

프리즘을 이용한 소형 단백질칩 분석 형광측정 시스템 개발

최재호*, 김호성*, 이국녕**, 김은미**, 김용관**, 김병기**
 중앙대학교*, 서울대학교**

Miniature Fluorescence Detection System for Protein Chips by Prism

Jae-ho Choi*, Ho-seong Kim*, Kook-Nyung Lee**, Eun-mi Kim**, Yong-Kweon Kim**, Byung-Gee Kim**
 Chung-Ang University*, Seoul National University**

Abstract - This paper presents a miniature optical system for the fluorescence detection of the patterned protein chip. The patterned protein chip was fabricated using MEMS process. The fluorescence from the patterned protein chip was measured while varying the concentration of the BSA. The fluorescence light is separated spatially from the excitation beam using mini-size prism to increase SNR (Signal-to-Noise Ratio). The combination of prism and mirrors can convert the excitation light from the laser diode to uniform illumination on the specimen. We believe that the proposed system for fluorescence detection can be applied to realization of point-of-care.

1. 서 론

최근 들어 Bio Technology에 대한 관심이 높아짐에 따라 DNA 분석 및 단백질 분석에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 이를 위한 분석 장비 또한 많이 연구, 개발 되고 있다. 그런데 인간의 질병발현에는 DNA보다 단백질이 더욱 직접적인 관련이 있어 단백질 분석에 대한 관심이 높아지고 있다. 현재 상용화 되어있는 단백질 분석 장비들은 여기광에 비해 상대적으로 파위가 대단히 작은 형광을 여기광으로부터 분리하기 위해 광필터를 여러 개 사용하기 때문에 광 효율이 낮아지므로 파위가 큰 광원을 사용해야만 한다. 또한 여러 개의 필터를 통과하면서 파위가 작아진 형광을 측정하는 검출기로 PMT (Photo multiplier tube)를 사용하기 때문에 스캐닝이 불가피하게 된다. 현재 많이 쓰이는 단백질 분석 장비로 Chip scanner, Laser Scanning Confocal Microscopy등이 있는데 위와 같은 이유로 고가에 부피가 크기 때문에 사용하는데 불편하고, 또한 분석을 하는데 시간도 오래 걸린다는 단점이 있다.

본 연구는 기존 장비의 단점을 해소하고자 저가의 소형 단백질 측정 장비를 개발하는데 그 목적을 두고 있다. 단백질의 종류와 농도를 분석하기 위해 MEMS 공정을 통해 단백질 칩을 제작하였으며 단백질 칩의 형광측정을 위해 프리즘을 이용한 측정장비를 개발하고자 하였다.

2. 단백질칩 제작과 형광측정시스템

2.1 단백질칩의 제작

Fig. 1은 단백질칩 제작 MEMS공정이다. 우선 Glass의 Cleaning 공정 후에 사진식각공정 (Photolithography)을 이용하여 마이크로 패턴을 제작하였고 그 위에 금 (Au)을 증착시킨 후 lift-off 공정으로 PR(Photoresist)을 제거하였다. 다음으로 알데히드로 단백질이 잘 부착되도록 Glass surface modification을 행하였고 형광물질 Cy5가 부착된 단백질 BSA를 패턴 제작 하였다. 샘플 단백질의 농도는 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1000ng/ml로 제작하여 형광 측정 실험을 하였다.

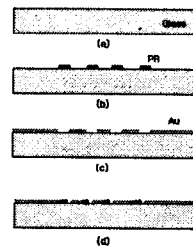


Fig. 1 Process sequences for Patterned Protein Chip (a) Cleaning, (b) Photolithography (AZ4330), (c) Au evaporation & PR lift-off, (d) Glass surface modification & BSA + Cy5 immobilization .

2.2 형광 측정 시스템

단백질칩의 형광 측정시스템은 단백질칩에 입사되는 여기광 모듈과 여기광을 효과적으로 단백질칩에 입사되도록 하는 광학계, 그리고 단백질칩으로부터 나오는 형광의 크기를 측정하는 형광 집속장치 및 데이터 분석장치로 구성되어있다.

