한국가시화정보학회지, 제11권, 제2호, (2013) 41~45
〈일반논문〉 (투고일 : 2013.09.05/수정일 : 2013.09.25/심사완료일 : 2013.09.26)
DOI : http://jksv.ksvi.or.kr/10.5407/JKSV.2013.11.2.043

고속 트립토판 자가형광 이미징을 위한 시공간적 집중 기반의 라인 스캐닝 이광자 현미경 개발

이준호[*†] · 남효석[*] · 김기현[*,**]

Development of line-scanning two-photon microscopy based on spatial and temporal focusing for tryptophan based auto fluorescence imaging

Jun Ho Lee, Hyo Seok Nam, and Ki Hean Kim

Abstract. Two-photon microscopy (TPM) is minimally-invasive 3D fluorescence microscopy based on nonlinear excitation, and TPM can visualize cellular structures based on auto-fluorescence. Line-scanning TPM is one of high-speed TPM methods without sacrificing the image resolution by using spatial and temporal focusing. In this paper, we developed line-scanning TPM based on spatial and temporal focusing for auto-fluorescence imaging by exciting the tryptophan. Laser source for this system was an optical parametric oscillator (OPO) and it made near 570 nm femtosecond pulse laser. It had 200fs pulse width and 1.72 nm bandwidth, so that the achievable depth resolution was 2.41um and field of view (FOV) is 10.8um. From the characterization, our system has 3.0 um depth resolution and 12.3 um FOV. We visualized fixed leukocyte cell sample and compared with point scanning system.

Key Words: Two-photon microscope(이광자 현미경), Auto-fluorescence(자가 형광), Tryptophan(트립토판), Leukocyte(백혈구), Temporal focusing(시간적 집중)

기호설명

N A : 개구수(Numerical Aperture)
λ : 파장(Wave length)
M : 배율(Magnification)
n : 굴절률(Refractive index)
α : 격자의 각도(Angle of grating)
c : 빛의 속도(Speed of light)
τ : 펄스 폭(Pulse Width)

1. 서 론

이광자 현미경은 이광자 여기를 바탕으로 한 3차원 구조 촬영이 가능한 형광현미경이다. 이광자 현미경은 촬영 투과 깊이가 크게 향상되었고, 이를 이용하여 다양한 생물학 및 면역학 연구에 적용되었다. 뉴런의 활동과 구조에 관한 경구[1], 장에서의 면역세포의 거동연구[2]가 진행되어왔다. 나아가 in vivo 연구를 위해선 고속 촬영 기술이 필요하여 기존의 포인트 스캐닝 방식은 세포의 거동을 촬영하기엔 스캔 속도가 느려 그 한계점이 있다.

형광 현미경의 촬영 속도를 증가시키는 방법으로는 기존에 개발되었던 고속 스캐너 기반의 이광자 현미경, 다초점 기반 이광자 현미경(multi-focal multi-photon microscopy)방법[3] 이외에 세포의 동역학적 연구를 위해서 비디오 속도의 다각형 미러(polygonal mirror)를 이용한 고속 이광자 현미경, 스피닝 디스크(spinning disk)를 이용한 고속 이광자 현미경, 공진 스캐너(resonant scanner)를 이용한 고속 이광자 현미경과 동시공간적 집중(simultaneous spatial and temporal focusing, SSTF)을 이용한 라인스캐닝 이광자 현미경[4]이 개발되었다. 라인스캐닝 이광자 현미경의 경우에는 펨토초 레이저의 펄스 폭을 조절하는 방법인 시간적 집중(temporal focusing) 방법

† 학생회원, 포항공과대학교 기계공학과
E-mail: junholee@postech.ac.kr
* 포항공과대학교 기계공학과
** 포항공과대학교 융합생명공학부

을 이용한 것으로 1차원 스캐닝만을 이용한다. 따라서, 스캐너의 부피가 줄어들어 시스템의 소형화가 기대된다.

