

고속 선주사 공초점 레이저 현미경의 생물학적 응용

Application of high-speed slit scanning confocal laser microscope in biology

정승환, 주성빈, 김창근, 김법민
연세대학교 보건과학대학 의공학과
jsh7951@nate.com

공초점 레이저 주사 현미경 (Confocal laser scanning microscope, CLSM)은 1961년 Minsky에 의해 처음 제안된 이후, 여러 종류의 공초점 현미경으로 개선·발전되어왔으며 광범위하게 사용되어지고 있다.^[1] 특히 생명과학분야에서 살아있는 시료를 대상으로 시료의 구조적인 이해 뿐 아니라, 생리학적 기능을 연구하는데 매우 중요한 역할을 하고 있다.^[1,2]

전자 현미경과 비교하여 광학 현미경의 장점은 미생물이나 조직의 변화를 살아 있는 상태로 찍을 수 있다는 것이다. 전자 현미경의 경우 고배율·고해상도로 관찰 할 수 있다는 장점이 있지만 시료를 관찰하기 위해서는 시료를 금속 코팅과 같은 전처리 과정을 거쳐야 하고 진공상태에서 측정해야 하기 때문에 관찰 후 시료가 손상될 수 있다. 공초점 레이저 주사 현미경은 기존의 광학 현미경에 비하여 약 1.4배 정도 더 좋은 해상도를 가지며, 미생물이나 조직을 살아 있는 상태로 찍을 수 있다는 장점을 가지고 있다.

일반적으로 현미경은 대물렌즈의 위치에 따라 inverted 현미경과 upright 현미경으로 나눌 수 있다. Upright 현미경은 시료를 cover slip과 cover slide로 고정시킨 후에 관찰하기 때문에 세포를 관찰하고자 할 때 실제 환경에서 벗어난 상태에서 관찰이 이루어지며 관찰 시간에 있어서도 제한을 받게 된다. 반면 inverted 현미경은 upright 현미경에 비하여 구조가 복잡하고 가격이 높다는 단점을 가지고 있지만 세포 배양이 가능한 chamber를 사용할 수 있기 때문에 오랫동안 실험 할 수 있는 조건을 유지시켜 줄 수 있다. 따라서 inverted 현미경은 주로 살아있는 미생물이나 조직을 관찰자가 원하는 환경에서 시간의 제약을 덜 받으면서 사용하고자 할 때 사용된다.

일반 공초점 주사 현미경은 크게 두 가지 방식으로 구성된다. 첫째, 레이저로 샘플에 초점을 맺는 점 주사 방식은 두개의 resonant 갈바노미터(~15 frames/sec)나 polygon(~4 frames/sec)을 주사 장치로 쓰고, CCD나 PMT 등으로 빛을 검출한다. 둘째, 현재 frame rate이 가장 빠른 Nipkow disk(~360 frames/sec) 방식은 다수의 마이크로 렌즈를 사용한 주사장치로 2차원 CCD로 검출한다. 레이저 점주사 방식은 Nipkow disk 방식에 비해 분해능이 상대적으로 높으나, 파장에 제한을 받고 갈바노미터의 스캐닝 속도로 인해 영상 재생 속도에 제한을 받는다. Nipkow disk 방식은 다 파장의 백색광원의 사용으로 인해 광원 손실이 커 분해능이 감소하고, 다수의 고가 마이크로 렌즈를 장착해야하기 때문에 가격이 비싸다. 또한, 데이터 획득 속도의 제한으로 실제 frame rate는 video rate 정도 밖에 안 된다는 단점이 있다. 이 두 방식은 입사빔과 광검출기 사이의 동기화를 위해 다수의 고가 장비가 요구된다.

본 연구에서는 이러한 장·단점들을 적용·보완하여 고속 선주사 스캐닝 공초점 현미경(HLS-CLM: high speed line scanning confocal microscopy) 방식에 inverted system을 이용하여 미생물이나 조직세포 등을 측정할 수 있는 장비를 고안하였다. 그림 1에서 HLS-CLM의 광원인 He-Ne(633nm)는 실선을 따라 원주형 광학계(cylindrical lens)에 의해 선 광원으로 만들어지고 AOD(Acousto-optic

