단일 분자 위치 측정을 이용한 초고해상도 광학현미경

DOI: 10.3938/PhiT.21.021

심 상 희

Super-resolution Fluorescence Imaging with Single-molecule Localization

Sang-Hee SHIM

Fluorescence microscopy has made a breakthrough in its resolving power by an order of magnitude largely due to recent advances in the rapidly emerging field of super-resolution microscopy. Here, a form of super-resolution microscopy based on single-molecule localization of stochastically switching probes will be discussed. During the imaging process in the approach, referred to as STORM or (F)PALM, a small subset of photo-switchable probes is switched on to isolate single molecules and subsequently localize them at nanometer-scale precision. The facilitated access to single molecules allows for multicolor, three-dimensional visualization of molecules and ultrastructures in fixed or living cells. The single-molecule-based super-resolution method is beginning to provide new insights in cell biology, microbiology and neurobiology at levels of single molecules, structures and cells.

서 론

지난 수 세기 동안 광학현미경은 현대 생물학을 발전시키는 원동력이 되어왔다. 세포의 미시 세계를 볼 수 있는 도구는 생체 구성 요소와 근본 원리를 직접적이고 구체적으로 알

수 있게 해주었다. 현미경의 발전과 더불어 특정 분자를 착색할 수 있는 다양한 염료 및 표지법의 개발로 분자 단위로 생물체를 시각화할 수 있게 되었다. 특히 형광물질은 자극한 빛과 다른 빛을 내기 때문에 높은 감도로 특정 분자만을 볼 수 있게 해준다. 형광핵산혼성화(fluorescence in situ hybridization; FISH)는 세포 내 특정염기서열의 DNA나 RNA를 볼 수 있게 해주며, 형광항체법(immunofluorescence)은 세포 내생(endogenous)의 특정 단백질을 볼 수 있게 해준다. 또한, 형광단백질(fluorescent protein)은 살아 있는 세포나 생물체에서 특정 분자의 분포 및 역학을 볼 수 있게 해 줌으로써 2008년 노벨 화학상의 주역이 되기도 하였다. 밝은 형광물질과 초고감도 카메라를 사용하면 살아있는 세포에서 단일 분자까지 볼 수 있다.

그러나 광학 현미경의 분해능 한계는 형광현미경법으로 시각화할 수 있는 대상을 제한해 왔다. 광학 현미경의 분해능은 수백 나노미터로, 대부분의 진핵생물의 세포보다 작지만 미토콘드리아와 같은 세포 소기관들이나 박테리아와 같은 미생물들의 크기와 비슷하다. 따라서 나노미터 단위의 크기를 갖는 구조를 보기 위해서는 전자현미경이나 원자현미경이 주로 사용되어 왔다. 이들은 원자나 분자 수준의 높은 분해능을 가지고 있지만 특정 분자를 구별하여 보거나 살아 있는 세포를 직접 관찰하는 데는 한계가 있다. 따라서 형광현미경의 분해능을 분자 수준으로 향상시킬 수 있다면, 생체현상을 시각화하는 거의 완벽한 도구를 얻을 수 있을 것이다.

그러나 모든 현미경의 분해능은 빛의 파동성에 의한 회절 현상으로 인하여 사용하는 빛의 파장의 길이로 제한되기 때문에 형광현미경의 분해능을 나노미터 수준으로 끌어올리는 것은 물리적으로 불가능한 것으로 여겨져 왔다. 이러한 한계는 최근에 이르러 형광 분자 고유의 물리적 화학적 성질을 활용함으로써 다양하게 극복하게 되었으며, 이러한 여러 방법들을 통틀어 초고해상도 형광현미경법(super-resolution fluorescence microscopy)이라 부른다.^[1] 이 분야의 주축 중 하나는 형광 분자들을 임의로 끄고 켜는 방법을 활용하여 단일

저자약력

심상희 박사는 University of Wisconsin-Madison에서 2008년 박사 학위를 받고, 현재 Harvard University의 Xiaowei Zhuang 교수의 지도 아래 박사후 연구원으로 재직 중이다. (shshim@fas.harvard.edu)

분자를 분리함으로써 분해능 한계를 극복한다. 이러한 방법은 2006년에 STORM(Stochastic Reconstructon Microscopy)^[2] 또는 (F)PALM(fluorescence) Photoactivation Light Microscopy^[3,4]의 이름으로 동시에 소개되었다. 비록 역사는 수년에 불과하지만, 단일분자 분광학(single molecule spectroscopy)에서 사용되는 다양한 기술을 접목할 수 있고, 비교적 단순한 광학 설비로 높은 해상도(10–20 nm)를 얻을 수 있는 장점 때문에 이미 상용화 단계에 다다라 새로운 생물학적 발견들을 낳아 쏟아내고 있다. 이번 리뷰를 통하여 단일 분자를 바탕으로 하는 초고해상도 현미경의 원리와 다양한 기능 및 가능성을 소개하고자 한다.

