

형광입자들의 크기와 농도에 따른 형광 상관 분광함수 측정

한예술 · 이재란 · 김석원[†]

울산대학교 물리학과

☎ 680-749 울산광역시 남구 대학로 93

(2012년 3월 30일 받음, 2012년 5월 23일 수정본 받음, 2012년 5월 29일 게재 확정)

형광입자의 크기와 수에 따라 형광 신호의 상관함수 변화를 측정하는 형광상관분광법을 이용하여 용액 내에서 확산 운동하는 나노크기 형광 입자들의 농도와 유체역학적 반지름을 비교하였다. 시료에 사용된 나노크기 형광 입자들은 Alexa Fluor 647, 양자점, 형광 bead이고, 증류수에서 1/10, 1/100로 입자들이 들어있는 용액을 희석하여 각 입자들에 대해 3가지의 다른 농도의 시료를 준비하였다. Alex Fluor 647의 알려져 있는 확산시간을 이용하여 형광상관분광장치의 유효초점 부피를 구하고, 각 입자들의 확산 계수, 크기, 희석에 따른 농도 변화를 측정할 수 있었다. 본 연구를 통해, 자체 제작된 형광상관분광장치로 임의적으로 희석된 시료들의 농도를 약 0.1 nM ~ 10 nM의 범위에서 측정할 수 있었고, 양자점의 확산계수를 $27 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 로 결정할 수 있었다.

Measurement of Fluorescence Correlation Function by Using Size and Concentration of Fluorescence Particles

Yesul Han, Jaeran Lee, and Sok Won Kim[†]

Department of Physics, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

(Received March 30, 2012; Revised manuscript May 23, 2012; Accepted May 29, 2012)

The concentration and hydrodynamic radius of nano-sized fluorescence particles diffusing in solution were compared by using fluorescence correlation spectroscopy (FCS), which can measure the variation of the correlation function of a fluorescence signal by size and number of particles. The used nano-sized fluorescence particles are Alex Fluor 647, quantum dots, and fluorescence beads, and three kinds of sample solutions with different concentrations were prepared by dilution to 1/10 and 1/100 with distilled water for each kind of particles. The effective focal volumes were calculated by using the known diffusion coefficient of Alexa Fluor 647 particles, and the diffusion time, number of particles in focal volume, and variation of concentration according to the dilution could be measured by the FCS system. Through this study, we determined that the concentrations of arbitrarily diluted sample solutions can be measured by a home-built FCS setup in the range of 0.1 nM ~ 10 nM and that the diffusion coefficient of the quantum dot was $27 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Keywords: Fluorescence correlation spectroscopy, Diffusion coefficient, Quantum dot, Alexa Fluor 647, Fluorescence bead

OCIS codes: (170.2520) Fluorescence microscopy; (070.4550) Correlators; (170.0170) Medical optics and biotechnology; (290.1990) Diffusion

I. 서 론

형광상관분광법(FCS : Fluorescence correlation spectroscopy)은 미소영역에서 형광 분자들의 움직임에 따라 방출되는 형광 세기 변화를 측정하여 형광 분자의 속도나 크기, 분자의 수, 주변 분자들과의 상호작용을 정량적으로 분석하는 기술로서^[1, 2], 1970년대에 FCS가 Webb과 Rigler에 의해 개발되었지만^[3-5] 최근 광학 기술의 발달과 함께 생물물리학 분야에

서 매우 유용한 기술로 자리잡고 있다^[6].

일반적으로 분자의 크기 및 동적 특성 등을 분석하기 위해 Gel Chromatograph 또는 Gel Electrophoresis(전기영동) 등이 이용되지만, 정보의 획득 과정에 시간이 많이 소요되고, 단계적인 처리 과정이 필요하다는 단점이 있다. 하지만 FCS의 경우 수 micro-liter의 소량의 시료로 복잡한 처리 과정 없이 짧은 시간에 여러 가지 정보를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다^[7].

[†]E-mail: sokkim@ulsan.ac.kr

Color versions of one or more of the figures in this paper are available online.

본 연구에서는 실험실에서 제작된 FCS 장치를 이용하여 증류수에서 크기가 다른 세 입자 Alexa Fluor 647, 양자점 (quantum dot) 그리고 형광 bead에 의해 발생하는 형광세기의 요동을 통해 형광 신호의 자기상관함수를 측정하고, 입자들의 농도와 유체역학적 크기를 비교하였다.

