

원자현미경 이용법

허광운 · 임 선 · 윤승길 · 이상은 · 최일신 · 김태완†

한경대학교

I. 서 언

나노기술(NT)분야는 원자나 분자 크기의 극미세 세계에서 물질의 구조와 특성을 규명하고 이를 조작, 제어하는 기술로서 IT, BT와 더불어 21세기 핵심기술로 주목 받고 있다. 과거 기술 발전은 기계공학, 전기, 전자공학 등이 산업발전을 주도했듯이 앞으로는 NT가 산업발전의 견인차 역할을 할 중요한 기술이기 때문이다.

최근 까지도 원자나 분자단위의 나노 세계는 너무나 미세하여 아무리 좋은 현미경으로도 볼 수 없는 미지의 영역이었다. 이러한 나노 세계를 열수 있는 열쇠가 1980년대에 발명된 원자현미경(SPM : Scanning Probe Microscope)이다.

원자현미경의 효시는 STM(Scanning Tunneling Microscope)이며 가장 널리 쓰이는 원자현미경은 AFM(Atomic Force Microscope)이다. 기존의 확대개념을 깨뜨린 원자현미경은 제 1 세대인 광학현미경과 제 2 세대인 전자현미경 다음의 제 3 세대 현미경으로 자리 잡아가고 있다. 광학현미경의 배율이 최고 수천배, 전자현미경(SEM)의 배율이 최고 수십만 배인데 비해서 원자현미경의 배율은 최고 수천만 배로서, 개개의 원자를 관찰할 수 있는 분해능을 가지고 있다. 또한 원자현미경의 수직방향 분해능은 수평방향 보다 더욱 좋아서 원자 지름의 수십분의 일(0.01 nm) 까지도 측정해 낼 수 있다. 이와 같이 경이적인 분해능으로 나노 세계를 직접 관찰함으로써 생물학적인 시료(DNA, RNA, 생합성 고분자, 생체막, 토양입자 등)에서 이제 까지 알 수 없었던 여러 가지 극미세 세계에 대한 관한 정보가 점차 밝혀질 것으로 기대되고 있다. 원자현미경의 응용분야로는 생물학 분야뿐만 아니라 표면 물리학, 반도체의 표면 계측, 화학 및 고분자, 재료공학, 기타 표면 분석 등이 있다.

II. 분석방법

1. 여러 가지 형태의 원자현미경

원자현미경에는 원자현미경의 효시인 STM(Scanning Tunneling Microscope)에서 출발하여 시료의 표면과 탐침(Cantilever) 사이의 Van der Waals force를 이용한 가장 보편적인

†Corresponding author: (Phone) +82-031-670-5081 (E-mail) taewkim@hnu.hankyong.ac.kr

AFM(Atomic Force Microscope)과 표면의 마찰력을 측정하는 LFM(Lateral Force Microscope), 시료의 경도(hardness)를 재는 FMM(Force Modulation Microscope), 시료 표면의 자기력을 재는 MFM(Magnetic Force Microscope)이 있다.이밖에도 시료의 전기적 특성을 재는 EFM(Electrostatic Force Microscope), 전기용량(capacitance)을 재는 SCM(Scanning Capacitance Microscope)이 있다.

이 모든 원자현미경들은 AFM에 기초를 두며 추가 장치에 의해 측정되는 현미경들이다. 측정방법은 시료 표면에 직접 탐침이 접촉하는 contact mode와 접촉없이 시료표면에 근접하여 측정하는 Non-contact mode 두 형태가 있다. 여기에서는 생물학적 시료(biological sample)에 가장 보편적으로 사용되고 있는 Non-contact mode AFM 사용에 대해서 살펴보도록 하겠다.

