

잔류 유기 용매가 모델 세포 지질막의 상전이, 상전이 엔탈피 및 상전이 온도에 미치는 영향

안은설·최재순·이동국[†]

서울과학기술대학교, 에너지바이오대학, 정밀화학과
(2014년 5월 12일 접수, 2014년 5월 14일 수정, 2014년 5월 29일 채택)

Effects of Residual Solvents in the Phase Transition, Transition Enthalpy, and Transition Temperature of Phospholipid Membranes

Eun Seol An, Jae sun Choi, and Dong kuk Lee[†]

Department of Fine Chemistry, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received May 12, 2014; Revised May 14, 2014; Accepted May 29, 2014)

요약: Phosphatidylcholine (PC) 인지질로 이루어진 모델 지질막은 세포막을 대신하여 지질막과 여러 분자간의 상호 작용을 연구하는 생물리 연구에 흔히 이용된다. 이들 모델 지질막을 제조하는 과정에서 지질 분자나 지질막과 작용하는 분자를 용해하는데 여러 가지 유기 용매가 이용된다. 용해 과정에 사용된 용매는 물론 제거되거나 소량 사용되기 때문에 실험 결과에 미치는 영향이 미미한 것으로 간주되어 보통 무시된다. 하지만 용매의 종류에 따라 소량의 용매가 용질 분자에 남아서 실험 결과에 영향을 미칠 수 있다. 본 연구에서는 시차열분석기와 인(³¹P) 고체 핵자기 공명 실험을 통하여 유기 용매가 지질막의 상변이와 지질막의 물리적 성질에 미치는 영향을 조사하였다. 클로로폼에 용해한 지질의 경우 비교적 쉽게 제거되었으며, 에탄올, trifluoroethanol (TFE) 또는 trifluoroacetic acid (TFA)에 용해한 분자들의 경우 용질에 잔류하여 지질과 용질의 상호작용시 지질의 물리적 성질에 영향을 미치는 것이 확인되었다. 따라서 지질막과 상호작용하는 분자들의 연구에서 용매의 선택이 중요하며 비록 미량이 사용되었을지라도 시료 제조와 실험 결과의 해석에 각별한 주의가 필요함을 보여 준다.

Abstract: Lipid membranes composed of phosphatidylcholine (PC) are used in biophysical study to mimic cellular membranes and interactions between the membrane and chemicals, where organics solvents are used in dissolving lipids or chemicals. Later, solvents are removed from the solution under nitrogen gas at room temperature, followed by the further removal of the solvent at vacuum condition for several hours. In this process, some solvents are easily removed under described conditions above and others are required more severe conditions. In this study, ³¹P solid-state nuclear magnetic resonance (SSNMR) techniques and differential scanning calorimetry (DSC) were used to see any changes in the line shapes of ³¹P NMR spectra of multilamellar vesicles (MLVs) samples of POPC and in the phase change temperature of multilamellar vesicles (MLVs) of DPPC in DSC thermogram with or without any residual solvents. The thermodynamic parameters associated with the solvents did exhibit noticeable changes depending on solvent types. Thus, it is concluded that solvents should be carefully chosen and removed completely and experimental results should also be interpreted with caution particularly for the experiments investigating lipid phase changes and related topics.

[†] 주 저자 (e-mail: dongkuk@snut.ac.kr)

Keywords: Lipid phase, Differential Scanning Calorimetry (DSC), lipid membrane, Solvent effects, ^{31}P solid-state Nuclear Magnetic Resonance (^{31}P SSNMR).

