

단백체 분석을 위한 일차원 및 이차원 역상크로마토그래피의 비교

문평곤 · 조영은 · 백문창[#]

경북대학교 의과대학 분자의학교실

(Received August 17, 2010; Revised September 12, 2010; Accepted September 19, 2010)

Comparison of 2-D RP-RP MS/MS with 1-D RP MS/MS for Proteomic Analysis

Pyong-Gon Moon, Young-Eun Cho and Moon-Chang Baek[#]

Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 700-422, Korea

Abstract — Single-dimensional (1-D) and two-dimensional (2-D) LC methods were utilized to separate peptides from various sources followed by MS/MS analysis. Two-dimensional ultra-high performance liquid chromatography is a useful tool for proteome analysis, providing a greater peak capacity than 1-D LC. The most popular 2-D LC approach used today for proteomic research combines strong cation exchange and reversed-phase LC. We have evaluated an alternative mode for 2-D LC of peptides using 2-D RP-RP nano UPLC Q-TOF Mass Spectrometry, employing reversed-phase columns in both separation dimensions. As control experiments, we identified 129 proteins in 1-D LC and 322 proteins in 2-D LC from *E. coli* extract peptides. Furthermore, we applied this method to rat primary hepatocyte and a total of 170 proteins were identified from 1-D LC, and 527 proteins were identified from all 2-D LC system. The in-depth protein profiling established by this 2-D LC MS/MS from rat primary hepatocyte could be a very useful reference for future applications in regards to drug induced liver toxicity.

Keywords □ 2-D LC MS/MS, RP-RP, hepatocyte

대부분의 단백질체는 펩타이드로 절단해서 질량 분석기로 분석을 하는 데, 이 경우 펩타이드의 종류가 상당히 많아 단일 분석 방법으로 분석하기 어렵다.^{1,3)} 이렇게 다양한 펩타이드를 적절하게 분리를 하면 질량 분석기를 이용하여 단백질 분석을 하는 데 크게 도움을 줄 수 있다. 따라서, 효과적인 펩타이드를 분리하기 위해 질량 분석기로 분석하기 전에 액체 크로마토그래피를 도입한 LC-MS/MS 방식을 널리 이용하고 있다.^{1,2)} 더 나아가서 액체 크로마토그래피를 1차원이 아닌 2차원 액체 크로마토그래피 방법을 이용하면 더 많은 수의 단백질을 동정할 수 있다.^{1,2,4-11)} 대부분의 2차원 액체 크로마토그래피 방법은 강 양이온 교환 컬럼 (strong cation exchange chromatography)과 역상 컬럼 (reverse phase chromatography), 즉 두 가지의 성질이 다른 컬럼을 연결하여 사용한다.^{3,7,11)} 이 방법의 단점으로 1차원 분리에 사용되는 강 이온 교환 컬럼의 낮은 분리도 때문에 분석 물질이 1차원 분석의 여러 분획에 분할되어 나오는 현상으로 인해 각각

분획의 분석 결과가 중첩되어 전체적으로 고르지 못한 단백질 동정 결과를 보이는 경우가 있다.¹²⁾ 최근, 두 역상 컬럼을 연결하는 새로운 2차원 액체 크로마토그래피 방법이 소개된 바 있다.^{6,9)} 이 경우, 동일한 성질을 이용하여 분리하는 두 컬럼을 이용함에도 불구하고, 각각 다른 pH를 가지는 이동상을 이용하여 서로 다른 분리 양상을 나타낼 수 있다. 첫 역상 컬럼은 pH 10의 이동상을 이용하고 두 번째 역상 컬럼은 pH 2.6의 이동상을 이용한다.^{6,9,14)} Nakamura의 연구¹⁵⁾에 의하면 단백질 분석에는 강 이온 교환-역상 컬럼 보다 분리도가 높은 역상-역상 컬럼을 이용한 2차원 액체 크로마토그래피가 더 적합하다고 발표하였다. 현재까지 나와 있는 역상-역상 컬럼을 이용한 2차원 액체 크로마토그래피 방법은 첫 번째 역상 컬럼에서 시료를 분리 한 후 일정 시간에 모인 분획을 따로 모아 두 번째 역상 컬럼에 다시 넣어 분리하는 오프라인(off-line) 형식의 분석이었다.^{6,9,14,16)} 이때 분획을 모으고 건조시켜 두 번째 역상 컬럼에 넣어주는 과정에서의 시료 손실이 생긴다. 이를 극복하기 위해 두 역상 컬럼을 온라인으로 연결한 후 첫 번째 역상 컬럼에서 분리된 시료를 두 번째 역상 컬럼에서 분리하는 온라인 방식의 역상-역상 2차원 액체 크로마토그래피 방법이 소개 되었다.^{13,14)} 이전 여러 연구에서 세포

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-420-4948 (팩스) 053-426-4944
(E-mail) mcbaek@knu.ac.kr

주 혹은 임상 시료를 2차원 액체 크로마토그래피를 이용한 분석에서도 온라인(on-line) 역상-역상 컬럼의 2차원 액체 크로마토그래피를 이용한 세포주 혹은 임상 시료 분석 연구결과는 현재 나와 있지 않다.

따라서, 본 연구를 위해 나노 초 고성능 액체 크로마토그래피(nano Ultra Performance Liquid Chromatography) 질량분석기(nano Electron Spray Ionization Quadruple-Time Of Flight Mass spectrometry)를 기반으로 온라인 역상-역상 2차원 액체 크로마토그래피를 이용하여 표준 단백질인 대장균 단백질 추출물을 분석하였고, 이를 1차원 액체 크로마토그래피와 비교하였다. 더 나아가 실제 실험에 이용이 될 수 있는 쥐(rat)의 간 조직 유래 일차 세포(primary cell)에 적용하여 동정된 단백질을 비교 얼마나 많은 단백질이 동정되는지 확인하여 온라인 역상-역상 2차원 액체 크로마토그래피의 활용성과 우수성을 확인하였다. 또한 쥐 간 세포 단백질을 대량 동정함으로써 차후 간 독성과 같은 간 세포를 이용한 실험에 참고가 될 수 있는 결과를 얻었다.

실험방법

쥐의 간 조직 유래 세포의 분리 및 배양

쥐의 간 조직은 Abdel-Raham의 방법을 이용하여 분리하였다.¹⁷⁾ 갓 채취한 쥐의 간 세포는 10% fetal bovine serum(FBS), 1 μ M의 인슐린, 1.4 μ M의 하이드로코티손(hydrocortison), 15 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 포함한 콜라겐으로 도포된 배양 접시에 접종한 후 습도 95%, 이산화탄소 5%, 37°C 항온 배양기에서 배양하였다.

단백질들의 트립신 절단

배양한 쥐의 간 조직 유래 세포는 radioimmunoprecipitation assay(RIPA) 용액(50 mM Tris-Cl pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)을 이용하여 세포용해 하여 BCA(bicinchoninic acid) 방법으로 단백질 정량을 실시하였다. 트립신(trypsin) 절단은 Chen의 방법¹⁸⁾을 이용하여 실시하였다. 용해된 단백질에 30 μ l의 6 M urea, 5 mM EDTA, 2%(w/v) SDS/0.1 M triethyl-ammonium bicarbonate(TEABC)를 넣어 37°C에서 30분을 반응시켜 단백질을 용해시킨 후, 환원(reduction)을 위해 10 mM dithiothreitol(DTT) 3 μ l를 처리하고 알킬화(alkylation)를 위해 55 mM iodoacetamide (IAA) 3 μ l를 처리하여 반응시켰다. 반응한 단백질을 15 μ l의 acrylamide/bisacrylamide solution(30%, v/v, 29:1), 10%(w/v) ammonium persulfate 2.5 μ l, 100% N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED) 1 μ l을 넣어 고형화 한 후 작은 조각으로 잘라 TEABC가 포함된 50%(v/v) acetonitrile(ACN) 1 ml

로 세 번 씻어주고, 감압건조기를 이용하여 완전히 건조시켰다. 건조된 젤 조각에 트립신 완충액(500 ng/ μ l trypsin, 50 mM ammonium bicarbonate)을 처리하여 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 이후 5% formic acid를 첨가하여 트립신의 작용을 중지시킨 후 25 mM TEABC와 ACN을 이용하여 펩타이드를 추출하였다. 추출된 펩타이드들은 감압건조기를 이용하여 완전히 건조시켰고, 분석 직전에 A 용액(0.1% formic acid)에 녹여 질량분석기로 분석하였다.

