

초소형 미세형광측정 스캐닝 시스템

김용운*, 성천야, 김호성, **이국녕, **김용권
 중앙대학교 전자전기공학부, **서울대학교 전기컴퓨터공학부

Miniature Fluorescence Detection System for Protein Chip

Kim Yong Yun*, Kim Ho Seong, Seong chun ya, **Lee Kook Nyung, **Kim yong kwon
 School of electrical & electronic engineering, Chung-Ang Univ.
 **School of Electrical Engineering and Computer Science, Seoul National University

Abstract - 광섬유, 마이크로렌즈, 마이크로 프리즘, 마이크로 스캐너로 구성된 단백질 분석용 초소형 형광측정 시스템을 설계하였다. SNR을 높이기 위해 단백질 패턴에 여기광이 수직이 아닌 비스듬하게 입사하는 구조를 제안하였으며 그 가능성을 실험적으로 확인하였다.

1. 서 론

Bio Technology에 대한 관심이 높아짐에 따라 DNA 분석, 단백질 분석에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. DNA에 관한 연구는 많은 성과를 거두어 왔고, 이미 이를 분석하기 위한 시스템도 개발되어져 있다. 하지만 질병과 직접적인 상관관계가 있는 단백질 분석을 위한 시스템은 현재 주로 Laser Scanning Confocal Microscopy 방식을 채택하고 있으며, 이와 같은 장비들은 가격이 비싸고 부피가 크기 때문에 사용하기 불편하며, 분석을 위한 시간도 오래 걸린다. 이러한 문제점들은 현재 개발되어진 MEMS 기술을 이용한 마이크로 미러와 마이크로 프리즘을 사용하여 해결되어질 수 있다[1, 2]. 본 연구에서는 초소형 단백질 칩 분석 시스템 구현에 앞서, 최적화된 마이크로 스캐닝 미러, 마이크로 프리즘, 마이크로 렌즈로 구성된 광학부를 설계하기 위해 Code V를 사용하여 시뮬레이션하고 설계된 시스템의 구현 가능성을 실험적으로 확인하였다.

2. 본 론

2.1 이론

인간의 질병을 분석하는데 있어서 중요한 요인이 되는 단백질을 분석이 가능하도록 전 처리를 하고 데이터처리까지 가능한 고 밀도로 패터닝된 Lab-on-a-chip의 제작이 MEMS나 MOEMS기술의 발달로 인해 가능해졌다. 이에 따라, 제작된 단백질 칩을 분석하기 위한 시스템의 제작이 필요하게 되었다.

고 밀도로 집적화 된 단백질 칩의 각 패턴의 단백질들은 여기광에 반응하여 발광하는 형광물질을 부착하고 있다. 여기에 여기광을 주사하여, 발광되어 나오는 빛을 검출함으로써 단백질의 종류와 그 양을 알아낼 수 있다. 이러한 시스템의 광학부를 설계하는데 있어서는 다음과 같은 세 가지의 제약조건이 따르게 된다. 첫째로, 단백질 패턴에서의 여기광의 크기가, 패턴의 최대면적을 주사 할 수 있어야 한다. 둘째로, 여기광은 패턴을 주사한 이후에 형광물질의 발광과 구별되어 디텍터에 입사되지 않아야 한다. (SNR : 8×10^{-3}). 셋째로, 단백질에 부착되어 있는 형광물질에서 나온 빛은 디텍터에서 최대한 많은 양을 받아들일 수 있어야 한다.

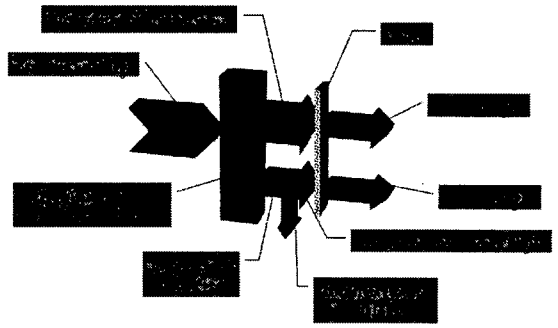


그림 1. Detection principle

그림 1은 형광측정이론의 모식도이다[1]. 형광물질에 입사된 여기광의 일부는 그대로 투과되고 일부는 형광에 기여하게 된다. 여기서 그대로 투과된 여기광은 노이즈가 되어 형광검출에 영향을 주게 된다.

