

= 단신 =

질량분석기를 단백질 분석에 적용하기 위한 고성능액체크로마토그래피 최적조건 연구

권성원* · 박철홍*

텍사스 주립대 사우스웨스턴 메디컬 센터, *바임 래버러토리즈
(2002. 6. 10 접수, 2002. 12. 3 승인)

A study on the optimal HPLC condition for peptides complex analysis using mass spectrometry

Sung Won Kwon*, Chul Hong Park*

The University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, USA 75390,

*BIME Laboratories, Seoul, Korea 137-130

(Received June. 10, 2002, Accepted Dec. 3, 2002)

Abstract : Peptides separation in high performance liquid chromatography (HPLC) is very important for the analysis of total proteins using mass spectrometry rather than two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). In this study, we investigated the optimal HPLC condition of peptides for the use of mass fingerprinting. As a result of pursuing a combination of solvent additives for HPLC, water and acetonitrile containing both 0.1% trifluoroacetic acid and 0.1% acetic acid respectively showed the most efficient resolution and sensitivity.

Key words : liquid chromatography, mass spectrometry, peptides, proteomics

1. 서 론

프로테오믹스의 주된 연구 방향은 발현된 단백질을 정성, 정량하는 것이기에 프로테오믹스의 분석에 있어 시료 중의 단백질의 분리는 매우 중요하다.¹ 현재 two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)와 질량분석기(mass spectrometry)를 이용한 방법이 단백질의 분리 및 정성 분석에 있어서 가장 널리 이용되고 있다.² 그러나 2D-PAGE는 등전점 (isoelectric point, pI) 과 분자량 (molecular weight) 에 의해 2차 평면으로 분리된 많은 수의 단백질을 개별적으로 추출하고 효소분해해야 하는 과정이 있어 비교적 짧은 시간에 많은 수의 단백질을 분

석하는데에는 한계가 있다. 또한 같은 시료라도 매번 2D-PAGE가 똑같은 양상을 보이는 것이 아니어서 재현성에 곤란한 문제를 안고 있기도 하다. 이러한 단점을 극복하고자 2D-PAGE 방법을 사용하지 않고 전체 단백질을 효소분해한 후, 곧바로 질량분석기로 연결시켜 펩타이드를 분석하는 방법들이 많이 시도되고 있다. 물론 이 방법은 시간을 절약할 수 있고 많은 수의 단백질을 한꺼번에 분석할 수 있는 장점이 있지만 단백질을 1차적으로 분리하지 않고 효소분해된 전체 펩타이드 혼합물을 한꺼번에 분석하기에 고성능액체크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)에서의 펩타이드의 분리는 무엇보다도 중요한 척도가 된다. 제대로 펩타이드가 분리되지 않고 같은 시간에 많은 수의 펩타이드가 질량분석기로 들어가면 펩타이드들이 포화되어 서로의 이온화되려는 성향을 경쟁적으로 감소시키

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-2057-8855 Fax : +82+(0)2-2057-8833

E-mail : chpark@bimelabs.com

기에 비록 검출될 수 있는 농도 이상의 펩타이드가 존재 하더라도 질량분석기에서는 검출을 하지 못하게 되기 때문이다.

본 실험에서는 효소분해된 펩타이드들의 최적의 HPLC 분리조건을 여러가지 용매를 사용하여 검토하였다. 펩타이드가 컬럼의 충전제와 이상적인 상호작용을 통해 분리되는 용매의 선택이 중요했으며 HPLC로부터 용리된 용매는 시료와 함께 질량분석기로 들어가므로 HPLC 분리에 영향을 미침과 동시에 질량분석기에서도 좋은 감도를 나타낼 수 있는 용매를 고려하였다.

2. 실험

2.1 시약 및 용리액

사용된 용매는 모두 HPLC 급 용매였으며 Human Albumin 표준품 및 기타 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 사 제품을 사용하였다. Solid phase extraction kit 인 Sep-Pak 은 Waters (Milford, MA, USA) 사 제품을 사용하였다. 탈이온수는 1차 증류한 증류수를 Millipore사의 탈이온장치를 통과시켜 사용하였다.

Water, acetonitrile을 용매로 사용하였으며 trifluoroacetic acid (TFA), acetic acid, formic acid 를 실험용액 내의 매질로 사용하였다. 특히 trifluoroacetic acid 의 경우 강산이고 formic acid 는 매우 반응성이 강하기에 실험당일 조제하여 사용하였다.

