

## 바이오패닝에 의한 $Pb^{2+}$ 친화성 펩타이드 서열의 탐색

Thuong T. L. Nguyen<sup>1</sup>, 홍순호<sup>1</sup>, 최우석<sup>2</sup>, 유익근<sup>1\*</sup>

## Screening of Peptide Sequences Cognitive of $Pb^{2+}$ by Biopanning

Thuong T. L. Nguyen<sup>1</sup>, Soon Ho Hong<sup>1</sup>, Woo-Seok Choe<sup>2</sup>, and Ik-Keun Yoo<sup>1\*</sup>

접수: 2013년 1월 31일 / 게재승인: 2013년 6월 25일  
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** For the selection of peptide specifically binding to  $Pb^{2+}$ , the biopanning with the commercially available Ph.D.-7 phage displayed heptapeptide library was carried out against  $Pb^{2+}$  immobilized on a metal-chelating IDA (iminodiacetic acid) resin. After four rounds of screening against  $Pb^{2+}$ -IDA including negative selections against charged bead with metal ions other than  $Pb^{2+}$  and uncharged bead, several candidate lead-binding phage peptides were initially determined based on the order of frequency from the screened phage clones. Of the selected phage peptide sequences, the peptide of the highest frequency, CysSerIleArgThrLeuHisGlnCys (CSIRTLHQC) also exhibited the strongest affinity for  $Pb^{2+}$  in binding assays for individual phage clones. However, there was not a significant difference in  $Pb^{2+}$  affinity between selected peptides when using synthetic heptapeptides corresponding to the displayed peptide sequences of phage clones.

**Keywords:** Peptide, Biosorbent, Biopanning,  $Pb^{2+}$

### 1. 서론

납은 장기간에 걸쳐 생체 조직에 축적되며 특히 수은, 카드뮴과 함께 내분비계 장애물질 중의 하나로 지목되는 중금속으로, 매우 낮은 농도에서도 높은 독성을 가지고 있다. 수중 및 토양에 존재하는 미량의 납 이온을 탐지, 분석하기 위해 원자흡광분석법 (AAS), 유도결합플라즈마 분광법 (ICP)과 같은 분광학적 방법들이 이용되고 있는데, 시료의 전처리가 필요하거나 고가의 장비가 요구되는 단점이 있다 [1]. 따라서 간단하고 비용이 적게 들면서 실시간으로 측정이 가능한 방법의 개발이 요구되고 있다. 오염된 환경에서의 납 제거는 이온교환, 응집, 흡착과 같은 전통적인 물리화학적 기술이 주로 이용된다 [2-4]. 일반적으로 이온교환은 처리비용이 비교적 고가인 문제점이 있고, 응집/흡착은 흡착제의 투입량 대비 낮은 제거효율로 2차 폐기물 발생량이 많고 농도가 낮을수록 효율이 떨어지는 단점이 있다. 미생물을 활용한 생흡착 및 식물정화법 (phytoremediation) 등의 생물학적 방법도 활발히 연구되고 있는데, 물리화학적 재료에 비해 비용이 저렴하고 낮은 농도에서도 효율적인 편이다. 그러나 이러한 방법들은 간섭물질이 많은 환경에서, 목적하는 특정 중금속의 선택적 제거에는 문제점을 보이고 있다 [5,6].

환경 위해물질로 존재하는 미량 중금속의 탐지, 분석 혹은 제거와 관련된 문제점들을 해결하는 한 방법으로 특정한 표적 물질에 선택적 친화력이 높은 리간드 (ligand)가 탐색되어 왔다. 예를 들어 카드뮴, 아연 등의 중금속에 대한 생물학적 리간드들이 보고되었는데 [7-9], 이러한 리간드들은 다양한 플랫폼의 바이오센서 인지부 혹은 생흡착제의 반응부위로서 응용될 수 있다 [10]. 아미노산 올리고머인 펩타이드 역시 대표적인 생물학적 리간드로서 표적 물질에 선택적 친화력을 보이는 펩타이드 서열들이 알려지고 있다. 펩타이드 서열

<sup>1</sup>울산대학교 화학공학부

<sup>1</sup>School of Chemical Engineering and Bioengineering, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

