4장 단백질: 일차 구조의 결정

- 단백질 정제와 분리
- 단백질 구조
- 유전체학, 단백체학, 생물정보학

생의학적 중요성

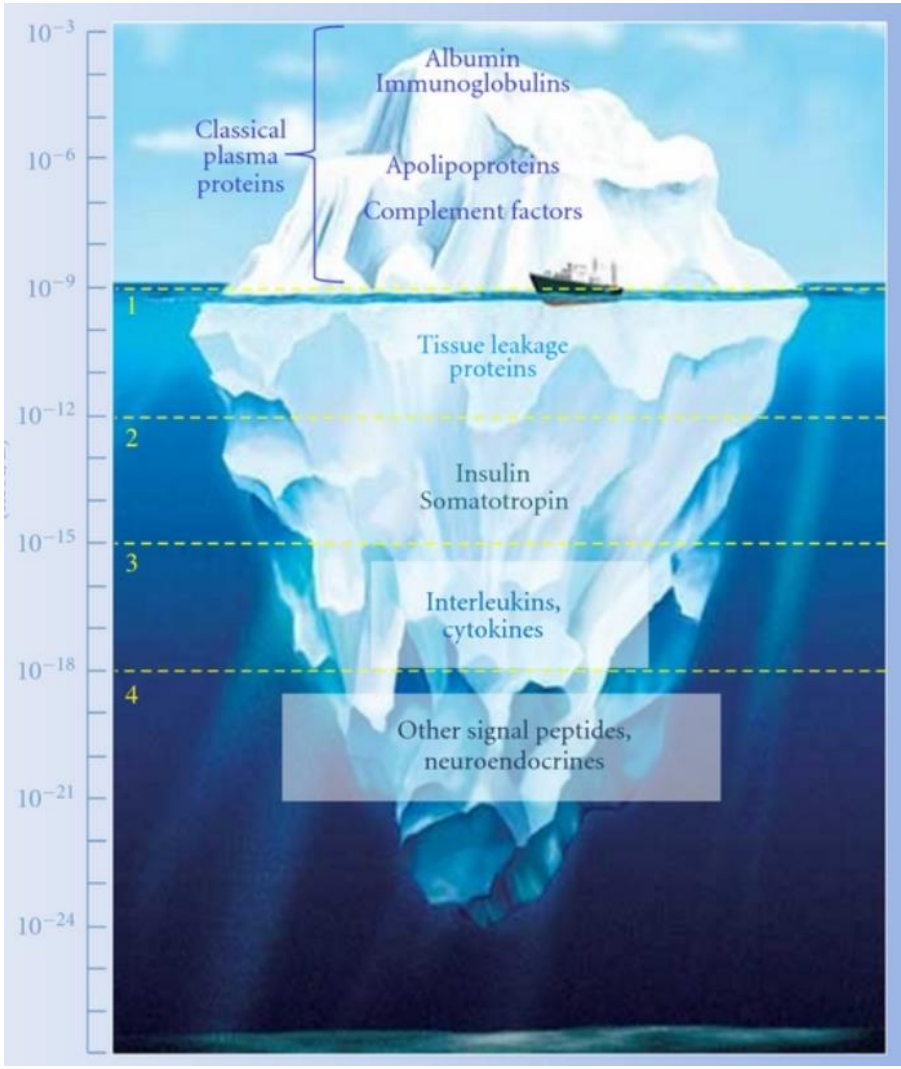
단백질의 역할

- 세포골격: 세포의 모양과 물리적인 시스템을 유지
- 액틴과 마이오신필라멘트: 근육의 수축과 이완
- 헤모글로빈: 산소 운반
- 항체: 외부로부터 보호
- 효소: 에너지의 생성 반응, 생물질의 합성과 분해, 유전자의 복제와 전사, mrNA의 가공 등 과정에서 촉매 작용

