

공유결합과 친화력결합에 의한 고정화 Trypsin의 효소역가와 절단특성 비교

^{1*}장 대 호 · ²성 기 훈 · ^{1†}이 은 규
¹한양대학교 화학공학과, ²한양대학교 응용화학과
(접수 : 2006. 3. 6., 게재승인 : 2006. 8. 12.)

Comparison of Enzymatic Activity and Cleavage Characteristics of Trypsin Immobilized by Covalent Conjugation and Affinity Interaction

Dae Ho Jang^{1*}, Gi Hun Seong², and Eun Kyu Lee^{1†}
¹Department of Applied Chemical Engineering, ²Department of Chemistry,
Hanyang University, Ansan 425-791, Korea
(Received : 2006. 3. 6., Accepted : 2006. 8. 12.)

We investigated the effects of immobilization chemistry on the yield of immobilization and the bioactivity of the immobilized enzymes. Trypsin as a model protein and macroporous polymer beads (Toyopearl AF 650M, Tosho Co., Japan) was used as a model matrix. Four methods were used to immobilize trypsin; covalent conjugation by reductive amination (at pH 10.0 and pH 4.0) and affinity interaction via streptavidin-biotin, and double-affinity interaction via biotin-streptavidin-biotin system. The covalent conjugation immobilized 3~4 mg/ml-gel, ca. 3-fold higher than the affinity method. However, the specific activity of the covalently (pH 10.0) and affinity-immobilized trypsin (via streptavidin-biotin) are ca. 37% and 50%, respectively, of that of the soluble enzyme (on the low-molecular-weight BAPNA substrate). When the molecular size of a substrate increased, the affinity-immobilized trypsin showed higher cleavage activity on insulin and BSA. This result seemed to indicate the streptavidin-biotin system allowed more steric flexibility of the immobilized trypsin in its interaction with a substrate molecule. To confirm this, we studied the molecular flexibility of immobilized trypsin using quartz crystal microbalance-dissipation. Self-assembled monolayers were formed on the Q-sensor surface by aminoalkanethiols, and glutaraldehyde was attached to the SAMs. Trypsin was immobilized in two ways: reductive amination (at pH 10.0) and the streptavidin-biotin system. The dissipation shift of the affinity-immobilized trypsin was 0.8×10^{-6} , whereas that of the covalently attached enzyme was almost zero. This result confirmed that the streptavidin-biotin system allowed higher molecular flexibility. These results suggested that the bioactivity of the immobilized enzyme be strongly dependent on its molecular flexibility.

Key Words : Immobilized trypsin, covalent immobilization, streptavidin-biotin system, quartz crystal microbalance, molecular flexibility.

서 론

단백질 고정화는 오래 전부터 활발하게 연구되고 있는 흥미로운 분야 중의 하나이다. 안정성 증가와 재사용을 목적으로 한 효소 고정화(1), 항체 치료제와 같은 의약품 단

백질의 정제를 위한 Protein A, Protein G 등 다양한 receptor의 고정화(2, 3), 최근 진단용 바이오칩 개발에서의 peptide, 항체 등의 고정화(4) 등 여러 분야에서 다양한 목적으로 단백질을 고정화시키고 있다. 단백질은 주로 공유 결합방법과 친화력 결합방법으로 고정화된다. 공유결합방법은 단백질을 구성하고 있는 아미노산 잔기를 알데하이드, 아민, 카르복실, 에폭시 그룹 등과의 반응에 의해 고체 표면에 고정화시킨다. 이 중 가장 보편적인 방법은 단백질의 라이신 잔기나 N-말단에 존재하는 아민기를 알데하이드 그룹으로 기능화 되어있는 고체 표면에 reductive amination 반응을 이용하여 고정화시키는 것이다. 이 방법은 염기성 조건에서 (pH 9.0~10.0) Schiff base의 중간단계

† Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory,
Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan
425-791, Korea.

Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779

E-mail : eklec@hanyang.ac.kr

* Present Address : K-Mac Corp., Daejeon, Korea

를 형성하고, NaBH_3CN 과 같은 환원제에 의해 imino 그룹이 환원되어 안정한 amide 결합을 형성한다(Fig. 1). 이 방법은 단백질의 아민기가 비교적 많기 때문에 반응 수율이 높으며, 여러 부위가 고정화되어 (multipoint attachment) 안정성을 향상시킬 수도 있다. 또한 반응단계가 매우 간단한 것이 큰 장점으로 작용한다(5-8). 하지만 이러한 염기성 조건에서의 반응은 여러 부위가 고체 표면 위에 직접 고정화됨으로써 본연의 입체 구조가 변화될 수 있고, random하게 무배향성으로 고정화되기 때문에 활성 부위가 가려져 활성이 감소되는 단점이 있다. 이러한 단점을 해결하기 위해 산성 조건 (pH 4.0)에서 단백질의 α -아민기 (N-terminus)와 ϵ -아민기 (Lys, Arg)의 pKa 차이를 이용하여 α -아민기만을 반응시키는 부위특이적 (site specific) 고정화 방법(9)과 linker를 이용하여 spacer arms을 형성하는 기술 (10) 등을 이용할 수 있다.

