3차원 위상현미경과 그 생물학적 응용

DOI: 10.3938/PhiT.19.026

최 원 식

Field-based 3D Microscopy and Its Biological Applications

Wonshik CHOI

Powerful optical microscopy techniques for probing and imaging biological cells and tissues have been developed. Advances have been made to improve spatial and temporal resolution, chemical and molecular specificities, and depth range of imaging. However, most of these developments have been based on measuring the intensity of light. We have developed phase microscopy techniques for quantifying not only the intensity but also the phase of the light, which we term as a field-based technique in comparison with conventional intensity-based technique. In this letter, I introduce a field-based 3D microscope which can map the distribution of refractive index in live cells and tissues. Experimental results such as tomographic imaging of cells and multicellular organisms will be described together with interesting biological applications such as detecting malaria-infected red blood cells and quantifying the thickness of cholesterol ribbons.

서 론

단백질, DNA 및 지방질(lipids) 등 생체 세포를 구성하는 대부분의 분자들은 빛, 특히 가시광선을 거의 흡수하지 않지만, 그 밀도에 따라서 빛의 속도, 즉 굴절률은 변화시킨다. 마찬가지로 이러한 분자들로 이루어진 생물 세포와 생체조직도

가시광선을 거의 흡수하지는 않지만 세포 소기관들 사이에는 각 구성 분자들의 밀도에 따라서 뚜렷하게 구별되는 굴절률 차이가 존재한다. 따라서 빛이 생체와 상호작용을 통해서 전파할 때 굴절률 분포의 역할이 중요하고, 광학 현미경 기술의 개발에도 그 역할이 매우 중요하다고 하겠다.

좋은 예로 Phase contrast 현미경을 들 수 있는데, 이 현미경은 샘플 내부에서의 굴절률의 구조가 만드는 공간적인 위상의 변화를 빛의 세기의 변화로 바꾸어서 영상의 대비(contrast)를 획기적으로 증가시켰고,^[1] Fritz Zernike는 이 기술의 개발로 1953년에 노벨 물리학상을 받았다. 그러나 기존의 Phase contrast 현미경은 정량적인 빛의 위상의 변화를 측정할 수 없다는 단점을 가지고 있어서 그 생명공학적인 응용성이 제한이 되어왔다. 정량적인 위상의 영상을 위해서 간섭계를 이용한 다양한 방법들이 시도되었고 발표되어 왔는데, 대표적으로 디지털 홀로그래피를 이용하는 방법^[2]과 Phase-shifting 간섭계를 이용하는 방법^[3]들이 있다.

샘플을 통과한 빛의 위상은 굴절률을 투명한 정보를 가지고 있다. 세포와 같이 주변과 굴절률 차이가 크지 않은 얇은 샘플에 대해 평면파를 입사시키면, 굴절률이 큰 부분을 지나는 빛의 파면이 더 많이 느려지게 된다. 투과한 빛의 위상 분포는 그림 1에서 보여주는 바와 같이 샘플의 굴절률을 빛의 진행방향으로 선적분한 것, 즉 굴절률과 두께의 곱으로 결정된다. 위상 현미경 기술들은 측정가능 위상의 민감도가 광경로차 기준으로 파장/1000 정도여서 나노미터 크기의 두께변화를 측정할 수 있고, 또한 세포의 평균 굴절률과 질량을 측정할 수 있다.^[4] 하지만 위상의 변화는 굴절률을 빛의 진행방향으로 모두 더한 것과 비례하기 때문에, 2차원 투영 이미지만 보여줄 뿐 세포의 3차원 구조를 보여주지는 못한다는 단점이 있다.

