



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0099463
(43) 공개일자 2023년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 21/65 (2006.01) G01J 3/28 (2006.01)
G01J 3/44 (2006.01) G01N 21/17 (2006.01)
G01N 21/25 (2006.01) G01N 21/31 (2006.01)
G01N 21/39 (2006.01) G01N 21/45 (2006.01)
G01N 21/63 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 21/65 (2013.01)
G01J 3/2823 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0188835

(22) 출원일자 2021년12월27일

심사청구일자 2021년12월27일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

기초과학연구원

대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

조민행

서울특별시 성북구 안암로 145

박진성

서울특별시 성북구 안암로 145

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열, 김태훈

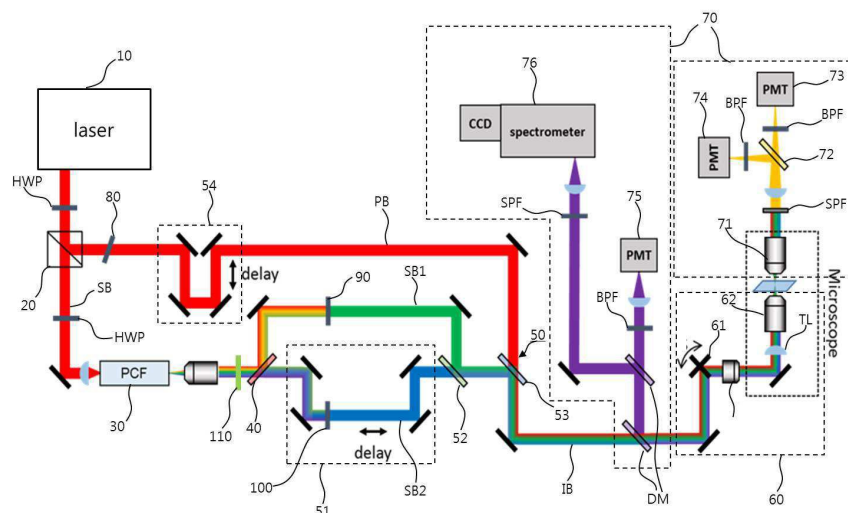
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 광대역 비표지 분자 이미징 시스템

(57) 요약

본 발명은 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 관한 것으로, 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템은 레이저광을 조사하는 광원(10), 광원(10)에서 조사된 레이저광을 펌프광(PB) 및 스톡스광(SB)으로 분할하는 광분할기(20), 광분할기(20)에서 분할된 스톡스광(SB)의 파장범위를 확장하는 광결정 광섬유(photonic crystal fiber, PCF, 30), 소정의 파장범위에 따라, 광결정 광섬유(30)를 통과한 스톡스광(SB)을 제1 스톡스광(SB1) 및 제2 스톡스광(SB2)으로 분할하는 스톡스광분할 이색거울(dichroic mirror, 40), 펌프광(PB), 제1 스톡스광(SB1), 및 제2 스톡스광(SB2)을 시간적 및 공간적으로 일치시켜, 결합광(IB)을 생성하는 광결합부(50), CARS(Coherent anti-Stokes Raman Scattering) 신호가 발생되도록, 광결합부(50)에서 생성된 결합광(IB)으로 샘플을 스캐닝하는 스캐닝부(60), 및 CARS 신호를 검출하는 검출부(70)를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01J 3/44 (2013.01)
G01N 21/255 (2013.01)
G01N 21/314 (2013.01)
G01N 21/39 (2013.01)
G01N 21/45 (2013.01)
G01N 21/636 (2013.01)
G01N 2021/1765 (2013.01)
G01N 2021/637 (2013.01)
G01N 2201/08 (2013.01)

(71) 출원인

한국기초과학지원연구원
대전광역시 유성구 과학로 169-148 (어은동)
주식회사 유니오텍
대전광역시 유성구 테크노4로 17, 3층 비313호(관평동, 대덕비즈센터)

(72) 발명자

최대식
대전광역시 유성구 배울2로 3, 801동 2102호
이한주
서울특별시 성동구 행당로 99, 103동 402호
임소희
서울특별시 성북구 안암로 145

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711134301
과제번호	IBS-R023-D1-2021-A00
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	기초과학연구원
연구사업명	기초과학연구원연구운영비지원(R&D)
연구과제명	분자 분광학 및 동력학 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	기초과학연구원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711123568
과제번호	C070420
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국기초과학지원연구원
연구사업명	한국기초과학지원연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명	생체노출 초미세플라스틱 검출기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한국기초과학지원연구원
연구기간	2020.05.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

레이저광을 조사하는 광원;

상기 광원에서 조사된 상기 레이저광을 펌프광 및 스톡스광으로 분할하는 광분할기;

상기 광분할기에서 분할된 상기 스톡스광의 파장범위를 확장하는 광결정 광섬유(photonic crystal fiber, PCF);

소정의 파장범위에 따라, 상기 광결정 광섬유를 통과한 상기 스톡스광을 제1 스톡스광 및 제2 스톡스광으로 분할하는 스톡스광분할 이색거울(dichroic mirror);

상기 펌프광, 상기 제1 스톡스광, 및 상기 제2 스톡스광을 시간적 및 공간적으로 일치시켜, 결합광을 생성하는 광결합부;

CARS(Coherent anti-Stokes Raman Scattering) 신호가 발생되도록, 상기 광결합부에서 생성된 상기 결합광으로 샘플을 스캐닝하는 스캐닝부; 및

상기 CARS 신호를 검출하는 검출부;를 포함하는 광대역 비표지 분자 이미징 시스템.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 광결합부는,

상기 제1 스톡스광과 상기 제2 스톡스광이 시간적으로 일치되도록, 상기 제2 스톡스광의 시간을 조절하는 스톡스광 조절기;

상기 스톡스광 조절기를 통과한 상기 제2 스톡스광과, 상기 제1 스톡스광을 공간적으로 일치시키는 스톡스광결합 이색거울; 및

상기 스톡스광결합 이색거울을 통해 공간적으로 일치된 상기 제1 스톡스광 및 상기 제2 스톡스광과, 상기 펌프광을 공간적으로 일치시켜, 상기 결합광을 생성하고, 생성된 상기 결합광을 상기 스캐닝부로 조사하는 결합광생성 이색거울;을 포함하는 광대역 비표지 분자 이미징 시스템.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 광결합부는,

상기 스톡스광 조절기에서 시간적으로 일치된 상기 제1 스톡스광 및 상기 제2 스톡스광과, 상기 펌프광이 시간적으로 일치되도록, 상기 펌프광의 시간을 조절하는 펌프광 조절기;를 더 포함하는 광대역 비표지 분자 이미징 시스템.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 광결합부로 조사되는 상기 펌프광의 파장범위를 조절하는 펌프광 대역통과필터(band pass filter);

상기 광결합부로 조사되는 상기 제1 스톡스광의 파장범위를 조절하는 제1 스톡스광 대역통과필터; 및

상기 광결합부로 조사되는 상기 제2 스톱스광의 파장범위를 조절하는 제2 스톱스광 대역통과필터;를 더 포함하는 광대역 비표지 분자 이미징 시스템.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 광결정 광섬유를 통과한 상기 스톱스광이 입사되고, 장파장 영역의 상기 스톱스광을 투과시키는 장파통과필터(long pass filter);를 더 포함하는 광대역 비표지 분자 이미징 시스템.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 스캐닝부는,

상기 샘플에 대한 상기 결합광의 스캔 영역을 조절하는 갈바노 스캐너(galvano scanner); 및

상기 갈바노 스캐너를 통과한 상기 결합광을 후방에서 상기 샘플을 향해 집속시키는 후방 대물렌즈;를 포함하는 광대역 비표지 분자 이미징 시스템.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 검출부는,

상기 결합광이 상기 샘플에 집속되어 전방에서 생성된 전방 CARS 신호를 수집하는 전방 대물렌즈;

상기 전방 CARS 신호를, 상기 펌프광과 상기 제1 스톱스광의 조합에 의해 생성된 제1 CARS 신호, 및 상기 펌프광과 상기 제2 스톱스광의 조합에 의해 생성된 제2 CARS 신호를 분리하는 신호분리 이색거울;

상기 신호분리 이색거울에서 분리된 상기 제1 CARS 신호를 검출하는 제1 광전증배관(photomultiplier tube, PMT); 및

상기 신호분리 이색거울에서 분리된 상기 제2 CARS 신호를 검출하는 제2 광전증배관;을 포함하는 광대역 비표지 분자 이미징 시스템.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 검출부는,

상기 결합광이 상기 샘플에 집속되어 후방에서 생성된 후방 CARS 신호를 검출하는 제3 광전증배관;을 더 포함하는 광대역 비표지 분자 이미징 시스템.

