

## 용액내 단분자의 형광소멸시간 측정

고동섭

목원대학교 물리학과

(1998년 10월 19일 받음, 1999년 1월 15일 수정본 받음)

공초점 현미경 시스템을 사용하여 반복률이 17 MHz이며, 중심파장이 638 nm인 극초단 펄스 다이오드 레이저에 의해서 여기된 단분자의 형광폭발신호를 계속하였다. 에칠렌글리콜 용액에 있는 적색 색소 분자(JA22)를 시료로 사용하였다. 시상관 단광자 계수기를 사용하여 단분자들의 형광소멸곡선을 수집하였으며, maximum likelihood estimator로 그것들을 분석하였다. 색소 분자당 40개 이상의 광자수를 가지고 분석하였을 때, 21%의 오차 확률로 형광소멸시간을 측정하는 것이 가능하였다.

### I. 서 론

Hirschfeld가 80~100개의 색소 분자가 흡착되어 있는 생체 분자를 관측한 이후<sup>[1]</sup> 많은 연구진들에 의해서 용매에 용해되어 있는 단분자(single molecule)를 검출할 수 있는 정도까지 분자 검출능을 향상시켜 왔다.<sup>[2-4]</sup> 검출공간을 극도로 제한함으로써 산란광을 포함하는 배경 잡음들을 최소화하고, 이 검출공간에 분자가 머무는 동안 분자에서 방출된 형광을 검출함으로써, 분자의 존재를 인식할 수 있다.

피측정 시료의 양을 최소화할 수 있는 가능성으로 인해 DNA 염기서열분석, 지하수 감시, 젤 전기 영동 분야에서 단분자 검출 기법을 이용하고자 하는 연구들이 진행되고 있다. 또한 단분자 검출법을 이용하여, 생체에 극미량으로 존재하는 항원과 핵산을 검출함으로써 질병을 조기에 진단하고 유전체 변형을 사전에 검출하고자 하는 연구도 진행되고 있다.<sup>[5-7]</sup>

한편 레이저 유도 형광 분광학 분야에서도 단분자 검출법을 이용하는데, 그 목적 중의 하나는 분자 양상불의 평균치를 측정하던 기존의 형광 분광학의 한계를 넘어서 단분자의 분광학적 특성을 조사함으로써 분자내에서 발생하는 양자론적 현상을 개별적으로 관측하고 이해하기 위해서이다.<sup>[8]</sup>

그러나 용액내에 위치한 분자의 경우에 광해리율(photo-bleaching rate)이 높고 확산 운동에 의해서 검출 영역에 분자가 머무는 시간이 길지 않기 때문에, 측정할 수 있는 형광 광자의 수가 적어서 아직은 정밀한 데이터 분석에 한계가 있는 것이 사실이다.<sup>[9]</sup> 본 실험은 단분자 검출법으로 단분자의 형광소멸 곡선을 측정하는 장치를 구성하고, 형광소멸시간을 산출하기 위한 형광 광자수의 한계를 검증하는데 목적을 두었다. 검출영역을 제한하는 수단으로써 공초점 현미경을 사용하였으며, 여기 광원으로는 다이오드 펄스 레이저를 사용하였고, 광검출기로는 SPAD(single photon avalanche diode)를 사용하였다.

### II. 측정장치

그림 1은 단분자에서 방출되는 형광을 검출하기 위한 단분

자 분광 장치의 개략도이다. 다이오드 레이저빔은 빗띠투과 필터(639DF9, Omega Optics)와 광속분할기를 거쳐서 시료에 입사한다. 레이저 빔의 빗띠폭이 넓기 때문에, 형광 파장과 겹치는 부분을 제거하기 위해서 필터를 사용하였다. 배율이 100이고 조리개수가 1.4인 oil-immersion 대물렌즈(Olympus)를 사용하여 레이저광을 시료에 집속시킨다.

