

## 고착 액적 증발면의 정밀 관측을 위한 전반사 형광 현미경 기법 개발

조원호\* · 이진기\*\*,<sup>†</sup>

### Development of a Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy for Precise Imaging the Drying Pattern of a Sessile Droplet

Wonho Cho\* and Jinkee Lee\*\*,<sup>†</sup>

**Abstract** Compared to epifluorescence(EPI) microscopy which captures fluorescence from the entire depth of sample, total internal reflection fluorescence(TIRF) can selectively visualize only a single surface of it. TIRF uses a thin evanescent field generated by the total internal reflection of laser light on surface. However, conventional TIRF system are designed for total internal reflection to occur at the upper surface of sample, making them unsuitable for sessile droplet imaging. We designed a TIRF system suitable for a sessile droplet imaging by utilizing slide glass as a lightguide. We presented the details for constructing the TIRF system using a prism, slide glass, air slit, and optical trap. Then, we compared the TIRF with EPI by imaging the droplet with fluorescent particles during its drying process. As a result, TIRF allows us to distinctly visualize the drying pattern on the bottom surface of droplet.

**Key Words** : Total internal reflection(내부 전반사), Fluorescence(형광), Microscopy(현미경)

#### 1. 서론

미세유체역학(Microfluidics) 연구에서 마이크로 및 나노 스케일의 유체 유동을 가시화하는 기술은 필수적이다. 그러나 미세 유체 유동의 직접적 가시화에는 한계가 있기 때문에, 일반적

으로 유체 내 입자의 거동을 대신 관측하여 유체 유동을 가시화하는 방식을 사용한다. 이러한 유동 가시화 기법에는 Micro-Particle image velocimetry ( $\mu$ -PIV)와 형광 현미경(Fluorescence microscopy) 등이 있다.<sup>(1-4)</sup>

이 중에서 형광 현미경은 입사하는 빛과 발광하는 빛의 구분을 통해 미세 유체 및 바이오 샘플의 가시화에 주로 사용되는 입자 관측 기법이다.<sup>(5)</sup> 이러한 형광 관측에 주로 사용되는 Epifluorescence(EPI) 기법은 대상 전체에 빛을 입사시킨 후 모든 깊이 층에서 발광하는 형광 정보를 수집하여 대상을 관측한다.<sup>(6,7)</sup> 반면에 Total internal reflection fluorescence(TIRF)는 빛

---

<sup>†</sup> School of Mechanical Engineering,  
Sungkyunkwan University, Professor  
E-mail: lee.jinkee@skku.edu

\* School of Mechanical Engineering,  
Sungkyunkwan University, M.S./Ph.D  
combined course

\*\* Institute of Quantum Biophysics,  
Sungkyunkwan University, Professor

---

이 내부 전반사 되었을 때 발생하는 감쇠장을 활용하여 표면 근처의 얇은 영역만을 선택적으로 관찰하는 미세 형광 관측 기법이다.<sup>(7-10)</sup> 따라서 대상의 특정 표면 주변 정보만을 수집하고자 할 때는 TIRF가 유용하게 사용될 수 있다.

그러나, 지금까지 개발된 TIRF 시스템은 대부분 샘플의 윗면에서 빛의 내부 전반사가 발생하도록 설계되었는데,<sup>(11,12)</sup> 이러한 구조는 표면 위에 고착된 액적(Sessile droplet) 형태의 샘플에 적용할 수 없다는 한계가 명확하다. 또한, 상용화된 TIRF 장비는 고가의 광섬유 기술을 기반으로 하기 때문에 TIRF의 다양한 활용성에도 불구하고 이를 통한 연구에 접근성이 낮은 경향이 있다.<sup>(13,14)</sup>

이와 같은 문제를 해결하기 위해 직접 렌즈, 미러, 프리즘 등 광학 장치를 조합하여 비용적으로 효율적인 TIRF 시스템을 구축하려는 연구가 진행되고 있다.<sup>(15,16)</sup> 그러나 이러한 시도는 여전히 샘플의 윗면에서 내부 전반사가 발생하는 일반적인 구조에 국한되어 있는데, 이는 샘플의 밑면에서 내부 전반사를 일으키는 구조는 lightguide가 사용되어 비교적 복잡하기 때문이다. 샘플의 밑면에서 내부 전반사를 일으키기 위해서는 빛의 경로를 샘플 아래의 lightguide로 유도하고 그 내부에서 반복되는 내부 전반사를 만들어야 하며, 진행되는 빛의 반사 횟수가 증가할수록 빛의 균일성은 감소하여 산란된 빛에 의해 관측이 방해받기 쉽다.<sup>(12)</sup> 따라서 대부분의 연구에서는 이를 방지하기 위해 빛을 샘플 아래에서 여러 번 반사시키는 대신 샘플의 윗면에서 한 번만 전반사 시킨다.<sup>(16)</sup>

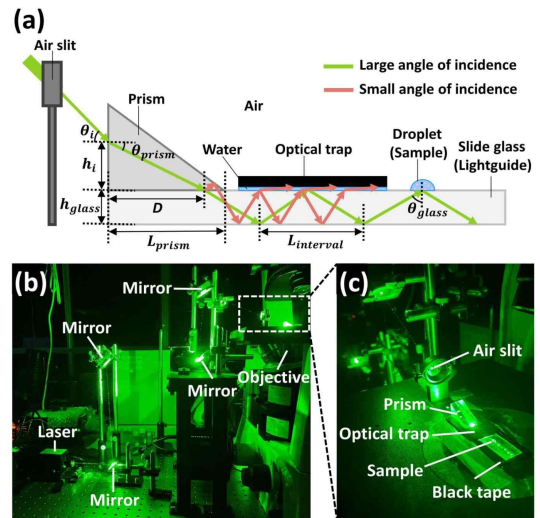
본 연구에서는 optical trap을 도입하여 lightguide 사용 시 관측이 방해받는 문제를 해결하고, 표면 위에 고착된 액적 샘플의 밑면에서 내부 전반사를 발생시키는 TIRF 구조를 설계하였다. 또한, 구축한 TIRF 시스템을 통해 고착 액적을 대상으로 미세 형광 입자를 관측하고 EPI 기법을 통해 관측한 경우와 결과를 비교 및 분석하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1 TIRF 원리 및 설계

