



# 고차원 생물 정보 추출을 위한 조직 및 장기 전체의 투명화 및 염색 기술

김 성 연

서울대학교 자연과학대학 생물물리 및 화학생물학과 / 유전공학연구소  
E-mail: sungyonkim@snu.ac.kr

## 서론

최근 급부상하고 있는 조직 및 장기 전체를 투명화하고 염색하는 기술은 의·생명과학자들에게 넓은 범위에 걸쳐 고 해상도로 고용량의 생분자 및 구조 정보를 추출할 수 있다는 가능성을 보여 주고 있다 [1-3]. 구체적으로 이는 하나의 조직 샘플에서, 수 밀리미터에서 수 센티미터 범위에 걸쳐, 빛의 회절 한계 혹은 이미징 기술에 의한 해상도 한계 내에서, 수백에서 수천 가지 이상의 분자 정보를 추출하려는 목표를 향한 첫 발걸음이라고 할 수 있다. 또한 조직 및 장기 전체를 온전한 상태로 연구하여 3차원적 정보를 얻기 위한 수요와 관심이 높아지면서, 다양한 전공의 연구자들이 새로운 조직 투명화 및 염색 기술의 개발에 뛰어들고, 이들에 의해 기술 수준이 성숙되며 더욱 많은 연구자들의 관심을 불러일으키는 선순환이 만들어지고 있다. 이 글에서는 현존하는 투명화 및 염색 기술들을 간략히 소개하고, 이들로 인해 열릴 새 지평과 극복해야 할 점을 논의해 본다.

## 조직 및 장기 투명화 기술

최초의 조직 투명화는 독일의 해부학자 Walter

Spalteholz가 benzyl alcohol과 methyl salicylate를 혼합한 유기 용액을 만들어 조직을 부분적으로 투명화한 1910년으로 거슬러 올라간다 [4]. 이후 조직을 투명화한다는 개념은 거의 한 세기 동안 잊혀져 있으면서 몇몇 연구자들에 의해 간헐적으로 시도되다가, 2007년에 조직 투명화를 이용한 Ultramicroscopy 기술이 발표되며 되살아났고 [5], 2013년 획기적으로 개선된 투명화 기술인 CLARITY가 개발되며 학자들의 관심을 집중적으로 받게 된다 [6]. 이를 계기로 조직 투명화 분야는 급격히 팽창하여 수많은 연구자들이 유사하거나 개선된 기술을 발표하였는데, 아래에서는 이를 세 가지로 분류하여 원리 및 장단점을 요약하였다 (그림 1).

## 단순히 굴절률 (refractive index)을 맞추는 방법

빛의 산란(scattering)은 조직을 불투명하게 만드는 주요 원인인데, 빛은 굴절율이 서로 다른 경계면에서 주로 산란된다. 따라서 조직을 담고 있는 용액의 굴절률을 조직의 굴절률(~1.46)에 맞추면 빛의 산란을 줄이고 조직을 투명하게 만들 수 있다. 많은 기술들이 간단히 조직을 정해진 순서에 따라 일련의 용액에 담그는 방법으로 조직을 투명화하는데, 그 예로 ClearT(95% formamide), ClearT2(50% formamide, 20% PEG)와 SeeDB(80.2% fructose, 0.5%



thioglycerol)를 들 수 있다 [7,8]. 이들은 모두 조직을 낮은 농도의 용액에 담그는 것에서 시작하여 몇 단계에 걸쳐 점차 농도를 높여 최종 용액에 도달하는 방식인데, 실험방법이 매우 쉽고 간단하다는 장점이 있지만 각 단계에서 조직에 용액이 침투하여 평형에 도달하기까지 시간이 오래 걸리고, 결정적으로 투명화 성능이 떨어진다. 단 무독성의 화합물을 사용하고, 형광을 보존하기 때문에 유전적으로 형광표지된 조직의 분자 및 구조를 관찰하기에 용이하며, 단순히 수용액에 담그는 것이기 때문에 다시 씻어내어 원래 조직 그대로의 상태로 되돌릴 수 있다.