청구항 9

청구항 7에 있어서,

상기 검출부는,

상기 결합광이 상기 샘플에 집속되어 후방에서 생성된 후방 CARS 신호의 스펙트럼을 검출하는 분광계;를 더 포함하는 광대역 비표지 분자 이미징 시스템.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 샘플은,

미세플라스틱 입자가 내재화된 세포 또는 생체를 포함하는 생물학적 샘플인 광대역 비표지 분자 이미징 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 관한 것으로, 보다 상세하게는 분자 진동 에너지 기반 2개 이상의 라만 모드를 이용하여 2개 이상의 이미지를 동시에 실시간으로 획득할 수 있는 이미징 시스템 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 미세플라스틱(Microplastic, MP) 입자는 지구상의 거의 모든 곳에서 발견되는 매우 작은 플라스틱 파편이다. 미세생물이 섭취한 미세플라스틱 입자는 먹이 사슬을 통해 거대생물이나 인간의 체내에 축적되어 신진대사와 생식에 심각한 영향을 미치므로, 중요한 생태학적 위협 요소로 여겨지고 있다. 환경 샘플 내 미세플라스틱의 크기와 화학적 조성을 파악하기 위해서 다양한 광학 현미경이 개발되었지만, 비슷한 크기와 형태의 세포 소기관이 존재하므로 세포 내 미세플라스틱 입자를 직접적으로 시각화하고 구별하는 것이 어렵다. 또한, 형광을 미세플라스틱 입자에 라벨링하여 관찰하는 방법이 개발되었으나, 형광 이미징 방법의 경우 형광 물질이 고분자로 이루어져 장시간 빛을 받으면 형광이 점점 약해져서 이미징을 할 수 없는 등 불안정한 광-물리적 특성을 가지고, 형광 자체의 독성에 의해 생체 손상이 유발될 수 있어 생물학적 샘플에 적용하기가 곤란하다.

[0004] 이에 라벨링이 필요 없이 분자의 진동에너지를 이용하는 비표지 진동 이미징 기술이 미세플라스틱의 독성 및 환경을 연구하는 분야에서 매우 큰 관심을 받고 있다. 이러한 비표지 진동 이미징 기술은 생물학적 샘플 내 오염물에 대한 비파괴, 비침습 및 직접적 화학적 이미징을 가능하게 한다. 위상차현미경(phase contrast microscope)이나 차등간섭대비현미경(differential interference contrast microscope) 등과 같은 다른 광학 현미경은 미세플라스틱 입자를 함유하지 않는 생물학적 샘플을 관찰하는데 널리 사용되고 있지만, 그 현미경 이미지는 화학적 특이 정보를 제공하지 못한다. 예를 들어, 이러한 광학 현미경은 세포 내 미세플라스틱과 동일한 크기의 지질이나 단백질 액적(droplet)을 구별할 수 없다. 이에 반해, 진동 이미징 기술은 미세플라스틱에 대한 사전 라벨링 없이 세포 내 서로 다른 화학적 조성 및 구조를 가지는 미세입자와 미세플라스틱을 식별할 수 있다.

[0005] 마이크로 푸리에 변환 적외선(micro-Fourier-transform IR, FT-IR) 이미징, 초점 어레이 푸리에 변환 적외선 초분광 이미징(focal array FT-IR hyperspectral imaging, HSI), 근적외선 초분광 이미징(near IR (NIR) HSI) 등과 같은 적외선(IR) 현미경을 이용한 이미징 방법이 널리 사용되는 진동 이미징 방법 중 하나이다. 그러나 이러한 적외선 흡수 또는 반사 기반 진동 이미징 방법은 중적외선 파장 회절(mid-IR wave diffraction)에 의한 기본 분해능 한계 등으로 인해 10 μm 미만의 미세플라스틱 입자를 정량분석하기에 부적합하다. 또한, 세포 및 유기체의 생리학적 용매인 물은 광범위한 적외선 주파수 영역에서 빛을 흡수하므로, 생물학적 샘플에의 적용이 더욱 제한될 수밖에 없다. 적외선 현미경과 달리 라만 현미경(Raman microscopy)은 물 분자에 의해 흡수되지 않는 가시광 레이저 빔(visible laser beam)을 사용하므로, 보다 향상된 공간 분해능을 가지고, 미세플라스틱 입자 이미지를 얻는데 사용될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 자발 라만 산란 현미경(spontaneous Raman scattering microscopy)은 광손상, 작은 산란 단면으로 인한 낮은 검출 감도 등의 이유로 생물학적 응용 분야에서 그 사용이 제한적이다.

[0006] 따라서, 하기 선행기술문헌의 비특허문헌에 개시된 바와 같이, 초단파 레이저 펄스와 다광자 광물질 간의 상호작용을 활용한 간섭성 반스톡스 라만 산란(Coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) 현미경이 미세플라

스틱의 생물학적 이미징을 위한 방법으로 선택될 수 있다. CARS 현미경은 우수한 공간 분해능, 고감도, 형광 비표지 등과 같은 장점을 가지므로 생물학에서 환경 과학에 이르기까지 다양한 연구 분야에서 광범위하게 사용되고 있다. 최근에는 CARS 현미경을 이용해 게(crab)와 동물성 플랑크톤 등과 같은 해양 생물이 섭취한 미세플라스틱 입자를 검출하여 생체 내 미세플라스틱 입자의 분포 및 축적을 밝혀낸 바 있다. 다만, 단색 CARS 현미경은 선택된 입자에 대한 하나의 자동 이미징 맵을 제공하기 때문에, 동시에 화학적으로 서로 다른 미세플라스틱 입자들을 식별하거나, 다른 소기관으로부터 특정 미세플라스틱 입자만을 구별할 수 없다. 이러한 한계를 극복하기 위해서, 초분광 이미징(HSI) 접근법에 기반한 광대역 다중 CARS 현미경이 개발되어 서로 다른 화학 종을 동시에 특성화하는데 도움을 주고 있다. 다만, 광대역 다중 CARS 현미경은 각 이미지 픽셀에 기록된 전체 진동 스펙트럼으로부터 화학적으로 다른 미세플라스틱 입자의 초분광 이미지를 얻을 수 있지만, 이미징 속도가 느린 단점이 있다. 결국, 미세플라스틱 입자의 생물학적 반응과 독성 효과를 이해하는데 매우 중요한 세포 내재화(cellular internalization), 세포 내 수송, 및 미세플라스틱 입자의 조직 내 침투와 같은 생체 내 미세플라스틱과 이들이 접합된 소기관의 동적 행동을 연구하기에 초분광 이미지 기반 방법은 한계가 있다.

[0007] 한편, 생체 내 미세플라스틱 입자를 실시간으로 관찰하기 위해서는 적어도 2개의 구분(세포, 생체, 미세플라스틱)이 가능한 2개의 라만 모드(Raman mode)가 필요하므로, 2개 이미지를 동시에 측정하도록 시스템이 구축되어야 하는데, 현재 기술로는 파장이 서로 다른 3개의 광원이 필요하므로, 시스템이 매우 복잡하고 시스템 구축에 상당한 비용이 소요되는 문제가 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Choi, D S; Kim, C H; Lee, T; Nah, S; Rhee, H; Cho, M Vibrational spectroscopy and imaging with non-resonant coherent anti-Stokes Raman scattering: Double stimulated Raman scattering scheme Opt Express 2019, 27, 23558-23575

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일측면은 1대의 펄스 레이저와 광결정 광섬유를 사용하여 레이저 스캐닝으로 fingerprint 및 CH stretch 영역을 동시에 측정할 수 있는 초광대역 멀티플렉스(multiplex) CARS 현미경 및 그 현미경 시스템으로서, 광대역 비표지 분자 이미징 시스템을 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 측면은 전방에 2대의 검출기와 후방에 1대의 검출기를 사용함으로써, 3개의 라만 모드를 이용하여 동시에 3개의 이미지를 얻을 수 있으며 실시간 이미지 획득이 가능한 광대역 비표지 분자 이미징 시스템을 제공하고자 한다.

[0012] 또한, 본 발명의 또 다른 측면은 라만 모드를 사용하는 2대의 검출기를 전방에 사용하고, 이광자 형광기술을 사용하는 1대의 검출기를 후방에 사용함으로써, 형광이미지도 동시에 획득할 수 있는 광대역 비표지 분자 이미징 시스템을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템은 레이저광을 조사하는 광원; 상기 광원에서 조사된 상기 레이저광을 펌프광 및 스톱스광으로 분할하는 광분할기; 상기 광분할기에서 분할된 상기 스톱스광의 파장범위를 확장하는 광결정 광섬유(photonic crystal fiber, PCF); 소정의 파장범위에 따라, 상기 광결정 광섬유를 통과한 상기 스톱스광을 제1 스톱스광 및 제2 스톱스광으로 분할하는 스톱스광분할 이색거울(dichroic mirror); 상기 펌프광, 상기 제1 스톱스광, 및 상기 제2 스톱스광을 시간적 및 공간적으로 일치시켜, 결합광을 생성하는 광결합부; CARS(Coherent anti-Stokes Raman Scattering) 신호가 발생되도록, 상기 광결합부에서 생

성된 상기 결합광으로 샘플을 스캐닝하는 스캐닝부; 및 상기 CARS 신호를 검출하는 검출부;를 포함한다.

