

Application of Local Probe Techniques in Biological Research -Potential of AFM in Developmental Biology- 생물학 연구를 위한 원자현미경 기술의 응용

조 상 준

한국과학기술원 바이오 시스템 학과 정문술 센터

400여 년 전에 발명된 망원경과 현미경은 물체를 이해하는 인간의 인식체계 중 시각 능력의 한계를 혁명적으로 극복하여 현대 과학발전의 초석이 되었다. 원자현미경 또는 주사탐침현미경 (Scanning Probe Microscopy)으로 대표되는 국소 탐침 기술 (Local Probe Technique) 은 인간의 인식체계 중 촉각을 마이크로와 나노 세계로 넓혔다고 할 수 있다. 촉각으로 물질의 성질을 인지한다는 것은 시각적인 정보를 보완할 뿐만 아니라 물질에 자극을 주어 생기는 간섭효과를 이용하여 물질을 변화시킬 수 있다는 것을 의미하게 된다. 그러므로 단일 분자나 원자를 감지하고 조작할 수 있게 되었다는 것은 인류 진화의 획을 긋는 하나의 획기적인 사건으로 분류가 되는 것이다. 원자현미경은 탐침과 시료간의 물리적인 상호관계를 측정함으로써 표면의 형태 (Physical topography)뿐만 아니라 전기적 (electronic charge density), 자기적 (magnetic field) 마찰력 (friction force), 경도 (hardness), 탄성 (elasticity) 등의 물리적 정보를 알려준다. 그리고 원자현미경의 가장 큰 장점 중 하나는 시료를 공기, 액체, 진공 속 어디에서나 사용할 수 있다는 점이다. 복잡한 시료 준비 절차를 거친 후 진공 속에서 측정해야 하는 전자 현미경에 비하여 액체 속에서 살아있는 생체 시료를 전자현미경에 필적하는 해상도로 관찰할 수 있는 원자현미경의 장점은 생물학자들에게 가장 큰 매력이 아닐 수 없다.

제1 세대의 광학현미경과 제 2세대의 전자현미경의 뒤를 잇는 제3세대 현미경이라고 불리는 원자현미경의 가장 중요한 기능은 역시 생체 시료의 표면을 관찰하는데 있다. 광학현미경으로는 얻을 수 없는 높은 해상도와 전자현미경에서는 불가능한 생리학적 조건에 가까운 액체상에서의 생체 시료 사진을 원자현미경을 통하여 얻을 수 있다는 것은 기존의 현미경에서는 얻지 못한 정보를 얻을 수 있다는 것을 의미한다. 원자현미경의 또 하나의 큰 장점은 극미세력 (Ultralow Force)을 높은 해상도로 측정할 수 있다는 점이다. 극미세력을 측정함으로써 생체 분자간의 상호작용을 측정할 수 있고 생리학적 환경에서! 동적인 생체 과정을 이해할 수 있는 길을 열었다. 예를 들어 생체 조절 기능 중 가장 기본적인 반응 중 하나인 수용체와 리간드의 구조와 상호작용을 원자현미경을 통하여 연구할 수 있다. 이렇게 생체 과정의 중심적 역할을 담당하는 구조와 기능의 상호관계를 동시에 측정할 수 있다는 것은 앞으로 세포 또는 기타 생물학적 현상을 이해하는데 크게 도움을 줄 것이다. 이 밖에 원자현미경은 생체 시료의 동적인 변화를 측정할 수 있게 해주고 또한 직접적인 조작을 가함으로써 생명의 신비에 좀더 깊이 접근할 수 있게 해준다.