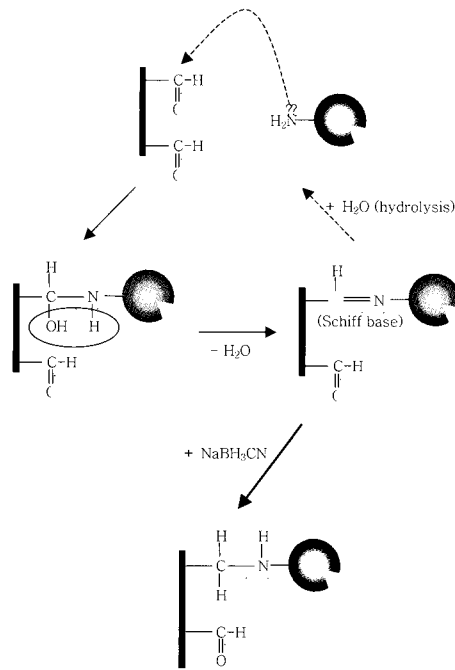


Figure 1. Mechanism of reductive amination.

Histidine-Ni, DNA-DNA, 항체-항원, avidin-biotin, Protein A-항체 등 생물분자간의 친화력을 이용한 고정화 방법은 특이적 부위만을 인식하는 고유의 특성으로 인하여 단백질 고정화에 매우 유리하다. 특히 avidin과 biotin의 경우 매우 강한 친화력 ($K_M = 10^{-15}$ M)에 의해 단백질 고정화 방법으로 널리 이용되고 있다(11-15). Biotin은 avidin과 특이적으로 결합할 수 있는 부위와 단백질이나 고체 표면에 쉽게 수식될 수 있는 기능이 존재한다. Avidin은 biotin과 결합할 수 있는 네 개의 단량체와 당 부분이 모여 하나의 구조를 이룬다. Avidin의 당 부분은 비특이적 반응을 유발시킬 수 있기 때문에 최근에는 이 부분이 제거된 streptavidin을 주로 이용한다(16). Streptavidin은 보통 알데하이드, 에폭시 기 등이 있는 고체표면에 결합 (streptavidin-biotin system)되거나 biotin이 수식되어 있는 표면에 친화력 결합 (biotin-

streptavidin-biotin system)으로 고정화 된다. 친화력 결합을 이용하면 streptavidin은 표면에 고밀도로 접합될 수 있고, biotin으로 수식된 목적물질만을 방향성 있게 고정화시킬 수 있는 장점이 있다(11).

SPR (surface plasmon resonance)과 QCM (quartz crystal microbalance)은 표면 위에 고정화되는 물질의 질량변화를 감지할 수 있는 장비이다. 두 장비는 민감도가 높으며, 실시간으로 반응을 관찰할 수 있고, 확인을 위한 형광물질 등의 표지(label)가 필요없다. 특히 QCM의 경우 질량변화 뿐만 아니라 고정화된 단백질의 분자 유연성 (molecular flexibility)도 확인할 수 있어 결합반응 외에 더 많은 정보를 얻을 수 있으며 센서 칩 표면개질이 용이하고, 실험조작이 쉬운 장점이 있다(17-20).

본 연구에서는 reductive amination 반응을 이용한 (1) multipoint, (2) single point 공유 결합방법과 (3) streptavidin-biotin, (4) biotin-streptavidin-biotin system을 이용한 친화력 결합방법을 이용하여 trypsin을 다공성 비드에 고정화 하였다. 다공성 비드는 넓은 표면적을 제공하고 액체의 확산이 용이하기 때문에 본 연구에서 사용되었으며, 최종 목적인 칩 기반 절단공정으로의 응용이 가능하다. 각각의 경우의 효소 고정화 수율을 분석하고, MALDI-TOF를 이용하여 BAPNA, Insulin, BSA 등의 기질 분해에 대한 고정화된 trypsin의 절단활성과 경향을 확인하여 free trypsin과 비교 하였다. 또한 QCM-D를 이용하여 (1)과 (3)의 방법에 의해 고정화된 trypsin의 분자유연성을 관찰하였다.

재료 및 방법

재료

단백질 분해효소인 trypsin (bovine pancreas)과 기질로 사용된 benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA), bovine serum albumin (BSA)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하였고, human insulin은 (주)종근당바이오에서 제공하였다. 고정화를 위한 비드로 Toyopearl[®] AF-Formyl-650M을 Tosoh사 (Yamaguchi, Japan)에서 구입하였다. 이 비드는 다공성 (평균 공극직경은 100 nm)으로 평균 지름이 65 μm 이며, 표면이 알데하이드 기로 되어있다. 친화력 결합을 이용한 고정화를 위하여 사용된 streptavidin과 NHS-LC-biotin, 투석막으로 사용된 dialysis cassette (MWCO 3,500, 0.5-3 ml)는 Pierce (Rockford, USA)사에서 구입하였다. Q-sense 칩의 표면개질용으로 사용된 11-amino-1-undecanethiol은 Dojindo (Kumamoto, Japan)에서 구입하였고, 25% glutaraldehyde는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 용해제로 사용된 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 DC chemical (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

다공성 비드에의 trypsin 고정화 방법

Fig. 2(a)와 (b)는 각각 pH 10.0과 4.0에서 reductive amination 반응을 이용하여 trypsin을 비드에 고정화시켰다. (a)의 경우, Toyopearl AF-Formyl-650M (TF) 100 μl 를 1.5 ml 샘플 튜브에 넣은 후 0.1 M sodium bicarbonate (SBB, pH 10.0) 버퍼 1 ml로 5회 세척하였다. 50 mg/ml trypsin

