

트리펩티드의 N-말단아미노산분석과 배열결정에 대한 연구

리혁철, 윤정호

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《나라의 과학기술을 세계적수준에 올려세우자면 발전된 과학기술을 받아들이는것과 함께 새로운 과학기술분야를 개척하고 그 성과를 인민경제에 적극 받아들여야 합니다.》

(《김정일선집》 증보판 제11권 138~139페이지)

세계적으로 특이한 기능(항비루스, 항균활성, 호르몬기능)을 가진 펩티드약물들이 개발되어 의료부문에서 질병치료에 리용되고있다.[3] 이러한 펩티드들의 아미노산배열결정은 약물의 본태와 함께 생리적작용물림새를 밝히고 그것을 치료에 적용하는데서 선차적인 요구로 나선다.

에드만법은 아미노산배열분석의 기본방법으로서 페닐이소티오시아나트를 리용하여 N-말단아미노산을 유도체화하고 무수트리플루오로초산으로 표식된 아미노산을 절단하여 분리동정하는 방법이다.[1, 2]

이로부터 우리는 에드만법으로 트리펩티드의 N-말단아미노산을 분석하고 그 배열을 결정하기 위한 연구를 하였다.

실험 방법

기구로는 초고성능액체크로마토그래프-질량분석계(《ACQUITY UPLC-MS》), 고속아미노산분석기(《Hitachi L-8900》), 자외가시선분광광도계(《UV-2201》), 푸리에변환적외선분광기(《Nicolet 6700》), 물순환식진공펌프(《SHB-DⅢ》), 항온수욕조(《DC-8006》)를, 시약으로는 페닐이소티오시아나트(PITC), 트리플루오로초산무수물(TFAA), 피리딘, 벤졸, 메틸알콜(HPLC급), 초순수를 리용하였으며 기타 모든 시약들은 분석순이다. 그리고 트리펩티드로서는 글루타티온을 리용하였다.

먼저 PITC를 리용하여 종합아미노산표준(《type H》)과 글리신표준을 유도체화한 다음 자외가시선스펙트르를 측정하여 표식아미노산의 최대흡수파장을 선택한다.

트리펩티드표준 1mg을 평량하여 시험관에 넣고 피리딘매질에서 PITC로 30min동안 N-말단아미노산의 표식반응을 진행하고 진공펌프를 리용하여 진공건조한다. 여기에 무수트리플루오로초산 100 μ L를 넣고 표식된 N-말단아미노산의 절단반응을 진행한다. 다음 반응액을 진공펌프를 리용하여 진공건조시키고 벤졸로 절단된 표식아미노산을 추출한다. 추출액을 진공건조시켜 메틸알콜에 용해한 다음 액체크로마토그래프-질량분석계(LC-MS)를 리용하여 표식아미노산을 분리동정한다. 다음 절단된 나머지 펩티드부분을 이와 같은 방법으로 절단하여 두번째 아미노산을 결정한다. 절단된 마지막아미노산은 아미노산분석기를 리용하여 분석하였다.

UPLC측정조건 : 분리탑 ACCQ-TAG ULTRA C18(1.7 μ m, 2.1mm \times 100mm), 분리탑온도 30 $^{\circ}$ C, 류속 0.4mL/min, 시료주입량 10 μ L, 검출과장 266nm, 측정시간 15min.

MS측정조건 : 원추전압 0V, 모세관전압 3kV, 탈용매온도 200℃, 탈용매기체흐름속도 650L/h, 원천온도 125℃.

고속아미노산분석기측정조건 : 질소압력 34~40kPa, 이동상 B1, B2, B3, B4, B5, B6완충용액, 발색시약 R1, R2, R3, 완충용액류속 0.400mL/min, 발색시약류속 0.350mL/min, 분리탑온도 57℃, 반응탑온도 135℃, 측정파장 570nm(검출기 1), 440nm(검출기 2), 시료주입량 20μL, 분석시간 53min.

실험결과 및 해석

PITC유도체화된 종합아미노산과 글리신의 자외가시선흡수스펙트럼 그림 1의 1과 2에서 보는바와 같이 200~400nm사이에서 자외가시선흡수스펙트럼을 측정한 결과 PITC유도체화된 아미노산들의 최대흡수파장은 266nm이며 선행연구[1]에서 밝힌 자료와 일치하였다.

글루타리온의 푸리에변환적외선흡수스펙트럼 그림 2에서 보는바와 같이 적외선흡수스펙트럼자료기지에 반영된 글루타리온의 스펙트럼과 우리가 구입한 글루타리온표준의 푸리에변환적외선흡수스펙트럼이 일치된다는것을 알수 있다.

