

## Invited Review

# Single Molecule Method for Molecular Biology

Jeong Hee Kim<sup>1,2</sup> and Cherlhyun Jeong<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Biochemistry and Molecular Biology, Kyung Hee University, Seoul 02447, South Korea

<sup>2</sup>KHU-KIST Department of Converging Science and Technology, Kyung Hee University, Seoul 02447, South Korea

<sup>3</sup>Center for Theragnosis, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 02792, South Korea

(received June 6, 2018; accepted June 7, 2018)

**In order to understand biological phenomena accurately, single molecule techniques using a physical research approach to molecular interactions have been developed, and are now widely being used to study complex biological processes. In this review, we discuss some of the single molecule methods which are composed of two major parts: single molecule spectroscopy and manipulation. In particular, we explain how these techniques work and introduce the current research which uses them. Finally, we present the oral biology research using the single molecule methods.**

**Key words: single molecule FRET, single molecule tracking, super-resolution microscopy, optical tweezer, AFM**

## 서론

빅뱅 직후 138억년전, 입자와 분자를 규정하는 물리학 법칙이 생겨났고 지구 생성 이후 새롭게 등장한 생

\*Correspondence to: Cherlhyun Jeong, Center for Theragnosis, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 02792, Korea  
Tel: +82-2-958-5943, +82-2-958-5909  
E-mail: che.jeong@kist.re.kr  
ORCID : 0000-0002-7584-3059

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

물학 법칙도 같은 법칙의 지배를 받는다. 광학 현미경 발명 이후로 생명체 및 생명 현상의 미세 영역에 관심을 갖게 되었고, 최근 100년 동안의 발전으로 생명 현상을 상당 부분 자세히 이해할 수 있었다. 그럼에도 불구하고 정성적 이해만으로는 수많은 분자가 상호작용하는 생명 현상을 완전하게 이해하는 것은 어렵다.

이러한 생명 현상을 정확히 이해하기 위해서는 물리학 법칙의 지배를 받는 분자 수준에서 정량적인 형태로 상호작용과 근본 원리를 밝혀내는 것이 중요하다. 물리학은 힘, 위치, 구조, 시간, 에너지의 물리적 성질을 정밀하게 측정하여 현상에 대한 원리를 정량적으로 규명하는 학문이며, 생명현상에 대해 물리적 연구방법이 도입된 것이 생물 물리학이다. 물리학적으로 생명현상을 연구할 때 기존의 생물학처럼 생체 분자 집합체의 평균 값을 연구하게 되면 생체 분자의 개별적 특성이 사라지게 되어 분자간의 상호작용을 정확히 알 수가 없다. 이를 극복하기 위해 단 분자 생물 물리학(Single Molecule Biophysics)은 단일 분자의 위치, 움직임, 상호작용, 반응을 직접 관찰함으로써 개별적인 특성 및 기작을 측정하는 것에서 출발한다.

세포내의 단백질과 같은 생체 물질들의 크기와 움직임, 상호작용은 나노미터 수준의 거리, 수 마이크로초에서 수 초의 시간 동안 이루어지므로 이를 관측할 수 있는 정밀한 실험 기법이 필요하다. 이러한 정밀한 실험 기법 개발의 공로로 2014년 노벨 화학상은 단분자 및 초고해상도 형광 이미징 방법의 개발에 관련하여 Eric Betzig, Stefan W. Hell, William E. Moerner에게 주어졌다. Moerner는 1989년 단일 분자를 최초로 이미징하여 단분

자 이미징 연구분야를 열었고[1], Betzig는 1995년에 초고해상도 형광 이미징 방법의 이론적 배경과 예측을 제시하였다[2]. 2000년대 Betzig와 Hell은 형광분자를 제어하거나[3] 광원의 제어를[4] 통해 초고해상도 형광현미경을 개발하였다.

최근 단분자 이미징 기법이 발달함에 따라 DNA[5-8], RNA[9-11], 단백질[12-14], 세포막[15-17] 등 세포 내 많은 종류의 생체 분자들의 개별적 특성을 분자 수준에서 연구하고 있다. 본 논문에서는 생체 분자의 위치와 구조 및 시간을 주로 관측하는 방법인 단분자 분광학과 힘과 에너지를 주로 관측하는 단분자 제어기술에 대하여 기본 개념과 적용 사례들을 소개하고 구강 생물학 분야에서 연구 진행을 살펴보겠다.

