

공초점 레이저 주사현미경을 이용한 다성분 고분자 소재의 구조 분석

Structure Analysis of Multi-Component Polymeric Material Using Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)

김재정 | Jae Jung Kim

Department of Chemical Engineering, Hongik University,
94 Wausan-ro, Mapo-gu, Seoul 04066, Korea
E-mail: jaejungk@hongik.ac.kr

1. 서론

블록공중합체, 생체고분자 등의 자가조립을 통해 형성되는 특징적인 구조에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 자가조립 소재의 구조는 그 기능을 결정하는 중요한 요소이기 때문에, 구조 분석, 고분자 설계, 구조-기능 간의 연관관계 등은 중요한 연구분야로 자리잡고 있다. 공초점 레이저 주사현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM), 중성자 산란, X-선 결정해석, 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM), 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM), 원자력현미경(atomic force microscope, AFM) 등 다양한 분석법이 구조 분석에 활용되고 있다. 각 분석법은 각기 다른 강점과 한계를 갖추고 있기 때문에, 상호 보완적으로 활용될 수 있다.

CLSM은 소재의 형광 시그널을 3차원적으로 시각화하는데 매우 강력한 분석법 중 하나로 사용되어 왔다. CLSM은 비초점면의 형광 시그널을 감소시켜, 초점면에서의 형광 시그널만을 감지하는 방식으로 광시야 형광현미경과 비교하여 높은 해상도를 제공하는 기술이다. CLSM은 타 현미경 기술(*i.e.*, SEM, TEM, AFM)과 비교하였을 때, 다음과 같은 강점을 보유하고 있다:¹ (1) 시간-경과(time-lapse) 이미징을 통해 in situ 동적 과정을 관찰할 수 있다. (2) 다성분 소재를 분석할 때, 선택적인 형광 염색을 통해 각 성분을 구분할 수 있다. (3) 여러 초점면의 이미지를 바탕으로 3차원적 이미지를 재구성할 수 있다. (4) 넓은 범위의 관측 시야를 확보할 수 있다. (5) 액상 샘플을 다룰 때, 동결/건조 준비 과정이 필요하지 않다. 한편, 전자현미경이나 원자력 현미경과 비교하였을 때, 비교적 낮은 x-y 해상도(~ 250 nm)를 가지고 있다는 한계점이 있으나, 최근 초해상도 현미경(super-resolution microscope, SRM)이 개발되어지면서 Abbe의 회절 한계보다 우수한 해상도를 달성할 수 있게 되었다. 다른 제한점으로 분석할 소재가 형광 시그널을 방출해야 한다는 점이 있으나, 이 역시 형광 프로브 디자인 전략의 발전으로 인해 해소할 수 있다. 본 총설에서는 CLSM의 원리, 형광 프로브 디자인 전략의 기본적인 원리에 대해 다루고, 최근 사용되는 대표적인 SRM을 소개하는 것으로 마무리하고자 한다.

Author



김재정

2012 서울대학교 화학생물공학부 (학사)
2017 MIT 화학공학과 (박사)
2017-2021 Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School (Post-Doc.)
2021-현재 홍익대학교 신소재·화공시스템공학부 화학공학전공 조교수

2. 본론

2.1 공초점 레이저 주사현미경(CLSM)의 원리

CLSM의 원리는 Marvin Minsky에 의해 1957년 처음으로 특허 출원되었다.² 기존의 광시야 현미경의 경우, 넓은 영역에 걸쳐 여기(excitation) 빛을 조사하여 나오는 샘플의 형광 시그널을 광검출기가 받아들이기 때문에, 비초점면에서의 시그널이 초점면의 시그널과 함께 겹치게 된다. 반면 CLSM의 경우, 포인트 조명(point illumination)을 통해 한 점에 빛을 조사하여 나오는 형광 시그널을 광검출기 앞의 핀홀을 통과시켜 비초점면의 시그널을 제거한다(그림 1). 이를 통해 초점면의 시그널만을 이미지하기 때문에 기존의 광시야 형광 현미경보다 높은 공간 해상도를 달성할 수 있게 한다. CLSM은 한 점에서의 형광 시그널만을 검출하기 때문에, 같은 초점면에서 넓은 영역의 이미지를 얻기 위해서는 샘플이나 포인트 조명의 위치를 옮겨가며 스캔하는 방식으로 이미지를 얻는다. 또한, 초점면을 이동시킴으로써 여러 z축에서 이미지를 얻어 3차원적 이미지를 재구성할 수 있다.