1차원 액체 크로마토그래피 분석

*E. coli*로부터 추출한 트립신 처리된 전체 단백질(Waters Corporation, Milford, MA)과 펩타이드화 한 쥐의 간 조직 유래 세포의 전체 단백질은 나노 초 고성능 액체 크로마토그래피로 분리하였다. 모든 시료는 C18 nanocolumn(75 μ m id, 250 mm length, 1.7 μ m particle size, Waters Corporation, Milford, MA)으로 분리하였으며, A 용액(0.1% formic acid 수용액)과 B 용액(0.1% formic acid를 포함한 ACN)의 농도구배에 따라 분리하였다. 각 용액들은 분당 0.3 μ l의 유속으로 1% B 용액에서 5% B 용액(5분)로, 후에 25% B 용액(45분), 60% B 용액(95분), 85% B 용액(95~100분)으로 차례로 증가시킨 후 다시 처음의 농도인 1% B 용액(100~105분)으로 흘러주었다.

2차원 액체 크로마토그래피 분석

간 및 *E. coli*로부터 얻어진 시료는 C18 Xbidge column(300 μ m id, 50 mm length, 5 μ m particle size, Waters Corporation, Milford, MA)과 C18 nanocolumn(75 μ m id, 250 mm length, 1.7 μ m particle size, Waters Corporation, Milford, MA)를 이용하여 분석 하였다. 2차원 액체 크로마토그래피 분석을 위해 2개의 펌프를 각기 다른 pH의 이동상을 흘러주는데 사용하였다(Fig. 1). 첫 번째 역상컬럼은 2번 펌프를 이용하여 pH 10의 이동상을 500 nl/min 으로 흘러주고 두 번째 역상 컬럼은 1번 펌프를 이용하여 pH 2.6의 이동상을 흘러주었다. 펩타이드 시료가 자동 시료 주입기를 통해 첫 번째 역상컬럼에 부착되고 11%, 21%, 28%, 37%, 45%의 다섯 농도의 ACN을 포함한 pH 10 이동상을 이용하여 계단식으로 분리하였다. 첫 번째 역상컬럼에서 분리된 펩타이드는 2차 컬럼을 이용해서 다시 분리하였다. 이때 첫 번째 역상컬럼에서 분리된 펩타이드는 높은 pH의 ACN용액이므로 두 번째 역상컬럼에 부착하기 전 트랩 컬럼에서 2번 펌프 유속의 10배 유속(5 μ l/min)으로 15분간 pH 2.6의 A 용액을 1번 펌프에서 흘려서, ACN의 농도를 희석시켜 트랩컬럼에 펩타이드가 부착할 수 있게 한다(Fig. 1a-트랩 모드). 트랩 컬럼에 부착된 펩타이드는 1번 펌프에서 흘려주는 pH 2.6의 이동상의 농도 구배를 이용하여 2차 분석하였다(Fig. 1b-분석 모드). 이 때 2번 펌프에서 나오는 pH 10의 이동상은 ACN이 포함되지 않은 용액으로

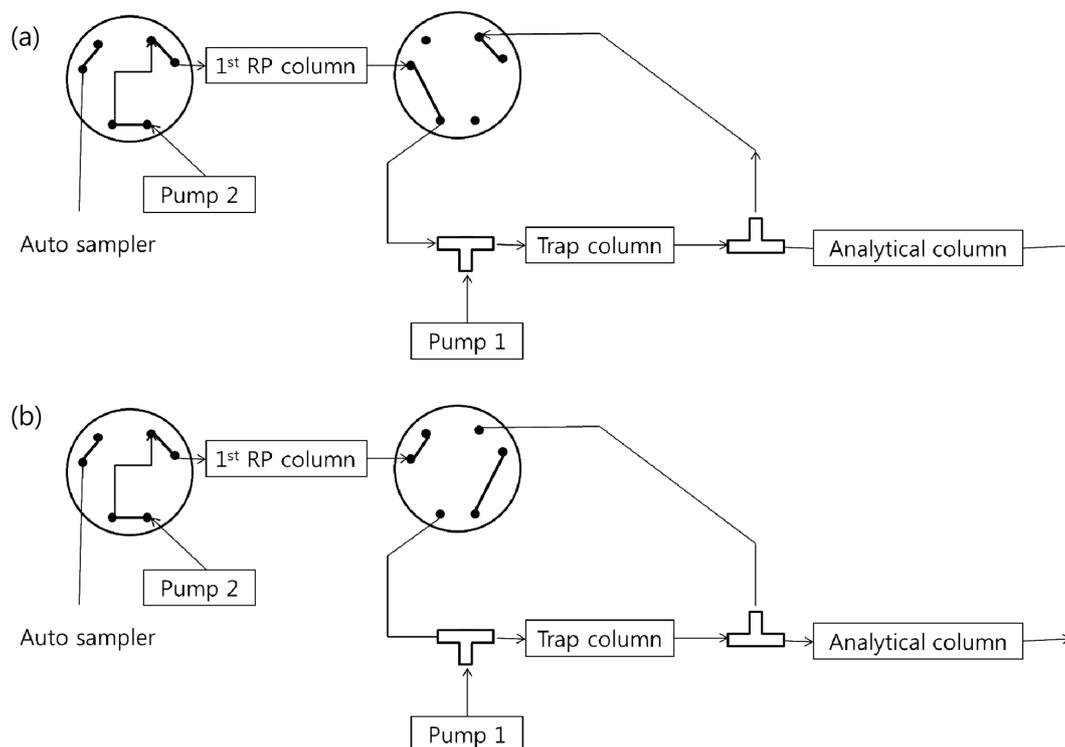


Fig. 1 – Configuration of an automated RP/RP 2D LC/MS with online dilution. (a) First dimension with online dilution and trap mode, (b) Second dimension with analysis mode.

버려지게 된다(Fig. 1b 2번 펌프 화살표). 두 번째 역상컬럼에서 각 용액들은 분당 $0.3 \mu\text{l}$ 의 유속으로 1% B 용액에서 5% B 용액(5분)으로, 후에 25% B 용액(30분), 60% B 용액(60분), 85% B 용액(60~63분)로 차례로 증가시킨 후 다시 처음의 농도인 1% B 용액(63~65분)으로 흘려주었다.

