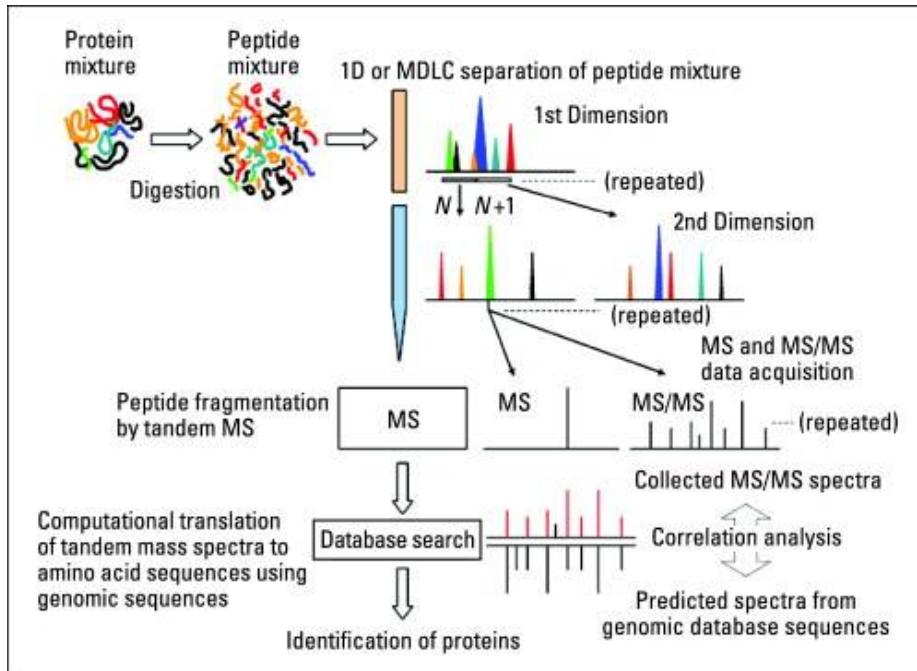


# 바이오연료 연구와 Proteomics - Part 1

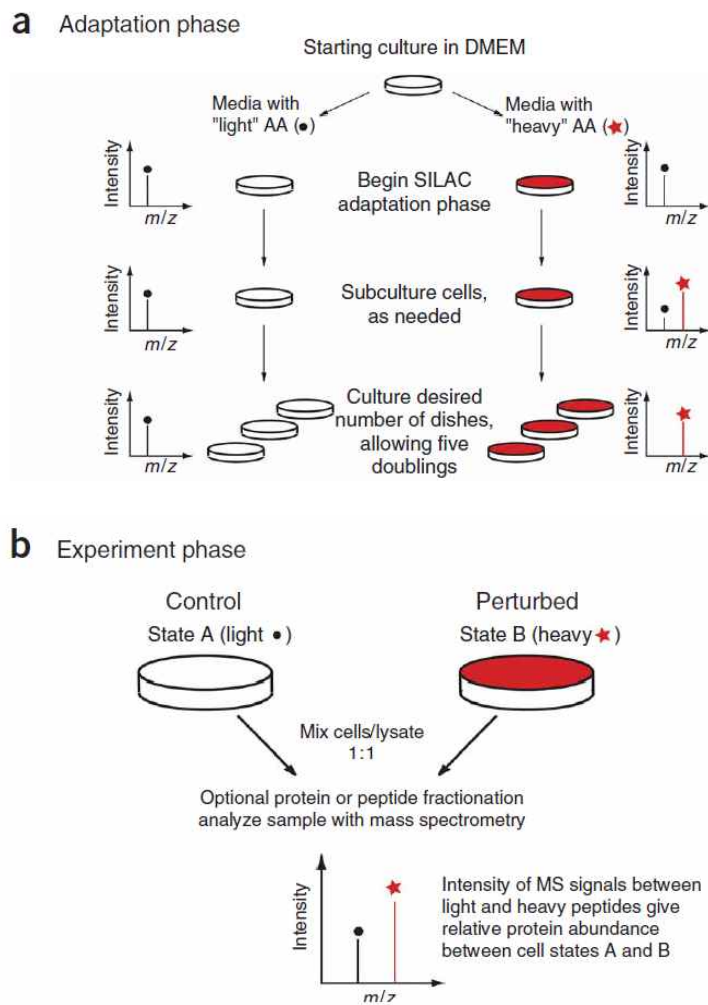
박정진

현재까지 세포내에서 발현되는 대부분의 단백질과 효소들을 분석할 수 있는 일반적인 방법은 개발되지 못했지만, 아마도 shotgun proteomics 라는 방법이 가장 근접한 방법이라고 할 수 있다. Shotgun proteomics란 추출한 단백질을 trypsin과 같은 효소로 분해한 다음, 분해된 peptide를 chromatography와 질량 분석기(Mass spectrometry, MS)를 통하여 분석하는 방법을 말한다. 이때 일반적으로 쓰이는 방법이 MudPIT (**Multidimensional Protein Identification Technology**)으로, 다차원 chromatography (보통 이차원 HPLC를 사용)와 tandem mass spectrometry (MS/MS)를 사용하여, 각각의 단백질에서 나온 peptide를 관찰하는 것이다 (<그림 1> 참조). 이 shotgun proteomics 방법은 단일 샘플에서 보통 500개에서 1,000개 가량의 단백질을 관측할 수 있다. 