

생체 다공성 매질에서 분자 확산 측정을 위한 영상 기반 형광 광표백 기법 개발

이동희* · 이정훈** · 박춘호*** · 김중경†

Development of Image-based Fluorescence Photobleaching Technique for Measuring Macromolecule Diffusion in Biological Porous Medium

Donghee Lee, Jeonghoon Lee, Choonho Park and Jung Kyung Kim

Abstract. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) has been widely used for the measurement of molecular diffusion in living cells and tissues. We developed an image-based FRAP (iFRAP) technique using a modified real-time microscope and a 488 nm Ar-ion laser. A fractional intensity curve was obtained from the time-lapse images of fluorescence recovery in the bleached spot to determine the diffusion coefficient of fluorescently labeled macromolecules in porous medium. We validated iFRAP through experiments with agar gels (0.5% and 1.5% w/v) containing FITC-Dextran (10, 70 and 500 kDa MW). Further validation was performed by a Monte Carlo approach, where we simulated the three-dimensional random walk of macromolecules in agar gel model. Diffusion coefficients were deduced from the mean square displacement curves and showed good agreements with those measured by iFRAP.

Key Words: Fluorescence(형광), Photobleaching(광표백), FRAP, Macromolecule(거대분자), Porous Medium(다공성 매질), Diffusion(확산)

기호설명

- $f_i(t)$: Fractional intensity
- D : Diffusion coefficient
- w : Radius of laser beam profile
- k_B : Boltzmann's constant
- η : Viscosity of medium
- T : Absolute temperature

1. 서 론

하이드로젤은 의료기기, 신체에 이식되는 조직, 약물 전달시스템, 조직공학용 지지체 등으로 사용되고 있으며 인체의 여러 조직에 존재하고 있는 생체 다공성 매

질로서 응용 범위가 매우 넓다⁽¹⁾. 하이드로젤은 세포와 분해되기 쉬운 약물 등을 보호할 수 있고 세포에 영양원을 공급하거나 분비되는 생체물질을 효과적으로 전달한다는 장점을 지닌다. 따라서 하이드로젤에서 단백질이나 다른 고분자의 확산율은 매우 중요한 정보이다⁽²⁾.

뇌의 세포외공간, 고형암 등 생체다공성 매질에서 분자 확산은 신호전달 또는 약물전달과정에서 중요한 역할을 한다. 고형암에서는 약물의 분자량과 조직구조의 영향을 받아 항암제가 수동적으로 확산된다. 즉, 암조직의 확산율에 따라 치료약물이 암조직 깊이 위치한 암세포에 전달되는 효율도 영향을 받는다⁽³⁾. 뇌의 세포외공간에서 발생하는 확산현상은 신경신호 전달과 세포 간의 신호교환을 위해 중요한 역할을 하므로 이를 정량적으로 이해하고자 아가로즈젤을 모델 시스템으로 활용하여 뇌 조직의 얇은 시편에서 측정된 확산율과 비교한 선행 연구가 있다⁽⁴⁾.

Axelrod 등⁽⁵⁾은 살아있는 세포와 같은 미세한 시스템 안에서 생체물질의 이동성을 정량적으로 측정하기 위해 형광 광표백 기법(Fluorescence Recovery After

†국민대학교 기계자동차공학부
E-mail : jkkim@kookmin.ac.kr
*국민대학교 대학원 기계공학과
**서울대학교 정밀기계설계공동연구소
***국민대학교 기계자동차공학부

Photobleaching; FRAP)을 개발하였다. 이 기법은 형광 물질로 염색된 매질에 레이저 빛을 조사하여 광표백 시킨 후 광표백된 영역으로 형광물질이 확산되면서 형광신호가 회복되는 과정을 분석하여 확산율을 측정하는 방법으로, 세포내 단백질의 운동뿐만 아니라 생체 다공성 매질에서 분자의 거동을 정량적으로 분석하는데 적합한 방법이다.

