

극미세 단백질 분석을 위한 프로테옴 분획 농축 기술

지재웅·*변상요

아주대학교 화학생물공학부 생명공학전공
(접수 : 2001. 10. 10, 게재승인 : 2001. 10. 25.)

Prefractionation and Enrichment for the Analysis of Low Abundance Proteome

Jae Woong Ji and Sang Yo Byun*

Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea

(Received : 2001. 10. 10., Accepted : 2001. 10. 25.)

In spite of the powerfulness for the simultaneous study of proteome expression and post-translational modification, 2-D PAGE has inevitable limitation to detect low abundant proteins. Since many of the low abundant proteins are likely to have very important regulatory functions in cells, separation and analysis of low copy number proteins is an important issue in proteome studies and challenge for 2-D techniques. Among various methods developed to detect low abundant proteins, electrophoretic protein prefractionation, chromatographic protein prefractionation, and subcellular fractionation are explained in this paper. Their practical strengths and weaknesses are also explained with current research trends.

Key Words : low abundant protein, 2-D PAGE, prefractionation, low copy number

서론

Two-dimensional electrophoresis (2-DE)가 현재까지는 세포나 조직 또는 생물체 전체로부터 추출된 protein profile에 대한 정량적인 비교를 통한 변화 양상을 분석하기 위한 검증된 가장 우수한 방법이다(1,2). 2-DE는 먼저 1차원적인 분리를 위해 soluble ampholyte(3-5)나 immobiline(6)과 같은 물질이 포함된 strip에서 denaturing condition으로 각 단백질의 등전점 (pI) 차이를 이용하여 isoelectric focusing을 하고 난 후, 2차원적인 분리에는 기존에 흔히 사용하는 SDS-PAGE slab gel을 이용하여 1차원적으로 분리된 각 단백질을 크기의 차이로 다시 한번 분리하는 기술이다. 2-DE를 이용하여 proteome을 분석하는 데 있어서의 현재의 기술 수준은 18×20 cm를 이용하면 대략 1,500~2,000개의 protein spots이 분석될 수 있는 정도이며, 좋은 조건하에서는 3,000 spots까지도 분석이 가능한 정도이다. 원핵세포의 유전자의 수는 3,000개 이하라는 사실을 고려해볼 때, 현재의 2-DE 기술 수준으로도 이론적으로는 충분히 원핵세포의 proteome을 분석 가능하리라 가정할 수 있지만, 비록 이러한 단순한 genome을 갖는 원

핵세포라 하더라도 proteome의 분석 시에는 기술적인 한계로 극미세 프로테옴 (low abundant proteome)의 분석은 현재로는 매우 힘들다(7).

Low copy number protein은 어느 특정시기에 어느 특정 조직에 존재하는 단백질의 상대적인 양을 표현할 때 쓰이는 용어이다. "Low copy number"라는 용어는 생체 내에 어떤 단백질이 불충분하게 존재한다는 의미로 잘못 이해될 수 있는데, 이것의 의미는 생화학적 분석에 충분치 않다는 의미로 해석되어야 한다. 즉, 어떤 특정 단백질이 low copy number로 존재한다는 것은 그 단백질이 그 정도의 양으로도 충분히 어떤 특정 조직에서 특정한 생물학적인 역할을 담당할 수 있다는 의미로 해석되어야 한다. 지금까지 알려진 바로는 질병과 관련된 단백질과 약물의 표적이 되는 단백질의 많은 경우는 low abundant protein인데, 이러한 단백질은 세포 내에 존재하는 양이 femto mole 수준이나 그보다 낮은 양으로 존재하기 때문에 2-DE 방법을 이용하여 분석하기가 매우 힘들다.

비록 최근에는 IPG (immobilized pH gradient)를 이용하면서 더욱 더 많은 양의 단백질을 2-DE를 통하여 분석할 수 있게 되었지만, 아직까지도 SDS-PAGE gel 상에서 대부분의 low copy number protein들을 다음의 2가지의 주된 이유로 검출되지 못하고 있다. IPG는 자체의 buffering capacity의 한계로 인하여 loading할 수 있는 단백질의 총량에 한계가 있고, SDS-PAGE gel 상에서 high abundant protein에 의한 spot fusion이 일어나기 때문이다(8). 더욱이, 이러한 수준의 2-DE

*Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea

Tel : +82-31-219-2451, Fax : +82-31-214-8918

E-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

기술 수준으로는 원핵생물보다도 훨씬 더 복잡한 진핵생물의 proteome을 분석하기에는 더욱 더 한계가 있다. 효모의 경우는 대략 6,000개 이상의 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있고, *Caenorhabditis elegans*의 경우는 19,000개 이상의 유전자가 존재하고, 고등 진핵생물의 경우에는 100,000개 내지는 그 이상의 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있다. 진핵세포의 경우 비록 어떤 특정시기에 어떤 특정 세포에 존재하는 mRNA-transcriptome의 수가 명확히 알려져 있지는 않지만, 포유동물의 경우 적어도 5,000~10,000개 이상인 것으로 여겨진다. 더욱이 진핵세포에서 일어나는 mRNA의 선택적 접합이나 단백질의 번역후 변형 (post-translational modification) 과정을 고려한다면 proteome은 transcriptome보다 훨씬 더 크고 복잡하다. 따라서, 포유동물의 경우 어느 특정 cell type에 적어도 10,000 unique protein species 이상이 존재하는 것으로 여겨지며, 어떤 특정 tissue에는 대략 50,000 unique protein species가 존재하는 것으로 간주된다(7). 따라서, 진핵생물의 proteome에 대한 효과적인 분석을 위해서는 현재보다 더 향상된 단백질 분리기술 개발이 필요한데, 세포 추출물 전체에 존재하는 10,000개 이상의 단백질을 정량적으로 분석할 수 있는 진전된 기술이 개발되어야만 한다. 우선 먼저 고려해볼 수 있는 기술은 2-DE를 하기에 앞서서 sample을 prefractionation하는 전략인데, 현재까지는 이 방법이 complex proteome에서 검출할 수 있는 protein의 종류의 수를 증가시

