

# 시분해 형광 영상 현미경의 이해 및 응용

## Introduction and Applications of Time-Resolved Fluorescence Confocal Microscopy

채원식 | Weon-Sik Chae

Gangneung Center, Korea Basic Science Institute, 7 Jukheongil, Gangneungsi, Gangwon-Do 210-702, Korea

E-mail: wschae@kbsi.re.kr

### 1. 배경

최근 광학현미경(optical microscope) 기술은 발전을 거듭하여 첨단 영상분석 기법을 바탕으로 기초과학에서 응용과학에 이르기까지 다양한 분야에서 활용되고 있다. 기본적으로 공초점 현미경의 성능의 향상과 함께 광학현미경의 이론적 영상분해능 한계를 향상시키는 노력으로 주사 근접장 현미경(near field scanning optical microscope, NSOM), 초고분해능 현미경(superresolution microscope)도 다양한 분야에서 활용도를 넓히고 있다. 앞서 언급된 현미경들은 빛의 투과(transmission), 반사(reflection), 형광(fluorescence) 현상을 이용한다. 이에 비하여 형광 물질은 그 고유의 형광 수명을 갖는데, 수명시간은 형광 분자의 자체 구조 뿐만 아니라 사용하는 용매 및 다른 분자와의 상호작용, 동종 분자와의 충돌 등에 의해서도 변화될 수 있다.

일반적으로 형광 수명이 높은 형광 분자들은 수 나노초 영역에서 형광 수명(lifetime) 시간을 보이는 예가 많다. 최근 개발되는 반도체 양자점 들은 수백 나노초에서 마이크로초까지 형광수명 시간을 보이기도 한다. 이러한 짧은 시간 동안 일어나는 광학 현상을 관찰하고자 이미 100여 년 전부터 일련의 노력이 경주되어져 왔다. Becquerel은 19 세기 중반 만분의 일초의 짧은 시분해 장비를 회전판을 이용하여 제작함으로써 인광물질의 수명을 처음으로 측정할 수 있었다.<sup>1</sup> 이후 시분해 측정은 전기장에 의해 분자배향이 제어되는 Kerr 셀 개발에 이르게 되어 이미 80여 년 전에 수 나노 초에 이르는 형광 수명 시간을 높은 정확도로 측정할 수 있게 되었다.<sup>2</sup>

현재에 이르러 시분해 형광 수명은 수 피코(pico, 일초분의 일)초 분해능 수준에서 시간 영역(time-domain) 또는 주파수 영역(frequency-domain) 측정 방식으로 측정되고 있다. 시간 영역에서 형광 수명 측정은 극초단의 레이저 펄스를 광원으로 조사하여 암실에서 화합물을 들뜨게 한 후 발현되는 형광을 시간-상관 단광자 계수(time-correlated single photon counting, TCSPC)기 또는 스트릭 카메라(streak camera)를 이용하여 검출하는 방법이다. 형광 수명에 대한 정보는 시간에 대한 광자의 세기 함수로부터 얻을 수 있는데, 지수함수(exponential function)로 얻게 되는 형광 감쇠 곡선(decay curve)을 적절한 이론적 모델을 이용한 최적화(fitting) 과정을 통하여 형광 수명을 얻을 수 있다. 이에 반해 위상변조방식에 기반하는 주파수 영역 검출법은 펄스 또는 정류상태 레이저 광을 시료에 조사 시 발현되는 형광의 수명으로부터 기인하는 신호의 상 변조(phase modulation)정보로부터 형광수명을 얻게 된다.<sup>3</sup>

Author



채원식

2003.8 연세대학교 화학과 (박사)  
2005.5-2007.12 University of Illinois at Urbana-Champaign (박사후연구원)  
2007.12-현재 한국기초과학지원연구원 선임연구원  
2010.3-2013. 2 강릉원주대학교 화학신소재학과 겸임부교수

형광체 화합물의 형광 수명은 들뜬 전자의 방사(radiative) 및 비방사(non-radiative) 전이과정에 의해 모두 영향을 받게 된다. 방사전이는 형광체 자체의 분자구조 및 기능기에 따라 원칙적으로 결정된다. 비방사 전이는 형광체-형광체 상호작용, 형광체-용매 상호작용, 에너지 전이(energy transfer) 등에 의해서 민감하게 변화하는 특성 때문에 형광체 물질의 상태 및 분자환경을 측정하는데 매우 유용한 도구가 될 수 있다.