질량분석기 분석

위의 방법에 따라 분리된 펩타이드들은 순차적으로 nano Ultra Performance Liquid Chromatography(nanoUPLC, Waters Corporation, Milford, MA) 와 연결된 nano-전자분부(ESI) 사극자(quadrupole) 이온 비행 시간차 분석기(TOF) 질량분석기(Q-TOF Premier, Waters Corporation, Manchester, UK)에 의하여 분석이 이루어졌다. 모든 분석은 양이온 모드로 분석하였다. 각각의 이온들은 순차적으로 Z 형태의 이온화 부분을 통해 질량 분석기 내부로 들어간다. 들어간 이온은 사극자에 도달하여 MS scan을 통해 선구 이온(precursor ion)의 m/z 를 확인한다. 사극자에는 직류전하와 라디오 전자기파가 동시에 흐르게 되는데 양전하를 띤 펩타이드 이온들은 사극자 내의 전자기장 내에서 회전하며 이동하는데 이를 바탕으로 각 이온을 정렬하여 선구 이온의 m/z 를 얻을 수 있다. 이때 scan은 0.6초 간격으로, MS spectra는 m/z 100에서 m/z 1,600의 범위에서 분석하였다. 이때 초당 이온 검출 강도 20 이상인 이온 중, 가장 높은 강도를 보이

는 3개를 선택하여 충돌관(collision cell)에서 높은 전압의 충돌 에너지를 주어 선구 이온(precursor ion)을 토막 이온(fragment ion)으로 조각을 내서 이온 비행 시간차 분석기를 통해 m/z 50에서 m/z 1,990 범위에서 1.2초 동안 MS/MS spectra를 받았다. 이온 비행 시간차 분석기는 하나의 반사관을 적용한 V 모드로 이온을 비행시켜 검출기를 통해 이온의 m/z 값을 얻었다. MS/MS spectra는 1.2초 후에 자동으로 데이터 받기를 멈추고 MS spectra 모드로 복귀하여 다시 m/z 100에서 m/z 1,600의 범위에서 데이터를 수집하였다. 한번 받은 이온은 300초 이내에 다시 가장 높은 강도를 보이는 3개 이온에 포함되더라도 자동으로 제외하고 다음 순위의 초당 이온 검출 강도 20 이상인 이온을 선택하여 분석한다. Mass의 정확도는 LockSpray(Waters Corporation, Manchester, UK)에서 reference인 GFP(Glu- Fibrinopeptide B, Sigma, Canton, MA, US)의 제 2가 양전하 모드 값인 785.8426 m/z 를 이용하여 30초 간격으로 MS 스캔하여 유지하였다.

데이터 변환

질량분석기로 얻은 데이터는 Mascot Distiller(Matrix Science; version 2.3.2, Boston, MA)를 이용하여 피크 리스트(mgf 파일)로 변환하였다. Mgf 파일을 Mascot(Matrix Science; version 2.2.1, Boston, MA) 프로그램을 이용하여 단백질을 동정하였다. 이때 *E. coli* 분석을 위하여 Swissprot 데이터베이스(version

51.6; 257,964 sequences; 93,947,433 residues)를 사용하였고 쥐의 간 조직 유래 일차세포 단백질 분석을 위해 IPI rat 데이터베이스(version 3.70; 39,579 sequences; 20,816,731 residues)를 사용하였다. 단백질 동정을 위한 파라미터로는 fixed modification에 carbamidomethyl C, variable modification에 oxidation M을 선택하였고 트립신 missed cleavage는 2개 이온 허용 한계는 0.1 Da로 설정하고 분석결과는 >95%의 정확도를 가지는 2개 이상의 펩타이드로부터 얻어진 단백질만을 최종 결과로 얻었다. 또한 질량분석기 분석을 통해 동정된 쥐의 간 조직 유래 일차세포 단백질을 DAVID 소프트웨어¹⁹(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/conversion.jsp>)를 이용하여 어떠한 세포 내 위치 카테고리 및 생물학적 작용 카테고리에 속하는지 분석하였다.

실험결과 및 고찰

표준 단백질인 대장균 단백질 추출물의 1차원-2차원 액체 크로마토그래피 분석

현재까지 소개된 대부분의 온라인 2차원 액체 크로마토그래피 분리방법은 강 양이온 교환 컬럼과 역상 컬럼을 연결한 Multidimensional Protein Identification Technology(MudPIT)²⁰ 방법을 이용하여 실행하였다. 하지만 앞선 연구자들의 비교에 의하면 강 양이온 교환 컬럼은 해상도가 낮고 특정 분석 시간대에 시료가 한꺼번에 용출되는 현상이 많다.¹³ 따라서 이차원 액체 크로마토그래피 분석의 첫 번째 컬럼에 사용하게 되면 한 펩타이드가 1차원 분석의 여러 분획에 걸쳐 동정되는 현상을 쉽게 찾아 볼 수 있고, 또한 특정 한 분획에서 동정된 단백질이 전체의 60% 이상을 차지하고 다른 분획에서는 동정된 단백질이 거의 없는 예를 확인 할 수 있다.¹³ 이런 현상은 강 양이온 교환 컬럼-역상 컬럼을 이용한 2차원 액체 크로마토그래피 방법이 1차원 액체 크로마토그래피 방법 보다는 효과적으로 단백질 동정에 이용될 수 있지만, 개선의 여지가 큼을 보여준다. 이런 문제점을 보완하기 위하여 나온 방법이 역상-역상 컬럼을 이용한 2차원 액체 크로마토그래피이다. 이 방법은 강 양이온 교환 컬럼보다 높은 분리도를 나타내고 특정 분석 시간대에 시료가 한꺼번에 용출되는 현상이 적어 높은 분리능을 보이는 역상 컬럼을 서로 다른 이동상 pH 조건을 이용하여 2차원 분석하는 방법이다. 따라서, 역상-역상 컬럼을 이용하여 강 양이온 교환 컬럼-역상 컬럼을 이용한 방법의 단점인 한 펩타이드가 1차원 분석(강 양이온 교환 컬럼)시 여러 분획에 걸쳐 동정되는 현상을 줄여서 전체 검출된 펩타이드의 수를 15%, 단백질의 수는 30% 증가시킨 논문이 보고되었다.¹³ 하지만 이 논문에서 이용한 역상-역상 이차원 액체 크로마토그래피 방법은 오프라인(off line) 방식이므로, 1차원 분석에 의해 나온 분획들을 모아 건조시킨 후에 다시 두 번째 역상 컬럼에 넣어주게 되는데, 이 과정에서 시료 손실이 생길

수 밖에 없다. 본 실험에서는 이를 극복하기 위하여 두 역상 컬럼을 온라인(on-line)으로 연결한 후 첫 번째 역상 컬럼에서 분리된 시료를 직접 두 번째 역상 컬럼으로 보내어 분리하는 역상-역상 2차원 액체 크로마토그래피를 이용하였다. 이 방법은 오프라인 방식과는 달리 특수하게 조합된 2개의 펌프가 필요하다(Fig. 1). 시료를 컬럼에 부착시킨 후 첫 번째 역상컬럼에서 분리한 펩타이드는 높은 pH의 ACN용액이므로 두 번째 역상컬럼에 부착하기 전 트랩 컬럼에서 2번 펌프 유속의 10배 유속으로 흘려서, ACN의 농도를 희석시켜 주는데, 이렇게 희석을 시켜주지 않으면 높은 ACN을 포함하고 있기 때문에 펩타이드가 트랩컬럼에 붙지 않게 되니 주의해야 한다.

앞선 연구자들이 여러 단백질 시료를 이용하여 2차원 액체 크로마토그래피 방법을 소개하였다.⁹⁻¹³ 일반적으로 표준 단백체를 이용하여 2차원 액체 크로마토그래피 방법의 효과를 확인하고 실제 분석하려는 세포주, 혈청 등의 시료를 분석하는 방법으로 실제 시료의 1차원 액체 크로마토그래피 방법과 오프라인 2차원 액체 크로마토그래피 방법을 비교하는 실험을 실시하였다.^{10-13,15} 그 중에서도 표준 단백질인 *E. coli* 단백질 추출물을 이용하여 실험한 예가 많이 있다.¹³ 표준 단백질인 *E. coli* 단백질 추출물은 규격화된 단백질 시료이므로 전처리가 잘 되어 있어, 분석 시 기나 컬럼에 문제를 야기시키지 않으며, 따라서 여러 가지 조건을 확인하는 실험을 진행하는 데 유용하게 사용된다.

