

Phospholipid 이중층막에서 Methylene Blue와 Thionine의 Metachromasy

김기준 · 이 후 설*

*대전대학교 화학공학과

Metachromasy of Methylene Blue and Thionine on the Phospholipid Bilayer Membrane

Kim, Ki-Jun · Lee, Hoo-Seol

*Dept. of Chemical Engineering, Dae-Jin University

(Received Oct. 10, 1996)

ABSTRACT

Metachromatic properties of admixture of thionine and methylene blue(MB) in aqueous solution and phospholipid bilayer membrane have been studied by absorption spectroscopy. When thionine and MB were mixed, new coaggregate has been formed because of MB was redistributed to thionine aggregate. In phospholipid bilayer membrane system, the highly concentrated thionine was easily formed the coaggregation with MB moiety independent of MB concentration, and absorption band of admixture were more transferred to short wavelength than aqueous system. In monomeric thionine concentration, the coaggregation band was observed at the middle wavelength between the site of monomeric thionine and the site of dimeric MB in the presence of lipid bilayer membrane.

I. 서 론

여러 유기색소 분자들은 농도가 달라지면 흡수파장과 흡광도가 변한다. 일반적으로 monomer 형태로 알려진 α 흡수띠는 장파장 쪽에서 나타나며, dimer 형태인 β 흡수띠는 단파장 쪽에서 나타난다(Fig. 1(a)).¹⁾ Metachromasy라 불리는 이러한 흡수성질의 변화는 계면활성제나 이온성 고분자 물질 등을 첨가할 때 더욱 큰 청색이동이 나타난다.²⁾ Dimer의 흡수대 보다 더욱 단파장에서 나타나는 다분자 회합체의 흡수띠를 γ , J 또는 H 흡수띠라 한다. 이것은 색소 분자들의 쌍

이는 갯수와 배열 형태로 구별하기도 한다. 전하를 띤 색소 분자들은 chondroitin sulfate 등과 같은 주기적인 음이온성 고분자 물질이 존재하면 다분자 회합체를 매우 잘 형성한다.^{3,4)} 두 종류 이상의 색소가 혼합된 때에는 metachromasy 현상에 대한 분광학적인 mechanism이나 구조론적인 해석은 매우 어렵게 된다. 두 개의 사슬을 가진 인지질을 수용액에 분산시키면 lamellar 구조가 형성되고, 이용액에 초음파를 처리하면 vesicle이 만들어진다.⁵⁻⁷⁾ 이 vesicle 이중층막의 친수성 부분은 전하를 띤 유기색소 분자들이 stacking되는데 좋은 쌓임 자리를 제공해 준다.^{8,9)} 본 연구에서는 유기용매 증발법과 초음파법으로 만든 vesicle

용액 존재 하에서 thionine과 methylene blue(MB)의 혼합 색소의 metachromasy를 고찰함으로써, 조직 염색과 항생작용과 같은 생체막에서의 유기색소분자의 기능과 거동 등에 대한 분광학적인 특성을 살펴보고자 한다.

II. 실험

1. 기구 및 시약

Methylene blue, thionine 그리고 L- α -lecithin (soy bean) 등은 Sigma Co. 제품을 사용했고, tris (hydroxymethyl)methylamine, NaOH 그리고 KCl 등은 Junsei Co.의 GR급을 사용했다. 가시부-자외부 분광기는 Pye Unicam Co.의 model SP8-400 spectrophotometer를 사용했으며, pH meter는 Orion Co.의 model 611을 그리고 초음파 발생기는 태금초음파사의 20kHz ultrasonicator을 사용했다.

2. Vesicle의 제조 및 흡수곡선의 측정

인지질 이중층막은 chloroform용액에 lecithin 0.1mole을 녹인 후 Deamer 등의 방법으로¹⁰⁾ 일차 제조한 후, 이 수용액을 10분동안 초음파를 처리하여 vesicle을 만들었으며 4°C 이하로 냉장 보관했다. 이때 초음파 처리시에 vial의 온도는 얼음물로 항온시켰다. 색소 보관용액들은 1mM-tris 완충용액을 사용하여 1mM로 제조하여 차광하에 냉장보관했다. 모든 보관용액은 제조 후 3일 이내에 사용했다. 일반 흡수 spectrum은 reference cell에 완충용액을 넣고 측정하였으며, 혼합색소용액의 흡수 spectrum의 경우에는 혼합용액 중의 색소 각각의 농도를 일정하게 유지시켰다. Difference spectrum 측정시에는 sample cell에 혼합색소-vesicle용액을 넣고, reference cell에는 한 가지의 색소나 또는 한 색소-vesicle 또는 두 가지 색소혼합물 등을 각각 따로 취해 측정했다.

III. 결과 및 고찰

1. 수용액에서의 metachromasy

Methylene blue와 thionine 그리고 혼합 색소용액 각각의 스펙트럼을 Fig. 1(a)에 나타냈다. 이것은 대부분 monomer상태로 존재하는 두 색소들의 농도 범

위이다. 혼합 색소용액의 최대 흡수파장은 monomer 상태의 thionine의 흡수파장 602nm 보다 길고 dimer 상태의 MB의 흡수파장인 609nm 보다 짧은 606nm 근처에서 나타났다. 이 때 MB의 monomer의 흡광도는 조금 감소했다. Fig. 1(b)는 두 색소가 모두 상당량 dimer를 생성시키는 농도에서 그린 spectrum들이다. MB의 monomer 흡광도는 더욱 크게 감소했으며, 혼합 흡수띠의 구간도 thionine dimer 흡수띠인 566nm 와 thionine monomer의 흡수띠인 600nm 사이에서