1. 서 론

여러 실험에서 물에 녹지 않는 물질을 용해시키거나 합성한 물질을 정제하는 용도로 다양한 종류의 용매가 사용된다. 물론, 용매가 실험 결과에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 극소량을 사용하거나 물리적인 방법으로 그들을 제거한 후 계획된 실험을 진행한다. 그리고 연구 주제나 실험 목적에 따라서 일반적으로 미량의 잔류 용매는 실험 결과에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 간주하여 무시하는 경향이 있다. 하지만, 세포 지질막과 서로 상호 작용하는 유기 분자 또는 펩타이드와 단백질을 포함한 생체 분자의 구조 분석 및 관련 연구에서 잔류 용매 분자들이 지질막의 물리적 성질 변화에 중요한 역할을 할 수 있다. 이와 관련하여, Kara J. Tierney와 그의 동료들은 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) 모델지질막에 스테를을 포함 시킨 후 지질막의 물리적 강도 및 형태에 관한 연구를 진행하여 지질막의 탄성계수가 변하는 것을 관찰하였다[1]. 그리고 MacDonald와 Goldfine은 세포 성장과정에서 여러 유기 용매의 영향을 연구하여 용매로 인하여 세포의 지질 구성 성분이 바뀌었고, 이는 지질막상의 라멜라(lamellar) 상과 비라멜라(nonlamellar) 상 사이의 평형이 바뀌는 세포 반응을 나타낸다는 사실을 발표하였다[2]. 또한 용매로 사용된 알코올 분자들이 생체 지질막의 두께나 탄성에 영향을 미칠 수 있다는 사실도 알려져 있다[3-5]. 펩타이드나 단백질 시료의 경우 특정 용매가 이들의 2차 구조를 유도하거나 특정한 2차 구조를 가지도록 한다는 실험 결과들이 이미 보고되어 있다[6-10]. 펩타이드나 단백질 분자는 이를 구성하는 아마노산의 친수성과 소수성 정도에 따라서 물에 대한 용해도의 차이가 매우 크다. 일반적으로 이들 시료는 분자량이 증가하거나 소수성 아마노산의 비율이 증가할수록 물에 대한 용해도는 감소하며 유기 용매에 용해하여야 한다. 이 과정에서 펩타이드나 단백질분자가 가지는 전하 특성과 용매 분자의 상대적인 극성 정도에 따라서 에너지적으로 가장 안정한 구조를 취하기 위하여 분자의 형태를 변형시키는 것은 자연적인 과정이라고 할 수 있

다. 지질막-생체 분자간 상호작용과 관련된 연구에는 생물리 화학 측면에서 두 가지 중요한 사실이 포함된다[11-16]. 우선 생체 분자의 구조 분석은 이들의 구조-기능 상관관계를 이해하는데 있어서 가장 중요한 요소이며, 용액 상태나 지질막 상태와 같은 환경 변화에 따라서 능동적으로 다른 형태를 가지는 생체분자의 유동적인 구조의 이해는 관련 연구가 추구하는 최종 목표이다. 두 번째는 항균 펩타이드의 작용 기작을 규명하기 위한 연구나 당노나 치매와 같은 아밀로이드 펩타이드로 생기는 질병 진행 과정을 연구한 실험 결과들에 따르면 관련 펩타이드와 세포 지질막사이의 상호 작용이 항균펩타이드의 작용기작이나 질병 진행에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다[17]. 하지만 이런 분야의 연구에서 실질적인 문제점은 관련 펩타이드의 용해도이다. 한 예로서, 아밀로이드 관련 펩타이드는 수용액 상태에서 매우 빠르게 불용성 침전물을 형성하기 때문에 실험의 진행에 장애 요소로 작용한다. 따라서 펩타이드를 용해시키기 위하여 여러 가지 용매가 사용되고 있다. 그런데 이 과정에 사용되는 용매 분자가 시료에 잔류하여 지질막과 상호 작용을 알아보기 위한 실험 과정에 영향을 미칠 경우 실험 결과의 해석에 커다란 오류를 제공할 수 있다.

본 연구에서는 시차열분석기(differential scanning calorimetry, DSC)와 ^{31}P 고체 핵자기 공명 분광(solid-state nuclear magnetic resonance, SSNMR) 실험을 이용하여 에탄올, 클로로폼, trifluoroethanol (TFE) 및 trifluoroacetic acid (TFA)와 같은 용매 분자가 지질막에 잔류할 경우 이들로 인한 지질막의 상변화와 상변화 온도에 미치는 영향을 알아보았다. DSC는 어떤 물질의 상전이와 함께 수반되는 엔탈피 변화나 상전이가 일어나는 온도를 측정하여 물질의 물리화학적 성질을 이해하는데 중요한 열역학적 자료를 제공한다[18-20]. 생체 세포막은 다양한 종류의 지질과 막 단백질로 이루어진 이중층 구조로 일반적인 조건하에서 액체 결정 상태를 유지한다. 이들 결정 상태는 외부 조건에 따라서 변하면서 다양한 기능을 수행한다. DSC 실험은 생체 세포막의 모델로써 세포막 구성 성분 중 가장

