

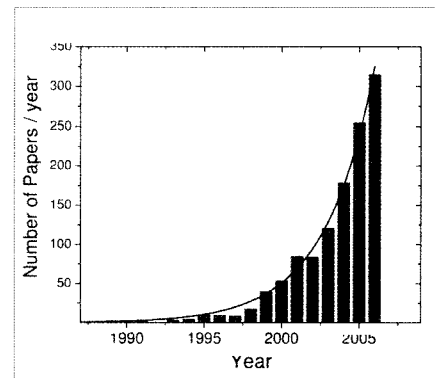
Single-Molecule Detection in Biology



포스텍 물리학과
이종봉 교수

생명현상의 특징은 heterogeneity와 stochastic fluctuation에 있다. 즉 하나의 앙상블(ensemble)에 있는 생체분자들이라도 각각의 서로 다른 반응 rate를 가지고 있으며, 노이즈와 더불어 반응이 일어난다. 이러한 복잡성을 규명하기 위해서는 새로운 물리적 개념 및 방법이 필요하다. 전통적으로 대부분의 생물학적 연구는 앙상블에서 생체분자들 또는 세포들의 평균된 정보들이었으므로, 한 앙상블에 있는 각각 다른 특성을 가진 생체 분자들의 동역학을 연구하는데 한계가 있었다. 그러나 과학적 기술의 발달로 인해 생체분자들의 개별적인 조작과 관측이 가능하게 되었다. 그러므로 앙상블 평균을 제거하고, 생화학적 반응이 일어나는 동안 각각의 분자를 시간에 따라 추적함으로써, 생체분자 성질들의 요동성(fluctuation)과 분포(distribution) 등의 특성을 알아낼 수 있고, transient intermediates 또한 관측이 가능하게 되었다. 이러한 단일분자 기술(single-molecule technique)들이 가진 장점들로 인해서, 단일분자 생물물리학(single-molecule biophysics)은 그간 관측할 수 없었던 새로운 현상을 관찰하거나 오랜 시간 해결되지 못한 생명현상에 대한 이해를 획기적으로 높임으로써 전 세계적으로 각광 받고 있는 분야이다. 단적으로 그림 1은 PubMed 데이터베이스에 “single molecule”의 제목으로 각 해에 출판된 논문편수의 히스토그램이다. 2.2년 마다 두 배로 성장하는 지수함수 패턴을 보여준다. 비록 매우 간단하고 근사적인 측정이지만 단일분자 분야의 빠른 성장을 보여 주고 있다.^[1]

현재까지 다양한 단일분자 관찰 (detection) 방법들이 개발되어 사용되고 있다.^[2] 일반적으로 가장 많이 사용되는 방법에는 형광분자를 관찰할 생체분자에 고정하여 형광분자에서 방출하는 광자로부터 생체분자의



[그림1] PubMed에 등록된 논문중 제목에 “single molecule”을 포함한 논문의 수에 대한 각 년도 별 히스토그램. ^[1]

운동을 관찰하는 것과 DNA, RNA와 같은 생체분자의 template에서 일어나는 변화를 관찰하는 것이 있으며, 최근에는 이 둘을 조합하여 좀 더 자세한 정보를 얻어 내리는 추세이다. 여기서는 가장 많이 사용되는 force-based 방법과 형광 (fluorescence) 방법, 두 개의 분야를 살펴 보고자 한다.

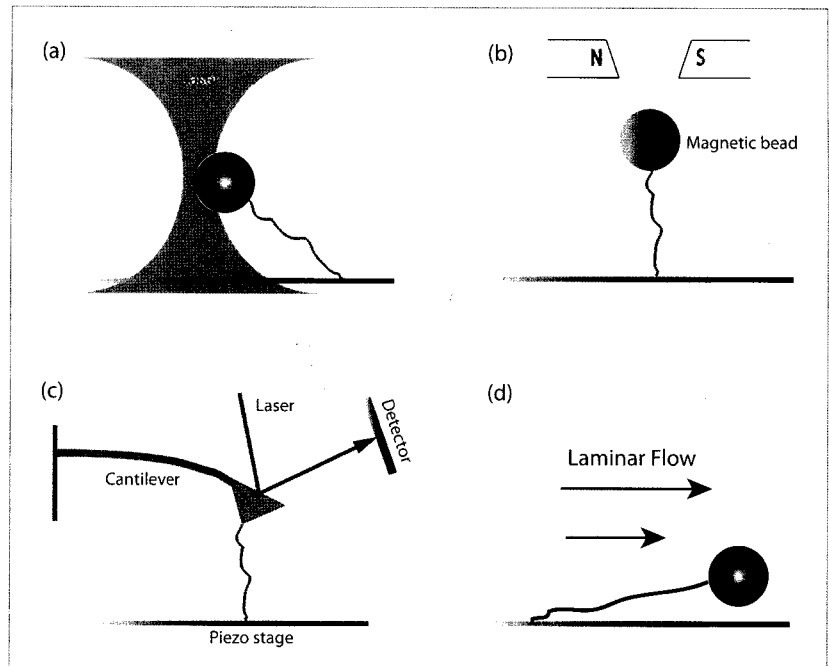
단일분자 관찰 방법

가. force-based 방법

- Optical tweezers : 용액 안에 작은 크기의 유전체 bead($\sim 1\mu\text{m}$)에 focus된 laser beam이 입사할 때 두 물질의 굴절률 차이로 인해 입사 빔 세기의 변화에 비례하는 힘이 그 bead에 전달된다.