- [0015] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 있어서, 상기 광결합부는, 상기 제1 스톱스광과 상기 제2 스톱스광이 시간적으로 일치되도록, 상기 제2 스톱스광의 시간을 조절하는 스톱스광 조절기; 상기 스톱스광 조절기를 통과한 상기 제2 스톱스광과, 상기 제1 스톱스광을 공간적으로 일치시키는 스톱스광결합 이색거울; 및 상기 스톱스광결합 이색거울을 통해 공간적으로 일치된 상기 제1 스톱스광 및 상기 제2 스톱스광과, 상기 펌프광을 공간적으로 일치시켜, 상기 결합광을 생성하고, 생성된 상기 결합광을 상기 스캐닝부로 조사하는 결합광생성 이색거울;을 포함할 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 있어서, 상기 광결합부는, 상기 스톱스광 조절기에서 시간적으로 일치된 상기 제1 스톱스광 및 상기 제2 스톱스광과, 상기 펌프광이 시간적으로 일치되도록, 상기 펌프광의 시간을 조절하는 펌프광 조절기;를 더 포함할 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 있어서, 상기 광결합부로 조사되는 상기 펌프광의 파장범위를 조절하는 펌프광 대역통과필터(band pass filter); 상기 광결합부로 조사되는 상기 제1 스톱스광의 파장범위를 조절하는 제1 스톱스광 대역통과필터; 및 상기 광결합부로 조사되는 상기 제2 스톱스광의 파장범위를 조절하는 제2 스톱스광 대역통과필터;를 더 포함할 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 있어서, 상기 광결정 광섬유를 통과한 상기 스톱스광이 입사되고, 장파장 영역의 상기 스톱스광을 투과시키는 장파통과필터(long pass filter);를 더 포함할 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 있어서, 상기 스캐닝부는, 상기 샘플에 대한 상기 결합광의 스캔 영역을 조절하는 갈바노 스캐너(galvano scanner); 및 상기 갈바노 스캐너를 통과한 상기 결합광을 후방에서 상기 샘플을 향해 집속시키는 후방 대물렌즈;를 포함할 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 있어서, 상기 검출부는, 상기 결합광이 상기 샘플에 집속되어 전방에서 생성된 전방 CARS 신호를 수집하는 전방 대물렌즈; 상기 전방 CARS 신호를, 상기 펌프광과 상기 제1 스톱스광의 조합에 의해 생성된 제1 CARS 신호, 및 상기 펌프광과 상기 제2 스톱스광의 조합에 의해 생성된 제2 CARS 신호를 분리하는 신호분리 이색거울; 상기 신호분리 이색거울에서 분리된 상기 제1 CARS 신호를 검출하는 제1 광전증배관(photomultiplier tube, PMT); 및 상기 신호분리 이색거울에서 분리된 상기 제2 CARS 신호를 검출하는 제2 광전증배관;을 포함할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 있어서, 상기 검출부는, 상기 결합광이 상기 샘플에 집속되어 후방에서 생성된 후방 CARS 신호를 검출하는 제3 광전증배관;을 더 포함할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 있어서, 상기 검출부는, 상기 결합광이 상기 샘플에 집속되어 후방에서 생성된 후방 CARS 신호의 스펙트럼을 검출하는 분광계;를 더 포함할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 있어서, 상기 샘플은, 미세플라스틱 입자가 내재화된 세포 또는 생체를 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[0026] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따르면, 1대의 펌프초 레이저와 광결정 광섬유를 사용하여 레이저 스캐닝으로 fingerprint 및 CH stretch 영역을 측정할 수 있는 초광대역 CARS 신호를 동시에 얻을 수 있다.

[0029] 또한, 레이저 스캐닝을 통해 최대 속도 1 frame/s으로 두 개 이상의 라만 모드(Raman mode)를 사용하여 2개 이상의 이미지를 동시에 실시간으로 획득할 수 있다.

[0030] 나아가 본 발명은 비표지 기술로서 생체 또는 세포에 대한 전처리 과정 없이, 생체 또는 세포 내 미세플라스틱 입자와 세포 소기관을 각각 이미징할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 라만 모드를 사용하는 전방 검출기 외에, 이광자 형광기술을 사용하는 후방 검출기를 배치함으로써 이광자 형광기술을 결합한 Multi-modal 현미경 시스템을 구축하여 생물학적 샘플에 대한 형광 이미지를 동시에 획득할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템을 개략적으로 도시한 구성도이다.

도 2 내지 도 3은 실험예에 따른 Multi-color CARS 현미경의 구성도이다.

도 4의 (a) ~ (d)는 실험예에 따른 8.7 μ m PS 비드와 혼합된 백합 꽃가루의 Multi-color CARS-TPE 이미지이고, 도 4의 (e) ~ (l)은 실험예에 따른 2 μ m PS 비드를 섭취한 *C. elegans*의 Multi-color CARS-TPE 이미지이다.

도 5의 (a)는 실험예에 따른 2 μ m PS 비드 용액에 노출된 U2OS 세포의 wide-illuminated PC 이미지이고, 도 5의 (b)는 상기 PS 비드 용액에 노출된 U2OS 세포의 Multi-color CARS 이미지이며, 도 5의 (c)~ (f)는 U2OS 세포 내 PS 비드 및 세포 소기관(LDs)의 입자 추적 및 이동 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서, 동일한 구성 요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를 가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 또한, "제1", "제2" 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위해 사용되는 것으로, 구성요소가 상기 용어들에 의해 제한되는 것은 아니다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.

[0035] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.

[0037] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템을 개략적으로 도시한 구성도이다.

[0038] 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템은 레이저광을 조사하는 광원(10), 광원(10)에서 조사된 레이저광을 펌프광(PB) 및 스톱스광(SB)으로 분할하는 광분할기(20), 광분할기(20)에서 분할된 스톱스광(SB)의 파장범위를 확장하는 광결정 광섬유(photonic crystal fiber, PCF, 30), 소정의 파장범위에 따라, 광결정 광섬유(30)를 통과한 스톱스광(SB)을 제1 스톱스광(SB1) 및 제2 스톱스광(SB2)으로 분할하는 스톱스광분할 이색거울(dichroic mirror, 40), 펌프광(PB), 제1 스톱스광(SB1), 및 제2 스톱스광(SB2)을 시간적 및 공간적으로 일치시켜, 결합광(IB)을 생성하는 광결합부(50), CARS(Coherent anti-Stokes Raman Scattering) 신호가 발생되도록, 광결합부(50)에서 생성된 결합광(IB)으로 샘플을 스캐닝하는 스캐닝부(60), 및 CARS 신호를 검출하는 검출부(70)를 포함한다.

[0040] 본 발명은 레이저를 이용한 고분해능 비표지 이미징 시스템에 관한 것으로서, 분자의 진동 에너지 기반의 2개 또는 그 이상의 라만 모드(Raman mode)를 이용하여 2개 또는 그 이상의 2차원 이미지를 동시에 획득할 수 있는 초광대역 멀티플렉스(multiplex) CARS 현미경 시스템을 제공한다. 생체 또는 세포 수준의 이미지를 얻기 위해서 일반적으로 고배율 광학 이미지를 이용하거나 특정 부분 또는 특정 소기관의 실시간 변화를 관찰하기 위해서 형광을 라벨링하여 관찰하는 방법을 최근까지 많이 사용되고 있다. 고분해능 형광 이미지를 확보하기 위해서 공초점 레이저 스캐닝 형광 이미징 기술을 사용할 수 있는데, 이에 의하면 일반 형광 이미징에 비해서 1.4배 정도 고분해능으로 이미징이 가능하므로 현재까지 많이 사용되고 있다. 최근에는 형광 이미징 또는 레이저 스캐닝 형광 이미지를 통해서, 미세플라스틱 입자가 다양한 종류의 생체(플랑크톤, *C. elegans*, 제브라피쉬 등등)에서 흡수 또는 섭취되어 그 생체 내에 축적되는 것으로 밝혀졌다. 다만, 형광은 고분자로 구성되어 있고 장시간 빛을 받으면 형광이 점점 약해져서 이미지를 할 수 없게 되고 형광 자체의 독성에 의해서 생체내의 손상이 발생할 수 있는 단점이 발생하는데, 최근에는 형광을 사용하지 않는 현미경 기술이 개발되고 있다. 특히, 지난 20년 동안,

다양한 고분자 물질, 신물질, 살아있는 바이오 샘플의 연구를 위해서, 라벨링이 필요 없는 분자의 진동에너지를 이용하는 CARS(Coherent anti-Stokes Raman Scattering) 분광 및 현미경 기술이 다양하게 개발되었다. CARS 분광은 사광과 혼합 분광이기 때문에, 종래 CARS 현미경은 적어도 파장이 다른 두 대의 10 피코초(ps) 이하 펄스 레이저를 사용한다. 일례로, 2대의 피코초 레이저 또는 1대의 피코초 레이저와 1대의 펨토초 레이저를 이용한 CARS 이미징은 고속 이미징이 가능하기 때문에 살아있는 세포 및 조직(protein, lipid droplets, nucleic acid, endoplasmic reticulum)을 실시간으로 모니터링하거나, dynamics를 관찰할 수 있다. 그러나 종래 피코초 레이저를 사용하여 2개의 라만 모드를 유발함으로써 2개의 이미지를 동시에 얻기 위해서는 반드시 3개의 레이저 광이 필요하므로, 시스템 구성이 복잡하고, 피코초 레이저 및 펨토초 레이저가 매우 고가이기 때문에 경제적 및 공간적 측면에서 문제가 있는바, 이에 대한 해결방안으로서 본 발명이 안출되었다.

[0041] 구체적으로, 본 발명에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템은 광원(10), 광분할기(20), 광결정 광섬유(photonic crystal fiber, PCF, 30), 스톡스광분할 이색거울(dichroic mirror, 40), 광결합부(50), 스캐닝부(60), 및 검출부(70)를 포함한다.

[0043] 여기서, 광원(10)은 레이저광을 조사하는 레이저이다. 일례로, 광원(10)은 1대의 펨토초 레이저일 수 있다.

