단일형광분자 관측을 기반으로 하는 초고해상도 형광 현미경

DOI: 10.3938/PhiT.22.053

이진우·홍성철

Super-resolution Fluorescence Microscopy Based on Single-molecule Localization

Jinwoo LEE and Sungchul HOHNG

Fluorescence microscopy is one of the most common techniques used in biology. Fluorescence microscopy has many advantages, but its poor resolution due to the diffraction limit of light is a weakness of this technique. As a result of efforts to overcome this limitation of fluorescence microscopy, several techniques were developed to break the diffraction limit of light. In this article, recent advances in super-resolution fluorescence microscopy based on single-molecule localization is introduced. The principle of the technique and several factors that can affect the resolution of the system are explained. Several methods to obtain better resolution and to optimize experimental conditions are developed, and new findings that were made by using this technique will be presented.

서 론

우리 눈으로 볼 수 없는 아주 작은 대상을 보고 싶을 때 어떤 도구를 사용하면 될까? 쉽게 떠올릴 수 있는 것이 바로 현미경(microscope)이다. 보통 현미경이라고 불리는 것은 빛을 이용한 광학 현미경으로 마이크로미터 수준의 작은 것까지 볼

수 있어 처음 개발된 이후로 무수히 많은 연구가 현미경을 통해 이루어졌고, 특히 연구 대상이 점점 작아지는 현대에 와서 연구 도구로서의 현미경의 중요성이 커진다고 할 수 있다.

생물학이나 의학 분야에서 세포나 조직을 연구할 때 흔히 사용하는 방법은 형광을 이용하는 것으로, 보고자 하는 대상에 형광물질을 표지한 후 현미경을 통해 형광 신호를 관찰하는 것이다. 이렇게 형광 신호를 이용하는 광학 현미경을 형광 현미경(Fluorescence microscope)이라고 한다. 형광 물질을 사용하면 우리가 보고자 하는 대상만 선택적으로 볼 수 있고 실험 과정과 방법이 간단하기 때문에 형광 현미경을 이용하여 많은 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 그렇지만 형광 현미경을 비롯한 광학 현미경은 가시광선 영역의 빛을 이용하기 때문에 빛의 파장보다 더 작은 나노미터 수준의 미세한 구조를 볼 수 없다는 단점이 있다. 이런 문제를 극복하기 위해 전자현미경이나 원자현미경 등의 장비가 있지만 시료준비가 까다롭고 사용 범위가 제한적이라는 단점이 존재하기 때문에 형광현미경만큼 널리 쓰이고 있지 않다.

최근 들어 형광을 이용하면서도 기존의 형광이 볼 수 없었던 작은 대상까지 볼 수 있는 초고해상도 형광 현미경기술(Super-resolution fluorescence microscopy)이 개발되었고, 그에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 이런 기술은 형광 현미경의 장점을 그대로 갖고 있으면서도 기존의 형광 현미경으로 관찰할 수 없었던 작은 대상까지 관찰할 수 있어서 차세대 연구기술로 각광받고 있다. 본 기고를 통해 초고해상도 형광 현미경기술, 그 중에서도 단일형광분자 관측을 기반으로 한 초고해상도 형광 현미경에 대해 소개하고 이 기술의 원리와 연구동향에 대해 기술하고자 한다.

형광현미경의 분해능과 한계

형광 현미경은 앞서 언급한 것처럼 세포나 조직 내의 관찰하고자 하는 대상을 형광물질로 표지한 후 광원을 시료에 조사하여 나오는 형광 신호를 관찰하는 장비이다(그림 1). 형광

저자약력

이진우 연구원은 서울대학교 물리학과 박사과정으로 2009년부터 연구실에서 단일형광분자 관측을 이용한 FRET 실험과 형광 현미경 개발에 주력해 왔다. (asurawav@naver.com)

홍성철 교수는 서울대학교 물리학과 박사(2000)로 미국 일리노이 주립대학에서 박사 후 연구를 거쳐 2006년부터 서울대학교 물리학과 교수로 재직 중이다. (shohng@snu.ac.kr)

Fig. 1. Inverted fluorescence microscopy.

