

# X-선 및 중성자선을 이용한 *In situ* 바이오 계면 분석기술 ; 생체유사막 및 단백질 단분자막의 구조 측정

신관우 · 최동진

## 1. 개요

최근 BT 분야에 많은 연구자들은 단일 세포를 이루고 있는 생체막의 기본 구조와 생체막에 포함되어 있는 인지질막에 흡착된 다양한 종류의 단백질의 구조, 그리고 이러한 단백질들과 외부물질과의 신호 전달체계 등의 관심을 쏟고 있다. 기존의 생물학적 접근에서 최근 고분자 및 나노소재의 분석에서 얻어진 새로운 분석 장치들의 적용으로 다양한 분석 기술들이 속속 개발되고 있으며, 궁극적으로 생명체의 성장, 분화, 정보전달등의 물리-화학적 반응을 이해하는 분야에 많은 연구자들이 연구를 가능하게 하였다.

특히, 다양한 나노 측정기술들의 눈부신 발전은 이러한 바이오 계면의 구조를 측정하기 위한 새로운 분석방법과 시료환경의 개발을 통하여 분자수준에서의 구조를 분석할 수 있는 수준에 이르렀다. 계면의 표면 구조를 분자수준에서 측정하는 방법으로는 AFM (atomic force microscopy)나 STM(scanning tunneling microscopy), 그리고 바이오 기술에 적용가능한 전자현미경 등의 개발로 비약적인 발전을 이루었으며, 최근 근접장을 이용한 NSOM 기술 등의 개발로 새로운 전기를 마련하고 있다. 그러나 이러한 장치들도 살아있는 생체재료나, 상온-상압에서의 유기재료의 구조 측정에는 아직 많은 제약이 있으며, 세포 내부에 존재하는 계면의 정보의 접근에는 아직 어려움이 있다. 생체계면은 그 특성상 액체와 온도/압력이 생체분자의 생리현상이 활성화될 수 있는 고유의 환경이 매우 중요하며, 생체고분자와 같이 biological system에 활용될 인공물질들의 특성 또한, 이러한 환경에서 직접 분석(*in-situ* characterization)할 수 있는 기술이 매우 중요하다.

본 총설에서는 1980년대 후반부터 고분자 및 고체박막의 나노 구조 분석에 널리 활성화된 측정기술인 X-ray와 중성자 반사를 장치를 중심으로<sup>1-6</sup> 생체막 및 생체 유사 계면의 단백질 및 DNA와 같은 생체분자들의 구조를 분석하고 이를 이용하여 생체막의 구조와 기능을 이해하기 위한 최근 연구결과들과 국내에서의 연구 성과들을 소개하고자 한다. 이를 위해서 생체막의 기본 구조, 그리고 이와 관련된 연구의 배경, 그리고 측정기술 및 분석 예의 소개로 이루어져 있다.

## 2. 생체막과 생체 유사막 구조의 구현

**그림 1**에서 보여주고 있는 것과 같이 세포를 이루고 있는 세포막은 인지질(phospholipids) 분자들의 자기조립에 의하여 5 nm 이내의 계면을 제공하며 세포내액(cytosol)과 세포외액(exterior)이 구분되어 있으며, 그 인지질막 사이에 존재하는 integral membrane protein, lipid-anchored membrane protein, peripheral membrane protein등이 세포의 다양한 생리작용(신호전달, 이온 채널, receptor, 면역반응)의 역할을 수행하고 있다.<sup>7</sup> **그림 1**에서와 같이 2차원 계면의 인지질막은 계면을 접하고 있는 친수성 계면과 단백질이 안정적으로 들어올 수 있는 소수성 공간을 제공한다. 따라서 세포의 생리작용을 이해하려고 하는 다양한 연구는 1차적으로 이러한 인지질막의 구조를 통하여 세포의 기능을 구현하게 된다.

### 2.1 세포 및 단백질 고정화 연구

인지질막의 표면의 고정화를 통하여 바이오칩에서 필요한 세포 및 단백질의 고정화의 핵심 기술로 이용될 수 있다.<sup>9,10</sup> 이때 계면에서 세포의 표면 특성을 제어하는 상호작용으로는 매우 강한 리셉터에 의



신관우

1995 서강대학교 화학과(학사)  
1997 한국과학기술원 신소재공학과(석사)  
2000 스토니브룩 뉴욕주립대학교(박사)  
2002 미국 NIST Center for Neutron Research (방문연구원)  
2006 광주과학기술원 신소재공학과 조교수  
2006~ 현재 서강대학교 화학과 및 바이오융합과정 부교수



최동진

2003 금오공대 재료공학과(학사)  
2005 금오공과대학교 재료공학과(석사)  
2006~ 현재 서강대학교 바이오융합과정 박사과정

### X-ray and Neutron Surface Scattering for *In situ* Characterization of Biological Monolayers

서강대학교 화학과 및 바이오융합과정 (Kwan Woo Shin and Dongjin Choi, Department of Chemistry and Program of Intergrated Biotechnology, Sogang University, Shinsoo-dong, Mapo-gu, Seoul 121-742, Korea)

e-mail: kwshin@sogang.ac.kr

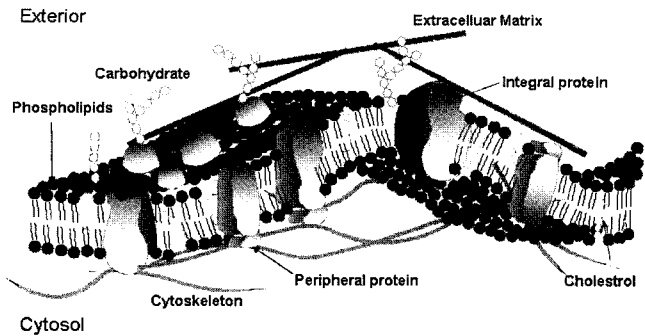


그림 1. 인지질 세포 이중막에서의 단백질 및 구성 분자들의 모식도.

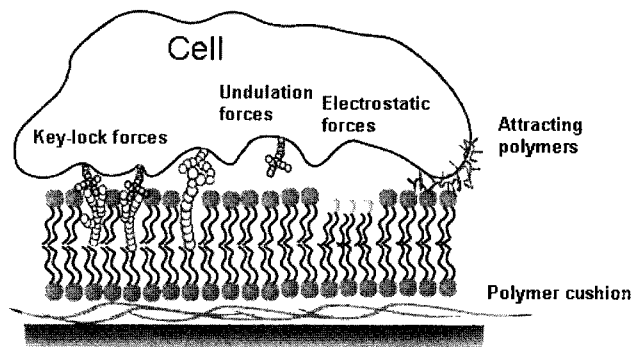


그림 2. 세포-세포접합시 작용하는 다양한 상호작용의 모식도.<sup>8</sup>

한<sup>11</sup> key-lock attraction과 undulation forces, 정전기적인 상호작용, 그리고 세포의 계면을 모사한 생체 인공 고분자에 의한 인력과 척력의 제어 등이<sup>12</sup> 있다.