2. 장치 및 기구

1) 원자현미경(XE-100, PSIA) 구조

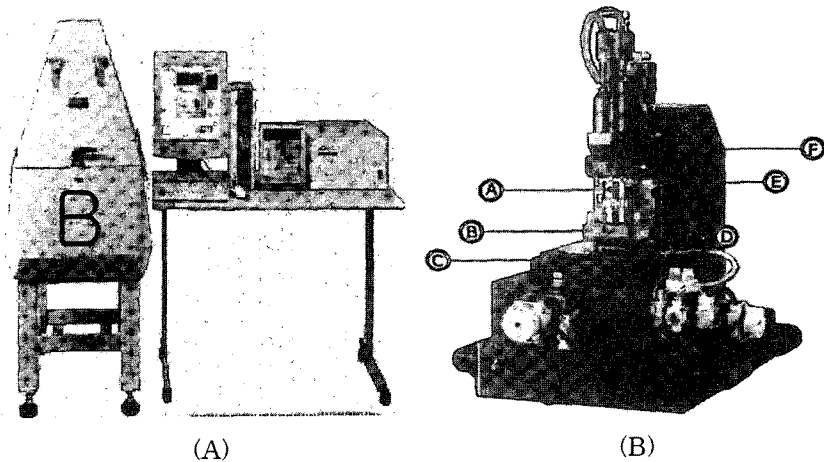
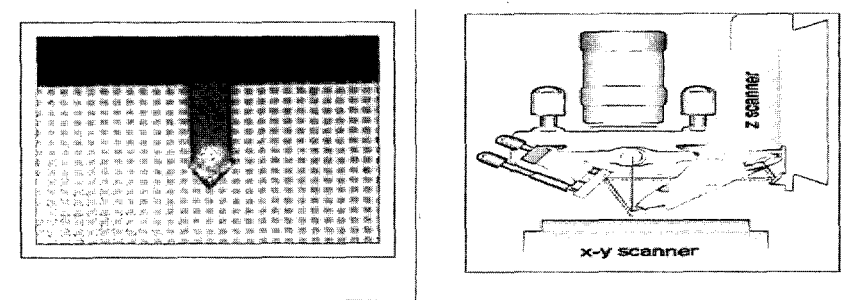


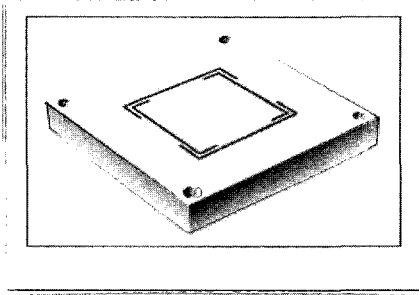
Fig. 1. Scanning Probe Microscope.

2) 기기의 명칭

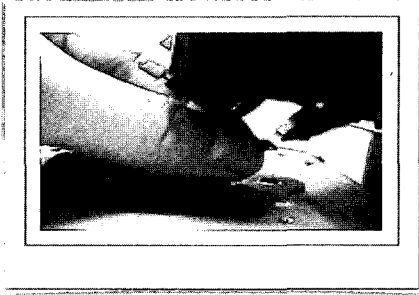


(a) High Quality Optical Microscope

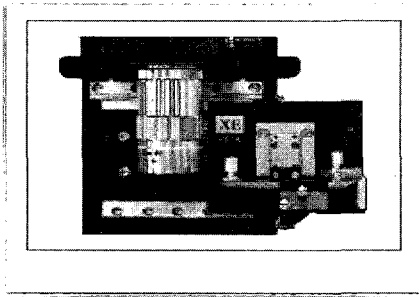
(b) Advanced Scan System



(c) Guided Flexure scanner



(d) EZ Snap Probe Tip Exchange



(e) Dovetail lock head mount
(f) Ball screw driven z-stage

3. 분석과정

AFM 에서는 다음 그림에서 보는 바와 같이 마이크로머시닝(micro-machining) 으로 제조된 캔틸레버(Cantilever) 라고 불리는 작은 탐침을 사용한다. 캔틸레버는 길이 100 μm , 폭 10