물질로 표지하기 위해서 보통 외부에서 형광물질이 부착되어 있는 항체 등을 넣어주거나 세포 내부에서 스스로 형광단백질을 만들도록 하는 방법을 사용한다. 세포 내에는 수많은 종류의 단백질과 핵산, 각종 물질들이 존재하는데 이 방법을 통해서 우리가 보고자 하는 대상만 관찰할 수 있고, 형광 물질마다 파장이 다르다는 점을 이용해 여러 대상을 함께 관찰할 수 있는 장점이 있다(그림 2). 또한 세포나 조직을 크게 손상시키지 않으며 실험을 준비할 수 있고 심지어 살아있는 세포를 대상으로 실험도 가능하다. 그렇지만 형광 현미경의 단점으로 지목되는 것은 바로 형광 현미경의 분해능(resolution)이다. 분해능이라는 것은 근접한 두 지점을 구분할 수 있는 능력으로 보통 거리단위로 나타내며 분해능보다 더 작은 구조는 식별하기 어렵다는 것을 의미한다. 현미경의 분해능은 현미경에서 사용되는 렌즈의 개구수(Numerical aperture)와 사용하는 형광물질의 파장에 의해 결정되는데 개구수가 클수록, 또는 사용하는 빛의 파장이 짧을수록 분해능이 좋아져 더 작은 대상도 구별할 수 있다. 그렇지만 렌즈의 개구수는 무한정 늘릴 수 없고 사용하는 빛의 파장 역시 가시광선 영역이기 때문에 일반적으로 형광 현미경은 빛의 파장보다 더 작은 대상은 구별할 수 없다. 이는 빛의 근본적인 특성에서 오는 한계로 아무리 배율을 늘린다고 해도 분해능이 더 좋아지지 않는다. 형광 현미경에서 사용하는 빛은 대부분 가시광선 영역으로 보통 400 – 700 nm의 파장을 갖는데 비해 단백질을 비롯한 세포 내 많은 구조는 수 나노미터에서 수십 나노미터 정도의 크기를 갖기 때

Fig. 2. Fluorescence image of cell. Blue, green and red color represent different cell components.^[1]

문에 이는 형광 현미경으로 관찰할 수 없으며, 따라서 지금까지는 간접적인 방법이나 전자현미경, 원자현미경 등을 이용하여 제한적으로 연구를 진행하고 있다.

초고해상도 형광 현미경의 개발

분해능의 한계에도 불구하고 형광 현미경이 갖는 장점이 뛰어나기 때문에 많은 연구자들이 그 한계를 극복하려 노력해왔고, 그 결과 형광 현미경의 한계를 극복하는 초고해상도 형광 현미경이 개발되었다. 초고해상도 형광 현미경은 여러 종류가 있는데 단일형광분자의 관찰을 기반으로 하는 방법(STORM/PALM; STochastic Optical Reconstruction Microscopy/Photo-Activated Localization Microscopy)^[2-4]과 유도방출을 이용하는 방법(STED; STimulated Emission Depletion Microscopy),^[5] 그리고 광원의 패턴조사를 이용하는 방법(SIM; STructured Illumination Microscopy)^[6] 등을 들 수 있다. 이러한 초고해상도 형광 현미경은 각각 특유의 장단점을 갖고 있는데, 본문에서는 그 중 단일형광분자 관찰을 기반으로 하는 방법에 대해 설명하도록 하겠다.

REFERENCES

- [1] <http://www.dvcco.com/resources/applications/life-sciences/fluorescence-microscopy/>.
- [2] M. J. Rust, M. Bates and X. Zhuang, *Nature Methods* **3**, 793, doi:10.1038/nmeth929 (2006).
- [3] E. Betzig, *et al.*, *Science* **313**, 1642, doi:10.1126/science.1127344 (2006).
- [4] S. T. Hess, T. P. Girirajan and M. D. Mason, *Biophysical Journal* **91**, 4258, doi:10.1529/biophysj.106.091116 (2006).
- [5] T. A. Klar and S. W. Hell, *Optics Letters* **24**, 954 (1999).
- [6] M. G. Gustafsson, *Journal of Microscopy* **198**, 82 (2000).