흡수파장이 649 nm, 형광의 파장이 670 nm인 형광물질 Cy5의 특성과 형광필터의 특성을 고려하여 본 연구에서는 출력파장이 639 nm, 파워가 25 mW인 레이저 다이오드를 사용하였다. 출력 빔의 모양이 상당히 큰 면적 (2x5mm)의 직사각형이므로 스캐닝을 하지 않고 한번에 20개 이상의 패턴을 측정할 수 있는 장점을 얻을 수 있었다. 또한 기존 측정장비들은 스캐닝을 하고 형광 검출기로 PMT (Photo Multiplier tube)를 사용하므로 형광을 분석하는데 오랜 시간이 소요된다는 단점이 있으나 본 연구에서는 여기광과 형광을 파장뿐만 아니라 공간적으로도 분리함으로써 신호 대 잡음비를 높여, 저가의 저조도 CCD 카메라를 사용하여도 짧은시간에 단백질칩의 형광을 분석할 수 있도록 하였다.

본 연구에서는 여기광과 형광을 공간적으로 분리하기 위하여 다음과 같이 세가지 시스템에 대하여 연구하였다. 첫 번째 시스템의 구성도를 Fig. 2에 도시하였다. 거울을 지면의 수직방향으로부터 45도 이상 기울여 여기광이 거울에 반사해 샘플에 입사한 후 대물렌즈에는 입사되지 않고 비껴나가게 설계하였다. 이 방법으로 신호 대 잡음비를 높일 수 있었다.

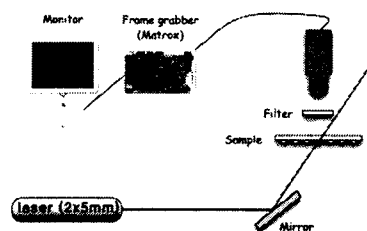


Fig. 2 Schematic of the Fluorescence detection system with simple oblique incidence.

그러나 이 레이저 다이오드의 출력 빔은 가우시안 분포를 가지고 있어 단백질칩에 입사 시킬 때, 한 패턴 내에서도 입사되는 빔의 세기가 일정하지 않아 형광 측정 시 오차의 원인이 되며 가우시안 분포의 꼬리부분을 사용할 수 없어 광 효율이 낮다는 단점이 있다. 또한 비스듬하게 패턴에 입사하므로 여기광 파워의 분포가 비대칭이라는 문제점도 있다.

위와 같은 문제점을 해결하기 위하여 본 연구에서는 Fig. 3와 같이 프리즘과 거울을 사용한 광학계를 채택하였는데 이와 같은 구조는 laser beam shaping이나 광섬유 Bragg grating 제작에 사용되어 왔다.

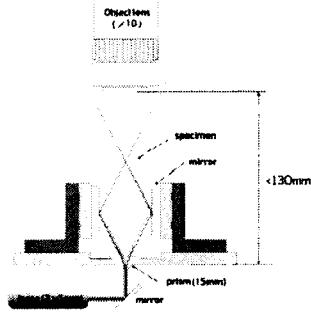


Fig. 3 Schematic of Fluorescence Detection system with Prism

즉 여기광인 레이저 빔은 프리즘의 지붕모서리로 입사하여 둘로 나누어지는데 모서리의 왼쪽으로 입사한 빛은 오른쪽으로 굴절된 후 거울에 반사되어 다시 왼쪽으로 진행하게 된다. 이 빛은 같은 과정을 거쳐 오른쪽으로 진행하는 빔과 교차하게 되는데 이 교차부분에 샘플을 미세 조정하여 위치시키면 Gaussian 빔이 반으로 나뉘고 좌우가 뒤집어진 후 더해져서 윗부분이 평평한 Top-Hat 분포를 얻을 수 있다. Top-Hat 분포는 샘플에서 균일한 조명을 이룩할 수 있고 Gaussian 분포에서 사용할 수 없는 꼬리부분의 파워를 이용할 수 있어 광 효율을 높일 수 있다. 또한 샘플에서 교차한 여기광은 대물렌즈로 입사하지 않고 형광만 입사하므로 프리즘을 이용한 beam shaping 뿐만 아니라 여기광과 형광의 공간적 분리를 이룩할 수 있다.