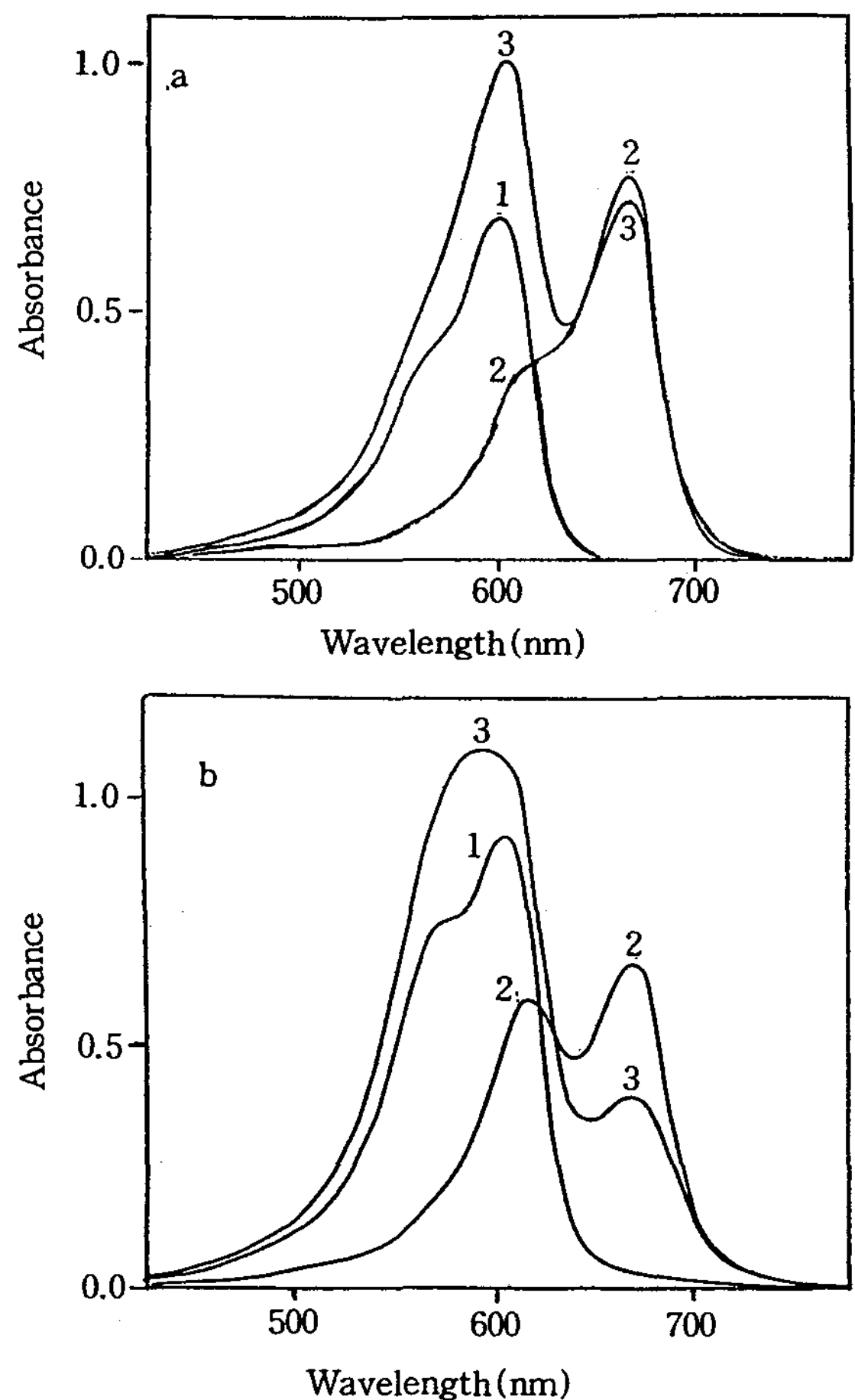


Fig. 1. Absorption spectra of thionine and MB in aqueous solution at 25°C, pH=7.5, a : 1 : [thionine]= 1.01×10^{-5} M, 2 : [MB]= 1.01×10^{-5} M, 3 : mixture of thionine and MB, path length=1cm, b : 1 : [thionine]= 2.70×10^{-4} M, 2 : [MB]= 1.28×10^{-4} M, 3 : mixture of thionine and MB, path length=1mm.

넓게 관측되었다. 비슷한 농도 범위일 때에 구조적으로 유사한 두 유기색소들의 stacking 효과는 기본 고리골격에 붙어 있는 amino기에 결합된 치환기의 수와 치환위치에 의해 영향을 받는 것으로 생각된다. 이런 색소들 중에 4개의 methyl를 가진 MB가 입체장애 효과로 인해 회합체의 흡수띠는 장파장에서 나타나며, dimer의 특성 흡수띠도 비교적 뚜렷이 나타난다. 이에 비해 입체장애가 작은 thionine은 단파장 영역에서 흡수띠가 나타나지만 dimer에 의한 흡수띠는 잘 나타나지 않는다. 본 실험에서는 thionine의 농도를 고정시키고 MB의 농도를 변화시켰다. Thionine을 monomer 농도로 고정시키고 MB의 농도를 증가시킬 때에는 thionine의 monomer 흡수띠와 MB의 dimer 흡수띠의 중간 부분에 새롭게 형성된 MB-thionine의 coaggregete의 흡수띠(612nm)가 강하게 나타났다. 그러나 thionine dimer 흡수띠를 나타내는 비교적 진한 농도로 고정시킬 때에는 MB의 농도를 증가시킴에 따라서 새로운 흡수띠는 thionine의 dimer의 흡수띠

(566nm)와 MB의 dimer 흡수띠(609nm)에 걸쳐 넓은 흡수대가 나타났다(Fig. 1(b)). 이것은 thionine과 MB가 혼합되면 thionine만의 dimer상태의 회합체보다는 약하지만 MB만의 회합체보다는 강한 J나 H 회합체 같은 새로운 혼합 회합체가 생성되는 것으로 생각할 수 있다. 용액의 pH변화는 thionine에 있는 amino기의 pKa값에 영향을 준다. Thionine은 염기성 수용액(pH=11.0)에서는 비활성화되어 흡광도가 현저히 떨어지나, MB는 pH의 영향이 크지 않았다(Fig. 2). 염기성 조건에서 혼합색소의 새로운 흡수띠는 단파장으로 이동이 되었음에도 흡광도는 비교적 크게 나타났다(Fig. 2의 2, 3번). 용액을 다시 산성으로 바꾸면(pH=3) 장파장으로 이동된 원래의 강한 흡광도로 환원되었다. 그러므로 thionine용액 중에서 MB 분자들은 thionine분자 회합체들 사이에 끼어들어 새로운 두 색소의 coaggregate를 형성하는 것으로 본다.

