

# 형광 수명 측정 시스템을 위한 평균 지연 방법에 대한 평가

## Evaluation of mean-delay method for Fluorescence Lifetime Measurement System

원영재, 문석배, 송우섭, 김덕영  
 광주과학기술원 정보기전공학부  
[dykim@gist.ac.kr](mailto:dykim@gist.ac.kr)

형광 수명(Fluorescence lifetime)은 각 형광체의 특성에 따라 특정 이온의 농도나 산소의 농도, 산도(pH) 등의 주변 환경에 의해 그 값이 변하며 따라서 형광 수명 측정은 기존의 형광 세기에 의해 이미지를 구성하는 형광 현미경에 비해, 고등적인 분광학적 정보를 수집하여 이미지를 구성하는 응용에 보다 자세한 정보를 제공한다. 또한 그 값이 형광 물질의 양에 의존하지 않으므로 별도의 보정작업이 필요 없다. 그동안 형광 수명 측정에 있어서 여러 방식이 제시 되었고 사용되고 있지만, 각각의 방식은 복잡한 디컨볼루션 작업과 긴 측정시간의 제약점을 갖고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 평균 지연 방법이 제시되었고 이로써 빠른 속도로 간단한 수식에 의한 형광 수명 측정이 가능하다.<sup>(1)</sup>

본 논문에서는 제시된 평균 지연 방법에 대하여 그 정확도(Accuracy)와 정밀도(Precision)를 실험적으로 평가하고 Monte Carlo Simulation 을 통해 다른 방법에 비해 그 성능이 더 향상되었음을 보여준다.

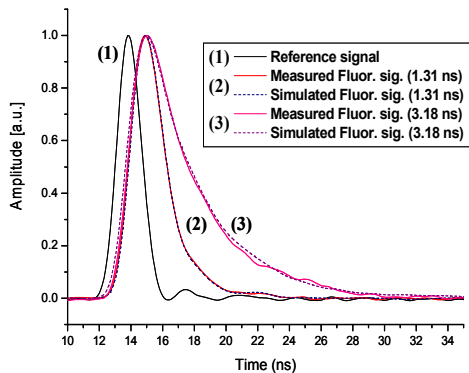


그림 1. Reference & Fluorescence 신호

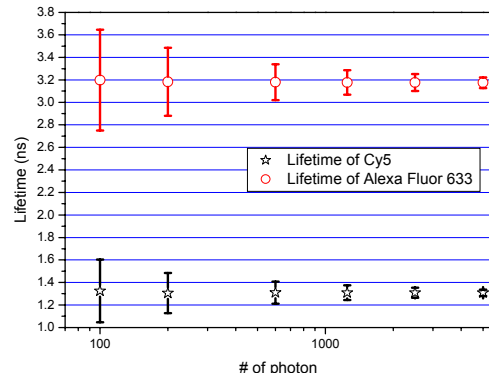


그림 2. 광자수에 따른 형광수명 및 표준편차

그림 1의 실선은 측정된 Reference 신호(1)와 형광 신호를 나타내고, 점선은 측정된 Reference 신호와 이상적인 Exponential 감소 곡선인 형광 신호를 컨볼루션 연산을 통하여 얻은 시뮬레이션 데이터이다. 실험은 (2) Cy5 와 (3) Alexa Fluor 633 형광 dye에 대하여 실행하였으며 각 데이터는 약 5000개의 광자수(Number of photon)에 의해 얻어진 결과이다. 그림 1에서 볼 수 있듯이 측정된 형광 신호는 시뮬레이션 데이터와 거의 일치함을 알 수 있고, 평균 지연 방식을 이용하여 형광 수명을 계산한 결과 측정된 데이터에 의한 형광 수명과 이상적인 형광 신호에 의한 형광 수명은 1% 이내의 오차를 갖고 있었으며, 이는 곧 99% 이상의 정확도를 의미한다.

평균 지연 방법에 대한 정밀도는 측정된 신호에 의해 계산된 형광 수명의 표준편차(Standard Deviation)에 의해 평가 할 수 있다. 각 경우에 대하여 광자수 약 100, 200, 600, 1250, 2500, 5000개에 의한 신호에 대해 형광 수명 및 표준 편차를 계산하였으며 각각 600개의 대조군을 가지고 계산하였다.

그림 2 는 Cy5 와 Alexa Fluor 633에 대하여 계산된 형광수명의 평균값 및 표준편차를 나타낸다. 형광수명

의 평균값은 검출된 광자수와 상관없이 큰 차이(1.5% 이내)를 보이지 않았으며 이는 작은 광자수로도 비교적 정확한 형광수명 값을 계산할 수 있음을 의미한다. 또한 표준편차는 검출된 광자수가 적을 경우 신호 대 잡음비가 더 작아지기 때문에 그 값이 더 커지는 경향을 보인다.