Tel: +82-52-259-2251, Fax: +82-52-259-1689

e-mail: ikyoo@ulsan.ac.kr

<sup>2</sup>성균관대학교 화학공학부

<sup>2</sup>School of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

의 탐색은 흔히 대장균 혹은 파지 (phage)의 세포표면 디스플레이 (cell surface display)를 적용한 바이오패닝 기법에 의해 수행된다. 바이오패닝은 목적 기질의 선정에 제약을 거의 받지 않고 천문학적 숫자의 다양한 펩타이드 서열의 목적 기질에 대한 친화성을 단시간 내에 탐색할 수 있는 장점이 있어 다양하게 활용되고 있다. 현재까지 중금속에 친화력을 보이는 것으로 알려진 펩타이드 서열로는  $Cd^{2+}$ 에 친화력을 보이는 HisSerGlnLysValPhe (HSQKVF),  $Hg^{2+}$ 에 대한 GlyHis-HisProHisGly (GHHPHG) 서열을 예로 들 수 있다 [11,12].

$Pb^{2+}$ 의 경우 기존의 전통적인 바이오패닝 기법을 이용한 펩타이드의 탐색은 보고되지 않고 있는데, 환경 시료중의  $Pb^{2+}$  인지, 혹은 제거를 위해서 친화력이 높은 펩타이드 서열이 확보되면, 향후 납 인지 센서의 탐지부 혹은 납을 흡착하기 위한 생흡착제 (biosorbent)의 흡착 부위로서 활용될 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는  $Pb^{2+}$ 에 대해 친화력이 높은 펩타이드 서열의 스크리닝을 시도했으며, 파지 표면 디스플레이에 기반한 전통적인 바이오패닝 기법을 이용하였다. 또한  $Pb^{2+}$  이외에 다른 +2가 금속이온 ( $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) 들에 대한 negative 스크리닝을 통해 이전 패닝 라운드에서 탐색된 펩타이드 중에서 다른 금속 이온에 대한 교차 친화성 (cross binding affinity)이 작은 서열을 배제함으로써 선택성이 높은 서열을 탐색하는 전략을 시도하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 생물재료 및 배지

양 말단에 cystein residue를 함유하고 사이에 7개의 무작위 아미노산으로 이루어진 고리형 펩타이드를 M13 파지의 pIII의 부로 발현하도록 구성한 파지 표면 디스플레이 시스템 (Ph.D.-C7C™, phage display peptide library kit, E8120S)은 NEB (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다. 파지 washing 버퍼로는 TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) 및 TBST 버퍼 (TBS + 0.1~0.4% Tween 20)를 이용하였다. 파지 elution 버퍼로는 Tris-imidazole 버퍼 (0.1 M Tris-HCl, 500 mM imidazole, pH 7.5)를 이용하였다. 파지 증폭을 위한 *E. coli* ER2738 (Ph.D.-C7C™) 배양 배지는 12.5 mg/L tetracycline이 첨가된 LB 배지 (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl)를 이용하였고, 파지 증폭용 배지는 5 mM  $MgCl_2$ 를 포함한 2xYT 배지 (16 g/L tryptone, 10 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, pH 7.0)를 이용하였다.

### 2.2. 금속 이온의 IDA 고정화

금속 이온 ( $Pb^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) 용액은 각각 0.2  $\mu$ m 필터로 여과된  $Pb(NO_3)_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $NiCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CoCl_2$ 로부터 준비되었다. 200~400  $\mu$ L의 IDA (iminodiacetic acid) 레진 (Chelating Sepharose Fast Flow, 17-0575-01, GE Healthcare)을 1 mL 증류수로 3회 세척후 1 mL의 금속이온 수용액 (10  $\mu$ M)에 넣고 overnight incubation시켜 IDA에 금속 이온을

고정화한다. 금속 이온이 고정화된 IDA 입자는 1 mL 증류수로 3회 세척후 1 mL TBST 버퍼 (0.1% Tween 20)로 3회 세척한다.

### 2.3. Pre-negative 스크리닝

NEB에서 구입한 1 mL의 파지 라이브러리 ( $2 \times 10^{12}$  virions, library complexity =  $1.2 \times 10^9$ ) 중에서 100  $\mu$ L를 취하여 900  $\mu$ L의 TBS 버퍼에 희석하였다. 1 mL 증류수로 3회 세척하고 금속 이온이 고정화되지 않은 1 mL의 IDA 입자와 파지 용액을 1시간 동안 incubation한 후 10,000 $\times$ g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액에 남아 있는 파지 입자들을 분리하여 증폭시킨 후 titer를 측정하였다. 파지 증폭 및 titering 측정은 NEB 매뉴얼에서 제시된 방법에 따라 실시하였고 파지 titer는 plaque forming unit (pfu)로서 측정되었다 [13].