### 2.2 생체막의 단백질 및 생체분자 인지

그림 2에서와 같이 특정단백질이나 세포 내로 약물을 전달하여야 하는 약물전달시스템이 특정세포를 인식하고 그 세포막의 공격이나 흡착과 같은 반응을 모사함으로써 세포막에서의 물리적 반응을 모사하고, 병원균이나 바이러스와 같은 분자들의 침입경로를 이해하는 연구등이 있다.<sup>13-15</sup>

### 2.3 단백질 및 엔자임 분자의 배향

앞에서 소개한 세포막 단백질들과 생리현상을 조절하는 다양한 엔자임들을 인지질 세포막에 구현함으로써 세포막의 구조 및 기능을 부여할 수 있다. 특히, 단백질과 같은 거대분자들은 polyelectrolyte의 계면 흡착과 탈착과 같은 유사한 kinetics를<sup>16</sup> 보여주며, 세포막표면의 extracellular matrix나 fibril 구조를 구현할<sup>17</sup> 수 있으며, 전자 전달 및 ionic pump와 같은 생리현상을 구현할<sup>18</sup> 수 있다.

세포막의 기본 구성분자인 인지질막이나 단백질과 같은 생체분자를 표면이나 계면에 배향하여 연구에 활용하는 기술은 크게 둘로 나눌 수 있다. 1) 친수성과 소수성을 모두 갖는 양쪽성 분자들이 액체와 기체의 계면 사이의 가사 2차원 계면(pseudo 2-dimensional system)에서 생기는 균일한 분자단위의 박막을 이용하는 Langmuir 단분자막(Langmuir monolayer) 기술과 2) 액체와 고체사이의 계면에서 자발적으로 흡착되는 자기조립 단분자막(self-assembled monolayers, SAMs) 기술이다.<sup>6</sup> 단분자막은 Langmuir trough에 의하여 분자당 평균 면적을 조절하여 막의 밀도를 조절할 수 있으나, 물과

같은 액체 면에서만 안정되게 형성되기 때문에, 디바이스를 만드는 응용성에서 많은 어려움이 있다. 이에 비하여 SAMs은 고체 기질에 열역학적으로 안정한 박막을 구현하기 때문에 상대적으로 활용성에서 유용하다. 그러나 Langmuir 박막의 경우 인지질막의 수평 mobility(Lateral mobility)를 쉽게 구현할 수 있어서, 실제 세포막의 elasticity나 세포배향 등을 연구할 때 유리한 반면, SAMs으로 이루어진 박막은 이러한 인지질막 자체의 mobility는 구현하기 매우 어렵다. 이러한 방법들을 이용하여 균일한 바이오 박막의 형성이 필요한데, 이러한 극미세 영역을 다루는 나노기술은 특정 물질을 분자수준에서 측정기술의 개발 또한 나노기술의 중요한 축으로 크게 부각되고 있다.<sup>5</sup>

## 3. 바이오 계면의 구조 분석 기술

위에 소개한 바와 같이 생체 박막 및 생체 박막 모사 소재와 같은 유기분자를 포함하는 연성 소재의 연구 분야는 고분자를 포함한 다양한 박막 제조 기법에 의하여 생성된 생체 모사 박막에 다양한 생체 분자의 생화학적, 물리적 상호작용을 측정하면서 연구가 진행된다. 대표적으로 생체 모사막의 구성에 사용되는 Langmuir 단분자막의 경우 그림 3과 같이 실제의 세포막을 물과 같은 액체 계면에 분산시키면 액체계면이 제공하는 매우 평평한 2차원 박막을 쉽게 형성할 수 있다. 이때 물속에 단백질과 같은 생체분자를 투입시켜, 실제 생체에서 일어나는 생화학, 물리적 흡착과 같은 반응들을 관찰할 수 있다.

이와 같이 기체와 액체 계면의 단분자막 구조(Langmuir monolayer)이나 Langmuir 박막을 고체기질에 이전시킨 Langmuir-Blodgett 박막(LB막)과 액체와 고체기질 계면의 자기조립 박막(SAMs) 등의 단분자 구조는 약 1~2 nm 두께를 갖고 있으며, 각 박막에 포함된 기능성 분자 구조를 측정하기 위해서는 0.1 nm 이내의 정밀도를 유지하여야 한다. 액체에 접하지 않는 고체기질 표면의 막은 기존의 AFM이나 TEM 등으로 나노구조를 측정하는 것이 어렵지 않으나, *in-situ* 측정을 위해서는 버퍼와 같이 생체와 유사한 pH를 유지하거나, salt의 양을 유지하기 위한 액체가 있어야 생체분자를 안정화 시키며, 실제 생체내 반응을 모사할 수 있다. 따라서 바이오 나노계면 측정의 핵심은 액체 계면이 포함된 나노 구조를 어떻

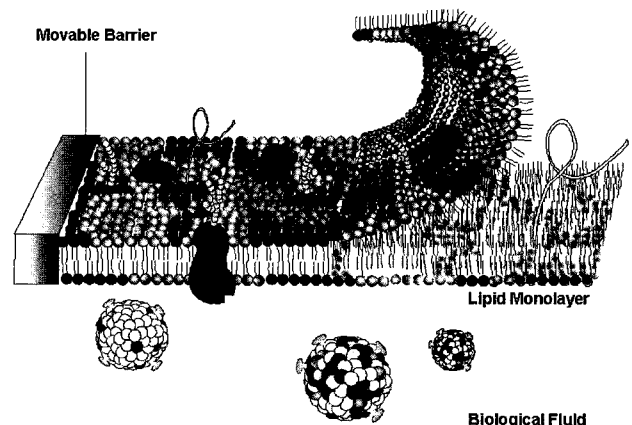


그림 3. Langmuir 기술을 이용한 생체 인지질 단일막의 형성 모식도.

