

고감도 · 고속 분자 Imaging 기술의 전망

보다 높은 공간분해능과 광검출능을 가지면서 분자의 고속 시간 응답 또는 거동 관측을 할 수 있는 Imaging 장치는 여러 가지 Nanotechnology를 포함한 요소기술의 진보에 따라 매일 새로워지고 있다. 그 중에서 분자관측에 의해 비로서 분명해지는 생체활동의 해명, 의료적으로 중요한 새로운 지견, 신규 유기재료 개발 등이 가능하게 되었으며, 얼마나 요소기술을 미묘하게 조합해 갈 것인지가 중요한 점이다. 이것은 분자관측을 목표로 하는 연구자뿐 아니라 이들 장치를 개발하는 기술자 또는 기업의 제휴가 필요하다는 것을 말한다. 이후에는 이들 연구자나 장치 제조사를 연결하여 상세한 대응을 하는 사업도 중요해질 것이다. 본고는 <광기술컨텍스트 2009년 1월호>에 게재된 Takiguchi Yoshihiro 교수(Hikari Sangyo Sosei(光産業創成)대학원대학)의 기고문을 발췌, 번역한 것이다.

〈편집자 주〉

1. 서론

개개의 분자를 직접 보고 싶다거나, 분자의 거동이나 에너지 상태를 계속하고 싶다는 요구는 여러 가지 과학·산업분야에서 모아지고 있다. 의료분야에서는 생체 조직 내에서 약제나 각종 이온의 거동과 질병과의 관계를 탐구하는 기초의학적인 과제에서부터 분자의 역동적인 특성의 해석을 실시간(또는 라이브)으로 실시하고 싶다고 한다. 그리고 유기발광소자나 유기태양전지 등의 산업 분야에서는 발광효율이 가장 좋은 분자와 그 분자가 있는 기판과의 전기적인 상호작용을 최적화시켜, 고효율동작을 달성시키기 위한 관측·해석 등이 요구되고 있다. 여기에서는 실제 개개의 분자 형태를 보는 것이 아니라 그 분자가 어디에 배치되고, 그 배치에 의해 어떤 특성으로 변화되었는지를 보고 싶다는 쪽이 크다. 이들 요구에서

는 분자를 어떤 방법으로 그 존재를 단일분자 레벨로 관측할 수만 있다면 된다는 것이다. 한편 분자의 형태 그 자체의 해석이 분야의 발전에 불가피한 경우도 있다. 대부분은 궁극적인 양자적 거동을 사용한 분자 디바이스의 탐구나 과학으로써의 물질 상호작용의 해명을 하는 경우로 생각 된다.

최근 10년간의 여러 가지 분야에서 Nanotechnology의 발전에 따라 분자 관측에서 초고해상을 달성하는 등 드라마틱한 발전을 볼 수 있었다. 그 동향으로는

- 주사 전자 터널 현미경(STM)을 비롯한 Probe형 Imaging
- Positron 등을 사용한 방사성 핵종 Imaging
- 광학 현미경에서의 각종 형광 물질/비선형 광학적 Imaging

등의 3개로 나눌 수 있다.

STM이나 원자간력 현미경을 비롯한 Probe형 현미경에서는 원자 레벨에서의 여러 가지 물성을 해명하는 도구으로써 범용화되어 왔다. 예를 들면 그림1은 금속 표면에 증착된 분자 Cluster의 STM에 의해 획득된 전자 상태상을 나타내고 있다. (Yokohama시

립대학의 Yokohama 등²⁾ 이른바 STM상 그림((a) 및 (b))이다. 하나 하나의 분자의 전자적인 구조가 그림 중의 (c)로 표시된 분자의 구조 모델 해석 결과와 높은 상관을 가지고, 초고해상도에서 검출되고 있는 모양이 선명하다. 분자의 자세한 입상 구조까지 명확히 밝혀져, 그 기술의 우수함에는 눈이 휘둥그레진다. 그리고 분자 Imaging 중의 중요한 방법으로 Positron 핵종에 의한 Imaging에 따른 분자의 거동 해석³⁾이 있다. Positron 검출 기술의 향상과 Positron·Emission CT나 MRI 등의 화상화 기술과 더불어 큰 발전을 계속하고 있다는 것을 명시해두고 싶다. 본 해설의 논의의 중심이 되는 광학 현미경도, 분자 그 자체에 갖가지 화학적 수정을 할 수 있게 되어, 생체 분자를 보다 관측하기 쉽게 하는 기술로써 형광 Marker 분자⁴⁾나 양자 Dot⁵⁾에 의한 Marking이 발전하고, 최근 Aequorea victoria의 형광분자가 노벨상을 수상함으로써 그 중요한 정도를 알 수 있다. 그리고 MEMS(Micro-Electro-Mechanic System) 기술의 발전은 현미경 그 자체를 수 cm의 초소형 고분해능 장치로 변화시키고 있다.⁶⁾

이처럼 광학적인 계측과 방사선 계측에 따른 분자 Marker에 의한 관측, Probe에 의한 고해상도 분자관측 등은 각각 다른 각도에

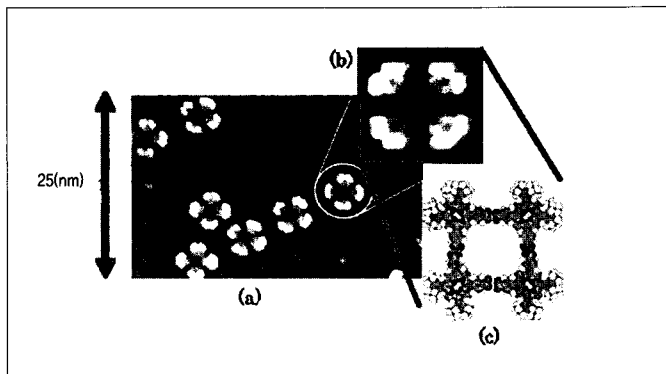


그림 1. 주사 터널 전자현미경에 의한 금속기판상에서 저장 배열된 (a)Cluster의 전자상태 관측 예와(b)그 확대상 및 (c)분자구조도(Yokohama시립대학 Yokoyama Takashi 선생 제공)

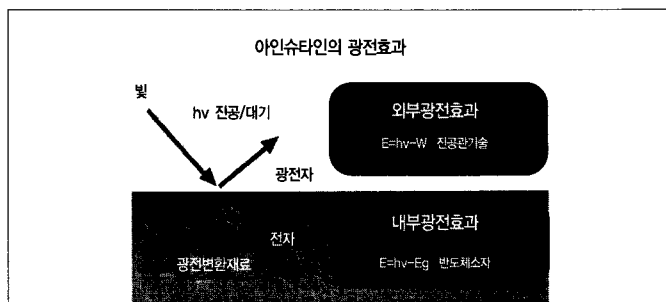


그림 2. 아인슈타인의 광전효과

서의 분자관측의 접근법이며, 앞으로 그 특성을 살린 발전이 기대되고 있다.