본 연구에서 구축한 TIRF 시스템의 구성은 Fig. 1(a)와 같다. 이 시스템은 프리즘, 슬라이드 글라스, air slit, 및 optical trap 등을 사용하여 구축되었다.

샘플 밑면에서 내부 전반사를 발생시키기 위해서는 빛의 경로를 샘플의 아래로 유도하는 역할인 lightguide가 필요하다.<sup>(17,18)</sup> 따라서, 샘플 아래에 슬라이드 글라스(Soda lime glass,  $n_{\text{glass}} = 1.526$ )를 위치시켜 이를 lightguide로 활용하였고, 그 위에 immersion oil( $n_{\text{oil}} = 1.517$ )을 통해 Littrow 프리즘(Uncoated, 30° - 60° - 90°, N-BK7 glass,  $n_{\text{prism}} = 1.520$ )을 부착하였다. 보통 광학 장치에서 Littrow 프리즘은 입사한 백색광을 스펙트럼의 구성 요소로 분산시키는 분산 프리즘으로 사용된다.<sup>(19)</sup> 하지만 TIRF 시스템은 파장이 일정한 레이저 광원(LD pumped green laser,  $\lambda = 532 \pm 1 \text{ nm}$ )을 사용하므로, 본 연구에서는 빛의 분산 효과가 무시되고 단지 빛의 경로를 슬라이



**Fig. 1.** (a) Schematic of TIRF. The green line shows the path of totally reflecting light, and the red line shows the path of refracting light. (b) Overall system and (c) microscope stage of the TIRF system.

드 글라스 내부로 유도하는 광 경로 변환 프리즘으로서 Littrow 프리즘을 사용하였다. 따라서, 레이저 광원에서 나온 빛은 이러한 프리즘을 통과하여 슬라이드 글라스에 입사하고, 유리-물 경계면(윗면) 또는 유리-공기 경계면(밑면)에서 반복적으로 반사되며 액적 아래에 도달한다. 이때, 유리-액적 경계면에서의 입사각이 임계각보다 크다면 내부 전반사가 발생하고, 결과적으로 경계면으로부터 높이 방향으로 세기가 지수적으로 감소하는 얇은 감쇠장이 생성되어 액적 밑면 주변의 형광을 발광시킨다.

유리-액적 경계면에서의 임계각( $\theta_c = 60.94^\circ$ )과 경계면에서 이보다 큰 입사각( $\theta_{\text{glass}} > \theta_c$ )을 만들기 위한 프리즘에서 초기 입사각 조건( $\theta_i < 46.68^\circ$ )은 다음의 스넬의 법칙을 통해 계산하였다.

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (1)$$

여기서 빛은 매질1에서 매질2 방향으로 향하며,  $n_1$ 은 매질1의 굴절율,  $\theta_1$ 은 입사각,  $n_2$ 는 매질2의 굴절율, 그리고  $\theta_2$ 은 굴절각이다.<sup>(7)</sup> 계산 과정에서 주변의 매질은 공기( $n_{\text{air}} = 1.0003$ )이고, 형광 입자가 혼합된 물 기반 현탁액인 액적의 굴절률( $n_{\text{droplet}}$ )은 물( $n_{\text{water}} = 1.333$ )과 같다고 가정하였다. 또한 프리즘, 슬라이드 글라스, 그리고 immersion oil의 굴절률이 거의 일치하므로 프리즘-유리 경계면에서 빛의 굴절은 발생하지 않는다고 가정하였다. 결과적으로 본 연구에서는 프리즘에서 초기 입사각을  $\theta_i = 23^\circ (< 46.68^\circ)$ 로 설정하여 유리-액적 경계면에서 입사각이 임계각을 초과하여 내부 전반사가 발생하도록 설계했다.

프리즘에서 초기 입사 위치 또한 프리즘의 굽곡을 고려한 계산을 통해 결정하였다. 빛이 프리즘의 옆면에 처음 입사하는 지점의 높이( $h_i$ )가 너무 높으면 굴절된 빛이 프리즘의 밑면보다 빗면에 먼저 도달하여 바깥으로 빠져나가게 된다. 또한, 빛이 프리즘에 입사하는 위치가 너무 낮으면 슬라이드 글라스에 입사한 빛이 밑면에

서 반사되어 다시 프리즘의 밑면으로 돌아와 프리즘을 통해 바깥으로 빠져나가게 된다. 따라서 프리즘에서 적절한 입사 위치 조건( $0.385 \text{ cm} < h_i < 0.585 \text{ cm}$ )을 다음 식을 통해 계산하였다.

$$L_{\text{prism}} - L_{\text{interval}} < D < L_{\text{prism}} \quad (2)$$

여기서  $L_{\text{prism}}$ 은 프리즘의 밑면 길이( $L_{\text{prism}} = 2.2 \text{ cm}$ ),  $L_{\text{interval}}$ 은 슬라이드 글라스의 한 표면(윗면 혹은 밑면) 상에서 빛이 반사되는 지점 사이의 간격,  $D$ 는 프리즘의 옆면으로부터 빛이 프리즘-유리 경계면에 도달하는 지점까지의 수평 거리를 나타낸다. 이때  $D$ 는 다음과 같이 나타낸다.