2.2 기기 및 장치

HPLC는 기울기 용리 펌프, 자외선 흡수 검출기로 구성된 Hewlett Packard 1050 series를 사용하였으며 Metacheml ODS 분리컬럼 (4.6 X 250 mm, 5 um)과 Phenomenex 보조컬럼과 Rheodyne 7125 시료주입장치 (25 µl sample loop) 를 사용하였다.

용리액의 흐름 속도는 분당 1 ml였으며 시료주입량은 10 µg이었다.

검출기는 펩타이드 backbone의 최대흡착을 보이는 214 nm를 관찰하고자 자외선 흡수분광기를 사용하였다.

2.3 시료의 제조

Human albumin 5.000 mg을 정밀히 무게를 잰 뒤, phosphate buffer saline 1 ml를 가하여 5 mg/ml 농도가 되도록 하였다. 8 M urea가 되도록 urea를 가한 후,

albumin 5.000 mg의 40 배 mole에 해당하는 dithiothreitol(DTT)를 가하고 37 °C에서 2 시간 동안 방치한 후, 5.000 mg albumin의 80배 mole에 해당하는 iodoacetamide를 가하고 차광시킨 후 0 °C에서 2 시간 방치한 후, 5.000 mg albumin의 40 배 mole에 해당하는 cysteine을 가하고 25 °C에서 30 분 동안 방치하였다. pH 8.5의 tris buffer 3 ml를 가하여 8 M urea를 2 M urea로 희석시킨 후 albumin 양의 2 % (w/w)에 해당하는 trypsin을 가한 후 37 °C에서 24 시간 효소분해 반응을 시켰다. 반응이 끝난 전체부피 4 ml 반응액을 ODS(octadecylsilane)로 구성된 solid phase extraction을 이용하여 salts 및 불순물을 제거한 후, 동결건조하였다. Solid phase extraction은 0.1% TFA를 함유한 75% acetonitrile과 탈이온수의 두가지 용매를 사용하였으며 75% acetonitrile과 탈이온수를 6 ml/min 의 흐름속도로 번갈아가며 충전제를 활성화시킨 후, 탈이온수로 solid phase extraction kit을 평형상태에 이르게 하였다. 2 ml/min의 속도로 반응이 끝난 효소분해물을 solid phase solid phase에 주입한 후, 0.1% TFA를 함유한 탈이온수 10 ml를 가해 salts 및 불순물들을 제거한 후, 0.1% TFA를 함유한 75% acetonitrile 를 3 ml 가하면서 용리액을 수취한 후, 동결건조하여 무게를 잰 뒤 1.000 mg/ml의 농도가 되도록 탈이온수를 가한 후 10 µl를 HPLC 에 주입하였다.

3. 결과 및 고찰

Table 1에 펩타이드를 분리하기 위한 HPLC 기울기 용리 조건을 나타내었다.

3.1 HPLC 조건

이상적인 질량분석을 위한 HPLC 조건은 질량분석기가 검출한계 이상의 감도가 필요한 scan time 안에 하나의 펩타이드가 용리되도록 하는 것이다. 하나의 펩타이드가 일정 단위시간 안에 존재한다면 tandem mass 분석이 용이하여 정확한 펩타이드 서열분석을 할 수 있다. 그러나 실제로는 여러개의 펩타이드가 같은 시간대에 용리되며 질량분석기는 이중 관심있는 피크만을 선택하여 tandem mass 분석을 하게 되고 상황에 따라서는 분석을 미처 하지 못한 펩타이드가 존재할 수도 있다. 따라서 본 연구에서는 가능하면 펩타이드가 좋은 분리능을 가지면서 다양한 시간대에 걸쳐

용리하도록 HPLC 최적조건을 구하였다.