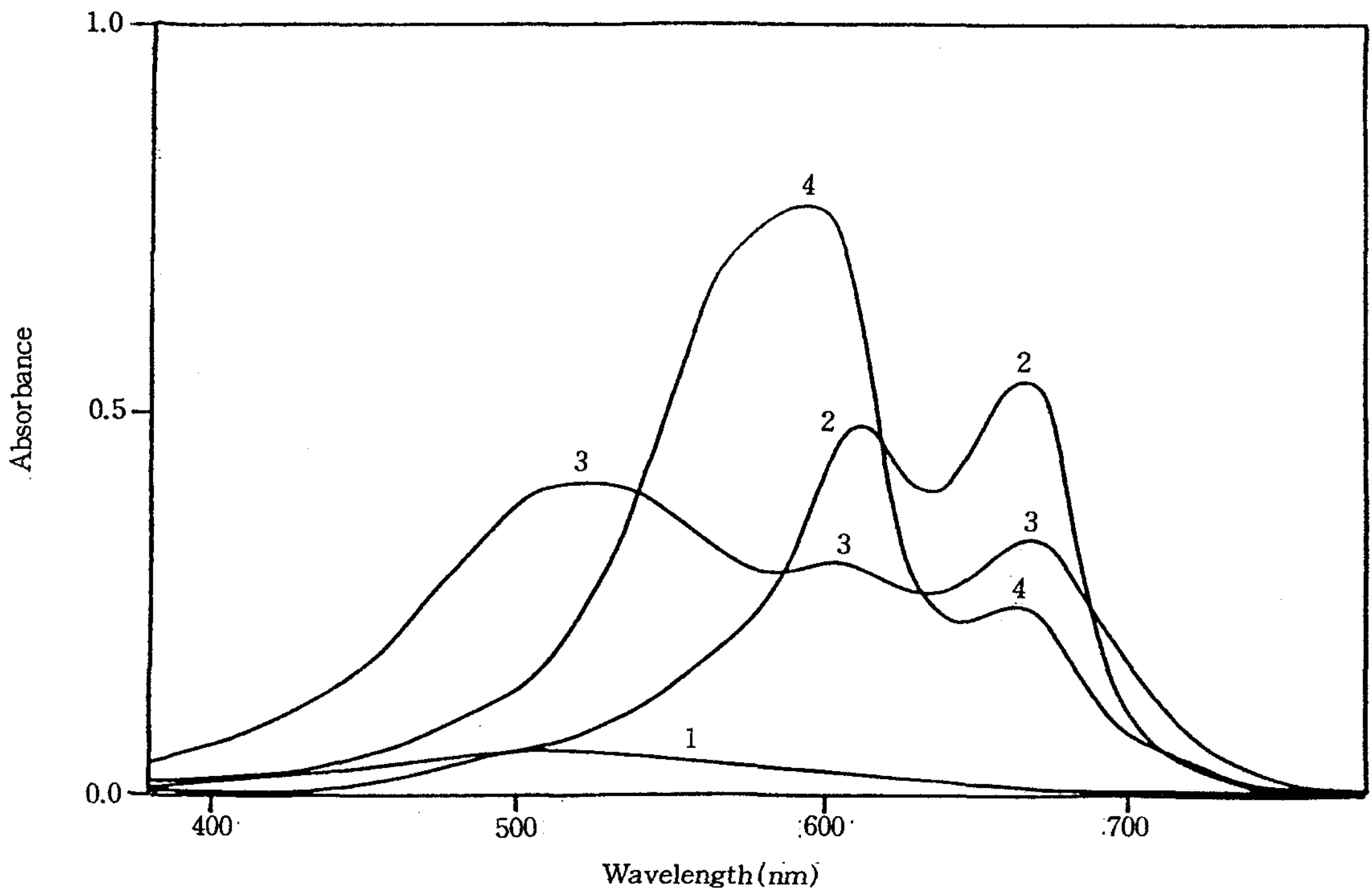


Fig. 2. Absorption spectra of thionine and MB in aqueous solution at 25°C : 1 : [thionine] = 2.91×10^{-4} M, 0, 2 : [MB] = 1.28×10^{-4} M, pH=11.0, 3 : basic mixture of thionine and MB(pH=11.0), 4 : acidic mixture of thionine and MB(pH=3.0), path length = 1nm.

2. 인지질 vesicle에서 metachromasy

친수성 부분이 zwitter ion인 인지질 vesicle이 존재하면 유기 색소분자들의 흡수대는 더욱 청색이동을 한다.¹¹⁻¹²⁾ 혼합 색소용액에 vesicle을 첨가하면 새로운 coaggrate의 흡광도는 더욱 커진다. Fig. 3은 dimer형태가 존재하는 진한 thionine과 상대적으로 농도가 묽은 MB를 취하여 각각의 spectrum을 조사하고, 혼합색소의 spectrum을 그린 다음, 이 용액에 vesicle을 첨가할 때 나타나는 spectrum변화를 나타낸 것이다. 인지질의 농도($4.0 \times 10^{-4}M$)가 thionine의 농도($1.65 \times 10^{-4}M$)보다 진하게 되면 thionine의 dimer흡수대보다 짧은 파장에서 새 흡수띠가 나타나고, 인지질을 더욱더 첨가시키면 새 흡수띠는 조금씩 장파장으로 이동했다. 이것은 vesicle의 양이 증가함에 따라 혼합색소들이 회합할 수 있는 자리가 많게 되어, 회합했던 색소분자들이 vesicle표면으로 일정 부분 재분배되는 것으로 생각된다. Fig. 4는 두 색소가 모두 dimer를 형성시키는 농도에서 그린 spectrum이다. 인지질의 농도가 두 색소 농도의 합과 비슷할 때