단일 분자의 초정밀 위치 측정

Localization of Single Molecules at High Precision

모든 생물학적 구조는 이를 이루는 각각의 분자들의 위치로 결정된다. 따라서 형광물질로 표지된 구조는 각 형광분자의 위치로 결정될 수 있다. 그러므로 형광분자들의 위치를 모두 정확하게 알 수 있다면, 높은 해상도의 이미지를 얻을 수 있을 것이다. 그렇다면 각각의 형광 분자들의 위치를 어떻게 측정할 수 있을까?

한 개의 형광분자에서 방출된 광자들은 사방으로 퍼져나간다. 대물렌즈에 다다른 광자들은 튜브 렌즈에 의해 모인다. 렌즈의 초점면에서 광자들은 무한히 작은 점으로 모이지 않고 빛의 회절 현상 때문에 유한한 크기의 원형의 회절무늬를 형성한다. 이러한 현상을 ‘아베의 회절 한계’(Abbe’s diffraction limit)라 부르며, 회절무늬의 크기는 빛의 파장에 비례하고 대물렌즈의 조리개수에 반비례한다. 가시광선의 파장은 400–700 nm이므로 높은 조리개수의 대물렌즈를 사용할 때 회절무늬의 측면(대물렌즈의 수직면)의 폭은 ~200 nm, 대물렌즈의 축방향의 폭은 ~500 nm에 달한다. 이러한 회절무늬의 유한한 크기는 광학현미경의 분해능을 수백 나노미터로 결정하는 주요원인이다.

그런데 이를 뒤집어 생각해 보면 한 현미경에서 얻은 모든 형광분자의 이미지는 모두 같은 모양, 같은 폭을 가지게 된다. 따라서 단일 분자들의 이미지에 알려진 회절무늬의 모양을 맞추어 보면 분자의 중심 위치를 정확하게 측정할 수 있다. N 개의 광자의 이미지는 분자의 중심 위치를 N 번 측정하는 셈이며, 한 개의 광자로 측정할 때마다 회절무늬 폭만큼의 부정확도가 있다고 생각할 수 있다. 따라서 위치 측정의 정확도는 $\Delta/\sqrt{N}$ (Δ : 회절무늬의 폭)으로 대략 나타낼 수 있다.^[5] 따라서 많은 수의 광자를 방출하는 입자의 중심 위치는 회절 한계보다 훨씬 작은 값의 정확도로 알아낼 수 있다.

이러한 원리는 다양한 생물리 실험에 적용되어 밝은 형광 입자의 경우 ~1 Å까지 정확도를 얻을 수 있다.^[6] 또한, 상온의 수용액 상에서 단일 형광 분자의 위치를 나노미터의 정확도로 측정할 수 있다.^[7] 그러나 여러 개의 분자가 가까이 위치하여 그 이미지가 겹치기 시작하면 위치 측정이 부정확해진다. 적은 수의 분자의 이미지가 겹칠 경우, 분자들의 흡수/방출 스펙트럼을 이용하여 분리하거나,^[8,9] photobleaching/photoblinking을 이용하여 시간 영역으로 분리할 수 있다.^[10,11] 그러나 가까이 자리한 분자의 수가 너무 많아지게 되면 이마지도 불가능해지게 된다.

확률적 스위칭을 통하여 회절 한계를 극복하다

Breaking the diffraction limit by stochastic switching

대부분의 생물학적 샘플에는 수천 수만 개의 형광분자들이 높은 밀도로 모여있기 때문에 앞서 소개한 단분자 위치 측정법만으로는 분석할 수 없다. 그러나 만일 이 수많은 분자들의 형광을 대부분 끈 후, 이미지들이 겹치지 않을 정도의 갯수의 분자들만 그 형광을 켜 수 있다면, 이들의 위치를 정확하게 알 수 있을 것이다. 위치를 측정한 분자들을 끈 다음 새로운 분자들을 비슷한 양만큼 켜서 위치를 측정하면 새로운 위치 값들을 얻을 수 있다. 분자를 끄고 켜면서 정확하게 그 위치를 측정하는 과정을 계속 반복하여 모든 분자들의 위치를 알아내면 구조 전체를 높은 정확도로 재현할 수 있다(그림 1A).

