

## Two-Photon Microscope의 응용 Applied Two-Photon Microscope

강문식, 임강빈, 권도윤, 김지호, 이홍근, 오천택, 한성준, Regis Grailhe

한국 파스퇴르 연구소

[mskang@ip-korea.org](mailto:mskang@ip-korea.org)

Two-photon microscope (이광자 현미경)은 비선형 광학 현미경 종류의 하나로 기존 공초점 현미경에 비해 긴 파장의 레이저를 사용하기 때문에 침투깊이가 상대적으로 증가하게 되는 장점이 있으며 초점에서 벗어난 부분의 형광은 발생하지 않기 때문에 형광정보를 수집 및 분리하는데 있어 높은 효율성을 가진다. 이러한 장점을 이용하여 세포 혹은 조직을 미세하게 관찰하는 분야에 많이 이용되고 있으며 또한 fluorescence correlation spectroscopy (FCS), fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), fluorescence lifetime imaging

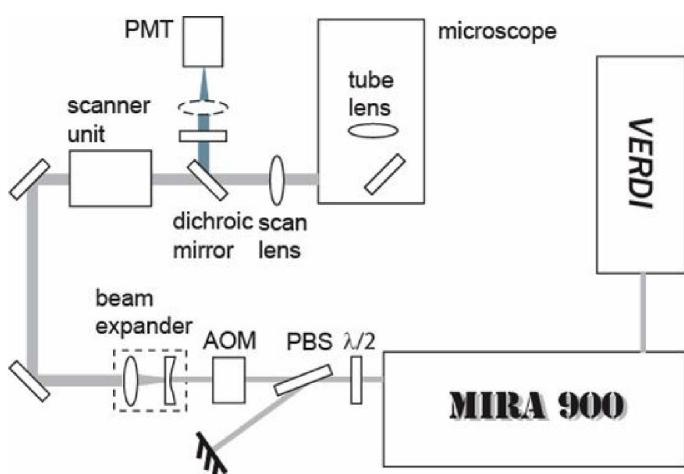


그림 1. Two-Photon Microscope의 개략도

Verdi-MiRA900: tunable femtosecond laser

$\lambda/2$  : wave plate

PBS: Polarization Beam Splitter

AOM: Acoustic Optics Modulator

microscopy (FLIM) 등 기존의 여러 가지 형광 현미경 기법에 적용되고 있다. 현재 이광자 현미경은 뇌, 신장 등의 다양한 생물학 분야의 연구에 사용되고 있으며 또한 분자와 DNA 영상 분야에도 활발하게 이용되고 있다.<sup>(1)(2)</sup>

본 논문에서는 파장변환이 가능한 femtosecond pulse laser, 2D 스캐너 그리고 PMT 등을 이용하여 직접 개발한 이광자 현미경을 이용해 획득한 조직의 3차원 이미지 구성과 two-photon FLIM 개발을 소개하고자 한다.

그림 1은 본 논문에서 개발한 이광자 현미경의 개략도를 보여준다. 파장 변환이 가능한 Ti-sapphire laser에서 발생한 펄스는 wave plate 와 PBS 그리고 AOM으로 구성된 파워 조절기를 지나게 되고, beam expander에 의해 확장된 빛은 2-D 스캐너와 스캔 렌즈를 통해 현미경으로 들어간다. 대물렌즈 (20X, NA=0.7)를 통해 샘플에 도달한 빛은 초점 내에서만 형광현상을 발생

시키며, 여기서 발생된 형광 빛은 대물렌즈와 다이크로익 미러를 통해 디텍터로 입사하게 된다. 디텍터 앞에 형광 필터를 사용하여 선택적으로 형광정보를 검출하였다.

