

## 차세대 생화학 분석 기술 : 공초점주사현미경

공초점주사현미경은 생화학 분석 기술로서 각광받고 있는 기술이다. 이 글에서는 공초점주사현미경의 특성 및 응용 분야에 대해 알아보고, 최근의 연구 동향에 대하여 간단히 소개한다.

유 흥 기 / 한국과학기술원 기계공학과, 박사과정

권 대 갑 / 한국과학기술원 기계공학과, 교수

e-mail : dggweon@kaist.ac.kr

### 생화학 분석 기술로서의 공초점주사현미경

최근 인간의 삶의 질 향상에 대한 관심은 그 어느 때보다 높다. 그에 따라 신약개발, 의료 진단기술과 같은 건강한 삶을 영위하기 위한 기술들이 각광을 받고 있고, 지노믹스(genomics), 프로테오믹스(proteomics), 생체영상 분야 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 생화학, 생의학 분야의 연구에서는 첨단 분석 기술을 가졌느냐 그렇지 못하느냐에 따라 연구 개발의 성패가 좌우될 정도로 분석 기술에 대한 의존도가 높다. 따라서 현존하는 분석 기술의 한계를 뛰어 넘는 차세대 분석 기술 연구를 위해 많은 노력을 기울이고 있다. 산업적인 측면에서도 의료용 진단기기의 세계시장이 130억 달러(2000년)에 이르고 매년 10% 이상의 고성장을 하고 있으며 생화학 분석기기도 BT산업의 발달과 더불어 급격한 성장을 보이는 등 큰 성장을 하고 있는 기술이다.

공초점주사현미경은 3차원 내부 형상 측정과 파장 분석을 통한 생화학 분석이 가능하기 때문에, 지노믹스, 프로테오믹스 등 생화학 분석 분야에 널리 응용될 수 있을 뿐 아니라, 정밀 의료 진단 기기로도 활용될 수 있는 분석 기술이다. 다음에서는 공초점 주사현미경의 원리, 응용 및 최근 연구 동향에 대해 알아보도록 하겠다.

### 공초점주사현미경의 원리 및 특성

공초점주사현미경은 1957년 Minsky에 의해 처음 제안되었다. 기술적인 한계로 인해 널리 활용되지 못하다가 컴퓨터와 레이저의 발달에 힘입어 1987년 최초의 상업적인 공초점주사현미경이 개발된 이후로, 그 활용도와 중요도가 크게 증가하고 있다. 공초점주사현미경의 사진은 그림 1에 나타나 있다. 검출기 앞에 핀홀을 채용하여 시편의 초점 평면에서 나온 빛만 검출기를 통과할 수 있고, 초점 평면 외의 곳에서 나온 빛은 핀홀에 가려 검출기에 도달하지 못하게 된다. 이러한 원리로 공초점주사현미경은 시편의 한 단면만을 관찰하는 광학적 절편효과를 갖는다. 뿐만 아니라 핀홀이 잡광을 제거해 주기 때문에, 시편을 높은 분해능으로 선명하게 관찰할 수

49-

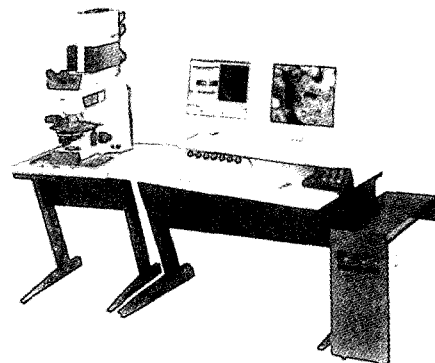


그림 1 공초점주사현미경

있다.

공초점주사현미경은 광학적 절편효과를 갖기 때문에 시편 내부의 2D 형상 관찰, 초점 심도의 확장, 및 시편의 3D 측정이 가능하다. 이러한 성질은 다른 측정기술로는 이루어낼 수 없는 공초점주사 현미경만의 독특한 특성이자, 또한 광학적 측정 방식이기 때문에, 파장 분석을 통한 생화학 성분 분석이 가능하다.

