

이차원전기영동법을 이용한 white muscle과 red muscle간의 단백질 발현양상의 비교분석

김남국*.조중호*.추교선*.박혜란*.박범영**.김언현***.이창수*

건국대학교 자연과학대학 응용생화학* · 수산학과**, 농촌진흥청 축산기술연구소**

Comparative Analysis of Muscle Proteome from Porcine White and Red Muscles by Two-dimensional Electrophoresis

N. K. Kim*, J. H. Joh*, K. S. Chu*, H. R. Park*, B. Y. Park**, O. H. Kim*** and C. S. Lee*

Department of Applied Biochemistry* and Animal Science***, College of Natural Science, Konkuk University, National Livestock Research Institute, R.D.A.**

ABSTRACT

The technique known as proteomics is useful for characterizing the protein expression pattern of a particular tissue or cell type as well as quantitatively identifying differences in the levels of individual proteins. In present study, we carried out the comparative expression patterns of white and red muscles. We used the two-dimensional electrophoresis(2-DE) for analyzing the protein expression. Proteins isolated from porcine white and red muscles were separated by 12% poly-acrylamide gel and then were detected by coomassie blue and silver staining. More than 600 protein spots were detected on each 2-DE gel. By visual analysis of the stained gel, five proteins were identified to be differentially expressed in the white vs red muscle. By database searching based on the molecular weights and pI(isoelectric point) of the five proteins, three of them were found to be most close to troponin I, T and myoglobin. However, further researche is needed for identification and functional analysis of the unidentified proteins. In conclusion, we found five proteins, which are differentially expressed in the white vs red muscle. The functional analysis of the differentially expressed proteins will provide valuable information on biochemical characteristics of the muscle type.

(Key words : White and red muscle, Two-dimensional electrophoresis)

I 서 론

단백체학(proteomics)이란 단백질 수준에서 유전자 발현에 대한 특성을 파악하고, 직·접적인 외부환경의 변화에 따른 단백질 발현에 대한 정보를 획득할 수 있는 새로운 기술

이라 할 수 있다(Pandey and Mann, 2000). 각 조직 및 세포수준에서 발현되는 모든 단백질(proteome) 연구에 있어 two-dimensional electrophoresis(2DE) 기술은 하나의 gel 상에 수천 종의 단백질을 분리함으로써 단백질 발현연구에 중요한 위치를 차지하고 있다. 이차원전기영동

Corresponding author : Chang-Soo Lee, Department of Applied Biochemistry, College of Natural Science, Konkuk University, Chung-Ju, Korea, E-Mail: cslee@kku.edu

법은 각 단백질을 고유의 pI(isoelectric point) 값에 따라 분리한 후 다시 분자량에 의해 분리함으로써 한 개체내 발현되는 모든 종류의 단백질의 발현양상과 생리적, 환경적 변화에 따른 발현정도의 변화도 관찰할 수 있다. 특히 유전정보만으로 확인이 불가능한 단백질의 발현량 및 번역 후 수식 등도 쉽게 분석할 수 있어 신호전달, 독성 및 약물작용 분야 등에 그 활용범위가 점점 넓어지고 있다(Soren 등, 2001).

골격근은 white fiber와 red fiber의 종류 및 상대적 함량비에 따라 white muscle과 red muscle로 구별되어지며, 두 종류의 근육은 성분의 조성차이 뿐만 아니라 생화학적으로도 많은 차이가 있음이 보고되었다(Maltin 등, 1997). Red muscle은 white muscle과 비교하여 근 수축 속도는 느리고, glycogen 함량이 낮으며, fiber 직경이 작은 반면에 myoglobin 함량과 모세혈관 및 미토콘드리아 함량이 높아 호기적 대사에 더 적합한 것으로 알려져 있다(Essen-Gustavsson 등, 1992; Fernandez 등, 1995). Pette and Staron(1990)에 의하면 돼지의 골격근 중 white muscle은 *longissimus dorsi*와 *gastrocnemius* muscle에서 red muscle은 *soleus*와 *psosa* muscle에서 이와 같은 생화학적 특성들이 잘 나타나고 있음을 확인할 수 있다. 현재 근육 fiber의 형태학적, 생화학적 특성에 대한 연구를 통하여 근육의 특성을 이해하고자 하는 노력이 지속되고 있으며, 근육의 근본적인 특성을 이용하여 육질개선에 활용하고자 하는 노력들이 진행되고 있으나(Karlsson 등, 1993; Maltin 등, 1997), 아직까지 단백질 수준에서 근육 특성에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구는 근육의 생화학적 특성을 단백질 수준에서 이해하기 위하여 돼지 근육으로부터 white muscle과 red muscle을 각각 채취하고, 근육조직에서 발현에 차이를 보이는 단백질의 변화를 이차원전기영동법을 통하여 분석함으로써, 근육의 생화학적 특성에 대한 정보를 획득하고자 함이다.