표 1. 바이오 나노 박막 측정 기술 및 그 특성<sup>5</sup>

Detection techniques	나노 구조측정	<i>In-situ</i>	Depth profiling	Dynamics	나노구조 분해능	가용기질
QCM	×	○	×	○	-	금속기질
SPR	×	○	×	○	-	금속기질
Fluorescence/Brewster angle Microscopy	×	○	×	○	1,000 nm	고체/액체
NSOM	○	○	△	×	80 nm	고체기질
Ellipsometry	×	○	○	○	1 nm	고체기질
Atomic Force Microscopy	○	○	×	×	1 nm	고체기질
SEM/TEM/XPS	○	×	○	×	sub-nm	금속기질
X-ray & Neutron REF	○	○	○	○	sub-nm	제한없음

계 측정하는가에 있다. 이러한 액체 계면에서 마이크로, 혹은 나노 이미징을 통한 분자 구조와 깊이에 따른 분자의 배향 및 분자의 밀도 분포를 측정하는 depth profiling 기술은 기존의 고체재료에서 개발된 측정기술을 적용하기가 매우 어렵다. 액체 계면 측정에 나노 측정 기술을 이용하기 위한 기본 조건을 나열하면 다음과 같다.

### 3.1 *In-Situ* 조건의 접근성

생체반응은 물분자의 존재가 필수적이며 일반적으로 상온에서부터 50 °C 이내의 생체적응 온도가 유지되어야 한다. 따라서 고진공, 고압/고온과 같은 특별한 측정을 위한 외부 조건 없이도 바이오 *in-situ* 나노 측정이 가능한 장치가 필요하다. 또한 액체위에 형성된 바이오 계면들은 기존의 *ex-situ* 나노 측정기술(TEM, SEM, 혹은 AFM) 등으로 관찰하기 어렵다.

### 3.2 Probe의 비파괴성

유기분자로 이루어진 생체분자들은 전자빔과 같은 높은 에너지 및 원자와 반응성이 높은 빛에 의하여 쉽게 파괴된다. 따라서 측정 과정에서 생체분자의 구조나 반응성이 낮은 입사빔을 활용하여야 한다. 예를 들면 중성자 빔의 경우 유기분자에 거의 물리적인 영향을 미치지 않으므로 수시간에 걸쳐서 같은 위치를 측정하여도 문제가 없다.

### 3.3 다양한 계면 및 기질의 접근성

구조 측정의 경우, 비투과성 매질과 매질 사이에 형성된 경우가 있으며, 특히 액체의 경우, 액체를 안정적으로 담기 위한 다양한 콘테이너가 필요한 경우도 있다. 일반 빛의 경우는 유리와 같은 투명한 고체의 경우 투과가 가능하며 레이저를 이용하여 일부 액체 매질을 투과하여 매질내의 구조를 측정이 가능하다. 그러나 향온을 유지시키기 위한 다양한 밀폐장치가 있을 경우나, 실리콘과 같은 비투과 매질이 존재할 경우 측정이 어렵다. 중성자의 경우 실리콘이나 알루미늄과 같은 기질에 거의 산란없이 투과하기 때문에 고체기질의 표면의 접근에 매우 용이하며, X-선의 경우도 파장대에 따라서 액체매질을 쉽게 투과할 수 있다. 정량적 측정 장치의 경우 QCM이나 SPR의 경우 금속 매질이 필수적으로 요구되는데 반하여, 타원계와 같은 경우 고체 기질에 특성과 상관없이 유사한 정량 측정이 가능한 장점이 있다.

### 3.4 나노미터이내의 분해능

나노 구조를 이해하기 위해서는 나노미터 이내의 구조를 분석할 수 있는 분해능이 필요한데, 수백 nm 파장대를 사용하는 가시광선의 영역의 소스의 경우 근접장을 활용하는 경우에도 수십 nm의 구조를 직접 측정하는 것은 어렵다. X-선이나 중성자선원의 경우 0.1~0.5 nm 대의 파장을 이용하기 때문에 나노구조의 직접적인 구조 측정이 가능하다. 레이저를 이용하는 경우에도 편광과 같은 광학

계수를 이용할 경우 수 나노 구조의 두께에 매우 민감하게 변하기 때문에 정밀한 측정이 가능하다.

이와 같이 기체와 액체 계면의 단분자막 구조(Langmuir monolayer)이나 Langmuir 박막을 고체기질에 이전시킨 Langmuir-Blodgett 박막(LB막)과 액체와 고체기질 계면의 자기조립 박막(self-assembled monolayer) 등의 단분자 구조는 약 1~2 nm 두께를 갖고 있으며, 각 박막에 포함된 기능성 분자 구조를 측정하기 위해서는 0.1 nm 이내의 정밀도를 유지하여야 한다. 액체에 접하지 않는 고체기질 표면의 막은 기존의 AFM이나 TEM 등으로 나노 구조를 측정하는 것이 어렵지 않으나, *in-situ* 측정을 위해서는 버퍼와 같이 생체와 유사한 pH를 유지하거나, salt의 양을 유지하기 위한 액체가 있어야 생체분자를 안정화 시키며, 실제 생체내 반응을 모사할 수 있다. 따라서 바이오 나노계면 측정의 핵심은 액체 계면이 포함된 나노 구조를 어떻게 측정하는지 여부가 핵심이다. 나노미터 혹은 그 이하의 분해능을 제공하는 TEM과 AFM과 같은 다양한 구조 측정 장치의 개발에도 불구하고, 액체계면을 직접 측정할 수 있는 장치는 계면의 산란을 이용하는 레이저/X-선/중성자선으로 한정되어 있으며, 그중에서도 나노미터의 분해능을 유지하는 장치는 X-선과 중성자선의 산란장치가 유일하다고 할 수 있다.<sup>5</sup> 이러한 두가지 방법에 의한 바이오 나노 박막 구조 및 특성을 실상황-실시간 측정이 가능한 대표적인 연구 방법을 정리하면 다음의 표 1과 같다.<sup>5,6</sup>

## 4. 바이오 계면분석을 위한 X-선 및 중성자 산란 기술<sup>6</sup>

중성자와 X-선의 반사를 측정은 액체/고체, 혹은 기체/액체가 이루는 평면의 계면에서 흡착이나 탈착과 같은 반응에 따른 구조의 변화를 측정하는데 널리 사용된다. 기존의 깊이 방향으로 구조의 분포도를 측정(depth profiling)할 수 있는 여타의 측정 장치에 비해 반사 측정 장치가 갖는 장점은 매우 다양하다. 특히, 표면에 측정에 의하여 beam damage가 적다는 점과 측정에 있어 샘플의 진공이 필요 없는 유일한 나노 스케일의 depth profiling의 기술이므로 반사율의 측정을 통한 생체분자의 구조적, 혹은 동력학적 실험에 이용될 수 있는 유일한 장치라고 할 수 있다. 또한, 바이오 계면 측정 장치와의 장점으로는, (1) 진공이 필요하지 않기 때문에 생리반응의 조건하(*in-situ* & real-time) 측정이 가능,<sup>19</sup> (2) 측정에 따른 표면 damage가 없으므로 장시간에 걸친 동력학 측정이 가능, (3) sub-nano scale의 depth profiling이 가능하며, in-plane diffraction과 결합하여 평면의 분자배열의 동시분석이 가능,<sup>20</sup> (4) (중성자 반사

