

용액내 단일 분자 검출을 위한 컴퓨터 인터페이싱 광자계수기의 제작*

고 동 섭

목원대학교 물리학과

S. Nord, M. Sauer, and J. Wolfrum

Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 253,
69120 Heidelberg, Germany

(1996년 10월 16일 받음)

단일 색소 분자가 공초점 현미경의 검출 영역을 통과하면서 방출하는 형광폭발신호를 수집하기 위해서 컴퓨터 인터페이싱 광자계수기를 제작하였다. 사용한 계수기 소자들에 의해서 결정되는 최대 계수 속도는 약 80 MHz이며, 486급 PC 컴퓨터와 BASIC으로 작성한 프로그램을 사용하였을 때 최소 bin-width는 약 25 μ s이었다. 이 계수기를 사용하여 에틸렌글리콜 용액내에 있는 JA22 단일 분자의 형광폭발신호를 수집하였으며 그 특성을 간략하게 기술하였다. 이때 색소 분자의 농도는 약 1×10^{11} mol/L이었다.

I. 서 론

레이저 유도 형광 분광법은 높은 감응도를 가지고 있으며, 이를 바탕으로 하는 단일 분자 검출법(single molecule detection)은 화학 분석, 형광 면역학 연구, flow cytometry, DNA 서열분석, 그리고 분자의 양자론적 특성 연구 분야에서 신기술로써 발전을 거듭하고 있다.^[1-15] 1976년 Hirschfeld^[16]와 1984년 Dovichi 등^[17]이 레이저 유도 형광 분광학에 기초한 용액내 단일 분자의 검출 가능성을 제시한 이후, 1990년에 그 가능성이 확인되었다.^[18-19]

용액내 단일 분자 검출 실험에서 사용하는 데이터 수집 장치로는 fluorescence autocorrelator,^[20] 다중 채널 TC-SPC(time-correlated single photon counting),^[21] time-gated TC-SPC,^[19, 22] 또는 MCS(multichannel scaler)^[23-24] 등이 있다. 여기에서 얻는 데이터는 형광폭발신호(fluorescence burst signal, 이하 FBS로 기록)이다. FBS라는 용어는, 색소 분자로부터 발생한 형광 신호가 마치 섬광과 유사한 형상을 가지고 있어서 그렇게 명명한 것 같다. 이 FBS의 세기는 분자의 분광학적 특성 또는 실험 조건과 밀접하게 관련되어 있다.^[23-25]

MCS를 사용하면 FBS를 실시간으로 직접 관측할 수 있다. 그러나 상품화되어 있는 MCS는 그 기능이 다양하고 분해능도 우수하지만, 단순히 FBS를 관측하기에는 사용상 복잡하

고, FBS를 분석하기 위한 프로그램을 별도로 작성 운영해야 하는 번거로움이 있다. 특히 FBS의 발생 빈도가 낮은 경우에, 데이터의 통계적 분석을 위해서는 장시간 데이터를 수집하여야 하는데, 그와 같은 기능을 갖추고 있는 MCS를 구하는 것이 쉽지 않다. 따라서 본 연구에서는 광전자 펄스를 수집하는 계수기를 별도로 구성한 후 컴퓨터를 이용하여 이 계수기를 제어하고, 주어진 시간동안 데이터를 계속 읽고 저장하는 광자계수기(이하 CIPC로 칭함)를 제작하였다. 이와같은 구성으로 데이터 수집 시간을 상당히 확장할 수 있었다. 자체 제작한 CIPC의 동작을 확인하기 위해서 ethylene glycol에 있는 색소 분자의 검출을 시도하였으며, 제 3장에서 그 실험 장치와 관측 결과를 간략히 정리하였다. 이것은 CIPC의 제작 목적과 용도를 보다 확실하게 밝히기 위함이다.