II. 이 론

일반적으로 FCS 실험에서, 형광 신호는 시료 용액 내의 수 femto-liter 사이즈의 개방된 부피(미소 관측 영역) 내에 있는 형광 입자로부터 방출된다. 미소 관측 영역은 대물렌즈의 개구수(numerical aperture)와 핀홀의 지름에 의해 결정된다. 그림 1(a)의 왼쪽 그림은 대물렌즈와 핀홀에 의해 형성된 미소 관측 영역의 크기를 레이저 빔의 축방향 반경 z 와 초점의 허리 반경 w 로 나타낸 것이다.

미소 영역에 빛이 조사될 때, 그 영역에 들어온 형광분자는 형광을 방출한다. 관측부피를 통과하는 형광 입자의 물리 화학적 변동은 시간에 따른 형광 세기 요동의 원인이 된다. 그림 1(a)를 통해 초점의 형태를 타원형으로 가정하면 유효 초점 부피는 $V_{eff}=(4/3)\pi zw^2$ 으로 나타낼 수 있다. 형광 분자들은 유효 초점 부피를 출입하면 그림 1의 그래프와 같이 시간에 따른 형광 세기 요동을 일으키는데, 분자의 크기가 작거나 용액의 점성도가 낮으면 (a)와 같이 시간에 따라 형광 변동의 주기 T 가 짧고, 분자의 크기가 크거나 용액의 점성도가 높으면 (b)와 같이 변동의 주기 T 가 길다. 그리고, 관측 부피를 동일한 시간에 출입하는 분자의 수가 적으면 (c)와 같이 평균 형광 세기 F 에 대해 형광 변동의 진폭 δF 가 크고, 개수가 많으면 (d)와 같이 평균 형광 세기 F 에 대해 형광 변동의 진폭 δF 가 작다. 시간 t 에서 유효 초점 부피로부터 방출되는 형광의 세기가 $F(t)$ 이고, 시간 $t+\tau$ 뒤의 형광 세기가 $F(t+\tau)$ 일 때, 지연 시간 τ 에 따른 두 신호 사이의 유사성은 자기상관함수(ACF : autocorrelation function) $G(\tau)$ 를 통해 확인할 수 있다. 자기상관함수는 시간 연속 신호 수집에 의해 얻어진 각각의 신호들 사이의 상호 상관관계를 나타내는 상관 계수들의 함수로, 식 (1)과 같이 나타낼 수 있다^[4].

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \tag{1}$$

형광 요동($\delta F(t)$)은 시간 평균으로부터 측정된 형광 세기 ($\langle F(t) \rangle$)로부터 시간 t 에서의 형광 세기 $F(t)$ 의 편차($\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$)이다. 단일 종류 형광 입자들의 병진 확산에 대한 형광신호의 자기상관함수 모델 식은 다음과 같다^[4, 5].

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \left(\frac{w}{z} \right)^2 \right]^{-1/2} \tag{2}$$

N 은 분자 개수이고, τ_D 는 분자의 확산 시간, w 와 z 는 미소 영역에 해당하는 타원의 단축과 장축이다. τ_D 는 분자의 확산 시간으로 형광의 자기상관함수로부터 얻을 수 있게 된다. 그리고 평균 확산 분자의 개수 $N = cV_{eff}$ (c 는 시료 용액의 농도)이다.

평형 상태에서의 형광 신호 요동에 대한 자기상관함수 분석은 확산 계수(D)에 대한 정보를 제공한다. 분자가 용액 속에 있을 때 병진 확산에 대한 확산 계수 D 는 Stokes-Einstein 식으로 나타낼 수 있다^[6].

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \tag{3}$$

여기서 R 은 분자의 반지름, k_B 는 볼츠만 상수, T 는 절대온도, η 는 액체의 점성도를 나타낸다. 병진 확산에 대한 확산 시간 τ_D 는 다음 식으로 주어진다^[4].

$$\tau_D = \frac{w^2}{4D} \tag{4}$$

실험적으로 식 (1)로부터 얻어지는 자기상관값들은 식 (2)로 최적맞춤되는 파라미터들을 추정하면 N , τ_D , z/w 에 대한 정보를 얻을 수 있고, 식 (3)을 통해 얻어지는 확산 계수를 통해 w 와 z 도 결정할 수 있다^[6-11].

