

이광자 분자센서를 이용한 생체 내 금속이온 검출

김 환 명*

아주대학교 에너지시스템 학부
443-749 경기도 수원시 영통구 원천동 산5

(2011년 7월 18일 접수; 2011년 8월 12일 수정본 접수; 2011년 8월 13일 채택)

Detection of Intracellular Free Metal Ions with Molecular Two-Photon Sensors

Hwan Myung Kim*

Division of Energy Systems Research, Ajou University, San 5, Woncheon-Dong, Yeongtong-gu, Suwon 443-749, Korea

(Received for review July 18, 2011; Revision received August 12, 2011; Accepted August 13, 2011)

요 약

이광자 현미경(two-photon microscopy)은 다양한 생명현상을 살아있는 조직의 깊은 곳에서 관찰할 수 있다는 장점 때문에 차세대 영상기술로 발전하고 있다. 이에 따라 다양한 목적에 사용할 수 있는 이광자 센서의 개발이 활발하게 진행 중이다. 이 총설에서는 금속이온 이광자 센서에 관한 최근의 연구 결과를 소개하고자 한다.

주제어 : 생체 영상, 금속 이온, 이광자 현미경, 이광자 센서

Abstract : Two-photon microscopy (TPM) is attracting much attention in biological imaging due to the capability of imaging deep inside the living tissues for a long period of time. For maximum utilization of TPM, it is essential to develop efficient two-photon sensors. Regarding this, many research groups are developing two-photon sensors for specific applications. In this review, we summarize recent results on selected examples of two-photon sensors for intracellular free metal ions in the live cells and tissues to provide a guideline for various imaging applications.

Keywords : *in vivo* imaging, Metal ions, Two-photon microscopy, Two-photon sensors

1. 서 론

생체 내에서 이루어지는 수많은 생명현상을 관찰하기 위한 노력은 무한히 지속되고 있고, 이를 위해 인위적인 요소가 가해지지 않은 생체조직을 비침습 방법으로 영상화시키는 연구는 차세대 핵심 기술로 발전하고 있다.

현재 살아있는 세포 및 생체 내의 생명현상을 분자수준으로 관찰할 수 있는 방법 중 가장 널리 이용되고 있는 방법은 공초점 현미경(confocal microscopy)을 이용한 영상화이다. 최근 들어 파장이 길고 에너지가 낮은 광자(photon) 두 개를 동시에 흡수하여 들뜬 상태에 도달한 후 방출하는 형광을 이용한 이광자 현미경(two-photon microscopy)이 개발되어 생체영상 분야의 발전에 큰 기여를 할 것으로 기대된다. 이 두 현미경의 차이는 전자는 일광자 형광을 사용하고 후자는 이광자 형광을 이용한다는 것이다. 일광자 형광과 이광자 형광의 원

리는 Figure 1에 비교하였다. 일광자 형광은 일광자($h\nu_1$) 흡수에 의해 들뜬 상태에 도달한 분자가 S_1 상태로 전이한 후 방출하는 빛이다. 반면에 이광자 형광은 낮은 에너지를 가진 광자($h\nu_2$) 두 개를 동시에 흡수하여 들뜬 상태에 도달한 분자가 방출하는 빛이다(Figure 1(a)). 이와 같이 이광자 현미경은 광원으로써 에너지가 낮은 장파장의 빛을 사용하는데, 그 장점은 i) 고화질의 동영상을 장시간에 걸쳐 얻을 수 있다는 것과 ii) 손상되지 않은 조직(intact tissue) 내부의 영상을 얻을 수 있다는 것이다[1-4]. 장파장의 빛은 생체 조직이 거의 흡수하지 않아 빛의 손실이 적고, background emission이 거의 없으며 이광자 흡수의 세기는 초점으로부터의 거리의 네제곱에 반비례하므로 이광자 형광은 빛의 초점에서만 방출된다(Figure 1(b))[1]. 따라서 고화질의 영상을 얻을 수 있다. 또한 광원으로써 펄스(pulse) 레이저를 사용하므로 광표백(photo-bleaching)과 기질에 대한 손상이 적어 생체 조직의 영상을 실시간 동영상으로 구현할 수 있다. 또한 일광자 공초점 현미경은 생체 조직에 대한 투과력이 낮아 (<80 μm) 조직의 표면만을 관찰할 수 있다는 한계를 가지고 있다[3]. 반면에 이광자 현미경은

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kimhm@ajou.ac.kr

이 논문은 한국연구재단 지정 중점연구소, 아주대학교 분자과학기술 연구센터 특집으로 투고되었습니다.

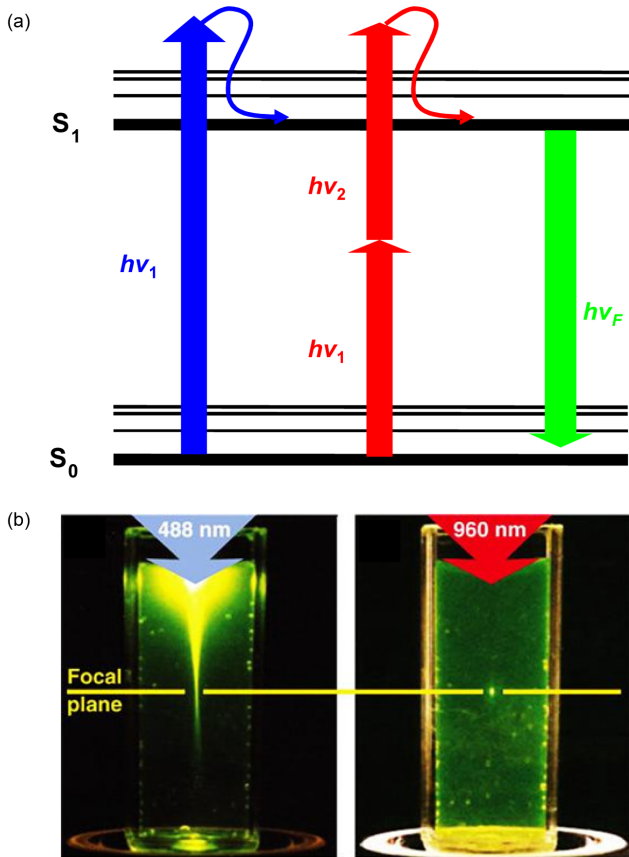


Figure 1. (a) Schematic description of one-photon and two-photon fluorescence. (b) Localization of excitation by one-photon (488 nm) and two-photon (960 nm) excitation[1].