[0045] 광분할기(20)는 광원(10)에서 조사된 레이저광을 2개의 광으로 분할한다. CARS 신호를 획득하기 위해서는 펌프광(PB)과 스톡스광(SB)이 필요한데, 광분할기(20)에서 레이저광을 펌프광(PB)과 스톡스광(SB)으로 분할한다. 한편, 레이저광이 광분할기(20)로 향하는 광경로 상에 반파장판(half wave plate, HWP)이 배치되어, 레이저광의 편광상태가 조정되고, 여기서 편광된 레이저광이 광분할기(20)인 편광 빔스플리터(polarizing beam splitter, PBS)로 입사되어, 펌프광(PB)과 스톡스광(SB)으로 분할될 수 있다. 또한, 스톡스광(SB)의 광경로 상에 다른 반파장판(half wave plate, HWP)이 배치되어, 스톡스광(SB)의 편광이 조정될 수 있다.

[0047] 광결정 광섬유(photonic crystal fiber, PCF, 30)는 광분할기(20)에서 분할된 스톡스광(SB)의 파장범위를 확장한다. 이러한 광결정 광섬유(30)를 통과한 스톡스광(SB)은 초광대역의 스펙트럼을 가지게 되고, 스톡스광분할 이색거울(40)로 조사된다.

[0048] 한편, 스톡스광(SB)이 소정의 파장범위를 가지도록, 광결정 광섬유(30)와 스톡스광분할 이색거울(40) 사이의 스톡스광(SB) 광경로 상에, 장파통과필터(long pass filter, 110)가 배치될 수 있다. 이때, 광결정 광섬유(30)를 통과한 스톡스광(SB)이 장파통과필터(110)에 입사되고, 장파장 영역의 스톡스광(SB)이 투과되어 스톡스광분할 이색거울(40)로 조사될 수 있다.

[0050] 스톡스광분할 이색거울(dichroic mirror, 40)은 광결정 광섬유(30)를 통과한 스톡스광(SB)을 소정의 파장범위에 따라 제1 스톡스광(SB1) 및 제2 스톡스광(SB2)으로 분할한다.

[0051] 한편, CARS 신호는 2개의 서로 다른 주파수를 가진 펌프광(PB)과 스톡스광(SB)이 시간적 및 공간적으로 동시에 겹쳐져 있을 때에 발생하는데, 본 발명에서는 펌프광(PB) 및 제1 스톡스광(SB1)의 조합, 및 펌프광(PB)과 제2 스톡스광(SB2)의 조합에 의해 각각 CARS 신호가 발생한다.

[0053] 광결합부(50)는 CARS 신호가 발생되도록, 펌프광(PB), 제1 스톡스광(SB1), 및 제2 스톡스광(SB2)을 시간적 및 공간적으로 일치시켜 결합광(IB)을 생성한다.

[0054] 한편, CARS 신호의 발생을 위해 결합광(IB) 생성 전, 즉 광결합부(50)로 조사되기 전에, 펌프광(PB)은 펌프광 대역통과필터(band pass filter, 80)를 통과하고, 제1 스톡스광(SB1)은 제1 스톡스광 대역통과필터(90)를 통과하며, 제2 스톡스광(SB2)은 제2 스톡스광 대역통과필터(100)를 통과함으로써, 펌프광(PB), 제1 스톡스광(SB1), 및 제2 스톡스광(SB2) 각각의 파장범위가 조절될 수 있다. 이렇게 파장범위가 조정된 펌프광(PB)과 제1 스톡스광(SB1)의 주파수 차이, 및 펌프광(PB)과 제2 스톡스광(SB2)의 주파수 차이가 샘플 내 타겟 라만 활성 모드의 진동 주파수와 일치될 때에 CARS 신호가 발생한다. 결국, 주파수가 고정된 펌프광(PB)에 대해, 제1 스톡스광(SB1) 및 제2 스톡스광(SB2)의 주파수를 독립적으로 조정함으로써, 2개 또는 그 이상의 진동 모드를 이용하여,

2개 이상의 이미지를 동시에 얻을 수 있다.

- [0055] 일 실시예로, 광결합부(50)는 스톱스광 조절기(51), 스톱스광결합 이색거울(52), 및 결합광생성 이색거울(53)을 포함하여, 결합광(IB)을 생성할 수 있다.
- [0056] 여기서, 스톱스광 조절기(51)는 제2 스톱스광(SB2)의 광경로 상에 배치되어, 제2 스톱스광(SB2)의 시간을 조절함으로써, 제1 스톱스광(SB1)과 제2 스톱스광(SB2)을 시간적으로 일치시킨다. 스톱스광 조절기(51)는 제2 스톱스광(SB2)의 광경로를 연장하거나, 또는 단축시키는 방식으로, 제2 스톱스광(SB2)의 광경로를 조절하여 제2 스톱스광(SB2)의 시간을 변경할 수 있다.
- [0057] 스톱스광 조절기(51)를 통과한 제2 스톱스광(SB2)과, 제1 스톱스광(SB1)은 스톱스광결합 이색거울(52)로 각각 입사되어 동축 상에서 겹쳐져, 즉 공간적으로 일치되어 결합광생성 이색거울(53)로 조사된다. 한편, 펌프광(PB)도 결합광생성 이색거울(53)로 조사됨으로써, 펌프광(PB), 제1 스톱스광(SB1), 및 제2 스톱스광(SB2)이 공간적으로 일치되어 결합광(IB)을 생성한다. 이렇게 결합광생성 이색거울(53)을 거쳐 생성된 결합광(IB)은 스캐닝부(60)로 조사된다. 한편, 결합광생성 이색거울(53)을 향해 조사되는 펌프광(PB)은 펌프광 조절기(54)를 거칠 수 있다. 펌프광 조절기(54)는 광분할기(20)로부터 결합광생성 이색거울(53)을 거치는 펌프광(PB) 광경로 상에 배치되어, 펌프광(PB)의 시간을 지연시킴으로써, 스톱스광 조절기(51)에서 시간적으로 일치된 제1 스톱스광(SB1) 및 제2 스톱스광(SB2)과, 펌프광(PB)을 시간적으로 일치시킬 수 있다. 여기서, 펌프광 조절기(54)는 펌프광(PB)의 광경로를 연장하거나, 또는 단축시키는 방식으로, 펌프광(PB)의 광경로를 조절하여 펌프광(PB)의 시간을 조절할 수 있다.
- [0059] 스캐닝부(60)는 결합광(IB)으로 샘플을 스캐닝한다. 이러한 스캐닝부(60)는 갈바노 스캐너(galvano scanner, 61), 및 후방 대물렌즈(62)를 포함할 수 있다. 여기서, 갈바노 스캐너(61)는 샘플에 대한 결합광(IB)의 스캔 영역을 조절하는 스캔 장치이다. 갈바노 스캐너(61)를 통과한 결합광(IB)은 후방 대물렌즈(62)로 조사되고, 후방 대물렌즈(62)는 샘플의 후방에서 샘플을 향해 결합광(IB)을 집속시키고, 이로 인해 전방 및/또는 후방으로 CARS 신호가 발생한다.
- [0060] 여기서, 샘플 내에 화학적 조성이 서로 상이한 다수의 물질이 포함된 경우에, 펌프광(PB)과 제1 스톱스광(SB1)의 조합에 의해 어느 하나의 물질에 대한 제1 CARS 신호가, 펌프광(PB)과 제2 스톱스광(SB2)의 조합에 의해 다른 하나의 물질에 대한 제2 CARS 신호가 각각 전방에서 발생할 수 있다. 일례로, 샘플은 미세플라스틱 입자가 내재화된 세포 또는 생체를 포함하는 생물학적 샘플일 수 있는데, 여기서 제1 CARS 신호는 미세플라스틱 입자에 대한 라만 모드로서, 제2 CARS 신호는 세포 내 소기관에 대한 라만 모드로서, 각각 전방에서 검출되어 이미징될 수 있다.
- [0061] 이렇게 광결정 광섬유(30)를 통과한 스톱스광(SB)을, 광의 에너지 손실이 거의 없는 2개의 이색거울(40, 52)을 이용하여 제1 스톱스광(SB1)과 제2 스톱스광(SB2)을 분리하고 결합하여 집속된 샘플에서 시간적 및 공간적으로 일치시켜, fingerprint 영역($500 \sim 1800\text{cm}^{-1}$) 및 CH stretch 영역($2800 \sim 3200\text{cm}^{-1}$)을 아우르는 초광대역 CARS 신호를 동시에 측정할 수 있다.
- [0062] 한편, 갈바노 스캐너(61)를 통과한 결합광(IB)은 스캔렌즈(scan lens, SL), 및 튜브렌즈(tube lens, TL)를 순차적으로 통과하여 후방 대물렌즈(62)로 조사될 수 있다.
- [0064] 검출부(70)는 CARS 신호를 검출하는데, 샘플에 대한 전방으로, 전방 대물렌즈(71), 신호분리 이색거울(72), 제1 광전증배관(photomultiplier tube, PMT, 73), 및 제2 광전증배관(74)이 배치될 수 있다.
- [0065] 여기서, 전방 대물렌즈(71)는, 결합광(IB)이 샘플의 후방에서부터 샘플을 향해 집속되어 샘플의 전방에서 생성된 전방 CARS 신호를 수집한다. 이때, 전방 CARS 신호는 상기 제1 CARS 신호 및 제2 CARS 신호를 포함한다. 수집된 전방 CARS 신호는 신호분리 이색거울(72)로 조사되어, 제1 CARS 신호와 제2 CARS 신호로 분리된다. 여기서, 전방 CARS 신호뿐만 아니라 펌프광(PB), 제1 스톱스광(SB1) 및 제2 스톱스광(SB2)도 전방 대물렌즈(71)에서 수집되는 바, 전방 대물렌즈(71)와 신호분리 이색거울(72) 사이의 광경로 상에 단파통과필터(shot pass filter, SPF)가 배치되어, 펌프광(PB), 제1 스톱스광(SB1) 및 제2 스톱스광(SB2)을 차단하고, 제1 CARS 신호와 제2 CARS 신호만을 신호분리 이색거울(72)로 조사할 수 있다. 신호분리 이색거울(72)에서 분리된 제1 CARS 신호는 제1 광전증배관(73)에서 검출되고, 제2 CARS 신호는 제2 광전증배관(74)에서 검출되어, 2개의 이미지를 얻을

수 있다. 여기서, 제1 CARS 신호와 제2 CARS 신호는 각각 대역통과필터(band pass filter, BPF)를 통과해 제1 광전증배관(73), 및 제2 광전증배관(74)에서 검출될 수 있다.

