

## Duplex SDS-PAGE를 이용한 단백질 분리향상

표재성<sup>1</sup> · 노시훈<sup>1</sup> · 송진수<sup>2</sup> · 이경현<sup>2</sup> · 김희준<sup>2</sup> · 박정일<sup>1</sup> · 권성원<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 종합약학연구소, <sup>2</sup>서울대학교 화학과

(2006. 9. 22. 접수. 2006. 11. 20. 승인)

### The enhancement of protein separation by duplex SDS-PAGE

Jae Sung Pyo<sup>1</sup>, Si Hun Roh<sup>1</sup>, Jin-Su Song<sup>2</sup>, Kyung Hyeon Lee<sup>2</sup>, Hie-Joon Kim<sup>2</sup>,  
Jeong Hill Park<sup>1</sup> and Sung Won Kwon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences,  
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received September 22, 2006; Accepted November 20, 2006)

**요약:** SDS-PAGE를 이용한 일반적인 단백질 분리는 단백질을 분자량에 따라 분리하는 방법이며 가장 보편적이고, 간단한 방법 중의 하나이다. 본 연구는 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 두 번에 걸쳐 동일한 분리 원리로 이차원으로 전개하는 방법의 전기영동을 시도하여 기존의 일차원 전기영동 분석법과 비교하였으며, 그 결과 향상된 분리능이 본 연구의 이차원 전기영동법에서 확인되었다. Gel에서 분리된 단백질들은 MALDI TOF MS를 이용하여 동정하여 서로 다른 단백질임이 확인되었으며, 이러한 duplex SDS-PAGE 분리법은 상대적으로 적은 비용으로 단백질 분리능을 용이하게 향상시킬 수 있는 경제적인 분석법으로 이용될 수 있을 것이다.

**Abstract:** The protein separation with molecular weight using SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) is the one of the most conventional and simple techniques. In, this study, two dimensional SDS-PAGE using same separation principle consecutively was investigated and compared with one dimensional SDS-PAGE. The enhanced separation from duplex SDS-PAGE was observed and separated proteins in the gel were identified by MALDI TOF MS. Identified proteins from different gel spots were found to have different gi numbers. Therefore, duplex SDS-PAGE separation method will be used for economic separation method in the future because only tiny amount of inexpensive reagents are used to perform duplex SDS-PAGE.

**Key words :** protein separation, SDS-PAGE, MALDI TOF MS

### 1. 서 론

인체 내에서 기능을 가지는 단백질은 대략 3만-10만 개로 추정하고 있고, 변형된 것까지 합하면 그 수

는 천문학적이다. 그리고 그러한 단백질들은 유전체들에 의해 발현된 최종 산물이며 생체 내의 여러 작용 및 질병에 관련하기 때문에 신약 개발 및 약에 의한 생체 변화를 이해하기 위해서는 단백질 차원의 변화

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-880-7844 Fax : +82-(0)2-886-7844