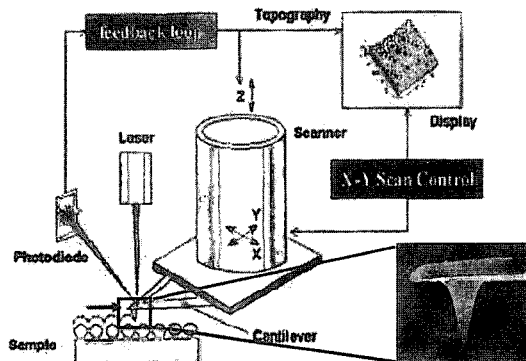


Fig. 2. Sample Measuring Process

μm , 두께 $1 \mu\text{m}$ 정도로 아주 작고 첨예하여 미세한 힘에 의해서도 아래위로 쉽게 휘어지도록 만들어졌다. 또한 캔틸레버 끝 부분에는 뾰족한 바늘이 달려있다. 이 탐침을 시료 표면에 접근시키면 탐침 끝의 원자와 시료표면의 원자 사이에 서로의 간격에 따라 끌어당기거나(인력) 밀치는(척력)이 작용한다(Van der Waals force). 접촉식(contact mode) AFM에서는 척력을 사용하는데 그 힘의 크기는 $1\sim 10 \text{ nN}$ 정도로 아주 미세하지만 캔틸레버 역시 아주 민감하므로 그 힘에 의해 휘어지게 된다. 이 캔틸레버가 아래위로 휘는 것을 측정하기 위하여 레이저 광선을 캔틸레버가 비추고 캔틸레버 윗면에서 반사된 광선의 각도를 포토다이오드(photodiode)를 사용하여 측정한다. 이렇게 하면 바늘 끝이 0.01 nm 정도로 미세하게 움직이는 것까지 측정해낼 수 있다. 구동기의 높이를 조절하여 캔틸레버가 일정하게 휘도록 유지시키면 탐침 끝과 시료사이 간격이 일정하게되어 시료의 형상을 측정해낼 수 있다.

비접촉식(Non-contact mode) AFM에서는 원자사이의 인력을 사용하는데 그 힘의 크기는 $0.1\sim 0.01 \text{ nN}$ 정도이다. 시료에 인가하는 힘이 접촉식에 비해 훨씬 작기 때문에 손상되기 쉬운 부드러운 시료를 측정하는데 적합하다. 원자간 인력의 크기는 너무 작아 캔틸레버가 휘는 각도로 직접 잴 수가 없다. 따라서 비접촉식 AFM에서는 캔틸레버를 공명진동수 부근에서 기계적으로 진동 시킨다.

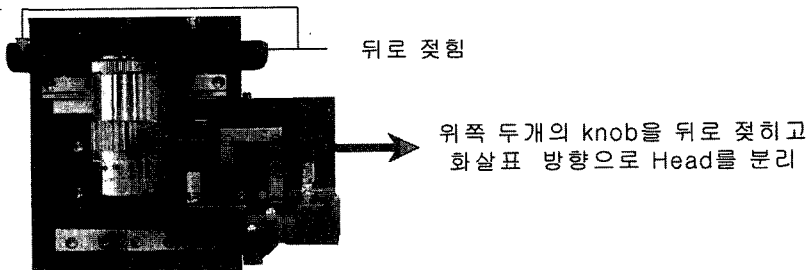
탐침이 시료표면에 접근하면 원자간의 인력에 의해 캔틸레버의 공명진동수가 변하게 되어 진폭과 위상에 변화가 생기는데 그 변화를 lock-in amp로 측정한다. 원자간에 상호 작용하는 힘은 시료의 전기적 성질에 관계없이 항상 존재하므로 도체나 부도체 모두를 높은 분해능으로 관찰 할 수 있다.

4. 조작

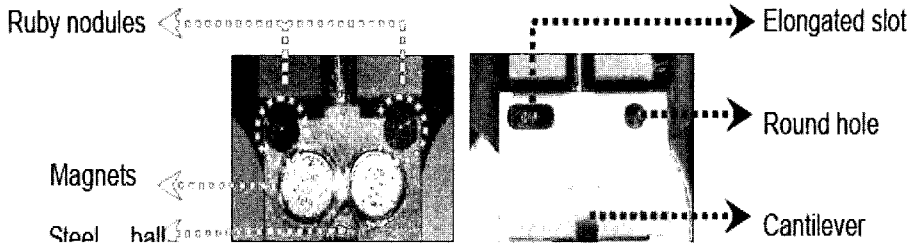
- 1) XE-100의 Power를 On한다.
- 2) Head 좌측의 Cable을 분리한 후, 아래 사진과 같이 Head를 분리한다

1) XE-100의 Power를 On한다.




2) Head 좌측의 Cable을 분리한 후, 아래 사진과 같이 Head를 분리한다

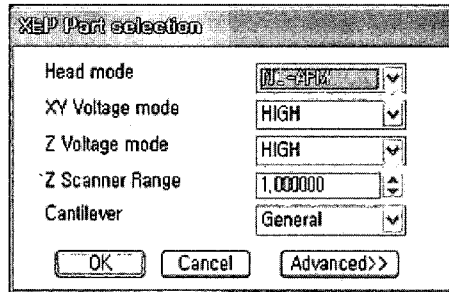


- 3) Chip Mount의 Tweezer Carrier Hole을 이용 Tweezer로 Cantilever를 Cantilever Box에서 꺼낸다.