III. 실 험

3.1. Optical Setup

연속 발진 레이저를 광원으로 사용하는 one-photon excitation에 기초하여 FCS 장치 광학계를 구성하고, 소프트웨어 상관기를 이용하여 자기상관함수를 계산하였다.

상용 형광 현미경(Olympus IX71)을 이용하여, 공초점 현미경을 간단하게 구성하였다. 그림 2는 본 연구에서 구성한 FCS 장치도를 나타낸 것이다. 빔 크기가 0.8 mm인 He-Ne레이저(Thorlab, 5 mW)는 이색성 거울(SEMOROCK, FF545/650-Di03)에서 반사된 후 대물렌즈(Olympus, NA/1.2, 60X)로 입

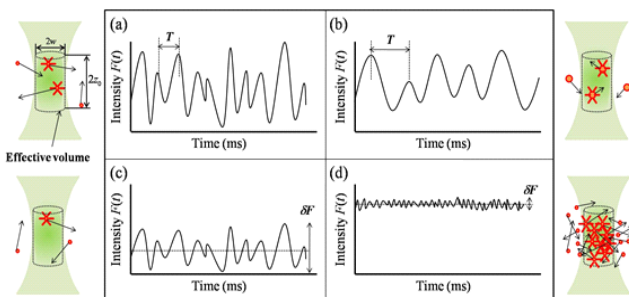


FIG. 1. The diffusion of fluorescence particles and the fluorescence intensity in very tiny region; (a) small size particles, (b) large size particles, (c) small number of particles, (d) large number of particles.

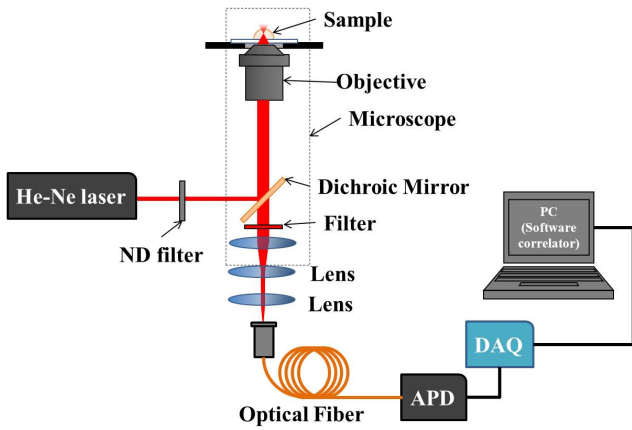


FIG. 2. Optical setup of FCS.

사하였고, 대물렌즈를 통과한 광은 immersion water와 0.17 mm 두께의 cover glass를 통과하고 시료 용액 내부에 미세한 부피를 가지는 초점을 형성한다. 초점 내부를 통과하는 형광 입자들은 형광을 방출하였다. 방출된 형광은 대물렌즈 방향으로 되돌아갔고, 대물렌즈로 들어간 형광들은 대물렌즈를 통과한 후에 이색성 거울에서 반사되지 않고 투과하여 현미경 내부에 있는 렌즈를 통과하고 거울에 의해 반사되어 현미경을 벗어났다. 현미경에서 나온 형광들은 초점거리가 각각 3 cm와 2.5 cm인 렌즈들을 통과하고 광섬유로 입사하였다. 광섬유를 통과한 형광들은 단광자측정 모듈(id Quantique, id100-MMF50)에 의해 TTL pulse signal로 변환되었다. 광원과 이색성 거울 사이에 neutral density filter를 두어 Cover glass를 통과한 레이저의 세기가 공기 중에서 400 μW 가 되도록 조정하였다.

검출기로 들어가는 광자수만큼 발생하는 pulse signal은 PCI-6602(National Instrument) 장비와 LabVIEW program에 의해 40초 동안 측정되고 그 결과가 10 μs ~ 8 s 범위에서 상관함수로 나타났다.