마지막으로 Monte Carlo Simulation을 사용하여 평균 지연 방법의 성능을 평가하였다. 일반적으로 형광수명 측정 방법에 대한 성능을 평가하기 위한 지표로서 Figure of merit (F) 값이 사용되었으며, 이는  $F = \frac{\Delta\tau}{\tau} \sqrt{N}$  으로 계산된다. 여기서  $\Delta\tau$  는 표준편차, N 은 검출된 광자수, 그리고  $\tau$ 는 계산된 형광수명을 나타낸다. F값이 작을수록 같은 광자수에 대한 표준편차가 작음을 의미하며, 이는 시스템이 더 좋은 성능을 갖고 있음을 의미한다. 본 실험에서는 광 양자 잡음 (Photon quantum noise)만 고려하였으며, 그 이외의 전기적 잡음 혹은 광 검출기 자체의 증폭값의 변동(Gain fluctuation) 등은 시스템에 따라 달라질 수 있는 요소이므로 고려하지 않았다.<sup>(2)</sup>

Monte Carlo Simulation은 특정 확률 분포를 갖는 현상에 대해서 그 확률 분포를 따르는 변수를 무작위로 할당하여 그 현상을 실제와 같이 모델링 하여 분석하는 방법으로써, 이를 사용하여 복잡한 계산식으로 풀이되는 현상들도 쉽게 해석할 수 있다. 본 연구에서 형광 dye로부터 방출되는 광자는 Exponential 함수의 확률 분포로 방출되는 임의의 광자 (Randomly distributed photon)로 볼 수 있으므로 Monte Carlo Simulation을 이용하여 Reference 신호 및 형광 신호를 모델링 할 수 있다. Simulation에 사용된 광원은 가우시안(Gaussian) 확률 분포를 따르도록 설계하였으며 광 검출기의 장치 응답 함수 또한 실제와 같은 확률 분포를 따르도록 설계하였다.

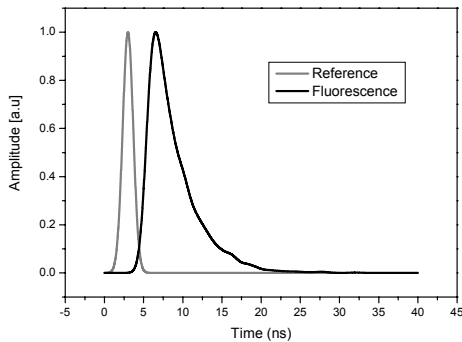


그림 3. Monte Carlo Simulation에 의해 모델링 된 Reference 및 형광 신호

Lifetime measurement method	Performance (F-value)
TCSPC	1 ~ 1.1
Time gating	1.2 ~ 1.5
Phase fluorometry	1.1 ~ 10
*Mean delay method	0.98

표 1. 광자수에 따른 형광수명 및 표준편차

그림 3은 Monte Carlo Simulation에 의해 모델링 한 Reference 및 형광 신호를 나타내며 형광신호는 2400 개의 광자수에 의해 모델링 되었다. 같은 방식으로 600개의 대조군을 만들었으며 이에 대한 평균 형광수명 값과 표준편차를 계산한 후 F 값을 계산한 결과 약 0.98의 값을 나타내었다. 표 1 은 기존의 형광 수명 측정 방식들에 대한 F 값 및 평균 지연 방법의 F 값을 나타내며, 평균 지연 방법의 F 값이 다른 값들에 비해 더 작음을 알 수 있다. 이는 같은 광자수에 의해 계산되는 형광 수명 값에 대한 정밀도가 더 좋음을 의미한다.

본 논문에서는 평균 지연 방법에 대한 분석을 통하여 적은 광자수로도 비교적 정확한 형광수명을 계산할 수 있음을 보았으며, 또한 시뮬레이션을 통해 기존의 방식들에 비해 그 성능이 더 좋음을 알 수 있었다. 이로써 평균 지연 방식을 사용하면 형광 수명의 변화를 이용한 빠른 속도의 동적인 현상을 기존 방식들에 비해 보다 적은 오차 범위 내에서 측정 할 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgement

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

참고문헌

1. 이동수 외, 한국광학회 2007년도 하계학술대회, TP-V12, 221-222 (2007)
2. K. Carlsson, et al., SPIE, vol. 4622, 70-78 (2002)