II 재료 및 방법

1. 실험재료

근육내 발현 단백질 분석을 위하여 3원교잡종 돼지(Landrace×Largewhite×Duroc) 3개체를 선발하였다. White muscle은 *longissimus dorsi*를 red muscle로는 *soleus* muscle을 선택하여 채취하였으며, 각 시료는 도살 후 1시간 이내에 채취하였다. 채취 즉시 액체질소를 이용하여 냉각하였고, 지방과 결합조직들을 제거한 뒤 분쇄하여 사용 전까지 -70°C 보관하여 사용하였다.

2. 실험방법

(1) 근육단백질의 제조

근육단백질 제조는 Molloy 등(1998)의 방법을 수정, 보완하여 수용성 및 불수용성 단백질을, 그리고 총단백질로 구분하여 추출하였다. 수용성 및 불수용성 단백질의 추출을 위하여 시료 150mg에 40mM Tris, 1×Protease inhibitor cocktail (Roche, Germany) 1ml을 첨가하고, 시료와 잘 혼합하여 4°C 에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 12,000g에서 10분간 원심분리하고 상등액과 침전물로 분리하였다. 여기서 얻어진 상등액은 수용성 단백질로 분류하고, 20% TCA solution을 이용하여 정제한 후 0.5ml의 lysis buffer[7M urea, 2M thio-urea, 4% 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propane sulfonate(CHAPS), 40mM Tris, 1% dithiothreitol (DTT), 0.5% Ampholyte(Bio-Rad, 3-10), 1×Protease inhibitor cocktail(Roche, Germany)]에 녹여 실험에 사용하였다. 상등액을 제거한 침전물에 lysis buffer 0.5ml을 첨가한 후 4°C 에서 30분간 재 반응시킨 후 12,000g에서 30분간 원심분리하고 분리된 상등액을 불수용성 단백질로 분류하였다. 총 단백질은 시료 100mg에 lysis buffer 1ml을 첨가한 후 4°C 에서 30분간 반응시킨 후 12,000g에서 30분간 원심분리하여 분리된 상등액을 이용하였다. 조제된 근육단백질

의 농도는 protein assay system(Bio-Rad, USA) 방법에 기초하여 실시하였으며, standard curve 작성은 bovine serum albumin(BSA)를 이용하였다.

(2) 이차원전기영동 분석

White muscle과 red muscle의 단백질 발현양상을 분석하기 위하여 염색방법에 따라 각 0.1mg과 1mg의 단백질을 이용하였다. 각 근육 단백질은 17cm 길이의 immobilized pH gradient strip(Bio-Rad, 3-10NL)에 16시간동안 재수화(rehydration) 시킨 후 등전점전기영동(isoelectric focusing)을 실시하였다. 등전점전기영동은 20℃에서, 각 strip에 전류가 50 μ A 이상 넘지 않도록 설정하였으며 100V에서 1시간, 500V에서 1시간 전개 후 순차적으로 8,000V까지 상승시켜 총 45,000Vhr와 80,000Vhr가 될 때 까지 실시하였다. 등전점전기영동 후 분자량에 따른 분리를 위하여 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS)가 포함된 12% acrylamide gel(18cm \times 20cm)을 이용하여 최초 10mA에서 1시간동안 전개 후, 염색시약이 gel 바닥면까지 전개될 때 까지 20mA에서 전개하였다. 분리된 단백질의 분자량과 pI값은 이차원 SDS-PAGE용 표준물질(Bio-RAD, USA)을 이용하여 측정하였다.

