

서론

STED 현미경 (STimulated Emission Depletion microscopy)의 기본 개념이 처음 제안되었던 1994년 무렵에는 [1], 대부분의 사람들이 근접장 주사 광학 현미경 (near-field scanning optical microscopy)이 빛의 회절한계 (diffraction-limit)를 극복할 수 있는 유일한 광학 현미경 기술이라고 생각하였다 [2]. 하지만 이 기술의 뛰어난 공간 분해능 (spatial resolution)에도 불구하고 광학 현미경의 가장 큰 수요자인 생물학자들은 제한적인 표면만을 관찰할 수 있는 근접장 기술의 한계 때문에 이를 활발히 이용할 수 없었다. 비슷한 시기에 등장하여 현재까지도 널리 이용되고 있는 이광자 형광 현미경 (two-photon fluorescence microscopy)은 비록 살아 있는 세포의 깊은 영역까지 탐지할 수 있다는 장점을 가지

(λ : 빛의 파장, n : 매질의 굴절률, θ : semi-aperture, NA: numerical aperture)

이러한 물리적인 법칙을 위반하지 않고 회절한계를 극복할 수 있는 원거리장 형광 나노스코피 (far-field fluorescence nanoscopy)의 개념은 독일의 Hell 교수에 의해 처음으로 제안되었다 [1]. 이 방법의 가장 큰 특징은 형광체를 지금까지와는 달리 광원을 조사하면 빛을 내는 단순한 발광체로 생각한 것이 아니라, 다른 빛으로 이들 형광 분자의 전자전이 (molecular electronic transition)를 조절해 회절한계에 구애 받지 않는 작은 포컬 스팟 (focal spot)을 만드는 데에 있다 [5]. 2000년에 실험 구현에 성공한 이후 [6], 다소 더디게 발전하던 STED 현미경 기술은 새로운 광학 부품들과 편리한 레이저 광원의 등장,

특집 | Optical Microscopy & Biomedicine

STED 현미경: 회절한계를 극복한 형광 나노스코피

한규영*

고 있지만 형광체 (fluorophores)의 비선형적 흡광 (absorption) 성질이 고분해능을 제공해 주지는 못하였다 [3]. 일반적인 대물 렌즈 (objective lens)와 가시 광선 영역의 광원을 이용한 원거리장 (far-field) 현미경 기술로 회절한계 이상의 공간 분해능 (xy 방향으로 ~ 200 nm 그리고 z 방향으로 ~ 500 nm)을 얻는 것은 오랫동안 뛰어넘을 수 없는 물리적인 한계로 인식되었다. (Abbe limit [4])

$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \sin \theta} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1)$$

장비의 간소화 그리고 형광체들의 분광학적인 이해 등에 힘입어 2006년 이후 눈부신 발전을 거듭하여 마침내 라이카 마이크로시스템 (Leica microsystems GmbH)에서 상용화 제품을 선보이게 되었다.

현재 STED 현미경은 20-60 nm의 공간 분해능으로 다양한 형광체 (multi-color)로 표지된 살아 있는 세포 (live cell)를 비디오 이미징 속도로 3차원 이미징 (three-dimensional imaging) 할 수 있는 단계에 이르렀고 [7-10], 최근에는 물리적인 방법으로 6 nm의 분해능을 기록해 [11] 가장 강력하고 보편적인 형광 나노스코

* Department of Physics, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA

피 기술로 각광 받게 되었다.