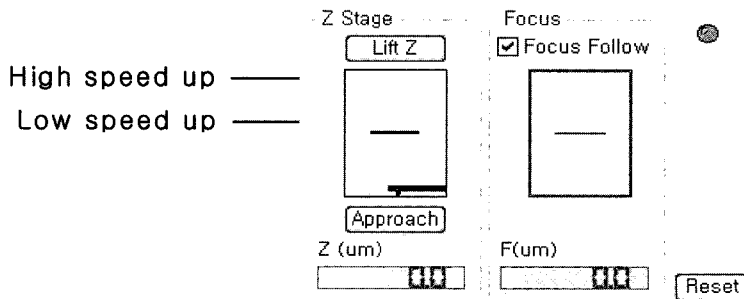
Tip의 손상이 없도록 Chip Mount의 옆면을 엄지와 검지로 잡고 Probe arm의 Magnetic 하단 Ruby ball에 cantilever의 두개의 hole (hole, Tweezer carrier hole)이 일치하도록 mount 한다.

- 4) 2)번의 Head 분리방법과 반대로 Head를 장착한다.
 5) Laser Icon 을 클릭하여 Laser를 off한 후 Part config Icon 을 클릭한 후 Head mode에서 아래 그림(a)과 같이 NC-AFM을 선택한 후 Laser 를 다시 On시킨다.

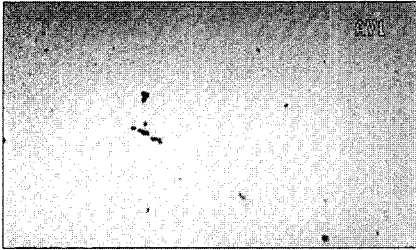


(a) Part selection

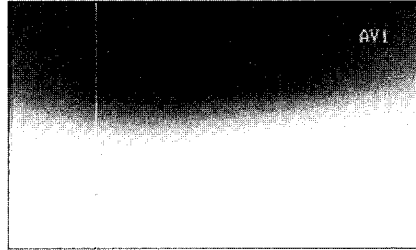
- 6) 육안으로 확인할 수 있는 부근까지 Z-stage를 Down하여 sample 표면에 최대한 접근시킨다. 만약 Laser intensity is too low라는 메시지가 뜨면서 Z-stage가 움직이지 않으면 maintenance mode로 바꾼다.



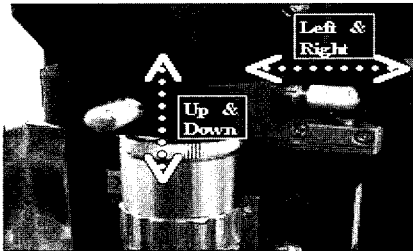
- 7) Focus Stage를 조정하여 sample 표면에 그림(b)와 같이 focus를 ●춘 후 그림 (d)의 Optic Knob을 상하방향으로 조정하여 sample 표면에 cantilever chip에 의한 그림자 부근을 그림 (c)와 같이 찾도록 한다.



(b) Sample 표면

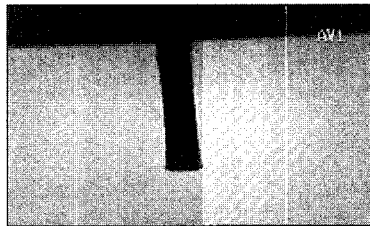


(c) Sample 표면상에 나타난 cantilever 그림자



(d) Optic position knob

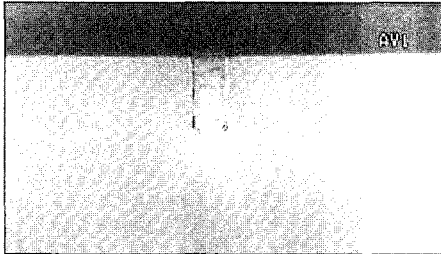
- 8) 윗 항목의 그림자 상태에서 Focus stage를 Up시켜 cantilever의 Bottom Line이 선명해 지도록 Focus를 조정한 후 그림자 (d)의 Optics의 Position Knob을 Left & Right로 조정하여 그림 (e)와 같이 Tip을 찾는다.



