

원자현미경의 나노 힘 측정을 이용한 생의학 연구에의 응용

조상준*(PSIA Corp), 이동진 (PSIA Corp), 김은파 (PSIA Corp), 이동률 (중문의대)

Atomic Force Microscopy Force Mapping Application in Biomedical Research

S.-J. Cho (PSIA Corp), D.-J. Lee (PSIA Corp), E. P. Kim (PSIA Corp) D. R. Lee (Pochun CHA University)

ABSTRACT

Local probe techniques such as scanning probe microscopy (SPM) or atomic force microscopy (AFM) extended our perception into ultra small world. Specially, the sense of touching was extended by AFM into the micro- and nanoworld and has provided complementary new insights of the microscopic world. In addition, touching objects is an essential step before trying to manipulate things. SPM as a touch sensor not only measure the mechanical properties but also detect different properties such as magnetic, electrical, ionic, thermal, chemical and biophysical properties in nanoscale and even less. Obtaining biophysical measurements, monitoring dynamics and processes together with high-resolution imaging of the biomolecules and cells with rather simpler sample preparation than any other techniques give great attractions to the scientists experimenting with biological samples. Among the many AFM capabilities we will specifically introduce the force plot which is used to measure tip-sample interactions and its application this time.

Key Words : Atomic Force Microscopy (원자간력현미경; 원자현미경), Force plot /Force-distance curve (힘-거리 그래프), Force mapping (지역별로 측정된 힘-거리 곡선 지도), Elasticity (탄성)

1. 서론

원자현미경 또는 주사탐침현미경 (Scanning Probe Microscope)으로 대표되는 국소 탐침 기술 (Local Probe Technique)은 인간의 인식체계 중 촉각을 마이크로와 나노 세계로 넓혔다고 할 수 있다. 촉각으로 물질의 성질을 인지 한다는 것은 시각적인 정보를 보완할 뿐만 아니라 물질에 자극을 주어 생기는 간접효과를 이용하여 물질의 물리적 성질을 파악하고 나아가 물질을 변화시킬 수 있다는 것을 의미한다. 원자현미경은 탐침과 시료간의 물리적인 상호관계를 측정 함으로써 데이터를 수집하는데 이는 탐침에 미치는 힘을 측정한다는 말로 바꿀 수 있다. 탐침에 미치는 힘은 물리적인 힘뿐만 아니라 전기력, 자기력, 마찰력 도는 물질의 경도, 탄성, 점성 등으로 인하여 미치는 힘 등 다양한 물리적 상호간섭력이다. 원자현미경의 가장 큰 장점 중 하나는 시료를 공기, 액체, 진공 속 어디에서나 사용할 수 있다는 점이다. 복잡한 시료 준비 절차를 거친 후 진공 속에서 측정 해야 하는 전자 현미경에 비하여 액체 속에서 살아있는 생체 시료를 전자 현미경에 필적하는 해상도로 관찰 할 수 있다는 원자현미경의 장점은 생물학자들에게 가장 큰 매력

이 아닐 수 없다. 또한 미세한 시료 표면의 구조를 관찰 할 수 있다는 커다란 장점 이외에 탐침을 이용 함으로써 극미세력 (ultra low force)를 높은 해상도로 측정할 수 있다는 점은 매우 중요한 의미를 지닌다. 기계적인 성질을 측정할 수 있는 원자현미경을 이용하여 신경교 세포 (glial cell)¹, 혈소판 (platelet)^{2,3}, 심장 세포 (cardiocyte)⁴, 대식 세포 (macrophage)⁵, 내피 세포 (endothelial cell)^{6,7}, 상피 세포 (epithelial cell)^{8,9}, 섬유 모 세포 (fibroblast)^{10,11}, 골아 세포 (osteoblast)¹² 등의 기계적인 성질이 측정되었다. 결과적으로 세포 표면의 기계적인 성질은 세포의 활동에 중요한 역할을 하며 기계적인 성질은 세포의 상태를 나타내는 중요한 지표의 하나로 쓸 수 있다. 또 다른 원자현미경의 힘 측정의 중요한 응용 분야에는 분자 인식 연구가 있다. 분자 수준에서의 생명현상을 한마디로 요약해서 말하면 생체분자들간의 결합과 해리라고 할 수 있는데 예를 들어 생체 조절 기능 중 가장 기본적인 반응 중 하나인 수용체 (Receptor)와 리간드 (Ligand)의 상호작용을 들 수 있다. 원자현미경은 개발된 역사가 짧은데도 불구하고 Biotin과 Avidin¹³, 항체와 항원^{14, 15, 16, 17}, Sense와 Antisense DNA¹⁸, 세포막 단백질¹⁹ 과 수용성 단

