

단백질 검출 초소형 미세형광측정 시스템에 관한 연구

성천야, 김호성
중앙대학교 전자전기공학부

Study of Miniature Fluorescence Detection System for Protein Chip

Cheonya Seong, Hoseong Kim
School of electrical & electronic engineering, Chung-Ang university

Abstract - 질병의 발현과 직접적인 관련이 있는 단백질의 검출, 정량화하는 분석 장비를 소형화 할 수 있는 방법을 소개하고 그 가능성을 실험적으로 확인하였다. 단백질 검출을 위한 형광측정방법에서 가장 큰 문제인 여기광과의 혼재로 인한 신호 대 잡음 비를 해결하기 위해 마이크로 프리즘을 이용한 여기 방식을 고안하고 설계, 시뮬레이션 하였으며, 선행 실험을 통해 프리즘의 이용한 형광검출방법이 신호 대 잡음 비의 향상과 분석 시스템의 소형화에 효과적임을 확인하였다.

1. 서 론

최근 Bio Technology에 대한 관심이 높아짐에 따라 DNA 분석, 단백질 분석에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. DNA에 관한 연구는 많은 성과를 거두어 왔고, 이미 이를 분석하기 위한 시스템도 개발되어져 있다. 하지만 질병의 발현에 보다 직접적인 관련이 있는 단백질 칩 분석을 위한 시스템은 현재 주로 Chip scanner, Laser Scanning Confocal Microscopy 방식을 채택하고 있으며, 이와 같은 장비들은 가격이 비싸고 부피가 크기 때문에 사용하기 불편하며, 분석을 위한 시간도 오래 걸린다.

고밀도로 집적화 된 단백질 칩의 단백질 패턴들은 여기광에 반응하여 발광하는 형광물질을 부착하고 있다. 여기에 여기광을 주사하여, 발광되어 나오는 빛을 검출함으로써 단백질의 종류와 그 양을 알아낼 수 있다.

이러한 시스템의 광학부를 설계하는데 있어서는 다음과 같은 세 가지의 제약조건이 따르게 된다. 첫째로, 단백질 패턴에서의 여기광의 크기가, 패턴의 최대면적을 주사 할 수 있어야 한다. 둘째로, 형광의 파장은 여기광의 파장에 비해 크게 다르지 않으므로 여기광이 측정시에 노이즈로 작용하게 된다. 셋째로, 단백질에 부착되어 있는 형광물질에서 나온 빛은 디텍터에서 최대한 많은 양을 받아들일 수 있어야 한다. 이중 가장 큰 문제인 신호 대 잡음 비의 향상을 위해서 본 연구에서는 마이크로 프리즘을 이용하여 여기광과 형광을 물리적으로 분리하는 여기 방식을 고안하였다.

본 연구에서는 시스템 구현에 앞서, 최적화된 마이크로 스캐닝 미러, 마이크로 프리즘으로 구성된 광학부를 설계하고 기초 선형 실험을 통해 프리즘을 이용한 여기광의 Oblique incident 방식이 신호 대 잡음 비를 높이는 데에 효과적임을 증명하였다. 그리고 MEMS 공정으로 제작되어지는 마이크로 프리즘과 스캐닝 미러를 도입함으로써 분석시스템의 소형화가 가능함을 보여주었다.

2. 본 론

2.1 이론

그림 1)은 형광측정이론의 모식도이다. 형광물질에 입사된 여기광의 일부는 그대로 투과되고 일부는 형광에 기여하게 된다. 여기서 그대로 투과된 여기광은 노이즈가 되어 형광검출에 영향을 주게 된다.

Beer-Lambert Law에 의하면, 형광물질에 의한 여기광의 흡수율은 식 1)과 같다.

$$A = \log \frac{I_T}{I_0} = \epsilon I c \quad \dots\dots \text{식 1)}$$

여기서 I_0 는 입사되는 여기광, I_T 는 통과되는 여기광의 세기를 나타내고, ϵ 은 여기광이 흡수될 확률, I 는 여기광이 형광물질을 통과하는 길이, c 는 형광물질의 농도를 나타낸다.