한편에서는 빛의 발생과 검출 기술에 대해서도 큰 변화를 볼 수 있다. 반도체 발광소자(Laser, LED, Super-Luminescent·Diode 등)의 고출력화가 진행됨과 동시에 이것을 여기광원으로 한 Fiber laser나 고체 Laser가 급격히 고휘도화·Short pulse 화하고 있다. 게다가 빛의 검출기에서는 아인슈타인의 광전효과(그림2)를 이용하여 외부 광전효과(광전자를 진공 중에 꺼내서 계측:광자 에너지 $h\nu$ 와 일함수 W 의 차의 에너지를 가진 광전자가 발생)를 이용한 이전의 광전자 증배관에 덧붙여 내부 광전 효과(광전자를 물질 중에 전반(propagation)시켜서 계측:광자 에너지 $h\nu$ 와 Bandgap E_g 의 차의 에너지를 가진 광전자가 발생)에 의한 반도체 검출 소자의 고감도화가 진행되고 있다. 그리고 2차원 소자인 CCD 카메라나 CMOS 카메라 등은 보다 높은 양자 효과(광·전자 변환율), 그리고 보다 많은 Pixel 수로 관측할 수 있는 고기능의 화상 장치로 진화하고 있다. 이처럼 광학에서의 진보는 의학/물리학/화학 등의 폭넓은 연구 활동에 큰 영향을 끼치고 있다.

이번 해설에서는 광학적인 방법을 중심으로 고감도 분자계측에 관하여 논의를 진행하고 싶다. 실제 단일분자를 계측하고자 생각하고 있는 연구자/기술자를 위해, 처음에는 단일 광자를 검출하기 위한 검출기의 현상을 폭넓게 소개하겠다. 그 안에서 각자 관계된 기술의 현상을 이해해주었으면 한다. 다음으로, 형광 관측 등의 선형광학적인 방법이나, Femto second laser 등을 이용한 비선형광학적인 방법에 의한 단일분자 검출법 등의 현상을 소개하고, 광기술에 의한 단일분자 계측의 앞으로의 전망을 논의하고 싶다. 논의할 때는 관련 인터넷 사이트를 인용하여, 독자가 신속하게 정보를 얻을 수 있도록 노력하였다. 단, 관련된 모든 사이트를

인용하지 못함을 여기에서 미리 사과하겠다. 그리고 광검출기에 관한 정보는 주로 Hamamatsu Photonics사의 기기를 대표로 소개했지만, 다른 제조사의 기기에 대해서도 각자 사양을 자세히 검토하길 바란다.

2. 광검출기^{7~9)}

단일분자의 광학적인 검출에서의 중요 포인트는 역시 보고자 하는 분자에서의 단일광자를 높은 신호/잡음비로 변별할 수 있다는 것이다. 개개의 분자 자신이 여기상태에서 기저상태로 떨어질 때의 감쇠시간은 분자에 따라서도 차이가 있지만, Nano초에서 Milli초 정도가 되는 것을 고려하면, 최대한 수천~수만개의 광자만이 검출에 기여하게 된다. 이 때문에 검출기에는 높은 양자효율(광-전자 변환 효율)을 가질 것을 요구하면서 보다 낮은 잡음 레벨의 장치이어야 한다는 양면이 요구되는 것이다. 그리고 예를 들면, 공초점 레이저 현미경에서 광검출에는 포인트 검출기(광전자증배관이나 반도체 검출기)가 적절하다거나, 일반 광학현미경에 접속된 고감도 2차원 카메라와 같은 광검출기의 차원성도 중요한 선정 포인트가 된다. 즉, 광검출기의 선정에는

- 파장감도(양자 효율)
- 잡음성능
- 검출의 차원성(1점에서 검출, 면에서 검출)
- 구동전원(고전압, 저전압)
- 신호처리회로(출력신호레벨, 응답속도)
- 가격

등이 선정하는 방침이 될 것이다.

그리고 분자에서의 빛을 확실히 검출기로 유도하는 광학계도 중요한 점이며, 현미경의 구조나 대물렌즈의 선정에도 주의가 필요하다.

다음에는 다른 차원성을 가진 광검출기의 기본적인 성능과 함께 최근의 개발상황도

정리해보았다.

2.1 광전자증배관

광전자증배관은 진공 유리용기 안에서 외부광전자효과로 빛을 전자로 변환하는 광전면과, 그 변환된 광전자를 증배하는 전자증배부를 가지고 있다. 그 구동에는 전자증배에 이용하는 1~2kV의 고전압 인가를 위한 전원도 필요하게 된다. 광전자증배관에서의 신호는 광전자를 전자증배한 결과의 전류 출력이다. 그 전류를 해석 가능한 디지털 신호로 변환하기 위해서는 여러가지 전자회로를 이용할 수 있다. 대표적인 예로는 직류전류증폭기나 Lockin 증폭기, 또는 Boxcar 적분기, 또는 Oscilloscope나 Digital 전류계 등을 들 수 있을 것이다.

