

Fluorescence Microscope using Total Internal Reflection for Measuring Biochip

裴秀眞* · 姜旭*
(Soo-Jin Bae · Uk Kang)

Abstract - This study suggests a new fluorescence microscope to observe micro-samples within fluorophore in a variety of biomedical fields including the fluorescence analysis of a biochip, such as a DNA micro-array. A fluorescence microscope is a device for irradiating light onto a micro-object, executing an excitation and fluorescence emission process. In this study, it adopts a total internal reflection fluorescence(TIRF) method to excite a whole micro-sample substrate different from an existing way which uses an evanescent wave resulting from a total internal reflection on the micro-sample surface.

Suggested TIRF microscope can reduce optical noise and obtain images with higher sensitivity thus obtain precise information about the density, quantity, location, etc. of a fluorophore, and can simultaneously process separate images even when plurality of fluorophores having different excitation and fluorescent wavelength ranges is distributed, thus easily obtain information about the fluorophores.

Key Words : Fluorescence Microscope, Total Internal Reflection, Biochip, Fluorophore, Micro-object

1. 서 론

바이오칩은 과학 기술의 발전과 유전자 연구 및 신약 개발 프로세스, 임상 진단 등의 분야에 혁신적인 변화를 가져올 것으로 주목을 받고 있으며, 단순한 연구개발을 위한 초기 용도에서 벗어나 질병 진단용, 식품·농축수산물 생산관리 등 다양한 산업 분야로 점점 확대되고 있다.

바이오칩의 일반적인 검출 방법은 바이오칩 기판상에 고밀도로 배치된 마이크로 샘플들에서 발생하는 형광을 검출하는 것으로, 바이오칩 자체 가격을 낮추기 위해서 고가의 형광 염료 양을 적게 상용하는 것이 현 추세이며, 결과적으로 적게 발생하는 형광 신호를 검출할 수 있는 고감도의 분석시스템이 필요하다[1].

종래에 일반적으로 사용되고 있는 형광 검출장비의 하나로 그림 1은 광원 앞에 설치된 여기 필터 및 차폐 필터들과 색선별 거울(dichroic mirror) 등의 조합으로 구성된 광 분리기 에 의해 여기광과 형광 방출광의 경로를 분리한다. 색선별 거울의 표면에 마련된 간섭 코팅 막은 여기광은 반사시키고 더 긴 파장을 갖는 형광 방출광은 통과시키기 때문에, 여기광은 검출기에 전달되지 않고 마이크로 객체로부터 방출되는 형광이 주로 도달하게 된다.

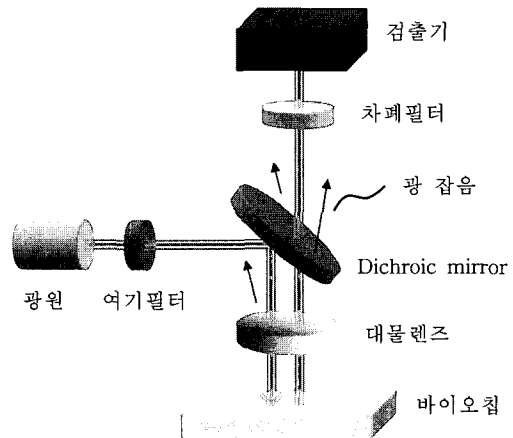


그림 1. 종래 기술의 형광 현미경의 한 예
Fig 1. Example of a conventional fluorescent microscope

그러나 대물렌즈를 전후로 여기광과 형광 방출광의 경로가 공간적으로 일치하는 부분이 존재하기 때문에, 대물렌즈의 광학 구성 성분들로부터 발생하는 고유 형광(autofluorescence)이나 대물렌즈 내부와 표면에 존재하는 산란원 등의 형광 발생원들에 의해 밝은 부위(hot spots)들을 형성하는 광학적 잡음이 야기된다. 이러한 광학적 잡음은 형성된 형광 이미지(fluorescent image)의 명암 대비를 낮추게 되며, 관측 대상인 마이크로 객체에 포함된 소량의 형광물질(fluorophore)에 의해 발생하는 미약한 형광의 정확한 식별을 어렵게 한다.