### 지방을 일부 제거한 후 굴절률을 맞추는 방법

지방은 조직을 구성하는 중요한 일부이지만 조직 내의 굴절률을 변화시켜 빛의 산란을 일으키는 주된 원인이다. 따라서, 단백질과 핵산을 주로 연구하는 경우 유기 용매를 사용해 조직에 존재하는 지방을 일부 제거하여 조직 내 굴절률을 균일화하는 방법으로 조직 투명화를 촉진시킬 수 있다. Spalteholz의 첫 투명화 용액도 유기 용매로, 후에 개발된 Ultramicroscopy 및 3DISCO기술에서는 BABB(benzyl alcohol and benzyl benzoate)와 THF(tetrahydrofuran)를 유기용매로 사용하였다 [5,9]. 이들 논문에서 마우스의 척수 조직은 BABB와 THF의 조합으로 투명화되었고 [10], 마우스 뇌 조직 전체는 BABB대신 DBE(dibenzyl ether)를 사용하여 투명화가 가능하였다 [9]. 유기 용매에 기반한 이 방법들은 수용액보다 빠른 속도로(마우스 뇌 전체의 경우 2-3일 정도 소요) 조직을 투명화할 수 있으나, 유독성의 화합물을 다루는 데 따른 불편함이 있고, 탈수에 의해 조직이 변형되고 작아지며, 단백질과 핵산이 손상된다. 특히 대부분의 형광 분자를 수 시간 내에 소광(quench)시키기 때문에 조직을 투명화한 후 형광이 기능하는 동안 빠르게 이미징해야만 하는 단점이 있어, 이를 극복하기 위해 최근 개발된 iDISCO기술에서는 유기 용매에서 소광되지 않는 Alexa dye를 이용한다 [11]. 그럼에도 불구하고, 유기 용매 처리 후 조직 전체의 자가형광(autofluorescence)이 높아져 고화질의 이미징을 위해서는 Alexa 647 등 장파장대의 형광물질만 사용할 수 있다.

유기 용매를 사용하는 대신, Triton-X 등의 약한 세제류 분자를 이용해 지방을 일부 제거하고, 요소(urea) 등을 이용해 단백질을 일부 변성(denature)시켜 굴절률을 떨어뜨리는 수용액을 사용하는 투명화 방법들로 Scale, ScaleS, CUBIC이 개발되었다 [12-15]. 요소를 사용한 방법은 조직을 전체적으로 팽창시켰으나, 이는 최근 ScaleS에서 sorbitol을 넣어 팽창된 조직을 수축시키는 방법으로 보완되었다. 이 기술들은 조직의 크기에 따라 투명화에 며칠에서 몇 주의 시간이 소요되는데, 단순히 여러 용액에 담그는 방법이기 때문에 실행이 간단하고, 상당한 정도의 투명화 성능을 보이며, 형광 물질을 잘 보존하여 좋은 투명화 방법으로 보인다.

### 조직-겔 복합체 형성 후 지방을 일부 제거하고 굴절률을 맞추는 방법

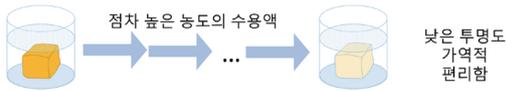
조직 투명화를 위해 지방을 일부 제거하면 구조적 지지가 사라지기 때문에 조직이 붕괴되고, 단백질과 핵산 등 다른 생분자가 유실될 수 있다. 이를 방지하기 위해 CLARITY에서는 먼저 조직 전체에 걸쳐 하이드로겔을 형성하여 조직-겔 복합체를 형성하고, 강한 세제인 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 전기장 안에서 수 일에서 수 주일간 가해 하이드로겔 네트워크에 공유결합적으로 연결되지 않은 포화 지방만을 효과적으로 제거한 후, 굴절률을 맞추는 용액에 담가 투명화를 달성한다 [6]. 이렇게 하면 형광 물질뿐 아니라 단백질과 핵산 등의 생분자를 최대한 보존하면서도 현존하는 기술 중 조직을 가장 투명하게 만들 수 있다. 뿐만 아니라 지방이 제거된 조직-하이드로겔 복합체는 원래의 조직보다 다공성(porous)이기 때문에, 항체 등 분자 탐침(molecular probe)의 침투를 용이하게 할 수 있다. 이러한 장점 덕분에 CLARITY 처리된 마우스의 뇌에서 최초의 뇌 전체에 걸친 염색이 성공하였다 [6].