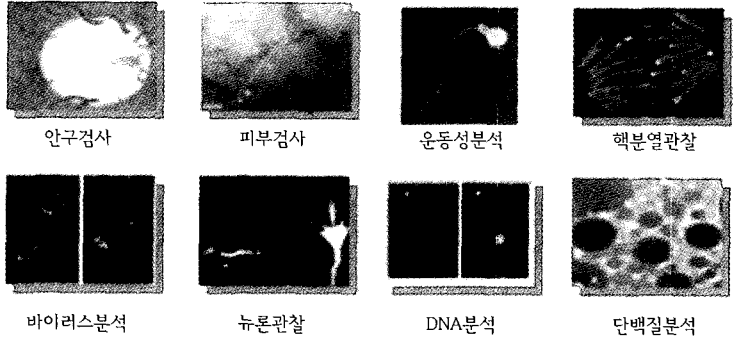


그림 2 공초점주사현미경의 응용 분야

### 공초점주사현미경의 응용 분야

공초점주사현미경은 그림 2와 같이 여러 생화학 분야의 분석에 이용될 수 있다. 의료용으로는 망막 측정이나 피부 검사에 이용되고, 내시경 시스템과 결합하여 암의 조기 진단 등에 활용될 수 있다. 레이저의 파워에 따라 공초점주사현미경을 이용한 비파괴 검사뿐 아니라 레이저를 이용한 치료도 가능하기 때문에, 검사와 진단, 치료를 모두 가능케 할 수 있다. 초당 1,000프레임의 고속측정 결과가 보고되고 있을 만큼 고속측정이 가능하기 때문에 세포나 분자의 빠른 운동성을 관찰할 수 있다. 또한 적절한 형광 염료를 이용하면 칼슘 농도 변화, pH 변화와 같은 생화학 물질의 동특성을 분석할 수 있다. 기존의 현미경보다 선명한 영상으로 뉴런의 구조나 세포 내 물질의 관찰이 가능하고, 단백질과 DNA 분석에도 사용된다.

### 공초점주사현미경의 최근 연구 동향

공초점주사현미경은 광학적 방법이기 때문에 회절 한계로 인한 분해능 한계를 갖는다. 최근, 공초점주사현미경이 갖는 분해능 한계를 극복하기 위해 다양한 연구가 시도되고 있다. 영상처리를 통한 이미지 향상 기법은 이미 많은 상용품에서 소프트웨어를 통해 구현되고 있다. 형광형 공초점주사현미경에서 영

상은 측정기기의 점확산함수(point spread function)에 의해 결정된다. 따라서 점확산함수를 측정한 후 이를 이용하여, 시편의 모양을 실제와 비슷해 지도록 영상처리를 하여 보다 선명한 영상을 획득할 수 있다. 주기적으로 반복되는 패턴을 조명하여 분해능을 두 배로 향상시킨 연구결과도 발표되었다. 이를 이용하면 매우 작은 크기의 고주파 영상신호도 획득할 수 있게 된다.  $4\pi$  공초점현미경을 통해 3~5배 정도의 광축 방향 분해능 향상을 얻은 결과도 발표되었다. 광축 방향으로 서로 마주보는 두 개의 대물렌즈를 사용하여 위 방향과 아래 방향에서 동시에 조명하면, 두 빔이 간섭하여 매우 좁은 영역으로 빛이 모이게 된다. 따라서 기존의 공초점현미경보다 훨씬 얇은 광학 절편도 얻을 수 있다. 공초점자가 간섭현미경은 반사형 시편에 대해 38%의 분해능을 향상시킨다. 복굴절현상을 이용하여 자가간섭현상을 만들어내는데, 초점 위치의 중심에서 반사된 빛은 보강 간섭을 일으켜 포토 다이오드에 의해 검출되고, 초점 spot의 변두리에서 반사된 빛은 상쇄 간섭을 일으켜 검출 면에서 광 강도가 0이 되어 검출되지 않게 된다. 따라서, 보다 작은 시편의 모양도 관찰할 수 있다. 유도방출소멸현상을 적용한 형광 공초점 현미경의 경우 광축 방향 분해능 50nm를 얻어 내는데 성공하였다. 초점 스폿에 도넛 모양의 유도방출소멸 빔을 쏘여주면, 초점 스폿의 중심 부분에서만 형광이 방출되고 주변 부분에서는 형광이 방출되지 않는다. 이러한 현상을 이용하여 작은 점에서 나온 빛만을 검출하기 때문에 고분해능의 영상을 얻을 수 있