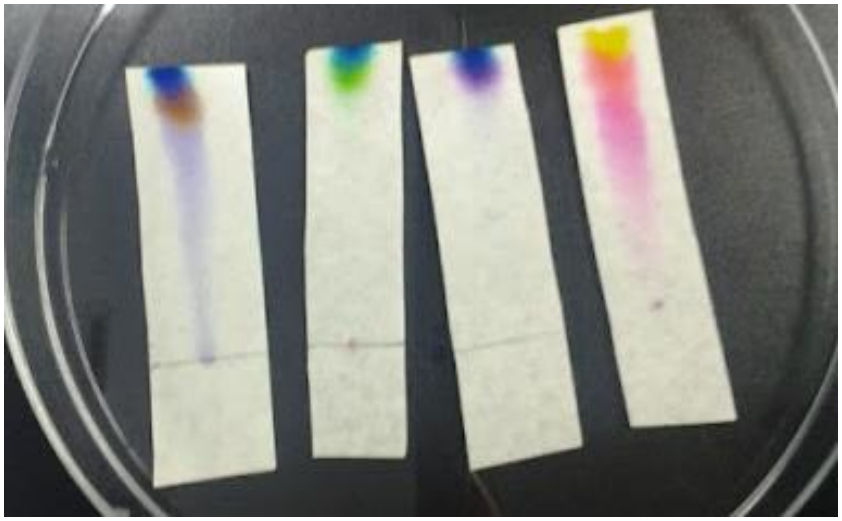
단백질과 펩타이드는 분석 전에 정제되어야 한다

선택적 침전법

- 단백질의 상대적 용해도 차이에 의해 침전을 일으킴
  - pH(등전적 침전)
  - 극성(에탄올, 아세톤 침전)
  - 염의 농도(황산암모늄을 이용한 염석)