STED 현미경: 원리

일반적인 STED 현미경은 기본적으로 두 개의 펄스 형태 광원이 필요하다 (그림 1). 그 중 하나인 여기 빛 (excitation light, 펄스 폭 $\ll 100$ ps)은 공초점 주사 형광 현미경 (confocal scanning fluorescence microscopy)에서와 같이 가우시안 (Gaussian) 형태를 가지고 형광체 (fluorophores)를 들뜬 상태 (excited state)로 여기 (excitation) 시켜 형광을 내도록 한다. 여기 빛을 조사 (illumination)한 직후 ($\ll 10$ ps) 잘 동기화 되어 있는 두 번째 광원인 도넛 모양의 STED 빛을 조사 하게 되면, 도넛의 가운데 부근을 제외한 다른 지역에서 들뜬 상태에 있는 형광체가 자극 방출 (stimulated emission) 현상을 통해 형광을 내기 전에 강제로 기저 상태 (ground state)로 내려오게 되어, 그 결과 도넛 정상 (donut crest) 부근의 형광은 감소 (depletion)하고 서브 회절 (sub-diffraction) 크기의 도넛 중앙 부분에서만 온전히 살아남은 형광 신호를 얻게 되는 것이다 (그림 2a). 자극 방출에 의한 형광 세기는 STED 빛의 세기에 기하급수적으로 반비례하기 때문에 특정 세기 이상을 조사하면 포화되는 비선형적 특징을 가지고 있다 (그림 2b). 결국, STED 빛의 세기 (I)가 증가할수록 형광을 낼 수 있는 포컬 스팟은 점점 작아져 다음과 같은 새로운 공간 분해능 규칙을 따르게 되고 [12], 이론적으로 STED 현미경은 분자 수준의 분해능까지 내려갈 수 있게 되는 것이다 [7].

$$\Delta r \cong \frac{\lambda}{2NA\sqrt{1+\beta(I/I_S)}} \quad (1)$$

(β : 도넛 형태 STED 빛의 기하학적 인자, I_S : STED 빛

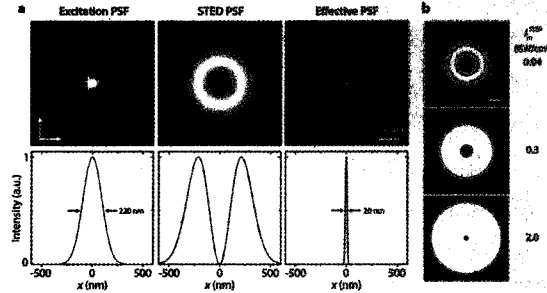


그림 2. STED 현미경의 고분해능 이미지 구현. (a) 여기 빛과 STED 빛의 (위) 포컬 스팟 모양과 (아래) 선 프로파일. 두 개의 빔을 시간과 공간적으로 적절히 중첩시켜 회절 한계를 뛰어넘는 작은 포컬 스팟을 생성. (b) STED 빛의 세기에 따른 자극 방출의 포화 정도. I_S 보다 3배 가량 높은 STED 빛의 세기부터 자극 방출과정이 포화되었다고 가정하였다. 척도선 (scale bar)은 200 nm

의 특성 세기)

기저 상태와 여기 상태에서 발생할 수 있는 재흡수 (re-absorption)나 다광자 흡수 (multi-photon absorption) 혹은 광표백 (photobleaching) 현상 등을 최소화하기 위해서 STED 빛의 파장은 일반적으로 방출 스펙트럼의 끝부분을 선택하고, 펄스 폭은 100-300 ps 범위를 사용하는 것이 효과적이다 [6]. 일반적인 유기 형광체의 I_S 값 ($3-10 \text{ MW/cm}^2$)을 고려했을 때, $0.1-1 \text{ GW/cm}^2$ 의 STED 빛 세기를 이용하면 20-65 nm의 공간분해능을 실험적으로 얻을 수 있게 된다. (이것을 실제 사용하는 레이저의 평균 출력 값으로 환산하면 대략 10-100 mW에 해당한다.)

자극 방출 과정은 선형 현상이라 형광체의 평균 수명 시간 ($\sim 1-3$ ns) 동안 I_S 에 해당하는 광자 (photon) 수보다 많은 양의 빛 ($\gg 3I_S$)을 가해 주기만 하면 효율적으로 형광을 억제할 수 있다. 즉 펄스 형태가 아닌 CW (continuous-wave) 레이저로도 이러한 조건을 쉽게 만족할 수 있기 때문에 경제적이면서도 사용하기 편리한 CW-STED 현미경을 구축할 수 있는 것이다 [13].

