creative commons
COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:48009-200000007565

석 사 학 위 논 문

단일 금 나노 입자의 광학적 특성 규명

Characterizing Optical Properties of Single Gold Nanoparticles

울 산 대 학 교 대 학 원

화 학 과

김 근 완

단일 금 나노 입자의 광학적 특성 규명

Characterizing Optical Properties of Single Gold Nanoparticles

지 도 교 수: 하 지 원

이 논문을 이학 석사 학위 논문으로 제출함

2017년 12월

울 산 대 학 교 대 학 원

화 학 과

김 근 완

김근완의 이학 석사 학위 논문을 인준함

심사위원 하 지 원 (인)

심사위원 이 영 일 (인)

심사위원 홍 종 욱 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2017년 12월

국문 초록

금 나노 입자는 국지 표면 플라즈몬 공명 효과에 의해 크기, 모양, 주변 매질의 유전율에 따라 달라지는 독특한 광학적 특성을 나타낸다. 금 나노 입자는 합성 시 크기와 모양의 조절이 가능하고, 생체 적합성, 싸이올 분자를 이용한 표면의 개질이 쉽다는 점 때문에, 다양한 분야에서 관심을 받고 있다. 지금까지는 흔히 집합체 수준에서 금 나노입자의 연구가 진행되어 왔으나, 단일 입자 분광학 기술의 발전으로, 금 나노 입자의 광학적 특성을 단일 입자 수준에서 확인하는 것이 가능해졌다. 단일 입자 수준에서의 광학적 특성 분석은, 집합체 평균 없이 나노 입자의 크기와 모양에 의한 광 특성을 분석 할 수 있기 때문에, 금 나노 입자의 광학적 특성을 더 깊이 이해하기 위해 매우 바람직한 일이다. 더욱이 금 나노입자를 화학 센서, 광학 탐침, 약물 전달체 등과 같은 다양한 분야에서 보다 넓은 응용을 위해서는 단일 입자 수준에서의 광학적 특성 규명 연구가 더욱 필요하다.

이 실험에서는 차등 간섭 명암 현미경과 암시야 현미경을 이용하여, 비등방성 모양을 가진 금 나노 입자의 광학적 특성을 단일 입자 수준에서 분석했다. 암시야 현미경을 이용하여 초점, 비초점 산란 이미지와 산란 스펙트럼을 얻었고, 비등방성 모양으로부터 나타나는 광학적 특성을 증명했다. 다음으로 차등 간섭 명암 현미경을 이용하여,

비등방성 모양에 의해 나타나는 편광 감응성 광특성을 분석했다. 더 나아가, 비등방성 모양의 금 나노 입자를, 다기능성 광학 탐침, 바이오센서로의 응용 가능성을 제시하였다.

Keywords: 국지 표면 플라즈몬 공명, 비등방성 금 나노 입자, 편광 감응성, 차등 간섭 명암 현미경, 암시야 현미경, 다기능성 광학 탐침, 바이오센서, 단일 입자 연구

Abstract

Gold nanoparticles have unique optical properties which depend on the size, shape, and dielectric constant of the surrounding medium due to localized surface plasmon resonance effect. Gold nanoparticles have been receiving attention in a variety of fields because of synthesis method that can control shape and size, biocompatibility, and convenience of functionalization on their surface using thiol molecules. Until now, gold nanoparticles have been studied at the ensemble level. However, with the development of single particle spectroscopy, it has become possible to characterize the optical properties of gold nanoparticles at a single particle level. Characterizing the optical properties of single gold nanoparticle without ensemble averaging is very desirable to have deeper insight in size and shape dependent optical properties of gold nanoparticles. Furthermore, it is necessary to characterize optical properties at the single particle level for wide application in various fields such as chemical sensors, optical probes, drug delivery, etc.

In this study, we investigated the optical properties of anisotropic gold nanoparticle using two powerful techniques in single particle study, differential interference contrast microscopy and dark-field microscopy. Using the dark-field microscopy we obtained focused, defocused scattering images and scattering spectra, and verified the optical properties induced by anisotropic shape. In addition, polarization-dependent optical properties due to anisotropic shape were observed using differential interference contrast microscopy. Furthermore, anisotropic gold

nanoparticles are suggested to be applicable to multifunctional optical probes and biosensors.

Keywords: Localized surface plasmon resonance, Anisotropic gold nanoparticle, Polarization dependence, Differential interference contrast microscopy, Dark-field microscopy, Multifunctional optical probe, biosensor, Single particle spectroscopy and microscopy

목차

국문 초록····· i

영문 초록····· iii

목차····· v

도식 목차····· vi

그림 목차····· vii

제 1장 서론····· 1

제 2장 재료 및 실험 방법····· 6

2.1. 재료 및 실험 장치····· 6

2.2. Pt가 코팅된 Au nanorod (Pt-AuNR)의 편광 감응성 광특성 분석····· 11

2.3. Defocused Orientation Imaging (DOI) 기술을 이용한 Pt-AuNR의 3차원 배향 결정····· 12

2.4. 단일 입자 수준에서의 Au nanourchin (AuNU)의 광 특성 분석····· 12

2.5. 단일 AuNU의 표적 물질의 Electrophilicity에 따른 LSPR 피크 이동의 분석····· 14

제 3장 결과 및 토의····· 16

3.1. Pt-AuNR의 편광 감응성 광특성 분석····· 16

3.2. DOI를 이용한 Pt-AuNR의 3차원 배향 결정····· 24

3.3. 단일 입자 수준에서의 AuNU의 광 특성 분석 결과····· 27

3.4. 단일 AuNU의 표적 물질의 Electrophilicity에 따른 LSPR 피크 이동의 분석····· 40

제 4장 결론····· 50

제 5장 참고 문헌····· 52

도식 목차

도식 1. 차등 간섭 명암 (Differential Interference Contrast, DIC) 현미경의 원리 모식도 ····· 8

도식 2. 암시야 (Dark-Field, DF) 현미경을 이용한 단일 입자 분광학의 원리 모식도····· 9

도식 3. 비등방성 금 나노 입자를 이용한 Rotational study 모식도····· 15

도식 4. 실험에서 사용된 표적 물질 (A) AuNU에 흡착된 표적 물질의 모식도 (B)····· 43

그림 목차

그림 1. 단일 입자 분광학을 위한 광학 현미경 시스템····· 10

그림 2. Pt-AuNR의 투과 전자 현미경 이미지(A) 단일 Pt-AuNR의 확대된 투과 전자 현미경 이미지(B)····· 20

그림 3. AuNR과 Pt-AuNR의 UV-Vis 흡수 스펙트럼 (A) Pt-AuNR의 단일 입자가 나타나 있는 DF 이미지 (B) AuNR과 Pt-AuNR 단일 입자로부터 얻어낸 단일 입자 산란 스펙트럼 (C)····· 21

그림 4. 슬라이드 글라스에 고정된 Pt-AuNR 단일 입자의 DIC 이미지 (A) 노란색 상자로 표시된 Pt-AuNR의 확대된 이미지 (B)····· 22

그림 5. Pt-AuNR를 10° 간격으로 회전시켜 얻은 DIC 이미지 패턴의 변화 (A) Pt-AuNR로부터 나오는 DIC 신호 (위)와 Polarization Anisotropy (아래)의 주기적인 변화 (B) ····· 23

그림 6. Pt-AuNR의 DF 이미지 (A) 그림 6A와 같은 영역에서의 비초점 이미지 (B)····· 25

그림 7. Pt-AuNR 단일 입자의 비초점 산란 패턴 이미지, (A, B, C) 비초점 산란 패턴 이미지의 시뮬레이션 데이터 (D, E, F) Pt-AuNR의 삼차원 공간 상에서의 배향 (G, H, I)····· 26

그림 8. 100-nm AuNS의 투과 전자 현미경 이미지 (A) 100-nm AuNU의 투과 전자 현미경 이미지 (B) 100-nm AuNS와 AuNU의 UV-Vis 흡수 스펙트럼(C)····· 32

그림 9 AuNS와 AuNU의 DF 이미지 (A, B) AuNS와 AuNU의 단일 입자 산란 스펙트럼 (C)····· 33

그림 10. 별 모양 금 나노 입자의 투과 전자 현미경 이미지 (A) 별 모양 금 나노 입자의 단일 입자 산란 스펙트럼 (B)····· 34

그림 11. AuNU의 DF 이미지 (A) 같은 영역에서 비초점 DF 이미지 (B) 비초점 거리에 따른 AuNU의 비초점 산란 패턴 이미지 (C)····· 35

그림 12. 단일 AuNU의 DF 편광 의존 산란 세기 변화····· 36

그림 13. AuNU의 DIC 이미지 (A) AuNU11의 DIC 신호 세기의 변화 (B) AuNU11를 10° 간격으로 회전시켜 얻은 DIC 이미지 패턴의

변화(C)····· 37

그림 14. AuNU12을 10° 간격으로 회전시켜 얻은 DIC 이미지 패턴의 변화 (A) AuNU12의 DIC 신호 세기의 변화 (B)····· 38

그림 15. AuNS의 rotational study 모식도 (A) AuNS의 회전 각에 따른 DIC 신호 세기 변화····· 39

그림 16. 100-nm AuNS의 주사 전자 현미경 이미지 (A) 100 nm-AuNU의 주사 전자 현미경 이미지와 확대된 이미지····· 44

그림 17. AuNS와 표적 물질이 흡착된 AuNS의 DF 이미지 (A, B, C) AuNU와 표적 물질이 흡착된 AuNU의 DF 이미지 (D, F, G)····· 45

그림 18. 15개 서로 다른 AuNS의 단일 입자 산란 스펙트럼 (A) p-ATP가 흡착된 AuNS의 단일 입자 산란 스펙트럼 (B) p-NTP가 흡착된 AuNS의 단일 입자 산란 스펙트럼(C)····· 46

그림 19. 15개 서로 다른 AuNU의 단일 입자 산란 스펙트럼 (A) p-ATP가 흡착된 AuNU의 단일입자 산란 스펙트럼 (B) p-NTP가 흡착된 AuNU의 단일 입자 산란 스펙트럼(C)····· 47

그림 20. 표적 물질의 electrophilicity에 따른 LSPR 피크의 이동 (A, B) 각 나노 입자의 LSPR 파장의 평균 (C) 각 나노 입자의 평균 LSPR 피크 이동 거리 (D)····· 48

그림 21. p-ATP 주입 후 시간에 따른 AuNU의 LSPR 파장의 이동 (A) AuNU의 LSPR 파장의 변화를 기반으로 한 LSPR 바이오 센서의 시연····· 49

제 1 장 서론

나노 입자는 적어도 한 차원의 크기가 100 nm 이하인 입자를 말한다. 이러한 나노 입자는 벌크 상태에서는 관찰 할 수 없었던 광학적[1], 전기적[2], 자기적[3] 성질을 가지기 때문에 많은 관심을 받고 있다. 특히 금 나노 입자로 대표되는 플라즈모닉 나노 입자는, 특정 파장의 빛이 조사되었을 때 표면의 자유 전자가 진동하는, 국지 표면 플라즈몬 공명 (Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR) 효과에 의하여 크기와 모양 그리고 주변 매질의 유전율에 따라 달라지는 광 특성을 가지고 있다. 특히 금 나노 입자는 합성 시 크기와 모양의 조절이 가능하고, 독성이 없고[4], 표면의 개질이 쉽다는 점 때문에 약물 전달체[5, 6], 광열 암 치료 요법[7, 8], 화학 센서[9-11], 광학 탐침[12, 13] 등 다양한 분야에서 연구되고 있다. 뿐만 아니라 플라즈모닉 나노 입자는 표면 증강 라만 분광학 (Serface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS) 에서 라만 신호를 증폭 시키기 위한 기질[14, 15]로 이용되기도 한다. 빛과 나노 입자의 상호 작용을 이용한 많은 응용 방법은 나노 입자의 LSPR 파장에 많은 영향을 받기 때문에, 나노 입자의 광 특성을 조절하기 위하여, 나노 입자의 크기, 모양을 조절하는 다양한 합성 방법과 광학적 특성이 보고되어 왔으나, 이러한 연구들은 주로 집합체 수준에서 진행되어 왔다.

최근 단일 입자 분광학 기술의 발전으로, 플라즈모닉 나노 입자의 광학적 특성을 단일 입자 수준에서 확인하는 것이 가능해졌다. 이전의 집합체 수준에서의 연구는 필연적으로 집합체 평균이 포함된 결과만을 확인 할 수 있었기 때문에, 단일 나노 입자 개개의 광 특성을 확인하는 것이 어려웠다. 그러나, 단일 입자 수준에서 나노 입자의 광학적 특성의 분석은, 나노 입자의 모양과 크기가 광학적 특성에 미치는 영향을 더 깊이 이해하는데 도움이 될 수 있다. 단일 나노 입자에 대한 연구는 대부분 산란 및 발광에 기초를 두고 진행되어, 구형 ([16], 막대형[12], 바이피라미드형[17], 큐브형[18], 쉘형[19] 등 다양한 나노 입자들에 대해 보고되었다. 하지만 단일 입자 수준에서 나노 입자의 광학적 특성 분석은 여전히 불충분하다.

단일 입자 회전 추적 (Single Particle Rotation Tracking) 기술의 발전은 광학 탐침으로 사용된 플라즈모닉 나노 입자를 실시간으로 추적할 수 있게 만들었다. 이전에는 주로 형광 분자가 광학 배향 탐침으로 널리 사용되어왔으나, 강한 형광 백그라운드가 발생하고, 감쇄 현상 (photobleaching) 때문에 관찰 시간도 짧다는 단점이 있었다. 이런 형광 탐침의 한계를 극복하기 위하여, 광학 탐침으로는 주로 gold nanorod (AuNR)[12]과 같은 비등방성 모양을 가진 나노 입자가 연구되어 왔다. 비등방성 모양을 가진 금 나노 입자는 그 모양 때문에 편광의 방향에

따라 달라지는 광 특성을 나타내게 된다. 편광을 기반으로 한 암시야(Dark-field, DF) 편광 현미경[13], 광열 헤테로다인 이미징(Photothermal heterodyne imaging)[20], 차등 간섭 명암 (Differential Interference Contrast, DIC) 현미경[12], 내부 전반사 (Total internal reflection) 산란 현미경[21], SERS[22, 23] 등이 막대형 금 나노 입자의 배향을 측정하기 위해서 사용되어왔다. 게다가, 비초점 배향 및 위치 이미징 (Defocused Orientation and Position Imaging, DOPI) 기술을 이용하면 각 축퇴도 (angular degeneracy)[24, 25] 없이 삼차원 상의 금 나노 입자 배향을 알 수 있다. 그러나 여전히 더 큰 민감도와 다기능성의 부여는 단일 입자 회전 추적 기술에서 큰 과제로 남아있다.

금 나노 입자의 LSPR 효과를 이용한 바이오센서는 각종 질병의 병원체 진단[26, 27], 세포 연구[28] 등의 분야에서의 응용 가능성 때문에 많은 관심을 받고 있다. LSPR 바이오센서는 금 나노 입자 주변 매질의 유전율의 변화에 민감하게 반응하여 발생하는 LSPR 파장의 이동에 기반하여 표적 물질을 탐지한다. 주변 매질의 유전율 변화에 대한 민감도는 거리에 크게 의존하기 때문에, 입자 표면에 DNA[29]나 RNA[30] 항원-항체[31, 32], 단백질[33] 결합시켜 이용하면 표적 물질을 선택적으로 검출 할 수 있고, 형광 물질과 같은 표지 물질을 사용하지 않고 직접 표적 물질을 실시간으로 관찰 할 수 있다. 그러나

LSPR 바이오센서는 여전히 혼합물에서 민감도가 떨어지고, 검출 한계가 낮다는 단점이 있다.