그 동안 시료 준비방법의 개발, 이미지 처리 소프트웨어의 발달, 그리고 계속된 원자현미경의 기계적인 향상 등을 통해 원자현미경을 사용한 연구는 비약적인 발전을 하고 있다. 하지만 부드럽고 탄성이 강한 생체 시료는 원자현미경으로 나노미터 또는 옴스트롬 수준에서 연구하는데 있어서 아직까지 많은 숙제를 남기고 있다. 현재 생체시료를 다루기 위한 새로운 캔틸레버와 탐침 개발과 더불어 원자현미경의 성능이 향상되고 있으며 다양한 광학, 분광 분석, 전기 생리학적 기술을 혼합한 복합 원자현미경 기술도 개발되고 있다. 이제 원자현미경은 새로운 나노기술을 탄생시키는 원동력이 되고 있다. 원자현미경의 기계적인 발전과 더불어 응용기술의 발전도 빠르게 진행되고 있다. 앞에서 언급한 몇 가지의 원자현미경 응용 기술은 개발된 많은 응용 기술 중 일부뿐이지만 원자현미경의 거대한 연구 잠재성을 볼 때 더욱더 많이 활용할 수 있는 기술의 개발이 기대된다.

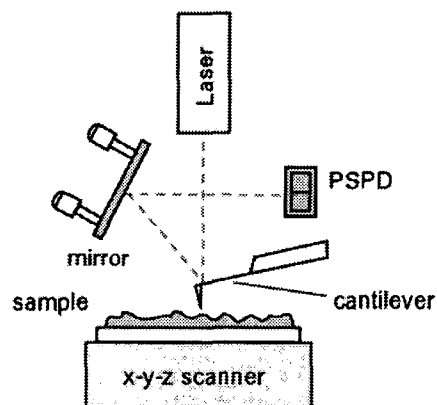
Application of Local Probe Techniques in Biological Research

Sang-Joon Cho, Ph.D.
KAIST

KAIST & PSIA

Schematics of AFM

- Deflection of cantilever is measured by laser beam bounce system.

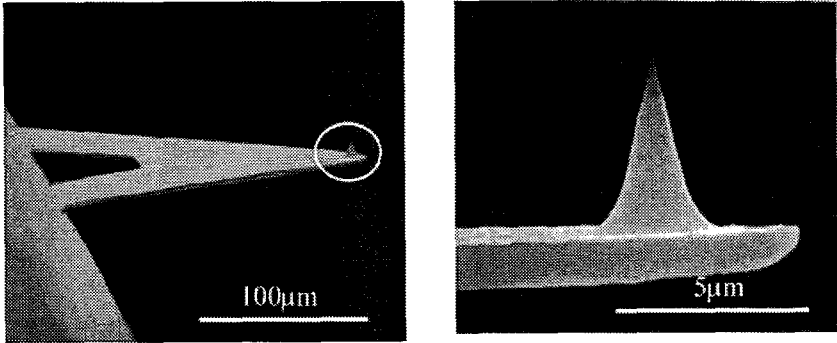


- Laser interferometer
- Piezo resistance
- Quartz tuning fork

Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

Typical AFM Cantilever and Tip



100 μ m

5 μ m

Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA


Advantages of AFM over TEM or SEM

- Accurate Height measurement to within 1 Å
- 3D representation of image
- No requirement for Au/Pd or C- sputter coating
- Does not require UHV conditions
- Does not use electron beam
- Ability to study in aqueous environments
- Manipulation of surfaces on sub-nanometer scale

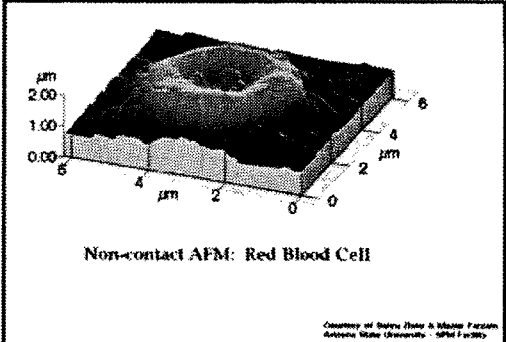
Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

AFM Images



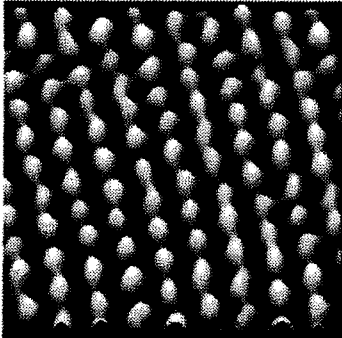
Micrograph showing a biological sample, likely a cell or protein complex, imaged using AFM. The image shows a textured surface with various features.