### 2.4. $Pb^{2+}$ 에 대한 바이오패닝

NEB에서 제공되는 파지 라이브러리의 complexity가  $1.2 \times 10^9$ 이므로 서로 다른 무작위 펩타이드 서열을 패닝 과정에서 서열별로 100 copy 이상 유지할 수 있도록, pre-negative 스크리닝에서 분리, 증폭된 파지의 초기 농도를  $2 \times 10^{11}$  pfu/mL로 조절하였다. 이와 같이 1 mL TBS 버퍼에 녹인 파지 용액을  $Pb^{2+}$ 가 고정화된 200  $\mu$ L의  $Pb^{2+}$ -IDA 입자와 1시간 동안 incubation 하고, 10,000 $\times$ g에서 5분간 원심분리하여  $Pb^{2+}$ 에 흡착되지 않은 파지 입자들을 상등액으로서 제거하였다. 그 다음  $Pb^{2+}$ -IDA 입자를 1 mL TBST 버퍼 (0.1% Tween 20)로 3회 washing하여  $Pb^{2+}$ 에 비선택적으로/약하게 흡착된 파지를 제거하였다. 마지막으로 500 mM imidazole을 함유한 Tris-imidazole 버퍼 1 mL로 10분간 incubation하여  $Pb^{2+}$ -IDA 입자에 흡착된 파지를 탈착 회수함으로써 1라운드의 패닝을 완료하였다. 회수된 파지는 titer를 측정후 증폭하여 다시 파지 농도를  $2 \times 10^{11}$  pfu/mL개로 조정하고 앞에서와 동일한 패닝 프로토콜에 의해서 2라운드의 패닝을 실시한다. 이와 같이  $Pb^{2+}$ -IDA 입자를 이용한 바이오패닝 과정을 총 4라운드에 걸쳐 실시하였다. 각각의 라운드에서 Table 1에서와 같이 washing 버퍼인 TBST에 포함된 Tween 20의 농도를 패닝 라운드가 진행됨에 따라 점차 증가시켰다.

### 2.5. Post-negative 스크리닝

전 단계의 패닝 라운드에서 선별된  $Pb^{2+}$  친화성 파지 입자들 중에서  $Pb^{2+}$ 가 아닌 다른 금속 이온 ( $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ )에 대해 교차 친화성을 가지는 파지를 제거하기 위해 post-negative 바이오패닝을 실시하였다.  $Pb^{2+}$ -IDA 바이오패닝을 거쳐 선별된 파지를 증폭하고 농도를  $2 \times 10^9$  pfu/mL로 조정하여  $Pb^{2+}$  이외의 금속 이온이 각각 고정화된 400  $\mu$ L의 Metal<sup>2+</sup>-IDA 입자와 30분간 incubation하고, 10,000 $\times$ g에서 원심분리하였다. 그리고 상등액으로 분리된 파지를 다시 다른 금속 이온이 고정화된 400  $\mu$ L의 Metal<sup>2+</sup>-IDA 입자와 30분간 incubation하는 식으로 스크리닝을 진행하였다. 마지막으로 5종류의 Metal<sup>2+</sup>-IDA 입자와 incubation을 모두 거친 상등액

**Table 1.** The number of phages in each biopanning round using phage library against Metal<sup>2+</sup>-IDA bead

Round	Target	Washing Buffer Concentration	Initial phages (pfu/mL)	Screened phages (pfu/mL)
1	IDA	-	N.D.	N.D.
2	Pb <sup>2+</sup>	0.1% Tween 20	2×10 <sup>11</sup>	2.1×10 <sup>3</sup>
3	Pb <sup>2+</sup>	0.2% Tween 20	2×10 <sup>11</sup>	1.6×10 <sup>6</sup>
4	Pb <sup>2+</sup>	0.3% Tween 20	2×10 <sup>11</sup>	1.2×10 <sup>6</sup>
5	Pb <sup>2+</sup>	0.4% Tween 20	2×10 <sup>11</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>
6	Ca <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	-	2×10 <sup>9</sup>	2.5×10 <sup>5</sup>

에 포함된 파지의 titer를 측정하였다. Fig. 1에 본 연구에서 진행한 전반적인 바이오패닝 과정을 도시하였다.