또한, 광 경로의 광 스펙트럼을 선별적으로 선택하는 요소(예를 들면, 색선별 거울)를 사용하는 위와 같은 구성에서는,

† 교신저자, 正會員 : 한국전기연구원 SOI-KOREA Center
E-mail : sjbae@keri.re.kr

* 正會員 : 한국전기연구원 SOI-KOREA Center
接受日字 : 2007年 6月 12日
最終完了 : 2007年 8月 12日

다색의 안료(dye)들에 의해 착색된 표본을 한 화면에서 비교하는 등의 관측이 근본적으로 불가능하다.

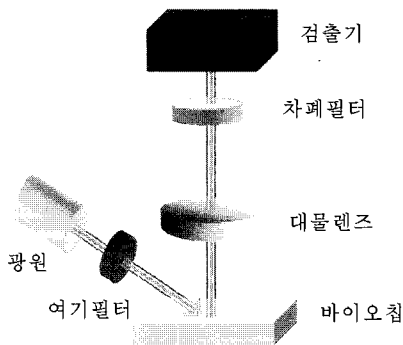


그림 2. 종래 기술의 형광 현미경의 다른 예, 여기 광과 형광 방출광의 경로를 분리한 예.

Fig 2. Example with the separated path of excitation light and fluorescence emission

위와 같은 문제점을 극복하기 위하여, 그림 2와 같이, 여기 광이 대물렌즈를 거치지 않도록 하여 여기광과 형광 방출광의 공간적인 경로를 분리하는 방식이 제안되었다. (예를 들어, 광원과 광섬유를 조합하여 분석 객체에 광을 조사하는 방식인, 미국 Applied Precision사의 Biochip Reader "Array WoRx"). 이러한 방식은 대물렌즈의 광축 방향에 대해 비스듬한 각도에서 객체에 광을 조사함으로써, 여기광이 대물렌즈를 거치지 않음으로써 광학 잡음의 양이 감소한다. 그러나 대물렌즈와 마이크로 객체 사이에 상당한 여유 공간이 필요하며, 그에 따라 높은 개구수(numerical aperture)를 갖는 대물렌즈의 사용이 어려워진다. 그 외에 마이크로 객체와 현미경의 여러 표면으로부터 발생하는 산란광이 대물렌즈에 들어가게 되어 광학 잡음의 발생을 피하기 어렵다는 문제를 갖고 있다.

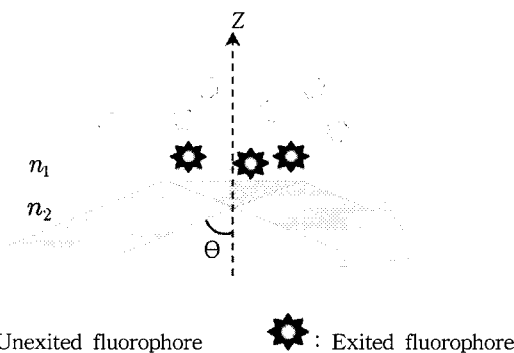


그림 3. 종래 기술의 형광 현미경의 다른 예, 형광 측정을 위해 완전 내부 반사를 이용한 예

Fig 3. Example using the principles of TIRFM

그림 3에는 광학 잡음을 보다 감소시키기 위하여, 완전 내부 반사를 이용하여 여기광을 조사하는 형광 현미경 방법(TIRFM: Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy)을 도시하였다. 이 방법에서는, 굴절률이 다른 두 매질의 경

계에서 입사각이 임계각(critical angle) 보다 클 때 전반사되는 것을 이용하여, 여기광과 형광 방출광의 경로를 분리시키고 광학적으로 밀도가 작은 매질에서 발생하는 감쇠파(evanescent wave)를 경계면 근처에 배치된 마이크로 객체의 형광 여기에 사용하는 구조이다.

형광 물질을 포함하고 있는 관측 대상 객체는 굴절률 n_1 을 갖는 매질 1에 위치한다. 매질들의 굴절률이 $n_2 > n_1$ 이고, 광선의 입사각이 $\theta > \theta_c = \sin^{-1}(n_1/n_2)$ 조건을 만족할 경우 (여기서 θ_c 는 입사 임계각임), 매질 1과 매질 2의 경계면에서 완전 내부 반사(total internal reflection, TIR)가 일어나며, 경계면에서 반사된 광선은 매질 2로 완전히 되돌아가게 된다.

