

## 동물학논단

# Laser Scanning Confocal Microscope (공초점형광현미경)의 원리와 응용



이 지 원

1990~1993년 서울대학교 분자생물학과 (학사)  
 1994~1995년 서울대학교 분자생물학과 (석사)  
 1996~현재 기초과학지원연구소 생체고분자분석팀 연구원



하 권 수

1980~1984년 서울대학교 (학사)  
 1984~1986년 서울대학교 (석사)  
 1988~1991년 오스틴 텍사스 주립대 (박사)  
 1991~1993년 Howard Hughes Med. Institute c/o Vanderbilt University Medical School (Research Associate, Post-doctor)  
 1994~현재 기초과학지원연구소 생체고분자분석팀장

### 1. Introduction

17세기에 들어 현미경을 이용한 세포의 관찰이 가능하게 되면서부터 광학현미경은 세포의 구조, 기능 및 조절기작을 연구하는데 광범위하고 유용하게 사용되어 왔다. 그러나, 일반적인 광학현미

경은 현미경의 초점부위를 관찰함에 있어 초점을 벗어난 부위가 간섭현상을 일으키기 때문에 고해상도의 화상을 관찰하기에는 부족함이 있었으며, 특히 두꺼운 시료의 경우 일반적인 관찰뿐만 아니라 3차원적인 구조를 보기에는 적당하지 않았다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 초점부위를 제외한 나머지 부분의 이미지를 제거하는 deconvolution이라는 컴퓨터를 이용한 기술이 형광현미경에 적용되기 시작하였다. 그러나 이러한 기술은 많은 시간이 걸린다는 단점이 있었기 때문에 또 다른 해결책으로 사용되기 시작한 것이 공초점형광현미경이다. Confocal microscopy (공초점형광현미경)의 원리는 Minsky에 의해 처음 개발되었는데, 광원과 detector의 초점을 시료의 한점에 일치시키는 것이다 (Fig. 1). 정확한 초점 부위를 제외한 부분의 화상정보를 동일한 초점에 맞추어진 광원, detector 그리고 시료로부터 제거할 수 있는 기술인 것이다. 이러한 Confocal microscope는 일반 형광현미경에 비해 명암을 확실하게 구별할 수 있을 뿐만 아니라 간섭현상의 제거로 고해상도의 화상을 얻을 수 있다.

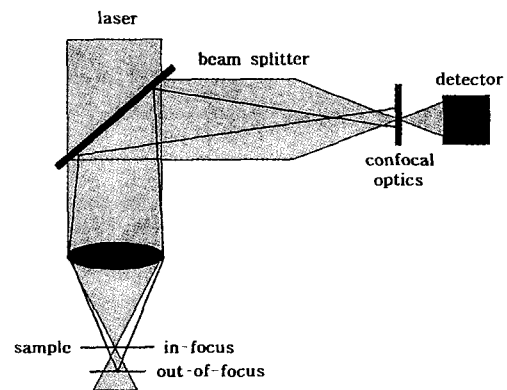


Fig. 1. Schematic diagram showing principles of confocal laser scanning microscope.

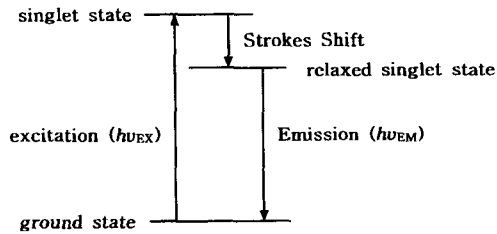


Fig. 2. Jablonski diagram illustrating fluorophore process.