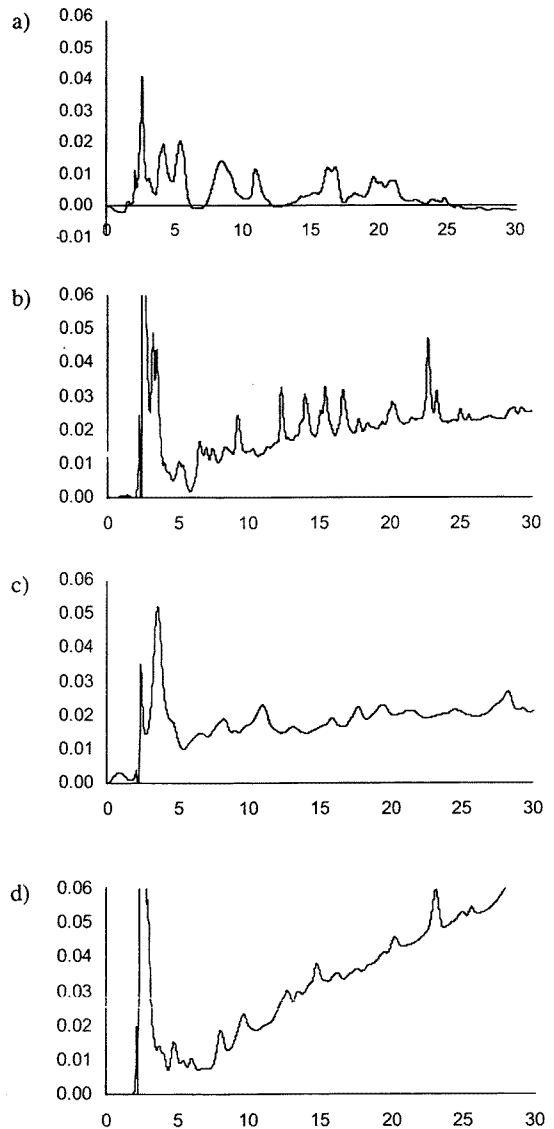
Table 1. HPLC gradient conditions for the analysis of albumin peptides

Min	A	B
0	87%	13%
30	60%	40%

- Exp. 1 A: H₂O,
e) B: CH₃CN.
Exp. 2 A: H₂O with 0.1% TFA,
B: CH₃CN with 0.1% TFA.
Exp. 3 A: H₂O with 0.1% acetic acid,
B: CH₃CN with 0.1% acetic acid.
Exp. 4 A: H₂O with 0.1% formic acid,
B: CH₃CN with 0.1% formic acid.
Exp. 5 A: H₂O with 0.1% TFA, acetic acid,
B: CH₃CN with 0.1% TFA, acetic acid.

용매에 첨가하는 매질의 우선적인 조건은 쉽게 질량 분석기 주입구에서 기체화가 되어야 하기에 salts 류는 고려대상에서 제외되고 낮은 UV cutoff를 가지고 대부분 펩타이드에 강한 용해도를 보이면서 휘발성이 있는 trifluoroacetic acid, formic acid, acetic acid를 대상으로 하였다.^{3,4} 농도는 상호작용이 없이 하나의 매질만의 HPLC에서의 분리능을 고려했을 때, 0.1% 이상인 경우에는 뚜렷한 분리능의 증가가 없었기에 각각 용질당 최고의 분리능을 보이기 위해 0.1%의 농도로 용리액을 조제하였다. 컬럼은 단백질의 경우 충전재가 C₁, C₈인 경우를 많이 쓰나 효소분해된 펩타이드의 경우에는 아미노산 서열이 단백질에 비해 무척 짧고 분자량도 2000 달톤이하이기에 C₁₈ 역상 컬럼을 사용하였다. 효소분해된 알부민 펩타이드를 시료로 하여 HPLC를 실행한 결과, Fig. 1에서와 같이 trifluoroacetic acid, blank, formic acid, acetic acid 순으로 분리능이 좋았다. 위의 매질들에 의해 분리능이 향상된 것은 다음과 같은 이유이다. 컬럼 충전재의 residual silanol group과 산성화합물은 낮은 pH에서는 중성이 되므로 서로간의 2차 상호작용이 최소화되면서 분리능도 좋아지고 재현성도 향상되기 때문이다. 또한 산성화합물의 이온화가 억제되어 용리 시간이 증가하기에 충분히 충전재와 상호작용을 할 수 있어 분리능이 좋아지기 때문이다.^{5,6} 다만 매질간의 펩타이드에 대한 서로 다른 특이성으로 인해 HPLC에서 분리능의 차이를 보이

는 것이다. 반면 질량분석기의 경우 acetic acid, formic acid, trifluoroacetic acid, blank 순으로 감도가 좋기에⁷ 0.1% trifluoroacetic acid 만을 HPLC 용리액으로 사용하면 질량분석기에서의 낮은 감도로 인하여 membrane 단백질같은 미량 펩타이드를 분석함에 있어 한계를 보일 수도 있다. 따라서 HPLC에서는 좋은 분리능을 유지하면서 질량분석기에서는 높은 감도를 가질 수 있는 용리액을 구상한 결과 0.1% trifluoroacetic acid와 0.1% acetic acid를 함유한 용리액이 가장 적절하였다.