$$D = \frac{h_i}{\tan \theta_{\text{prism}}} \quad (3)$$

여기서  $\theta_{\text{prism}}$ 은 빛이 처음 프리즘에 입사할 때의 굴절각이고, 식(1)에 초기 입사각 및 공기와 프리즘의 굴절률을 대입하여 계산된다. 또한,  $L_{\text{interval}}$ 은 다음과 같이 나타낸다.

$$L_{\text{interval}} = 2h_{\text{glass}} \tan \theta_{\text{glass}} \quad (4)$$

이때  $h_{\text{glass}}$ 는 슬라이드 글라스의 높이( $h_{\text{glass}} = 0.1 \text{ cm}$ ),  $\theta_{\text{glass}}$ 는 유리-액적 경계면에서의 입사각을 나타내고,  $\theta_{\text{glass}} = 90^\circ - \theta_{\text{prism}}$  관계를 가진다.

프리즘에서 입사각과 입사 위치를 정한 이후에 air slit(단면:  $3 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ )과 optical trap (Black rubber)을 사용하여 셋업을 완성하였다. 레이저 빛의 단면이 너무 크면 단면의 일부는 슬라이드 글라스로 입사하지 않고 프리즘의 끝에서 바깥 공기로 방출되어 관측을 방해한다. 따라서 프리즘을 통과한 빛이 모두 슬라이드 글라스로 진행할 수 있도록 air slit을 사용하여 빛의 단면 크기를 조절하였다.

또한 프리즘-유리 경계면에서는 Fig. 1(a)에

표시된 것처럼 입사각이 크고 작은 두 가지의 빛 경로가 발생하게 된다. 대부분의 빛은 프리즘-유리 경계면에서 그대로 슬라이드 글라스에 입사하는데, 이 경로의 빛은 유리-액적 경계면에서의 입사각이 임계각보다 커서 내부 전반사를 발생시키며 진행한다.

그러나 immersion oil의 투과율이 100%가 아니기 때문에, 빛의 일부는 프리즘-유리 경계면에서 반사된 후 프리즘 빗면에서 다시 반사되어 슬라이드 글라스에 입사한다. 이러한 경로의 빛은 유리-액적 경계면에서의 입사각이 임계각보다 작아서 유리-액적 경계면을 투과하게 되는데, 이렇게 경계면을 투과하는 빛은 위층에 떠 있는 형광 입자에 도달하여 형광을 발광시킨다.

따라서 TIRF 시스템으로 액적의 밑면 주변만을 관측할 수 있는 환경을 만들기 위해, 슬라이드 글라스 위에 물을 도포하고 그 위에 optical trap을 설치했다. 검은색 optical trap은 유리-물 경계면을 투과하여 optical trap에 도달하는 빛을 흡수한다.<sup>(20)</sup> 이때, optical trap과 슬라이드 글라스 사이에 물을 사용한 이유는 물 기반의 현탁액인 액적과 물의 굴절률이 거의 동일하기 때문이다. 이를 통해 유리-액적 경계면을 투과하는 경로의 빛은 optical trap을 통해 액적에 도달하기 전에 흡수되고, 유리-액적 경계면에서 내부 전반사가 발생하는 경로의 빛은 optical trap에 의해 흡수되지 않은 채 액적의 밑면에 도달하는 시스템을 구축하였다.

이러한 구조를 통해 액적의 밑면에서 투과하는 빛을 제거하고 내부 전반사를 발생시키면 밑면에 얇은 감쇠장을 생성할 수 있다. 이때 본 연구에서 설계된 감쇠장의 두께( $z_p \sim 100$  nm)는 다음 식을 통해 계산된다.

$$z_p = \frac{\lambda}{4\pi n_{glass} \sqrt{\sin^2 \theta_{glass} - \left(\frac{n_{droplet}}{n_{glass}}\right)^2}} \quad (5)$$

여기서  $\lambda$ 는 레이저 빛의 파장이다.<sup>(7)</sup> 이러한 감쇠장의 두께는 매우 얇기 때문에 TIRF를 통해 액적 밑면 주변의 형광만을 관측할 수 있다.

실제 TIRF 시스템을 구성한 모습은 Fig. 1(b), (c)와 같다. 빛은 레이저 광원으로부터 시작되어 4개의 45°미러(Nd: YAG laser mirror)에서 반사되어 inverted microscope(Nikon Eclipse Ti-U)의 대물렌즈 위 재물대 구간으로 이동한다. 그리고 마지막 4번째 미러에서 반사된 빛은 재물대 위에 설치된 air slit을 통과하고 프리즘을 통해 슬라이드 글라스에 입사된다. 이후 optical trap 구간을 통과하며 유리-액적 경계면을 투과하는 빛은 흡수되고, 내부 전반사를 발생시키는 빛만 액적에 도달하게 된다.

레이저와 미러는 광학 테이블 상에서 미러 마운트(45° Mirror mount), 광학 포스트(Stainless steel mounting post), 포스트 지지대(Post holder) 등을 통해 고정되었다. 각각의 미러에 대해, 미러 한 개당 3개 이상의 광학 포스트를 연결 및 지지하여 외부의 충격에 의해 미러의 각도가 틀어지는 것을 방지하였다. 또한, 4번째 미러는 미세 조절 미러 마운트(Kinematic mirror mount)와 함께 설치하여 프리즘에 입사하는 입사각( $\theta_i$ ) 및 입사 높이( $h_i$ )를 정교하게 조절 가능하도록 설계했다.