여기광인 펄스 다이오드 레이저의 중심 파장은 638 nm, 봉우리 출력은 약 150 mW, 그리고 반치폭은 500 ps이다. 본 실험에서는 펄스 반복률을 17 MHz로 설정하였으며, 시료에서의 평균 여기광 세기는 약 450  $\mu$ W이었다.

형광 광자는 동일한 대물렌즈로 모았다. 광부품들에서 반사되는 여기광과 용액에서 발생하는 라만 산란광이 검출기로 입사하는 양을 최소화하기 위해서 Raman edge cut-off 필터(650REFLP, Omega Optics)를 사용하였다. 초점밖 신호(out-of-focus signal)를 제거하고, 검출공간을 최소화하기 위해서 직경이 100  $\mu$ m인 바늘구멍을 대물렌즈의 후초점면에 놓았다.<sup>[10]</sup> 이와같은 검출조건에서, 검출공간의 직경은 약 0.3  $\mu$ m이며, 필터 세트, 대물렌즈의 형광수집률, 광검출기의 양자효율, 그리고 대물렌즈와 광검출기와의 총투과율을 고려하였을 때 형광 광자 측정률은 약 1%가 된다.

단광자(single photon) 검출기는 SPAD(SPCM 200, EG&G Ortec Optoelectronics)를 사용하였다. SPAD의 검출면적은 150 $\times$ 150  $\mu$ m이며, 암전류 신호는 약 30 counts/s, 양자 효율은 600 nm에서 약 60%이다. 일반적으로 PM-tube의 양자효율은 5~20%이므로 단일 광자를 검출하는데는 SPAD가 효과적이다. SPAD의 전기 펄스를 증폭하여 자체 제작한 다중채널 계수기(MCS)<sup>[11-12]</sup>와 다중채널 시상관 단광자 계수기(TCSPC)<sup>[13]</sup>로 입력하였다.

MCS는 단광자의 형광폭발신호를 실시간으로 모니터링하고, 신호의 자기상관함수를 계산하여 분자가 검출공간에 머무는 시간을 산출하는 목적으로 사용하였다. 본 실험에서 사용한 컴퓨터 인터페이스 TCSPC(SPC-300, Becker & Hickl)는 최소 10 ms의 적분시간으로 쉬임없이 형광소멸곡선을 수집하는 기능을 가지고 있다.

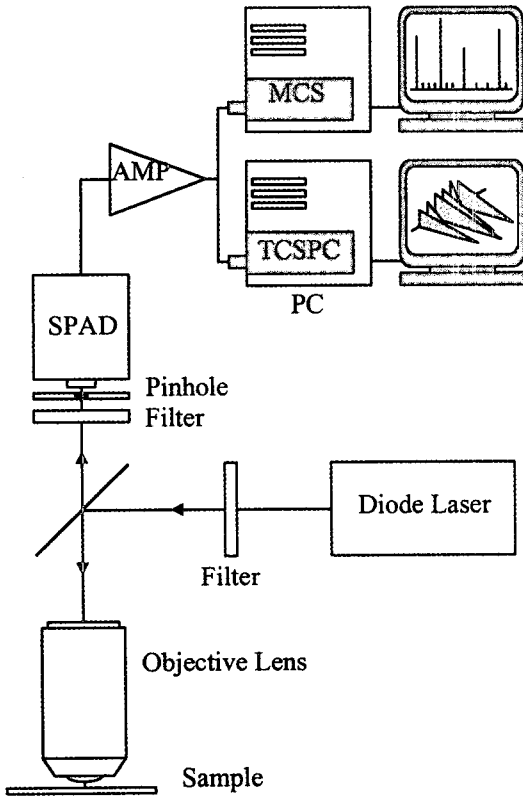


그림 1. 공초점 현미경을 사용한 용액내 단분자 검출 장치의 개략도.

