

실시간 샘플링 방법을 이용한 고속 형광 수명 측정 시스템

High-speed fluorescence lifetime measurement system based on real-time sampling method

이동수, 문석배, 배운성, 김덕영

광주과학기술원 정보통신공학과

dslee@gist.ac.kr

형광 수명(Fluorescence lifetime)의 측정은 기존의 형광 세기에 의해 이미지를 구성하는 형광 현미경에 비해, 고등적인 분광학적 정보를 수집하여 이미지를 구성하는 응용에 보다 자세한 정보를 제공한다. 형광 분자에서 형광 광자의 생성 확률은 전자 여기(excitation)가 이뤄진 시점을 정점으로 지수 함수적으로 감쇠를 그리게 된다. 이 지수 함수적 감쇠곡선의 특성 감쇠 시간을 형광 수명이라 한다. 형광 수명은 각 형광체의 특성에 따라 특정 이온의 농도나 산소의 농도, 산도(pH) 등의 주변 환경에 의해 그 값이 변하게 된다.⁽¹⁾ 따라서 형광 수명의 측정을 통해 이런 변수들의 공간적인 분포를 조사하는 방식의 형광 수명 이미징 현미경(Fluorescence Lifetime Imaging Microscope; FLIM)이 가능하게 된다.

형광 수명을 측정하는 가장 직관적인 방법은 짧은 펄스 형태의 여기광을 시료에 입사시키고 방출되는 형광의 시간 파형을 고속의 광검출기(photo-detector)를 통해 측정하는 방법이다. 하지만 일반적인 광검출기(PMT, APD)에 의해 측정된 파형은 형광 지수 함수 감쇠 파형에 광 검출기의 응답, 즉 장치 응답 함수(Instrumentation Response Function)가 컨벌루션(convolution) 되어 있다. 따라서 실제 형광의 지수함수 파형에서 형광 수명을 측정하기 위해서는 디컨벌루션(deconvolution) 과정이 필요하게 된다. 이와 같은 디컨벌루션 과정이 필요없고, 고감도의 안정적인 측정방법으로는 시간-상관 단일 광자 계수기(Time-Correlated Single Photon Counting; TCSPC)가 있다. 하지만 이 방법은 근본적으로 측정시간의 제약점을 보여준다.⁽²⁾ 이러한 문제점을 해결하기 위해서 본 논문에서는 실시간 샘플링 방법(real-time sampling method)을 이용하여 측정된 형광 펄스 신호로부터 장치 응답 함수의 기여를 디컨벌루션 과정을 통해 제거하고, 빠른 속도로 형광 수명을 측정할 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

그림 1은 실시간 샘플링 방법을 이용하여 형광 수명을 측정하는 시스템의 구성도와 실제 형광 염료 Alexa

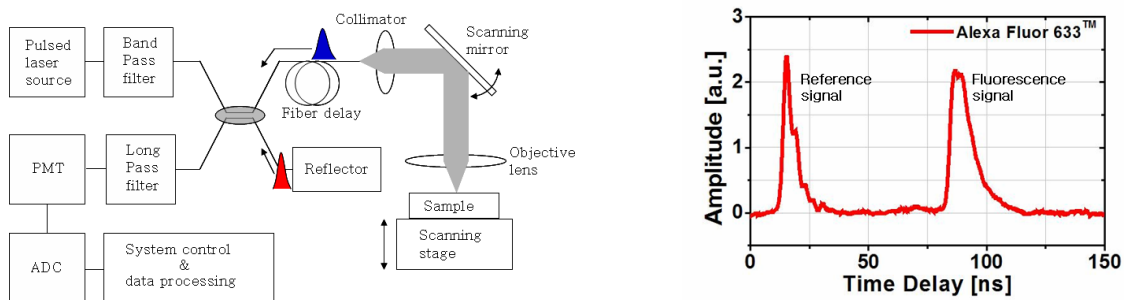


그림 1. 실시간 샘플링 방법을 이용한 형광 수명 측정 시스템의 구성도(좌측), 측정된 장치 응답 함수와 형광 펄스 신호(우측).