E-mail: swkwon@snu.ac.kr

에 관심을 가져야 하며, 현대 과학에서는 단백질 분석법을 통하여 그 변화 정도를 확인하고 있다.<sup>1,2</sup>

오늘날 많이 사용되고 있는 단백질학 연구의 주요 목표는 단백질의 발현과 발현 후 변형, 기능 및 조절 작용, 다른 단백질과의 상호작용, 결합 등에 초점을 두어 분자생화학적으로 이들 단백질간의 기능 및 상호연관 네트워크를 규명하는 것이다.<sup>3,4</sup> 그러기 위해서는 단백질의 분리 및 동정이 기본이 되어야만 하는데 2D-electrophoresis는 생체 내에 있는 수천 수백 가지의 단백질을 분리할 수 있는 가장 대표적인 방법이다. 2D-electrophoresis는 기본적으로 단백질의 두 가지 성질을 이용하여 분리하는 것이다. 첫 번째는 특별히 제작된 IPG strip을 이용, 단백질을 각각의 고유 등전점별로 분리하는 것이고, 두 번째는 IPG strip 위에서 분리된 단백질을 수직방향으로 SDS-PAGE를 하여 분자량별로 분리하는 것이다. 이 때 쓰이는 SDS-PAGE는 1970년대 초반 영국의 Laemmli에 의하여 제안되어 몇 차례의 개량을 거치게 되었으며, 최근에는 단백질 분해능과 검출능이 상당한 수준까지 향상된 gel의 망상형 구조를 이용하여 단백질을 분자량의 차이에 따라 분리하는 방법이다.<sup>5,6</sup> SDS-PAGE는 한천 gel에 비해 큰 분자량의 분리에 주로 쓰이며, 단백질의 정성 및 정량분석 등에 매우 용이한 장점이 있으며 단백질의 양이 적을 경우 IPG strip을 이용한 단계를 생략하고 SDS-PAGE만을 이용하여 분석을 하기도 한다. 그러나 일반적으로 SDS-PAGE를 이용하여 분리를 해도, 양이 많은 경우 분리된 단백질 간의 겹침이 발생하거나 등의 이유로, 등전점에 따른 단백질 일차 분리를 병행하고 있다. 하지만 이러한 IPG strip을 이용함에 있어서는 몇 가지 단점이 있다. 먼저 분석시간이 오래 걸린다는 것과 비용이 많이 소요되기에 다량의 시료를 분석하는 데에는 한계가 있다는 것이다. 따라서 본 연구에서는 그러한 단점을 극복하기 위해서 IPG strip을 이용하지 않으면서도 단백질을 보다 효과적으로 분리할 수 있는 방법을 연구하던 중, SDS-PAGE만을 이용하여 단백질을 분석 하는 방법을 새로이 고안하였다. 이는 바로 duplex SDS-PAGE법으로서 분자량의 차이에 따라 1차 전개가 끝난 acrylamide gel을 적당한 크기로 자른 다음, gel을 수평으로 눕혀서 2차 전개를 시행하는 방법이다. Duplex SDS-PAGE 분석 시, IPG strip을 사용하지 않기 때문에 비용을 최소화하면서도 빠른 시간 내에 단백질을 분리 할 수 있는 한편, 일반적인 SDS-PAGE와 비교하여서도 그 분리능의 개선 및 겔 염색 후 단백질 스팟들의 위치 확인이 더 용이함을

알 수 있었다.

## 2. 연구방법

### 2.1 시약 및 기기

시료의 분석에 이용한 전기영동장치는 전력공급장치는 Amersham사의 EPS 3501 XL을 사용하였고, 분리에 이용한 수조는 Invitrogen사의 XCell SureLock을 사용하였다. 1차 전기영동에 사용한 gel은 Invitrogen사의 NuPAGE Bis-Tris gel 4-12%이며 2차 전기영동에 사용한 gel은 Laemmli 방식의 10% gel을 만들어 사용하였다. Running buffer는 Invitrogen사의 NuPAGE MES Running buffer와 NuPAGE MOPS Running buffer를 사용하였으며, gel을 제조할 때 사용한 ammonium persulfate(A.C.S grade), TEMED(ultra pure grade), 29:1 acylamide/bis solution(ultra pure grade, 40%), SDS 20% solution(biochemistry grade), Tris(ultra pure grade)는 Amresco사로부터, gel을 고정하기 위해 사용한 ultrapure agarose, LDS sample loading buffer 및 staining solution으로 쓰인 Colloidal Coomassie Blue staining kit은 Invitrogen사로부터 구입하였다. A549 세포주는 한국세포주은행으로부터 분양받았으며, cell lysis buffer는 cell signaling technology으로부터, protease inhibitor인 phenylmethanesulfonylfluoride와 CHCA( $\alpha$ -cyano-4-hydroxy cinnamic acid)는 sigma사로부터 구입을 했으며, 단백질 분석에 쓰인 mass spectrometer는 Bruker Daltonics사의 Autoflex2를 사용하였다.