세포 내 구성물질 중에서는 자가 형광을 발현하는 물질들이 있다. NAD(P)H, Riboflavin 등과 제 2고조파 발생(Second Harmonic Generation, SHG)을 할 수 있는 콜라겐(collagen) 등이 있는데, 이들을 통틀어 고유형광체(intrinsic fluorophore)라 한다. 이 것들을 이용하면 외부형광표지자(exogenous marker)없이 세포촬영(cell imaging) 및 조직촬영(tissue imaging)이 가능하나 이들 고유형광체는 흡수도가 외부형광체에 비해 매우 낮아서 촬영시간이 매우 오래 걸린다.[5,6] 하지만 고유 형광체 중 단백질을 구성하는 아미노산(amino acid)들 중 하나인 트립토판(tryptophan)은 흡수도가 다른 고유형광체에 비해 매우 높다.[7] 하지만 트립토판의 효과적인 형광발현을 위해서는 심 자외선(deep-ultraviolet, deep UV, 280nm)영역의 여기 파장(excitation wavelength)이 필요한데, 이는 기존의 Ti:Sapphire 레이저로는 여기가 어렵다는 문제가 있다. 또 문제가 되는 것은 UV영역을 사용하는 자외선현미경(UV microscope)은 세포에 광 손상(photo-damage)을 일으킨다는 점이고, 자외선파장은 일반적인 광학요소에서 투과도가 낮기 때문에 자외선파장이 가능한 석영(quartz)을 기반으로 하는 특수한 광학요소(optical element)들을 필요하다는 점이다.

이 논문에서는 자가형광 기반 이광자 현미경의 촬영 속도를 증가시키는 방법의 한가지인 시공간적 집중을 이용한 라인스캐닝 이광자 현미경을 개발함을 보인다. 그리고 일반적인 이광자 현미경은 외부형광체를 세포에 붙여서 거동을 살펴보기 때문에 형광체가 실제 조직의 환경에 어떠한 영향을 줄지 밝혀지지 않았다. 그래서 여기서는 광파라메트릭 발진기(Optical parametric oscillator, OPO)를 이용한 572nm 펨토초 펄스 레이저를 이용하여 외부형광체를 사용하지 않고 세포촬영이 가능함을 보여 준다.

시스템의 검증이 끝난 후 고정된 세포를 이용하여 외부형광체를 사용하지 않고 트립토판의 자가형광만을 이용하여 세포촬영이 가능함을 보여 시공간적 집중을 이용한 라인스캐닝 이광자 현미경 시스템이 572nm 펨토초 펄스 레이저로 작동이 가능함을 보인다.

2. 시스템 구성 및 성능

2.1 시스템 구성

라인스캐닝 이광자 현미경은 시공간적인 집중을 기반으로 형광체의 비선형적인 이광자 여기를 일으키는 원리를 이용하는 3차원 영상 기술이다. 비선형 과정에 있어서 가장 중요한 점은 이광자 여기 형광의 효율은 펄스 폭에 반비례한다. 그러므로 회절 격자를 이용하여 다 방향에서 넓은 펄스 폭을 가지고 진행을 하게하면 제한된 한 공간에서 가장 짧은 펄스 폭을 가지게 할 수 있다.

Dan Oron[8]에 의해 개발된 라인스캐닝 이광자 현미경을 토대도 라인스캐닝 이광자 현미경을 개발하였다. 라인스캐닝을 위해서 구형렌즈와 검류계 스캐너를 이용하였고, 형광신호의 탐지를 위해서 EMCCD를 감지기로 사용하였다.