**2.6. 펩타이드 서열 분석**

모든 단계를 거쳐 스크리닝된 파지에서 표면에 디스플레이된 펩타이드 서열을 분석하기 위해 200개의 파지 클론을 무작위로 선택하여 각각 증폭하였다. 증폭된 각각의 파지에 대해 QIA M13 kit (Qiagen)를 이용하여 ssDNA를 추출한 후 NEB에서 제공된 -96 gIII sequencing primer를 이용하여 DNA 서열 분석을 의뢰하였다.

**2.7. 개별 파지 펩타이드의 Pb<sup>2+</sup> 친화성 비교**

아미노산 서열 분석이 완료된 200개의 파지 클론 중에서 빈도수가 높게 나타난 5개의 파지를 선별하여 각각 증폭하였다. 각각 증폭된 10<sup>9</sup>개의 파지를 200 µL의 Pb<sup>2+</sup>-IDA 입자와 1 시간 동안 incubation 하고 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이후의 과정은 앞에서 기술한 2.4.절의 과정과 동일하며, 500 mM imidazole을 함유한 Tris-imidazole 버퍼를 이용하여 Pb<sup>2+</sup>-IDA 입자에 흡착된 파지를 탈착 회수하고 파지 titer를 5개 파지 클론 별로 측정하였다.

**2.8. 개별 합성 펩타이드의 Pb<sup>2+</sup> 친화성 비교**

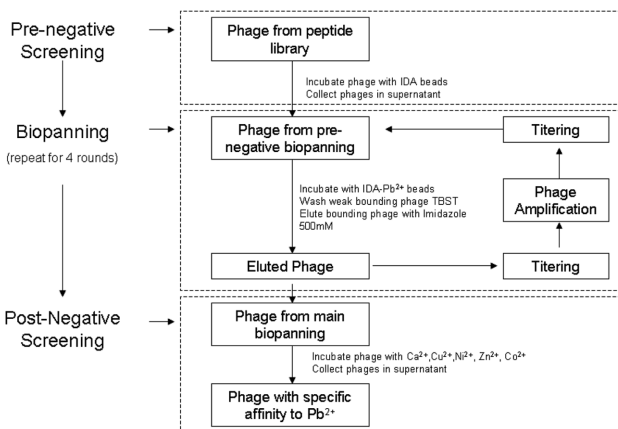
빈도수가 높은 5개의 파지의 펩타이드 서열에 대하여 7-mer 합성 펩타이드 제작을 의뢰하였다. 각각의 합성 펩타이드는 1 mg/mL 농도로 TBS 버퍼에 준비한다. 100 µL의 펩타이드 용액을 200 µL의 Pb<sup>2+</sup>-IDA 입자와 1시간 동안 incubation 하

고, 10,000×g에서 5분간 원심분리하여 Pb<sup>2+</sup>에 흡착되지 않은 펩타이드를 상등액으로 분리하였다. 흡착되지 않은 펩타이드의 양을 측정하기 위해서 fluorescamine 반응을 이용하였다 [14]. 100 µL의 펩타이드 상등액을 96 well plate에 옮기고 fluorescamine (3 mg/mL in acetone) 용액 20 µL와 반응시킨 후, fluorescence intensity를 microplate reader (excitation at 390 nm, emission at 465 nm, SpectraMax M2/M2e, Molecular Devices)에서 측정하였다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. Pb<sup>2+</sup> 친화성 펩타이드의 탐색**