3.2. 시료 준비

그림 3은 형광 분자인 Alexa Fluor 647(Invitrogen, A20006), 나노입자인 양자점 (Q-dot, Invitrogen, Q21321MP), 그리고 형광 bead(Invitrogen, F8782)의 구조를 나타낸 것이다. Alexa Fluor 염료는 쿠머린(coumarin), 로다민(rhodamin), 크산테(xanthene), 그리고 시아닌(cyanine) 염료들의 술폰화 반응을 통해 합성된 것으로 알려져 있다. 술폰화 반응은 Alexa Fluor 염료를 친수성과 (-)대전을 일으킬 수 있게 만든다. Alexa Fluor는 일반적으로 여기와 방출이 비슷한 보통의 염료들보다 pH 반응의 민감성이 작고 밝으며 안정성이 우수하다. Alexa Fluor 647은 molecular mass(MM)가 약 1300 g/M이고, He-Ne laser(633 nm)와 Krypton-ion laser(647 nm)에 의하여 발광하여 668 nm 파장을 방출하고, 어떠한 물질에 부착되는 지에 관계없이 흡광 및 발광 파장에 변화가 없다는 장점을 가지고 있다.

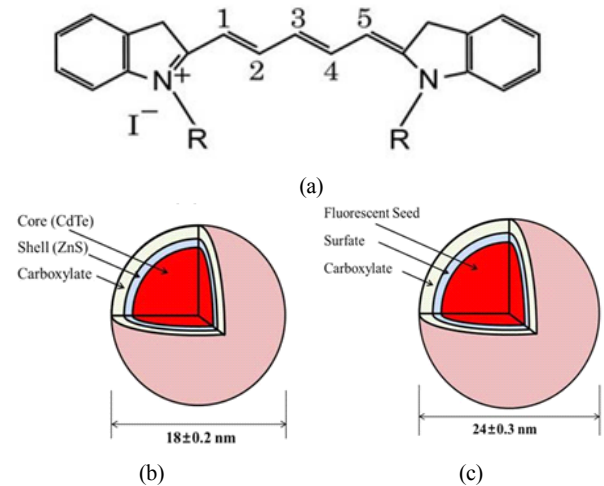


FIG. 3. The information of samples; (a) Alexa Fluor 647: 2.38 nm dia., (b) Quantum dot: 18 nm dia, (c) Fluorescence bead: 24 nm dia.

나노입자인 양자점은 지름이 18 ± 0.2 nm이고, 중심에 CdSe로 된 core가 있고 그 위에 ZnS로 된 shell이 덮여 있다. 최외각에 코팅되어진 carboxylate는 immune globulin, BAS, avidin 등과 같은 대부분의 단백질에서 발견되는 amine기와 공유 결합함에 따라 조직이나 세포 혹은 단백질이 포함되어 있는 용액들을 만족시켜 특정 단백질의 유무 혹은 그 양을 측정하는데 사용된다. 형광 bead는 지름이 24 ± 0.3 nm이고, 중심에 있는 형광 씨앗 물질을 황산염 처리 후 양자점과 마찬가지로 표면에 carboxylate가 코팅된 것으로 1.055 g/cm^3 의 밀도로 인해 증류수 내에서 가라앉게 되고, 가라앉은 비드들의 표면에 돌출된 carboxylate간 접촉에 의해 약간의 뭉침 현상이 발생하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 사용된 Alexa Fluor 647과 bead는 pH 7인 증류수에 보관되었고, 양자점은 pH 9인 borate에 보관되었다. 세 시료들은 증류수로 농도를 희석하여 사용하였다. 형광 bead는 bead들끼리 뭉침을 최소화하기 위해 15분 동안의 초음파 분쇄와 5,000 RPM으로 3분간의 원심분리과정 후에 가라앉지 않은 bead 들을 사용하였다. 이 시료에 대해 1/10, 1/100로 희석된 시료까지 3가지 농도의 시료를 준비하였다. 양자점과 Alexa Fluor 647은 뭉침 현상이 거의 없었기 때문에 수십 nM 농도에 대해 증류수로 1/10, 1/100로 희석하여 각각 3가지 농도의 시료를 준비하였다.

IV. 결과 및 논의

본 연구에서는 증류수에 희석된 Alexa Fluor 647, 양자점, 형광 bead에 대해 농도별로 형광신호를 측정하여 상관함수를 획득하였다. 상온에서 40초씩 20회 반복 측정된 결과들에 대해 그림 4와 같이 평균하여 나타낼 수 있었다.