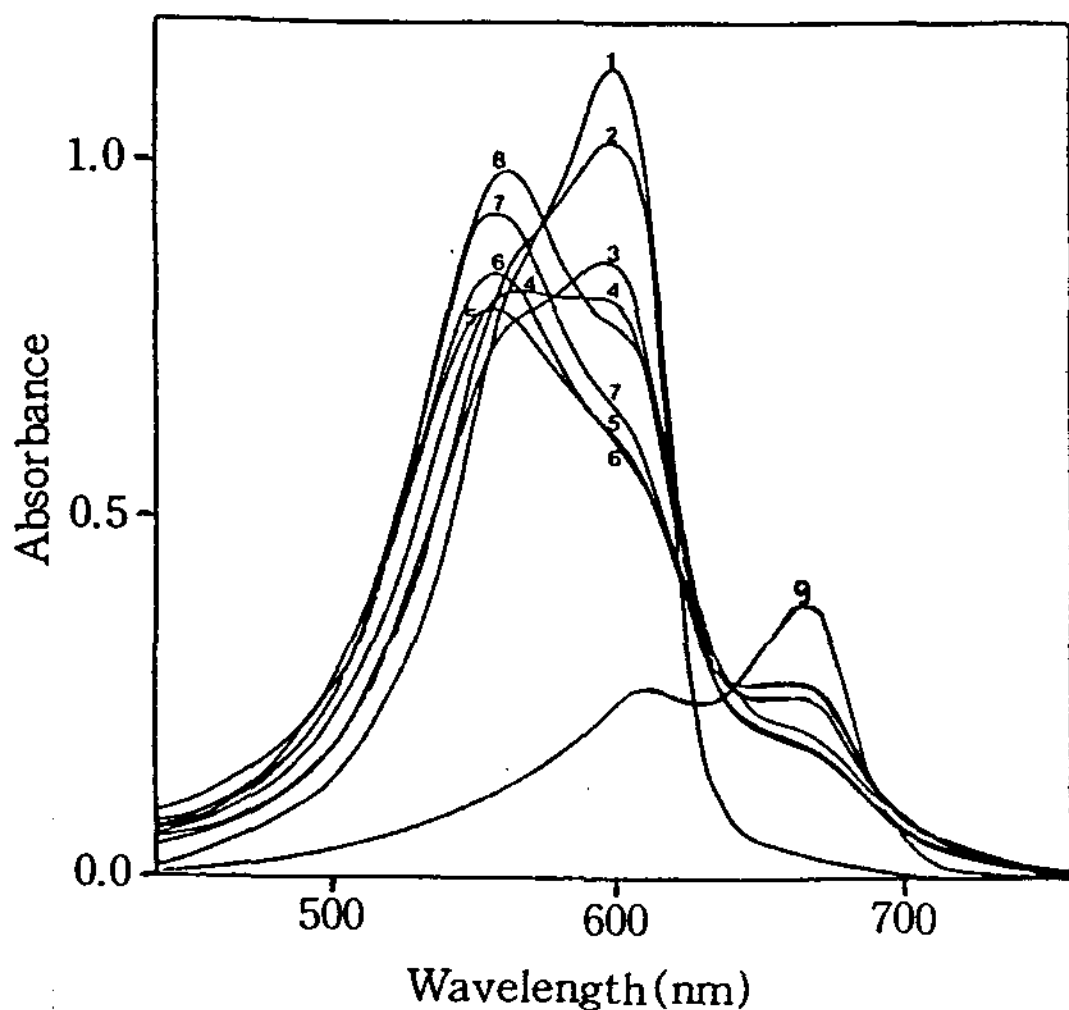


Fig. 3. Absorption spectra of $1.65 \times 10^{-4} M$ -thionine and $3.08 \times 10^{-5} M$ -MB in the presence of phospholipid vesicle at $25^\circ C$, $pH=7.18$: 1 : thionine only, 2 : thionine+MB, 3 : $1.84 \times 10^{-4} M$ -lipid, 4 : $2.55 \times 10^{-5} M$ -lipid, 5 : $4.08 \times 10^{-4} M$ -lipid, 6 : $7.14 \times 10^{-4} M$ -lipid, 7 : $1.02 \times 10^{-3} M$ -lipid, 8 : $2.55 \times 10^{-3} M$ -lipid, 9 : MB only, path length = 2mm.

$640nm$ 인 혼합색소 흡수띠가 감소하면서 단파장 이동을 하였으며, vesicle이 점점 첨가됨에 따라 MB의 monomer와 dimer 그리고 thionine의 monomer흡수 띠들은 모두 대부분 사라지고 $562nm$ 에서 강한 흡수대가 형성되었다. 이것은 Fig. 3과 같이 dimer가 상당량 형성되는 thionine농도에서는 thionine과 혼합된 MB는 thionine분자들 사이에 잘 끼어들어 dimer성 thionine분자와 같은 거동을 하는 것으로 생각된다. Fig. 5는 묽은 농도의 thionine과 dimer가 형성되는 농도의 MB를 혼합시킬 때 나타나는 spectrum이다. Monomer 및 dimer형태의 MB분자들이 thionine분자들보다 많기 때문에 thionine분자와 회합체를 이루고 남은 monomer성 MB분자가 잔류한다. 이 때에 새 흡수띠는 $580nm$ 근처에서 나타났고, 앞의 두 경우(Fig. 2, Fig. 3)에 나타난 흡수띠($560 \sim 564nm$)와는 다른 현상이다. 이것은 vesicle이 존재할 때, mono 및 dimer를 형성했던 MB분자들은 대부분 monomer형태의 thionine분자와 회합하여 비교적 약한 thionine-MB 회합체를 형성하는 것으로 생각된다. 결국, thionine의 농도가 진할 때에는 phospholipid membrane matrix¹³⁾ 위에서 thionine molecular moiety