양 말단에 cystein을 함유하고 7개 아미노산으로 구성된 고리형 펩타이드가 M13 표면에 발현된 파지 디스플레이 시스템을 이용하여 Pb<sup>2+</sup>에 선택적 친화성을 나타내는 펩타이드 서열을 탐색하였다. Fig. 1에 본 연구에서 진행한 바이오패닝 라운드 과정을 총괄적으로 나타내었다. 우선 pre-negative 스크리닝을 통해 Pb<sup>2+</sup>가 고정화되지 않은 순수한 IDA와 파지 입자를 접촉시켜 IDA 자체에 친화성을 보이는 파지들을 제거하였다. 이는 표적물질인 Pb<sup>2+</sup>가 아닌, 고정화를 위해 사용되는 IDA 자체에 친화성을 보이는 펩타이드 서열들을 제거하여 이후의 바이오패닝에서 남아만 순수하게 친화성을 보이는 파지를 분별해내기 위해서이다. 이렇게 얻어진 파지는 증폭한 후 농도를 2×10<sup>11</sup> pfu/mL로 조정하였는데 (Table 1), 이는 패닝 과정에서 각 펩타이드 서열별로 최소한 100 copy 이상의 파지가 존재하도록 하여 Pb<sup>2+</sup>를 인지할 수 있는 충분한 수의 파지를 투입하기 위해서이다. Pb<sup>2+</sup>에 대한 패닝은 4 라운드에 걸쳐 실시하여 펩타이드의 스크리닝, 친화력이 없거나 낮은 펩타이드의 제거, 스크리닝된 펩타이드의 증폭 및 재스크리닝 등의 반복적인 패닝 과정을 통해 Pb<sup>2+</sup>에 높은 친화력을 보이는 펩타이드 서열을 선별하였다. 이때 Pb<sup>2+</sup>에 약하게 흡착된 파지를 제거하기 위해 washing 버퍼인 TBST에 포함된 Tween 20의 농도를 라운드가 진행됨에 따라 Table 1에서 정리한대로 0.1~0.4%까지 증가시켰는데, 이는 후반 라운드로 갈수록 Pb<sup>2+</sup>에 강하게 붙은 파지들을 효율적으로 분리하기 위해서이다. 2라운드 후에 파지 titer는 2.1×10<sup>3</sup>개로 스크리닝에 투입된 초기 파지 양에 비해 매우 적은 갯수가 얻어졌는데, 이는 파지 라이브러리 중에서 Pb<sup>2+</sup>에 친화성을 지니는 펩타이드가 제한적임을 나타낸다. 3~5라운드에서 투입되는 파지의 농도도 전 라운드에서 선별된 파지를 증폭하



**Fig. 1.** Overview of biopanning protocol for the selection of specific lead-binding peptides from the phage library.

**Table 2.** Amino acid sequences of Pb<sup>2+</sup> binding peptides obtained from 197 sample phage clones after biopanning

No	Amino acid sequences of peptides	Frequency of each sequence
1	CysProAsnSerProAlaProGlnCys (C PNSPAPQ C)	10
2	CysProThrThrLeuProHisSerCys (C PTTLPHS C)	34
3	CysGlnGlnLeuProArgGlySerCys (C QQLPRGS C)	55
4	CysSerIleArgThrLeuHisGlnCys (C SIRT LHQ C)	78
5	CysProAsnSerArgAspMetLysCys (C PNSRDMK C)	5
6	CysSerSerSerAsnLysThrThrCys (C SSSNKTT C)	2
7	CysMetHisAlaThrArgGlnAspCys (C MHATRQD C)	2
8	CysMetLysSerSerHisIleThrCys (C MKSSHIT C)	1
9	CysSerIleLysAlaLysAlaAlaCys (C SIKAKAA C)	2
10	CysLysHisAlaSerGluArgLeuCys (C KHASERL C)	2
11	CysProSerValThrThrProHisCys (C PSVTTPH C)	1
12	CysAsnAlaHisHisProlleHisCys (C NAHHPIH C)	1
13	CysProProSerGlnArgGlnGlnCys (C PPSQRQQ C)	2
14	CysSerProIleMetProThrLeuCys (C SPIMPTL C)	1
15	CysHisGlyAsnIleProArgMetCys (C HGNIPRM C)	1
Sum		197

여 동일한 양의 파지로 패닝을 시작하여 스크리닝 확률을 일정하게 유지하였고, 이로 인해 3~5라운드의 패닝에서 선별된 파지의 개수는 대체로 ~10<sup>6</sup>개 수준이 유지되었다.

