

광산란 기법을 이용한 생물분자 자기조립체 특성 분석 (Application of Light Scattering Technique to the Characterization of Self-Assembly of Biomolecules)

최근 고감도, 고효율 바이오 칩에 대해 많은 관심이 집중되고 있다. DNA 칩, 단백질 칩, 실험실 칩(Lab-on-a-Chip)을 포함한 모든 바이오 칩들에는 대량의 과학적 정보를 빠르고 정확하게 얻을 수 있는 새로운 제작 및 측정 기술들이 함축되어 있다. 이러한 바이오 칩은 속도와 정확성의 이점으로 인해 질병검사를 위한 기존의 기법들을 대체할 것으로 전망된다¹.

이와 같은 바이오 칩은 고형기재 표면에서 이중물질의 교차반응을 배제하고 표적물질의 저농도 측정을 가능하게 하는데 그 기술적 핵심이 있으며, 바이오 칩 상용화를 위해 현재 활발히 수행되는 연구분야중 하나이다. 고체 표면에 고정화되는 생물분자의 밀도, 균일성, 활성도에 따라 개별 DNA, RNA, 항원, 및 기타 단백질 분자들의 검출한계와 비특이적 결합여부가 결정되며, 고정화 방법은 바이오센서의 검출한계와 비특이적 반응배제에 결정적인 역할을 한다.

생체분자를 고체 표면에 부착하는 기술은 여러 기술이 알려져 있으나, 랑뮈르-블로젯(Langmuir-Blodgett; LB)기술²과 자기조립(Self-Assembly; SA)기술³이 대표적이다. LB 기술은 수면에 살포된 양친매성(Amphiphilic) 분자들의 기상-액상 계면간에 단분자막 형태로 존재하는 특성을 이용하여, 넓게 확산된 단일분자막을 랑뮈르와 블로젯이 개발한 기술을 이용하여 단일분자막을 고체 표면에 적층할 수 있다⁴. LB 기술은 표면 위에 분산된 물질의 면적당 밀도를 임의로 조절할 수 있으며, 누적횟수 조절에 따라 단층 분자막 및 다층분자막을 손쉽게 제조할 수 있다. 그러나 이 방법은 시간과 재료의 공급이 매우 제한된다.

자기조립(SA) 기술은 나노크기의 분자들을 크기와 구성성분을 제어하면서 조립블록화하고, 이들을 일정한 성질과 기능을 갖는 큰 구조로 조립하는 소위 bottom-up 방식을 이용하는 것으로서, 대표적인 예로 알킬 티올(alkyl-thiol)을 들 수 있다. 탄소수가 10개 이상되는 긴 사슬구조의 알킬기 끝에 티올기가 붙어 있는 화합물을 용액에 녹인 후, 금을 넣고 잠시 기다리면 티올과 금표면사이의 친화력으로 인하여 흡착이 일어나며 알킬기사이의 친화력으로 인하여 촘촘히 늘어서게 된다. 자기조립되는 분자 말단의 작용기에 따라 표면의 젖음성(wettability)이 변하고, 알킬기의 길이에 따라서 성질이 변하므로 목적에 따라 쌓임 구조와 성격의 조절이 가능한 기술이다⁵.

고체표면에 균일한 단분자막을 형성하기 위해 분자자기조립기법이 주목받고 있다. 분자 자기조립 기법의 중요한 핵심은 분자간 인력에 의한 응집상태를 제거하고, 초분산

성을 달성하여 용액내 조립하려는 단분자들의 크기와 성질을 일정하게 하는데 있다. 생물분자는 그 생화학적 성질상 수용액상에서 응집상태로 존재하며, 이러한 응집상태를 해소하기 위해 초음파와 같은 물리적 충격을 가할 경우 쉽게 활성을 잃어버리는 특성이 있다. 단백질과 같은 생체물질의 응집상태를 규명하고 관찰하기 위해 최근 들어 광산란(Light Scattering; LS)기법이 많이 응용되고 있다. 광산란 기법은 Tobacco Mosaic Virus(TMV)의 차원과 형태해석⁶ 및 단백질 분산성 규명에 최근들어 응용되기 시작하고 있다⁷. 향후 나노 생물분자막 기술 구현을 위한 요소 기술로 예상되는 광산란에 대해 본고에서 간략히 설명하고자 한다.

빛이 매질속을 통과할 때 빛과 매질사이의 상호작용은 여러 가지 형태가 있으나, 빛의 흡수가 일어나면서 물질을 구성하는 원자의 전이가 안정한 에너지 준위사이에서 일어나지 않으면 빛을 흡수한 원자는 곧 빛을 방출하면서 안정된 상태로 되돌아간다. 이 때, 방출되는 빛은 모든 방향으로 이루어지기 때문에 산란(Scattering)이라 한다.

