

# Multicolor flow cytometry를 위한 새로운 형광 소개

개별 세포를 분리하고 동정하는 방법으로써 flow cytometry가 널리 사용될 수 있었던 것은 단클론 항체 기술 발전에 의하여 수많은 항원을 특이적으로 인지하고 형광을 이용해 검출할 수 있었기 때문이다. 특이성 및 친화도가 높은 항체를 개발하려는 노력과 함께 강한 형광을 띄며 안정한 형광물질을 개발하려는 노력이 현재에도 계속되고 있다. 본 고에서는 면역형광 염색을 효율적으로 활용하기 위하여 최근에 개발된 형광을 중심으로 소개하고자 한다.

## 1) Alexa Fluor 488

Alexa Fluor 488은 flow cytometry와 형광현미경에 적합한 녹색형광으로 488 nm 파장의 빛에 의하여 발광하여 525 nm 파장을 방출한다. 또한 fluorescein 보다 강한 형광을 나타내며 오랜 시간 지속되고, pH 4-10 구간에서 안정하기 때문에 대부분의 응용에서 FITC를 대체할 수 있다.

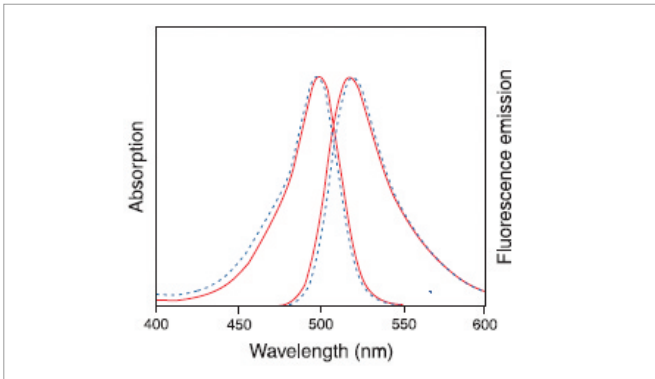


그림 1 Fluorescein(blue)과 Alexa Fluor 488(red)에 대한 흡광 및 형광을 파장에 따라 도표화하였다. 두 형광은 동일한 분광상의 특성을 보여 주고 있다.

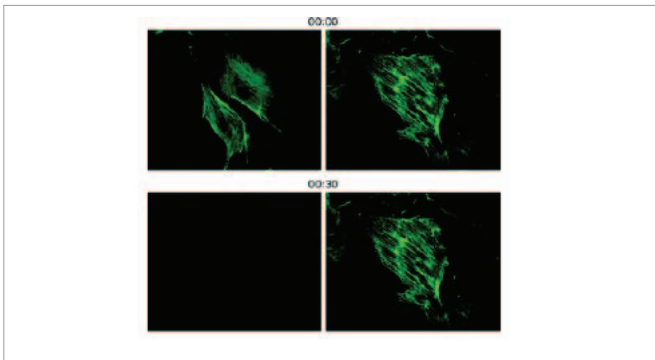


그림 2 Bovine pulmonary artery endothelial cell fluorescein phalloidin(왼쪽) 과 Alexa fluor 488 phalloidin(오른쪽)로 염색하여 FITC filter set으로 구성된 형광현미경으로 관찰하였다. 30초 후에 다시 관찰한 결과는 하단에 표시하였다.

## 2) Alexa Fluor 647

Alexa Fluor 647은 He-Ne laser(at 633 nm)와 Krypton-ion laser(at 647 nm)에 의하여 발광하여 668 nm 파장을 방출하기 때문에 Cy5 dye와 매우 유사한 분광상 특성을 가진다. 또한 Alexa Fluor 647은 Cy5보다 강한 형광을 나타내고 어떠한 물질에 부착되는 지에 관계없이 흡광 및 형광 파장에 변화가 없다는 장점을 가진다.

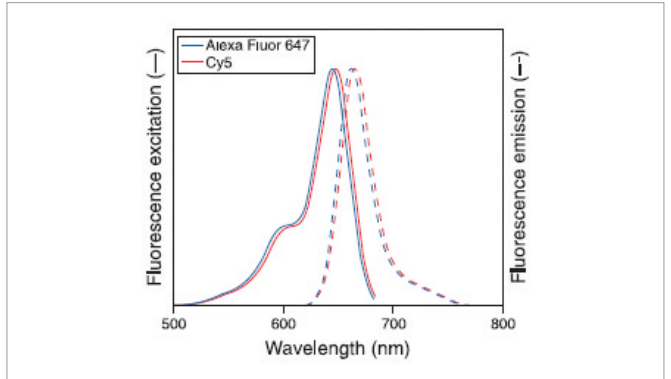


그림 3 Fluorescein(blue)과 Alexa Fluor 647(red)에 대한 흡광 및 형광을 파장에 따라 도표화하였다. Cy5는 단백질이나 핵산에 부착하면 부가적인 흡광 파장(600 nm)를 갖는 반면 Alexa Fluor 647은 이러한 분광 특성상의 변화가 유발되지 않는다.

