

칩 기반 미세관 HPLC를 이용한 단백질 분석

김보라¹ · 박종문¹ · 이후근^{1,2} ★

¹가천대학교 이길여암당뇨연구원, ²가천대학교 약학대학
(2011. 11. 14. 접수, 2011. 11. 16. 수정, 2011. 11. 16. 승인)

Chip-based microcapillary HPLC for proteomic analysis

Bora Kim¹, Jong-Moon Park¹ and Hookeun Lee^{1,2} ★

¹Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Gachon University,
Songdo-dong, Yeonsu-ku, Incheon 406-840, Korea

²College of Pharmacy, Gachon University, Songdo-dong, Yeonsu-ku, Incheon 406-840, Korea

(Received November 14, 2011; Revised November 16, 2011; Accepted November 16, 2011)

요 약: 지난 10년간 고해상도 탠덤질량분석기에 사용되는 다양한 미세관 HPLC들이 개발되어 단백질 분석연구에 사용되어져 왔다. 질량분석에 앞선 분리과정은 샘플 중의 불순물을 제거하며, 분석물을 좁은 용리 피크 내에 농축함으로써 이어지는 질량분석의 민감도를 향상시킬 수 있다. 본 총설에서는 복잡한 단백질 분석에 사용되는 미세유체 칩을 기반으로 하는 고성능 분리 기술들의 최근 개발 동향을 고찰하였다.

Abstract: Over the last decade sophisticated and powerful microcapillary HPLC for proteomic analysis have been developed increasingly and interfaced with high resolution tandem mass spectrometers. Separation prior to mass spectrometric (MS) analysis removes impurities, and concentrates analytes in the narrow elution peaks, resulting in increased sensitivity of MS analysis. This review will focus on the recent advances of on-line high-performance separation techniques based on microfluidic chips for complex proteomic analysis.

Key words : microcapillary, HPLC, microfluidic chip, proteomic analysis

1. 서 론

단백체학은 특정 조건하에서 세포내의 총체적 단백질 기능 및 변화에 관한 연구를 하는 학문으로, 조직과 세포로부터 발현된 단백질의 프로파일링은 단백질 연구의 기반이 된다. 단백질 분석기술은 분리분석기술과 질량분석기술을 결합한 액체 크로마토그래피-질량 분석(LC-MS)이 널리 사용되고 있다.

질량분석기를 이용한 단백질 연구는 electrospray ionization (ESI)¹과 matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)²와 같은 이온화 방법들이 개발됨으로써 본격화되었다. 이들 이온화 방법들은 단백질이나 펩타이드와 같은 비휘발성 분석물을 변형 또는 파괴 없이 기체 이온으로 만들어 질량분석을 가능하게 한다. 특히 ESI는 용액 상태의 샘플을 전위차(electrical potential)를 가해준 상태에서 작은 직경의 분사바늘

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)32-899-6584 Fax : +82-(0)32-899-6519

E-mail : hklee@gachon.ac.kr

(spray needle)을 통하여 대기 증으로 분무하여 기체이온을 생성하는 방식으로, HPLC 및 capillary electrophoresis (CE)와 같은 분리기술을 질량분석기에 온라인으로 결합시키는데 사용된다. ESI는 다중전하(multiple charge)를 띠는 이온들을 생성하는 특징 때문에, mass/charge (m/z) 측정범위가 제한적인(0-4000) 사중극자(quadrupole) 계열의 질량분석기에서도 4000 Da 이상의 이온들의 질량을 측정할 수 있다.

단백체 분석 LC-MS 시스템에서는 분석민감도를 극대화하기 위하여 nanospray ionization (NSI)³을 주로 사용하는데, 이는 용액의 flow rate를 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 이하로 낮춤으로써 ESI 시스템에서 용매의 증발을 촉진하는 nebulizing gas를 사용하지 않는다. NSI에서는 분무된 샘플용액 방울(droplet)들의 크기가 작고, 표면적/부피 비율이 높기 때문에 용매 분자들을 증발시키는 것이 용이하다. 이러한 특징은 이온화 효율을 증가시킴으로써 질량분석기의 검출한계를 낮추는 효과를 가져오며, Shevchenko들은 1990년대 중반 수 femtomole 수준의 펩타이드 분석을 보고한 바 있다.⁴