2.2 형광 프로브 준비

CLSM을 통해 소재의 구조를 분석하기 위해서, 샘플에서 형광을 발하는 영역이 존재해야 한다. 다성분 소재인 경우, 형광을 발하는 부분과 그렇지 않은 부분, 또는 다른 여기 파장을 가지는 영역으로 구분되어야 구조 분석이 가능해진다. 형광을 띄지 않는 샘플을 분석할 경우, 분석하고자 하는 영역을 형광 프로브로 염색하여 CLSM으로 관찰할 수 있다.

이 경우, 형광 프로브의 준비법은 크게 2가지로 구분 가능하다. 이해를 돕기 위해, A와 B의 이성분으로 이루어진 소재라 가정하고, A를 형광 프로브로 염색하고자 하는 상황에 대해 고려해보자. 첫번째 방법은 형광 프로브로 기능화된 A를 사용하는 것이다. 두번째는 A와 형광 프로브 간의 상호작용을

이용하여, 형광 프로브가 A만을 선택적으로 염색하게 한다. 두 전략 모두 형광 프로브는 다음의 사항들을 고려하여 주의 깊게 준비해야 한다.¹ (1) 형광 프로브가 구조 형성과정에서 영향을 끼치지 않아야 한다. 이는 구조를 분석하기에 충분한 형광 세기를 제공하지만, 구조 형성과정에는 영향을 주지 않도록 농도를 조절함으로써 완화할 수 있다. (2) 여러 형광 시그널을 검출할 때, 너무 강한 형광 시그널을 발하게 되면 크로스토크로 인해 잘못된 구조로 오분석할 수 있다. (3) 광 표백으로 인해 구조를 오인할 수 있다. (4) 일부 SRM의 경우, 디콘볼루션(deconvolution) 과정에서 잘못된 정보를 제공할 수 있으므로, 이를 완화하기 위해 적절한 대조 실험이 필요하다.

2.3 초해상도 현미경(SRM)

비초점면의 시그널을 제공하여 높은 공간 해상도를 제공할 수 있는 CLSM의 경우도 근본적인 Abbe의 회절 한계를 극복할 수 없다고 여겨져 왔다. Abbe의 회절 한계 내의 형광단(fluorophore)은 함께 여기 빛을 받아 동시에 형광을 발하고, 같이 회절되어 검출되기 때문에 별도로 검출하는 것이 불가능하다.³ 이에 따라, CLSM의 x-y해상도는 빛의 파장(λ)을 개구수(numerical aperture, NA)의 2배로 나눈 값보다 작아질 수 없으며, 가시광선 영역에서 ~250 nm로 제한된다.

$$resolution = \frac{\lambda}{2 NA}$$

이러한 한계점은 SRM이 개발됨에 따라 극복되었다. 대표적인 SRM에는 구조 조명 현미경(structured illumination microscope, SIM), 자극 방출 감소 현미경(stimulated emission depletion microscope, STED microscope), 단일분자 국소화 현미경(single-molecule localization microscope, SMLM)이 있다. 각 장비들은 다른 원리로 Abbe의 회절 한계를 극복하였으며, 각기 다른 장단점을 가지고 있어 분석할 샘플의 특성에 알맞은 장비의 선택이 필요하다.