Fig. 3. (A) Intensity profile of several single-fluorophores. (B) Enlarged image of fluorophore circled in A. Solid lines represent Gaussian curve fit. Center position can be determined by fitting parameters.^[7]

일반적으로 형광 현미경으로부터 얻어지는 이미지는 매우 많은 수의 형광 분자로부터 나온 신호를 본 결과로, 형광분자 하나하나의 신호는 매우 작기 때문에 관찰하기 어렵다. 그렇지만 최근 기술의 발전으로 EM-CCD(Electron-Multiplying Charged Coupled Device)나 sCMOS(scintillating Complementary Metal-Oxide Semiconductor)와 같은 신호 대 잡음비가 좋은 고성능 카메라가 나오면서 단일형광분자의 신호를 관찰하는 것이 가능해졌다.

형광분자 하나의 크기는 보통 수 나노미터 이하로 매우 작지만 빛의 파장한계로 인해 실제로 현미경을 통해 관찰하는 단일형광분자는 직경이 수백 나노미터에 이르는 큰 크기로 보인다. 이때 단일형광분자의 모양은 2차원 가우시안함수(Gaussian function)로 근사될 수 있고, 비선형 회귀분석을 통해서 단일형광분자의 중심 위치를 나노미터 수준으로 아주 정확하게 찾아낼 수 있다^[7] (그림 3). 그렇지만 이 방법을 일반적인 형광 현미경에 적용할 수 없는데 그 이유는 보통 형광물질들은 서로 매우 가깝게 분포하므로 실제 이미지에서는 매우 많은 수의 단일분자의 모양이 겹쳐 있어 비선형 회귀분석을 통한 중심 위치 추적이 불가능하기 때문이다.

형광분자 중 일부는 BME(betamercaptoethanol)나 MEA(mercaptoethylamine)같은 화학 물질이 존재하는 경우, 빛을 내지 않다가 가끔씩 빛을 내는 특징을 갖고 있다.^[9] 즉, 이 방법을 이용하면 매우 많은 수의 형광분자가 가까이 분포하고 있다고 하더라도 적은 수의 형광분자만 빛을 내고 있기 때문에 단일형광분자의 신호를 구별하는 것이 가능해진다. 이 경우, 다음과 같은 과정을 거칠 수 있다. 1) 현재 빛을 내는 형광분자의 위치를 결정하고, 2) 시간이 지나면 빛을 내던 형광분자는 빛을 내지 않게 되고 다른 형광분자가 빛을 내기 시작하면 새롭게 빛을 내는 형광분자의 위치를 결정한다. 이와 같은 과정을 계속 반복하게 되면 결국 나노미터 수준의 형광분자들의 위치 분포를 파악하게 되고 이를 재구성하게 되면 최종적으로 기존의 형광현미경에 비해 약 10배 정도의 정밀도를 갖는 이미지를 얻을

Basic Principle of STORM Superresolution Imaging

Fig. 4. Principle of super-resolution imaging based on single-molecule localization. From (b) to (e) different fluorophore emitted the light and be localized. (f) Final image can be obtained by repetition of (b) to (e).^[8]

Fig. 5. Super-resolution images of microtubule. (A, C, E) Conventional fluorescence images of microtubule. (C) and (E) are enlarged images of dashed rectangle in (A). (B, D, F) Corresponded super-resolution images.^[10]

수 있다(그림 4, 5). 이와 같은 방법으로 고해상도 이미지를 얻는 기술은 크게 STORM과 PALM을 들 수 있는데, 위에 설명한 것처럼 화학물질을 사용하여 형광물질을 깜박이게 하는 방식을 이용하는 것이 STORM이고 PALM의 경우는 기존의 형광단백질을 변형시켜서 약한 자외선이나 보라색 빛을 쬐어주면 형광의 특징이 바뀌는 광활성형광단백질(Photo-activatable fluorescent

REFERENCES

- [7] A. Yildiz and P. R. Selvin, *Accounts of chemical research* **38**, 574, doi:10.1021/ar040136s (2005).
- [8] <http://www.microscopyu.com/articles/superresolution/stormintro.html>.
- [9] G. T. Dempsey, *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* **131**, 18192, doi:10.1021/ja904588g (2009).
- [10] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey and X. Zhuang, *Science* **317**, 1749, doi:10.1126/science.1146598 (2007).

protein)을 이용한다는 점이 STORM과 다를 뿐 기본적으로 같은 원리를 이용한다. STORM의 경우는 외부에서 형광물질을 주입하기 때문에 더 밝은 형광물질을 사용할 수 있다는 장점이 있지만 살아있는 세포를 대상으로 실험하기 어렵다는 단점이 있다. 반대로 PALM은 형광단백질을 사용하기 때문에 밝기가 STORM에 비해 약하지만 살아있는 세포를 대상으로 실험하기 쉽다는 장점이 있다. 이외에도 몇 가지 다른 종류가 있지만 결국 단일형광분자를 구별할 수 있도록 하는 방법이 다를 뿐 모두 단일형광분자를 관찰하고 위치를 결정하는 방식을 이용한다는 점에서는 동일하다.