본 연구에서는 다양한 모양과 크기를 지닌 금 나노 입자를 DIC 현미경과 DF 현미경을 이용하여, 단일 입자 수준에서 분석한다. 두 현미경 모두 단일 입자 연구를 수행하는데 사용 할 수 있는 강력한 기술이다. DIC 현미경의 원리는 도식 1에서 보이는 것과 같이, 램프로부터 나온 빛은 첫 번째 편광기를 통과 한 후, 첫 번째 Nomarski 프리즘을 통과하여 서로 수직인 두 개의 편광으로 나눠진다. 두 편광 사이의 거리를 전단 거리(shear distance)라고 하며, 이중으로 상이 나타나는 것을 막기 위하여, 대물 렌즈의 분해능 보다 작게 만든다. 나눠진 편광은 시료의 두께, 기울기, 굴절률에 따라 경로가 변경된다. 두 개의 빛이 대물 렌즈를 통과 한 후, 두 번째 Nomarski 프리즘을 통과하게 되고 이 과정에서 두 편광이 합쳐지고, 빛의 경로가 같아진다. 합쳐진 빛은 두 번째 편광기를 통과하면서, 명암의 차이를 발생시키고, 이를 이용하여 샘플의 이미지를 얻을 수 있다. DF 현미경은 도식 2에서 원리를 볼 수 있다. DF 콘덴서의 Numerical aperture는 대물 렌즈의 Numerical aperture보다 크고, 램프의 빛은 콘덴서를 통과할 때, 샘플로 바로 조사되는 빛은 차단된다. 따라서, 현미경 스테이지에 샘플이 없으면, 이미지는 어둡게 보인다. 하지만 샘플에 스테이지에 놓이면, 샘플로부터 산란된 빛이

선택적으로 대물 렌즈를 통과하게 되어서, 샘플은 어두운 배경에서 밝게 빛나는 형태로 나타난다. DF 현미경과 DIC 현미경은 모두 직경 20 nm 이상의 금 나노 입자를 쉽게 검출 할 수 있다. 두 단일 입자 연구 기술을 이용하여, 입자의 비등방성 모양에 따른 금 나노 입자의 광학적 특성을 확인하고, 다양한 기능을 제공함과 동시에 삼차원 공간 상에서 나노 입자의 배향을 실시간으로 관측 할 수 있는 다기능성 광학 탐침을 개발하고자 한다.

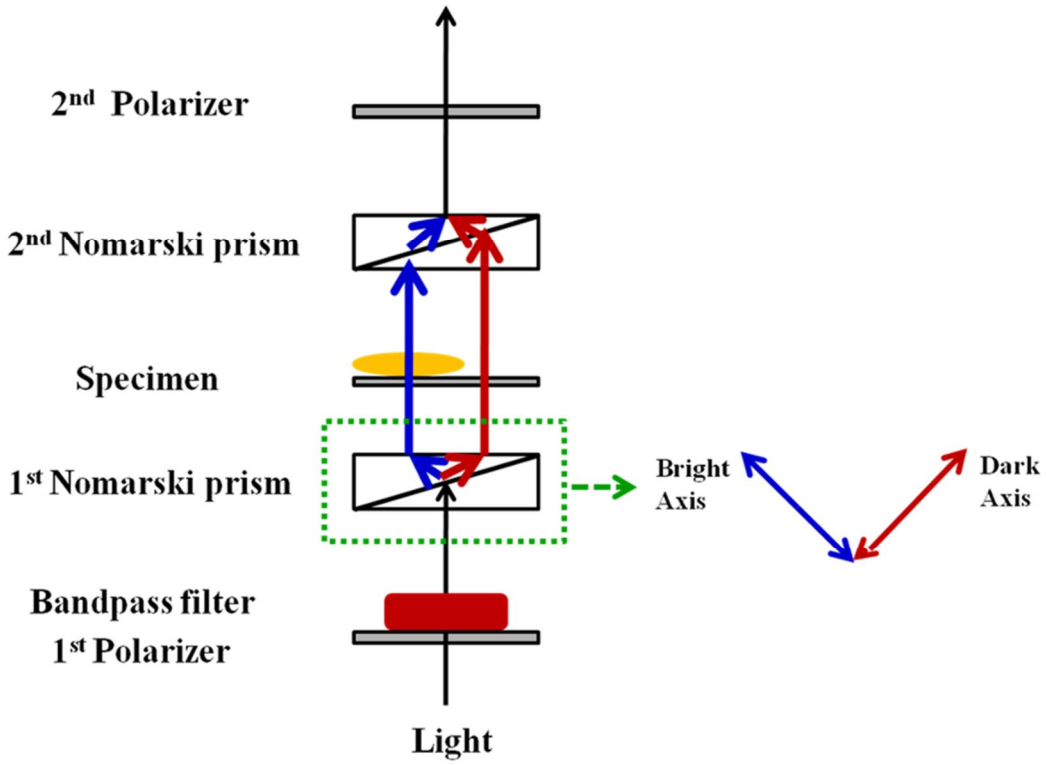
제 2 장 재료 및 실험방법

2.1. 재료 및 실험 장치

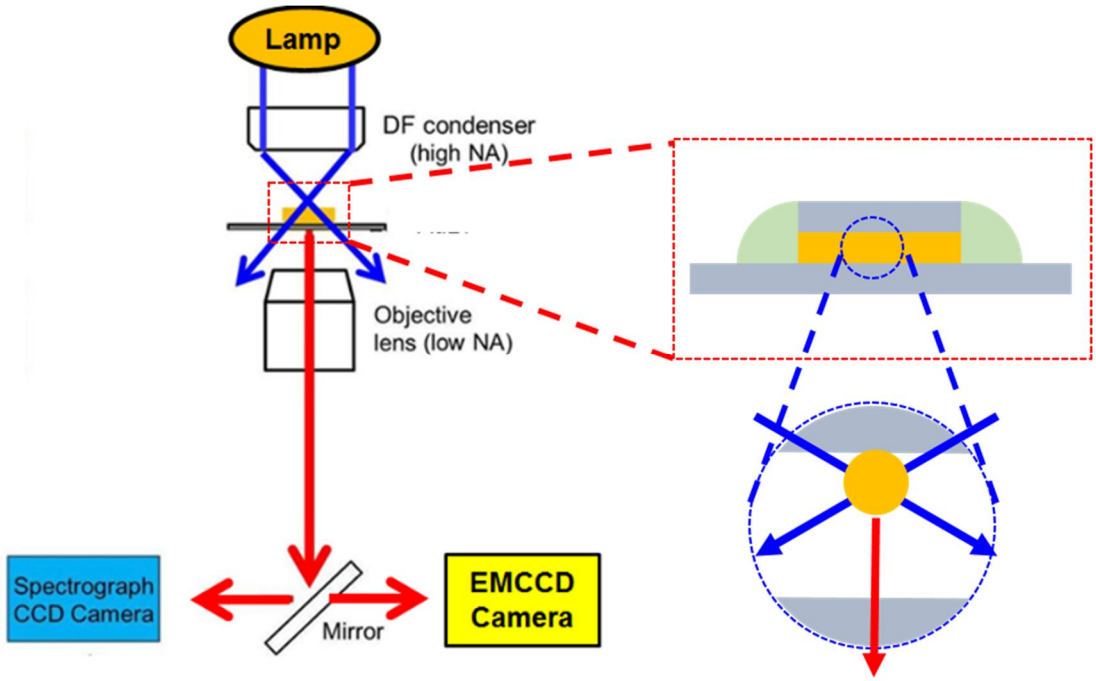
실험에서 사용된 AuNR (25 nm × 75 nm)는 Nanopartz 에서 구입하였고, 나머지 백금 코팅 막대형 금 나노 입자 (Pt-AuNR)와, 100-nm AuNS, 90-nm, 100-nm 성게형 금 나노 입자 (AuNU)는 Sigma-Aldrich 에서 구입하였다. 구매한 나노 입자는 실험에 사용하기 전 투과 전자 현미경이나 주사 전자 현미경을 통하여 구조를 확인하고, UV-Vis Spectroscopy 를 이용하여 집합체 수준에서의 LSPR 파장을 확인하였다. 또한 실험에서 사용된 p-아미노싸이오페놀 (p-aminothiophenol, p-ATP)과 p-나이트로싸이오페놀 (p-nitrothiophenol, p-NTP) 또한 Sigma-Aldrich 에서 구입하였다. 모든 나노 입자는 3 차 증류수에 20 배 희석 한 후, 초음파 처리하여 단일 입자의 생성을 유도한 다음 사용되었다. 샘플은 미리 세척된 슬라이드 글라스에 희석한 금 나노 입자 용액을 10 μL 를 올리고, 커버 글라스로 덮은 뒤, 커버 글라스를 고정시킴으로써 제작되었다.

DF 현미경 이미지는 Nikon Plan Fluor 100 × 0.5-1.3 oil iris 대물 렌즈와 Nikon DF 콘덴서를 사용하는 Nikon Inverted 현미경을 이용하여, Andor iXon EMCCD 카메라를 통해 기록되었다. 수집된 나노 입자의 이미지는 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 분석되었다. 또한 DF 산란 스펙트럼은 원하는 나노 입자로부터 산란되는 빛 만 선택적으로 수집 할

수 있도록, 샘플의 위치는 전동 스테이지를 통하여 조절되었으며, 그레이팅 (300 l/mm)을 통해 분산되어 Andor spectrometer 와 Andor CCD 카메라를 통해 검출되었다. 소프트웨어를 통해 그레이팅을 조절하여 필요에 따라 측정 중심 파장을 조절하여 원하는 영역의 스펙트럼을 얻었으며, 배경 신호와 램프 신호는 입자가 없는 지역에서 측정하여, MATLAB 프로그램을 사용하여 데이터를 분석하였다. DIC 현미경 이미지는 Nikon inverted microscope 에 2 개의 Nomarski 프리즘, 2 개의 편광기가 장착되어 있어야 한다. Numerical aperture 가 1.4 인 oil immersion condenser 와 Plan Apo oil-immersion 대물 렌즈를 사용하고, Andor iXon EMCCD 카메라를 이용하여 이미지를 얻는다. 단일 입자 연구를 위한 광학 현미경의 세팅은 그림 1 에서 볼 수 있다. 얻어진 DIC 이미지는 ImageJ 소프트웨어를 통해 분석되었다.



도식 1. 차등 간섭 명암 (Differential Interference Contrast, DIC) 현미경의 원리 모식도



도식 2. 암시야 (Dark Field, DF) 현미경을 이용한 단일 입자 분광학의 원리 모식도

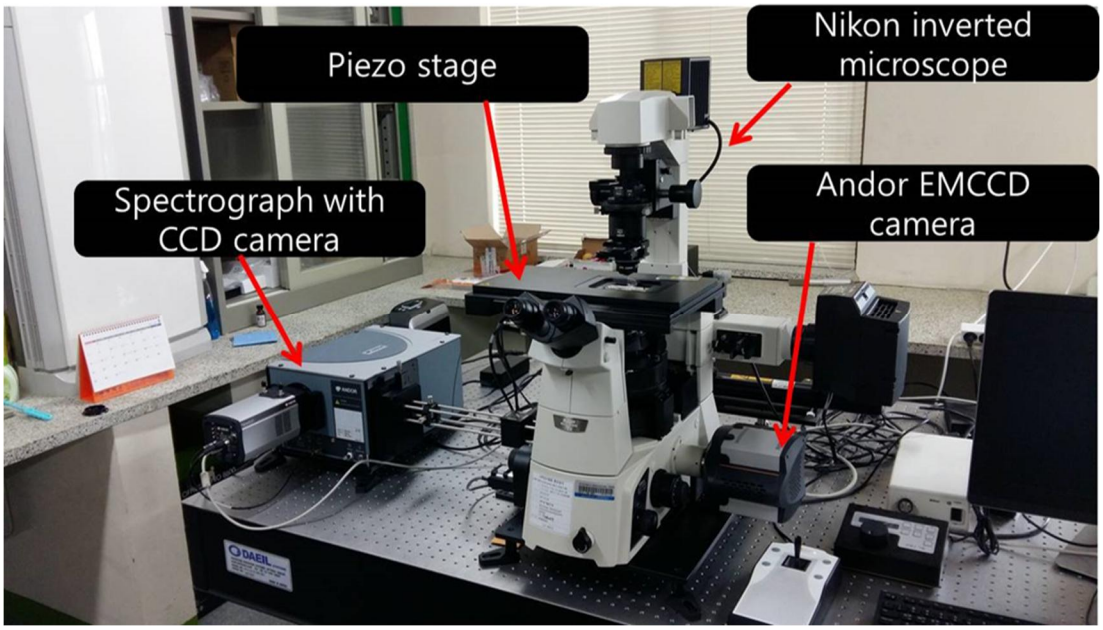


그림 1. 단일 입자 분광학을 위한 광학 현미경 시스템

2.2. Pt-AuNR 의 편광 감응성 광특성 분석

2.2.1. Pt-AuNR 단일 입자 산란 스펙트럼 분석

AuNR 에 백금이 코팅 되었을 때, 변화하는 광학적 특성을 알아보기 위하여, 보통의 AuNR 와 Pt-AuNR 를 앞서 설명한 방식대로 샘플로 만들어서 준비한다. 대물 렌즈에 오일을 한 방울 떨어트리고 샘플을 스테이지에 올려 커버 글라스를 오일과 접촉시킨다. 그 후 슬라이드 글라스에 오일을 한 방울 떨어트리고 콘덴서를 오일과 접촉시킨다. 접안 렌즈를 통해 샘플을 주시하며 초점을 찾은 후, 단일 입자 상태로 존재하고 있는 나노 입자를 찾아서 piezo stage 를 조작하여 중앙으로 옮긴다. 대물 렌즈에 의해 모아진 빛을 EMCCD 카메라로 보내서 DF 이미지를 얻거나, 분광기로 보내서 나노 입자의 산란 스펙트럼을 얻는다. 측정 위치를 나노 입자가 없는 위치로 이동하여 백그라운드 신호를 얻고, 대물 렌즈의 조리개를 활짝 열어서 램프 신호를 얻는다.

2.2.2 회전에 따른 Pt-AuNR DIC 이미지 패턴 변화 분석

Pt-AuNR 를 샘플로 제작하여 rotational stage 위에 올리고 고정시킨다. DIC 현미경을 사용하여, 대물 렌즈와 콘덴서 양 쪽에 오일을 접촉시키고 접안 렌즈를 통해 샘플을 주시하며 초점을 찾는다. 초점을

맞추면 0°부터 180°까지 10° 간격으로 rotational stage 를 회전시키며, 나노 입자의 DIC image 를 EMCCD 를 이용하여 얻어낸다.

2.3. DOI 를 이용한 Pt-AuNR 의 3 차원 배향 결정

2.3.1. Pt-AuNR 의 비초점 산란 패턴 이미지 분석

Pt-AuNR 용액을 샘플로 만들어 준비하고 스테이지 위에 올려 DF 현미경을 사용하여, 대물 렌즈와 콘덴서 양 쪽을 오일과 접촉시킨 후, 초점을 맞춘다. EMCCD를 이용하여 초점 위치부터 1 μm 정도까지 초점을 흐트러트려가면서 초점 이미지와 비초점 이미지를 얻는다.

2.4. 단일 입자 수준에서의 AuNU 의 광 특성 분석

2.4.1 짧고 뾰족한 팁에 의한 금 나노 입자의 LSPR 특성 변화 분석

100-nm AuNU 와 100-nm AuNS 를 샘플로 제작하여 piezo stage 에 올려두고, 대물 렌즈와 콘덴서를 오일에 접촉시킨 후, DF 현미경을 사용하여 초점을 맞춘다. 단일 입자로 존재하고 있는 나노 입자를 찾아서 중앙으로 이동 시킨다. 대물 렌즈에 의해 모아진 빛을 EMCCD 카메라로 보내서 DF 이미지를 얻는다. 나노 입자로부터 나오는 산란 신호를 분광기로 보내서 나노 입자의 산란 스펙트럼을 얻는다. 측정 위치를 나노

입자가 없는 위치로 이동하여 백그라운드 신호를 얻고, 대물 렌즈의 조리개를 열어서 램프 신호를 얻는다.

2.4.2. AuNU 의 비초점 산란 패턴 분석

100-nm AuNU 샘플을 준비하고 DF 현미경을 이용하여 초점을 맞추고, EMCCD 를 이용하여 초점 위치의 DF 이미지를 얻는다. 초점 위치부터 0.5 μm 간격으로 초점을 흐트러트리면서 비초점 DF 이미지를 얻는다.

2.4.3. DF 현미경을 이용한 단일 AuNU 의 편광 의존성 광특성 분석.

DF 현미경 콘덴서에 편광기와 700 nm bandpass filter 를 부착하고, AuNU 샘플을 스테이지 위에 올려 대물 렌즈와 콘덴서 양 쪽을 오일과 접촉시킨다. 접안 렌즈를 이용하여 샘플을 주시하면서 초점 평면을 찾는다. 초점 평면에 도달하면, 0°부터 180°까지 10° 간격으로 편광기를 회전시키면서 단일 AuNU 의 DF 이미지를 얻는다.

2.4.4. AuNU 의 회전에 따른 DIC 신호 세기 분석

AuNU 를 샘플로 만들어 rotational stage 위에 올리고 테이프를 이용하여 슬라이드 글라스를 고정시킨다. DIC 현미경을 사용하여, 대물 렌즈와 콘덴서 양 쪽에 오일을 접촉시킨 상태에서 초점 조절 나사를

이용하여 초점을 찾는다. 초점을 맞추면 0°부터 360°까지 10° 간격으로 rotational stage 를 회전시켜, 나노 입자의 DIC image 를 얻어낸다.