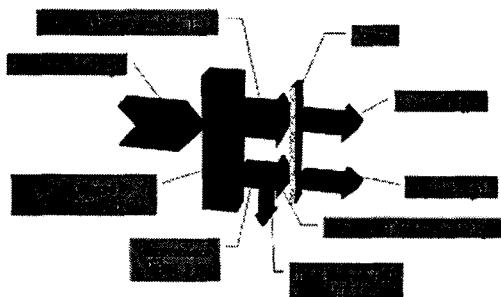


그림 1) 형광측정이론

형광(I_F)의 세기는 여기광(I_0)의 세기에 비례하게 되므로 식 2)과 같이 된다.

$$I_F = \phi I_0 (1 - 10^{-A}) \quad \dots\dots \text{식 2)}$$

그러므로 식 1)과 식 2)에서 흡수되지 않고 그대로 투과되는 빛과 형광의 비는 다음 식 3)와 같다.

$$\frac{I_F}{I_T} = \phi (10^A - 1) \quad \dots\dots \text{식 3)}$$

여기에서 삽입하는 필터의 특성을 고려하면 식 4)와 같다.

$$\frac{I_S}{I_N} = \phi (10^A - 1) 10^{OD(e) - OD(f)} \quad \dots\dots \text{식 4)}$$

여기에서 $OD(e)$, $OD(f)$ 는 필터의 광학밀도로서, 여기광과 형광이 필터를 통과할 수 있는 비율을 나타낸다. 최종적으로 디텍터의 NA(numerical aperture)를 고려하여, 신호 대 잡음 비를 계산하면 식 5)와 같이 된다.[1]

$$\frac{I_S}{I_N} = \phi (10^A - 1) 10^{OD(e) - OD(f)} \frac{1 - (1 - NA^2/n^2)^{1/2}}{2} \quad \dots\dots \text{식 5)}$$

10^{10} ng/ml 의 Cy5의 경우 NA가 0.3일 경우, SNR은

8×10^{-3} 정도가 되며, 이 값은 너무 작아 형광검출이 어렵다. 이러한 제약조건들을 해결하기 위해, 여기광이 angular separation을 가지게 하여, 형광과 구별되게 함으로서, 신호 대 잡음 비를 높일 수 있는 광학 시스템을 설계하였다.

2.2 시스템 설계 및 시뮬레이션

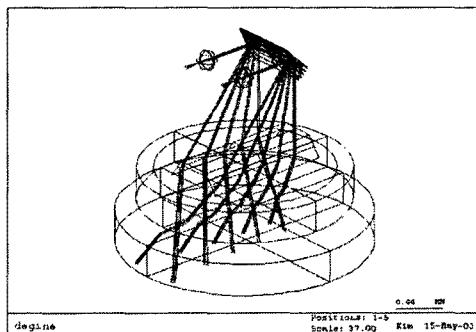


그림 2) 전체시스템

설계된 시스템은, 광섬유에 의해 스캐닝 미러로 주사되어 지는 빔이 마이크로 프리즘을 통해 각 패턴으로 입사하게 되며, 형광 물질과 반응한 후에 검출영역 바깥으로 나가게 된다. 그림 1)은 전체적인 시스템을 나타낸 것이다. 그림에서 두개의 볼 렌즈를 통해 입사된 여기광은 마이크로 스캐닝 미러에 의해 스캔 되고, 아래쪽에 있는 프리즘을 통해 분석해야 할 패턴에 집중된다.

이 시스템은 크게 두개의 레이어로 구성되어 있다. 첫 번째 레이어에는 광섬유, 볼렌즈 그리고 레이저의 스캔을 위한 스캐닝 미러로 구성되어 있고, 두 번째 레이어는 두개의 빔을 단백질 패턴에 비스듬히 입사시켜 주고 입사 후 형광과 투파광의 분리를 위한 마이크로 프리즘으로 구성되어 있다.



그림 3) 1st layer

그림 3)는 첫 번째 레이어의 구성을 나타낸 그림이다. 실리콘 웨이퍼위에 MEMS공정을 사용하여 제작한다. 광섬유와 볼렌즈는 V-groove를 제작해 고정시키고, 실리콘 결정의 (1 1 1)면을 애칭하여 얻어진 경사면을 스캐닝 미러로 사용하여 전극을 사용하여 당김으로서 구동하게 된다.