(in HCl, pH 2.5) 20 μ l는 0.1 M SBB (pH 10.0) 980 μ l에 녹여서 준비하였다. TF가 있는 튜브에 준비된 trypsin 용액 400 μ l를 첨가하여 4°C에서 3시간 반응시켰다. 반응 후 100 mg/ml NaBH₃CN 20 μ l를 튜브에 첨가하여 1시간 동안 같은 온도에서 환원시켰다. 반응 후 원심분리기를 이용하여 상층액을 취하여 고정화된 trypsin의 양을 측정하였다. 최종 샘플은 20 mM ammonium bicarbonate (ABB, pH 8.0) 1 ml로 5회 세척한 후 냉장보관 하였다. (b)의 경우에는 0.1 M sodium phosphate (SPB, pH 4.0) 버퍼를 이용하여 (a)와 같은 방법으로 제조하였다.

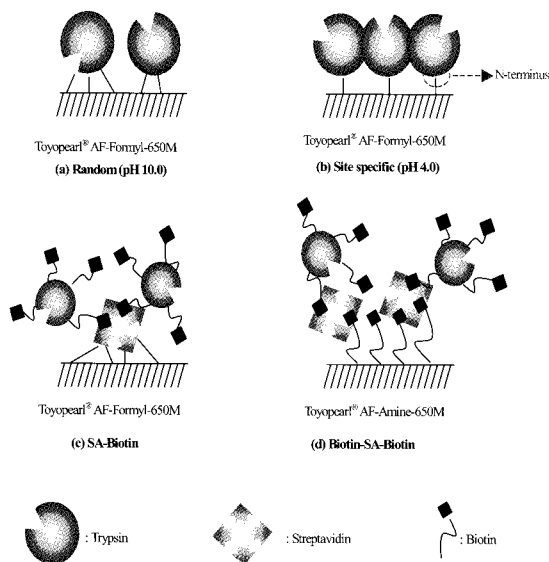


Figure 2. Immobilization strategy of trypsin on macroporous beads.

Fig. 2의 (c)와 (d)는 streptavidin-biotin system을 이용하여 trypsin을 고정화시킨 것이다. (c)의 경우, TF 100 μ l를 1.5 ml 샘플 튜브에 넣은 후 0.1 M SBB (pH 10.0) 1 ml로 5회 세척하였다. 0.1 M SBB (pH 10.0)에 용해되어 있는 streptavidin 1 mg/ml 450 μ l를 TF가 있는 튜브에 첨가하여 상온에서 3시간 반응시켰다. 반응 후 100 mg/ml NaBH₃CN 20 μ l를 튜브에 첨가하여 1시간 동안 환원시켰다. Trypsin을 biotin으로 수식하기 위하여 50 mg/ml (in HCl, pH 2.5) trypsin 용액 20 μ l와 DMSO에 용해되어 있는 10 mg/ml NHS-LC-biotin 20 μ l를 0.1 M SPB (pH 7.2) 960 μ l가 들어있는 1.5 ml 튜브에 넣고 교반하였다. 미 반응된 biotin을 제거하기 위하여 0.1 M SPB (pH 7.2)으로 투석하였다. Biotinylated trypsin 1 mg/ml 200 μ l를 streptavidin-TF 100 μ l가 들어있는 1.5 ml 튜브에 넣어 2시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 반응 후 원심분리기를 이용하여 상층액을 취하여 고정화된 trypsin의 양을 측정하였다. 20 mM ABB (pH 8.0) 1 ml로 5회 세척한 후 냉장보관 하였다.

(d)의 경우에는 Toyopearl AF-Amine-650M (TA)을 biotin으로 개질하기 위하여 DMSO 50 μ l와 0.1 M SPB (pH 7.2) 950 μ l에 2 mg NHS-LC-biotin을 혼합하여 만든 용액의 900 μ l를 첨가하여 2시간 반응시킨 후 동일 버퍼로 5회 세척하였다. 준비된 0.1 M SPB (pH 7.2)에 용해되어 있는

streptavidin 1 mg/ml 900 μ l를 첨가하여 2시간 반응시킨 후 미 반응된 streptavidin을 버퍼로 세척하여 제거하였다. 그 다음 1 mg/ml biotinylated trypsin 200 μ l를 첨가하여 2시간 반응시킨 후 20 mM ABB (pH 8.0) 1 ml로 5회 세척한 후 냉장보관하였다.

고정화 trypsin 역가 측정 (BAPNA, insulin, BSA 기질 대상)

DMSO에 용해되어 있는 20 mg/ml BAPNA 40 μ l와 20 mM ABB (pH 8.0) 버퍼에 녹아있는 1 mg/ml trypsin 용액 또는 고정화된 trypsin 용액 10 μ l는 20 mM ABB (pH 8.0) 200 μ l가 들어있는 1.5 ml 튜브에 넣어 상온에서 10분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 원심분리기를 이용하여 상층액 200 μ l를 96 well-plate에 취하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 미리 20 mM ABB에 용해시켜 놓은 0.1 mg/ml insulin과 1 mg/ml BSA 용액 500 μ l에 고정화된 trypsin 용액 80 μ l를 첨가하여 32°C에서 6시간 반응시켰다. 원심분리기를 이용하여 상층액 30 μ l를 취한 후 다공성 R2 resins이 들어있는 narrow GELoader tip (Eppendorf, Germany)을 이용하여 탈염하였다. 1 μ l의 탈염된 샘플은 1 μ l의 matrix 용액 (sinapinic acid saturated in 0.1% TFA: acetonitrile, 7 : 3)과 혼합되었다. 혼합용액 1 μ l는 MALDI target plate위에 침전되었고, 양전하 이온 (positively charged ions)의 mass spectra는 Bruker Ultraflex instrument (Bruker Daltonik, Germany)에 기록되었다 (linear mode, 337 nm nitrogen laser, 39 ns pulse duration, and 25 kV acceleration voltage).