광산란은 크게 두 가지로 나뉘어 진다. 하나는 정적 광산란(Static Scattering) 또는 탄성 광산란(Elastic Light Scattering)이라고 불리는 방법으로 산란각도에 따른 산란된 빛의 강도를 물질의 농도, 온도, 등의 함수로 측정하여 물질의 분자량, 크기 및 모양과 열역학적 성질을 측정하는데 사용된다. 다른 하나는 동적 광산란(Dynamic Light Scattering) 또는 준탄성광산란(Quasi-Elastic Light Scattering)이라 불리우며, 산란광의 주파수가 입사광의 그것과는 달리 주파수 분포를 가지고, 시간에 따라 산란광의 주파수 분포를 측정하여 병진 확산계수, 유체역학적 반경, 분자량 분포 등의 정보를 얻을 수 있다⁸.

빛의 파장에 비해 아주 작은 입자에 z축 편광된 단색광(파장: λ , 주파수: ν)이 입사될 때 입사광의 전기장은 그와 같은 주파수로 진동하는 쌍극자를 유발하게 된다. 이때, 입자가 광학적으로 등방성(isotropic)이면 그 쌍극자는 입사광의 전기장 벡터와 같은 방향으로 진동하게 되며, 이 진동 쌍극자는 그 자체로 전자파를 방출하는 광원이 되어 빛을 방출하며 이 빛이 바로 산란광이 된다. 강도 I_θ 를 가지는 산란된 빛의 각에 따른 변화는 식 (1)과 같이 주어진다.

$$I_\theta = I_0 \frac{16\pi^4 a^2 \sin^2\theta}{\gamma^2 \lambda^2} \quad (1)$$

여기서 I_0 는 입사광의 세기, γ 는 시료와 검지기 간의 거리, a 는 분자의 편광화 능력, 입사광의 전기장력의 크기에 대한 유도 쌍극자의 크기와 관련있는 비례상수로서 분극률(Polarizability)을 나타낸다. N_0 개의 단위 부피당 입자개수가 존재하는 희박기체의 부피 v 와 그림 1과 같은 실험구조를 가정하자.

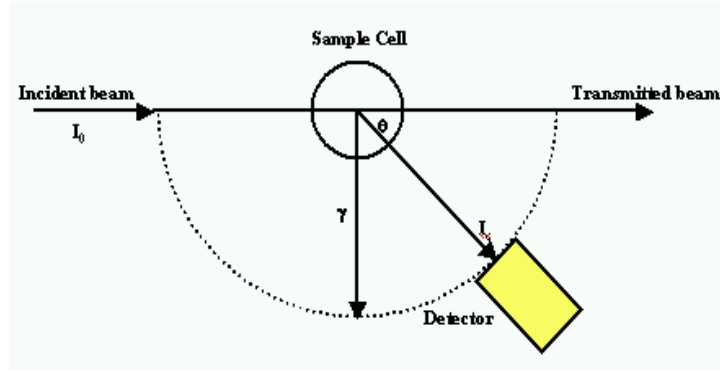


그림 1. 산란광을 측정하기 위한 기구들의 모식도

여기서 α 가 쉽게 결정되지 않기 때문에 굴절률 n 과 α 의 관계를 성립시켜 결정하면 그 관계는 다음과 같다.

$$4\pi(N/V)\alpha = n^2 - 1 \quad (2)$$

진공에서 굴절률은 일정하므로 희박 기체의 경우,

$$n = 1 + (dn/dc)c \quad (3)$$

여기에서 dn/dc 는 기체의 농도, c (단위부피당 질량)에 따른 n 의 정비례 증가분이고, 굴절률 증가분으로 알려져 있다. c 가 작을 경우 다음과 같이 쓸 수 있다.

$$n^2 = 1 + 2(dn/dc)c \quad (4)$$

위 식들을 정리하면 Rayleigh 방정식이라 불리는 이상 탄성적 산란에 관한 관계식을 얻을 수 있다⁹. Rayleigh 방정식은 다음과 같다.

$$R(\theta) = \frac{I_{\theta} r^2}{I_0} = \frac{9\pi^2}{2\lambda^4} \left(\frac{n_1^2 - n_0^2}{n_1^2 + 2n_0^2} \right)^2 N_0 v^2 (1 + \cos^2 \theta)$$

(5)

여기에서 $R(\theta)$ 는 산란각 θ 에서의 Rayleigh ratio로 정의되며, λ 는 매질내 입사광의 파장, n_1 과 n_0 는 각각 용질과 매질의 굴절률로 정의된다.

광산란 장치를 구성하기 위한 기본적 구조는 레이저 감지기(detector)인 PMT (Photomultiplier tube), A/D변환기(Analog/Digital converter) 고전압 Power supply, 시료 holder 및 몇 개의 거울과 렌즈로 이루어져 있다. 동적 광산란 장치에는 이외에도 전단증폭기(preamplifier), 판별기(discriminator) 그리고 자체 상관기(autocorrelator)등이 더 필요하다. 보통의 광산란 장치를 많이 사용하고 있으나, 연구할 목적과 시료의 상태(액체 또는 고체)에 따라 적합하게 직접 제작하여 사용하기도 한다.