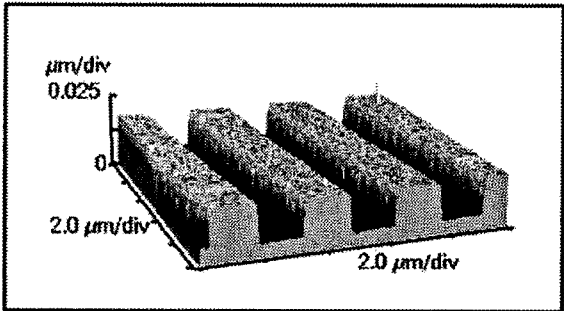
3D AFM image of a red blood cell. The vertical axis is labeled in μm with values 0.00, 1.00, and 2.00. The horizontal axes are also labeled in μm with values 0, 2, 4, and 6. The image shows a central depression in the cell's surface.

Non-contact AFM: Red Blood Cell

Courtesy of Robert Hertz & Marco Frazzini, Padova State University - SPN 1-2002



AFM image showing a regular, grid-like pattern of small, rounded features, possibly representing a surface structure or a biological array.



3D AFM image showing a surface with several rectangular features. The vertical axis is labeled $\mu\text{m/div}$ with values 0 and 0.025. The horizontal axes are labeled $2.0 \mu\text{m/div}$.

Mica: digital instruments; Gratings: www.eng.yale.edu

Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

Biological Application

1. DNA imaging
2. Cell imaging
3. DNA-protein interaction
4. Protein-protein interaction
5. Single-molecule force spectroscopy
6. Biomolecule nanolithography
7. Dynamics of biological sample

