

MALDI-TOF 펩타이드 질량분석

조교: 강유진
kangyu1200@snu.ac.kr

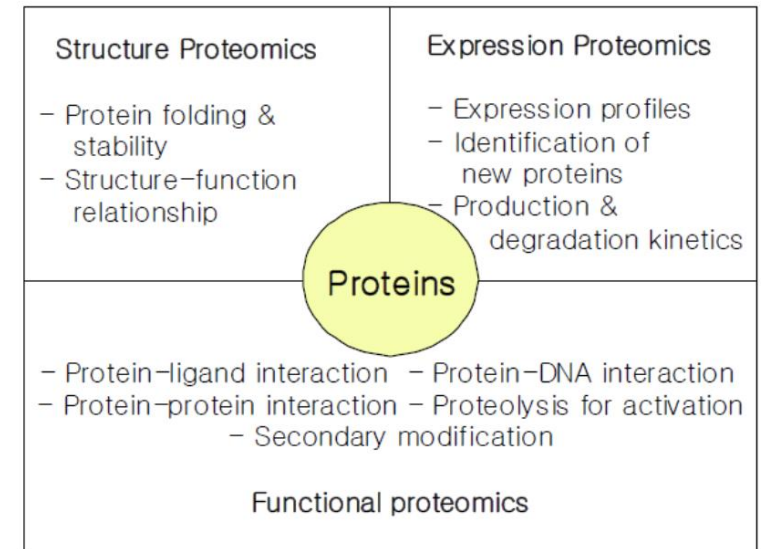
✓ 실험목표

- 주어진 단백질을 트립신으로 가수분해하고 얻어진 펩타이드들의 질량을 측정하여 해당 단백질이 lysozyme, bovine serum albumin (BSA), ovalbumin, hemoglobin 중에서 어느 것인지 알아낸다.
- 분해된 펩타이드 질량으로부터 단백질을 동정하는 방법, 그리고 단백질이나 펩타이드 분자량 측정에 사용되는 MALDI-TOF MS 방법의 원리와 기기 사용법을 배운다.

✓배경

1. 프로테오믹스

- 어느 시점에 어느 세포에서 발현되는 단백질의 총체, 즉 프로테옴(proteome)의 프로파일을 얻는 새로운 연구 분야를 프로테오믹스라고 한다.
- 프로테오믹스는 지금까지 알려지지 않은 생물학적 문제들의 근본적인 이해와 아울러 질병 메커니즘의 파악을 통하여 질병의 진단과 치료의 새로운 길을 열어줄 것으로 기대되고 있다.



✓배경

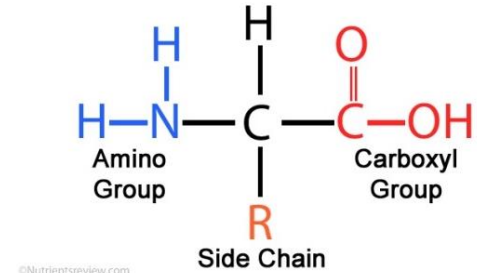
2. 단백질의 구조

- 아미노산은 중간 탄소에 염기성인 아미노기(amino group, $-NH_2$)와 산성인 카르복실기(carboxyl group, $-COOH$)가 결합된 분자로 단백질은 아미노산이 펩타이드 결합을 통해 축합된 생체 고분자이다.

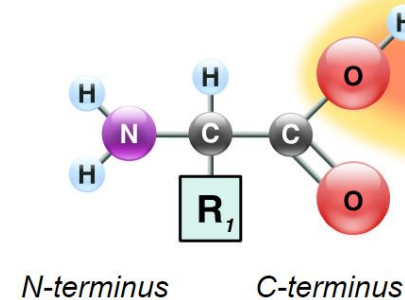
- 아미노산의 아미노기와 다른 아미노산의 카르복실기가 결합하면 한 분자의 물이 빠져나오면서 아마이드 결합 (amide bond)을 형성한다.

이렇게 만들어진 펩타이드는 또 다른 아미노산을 같은 방식으로 계속 결합시켜 나가면서 긴 아미노산 사슬인 펩타이드를 형성한다.