## 단분자 분광학(Single Molecule Spectroscopy)

광학 현미경의 발명은 육안으로 볼 수 없는 피사체를 확대하여 생물학의 연구 범위를 확대하였다. 이와 더불어 단순히 좀더 자세한 생물체를 시각화하기 위해 특정 분자를 표지 할 수 있는 다양한 염료 및 표지법이 개발되었다. 특히 형광 염료는 흡수하는 빛 파장에 비해 방출하는 파장이 바뀌므로 특정 분자만 표지하여 관측이 가능하며 적은 농도로도 구별이 가능하다. 하지만 이미징 시스템에 대한 개선에도 불구하고 광학 현미경은 빛의 기본 회절 한계를 초과 할 수 없으며 대략 반 파장 (~200 나노미터) 보다 작은 범위의 생체 물질에 대해서는 구분이 어려워 보다 자세한 연구가 어렵다.

이를 극복하기 위해 단분자 분광학이 발달하게 되어 수 ~ 수십 나노미터 수준의 관측이 가능하게 됨으로써 생체 분자의 정확한 구조와 위치 그리고 상호작용에 대한 이해의 폭을 넓혀왔다. 이러한 단분자 분광학을 다양한 기술이 존재하나 여기에서는 단분자 프렛, 단분자 추적기법, 초고해상도 형광 현미경에 대하여 살펴보겠다.

### 단분자 프렛(Single Molecule Förster Resonance Energy Transfer: smFRET) 기법

프렛은 1946년 Theodor Förster[18]에 의해 제안된 현상으로 두 가지 다른 형광분자 사이에 거리에 따라 전자공명을 통한 에너지 이동 현상을 말한다. 이때 에너지를 주는 형광분자를 도너(donor), 에너지를 받는 분자를 억셉터(acceptor)라고 하고 두 분자 사이의 거리가 가까워질수록 쌍극자 상호작용이 늘어나 에너지의 전달이 늘어난다. 이 두 형광 분자의 프렛 효율  $E$ 는 거리  $R$ 의 함수로 나타낼 수 있다.

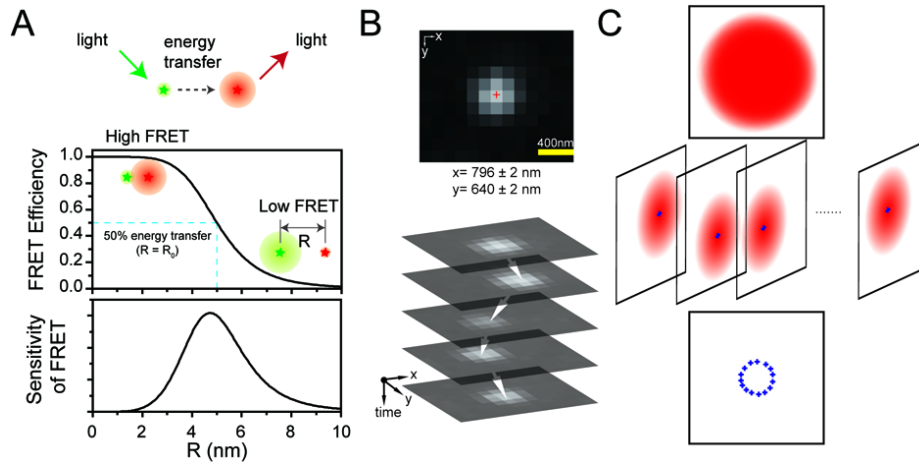
$$E = \frac{1}{(1 + (R/R_0)^6)}$$

이때  $R_0$ 는 프렛 효율이 0.5가 되는 두 형광 분자의 거리이며 도너와 억셉터의 광학적 성질로 결정이 된다. 통상적으로 사용되는 프렛 쌍들에 대해 효율을 계산해 보면 3~7 나노미터의 거리변화에서 0~1의 값을 갖는다 (그림 1 A). 에너지 전달 현상이 일어날 때 효율에 따라 억셉터가 받은 만큼의 에너지가 형광 빛으로 나오게 되고, 도너가 억셉터에 주고 남은 에너지가 도너의 형광 빛으로 나오게 된다. 따라서 실험적으로 도너와 억셉터의 형광 빛 세기를 측정하면 매우 민감하게 두 형광분자의 거리 변화를 측정할 수 있다. 만일 형광분자가 생체 분자에 부착되어 있다면 두 개의 생체 분자 또는 한 개의 생체 분자의 두 위치 사이의 상대적 거리 변화를 정확히 파악 할 수 있어 생체 분자 사이의 상호작용이나 생체분자의 모양변화를 연구할 수 있다.

처음 제안된 이후 프렛 변화를 이용한 생물학 연구는 오랫동안 진행되어 왔지만 양상불 평균값을 관측하는 실험 기법의 한계로 인해 정확한 거리변화로 인한 개개의 생체 분자의 상태를 파악하기 보다는 정상상태 (steady state) 만을 측정 할 수 있었다. 하지만 단일 분자 수준에서 프렛을 측정하면서 생체 분자의 상호작용을 실시간으로 정확히 관측할 해왔다. 단분자 프렛은 양상불 평균 관측에 비해 1) 생체 분자의 여러 상태를 나노미터 수준에서 구별하고 개개의 생체 분자 측정을 통한 상태의 분포를 얻을 수 있으며, 2) 실시간 개별 분자의 관측으로 인해 동기화되지 않는 개개의 분자의 운동을 관찰 함으로써 정확한 분자 모델을 제시할 수 있다.

