

## 원자힘현미경을 이용한 지지 지질층의 특성규명

박진원<sup>†</sup>

경원대학교 바이오나노대학  
461-701 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65번지  
(2009년 4월 20일 접수, 2009년 6월 19일 채택)

### Characterization of Supported Lipid Layers Using Atomic Force Microscopy

Jin-Won Park<sup>†</sup>

College of Bionanotechnology, Kyungwon University, San 65, Bokjeong-dong, Sujeong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi 461-701, Korea  
(Received 20 April 2009; accepted 19 June 2009)

#### 요 약

원자힘현미경은 초미세크기의 물리적 특성을 규명하기 위한 수단으로서 지지 지질층의 물리적 특성 규명에 이용되어 왔다. 원자힘현미경이 출현하기 이전에는 초미세관점에서 지지 지질층에서 발생하는 물리적 현상의 관찰이 전무하였다. 이 현미경은 탐침바늘(Cantilever)로 표면을 주사(Scanning)함으로써 표면의 초미세 형상(Morphology)을 제공하고 표면에 접근(Approach)했다가 후퇴(Retract)하는 탐침바늘의 거동을 모니터링함으로써 힘곡선(Force Curve)을 나타낼 수 있다. 형상 파악을 통해 지지 지질층의 구조와 막 단백질이 지질층의 구조에 미치는 영향을 밝히는 연구가 진행되어 왔으며, 힘곡선을 통하여 지지 지질층 표면 특성-기계적-정전기적 특성-에 대한 연구가 진행되었다. 본 총설에서는 원자힘현미경을 이용하여 현재까지 진행된 지지 지질층의 구조와 표면 특성 연구에 대하여 소개하고 향후 연구 진행 방향에 대하여 논의하고자 한다.

**Abstract** – The atomic force microscopy (AFM) has been used, as a powerful tool, to investigate physical properties of supported-lipid layers. Prior to the advent of the AFM, no observation was performed for the physical phenomena at the nanometer-scale. This microscope provides nanometer-scale morphology by scanning surfaces with the cantilever and presents force curve by monitoring the behavior of the cantilever that approaches to surface and retracts from the surface. From the morphology, the structures of the supported lipid layer and the effect of other molecules on the structures have been investigated. From the force curve, the surface properties—electrostatic and mechanical properties—of the supported lipid layers have been studied. In this article, characterization of the structure and surface properties of the supported lipid layer is explained. Future perspectives and direction are also discussed.

Key words: Supported Lipid Layer, AFM, Morphology, Force Curve, Structure, Surface Properties

#### 1. 서 론

지지 지질층(Supported Lipid Layer)은 일반적으로는 마이카(Mica), 실리카(Silica) 또는 유리덮개판(Cover Slide) 등의 고체 표면 위에 형성된 지질층을 의미한다. 이 지질층은 생체막에 대한 모형으로서 기초와 응용 연구 관점에서 많은 관심을 받아왔다. 그에 따라, 생체막의 구조와 특성을 파악하고, 분자인식, 물질수송, 효소촉매작용, 세포부착, 세포간 정보교환, 그리고 막 융합과 같은 생물학적 과정들을 규명하기 위하여 이용되었다[1-11]. 또한, 지지 지질층은 바이오센서, 나노디바이스, 약물 검출 및 전달, 치료용 벡터, 무기표면에 생기능성 부여 등의 분야들에 응용될 수 있다[12-17].

지지 지질층을 분석하는 표면특성분석기기에는 여러 가지가 있다.

형광현미경(Fluorescence Microscopy), Brewster 각도현미경(Brewster Angle Microscopy), X-선 반사와 회절(X-ray Reflection and Diffraction), 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance), 미량수정저울(Quartz Crystal Microbalance), 표면 강화 라만 분석기(Surface Enhanced Raman Spectroscopy), 엘립소메트리(Ellipsometry), X-선 광전자 분광기(X-ray Photoelectron Spectrometry), 비행시간이차이온질량분석법(Time-Of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry) 등이 있다[8, 18-23]. 이러한 표면특성분석기기들로부터 여러 가지 유용한 표면 특성들을 파악할 수 있다. 그러나, 원자힘현미경이 출현하기 전까지, 나노미터 수준으로 지지 지질층의 구조와 특성에 대하여 알려진 바가 없다.

원자힘현미경의 출현으로 지지 지질층을 포함한 여러 연구 분야에 새로운 가능성이 제시되었다[24]. 지지 지질층의 연구에 대하여 원자힘현미경만이 갖는 장점들은 (i)실시간으로 수용액 환경에서 지질

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: jwpark@kyungwon.ac.kr

이중층의 나노구조와 그 변화를 모니터링할 수 있다는 것, (ii) 높은 해상도에서 물리적 특성의 직접적인 측정이 가능하다는 것, 그리고 더 나아가 (iii) 정밀한 제어가 가능한 조건에서 지질층의 구조와 물리적 과정들에 변화를 줄 수 있다는 것이다. 이러한 장점들로 인하여 지지 지질층 연구에 대한 원자힘현미경의 활용이 지속적으로 증가하고 있다. 지속적인 증가가 논문의 수로 증명될 수 있는데, 2000년도 이전까지 지지 지질층에 원자힘현미경을 활용하여 발표된 연구 논문의 수가 60여 편이었으나, 2000년 이후에는 300편에 가까운 논문들이 발표되었다.

원자힘현미경의 원리와 방식들에 대하여 이미 널리 알려져 있으므로, 본고에서는 다루지 않는다. 원자힘현미경은 탐침바늘(Cantilever)로 표면을 주사(Scanning)함으로써 표면의 초미세 형상(Morphology)를 제공하고 표면에 접근(Approach)했다가 후퇴(Retract)하는 탐침바늘의 거동을 모니터링함으로써 힘곡선(Force Curve)을 나타낼 수 있다. 형상 파악을 통해 단일 성분 또는 여러 성분들로 구성된 지지 지질층의 구조를 분석함으로써 상 분리(Phase Separation) 등의 물리적 현상을 규명하였으며, 지지 지질층 자체 외에도 다른 분자들이 첨가됨에 따라 나타나는 변화에 대하여도 수행되었다.  $Ca^{+2}$  등의 이온, Prion Protein(PrP) Peptide의 첨가에 따른 형상 변화, DNA 고정화, 지방분해효소(Lipase)의 작용 등에 대하여 연구가 진행되었다[25-33].

힘곡선을 이용하여 지지 지질층 표면 특성에 대한 연구가 진행되었다[25,34,35]. 지지 지질층의 상(Phase)에 따른 기계적 특성을 분석할 수 있으며, 탐침바늘에 특정한 화학조성을 부여하고 힘곡선을 측정함으로써 더 많은 물리적 특성을 파악하는 연구도 진행된 바 있다. 또한, 탐침바늘의 기하형태를 한정시킴으로써 측정된 힘곡선을 Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek(DLVO) 이론으로 분석가능하게 하여 수용액상에 존재하는 지지 지질막의 정전기적 특성을 얻을 수 있다[36]. 본 고에서는 원자힘현미경을 통해 수행된 지지 지질층 연구에 대하여 초미세형상에 의한 구조 연구 그리고 힘곡선에 의한 표면 특성 연구로 나누어 소개하고 향후 연구 진행 방향에 대하여 논의하고자 한다.

