

1. 머리말

현대 과학의 화두가 되고 있는 의생명과학은 광자기술에 기초한 의생명 광학의 발전으로 인해서 더욱 급속히 성장하고 있다. 생물학과 의학의 연구에 중요한 역할을 해 온 광학현미경은 약 400년 전에 루벤후크(Leeuwenhoek)의 발명으로 시작되었으며, 이로부터 꾸준히 발달하여 생명과학에서 빼놓을 수 없는 도구가 되었다. 그러나 기존 광학현미경의 분해능(resolution 용어설명 참조)은 1876년 독일의 물리학자 Abbe가 주장하였듯이 사용되는 광선의 반파장 정도 밖에 볼 수 없는 상태에 머물러 있었다[1].

그러나 근래에 들어 전통적인 회절한계(diffraction-limit 용어설명 참조)를 뛰어넘는 초분해능(super-resolution 용어설명 참조) 나노 현미경(nanoscopy)이

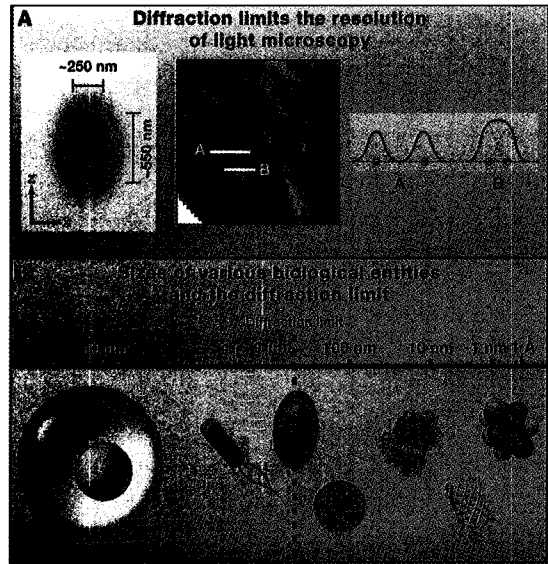


그림 1. 고전적인 광학현미경의 분해능과 각종 현미경적 대상의 크기[2]

특집 ┃ Optical Microscopy & Biomedicine

전반사 현상에 기반한 초분해능 광학 나노 현미경의 발전

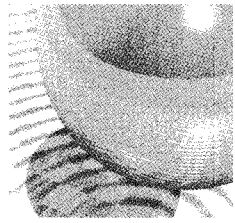
정의현*

개발되기 시작하면서 기존 광학현미경의 한계를 극복하게 되었다. 높은 분해능을 갖는 현미경의 등장은 미소한 수준의 생명현상에 대한 연구를 가능하게 함으로써 기존 광학현미경의 제한과 함께 묶여 있었던 생물학과 기초의학의 연구에 새로운 장을 열게 되었다. 그림1은 현미경의 회절한계에 의한 분해능과 다양한 생명체들의 크기를 보여준다. 그 중에서도 본 논문에서는 주로 전반사(total internal reflection 용어설명 참조) 구조에 기반한 나노 현미경을 다루고자 한다. 아울러 초분해능 나노 현미경의 발전과 의생명 과학에 미치는 영향을 고찰하기로 한다.

2. 전반사 현상에 기반한 초분해능 나노 현미경의 구현 방법들

현재의 초분해능 현미경은 크게 두 가지로 분류할 수 있다. 즉, 공간적으로 패턴화된 입사광을 이용하는 기술과 단 분자의 위치추정에 기반하는 기술이 그것이다. 첫 번째는 소위 STED(stimulated emission depletion) 현미경과 구조화된 입사광 현미경(SIM 용어설명 참조)이 있다. STED는 본 호의 다른 논문에서 자세히 다루게 될 것이다. SIM은 입사광에 높은 공간 주파수(high spatial frequency)패턴을 주어서 샘플에 조사하여 확장

* 광주과학기술원 의료시스템공학 학제전공 및 기전공학부



된 분해능을 얻는 방법이다. 두번째는 단분자 위치추정에 기초한 초분해능 현미경으로서 단일 형광분자 (single fluorophore)에서 나오는 미세한 형광신호를 고성능 카메라로 측정하고 그 위치를 결정함으로써 구현되었다. 이방법은 2006년 비슷한 시기에 세 그룹의 연구팀에 의해 STORM, PALM, FPALM(용어설명 참조)라는 이름으로 독자적으로 발표되었다[3-5]. 아래에서 각각의 기술의 원리를 자세히 살펴보겠다.