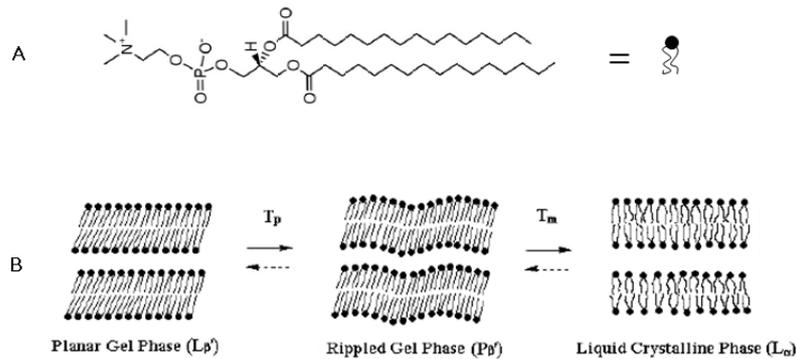


Figure 1. DPPC molecular structure(A) and illustrated DPPC bilayer morphologies of the different physical phases. T_p and T_m are pretransition and main transition temperatures, respectively. Solid arrows indicate heating transitions and dotted arrows indicate cooling transitions [14].

많은 양을 차지하는 phosphatidylcholine (PC) 중 하나인 DPPC 인지질로 이루어진 LUVs 형태로 진행하였다. DPPC 지질의 경우 지질 분자의 형태에 따라 다양한 온도에서 상전이가 일어난다(Figure 1). 충분히 수화된 DPPC 지질은 35.5 °C 이하의 젤 상(L_b)을 유지하지만, 이 온도 보다 증가하면 ripple 상으로 바뀐다(pretransition). 그리고 온도가 41.3 °C 이상으로 올라가면 젤 상(L_b)에서 액체 결정상(L_a)으로 상변화가 일어난다(main transition)[21-22]. 따라서 지질에 다른 물질이 첨가될 경우 이들 물질과 지질 분자 사이의 상호작용으로 인하여 상 변화가 일어나는 온도가 바뀌거나 새로운 상이 생겨난다[23]. 그리고 지질막의 상변화나 지질분자의 배향 또는 운동성 변화는 ^{31}P 고체핵자기공명 실험을 통하여 확인하였다. PC 인지질 분자의 친수성 부분에는 핵자기공명 실험에 활성인 ^{31}P 원소가 있기 때문에 지질막과 다른 물질간 상호작용으로 인한 지질막의 물리적인 상변화나 구조 변화 또는 지질막과 작용하는 물질의 작용기작 연구에 다양하게 이용되고 있다[23-24]. 특히, 인지질로 이루어진 multilamellar vesicles (MLVs)이나 large unilamellar vesicles (LUVs) 형태의 ^{31}P 고체핵자기공명실험은 지질의 물리적인 상(phase)이나 지질포의 크기에 따라서 독특한 ^{31}P 스펙트럼을 제공하기 때문에 지질막 관련 연구에 많이 이용된다[21-22,25].

2. 시약 및 실험 방법

2.1. 시약 및 시료 제조

본 실험에 사용된 클로로폼, 에탄올, TFE, 그리고 TFA는 Aldrich-Korea로부터 구입하였으며, 사용된 인지질(1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC)와 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC))은 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)로부터 구입하였다. 모든 시약은 별도의 정제 과정 없이 실험에 사용되었다. 지질포의 제조는 실험에 사용된 지질을 유기 용매에 녹인 후 질소 가스하에 건조시키고, 이어서 진공상태에서 일정 온도하에 10 시간 건조하였다. 지질 건조에 사용된 진공오븐(DZF-6030A, WWW.NEURONFIT.COM)은 ULVAC (ULVAC KIKO Inc., Japan) 진공 펌프를 사용하였다. 그 다음, 유기 용매를 제거한 지질에 일정량의 완충용액을 첨가하여 vortexer를 이용하여 MLVs를 제조하였다.

2.2. 시차 열분석 실험(differential scanning calorimetry, DSC)

시차 열분석 실험은 NanoDSC (TA instruments, USA)를 이용하여 진행하였으며, 모든 실험 데이터는 NanoDSC와 함께 제공된 프로그램을 이용하여 분석하였다. 모든 MLVs 용액은 실험 전 15 min 간 진공하에서 산소를 제거한 후 DSC 기기에 채운 뒤 실험을 진행하였다. DSC 실험에서 시료의 가열 속도는 1 °C/min였다.

