

## 원자현미경을 이용한 생체물질의 접착력 측정기술 개발

김성주\*(포항공과대 대학원 기계공학과), 문원규(포항공과대 기계공학과),  
전종협(포항공과대 대학원 기계공학과)

### Novel measuring technique for biological adhesion forces using AFM

S. J. Kim(Mech. Eng. Postech), W. K. Moon(Mech. Eng. Postech), J.H. Jun(Mech. Eng. Postech)

#### ABSTRACT

The study on the interaction forces of some biological materials is important to understanding biological phenomena and their application to practical purpose. This paper introduces a measuring technique for biological adhesive forces using the AFM(Atomic Force Microscope). Since no standardized thesis on adhesive forces exist, the adhesive forces is defined as adhesive forces against a hardened surface of biological materials. To grant the results are meaningful, which is based on the understanding the surface characteristics of biological materials using the AFM, a nominal value of average adhesive force per unit area should be measured. Therefore the modified AFM probe with small micro glass bead was proposed so that it can guarantee the required contact area for measuring the average adhesive forces. A pyrex glass substrate with circular patterns, which was fabricated by micromachining technique, is introduced in order to controll the contact area. The two types of mussel adhesive proteins, Celltak and recombinant-MGFP5, were tested by the proposed measuring method. The test results show that the adhesive force of the mussel adhesive proteins can be reliably measured by use of this method.

**Key Words** : interaction force(상호작용력), adhesive force(접착력), AFM(원자현미경), adhesive protein(접착단백질)

#### 1. 서론

과거의 생체물질의 연구는 주로 화학적 특성을 연구하는데 주력하였지만, 생명 현상의 보다 정확한 이해와 그것의 실용적인 활용을 위해서는 물리, 역학적 측면에서의 생체물질의 특성과 동작원리에 대한 연구가 필요하다. 최근 나노 기술의 발달로 원자현미경(AFM-Atomic Force Microscope)과 같은 고정밀도의 측정장비가 보급됨에 따라 생체물질간의 상호 작용력(interaction force)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.[1] 이러한 생체물질들의 상호작용력중에서 생체물질과 특정 표면과의 접착력(adhesive force)은 물질의 고유한 특성으로서 의미를 갖는다. 그러나 아직까지 이러한 접착력에 대해서 물리화학적으로 통일된 이론이 정립되어 있지 않으며 접착제와 접착대상에 따라 다양한 이론들이 제시되고 있다. 더욱이 생체물질의 경우 그 형태와 결합력의 크기가 다양하므로 측정대상에 따라 적절한 측정 기술

의 개발이 필요하다. [2]

본 연구에서는 접착력을 접착제의 작용기들간의 내부작용에 의한 접착력과 구분하여 경화된 접착제의 표면 접착력을 지칭하는 것으로 통일하였으며, 일반적으로 약 5pN정도의 분해능을 갖고 수천 nN 수준까지의 넓은 영역의 힘측정이 가능한 AFM을 활용하여 생체물질의 접착력을 측정하였다.

접착단백질과 유리표면 사이의 접착력을 측정하기 위해서는 단백질의 표면특성에 관한 배경정보 획득과 단백질과 표면의 접촉상태를 규정할 수 있는 방안의 마련이 우선되어야 한다. 이에 따라 먼저 AFM의 각종 모드를 활용하여 홍합접착단백질의 표면특성을 이해하는 것부터 시작하였으며, 수정된 AFM probe와 일정한 형상을 가진 기저판(patterned substrate)을 사용함으로써 접촉상태를 규정하고, 접촉면적을 조절함으로써 생체물질의 접착력을 측정하기 위한 적절한 방법을 찾는 연구가 수행되었다.