킬 수 있는 가장 적절한 방법이라고 여겨진다.

Table 1에서는 MS와 Coomassie blue staining, 그리고 silver staining 등의 분석에서 각각의 copy number에 따른 각각의 단백질의 실질적인 검출을 위한 필요량에 대한 대략적인 guide를 정리해 놓았다. Corthals 등(8)은 이 표에서 각 단백질의 abundance를 5단계로 나누었는데, Anderson 등(9)은 사람세포에서 각 단백질의 abundance를 7-8단계로 나누었다. 혈장단백질의 경우는 가장 많이 존재하는 알부민(albumine)에서 피사중인 세포에서 분비되는 single copy protein까지 12단계로 분류해야 될 것으로 생각된다.

Low copy number protein의 분석을 위해서 시료의 prefractionation과 enrichment에 이용될 수 있는 여러 가지 방법이 개발되었는데, 이러한 방법은 아래에서처럼 크게 4가지 방법으로 나눌 수 있다. 1) electrophoretic protein prefractionation, 2) chromatographic protein prefractionation, 3) subcellular fractionation [11], 4) sequential extractions with increasingly stronger solubilization solution [10]. 이 중에는 이미 전부터 이용되어온 방법도 있고 최근에 새롭게 개발되어진 방법도 있다. Prefractionation 방법을 선택 시에 무엇보다도 고려해야 할 점은 1) fractionation 과정 중에 protein loss를 최소화하기 위해서 prefractionation methods 자체는 간단해야한다는 점이고, 2) 여러 단계를 이용해야하는 경우에는 각 단계는 ion-exchange chromatography나 hydrophobic interaction chromatography

Table 1. Detection limits for proteins assuming 100% recovery. An indication is given for the number of cells required to provide sufficient protein to visualize and analyse. A challenge for proteomics will be to minimize protein losses during purification and separation as well as to reduce the dynamic range of protein expression within a given cell or organism. Assuming that no losses occur during protein harvesting and separation: for 10^9 cells and 1000 proteins copies 1.6 pmole of protein is present. For a 25, 50 and 100 kDa protein this translates to 4, 8 and 16 ng, respectively. The only means of analysis for this level of protein currently is μ LC-MS/MS or MALDI-TOF MS. Nano-electrospray has similar detection limits to μ LC-MS/MS or MALDI-TOF. For 10^6 cells only the most highly abundant proteins will be visualized and amenable to highly sensitive MS.

1.0E+09	1000000	1.0E+15	1600 pmole	41528.00	83056.00	166112.00	Coomassie blue	LC-MS/MS MALDI-TOF
1.0E+09	100000	1.0E+14	160 pmole	4.152.00	830400	16608.00	Coomassie blue	LC-MS/MS MALDI-TOF
1.0E+09	10000	1.0E+13	16 pmole	415.00	830.00	1660.00	Silver staining	μ LC-MS/MS MALDI-TOF
1.0E+09	1000	1.0E+12	1.6 pmole	41.00	82.00	164.00	Silver staining	μ LC-MS/MS MALDI-TOF
1.0E+09	100	1.0E+11	160 pmole	4.00	8.00	16.00	Silver staining	μ LC-MS/MS MALDI-TOF
1.0E+09	10	1.0E+10	16 pmole	0.40	0.80	1.60	Radio	-
1.00E+08	1000000	1.0E+14	160 pmole	4152.00	8304.00	16608.00	Coomassie blue	LC-MS/MS MALDI-TOF
1.00E+08	100000	1.0E+13	16 pmole	415.00	830.00	1660.00	Silver staining	μ LC-MS/MS MALDI-TOF
1.00E+08	10000	1.0E+12	1.6 pmole	41.00	82.00	164.00	Silver staining	μ LC-MS/MS MALDI-TOF
1.00E+08	1000	1.0E+11	160 pmole	4.00	8.00	16.60	Silver staining	μ LC-MS/MS MALDI-TOF
1.00E+08	100	1.0E+10	16 pmole	0.40	0.80	1.60	Radio	-
1.00E+08	10	1.0E+09	1.6 pmole	0.04	0.08	0.16	Radio	-
1.00E+07	1000000	1.0E+13	16 pmole	415.00	830.00	1660.00	Silver staining	μ C-MS/MS MALDI-TOF
1.00E+07	100000	1.0E+12	1.6 pmole	41.00	82.00	164.00	Silver staining	μ LC-MS/MS MALDI-TOF
1.00E+07	10000	1.0E+11	160 pmole	4.00	8.00	16.00	Silver staining	μ LC-MS/MS MALDI-TOF
1.00E+07	1000	1.0E+10	16 pmole	0.40	0.80	1.60	Radio	-
1.00E+07	100	1.0E+09	1.6 pmole	0.04	0.08	0.16	Radio	-
1.00E+07	10	1.0E+08	0.2 pmole	0.004	0.008	0.016	Radio	-
1.00E+06	1000000	1.0E+12	1.6 pmole	41.00	82.00	164.00	Silver staining	μ LC-MS/MS MALDI-TOF
1.00E+06	100000	1.0E+11	160 pmole	4.00	8.00	16.00	Silver staining	μ LC-MS/MS MALDI-TOF
1.00E+06		1.0E+10	16 pmole	0.40	0.80	1.60	Radio	-
1.00E+06	1000	1.0E+09	1.6 pmole	0.04	0.08	0.16	Radio	-
1.00E+06	100	1.0E+08	0.2 pmole	0.004	0.008	0.016	Radio	-