두 매질의 분리 경계에 입사되는 전자기 방사선(electromagnetic radiation)의 극히 일부는 경계면을 투과하여 그림 3의 Z축 방향에서 그 세기가 지수적으로 감쇠하면서 소멸하므로, 매질 1의 내부로는 전파되지는 못한다. 즉 매질 1의 경계면 근처의 극히 일부 영역에서 에버네센트(evanescent) 파의 전파가 일어나게 된다[2],[3]. 매질 1의 경계면을 $Z=0$ 이라 하면, Z축 방향에서의 에버네센트 파의 세기는 다음과 같은 관계식을 따른다.

$$I(z) = I_0 e^{-z/d} \tag{1}$$

$$\text{여기서 } d = (\lambda_0 / 4\pi)(n_2^2 \sin^2 \theta - n_1^2)^{-1/2}$$

에버네센트 파는 경계면 근처에 존재하는 마이크로 객체에 포함된 형광 물질을 여기시키는 작용을 할 수 있으나, 매질 1에서 에버네센트 파가 투과되는 깊이는 일반적으로 수백 나노미터를 초과하지 않는다. 따라서 이 방법은 경계면 근처의 영역에 존재하는 미세 객체를 관측하기에 적합하나, 상술한 바와 같이 에버네센트 파는 그 세기가 낮으므로, 검출되는 광의 감도가 지극히 낮고, 항상 경계면 근처에 존재하는 미세 객체들만이 관측되기 때문에, 일정 부피 내에 분포된 마이크로 객체들의 관측용으로는 적합하지 않다는 문제점을 갖는다.

본 연구는 이와 같은 문제점을 해결하면서, 각종 광학 잡음을 제거하여 보다 감도 높은 이미지를 얻고, 다수의 광학 필터를 채용하고 있는 기존의 측정 장비의 복잡성을 개선하고자 한다. 나아가서는 여기 및 형광 파장의 범위가 다른 다수의 형광 물질이 분포된 경우에도 구별된 이미지를 동시에 측정 가능한 새로운 구조의 바이오칩 측정 장비를 제안하고자 한다.

2. 형광 측정 원리

본 연구의 형광 측정 방법은 상술한 에버네센트 파를 이용하는 형광 현미경과는 달리, 일정 부피 내에 분포된 마이크로 객체를 여기시킴으로써 그로부터의 형광 이미지를 높은 감도로 얻는 것이 가능하도록 한다. 즉 종래의 TIRFM 방식과는 달리, 에버네센트 장(field)의 작용 지역이 아니라, 시편의 전체 두께에 걸쳐 발생하는 마이크로 객체를 여기시킴으로써 형광을 유도한다.

매질 1을 통해 입사된 여기광을 매질 1과 접해있는 경계면

에서 전반사가 되도록 매질 1과 매질 3의 굴절률을 $n_1 > n_3$ 관계를 만족하도록 하고, 여기광의 경계면에 대한 입사각은 임계각 이상으로 여기 시킨다. 이때 매질 1에서의 여기광 통과 경로 내에 존재하는 마이크로 객체에 포함된 형광 물질이 여기 되면서 방출하는 형광을 대물렌즈에 의하여 포착함으로써 미세 객체를 관측할 수 있다. 그림 4에는 이러한 본 연구의 형광 여기 방식을 도시하였다.