을) 액체/고체, 기체/액체 등 다양한 계면의 측정 가능,<sup>21</sup> (5) (X-선 반사율) 높은 flux를 갖는 방사광 X-선은 좋은 영역에 매우 넓은 영역의 공간 spacing의 접근이 가능하다는 점이다.<sup>22</sup> 생체 내에서 생체막은 세포 외막으로 주변 환경과의 상호작용을 조절하는 역할을 한다. **그림 3**에서 보는 것과 같이 생체막은 지질과 단백질 분자의 회합체로 구성되어있고 그 구조적 형태를 보면 연속적인 이중층으로 이루어져 있으며, 기능적으로는 수용성 분자에 대한 외벽으로서 그리고 단백질 분자와 상호하는 역할을 담당한다. 그림 특정 단백질은 지질 이중층에 복합되어 세포간의 융합기능을 수행하고, 기공이나 미세관을 통해 이온의 이동을 조절하기도 하며, 세포막 표면에 효소적 기능도 담당할 뿐만 아니라 단백질이 호르몬에 의해 활성화되어 수용체(receptor)로서 작용하여 생체와의 상호작용을 담당하게 된다. 그러나 세포막은 아주 복잡하고 다루기 힘들어 실험실에서 복제해서 연구 목적으로 사용하기 매우 힘들다. 따라서, 생체 세포막과 유사하나 생체 세포막보다 간단한 구조의 인공 생체 유사막은 이러한 복잡한 시스템에 대체하여 연구할 목적으로 사용할 수 있다. 이 경우 세포막 fusion에 의한 고체기질 표면에 흡착이나, Langmuir 기술을 이용한 액체 표면에 인공 생체막의 구현이 가능하다.

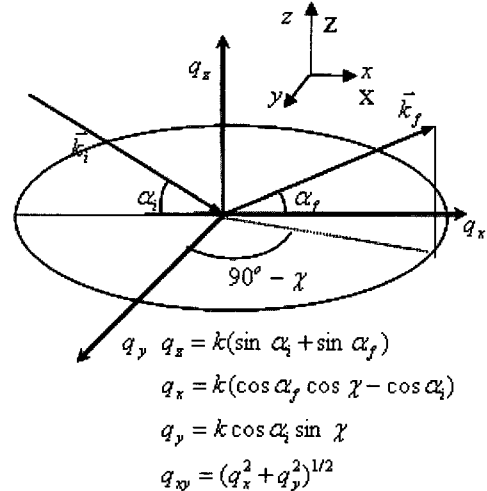
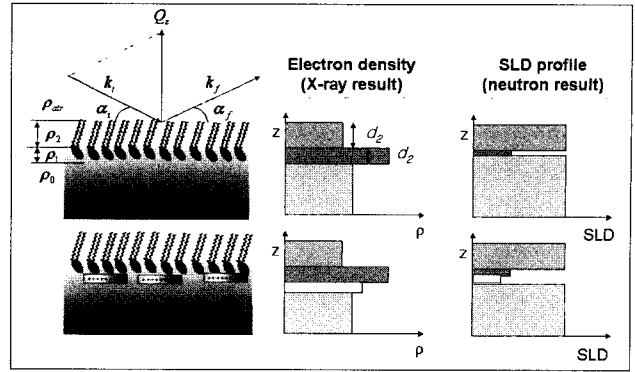
입사된 파장은 다른 특성을 가진 두 매질이 만나는 계면을 지날 때, 그 계면에서 투과와 반사의 현상이 나타난다. 계면이나 표면이 이론적으로 완전한 평면이라고 가정하면, 입사각과 동일각을 이루며 반사하게 된다. 이때 단색 파장이 입사각을 바꾸어 가면서 균일한 하나의 박막이 이루는 두개의 계면에 조사될 때, 각각의 계면에서 반사된 파의 위상은 입사각에 따라 변하는 광로거리 (beam path)에 의하여 보강간섭 (constructive interference)와 상쇄간섭 (destructive interference)이 반복적으로 나타나게 된다. 이때 입사파의 세기와 반사파의 세기의 비를 반사율(reflectivity)로 정의하면 반사파의 세기가 충분할 경우 최대치인 1(전반사의 경우)에서 간섭파형을 유지하면서 각도에 의하여 감소하게 된다. 일반적으로 중성자나 X-선 반사율 측정장치의 경우  $1 \sim 10^{-8}$  범위의 반사율 측정이 가능하다.

**그림 4**에 정의된 것과 같이 Z를 계면에 수직 방향으로 놓고, X와 Y 좌표를 계면에 평행하게 놓을 때, 입사파동벡터  $k_i$ 와 반사파동벡터  $k_r$ 의 Z 방향 성분의 파동벡터 전이(wavevector transfer)를  $Q_z = k_r - k_i$ 로 표현할 수 있으며, 이때 입사각을  $\alpha_i$ 로, 반사각을  $\alpha_r$ 로 정의할 때 그 Z 성분의  $Q_z = k(\sin \alpha_i + \sin \alpha_r)$ 로 주어진다. 이때 대칭 등각의 거울형 반사율은  $\alpha_i$ 와  $\alpha_r$ 을 등각으로 유지시키면서 변화시킬 때 변화하는 여기서  $k$ 는  $k = 2\pi/\lambda$ 로 주어지며  $\lambda$ 는 입사된 빛의 파장이다. 이와같이 입사각과 반사각을 변화시킴에 따라 반사율을 측정함으로써 박막표면의 미세구조를 측정하는 것이 본 실험장치의 기본이론이다.<sup>1,2,23</sup>

굴절률( $n$ )은 실수부분( $\delta$ )과 허수부분( $\beta$ )으로 나타낼 수 있는데 산란구조와 위의 그림과 같을 경우, 박막재료(1)의 굴절률은 다음과 같다.

$$n = 1 - \delta + i\beta = 1 - \frac{\rho}{2\pi} \lambda^2 b + i\beta$$

여기서 실수부분은 X-선의 경우 전자밀도에 해당하는  $\rho$ 와 전자의 반경에 해당하는  $b$ 가 결정하며, 중성자의 경우는 각각 중량 밀도와 평균 중성자 산란 길이(average neutron scattering length)를 나



**그림 4.** (오른쪽) 생체막의 액체 계면에서 조성된 Langmuir 박막으로부터 반사를 측정을 통한 전자 밀도, 두께, Scattering Length Density의 Depth profiling의 결과 비교.<sup>6</sup> (왼쪽) reflectivity와 GIXD의 산란 geometry.<sup>24</sup>