그런데 Bragg grating 제작에 사용되는 간섭무늬의 간격(수 μm)은 단백질칩의 패턴 크기(수백 μm)에 비해 대단히 작으므로 그 영향을 무시할 수 있으나 프리즘의 모서리를 통과하면서 둘로 나누어진 레이저 빔 각각에는 반평면에 의해 발생하는 회절무늬가 나타나게 되며, Fresnel 회절 이론에 의한 회절무늬의 세기는 아래와 같은 식으로 표현될 수 있다. 이러한 회절문제를 해결하기 위하여 다음과 같이 시뮬레이션과 실험을 수행하였다.

$$I = \frac{1}{2} \left\{ \left[\frac{1}{2} - C \left(-x_0 \sqrt{\frac{k}{\pi z}} \right) \right]^2 + \left[\frac{1}{2} - S \left(-x_0 \sqrt{\frac{k}{\pi z}} \right) \right]^2 \right\} \quad (1)$$

$$C(\alpha) = \int_0^\alpha \cos\left(\frac{\pi t^2}{2}\right) dt, \quad S(\alpha) = \int_0^\alpha \sin\left(\frac{\pi t^2}{2}\right) dt$$

프리즘의 모서리에 의한 회절무늬는 샘플까지의 거리를 길게 하여 Fraunhofer 회절영역을 사용하면 그 영향을 작게 할 수 있으므로 샘플의 정확한 위치를 찾기 위하여 시뮬레이션과 실험을 병행하였다. 그 시뮬레이션 결과 프리즘과 샘플의 거리가 20 cm일 때 여기광의 파워가 샘플에서 가장 균일하였고 또한 면적이 가장 넓어짐을 확인하였다. 거리가 10 cm, 20 cm에서의 시뮬레이션과 실험에 의한 파워분포를 Fig. 4 와 Fig. 5에 나타내었다.

즉, 시뮬레이션의 경우 거리를 10 cm로 하였을 경우에 평평한 부분은 대략 290 μm 였으나 20 cm로 하였을 경우에는 340 μm 를 얻을 수 있었고, 실험의 경우에도 시뮬레이션과 같은 경향으로 거리를 10 cm로 하였을 경우 330 μm 를 얻을 수 있는 반면 20 cm로 하였을 경우 460 μm 로 얻어져 본 연구에서는 거리를 20 cm로 선택하였다.

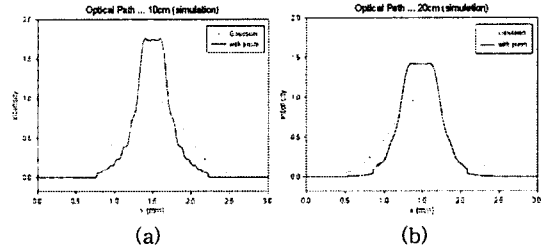


Fig. 4 Simulation of uniform illumination variation for optical path difference (a) optical path : 10 cm, uniformity area : 290 μm (b) optical path : 20 cm, uniformity area : 340 μm

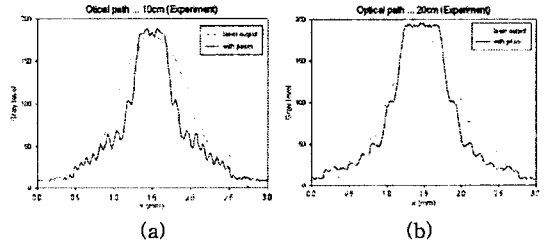


Fig. 5 Experiment of uniform illumination variation for optical path difference (a) optical path: 10 cm, uniformity area: 330 μm (b) optical path: 20 cm, uniformity area: 460 μm .