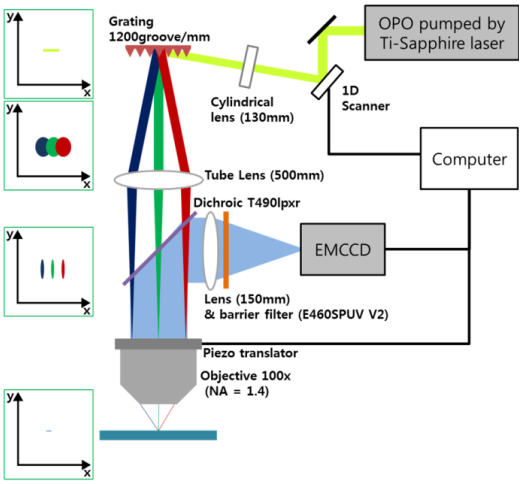

Fig. 1. Schematic diagram of two photon line scanning microscopy

Fig.1는 570nm 펨토초 레이저를 이용한 라인스캐닝 이광자 현미경의 도식도를 나타낸다. 이광자 여기는 여진광의 파워의 제곱에 비례하므로 순간적으로 높은 에너지를 필요로 한다. 높은 세기의 출력을 내기 위해서 140fs의 펄스 폭과 80MHz의 반복률을 가지는 Ti:Sapphire 레이저(Chameleon II, Coherent)를 사용하였다. Ti:Sapphire 레이저를 펌핑 소스로 활용하여 OPO를 구동하였고, 펄스 폭이 200fs이며 파장이 572nm인 여진광을 만들어 냈다. 레이저 파워를 조절하기 위해 반파장 판과 편광자를 이용하였다. Ti:Sapphire 레이저는 선형 편광 성질을 가지고 있어 반파장판을 이용하여 선형 각을 바꾼 뒤 편광자를 이용해서 S편광성분은 반사시키고 남은 P편광성분만을 통과시키는 원리고 파워를 조절하였다. 파워가 조절된 여진광은 검류계 스캐너(galvanometric scanner, 6215H, Cambridge Technology)통해서 y축 방향으로 스캔 된다.

검류계 스캐너의 스캔속도와 범위는 PCI-board(NI-6731, National Instrument)를 통해서 Labview 2011프로그램으로 제어된다. 스캐너를 지난 레이저는 초점거리가 130mm인 구형렌즈를 통과한 뒤 회절격자(Reflective Ruled Diffraction Grating, 1200groove/mm, 500nm, edumund optics)에 초점이 맞추어진다. 회절격자에서 여진광은 회절이 되어 펄스 폭이 넓어지게 된다. 튜브 렌즈는 초점거리가 500mm인 렌즈(NIR Achromatic lens, Thorlabs)를 사용하였다. 튜브 렌즈를 지나게 된 여진광은 680nm 하이 패스 이색성 거울(high pass dichroic mirror, T680dclpxr, chroma)을 투과하여 대물렌즈로 입사한다. 오일 담금 대물렌즈(oil immersion objective, 100x,NA=1.4, Olympus)를 사용하였다. 대물렌즈의 후개구에서 회절 된 각각의 레이저가 라인으로 지나간 후 초점평면에서 라인으로 나타난다. 샘플에서 발생한 형광은 대물렌즈를 되돌아 간 뒤 롱패스 이색성 거울 (high pass dichroic mirror, T490lpxr, chroma) 에 의해서 탐지기영역으로 반사된다. 형광신호는 초점거리가 150mm인 가시광선 색지움 렌즈(VIS Achromatic lens, Thorlabs)와 460nm barrier filter(E460SPUV V2, chroma)를 지나서 EMCCD(iXon+ 885, ANDOR) 로 감지된다. 사용된 EMCCD는 530nm에서 양자효율이 95%로 형광신호를 감지하기에 충분한 성능을 가진다. 3차원 영상 촬영을 위해서 대물렌즈에는 피에조 스테이지(piezo stage, P725, PI)가 달려있어 Labview 프로그램을 이용하여 깊이 방향으로 제어할 수 있다.

2.2 시스템 성능 측정

개발된 시스템의 형광신호의 세기 비교하기 위해서 기존의 포인트 스캐닝 이광자 현미경과 라인 스캐닝 이광자 현미경으로 5000㎛M L-tryptophan solution을 촬영하였다. Fig.2는 각각의 현미경으로 촬영한 결과를 나타낸다.