단분자 프렛은 1996년 하택집 박사 등이 처음으로 단일 프렛 쌍에서 나오는 형광신호를 검출한 이래로[19] 생체 분자의 나노미터 정도의 거리변화를 관측하는데 중요한 실험 기법으로 각광받고 있다. DNA 자체를 연구하여 holliday junction에 프렛 형광쌍을 붙여 이온농도와 DNA 서열에 따라 두 개의 상태를 갖고 에너지장벽이 존재함을 보이기도 하고[5], 비슷한 방법으로 리보자임의 3가지 상태 사이의 접힘 변화를 관측하여 유전자 번역 과정을 연구하였다[10].

DNA와 단백질 사이의 상호작용에 관해서도 연구하여 rep helicase가 어느 정도 속도로 DNA를 풀어가는지를 관측하였으며[6] RecA recombinase의 필라멘트 동역학에 대해서도 밝혔다[20]. 또한 DNA 복구 단백질인 MutS를 연구하여 DNA 불일치 부분의 유무에 따른 결합 상호작용뿐 아니라 불일치 부분에 MutS가 결합한 후 ATP 부착을 통해 안정적인 형태로 모양 변화를 일으켜 불일치



**Figure 1. Single molecule spectroscopy.** (A, top) Schematics representation of FRET and (A, bottom) FRET vs distance between dye pair ( $R$ ) where  $R_0 = 5$  nm. At around  $R_0$ , the sensitivity is maximized. (B) Schematic representation of single particle localization and tracking. The precise position of the fluorophore can be determined from actual intensity data using Gaussian fitting with sub-diffraction-limited area. After repeating the localization step on a time series of images, the positions are linked to generate trajectories that track the motion of the single molecule. (C) The principle of STORM and PALM. (top) In conventional fluorescence microscopy, when fluorophores exist in the diffraction limit ( $\sim 200$  nm), it cannot be resolved. (middle) Different fluorescent probes marking the sample structure are activated at different time points, allowing subsets of fluorophores to be imaged without spatial overlap and to be localized to high precision. (bottom) With multiple snapshots, a final super-resolution image can be reconstructed from the accumulated positions.

신호를 전달함을 밝혔다[7]. werner 증후군에 관련된 연구에서도 단분자 FRET 기법을 도입하여 DNA를 풀어가는 메커니즘을 밝혀내 질병과 관련된 연구에서도 단일 분자 기작이 유용함을 보였다[21].

단일 단백질에 두 군데 프렛 형광 분자를 부착하면 단백질의 모양 변화를 관측할 수 있다. M. Möller 연구 그룹에서는 Rnase H의 접힘과 풀림 구조 변화를 관찰하였으며,[9] 항체에서도 야생형(Wildtype)과 돌연변이 (Mutant) 사이에서의 구조변화를 단분자 프렛 기법으로 확인하였다[22].

살아있는 세포에서도 형광단백질을 이용한 프렛 연구가 가능하다. A. Kusumi 그룹에서는 단일 Ras 단백질의 활성 정도를 형광 프렛을 통해 살아있는 세포에서 관측하였고,[23] K.R Weninger 그룹에서는 막융합에 관련된 스네어(SNARE)단백질의 모양 변화를 관측하고 단분자의 움직임을 확인하였다[15].

최근에는 기술의 발달로 한 쌍의 프렛 분자뿐 아니라 3개 이상의 형광 분자 사이의 거리 변화를 관측할 수 있는 다색 프렛 기술이 개발되었다[8]. 또한 프렛 기반의 바이오센서는 막단백질의 역학 연구에 널리 사용되고 있으며 [24], 단분자 힘 측정 연구에도 사용될 수 있다[25].

### 단분자 추적기법 (Single Molecule Tracking)

앞서 밝힌 바와 같이 형광분자를 이용한 생체분자의 관측은 다른 생체분자들과의 구분을 가능하게 한다. 하

지만 많은 형광 분자가 단위 부피 내에 있는 경우 광학적 회절 한계 때문에 단일 분자 수준에서 생체 분자를 구분하기 어렵다. 이런 공간적 제약을 극복하기 위해 피오나(FIONA: Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy)[12] 라는 기술이 개발되었다. 단위 부피 내에 한 개의 형광 분자가 있다면 빛의 회절 성질 때문에 광학 현미경상에서  $\sim 200$ 나노미터 정도의 빛 분포로 관측된다. 하지만 회절된 빛의 경우 가우시안(Gaussian)함수에 맞추면 수 나노미터 수준의 위치를 특정할 수 있고, 시간에 따라 관측하면 단일 분자의 움직임을 나노미터 수준의 정확도에서 관측할 수 있다 (그림 1 B).