초고해상도 현미경에서의 분해능

그렇다면 이러한 초고해상도 형광 현미경에서 분해능은 어떻게 결정되는 것일까? 단일형광분자 관찰을 기반으로 하는 초고해상도 형광 현미경의 정밀도는 결국 단일형광분자의 상을 보고 위치를 결정할 때 얼마나 정확하게 결정되느냐에 따라 달라진다. 즉, 카메라에 맺힌 단일형광분자의 모양이 선명하고 뚜렷할수록 위치가 정확하게 결정되는 것이고, 이것이 높은 분해능으로 이어지는 것이다. 이론적인 분석을 통해 분해능에 영향을 끼치는 요인으로는 검출된 총 광자의 수, 노이즈의 정도, 카메라 픽셀의 크기, 사용한 형광 분자의 파장, 사용한 대물렌즈의 개구수가 있다는 것이 알려져 있다.^[11]

카메라에 맺힌 상의 모양은 결국 카메라의 픽셀에 들어오는 광자에 의해 결정되게 된다. 이때 광자의 수가 많으면 많을수록 상의 모양은 점점 선명해지게 되므로(그림 6) 비선형 회귀 분석을 통해 결정되는 위치 또한 점점 정확해지게 된다. 만약 광자의 수를 N 개라고 한다면 위치의 오차는 N 의 제곱근에 반비례해서 줄어들기 때문에 광자의 수가 충분히 많다면 이론적으로는 나노미터 이하의 분해능을 갖는 것도 가능하다. 따라서 최대한 많은 광자를 검출하는 것이 좋은 분해능을 얻는데 매우 중요한 요소가 되는데, 이점을 이용해 최근에 개발된 이중 대물렌즈 STORM(dual objective STORM)은 2개의 대물렌즈를 사용하여 기존의 형광 현미경보다 2배 더 많은 광자를 얻음으로써 기존의 STORM보다 한결 더 좋은 분해능을 얻는데 성공하였다.^[12,13] 또한 노이즈가 적으면 적을수록 상이 선명해지는 효과가 있으므로 마찬가지로 더 좋은 분해능을 얻게 된다. 특히 세포나 조직 같은 3차원적인 구조를 갖는 경우, 초점 평면 이외에서 나오는 형광 신호들이 모두 노이즈로 작용하게 되어 좋은 분해능을 얻기 힘들다. 따라서 일반적인 대면적 광원조사 방식(epi-fluorescence microscopy)과는 다른 여러 가지 방식을 사용하여 노이즈를 최대한 줄이고 있다. 이외에도 일반적으로 사용하는 카메라는 픽셀화 되어있어 비연속적

Fig. 6. Images of single-fluorophore with different photon number N .^[11]

이기 때문에 그 부분이 고려되어야 하는데, 일반적으로 1픽셀의 너비가 맺히는 상의 너비와 비슷할 때 가장 좋은 분해능을 얻는다고 알려져 있다. 형광 분자가 내놓는 빛의 파장과 대물렌즈의 개구수에 의해 맺히는 상의 너비가 바뀌게 되는데 이 너비가 작을수록 더 좋은 분해능을 얻을 수 있다.

노이즈의 감소방법

단일형광분자의 신호는 매우 작기 때문에 관찰을 위해서는 노이즈를 줄이는 것이 필수적이다. 노이즈가 심한 경우에는 아예 단일형광분자의 신호를 관찰할 수 없을뿐더러 설명 관찰이 가능하다고 하더라도 위에서 언급한 것과 같이 분해능이 원하는 만큼 나오지 않는 결과를 초래한다. 특히 생물시료의 경우는 초점 평면 이외의 부분에서의 자가형광(Auto-fluorescence) 등에 의해 노이즈가 많이 발생한다. 따라서 노이즈를 줄이고 단일형광분자의 관측을 용이하게 하기 위해 다양한 방법들이 사용되고 있다.