하지만 이 방법은 일반적으로 정량적인 분석에서는 사용하기가 곤란한데, 그 이유로는 peptide들이 이온화 되는 효율이나 MS에 들어가는 비율이 그들의 조성이나 아니면 분석 조건에 따라 달라질 수 있어서 단순히 MS 시그널의 높이를 가지고 정량 분석을 하는 데에는 무리가 있다. 그래서 지금껏 많은 과학자 들은 단백질체의 정량 분석을 하기 위해 다음과 같은 해법을 제시했다.



<그림 1> LC-MS/MS를 이용한 일반적인 MudPIT 방법 개략도 (N은 샘플 fraction 개수)

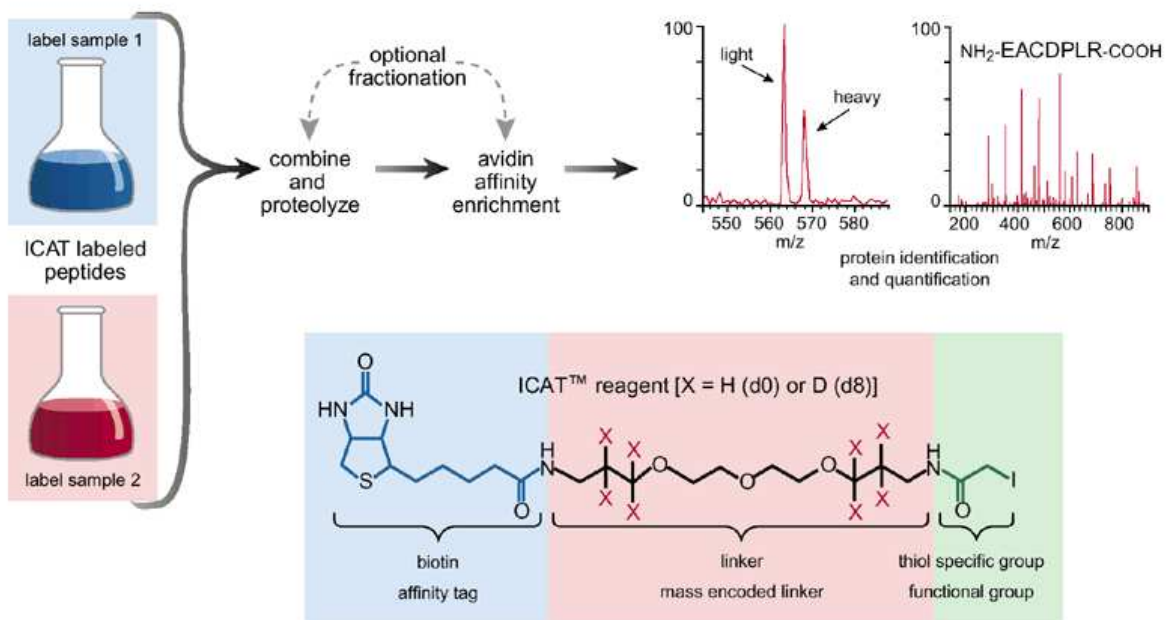
1. SILAC (**S**table **I**sotope **L**abeling with **A**mino acid in **C**ell culture): 일반적인 탄소-12로 이루어진 아미노산을 배지에 넣어 키운 세포와 탄소-13으로 레이블된 아미노산이 들어있는 배지에서 키운 세포에서 단백질을 추출한 다음 함께 LC-MS/MS로 분석하는 방법(<그림 2> 참조). <그림 2>의 a에서와 같이 세포를 일반 배지와 레이블된 아미노산이 들어있는 배지에서 충분히(레이블된 배지의 세포에서는 레이블된 아미노산만 나올 때까지) 동일한 조건에서 키운 다음, 각각의 세포를 가지고 실험을 한다. 실험 후, b와 같이 peptide를 함께 분석하면 어느 조건에서 발현양이 줄었는지, 또는 늘었는지를 확인 할 수 있다.