광원에 해당하는 레이저는 보통 632.8 nm 파장의 He/Ne laser와 488 nm 파장의 Ar ion laser를 사용하는데, 실험목적에 알맞은 레이저 세기를 선택하는 것이 중요하다. PMT로는 정적 광산란 실험의 경우 산란과 세기에 비례하는 전류를 출력으로 내보내는 것을 주로 사용하고, 동적 광산란 실험의 경우에는 광자의 수를 측정하는 것이 널리 사

용된다. PMT의 성능은 파장에 따라 달라지므로 레이저의 파장에 따라 선택하는 것이 바람직하다.

산란광의 세기는 액체의 경우 입사광 세기의 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 배정도, 얇은 막과 같은 고체나 분말의 경우에는 이보다 조금 큰 정도로 매우 작다. 그러나 유리나 수정으로 되어있는 시료 용기의 표면에서 반사되는 반사광의 세기는 산란광의 세기보다 훨씬 크게 때문에 이러한 반사광을 얼마나 제거해 주느냐가 정확한 광산란 실험 결과를 얻는데 있어서 매우 중요하다. 예로 유리와 굴절률이 비슷한 용매(주로 톨루엔이나 벤젠)가 담긴 용기안에 산란용기가 위치하도록 장치를 구성하면 반사광을 많이 줄일 수 있고, 실험중에 온도를 일정하게 유지시켜주기 위한 용도로도 사용되어 거의 대부분의 광산란 장치에 채용되고 있다.

이외에도 산란광만을 감지하고 기타 파장의 빛은 감지할 수 없도록 하는 간섭필터, 수직 편광을 만들기 위한 analyzer, 빛을 깨끗이 하거나 산란부피를 조절하는 pinhole등으로 광산란 장치는 구성된다.

이와 같이 광산란 기법은 생물분자의 크기를 측정하는데 매우 유용한 도구로서 응용될 수 있다. 제시되는 광산란 기법을 이용하여 생물분자의 분산성을 측정하며, 측정된 분산성을 기준으로 하여 분산성 향상 기술을 개발하며, 분산도가 증가된 생물분자의 자기조립을 통해 표면에 자기조립되는 생물분자의 구조를 변화시키고자 하는 노력이 진행중에 있다. 과거에는 광산란 기법이 화학, 고분자 영역과 관련된 연구가 많이 진행되어 왔으나^{9,10}, 최근에는 생물물리(Biophysics), 생화학 분야에 광산란 기법이 현재 많이 도입되고 있다. 광산란 기법에 의한 분산도 측정이 생물분자의 자기조립 기술의 개발에 기여하리라 사료된다. 생물분자 자기조립 기술의 발달은 원자 조작에 의해 나노 크기를 갖는 생체 분자들의 조립블록들을 크기와 구성성분을 제어하면서 제작하고, 이들을 일정한 성질과 기능을 갖는 상위 개념의 구조로 조립하는 생물 나노기술을 발전시키리라 전망된다. 광산란 기법과 결합된 생물분자막 제조 기술을 응용해 제작되는 나노 수준의 생물분자막을 통해 표적물질의 검출한계와 선택성이 향상된 고감도 바이오칩에 대한 개발사례는 현재까지 보고된 바 없으므로 향후 다양한 여러 연구가 필요하리라 예상된다.

■ 참고문헌

1. Roger P. Ekins. Ligand assay: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clinical Chemistry*. **44**:9, 2015-2030(1998).
2. J.-W. Choi, Y.-K. Kim, I.-H. Lee, J. Min, and W.H. Lee. Optical organophosphorus biosensor consisting of acetylcholinesterase viologen hetero Langmuir-Blodgett film. *Biosensors & Bioelectronics*. **16**, 937-943(2001).
3. A. Nakasa, U. Akiba, and M. Fujihira. Self-assembled monolayers containing biphenyl derivatives as challenge for nc-AFM. *Applied Surface Science*. **157**,

326-331(2000).

4. Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blodgett To Self-Assembly*, 1st ed.; Academic Press; Boston, 1991; pp. 101-219
5. Cass, T. and Ligler F.S., *Immobilized Biomolecules in Analysis-A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, 1998; pp. 60-72.
6. N. Santos and M. Castanho. Teaching Light Scattering Spectroscopy: The Dimension and Shape of Tobacco Mosaic Virus. *Biophysics Journal*. **71**, 1641-1646(1996).
7. S.Y. Kwon and M.W. Kim. Structure and Growth Control of a Nonionic Surfactant Micelle by Adding Phospholipid. *Langmuir*. **17**, 8016-8023(2001).
8. V.A. Bloomfield. Static and Dynamic Light Scattering from Aggregating Particles. *Biopolymers*. **54**, 168-172(2000).
9. S.Z. Zhang, F.L. Zhao, K.A. Li, and S.Y. Tong. Determination of glycogen by Rayleigh light scattering. *Analytica Chimica Acta*. **431**, 133-139(2001).
10. V.A. Bloomfield. Quasi-elastic light-scattering in biochemistry and biology. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. **10**, 421-450(1981).
11. S.E. Harding, D.B. Sattelle, and V.A. Bloomfield. *Laser Light Scattering in Biochemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992.