에 의한 포획된 시료의 비선형 현상을 관찰하기 위해서는 광포획 효율의 증가나 레이저 스위칭과 같은 방법이 요구될 것으로 생각된다.

본 논문에서는 power spectrum method를 사용하여 Optical tweezers의 포획힘을 측정하고자 하였다. Power spectrum method를 이용한 포획힘을 측정하기 위해서는 trap stiffness, calibration factor, viscosity의 측정이 요구된다. 본 논문에서는 포획된 입자의 높이와 입사된 레이저 파워에 따라 trap stiffness와 calibration factor를 측정하였다. 측정된 결과는 다른 논문의 결과와 비교하였으며, 본 논문에서 측정한 결과와 유사한 경향이 나타남을 관찰하였다.

Power spectrum method를 이용한 포획힘 측정 방법은 Myosin, DNA, collagen fiber와 같은 중합체의 물리적 특성 연구에 이용되어 왔다. 이와 같은 생물학적 중합체의 물리적 특성 연구는 생물 분자의 motor를 이해하는데 중요한 요소이다. 본 논문에서 제작한 시스템을 이용한 포획힘 측정은 아직 연구 단계이나, 차후 진동, QPD 감도 등의 해결을 통한 시스템의 안정화가 확보된다면 위와 같이 DNA와 같은 중합체의 물리적 특성 연구에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- [1] Feld MS, Manoharan R, Salenius J, "Detection and characterization of human tissue lesions with near infrared Raman spectroscopy," Proc SPIE. 2388, 99-104, 1995
- [2] Molckovsky A, Song LM, Shim MG, Marcon NE, Wilson BC, "Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps," Gastrointest Endosc, 57, 396-402, 2003
- [3] C. Xie, M. A. Dinno, and Y. Li, "Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells," Opt. Lett. 27, 249-251, 2002
- [4] C. Xie and Y. Li, "Raman spectra and optical trapping of highly refractive and nontransparent particles," Appl. Phys. Lett. 81, 951-953, 2002
- [5] Kerstin Ramser, Katarina Logg, Mattias Goksör, Jonas Enger, Mikael Käll, and Dag Hanstorp, Resonance raman spectroscopy of optically trapped functional erythrocytes, J. Biomed. Opt, 9, 593, 2004
- [6] J. W. Chan, A. P. Esposito, C. E. Talley, C. W. Hollars, S. M. Lane, and T. Huser, Reagentless identification of single bacterial spores in aqueous solution by confocal laser tweezers raman spectroscopy, Anal. Chem, 76, 599, 2004
- [7] J. L. Deng, Q. Wei, M. H. Zhang, Y. Z. Wang, and Y. Q. Li, Study of the effect of alcohol on single human red blood cells using near-infrared laser tweezers raman spectroscopy, J. Raman. Spec, 36, 257, 2005
- [8] F. Zheng, Y. Qin, K. Chen, "Sensitivity map of laser tweezers Raman spectroscopy for single-cell analysis of colorectal cancer," J. Biomed. Opt, 12, 034002, 2007
- [9] Jenifer F. Ojeda, Changan Xie, Yong-Qing Li, Fred E. Bertrand, John Wiley, and Thomas J. McConnell, "Chromosomal analysis and identification

based. on optical tweezers and Raman spectroscopy," *Opt. Express*, 14, 5385, 2006

[10] GP. Singh, G. Volpe, CM. Creely, H. Grotsch, IM. Geli, and **D. Petrov**, "The lag phase and G1 phase of a single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy," *J. Raman Spec.* 37, 858 - 864, 2006

[11] 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

[12] MD. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, SM. Block, "Stretching DNA with optical tweezers," *Biophys. J.*, 72, 1335, 1997

[13] Finer, J.T., Simmons, R.M. and Spudich, J.A. "Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps." *Nature*, 368, 113-119, 1994

[14] C.G. Baumann, V.A. Bollmfield, S.B. Smith, C. Bustamante, M.D. Wang, and S.M. Block, "Stretching of single collapsed DNA molecules," *Biophys. J.*, 78, 1965-1978, 2000

[15] JH Huisstede, V Subramaniam, ML Bennink, "Combining Optical Tweezers and Scanning Probe Microscopy to Study DNA - Protein Interactions," *MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE*, 70, 26-33, 2007

[16] A. Meyer, A. Marshall, B. G. Bush, and E. M. Furst, "Laser tweezers microrheology of a colloidal suspension," *J. Microrheology*, 50, 77-92, 2006

[17] Svoboda, K., Schmidt, C.F., Schnapp, B.J. and Block, S.M. "Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry." *Nature* 365, 721-7, 1993