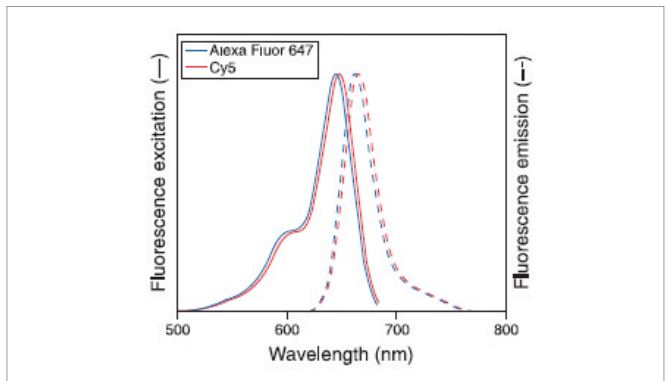


그림 4 Alexa Fluor 647 및 Cy5에 대한 여기 파장(excitation) 및 형광 방출(emission) 파장에 따라 도표화하였다. 두 형광은 동일한 분광학적 특성을 보여 주고 있다.

## 3) PE-Alexa Fluor 610

Phycoerythrin(PE)에 Alexa Fluor 610이 결합되어 FRET(Fluorescence resonance energy transfer) 과정을 통하여 새로운 분광특성을 가지는 형광물질이다. Phycoerythrin이 488 nm 파장을 받아들여 Alexa Fluor 610에 전달됨으로써 628 nm 파장을 방출한다.

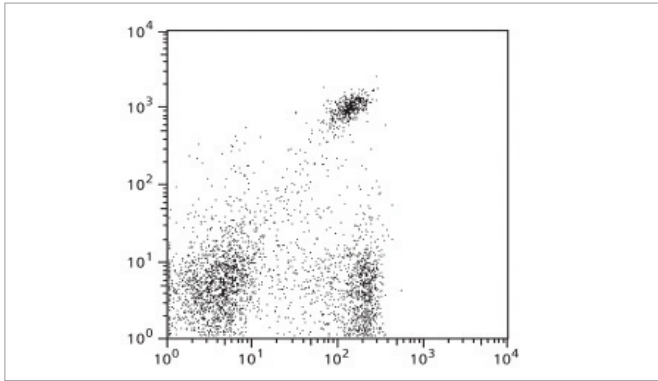


그림 5 NOD Mouse 비장 세포를 CD3-FITC와 CD8-PE-Alexa Fluor 601으로 염색하였으며, FACSCalibur로 결과를 검출하였다. 다른 tandem-dye로 관찰하였을 때 나타나는 B 세포의 artifactual staining이 관찰되지 않는 장점을 가진다.

#### 4) PE-Alexa Fluor 647

Phycoerythrin(PE)에 Alexa Fluor 647이 결합되어 FRET(Fluorescence resonance energy transfer) 과정을 통하여 새로운 분광특성을 가지는 형광 물질이다. Phycoerythrin이 488 nm 파장을 받아들여 Alexa Fluor 647에 전달됨으로써 668 nm 파장을 방출한다.

#### 5) PE-Alexa Fluor 700

488 nm 파장에서 여기 되어 723 nm 파장의 빛을 방출한다. PE-Cy5.5와 분광상의 유사한 특징을 가진다.

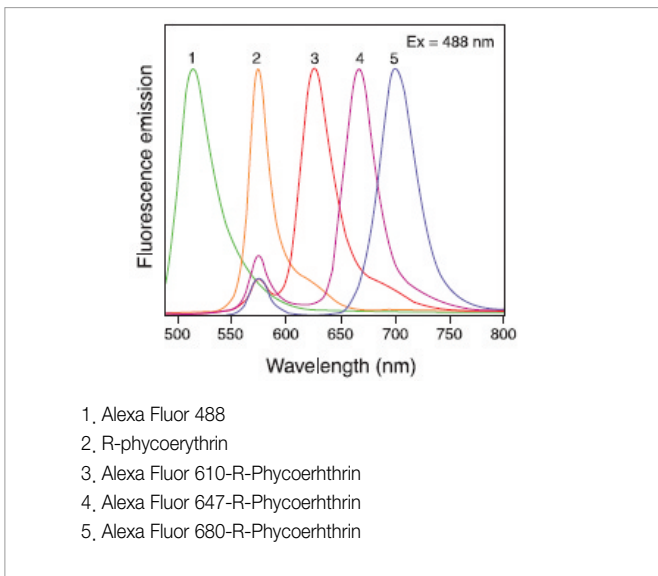


그림 6 각각의 형광물질에 따른 현광 분광 도표. Tandem dye를 사용하면 argon-ion laser(488 nm)을 excitation source로 사용하여 5가지의 목표물질을 동시에 검출 가능하다.