QCM-D를 이용한 trypsin 고정화 과정의 실시간 모니터링

Q-sensor chip 표면을 aldehyde 기능기로 개질하기 위하여 1 mg/ml (in absolute Ethanol)의 11-amino-1-undecanthiol 2 ml를 Q-sensor 칩이 놓여 있는 12-well plate에 채운 후 4시간 상온에서 가볍게 교반시켰다. 반응 후 0.1 M sodium phosphate, pH 7.2로 세척하였다. 0.1 M SPB (pH 7.2)에 희석된 0.25% glutaraldehyde 2 ml를 같은 well에 채운 후 3시간 동안 상온에서 가볍게 교반시킨 후 DIW로 10회 세척하였다. 표면이 개질된 칩을 반응 chamber에 넣은 후 고정화 실험을 진행하였다.

공유결합을 이용한 고정화의 경우 0.1 M SBB (pH 10.0)으로 10분간 평형을 잡은 후 0.1 M SBB (pH 10.0)에 용해되어 있는 trypsin 용액 1 ml를 넣어주었다. 10분간 반응시킨 후 0.1 M SBB (pH 10.0) 2 ml로 세척하였고, 5분간 안정화시킨 후 반응을 종료하였다.

그리고 streptavidin-biotin system을 이용한 고정화는 0.1 M SPB (pH 7.2)로 10분간 평형을 잡은 후 동일버퍼에 녹아있는 0.1 mg/ml streptavidin 용액 1 ml를 넣어주었다. 10분간 반응을 시킨 후 0.1 M SPB (pH 7.2) 2 ml로 세척하였고, 안정화시킨 후 0.1 M SPB (pH 7.2)에 용해되어 있는 0.1 mg/ml biotinylated trypsin 용액 1 ml를 넣어주었다. 10분간 반응시킨 후 0.1 M SPB (pH 7.2)로 세척하였다. 5분간 안정화시킨 후 반응을 종료하였다.

결과 및 고찰

Trypsin의 고정화 수율

한정된 고체 표면에 단백질을 고밀도로 집적화시키는 것은 매우 중요하다. 특히 바이오센서나 단백질칩과 같이 고감도를 요구하는 분야에서의 그 중요성은 더욱 높아진다. 본 연구에서는 네 가지의 다른 고정화 전략을 사용하였다. Table 1에서 보듯이 pH 10.0과 4.0 조건에서 공유결합에 의해 고정화된 trypsin은 1 ml의 Toyopearl beads에 약 3~4 mg이었다. 반면에, streptavidin-biotin system을 이용한 경우 약 0.9 mg의 trypsin이 고정화되었다. 이 경우 비드 표면에 약 4 mg만의 streptavidin이 고정화되어 biotinylated trypsin의 고정화 양을 매우 제한적으로 만든다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 biotin-streptavidin-biotin system을 이용하여 고정화하였다. Streptavidin과 biotin간의 결합력이 매우 우수하기 때문에 biotin으로 개질된 표면은 streptavidin의 고정화 양을 증가시킬 것이라고 예상하였다. 예상대로 streptavidin의 고정화 양은 3배 이상 증가되었다. 하지만 biotinylated trypsin은 거의 고정화되지 않았다. 현 실험에서는 1 ml gel당 biotin 20 mg을 사용하였는데 이는 비드 표면에 개질용으로 사용된 biotin의 밀도가 매우 높아 streptavidin의 네 개의 반응부위와 모두 결합하였을 가능성이 크다고 판단된다. 고체표면을 biotin으로 개질하는 분야는 이미 많은 연구가 진행되었다. 이러한 연구에서는 높은 밀도의 biotin으로 개질하는 것보다 다른 비활성의 linker와 혼합물 형태로 개질하여 streptavidin이 2차 biotin으로 수식된 분자와의 binding 수율을 더 높이는 것을 제시하였다(21-23). 따라서 본 연구에서도 표면개질용 biotin의 밀도를 조절하면 biotinylated trypsin의 고정화 수율을 향상시킬 수 있을 것으로 기대한다.

이온결합, 소수성결합과 같은 비특이적 흡착이 발생하여 본연의 3차원 구조가 뒤트러거나 변형되었을 가능성이 높다(6). 두 번째 담체 표면에 밀접하게 고정화되어 목적물질의 접근이 매우 불리하다. 특히 pH 4.0에서 N-terminus의 아민 기만을 고정화시킨 경우 불행하게도 N-terminus와 활성부위 사이가 비교적 밀접하게 붙어있어 더욱 더 낮은 활성을 낮아진 것으로 판단된다. 한편 streptavidin-biotin system에 의해 결합된 trypsin은 1.6 U/mg-trypsin으로 50%를 유지하였다. 이 경우의 trypsin은 여러 아민 잔기에 biotin이 수식되기 때문에 활성이 저하되었다. 하지만 streptavidin과 biotin이 안정한 spacer arm으로 작용하여 공유결합방법이 갖고 있는 문제점을 피할 수 있었기 때문에 비교적 높은 활성을 유지한 것으로 사료된다.