광전면의 양자 효율은 빛을 전자로 변환하기 위한 광전변환 재료의 종류와 그 구조에 의해 결정된다. 예를 들면 광전자 증배관에 이용되는 외부 광전효과를 위한 광전면에서는 그림3 안의 사각형으로 표시한 것처럼 여러 가지 소재에서 생긴 가시광선부터 적외선 영역에 분포한 양자효율의 파장특성을 가지고 있다. 가로축은 광전면에 입사하는 빛의 파장, 세로축은 각 광전면의 각 파장에서 양자효율에 대응된다. 광전면의 소재는 알칼리금속으로 만들어진 것(Bialkali, Multialkali 광전면)과 반도체소재로 된 것이 있다. 그림3에서 자외선 영역의 관측을 필요로 하는 경우에는 Cesium · Tellurium을 이용한 광전면이 효과적이며, 한편 적외선 영역의 파장 감도가 필요한 경우에는 Indium phosphide(InP)/Indium Gallium Arsenide (InGaAs)을 이용한 광전면이 효과적이다. 관측하고자 하는 분자의 발광 또는 흡수파장이 어느 파장 영역이 될 것인지가 정해지면, 거기에서 이용할 수 있는 광전면의 소재가 수 종류로 결정될 수 있다. 이 때 중요한 것은 그림에서 세로축 값인 양자 효율이 하나인 파라미터이다. 이 양자 효율이 낮으면, 아무리 노력해서 고성능의 앰프를 이용해도 전자신호가 발생하지 않기 때문에 잡음밖에 증폭되지 않는다. 그리고 어떤 파장 영역에서도 광전자증배관을 이용함으로써 단일광자 검출이 가능하다. InGaAs 광전면에서는 대략 900nm~1600nm의 근적외선 영역에서 1%의 양자 효과를 가지고 있다. 즉, 100개의 근적외선의 광자가 들어가면, 1개의 광전자가 광전면에서 발생하게 된다. 따라서 단일분자에서의 근적외선 형광이 발행한 경우에도 높은 효율에서 단일분자 관측이 가능하다. 단, 아직 이 영역에서 분자를 관측하지 않은 것은 이 광전면이 생긴지 얼마 되지 않았기 때문이다. 물의 흡수나 활성산소의 발광 등도 이 파장 영역에서 생기는 것으로 보아, 분자와 산소나 물과의 상호작용을 고려한 관측일 가능하지 않을까 추측하고 있다.

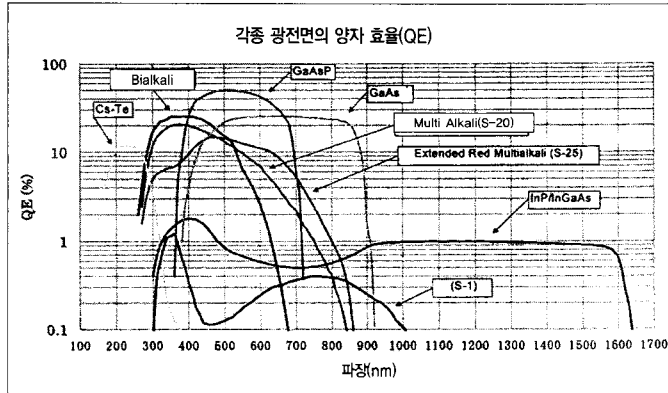


그림 3. 각종 광전면의 파장감도 특성(QE:양자 효율)

관측파장과 광전면의 종류가 정해지면, 다음은 그 시간 응답과 잡음 레벨과 증폭률과 가격이 검토 대상이 될 것이다. 이들 파라미터는 광전면 그 자체뿐 아니라, 전자증배부의 구조 등으로 정해진다. 그림에 나타난 광전면을 가진 광전자증배관은 대부분 0.5~수 Nano초 정도의 시간응답을 나타낸다. 보다 빠른 응답을 구할 경우에는 그림4에 나타난 소형 광전자증배관이나 전자증배부로서 Micro Channel Plate(MCP)라고 불리는 전자증배기구를 내장시킨 광전자증배관을 이용하여 0.3Nano초 정도의 시간 응답을 얻을 수 있게 된다.¹⁰⁾

한편, 잡음 레벨은 광전면의 파장 특성과 높은 상관성을 가지고 있다. 열잡음은 광전면 내부의 전자가 광전면 자신의 온도에 의해 확률적으로 광전면과 진공장 사이에 있는 에너지 장벽을 초월하기 위해, 전자증배부에 이 전자를 입력하여 증폭시킴으로써 발생한다. 따라서 그 에너지 장벽이 낮은 근적외선에서 높은 감도를 가지고 있는 광전면 쪽이 열잡음이 많아진다. 예를 들면 그림3에서 GaAs 광전면과 Gallium arsenide phosphide (GaAsP)의 광전면은 650nm의 붉은 영역에서 거의 같은 양자 효율을 가지고 있지만, GaAs 쪽이 근적외선 감도가 높은 만큼 열잡음이 발생하기 쉽다. 열잡음을 저감시키기 위해서는 광전면의 온도를 낮출 필요가 있어, Peltier 소자 등을 이용하여 광전면을 -30℃ 정도까지 냉각 시킴으로써 열잡음을 2자리수 이상 저감시키고 있다.

전술한 것처럼 고속으로 응답하는 TO-8형 Package (직경 16mm)에 둘러싸인 광전자증배관은 그림 4와 같다. 최근 10년에 걸쳐 소형화되고 있는 광전자증배관의 예이다. 이 광전자증배관에서는 전자증배부에 반도체 lithography 등의 정밀 Edging 기술을 도입함으로써 소자의 고정도/소형화를 달성하고 있다. 용기의 소형화에 따라 광전면의 냉각도 쉬워져 고압전원이나 신호처리회로를 내장한 검출기 Module로서 보다 쉽고 편리한 광전자증배관이 만들어져 왔다. 소형 Peltier 냉각 기구와 진공단열구조를 탑재함

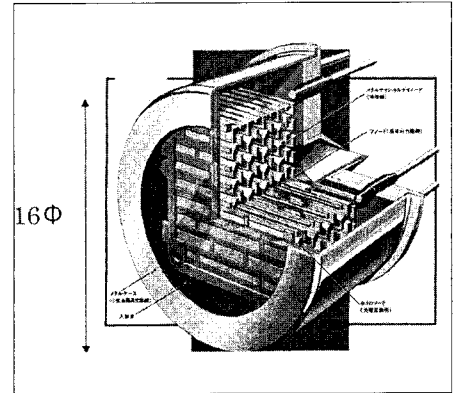


그림 4. TO-8형 소형 광전자 증배관의 내부 구조도

으로써 열잡음이 문제였던 근적외선 영역의 관측도 용이해졌다. 그 결과로는 열잡음의 카운트 레이트가 1초간 0.3개 정도로, 매우 작은 열잡음으로 억제할 수 있게 되었다. 이 때문에 종래 광전자증배관을 현미경에 장착하는 것이 어려웠던데 비해 C-mount를 통해 직접 접속할 수 있게 되었다. 더구나 소형화됨에 따라 하나의 진공용기 내에 몇 개의 개별 전자증배 기구를 봉입하여 광전면에 파장 선택 Filter를 덧붙임으로써 동시에 다파장에서 광자 검출 관측이 가능한 특수 광전자증배관도 만들어져, 분자관측에 큰 힘을 발휘하고 있다.