2.3.1 SIM

SIM은 주기적으로 반복되는 패턴된 조명을 통한 간섭 현상으로 보다 높은 해상도를 제공한다.⁴ 일반적으로 줄무늬(stripe) 패턴이 사용되며, 패턴 간의 간격은 해상도 한계에 가까운 값을 사용한다(그림 2). 이와 같이 패턴된 조명이 Abbe의 회절 한계 보다 작은 영역 안의 여러 형광단에 도달하면, 큰 스케일의 검출가능한 간섭 패턴(Moiré fringes)가 발생된다. 여러 각도의 패턴된 조명에서부터 얻은 간섭 패턴을 디콘볼루션을 통해 이미지를 재구성한다. SIM은 2배

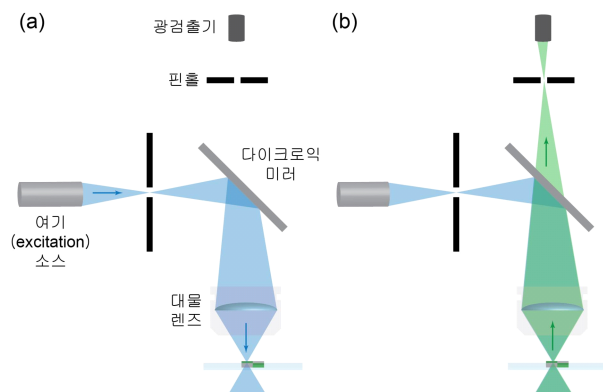


그림 1. CLSM의 측정 원리; (a) 포인트 조명을 통한 여기 빛 조사(파란색), (b) 핀홀을 통한 비초점면의 형광 시그널을 제거 후, 광검출기에 도달하는 초점면의 형광 시그널(초록색).

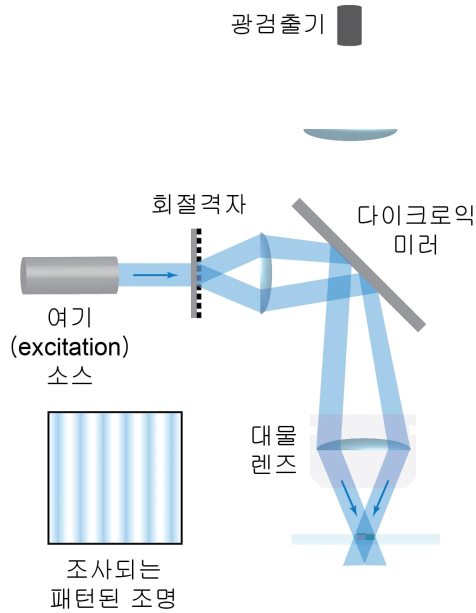


그림 2. 패턴된 조명을 이용하는 SIM의 조사.

향상된 ~120 nm의 x-y 해상도를 달성할 수 있다.⁵ 다른 SRM과 비교하여 비교적 떨어지는 해상도를 제공하지만, 빠른 이미징이 가능하며, 특별한 형광 프로브를 사용할 필요가 없고, 다중 분석이 가능하다는 장점을 갖추고 있다. 다만, 이미지를 재구성할 때, 아티팩트(artifact)를 형성하기 쉽다는 단점을 가지고 있다. 향상된 SIM인 비선형 SIM(nonlinear SIM), 즉각적 SIM(instant SIM)의 경우, x-y 해상도를 50 nm까지 향상시킬 수 있다.^{6,7} 2016년 Manners 그룹에서 PFS₂₈-b-PDMS₅₀₀이 시드로 있을 때, PFS₃₆-b-P2VP₅₀₂와 PFS₂₀이 자가조립 되어 형성되는 혈소판 같은 마이셀을 형광 레이블된 PFS-b-PDMS를 이용해, SIM을 통해 성공적으로 이미징 하였다.⁸

