단분자 역학 제어 연구에 관하여

DOI: 10.3938/PhiT.22.050

홍석철·문현민

Mechanical Manipulation of a Single Biomolecule

Seok-Cheol HONG and Hyeon-Min MOON

The advent of single-molecule force spectroscopy has transformed how people think about, approach, and study biological problems. By using tension and torsion to actively manipulate biomolecules and by measuring various mechanical and kinetic quantities, one can describe biological systems from a more physical foundation. Development of sophisticated techniques such as optical tweezers, magnetic tweezers, and AFM has made such a revolution possible and these techniques have played central roles in advancing the physical understanding of biosystems. In this report, we overview these techniques, their applications to biological problems, and recent developments in hybridization of single-molecule techniques.

여는 말

분자의 개념이 19세기 초 화학자들에 의해 도입되었지만 과학계에서 이를 수용하는 데 다시 한 세기가 흘러야 했다. 20세기 초 브라운 운동에 대한 아인슈타인과 페랭의 연구 덕분에 분자가 물리적인 실체임이 확립될 수 있었다.^[1,2] 하지만 비교적 최근까지도 분자는 물질계의 구성 단위, 화학작용의 반응 단위라는 자연을 이해하는 기본 틀로서 역할을 했을 뿐 이들

의 실체를 탐구하거나 분자성에서 비롯되는 흥미로운 현상을 연구하는 데 한계가 있었다. 특히, 물질계에 비하면 아직 신비로운 생명현상에서 생명체의 구성단위인 분자 수준에서 현상을 이해하는 것은 대단히 어려운 일로 여겨졌다. 20세기 중반에 시작된 분자생물학은 생명현상을 분자들 사이의 상호작용으로 이해하기 시작한 중대한 발전이었다.^[3] 하지만 이들의 상호작용의 물리적 성질에 대해서는 여전히 알 수 없었다. 80년대 후반에 들어 생명현상을 분자들의 물리적, 화학적 거동의 관점에서 이해하려는 일련의 노력이 시작되었다. 분자 수준의 정보를 획득하기 위해서는 띄엄띄엄하게 존재하는 분자이기에 갖는 이질성(heterogeneity), 요동(fluctuation)을 파악할 필요가 있다. 이에 대한 좋은 해결책이 분자 하나하나의 거동을 추적하는 것이다. 이 시기에 들어 정밀 제어, 고감도 검출 기술이 발달하여 이러한 목적을 이루기에 충분한 기술적 기반이 갖추어졌으며 이로써 단분자 생물물리학이라는 새로운 분야가 시작되었다.^[4-10] 특히 이 글에서는 개별 (생물)분자들의 구조, 물성, 상호작용 연구에 획기적 전기를 마련한 단분자 생물물리의 역학적 방법들에 대해서 소개하고자 한다.

우리에게 익숙한 분자의 물성이란 수많은 분자 앙상블의 평균적인 특성이다. 따라서 분자 개개의 이질적인 면은 평균하는 과정에서 사라져 관찰할 수가 없었다. 또한 개별 분자를 제어하는 것이 불가능했으므로 이들의 상호작용은 관찰하는 것이

저자약력

홍석철 교수는 UC Berkeley 대학교 이학박사(2002)로서 동 대학교 분자 세포생물학과에서 2년간 박사후 연구원 과정을 거쳐 2004년부터 고려대학교 물리학과 교수로 재직 중이다. 2013년부터 물리학회 학력평가이사를 맡고 있다. (hongsc@korea.ac.kr, <http://biophys.korea.ac.kr>)

문현민 연구원은 고려대학교 물리학과 석박사과정으로 2009년부터 분자생물리 연구실에서 FRET과 Magnetic Tweezers 융합기술을 이용한 분자 생물물리 연구에 참여하고 있다. (sagoos@paran.com)

REFERENCES

- [1] A. Einstein, Annalen der Physik **17**, 549 (1905).
- [2] J. Perrin, Ann. Chim. Phys. **18**, 5 (1909).
- [3] J. D. Watson and F. H. C. Crick, Nature **171**, 737 (1953).
- [4] A. Kishino and T. Yanagida, Nature **334**, 74 (1988).
- [5] W. E. Moerner and L. Kador, Solid. Phys. Rev. Lett. **62**, 2535 (1989).
- [6] A. Ashkin and J. M. Dziedzic, Science **235**, 1517 (1987).
- [7] A. Ashkin, J. M. Dziedzic and T. Yamane, Nature **330**, 769 (1987).
- [8] S. Smith, L. Finzi and C. Bustamante, Science **258**, 1122 (1992).
- [9] S. Block, L. Goldstein and B. Schnapp, Nature **348**, 348 (1990).
- [10] T. Strick, J. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon and V. Croquette, Science **271**, 1835 (1996).