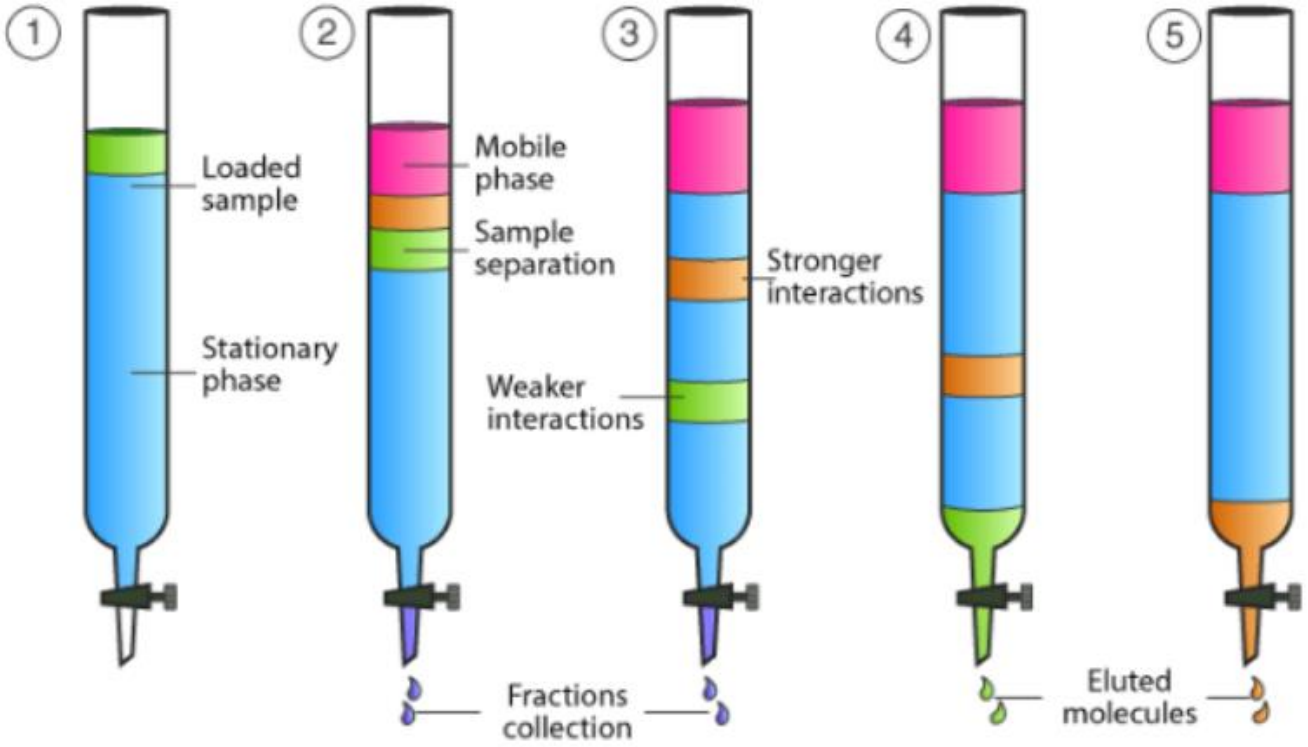
단백질과 펩타이드는 분석 전에 정제되어야 한다



크로마토그래피(Chromatography)

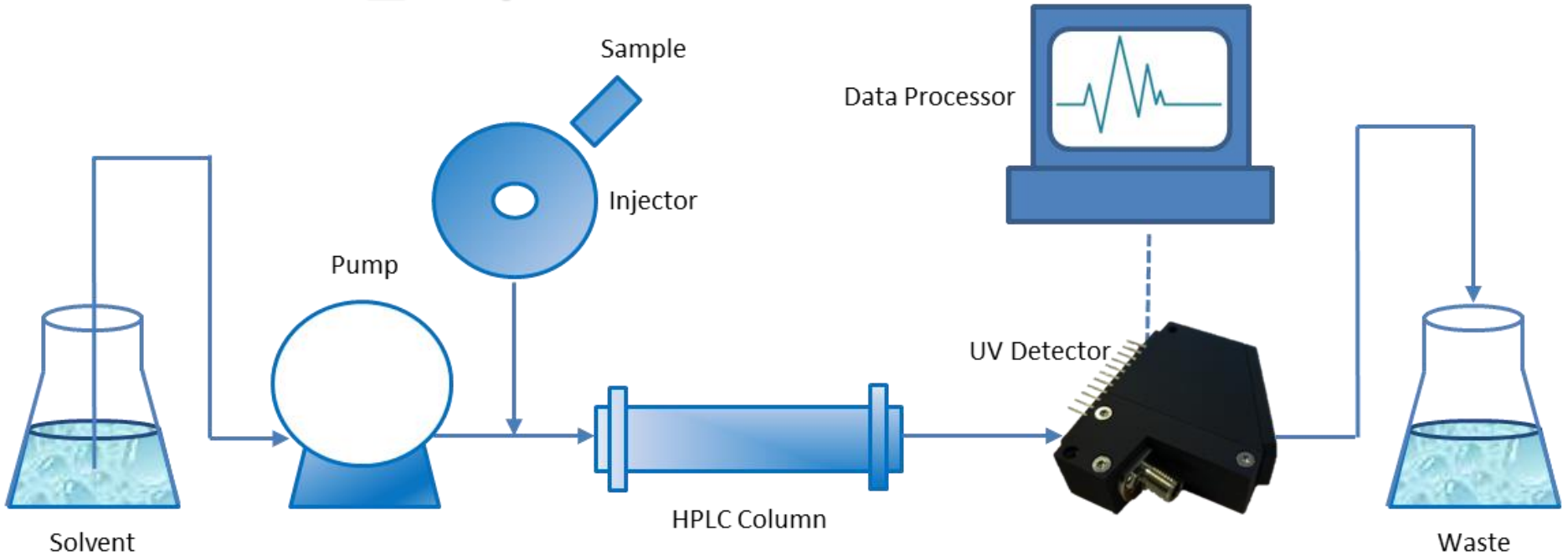
- 혼합물을 이동상(Mobile phase)에 녹여 고정상(정지상, Stationary phase)에 흘렸을 때, 고정상과 상호작용하는 힘으로 혼합물을 분리하는 기술
- 혼합물의 물질 분리, 질병 조기진단 외에도 과학수사, 도핑테스트, 원산지 추적 등 여러 분야에 사용됨