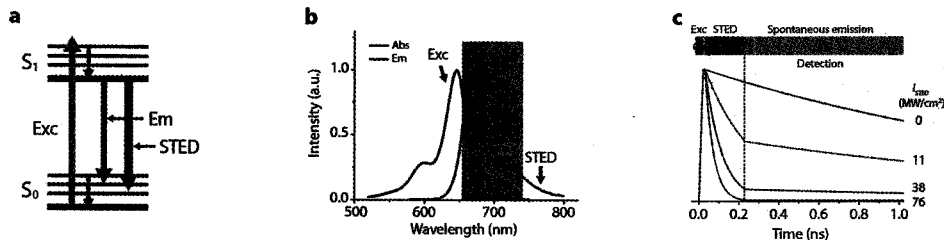
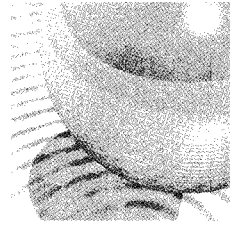


그림 1. 자극 방출에 의한 형광 조절. (a) 일반적인 유기 형광체의 에너지 다이어그램. 회색 화살표는 빠른 진동 이완 과정을 표시. (b) 대표적인 유기 형광체 ATTO 647N의 흡광/방출 스펙트럼. 이 경우 여기 빛은 635 nm, 그리고 STED 빛은 760-780 nm의 파장을 일반적으로 사용한다. (c) STED 현미경에 사용되는 두 펄스의 시간적 구성도와 시간 게이팅 (time-gating)을 이용한 형광 탐지



STED 현미경: 구성

STED 현미경은 그림 3에서 보듯이 기본적으로 공초점 주사 형광 현미경과 유사하게 구성되어 있다. 싱글 모드 광섬유 (single mode fiber)로 공간적으로 필터링한 레이저 빛을 우선 콜리메이션 렌즈로 평행 빔으로 만들어 높은 NA값을 지니는 대물 렌즈로 보낸다. 이때 형광체의 고른 조사를 위해 1/4 파장판 (quarter-wave plate) (혹은 추가적으로 1/2 파장판)으로 원편광 (circular polarization)된 형태의 빛을 사용한다. 얻어진 형광은 같은 대물렌즈를 통해 아발란치 광다이오드 (avalanche photodiode)나 광전 증배관 (photomultiplier tube)같은 광검출기로 보내어지고, 피에조 스테이지 (piezo stage)나 갈바노 미러 (galvano mirror) 등을 이용해 이미지 스캐닝을 할 수 있다. 하지만 공초점 현미경과 달리 광원에 STED 빛을 추가하여 여기 빛과 합쳐 대물렌즈로 보내고, STED 빔 라인 사이에는 위상 변조 (phase plate) 장비를 설치해 그 위상 패턴에 따라 2차원 (도넛 형태) 혹은 3차원에서 한정할 수 있는 포켓 스팟을 생성할 수 있다 (그림 3 삽입도).

STED 빛의 광원으로 가장 널리 사용되는 것은 타이타늄 사파이어 펄스 레이저 (Ti:Sa laser)와 OPO (optical parametric oscillator) 혹은 광섬유를 이용한 슈퍼컨티늄 (supercontinuum) 레이저이고 [14], 이들 광원은 필요에 따라 비선형 결정이나 긴 광섬유 등을 이용해 펄스 폭을 조절한다. 여기 빛은 피코초 다이오드나 슈퍼컨티늄에서 나온 일부 빛을 사용한다.