Fig. 4의 시뮬레이션 그래프에서 점선은 가우시안 프로파일이며 실선은 프리즘에서 나뉜 두 빔을 겹친 프로파일이다. 그래프와 같이 프리즘을 통해 나뉜 두 빔을 겹칠 경우 사용되지 않는 가우시안 프로파일의 꼬리부분의 파워를 사용함으로써 광 효율을 높이는 효과를 얻을 수 있게 된다. 광 경로가 10cm인 경우에는 최대 광 파워가 74% 증가하며, 광 경로가 20cm인 경우에는 42% 증가한다. 광 효율 측면에서 볼 때에는 광 경로가 10cm인 경우가 시스템에 적절한 것으로 보이지만 본 연구에서 개발하고자 하는 시스템에서는 광 파워가 균일한 면적이 큰 것이 더 중요하므로 광 경로를 20cm로 하는 것이 더 효율적이라 할 수 있다.

Fig. 5는 실험을 통해 얻은 결과 그래프로 시뮬레이션과 같이 거리를 20 cm로 하였을 경우 더 넓은 균일한 면적을 얻을 수 있었다. 그러나 광 효율 면에서는 시뮬레이션과 실험의 결과가 다른 것을 볼 수 있는데 이는 본 시스템을 구성하였을 때 프리즘 입사면과 모서리에서 반사에 의한 여기광의 파워 손실 때문이다. 그러나 실제 제품으로 양산시에는 프리즘에 무반사 코팅을 하여 손실을 줄인다면 광 효율을 더 크게 할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 광 경로를 20cm가 되도록 미니 프리즘과 거울을 이용하여 형광 측정 시스템을 구성하였으며 이 시스템으로 단백질칩의 형광을 측정 하였다.

그러나 위와 같은 시스템을 구축하기에는 미니 프리즘 및 거울의 조립이 상당히 어렵고 프리즘을 중심으로 양쪽에 거울을 완벽히 대칭이 되도록 해야 하는데 이 또한 힘들기 때문에 프리즘과 블럭-거울을 사용한 Mirror-Block 시스템을 고안하였다. Mirror-Block 시스템은

Fig. 6 과 같이 프리즘과 블록-거울을 하나로 제작하며, 프리즘의 바닥면에 프리즘과 같은 재질의 물질을 블록을 만들고 블록의 양쪽의 외부에 알루미늄으로 코팅을 하여 빛을 반사시켜 단백질칩에 여기광을 입사 하도록 하는 구조로 이루어져 있다.

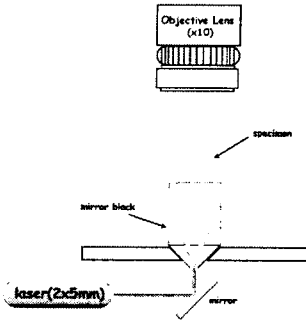


Fig. 6 Schematic of mirror Block system

위와 같이 프리즘과 블록-거울을 하나로 제작할 경우 조립의 어려움과 시스템의 대칭성 문제는 쉽게 해결 가능하지만, 이 실험을 위해 블록-거울을 한 개 제작할 때에는 제작비용이 많이 들어 제작할 수 없었다. 그러나 후에 완전한 시스템으로 개발이 완료되어 양산을 할 때에는 저렴한 비용으로 제작할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 Fig. 3과 같이 프리즘과 거울 두 개를 이용한 시스템으로 형광 측정 실험을 수행하였으며, 그 결과를 프리즘을 사용하지 않고 형광을 측정한 실험 결과와 비교, 분석하였다.

3. 실험 및 실험결과

프리즘을 사용하지 않은 첫 번째 시스템으로 단백질칩의 형광을 측정한 결과를 Fig. 7에, 미니 프리즘과 거울을 사용한 두 번째 시스템으로 측정한 결과를 Fig. 8에 나타내었다.

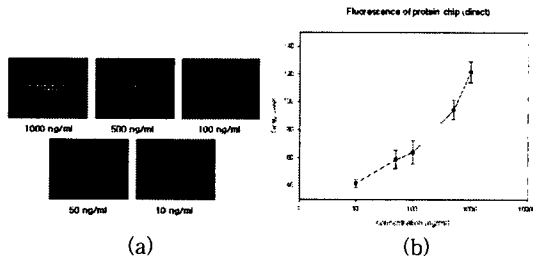


Fig. 7 Experiment result with system in Fig. 2. (a) Image of multi-pattern, (size : 100 um , Objective lens magnification : x10), (b) Fluorescence intensity vs. concentration.