Confocal microscope는 화상을 얻는 방법 즉, Scanning 방법에 따라 stage를 전후좌우로 움직이는 “stage scanning type”, scanning beam과 고정된 stage를 이용하는 “beam scanning type”, 그리고 고정된 광원과 stage를 가진 “spinning disk” 등의 세 가지로 구분될 수 있다. 이 중에서 특히 confocal laser scanning microscope (CLSM)라고 통칭되는 beam scanning type이 가장 널리 이용되고 있다. CLSM은 scanning 방법과 화상을 구성하는 방법의 차이에 의해 “slow scanning type”과 “fast scanning type”으로 구분되는데, 본고에서는 주로 slow scanning confocal microscope를 이용한 세포내 고분자물질 및 구조물의 3차원적인 구조와 세포내 신호전달물질의 실시간 변화 연구에 대해 고찰해 보고자 한다.

## 2. Confocal Laser Scanning Microscope의 특징

CLSM은 Table 1에서 보는 바와 같이 시료의 관찰방법과 image를 얻는 방법에 있어서 일반 현미경과는 다른 점이 많다. Confocal microscope의 경우 다양한 beam splitter와 filter (excitation 및 emission)들을 사용하여 image를 얻게 되는데, 이러한 image는 광원과 detector (PMT)의 초점을 한 점에 동시에 일치시켜 얻어지는 것이다 (Fig. 1). 그러므로 시료 전체의 image를 얻기 위해서는 시료 전체에 대한 scanning이 필수적이며, 이렇게 얻어진 각 초점의 image들은 computer에 저장되어 전체적으로 하나의 image로 재구성되는 것이다. 또 Confocal microscope에서는 일반 현미경에서

Table 1. Differences between confocal and conventional microscopy

Characteristics	Confocal microscopy	Conventional microscopy
sample illumination	focal	whole field
illumination source	laser	mercury lamp
real-time scanning	possible	possible
optical sectioning	possible	impossible
z-axis scanning	possible	impossible
depth of field	0.5~1.5 $\mu$ m	whole sample depth
resolution & contrast	much better	normal
repetitive observation	possible	almost impossible
image saving time	<sec	min
image processing	3-D, stereo-image	impossible

널리 사용되는 수은램프 (mercury lamp)의 빛이 적은 초점부위를 보기에는 빛의 세기가 너무 미약하기 때문에 일반 현미경에서 사용하는 광원과 달리 여러 종류의 laser가 이용된다. 이러한 이유로 인해 confocal laser scanning microscope라는 명칭이 붙게 된 것이다.

Fig. 1에 나타난 바와 같이 confocal microscopy는 일반 현미경에 비해 다음과 같은 여러 가지 장점을 가지고 있다 (1, 2). 첫째, 일반 현미경에 비해 confocal microscope는 초점의 두께를 줄일 수 있기 때문에 생체고분자 물질 등의 세포내 분포를 관찰하기에 유리하며, 둘째, confocal microscope는 시료를 광학적인 절편 (optical section)으로 만들어 관찰할 수 있기 때문에 시간적, 공간적으로 그 분포와 농도가 변화하는  $Ca^{2+}$ , cAMP,  $H_2O_2$  등의 세포내 신호전달물질에 대한 정보를 실시간으로 얻을 수 있다. 셋째는, 광학적 절편화 기능을 이용하여 세포내 물질들의 분포 등을 결정할 수 있는 3차원 image를 구성할 수 있다. 또한 confocal microscope는 그 특성상 모든 정보를 computer를 이용하여 처리하기 때문에 저장된 image를 분석하여 3 차원 구조, 입체 영상, color depth coding 및 각 부위의 형광도를 측정할 수가 있으며, 마지막으로 일반 현미경에서 하나의 이미지를 얻기 위해 몇 분의 시간이 요구되는데 비해 confocal microscope를 사용할 경우 수 초 내지 그 이하의 짧은 시간으로 이미지를 저장할 수 있다.