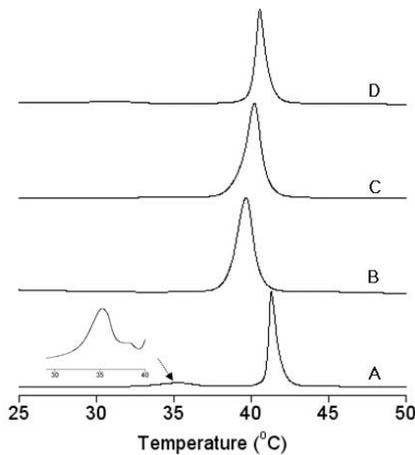


Figure 2. DSC heating thermograms of DPPC MLVs; Pure lipids (A), treated with 10 mol% resveratrol dissolved in 2 : 3 Ethanol : water (B), prepared with DPPC and 10 mol% resveratrol (C), treated with 2 : 3 ethanol : water (D).

2.3. 고체 핵자기 공명 실험(solid-state nuclear magnetic resonance, SSNMR)

모든 고체 핵자기 공명 실험은 Varian Mercury 400 MHz 액체/고체 겸용 기기에서 진행하였으며, ^1H 과 ^{31}P 의 공명 주파수는 각각 400.13와 161.84 MHz 이었고, magic angle spinning (MAS)용 double resonance probe를 이용하여 시료의 회전 없이 정지상으로 실험을 진행하였다. ^{31}P chemical shift 스펙트럼은 spin-echo sequence를 이용하여 37 °C에서 진행하였다[20-21]. ^{31}P 에 대한 90 ° 펄스 길이는 4.3 μs 이었고, 30 kHz의 펄스 세기를 이용하여 proton decoupling하였다. ^{31}P 스펙트럼은 85% H_3PO_4 용액의 NMR 피크를 0.0 ppm으로 하여 reference하였다. 모든 NMR 스펙트럼은 vnmrJ 프로그램을 이용하여 FT를 진행하였으며, 최종 그림은 Kaleidagraph (YessWorld, PA, USA, Ver. 4.0)를 이용하여 그렸다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시차 열분석 실험

모델 지질막의 상 변화에 따른 지질 분자의 배열 형태는 Figure 1에서 보여주는 것과 같으며, 지질의 종류에 따라서 상변화 온도와 상의 종류는 다르게 나타날 수 있다[13-14]. 따라서 지질의 상변화가 일어나는 온도 관찰은 세포막과 작용하는 분자의 형태나 전하 등

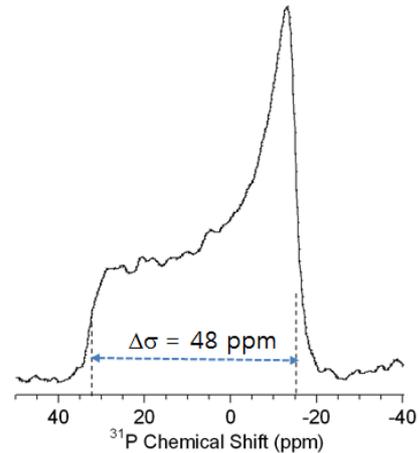


Figure 3. ^{31}P spectra of POPC MLVs prepared using chloroform and tris buffer. ^{31}P chemical shift anisotropy (Ds) is 48 ppm, which is a typical value for MLVs composed of PC lipids.

물리화학적 특성에 따른 세포막과 상호 작용 과정을 이해하고 연구하는데 유용한 자료를 제공한다. Figure 2는 DPPC 지질로 이루어진 네 가지 MLVs 시료에 대한 DSC thermograms을 보여주고 있다. 먼저 순수한 DPPC의 DSC 실험을 진행하여 상변이 온도(T_m)를 확인하였다(Figure 2A, $T_m = 41.4$ °C). 그리고 DPPC 지질막의 상변이에서 에탄올의 영향을 알아보기 위하여 다음과 같은 DSC 실험을 진행하였다. 비교 시료로써 에탄올에 용해한 resveratrol 용액을 사용하였고, DPPC 지질은 클로로폼에 용해하였다. Resveratrol 분자를 포함하는 DPPC 지질 시료에 대한 실험은 다음 두 가지 방법(시료 B 와 시료 C)으로 준비하여 진행하였다. 시료 B는 9 : 1 DPPC : resveratrol이 되도록 2 : 3 에탄올 : 물 수용액에 용해한 resveratrol 용액으로부터 취하여 용매(클로로폼)를 제거한 1 mg DPPC 지질 시료에 첨가하고 추가적으로 완충용액을 첨가하여(총 지질 용액 부피=1 mL) MLVs를 제조하였다(Figure 2B). 시료 C는 클로로폼에 용해한 DPPC 지질(1 mg) 용액과 에탄올에 용해한 resveratrol 용액(10 mol%) 일정량을 각각 취하여 혼합한 후 질소 가스하에서 용매를 제거하고, 이어서 진공 오븐에서 7 h 동안 잔류 용매를 제거한 후 완충 용액을 1 mL를 첨가하여 MLVs 시료를 제조하였다(Figure 2C). 그리고, DPPC 지질막의 상변이에서 순수한 에탄올의 영향을 알아보기 위하여 클로로폼을 제거한 DPPC 지질에 2 : 3 에탄올 : 물 수용액을 일정량(시