그림 4는 Alexa Fluor 647, 양자점, 형광 bead의 농도에 따른 상관함수를 나타낸 것이다. x-축은 시간 지연 τ 에 대해

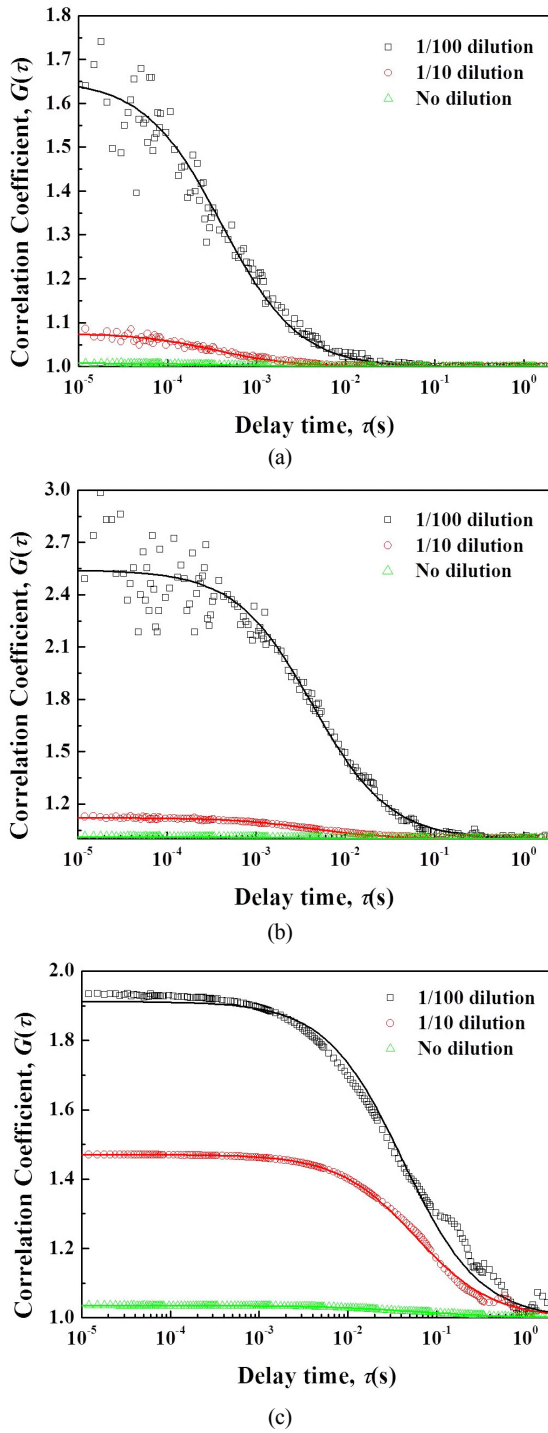


FIG. 4. The correlation function of samples diluted by distilled water; (a) Alex Fluor 647, (b) Quantum dot, (c) Fluorescence bead.

TABLE 1. Average number of particle in effective focal volume

Dilution	Number of particle		
	Alexa Fluor 647	Quantum dot	Bead
1/100 dilution	1.52±0.5	0.64±0.12	2.10±1.4
1/10 dilution	13.2±5.2	8.35±2.2	5.83±3.5
No-dilution	130.6±4.3	101.55±10.4	87.14±15

로그 스케일로 나타내었고, y-축은 상관 함수의 값을 나타내었다. 각각의 기호들은 희석량에 따라 다르게 나타내었고, 기호들에 가까운 선들은 식 (2)를 통해 최적맞춤한 결과이다. 모든 결과에 대한 최적맞춤에서 z/w 는 입자의 크기가 가장 작은 것으로 알려진 Alexa Fluor 647의 최적 맞춤에서 얻어진 파라미터값 10으로 고정하였다. 각각의 결과에서 초기 진폭 $G(0)$ 는 no-dilution, 1/10 dilution, 1/100 dilution 순으로 증류수에 많이 희석할수록 진폭이 높아지는 결과를 보였다. 식 (2)에서 $\tau=0$ 일 때, 초기 진폭이 입자 개수의 역수라는 것을 고려하면 희석에 의해 농도가 낮아짐을 반영한 결과라고 할 수 있다. 1/10씩 희석하였기 때문에 $G(0)$ 도 농도에 따라 10 배씩 증가하여야 하지만, bead의 경우 뭉침의 크기가 다른 입자들이 공존하기 때문에 초기진폭과 희석 비율이 잘 맞지 않는 것으로 나타났다. 이는 입자의 개수 파라미터 N 을 비교하는 Table 1에서 다시 확인 할 수 있다.

