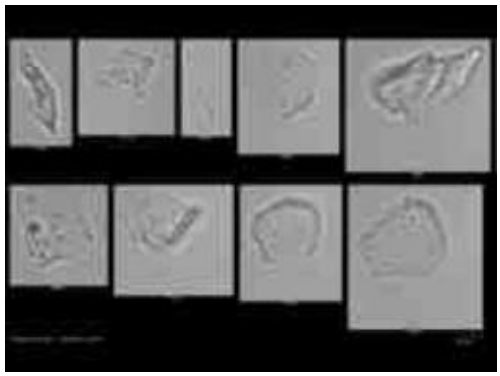
FlowCAM Nano
Extending the Limits : Oil Immersion Flow Microscopy



단백질 과학자들 사이에서 가장 보편적 요구사항 중 하나가 입자 특성 분석이다. 따라서 이미징 데이터는 크기, 모양 및 다른 형태학적 정보를 수집하여 제형 분야에서 단백질 응집체와 다른 입자들을 구별하기 위해 사용되는 기술 중 하나이다. 유동 이미징 현미경법(Flow Imaging Microscopy)은 2um에서 최대 5mm까지 입자크기 측정범위가 광범위하고 이미지화된 입자의 형태학적 특성을 표시해준다. 투명, 반투명 및 불투명한 입자를 측정할 수 있어서 단백질 응집체와 비단백질성 입자를 구분할 수 있다.
유침 유동 현미경법(Oil Immersion Flow Microscopy)은 최근 광학 해상도가 수백 나노미터(nm)까지 증가함에 따라 나노입자를 이미지화할 수 있는 독창적인 기능을 갖추게 되었고, 입자 측정범위가 300nm까지 확대되었다. 이 기술은 Nano-Flow Imaging(Fluid Imaging Technologies, Scarborough, ME)으로 명명되었다.

아베(Abbe) 해상도 한계(limit)는 광학시스템이 분석할 수 있는 최소 디테일을 정의한다. 특정 파장의 광을 사용하고 특정 개구수(numerical aperture)를 갖는 완벽한 광학 시스템에서, 이 한계치는 *해상도(resolution)=0.61*파장/(개구수)*라는 방정식으로 정의된다. 일반적인 고품질 10X 에어 대물렌즈(air objective)의 해상도는 약 2μm이다. 그러나 현미경법에서 유침 대물렌즈(oil immersion objective)가 청색 발광 다이오드(LED)와 같이 사용되는 경우 훨씬 더 우수한 해상도를 실현할 수 있다. 동일한 시스템에서 일반적인 고품질 유침 대물렌즈는 개구수가 1.4이어서 해상도=0.61*0.5(μm)/1.4=0.22μm가 된다. 즉, 이것은 유침 광학시스템의 해상도가 약 10배 더 좋다는 것을 의미한다.

Applications of oil immersion microscopy to flow imaging

유침 대물렌즈는 최적의 조도를 제공하기 위해 높은 개구수의 아베 콘덴서와 같이 작동하도록 설계되었다. 또한, 그것은 침유(immersion oil)와 커버글라스(coverslip)를 통해 시료를 이미지 측정하도록 설계되었다. 최적의 구성은 슬라이드와 콘덴서 사이에 침유가 있고 시료 아래에 유리 슬라이드가 있는 것이다(Figure 1). Figure 1은 슬라이드와 콘덴서 사이에 침유(immersion oil)가 있고 샘플 아래에 유리 슬라이드(glass slide)가 있는 최적의 유동 이미징 구성을 보여준다. 고해상도 이미징 시스템을 구현하기 위해 유사한 방식으로 유세포 이미지측정기(Imaging flow cytometer)에 플로우 셀(flow cell)을 설치할 수 있다(Figure 2).

특허를 획득한 이 새로운 구성에서, 커버글라스(coverslip)와 현미경 슬라이드는 flow cell의 벽으로 대체되었다.