타낸다. 파의 흡수에 의한 상의 변화를 일으키는  $\beta$ 를 무시할 때, X-선과 중성자의 굴절률은 결국  $\rho b$ 의 값이 결정하며 이 값을 산란길이 밀도(scattering length density,  $\rho^s$ )라 부른다. 이 값은 샘플의 종류에 따라서 주어지는 고유의 값으로 X-선의 경우 원자번호에 따른 전자 밀도에 의하여 변화하며, 중성자의 경우는 원자번호에 무관하게 각각의 핵이 갖는 고유의 산란 길이 상수의 합으로 주어지기 때문에 전자분포에 의하여 변화하는 계면의 경우는 X-선이 유리하나, H, C, O와 N과 같은 낮은 원자번호의 원자로 이루어진 바이오 재료에서는 중성자 반사율이 매우 유리하다. 일반적으로는 이러한 바이오 계면의 측정에서는 X-선과 중성자가 함께 사용된다. 특히, **그림 5**에서와 같이 생체 막에서 주요 성분인 인지질 분자가 액체계면이나 고체기질 위에 단분자막을 이루고 있을 때 인지질을 구성하는 지질층의 꼬리부분과 인을 포함하는 머리부분으로 나눌 수 있다. 이때 꼬리부분은 탄소와 수소로 이루어져 상대적으로 낮은 전자밀도를 갖고 있으나 인을 포함하는 머리부분은 상대적으로 약 30% 이상 높은 전자밀도를 갖는다. 따라서 생체막을 이루는 분자들의 배향 구조를 측정하는데 X-선이 매우 중요한 장치로 활용된다.

나이가 생체막에서 벌어지는 다양한 생화학적 반응은 외부의 단백질과 같은 생체분자들이 표면 흡착 구조의 측정이 중요하는데, 이때는 X-선에 비하여 상대적으로 수소에 대한 동위 원소인 중수소(deuterium)의 치환에 의하여 특정 위치에 동위원소 치환을 하여 매

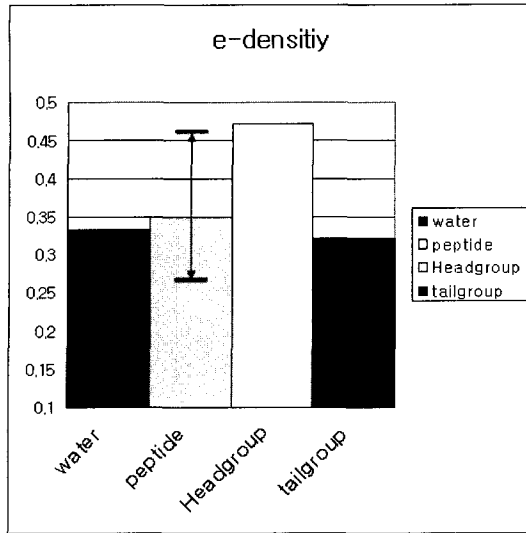


그림 5. 물에 형성된 인지질 막과 펩타이드막의 상대적인 전자 밀도 비교.

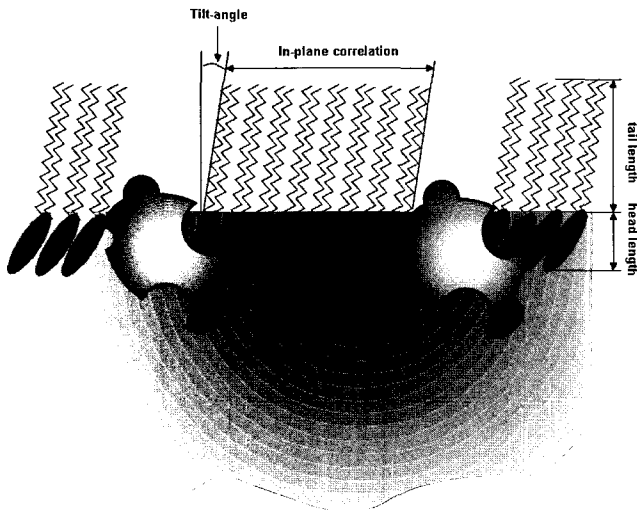


그림 6. 인지질단분자막에 단백질이 결합되었을 때 특정 가능한 길이의 dimensions.

우 높은 산란길이밀도의 차이를 갖는 중성자 반사율 장치가 활용된다. 특히 물의 표면에 생성된 단분자막은 D<sub>2</sub>O를 사용한 경우( $\rho^s = 6.67 \times 10^{-6}$  nm) 매우 높은 산란길이 밀도를 갖게되어 생체막이나 단백질보다 약 6배 이상의 높은 밀도 대비(density contrast)를 이용하여 다양한 환경에서의 단백질 흡착 및 구조 측정 실험이 가능하다. 또한 중성자분석에서 매우 중요한 기술중에 하나는 Null reflecting water(NRW)라는 배합으로 D<sub>2</sub>O 8.1%를 혼합한 H<sub>2</sub>O 사용하게 되면, 산란길이밀도가 0이 되어 중성자는 액체계면을 마치 air상태(진공상태)로 인지하여 액체표면에 있는 단분자막의 구조에 매우 민감한 결과를 보여준다.

따라서 그림 6에서 보는 것과 같이 인지질 생체막의 단일 분자막이 이루어 졌을 때, X-ray를 이용해서는 생체막의 headgroup-tailgroup에서 달라지는 전자밀도 계면의 거칠기, 두께, 생체막의 전자밀도 등을 구할 수 있으며, 중성자 반사율을 이용해서는 deuterated(D-H 치환)된 tailgroup의 구조를 매우 정밀하게 측정할 수 있다.

이때, headgroup의 정보는 X-선 반사를 측정을 통해서, 또한 tailgroup의 정보는 중성자선을 이용하여 동시에 2 nm 이내의 박막의 정보를 정확하게 알아낼 수 있다. 또한 tail과 headgroup의 이론적 길이정보 대비 두께의 비를 통하여 tailgroup의 tilt angle은 표면 산란에 의하여 얻어지는 매우 중요한 분석결과에 하나로 널리 활용된다.