슬라이드 글라스에는 가장자리부터 약 5mm 안쪽 부분까지 검은색 전기 절연 테이프(Electrical insulating adhesive tape)를 부착하여 슬라이드 글라스 내부에서 산란에 의해 환하게 빛나는 빛을 흡수하였다.

## 2.2 입자 크기별 실험

관측 대상의 크기에 따른 TIRF 관측 결과를 확인하기 위해 평균 지름이 10  $\mu\text{m}$  인 형광 입자 현탁액(Fluorescent Nile red particles, 10.1  $\mu\text{m}$ , Spherotech Inc. /  $\lambda_{ex} = 530$  nm,  $\lambda_{em} = 570$  nm / 1.0 wt% aqueous suspension with deionized water), 평균 지름이 1  $\mu\text{m}$ 인 형광 입자 현탁액(Amine-modified polystyrene, fluorescent red, 1.0  $\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich Inc. /  $\lambda_{ex} = 575$  nm,  $\lambda_{em} = 610$  nm / 2.5 wt% aqueous suspension with deionized water), 평균 지름이 0.1  $\mu\text{m}$  인 형광 입자 현탁액(Sulfate -modified polystyrene, fluorescent red, 0.1

$\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich Inc. /  $\lambda_{ex} = 538 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 584 \text{ nm}$  / 2.5 wt% aqueous suspension with deionized water) 등을 사용하여 샘플을 제작했다. 이때  $\lambda_{ex}$ 는 입자의 형광을 최대로 발광시키는 빛의 파장이고,  $\lambda_{em}$ 은 입자가 최대로 방출하는 형광의 파장이다. 각 샘플은 형광 입자 현탁액을 초순수 물(Deionized water)과 1  $\mu\text{L}$ :1 mL 비율로 혼합하여 제작하였다. 제작된 샘플은 형광 입자들이 내부에서 서로 얽히지 않도록 초기에 vortex mixer를 통해 180 s 동안 혼합되었다. 슬라이드 글라스는 에탄올을 통한 세척 및 에어 건을 통한 건조과정을 거쳐 표면의 먼지가 제거된 상태로 사용되었다. 샘플을 도포할 때, 마이크로 피펫을 사용하여 샘플 1  $\mu\text{L}$ 를 슬라이드 글라스 위에 떨어뜨려 표면에 고착된 액적 형태로 샘플을 형성하였다.

각 크기의 형광 입자가 포함된 액적에 대해 TIRF와 EPI 기법을 사용하여 관측을 진행하고 두 경우의 결과를 비교하였다. 동일한 샘플을 대상으로 TIRF와 EPI에서 모두 액적의 밑면을 초점면으로 설정하였고, inverted microscope의 대물렌즈( $\times 10$ ,  $\times 40$ , Nikon CFI Plan Fluor)와 Kinetix sCMOS 카메라(TELEDYNE Inc.)를 사용하여 노출시간 100 ms로 샘플을 관측하였다.

본 연구에서 구축한 TIRF 시스템에 사용된 레이저의 파장은 532 nm이고, EPI 기법을 통한 관측 시 사용된 inverted microscope의 램프 빛의 파장은 527.5 - 552.5 nm이다. 이러한 두 광원의 빛을 빠르고 간편하게 허용 및 차단하기 위해 레이저와 램프 각각에 셔터를 설치하였다. 그리고 TIRF와 EPI에서 최대한 동일한 순간에 샘플을 관측하기 위해 레이저와 램프의 전원을 모두 켜 채로 관측을 준비하였다. 이후 먼저 레이저 앞의 셔터를 닫아 레이저 빛을 차단하고 램프의 빛을 통해 EPI 기법으로 관측을 진행하였다. 그런 다음 램프의 셔터를 닫아 램프 빛을 차단하고 레이저의 셔터를 열어 TIRF 시스템으로 관측을 진행하였다.

이후 TIRF 시스템 사용 시 관측되는 입자 크기가 감소하는 현상을 분석하기 위해 각 크기의

입자가 관측된 지름을 측정했다. TIRF와 EPI 기법을 사용하여 10  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , 0.1  $\mu\text{m}$  크기의 입자를 각각 3번씩 관측하고 관측된 입자들의 지름을 imageJ software를 통해 측정하였다. 이때 입자 지름 측정에 사용된 관측 결과들은 3200  $\times$  3200 픽셀 크기의 이미지였다. 또한 EPI 기법을 사용한 경우에는 in-focused 입자와 out-focused 입자가 함께 관측되었는데, 이중 in-focused 입자의 지름만을 측정하여 TIRF를 통해 관측한 in-focused 입자와 지름을 비교하였다.

### 2.3 Drying pattern 관측

Drying pattern 관측 시 TIRF와 EPI 기법을 비교하기 위해 고착 액적의 증발 과정을 관측하였다. 샘플은 입자 크기별 실험에서 사용한 평균 지름이 1  $\mu\text{m}$ 인 형광 입자 현탁액을 초순수 물과 4  $\mu\text{L}$ :1 mL 비율로 혼합하여 제작하였다. 또한 이전 실험과 같이 vortex mixer를 통해 180 s 동안 샘플을 혼합하였고, 슬라이드 글라스는 에탄올과 에어 건을 통해 세척 및 건조하여 표면의 먼지를 제거한 후 사용하였다. 관측 시에는 마이크로 피펫을 사용하여 샘플 1  $\mu\text{L}$ 를 슬라이드 글라스 위에 고착 액적 형태로 떨어뜨리고 공기 중에 노출시켜 증발시켰다. 이때 증발 환경은 온도 약 25  $^{\circ}\text{C}$  및 상대습도 약 60 %였고, 친수성 슬라이드 글라스를 사용하여 액적의 contact line이 고정된 채 접촉 반경이 일정하게 증발하도록 설계하였다.