2.3.2 STED

STED는 2개의 정렬된 조명을 사용한다. 하나는 CLSM에서 사용된 것과 같은 여기 소스이며, 다른 하나는 도넛 모양의 감소 레이저(depletion laser)이다.^{9,10} 감소 레이저가 조사된 도넛 부분은 형광 시그널이 방출되지 않게 되어, 중심의 작은 유효 여기 영역이 생성된다(그림 3). 이를 통해 STED는 ~50 nm의 높은 x-y 해상도를 달성할 수 있다.⁵ STED는 SIM과 달리 추가적인 컴퓨터 기반 후처리가 필요하지 않으며, CLSM에 감소 레이저를 추가하여 사용하는 만큼 비교적 쉽게 사용가능한 장비이다. STED에 사용하는 형광단의 경우, 높은 광안정성을 갖추고 있어야 하며, 감소 레이저를 사용할 수 있는 적절한 여기/방출 파장을 가질 경우 가장 효과적이다. 2016년 Hamachi 그룹에서 두가지 다른 펩타이드 타입, 지질 타입의 하이드로젤레이터(hydrogelator)가

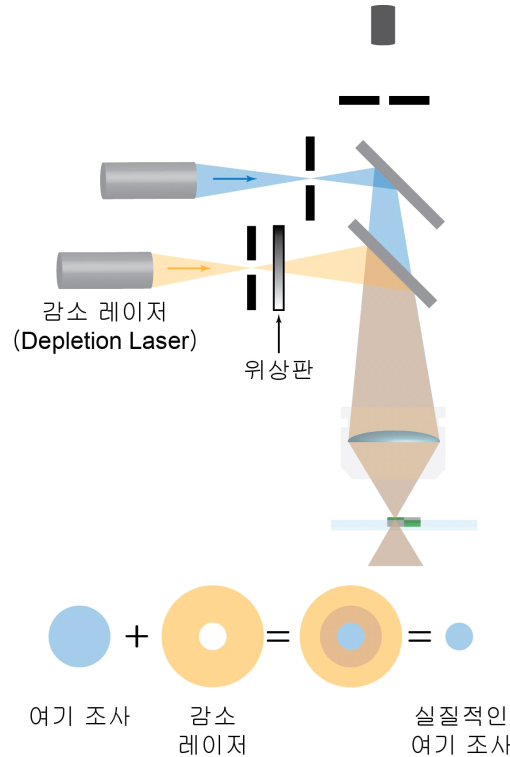


그림 3. 정렬된 여기 조사와 감소 레이저를 이용하는 STED의 조사.

자가조립 하여 형성하는 구조를 STED로 관찰하였다.¹¹ 각 하이드로젤레이터가 다른 형광을 띄게 하여 관찰한 결과, 각기 별도의 나노섬유를 형성해서 겹치지 않는 이중 네트워크 하이드로젤을 형성하는 것을 확인하였다.

2.3.3 SMLM

SMLM은 각 형광단의 위치를 정확히 측정하는 방법으로 높은 해상도를 달성한다.¹² SMLM은 온-오프 상태로 전환되는 광스위칭(photoswitching) 형광단이 필요하다. 이 분자들은 여기 빛이 조사될 때, 대부분 오프 상태로 존재하며, 아주 작은 부분만이 온 상태로 형광을 방출한다. 이로 인해 각 분자의 위치를 특정할 수 있게 된다. 일반적으로 수천에서 수만 프레임의 이미지를 얻고, 후처리 과정에서 모든 프레임을 겹쳐 놓고(super-impose) 평균위치를 계산하여 각 분자의 위치를 특정한다(그림 4). 일반적으로 ~20 nm의 x-y 해상도를 달성할 수 있다.⁵ 다른 SRM과 비교하였을 때, 높은 해상도를 제공하지만, 분단위의 가장 오랜 이미징 시간이 걸린다는 단점이 존재한다. SMLM은 형광단의 온-오프 스위칭을 달성하는 방식에 따라 분류되며, 대표적으로 PALM(photo-activated localization microscope), (d)STORM((direct) stochastic optical reconstruction microscope), PAINT(point accumulation for imaging in nanoscale topography)가 있다. 2014년 Meijer 그룹에서 1,3,5-benzenetricarboxamide(BTA)가 자가조립