<그림 2> SILAC 개략도 (출처: Nat. Protocols 1(6): 2650-2660)

2. ICAT (**I**sotope **C**oded **A**ffinity **T**ags): 단백질의 보다 정확한 정량을 위해 단백질에 특별한 tag를 부착한 뒤에 MS로 질량을 측정하는 tagging 기법 중 하나로, 수소와 중수소간의 분자량의 차이를 tagging에 적용한 방법이다. 아미노산 중 cysteine에 ICAT

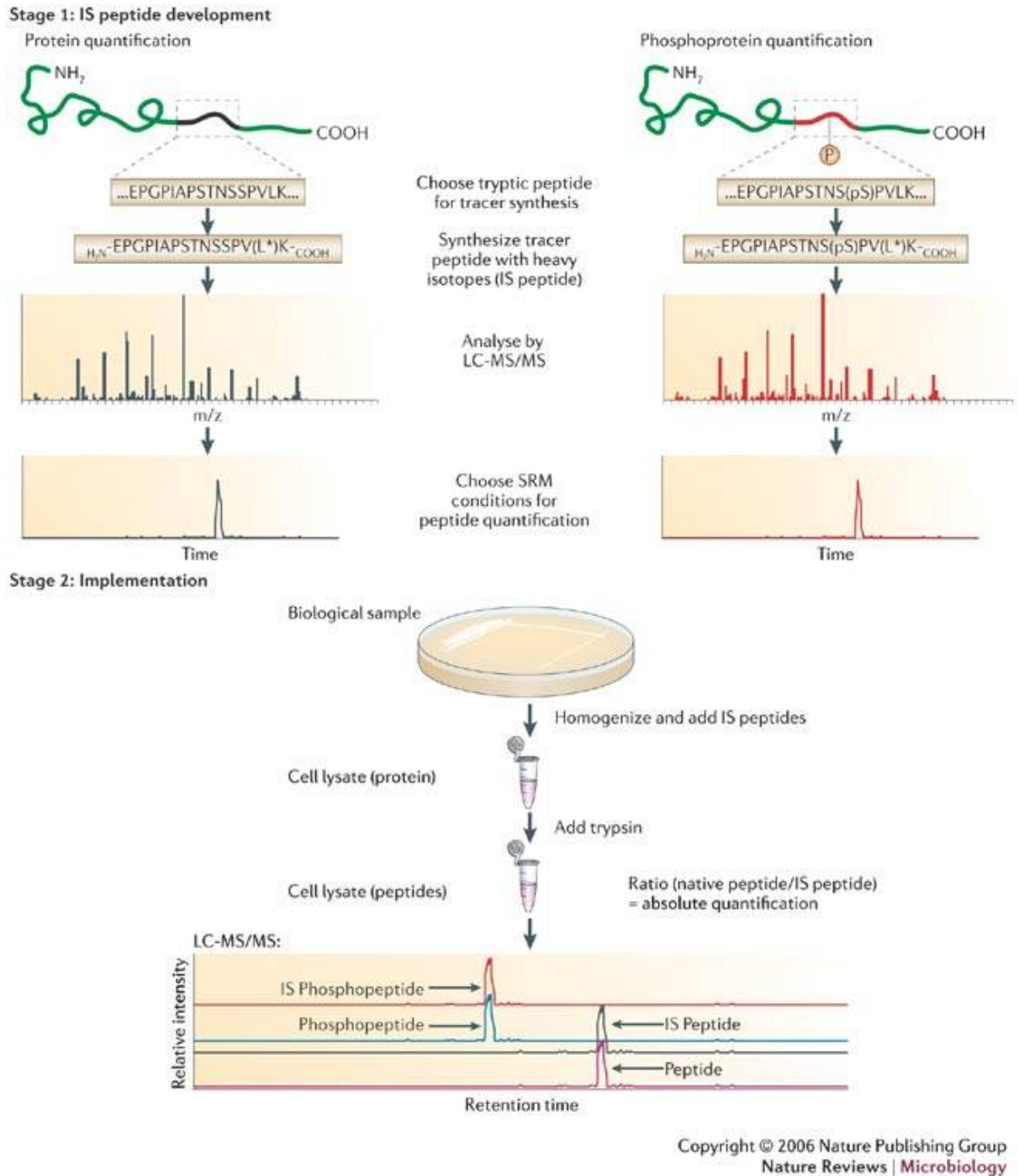
시약으로 labeling을 하여 단백질을 분석하는데, 두 가지 sample을 사용하여 단백질의 양을 상대적으로 비교한다. 이 때에 기준이 되는 표준 시료를 control이라고 하여, control과 측정하고자 하는 시료에 각각 일반적인 수소를 포함함 d0 reagent와 중수소를 포함한 d8 reagent를 사용하면, cysteine 하나의 분자량에 reagent의 분자량만큼 증가한 아미노산을 얻게 된다. 이러한 질량 차이를 이용하여 MS spectrum에서 8 Da 만큼 차이가 나는 스펙트럼 peak을 찾고 이들 중 하나를 데이터베이스를 통해 단백질을 동정하면, 해당 단백질의 대조군과 실험군에서 발현되는 양을 비교할 수 있다 (<그림 3> 참조).