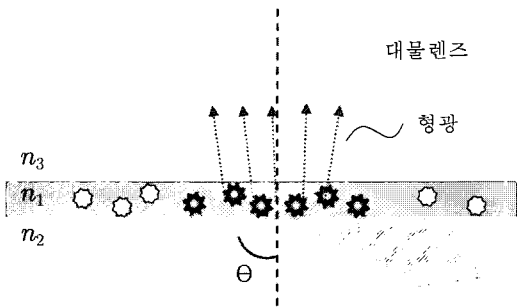


그림 4. 형광 현미경의 세부 구조.
Fig 4. Detailed construction of the fluorescence microscope

형광물질을 포함하는 관측하고자 하는 마이크로 객체(유기 분자, 섬유질, DNA, 염색체, 세포 등)는 n_1 의 굴절률을 갖는 매질 1에 포함되어 있으며, 매질 1의 한쪽 면에 접하고 그 하부를 지지하는 굴절률 n_2 의 매질 2가 존재한다. 매질 2의 굴절률 n_2 는 매질 1의 굴절률 n_1 과 같거나 비슷하도록 조정하는 것이 가능하나, 반드시 그러할 필요는 없으며, 굴절률이 같거나 비슷하도록 조정된 경우에는 그림 4에 도시된 바와 같이 매질 1 및 매질 2의 경계에서는 입사광의 굴절이 거의 일어나지 않게 된다. 매질 1의 다른 한 면은 대물렌즈와 매질 1 사이에 존재하는 n_3 의 굴절률을 갖는 매질 3(일반적으로 공기)과 접하고 있으며 각 매질들의 굴절률은 다음을 만족시킨다.

$$n_2 \approx n_1 > n_3$$

여기서, 매질 1과 매질 3의 경계면에 입사하는 광선의 입사각은 임계 반사각인 θ_c 보다 크거나 같아야 한다.

$$\theta > \theta_c = \sin^{-1}(n_3/n_1) \quad (2)$$

이 경우 매질 2로 비스듬히 입사하는 광선은 실제적으로 광선 방향의 큰 변화 없이, 매질 2와 매질 1의 경계면을 가로 지르며, 매질 1과 매질 3의 경계면에서 완전 내부 반사된다. 따라서 매질 1 내에서 완전 내부 반사되는 광 경로 내에 존재하는 마이크로 객체에 포함된 형광물질에 의해 형광이 방출된다. 대물렌즈는 이러한 형광을 포집하고, 카메라 등을 포함하는 광 처리부에서 시편의 형광 화상을 형성한다.

3. 시스템 구성

그림 5에서는 본 연구의 형광 측정 원리에 따른 형광 현미경의 시스템을 구성하기 위한 구체적인 전체 구성도를 나타내었다.

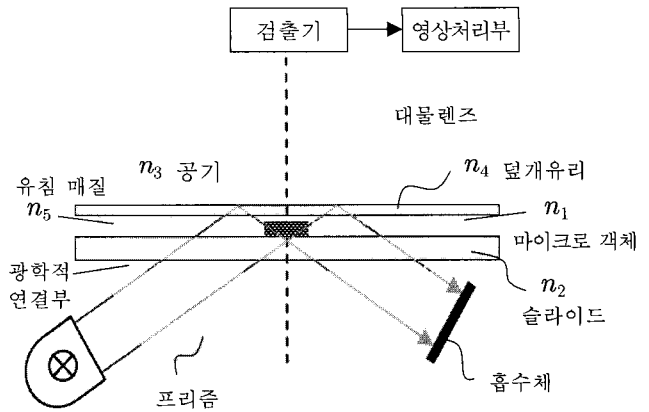


그림 5. 형광 현미경의 전체 구성도
Fig 5. Entire construction of a fluorescence microscope

한편, 그림 4에서 매질 3과 경계면을 형성하는 매질 1의 표면이 충분히 고르고 매끄럽지 않은 경우에 표면에서의 여기광의 굴절 및 산란 때문에 두 매질의 경계에서 광의 누설이 발생할 수 있다. 누설된 광은 바람직하지 않은 기생광(stray light)으로, 대물렌즈에 입사하여 형광 화상의 명암 대비를 낮추며, 실제의 마이크로 객체로부터의 형광이 아닌 거짓상을 형성한다. 이러한 누설광의 발생 가능성을 줄이기 위해 본 연구에서는 바이오칩 슬라이드(n_2)의 상부 표면에 유침 매질층(optical coupling fluid, n_5)을 도포하고, 그 상부에 n_4 의 굴절률을 갖는 덮개유리를 덮었다. 이 경우, 선택된 유침 매질의 굴절률과 덮개유리의 굴절률이 동일하거나 근사하도록 하여, 거의 광학적으로 동질의 매질이 되도록 할 수 있다.

즉 $n_2 \approx n_4 \approx n_5$ 가 되도록 설정하였다.

광원과 프리즘에 의해 바이오칩 시편으로 여기광을 공급할 때 프리즘 상부면과 슬라이드의 경계에는 굴절률을 맞추어 광학적으로 원활히 접촉시켜주는 물질(optical coupling material) 층을 형성해주었고, 프리즘의 다른 한 면에는 전반사 되어 온 여기광의 역 반사를 줄이기 위해 광흡수체(광묵)를 도포하였다.