료 B를 제조하는 데 사용된 양과 동일 부피)을 첨가하고 나머지는 완충용액을 첨가하여 1 mL로 하여 MLVs를 제조하여 DSC 실험을 하였다(Figure 2D). 위의 네 경우에 대한 DSC 실험 결과(Figure 2A ~ D)를 비교하여 보면 시료에 따라서 상전이 온도(T_m)가 변하는 것을 쉽게 확인할 수 있다. 또한, 순수한 DPPC 지질에서 35.5 °C 근처에서 일어나는 pretransition이 에탄올 또는 resveratrol이 첨가될 경우 사라진 것을 확인할 수 있다. 추가적으로 상전이가 일어나는 온도 범위로 부터 상전이에 수반되는 지질분자들의 cooperativity를 알 수 있다. 이들 시료로부터 DPPC 지질막의 상전이 온도가 가장 큰 순으로 비교하여 보면 B 시료가 가장 크고, 이어서 C 시료와 D 시료 순이었다. 그 이유는 B 시료의 경우 DPPC 지질막의 상전이에 resveratrol 분자와 에탄올이 모두 영향을 주었기 때문인 것으로 판단된다. C 시료의 경우는 B 시료의 경우와 비교하여 동일한 양의 resveratrol 분자가 포함되었으나, 에탄올의 일부는 제거되고 잔류하는 미량의 에탄올의 영향으로 B 시료의 경우보다 다소 낮은 영향을 미친 것으로 판단된다. D 시료의 경우는 resveratrol 없이 에탄올 분자의 영향만을 받아서 B 시료와 C 시료의 경우보다 더 낮은 영향을 미친 것으로 설명할 수 있다. 본 연구 결과와 비교하여 Kara J. Tierney와 그의 동료들이 진행한 DPPC-스테롤 모델지질막의 물리적 강도 및 형태에 관한 연구에서 스테롤이 포함된 지질막과 포함되지 않은 지질막을 에탄올에 노출 시킬 경우 지질막의 물리화학적 성질 변화를 측정하였다. 지질을 에탄올에 노출 시킨 이유 중 하나는 음식의 발효과정에 상당량의 에탄올이 생성되기 때문에 이에 대한 효과를 알아보기 위함이었으며, 알코올 분자가 지질막의 탄성계수를 감소시킨다는 사실을 보여주었다[1]. 또한, 용매로 사용된 에탄올의 경우 지질막의 두께를 감소 시키거나 탄성을 변화 시켜서, 나아가 지질막의 물질 투과에 영향을 미칠 수도 있다는 실험 결과도 보고된 바가 있다[2-5]. 이런 결과와 유사하게 잔류 용매로써 에탄올 분자가 모델지질막의 상변화에 미치는 과정은 지질막을 이루는 DPPC 분자의 친수성 부분에서 인접한 분자와 형성한 수소결합이 방해받아서 생기는 결과로 볼 수 있다. 특히 DPPC 지질의 상전이(T_m) 전에 일어나는 pretransition은 지질막 표면의 ripple phase와 관련이 있기 때문에 지질분자의 친수성 부분에서 위치하는 수소 결합의 방해는

DSC스펙트럼의 pretransition 시그널이 소멸되는 것과

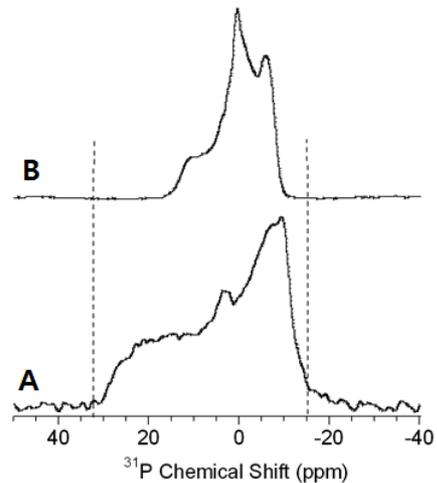


Figure 4. ^{31}P spectra of POPC MLVs prepared using two different methods; (A) TFE controlled, (B) TFA and TFE controlled. For comparison, the vertical dotted-lines included indicate the chemical shift range of typical MLVs sample shown in Figure 3.