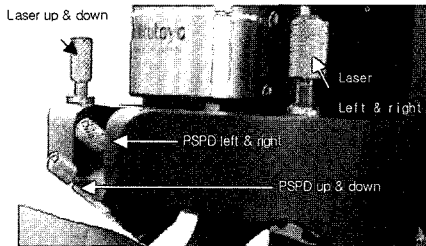
(e) tip에 focusing된 화면

- 9) 육안으로 cantilever의 하단에 대략적으로 Laser Align Knob (그림 g)을 조정하여 Laser spot을 맞춘 후 LCD TV로 확인하며 Laser spot을 좀더 정확하게 Tip의 하단(그림 f)에 맞추도록 한다.

- 10) 그 후 PSPD Knob(그림 g)을 조절하여 XEP의 하단에 Display된 PSPD Cell(그림 h)의 중앙에 Red Point가 위치하도록 하여 A+B는 1V이상, A-B는 -500 mV~+500 mV가 되도록 맞춘다.

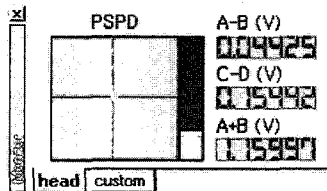


(f) Laser Align Position



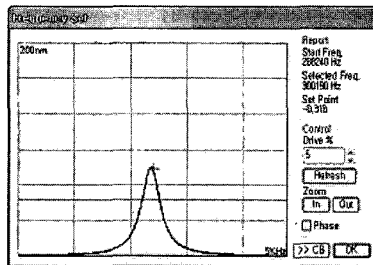
(g) Laser Spot & Align Knob

- 11) 이때 PSPD의 Laser Spot이 Mirror에서 많이 벗어나 맞추기 어려운 경우는 PSPD Knob을 시계 반대방향으로 돌려 PSPD Mirror가 Head에 밀착된 상태로 만들어 한쪽 Knob을 조절하여 A+B의 최고치를 찾은 후 반대편 오른쪽 Knob을 조절하여 역시 A+B의 최고치를 맞추는 작업을 반복하여 맞추면 무난하게 A+B를 1V 이상으로 맞출 수 있다.



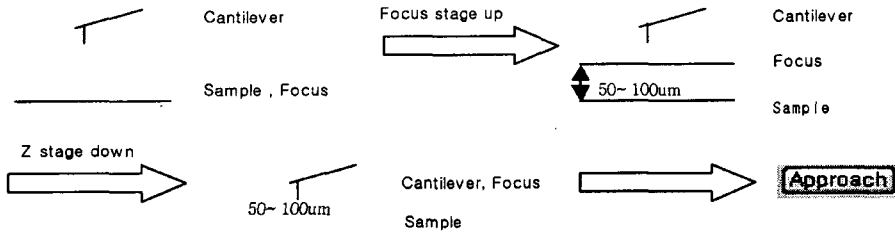
(h) PSPD Display Window

- 12) Scan control window에 있는 **NCM ASetup** Icon을 Click 하면 아래그림(i)와 같은 창이 뜨게 된다(s/w에서 자동으로 resonant frequency를 잡는다). 그 뒤 OK를 클릭한다.

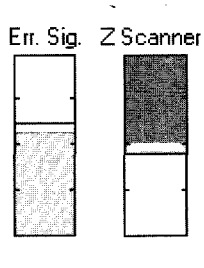



(i) NCM Frequency Sweep Window

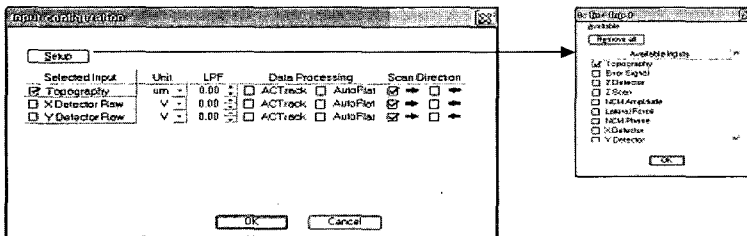
- 13) Focus를 Down시켜 Sample Surface에 Focus를 맞춘 후 측정을 원하는 영역으로 X, Y stage를 이동시킨다.
- 14) 그 뒤에 focus를 약 50~100 μm 정도를 올린다. 그리고 focus option을 해제한 후 cantilever가 LCD TV에 정확히 초점이 맞을 때까지 내린다. 이때 캔틸레버의 모습이 희미하게 나타나기 시작하면 Z stage의 이동속도를 천천히 하면서 초점을 맞추어야 한다.