불가능했거나 간접적인 방법에 의존해야 했다. 이러한 한계점을 극복하고자 하는 노력의 일환으로 최근 이십여 년에 걸쳐 발전한 기술이 단분자 힘분광학(single molecule force spectroscopy)이다.^[11] 이 기술을 활용하면 대상이 되는 개별 분자에 힘, 토크를 가하면서 이들의 움직임을 추적, 관측할 수 있다. 현재까지 여러 방법들이 개발되었지만 주로 사용되는 것들은 원자힘현미경(Atomic Force Microscope), 광학트위저(Optical Tweezers), 자성트위저(Magnetic Tweezers) 등이다. AFM은 캔틸레버(cantilever)와 표면의 물리적 작용에 의해 캔틸레버가 왜곡되는 것을 광학적으로 측정하여 표면의 고저를 파악하는 기술이며 이러한 상호작용을 이용하여 물체의 표면을 영상화할 뿐 아니라 탄성도, 결합력, 작용력 등도 측정할 수 있는 기술이다. 광학트위저는 굴절률이 다른 물체(생물분자, 세포, 바이러스 자체거나 표지물로 사용되는 마이크론 크기의 구슬)를 집속된 빛의 힘으로 포획하여 제어하는 기술이다. 자성트위저는 자석을 이용해서 자성을 띠는 구슬(또는 이로 표지된 생체분자)에 힘과 토크를 가하는 기술이다. 아래 표는 이들 대표 기술들의 사양을 간략하게 정리한 표이다.

	AFM	Optical tweezers	Magnetic tweezers
Type	Point	Point	Global / Point
Force Range (pN)	10~10 ⁴	0.1~200	0.1~100
Stiffness (pN/nm)	10~10 ⁵	0.005~1	10 ⁻⁶ ~10 ⁻³
Probe size (μm)	100~250	0.25~5	0.5~5

우선, 이들 기술의 성능을 결정하는 중요한 요소인 위치와 힘의 분해능에 대해서 살펴보자.^[11]

DNA와 같은 생체분자를 제어하는 경우에 그 분자를 직접 제어하기 어려우므로 보통 다루기 편한 마이크론 크기의 구슬을 붙여서 이를 통해 제어한다. 광학트위저의 경우에는 물과 굴절률이 다른 폴리스티렌 재질의 구슬, 자성트위저의 경우에는 철산화물이 침투된 폴리스티렌 구슬을 사용한다. 이러한 구슬이 레이저 빛의 초점에 놓이거나 자기력 하(주로 이 경우에는 한쪽이 고정된 생체 분자를 연구함에 놓이면 일종의 포텐셜 우물에 갇힌 것으로 볼 수 있는데 이때 열적 요동에 의해서 갇힌 구슬이 포텐셜 우물 안에서 진동한다. 이러한 구슬의 운동방정식을 적으면 아래와 같은데

$$m \frac{d^2x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + kx = F(t)$$

여기서 질량 항은 무시할 수 있으며 γ 는 끌림 상수이고 k 는 포텐셜 우물의 복원상수이다. 에너지 등분배 정리(equipartition theorem)에 의해서 위치 분해능은 $\delta x = \sqrt{\frac{k_B T}{k}}$ 로 주어지고

조화진동자를 가정하므로 힘 분해능은 $\delta F = \sqrt{k k_B T}$ 로 주어진다. 하지만 실제 실험에서 주파수 샘플링을 하므로 파워스펙트럼 분석을 통해 밴드폭이 Δf 의 경우 위치 분해능은 $\delta x = \sqrt{\frac{4\gamma k_B T \Delta f}{k^2}}$ 로 되며 힘 분해능은 $\delta F = \sqrt{4\gamma k_B T \Delta f}$ 이 된다.^[11]

이로부터 포텐셜이 강하게 가늘수록, 밴드폭이 작을수록, 끌림이 작을수록 (구슬이 작을수록, 용액의 점성이 작을수록) 위치분해능은 좋아진다. 하지만 밴드폭을 작게 하면 시간분해능이 나빠지므로 끌림 상수를 작게 하는 것이 가장 유리하다고 할 수 있다. Power spectrum 분석 후에 cut-off frequency를 측정하여 구슬에 작용하는 힘을 결정할 수도 있다.