이러한 방법을 이용하여 P. R. Selvin은 Myosin V가 hand-over-hand 방식으로 액틴 필라멘트 위에서 움직이고 있음을 1.5나노미터의 정확도로 관측하여 그 전까지 논란이 되고 있던 작동 메커니즘을 확정하였다[12]. 같은 방법으로 Myosin과[26] Kinesin에서[27] 단분자 추적기법을 이용한 분자 기작을 밝히는 연구들이 이루어졌다.

또 다른 단백질이 움직일 수 있는 기질로는 DNA가 있다. 프렛으로는 10 나노미터 이내의 움직임만 관측할 수 있으므로 세포내의 긴 DNA상에서 표적을 찾아가는 단백질의 거동을 파악하기는 어렵다. 따라서 단분자 형광 추적 기법을 이용하여 Lac repressor의 거동[13], T7 RNA polymerase의 움직임[28], 살아있는 세포에서 Transcription factor의 움직임[29] 등의 연구가 이루어졌다. 뿐만 아니라 세포막 표면에서 2차원적 움직임도 관측하였다[16].

### 초고해상도 현미경 (Super-resolution Microscopy)

단위 부피 내에 형광분자가 하나라면 정확한 위치를 측정할 수 있지만 세포내의 생체 분자들처럼 여러 개가 회절 한계 내(~200 나노미터)에 모여 있다면 전통적인 광학 현미경으로는 그 위치를 정확히 파악할 수 없다. 하지만 그 형광분자들이 모두 꺼진 상태에서 단위 부피 내에 한 개의 형광 분자만 켜져서 위치를 파악하고 모든 분자에 대해 이러한 측정이 반복된다면 이들의 위치를 정확하게 알 수 있다 (그림 1 C). 이러한 실험 기법을 적용하여 유기염료를 이용한 STORM (Stochastic Reconstruction Microscopy)[30], 형광 단백질을 이용한 PALM (PhotoActivated Localization Microscopy)[3]이라는 초고해상도 형광 현미경법이 개발 되었다. 이를 이용하여 신경세포의 축색돌기에서의 액틴과 스펙트린의 3차원 구조 연구[14], 서로 다른 후성 유전적 상태를 갖는 크로마틴 폴딩 연구[31], 시냅스에서의 소포체 priming 및 fusion 연구[17,32], E. Coli에서 상동재조합 과정의 RecA 단백질의 역할에 관한 연구[33] 등 기존에 연구방법으로 알 수 없었던 세포내부의 정확한 정보들을 알게 되었다.

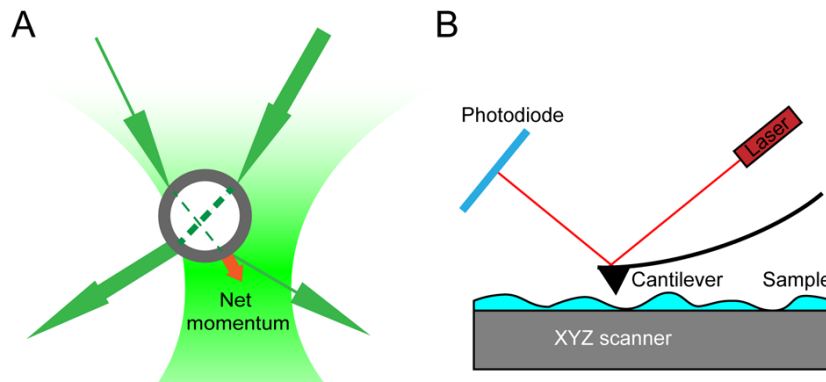
### 단분자 제어기술(Single Molecule Manipulation)

생명현상을 물리적으로 연구하는 또 하나의 방법은 힘과 에너지를 관측하는 것이다. 생체 내에서 많은 상호작용들이 에너지를 소모하게 되며 이는 힘을 동반하게 된다. 따라서 단일 분자의 힘을 측정하거나 제어하면 생체 분자의 작동 기작에 대해 보다 정밀하게 연구할 수 있다. 여기에서는 광학 집게, 원자힘 현미경에 대하여 살펴보겠다.