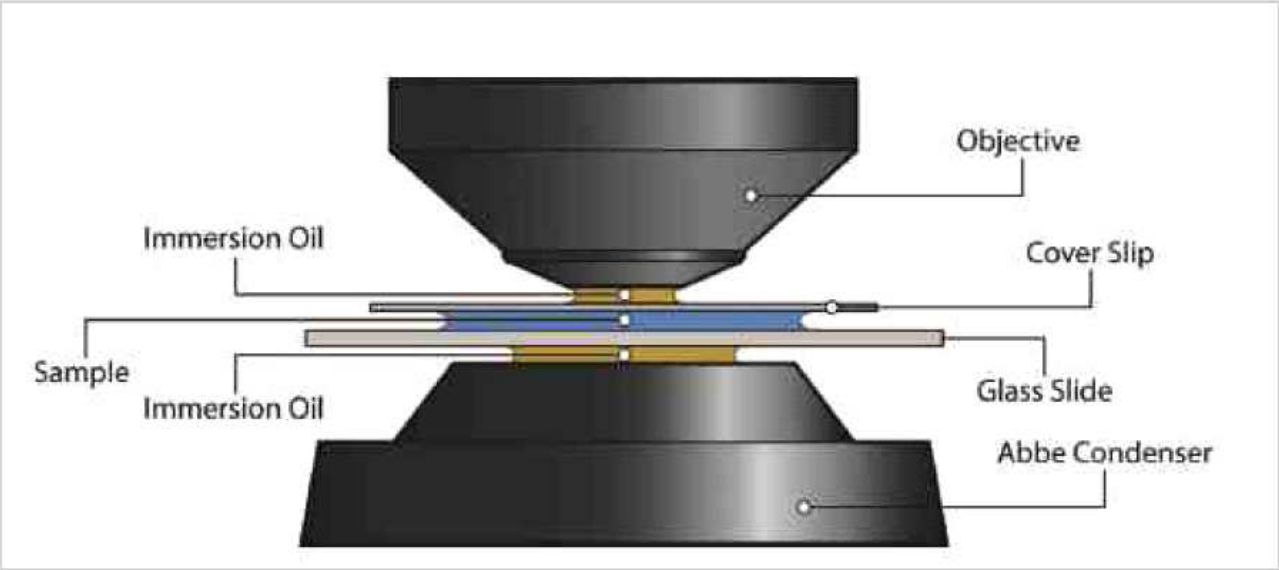


Figure 1 – Front view of typical oil immersion microscope sample assembly.