(3) Gel 염색

분리된 단백질을 가시화하기 위하여 coomassie stain과 silver stain을 이용하여 실시하였다. Coomassie stain은 Neuhoff 등(1988)의 방법에 의해 coomassie brilliant blue G-250을 이용하여 실시하였고, silver stain은 EMBL(Shevchenko 등, 1996) 방법에 기초하여 다음과 같이 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 50% methanol, 5% acetic acid에서 20분간 고정화시킨 후 50% methanol과 증류수를 이용하여 gel을 충분히 씻어준 뒤 0.2% sodium thiosulfate를 이용하여 1분간 반응시켰다. 0.1% silver nitrate에서 20분간 반응시킨 후 증류수를 이용하여 남아있는 silver nitrate를 충분히 제거하고,

0.04% formaldehyde와 2% sodium carbonate를 포함한 용액을 이용하여 발색반응을 유도하였다. 발색반응이 충분히 진행된다면 5% acetic acid를 이용하여 반응을 정지시켰다.

(4) 단백질 발현양상 분석 및 database 검색

가시화된 단백질은 2D 분석용 프로그램인 PDQuest(Bio-Rad, USA)를 이용하여 분석하였고, white muscle과 red muscle간 발현에 차이를 보이는 단백질을 선별하였다. 이차원 SDS-PAGE용 표준물질(Bio-Rad, USA)을 기준으로 gel image상에서 각 spot의 pI값과 분자량을 측정하였다. 측정된 pI값과 분자량을 이용하여 일치되는 단백질 확인은 ExPASy Molecular Biology Server의 TagIdent program을 사용하여 기존에 보고된 인간, 소, 양 및 돼지의 database내에서 검색하였다. 검색된 단백질 중 각 단백질의 특성 및 발현조직 등을 고려하여 가장 유사한 단백질을 확인하였다.

III 결과 및 고찰

근육내 단백질 발현양상 분석을 위하여 3원교잡종 3개체를 선별하고, white muscle은 *longissimus dorsi* muscle을 red muscle은 *soleus* muscle을 선택하여 채취하였다. 각 근육으로부터 추출된 총단백질은 immobilized pH gradient strip을 이용하여 등전점전기영동 후 acrylamide gel상에서 전개되었다. Silver stain 방법에 의해 가시화된 gel image는 PDQuest software를 이용하여 분석하였으며, 각 gel image에서 평균 600~1000개의 spot을 관찰하였다. 이차원전기영동을 통해 관찰된 근육 단백질은 pH 4~10 범위에서 주로 관찰되었으며, 특히 pH 4~6 범위에서 가장 많은 단백질이 존재함을 확인할 수 있었다. 분석에 사용된 3개체에서 공통적으로 발현되는 단백질들을 선별하고 white muscle과 red muscle간 단백질 발현분석에 이용하였다. 선별된 spot 중 white muscle과 red muscle간에 발현의 차이를 보이는 단백질

spot 15개를 2차 선별하였으며, 반복실험을 통하여 최종적으로 발현의 차이를 나타내는 5개의 spot을 확인하였다(Fig. 1). 각 단백질의 분자량과 pI값은 gel image상에서 이차원 SDS-PAGE용 표준물질을 기준으로 확인하였다(Table 1).

PDQuest software를 통해 측정된 pI값과 분자량을 기준으로 발현의 차이를 보이는 단백질을 확인하기 위하여 ExPASy Molecular Biology Server의 TagIdent program을 이용하였고, pI값과 분자량의 오차범위를 ± 0.25 , $\pm 20\%$ 로 설정하여 일치되는 단백질을 검색하였다. 검색된 단백질 중 발현동물 및 발현조직의 특성 등을 고려하여 가장 유사한 단백질을 확인하였다. Spot 1과 3의 pI값은 5.83과 5.34이고 분자량은 29.0kDa과 30.39kDa으로서 두 단백질은 오차범위내에 위치하고 있으며 이와 가장 유사한 단백질은 Swiss-Prot database 검색을 통하여 troponin T(pI값 5.63, 분자량 32.90kDa)인 것으로 나타났다. Spot 2의 경우는 pI값과 분자량이 5.50과 30.22kDa로

troponin I(pI값 5.47, 분자량 28.06kDa)와 유사한 것으로 분석되었다. 또한, spot 5의 경우 측정된 pI값 6.74와 분자량 18.45kDa를 이용하여 검색한 결과 myoglobin(pI값 6.83, 분자량 16.95kDa)과 가장 일치함을 알 수 있었다. 그러나 spot 4의 경우 오차범위 내에서는 유사한 단백질을 검색할 수 없었다(Fig. 1, Table 1).