마지막 단계로 Pb<sup>2+</sup> 이외에 다른 +2가 금속이온 (Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>)들에 대한 negative 스크리닝을 통해 이전 라운드에서 탐색된 펩타이드 중에서 Pb<sup>2+</sup>에 대한 선택적 친화성이 높고 다른 금속 이온에 대한 교차 친화성이 작은 서열의 스크리닝을 시도하였다. 이 과정에서는 초기 파지 입자의 숫자를 2×10<sup>9</sup>개로 전단계 패닝 과정에 비해 1/100로 줄였고, 반면에 Me<sup>2+</sup>-IDA bead의 부피는 2배로 함으로써 negative 스크리닝의 효율을 극대화하였다. 즉 파지의 숫자에 비해 Me<sup>2+</sup>-IDA의 양이 늘어나므로 파지가 금속이온과 접촉할 수 있는 기회가 늘어나서, Pb<sup>2+</sup> 이외의 금속에 친화성을 보이는 파지들을 최대한 배제시킬 수 있을 것으로 판단하였다. 1단계의 pre-negative 스크리닝 및 마지막의 post-negative 스크리닝 전략은 현재까지의 전통적인 바이오패닝 문헌들에서 체계적으로 시도되지 않고 있는데, 선별되는 펩타이드의 Pb<sup>2+</sup>에 대한 선택도를 향상시키고 향후 센서 혹은 흡착제의 기능기로서의 민감도를 향상시키기 위한 방법론이라고 할 수 있다.

### 3.2. 펩타이드의 아미노산 서열 분석

최종적으로 스크리닝된 파지 클론에서 무작위로 200개를 선택하여 펩타이드 서열 분석을 실시하였다. Table 2에 결과를 정리하였는데 constrained 라이브러리로부터 출발했기 때문에 양 끝에 모두 Cys residue를 포함하고 있다. 총 15가지의 서로 다른 펩타이드 서열이 나타났는데, 특히 1~4번까지의 서열이 각각 10, 34, 55, 78개로 중복해서 발견되었다. 이전 문헌에 비해 본 연구에서는 비교적 충분한 갯수 (200개)의 파지 입자에 대해 아미노산 서열을 분석하였기 때문에 결과의 신뢰도는 높을 것으로 추측된다. CSIRT LHQC로 이루어진 4번 펩타이드가 가장 높은 빈도로 발견되었는데, 기존에 잘 알려진 Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> 등에 친화성을 나타내는 대표적인 아미노산인 His residue는 6번 위치에 1개만 존재하였으며 그 외에 2번 펩타이드에서 6번 위치에 His residue가 1개 발견되었다. 또

한 0번 및 8번 위치에 constrained loop 형성을 위해 포진된 Cys residue를 제외한 나머지 7개 아미노산의 위치별 homology, 특정한 아미노산의 빈도, 포함된 아미노산의 charge 특성 등을 검토해보았으나, 이러한 1차원적 정보로는 Pb<sup>2+</sup>에 친화적인 consensus binding motif의 존재를 파악하기는 어려웠다. 한가지 특이한 점은 서열분석에 사용된 전체 200개의 샘플 중 약 89%를 차지한 1~4번 펩타이드의 경우, acidic 아미노산은 전무하였고, basic 아미노산 역시 선별된 다른 펩타이드에 비해 훨씬 적은 수로 분포하는 것으로 보아, Pb<sup>2+</sup>에 대한 친화력은 정전기적 상호작용에 의해 지배를 받기 보다는 펩타이드의 구조적 특성에 기인하는 것으로 보인다고 추정할 수 있다.

### 3.3. 선별된 펩타이드 서열의 친화성 비교

Table 2에서 가장 빈도수가 높게 발견된 1~5번까지의 펩타이드 서열이 발견된 파지 클론을 각각 증폭시킨 후, 파지 입자의 개수를 10<sup>9</sup>개로 일정하게 조정하여 각각 Pb<sup>2+</sup>-IDA에 흡착시키고 패닝에서와 같이 흡착된 파지의 갯수를 측정하여 Fig. 2에 나타냈다. 앞에서 실시한 패닝은 파지 라이브러리로부터 출발하므로 파지 혼합물을 이용한 셈이지만, 여기서는 동일한 펩타이드 서열이 디스플레이된 순수한 파지별로 실시된 개별적인 패닝을 통해 펩타이드 서열별로 상대적인 친화도 크기를 정확하게 비교할 수 있다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 Table 2에서 가장 빈도수가 높았던 4번 펩타이드 서열이 개별적인 친화도 분석에서도 가장 높은 값을 보여주고 있다. 사실 파지마다 표면에 발견되어 있는 펩타이드의 서열에 따라 증식율이 다를 수 있으므로 [15], Table 2에서 많은 빈도수를 보인 파지 클론의 펩타이드 서열이 반드시 Pb<sup>2+</sup>에 가장 높은 친화력을 가진다고 단정할 수는 없다. 그러나 Fig. 2에서 파지 갯수를 동일하게 조절한 후 얻어진, Pb<sup>2+</sup>-IDA에 흡착된 파지의 양은 Table 2에서 최고 빈도수를 기록한 4번 펩타이드 서열과 동일하므로 본 연구에서 이루어진 바이오패닝의 신뢰도는 높다고 추정된다.