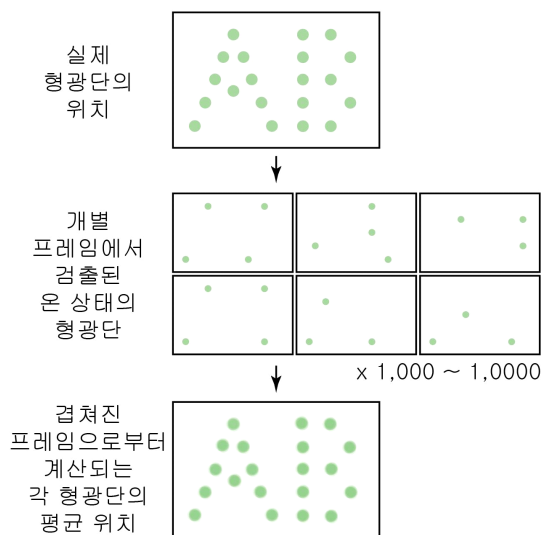


그림 4. SMLM의 측정원리.

되어 형성되는 1차원 나노섬유 구조를 관찰하였다.¹³ 이 연구에서 형광 레이블된 BTA를 이용하여, STORM으로 시간-경과 이미지를 얻어 단량체가 교체되는 것을 확인하였다.

3. 결론

본고에서는 형광 시그널을 감지하여 다성분 소재의 구조 분석을 수행하는 CLSM의 기본원리와 형광 프로브를 준비하는 원칙에 대해 소개하였다. 이 후, Abbe의 회절 한계를 넘어서는 높은 해상도로 형광 시그널을 감지할 수 있는 SRM의 대표적인 예인 SIM, STED, SMLM의 기본원리, 각 기술들의 특징과 분석 사례를 소개하였다. 논의된 각 기술들의 장점과 한계점을 바탕으로 분석할 샘플의 특성에 알맞은

기술을 선택할 수 있을 것이라 기대한다. 본고에서 논의한 기술들은 고분자 및 생체분자의 자가조립 구조를 분석하는 중성자 산란, X-선 결정해석, SEM, TEM, AFM과 상호보완적으로 활용되어 새로운 소재 구조 분석에 핵심적인 역할을 수행할 것으로 전망한다.

참고문헌

1. R. Kubota, W. Tanaka, and I. Hamachi, *Chem. Rev.*, **121**, 14281 (2021).
2. M. Minsky, US Patent 3013467 (1961).
3. E. Abbe, *Arch. Für Mikrosk. Anat.*, **9**, 413 (1873).
4. J. M. Guerra, *Appl. Phys. Lett.*, **66**, 3555 (1995).
5. S. Pujals, N. Feiner-Gracia, P. Delcanale, I. Voets, and L. Albertazzi, *Nat. Rev. Chem.*, **3**, 68 (2019).
6. M. G. Gustafsson, *PNAS*, **102**, 13081 (2005).
7. A. G. York, P. Chandris, D. Dalle Nogare, J. Head, P. Wawrzusin, R. S. Fischer, A. Chitnis, and H. Shroff, *Nat. Methods*, **10**, 1122 (2013).
8. H. Qiu, Y. Gao, C. E. Boott, O. E. Gould, R. L. Harniman, M. J. Miles, S. E. Webb, M. A. Winnik, and I. Mannes, *Science*, **352**, 697 (2016).
9. S. W. Hell and J. Wichmann, *Opt. Lett.*, **19**, 780 (1994).
10. T. A. Klar and S. W. Hell, *Opt. Lett.*, **24**, 954 (1999).
11. S. Onogi, H. Shigemitsu, T. Yoshii, T. Tanida, M. Ikeda, R. Kubota, and I. Hamachi, *Nat. Chem.*, **8**, 743 (2016).
12. E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, and M. W. Davidson, *Science*, **313**, 1642 (2006).
13. L. Albertazzi, D. van der Zwaag, C. M. Leenders, R. Fitzner, R. W. van der Hofstad, and E. Meijer, *Science*, **344**, 491 (2014).