REFERENCES

- [1] B. H. B. Huang, H. Babcock and X. W. Zhuang, *Cell* **143**, 1047 (2010).
- [2] M. J. Rust, M. Bates and X. W. Zhuang, *Nat. Methods* **3**, 793 (2006).
- [3] E. Betzig, *et al.*, *Science* **313**, 1642 (2006).
- [4] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan and M. D. Mason, *Biophys. J.* **91**, 4258 (2006).
- [5] R. E. Thompson, D. R. Larson and W. W. Webb, *Biophys. J.* **82**, 2775 (2002).
- [6] A. Yildiz and P. R. Selvin, *Accounts Chem. Res.* **38**, 574 (2005).
- [7] A. Pertsinidis, Y. X. Zhang and S. Chu, *Nature* **466**, 647 (2010).
- [8] T. D. Lacoste, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9461 (2000).
- [9] L. S. Churchman, Z. Okten, R. S. Rock, J. F. Dawson and J. A. Spudich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1419 (2005).
- [10] M. P. Gordon, T. Ha and P. R. Selvin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6462 (2004).
- [11] X. H. Qu, D. Wu, L. Mets and N. F. Scherer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11298 (2004).

Fig. 1. Basic principles of STORM. (A) Schematic illustration of the imaging concept. (B) STORM (right) and the corresponding conventional fluorescence image (left) of microtubules in a BS-C-1 cell. Microtubules were immunolabeled with Alexa647, a photo-switchable organic dye. Reproduced with permission from [16]. (C) STORM (right) and conventional fluorescence image (left) of clathrin-coated pits. Clathrins are immunostained with Alexa647. Reproduced with permission from [17]. Scale bars: 500 nm.

이처럼 많은 수의 형광분자들을 공간이 아니라 시간으로 분리한 후 그 위치를 정확하게 측정하여 구조를 재현하는 방법은 동시에 3개의 연구실에서 소개되어 STORM,^[2] PALM^[3] 또는 FPALM^[4]이라 명명되었다. 이들은 빛에 의하여 끄고 켤 수 있는 유기 염료나 형광 단백질을 사용하여 초고해상도 형광 현미경법을 구현하였다. 이러한 광스위칭이 가능한 형광물질들은 형광을 일으키는 빛의 세기가 강하면 이에 의하여 꺼지며, 이 빛과 다른 파장의 빛에 의하여 꺼진 상태에서부터 형광상태로 활성화된다. 형광이 꺼지는 확률은 형광을 일으키는 들뜸(excitation) 빛의 세기에 비례하고, 형광이 활성화되는 확률은 활성화(activation) 빛의 세기에 비례하며, 스위칭의 모든 과정은 확률에 비례하여 임의로 일어난다. 임의적 확률적 과정에 의하여 시간상으로 분리된 분자들의 위치를 종합하여 구조를 재현하기 때문에 이 글에서는 이러한 방법들을 통틀어 STORM(Stochastic Reconstruction Microscopy)이라고 부르겠다.

STORM이미지의 해상도는 광스위칭을 일으키는 형광물질의 밝기에 의하여 결정된다. 앞서 단분자 위치측정에서 언급했듯이, 형광물질이 켜진 후 꺼질 때까지 탐지한 광자의 숫자가 위치 측정의 정확도를 결정하기 때문이다. 여러 광스위칭을 일으키는 형광물질 중 Cy5나 Alexa647과 같은 밝은 유기 염료는 수천 개의 광자를 방출하며, 형광단백질들은 대개 수백 개의 광자를 방출한다. 이러한 광자수는 이론적으로 회절 한계보다 해상도를 수십 수백 배 향상시킬 수 있으며, 실험적으로는 Alexa647를 통해 ~20 nm의 해상도가 실현되었다(그림 1B).^[2]