Confocal microscope를 이용하여 만족할 만한 결과를 얻기 위해서는 몇 가지 부대 장비가 필요

하다. 첫째, 시료에 알맞은 광원으로 laser가 필수적인데, 종류에 따라 사용할 수 있는 시간과 냉각장치, 그리고 파장이 서로 다를 수 있다. 그러므로 laser를 선택할 경우 시료의 특성에 따라 적절한 종류를 선택하여 사용해야 한다. 둘째, 시료로부터 나오는 형광 즉, emission fluorescence를 제외한 나머지 형광을 제거하기 위한 emission filter가 필수적인데, 이 emission filter는 특히 ratio measurement와 double staining에 있어서 매우 중요한 요소이다. 셋째, 현미경 부분 외에 computer에 장착되는 memory의 용량도 매우 중요한 요소가 될 수 있는데, 3차원 영상의 재구성 및 실시간 분석을 수행하기 위해서는 적절한 크기의 RAM이 충족되어야만 분석이 가능하다. 필요한 RAM의 용량은 confocal microscope의 해상도 (resolution)와 밀접한 관련이 있는데, 예를 들어 confocal microscope의 해상도가  $1024 \times 1024$  pixels일 경우 하나의 RGB (red/green/blue) image를 구성하기 위해서는 약 3 Mb의 memory가 필요하므로, 만약 20개의 image를 재구성하기 위해서는 약 60 Mb의 memory가 요구되는 것이다. 특히, 실시간 분석의 경우 한 번의 실험에 적게는 수 십장에서 수 백장의 image가 사용되기 때문에 충분한 memory의 확보는 매우 중요한 의미를 갖게 된다. 마지막으로 살아있는 세포를 이용한 실시간 분석을 위해서는 관류장치 (perfusion system)가 필요한데, 이러한 관류장치는 제물대 위에 올려진 살아있는 세포에 직접 자극물질이나 화학물질 등을 처리하면서 세포에는 아무런 물리적인 자극을 주지 않고 실험을 수행하기 위한 필수적인 장비이다.

### 3. 시료의 준비

시료 준비는 일반 형광현미경에서와 마찬가지로 매우 중요한 단계이다. 여기에서 시료 준비란 관찰하고자 하는 시료를 적절한 형광물질로 염색을 하는 것 (staining)으로 이를 위해서는 형광물질 (fluorescent dye)에 대한 이해가 필수적이다 (3). 형광물질은 광원으로부터 들어오는 빛 ( $h\nu_{ex}$ )에 의해 바닥상태 (ground state)에서 여기상태 (singlet state)가 되고, 이어서 relaxed singlet state로 변화하면서 에너지의 일부분을 잃어버리게 된다 (Fig.

2). 계속해서 형광물질은 형광 ( $h\nu_{em}$ )을 방출하면서 바닥상태로 환원하게 되는데, 이 과정에서 방출되는 형광은 형광물질을 들뜨게 하기 위한 광원의 파장보다 긴 파장으로 방출되게 되며, 이러한 현상을 Strokes Shift라고 한다. 이 Strokes Shift는 excitation light와 emission light를 분리할 수 있게 하는 매우 중요한 요소이다 (3).

관찰하기에 적절한 시료를 준비하기 위한 다음 단계로는 적절한 형광물질의 선택이다. 적절한 형광물질을 선택하기 위해서는 quantum yield, emission/excitation wavelength, photostability, pH sensitivity, Strokes Shift 등 그 형광물질의 특성들이 고려되어야 하며, 형광물질을 살아있는 세포에 적용하고자 할 경우 micorinjector 등을 이용하여 세포에 직접 주입하지 않는 경우, 세포막을 통한 투과성을 증가시키기 위해 acetoxymethyl ester (AM)이나 diacetate (DA) 등의 잔기가 붙어있는 유도체를 선택하여야 한다 (5, 6). 현재까지 가장 보편적으로 사용되고 있는 형광물질로는 fluorescein isothiocyanate (FITC)와 tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)가 있는데 (Table 2), FITC는 비교적 높은 quantum yield와 extinction coefficient, 그리고 생체물질과의 낮은 non-specific binding 특성을 가지고 있을 뿐만 아니라 높은 친수성으로 인해 특정 물질과의 복합체 (conjugate)를 손쉽게 만들 수 있다는 유리한 점이 있다. 그러나 FITC는 pH의 변화에 민감할 뿐만 아니라 빛에 불안정하다는 단점을 가지고 있기도 하다 (1, 3, 4). 반면에 TRITC의 경우 FITC에 비해 낮은 quantum yield를 가지고 있으며 pH에 민감하지 않다는 장점이 있기는 하지만, 두 개 이상의 형광물질이 하나의 IgG 분자에 결합을 할 경우 inter-molecular bleaching이 발생하는 단점을 가지고 있기도 하다.