II. CIPC 카드의 제작 및 특성

그림 1은 CIPC의 작동 원리를 설명하기 위한 회로 구성도이다. 채널과 채널 사이에서 발생하는 dead-time을 최소화하기 위해서 두 개의 계수기를 병렬로 연결하였다. 1 MHz 펄스 발생기에서 발생한 square 펄스는 82C54(programmable interval timer)에 의해서 사용자가 정하는 수만큼 pulse rate가 감소한다. 이 펄스의 반주기는 bin-width(또는 적분 시간)에 해당한다. 이 출력 신호는 NOT 게이트(74F14)를 통해 counter 1에 있는 AND 게이트(74F00)로, 또 하나는 74F14를 통해 counter 2에 있는 74F00으로 입력된다. 각 계수기의 입력단에 있는 74F00 중의 하나가 HIGH 상태에 있으면, 다른 하나는 LOW 상태에 놓이게 된다. 따라서 CFD(constant fraction discriminator)의 출력 펄스들은 74F00을 통해 교대로 각 동기 계수기인 74F193으로 입력된다. 이 과정에서 두개의 74F00이 교대하는 순간에 dead time이 발생하는데, set-up 시간이 ~10

* 본 연구는 한국과학재단의 지원(1995년 전반기)으로 수행한 해외 post-doc. 연수 결과의 일부입니다. JA22 분자를 사용하도록 허락하여 주신 독일 Gesamthochschule 대학교 K. H. Drexhage 박사에게 감사드립니다. 본 카드를 제작하는데 있어 많은 도움을 주신 조도훈 씨와 대우고등기술연구원 남기중 박사에게 감사드립니다. 1996년 연세대학교에서 정년 퇴임을 맞이하신 전 한국광학회 회장 김용 교수님께 그동안 이끌어 주신데 대한 감사의 마음으로 이 작은 논문을 바칩니다.

ns인 반면에, CFD의 출력 펄스폭은 ~100 ns이므로, 상대적으로 dead time을 무시할 수 있다.

4 bits 계수기인 74F193 두 개를 직렬로 연결하여 8 bits 계수기를 구성하였다. 또한 74F193의 over-flow 상태를 점검할 수 있도록 회로를 구성하였다. 즉 74F193에서 carry가 발생하였는가를 확인하기 위하여 D 플립-플롭 74F74를 사용하였다. 이 값을 포함하여 단위 bin-width당 각 계수기의 최대 계수량은 9 bits(511 개)가 된다. 만약 최대 계수량을 증가시킬 필요가 있다면, 74F74 대신 74F193을 사용함으로써 가능하다.

그림 2는 CIPC로부터 데이터를 읽기 위한 운영 프로그램의 흐름도이다. 먼저 사용자가 원하는 bin-width를 얻기 위해서 82C54에 관련 데이터를 입력한다. 다음에 status 점검 회로를 통해 82C54의 출력 전압 상태를 읽는다. 그림 1의 status가 HIGH 상태이면 현재 counter 2가 계수하고 있음을 나타낸다. 따라서 컴퓨터는 counter 1의 출력값을 읽는다. Counter 1의 값을 읽은 후, 곧 그것을 초기화한다. 이제 status 값을 읽으면서 LOW 상태가 될 때까지 기다린다. 만약 LOW가 되면, 반대로 counter 2의 값을 읽고 초기화한다. 이 일련의 동작을 반

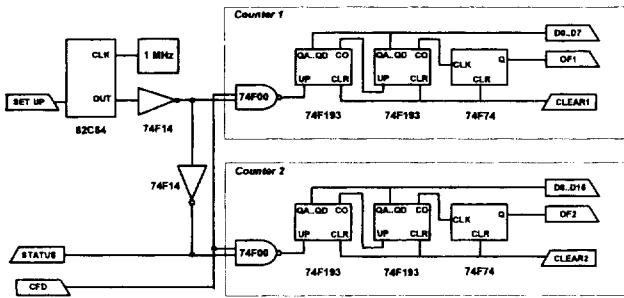


그림 1. 광자계수기 카드의 회로 구성도.