2차원 액체 크로마토그래피 분석에 있어 시료를 첫 번째 컬럼에서 몇 개의 분획으로 나누어 분석해야 하는지는 매우 중요하다. 분획이 너무 적으면 효과적으로 분리되지 않아 결과적으로 많은 펩타이드를 검출하기 어렵고, 분획이 너무 많으면 분석에 소요되는 시간이 너무 길어진다. 가능한 많은 펩타이드를 검출 하면서 시간을 최소화하는 분획의 수를 결정하기 위하여 이전 연구자들의 결과에 의하면,²¹ 1차원 액체 크로마토그래피 방법과 5개의 분획으로 분리하여 검출된 펩타이드의 수를 확인하면 5개의 분획으로 분리하였을 때 펩타이드 수가 2.1배 증가하였다. 하지만 5개의 분획으로 분리하였을 때와 10개의 분획으로 분리하였을 때의 펩타이드 수를 확인하면 10개의 분획으로 분리하였을 때 시간은 2배가 들었지만 펩타이드의 수는 고작 10% 증가하는데 그친다. 따라서, 본 실험에서는 효과적인 분석을 위해 표준 단백질인 *E. coli* 단백질 추출물을 5개의 분획으로 분리한 온라인 역상-역상 이차원 액체 크로마토그래피 방법으로 분석하였고, 이 방법을 실제 시료인 간 조직 유래 일차세포 분석에 적용하였다.

E. coli 추출 단백질을 1차원, 2차원 액체 크로마토그래피 분리방법을 이용하여 분석하였다(Fig. 2a, b). 1차원 액체 크로마토그래피 방법(Fig. 2a)으로 120분 동안 데이터를 얻었고, 2차원 액체 크로마토그래피 방법(Fig. 2b)으로 각 분획마다 80분 동안 데이터를 얻었다. 첫 번째 역상 컬럼의 계단식 이동상 조성(11%, 21%, 28%, 37%, 45%)별로 얻어진 결과에서 28%에서 가장 많

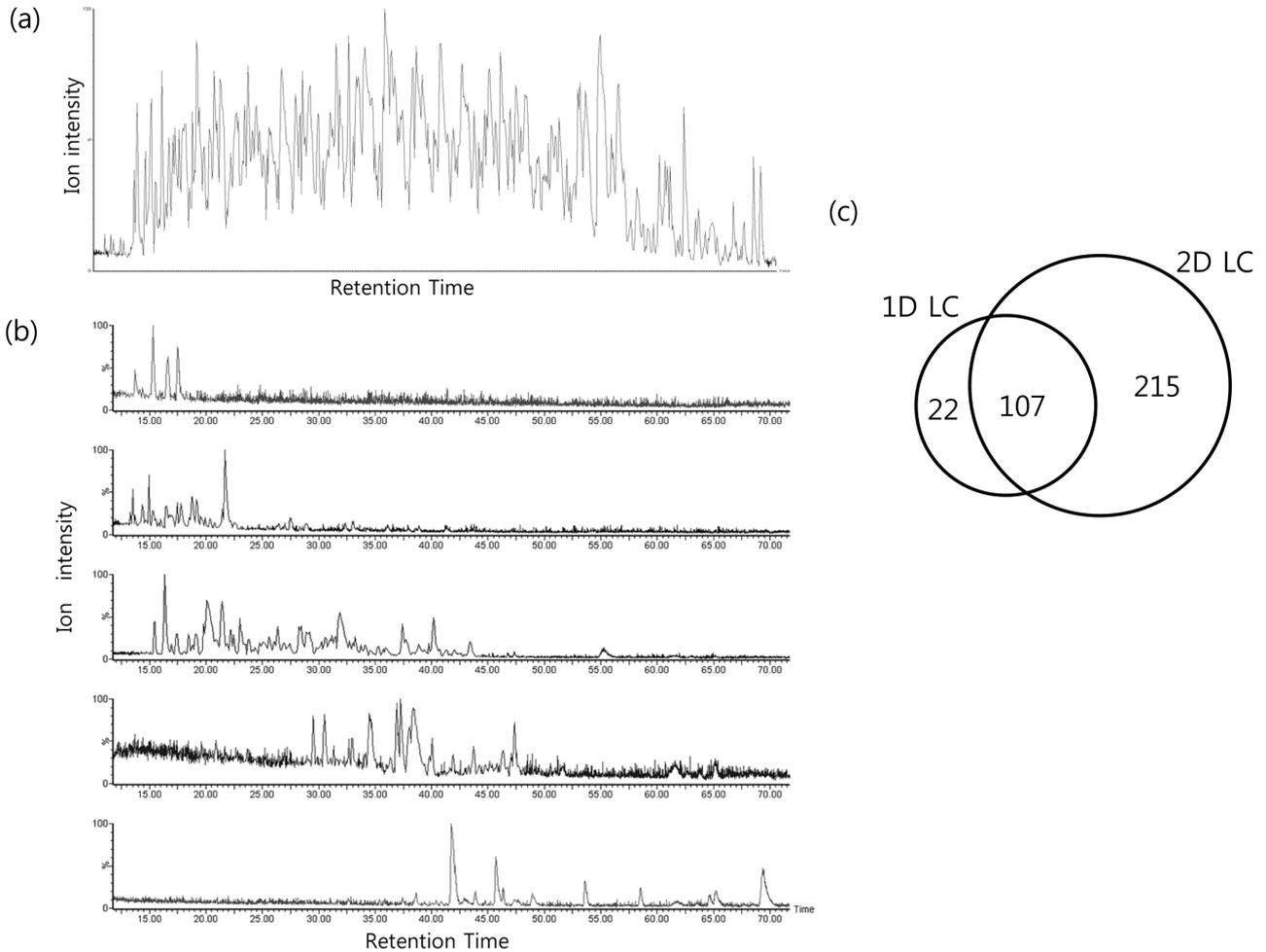


Fig. 2 – Separation of tryptic peptides from *E. coli* protein extracts by 1-D and 2-D LC. (a) *E. coli* extracts separated by 1-D LC, (b) *E. coli* extracts separated by 2-D LC. Fraction: F1, 11% (ACN/H₂O); F2, ACN 21% (ACN/H₂O); F3, ACN 28% (ACN/H₂O); F4, 37% (ACN/H₂O); F5, 45% (ACN/H₂O). (c) *E. coli* extracts identified using 1-D and 2-D LC.

은 이온 피크가 검출되었다. 이온 피크 검출은 11%(Fig. 2b 첫 그림)에서 이동상 농도가 높아질수록 늦은 시간에 시작 되었고, 45%(Fig. 2b 다섯 번째 그림)에서는 거의 검출 되지 않았다.

액체 크로마토그래피로 분리하여 질량분석기에서 얻은 결과를 Mascot 프로그램을 이용하여 단백질을 동정하였다. *E. coli* 추출 단백질을 1차원 액체 크로마토그래피로 분리 하였을 때 129개의 단백질을 동정 하였다. 2차원 액체 크로마토그래피에서는 첫 번째 역상 컬럼에서 분리된 5개의 분획(이동상 ACN 농도 11%, 21%, 28%, 37%, 45%, Fig. 2b 위에서부터)에서 각각 48, 104, 180, 116, 78개의 단백질을 동정하였다. 전체 동정된 526개의 단백질 중 한 분획에서만 동정된 단백질이 182개, 두 분획에서 동시에 동정된 단백질이 79개, 세 개의 분획에서 동정된 단백질이 58개, 네 개의 분획에서 동정된 단백질이 3개였다. 중복 되지 않는 322개의 단백질을 1차원 액체 크로마토그래피에서 동정된 단백질과 비교 하였을 때 107개의 단백질이 공통으로 동정되었고

2차원 액체 크로마토그래피에서만 동정된 단백질이 215개가 동정되었다(Fig. 2c).