### 2.2 A549 세포주의 단백질 추출

A549 세포주를 T-75 배양용기에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 성장이 80%정도 될 때까지 배양한 후, 배지를 제거하고 PBS 10 mL로 2번 세척하여 남은 배지와 부착되지 않은 cell을 완전히 제거하였다. 부착된 A549 세포주만 남은 T-75 배양용기에 cell lysis buffer 0.5 mL와 PMSF 0.08 mg을 혼합하여 넣고 0°C에서 5분 동안 incubation 한 후, scraper로 긁어서 취한 다음, 14,000 g에서 30분 동안 원심분리하여 상정액을 취하였다. 상정액의 단백질을 정량한 후, duplex SDS-PAGE를 실시하였으며 단백질 정량은 Lowry 법을 사용하였다.

### 2.3 전기영동

단백질 50 µg과 LDS sample buffer 5 µL를 혼합한 후 4-12% polyacryl amide gel에 loading 하여 NuPAGE

MES running buffer를 사용하여, 150 V로 90분간 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 후, polyacrylamide gel을 단백질이 전개된 세로 방향으로 1~2 mm 정도의 폭으로 2개를 자른 다음, 하나는 바로 염색을 다른 하나의 gel은 10% polyacrylamide gel에 가로방향으로 길게 loading 한 후, 0.5% agarose를 이용하여 고정을 시켰다. 고정이 끝난 후, NuPAGE MOPS running buffer를 이용하여, 150 V로, 80분 동안 전기영동을 하였다.

#### 2.4. 염색 및 효소 처리

전기영동이 끝난 gel은 40% ethanol과 10% acetic acid로 10분 동안 고정화(fixation)시키고 Colloidal Commassie Blue staining kit을 사용하여 염색하였다.

염색이 끝난 후 분석할 부위들을 오려낸 다음 acetonitrile과 증류수 1:1용액으로 탈색시킨 후, acetonitrile로 dehydration을 한 후, trypsin 용액(5 µg/mL in 20 mM ammonium bicarbonate) 10 µL와 혼합하여 37°C에서 12시간 incubation하였다.<sup>8</sup>

#### 2.5. MALDI TOF MS와 Database 검색

Bruker Datonics의 Anchorchip plate를 사용하여 진행하였다. 먼저 95% 아세톤 용액에 CHCA를 포화시킨 후, 포화 용액을 이용하여 Anchorchip plate위에 thin layer를 형성시켰다. 그 위에 0.5% TFA용액과 in-gel digestion한 용액을 1:1로 섞은 후 섞은 용액 0.7 µL를 plate에 로딩한 후, 2~3분 후 0.1% TFA용액에 10 mM 농도의 ammonium phosphate로 닦아 낸 후 AutoflexII를 이용해서 분석하였다. AutoflexII의 조건은 ion source 1은 19.00 kV, ion source 2는 16.85 kV, lens는 8.55 kV, reflector는 20.00 kV, reflector 2는 9.55 kV로 조절하였고 pulsed ion extraction은 90ns로 맞추어 이용하였다. 단백질 동정은 Mascot과 연동되는 Bio-tools를 이용하여 동정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. Duplex 및 general SDS-PAGE

A549 세포주에서 추출된 50 µg의 단백질을 이용하여 Duplex 및 general SDS-PAGE를 실시한 결과 Fig. 1과 같은 결과를 얻을 수 있었다. Duplex SDS-PAGE(Fig. 1의 위쪽) 경우 분리되어 염색된 단백질들은 일반 SDS-PAGE의 세로 방향 전개가 아닌 대각선 방향의 전개를 확인 할 수 있었는데, 가로 방향의 전

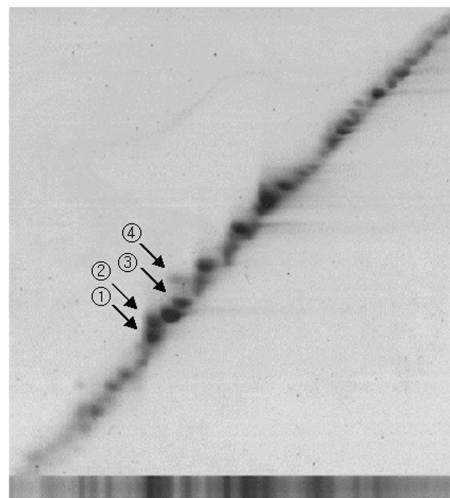


Fig. 1. Duplex and general SDS-PAGE separation. Protein spots of interest are numbered. (Lower position of Fig. 1 is general SDS-PAGE separation, and upper is Duplex SDS-PAGE of A549 cell proteins).

