

## Fast point fluorescence recovery after photobleaching integrated into a confocal microscope

임강빈, Ute Schmidt, 강문식, 이지영, Malte Wachsmuth  
한국파스퇴르 연구소 Cell Biophysics group  
kbim@ip-korea.or.kr

FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)은 Axelrod et al.<sup>(1)</sup>에 의해 제안된 이후로 세포내의 단백질의 분산이나 단백질과 receptor간의 상호작용 등을 측정하는 데 유용한 도구로 사용되어지고 있다. 특히 이광자 현미경, 전반사 현미경 등 여러 가지 현미경 기법과 결합하여 다양한 측정법들이 개발되어지고 있다.

매우 강한 레이저 광을 관심 있는 영역에 짧은 시간 동안 조사시키면, 조사 영역 내에 있는 형광자들은 모두 표백되어진다. 조사 영역밖에 있었던 단백질이 분산을 통해서 조사 영역내로 들어오게 되고 결국 세포내에 형광 세기 분포가 전체적으로 평형을 이루게 된다. 강한 광을 조사시킨 후, 상대적으로 약한 광을 조사시키면 세포내의 단백질의 움직임에 따라 형광신호가 어떻게 복구되어지는지 관측할 수 있으며, 신호를 분석하여 단백질의 움직임이나 상호작용 등의 정보를 얻을 수 있다. 매우 빠르게 분산하는 단백질의 운동성을 측정할 수 있는 FCS (fluorescence correlation spectroscopy)<sup>(2)</sup>와는 다르게 FRAP은 상대적으로 느리게 분산하는 단백질에만 적용되어진다고 알려져 있다.

본 논문에서는 전형적인 FRAP 기법과는 다르게 매우 짧은 시간동안 매우 작은 영역에만 조사하여 여러 가지 정보를 얻을 수 있는 point-FRAP 기법을 상용 공초점 현미경에 결합하였으며, 여러 가지 종류의 단백질의 움직임을 관측하였다. 또한 이러한 기법을 설명할 수 있는 새로운 분석 모델을 개발하였으며, 기존의 모델로 얻은 결과와 비교하였다. 측정되어진 세포내의 단백질의 분산 시간은 bleaching time에 의존하였으며 이 결과를 FCS 기법으로 얻은 결과와 비교하였다.

실험에 쓰인 세포는 암세포인 HeLa cell과 MCF-7 cell을 사용하였고, 단백질에 붙어 있는 GFP와 YFP의 형광 신호를 얻기 위해서 상용 공초점 현미경에 있는 Ar<sup>+</sup> 레이저를 광원으로 사용하였다. 그리고 형광 신호는 avalanche photodiode (APD) 를 사용하여 관측하였다. 레이저 파워 세기를 APD와 동기화시켜 조절하기 위해서, NI-DAQ카드와 LabVIEW 프로그램을 사용하여 그림 1과 같은 신호를 발생시켜 레이저와 APD로 각각 보내었다.

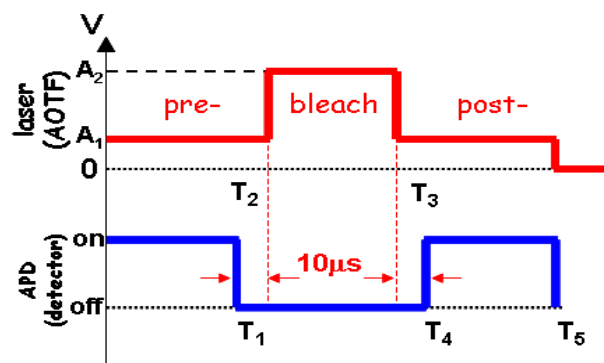


그림 1. point-FRAP을 위한 laser와 APD로 보내는 신호

그림 2는 상용 공초점 현미경으로 얻은 MCF-7 cell 의 사진과 세포내의 nucleoplasm과 speckle로부터 얻은 FRAP 신호이다. 그림에서 보는 바와 같이 point-FRAP 장치를 이용하여 세포내의 서로 다른 작은 영역에서 얻은 신호로부터 단백질의 분산이 세포 내에서 일정하지 않다는 것을 알 수 있다.

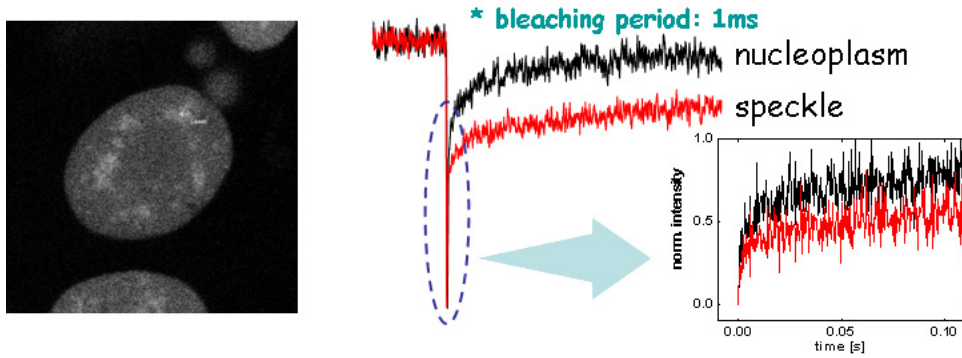


그림 2. (왼쪽) 상용 공초점 현미경으로 얻은 MCF-7 cell 사진 (중간, 오른쪽) nucleoplasm과 speckle에서 얻은 GFP-Ref의 point-FRAP 신호

참고문헌

1. Axelrod et al. "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics", Biophys. J. 16, 1055 (1976).
2. E. L. Elson et al. "Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory", Biopolymers, 13, 1 (1974).