

## Gradient 2-D PAGE를 이용한 양수 프로테옴 분석

이 은 희 · <sup>1</sup>김 재 찬 · †변 상 요  
아주대학교 화학생물공학부 생명공학전공, <sup>1</sup>중앙대학교 용산부속병원 안과학교실  
(접수 : 2002. 11. 25., 게재승인 : 2003. 2. 25.)

## Proteome Analysis of Amniotic Fluid by Gradient 2-D PAGE

Eun Hui Lee, Jae Chan Kim<sup>1</sup>, and Sang Yo Byun†

School of Chemical Engineering and Biotechnology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, College of Medicine, Chung-ang University Medical Center, Seoul 140-757, Korea

(Received : 2002. 11. 25., Accepted : 2003. 2. 25.)

Analysis of proteome in amniotic fluid was performed by 2-D PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis). Proteins in amniotic fluid were separated by centrifugation and solubilized in buffer solution for IEF, using an IPG strip of pH 4-7L. Both a homogeneous slab gel of 12.5% and a gradient gel of 8-18% were used. After 2-D PAGE, spots were stained with silver nitrate and picked up for in-gel digestion. Digested peptides were analysed by MALDI-TOF and proteins were further identified. More protein spots were detected in the gradient gels and a protein not previously reported was identified.

**Key Words** : Proteome, amniotic fluid, 2-D PAGE, gradient gel

### 서 론

사람의 양수는 16-18주 임신기간 때 태아의 성별, 염색체 이상을 조사하는 태반 장애 등의 임상 평가에 이용되어 왔다. 양수에 존재하는 단백질은 알콜 남용이나 fish-eye disease 에 따라 변하는데, 관련 연구가 지난 수년간 이차원 전기영동 (2-D PAGE)을 이용하여 진행되었다(1,2). 최근 발전된 2-D PAGE 방법은 일차원 전기영동에서 IPG(immobilized pH gradient)가 개발되며 재현성과 분해능이 향상되어 보다 많은 프로테옴을 분리할 수 있게 되었다. 또한 계속 향상되는 이미징 분석 기법과 질량분석이 가능하게 되면서 많은 양수 단백질이 계속 밝혀지게 되었다. 이러한 양수 프로테옴은 SWISS-2D PAGE와 같은 웹사이트에 database화되어 공개되고 있다(2).

현재까지 많이 이용되어 온 일반적인 2-D PAGE 방법은 loading할 수 있는 단백질 총량의 한계와, 고농도로 존재하는 일부 단백질에 의한 spot fusion 현상 때문에 소량으로 존재하는 미세 단백질의 분리 분석이 상대적으로 미흡하였다. 최근 들어 이를 보완하는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 본 실험에서 사용된 gradient gel도 미세 단백질의 분리 분석에

효과적이다. 양수 내에는 일반적인 체액 단백질과 같이 고농도로 존재하는 특정 단백질이 있어 2-D PAGE를 어렵게 하지만, gradient gel을 사용함으로써 분해능(resolution)을 향상시켜 많은 단백질을 분석할 수 있었다. 이러한 방법을 이용하여 기존의 protein database에 존재하지 않는 새로운 단백질도 감지할 수 있었다.

### 재료 및 방법

#### 실험 재료

본 실험에서는 중앙대학교 용산 부속 병원에서 30세 임신부의 125주 6일된 양수를 제공받아 -80℃에 보관하며 사용하였다.

#### Sample 전처리

양수를 multiple surfactant solution(5M urea, 2M thiourea, 2mM TBP, 2% CHAPS, 2% sulfobetaine3/10, 0.5% ampholite, 40mM Tris, 0.002% Bromophenol blue dye)으로 solubilize한 후 centrifuge(15,000g, 15min, 4℃)하여 soluble한 단백질을 얻어 modified Bradford method를 이용하여 단백질 정량하였다(8).