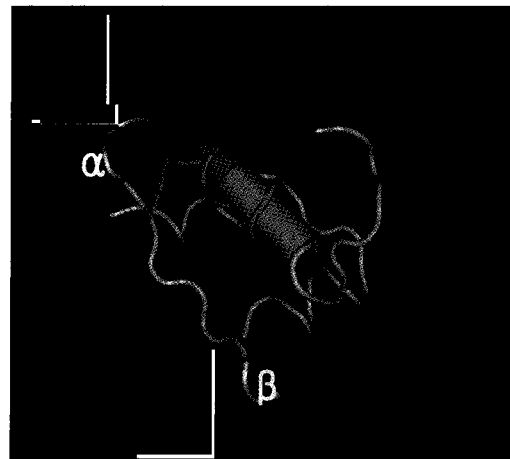


Figure 3. The 3D structure of insulin (α: Lys43 and β: Arg50 can be digested by trypsin).

Table 1. Comparison of specific activity of free trypsin with immobilized trypsin by four different immobilization methods

	Streptavidin (mg/ml-gel)	Trypsin (mg/ml-gel)	Specific activity (unit/immobilized trypsin mg)	Total immobilized activity (unit/ml-gel)
Reductive amination (pH 10.0)	-	3.2	1.20 (37%)	3.84
Reductive amination (pH 4.0)	-	3.6	0.41 (13%)	1.48
SA-biotin linker system	4	0.9	1.59 (50%)	1.43
Biotin-SA-biotin linker system	14	0.001	-	-
Free trypsin	-	-	3.25 (100%)	-

고정화된 trypsin과 free trypsin의 활성비교

고정화된 trypsin의 BAPNA 절단 비활성 (specific activity)을 측정하여 free trypsin과 비교하였다. Table 1에서 보듯이 pH 10.0에서 공유결합된 trypsin의 경우 1.2 U/mg-trypsin으로서 free trypsin 활성의 37%를 유지하는 반면에 pH 4.0에서 결합된 trypsin은 13%로 매우 낮은 활성을 나타내었다. Linker 없이 공유결합된 trypsin의 경우 활성이 감소되는 주요 원인을 다음과 같이 두 가지로 생각해 볼 수 있다. 첫 번째 고정화된 trypsin은 특이적으로 유도한 반응 외에도

고정화된 trypsin의 Insulin에 대한 절단특성

BAPNA와 크기가 다른 기질에 대한 고정화된 trypsin의 활성을 관찰하기 위하여 인간 insulin을 대상으로 절단공정을 수행하였다. 절단 결과는 MALDI-TOF를 이용하여 분석하였다. Fig. 3에서 보듯이 trypsin은 51개의 아미노산으로 이루어진 인슐린의 두 부위를 절단할 수 있다. C-terminus 부위에 있는 Arg50 (β)은 구조적으로 고정화된 trypsin에 접근이 용이한 반면에 고리형태 구조에 존재하는 Lys43 (α)은 비교적 어려울 것이다. Fig. 4의 질량 spectrum에서 관찰할 수 있는 절단된 펩타이드 절편은 1-50, 1-43, 44-51, 44-50, 1으로 다섯 개이다. 부위 특이적 절단수율 (site specific activity)은 절단되지 않은 insulin의 spectrum 강도 (intensity)와 절단된 peptide의 강도비율로 계산되었다. Table 2를 보면 공유결합에 의해 고정화된 trypsin의 경우 Arg50에 대한 절단수율은 높은 반면에 Lys43에 대한 절단수율은 상대적으로 낮았다. Streptavidin-biotin에 의해 이용하여 고정화된 trypsin은 전체적인 절단수율은 낮았지만 Lys43에 대한 절단수율은 1.27 U/mg-trypsin으로 공유결합방법의 trypsin보다 약 6배 우수하였다. 전체 절단수율은 단위질량의 비드에 고정화된 trypsin의 양에 의존하기 때문에 공유결합방법이 높으나 접근이 용이하지 않은 절단부위에 대한 활성은 친화력 결합방법이 우수함을 확인하였다. 이는 streptavidin-biotin

system으로 고정화된 trypsin이 공유결합으로 고정화된 trypsin보다 분자 유연성이 높아 부위특이적 절단 효율이 높은 것으로 판단된다.