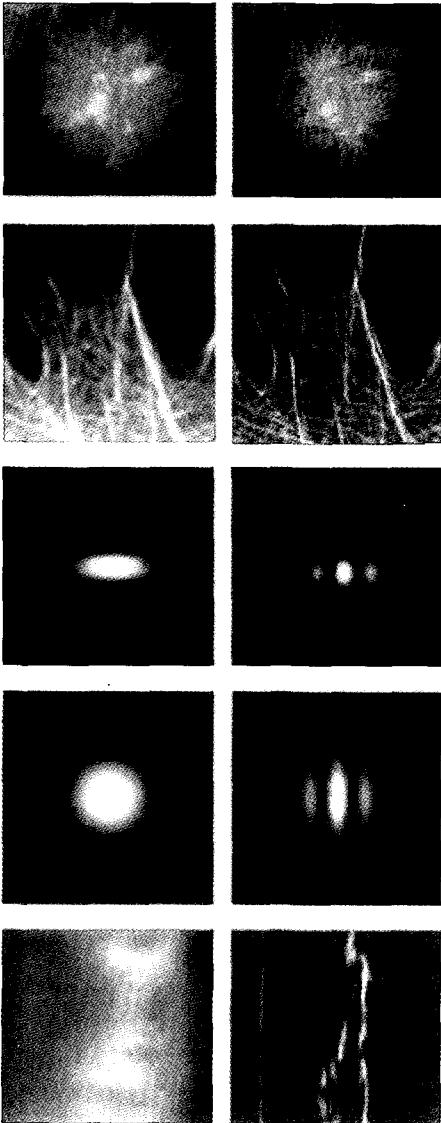


그림 3 최근 연구된 고분해능 공초점주사현미경의 연구 결과들(위에서부터 영상처리, 패턴조명, 4pi 공초점현미경, 자가간섭공초점현미경, 유도방출소멸공초점현미경)

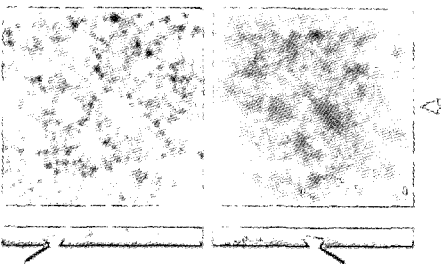


그림 4 공초점라만현미경의 영상

다. 그림 3은 최근 연구에 의해 얻어진 결과들을 보여주고 있다. 이처럼 공초점주사현미경의 광학적 분해능 한계를 극복하기 위한 연구들이 다양하게 진행되고 있고, 상당부분 진전을 이루었다.

펄스 레이저의 발전 덕분에 이광자공초점 현미경을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이광자공초점현미경은 이광자흡수현상을 이용한 것으로, 장파장의 펄스 레이저를 광원으로 사용하게 된다. 그 덕분에 시편 내부 깊숙한 부분도 관찰할 수 있고, 형광소멸효과(photo bleaching)도 기존의 공초점현미경에 비해 현격히 적기 때문에 시간에 따른 세포와 분자의 변화를 관찰하기에 적당하다. 이광자공초점 현미경의 가장 큰 문제는 아직까지 가격이 너무 비싸다는 것이나, 뛰어난 성능으로 인해 향후 활용도가 높아질 것으로 기대된다.

최근에는 공초점주사현미경에 라만 분광기술을 추가하여 시편의 깊이에 따른 분석을 가능하게 하였다. 라만 파장 변화는 구성 분자에 따라 다르게 나타난다. 따라서 라만 파장변화를 측정하면 구성 물질에 대한 정보를 얻을 수 있다. 라만 분광기를 장착한 공초점주사현미경은 라만 파장 변화의 x-y 영상뿐만 아니라, x-z 영상도 획득이 가능하기 때문에, 시편의 깊이 방향에 따른 화학 성분을 분석해낼 수 있다.

### 공초점주사현미경의 현재와 미래

공초점 주사 현미경은 레이저 모듈, 고감도 광 센서, 정밀 스캐너 등 고가의 구성 요소가 사용된다. 따라서 기존 광학현미경에 비해 훨씬 비싼 가격을 형성하고 있다. 그럼에도 불구하고 특히 생화학 분석 분야를 중심으로 점차 기존의 광학현미경을 대체해 나가고 있다. 공초점주사현미경은 광학적 절편 효과를 이용하여 3차원 투시 측정 및 분석이 가능하고, 보다 선명한 영상을 얻어낼 수 있으며, 광학적 측정 방법이기 때문에 비파괴적이며 생화학 분석도 가능하기 때문이다. 이러한 장점과 더불어 광학적 회절 한계를 뛰어넘는 분해능 향상, 다른 분석 기술과의 융합을 통하여 생화학, 생의학, 신소재 등의 분야에서 응용 영역을 더욱 넓혀 가고 있다.