쥐의 간 조직 유래 일차 세포 단백질 동정

간 조직 유래 세포는 약물의 간독성 등을 판단하는데 종종 이용된다.^{22,23)} 이전 연구에서 여러 가지 방법으로 쥐의 간 조직 유래 세포를 분석하여 약물의 간 독성 평가에 이용하였지만,^{22,23)} 질량 분석기를 이용한 단백질 수준 연구의 예는 많지 않다.^{24,25)} 특히 1차원 액체 크로마토그래피와 질량분석기를 이용하여 간 조직 유래 세포의 단백체를 분석한 결과는 현재까지 발표 된 바 없다. 본 실험에서는 쥐의 간 조직 세포를 분리하여 배양하고 배양한 세포를 용해하여 앞서 확립한 온라인 역상-역상 2차원 액체 크로마토그래피와 질량 분석기를 이용하여 많은 수의 단백질을 동정하여 쥐의 간 조직 세포 단백질의 조성을 확인하였다.

쥐의 간 조직 유래 세포에서 얻은 단백질은 1차원 액체 크로

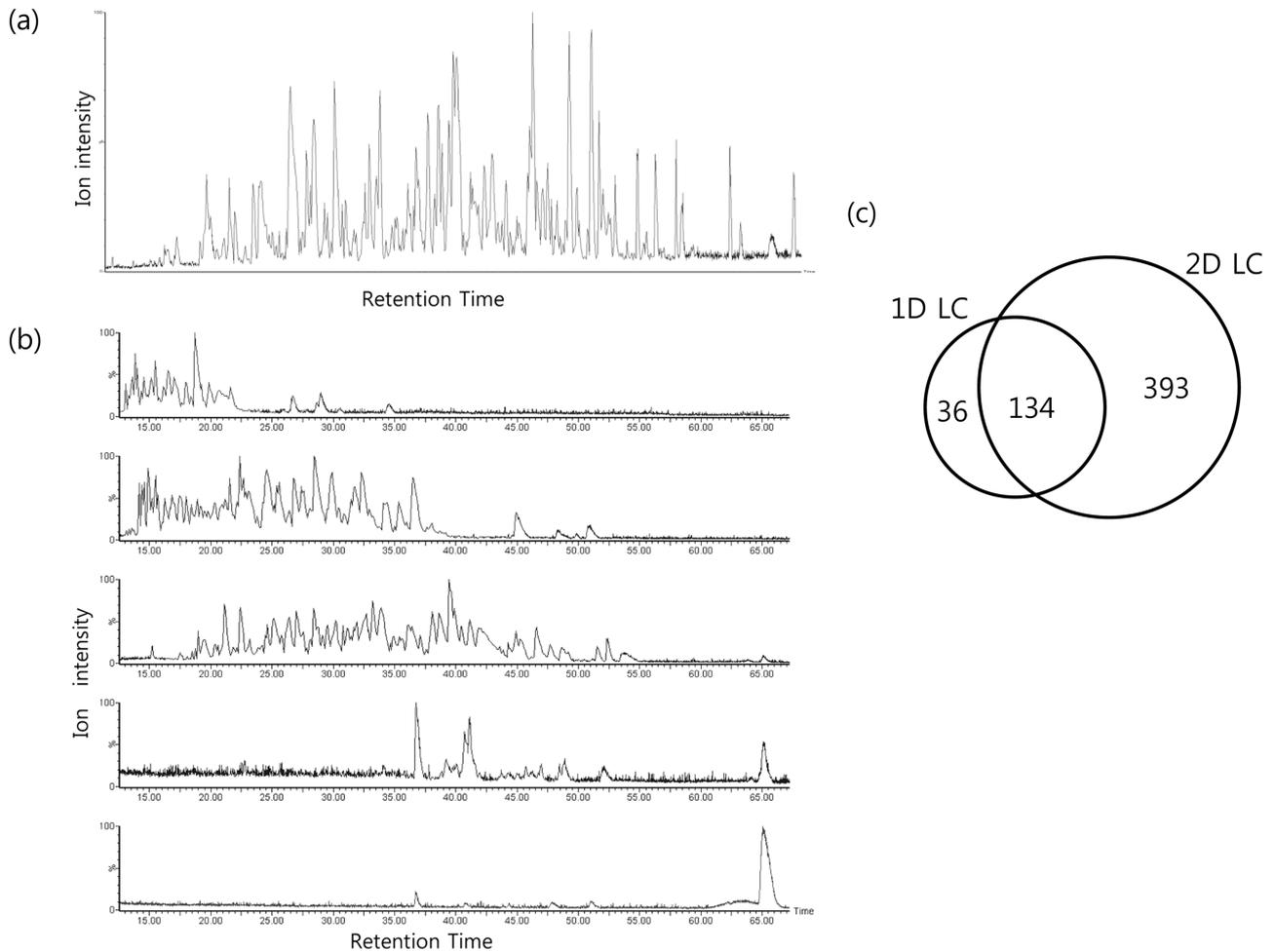


Fig. 3 – Separation of tryptic peptides derived from rat primary hepatocyte proteins by 1-D and 2-D LC. (a) Separation pattern generated by 1-D LC, (b) Separation pattern generated by 2-D LC. Fraction: F1, 11% (ACN/H₂O); F2, ACN 21% (ACN/H₂O); F3, ACN 28% (ACN/H₂O); F4, 37% (ACN/H₂O); F5, 45% (ACN/H₂O). (c) Numbers of proteins identified by 1-D LC and 2-D LC method shown as Venn diagrams.

마토그래피 방법(Fig. 3a)으로 120분 동안 데이터를 얻었고, 2차원 액체 크로마토그래피 방법(Fig. 3b)으로 각 분획마다 80분 동안 데이터를 얻었다. 첫 번째 역상 컬럼의 계단식 이동상 조성(11%, 21%, 28%, 37%, 45%, Fig. 3b 위에서부터)으로 분석하였다. 이때 21%와 28%에서 가장 많은 이온 피크가 검출되었다. 첫 번째 역상 컬럼의 이동상 ACN 농도에 따라 두 번째 역상컬럼에서 검출된 이온 피크의 검출 시간이 지연되는 현상을 볼 수 있다. 이를 통해 첫 번째 역상 컬럼에서 분석 시료가 ACN 농도에 따라 분리 됨을 알 수 있다.

쥐의 간 조직 유래 세포 단백질을 1차원 액체 크로마토그래피 방법으로 분리하였을 때 170개의 단백질이 동정되었고 2차원 액체 크로마토그래피에서 각각의 분획에서 139, 238, 266, 95, 45개의 단백질이 동정되었다. 전체 동정된 783개의 단백질 중 한 분획에서만 동정된 단백질이 331개, 두 분획에서 동시에 동정된 단백질이 137개, 세 개의 분획에서 동정된 단백질이 58개, 네 개

의 분획에서 동정된 단백질이 1개였다. 전체 분획에서 나온 단백질 중 중복된 것을 제외한 최종 동정된 단백질은 527개였다. 1차원, 2차원 분석에서 동시에 동정된 단백질이 134개, 1차원 분석에서 동정하지 못한 단백질 393개가 2차원 분석에서 확인되었다(Fig. 3c). 한 가지 예로써, 2차원 분석에서만 동정된 단백질 중 약물의 반응에 중요한 역할을 하는 microsomal glutathione S-transferase 1(IP100230889)의 두 펩타이드 VFANPEDCAGFGK(Fig. 4a), MMFLSSATAFQRL(Fig. 4b)을 MS/MS 스펙트라와 토막 이온 리스트를 보였다. 2차원 분석에서 검출된 펩타이드는 2,962개로 중복된 174개의 펩타이드를 제외하면 2,606개의 펩타이드를 동정하였다. 첫 번째 역상 컬럼 분석에서 이동상의 ACN 농도에 따른 분획별로 423, 785, 961, 304, 133개의 펩타이드가 검출되었다(Fig. 5a). 검출된 전체 펩타이드 중 하나의 펩타이드가 5개의 분획 중 몇 개의 분획에서 검출되었는지를 확인하였을 때 99% 이상의 펩타이드가 하나의 분획에서만 동정되었고