<그림 3> ICAT 개략도 (출처: Nat Genet **33**: 311-323)

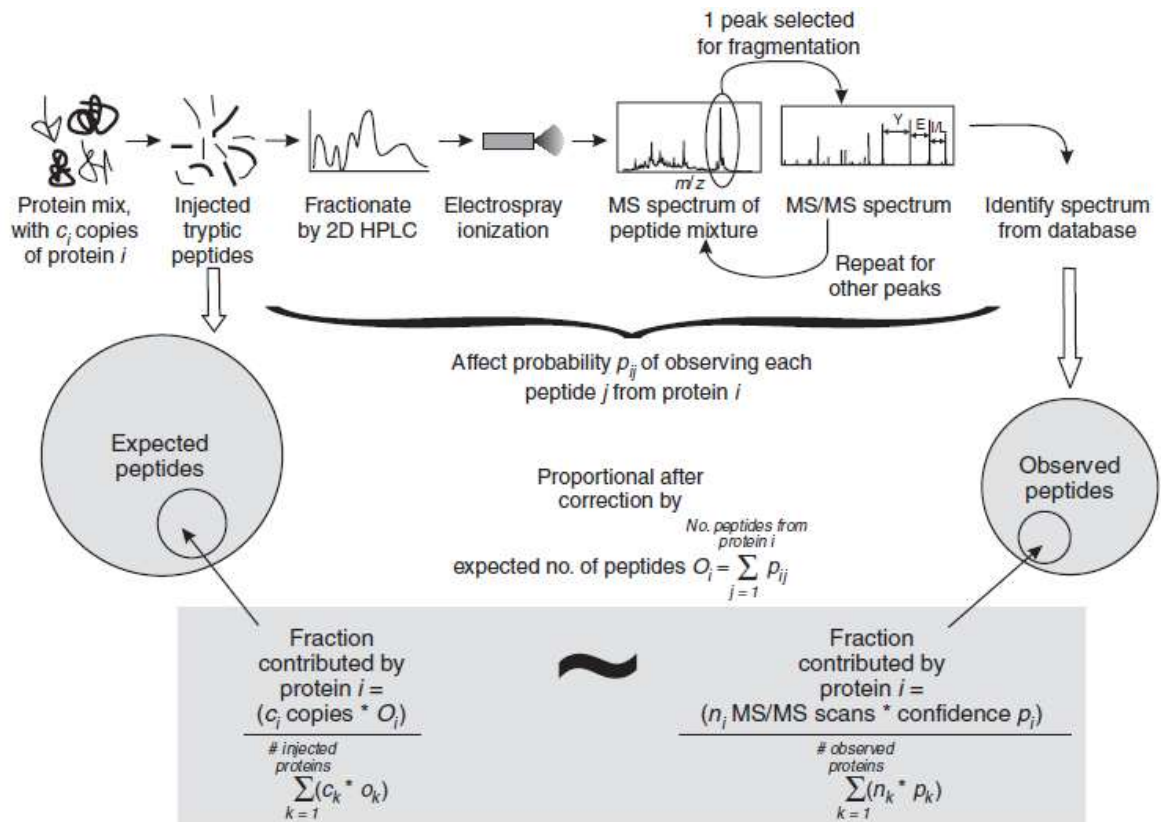
3. AQUA (**A**bsolute **Q**uantification of **P**roteins): 분석하려는 단백질의 peptide fragments 들 중에서 적합한 peptide를 고른 다음 (trypsin에 의해 100%가깝게 잘려질 것, charge는 +2만큼, 사이즈는 일반적인 MS의 분석범위 안(2,000 Da)에 있을 것 등), Sigma-Aldrich 등의 회사를 통해 AQUA peptide를 주문한다 (자연적으로 만들어지는 peptide보다 무겁게 만든다). 그런 다음, 시료에서 단백질을 추출해서 trypsin으로 자른 후, 우리가 알고 있는 양만큼 AQUA peptide를 넣어준다. 그런 다음 MS spectrum을 분석하여, AQUA peptide의 intensity와 시료에서 나온 peptide의 intensity를 비교해서 정량하는 방법이다. SILAC이나 ICAT처럼 control이 필요 없다는 장점이 있으나, 올바른 AQUA peptide의 선택과 제작에 4~8주 가량 시간이 소요된

다 (<그림 4> 참조).



<그림 4> AQUA 개략도 (출처: [Nat Rev Micro 4\(12\): 932-942.](#))