형광 탐침

Fluorescent probes

STORM 이미지에 사용될 수 있는 형광탐침은 아래와 같은 조건을 충족하여야 한다. 첫째, STORM 탐침은 형광 스펙트럼에 해당하는 빛을 방출하지 않는 꺼진 상태를 가져야 한다. 이 꺼진 상태는 보통 화학구조가 변하거나 일시적으로 전자 상태가 변화된 상태이다. 둘째, 높은 해상도를 얻기 위해서는 앞서 이야기했듯 켜진 후 꺼질 때까지 많은 수의 광자를 방출하여야 한다. 셋째, 분자들의 위치를 정확하게 측정하기 위해서는 회절 한계 면적 내에 한 개의 분자만 켜져 있어야 하므로 대다수의 분자들은 꺼진 상태에 있어야 한다. 특히, 모든 광스위칭이 가능한 형광물질들은 열에너지나 들뜸빛에 의하여 자발적인 활성화를 일으킬 수 있기 때문에 활성화빛이 없는 상태에서도 일정량의 분자들이 켜져 있게 된다. 이러한 자발적 활성화의 확률이 작을수록 좋은 STORM 탐침이 된다. 이러한 필수조건들과 더불어, 동영상을 만들 경우에는 스위칭이 일어나는 횟수도 중요하다. 한 개의 탐침이 많은 횟수의 스위칭 과정을 거칠 수 있으면, 그 만큼 동영상을 이루는 이미지의 개수도 늘어나기 때문이다.

이러한 조건들을 충족시키는 탐침들이 유기 염료부터 형광 단백질까지 다양하게 개발되어 있다.^[1] 형광단백질들은 생체 내의 단백질을 유전적으로 표지하여 살아 있는 세포에서 발현할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 형광단백질들은 방출 광자수가 적기 때문에 해상도가 낮은 편이다(그림 1C). 유기형광물질은 대개 밝고 안정하며, 단백질 외에도 핵산, 당류, 지질, 약물 등의 작은 분자들을 표지할 수 있다. 항체를 사용하면 유기염료로 생체 내생(endogenous)의 단백질을 표지할 수 있으나, 항체의 크기가 10-15 nm에 달하기 때문에 STORM 이미지 속 구조의 크기가 인공적으로 늘어날 수 있고 살아 있는 세포를 표지하기 어렵다는 단점이 있다. SNAP, trimephorin 등의 유전적으로 발현할 수 있는 꼬리표(tag) 단백질을 이용하면 살아있는 세포에 존재하는 특정 단백질을 유기 염료로 표지하여 STORM 이미지를 얻을 수 있다.^[12,13]

다색 이미징

Multicolor imaging

STORM 탐침들은 다양한 스펙트럼에 걸쳐 개발되어 있

REFERENCES

- [12] I. Testa, *et al.*, Biophys. J. **99**, 2686 (2010).
- [13] R. Wombacher, *et al.*, Nat. Methods **7**, 717 (2010).

Fig. 2. Photoswitchable fluorescent probes for STORM imaging. (A) Organic dyes and fluorescent proteins for STORM imaging across the visible and near-infrared spectra. (B) A 4-color STORM image using 4 dyes in distinct spectra: Alexa647 for ER (cyan), Cy3B for mitochondria (magenta), Atto488 for microtubule (green) and Dylight750 for acetylated microtubule (white) in a BS-C-1 cell. The left and right panels show the same field of view of the same cell. Reproduced with permission from [14]. (C) A 2-color STORM image using Alexa647 paired with activators: Cy2-Alexa647 for microtubule (green) and Cy3-Alexa647 for clathrin (red). Scale bars: 200 nm. Reproduced with permission from [16].

므로 (그림 2A), 이들을 조합하여 다색 이미지를 얻을 수 있다. 스펙트럼이 겹치지 않는 형광물질들을 조합하면 색간의 혼선이 거의 없는 다색 이미지를 4가지 색까지 얻을 수 있다 (그림 2B).^[14] 또한, 스펙트럼이 겹치는 탐침들을 섞어 놓아도 단일 분자의 스펙트럼은 구별할 수 있으므로 그 신원을 알 수 있다.^[12] 이러한 방법을 통하면 색간의 혼선이 있을 수 있지만, 하나의 광원을 사용하여 고정된 셀에서는 4가지 색,^[12] 살아 있는 세포에서는 3가지 색^[15]까지 구분할 수 있다.

다른 탐침을 혼용하는 방법들은 각 색의 이미지가 사용한 탐침의 물리 화학적 성질에 따라 해상도가 달라진다는 단점이 있다. 이를 극복하기 위해서 광자수가 가장 많아 최고의 해상도를 주는 한 가지 탐침으로 모든 색의 이미지를 얻되, 이 탐침을 여러 색의 활성화 분자와 함께 표지한 후, 활성화 분자에 최적화된 활성화 빛을 사용하여 색을 구분하는 방법이 있다 (그림 2C).^[16]

3차원 이미징

3D imaging

3차원 STORM 이미지는 각 분자의 위치를 3차원으로 측정함으로써 얻을 수 있다. 지금까지 카메라 상의 2차원 중심 위치를 측정하여 2차원 이미지를 얻었으므로, 대물렌즈의 축 방향의 위치를 알아낼 수 있는 방법을 고안하면 3차원 이미지를 얻을 수 있다.