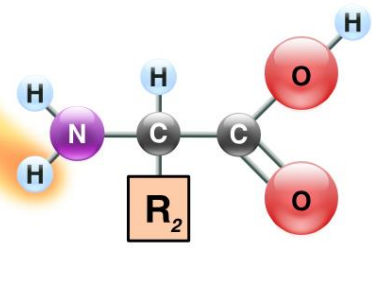
Amino Acid Structure



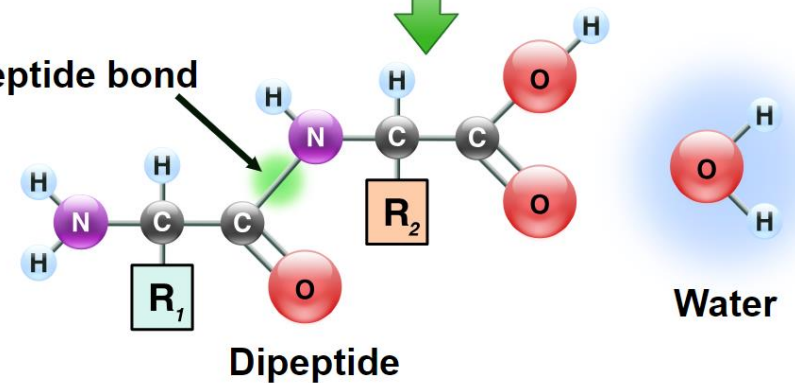
Amino acid (1)



Amino acid (2)