2.5. 단일 AuNU 의 표적 물질의 Electrophilicity 에 따른 LSPR 파장 이동의 분석

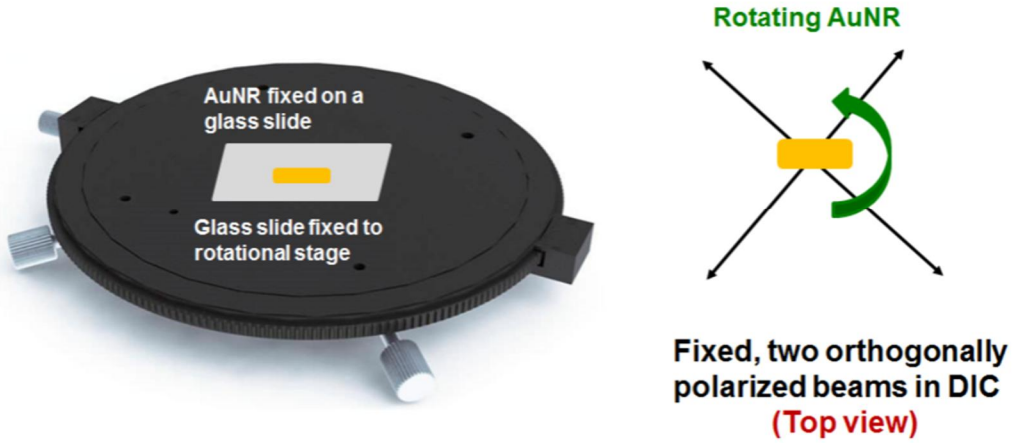
2.5.1. 표적 물질의 electrophilicity 에 따른 LSPR 피크 시프트 분석

AuNU 와 AuNS 를 슬라이드 글라스 위에 한 방울 떨어트리고, 커버 글라스를 덮은 후 드라이키퍼에서 샘플의 물을 완전히 건조 시켜서, 각각 3 개씩 6 개의 샘플을 준비한다. 샘플에 각각 에탄올, 1 μM 농도의 p-ATP 에탄올 용액, 1 μM 농도의 p-NTP 에탄올 용액을 한 방울 떨어트리고 커버 글라스 주변을 밀봉하여 샘플을 준비한다. 각각 샘플에 대하여 DF 현미경을 이용하여 DF 이미지를 측정하고, 단일 입자 산란 스펙트럼을 15 개씩 얻어서 LSPR 피크의 위치를 기록한다.

2.5.2. p-ATP 주입 후 시간 경과에 따른 성게 모양 금 나노 입자의 피크 이동 분석

AuNU를 24 × 50 mm 커버 글라스에 한 방울 떨어트리고, 20 × 20 mm 커버 글라스를 덮은 후 드라이키퍼에서 샘플을 완전히 건조시킨다. 샘플이 완전히 건조되면 에탄올을 한 방울 떨어트리고 초점을 맞춰, 단일 입자를 찾고 산란 스펙트럼을 얻는다. 스테이지에 샘플을 고정시킨

상태에서 샘플 내부의 에탄올을 완전히 건조시키고, 1 μM 농도의 p-NTP 에탄올 용액을 떨어트리고, 떨어트린 직 후 산란 스펙트럼을 측정하기 시작한다. 이후 3분 간격으로 반복 측정을 진행하여 LSPR 스펙트럼을 얻는다.



도식 3. 비등방성 금 나노 입자를 이용한 Rotational study 모식도

제 3장 결과 및 고찰

3.1. Pt-AuNR 의 편광 감응성 광특성 분석

그림 2 는 투과 전자 현미경을 이용하여 얻어낸 Pt-AuNR 의 구조이다. Pt-AuNR 의 폭과 길이는 평균 25 nm × 73 nm 이며 그림 2B 의 확대된 이미지를 통해 백금 cluster 가 3-7 nm 의 두께로 중심의 AuNR 에 흡착되어있는 것을 확인 할 수 있었다. Pt-AuNR 과 AuNR 의 UV-Vis 스펙트럼이 그림 3A 에 나와있다. AuNR 는 일반적으로 가로축과 세로축 두 가지 방향의 SPR 모드를 가지게 되고, 그림 3A 에서 볼 수 있는 것과 같이 520 nm 에서의 transverse SPR 피크와 710 nm 에서의 longitudinal SPR 피크가 나타나게 된다. 그러나 Pt-AuNR 의 경우 표면에 붙은 백금 코팅 때문에 longitudinal SPR 피크가 강하게 감쇄 되는 것을 확인했다. Pt-AuNR 의 산란 특성과 감쇄를 더 깊이 이해하기 위하여, DF 현미경을 이용하여 AuNR 과 Pt-AuNR 의 단일 입자 산란 스펙트럼을 얻었다. 그림 3B 에서 노란색 상자로 강조된 Pt-AuNR 단일 입자의 산란 스펙트럼을 얻은 결과, AuNR 과 비교하여, 백금 클러스터의 흡착으로 인해 강하게 감쇄되어, 스펙트럼의 띠 넓이가 매우 커진 것을 그림 3C 에서 확인 할 수 있다. 백금 코팅은 강한 플라즈몬 감쇄를 일으키기 때문에, DF 현미경을 사용하여 단일 입자를 추적하기에는 Pt-AuNR 의 산란 신호가 너무 약하다.

반면에 DIC 현미경은 샘플과 빛의 간섭을 이용하여 명암을 만들어 이미지를 얻어내기 때문에, 단일 입자를 추적하여 회전과 배향을 알아내기에 더 적합하다. 그러나 지금까지 DIC 를 이용하여 단일 Pt-AuNR 의 광 특성을 분석한 사례가 없었기 때문에, 배향 각도를 알아내기 위한 DIC 의 이미지 패턴 변화나 DIC 신호 세기 변화에 대한 정보는 아직 알려지지 않았다. 따라서, 우리는 단일 Pt-AuNR 을 슬라이드 글라스에 고정시키고, Pt-AuNR 의 longitudinal SPR 파장 영역에 가장 가까운 700 nm bandpass 필터를 사용하여 DIC 이미지(그림 4A)를 얻었다. Pt-AuNR 의 배향은 AuNR 의 장축과 DIC 편광의 암축 사이의 배향 각도 φ 로 정의된다. 노란색 상자로 강조된 두 개의 단일 Pt-AuNR 의 확대된 이미지는 슬라이드 글라스 상에서의 배향에 따라 달라지는 Pt-AuNR 의 DIC 패턴을 보여준다. AuNR 의 장축이 DIC 편광의 암축 방향과 평행하게 정렬되면, 그림 4B 에서 볼 수 있는 Pt-AuNR2 의 이미지와 같이 완전히 어두운 패턴을 보이게 된다. Pt-AuNU 가 배향된 각도가 45°라면 그림 4B 의 Pt-AuNR3 이미지와 같이 반은 밝고 반은 어두운 이미지를 보인다.

이어서 노란색 상자로 강조한 Pt-AuNR2 에 대해 10° 간격으로 0°부터 180°까지 rotational stage 를 회전시켜 편광의 방향에 따른 DIC 이미지의 변화를 관찰했다. 그림 5A 는 0°부터 180°까지의 이미지를 보여준다. 그림 5A 의 각 이미지를 통해 Pt-AuNR 의 이미지의 패턴이

배향 각도 φ 가 변함에 따라, 주기적으로 변하는 것을 발견했다. 편광의 방향에 따른 광학적 특성의 변화를 알아보기 위하여 각 이미지에 대하여 가장 강한 DIC 신호와 가장 약한 DIC 신호를 측정하여, 회전 각도의 함수로서 그림 5B 의 위 이미지와 같이 그래프를 그렸다. 이미지의 패턴이 주기적으로 변하는 것과 마찬가지로, DIC 신호 세기 또한 회전 각도에 따라 주기적으로 변하며, 밝기 신호와 어두움 신호가 서로 anti-correlated 관계에 있어, 밝기 신호가 증가하면 어두움 신호가 감소하고, 어두움 신호가 증가할 때는 밝기 신호의 감소를 수반했다. 뿐만 아니라 정규화된 DIC 신호는 이론적인 값인 $\sin^4(\varphi)$와 $\cos^4(\varphi)$에 각각 잘 매칭이 되었다. 따라서 Pt-AuNR 는 편광의 방향에 따라 달라지는 광 특성을 지니며, DIC 이미지와 신호 세기는 편광의 방향에 따라 주기적으로 변함을 알 수 있었고, 이 결과를 통해 DIC 이미지와 신호의 세기를 측정함으로써 단일 Pt-AuNR 의 공간적 방향 φ 를 알아낼 수 있다.

DIC 신호의 세기는 실험의 조건에 따라 달라질 수 있기 때문에, DIC 신호의 강도 비를 이용하는 DIC 편광 이방성 (Polarization anisotropy, P)를 이용하면, 신호 세기의 불안정성의 영향을 받지 않고 재현성 있고 신뢰 할 만한 각도를 측정 할 수 있다. 편광 이방성 P 는 정규화된 DIC 밝기 세기와 어두움 세기로부터 다음 식 (1)을 이용하여 구해진다.

$$P = \frac{I_{\mathrm{B,N}} - I_{\mathrm{D,N}}}{I_{\mathrm{B,N}} + I_{\mathrm{D,N}}} \tag{1}$$

그림 5B 의 아래 그래프 또한 Pt-AuNR 의 배향 각도에 따른 DIC 편광 이방성 P 의 주기적인 변화를 보여준다. Pt-AuNR 이 편광의 밝은 축과 정렬되면 P 값은 최대 값 1 이 되고, 어두운 축과 정렬되면 -1 이 된다. DIC 의 편광 이방성 P 는 식 2 에서 볼 수 있는 것처럼 배향 각도 φ 와 관련되어 있다.

$$\varphi = \operatorname{acos}\left(\sqrt{\frac{A - \sqrt{A^2 - 2A}}{2}}\right), \quad P < 0$$
$$\varphi = \operatorname{acos}\left(\sqrt{\frac{A + \sqrt{A^2 - 2A}}{2}}\right), \quad P > 0 \tag{2}$$

여기서 A는 (P-1)/P로 정의된다. 따라서, DIC 편광 이방성 P의 측정으로부터 배향 각도 φ가 추론될 수 있다.

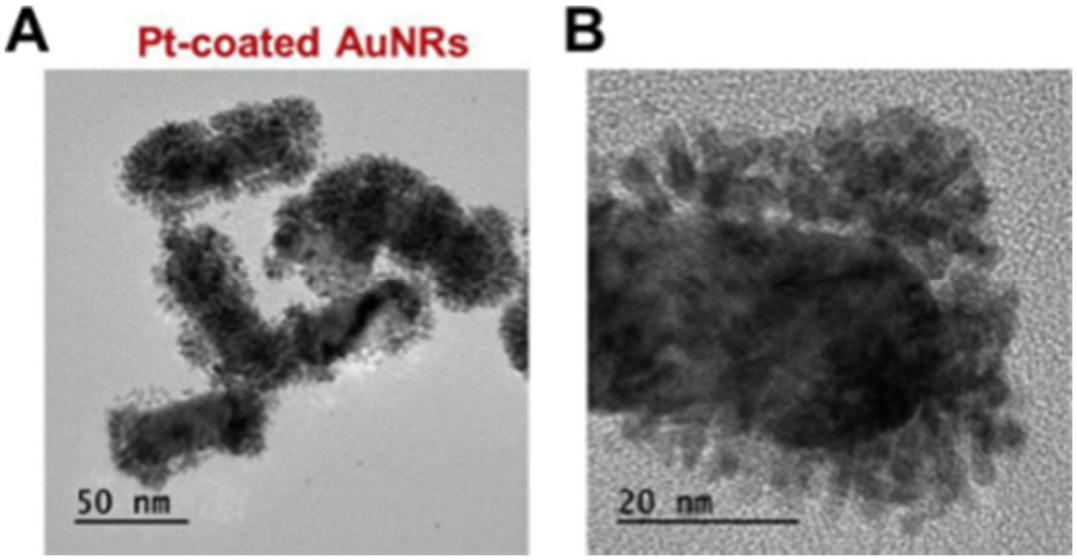


그림 2. Pt-AuNR의 투과 전자 현미경 이미지(A) 단일 Pt-AuNR의 확대된 투과 전자 현미경 이미지(B)

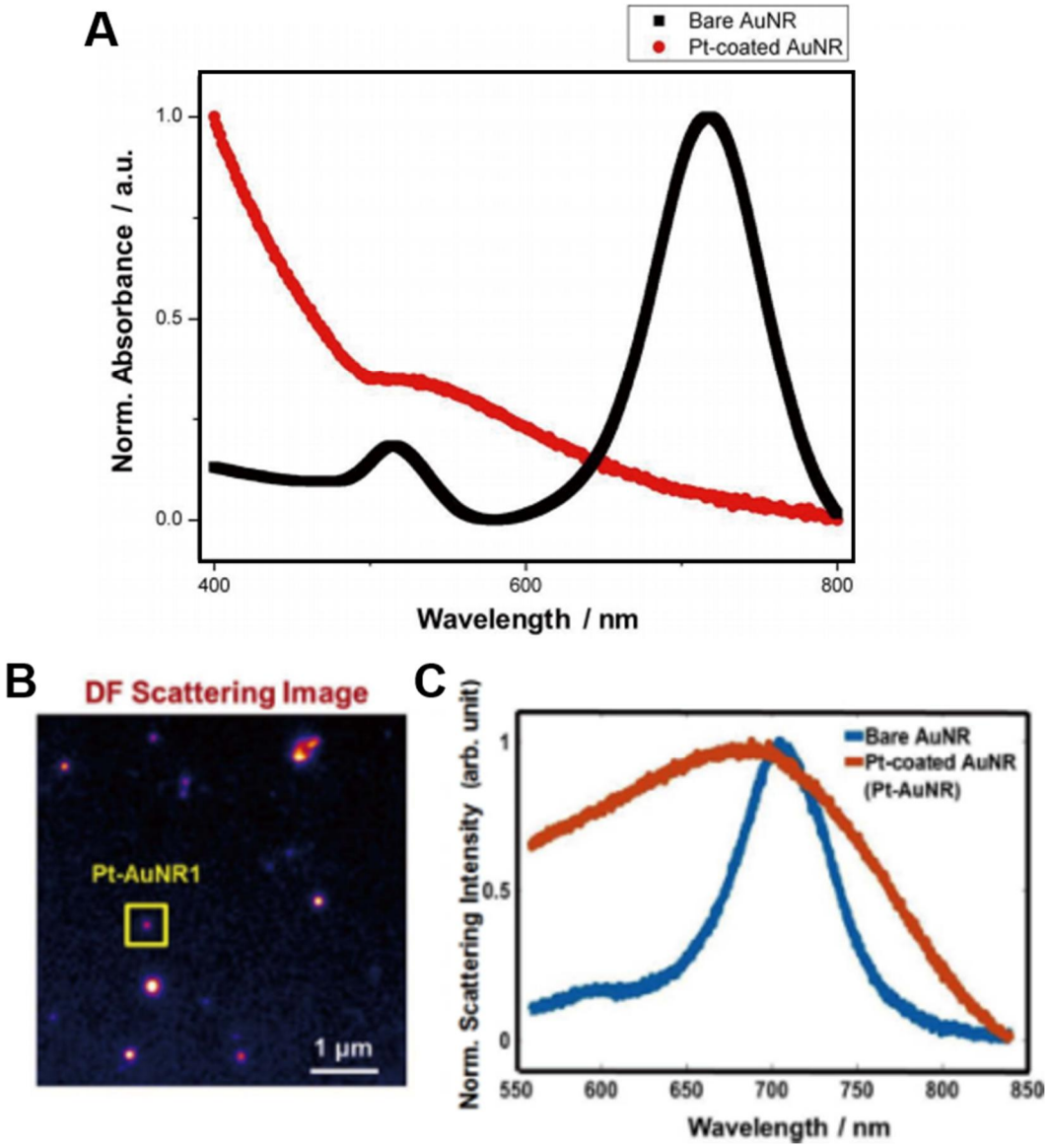


그림 3. AuNR과 Pt-AuNR의 UV-Vis 흡수 스펙트럼 (A) Pt-AuNR의 단일 입자가 나타나 있는 DF 이미지 (B) AuNR과 Pt-AuNR 단일 입자로부터 얻어낸 단일 입자 산란 스펙트럼 (C)