- 15) Scan size를 0으로 하고, approach 위치를 확인한 뒤 Encloser의 cover를 닫은 뒤 Z stage control bar 아래에 있는 **Approach** icon을 클릭한다.
- 16) Approach가 되었는지의 확인은 STAGE CONTROL 창의 녹색 LAMP의 깜빡임이 Approach후 멈추고 아래 그림과 같이 Z SCANNER BAR 전체 영역중 CENTER 부근에 녹색영역(Z scanner 팽창)에 위치하게 된다.

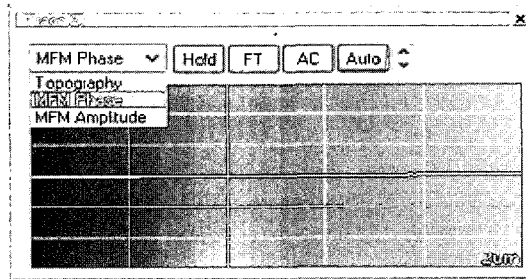


- 17) Scan Control Window의 Scan Rate(0.5hz)와 Z-Servo Gain(1.0)을 조정 후 Scan Size를 지정한다.
- 18) Input config Icon  를 click한 뒤 아래 그림(I)과 같이 설정한다.



(I) Input Config Window-Topography Setting

19) Topography의 Line Trace Window의 Line을 확인하며 X, Y Slope을 맞추어 준다.



(m) Line Trace Window

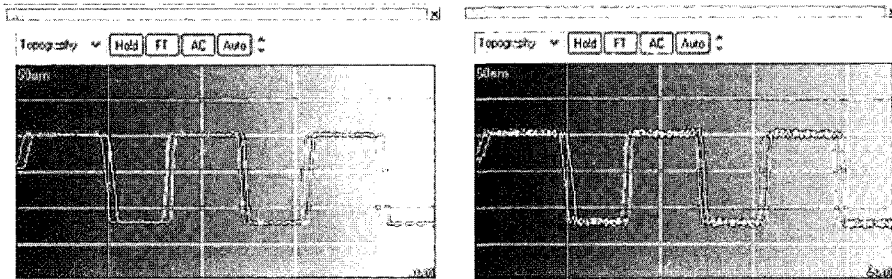
※Hold : Hold를 Click하는 순간 Window에 Display되고 있는 Line을 정지 시키다.

※FT : Trace Line을 fast Fourier Transformation시켜 Trace Line이 갖는 진동에 관한 Data를 볼 수 있다.

※AC : Trace Line Cycle의 Center를 잡아 Line을 Display 한다.

※Auto : Trace Line의 Range를 Line이 Over되지 않도록 Auto Range하여 준다.

20) Topography Scan이 이루어지는 Line trace window를 확인하며 각각의 Value를 setting 한다.



(n) Servo gain이 적절한 경우 (o) Servo gain이 커서 진동이 생기는 경우

※Set Point : Line trace를 살펴보면서 어느 정도 Setpoint를 증가하여(Sample에서 멀어짐) 상태에서 Forward & Backward의 형태가 일치(약간의 Shift는 일어날 수 있음)하여 Setpoint의 값을 감소(Sample에 접근) 시켜도 Line 형태의 변화가 없는 지점의 Value를 찾는다.

※Z servo Gain : Line trace를 살펴보면서 Z servo Gain을 변화시켜 Oscillation(그림 n)이 없는 최대한의 값으로 설정함.

※Scan Rate : Line Trace를 살펴보면서 0.3~1 Hz 사이로 표면정보가 최대한 표현되며 Rate에 의한 Line이 변화가 없는 지점의 Value를 찾아 Setting 한다.

21) IMAGE Image 를 CLICK하여 IMAGE를 SCAN한다.

22) Image가 완료되면 Scanner 동작에 의한 Tip의 마모 및 손상을 줄이기 위해 Scan Size

를 Zero로 맞춘 후 Z-Stage Up 시킨후 XEP를 종료한다.