Table 1. Characterization of differential expressed proteins between white and red muscles

Spot No.	Fraction ¹⁾	MW ²⁾	pI ³⁾
1	II	29.00	5.83
2	II	30.22	5.50
3	II	30.39	5.34
4	I	23.09	5.28
5	I	18.45	6.74

¹⁾Fraction I II insoluble protein.

²⁾MW and ³⁾pI : Molecular weight and pI measured on two-dimensional electrophoresis gel by PDQuest, which values compared with 2D SDS-PAGE standard.

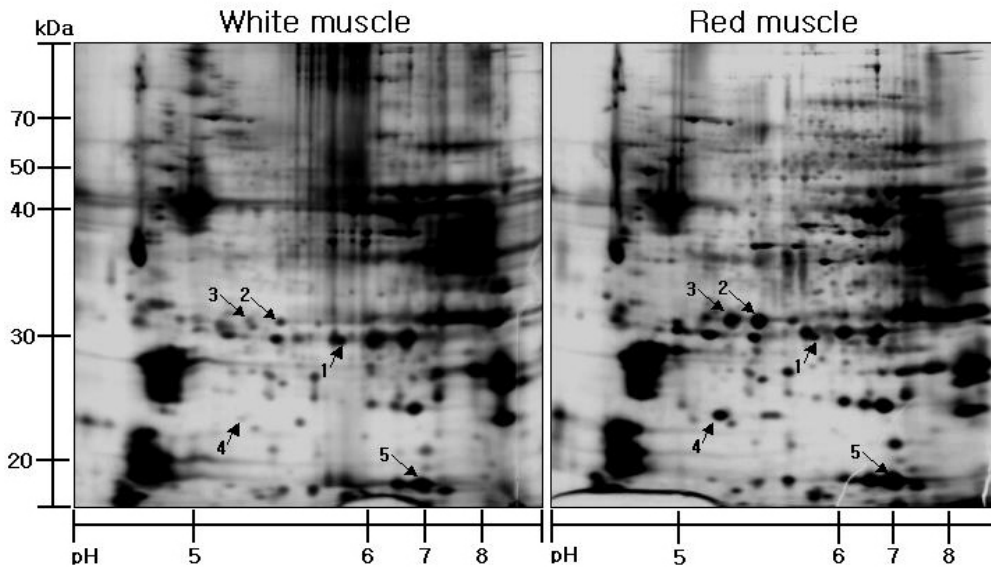


Fig. 1. Comparative analysis of differential expressed proteins between white and red muscles. Separation was performed in the immobilized pH gradient(IPG) 3-10NL strip in the first dimension and an SDS gel (12% T) in the second. The protein loading was 100 μ g and the gel was stained with EMBL silver stain method. Arrows show 5 spots that differentially expressed proteins between white and red muscles.

