

살아있는 단일세포 및 생체시료 측정을 위한 이온전도 현미경의 피드백 알고리즘 개발

Development of Scanning Ion Conductance Microscopic Feedback Algorithm for Single Live Cell Measurement

*경구은¹, *조상훈², 조용성², 김준휘²

*G.-E. Jung¹, #S.-J. Cho(msjcho@ParkAFM.co.kr)², Y.-S. Cho², J. Kim²
^{1,2} (주) 파크시스템스

Key words : Scanning Ion Conductance Microscopy, Live Cell Imaging, Atomic Force Microscope

1. 서론

원자현미경의 가장 큰 장점 중 하나는 시료를 공기, 액체, 진공 속 어디에서나 사용 할 수 있다는 점으로, 고해상도의 이미지를 얻기 위해서는 복잡한 시료 준비 절차를 거친 후 진공 속에서 측정해야 하는 전자현미경에 비하여 액체 속에서 살아있는 생체 시료를 전자현미경에 필적하는 해상도로 관찰 할 수 있는 원자현미경의 장점은 생물학자들에게 가장 큰 매력이 아닐 수 없었다. 그러나 원자현미경 측정을 위해서는 시료가 기판에 단단하게 고정되어 있어야 한다는 점은 액상에서의 다양한 생체 분자들을 관찰해야 하는 생의학 실험에서 큰 제약이 아닐 수 없다.

급격하게 발전한 생화학과 분자생물학에 의하여 많은 생물학적 신비가 밝혀짐에 따라 많은 사람들의 관심이 한 단계 올라가 수많은 생화학과 분자생물학적인 메커니즘에 의하여 생명현상을 보여주는 최소 단위인 단일 세포를 분석하고자 하고 있으나 현재는 살아있는 단일세포를 관찰하고 실험할 수 있는 장비에 많은 제약을 가지고 있다.

고해상도를 가지고 액상에서 측정할 수 있는 원자현미경 (atomic force microscopy)은 초기에 생물학자들에게 많은 관심을 끌었으나 탭핑모드 (tapping-mode)¹나 비접촉식 모드 (non-contact mode)의 개발에도 불구하고 액상에서 다양한 상호간섭력을 갖는 생체 분자를 측정하는데 많은 어려움을 겪고 있고, 특히 살아있는 세포와 같이 출렁이는 표면위의 생체분자나 모양을 측정한다는 것은 거의 불가능에 가까웠다. 이를 극복하기 위하여 이온전도현미경(scanning ion conductance microscopy; SICM)이라는 캔틸레버 대신유리 파이펫을 사용하는 새로운 주사탐침현미경 기법이 개발되어 완전한 Non-Contact mode 이미징이 가능하게 된다. (Fig 1)

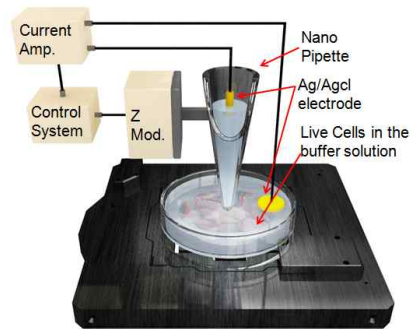


Fig. 1 Ion Conductance Microscopy

2. Approach, Retract and Scan (ARS) Mode

주사탐침 현미경의 주사 스캔 방식은 세포와 같이 높은 단차의 변화를 캔틸레버 또는 파이펫의 피드백으로 쫓아가기가 쉽지 않다. 특히 액상에서는 캔틸레버를 둘러싸고 있는 액체의 비중에 의해 damping 효과까지 있어서 이런 현상을 더욱 악화시킨다. 이를 극복하기 위해 개발된 tapping 모드도 캔틸레버를 공명진동수 부근에서 진동시켜 생기는 amplitude가 세포의 큰 단차 변화를 쫓아가기 어렵다. 그래서 현재까지 발표된 대부분의 세포 이미지가 형상 (topography) 이미지가 아닌 팁과 시료간의 간섭에 의해 생기는 에리 이미지가 대부분이며 이는 세포의 진정한 이미지가 아닌 세포내부 (Cytoskeleton)의 구조와 같이 비교적 단단한 구조물의 이미지라고 할 수 있다. 이를 극복하기 위해서 Fig2와 같은 ARS mode를 개발하게 되었다. Fig2의 왼쪽 그림은 Non-Contact AFM mode (NC-mode)에 Z 피에조의 Approach, Retract 높이를 시료의 단차에 따라 결정하여 피드백을 해주어 픽셀 단위로 시료의 높이를 측정하도록 하였고 오른쪽 그림은 같은 원리를 이용하

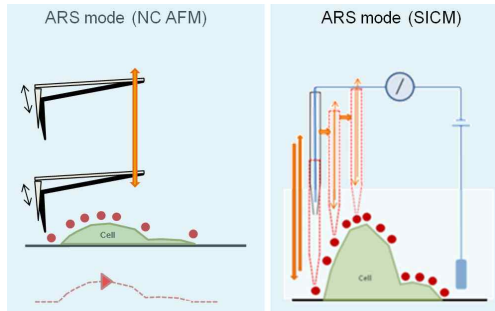


Fig. 2 ARS mode for Non-contact AFM and SICM

나 피드백을 SICM의 원리로 측정하도록 구성을 하였다. Fig 3은 NC imaging에서 ARS mode를 구현했을 때와 일반적인 Raster scan을 했을 때의 이미지를 비교하고 있으며 Raster scan을 했을 때 생기는 끌림 현상이 ARS mode에서는 사라짐을 알 수 있다.