이러한 형광 수명 측정 기술은 최근 시간 영역 또는 주파수 영역 측정 방식을 그대로 광학현미경 기술에 적용하여 시간 분할 뿐만 아니라 공간을 동시에 분해하여 분석할 수 있는 시분해 형광 공초점 현미경(time-resolved fluorescence confocal microscopy)으로 개발되었다. 기존에는 벌크(bulk) 용액 또는 고체 시료를 측정하기 때문에, 얻게 되는 형광 수명 값은 수 많은 분자에 대한 앙상블(ensemble) 값으로 표현되나, 광학현미경 기술과의 접목으로 단분자 수준의 정보나

특정한 관심 영역(region of interest, ROI)에 대하여 선택적으로 형광 수명 값을 얻을 수 있게 되었다.<sup>4</sup>

이는 형광 수명 측정한계를 단분자 수준에서 측정이 가능함으로 개개의 분자가 겪는 상태 또는 환경을 높은 정밀도로 측정을 할 수 있음을 의미하기 때문에 최근 급격히 발전하고 있는 나노-바이오 융합기술 분야와 더불어 수요가 크게 증가하고 있다. 특히, 시분해 형광 공초점 현미경 기술은 생명과학 분야에서 처음 활용되었는데, 세포 또는 종양을 영상화하기 위한 용도로 활용되거나 비율척도형 영상(ratiometric imaging)이 어려운 공명 에너지 전이(resonance energy transfer)형 세포의 영상화 연구에서 우수성을 입증하기 시작하였다.

형광 수명 영상분석 기술은 1980년대 후반에 시간영역 측정법에 의한 영상기술이 일련의 연구자들에 의해 개발되었고,<sup>5</sup> 1990년대 초 주파수 영역에서 위상변조 방식으로 영상화하는 기술이 Lakowicz 교수 그룹에 의해 개발되었다.<sup>6</sup> 1990년대 이후, 관련 영상화 기술은 점진적으로 발전해오다가 2000년대에 이르러 관련 장비의 상용화와 함께 관련 논문 수가 크게 증가하는 추세를 보이고 있다(그림 1). 앞에서 언급한 바와 같이 초기 연구들은 생명과학분야에서 주로 성과를 보였으나, 최근에는 화학, 물리, 재료, 의료, 기계, 전자 등 산·학·연의 다양한 분야에서 활용도가 높아지고 있는 추세이다. 이에 반하여 국내 관련 연구는 초기 단계이지만, 다행히 한국기초과학지원연구원(이하 기초연) 강릉센터(강릉원주대학교 내 소재)에 시분해 형광 공초점 현미경이 2010년 구축되면서, 현재 국내 여러 연구자들이 활발하게 연구에 활용하고 있다(그림 2).

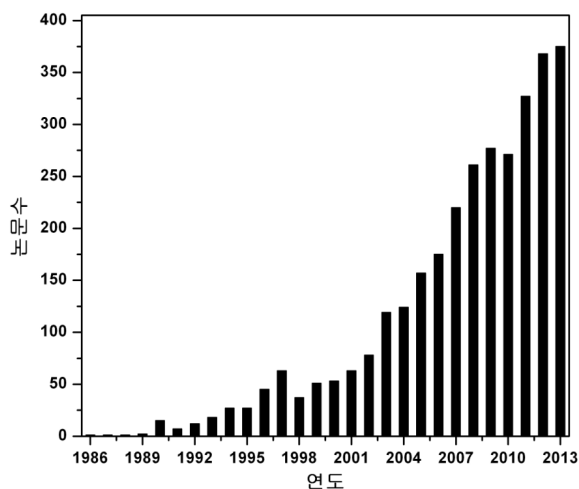


그림 1. 시분해 형광 영상 또는 형광 수명 영상을 키워드로 검색한 출판 논문 수 추이(Scopus 검색).