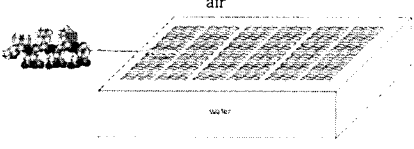
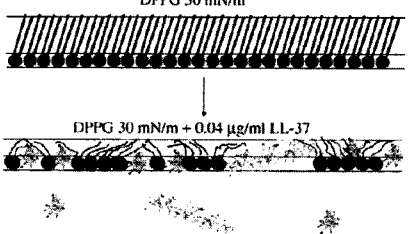
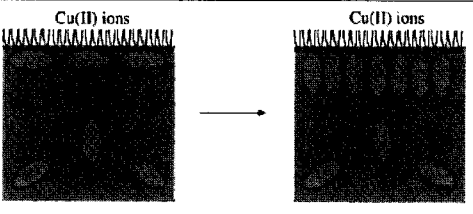
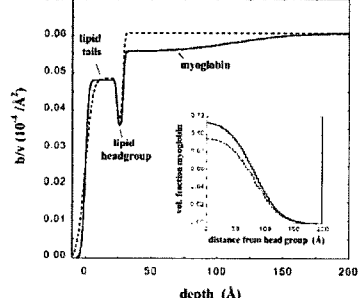
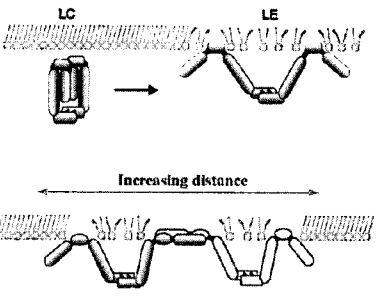
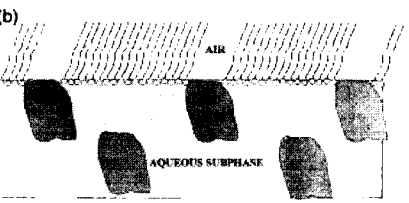
또한 Grazing-incidence X-ray diffraction(GIXD)의 기술을 반사율측정과 동시에 적용하게 되면 인지질 생체막의 in-plane에서 형성되는 crystalline 구조의 정보를 air/water interface에서 얻을 수 있다.<sup>25</sup> 각 인지질 분자들이 close-packing되어서 얻어진 육사각의 형태에서 단백질의 흡착이나 headgroup의 charge의 변화에 의하여 distorted hexagon의 형태로 변화하는 것을 실시간으로 측정이 가능하며, 또한 in-plane의 correlation length를 Lorentzian peak으로 fitting하게 되면, 표면의 도메인이 형성되는 과정의 정보를 유추해 낼 수 있다. 그림 6에 주어진 액체계면에서 얻어진 in-plane 표면의 정보(ex, in-plane correlation length)는 위의 그림 4의  $q_{xy}$ 의 air/water의 critical angle에 고정된 검출기의 intensity를 통하여 얻게 된다.<sup>24</sup>

### 5. 바이오 계면의 X-선 및 중성자 반사율 분석 : 펩타이드 및 단백질의 흡착 구조

단백질과 단백질을 이루는 알파 헬릭스(alpha-helix)나 베타 시트(beta-sheet) 형태의 짧은 펩타이드는, 앞서 세포막의 구조에서 나타난 것과 같이 계면에서 세포막을 투과하거나 자기 조립하여 필라멘트나 네트워크를 형성하는 것으로 알려져 있다. 계면에 다양한 receptor나 인지질막의 charge의 변화, 그리고 계면의 밀도나 tailgroup간의 상호작용에 의하여 단백질이나 펩타이드체의 흡착은 크게 변화할 수 있으며, 이를 조절하면 특정 기질에 단백질을 이용한 extracellular matrix나 cytoplasmic fiber 등을 인공적으로 형성하여 세포의 재생을 통한 tissue-engineering 그리고 세포막의 투과를 통한 drug-delivery system 등에 활용할 수 있다. 이와 같은 연구의 방향에서 중성자 반사율(NR)과 X-선 반사율(XR)을 이용하여 연구한 주요한 결과의 사례를 소개하면 다음의 표 2에 나와 있는 것과 같다.

$\beta$ -hairpin peptides의 경우 계면에서 친수성면과 소수성면이 각각 형성되면서 막의 형태로 조립되게 된다. 이때 접하고 있는 체액내의 이온의 농도 및 온도 등에 의하여 구조를 이루고 있는 수소결합과 정전기적 인력에 변화에 의하여 펩타이드체의 구조에 변화가 오게 되고, 또한 이를 이해하면서 단백질의 3차원구조의 변형을 이해할 수 있다. 위의 표에서 나타난 것과 같이 물위에서  $\beta$ -sheet 형태로 배향된 펩타이드체를 중성자 반사율 장치로 분석한 결과가 예 3-1에 보고되어 있다. 이때 중성자 반사율 장치를 이용하였는데, 주목할 점은 앞에서 설명한 Null reflecting water의 기술을 이용하여 sub-phase에 의한 incoherent한 background를 제거하고 non-deuterated된 peptide의 monolayer 구조를 1 nm 이내의 정밀도로 정량적으로 분석할 수 있었다. 이와 반대로  $\alpha$ -helix 구조를 띤 펩타이드의 경우는 인지질막을 매우 효과적으로 공격하여 세포막의 표면에 구멍을 내어 세포내로 뚫고 들어가거나 세포막 표면에 치명적인 상처를 내어 세포를 죽일 수 있는 항균작용등을 일으키는 주요한 역할을 한다. 예 3-2는 이러한  $\alpha$ -helix 구조를 띤 펩타이드가 세포막

표 2. 단백질 및 펩타이드가 세포막에 흡착된 구조를 산란측정 한 주요 예<sup>26-31</sup>

구분	연구분야	주요분석 tool	Reference	주요연구결과
예 3-1	$\beta$ -hairpin peptides의 흡착	NR	<i>JACS</i> , <b>125</b> , 3751 (2003)	
예 3-2	펩타이드의 인지질막 흡착에 따른 인지질막의 구조 변화	XR	<i>Biophysics J.</i> , <b>90</b> , 1275 (2006)	
예 3-3	Myoglobin의 lipid 흡착	NR	<i>Langmuir</i> , <b>21</b> , 6815 (2005)	
예 3-4	흡착된 단백질의 Segment 농도 Profiling	NR XR	<i>Langmuir</i> , <b>18</b> , 3754 (2002)	
예 3-5	인지질막의 단백질의 흡착에 따른 거동변이	Langmuir isotherm	<i>PNAS</i> , <b>96</b> , 12518 (1999)	
예 3-6	단백질의 인지질막 흡착 구조	XR	<i>PNAS</i> , <b>96</b> , 2608, (1999)	

을 공격할 때, 다양한 세포막의 headgroup의 종류에 따라서  $\alpha$ -helix 펩타이드와의 상호작용 등을 X-선 반사율 장치를 이용하여 보여주고 있다. 본 실험에 이용된 LL-37 펩타이드는 항균작용에 매우 효과적인 특성을 보이고 있으며, 본 연구를 통하여 세포막(gram

negative, gram positive)의 종류에 따라서 균의 종류를 선택적으로 공격하는 결과를 보여주고 있다. 유사한 연구는 최근 triblock 고분자인 Poloxamer (PEO-PPO-PEO block 공중합체)의 인지질막 흡착 연구를 통한 유사 생체고분자의 세포표면 흡착 연구를 X-선 반사율,