온라인 분리기술에 NSI를 이용하기 위하여 소형화(miniaturized) HPLC 컬럼들이 개발되었는데, 이들 컬럼들은 내경(i.d.)이 20-150 μm 의 미세관을 충전시켰으며 flow rate이 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 이하에서 펩타이드의 분리 분석이 수행되었다.⁵⁻⁷ HPLC-NSI-MS 시스템에서 LC 컬럼의 직경을 작게 할수록 질량분석의 민감도는 증가하지만, 컬럼 i.d.가 50 μm 이하 일 때, spray tip이 자주 막히기 때문에 실제로는 75 또는 100 μm 크기의 미세관 컬럼(microcapillary column)이 가장 널리 쓰이고 있다.

미세관 컬럼은 적은 양의 고정상 충전물로 채워지기 때문에 컬럼의 수명이 짧으며, 낮은 압력(<1000 psi)에서 분리를 수행하여 분리 분해능(resolution), 머무름 재현성(retention reproducibility) 등이 기존의 HPLC 컬럼보다도 낮은 편이다. 또한 극히 낮은 flow rate condition (0.2~0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$)에 의한 긴 sample loading 시간을 단축하기 위해서 상대적으로 높은 flow rate를 사용하는 precolumn (flow rate > 4 $\mu\text{L}/\text{min}$)을 함께 사용한다. Precolumn은 sample cleanup의 역할도 하지만, 두 개의 column을 사용하기 위해서는 switching valve를 사용하여 flow path를 바꾸어 주어야 하기 때문에 크로마토그래피 시스템의 tubing connection이 복잡해지는 단점이 있다.

미세관 컬럼의 성능을 향상시키는 시도로서 ultra high-pressure 미세관 컬럼이 개발되었다. 초기의 컬럼

은 75 μm i.d. \times 100 cm 크기로 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 flow rate를 사용하였을 때 약 10,000 psi의 back pressure가 걸린다. 이러한 초고압 조건에서 분리능 및 검출한계가 크게 향상되어, fourier transform ion-cyclotron resonance (FTICR) MS와 함께 사용되어 zeptomole (10^{-21} mole) 범위의 극미량 펩타이드 분석이 보고된 바 있다.^{8,9}

미세관 크로마토그래피 시스템을 향상시키는 시도로서는, 랩-온-칩(lab-on-chip) 기술을 사용하여 precolumn, 미세관 컬럼, switching valve, nanospray tip 등을 polyimide film에 집적(integration) 시킨 시스템이 Agilent사에서 개발되어 단백질 연구에 사용되고 있다.^{10,11} HPLC-chip 시스템은 컬럼 및 밸브 시스템을 단순화함으로써 LC retention의 재현성 및 sample recovery를 향상시켰고, 또한 operation의 편의성을 증대시켜 데이터 생산성을 증가시키는 특징이 있다. 본 총설에서는 이러한 특징을 가지는 HPLC-Chip을 이용한 최근 분석 기술개발 동향과 응용해 대하여 알아보고, 이를 활용한 실험 중 비표지 정량 분석법(label-free quantification)과 번역후 변형(post-translational modification) 단백질 분석법에 대하여 고찰해 보고자 한다.

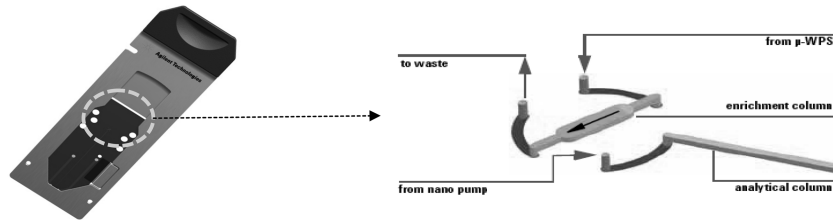
2. HPLC-Chip

Fig. 1에는 Chip-LC 시스템이 장착된 quadrupole time-of-flight (QTOF) MS system 과 칩 내부의 컬럼 구성을 나타내었다. Fig. 1(a)와 같이 크로마토그래피의 컬럼을 내장하고 있는 칩을 chip-cube에 insert하는 plug-&-play 포맷으로 장착한다. Fig. 1(b)에 나타낸 컬럼 구성은 sample loading stage를 나타낸다. Autosampler (μ -WPS)로부터 공급된 샘플이 enrichment column (precolumn)에서 농축되고 sample solvent는 waste로 빠져나가게 된다. 샘플이 loading된 후 6-port switching valve가 회전하여 enrichment column과 analytical column을 연결한 후 gradient 용액을 흘려줌으로써 LC separation이 시작하게 된다. 이때 enrichment column의 크기는 40 nL 또는 160 nL가 있으며, analytical column은 75 μm i.d. \times 15 cm가 많이 사용된다.