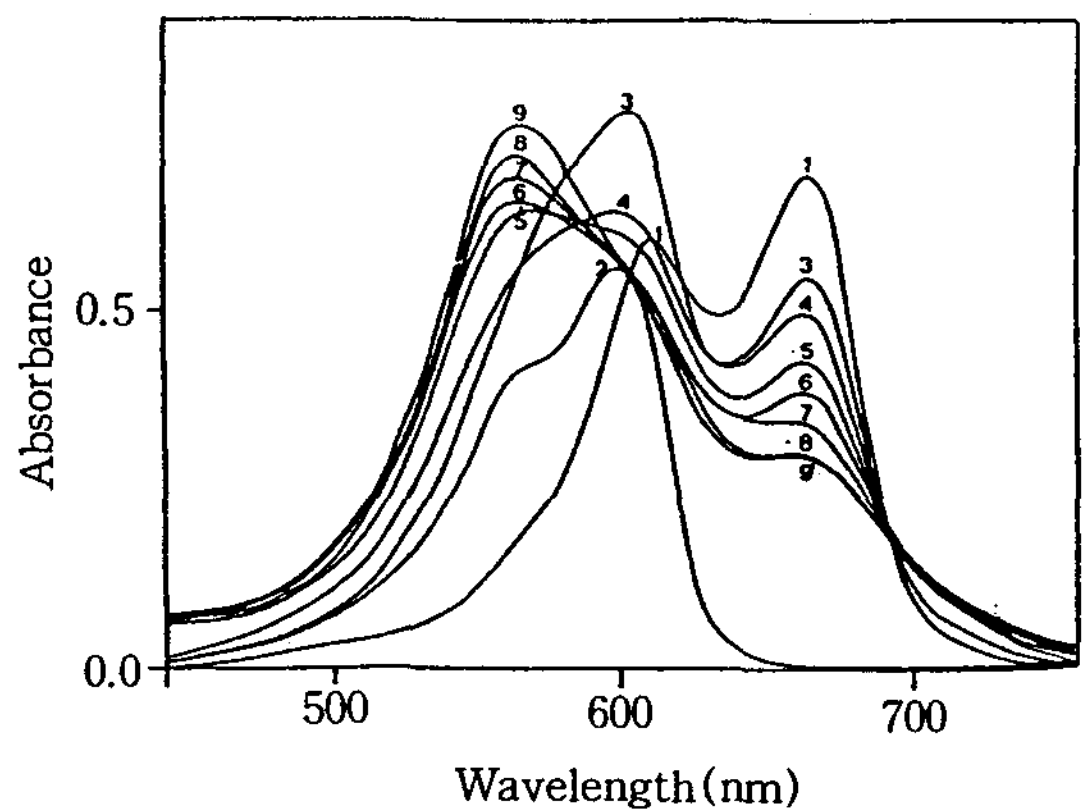


Fig. 4. Absorption spectra of $1.65 \times 10^{-4} M$ -thionine and $1.28 \times 10^{-4} M$ -MB in the presence of phospholipid vesicle at $25^\circ C$, $pH=7.18$: 1 : MB only, 2 : thionine only, 3 : thionine+MB, 4 : $3.06 \times 10^{-4} M$ -lipid, 5 : $2.55 \times 10^{-5} M$ -lipid, 6 : $6.12 \times 10^{-4} M$ -lipid, 7 : $8.16 \times 10^{-4} M$ -lipid, 8 : $1.22 \times 10^{-3} M$ -lipid, 9 : $2.04 \times 10^{-3} M$ -lipid, path length = 1mm.

“HOST”에 MB가 “GUST”로 분배되고, thionine의 농도가 묽을 때에는 phospholipid membrane matrix 위에서 MB분자들이 thionine-MB pair를 이루어 이중층막의 표면에 재분배되는 것으로 생각된다.

3. Difference Spectrum

Fig. 6은 인지질의 농도가 $7.14 \times 10^{-4} M$ 일 때(Fig. 3의 6)의 difference spectrum이다. Sample cell에 인지질과 thionine 그리고 MB를 혼합한 용액을 넣고, reference cell에 인지질 vesicle, MB 또는 thionine, MB와 thionine의 혼합수용액, MB-vesicle수용액 그리고 thionine-vesicle수용액 등을 각각 넣고 difference spectrum을 그렸다. Reference cell에 MB용액($3.08 \times 10^{-5} M$)만을 취했을 때(Fig. 6(2))에 560nm 흡광도는 조금 감소하였으나, monomeric MB의 흡광도(668nm)는 크게 감소하였다. 이것은 MB monomer는 vesicle 수용액에서 thionine과 회합체를 상당량 형성함을 의미한다. 그리고 reference에 thionine만을 취한 3번 spectrum의 경우에는

560nm 흡광도가 크게 감소하였고, thionine monomer의 흡수띠인 600nm에서의 흡광도는 음의 감소를 나타냈다. 이것은 수용액상에서 monomer형태로 존재하였던 thionine의 분자들은 vesicle상에서는 대부분 MB와 회합체를 형성하는 것으로 생각된다. 그리고 Fig. 6(4) spectrum에서는 600nm 흡광도가 더욱 감소했고, MB의 두 흡수띠들도 감소했다. 6번 spectrum은 MB와 vesicle의 혼합용액을 reference로 사용한 경우로서 560nm에서의 흡광도의 감소가 작게 나타났다. 결과적으로 vesicle이 존재할 때 생성되는 thionine-MB 혼합체의 흡수띠는(560nm) MB가 크게 기여함을 알 수 있다. Fig. 7은 thionine과 MB가 모두 상당량 dimer를 상당량 형성하는 농도에서 두 색소혼합용액에 인지질 vesicle이 첨가될 때(Fig. 4(6))의 spectrum이다. Reference로 MB만을 취했을 때, MB의 668nm흡광도는 매우 큰 음의 편차를 나타냈고, 564nm에서의 흡광도는 일정량 감소했다. 이것은 vesicle상에서는 monomer형태로 존재했던 MB는 사라지면서, 이것들의 대부분 thionine-MB회합체를