입자 크기별 실험과 동일하게 TIRF와 EPI에서 모두 액적의 밑면을 초점면으로 설정하고, inverted microscope의  $\times 20$  대물렌즈와 Kinetix sCMOS 카메라를 사용하여 노출시간 100 ms로 액적의 drying pattern을 관측하였다.

액적이 증발하는 동안 450 s 간격으로 TIRF와 EPI를 통해 drying pattern을 관측하였다. 이전과 동일하게, EPI에서 TIRF 시스템으로 셋업을 전환하기 위해 램프와 레이저에 설치된 셔터를 이용하였다. 이때 수동으로 램프와 레이저의 셔터를 열고 닫았기 때문에 관측 기법을 전환하는 과정에서 약간의 시간이 소요되었다. 따라서 이를 고려해 TIRF는 EPI 보다 5 s 늦게 관측하였다.

### 3. 결과 및 분석

#### 3.1 입자 크기별 실험 결과

Fig. 2는 지름이 각각  $10\ \mu\text{m}$ ,  $1\ \mu\text{m}$ ,  $0.1\ \mu\text{m}$ 인 형광 입자가 혼합된 고착 액적 형태의 샘플들을 TIRF와 EPI로 관측한 결과를 보여준다. 모든 경우에서 초점면은 액적의 밑면으로 설정하였으므로 관측 결과에서 in-focused 입자는 액적의 밑면에 위치한 입자이고 out-focused 입자는 밑면보다 위층에 위치한 입자이다.

Fig. 2(a)는  $10\ \mu\text{m}$  크기의 형광 입자가 포함된 액적을 EPI와 TIRF로 관측한 결과이다. EPI를 사용하였을 때, 액적의 밑면에 위치한 입자와 그보다 위에 존재하는 입자가 동시에 관측되었다. 반면에 TIRF를 사용하였을 때는 액적의 밑면에 위치한 입자만이 관측되었다.

Fig. 2(b)는 이전과 동일한 조건에서  $1\ \mu\text{m}$  크기의 형광 입자를 관측한 결과이다. 이 경우에도 EPI를 사용하였을 때 액적의 위층에 부유하는 입자가 out-focused 상태로 함께 관측되어 주변 배경을 흐리게 만들었다. 그러나 TIRF를 사용한 경우 배경이 맑아지고 밑면에 존재하는 입자만이 선명하게 관측되었다.

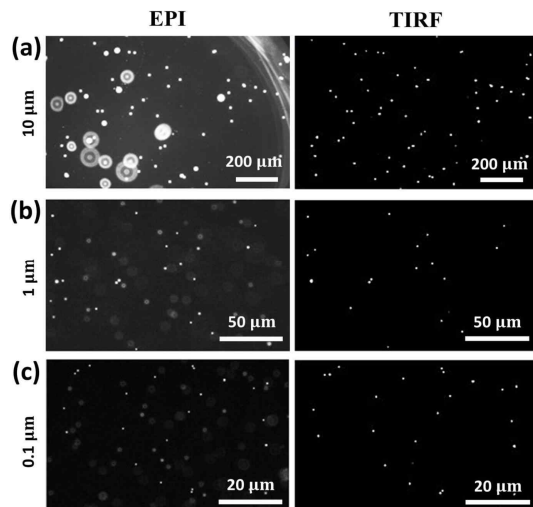


Fig. 2. EPI and TIRF observation results of (a)  $10\ \mu\text{m}$  diameter particle, (b)  $1\ \mu\text{m}$  diameter particle, and (c)  $0.1\ \mu\text{m}$  diameter particle.

이렇게 TIRF 시스템을 통해 관측했을 때 out-focused 입자가 제거되고 밑면의 입자만이 관측되는 효과는  $0.1\ \mu\text{m}$  크기의 형광 입자에 대해서도 나타났다 (Fig. 2(c)).