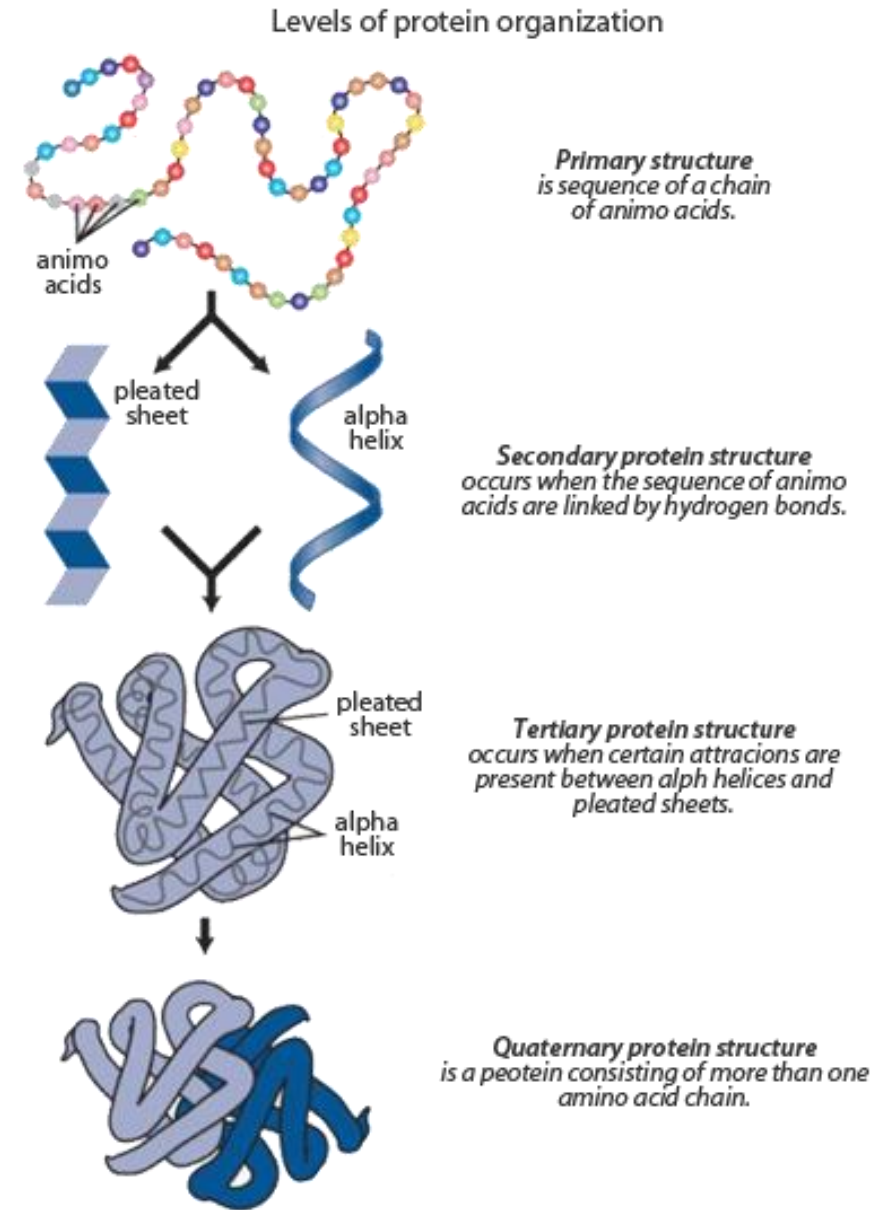
Peptide bond



✓배경

2. 단백질의 구조

- 1차 구조: 아미노산 서열
- 2차 구조: 수소 결합으로 인해 아미노산이 반복적인 패턴으로 접힘
- 3차 구조: 결사슬 상호 작용에 의해 단백질이 3차원으로 접힘
- 4차 구조: 3차 구조를 이루고 있는 독립적인 단백질 여러 개가 모여 만든 구조



✓배경

3. 펩타이드 질량 지문

- 어떤 단백질의 가수분해로 얻어진 펩타이드 조각들의 질량 분포를 조사하는 것을 peptide mass fingerprinting 또는 peptide mass mapping이라고 한다.
- 트립신(trypsin)이라는 효소는 N-말단부터 보았을 때 arginine(R)과 lysine(K) 잔기 다음의 펩타이드 결합을 선택적으로 자른다. 때로는 트립신은 R과 K 잔기 다음을 놓치기도 하는데 이를 miscleavage라고 한다.

glycine (G)	75.00	alanine (A)	89.04
serine (S)	105.03	phenylalanine (P)	115.05
valine (V)	117.07	threonine (T)	119.05
cysteine (C)	121.01	leucine (L)	131.08
isoleucine (I)	131.08	asparagine(N)	132.04
aspartic acid (D)	133.03	glutamine(Q)	146.06
lysine (K)	146.09	glutamic acid (E)	147.04
methionine (M)	149.04	histidine (H)	155.06
phenylalanine (F)	165.07	arginine (R)	174.10
tyrosine (Y)	181.06	tryptophan (W)	204.08