Beer-Lambert의 법칙에 의하면, 형광물질에 의한 여기광의 흡수율은 식 (1)과 같다.

$$A = \log \frac{I_T}{I_0} = \epsilon lc \quad \dots\dots\text{식 (1)}$$

형광의 세기는 흡수되는 여기광에 비례하게 되므로 식 (2)과 같이 된다.

$$I_F = \phi I_0(1 - 10^{-A}) \quad \dots\dots\text{식 (2)}$$

그러므로 흡수되지 않고 그대로 투과되는 빛과 형광의 비는 다음 식 (3)과 같다.

$$\frac{I_F}{I_T} = \phi(10^A - 1) \quad \dots\dots\text{식 (3)}$$

여기에 quantum yield, 삽입하는 필터의 특성, NA를 고려하여, SNR을 계산하면 식 (4)과 같이 된다.

$$\frac{I_S}{I_N} = \phi(10^A - 1)10^{OD(e) - OD(f)} \frac{1 - (1 - NA^2/n^2)^{1/2}}{2} \quad \dots\dots\text{식 (4)}$$

10nm의 Cy5의 경우 NA가 0.3일 경우, SNR은 8×10^{-3} 정도가 되며, 이 값은 너무 작아 형광검출이 어렵게 된다.

이러한 제약조건들을 해결하기 위해, 여기광이 angular separation을 가지게 하여, 형광과 구별되게 함으로서, SNR을 높일 수 있는 광학 시스템을 설계하였다.

2.2 시스템 설계 및 시뮬레이션

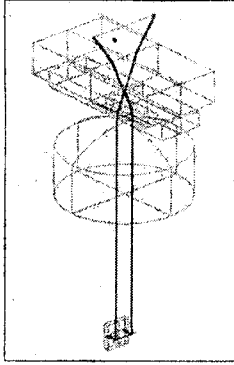


그림 2. 전체 시스템

Code V를 사용하여 설계된 시스템은, 광섬유에 의해 scanning mirror로 주사되어 지는 빔이 마이크로 프리즘을 통해 각 패턴으로 입사하게 되며, 형광 물질과 반응한 후에 검출영역 바깥으로 나가게 된다. 그림 2는 전체적인 시스템을 나타낸 것이다. 시뮬레이션에 사용된 레이저는 Cy5의 여기를 위해 파장이 638.9nm인 레이저 다이오드를 사용하였다. 이 시스템은 크게 두 부분으로 나누어 생각할 수 있다.

첫째는 빔을 쏘아주는 광섬유를 고정하는 부분이다. 기존의 광섬유와 구형렌즈를 이용한 정렬방식은 제작에 많은 어려움이 따르고, 특히 이 시스템은 약간의 오차에도 결과에 큰 차이가 있을 수 있으므로 다른 방식을 채택하였다. 즉, 그림 3과 같이 실리콘 웨이퍼에 구멍을 내고 그 위에 150 μm 의 두께로 SiO_2 의 막을 만든 후에 마이크로 렌즈를 부착한 다음 광섬유를 삽입해서 빔을 집광하는 형식이다.