백질⁽¹⁰⁾등 상당히 많은 종류의 생체분자 사이의 상호 작용을 이해하는 데 사용되었다. 탐침에 리간드를 부착시킨 후 표면의 수용체와 반응시킴으로써 원자현미경은 생체 분자간의 상호작용을 측정할 수 있다. 이러한 실험을 통하여 생체 분자간의 친화력 (Affinity), 속도상수 (Rate Constant)와 수용체와 리간드의 접촉부분 (Binding Pocket)의 구조적인 정보 등을 얻을 수 있다. 그 뿐 아니라 여러 종류의 수용체 중 원하는 수용체를 찾을 수 있는 수용체 지도를 만들 수 있다는 점에서 수 많은 가능성을 보여주고 있다. 이번에 원자현미경의 극미세력 측정을 생물 연구에 이용하는 부분에 대해서 소개하고자 한다.

2. 실험 방법

2.1 원자현미경 실험

이 실험을 위해서 XE-150 의 100 μm 스캐너 (PSIA Corp, Korea)를 사용했다. 캔틸레버로는 Silicon nitride 재질의 DNP-S (Veeco, USA)의 스프링 상수가 0.58 k (N/m)인 타입 A 와 0.06 k (N/m)인 타입 D 가 사용됐다. 원자현미경은 모두 진동이 제거된 바닥에 놓여져 있으며 데이터의 재현이 가능하다. 시료를 찍는 방식으로는 접촉식 (contact mode)와 비접촉식 (non-contact mode)가 모두 사용됐다. 시료 사진과 힘-거리 그래프는 XEI (PSIA Corp, Korea) 소프트웨어를 사용하여 얻어졌다. 이 실험에 쓰인 배아줄기세포는 포천중문의대에서 고정된 상태로 준비되어 시료로 사용되었다.

3. 결론

3.1 Force-Distance Curve

원자현미경의 다른 현미경과 비교하여 뛰어난 점은 극미세력을 높은 해상도로 측정할 수 있다는 점이다. 원자현미경으로 얻어지는 힘-거리 그래프는 탐침과 시료간의 상호작용을 측정함으로써 얻어지며 이 분야의 응용분야는 재료분야, 생의학과 기타 여러 분야의 새로운 장을 열었다. 특히 생물학에서는 극미세력을 측정함으로써 시료의 탄성, 점성, 경성 등의 생물리학적 상태를 알 수 있으며 심지어 생체 분자간의 상호작용을 연구할 수 있다. 이는 생리학적 환경에서 동적인 생체 과정을 이해할 수 있는 길을 열었다고 할 수 있다. Fig. 1 은 원자현미경을 이용한 가장 기본적인 힘-거리 그래프를 나타내고 있다. 이 그래프는 적어도 두 가지 중요한 정보를 우리에게 제공하고 있다. 첫째는 시료와 탐침간의 인력정보이다. 탐침이 시료에 접근함에 따라 인력이 강한 시료는 탐침을 잡아당겨 캔틸레버가

밑으로 구부러지게 만든다. Fig. 1 에서는 인력이 강하지 않은 유리였지만 인력이 중요하게 작용하는 생체시료에서는 강한 인력이 작용하고 정확한 캔틸레버의 스프링 상수를 이용하여 인력의 크기를 측정할 수 있다. 두 번째로 탐침이 시료를 접근함에 따라 휘어지는 캔틸레버의 정도에 따라 시료의 탄성 (elasticity)를 측정할 수 있다. Fig. 1 의 ㉑와 같이 시료가 단단했을 경우 탐침이 시료에 접근함에 따라 캔틸레버는 날카롭게 휘어질 것이다. 하지만 시료가 부드러울 경우 캔틸레버는 천천히 휘어질 것이