칼럼(column) 크로마토그래피



- 고정상 용기가 칼럼(관) 모양인 크로마토그래피
- 유리, 금속, 플라스틱 등 비드(bead)를 긴 칼럼에 채우고, 이동상을 흘려내는 방식
- 이동상과 고정상의 상호 친화도에 따라 분류 속도가 결정

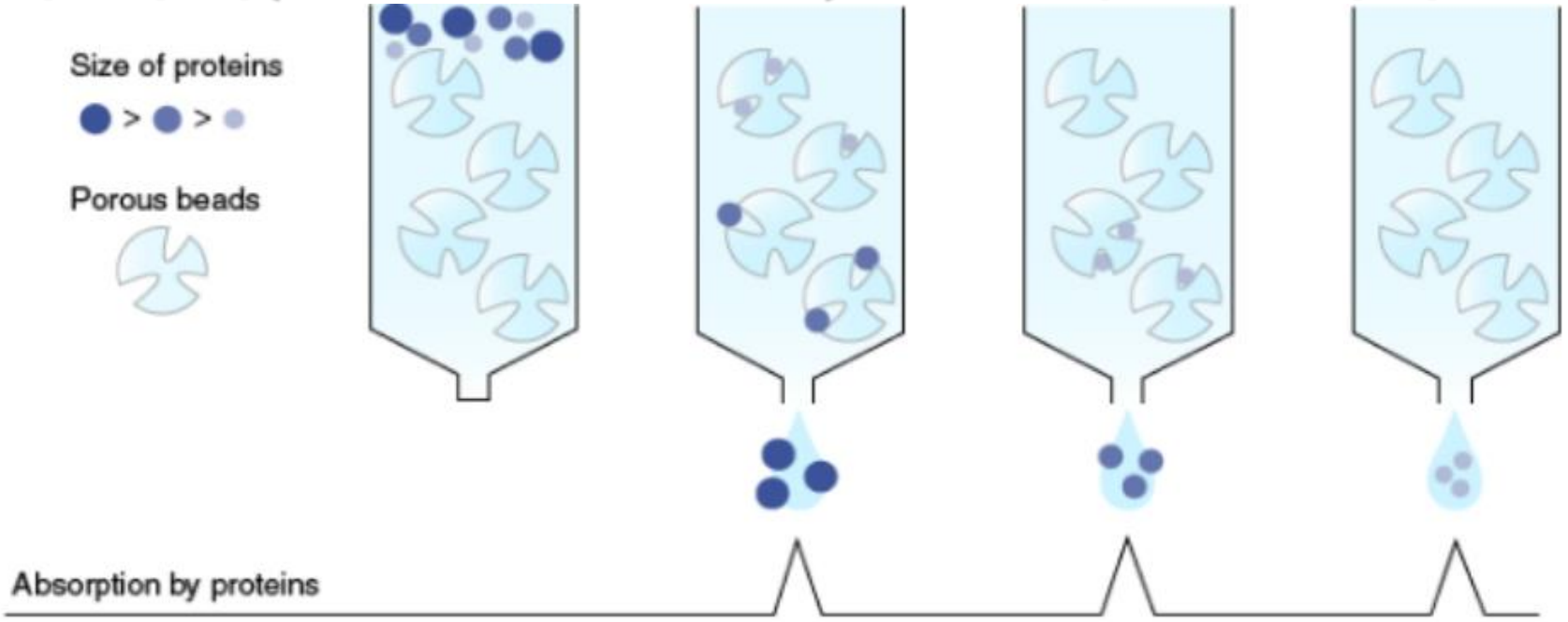
HPLC - 고압 액체 크로마토그래피



- 칼럼 크로마토그래피에 높은 압력을 걸어 사용
- 분리도, 정확도, 정밀도, 감출감도가 좋음
- 분석 물질에 맞는 칼럼, 이동상, 디텍터를 이용하여 검출