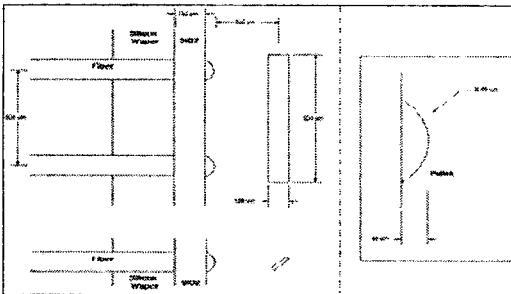


그림 3. 광섬유 마운트

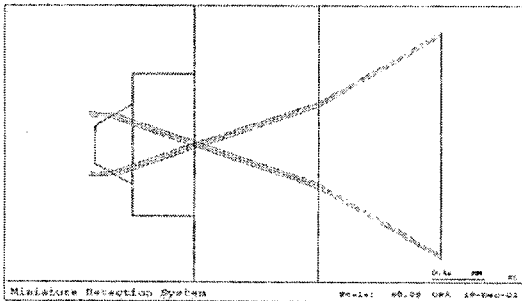


그림 4. 마이크로프리즘에 의한 여기광의 집속

둘째는, 마이크로 프리즘을 사용해 패턴에 빔을 주사하는 부분이다. 그림 4에서와 같이 마이크로 프리즘에 입사된 두 빔은 분석할 패턴이 있는 부분에서 교차하여 형

광물질에 집속되고, 양쪽으로 갈라져서 진행하므로 여기광에 의한 노이즈를 최대한 줄이도록 설계되었다. 아래 그림 5는 스캐닝 미러를 -8° 에서 $+8^\circ$ 까지 스캔 했을 때를 시뮬레이션 한 결과이다. 중심 부분에서는 렌즈를 통과한 후 각 패턴에서 수직이 되지만, 가장자리를 통과하는 경우 각 패턴에서 수직이 되지 않음을 알 수 있다. 또한, 중심에서 1.5mm범위 내에서는 단백질 패턴에서 두 빔이 겹치지만, 그 스캔각이 그 이상이 되면 패턴에서 두 빔이 벌어짐을 볼 수 있었다. 광섬유의 마운트와 마이크로 프리즘의 물질로는 PMMA를 사용하였으며, 굴절률은 1.491이다.

설계된 시스템으로 시뮬레이션 한 결과, 단백질 패턴에서의 빔의 크기는 직경 $174 \times 108 \mu\text{m}$ 이고, 디텍터가 위치하는 자리에서 두 빔의 중심 간격이 2.23mm 떨어져 있었다.

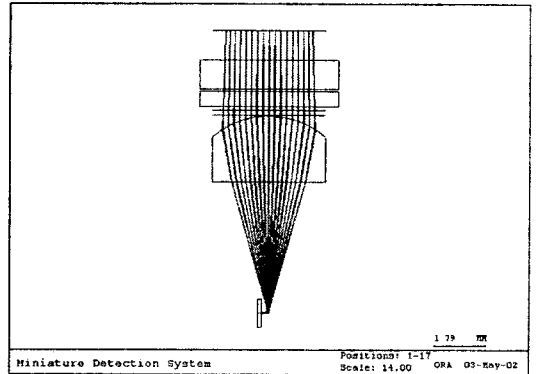


그림 5. Mirror scanning

2.3 실험결과

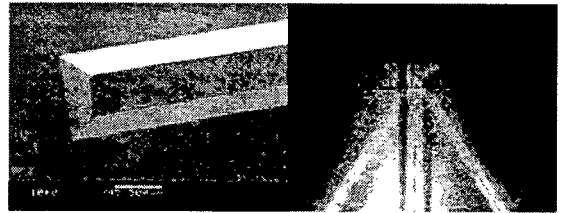


그림 6. 마이크로 프리즘

그림 6은 MEMS공정을 이용하여 제작한 마이크로 프리즘이다. 프리즘은 PMMA로 제작되었으며 Code V를 이용한 설계에서 빛의 투과 각이 33.15° 이었고, 실험에서 측정된 투과 각은 32.64° 이었으며, 거의 설계대로 제작되었음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 설계된 초소형 형광측정시스템의 목적은 분석해야 할 패턴에 여기광을 비스듬하게 입사시켜, Detector에서 측정하고자 하는 형광과 여기광을 분리시켜 SNR를 높이고자 하는 것이다. 이 가능성을 시험해 보기 위해 다음 그림 7과 같이 광학계를 구성하여 실험을 해 보았다.