바이오칩 슬라이드 위의 매질 1에는 관측하고자 하는 마이크로 객체가 있으며, 덮개유리에 의해 가깝게 덮여 진다. 덮개유리 밑의 마이크로 객체가 위치한 제1 매질 위에 도포된 유침 오일 등의 광학 연결 매체(optical coupling fluid)는 시료 표면의 미세한 요철 등 고르지 않은 부분을 채우고 접촉하는 매질들의 굴절률을 서로 맞추어 주는 역할을 한다. 덮개유리의 상부 표면은 공기 매질을 사이에 두고, 대물렌즈의 맨 앞 렌즈와 이격되어 있다.

제2 매질인 슬라이드와 광학 연결 매질, 프리즘의 굴절률은 서로 같도록 선택하는 것이 바람직하며, 제4 매질인 덮개유리와 제3 매질인 공기와의 경계면으로 입사하는 여기광 광선의 입사각은 입사 임계각보다 커야 한다. 매질 3의 경계면에서 완전 내부 반사되는 입사광 및 반사광은 마이크로 객체를 지나면서, 부분적으로 마이크로 객체 내의 형광 분자들에 흡수되어 형광을 발산하도록 한다. 이 경우에 시료 표면의 전체 두께에서 형광물질이 여기 될 수 있어, 시료의 n_3 표면

등 일부 영역(그림 3)이 아닌, 여기광이 지나가는 공간 전체(그림 4)에서 형광 물질의 여기가 일어나게 된다.

대물렌즈에 의해, 마이크로 객체로부터 나오는 형광이 포집되어 상이 형성되고, CCD 카메라 등을 포함하는 영상 수신부로 인입된다. 영상 수신부는 기록 장치와 연결되어 영상 처리 및 분석을 통해 텔레비전 화면의 저장, 처리 및 분석을 하는 영상 처리부와 접속된다.

매질 3과의 경계면에서 반사된 광선은 광학 잡음 발생을 억제시키기 위해 프리즘의 한 면에 설치된 광흡수체에 의해 흡수된다.

이러한 본 연구의 형광 현미경은 종래 기술의 형광 현미경에서 일반적으로 사용되는 여기 및 차폐 광 필터를 사용하지 않음으로써 여기광 스펙트럼의 세기 감쇠를 가져오지 않는다. 또한, 대물렌즈를 포함하는 형광 방출광의 경로에 광 스펙트럼을 선택적으로 선택하는 필터 등의 광학 요소가 존재하지 않으며, 백색광을 광원으로 하고, 수신부에 컬러 CCD 카메라를 통해 컬러 영상 신호 영상화 등 처리가 가능하다. 파장 뷰어(multi-wavelength viewer)를 사용함으로써, 여러 형광 물질로부터 방출되는 형광 이미지를 동시에 관측 및 기록할 수 있다. 이러한 구성에서는, 여러 형광 물질들 동시에 여기될 수 있도록 광원으로부터 백색광의 형태로 조사되며, 다 파장 뷰어(multi-wavelength viewer)를 통해 각 형광물질 자신의 형광 스펙트럼들을 통한 개별적 형광 상이 형성될 수 있다.

또한, 프리즘과 슬라이드 사이에도 건조한 상태에서도 원활한 광학적 접촉을 형성하는 탄성 재료로 이루어진 유침 매질이 사용될 수 있다. 이것은 슬라이드와 프리즘의 접촉 시, 유침 오일을 얇게 칠하거나, 이를 제거하는 작업이 필요 없도록 하여, 작업의 편의성을 증가시킨다.