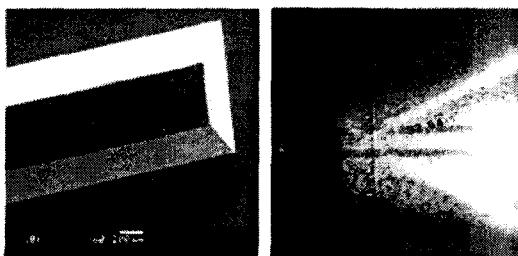


그림 5) Micro Prism

그림 4)은 프리즘이 구성되어 있는 두 번째 레이어를

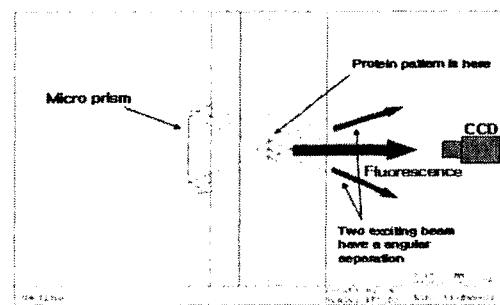


그림 4) 2nd layer

나타낸 그림이다. 프리즘은 폭 540um, 높이 300um, 경사각 54.74°로, 열가소성 수지의 일종인 PMMA로 제작되어진다. 그림에서 보는 바와 같이 프리즘을 통하여 입사된 두개의 여기광이 교차하는 지점에 분석할 단백질 패턴이 놓여지게 되고, 여기광은 단백질 패턴을 주사한 후, 서로 다른 방향으로 퍼져 나가게 된다. 이러한 방식으로 여기광이 도달하지 않는 위치에서 형광을 측정하여 신호 대 잡음 비를 높일 수가 있다.

그림 5)는 설계한 프리즘을 제작한 결과이다. 프리즘에 빛을 수직입사 시켰을 때, 설계상의 굴절각은 33.15°, 실제 굴절각은 32.64°로서 설계목표치에 98.5%의 성능을 보였다.

그림 6)는 스캐닝 미러를 $-10^{\circ}, -5^{\circ}, 0^{\circ}, 5^{\circ}, 10^{\circ}$ 로 움직이면서 시뮬레이션 한 결과이다. 가우시안 빔 분석을 했을 때, 빔의 직경은 미러에서 약 40~50um, 프리즘에서는 약 60~70um, 단백질 패턴이 놓여질 위치에서는 120~130um 정도의 크기를 가지고 진행하는 것으로 나타났다. 하지만 그림에서 보는 바와 같이 미러가 10° 인 경우는 다른 각도에서 보다 경로차가 심하기 때문에 빔의 모양이나 두 빔 모이는 위치가 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 미러의 각도가 10° 인 경우를 제외하면 레이저에 의해 스캔되는 길이는 약 1.5mm정도이다.

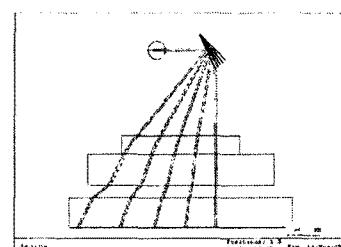


그림 6) Side view

2.3 실험에 의한 증명

설계된 광학계의 포인트는 분석해야 할 패턴에 여기광을 비스듬하게 입사(Oblique incidence)시켜, 디텍터에서 원하는 형광과 분리시켜 신호 대 잡음 비를 높이고자 하는 것이 목적이다. 이 가능성을 시험해 보기 위해 그림

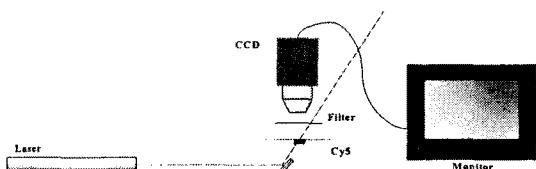


그림 7) 실험 셋팅

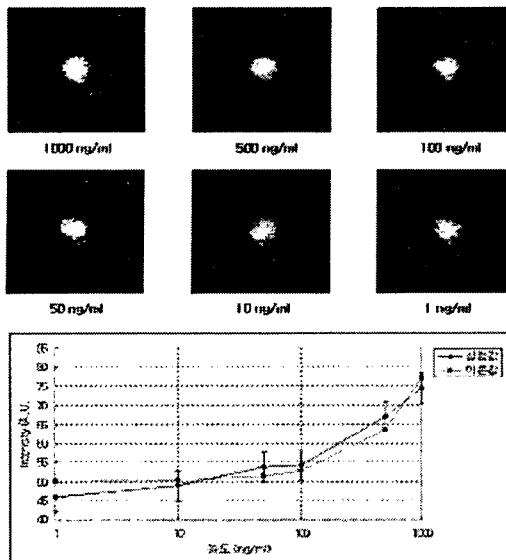


그림 8) 실험 결과 & plot

7)과 같이 실험 구성을 하여 실험을 해 보았다. 15mW 638.9nm의 레이저를 사용하여 1000ng/ml, 500ng/ml, 100ng/ml, 50ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml의 농도를 가지는 Cy5가 부착된 단백질 패턴을 주사해 보았다. 각 패턴의 크기는 적정 200μm이다.