Table 2. Comparison of site-specific cleavage of immobilized trypsin on human insulin

	Specific activity of site α (U/mg-trypsin)	Specific activity of site β (U/mg-trypsin)
Covalent bonding (reductive amination)	0.22	0.53
Affinity binding (streptavidin-biotin system)	1.27	0.28

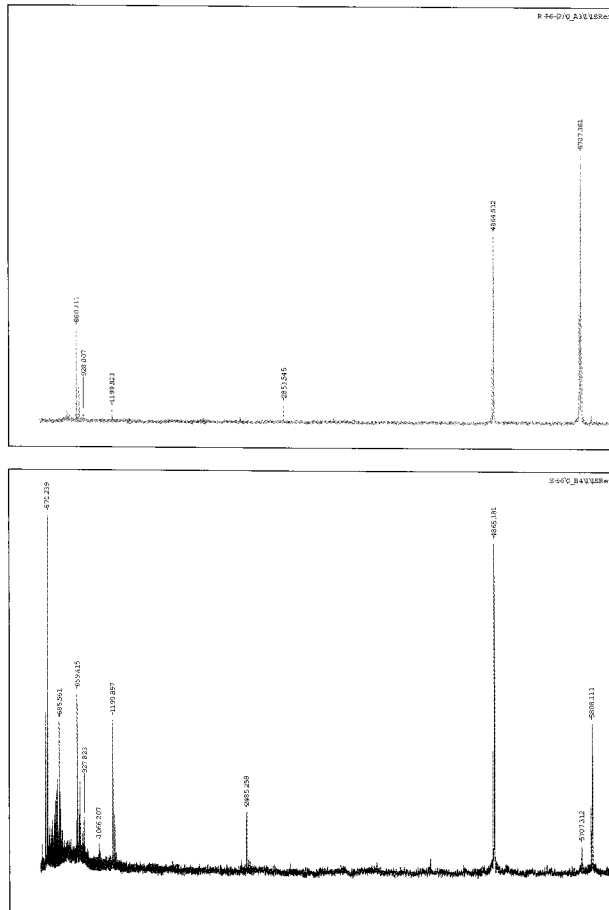


Figure 4. Mass spectrum of (a) digested insulin by covalently immobilized trypsin, (b) by immobilized trypsin by streptavidin-biotin system.

고정화된 trypsin의 BSA에 대한 절단특성

우리는 BSA를 절단함으로써 거대 분자에 대한 절단가능성을 확인하였다(Fig. 5). Free trypsin으로 BSA를 절단하였을 때 확인된 펩타이드의 개수는 14개로 sequence coverage (%)는 24%였다. Sequence coverage는 절단된 펩타이드들이 전체 단백질 sequence에 해당하는 비율을 의미한다. 공유결합으로 고정화된 trypsin으로 절단한 BSA는 7개 (14%)의 펩타이드가 확인된 반면에 streptavidin-biotin에 의해 고정화된 trypsin으로 BSA를 절단하였을 때 13개 (22%)의 펩타이드를 확인할 수 있었다. 공유결합으로 고정화된 trypsin의 경우 가장 낮은 sequence coverage를 보였다. Streptavidin-

biotin으로 고정화된 trypsin의 spectrum signal은 약했지만 coverage면에서 free trypsin과 거의 동일하였다. 이로서 우리는 Streptavidin-biotin으로 고정화된 trypsin의 구조가 비드 표면에서 변형되지 않은 채 유지되고 있어 절단효율이 공유방법으로 고정화된 trypsin보다 높음을 판단할 수 있다.

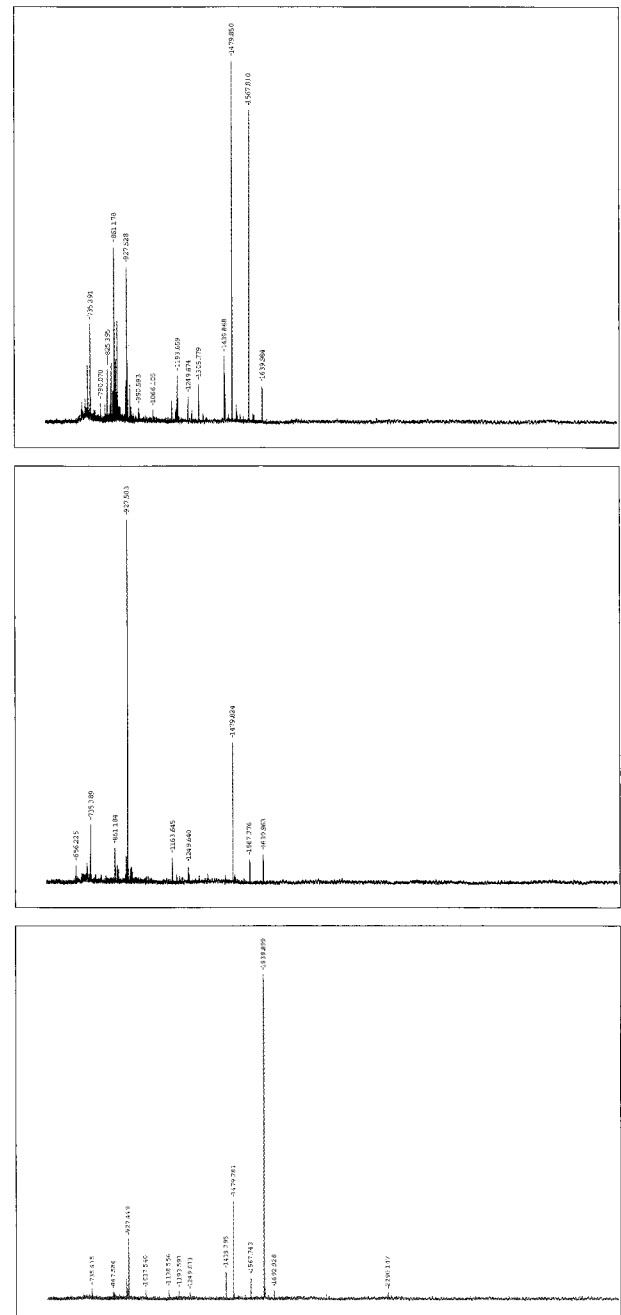


Figure 5. Mass spectrum of digested BSA by (a) free trypsin, (b) covalently immobilized trypsin, (c) immobilized trypsin by streptavidin-biotin system.