투과력이 좋아(>500 μm) 손상되지 않은 조직의 내부에서 진행되는 생물학적인 현상을 장시간에 걸쳐 실시간으로 관찰할 수 있다. 그러나 이광자 현미경에 사용되는 핵심소재인 이광자 형광 센서의 개발은 아직 시작 단계에 있다. 따라서 이 분야의 급속한 발전이 이루어지기 위해서는 다양한 이광자 형광 센서의 개발이 선행되어야 한다.

생체 내 존재하는 미량의 금속이온은 다양한 생명현상에서 핵심적인 역할을 담당하고 있다[5]. 특히 알칼리, 알칼리 토금속, 전이 금속이온의 농도는 세포와 조직의 위치에 따라 각기 다른데 이 농도의 급격한 변화는 병리학적 문제를 야기시킨다[5,6]. 그러나 아직 이광자 현미경에 사용할 수 있는 금속이온 센서의 부족으로 이 분야의 연구에 제한을 받고 있다. 또한 상용화 되어 있는 일광자 형광 센서의 대부분은 이광자 현미경에서 사용하기에 낮은 형광 효율을 가지고 있어 ($\delta_{TPA} < 50 \text{ GM}$) 사용에 어려움이 있다[4]. 그러므로 생체 영상에 적용시킬 수 있는 높은 형광 효율을 가진 이광자 센서의 개발이 매우 중요하다. 최근 들어 금속이온을 감지할 수 있는 다양한 이광자 센서가 개발되어 살아있는 조직 내의 생명현상을 관찰할 수 있게 되었다[7,8].

이 총설에서는 최근의 개발된 금속이온 이광자 센서에 관해 간략히 소개하고, 센서를 이용한 이광자 현미경의 세포영상과 조직영상을 소개하고자 한다.

2. 생체 영상을 위한 이광자 형광센서

지난 몇 년간 개발된 이광자 형광센서는 “Turn-on” 형태이다. 즉, 생리적 수용액에서 센서 자체의 이광자 형광 세기는 매우 작으나 금속 이온과 결합하였을 때에는 그 세기가 급증하는데, 이는 금속 이온 수용체와 형광체 간의 PeT (Photo-induced Electron Transfer) 메커니즘에 기인된 현상으로 볼 수 있다[7,8]. 또한 생체 조직 내부의 금속이온을 감지할 수 있는 이광자 센서를 고안하기 위해서는 다음과 같은 사항들을 고려해야 한다. (i) 이광자 형광효율이 높아야 된다: 자연 그대로의 생명현상을 관찰하기 위해서는 염색하는 센서의 농도가 최소화 되는 것이 바람직하므로 낮은 센서의 농도에서 밝은 이광자 현미경 영상을 얻을 수 있어야 된다. (ii) 물에 대한 용해도를 고려해야 한다: 생체 내에는 약 70% 이상이 물로 구성되어 있으므로 세포와 조직을 염색시키기 위해서는 물에 대한 용해도가 좋아야 한다. (iii) 특정 금속과의 높은 선택성과 알맞은 해리상수(K_d)를 가져야 한다: 생체 내에는 다양한 생체분자와 금속이온이 존재하며 각 소기관 및 세포의 종류에 따라 금속이온의 농도가 다르므로 이를 검출하기 적당한 선택성과 감응능력을 갖추어야 한다. (iv) 세포 내로의 투과력이 좋아야 한다: 세포 내로 염색이 잘 되기 위해서는 센서의 분자량이 작은 것이 유리하다. (v) 광안정성(photostability)을 가져야 한다: 생명현상을 장시간에 걸쳐 실시간으로 관찰하기 위해서는 센서의 자가 광표백이 최소화 되어야 한다. 위의 조건들을 만족하는 몇 가지 이광자 센서를 소개하고자 한다.

2.1. 마그네슘 이온 이광자 센서

마그네슘 이온은 생체 내에서 세포 증식과 세포사(cell death), 효소반응, 신호 전달 등 다양한 역할을 한다[9-11]. 생체 내에 분포되어 있는 마그네슘 이온을 관찰하기 위해서, 이광자 형광 표지자인 AMg1이 개발되었다[12]. AMg1은 청색의 형광 물질인 6-acetyl-2-(dimethylamino)naphthalene (acedan)을 이광자 형광체로 사용하였고, 마그네슘을 선택적으로 감지할 수 있는 *o*-aminophenol-*N,N,O*-triacetic acid (APTRA) 을 마그네슘 수용체(receptor)로 도입시킨 형태로 고안되었다(Scheme 1). AMg1은 생리적 완충용액(Tris buffer, pH 7.05)에서 마그네슘 이온을 감지하였을 때, 약 17배의 이광자 형광 증가율을 가지며, 마그네슘 이온과 칼슘 이온에 대한 해리상수(K_d)는 각각 $1.4 \text{ mM} \pm 0.1 \text{ mM}$ 과 $9.0 \text{ mM} \pm 0.3 \text{ mM}$ 로 측정되었다. 세포 내에 존재하는 마그네슘 이온의 농도(0.1~6.0 mM)는 칼슘 이온의 농도(10 nM~1 μM)보다 수백배 높기 때문에 AMg1은 다른 금속이온과의 간섭 없이 체내에 존재하는 마그네슘 이온을 감지할 수 있다[13,14]. 또한 AMg1과 AMg1-Mg^{2+} 는 생리적 pH 범위에서 안정성을 가지며, 특히 AMg1-Mg^{2+} 는 이광자 형광효율(two-photon action cross section)이 780 nm부근에서 약 125 GM 정도로 상업적으로 구할 수 있는 Mg-Green이나 Mag-fura-2에 비해 7배 정도 크다[13]. 이는 생체 내에서 AMg1이 상업적 센서 보다 더 효율적으로 고화질의 생체영상을 얻을 수 있다는 것을 의미한다.