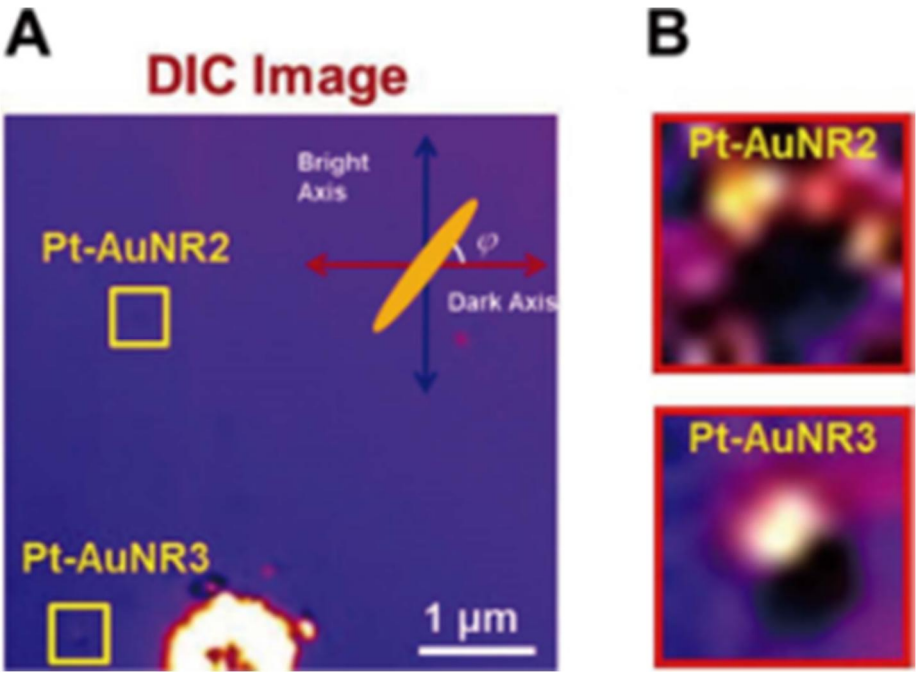


그림 4. 슬라이드 글라스에 고정된 Pt-AuNR 단일 입자의 DIC 이미지 (A) 노란색 상자로 표시된 Pt-AuNR의 확대된 이미지 (B)

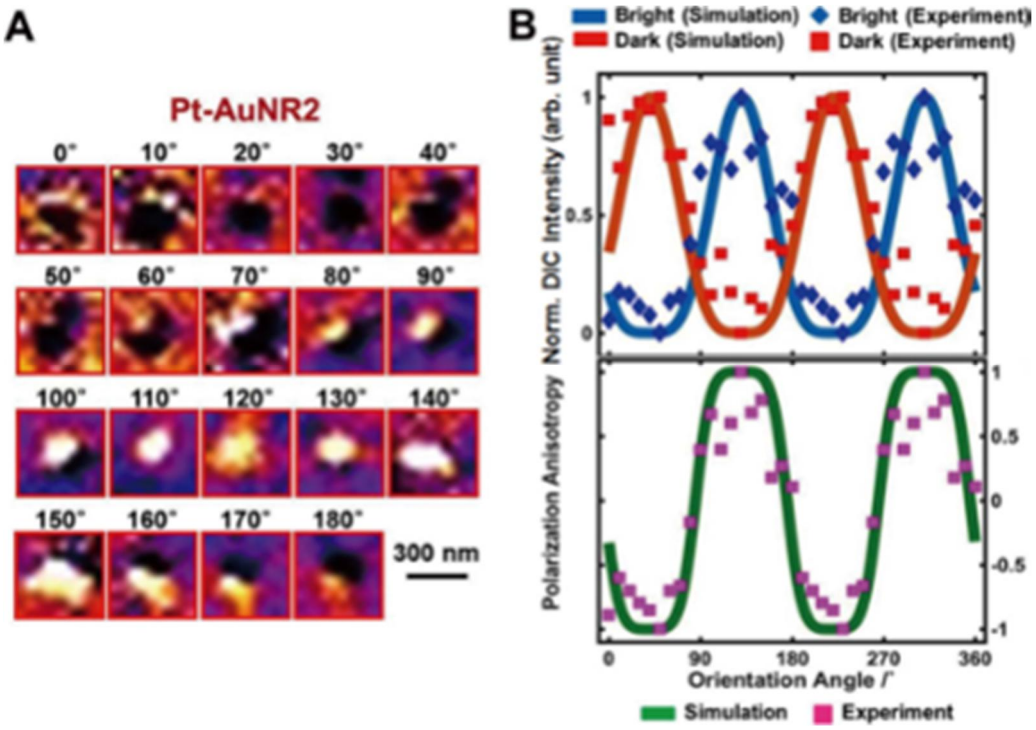


그림 5 Pt-AuNR를 10° 간격으로 회전시켜 얻은 DIC 이미지 패턴의 변화 (A) Pt-AuNR로부터 나오는 DIC 신호 (위)와 Polarization Anisotropy (아래)의 주기적인 변화 (B)

3.2. DOI 기술을 이용한 Pt-AuNR 의 3 차원 공간 배향 결정

그림 6A 는 Pt-AuNR 의 초점 평면에서 얻어진 DF 이미지로, Pt-AuNR 로부터 산란 된 빛은 3D 배향에 대한 정보를 거의 제공하지 않고, 밝은 점으로 집중되어 있다. 그러나 Pt-AuNR 이 초점 평면으로부터 약 1 μm 떨어진 곳에 있으면, 그림 6B 와 같이 독특한 도넛 모양의 산란 패턴이 관찰된다.

그림 7 은 그림 6B 에서 노란색 상자로 강조된 Pt-AuNR 의 삼차원 공간 상에서의 방위각을 결정하는 것을 보여준다. 그림 7A 는 비초점 평면에서 DF 현미경을 이용하여 얻어진 Pt-AuNR1 의 산란 패턴 이미지를 나타내고, 그림 4D 는 Matlab 을 이용해 시뮬레이션하여 얻은 그림 4A 의 산란 패턴과 가장 유사한 형태의 산란 패턴 이미지이다. 얻어진 산란 패턴을, 시뮬레이션 프로그램에 따라 파라미터를 조절하여 얻은 가장 잘 맞는 시뮬레이션 패턴과 비교함으로써, Pt-AuNR 의 방위각을 추정해낼 수 있다. Pt-AuNR 은 백금 코팅에 의하여 강한 플라즈몬 감쇄 현상을 보이지만, 그럼에도 불구하고 비초점 산란 패턴을 확인하여 3 차원 공간성에서의 배향을 확인 할 수 있었다.

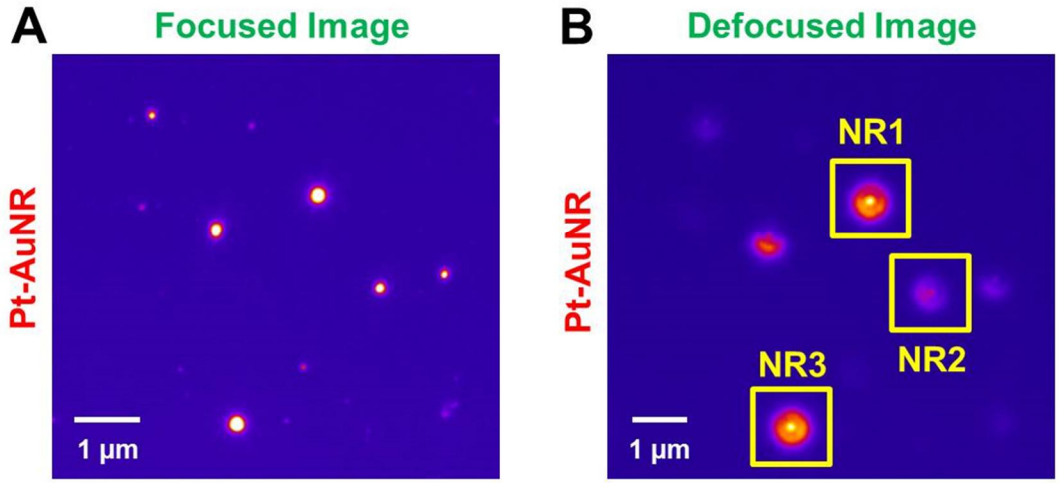


그림 6. Pt-AuNR의 DF 이미지 (A) 그림 6A와 같은 영역에서의 비초점 이미지 (B)

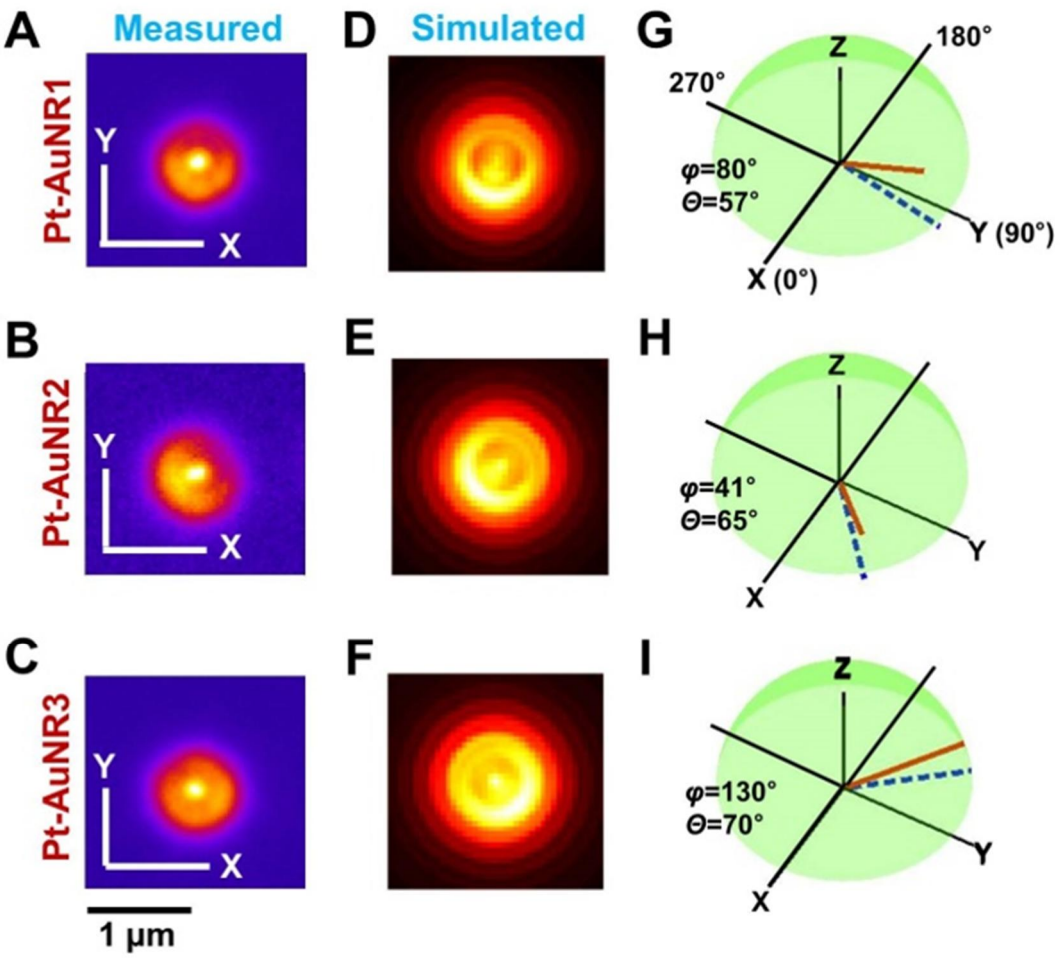


그림 7. Pt-AuNR 단일 입자의 비초점 산란 패턴 이미지, (A, B, C) 비초점 산란 패턴 이미지의 시뮬레이션 데이터 (D, E, F) Pt-AuNR의 삼차원 공간 상에서의 배향 (G, H, I)

3.3. 단일 입자 수준에서의 AuNU 의 광 특성 분석.

100-nm AuNU 의 짧고 뾰족한 팁에 의해 변하는 광학적 특성을 알아보기 위해, 100-nm AuNS 를 대조군으로 사용하여 비교하면서 실험을 진행하였다. AuNS 와 AuNU 의 구조는 먼저 투과 전자 현미경을 통해서 얻은 그림 8A, B 를 통해 확인 할 수 있다. AuNS 는 매끄러운 표면을 보여주는 것과 반대로 AuNU 는 매우 거친 표면을 가지고 있다. AuNU 의 거친 표면은 표면에 붙어있는 짧고 뾰족한 팁 때문에 생긴다. 그림 8C 는 AuNS 와 AuNU 의 UV-Vis 스펙트럼으로 크기가 비슷한 나노 입자임에도 AuNS 는 LSPR 파장이 570 nm 정도에 위치하는 반면에, AuNU 는 690 nm 정도에 위치하여, 표면의 짧고 뾰족한 팁이 붙음으로써 AuNS 보다 장파장에서 LSPR 피크가 나오는 것을 확인했다.

나노 입자의 모양에 의해 변하는 광 특성을 더 깊이 이해하기 위하여 두 나노 입자에 대하여 단일 입자 레벨에서의 분석을 실시했다. 그림 9A 와 B 에서 각각 AuNS 와 AuNU 의 DF 단일 입자 산란 이미지를 보여주고 있다. 각 이미지에 노란색으로 표시된 나노 입자로부터 그림 9C 에서 볼 수 있는 단일 입자 산란 스펙트럼을 얻었다. AuNS1 의 LSPR 피크는 약 576 nm 에서 나타났고, AuNU1 의 LSPR 피크는 약 700 nm 에서 나타나 UV-Vis 스펙트럼에서 확인 한 것 과 같이 red-shift 가 발생하는 것을 볼 수 있었다.

이어서, 별 모양 금 나노 입자의 투과 전자 현미경 이미지와 DF 산란 스펙트럼을 얻었다. 그림 10A 에서 보이는 것처럼 AuNU 보다 더 길고 적은 수의 팁을 가지고 있다. 단일 별 모양 금 나노 입자의 단일 입자 산란 스펙트럼은 그림 10B 에 나와있다. AuNU 가 700 nm 근처에서 단일 피크를 나타내는 것과 다르게, 별 모양 금 나노 입자는 765 nm 와 873 nm 에서 2 개의 LSPR 피크를 가진다. 별 모양 금 나노 입자는 팁의 길이가 제각기 달라서 LSPR 효과에 의해서 생기는 다중의 쌍극자가 서로 다른 LSPR 파장을 가져서 분리되는 반면에, AuNU 는 팁의 길이의 편차가 크지 않아서 LSPR 파장이 분리되지 않는다.

다음으로 비초점 상태에서의 AuNU 의 광학적 특성을 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 초점 평면 (그림 11A)부터 천천히 초점을 흐리면서, 비초점 산란 패턴 (그림 11B)이 나오는 것을 관찰했다. 초점 평면 상에서는 배향에 대한 정보를 거의 가지고 있지 않은 밝은 점으로 관찰되다가 1 μm 를 이동했을 때, 도넛 형태의 산란 패턴이 나오는 것이 보였다. 그러나 AuNU 의 특징적인 비초점 산란 패턴 이미지는 1.5 μm 를 이동하였을 때 나타났다. 그림 11C 의 1.5 μm 비초점 거리의 산란 패턴 상에서 불규칙적으로 나타나는 밝고 어두운 패턴의 반복은 AuNU 의 뾰족한 팁에 의하여 생성된 다중의 단일 쌍극자의 공간 상에서의 분포를

보여준다. 이러한 비초점 산란 패턴 이미지는 단순한 모양의 AuNR 와는 다른 점을 보인다.

AuNU 표면에서 단일 쌍극자가 생성되는 것을 확인하기 위하여, 700 nm 파장의 빛을 편광으로 만들고, 10 도 간격으로 회전시켜, DF 이미지를 얻었다. 그리고 각각의 이미지로부터 DF 산란 신호 세기를 측정하고, 얻어낸 신호 세기를 편광의 각도의 함수로서 그림 14 과 같이 그래프로 그렸다. 6 개의 입자를 선정하여 산란 신호의 세기를 확인 한 결과, 편광의 회전 각도에 따라 산란 신호도 주기적으로 변하는 것을 확인할 수 있었다. 편광 의존성 광 특성은 편광 각의 함수로서 단일 AuNU 의 DF 산란 신호의 주기적 변화를 이용하여 증명 할 수 있으며, SPR 이 단일 쌍극자 산란자처럼 행동한다는 것을 의미한다.

최근 간섭 현상을 이용한 DIC 현미경이 단일 입자의 관찰 및 분석에 강력한 방법으로 떠오르고 있지만, DIC 현미경을 이용하여 금 나노 입자의 광 특성을 분석한 연구는 여전히 부족하다. AuNU 의 광 특성 또한 DIC 현미경을 이용하여 연구되지 않아서, AuNU 의 DIC 이미지 및 신호의 세기는 아직 알려져 있지않다. 이런 특성을 연구하기 위해 DIC 현미경을 이용하여, 슬라이드 글라스에 고정 된 단일 AuNU 를 찾아 측정을 진행했다. 그림 13A 는 슬라이드 글라스에 고정된 단일 AuNU 의 700 nm 파장에서의 DIC 이미지를 보여준다. AuNU 의 특징적인 DIC

이미지 패턴은 3D 구조 및 팁이 뻗어있는 방향에 따라 다르게 관찰되었다. AuNU 의 간섭 특성을 더 명확하게 이해하기 위해, 고정된 AuNU 를 rotational stage 를 회전시켜 편광에 따라 달라지는 DIC 이미지를 얻었다. 스테이지의 회전은 0°부터 360°까지 10° 간격으로 진행되었다. 그림 13B 는 AuNU 11 의 밝기 신호와 어두움 신호를 측정하여, rotational stage 의 회전 각도에 대하여 그래프를 그린 것으로 DIC 신호의 세기가 AuNU 가 회전함에 따라 주기적으로 변하는 것을 확인 할 수 있다. 뿐만 아니라 밝기 신호와 어두움 신호가 서로 anti-correlate 관계에 있어 밝기 신호의 증가가 어두움 신호의 감소를 수반하고, 그 반대의 경우도 마찬가지로 적용된다. 그림 13C 는 AuNU11 의 회전에 따른 단일 입자 이미지 패턴으로, DIC 이미지 패턴이 회전 각도에 따라 주기적으로 변하는 것을 볼 수 있다.