분자 및 구조 정보를 잘 보존하기 위해서는 고정제(fixative)를 충분히 사용하고 하이드로겔을 치밀하게 만들어야 하는데, 이렇게 만든 조직-하이드로겔 복합체에서는 단순히 세제 용액에 넣고 흔들어서 지방을 제거하는 데 오랜 시간이 걸리게 된다. 조직 전체에 강한 전압을 가해 지

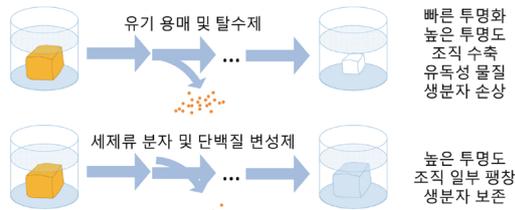
투명화의 주요 원리: 빛의 산란 감소



단순히 굴절률을 맞추는 방법



지방을 일부 제거한 후 굴절률을 맞추는 방법



조직-겔 복합체 형성 후 지방을 일부 제거하고 굴절률을 맞추는 방법

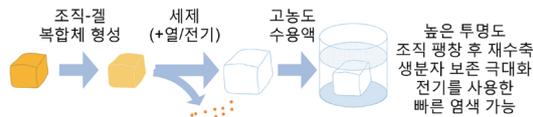


그림 1. 조직 투명화의 주요 원리 및 현존하는 방법

지방 제거를 촉진하기 위해 특수하게 제작된 전기 영동 장비가 고안된 것은 바로 이러한 이유 때문이다. 반면에 특수 장비를 만들거나 구해야 하는 불편함을 덜거나, 지방 제거 속도를 단축하기 위해 고정제를 적게 처리하고, 하이드로겔을 성기게 만드는 방법들이 시도되었다 [16-18]. 이렇게 하면 같은 세기의 전기장이 가해져도 훨씬 빠른 시간 내에 조직이 투명화될 수 있고, 심지어 전기장 없이 단순히 SDS용액에 담그고 수 시간에서 수 일간 흔들기만 해도 쉽게 투명화를 달성할 수 있다. 그러나 투명화 속도를 단축시키는 방법들은 필연적으로 분자 및 구조의 보존 정도를 희생할 수밖에 없기 때문에, 조직 투명화 방법을 사용하는 연구자들은 좋은 균형점을 찾기 위해 유의해야 한다. 최근 발표된 SWITCH기술에서는 이와같이 조직-하이드로겔을 약화시키는 시도와는 정반대로 글루타알데하이드 (glutaraldehyde)를 이용하여 조직이 더욱 강하게 고정되

고 치밀한 조직-겔 복합체를 만들어, 200V이상의 전압이나 70-80℃의 고온 등 혹독한 조건에서 조직을 손상시키지 않으면서도 빠르게 투명화할 수 있다 [19]. 이 기술은 분자 및 구조 정보의 보존을 극대화시키면서도 조직을 빠르게 투명화할 수 있고, 실행이 간단하고 쉬워서 널리 사용될 것으로 전망된다.

## 조직 및 장기 염색 기술

현재는 조직 투명화를 목적으로 많은 기술이 개발 및 발전되어, 많은 연구자들이 CLARITY 및 CLARITY에서 파생된 여러 방법, SWITCH, 수용액 및 유기 용매 기반의 여러 투명화법 등을 이용해 조직 투명화를 대부분의 조직 및 장기에 대해 쉽게 달성할 수 있게 되었다. 반면에 투명화된 조직의 구조나 분자의 분포를 관찰하기 위해 필수적인 염색 방법에 대한 기술 개발은 상대적으로 미진하다. 분자의 확산은 본질적으로 느리기 때문에, 유전학적으로 형광 표지가 되어 있지 않아 면역조직화학법(immunohistochemistry) 등으로 염색을 해야 할 경우 항체 등 분자 탐침이 조직 전체로 침투하는 데 오랜 시간이 걸린다. 이를 해결하기 위해 조직의 보존 정도를 희생해 가며 고정제를 적게 쓰거나 성긴 겔을 만드는 방법 [16-18], 얼리고 녹이는 것을 반복하거나, 탈수(dehydration) 및 재수화(rehydration) 등을 반복하여 조직 자체를 좀 더 다공성으로 만드는 방법 [11,20,21], 확산 속도를 높이기 위해 온도를 높이거나 [21], 마이크로파를 사용하는 방법 [21], 혈관을 이용해 염료 등을 perfusion으로 조직 전체에 전달하는 방법 [17] 등이 시도되었으나, 아직까지 조직 및 장기 전체를 다양한 분자 탐침으로 염색한 설득력 있는 데이터는 iDISCO방법에서 제시된 정도이다. 그러나 iDISCO의 염색법은 유기용매를 이용한 투명화 전에 실행되어야 하기 때문에 한 번에 여러 가지를 볼 수 없고, 한 조직으로 한 번의 염색밖에 할 수 없어 multiplexing capability가 떨어진다는 단점이 있다.