## 2. 접착력 측정원리 및 생체접착단백질

AFM은 현재 가장 보편적이고 활용도가 높은 원자현미경으로서 마이크로머시닝(micromachining)으로 제작된 캔틸레버(cantilever)를 사용하여 시료표면의 정보를 아주 정밀한 3차원으로 표현가능하다. AFM은 기본적으로 물질표면의 형상을 측정할 수 있는 것외에 다른 특성들을 측정할 수 있도록 다양한 측정모드들이 개발되어 활용되고 있다. 그중에서 본 연구에서 활용하려는 접착력의 측정방법은 캔틸레버의 변위와 스캐너의 움직임과의 관계로부터 힘-거리 곡선을 산출하는 것이다. Fig. 1은 힘-거리 곡선에서 캔틸레버와 스캐너의 관계를 잘 보여준다.

- (A) AFM 스캐너의 상하 조작을 통해 캔틸레버와 시료를 접근시킨다.
- (B) 캔틸레버와 시료의 거리가 점차 가까워지다가 어느 순간 인력에 의해 급격히 가까워져서 접촉상태가 된다.
- (C) 캔틸레버와 시료가 접촉된 상태에서 스캐너가 접근 및 후퇴운동을 한다. 이때 이론적으로 캔틸레버와 시료의 변위는 동일하다.
- (D) 스캐너를 캔틸레버와 시료의 거리가 멀어지는 방향의 후퇴운동으로 조작을 하는데 접촉부위에 접착력이 작용하는 영역까지 캔틸레버가 휘어지면서 시료와 함께 움직인다. 이때 캔틸레버가 최대로 휘어진 지점에서 환산된 힘이 시료의 표면 접착력이 된다.
- (E) 캔틸레버의 최대 변위 지점을 넘어서면 캔틸레버가 시료에서 순간적으로 떨어져서 변위가 없는 초기 상태로 돌아간다.

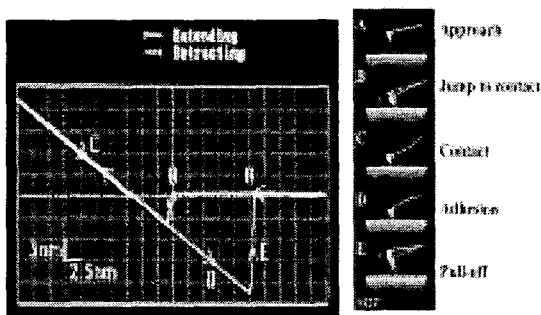


Fig.1 Force-distance curve in AFM

융합 접착단백질은 어떠한 화학합성 접착제보다도 강력한 자연 접착제로 알려져 있으며 습기가 많은 곳에서도 강한 접착력을 발휘하며, 생체에 사용시 인간세포를 공격하거나 면역반응을 일으키지 않아서 의학분야에의 활용도가 매우 높다고 할수 있다. [3] 이러한 융합접착단백질의 탁월한 특성을 적

극적으로 활용하기 위해 천연융합단백질보다 더 우수한 접착능력을 보여주는 인공융합접착단백질(수퍼단백질)이 개발되고 있다.[4] 이렇게 개발된 수퍼접착단백질의 환경에 대한 접착능력을 검증하기 위해서는 접착단백질에 대한 적절한 접착력 측정 기술이 반드시 필요하다. 본 연구에서는 천연융합에서 추출해낸 상용 융합접착 단백질인 Celltak과 천연 접착단백질의 연구를 통해 만들어낸 수퍼단백질인 재조합 MGFP-5 (recombinant MGFP-5)에 대한 접착력을 측정하였다.

## 3. 측정대상의 표면 특성 연구

우선 측정 대상인 접착단백질에 대한 표면특성을 파악하기 위해 AFM의 다양한 모드를 활용하였으며, 그 결과를 통하여 새로운 접착력 측정법을 제안하는 근거를 마련하였다.