2.2 반도체 검출기

일반적으로 Photo Diode(PD)라고 불리는 반도체의 검출기는 광전자증배관과 비교하여 약간 저렴하면서도 고전압을 필요로 하지 않는다는 점에서 널리 사용되고 있다. 소재로는 Silicon이나 Ion gas, Germanium 등이 사용되고 그 파장 응답 특성은 그림5와 같다. 가시광 영역의 검출에는 Silicon 검출기가 주로 이용된다.

Silicon은 전자기기의 기판으로 이용되기 때문에 대구경 기판이 싸게 입수된다는 점에서 광검출기의 양산에도 적합하다. 단일 광자 검출을 위해서는 주로 Avalanche PD가 이용되고 있다. 반도체에 200V 정도의 전압을 인가하여 광전자의 전도 시 전자증

배를 일으켜 증폭하는 구조를 가지고 있어, 0.3nano초 정도의 고속 응답도 동시에 달성할 수 있는 것이다. 그리고 고가이지만, 단일 광자 검출형 Avalanche PD도 시판되고 있어¹⁰⁾, 이것을 이용한 단일분자 관측도 가능하다.

2.3 Hybrid 검출기¹²⁾

광전자증배관의 특성과 반도체 검출기의 성능을 융합시킴으로써 새로운 검출기가 창출되고 있다. 그림6(a)에 그 Hybrid형 검출기의 구조를 나타냈다. 즉 광전면을 이용한 진공관내에 Avalanche PD를 설치함으로써 광전면에서 빛이 전자로 변환되고 그것을 전압에 의해 가속시켜 반도체 소자에 Electron Bombardment를 하여 2차 전자 증배함과 함께 반도체 자체 내부에서 일어나는 Avalanche 현상에 의한 전자 증배를 하고 통상의 광전자 증배관에 가까운 전자 증배율을 달성하여 단일광자 검출을 가능하게 하였다.

이 Hybrid 검출기의 최대 장점은 그림 6(b)에 표시한 출력신호의 파고 분포(검출기에서 광전자 전류 Pulse의 신호 강도의 분포)를 보면 알 수 있듯이, 동시에 입사한 광자 수를 이 그림에서는 1~10개까지 변별하여 검출할 수 있다는 것이다. 즉 하나의 분자에서는 동시에 2개의 광자를 방출할 수가 없지만, 몇 개의 분자 사이에서 어떤 고차의 상관을 가지고 광자 방출할 경우에는 그 상관의 정도인 동시적인 광자 발생 등을 정량적으로 관측하는 수단을 제공할 수 있다.

2.4 고감도 카메라

분자 관측에서는 광학현미경과의 조합에 의해 현미경하의 시료를 실시간으로 관측된다. 일반적으로는 고감도 CCD 카메라나 CMOS 카메라 등이 이용된다.

구체적으로는

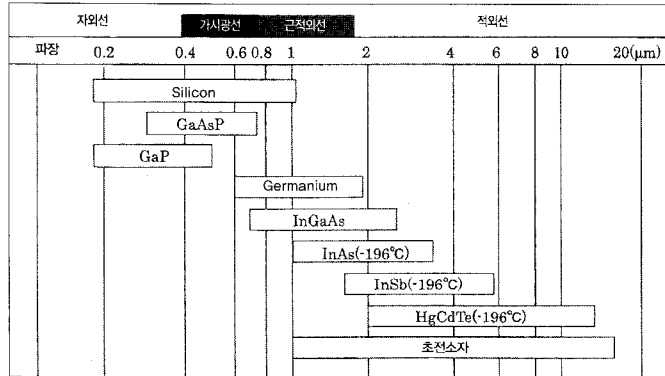


그림 5. 반도체 검출기의 파장 감도 영역

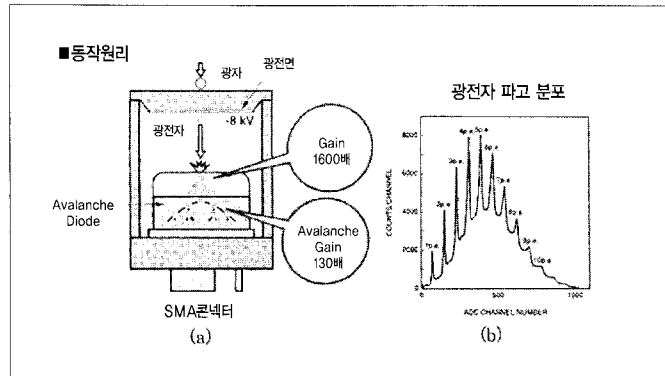


그림 6. Hybrid형 광전자 증배관의 (a)구조와 동작도 및 (b) 출력의 광전자 파고 분포도

- 냉각 CCD 카메라
 - 3판식 CCD 카메라
 - Electron Bombardment (EB형) CCD 카메라
 - Electron Multiplying (EM형) CCD 카메라
 - Image 증배관 접속 CCD 카메라
- 등을 들 수 있다.