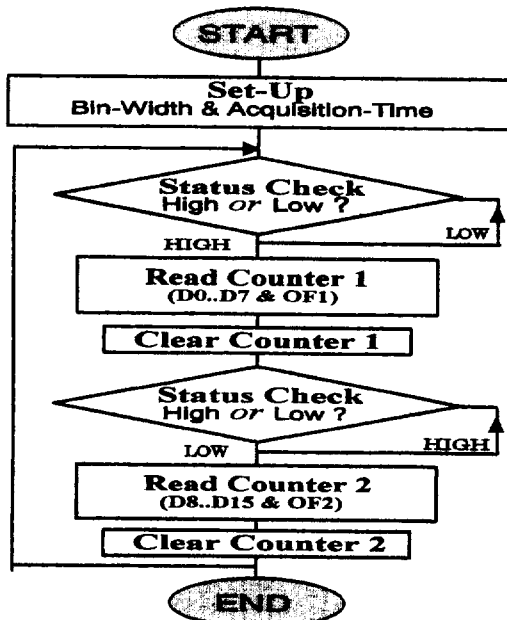


그림 2. 광자계수기에서 데이터를 읽기 위한 컴퓨터 운영 프로그램의 흐름도. 보조 프로그램들은 표시하지 않았다.

복하여 진행함으로써 시간에 따른 광자수를 얻을 수 있다.

한번에 수집할 수 있는 데이터 양은 사용하는 컴퓨터 언어의 기능에 의해서 결정될 것이다. 여기서는 운영 프로그램 작성을 위하여 BASIC을 사용하였으며, 한번에 최대 120,000 개의 채널을 수집하였다. 따라서 bin-width를 1 ms로 했을 때, 120 초동안 연속적으로 데이터를 수집할 수 있다. 만약 컴퓨터 메모리를 효과적으로 활용한다면 그 양을 더욱 확장할 수 있을 것이다. 최소 bin-width는 컴퓨터 속도와 사용한 프로그램의 기능에 의해서 결정된다. 펄스 발생기와 계수기를 연결한 후 bin-width를 조절하면서 계수 결과의 정확성을 검토하여, 최소 bin-width를 결정하였다. BASIC과 486급 PC 컴퓨터를 사용하였을 때 최소 bin-width는 약 25 μs가 되었다. 단일 분자가 공초점 현미경의 검출 영역에 머무는 시간은 용매의 점성에 따라 다르지만, 일반적으로 대략 수십 μs에서 수십 ms이므로, 여기에서 얻은 최소 bin-width는 단일 분자 검출 실험에서 사용하기에 적절한 분해능이라고 본다. 필요한 경우보다 빠른 컴퓨터를 사용한다면 최소 bin-width를 줄일 수 있을 것이다. 한편 FBS의 분석에 필요한 데이터 필터링 알고리즘과 FBS의 발생 빈도수 또는 반치폭 등을 계산하는 프로그램을 함께 운영하여, 편리하게 이 계수기를 사용할 수 있었다.

CIPC의 용도를 보다 구체적으로 전달하기 위해서, 다음 장에서는 자체 제작한 CIPC로 수집한 단일 색소 분자의 형광폭 발신호를 보여 주고, 간략하게 그 특성도 정리하였다.