[0066] 또한, 검출부(70)는, 결합광(IB)이 샘플에 집속되어 후방에서 생성된 후방 CARS 신호를 검출하는 제3 광전증배관(75)을 더 포함할 수 있다. 후방 CARS 신호는, 결합광(IB)이 샘플에 집속되는 광경로를 역으로 따라 이동되고, 제3 광전증배관(75)에서 검출되어 이미징될 수 있다. 여기서, 후방 CARS 신호는 대역통과필터(band pass filter, BPF)를 통과해 제3 광전증배관(75)에서 검출될 수 있다.

[0067] 이 경우, 본 발명에 따르면, 전방 CARS 신호, 즉 제1 CARS 신호와 제2 CARS 신호, 그리고 후방 CARS 신호에 의해 3개의 이미지를 동시에 얻을 수 있다.

[0068] 한편, 검출부(70)는, 후방 CARS 신호의 스펙트럼을 검출하는 분광계(76)를 더 포함할 수도 있다. 여기서, 분광계(76)에는 전하결합소자(charge coupled device, CCD)와 같은 검출기 어레이가 장착될 수 있다. 이때, 후방 CARS 신호는 단파통과필터(short pass filter, SPF)를 통과해 분광계(76)에서 검출될 수 있다.

[0069] 여기서, 결합광(IB)의 광경로를 역으로 따라 이동하는 후방 CARS 신호는 이색거울(dichroic mirror, DM)에 의해 그 광경로에서 벗어날 수 있고, 또 다른 이색거울(dichroic mirror, DM)에 의해 분리되어 각각 제3 광전증배관(75)과 분광계(76)에서 검출될 수 있다.

[0071] 종합적으로, 본 발명에 따르면, 본 발명에 따르면, 1대의 펄스 레이저와 광결정 광섬유를 사용하여 레이저 스캐닝으로 fingerprint 및 CH stretch 영역을 측정할 수 있는 초광대역 CARS 신호를 동시에 얻을 수 있다. 또한, 레이저 스캐닝을 통해 최대 속도 1 frame/s으로 두 개 이상의 라만 모드(Raman mode)를 사용하여 2개 이상의 이미지를 동시에 실시간으로 획득할 수 있다. 나아가 본 발명은 비표지 기술로서 생체 또는 세포에 대한 전처리 과정 없이, 생체 또는 세포 내 미세플라스틱 입자와 세포 소기관을 각각 이미징할 수 있다. 또한, 본 발명은 라만 모드를 사용하는 전방 검출기 외에, 이광자 형광기술을 사용하는 후방 검출기를 배치함으로써 이광자 형광기술을 결합한 Multi-modal 현미경 시스템을 구축하여 생물학적 샘플에 대한 형광 이미지를 동시에 획득할 수 있다.

[0073] 이하에서는 구체적 실험예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

1. Multi-color CARS 현미경

[0076] 도 2 내지 도 3은 실험예에 따른 Multi-color CARS 현미경의 구성도로서, 도 2 내지 도 3을 참고로, 본 발명에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템을 Multi-color CARS 현미경으로 구현하였고, 본 발명에 따른 광대역 비표지 분자 이미징 시스템에 대해서는 진술하였는바, 이하에서는 간단하게만 설명한다. 도 2에서 fs-OPD는 펄스 초 광학 매개변수 발진기(femtosecond optical parametric oscillator), PBS는 편광 빔스플리터(polarizing beam splitter), PCF는 광결정 광섬유, $\lambda/2$ 는 반파장판(half-wave plate), BPF는 대역통과필터(bandpass filter), SPF는 단파통과필터(shortpass filter), DM은 이색거울(dichroic mirror), PMT는 광전증배관(photomultiplier tube), CCD는 전하결합소자(charge coupled device), SL은 스캔렌즈(scan lens), TL은 튜브렌즈(tube lens)를 각각 나타낸다.

[0077] 본 실험예의 주 목표는 고속 레이저 스캐닝 다색 CARS 이미징 시스템을 사용하여 살아있는 세포에 내재화된 미세플라스틱(PS microbeads) 및 세포 소기관(cytoplasmic organelles, LDs)을 동시에 비표지 진동 이미징하는데 있다. 종래 단색 CARS 현미경은 라만 펄프광과 스톡스광 등 2개의 극초단파 레이저 광을 사용하는 데 반해, 본 실험예에서는 라만 펄프광(ω_p), 제1 스톡스광(ω_{s1}) 및 제2 스톡스광(ω_{s2}) 등 3개의 서로 다른 피코초(picosecond, ps) 광을 사용한다. 2개의 스톡스광의 파장은 대역통과필터(band-pass filters, BPFs)를 이용해 조정될 수 있는데, 제1 스톡스광의 파장은 815 ~ 940nm 범위에서, 제2 스톡스광의 파장은 993 ~ 1043nm 범위에서 조정되며, 펄프광의 파장은 783nm로 고정된다. CARS 신호는 펄프광과 스톡스광의 주파수 차이가 타겟 라만 활성 모드(target Raman-active mode)의 진동 주파수와 일치할 때에 발생된다. 본 실험예에서는 고정된 펄프광 주파수에 대해, 2개의 독립적으로 조정 가능한 스톡스광의 주파수를 적절하게 조정함으로써, 2개 또는 그 이상의 진동 모드를 동시에 이용하여, 서로 다른 미세플라스틱 입자와 세포 내 소기관에 대한 이미지를 동시에 얻을

수 있다. 본 실험예에서 PS 비드와 LDs의 2색 CARS 이미징을 획득하기 위해 제1 스톱스광의 파장이 850nm로, 제2 스톱스광의 파장이 1008nm로 각각 조정되었다. 여기서, 펄스광과 제1 스톱스광의 주파수 차이($\Delta \omega_1 = \omega_P - \omega_{s1}$)는 PS 비드의 ring breathing 모드 주파수($\Delta \omega_1 = \omega_{PS} = 1000\text{cm}^{-1}$)에 매칭되고, 펄스광과 제2 스톱스광의 주파수 차이($\Delta \omega_2 = \omega_P - \omega_{s2}$)는 LD의 CH stretch 모드 주파수($\Delta \omega_2 = \omega_{LD} = 2850\text{cm}^{-1}$)에 매칭된다. 3개의 광(펄스광, 제1 및 제2 스톱스광)은 서로 조합되어 대물렌즈를 통해 샘플로 집속됨으로써 해당 CARS 신호를 생성한다. 여기서, CARS 1은 $\lambda_{\text{CARS1}} = 726\text{nm}$ ($\omega_{\text{CARS1}} = \omega_P + \omega_{PS}$)에서 펄스광과 제1 스톱스광의 조합에 의해 생성되고, CARS 2는 $\lambda_{\text{CARS2}} = 640\text{nm}$ ($\omega_{\text{CARS2}} = \omega_P + \omega_{LD}$)에서 펄스광과 제2 스톱스광의 조합에 의해 생성되는 것으로서, 각각 PS 비드와 LDs의 CARS 신호에 대응된다. 2개의 CARS 신호는 이색거울(DM)에 의해 분리되고, 대역통과필터(BPF)에 의해 스펙트럼 필터링된 다음, 2개의 광전증배관(photomultiplier tubes, PMTs)에서 각각 별도로 감지된다.

[0078] 본 실험예에 따른 Multi-color CARS 현미경은 1개의 펄스 레이저 광원과 광결정 광섬유(photonic crystal fiber, PCF)로써, 2000cm^{-1} 떨어진 fingerprint와 CH stretch 진동 모드를 이용하여 2개 이상의 CARS 이미지를 얻을 수 있다. 기존의 피코초 레이저를 사용하여 2개 이상의 이미지를 동시에 획득하기 위해서는 반드시 3개 이상의 레이저 광이 필요하지만, 본 실험예에 따른 Multi-color CARS 현미경은 복잡하고 고가인 다수의 레이저 광원이 필요없다.

[0079] 또한, 본 실험예에 따른 CARS 현미경은 고속 레이저 스캐닝 방법으로써, 세포에서 움직이는 소기관(LDs) 및 내재화된 미세플라스틱 입자를 실시간으로 이미징할 수 있다. 본 실험예에 따른 CARS 현미경은 전하결합소자(charge coupled device, CCD)와 같은 검출기 어레이가 장착된 분광계와 함께 사용될 수 있다. 다른 초분광 이미징 현미경과 유사하게 샘플 스테이지를 스캔하는 동안에 모든 CARS 스펙트럼 데이터는 각각의 이미지 픽셀에 기록되고, 그 스펙트럼 데이터큐브(data cube)에서 2개 이상의 CARS 이미지가 재구성된다. 종래 다중 CARS 방식은 화학적으로 서로 다른 물질의 전체 스펙트럼 정보를 추출하는데 탁월한 장점이 있으나, 샘플 스캔 및 CCD 검출속도에 의해 이미징 속도가 느리다는 단점이 있다. 본 실험예에 따른 CARS 현미경은 2개 이상의 CARS 이미징을 위해 갈바노 스캐너(Galvano-scanner)를 사용하여 입사광을 조정한다. 이를 통해 데이터 획득 속도를 상당히 증진시킴으로써 미세플라스틱 입자에 대한 실시간 비표지 생체 이미징을 가능하게 한다.