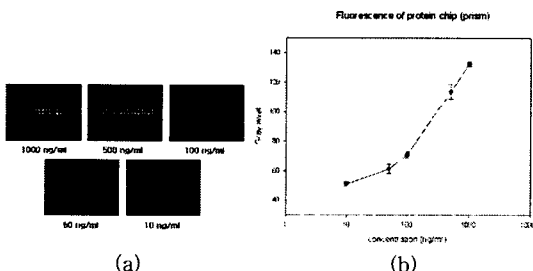


Fig. 8 Experiment result with system in Fig. 3. (a) Image of multi-pattern, (size: 100 um, Objective lens magnification : x10), (b) Fluorescence intensity vs. concentration

Fig. 7과 Fig. 8을 비교하면, 프리즘을 사용한 시스템에 의한 형광이 더 크며, 농도에 따른 형광의 변화율이 더 큼을 알 수 있어 분해능이 높음을 확인 할 수 있다. 또한 단백질의 농도가 50 ng/ml 와 100 ng/ml 인 경우, 프리즘을 사용하지 않고 형광을 측정한 실험결과는 오차 범위가 겹치는 반면 미니 프리즘을 사용하여 측정한 결과의 오차범위는 겹치지 않으므로 더 낮은 농도에서도 농도를 분석할 수 있다. 그러므로 프리즘을 이용하여 측정 한 시스템의 성능이 더 우수한 것으로 확인되었다.

프리즘을 이용하여 단백질칩의 형광을 측정한 결과 그래프의 기울기가 더 크게 나타난 이유는 보다 균일한 여기광 분포를 사용하였고 가우시안 빔의 쓰이지 않았던 꼬리부분의 파워도 활용함으로써 광 효율이 좋아져 각 단백질 농도에 따른 형광의 세기도 확실히 구분이 되기 때문이다.

향후 mirror block을 사용하고 시스템을 더욱 정교하게 구축하여 빔의 겹치는 부분의 면적을 더욱 세밀하게 조정한다면 보다 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 사료된다.

3. 결 론

본 연구에서는 MEMS공정용 이용하여 단백질 칩을 제작하였고 저가의 소형 단백질 형광 측정 장비 개발을 위한 시스템을 설계, 제작하였다. 미니 프리즘을 이용하여 여기광과 형광을 공간적으로 분리하였으며 Uniform illumination을 위해 Fresnel 회절과 여기광의 광 파워 분포를 시뮬레이션 하였고 그 결과 광 경로 20 cm에서 460 um의 평평한 면적을 얻을 수 있었다.

기존의 스캐닝 방식 형광 측정 장비의 단점을 해결하고자 여기광으로 상당히 큰 면적의 직사각형 빔(2x5 mm)을 출력하는 레이저 다이오드를 사용하였다. 또한 현재 형광 검출기로 쓰이는 PMT를 사용하지 않고 저가의 저조도 CCD 카메라를 사용함으로써 짧은 시간에 단백질 칩 형광 분석이 가능하도록 하였다. 그 결과 50 ng/ml 이상의 단백질 농도를 분석할 수 있었으며 현재 상용화되어 있는 Chip scanner와 거의 같은 결과를 얻을 수 있었다.

본 연구에서 개발된 소형 형광 측정 장비는 저가, 소형이며 멀티 패턴 단백질 칩을 scanning없이 한번에 측정할 수 있어 그 질병의 유무를 소형 병원에서 단시간에 판정할 수 있는 Point-of-care의 실용화를 앞당길 수 있으리라 사료된다.

[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] Allen Nussbaum and Richard A. Phillips , "Contemporary Optics for Scientists and Engineers," pp 228~236 , Prentice Hall , ISBN 0-13-170183-5
- [3] Jing Cheng, Larry J.Kricha, "Biochip Technology, harwood academic publishers (2001), ISBN 90 5702 613 9