

세포의 실시간 이미징을 위한 무표지 형광수명 영상 현미경 개발

권순용¹, 박준하¹, 한정무¹, 전성윤¹, 권보미^{2*}, 유흥기^{1*}

한국과학기술원 기계공학과¹

세종대학교 기계공학과²

Development of label-free fluorescence lifetime imaging microscopy for live cell imaging

Soonyong Kwon¹, Joonha Park¹, Jeongmoo Han¹, Jessie Sungyun Jeon¹, Bomi Gweon^{2*} and Hongki Yoo^{1*}

¹Department of Mechanical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Korea

²Department of Mechanical Engineering, Sejong University, Korea

*bgweon@sejong.ac.kr, h.yoo@kaist.ac.kr

Abstract

Optical imaging of intrinsic fluorescence of cells provides a minimally invasive assessment of structural and chemical information of biological samples. For example, fluorescence lifetime (FL) imaging of NAD(P)H and FAD autofluorescence offers a readout of mitochondrial function, which is dependent on the phenotype and the environment of cells. We developed a fast label-free confocal FL imaging microscopy to estimate the metabolic state of cells in real-time. FL of multiple spectral channels can be achieved by incorporating analog mean delay method, fiber delay lines, and bidirectional scanning. Its applicability is illustrated by FL images of human urinary bladder cancer cells.

1. 연구 배경

생체 내에 내제된 형광은 생체의 생리적 상태를 평가하는 중요한 지표가 될 수 있다. 특히, 자가 형광을 이용한 광학적 관측은 생체에 영향을 끼칠 수 있는 외부표지자 없이 비침습적이고 지속적인 관찰을 가능케 한다.

생체 내에서 자가 형광을 발하는 대표적인 분자인 NAD(P)H (nicotinamide adenine (pyridine) dinucleotide) 와 FAD(flavin adenine dinucleotide)는 세포대사 기능에 관여하는 조효소로 해당 과정(glycolysis), TCA회로, 전자전달계(electron transport chain)에서 전자를 운반하는 주요 요소로 관여한다[1].

FAD와 NADH의 비율인 산화 환원 비(redox ratio)는 생체 내 대사 과정의 상태를 평가하는 데 활용될 수 있다. 예를 들어, 증식 작용이 활발하게 발생하는 암세포의 경우, 산화적 인산화를 통한 ATP(adenosine tri-phosphate)의 합성이 감소하고 해당 과정을 통한 ATP 합성이 증가함에 따라 NADH의 양이 증가하는 것으로 알려져 있는데, 이를 통해 산화 환원 비를 이용하여 정상 세포와 암세포를 구분하고 암을 조기 진단하거나, 약물 효능 연구에서 약물에 의한 세포의 상태를 평가하는 연구가 이루어지고 있다. 다만 미토콘드리아 내의 NADH(bound NADH)와 외부에 존재하는 NADH(unbound NADH)가 발하는 형광 신호의 크기가 다르기 때문에, 광량 측정을 통한 축적된 NADH의 정량적 평가에는 어려움이 따른다[1].

최근 연구에 따르면 bound NADH 와 unbound NADH의 형광 수명이 다른 것으로 알려졌다[2]. 또한 형광 수명은 형광 신호의 크기에 의존하지 않으므로 형광 수명을 통해 bound NADH와 unbound NADH의 정량적 측정이 가능하고 이를 통해 세포의 대사 상태를 평가할 수 있다.

형광 수명을 측정하는 가장 대표적인 방법으로 TCSPC(Time correlated single photon counting)가 있다. TCSPC는 빠른 반복률의 레이저와 단일광자검출기(single photon detector)를 이용하여 시편에 빛을 여러 번 조사한 후 광자가 검출기에 도달하기까지의 시간을 측정하여 히스토그램을 통해 형광 수명을 측정하는 방식이다. TCSPC는 적은 에너지의

펄스를 조사하기 때문에 시편에 thermal damage를 유발하지 않는다는 장점이 있는 반면[3], 하나의 형광 수명 계산을 위해 다수의 측정을 필요로 하는 시스템의 특성상 영상을 획득하기까지 오랜 시간이 걸리고 영상 획득 시간을 줄이기 위해 빠른 반복률을 가지는 고가의 레이저를 필요로 한다. 이러한 점은 세포의 자가 형광을 통한 실시간 물질 대사 측정에 어려움으로 작용할 수 있다. 본 연구에서는 형광 수명을 빠르게 측정할 수 있는 아날로그 평균지연법을 통하여 세포의 자가 형광을 측정하여 세포의 물리적, 화학적 환경을 빠르고 비침습적으로 관찰할 수 있는 공초점 무표지 형광 수명 영상 현미경을 개발하였다.