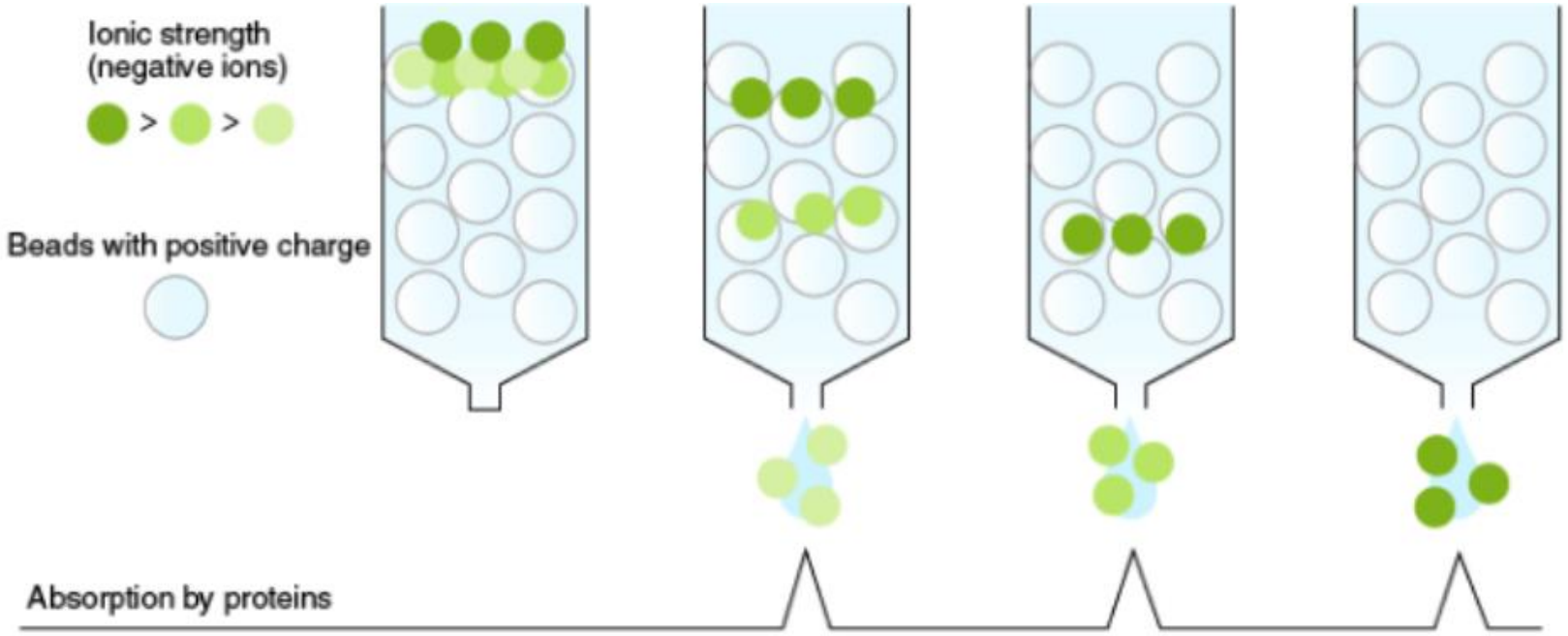
= 겔 여과 크로마토그래피

크기 배제(size exclusion) 크로마토그래피



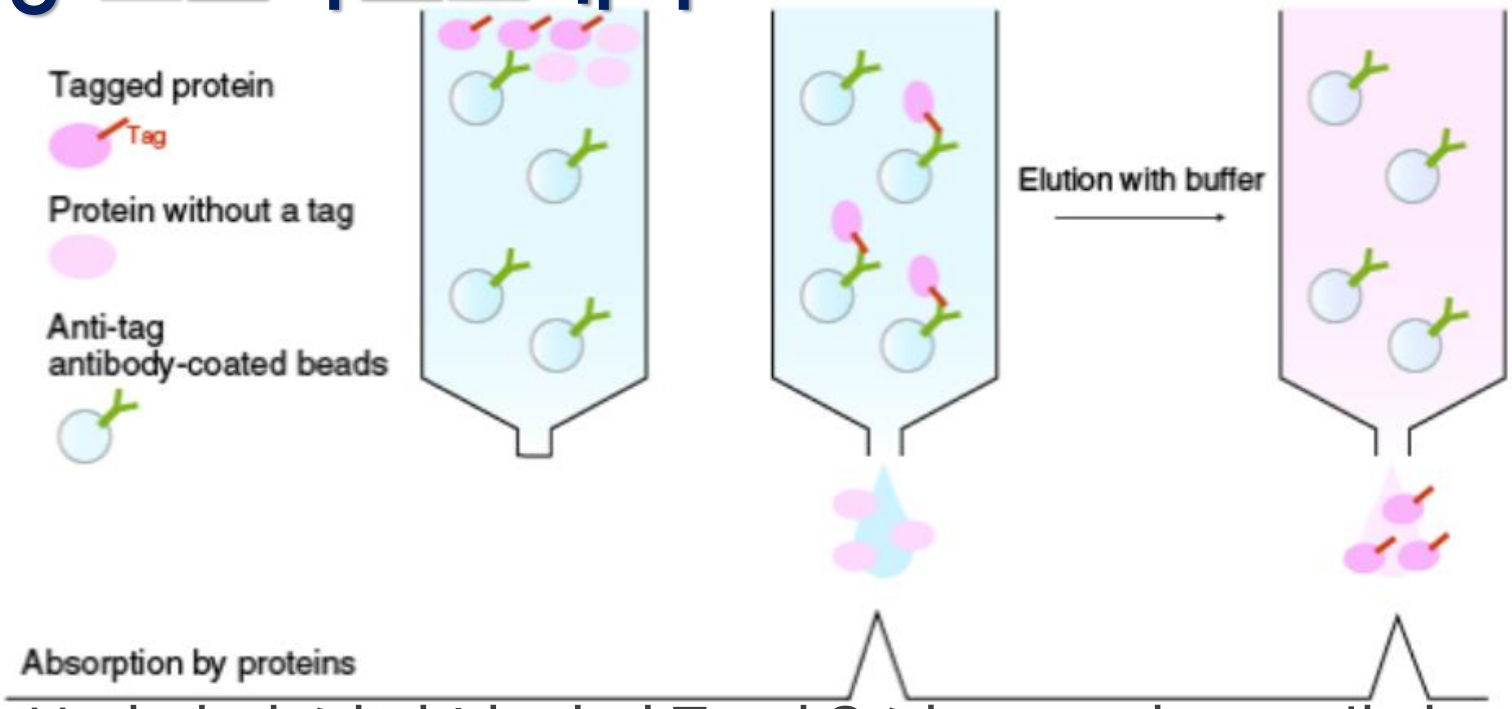
- 물질 크기에 따른 컬럼 통과 속도를 이용한 크로마토그래피
- 다공성 충전재를 사용, 큰 분자에서 작은 분자 순으로 용출
- 단백질 구조를 거의 변성시키지 않아서, 3차/4차 구조를 결정하기 위해 사용

