

색소 농도에 따른 형광 광자의 계수율 : 광자 검출기의 dead time 효과

고 동 섭

목원대학교 물리학과

(1997년 4월 22일 받음)

공초점 형광 현미경과 단일 광자 계수기로 구성되어 있는 단일 분자 검출 장치를 사용하여, 색소 농도에 따른 광자 계수율의 변화를 관측하였다. 농도가 증가함에 따라 계수율이 포화하는 경향을 보였으며, 광검출기의 죽은 시간을 고려하여 측정 결과를 설명하였다. 계수율과 검출 부피, 광검출기의 양자 효율, 입사 광량 사이의 관계를 나타내는 관계식을 제시하였다. 또한 신호대 잡음비에 대해서도 간략하게 논하였다.

형광 분광학을 이용하는 단일 분자 검출법(single molecule detection)은 높은 감응도를 가지고 있어서 화학 분석, 형광 면역학 연구, flow cytometry, DNA 서열분석, 그리고 분자의 양자론적 연구에서 신기술로 발전하고 있다.^[1-3] 일반적으로 단일 분자 검출 실험에서는 양자 효율이 높은 SPAD(single photon avalanche diode)^[4,5]를 사용하는데, 이 광검출기는 죽은 시간(dead time)을 가지고 있어서 분자의 농도가 증가함에 따라 형광 광자 계수율이 포화하는 현상이 있다.

검출기의 죽은 시간은 두 가지 형태로 구분한다.^[6] 첫 번째 형태는 죽은 시간동안 발생하는 사건에 반응을 하지 않으며, 이 사건들에 의해서 죽은 시간의 크기가 변화하지 않는 경우이다. 두 번째 형태는 죽은 시간 동안 발생하는 사건에 대해 반응하지는 않지만 이 사건들에 의해서 죽은 시간이 증가하는 경우이다.

SPAD에서는 내부 눈사태(avalanche) 현상을 중지시키기 위해서 수동형 또는 능동형의 억제 회로(quenching circuit)를 사용한다. 억제 반응이 회복하는 시간이 필요한데, 그동안 광자가 입사하는 경우 광검출기는 이 사건들을 인식하지 못한다. 또한 바이어스 전압이 파괴(break-down) 수준까지 완전히 회복하기 전에 광자가 입사되면, 그렇지 않은 경우와 비교하여 SPAD에서는 낮은 전압의 신호가 발생한다. 출력 전압이 데이터 수집 장치의 문턱보다 낮다면 이 사건도 감지할 수 없기 때문에, 관측자는 SPAD의 죽은 시간이 연장된 것으로 인식한다. 따라서 SPAD는 두 번째 형태의 죽은 시간(paralyzable dead time이라 함^[6])을 갖는다고 볼 수 있다.

단일 분자 검출 실험은 농도가 매우 낮은 상태에서 이루어지므로, 광검출기의 죽은 시간에 비해서 형광의 입사율이 지나치게 높지 않기 때문에 SPAD를 첫 번째 형태로 가정하여도 무방할 것이다. 본 소논문에서는 이 가정에 바탕을 두고, 색소의 농도에 따른 형광 광자 계수율 변화를 나타낸 관계식을 유도하였으며, 그 구조가 간결하여 매개 변수들의 물리적 의미를 이해하는 것이 용이하였다.

다른 논문에서 실험 장치의 기본 구성을 소개하였기 때문에^[7-9], 여기서는 주요 사항만을 간략하게 정리하고자 한다. 시료는 JA22 분자를 사용하였다.^[7,10] 이 분자는 에틸렌글리콜에