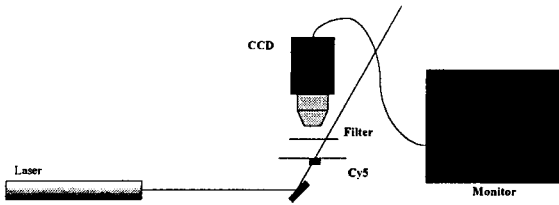


그림 7. 실험 세팅

여기광으로 15mW, 638.9nm의 레이저 다이오드를 사용하여 직경이 약 200 μ m이고, 농도가 각각 1 μ g/ml, 500ng/ml, 100ng/ml, 50ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml인 Cy5가 부착된 단백질 패턴에 집속하여 보았다. 그림 8은 저조도 칼라 CCD를 사용하여 획득한 형광의 사진이며 이미지 프로세싱 소프트웨어를 사용하여 밝기를 측정하였다.

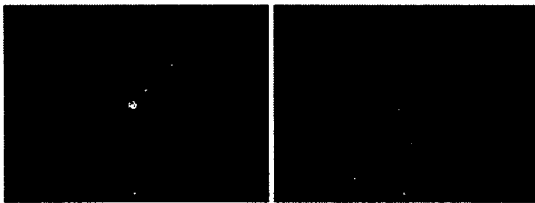


그림 8. 1 μ g/ml(좌), 100ng/ml(우)에서의 형광

단백질의 농도와 형광의 세기의 관계는 그림 9에 도시하였으며 200ng/ml 이상의 범위에서 선형적으로 변함을 알 수 있었다. 그래프를 보면 200ng/ml이하의 영역에서 다시 밝아지는 것을 볼 수 있는데, 이것은 Cy5의 농도가 낮아져 레이저가 흡수되지 않고 투과하는 양이 많아져서 SNR이 낮아진 결과라고 생각되어지며 더욱 정밀한 실험을 수행할 계획이다.

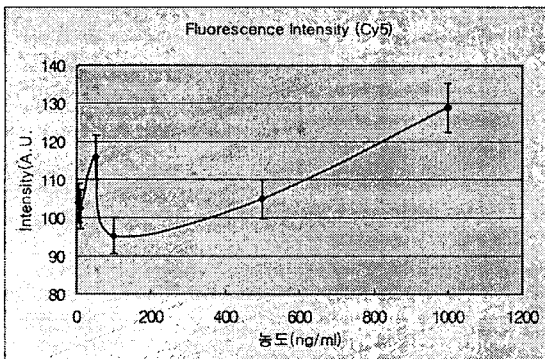


그림 9. 단백질 농도에 따른 형광의 세기변화

실험의 결과, 기존의 Laser Scanning Confocal Microscopy방식이 아닌 oblique incident 방식으로도 형광 측정이 가능함을 알 수 있었다.

3. 결 론

본 논문에서는 단백질 분석용 초소형 형광측정 시스템을 설계하였고, SNR을 높이기 위해 단백질 패턴에 여기광이 수직이 아니라 비스듬하게 입사하는 구조를 제안하였으며 그 가능성을 실험적으로 확인하였다. 그 결과, 200~1000ng/ml의 단백질 농도 범위에서 형광의 세기가 농도에 비례함을 알 수 있었다. 본 논문에서 제안된 방

식을 사용하면 Laser Confocal Microscopy와 같이 고가의 대형 측정기기 대신에 CCD와 MEMS기술로 제작된 초소형 광학부품을 사용한, 저가의 휴대형 단백질 분석용 형광측정기기를 제작할 수 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 초미세 생체전자 시스템 연구센터의 과제지원으로 이루어졌습니다.

(과제번호 97K4-0900-00-01-3)

[참 고 문 헌]

- [1] Jean-Christophe Roulet, Reinhard Volkel, Hans Peter Herzig, Elisabeth Verpoorte, Nico F. de Rooji Rene Dandliker "Microlens system for fluorescence detection in chemical microsystems" *Optical Engineering* May 2001.
- [2] J.C Roulet, Hans Peter Herzig, Elisabeth Verpoorte, Nico F. de Rooji Rene Dandliker "Integration of micro-optical systems for fluorescence detection in μ TAS application" *Micro Total Analysis System* 2000.