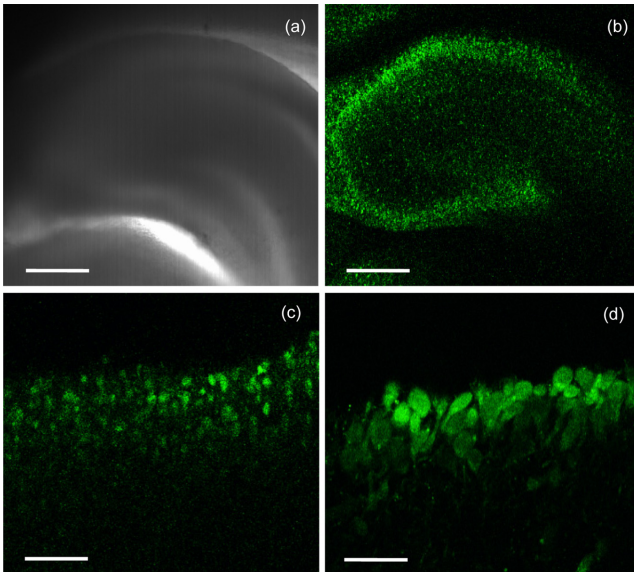
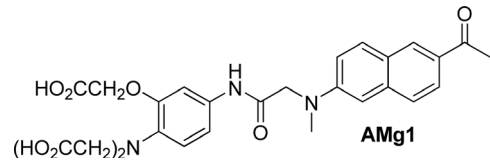


Figure 2. Images of a fresh mouse hippocampal slice stained with 5 μM AMg1-AM. (a) A bright-field image shows the CA1 and CA3 regions as well as the dentate gyrus by magnification at 10 \times . (b) TPM image with the same magnification reveals the same regions at a depth of $\sim 270 \mu\text{m}$. (c) Magnification at 40 \times shows the CA1 layer at a depth of $\sim 150 \mu\text{m}$. (d) Magnification at 100 \times shows CA1 pyramidal neurons at a depth of $\sim 150 \mu\text{m}$. Scale bars, 300 (a, b), 120 (c), and 30 (d) μm , respectively. The TPEF images were collected at 500-620 nm upon excitation at 780 nm with fs pulses[12].



Scheme 1. The structure of AMg1.

Figure 2는 AMg1-AM 5 μM 을 쥐 뇌 조직의 hippocampal 절편에 염색시킨 후 얻은 이광자 현미경 사진이다. Dentate gyrus (DG)와 CA1-CA3 부분에 존재하는 자유 마그네슘 이온의 분포를 약 100 μm 이상의 깊이에서 이광자 현미경 영상으로 확인할 수 있다(Figure 2(b)). 이광자 현미경의 고배율 렌즈를 이용해 확대한 영상을 보면 pyramidal 뉴런(neuron)층인 CA1 부분에 존재하는 자유 마그네슘 이온의 분포를 좀 더 명확히 볼 수 있다(Figures 2(c) and (d)). 이 결과들을 통해 AMg1이 살아있는 쥐의 뇌 조직 깊은 곳에서 존재하는 마그네슘 이온의 분포를 감지 할 수 있는 표지자임을 알 수 있다.

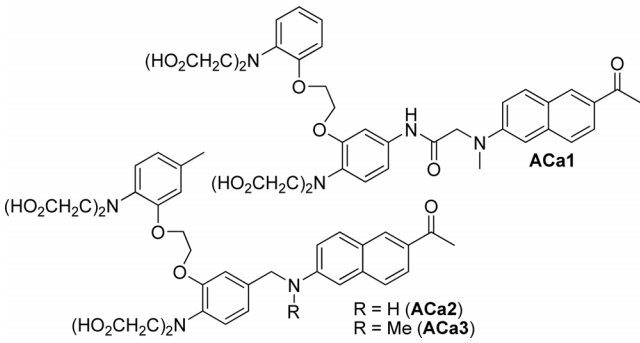
2.2. 칼슘 이온 이광자 센서

칼슘 이온은 세포 내에서 진행되는 수많은 생명 현상을 조절하는 이차 신호전달 물질이므로 이의 농도 변화를 실시간으로 관찰하는 것은 매우 중요하다[15-17]. 특히 칼슘 이온은 생체 내에서 수 마이크로 초 내에 외포작용(exocytosis)을 유발하고, 염색체의 전사(gene transcription)를 조정하며, 수 분

Table 1. Photophysical data for TP probes.[7,8]

probe	solvent	$\lambda_{\text{max}}^{(1)}/\lambda_{\text{max}}^{(2)}$ [a]	$\Phi^{[b]}$	$K_d^{\text{OP}}/K_d^{\text{TP}}[c]$	$\lambda_{\text{max}}^{(2)[d]}$	$\delta^{[e]}$	$\delta\Phi^{[f]}$
AMg1	$\text{H}_2\text{O}^{[g]}$	365/498	0.04	1.4/1.6 mM	ND	ND	ND
AMg1- Mg^{2+}		365/498	0.58		780	215	125
ACa1	$\text{H}_2\text{O}^{[i]}$	365/498	0.012	0.27/0.25 μM	ND	ND	ND
ACa1- Ca^{2+}		365/498	0.49		780	230	110
ACa2	$\text{H}_2\text{O}^{[i]}$	362/495	0.010	0.14/0.16 μM	ND	ND	ND
ACa2- Ca^{2+}		362/495	0.42		780	210	90
ACa3	$\text{H}_2\text{O}^{[i]}$	375/500	0.015	0.13/0.14 μM	ND	ND	ND
ACa3- Ca^{2+}		375/517	0.38		780	250	95
ANa1	$\text{H}_2\text{O}^{[j]}$	367/500	0.08	20/20 mM	ND	ND	ND
ANa1- Na^+		367/500	0.65		780	146	95
ACaL	$\text{H}_2\text{O}^{[i]}$	369/500	0.0037	45/41 nM	ND	ND	ND
ACaL- Ca^{2+}		372/502	0.043		780	90	
BCaM	$\text{H}_2\text{O}^{[m]}$	360/470	0.07	90/89 $\mu\text{M}^{[o]}$	ND	ND	ND
BCaM- Ca^{2+}		360/470 ^[n]	0.98		780	153	150

