

Real-Time PCR 장치용 형광 검출기를 위한 카메라 성능 비교 및 분석

구슬빛나, 김중대, 박찬영, 김유섭, 이득주*

*한림대학교

rntmfqlcsk@gmail.com, kimjd@hallym.ac.kr, cypark@hallym.ac.kr, yskim@hallym.ac.kr,
*dlemrwn@hallym.ac.kr

Comparison and analysis of camera performance for fluorescence detector for Real-Time PCR devices

Koo Seul Bit Na, Kim Jong Dae, Park Chan Young, Kim Yu Seop, Lee Deuk Ju*

*Hallym Univ.

요 약

본 논문에서는 저가형 소형 다중 실시간 중합 효소 연쇄반응(Multiplex Real-Time PCR) 시스템에 적절한 검출기를 채택하기 위한 카메라 성능을 비교한다. 형광 검출을 통해 분석하는 기기에서 검출기의 성능은 중요하다. 기존 Real-Time PCR에서 검출기로 사용되는 카메라는 가격이 비싸고 크기가 크다. 최근 소형 디지털카메라의 발전으로 인해 성능이 뛰어난 카메라들이 개발되고 있다. 따라서 검출기의 소형화로 인해 광학계를 최소화하여 기기의 소형화 및 저비용으로 구현이 가능해진다. 본 논문에서는 CMOS(Complementary Metal - Oxide - Semiconductor) 센서로 만들어진 고성능 산업용 카메라와 저가형의 web 카메라를 비교하여 현장진료검사(Point-of-care, POC)가 가능한 다중 Real-Time PCR 검출기에 적합한 카메라를 위한 비교 실험을 진행하였다. 카메라의 성능을 비교하기 위해 실제 DNA를 완전히 증폭했을 때의 농도와 같은 레퍼런스 형광염료(FAM)와 2차 증류수(Double Distilled Water, DDW)를 사용하여 실험한 후 차이를 비교하였다. 비교 결과 저가형의 web 카메라도 충분한 형광 검출이 가능함을 확인하였다.

I. 서론

Real-Time PCR 장치는 PCR 측정 장치보다 신속하고 정확하여 현재 분자진단에 많이 활용되고 있다. 형광 검출 시스템에서 일반적으로 쓰이고 있는 검출기의 종류 중 하나인 카메라는 전하결합소자(Charge-coupled device, CCD) 카메라 위주로 사용되고 있다. 하지만 CCD 특성상 부가 회로가 필요하고 동적 영역이 높은 대신 크기가 커지는 단점이 발생한다. CCD 카메라로 인해 전체 시스템 모듈이 커지게 되면서 형광 검출을 위한 부가적인 광학적 구성요소들이 증가하여 부피가 커지고 가격이 높아지는 문제점이 있다 [1]. 디지털카메라의 발전으로 인해 다양한 카메라의 종류와 많은 기술이 여러 기기에 적용되었다. 이미지 센서는 카메라의 기술에서 중요한 역할을 한다. CMOS 센서는 제조 공정 기술만 있다면 대량생산이 가능하여 주로 스마트폰 카메라에 사용된다. 그로 인해 스마트폰 시장이 빠르게 발전함에 따라 성능이 좋은 소형 CMOS 센서를 탑재한 저가형의 카메라들이 개발되고 있다 [2]. 고성능의 소형 센서를 지닌 카메라는 검출 기기의 설계를 단순화하여 시스템의 비용을 줄일 수 있다. 일체형 회로로 되어있으며 센서의 크기가 작아 렌즈의 크기와 개구부도 작아 소형화가 가능하다. 또한, 소형화로 인해 신호 처리의 재현성 및 감도를 향상시키기 위한 광학적 부품들의 크기도 소형화할 수 있다. 따라서 검출 시스템의 부피가 작아지며 저가형으로 구현할 수 있어 현장진료검사(PointofCare, POC)가 가능하다 [3]. 고성능 산업용 카메라는 일반 카메라보다 좋은 성능의 부품으로 이루어져 있어 이미지 품질이 좋다. 외부 영향에 따른 유연한 조작과 렌즈의 탈착이 가능하다. 따라서 복잡하고 전문적인 측정 작업 범위에 적합하므로 형광 검출에 좋은 성능을 보여준다. Web 카메라는 저가형이며, 일반적인 사진 유형에 대한 모든 기능이 대부분 자동으로 설정되어 있다. 대부분 내장된 렌즈로 이루어져 있어 렌즈 교체가

어렵지만, 검출 시스템에 따라 저가형으로 구현 가능하다. 본 논문에서는 소형 다중 Real-Time PCR 형광 검출 시스템에 적합한 형광 검출기 성능을 비교한다. 제안한 카메라 성능 비교 실험을 위해 레퍼런스 형광염료 시약(FAM)과 2 차 증류수(DDW)를 사용하여 밝기를 측정하여 진행하였다. 실험 결과는 정량적이고 정성적인 분석을 통해 검증하였다. 비교 실험 결과 본 논문에서 제안한 시스템에 저가형 web 카메라를 사용하여 구현하였을 때 고성능 산업용 카메라보다 좋은 성능을 보이는 것을 확인하였다.