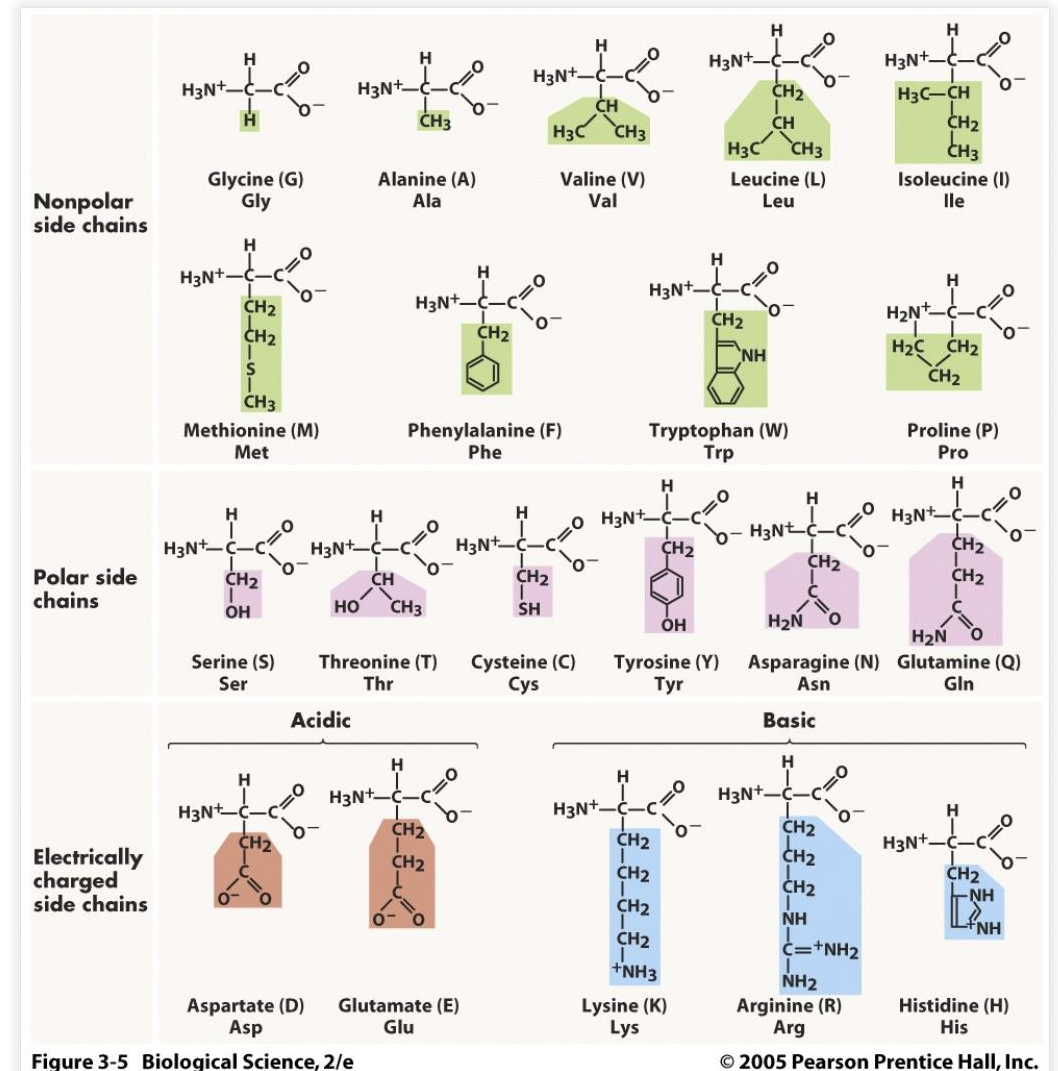


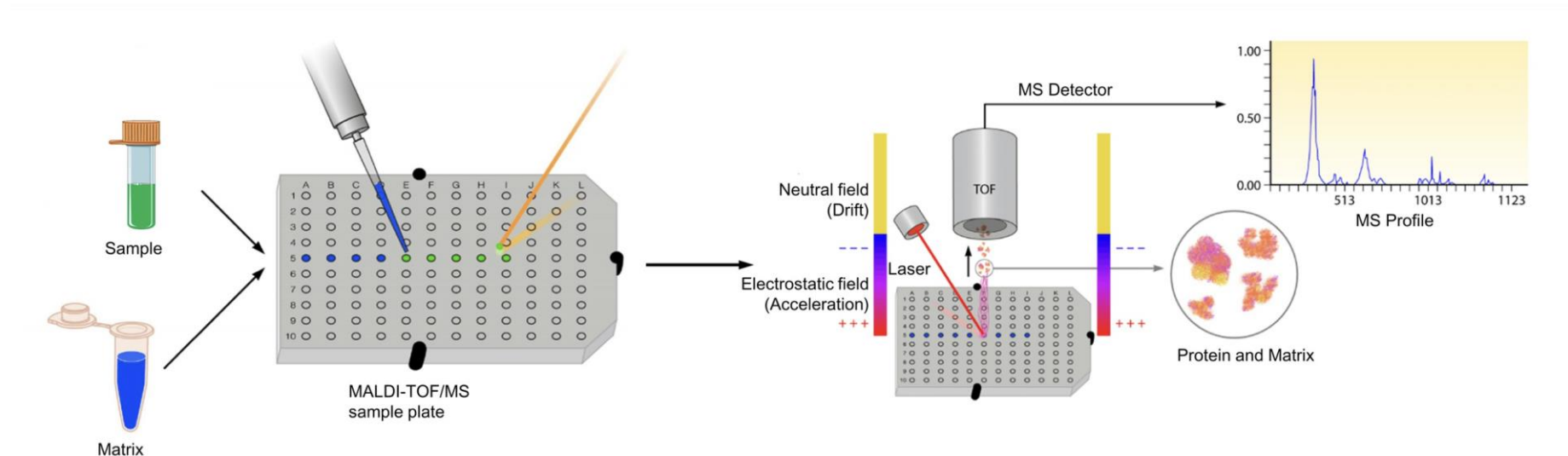
Figure 3-5 Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