단분자가 검출 영역을 지나가는 순간에 레이저 유도에 의해서 형광이 발생하고, TCSPC로 이 형광을 수집함으로써 형광소멸곡선을 측정한다. 다만 적분시간에 비해서 분자가 머무는 시간이 길 경우, 단분자 형광 신호가 몇개의 bin에 나누어져 수집될 수 있다. 본 실험에서는 분자가 검출영역에 머무는 평균 시간이 수 ms이므로, 각 bin의 적분 시간을 10 ms로 설정하였다.

본 실험에서 시료로 사용한 JA22 색소 분자<sup>[14]</sup>는 에틸렌글리콜에서 최대흡수파장이 617 nm, 형광빛파의 봉우리 파장은 640 nm이며, 형광양자효율은 0.9 이상이다. 농도가  $1 \times 10^{-5}$  mol/L인 용액을 준비한 후, 몇 단계로 희석하여  $\sim 1 \times 10^{-11}$  mol/L 정도까지 농도를 낮추었다. 이 농도에서는, 공초점 현미경에 의해서 주어지는 검출공간의 부피가  $\sim 10^{-15}$  L이므로, 이 검출공간에 두 개 이상의 색소 분자가 동시에 머무는 확률은 매우 낮아서, 대부분의 형광신호는 단분자의 것으로 보아도 된다.

Protonation과 pseudobase를 확보하기 위해서 색소 용액 100 mL에 trifluoroacetic acid를 50  $\mu$ L 정도의 비율로 혼합하였다. 이렇게 준비한 시료는 오목면이 있는 유리판과 0.17 mm 두께의 유리덮개판 사이에 놓았다.

### III. 결과 및 분석

순수 용매를 시료로 하여 측정한 결과 배경 잡음은 약 800 Hz 정도였다. 광검출기의 암전류 신호는 약 30 counts/s이어서 거의 무시되므로, 배경 잡음은 주로 산란광에 의한 것이다.

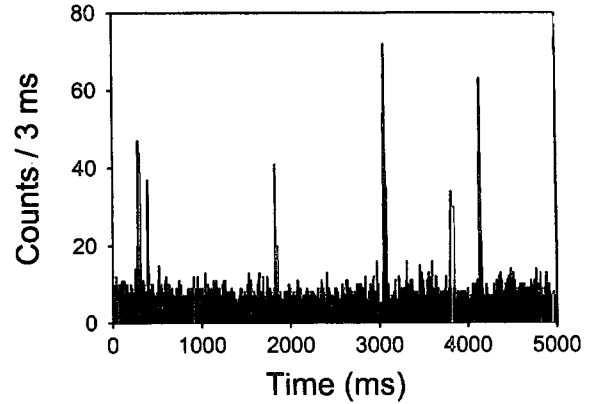


그림 2. MCS로 측정한 형광폭발신호. 각 채널의 적분시간은 3 ms이다.

이 형광폭발신호의 신호폭 분포를 분석한 결과 분자가 검출 영역에 머무는 평균 시간은 약 5 ms이었다. 큰 신호는 검출 영역의 중심을 지나간 분자에서 방출된 것이며, 작은 신호들은 검출 영역의 가장자리를 지나간 분자로부터 발생한 것이다.

그림 3은 TCSPC로 수집한 일련의 histogram이다. 산란광으로 이루어진 배경 잡음 신호는 여기광이 시료에 입사하는 동안에만 발생하며, 그림 3에서 이와같은 배경 잡음 신호를 볼 수 있다. 한편 단분자의 형광 신호는 그림 3에서 bin time이 70 ns일 때 나타났으며, 이 데이터를 분석하여 형광소멸 시간을 산출할 수 있다. 일반적으로 TCSPC를 이용하는 형광 측정에서는 최소제곱법에 근거한 곡선맞춤을 통해 형광소멸 시간을 산출한다.<sup>[13]</sup> 그러나 이 계산 과정은 각 채널의 데이터들이 정규분포를 하고 있다는 전제를 그 배경으로 하고 있기 때문에, 광자 계수율이 낮은 본 실험에서는 분석 방법으로 이용할 수 없다.