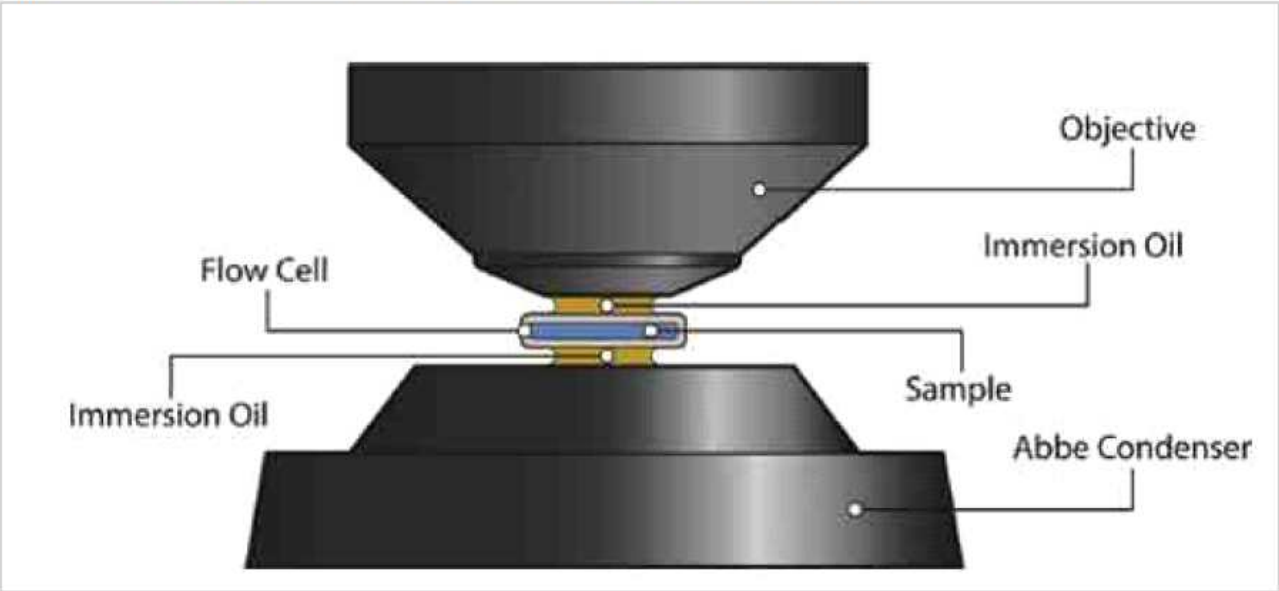


Figure 2 – Top view of the FlowCam Nano oil immersion flow cell assembly (Fluid Imaging Technologies).

유침 유동 현미경(Oil immersion flow microscopy)으로는 단백질 응집체, 실리콘 오일 방울, 유리파편, 기타 불투명, 투명, 반투명 미립자들이 식별 가능한 고해상도 이미지로 측정된다. 이 기술의 가장 큰 장점은 입자의 형태가 그 특성화에 중요한 유체 속의 미립자 함유물을 실시간으로 이미지를 측정하고 식별할 수 있다는 것이다. 나노입자 측정 및 이미징 기술은 최근 수 년간 나노 입자에 대한 인식 및 중요성이 높아짐에 따라 크게 발전했다. 이 시스템은 실시간으로 나노입자를 이미지화하고 특성화할 수 있는 중요한 일보 전진한 기술이다.

Nano-Flow Imaging 시스템은 콜로이드의 활성도 및 그 기원(단백질 또는 실리콘 오일)에 대한 조기 경보시스템을 제공하는데 필요한 미립자 이미지를 제공한다. 이미지는 단백질 응집체의 기원을 확인하는 데 매우 중요하다.

단백질 제형을 넘어서는 응용 분야, 예를 들어 식품, 음료 및 생물학적 처리공정에서는 이 기술을 사용하여 오퍼레이터가 미생물 개체수(크기가 너무 작아서 현미경 없이 모니터링할 수 없는 박테리

아)를 측정할 수 있으므로 통계적으로 중요한 데이터를 제공할 수 있다. Nano-Flow Imaging 시스템을 사용하여 사용자는 흐름 내에 있는 나노입자 및 큰 입자에 속해있는 나노입자 크기의 세부물질을 이미지화할 수 있다.

Importance of selecting illumination wavelength

아베 해상도 한계를 정의하는 식, *해상도=0.61*파장/(개구수)* 에서 알 수 있듯이, 해상도는 광원의 파장에 정비례한다. 백색 광원은 적색, 청색 및 녹색을 포함하는 파장 범위를 갖는다. 적색은 가장 낮은 해상도를, 녹색은 중간 해상도를, 청색은 가장 높은 해상도를 제공한다. 이러한 파장 조합을 가진 백색 광원은 이미지를 희미하게 하여 해상도가 떨어진다. 0.408μm 청색 LED 같은 단파장 광원은 해상도가 훨씬 더 좋다. 이 파장값을 사용하면 개구수가 1.4인 대물렌즈의 해상도는 0.22μm가 된다. 그래서 이 파장이 광원으로 선택되었다.