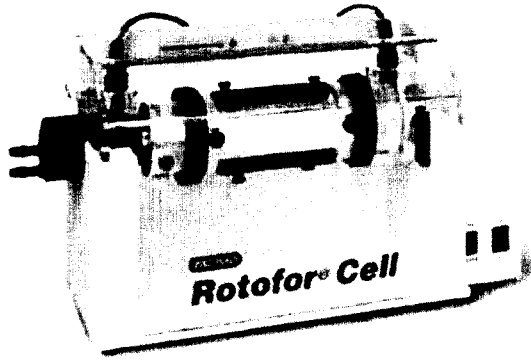


Figure 1. Bio-Rad 사의 Rotofor™.

에서처럼 서로 다른 물리적 특성(physical property)을 이용하는 fractionation method를 이용해야 한다는 점이다. Prefractionation 단계가 적으면 적을수록 yield는 높아지게 된다. 또한, cross-contamination이 일어나지 않기 위해서는 각 fraction을 분리하는 해상력 (resolution)이 좋은 방법이어야 한다. Chromatographic protein prefractionation 방법과 subcellular fractionation 방법, 그리고 용액의 이온강도를 순차적으로 높여주면서 단백질을 분획 시키는 방법 등은 각 fraction이 완벽하게 분획 되지 못해 cross-contamination이 일어난다는 문제점을 안고 있다. 이러한 cross-contamination은 proteome 분석 시 정량적인 분석과 비교·분석을 하는 데에 있어서 결과 해석의 복잡성을 야기 시킬 수 있다(12).

Electrophoretic Protein Prefractionation

고정된 pH range를 갖는 여러 용액에서 protein을 prefractionation하는 기술을 liquid-phase IEF(isoelectric focusing)라 하는데, 이 기술은 2-DE와 직접적으로 적용이 가능하다. 즉, electrophoresis를 용액이나 gel matrix를 이용하여 수행할 수 있는데, 이러한 경우에는 protein loss를 줄이기 위해 protein-surface interaction을 최소화 할 수 있는 적절한 용액을 이용해야만 한다. Liquid-phase IEF의 예로서 Bier 등(13)이 개발한 preparative IEF를 들 수 있는데, Bio-Rad 사에서 Rotofor™ 라는 기기로 상업화시켰다. Rotofor는 20개의 구획으로 나뉘어져 있는 rotating chamber로 구성되어 있는데, liquid-phase IEF 방법을 이용하여 단백질 sample을 등전점 (pI)에 따라 fractionation시킨다 (Figure 1). 이 기기는 별도의 separation barrier를 가지고 있지 않기 때문에 resolution이 좋지 않다는 문제점을 안고 있으며, 최종적으로 매우 희석된 상태의 단백질 fraction이 얻어진다는 문제점을 가지고 있다. Hochstrasser 등(15)은 낮은 농도로 존재하는 혈장단백질을 혈청에서부터 이 기기를 이용하여 prefractionation하였다고 보고하였다. 이 방법은 기술적인 한계점으로 많이 보급되지는 못했지만, 다양한 종류의 biological fluid와 tissue에 적용 가능한 방법이다. 또한 Burggraf 등(16)은 Octopus™(Dr. Weber GmbH, Kirchheim, Germany)라는 liquid IEF system을 이용하여 세포 추출물 전체로부터 80종류의 pI fraction을 얻었다고 보고하였다.

Righetti 등(14,17)은 또 다른 형태의 IEF 기법인 multi-

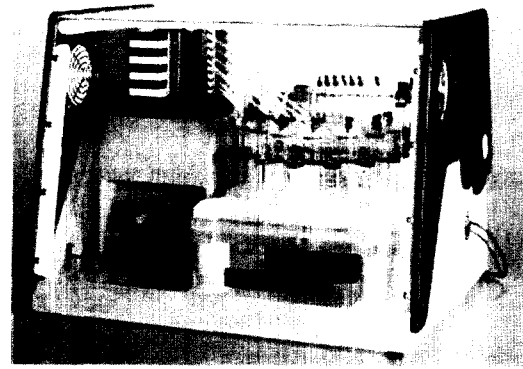


Figure 2. Amersham Pharmacia 사의 IsoPrime™.

compartment electrolyser를 개발했는데, 이들은 7개의 “isoelectric membrane”로 구획되어진 8개의 chamber를 갖는 기기를 개발하였다. 이들이 사용한 membrane은 Immobiline을 이용하는 IPG technology를 이용하였는데, 이러한 membrane이 “pH barrier”로 작용하여 전기장을 걸어준 상황에서 proteome이 각각의 pI에 따라 각각의 chamber로 fractionation되게 된다. Fractionation된 후에는 각 chamber에 분리되어진 각각의 sub-proteome은 narrow-range IPG 2-DE를 이용하여 분석될 수 있고, 결과적으로 전체 pH range에 해당되는 protein spot을 얻을 수 있게 된다. 이러한 원리를 적용한 system으로 IsoPrime™ (Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA)이 있는데 (Figure 2), 이 system은 fractionation 후에 얻어지는 각 chamber의 volume이 38ml이나 된다는 시료의 희석 문제점 때문에 prefractionation 기기로서 널리 보급되지는 못하였다.

