

Two-Photon Microscope의 개발 Development of Two-Photon Microscope

강문식, 임강빈, Regis grailhe
한국 파스퇴르 연구소
mskang@ip-korea.org

광학 현미경은 살아있는 세포들의 구조를 미세하게 관찰할 수 있는 특징으로 인해 생물학, 의학등 여러 분야에서 활용되고 있다. 최근에 들어, 화학적 형광 발현 물질의 발전에 힘입어 형광 기술을 이용한 현미경 이미징 기법은 분자 생물학, 특히 생물의학 연구에서 가장 중요한 하나의 도구로 쓰여지고 있다. 형광현미경은 조직이나 세포안의 원하는 부분의 정보를 선택적으로 획득할 수 있다는 장점으로 인해 그 활용가치가 높아지고 있다. 특히, 공초점 현미경을 이용한 형광 이미징 방법은 비 침습적으로 고해상도의 영상을 관찰할 수 있다⁽¹⁾.

Two-photon microscope(이광자 현미경)은 공초점 현미경에 비해 한 단계 진화한 형태로써 기존의 현미경의 단점을 보완한 기법이다. 이광자 현미경의 장점은 간략하게 다음과 같이 분류된다. 첫 번째, 기존보다 긴 파장의 레이저를 사용하기 때문에 침투깊이가 증가한다. 두 번째, 초점에서 벗어난 부분의 형광은 발생하지 않아서 검출영역에 핀홀을 사용하지 않으므로 형광정보를 수집하는데 있어 높은 효율성을 갖게 된다. 마지막으로 샘플의 손상을 최소화 할 수 있다는 장점이 있다⁽¹⁾⁽²⁾

본 연구에서는 파장변환이 가능한 femtosecond pulse laser, 2-D 스캐너 그리고 PMT 등을 이용하여 직접 이광자 현미경을 개발하여 단일 세포와 동물 실험등 다양한 샘플에 적용하여 영상을 획득하는데 그 목적이 있다.

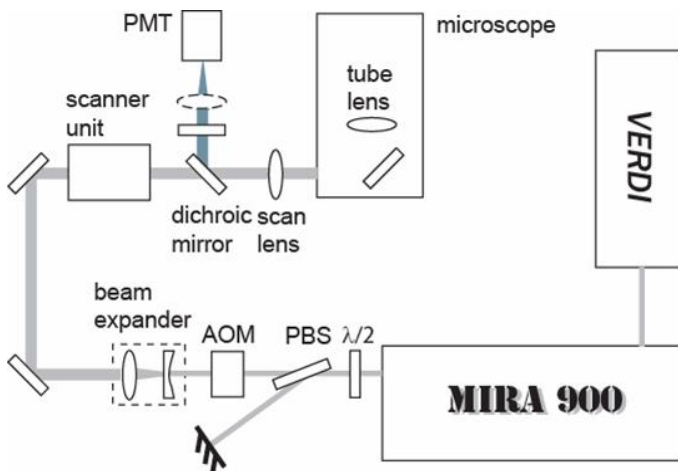


그림 1. Two-Photon Microscope의 개략도
Verdi-MiRA900: tunable femtosecond laser
λ/2 : wave plate
PBS: Polarization Beam Splitter
AOM:Acoustic Optics Modulator

그림1은 이광자 현미경의 개략도를 보여준다. 먼저 파장변환이 가능한 Ti-sapphire laser의 펄스 초 펄스의 파워는 half-wave waveplate와 polarizing beam splitter와 acousto-optic modulator (AOM)를 이용하여 미세하게 조절할 수 있다. 이때 AOM을 통과하면서 1차 회절된 빛만 빔 확장기(beam expander)로 입사하게 된다.⁽³⁾ 일반적으로 photodamage와 photobleaching을 최소화하기 위해서 샘플에 조사되는 레이저의 세기는 수십mV 범위에서만 사용되어지고 있다. 적당한 빛의 세기를 조절하는 것은 샘플의 손상을 막는 범위 안에서 보다 나은 영상을 얻기 위해서 중요한 요소중의 하나이다. 본 논문에서는 1차적으로 wave plate에서 큰 범위로 빛의 파워를 낮춰주고 AOM을 통해 미세한 범위로 빛의 세기를 조절해 줌으로써 샘플에 대한 손상을 최소화 하였다. 이러한 빛은 beam

expander를 통과하면서 3배의 크기로 확장되게 된다. 확장된 빔은 갈바노미터 거울 2개로 구성된 스캐너에 의해 이차원으로 스캐닝하게 되고 scan lens를 통과해 현미경으로 들어가게 된다. 대물렌즈를 통해 샘플로 입사된 빛은 초점면에서 two-photon 현상을 일으키고 이곳에서 발생한 형광 빛은 대물렌즈에 의해 다시 모아져서 되돌아 나오게 된다. 이 빛은 scan lens와 dichroic mirror를 통해 검출기로 들어가 최종적으로 영상을 얻게 된다. Dichroic mirror로부터 진행하는 형광 빛의 방향을 살펴보면 기존의 이광자 현미경에서 형광정보를 검출하는 경로가 기존의 공초점 현미경과 다른 것을 확인할 수 있으며 이것은 앞서 언급했던 이광자 현미경의 큰 장점을 설명하고 있다.

본 연구에서는 파장을 변환할 수 있는 femtosecond laser를 이용하여 이광자 현미경을 개발하였고 FLM, FCS, FRET 와 같은 다른 형광 현미경 기술을 쉽게 접목하려고 한다. 본 논문에서 제시한 이광자 현미경은 700nm-1000nm 범위의 레이저를 소스로 사용할 수 있기 때문에 현재 형광 이미징에서 사용되는 거의 모든 샘플을 측정할 수 있으리라 사료되며 많은 수의 샘플의 영상을 획득하면서 점차 적용범위를 확장할 것이다.

향후로는 보다 짧은 시간안에 3-D 이미지를 얻기 위하여 현재의 2-D 스캐너 부분을 보다 빠른 resonant scanner로 교체할 예정이며 수정 보완을 통해 살아있는 조직에도 적용할 것이다⁽⁴⁾.

1. Michael Rubart et al, "Two-Photon Microscopy of Cells and Tissue", JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION, Circularion Research, 2004;94:1154-1166
2. B. Lendvai et al, " Application of two-photon microscopy to the study of cellular pharmacology of central neurons", Advanced Drug Delivery Reviews 58, 2006, 841-849
3. R.Salome et al, "Ultrafast random-access scanning in two-photon microscopy using acouso-optic deflectors", Journal of Neuroscience Methods 154, 2006, 161-174
4. Michael J. Sanderson et al, "Acquisition of Multiple Real-Time Images for Laser Scanning Microscopy", Microscopy and Analysis, July 2004,