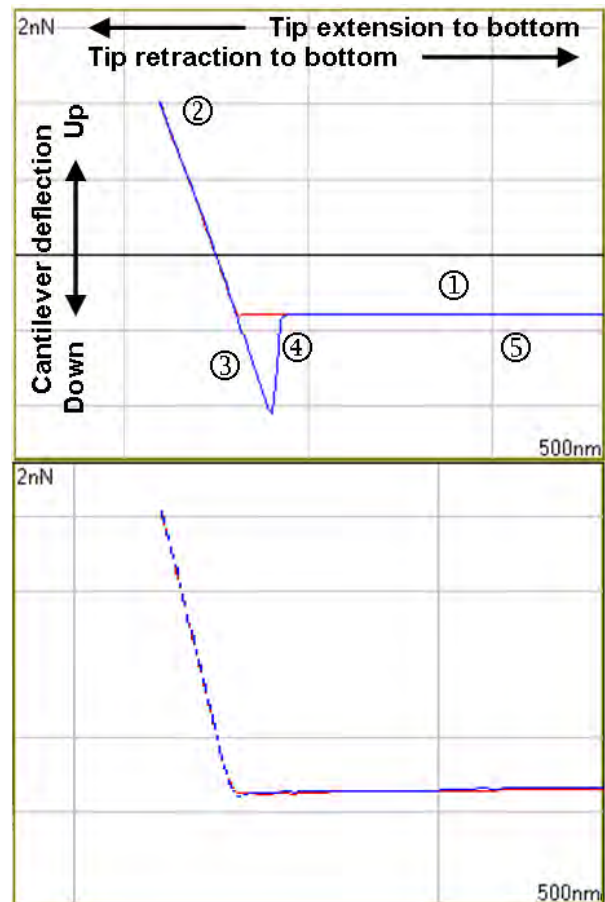


Fig.1 Up: AFM force-distance curve on cover glass in air with super luminescence diode (SLD) equipped scanner with spring constant 0.06 K (N/m) cantilever. ①, ② Read line indicates the tip extension to the bottom and ③, ④, ⑤ blue line indicates the tip retraction. ③, ④ Downward cantilever deflection of the blue line indicates the adhesion effect of the tip to sample. Bottom: The figure shows force-distance curve on cover glass in liquid. The attraction caused by meniscus force has been removed in liquid.

다. (Fig. 2) ㉓은 위로 휘어진 캔틸레버가 Z 스캐너의 피에조 (piezo)가 위로 수축함에 따라 원래대로 돌아올 뿐 아니라 반대로 표면의 인력 (attraction force)에 의해 밑으로 휘어지는 현상을 보여주고 있다. ㉔는 피에조가 계속 수축해서 캔틸레버가 올라감에 따라 결국에는 탐침이 표면의 습도에 의한 이 경우에는 3 nN 정도의 장력 (meniscus force)을 떨치고 휘어짐이 없는 캔틸레버의 정상위치로 돌아옴을 보여준다. Fig 1의 밑의 그래프는 공기 중에서 탐침에 작용하던 meniscus force가 액상에서는 제거됨을 보여주고 있다. 그러므로 액상에서는 표면에 있는 분자와 탐침에 있는 분자간의 상호 인력을 비교적 정확하게 측정할 수 있다. 이와 같이 원자현미경의 힘-거리 그래프의 모양과 기울기는 표면의 탄성과 인력 등 다양한 정보를 제공한다. 이 힘-거리 그래프를 분석함으로써 훨씬 복잡한 분자간의 상호작용을 이해할 수 있다.

Fig 2는 배아줄기세포 (Embryonic Stem Cell)를 접촉식 방식 (contact mode)로 찍은 후 힘-거리 그래프를 찍음으로써 세포 표면의 탄성을 측정한 그림이다. Fig 1의 유리와 같이 단단한 (stiff) 시료는 캔틸레버의 휨 (deflection)이 시료의 높이와 비례하므로 급격하게 위로 꺾이지만 부드러운 (soft) 시료에서는 캔틸레버의 휨이 완만하게 꺾이고 경사도 완만하여 팁에 의하여 표면이 눌리는 현상을 관찰할 수 있다. 그러므로 Fig 2의 화살표 부분은 시료의 높이와 캔틸레버의 휨이 비선형으로 비례함을 볼 수 있다.