저자약력

최원식 교수는 서울대학교 물리천문학부에서 원자물리학 전공으로 박사학위를 받았으며(2004), 미국 MIT의 G. R. Harrison Spectroscopy Laboratory에서 박사후 연구원으로(2006-2009) 바이오 이미징 기술, 특히 3차원 위상현미경 기술, 개발 및 응용에 대한 연구를 하였다. 2009년 9월부터 고려대학교 물리학과에서 조교수로 재직 중이며 현재는 생체조직 깊이 이미징할 수 있는 새로운 현미경 기술 개발 연구를 수행하고 있다.
(wonshik@korea.ac.kr)

REFERENCES

- [1] F. Zernike, Physica **9**, 686 (1942).
- [2] B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuhe, Y. Emery, C. Depeursinge and P. Magistretti, Opt. Express **13**, 9361 (2005).
- [3] C. Fang-Yen, S. Oh, Y. Park, W. Choi, S. Song, H. S. Seung, R. R. Dasari and M. S. Feld, Opt. Lett. **32**, 1572 (2007).
- [4] G. Popescu, T. Ikeda, K. Goda, C. A. Best-Popescu, M. Laposata, S. Manley, R. R. Dasari, K. Badizadegan and M. S. Feld, Phys. Rev. Lett. **97**, 218101 (2006).

Fig. 1. Wavefronts of the normally incident plane wave (straight red lines) get distorted while the wave passes through a sample with inhomogeneous refractive index distribution. The phase delay of the transmitted wave represents the projection of refractive index along propagation direction.

위상현미경을 이용한 생체 세포의 CT 스캔

생체 조직을 물질 고유의 성질인 굴절률을 이용하여 3차원 영상을 하면, 염색을 한다거나 형광물질을 주입하는 등의 샘플 준비과정을 거칠 필요가 없고, 또한 외부 물질의 주입에 따른 부작용이 없이 살아있는 세포를 있는 그대로 영상할 수 있다는 장점이 있다.^[5] 앞서 설명한 바와 같이 기존의 위상현미경은 2차원 굴절률 투영영상을 측정하는데, 이것은 x선을 이용한 CT 스캔에서 각각의 영상이 흡수 계수의 투영영상을 측정하는 것과 유사하다. CT 스캔에서는 누워있는 환자에 대해 x선 광원과 검출기를 돌려가면서 투영 흡수 영상을 다양한 각도에서 찍은 후 사람의 3차원 구조를 얻는다. 마찬가지로, 굴절률의 투영 영상인 위상을 여러 각도에서 측정하면 생체 내부의 3차원 굴절률 구조를 얻을 수 있다.

이 아이디어를 적용하여 3차원 굴절률 구조를 영상할 수 있는 몇 가지 성공적인 연구가 있어왔다. 다양한 각도의 투영영상을 얻기 위한 두 가지 방법이 있는데, 첫 번째 방법은 고정된 입사빔에 대해 샘플을 회전시키는 것이고, 두 번째 방법은 샘플을 고정하고 입사하는 빛의 방향을 회전시키는 것이다. 샘플을 회전시키는 것은 모든 각도에 대한 투영영상을 측정할 수 있기 때문에 횡방향 해상도와 축방향 해상도가 같다는 장점이 있는 반면, 샘플의 회전축을 고정시키기가 힘들고, 회전을 하면 샘플의 구조에 영향을 줄 수 있다는 단점이 있다. 따라서 샘플을 회전시키는 것은 생체 샘플보다는 광섬유 같은 고체 샘플에 주로 이용되었고^[6,7] 생체세포의 경우는 특별한 샘플 준비과정이 필요하다.^[8]

샘플을 고정하고 입사빔을 회전시키는 방법은 측정하는 동안에 샘플에 어떠한 역학적인 힘을 가하지 않기 때문에 생체 샘플 있는 그대로의 상태로 영상을 하는 것이 가능하다. 빛의 회전은 샘플과 독립적이기 때문에 측정 속도를 빠르게 할 수

Fig. 2. (A) Geometry of illumination and projection at x-z plane. Blue line: illumination at zero degree, red line: illumination at angle theta. (B) and (C): projection line profile of phase at angle of zero and 45 degree, respectively at fixed $y=y_0$. (D) and (E): projection phase images corresponding to (B) and (C). Colorbar indicates phase in radians.