Figure 2는 대표적인 천연융합단백질인 Celltak을 충분히 말린 시료에 대해 AFM을 이용하여 표면형상을 찍고, 그 형상의 정보를 바탕으로 각 지점의 접착력을 측정한 결과이다. 측정결과 상대적으로 낮은 지점, 곧 단백질이 적은 지점이라고 판단되는 곳에서의 접착력이 더욱 강하게 측정되는 모순된 결과를 얻었다. 이러한 결과는 1)형상 정보 획득시 캔틸레버팁의 오염, 2)단백질과 캔틸레버팁의 접촉면적의 변화, 3)접착단백질의 강한 내부 결합에 의한 코팅효과 등에 기인한 것으로 판단되며, 반복된 실험결과에서 유사한 경향을 보여주지 않는다.

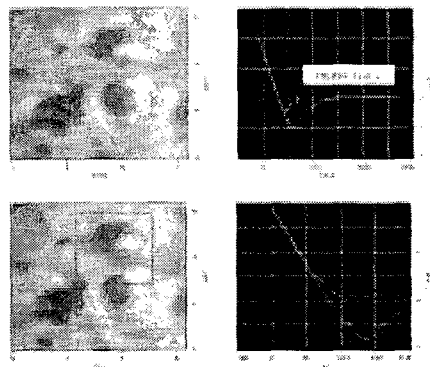


Fig. 2 Adhesion force measurement based on topograph

Figure 3은 기존의 고농도 단백질(BSA)을 증류수로 희석하여 분포를 달리하도록 처리한 후 공기중에서 말린 뒤에 AFM의 마찰력 측정모드(FFM, friction force mode)를 활용하여 표면마찰력과 접착력을 측정한 결과이다. 측정결과 표면 마찰력의 분포

와 접촉력과는 무관함을 알 수 있다. 그리고 표면 마찰력과 표면 형상의 정보는 완전히 독립적이지 않을 수 있기 때문에 데이터 처리를 통해 마찰력 정보에서 형상의 정보를 제거한 정보를 얻었지만, 역시 뚜렷한 마찰력의 분포와 접촉력의 분포와의 관계는 찾을 수 없었다.

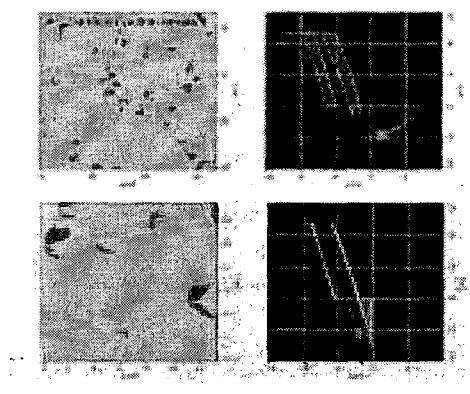


Fig. 3 Adhesion force measurement based on surface friction force

#### 4. 단위 면적당 접촉력 측정

3장의 결과로부터 특정 단백질의 표면 접촉력으로서 의미있는 측정치를 얻기 위해서는 어느 정도의 접촉 면적이 보장되어야 하고, 일정한 면적에서 얻은 접촉력 데이터들에 대한 평균값등의 대표값을 규정해야 할 것으로 판단된다. 곧 SAM(self assembled monolayer) 등으로 시료와 캔틸레버 팁의 표면처리를 통해 균일한 조건을 조성하지 않는 한, 기존의 캔틸레버로 얻은 힘곡선을 활용한 아주 작은 접촉면적에 대한 단백질 표면 일부분의 측정 결과는 무의미할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 접촉 면적을 넓히는 일반적인 방법 이외에 일정한 형상을 가진 기저판을 사용함으로써 접촉면적을 조절할 수 있게 되어 단위 면적당 접촉력을 측정하였으며, 측정결과와 편차를 줄일 수 있었다.

Figure 4(a)는 캔틸레버 끝단에 구슬을 붙여서 접촉면적을 넓히는 일반적인 방법을 따라 캔틸레버를 수정한 결과이다.[5] 우선 에폭시 접착제(epoxy resin)를 캔틸레버의 끝단에 묻힌후 유리구슬을 붙이고 상온에서 24시간 이상 접착제를 굳힌다. 사용된 구슬은 Duke Scientific Corporation사에서 제작한것으로 미국표준기술연구소(NIST)의 인정을 받은것이며, 평균 지름은 20.3? 4μm이다.