## 2. 지지 지질층의 형상 연구

지지 지질층은 리포솜융합(Liposome Fusion)이나 Langmuir Trough 기-액 계면에 배열된 지질층을 고체 표면에 전달함에 의해 제조된다[37-39]. 그리고, 제조하려는 지질층의 구조에 따라 리포솜융합, Langmuir Blodgett(LB) 기법, Langmuir Schaefer(LS) 기법, 또는 이들을 조합한 방법으로 지지 지질층을 형성한다.

예를 들어, 지지 지질이중층(Supported Lipid Bilayer)을 형성할 때, 두 개의 층에 대한 조성과 상(Phase)에 대한 제어가 요구되지 않는 경우에는 리포솜융합으로 지질이중층을 제조한다[37]. 조성과 상에 대하여 비대칭성이 요구될 때는, LB 기법으로 고체 표면에 노출되는 층을 먼저 만들고 그 다음에 LB 기법, LS 기법, 또는 리포솜융합으로 두 번째 층을 제조한다[40,41]. 기-액 계면에 배열된 지질층을 제어하는 것이 가능하므로, LB 기법이 리포솜융합보다는 정밀한 제어된 지질이중층을 형성할 수 있도록 한다. 그러나, 제조되고 난 후의 지지 지질이중층이 수용액 환경 안에 항상 계속 유지되어야 하는 것을 고려할 때, 리포솜융합에 의한 지질이중층은 기기 안에 고체 표면을 설치한 후에 지질이중층 형성을 가능하게 하므로 지질이중

층을 표면특성분석기기로 분석하는 측면에서 용이하다.

지질단층(Supported Lipid Monolayer)를 제조할 때, 지질층이 수용액 환경 안에 형성되면 고체 표면을 소수성으로 변화시킨 후에 LB 기법, LS 기법, 또는 리포솜융합을 이용한다[35]. 지질층이 수용액 밖에서 제조할 때, LB 기법으로 형성한다[25]. 그리고, 고체 무기물 표면 위에 고분자 박막을 형성하고 그 위에 지질층을 제조하기도 하며, 다공성의 무기물 표면 위에 지질층을 형성하기도 한다[4,17].

원자힘현미경은 단일 성분 또는 여러 성분들로 구성된 지지 지질층을 연구하기 위하여 활용되었다. 이 경우들에 대하여, 원자힘현미경은 지질층 표면에 존재할 수 있는 상 분리(Phase Separation)나 결점을 파악하는 측면에서 매우 유용하다[25]. 상 분리의 식별은 원자힘현미경이 갖는 수직방향으로의 해상도와 관련이 있다. 2차원에 배열된 지질분자들의 조밀도에 따라, 상(Phase)이 구별되고 지질층의 두께(Thickness)가 달라지게 된다. 분자들의 전이온도가 다른 두 가지

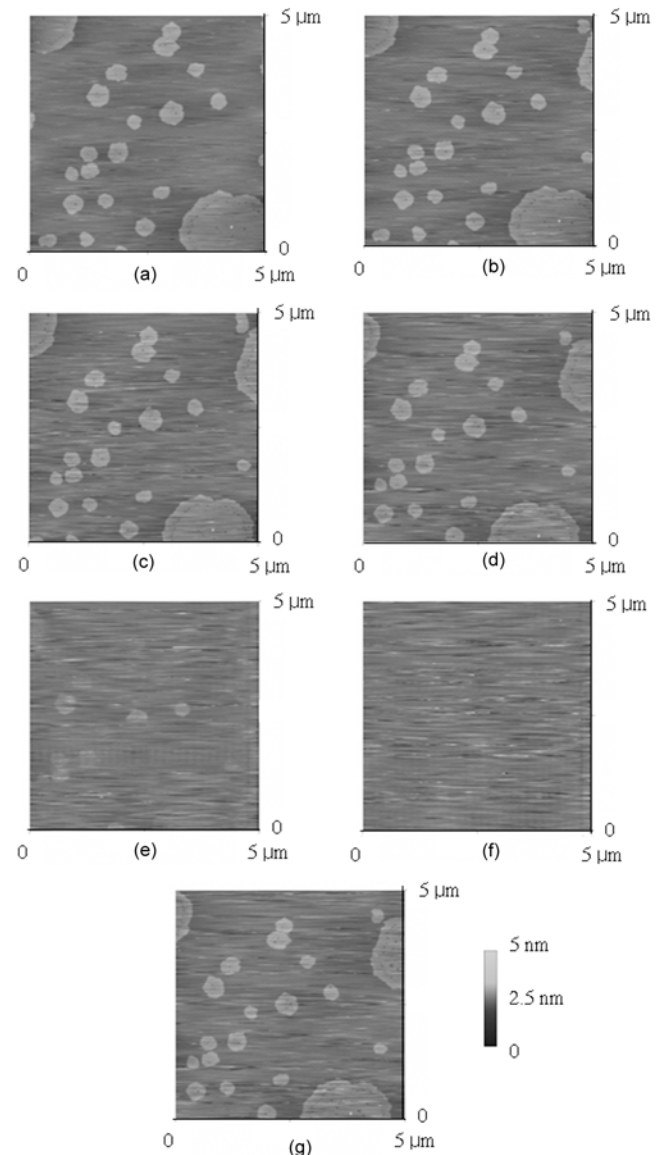


Fig. 1. Gray scale tapping mode images ( $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ ) of mixed DPPC/DOPC monolayer on mica: (A)  $25\ ^\circ\text{C}$ ; (B)  $30\ ^\circ\text{C}$ ; (C)  $35\ ^\circ\text{C}$ ; (D)  $40\ ^\circ\text{C}$ ; (E)  $45\ ^\circ\text{C}$ ; (F)  $50\ ^\circ\text{C}$ ; and (G)  $25\ ^\circ\text{C}$  back from  $50\ ^\circ\text{C}$ . Reprinted with permission from [25]. Copyright 2008, Elsevier Science.