2.1 패턴화된 입사광을 이용한 초분해능 현미경 구현 기술

SIM은 입사광에 세밀한 패턴을 부여하고 이 패턴이 샘플의 구조 속에 내재하는 공간주파수 (spatial frequency) 정보와 함께 겹쳐짐으로써 생긴 이미지를 처리(post processing) 한 후에 높은 분해능을 얻을 수 있게 한다. 일반적으로 입사광으로 만들 수 있는 패턴도 회절 한계의 적용을 받기 때문에 기존에 비해 약 2배 정도의 분해능의 향상을 가져올 수 있다. 한편 고개구수 대물 렌즈를 사용하여 전반사 조건에서 입사광을 정상파로 만들어 2배 이상의 분해능을 얻는 방법(standing-wave total-internal-reflection fluorescence microscopy)도 구현되었다[6, 7]. 2005년에 Gustafsson은 강한 세기의 입사광으로 샘플에서 나오는 형광신호가 포화 (saturation)되게 함으로써 보다 높은 분해능을 얻게 되

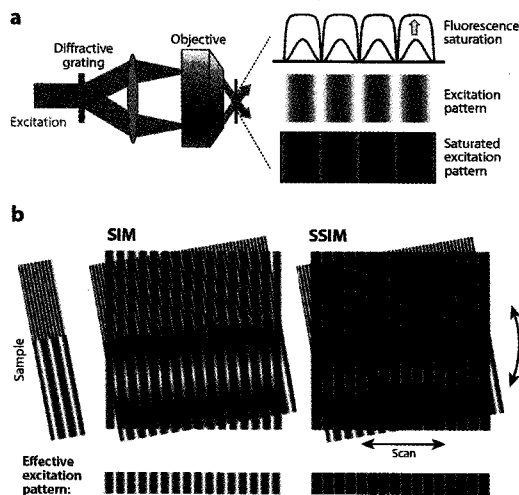


그림 2. SIM과 SSIM의 원리(9)

었고 이러한 비선형성을 이용한 현미경을 saturated SIM (SSIM)이라 명명하였다[8]. SSIM은 개념적으로는 STED의 원리를 역으로 적용한 방법이라 할 수 있다. 그림 2는 SIM과 SSIM의 원리를 도식적으로 보여준다. 기본적으로 구조화된 패턴과 샘플의 간섭으로 인한 모아레 패턴 (Moire pattern)을 이용하여 높은 분해능을 얻어내는 방법이다.

2.2 단분자 위치 추정을 이용한 초분해능 현미경 구현 기술

단분자의 위치를 높은 정확도로 추정하는 방법은 이전에도 존재하였다. 하지만 회절 한계로 인하여 각각의 분자들이 밀접한 근접거리에서 이미지가 중첩되기 때문에 이미징 기법으로 사용될 수 없었다. 형광분자를 선택적으로 활성화 시켜서 형광을 조절할 수 있는 기술로 인해서, 단분자의 형광을 이미징하여 위치를 정밀하게 측정하고 수많은 단분자들에 대해서 이 과정을 반복하여 초고해상도를 얻는 방법이 개발되었는데 바로 STORM/(F)PALM 기술이다[3-5]. 이 방법은 패턴화된 입사광을 만들기 위한 추가적인 장치가 필요없으므로 민감한 CCD 카메라와 이미지 프로세싱만으로 구현이 용이하다는 장점이 있다.