직접적인 관련이 있다.

3.2. 고체 핵자기 공명 실험

PC 지질로 이루어진 MLVs 지질포의 전형적인 ^{31}P 고체 핵자기 공명 스펙트럼은 Figure 3에서 보여주는 것과 같다. 하지만 지질막과 작용하는 분자들 중에서 용해도 문제로 인하여 유기 용매를 사용하는 경우 시료에 잔류하는 용매 분자들이 실험 결과 및 얻어지는 결과의 해석에는 영향을 미치지 않는 것으로 간주되지만, 이는 용매에 따라서 다소 차이가 있다[26-28]. TFA와 TFE는 생체 분자의 용해에서 일반적으로 널리 사용되는 용매이며, 펩타이드 용해에 사용될 경우 펩타이드 분자를 알파 나선 형태의 2차 구조를 가지도록 유도하는 것으로 알려져 있다[26-28]. 이 과정에서 용매 분자가 펩타이드의 사슬과 강한 물리적인 결합을 이룸으로써 일반적인 조건에서 제거가 용이하지 않을 수 있다. 이와 같은 잔류 용매 분자를 포함하는 펩타이드와 같은 분자가 지질 분자와 혼합될 경우 비록 잔류량이라 할지라도 지질막의 물리화학적 성질에 영향을 미칠 수 있다. Figure 4는 TFE나 TFE/TFA 소량을 첨가하여 제조한 POPC 지질의 MLVs에 대한 ^{31}P 고체 핵자기 공명 스펙트럼을 보여 준다. 지질을 클로

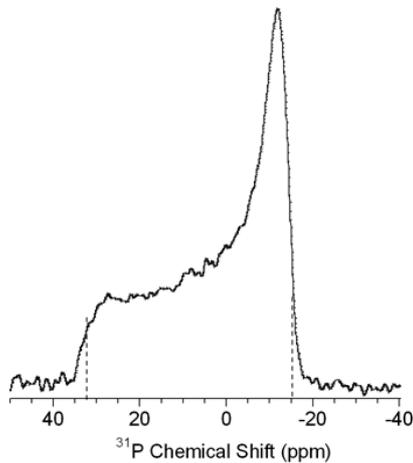


Figure 5. ^{31}P NMR Spectrum of MLVs composed of POPC in tris buffer (pH=7.4). Dry POPC powder (5 mg) was dissolved in chloroform with the addition of small amount of TFE. For comparison, the vertical dotted-lines included indicate the chemical shift range of typical MLVs sample shown in Figure 3. The lipid solution was dried under N_2 gas at room temperature, followed by then further dried in the vacuum oven at 50°C for ~ 10 h. The lipid films were hydrated using 1 mL of Tris buffer (pH=7.4) and briefly sonicated to form MLVs.

로폼에 용해한 후 완전히 제거하고 만든 MLVs의 경우(Figure 3)와 비교하면 상당한 차이를 보인다. 용매가 제거된 POPC로 이루어진 MLVs의 경우 Ds (CSA)=48 ppm (Figure 3; -15 ppm ~ +33 ppm)인데, TFE 용매가 잔류하는 경우 Ds (CSA)=40 ppm (Figure 4A; -12 ppm ~ +28 ppm)으로 스펙트럼의 폭이 좁아졌으며, 추가적으로 3 ppm 근처에 새로운 피크가 나타났다. 그리고 POPC의 MLVs를 제조하는 과정에서 TFE와 TFA가 잔류할 경우 ^{31}P 스펙트럼은 좀 더 많은 영향을 받는다(Figure 4B). 두 경우를 비교하면 TFE만 잔류할 경우 보다 스펙트럼의 Ds (CSA)=21 ppm (Figure 4A; -8 ppm ~ +13 ppm)으로 줄어들었을 뿐만 아니라 0.5 ppm 근처의 피크의 세기가 현저하게 증가함을 알 수 있다. 이와 같은 현상은 세 가지 다른 원인에 근거하여 설명할 수 있다. 우선 스펙트럼의 폭이 좁아진 사실로부터 내릴 수 있는 결론은 인(P) 원소를 포함하는 지질 분자의 친수성 머리 부분이 좀 더 자유로워짐으로써 운동성이 활발해진 결과이다. 그리고 0.0 ppm 근처에 생긴 피크는 용매로 인하여 유도된 마이셀 형태의 작은 조각이 형성되어 여기에 포함된 지질 분자는 액체 상태와 유사한 운동성을 가지게 됨으

