

광대역 CARS 현미경 개발 및 나노 재료 및 바이오응용 연구

Development of multiplex CARS microscopy and its Nano- and Bio-application

최대식*, **, 전병혁*, 이흥순*, 김창호*, 백구연*, 우숙이*, 정세채*, 조동현**

*한국표준과학연구원 전략기술부, **고려대학교 물리학과

scjeoung@kriss.re.kr

광학 및 전자광학 현미경의 개발 및 발전은 재료 과학 및 세포 생물학과 의학의 발전과 밀접한 관련이 있다. 일반적인 광학현미경으로는 세포의 근사적인 형태는 볼 수 있지만 세포의 세부적인 소기관을 볼 수는 없다. 충분한 대상 물질의 대조 능력과 분해능을 갖기 위하여 새로운 현미경이 필요로 하였다. 1957년 Minsky에 의해서 이론적으로 제안되었던 공초점 현미경 기술은, 1960년대에 레이저가 개발됨으로써 1977년에 Komfiner과 Sheppard가 처음으로 실험적으로 증명됨으로써, 시료의 평면상 이미지와 함께 깊이 방향으로 분해능을 1 um이하로 향상됨으로써 3차원으로 영상화하는 것을 가능하게 하였다.⁽¹⁾ 이러한 공초점 형광 현미경은 더욱더 다양한 형태로 진화하여 현재에는 관련 재료학분야 뿐만 아니라 생물학자 및 의학자들에게는 강력한 실험 장비가 되고 있다. 한편 공초점 형광 현미경은 시료 내에 인위적으로 혹은 자연적으로 존재하는 발광 물질로부터 발생하는 광 발광의 측정을 기반으로 한다. 한편 이러한 색소의 사용 시 특정한 분자에 착색해서 물질의 대조 능력이 뛰어나지만 색소의 광 유발 화학반응에 의하여 대상 시료의 화학적 물리적 성질이 변화 되어서 샘플의 본성을 측정할 수 없는 단점이 종종 보고되어지고 있다.

최근 20년 동안 2차 및 3차 조화파 발생과 CARS 및 다차원 Raman현상 등 다양한 비선형 광학현상에 근거한 다양한 형태의 비선형 광학현미경이 보고되어왔다. 2차 및 3차 조화파 현미경은 물질의 경계면에서는 일반적으로 실제로 응용이 가능한 정도로 신호가 충분한 반면, 경계면이 아닌 영역에서는 신호가 미약하여 실제 측정을 하기위하여서는 상대적으로 레이저 세기가 상당히 증가되는 단점을 가지고 있다⁽²⁾. Raman 현미경은 레이저 광의 광자와 분자 간에 발생된 비탄성 충돌의 결과로 나타나는 자발적 산란으로 광자와 분자간의 진동 에너지 교환에 따라 스톡스 라만의 신호가 발생되어 이를 영상화한 것이다. 이 현미경은 색소의 착색 없이 샘플에 존재하는 특정 분자의 위치와 양을 영상화하는 화합물 맵핑이라고 하는 장점을 가지고 있다. 그러나 Raman 신호가 형광신호에 비해 약 $(1/10^{16})$ 배나 작아서 강한 여기 레이저 파워가 필요할 뿐만 아니라, 하나의 영상 이미지를 얻는데 1시간 이상이 소모되는 단점을 가지고 있다. 한편 1999년 Duncan 등은 기존의 Raman 현미경의 장점을 사용하고 단점을 보완하기 위하여 기존의 CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) 비선형 광학 현상을 응용하여 이미징 현미경을 개발하고 그 유용성을 실험적으로 증명하였다^(3,4). CARS는 스톡스 빔과 펌프 빔을 포함하는 3차 비선형 광학 현상이다. 한편 CARS 신호의 세기는 분자의 진동 레벨 에너지와 일치하는 공명 진동수에 배합하여 증가함으로, 일반적으로 기존의 Raman 신호보다 약 10^4 배 이상 증가한다고 알려져 있다. 또한 CARS 신호는 coherent한 성질로 인하여 레이저 빔처럼 직진성을 가지고 있음으로, 신호 대 잡음 비가 Raman 산란보다 좋다고 알려져 있다.

일반적으로 측정 모드에 따른 다양한 형태의 CARS 현미경은 크게 광원의 종류에 의하여 2 대의 각기 다른 피코초 레이저를 동기화 하여 사용하는 경우와 1대의 펨토초 레이저를 이용하여 2가지 각기 다른 과정을 발생하여 사용하는 경우가 알려져 있다. 본 연구에서는 한 대의 펨토초 레이저를 사용하고 레이저의 기본 800 nm 영역에서 발진하는 자체 광원과 PCF (Photonic Crystal Fiber)을 기반으로 발생한 super-continuum 빔 2개를 시간적-공간적 동기화를 이룸으로써 CARS 현상을 유도하였다. super-continuum 빔은 스톡스 광으로 사용하면 과정을 변환시킬 때 어떤 새로운 광학적 정렬이 없이 다양한 분자의 CARS