- APEX (**A**bsolute **P**rotein **E**xpression): 이 방법은 우리가 측정하고자 하는 단백질의 abundance와, 일반적인 MudPIT 방법에서 관측되는 그 단백질의 peptide갯수 사이의 상관관계를 이용하는 방법이다 (<그림 5> 참조)



<그림 5> APEX 개략도 (출처: Nat Biotech **25**(1): 117-124)

SILAC과 ICAT은 동위원소로 label된 샘플과 상대적인 정량을 하는 방법이며, AQUA는 우리가 이미 알고 있는 peptide를 시료에 추가함으로써 절대 정량이 가능하다는 장점이 있다. 하지만, AQUA peptide를 하나의 샘플에 추가할 수 있는 수에 제한이 있어서(가격적인 측면에서도 제한이 있으나 기술적으로 MRM (Multiple reaction monitoring) 역시 수백 개라는 제한이 있다) omics 적 관점에서는 적용하기가 어려운 기술이다.

하지만 APEX는 정량 분석에 단백질의 개수 제한이 없으며, 미리 단백질 함량과 검출되는 peptide 사이의 상관 관계를 이용한 절대 정량이 가능하다는 장점이 있으나, 만약 처음 이 방법을 적용할 경우에는 항상 western blot이나 2D-gel을 통하여 검증과정이 필요하다는 단점이 있다.