각 시스템의 시계(Field of View, FOV)비교는10㎛ 마이크로스피어를 촬영한 자료와 L-tryptophan을 촬영한 자료를 이용하여 구했으며, 포인트스캐닝 이광자 현미경의 경우 39.4㎛이상의 시계를 가질 수 있는 반면 라인스캐닝 이광자 현미경의 경우 12.3㎛의 시계를 가지게 되었다. 사용된 에너지를 살펴보면 라인스캐닝 이광자 현미경에서는 3797.0㎛J/㎛2 포인트스캐닝 이광자 현미경에서는 465.8㎛J/㎛2의 에너지를 사용하여 라인스캐닝에 8배정도 많이 사용한 결과가 구해졌다. 이는 EMCCD의 효율이 4배가량 감소한 부분과 펄스 폭이 200fs으로 늘어남에 다라서 이광자 여기가 효과적으로 일어나지 못했기 때문으로 보인다. Signal to background ratio (SBR)에 있어서는 비슷한 값으로 구해졌는데, 형광신호의 평균값은 153.06으로 충분히 감지되는 것으로 판단할 수 있다.

Field Of View	39.4 X 39.4㎛	12.3 X 18.2㎛
Power at sample	220mW	170mW
Frame rate	3.28s/frame	5s/frame
Energy/Area	465.8 ㎛J/㎛²	3797.0 ㎛J/㎛²
Average intensity	77.59	153.06
Noise	1	55.8

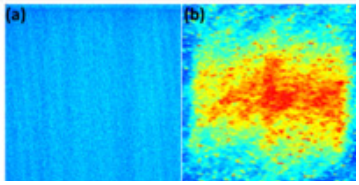

Fig. 2. L-tryptophan solution imaging. by (a) Point scanning, (b) Line scanning

Table. 1. Axial resolution comparison of Point scanning and Line scanning

	Theoretical axial resolution	Experimental axial resolution
Point scanning	0.74㎛	<2.0㎛
Line scanning	2.41㎛	3.0㎛

각 시스템의 이론적인 해상도는 Point Spread Function의 반치전폭 (Full Width Half Maximum, FWHM)을 통해서 구할 수 있으며, 이론 식은 다음과 같이 Gaub 근사에 의해서 유도되었다. 따라서 Axial과 Lateral 해상도는 식 (1), (2), (3)를 통해 이론 값을 얻을 수 있다.

$$FWHM_{lateral} = \frac{2\times 0.337\lambda}{NA}, NA < 0.7 \qquad 식(1)$$

$$FWHM_{lateral} = \frac{2\times 0.383\lambda}{NA^{0.91}}, NA \geq 0.7 \qquad 식(2)$$

$$FWHM_{axial} = \frac{2\times 0.626\lambda}{n-\sqrt{n^2-NA^2}} \qquad 식(3)$$

각 시스템의 실험적인 해상도 값을 구하기 위해서 아가로스 젤에 2㎛ 청색 마이크로스피어를 심어서 포인트스캐닝 이광자 현미경과 라인스캐닝 이광자 현미경으로 촬영하였다. Fig.3은 2㎛ 청색 마이크로스피어를 깊이 방향

으로 0.132㎛ 단위로 촬영하여 깊이 방향으로의 세기 분포를 나타낸 것이다. 포인트 스캐닝 방식과 라인스캐닝 방식의 이광자 현미경의 시스템의 이론적인 깊이 방향 해상도 값과 실험적인 깊이 방향 해상도 값은 Table.1에 나타나있다.