### 광학 집게 (Optical Tweezer)

광학 집게는 1970년 벨 연구소의 Arthur Ashkin 박사가 처음 기본 개념을 착안하였고 1986년 Steven Chu에 의해 집광된 레이저를 이용하여 광학 포획이 가능함을 보임으로써 시작되었다.[34] 광학 집게의 원리는 다음과 같다. 물보다 큰 굴절율을 갖는 마이크론 사이즈의 입자에 레이저 빛이 조사되면 입자를 통과하는 빛은 입자 표면에서 굴절되어 들어가, 굴절되어 입자를 나오게 된다. 이때 입자에서 일어나는 빛의 굴절 현상으로 광자의 운동량이 변하게 되는데 그에 대한 반작용으로 입자에 힘이 발생한다. 입자를 집광된 레이저의 초점 근처에 위치시키면 굴절에 의한 합력으로 입자는 레이저의 초점 가운데 위치하게 되고, 레이저 빛의 초점 위치에 입자를 포획할 수 있다 (그림 2 A). 만일 초점 위치와 다른 위치에 입자가 있다면 입자가 초점으로 가려는 힘과 동일한 힘으로 입자를 당기거나 미는 힘이 발생한다고 생각할 수 있으므로 초점에서부터의 거리를 측정하면 입자에 인가된 힘을 측정할 수 있다. 보통 분자 수준의 생체 물질은 크기가 나노 미터 정도 이므로 보고자 하는 생체 물질에 DNA를 통해 마이크론 사이즈의 입자를 연결해 생체 물질에 힘을 측정하거나 가하게 된다. 이때 가할 수 있는 힘은 1~ 수백 피코 뉴턴(pN) 정도의 힘인데 DNA에 단백질이 붙거나(수 피코 뉴턴), 단백질 간에 상호작용(수십 피코 뉴턴), 항체-항원 반응(~100 피코 뉴턴) 등을 측정할 수 있다.

이러한 현상을 1987년에 Ashkin 박사가 바이러스와 박테리아에서 가능함을 보였고, 1996년 Bustamante 그룹에서 힘에 따른 DNA의 길이변화를 측정하면서 단일 생체 분자에 적용되었다[35]. 그 이후 RNA의 이차 구조 폴딩 연구[11], 단백질 폴딩 연구[36] 등 단일 분자 자체의 성질을 연구하는데 사용 되었을 뿐 아니라, 앞서 보



**Figure 2. Single molecule manipulation.** (A) Schematics of the optical tweezer. When the bead is displaced from the beam focus, the larger momentum change of the more intense rays cause a net momentum pulling the bead toward the focal point. (B) Schematics of the AFM. The change of the cantilever position which means the sample undulation is detected by measuring the movement of a laser spot on the photodiode, which is being reflected from the back-side of the cantilever.

있던 kinesin 단백질이 액틴 위를 걸어갈 때 짐을 지고 가는 힘의 측정[37], RNA polymerase의 운동[38] 등 다양한 단백질이 운동할 때 힘과 상호작용을 측정하여 분자단위의 정확한 기작을 파악하였다.

최근에는 하나의 레이저로 시간 별로 다른 지점에 여러 개의 초점을 만들거나[39] 홀로그래프를 이용하여 3차원 상에서 여러 개의 초점을 만들어[40] 여러 입자를 동시에 제어 할 수 있는 기술을 개발하여 발전하고 있다.

### 원자힘 현미경 (Atomic Force Microscopy: AFM)

원자힘 현미경의 전신인 주사 터널링 현미경(Scanning Tunneling Microscopy: STM)은 스위스의 IBM연구원인 Binnig, Rohrer의 연구 그룹에서 1982년 개발되었으며[41] 이로 인해 1986년 노벨물리학상을 수상하였다. 이후 1986년에 비슷한 원리로 원자힘 현미경을 발명하였다[42]. 원자힘 현미경은 뾰족한 탐침이 시료의 표면과 상호작용하는 반데르발스 힘에 의해 움직이게 되면 이를 레이저 반사로 원자의 크기까지도 관측할 수 있는 현미경이다 (그림 2 B). 이를 이용하면 시료의 표면의 구조를 정확히 이미징 하거나 힘을 재고 또는 힘을 줄 수 있게 된다.

광학 집게와 마찬가지로 생체 분자에 힘을 주거나 작용되는 힘을 측정할 수 있으므로 HMO1 단백질의 nucleosome-free chromatin 안정화 작용을 원자힘 현미경을 통해 분자단위로 이미징하거나[43], 탐침에 리간드를 달아 이스트 세포 표면에 리셉터와 결합하는 힘을 측정하고 이를 이용하여 세포 표면의 리셉터를 매핑하기도 하였다[44]. 최근에는 고속 원자힘 현미경의 개발로 self-assembly 단백질의 assembly 과정을 실시간으로 이미징하고 측정하기도 한다[45].