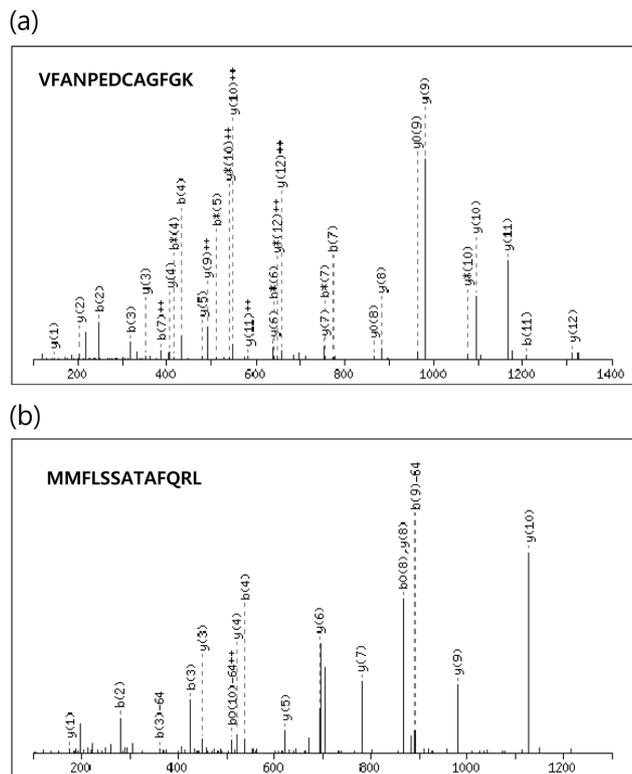


Fig. 4 – Spectrum generated by Mascot for microsomal glutathione S-transferase 1 (IPI00230889). (a) Peptide sequence of VFANPEDCAGFGK and (b) peptide sequence of MMFLSSATAFQRL.

1% 미만의 펩타이드만이 2개 이상의 분획에서 중복으로 동정되었다(Fig. 5b). 앞서 밝힌 강 이온 교환-역상 컬럼의 단점인 강 이온 교환 컬럼의 낮은 해상도 때문에 분석 물질이 첫 번째 컬럼 분석의 여러 분획에 분할되어 나와 전체 동정 할 수 있는 단백질 양이 줄어드는 현상이 본 실험에서는 거의 보이지 않았다. 그러므로 1차원 분석에서 동정 할 수 없었던 393개의 단백질이 2차원 분석에서 확인 할 수 있었다.

2차원 액체 크로마토 그래피 방법으로 분석된 결과는 동정된 단백질 수 뿐만 아니라 단백질 동정에 이용된 펩타이드 수도도 큰 차이를 보였다(Table I). 1차원 분석에서 가장 낮은 수준의 정확도를 가진 2개의 펩타이드로 동정된 Serine hydroxymethyltransferase, Thiosulfate sulfotransferase 같은 단백질은 2차원 분석에서 7개와 9개의 펩타이드로 각각 동정되었다. 1차원 분석에서 동정된 단백질 중 단백질 스코어 순서로 30위 이고 10개의 펩타이드로 동정된 ATP synthase subunit alpha 는 2차원 분석에서 17개의 펩타이드로 동정되었고, 1차원 분석에서 가장 많은 52개의 펩타이드로 동정된 Carbamoyl-phosphate synthase도 2차원 분석에서 98개의 펩타이드로 동정되었다. 특히 Succinate dehydrogenase 같은 경우에는 1차원 분석에서는 1개의 펩타이드로부터 결과를 얻어 단백질 동정 조건에 부합 하지 못했다. 그

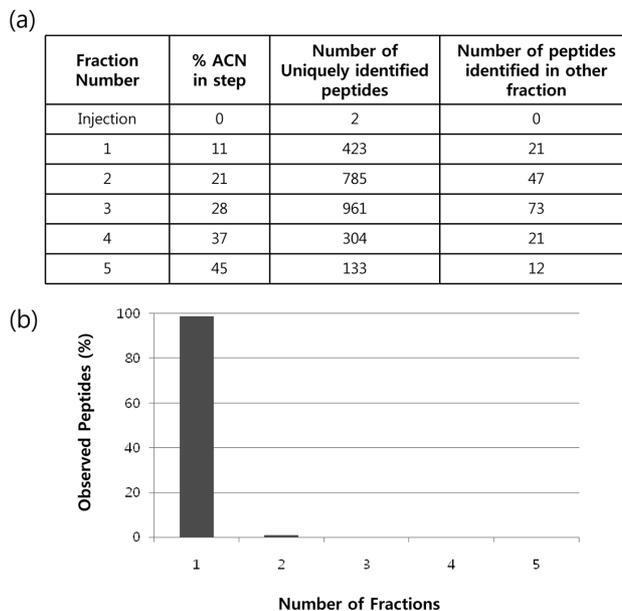


Fig. 5 – Observed peptides splitting for the 2-D LC fraction analyses. (a) Peptide sequencing results from MS data of a set of RP/RP 2D LC-MS/MS chromatograms, (b) peptide splitting for the 2-D LC fraction analyses.

Table I – Number of peptides of representative proteins identified by 1-D LC and 2-D LC method

Protein mane	Accession No.	Number of identified peptides	
		1-D	2-D
Succinate dehydrogenase	IPI00200659	1	4
Serine hydroxymethyltransferase	IPI00195109	2	7
Thiosulfate sulfurtransferase	IPI00366293	2	9
ATP synthase subunit alpha	IPI00396910	10	17
Carbamoyl-phosphate synthase	IPI00210644	52	98

러나 2차원 분석에서는 4개의 펩타이드로부터 동정되어 의미 있는 결과로 얻을 수 있었다. 99% 이상의 펩타이드가 하나의 분획에서만 동정 되었고 1% 미만의 펩타이드만이 2개 이상의 분획에서 중복으로 동정된 것과 단백질 동정에 사용된 펩타이드의 수가 증가하였기 때문에 1차원 분석에 비해 2배 이상의 단백질이 2차원 분석에서 동정되었다.

쥐의 간 조직 유래 세포 단백질의 세포내 위치 및 생물학적 작용에 따른 분류

쥐의 간 조직 유래 세포 단백질을 두 가지 방법으로 분리하여 동정된 단백질을 DAVID 소프트웨어¹⁹⁾를 이용하여 세포내 위치를 확인하였다. 1차원 분석에서 동정된 단백질 중 129개의 DAVID¹⁹⁾ 분석결과를 얻을 수 있었다. 그 중 mitochondrion이 가장 많은 61개 였고 cytosol(22) endoplasmic reticulum(17), microsome(13), nucleoid(7), intermediate filament(6), micro-