한편, 조직의 보존 정도를 희생하여 염색 시간을 줄이지 않고도 전기장 등의 외력을 가하여 조직 내에서 분자 탐침의 침투 속도를 높일 수 있다. 전기장은 매우 효과적으로 분

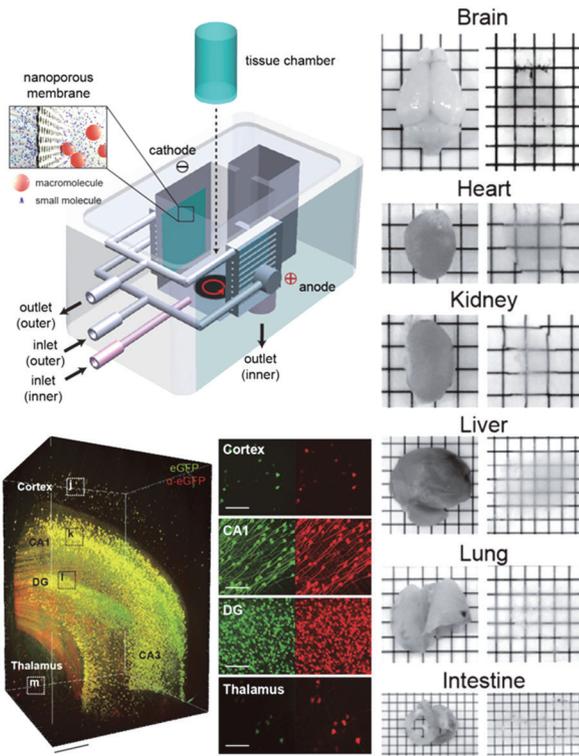
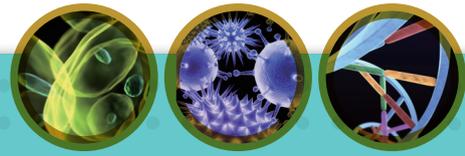


그림 2. 확률적 분자수송법(stochastic electrotransport)를 이용한 빠른 조직 투명화 및 염색 ([22]의 이미지 일부 사용)

자 탐침을 조직 내로 이동시킬 수 있지만, 충분히 강한 전기장을 걸었을 때 조직이 피고 있는 전하로 인해 조직이 망가지는 단점이 있어 쉽게 염색에 적용될 수 없었다. 이를 극복하기 위해 최근 필자가 CLARITY의 개발자인 매사추세츠 공과대학(MIT)의 정광훈 교수와 개발한 확률적 전기수송(stochastic electrotransport)기술을 이용하면 회전하는 전기장을 이용하면 조직을 손상시키지 않고도 큰 조직을 빠르고 균일하며 완전하게 염색할 수 있다 (마우스 뇌의 경우 합성유기염료, 락틴, 항체 모두 하루 이내) (그림 2) [22]. 확률적 전기수송 기술의 원리는 조직 투명화에도 적용되어 구조와 분자를 잘 보존하면서도 기존의 CLARITY보다 10배 이상 빠르게 각종 조직을 투명화하는 데에도 사용될 수 있다 [22]. 한편 SWITCH기술에서는 분자 탐침과 표적과의 반응 속도를 조절하고, 동시에 분자 탐침을 매우 높은 농도를 사용하여 농도 구배(concentration gradient)를

극대화시켜 확산 속도를 증가시켰다 [19]. 이 기술은 반응 속도를 조절하여 조직 전체를 균일하게 염색할 수 있다는 비전을 제시한 데 큰 의의가 있다. 특히 SWITCH기술에서 glutaraldehyde로 처리된 조직은 20회 넘게 반복적으로 염색이 가능하기 때문에, stochastic electrotransport기술과 결합하여 다차원적 분자 정보를 넓은 범위에 걸쳐 고해상도로 추출할 수 있도록 해 줄 것으로 기대된다. 이 외에도 외부에서 가해지는 압력을 이용하여 분자 탐침의 이동속도를 증가시킨ACT-PRESTO 기술이 발표되었다 [18].