[0080] 나아가, 본 실험예에 따른 CARS 현미경은 또 다른 광전증배관(PMT)을 사용함으로써, 후방 CARS 신호(도 1의 CARS3) 또는 2광자 형광(two-photon fluorescence, TPF)을 측정하여, 3개의 CARS 또는 CARS-TPF 이미지를 얻을 수 있다. 또한, 분광계를 통해 기록된 후방 CARS 스펙트럼은 epi-CARS 현미경에서 획득 가능한 정보를 제공할 수 있다. 이러한 추가적인 이미징 수단은 살아있는 세포 또는 생체 내 화학적으로 다른 입자에 대한 이미징 연구에 기여할 수 있다.

[0082] 2. 생물학적 샘플 준비

[0083] 대장균 균주 OP50의 세균층(lawn of E.coli)을 포함하는 선충 성장배지(nematode growth medium, NGM) 플레이트에서 C. elegans(야생형 N2 균주)를 배양하였다. 실험 전에 1ml 물에 현탁된 $2\mu\text{m}$ PS 비드(78452-5ML-F, Sigma-Aldrich)를 NGM 플레이트에 접종하여, 2시간 동안 그 선충(C. elegans)과 함께 배양함으로써 C. elegans가 PS 비드를 섭취하도록 유도하였다. 그런 다음 4% 포름알데히드 용액으로 다수의 선충을 고정하고, 얇은 글라스 챔버로 옮겼다. 글라스 챔버는 $100\mu\text{m}$ 이하 두께의 파라필름 스페이서(parafilm spacer)로 서로 이격되도록 겹쳐진 2개의 커버 글라스로 형성된다. Multi-color CARS 생세포 이미징을 위해, 바닥에 세포 부착용 0.1mg/ml poly-D-lysine이 코팅된 35mm confocal dish에서 U2OS 세포를 배양하였다. 성장 보충제(10% FBS)가 첨가된 RPMI 배지에서 1일 동안 인큐베이션한 후, $2\mu\text{m}$ PS 비드(0.002 wt.%)를 샘플 접시(sample dish)에 혼합하여 세포 섭취를 유도하였다. 그 결과, 4시간 이내의 식세포 활성화에 의해 많은 양의 PS 비드가 U2OS 세포에 내재화되었다. 배지를 교환하여 잔류 PS 비드를 제거하고, 전동식 스테이지에 장착된 미니 인큐베이션에 샘플 접시를 설치하고 Multi-color CARS 이미징을 수행하였다. 이때, 온도는 37°C , CO_2 는 5% 수준으로 유지하였다.

[0085] 3. 백합 꽃가루(Lily Pollen)와 C. elegans의 Multi-color CARS 이미징

[0086] 생물학적 샘플에서 화학적으로 다른 입자의 동시 이미징이 가능함을 입증하기 위해서, PS 마이크로비드(PS

microbeads)를 사용하여 백합 꽃가루(Lily Pollen)와 *C. elegans*에 대한 Multi-color CARS 현미경 검사를 수행하고, 그 결과를 도 4에 도시하였다. 도 4의 (a) ~ (d)는 실험예에 따른 8.7 μ m PS 비드와 혼합된 백합 꽃가루의 Multi-color CARS-TPE 이미지이고, 도 4의 (e) ~ (l)은 실험예에 따른 2 μ m PS 비드를 섭취한 *C. elegans*의 Multi-color CARS-TPE 이미지이다. 도 4의 (a) 내지 (d)를 참고로, $\omega_v = 1605\text{cm}^{-1}$ (green), $\omega_v = 3050\text{cm}^{-1}$ (red), 및 $\omega_v = 1524\text{cm}^{-1}$ (blue)에서 8.7 μ m PS 비드와 혼합된 백합 꽃가루에 대한 3가지 서로 다른 진동 모드의 CARS 이미지를 얻었다. 백합 꽃가루 알갱이(lily pollen grains)와 끈적한 꽃가루(sticky pollenkitts)는 각각 $\omega_v = 1605\text{cm}^{-1}$ 및 $\omega_v = 1524\text{cm}^{-1}$ 에서 특징적인 라만 피크를 가지는데, 이는 각각 백합 꽃가루의 C=C 방향족 ring stretching 모드 및 C=C stretching 모드와 관련이 있다. 펌프광과 조합되고 스펙트럼이 넓은 제1 스톡스광은 1605 및 1524 cm^{-1} 주파수로 백합 꽃가루의 라만 활성 모드를 여기시킨다(도 4의 (a) 및 (c) 참조).

[0087] 스펙트럼 필터를 사용하여, 전방 및 후방에 배치된 광전증배관(PMT)을 통해 CARS 신호를 별도로 측정하였다. 도 4의 (b)의 CARS 이미지는 PS 비드의 CH stretch 진동 모드($\omega_v = 3050\text{cm}^{-1}$)와 관련되는 것으로서, 펌프광과 제2 스톡스광에 의해 발생되고, 또 다른 광전증배관(PMT)을 통해 감지된다. PS 비드, 백합 꽃가루 알갱이, 꽃가루의 라만 피크 사이의 스펙트럼 중첩으로 인해 CARS 이미지가 공간적으로 함께 나타날 수 있다. 예를 들면, $\omega_v = 1605\text{cm}^{-1}$ 에서의 CARS 이미지(도 4의 (a))는 PS 비드와 꽃가루 알갱이를 모두 나타낸다. $\omega_v = 3050\text{cm}^{-1}$ 의 CARS 이미지(도 4의 (b))는 PS 비드와 꽃가루(pollenkitts)의 공간적 분포 정보를 제공한다. 반면, $\omega_v = 1524\text{cm}^{-1}$ 에서의 CARS 이미지(도 4의 (c))에서는 꽃가루(pollenkitts)가 우세하게 나타난다. 따라서, 도 4의 (d)의 병합된 CARS 이미지에서 서로 다른 유사 색상의 조합에서 PS 비드(orange), 꽃가루 알갱이(green), 꽃가루(purple)의 명확한 CARS 대비를 나타낸다. 또한, 마이크로미터 미만의 해상도에서 꽃가루 알갱이로 둘러싸인 꽃가루의 미세 구조가 감지될 수 있다.

[0089] 한편, 본 실험예에 따른 Multi-color CARS 현미경을 사용하여 2 μ m의 PS 비드를 섭취한 후 2시간이 지난 *C. elegans*을 관찰하였다. 도 4의 (e) 내지 (l)은 2색 CARS 이미지와 auto-TPF 이미지를 나타낸다. PS 특이적 CARS 이미지(도 4의 (f) 및 (j), red)와 지질(lipid) 특이적 CARS 이미지(도 4의 (e) 및 (i), green)에서, 850 nm 파장의 제1 스톡스광과 1008nm 파장의 제2 스톡스광이 사용되었다. 2개의 CARS 이미지는 각각 PS 비드의 ring breathing 모드($\omega_v = 1000\text{cm}^{-1}$)와 지질의 CH stretch 모드($\omega_v = 2850\text{cm}^{-1}$)와 관련된다. *C. elegans* 내에서 화학적으로 서로 다른 PS 비드와 지질, 및 이들의 공간적 분포는 PS 특이적 CARS 이미지, 지질 특이적 CARS 이미지, 및 병합 CARS 이미지에서 잘 나타난다. 도 4의 (g) 및 (k)의 auto-TPF 이미지(blue)는 550 ~ 600nm의 파장 영역에서 자가형광을 검출하여 얻은 것으로, *C. elegans*의 전체 외형 및 장(intestine) 구조를 보여준다. 여기서, PS 마이크로비드들은 *C. elegans*의 장을 따라 위치하는데, 인접한 조직으로 침투한 흔적이 관찰되지 않는다. 이와 달리, 서로 다른 크기와 형태를 가지는 많은 지질 축적(lipid storage)이 장 외부 조직에 널리 분포되어 있음을 확인할 수 있다.

[0091] 4. PS 비드 및 세포 소기관이 내재된 비표지 생세포 이미징

[0092] 본 실험예에 따른 CARS 현미경을 이용해, 정적인 생물학적 샘플(백합 꽃가루 및 *C. elegans*)에서 화학적으로 서로 다른 입자를 동시에 이미징할 수 있음을 위에서 설명하였다. 이하에서는 PS 비드와 세포 소기관의 세포 내 역학을 조사하기 위해 U2OS 세포에 대해 실시간 CARS 이미징을 수행하였고, 그 결과를 도 5에 도시하였다. 도 5의 (a)는 실험예에 따른 2 μ m PS 비드 용액에 노출된 U2OS 세포의 wide-illuminated PC 이미지이고, 도 5의 (b)는 상기 PS 비드 용액에 노출된 U2OS 세포의 Multi-color CARS 이미지이며, 도 5의 (c)~ (f)는 U2OS 세포 내 PS 비드 및 세포 소기관(LDs)의 입자 추적 및 이동 분석 결과이다.