실험의 종류와 목적에 따라 형광물질의 염색은 “3-D construction”과 “real-time analysis” 등에 적용하기 위한 두 가지의 염색 방법으로 나눌 수 있다 (Table 3). 첫째, 3-D construction에 사용되는 일반적인 염색방법으로 immunostaining이 있는데, 이 방법은 세포를 fixation, permeabilization 과정을 거친 후, 특정 형광물질로 염색을 하는 방법이다. 이 방법에서는 일반적으로 특정 물질을 인지하기

**Table 2.** Characteristics of various kinds of fluorophores.

Fluorophore*	M.W.	Ex (nm)	Em (nm)	Ex coefficient**	quantum yield
AMCA	237	347	445	15	-
DAMC	261	391	474	-	-
LY	457	428	533	12	-
FITC	389	496	518	67	0.2-0.35
BODIPY	292	503	511	80	0.40
TRITC	444	554	576	67	-
LRSC	577	572	590	83	0.04
R-PE	240,000	480, 565	578	2,000	0.85
B-PE	240,000	546, 565	575	2,410	0.59
TRSC	625	592	610	87	0.01
NBD-Cl	199	465	535	-	-
Pyrene	202	345	378	-	-

\* AMCA: 7-Amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid, DAMC: 7-Diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid, LY: Lucifer yellow, FITC: Fluorescein isothiocyanate, BODIPY: 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diazaindacene-3-propionic acid, TRITC: Tetramethylrhodamine isothiocyanate, LRSC: Lassamine rhodamine sulfonyl chloride, R-PE: R-phycoerythrin, B-PE: B-phycoerythrin, TRSC: Texas red sulfonyl chloride, NBD-Cl: 7-Chloro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole

\*\*  $\times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

위한 1차 항체를 사용하게 되며, 다음으로 형광 물질이 붙어있는 2차 항체를 사용하여 1차 항체를 인지하게 된다. 특별한 경우 특정 물질을 인지할 수 있는 1차 항체에 직접 형광물질이 붙어 있는 경우도 있는데, 대표적인 경우가 세포내 F-actin과 반응하는 NBD-phalloidin이나 rhodamine-phalloidin 등을 사용하는 경우이다 (Table 3 and Fig. 3). 둘째, 살아있는 세포내의 신호전달 물질을 관찰하기 위한 염색방법이 있는데, 이 방법은 fixation과 permeabilization 과정이 필요 없다. 그러므로 형광물질은 세포막에 대해 투과성을 가지고 있어야 하며 (Table 3), 대부분의 경우 앞에서 언급한 바와 같이 acetoxymethyl ester (AM)나 diacetate (DA) 들의 잔기가 결합되어 있는 유도체를 사용하게 된다. 이러한 유도체들은 세포막을 투과하여 세포내로 들어간 후 세포내에 존재하는 esterase에 의해 이들 잔기 (AM 또는 DA)가 제거되어 특정 물질과 반응할 경우 형광을 방출할 수 있는 물질로 변하게 된다.