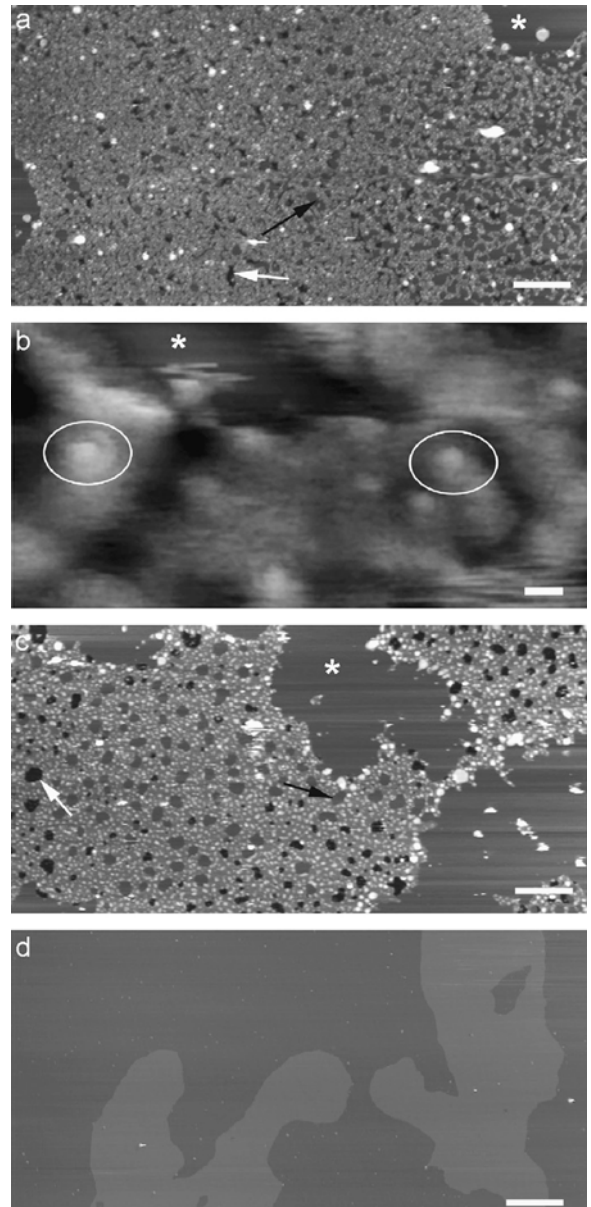
다른 지질들로 지지 지질층을 형성하여 온도 변화에 따른 상의 형상 변화를 관찰하였다. 전이온도가 41 °C인 Dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC)와 0 이하인 dioleoylphosphatidylcholine(DOPC)로 지지 지질층을 형성하였다. 그리고, 25에서 50 °C까지 온도변화에 따라 형상이 달라지는 정도를 관찰하였다. 그리고, 형상의 가역성을 확인하기 위하여 50에서 25 °C로 온도를 다시 내렸을 때에 대하여도 실험을 수행하였다. 이에 대한 결과는 Fig. 1에 제시되어 있다. 상 분리가 25 °C에서 명확히 관찰된다. 연속적인 영역에 좀더 높이가 높은 타원형의 영역들이 묻혀져 있는 형태가 나타나고 있다. 타원형 영역들은 DPPC에 해당되며, 그 외의 영역은 DOPC에 해당된다. 이는 Langmuir 등온선(Isotherm)의 결과로 확인할 수 있다. 25에서 40 °C까지의 온도변화에서는 상 분리가 여전히 존재하였으나, 40 °C 이상에서는 타원형의 영역들이 사라졌다. 이 현상은 전이온도가 41 °C인 DPPC와 일맥상통하는 결과이다. 50 °C에서 타원형의 영역들은 더 이상 발견되지 않았다.

온도를 50에서 25 °C로 다시 낮추었을 때, 형상이 거의 복원되었다. 이 결과로부터 LB 기법으로 고체 표면에 형성된 지지 지질층은 상 변이(Phase Change) 도중에 지질 분자들이 2차원 확산(Diffusion)되지 않음을 확인할 수 있다. 그러나, 25 °C로 다시 낮춘 후에 나타난 지지 지질층의 표면에서 더 많은 결점들이 발견되었다. 이 결과는 다음과 같이 설명할 수 있다. 상 변이가 일어난 동안에 분자당 평균 면적이 늘어났다가 다시 줄어들게 된다. 늘어나는 과정에서 몇 개의 분자들은 지질층으로부터 떠나게 된다. 이에 따라 결점들이 형성된 것으로 파악된다.

원자힘현미경을 이용한 지지 지질층의 연구는 지지 지질층 자체 외에도 다른 분자들이 첨가됨에 따라 나타나는 변화에 대하여도 수행되었다. 칼슘이온( $Ca^{+2}$ )이 첨가됨에 따라 막 단백질이 지지 지질층에 삽입(Incorporation)되는 양상의 변화가 관찰되었다[26]. 이 연구에 대한 결과는 Fig. 2에 나타나있다. 도데실말토사이드(Dodecyl-b-D-Maltoside;DDM)와 도데실싸이오말토사이드(Dodecyl-b-D-thiomaltoside;DDTM)을 이용하여 막 단백질인 광화학계반응센터(Light Harvesting Complex Reaction Center)가 DOPC와 DPPC로 구성된 지지 지질층에 삽입되는 지에 대하여  $Ca^{+2}$ 의 유무에 따라 관찰하였다. Fig. 2의 (a), (b), 그리고 (c)가 보이는 바와 같이,  $Ca^{+2}$ 가 없는 상황에서는 광화학계반응센터가 잘 삽입된 것이 관찰되었다. 그러나, Fig. 2의 (d)에서 보이는 것과 같이,  $Ca^{+2}$ 가 있는 조건에서는 광화학계반응센터가 전혀 삽입되지 않은 것으로 관찰되었다.

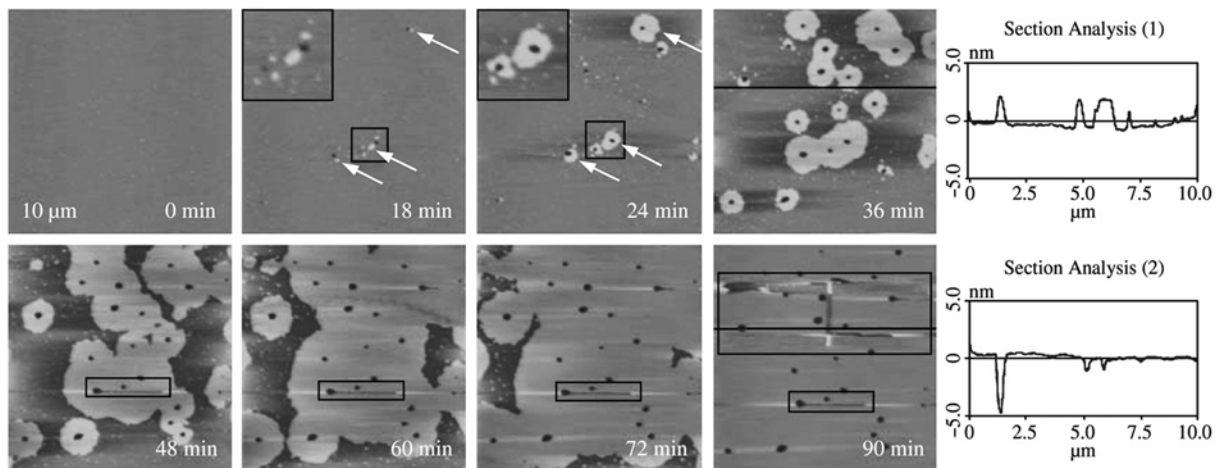
이 결과는  $Ca^{+2}$ 의 농도와 사용되는 막 단백질의 농도의 비율에 따라 변화될 소지가 있는 것으로 판단된다.  $Ca^{+2}$ 가 막 단백질의 삽입을 방해하는 이유는 다음의 이유로 분석될 수 있다.  $Ca^{+2}$ 은 인지질의 포스페이트와 카보닐과 결합할 수 있으며 이 결합은 지질의 친수그룹의 수정과 고정화를 유도한다. 결과적으로  $Ca^{+2}$ 은 인지질의 네트워크 밀도를 높이며 측면적 상호작용을 강화하여 기계적 저항이 증대되도록 한다. 이는 다른 물질들이 삽입되는 것을 방해하게 된다.