QCM-D를 이용한 고정화된 trypsin의 molecular flexibility 확인

공유결합방법과 친화력 결합방법의 절단특성 차이의 원인을 명확하게 규명하기 위하여 QCM-D에서 비드에서의 실험을 똑같이 구현하여 실시간으로 frequency 변화 (Δf)와

dissipation 변화 (ΔD)를 관찰하였다(Fig. 6). QCM-D에서 Δf 값으로 Sauerbrey relation을 이용하여 질량변화 (Δm)를 계산할 수 있다(24).

$$\Delta m = -k \cdot \Delta f \quad (1)$$

여기서 k 는 5 MHz quartz crystal의 진동질량상수이며, $17.7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^2$ 이다. 한편 ΔD 는

$$\Delta D = E_{lost} / 2\pi E_{stored} \quad (2)$$

로 정의된다(25). 여기서 E_{lost} 는 한 진동에서 소실된 에너지이며, E_{stored} 는 진동기에 보존된 전체 에너지로 정의된다. ΔD 는 진동이 일정한 상태에서 전류를 차단하여 진동의 감소 정도를 산출한 값이다. 분자구조가 견고한 (rigid) 물질은 전류가 차단된 후에도 오랫동안 진동이 유지되면서 서서히 감소하는 반면에 점성이 있는 물질은 급격하게 감소한다. 그래서 점성이 높은 물질, 즉 분자유연성이 높은 물질일수록 ΔD 값은 증가한다(11). Table 3에서 보듯이 Δm 은 공유결합방법이 185 ng/cm^2 , 친화력 결합방법이 159 ng/cm^2 으로 비슷했다. 하지만 단위질량당의 ΔD 의 변화량을 가리키는 $\Delta D/\Delta m$ 을 계산하면(11), 공유결합방법은 $0.16 \times 10^{-9} \text{ ng}^{-1} \text{ cm}$ 반면에 친화력 결합방법에서는 $5.53 \times 10^{-9} \text{ ng}^{-1} \text{ cm}$ 증가하였다. 이것으로 친화력 결합방법에 의해 고정화된 trypsin은 유연한 반면에 공유결합에 의해 고정화된 trypsin은 단단하게 접합되었음을 알 수 있다. 또한 이러한 분자 유연성의 차이가 활성에 많은 영향을 미친다는 것을 유추할 수 있다.

Table 3. Comparison of sequence coverage of free trypsin with immobilized trypsin by two different immobilization methods on BSA

	Number of peptides	Sequence coverage
Covalent bonding (reductive amination)	7	14%
Affinity binding (streptavidin-biotin system)	13	22%
Free trypsin	14	24%

Table 4. Comparison of dissipation shift of immobilized trypsin by covalent binding with streptavidin-biotin system

	$\Delta m \text{ (ng/cm)}$	$\Delta D \text{ (-)}$	$\Delta D/\Delta m \text{ (ng}^{-1} \text{ cm)}$
Reductive amination	185	0.03×10^{-6}	0.16×10^{-9}
Streptavidin-biotin system	159	0.7×10^{-6}	5.53×10^{-9}

요 약

본 연구에서는 trypsin을 모델 단백질로 하여 단백질 본연의 활성을 유지할 수 있는 고정화 방법을 찾기 위하여 공유결합방법과 친화력 결합방법을 이용하여 trypsin을 고정화하였다. Streptavidin-biotin system을 이용한 고정화 방법은 bioactivity 유지측면에서 공유결합 방법보다 우수함을 확인하였다. 하지만 streptavidin-biotin system을 이용하였을 때 고정화 수율이 낮은 것은 해결해야 할 과제이다. 분자량이 다

른 기질들 (BAPNA, insulin, BSA)을 대상으로 고정화 trypsin의 부위 특이적 절단 특성을 분석한 결과 streptavidin-biotin에 의해 고정화된 trypsin이 절단효율도 높고 sequence coverage도 높은 것으로 확인되었다. 또한 공유결합된 trypsin은 견고한 분자구조를 나타낸 반면 streptavidin-biotin system으로 고정화된 trypsin은 유연성이 높은 것을 QCM-D를 이용하여 관찰할 수 있었다. 따라서 streptavidin-biotin system에 의한 고정화 방법에서 streptavidin-biotin 결합이 일종의 spacer arm 역할을 하면서 고정화된 trypsin의 분자유연성을 향상시켜 절단반응의 부위특이성과 절단수율을 향상시키는 것으로 판단되었다.