최초의 3차원 STORM 기술은 카메라 앞에 원통형(cylindrical)의 렌즈를 끼워넣어 카메라의 두 축에서의 초점이 다르게 하는 비점수차(astigmatism)를 이용하는 방법을 사용하였다(그림 3A).^[17] 이러한 방법을 사용하면 단분자의 축상 위치에 따라 가로 또는 세로로 긴 타원형으로 그 이미지의 모양이 변한다. 따라서 이 타원형 이미지의 중심위치와 더불어 이미지의 모양으로부터 축방향 위치를 얻어 3차원 위치를 결정할 수 있다. 이러한 방법으로 측면으로는 20 nm, 축상으로는 50 nm 정도의 해상도를 얻을 수 있다(그림 3B).^[17] 비점수차 방법에 두 개의 대물렌즈를 결합하여 광자의 숫자를 두 배로 늘리면 해상도를 측면 9 nm, 축방향 18 nm까지 향상시킬 수 있다.^[18] 단분자의 이미지 모양을 변화시켜 축상 위치를 결정하는 다른 방법들로는 두 개의 초점면을 사용하거나,^[19] 나선형으로 이미지를 변형시키거나,^[20] 거울로 축방향 이미지를 측면으로 반사시키는 방법^[21] 등이 있다.

3차원 이미지를 얻는 가장 해상도가 높은 방법은 두 개의 정반대 방향으로 놓인 대물렌즈에서 얻은 이미지들의 간섭(interferometry) 현상을 이용하는 것이다.^[22] 각 분자의 위치에 따라 두 대물렌즈를 통과한 경로의 길이가 달라지므로 그 간섭된 빛의 세기가 달라지는 것을 관찰하여 축방향 위치를 결정한다.

REFERENCES

- [14] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates and X. Zhuang, *Nat. Methods* **8**, 1027 (2011).
- [15] M. Schwering, *et al.*, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **50**, 2940 (2011).
- [16] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey and X. W. Zhuang, *Science* **317**, 1749 (2007).
- [17] B. Huang, W. Q. Wang, M. Bates and X. W. Zhuang, *Science* **319**, 810 (2008).
- [18] K. Xu, H. P. Babcock and X. Zhuang, *Nat. Methods* **9**, 185 (2012).
- [19] M. F. Juetten, *et al.*, *Nat. Methods* **5**, 527 (2008).
- [20] S. R. P. Pavani, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2995 (2009).
- [21] J. Y. Tang, J. Akerboom, A. Vaziri, L. L. Looger and C. V. Shank, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10068 (2010).
- [22] G. Shtengel, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3125 (2009).

Fig. 3. 3D STORM imaging. (A) Schematic of the microscope using astigmatism (left) and images of a single molecule at various axial positions (right). (B) 3D STORM image of microtubules immunolabeled with Alexa647 in a BS-C-1 cell. (Bottom): The x-y, x-z and y-z cross-sections of a boxed region on the top image. Reproduced with permission from [17].

다(그림 3C).^[22] 이러한 방법을 사용하면 광자수가 적은 형광단백질에서도 10 nm의 축상해상도를 얻을 수 있다(그림 3D).^[22]

STORM은 높은 조리개수의 대물렌즈를 사용하기 때문에 이미징이 가능한 두께는 600 nm 정도이다. 수 마이크론의 세포 전체의 두께를 아우르려면 대물렌즈를 여러 축방향 위치로 스캔한 후 각 초점면에서 얻은 이미지를 쌓아 세포 전체의 이미지를 얻을 수 있다.^[23] 이보다 두꺼운 샘플의 경우 빛의 산란, 구면수차, 샘플의 자가 형광 때문에 위치측정의 정확도가 떨어진다. 이를 극복하기 위해서 이광자과정(two-photon process)을 통한 활성화로 8마이크론 이상의 깊이에서 3차원 STORM 이미지를 얻을 수 있다.^[24] 또한, 얇은 편상으로 모양을 만든 들뜸빛을 형광의 탐지각과 수직 입사시키는 selective plane illumination microscopy(SPIM)을 이

용하면 50–150마이크론 두께의 샘플에서 3D STORM 이미지를 얻을 수 있다.^[25]