III. 단일 분자 검출 및 결과

그림 3은 공초점 현미경을 이용하여 ethylene glycol에 있는 단일 분자를 검출하기 위한 구성도이다. 색소 분자의 농도는 약 1×10^{-11} mol/L이었다. 시료는 오목면이 있는 유리판과 현미경 덮개 유리판 사이에 놓았다. 단일 광자 검출기는 SPAD (single photon avalanche diode)를 사용하였다.^[26] SPAD(EG&

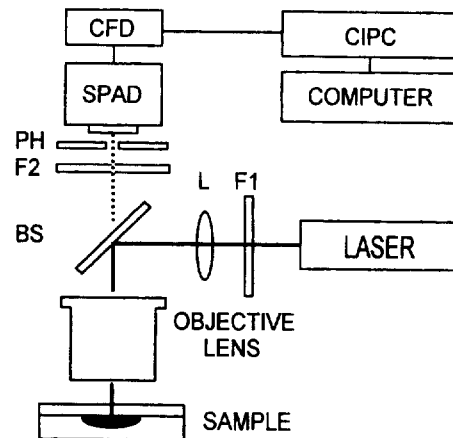


그림 3. 단일 분자 검출 장치의 구성도. Objective lens: oil immersion, 100×, 1.25 NA, CFD: constant fraction discriminator, CIPC: computer-interfaced photon counter, SPAD: single photon avalanche diode, F1: 중심 파장이 633 nm인 band-pass filter, L: 렌즈, BS: beam splitter, F2: Raman edge cut-off filter, PH: 직경 100 μm pinhole.

G model SPCM 200)는 600 nm에서 양자효율이 약 50-80%이므로, 약 5-10%인 PM-tube에 비해서 단일 광자의 검출 효율이 우수하다. 이 SPAD의 전기 펄스는 CFD(EG&G ortec model 584)를 거쳐서 자체 제작한 CIPC로 입력된다.

그림 3에서 band-pass 필터 F1은 다이오드 레이저의 발진 스펙트럼이 넓기 때문에 사용하였다. 여기광, 초점밖 신호(out-of-focus signal), 기타 잡음 신호를 최소화하기 위해서 Raman edge cut-off 필터(F2; Omega optical, 650REFLP)와 직경이 100 μm인 pinhole(PH)을 사용하였다.

배경잡음을 이루고 있는 산란광의 세기가 λ⁴에 반비례하므로 여기 광원으로써 장파장 레이저를 사용하는 것이 신호대 잡음비를 향상시키는데 유리하다. 최근에 흡수 파장이 적색 광 영역에 있으면서도 형광 효율이 약 1에 가까운 색소들이 개발되고 있기 때문에, 여기 광원으로 He-Ne 레이저 또는 diode 레이저를 사용할 수 있게 되었다.^[27-28] 비록 이 레이저들의 출력이 낮더라도, 배율이 큰 대물렌즈를 사용하여 여기 광원을 시료에 집속하면 포화 여기 상태를 얻을 수 있을 정도로 단위 면적당 출력이 증가한다.

그림 4는 본 실험에서 사용한 JA22 분자의 형광 및 흡수 스펙트럼, 그리고 필터와 beam splitter로 이루어진 광학계의 투과 곡선, 그리고 이 투과율에 의해서 보정된 형광 스펙트럼 곡선을 각각 보여주고 있다. JA22 분자는 형광 효율이 약 1이며,^[27] 그림 4의 곡선 (a)와 (b)에 보인 바와 같이 ethylene

