

## 간접성 반스톡스 라만 산란을 이용한 생체 시료 분자진동 이미징 기술

### Molecular Vibrational Bio-Imaging Based on Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS)

이재용, 이은성

한국표준과학연구원 전략기술연구부 나노바이오융합연구단

eslee@kriss.re.kr

비선형광학 레이저 분광기술은 최근에 들어 급속한 발전을 이루고 있는 바이오메디칼 이미징 분야에서 매우 중요한 측정 도구로 부각되고 있다.<sup>(1)</sup> 대표적인 비선형광학 영상 대조(Image Contrast) 기법으로는 2차 조화파 발생 (SHG), 3차조화파 (THG), 합주파수 발생 (SFG), 광 커 효과 (Optical Kerr Effect), 유도 라만 산란 (Stimulated Raman Scattering), 간접성 반스톡스 라만 산란 (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering: CARS) 등을 들 수 있다.

생체 영상화에 있어서 비선형광학적인 접근법에 주목하는 이유는, 대상물을 살아있는 상태로 유지할 수 있는 비침습적 3차원 측정, 물리적/분자화학적 정보 취득, 높은 효율의 광신호 검출을 통한 실시간 모니터링을 가능하게 할 잠재적 요건을 가지고 있기 때문이다. 의료 진단 분야에서 이미 보편화된 영상기법인 MRI, PET, SPECT, X-선 CT, 초음파 영상, 백색광 내시경 등에 비교할 때 단일 세포 수준에 이르는 우수한 공간 분해능과 보다 충실한 분자화학적 정보 제공이 차별화된 목적이라 할 수 있으며, 생명공학 기초연구에서 제한적으로 활용되고 있는 생체분자 이미징 질량분석기, Bio-AFM, Bio-SEM/TEM 등에 대해서는 바이오메디칼 응용 측면에서 월등한 생체 접근성을 가지는 것이 특징이다.

본 발표에서는 CARS 분광 영상대조 기법과 레이저 빔 스캔 현미경을 결합함으로써 구현되는 생체 시료 분자진동 이미징 기술에 관하여 소개하고자 한다. CARS 현미경은 생체를 구성하는 분자 고유의 진동지문(Vibrational Fingerprint) 신호를 매우 높은 감도와 공간 분해능으로 검출함으로써, 생체 세포나 조직을 형광 표지(fluorescence tagging) 없이 실시간 3차원 관찰 가능하게 하는 바이오 이미징 기술로서 제안되었다.<sup>(2)</sup>

CARS는 분자진동 분광선을 이용하는 점에서 종래의 라만 분광법과 유사하나, 주파수가 각기 다른 펌핑 빔( $\omega_L$ ), 스톡스 빔 ( $\omega_S$ ), 조사 빔( $\omega_P$ )이 시료에 집속 입사하여 사광파혼합 (four wave mixing)을 통해 공명 강화된 반스톡스 광간섭 신호( $\omega_{AS}$ )를 형성하는 것이 특징이다. (그림 1 참조) CARS 신호는 자발 라만 산란에 비해 세기가 대략 10000배 이상 크기 때문에 검출 감도 및 측정 속도를 획기적으로 향상시킬 수 있

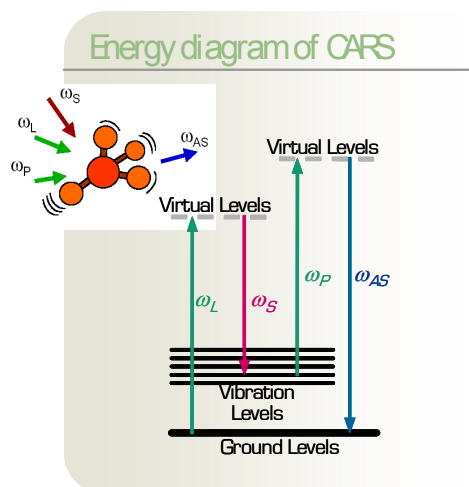


그림 1. CARS 현상에 의한 분자진동 천이 구조 도표,

으며, 입사광에 대해서 파장이 짧은 쪽으로 편이되어 배경잡음 발광으로부터 분리가 용이하다. 또한, 종래의 다광자 여기 형광법과 달리 광흡수 현상이 아닌 광매개 변환 과정을 거치므로 생체 시료의 열 손상 위험을 현저히 줄일 수 있다. 이러한 비선형 라만 상호작용은 현미경 대물렌즈를 통해 시료 내부에 집속된 레이저 빔 초점공간에 국한해 산란광을 발생시키므로, 시료 또는 입사 레이저 빔을 고속으로 래스터 주사(Raster Scan)하면서 CARS 신호를 공간 맵핑(Mapping)함으로써 별도의 공초점(Confocal) 광학계 없이 3차원 생체시료에 대한 분자진동 영상을 얻게 된다. (그림 2 참조)