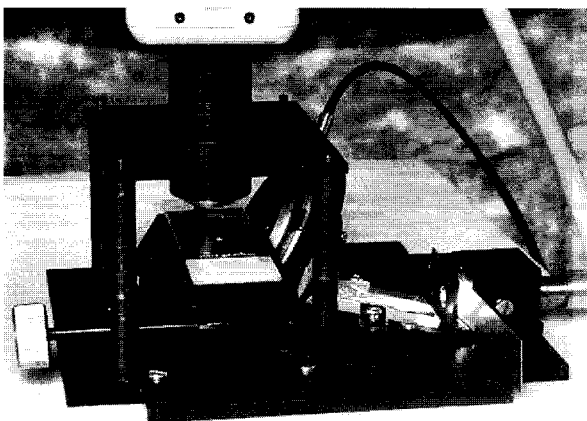


그림 6. 제작된 바이오칩 측정 장치
Fig 6. Apparatus for measuring a biochip

그림 5의 형광 현미경을 그림 6과같이 실제로 구현하고, 이를 사용하여 실제 마이크로 객체를 관측한 결과를 예시한다. 광원으로는 250W 단 파장 아크 수는 램프(모델명: DRSha-250-3M)와, 개구수 0.36의 석영 광섬유로 구성된 광원 시스템 또는 반도체 레이저(모델명: VM 65014, 655 nm, 25 mW, 제조원: Midwest laser products)가 사용되었다. 대물렌즈로는 Wild Heerbrugg사의 M-420 장비에 사용되는

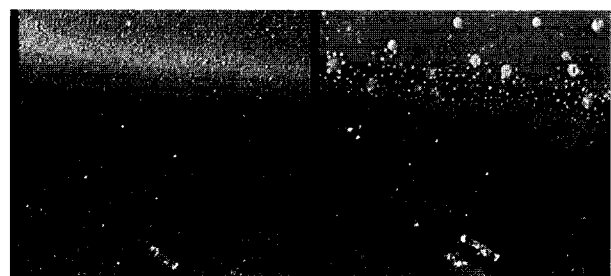
Macrozoom 1:5를 사용하였다. 프리즘은 굴절률 1.51과 꼭지각 90도의 각도를 갖는 유리 재질로 제작되었다. 프리즘 상부면은 유침 매질의 역할을 하는 탄성 플라스틱 재료가 덮여졌다. 영상 수신 장치로는 칼라 CCD 카메라 시스템 OTV-S6 (Olympus) 또는 단색 고감도 CCD 카메라 시스템 "Photometrics CoolSNAPe (Roper Scientific, GmbH)"가 사용된다. 얻어진 영상은 프레임그래버 FG/PCI-2을 통해 화면의 디지털 처리를 거쳐 컴퓨터 모니터에 매핑된다. 여기광을 조사하는 광경로와 형광을 수신하는 광경로에는 여기 및 차폐 필터가 설치되지 않았다.

관측은 다양한 표본 배치 방식과 객체를 사용하여 이루어졌다. 시료 표본은 (a) 표본 표면이 공기 매질에 직접 접하도록 놓인 경우와 (b) 표본 표면이 유침 오일(immersion oil, 1.515)을 통해 덮개유리로 살짝 덮여져 있는 경우에 대하여 각각 관측되었다.

4. 장 실험 결과

실험 1:

연구 객체인 다색 형광 표본과 유사한, 빨간 및 녹색 형광 염료를 사용하여, 프리즘의 면에 직접적으로 선의 형태로 표시한 경우의 영상을 그림 7에 나타내었다. 광섬유를 통한 백색 광원을 사용하여 광을 조사하였으며, 광 필터는 사용되지 않았다. 그림 7에는, 칼라 카메라 OTV-S6를 사용하여 기록된 화상으로서, (a) 덮개유리를 사용하지 않은 경우(왼쪽 화면)와, (b) 덮개유리를 사용한 경우(오른쪽 화면)를 나타낸다. 이러한 결과를 통해, 본 연구에서 제안된 형광 현미경이 여러 색깔의 형광물질을 동시에 관측하고 기록하는데 사용될 수 있음을 확인할 수 있다.



(a) (b)

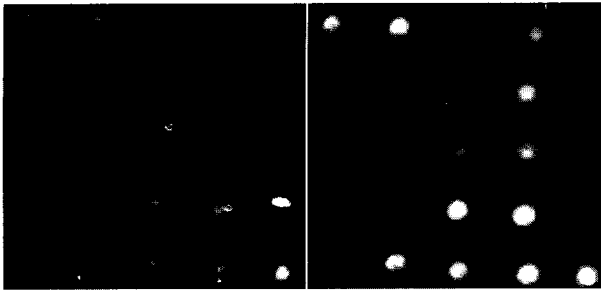
그림 7. 다색의 형광 표본 관측 영상의 예
Fig 7. Multi-dye fluorescence image