로써 고체 상태일 경우 방향성에 의존하던 CSA 값이 존재하지 않고 평균값만 가지게 된 결과이다. 또한 지질 분자들이 소량의 용매의 영향으로 물리적인 상의 형태를 액체결정상이 아닌 다른 상을 이루어서 생기는 결과일수도 있다. 따라서 본 실험 결과는 소량의 잔류 용매로 인하여 지질막을 이루는 지질 분자의 물리적 성질, 운동성 그리고 마이셀 형태의 구조체가 얻어질 수 있음을 보여주고 있다. Figure 5는 TFE 용매가 포함된 POPC 지질에 시료를 50°C 에서 진공 건조시킨 후 MLVs 시료를 제조하여 ^{31}P 고체 핵자기 공명 스펙트럼을 얻은 것이다. 이 경우 클로로폼으로 제조한 시료와 같은 형태의 스펙트럼을 보여준다. 이는 TFE의 경우 용매를 제거하기 위하여 좀 더 격한 조건이 필요함을 의미하며, 용매가 완전히 제거 될 경우 실험에 사용된 용매의 종류에 관계없이 동일한 형태의 ^{31}P 스펙트럼을 제공함을 나타낸다. 결과적으로, 지질분자와 어떤 화합물 간 상호 작용을 연구하기 위하여 ^{31}P 고체 핵자기 공명 실험을 진행할 경우 잔류 용매로 인한 영향을 무시하고 실험 결과를 해석할 경우 커다란 오차를 유도할 수 있음을 시사한다.

4. 결 론

본 연구에서는 DSC와 ^{31}P 고체 핵자기공명 실험을 이용하여 모델지질막의 상변이와 상변이에 따른 엔탈피 및 온도 측정과 관련되는 실험에서 지질막 시료를 준비하고 제조하는 과정에 사용되는 유기 용매가 완전히 제거되지 않고 잔류할 경우 실험 결과에 미치는 영향을 살펴보았다. 위의 결과에서 보았듯이 실험에 사용된 용매의 종류와 용매를 제거하는 조건에 따라서 그 영향이 상당히 차이가 난다는 사실을 알았다. DSC를 이용한 DPPC 지질막의 상변화 엔탈피 및 온도 측정 결과 잔류 에탄올이 실험 결과에 상당한 영향을 미친다는 사실도 확인하였다. ^{31}P 고체 핵자기공명 실험을 이용한 지질막의 구조 및 상변화에 미치는 TFE나 TFA의 영향에 대한 실험 결과 역시 다소 차이는 있지만, MLVs 형태의 ^{31}P 고체 핵자기 공명 스펙트럼에 상당한 영향을 미친다는 사실을 확인할 수 있었다. 하지만 클로로폼의 경우 별다른 차이를 유도하지 않았다. 클로로폼과 달리 TFE나 TFA 분자들은 분자 내에 존재하는 불소 원자로 인하여 용매로 사용될 경

우 인접하는 용질 분자와 강한 수소 결합을 할 수 있는 분자이기 때문에 이러한 차이가 생기는 이유가 될 수 있다. 따라서 유사한 실험을 계획하는 과정에서 용매 분자가 지질시료에 잔류할 경우 실험 결과를 해석하는 과정에서 의도하지 않은 오차를 제공하거나 잘못된 해석을 이끌 수 있다는 사실을 확인하였다. 나아가, 잔류하는 용매 분자들이 시료에 어떠한 형태로 남아서 시료의 물리화학적 성질 변화에 어떤 형태로 영향을 미치는지에 대한 근본적인 대답은 향후 좀 더 구체적인 구조 분석 실험을 통하여 밝혀질 수 있으리라 생각된다.

감사의 글

이 연구는 서울과학기술대학교 교내연구비(2014-0520)의 지원으로 수행되었습니다.