II. 본론

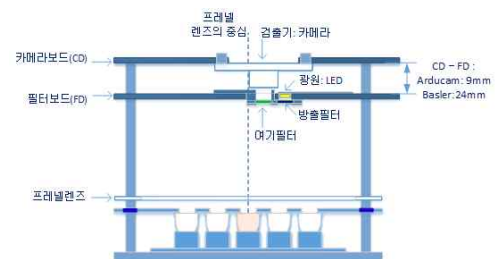


그림 1. 검출 시스템 구조도

비교 성능 평가를 위해 고성능 산업용 카메라와 저가형 web 카메라를 사용하였다. 저가형의 web 카메라는 Arducam 회사의 SONY IMX 298 센서를 탑재한 USB(Universal Serial Bus) 오토 포커스 비디오 웹 카메라로 채택하였다. Arducam 카메라는 오픈 플랫폼 소프트웨어로 제어하였다. 산업용 카메라는 ONSEMI AR0134 CMOS 센서를 탑재한 Basler를 채택하였으며, 전용 소프트웨어 프로그램을 사용하여 제어하였다. Basler 카메라의 렌즈는 12mm 마운트를 적용하는 렌즈 대신 작은 크기의 1/3" sensor CCTV 카메라용 pin hole 렌즈를 사용하였다. 그림 1은 소형 다중

형광 검출 시스템에 적합한 형광 검출기 구조도를 보여준다. 프레넬 렌즈를 사용하여 하나의 검출기와 하나의 광원을 같은 평면에 배치하였다. 카메라와 광원은 프레넬 렌즈 중심에서 방사형 방향으로 배치하였다. 형광 검출을 위해 각 4개(FAM, HEX, ROX, CY5)의 형광 파장에 맞는 소형 여기 필터와 소형 방출 필터를 사용하여 필터 모듈을 제작하였다. 여기 필터는 LED 앞에 배치되어있으며 방출 필터는 카메라 앞에 배치되어 튜브에 반사된 형광을 검출한다. 최하단에는 시약을 담은 5x5 형태의 튜브를 꽂을 수 있는 챔버와 프레넬 렌즈가 있으며, 프레넬 렌즈 위에는 LED와 필터 모듈이 있는 필터 보드를 프레넬 렌즈의 유효초점 거리만큼 거리를 두었다. 필터 보드는 LED와 필터의 변화가 없도록 고정하여 움직임을 최소화하였다. 카메라는 시야각에 가리지 않게 광학 필터에 최대한 근접하게 배치하였다. 두 개의 카메라를 개별적으로 고정하기 위해 카메라 교체 시 카메라 보드를 통해 물리적 변화를 줄였다. 검출 시스템의 모든 모듈들은 빛이 새는 현상을 최소한으로 줄이기 위해 압실을 제작하여 무광처리하였다. Web 카메라 형광 검출기의 마이크로 컨트롤러는 아두이노를 사용하였으며, 산업용 카메라 형광 검출기는 전용 컨트롤러 I/O 보드를 사용하였다. LED 드라이버를 통해 PWM(Pulse Width Modulation)을 제어하여 LED의 밝기를 조절하였다. 카메라 설정을 위해 필요한 I/O 보드와 ProMicro를 하나의 회로 보드에 묶어 커넥터로 변환할 수 있게 하였다.

카메라의 비교 실험을 하기 위해 DNA가 완전히 증폭하였을 때의 형광 농도의 레퍼런스 형광염료시약(FAM)과 2차 증류수(DDW)를 사용하여 실험을 진행하였다. 각각 FAM (5 μ mol/36 μ L)과 DDW (36 μ L)의 시약이 담긴 25개의 튜브로 1세트씩 준비하여 0도와 180도로 돌려서 총 2세트를 촬영하였다. 분석을 위한 이미지처리는 하나의 FAM 영상 이미지의 최소 형광 값과 최대 형광 값을 설정하여 Blob detection을 통해 정보를 얻은 후 관심영역을(ROI) 지정하여 나머지 이미지의 형광 밝기를 구하였다. 정확성을 높이기 위해 2세트씩 촬영된 이미지를 반복교차 시켜 분석하였다.