실험 2:

결핵 치료를 위한 항생제에 내성을 갖는 결핵균 진단을 위한 올리고뉴클레오타이드 바이오칩(Oligonucleotide biochip)을 본 연구의 형광 현미경을 사용하여 관측하였다. 사용된 마이크로칩은 50개의 셀로 구성되며, 각 셀의 지름이 약 100 μm로, 현미경 슬라이드 위에 있는 겔에 형성되어졌다. 셀 안에는 다양한 올리고뉴클레오타이드를 갖는 DNA 보합결합(hybridization)에 의하여 만들어진 분자들이 위치하며, 형광 라벨이 묻혀 있다.

셀의 형광 밝기는 셀에 고정된(immobilized) 뉴클레오타이드의 성분에 의존한다. 형광 마커로써 염료 Cy5가 사용되었으며, 여기광으로는 반도체 레이저 VM 65014가 사용되었다. 형광 수신은 고감도 단색 카메라 Photometrics CoolSNAPe가 사용되었다. 그림 8에는 (a) 덮개유리를 사용하지 않은 경우(왼쪽 화면)와, (b) 덮개유리를 사용한 경우(오른쪽 화면)를 도시하였다.

본 연구에서 제안된 방식에 의해 여기 및 수신 광 경로에 광 필터를 설치함이 없이 생체 마이크로칩의 형광 측정이 가능하게 된다. 겔 표면의 흠 등 결함에 의해 발생하는 광학 잡음을 제거하기 위해 덮개유리를 사용한 경우가 관측된 형광화질이 더 우수하였다.



(a) (b)

그림 8. 본 연구의 형광 현미경의 관측된 영상의 예
Fig 8. Examples of an image observed by the fluorescence microscope according to the present study

5. 결 - 론

본 연구의 형광 현미경은 바이오칩 등 마이크로 시편의 형광 측정을 위해 완전 내부 반사(전반사)를 이용한 여기 방식으로 여기광과 형광 방출 광의 경로를 분리하며, 여기광이 시편을 중심으로 대물렌즈 및 광 처리부의 반대쪽에서 조사되도록 구성함에 따라, 여기광의 조사에 의해 대물렌즈 등에서 발생하는 불필요한 형광 및 산란 등을 효과적으로 차단한다. 또한 대물렌즈와 시편 사이의 작업 공간을 줄여 형광 집광 효율을 증대시키고, 광 처리부 등 측정부에서는 형광 방출광 만이 도달하게 되므로 여기 광 차단용 필터 및 차폐 필터 등이 불필요하게 되어 장치가 구조적으로 매우 간단해지면서도 고감도를 구현할 수 있다.

그리고 상술한 완전 내부 반사 여기 방식은 광학 필터를 사용하지 않기 때문에 다색의 형광 염료들을 한 화면에서 동시에 관측가능하다.

참 고 문 헌

- [1] Mace M Jr, Montagu J, Rose S, McGuinness G, "Novel Microarray Printing and Detection Technologies", Microarray Biochip Technology, Mark Schena, Ed., Eaton Publishing Co. pp. 39-64, March 2000.
- [2] Xiao-Hong Xu, Edward S. Yeung, "Direct Measurement of Single-Molecule Diffusion and Photodecomposition in Free Solution", Science 21, vol. 275, no. 5303, pp. 1106-1109, Feb. 1997.
- [3] Ronald D. Vale, Takashi Funatsu, Daniel W. Pierce, Laura Romberg, Yoshie Harada, Toshio Yanagida, "Direct Observation of Single Kinesin Molecules Moving along Microtubules", Nature 380, vol. 380, pp. 451-453, April 1996

저 자 소 개



배수진(裴秀眞)

2000년 KAIST 전기및전자공학과 학사.
2003년 同 대학원 전기및전자공학과 석사.
2003년~현재 한국전기연구원 연구원.
TEL : 031-500-4818
FAX : 031-500-4850
E-mail : sjbae@keri.re.kr



강욱(姜旭)

1985년 서강대학교 물리학과 학사.
1987년 同 대학원 물리학과 석사.
1996년 S.I.Vavilov State Optical Institute
광학 박사.
1987년~현재 한국전기연구원 책임연구원.
TEL : 031-500-4812
E-mail : ukang@keri.re.kr