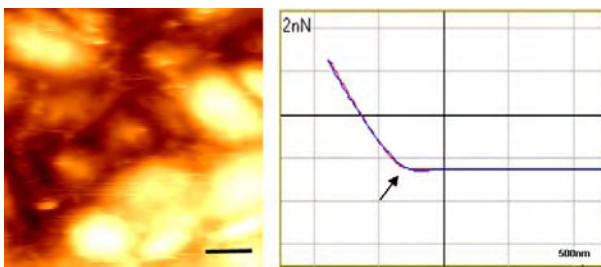


Fig.2 Left: Topographical AFM contact image of fixed embryonic stem (ES) cell. Bar = 10 μm . Right: Force-distance curve on ES cell surface in liquid with super luminescence diode (SLD) equipped scanner with spring constant 0.06 K (N/m) cantilever. The gentle bending at the arrow indicates softness of the sample.

3.2 Force-Mapping

Fig 3는 XEP (PSIA Corp, Korea)의 Force-mapping 기능을 이용하여 배아줄기세포 표면에서 힘-거리 그래프 지도를 구한 모습이다. 1번 5번 지역과 7, 8, 11, 12번 지역에서 탐침과 시료가 반응하는 모습을

관찰할 수 있다. 이 반응은 배아줄기세포는 SSEA (Stage-specific embryonic antigen)에 대한 항체가 처리되어있었기 때문에 이미지 과정 중 탐침에 묻은 항체가 시료와 반응한 것으로 추측된다. 이와 같이 힘-거리 그래프를 사용하여 분자간의 상호작용을 연구할 수 있다.

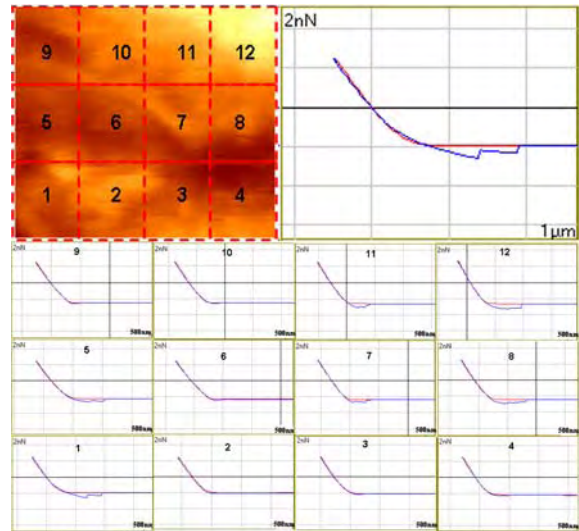


Fig 3. Force mapping of the ES cell surface. Top left: ES cell surface where force mapping was performed. Top right: Specific adhesion effects between tip and sample were observed. Bottom: 1, 5 and 1,9, 11,12 region showed the specific adhesion effects.

4. 결론

원자현미경은 시료 준비 방법의 개발, 이미지 처리 소프트웨어의 발달, 기계적인 향상, 탐침의 나노 환경에서의 역학해석의 발전, 그리고 정밀한 전자회로의 개발 등을 통하여 비약적인 발전을 거듭하고 있다. 특히 원자현미경의 나노 및 피코 수준의 힘을 쥘 수 있는 기능은 부드럽고 탄성이 강할 뿐 아니라 수많은 화학적 물리학적 반응이 일어나는 생체 시료의 생물리학적 성질을 관찰할 수 있는 도구로써 많은 시사점을 던져주고 있다. 새로운 캔틸레버와 탐침의 개발과 더불어 원자현미경 자체의 성능이 향상되고 있을 뿐 아니라 다양한 광학 전기 생리학, 분광 분석학적인 기술이 혼합한 복합 현미경 기술도 개발되고 있기 때문에 원자현미경은 아직 미지의 세계로 남아있는 생명의 신비를 밝히는데 핵심적인 역할을 할 것으로 기대된다.

후 기

이 논문은 부분적으로 학술진흥재단의 기초과학 연구지원 (KRF-2004-015-c00426 to S.-J.C.)과 과학기술부 및 한국과학기술기획평가원에서 지원받는 특정연구개발과제 중 나노섬모 자연모사 원천기술 개발 및 기반구축사업의 지원을 받았다.