최근까지 다양한 역학적 제어 기술이 개발되었으나 이 글에서 주로 위에서 언급한 세 가지 방법을 기술할 것이며 hydrodynamic manipulation과 micropipette manipulation 등은 상대적으로 덜 중요하다고 생각되어 자세한 설명은 생략하겠다. 그 이유는 유체에 의한 방법은(비교적 쉽게 구현되는 수단으로) 유체의 속도를 일정하게 해줌으로써 스토크스의 법칙에 따라 힘을 시간적, 공간적으로 일정하게 가할 수 있다는 장점이 있지만 입자를 개별적으로 제어하기 어렵고 입자가 표면에 근접하면 힘의 작용 양상이 복잡해지며, 실험 용액의 낭비가 심하다는 단점이 있다. 그리고 피펫에 의한 방법은 비교적 간편하게 제작해서 쓸 수 있어 좋지만 AFM과 원리가 비슷하여 따로 다룰 필요성이 없다. ABEL(anti-Brownian electrokinetic) trap이라는 표지없이 입자를 잡고 제어하는 기술이 있는데 이 기술은 입자의 움직임을 보고 움직임을 반대방향으로 움직이도록 전기장을 걸어서 입자를 제어한다. 아직 널리 사용되는 기술이 아니므로 여기서는 다루지 않도록 하겠다.^[12]

AFM

전도성이 있는 물질 표면의 지형과 전자에너지 상태를 측정하는 STM이 개발되어 표면, 나노 과학에 혁명적인 변화를 가져왔다. 하지만 이 기술은 시료가 전도성을 지니지 않으면 사용하기 어렵다. 이에 대한 대안으로 두 개의 탐침이 있는 장치가 개발되었다.^[13] 일차 탐침이 표면의 지형을 따라가도록 고안되었으며 그 뒷면이 전도성을 지니고 있어 이 탐침의 높이를 STM 탐침이 따라가면서 측정하는 기술이 개발되었는데 이것이 부도체의 표면을 측정할 수 있는 최초의 AFM이었다. 이는

REFERENCES

- [11] K. Neuman and A. Nagy, Nat. Meth. **5**, 491 (2008).
- [12] A. Cohen and W. Moerner, PNAS **103**, 4362 (2006).
- [13] G. Binnig, C. Quate and C. Gerber, Phys. Rev. Lett. **56**, 930 (1986).

Fig. 1. Schematic picture of AFM (from wikipedia).

STM을 최초로 개발한 Binnig이 Quate, Gerber와 함께 1986년에 개발하였다. 하지만 이 방식은 널리 활용되지 못하였다. 그 후에 훨씬 편리한 방법이 개발되었는데 그 방식은 다음과 같다(그림 1). 긴 캔틸레버의 뒷면에 빛을 쏘아 반사된 빛을 반사광의 방향에 민감한 PSD(position sensitive detector)나 QPD(quadrant photodiode)로 측정하면 캔틸레버가 표면과 접촉하여 휘거나 뒤틀릴 때, 반사광의 벗어남을 측정하여 시료의 고저와 같은 지형을 측정할 수 있다.^[14] 이것이 현재 널리 쓰이는 AFM의 구동 원리이다. 이 기술은 매우 보편적으로 사용되어 다양한 물질의 표면 연구에 중요한 기여를 하였다. 이 기술은 생체분자와 세포 등 생물학적 시료의 모양, 요철, 고저 등 지형적 정보를 획득하는데 널리 사용되고 있다. 특히 생물학적 과정이 물속에서 일어나므로 물속에서 AFM 실험을 수행할 수 있는 장치도 개발되었다. 요철을 재는 다양한 모드의 AFM이 개발되었는데 직접 접촉해서 구조를 읽는 접촉모드 AFM은 높은 공간 분해능($\sim$ 원자 수준)을 갖고 고속으로 측정할 수 있지만 특히 부드러운 생물학적 시료를 손상시키거나 긁을 수 있으며 액체 면을 연구하는 데는 곤란하다. 반데르발스 힘에 의한 캔틸레버의 공명 주파수 변화를 읽어 거리(시료의 고저)를 측정하는 비접촉모드는 힘을 정밀하게 측정할 수 있고 부드러운 시료를 짚 수 있지만 공간 분해능은 낮으며 살짝만 접촉하는 탭핑모드는 힘분해능은 양호하고 공간분해능은 우수하며 부드러운 시료에도 사용할 수 있지만 느리고 액체면 연구가 곤란하다는 단점이 있다. 이 밖에도 측력, 자기력, 분극을 측정하는 주사현미경이 개발되어 있다.

최근에는 비디오 속도로 측정할 수 있는 원자힘 현미경이 개발되어 실제 눈으로 보듯 나노미터 수준에서 생물분자의 모양 및 크

기를 확인하며 운동을 관찰할 수 있는 획기적인 결과가 보고되었다.^[15] 미오신 단백질(myosin V)이 두 발로 hand-over-hand 방식으로 걷는 것을 보여준 것은 대단히 놀라운 일이었다.

원자힘 현미경은 힘을 가하고 잴 수 있는 장점이 있어 힘 스펙트럼을 얻는 데도 이용되고 있다. 최소 작용력이 다른 기술에 비해 크기 때문에 단백질의 풀림, 리간드 수용체의 결합, 분리, 세포막 등 세포 골격 및 모양에 관련된 구조의 탄성 측정 등에 사용된다.