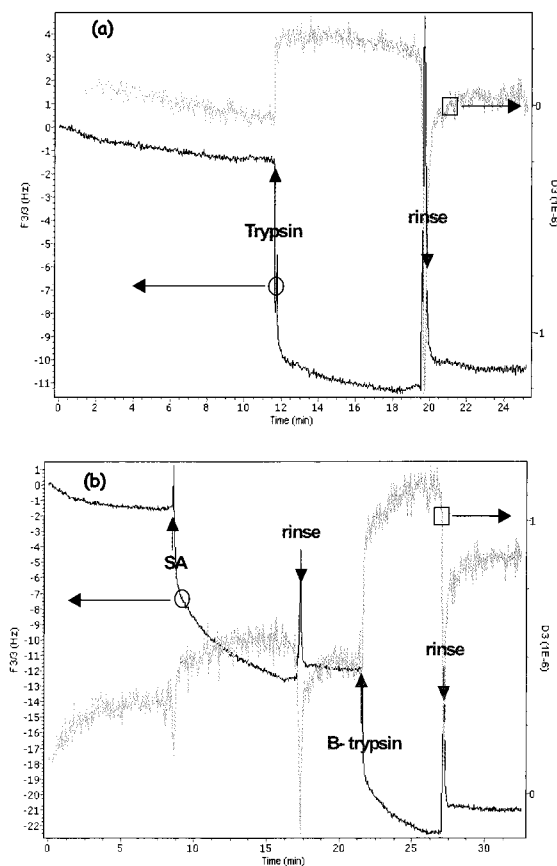


Figure 6. Real-time monitoring of trypsin immobilization using QCM-D ((a) Trypsin was covalently immobilized by reductive amination and (b) was attached via streptavidin-biotin system on the modified sensor chip by SAMs (amine-thiols)).

감 사

본 논문은 과학기술부 성장동력산업기술개발사업의 단백질칩 과제 (사업명: 초고감도, 고집적 단백질 칩 개발을 위한 단백질의 배향성과 안정성 측정기술과 표면개질기술의 개발)의 지원으로 수행되어 이에 감사합니다. 또한, 교육인적자원부, 산업자원부, 노동부가 공동지원하는 최우수 실험실지원사업 (사업명: 차세대 바이오의약 생산을 위한 생물인식공학기술)의 지원에도 감사드립니다.

REFERENCES

1. Solomon B., O. Raviv, E. Leibman, and G. Fleminger (1992), Affinity purification of antibodies using immobilized FB domain of protein A, *J. Chromatography* **597**, 257.
2. Babashak, J. V. and T. M. Phillips (1988), Use of avidin-coated glass beads as a support for high-performance immunoaffinity chromatography, *J. Chromatography* **444**, 21.
3. Zhu, H. and M. Snyder (2003), Protein chip technology, *Current Opinion in Chemical Biology* **55**, 7
4. Greg, T. H. (1996), Bioconjugate Techniques, p141-142, Academic press, San Diego, USA.
5. Guisan, J. M. (1989), Immobilization-stabilization of enzymes: variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment, *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 353-359.
6. Guisan, J. M. (1989), Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives, *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 360-366.
7. Zare, R. N. (2005), Enhanced proteolytic activity of covalently bound enzymes in photopolymerized sol gel, *Anal. Chem.* **77**, 4604-4610.
8. Means, G. E. and R. E. Feeney (1995), Reductive alkylation of proteins, *Analytical Biochemistry* **224**, 1-16.
9. Bisswanger, H. (2001), Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers, *Enzyme Microb. Technol.* **29**, 567-574.
10. Knoll, W. (2005), Surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance study of streptavidin film structure effects on biotinylated DNA assembly and target DNA hybridization, *Langmuir* **21**, 348-353.
11. Amankwa, L. N. and W. G. Kuhr (1992), Trypsin-modified-fused-silica capillary microreactor for peptide mapping by capillary zone electrophoresis, *Anal. Chem.* **64**, 1610
12. Amankwa, L. N. and W. G. Kuhr (1993), Online peptide mapping by capillary zone electrophoresis, *Anal. Chem.* **65**, 2693
13. Campbell, C. T. (2004), Microspotting streptavidin and double stranded DNA arrays on gold for high-throughput studies of protein-DNA interactions by surface plasmon resonance microscopy, *Anal. Chem.* **76**, 918-929.
14. Turkova, J. (1999), Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function, *J. Chromatography B* **722**, 11-31.
15. Greg, T. H. (1996), Bioconjugate Techniques, p570-571, Academic press, San Diego, USA.
16. Ihalainen, P. and J. Peltonen (2004), Immobilization of streptavidin onto biotin-functionalized Langmuir-Schaefer binary monolayers chemisorbed on gold, *Sensors and Actuators B* **102**, 207-218.
17. Chou, T. C. (2004), Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor, *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 75-81.
18. Shen, G. (2004), Nanogold particle-enhanced oriented adsorption of antibody fragments for immunosensing platforms, *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 2210-2217.
19. Ozcan, A. (2005), Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance, *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 2197-2202.
20. Campbell, C. T. and P. S. Stayton (2001), Surface characterization of mixed self-assembled monolayers designed for streptavidin immobilization, *Langmuir* **17**, 2807-2816
21. Campbell, C. T. and P. S. Stayton (2000), Binding and dissociation kinetics of wild-type and mutant streptavidins on mixed biotin-containing alkythiolate monolayers, *Langmuir* **16**, 9421-9432.
22. Sim, S. J. (2006), A strategy for sensitivity and specificity enhancements in prostate specific antigen- α_1 -antichymotrypsin detection based on surface plasmon resonance, *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 2106-2113.
23. Sauerbrey, G. A. (1959), Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur mikrowägung. *Z. Phys.* **155**, 206-222.
24. Salt, D. (1987), Hy-Q Handbook of Quartz Crystal Devices; Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd, Cornwall.
25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (2005)