개 및 분리는 1차 전기영동을 통하여, 세로 방향의 전개는 2차 전기영동을 통하여 이루어졌다. 1차 전기영동만 하고 염색한 겔은 Fig. 1의 아래쪽 부분에 나타나 있다.

Fig. 1에서 Duplex SDS-PAGE의 경우 대각선 전개에서 벗어난 일부 단백질들(②번, ④번)을 확인 할 수 있었고 이러한 특이 단백질들은 수평방향의 1차 전기영동과 비교해 볼 때 1차 전기영동 후에는 분리가 되지 않은 상태로 존재했다.

즉, ①번 단백질은 ②번 단백질과, 그리고 ③번 단백질은 ④번 단백질과 서로 같은 세로축에 위치한다는 점으로 미루어보아 1차 전기영동 후에는 분리가 되지 않아 Fig. 1의 1차 전기영동에서도 ①번 단백질은 ②번 단백질과 ③번 단백질은 ④번 단백질과 동일한 위치에서 관찰할 수 있었고 아직 분리가 이루어지지 않았음을 알 수 있었다. 하지만 Duplex SDS-PAGE 후에는 ②번 단백질은 ①번 단백질과 ④번 단백질은 ③번 단백질과 서로 다른 위치로 분리 관찰 되었다. 이러한 분리능의 향상은 2차 전기영동 시 1차 전기영동의 전개조건과 달리 running buffer, acrylamide gel 조성 및 전기영동 전개시간 등을 변경한 것에서 비롯된 것 같았다. 이처럼 목표로 하는 단백질의 예상되는 성질 등을 고려하여 다양한 조건의 전개를 적용시켜 Duplex SDS-PAGE를 시행한다면 1차 전기영동보다 효율적이고 향상된 단백질 분리법을 할 수 있을 것이다.