FRAP은 생물막⁽⁶⁾, 연골⁽⁷⁾, 튜블린⁽⁸⁾ 등의 생체조직에서 확산율을 측정하는데 사용되었다. 또 다른 응용 분야로는 최근 활발히 연구되고 있는 줄기세포공학 및 조직공학에 예로 들 수 있다. 세포의 분화와 성장을 제어하기 위해 성장인자의 시간적, 공간적 농도분포가 매우 중요한 요소로 인식되고 있으며, FRAP은 세포가 군집을 이루고 있는 조직의 세포외공간에서 확산과 유동에 의해 분포되는 생체분자의 확산율을 측정할 수 있다.

본 연구에서는 영상 기반 형광 광표백 기법(*i*FRAP)을 개발하였고, 이를 검증하고자 다양한 분자량을 가지는 FITC-Dextran(10, 70, 500 kDa MW)의 확산율을 수용액과 아가젤(0.5, 1.5%)에서 측정하고 비교하였다. 또한 몬테카를로(Monte Carlo) 방법으로 분자 확산 현상을 모델링하여 평균제곱변위(mean square displacement; MSD)를 계산하고 분자량과 공극의 크기에 따른 확산율의 변화를 분석하였다.

2. 실험 장치 및 방법

2.1 샘플 준비

다공성 매질을 준비하기 위해서 아가의 양을 조절하여 농도가 0.5%, 1.5%인 아가젤을 만들었다. 실온에서 만든 아가젤을 4시간동안 응고시킨 후 FITC-Dextran (Sigma Aldrich) 수용액(10, 70, 500 kDa)에 넣어 4°C의 냉장고에서 48시간 동안 보관하였다. 아가젤의 농도를 조절함으로써 다공성 매질 공극의 크기를 조절하였고, 분자량이 다른 FITC-Dextran으로 확산하는 분자의 크기를 조절하였다. *i*FRAP 실험은 8 mg/ml 농도의 FITC-Dextran 수용액에 대하여 수행되었다.

2.2 장치 구성

실험장치의 모식도를 Fig. 1에 나타내었다. 자체 제작한 온도조절장치에 넣은 아가젤의 온도를 25°C로

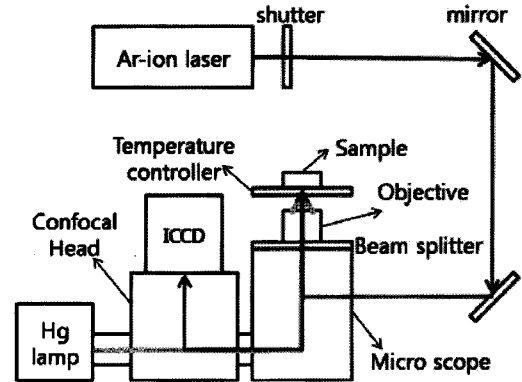


Fig. 1. Diagram of images-based FRAP (*i*FRAP) setup.

유지하고 20배 대물렌즈를 장착한 도립형 고배율 현미경(IX71, Olympus)을 이용해 샘플에 초점을 맞췄다. 광표백을 위하여 488 nm 파장의 Ar-ion 레이저를 이용하였고 셔터를 이용해 광표백되는 시간을 조정하였다. 23 mW의 레이저 빛은 257 ms 동안 샘플을 광표백 시킨 후 셔터에 의해 차단되고 그와 동시에 저조도용 ICCD 카메라(Dicam-Pro, Cooke Corp.)와 AQM6 S/W를 사용하여 이미지를 획득하였다. 형광을 감지하기 위해 Neutral density(ND) 필터를 장착한 수은램프를 사용하였으며 광표백 후 형광이 회복되는 현상을 컴퓨터 모니터를 통해 실시간으로 확인하였다.