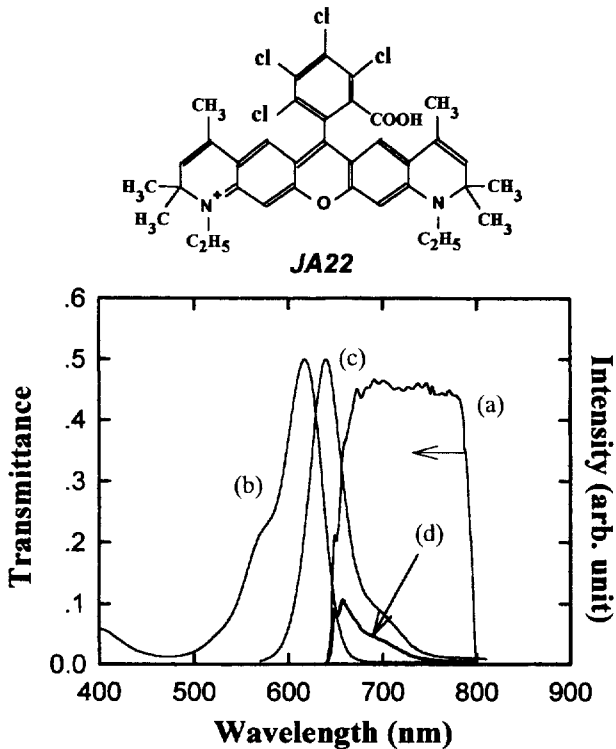


그림 4. (a) Beam splitter와 Raman edge cut-off 필터의 총투과율과 ethylene glycol 용액에서 측정된 JA22 분자의 (b)흡수 스펙트럼, (c)형광 스펙트럼, 그리고 (d)형광 스펙트럼을 곡선 (a)로 보정한 투과율 곡선. 위에 있는 그림은 JA22 분자의 구조이다.

glycol에서 최대 흡수 파장은 617 nm, 형광 스펙트럼의 peak 파장은 640 nm이다. 필터 세트의 총투과율로 보정한 형광 스펙트럼은 곡선 (d)로 표시하였다. 그림 4에 있는 곡선 (c)와 (d)의 면적비로 계산하였을 때, beam splitter와 Raman edge cut-off 필터에 의한 형광 광자의 총투과율은 약 18%가 되었다. 대물렌즈의 형광 수집률은 약 12%, 광검출기의 양자효율은 60%, 그리고 He-Ne 레이저광으로 측정된 대물렌즈와 광검출기 창 총투과율이 90%이므로, 이 검출 장치의 형광 광자 수집률은 약 1%가 된다. 형광 수집율은 단일 분자 검출 장치에서 우선적으로 향상시켜야 하는 과제 중의 하나이다.

검출 부피에 평균 \bar{n} 개의 분자가 있다면, n 개의 분자가 검출 영역내에 동시에 존재할 확률은 다음과 같다^[22].

$$p(n) = \bar{n}^n \exp[-\bar{n}] / n! \quad (1)$$

만약 검출 부피가 1 fL이고 색소의 농도가 1×10^{11} mol/L 라면, $p(0)=0.99$, $p(1)=6.0 \times 10^{-3}$, 그리고 $p(2)=1.8 \times 10^{-5}$ 가 된다. 따라서 검출한 대부분의 FBS는 단일 분자로부터 방출된 것으로 볼 수 있다.

그림 5~7은 JA22 분자로부터 얻은 FBS이다. 그림 5는 cw 다이오드 레이저($\lambda=631$ nm, 시료에서 1.2 mW)를 사용하여 얻은 것이며, 그림 6~7은 다이오드 펄스 레이저($\lambda=638$ nm, 펄스반복률=17 MHz, 펄스폭=700 ps, 시료에서 평균 450 μW)를 여기광으로 사용하여 얻은 결과이다. 각 그림의 (a)는 raw 데이터 $C(i)$ 이며, (b)는 다음 식을 사용하여 weighted-quadratic-sum 필터링한 결과인 $S(i)$ 이다.^[19]