✓배경

4. 펩타이드의 질량분석

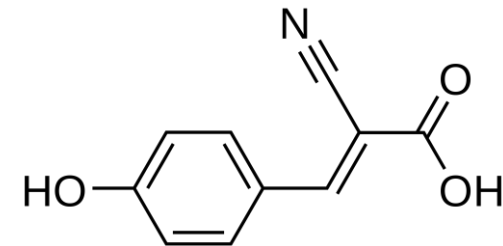
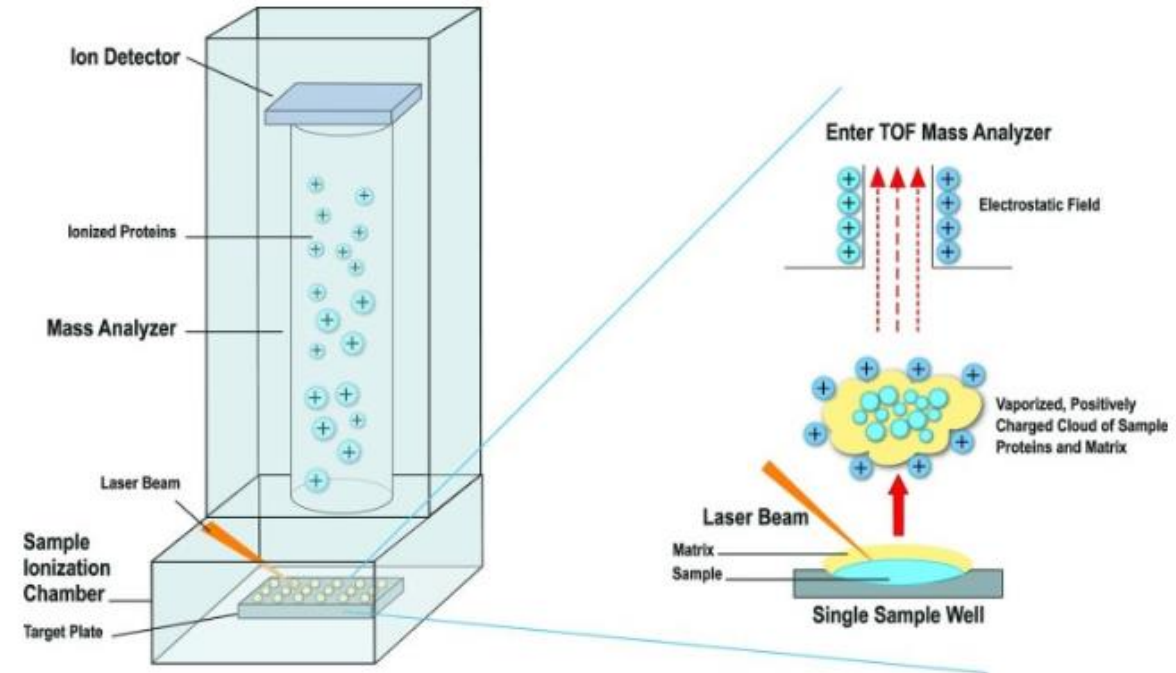
- 단백질을 가수분해해서 특정한 분자량을 가진 펩타이드들의 혼합물을 얻었다면 그 다음에 해야 할 일은 각각 펩타이드의 분자량을 정확히 측정하는 것이다.
- 분자량이 1,000 정도인 펩타이드나 수 만에 달하는 단백질의 분자량을 정확히 측정하는 것은 쉽지 않다. 그러나 1980년대 후반에 개발된 MALDI-TOF 질량분석 방법을 사용하면 펩타이드나 단백질의 분자량을 0.01% 이내의 오차 범위에서 측정할 수 있다.