* STORM (Stochastic optical reconstruction microscopy)현미경

하버드의 Xiaowei Zhuang 그룹은 광스위칭이 가능한 (photoswitchable) 형광 프로브를 이용하여 형광 분자의 일부분만을 활성화하여 초분해능을 구현하는 STORM 현미경을 개발하였다. 한번에 활성화된 일부분의 형광 분자만 이미징을 하고 이 형광 분자들의 위치를 추정하

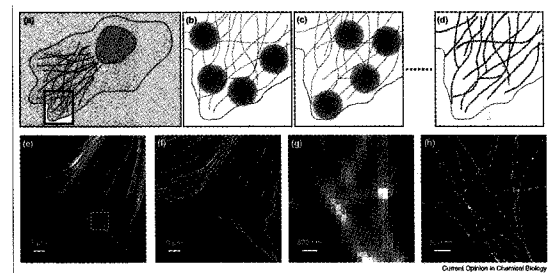


그림 3. STORM의 원리(10)

전반사 현상에 기반한 초분해능 광학 나노 현미경의 발전

는 사이클을 반복하는 방법을 사용하였다. 이로써 샘플의 위치를 재구성하여 DNA와 DNA-단백질 복합체 샘플을 이용하여 20 나노미터의 분해능을 보여주었다[5]. 그림 3에서 STORM의 원리를 도식으로 나타내었다.

* (F)PALM((fluorescence) photoactivation localization microscopy) 현미경

거의 같은 시기에 Eric Betzig 그룹과 Samuel Hess 그룹은 독자적으로 STORM과 비슷한 방법론을 제시하였다[3, 4]. 즉, 아주 약한 입사광(activation light)으로 한번에 떨어진 소수의 분자들만 형광을 발생하게 하고 이를 이미징하여 위치를 추정한뒤 다시 광학적으로 광표백(photobleaching) 하면서 이 과정을 수천번 반복하면 각 단일 분자들의 위치를 나노미터 수준으로 추적할 수 있게 된다 (그림 4). PALM 기술로 Betzig 그룹은 2006년

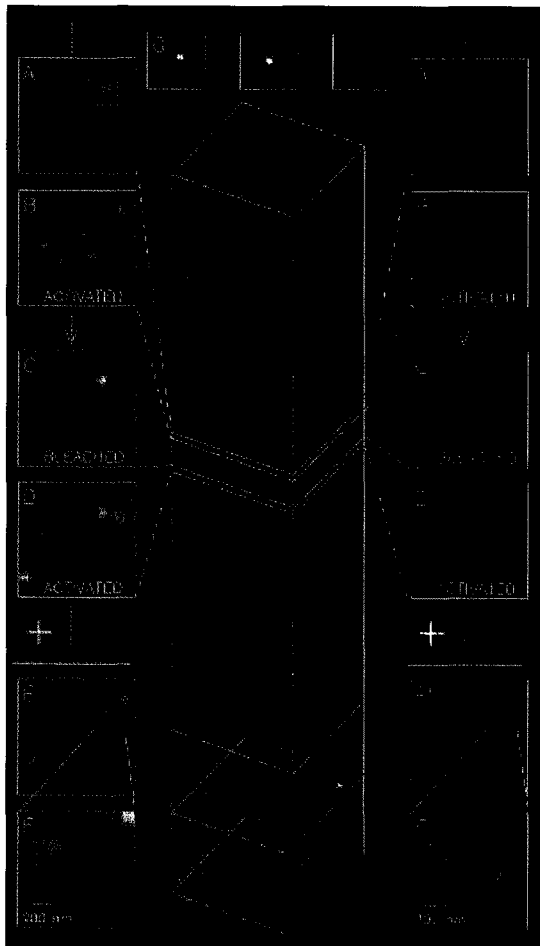


그림 4. PALM의 원리(3)

사이언스 지에서 세포의 focal adhesion complex와 세포소체에서 단백질의 분포를 보여주었다[3].

STORM과 (F)PALM은 약한 빛으로 충분히 떨어진 임의의 형광분자를 여기 (excitation)시켜서 위치추정을 하는 점에서 거의 같은 개념이지만 구현법에 있어서의 차이점은 다음과 같다. STORM은 형광분자의 광스위칭 (photoswitching) 으로 활성화 및 비활성화로 이미징을 하는 반면 (F)PALM은 광활성이 가능한 형광분자를 이미징 이후에 영구적으로 광표백 (photobleaching) 하는 데 있다.

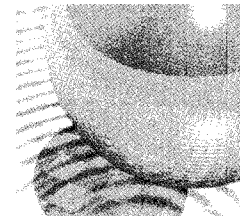
2.3 소개된 기술의 비교

위에서 설명한 패턴화된 입사광 및 단분자의 위치를 추정하는 방법에 의한 초분해능 현미경 기술의 분해능 및 장단점을 표1에서 비교하였다.