Table 1. List of identified proteins

| Spot No. | Identified Protein  | Mass (Da) | gi Number | Identified peptide (matched peptides shown on lined)  |
|----------|---|-----------|-----------|---|
| ①        | Aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) | 35998     | 14250736  | 1 MATFVELSTK <u>AKMPIVGLGT</u> <u>WKSPLGKVK</u> E AVKVAIDAGY RHIDCAVYVQ<br>51 NEHEVGEAIQ <u>EKIQEKAVKR</u> <u>EDLFIVSKLW</u> <u>PTFFERPLVR</u> KAFEKTLKDL<br>101 <u>KLSYLDVYLI</u> <u>HWPQGFKSGD</u> <u>DLFPKDDKGN</u> <u>AIGGKATFLD</u> <u>AWEAMEELVD</u><br>151 <u>EGLVKALGVS</u> <u>NFSHFQIEKL</u> LNKPLGKYKP VTNQVECHPY LTQEKLIQYC<br>201 HSKGITVTAY <u>SPLGSPDRPW</u> <u>AKPEDPSLLE</u> <u>DPKIKEIAAK</u> <u>HKTTAAQVLI</u><br>251 <u>RFHIQRNVIV</u> <u>IPKSVTPARI</u> <u>VENIQVDFDK</u> <u>LSDEEMATIL</u> <u>SFNRNWRACN</u><br>301 <u>VLQSSHLEDY</u> <u>PFDAEY</u>  |
| ②        | 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase                        | 36806     | 1815604   | 1 MDSKQCVKL <u>NDGHFMPVLG</u> <u>FGTYAPPEVP</u> <u>RSKALEVTKL</u> <u>AIEAGFRHID</u><br>51 <u>SAHLYNNEEQ</u> <u>VGLAIRSKIA</u> <u>DGSVMREDIF</u> <u>YTSKLWSTFH</u> <u>RPELVPALE</u><br>101 <u>NSLKAQLDY</u> <u>VDLYLHSPM</u> <u>SLKPGEELSP</u> <u>TDENGKVIDF</u> <u>IVDLCTWEA</u><br>151 <u>MEKCKDAGLA</u> <u>KSIGVSNFNR</u> <u>ROLEIILNKP</u> <u>GLKYKPVQCNQ</u> <u>VECHPYFNRS</u><br>201 <u>KLLDFCKSKD</u> <u>IVLVAYSALG</u> <u>SQRDKRWDP</u> <u>NSPVLLEDPV</u> <u>LCALAKKHKR</u><br>251 <u>TPALIALRYQ</u> <u>LQGVVVVLAK</u> <u>SYNEQRIRQN</u> <u>VQVFEFQLTA</u> <u>EDMKAIDGLD</u><br>301 <u>RNLHYFNDS</u> <u>FASHPNPYS</u> <u>DEY</u>   |
| ③        | Enolase 1, (alpha)  | 47139     | 4503571   | 1 MSILKIHARE <u>IFDSRGNPTV</u> <u>EVDLFTSKGL</u> <u>FRAAVPSGAS</u> <u>TGIYEALERL</u><br>51 <u>DNDKTRYMGK</u> <u>GVSKAVEHIN</u> <u>KTIAPALVSK</u> <u>KLNVTQEKI</u> <u>DKLMIEMDGT</u><br>101 <u>ENKSKFGANA</u> <u>ILGVSLAVCK</u> <u>AGAVEKGVPL</u> <u>YRHIADLAGN</u> <u>SEVILVPAF</u><br>151 <u>NVINGGSHAG</u> <u>NKLAMQEFMI</u> <u>LPVGAANFRE</u> <u>AMRIGAEVYH</u> <u>NLKNVIKEYK</u><br>201 <u>GKDATNVGDE</u> <u>GGFAPNILEN</u> <u>KEGLELLKTA</u> <u>IGKAGYTDKV</u> <u>VIGMDVAASE</u><br>251 <u>FFRSGKYDL</u> <u>FKSPDDPSRY</u> <u>ISPDQLADLY</u> <u>KSFIKDYPVV</u> <u>SIEDPFDQDD</u><br>301 <u>WGAWQKFTAS</u> <u>AGIQVVGDDL</u> <u>TVTNPKRIAK</u> <u>AVNEKSCNCL</u> <u>LLKVNQIGSV</u><br>351 <u>TESLQACKLA</u> <u>QANGWGMVVS</u> <u>HRSGETEDTF</u> <u>IADLVVGLCT</u> <u>GQIKTGAPCR</u><br>401 <u>SERLAKYNQL</u> <u>LRIEELGSK</u> <u>AKFAGRNFRN</u> <u>PLAK</u> |
| ④        | FERM domain containing 6                                    | 70937     | 27436418  | 1 MATFVELSTK <u>AKMPIVGLGT</u> <u>WKSPLGKVK</u> E AVKVAIDAGY RHIDCAVYVQ<br>51 NEHEVGEAIQ <u>EKIQEKAVKR</u> <u>EDLFIASKLW</u> <u>PTFFERPLVR</u> KAFEKTLKDP<br>101 <u>KLSYLDVYLI</u> <u>HWPQGFKSGD</u> <u>DLFPKDDKGN</u> <u>AIGGKATFLD</u> <u>AWEAMEELVD</u><br>151 <u>EGLVKALGVS</u> <u>NFSHFQIEKL</u> LNKPLGKYKP VTNQVECHPY LTQEKLIQYC<br>201 HSKGITVTAY <u>SPLGSPDRPW</u> <u>AKPEDPSLLE</u> <u>DPKIKEIAAK</u> <u>HKTTAAQVLI</u><br>251 <u>RFHIQRNVIV</u> <u>IPKSVTPARI</u> <u>VENIQVDFDK</u> <u>LSDEEMATIL</u> <u>SFNRNWRACN</u><br>301 <u>VLQSSHLEDY</u> <u>PFDAEY</u>  |