1. 전반사 현미경(TIRF; Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy)

전반사 현상은 빛이 굴절률이 높은 매질에서 낮은 매질로 진행할 때 입사각이 임계각보다 크면 매질의 경계면에서 반사되

REFERENCES

- [11] R. E. Thompson, D. R. Larson and W. W. Webb, *Biophysical Journal* **82**, 2775, doi:10.1016/S0006-3495(02)75618-X (2002).
- [12] K. Xu, H. P. Babcock and X. Zhuang, *Nature Methods* **9**, 185, doi:10.1038/nmeth.1841 (2012).
- [13] S. Ram, P. Prabhat, E. S. Ward and R. J. Ober, *Optics Express* **17**, 6881 (2009).

Fig. 7. Schematic diagram of (A) TIRF^[14] and (B) HILO^[15] microscopy.

는 현상을 말한다. 이때 빛은 경계면을 지나갈 수 없지만 경계면 건너편에는 경계로부터 거리가 멀어질수록 그 크기가 지수함수적으로 감소하는 소멸파(evanescent wave)가 존재하게 된다. 전반사 현미경은 이 소멸파를 이용해서 바닥에 위치하고 있는 형광분자를 조사하게 되는데, 보통 소멸파가 존재하는 범위가 100 nm 내외이기 때문에 바닥으로부터 떨어져 있는 형광분자들은 빛을 내지 않게 되고 따라서 노이즈가 굉장히 줄어들게 된다(그림 7(A)). 대신 이 방법을 이용하면 바닥 부분의 세포 표면만 관찰할 수 있고 세포 내부의 정보는 전혀 얻을 수가 없게 된다. 따라서 바닥 부분의 세포막을 관찰할 때 주로 사용된다.

2. HILO 현미경^[15] (Highly Inclined and Laminated Optical Sheet Microscopy)

전반사 현미경에서 입사각을 임계각보다 조금 작게 한 것이 HILO 현미경이다. 이 경우 전반사는 일어나지 않지만 빛이 기울어진 상태로 입사하기 때문에 기존의 현미경에 비해 얇은 빛의 띠가 생기게 된다. 따라서 이 띠 범위 이외의 분자들은 형광신호를 내지 않기 때문에 노이즈를 줄일 수 있다(그림 7(B)). 이 방법은 노이즈를 줄이면서도 세포 안까지 볼 수 있는 데다 전반사 현미경과 쉽게 병행 사용할 수 있어 일반적으로 STORM/PALM 실험에서 가장 많이 사용하는 방법이다. 그렇지만 노이즈를 줄이는 능력이 뛰어나지 않고 두꺼운 시료에는 적용할 수 없다는 단점이 있다.

Fig. 8. Schematic diagram of (A) confocal^[16] and (B) SPIM^[17].

3. 실시간 공초점 형광 현미경^[18] (Video-rate confocal fluorescence microscopy)

공초점 현미경에서는 대물렌즈의 초점과 초점을 공유하는 위치를 렌즈를 이용해 만들고 그 위치에 작은 구멍을 두어 초점 평면 이외에서 나온 신호는 구멍을 통과하지 못하게 하는 원리를 이용해 노이즈를 줄이게 된다(그림 8(A)). 전반사 현미경 처럼 관측 범위가 제한되는 것이 아니기 때문에 기존에 많이

REFERENCES

- [14] <http://www.nikon-instruments.jp/eng/page/products/wtirtf.aspx>.
- [15] M. Tokunaga, N. Imamoto and K. Sakata-Sogawa, Nature Methods **5**, 159, doi:10.1038/nmeth1171 (2008).
- [16] <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>.
- [17] V. Ntziachristos, Nature Methods **7**, 603, doi:10.1038/nmeth.1483 (2010).
- [18] J. Lee, Y. Miyanaga, M. Ueda and S. Hohng, Biophysical Journal **103**, 1691, doi:10.1016/j.bpj.2012.09.014 (2012).