2. 연구 방법

시스템의 구성은 그림 1. 과 같다. NAD(P)H의 여기 파장은 335-350nm, 방출 파장은 440-450nm로 알려져 있고 FAD의 여기 파장은 365-455nm, 방출 파장은 515-525nm으로 알려져 있다[*]. 생체의 자가 형광을 획득하기 위해 1MHz, 355nm 파장의 나노초 펄스 광원을 이용하였다. 레이저에서 나온 광원은 Dichroic mirror에 의해 나누어져 투과된 빛은 광학적 기준 신호로 활용되고 반사된 빛은 스캐닝 미러를 통과한다. X축 스캔을 위해 300Hz resonant 미러를 사용하였고 Y축 스캔을 위해 Galvano 미러를 사용하였다. 빠르고 효율적인 영상 획득을 위해 bidirectional scanning을 적용하였다. 스캔 미러를 통과한 광원은 스캔 렌즈와 튜브 렌즈를 지나 대물렌즈의 back aperture의 크기만큼 확대되고 대물렌즈를 통해 시편에 입사된다. 시편으로부터 방출된 형광 신호는 반대경로로 이동하여 Dichroic mirror를 투과하고 멀티모드 광섬유(50um)에 입사된다. 멀티모드 광섬유의 시작 끝점은 대물렌즈의 conjugate focal plane에 위치하여 있는데 이를 통해 대물렌즈의 초점 이외에서 방출되는 빛을 차단하여 축방향에 대한 분해능을 가질 수 있다. 멀티모드 광섬유를 지난 신호를 파장 대역으로 나누어 받기 위해 3개의 Dichroic mirror를 45도 기울여 직렬로 배치하였고 나누어진 빛의 경로에 필터를 두어 방출 파장을 4개의 채널(390/40nm,

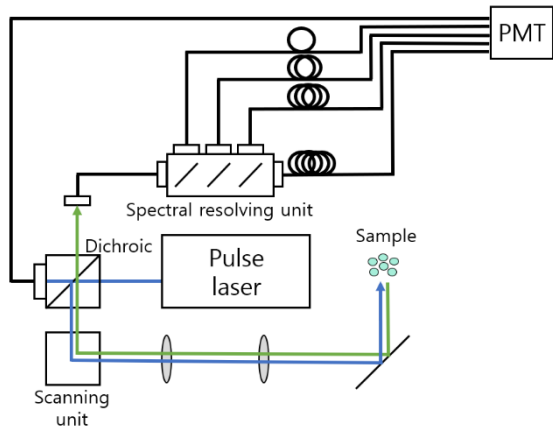


그림 1. 시스템 구성

452/50nm, 542/50nm, 630/50nm)로 분리하였다. 광학적 기준 신호와 각 채널의 신호는 길이가 다른 멀티모드 광섬유(1m, 11m, 21m, 31m, 41m)를 지남으로써 하나의 광검출기(photomultiplier tube)를 통해 4개의 파장대역의 신호를 획득할 수 있다.

불안정한 자가 형광 신호의 형광 수명을 빠른 속도로 측정하기 위해 아날로그 평균 지연법을 적용하였다. 아날로그 평균 지연법은 다수의 광자를 가지는 빛을 시편에 조사한 후, 시편으로부터 방출된 형광의 과도 신호를 디지털타이저를 통하여 수집한다. 획득한 레이저에서 여기된 광학적 기준 신호의 평균 지연 시간과 형광 신호의 평균 지연 시간의 차를 계산하여 시편의 형광 수명을 측정할 수 있다.

3. 연구 결과

개발한 FLIM 시스템을 사용하여 인체의 방광암 세포인 T24의 형광수명 영상을 그림 2와 같이 획득하였다. 그림 2의 밝기는 형광 세기 정보를 나타내며 이를 통해 세포의 형태를 확인할 수 있으며 이 형광의 형광 수명 값은 색조로 표현되어있다. 이와 같이 획득한 이미지를 통해 세포의 물질대사 상태를 추정할 수 있음을 확인할 수 있다. 영상의 픽셀 사이즈는 1024 x1024이며, 4개의 채널에 대한 형광 세기와 형광 수명 영상을 얻는데 1.71초가 소요되었다. 개발한 시스템은 세포의 분화, 암세포의 약물에 대한 반응을 실시간으로 관찰하는데 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

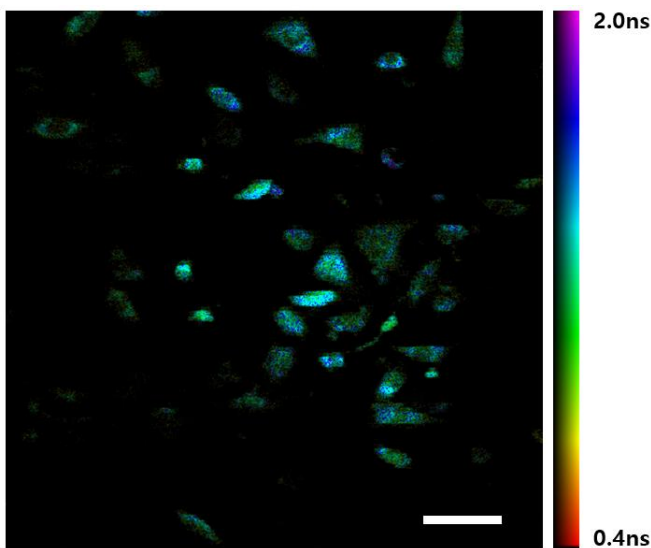


그림 2. 세기 신호가 고려된 T24 세포의 452nm 파장 대역 형광 수명 영상 (Scale bar : 100um)

4. Acknowledgements

이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF) 과제 (2020R1A2C3006745) 및 Korea Evaluation Institute of Industrial Technology (KEIT) 과제 (20008546)의 지원을 받아 수행하였음.

5.참고 문헌

- [1] Georgakoudi, I., & Quinn, K. P. "Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state." *Annual review of biomedical engineering*, 14, 351-367.
- [2] Lakowicz, J. R., Szmacinski, H., Nowaczyk, K., & Johnson, M. L. "Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(4), 1271-1275.
- [3] Zhou, X., Bec, J., Yankelevich, D., & Marcu, L. "Multispectral fluorescence lifetime imaging device with a silicon avalanche photodetector." *Optics Express*, 29(13), 20105-20120.