미세관 LC system에서 optimum 이동상의 속도는 1-2 mm/s이며, 이는 75 μm i.d. 컬럼의 경우 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 이다.¹² 그리고 미세관 컬럼에서 분리되어 나오는 peak volume은 수 십 nL 수준이기 때문에 tubing과 switching valve, tubing과 column, column과 spray tip 사이의 연결 부위에서 생길 수 있는 dead volume은 용리되는 peak들의 band broadening에 크게 영향을 미



(a)



(b)

Fig. 1. Schematics of (a) Quadrupole time-of-flight MS equipped with chip cube unit (b) HPLC-chip and inside column configuration.

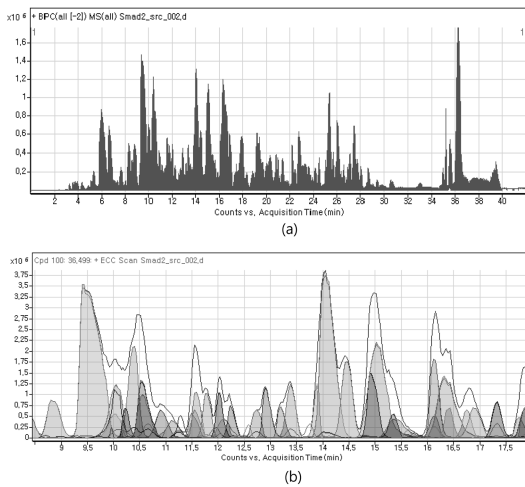


Fig. 2. Base peak chromatograms of MCF10A1 cell digest obtained from C18 HPLC-Chip/QTOF MS. (a) Base peak chromatogram (b) extracted ion chromatograms from 8.5 to 18 min (Loading flow rate:4.0 μ L/min, Gradient flow rate:0.3 μ L/min, Gradient:0-40% B/30 min, 80% B/5 min, Solvent A:2% ACN + 0.1% formic acid, Solvent B:98% ACN + 0.1% formic acid).

친다. 또한 연결부위들에서 생길 수 있는 leakage들은 그 부피가 작아서 검출하기가 어렵다. 이러한 실제 문제점들이 precolumn, valve, analytical column, 및 spray

tip 등이 하나의 unit으로 집적된 HPLC-Chip시스템에서는 최소화될 수 있다.

HPLC-Chip/QTOF MS 시스템에서 얻은 단백질 분석 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 수천 개 이상의 펩타이드를 포함하는 단백질 샘플의 경우 미세관 컬럼의 peak capacity가 충분히 높지 않기 때문에 Fig. 2(a)와 같이 많은 peak들이 겹쳐서 용리된다. Fig. 2(b)는 크로마토그램의 일부분을 확대하여, 질량분석 스펙트럼으로부터 이온 크로마토그램을 추출하여 overlap시킨 것으로 각 peak들이 tailing 없이 용리됨을 볼 수 있다.

2.1. HPLC-Chip을 이용한 단백질 정량분석

미세관 액체 크로마토그래피를 이용한 단백질 정량 분석은 미세관 컬럼을 이용한 펩타이드 분리의 재현성이 높지 않기 때문에, 크로마토그래피 peak의 면적 비교를 통한 정량 분석 보다는, isotope tagging reagent를 펩타이드에 tagging하여 정량하는 방법이 주로 사용되어 왔다.¹³ 이는 미세관 컬럼의 충전 정지상의 packing compactness가 낮고, operation back-pressure가 높지 않은 점(~1000 psi)에 기인한다. 또한 tubing, injector sample loop, valve 등이 가지는 dead volume에서의 펩타이드의 nonspecific interaction도 분리 재