Table 1에서 보이듯이 각각의 시료들에 대해 증류수의 희석량에 따른 입자의 개수 변화가 완벽하게 1/10씩 감소하지는 않지만, Alexa Fluor 647과 양자점에 대해서는 오차 범위 내에서 일치하는 것을 확인할 수 있다. Bead의 경우, 입자들 간의 뭉침에 의해 식 (2)의 one-component 확산식 대신에 다음과 같은 two-component 확산식을 적용하여 확산 시간과 입자의 개수를 다시 계산하였다^[4].

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[f_1 \left[1 + \frac{\tau}{\tau_{D1}} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_{D1}} \left(\frac{w}{z} \right)^2 \right]^{-1/2} + f_2 \left[1 + \frac{\tau}{\tau_{D2}} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_{D2}} \left(\frac{w}{z} \right)^2 \right]^{-1/2} \right] \quad (5)$$

여기서 f_1 과 f_2 는 서로 다른 두 종류의 입자가 상관함수의 진폭에서 차지하는 비율이고, τ_{D1} 과 τ_{D2} 는 각 입자들의 확산 시간을 나타낸다. Table 1에 나타낸 bead 입자의 개수는 1/100, 1/10, No dilution 각각에 대해 f_1 이 0.52, 0.36, 0.42임을 이용하여 $N_1=1/(G(0)f_1)$ 식에 적용하여 계산된 값이다. 희석량에 맞게 입자의 개수가 정확하게 1/10씩 감소하지는 않는 것은 실제 bead 한 개의 크기보다 크게 뭉쳐진 입자들이 다양하게, 보다 많이 존재하기 때문에 정확한 입자의 개수 측정이 어려운 것으로 보인다.

입자들의 크기 비교를 위해 1/100로 희석된 각 시료들에 대한 상관함수를 진폭이 1인 규격화된 상관함수로 그림 5와 같이 나타내었다.

그림 4와 달리, 그림 5는 규격화 과정에서 초기 진폭 $G(0)$ 는 1, $G(\infty)$ 는 0으로 나타내었다. Alexa Fluor 647, 양자점,

형광 bead 순으로 FWHM이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이는 식 (3)과 (4)를 통해 입자의 크기가 증가하는 순서와 같음을 알 수 있다. Alexa Fluor 647과 양자점은 최적맞춤 곡선이 1개만 나타나지만 bead의 경우 약 2×10^{-2} s 이후로 최적맞춤과 실험값이 어긋나는 것을 볼 수 있다. 앞에서 언급한 바와 마찬가지로 bead는 뭉침에 의해 크기가 다른 입자가 공존함에 따라 식 (5)에서 보다 많은 확산 구간을 가지는 것으로 여겨진다. 본 연구에서는 bead에 대해 최적 맞춤이 일치하는 2×10^{-2} s 이전의 값들에 대해서 단일 bead 입자의 확산 구간으로 간주하고 다른 시료들과 함께 단일 입자의 확산 시간을 Table 2에 나타내었다.

희석양에 따라 평균 확산시간은 조금씩 다르지만, Alex

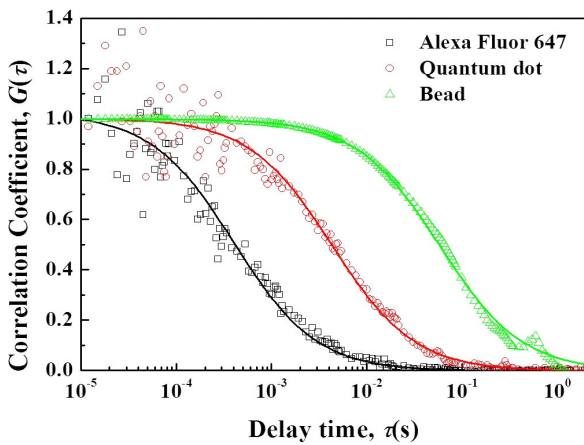


FIG. 5. The normalized correlation function of samples.