Figure 4(b)는 일정한 패턴이 있는 유리 기저판을 마이크로머시닝 공정으로 제작한 결과이다. 패턴

의 오염물이나 불균일 확률을 최소화하기 위해 한번의 습식 식각으로 제작하였으며, 수정된 팁의 구슬의 구면과 기저판의 평면이 유효 접촉을 할 수 있도록 크기를 조절하였다. 유효면적의 크기를 고려한 패턴의 크기는 다음과 같이 구할수 있다.[2]

For the surface separation D, the effective area A, bead radius R, the spherical-surface interaction is

$$\begin{aligned}
 A &= 2\pi RD / (n - 5) \\
 &= 2\pi RD \quad (\text{for } n = 6, \text{ vanderwaals forces}) \\
 &= \pi x^2 \\
 R &= 10\mu\text{m}, \quad D = 0.5\mu\text{m} \quad (\text{by protein}) \\
 \text{available radius } x &= \sqrt{2RD} = 3.16\mu\text{m} \\
 \therefore \text{pattenradius} &< 3\mu\text{m}
 \end{aligned}$$

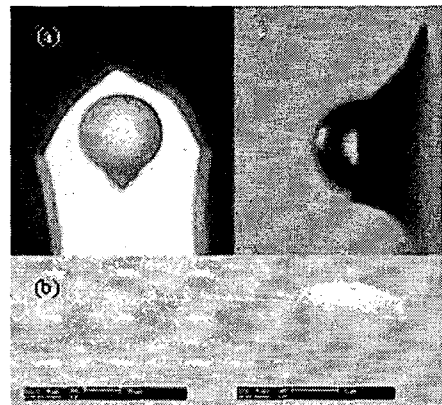


Fig. 4 (a) Cantilever tip modification with micro bead (b) Fabrication of circular patterned substrate

Figure 5는 수정된 캔틸레버와 패턴을 가진 기저판을 이용하여 단위면적당 접촉력 측정을 위한 개념도이며, 실험 과정은 다음과 같다.

- (1) AFM의 접촉모드로 패턴의 돌출부 면적을 구한다.
- (2) 수정된 캔틸레버를 장착하여 접촉 지점을 찾기 위해 표면 정보를 획득한다.
- (3) 캔틸레버와 기저판 사이에 단백질 흡착을 위한 공간을 확보한다.
- (4) 보조기구를 사용하여 수정된 캔틸레버의 끝단에 단백질을 흡착시킨다. 단백질 용액에 캔틸레버의 구슬부분을 용액에 담그고(10분), 공기중에서 충분히 말린다.(20분)
- (5) (2)과정에서 획득한 표면 이미지를 토대로 힘곡선을 얻는다.

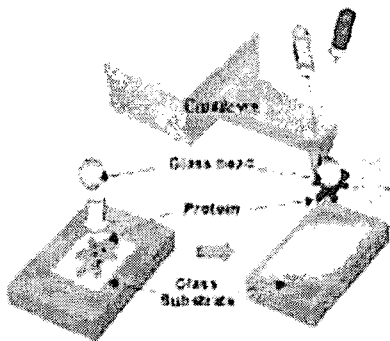


Fig. 5 Schematic view of measurement system

기존에 알려진 방법은 유리 기저판에서 접착단백질을 말린 후 수정된 팁과의 접착력을 측정하는 것이다. 그러나 수정된 팁에 직접 단백질을 흡착시킨 후 접착력을 측정함으로써, 우선 접촉면적에 영향을 받는 측정 결과에 대한 편차를 줄일 수 있고, 구슬을 이루는 재료의 가공의 제한을 벗어나, 기저판을 변경함에 따라 다양한 표면에 대한 단백질의 접착력 실험이 가능해진다.