2.3 이미지 분석

FITC-Dextran 수용액으로 염색된 샘플에서 광표백 후 형광이 회복되는 과정을 Fig. 2에 나타내었다. 257 ms 간격으로 얻은 이미지를 분석하고자 ImageJ S/W(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)를 사용하였다. 각 이미지에서 표백된 영역과 표백되지 않은 영역의 계조치를 측정하고 이 두 값을 이용해 수은램프에 의한 형광 표백을 보정하였다. 보정된 데이터를 이용해 형광 회복 곡선을 얻고자 시간에 따른 fractional intensity인 $f_k(t)$ 를 식(1)을 사용하여 계산하였다⁽⁵⁾.

$$f_k(t) = \frac{F_k(t) - F_k(0)}{F_k(\infty) - F_k(0)} \quad (1)$$

식(1)에서 $F_k(\infty)$, $F_k(0)$ 는 각각 표백 전과 표백 직후의 형광 강도를 나타낸다. 레이저 빛의 반지름은 레이저 강도가 최대치의 e^{-2} 이 되는 곳의 위치를 레이저 빔

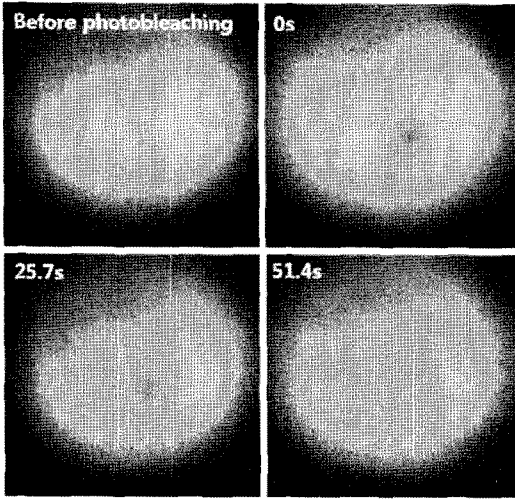


Fig. 2. Fluorescence images before and at indicated times after photobleaching.

의 중심으로부터 계산하여 측정하였다.

2.4 확산계수 계산

$F_R(t)$ 를 이용하여 형광 회복 곡선을 Fig. 3과 같이 얻은 다음 확산계수는 빔 형상을 균일한 원형이라고 가정하고 근사식을 사용하여 계산하였다⁽⁹⁾.

$$D = 0.224 \left(\frac{w^2}{\tau_{1/2}} \right) \quad (2)$$

w 는 레이저 빔의 반지름, $\tau_{1/2}$ 은 형광의 강도가 50% 회복되는 시간으로부터 구하였다.

2.5 몬테카를로 시뮬레이션

실험 결과를 검증하기 위해 Matlab을 이용한 몬테카를로 시뮬레이션을 수행하였다. 입자의 불규칙한 움직임은 난수발생함수를 이용하여 나타냈으며 직육면체는 장애물을 나타낸다. 장애물의 크기 및 간격, 브라운 운동을 하는 입자의 개수, 챔버의 크기, 입자의 이동거리 등의 파라미터를 변경하였다. 입자의 이동거리는 식(3)과 같이 나타낼 수 있다. 식(3)과 식(4)를 통해 입자의 분자량에 따른 이동거리를 설정하였고, 아가젤 공극의 비를 이용하여 장애물의 간격을 조정하였다. 입자가 장애물에 충돌했을 경우에는 충돌한 벽을 기준으로 하여 대칭적으로 움직이도록 설정하였다.

$$\Delta x_i(t) = \sqrt{2D_x t} \quad (3)$$

$$\frac{D_2}{D_1} = \frac{\frac{k_B T_2}{6\pi\eta_2 r_2}}{\frac{k_B T_1}{6\pi\eta_1 r_1}} = \frac{T_2 \eta_1 r_1}{T_1 \eta_2 r_2} = \frac{T_2 \eta_1}{T_1 \eta_2} \left(\frac{MW_1}{MW_2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (4)$$

각 분자의 궤적으로부터 MSD를 계산하여 분자량과 공극의 크기에 따른 겔보기 확산율의 변화를 분석하였다.