서 최대 흡수 파장이 617 nm이고, 형광 빛띠의 봉우리 파장은 640 nm이다. 이 색소 분자의 형광 수명 시간은 4 ns이며, 형광 효율은 0.9 이상이다. 형광 검출 장치로는 공초점 현미경을 사용하였다. 시료는 오목면이 있는 유리화 얇은 유리판 사이에 놓았다. 광검출기로서 검출 면적이 $100 \times 100 \mu\text{m}$ 인 SPAD (SPCM-200, EG&G)를 사용하였다. 여기 광원은 He-Ne 레이저이며, 시료에서 광세기는 1.2 mW이었다. 레이저빔은 중심 파장이 632 nm인 띠통과 필터, 렌즈, 그리고 광분리기를 거쳐서 현미경 대물렌즈($\times 63$, 0.85 N.A., Melles Griot)를 통해 시료에 입사되었다. 형광 광자는 같은 대물렌즈와 Raman 가장자리 끌어버림 필터(650REFLP, Omega)를 거쳐서 SPAD에 입사된다. 초점 밖 신호를 최소화하기 위해서 바늘구멍(직경 50 μm , Melles Griot)을 대물렌즈의 후초점면에 위치시켰다. SPAD의 신호는 CFD(constant fraction discriminator, EG&G model 584)를 거쳐서 자체 제작한 광자 계수기^[7]를 통해 컴퓨터에서 수집하였다. 각 농도에 대해 360초 동안 계측하였다.

그림 1은 색소의 농도를 변화시키면서 측정된 광자 계수량

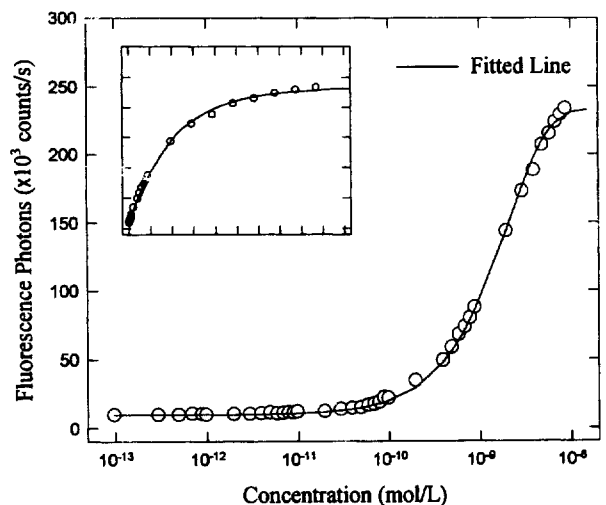


그림 1. 색소의 농도에 따른 형광 광자 계수 결과. 농도가 증가함에 따라 포화하는 경향을 보이고 있다. 삽입 그림에서는 x축을 선형 눈금으로 취했다.

을 보여 주고 있다. 농도가 증가함에 따라 계수량이 포화하는 현상이 나타난다.

실험 조건으로써 광자 계수기의 적분 시간에 비해서 분자가 검출 영역에 머무는 시간이 긴 경우를 고려하기로 한다. 1개의 분자가 검출 영역에 머물고 있는 동안, 단위 시간당 β 개의 형광 광자가 광검출기로 입사한다고 가정하자. m 개의 분자가 검출 영역에 동시에 존재할 때 광검출기로 입사하는 단위 시간당 광자수는

$$n = \beta m + \bar{n}_B \tag{1}$$

가 된다. 여기서 \bar{n}_B 는 배경 잡음의 단위 시간당 평균 입사 광자수이다. 배경 잡음은 여기광의 산란광에 의해서 주로 발생한다.