있어 여러 가지 동역학적인 연구를 할 수 있다. 이 방법의 단점은 현미경의 개구수(Numerical Aperture)의 한계 때문에 전체 각도에 대한 투영이미지를 얻을 수 없다는 점이다. 따라서 보통의 현미경에서와 같이 축방향 해상도가 횡방향 해상도보다 좋지 않다는 단점이 있지만 샘플에 대한 선행 지식이 있으면 부족한 정보에 대한 예측이 가능하기 때문에 어느 정도 보완이 가능하다.^[9]

생체 샘플을 영상하기 위해서는 입사 빛을 회전시키는 것이 더 유리하기 때문에 입사 빛의 방향을 돌려가면서 생체 샘플을 영상하였다. -70도에서 70도 사이의 입사각에 대해 보통 600장의 이미지를 0.1초 내에 측정하여 한 세트의 각도에 따른 위상이미지를 얻고, 이것으로부터 하나의 3차원 영상을 얻는다. 그림 2는 수직으로 입사하는 경우와 수직에 대해

REFERENCES

- [5] W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, S. Oh, N. Lue, R. Dasari and M. S. Feld, Nat Methods **4**, 717 (2007).
- [6] A. Barty, K. A. Nugent, A. Roberts and D. Paganin, Opt. Commun. **175**, 329 (2000).
- [7] W. Gorski, and W. Osten, Opt. Lett. **32**, 1977 (2007).
- [8] F. Charriere, N. Pavillon, T. Colomb, C. Depeursinge, T. J. Heger, E. A. D. Mitchell, P. Marquet and B. Rappaz, Opt. Express **14**, 7005 (2006).
- [9] K. C. Tam and V. Perezmendez, Journal of the Optical Society of America **71**, 582 (1981).

Fig. 3. Refractive index tomogram of a HeLa cell. (A) A 3D rendered image of a HeLa cell. The outermost layer of the upper hemisphere of the cell is omitted to visualize the inner structure. Nucleoli are colored green and parts of cytoplasm with refractive index higher than 1.36 are colored red. The side of the cube is 20 μm . (B) Top view of a. (C-H) Slices of the tomogram at heights indicated in a. Scale bar, 10 μm . Color bar, refractive index at $\lambda = 633 \text{ nm}$. (I, J) Brightfield images for objective focus corresponding to E and F, respectively.

45도 각도로 입사하는 경우에 측정한 위상 영상을 보여준다. 이미지를 측정하는 면이 고정되어 있고, 입사각만 회전하기 때문에 각도가 클 경우에 샘플의 영상이 길어지는 것을 알 수 있다. 그리고 각각의 각도 영상에서는 세포의 내부구조가 잘 보이지 않는 것을 확인할 수 있다.

얻어진 위상 이미지들로부터 3차원 굴절률 이미지를 구현하기 위해서 먼저 filtered back-projection method^[10] 또는 inverse Radon 변환이라는 CT에서 사용하는 알고리즘을 적용하였다. 굴절률을 알고 있는 수 마이크로미터 크기의 구체 (Polysciences #17136, $n=1.588$ at $\lambda = 633 \text{ nm}$)를 영상하여 측정 시스템의 굴절률의 정확도가 0.001인 것을 확인하였다. 측정한 공간 해상도는 횡방향이 약 0.5 μm 이었고, 축방향이 약 0.75 μm 이었다.

