

## 단백질의 효소 분해 (오븐 VS 마이크로웨이브)



단백질 효소 분해에 있어 일반적인 오븐과 마이크로웨이브 방식의 비교 분석

### 1. 실험 개요

단백질 효소 분해에 있어 일반적이 오븐과 마이크로웨이브 방식을 비교 분석하기 위하여 2011년 3월 한 달 간 비교 실험을 진행하였다.

### 2. 실험 절차



### 3. 실험 프로토콜 (In-Solution Digestion)

	오븐	마이크로웨이브
Chemical Reagent	효소: 트립신 Buffer/Salt Removal: Genotech Perfect FOCUS™ 또는 100%(w/v) TCA	
Solutions	25Mm NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> : 100mg NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> / 40ml Water 환원액: 10mM Dithiothreitol(DTT) in 25mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 알킬화제: 55mM iodoacetamide in 25mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 추출액: 50% ACN/45% H <sub>2</sub> O / 5% formic acid	
<b>단백질 분해 과정</b>		
Disulfide Reduction	1) 각 샘플의 환원액 20μl을 넣어준다. 2) 56°C에서 1시간 동안 배양기에 넣고 shaking한다.	1) 작동 2) 55°C에서 10분동안 50W의 마이크로웨이브 조사
Sulfhydryl Alkylation	1) 샘플에 알킬화제 20μl을 넣어준다. 2) 1시간동안 암흑상태의 상온에서 배양	
Precipitation	Genotech Perfect FOCUS™ 혹은 TCA를 이용하여 Buffer, Salt, DTT, 요오드아세트아미드를 제거한다.	
Typsin Digestion	1) 트립신 20μg와 1.6mL의 NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 를 섞어 트립신 용액을 만든다. 2) 트립신 용액과 샘플을 섞어준다. (트립신과 단백질 비율 1:10~1:100) 3) 37°C에서 7시간/Overnight동안 배양	1,2는 작동 3) 55°C에서 15분/30분 동안 50W의 마이크로웨이브를 조사
Sample Clean up	1) 샘플에 추출액 200μl을 넣어준다. 2) 30분간 초음파 처리 3) 5% ACN/0.1% formic acid 10μl로 건조된 펩타이드를 용해시킨다	
분석	질량 분석기로 분석	

## 결과

검출된 단백질 (gi No.*)	분해 방법		Score*	Sequence Coverage*	검출된 펩타이드 수
gi 248147	오븐	7시간	136	86%	5
		Overnight	117	86%	4
	마이크로웨이브	15분	118	86%	5
		30분	139	86%	5
gi 83406093	오븐	7시간	281	32%	9
		Overnight	236	56%	10
	마이크로웨이브	15분	169	25%	9
		30분	185	46%	9
gi 115660	오븐	7시간	278	53%	9
		Overnight	미검출	미검출	미검출
	마이크로웨이브	15분	172	46%	8
		30분	179	46%	8
gi 2781208	오븐	7시간	미검출	미검출	미검출
		Overnight	93	14%	5
	마이크로웨이브	15분	99	10%	4
		30분	100	25%	6
gi 162797	오븐	7시간	182	45%	7
		Overnight	미검출	미검출	미검출
	마이크로웨이브	15분	76	37%	6
		30분	100	37%	6

gi No. : 단백질 고유번호

Score: Mascot([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) 고유값

Sequence Coverage: 전체 아미노산 중 찾아진 아미노산의 %. 찾아진 펩타이드 수가 많을수록 높음(단백질 크기에 의존)

## 결론

- 분해 시간이 길수록 좋은 결과가 산출됨: 마이크로웨이브는 15분보다 30분에서, 오븐은 7시간보다 Overnight에서 더 좋은 결과를 얻음

- 마이크로웨이브 30분 분해와 오픈 Overnight를 비교해보면 단백질에 따라 다른값들을 보여주어 정확한 비교는 어렵지만, 대략 유사한 결과를 보임
- 사용된 시간만을 비교한 경우, 마이크로웨이브 장비를 이용했을 시 짧은 시간 내 매우 좋은 결과 산출
- 각 방식 별 검출되는 단백질의 종류가 달라 단순 비교하는데는 한계가 있음. 단 검출되는 단백질 수는 마이크로웨이브를 이용하였을 때 많은 편이었음

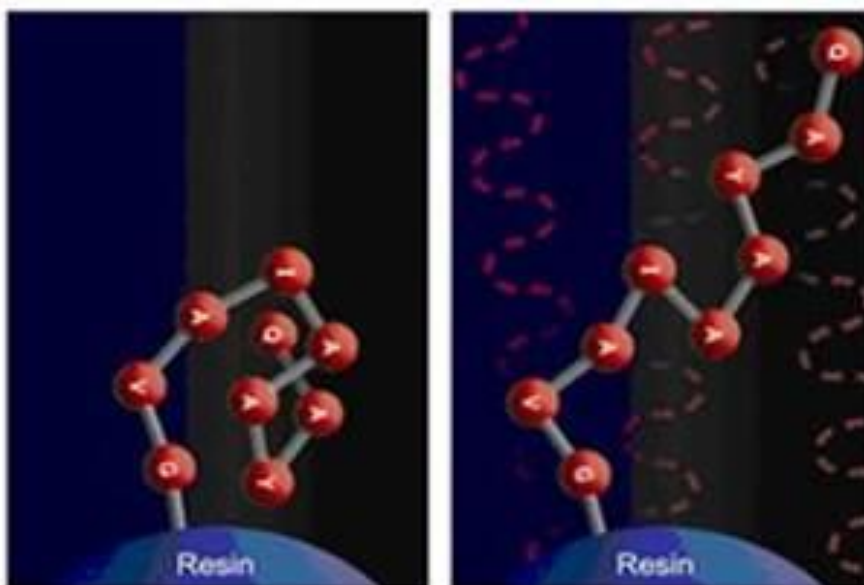
## 마이크로웨이브 장비 소개

### 1. 원리

단백질은 펩타이드 결합 사이의 수소 결합으로 인해 Helix Dipole 구조를 띄게되고, 펩타이드 결합이 길수록 응집(Aggregation)이 발생한다. 그러나 극성이 큰(Dipole Moment:  $3.7\mu$ ) 펩타이드 결합은 마이크로웨이브와 쉽게 반응하여 단백질 나선형 구조가 풀리게되어 펩타이드 분해 및 합성을 용이하게 한다.

### 2. CEM사 Discover Enzymatic Digestion

- 15~30분의 빠른 분석 시간
- 최대 14개의 샘플을 동시에 분해하는 높은 처리량
- 소수성 단백질 분해에도 높은 효율을 보임
- In-Solution, In-gel 방식 모두 사용 가능
- CEM사만의 Microcentrifuge Tube Holder로 모든 Tube가 동일 온도 유지



영인에스티 담당자

영인에스티 계측기술사업부 분광분석팀 (02-6190-9865)

