

혈액 단백질 바이오마커 연구를 위한 분석기법의 동향

이 은 영(연세프로테오믹스연구센터)

암 을 비롯한 각종 질병의 조기 진단을 위한 단백질 바이오마커를 혈액 속에서 찾는 일은 매우 중요하며 각종 프로테오믹스 기법을 사용하여 꾸준히 진행되고 있다. 바이오마커 분석을 위해서 얻을 수 있는 시료 중, 혈액이 가장 많은 생체 정보를 담고 있으면서도 가장 얻기 쉬운 샘플이라는 점에서 혈액 단백질 연구의 중요성은 가중된다. 혈액 단백질의 dynamic range는 10¹⁰을 넘는 것으로 알려져 있고 많은 potential 바이오마커들은 매우 낮은 농도로 존재할 것이라 예상된다. MS 분석을 기반으로 하면, single spectrum으로는 대략 10³ dynamic range 영역의 분석이 가능하고 reversed phase HPLC와 병행해서는 10⁴ ~10⁵ 영역을 cover 할 수 있다. 현재의 프로테오믹스 분석 기술로는 매우 낮은 농도 (~pg/ml)로 존재하는 바이오마커를 높은 농도로 존재하는 단백질들 사이에서 (albumin, 30~40 mg/ml, IgG 10~25 mg/ml plasma) 분리 분석해내기는 어렵다. 이러한 한계는 다양한 전처리 분획 방법을 통해서 단백질의 complexity와 dynamic range를 줄여주는 방법으로 극복

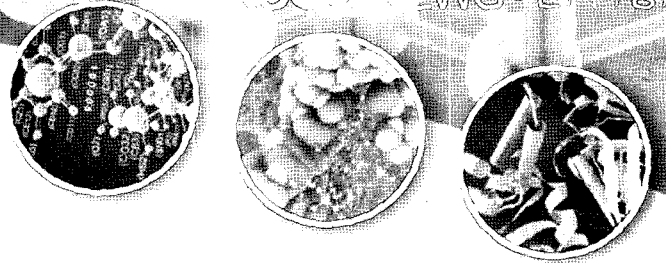
될 수 있다. 전처리 분획방법은 크게 세가지로 나누어 볼 수 있는데 첫 번째 affinity depletion, 두 번째 enrichment, 세 번째, 단백질 등전점 (isoelectric point)을 이용한 분획이다 <표 1>.

Affinity depletion은 LC column 이나 spin column 타입을 사용한다. 혈액 속에 매우 높은 농도로 존재하는 6개의 단백질 (Albumin, IgG, IgA, Transferrin, Anti trypsin, Haptoglobin) 또는 7개 단백질 (Fibrinogen 추가) 을 affinity column을 이용하여 전체 단백질량의 약 90%를 제거하는 방법으로 multiple affinity removal column (MARC, Agilent)이 사용되고 있고 12개 단백질이 전체 단백질의 약 97%를 제거하는 IgY (Beckman), 그리고 20개 단백질은 전체 단백질의 약 99%를 제거하는 ProteoPrep 20 (Sigma)이 상용화 되어 있다. 이들 depletion column은 소변이나 척수액, 난포액 등의 체액에도 적용 가능하다. affinity depletion 방법만으로도 dynamic range를 10²~10⁶ 정도 낮추는 효과를 가져올 수 있다.

Enrichment 방법은 glycosylation, phosphorylation 등 post translational modification 된 부분에 대한 affinity를

Table 1. Analytical procedure of plasma proteins

	Desalting	① Filtering with membrane TCA/Acetone precipitation
2	Labeling in Protein level	① DIGE- Cy2, Cy3, Cy5 dye ICPL, ICAT
3	Depletion	① MARC- major 6 proteins (Hu-6, Hu-7) IgY- major 12 proteins ② Proteoprep20- major 20 proteins
4	Protein enrichment	① Multilectin resin- Glycoprotein Antiphospho resin- Phosphoprotein
5	Fractionation by Isoelectric point	① in solution- FFE, ZOOM, MicroRotofor, MCE ② in chromofocusing column- PF2D in gel- IPG strip
6	2-Dimensional separation	① in gel- SDS-PAGE in column- RP-HPLC, C18 resin
7	MS/MS analysis	① Nano LC- MS/MS (LTQ) MALDI- TOF/TOF (4800)
8	Informatics	① Mascot ② Sequest ③ Spectrum-Mill



이용하여 혈액 내에 존재하는 glycoprotein, phosphoprotein 만을 분리해주는 것으로 dynamic range를 낮추는 동시에 단백질 complexity를 급격하게 감소시켜준다. Multilectin column은 glycoprotein의 a mannose residues, GlcNAc GlcNAc, secretory IgA 등에 affinity를 갖는 각종 plant lectin (Concanavalin A, Wheat germ agglutinin, Jacalin) 을 agarose bead에 붙인 resin을 사용한다. 혈액 단백질 종류의 50% 이상이 glycoprotein 이라고 알려져 있고 가장 농도가 높은 albumin은 glycoprotein이 아니므로 이 column을 사용하면 glycoprotein을 enrichment 하는 동시에 albumin을 depletion 하는 것이 가능하다. 또한, 단백질의 phospho group에 affinity를 갖는 각종 resin을 다양하게 선택해서 사용할 수 있다.