SIM, SW-TIRF, SSIM은 입사광의 패턴에 기반을 두기 때문에 특한 형광표지자가 필요하지 않으나 STORM/(F)PALM은 활성화가 가능한 별도 형광 표지자가 필요하게 된다. SSIM같은 경우는 상대적으로 높은 입사광의 강도를 필요로 하므로 형광 표지자의 광표백이 문제가 될 수 있다. 한편 STORM/(F)PALM현미경은 고성능 카메라와 적합한 형광 표지자가 있으면 장치적으로

표1. 전반사에 기반한 초분해능 현미경의 분해능 장단점 비교.

분류	방법	분해능	장점	단점
패턴화된 입사광법	SIM SW-TIRF	100 - 130 nm	- compatible with wide-field - flexible fluorophores	- limited resolution improvement - post data processing
	SSIM	50 nm and below	- theoretically unlimited resolution - compatible with wide-field - flexible fluorophores	- excessive photobleaching - post data processing
단분자 위치 추정법	(F)PALM STORM	20 - 50 nm	- high resolution - relatively simple setup	- fluorophore-limited - post data processing



는 SIM보다 더 간단하게 구현할 수 있는 장점이 있다. 최근에는 많은 광활성 형광 단백질 (photo-activatable fluorescent protein)들이 개발되어 왔고 이미 빈번하게 사용되는 형광물질들이 특정조건하에서 광스위칭 성질이 있다는 사실도 알려지게 되었다[9].

3. 의생물학에의 적용을 위한 초분해능 현미경의 진화

근래에 들어와서 초분해능 현미경은 생물학적인 대상으로 새로운 응용분야를 만들어 내고 있는데 이는 다양한 기술의 진보에 힘입은 결과이다. 아래에서 대표적인 기술 발전의 경향을 살펴보았다.

3.1 실시간 촬영을 위한 빠른 이미징 속도의 구현

살아있는 생물체를 이미징할 수 있는 점은 광학 현미경의 큰 장점중 하나이다. 초분해능 현미경을 이용하여 실시간으로 살아있는 샘플을 고해상도로 관찰할 수 있다면 역동적인 생명현상을 이해하는데 큰 도움이 될 것이다. 대부분의 초고해상도 현미경 방법은 충분한 형광신호를 얻기 위해서 상대적으로 느릴 수밖에 없었다. 따라서 초기에는 살아있는 샘플보다 화학처리된 정적인 샘플을 대상으로 구현되었다. 하지만 2009년 Gustafsson 그룹은 기계적으로 회절격자를 움직이는 대신에 공간 빛 변조기 (space light modulator)를 이용하여 패턴을 전자적으로 빠르게

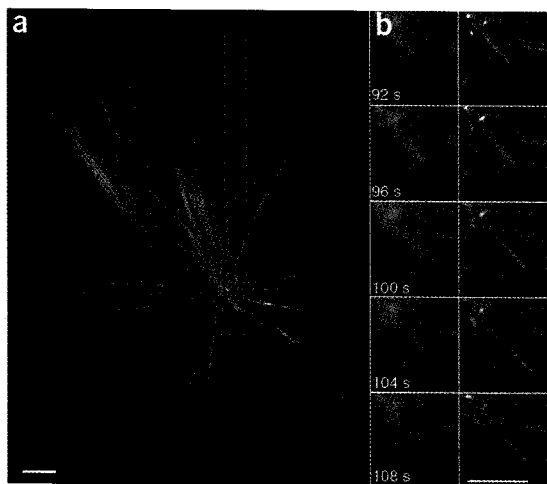


그림 5. 실시간 초분해능 현미경 live cell SIM[11]

생성함으로써 살아있는 세포 소기관의 역동적 움직임을 (초당 11 이미지) 초분해능으로 보여주었다 (그림 5) [11].