파지 표면에 디스플레이된 펩타이드 서열은 양 말단에 Cys

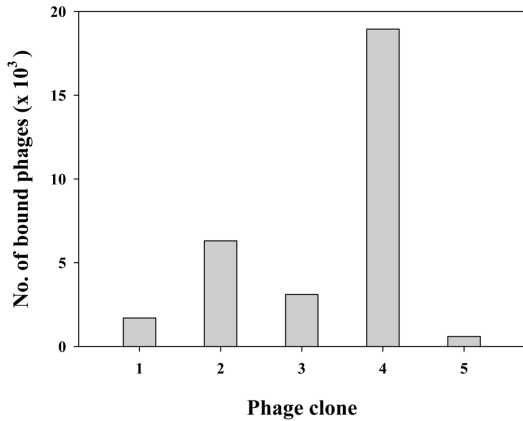


Fig. 2. Comparison of Pb<sup>2+</sup> affinity between individual phage peptide selected from 6-round of biopanning: 1, CPNSPAPQC; 2, CPT-TLPHSC; 3, CQQLPRGSC; 4, CSIRTLHQ; 5, CPNSRDMKC.

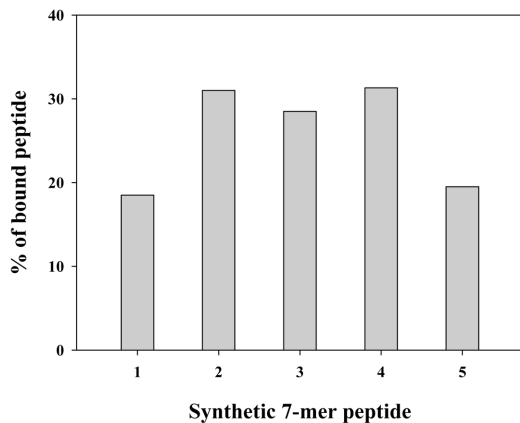


Fig. 3. Comparison of Pb<sup>2+</sup> affinity between individual synthetic 7-mer peptide corresponding to selected phage peptide: 1, PNSPAPQ; 2, PTTLPHS; 3, QQLPRGS; 4, SIRTLLHQ; 5, PNSRDMK.

residue를 포함한 고리형 구조이므로 가운데의 7-mer 펩타이드 서열만의 순수한 친화성을 검토하기 위해 1~5번 펩타이드 서열에 대해 각각 합성된 7-mer 펩타이드 용액을 이용한 친화도 분석을 실시하였다. 2.8.절에서 서술된 바와 같이 개별 펩타이드 용액과 Pb<sup>2+</sup>-IDA를 접촉시킨후 상등액 중에 남아 있는 펩타이드의 농도를 분석하여 흡착된 펩타이드의 양을 mass balance로 구한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 파지 클론에 대한 Fig. 2의 친화도 분석 결과와는 달리 4번 펩타이드 서열의 상대적 친화도는 크지 않았다. 이유는 명확하지 않으나 Fig. 2에서는 펩타이드가 파지 입자의 표면 단백질 일부로 발현된 상태에 대한 비교이고, 여기에서는 free 펩타이드가 사용되어 펩타이드가 금속이온과 접촉하는 contextual environment가 다르다는 점을 생각해 볼 수 있다 [16]. Chen 등 [16]의 연구에서도 QCM-D와 같은 다양한 분석 장비를 동원하여 free 펩타이드, 파지 디스플레이 펩타이드, LacI 단백질 결합 펩타이드를 비교하여 metal oxide에 대한 펩타이드의 친화도 비교를 수행하여, 7-mer 펩타이드의 친화도 차이가 펩

타이드의 서열 뿐만 아니라 구조적 특성에 의한 것으로 추정한다. 따라서 본 연구에서 얻어진 펩타이드 서열의 보다 정확한 친화도 평가는 단순한 상대적 비교가 아닌 정량 분석 장비를 이용한 흡착상수의 평가를 통한 후속 연구에서 진행될 예정이다.