[a] λ_{max} of the one-photon absorption and emission spectra in nm. [b] Fluorescence quantum yield. [c] Dissociation constants measured by one- (K_d^{OP}) and two-photon (K_d^{TP}) processes, except otherwise noted. [d] λ_{max} of the two-photon excitation spectra in nm. [e] The peak two-photon cross section in $10^{-50} \text{cm}^4/\text{s/photon}$ (GM). [f] Two-photon action cross section. [g] 10 mM Tris buffer (100 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM EGTA, pH 7.05) in the absence and presence (50 mM) of free Mg^{2+} . [h] 30 mM MOPS buffer (100 mM KCl, 10 mM EGTA, pH 7.2) in the absence and presence (39 μM) of free Ca^{2+} . [i] 10 mM MOPS buffer ($[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = 135 \text{mM}$, pH 7.0) in the absence and presence (135 mM) of free Na^+ . [j] 30 mM MOPS buffer (100 mM KCl, pH 7.2) in the absence and presence (2.5 mM) of free Ca^{2+} . [k] The λ_{max} measured in LUVs composed of DPPC/CHL, raft mixture, and DOPC were 436, 450, and 452 nm, respectively. [l] K_d values measured in LUVs and cells are $81 \pm 4 \mu\text{M}$ and $78 \pm 5 \mu\text{M}$, respectively.



Scheme 2. The structures of ACa1-ACa3.

에서 수 시간 내에 확산(proliferation)을 일으킨다[15-17]. 생체 내에서 칼슘 이온의 농도는 100 nM에서 1 μM까지 생체 활성에 따라 다양하게 존재한다. 최근 살아있는 조직 깊은 곳에서 칼슘 wave를 광표백과 오차 없이 실시간으로 관찰할 수 있는 여러 이광자 형광 센서(ACa1-ACa3)들이 소개되었다(Scheme 2)[18,19].

ACa1-ACa3의 대표적인 물성은 Table 1에 요약되어 있다. ACa1-ACa3가 칼슘이온을 감응하면 자체의 형광에 비해 25~42배의 이광자 형광 증가율을 보이는 turn-on 센서이다[18,19]. 칼슘 이온에 대한 ACa1-ACa3의 이광자 해리상수(K_d)는 0.14 μM~0.25 μM 범위 내에서 존재하며, 이는 마이크로 몰(μM) 이하의 칼슘 이온을 감지할 수 있음을 의미한다(Table 1). ACa1-ACa3 다른 금속이온과의 간섭 없이 체 내에 존재하는 자유 칼슘 이온을 선택적으로 감지할 수 있으며, 생리적 pH 범위에서 안정성을 가진다. ACa1-ACa3와 각각의 칼슘 이온 복합체는 이광자 형광 효율이 780 nm부근에서 약 90~110 GM 정도로 상용화 되어있는 Oregon Green-1 (OG-1)에 비해 약 4 배 정도 크다[18,19].

Figure 3은 살아있는 쥐의 뇌 조직 절편에 10 μM의 ACa1-AM으로 염색한 후 hypothalamic 인근 지역에 존재하는 astrocyte에서 진행되는 자발적인 칼슘 wave를 이광자 현미경을 이용하여 실시간으로 촬영해 얻은 영상을 시간대 별로 정리한 것이다. Figure 3의 이광자 현미경 영상을 통해 소마 안에서의 칼슘 wave (Figure 3, trace 1)를 광표백 현상 없이 1100 초 이상 관찰할 수 있었다. 또한, astrocyte에서 발생하는 spike는(Figure 3, trace 2) 소마에서 발생하는 것보다 조금 빨리 나타난다. 이것은 생체 조직내의 astrocyte에서 소마로 신호(signal)가 전달되는 현상을 실시간으로 이광자 현미경을 사용하여 관찰한 것이다.

2.3. 소듐 이온 이광자 형광 표지자

소듐 이온은 세포 내에서 고농도로 존재하는 이온 중 하나이며 생체 내의 생리학적으로 중요한 역할을 한다[20-22]. 세포 내에 존재하는 자유 소듐 이온(free Na⁺)의 농도는 5~30 mM 정도로 존재하며, 세포 밖에는 100 mM 이상으로 존재한다[20-22]. 이러한 소듐 이온의 농도는 세포의 원형질막에 존재하는 이온채널과 펌프에 의해 조절된다. 세포 내로의 소듐

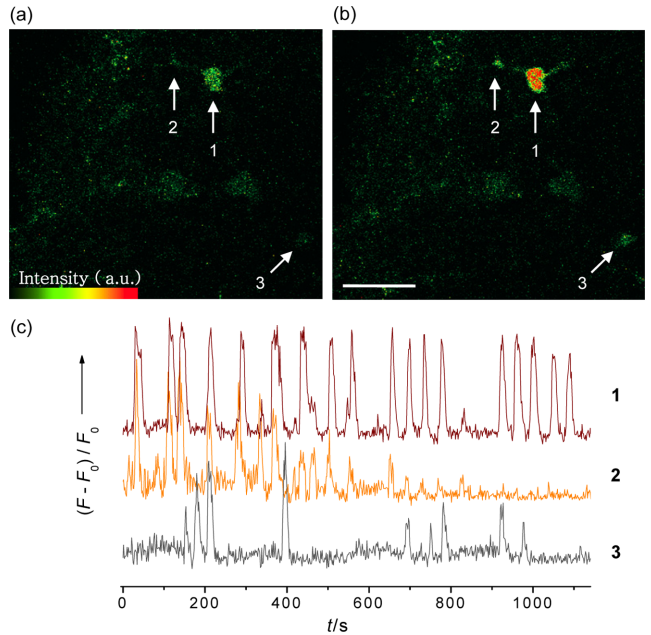
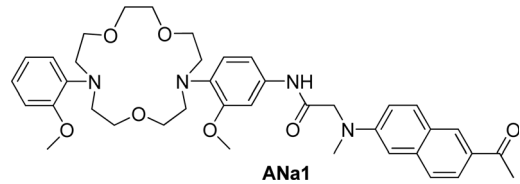