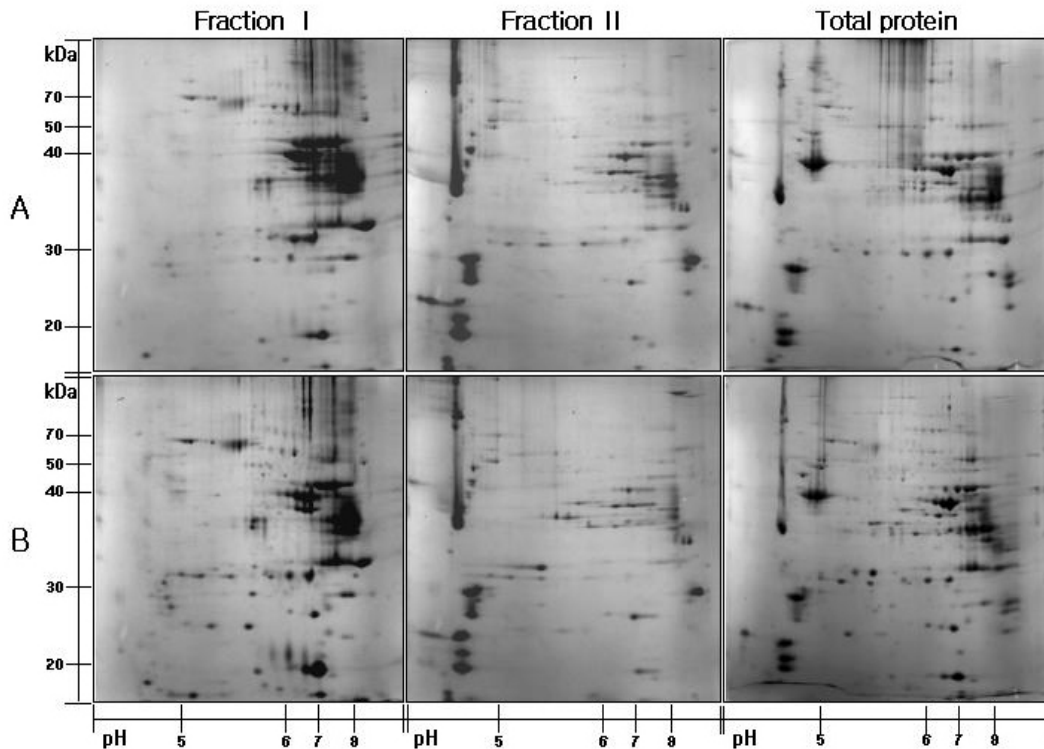


Fig. 2. Comparison of the two-dimensional electrophoresis gel profiles of the fraction I (soluble), II (insoluble), and total proteins in white (A) and red (B) muscles. Separation was performed in the immobilized pH gradient(IPG) 3-10NL strip in the first dimension and an SDS gel (12% T) in the second. The protein loading was 1mg and the gel was stained with coomassie blue G-250.

근육을 구성하는 단백질은 근원섬유단백질, 근장단백질 그리고 육기질단백질로 구분되어진다. 이중 근원섬유단백질은 총 단백질의 60% 정도를 차지하고 있으며 주로 골격유지 및 운동에 관여하는 myosin, actin 및 troponin 등으로 구성되어 있다. 또한, 근장단백질은 근육내 에너지 대사와 관련된 다양한 효소 및 근육내 산소운반 역할을 담당하는 색소 단백질인 myoglobin 등을 포함하고 있다(Karlsson 등, 1999; Lawrie, 1985). Myoglobin은 보통 분자량이 17kDa인 단백질로 산소와 친화성이 매우 높으며 주로 심근과 골격근 세포의 세포질에 존재하여 혈중 산소를 근육조직으로 운반하는 역할을 담당하며 산화적 대사가 많은 red muscle에 많이 존재하는 것으로 보고되고 있다(Cassens 등, 1971). Lawrie(1950)는 white

muscle과 red muscle에서 myoglobin의 함량을 비교한 결과 돼지 근육의 경우 white muscle과 red muscle에서 각각 0.280%, 0.435%(wet weight)로 분석되었으며, 말 근육의 경우 0.465%와 0.705%으로 중간 함량의 차이를 보이기는 하나 red muscle에서 약 1.5배 높은 것으로 보고되었다. 본 실험에서도 myoglobin으로 생각되는 spot 5의 경우 red muscle에서 white muscle 보다 평균 2.5배 높은 것으로 분석되었다(Fig. 3).

총단백질 추출로 관찰되는 단백질 spot들의 용해도 특성을 확인하기 위하여 근육 시료로부터 수용성 및 불수용성 단백질로 분획하고, PDQuest software를 통하여 총단백질의 spot 결과와 비교분석 하였다. 단백질 발현에 차이를 보이는 5개의 spot을 확인한 결과 단백질 spot