STED 현미경에 적용 가능한 형광체들

자극 방출은 흡광 현상처럼 분자 수준에서 가장 기본적인 프로세스이기 때문에 원칙적으로 STED 현미경에서는 모든 형광체를 사용할 수 있고, 실제로 유기 형광체 (organic dyes) [7]나 GFP (green fluorescent protein) 같은 형광 단백질 (fluorescence proteins) [15] 심지어는 형광 나노다이아몬드 (color centers in diamond) [16] 등에 성공적으로 적용할 수 있음을 증명해 보였다. 하지만 (i) 형광 수명이 너무 짧거나 (< 1 ns, 예를 들면 Cy3), (ii) 여기 상태에서 순간 흡광 (transient absorption)을 일으킬 가능성이 높은 경우 [17] 혹은 (iii) 암흑 상태 (dark state)로 전이되는 확률이 높아 광표백 프로세스를 겪을 확률이 높은 형광체의 경우는 좋은 결과를 얻을 수 없다. 참고로 이러한 STED 빛의 피크 세기는 이광자 형광 현미경에서 사용하는 값보다 대략 10-100배 낮아서 [3, 18], 살아 있는 세포에서 STED 빛에 의한 광손상 (photo-damage)은 무시할만하다고 알려져 있다 [19]. (지금까지 STED 현미경에 사용된 형광체에 대한 자료는 [20]번 항목을 참조.)

응용 분야

거의 모든 바이오 이미징 분야에서 STED 현미경 기술을 사용할 수 있다는 것이 이 기술의 가장 큰 장점이라고 할 수 있다. 물론 이때 우리가 얻을 수 있는 2차원/3차원 공간 분해능은 공초점 현미경 기술보다 3-10 배 이상 향상된 결과이다 (그림 4a와 4b). 그 중에서도 가장 활발하

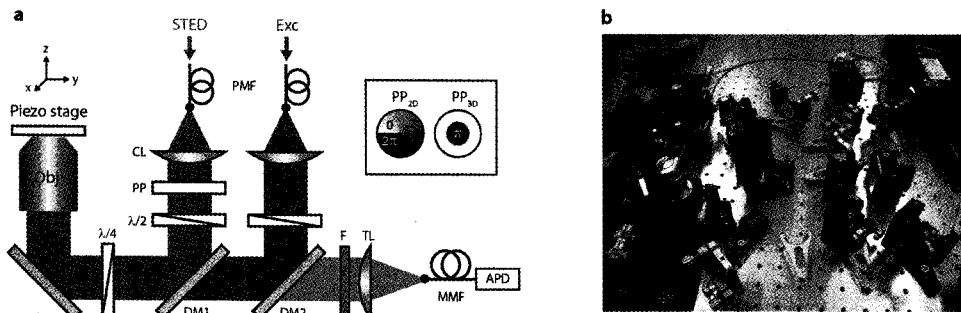


그림 3. STED 현미경의 구성도. (a) APD, 아발란치 광다이오드; CL, 콜리메이션 렌즈; DM1, 단파장 통과 다이크로익 빔스플리터 (short-pass dichroic beamsplitter); DM2, 장파장 통과 다이크로익 빔스플리터; F, 형광 필터; $\lambda/4$, 색수차 보정 (achromatic) 1/4 파장판; $\lambda/2$, 색수차 보정 1/2 파장판; MMF, 다중 모드 광섬유; Obj, 대물 렌즈; PMF, 편광 유지 (polarization-maintaining) 싱글 모드 광섬유; PP, 위상 변조기; TL: 튜브렌즈. 삽입도는 2차원과 3차원 위상변조기. (b) STED 현미경의 실제 모습