$$S(i) = \sum_{j=0}^{k-1} w(j)[C(i+j)]^2 \quad (2)$$

여기서 k 는 통과시간/bin-width 혹은 광해리시간/bin-width 내

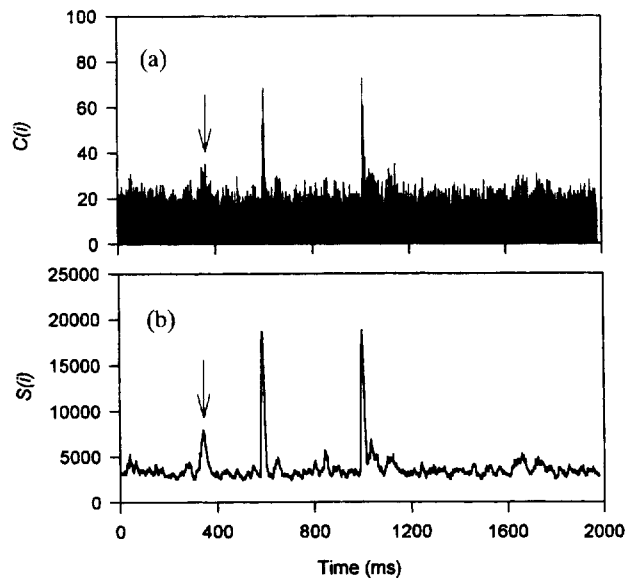


그림 5. 연속 다이오드 레이저를 여기광으로 사용하여 검출한 형광폭발신호. 레이저광의 파장은 631 nm이며, 세기는 시료에서 1.2 mW, 계수기의 bin-width는 1 ms이다. (a)와 (b)의 설명은 본문 참조.

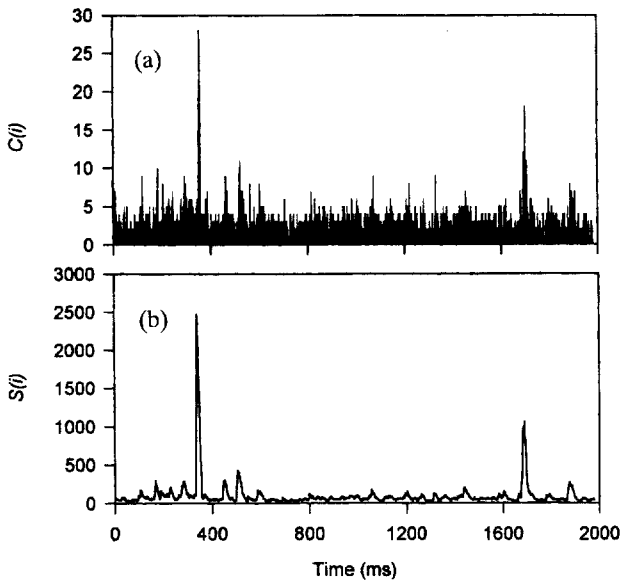


그림 6. 펄스 다이오드 레이저를 여기광으로 사용하여 검출한 형광폭발신호. 레이저광의 파장은 638 nm, 펄스반복률은 17 MHz, 펄스폭은 700 ps, 광의 세기는 시료에서 평균 450 μW, 계수기의 bin-width는 1 ms이다.

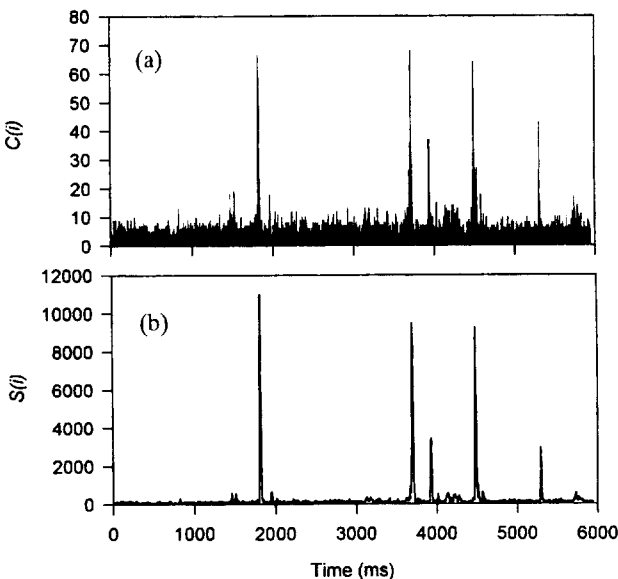


그림 7. 펄스 다이오드 레이저를 여기광으로 사용하여 검출한 형광폭발신호. 레이저광의 특성은 그림 6의 설명문 내용과 동일하며, 계수기의 bin-width는 3 ms이다.