그림 2. 한국기초과학지원연구원 강릉센터에 설치된 시분해 형광 공초점 현미경 사진.

## 2. 원리 및 성능

최근 개발되고 있는 시간 영역 시분해 형광 영상 현미경은 TCSPC 기법의 장점을 적극 활용하고 있다. 현미경에서 특정 시료를 공간상에서 빠른 속도로 영상화하기 위해서는 고속의 광자 검출 시스템이 필요한데, 현재 적용되는 TCSPC 시스템은 단위 초당 수 백만번의 높은 광자 계수율로 인하여 형광 양자수율이 높은 시료의 경우 형광 감쇠곡선 하나를 얻는데 1 밀리초 정도면 가능하다. 일례로 총 일만 픽셀(100×100 픽셀)로 구성된 영상을 하나 얻는데 10초면 충분하다는 계산이 나온다. 여기(excitation) 광원으로는 극초단의 Ti-Sapphire 펄스(femto, 천조분의 일)초 펄스 레이저를 사용할 수도 있지만 비교적 고가이며, 광섬유 레이저의 적용도 가능하다. 비교적 사용이 간편한 다이오드 펄스 레이저는 독일 PicoQuant 사에서 개발되어 판매되고 있는데, 최근에는 375에서 2,000 나노미터 영역에서 광원으로 사용할 수 있고 최소 50 피코초의 비교적 짧은 펄스폭과 1~20 밀리와트의 평균 출력을 갖는 다이오드 레이저(LDH 시리즈)가 공급되고

있다. 이들 펄스 레이저는 레이저 드라이브(PDL 시리즈)로 매우 간편하게 펄스 반복률 조절이 가능하다. 이외에도 LED 광원도 245에서 600 나노미터 영역에서 최소 500 피코초 펄스를 발현하는 여기 레이저 광원으로 사용할 수 있다. 또한 아주 최근에 초연속(supercontinuum) 레이저 광원이 개발되어 480에서 700 나노미터 영역에서 파장 조절이 가능하고 최소 90 피코초 펄스폭의 광원을 제공한다. 장비의 시간분해능은 앞에서 언급한 레이저 광원의 펄스폭 뿐만 아니라 검출기의 응답시간(response time)에 의해서도 결정된다. Hamamatsu 사의 R3809U-50 MCP-PMT는 25 피코초의 기기감응함수(instrumental response function, IRF)를 보이며, PicoQuant 사의 LDH 시리즈 다이오드 레이저 광원과 단광자 애벌란치 다이오드(single photon avalanche diode, SPAD) 광 검출기를 동시에 사용할 때, 50~200 피코초 펄스폭의 비교적 빠른 IRF 를 안정적으로 얻을 수 있다. 또한 SPAD 광검출기는 가시광선 영역에서 높은 광검출 효율(49~70%)로 시분해형광 영상 분석 이외에 단분자 분광학(single molecule spectroscopy)이나 형광상관분광학(fluorescence correlation spectroscopy, FCS)에도 활용될 수 있다.