Prion Protein(PrP) Peptide 첨가에 의하여 야기되는 지지 지질층 형상의 변화가 실시간으로 관찰되었다[29]. Fig. 3은 시간의 흐름에 따라 나타나는 지지 지질층의 형상 변화를 나타내고 있다. Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine(POPC)로 구성된 지지 지질층에 PrP106~126을 첨가한 결과, 첨가한 지 18분 후에 소공(Pore)들의 형성이 관찰되었다. 소공의 형성과 동시에, 소공 근처에 지지 지질층보다 높



**Fig. 2.** Effects of calcium on direct incorporation of transmembrane proteins into SLBs. LH1-RC complexes from *Rb. Veld.* were directly incorporated at 4 °C into DOPC/DPPC SLBs using 0.2 mM DDM (a,b) or 0.05 mM DOTM (c). Flat lipid membranes(white asterisk) alternate with corrugated membranes that correspond to lipid domains enriched in proteins as attested by high resolution AFM imaging in (b) where core complexes can be easily delineated(see white ellipses). Inside these domains, pure lipid phase(black arrows) as well as holes corresponding to fully solubilized membranes(white arrows) are observed. The brighter spots correspond to non-fused vesicles. In the presence of 5 mM  $CaCl_2$ , neither membrane solubilization nor protein incorporation is detected (d). The z-color scale is 20 nm (a,c,d) or 15 nm (b). The scale bars are 1  $\mu$ m (a, c), 2  $\mu$ m (d), 10 nm (b). Reprinted with permission from[26]. Copyright 2007, Elsevier Science.

은 평평한 영역(Flat High-rise Domains; FHD)이 형성되었다. 그러나, 90분이 지난 후에, 이 FHD는 지질층 전역에 확장되었다. 가장 깊은 소공의 단차는 FHD를 기준으로 5.4 nm이고(Fig. 3의 Section



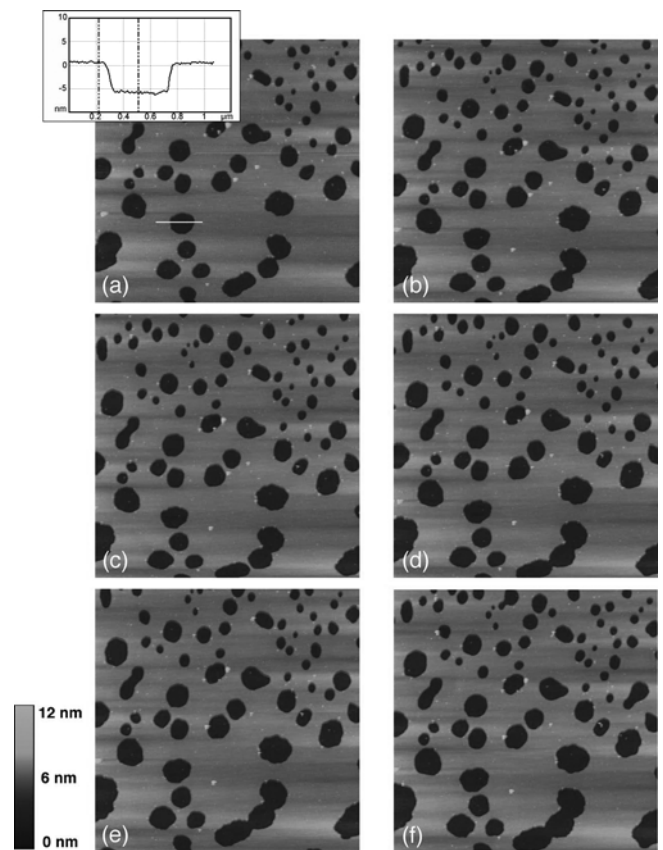
**Fig. 3.** In situ time-lapse AFM images of PrP106~126 amide diffusion in POPC SLB buffered by HBS. The visual field is  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ . Height scale is 10 nm. The image at 0 min represents the membrane without the presence of the peptide. The white arrows indicate the FHDs and pores formed after the injection of PrP106-126 amide. The rectangular frames indicate the destroyed regions on the SLB caused by the AFM tip. Section analysis (1): FHDs are  $\sim 2.5$  nm higher than the surrounding lipid bilayer along the black line in the image of 36 min. Section analysis (2): the depth of the deepest pore on FHDs is about 5.2 nm along the black line in the image of 90 min. Reprinted with permission from [29]. Copyright 2007, Elsevier Science.

Analysis (2) 참고), FHD의 높이 단차는 지질층을 기준으로 2.5 nm 높으므로(Fig. 3의 Section Analysis (1) 참고) Peptide는 2.7 nm 깊이로 지질층에 침투(Penetration)한다. 이는 지질층의 절반 깊이에 해당된다. 따라서, PrP106~126에 의하여 형성된 소공들이 지질층을 관통하지 못함을 의미한다.

형상 변화 관찰을 통해 얻어진 결과로부터, PrP106~126이 지질층에서 갖는 거동에 대하여 다음과 같이 가설을 세울 수 있다. 이 Peptide는 POPC 표면에 먼저 흡착을 하고, Peptide의 소수성 영역은 지질분자들과 복합체(Complex)를 형성하며 소공들을 만든다. 만들어진 소공에 의하여 지질층의 구조가 불안정해지고, 이에 따라 지질층의 소수성 영역은 Peptide로 결합하게 된다. 이 결합은 FHD에 해당되며, FHD는 소공을 중심으로 퍼져나가게 된다.

Lipase는 인지질을 분해하는 효소로 잘 알려져 있다. 원자힘현미경은 Lipase가 지질층에서 작용하는 방식을 시각화(Visualization)하는 것에 이용되었다[32]. DPPC와 Monopalmitoylglycerol(MPG)로 제조된 지질층에 *Candida rugosa* Lipase(CRL)를 주입하여 지질층의 형상 변화가 관찰되었다. 이에 대한 결과는 Fig. 4에 제시되어 있다. Fig. 4(a)에서 (f)까지 시간의 흐름에 따라 CRL이 지질층에 미치는 영향이 모니터링 되었다. 시간의 흐름과 더불어 타원형의 검은 영역이 증가됨을 알 수 있다. 이 검은 영역은 다음과 같은 이유로 Lipid 분자들이 지질층으로부터 방출된 영역으로 고려될 수 있다. Lipase는 지질 분자들의 친수기를 가수분해하는 것으로 알려져 있다. 따라서, CRL과 닿는 지질층 영역의 친수기는 가수분해되고, 분해된 친수기들은 수용액 속으로 방출된다. 그리고, 지질분자들의 소수영역이 수용액에 노출되어 결과적으로 CRL과 닿는 지질층의 영역은 구조가 붕괴된다.

시간에 따른 형상 변화의 관찰은 CRL의 작용을 반응 속도 관점에서 해석 가능하게 한다. CRL의 가수분해 반응 속도를 계산하기 위하여, 시간의 흐름에 따른 검은 영역 면적 변화를 계산하였다. 그리고, 반응 속도의 표준화(Normalization)를 위하여, 검은 영역 면적의 둘레 길이(Perimeter)로 검은 영역 면적을 나누고 시간에 따른 변화를 계산하였다. 계산 결과, 반응의 양상이 Long Lag Phase를 포



**Fig. 4.** Time set of AFM images showing the MPG hydrolysis when a 2.5 nM CRL solution was flushed into the liquid cell. The dark areas are the bilayer structural defects, which expands after adding the enzyme due to MPG hydrolysis and subsequently desorption of the DPPC bottom layer. (a) Prior to flushing the enzyme into the cell; (b) 12 min after flushing the enzyme into the cell; (c-f) selected images 44-82 min after flushing the enzyme. Inset in 'a' shows the height measure (white line) of the bilayer, corresponding to 5.5 nm depth. Reprinted with permission from [32]. Copyright 2006, Elsevier Science.

함하고 있으며, 이는 Lipase 반응에서 공통된 특징과 일치한다.

위에서 기술된 연구 외에도 지지 지질층에 Gramicidin과 같은 항생물질, 에탄올, Lipopeptide 등이 첨가됨에 따라 나타나는 형상 변화에 대하여 규명되었다. 그리고, 지지 지질층이 DNA 고정화, 단백질 결정화를 위한 기질로서 이용될 때 나타나는 형상 변화에 대한 연구도 수행되었다[27,28,30,31,33].