이를 생물학적 분자에 적용한 예로, 1994년 Gaub이 개별 리간드-리셉터(ligand-receptor) 사이에 작용되는 힘을 처음으로 측정한 것이 있다.^[16] 1996년에는 Fernandez가 원자힘현미경의 힘분광학 기술을 마스트 세포의 내강의 구조의 물리적 특성을 연구하는 데 사용하였다.^[17] 1999년엔 Strunz 등이 힘에 의해 단일 DNA 이중나선이 풀리고 단일나선으로 변하는 동역학을 연구하여 발표하였다.^[18]

나노미터 이하의 분해능으로 구조를 관찰할 수 있고 정량적 힘측정을 할 수 있다는 것은 훌륭한 강점이지만 여러 가지 한계를 지니고 있다. 직접 접촉해야 한다는 점, 탐침이 커서 원하는 분자뿐만 아니라 다른 분자들의 영향을 받을 수 있는 점, (보통) 최소 작용력이 수십 pN에 달할 정도로 크다는 점 등이 약점이다. 따라서, 약한 힘에 의해 일어나는 생명현상에 대한 연구에 불리한 면이 있다.

광학트위저

1970년 Ashkin이 레이저를 이용하여 마이크로 크기의 입자를 포획할 수 있다는 것을 발표하였다.^[19] 광학트위저는 Ashkin이 발명한 이래로 세포를 포함해 마이크로 크기의 입자를 제어하는데 널리 이용되고 있다.^[6,7] 빛이 어떤 물질을 통과할 때, 그 물질에 힘을 가할 수 있다. 이는 빛이 운동량을 가지고 있으며 전체 운동량은 보존되어야 하는 것으로 이해할 수 있다. 빛이 가할 수 있는 힘은 두 가지로 나눌 수 있다. 하나는 빛의 진행방향에 따라 밀어내는 힘인 scattering force이고, 다른 하나는 빛 세기의 기울기에 의해 빛의 중심축으로 끌어당기는 gradient force이다. 후자는 빛이 구슬에서 굴절할 때 빛이 경

REFERENCES

- [14] P. Hansma, V. Elings and O. Marti, Science **242**, 209 (1988).
- [15] N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa and T. Ando, Nature **468**, 72 (2010).
- [16] E. Florin, V. Moy and H. Gaub, Science **264**, 415 (1994).
- [17] A. F. Oberhauser and J. M. Fernandez, PNAS **93**, 14349 (1996).
- [18] T. Strunz, K. Oroszlan, R. Schäfer and H.-J. Güntherodt, PNAS **96**, 11277 (1999).
- [19] A. Ashkin, Phys. Rev. Lett. **24**, 156 (1970).

Fig. 2. (a) Principle of optical tweezers(from wikipedia). Single-molecule manipulation studies of various systems by optical tweezers: (b) kinesin, (c) viral packaging, (d) RNA polymerase.

는 운동량의 변화를 구슬이 상쇄하는 과정에서 구슬이 자연적으로 빛의 중심부로 끌려가기 때문에 발생한다. 레이저처럼 강하게 정렬된 빛이 현미경 대물렌즈처럼 NA가 큰 렌즈를 지나면서 아주 정밀한 초점을 맺게 되는데 이때 scattering force 보다 강한 gradient force가 형성된다. 이에 초점위치 주변에 물과 굴절률이 다른 유전물질이 있다면 빛에 의해 포획될 수 있다(그림 2). 이 기술을 이용하면 빛의 초점 위치나 시료의 위치를 제어하면서 포획된 분자에 힘을 가하며 그 움직임을 관측할 수 있다. 광학트위저는 초점의 위치를 3차원적으로 자유롭게 조절할 수 있고, 0.1 pN의 약한 힘부터 200 pN 정도의 강한 힘까지 분자에 가할 수 있다. 이 기술은 마치 집게로 집듯 생체분자를 잡아서 자유자재로 움직일 수 있기 때문에 아주 강력하고 유용한 실험방법이 되었다. 초기의 많은 단분자 생물리 실험들이 이 방법을 통해서 새로운 결과를 얻을 수 있었는데 몇 가지 예를 살펴보면 다음과 같다.