단일 AuNU 의 DIC 신호는 3D 공간 상에서의 팁의 분포에 영향을 받는다. 특히, 그림 13B 와 그림 14A 에서 관찰 가능한 DIC 신호의 갑작스러운 변화는 무작위로 뻗어있는 AuNU 의 팁의 공간적 분포에 의해 영향을 받은 것이다. 그림 14A 의 AuNU 입자의 모식도에서와 같이 AuNU 는 여러 개의 단일 쌍극자를 생성 할 수 있다. 이 결과는 DIC 현미경을 이용하여 측정된 다른 AuNU 입자들에 의해서도 재현된다.

AuNU 의 대조 실험을 위해, 단일 AuNS 를 이용하여 같은 실험을 진행했다. 그림 15A 에서 AuNS 를 이용한 rotational study 의 모식도를 확인할 수 있다. 실험 결과 그림 15B 에서 볼 수 있는 것처럼, 입자가 회전함에도 불구하고 단일 AuNU 의 경우와 달리 밝기 신호와 어두움 신호의 세기는 거의 일정했다. 따라서 AuNU 의 편광 감응성 광 특성은 짧고 뾰족한 팁에 의하여 나온다는 것을 알 수 있다.

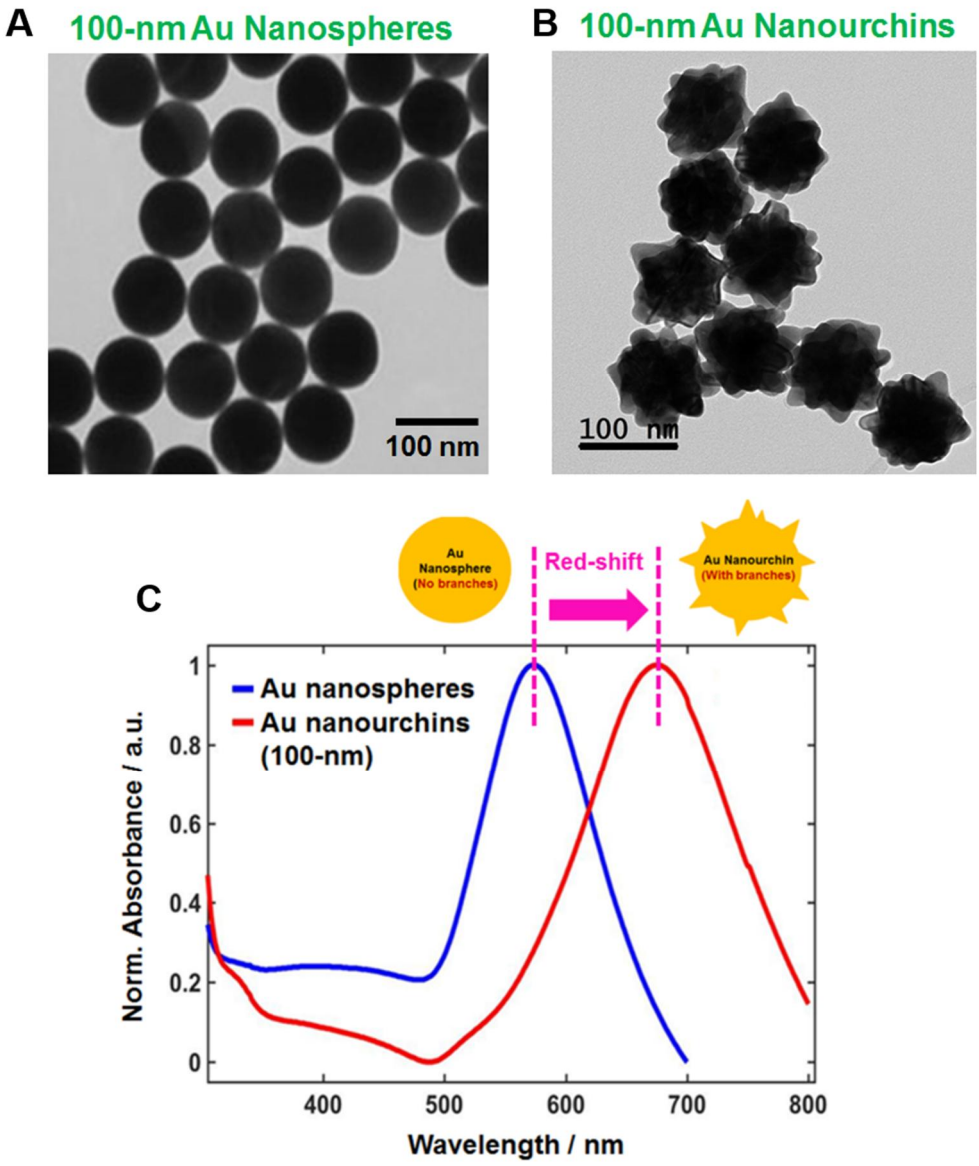


그림 8. 100-nm AuNS의 투과 전자 현미경 이미지 (A) 100-nm AuNU의 투과 전자 현미경 이미지 (B) 100-nm AuNS와 AuNU의 UV-Vis 흡수 스펙트럼 (C)

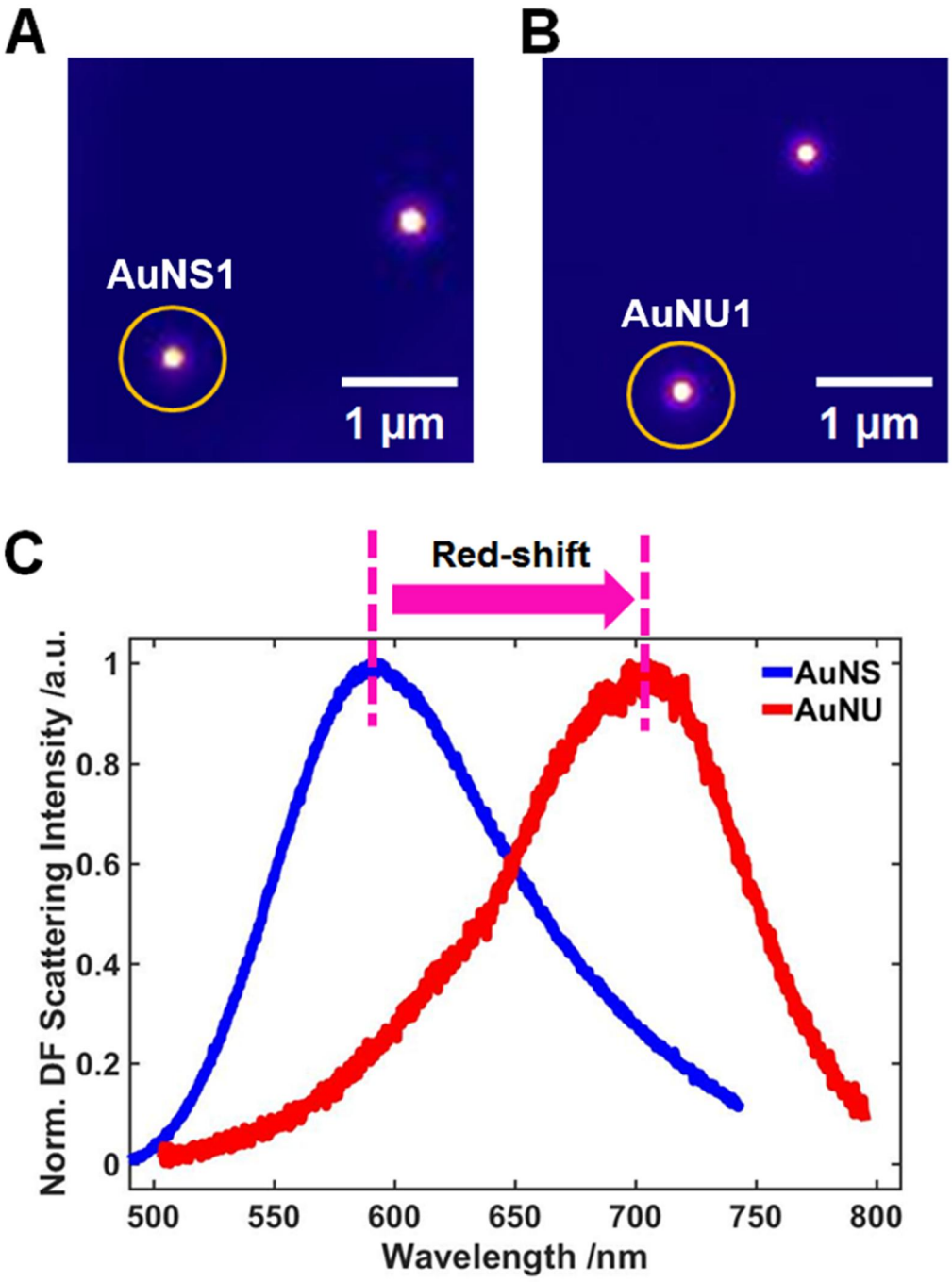


그림 9. AuNS와 AuNU의 DF 이미지 (A, B) AuNS와 AuNU의 단일 입자 산란 스펙트럼 (C)

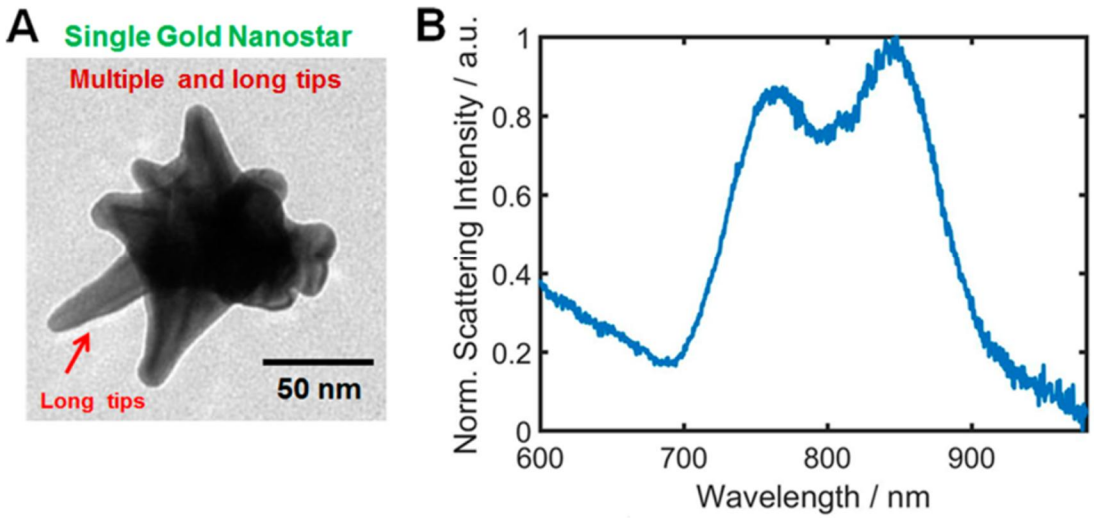


그림 10. 별 모양 금 나노 입자의 투과 전자 현미경 이미지 (A) 별 모양 금 나노 입자의 단일 입자 산란 스펙트럼 (B)

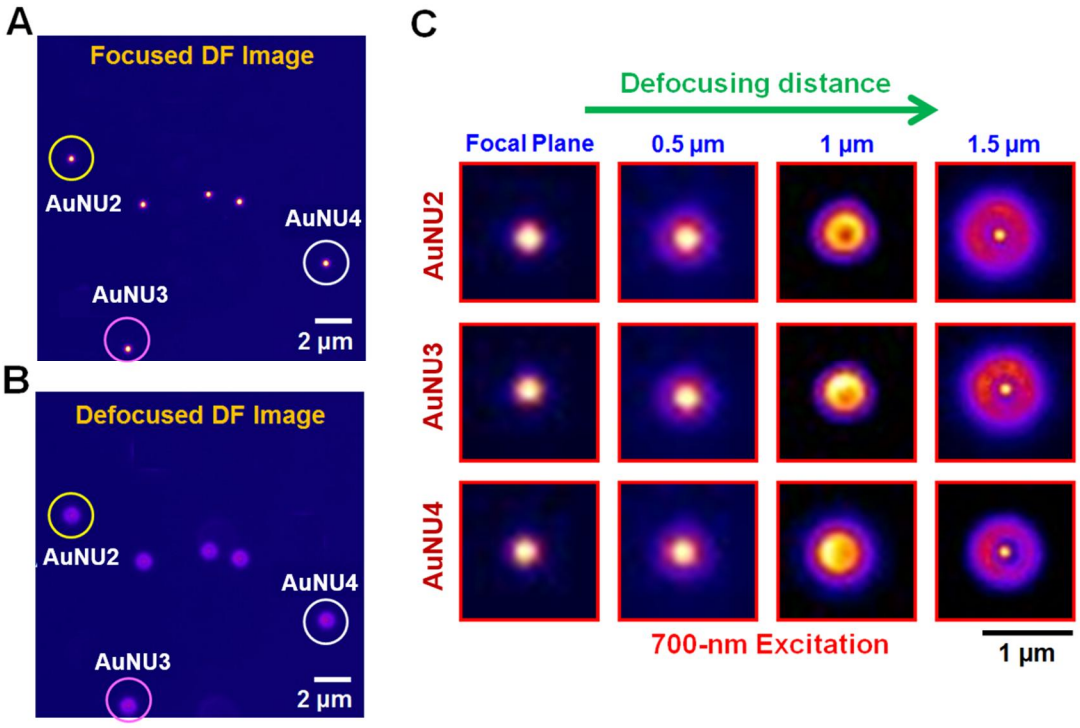


그림 11. AuNU의 DF 이미지 (A) 같은 영역에서의 비초점 DF 이미지 (B)

비초점 거리에 따른 AuNU의 비초점 산란 패턴 이미지 (C)