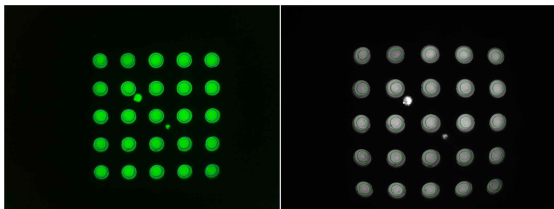


그림 2. 회전하지 않은 튜브에서 촬영 후 ROI된 FAM 이미지; (a) 저가형 web 카메라, (b) 고성능 산업용 카메라

그림 2(a)는 web 카메라를 gain 0, exposure -2 led pwm 200 으로 설정하고 촬영한 FAM 이미지고, 그림 2(b)는 산업용 카메라에서 exposure를 0.25sec으로 설정한 FAM 이미지를 보여준다. 2 사분면에 LED와 카메라가 배치되어있어 4 사분면이 다른 사분면들에 비해 밝기가 열약하지만, 프레넬 렌즈의 사용으로 그림2(a)와 같이 크게 비교되지 않는다. 그림 2(b)의 이미지를 보면 사용할 수 있는 카메라의 렌즈 채택이 미흡하여 프레넬 렌즈를 사용해도 중앙을 기점으로 어안렌즈처럼 기울어짐을 보여준다. 특히 4 사분면 외각 라인으로 많이 기울어지고 밝기가 어두운 것을 알 수 있다.

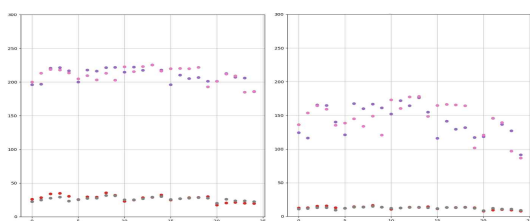


그림 3. FAM과 DDW의 평균 밝기; (a) 저가형 web 카메라, (b) 고성능 산업용 카메라

그림 3은 0도와 180도로 튜브를 회전하며 촬영한 이미지에서 그림 2와 같이 ROI 영역을 지정한 후 FAM과 DDW의 반경 내 평균 밝기를 보여준다. 반경에 대한 값은 4개 이미지 튜브의 센터에서 형광의 범위를 넓혀가며 수집한 이미지 조합의 최소 밝기 차에서 안정적인 차이를 보였던 값으로 선택하였다. 카메라별 이미지 사이즈가 달라 튜브 평균의 반경도 차이를 보인다. Web 카메라로 촬영한 이미지 그림 3(a)는 반경 값 50pixel로 두었고, 산업용 카메라로 촬영한 그림 3(b)는 14pixel로 두었다. Web 카메라의 경우 25개 튜브 밝기의 scatter 형태가 안정적이며, FAM 간의 차이도 적은 것을 보여준다. 산업용 카메라의 경우 web 카메라에 비해 FAM의 밝기가 1.5배 정도 차이가 있음을 보여주며, (5,5)의 밝기가 가장 떨어지는 것을 알 수 있다. 표 1은 카메라별 반경 내의 밝기 평균에 따른 통계를 통해 공간적 균일성을 보여준다. FAM과 DDW 4개의 이미지 조합의 평균 차이를 통해 계산하였다. max/min=1 또는 rel.std max=0으로 수렴할수록 공간적으로 균일하다는 것을 알 수 있다. 표를 보면 web 카메라가 산업용 카메라보다 형광 측정에 대한 균일성이 뛰어난 것을 알 수 있다.

표 1. 카메라별 반경 내의 밝기 평균에 따른 통계

카메라	rad	max	min	max/min	means	rel.std max
Basler	5	166.96	84.33	1.98	136.56	17.86
	10	165.44	81.96	2.02	133.85	18.35
	14	163.68	80.53	2.03	131.33	18.95
Arducam	15	195.61	167.82	1.17	183.68	5.57
	30	196.05	166.31	1.18	184.36	6.11
	50	196.57	164.91	1.19	183.76	6.55

III. 결론

본 논문에서는 소형 다중 Real-Time PCR을 위한 형광 측정 시스템을 통해 CMOS 센서로 만들어진 고성능 산업용 카메라와 저가격의 web 카메라의 비교 실험을 진행하였다. 그 결과 본 연구팀이 설계 제작한 다중 소형 Real-Time PCR 형광 검출기를 통해 저가격 웹 카메라가 고성능 산업용 카메라보다 좋은 형광 검출 성능을 보여주었으며, 저가의 소형 web 카메라를 사용하여 현장진료기기의 가능성을 확인하였다. 추후 양쪽 외각 부분의 형광값이 떨어지는 현상은 이미지 처리기법을 개선하고, 시스템 설계 수정을 통해 보완하고, 프로토타입 완성을 통해 상용 시스템과 비교하는 성능 평가도 진행할 예정이다.

ACKNOWLEDGMENT

이 논문은 2022년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (2020R1I1A1A01056628)

참 고 문 헌

- [1] Ghallab, Y. H., Ismail, Y. "CMOS based lab-on-a-chip: Applications, challenges and future trends," IEEE Circuits and Systems Magazine, pp. 27-47, 2014.
- [2] Logan, J., Edwards, K. "An overview of real-time PCR platforms," Real-time PCR an essential guide. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom, pp. 13-29, 2004.
- [3] Petralia, S., Conoci, S. "PCR technologies for point of care testing: progress and perspectives," ACS sensors, pp. 876-891, 2017.