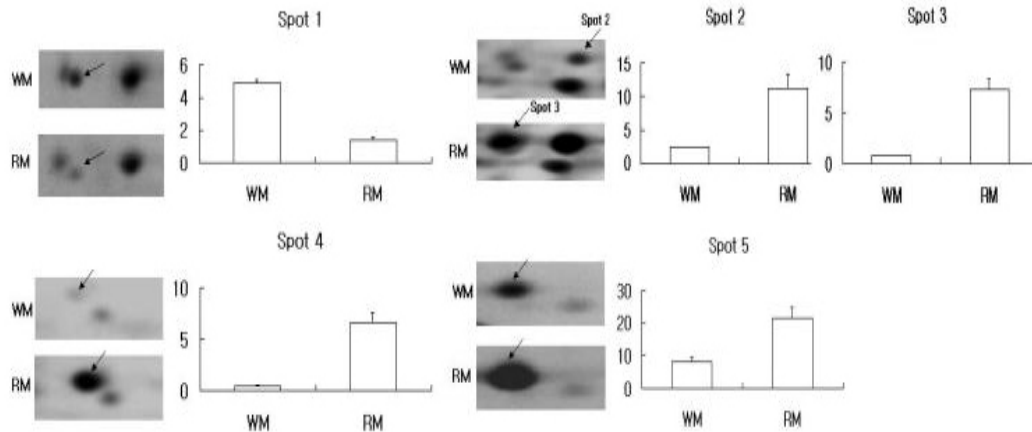


Fig. 3. Expression profiles of 5 spots between white (WM) and red (RM) muscles. The X-axes show muscle types, while the Y-axes show the relative spot intensity of the individual spots. The bars represent the average intensity based on observations in three animals.

1~은 불수용성 분획에서 확인되었으며, spot 4와 5의 경우는 수용성 분획에서 관찰되었다 (Fig. 2). 단백질의 발현정도를 비교분석한 결과 5개 spot 중에서 1개(spot 1)는 white muscle에서 나머지 4개(spot 2~)는 red muscle에서 높게 발현되었다. Spot 1의 경우 red muscle보다 white muscle에서 3.6배 높게 발현됨을 확인할 수 있었다. Spot 2와 3은 white muscle보다 red muscle에서 평균 5.2배와 8.5배 높게 발현되었음이 관찰되었고, 특히 spot 4의 경우 평균 14.6배나 높은 발현 양상을 보이고 있다 (Fig. 3).

Margreth와 Novello(1964)에 의하면 white muscle과 red muscle간에 단백질 합성능력의 차이가 있으며, 근육내 대사와 관련된 많은 효소들의 활성 차이를 관찰하였고(Beecher 등, 1968; Takasu and Hughes, 1966), free amino acid의 구성도 많은 차이가 있음이 보고되었다 (Cornet and Bousset, 1999). 이러한 근육조직간 다양한 차이는 근육을 구성하는 muscle fiber의 조성 및 생화학적 특성에 기인하며, 품종 및 연령에 따라 상당한 차이를 보이고 있다 (Cassens and Cooper, 1971; Henckel 등 1997). 또한, 이러한 특성의 차이는 육질과 관련되어 중요한 요인으로 분석되고 있다(Klont 등,

1998; Maltin 등, 1997; Ozawa 등 2000). 근육 조직의 특성을 분석하고 이해하는 것은 근육의 분화 발달 및 각 근육 fiber의 역할에 대한 중요한 자료가 될 것이다.

본 연구에서는 단백질 수준에서 근육의 대사 및 생리적 특성에 대한 정보 획득을 위하여 이차원전기영동법과 단백질 database 해석 기법을 이용하였고, 이를 통해 white muscle과 red muscle간에 발현의 차이를 보이는 5개의 단백질을 확인할 수 있었다. 이는 근육조성에 따른 근육의 대사과정과 같은 생화학적 특성을 이해하는데 중요한 자료로 이용될 수 있을 것으로 생각되어진다.

IV 요약

근육의 생화학적 특성을 단백질 수준에서 분석하기 위하여 3원교잡종 돼지 3개체를 선발하고, white muscle은 *longissimus dorsi* muscle을 red muscle은 *soleus* muscle을 분리하여 분석에 이용하였다. 각 근육조직은 수용성, 불수용성 단백질 및 총단백질로 분리하여 추출하였고, 이차원전기영동 분석을 위하여 17cm 길이의 immobilized pH gradient strip (Bio-Rad, 3-10NL)과 12% acrylamide gel을 이

용하여 전개하였다. 각각의 gel은 coomassie stain과 silver stain을 통하여 가시화 하였고, PDQuest software을 통하여 단백질 발현양상을 분석하였다. 하나의 gel에서 평균 600개 이상의 단백질 spot을 관찰하였으며, 반복실험을 통하여 white muscle과 red muscle간에 발현의 차이를 보이는 5개의 단백질 spot을 확인할 수 있었다. 5개의 spot 중 4개의 단백질은 측정된 분자량과 pI값이 troponin I, T 및 myoglobin의 수치값과 유사한 것으로 확인되었다. 그러나, 1개의 spot은 오차범위 내에서 유사한 단백질을 확인할 수 없었다. 5개의 단백질 spot중 1개(spot 1)는 white muscle에서, 4개의 spot(spot 2~ 5)은 red muscle에서 높게 발현됨을 확인하였으며, 특히 spot 4의 경우 white muscle 보다 red muscle에서 평균 14.6배 높게 발현됨을 확인하였다. 본 연구는 근육의 생화학적 특성을 이해하는데 중요한 기초 자료로 활용될 수 있으며, 앞으로 white muscle과 red muscle의 단백질 발현 분석을 통하여 단백질 수준에서의 생화학적 특성에 관한 연구가 충분히 진행되어야 할 것이다.