현재 기초연 강릉센터에 설치된 시분해 형광 영상현미경은 TCSPC 기법을 기반으로 하여 시간영역에서 형광 수명을 측정하는 장비이다. 영상분석은 여기광으로 펄스 레이저를 이용하여 시료를 들뜨게 한 후 시공간 분해 분광기에서 기본적으로 고유한 형광의 검출시간( $t$ )을 결정하고, 검출 지점( $x, y$  또는  $z$ )에 대한 정보, 그리고 서로 상이한 파장의 광자 검출을 위한 채널 수( $n$ )와 같은 많은 정보들이 동시에 처리된다.<sup>4</sup> 이와 같은 시간과 공간, 에너지에 대한 실시간 다차원 영상분석은 고속 컴퓨터 프로세스와 대용량 저장매체의 성능에 힘입어 고속 신호처리가 가능하게 되었다. 보통 형광수명 영상은 픽셀로 구성되는데, 단일 요소(single component)의 형광 수명( $F(t) = A \cdot \exp(-t/\tau)$ ) 분석에는 픽셀당 최소 185 개의 광자가 필요한데 반하여, 두 개 이상의 형광수명으로 구성된 형광 감쇠곡선( $F(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot \exp(-t/\tau_i), i \geq 2$ )의 지수분석을 위해서는 최소 만개 이상의 광자가 필요하다.<sup>7</sup> TCSPC 장비들은 원리적으로 초당 수 백만번의 광자 계수가 가능하므로 이러한 빠른 형광 수명 영상분석이 가능하게 된다.

TCSPC 기법으로 광 검출 시, 레이저 펄스 반복률 보다 매우 적은 계수율(수 % 이하)을 전제로 하는데, 이것은 한번에 다수의 광자가 광검출기에서 동시에 처리될 때 TCSPC 기법의 원리상 형광 감쇠곡선을 빠른 쪽으로 휘게하는 광자의 '누적(pile-up)' 효과를 불러와 궁극적으로 측정되는 형광 감쇠곡선이 고유한 값으로부터 빠르게 왜곡되어 관찰된다.<sup>8</sup> 보통 사용하는 여기 레이저의 반복률이 수 십 MHz 이상으로 매우 빠르고, 계수율이 여기 레이저의 펄스 반복률의 최대

5%를 넘지 않으면 이 광자 누적 효과는 측정되는 형광수명 값에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 보고되고 있다. 즉, 40 MHz 펄스 레이저 사용 시 2 MHz 이하의 광자 계수율(counting rate)을 유지하면 누적 효과를 최소화 할 수 있다. 이에 반해 주파수 영역 측정방식에 근거하는 형광 수명 영상장비는, 여기 레이저 광에 대비한 형광의 상 변조 차이로부터 형광수명을 측정하기 때문에 영상분석에 대한 속도 측면에서 10 배 이상 빠른 장점이 있다.

현재까지 상용화되고 있는 시분해 형광 영상장비는 독일 PicoQuant 사, Becker & Hickl 사에서 시간 영역 측정 방식에 기반을 둔 장비를 개발하였고, 미국 ISS사, 네덜란드 Lambert Instruments사에서 주파수 영역 측정 방식에 기반을 두어 영상장비를 개발하고 있다. 일례로 PicoQuant 사에서 개발한 시간 영역 방식에 의한 형광수명 영상장비는 기존의 Leica, Olympus, Nikon, Carl Zeiss 등 광학현미경 전문 제조업체들에서 보유중인 기존의 광학현미경 기술과 호환성이 뛰어나 융합 공초점 현미경 형태로도 개발되고 있다.

### 3. 응용 분야

그림 3은 기초연 강릉센터에 설치된 영상장비를 이용하여 얻은 몇 가지의 형광 수명 영상분석 결과이다. 그림 3a는 형광염료로 처리된 데이지 홀씨에 대한 형광수명 영상분석 이미지이다. 왼쪽에 비교된 일반 공초점 현미경 영상과 비교하여 추가적인 정보(형광 수명)가 나타나고 공간상에서 상이한 수명분포로 구성되고 있음을 확연히 알 수 있다. 그림 3b는