Fluor 647과 양자점은 오차 범위 내에서 확산 시간이 일치하는 것으로 보인다. 하지만, bead의 경우 농도에 따라 확산 시간이 일정하지 않게 나타났다. 이는 그림 5에서 언급한 2×10^{-2} s 이전의 구간에 대해서도 여전히 뭉쳐진 bead가 존재하는 것임을 알 수 있다. 각 시료들의 확산 계수는 식 (4)의 확산계수와 확산 시간의 관계를 이용하여 확산계수가 알려져 있는 Alexa Fluor 647 ($D=280 \mu\text{m}^2/\text{s}$)의 확산시간에 대한 다른 입자들의 확산 시간 비율로 확산 계수를 구하였다^[12]. 식 (3)의 Stocks-Einstein 식에 실험실 온도 25°C 에서 물의 점성도 $\eta=0.89 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 와 각각의 확산계수를 적용하여 입자들의 유체역학적 반지름을 구하였다. Table 3은 장치의 유효초점부피, 각 입자들의 확산 계수와 유체역학적 반지름 그리고 농도를 계산한 결과를 나타내었다.

Alexa Fluor 647의 확산 계수와 확산시간을 통해 식 (4)에 의해 얻어지는 w 와 식 (2)에서 얻은 $z/w=10$ 을 이용하여 타원체의 부피식 $V=(4/3)\pi zw^2$ 으로부터 장치의 유효초점부피 12.56 fL 를 구할 수 있었고, 양자점의 확산 계수를 약 $27 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 로 결정할 수 있었다. 비드의 확산 계수는 농도에 따라 일정하지 않기 때문에 단일 bead 입자의 확산 계수로 확정할 수 없었다. 양자점의 유체역학적 반지름은 약 $9.08 \pm 0.34 \text{ nm}$ 로 그림 3의 반지름 $9 \pm 0.1 \text{ nm}$ 보다 크게 나타나는 것을 알 수 있다. 비드의 경우 시료 제작자에 의해 알려진 지름 $24 \pm 0.3 \text{ nm}$ 에 비해 1/100, 1/10, No dilution 각각에 대해 6.1, 11.4, 8.5배 크게 나타났고, 입자들의 뭉침이 구에 가깝다는 가정하에서 각 반지름에 대한 부피 비교를 통해 각각 약 28, 186, 75개 정도의 입자들이 뭉쳐졌을 것으로 예상된다. 농도는 Table 1에서 얻은 입자의 개수와 앞에서 얻은 초점부피

TABLE 2. The diffusion time of aqueous solution samples

Dilution	Diffusion time (ms)		
	Alexa Fluor 647	Quantum dot	Bead
1/100 dilution	0.40 ± 0.06	4.30 ± 0.48	33.3 ± 5.22
1/10 dilution	0.40 ± 0.06	4.06 ± 0.84	62.6 ± 6.20
No-dilution	0.42 ± 0.06	4.19 ± 0.62	46.3 ± 6.19

TABLE 3. The diffusion coefficient, hydrodynamic radius and concentration of aqueous solution samples by dilution quantity

Sample	Alexa Fluor 647	Quantum dot	Bead
Effective focal Volume (fL)	12.56		
Diffusion coefficient (mm^2/s)	1/100 dilution	280	3.36
	1/10 dilution	280	1.79
	No dilution	280	2.42
Effective Radius (nm)	1/100 dilution	0.88	72.9
	1/10 dilution	0.88	137.1
	No dilution	0.88	101.4
Concentration (nM)	1/100 dilution	0.20	0.28
	1/10 dilution	1.74	0.71
	No dilution	17.27	11.52

(V), 아보가드로수(N_A)를 이용하여 몰 농도($c=N/(VN_A)$)로 나타내었다. 일반적으로 알려져 있는 FCS 장치의 유효초점 부피인 수 fL에 비해 10배 정도 큰 유효초점 부피를 가지기 때문에 수 nM보다 1/10 더 희석된 농도에서 1개 정도의 입자를 검출하게 되는 것으로 보인다. 유효초점의 크기는 대물렌즈로 입사하는 빔의 지름과 디텍터 앞에 사용되는 핀홀의 크기에 의해 결정되는데^{9, 13)}, 본 연구에서는 빔의 지름이 대물렌즈 구경보다 1/10 정도 작고, 핀홀 대신 사용한 optical fiber의 지름이 62.5 μm 로 일반적으로 사용되는 30~50 μm 보다 크기 때문에 유효초점부피가 크게 나타난 것으로 보인다.