## 구강 생물학 분야에서의 단분자 연구기법 활용

현재까지 구강생물학분야에서 단분자 연구기법을 활용한 연구는 그다지 많지 않다. UCLA의 Gimzewski 그룹에서 원자힘 현미경을 사용하여 흥미로운 연구 결과 들을 발표하였다[46-48]. 최근 exosome의 특징 및 응용에 대한 연구가 활발해 지면서 exosome 및 세포 외 소포체에 대한 연구에 원자힘 현미경을 사용되고 있다[46]. Exosome은 자연발생적으로 생성되는 bio-nano particle로서 근래에 그 특징 및 응용에 대한 연구가 상당한 관심을 끌고 있다. 구강생물학 분야에서도 Sharma 등이 고 해상도 원자힘 현미경을 사용하여 정상대조군과 암환자군의 타액에서 유래한 exosome을 비교하고, 암환자 유래 exosome에서

CD63 surface antigen의 밀도가 증가됨을 보고하였다[47]. 또한 Gimzewski 그룹은 충치의 원인균인 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)가 치아 표면에 형성하는 biofilm의 두께를 아미노산 L-Arg이 존재 및 부재의 조건에서 원자힘 현미경으로 측정하여 L-Arg이 *S. mutans*의 치아표면 부착성에 미치는 연구결과를 발표하였다[48].

또 다른 보고는 RNA polymerase-amelogenin gene complex를 원자힘 현미경을 이용하여 단분자 수준으로 이미징한 보고가 있다[49]. 치아 가장 표면에 위치하는 조직인 법랑질의 단백질인 amelogenin을 코딩하는 AMELX 유전자가 전사적으로 활성화한 상태에서 RNA polymerase와의 결합을 원자힘 현미경으로 관찰하여 transcription complex가 DNA상의 특정 위치에서 단 하나의 RNA polymerase와 결합함을 밝혔다. 원자힘 현미경을 활용한 본 연구 결과는 단백질 단분자를 시각화시켜 줌으로써 치아의 법랑질 형성에서 AMEX유전자의 발현에 대한 이해 증진에 기여하였다.

국립대만대학 치과대학의 Lin 그룹은 bone morphogenetic protein 4 (BMP4) 단백질에 enhanced green fluorescent protein을 융합한 결합체 (BMP4-EGFP)를 단분자 형광 현미경으로 관찰하였다[50]. 본 연구에서 처음으로 살아있는 인간 치주인대세포 (human periodontal ligament cell)의 세포막에 형광표지 BMP4 단백질이 localize되는 것을 이미징 하였으며, 리간드인 BMP4가 BMP 리셉터에 결합하는 과정을 단분자 추적기법을 통하여 밝혔다.

## 결론

지금까지 우리는 단분자 연구 기법 중 단분자 분광학과 단분자 제어기법에 대해 살펴보았다. 단분자 분광학에서 단분자 프렛의 원리와 DNA, 단백질 등의 분자수준의 모양변화나 상호작용의 연구 내용들에 대해 소개하였다. 그리고 단분자 추적 기법을 설명하고 생체 분자들이 DNA, 액틴, 세포막 등에서 어떻게 움직이는지에 대한 연구에 대해 소개하였다. 노벨상의 배경 기술이었던 초고해상도 현미경 또한 원리를 살펴보고 최신 연구 동향에 대해 알아보았다. 또 다른 물리적 성질인 힘을 제어하는 단분자 제어기술에 대해서도 살펴보았는데 미세한 힘까지 측정하고 제어할 수 있는 광학 집게 기술로 세포 내에서 생체 물질들에 어느 정도의 힘으로 상호작용하는지 관측한 연구 결과들을 소개하고, 원자힘 현미경으로 어떤 연구들이 가능한지 살펴보았다.

아직까지 단분자 기술에는 생체 물질에 형광 분자를 정확한 위치에 부착하는 문제나, 충분한 형광 빛을 확보할 수 있는 형광 물질의 개발, 다른 분자와의 간섭을 피

하는 등의 문제들이 남아있다. 하지만 최근에 이러한 문제들이 개선되고 있으며 좀 더 정밀한 측정법들이 개발되고 있다. 또한 구강 생물학에서도 기본적으로 세포에서의 생체 분자들의 상호작용 연구가 중요하므로 단분자 기법들을 이용해 연구를 진행한다면 보다 세밀하고 정밀한 기작들을 밝혀 낼 수 있을 것이다.

---

## Acknowledgement

This work was supported by National Research Foundation of Korea (NRF) Grants (No. 2018R1A2B2008995).

---

## Conflict of Interest

The authors declare no competing financial interests.