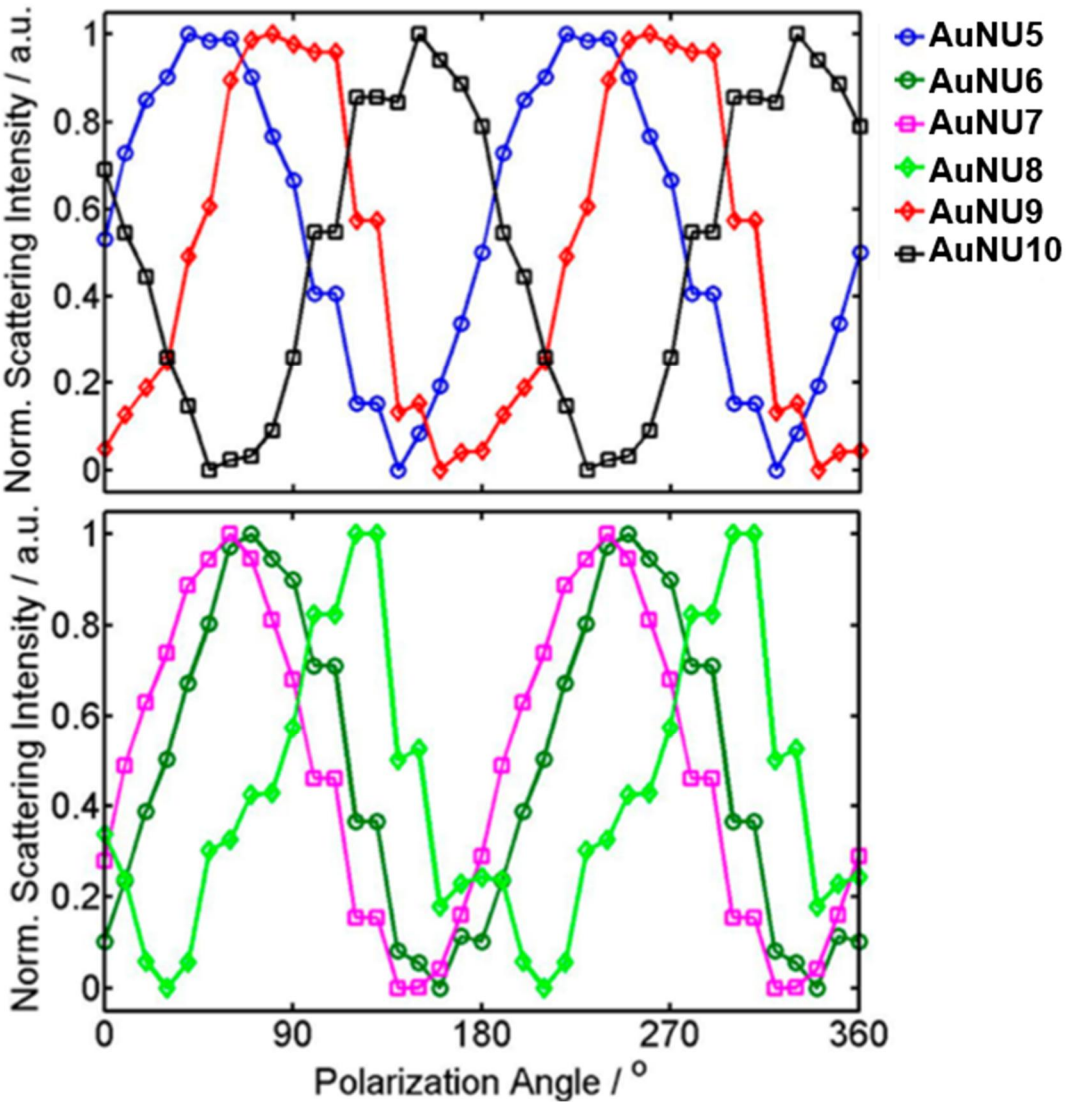


그림 12. 단일 AuNU의 DF 편광 의존 산란 세기 변화

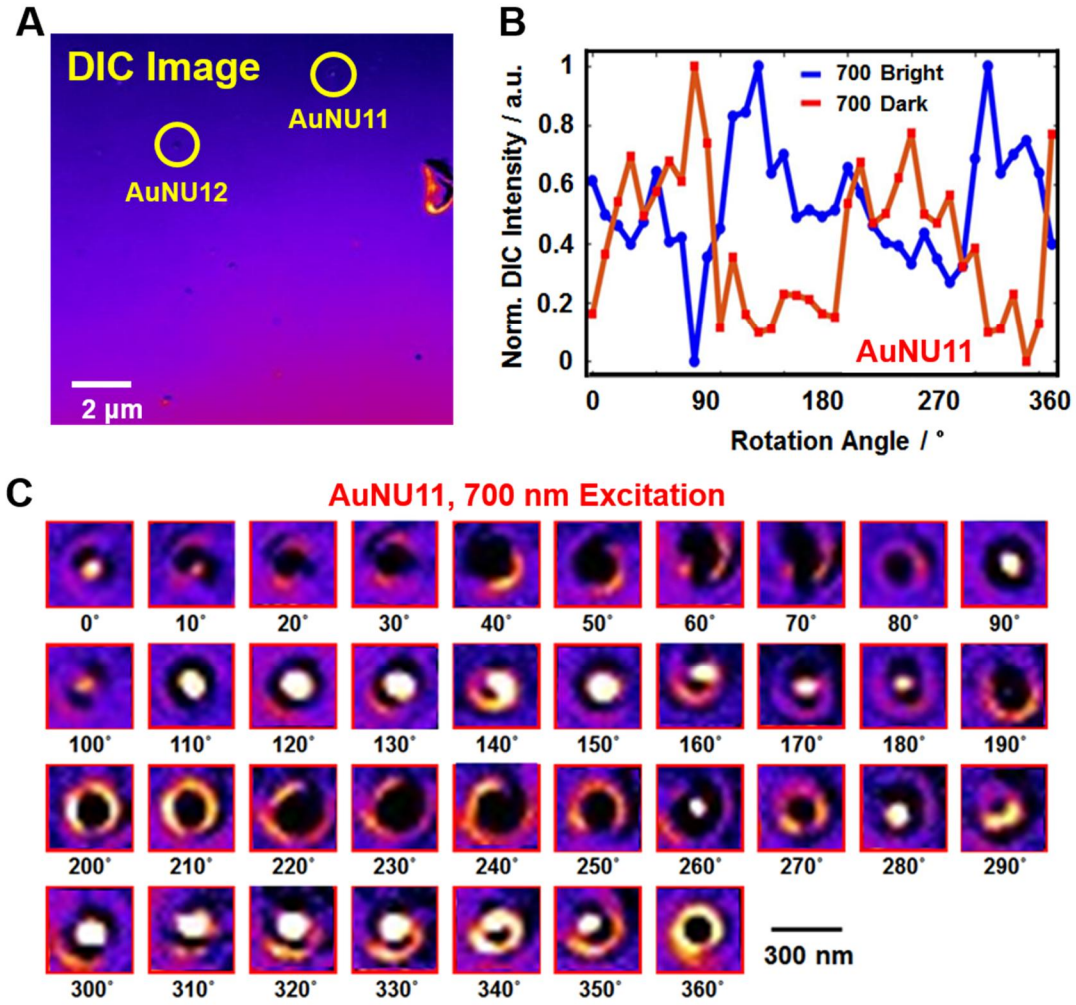


그림 13. AuNU의 DIC 이미지 (A) AuNU11의 DIC 신호 세기의 변화 (B) AuNU11를 10° 간격으로 회전시켜 얻은 DIC 이미지 패턴의 변화

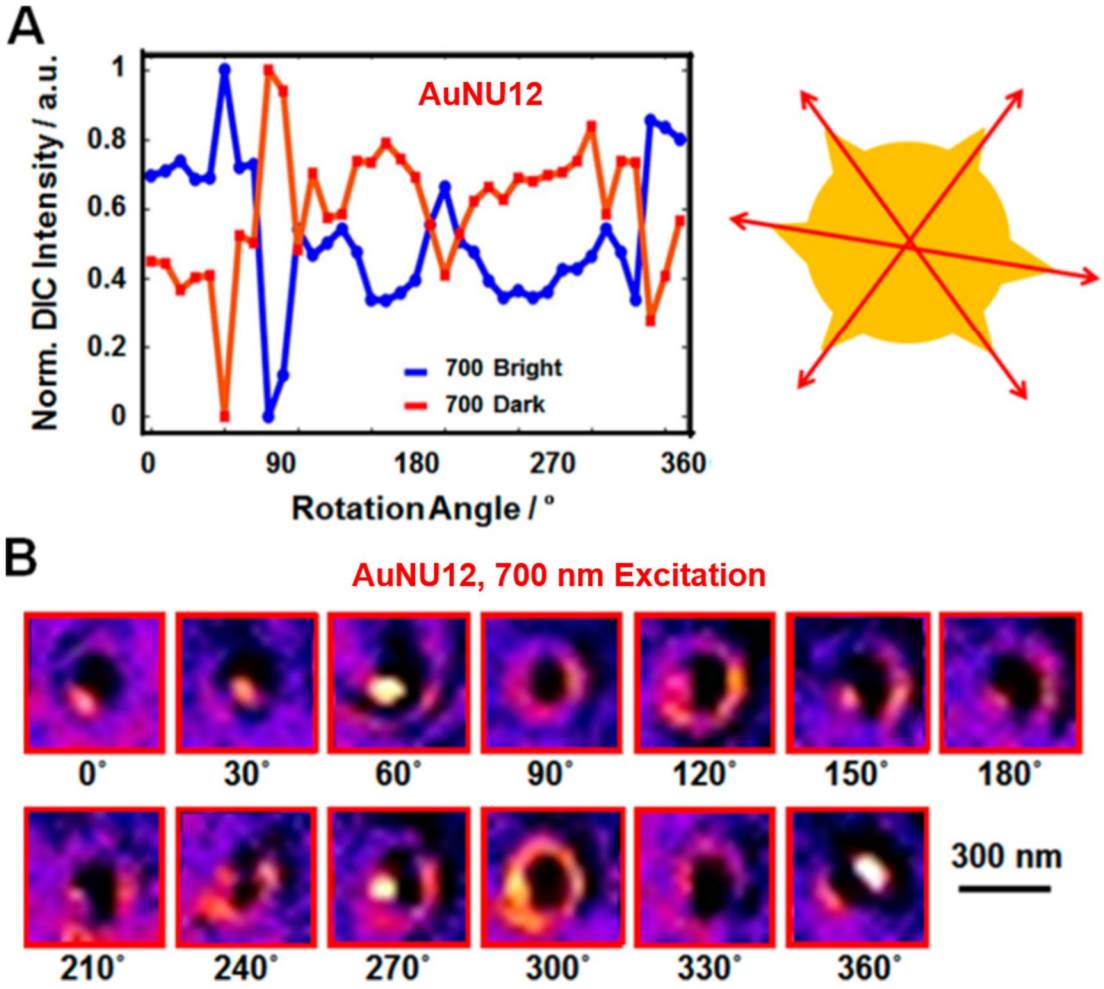


그림 14. AuNU12을 10° 간격으로 회전시켜 얻은 DIC 이미지 패턴의 변화 (A) AuNU12의 DIC 신호 세기의 변화 (B)

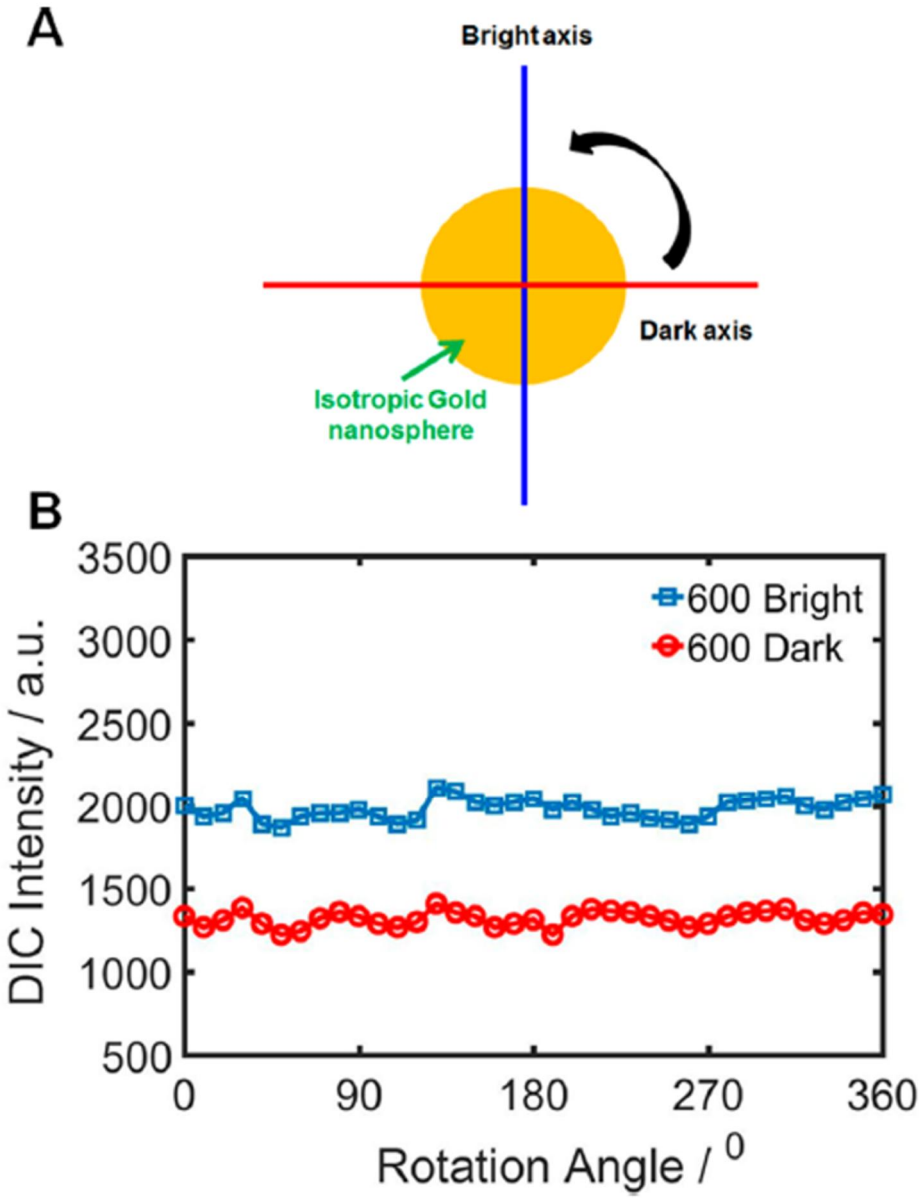


그림 15. AuNS의 rotational study 모식도 (A) AuNS의 회전 각에 따른 DIC 신호 세기 변화

3.4. 단일 금 나노 입자의 모양과 표적 물질의 Electrophilicity 에 따른 LSPR 피크 이동의 분석

도식 3A 의 p-ATP 의 아미노기는 강한 electron donating group (EDG)이고, 반면에 p-NTP 의 나이트로기는 강한 electron withdrawing group (EWG)이다. 싸이올 그룹은 도식 3B 에서 볼 수 있는 것과 같이 금과 강한 결합을 형성한다. 이 실험에서는 에탄올 매질의 AuNS 와 AuNU, p-ATP-AuNS, p-ATP-AuNU, p-NTP-AuNS, p-NTP-AuNU 6 종류의 샘플이 사용되었고, p-ATP 와 p-NTP 가 나노 입자와 반응을 완전히 끝낼 수 있도록 싸이올 용액을 주입하고 30 분간 기다린 후에 측정을 진행하였다.

먼저 AuNS 와 AuNU 의 구조 확인을 위하여 주사 전자 현미경을 사용하여, 이미지를 얻었다. AuNS 는 그림 16A 에서 볼 수 있는 것과 같이 표면이 매끄러운 것을 볼 수 있다. 그러나 그림 16B 에서 볼 수 있는 AuNS 는 표면에 짧고 뾰족한 팁이 붙어있어 표면이 거칠고 hot spot 이 생성될 수 있기 때문에, AuNS 보다 더 많은 양의 싸이올 분자와 빠른 속도로 결합을 형성한다.

그림 17 은 각 샘플에서 얻어진 DF 이미지를 보여주고 있다. 각 샘플에서 노란색으로 표시된 단일 나노 입자로부터 DF 산란 스펙트럼을 얻었고, 해당 입자로부터 얻은 DF 산란 스펙트럼은 그림 20A 와 B 에서

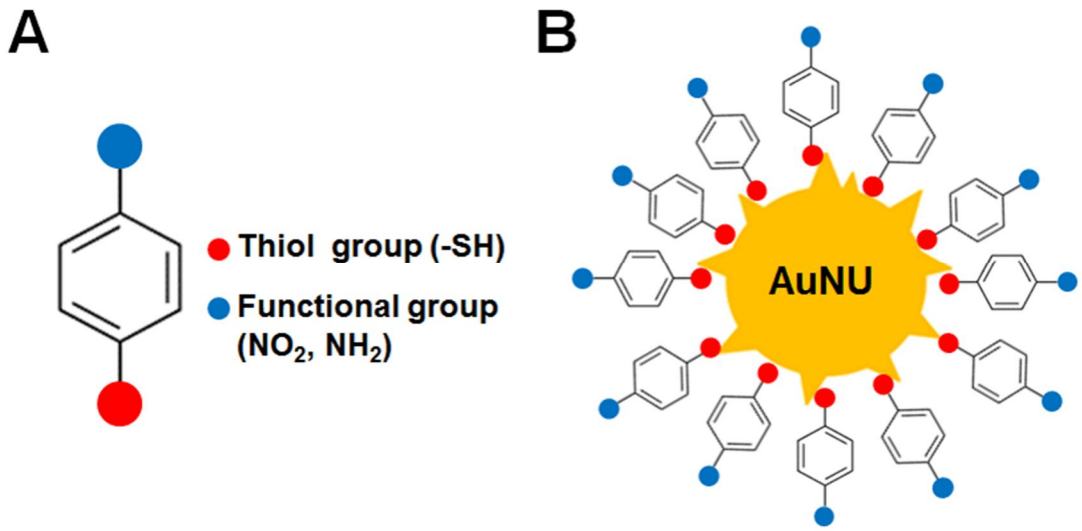
확인 할 수 있다. 각 AuNS 샘플 별로 무작위로 15 개의 단일 입자를 선택하여, DF 산란 스펙트럼을 얻은 후 그림 18 에 나타내었다. 보통의 AuNS 의 LSPR 파장은 평균 594 nm 에서 나타나고, p-ATP 와 p-NTP 가 붙은 경우 각각 598 nm 와 604nm 정도에서 나타난다.

AuNU 샘플 또한 마찬가지로 각 샘플에 대해 15 개씩 무작위로 선택하여 DF 산란 스펙트럼을 얻고, 평균 LSPR 피크 위치를 계산했다. 각각의 DF 산란 스펙트럼은 그림 19 에서 볼 수 있다. 보통의 AuNU 는 696 nm 에서 LSPR 피크가 나타나고 p-ATP 와 p-NTP 는 각각 769 nm 와 784 nm 에서 나타났다. AuNS 의 LSPR 피크는 나타나는 위치가 균일한 반면에, AuNU 는 나타나는 범위가 넓고, 스펙트럼의 모양도 불규칙했다.