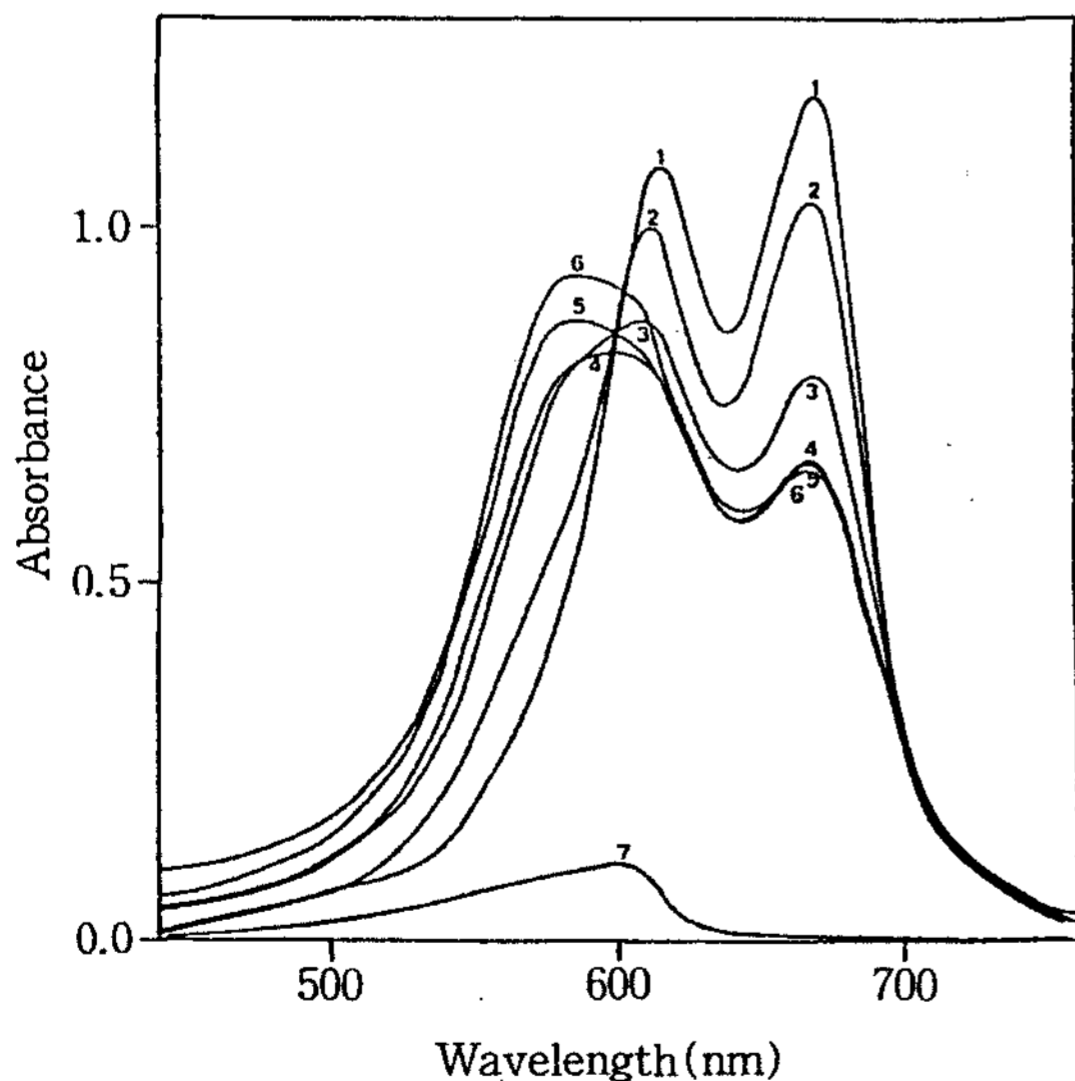


Fig. 5. Absorption spectra of $2.30 \times 10^{-5} M$ -thionine and $1.28 \times 10^{-4} M$ -MB in the presence of phospholipid vesicle at 25°C, pH=7.18: 1: MB only, 2: thionine+MB, 3: $3.0 \times 10^{-4} M$ -lipid, 4: $7.0 \times 10^{-4} M$ -lipid, 5: $9.0 \times 10^{-4} M$ -lipid, 6: $1.2 \times 10^{-3} M$ -lipid, 7: thionine only, path length =2mm.

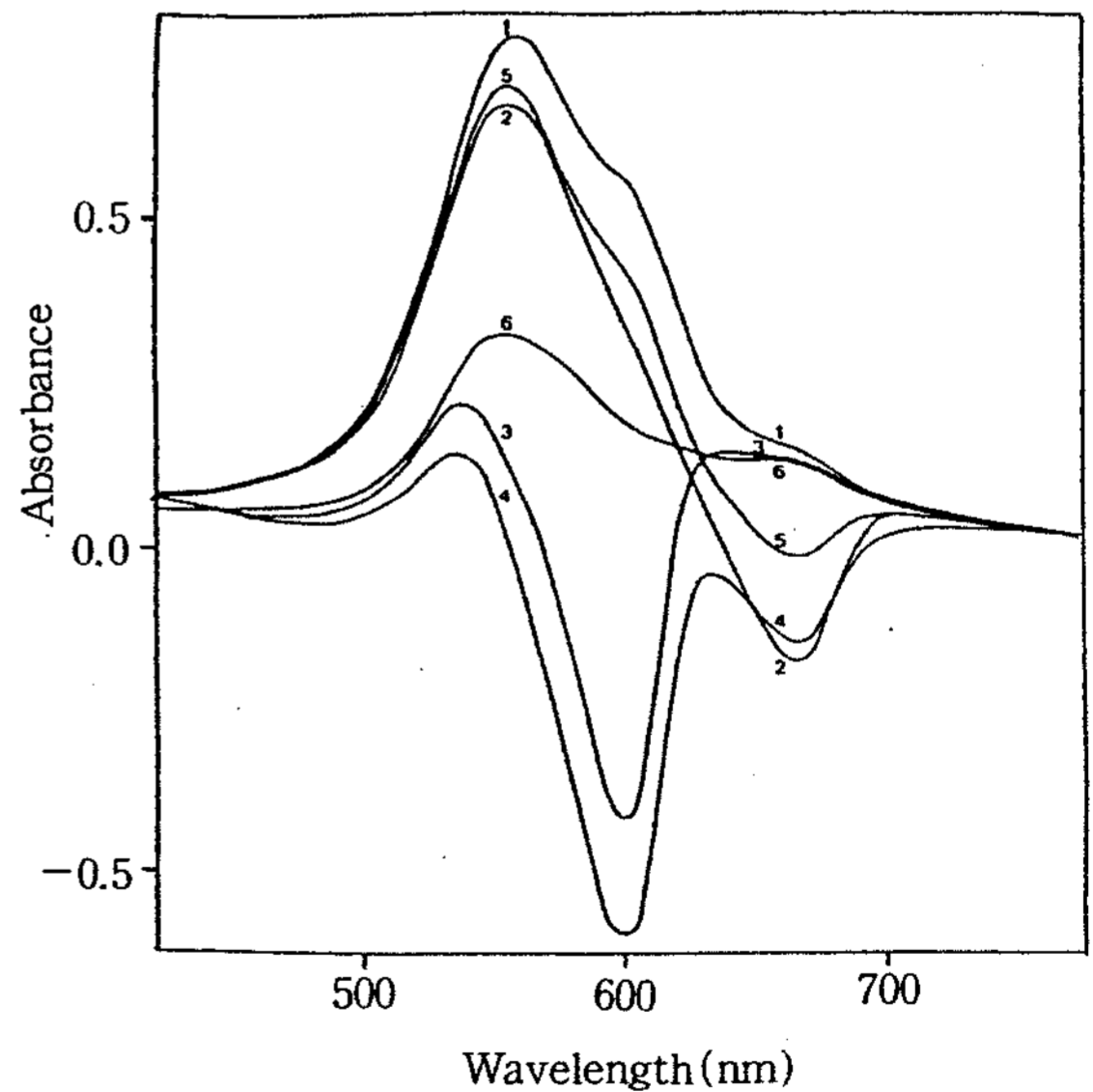


Fig. 6. Difference spectra of $1.65 \times 10^{-4} M$ -thionine and $3.08 \times 10^{-5} M$ -MB in $7.14 \times 10^{-4} M$ -lipid vesicular soln at 25°C, pH=7.18: sample cell = lipid+thionine+MB: reference cell follows, 1: lipid vesicle, 2: MB, 3: thionine, 4: thionine+MB, 5: MB+vesicle, 6: thionine+vesicle, respectively, path length =2mm.