STED 현미경: 회절한계를 극복한 형광 나노스코피

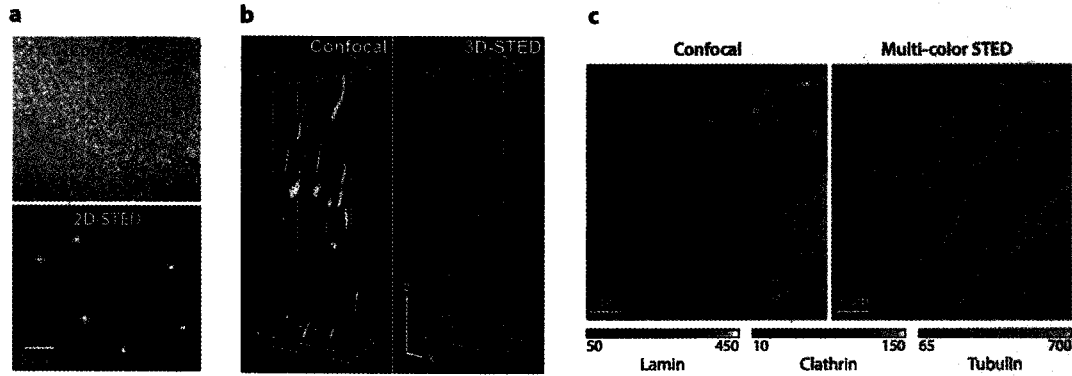


그림 4. 다양한 STED 이미지들. 다이아몬드 컬러센터의 (a) 2차원 STED 이미지와 (11) (b) 3차원 렌더링 STED 이미지 (16). (c) 각기 다른 세 형광체의 스펙트럼과 수명 차이를 이용한 다중 표지 STED 이미지 (26)

계 STED 현미경을 이용하고 있는 곳은 신경생물학 분야인데 그 이유는 기존의 형광 현미경이나 전자 현미경으로는 살아 있는 세포에서 회절한계 이내에 묻혀 있는 표적들의 모습이나 움직임을 관찰하기가 거의 불가능 하기 때문이다. 예를 들어 시냅스 소포 (vesicle)의 빠른 움직임이나 [9] 뉴런의 실시간 움직임 [21], 세포외배출 (vesicle exocytosis) 과정에 관여하는 시냅스 단백질들의 행로 [22], 혹은 거대 단백질의 형태 [23]나 공간적 분포 [24] 등에 대한 연구가 활발히 진행되었다.

대부분의 생물학적 문제에서는 두 가지 혹은 그 이상 되는 컴포넌트 사이의 상호관계나 근접도에 대해 알고 싶은 경우가 많은데 이러한 경우 다중 형광 표지를 해야 할 필요가 있다. STED 현미경 기술은 여러 가지 방법으로 이를 구현하였는데 (그림 4c), 예를 들면 (i) 흡광영역은 다르지만 형광 방출 영역이 비슷한 형광체를 이용하거나 [8], (ii) 레이저 광원 수를 늘리거나 [25], 혹은 (iii) 형광 수명의 차이 [26] 등을 이용해 미토콘드리아 단백질의 분포에 관한 자세한 정보 등을 얻을 수 있었다 [8].

STED 현미경은 바이오 이미징뿐만 아니라 고농도에 서 단분자 실험을 할 수 있는 새로운 분석 방법 [27], 양자 컴퓨터의 모델 시스템인 컬러센터의 고분해능 이미징 [11], 재료분야의 서브 회절크기의 리소그래피에도 응용되어 [28] 앞으로 더욱 새롭고 다양한 분야에 이용될 충분한 가능성을 지니고 있다.

맺음말

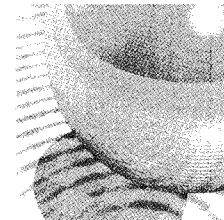
STED 현미경은 현재 이론적으로 그리고 기술적으로 잘 정립되어 있어서 이광자 형광 현미경 [29], FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) [30] 그리고 FCS (fluorescence correlation spectroscopy) [27, 31] 와 같이 다양한 고급 현미경/분광학 기술과 결합하여 눈부시게 발전하고 있다. 다만 100만 불이 넘는 상용화 장비의 가격과 제작 과정의 기술적인 어려움 때문에 국내에서는 많은 생물학자들이 그들의 흥미로운 시스템을 테스트해보지 못하고 있는 상황이다†. 하지만 16세기 현미경의 발명 이후부터 지금까지 원거리장 광학현미경의 한계라고 여겨졌던 빛의 회절한계를 뛰어넘어 살아 있는 세포에서 나노스케일의 샘플을 볼 수 있다는 사실만으로도 이 강력한 테크닉에 주목할 필요성을 느낄 수 있을 것이다‡.



감사의 글

† 현재 국내에서는 유일하게 서울대학교 화학부 김성근 교수님 연구실에서 STED 현미경이 설치되어 운용되고 있다.

