

특강 3

이차원전기영동법(Two-dimensional Electrophoresis)을 이용한 단백질체(Proteome)의 분리와 동정(Identification)

이 소 영, 김 진 회

경상대학교 낙농학과

단백질체(Proteome)이란 말은 어원적으로 단백질(protein)에 전체란 뜻을 가진 어미(-body, -some)가 연결된 합성어로 주어진 순간에 세포나 조직이 발현하는 모든 단백질의 총체를 의미하고 이를 연구하는 학문은 Proteomics라 일컫는다. 2001년 2월 International Human Genome Project에 의해 human genome sequence가 밝혀짐으로써 유전체 연구는 일단락 완성되었지만, 염기서열만 가지고는 이 유전자 산물의 기능을 알 수 없었고, 이것이 전사되고 최종적으로 완벽한 모양이 갖추어진 단백질을 분석해야만 그 기능을 알 수 있었다. 따라서 이후 학문의 동향은 Post-genomics로 이어지면서 Proteomics는, 전사(transcription) 조절체를 연구하는 transcriptomics, 단백질의 기능 등으로 대사 과정을 연구하는 metabolomics, 신호전달을 연구하는 signalomics 등과 함께 bioinformatics의 기술에 의해 총체적으로 모여서 Physiomics를 구성하게 된다.

Proteomics는 크게 two-dimensional electrophoresis(2-DE)와 non 2-DE로 분류되는데 일반적으로 2-DE를 이용하여 단백질체를 profiling 하여 mass spectrometry(MS)에 의해 동정(identification)하는 것이 보편화되어 있다. 따라서 본 강연은 2-DE와 MS technique의 하나인 Matrix Assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry를 통하여 단백질을 분리, 동정하는 방법을 소개한다.

1. 2-Dimensional Electrophoresis

2-DE는 이미 27년 전에 사용되기 시작했던 단백질 생화학 기술로서 단백질의 등전점(Isoelectric point, pI)으로 나타내는 net charge에 따라 제 1차 분석을 한 후 (1D, Isoelectric focusing) 이어서 분자량에 따라 분리하는(2D) 방법이다. 최근 고정화된 pH gradient 기술이 2-D gel을 “preparative“ 용도로 사용하면서 여러 장을 동시에 분석할 수 있는 기술과 접목되고 더불어 2-D gel용 sample 추출방법과 densitometer에 의한 image 분석이 개발되면서 매우 빠른 속도로 발전해 온 것은 사실이지만 현재 사용되는 모든 기술은 많은 단점을 가지고 있으며, 이를

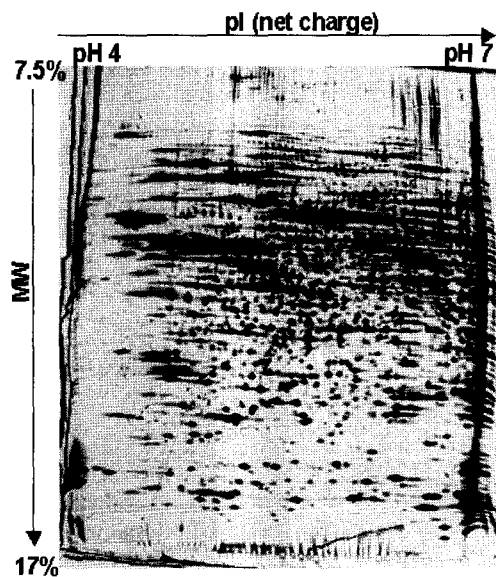


그림 1. Two-dimensional electrophoresis

극복하기 위한 연구가 진행 중이다. 특히 많은 벤처 회사들이 세포, 조직이 발현하는 모든 단백질의 동정에는 한계가 있음을 인식하고, 보다 효율적이며 적극적인 연구 방법을 모색하고 있다.

현재 개발되고 있는 기술들이 상용화될 때까지 어느 정도 시간이 소비될지 예측하기 어려우나, 어떠한 기술이 개발되더라도, 이차원전기영동을 이용한 단백질 분석법은 당분간 (향후 10년 이상) 계속 이용될 것으로 전망되며, 가장 확실한 분석 기술이다. 이차원전기영동을 대체하기 위한 새로운 기술 개발이 활발하게 이루어지고 있으나, 아직 실효성은 의문시되고 있는 형편이며, 이러한 기술이 개발된다고 하여도, 고가의 장비를 다량 보유하여야 가능하므로 향후에도 이차원 전기영동법을 기본으로 한 Proteome 분석 기술이 지속적으로 이용될 것으로 전망된다(Peter Mitchell, In the Pursuit of Industrial Proteomics, Nature Biotech, 21, 233~237, 2003).

2. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry

1900년대 초에 질량 분석법이 처음으로 사용되기 시작한 이래 다양한 이온화법이 발달되어 왔으며, 일반적으로 EI(Electron Impact)가 표준 이온화 방법으로 널리 사용되고 있다. 그러나 이 방법은 휘발성 시료에만 사용할 수 있으며, 열에 불안정한 시료에는 사용할 수 없는 단점을 가지고 있어 응용은 주로 유기 저분자에 한정되어 있다. 이러한 이유로 휘발성이 없거나 열 안정성이 없는 물질의 질량 분석을 위한 여러 가지 이온화 방법들이 개발되었는데 대표적인 예로 MALDI-TOF를 들 수 있다. 이는 고분자 물질에 대해 시료의 분해없이 기화/이온화가 가능한 방법으로 일반적으로 질량이 크고 열에 불안정한 생체 고분자나 합성고분자에 매우 이상적으로 적용될 수 있는 방법으로 알려져 있다.