---

## References

- Moerner W, Kador L. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys Rev Lett* 1989;62:2535-8. doi:10.1103/PhysRevLett.62.2535.
- Betzig E. Proposed method for molecular optical imaging. *Opt Lett* 1995;20:237-9. doi:10.1364/OL.20.000237.
- Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, et al. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* (80- ) 2006; 313:1642 LP-1645. doi:10.1126/science.1127344.
- Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egnér A, Hell SW. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:8206-10. doi:10.1073/pnas.97.15.8206.
- McKinney SA, Déclais A-C, Lilley DMJ, Ha T. Structural dynamics of individual Holliday junctions. *Nat Struct Biol* 2003;10:93-7. doi:10.1038/nsb883.
- Myong S, Rasnik I, Joo C, Lohman TM, Ha T. Repetitive shuttling of a motor protein on DNA. *Nature* 2005;437: 1321-5. doi:10.1038/nature04049.
- Jeong C, Cho WK, Song KM, Cook C, Yoon TY, Ban C, et al. MutS switches between two fundamentally distinct clamps during mismatch repair. *Nat Struct Mol Biol* 2011;18:379-85. doi:10.1038/nsmb.2009.
- Lee S, Lee J, Hohng S. Single-molecule three-color FRET with both negligible spectral overlap and long observation time. *PLoS One* 2010;5:1-9. doi:10.1371/journal.pone.0012270.
- Groll J, Amigoulova E V, Ameringer T, Heyes CD, Röcker C, Nienhaus GU, et al. Biofunctionalized, Ultrathin Coatings of Cross-Linked Star-Shaped Poly(ethylene oxide) Allow Reversible Folding of Immobilized Proteins. *J Am Chem Soc* 2004;126:4234-9. doi:10.1021/ja0318028.
- Tan E, Wilson TJ, Nahas MK, Clegg RM, Lilley DMJ, Ha T. A four-way junction accelerates hairpin ribozyme folding via a discrete intermediate. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100: 9308-13. doi:10.1073/pnas.1233536100.
- Liphardt J, Onoa B, Smith SB, Tinoco I, Bustamante C. Reversible Unfolding of Single RNA Molecules by Mechanical Force. *Science* (80- ) 2001;292:733 LP-737.
- Yildiz A, Yildiz A, Forkey JN, McKinney SA, Ha T, Goldman YE, et al. Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* (80-) 2003;300:2061-5. doi:10.1126/science.1084398.
- Wang YM, Austin RH, Cox EC. Single molecule measurements of repressor protein 1D diffusion on DNA. *Phys Rev Lett* 2006;97:48302. doi:10.1103/PhysRevLett.97.048302.
- Xu K, Zhong G, Zhuang X. Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal Structure in Axons. *Science* (80- ) 2013;339:452-6. doi:10.1126/science.1232251.
- Sakon JJ, Weninger KR. Detecting the conformation of individual proteins in live cells. *Nat Methods* 2010;7:203-5. doi:10.1038/nmeth.1421.
- Dahan M, Lévi S, Luccardini C, Rostaing P, Riveau B, Triller A. Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking. *Science* (80- ) 2003;302:442 LP-445. doi:10.1126/science.1088525.
- Tang AH, Chen H, Li TP, Metzbower SR, MacGillavry HD, Blanpied TA. A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature* 2016;536:210-4. doi:10.1038/nature19058.
- Forster T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften* 1946;33:166-75. doi:10.1007/BF00585226.
- Ha T, Enderle T, Ogletree DF, Chemla DS, Selvin PR, Weiss S. Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93: 6264-8. doi:10.1073/pnas.93.13.6264.
- Joo C, McKinney SA, Nakamura M, Rasnik I, Myong S, Ha T. Real-Time Observation of RecA Filament Dynamics with Single Monomer Resolution. *Cell* 2006;126:515-27. doi:10.1016/j.cell.2006.06.042.
- Wu WQ, Hou XM, Zhang B, Fossé P, René B, Mauffret O, et al. Single-molecule studies reveal reciprocating of WRN helicase core along ssDNA during DNA unwinding. *Sci Rep* 2017;7:1-11. doi:10.1038/srep43954.
- Ju M-S, Na J-H, Yu YG, Kim J-Y, Jeong C, Jung ST. Structural consequences of aglycosylated IgG Fc variants evolved for FcγRI binding. *Mol Immunol* 2015;67. doi:10.1016/j.molimm.2015.06.020.
- Murakoshi H, Iino R, Kobayashi T, Fujiwara T, Ohshima C, Yoshimura A, et al. Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7317-22. doi:10.1073/pnas.0401354101.
- Boersma AJ, Zuhorn IS, Poolman B. A sensor for quantification of macromolecular crowding in living cells. *Nat Methods* 2015;12:227-9. doi:10.1038/nmeth.3257.