Fluor 633을 이용하여 측정된 여기광과 광검출기에 의한 장치 응답 함수와 형광 현상에 의해 발생된 형광 펄스 전기신호의 결과를 보여준다. 광섬유 커플러를 포함하는 형광 수명 측정 시스템에서 펄스 레이저가 광섬유 커플러를 통해 두 부분으로 진행하게 된다. 그 중 대물렌즈로 진행되는 여기광은 시료에 조사되어 형광 분자가 형광을 방출하게 된다. 이렇게 발생된 다수의 형광 광자는 광검출기에 수광되어 펄스 전기신호로 변환되게 된다. 여기광원과 광검출기에 의해 발생하는 장치 응답 함수의 펄스 신호를 얻기 위해서 광섬유 커플러를 통해 반사기(reflector)로 진행하여 다시 반사된 여기광원을 광검출기로 수광하여 얻을 수 있다. 이때 광섬유 지연을 주어서 장치 응답 함수의 파형(Reference signal)과 형광에 의한 형광 펄스신호(Fluorescence signal)를 펄스 레이저의 한 주기동안 동시에 측정하게 된다. 이 각각의 신호는 실시간 샘플링 방법에 의해 데이터로 획득되게 된다. 이렇게 얻어진 두 개의 신호로부터 디컨벌루션 과정을 통해 실제 형광 지수함수 파형에서의 특성 감쇠시간인 형광 수명을 구할 수 있게 된다. 20°C의 증류수에 희석된 Alexa Fluor 633의 형광 수명은 3.2 ns이고, 실시간 샘플링 방법을 이용한 본 형광 수명 측정 시스템에 의해서는 3.27 ns의 형광 수명을 얻을 수 있었다.

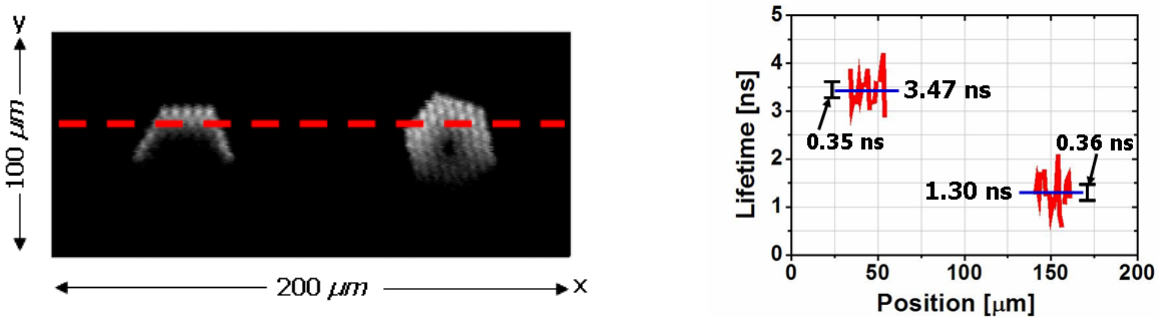


그림 2. 광자 결정 광섬유의 형광 세기 이미지(좌측)와 형광 수명의 변화(우측)

그림 2는 두 개의 광자 결정 광섬유(Photonic Crystal Fiber; PCF)에 다른 형광 수명을 가지는 형광 염료를 채운 뒤 이 형광체로부터 나오는 형광의 세기를 이미징하여 얻은 결과와 그때 1 라인에서의 형광 수명의 변화를 나타내는 도표를 보여준다. 한 개의 PCF에는 Alexa Fluor 633 형광 염료를 채우고, 다른 한 개의 PCF에는 Cy5 형광 염료를 채운 뒤에 이미지와 형광 수명의 변화를 얻었다. 형광 세기 이미지는 주사(scanning) 시스템에 의해 x축 방향으로 200um, y축 방향으로 100um의 범위를 주사하면서 이미지를 얻었다. 여기서 y축 위치는 고정시킨 후 x축으로 주사하면서 형광 수명의 변화를 측정하였다. 좌측 PCF에서의 형광 수명의 평균값은 3.47 ns이었고, 좌측 PCF에서 형광 수명의 평균값은 1.3 ns이었고, 표준 편차는 각각 0.35 ns, 0.36 ns의 범위 내에서 형광 수명의 변화가 발생하였다.

본 논문에서는 광검출기의 응답속도의 제한에 의해 발생하는 장치 응답 함수의 기여를 실시간 샘플링 방법을 이용하여 디컨벌루션 과정을 거쳐 형광 수명을 측정하는 시스템을 소개하였다. 개발된 방법은 빠른 속도로 형광 수명을 측정할 수 있어 생물학 및 의학적 분야에서 실시간 3차원 구조의 이미징과 형광 수명의 변화가 빠른 샘플의 특성을 파악하는 FLIM 응용에 활용될 것으로 기대된다.

Acknowledgement

This work was supported by Creative Research Initiative program of MOST/KOSEF.

참고문헌

1. M. R. Eftink, Topics in fluorescence spectroscopy, 2, 53-123 (1991)
2. H. C. Gerritsen, et al., Handbook of biological confocal microscopy, Springer, 516-534 (2006)