그림 17 에서 노란색 사각형으로 표시된 나노 입자로부터 얻은 단일 입자 산란 스펙트럼을 그림 20A, B 에서 보여주고 있다. 보통 AuNS 보다 싸이올 분자가 코팅되었을 때, 그리고 electrophilicity 가 더 높은 싸이올 분자가 코팅되었을 때 더 큰 red-shift 를 보임을 확인했다. AuNU 도 AuNS 와 같이 싸이올 코팅에 의해 red-shift 가 되었을 뿐만 아니라, 싸이올의 흡착에 민감하게 반응하여, AuNS 보다 더 큰 red-shift 를 보임을 그림 20C 에서 확인 할 수 있다. AuNS 와 AuNU 의 red-shift 정도는 그림 20D 에서 직접적으로 비교 할 수 있다. 이 결과는 단일 AuNU 가

바이오 물질을 검출하는 LSPR 센서로 사용 될 수 있는 잠재력을 뒷받침한다.

단일 AuNU가 LSPR 바이오 센서로 사용될 수 있는 잠재력을 나타내기 위해, 싸이올 분자와 AuNU의 결합하여 발생하는 LSPR 피크의 red-shift를 실시간으로 관찰하여 그림 21A에 나타내었다. 측정이 진행됨에 따라 AuNU의 LSPR 피크가 조금씩 red-shift하는 것을 볼 수 있다. 그림 21B는 시간에 따라 LSPR 피크가 red-shift되는 거리를 보여주고 있다. 이 실험을 통하여 단일 AuNU 입자를 이용하여 싸이올 분자를 LSPR 피크의 red-shift를 이용하여 검출해낼 수 있음을 보였다.



도식 4. 실험에서 사용된 표적 물질 (A) AuNU에 흡착된 표적 물질의 모식도 (B)

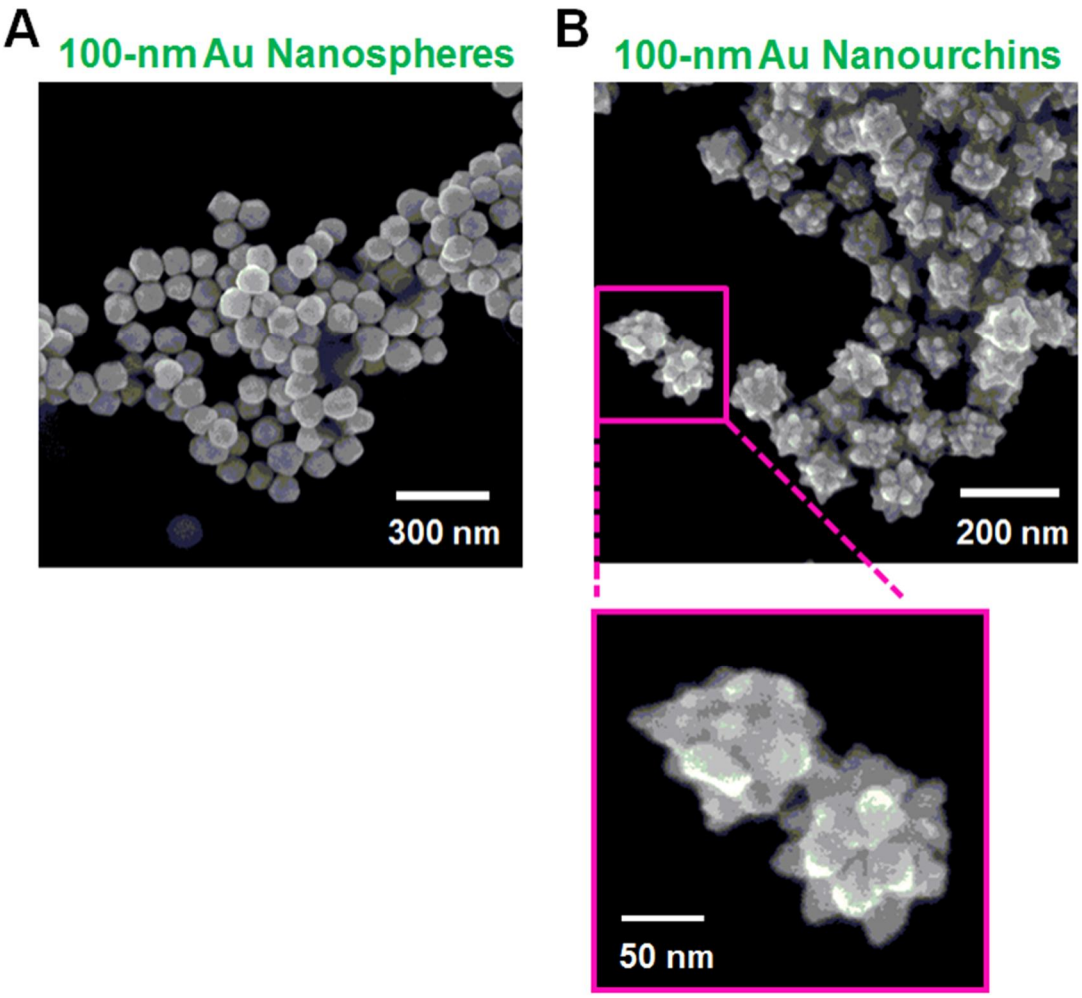


그림 16. 100-nm AuNS의 주사 전자 현미경 이미지 (A) 100-nm AuNU의 주사 전자 현미경 이미지와 확대된 이미지(B)

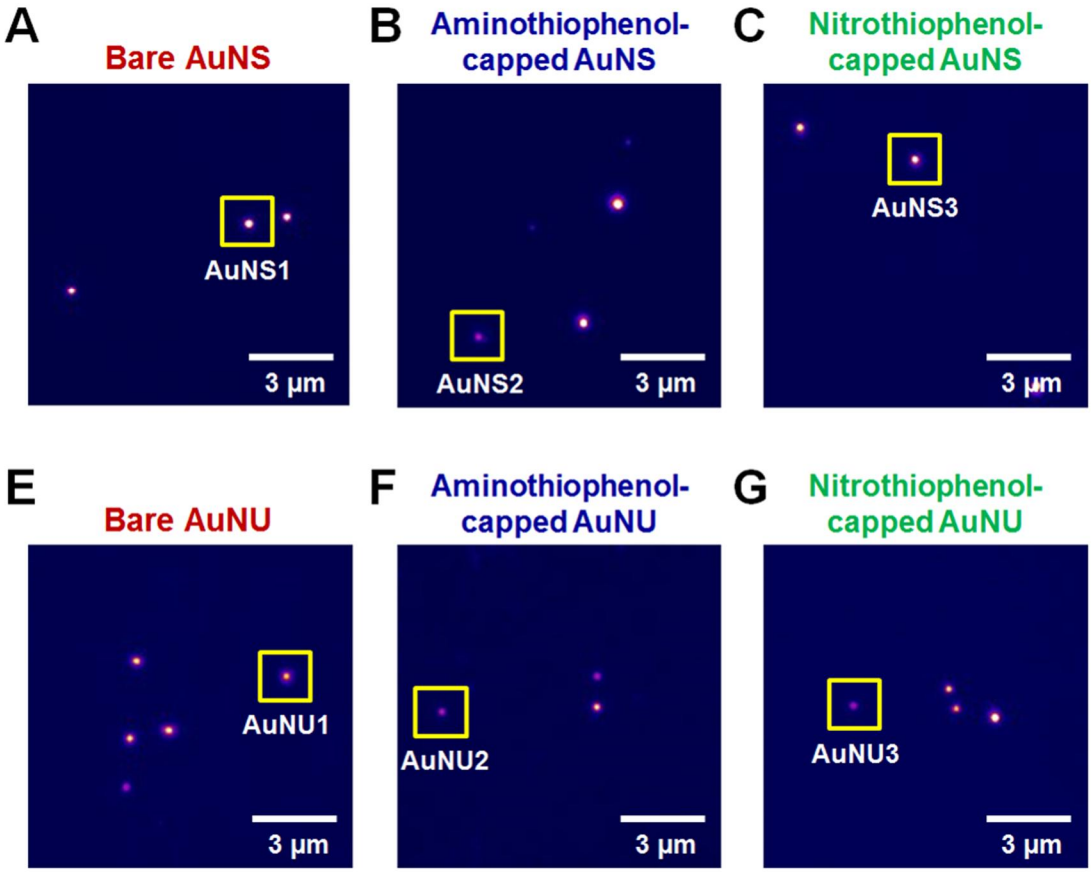


그림 17. AuNS와 표적 물질이 흡착된 AuNS의 DF 이미지 (A, B, C) AuNU와 표적 물질이 흡착된 AuNU의 DF 이미지 (D, F, G)

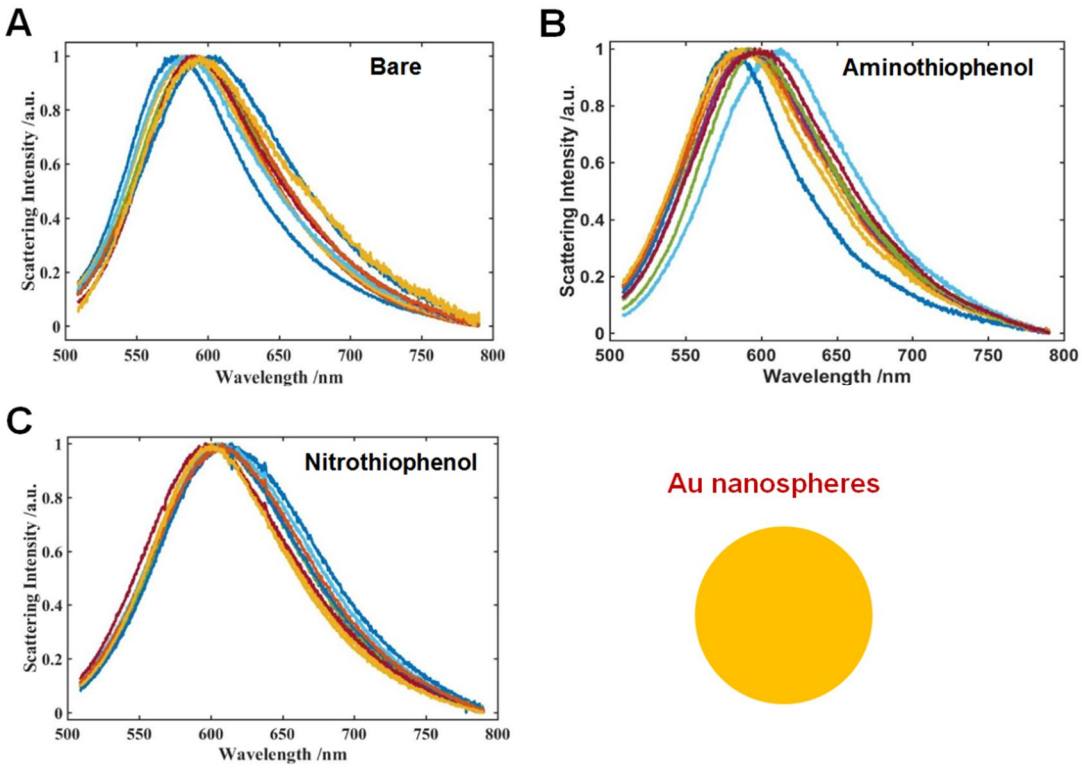


그림 18. 15개 서로 다른 AuNS의 단일 입자 산란 스펙트럼 (A) p-ATP가 흡착된 AuNS의 단일 입자 산란 스펙트럼 (B) p-NTP가 흡착된 AuNS의 단일 입자 산란 스펙트럼(C)

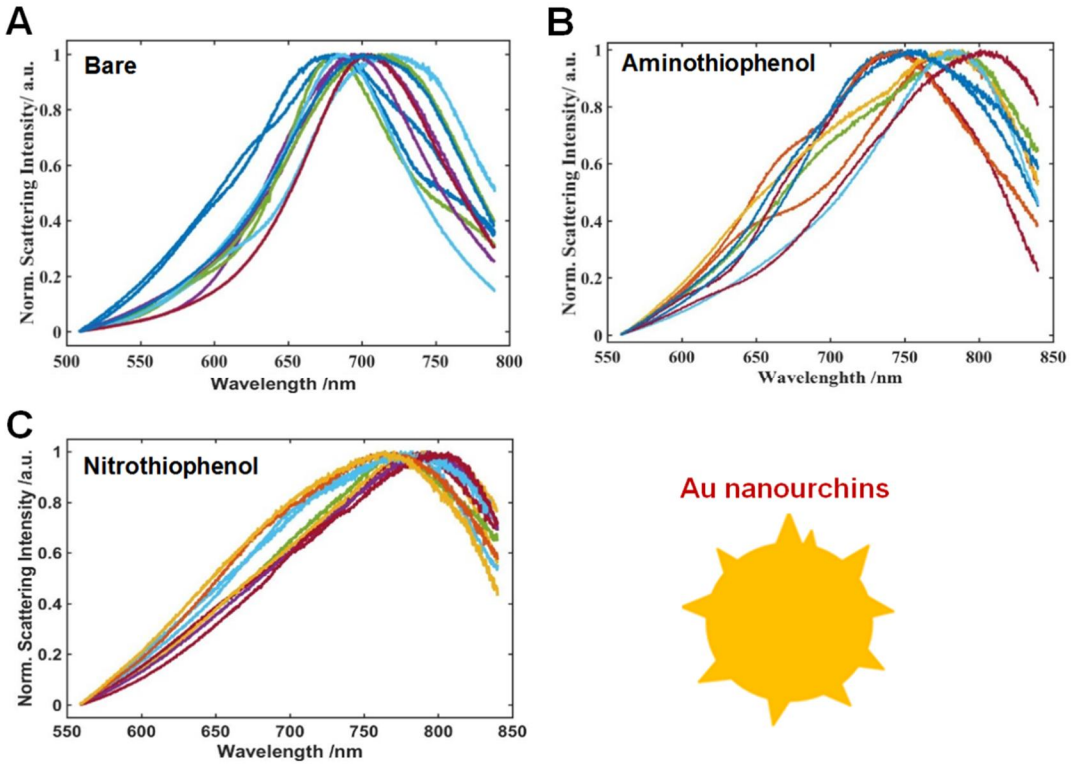


그림 19. 15개 서로 다른 AuNU의 단일 입자 산란 스펙트럼 (A) p-ATP가 흡착된 AuNU의 단일입자 산란 스펙트럼 (B) p-NTP가 흡착된 AuNU의 단일 입자 산란 스펙트럼(C)

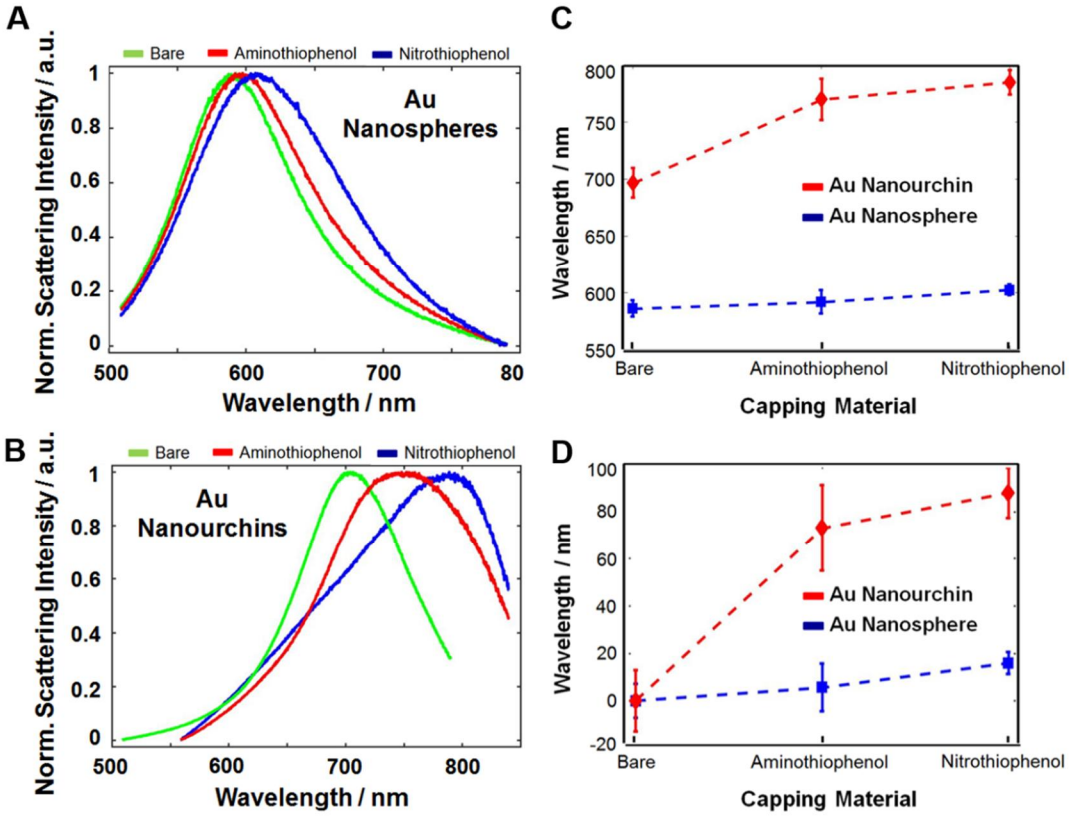


그림 20. 표적 물질의 electrophilicity에 따른 LSPR 피크의 이동 (A, B) 각 나노 입자의 LSPR 파장의 평균 (C) 각 나노 입자의 평균 LSPR 피크 이동 거리 (D)