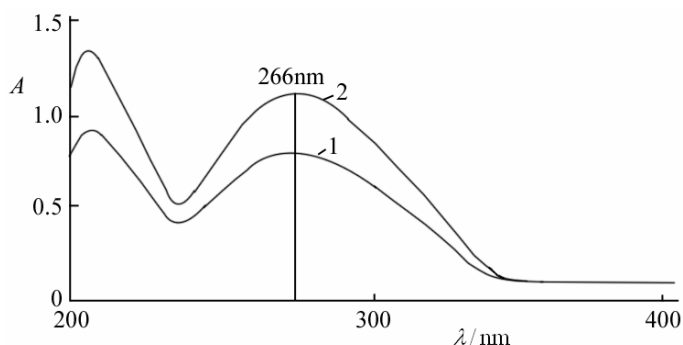


그림 1. PITC유도체화된 종합아미노산과 글리신의 자외가시선흡수스펙트럼
1-Gly의 PITC유도체의 흡수스펙트럼,
2-종합아미노산표준의 PITC유도체의 흡수스펙트럼

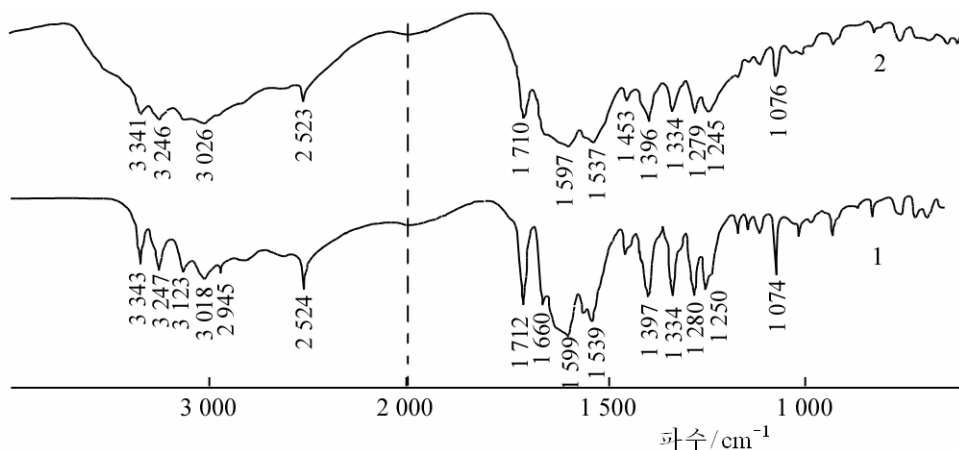


그림 2. 글루타리온의 푸리에변환적외선흡수스펙트럼
1-자료기지, 2-글루타리온표준

LC-MS를 리용한 N-말단아미노산의 분리동정 최대흡수파장 266nm에서 얻은 표식된 N-말단아미노산의 크로마토그램은 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 검출파장을 266nm로 설정하였을 때 3개의 봉우리가 나타나

는데 그중에서 첫번째 봉우리는 용매봉우리며 유지시간 6.04와 12.5min에서 2개의 기본봉우리가 나타났다. 이 2개의 봉우리들에 대한 MS분석을 진행한 결과는 그림 4, 5와 같다.

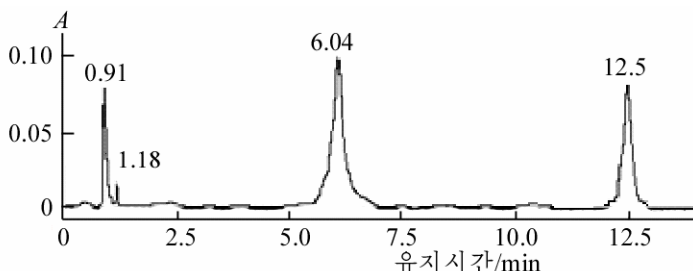


그림 3. 표식된 N-말단아미노산의 크로마토그램

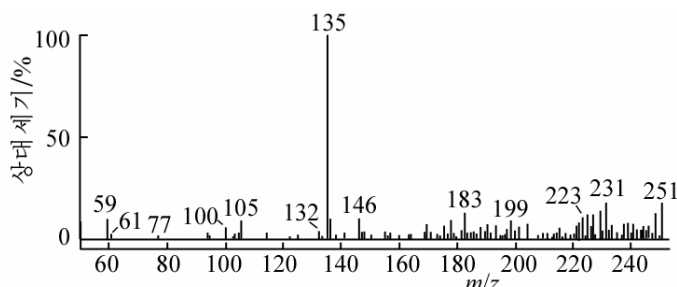


그림 4. 유지시간 6.04min 봉우리의 질량스펙트럼

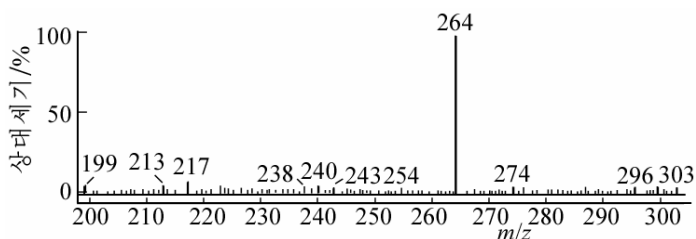


그림 5. 유지시간 12.5min 봉우리의 질량스펙트럼

그림 4에서 보는바와 같이 유지시간 6.04min에서 용출된 성분의 m/z 는 135로서 유도체 화시약인 PITC의 분자량과 일치하였다.