[18] K Berg-Sørensen, H Flyvbjerg, "Power spectrum analysis for optical tweezers," *Review of Scientific Instruments*, 75, 594-612, 2004

[19] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu, "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles," *Opt. Lett.* 11,

288, 1986

- [20] Ashkin, A. "History of optical trapping and manipulation of small-neutral particles, atoms, and molecules," *IEEE J. Sel Top. Quantum Electron.* 6, 841-856, 2000
- [21] K. O. Greulich, *Micromanipulation by Light in Biology and Medicine: The Laser Microbeam and Optical Tweezers*, Birkhauser, Boston, Mass., 1999
- [22] Yasuhiro Harada, Toshimitsu Asakura, "Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime," *Optics Communications*, vol. 124, 529-541, 1996
- [23] A. Ashkin, "Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime," *Biophysics. J.*, vol. 61, 569-582, 1992
- [24] G. Roosen and C. Imbert, "Optical levitation by means of two horizontal laser beams: a theoretical and experimental study," *Phys. Lett. A* 59, 6-8, 1976.
- [25] C. V. Raman and K. S. Krishna, "A New Type of Secondary Radiation," *Nature*. 121, 501, 1928
- [26] John R. Ferraro, Kazuo Nakamoto, Chris W. Brown, *Introductory Raman Spectroscopy 2nd Edition*, Academic press, inc. 2002
- [27] B. Schrader, D. S. Moore, "Laser-Based Molecular Spectroscopy for Chemical Analysis-Raman Scattering Processes," *Pure & Appl. Chem.*, 69, 7, 1451-1468, 1997
- [28] Gajendra Pratap Singh, "Raman Microspectroscopy of Optically Trapped Cells," ph.D. dissertation Universitat Politecnica De Catalunya, 2006
- [29] W. H. Wright, G. J. Sonek and M. W. Berns, "Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers," *Appl. Opt*, 33, 1735, 1994
- [30] M. Capitanio, G. Romano, R. Ballerini, M. Giuntini, D. Dunlop and L. Finzi, "Calibration of optical tweezers with differential interference contrast signals," *Rev. Sci. Instrum.* 73, 1687, 2002

- [31] K. Svoboda and S. M. Block, "Biological applications of optical forces," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 247, 1994
- [32] M. W. Allersma, F. Gittes, M. J. deCastro, R. J. Stewart, and C. F. Schmidt, "Two-Dimensional Tracking of ncd Motility by Back Focal Plane Interferometry," *Biophys. J.* 74, 1074-1085, 1998
- [33] J. T. Finer, R. M. Simmons, and J. A. Spudich, "Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps," *Nature.* 368, 113, 1994
- [34] F. Gittes and C. F. Schmidt, "Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers," *Opt. Lett.* 23, 7-9, 1998
- [35] A. Buosciolo, G. Pesce, and A. Sasso, "New calibration method for position detector for simultaneous measurements of force constants and local viscosity in optical tweezers," *Opt. Commun.* 230, 357-368, 2004
- [36] G. Pesce, A. Sasso, S. Fusco, "Viscosity measurements on micron-size scale using optical tweezers." *Rev. Sci. Instr.* 76, 115105, 2005
- [37] R. Kesavamoorthy, T. Sakuntals and Akhllesh K. Arora, "Insitu Measurement Of Charge On Polystyrene Particles In Colloidal Suspension," *Sci. Technol.* 1, 440-445, 1990
- [38] K. Konig, H. Liang, M. W. Berns, and B. J. Tronberg, "Cell damage in near-infrared multimode optical traps as a result of multiphoton absorption," *Opt. Lett.* 21, 14, 1090, 1996
- [39] Keir C. Neuman, Edmund H. Chadd, Grace F. Liou, Keren Bergman, and Steven M. Block, "Characterization of Photodamage to Escherichia coli in Optical Traps," *Biophys. J.* 77, 2856-2863, 1999
- [40] Im Kang-Bin., Ju Sung-Bin., Han Sumin., Park Hwajoon. and Kim Beop-Min., "Trapping efficiency of a femtosecond laser and damage thresholds for biological cells," *J. Korean Phys. Soc.* 48, 968-973, 2006
- [41] Little, H., Brown, C. T. A., Garcés-Chavez, V., Sibbet, W. and Dholakia, K., "Optical guiding of microscopic particles in femtosecond and continuous