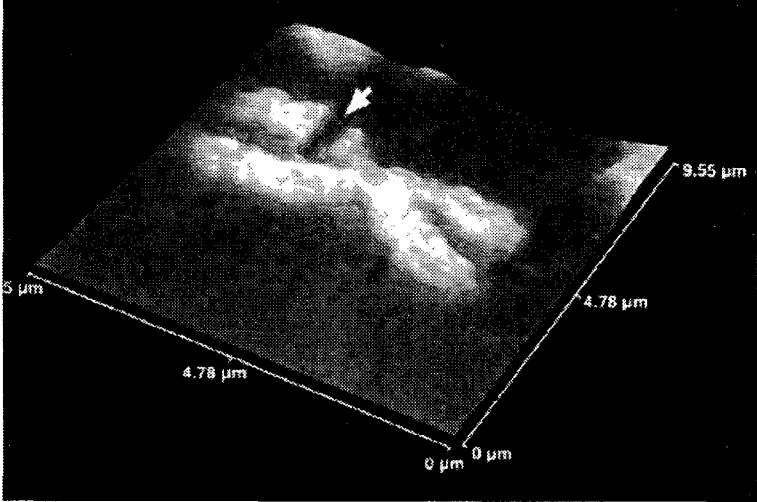
Potential of SPM in Biomedical Research

1. New Application Development
2. New SPM Development

Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

Human Chromosome 2

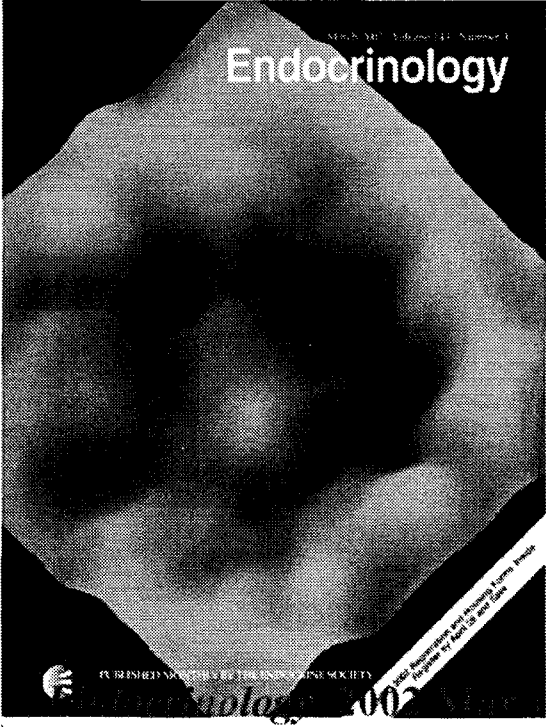


Thalhammer et al., 1997

Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

Growth Hormone Releasing Cell



Endocrinology

PUBLISHED MONTHLY BY THE ENDOCRINE SOCIETY

43(3) 1144

KAIST & PSIA

Cell-to-cell interaction

Glycoprotein csA in aggregating Cells of Dictyostelium discoideum

Figure (a) shows three stages of cell-to-cell interaction: Contact formation, Adhesion, and Bond rupture. Figure (b) is a micrograph showing cells interacting. Figure (c) is a graph of Adhesion force (100pN) vs Distance (μm) showing multiple curves. Figure (d) is a graph of Adhesion force (500pN) vs Distance (μm) showing multiple curves.

Nature Cell Biology, vol 2, June, 2000 : 313-317

Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

Protein-protein interaction

Figure (a) is a schematic titled "Adhesion Forces Between Individual Ligand-Receptor Pairs" showing a silicon AFM tip with Biotin-Avidin interacting with a Biotinylated agarose bead. Labels include "with Blocking". Figure (b) shows three force-displacement graphs labeled A, B, and C. Graph A shows "Approach" and "Retraction" with a 5 nN and 100 nm scale. Graph B shows a 5 nN and 100 nm scale. Graph C shows a 500 pN and 50 nm scale. The x-axis is labeled "Displacement" and the y-axis is "Force".

Science, vol 264, April 15, 1994 : 415-417

Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

Protein folding/unfolding studies by AFM

Stretching chains of identical Spectrin repeats

Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

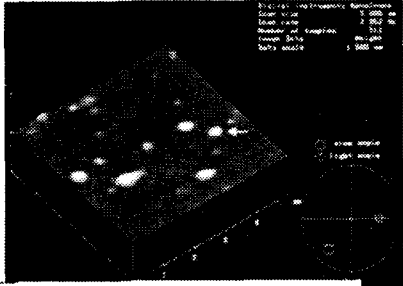
Single-molecule force spectroscopy

Science, vol 288, April 7, 2000 : 143-146

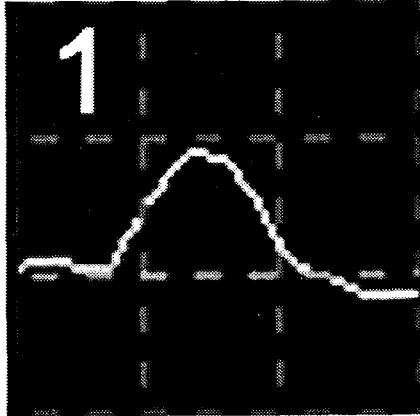
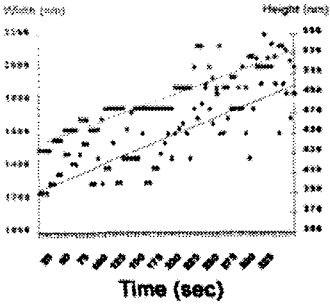
Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