또 다른 형태의 membrane system으로는 Gradiflow™ (Gradipore, Sydney, Australia)이 있는데(18), 이 system은 protein의 pI와 mobility, size, 그리고 affinity의 4가지 종류의 parameter를 이용하여 proteome을 prefractionation할 수 있도록 설계되었다(19-21). 이 system은 nondenaturing buffer를 이용한다는 장점을 가지고 있지만, IsoPrime과 마찬가지로 3 mL~수백 mL의 비교적 많은 양의 시료를 필요로 한다는 단점이 있다.

요약해보면 preparative IEF methods는 prefractionation을 하기 위한 좋은 방법이지만 상업적으로 판매되고 있는 Preparative IEF 기기들은 많은 양의 단백질 sample을 필요로 한다는 문제점과 실험과정 중에 단백질의 손실이 많이 일어난다는 문제점, 최종적으로 매우 희석된 상태의 단백질 fraction이 얻어지기 때문에 곧바로 연이어서 2-DE 분석이 힘들다는 문제점, 그리고 비싸고 사용이 어렵다는 문제점을 가지고 있다. 최근에는 이러한 단점을 보완하여 100 μL 시료까지도 분석할 수 있는 smaller prototype version(Mini IEF system)이 개발 중에 있는 것으로 알려져 있다.

Xun Zuo 등 [7,12]은 최근에 Righetti 등의 분리원리를 응용한 system인 microscale solution isoelectric focusing(μsol-IEF) 기기를 개발하여 E. coli 세포 추출액과 쥐의 혈청으로부터 재현성 있는 fraction들을 얻을 수 있었고 좀더 효율적으로 정량적인 비교·분석이 가능하였다고 보고하였다. 이들은 pH barrier 역할을 하는 5개의 Immobile를 포함하는

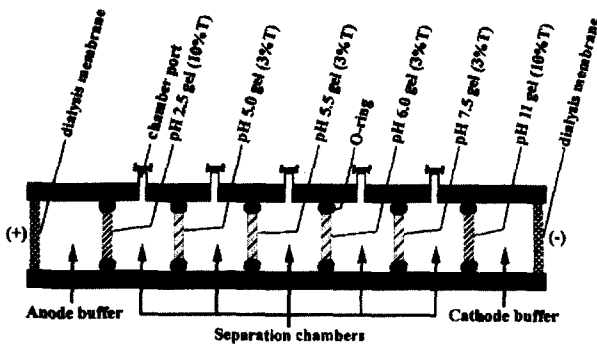


Figure 3. A proposed second generation solution isoelectrofocusing device. This modified device contains more separation chambers to cover the full pH range of most proteomes and to increase the total number of spots that should be detected. Each chamber has an access port for improved sample loading and removal.

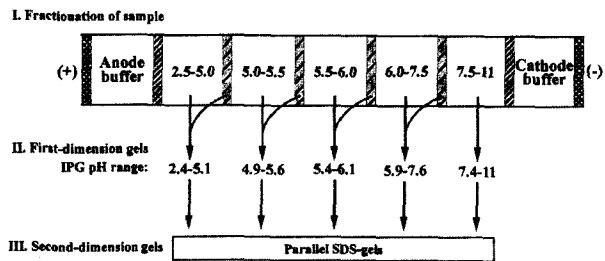


Figure 4. Schematic illustrating a method for global analysis of complex proteomes. The specific number of separation chambers and the pH values of the separation membranes can be adjusted to fit different conditions and sample properties. It should be feasible to optimize the pH ranges so that the full resolving capacity of each gel can be utilized. Since each full-size(18 cm × 18 cm)gel should be readily capable of resolving 2000-3000 spots when a high-sensitivity detection method is used, the illustrated scheme should be capable of resolving on the order of 10,000-15,000 protein spots when complex eukaryotic proteomes are analyzed.

acrylamide gel membrane(pH 3.5, 4.8, 5.4, 5.8, 9.5)으로 경계 지워진 500 μ L의 internal volume을 갖는 4개의 separation chamber를 고안하여, SCID mice로부터 추출한 proteome을 4개의 fraction(각 500 μ L)으로 나누었다. 또한, 별도의 추가적인 과정 없이 각 fraction의 일부(100 μ L)를 곧바로 4 종류의 narrow pH range gel(18cm)를 이용하여 2-DE를 성공적으로 수행하였다. 이들이 개발한 방법은 tubing이나 pump 등을 사용하지 않는 간단한 방법이므로 빠르고(~5~6h), 높은 회수율(65~80%)을 갖는다. 이들은 포유동물의 어느 특정 cell type에 존재하는 모든 protein component를 분석하기 위하여 pH barrier 역할을 하는 6개의 gel membrane(pH 2.5, 5, 5.5, 6, 7.5, 11)으로 경계 지워진 5개의 separation chamber를 갖는 μ sol IEF system을 제안했는데 (Figure 3,4), narrow pH range gel은 대략적으로 2,000~3,000 protein component를 분석할 수 있는 해상력을 가지고 있기 때문에, 이들이 제안한 μ sol IEF system을 이용하여 5종류의 fraction을 얻게 된다면 적어도 10,000~15,000 protein component를 분석할 수 있게 된다. 따라서, 이론상으로는 포유동물의 어느 특정 cell type

에 존재하는 10,000개 이상의 protein component 모두를 분석할 수 있으리라 기대된다.