25. Freikamp A, Mehlich A, Klingner C, Grashoff C. Investigating piconewton forces in cells by FRET-based molecular force microscopy. *J Struct Biol* 2017;197:37-42. doi:10.1016/j.jsb.2016.03.011.
26. Cai D, McEwen DP, Martens JR, Meyhofer E, Verhey KJ. Single molecule imaging reveals differences in microtubule track selection between kinesin motors. *PLoS Biol* 2009;7. doi:10.1371/journal.pbio.1000216.
27. Yildiz A, Tomishige M, Vale RD, Selvin PR. Kinesin Walks Hand-Over-Hand. *Science* (80-) 2004;303:676-8. doi:10.1126/science.1093753.
28. Kim JH, Larson RG. Single-molecule analysis of 1D diffusion and transcription elongation of T7 RNA polymerase along individual stretched DNA molecules. *Nucleic Acids Res* 2007;35:3848-58. doi:10.1093/nar/gkm332.
29. Elf J, Li G-W, Xie XS. Probing Transcription Factor Dynamics at the Single-Molecule Level in a Living Cell. *Science* (80-) 2007;316:1191-4. doi:10.1126/science.1141967.
30. Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 2006;3:793-6. doi:10.1038/nmeth929.
31. Boettiger AN, Bintu B, Moffitt JR, Wang S, Beliveau BJ, Fudenberg G, et al. Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states. *Nature* 2016;529:418-22. doi:10.1038/nature16496.
32. Yoon T-Y, Lu X, Diao J, Lee S-M, Ha T, Shin Y-K. Complexin and Ca<sup>2+</sup> stimulate SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15:707-13. doi:10.1038/nsmb.1446.
33. Lesterlin C, Ball G, Schermelleh L, Sherratt DJ. RecA bundles mediate homology pairing between distant sisters during DNA break repair. *Nature* 2014;506:249-53. doi:10.1038/nature12868.
34. Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE, Chu S. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt Lett* 1986;11:288. doi:10.1364/OL.11.000288.
35. Smith SB, Cui Y, Bustamante C. Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. *Science* (80-) 1996;271:795-9. doi:10.1126/science.271.5250.795.
36. Ceconi C, Shank EA, Bustamante C, Marqusee S. Direct observation of the three-state of a single protein molecule. *Science* (80-) 2005;417:2057-60.
37. Schnitzer MJ, Block SM. Kinesin hydrolyses one ATP per 8 nm step. *Nature* 1997;388:386-90.
38. Wang MD, Schnitzer MJ, Yin H, Landick R, Gelles J, Block SM. Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science* (80-) 1998. doi:10.1126/science.282.5390.902.
39. Noom MC, van den Broek B, van Mameren J, Wuite GJL. Visualizing single DNA-bound proteins using DNA as a scanning probe. *Nat Methods* 2007;4:1031-6. doi:10.1038/nmeth1126.
40. Rodrigo JA, Alieva T. Freestyle 3D laser traps: tools for studying light-driven particle dynamics and beyond. *Optica* 2015;2:812. doi:10.1364/OPTICA.2.000812.
41. Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys Rev Lett* 1982;49:57-61. doi:10.1103/PhysRevLett.49.57.
42. Binnig G, Quate CF. Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* 1986;56:930-3. doi:10.1103/PhysRevLett.56.930.
43. Murugesapillai D, McCauley MJ, Huo R, Holte MHN, Stepanyants A, Maher LJ, et al. DNA bridging and looping by HMO1 provides a mechanism for stabilizing nucleosome-free chromatin. *Nucleic Acids Res* 2014;42:8996-9004. doi:10.1093/nar/gku635.
44. Takenaka M, Miyachi Y, Ishii J, Ogino C, Kondo A. The mapping of yeast's G-protein coupled receptor with an atomic force microscope. *Nanoscale* 2015;7:4956-63. doi:10.1039/C4NR05940A.
45. Nievergelt AP, Banterle N, Andany SH, Gönczy P, Fantner GE. High-speed photothermal off-resonance atomic force microscopy reveals assembly routes of centriolar scaffold protein SAS 6. *Nat Nanotechnol* 2018;13:Accepted. doi:10.1038/s41565-018-0149-4.
46. Sharma S, Leclaire M, Gimzewski JK. Ascent of atomic force microscopy as a nanoanalytical tool for exosomes and other extracellular vesicles. *Nanotechnology* 2018;29. doi:10.1088/1361-6528/aaab06.
47. Sharma S, Gillespie BM, Palanisamy V, Gimzewski JK. Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human-saliva-derived exosomes. *Langmuir* 2011;27:14394-400. doi:10.1021/la2038763.
48. Sharma S, Lavender S, Woo JR, Guo L, Shi W, Kilpatrick-Liverman LT, et al. Nanoscale characterization of effect of L-arginine on *Streptococcus mutans* biofilm adhesion by atomic force microscopy. *Microbiol (United Kingdom)* 2014;160:1466-73. doi:10.1099/mic.0.075267-0.
49. Crampton N, Thomson NH, Kirkham J, Gibson CW, Bonass WA. Imaging RNA polymerase-amelogenin gene complexes with single molecule resolution using atomic force microscopy. *Eur J Oral Sci* 2006;114:133-8. doi:10.1111/j.1600-0722.2006.00274.x.
50. Mi HW, Lee MC, Chiang YC, Chow LP, Lin CP. Single-molecule imaging of Bmp4 dimerization on human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 2011;90:1318-24. doi:10.1177/0022034511418340.