Dynamics of biological sample



Dynamics of ZG + GTP



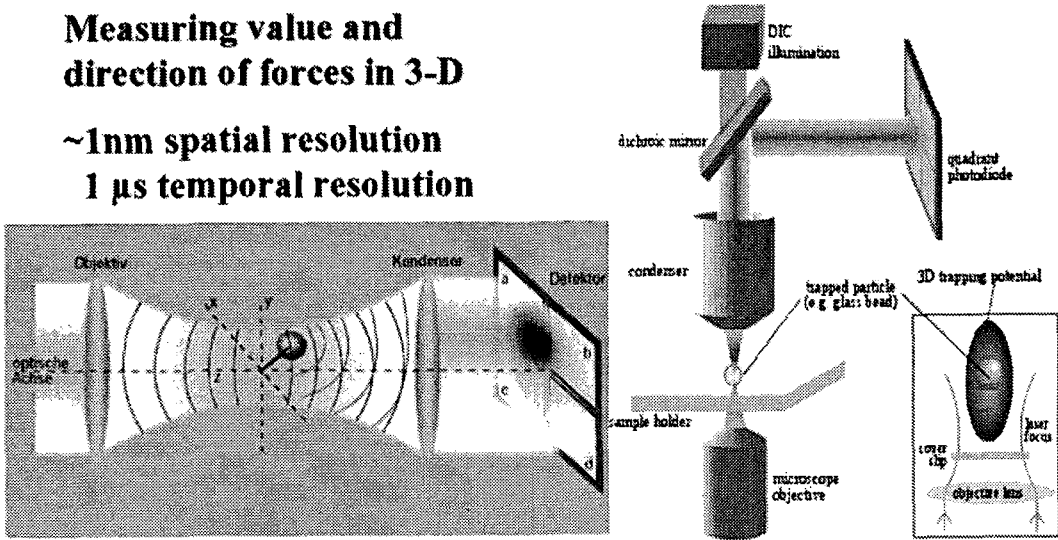
Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

The Photonic Force Microscope PFM

Measuring value and direction of forces in 3-D

~1nm spatial resolution
1 μ s temporal resolution

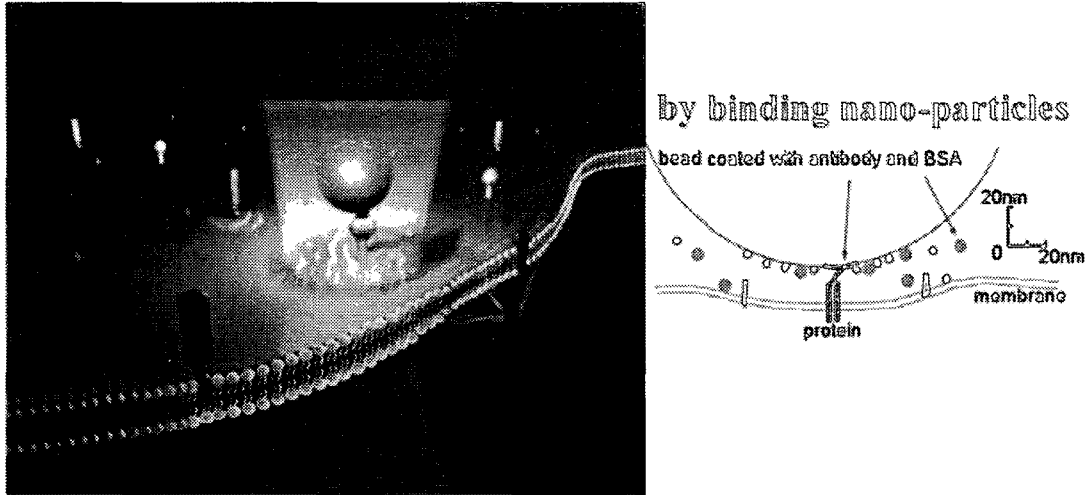


Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

Spotlight on the cell membrane

Measuring membrane viscosity and interaction of single membrane molecules or rafts using the PFM



by binding nano-particles
bead coated with antibody and BSA
20nm
0 20nm
membrane
protein

..... Advanced Local Probe Microscopes

KAIST & PSIA

Conclusions

- SPM is an powerful technique in biomedical research
 - SPM images provide information on the surface structure of biomolecular systems which is **complementary** to other established techniques such as light and electron microscopy, nuclear magnetic resonance and x-ray crystallography.

- The advantage of directly observing biomolecular systems in their **native environment** opens the exciting possibility to analyze their **structural** and **functional** properties at the submolecular level.

..... Advanced Local Probe Microscopes