한편 STORM/(F)PALM의 경우는 한 장의 최종 이미지를 구현하기 위해서 수 천장의 이미지가 필요하기 때문에 적어도 수 초에서 수 시간이 소요될 수 있다. 하지만 Betzig 그룹에서는 2008년에 적절한 생물적 문제 (focal adhesion complex)를 설정하고 주의깊게 실험을 설계함으로써 살아있는 세포 소기관의 움직임을 실시간으로 (이미지 당 25 - 60초) 관찰할 수 있음을 보여주었다[12]. 한편 같은 해에 Lippincott-Schwartz의 그룹에서 PALM과 단일 입자 추적 (single particle tracking)을 결합하여 살아있는 세포의 세포막 단백질의 움직임을 초고해상도로 촬영함으로써 역동적인 단분자 이미징 (dynamic single molecule imaging)시대를 열게 되었다[13]. 가역적으로 스위칭이 가능한 프로브 (reversibly switchable probes)는 광표백을 사용하는 방법보다 더 긴 시간동안 관찰을 가능하게 할 것이다. 한편, 이러한 방향 이외에 표면 플라즈몬 공명 현상을 이용하여 초분해능 현미경의 형광신호를 증가시키려는 노력도 이미징 속도를 증가시키는데 일조하리라 예상된다[14, 15].

3.2 다채로운 이미징으로의 확장

생물학을 연구하는데 있어 형광 현미경의 장점 중 하나는 분자적인 상호작용을 연구할 수 있는 것이다. 이것은 두 개 이상의 컬러 채널을 통해서 가능하게 된다. 2008년 Zhuang 그룹은 STORM 방법으로 두 가지 색깔의 STORM 이미지를 이용하여 세포의 초미세구조의 정보를 보여주었다 (그림 6). 광-스위칭이 가능한 활성화와 전달자 쌍 (activator-reporter pairs)을 이용해서 세포 수준에서 분자적인 상호작용을 다색으로 가시화할 수 있음을 보인 것이다[16].

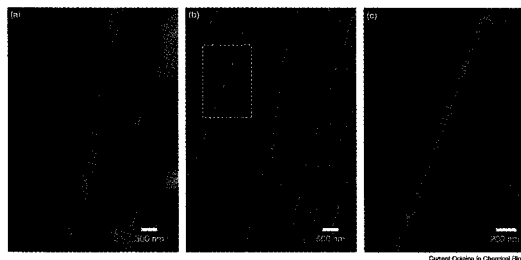


그림 6. 다중 채널 multi-color STORM 이미지[16]

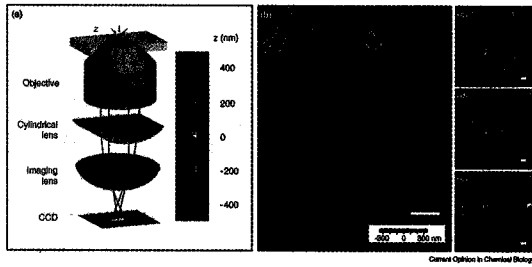


그림 7. 삼차원 STORM 이미지(18)

3.3 삼차원 이미징으로의 확장

세포 내의 분자적인 구조를 입체적으로 이해하기 위해서는 결국 삼차원 초분해능 현미경이 필요하게 된다. 2008년 Gustafsson은 SIM을 변형하여 세 개의 입사광을 간섭시킨 3D SIM을 개발하였다[17]. 같은 해 Zhuang 그룹은 렌즈의 비점수차(astigmatism)를 이용하여 3D STORM을 구현하였다. 이는 간단한 광학 설계를 통하여 실린더 형태의 렌즈를 빛의 경로에 두어서 이미지의 타원형 정도(ellipticity)로부터 단일 분자의 광축 방향으로 떨어진 위치를 결정하는 방법이다(그림 7)[18]. 2009년에는 Hess 그룹에서도 PALM 현미경에서 광축 방향으로의 간섭현상을 이용하여 20 나노미터 이하의 삼차원 단백질의 분포를 결정할 수 있는 interferometric PALM (iPALM)을 발표하였다[19].

이렇듯 초분해능 현미경이 발표되고나서 단지 몇 년 사이에 이미징 속도, 채널 수, 삼차원으로의 확장이 경쟁적으로 이루어졌고, 이미 이 기술들은 활발하게 상용화의 길을 걷고 있다. 예를 들어 SIM 현미경 기술은 Zeiss와 Applied Precision 등의 회사에서 그리고 (F)PALM/STORM 현미경 기술은 Zeiss등의 회사에서 상용화 되었다.