Figure 3. (a,b) Pseudo colored TPM images of an acute rat hypothalamic slice stained with 10 μM ACa1-AM taken after 195 (a) and 214 (b) s. Magnification at 100× shows hypothalamic area at a depth of ~170 μM. (c) Spontaneous Ca²⁺ transients recorded in soma (1), astrocyte process (2), and neighboring cell (3). The TPEF images were collected at 500~620 nm upon excitation at 780 nm with fs pulses. Scale bar, 30 μm[18].



Scheme 3. The structure of ANa1.

이온의 유입(influx)은 Na⁺/Ca²⁺ 교환자(NCX) 등에 의해, 세포 밖으로 소듐 이온의 유출(efflux)은 Na⁺/K⁺-ATPase에 의해 조절된다. 이러한 현상들을 이해하기 위해서 이광자 염료인 아세단(acedan)과 소듐 이온 수용체(receptor)인 1,7-diaza-15-crown-5를 기반으로 하는 이광자 형광 센서, ANa1이 개발되었다(Scheme 3)[23].

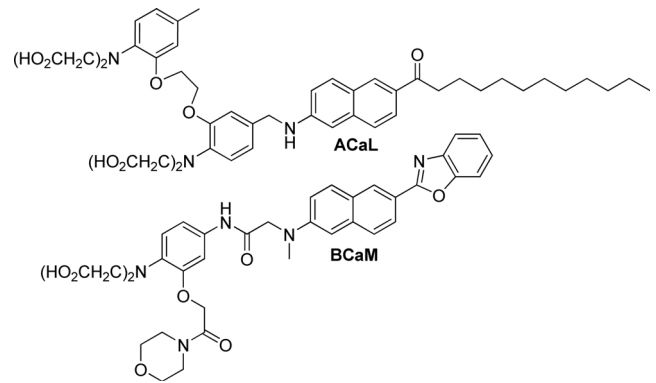
ANa1이 소듐이온을 감응하면 센서 자체의 형광에 비해 약 8배의 이광자 형광 증가율을 가지며, 소듐 이온에 대한 해리상수(K_d)는 약 20 mM로 측정되었다(Table 1). ANa1은 소듐 이온에 대해 높은 선택성을 보이며, 생리적 pH 범위에서 안정성을 보인다. 또한 ANa1-소듐 이온 복합체는 780 nm부근에서 약 95 GM 정도의 이광자 형광 효율을 가지며, 이는 상업적으로 구할 수 있는 Sodium Green (SG)이나 SBFI에 비해 3~5배 정도 더 크다. 따라서 ANa1으로 염색한 헬라 세포(HeLa cells)에서 얻은 이광자 현미경 영상이 SG나 SBFI에서 얻은 영상보다 더 선명하고 밝다[23].

ANa1의 유용성을 확인하기 위해서 다음과 같은 실험이 진행되었다. 먼저 ANa1을 astrocyte에 염색시킨 뒤 스테로이드 호르몬의 일종인 ouabain을 첨가한 뒤 이광자 형광의 세기 변화를 관찰하였다. Ouabain은 Na^+/K^+ -ATPase를 억제해 세포질의 자유 소듐 이온 농도를 증가시킨다[24-26]. 그 결과 이광자 형광 세기는 서서히 증가하고 1,800초 후에는 최고점에 도달하였다. 세포질에 존재하고 있는 소듐 이온의 농도($[\text{Na}^+]_i$)를 $[\text{Na}^+]_i = K_d^i [(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)]$ 을 통해 계산해 보면 10 mM \pm 2.1 mM이다. 여기에 1 mM의 ouabain을 처리해 주면 1,800초 후에는 최대값인 50 mM \pm 5.0 mM이 된다[23]. 이 결과를 통해 ANa1이 세포내의 소듐 이온 농도의 변화를 장시간에 걸쳐 실시간으로 관찰 하기에 용이한 센서임을 알 수 있다.

ANa1 20 μM 을 쥐 뇌 조직의 hippocampal 절편에 염색시켜 각각의 이미지를 얻었다(Figure 4). 이광자 현미경 영상을 보면, 소듐 이온은 DG부분에 비해 pyramidal 뉴런(neuron)층인 CA1-CA3 부분에 더 많이 존재 하는 것을 알 수 있다(Figures 4(b)). 고배율로 확대한 영상을 보면 소듐 이온의 분포를 세포 수준에서 더 명확히 볼 수 있다(Figures 4(c)). 이 결과들을 통해 ANa1이 살아있는 조직의 깊은 곳에 존재하는 소듐 이온의 분포를 감지하기에 적합한 센서임을 알 수 있다.

2.4. 이광자 형광 센서를 이용한 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 의 상호작용 동시 영상화

세포막 인근의 칼슘 이온은 세포 내의 농도보다 수백 배 더 높고 100 μM 이상 존재하는 것으로 잘 알려져 있다[17]. 이러



Scheme 4. The structures of ACaL and BCaM.

한 고농도의 칼슘 이온이 존재하는 국소적인 위치는 체내에서 일어나는 여러 생리활성을 조절하는데 중요한 역할을 한다[17]. 세포 내에 칼슘 이온 농도가 높아지면 항상성(homeostasis)을 유지하기 위해 이온은 세포 밖으로 나가고 소듐 이온은 세포 안으로 들어오게 된다. 이것을 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 교환이라고 한다[17,26].