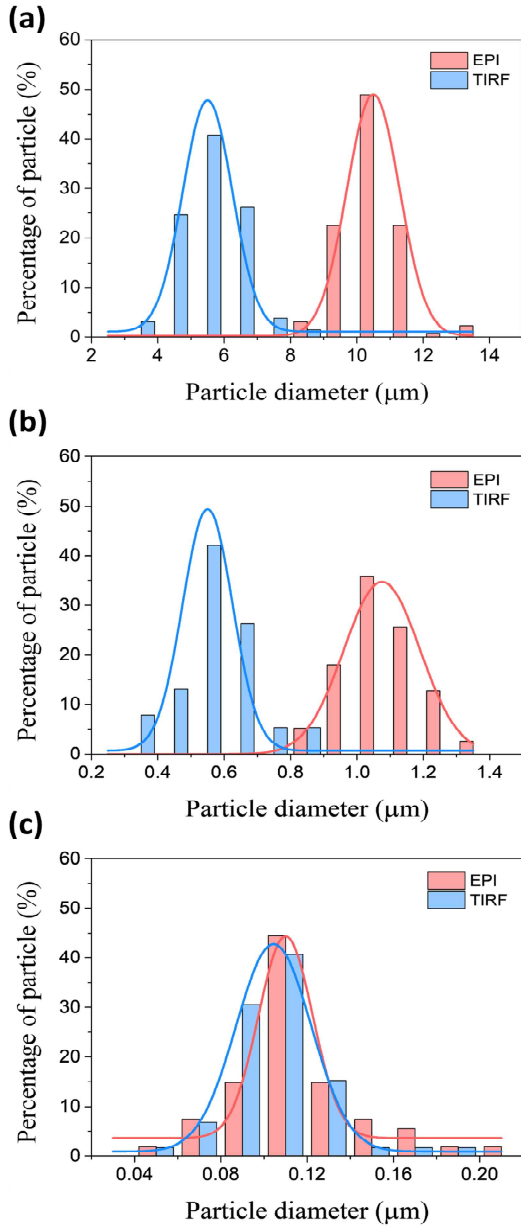
결과적으로 액적에 포함된 형광 입자의 크기와는 무관하게, 액적을 EPI로 관측한 경우에는 out-focused 입자와 in-focused 입자가 함께 관측되었다. 이는 EPI로 액적을 관측할 때 램프의 빛이 초점면 보다 위층에서 부유하는 입자에도 도달하여 형광을 발광시키기 때문인데, 초점면 밖에서 발광한 형광은 초점이 맞지 않은 채로 관측된다. 반면에 액적을 TIRF로 관측한 경우에는 모든 크기의 형광 입자 샘플에서 out-focused 입자가 제거되고 in-focused 입자만이 관측된 것을 확인할 수 있다. 이는 TIRF 시스템에서는 레이저 빛의 내부 전반사에 의해 액적의 밑면에 발생하는 얇은 감쇠장을 통해 그 내부의 형광 입자만을 발광시키기 때문이다. 따라서 밑면보다 위층에 존재하는 입자에는 도달하는 빛이 없어 형광이 발광하지 않고 TIRF에서 관측되지 않는다.

TIRF는 관측하는 형광 입자의 크기에 무관하게 out-focused 입자를 제거하였지만 대상 입자의 크기에 따라 TIRF에서 관측되는 입자의 크기가 실제보다 감소하는 경우가 존재했다.

Fig. 2(a)에서 보이는 것처럼  $10\ \mu\text{m}$  크기의 형광 입자를 관측한 경우 TIRF를 사용했을 때 EPI를 사용했을 때보다 밑면에 존재하는 입자가 더 작게 관측되었다. 이렇게 TIRF에서 관측되는 입자의 크기가 실제보다 감소하는 현상은  $1\ \mu\text{m}$  크기의 형광 입자에 대해서도 나타났다 (Fig. 2(b)). 반면에 Fig. 2(c)에서 보듯  $0.1\ \mu\text{m}$  크기의 형광 입자를 관측한 경우에는 TIRF와 EPI에서 관측된 입자의 크기에 눈에 띄는 차이가 없었다.

이러한 현상을 분석하기 위해  $10\ \mu\text{m}$ ,  $1\ \mu\text{m}$ ,  $0.1\ \mu\text{m}$  크기의 형광 입자를 대상으로 TIRF와 EPI를 통해 각 3번씩 관측을 진행하고 입자들의 지름을 측정하여 그 분포도를 나타내었다 (Fig. 3).

그 결과 Fig. 3(a)에서,  $10\ \mu\text{m}$  크기의 형광 입자를 관측한 경우 TIRF에서 관측된 입자의 지름이 전체적으로 감소한 것을 확인하였다. 이때



**Fig. 3.** Observed diameter distribution of (a) 10  $\mu\text{m}$  diameter particle, (b) 1  $\mu\text{m}$  diameter particle, and (c) 0.1  $\mu\text{m}$  diameter particle.

TIRF를 통해 관측된 입자의 평균 지름은 5.551  $\mu\text{m}$ (표준편차: 0.949  $\mu\text{m}$ )로 실제 지름보다 작게 관측된 반면에 EPI를 통해 관측된 입자의 평균 지름은 10.513  $\mu\text{m}$ (표준편차: 0.951  $\mu\text{m}$ )로 입자가 실제 크기와 거의 동일하게 관측되었다.

Fig. 3(b)는 1  $\mu\text{m}$  크기의 형광 입자가 TIRF와 EPI에서 관측된 지름의 분포를 나타낸다. 이 경우 역시 TIRF에서 관측된 형광 입자의 크기가 감소하여 지름 분포도가 전체적으로 왼쪽으로 이동하였다. 또한 TIRF에서 관측된 입자의 평균 지름인 0.578  $\mu\text{m}$  (표준편차: 0.112  $\mu\text{m}$ )는 EPI에서 관측된 평균 지름 1.095  $\mu\text{m}$  (표준편차: 0.113  $\mu\text{m}$ )보다 작았다.

반면에 Fig. 3(c)에서 보듯이 0.1  $\mu\text{m}$  크기의 형광 입자는 다른 경우들과 달리 TIRF와 EPI 모두에서 관측된 지름의 분포가 거의 일치하였다. 또한 TIRF와 EPI에서 관측된 입자의 평균 지름 역시 각각 0.107  $\mu\text{m}$  (표준편차: 0.029  $\mu\text{m}$ )와 0.110  $\mu\text{m}$  (표준편차: 0.037  $\mu\text{m}$ )로 모두 실제와 유사한 크기로 관측되었다.