4. 맺음말 및 향후 전망

본 글에서는 주로 전반사 현상에 기초한 초분해능 현미경에 관해서 그 원리와 최근의 급속한 발전을 소개하였다. 이러한 발전의 이면에는 물리학자, 화학자, 공학자 그리고 생물학자의 융합적인 협력이 있어왔다. 초분해능 현미경 기술은 앞으로 생명과학의 근본적인 문제에 대한

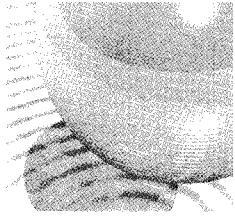
이해를 높이는데 역할이 기대되고 있다. 즉, 원거리 광학 현미경의 분해능이 전통적인 수 백 나노미터에서 수 십 나노미터로 열 배 이상 좋아지면서 분자 스케일에서 세포 내 소기관의 움직임을 실시간으로 보는 꿈같은 일이 현실로 다가올 것이다. 머지않은 미래에는 진정한 분자 수준의 분해능을 갖는 현미경으로 살아있는 세포나 생체 조직에서 분자 간의 상호작용과 생화학적인 현상도 보여 주게 될 것이다.

원리적으로 초분해능 현미경 기술은 분자 수준의 이미징을 가능케 한다. 하지만 현실적으로 현미경의 분해능은 근본적인 회절 한계 뿐만 아니라 샘플에 관련된 요소, 즉 레벨링 밀도, 프로브의 크기, 샘플의 보존상태 등에 의해서도 제약이 된다. 특히 상대적으로 두꺼운 생물학적인 조직에서 초분해능을 구현하는 일은 빛의 산란과 흡수 등으로 인해서 더욱 쉽지 않은 것이지만 이미 천문학에서 사용되고 있는 적응 광학(adaptive optics)나 이미징 후처리 프로세싱(post processing) 등의 방법으로 극복할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 사용자는 각 기술들의 장·단점 등의 특성을 정확히 인지하여야 필요한 문제에 적절하게 적용할 수 있을 것이다.

상대적으로 짧은 역사에도 불구하고 초분해능 현미경은 불변으로 믿어져 왔던 회절 한계를 극복하며 발전하게 되었고 이를 바탕으로 생물학적인 연구에 응용이 이미 시작되고 있다. 나노미터 수준에서 생명현상을 볼 수 있게 됨으로 세포생물학, 미생물학, 신경 생물학 등에서 새로운 발견과 함께 자연과 생명에 대한 통찰력을 제시하는데 중요한 역할을 담당하게 될 것이다.

▶ 용어설명

- **분해능 (resolution)** : 가까이 떨어진 두 물체를 구별해 낼 수 있는 최소 거리, 보통 점퍼짐 함수(point-spread function, PSF)의 중간두께(full-width at half-maximum, FWHM)로 사용함.
- **회절 (diffraction)** : 빛이 물체(예를 들어 렌즈의 구경)를 만날때 경로가 휘어지는 현상. 이 회절현상으로 인해서 입사광의 초점을 맞추는 능력 및 분해능에 한계를 가져오게 된다. 일반적으로 에너지가 작거나 긴 파장을 가진 빛일수록 회절이 잘 일어나므로 분해능이 낮아지게 된다.
- **회절한계 (diffraction-limit)에 따른 분해** : 광학시스템



에서 오직 회절현상만 있고 다른 요소 (예를 들어서 구면 수차 등)가 없다고 가정할 때 이론적으로 얻을 수 있는 분해능

- 초분해능 (super-resolution) : 전통적 회절한계에 의한 분해능보다 작은 물체를 구별해 내는 기술
- 전반사 (total internal reflection) : 굴절률이 다른 물질의 접촉면에서 굴절률이 낮은 곳으로 비스듬히 들어오는 입사광이 접촉면에서 거울처럼 완전히 반사되는 현상. 전반사를 이용한 현미경은 이때 굴절률이 낮은 물질의 영역에 얇게 깔리는 에바네스cent 파 (evanescent wave)를 이용하기 때문에 신호대잡음비(signal-to-noise ratio)가 높으며 단분자의 이미징에 주로 사용되고 있다.
- SIM : structured illumination microscopy 구조화된 입사광에 기반한 현미경
- (F)PALM : (fluorescence) photoactivation localization microscopy (형광) 광활성화에 기반한 위치 결정 현미경
- STORM : stochastic optical reconstruction microscopy 확률론에 기반한 광학적 재구성 현미경