Reference

1. K. J. Tierney, D. E. Block, and M. L. Longo, Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol, and ethanol, *Biophysical J.*, **89**, 2481 (2005).
2. D. L. MacDonald and H. Goldfine, Effects of solvents and alcohols on the polar lipid composition of clostridium butyricum under conditions of controlled lipid chain composition, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(12), 3517 (1991).
3. P. L. Yeagle, The structure of biological membranes 2nd ed., 173, CRC Press, Boca Raton, Florida (2005).
4. H. V. Ly and M. L. Longo, The influence of short-chain alcohols on interfacial tension, mechanical properties, area/molecule, and permeability of fluid lipid bilayers, *Biophys. J.*, **87**, 1013 (2004).
5. H. V. Ly, D. E. Block, and M. L. Longo, Interfacial tension effect of ethanol on lipid bilayer rigidity, stability, and area/molecule: a micropipet aspiration approach, *Langmuir*, **18**, 8988 (2002).
6. H. Gaussier, H. Morency, M. C. Lavoie, and M. Subirade, Replacement of trifluoroacetic acid with HCl in the hydrophobic purification steps of pediocin PA-1: a structural effect, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(10), 4803 (2002).
7. M. Goodman, F. Chen, and F. R. Prince, Conformational aspect of polypeptide structure. XLIV. Conformational transitions of poly (N-methyl-alanines) induced by trifluoroacetic acid, *Biopolymers*, **12**(11), 2549 (1973).
8. F. D. Sönnichsen, J. E. Van Eyk, R. S. Hodges, and B. D. Sykes, Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide, *Biochemistry*, **31**(37), 8790 (1992).
9. R. Xue, S. Wang, C. Wang, T. Zhu, F. Li, and H. Sun, HFIP-induced structures and assemblies of the peptides from the transmembrane domain 4 of membrane protein Nramp1, *Biopolymer*, **84**(3), 329 (2006).
10. R. B. Nellas, Q. R. Johnson, and T. Shen, Solvent-induced α - to 3(10)-helix transition of an amphiphilic peptide, *Biochemistry*, **52**(40), 7137 (2013).
11. R. B. Gennis, Biomembranes: Molecular structure and function, ed. Springer, Springer Verlag, New York (1989).
12. H. L. Scott Jr. and T. J. Coe, A theoretical study of lipid-protein interactions in bilayers, *Biophys. J.*, **42**(3), 219 (1983).
13. A. G. Lee, Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective, *Biochimica. et. Biophysica. Acta.*, **1612**, 1 (2003).
14. A. G. Lee, Lipid-protein interactions, *Biochem. Soc. Trans.*, **39**(3), 761 (2011).
15. A. C. Newton, Interaction of Proteins With Lipid Headgroups: Lessons from Protein Kinase C, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**, 1 (1993).
16. M. J. Sanderson, Peptide-lipid interactions: Insights and perspectives, *Org. Biomol. Chem.*, **3**, 201 (2005).
17. R. S. Harrison, P. C. Sharpe, Y. Singh, and D. P. Fairlie, Amyloid peptides and proteins in review, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **159**, 1 (2007).
18. E. A. Smith and P. K. Dea, Applications of calorimetry in a wide context-differential scanning calorimetry,

- isothermal titration calorimetry and microcalorimetry : Chapter 18, ed. Amal Ali Elkordy, In Tech, Croatia (2013).
19. S. Tristram-Nagle, T. Moore, H. I. Petrache, and J. F. Nagle, DMSO produces a new subgel phase in DPPC: DSC and X-ray diffraction study, *Biochimica et. Biophysica. Acta.*, **1369**, 19 (1998).
 20. S. Ali, S. Minchey, A. Janoff, and E. Mayhew, A differential scanning calorimetry study of phosphocholines mixed with paclitaxel and its bromoacylated taxanes, *Biophys. J.*, **78**(1), 246 (2000).
 21. I. C. P. Smith and I. H. Ekiel, Phosphorus-31 NMR: Principles and applications, ed. D. Gorenstein, 447, Academic Press Inc., London, England (1984).
 22. J. Seelig, ³¹P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **515**, 105 (1978).
 23. K. A. H. Wildman, D. K. Lee, and A. Ramamoorthy, Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37, *Biochemistry*, **42**(21), 6545 (2003).
 24. K. J. Hallock, D. K. Lee, and A. Ramamoorthy, MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain, *Biophys. J.*, **84**(5), 3052 (2003).
 25. P. L. Yeagle, Encyclopedia of nuclear magnetic resonance, eds. D. M. Grant and R.K. Harris, 3015, John Wiley, Toronto, Canada (1996).
 26. J. Safar, P. P. Roller, D. C. Gadusek, and C. J. Gibbs Jr., Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity, *Protein Science*, **2**, 2206 (1993).
 27. T. Hayakawa, Y. Kondo, and H. Yamamoto, Secondary structure of poly-L-arginine and its derivatives, *Bulletin of Chemical Society of Japan*, **42**, 1937 (1969).
 28. S. P. Brazier, B. Ramesh, P. I. Haris, D. C. Lee, and S. K. S. Srari, Secondary structure analysis of the putative membrane-associated domains of the inward rectifier K⁺ channel ROMK1, *Biochem. J.*, **335**, 375 (1998).