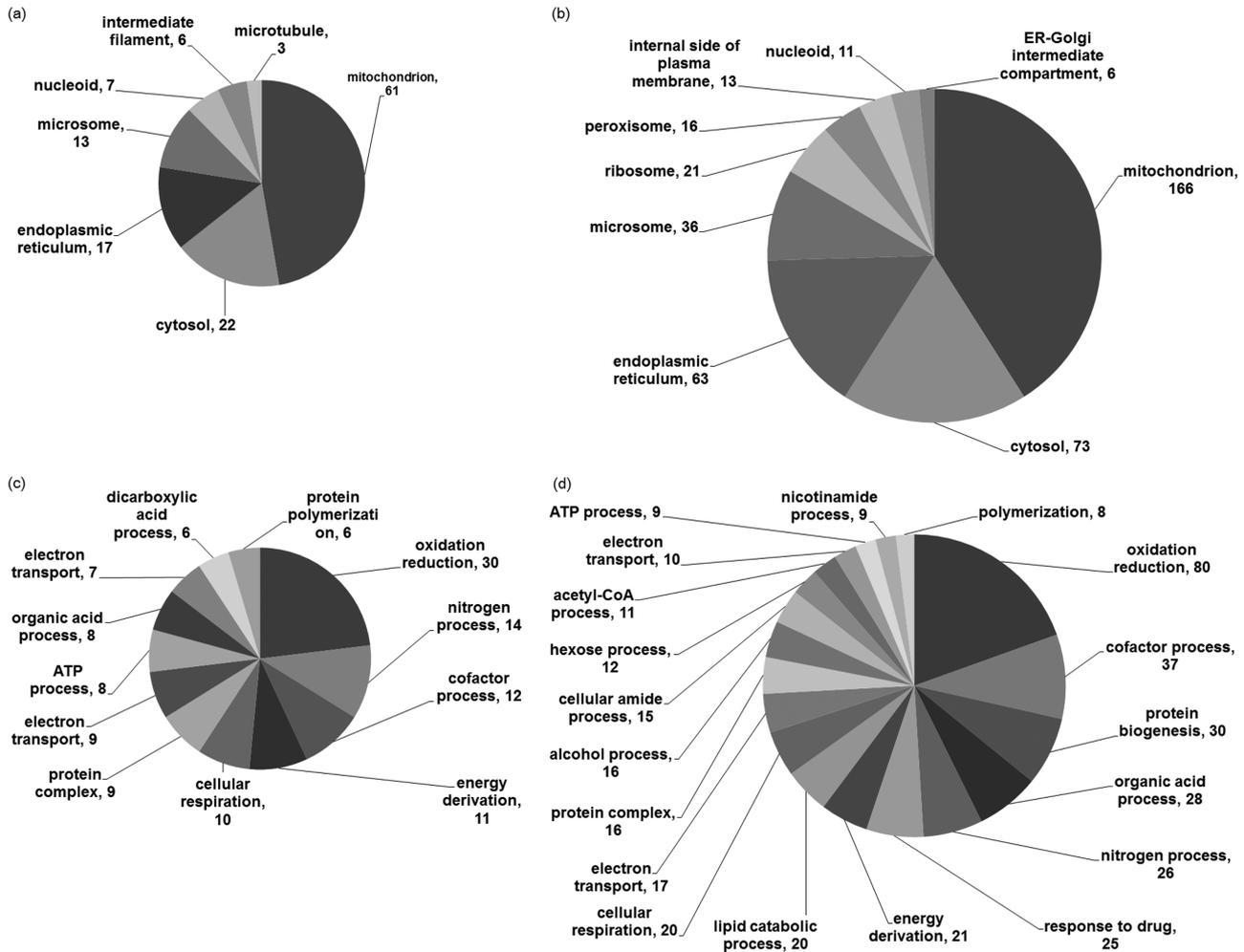


Fig. 6 – Analysis of proteins identified by two LC methods. The categories of proteins based on their cellular composition (a, b) and biological process (c, d) by the Gene Ontology annotations. (a), (c) rat primary hepatocyte identified using 1-D LC, (b), (d) rat primary hepatocyte identified using 2-D LC method.

tubule(3) 순서로 나타났다(Fig. 6a). 2차원 분석에서는 405개의 세포내 위치를 확인할 수 있었고 mitochondrion이 가장 많은 166개 이었다. Cytosol(73), endoplasmic reticulum(63), microsome(36), ribosome(21), peroxisome(16), internal side of plasma membrane(13), nucleoid(11), ER-Golgi intermediate compartment(6) 순서로 나타났다(Fig. 6b). 전체적으로 1차원 분석과 2차원 분석을 비교하였을 때 mitochondrion 단백질은 47%, 41%였고, cytosol 단백질은 17%, 18%였다. 그 외 다른 세포내 위치들도 두 분석 방법에서 비율에서는 큰 차이를 보이지는 않았지만 수적인 면에서 차이가 컸다. 또한 1차원 분석에서는 나오지 않은 ribosome, peroxisome, internal side of plasma membrane, nucleoid, ER-Golgi intermediate compartment에 속하는 단백질이 2차원 분석에서 동정되었다.

같은 방법으로 동정된 단백질의 생물학적 작용에 따라 분류를 하였다. 1차원 분석에서 동정된 단백질 중 130개의 DAVID¹⁹⁾ 생

물학적 작용 카테고리에 속하는 결과를 얻을 수 있었다. 그 중 oxidation reduction이 가장 많은 30개였고 nitrogen compound biosynthetic process(14), cofactor metabolic process(12) energy derivation by oxidation of organic compounds(11), cellular respiration(10), cellular protein complex assembly(9), electron transport chain(9), ATP metabolic process(8), carboxylic acid catabolic process(8), respiratory electron transport chain(7), dicarboxylic acid metabolic process(6), protein polymerization(6) 순서로 나타났다(Fig. 6c). 2차원 분석에서는 407개의 생물학적 작용을 확인할 수 있었다. 그 중 oxidation reduction이 가장 많은 80개였고 cofactor metabolic process(37), protein complex biogenesis(30), organic acid catabolic process(28) nitrogen compound biosynthetic process(26), response to drug(25), energy derivation by oxidation of organic compounds(21), lipid catabolic process(20), cellular

respiration(17), electron transport chain(17), cellular protein complex assembly(16), alcohol catabolic process(16), cellular amide metabolic process(15), hexose catabolic process(12), acetyl-CoA catabolic process(11), respiratory electron transport chain(10), ATP metabolic process(9), nicotinamide nucleotide metabolic process(9), protein polymerization(8) 순서로 나타났다(Fig. 6d). 1차원 분석과 2차원 분석에서 얻어진 생물학적 작용을 비교하였을 때 oxidation reduction이 1차원 분석에서 23%, 2차원 분석에서 20%였고, cofactor metabolic process는 각각 9%로 나왔다. 1차원 분석에서는 나오지 않은 protein complex biogenesis, lipid catabolic process, cellular lipid catabolic process, alcohol catabolic process, cellular amide metabolic process, hexose catabolic process, acetyl-CoA catabolic process, nicotinamide nucleotide metabolic process의 카테고리에 속하는 단백질들이 2차원 분석에서만 동정되었다. 특히 response to drug 카테고리의 단백질을 1차원 분석에서는 하나도 동정할 수 없었지만 2차원 분석에서는 microsomal glutathione S-transferase 1(Fig. 4), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase, ATP-binding cassette, NADH-ubiquinone oxidoreductase, UDP glucuronosyltransferase 1 family, acetyl-Coenzyme A carboxylase beta, acyl-CoA synthetase long-chain family, acyl-Coenzyme A dehydrogenase, aldolase B, argininosuccinate synthetase, cadherin, carbamoyl-phosphate synthetase, coproporphyrinogen oxidase, defender against cell death, glutathione S-transferase, hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, 3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase, enoyl-Coenzyme A hydratase(trifunctional protein), lactate dehydrogenase A, Heat shock protein 60, superoxide dismutase, ubiquinol-cytochrome c reductase를 포함하는 총 25개의 단백질을 동정하였다. 약물 독성 평가 등에 이용하기 위해 간의 조직 유래 세포의 단백질을 분석할 때 2차원 액체 크로마토그래피 분리 방법을 이용하면 관련되는 인자를 1차원 분석에 비해 많이 찾을 수 있음을 보여준다.