살아있는 세포의 이미징

Live-cell imaging

초고해상도 형광현미경법의 차별화된 장점은 살아있는 세포에서도 특정 분자의 초고해상도 이미지를 얻을 수 있다는 것이다. 그런데 STORM에서 염두에 두어야 할 점은 분자들을 시간상으로 분리하여 이미지를 얻기 때문에 시간 해상도가 느려질 수 있다는 것이다. 전체적인 구조를 정밀하게 재현하려면 충분히 많은 숫자의 위치점을 모으는 것이 중요하며, 그를 위해서는 시간을 오래 들여야 하므로 시간과 공간 해상도를 서로 절충하여야 한다. 이 때문에 살아있는 포유동물세포 및 박테리아에서 형광단백질을 이용하여 최초로 STORM을 구현하였을 때에는 ~60 nm의 공간해상도를 30–60초 내에 얻게 되었다.^[26,27] 이를 향상시키기 위하여 10배 빠른 카메라 프레임 속도를 사용하고, 형광단백질 대신에 빠르게 스위칭하는 유기 물질인 Alexa647을 이용하여 20 nm의 2차원 공간해상도를 0.5초 내에 얻었다.^[28] 또한 활성화 빛을 이용하여 활성화 속도를 높임으로써 1–2초 내에 30 nm의 3차원 공간 해상도를 얻을 수 있다.^[28]

시간 해상도를 높일 수 있는 또 다른 방법은 단일분자의 이미지가 다소 겹쳐지더라도 수치적으로 분리할 수 있는 분석법을 개발하는 것이다. 이러한 분석법이 있다면, 각각의 프레임마다 더 많은 숫자의 분자들을 활성화시킬 수 있으므로

REFERENCES

- [23] B. Huang, S. A. Jones, B. Brandenburg and X. W. Zhuang, *Nat. Methods* **5**, 1047 (2008).
- [24] A. G. York, A. Ghitani, A. Vaziri, M. W. Davidson and H. Shroff, *Nat. Methods* **8**, 327 (2011).
- [25] F. C. Zanicchi, *et al.* *Nat. Methods* **8**, 1047 (2011).
- [26] H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith and E. Betzig, *Nat. Methods* **5**, 417 (2008).
- [27] J. S. Biteen, *et al.*, *Nat. Methods* **5**, 947 (2008).
- [28] S. A. Jones, S. H. Shim, J. He and X. W. Zhuang, *Nat. Methods* **8**, 499 (2011).
- [29] S. J. Holden, S. Uphoff and A. N. Kapanidis, *Nat. Methods* **8**, 279 (2011).
- [30] F. Huang, S. L. Schwartz, J. M. Byars and K. A. Lidke, *Biomed. Opt. Express* **2**, 1377 (2011).
- [31] D. T. Burnette, P. Sengupta, Y. H. Dai, J. Lippincott-Schwartz and B. Kachar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 21081 (2011).
- [32] P. D. Simonson, E. Rothenberg and P. R. Selvin, *Nano Lett.* **11**, 5090 (2011).
- [33] S. Cox, *et al.*, *Nat. Methods* **9**, 195 (2012).

Fig. 4. Live-cell STORM imaging. (A) Focal adhesion molecules, paxillin fused with tdEos, a photoactivatable protein, in a live CHO cell imaged at 55-sec time resolution. Reproduced from with permission [26]. (B) Clathrin-coated pits (CCP) tagged with SNAP and Alexa647 resolved in 3D at 1-sec resolution. (Left): a x - y cross-section at the bottom of CCPs. (Right): a x - z cross-section through the middle of the CCP indicated by the arrow. (C) A 2-color image of a CCP (magenta) enclosing a transferrin cluster (green) in x - y cross-section (left) and x - z cross-section (right). Reproduced from [28]. Scale bars: (A) 5 μ m, (B,C) 100 nm.

보다 짧은 시간 안에 충분한 수의 위치점을 얻을 수 있게 된다. 현재 이러한 분석법으로는 같은 이미지에서 위치측정과 이미지 감산을 반복하거나,^[29,30] 이미지들의 순차적인 정보를 이용하여 앞뒤의 이미지를 빼거나^[31,32] 전체적으로 분자들의 위치의 확률을 추론하는 방법^[33]이 있다. 특히 후자의 방법은 형광이미지가 시간 상에서 변동하기만 하면 되기 때문에, 탐침이나 기기에 대한 요구 조건이 단순해지는 장점이 있다.