단백질 등전점을 이용한 분획은 solution 상태로 분리 하는 Free flow electrophoresis (FFE, BD), MicroRotofor (Bio-Rad)가 있으며 700~1000 Vhr 전극을 걸어주면 단백질이 전하에 따라 cathode 또는 anode로 이동하면서 등전점에 해당하는 pH 에서는 어느 방향으로도 움직이지 않게 되는 원리를 이용해서 단백질을 10~70 fractions 으로 분획한다. 이 외에 ZOOM (Invitrogen)과 Multi Compartment Electrolyser (MCE, proteome systems)도 모두 solution 상태로 단백질을 pH별로 분리하는 장비로서 각 pH에 맞는 disc를 setting 해주고 전극을 3,000 Vhr (ZOOM) 또는 12,000 Vhr (MCE) 정도 걸어주면 3~5 mg의 protein 이 3시간 안에 분리가 된다. 때때로 단백질이 pI에 따라 이동하는 동안 disc에 붙어서 loss 가 생기게 되는 단점이 있는데 disc의 재질과 두께, pore size에 따라서 loss 정도가 다르다.

PF2D (Beckman) chromofocusing column을 이용해서 pH 별로 분획하는 것도 가능하다. Buffer pH 8.5에서 전체 혈액 단백질을 column에 binding 시키고 pH 4.0까지 pH gradient를 이용하여 elution하면 약 10개의 fractions을 얻을 수 있다. 그리고 gel 상에서 분리하는 전통적인 방법으로 IPG strip을 이용하여 isoelectric focusing (IEF)를 할 수 있다. 80,000~100,000 Vhr, 20~30시간이 소요되고 분리되는 단백질 량은 양은 최

대 2 mg 정도 이다.

Affinity depletion, Enrichment, IEF 방법으로 분리 된 단백질 분획은 다시 한번 IPG strip을 이용한 IEF를 거쳐 이차원전기영동으로 단백질 각각을 분리하거나 곧바로 1-DE SDS-PAGE를 거쳐 분자량에 따라 분리 또는 C18 column을 거쳐서 hydrophobicity를 기준으로 분리한 후 MS/MS을 진행하게 된다. 또한 Affinity depletion, Enrichment, IEF의 세가지 방법은 두 가지 이상을 병행해서 사용하게 되는데, MS 분석 전에 이런 전처리를 행해 줌으로써 매우 낮은 농도로 존재하는 혈액 단백질 바이오마커 검출에 한걸음 나아갈 수 있게 되리라 본다.

참고문헌

Lee HI, et al., 2006. Biomarker discovery from the plasma proteome using multidimensional fractionation proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 10, 42-9.

Anderson NL and Anderson NG 2002. The human plasma proteome. *Mol Cell Proteomics* 1, 845-867.

Tam SW, et al., 2004. Depletion and fractionation technologies in plasma proteomic analysis. *Expert Rev Proteomics* 1, 411-420.

Ahmed N, et al., 2003. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. *Proteomics* 3, 1980-1987.

Cho SY, et al., 2005. Efficient prefractionation of low-abundance proteins in human plasma and construction of a two dimensional map. *Proteomics* 5, 3386-3396.

Zolotarjova N, et al., 2005. Differences among techniques for high abundant protein depletion. *Proteomics* 5, 3304-3313.

Huang L, et al., 2005. Immunoaffinity separation of plasma proteins by IgY microbeads: meeting the needs of proteomic sample preparation and analysis. *Proteomics* 5, 3314-3328.

Herbert B and Righetti PG 2000. A turning point in

proteome analysis: sample prefractionation via multicompartement electrolyzers with isoelectric membranes. *Electrophoresis* 21, 3639-3648.

Moritz RL, et al., 2005. Application of 2 D free flow electrophoresis/RP HPLC for proteomic analysis of human plasma depleted of multi high abundance proteins. *Proteomics* 5, 3402-3413.

Weber G, et al., 2004. Efficient separation and analysis of peroxisomal membrane proteins using free flow isoelectric focusing. *Electrophoresis* 25, 1735-1747.

Shin YK, Kim KY, Paik YK. Alterations of protein expression in macrophages in response to *Candida albicans* infection. *Mol Cells* 20, 271-9.