그림 2는 본 논문에서 개발한 이광자 현미경을 이용하여 얻은 two-photon 이미지와 FLIM 이미지이다. 그림 2(a)는 여러 형광물질로 염색되어 있는 convallaria 식물 세포에 800nm 광원을 사용하여 획득한 단면 이미지로서 물관과 체관의 구분이 뚜렷한 것을 확인할 수 있다. 그림 2(b)는 이광자 현미경을 이용하여 획득한 초파리 머리 부분의 3D 이미지이다. 유전자 조작을 통해 특정한 형광물질이 발현되는 초파리의 뇌를 이미징하였다. 그림 2(c)는 이광자 현미경을 이용한 FLIM 이미지이다. 그림(c)는 convallaria에서 측정된 lifetime 과 이것을 이용하

여 재구성 된 이미지를 보여주고 있다.

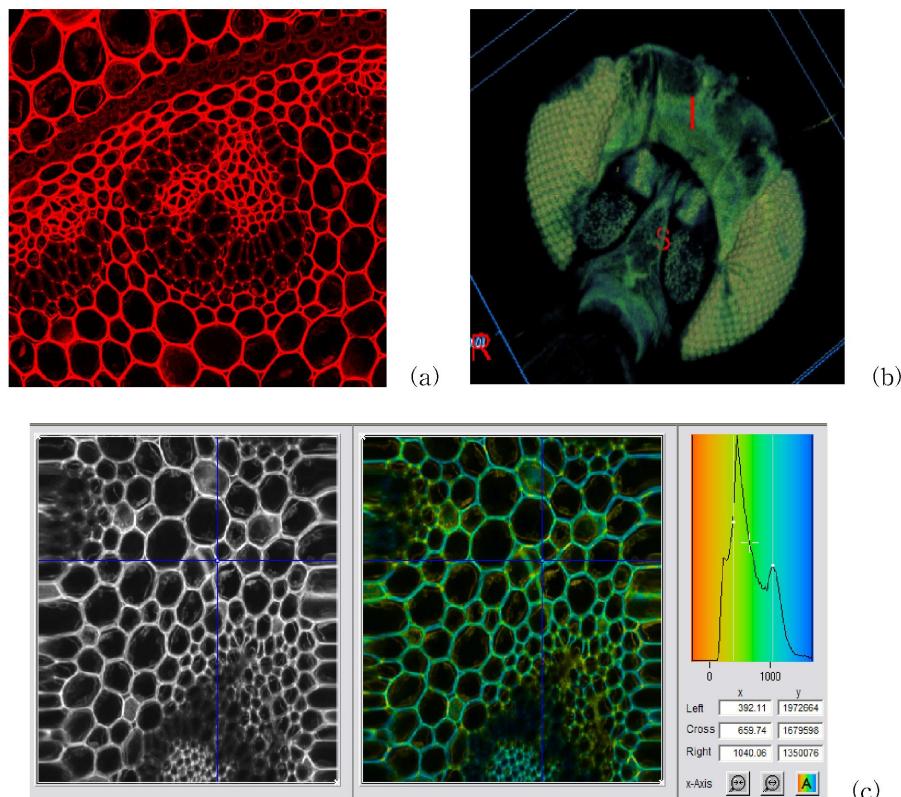


그림2. (a) Convallaria의 이광자 현미경 이미지 (b) 초파리 머리로 획득한 형광 3D 이미지  
(c) 이광자 현미경을 이용한 FLIM 이미지

본 연구에서는 이광자 현미경을 개발하고 다양한 샘플의 이미지를 측정하고 이를 이용하여 3차원 이미지를 구성해 보았다. 또한 형광 현미경의 기술중의 하나인 FLIM에 적용해 봄으로써 다른 형광 현미경 기술에 접목할 수 있는 가능성을 확인하였다.

1. B. Lendvai et al, "Application fo two-photon microscopy to the study of cellular pharmacology of central neurons", Adavanced Drug Delivery Reviews 58, 2006, 841-849
2. Michael J. Sanderson et al, "Acquisition of multiple Real-Time Images for Laser Scaning Microscopy", Microscopy and Analysis, July 2004