광자 계수율이 낮은 경우, MLE(maximum likelihood estimator) 방법을 사용할 수 있는데, 여기서는 각 채널에 수집된 데이터들이 각각 다항 분포(multinomial distribution) 특성

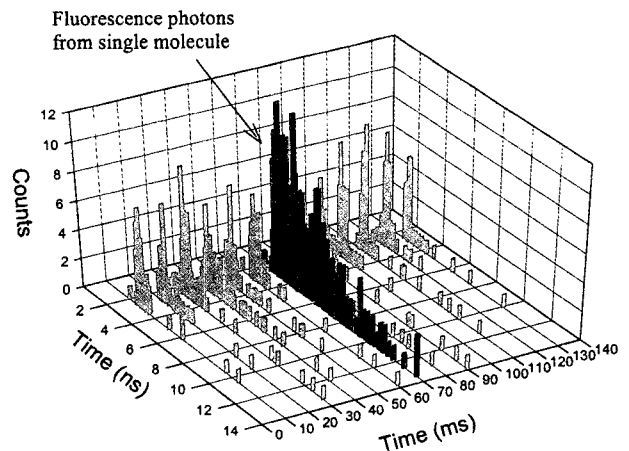


그림 3. 다중채널 TCSPC로 수집한 일련의 시분해 형광소멸곡선 histogram.

을 갖는다고 가정하고 있다.<sup>[15]</sup> 형광소멸과정이 단지수함수로 표현된다는 가정하에서 형광소멸시간을 계산하는 것이 제한적 요소이지만, 분자간 에너지 전이와 농도 소광이 무시될 정도의 낮은 농도에서는 형광소멸곡선이 단지수함수로 잘 표현되므로, 단분자 수준의 본 계측에서는 MLE 방법을 이용하는 것이 가능할 것이다.

만약에  $0 \leq t \leq T$  사이에서 형광 광자를 수집하고 시간에 따른 계수를 변화가  $\exp(-t/\tau)$ 로 주어지는 경우, TCSPC의  $j(j=1, 2, \dots, m)$  채널에서 형광 광자가 계측될 확률  $P_j$ 는 다음과 같다.<sup>[15]</sup>

$$P_j = \frac{e^{-jw/\tau}(e^{w/\tau}-1)}{1-e^{-T/\tau}} \quad (1)$$

여기서  $w = T/m$ 이며,  $\tau$ 는 분자의 형광소멸시간이다.  $j$ 채널의 광자 계수치를  $n_j$ 라 하였을때, likelihood 함수  $L$ 은

$$L = N! \prod_{j=1}^m \frac{P_j^{n_j}}{n_j!} \quad (2)$$

로 정의하며, 여기서

$$N = \sum_{j=1}^m n_j \quad (3)$$

이다.  $L$ 이 최대가 되었을 때, 곡선맞춤이 최적의 상태로 이루어진 것으로 판단하며, 식(1)을 식(2)에 대입하여,  $\partial L / \partial \tau = 0$ 인 조건을 구하면 다음 식과 같다.

$$\frac{w}{1-e^{-w/\tau}} + \frac{T}{1-e^{-T/\tau}} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^m jwn_j \quad (4)$$

계측한 데이터로부터 식(4)의 오른쪽항을 계산하고, 등호가 성립하도록 왼쪽항의  $\tau$ 를 구한다.