참고문헌

1. Henderson, E., Haydon, P. G., and Sakaguchi, D. S. "Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy," *Science*, Vol 257, pp. 1944-1946, 1992.
2. Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C. M., Cleveland, J. P., and Hansma, P. K., "Measuring the elastic properties of human platelets with the atomic force microscope," *Biophys. J.* Vol 70, pp. 556-567, 1996
3. Walch, M., Ziegler, U., and Groscurth, P., "Effects of streptolysin O on the microelasticity of human platelets analyzed by atomic force microscopy," *Ultramicroscopy*, Vol 82, pp. 259-267, 2000.
4. Hofmann, U. G., Rotsch, C., Parak, W. J., and Radmacher, M., "Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope," *J. Struct. Biol.*, Vol 119, pp. 84-91, 1997.
5. Rotsch, C., Braet, F., Wisse, E., and Radmacher, M., "AFM imaging and elasticity measurements of living rat liver macrophages," *Cell Biol. Int.* Vol. 21, pp. 685-696, 1997.
6. Mathur, A. B., Truskey, G. A., and Reichert, W. M., "Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells," *Biophys. J.*, Vol 87, pp. 1725-1735, 2000.
7. Sato, N. K., Kataoka, N., Sasaki, M., and Hane, K., "Local mechanical properties measured by atomic force microscopy for cultured bovine endothelial cells exposed to shear stress," *J. Biomech.*, Vol. 33, pp. 127-135, 2000.
8. Hoh, J. H., and Schoenenberger, C.-A., "Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy," *J. Cell Sci.*, Vol. 107, pp. 1105-1114, 1994.
9. A-Hassan, E., Heinz, W. F., Antonik, M. D., D'Costa, N. P., Nagaswaran, S., Schoenenberger, C.-A., and Hoh, J. H., "Relative micro-elastic mapping of living cells by atomic force microscopy," *Biophys. J.*, Vol. 74, pp. 1664-1578, 1998.
10. Rotsch, C., Jacobson, K., and Radmacher, M., "The dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by atomic force microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 96, pp. 921-926, 1999.
11. Rotsch, C., and Radmacher, M., "Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts-An atomic force microscopy study," *Biophys. J.*, Vol 78, pp. 520-535, 2000.
12. Domke, J., Dannohl, S., Parak, W. J., Muller, O., Aicher, W. K., and Radmacher, M., "Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy," *Colloids Surf., B*, Vol. 19, pp. 367-379, 2000.
13. Wong, S. S., Joselevich, E., Woolley, A. T., Cheung, C. L. and Lieber, C. M., "Covalently functionalized nanotubes as nanotubes as nanometer-sized probes in chemistry and biology," *Nature* Vol. 394, pp. 52-55, 1998.
14. Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H. J., Schilcher, K. and Schindler, H., "Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 93, pp. 3477-3481, 1996.
15. Hinterdorfer, P., Schilcher, K., Baumgartner, W., Gruber, H. J. and Schindler, H., "A mechanistic study of the dissociation of individual antibody-antigen pairs by atomic force microscopy," *Nanobiology* Vol. 4, pp.39-50, 1998.
16. Willemsen, O. H., Snel, M. M. E., vander Werf, K. O., de Grooth, B. G., Greve, J., Hinterdorfer, P., Gruber, H. J., Schindler, H., van Kyook, Y. and Figdor, C. G., "Simultaneous height and adhesion imaging of antibody antigen interactions by atomic force microscopy," *Biophys. J.* Vol. 57, pp. 2220-2228, 1998.
17. Ros, R., Schwesinger, F., Anselmetti, D., Kubon, M., Schafer, R., Pluckthun, A. and Tiefenauer, L., "Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 95, pp. 7402-7405, 1998.
18. Strunz, T., Oroszlan, K., Schafer, R. and Guntherodt, H.-G., "Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, pp. 11,277-11,282, 1999.
19. Chen, A. and Moy, V. T., "Cross-linking of cell surface receptors enhances cooperativity of molecular adhesion," *Biophys. J.* Vol. 78, pp. 2814-2820, 2000.
20. Baumgartner, W., hinterdorfer, P., Ness, W., Raab, A., Vestweber, D., Schindler, H. and Drenckhahn, D., "Cadherin interaction probed by atomic force microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 8, pp. 4005-4010, 2000.