그림 8)은 실험 결과와 농도변화에 따른 형광의 밝기 이론값과 비교하여 나타낸 그라프이다. 농도의 증가에 따라 측정되는 형광의 세기가 증가하고 있는 것을 볼 수 있다. 이론값과 실험값을 비교해 보면 대체로 비슷한 경향을 보이는 것을 알 수 있으나 100ng/ml이하의 농도에서 이론값은 거의 변화하지 않는 반면 실험값은 서로 구분이 가능할 정도로 다른 값을 보임을 알 수 있다. 이것은 아직도 고려하지 못한 어떤 요인이 있을 수도 있으므로 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

그림 9)는 같은 샘플을 칩 스캐너를 이용하여 분석한 결과와 비교한 것이다. 칩 스캐너의 경우 1000ng/ml이하에서는 거의 형광이 관측되지 않았으나 Oblique incidence방식으로는 관측이 가능했다. 칩 스캐너의 경우에는 여러 샘플을 동시에 검사하는 반면, 본 실험에서는 하나의 샘플을 검사하였으므로, 직접적인 비교는 힘들겠지만 칩 스캐너를 사용하여 하나의 패턴을 검사한 경우에도 형광의 세기가 그다지 커지지 않는 것을 보아 Oblique incidence방식으로 스캔을 하였을 때에도 더 좋은 성능을 보일 것으로 사료된다.

3. 결 론

본 연구에서는 최근 연구가 활발히 이루어지고 있는 단백질 칩의 분석을 위한 새로운 광학 시스템을 고안하고 설계, 시뮬레이션 하였으며 선형 실험을 통해 이론에 부합함을 확인하였고 그 가능성을 진단한 결과, 기존의 방식보다 간단하고 소형화 된 광학계를 이용해 단백질 칩 분석 시스템의 소형화가 가능하다는 것을 확인하였다. 형광측정에 가장 큰 걸림돌이라고 할 수 있는 신호 대 잡음 비를 높이기 위해 마이크로 프리즘을 사용하여 여기광과 형광을 기하학적으로 분리하는 해결책을 제안하였으며, 프리즘을 제작하여 그 성능을 평가하였다. 마이크로 머시닝을 이용한 마이크로 미러와 프리즘은 단백질 칩 분석 시스템의 소형화와 성능향상을 위해 효과적인 해결 방법임을 제시하였다.

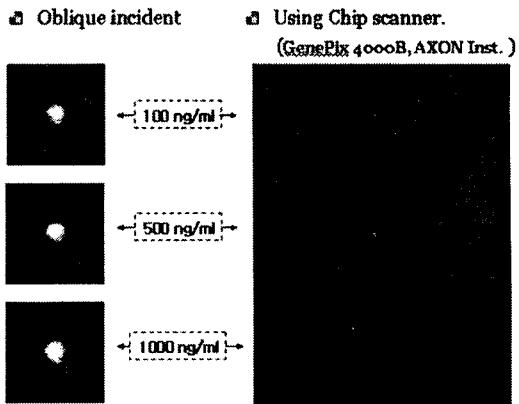


그림 9) Chip scanner와 비교

Acknowledgment

본 연구는 초미세 생체전자 시스템 연구센터의 과제지원으로 이루어졌습니다. (과제번호 97K4-0900-00-01-3)

[참 고 문 헌]

[1] Jean-Christophe Roulet, Reinhard Volkel, Hans Peter Herzig, Elisabeth Verpoorte, Nico F. de Rooji Rene Dandliker "Microlens system for fluorescence detection in chemical microsystems" *Optical Engineering* May 2001.

[2] J.C Roulet, Hans Peter Herzig, Elisabeth Verpoorte, Nico F. de Rooji Rene Dandliker "Integration of micro-optical systems for fluorescence detection in μTAS application" *Micro Total Analysis System* 2000.

[3] Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with improved fluorescence properties. *J.Biol.Chem.* 260, 3440-3450.

[4] Lakowicz, J.R. (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum, New York.

[5] Rost, F.W.D.(1992). *Fluorescence Microscopy*, Vol. 1. Cambridge University Press, New York.

[6] Rost, F.W.D.(1992). *Quantitative Fluorescence Microscopy*. Cambridge University Press, New York.