결론

본 연구에서는 *E. coli* 추출 단백질과 쥐의 간 조직 유래 세포 단백질을 1차원과 2차원 액체 크로마토그래피를 이용하여 분리하고 질량분석기로 분석하여 2차원 역상-역상 컬럼 크로마토그래피가 단백질 분석에 적합함을 보였다. 본 실험은 세포주를 이용하여 온라인 2차원 역상-역상 컬럼 크로마토그래피로 분석하는 최초의 논문이다. *E. coli* 추출 단백질을 분석하였을 때 1차원, 2차원 분석에서 129, 322개의 단백질이 동정되었고 쥐의 간 조직 유래 세포의 단백질에서 170, 527개의 단백질이 동정되었

다. 쥐의 간 조직 유래 세포의 단백질을 동정하기 위해 사용된 펩타이드를 확인한 결과 2,606개 이었고 전체 99% 이상의 펩타이드가 첫 번째 역상 컬럼의 5 분획 중 하나에서만 검출되었고, 동일하게 동정된 단백질들에서도 2차원 분석에서 더 많은 펩타이드로부터 동정됨을 확인하였다. 전체적으로 1차원 분석에서 동정되지 않은 393개의 단백질이 2차원 분석에서만 확인되었다. 이는 약물 독성 평가 등의 간 조직 유래 세포의 단백질 분석에 적용하면 1차원 분석에서 검출되지 않는 대량의 단백질 군을 이용하여 폭넓은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 식품의약품안전청(과제번호 09172응용연641) 및 2010년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구임(지역거점 연구단육성사업/노화극복 웰빙을 위한 융합의료기술개발사업단).

참고문헌

- Adkins, J. N., Monroe, M. E., Auberry, K. J., Shen, Y., Jacobs, J. M., Camp, D. G., 2nd, Vitzthum, F., Rodland, K. D., Zangar, R. C., Smith, R. D. and Pounds, J. G. : A proteomic study of the HUPO Plasma Proteome Project's pilot samples using an accurate mass and time tag strategy. *Proteomics*. **5**, 3454 (2005).
- Eriksson, J. and Fenyo, D. : Protein identification in complex mixtures. *J. Proteome. Res.* **4**, 387 (2005).
- Wolters, D. A., Washburn, M. P. and Yates, J. R., 3rd : An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **73**, 5683 (2001).
- Shen, Y., Zhang, R., Moore, R. J., Kim, J., Metz, T. O., Hixson, K. K., Zhao, R., Livesay, E. A., Udseth, H. R. and Smith, R. D. : Automated 20 kpsi RPLC-MS and MS/MS with chromatographic peak capacities of 1000-1500 and capabilities in proteomics and metabolomics. *Anal. Chem.* **77**, 3090 (2005).
- Echan, L. A., Tang, H. Y., Ali-Khan, N., Lee, K. and Speicher, D. W. : Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics*. **5**, 3292 (2005).
- Gilar, M., Olivova, P., Daly, A. E. and Gebler, J. C. : Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *J. Sep. Sci.* **28**, 1694 (2005).
- Masuda, J., Maynard, D. M., Nishimura, M., Ueda, T., Kowalak, J. A. and Markey, S. P. : Fully automated micro- and nanoscale one- or two-dimensional high-performance liquid chromatography system for liquid chromatography-mass spectrometry compatible with non-volatile salts for ion exchange chromato-

- graphy. *J. Chromatogr. A* **1063**, 57 (2005).
- 8) Omenn, G. S., States, D. J., Adamski, M., Blackwell, T. W., Menon, R., Hermjakob, H., Apweiler, R., Haab, B. B., Simpson, R. J., Eddes, J. S., Kapp, E. A., Moritz, R. L., Chan, D. W., Rai, A. J., Admon, A., Aebersold, R., Eng, J., Hancock, W. S., Hefta, S. A., Meyer, H., Paik, Y. K., Yoo, J. S., Ping, P., Pounds, J., Adkins, J., Qian, X., Wang, R., Wasinger, V., Wu, C. Y., Zhao, X., Zeng, R., Archakov, A., Tsugita, A., Beer, I., Pandey, A., Pisano, M., Andrews, P., Tammen, H., Speicher, D. W. and Hanash, S. M. : Overview of the HUPO plasma proteome project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics*. **5**, 3226 (2005).
 - 9) Toll, H., Oberacher, H., Swart, R. and Huber, C. G. : Separation, detection, and identification of peptides by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry at high and low pH. *J. Chromatogr. A* **1079**, 274 (2005).
 - 10) Weatherly, D. B., Atwood, J. A., 3rd, Minning, T. A., Cavola, C., Tarleton, R. L. and Orlando, R. : A Heuristic method for assigning a false-discovery rate for protein identifications from Mascot database search results. *Mol. Cell. Proteomics*. **4**, 762 (2005).
 - 11) Zolotarjova, N., Martosella, J., Nicol, G., Bailey, J., Boyes, B. E. and Barrett, W. C. : Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *Proteomics*. **5**, 3304 (2005).
 - 12) Peng, J., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Licklider, L. J. and Gygi, S. P. : Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J. Proteome. Res.* **2**, 43 (2003).
 - 13) Gilar, M., Olivova, P., Chakraborty, A. B., Jaworski, A., Geromanos, S. J. and Gebler, J. C. : Comparison of 1-D and 2-D LC MS/MS methods for proteomic analysis of human serum. *Electrophoresis* **30**, 1157 (2009).
 - 14) Dowell, J. A., Frost, D. C., Zhang, J. and Li, L. : Comparison of two-dimensional fractionation techniques for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **80**, 6715 (2008).
 - 15) Nakamura, T., Kuromitsu, J. and Oda, Y. : Evaluation of comprehensive multidimensional separations using reversed-phase, reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry for shotgun proteomics. *J. Proteome. Res.* **7**, 1007 (2008).
 - 16) Schley, C., Altmeyer, M. O., Swart, R., Muller, R. and Huber, C. G. : Proteome analysis of *Myxococcus xanthus* by off-line two-dimensional chromatographic separation using monolithic poly-(styrene-divinylbenzene) columns combined with ion-trap tandem mass spectrometry. *J. Proteome. Res.* **5**, 2760 (2006).
 - 17) Figliomeni, M. L. and Abdel-Rahman, M. S. : Ethanol does not increase the hepatotoxicity of cocaine in primary rat hepatocyte culture. *Toxicology* **129**, 25 (1998).
 - 18) Han, C. L., Chien, C. W., Chen, W. C., Chen, Y. R., Wu, C. P., Li, H. and Chen, Y. J. : A multiplexed quantitative strategy for membrane proteomics: opportunities for mining therapeutic targets for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol. Cell. Proteomics*. **7**, 1983 (2008).
 - 19) Dennis, G., Jr, Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C. and Lempicki, R. A. : DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome. Biol.* **4**, P3 (2003).
 - 20) Washburn, M. P., Wolters, D. and Yates, J. R. 3rd. : Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242 (2001).
 - 21) Liu, H., Li, G. Finch, J. W., Geromanos, S. J. and Gebler, J. C. : Development of an Automated RP/RP 2D Nano LC/MS Method for Proteomic Analysis. ABRF P57-T (2007).
 - 22) Bargagli, E., Penza, F., Vagaggini, C., Magi, B., Perari, M. G. and Rottoli, P. : Analysis of carbonylated proteins in bronchoalveolar lavage of patients with diffuse lung diseases. *Lung*. **185**, 139 (2007).
 - 23) Korolainen, M. A., Nyman, T. A., Nyyssonen, P., Hartikainen, E. S. and Pirttila, T. : Multiplexed proteomic analysis of oxidation and concentrations of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer disease. *Clin. Chem.* **53**, 657 (2007).
 - 24) Beigel, J., Fella, K., Kramer, P. J., Kroeger, M. and Hewitt, P. : Genomics and proteomics analysis of cultured primary rat hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* **22**, 171 (2008).
 - 25) Rowe, C., Goldring, C. E., Kitteringham, N. R., Jenkins, R. E., Lane, B. S., Sanderson, C., Elliott, V., Platt, V., Metcalfe, P. and Park, B. K. : Network analysis of primary hepatocyte dedifferentiation using a shotgun proteomics approach. *J. Proteome. Res.* **9**, 2658 (2010).