냉각 CCD 카메라에서는 단일 광자를 검출하기 위하여 소자에 대한 열잡음을 저감시키기 위해 소자를 -30℃ 이하로 냉각시킨다. 더구나 일반적으로 이들 소자는 전자증배 기능을 가지고 있지 않기 때문에 장시간 노광에 의한 화상의 적분을 필요로 한다. 그림 7에는 고감도 3판식 CCD 카메라에 의한 컬러 형광 관측의 결과를 나타냈다. (a)에는 Hamamatsu Photonics사 제품의 카메라¹³⁾의 개관사진을 나타냈고, 이것을 이용하여 획득된 형광 화상은 (b)와 같다. 컬러가 아니기 때문에 자세한 것은 나타낼 수 없지만, RGB의 합성 화상과 각각의 RGB마다의 화상을 나타냈고, 본 그림(c)에 표시한 단판식 CCD 카메라의 RGB마다의 화상과 비교하여, 그 색분리가 깨끗하게 되어 있다는 것은 분명하다. 다른 단백질 등의 거

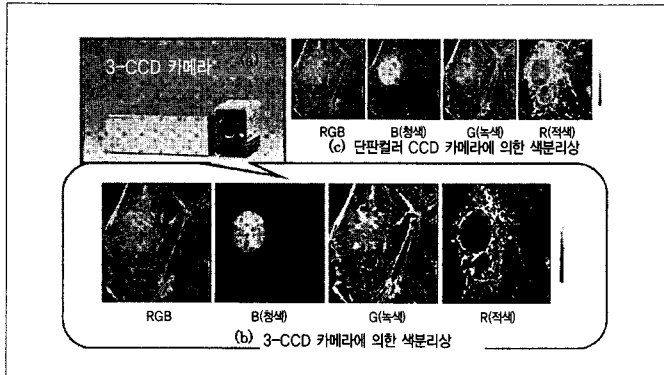


그림 7. 3판식 CCD 카메라의 (a)개관사진, (b)RGB 화상과 개별 색화상 및 (c)단판식 CCD 카메라의 RGB화상과 개별 색화상 예

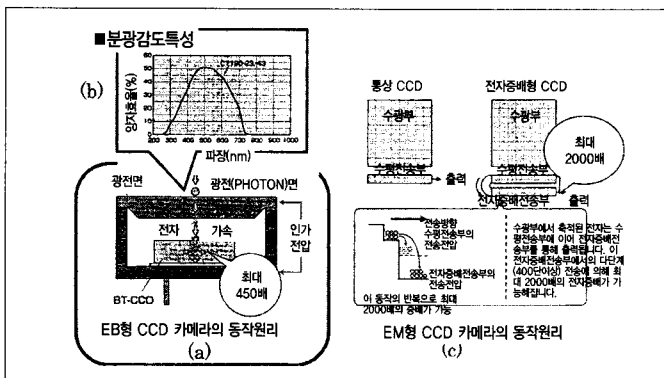


그림 8. Electron Bombardment형 CCD 카메라의 (a)구조 모식도와 (b)파장 감도의 예 및 (c) Electron Multiplying형 CCD 카메라의 증배 메커니즘 설명

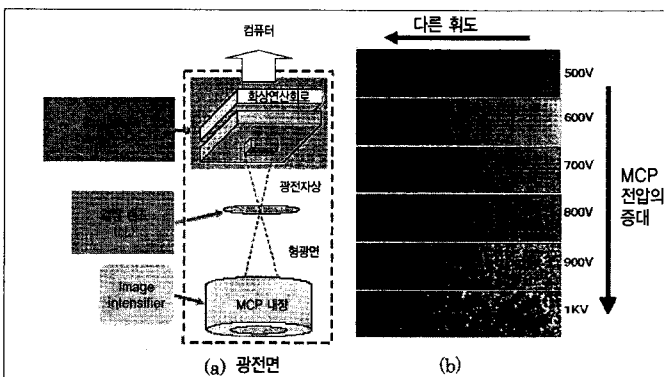


그림 9. Image 증배관(I.I.)에 접속한 Intelligent Vision 소자의 (a)구조 모식도와 (b)MCP 인가전압을 변화시켰을 때의 출력광자 화상의 예

동을 해명하기 위해서는 이 색의 예리함이 중요해질 수도 있다.

단일분자 관측에서는 빛의 신호/잡음비를 보다 높이기 위해 어떤 전자 증배 기능을 이 2차원 카메라에 도입하였다. 이 때문에 상기 5종류의 카메라 중, 밑의 3 종류의 전자증배형 카메라가 있는 것이다. 그림8(a)에 표시한 Electron Bombardment CCD 카메라에서

는 Hybrid형 광전자 증배관과 마찬가지로, 진공용기 내에 광전면과 양자효율을 높이기 위해 소자기판을 Edging으로 박막화한 CCD 소자를 봉입하고, 이 CCD 소자에 3kV의 가속전압으로 광전자를 표면에서 조사 (Electron Bombardment라고 함)함으로써 1광전자 당 평균 450개의 2차전자를 발생시켜 2차원 화상이 고감도로 검출될 수 있도록 고안하고 있다. (b)는 그 중에서 GaAsP에서 생긴 광전면을 이용했을 때의 파장감도 분포를 나타낸 것이다.

또 한가지의 고감도 2차원 카메라는 최근 Hamamatsu Photonics사가 개발한 반도체 전자 증배부를 내장시킨 EM-CCD 카메라이다.^{7, 13)} 그림8(c)에 그 동작원리를 나타냈다. 일반적인 CCD 카메라에서는 각각의 Pixel에서 광-전류 변환된 신호를 순차 전송하고, 그 후 FET 증폭기 등을 통해 전기적으로 증폭된다. 그러나 EM-CCD에서는 그 전기적인 증폭을 이용하지 않고, Avalanche 반도체 검출기 등에서 이용되는 전자증배의 개념을 도입함으로써 입사되는 전자에서만 증배 작용을 하는 증폭을, 대략 400단의 전자 증배계를 직렬 접합시켜 약 2000배의 증배율을 달성하고 있다. 그 결과로 높은 신호/잡음비에서의 화상 계측이 가능해졌다.

그리고 내부에 Micro-Channel Plate(MCP)를 내장한 Image 증배관(통칭 I.I.)을 광학적으로 결합시킨 카메라가 Image 증배관 접속 CCD 카메라이다. I.I.에 의해 단일 광자로부터 2차원 영상을 증배하여 고휘도의 휘점 화상으로 변환시킨다. 이것을 고감도 CCD 카메라를 통해 컴퓨터의 화상 메모리에 2차원 영상으로 축적함으로써 광자 분포 화상을 얻을 수 있다. 이러한 I.I. 장착 카메라 중에서 보다 높은 기능을 가진 것이 그림9에 표시한 Intelligent Vision Camera에 I.I.를 장착시킨 고속동작의 카메라이다. 그림9(a)의

동작 구조처럼 현미경하의 시료에서 발생한 빛은 I.I.의 광전면 하부부터 결상/집광된다. 여기에서 광전자로 변환되어 내장된 MCP에서 전자증배된다. 그 중 출력 형광면에서 다시 휘도가 강한 빛의 상으로 바뀌어 뒤쪽의 Intelligent Vision 소자에 렌즈를 써서 결상된다.

