

고속 및 광표백 감소 이미징을 위한 최적 반복률 이광자 자극 형광 수명 현미경

송정근¹, 강주형², 남형수¹, 강운교¹, 김현정³, 김진원³, 유흥기^{1*}

한국과학기술원 기계공학과¹

한양대학교 바이오메디컬공학과²

고려대학교 구로병원 심혈관 센터³

Optimal repetition rate light source two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy for high-speed and photobleaching reduced imaging

Jeonggeun Song¹, Juehyung Kang², Hyeongsu Nam¹, Ungyo Kang¹, Hyun Jung Kim³, Jin Won Kim³, and Hongki Yoo¹

¹Department of Mechanical Engineering, KAIST, Daejeon, Republic of Korea

²Department of Biomedical Engineering, Hanyang University, Republic of Korea

³Cardiovascular Center, Korea University Guro Hospital, Seoul, South Korea

Abstract

Two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy (TP-FLIM) provides high-resolution in vivo imaging for various applications in life science and biomedical fields. Typically, TP-FLIM is implemented using a femtosecond Ti:Sapphire laser with a repetition rate of approximately 80MHz and time-correlated single photon counting (TCSPC), which slows down imaging rate. In this study, we developed a TP-FLIM utilizing analog-mean-delay method with an optimal repetition rate for high speed and reduced photobleaching. Due to the quadratic relationship, between peak illumination power and the fluorescence emission, pulsed with low repetition rate can be used to dramatically increase fluorescence emission. By tuning the repetition rate of TP-FLIM's femtosecond laser, we were able to enhance SNR and lifetime precision while minimizing photobleaching.

1. 연구 배경

형광 수명 이미징 현미경(Fluorescence lifetime imaging microscopy)은 생명과학, 의생명과학 등 다양한 분야에서 주목받고 있다. 형광 수명은 형광체(fluorophore)에 자극을 가해 발생하는 형광의 발현 평균시간으로, 형광체가 가지는 고유 값이다. 형광 수명 영상은 이 같은 특성을 이용해 생체 시편의 구조적인 정보를 제공할 뿐만 아니라, 산도(pH), 온도, 신진대사의 상태 등 주변 환경의 생화학적 정보를 제공하기 때문에 다양한 연구 활동에 사용되고 있다. 그 중에서도 자가 형광 autofluorescence 수명 영상은 염색, 조영제가 추가적으로 투여되지 않은 Label-free 생체 조직을 사용할 수 있다는 장점이 있어, in-vivo에서의 영상 획득에 큰 장점으로 작용된다.

형광을 획득하는 방식 중 하나인 이광자 자극(two-photon excitation)은 전형적으로 사용하는 단일 광자 자극(single photon excitation)에 비해 높은 파장의 레이저를 사용하기 때문에, 생체 조직에 깊게 침투할 수 있으며, 산란이 적어 두꺼운 조직의 영상을 획득하기에 유리하다. 이 광자 자극은 광원이 시간과 공간적으로 크게 집중되어 있는 초점 부분에서만 형광이 발현하여, 단일 광자보다 광독성(phototoxicity), 광표백(photobleaching)의 영향력을 줄일 수 있으며, 광학적 분할 능력(optical sectioning ability)을 가지고 있어 이를 이용한 3차원 생체 조직 영상 획득이 이뤄지고 있다. 최근에는, 이 광자 자극 현미경을 활용하여, 형광 수명 영상을 획득하는 이 광자 자극 형광수명 현미경(two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy)에 대한 연구가 활발하게 이뤄지고 있다 [1].

기존의 이 광자 자극 현미경에서 사용하는 초고속 펄초 펄스 레이저(ultrafast femtosecond pulse laser)는 76~80MHz의 높은 펄스 반복률(repetition rate)을 사용하고 있다. 펄스의 수가 많아 질수록 펄스에너지가 줄어들기 때문에 펄스 하나당 획득할 수 있는 형광이 적어지게 되며 이는 곧 신호 및 잡음 대비(signal to noise ratio)를

저하시킨다. 이 광자 자극으로 획득한 형광은 펄스가 가지는 에너지의 제곱에 비례하도록 나오는 특성(quadratic relation)을 가지고 있기 때문에 펄스 반복률을 줄여 펄스 에너지를 올려줌으로써 형광을 비약적으로 늘릴 수 있다.

기존의 형광 수명을 획득하는 방식은 전형적으로 TCSPC(time-correlated single photon counting)로 하나의 형광 수명을 획득하는데 수십, 수백개의 펄스데이터를 이용하여 통계적으로 형광 수명을 획득하는 방식이다. 이는 매우 긴 수집시간을 필요로 하며 높은 반복률의 광원을 요구한다. 우리는 analog mean delay method(AMD method)와 최적 반복률을 사용하여 기존에 동일한 평균 파워, 보다 높은 품질의 영상을 빠른 속도로 획득할 수 있는 이광자 자극 형광 수명 현미경 시스템을 개발하였다 [2].