Fig. 9. 3D super-resolution imaging. (A) Principle of 3D STORM. (B) 3D STORM image of microtubule. Different z-position was represented by different color. Scale bar : 5 μm .^[20]

쓰이던 방법이다. 다만 이 방법을 이용할 경우 1개의 이미지를 얻기 위해서는 2차원 스캔이 필요하고 일반적인 대면적 현미경법에 비해 시간이 많이 필요하게 된다. 따라서 많은 이미지를 필요로 하는 STORM/PALM에는 적합하지 않다고 여겨져 왔다. 그렇지만 최근 연구에 의해 점초점 대신 선초점을 이용하여 스캔에 필요한 시간을 줄이는 실시간 공초점 형광 현미경을 STORM/PALM에 도입함으로써 노이즈를 HILO에 비해 크게 줄이면서도 임의의 깊이에서 측정이 가능해졌다. 그렇지만 빛의 수직적 조사에 의한 광표백현상(photo-bleaching)이 심해 3차원 이미지를 얻기가 어렵다는 단점이 있다.

4. 선택적 평면조사 현미경^[19] (SPIM; Selective plane illumination microscopy)

위에서 언급한 현미경들은 모두 빛이 대물렌즈의 뒷부분을 통해 들어와서 수직방향으로 시료에 조사되기 때문에 우리가 관찰하고 있지 않은 부분에도 빛이 들어가게 된다. SPIM에서는 이와 다르게 추가적인 렌즈를 대물렌즈와 수직인 방향으로 배치해서 빛이 수평방향으로 조사되게 구성되었다(그림 8(B)). 이 경우 우리가 실제로 관찰하고 있는 대상에만 빛을 조사할 수 있기 때문에 노이즈가 크게 줄어들고 공초점 현미경에서 존재하는 광표백현상도 적다는 장점이 있어 차세대 기술로 각광받고 있다. 그렇지만 실제 렌즈의 크기 문제 등의 제한으로 높은 개구수를 갖는 렌즈를 사용하기 어렵고, 바닥 근처에서는 빛을 조사하기 어렵다는 단점이 있다. 또한 시료를 준비하는데 있어 기존의 방법과는 다른 방식으로 준비해야 하기 때문에 아직 널리 쓰이고 있지는 않다.

3차원으로의 확장

보통 형광 현미경에서 얻는 결과는 2차원 이미지이다. 따라

서 3차원 이미지는 높이를 바꿔가며 2차원 이미지를 찍고 각각의 2차원 이미지를 위아래로 배열하여 얻어지게 된다. 따라서 수직방향의 분해능은 수평방향의 분해능과는 다른 원리를 갖게 되며 보통 수직방향의 분해능이 수평방향의 분해능보다 떨어지게 된다. 위에 언급한 바와 같이 STORM/PALM을 이용하면 10 nm 수준의 분해능을 갖는 고해상도 이미지를 얻을 수 있지만 결국 2차원 이미지이기 때문에 수직방향의 분해능은 일반적인 형광 현미경과 다를 것이 없다. 따라서 수직방향에서도 높은 분해능을 얻어 3차원적인 초고해상도 형광 이미지를 얻기 위해 많은 연구가 진행되었고, 다양한 방법을 이용하여 수직방향에서도 높은 분해능을 얻을 수 있게 되었다.

형광 현미경을 이용하여 이미지를 얻을 때는 일반적으로 현미경 대물렌즈에 의해 집광된 형광신호가 카메라 등의 검출기에 상을 맺게 된다. 형광 현미경을 이용해 어느 형광 분자의 상을 관찰하고 있는 상황을 가정해보자. 대물렌즈의 높이를 바꾸면 초점의 위치가 바뀌기 때문에 카메라에 맺힌 형광 분자의 상도 초점이 흐려지고 크기가 커지게 된다. 보통 사용하는 렌즈는 대부분 원형이기 때문에 초점이 흐려지는 현상이 모든 방향에 대해 동일하게 되고 따라서 초점이 위로 어긋났는지 아래로 어긋났는지 파악하기 어렵다. 그렇지만 만약 중간에 원통형 렌즈를 두게 되면 좌우방향의 초점과 상하방향의 초점이 서로 어긋나게 되는데 이 경우 초점이 위로 바뀌는지 아래로 바뀌는지에 따라 상의 모양이 좌우로 길어지거나 상하로 길어지는 차이가 보이게 되어 두 가지 경우를 구별할 수 있게 된다. 이는 일종의 비점수차(astigmatism)를 의도적으로 도입한 경우로, 형광분자의 상이 타원형을 띌 때 장축과 단축의 길이

REFERENCES

- [19] F. Cella Zanacchi, *et al.*, Nature Methods **8**, 1047, doi:10.1038/nmeth.1744 (2011).
- [20] B. Huang, W. Wang, M. Bates and X. Zhuang, Science **319**, 810, doi:10.1126/science.1153529 (2008).