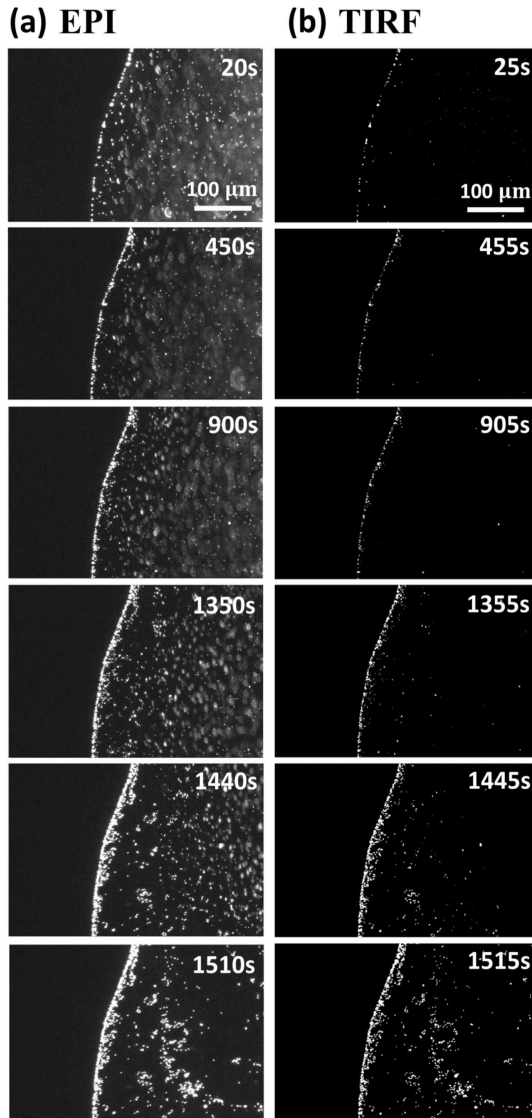
이렇게 형광 입자의 크기에 따라 TIRF에서 관측되는 입자의 크기가 감소하거나 유지되는 이유는 TIRF의 관측 범위가 감쇠장의 두께( $z_p \sim 100 \text{ nm}$ ) 정도로 얇기 때문이다.

10  $\mu\text{m}$ 와 1  $\mu\text{m}$  크기의 입자는 입자의 반지름이 감쇠장의 두께보다 크기 때문에 TIRF를 사용할 경우 입자의 일부분만이 감쇠장에 의해 발광되어 관측된다. 따라서 TIRF를 사용했을 때 관측되는 입자의 크기가 실제 입자의 크기보다 작은 것이다.

반면에 0.1  $\mu\text{m}$  크기의 형광 입자는 입자의 반지름이 감쇠장의 두께보다 작아서 입자 전체가 감쇠장에 의해 발광한다. 따라서 TIRF를 사용한 경우에도 입자의 크기가 거의 동일하게 관측된 것이다. 이를 통해 TIRF 시스템으로 관측되는 정보는 대상의 전체 모습이 아니라 밀면 근처에 존재하는 일부의 모습이라는 것을 확인하였다.

### 3.2 Drying pattern 관측 결과

Fig. 4는 부피 1  $\mu\text{L}$ 인 액적이 공기 중에 노출되어 증발하는 동안 밀면의 drying pattern을 TIRF와 EPI로 관측한 결과이다. 앞선 실험들과 같이 액적의 밀면을 초점면으로 설정하였으므로 in-focused 입자는 액적의 밀면에 위치한 입자이고 out-focused 입자는 위층에서 부유하는 입자이다.



**Fig. 4.** Drying pattern observed by (a) EPI and (b) TIRF.

Fig. 4(a)는 EPI로 관측한 액적의 drying pattern이다. 이 경우에는 증발이 진행되는 대부분의 시간 동안 액적 전체에서 out-focused 입자가 함께 관측되어 밀면의 drying pattern 관측을 방해하였다. 이는 액적이 증발할 때 친수성인 슬라이드 글라스에 의해 contact line이 고정되어 접촉 반경이 일정하게 증발했기 때문이다. 따라서 증발 과정의 대부분 동안 액적 전체에 부유하는 입자가 존재했고, 이들이 out-focused 상태로 관

측되었다. 이후 증발이 종료되어 모든 입자가 밀면에 가라앉은 이후에만 선명한 밀면의 drying pattern을 관측할 수 있었다.

반면에 Fig. 4(b)에 보이듯 TIRF로 drying pattern을 관측한 경우에는 증발이 진행되는 모든 과정 동안 out-focused 입자가 제거된 채 밀면의 무늬만이 선명하게 관측되었다. 이를 통해 고착 액적 샘플의 drying pattern 관측 시 본 연구에서 구축한 TIRF 시스템을 활용하여 모든 증발 과정 동안의 drying pattern을 선명하게 관측할 수 있음을 확인하였다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 고착 액적 밀면 근처의 형광 정보만을 선택적으로 관측할 수 있는 TIRF 시스템을 구축하였다. 이 과정에서 슬라이드 글라스를 lightguide로 활용하고 optical trap을 사용하여 액적의 밀면에서 빛이 전반사 되는 구조를 설계하였다. 또한 TIRF 시스템의 원리와 구조를 설명하고 시스템을 구축하는 자세한 과정을 제시하였다.

이후 관측 대상의 크기에 따른 TIRF 시스템의 활용 가능성을 판단하기 위해 10  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , 0.1  $\mu\text{m}$  크기의 형광 입자 샘플을 대상으로 실험을 진행하였다. 각 크기별 형광 입자가 포함된 액적의 밀면을 초점면으로 하여 TIRF와 EPI를 통한 관측을 진행하고 두 결과를 비교하였다. 그 결과 대상 입자의 크기와는 무관하게 밀면의 입자만을 선택적으로 관측하는 TIRF의 효과가 달성되었다. 반면에 대상 입자의 크기에 따라 변하는 성질도 확인하였는데, 대상 입자의 크기가 감쇠장 두께보다 큰 경우에 TIRF에서 관측되는 입자의 크기가 감소하는 것이었다. 이는 TIRF 시스템이 감쇠장 범위 이내의 얇은 영역만을 관측하기 때문이다.