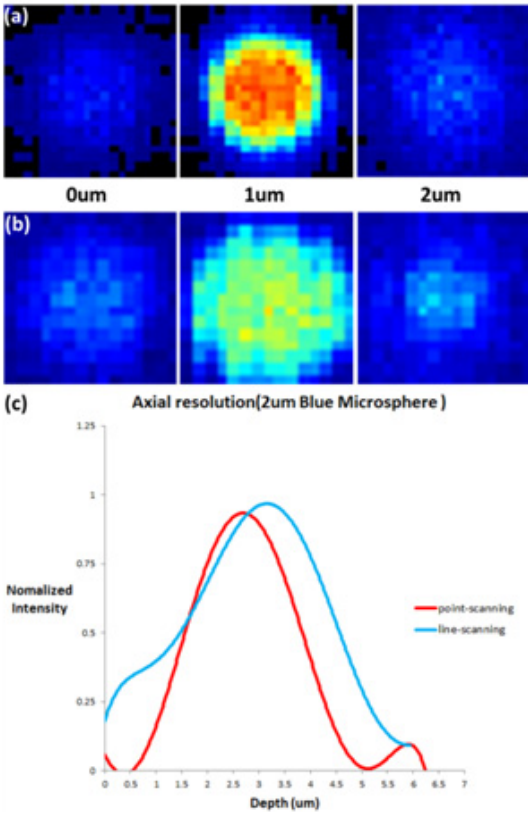

Fig. 3. 2㎛ blue microsphere imaging
(a): Point scanning, (b): Line scanning,
(c): depth distribution of fluorescence intensity

포인트 스캐닝 이광자 현미경으로 촬영한 2㎛ 청색 마이크로스피어의 깊이 방향에 대한 FWHM을 구해보면 2.1㎛로 오차가 5% 이내에 있다고 볼 수 있다. 라인스캐닝 이광자 현미경으로 촬영한 2㎛ 청색 마이크로스피어의 FWHM을 구해보면 3㎛로 실제 마이크로스피어의 크기와 50%정도의 오차가 발생하였으나, 앞에서 제시한 FWHM 식에서 구한 이론 값은 2.41㎛으로 실험값과는 24.5%의 오차가 발생했음을 알 수 있다

3. 백혈구 촬영

앞서 개발된 시공간적 집중을 이용한 라인스캐닝 이광자 현미경을 이용하여 고정된 백혈구(fixed leukocyte)를 촬영하였다. 얻어진 이미지의 해상도 차이를 직접적으로 비교하기 위해서 포인트스캐닝 이광자 현미경과 실험결과를 비교하였다.

백혈구를 촬영한 결과는 Fig.4에 나타나있다. 라인스캐닝 이광자 현미경으로 촬영한 영상은 포인트스캐닝 이광자 현미경으로 촬영한 영상에 비해서 흐릿하게 나타나 백혈구 내부의 구조를 상세하게 구분할 수 는 없다. 이는 평면 방향 해상도가 나쁘기 때문에 일어난 현상으로 생각이 되며, 면적당 소모된 에너지를 살펴보면 대략 7배 정도의 차이가 나는데 앞서 L-tryptophan용액을 촬영할 때 소모된 에너지 차이와 유사하다. 하지만 촬영속도에 있어서는 라인 스캐닝 방식이 2.6배정도 빠른 속도를 가질 수 있었고, 얻어지는 신호의 세기를 볼 때 더 빠른 속도의 촬영이 가능함을 보였다.

Field Of View	39.4 X 39.4μm	12.3 X 18.2μm
Power at sample	34mW	170mW
Frame rate	2.62s/frame	1s/frame
Energy/Area	57.4 μJ/μm²	350.73 μJ/μm²

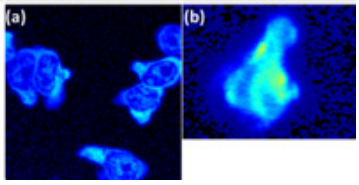

Fig. 4. Fixed leukocyte cell image. (a): Point scanning, (b): Line scanning

4. 결 론

자가형광 이미징을 위한 시스템으로 시공간적인 집중을 이용한 라인 스캐닝 이광자 현미경을 개발하였다. 572nm 펨토초 레이저 기반의 라인 스캐닝 이광자 현미경에서는 깊이 방향 해상도가 3㎛로 구해졌다. 이는 이론적인 해상도와 비교해볼 때 25%이내의 오차를 가지는 값이나 포인트 스캐닝 이광자 현미경의 해상도에 비해서는 2~3배정도 떨어지는 해상도가 된다. 그리고 고정 된 백혈구를 촬영을 한 결과 포인트스캐닝 이광자 현미경에 비해

서 흐릿한 영상을 얻을 수 있었는데 이를 통해서 평면 방향 해상도도 떨어지는 것으로 볼 수 있다. 이와 같은 현상이 발생한 가장 큰 이유로는 사용하는 레이저의 펄스 폭에 의한 것이다. OPO를 이용함에 따라서 레이저의 펄스 폭은 200fs이상이 되었는데 이는 시간적 집중에 의한 깊이 해상도를 구하는 식(4)을 통해서 볼 때 해상도에 나쁜 영향을 주게 된다.