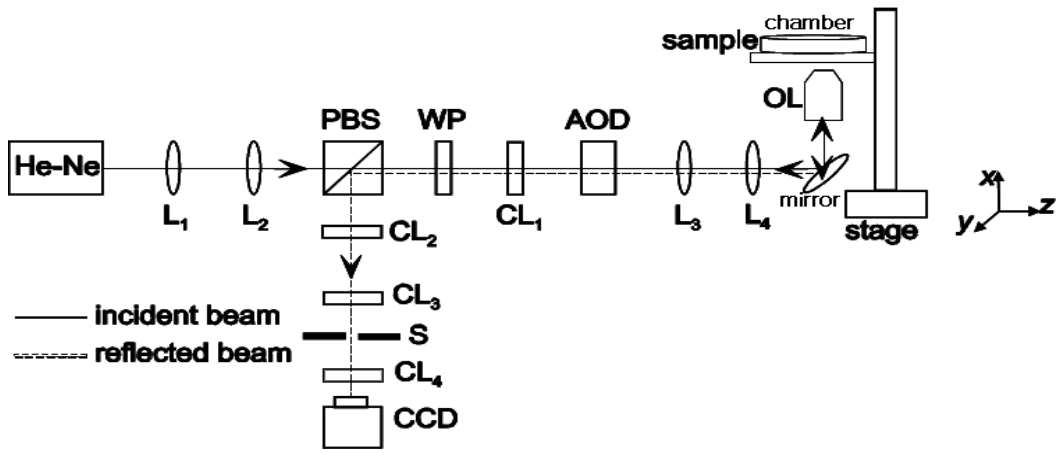


그림 1 Schematics of the inverted HLS-CLM

deflector)^[3]에 의해 샘플을 스캔한다. AOD와 PBS(polarization beamsplitter)를 거쳐 샘플에서 반사된 빛은 점선을 따라 슬릿을 통과한 빛만이 line-CCD에서 검출된다. CCD에서 검출된 이 신호를 영상 수집 장치(frame grabber)를 이용하여 이미지로 구현했으며, line CCD의 line rate는 67 kHz로 약 190 frames/s(512×512 pixel)의 실시간 영상을 획득이 가능하다. 본 연구는 이러한 고속고해상도 영상 형성 장치 및 방법을 이용하여 inverted 되지 않은 상태에서 그림 2와 같이 양파 세포를 깊이 방향으로 8 μ m씩 sectioning하여 2D 이미지를 획득했으며, 그림 3은 2 μ m로 sectioning 해서 얻은 86장의 2D 이미지를 3D로 재구성한 것이다.

앞으로 inverted system으로 전환하여 박테리아와 같은 미생물이나 조직 세포 등 움직이는 시료를 가지고 실시간 영상 획득을 통해 조직의 변화를 관찰 하고자 한다.

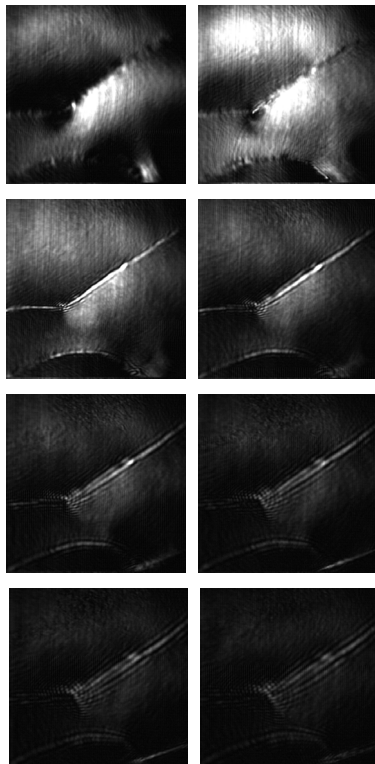


그림 2. 양파의 2D 이미지

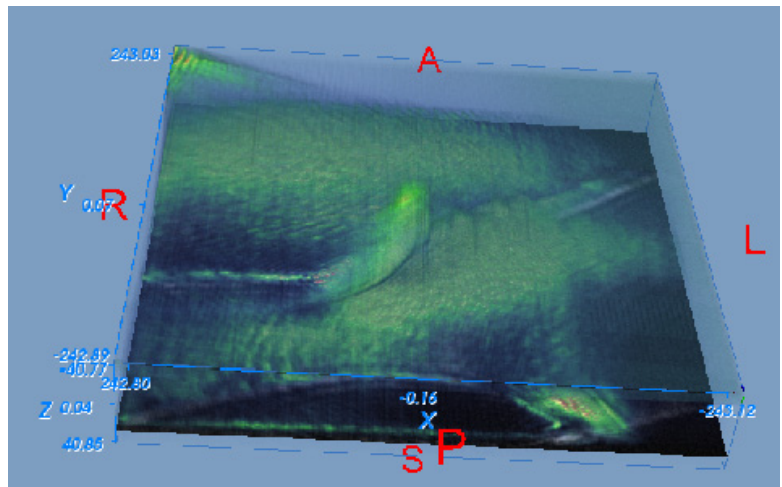


그림 3. 86장의 2D 이미지로 구현한 3D reconstruction

- [1] M. Minsky, "Microscopy apparatus", U.S. patent 3,013,467 (1961).
- [2] Robert H Webb Rep, "Confocal optical microscopy" Prog. Phys. 59, pp. 427-471 (1996)
- [3] Gottlieb, C. L. Ireland, and J. M. Ley, "Electro-Optic and Acousto-Optic Scanning and Deflection", Dekker, New York (1983)