**표 3.** NR을 이용한 생체유사 고분자 단분자 막의 구조 측정을 보여주는 결과

연구분야	주요분석 tool	Reference	주요 연구 결과
Polyelectrolyte 고분자의 계면 흡착	NR, XR	Macromolecules 2000, 33, 6126	Salt의 양에 따른 polyelectrolyte 고분자의 계면 거동
Polymer modified 인지질막의 계면거동	NR	Biophysical J. 1998, 2352	Bio-fouling surface
Polymeric 인지질 이중막 구조	NR	Langmuir 2003, 19, 7688	cross-linked 인지질막 구조 분석
Random copolymer의 단분자막 표면의 선택적 흡착	NR	J. Phys. Chem. B, 2004, 108, 11442	선택적 표면 흡착
모델 세포막과 인지질 vesicle의 상호작용	NR	Langmuir 2005, 21, 7912	charge에 따른 표면 흡착
인지질막의 액체-고체 계면 구조	XR	Phys. Rev. Lett. 2005, 94, 238104	XR 및 NR의 결과 비교
Gemini surfactants의 단분자 구조	NR, MD	J. Phys. Chem. B, 110, 221136 (2006)	NR결과의 시뮬레이션
SAM 단분자막과 물과의 상호작용	NR	Langmuir 2003, 19, 2284	SAM 과정에서 물의 분포 분석
흡착된 인지질 이중막에서의 물의 분포	NR, AFM	Langmuir 1996, 12, 1343	SAM 인지질막의 물의 분포
다공성 실리카위에 분포된 인지질 이중막 구조	NR, TEM	Langmuir 2005, 21, 2865	다양한 기질위에 분포된 인지질막 구조 분석
fibrinogen 및 알부민의 계면 흡착 구조	NR	JCIS, 285, 2005, 458	pH에 따른 단백질의 흡착 구조

GIXD를 통하여 얻어진 결과도 또한 보고된 바 있다.<sup>22</sup>

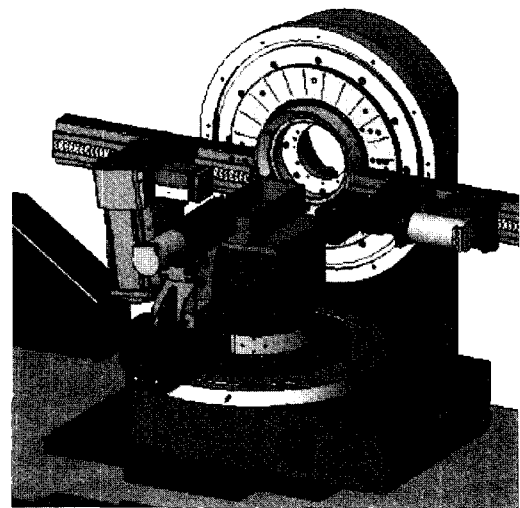
다양한 crystalline segment를 갖는 거대한 펩타이드체의 단백질은 그 종류나 생체에서의 역할이 매우 다양하다. 다양한 질병의 발병과 밀접한 관계가 있으며, 특히 세포막에 포함된 rhodopsin과 같은 단백질들은 빛이나 신호의 전달, 그리고 에너지의 전환 등의 역할을 하게 된다. helical 도메인으로 이루어진 myoglobin도 단일한 체인으로 약 153개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 산소의 결합에 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 myoglobin의 경우 세포내의 금속이온들과 선택적인 binding을 하게 되는데, 계면에 존재하는 Cu나 Ni 이온들이 myoglobin의 선택적인 흡착을 유도하게 되는데, 이 과정을 시간에 따라 측정하여 약 4 nm의 단일 단백질 막을 형성하는 과정을 중성자 반사율 장치를 통하여 비교한 결과가 예 3-3에 보여주고 있으며, 예 3-4는 이때 매우 정밀하게 인지질막의 tail/headgroup막에 depth profiling의 결과와 함께, Cu 이온을 통한 단백질의 selective adsorption이 가능함을 보여주고 있다.

세포외막에 존재하는 fibronectin과 같은 단백질은 특정 인지질막의 표면에서 fibril 네트워크를 구성하는 대표적인 extracellular 단백질이다. 이때 세포막의 기본 구성을 이루는 인지질막이 fibril 구조를 이루는 과정에서 표면에 tensile force 등에 변화를 일으키게 되는데 이 과정을 Langmuir 기술을 이용하여 분석한 결과를 보여주고 있으며(예 3-5), 이러한 단백질들의 folding과 계면 흡착을 X-선 반사율 측정을 통해서 실시간 분석한 결과가 예 3-6에 보여주고 있다. 이때 단백질의 흡착에 의하여 엔자임과의 반응이 유도될 수 있으며, 세포막에 구멍을 내는 모식적인 그림을 연구 결과에 의하여 확인할 수 있다.

그 외에도 물과 접한 계면에서 이온화가 되거나 용해되어서 이와 유사한 생체분자의 거동을 이해하는데 도움이 되는 실험 결과들이 표 3에 정리되어 있다. 특히, 표 3은 중성자 반사율장치를 사용하여서 액체/고체, 기체/액체의 계면에 sub-nm 이내의 depth profiling과 kinetics를 보여주는 결과들로 선택하였음을 밝혀둔다.

## 6. 국내의 연구 방향

생물학적 반응들은 미세한 생체분자들과 이를 둘러싸고 있는 외부 환경의 미세한 조건의 변화에 의하여 구조적, 물리, 화학적 특성이 동시에 작용하는 복합적인 과정이다. 따라서 단백질과 DNA 같은 분



**그림 7.** Cu K $\alpha$  소스를 이용한 바이오계면측정용 반사율-회절 동시측정 장치의 개념도(서강대-Bruker 공동설계).

자체의 액체에서의 거동은 이를 인공적으로 모사한 생체고분자의 모델연구로부터 많은 핵심적인 정보를 얻고 있다. 분자들의 확산, 배향 및 온도나 이온에 따른 구조적 변형등은 polyelectrolyte의 제어된 환경에서의 연구를 통하여 그 유사성이 확인된 바 있다. 본 논문에서 소개된 Langmuir 박막기술 및 자기조립에 이루어진 다양한 생체모사 박막의 구조에 관한 연구와, 나아가 단백질의 흡착 및 탈착하는 반응 및 구조를 실시간 *in-situ*로 측정하는 기술들은 앞에서 서술한 바와 같이 고분자 구조연구에서 발전된 기술을 이용한 결과<sup>1</sup> 이라고 단언할 수 있다. 특히, X-선과 중성자 산란기술의 경우, 고분자 구조와 같이 구조적 제어가 가능한 시스템에서 확립된 모델을 이용하여 생체분자에 이용하여 최근 급격한 기술의 확산을 보여 주고 있다.