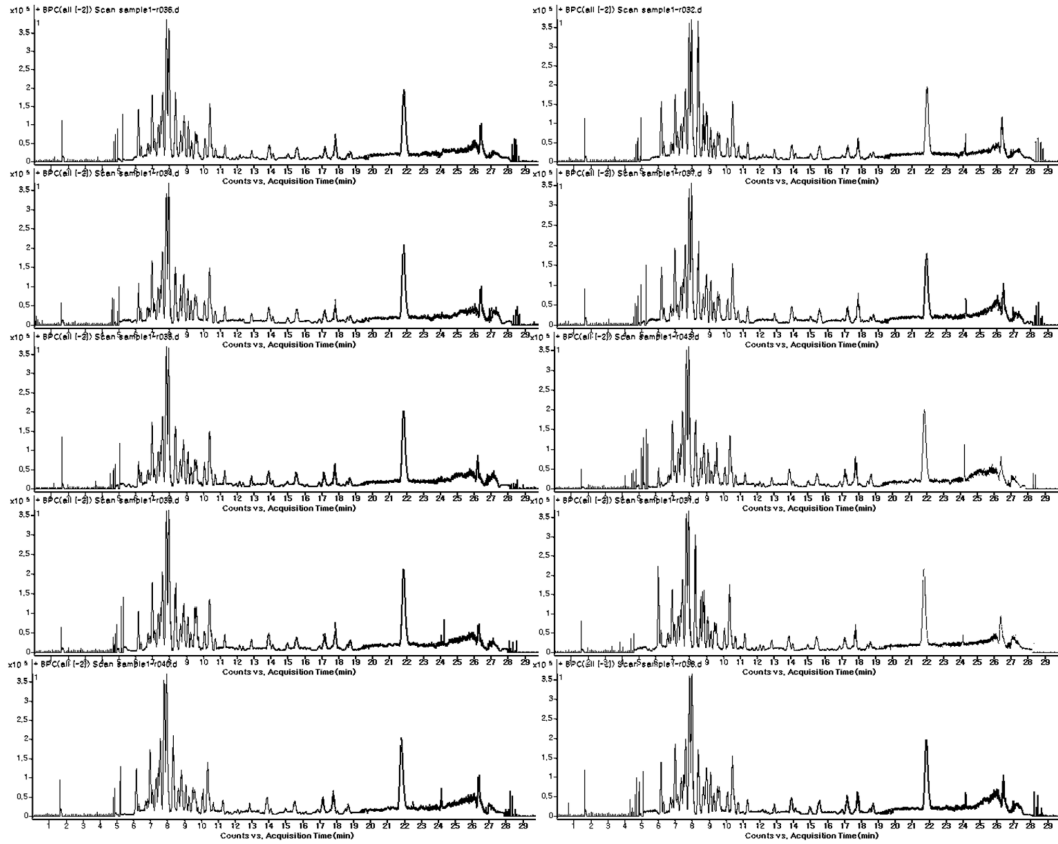


Fig. 3. Base peak chromatograms of BSA digests obtained from 10 consecutive runs. (Loading flow rate : 4.0 μ L/min, Injection amount : 0.1 μ g, Gradient flow rate : 0.3 μ L/min, Gradient : 0-40% B/20 min, 80% B/5 min, Solvent A : 2% ACN + 0.1% formic acid, Solvent B : 98% ACN + 0.1% formic acid).

현성에 영향을 미친다. HPLC-Chip의 경우 컬럼을 제외한 extra volume을 최소화하여, 높은 재현성을 실현하고 있다. Fig. 3에는 Bovine Serum Albumin (BSA) digest를 HPLC-Chip/QTOF MS를 사용하여 10 회 연속으로 분석한 결과를 나타내었다. 검출된 펩타이드들의 retention time이 2% 이내에서, peak intensity는 5% 이내에서 변하는 높은 분리 재현성을 확인할 수 있었다.