3. 결과 및 토의

다공성 매질에서 공극의 크기가 확산율에 영향을 미친다는 가설을 세워 아가젤의 확산율을 농도별(0.5%, 1.5%)로 측정하였다. 아가젤의 농도를 조절한 이유는 아가 농도가 아가젤의 공극 크기를 결정하기 때문이다. 0.5%, 1.5% 아가젤 공극의 평균 크기는 각각 450 nm, 150 nm로 보고된 바 있다⁽¹⁰⁾. 257 ms의 간격으로 얻은 이미지를 분석하여 촬영한 0.5% 아가젤에서 FITC-Dextran의 분자량에 따른 형광회복 곡선에서 분자량이 작을수록 mobile fraction이 많은 것을 알 수 있다(Fig. 3). 또한 분자량에 따른 확산도 분자량이 작을수록 빠르게 일어나는 것을 알 수 있다⁽³⁾. FRAP 실험을 통하여 얻은 형광회복곡선으로부터 얻은 확산계수를 이용하여 계산한 분자크기에 따른 확산계수의 비를 Fig. 4에 나타내었다. 수용액에서 FITC-Dextran 70 kDa과 500 kDa의 확산계수가 10 kDa의 확산계수에 비해 각각 50%, 63% 작게 나타났다. 아가젤 0.5%에서 확산계수 감소율은 각각 46%, 63%, 아가젤 1.5%에서 확산계수 감소율은 각각 44%, 67%로 측정되었다.

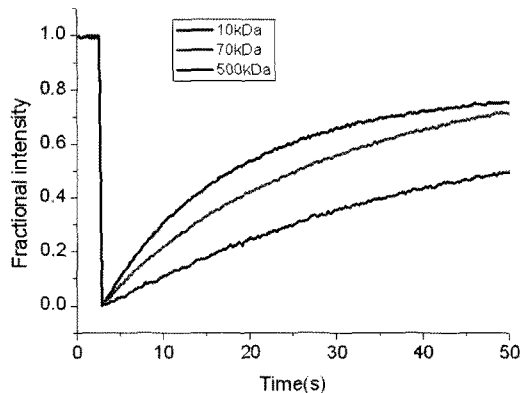


Fig. 3. Fractional fluorescence intensity after photobleaching (0.5% agar gel).

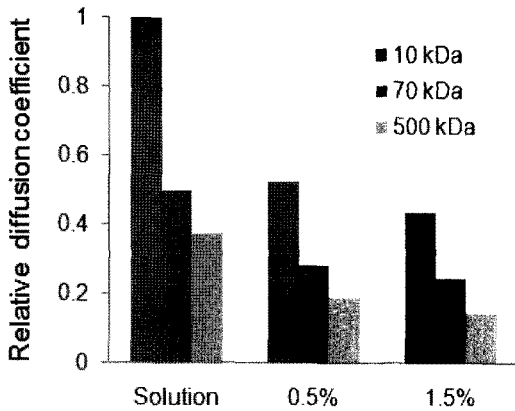


Fig. 4. Diffusion coefficients of FITC-Dextrans (10, 70 and 500 kDa) measured by *i*FRAP in solution and agar gels (0.5 and 1.5% w/v).

FITC-Dextran을 구형으로 가정하면 수용액에서 입자의 확산계수의 분자량에 따른 변화는 Stokes-Einstein equation으로 유추할 수 있다. 샘플의 환경과 실험조건이 동일하기 때문에 온도와 점성이 같다고 가정하면 확산계수의 비는 식(4)와 같이 나타낼 수 있다. 식(4)를 통해서 분자량에 따른 확산계수의 비를 계산해본 결과 FITC-Dextran 70 kDa과 500 kDa의 확산계수가 10 kDa의 확산계수보다 각각 48%, 73% 감소한 것을 알 수 있다.