샘플로는 배양액 속에 있는 단일 HeLa 세포를 사용하였다. 세포들은 배양 용기에서 떼어낸 후 커버글라스 위에 붙도록 하였다. 그림 3의 A, B는 단일 세포의 3차원 굴절률 영상을 보여주고 있고, 그림 3의 C-H는 세포의 단면 영상을 위에서부터 아래로 내려오면서 보여주고 있다. 이 단면 영상을 통해서, 각각의 위상 이미지에서는 볼 수 없었던 세부적인 세포의 구조를 볼 수 있었고, 굴절률이 굉장히 불균일한 분포를 가지고 있음을 알 수 있으며, 그 값은 1.36에서 1.40까지 분포함을 알 수 있다. 그림 3E-F와 같은 높이에 대해 기존의 bright field 현미경으로 초점을 바꿔가면서 이미지를 얻은

Fig. 4. (A) Brightfield image of *C. elegans*. (B) Mosaic of x-y slices of index tomograms through *C. elegans*. Anterior is to the right. Color bar, refractive index at $\lambda = 633 \text{ nm}$.

것이 그림 3 I-J인데, 세포의 경계, 세포핵의 경계, 세포 핵소체의 크기와 모양 등 구조를 비교해 보면 잘 일치하는 것을 알 수 있다. 하지만 3차원 위상 이미지가 대비가 훨씬 뛰어난 것을 알 수 있고, 무엇보다도 세포 각 부분 부분의 굴절률을 정량적으로 알 수 있다는 것이 중요한 차이점이다. 이 연구는 살아있는 세포를 있는 그대로 두고 굴절률을 3차원 이미징한 최초의 연구이다.^[5]

여러 세포로 구성된 유기체도 이미징이 가능하다는 것을 보이기 위해서, nematode *C. elegans*를 영상하였다. 샘플의 크기가 이미징 영역보다 크기 때문에 샘플의 부분 부분을 영상하고 다시 조합하여 전체의 이미지를 얻었다 (그림 4). 소화에 필요한 내장 등의 구조가 잘 보임을 알 수 있다.

3차원 위상 현미경의 생물학적 응용

말라리아에 감염된 적혈구 연구: 살아있는 세포의 굴절률을 측정할 수 있는 3차원 위상 현미경을 말라리아에 감염된 적혈구에서 질병의 진행 단계를 정량화하는 연구에 적용하였다.^[11] 질병의 네 가지 진행 단계, 즉 정상 상태, Ring stage, Trophozoite stage, Schizont stage에 대해 3차원 굴절률 영상을 하였고, 각 단계별로 세포의 굴절률 값을 얻었다 (그림 5A).

각각의 진행 단계에 대해 15개의 적혈구를 이미징하고, 헤모글로빈의 밀도와 굴절률 사이의 관계를 조사한 후, 각 단계별로 헤모글로빈의 농도를 얻을 수 있었다 (그림 5B). 그 결

REFERENCES

- [10] A. Kak, and M. Slaney, *Principles of Computerized Tomographic Imaging* (Academic Press, New York, 1999).
- [11] Y. Park, M. Diez-Silva, G. Popescu, G. Lykotrafitis, W. Choi, M. S. Feld and S. Suresh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 13730 (2008).

Fig. 5. Host RBC Hb concentrations decreases as *P. falciparum* matures. (A) Refractive index of healthy RBC and *Pf*-RBCs at the indicated stages. (B) Mean corpuscular Hb concentration(MCHC) of healthy and *Pf*-RBCs at the indicated stages. (C) Cytoplasm volume of *Pf*-RBCs at the indicated stages. (D) Hb content in healthy and *Pf*-RBCs at the indicated stages. Each point in A represents average refractive index for one cell. Graphs in B-D show the median (central horizontal line), standard deviations (box), and minimum and maximum values (vertical lines). For each condition, 15 samples were tested.

과 질병이 진행될수록 헤모글로빈의 농도가 줄어드는 것을 확인하였다. 이것은 말라리아 기생충이 헤모글로빈을 소모시켜서 질병이 진행될수록 헤모글로빈의 양이 줄어든다는 기존의 보고와 잘 일치한다. 또한 각 세포 내부의 굴절률을 더하여, 세포 당 전체 헤모글로빈의 양을 구할 수 있었는데(그림 5D), 이 결과도 농도 변화와 비슷한 경향성을 보였다. 이 연구를 통해 3차원 위상 현미경을 이용하여 살아있는 샘플에 대해 굴절률 값을 얻으면 분자의 농도를 정량화할 수 있다는 것을 보였다.