1987년에 Ashkin 등이 바이러스와 박테리아 같은 작은 생물학적 물질을 포획하는 데 광학트위저를 사용하였다.^[6] 1990

년에는 Block이 단일 키네신(kinesin) 분자의 움직임에 대해서 광학트위저를 이용하여 연구하였다.^[9] 한편 Block 등은 RNA polymerase가 DNA 위를 걸으면서 RNA를 합성하는 과정을 관찰하고 이 효소의 운동 특성을 연구하였는데 움직이는 속도, 힘의 효과를 밝혔고 후에 효소가 하나의 염기를 추가하며 취하는 걸음을 관찰함은 물론 이에 관련된 mechano-chemical cycle에 대해서도 규명하였다.^[20-22] 90년대 중반에는 Bustamante 교수는 이 방법을 사용해서 DNA의 overstretching 현상을 발표하였다.^[23] 한편 이 그룹은 단백질(titin)의 폴림 현상도 AFM을 이용한 Gaub 그룹과 독립적으로 관찰하였다.^[24] 이 방법을 활용하여 바이러스 캡시드에 바이러스의 게놈이 집적되는 역학적 과정도 최초로 규명하였다.^[25] Block, Yanagida 등은 키네신, 미오신 단백질 모터의 운동에 관련된 역학적 과정을 규명하기 위해서 구슬이 표지된 단백질 분자에 광학트위저로 힘을 가해 운동과정을 관찰하고 반대로 걷는 과정을 유발하기도 하여 이 분야를 심도있게 이해하는 데 크게 기여하였다.

초창기 광학트위저에서는 (DNA) 분자 한 쪽을 바닥이나 피펫에 고정시키고 반대쪽 끝을 한 개의 레이저 트랩을 만들어 제어했으나, 기술의 발전과 더불어 다중 트랩도 가능해졌다. Block은 AOD를 이용하여 단일 레이저를 빠르게 회전시켜서 다중 트랩을 형성하는 것과, 편광에 따라 빛을 나눠 만든 이중 트랩에 대하여 보고하였다.^[26] 1998년에는 Dufresne 등이 빛의 회절을 이용해서 4×4 다중 트랩 어레이를 형성하였다.^[27]

광학트위저의 경우 당김힘만 작용가능하고 돌림힘을 작용시키기가 힘들었다. 이러한 것을 극복하기 위해 복굴절 물질과 레이저의 원편광을 이용하여 돌림힘을 가할 수 있는 광학트위저를 2004년에 Wang이 보고하였다.^[28]

3차원의 자유도로 넓은 영역에 힘에 대해 정밀한 제어가 가능하기에 단분자 실험에 매우 유용한 광학트위저도 한계점이 존재한다. 레이저를 강하게 집중할 때 발생하는 gradient force

REFERENCES

- [20] H. Yin, M. D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S. M. Block and J. Gelles, *Science* **270**, 1653 (1995).
- [21] J. Shaevitz, E. Abbondanzieri, R. Landick and S. Block, *Nature* **426**, 684 (2003).
- [22] E. Abbondanzieri, W. Greenleaf, J. Shaevitz, R. Landick and S. Block, *Nature* **438**, 460 (2005).
- [23] D. Smith, Y. Cui and C. Bustamante, *Science* **271**, 795 (1996).
- [24] M. S. Kellermayer, S. B. Smith, H. L. Granzier and C. Bustamante, *Science* **276**, 1112 (1997).
- [25] D. Smith, S. Tans, S. Smith and S. Grimes, *Nature* **413**, 748 (2001).
- [26] K. Visscher, S. P. Gross and S. M. Block, *IEEE Journal of IEEE* **2**, 1066 (1996).
- [27] E. R. Dufresne and D. G. Grier, *Rev. Sci. Instrum.* **AIP** **69**, 1974 (1998).
- [28] A. La Porta and M. Wang, *Phys. Rev. Lett.* **92**, 190801 (2004).

를 사용하는 장비이므로 레이저의 세기나 세기의 공간분포에 영향을 주는 상황에 민감하게 반응한다. 그리고 트랩 자체가 에너지 우물에 해당하기 때문에 연구 대상 분자뿐만 아니라 주변에 있던 다른 분자도 비특이적으로 따라와서 방해를 받을 수 있다. 한편, 형광현미경과 같이 빛을 이용하는 다른 기술을 간섭할 수 있어 주의가 필요하다.

그럼에도 불구하고 광학트위저에서는 레이저 파워가 수십 mW에서 수 W이고 수 μm 크기의 구슬을 제어하는 경우에 ~ 1 pN에서 100 pN을 상회하는 수준의 힘을 가할 수 있는데 이는 대부분의 단백질 모터가 발생시키는 힘의 범위를 아우르며 생체 분자들의 결합력을 포함하는 영역이라 매우 유용하게 사용된다.

자성트위저

접촉을 하지 않고서 물질에 힘을 가할 수 있는 방법 중 직관적이며 쉽게 구현할 수 있는 것이 자성을 이용한 것이다. 자성을 이용하여 작은 크기의 물질에 힘을 가하는 것은 1950년 Crick과 Hughes가 세포질에 자성물질을 삽입해 당김힘, 돌림힘을 접촉 없이 세포에 작용한 것부터 시작된다.^[29] 이러한 방법이 발전하여 자기력과 자기장을 이용하여 생체 분자를 당기고 비틀어 주는 기술이 자성트위저다.