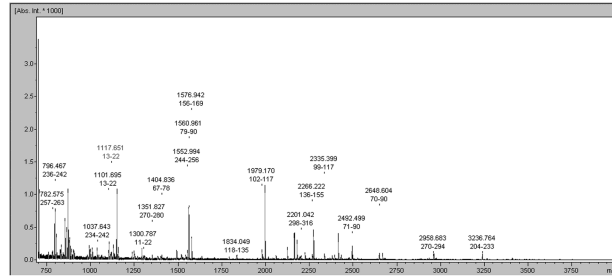
### 3.2. 단백질 동정

Duplex SDS-PAGE 결과 관찰되었던 특이 단백질 부위들을 MALDI TOF MS를 이용하여 분석하였다. 분석 결과 Table 1과 같은 결과를 얻을 수 있었으며 각각의 mass spectrum은 Fig. 2와 같다.

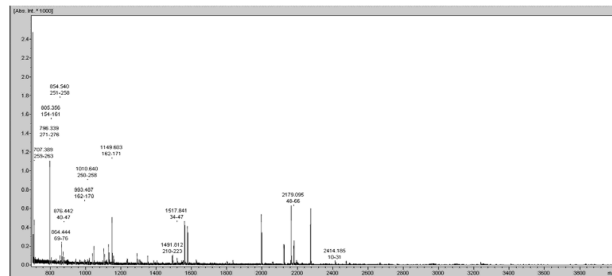
질량분석기를 이용한 단백질 동정 결과 ①번 단백질은 aldo-keto reductase family 1, member B10(aldose reductase)로 ②번 단백질은 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, ③번 단백질은 enolase 1(alpha), ④번 단백질은 FERM domain containing 6로 동정되었다. ①번 단백질은 ②번 단백질과, ③번 단백질은 ④번 단백질과 polyacrylamide gel상에서 각각 서로 같은 가로축에 위치하면서, 다른 세로축에 위치하고 있음을 Fig. 1에서 확인 할 수 있다. 즉, 같은 가로축에 위치한다는 것으로 1차 전기영동으로 분리되지 않았다는 것을 알 수 있으며 분리되지 않은 단백질들이 2차 전기영동에 의해 세로축으로 분리됨을 확인할 수 있다. 또한 2차 전기영동에서 분리되었던 각각의 단백질들인 ②번, ④번 단백질들은 ①번, ③번 단백질

들과 각각 다른 gi number를 가지고 있는 독립적인 단백질임을 확인하였기에(Table 1), 이들 ②번, ④번 단백질들은 ①번, ③번 단백질들의 단순한 클립 등의 이유로 나타난 것이 아님을 확인할 수 있다. ④번 단백질의 경우 ③번 단백질과 분자량을 비교할 때 ①번과 ②번 단백질에 비해 큰 차이를 보이는데 이는 ④번 단백질인 FERM domain containing 6이 SDS-PAGE상에서 분리가 용이하지 않은 단백질이거나, 전체 단백질 시료 중에 high abundant로 존재하는 단백질이어서 SDS-PAGE에서 분리가 제대로 이루어지지 않고 전체적으로 분포한다고 추정할 수 있다. 실제 serum의 예의 경우, 저분자, 고분자 영역 모두에서 알부민 단백질이 관찰된다. 또 다른 설명으로는 degradation된 단백질이어서 70 kDa 단백질이 47 kDa 단백질과 비슷한 위치에서 발견된다고 할 수 있으나, 이번 실험의 경우 단백질 아미노산 서열의 up/down stream의 넓은 범위에서 다양한 펩타이드가 동정되었기에 degradation되었을 가능성은 매우 낮다.