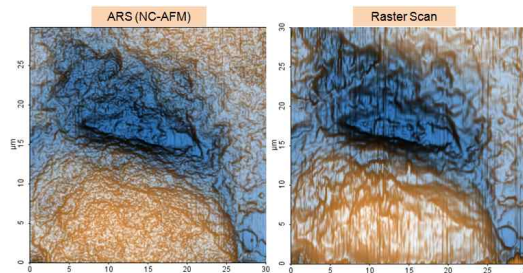


Fig. 3 NC-ARS vs. Raster scan on Fixed COS M6 Cell 이를 통하여 일반적으로 측정하기 어려운 높은 단차의 고정된 세포의 형상을 쉽게 얻을 수 있었으나 살아있는 세포의 경우에는 세포자체의 움직임까지 있어서 AFM feedback으로는 완전히 틱이 세포 표면의 생체분자들에 의해 오염되는 현상을 방지할 수 없었고 SICM 방식을 사용했을 때도 측정 도중에 파 이렛이 오염되는 현상을 완전히 막을 수는 없었다.

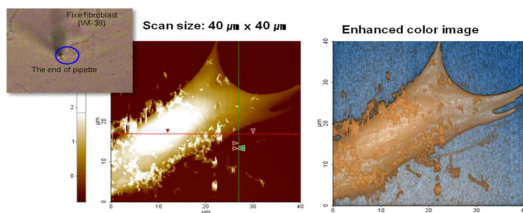


Fig. 4 SICM-ARS image of human lung fibroblast, (inlet: optical image of pipette tip imaging cells, Left: Topographical image, Right: Enhanced color image)

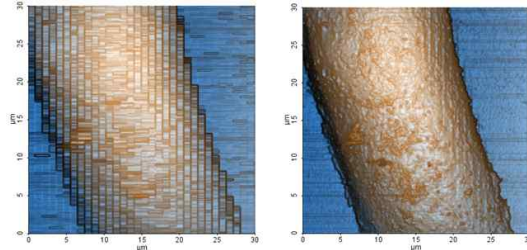
Fig4.는 어떤 방법으로도 끝까지 측정할 수 없었던 폐의 상피세포 (WI-38)를 SICM-ARS 모드로 안정

적으로 관찰한 데이터이다.

3. Development of Adaptive Scan

ARS mode를 통하여 AFM과 SICM 측정을 개선할 수 있었다. 하지만 ARS mode의 단점은 기존의 모드에 비해서 속도가 현저하게 느려진다는 점이다. 물론 기존의 모드에서 측정할 수 없다면 속도 비교는 무의미한 일이겠지만 그래도 한 장의 이미지를 얻는데 걸리는 시간은 실험에 있어서 중요한 요소로 작용할 수 있다. ARS mode에서 가장 시간이 많이 걸리는 부분은 Approach를 하는 동작이다. 시료의 단차에 상관없이 retract를 하면 평평한 곳에서는 상당히 긴 시간에 걸쳐 접근을 해야 하기 때문에 미리 대략적인 세포의 단차를 알 수 있다면 미리 Z스캐너의 높이를 조정할 수 있어 상당한 시간을 절약할 수 있다. 이를 위하여 prescan을 통하여 대략적인 시료의 높이를 측정하고 ARS mode를 시행하는 adaptive scan 모드를 개발하였으며 이를 통하여 기존에 걸리던 시간의 약 40%를 줄일 수 있었다. Prescan시 Z스캐너의 Retract 높이는 5 μm이며, 실제 측정할 때는 2 μm를 적용하여 시간을 줄일 수 있었다.

Fig. 5 SICM-Prescan and ARS scan



4. 결과 및 결론

부드럽고 탄성이 강한 생체 시료는 나노미터 또는 옴스트롬 수준에서 연구하는데 있어서 아직까지 많은 숙제를 남기고 있다. 하지만 미지의 새로운 영역을 탐구할 수 있다는 점에서 반드시 극복해야 한다. 현재 생체시료를 다루기 위한 새로운 캔틸레버와 탐침의 개발과 더불어 다양한 성능향상이 되고 있어 앞으로 원자현미경이 생명의 신비를 밝히는 데 큰 역할을 할 것이 기대된다.

후기

본 연구는 지식경제부 산업원천기술개발사업의 지원을 받았음 프로젝트번호 (ISTDP10033633)