Chromatographic Protein Prefractionation

크로마토그래피 기술이 proteins의 분리에 이용될 수 있는데, 크로마토그래피는 크게 3종류의 형태-elution chromatography, frontal chromatography, displacement chromatography-가 존재한다. 이 중에서 elution chromatography가 preparative separation과 analytical separation에 가장 많이 이용되고 있다. 크로마토그래피 기법을 이용할 때 step-gradient를 이용하면 세포 추출물 전체를 partial purification 한다거나 enrichment를 할 수 있게 되는데, 기존의 Ion-exchange chromatography(IEC)와 hydrophobic-interaction chromatography(HIC), reverse-phase chromatography(R-PC), 그리고 affinity chromatography 등과 같은 크로마토그래피 기법들은 step-gradient mode로 작동될 수 있다. Size exclusion chromatography(SEC)는 동작 과정 중에 protein loss가 많이 일어나기 때문에 현재는 이용되지 않고 있고, 대부분 membrane filtration 방법으로 대체되어 이용된다. IEC의 경우는 electrophoresis에서처럼 단백질의 surface charge에 의하여 영향을 받으므로 mobile-phase의 pH에 의하여 영향을 받는다. Chromatographic protein prefractionation 시에 많이 이용되는 방법은 affinity chromatography인데 heparin affinity chromatography(27,28)와 hydroxyapatite affinity chromatography [25], dye ligand affinity chromatography(29), 그리고 IMAC(immobilized metal affinity chromatography) (30) 등이 보고되었다. 이러한 affinity chromatography를 이용하는 데 있어서의 한계점은 resin과 친화성이 있는 특정한 단백질들만 enrichment된다는 점인데, 따라서 proteome에 대한 전체적인 분석에는 적절치 않은 방법이다. chromatography를 이용한 분리에 영향을 줄 수 있는 기타 다른 요인으로는 stationary phase ligand density와 salt의 함유량이다.

Prefractionation 시에 크로마토그래피를 적용한 몇몇 예가 발표되었는데, Fountoulakis(22,23) 등은 Heparin-Actigel을 이용하여 *Haemophilus influenza*의 low copy number protein을 enrichment하였다고 보고하였다. 또한, TSK phenyl column을 이용하는 HIC를 이용하여서도 *Haemophilus influenza*로부터 low abundant protein을 enrichment하였다고 보고되었다(24). 또한, *E. Coli*의 단백질 추출물로부터 proteins의 enrichment에 hydroxyapatite chromatography를 이용하였다고 보고되었는데 (25), 이 경우에는 특히 cold-shock protein과 같은 low-molecular-mass protein이 enrichment되었다고 보도되었다. Harrington 등 (26)은 DNA-binding protein을 enrichment시키기 위하여 cation-exchange chromatography(CEC)를 이용하였는데, CEC-fraction인 경우는 2-DE로 분석 시에 전 pI에 걸쳐 두루 protein spot이 나타나는 양상을 보였는데 이것은 protein의 basic domain은 protein의 전체적인 pI에는 그다지 큰 영향을 주지 못하기 때문에 나타난 결과라고 생각된다. 최근에, Volker Bradock 등 (31)은 RP-HPLC의 five-step gradient를 이용하여 crude cell lysate로부터 proteome을 재현성 있게 prefractionation하였다고 보고하였다 (Figure 5).

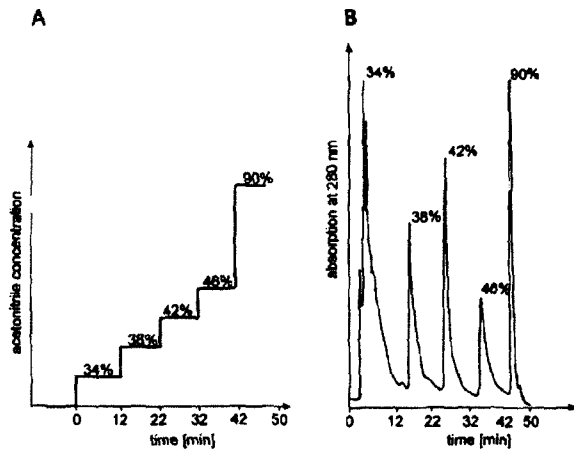


Figure 5. (A) Scheme of the five-step gradient with rising concentration of each step is indicated on the x-axis. (B) Corresponding HPLC chromatogram monitored at a wavelength 280 nm.