외의 값으로 취한다. Weight 함수 $w(j)$ 는 배경 잡음에 대해 FBS가 명확하게 구분이 되도록 하는 함수를 취한다. 일반적으로 분자가 검출 영역의 중심을 향해서 움직일 때, 신호가 증가하다가 광해리에 의해서 갑자기 소멸하는 경우가 많으므로 $w(j)=(j+1)/k$ 로 취하였다. 그러나 $w(j)$ 를 Gaussian 함수로 취하여도 필터링한 결과에서 가시적으로 현저한 차이점을 발견할 수 없었다. 본 실험에서는 FBS의 폭을 조사한 결과 최대 20 ms이었으므로, bin-width가 1 ms인 그림 5와 그림 6에서 $k=20$, bin-width가 3 ms인 그림 7에서는 $k=7$ 로 하여 필터

링 데이터를 구하였다.

그림 5에 표시한 화살표는 raw 데이터에서 잡음 신호들과 특별히 구분되지 않는 신호가 필터링 결과에서 보다 명확한 신호로 변환된 것을 보이기 위한 것이다. Rayleigh 및 Raman 산란광이 주요 배경 잡음을 이룬다. 이 산란광은 레이저광이 입사하는 동안에만 발생하므로, 펄스 레이저를 사용한 경우, cw 레이저에 비해서 이 잡음들의 발생 빈도가 감소한다. 신호 대 잡음비(S/N)가 그림 5에서 약 13, 그림 6에서는 약 16 정도여서 cw 레이저를 사용하였을 때보다 펄스 레이저를 사용하였을 때 S/N 값이 향상된 것을 보여 주고 있다. 한편 bin-width가 3 ms인 그림 7에서는 S/N 값이 약 24이므로, 동일 조건에서 bin-width가 S/N 값에 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. 배경잡음 크기는 bin-width에 단순 비례하여 증가하는 반면에, FBS는 분자가 검출 영역을 통과하는 순간에만 발생하므로, bin-width를 분자의 검출 영역 통과 시간보다 작게 조절하는 것이 좋다. 한편 검출 광자수의 Poisson 분포 특성¹⁷⁾과 함께, 검출 영역의 위치에 따라 여기광의 세기와 수집 효율이 다르므로 분자가 어떤 경로를 따라 검출 영역을 통과하느냐에 따라라도 신호의 모양과 세기가 달라진다.

IV. 결 론

용액내 단일 분자 검출에 적합한 광자계수기의 구성 방법을 소개하였고, 이 장치를 사용하여 단일 분자로부터 발생한 형광폭발신호를 효과적으로 수집하였음을 보였다. 현재 자체 기억 소자를 추가하여, 데이터 수집 속도를 증가시키고 실시간으로 hard disk에 데이터를 저장할 수 있도록 기능을 향상시키는 작업을 진행하고 있다. 단일 분자 검출법을 보다 효과적인 레이저 분광학적 도구로 이용하기 위해서는 대용량 데이터 수집 장치의 개발 외에도 형광 광자 수집을 극대화하기 위한 광학계 구성, 배경잡음과 여기광을 효과적으로 최소화할 수 있는 광학 필터의 설계, 형광 효율이 우수한 색소 분자의 개발, 그리고 감응도가 우수한 단일 광자 검출기의 개발 등 신호대 잡음비를 향상시킬 수 있는 관련 연구들이 선행되어야 한다.

참 고 문 헌

- [1] M. D. Barnes, W. B. Whitten, and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **67**, 418A (1995).
- [2] J. Manni, *Biophotonics International*, September/October, 48 (1995).
- [3] B. B. Haab and R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **67**, 3253 (1995).
- [4] A. Castro and E. B. Shera, *Appl. Opt.* **34**, 3218 (1995).
- [5] A. T. Woolley and R. A. Mathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11348 (1994).
- [6] A. Castro, F. R. Fairfield, and E. B. Shera, *Anal. Chem.* **65**, 849 (1993).
- [7] S. A. Soper, B. L. Legendre, and D. C. Williams, *Anal. Chem.* **67**, 4358 (1995).