2-DE를 통하여 분리된 단백질은 gel 상에서 spot으로 나타나며 동정하고자 하는 spot은 picking 하여 여러 가지 preparation 과정을 통하여 Trypsin 등의 digestion enzyme을 이용하여 in gel digestion을 한다. 이렇게 만들어진 시료는 UV를 흡수하는 matrix를 첨가하여 결정화시킨 후 레이저를 조사하여 이온화시켜 생성된 이온들의 비행시간의 차이로 질량을 분석하는 분석법으로 고분자의 절대 질량을 측정할 수 있다.

3. Database search

MALDI-TOF에 의해 분석되어진 fragment 들의 질량값을 이용하여 원하는 protein의 동정을 하기 위해서는 Ms-Fit(ProteinProspector), PROWL와 같은 data 분석 시스템이 필요하다. Ms-Fit는 UCSF(University of California San Francisco) Mass Spectrometry Facility로부터 지원되는 peptide mass fingerprinting tool로서 사용자의 Mass spectrometry가 database에 존재하는 protein sequence와 일치하는 protein을 identify 한다.

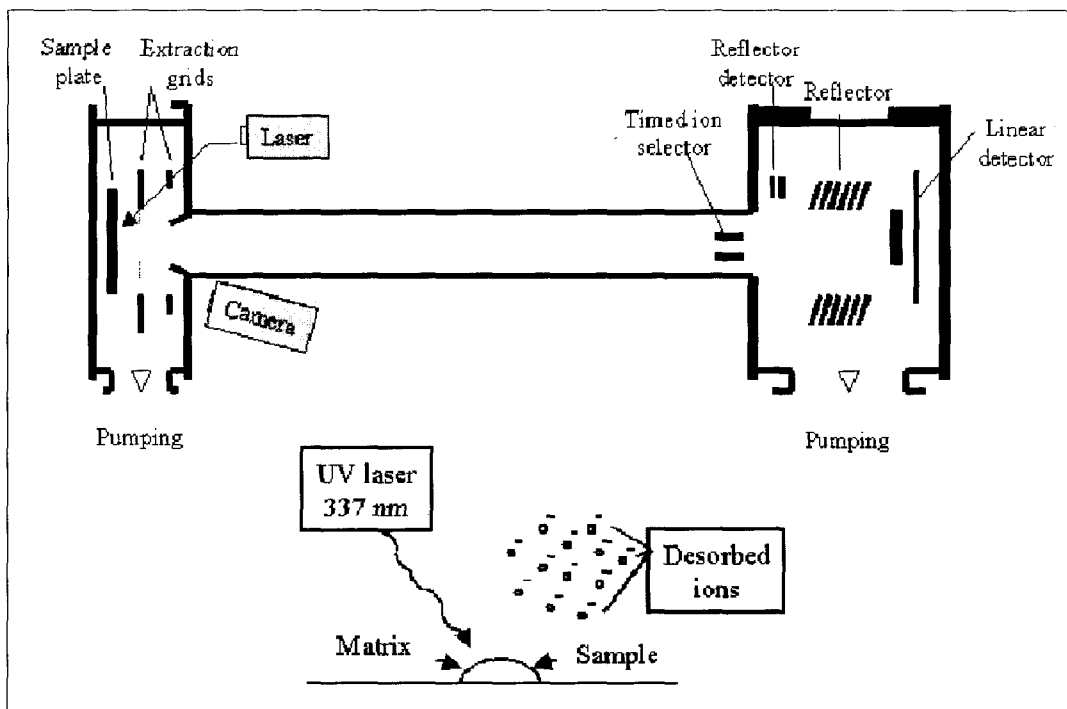


그림 2. Matrix Assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry 원리

Ms-Fit Protein Prospector

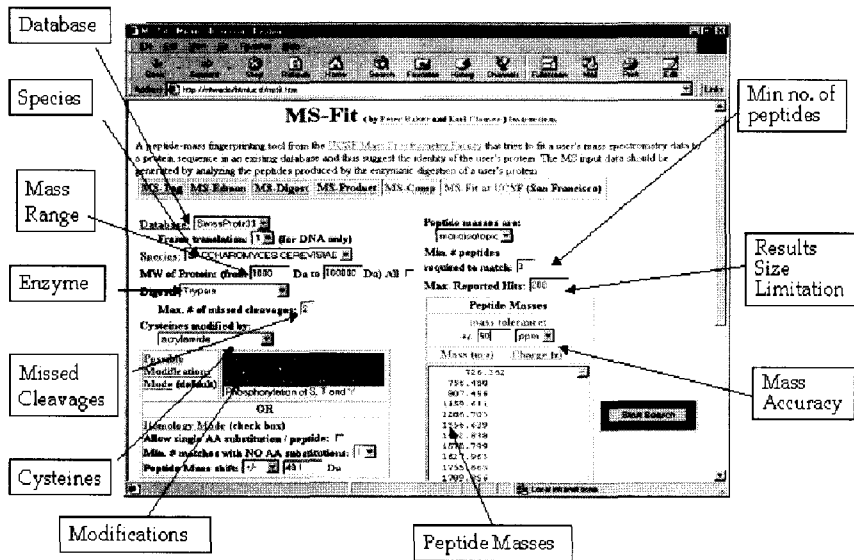


그림 3. Ms-Fit program을 통한 Database search