그리고 그림 5에서 보는바와 같이 유지시간 12.5min에서 용출된 성분의 m/z 는 264로서 Glu의 PITC유도체인 PTH-Glu의 분자량과 일치하였다. 이로부터 트리펩티드가 정확히 절단되었으며 표식된 N-말단아미노산이 Glu라는것을 알수 있다.

LC-MS를 리용한 두번째 아미노산의 분리동점 최대흡수파장 266nm에서 표식된 두번째 아미노산의 크로마토그램은 그림 6과 같다.

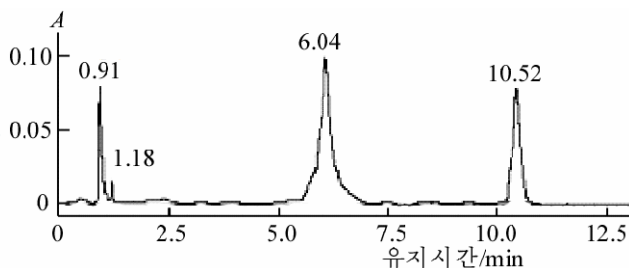


그림 6. 표식된 두번째 아미노산의 크로마토그램

그림 6에서 보는바와 같이 두번째 봉우리는 유도체화시약의 봉우리이므로 유지시간 10.52min 봉우리에 대한 MS분석을 진행하였다.(그림 7)

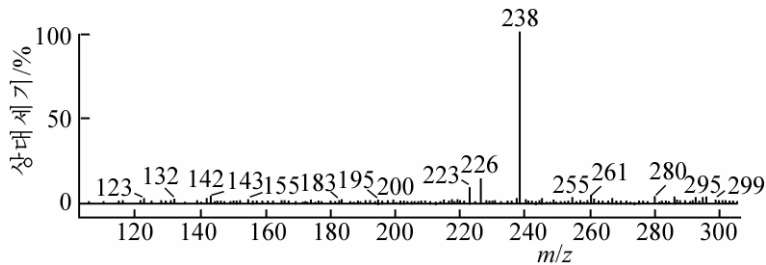


그림 7. 유지시간 10.52min 봉우리의 질량스펙트럼

그림 7에서 보는바와 같이 유지시간 10.52min에서 용출된 성분의 m/z 는 238로서 Cys의 PITC유도체인 PTH-Cys의 분자량과 일치하였다. 이로부터 두번째 아미노산이 정확히 절단되었으며 표식된 두번째 아미노산이 Cys라는것을 알수 있다.

고속아미노산분석기를 리용한 절단된 세번째 아미노산의 분리동정 그림 8에서 보는바와 같이 이온교환크로마토그램에서 Gly의 봉우리가 나타났다. 그러므로 최종추출 후 얻어진 수용액상에는 절단된 유리Gly만이 들어있다는것을 알수 있다.

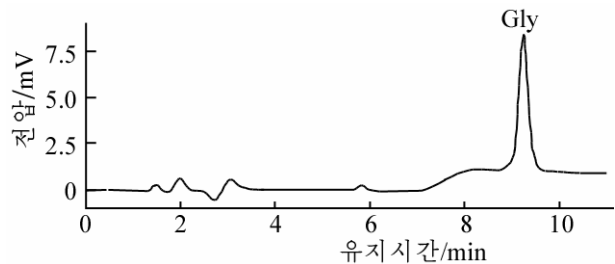


그림 8. 최종추출 후 얻어진 수용액의 이온교환크로마토그램

따라서 트리펩티드의 아미노산배열이 Glu-Cys-Gly라는것을 알수 있다.

맺 는 말

에드만법을 리용하여 트리펩티드인 글루타티온을 절단하고 표식된 N-말단아미노산과 두번째 아미노산을 LC-MS를 리용하여 분리동정하였다.

다음으로 아미노산분석기를 리용하여 절단된 세번째 아미노산을 측정함으로써 트리펩티드의 배열을 결정하였다.

참 고 문 헌

- [1] David L. Nelson et al.; Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman, 82~98, 2008.
- [2] Donald Voet et al.; Biochemistry, John Wiley & Sons, 164~167, 2011.
- [3] Glen P. Jackson et al.; Science and Justice, 55, 43, 2015.

On the Analysis of N-Terminal Amino Acid and Sequence Determination of Tripeptide

Ri Hyok Chol, Yun Jong Ho

We derivated the tripeptide by PITC, cut the derivated N-terminal amino acid by trifluoroacetic anhydride and identified by using LC-MS.

Then the second amino acid was identified as above. The third amino acid was analyzed by amino acid analyzer and the sequence of tripeptide was determined.

Key words: N-terminal amino acid, tripeptide, sequence determination