다른 초고해상도 현미경법과 차별되는 STORM의 장점 중 하나는 단일 분자가 분리되어 쉽게 single particle tracking을 할 수 있다는 점이다. 기존의 tracking 실험에서는 분자들의 이미지를 분리하기 위하여 아주 적은 수의 탐침만을 표지하여 왔다. 그런데 광스위칭이 가능한 탐침을 사용하면, 시간 상 이들을 분리할 수 있으므로 많은 수의 탐침을 사용할 수 있다. 따라서 매우 높은 밀도로 확산 계수(diffusion coefficient)의 지도를 얻을 수 있게 된다.^[34] 이를 이용하여 세포 표면의 지질이나 막단백질의 확산계수의 분포를 시공간으로 분리하여 알아낼 수 있다.

응 용 Applications

STORM은 개발된 지 수 년밖에 지나지 않았지만, 다양한 생물학적 시스템에 적용되어 새로운 발견들을 쏟아내고 있다. STORM은 세포생물학뿐만 아니라 면역학, 미생물학, 신경생물학에 걸친 생물학 전반에 다양하게 적용되고 있다.

진핵생물의 미세한 단백질 복합체들은 STORM의 기술 개발 단계부터 연구되어 왔다. 일례로 클라트린 피복 소공

Fig. 5. Applications of STORM imaging (A-B) Architecture of integrin-based cell adhesions. (A) An iPALM image of integrin α_5 , a plasma membrane marker, fused with tdEos. (Top): top view, (Bottom): side view of the boxed region on top. (B) Model of focal adhesion molecular architecture. Reproduced with permission from [35]. (C) Bacterial chromosome organization. STORM (center) and conventional fluorescence (right) images of H-NS, a nucleoid-associated protein, tagged with mEos2, and a corresponding bright-field image (left) in a live *E. coli* cell. Reproduced with permission from [39]. (D) Synapse imaging of brain tissues. (Left, center): conventional and STORM images of a presynaptic scaffold, Bassoon (red) and a postsynaptic scaffold, Homer1 (green). (Right): 3-color STORM image of an AMPA receptor, GluR1 (blue) and Bassoon/Homer1. Reproduced with permission from [40]. Scale bars: 500 nm (A,C), 200 nm (D).

(Clathrin-coated pit)은 세포막에 형성되는 100 nm 정도의 지름의 구형 껍질로써 다색,^[16] 삼차원,^[17] 라이브 이미징^[28]의 개발/실연에서 그 성능을 입증하였다(그림 1C, 2C, 4B-C). 또 다른 단백질 복합체로는 세포가 외부환경에 부착하게 해주는 focal adhesion complex가 있다. 이 구조는 살아있는 세포에서 처음으로 STORM 이미지를 얻는데 사용되었다(그림 4A).^[26] 또, 그 단백질 구성원들의 위치를 10 nm의 해상도로 측정함으로써, 외부부착/신호전달/힘전달/액틴조절의 다양한 기능의 다층 구조로 이루어짐을 분자 수준으로 밝히기도 하였다 (그림 5A-B).^[35]

세포 표면막에는 다양한 지질과 단백질 분자들이 동적이며 미세한 영역 구조를 형성한다. STORM은 분자들의 분포와 더불어 확산계수를 측정할 수 있으므로 이러한 지질막 영역(membrane domain)을 연구하는 데 적합하다. STORM은 지질 뗏목(Lipid raft)이나 액틴 울타리(actin corral) 등의 가설들과 밀접한 관계가 있는 GPI-anchored protein들의 분포를 정량적으로 분석했을 뿐 아니라,^[36] 바이러스 감염과 관련

REFERENCES

- [34] S. Manley, *et al.*, Nat. Methods **5**, 155 (2008).
- [35] P. Kanchanawong, *et al.*, Nature **468**, 580 (2010).
- [36] P. Sengupta, *et al.*, Nat Methods **8**, 969 (2011).
- [37] S. T. Hess, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **104**, 17370 (2007).