SPAD의 죽은 시간을 τ_d 라 하면, 이 시간 동안 입사한 광자 중에서 SPAD가 인식할 수 있는 평균 광자수는

$$\bar{j} = Q_s n \tau_d \tag{2}$$

가 된다. 여기서 Q_s 는 SPAD의 양자 효율이다. 이 평균 광자수에 대해 τ_d 동안 입사하는 광자수가 Poisson 분포를 따른다면, j 개의 광자가 입사할 확률은 다음과 같다.^[11]

$$P_s(j) = \frac{\bar{j}^j \exp(-\bar{j})}{j!} \tag{3}$$

$j=0$ 일 확률, 즉 τ_d 동안 광자가 입사하지 않을 확률은 $\exp(-\bar{j})$ 가 된다. j 개의 입사 광자에 의해서 SPAD에서는 오직 1 개의 광전자 펄스만이 발생하므로, 단위 시간당 발생한 광전자 펄스 수 N_s 는 다음과 같다.

$$N_s(-\bar{j}) = \frac{1 - \exp(-\bar{j})}{\tau_d} \tag{4}$$

만약 $\bar{j} \ll 1$ 라면 $N_s(\bar{j}) \approx \bar{j}/\tau_d = Q_s n$ 이 되므로 입사광량에 선형적으로 광전자 펄스가 발생하지만, $\bar{j} \gg 1$ 인 경우에는 $1/\tau_d$ 의 값으로 포화된다.

본 실험에서 사용한 SPAD에서는 수십 mV 이하의 아날로그 신호가 출력되며, CFD의 문턱을 넘지 못한 SPAD의 일부 신호는 광자 계수기에서 검출되지 않는다. 데이터 수집 장치의 계수 효율을 Q_c 라고 한다면, 식 (1), (2), (4)에 의해서, 검출 영역에 m 개의 분자가 있을 때 최종적으로 검출되는 단위 시간당 광자수는 다음과 같다.

$$N_p(m) = \left(\frac{Q_c}{\tau_d} \right) \left[1 - \exp \{ -Q_s (\beta m + \bar{n}_B) \tau_d \} \right] \tag{5}$$

한편 검출 영역에 위치하고 있는 분자의 평균 밀도는 농도 C 에 비례하므로 비례 상수를 ξ 라 하면 $\bar{m} = \xi C$ 가 된다. 분자는 확산 작용에 의해 불규칙한 위치 이동을 하기 때문에, 어떤 시간에 m 개의 분자가 동시에 검출 공간에 존재할 확률은 다음과 같이 주어진다.^[12]

$$P_C(m) = \frac{\bar{m}^m \exp(-\bar{m})}{m!} \tag{6}$$

따라서 실제로 측정되는 단위 시간당 평균 광자수는

$$\bar{N}_p = \sum_{m=0}^{\infty} P_C(m) N_p(m) = \bar{N}_B + \gamma [1 - \exp(-\alpha C)] \tag{7}$$

가 된다. 여기서

$$\bar{N}_B = (Q_c/\tau_d) [1 - \exp(-Q_s \bar{n}_B \tau_d)] \tag{8}$$

$$\gamma = (Q_c/\tau_d) \exp(-Q_s \bar{n}_B \tau_d) \tag{9}$$

$$\alpha = \xi [1 - \exp(-Q_s \beta \tau_d)] \tag{10}$$

이며, \bar{N}_B 는 측정된 배경 잡음수이다.

그림 1의 실선은 식 (7)을 사용하여 곡선 맞춤을 한 것이다. 비교적 측정치와 잘 일치하고 있다. 여기에서 사용한 SPAD의 최대 계수율은 약 5×10^5 counts/s이지만, CFD의 문턱을 최대로 낮추었음에도 실제 계수율은 2.53×10^5 counts/s 이어서 Q_c 는 약 0.51이 되었다. 그러나 식 (7)에 의하던 분자 농도에 따른 광자 계수율의 변화율은 Q_c 에 의해서 영향을 받지 않는다. 곡선 맞춤 결과 $\alpha \sim 4.5 \times 10^8$ L/mol이 되었다. 만약 부피가 V_p 인 검출 공간의 모양이 완전한 구를 이룬다면, $\xi = V_p N_A$ 가 된다.^[13] 여기서 N_A 는 아보가드로 수이다. Rigler 등^[14]의 계산법을 이용하여, 공초점 현미경에 의해서 주어지는 검출 영역의 크기를 계산한 결과, V_p 는 약 4×10^{-15} L이었다.