만드는 것으로 생각된다. 또한 6번 difference spectrum에서와 같이, 668nm에서의 흡광도의 차이가 작은 것은 수용액에서나 vesicle용액에서 thionine과 혼합된 MB는 monomer로 존재하는 양이 많지 않음을 알 수 있다. Fig. 8은 Fig. 4 중에서 인지질의 농도가 $9.0 \times 10^{-4}M$ 일 때의 difference spectrum이다. Monomer성인 묽은 농도의 thionine과 dimer성인 진한 농도의 MB를 혼합한 vesicle용액을 sample cell에 넣고, thionine 또는 thionine+vesicle용액을 reference로 사용했을 때의 difference spectrum에서는 (Fig. 8의 3, 6) 전영역에서 흡광도의 차이가 크지 않았다. 이것은 MB의 농도가 thionine의 농도보다 상대적으로 진하기 때문에, thionine-MB 회합체 형성에 참여할 수 있는 monomer형태의 MB의 분자수가 적기 때문인 것으로 생각된다.

IV. 결 론

수용액에서 thionine과 MB가 혼합되면, MB분자가 상당량 thionine회합체 속으로 재분배되어 새로운 thionine-MB coaggregete가 형성된다. 두 색소가 혼합된 수용액에 인지질 이중층막을 첨가하면, thio-

nine의 농도가 진할때에는 MB의 농도에 관계없이 thionine과 MB가 coaggrete를 더욱 잘 형성하며, coaggregete의 흡수띠의 위치는 dimer성 thionine 흡수띠보다 짧은 단파장 쪽에서 나타났다. 그리고 monomer형태가 대부분인 묽은 thionine 농도 조건에서는, 인지질이중층막을 첨가하면 thionine-MB의 coaggregete가 나타내는 흡수띠는 monomer형태의 thionine 흡수띠와 dimer형태의 thionine 흡수띠의 중간 부분에서 나타났다. 이것은 이중층막의 친수성 부분은 색소분자들이 stacking하는데 좋은 자리를 제공하여 주며, 두 색소들 사이의 coaggregation능력은 각 색소분자들의 입체구조에 의해 결정되는 것으로 사료된다.

문 헌

1. I. L. Arbeloa and K. K. Rohatgi-Mukerjee, *Spectrochimica, Acta*, 44A, 423(1981).

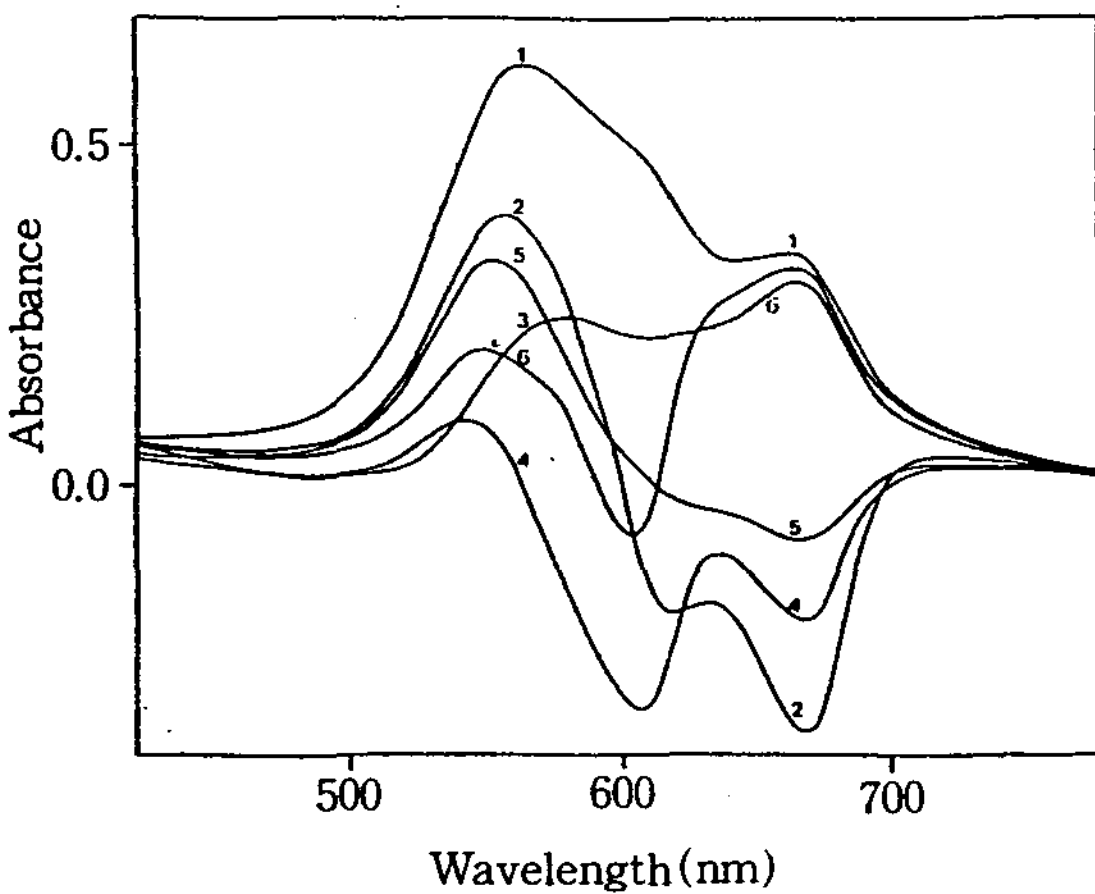


Fig. 7. Difference spectra of $1.65 \times 10^{-4}M$ -thionine and $1.28 \times 10^{-4}M$ -MB in $6.12 \times 10^{-4}M$ -lipid vesicular soln at $25^\circ C$, $pH=7.18$: sample cell=lipid+thionine+MB: reference cell follows, 1: lipid vesicle, 2: MB, 3: thionine, 4: thionine+MB. 5: MB+vesicle, 6: thionine+vesicle, respectively, path length=1mm.