### 향후 연구 전망

조직 투명화 및 염색 기술은 여러 학문 분야에 걸친 융합 연구와, 산·학의 협업이 필수적으로 요구되는 대표적인 예이다. 생물학자와 화학자, 의공학자, 재료공학자 등 다양한 과학기술 분야에서의 참여가 두드러지며, 기업에서 표준화되고 사용하기 쉬운 장비를 만들어 기술의 적용을 촉진하고, 기술의 사용에서 나오는 새로운 아이디어가 다시 장비의 디자인에 이용되는 선순환이 돋보인다. 국내에서도 라이브셀인스트루먼트(Live Cell Instrument)사에서 대표적으로 기술의 개발 단계에서부터 긴밀하게 참여하여, 조직-하이드로겔 형성과 조직 투명화 및 염색을 용이하게 하는 장비를 만들어 공급하며 기술의 발전과 보급에 중요한 역할을 수행하고 있다.

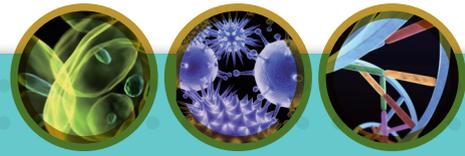
다음으로 투명화되고 염색된 조직에서 고해상도의 정보를 넓은 범위에 걸쳐 추출하려면 그것을 가능케 하는 이미징 기술이 필요하다. 먼저 개구수(numerical aperture)가 높으면서도 작동거리(working distance)가 긴 대물렌즈(objective lens)가 필수적인데, 현재 20-25x로 1.0 NA에 5.6-8.0 mm의 작동거리를 갖는 대물렌즈가 주요 현미경 회사에서 개발되어 있다. 투명화된 조직은 two-photon 현미경이 아니라 one-photon 공초점 레이저 주사 현미경으로도 이미징이 가능하지만, 빠른 속도로 넓은 부피를 photobleaching없이 이미징을 하기 위해서는 최근 주목받는 light-sheet microscopy가 매우 유용한 방법이 될 수 있다. 이러한 이미징의 결과로 얻어지는 수십 기가바이트에

서 수백 테라바이트에 달하는 거대한 이미지 데이터를 어떻게 시각화하고 효과적으로 분석할지를 해결하기 위해 전 세계의 빅데이터 및 이미지 분석 전문가들이 노력하고 있다.

이러한 어려움은 수년 내에 극복될 수 있을 것으로 예상되며, 필자는 전 세계의 수많은 학교와 기업 연구소, 병원 등에서 기존의 조직학적 방법을 대체하는 기술로서 조직 투명화 및 염색 기술이 널리 보급될 것이라 전망한다. 투명화 기술로 처리된 각 조직 샘플에서 넓은 범위에 걸쳐 고해상도로 고차원적 생분자 및 구조 정보를 추출함으로써, 더욱 발전된 조직 가공 기술이 생명 현상 및 질병 연구를 촉진시키고, 조직 검사법에 적용되어 진단의 정확도를 획기적으로 향상시키며, 나아가 신약 개발의 플랫폼으로 자리매김할 날을 기대해 본다.

## [참고 문헌]

1. S.-Y. Kim, K. Chung, K. Deisseroth, Light microscopy mapping of connections in the intact brain, *Trends Cogn. Sci.* 17 (2013) 596–599. doi:10.1016/j.tics.2013.10.005.
2. D.S. Richardson, J.W. Lichtman, Clarifying Tissue Clearing, *Cell*, 162 (2015) 246–257. doi:10.1016/j.cell.2015.06.067.
3. E.A. Susaki, H.R. Ueda, Whole-body and Whole-Organ Clearing and Imaging Techniques with Single-Cell Resolution: Toward Organism-Level Systems Biology in Mammals, *Cell Chem. Biol.* 23 (2016) 137–157. doi:10.1016/j.chembiol.2015.11.009.
4. W. Spalteholz, Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten, S. Hierzel, Leipzig, 1914.
5. H.-U. Dodt, U. Leischner, A. Schierloh, N. Jährling, C.P. Mauch, K. Deininger, et al., Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain, *Nat. Methods*, 4 (2007) 331–336. doi:10.1038/nmeth1036.
6. K. Chung, J. Wallace, S.-Y. Kim, S. Kalyanasundaram, A.S. Andalman, T.J. Davidson, et al., Structural and molecular interrogation of intact biological systems, *Nature*, 497 (2013) 332–337. doi:10.1038/nature12107.
7. M.-T. Ke, S. Fujimoto, T. Imai, SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction, *Nat. Neurosci.* 16 (2013) 1154–1161. doi:10.1038/nn.3447.
8. T. Kuwajima, A.A. Sitko, P. Bhansali, C. Jurgens, W. Guido, C. Mason, ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue, *Development*, 140 (2013) 1364–1368. doi:10.1242/dev.091844.
9. A. Ertürk, K. Becker, N. Jährling, C.P. Mauch, C.D. Hojer, J.G. Egen, et al., Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO, *Nat. Protoc.* 7 (2012) 1983–1995. doi:10.1038/nprot.2012.119.
10. A. Ertürk, C.P. Mauch, F. Hellal, F. Förstner, T. Keck, K. Becker, et al., Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury, *Nat. Med.* 18 (2012) 166–171. doi:10.1038/nm.2600.
11. N. Renier, Z. Wu, D.J. Simon, J. Yang, P. Ariel, M. Tessier-Lavigne, iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging, *Cell*, 159 (2014) 896–910. doi:10.1016/j.cell.2014.10.010.
12. H. Hama, H. Kurokawa, H. Kawano, R. Ando, T. Shimogori, H. Noda, et al., Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain, *Nat. Neurosci.* 14 (2011) 1481–1488. doi:10.1038/