이 Vision 카메라는 보통처럼 2차원 배열된 Pixel(수십 micron 크기의 반도체 광검출기의 2차원 배열)의 각각으로부터 직접 신호출력을 얻을 수 있는 parallel 출력을 가진 카메라이다. 그 특징은 고속 화상출력이 가능하다는 것과 각각의 Pixel에서의 신호를 이용하여 고속화상처리를 뒤쪽의 회로계를 써서 하드적으로 실행할 수 있다는 점이다. 이 때문에 예를 들어 512x512 Pixel 수의 카메라에서는 매초 250 프레임 속도로 화상을 실시간 처리하고, 고속으로 이동하는 물체의 트래킹 등을 가능하게 한다. 그림9(b)는 I.I.의 MCP에 인가하는 전압을 바꾸었을 때의 출력 광자상을 나타낸 것인데, 1kV의 인가전압에서는 개개의 광자상에 대응한 하얀 휘점상이 보인다. 이처럼 단일 광자를 관측할 수 있는 고속화상처리장치로써 이 시스템이 효과적이라는 것을 알 수 있다.

3. 분자관측법^{15, 16)}

단일분자에서의 광검출은 상술한 검출기에 대한 평가가 매우 높지만, 관측하고자 하는 분자를 둘러싼 다른 분자와의 변별이 다음의 큰 과제이다. 필요한 분자만이 빛내주는 것처럼 변별성이 높은 관측 이외에서는 환경에서의 Stray light나 다른 분자에서의 발광이나 산란광을 어떻게 저감시킬 것인가가 중요한 포인트가 된다. 그래서 다음에서 정리해놓은 분자에 형광 마커를 하여 이것을 단파장광원에서 여기시켜 필요한 분자만을 도드라지게 하는 선형광학적인 계측이나, 그 때의 빛의 조명방법을 고안하여

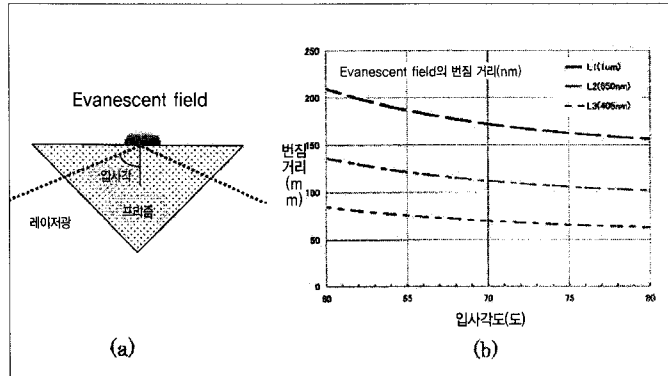


그림 10. (a)프리즘 표면에 발생하는 Evanescent field의 모식도와 (b)그 변질 거리의 입사각 및 파장 의존성의 계산 결과

Evanescence field를 이용한 국소적인 여기를 실시하는 것을 생각할 수 있다. 게다가 그 분자의 비선형 응답을 이용한 분자의 변별 수법이 실험적으로 검토되어, 중요한 기술에까지 고조되고 있다. 이것들을 미리 정리 분류해보면,

- 선형광학적 관측
 - ▷ 형광 관측(형광 단백질, 양자 Dot marker)
 - ▷ 흡수 관측
 - ▷ 에너지 이동(FRET)
 - 비선형광학적 관측
 - ▷ 2광자 흡수 형광
 - ▷ 제2차 고조파 발생
 - ▷ Raman 분광
- 등이 있다.

3.1 형광 마커에 의한 관측

노벨상으로 일약 일반 사람에게도 알려지게 된 GFP(Green Fluorescent Protein)을 비롯한 형광단백질을 이용한 형광 마커나, 무기 재료에서 만들어진 양자 Dot을 이용한 형광 마커는 특정 분자에게 흡착하는 유기재료를 갖춤으로써 관측하고자 하는 분자의 높은 선택성을 나타내고, 그 분자의 동적 분포를 명확하게 해준다. GFP 등의 형광 단백질은 DNA 레벨에서의 생체 도입에 의해 녹색으로 빛나는 쥐나 돼지 등을 생산해내고 있다. 양자 Dot에서는 종래 Cadmium계의 소재를 이용한 것 외에도 Silicon Carbide¹⁷⁾나 금속산화물 등을 이용한 새로운 양자 Dot의 개발도 진행되고 있어, 유기·무기 소재의 상호 장점을 이용하여 분자의 실시간·화상이 넓은 분야에서 응용되고 있다.

3.2 Evanescent field 관측⁸⁾

형광 마커의 경우에는 여기광이 비치는 부분 전체에서 형광발광이 관측되기 때문에 두께가 있는 세포 등에서는 국소적인 분자의 거동 관측 시 다른 조직과의 분리가 곤란한 경우가 있다. 그래서 한가지 중요한 관측 수법으로써, Yanagita나 Hunatsu 등이 추천하는 Evanescent 관측법을 들 수 있다. 이 방법은 그림10(a)와 같이 프리즘의 경사면에 레이저 빛을 도입했을 때 굴절률이 낮은 공기 또는 시료 측에 번지는 근접장광을 이용한다.

그 번지는 정도는 그림10(b)의 계산결과처럼 60nm~ 200nm로, 입사하는 빛의 파장(405nm, 650nm, 1 μ m)과 입사각에 의존하여 변화시킬 수 있다. 짧은 파장의 빛을 이용하여, 큰 입사각에서 레이저 등을 경계면에 조사함으로써 번짐이 얇은 Evanescent field를 만들 수 있다. 따라서 그 Evanescent field의 근방에만 측정하고자 하는 형광 마킹된 분자를 도입함으로써 좁은 영역의 분자 거동을 관측하는 방법이 된다. 이 방법에서는 시료 두께 방향이 다른 분자에서의 불필요한 형광이나 산란광에 의한 잡음 저감이 도모되어, 분자관측으로써는 매우 중요한 방법이 되고 있다.