전형적인 자성트위저에서는 그림 3과 같이 샘플 바닥에 분자의 한 끝을 고정시키고 다른 쪽 끝에 자성구슬을 붙인 상태에서 자석으로 힘을 가해지면서 자성구슬의 움직임을 관측하는 방식을 이용한다. 이러한 방식이 정착되기 전인 1992년에 Bustamante 그룹은 자기력과 유체의 힘을 함께 이용하여 단일 DNA에 힘을 가하면서 그 DNA의 길이 변화를 측정함으로써 DNA의 힘-신장 관계를 측정하였다.^[8] 1994년에 Ziemann, Sackmann은 F-actin network의 탄성에 대한 연구에 전자석을 이용한 자성트위저를 사용하였다.^[30] 1996년에는 Bensimon, Croquette이 단일 DNA 분자에 토크를 주어 DNA 초나선 상태를 만들으로써 초나선의 물리적 특성을 연구할 수 있었고 더 나아가 초나선을 제어하는 토포 아이소머라제의 작용도 연구하였다.^[31] Ingber 그룹은 magnetic twisting cytometry 등으로 일컫는 유사한 기술을 이용해서 역학적 방법에 의한 신호전달 메커니즘을 연구하고 있다.^[16] 저자의 연구실은 자성트위저를 이용하여 cisplatin이 결합한 DNA의 탄성 변화를 통해서 cisplatin 결합량을 측정하는 방법을 개발하였고^[32] 이러한 측정과 함께 cisplatin 결합 DNA의 비틀림 특성을 통해서 탄산비페 내에서 cisplatin이 mono-adduct를 형성함을 밝혀 이 항암제의 효과를 이해하는 데 기여하였다.^[33]

자성트위저의 작용 원리를 살펴보면 다음과 같다. 비균일한 장이 있고 거기에 자기모멘트가 있으면 힘을 받게 된다. 이를 이용해 자성구슬로 표지된 단일 생체분자, 세포막 등을 역학적

Fig. 3. (a) Schematic picture of magnetic tweezers. (b) Superhelicity (σ)-vs.-(relative) extension of DNA (Ref. [34]).

으로 제어한다. 한편 자기모멘트는 자기장의 방향으로 배향하려는 성질이 있는데 자기장을 돌려줌으로써 비틀림, 토크를 유발할 수 있다. 자기력을 이용하는 방법의 장점은 대부분의 생체계는 자성을 띠지 않아 자기장에 반응하지 않으므로 표지된 것만 선택적으로 제어할 수 있다는 점이다. 상용화된 1 마이크로 크기의 자성구슬이 많이 사용되는데 (Dynal MyOne(invitrogen)) 희토류 자석을 사용하여 수 mm 이내에서 힘을 가하면 1-2 pN의 힘을 얻을 수 있다. 이 힘이 매우 약하다고 생각될 수

REFERENCES

- [29] F. Crick and A. Hughes, *Experimental Cell Research* **1**, 37 (1950).
- [30] F. Ziemann, J. Rädler and E. Sackmann, *Biophysical Journal* **66**, 2210 (1994).
- [31] T. Strick, V. Croquette and D. Bensimon, *Nature* **404**, 901 (2000).
- [32] N-K. Lee, J-S. Park, A. Johnner, S. Obukhov, J. Hyon, K. J. Lee, *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* **101**, 248101 (2008).
- [33] J-S. Park, S. H. Kim, N-K. Lee, K. J. Lee and S-C. Hong, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 3128 (2012).
- [34] S. Neukirch, *Phys. Rev. Lett.* **93**, 198107 (2004).

있지만 DNA 연구에는 적합하다. 그리고 영구자석에 의한 자력은 일정하므로 안정적으로 실험할 수 있어 좋다.

Bensimon, Croquette 그룹이 주도하여 발전시킨 이 기술은 전통적으로 DNA에 관련된 문제를 연구하는데 사용되었다. 특히 DNA는 비틀림 특성 즉 초나선이 매우 중요한데 이를 연구하는데 가장 우수한 방법이다. 그리고 DNA는 1 pN만 작용해도 전체 길이의 90% 이상이 되므로 1 pN도 결코 작은 힘이 아니다. 그림 3은 자성트위저를 이용해서 초나선에 따른 힘-신장 관계를 얻은 데이터이다.^[34]

자성트위저는 구성하기 쉽고 돌림힘을 쉽게 작용할 수 있다는 많은 장점을 가지고 있지만 분명 단점도 존재한다. 자석이 샘플 주변에 근접해야 하기 때문에 공간적 제약에 처할 수 있다는 점과, 자성구슬의 형상을 카메라로 기록해서 분석하기 때문에 포토다이오드의 신호를 전기적으로 분석하는 다른 장비들에 비해 속도가 느리다는 점이 단점이라 할 수 있다.

