

전반사형광(TIRF)을 이용한 세포의 유전자 발현과 부착성의 동시 측정

이용구*, 이범준*, 진송완*, 유정열*

Simultaneous Measurement of Gene Expression and Cell Adhesion Using TIRF Image

Yongkoo Lee*, Beomjoon Lee*, Songwan Jin*, Jung Yul Yoo*

1. 서론

세포로부터 원하는 단백질을 대량으로 얻기 위하여 세포에 특정 유전자를 삽입하는 기술은 인류 복지에 매우 큰 영향을 미치고 있는 훌륭한 유전공학 기술의 한 가지이다. 이와 같은 유전자 삽입 기술에서는 특정 유전자를 불특정 다수의 세포에 삽입하게 되므로 그 효율을 높이기 위해서는 반드시 적절하게 삽입된 세포와 그렇지 않은 세포를 분리해야 하며 또한 적절하게 삽입된 세포 중에서 건강하게 잘 살고 있는 세포를 구분해 내는 작업이 필요하다. 현재 특정 유전자의 존재 유무는 형광 단백질을 합성하는 유전 물질을 함께 삽입하는 방법으로 가시화 하며, 건강한 세포를 분리하는 방법은 부착성을 조사하는 기법이 사용된다. 바다에 붙어 생활하는 세포의 부착성은 특정 세포가 주변 환경에 적응하는 정도를 알아보는 주요한 척도가 되기 때문이다. 세포의 부착성을 관찰하는 기존의 방법은 작업자가 배양중인 세포군을 씻어내는 일을 수 회 반복하여 이후 붙어 있는 세포의 수를 기록하는 매우 노동 집약적인 과정이다. 이에 본 연구에서는 유전 물질의 존재 여부와 세포의 부착성을 동시에 살펴볼 수 있는 장치를 개발하여 유전공학 연구에 기여 하는 실험 방법을 제시하고자 한다.

2. 본론

2.1 원리

2.1.1 eGFP

원하는 기능을 하는 유전 물질을 세포에 주입하는 방법으로는 전기쇼크를 이용하여 세포막 내로 유전자가 유입되게 하는 기법과 관을 직접 세포에 삽입하여

유전 물질을 흘려 넣는 기법 등이 있다. 전자는 대량의 세포에 주입하는데 적합하지만 효율성이 떨어지고 후자는 특정 세포를 선택적으로 주입하는데 적절하지만 고도의 제어 기술이 필요하다. 한편, 적절하게 삽입된 세포를 가시적으로 구분하기 위하여 형광 발현 유전자를 동시에 삽입한다. eGFP라고 불리는 형광 단백질을 양산하게 하는 유전 물질을 넣으면 488 nm 파장의 광원에 여기 되어 508 nm 파장의 형광을 발산한다.

2.1.2 전반사형광

일반적으로 빛은 밀(密)한 매질에서 소(疎)한 매질로 입사될 때 특정 각도 이상의 임계각에서 전반사가 일어난다. 아래의 식 (1)에서 임계각과 두 매질의 관계를 나타내었다.

$$\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1) \quad (1)$$

이때 전반사 되는 지점의 반대 방향 즉, 소한 매질 방향으로 급격히 감소하는 전자기파가 형성 되는데 이를 소멸파(evanescent wave)라고 한다. 이러한 소멸파는 입사되는 광원의 파장에 따라 수백 나노미터 영역 이내의 형광 물질만을 여기 시킬 수 있다. 따라서 세포가 부착하는 근접점이 속하는 수십에서 수백 nm의 영역만을 가시화 할 수 있게 된다. 그림 1은 이러한 전반사 현상이 생기는 원리를 보여준다.