구체적으로는 그림11(a)처럼 고배율 또는 큰 개구 수의 유침대물렌즈를 이용하여 시료와 Preparat 사이에서 발생하는 Evanescent field를 효과적으로 이용함으로써 보다 높은 배율에서의 관측을 가능하게 한 보고도 있다. 예를 들면 100배의 유침렌즈를 이용한 관측에서 회절 한계에서는 200nm 이하의 구조가 관측 가능하다. 형광 마커를 이용한 Evanescent 관측에서는 그림11(b)(c)처럼 일반적인 반사조명에서의 관측과 비교해도 보다 선명한 분자 분포를 관측할 수 있다.

3.3 형광 공명 에너지 이동(FRET)

2개의 다른 형광 분자를 이용하여 필요한 세포 등에 마킹한다.

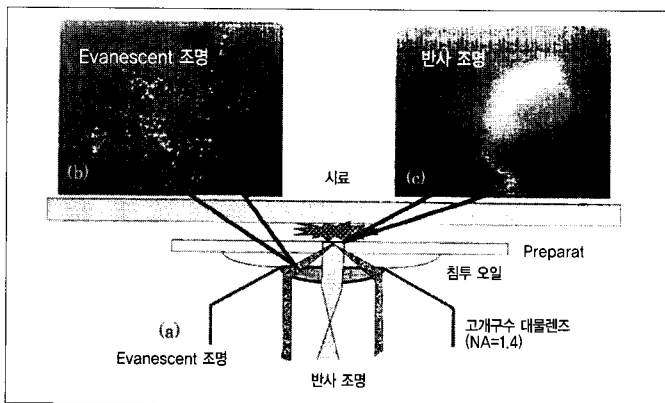


그림 11. (a)고배율 유침렌즈를 이용한 Evanescent 조명과 반사조명의 모식도와 (b) Evanescent 조명에 의한 분자관측상과 (c) 반사조명에 의한 관측상 예

이 때 이들 2개의 형광 분자 간의 물리적인 거리가 근접하면 그 형광 분자간 에너지 이동이 일어나, 한 쪽의 형광이 소실되어 다른 형광만 나타나게 된다. 이처럼 2개의 형광 분자 간 에너지 이동 현상을 그 머리글자를 따서 FRET라고 부른다. 특정 세포막의 분자에 붙는 2종류의 형광 분자를 이용하여, 형광 관측함으로써 세포막에서의 구조나 역동적인 변화를 해석하는 것도 가능해진다. 잡지인 Nature 검색에서 FRET를 찾아보면 1000건이 넘는 논문이 검색된다. 여러 가지 세포내 분자에서 배열을 확인하는 실험검증에 이용되고 있다.

3.4 2광자 흡수형광 발광⁹⁾

GFP 등은 주로 청색 또는 자외선 영역의 광원을 이용하여 여기되고 형광을 발하지만, Femto초 레이저 등의 근적외선 펄스를 이용하여 분자가 동시에 2개의 광자를 흡수함으로써 여기되어 형광을 발할 수 있게 된다. 이것은 분자의 비선형광학 응답의 하나이다. 이 결과 Femto초 레이저의 파장을 최적화하여 현미경하의 분자를 순간 조사함으로써 2광자 흡수하는 형광 분자만을 Mapping할 수 있게 된다. 종래의 청색 또는 자외선 여기에서는 산란광 등에 의해 주변에 있는 분자도 형광을 발하게 되어, 필요한 분자의 변별에 고생했던 것에 비해 2광자 흡수에서는 Femto초 레이저의 산란에서는 여기되지 않기 때문에 주변에서의 형광 발광에 의한 배경을 대폭 감소시킬 수 있다.

3.5 제2차 고조파 발생에 의한 관측

상술한 2광자 흡수 형광과 마찬가지로 비선형광학적인 거동을 이용하는 것이 제2차 고조파를 이용한 관측이다. 마찬가지로 Femto초 레이저에서의 근적외선 펄스를 여기광으로 했을 때 분자 내부에서 일어나는 비선형 분극에 의해 그 여기파장의 절반

이 빛으로 변환될 가능성이 있다. 현미경 하에서 집광된 빛을 비춤으로써 그 레이저광의 전반 방향에 고조파가 Coherent(가간섭성)로 발생한다. 이 빛을 Band Pass Filter를 통해 검출하여 형광 발광과는 다른 높은 분리능으로 분자의 변별 계측이 가능하게 된다. 스탠포드대학의 Llewellyn 등²⁰⁾은 Micro and scope와 Femto초 레이저를 사용하여 근육내의 Myosin 분자를 가시화하여 근섬유의 거동을 연구하고 있다.

4. 관측 장치

상기의 관측 장치나 관측 기술에서 중요한 위치를 차지하는 것이 현미경 본체이다. 여기에는 대물렌즈를 장착하여 그것을 해석하는데 상술한 광검출기를 조합시켜 이용하고 있다. 일반 현미경에서는 백색광원이나 각종 레이저광원에서의 빛을 투과 또는 반사하여 조명함으로써 여러 가지 상황하에서의 시료 관측을 할 수 있다. 기본적으로는 대물렌즈와 카메라 사이를 결합하는 것만이다. 그 광축 사이에 빛의 파장 필터나 편광판 또는 레이저 여기를 위한 Beam Splitter 등을 장착한다. 그 때 현미경 전체가 높은 진동 안정성을 가지고 있기 때문에 공간 흐림이 없는 현미경 화상을 얻을 수 있다. 여기에서 중요한 것은 필요한 공간해상도를 얻기 위해서 현미경의 배율을 높이는 것이 필요한지, Pixel 수가 많은 카메라를 사용할 것인지, 또는 높은 이동분해능을 가진 2차원 스테이지를 써서 2차원적으로 현미경상을 주사하여 그 공간분해능을 높일 것인지 하는 검출의 최적화가 필요하다. (예를 들면 Hamamatsu Photonics사의 Nano Zoomer라는 장치가 있다.²¹⁾ 그리고 관측하는 파장이나 투사되는 광원의 파장에 따라서는 자외선이나 적외선용 대물렌즈를 이용할 수도 있다. 또는 시료의 두께나 관측하고자 하는 부위까지의 거리가 소재의 표면에

서부터 멀리 떨어져있는 경우에는 작동거리가 긴 대물렌즈를 사용할 수도 있다. 그 때 대물렌즈의 최적화가 중요한 선정 요소가 될 것이다.