이러한 성질을 이용하여 bead에 DNA, RNA, 또는 단백질 등의 생체분자를 붙이고, 생체분자의 다른 한쪽은 표면에 고정하여 bead를 구속한다.(그림 2 (a)) 입사 빔의 세기 또는 bead의 위치 변화를 줌으로써 bead에 결합된 생체분자에 힘을 가할 수 있다. 생체분자에 가할 수 있는 힘은 일반적으로 0.1pN에서 100pN 사이이다. Bead의 위치변화에 대한 feedback loop을 이용하여 일정한 힘을 생체분자에 가할 수 있으며, 다른 하나의 detection laser 또는 trapping laser의 산란 빛을 이용하여 bead의 위치를 추적함으로써 생체분자의 운동을 추적할 수 있다. 이 optical tweezers의 가장 큰 장점은 단지 수 Å의 공간 분해능을 가지고 생체분자의 운동을 관찰할 수 있다는 것에 있다.^[6] 그러나 실험 셋팅 및 운용에 많은 기술적 인 노하우가 필요하다.^[4]

- Magnetic tweezers : superparamagnetic bead에 고정된 생체분자를 자기력을 이용해서 manipulation하는 방법이다.^[5] Bead에 작용하는 이 힘은 magnetic field gradient에 비례한다. 이 magnetic field gradient는 생체분자의 운동의 length scale에 비하여 매우 크므로 일정하다고 할 수 있다. 그러므로 생체분자를 관찰하는 동안 feedback loop없이 일정한



[그림2] 힘에 근거한 단일분자 기술. (a)Optical tweezers (b)Magnetic tweezers (c)Atomic force microscopy(AFM) (d)Flow stretching method

힘을 적용할 수 있다. 또한 자석을 회전시켜 생체분자에 회전력을 가할 수 있어 DNA의 supercoiling 특성을 연구하는데 주로 사용되고 있다.^[6] 생체분자의 운동은 bead의 위치변화를 추적하여 결정한다. 힘의 범위는 0.05~20pN으로서 상대적으로 작은 힘을 생체분자에 적용할 수 있고 약 10nm의 공간 분해능을 구현할 수 있다.^[5]

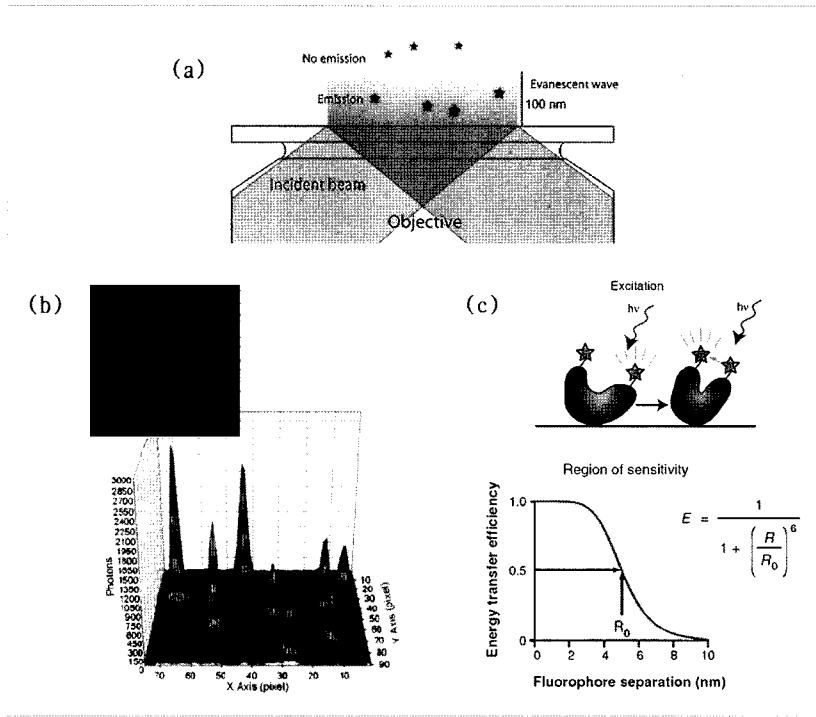
- Atomic force microscope(AFM) : AFM 팁(tip)과 표면 사이에 적용하는 힘을 이용하여 수 Å의 분해능을 가지고 표면 이미징에 주로 사용되어 오고 있는 방법이다. 그러나 근래에 단일분자 manipulation에 많이 사용되고 있다. Cantilever의 팁에 생체분자를 공유결합 방법 또는 흡착을 이용해서 고정하여 piezo stage를 수직축 방향으로 이동함으로써 생체분자에 힘을 가할 수 있다. 생체분자에 작용하는 힘은 cantilever의 탄성정도와 움직인 거리에 의해 결정된다. 움직인 거리는 cantilever 상단에 반사되는 빔을 position-sensitive detector를 이용하여 관측한다.^[7]