Subcellular Fractionation

Subcellular fractionation을 prefractionation에 적용 시에는 2가지의 주된 장점이 있는데, 첫 번째로는 proteome 전체 중에서 subset proteome만 분석하게 되므로 분석되는 단백질의 diversity와 complexity가 감소한다는 것이고, 둘째로는 생물학적으로 서로 연관성 있는 단백질들이 preselection된다는 점이다. 특히, proteome과 genome과의 연계성을 연구하기 위한 subcellular protein map 작성 시에는 세포소기관 각각을 fractionation 한 후, 각 세포소기관에 존재하는 단백질에 대한 분석이 이루어져야 한다.

Subcellular fractionation 시에는 2종류의 일반적으로 공통으로 이용되는 과정이 있는데, 첫 번째로는 cellular organization을 깨는 homogenization과정이고, 둘째로는 homogenate를 서로 다른 그룹으로 분리시키는 과정이다. 두 번째 과정에서 이용되는 기법에는 여러 가지가 있는데, 전통적인 방법인 density gradient를 이용하는 방법과 immuno-isolation, electromigration analysis(free-flow electrophoresis, high density gradient electrophoresis, immune free-flow electrophoresis), flow cytometry(fluorescence-activated organelle sorting), 그리고 sequential extraction of cells and tissues(using detergent containing buffer)(32,33) 등이 그 예이다.

Subcellular fractionation 방법을 통한 low-copy number protein의 enrichment 방법은 널리 이용되어 왔는데, 가장 일반적으로 이용되는 subcellular fractionation 방법은 density gradient 방법이다. 이 방법의 첫 번째 단계는 low centrifuge force를 이용하여 핵과 파괴되지 않은 세포들을 세포질성 세포소기관(cytoplasmic organelle)과 분리하여 post-nuclear supernatant(PNS)를 얻는 과정이다. 그 다음 단계는 nuclei pellet과 PNS를 각각 다양한 density gradient centrifugation을 통하여 어떤 특정한 세포소기관-nuclei, plasma membrane, mitochondria, lysosome, endosome, phagosome-만 분리해 내는 단계이다.

세포소기관을 fractionation 하기 위해서 density gradient media를 이용하는데(34), sucrose와 Percoll이 일반적으로 이용

되는 media이다. 이 중에서도 molecule-molecule interaction에 아무런 영향을 주지 않기 때문에 sucrose가 일반적으로 많이 이용되어지는데, sucrose는 viscosity가 높고 삼투에 영향을 주기 때문에 세포소기관의 탈수를 유발할 수 있다는 문제점을 앓고 있다. Percoll은 PVP(polyvinyl pyrrolidone)로 coating된 silica 입자의 sterile colloidal suspension인데, viscosity가 낮고 삼투에는 아무런 영향을 주지 않는다는 장점을 가지고 있다. 원형질막이나 미토콘드리아, 퍼옥시좀, synaptosome, 그리고 리소솜의 분리에는 일반적으로 iso-osmotic(0.25M) sucrose buffer, pH 7.4~7.6가 이용된다.

최근에 와서는 X-ray contrast compounds Iodixanol과 Nycodenz가 density gradient media로 이용되어지고 있는데 (35,36), 이들 media는 low viscosity와 low osmolarity, low toxicity, 그리고 high density 등의 여러 장점을 가지고 있다. Kimie Murayama 등(37)은 이러한 media를 이용하여 rat liver로부터 골지체와 소포체, 리소솜, 미토콘드리아, 그리고 퍼옥시좀 등의 fraction을 얻었다고 보고하였다.

Alternative Approach

앞에서 살펴본 방법들은 주로 2-DE와 연계된 기법들인데, 만약 수백~수천 개의 단백질을 분석하기 위하여 2-DE가 필요치 않게 된다거나 정제한 단백질이 2-DE 분석에 이용되기에는 너무 적게 존재하는 경우에는 1-D(one dimensional) SDS-PAGE를 이용할 수 있다. 또한, 1-D gel은 200kDa 이상의 거대한 단백질이나 hydrophobic membrane protein의 분석에도 이용될 수도 있다.

Link 등(38)은 proteome을 분석하기 위해 multidimensional liquid chromatography를 tandem mass spectrometer와 연계시켜 사용하였는데, 이들은 이 방법을 통하여 single run으로 효모 리보솜의 40S 소단위체의 구성성분인 100개 이상의 protein을 분석하였다고 보고하였다. Schulz-Knappe 등(39)은 cation-exchange chromatography와 reverse-phase chromatography를 연계시키는 방법을 이용하여 사람의 혈액으로부터 단백질을 대용량으로 fractionation한 후, 사람 혈액의 peptide bank를 제작하였다고 보고하였다. Oda 등(40)은 단백질 개개의 동정과 정량을 동시에 하고 단백질 개개의 특정 위치에서의 변형 정도의 변화를 알아보기 위하여 MS-based method을 이용하였는데, 세포 전체를 안정적인 동위원소로 표지 하여 정량하는 방법을 이용하였다.