V. 결 론

본 연구에서는 크기가 다른 세 입자 Alexa Fluor 647, 양자점, 형광 bead를 증류수에 희석하여 632.8 nm의 파장을 가지는 He-Ne 레이저 광원으로 구성된 공초점 현미경에서 초점 내에 존재하는 평균적인 입자의 수와 확산 시간을 측정하고, 확산계수, 입자의 유체역학적 반지름과 용액의 농도를 구하였다. 양자점의 확산계수와 유체역학적 반지름을 $27 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $9 \pm 0.1 \text{ nm}$ 로 결정할 수 있었지만, 비드의 경우 불규칙적 움직임에 의해 단일 bead의 확산계수와 유체역학적 반지름을 결정하는 것이 불가능하였다. 그리고, 12.56 fL의 유효 초점부피를 통해 본 FCS 장치에서 0.1 ~ 10 nM 농도 범위에서 입자의 확산 운동을 분석할 수 있음을 확인하였다. 본 연구를 통해, FCS 장치가 형광입자들을 많이 활용하는 생물학적 연구에 있어서 세포 내에 존재하는 매우 낮은 농도의 특정 단백질이나 DNA들의 변화를 짧은 시간에 측정할 수 있게 하는 도구로 활용될 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 정부(교육과학기술부)의 지원으로 한국연구재단의 도약연구사업(ROA-2007-000-200520)의 지원으로 수행되었습니다.

References

1. S. H. Kim, T. Shin, and D. Kim, "Particles size measurement of silole nano-clusters by fluorescence correlation spectroscopy," *J. Korean Phys. Soc.* **56**, 1264-1268 (2010).
2. P. Schuille, U. Haupts, S. Maiti, and W. W. Webb, "Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation," *Biophys. J.* **77**, 2251-2265 (1999).
3. A. Einstein, "On the movement of small particles suspended in a stationary liquid demanded by the molecular kinetic theory of heat," *Ann. Phys.* **17**, 549-560 (1905).
4. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. (Springer Science+Business Media, New York, USA, 2006), Chapter 24.
5. P. Kask, P. Piksarv, M. Pooga, T. Mets, and E. Lippmaa, "Separation of the rotational contribution in fluorescence correlation experiments," *Biophys. J.* **55**, 213-220 (1989).
6. J. A. Hodgdon and F. H. Stillinger, "Stokes-Einstein violation in glass-forming liquids," *Phys. Rev. E* **48**, 207-213 (1993).
7. K. Jacobson, E. D. Sheets, and R. Simson, "Revisiting the fluid mosaic model of membranes," *Science* **268**, 1441-1442 (1995).
8. A. Cooper, *Biophysical Chemistry* (RSC, Cambridge, UK, 2005), Chapter 4.
9. O. Krichevsky and G. Bonnet, "Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications," *Rep. Prog. Phys.* **65**, 251-297 (2002).
10. R. Rieger, C. Rocker, and G. U. Nienhaus, "Fluctuation correlation spectroscopy for the advanced physics laboratory," *Am. J. Phys.* **73**, 1129-1134 (2005).
11. P. Zhang, L. Li, C. Dong, H. Qian, and J. Ren, "Sizes of water-soluble luminescent quantum dots measured by fluorescence correlation spectroscopy," *Analytica Chimica Acta* **546**, 46-51 (2005).
12. K. Wang, X. Qiu, C. Dong, and J. Ren, "Single-molecule technology for rapid detection of DNA hybridization based on resonance light scattering of gold nanoparticles," *ChemBioChem* **8**, 1126-1129 (2007).
13. J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra, T. Dertinger, and U. B. Kaupp, "Performance of fluorescence correlation spectroscopy for measuring diffusion and concentration," *ChemPhysChem* **6**, 2324-2336 (2005).