### 3. 지지 지질층의 표면 특성 연구

지지 지질막의 기계적인 특성과 정전기적인 특성을 파악하는 측면에서도 원자힘현미경이 유용하게 이용되었다. 이는 수직방향으로의 탐침바늘 거동을 나노수준에서의 정밀한 제어와 모니터링이 가능하기 때문이다. Fig. 5는 탐침바늘의 거동에 따른 힘곡선을 제시하고 있다. 힘곡선은 네 가지 영역으로 나눌 수 있다. 영역 I에서는 탐침바늘이 표면으로 접근하고 있으나 아직 표면과 상호작용을 하고 있는 얇은 상태이다. 탐침바늘의 거동을 보여주는 곡선이 평평하게 나타나고 있다. 탐침바늘이 계속 접근하여 표면과 상호작용을 하게 되면 곡선은 더 이상 평평하지 않게 된다. 영역 II처럼 인력이 작용하면 곡선은 음성의 휨(Negative Deflection)을 나타내고, 척력이 작용하면 양성의 휨(Positive Deflection)을 나타낸다. 표면과 접촉한 후에, 탐침바늘이 표면방향으로 추가적으로 이동하면 척력에 의한 양성 휨이 관찰된다(영역 III). 추가적인 이동은 표면에 가하려는 힘에 따라 제어될 수 있다. 이로부터 시료의 탄성특성을 얻을 수 있다. 탐침바늘이 후퇴하면서 나타나는 거동은 힘곡선의 영역 IV에 해당된다. 탐침바늘과 시료의 부착력으로 인하여 탐침바늘은 음성의 휨을 보이고 있다. 이 음성의 휨은 탐침바늘의 복원력에 의하여 시료표면에서 탐침바늘이 떨어져 나갈 때까지 지속된다.

여기에서 설명된 힘곡선을 통하여, DPPC와 DOPC로 형성된 지지 지질막의 탄성특성을 규명할 수 있다. 가해지는 힘(F)에 따라 지질막과 고체 표면사이의 단차(Step Height) 변화를 관찰한 결과, 25 °C에서 DPPC의 단차는 F의 2/3승에 반비례하나 DOPC의 단차는 F의 변화에 따라 변화가 없는 것으로 밝혀졌다(Fig. 6). Hertz 이론에 따라, 탄성적 변형(Elastic Deformation)은 침투깊이(Penetration Depth)의 표면에 가해진 힘의 2/3승으로 비례한다[42]. 따라서, 25 °C에서 DPPC 영역은 탄성적 거동을 보인다고 할 수 있다. 그러나, 40 °C 이

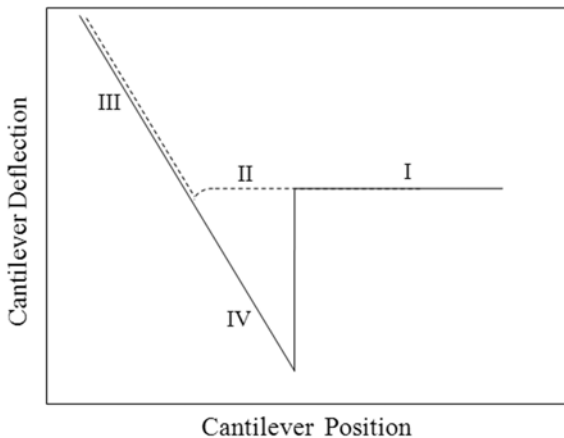


Fig. 5. Scheme of a force curve with the different regions of the approach and retraction. Descriptions for the different regions are included in the text.

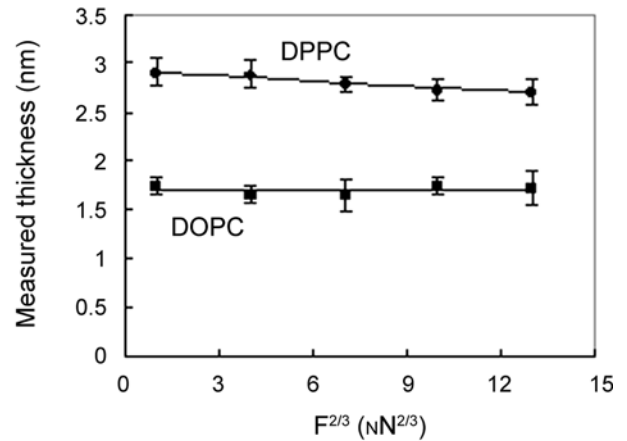


Fig. 6. Thickness measured by AFM as a function of the 2/3 power of the externally applied force F at 25 °C. Bars are the standard deviation of five measurements. Reprinted with permission from [25]. Copyright 2008, Elsevier Science.

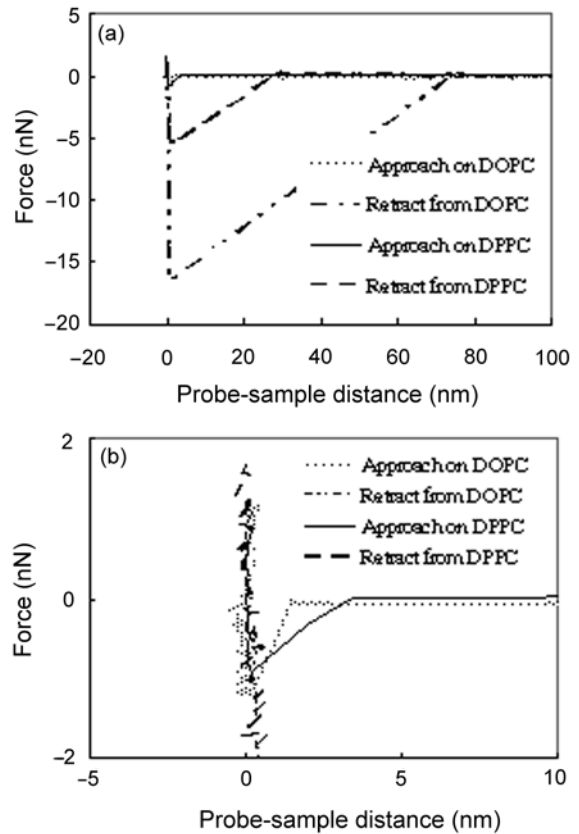


Fig. 7. Force-distance curves recorded over DPPC and DOPC at 25 °C: (A) long range to present adhesion pull off forces and (B) short range to present jump distances. Reprinted with permission from [25]. Copyright 2008, Elsevier Science.

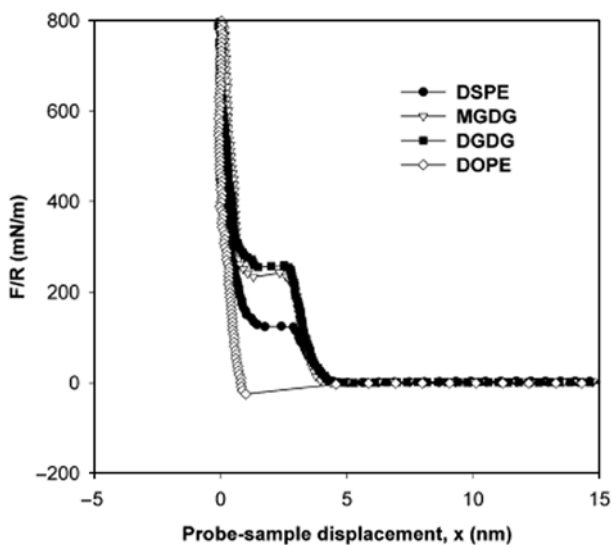
상에서는 DPPC도 DOPC와 마찬가지로 탄성력을 가지고 있지 않다.