CARS 바이오현미경 기술의 초보적 구현이 이루어진 이후,<sup>(2)</sup> 실용적 측면에서의 성능 향상을 위한 노력이 지속적으로 이루어짐으로써<sup>(3-5)</sup> 현재 수십 mW 출력의 파장가변 근적외선 피코초/펨토초 레이저 시스템과 갈바노 거울(Galvano Mirror Scanner)을 채용한 레이저 빔 스캔 현미경을 이용하여 CH, OH, CC, CD, OD Amide, Phosphate, Aromatic Ring 등의 다양한 생체 세포 분자진동 영상을 300 nm 급 분해능과 수 frame/s의 속도로 측정하는 수준에 이르렀다. 최근에는 생체 피부조직의 소기관 관찰과 약물침투 동역학 가시화 가능성을 보여주는 연구개발 결과가 보고되었으며,<sup>(6)</sup> 생체 내부 장기에 대한 응용을 목표로 광섬유 기반의 CARS 내시경 시스템에 관한 기술적 시도가 첫 걸음을 내딛고 있다.<sup>(7)</sup>

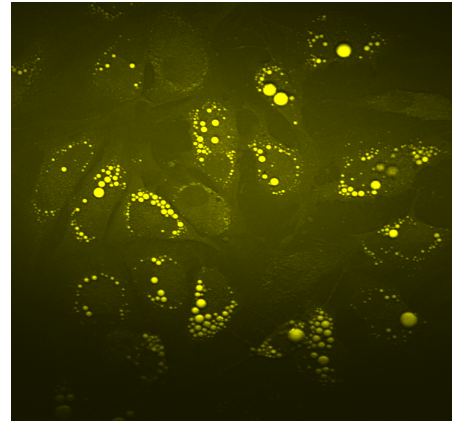


그림 2 생체줄기세포의 지방세포 유도 분화 과정을 무표지 관찰한 CARS 현미경 영상 (Raman shift =  $2837\text{ cm}^{-1}$ ).

한국표준과학연구원에서도 파장가변 CARS 바이오 현미경 장비를 자체 제작하여, 질병기작 규명, 질병 조기진단, 약물 효능 및 독성 평가와 관련된 다양한 분자생물학적 응용연구에 활용을 시도하고 있다. 현재로서 CARS 바이오 현미경을 적용하기 용이한 생체 시료는 주로 배양이 가능한 각종 암세포, 섬유아 세포, 신경세포, 간 세포, 췌장 세포 등이며, 피부나 내부 장기와 같은 조직 이미징의 경우 생체로부터의 적출이 필요하다. 응용 연구와 병행하여 CARS 바이오 이미징의 실용화와 폭넓은 활용에 걸림돌이 되고 있는 측정감도 향상과 분자선택성 확보, 그리고 의료진단용 광학계 개발을 비롯한 기술적 문제를 해결하기 위한 연구도 진행되고 있다.<sup>(8)</sup>

본 발표에서는 CARS 분자진동 영상대조를 이용한 레이저 빔 스캔 현미경의 원리와 기본적인 장치 구성에 대해 설명하고, CARS 바이오 이미징 기술의 발전 경로, 기술적 한계와 극복 방안, 앞으로의 바이오메디칼 응용 분야에 대하여 전반적으로 소개하고자 한다.

[참고문헌]

1. P. Campagnola *et al.*, Optics & Photonics News, June 2003, 40.
2. A. Zumbusch *et al.*, Phys. Rev. Lett. **82**, 4142 (1999).
3. A. Volkmer *et al.*, Phys. Rev. Lett. **87**, 023901 (2001).
4. J.-X. Cheng *et al.*, Opt. Lett. **26**, 1341 (2001).
5. M. Mueller *et al.*, J. Phys. Chem. **106**, 3715 (2002).
6. C. L. Evans *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. **102**, (2005).
7. F. Legare *et al.*, Opt. Exp. **14**, 4427 (2005).
8. E. S. Lee, J. Y. Lee, and Y. S. Yoo, J. Biomed. Opt. **12**, 024010 (2007).