✓배경

5. MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight)

- 펩타이드 혼합물에 매트릭스(matrix)라고 불리는 물질을 과량으로 넣어주고 펩타이드와 함께 결정을 만든다.
- Matrix는 자외선을 잘 흡수해서 전달하고, 또 약산이기 때문에 기화된 펩타이드에 양성자를 제공해 $[M+H]^+$ 형태의 이온 형성을 도와준다.



alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid

✓ 실험기구 및 시약

마이크로 피펫, heating block, sample plate, MALDI-TOF 질량분석기, 트립신, CHCA matrix, Lysozyme, BSA, Ovalbumin, Hemoglobin

✓ 실험과정

1. 마이크로 피펫으로 1 mg/mL 단백질 용액 50 μ L를 취하여 90°C heating block에서 10 분간 열처리하여 단백질의 가수분해가 잘 되도록 변성(denature)한다.
2. 열처리한 단백질 용액에 트립신 용액(trypsin 0.1 mg/10mM ammonium bicarbonate 1mL) 50 μ L를 가하고, 37°C heating block에서 10분 정도 가수분해한다.
3. 위의 단백질을 트립신으로 가수분해한 펩타이드 용액 (tryptic digest) 10 μ L에 메이트릭스 용액 (CHCA 10 mg/0.1% trifluoroacetic acid in 1mL of ACN : H₂O = 6:4) 10 μ L 를 가하고 섞어 준다.
4. 이 혼합 용액 1 μ L를 sample plate의 특정한 위치에 loading 한다. (loading한 위치를 기억한다.)
5. loading이 끝나면 각 조의 시료를 질량분석 한다.
6. 얻어진 peptide mass fingerprint로부터 주어진 단백질이 어느 것인지 결정한다.

1000 μ L=1mL

✓결과 처리

1. 세가지 후보 단백질에 대해서 아미노산 서열로부터 트립신 처리 후 얻어질 것으로 예상 되는 대표적인 펩타이드의 분자량과 비행시간을 계산한다.
2. 얻어진 peptide mass fingerprint와 위의 계산 결과를 비교 분석하여 어떤 단백질인지 동정한다.
3. 동정된 단백질에 대하여 miscleavage에 의한 펩타이드 피크가 있는지 살펴본다.
4. 검출된 모든 피크로부터 동정된 단백질 아미노산 서열 중 얼마가 커버되는지 % coverage를 계산해본다.

✓ 과제

1. 본 실험에서 펩타이드 조각을 얻기 위해 사용한 효소 Trypsin은 Arginine(R)과 Lysine(K) 잔기들의 카복실기 쪽 펩타이드 결합을 끊는 역할을 한다.

(1) Trypsin의 가수분해는 어떻게 특정 잔기에 특이적으로 발생하는 것일까? 효소와 기질 사이의 결합 자리를 참고하여 그 이유를 생각해보자.

(2) 또 다른 단백질 가수분해 효소인 Chymotrypsin은 Tyrosine(Y), Tryptophan(W), 그리고 Phenylalanine(F) 잔기들의 카복실기 쪽 펩타이드 결합을 끊는 것으로 알려져 있다. Chymotrypsin은 Trypsin과 유사한 결합 자리를 지니는데, 어떠한 차이로 인해 이처럼 다른 잔기 특이성을 가지는 것일까?

2. MALDI-TOF는 시료에 레이저를 쬔어 기화된 펩타이드 양이온을 전기적 에너지를 주어 가속시킨다. 기체 상태의 이온은 일정한 거리를 비행하게 되는데, 이온 검출기에 도달하는 시간을 측정하여 그 분자량을 구할 수 있다. MALDI-TOF를 이용하여 어떤 펩타이드 시료를 측정하였는데, 만약 가속된 이온이 가진 운동에너지가 10 keV이고, 이온이 1미터를 비행하는 데에 500 마이크로초가 걸렸다면 이 펩타이드의 분자량은 얼마일까?