감사의 글

본 연구는 광주과학기술원 의료시스템공학연구소 (Institute of Medical System Engineering)와 다산 프로젝트의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

1. Abbe, E., Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. Arch. Mikr. Anat., 1873. 9: p. 413-468.
2. Huang, B., H. Babcock, and X. Zhuang, Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. Cell. 143(7): p. 1047-58.
3. Betzig, E., et al., Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science, 2006. 313(5793): p. 1642-5.
4. Hess, S.T., T.P. Girirajan, and M.D. Mason, Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. Biophys J, 2006. 91(11): p. 4258-72.
5. Rust, M.J., M. Bates, and X. Zhuang, Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nat Methods, 2006. 3(10): p. 793-5.
6. Chung, E., et al., Two-dimensional standing wave total internal reflection fluorescence microscopy: superresolution imaging of single molecular and biological specimens. Biophys J, 2007. 93(5): p. 1747-57.
7. Chung, E., D. Kim, and P.T. So, Extended resolution wide-field optical imaging: objective-launched standing-wave total internal reflection fluorescence microscopy. Opt Lett, 2006. 31(7): p. 945-7.
8. Gustafsson, M.G., Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(37): p. 13081-6.
9. Huang, B., M. Bates, and X. Zhuang, Super-resolution fluorescence microscopy. Annu Rev Biochem, 2009. 78: p. 993-1016.
10. Bates, M., B. Huang, and X. Zhuang, Super-resolution microscopy by nanoscale localization of photo-switchable fluorescent probes. Curr Opin Chem Biol, 2008. 12(5): p. 505-14.

전반사 현상에 기반한 초분해능 광학 나노 현미경의 발전

11. Kner, P., et al., Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nat Methods*, 2009. 6(5): p. 339-42.
12. Shroff, H., et al., Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat Methods*, 2008. 5(5): p. 417-23.
13. Manley, S., et al., High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat Methods*, 2008. 5(2): p. 155-7.
14. Chung, E., et al., Wide-field extended-resolution fluorescence microscopy with standing surface-plasmon-resonance waves. *Opt Lett*, 2009. 34(15): p. 2366-8.
15. Kim, K., et al., Plasmonics-based spatially activated light microscopy for super-resolution imaging of molecular fluorescence. *Opt Lett*, 2010. 35(20): p. 3501-3.
16. Bates, M., et al., Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 2007. 317(5845): p. 1749-53.
17. Gustafsson, M.G., et al., Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J*, 2008. 94(12): p. 4957-70.
18. Huang, B., et al., Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nat Methods*, 2008. 5(12): p. 1047-52.
19. Shtengel, G., et al., Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(9): p. 3125-30.

약 령



정 의 현

- | | |
|------------------------|--|
| 2011년 2월
- 현재 | 광주과학기술원 의료시스템
공학 학제전공 및 기전공학부
조교수 |
| 2007년 3월
- 2011년 1월 | 미국 매사추세츠 종합병원 /
하버드 의대 박사 후 연구원 |
| 2007년 4월
- 2009년 4월 | Nanopoint Inc. (live cell
imaging solution company),
미국, 기술 컨설턴트 |
| 2006년 6월
- 2007년 3월 | Cambridge Devices
(medical device startup)미
국, 인턴 엔지니어 및 기술 컨
설턴트 |
| 2007년 2월 | Harvard-MIT Division of
Health Sciences and
Technology 의공학 박사 |
| 2003년 9월 | Massachusetts Institute of
Technology 기계공학과 박사
과정 |
| 2001년 6월 | 대한민국 공군사관학교 교수부
전임강사 |
| 1998년 2월 | KAIST 항공우주공학과, 공학
석사 |
| 1996년 2월 | KAIST 항공우주공학과, 공학사
(물리학 부전공) |