Aebersold 등(41,42)은 isotope-coded affinity tags(ICATs)라는 새로운 종류의 chemical reagents와 MS/MS를 이용하여 전체적인 단백질을 정량분석 하였다고 보고하였는데, ICAT은 affinity tag로 이용되는 biotin과 안정적인 isotope (deuterium)를 incorporation시킬 수 있는 linker, 그리고 단백질의 cysteine residue와 결합할 수 있는 thiol-specific reactive group의 3가지의 구성요소를 가지고 있는 chemical이다. 이들은 ICAT으로 각각 표지된 비교하고자 하는 두 종류의 proteome을 protease(trypsin)로 처리한 후 biotin-affinity chromatography를 이용하여 ICAT-labeled peptide만 분리하였고, 이렇게 분리된 ICAT-labeled peptide를 HPLC와 연계된 tandem mass spectrometer를 통하여 분석하였다 (Figure 6). HPLC를 통해서

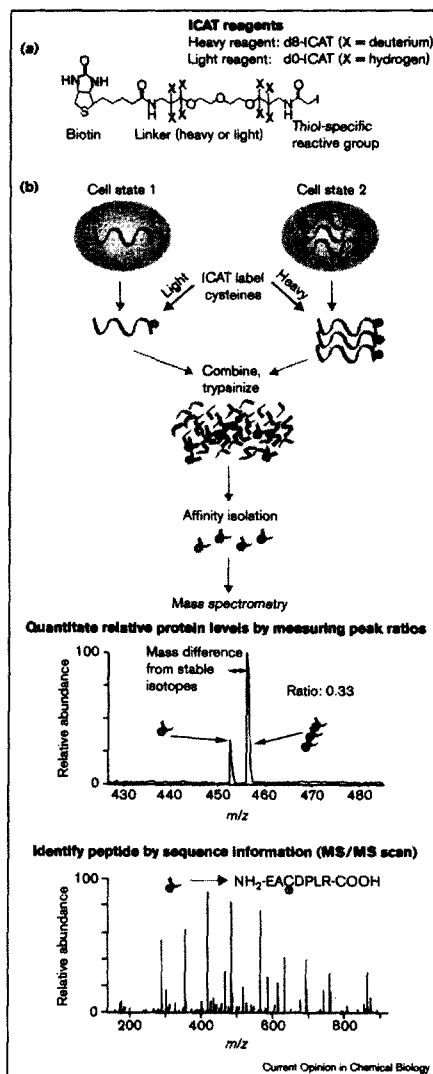


Figure 6. The ICAT strategy for quantifying differential protein expression. (a) structure of the ICAT reagent. The reagent consists of three elements: an affinity tag (biotin), which is used to isolate ICAT-labeled peptides; a linker, which can incorporate stable isotopes; and a reactive group with specificity toward thiol groups (i.e. to cysteines). The reagent exists in two forms: heavy (containing eight deuteriums) and light (containing no deuteriums). (b) The ICAT strategy. The method shows the analysis of a single protein (shown here as a protein expressed in one cell state at 1 copy/cell and in another cell state at 3 copies/cell), but is equally applicable to total cell lysates. The proteins from cell state 1 and cell state 2 are harvested, denatured, reduced, and labeled at cysteines with the light or heavy ICAT reagents, respectively. The samples are then combined and digested with trypsin. ICAT-labeled peptides are isolated by biotin-affinity chromatography and then analyzed by online HPLC coupled to a tandem mass spectrometer. The ration of the ion intensities for an ICAT-labeled pair quantifies the relative abundance of its parent protein in the original cell state. In addition, the tandem mass spectrum reveals the sequence of the peptide and unambiguously identifies the protein. This strategy results in the quantification and identification of all protein components in a mixture. It is, in theory, applicable to protein mixtures as complex as the entire proteome. *m/z*, mass; *charge ratio*.

는 peak ratio를 이용하여 어떤 특정 단백질의 두 proteome 간에서의 상대적인 양을 비교할 수 있고, MS를 통해서도 각 peptide를 identification할 수 있다. 이들이 개발한 ICAT방법은 방법은 전체적인 단백질 발현 정도를 정량적으로 비교·분석할 수 있기 때문에 앞으로 널리 보급될 것이라고 생각된다.

결론

현재의 proteome 분석 기술의 수준으로 다양한 양상의 protein expression을 분석하는 데에 있어서의 가지는 한계점을 이해하는 것은 앞으로의 proteome 분석 기술의 발전 가능성과 발전 방향을 확인시켜줄 수 있게 된다고 생각된다. 결론적으로, 단백질의 prefractionation이나 purification method를 고려할 때는 이러한 방법이 일단은 간단한 방법이어야 한다는 것이 전제조건이고, 또한 그 이후의 분석과정(2-DE)과 상호 연계성을 가질 수 있어야 한다는 점이다. 이상적인 prefractionation 방법은 각각의 분리 단계가 각각 subcellular localization이나 hydrophobicity, charge, size, shape, solubility, 또는 affinity 등과 같은 서로 다른 molecular property를 이용하는 단계인 방법이다. 앞으로의 proteome 분석술의 발전방향은 protein expression profile에 대한 빠르고 정량적인 분석을 위한 integrated methods가 개발되는 방향으로 진행될 것이라고 예상된다.