#### 4. 결론

민감성을 향상시키기 위해 negative 선별 과정을 포함하도록 개선된 바이오패닝 기법을 이용하여 Pb<sup>2+</sup>에 강한 친화성을 보이는 펩타이드 서열을 탐색하였다. 아미노산 서열 분석을 거쳐 선별된 후보 펩타이드 중에서 가장 높은 빈도수를 보인 CysSerIleArgThrLeuHisGlnCys 서열이 개별적인 파지 클론을 이용한 친화도 분석에서도 Pb<sup>2+</sup>에 대해 가장 강한 친화력을 보였다. 반면에 양 말단의 Cys residue가 제거된 7-mer 합성 펩타이드 용액을 이용한 친화도 분석에서는 친화력의 우위를 뚜렷하게 보이지 않았는데, 파지 표면에 디스플레이된 고리형 펩타이드와 free 펩타이드 사이의 입체적인 구조의 차이 등이 이유인 것으로 보인다. 후보군으로 스크리닝된 각 펩타이드의 아미노산 서열 분석에서도 acidic 아미노산이 발견되지 않고 basic 아미노산이 적은 특징이 관찰되었는데, 따라서 Pb<sup>2+</sup>에 대한 친화성이 정전기적 상호작용보다는 구조적 특징에 기인하는 것으로 추정된다. 본 연구에서 스크리닝된 펩타이드 서열의 보다 정확한 친화성 평가는 흡착상수 평가와 같은 후속 연구를 통해 밝혀져야 할 것으로 보인다.

#### 감사

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 연구임 (KRF-2008-521-D00230)

#### REFERENCES

- Forzani, E., H. Zhang, W. Chen, and N. Tao (2005) Detection of heavy metal ions in drinking water using a high-resolution differential surface plasmon resonance sensor. *Environ. Sci. Technol.* 39: 1257-1262.
- Srivastava, N. K. and C. B. Majumder (2008) Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *J. Hazard. Mat.* 151: 1-8.
- Shin, E. W., T. T. L. Nguyen, and I. K. Yoo (2007) Adsorption behavior of Pb<sup>2+</sup> ions on alginate beads and capsules. *Korean Chem. Eng. Res.* 45: 166-171.
- Park, H. G., T. W. Kim, M. Y. Chae, and I. K. Yoo (2007) Activated carbon-containing alginate adsorbent for the simultaneous removal of heavy metals and toxic organics. *Process Biochem.* 42: 1371-1377.

5. Bunke, G., P. Gotz, and R. Buchholz (1999) *Environmental processes I*, p. 431-452. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
6. Kratochvil, D. and B. Volesky (1998) Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends Biotechnol.* 16: 291-300.
7. Darwish, I. A. and D. A. Blake (2002) Development and validation of a one-step immunoassay for determination of cadmium in human serum. *Anal. Chem.* 74: 52-58.
8. Shults, M. D., D. A. Pearce, and B. Imperiali (2003) Modular and tunable chemosensor scaffold for divalent zinc. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 10591-10597.
9. Yang, W. R., E. Chow, G. D. Willett, D. B. Hibbert, and J. J. Gooding (2003) Exploring the use of the tripeptide Gly-Gly-His as a selective recognition element for the fabrication of electrochemical copper sensors. *Analyst.* 128: 712-718.
10. Ravikumar, S., I. K. Yoo, S. Y. Lee, and S. H. Hong (2011) Construction of copper removing bacteria through the integration of two-component system and cell surface display. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165: 1674-1681.
11. Kotrba, P., L. Doleckova, V. de Lorenzo, and T. Ruml (1999) Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1092-1098.
12. Mejare, M., S. Ljung, and L. Bulow (1998) Selection of cadmium specific hexapeptides and their expression as OmpA fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Eng.* 11: 489-494.
13. Ph.D.-7 Phage Display Peptide Library Kit Manual, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA.
14. Udenfriend, S., S. Stein, P. Bhlen, W. Dairman, W. Leimgruber, and M. Weigele (1972) Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science*, 178: 871-872.
15. Brammer, L. A., B. Bolduc, J. L. Kass, K. M. Felice, C. J. Noren, and M. F. Hall (2008), A target-unrelated peptide in an M13 phage display library traced to an advantageous mutation in the *gene II* ribosome-binding site. *Anal. Biochem.* 373: 88-98.
16. Chen H., X. Su, K. G. Neoh, and W. S. Choe (2009), Context-dependent adsorption behavior of cyclic and linear peptides on metal oxide surfaces. *Langmuir* 25: 1588-1593.