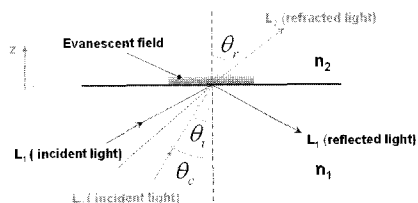


그림 1. 전반사 현상과 소멸파의 형성

* 서울대학교 기계항공공학부

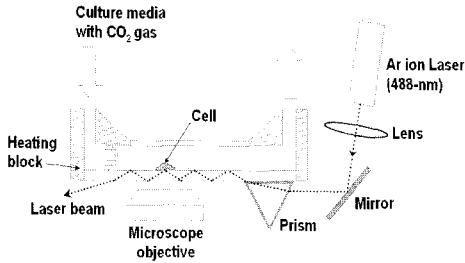


그림 2. 실험장치의 모식도

2.2 장치

실험이 진행되는 일정 시간 동안 세포가 생명 활동을 유지하도록 적절한 온도와 이산화탄소의 농도를 유지시켜주는 배양 장치를 사용하였다.

본 실험에서 사용한 세포는 eGFP 단백질이 발현되도록 유도된 293세포(Human Kidney Cell)이다. eGFP는 488 nm의 광원에 여기 되어 508 nm의 빛을 발하는 형광 단백질이다. 그러므로 488 nm의 광원을 방출하는 Ar ion 레이저를 광원으로 사용하였다.

전반사 현상을 유도하기 위하여 프리즘을 사용하였다. 프리즘을 통과한 광원은 배양 장치 바닥의 유리판을 연속적으로 전반사하면서 세포 바닥 방향으로 소멸파를 발생시킨다. 그림 2는 본 실험 장치의 모식도이다.

3. 결론

본 연구를 통하여 세포의 유전자 발현 여부와 부착 여부를 동시에 살펴 볼 수 있는 장치를 개발하였다. 그림 3의 (a)는 일반 광학 이미지이고 (b)는 형광이미지, 그리고 (c)는 전반사형광 이미지이다. (a)와 (b)를 비교해 보면 중앙부의 두 세포만이 형광이 발현되는 것을 알 수 있고 이를 통해서 유전자의 유무를 확인할 수가 있다. 한편, (b), (c)를 비교해 보면 오른쪽의 세포만이 적절하게 부착되어 있다고 결론 낼 수 있다.

이 때, (c)의 전반사 형광을 살펴보면 작은 점들을 볼 수가 있는데 이것이 세포가 바닥에 부착하는 근접점들이다. 이러한 근접점의 이동을 관찰함으로써 세포가 제자리에서 부착 영역을 넓히는 현상을 관찰하였으며 그림 4에서 근접점들의 이동을 영상분석을 통하여 정량화 해보았다.

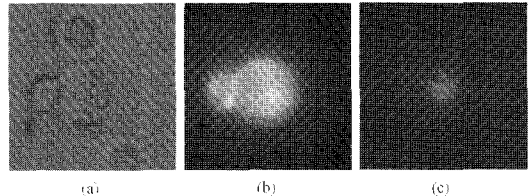


그림 3. 세포의 이미지 (a)광학, (b)형광, (c)전반사형광

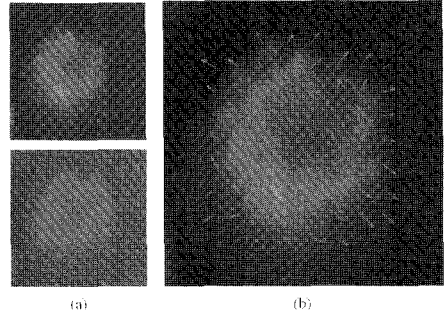


그림 4. (a) 원 이미지 (b) 근접점들의 운동을 분석

후 기

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R01 2005 000 10558 0)지원으로 수행되었음

참고 문헌

- (1) Axelrod, D., 1981, "Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence," *The Journal of Cell Biology*, Vol. 89, pp.141~145.
- (2) Burmeister, J. S., Olivier, L. A., Reichert and W. M., Truskey, G. A. 1998, "Application of total internal reflection fluorescence microscopy to study cell adhesion to biomaterials," *Biomaterials*, Vol. 19, pp.307~325.
- (3) Newgreen, D. F., 1989, "Physical influences on neural crest cell migration in avian embryos: contact guidance and spatial restriction," *Dev Biol.*, Vol. 131, No. 1, pp.136~148.
- (4) Toomre, D. and Manstein, D. J., 2001, "Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy," *Trends in Cell Biology*, Vol. 11, No. 7, pp.298~303.