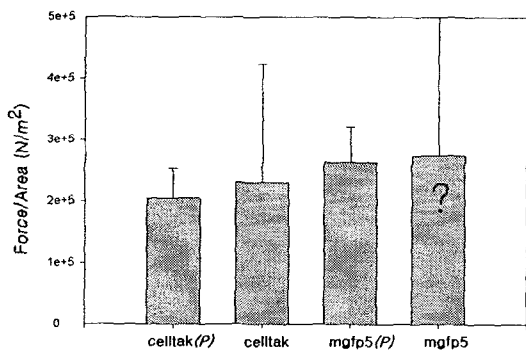


Fig. 6 Measured adhesion force per unit area

Figure 6은 한가지의 시료에 대해 4-5개의 캔틸레버로 패턴 혹은 패턴이 없는 기저판의 4-5개의 지점에 대한 10여차례의 힘곡선으로부터 얻은 유효값에 대한 통계치이다. 결과는 예상 가능한 경향을 잘 보여주고 있다. 패턴이 없이 측정된 경우의 결과 편차(평균값의 24%)가 패턴이 있는 경우의 결과(평균값의 84%)에 비해 눈에 띄게 크다는 것을 확인할 수 있다. 이는 결과의 균일성에 있어서 패턴의 효과를 보여준다. 단위 면적당 작용한 접착력이므로 패턴이 있는 경우는 접촉면적을 규정할 수 있었는데 반해, 패턴이 없는 경우의 결과는 접촉면적을 알 수 없으므로 패턴의 접촉면적을 그대로 사용하였다. 따라서 위 결과는 실제 패턴이 없는 경우의 접촉면적이 패턴에 의한 접촉면적보다 다소 크다는 것을 말해준다.

다. 그리고 재조합해낸 MGFP5가 슈퍼단백질로서 천연 단백질인 celltak에 비해 단위 면적당 접착력이 더 우수함을 확인할 수 있다.

## 5. 요약 및 결론

본 연구에서는 AFM을 활용하여 접착단백질의 접착력을 직접 측정하였다. 구슬을 이용한 캔틸레버의 수정과 패턴이 있는 기저판의 제작을 통해 접촉면적을 규정할 수 있게 하여 단위면적당 접착력을 측정하였다. 이렇게 측정된 단위 면적당 접착력은 특정 표면에 흡착된 생체 물질에서 접착력 유발 작용기가 표면에 비교적 고르게 분포되어 있으므로 일정한 면적에 대한 통계적인 힘의 값이 의미 있다는 연구결과에 근거하여 설정된 것으로 생체물질의 특성으로 고려할 수 있을 것이다.

## 후기

본 연구는 과학기술부가 지원하는 특정연구개발사업 중 나노핵심기술개발사업에 의하여 수행 중인 나노생체물질의 초미세력 감지기술개발 과제(M10214000116-02B1500-02010)의 지원으로 수행되었으며, 이에 관계자 여러분들께 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Nuno C. Santos, Miguel A.R.B. Castanho "An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy" Biophysical Chemistry, Vol. 107, pp. 133 - 149, 2003.
2. Jacob N. Israelachvili, "Part One-The Forces between Atoms and Molecules : Principles and Concepts, Part Two-The Forces between particles and Surfaces" Intermolecular and surface forces with applications to colloidal and biological systems, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic press, 1987
3. Debra Utacia Krol, "Mussel Power", 03.16.2000, [http://www.sciencentral.com/articles/view.php3?language=english&type=&article\\_id=218391170](http://www.sciencentral.com/articles/view.php3?language=english&type=&article_id=218391170)
4. D.S. Hwang, H.J. Yoo, J.H. Jun, W.K. Moon, H.J. Cha, "Expression of Functional Recombinant Mussel Adhesive Protein Mgfp-5 in Escherichia coli", Applied and environmental Microbiology, vol. 70, pp3352-3359, 2004
5. H. Kim, H. Arakawa, T. Osada, A. Ikai, "Quantification of fibronectin and cell surface interactions by AFM", Applied Surface Science, vol. 188, 2002