콜레스테롤 나선 리본 연구: 위상 현미경이 샘플의 두께를 나노미터 크기까지 측정할 수 있기 때문에, 나노스케일의 얇은 나선형 콜레스테롤 띠의 3차원 구조를 측정하였다.^[12] 콜레스테롤 나선 띠는 나노스케일의 생물학적 물체들 사이의 힘을 측정하거나 또는 힘을 가할 수 있는 기능을 할 수 있기 때문에, 생물물리 및 나노사이언스 커뮤니티에 중요한 연구 주제이다. 나선 띠의 두께는 용수철 상수를 결정하는 중요한 요소인데, 그 두께는 수십 나노미터 내외로서 해상도가 500나노미터 내외인 기존의 현미경으로는 측정할 수 없다. 또한 이 나선 띠는 3차원 구조를 가지고 있고, 깨어지기 쉽기 때문에 AFM(Atomic Force Microscopy)이나 전자 현미경을 사용할 수 없다. 3차원 위상 현미경은 빛을 이용하여 비접촉식 및 비침습적(non-invasive)으로 나노미터 두께를 측정할 수 있기

Fig. 6. Phase-contrast microscopy of cholesterol helical ribbons. (A) A color coded phase image of a 68-nm-thick helical ribbon (100 pixels equals 15.3 μm). The scale strip on the right shows the phase retardation in radians. Shown is the lower part of the helical ribbon, which is in focus of the phase microscope. (B) The histogram of phase retardations for pixels within the black rectangle on A. The peaks are fitted with a Gaussian distribution. The phase difference between the fitted centers of the two peaks is used to calculate the thickness of the ribbon.

때문에 (그림 6A) 크기가 다른 콜레스테롤 나선 띠에 대해 그 두께를 측정할 수 있었으며 (그림 6B), 나선 띠의 반경은 두께의 제곱과 비례함을 실험적으로 증명하였다. 이 결과로부터 두께를 측정하지 않더라도 반경으로부터 두께를 예측하는 것이 가능해졌으며, 향후 나선 띠를 이용한 나노크기의 생체 입자들 사이의 힘 측정을 더욱 용이하게 만들었다.

맺음말

살아있는 생체 세포나 조직을 있는 그대로 영상하기 위해서 물질 고유의 특성인 굴절률을 3차원적으로 이미징하는 3차원 위상현미경에 대해 소개를 하였고, 그 응용으로 말라리아에 감염된 적혈구의 헤모글로빈의 양을 정량적으로 측정하는 연구와 콜레스테롤 나선 리본의 두께를 측정하는 연구를 소개하였다. 3차원 위상현미경은 현재 많이 사용되고 있는 형광현미경과는 달리 외부 물질을 주입하는 등의 샘플 준비과정을 거칠 필요가 없고, 또한 그에 따른 신진대사 방해와 같은 부작용 없이 살아있는 세포를 있는 그대로 영상할 수 있다는 장점이 있기 때문에 앞으로도 생물학 연구의 유용한 도구로 사용될 것으로 기대한다. 특히, 빛의 위상을 기록하는 것은 빛과 생체조직의 상호작용을 정량화하는 필수적인 방법이기 때문에 향후 적응제어광학 등의 기술과 결합하면 생체속 깊이 영상할 수 있는 기술을 개발하는 데 응용될 가능성이 클 것으로 예상된다.

REFERENCES

- [12] B. Khaykovich, N. Kozlova, W. Choi, A. Lomakin, C. Hossain, Y. Sung, R. Dasari, M. S. Feld and G. B. Benedek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **106**, 15663 (2009).