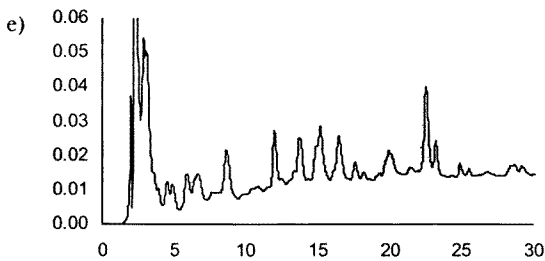


Fig. 1. HPLC/UV-Vis chromatogram of human albumin peptides.

- a) Solvent: H₂O, CH₃CN.
- b) Solvent: H₂O with 0.1% TFA, CH₃CN with 0.1% TFA.
- c) Solvent: H₂O with 0.1% acetic acid, CH₃CN with 0.1% acetic acid.
- d) Solvent: H₂O with 0.1% formic acid, CH₃CN with 0.1% formic acid.
- e) Solvent: H₂O with 0.1% TFA, acetic acid, CH₃CN with 0.1% TFA, acetic acid.

3.2 용리액의 선택

펩타이드 갯수가 적어 HPLC 과정없이 syringe pump 를 이용하여 직접 질량분석기로 분석하는 경우에는 좋은 proton donor인 acetic acid가 최우선 용질이며 시료의 양이 충분하고 질량분석기 주입구에서 용리액을 휘발시킬 수 있는 장치가 이상적으로 고안되어 있다면 trifluoroacetic acid나 formic acid를 단독으로 사용하여도 무방하다. 반면 시료의 양이 적거나, 펩타이드 갯수가 많거나, 용리액의 흐름속도가 빠르고 용리액중 탈이온수가 차지하는 비중이 커서 용리액이 제대로 휘발될 수 없는 상황이라면 0.1% trifluoroacetic acid와 0.1% acetic acid를 함유한 용리액이 좋은 선택이 될 수 있다. 예를 들어 노중단백질 분석같은 많은 수의 미량 단백질을 함유하고 있는 시료의 경우 더욱 더 HPLC 분리능이 중요하기에 본 연구에서 사용된 0.1% trifluoroacetic acid와 0.1% acetic acid를 함유한 용매를 사용하여 보다 많은 펩타이드를 용리시간에 따라 분획

할 수 있다면, 훨씬 많은 수의 펩타이드를 질량분석기를 이용하여 분석할 수 있으리라 사료된다.

4. 결 론

고성능액체크로마토그래피를 이용하여 질량분석기에 적용하기 위한 펩타이드 최적 분리 조건을 검토한 결과, 0.1 % trifluoroacetic acid와 0.1% acetic acid를 함유한 water와 acetonitrile을 용매로 하여 기올기 용리하였을 때가 높은 질량분석기의 감도를 유지하면서 최적의 분리능을 보여주었다. 전체 단백질 혼합물 중 발견된 미량의 단백질을 정성, 정량분석하는 프로테오믹스 분야에서는 반드시 필요한 용리액 조성이다.

감사의 글

이 논문은 한국과학재단의 해외 Post-doc. 연수지원과 보건장학회에 의하여 연구되었음

참고 문헌

1. M. P. Washburn and J. R. Yates III, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 242-247 (2001).
2. C. L. Gatlin, G. R. Kleemann, L. G. Hays, A. J. Link and J. R. Yates III, *Anal. Biochem.*, **263**, 93-101 (1998).
3. J. Eshraghi and S. K. Chowdhury, *Anal. Chem.*, **65**, 3528-3533 (1993).
4. D. Corradini and G. Cannarsa, *J. Liq. Chrom.*, **18**, 3919-3931 (1995).
5. D. J. Poll and D. R. K. Harding, *J. Chromatogr.*, **539**, 37-45 (1991).
6. B. Cai and J. Li, *Anal. Chim. Acta*, **399**, 249-258 (1999).
7. Y. Oda, K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn and B. T. Chait, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 6591-6596 (1999).