[0093] 도 5의 (a) 및 (b)는 PS 비드에 노출된 U2OS 세포의 종래 wide-illuminated PC 이미지, 및 2색 CARS 이미지를 나타낸다. 도 5의 (a)의 PC 이미지에서, U2OS 세포 내에 밝은 구형 입자가 다수 관찰되었다. 세포 외부의 입자는 완충 용액의 대류(convection)에 의해 초점이 맞지 않는 평면에서 표류하는 PS 비드를 나타낸다. 도 5의 (a)의 하단에 확대된 PC 이미지에서 알 수 있듯이, PS 비드와 세포 소기관 입자가 잘 구별되지 않는다. 이는 PC

이미지 대비(image contrast)가 표적의 화학적 조성에 매우 둔감하기 때문에 판단된다. 결국, 세포 내에서 구별할 수 없는 크기와 모양을 가진 세포 소기관의 존재로 인해, 크기, 모양 또는 이미지 대조를 통한 입자의 특성화가 불가능하다. 또한, wide-illuminated PC 이미지도 제한된 축 해상도로 인해 세포 외부의 PS 비드와 세포 내부의 PS 비드를 구별하는데 유용하지 않다. 이와 대조적으로, Multi-color CARS 이미지(도 5의 (b))는 세포에 내재화된 PS 비드와 세포 소기관(LD)의 명확한 화학적 대조를 보여주는데, 여기서 PS 특이적 ring breathing 진동($\omega_v = 1000\text{cm}^{-1}$: orange)과 소기관(LD) 특이적 CH stretching 진동($\omega_v = 2850\text{cm}^{-1}$: green)이 동시에 측정되었다. 실제로, CH stretch 진동 모드와 관련된 PS의 상대적으로 약한 라만 활성 피크는 동일한 진동 주파수 $\omega_v = 2850\text{cm}^{-1}$ 에서 훨씬 더 강한 소기관(LD)의 CH stretch 유도 라만 피크와 부분적으로 겹쳐진다. $\omega_v = 2850\text{cm}^{-1}$ 에서의 PS 유래 CARS 신호의 작은 기여(small contribution)를 제거하고자, $\omega_v = 2850\text{cm}^{-1}$ 에서 적절하게 인수분해된 CARS 신호에서, $\omega_v = 1000\text{cm}^{-1}$ 에서 인수분해된 CARS 신호를 차감하였다. 이렇게 $\omega_v = 2850\text{cm}^{-1}$ 에서 PS 기여도가 제거된 CARS 이미지는 $\omega_v = 1000\text{cm}^{-1}$ 에서의 PS 특이적 CARS 이미지에 병합된다. 이러한 후처리는 PS 비드(orange)와 소기관(green)의 화학적 구별성은 물론 이미지 품질을 향상시킬 수 있다. U2OS 세포의 CARS 이미지에서 다수의 구형 입자가 나타나지만, PC 이미지와 다르게, 병합된 CARS 이미지에서는 $2\mu\text{m}$ 의 PS 비드(orange)와 소기관(green)이 용이하게 구별된다.

[0094] PS 비드와 소기관을 개별적으로 동시에 추적하는 고속 레이저 스캐닝 2색 CARS 이미징을 통해 실시간으로 PS 비드와 소기관의 세포 내 움직임을 추적할 수 있다. 6분 동안 30초마다 촬영한 타임 랩스(time-lapse) 이미지에서 52개의 PS 비드 궤적을 얻었고, 그 평균속도가 $14.0 \pm 6.4 \text{ nm/s}$ 임을 측정하였다. 그 중 특정 방향으로 움직이는 소정의 PS 비드의 대표적 궤적을 도 5의 (d)에 도시하였다. 한편, PS 비드 중 일부는 확산 운동 및 무작위 방향 전환을 가지는 브라운 유사 거동(Brownian-like behavior)을 나타냈다. 또한, 세포 경계 근처에서 서로 인접한 다수의 PS 비드가 세포체(cell body)를 향해 같은 방향으로 함께 움직이는 것도 관찰되었다. 이러한 상관적인 움직임은 원형질막 표면에 국부적으로 트랩된 PS 비드가 세포 운동에서 일반적으로 관찰되는 원형질막 유동에 따라 수동적으로 움직이는 것으로 판단된다. 또한, 도 5의 (c)를 참고로 소기관의 다른 궤적을 통해 알 수 있듯이, 간단하게 다수의 소기관을 동시에 추적할 수도 있다. 21개의 소기관의 평균속도는 $18.9 \pm 11.3 \text{ nm/s}$ 로 내재화된 PS 비드보다 약 35% 빠른 것으로 확인되었다.

[0096] 6. 다색 CARS 이미징 방법과 다른 비표지 이미징 방법 비교

[0097] 샘플의 다양한 굴절률과 두께에 따라 생성된 빛의 간섭에 의해 밝기 변화를 매핑하는 PC 현미경 및 DIC 현미경과 같은 위상 이미징 방법은 미세플라스틱이 내재화된 생세포와 같은 투명한 생물학적 샘플을 분석하는데 널리 사용되어 왔다. 그러나 이러한 굴절률 기반 이미징 접근 방식은 피분석물의 화학적 조성에 관한 직접적인 정보를 제공할 수 없고, 화학적으로 서로 다른 미세입자를 구별할 수 없다.

[0098] 도 5의 (a)을 참고로, 생세포 PC 이미지에서 알 수 있듯이, PS 비드가 내재화된 세포에서 PS 비드의 형태는 PS 비드에 노출된 적 없는 세포의 구형 소기관과 유사한 이미지 대조를 보인다. 즉, PS 비드와 세포 소기관과 같이 화학적으로 다른 미세입자들은 PC 이미지에서 구별할 수 없는 위상차를 가진다. 따라서, PC 이미지만으로는 정확한 입자 식별이 매우 어렵다. 이에 반해, Multi-color CARS 이미징의 경우는, 화학결합 특이적 진동 신호를 별개로 감지하여, 화학적으로 다르지만 구별이 곤란한 형태를 가지는 PS 비드와 소기관을 이차원 진동 이미지 맵에서 공간적 및 분광학적으로 분해할 수 있다. 종래 라만 현미경이나 multiplex CARS 현미경 같은 HIS 기반 진동 이미징 기술은 여러 미세입자를 동시에 상당히 안정적이고 정확하게 특성화할 수 있지만, 샘플 스캐닝 방식에 의존하기 때문에 신호 대 잡음비(signal-to-noise ratio, SNR)가 낮고, 상대적으로 이미징 속도가 일반적으로 프레임당 수십 분에 이를 정도로 느리므로, 빠르게 생체 이미징을 할 수 없다. 또한, 느린 샘플 스캐닝과 신호 평균화로 인해 광 조사 시간이 길어지므로, 생물학적 샘플에 광독성을 유발할 수도 있다.

[0099] 반면, 본 실험예에 따른 CARS 현미경은 고속 레이저 스캐닝 CARS 현미경으로서 프레임당 수십 초 미만으로 이미징 속도를 향상시켜 실시간으로 생세포 이미징을 가능하게 한다.

[0100] Multi-color CARS 현미경은 기본적으로 형광 배경이 필요 없는 검출방법이지만, 종래 CARS 현미경에서는 비화학적 이미지 대비를 생성하는 진동 비공진(non-resonant, NR) 백그라운드 신호가 문제된다. 이에 반해, 본 실험예

에 따른 Multi-color CARS 현미경은 공진 및 비공진 진동 주파수에서 동시에 얻어지는 2개의 CARS 이미지의 차이를 취함으로써 원치 않는 NR 대비를 효과적으로 제거할 수 있다.

[0101] 한편, SRS(Stimulated Raman scattering) 현미경은 환경 미세플라스틱을 신속하게 안정적으로 특성화하는데 유용한 것으로 알려져 있다. SRS 신호는 NR 백그라운드 없이 뿐만 아니라 농도에 선형적으로 비례하므로, 미세 입자의 정확한 스펙트럼 측정 및 화학 측정 분석이 가능하다. 그러나 SRS 현미경은 매우 강한 입사 광에서 약한 SRS 이득 또는 손실 신호를 구별하기 위해서 레이저 광 변조기 및 락인앰프(lock-in amplifier) 등과 같은 추가적인 광학장치가 요구된다. 또한, fingerprint 및 CH stretch 진동 신호를 동시에 이미지화하기 위해서, 원칙적으로 하나의 펄스광과 2개 이상의 스톱스광을 조사할 수 있는 다수의 피코초 레이저 시스템이 구축되어야 한다. 이러한 SRS 이미징을 위한 요구사항으로 인해 광학장비의 설정이 복잡해질 수밖에 없다. 이에 반해, 본 실험예에 따른 Multi-color CARS 현미경은 광결정 광섬유(PCF)와 결합된 단일 발진기를 광원으로 사용하여 상대적으로 저렴하고 단순하게 시스템을 구성할 수 있으며, 초광대역 라만 활성 모드를 사용하여 다양한 생세포 내의 미세플라스틱 입자 및 소기관에 대한 실시간 이미징을 달성할 수 있다.

[0103] 이상 본 발명을 구체적인 실시예 및 실험예를 통하여 상세히 설명하였으나, 이는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명은 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 그 변형이나 개량이 가능함이 명백하다.