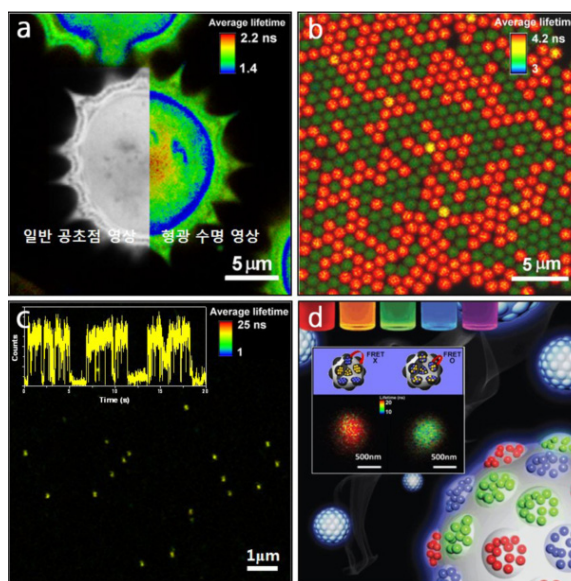


그림 3. 대표적인 시분해 형광 수명 영상 분석 결과: (a) 데이지 홀씨(daisy pollen)의 형광 수명 영상(일반 공초점 현미경 영상과 비교), (b) 두 가지 상이한 형광체로 각각 처리된 콜로이드 입자 자기조립체, (c) 단일 반도체 양자점 입자 영상 및 시간에 따른 형광세기 추세 분석(삽입 그림), (d) 블록 공중합체 기반 반도체 나노입자간 공명에너지전이 효율 변화 규명 예.

각각 다른 두 가지의 형광분자로 처리된 폴리스티렌 콜로이드 입자들의 자기조립체를 형광 수명으로 영상화한 예이다. 사용된 형광분자는 3.5 ns와 4.2 ns의 각각 상이한 형광수명 값을 갖는데, 일반 현미경상에서 구분이 어려운 혼합된 콜로이드 입자는 형광수명 값의 차이로 인하여 뚜렷이 구분되는 영상분석이 가능하다. 뿐만 아니라 단일 분자 또는 단일 나노입자에 대한 단분자 분광학 연구도 가능하다. 그림 3c는 스핀코팅 방법으로 분산된 단일 나노입자들에 대한 영상분석 예이다. 일반적으로 단일 나노입자는 에너지 준위, 재결합 경로, 결합, 전하 상태에 기인하여 형광 깜빡거림(blinking) 현상을 보이는데, 이는 삽입 그림에서 나타나는 바와 같이 시간에 대한 형광세기 변화가 디지털 패턴으로 발현되는 것을 알 수 있다. 그림 3d는 블록 공중합체를 이용하여 다른 크기의 반도체 나노입자를 선별적으로 구속하거나 동시에 블렌딩하여 크기가 다른 나노입자간에 생길 수 있는 에너지 전이 효율을 제어할 수 있음을 본 장비를 이용하여 분석한 예이다. 에너지 전이를 동반하는 경우 형광 수명이 빨라짐을 단일 입자 수준에서 직접 규명할 수 있었다.<sup>9</sup>

이외에도 형광 수명영상은 세포영상분석에서 뚜렷한 장점을 갖는다. 세포는 보통 자체 형광을 발현하여 프로브 형광분자의 신호를 선별하는데 어려움이 있는데, 프로브 형광체의 특정 형광수명 값을 이용하면 선별적 영상 처리가 가능하게 된다.<sup>10,11</sup> 최근 개발되는 시분해 형광 영상 장비는 형광체 용액에 대한 형광상관분광학 연구를 형광 수명 측정과 동시에 실시할 수 있다. 또한 고분자 물질의 영 계수(Young's modulus)를 측정하는 데에도 본 장비가 이용될 수 있다.<sup>12</sup> 이외에도 시간 게이트(time-gated) 영상처리, 공명 에너지 전이(FRET) 영상분석, 형광 안정성의 통계처리 등 형광분광 분석 분야에서 다차원(시간, 공간, 에너지 등) 신호 및 영상분석이 가능하다.