2. 연구 방법

그림 1은 이광자 형광수명 현미경의 전체적인 도식이다. 76MHz의 펄스 반복률을 가지고 있는 Ti:S 초고속 펄초 펄스 레이저(817nm)를 사용했다. 펄스 피커(pulse picker)를 이용하여 76MHz보다 낮은 반복률로 조절하였다. 펄스 피커

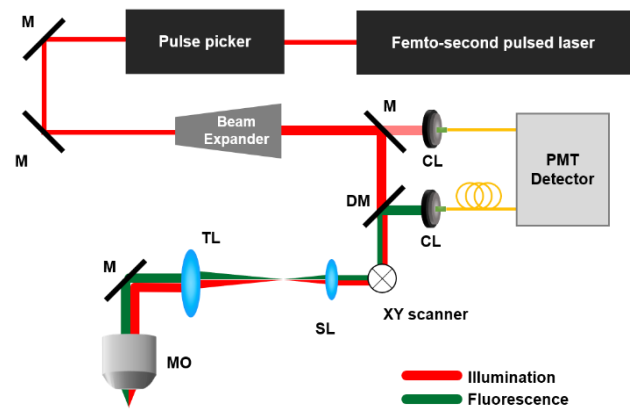


그림 1. 이광자 자극 형광 수명 현미경 시스템

드라이버를 이용하여 펄스 반복률을 1~19MHz로 조절하였다. 펄스 반복률이 조절된 광원이 거울(M)에 반사되는데 일부 통과하는 광원을 IRF(Instrument response function) 신호로서 사용했다. 반사된 광원은 4KHz의 공진 스캐너(resonant scanner), 갈바노 스캐너(galvano scanner) 그리고 대물렌즈(UPlanSApo 20x, 0.75, Olympus)를 통과해 샘플에 도달한다. 샘플에서 방출된 형광은 동일 대물렌즈로 되돌아 Dicroic mirror(FF705-Di01-25x36, Semrock)와 emission filter(FF01-550.200-36, Semrock)을 지나 collimator로 인해 440um 멀티 모드 광섬유에 통과시켜 최종적으로 광증폭튜브(photomultiplier tube)를 통해 IRF 신호와 함께 검출된다. 형광 쪽의 광섬유 길이를 5m 더 길게 뒤서 형광이 IRF 보다 22~25ns 정도 늦게 검출하여 형광 수명을 측정한다. 광증폭튜브를 지난 전기신호는 50MHz 대역폭의 증폭기(C6438-01, Hamamatsu)를 지나 최종적으로 400MHz의 샘플링 속도의 디지털라이저(PX14400d, Signatec), 워크스테이션에 도달한다. 이미지 뷰어 소프트웨어를 통해서 400x400um FOV를 가지는 형광 수명 영상을 획득한다.

형광슬라이드(FSK5, Thorlabs)와 쥐의 신장 조직을 1~19MHz 반복률 이용해 영상의 신호 대 노이즈 비, 형광 수명 정밀도를 분석하고, 낮은 반복률로 인한 속도 향상 및 광표백 현상 저지를 입증한다.

3. 연구 결과

그림 2(a)는 펄스 반복률에 따른 형광슬라이드의 형광량을 보여준다. 모두 5mW의 평균 파워를 사용했다. 1MHz의 반복률을 사용했을 때 얻을 수 있는 형광의 양은 19MHz의 반복률을 사용했을 때의 형광의 양보다 176배 높았다. 형광량은 quadratic relation을 따르고 있어 시스템이 이광자 자극을 일으켜 형광을 획득하고 있다. 그림 2(b)는 반복률에 따른 형광 슬라이드의 형광 수명을 각각 10회 반복하여 계산한 형광 수명의 평균과 표준 편차를 보여준다. Analog mean delay(AMD) method를 사용해서 형광 수명을 측정했다. 반복률이 낮아질수록 측정된 형광 수명의 표준 편차가 감소했다. 발생한 형광량이 형광 수명의 정밀도에 영향을 미침을 확인할 수 있다.