힘곡선으로부터 지지 지질막과 탐침바늘 사이의 부착력을 관찰할 수 있다. 탐침바늘이 후퇴하는 과정에서 음성의 휨이 나타나고 있다(Fig. 7). 25 °C에서 DPPC 표면보다 DOPC의 표면에서 더 큰 부착력이 존재함을 알 수 있다. 탄성력과 마찬가지로, 40 °C 이상에서는 두 표면에서의 부착력도 동일한 것으로 측정되었다. 그리고, 힘

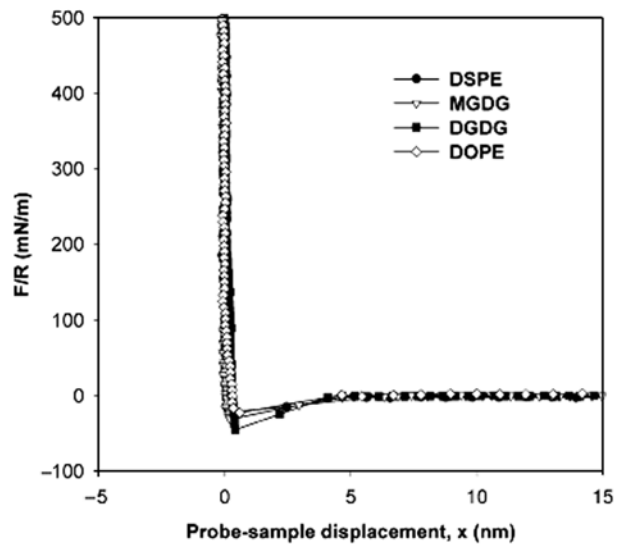
곡선에서 탐침바늘이 표면 근처에 도달했을 때, 작은 음성의 힘이 나타났다. 이 음성의 힘은 탐침바늘이 표면 근처에서 표면으로 뛰어 들기(Jump)가 반데르발스 힘(van der Waals forces)에 의하여 발생한 것이다. 25 °C에서 DPPC와 DOPC를 비교할 때, 탐침바늘의 뛰어 들기가 DPPC에서 더 먼 거리에서 발생한 것으로 분석된다. 40 °C 이상의 두 표면에 대하여 이 현상 역시 동일한 것으로 측정되었다. 탄성력, 부착력, 그리고 뛰어 들기 차이점은 두 지질의 말단이 모두 메틸기이므로 표면에너지(Surface Energy)의 차이에 의한 것은 아닌 것으로 판단된다. 이는 모두 상 차이(Phase Difference)로 인하여 발생한 것으로 생각된다. 전이온도가 낮은 DOPC는 25 °C에서 DPPC와 비교하여 단위면적당 분자의 수가 적으므로, 층이 비탄성적이며 동일한 힘이 가해진 탐침바늘이 더 깊이 침투할 수 있게 된다. 더 깊은 침투는 탐침바늘과 표면사이의 접촉면적을 증가시킴으로 부착력이 증대된다. 단위면적당 분자의 수가 많은 DPPC 층은 더 큰 반데르발스힘을 갖게 된다.

탐침바늘에 특정한 화학조성을 부여하고 힘곡선을 측정함으로써 더 많은 물리적 특성을 파악하는 연구도 진행된 바 있다[34]. Distearoylphosphatidylethanolamine(DSPE), Dioleoylphosphatidylethanolamine(DOPE), Monogalactosyldiglyceride(MGDG), 그리고 Digalactosyldiglyceride(DGDG)로 각각 지지 지질층을 제조하고, 화학적으로 처리된 원자현미경 탐침바늘과 지지 지질층의 상호작용을 모니터링 하였다. 탐침바늘을 화학적으로 처리하기 위하여, 4 nm의 크롬(Cr)과 60 nm의 금(Au)을 전자빔 열 증착기로 탐침바늘에 증착한 후에 Mercaptohexadecanol과 Mercaptohexadecane 용액에 각각 담금으로써 탐침바늘의 끝에 메틸기(-CH<sub>3</sub>)와 수산기(-OH)를 부여하였다.

수산기와 메틸기가 부여된 탐침바늘과 지지 지질층 사이의 상호작용이 각각 Fig. 8과 9에 나타나있다. 탐침바늘이 각각 다른 곡률반경을 가질 수 있으므로, 측정된 힘(F)을 탐침바늘의 곡률반경(R)로 나누는 표준화(Normalization)를 수행하여 그래프로 표현하였다.



**Fig. 8.** Normalized force( $F/R$ ) vs probe-sample displacement ( $x$ ) curves for the indentation of various LB bilayers using  $-OH$ -modified AFM probes (approach only). DSPE/DSPE, MGDG/DSPE, DGDG/DSPE, and DOPE/DSPE bilayers are represented. Lines are to guide the eye. Reprinted with permission from [34]. Copyright 2003, American Chemical Society.



**Fig. 9.** Normalized force( $F/R$ ) vs probe-sample displacement ( $x$ ) curves for the indentation of various LB bilayers using  $-CH_3$ -modified AFM probes (approach only). DSPE/DSPE, MGDG/DSPE, DGDG/DSPE, and DOPE/DSPE bilayers are represented. The breakthrough even occurs essentially on contact in all cases. Lines are to guide the eye. Reprinted with permission from [34]. Copyright 2003, American Chemical Society.

2차원에서 MGDG와 DGDG는 DSPE와 동일한 상(Phase)이나, DSPE와 비교하여 더 크고 더욱 수화(Hydration)된 친수기를 갖고 있으므로 지지막 표면과 탐침바늘의 수산기 사이에 더 큰 척력이 관찰된다. 또한, DOPE는 DSPE와 비교하여 조밀도가 낮으므로 압축 계수(Compressibility Modulus)가 매우 낮고 분자당 면적이 넓다. 그 결과, 척력이 존재하지 않는다. 이 결과들은 지지층 표면에 존재하는 수산기 사이의 척력이 기계적 힘(Mechanical Forces)과 수화 힘(Hydration Forces)의 조합임을 증명한다.

이에 반하여, 탐침바늘이 메틸기를 가지고 있는 경우에는 모든 지지 지질층에서 척력이 전혀 관찰되지 않았다. 메틸기의 경우 수화가 일어나지 않으므로, 수화 힘에 의한 척력이 존재하지 않더라도 지지층의 기계적 힘에 의한 척력은 존재할 것으로 예상되었다. 그럼에도 불구하고, Fig. 9의 결과에서 척력이 전혀 관찰되지 않은 것은 탐침바늘에 부여된 메틸기의 계면에너지(Interfacial Energy)에 의하여 메틸기와 지지층의 소수성 영역 사이에 발생하는 인력이 기계적 힘에 의한 척력을 상쇄하기 때문인 것으로 추정하고 있다.

탐침바늘의 기하형태를 한정시키고 측정된 힘곡선을 분석하여 수용액상에 존재하는 지지 지질막의 정전기적 특성을 얻을 수 있다 [35]. 탐침바늘의 기하형태를 한정시키는 이유는 측정된 힘곡선을 이론적으로 분석하기 위함이다. 측정된 힘곡선은 Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek(DLVO) 이론에 따라 반데르발스 힘과 정전기적인 힘의 합으로 분석될 수 있다[36]. 그리고, 반데르발스 힘과 정전기적인 힘에 대한 이론식들을 적용하여 정전기적 특성을 산출할 수 있다[43].