Fig. 10. Result of DAOSTORM. The position of fluorophore (indicated by green x) are determined even there is overlap between fluorophore.^[23]

를 이용하여 현재 초점 평면으로부터 수직방향으로 얼마나 멀리 떨어져 있는지 파악할 수 있게 된다^[20] (그림 9(A)). 이 방법을 이용하게 되면 단일형광분자의 수평방향의 위치뿐 아니라 수직 방향의 위치까지 매우 정확하게 파악할 수 있게 되어 3차원 방향으로 초고해상도 이미지를 얻는 것이 가능해진다 (그림 9(B)). 이렇게 원통형 렌즈를 도입하여 비점수차를 이용하는 방법 이외에도 빛의 간섭현상을 이용하는 방법,^[21] 다중 평면 이미징^[22]을 이용하는 방법 등 여러 가지 방법이 있다.

관측과 분석시간의 감소

1. 관측시간

STORM/PALM을 이용하여 1개의 고해상도 이미지를 얻기 위해서는 보통 10,000~100,000개 정도의 이미지로 이루어진 동영상 분석해야 한다. 실험에서 일반적으로 사용하는 CCD 카메라가 1개의 이미지를 얻기 위해 30 ms 정도가 필요하다는 점을 고려하면 고해상도 이미지를 얻기 위해서는 5분에서 50분 정도의 시간이 소요된다는 것이다. 만약 3차원으로 이미지를 구성한다고 하면 필요한 시간은 기하급수적으로 증가하게 된다. 이렇게 긴 시간이 필요하다면 정적인 이미지를 얻을 때는 문제가 없을지라도 살아있는 시료의 동적인 상태를 연구하기는 어렵게 된다.

이와 같이 STORM/PALM에서 긴 시간 동안 많은 이미지를 필요로 하는 것은 회귀분석을 통해 위치를 결정하기 위해서 단일형광분자들을 서로 구별할 수 있을 정도의 적은 수만 한 화면에 나타나야 하기 때문이다. 그렇지만 최근 들어 알고리즘의 발전을 통해 설명 여러 개의 단일형광분자가 겹쳐있다고 하더라도 위치를 결정할 수 있게 되면서 1개의 고해상도 이미

Fig. 11. Schematic diagram of parallel analysis by GPU.^[26]

지를 얻기 위해 필요한 기본 이미지의 수를 많이 줄일 수 있을 것으로 기대되고 있다^[23,24] (그림 10). 또한 CCD 카메라 대신 sCMOS 카메라의 등장으로 1개의 이미지를 얻는데 걸리는 시간이 더욱 줄어들어 많은 이미지를 더 짧은 시간에 얻을 수 있게 되었다. 위와 같은 기술의 발전을 기반으로 하여 최신 연구에서는 작은 영역에서 초고해상도 이미지를 얻는데 단지 33 ms 정도가 소요된다는 결과가 보고되었다.^[25]

2. 분석시간

STORM/PALM 기술은 측정시간뿐 아니라 분석하는데도 많은 시간이 소요된다. 1개의 고해상도 이미지를 얻기 위해서는 최소 수백만에서 수천만 개의 단일형광분자의 이미지를 비선형

REFERENCES

- [21] G. Shtengel, *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**, 3125, doi:10.1073/pnas.0813131106 (2009).
- [22] M. F. Juetten, *et al.*, Nature Methods **5**, 527, doi:10.1038/nmeth.1211 (2008).
- [23] S. J. Holden, S. Uphoff and A. N. Kapanidis, Nature Methods **8**, 279, doi:10.1038/nmeth0411-279 (2011).
- [24] F. Huang, S. L. Schwartz, J. M. Byars and K. A. Lidke, Biomedical Optics Express **2**, 1377, doi:10.1364/BOE.2.001377 (2011).
- [25] F. Huang, *et al.*, Nature Methods **10**, 653, doi:10.1038/nmeth.2488 (2013).
- [26] C. S. Smith, N. Joseph, B. Rieger and K. A. Lidke, Nature Methods **7**, 373, doi:10.1038/nmeth.1449 (2010).