최근들어, 세포막 인근 칼슘을 감지할 수 있는 이광자 형광 표지자인 ACaL이 소개되었다[27,28]. 그러나 ACaL의 해리 상수($K_d = 41$)가 세포막 인근에 있는 100 μM 이상의 칼슘을 감지하기에는 너무 작다(Table 1). 또한 소듐이온 표지자인 ANa1과 형광의 파장범위가 비슷하여 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 상호작용을 동시에 영상화시키기 어려운 문제가 있다. 이에 따라 세포막 인근의 칼슘이온을 감지하기 적합한 수용체를 도입시키고 형광의 파장범위가 ANa1과 서로 다른 새로운 이광자 형광체로 유도된 BCaM이 개발되었다(Scheme 4)[29].

BCaM은 칼슘 이온과 감응하면 자체의 형광의 세기에 비해 약 14배의 이광자 형광 증가율을 가지며 칼슘 이온에 대한 해리상수(K_d)는 완충용액 상에서 일광자(K_d^{OP})와 이광자(K_d^{TP}) 과정에 의해 측정된 값이 약 90 μM 로 거의 같았다. 또한 원형 질막의 모형으로 사용되는 LUVs (large unilamellar vesicles)에 BCaM을 염색한 후 측정된 값과 헬라 세포(HeLa cells) 내에서 측정된 값은 81과 78 μM 로서 그 값이 거의 같았다. 따라서 BCaM은 세포막 인근의 칼슘이온을 감지하기 적합한 이광자 센서임을 알 수 있다(Table 1)[29].

BCaM은 높은 칼슘이온 선택성을 가져 생체 내 존재하거나 존재할 가능성이 있는 모든 금속 이온에 대해 거의 감응을 하지 않으며, 생리적 pH 범위에서 안정성을 보이므로 칼슘의 농도 활성화와 분포를 다른 금속이온과 pH 변화의 방해 없이 검출할 수 있다. 또한 BCaM-칼슘 이온 복합체(BCaM- Ca^{2+})는 780 nm부근에서 약 150 GM 정도로 이광자 형광 효율이 상업적으로 구할 수 있는 Calcium-Green이나 Fura-2에 비해 3-5배 정도 더 크므로 낮은 농도의 센서를 이용하여 고화질의 이광자 현미경 영상을 얻을 수 있다[29].

BCaM이 원형질막에 선택적으로 염색이 되는지 여부를 알아보기 위하여 살아있는 HeLa 세포에 0.5 μM 의 BCaM을 염색한 후 이광자 현미경 사진을 촬영하였다(Figure 5(a)). 더 나아

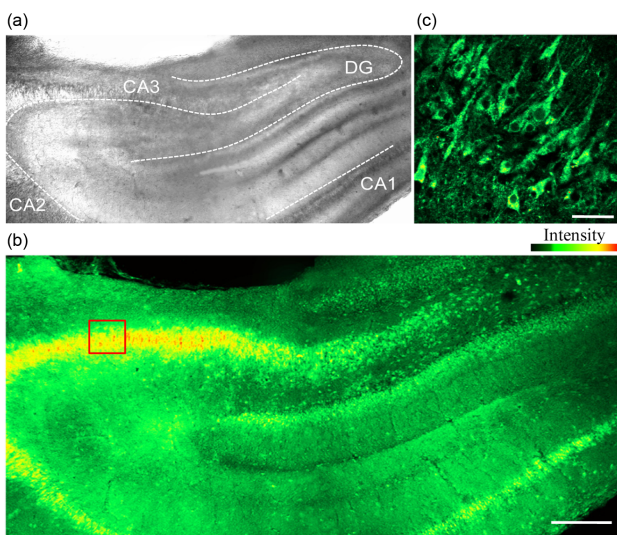


Figure 4. Images of a rat hippocampal slice stained with 20 mM ANa1 for 40 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. (a) Bright-field image of the CA1-CA3 regions as well as the dentate gyrus by 10 \times magnification. (b) TPM image by 10 \times magnification. 25 TPM images were accumulated along the z-direction at the depth of \sim 100–200 nm. Scale bar, 300 μm . (c) Magnification at 100 \times in pyramidal neuron layer of CA3 regions (red box in Figure 3(b)) at a depth of \sim 120 nm. Scale bar, 30 μm . The TPM images were collected at 500–620 nm upon excitation at 780 nm with fs pulse[26].