III. 결 과

1. AFM의 Non-contact mode를 이용한 보리의 호분층 관찰

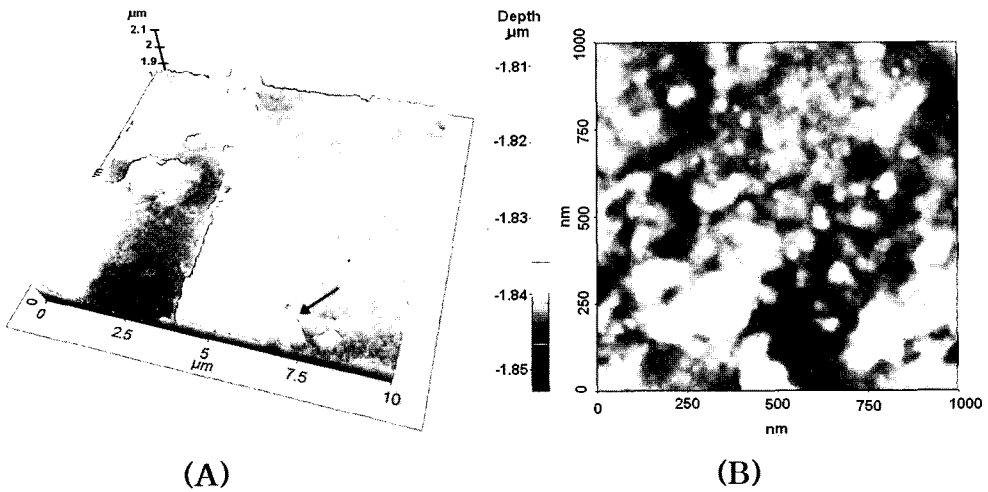


Fig. 4. Three-dimensional (A) and 2-dimensional (B) images of barley aleurone layer using non contact mode AFM (A, $10 \times 10 \text{ mm}^2$) and topographic image(B, $1 \times 1 \text{ mm}^2$) (Huh et al., 2004).

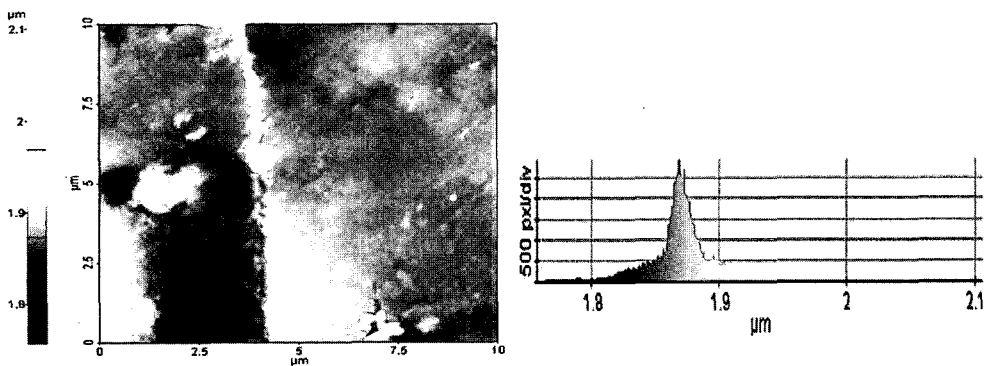


Fig. 5. The histogram of aleurone layer topographic image (Huh et al., 2004).