본 TCSPC의 기기감응곡선의 반치폭은 약 700 ps이었으며, 계산 과정에서 산란광 성분이 포함되는 것을 최대한 제한하기 위해서 기기감응곡선의  $FW(1/10)M$ 인 위치를 초기 채널 ( $j=1$ )로 설정하였다. 이때 계측창의 폭은 8.3 ns,  $m=65$  채널이었다. 그림 4(a)는 순수 용매 상태에서 계측한 것이며, (b)는 색소 분자가 있는 시료에서 계측한 결과로 총광자수  $N$ 이 감소함에 따라서  $\tau$ 의 분산이 증가하는 경향을 보이고 있다. 총광자수  $N$ 이 40 이상인 데이터만으로 계산한 결과, 단분자의 형광소멸시간이  $3.27 \pm 0.68$  ns의 범위에 분포하였다. 여기서 오차는 표준편차이다. 비록 상대 오차가 약 21%이기는 하지만, 본 실험 결과는 단분자의 형광소멸시간의 계측이 가능하다는 것을 확인해 주었다. 만약 레이저 펄핑률을 증가시키고 형광 광자의 수집 효율을 향상시킨다면 계측 오차를 상당히 줄일 수 있을 것이다.

한편 계측창의 채널수  $m$ 이  $\tau$ 의 계산치와 관계가 있음을 확인하였다. 계측창은 8.3 ns로 유지하고,  $m$ 만을 변화시키면서 계측한 결과, 그림 5와 바와같이  $m$ 이 감소함에 따라, 즉 TCSPC 채널의 적분시간이 증가함에 따라서 계산된  $\tau$ 가 상대적으로 증가하는 경향을 보이고 있다. 그림에 나타내지는 않았으나, 채널수  $m$ 을 더 증가시키면, 각 채널에 수집되는 광자

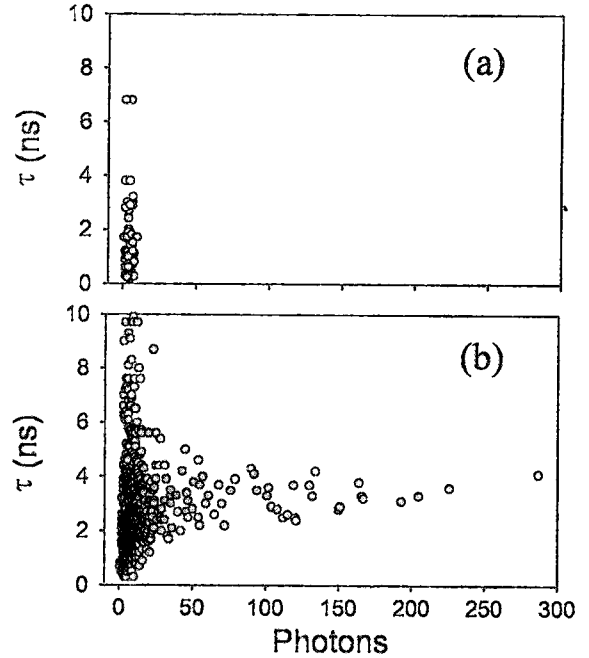


그림 4. 광자수에 따른 형광소멸시간 계측값의 분포도. (a)는 순수 용매에서 계측한 결과이며, (b)는 색소 용액에서 계측한 결과이다.

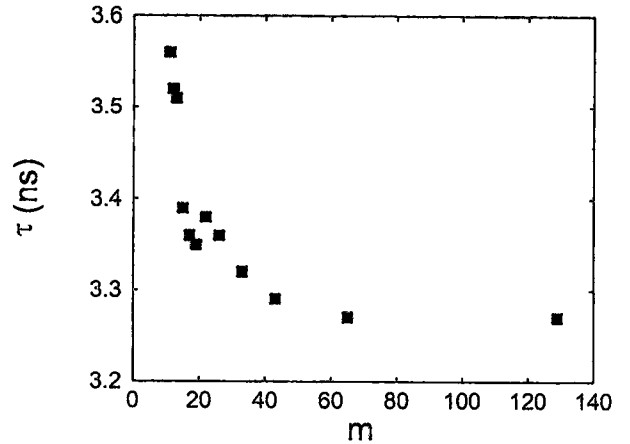


그림 5. 계측창의 채널수  $m$ 과 계산된 형광소멸시간  $\tau$ 사이의 관계. 계측창의 폭은 8.3 ns이다.