Methods

유침 Nano-Flow Imaging 시스템은 1.4-NA 유침 대물렌즈로 구성되었다. Fisher Scientific의 사이즈 칼리브레이션용 폴리스티렌 입자 345nm, 602nm, 903nm(각각의 Fisher Scientific P/N 3K-350, 3K-600, 3K-900)를 50μL의 탈이온수 시료에 첨가하고, VisualSpreadsheet 소프트웨어(Fluid Imaging Technologies)를 사용하여 장비에 주입하였다. 장비는 이 표준입자로 사이즈 칼리브레이션을 하고 장비 보정상수를 조정하였다. Edge Gradient Filter 기능을 사용하여 초점이 맞지 않는 표준입자 이미지는 분리 제거하였다. 장비를 칼리브레이션한 후 표준입자를 다시 장비로 측정하였다. 단백질 응집체 샘플과 NIST 단백질 샘플을 유침 Nano-Flow Imaging 시스템으로 유사하게 측정하였다. 비교 목적으로, NIST 단백질 샘플을 10X 에어 대물렌즈 Flow Imaging 시스템으로도 측정하였다.

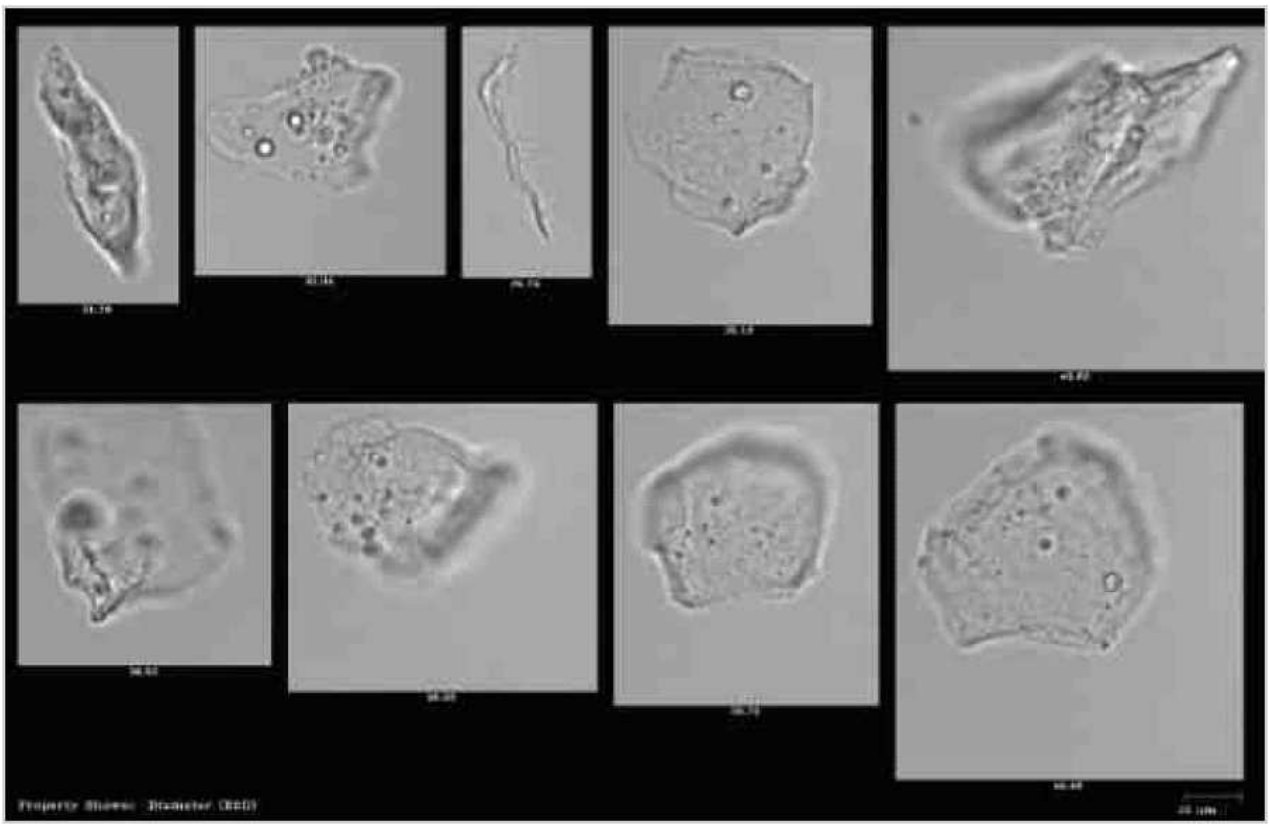


Figure 3 – Protein agglomerates from NIST Protein Reference Standards (bar = 10 μm).

