

PreScan/ReScan에 방해가 되는 자가형광 대처법 (Applicable Autofluorescence Quenching Methods for PreScan/ReScan)

세포체학실험실에 보유 중인 Operetta CLS (High Content Screening, HCS)장비의 핵심기능 중 하나인 PreScan/ReScan (형광 이미지 슬라이드 스캔)을 이용하기에 앞서 샘플준비 단계에서 고려되어야 할 사항 중, autofluorescence (자가형광)에 대한 적절한 조치방법에 대해 간략히 기술하였습니다. 자가형광을 유발하는 원인은 내재적(endogenous autofluorescence), 외인성(extrinsic fluorescence) 그리고 고정액 유래(fixative-induced fluorescence) 요인으로 나누어 볼 수 있으며, 각각의 자가형광은 샘플준비 과정에서 인위적으로 발생되기도 하며, 처리되는 유기용매에 의해 자연스럽게 사라지기도 합니다. 아래 표는 각 요인 별 자가형광을 유발하는 원인과 특성을 정리 요약한 것입니다.

Classification	Causes
Endogenous autofluorescence	Flavins (Latin flavus meaning "yellow"): riboflavin, FMN, FAD, FADH/FADH ₂ Porphyrins (RBC hemoglobin originated, 600-730 nm) NAD(P)H (420-550 nm) Lipofuscin (420-700 nm) Elastic fibers (420-600 nm)
Extrinsic fluorescence	Chemical agents, drugs, natural product for in vivo pharmacological uses (emission spectrum varies dependent upon the origin species)
Aldehyde-induced fluorescence	Formaldehyde crosslinking with amino-group seems create broad green to yellow (450-580 nm) fluorescence overall entire tissue.

보통의 경우, bleaching과정을 샘플준비 단계에 추가하여 원치 않는 자가형광을 제거하게 되는데, 주로 문제가 되는 샘플로는 mouse skin, kidney, liver, brain 등이며, perfusion을 충분히 실시하지 않은 circulatory systems (heart, lungs and veins) 등도 RBC와 porphyrins에 의한 자가형광 간섭이 자주 관찰되는 조직 중 하나입니다. 대체로, 자가형광 스펙트럼은 labeled fluorescent dye 또는 exogenously inserted fluorescent proteins보다 넓은 영역에서 상대적으로 높은 intensity를 보이면서 labeled target molecules과 overlapping되어서 관찰되는 경우가 많습니다. Endogenous autofluorescence의 경우, paraffin block sectioned slide를 제작하는 과정(fixation 또는 dehydration)중, 다양한 organic solvents에 노출되면서 자연스

럽게 감소하게 됩니다. 하지만, optimal cutting temperature (OCT) compound (consists of 10.24% polyvinyl alcohol, 4.26% polyethylene glycol and 85.5% of non-reactive ingredients)를 이용한 frozen section의 경우, endogenous autofluorescence가 감소되지 않는 것으로 보여집니다. Neuron이나 retina cells에서 주로 관찰되는 lipofuscin은 lysosomal digestion에 의해서 분해된 unnecessary components로 mercury, aluminium, iron, copper, zinc와 같은 metal기와 sugars, 산화된 lipids, proteins등으로 결합된 yellow-brown pigment granules으로서 420 – 633의 광범위한 excitation spectra를 보입니다. 조직에서 보여지는 lipofuscin의 축적은 노화에 의해 증가되는 것으로 사료되며, lipofuscin의 생성과 자연분해 메카니즘 사이에서 impaired balance가 원인으로 지목되고 있습니다. 이러한 자가형광을 샘플 준비단계 과정 중에 효과적으로 제거할 수 있는 방법들은 아래(표)와 같습니다.

Method	Assessment
Time-gated detection method (FLIM and ADOTA fluorophore)	Excellence in separating fluorescent signals Access to the equipment and operation is quite complicated and expensive
Chemical quenching kit (Vector®TrueView™ SP-8400)	Easy to use and more than moderate autofluorescence quenching capability Price per kit (up to 100 tissue slides) is around 200 USD
Sudan Black B (SBB)	Good at 0.1% of SBB in frozen section Moderate at 0.1% of SBB in paraffin section SBB also dissolves many types of lipids on the tissue
LED or laser-induced photobleaching	Prolonged sample preparation time (6-12 hours for photobleaching under 25C°) Delayed exposure time for thicker-sectioned materials

형광 염색된 슬라이드 샘플의 정량(quantification)을 위해서는 자가형광이 제거된 뚜렷한(actual fluorescence of interest) 이미지가 선제조건이며, 이를 위해서 자가형광에 대한 명확한 이해와 상기에 기술된 제거방법을 활용한다면 소기의 성과를 얻을 수 있을 것으로 사료됩니다.