토크 측정

단분자 힘 분광학 기술은 주로 힘을 측정하는 데 관심이 있는데 몇몇 생물학적 문제에서는 토크 측정이 필요하다. 앞서 설명했듯이 자성트위저가 가장 보편적이고 편리한 토크 관련 제어기술이지만 광학트위저에 의한 기술들도 개발되었다.^[35] DNA의 비틀림 특성(상수)을 이해하고자 DNA 양쪽에 폴리스티렌 구슬을 달고 하나는 광학트위저로 잡고 다른 하나는 피펫으로 빨아들여 잡은 후 피펫을 돌려 토크를 유발할 수 있었다. 그리고 최근에는 복굴절을 갖는 수정(quartz)을 DNA에 표시한 후 이것이 편광에 따라 배향됨을 이용하여 토크를 작용하였다.^[28] 편광을 회전시켜줌으로써 수정이 따라 돌고 이에 DNA가 따라 비틀리게 하였다. 이러한 기술은 보편적으로 사용되고 있지는 않지만 빛에 의한 빠른 제어, 광학트위저로 토크 작용을 할 수 있다는 점 등의 장점을 갖고 있다.

한편, 회전에 관해 매우 약한 구속토크를 주는 자성트위저를 이용해 토크를 직접 측정하는 기술도 개발되었다.^[36] 이 기술에서는 약한 구속토크에 의해 자성구슬이 DNA 축을 회전축으로 하여 방향의 요동을 보인다. 이 요동 양상을 이해하여 회전 포텐셜 우물의 가파름을 알 수 있고 이때 작용한 자기장과 자성구슬의 방향의 어긋남으로부터 토크를 측정할 수 있었다.

융합 기술

단분자 생물리 기술은 나노바이오 분야에 큰 변혁을 일으켰다. 하지만 개별 기술들은 매우 유용하고 강력한 수단이지만 기술마다 장점과 동시에 한계를 지니고 있다. 특히 단분자 제어기

Fig. 4. Hybrid technique of AFM & single-molecule FRET (Ref. [38]).

술은 생체분자의 역학적 특성을 측정하는 데는 유용하지만 어떤 개별 분자의 민감한 검출이나 나노미터 수준의 구조 변화를 탐지하는 데는 어려움이 있다. 형광측정에 바탕을 둔 단분자 검출기술은 형광분자가 작아서 표지가 용이하며, 개별 생체분자의 검출이 가능할 정도로 감도가 좋고, 다양한 방출파장으로 여러 대상을 동시에 선별적으로 관찰할 수 있다. 다른 글에서 자세히 다뤄질 단분자 프렛 기술에 이를 잘 활용하면 분자들의 결합이나 나노미터 수준의 구조변화를 관찰하는 것도 가능하다. 하지만 대상을 역학적으로 제어하는 것에는 어려움이 따른다. 이러한 단점을 보완하고 본래의 기술의 한계를 극복하기 위해서 단분자 생물리 기술들을 융합하는 연구가 진행되고 있다.

80년대 말에 마이크로피펫 기술과 전반사 형광 현미경 기술을 융합하여 액틴 단백질에 가하는 미오신 단백질의 역학적 작용을 관찰한 이래^[4] 지금까지 다양한 방식으로 미세 제어 기술과 고감도 형광측정 기술이 융합되었다.

AFM + 형광 융합 기술

원자힘 현미경에 형광을 이용하여 동시에 관찰하는 것의 예로는 2005년에 Otto가 형광현미경과 원자힘현미경을 접목하여 동시에 관찰한 것이 있다.^[37] AFM 기술과 전반사 현미경에 바탕을 둔 형광현미경 기술을 융합하여 AFM으로 분자를 역학적

REFERENCES

- [35] Z. Bryant, M. Stone, J. Gore, S. Smith, N. R. Cozzarelli and C. Bustamante, *Nature* **424**, 338 (2003).
- [36] J. Lipfert, J. W. J. Kerssemakers, T. Jager and N. H. Dekker, *Nat. Meth.* **7**, 977 (2010).
- [37] R. Kassies, K. O. van der Werf, A. Lenferink, C. N. Hunter, J. D. Olsen, V. Subramaniam and C. Otto, *J. Microsc.* **217**(Pt 1), 109 (2005).

Fig. 5. Hybrid technique of optical tweezers & smFRET (Ref. [42]).