음이온성의 지질인 Dioleoylphosphatidylglycerol(DOPG)와 중성의 지질인 DOPC로 리포솜융합을 통해 제조된 지지 지질층에 실리카 구(Silica Sphere)가 부착된 탐침바늘을 접근시키면서 나타나는 탐침바늘의 거동을 측정하였다. 측정된 결과를 표준화된 힘곡선

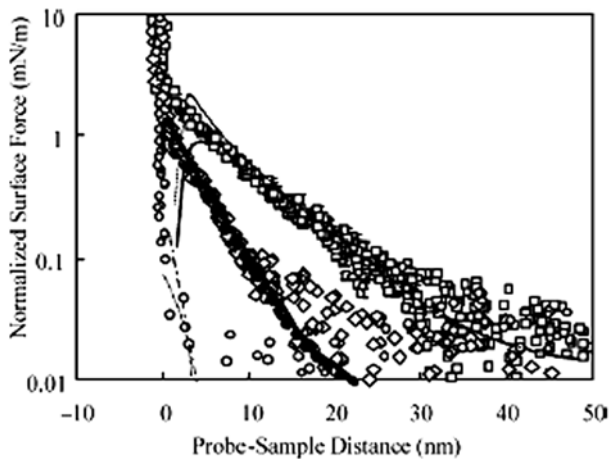


Fig. 10. Surface force measurements made between a silica sphere and surface in the three running buffers. The normalized surface forces were calculated by dividing the measured surface forces by the radius of the silica sphere. The measurements made in 1 mM NaCl-0.2 mM NaOAc, 10 mM NaCl-2 mM NaOAc, and 100 mM NaCl-20 mM NaOAc solutions at pH 4 are shown with squares, diamonds, and circles, respectively. Surface forces were calculated by using DLVO theory for the constant surface potential and surface charge density boundary conditions. The ionic strength of the solution was calculated using the known concentrations of NaCl and NaOAc. Normalized force ( $F/R$ ) vs probe-sample displacement ( $x$ ) curves for the indentation of various LB bilayers using -OH-modified AFM probes (approach only). DSPE/DSPE, MGDG/DSPE, DGDG/DSPE, and DOPE/DSPE bilayers are represented. Lines are to guide the eye. Reprinted with permission from [35]. Copyright 2006, American Chemical Society.

(Normalized Force Curve)으로 Fig. 10에서와 같이 표현하였다. 그리고, 표준화된 힘 곡선은 DLVO 이론을 적용하여 표면의 정전기적인 특성-전하 밀도와 위치에너지(Potential)-에 따라 계산된 힘값을 측정값에 맞춤(Fitting)으로써 최적의 특성치를 산출할 수 있다. 그리고, 이 결과값은 SPR을 통하여 산출되는 지질의 밀도와 조합하여, 지질층의 조성을 정확히 구할 수 있다(리포솜융합에 의하여 제조되는 다성분 지질층의 조성은 리포솜의 조성과 같지 않다).

Fig. 10에서 제시한 바와 같이, 맞춤을 시행하여 여러 가지 수용액의 이온 농도에 따라 정전기적 특성을 산출하였다. 이 특성은 이온 농도와 단조로운 대응 관계(Monotonic Correlation)를 가지고 있다. 염 농도와 표면의 이온기들 사이의 관계를 설명하기 위하여, Pashley가 질량보존의 법칙을 바탕으로 제시한 모델이 있다. 위의 대응 관계는 Pashley의 모델과 일치하고 있다.

#### 4. 결 론

원자힘현미경은 생체막의 구조와 특성을 파악하고, 분자인식, 물리수송, 효소촉매작용, 세포부착, 세포간 정보교환, 그리고 막 융합과 같은 생물학적 과정들을 규명하기 위하여 이용되었다. 이 가운데서도 세부적으로는 지지 지질막의 구조와 결점 형성, 외부 물질에 의한 형상 변화에 대한 연구가 수행되었고, DNA 고정화, 단백질 결정화, 효소의 활성 작용을 이해하는 측면에서 지지 지질막들의 유용성이 확인되었다. 힘곡선은 지지 지질막의 기계적-정전기적

특성 파악에 이용되었다. 그리고, 탐침바늘의 화학적 성질과 기하형태를 한정시킴으로써 더 많은 정보들을 얻을 수 있다. 앞으로 탐침바늘의 곡률반경이 더 작아지면서 지지 지질막의 구조를 분자 단위까지 실시간으로 시각화될 것을 기대할 수 있다. 또한, 구조의 힘측정(Force Measurement)의 정밀도보다 향상되고 그에 걸맞게 힘곡선에 대하여 더욱 복잡한 분석이 요구될 것으로 예상된다. 그리고, 복잡한 분석이 수행되기 위하여, 분자동력시뮬레이션(Molecular Dynamic Simulation)의 역할이 부각될 것으로 생각된다[44].

#### 감 사

이 연구는 2007년도 경원대학교 지원과 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원에 의한 결과입니다. (KRF-2008-331-D00118).

#### 참고문헌

1. Ringsdorf, H., Schlarb, B. and Venzmer, J., "Molecular Architecture and Function of Polymeric Oriented Systems - Models for the Study of Organization, Surface Recognition, and Dynamics of Biomembranes," *Angew. Chem-Int. Edit.*, **27**(1), 113-158(1988).
2. Goksu, E. I., Vanegas, J. M., Blanchette, C. D., Lin, W. C. and Longo, M. L., "AFM for Structure and Dynamics of Biomembranes," *Biochem. Biophys. Acta-Biomembranes*, **1788**(1), 254-266 (2009).
3. Mossman, K. and Groves, J., "Micropatterned Supported Membranes as Tools for Quantitative Studies of the Immunological Synapse," *Chem. Soc. Rev.*, **36**(1), 46-54(2007).
4. Janshoff, A. and Steinem, C., "Transport across Artificial Membranes - an Analytical Perspective," *Anal. Bioanalytical Chem.*, **385**(3), 433-451(2006).
5. Rossetti, F. F., Textor, M. and Reviakine, I., "Asymmetric Distribution of Phosphatidyl Serine in Supported Phospholipid Bilayers on Titanium Dioxide," *Langmuir*, **22**(8), 3467-3473(2006).
6. Groves, J. T. and Dustin, M. L., "Supported Planar Bilayers in Studies on Immune Cell Adhesion and Communication," *J. Immunol. Methods*, **278**(1-2), 19-32(2003).
7. Tanaka, M. and Sackmann, E., "Polymer-supported Membranes as Models of the Cell Surface," *Nature*, **437**(7059), 656-663(2005).
8. Twardowski, M. and Nuzzo, R. G., "Molecular Recognition at Model Organic Interfaces: Electrochemical Discrimination Using Self-assembled Monolayers(SAMs) Modified via the Fusion of Phospholipid Vesicles," *Langmuir*, **19**(23), 9781-9791(2003).
9. Leckband, D. and Israelachvili, J., "Intermolecular Forces in Biology," *Quarterly Reviews of Biophysics*, **34**(2), 105-267(2001).
10. Sinner, E. K. and Knoll, W., "Functional Tethered Membranes," *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**(6), 705-711(2001).
11. Boxer, S. G., "Molecular Transport and Organization in Supported Lipid Membranes," *Current Opinion in Chemical Biology*, **4**(6), 704-709(2000).
12. Castellana, E. T. and Cremer, P. S., "Solid Supported Lipid Bilayers: From Biophysical Studies to Sensor Design," *Surface Science Reports*, **61**(10), 429-444(2006).
13. Anrather, D., Smetazko, M., Saba, M., Alguel, Y. and Schalkhamer, T., "Supported Membrane Nanodevices," *J. Nanosci. Nano-*