한편, 현미경 관측의 위상계측 방법으로써 동일한 유침렌즈를 이용한 간섭형 정량위상 현미경을 이용함으로써 시료의 3차원적인 굴절률 분포의 경시 변화를 실시간으로 관측할 수 있게 된다.²²⁾ 세포 전체의 형상과 역동적인 형태 변화를 관측함과 동시에 필요한 분자의 분포 거동을 관측할 수 있다면 분자의 관측 기능을 보다 부가할 수 있다고 생각된다.

공초점 현미경에서는 대물렌즈의 공초점 위치에 금속 Aperture의 성능 등을 설치하여 시료의 초점에서 일어난 광성분만을 검출함으로써 대물렌즈와 Aperture의 성능으로 정해지는 2차원면 내의 공간분해능과 대물렌즈의 초점 심도에 의해 정해지는 안길이 방향의 공간분해능을 가진 3차원상의 해석이 가능해진다. 최근에는 레이저 주사형 공초점 현미경에서 레이저의 집광축과 현미경의 광축을 조금 이동시킨으로써 양쪽 축의 교점만의 빛을 관측할 수 있게 하여 보다 높은 분해능을 달성하는 장치 개발을 진행할 수 있게 되었다.²³⁾

5. 결론

보다 높은 공간분해능과 광검출능을 가지면서 분자의 고속 시간 응답 또는 거동 관측을 할 수 있는 Imaging 장치는 여러 가지 Nanotechnology를 포함한 요소기술의 진보에 따라 매일 새로워지고 있다. 그 중에서 분자관측에 의해 비로서 분명해지는 생체활동의 해명, 의료적으로 중요한 새로운 지견, 신규 유기재료 개발 등이 가능하게 되었으며, 얼마나 요소기술을 미묘하게 조합해 갈 것인지가 중요한 점이다. 이것은 분자관측을 목표로 하는 연구자 뿐 아니라 이들 장치를 개발하는 기술자 또는 기업의 제후가 필요하다는 것을 말한다. 이후에는 이들 연구자나 장치 제조사를 연결하여 상세한 대응을 하는 사업도 중요해질 것이다. Hikari Sangyo Sosei(光産業創成)대학원대학 내에서 진행되고 있는 학생기업의 활동이나 필자가 진행하고 있는 기업활동은 이들 활동을 지원해갈 수 있는 것이라 확실하게 말할 수 있다.

[참고문헌]

1. H. R. Herschmen, Science, 302, (2003) 605
2. T. Yokohama et al., J. Chemi. Phys. 121, 11993(2004)/T. Yokohama et al., Nature 413, 619(2001)/N. Nishiyama et al., J. Chemi. Phys. B 112, 5272(2008)/
<http://www.user.yokohama-cu.ac.jp/~nano/>

- (Yokohama시립대학 Yokoyama Takashi 조교수 연구실)
3. <http://www.riken.jp/metallomics/about/imaging.html>
(이화학연구소 PET Imaging)
[http://www.molecularimaging.jp/about/\(일본분자Imaging학회\)](http://www.molecularimaging.jp/about/(일본분자Imaging학회))
<http://www.nedo.go.jp/kankobutsu/pamphlets/bio/bio2008/02.pdf> (Positron Imaging)
 4. H. Hogan, "Putting a shine on new fluorescent proteins", *BioPhotonics Int.* p.24, Oct (2008)
 5. <http://www.invitrogen.co.jp/qdot/products.shtml>
(Invitrogen Corp. Qdot 카다로그)
 6. <http://www.stanford.edu/group/moerner/> (Stanford대학 Moerner교수 연구실)
 7. Hokomatsu Photonics 홈페이지 <http://jp.hamamatsu.com/>
 8. Nakamura Koji *Parity* vol. 19, No. 02, p.24 (2004)
 9. Matsumoto Hirokazu 편 「광측정기 가이드」제2부 제2장 제8절 Takiguchi Yoshihiro OPTRONICS사 (2004)
 10. H.Kume, K.Koyama, K.Nakatsugawa, S.Suzuki and D. Falowitz, *Appl. Optics* 27, 6, 1170 (1998)
 11. AMETEK/ORTEC사 카다로그
(<http://www.orteconline.com/>)
 12. M.Suyama et al. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* 44, 3, 985(1997)
M.Suyama et al. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* 51, 3, 1056(2004)
 13. G.M.Church et al., *BioPhotonics Int.* p.34, June (2008)
 14. Toyota Haruyoshi 등 광학 심포지움 강연 예고집(강연번호9) (2005)
 15. Takiguchi Yoshihiro, Ishida Kazuyuki *광학* 제35권2호 p.89 (2006)
 16. <http://www.phys1.med.osaka-u.ac.jp/>
(Osaka대학 Yanagida Toshio 교수 연구실)0
 17. D.Shenkenberg, "Live-cell imagind with quantum dots made from nontoxic materials", *BioPhotonics Int.* p.16, July. 2008
 18. Hunatsu Takashi : *응용물리학회지*, 72 (2003) 727 /
Hunatsu Takashi, Ueno Taro : *광학*, 34 (2005) 500
 19. H.Hogan, "Two Photons monitor neutons" *BioPhotonics Int.* p.33, Sep. (2008)
 20. M.Llewellyn, et al. "Minimal invasive high-speed imaging of sarcomere contractile dynamics in mice and humans", *Nature*, 454 (2008) 784-788
 21. <http://jp.hamamatsu.com/rd/publication/nature/common/na0611.html>
(Hamamatsu Photonics Nature 잡지 광고 안내)
 22. H.Hogan, "Twice the resolution, using multiple beams", *BioPhotonics Int.* p.40 Aug. 2008

TAKIGUCHI, Yoshihiro

HikariSangyoSosei대학원대학
광가공·프로세스분야
431-1202 Shizuoka-ken,
Hamamatsu-si, Nishi-ku
Kurematsu-cho 1955-1