크로마토그래피 peak의 면적을 측정하는 정량법은 화학, 환경, 제약 등의 분야에서 널리 사용되어 왔지만, 단백질학 분야에서는 미세관 액체 크로마토그래피의 기술 발전 및 데이터 처리를 위한 bioinformatics 소프트웨어의 개발로 2000년대 후반부터 본격적으로 사용되고 있다. 여러 가지 bioinformatics tool들이 개발되었지만, 본 연구실에서는 미국 시애틀에 위치한 Institute for Systems Biology에서 개발한 CORRA (Computational framework and tools for LC-MS discovery and targeted mass spectrometry-based proteomics)¹⁴를

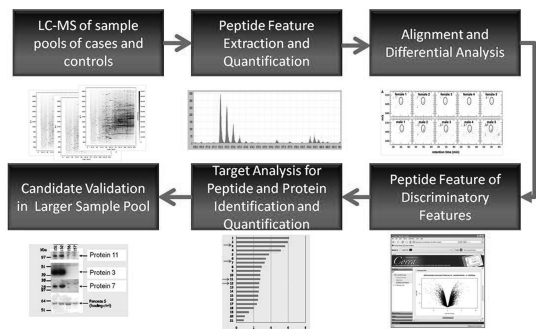


Fig. 4. Workflow of CORRA : a discovery-based approach for generating biomarker candidate.

사용하여 HPLC-Chip/QTOF MS 정량분석을 수행하고 있다.

Fig. 4에는 CORRA의 workflow를 나타내었다. 각 샘플당 multiple LC-MS run을 수행 후, 각 펩타이드의 ion chromatogram을 추출한 다음, multiple run에서

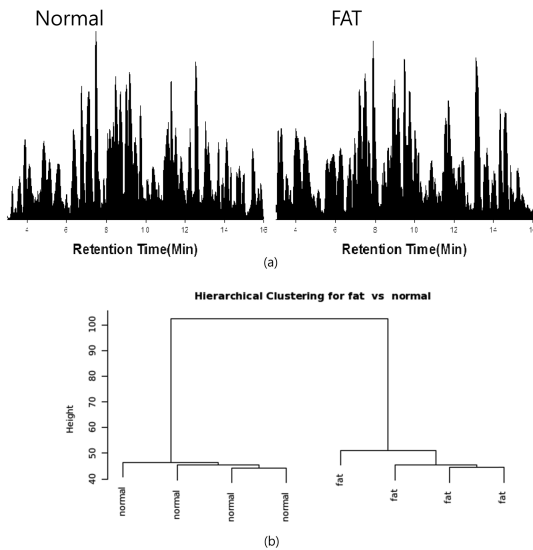


Fig. 5. Analysis of mouse tissue proteomes (a) chromatograms of normal vs. fat mouse samples obtained from HPLC-Chip/QToF MS, (b) unsupervised clustering.

같은 펩타이드들의 retention time을 align하고, intensity normalization 과정을 거치게 된다. 이렇게 처리된 펩타이드 peak들을 비교 정량하게 되며, abundance variation이 experimental error 또는 biological factor의 영향인지를 통계적 분석처리를 통하여 검증한다. Fig. 5에는 normal mouse와 16 주 동안 고지방 사료를 섭취한 mouse의 피하지방세포의 단백체를 비교정량한 결과를 나타내었다. Fig. 5(a)는 각 단백질 샘플의 chromatogram이며, Fig. 5(b)는 peak pattern의 clustering 분석 결과이다. Fig. 5(b)에서 보는 바와 같이 각각의 샘플들에 대해서 4 반복 실험을 실시했을 경우 normal 과 fat 샘플의 peak pattern이 확연히 차이가 남을 알 수 있다.

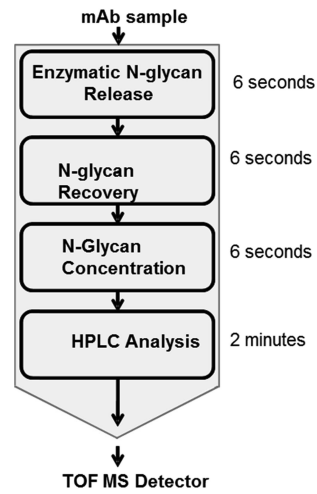


Fig. 6. Workflow of mAb-glyco chip.