- technol.*, **4**(1-2), 1-22(2004).
14. Groves, J. T., "Membrane Array Technology for Drug Discovery," *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, **5**(4), 606-612(2002).
  15. Cooper, M. A., "Advances in Membrane Receptor Screening and Analysis," *Journal of Molecular Recognition*, **17**(4), 286-315(2004).
  16. Troutier, A. L. and Ladaviere, C., "An Overview of Lipid Membrane Supported by Colloidal Particles," *Advances in Colloid and Interface Science*, **133**(1), 1-21(2007).
  17. Sackmann, E., "Supported Membranes: Scientific and Practical Applications," *Science*, **271**(5245), 43-48(1996).
  18. Tero, R., Ujihara, T. and Urisut, T., "Lipid Bilayer Membrane with Atomic Step Structure: Supported Bilayer on a Step-and-Terrace TiO<sub>2</sub>(100) Surface," *Langmuir*, **24**(20), 11567-11576(2008).
  19. Grigoriev, D. O., Kragel, J., Akentiev, A. V., Noskov, B. A., Miller, R. and Pison, U., "Relation between Rheological Properties and Structural Changes in Monolayers of Model Lung Surfactant under Compression," *Biophys. Chem.*, **104**(3), 633-642(2003).
  20. Caffrey, M. and Wang, J., "Membrane-structure Studies Using X-ray Standing Waves," *Annu. Rev. Biophys Biomolecular Struct.*, **24**, 351-377(1995).
  21. Oleson, T. A. and Sahai, N., "Oxide-dependent Adsorption of a Model Membrane Phospholipid, Dipalmitoylphosphatidylcholine: Bulk Adsorption Isotherms," *Langmuir*, **24**(9), 4865-4873(2008).
  22. Leverette, C. L. and Dluhy, R. A., "Vibrational Characterization of a Planar-supported Model Bilayer System Utilizing Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) and Infrared Reflection-absorption Spectroscopy (IRRAS)," *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, **243**(1-3), 157-167(2004).
  23. McArthur, S. L., Halter, M. W., Vogel, V. and Castner, D. G., "Covalent Coupling and Characterization of Supported Lipid Layers," *Langmuir*, **19**(20), 8316-8324(2003).
  24. Binnig, G., Quate, C. F. and Gerber, C., "Atomic Force Microscope," *Phys. Rev. Lett.*, **56**(9), 930-933(1986).
  25. Park, J.-W. and Ahn, D. J., "Temperature Effect on Nanometer-scale Physical Properties of Mixed Phospholipid Monolayers," *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **62**(1) 157-161(2008).
  26. Berquand, A., Levy, D., Gubellini, F., Le Grimellec, C. and Milhiet, P. E., "Influence of Calcium on Direct Incorporation of Membrane Proteins into In-plane Lipid Bilayer," *Ultramicroscopy*, **107**(10-11), 928-933(2007).
  27. Lei, S. B., Tero, R., Misawa, N., Yamamura, S., Wan, L. J. and Urisu, T., "AFM Characterization of Gramicidin-A in Tethered Lipid Membrane on Silicon Surface," *Chem. Phys. Lett.*, **429**(1-3), 244-249(2006).
  28. Song, C. S., Ye, R. Q. and Mu, B. Z., "Molecular Behavior of a Microbial Lipopeptide Monolayer at the Air-water Interface," *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, **302**(1-3), 82-87(2007).
  29. Zhong, J., Zheng, W. F., Huang, L. X., Hong, Y. K., Wang, L. J., Qiu, Y. and Sha, Y. L., "PrP106-126 Amide Causes the Semi-penetrated Poration in the Supported Lipid Bilayers," *Biochimica et Biophysica acta-Biomembranes*, **1768**(6), 1420-1429(2007).
  30. Weisenhorn, A. L., Egger, M., Ohnesorge, F., Gould, S. A. C., Heyn, S. P., Hansma, H. G., Sinsheimer, R. L., Gaub, H. E. and Hansma, P. K., "Molecular-Resolution Images of Langmuir-Blodgett-Films and DNA by Atomic Force Microscopy," *Langmuir*, **7**(1), 8-12(1991).
  31. Reviakine, I., Bergsma-Schutter, W., Mazeret-Dubut, C., Govorukhina, N. and Brisson, A., "Surface Topography of the p3 and p6 Annexin V Crystal Forms Determined by Atomic Force Microscopy," *J. Struct. Biol.*, **131**(3), 234-239(2000).
  32. Prim, N., Iversen, L., Diaz, P. and Bjomholm, T., "Atomic Force Microscope Studies on the Interactions of Candida Rugosa Lipase and Supported Lipidic Bilayers," *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **52**(2), 138-142(2006).
  33. Mou, J. X., Yang, J., Huang, C. and Shao Z. F., "Alcohol induces Interdigitated Domains in Unilamellar Phosphatidylcholine Bilayers," *Biochemistry*, **33**(33), 9981-9985(1994).
  34. Schneider, J., Barger, W. and Lee, G. U., "Nanometer Scale Surface Properties of Supported Lipid Bilayers Measured with Hydrophobic and Hydrophilic Atomic Force Microscope Probes," *Langmuir*, **19**(5), 1899-1907(2003).
  35. Park, J.-W. and Lee, G. U., "Properties of Mixed Lipid Monolayers Assembled on Hydrophobic Surfaces through Vesicle Adsorption," *Langmuir*, **22**(11), 5057-5063(2006).
  36. Derjaguin, B., "On the Repulsive Forces between Charged Colloid Particles and on the Theory of Slow Coagulation and Stability of Lyophobic Sols," *Trans. Faraday Soc.*, **35**(3), 203-214(1940).
  37. Brian, A. A. and McConnell, H. M., "Allogeneic Stimulation of Cytotoxic T cells by Supported Planar Membranes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**(19), 6159-6163(1984).
  38. Blodgett, K. A. and Langmuir, I., "Built-up Films of Barium Stearate and their Optical Properties," *Phys. Rev.*, **51**(11), 964-982(1937).
  39. Tamm, L. K. and McConnell, H. M., "Supported Phospholipid-bilayers," *Biophys. J.*, **47**(1), 105-113(1985).
  40. Schneider, J. S., Dufrene, Y. F., Barger, W. R. and Lee, G. U., "Atomic Force Microscope on Supported Lipid Bilayers," *Biophys. J.*, **79**(2), 1107- 1118(2000).
  41. Park, J.-W., "Individual Leaflet Phase Effect on Nanometer-scale Surface Properties of Phospholipid Bilayers," *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **71**(1), 128-132(2009).
  42. Maugis, D., *Contact, Adhesion. and Rupture of Elastic Solids*, Springer-Verlag, Berlin, 240-262(2000).
  43. Verwey, E. J. W. and Overbeek, J. T. G., *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier, New York, 51-63(1948).
  44. Engel, A., Gaub, H. E. and Müller, D. J., "Atomic Force Microscopy: A Forceful Way with Single Molecules," *Curr. Biol.*, **9**(4), R133-R136(1999).