Results

345nm, 602nm 및 903nm 표준입자는 각각 350nm, 590nm 및 950nm로 측정되었다. 표준입자 사이즈 측정결과 데이터의 측정 에러는 10% 미만이다. 장비를 적절하게 칼리브레이션한 후 NIST 단백질 표준시료(Protein Reference Standards)를 측정하였다.

Figure 3의 단백질 응집체 이미지에서 약 0.3μm 입자크기까지 특징이 명확하게 보인다. 큰 입자의 경우, 입자의 일부가 초점이 안 맞을 수도 있음을 알 수 있다

Figure 4의 NIST 단백질 표준샘플 이미지는 에어 기반 10X 시스템으로 측정한 것이다. 이 구성을 사용하면 1μm미만의 입자를 측정하거나 이미지화 할 수 없으며 더 큰 사이즈인 5-6μm 입자도 자세히 구별할 수 없다. 유침 Nano-Flow Imaging 시스템으로 측정한 Figure 5의 이미지는 입자 사이즈가 300nm에서 거의 6μm 크기범위에 해당한다. 이들 이미지는 해상도가 훨씬 더 좋고 입자가 자세히 보인다.

유침 Nano-Flow Imaging 시스템과 표준 에어 대물렌즈 Flow Imaging 시스템의 분해능 차이를 입증하기 위해 Figure 4의 6μm 입자를 Figure 5의 5.97μm 입자와 비교할 필요가 있다.

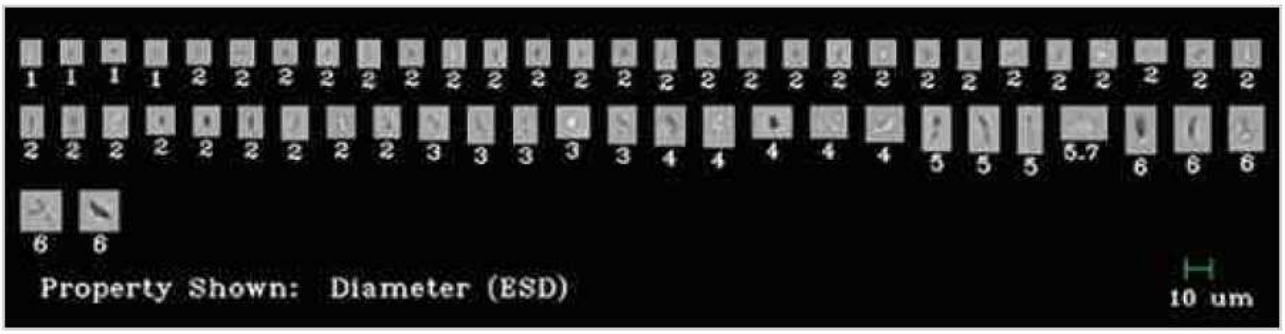


Figure 4 – NIST Protein Reference Standards as imaged with a standard 10× air objective flow imaging system. (Particle size shown below each image in microns ranging from 1–6 μm.)