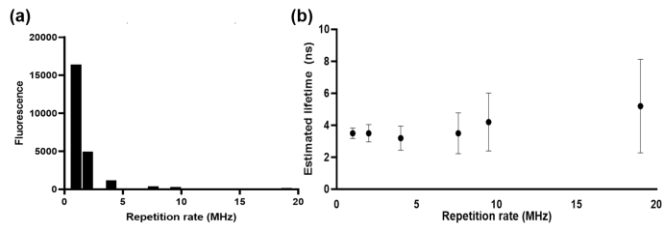


그림 2. (a) 반복률에 따른 형광 슬라이드 이광자 자극으로 발생한 형광량 (b) 이광자 자극 형광 수명

그림 3(a)는 쥐의 신장 조직 형광 수명 이미지에 형광 이미지가 가중된 것을 보여준다. 그림 3(b)는 형광 이미지의 region of interest(ROI) 내에 있는 평균 형광 신호와 노이즈의 표준 편차를 이용해서 신호 대 잡음비(SNR)를 계산했을 때의 결과를 그래프로 보여주고 있다. 1MHz repetition rate를 이용해서 찍은 이미지의 SNR이 19MHz 반복률을 이용해서 찍은 이미지의 23.6배 높다.

그림 4(a)는 펄스 반복률에 따른 광퇴색 효과를 나타낸다. 동일 시간내에 감소한 형광 양을 보여주는 것으로 10분간 이미징을 진행했을 때 감소하는 것을 보여준다. 4MHz의 경우 32% 정도 감소하였으며, 9.5MHz의 경우 15%가량

감소하였다. 그림 4(b)는 동일 SNR의 이미지를 얻기 위해서 필요한 시간 대비 발생하는 광퇴색 효과를 보여주는 그래프이다. 낮은 반복률을 사용할수록 같은 품질의 영상을 보여주기 위해 필요한 시간이 급격하게 증가한다. 이는 낮은 반복률을 사용하여 영상을 획득할 때 보다 높은 속도로, 비교적 광표백을 줄이며 영상을 획득할 수 있음을 보여준다.

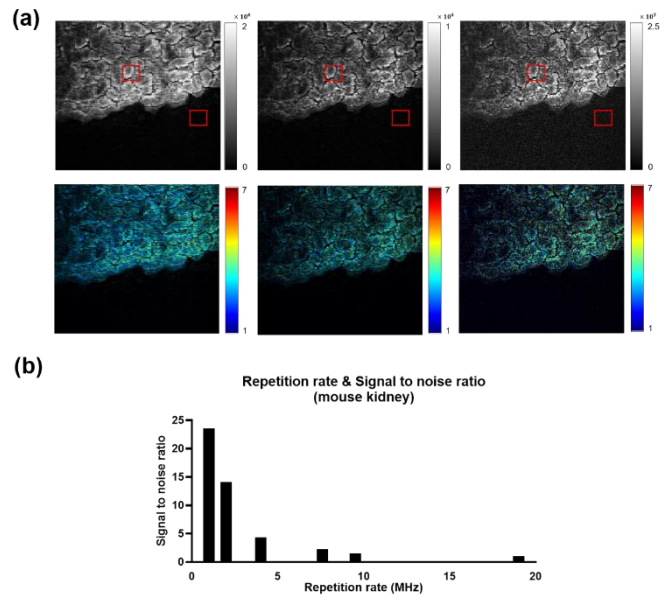


그림 3. (a) 쥐 신장 형광 및 형광 수명 이미지 (b) 동일 평균 파워, 반복률 변화에 따른 이미지 SNR

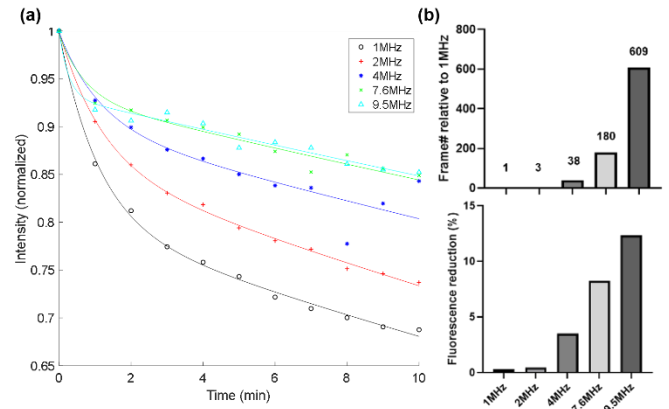


그림 4. (a) 펄스 반복률에 따른, 쥐 혈관 조직의 광표백 효과 (b) 동일 품질의 영상을 획득하기 위해 걸리는 이미징 시간 및 그에 따른 광표백

4. Acknowledgements

이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF) 과제의 지원을 받아 수행하였음. (2020R1A2C300674513)

5.참고 문헌

- [1] W.R.Zipfel, R.M. Williams, and W.W.Webb, "Nonlinear magic:multiphoton microscopy in the biosciences," Nature biotechnology, vol. 21, no. 11, pp. 1369-1377, 2003
- [2] S. Moon, Y. Won, and D. Y. Kim, "Analog mean-delay method for high-speed fluorescence lifetime measurement," Optics express, vol. 17, no. 4, pp. 2834-3849, 2009