된 hemagglutinin,^[37] VSVG^[34]과 같은 단백질들의 클러스터를 관찰하였으며, 면역세포 간 시냅스에 존재하는 T세포 수용체의 비균질 분포를 보기도 하였다.^[38]

미생물의 크기는 1마이크론 정도로 광학현미경의 분해능으로는 내부 구조를 보기 어렵다. STORM은 살아있는 미생물 내부의 구조를 초고해상도로 볼 수 있는 도구를 제공함으로써 기존에 볼 수 없었던 구조들을 밝혀내고 있다. 일례로, 대장균의 H-NS라는 global transcriptional silencer는 염색체당 두 개의 작은 클러스터를 자신이 조절하는 유전자 근처에 만들을 3D STORM으로 발견하였다(그림 5C).^[39]

뉴런 세포들은 다른 뉴런들과 소통하기 위하여 그 접합부위의 시냅스를 형성하고 다양한 신경전달물질을 주고받는 수용체들을 포진시킨다. 일례로, optogenetics와 3D STORM을 결합하여 외부 자극에 의하여 시냅스의 구조와 수용체의 구성/구조가 어떻게 변화하는지를 단일 시냅스 상에서 볼 수 있었다(그림 5D).^[40]

생물 이외에 나노재료에서도 확률적으로 형광을 끄고 키는 방법만 마련되면 STORM을 적용할 수 있다. 일례로 형광유도성 반응촉매를 이용하여, 나노 촉매 내의 반응속도의 분포를 알아낼 수 있다. 이를 응용하여, 금 나노 막대 내에서 막대 중심으로부터 막대 끝까지 반응 속도의 분포를 알아낼 수 있었다.^[41]

맺음말

STORM은 광스위칭이 가능한 형광탐침을 이용하여 분자들을 시간상으로 분리한 후 단일 분자들의 위치를 정확하게 측정하여 고해상도 이미지를 재현한다. 따라서 기존의 고성능현미경에 형광탐침과 분석법을 바꾸는 것만으로도 전통적인 형광현미경법의 해상도보다 10배 이상 개선된 초고해상도를 구현할 수 있다. STED나 SIM과 같은 다른 초고해상도 형광현미경법에 비하여 비교적 간단한 기기장치를 사용하면서도 더 향상된 해상도(10–20 nm)를 제공한다. 또한 단일분자 분

석법에서 사용되던 다양한 기술과 접목되어 쉽게 다색, 삼차원 이미징을 구현할 수 있고, 분자들의 위치뿐 아니라 확산 계수 등의 물리화학적 성질들도 알아낼 수 있다. 이러한 기기적 단순성과 다양한 성능에 힘입어 이미 상용화가 진행되어 최근 Nikon, Zeiss 등에서 상용 기기가 출시되었다.

뿐만 아니라, STORM 기술에는 아직 발전의 여지가 남아 있다. STORM의 해상도는 이론적으로는 무한히 개선될 수 있기 때문이다. 즉, 보다 많은 광자를 얻을 수 있는 형광탐침과 광학기기를 개발하면 그에 비례하여 해상도를 더욱 개선시킬 수 있다. 또한, 기존의 형광 탐침으로도 실제 구현된 해상도가 이론값에 미치지 못하다는 사실은 기기장치나 분석법에 개선의 여지가 남아있음을 시사한다. 기존에 주로 사용되어 왔던 EMCCD 카메라보다 더 빠르고 넓은 이미지 영역을 제공하는 sCMOS 카메라를 응용함으로써 시간 해상도도 개선할 수 있을 것이다. 또, 다양한 표지 방법의 개발을 통해 시공간 해상도를 개선시키고 단백질 외의 생체 물질도 초고해상도로 분석할 수 있을 것이다. 뿐만 아니라, 단일 분자를 쉽게 분리할 수 있는 점을 활용하여 확산 계수 이외의 여러 다른 생체 시스템의 물리 화학적 성질들을 세포에서 단일분자 수준으로 알아낼 수 있을 것이다.

기존의 장점들과 미래의 개발가능성에 힘입어 STORM은 널리 보급되어 다양한 생물, 비생물적 시스템에 적용될 수 있을 것이다. 생체 내 미세 구조를 단일 분자 레벨에서 볼 수 있는 STORM은 기존의 분자생물학, 생화학 기술을 보완하여 생체 내 분자들의 동적 상호 작용에 관한 우리의 이해를 크게 넓히는 데 기여할 것으로 기대된다.

REFERENCES

- [38] B. F. Lillemeier, *et al.*, Nature Immunology **11**, 90 (2010).
- [39] W. Q. Wang, G. W. Li, C. Y. Chen, X. S. Xie and X. W. Zhuang, Science **333**, 1445 (2011).
- [40] A. Dani, B. Huang, J. Bergan, C. Dulac and X. W. Zhuang, Neuron **68**, 843 (2010).
- [41] X. Zhou, *et al.*, Nature Nanotechnology **7**, 237 (2012).