- [8] A. Castro and E. B. Shera, *Anal. Chem.* **67**, 3181 (1995).
 [9] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, and R. A. Keller, *Phys. Rev. Lett.* **72**, 160 (1994).
 [10] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, and R. A. Keller, *Science* **265**, 364 (1994).
 [11] M. E. Moerner, *Science* **265**, 46 (1994).
 [12] J. Jasny, J. Sepiol, T. Irngartinger, M. Traber, A. Renn, and U. P. Wild, *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 1425 (1996).
 [13] S. Draxier and M. E. Lippitsch, *Anal. Chem.* **68**, 753 (1996).
 [14] C. W. Wilkerson, P. M. Goodwin, W. P. Ambrose, J. C. Martin, and R. A. Keller, *Appl. Phys. Lett.* **62**, 2030 (1993).
 [15] 한중훈, "레이저를 이용한 단일 원자/분자 검출 기술", *물리학과 첨단기술* **5**(3), 30 (1996).
 [16] T. Hirschfeld, *Appl. Opt.* **15**, 2965 (1976).
 [17] N. J. Dovichi, J. C. Martin, J. H. Jett, M. Trkula, and R. A. Keller, *Anal. Chem.* **56**, 348 (1984).
 [18] E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, and S. A. Soper, *Chem. Phys. Lett.* **174**, 553 (1990).
 [19] S. A. Soper, L. M. Davis, and E. B. Shera, *J. Opt. Soc. Am. B* **9**, 1761 (1992).
 [20] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, and P. Kask, *Eur. Biophys. J.* **22**, 169 (1993).
 [21] C. Zander, M. Sauer, K. H. Drexhage, D.-S. Ko, A. Schulz, J. Wolfrum, L. Brand, C. Eggeling, and C. A. M. Seidel, *Appl. Phys. B* **63**, 517 (1996).
 [22] L.-Q. Li and L. M. Davis, *Appl. Opt.* **34**, 3208 (1995).
 [23] S. Nie, D. T. Chiu, and R. N. Zare, *Anal. Chem.* **67**, 2849 (1995).
 [24] S. Nie, D. T. Chiu, and R. N. Zare, *Science* **266**, 1018 (1994).
 [25] R. A. Mathies, K. Peck, and L. Stryer, *Anal. Chem.* **62**, 1786 (1990).
 [26] L.-Q. Li and L. M. Davis, *Rev. Sci. Instrum.* **64**, 1524 (1993).
 [27] M. Sauer, Ph. D. thesis, Heidelberg Univ., 1995.
 [28] M. Sauer, K.-T. Han, R. Müller, A. Schulz, R. Tadday, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N. J. Marx, and K. H. Drexhage, *J. Fluoresc.* **3**, 131 (1993).

Fabrication of computer-interfaced photon counter for single molecule detection in solution

Dong-Seob Ko

Department of Physics, Mokwon University, Taejon 301-729, Korea

Simon Nord, Markus Sauer, and Jürgen Wolfrum

Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 253, 69120 Heidelberg, Germany

(Received: October 16, 1996)

In order to acquire the fluorescence burst signals emitted from single dye molecules that pass through a detection space defined by a confocal microscope, a computer-interfaced photon counter has been fabricated. The maximum count rate is about 80 MHz, which is limited by the counter devices used. Using both the operating computer program written by BASIC and the 486 PC computer, the minimum bin-width of 25 μ s has been achieved. The characteristics of fluorescence burst signals emitted from JA22 molecules at about 1×10^{-11} mol/L in ethylene glycol are discussed briefly.