마지막으로 TIRF와 EPI를 통해 액적 밀면의 drying pattern을 관측하고 결과를 비교하였다. 이를 통해 접촉 반경이 일정하게 증발하는 액적의 경우 모든 증발 과정 동안 밀면의 drying pattern만을 선명히 관측 가능하다는 점에서



TIRF의 유용성을 확인하였다.

본 연구에서는 고착 액적의 밑면을 관측할 수 있는 TIRF 시스템을 구축하였으며, 이 과정에서 TIRF의 미세 형광 입자 관측 특성을 분석하였다. 향후 이러한 연구는 미세 유체 내부 유동의 가시화에 다양하게 기여할 수 있다.

## 후 기

본 연구는 정부(교육부 및 미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. NRF2021R1A6A1A03039696, No. 2020R1A2C3010568).

## REFERENCE

- 1) Jeong, E. H., and Kim, K. C., 2005, "Principle and Application of Micro PIV," *Journal of the Korean Society of Visualization*, Vol. 3(1), pp.36-42.
- 2) Song, R., and Lee, J., 2016, "Hemodynamical analysis by viscosity characteristics of artificial blood for  $\mu$ -PIV experiment of Radio-cephalic arteriovenous fistula (RC-AVF)," *Journal of the Korean Society of Visualization*, Vol. 14(1), pp.33-39.
- 3) Min, Y. U., Lee, D. Y., and Kim, K. C., 2010, "Development of Hybrid Micro/Nano PIV system," *Journal of the Korean Society of Visualization*, Vol. 8(4), pp.31-37.
- 4) Park, S. C., Song, R., Kim, S., Kim, H. K., Kim, S. H., and Lee, J., 2016, "Fabrication of artificial arteriovenous fistula and analysis of flow field and shear stress by using  $\mu$ -PIV technology," *Journal of Mechanical Science and Technology*, Vol. 30, pp.5503-5511.
- 5) Masters, B. R., 2010, "The development of fluorescence microscopy," *Encyclopedia of life sciences*, pp.1-9.
- 6) Lichtman, J. W. and Conchello, J. A., 2005, "Fluorescence microscopy," *Nature methods*, Vol. 2(12), pp.910-919.
- 7) Yoda, M., 2020, "Super-resolution imaging in fluid mechanics using new illumination approaches," *Annual Review of Fluid Mechanics*, Vol. 52, pp.369-393.
- 8) Mattheyses, A. L., Simon, S. M., and Rappoport, J. Z., 2010, "Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist," *Journal of cell science*, Vol. 123(21), pp.3621-3628.
- 9) Axelrod, D., 2001, "Selective imaging of surface fluorescence with very high aperture microscope objectives," *Journal of biomedical optics*, Vol. 6(1), pp.6-13.
- 10) Martin-Fernandez, M. L., Tynan, C. J., and Webb, S. E. D., 2013, "A 'pocket guide' to total internal reflection fluorescence," *Journal of microscopy*, Vol. 252(1), pp.16-22.
- 11) Axelrod, D., 2001, "Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology," *Traffic*, Vol. 2(11), pp.764-774.
- 12) Axelrod, D., 2022, *Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) and Evanescence Microscopies*, IOP Publishing.
- 13) Lam, J. Y., Wu, Y., Dimou, E., Zhang, Z., Cheetham, M. R., Körbel, M., ... and Danial, J. S., 2022, "An economic, square-shaped flat-field illumination module for TIRF-based super-resolution microscopy," *Biophysical Reports*, Vol. 2(1).
- 14) Asanov, A., Sampieri, A., Moreno, C., Pacheco, J., Salgado, A., Sherry, R., and Vaca, L., 2015, "Combined single channel and single molecule detection identifies subunit composition of STIM1-activated transient receptor potential canonical (TRPC) channels," *Cell Calcium*, Vol. 57(1), pp.1-13.
- 15) Gibbs, D. R., Kaur, A., Megalathan, A., Sapkota, K., and Dhakal, S., 2018, "Build your own microscope: step-by-step guide for building a prism-based TIRF microscope," *Methods and*

- Protocols, Vol. 1(4), pp.40.
- 16) Fairlamb, M. S., Whitaker, A. M., Bain, F. E., Spies, M., and Freudenthal, B. D., 2021, "Construction of a three-color prism-based TIRF microscope to study the interactions and dynamics of macromolecules," *Biology*, Vol. 10(7), pp.571.
  - 17) Charlton, C., Gubala, V., Gandhiraman, R. P., Wiechecki, J., Le, N. C. H., Coyle, C., ... and Williams, D. E., 2011, "TIRF microscopy as a screening method for non-specific binding on surfaces," *Journal of colloid and interface science*, Vol. 354(1), pp.405-409.
  - 18) Asanov, A., Zepeda, A., and Vaca, L., 2010, "A novel form of Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (LG-TIRFM) reveals different and independent lipid raft domains in living cells," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, Vol. 1801(2), pp.147-155.
  - 19) Zissis, G. J., 1995, Dispersive prisms and gratings, *Handbook of optics*.
  - 20) Ramachandran, S., Cohen, D. A., Quist, A. P., and Lal, R., 2013, "High performance, LED powered, waveguide based total internal reflection microscopy," *Scientific reports*, Vol. 3(1), pp.2133.