#### 이차원 전기영동

이차원 전기영동의 첫 단계로 IPG dry strip을 rehydration buffer(8M urea, 0.5% CHAPS, 0.002% Bromophenol blue, 2mM TBP, 0.5% ampholite)로 reswelling하였다. 단백질의 등전점을

† Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 442-749, Korea  
Tel : +82-31-219-2451, Fax : +82-31-214-8918  
E-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

이용한 일차원 전기영동에서는 Pharmacia사의 IPGphor를 이용하였으며, 전처리하여 얻은 단백질을 multiple surfactant solution으로 희석하여 loading하였다. 이 때 IPG strip은 13cm pH 4-7L을 사용하였다. 일차원 전기영동 후 IPG strip을 equilibration solution(6M urea, 2% SDS, Tris/HCl gel buffer, 20% glycerol, 5mM TBP, 2.5% acrylamide)에 20분간 평형화시켜 이차원 전기영동(SDS-PAGE)을 실시하였다. 이 때 SDS gel은 12.5%(30%T/2.5%C)와 8-18% gradient gel(40%T/2.5%C)을 사용하였다. 이차원 전기영동이 끝난 gel은 silver nitrate staining을 하였다(3-5).

### Gel Image 분석 MALDI-TOF 분석

ImageMaster 2D Elite Software 및 Image Scanner를 사용하여 silver nitrate staining된 gel spot 이미지를 분석하였다. Silver nitrate staining한 gel 중 특정 spot을 잘라서 trypsin in-gel digestion하고 탈염과정을 거친 후 MALDI-TOF(Ettan MALDI-TOF/Pro, Amersham Bioscience)를 이용하여 특정 단백질들을 확인하였다(6,7).

## 결과 및 고찰

### 단백질 pattern 분석

양수로부터 얻은 단백질 150 $\mu$ g을 SDS 12.5% gel과 8-18% gradient gel로 이차원 전기영동을 실시한 결과 Fig. 1의 결과를 얻을 수 있었다. 이때 양수 전처리 단계에서 양수를 multiple surfactant solution에 용해시켜 양수 내에 존재하는 대부분의 단백질을 용해시켰다. 또한 원심분리를 통하여 soluble한 단백질만을 얻어 이차원 전기영동을 하여 단백질 침전이 일어나는 결과를 줄일 수 있었다. Fig. 1의 (a), (b)를 비교하여 볼 때 8-18% gradient gel이 12.5% gel보다 protein separation이 좋음을 알 수 있었다. 이미지 분석 결과 (Fig.

1(a)(b)-A) 양수 내에는 한 단백질이 고농도로 존재함을 알 수 있었다. 또한 30~45kDa사이의 특정 부분의 spot들(Fig. 1(a)(b)-B)이 12.5% gel과 8-18% gradient gel에서 서로 다른 pattern을 보임을 알 수 있었다.

### 미세 단백질 분석

양수 내 소량으로 존재하여 12.5% gel에서는 감지가 어려웠던 단백질을 8-18% gradient gel을 사용하여 분리할 수 있었다. Fig. 1의 B부분을 이미지 분석하여 gradient gel에서 더 나타난 spots을 비교, 분석하였다(Fig. 2). 그 결과 12.5% gel은 total 40개의 spot을, 8-18% gradient gel은 69개의 spot이 감지됨으로서 gradient gel에서 보다 우수한 단백질 분해능(resolution)을 얻을 수 있었다.

### MALDI-MS분석

이차원 전기영동의 결과 Fig. 1의 A와 같이 양수 내에는 고농도로 존재하는 특정 단백질이 있었다. 이 단백질을 identification하기 위하여 spot을 잘라서 trypsin처리하여 in-gel digestion하였다. 이것을 MALDI-TOF를 이용하여 분석하였다. 그 결과 이 단백질은 serum albumin precursor임을 확인하였다(Fig. 3). 또한 gradient gel을 사용하여 detection된 단백질들, 양수 내 소량으로 존재하는 단백질 중 특정 spot을 선택하여 MALDI-TOF로 분석하였다. 그 결과 spot number 3, 24, 57은 기존의 양수의 protein database에 존재하는  $\alpha$ -1B glycoprotein,  $\alpha$ -1 antitrypsin, vitamin D binding protein (GC globulin)임을 확인하였다. 그리고 spot number 40은 기존의 protein database에 존재하지 않는 새로운 단백질임을 확인하였다. 따라서 8-18% gradient gel을 이용하여 실험한 결과 소량으로 존재하는 단백질 뿐 아니라 기존에 알려지지 않은 새로운 단백질을 밝혀낼 수 있었다(Fig. 4).