‡ 초고를 읽어준 서울대학교 화학부 김남두 군에게 감사함을 표합니다.



참고 문헌

1. S. W. Hell, and J. Wichmann, *Opt. Lett.* 19, 780–782 (1994).
2. E. Betzig, and J. K. Trautman, *Science* 257, 189–195 (1992).
3. W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, *Science* 248, 73–76 (1990).
4. E. Abbe, *Arch. Mikr. Anat.* 9, 413–468 (1873).
5. S. W. Hell, *Nat. Biotechnol.* 21, 1347–1355 (2003).
6. T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97, 8206–8210 (2000).
7. G. Donnert, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103, 11440–11445 (2006).
8. R. Schmidt, et al., *Nat. Methods* 5, 539–544 (2008).
9. V. Westphal, et al., *Science* 320, 246–249 (2008).
10. B. Harke, C. K. Ullal, J. Keller, and S. W. Hell, *Nano Lett.* 8, 1309–1313 (2008).
11. E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine, C. Eggeling, and S. W. Hell, *Nature Photon.* 3, 144–147 (2009).
12. B. Harke, et al., *Opt. Express* 16, 4154–4162 (2008).
13. K. I. Willig, B. Harke, R. Medda, and S. W. Hell, *Nat. Methods* 4, 915–918 (2007).
14. D. Wildanger, E. Rittweger, L. Kastrup, and S. W. Hell, *Opt. Express* 16, 9614–9621 (2008).
15. K. I. Willig, et al., *Nat. Methods* 3, 721–723 (2006).
16. K. Y. Han, et al., *Nano Lett.* 9, 3323–3329 (2009).
17. J. Hotta, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 132, 5021–5023 (2010).
18. S. W. Hell, "Far-field optical nanoscopy," in *Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology: Nobel Symposium (Springer Series in Chemical Physics)*, A. Graslund, R. Rigler, and J. Widengren, eds. (Springer, Berlin, 2009).
19. B. Hein, K. I. Willig, and S. W. Hell, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105, 14271–14276 (2008).
20. http://www.mpibpc.mpg.de/groups/hell/STED_Dyes.html.
21. U. V. Nagerl, K. I. Willig, B. Hein, S. W. Hell, and T. Bonhoeffer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105, 18982–18987 (2008).

22. K. I. Willig, S. O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn, and S. W. Hell, *Nature* 440, 935–939 (2006).
23. R. J. Kittel, et al., *Science* 312, 1051–1054 (2006).
24. J. J. Sieber, K. I. Willig, R. Heintzmann, S. W. Hell, and T. Lang, *Biophys. J.* 90, 2843–2851 (2006).
25. G. Donnert, et al., *Biophys. J.* 92, L67–L69 (2007).
26. J. Bückers, D. Wildanger, G. Vicidomini, L. Kastrup, and S. W. Hell, *Opt. Express* 19, 3130 – 3143 (2011).
27. L. Kastrup, H. Blom, C. Eggeling, and S. W. Hell, *Phys. Rev. Lett.* 94, 178104 (2005).
28. J. Fischer, G. von Freymann, and M. Wegener, *Adv. Mater.* 22, 3578–3582 (2010).
29. G. Moneron, and S. W. Hell, *Opt. Express* 17, 14567–14573 (2009).
30. E. Auksorius, et al., *Opt. Lett.* 33, 113–115 (2008).
31. C. Eggeling, et al., *Nature* 457, 1159–1163 (2009).

약 력



한 규 영

2011/02 ~ 현재 University of Illinois at Urbana-Champaign (Prof. Taekjip Ha), 박사 후 연구원

2010/09 ~ 2011/01 서울대학교 화학부, 박사 후 연구원

2010/08 서울대학교 화학부 (Prof. Seong Keun Kim), 이학 박사

2007/11 ~ 2010/03 Max-Planck Institute for Biophysical Chemistry (Prof. Dr. Stefan W. Hell), 방문 연구원

2004/02 서울대학교 자연과학대학, 이학사