감사

본 연구는 한국과학재단지정 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Herbert, B. R., J. C. Sanchez, and L. Bini (1997), *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, pp 13-33, Springer, Berlin
- Quadroni, M. and P. James (1999), *Electrophoresis*, **20**, 664-677.
- Klose, J. (1975), *Humangenetik*, **26**, 231-243.
- O' Farrell, P. H. (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021.
- Scheele, G. A. (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5375-5385.
- Bjellqvist, B., J. EK, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gog, R. Westermeier, and W. Postel (1982), *J. Biochem. Biophys. Methods*, **6**, 317-339.
- Zuo, X., L. Echan, P. Hembach, H. Y. Tang, K. D. Speicher, D. Santoli, and D. W. Speicher (2001), *Electrophoresis*, **22**, 1603-1615.
- Corthals, G. L., V. C. Wasinger, D. F. Hochstrasser, and J. Sanchez (2000), *Electrophoresis*, **21**, 1104-1115.
- Anderson, N. L. and N. G. Anderson (1998), *Electrophoresis*, **19**, 1853-1861.
- Molloy, M. P., B. R. Herbert, B. J. Walsh, M. I. Tyler, M. Traini, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, K. L. Williams, and A. A. Golley (1998), *Electrophoresis*, **19**, 837-844.
- Huber, L. A., C. Pasquali, R. Gagescu, A. Zuk, G. J.

- Gruenber, and K. S. Matlin (1996), *Electrophoresis*, **17**, 1734-1740.
12. Zuo, X. and D. W. Speicher (2000), *Anal. Biochem.*, **284**, 266-278.
 13. Bier, M., N. B. Egen, T. T. Allgyer, G. E. Twitty, and R. A. Mosher (1979), Pierce Chemical Co., pp 79-89, Rockford, IL
 14. Righetti, P. G., E. Wenisch, and M. Faupel (1989), *J. Chromatogr.*, **475**, 93-309
 15. Hochstrasser, A. C., R. W. James, D. Pometta, and D. Hochstrasser (1991), *App. Theor. Electrophor.*, **1**, 333-337.
 16. Burggraf, D., G. Webber, and F. Lottspeich (1995), *Electrophoresis*, **16**, 1010-1015.
 17. Righetti, P. G., M. Faupel, and E. Wenisch (1992), *Adv. Electrophor.*, **5**, 159-200.
 18. Etori, C., P. G. Righetti, C. Chiesa, F. Frigerio, G. Galli, and G. Grandi (1992), *J. Biotechnol.*, **25**, 307-318.
 19. Corthals, G. L., B. M. Collins, B. C. Mabbutt, J. Williams, K. L. Williams, and A. A. Gooley (1997), *J. Chromatogr. A*, **773**, 299-309.
 20. Horvath, Z. S., A. A. Gooley, C. W. Wrigley, J. Margolis, and K. L. Williams (1996), *Electrophoresis*, **17**, 224-26.
 21. Margolis, J., G. Corthals, and Z. S. Horvath (1995), *Electrophoresis*, **16**, 98-100.
 22. Fountoulakis, M., H. Langen., S. Evers, C. Gray, and B. Takacs (1997), *Electrophoresis*, **18**, 1193-1202.
 23. Fountoulakis, M. and B. Takacs (1998), *Prot. Expr. Purif.*, **14**, 113-119.
 24. Fountoulakis, M., M. F. Takacs, and B. Takacs (1999), *J. Chromatogr. A*, **833**, 157-168.
 25. Fountoulakis, M., M. F. Takacs, P. Berndt, H. Langen, and B. Takacs (1999), *Electrophoresis*, **20**, 2181-2195.
 26. Harrington, M. G., J. A. Coffman, F. J. Calzone, L. E. Hood, R. J. Britten, and E. H. Davidson (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6252-6256.
 27. Jungblut, P. and J. Klose (1986), *Biochem. Genet.*, **24**, 925-939.
 28. Karlsson, K., N. Cairns, G. Lubec, and M. Fountoulakis (1999), *Electrophoresis*, **20**, 970-2976.
 29. Jungblut, P., J. Klose (1989), *J. Chromatogr.*, **482**, 125-132.
 30. Jungblut, P., H. Baumeister, and J. Klose (1993), *J. Chromatogr.*, **14**, 638-643.
 31. Badock, V., U. Steinhusen, K. Bommert, and A. Otto (2001), *Electrophoresis*, **22**, 2856-2864.
 32. Pawson, T. and J. D. Scott (1997), *Science*, **278**, 2075-2080.
 33. Pasquali, C., I. Fialka, and L. A. Huber (1999), *J. Chromatogr. B*, **722**, 89-102.
 34. Rickwood, D. (ED.) (1992), *Centrifugation: A Practical Approach*, pp 77-138, IRL Press, Oxford University
 35. ord, T., J. Graham, and D. Rickwood (1994), *Anal. Biochem.*, **220**, 360-366.
 36. Graham, J. M., T. Ford, and D. Rickwood (1994), *Anal. Biochem.*, **220**, 367-373.
 37. Murayama, K., T. Fujimura, M. Morita, and N. Schindo (2001), *Electrophoresis*, **22**, 2872-2880.
 38. Link, A. J., J. Eng, D. M. Schieltz, E. Carmack, G. J. Mize, D. R. Morris, B. M. Garvik, and J. R. Yates III (1999), *Nature Biotechnol.*, **17**, 676-682.
 39. Schulz-Knappe, P., M. Schrader, L. Standker, R. Richter, R. Hess, M. Jurgens, and W. G. Forssmann (1997), *J. Chromatogr. A*, **776**, 125-132.
 40. Oda, Y., K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn, and B. T. Chait (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6591-6596.
 41. Gygi, S. P., B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, and R. Aebersold (1999), *Nature Biotechnol.*, **17**, 994-999
 42. Gygi, S. P. and R. Aebersold (2000), *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 489-494.