으로 제어하며 형광으로 개별 분자 하나하나를 직접 관찰하는 기술도 개발되었다.^[38] 또한 AFM에 FRET을 접목하여 단백질의 구조변화를 단분자 수준에서 관찰한 것으로는 (그림 4) 힘이 가해졌을 때, kinase의 구조가 변하는 양상을 관측한 것이 있다.^[39]

광학트위저 + 형광 융합 기술

1998년에 Ishijima 등이 광포획으로 잡은 액틴 위를 걸어가는 미오신 다발을 형광으로 직접 관찰하고 연구하였다.^[40] 2004년에 van Dijk 등이 광포획과 단분자 형광 측정을 접목한 기술을 발표했고^[41] 2007년에 Lang 그룹에서 광학트위저와 단분자 FRET의 융합기술을 개발하여 DNA hairpin의 폴림에 대해 연구하였다.^[42]

2007년에 Hohng 등이 Holliday junction 구조를 지닌 DNA 분자에 광학트위저로 힘을 가했을 때, 실시간으로 관측되는 FRET의 값의 변화를 이용하여 Holliday junction의 energy landscape를 구했다. 이 기술에서는 광학트위저의 빛과 형광을 발하는 빛을 공간적으로 분리하여 이들의 간섭을 줄일 수 있었다 (그림 5).^[43]

자성트위저 + 형광 융합 기술

자성트위저와 형광기술의 융합도 활발히 진행되었다. 자성트위저와 전반사 현미경에 바탕을 둔 형광 현미경 기술을 융합하여 viral capsid의 DNA 집적과정을 연구하였고^[44] 자성트위저에 단분자 프렛 기술을 융합하여 힘 측정에 활용하는 연구를 하였다.^[45] 하지만 후자는 자성트위저로 토크를 작용하지 못해 다른 힘 제어 기술과 구별되는 자성트위저의 장점을 살리지 못했다. 후에 저자의 연구실에서 토크를 작용할 수 있는 자성트위저와 단분자 프렛 기술을 합쳐서 힘과 비틀림이 제어된 상태에서 나노미터 수준의 구조 변화를 관찰할 수 있는 방법을 최초

Fig. 6. Hybrid technique of magnetic tweezers & smFRET (Ref. [45]).

로 개발하였으며 이를 통해 비표준적 DNA 구조인 Z-DNA의 형성의 역학적 조건, 동력학을 규명하였다 (그림 6).^[46] B-form에서 Z-form DNA로 변하게 되면 그 부분에 대해서 수 나노미터의 길이 변화가 생기므로 이를 FRET으로 관찰하였다. 한편, 외부에서 자성트위저를 통해 B-form DNA에 왼나사 방향으로 토크가 주어질 때, 초나선이 만들어지며 DNA의 양끝 길이가 줄어든다. 그러나 적정 장력에서는 특정서열의 부분이 Z-form DNA로 변하면서 토크가 감소하여 자성트위저로 관측된 DNA의 길이가 늘어나는데 이를 프렛 변화와 동시에 관찰할 수 있었다.

맺는 말

원자힘 현미경이나 자성트위저, 광학트위저와 같은 Force spectroscopy를 이용하면, 직접적으로 관찰하기 힘들었던 분자 수준의 역학적 특성과 움직임에 대해 이해할 수 있다. 특히 생물학적으로는 생명의 근본현상이지만 간접적인 방법을 통해 추측을 할 수 밖에 없었던 DNA와 단백질 간의 상호작용이나 단백질과 단백질의 상호작용, DNA나 단백질의 구조적인 변화 등을 in vitro에서 구현함으로써 좀 더 심도 깊은 이해를 할 수 있는 혁신을 이루었다.

REFERENCES

- [38] A. Sarkar, R. Robertson and J. Fernandez, PNAS **101**, 12882 (2004).
- [39] Y. He, M. Lu, J. Cao and H. P. Lu, ACS Nano **6**, 1221 (2012).
- [40] A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka, *et al.*, Cell **92**, 161 (1998).
- [41] M. A. van Dijk, L. C. Kapitein, J. van Mameren, C. F. Schmidt and E. J. G. Peterman, J. Phys. Chem. B **108**, 6479 (2004).
- [42] P. B. Tarsa, R. R. Brau, M. Barch, J. M. Ferrer, Y. Freydon and P. Matsudaira, *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. **46**, 1999 (2007).
- [43] S. Hohng, R. Zhou, M. Nahas, J. Yu, K. Schulten, D. Lilley, *et al.*, Science **318**, 279 (2007).
- [44] T. Hugel, J. Michaelis, C. L. Hetherington, P. J. Jardine, S. Grimes, J. M. Walter, *et al.*, Plos Biol. **5**, e59 (2007).
- [45] H. Shroff, B. Reinhard, M. Siu, H. Agarwal, A. Spakowitz and J. Liphardt, Nano Lett. **5**, 1509 (2005).
- [46] M. Lee, S. H. Kim and S-C. Hong, PNAS **107**, 4985 (2010).