AFM은 다른 방법들 중 가장 큰 힘을 가할 수 있어 단백질 folding/unfolding 연구에 많이 이용되고 있다.^[8,9] 적용할 수 있는 힘의 범위는 5~10,000pN이다.

● Flow-stretching : 위의 세 가지 방법은 한 번에 한 개의 생체분자를 관찰할 수 있다. 그러나 이 flow stretching 방법은 한 번에 수백 개의 개별 생체분자를 관찰할 수 있는 방법이다.^[10] DNA의 한 쪽 끝을 glass 표면에 고정하고, 다른 한 쪽 끝을 micrometer 크기의 bead에 연결한다. Laminar flow를 가하여 glass 표면에 평행한 drag 힘이 bead에 작용하여 DNA를 stretching한다. 힘은 flow rate와 bead의 크기에 의해 결정되며, 가할 수 있는 범위는 1pN에서 수십 pN까지 가능하다. DNA에서 일어나는 변화를 bead의 위치를 추적하여 관찰한다. 그러나 flow에 의한 요동 등에 의해 공간 분해능이 떨어지는 단점이 있다. 약 16 μ m의 contour length를 가지고 있는 λ -phage DNA를 사용할 경우 3pN에서 약 50nm의 공간 분해능을 가지고 있다. 단백질 assemblies의 경우 여러 단백질의 상호작용이 요구되므로 단일분자 수준에서 관찰하기에 많은 노력이 필요하다. 그러한 단일분자 수준에서 단백질 complex의 event를 관찰하기 위해서는 현재까지 이 multiplexed 방법이 적합하다.^[11]

나. Fluorescence 방법

Single-molecule 형광 실험은 하나의 형광분자에서 방출되는 광자의 수가 적으므로 신호를 노이즈로부터 분리하기가 어렵다. 그러나 signal-to-noise 비가 매우 높은 Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy(TIRFM)를 이용하면 하나의 형광분자로부터 방출되는 작은 신호도 관찰할 수 있다.^[12] TIRFM은 입사되는 빛이 glass-water 경계면에서 완전히 반사될 때, 입사 빛의 electromagnetic field가 경계에서 연속성을 만족시키기 위해 evanescent wave가 발생하는 원리를 이용한다. 이 evanescent wave는 경계로부터 약 100nm의 depth를 가지고 진행한 후 소멸하므로 focal plane 바깥으로부터의 background fluorescence를 제거하게 된다.(그림 3 (a)) TRIFM은 개개의 생체분자의 운동을 실



[그림3] (a)Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy(TIRFM) (b)형광분자의 2-dimension Gaussian 함수 fitting을 통해서 생체분자의 위치를 수 nm의 정확도를 가지고 결정한다.^[14] (c)Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)^[19]

시간으로 관찰하거나 두 형광분자사이의 에너지 전달을 측정하여 상호작용을 연구하는 Fluorescence Resonance Energy Transfer(FRET)등에 광범위하게 사용되고 있는 단일분자 수준의 형광 이미징에 가장 많이 사용되는 현미경이다.

● Particle Tracking

Particle tracking 방법은 생체분자의 운동을 직접, 실시간으로 관찰할 수 있는 방법으로써 생체분자에 고정된 형광분자를 TIRFM을 이용하여 시간에 따라 생체분자에 고정된 형광분자의 위치를 추적한다. 관측된 형광분자의 intensity profile을 2-dimension Gaussian 함수로 fitting하여 그 형광분자의 위치를 결정할 수 있다.(그림 3 (b)) 위치를 결정하는데 주어지는 불확실도는 $\sqrt{\frac{N}{s}}$ 로서 근사된다. 여기서 s는 Gaussian 함수 fitting에 의해 얻어진 표준편차이며, N은 형광분자가 방출하는 광자의 수이다. 즉 형광분자의 밝기가 밝으면 밝을수록 더 정확한 위치를 정할 수 있다.^[13,14] 충분히 밝은 형광 분자의 경우 1초의 integration time에서 수 nm의 공간 분해능을 가지고 형광분자의 위치를 정할 수 있다. 최근