#### 6) APC-Alexa Fluor 750

Allophycocyanine(APC) 여기 파장인 633/635 nm 파장에서 동일하게 여기 되어 775 nm 파장의 빛을 방출한다. APC-Cy7을 완벽하게 대체 할 수 있는 tandem dye로서 장시간 동안 안정하게 형광을 발하는 장점을 가진다.

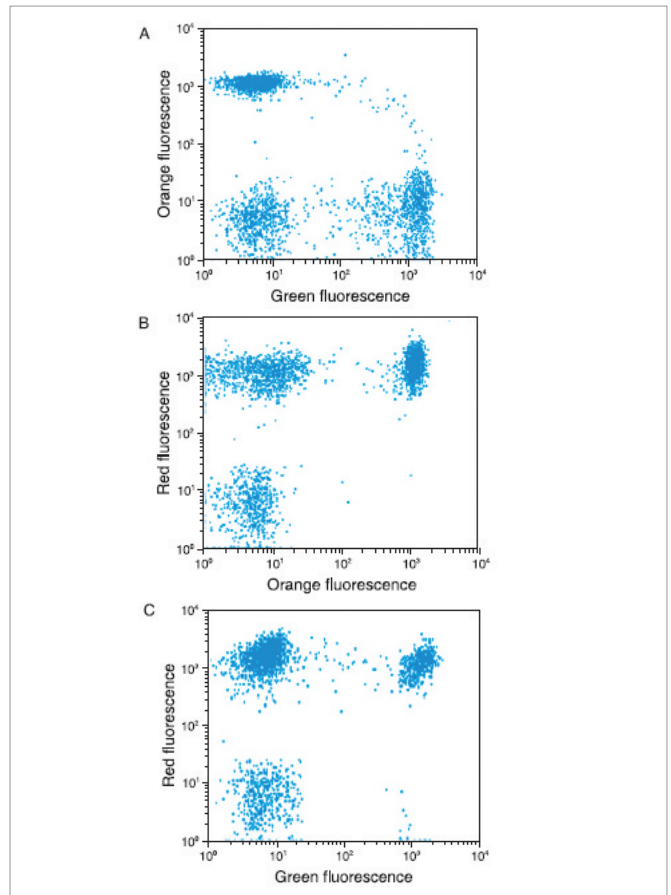


그림 7 Anti-human CD3-Alexa Fluor 610-R-PE, Anti-human CD4-R-PE, Anti-human CD8-Alexa Fluor 488을 이용하여 말초혈액을 염색하였다(Ammonium chloride RBC lysis solution으로 RBC 제거). Becton Dickson FACScan flow cytometer를 이용하여 분석하였으며, CD8은 green channel(525 nm), CD4는 orange channel(575 nm), CD3는 far red channel(>650 nm)에서 검출하였다. A는 CD4와 CD8이 배타적으로 양성반응을 보이는 모습을 보여주고 있으며, B는 CD3와 CD4가 양성반응을 보이는 군집을 확인할 수 있고, C는 CD3와 CD8이 양성반응을 보이는 군집이 확인된다.

#### · Excitation and Emission Wavelengths for Flow Cytometry

| Fluorochrome       | Light Source    | Excitation Laser (nm) | Emission Wavelength (nm) |
|--------------------|-----------------|-----------------------|--------------------------|
| Alexa Fluor® 488   | Argon-ion laser | 488                   | 519                      |
| FITC               | Argon-ion laser | 488                   | 519                      |
| R-PE               | Argon-ion laser | 488, 532              | 578                      |
| PE-Alexa Fluor 610 | Argon-ion laser | 488                   | 628                      |
| PE-Alexa Fluor 647 | Argon-ion laser | 488                   | 668                      |
| PE-Cy5(TC)         | Argon-ion laser | 488                   | 667                      |
| PE-Cy5.5           | Argon-ion laser | 488                   | 694                      |
| PE-Alexa Fluor 700 | Argon-ion laser | 488                   | 723                      |
| PE-Cy7             | Argon-ion laser | 488                   | 767                      |
| Texas Red*         |                 | 595                   | 615                      |
| APC                | He-Ne lasers    | 633/635               | 660                      |
| Alexa Fluor 647    | He-Ne lasers    | 633/635               | 668                      |
| APC-Cy5.5          | He-Ne lasers    | 633/635               | 694                      |
| APC-Cy7            | He-Ne lasers    | 633/635               | 767                      |

\* Texas Red 검출은 흡광 범위 내에 TR를 여기 시킬 수 있는 laser가 있어야 한다.

\* Alexa Fluor dyes는 Molecular Probes, Inc의 상표명으로 등록되어 있으며, 특허 출원으로 보호 받고 있다.