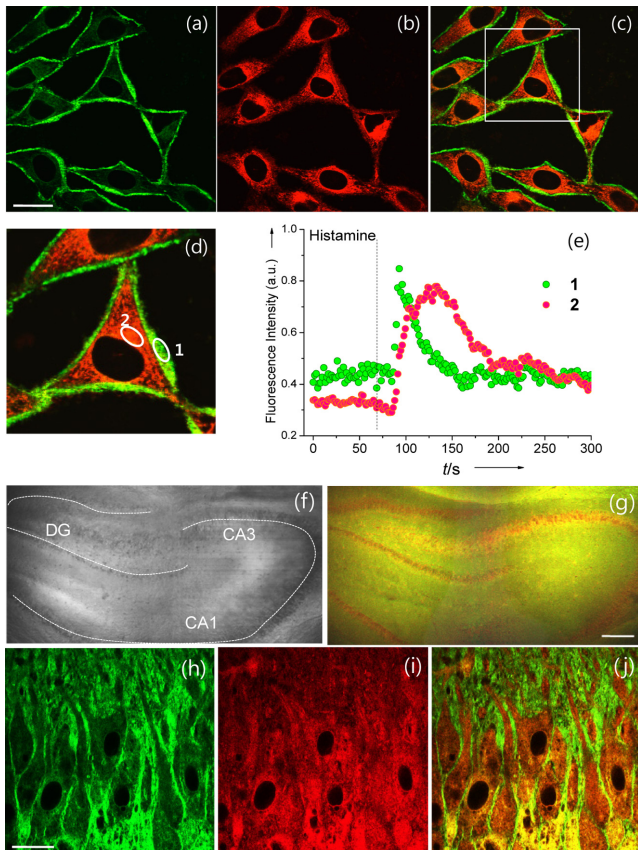


Figure 5. (a-e) Dual-channel TPM images of HeLa cells colabeled with BCaM and ANa1 collected at (a) 390~450 nm (BCaM, Ch1) and (b) 500-560 nm (ANa1, Ch2), respectively. (c) Merged image and (d) enlargement of a white box in (c). (e) Time course of TPEF at designated position in (d) after stimulation with 100 μM histamine in nominally Ca^{2+} -free buffer. (f-j) Images of a rat hippocampal slice costained with BCaM and ANa1. (f,g) Bright-field and TPM images of the CA1-CA3 regions as well as dentate gyrus at 10x magnification. (g) 25 TPM images collected at Ch1 and Ch2, respectively, along the z direction at the depths of approximately 100-200 μm were accumulated and then merged. (h-j) TPM images of CA3 regions collected at (h) Ch1 and (i) Ch2 at a depth of $\sim 100 \mu\text{m}$ by 100x magnification. (j) Merged image. Excitation wavelength was 780 nm. Scale bars: 30 (a,h) and 300 (g) μm [32].

가 살아있는 세포 내에서 BCaM의 이광자 형광의 최대파장이 ANa1과 다르므로 이 둘을 동시에 염색하여 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 의 활성을 서로 다른 검출영역에서 동시 영상화를 통한 연구가능성을 확인하였다[29].

생체 내의 모든 활성은 이온 또는 분자들의 상호작용을 통해서 이뤄진다. 한 가지 예가 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 교환이다. 하나의 칼슘 이온이 세포 밖으로 나가면 세 개의 Na^+ 이 세포 안으로 들어 오게 된다. 이것을 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 교환이라고 한다[26,30]. 이 교환을 동시에 조사하기 위하여 BCaM과 ANa1을 같은 HeLa 세포에 염색한 후 서로 다른 채널에서 이광자 현미경 영상을 동시에 얻었다(Figure 5(a-e)). Figure 5에서 BCaM은 세포막에 존재하는 칼슘 이온의 분포를(Figure 5(a)), ANa1은 세포질에 존

재하는 Na^+ 이온의 분포를 각각 보여 준다(Figure 5(b)). 이 세포에 histamine을 첨가하면 이광자 형광의 세기(초록색)가 세포막에서 먼저 증가하고, 잠시 후 세포질에서의 이광자 형광의 세기(빨간색)가 증가하는 것을 관찰할 수 있다(Figure 5(e)). 이것은 histamine에 의해 자극된 세포가 Ca^{2+} 이온을 세포 밖으로 방출하는 과정에서 세포막 근처의 Ca^{2+} 이온이 먼저 증가하고, 그 다음에 Na^+ 이온이 세포질로 들어오는 과정을 보여주는 것이다[30]. 따라서 BCaM과 ANa1을 이용하여 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 교환을 이광자 현미경을 이용하여 동시 영상화 시키는데 성공한 예이다. 이를 발표한 논문을 보면 쥐의 뇌 조직의 hippocampal 절편에 두 센서를 염색시킨 후 약 120 μm 깊이에 존재하는 Na^+ 및 Ca^{2+} 의 분포를 이광자 현미경 동시영상으로 명확하게 보여주고 있다. 이는 손상되지 않은 조직 내부(100~200 μm)의 Na^+ 및 Ca^{2+} 의 분포를 이광자 현미경 영상으로 관찰하는데 있어 BCaM과 ANa1이 유용한 한 쌍의 센서임을 보여줌과 동시에 이광자 현미경을 이용한 생체분자의 상호작용을 보여주는 새로운 기술을 소개한 것이다.

3. 결론

지금까지 살아있는 세포와 생체 조직에 존재하는 다양한 금속들을 감지할 수 있는 이광자 센서들을 간략하게 소개하였다. 이광자 형광체와 금속 이온 수용체의 연결에 의해 고안된 이광자 센서들은 다음과 같은 사항들을 고려하여 개발되었다; (i) 밝은 이광자 현미경 영상을 위한 이광자 형광 효율의 중요성, (ii) 특정 금속 이온과 결합했을 때, 이광자 형광이 방출될 수 있는 적절한 수용체의 장착, (iii) 물에서의 적절한 용해능력과 세포 안을 염색할 수 있는 세포 투과성(cell permeability), (iv) 살아있는 세포 환경에서 다른 생체분자의 간섭에 영향을 받지 않고 목표 금속 이온을 잘 감지 할 수 있는 선택성(selectivity), (v) 장시간에 걸쳐 실시간으로 관찰이 가능할 수 있도록 하는 높은 광 안정성(photostability).

위의 사항들과 더불어 생체 내에서 일어나는 헤아릴 수 없는 생명현상을 실시간으로 관찰하기 위해서는 다양한 색상의 형광을 방출하는 이광자 형광 센서의 개발이 필요하다. 이광자 현미경의 발전과 더불어 원하는 목적에 사용할 수 있는 다양한 이광자 센서를 개발하고 응용 범위를 진단 시약으로 확장시킨다면 생물학과 의학 연구에 있어서 획기적인 발전을 이룰 수 있을 것이다.

감사

이 논문은 2010년도 아주대학교 일반연구비 지원과 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업(2011-0022978)으로 수행된 연구임.

참고문헌

1. Zipfel, W. R., Williams, R. M., and Webb, W. W., "Nonlinear Magic: Multiphoton Microscopy in the Biosciences," *Nat. Bio-*