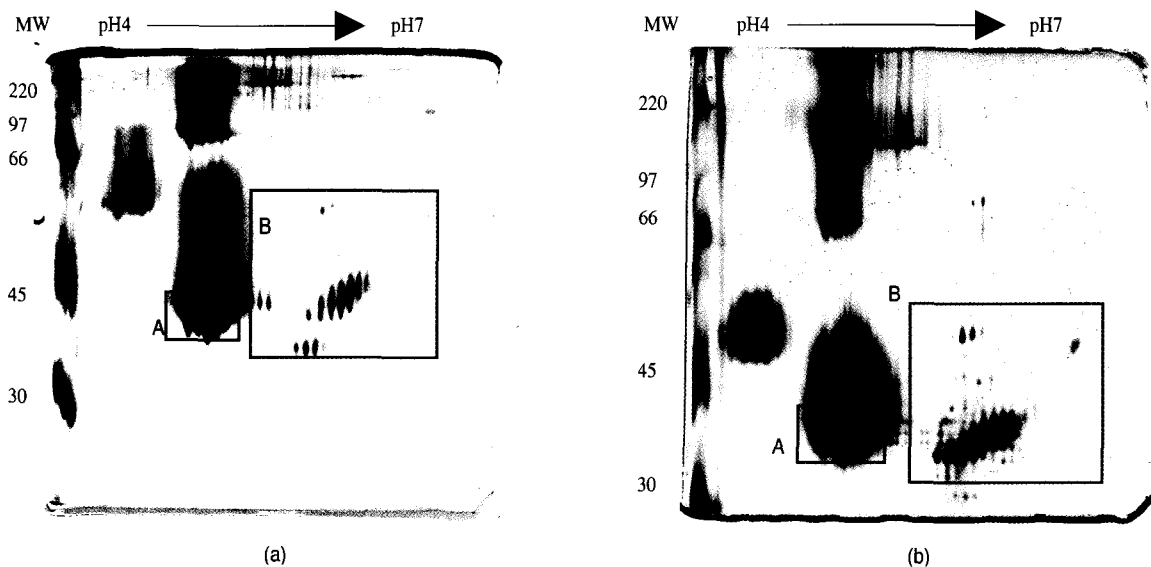


Figure 1. Two-dimensional SDS-PAGE analysis of human amniotic fluid protein, sample 150 $\mu$ g (a) 12.5% gel (b) 8-18% gradient gel.

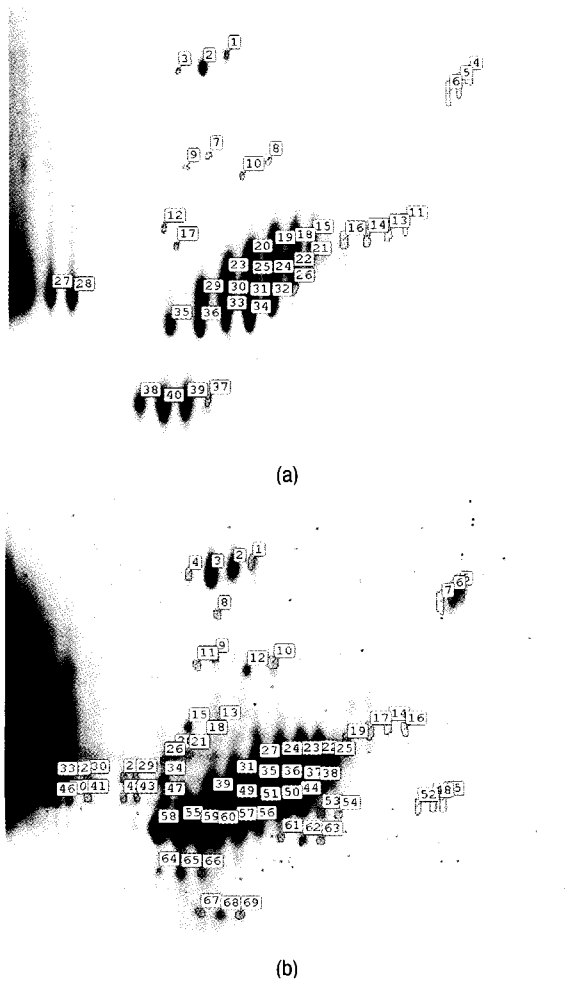
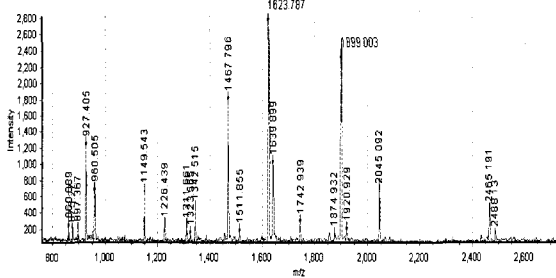