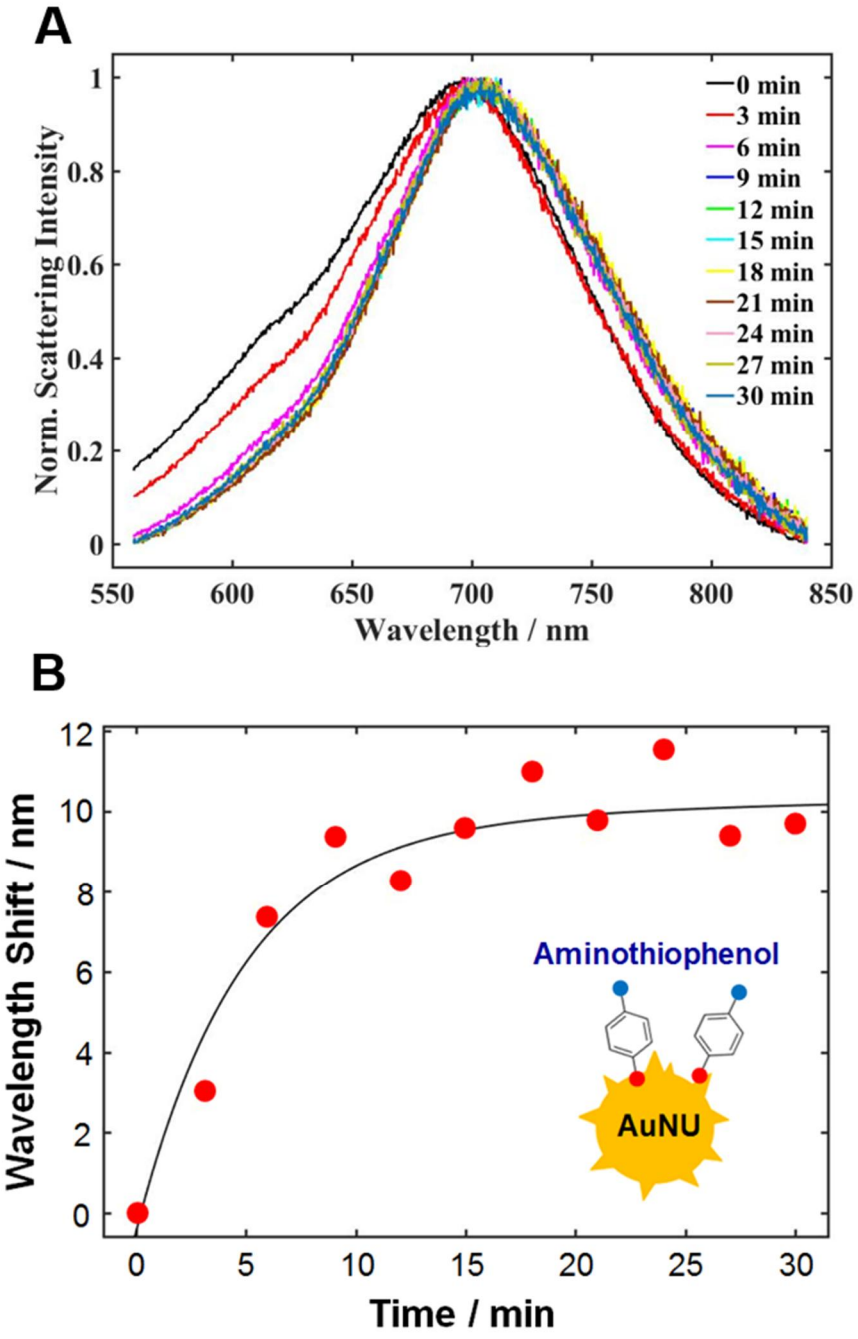


그림 21. p-ATP 주입 후 시간에 따른 AuNU의 LSPR 파장의 이동 (A) AuNU의 LSPR 파장의 변화를 기반으로 한 LSPR 바이오 센서의 시연

제 4장 결론

본 연구에서는 DIC 현미경과 DF 현미경을 이용하여, 금 나노 입자의 광학적 특성을 분석하고, 특히 비등방성 모양에 의해 발생하는 편광 의존성 광 특성을 규명하였다. Pt-AuNR은 백금 클러스터에 의한 코팅 때문에 발생하는 강한 플라즈몬 감쇄 현상 때문에, DF 현미경을 이용하여 광 특성을 분석하는데 어려움이 있다. 그러나 간섭 기반의 DIC 현미경을 이용하면 훨씬 높은 명암과 감도로 단일 Pt-AuNR의 이미지를 얻을 수 있었다. 이어서, 단일 입자 회전 추적 기술을 이용하여 DIC 현미경 하에서 Pt-AuNR가 신뢰 할만한 배향 탐침으로 사용될 수 있음을 증명했다. 뿐만 아니라 Pt-AuNR은 bimetallic nanoparticle로 촉매로 사용될 수 있기 때문에, 다기능성 광학 탐침으로 사용 할 수 있는 가능성을 제시하였다.

이어지는 연구에서는 성게와 같이 표면에 뾰족한 팁이 다수 붙어있는 나노 입자를 구형의 나노 입자와 비교 분석하면서 뾰족한 팁에 의해 나타나는 광학적 특성을 밝혀내고자 하였다. 먼저 단일 입자 산란 스펙트럼에서 AuNU가 같은 크기의 AuNS보다 약 100 nm red-shift 되는 것을 확인했으며, 비초점 산란 이미지에서 짧은 팁의 공간상 배향에 따른 특징적인 패턴을 발견할 수 있었다. 이어서 편광된 빛을 회전시키면서 DF 산란 이미지를 얻은 결과, AuNU가 편광 의존성 광 특성을 지니고

있고, 700 nm SPR 파장의 빛이 조사되었을 때, AuNU의 산란 신호가 매우 분극화되어 있음을 확인했다. 관찰된 산란 세기의 편광 의존성은 단일 AuNU의 표면 플라즈몬 공진이 단일 쌍극자 산란자로서 거동함을 나타낸다. 다음으로 DIC 현미경을 이용한 rotational study에서는 700 nm 파장에서 AuNU 표면의 팁에 의해 여러 방향으로 단일 쌍극자가 발생하기 때문에 DIC 신호의 세기가 불규칙하게 변하도록 영향을 받는다. 이 결과는 DIC 현미경 검사에서 뾰족한 팁에 의해 나타나는 편광 의존성 간섭 특성을 더 명확하게 해준다.

마지막으로 AuNU 단일 입자를 DF 현미경 및 분광법을 이용해, LSPR 바이오센서로의 응용을 테스트 하였다. 뾰족한 팁을 갖는 AuNU는 비슷한 크기의 AuNS보다 더 높은 감도를 나타냈다. 금 나노 입자의 LSPR 피크는 나노 입자 표면에 부착된 싸이올 그룹의 electrophilicity에 영향을 받아, EWG 그룹이 더 큰 red-shift를 발생시켰다. 1 μM의 p-ATP를 주입한 이후로 실시간으로 측정된 LSPR 피크의 red-shift를 통해 AuNU가 매우 민감한 LSPR 센서로 사용될 수 있는 잠재력을 증명하였다.

제 5장 참고 문헌

[1] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz, "The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment," *The Journal of Physical Chemistry B,* vol. 107, no. 3, pp. 668-677, 2003/01/01 2003.

[2] G. Schmid and U. Simon, "Gold nanoparticles: assembly and electrical properties in 1-3 dimensions," *Chemical Communications,* 10.1039/B411696H no. 6, pp. 697-710, 2005.

[3] H. Hori, T. Teranishi, Y. Nakae, Y. Seino, M. Miyake, and S. Yamada, "Anomalous magnetic polarization effect of Pd and Au nano-particles," *Physics Letters A,* vol. 263, no. 4, pp. 406-410, 1999/12/06/ 1999.

[4] D. E. Mustafa, T. Yang, Z. Xuan, S. Chen, H. Tu, and A. Zhang, "Surface Plasmon Coupling Effect of Gold Nanoparticles with Different Shape and Size on Conventional Surface Plasmon Resonance Signal," *Plasmonics,* journal article vol. 5, no. 3, pp. 221-231, September 01 2010.

[5] Q. Zhang *et al.*, "Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer-Targeted and Controlled Drug Delivery," *Advanced Functional Materials,* vol. 22, no. 24, pp. 5144-5156, 2012.

[6] W. Sun *et al.*, "Endocytosis of a single mesoporous silica nanoparticle into a human lung cancer cell observed by differential interference contrast microscopy," *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* vol. 391, no. 6, p. 2119, 2008/05/17 2008.

[7] M. Xuan, J. Shao, L. Dai, J. Li, and Q. He, "Macrophage Cell Membrane Camouflaged Au Nanoshells for in Vivo Prolonged Circulation Life and Enhanced Cancer Photothermal Therapy," *ACS Applied Materials & Interfaces,* vol. 8, no. 15, pp. 9610-9618, 2016/04/20 2016.

[8] X. Wu, T. Ming, X. Wang, P. Wang, J. Wang, and J. Chen, "High-Photoluminescence-Yield Gold Nanocubes: For Cell Imaging and Photothermal Therapy," *ACS Nano,* vol. 4, no. 1, pp. 113-120, 2010/01/26 2010.

[9] N. Nath and A. Chilkoti, "Label-Free Biosensing by Surface Plasmon Resonance of Nanoparticles on Glass: Optimization of Nanoparticle Size," *Analytical Chemistry,* vol. 76, no. 18, pp. 5370-5378, 2004/09/01 2004.

[10] R. C. Jorgenson and S. S. Yee, "A fiber-optic chemical sensor based on surface plasmon resonance," *Sensors and Actuators B: Chemical,* vol. 12, no. 3, pp. 213-220, 1993/04/15/ 1993.

[11] E. M. Larsson, J. Alegret, M. Käll, and D. S. Sutherland, "Sensing Characteristics of NIR Localized Surface Plasmon Resonances in Gold Nanorings for Application as Ultrasensitive Biosensors," *Nano Letters,* vol. 7, no. 5, pp. 1256-1263, 2007/05/01 2007.

[12] J. Won Ha, W. Sun, G. Wang, and N. Fang, "Differential interference contrast polarization anisotropy for tracking rotational dynamics of gold nanorods," *Chemical Communications,* 10.1039/C1CC11679G vol. 47, no. 27, pp. 7743-7745, 2011.

[13] C. Sönnichsen and A. P. Alivisatos, "Gold Nanorods as Novel Nonbleaching Plasmon-Based Orientation Sensors for Polarized Single-Particle Microscopy," *Nano Letters,* vol. 5, no. 2, pp. 301-304, 2005/02/01 2005.

[14] H. Yuan, A. M. Fales, C. G. Khoury, J. Liu, and T. Vo-Dinh, "Spectral characterization and intracellular detection of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)-encoded plasmonic gold nanostars," *Journal of Raman Spectroscopy,* vol. 44, no. 2, pp. 234-239, 2013.

[15] J. Xie, Q. Zhang, J. Y. Lee, and D. I. C. Wang, "The Synthesis of SERS-Active Gold Nanoflower Tags for In Vivo Applications," *ACS Nano,* vol. 2, no. 12, pp. 2473-2480, 2008/12/23 2008.

[16] J. Olson, S. Dominguez-Medina, A. Hoggard, L.-Y. Wang, W.-S. Chang, and S. Link, "Optical characterization of single plasmonic nanoparticles," *Chemical Society Reviews,* 10.1039/C4CS00131A vol. 44, no. 1, pp. 40-57, 2015.

[17] T. Zhang *et al.*, "Single Bipyramid Plasmonic Antenna Orientation Determined by Direct Photoluminescence Pattern Imaging," *Advanced Optical Materials,* vol. 1, no. 4, pp. 335-342, 2013.

[18] J. Huang, P. Yu, C.-T. Yuan, H.-C. Ko, J. Tang, and T.-S. Hsieh, "Single-particle studies of the plasmonic fluorescence in gold nanocubes," 2012, vol. 6, p. 7: SPIE.

[19] C. L. Nehl, N. K. Grady, G. P. Goodrich, F. Tam, N. J. Halas, and J. H. Hafner, "Scattering Spectra of Single Gold Nanoshells," *Nano Letters,* vol. 4,

no. 12, pp. 2355-2359, 2004/12/01 2004.

[20] W.-S. Chang, J. W. Ha, L. S. Slaughter, and S. Link, "Plasmonic nanorod absorbers as orientation sensors," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 107, no. 7, pp. 2781-2786, February 16, 2010 2010.

[21] K. Marchuk and N. Fang, "Three-Dimensional Orientation Determination of Stationary Anisotropic Nanoparticles with Sub-Degree Precision under Total Internal Reflection Scattering Microscopy," *Nano Letters,* vol. 13, no. 11, pp. 5414-5419, 2013/11/13 2013.

[22] H. Xu and M. Käll, "Polarization-Dependent Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Isolated Silver Nanoaggregates," *ChemPhysChem,* vol. 4, no. 9, pp. 1001-1005, 2003.

[23] T. Shegai, B. Brian, V. D. Miljković, and M. Käll, "Angular Distribution of Surface-Enhanced Raman Scattering from Individual Au Nanoparticle Aggregates," *ACS Nano,* vol. 5, no. 3, pp. 2036-2041, 2011/03/22 2011.

[24] E. Toprak *et al.*, "Defocused orientation and position imaging (DOPI) of myosin V," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 103, no. 17, pp. 6495-6499, April 25, 2006 2006.

[25] L. Xiao, Y. Qiao, Y. He, and E. S. Yeung, "Three Dimensional Orientational Imaging of Nanoparticles with Darkfield Microscopy," *Analytical Chemistry,* vol. 82, no. 12, pp. 5268-5274, 2010/06/15 2010.

[26] P. Selid, H. Xu, E. M. Collins, M. Striped Face-Collins, and J. X. Zhao, "Sensing Mercury for Biomedical and Environmental Monitoring," *Sensors,*

vol. 9, no. 7, p. 5446, 2009.

[27] A. J. Haes, L. Chang, W. L. Klein, and R. P. Van Duyne, "Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor," (in English), *Journal of the American Chemical Society,* vol. 127, no. 7, pp. 2264-2271, 2005.

[28] W. Zhou, Y. Ma, H. Yang, Y. Ding, and X. Luo, "A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma," *International Journal of Nanomedicine,* vol. 6, pp. 381-386, 03/02

02/15/received 2011.

[29] T. Endo, K. Kerman, N. Nagatani, Y. Takamura, and E. Tamiya, "Label-Free Detection of Peptide Nucleic Acid−DNA Hybridization Using Localized Surface Plasmon Resonance Based Optical Biosensor," *Analytical Chemistry,* vol. 77, no. 21, pp. 6976-6984, 2005/11/01 2005.

[30] T. M. Davis and W. David Wilson, "Surface plasmon resonance biosensor analysis of RNA-small molecule interactions," in *Methods in Enzymology*, vol. 340: Academic Press, 2001, pp. 22-51.

[31] V. Nanduri, A. K. Bhunia, S.-I. Tu, G. C. Paoli, and J. D. Brewster, "SPR biosensor for the detection of L. monocytogenes using phage-displayed antibody," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 23, no. 2, pp. 248-252, 2007/09/30/ 2007.

[32] H. S. Jang, K. N. Park, C. D. Kang, J. P. Kim, S. J. Sim, and K. S. Lee,

"Optical fiber SPR biosensor with sandwich assay for the detection of prostate specific antigen," *Optics Communications,* vol. 282, no. 14, pp. 2827-2830, 2009/07/15/ 2009.

[33] J. Jose, J.-W. Chung, B.-J. Jeon, R. M. Maas, C.-H. Nam, and J.-C. Pyun, "Escherichia coli with autodisplayed Z-domain of protein A for signal amplification of SPR biosensor," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 24, no. 5, pp. 132dd1329, 2009/01/01/ 2009.