- technol.*, **21**, 1369-1377 (2003).
2. Helmchen, F., and Denk, W., "Deep Tissue Two-photon Microscopy," *Nat. Methods*, **2**(12), 932-940 (2005).
 3. Williams, R. M., Zipfel, W. R., and Webb, W. W., "Multiphoton Microscopy in Biological Research," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**(5), 603-608 (2001).
 4. Xu, C., Zipfel, W., Shear, J. B., Williams, R. M., and Webb, W. W., "Multiphoton Fluorescence Excitation: New Spectral Windows for Biological Nonlinear Microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**(20), 10763-10768 (1996).
 5. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., "Molecular Biology of the Cell," 4th ed.; Taylor & Francis Group: New York (2002).
 6. a) Lippard, S. J., and Berg, J. M., "Principles of Bioinorganic Chemistry," University Science Books, Mill Valley, California, USA, (1994); b) Bae, M. A., Kwak, I. S., Won, S. W., and Yun, Y. S., "Gold Recovery from Cyanide Solution through Biosorption, Desorption, and Incineration with Waste Biomass of *Corynebacterium Glutamicum* as Biosorbent," *Clean Technology*, **16**(2), 117-123 (2010).
 7. Kim, H. M., and Cho, B. R., "Two-photon Probes for Intracellular Free Metal Ions, Acidic Vesicles, and Lipid Rafts in Live Tissues," *Acc. Chem. Res.*, **42**(7), 863-872 (2009).
 8. Kim, H. M., and Cho, B. R., "Two-Photon Fluorescent Probes for Metal Ions," *Chem.-Asian J.*, **6**, 58-69 (2011).
 9. Rubin, H., "Magnesium: The Missing Element in Molecular Views of Cell Proliferation Control," *BioEssays*, **27**(3), 311-320 (2005).
 10. Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., and Martinou, J. C., "Bax-induced Cytochrome C Release from Mitochondria is Independent of the Permeability Transition Pore but Highly Dependent on Mg^{2+} Ions," *J. Cell Biol.*, **143**(1), 217-224 (1998).
 11. "Magnesium and the Cell"; Birch, N. J., Ed.; Academic Press: San Diego, CA (1993).
 12. Kim, H. M., Jung, C., Kim, B. R., Jung, S. Y., Hong, J. H., Ko, Y. G., Lee, K. J., and Cho, B. R., "Environment-sensitive Two-photon Probe for Intracellular Free Magnesium Ions in Live Tissue," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**(19), 3460-3463 (2007).
 13. The Handbooks-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed.; Haugland, R. P. Ed.; Molecular Probes: Eugene, OR (2005).
 14. a) Fitz, J. G., Sostman, A. H., and Middleton, J. P., "Regulation of Cation Channels in Liver Cells by Intracellular Calcium and Protein Kinase C," *Am. J. Physiol. (London)*, **266**(4), G677-G684 (1994); b) Cho, M. R., Thatte, H. S., Silvia, M. T., and Golan, D. E., "Transmembrane Calcium Influx Induced by ac Electric Fields," *FASEB J.*, **13**(6), 677-683 (1999).
 15. Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L., "Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodeling," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**(7), 517-529 (2003).
 16. Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P., "Regulation of Cell Death: the Calcium-Apoptosis Link," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 552-565 (2003).
 17. Rizzuto R., and Pozzan T., "Microdomains of Intracellular Ca^{2+} : Molecular Determinants and Functional Consequences," *Physiol. Rev.*, **86**(1), 369-408 (2006).
 18. Kim, H. M., Kim, B. R., Hong, J. H., Park, J. S., Lee, K. J., and Cho, B. R., "A Two-photon Fluorescent Probe for Calcium Waves in Living Tissue," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**(39), 7445-7448 (2007).
 19. Kim, H. M., Kim, B. R., An, M. J., Hong, J. H., Lee, K. J., and Cho, B. R., "Two-photon Fluorescent Probes for Long-term Imaging of Calcium Waves in Live Tissue," *Chem.-Eur. J.*, **14**(7), 2075-2083 (2008).
 20. Burnier, M., "Sodium in Health Disease," Informa Healthcare, M. Burnier, New York (2008).
 21. The Na^+ , K^+ Pump, Part B: Cellular Aspects, ed. J. C. Skou, J. G. Norby, A. B. Maunsbach, M. Esmann, Alan R. Liss, John Wiley & Sons, New York, USA (1998).
 22. Murphy, E., and Eisner, D. A., "Regulation of Intracellular and Mitochondrial Sodium in Health and Disease," *Circ. Res.*, **104**(3), 292-303 (2009).
 23. Kim, M. K., Lim, C. S., Hong, J. T., Han, J. H., Jang, H. Y., Kim, H. M., and Cho, B. R., "Sodium-ion-selective Two-photon Fluorescent Probe for in Vivo Imaging," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**(2), 364-367 (2010).
 24. Scheiner-Bobis, G., and Schoner, W., "A Fresh Facet for Ouabain Action," *Nat. Med.*, **7**(11), 1288-1289 (2001).
 25. Chatton, J. Y., Marquet, P., and Magistretti, P. J., "A Quantitative Analysis of L-glutamate-regulated Na^+ Dynamics in Mouse Cortical Astrocytes: Implications for Cellular Bioenergetics," *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 3843-3853 (2000).
 26. Blaustein, M. P., and Lederer, W. J., "Sodium/calcium Exchange: Its Physiological Implications," *Physiol. Rev.*, **79**(3), 763-854 (1999).
 27. Mohan, P. S., Lim, C. S., Tian, Y. S., Roh, W. Y., Lee, J. H., and Cho, B. R., "A Two-photon Fluorescent Probe for Near-membrane Calcium Ions in Live Cells and Tissues," *Chem. Commun.*, **36**, 5365-5367 (2009).
 28. Shin, Y. N., Lim, C. S., Tian, Y. S., No, W. Y., and Cho, B. R., "Detection of Near-membrane Calcium Ions in Live Tissues with Two-Photon Fluorescent Probes," *Bull. Korean Chem. Soc.*, **31**(3), 599-605 (2010).
 29. Kim, H. J., Han, J. H., Kim, M. K., Lim, C. S., Kim, H. M., and Cho, B. R., "Dual-Color Imaging of Sodium/Calcium Ion Activities with Two-Photon Fluorescent Probes," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**(38), 6786-6789 (2010).
 30. Houchi, H., Kitamura, K., Minakuchi, K., Ishimura, Y., Okuno, M., Ohuchi, T., and Oka, M., "Mechanism of Histamine-induced Calcium Efflux from Cultured Bovine Adrenal Chromaffin Cells: Possible Involvement of an Na^+/Ca^{2+} Exchange Mechanism," *Neurosci. Lett.*, **180**(2), 281-284 (1994).