- wave Bessel light beams," *Opt. Express*, 12, 2560-2565, 2004
- [42] Agate, B., Brown, C. T. A., Sibbett, W. Dholakia, K., "femtosecond optical tweezers for in-situ control of two photon fluorescence," *Opt. Express*, 12, 3011-3017, 2004
- [43] Chan, James W., Winhold, Heiko, Lane, Stephen M. and Huser, Thomas, "Optical trapping and coherent anti-stokes raman scattering (CARS) spectroscopy of submicron-size particles," *IEEE J SEL TOP QUANT*, 11, 858-863, 2005
- [44] A. Rohrbach, and E. H. K. Stelzer, "Three-dimensional position detection of optically trapped dielectric particles," *J. Appl. Phys.* 91, 5474-5488, 2002
- [45] Martin Li, Jochen Arlt "Trapping multiple particles in single optical tweezers," *Opt Commun*, 281, 135-140, 2008
- [46] K. C. Vermeulen, G. J. L. Wuite, G. J. M. Stienen, and C. F. Schmidt "Optical trap stiffness in the presence and absence of spherical aberrations," *Applied Optics*, 45, 8, 10, 2006

Appendix A

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

위의 식을 푸리에 변환하면,

$$m(i f)^2 \hat{x} = -k \hat{x} - \gamma i f \hat{x} + \hat{F}$$

$$\hat{x}(-m\omega^2 + k + \gamma i f) = \hat{F}$$

$$\hat{x} = \frac{\hat{F}}{(-m\omega^2 + k + \gamma i f)}$$

푸리에 변환한 위의 식을 주파수 성분의 크기를 획득하기 위하여 다음 과정과 같이 절댓값을 하면 다음과 같다.

$$|\hat{x}|^2 = \frac{|\hat{F}|^2}{(-mf^2 + k)^2 + \gamma^2 \omega^2}, \quad \text{이 식에서 } |F(f)|^2 = 4\gamma k_B T \text{와 같으며, } k_B \text{는 볼츠만}$$

상수, T는 온도를 각각 나타낸다. 또한 f_c 는 corner frequency, k는 trap stiffness를 각각 나타내며 $k = 2\pi\gamma f_c$ 와 같다.

위의 식을 풀면,

$$\begin{aligned} |\hat{x}|^2 &= \frac{|\hat{F}|^2}{(-mf^2 + k)^2 + \gamma^2 \omega^2} \\ &= \frac{4\gamma k_B T}{(-mf^2 + 2\pi\gamma f_c)^2 + \gamma^2 f^2}, \quad \text{여기에서 질량 } m \text{은 } 0 \text{으로 무시될 수 있다.} \\ &= \frac{4k_B T}{\gamma\{(2\pi f_c)^2 + f^2\}} = \frac{4k_B T}{\gamma\{4\pi^2 f_c^2 + 4\pi^2 f^2\}} \\ &= \frac{k_B T}{\gamma\pi^2(f_c^2 + f^2)} \end{aligned}$$

다음과 같이 최종적으로 power spectrum을 얻을 수가 있다.

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

위의 식에서 낮은 주파수 성분에 대해서는 f 를 0에 근사한다고 가정하면,

$$S_x(0) = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2 \left(\frac{k}{2\pi\gamma}\right)^2} = \frac{4\gamma k_B T}{k^2}, \quad f_c = \frac{k}{2\pi\gamma}$$

위의 식과 같이 상수로 근사하게 된다. 또한, 그 이상의 주파수 성분에 대해서는 $1/f^2$ 으로 감쇄하며 따라서 power spectrum을 예측할 수가 있다.

ABSTRACT

Raman spectroscopic analysis of biological cells and trap stiffness measurements using optical tweezers

Ju Sung-Bin

Dept. of Biomedical Engineering

The Graduate School

Yonsei University

A single living cell is a complex mixture of large number of biomolecules enclosed in a cell membrane. These biomolecules constitute the cell organelles such as nucleus, liposome, etc. and the understanding of various cellular processes is based on their correct identification. To cure or diagnose such cellular disorders leading to diseases, the identification of concerned biomolecules becomes inevitable.

In the latest developments, the combination of Raman spectroscopy with optical tweezers, known as LTRS(Laser Tweezers Raman Spectroscopy) has opened a way to a single cell detection and characterization. To analyze the chemical information of complex mixture of a single cell, LTRS may be the fastest and the simplest technique.

In this paper, we made LTRS system and observed Raman spectrum of polystyrene bead. Also we observed Raman intensity of RBC as a marker for optical damage.

Also, we tried to directly measure the force exerted on a trapped particle by

using power spectrum method. In experiment, we measured the stiffness of the trap and the calibration factor.

We expect that these results will be applied to identify the chemical and structural properties of cells and will analyze biological motor.

key-word : optical tweezers, LTRS, power spectrum method