에는 이러한 위치 정확도를 이용하여 diffraction limit의 벽을 허무는 형광 현미경에 이용하고 있다.^[15,16]

● Fluorescence Resonance Energy Transfer(FRET)


두 개의 서로 다른 형광분자를 이용하여 생체분자의 수 nm 수준의 운동을 관찰하는 방법이다. Laser를 이용한 donor인 형광분자의 excitation이 dipole-dipole 상호작용에 의해 10nm 이내 가까이 있는 또 다른 형광분자인 acceptor에게 그 에너지가 전달되어 acceptor의 광자 방출을 관찰함으로써 두 형광분자의 상호작용을 통해 생체분자의 운동을 관찰한다.^[17,18] 그 에너지 전달의 효율, E , 은 다음과 같다.

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

여기서 R 은 두 형광분자, donor와 acceptor사이의 거리이며, R_0 은 50%의 에너지가 전달되는 두 형광분자사이의 거리이다. 에너지 전달 효율은 두 형광분자사이 거리의 6승에

반비례하므로 3~8nm 범위에서 발생하는 생체분자들 사이의 상호작용 또는 생체분자의 conformational 변화 등을 연구하는데 매우 효과적인 방법이다.(그림 3 (c))

맺음말

앞서 살펴본 단일분자 기술들은 주로 개별적 생체분자들에 대한 mechanism 및 동역학 연구에 많은 기여를 해오고 있다. 그러나 생명현상에 있어서 대부분의 효소들은 multiprotein complexes 안에서 다른 효소들과 상호작용함으로써 그 기능을 수행하게 된다. 그러므로 single-molecule 기술들을 이용하여 생명현상에 참여하는 macromolecular assemblies의 연구가 향후 연구 방향의 핵심이 될 것으로 기대된다. 그러므로 현시점에서 생물학적 complex system을 연구할 수 있는 단일분자 관측 기술들의 개발이 시급히 요구되고 있으며 이전까지 세포 밖에서 수행되어 온 많은 단일분자 실험들이 세포내에서의 생체분자의 동역학 연구로 전환되어 시도되고 있다. 

참고문헌

1. W.E. Moerner. New directions in single-molecule imaging and analysis. PNAS 104, 12596(2007)
2. N.G. Walter, C.-Y. Huang, A.J. Manzo, M.A. Sobhy. Do-it-yourself guide: how to use the modern single-molecule toolkit. Nat. Methods 5, 475(2008)
3. E.A. Abbondanzieri, W.J. Greenleaf, J.W. Shaevitz, R. Landick, S.M. Block. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. Nature 438, 460(2005)
4. J.R. Moffitt, Y.R. Chelma, S.B. Smith, C. Bustamante. Recent advance in optical tweezers. Ann. Rev. Biochem. 77, 205(2008)
5. C. Gosse, V. Croquette. Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. Biophys. J. 82, 3314(2002)
6. G. Charvin, J.F. Allemand, T.R. Strick, D. Bensimon, V. Croquette. Twisting DNA: single molecule studies. Contemp. Phys. 45, 383(2004)
7. T.E. Fisher, P.E. Marszalec, J.M. Fernandez. Stretching single-molecules into novel conformations using the atomic force microscope. Nat. Struct. Biol. 7, 719(2000)
8. M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez, H.E. Gaub. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. Science 276, 1109(1997)

9. H. Dietz, M. Rief. Exploring the energy landscape of GFP by single-molecule mechanical experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16192(2004)
10. A.M. van Oijen, P.C. Blainey, D.J. Crampton, C.C. Richardson, T. Ellenberger, X.S. Xie. Single-molecule kinetics reveal base dependence and dynamic disorder of lambda exonuclease. *Science* 301, 1235(2003)
11. J.B. Lee, R.K. Hite, S.M. Hamdan, X.S. Xie, C.C. Richardson, A.M. van Oijen. DNA primase acts as a molecular brake in DNA replication. *Nature* 439, 621(2006)
12. T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* 374, 555(1995)
13. R.E. Thompson, D.R. Larson, W.W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* 82, 2775(2002)
14. A. Yildiz, J.N. Forkey, S.A. McKinney, T. Ha, Y.E. Goldman, P.R. Selvin. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* 300, 2061(2003)
15. B. Huang, W. Wang, M. Bates, X. Zhuang. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* 319, 810(2008)
16. E. Betzig et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313, 1642(2006)
17. T. Ha. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Methods* 25, 78(2001)
18. R. Roy, S. Hohng and T. Ha. A practical guide to single-molecule FRET. *Nat. Methods* 5, 507-516 (2008)
19. W. J. Greenleaf, M.T. Woodside, S.M. Block. High-resolution single-molecule measurement of biomolecular motion. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 171(2007)