다공성 매질의 공극 크기와 분자량에 따른 걸보기 확산율의 변화를 몬테카를로 시뮬레이션을 통해 분석

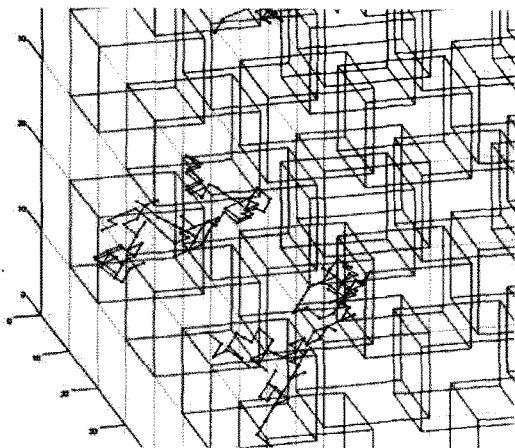


Fig. 5. Representative trajectories of two molecules diffused in porous medium

하였다. 다공성 매질 내에서 확산되는 분자의 브라운 운동을 Fig. 5에 나타내었다. MSD를 이용하여 입자의 움직임을 확인하고 그 결과들을 바탕으로 입자의 이동 궤적을 예측할 수 있다. 몬테카를로 시뮬레이션을 통한 각 분자의 이동궤적으로부터 MSD를 계산하여 Fig. 6에 나타내었다. 본 연구에서 얻은 확산계수의 실험값과 계산값을 Table 1에 비교하여 나타내었다. 수용액에서 FITC-Dextran 70 kDa과 500 kDa의 확산계수가 10 kDa의 확산계수보다 각각 48%, 73% 작은 것을 알 수 있었다. 아가젤 0.5%에서 확산계수 감소율은 각각 46%, 71%, 아가젤 1.5%에서 확산계수 감소율은 각각 47%, 71%로 계산되었다. Stokes-Einstein equation을 통하여 유추한 확산계수의 감소비율과 거의 동일하게 나타났다. *i*FRAP 실험과 몬테카를로 시뮬레이션을 통하여 다공성 매질의 공극크기가 작을수록 또한 확산체의 분자량이 클수록 확산이 느린 것을 알 수 있었다.

생체 다공성 매질에서의 확산율을 측정하기 위해 본 연구에서 개발한 *i*FRAP 기법은 일반적인 FRAP에서 사용하는 PMT와 같은 광검출기로 한 지점에서의 확산율을 측정하는 것이 아니라, 확산체가 확산되는 과정을 2차원 영상을 통해 실시간으로 관찰할 수 있다는 장점이 있다. 그러므로 샘플에서 원하는 영역의 확산율을 정확히 측정할 수 있으며 비등방성 확산에도 적용할 수 있다. 또한 *i*FRAP에 공초점 현미경 기능을 활용하면 3차원 공간에서 확산 측정도 가능할 것이다.

4. 결 론

세포 및 조직에서 단백질 또는 고분자의 확산은 생

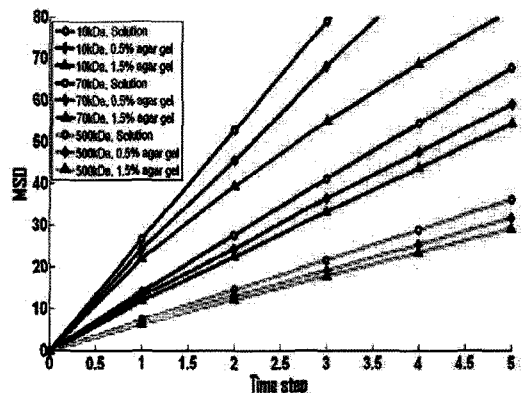


Fig. 6. MSD-t plot

Table 1. Decrement of diffusion coefficients compared with diffusion coefficients at 10 kDa