수가 감소하기 때문에, 계산 자체가 무의미해지는 경우도 있었다.  $m$ 이 대략 60~130일 때, 안정된 계측 결과를 얻을 수 있음을 확인한 후,  $m=65$ 로 고정하고 실험을 실시하였다.

#### IV. 결 론

공초점 현미경과 다이오드 펄스 레이저 그리고 시상판 단광자 계수 장치를 사용하여 단분자의 형광소멸시간을 계측하는 것이 가능함을 보였다. 여기 광원으로 다이오드 레이저를 사용함으로써 계측 장치의 소형화도 기대할 수 있었다. 여기 광원의 반복률이 17 MHz이고 형광수집효율이 약 1%인 계측 조건에서 총광자수가 40 이상일 때 21%의 오차 범위에서 JA 22 색소 분자의 형광소멸시간을 계측하였다. 앞으로 형광 수

집 효율을 향상시키고, 반복률이 빠른 펄스 레이저 시스템을 사용한다면, 보다 정밀한 단분자 계측과 분광학적 특성 연구가 가능할 것이다.

### 감사의 글

JA22 분자를 제공하여 주신 독일 Gesamthochschule 대학교 K. H. Drexhage 박사에게 감사드립니다. 본 연구는 1998년도 목원대학교 학술연구비의 지원을 받아 수행하였습니다.

### 참고문헌

- [1] T. Hirschfeld, *Appl. Opt.* **15**, 2965 (1976).
- [2] N. J. Dovichi, J. C. Martin, T. H. Jett, R. A. Keller, *Science* **219**, 845 (1983).
- [3] S. Nie, D. T. Chiu, and R. N. Zare, *Science* **266**, 1018 (1994).
- [4] M. D. Barnes, W. B. Whitten, and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **67**, 418A (1995), and references cited therein.
- [5] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, M. E. Johnson, J. C. Martin, B. L. Marrone, J. A. Schecker, C. W. Wilkerson, R. A. Keller, A. Haces, P.-J. Shih, and J. D. Harding, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **97**, 1535 (1993).
- [6] S. Niehren, W. Kinzelbach, S. Seeger, and J. Wolfrum, *Anal. Chem.* **67**, 2666 (1995).
- [7] B. B. Haab and R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **67**, 3253 (1995).
- [8] T. Basche, W. E. Moerner, M. Orrit, and U. P. Wild, *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy* (VCH, Weinheim, 1996).
- [9] J. Enderlein, *Appl. Opt.* **34**, 514 (1995).
- [10] D. R. Sandison and W. W. Webb, *Appl. Opt.* **33**, 603 (1994).
- [11] 고동섭, S. Nord, M. Sauer, J. Wolfrum, *한국광학회지* **8**, 221 (1997).
- [12] D.-S. Ko, *Rev. Sci. Instrum.* **68**, 248 (1997).
- [13] D. V. O'Connor and D. Phillips, *Time-Correlated Single Photon Counting* (Academic Press, London, 1984).
- [14] M. Sauer, Ph.D. Thesis, Heidelberg Univ., 1995.
- [15] J. Tellinghuisen and C. W. Wilkerson, Jr., *Anal. Chem.* **65**, 1240 (1993).

## Measurement of fluorescence decay times of single molecules in solution

Dong-Seob Ko

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

(Received October 19, 1998, Revised manuscript received January 15, 1999)

A confocal microscope system was used to study the bursts of fluorescence photons from single dye molecules excited at 638 nm by a short-pulsed diode laser with a repetition rate of 17 MHz. A red dye, JA22, in ethylene glycol solution was used as a sample. The fluorescence decay curves of single molecules were acquired using a time-correlated single photon counting and analyzed by a maximum likelihood estimator. It was possible to measure the fluorescence decay times with an error probability of 21% at photon number of more than 40 per dye molecule.