본 실험에서 사용한 SPAD의 Q_s 는 650 nm에서 0.65이다. 식 (10)에 의해서 $\beta \sim 1.6 \times 10^5$ photons/s가 되었다. 이 때 SPAD의 τ_d 는 최대 계수율의 역수로 취했다. 한편 형광 수명 시간이 4 ns이고 형광 효율이 1일 때, 포화 여기 조건에서 최대 형광 방출율은 $\leq 10^8$ photons/s이다.^[15] 현미경 대물렌즈로 집속하므로, 수 mW의 저출력 레이저를 사용하더라도 여기광의 중심에서는 포화 여기 상태에 이른다. 본 실험의 형광 광자 수집률은 약 1% 이하이므로^[7] 여기광의 중심에 위치한 분자로부터 발생하여 검출기로 입사한 형광은 $< 10^6$ photons/s가 된다. 그러나 검출 공간의 가장자리에서는 여기광의 세기가 약하고 형광 검출율도 감소하므로 입사 광량은 다소 감소할 것이다. 또한 삼중항 상태로의 계간 전이와 광해리에 의해서 방출 광량이 감소한다. 이 실험 조건을 고려할 때, 위에서 계산한 β 는 예측 범위 안에 있는 값이다.

한편 식 (5)에 의해서, 분자 1 개가 검출 영역에 있는 경우 배경 잡음을 뺀 형광 계수율은 약 45 counts/ms가 되었다. 그림 2는 3×10^{-12} mol/L에서 1 ms의 적분 시간으로 검출한 전형적인 광자폭발신호를 보여 주고 있다. 이 농도에서는 두 개 이상의 분자가 검출 공간에 있을 확률은 무시할 정도이다. 따라서 그림 2의 광자폭발신호는 단일 분자로부터 방출되었음이 확실하다. 관측한 광자폭발신호의 크기와 식 (5)의 계산 결과가 자릿수 정도에서 일치하기 때문에, 위의 관계식들이 농도 의존 실험 결과를 설명하는데 적합하다는 것을 확인할 수 있다.

식 (5)와 (8)에 의해서, 계측기의 특성이 단일 분자에서 방출한 광자폭발신호의 신호대 잡음비 (S/N)에 미치는 영향을 평가할 수 있다. 계측 조건이 $\bar{n}_B < \beta$ 인 경우, 만약 $\tau_d < \beta^{-1}$ 이면

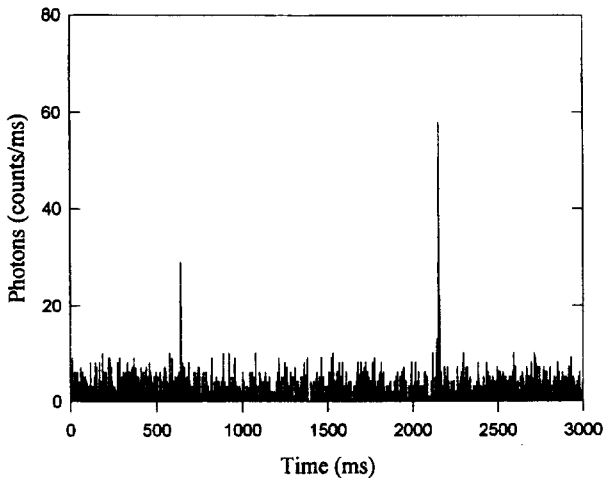


그림 2. 색소의 농도가 3×10^{-12} mol/L인 용액에서 수집한 단일 색소 분자의 전형적인 광자폭발신호. 광자 계수기의 적분 시간은 1 ms이다. 평균 배경 잡음을 감산하여 그렸다.

$$(S/N) \equiv \frac{N_p(1) - \bar{N}_B}{\sqrt{\bar{N}_B}} \approx \beta \sqrt{\frac{Q_c Q_s}{n_B}} \quad (11)$$

가 되어 τ_d 는 S/N 값에 영향을 주지 않는다. 그러나 $\tau_d \gg \beta^{-1}$ 이면, $S/N \rightarrow 0$ 이 된다. 동일한 측정 조건일 때, τ_d 가 증가함에 따라 S/N 값은 $\tau_d \sim \beta^{-1}$ 이 되는 부근에서 지수함수와 유사한 형태로 급격히 단순 감소한다.