**Fig. 3.** 3-D structure of filamentous actin in Swiss 3T3 cells.

**Table 3.** Procedures for cell staining.

	3-D construction	Real-time analysis
Staining procedures	1. Cells on coverslips	1. Cells on coverslips
	2. Treat cells with agonists	2. Label with fluorescent dye
	3. Fixation	3. Mount the coverslips on a perfusion chamber
	4. Permeabilization	4. Set up CLSM and start scanning
	5. Blocking	5. Continue scanning with an agonist
	6. Incubation with 1' Ab	
	7. Incubation with 2' Ab	
	8. Mounting with anti-bleaching medium	
	9. Observe with CLSM	
Examples	F-actin, microtubule, proteins	Ca <sup>2+</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , pH, cAMP, etc.
	FITC, Phalloidin, DAPI, Fluorescent Hoechst, NBD-phalloidin, dyes PE, BODIFY, Lucifer yellow, & etc.	H <sub>2</sub> DCFDA, Fluo-3AM, BCECF-AM, Fura red-AM, SNAFL-AM, & etc.

#### 4. Confocal microscope의 응용

Confocal microscope는 생명과학, 의학, 약학, 식품공학, 재료공학 등 각종 연구분야에 광범위하게 이용되지만 그 사용방법에 있어서는 앞에서 언급한 바와 같이 크게 두 가지 방법 즉, “3-D image construction”과 “real-time imaging”으로 나눌 수 있다. 그 중 3-D image construction은 confocal

microscope의 매우 중요한 고유기능 중의 하나로 일한 형광현미경과 구분되는 특징이기도 하다. 3-D image는 시료를 광학적 절편으로 나누어 image를 얻은 후 그 image들을 재구성하여 전체적인 3차원 영상을 만드는 방법으로 매우 다양한 연구 분야에 적용될 수 있는데, 3-D image construction을 이용할 경우 일반 형광현미경으로는 구분이 불가능한 특정 물질의 세포내 분포를 정확하게 구별할 수 있다는 큰 장점이 있다. Fig. 3의 3-D image는 Swiss 3T3 fibroblasts에서 filamentous actin의 분포를 나타내는 일례이다. 이 image는 세포의 두께에 따라 순차적으로 15개의 광학적 절편을 재구성하여 얻어진 image로, 이러한 image는 표현 방법에 따라 "stereo image"와 "depth coded image"로 나타낼 수 있어 특정 물질의 세포내 분포를 정확하게 알아낼 수 있을 뿐만 아니라 이렇게 재구성된 3-D image를 수평 또는 수직 방향으로 360° 회전시 "rotation/animation" 기능을 사용하여 세포내 분포와 구조를 더욱 정확하게 관찰할 수 있다. 또 다른 대표적인 예로 막 단백질의 "internalization"의 연구에 이러한 3-D image construction 방법이 사용될 수 있는데, epidermal growth factor receptor나 thrombin receptor 등은 세포막으로부터 세포질 내부로 internalization 되는 것으로 알려져 있는데 (7, 8), 이러한 종류의 연구를 수행하기 위해서는 confocal microscope의 고유기능인 3-D image construction 기법을 사용하지 않고 일반 형광현미경을 사용할 경우 세포막과 세포질, 그리고 핵과 그 밖의 세포내 구조물들을 정확하게 구분할 수 없기 때문에 거의 불가능하게 된다. 그 외에 3-D image construction 기법은 "colocalization"에 사용될 수 있는데, 이 방법을 사용하여 특정 물질들을 동시에 서로 다른 파장의 염색물질로 염색함으로써 조직이나 세포내의 분포와 상대적인 양을 정량하고 관찰할 수 있게 된다.

Confocal microscope의 두 번째 대표적인 이용 방법은 "real-time imaging" 기법이다. 세포 조절기작을 연구함에 있어서  $Ca^{2+}$ , pH, cAMP, 그리고  $H_2O_2$  등의 세포내 신호전달 물질들의 실제 시간에 따른 변화를 관찰하는 것이 매우 중요한데, 이러한 실험을 위해서는 살아있는 세포에 특정 신호전달물질을 인지하여 형광을 나타내는 염색