2.2. HPLC-Chip을 이용한 당분석

생체 내에서 발견되는 탄수화물은 신호 전달, 세포성장, 염증, 생체방어, 면역 등의 과정에서 중요한 역할을 하며, 특히 당쇄화 단백질의 당(glycan) 분석은 바이오시밀러 산업분야에서 단일항체 의약품의 functionality 평가에 있어 중요한 역할을 차지하고 있다. 최근 크로마토그래피와 질량분석기를 이용한 표준화된 분석방법의 구축이 많이 시도되고 있으며 Agilent사에서 개발된 mAb-Glyco Chip은 당분석을 전처리 과정을 거치지 않고 빠른 시간에 질량분석기에서 분석할 수 있도록 한다.¹⁵

기존의 당 분석은 LC/Fluorescence 방법의 경우 3-4 일, MALDI MS 범의 경우 약 8시간이 걸리지만, Fig. 6에서 보는 바와 같이 glyco-chip을 사용할 경우 약 10분만에 분석을 완료할 수 있다. Glyco-chip은 PNGase F 효소가 bead에 부착된 affinity column과 carbon graphite 미세관 컬럼으로 구성되어 있다. 단일항체가

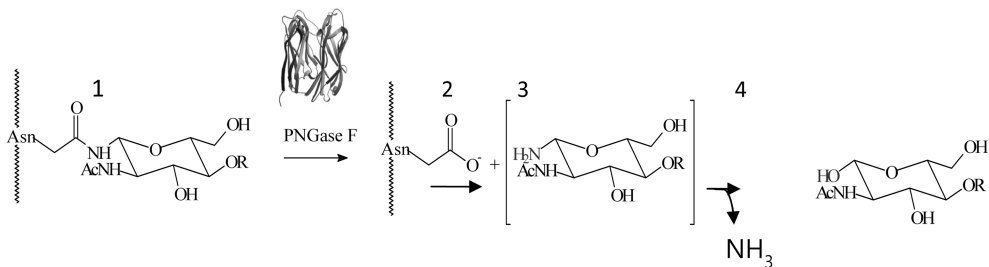


Fig. 7. PNGase F cleaving reaction : 1. C-N bond cleavage, 2. Conversion of asparagine to aspartic acid, 3. β -glycosylamine intermediate, 4. Hydrolysis of β -glycosylamine.

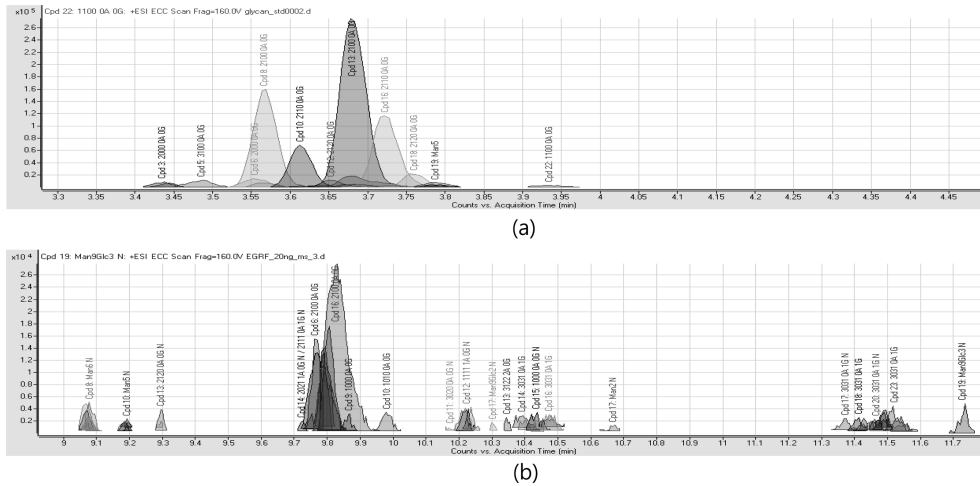


Fig. 8. Glycan ion chromatograms of (a) glycan standard mixture (b) EGFR protein.