바이오 구조체의 측정기술은 크게 microscopic 기술로 얻을 수 있는 정보와 scattering으로 얻을 수 있는 정보로 나눌 수 있는데, 국내에서는 전자의 기술은 상당한 수준에 올라와 있는 한편, 산란에 의한 바이오 계면 측정의 분야는 매우 취약하다. 한 시스템의 계면 나노 구조 및 특성을 완벽하게 이해하기 위해서는 동일한 시스템에 다양한 측정 기술을 동시에 적용시킬 수 있는 복합적인 기술 적용이 필요하다. X-선-중성자-레이저로 나눌 수 있는 다양한 입사빔과, depth profiling, 2차원 평면구조 및 정량 분석법 등을 다양하게 적용하기

위해서는, 이러한 기술의 개발과 장치분야 인프라에 많은 투자가 필요하다. 이미 포항기속기에 여러대의 X-선 반사율 장치를 비롯한 산란장치들은 바이오계면 분석에 많이 활용되고 있으며, 하나로에 설치된 중성자 반사율 장치(REF-V)는 다양한 분야의 박막시료의 표면 및 경계면의 비파괴적인 나노 구조 측정 기술로 활용되고 있다.<sup>32</sup> 올해 8월에 미국 Brookhaven National Lab에서 도입하여, 서강대학교와 하나로에 연구팀이 설계변경을 통해 설치한 새로운 액체 및 고체 계면 겸용 중성자 반사율 장치(REF-H)가 새로이 가동에 들어가게 된다.<sup>33,34</sup> 또한 서강대학교 바이오융합 사업단에서는 액체 계면의 X-선 분석을 위하여 국내에서는 최초로 반사율과 GIXD가 가능한 **그림 7**과 같은 장치를 설계하여 최근 제작중에 있다. 또한, 고분자 등 유기 소재 구조 측정에 유리한 냉중성자 사업이 끝나는 2010년 경에는 생체구조의 계면 측정에 있어 세계적인 성능을 갖춘 수평형 장치를 국내에서는 최초로 보유하게 된다.<sup>35</sup> 이러한 장치의 개발과 더불어, 국내에서도 중성자 및 X-선을 이용한 반사율 측정 장치를 이용하여, 많은 생체 고분자 및 바이오 박막 분야의 분석 연구가 활성화되기를 기대한다.

**감사의 글** : 본 논문에 인용된 자료 조사를 위하여 과학기술부의 원자력 연구 개발 사업 및 KAIST-BAERI, 그리고 과학기술부 21세기 프론티어 연구개발사업인 ‘나노소재기술개발사업단’의 지원(과제번호 : 06K1501-01311)에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. K. Shin, X-ray and Neutron Reflectivity Techniques for Characterization of Polymer Thin Films, *Polymer Science and Technology*, **15**, 750 (2004).
2. T. P. Russell, *Mat. Sci. Rep.*, **5**, 171 (1990).
3. K. Shin and J. Lee, *Physics & High Technology*, Feb/Jan, 27 (2002).
4. J. Penfold, *et al.*, *J. Chem. Soc., Faraday Trans*, **93**, 3899 (1997).
5. K. Bae, H. Lee, and K. Shin, “Nano-Characterization Techniques for Biological Membranes and Molecular Structures”, *Nanotechnology Report 2006*, KIST, (2006).
6. K. Shin, *Specialty Chemical*, **90**, 19 (2006).
7. H. Lodish *et al.*, *Molecular Cell Biology*, 5th edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2004.
8. R. Simon, E. Sackmann, *Physical Chemistry of Biological Interface*, Baszkin and W. Norde, Eds, Marcel Dekker, New York, 2000.

9. J. M. Kim, H. S. Jung, J. W. Park, T. Yjikimasa, H. Oka, H. Y. Lee, and T. Kawai, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 2358 (2005).
10. J. M. Orban, K. M. Faucher, R. A. Dluhy, and E. L. Chaikof, *Macromolecules*, **33**, 4205 (2000).
11. E.-L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub, *Science*, **264**, 415 (1994).
12. G. Wiegand, T. Jaworek, G. Wegener, and E. Sackmann, *Langmuir*, **13**, 3563 (1997).
13. T. B. Huff, M. N. Hansen, Y. Zhao, J.-X. Cheng, and A. Wei, *Langmuir*, **23**, 1596 (2007).
14. H. Brooks, B. Lebleu, and E. Vives, *Adv. Drug. Delivery Rev.*, **57**, 559 (2005).
15. E. Vives, *J. Controlled Release*, **109**, 77 (2005).
16. N. J. Jain, P.-A. Albouy, and D. Langevin, *Langmuir*, **19**, 8371 (2003).
17. G. Baneyx and V. Vogel, *PNAS*, **96**, 12518 (1999).
18. D.W. Grainger, A. Reichert, H. Ringsdorf, and C. Salessse, *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 365 (1990).
19. M. C. Rheinstadter *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, **93**, 108107 (2004)
20. D. J. Doshi *et al.*, *Langmuir*, **21**, 2865 (2005); C. E. Miller *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, **94**, 238104 (2005)
21. D. Schwendel, *et al.*, *Langmuir*, **19**, 2284 (2003); G. Fragneto *et al.*, *Langmuir*, **16**, 4581 (2000).
22. G. Wu *et al.*, *Biophysics. J.*, **89** 3159 (2005).
23. M. Tolán, *X-ray scattering from soft-matter thin films*, Springer, Berlin, 1999.
24. P. Dutta, *Current Science*, **78**, 1478 (2000).
25. T. L. Kuhl *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7682 (1999).
26. J. R. Lu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3751 (2003).
27. F. Neville *et al.*, *Biophysics. J.*, **90**, 1275 (2006).
28. M. S. Kent *et al.*, *Langmuir*, **21** 6815 (2005).
29. M. S. Kent, *et al.*, *Langmuir*, **18**, 3754 (2002).
30. G. Baneyx and V. Vogel, *PNAS*, **96**, 12518 (1999).
31. D. Gidalevitz, Z. Huang, and S. A. Rice, *PNAS*, **96**, 2608, (1999).
32. J. Lee *et al.*, *Journal of the Korean Vacuum Society*, **14**, 132 (2005).
33. C. Lee *et al.*, *Journal of the Korean Vacuum Society*, **14**, 119 (2005).
34. O.-S. Kwon *et al.*, *Thin Solid Films*, **515**, 5705 (2007).
35. C. Lee *et al.*, *Physica B*, **385** (2006).