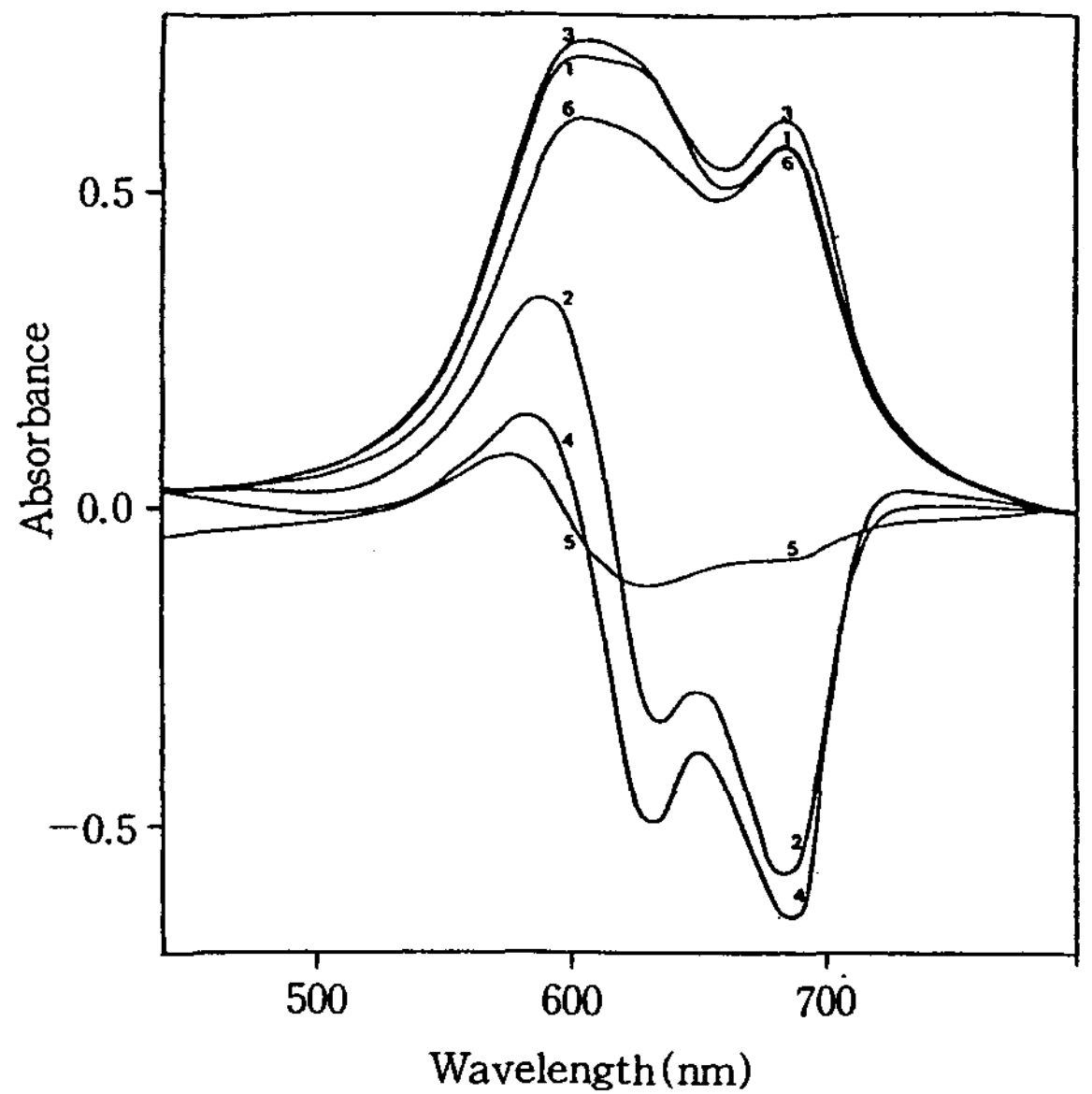


Fig. 8. Difference spectra of $2.30 \times 10^{-5}M$ -thionine and $1.28 \times 10^{-4}M$ -MB in $9.00 \times 10^{-4}M$ -lipid vesicular soln at $25^\circ C$, $pH=7.18$: sample cell=lipid+thionine+MB: reference cell follows, 1: lipid vesicle, 2: MB, 3: thionine, 4: thionine+MB, 5: MB+vesicle, 6: thionine+vesicle, respectively, path length=2mm.

2. V. Vitagliano and L. Costantino, *Bull. Soc. Natur. Napoli*, 78, 169(1976).
3. R. E. Vallard and C. H. Park, *J. Chem. Soc.*, (A), 1340(1970).
4. E. T. Clark and H. G. Drickmer, *J. Phy. Chem.*, 90, 589(1986).
5. S. J. Singer and G. L. Nicolson, *Science*, 175, 720~731(1972).
6. J. Marra and J. Israelachvili, *Biochemistry*, 24, 4608~4618(1985).
7. M. J. Janiak, D. M. Small and G. G. Shipley, *Biochemistry*, 15, 4575~4580(1976).
8. R. G. Horn, *Biochimica Biophysica Acta*, 778, 224(1984).
9. R. A. Mackay, F. R. Longo, B. L. Knier and H. D. Durst, *J. Phy. Chem.*, 91, 861~864(1987).
10. D. Deamer and A. D. Bangham, *Biochimica Biophysica Acta*, 443, 629~634(1976).
11. Y. Okahata, R. Ando and T. Kunitake, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 52(12), 3647~3653(1979).
12. H. Lee and H. S. Lee, *J. Kor. Soc.*, 35(6), 612~616(1991).
13. H. Lee, H. O. Pae, C. O. Lim and H. S. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.*, 36(4), 504~510(1992).