chip에 load되었을 때, PNGase F는 항체와 당의 결합을 끊어주는 역할을 하며, 이 때 release된 당은 graphite 컬럼에 농축되어 질량분석기로 주입된다. PNGase F는 glycosylated asparagine의 side chain의 C-N bond를 끊어주며, 이때 asparagine은 aspartic acid로 변환되고, 떨어져 나온 glycan unit는 intermediate인 β -glycosylamine을 형성하지만 약 20 분 정도의 시간 간격을 두고 hydrolysis가 진행되어 amine 그룹이 hydroxyl group으로 치환된다.¹⁶ 이때 β -glycosylamine은 positive mode 질량분석에서 이온화 효율이 높지만, hydrolyzed된 form은 이온화 효율이 매우 낮게 된다. 이것은 amine 그룹의 경우 쉽게 proton과 결합하여 positive charge를 띠게 되지만, hydroxyl group은 proton을 수용할 수 없기 때문이다. Glyco-chip의 경우 10 분 이내에 모든 분석이 끝나기 때문에 hydrolysis에 영향을 받지 않고, 높은 민감도의 당 분석을 수행할 수 있다. Fig. 8에는 Glyco-Chip을 이용한 standard glycan mixture 분석(a)과 EGFR 단백질의 glycan 분석 결과(b)를 나타내었다. Fig. 8(b)의 경우 총 50 ng의 단백질을 loading하여 얻은 당분석 결과이다.

3. 결론

HPLC-Chip은 tubing, valve, column, spray tip 등의 장치가 내장되어 있어, 기존의 미세관 컬럼에 비하여 높은 머무름 재현성을 가지고 있으며 특히 비표지 단백질 정량 분석에 있어 높은 성능을 보여주고 있다. 또한 plug-&-play 포맷의 작동방식은 analytical instru-

mentation의 지식이 높지 않은 생물학, 의학 연구자들에게 높은 편의성을 제공한다. 또한 키트화된 장치의 특성상 질량분석기와의 interfacing이 용이하며 실험상의 troubleshoot를 줄여주는 장점이 있다. 이러한 장점은 향후 HPLC-Chip/MS 시스템이 단백질뿐만 아니라 대사체(metabolomics), 당쇄학체(glycomics) 등의 분야로 활용범위가 넓어질 것으로 예상된다.

감사의 글

이 논문은 2011년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2011K000118, 2011K000884, World Class University (WCU) R322011000102150).

참고문헌

1. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse, *Science*, **246**, 64-71 (1989).
2. M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301 (1995).
3. M. Wilm and M. Mann, *Anal. Chem.*, **68**, 1-8 (1996).
4. A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann, *Anal. Chem.*, **68**, 850-858 (1996).
5. Y. Ishihama, *J. of Chromatogr. A*, **1067**, 73-80 (2005).
6. M. A. Moseley, L. J. Deterding, K. B. Tomer and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **63**, 1467-1473 (1991).
7. L. A. Holland and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **67**,

- 3275-3283 (1995).
8. Y. Shen, R. J. Moore, R. Zhao, J. Blonder, D. L. Auberry, C. Masselon, L. Pasa-Tolic, K. K. Hixson, K. J. Auberry and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, **75**, 3596-3605 (2003).
 9. M. E. Belov, G. A. Anderson, M. A. Wingerd, H. R. Udseth, K. Tang, D. C. Prior, K. R. Swanson, M. A. Buschbach, E. F. Strittmatter and R. J. Moore, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **15**, 212-232 (2004).
 10. H. Yin, K. Killeen, R. Brennen, D. Sobek, M. Werlich and T. Goor, *Anal. Chem.*, **77**, 527-533 (2005).
 11. M. H. Fortier, E. Bonneil, P. Goodley and P. Thibault, *Anal. Chem.*, **77**, 1631-1640 (2005).
 12. H. Yin and K. Killeen, *J. Sep. Sci.* **30**, 1427-1434 (2007).
 13. H. Lee, E. C. Yi, B. Wen, T. P. Reily, L. Pohl, S. Nelson, R. Aebersold and D. R. Goodlett, *J. Chromatogr. B*, **803**, 101-110 (2004).
 14. M.-Y. Brusniak, B. Bodenmiller, D. Campbell, K. Cooke, J. Eddes, A. Garbutt, H. Lau, S. Letarte, L. N. Mueller, V. Sharma, O. Vitek, N. Zhang, R. Aebersold and J. D. Watts, *BMC Bioinformatics*, **9**, 542 (2009).
 15. M. A. Bynum, H. Yin, K. Felts, Y. M. Lee, C. R. Monnell and K. Killeen, *Anal. Chem.*, **81**, 8818-8825 (2009).
 16. J. R. Rasmussen, J. Davis, J. M. Risley and R. L. Van Etten, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**(3), 1124-1126 (1992).