- nn,2928.
13. E.A. Susaki, K. Tainaka, D. Perrin, F. Kishino, T. Tawara, T.M. Watanabe, et al., Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis, *Cell*, 157 (2014) 726–739. doi:10.1016/j.cell.2014.03.042.
  14. H. Hama, H. Hioki, K. Namiki, T. Hoshida, H. Kurokawa, F. Ishidate, et al., ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging, *Nat. Neurosci.* 18 (2015) 1518–1529. doi:10.1038/nn.4107.
  15. E.A. Susaki, K. Tainaka, D. Perrin, H. Yukinaga, A. Kuno, H.R. Ueda, Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging, *Nat. Protoc.* 10 (2015) 1709–1727. doi:10.1038/nprot.2015.085.
  16. R. Tomer, L. Ye, B. Hsueh, K. Deisseroth, Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues, *Nat. Protoc.* 9 (2014) 1682–1697. doi:10.1038/nprot.2014.123.
  17. B. Yang, J.B. Treweek, R.P. Kulkarni, B.E. Deverman, C.-K. Chen, E. Lubeck, et al., Single-Cell Phenotyping within Transparent Intact Tissue through Whole-Body Clearing, *Cell*, 158 (2014) 945–958. doi:10.1016/j.cell.2014.07.017.
  18. E. Lee, J. Choi, Y. Jo, J.Y. Kim, Y.J. Jang, H.M. Lee, et al., ACT-PRESTO: Rapid and consistent tissue clearing and labeling method for 3-dimensional (3D) imaging, *Sci. Rep.* 6 (2016) 18631. doi:10.1038/srep18631.
  19. E. Murray, J.H. Cho, D. Goodwin, T. Ku, J. Swaney, S.-Y. Kim, et al., Simple, Scalable Proteomic Imaging for High-Dimensional Profiling of Intact Systems, *Cell*, 163 (2015) 1500–1514. doi:10.1016/j.cell.2015.11.025.
  20. R.V. Sillitoe, R. Hawkes, Whole-mount Immunohistochemistry: A High-throughput Screen for Patterning Defects in the Mouse Cerebellum, *J. Histochem. Cytochem.* 50 (2002) 235–244. doi:10.1177/002215540205000211.
  21. J.A. Gleave, J.P. Lerch, R.M. Henkelman, B.J. Nieman, A Method for 3D Immunostaining and Optical Imaging of the Mouse Brain Demonstrated in Neural Progenitor Cells, *PLoS ONE*, 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0072039.
  22. S.-Y. Kim, J.H. Cho, E. Murray, N. Bakh, H. Choi, K. Ohn, et al., Stochastic electrotransport selectively enhances the transport of highly electromobile molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E6274–6283. doi:10.1073/pnas.1510133112.

#### 저 | 자 | 약 | 력

#### 김성연

2003–2009	서울대학교 화학부, 생명과학부 학사
2009–2013	Stanford University, Neurosciences Ph.D. Program, 박사
2013–2015	Massachusetts Institute of Technology, Institute for Medical Engineering and Science, 박사후 연구원
2015–현재	서울대학교 자연과학대학, 조교수 서울대학교 유전공학연구소, 조교수