Sample	Molecular weight	iFRAP	Simulation
Solution	70 kDa	50%	48%
	500 kDa	63%	73%
0.5% agar gel	70 kDa	46%	46%
	500 kDa	63%	71%
1.5% agar gel	70 kDa	44%	47%
	500 kDa	67%	71%

명현상의 특성을 변화시키고 약물 전달효율에 영향을 미치는 중요한 요인이다. 따라서 다양한 생체 다공성 매질에서 생물학적으로 중요한 분자들의 확산율을 정량적으로 측정할 필요성이 증가되고 있다. 본 논문에서는 생체 다공성 매질에서 분자 확산율을 측정할 수 있는 영상 기반 형광 광표백 기법(iFRAP)을 개발하였다. 아가젤의 공극 크기와 FITC-Dextran의 분자량에 따른 확산율을 측정하였고, 실험결과를 몬테카를로 시뮬레이션 결과와 비교 검증하였다. iFRAP을 통해서 다공성 매질 내를 움직이는 물질의 분자량이 증가하면 확산율이 감소하는 현상을 정량적으로 측정하였으며, 다공성 매질의 공극의 크기가 확산율에 미치는 영향을 확인하였다.

후 기

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2007-331-D00588)과 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원(R01-2008-000-20581-0)을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

- 1) Kosto, K. B. and Deen, W. M., 2004, "Diffusivities of Macromolecules in Composite Hydrogels," *AICHE, J.*, Vol. 50, No. 11, pp. 2648~2658.
- 2) Johnson, E. M., Berk, D. A., Jain, R. K. and Deen,

- W. M., 1996, "Hindered Diffusion in Agarose Gels: Test of Effective Medium Model," *Biophys. J.*, Vol. 70, No. 2, pp. 1017~1023.
- 3) Thiagarajah, J. R., Kim, J. K., Magzoub, M. and Verkman, A. S., 2006, "Slowed Diffusion in Tumors Revealed by Microfiberoptic Epifluorescence Photobleaching," *Nature Methods*, Vol. 3, No. 4, pp. 275~280.
- 4) Hrabetová S., Hrabec, J. and Nicholson, C., 2003, "Dead-space Microdomains Hinder Extracellular Diffusion in Rat Neocortex during Ischemia," *J. Neurosci.*, Vol. 23, No. 23, pp. 8351~8359.
- 5) Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. and Webb, W. W., 1976, "Mobility Measurement by Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Kinetics," *Biophys. J.*, Vol. 16, No. 9, pp. 1055~1069.
- 6) Bryers, J. D. and Drummond, F., 2000, "Local Macromolecule Diffusion Coefficients in Structurally Non-uniform Bacterial Biofilms using Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)," *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 60, No. 4, pp. 462~473.
- 7) Leddy, H. A. and Guilak, F., 2003, "Site-Specific Molecular Diffusion in Articular Cartilage Measured using Fluorescence Recovery after Photobleaching," *Ann. Biomed. Eng.*, Vol. 31, No. 7, pp. 753~760.
- 8) Salmon, E. D., Saxton, W. M., Leslie, R. J., Karow, M. L. and McIntosh, J. R., 1984, "Diffusion Coefficient of Fluorescein-labeled Tubulin in the Cytoplasm of Embryonic Cells of a Sea Urchin: Video Image Analysis of Fluorescence Redistribution after Photobleaching," *J. Cell Biol.*, Vol. 99, No. 6, pp. 2157~2164.
- 9) Soumpasis, D. M., 1983, "Theoretical Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Experiments," *Biophys. J.*, Vol. 41, No. 1, pp. 95~97.
- 10) Ackers, G. K. and Steere, R., L., 1962, "Restricted Diffusion of Macromolecules through Agar-gel Membranes," *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 59, pp. 137~149.