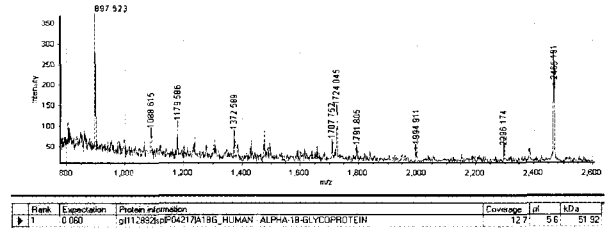
Figure 2. Image analysis of low copy number protein Fig.1-B (a) 12.5% gel (b) 8-18% gradient gel.



Identification result

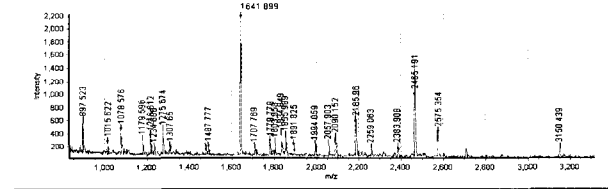
Rank	Expectation	Protein information	Coverage	pl	kDa
1	0.000	gi11513633 cbt1E7EA - Chain A, Human Serum Albumin, Complexed With Decanoic Acid [Lacine]	22.4	5.7	66.4
2	0.000	g6513427 gHAF01333 [AF130169] serum albumin precursor [Homo sapiens]	21.5	5.9	69.2
3	0.000	g4630227 eHNP_0204631 - albumin precursor, PR02682 [acolin] [Homo sapiens]	21.5	5.9	69.2
4	0.000	gi178345 gAA489398.1 - IAF1523 - Molecular Yencan [Homo sapiens]	21.7	6.0	69.2
5	0.000	g439532 eHNP_0204631 - (Y03456) serum albumin [Homo sapiens]	21.5	6.1	69.3
6	0.000	gi4393275 cbt1D1E - Human Serum Albumin In A Complex With Myristic Acid And Triiodobenzoic	22.5	5.7	66.0
7	0.000	gi29590 eHNP_0204631 - (Y03456) feeding lane HSA [Homo sapiens]	19.2	5.9	69.2
8	0.000	gi7441762 gHAF01333 [AF130169] serum albumin precursor [Homo sapiens]	21.5	5.7	62.0
9	0.000	gi1493459 gAA489398.1 [AF1523] - IAF13017_36 [AF130077] PR02676 [Homo sapiens]	18.8	6.0	66.7
10	0.000	gi7770217 gHAF01333 [AF130169] serum albumin precursor [Homo sapiens]	29.6	6.1	32.9
11	0.000	gi7939791 gHAF01333 [AF130169] serum albumin precursor [Homo sapiens]	24.4	6.6	32.1

Figure 3. MALDI-MS analysis of a high abundant protein of amniotic fluid.