#### 4. 전망

시분해 형광 수명 영상현미경은 개발 초기 세포 또는 종양 등 생명과학 분야에서 형광의 정류상태 정보들(세기 또는 형광 스펙트럼 등)을 기반으로 하는 기존의 형광현미경에서 관측이 어려웠던 차별적인 정보를 분석하기 위하여 개발되었다. 이는 관련분야에서 괄목할 만한 뚜렷한 학문적 진보를 보이고 있으며, 최근에는 화학, 소재, 기계, 전자 분야에 이르기 까지 장비의 활용도가 확대되고 있는 추세이다. 시분해 형광 공초점 현미경은 기존의 형광 수명을 영상화하는 장비로 근

래 이슈가 되고 있는 장비의 영상화 추세와도 그 궤적을 같이 한다. 이는 기존의 장비들이 데이터의 해석을 주로 다루는 측면이 있다면, 영상장비들은 데이터를 2차원 또는 3차원 공간상에 도시하여 이미지로 보여주기 때문에 직관적으로 이해가 빠르다는 장점 때문에 최근 기초과학분야 뿐만 아니라 응용과학, 더 나아가 인간의 삶의 질을 윤택하게 하는 다양한 분야에서 활용이 증가하고 있다.

이외에도 적외선 영역에서 특정 분자진동 에너지를 이용하는 진동분광영상 현미경(FT-IRM)이나 원소의 분포를 영상으로 보여주는 질량분석영상(MSI) 장비, 바이오 전자현미경 등은 생명과학 분야에서 점차 활용도가 커지고 있다. 본지에 소개하고 있는 시분해 형광 영상 현미경도 특정한 시료가 갖는 고유한 형광 수명 정보를 공간상에 영상화함으로써 기존의 형광 현미경에서 판별할 수 없었던 분자(나노 및 고분자)간 또는 분자-분자, 분자-매트릭스 상호작용으로부터 기인하는 초고속 분광학에 기반하는 분자영상을 구현함으로써 향후 다양한 분야에서 요구하는 고급 영상분석기술을 제공할 것으로 기대된다.

#### 참고문헌

1. E. Becquerel, *Ann. Chimie Phys.* **3**, 5 (1859).
2. E. Gaviola, *Ann. Phys.* **81**, 681 (1926).
3. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, 2006.
4. W. Becker, A. Bergmann, M. A. Hink, K. König, K. Benndorf, and C. Biskup, *Micro. Res. Tech.* **63**, 58 (2004).
5. T. Oida, Y. Sako, and A. Kusumi, *Biophys. J.*, **64**, 676 (1993).
6. J. R. Lakowicz, H. Szmajda, K. Nowaczyk, and M. L. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1271 (1992).
7. M. Köllner and J. Wolfgram, *Chem. Phys. Lett.*, **200**, 199 (1992).
8. H. C. Gerritsen, M. A. H. Asselbergs, A. V. Agronskaia, and W. G. J. H. M. Van Sark, *J. Microsc.*, **206**, 218 (2002).
9. K. H. Ku, M. P. Kim, K. Paek, J. M. Shin, S. Chung, S. G. Jang, W.-S. Chae, G.-R. Yi, and B. J. Kim, *Small*, **9**, 2667 (2013).
10. M. Y. Berezin, and S. Achilefu, *Chem. Rev.*, **110**, 2641 (2010).
11. Z. Yang, Y. He, J.-H. Lee, N. Park, M. Suh, W.-S. Chae, J. Cao, X. Peng, H. Jung, C. Kang, and J. S., Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 9181 (2013).
12. A.-Y. Jee, S. Park, H. Kwon, and M. Lee, *Chem. Phys. Lett.*, **477**, 112 (2009).