결론적으로 농도 의존 실험 결과와 본 연구에서 유도한 관계식을 근거로 하면, 단일 분자 검출 장치의 특성과 측정 결과를 정량적으로 이해하는 것이 가능할 것이다. 또한 임의의 농도에서 관측한 광자 계수량의 보정에도 도움을 줄 것이다. 신호대 잡음비를 만족할 수준으로 얻기 위한 광검출기의 적정 선택 기준점도 정할 수 있다. 단, 본 연구에서는 SPAD의 죽은 시간이 입사 광량과 관계없이 일정하다고 가정하여 해법을 구했다. 그러나 실제로는 SPAD의 제작 특성에 따라 각각 정도의 차이는 있으나, 입사 광량이 증가함에 따라 죽은 시간이 다소 증가한다. 이 점을 고려한다면 보다 정확한 관계식을 유도할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 해외 post-doc. 지원에 의하여 수행되었습니다. JA22 분자를 제공하여 주신 Gesamthochschule 대학교의 K. H. Drexhage 박사께 감사드립니다.

참고 문헌

- [1] M. D. Barnes, W. B. Whitten, and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **67**, 418A (1995) and references cited therein.
- [2] M. Eigen and R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5740 (1994).
- [3] X.-H. Xu and E. S. Yeung, *Science* **275**, 1106 (1997).
- [4] L.-Q. Li and L. M. Davis, *Rev. Sci. Instrum.* **64**, 1524 (1993).
- [5] H. Dautet, P. Deschamps, B. Dion, A. D. MacGregor, D. MacSween, R. J. McIntyre, C. Trottier and P. P. Webb, *Appl. Opt.* **32**, 3894 (1993).
- [6] J. H. Gilchrist and S. K. Babey, *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **NS-25**, 1655 (1978).
- [7] 고동섭, S. Nord, M. Sauer, and J. Wolfrum, *한국광학회지* **8**, 42 (1997).
- [8] 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).
- [9] R. Müller, C. Zander, M. Sauer, M. Deimel, D.-S. Ko, S. Siebert, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N. J. Marx, K. H. Drexhage, and J. Wolfrum, *Chem. Phys. Lett.* **262**, 716 (1996).
- [10] M. Sauer, Ph. D. Thesis, Heidelberg University, 1995.
- [11] R. Loudon, *The Quantum Theory of Light* (Oxford Univ., London, 1973), p. 217.
- [12] L.-Q. Li and L. M. Davis, *Appl. Opt.* **34**, 3208 (1995).
- [13] 검출 공간의 구조에 따라 다소 차이가 있다. 참고문헌 [2] 참조.
- [14] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, and P. Kask, *Eur. Biophys. J.* **22**, 169 (1993).
- [15] G. Engh and C. Farmer, *Cytometry* **13**, 669 (1992).

Fluorescence photon counting rate as a function of dye concentration : Effect of dead time of photon detector

Dong-Seob Ko

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

(Received : April 22, 1997)

A single molecule detection system, which consists of confocal fluorescence microscope and single photon counter, has been used to observe the dye concentration dependence of photon counting rate. With increasing concentration, a saturation effect of counting is observed and demonstrated on the basis of the dead time of photon detector. The equations presented here show the relations between the counting rate and some parameters such as probe volume, quantum efficiency of detector, and fluorescence photon number entered onto detector. The signal-to-noise ratio is also discussed briefly.