$$\frac{\iota\tau}{\sin\alpha} \approx \frac{M\lambda}{2NA} \qquad \text{식(4)}$$

깊이 방향의 해상도를 향상시키기 위해선 펄스레이저의 펄스 폭을 압축을 하여야 되는데, 그 방법은은 1982년에 소개된 프리즘을 이용한 펄스 압축(prismatic pulse compression)에 관한 이론으로 기반으로 단일 프리즘(single-prism)을 이용한 방법을 시작으로 다중 프리즘(multiple-prism)을 이용한 방법이 소개되었다. 이는 이광자 현미경을 이용한 깊은 조직 이미징(deep tissue imaging)에 널리 이용되고 있다. 이를 활용하면 펄스 폭을 줄일 수 있을 것이고 해상도 역시 향상시킬 수 있을 것이라 기대된다. 그리고 좁은 시계를 넓히는 데에 도움이 될 것이라 기대되며, 이와 더불어 사용되는 레이저의 직경을 회절격자의 각도에 맞춰서 최적화시키면 더 넓은 시계를 가질 것이다.

OPO를 이용하여 572nm 펨토초 펄스 레이저를 얻을 수 있으나 사용할 수 있는 최대출력은 650mW로 제한이 된다. 그리고 사용되는 회절격자에 의해서 에너지 효율이 30%가량 손실이 되며, 실험에 사용한 EMCCD는 가시광선 영역에 대해서 95%의 효율을 가지지만 자외선 영역에 대해서는 25%의 효율만을 가진다. 이런 요소들은 라인 스캐닝 이광자 현미경의 이미징 속도를 제한하는 요소가 된다. 고정 된 백혈구를 촬영하는 속도에 있어서 라인스캐닝 이광자 현미경은 포인트스캐닝 이광자 현미경에 비해서 2.6배가량 빠른 이미징 속도를 가지고 있는데 더 효율이 좋은 회절격자를 사용하고 자외선 영역에 적합한 EMCCD를 사용하여 시스템을 최적화시키면 고속의 이미징 시스템으로써 성능의 향상이 가능할 것이라 기대된다.

앞선 문제점들을 보완하게 된다면 자가형광을 이용한 고속 이광자 시스템으로 활용이 가능할 것이라 생각되며 면역세포의 동역학적인 거동에 관한 연구를 하는데 있어서 적합한 시스템으로 활용할 수 있을 것이다.

후 기

본 연구는 한국과학재단 (national research foundation)의 개인핵심 연구과제 (2010-002801)의 지원을 받아서 수행되었습니다.

참고문헌

1) W. Denk, 1994, “Anatomical and functional imaging of neurons using 2 photon laser microscopy,” J. Neuroscience Methods, 54, pp.161-162
2) Miller, 2004, “Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes,” J. Exp. Med., Vol.200(7), pp. 847-856
3) JorgBewersdorf, 2005, “Multifocal multi photon microscopy,” PMC, 29, pp.550-559
4) Guanghao Zhu, 2005, “Simultaneous spatial and temporal focusing of femtosecond pulses,” Optics Express, Vol.13(6), pp.2153-2159
5) W. R. Zipfel, 2003, “Live tissue intrinsic emission microscopy using multi-photon intrinsic fluorescence and second harmonic generation,” Proc. Natl. Acad. Sci. 100, pp.7075-7080
6) W. R. Zipfel, 2003, “Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences,” Nature Biotech., Vol. 21, 2003, pp.1369-1377
7) Chunqiang Li, 2010 ,”Imaging leukocyte trafficking in vivo with two-photon-excited endogenous tryptophan fluorescence,” Optics Express, Vol.18 (2), pp.988-999
8) Dan Oron, 2005, “Improved depth resolution in video-rate line-scanning multiphoton microscopy using temporal focusing,” Optics Letters, Vol.30 (13), pp.1686-1688