Fig. 12. Super-resolution imaging of neuron. (A) Conventional fluorescence result. (B) Detailed 3D STORM image of yellow rectangle region. Periodic structure is observed in STORM image.^[27]

회귀분석을 해야 하기 때문에 계산해야 할 양이 많은 축에 속한다. 따라서 실험을 하고 결과를 얻기까지 긴 시간을 필요로 하기 때문에 빠르게 결과를 확인하고 조건을 바꿔가야 하는 실험에서는 단점으로 작용하게 된다. 처음 기술이 도입되었을 때는 분석하는데 걸리는 시간이 측정하는데 걸리는 시간보다 오히려 더 길기도 하였다. 그렇지만 최근 들어 그래픽카드의 병렬연산을 이용하여 분석시간을 획기적으로 단축시키는데 성공하였고, 그 결과 측정을 하면서 실시간으로 분석을 할 수 있는 수준까지 이르렀다^[26] (그림 11).

맺음말

단일형광분자 관찰을 기반으로 하는 초고해상도 형광 현미경 STORM/PALM 기술의 등장으로 인해 형광 현미경의 장점을 그대로 갖고 있으면서도 10 nm 수준의 분해능을 갖고 고해상도의 이미지를 얻는 것이 가능해졌다. 기술이 개발된 지 많은 시간이 흐르지 않았기 때문에 지금까지의 연구는 주로 기술 자체를 좀 더 발전시키거나 기존에 갖고 있는 단점들을 개량하는데 집중되었다. 광자를 더 많이 모으거나 노이즈를 줄이는 방식을 통해 더 좋은 분해능을 얻는 것이 가능해졌고, 비점수차를 의도적으로 도입하는 등의 방법을 이용해서 3차원 방향에서의 높은 분해능을 얻는 것이 가능해졌다. 그리고 실험장비와 분석 방법의 발전으로 측정과 결과분석에 필요한 시간 또한 획기적으로 줄어들었다. 그리고 최근 들어서는 단지 기술의 발전에서 벗어나서 직접적으로 STORM을 이용하여 뇌 조직에서 신경세포의 새로운 구조를 밝혀낸 결과가 Science에 출판

Fig. 13. STORM images of nanowire. (A, C) Conventional fluorescence images. (C) is the enlarged image of the small region in white rectangle in (A). (B, D) Corresponding STORM images of nanowires. Scale bar : 5 μ m (A, C) and 500 nm (B, D).^[28]

되는 등^[27] (그림 12) STORM을 이용한 생물학 연구가 점점 활발해질 것으로 기대되고 있다. 또한 세포나 조직 등의 생물시료뿐 아니라 나노와이어같은 나노구조물질을 관찰하는 데도 STORM 기술이 사용되기도 하여 그 적용범위 또한 넓어질 것으로 예상된다^[28] (그림 13).

현재 연구 개발되고 있는 초고해상도 형광 현미경이 기존의 전자현미경이나 원자현미경보다 무조건 좋은 것은 아니며 장점뿐 아니라 단점 또한 존재하고 있다. 그렇지만 기존의 기술이 갖는 한계점으로 인해 부족했던 부분을 채워 줄 수 있음은 분명하고 따라서 다른 기술과의 상호 보완을 통해 기존에 연구하기 어려웠던 부분을 연구할 수 있는 새로운 도구를 제공한다는 점에서 그 의미가 크다고 할 수 있다. 이런 새로운 기술의 발전이 더 나은 연구 환경을 제공하고 나아가 과학발전에 기여하기를 기대해본다.

사사

본 글은 창의 연구(물리 유전학 연구단, 2009-0081562)의 지원 하에 작성되었음.

REFERENCES

- [27] K. Xu, G. Zhong and X. Zhuang, Science **339**, 452, doi: 10.1126/science.1232251 (2013).
- [28] J. Park, *et al.*, Small, doi:10.1002/sml.201301214 (2013).