2. AFM의 Non-contact mode를 이용한 보리의 염색체 관찰

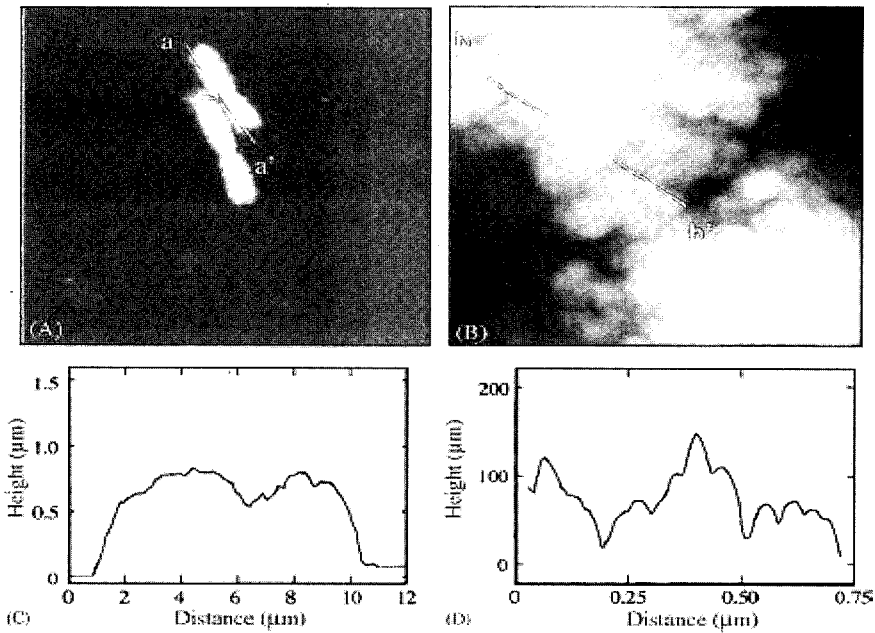


Fig. 6. AFM images of critical-point dried barley chromosomes.

3. AFM의 Non-contact mode를 이용한 DNA 복제관찰

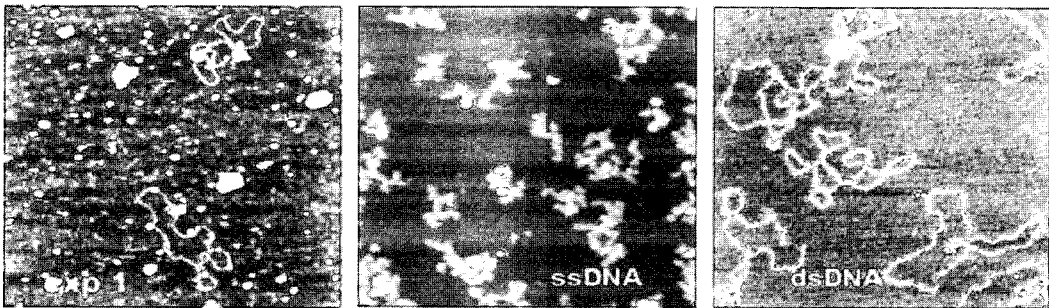


Fig. 7. DNA replication assayed by AFM (Hansma et al., 1999).

4. AFM의 contact mode를 이용한 Gold 표면관찰

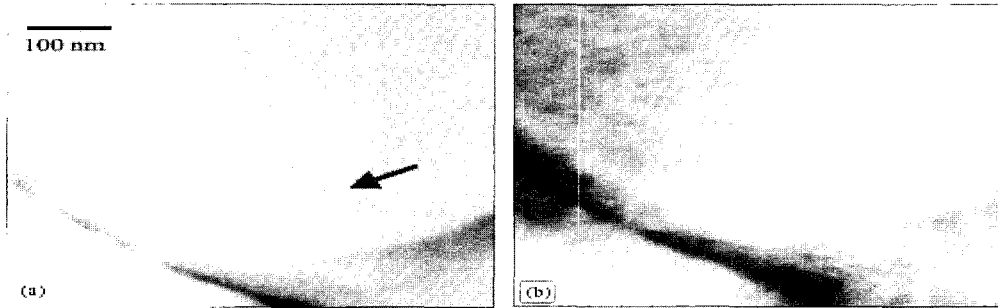


Fig. 8. In situ contact mode AFM image of clean gold surface (Holmberg et al., 2003).

참고문헌

1. Hansma, H. G., R. Golan, W. Hsieh, S. L. Daubendiek and E. T. Kool. Polymerase Activities and RNA Structures in the Atomic Force Microscope. *Journal of Structural Biology* 127 : 240-247.
2. Holmberg, M., A. K?hkea, J. Garnaesa and A. Boisen. 2003. Hybridization of short DNA molecules investigated with in situ atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 97 : 257-261.
3. Huh, K. W., S. H. Kim, H. H. Ku, B. M. Lee, J. Y. Kim, Y. W. Seo, and T. W. Kim. Surface Imaging of Barley Aleurone Cell by Atomic Force Microscopy. *Korean Journal of Crop Sci.* 49(1) : 36-40.

Use of Atomic Force Microscope for Biological Samples

*Kwang-Woon Huh, Sun Lim, Seung-Gil Yun, Sang Eun Lee,
Il-Shin Choe*, and Tae-Wan Kim†*

*Hankyong National University, Dept. of Plant Resources Science,
*Dept. of Dairy Science Ansong 456-749, Gyonggido, Korea
+82-31-670-5081, taewkim@hnu.hankyong.ac.kr*