V 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

VI 인용 문헌

- Beecher, G. R., Kastenschmidt, L. L., Cassens, R. G., Hoekstra, W. G. and Briskey, E. J. 1968. A comparison of the light and dark portions of a striated muscle. *J. Food Sci.* 33:84.
- Cassens, R. G. and Cooper, C. C. 1971. Red and white muscle. *Adv. Food Res.* 19:1.
- Cornet, M. and Bousset, J. 1999. Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between red and white muscles. *Meat Sci.* 51:215.
- Essen-Gustavsson, B., Karlstrom, K. and Lundstrom, K. 1992. Muscle fibre characteristics and metabolic response at slaughter in pigs of different halothane genotypes and their relation to meat quality. *Meat Sci.* 31:1.
- Fernandez, X., Lefaucheur, L. and Candek, M. 1995. Comparative study of two classifications of muscle fibres: consequences for the photometric determination of glycogen according to fibre type in red and white muscle of the pig. *Meat Sci.* 41:225.
- Henckel, P., Oksbjerg, N., Erlandsen, E., Barton-Gade, P. and Bejerholm, C. 1997. Histo- and biochemical characteristics of the longissimus dorsi muscle in pigs and their relationships to performance and meat quality. *Meat Sci.* 47:311.
- Karlsson, A., Enfalt, A. C., Essen-Gustavsson, B., Lundstrom, K., Rydhmer, L. and Stern, S. 1993. Muscle histochemical and biochemical properties in relation to meat quality during selection for increased lean tissue growth rate in pigs. *J. Anim. Sci.* 71:930.
- Karlsson, A. H., Klont, R. E. and Fernandez, X. 1999. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livest. Prod. Sci.* 60:255.
- Klont, R. E., Brocks, L. and Eikelenboom, G. 1998. Muscle fibre type and meat quality. *Meat Sci.* 49: S219.
- Lawrie, R. A. 1950. Some observations on factors affecting myoglobin concentrations in muscle. *J. Agr. Sci.* 40:356.
- Lawrie, R. A. 1985. *Meat science*, 4th ed. Pergamon press, Headington Hill Hall, Oxford, U.K., p43.
- Maltin, C. A., Warkup, C. C., Matthews, K. R., Grant, C. M., Porter, A. D. and Delday, M. I. 1997. Pig muscle fibre characteristics as a source of variation in eating quality. *Meat Sci.* 47:237.
- Margreth, A. and Novello, F. 1964. Observations on the chemical determination and distribution of ribonucleic acid in several striated muscle. *Exp. Cell Res.* 35:38.
- Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. I., Traini, M., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L. and Gooley, A. A. 1998. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 19:837.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with

- clear background at nanogram sensitivity using coomassie brilliant blue G-250 and R-250. Electrophoresis. 9:255.
16. Ozawa, S., Mitsuhashi, T., Mitsumoto, M., Matsumoto, S., Ttoh, N., Itagaki, K., Kohno, Y. and Dohgo, T. 2000. The characteristics of muscle fiber types of longissimus thoracis muscle and their influences on the quantity and quality of meat from japanese black steers. *Meat Sci.* 54:65.
 17. Pandey, A. and Mann, M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837.
 18. Pette, D. and Staron, R. S. 1990. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibres. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 116:1.
 19. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68:850.
 20. Soren, N. H., Michael, D. W. and Rainer Cramer. 2001. Proteomics-post-genomic cartography to understand gene function. *Pharmacol. Sci.* 22:376.
 21. Takasu, T. and Hunhes, B. P. 1966. Lactate dehydrogenase isoenzymes in developing human muscle. *Nature* 212:609.
- (접수일자 : 2003. 7. 8. / 채택일자 : 2003. 9. 15.)