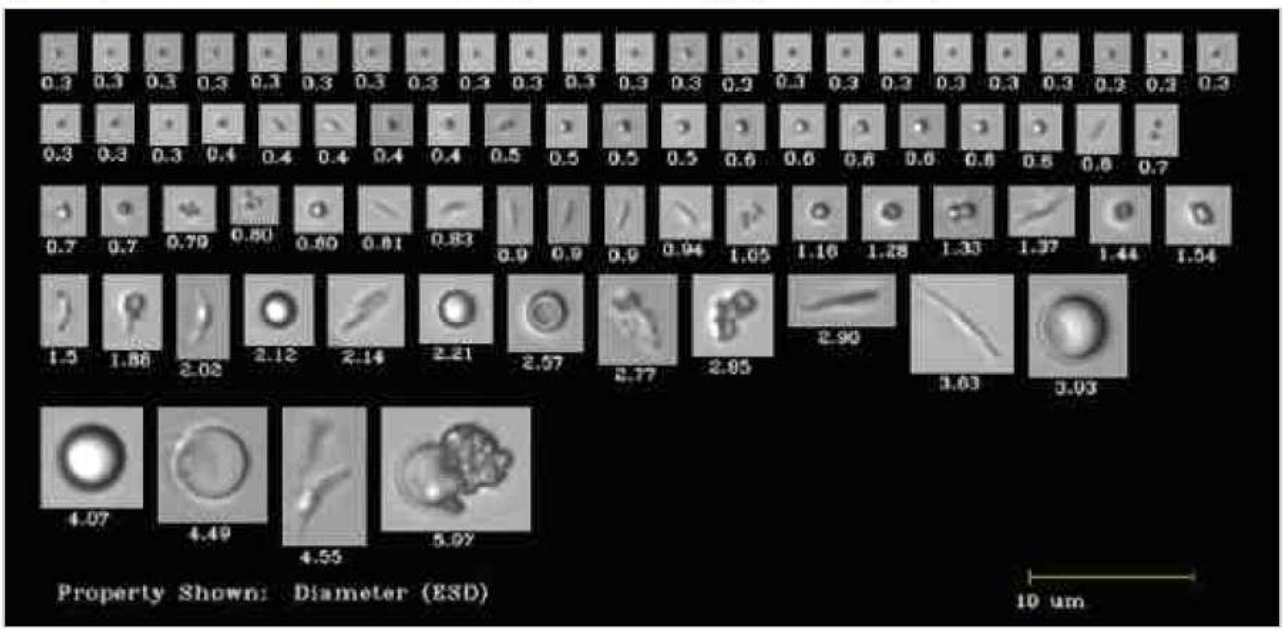


Figure 5 – NIST Protein Reference Standards as imaged with 40× oil immersion Nano-Flow Imaging system. (Particle size shown below each image in microns ranging in size from 300 nm to almost 6 μm.)

Summary

제형 분석 기술 역사상 처음으로 유침 광학장치가 적절하게 구성된 유동 이미징 현미경을 사용하여 약 300nm까지 작은 입자가 있는 시료를 분석할 수 있다. 이것은 제형 과학자와 공정기술자에게 피드백의 신세계를 열어주는 것이다. 오염물질은 생산 현장 어디에서나 유입될 수 있으며 리콜에서부터 심각한 합병증 및 사망에 이르는 다양한 문제를 유발할 수 있다. 미스터리한 나노입자의 이미지를 가지게 되면 과학자들은 제형개발, 품질보증, 완제(fill finish) 또는 보관 및 배송 과정 중 어디에서 개선점을 찾아야 할지 알 수 있다.

References

1. Born, M. and Wolf, E. *Principles of Optics*, sixth ed. Pergamon Press: New York, NY: 1993, p. 419.

2. Sieracki, C.K. and Peterson, K.A. Oil-immersion enhanced imaging flow cytometer. U.S. Patent 7,796,256 b1;May 5, 2008.

출처 : Labcompare, 2018. 5. 3일자

저자 : Chris Sieracki

Chris Sieracki / Chairman
Fluid Imaging Technologies
200 Enterprise Dr., Scarborough, ME 04074, USA
Tel.: 207-289-3200
e-mail: Chris.Sieracki@fluidimaging.com
www.fluidimaging.com