[0104] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속한 것으로 본 발명의 구체적인 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

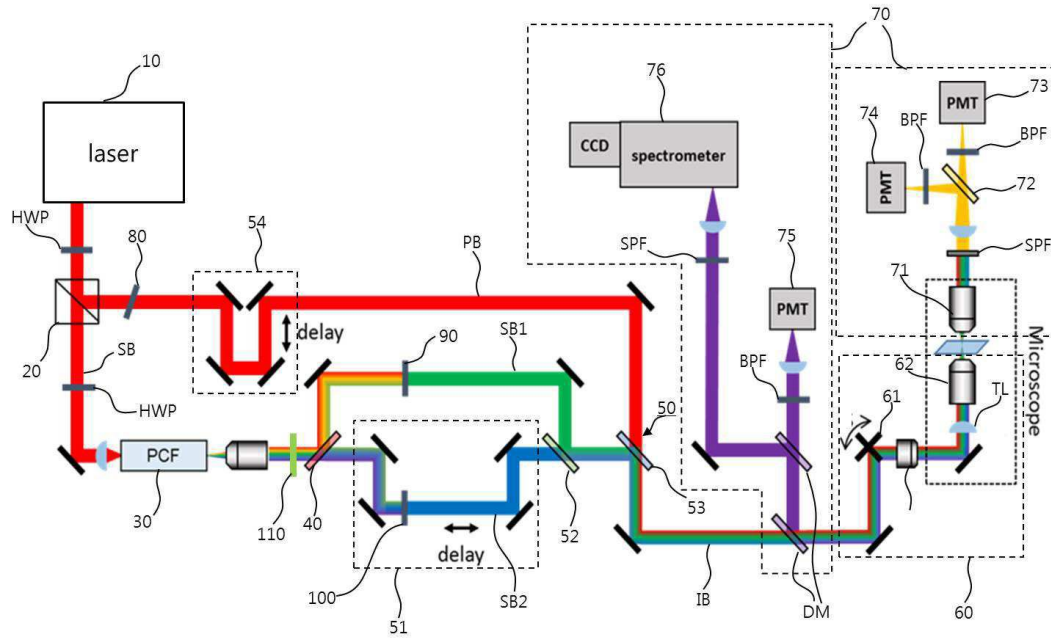
부호의 설명

[0106] 10: 광원 20: 광분할기
30: 광결정 광섬유 40: 스톱스광분할 이색거울
50: 광결합부 51: 스톱스광 조절기
52: 스톱스광결합 이색거울 53: 결합광생성 이색거울
54: 펄스광 조절기 60: 스캐닝부
61: 갈바노 스캐너 62: 후방 대물렌즈
70: 검출부 71: 전방 대물렌즈
72: 신호분리 이색거울 73: 제1 광전증배관
74: 제2 광전증배관 75: 제3 광전증배관
76: 분광계 80: 펄스광 대역통과필터
90: 제1 스톱스광 대역통과필터 100: 제2 스톱스광 대역통과필터
110: 장파통과필터 PB: 펄스광
SB: 스톱스광 SB1: 제1 스톱스광
SB2: 제2 스톱스광 IB: 결합광
HWP, $\lambda/2$: 반파장판 DM: 이색거울
BPF: 대역통과필터 SPF: 단파통과필터
SL: 스캐너 TL: 튜브렌즈
PBS: 빔스플리터 PCF: 광결정 광섬유

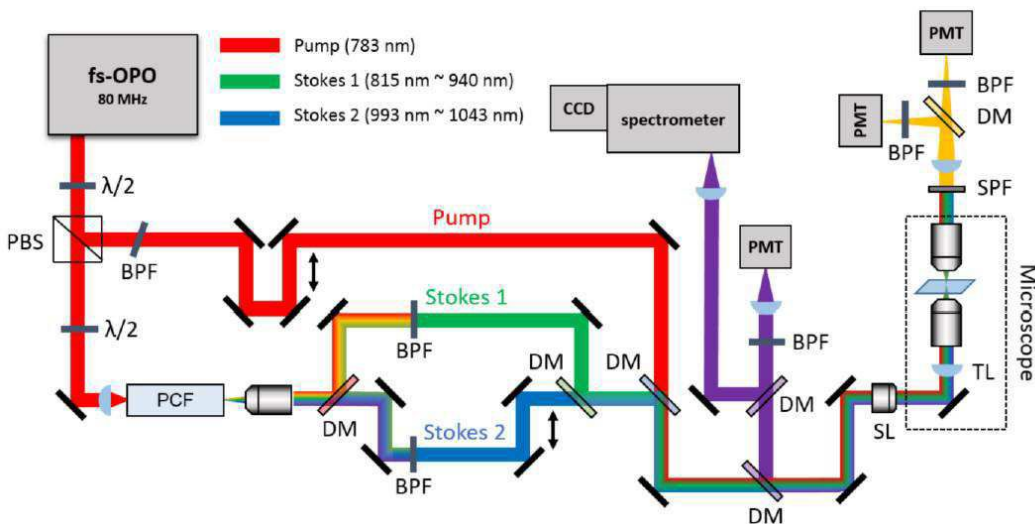
PMT: 광전증배관

도면

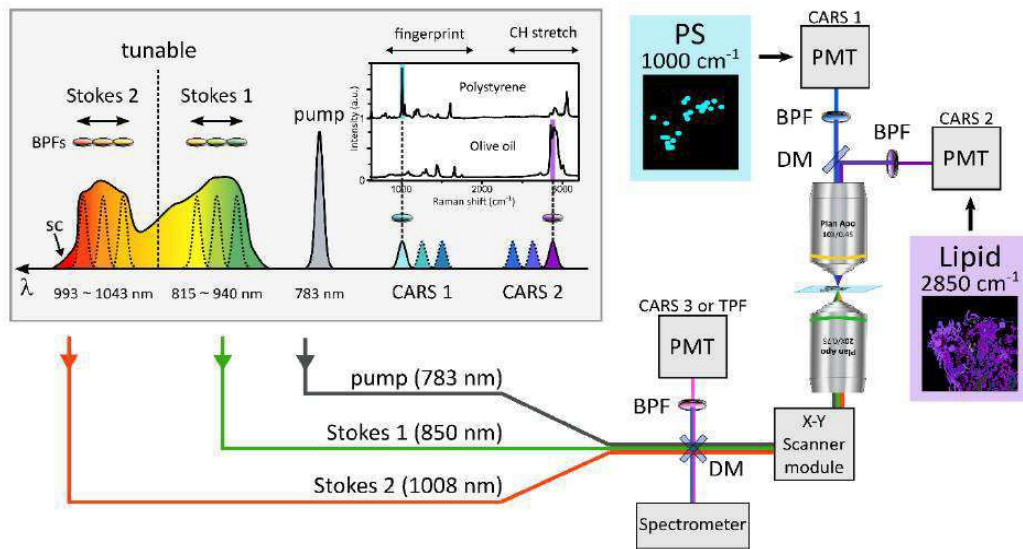
도면1



도면2

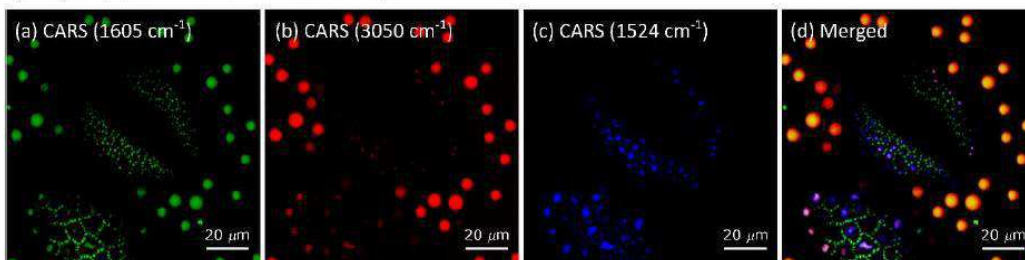


도면3

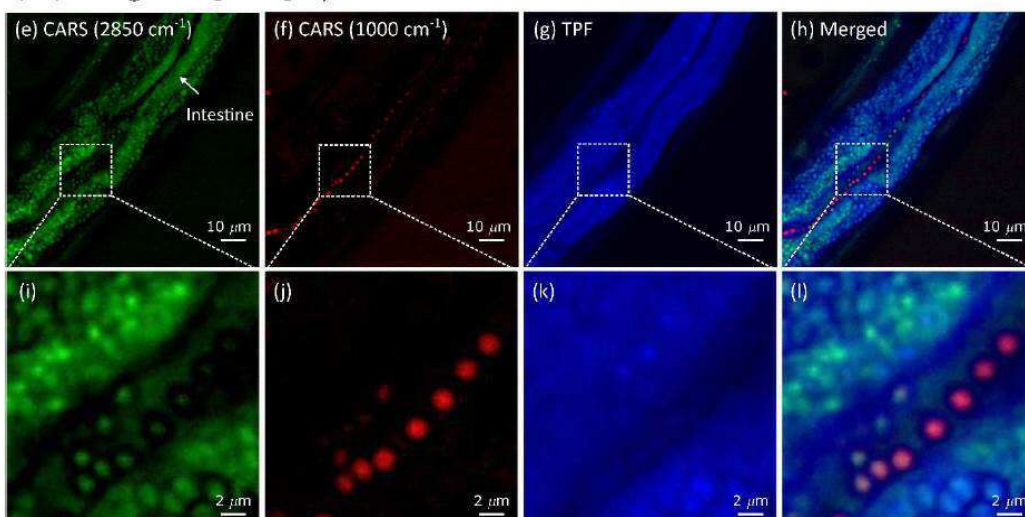


도면4

(a-d) Lily pollen mixed with 8.7 μm PS beads



(e-l) *C. elegans* ingesting 2 μm PS beads



도면5