물질들이 필요하게 된다. 그러한 특성을 가진 물질들은 대부분 AM 또는 DA 잔기를 가지고 있으며,  $Ca^{2+}$ -specific dye인 fura-2AM, fluo-3AM, Indo-1AM, 세포내의 대표적인 활성산소 중의 하나인  $H_2O_2$ 를 측정할 수 있는  $H_2DCFDA$ , 그리고 세포내 pH 변화를 관찰할 수 있는 SNAFL-1AM, BCECF-AM, SNARF-1AM (3) 등이 있다. 이러한 "real-time imaging" 기법은 일반 형광현미경을 이용하여 실험을 수행할 수도 있지만 형광의 강도에 한계가 있으며, 최근에는 세포의 전체적인 분포와 변화뿐만 아니라 신호전달물질의 국부적인 변화를 측정하는 것이 중요시되고 있기 때문에 confocal microscope를 사용하지 않을 경우에는 그 결과의 분포 및 농도에 대한 정확한 정보를 기대하기는 곤란하다. 일례로 Fig. 4의 경우 rat-2 fibroblast에서 lysophosphatidic acid에 의해 시간적으로 변화하는 세포내 유리  $Ca^{2+}$  농도를 측정함으로써 경우에 따라 세포 전체뿐만 아니라 세포질, 핵, 또는 mitochondria이나 ER, Golgi complex와 같은 세포내 소기관 내부의 농도 변화를 구분하여 측정할 수가 있는 것이다 (9).

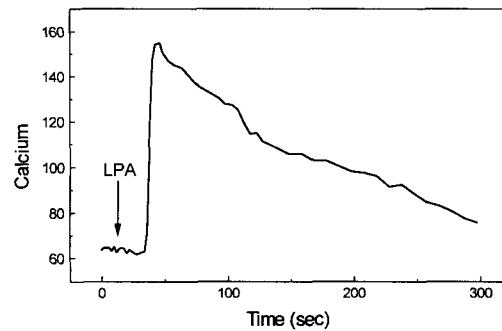


Fig. 4. Time-course changes of intracellular  $Ca^{2+}$  induced by LPA in Rat-2 fibroblasts.

### 참고 문헌

Wright, S.J., Centonze, V.E., Stricker, S.A., Devries, P.J., Paddock, S.W., and Schatten, G. (1993) "introduction to confocal microscope and three-dimensional reconstruction", In B. Matsumoto, ed., Cell Biological Applications

- of Confocal Microscopy. Academic Press, San Diego, California, pp. 1-45.
- Inoue S, (1990) "Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In J.B. Pawley, ed., Handbook of biological confocal microscopy", Plenum Press, New York, pp. 1-14.
- Haugland, R.P. (1996) "Handbook of fluorescent probes and research chemicals" Molecular Probes, Eugene, Oregon, pp. 1-46.
- Kasten, F.H. (1996) "Introduction to fluorescent probes: properties, history and application" In W.T. Mason, ed., Fluorescent and luminescent probes for biological activity. Academic Press, San Diego, California, pp. 12-33.
- Hermanson, G. T. (1996) "Bioconjugate techniques" Academic Press, San Diego, California, pp. 297-416.
- Brelje, T. C., Wessendorf, M. W., and Soenson, R. L., (1993) "Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitation" In B. Matsumoto, ed., Cell Biological Applications of confocal microscopy. Academic Press, San Diego, California, pp. 1-45.
- McCune, B. K., Prokop, C. A., and Earp, H. S. (1990) "Transient epidermal growth factor (EGF)-dependent suppression of EGF receptor autophosphorylation during internalization" J. Biol. Chem. 265, 9715-9721.
- Brass, L. F., Pizarro, S., Ahuja, M., Belmonte, E., Blanchard, N., Stadel, J. M., and Hoxie, J. A. (1994) "Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization, and recycling" J. Biol. Chem. 269, 2943-2952.
- Lee, Z.-W., Kweon, S.-M., Kim, B.-C., Leem, Sun.-H., Shin, I., Kim, J.-H., and Ha, K.-S. (1998) "Phosphatidic acid-induced elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> is mediated by RhoA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat-2 fibroblasts" J. Biol. Chem. 273, 12710-12715.