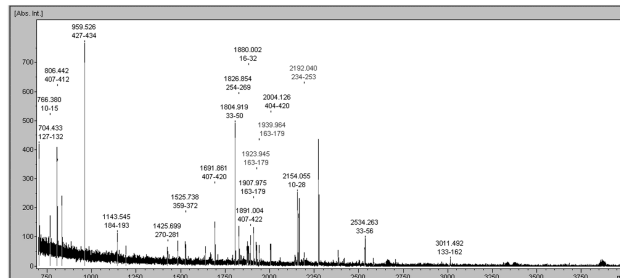
A) Mass spectrum of gel spot ①. It was identified as Aldo-keto reductase family 1, member B10.



B) Mass spectrum of gel spot ②. It was identified as 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase.



C) Mass spectrum of gel spot ③. It was identified as Enolase 1.



D) Mass spectrum of gel spot ④. It was identified as FERM domain containing 6.

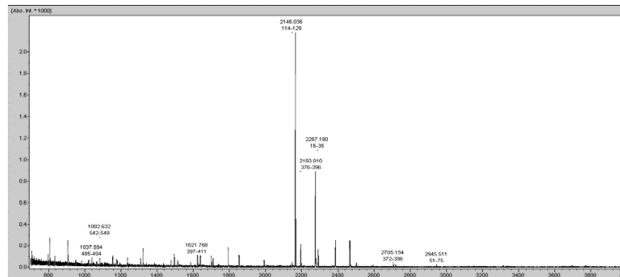


Fig. 2. MALDI TOF mass spectra of selected gel spots for the peptide mass fingerprinting analysis.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 기존의 SDS-PAGE를 통한 단백질 분석법을 개선하고자 두 번의 전기영동을 시행하는

새로운 분석법을 시도하여 기존의 전기영동법과 분리능 및 효율성 등을 비교하고자 하였다. 즉, 단백질 시료를 전기영동하여 분리한 다음 겔을 세로방향으로 자른 후, 다시 가로방향으로 놓혀 길게 loading하여

전기영동하는 방법을 사용하였다. 그 결과, 한 번의 전기영동으로 분리되지 않았던 단백질들이 두 번의 전기영동을 통하여 대각선으로 전개되면서 더 좋은 분리능을 보여주었으며, 비록 isoelectric focusing을 이용한 고가의 2D-electrophoresis보다는 떨어지는 분리능이지만 기존의 일차원 전기영동 분석법보다 우수한 분리능을 보였다. 그리고 2차 전기영동 시, running buffer의 종류, acrylamide gel 조성 및 전기영동 시간 등의 분석 조건들을 1차 전기영동과 다르게 적용할 수 있는데, 이처럼 분석하려는 단백질들의 성질을 고려하여 다양한 분석조건을 적용시킬 수 있다는 점 또한 장점이라 할 수 있다. 고가의 이차원 전기영동법과 비교 시 strip을 이용하여 단백질을 등전위점에 따라 분리하는 단계에서는 많은 비용과 시간이 소모되는 단점이 있지만, 분자량의 크기에 따라 분리되는 원리를 동일하게 두 번 적용한 Duplex SDS-PAGE의 경우, 1시간 이내의 추가 분석만을 통하여 경제적이면서 신속한 분석이 가능하다는 점, 그리고 분석 단계가 줄어들어 따른 시료의 손실을 최소화 할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

## 감사의 글

본 연구는 2006년도 보건장학회의 지원으로 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. P. Jungblut and B. Wittmann-Liebold, *J. Biotechnol.*, **41**, 111-120(1995).
2. K. Kahn, *Science*, **270**, 369-370(1995).
3. M. Norin and M. Sundstrom, *Trends Biotechnol.*, **20**, 79-84(2002).
4. A. Pandey and M. Mann, *Nature*, **405**, 837-846(2000).
5. K. Einer-Jensen, T. N. Krogh, P. Roepstorff, N. Lorenzen, *J. Virology*, **72**, 10189-10196(1998).
6. D. Ungar, T. Oka, E. E. Brittle, E. Vasile, V. V. Lupashin, J. E. Chatterton, J. E. Heuser, M. Krieger, M. G. Waters, *J. Cell Biol.*, **157**, 405-415(2002).
7. U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680-685(1970).
8. J. Kim, J. Kim, H. Kim, *Anal. Chem.*, **77**(22), 7483-7488(2005).