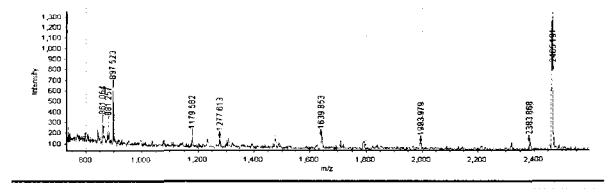
Rank	Expectation	Protein information	Coverage	pl	kDa
1	0.060	gi1138226 pF04217A19G_HUMAN - ALPHA-1B-GLYCOPROTEIN	12.7	5.6	51.92

(a)



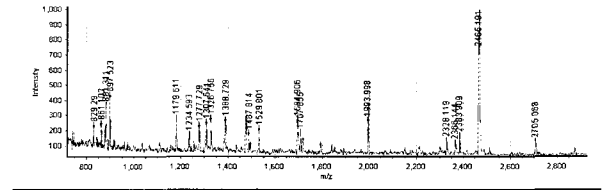
Rank	Expectation	Protein information	Coverage	pl	kDa
1	0.000	gi1942953 pD1P51 - Intact Recombinant Alpha1 Antitrypsin Mutant Phe 51 To Leu	43.9	5.4	44.2
2	0.000	gi1702025 pF01023A1AT_HUMAN - ALPHA-1-ANTITRYPSIN PRECURSOR (ALPHA-1 PROTE	34.2	5.4	46.7
3	0.000	gi1942953 pD1KCT - Alpha1 Antitrypsin	36.3	5.4	44.2

(b)



Rank	Expectation	Protein information	Coverage	pl	kDa
1	0.042	gi14763226 pXP_005846.3 - hypothetical protein XP_005846 [Homo sapiens]	16.4	5.1	33.64

(c)



Rank	Expectation	Protein information	Coverage	pl	kDa
1	0.043	gi1529593 pHNP_046097.2 - group-specific component (vitamin D binding protein) [Homo sapiens]	16.7	5.3	52.90
2	0.043	gi2118656 pHNP_0536767 - vitamin D binding protein - human	16.7	5.4	52.93
3	0.043	gi4553102 gAA489398.1 [AF1523] - IAF13017_36 [AF130077] PR02676 [Homo sapiens]	16.7	5.3	52.93

(d)

Figure 4. MALDI-MS analysis of low copy number protein of amniotic fluid (a)spot3 (b)spot24 (c)spot40 (d)spot57 of on 8-18% gradient gel.

요약

양수 내에 존재하는 총 단백질을 이차원 전기영동을 이용하여 분리 분석하였고, gradient gel을 이용하여 양수 내에 소량으로 존재하는 미세 단백질을 분리하였다. 양수 내에는 고농도로 존재하는 단백질이 있는데 이것이 serum albumin precursor임을 확인하였고, 8-18% gradient gel의 이용으로 분해능(resolution)이 향상되어 미세 단백질을 분리 분석할 수 있었다. 이차원 전기영동 후 MALDI-TOF를 이용하여 단백질을 identification하여 기존의 양수 protein database에 존재하는 단백질을 확인하였고, 존재하지 않는 새로운 단백질을 분리 분석하였다.

## 감 사

본 연구는 한국과학재단지정 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Marshall T. and K. M. Williams (1991), The simplified technique of high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: Biomedical applications in health and disease, *Electrophoresis* **12**, 461-471.
2. S. Liberatori, and L. Bini (1997), A two-dimensional protein map of human amniotic fluid at 17 weeks' gestation, *Electrophoresis* **18**, 2816-2822.
3. O'Farrell, P. H. (1975), High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.* **250**(10), 4007-4021.
4. Rabilloud T. (1996), Solubilization of proteins for electrophoretic analysis, *Electrophoresis* **17**, 813-829.
5. Mark P. Molloy, Ben R. Herbert (1998), Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis, *Electrophoresis* **19**, 837-844.
6. Jenö P. (1995), Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* **224**, 75-82.
7. Helmann, U. (1995), Improvement of an 'In-Gel' digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragment for amino acid sequencing, *Anal. Biochem.* **224**, 451-455.
8. Simon Roe (2001), Protein Purification Techniques, 2nd ed., pp31-32, Oxford University Press, New York.