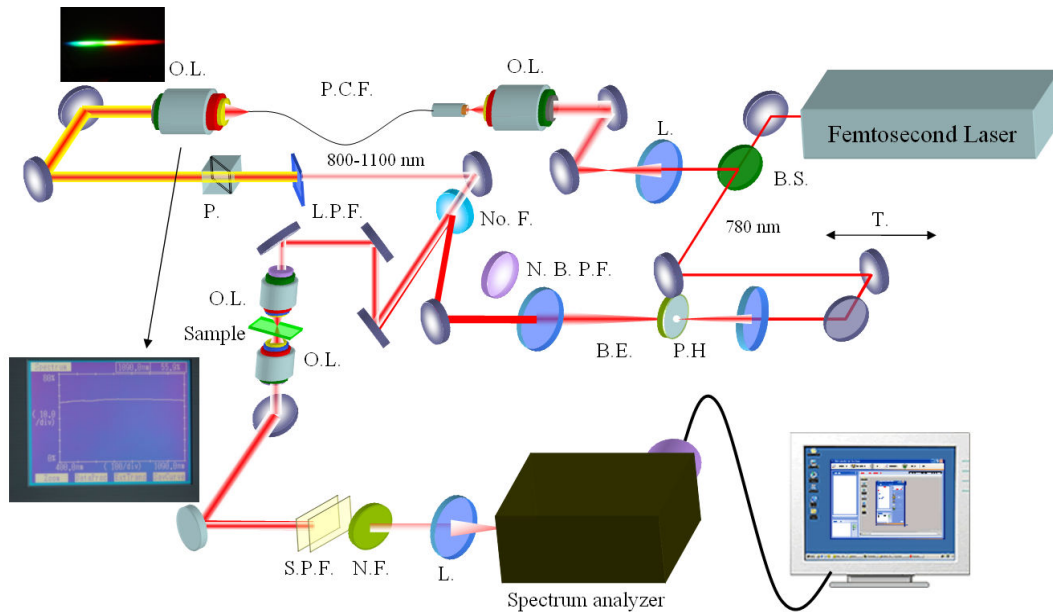


그림 1 다중 CARS 현미경 실험 장치 개략도

신호를 얻는 장점을 가지고 있으며, 샘플에서 여러 분자가 공존할 경우에 모든 신호를 한 번에 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다. 어떤 특별한 분자인 경우에는 fingerprint 전 영역을 동시에 측정함으로써 물질의 화학적인 구조에 대한 논의를 좀더 체계적으로 할 수도 있다.

그림 1은 실험실에서 개발된 CARS 현미경 시스템을 개략적으로 나타내었다. 광원으로 사용될 광원은 Coherent사에서 제작된 펨토초 레이저 (MIRA, Coherent, USA)를 사용하였다. Super-continuum 광원은 약 30 cm의 광경자 파이버에 펨토초 레이저 광원을 집속함으로써 발생하였다. 이렇게 발생한 2개의 각기 다른 파장대역의 광원은 NA=0.9, X100의 대물 렌즈로 대상 물질에 집속함으로써 CARS 신호를 발생하도록 고안하였다. 물질로부터 발생된 CARS 신호는 수집 렌즈(NA=0.55, X40)를 이용하여 집광하고 초점거리 30 cm의 분광기를 통하여 분광하고 Photomultiplier로써 검출하였다. 검출된 광전자 신호는 I-V 전환/증폭하고 Lock in Amp를 사용하여 S/N비를 향상시켰다. 샘플을 XY 스테이지에 거치하고 구동함으로써 CARS신호를 2차원 이미지 영상화를 하였다. CARS의 기본적인 실험을 수행 하였고 몇 가지 액체 샘플에 대한 CARS 신호를 측정하였다. 현재 이상의 개발된 다중 CARS 현미경을 이용하여 다양한 크기의 polystyrene bead 및 고분자 박막의 공정 전후의 물질 구조 변이와 같은 첨단 소재에 대한 응용연구뿐만 아니라 fibroblast 세포 및 백합 꽃가루등과 같은 다양한 형태의 생물 소재에 대한 광대역 CARS 신호 영상을 얻기 위한 연구를 수행 중에 있다.

참고 문헌

1. Steve M. Potter, "Vital imaging: Two photons are better than one", Current Biolgy 6, 1595-98 (1996).
2. Jeff A. Squier, Michiel Muller, G. J. Brakenhoff and Kent R. Wilson, "Third harmonic generation microscopy", Optics Express 3, 315-324 (1998).
3. Andreas Zumbusch, Gary R. Holtom, and X. Sunney Xie, " Three-dimensional vibrational imaging by coherent Anti-stokes Raman scattering", Physical Review Letters 17, 4142-5 (1999).
4. Hideaki Kano and Hiro-o Hamaguchi, " Ultrabroadband multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using a supercontinuum generated from a photonic crystal fiber", Applied Physics Letters 86, 121113-1-3 (2005).