이온교환 크로마토그래피



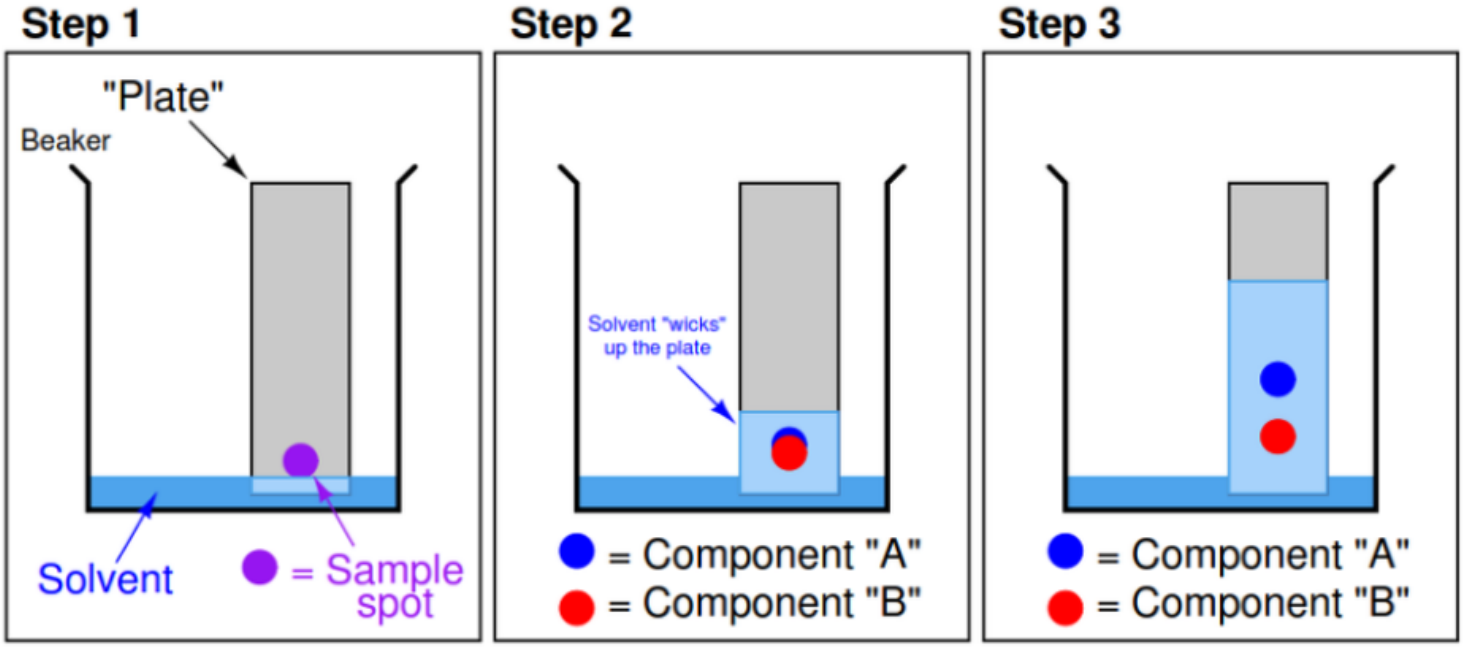
- 물질의 전하 차이를 이용한 크로마토그래피
- 고정상 전하에 반대되는 전하를 띠는 물질이 늦게 용출됨
  - 음이온 교환 크로마토그래피: 양이온 수지
  - 양이온 교환 크로마토그래피: 음이온 수지

친화성 크로마토그래피



- 특정 분자와의 친화성 차이를 이용한 크로마토그래피
- 친화력이 없는 물질은 곧바로 떨어지고, 친화력이 높은 물질은 남아있음
- 높은 친화성으로 원하는 물질만 선택하여 용출
- 아비딘-바이오틴 결합, 히스티딘-금속이온 결합 등이 존재

박층 크로마토그래피 (TLC)

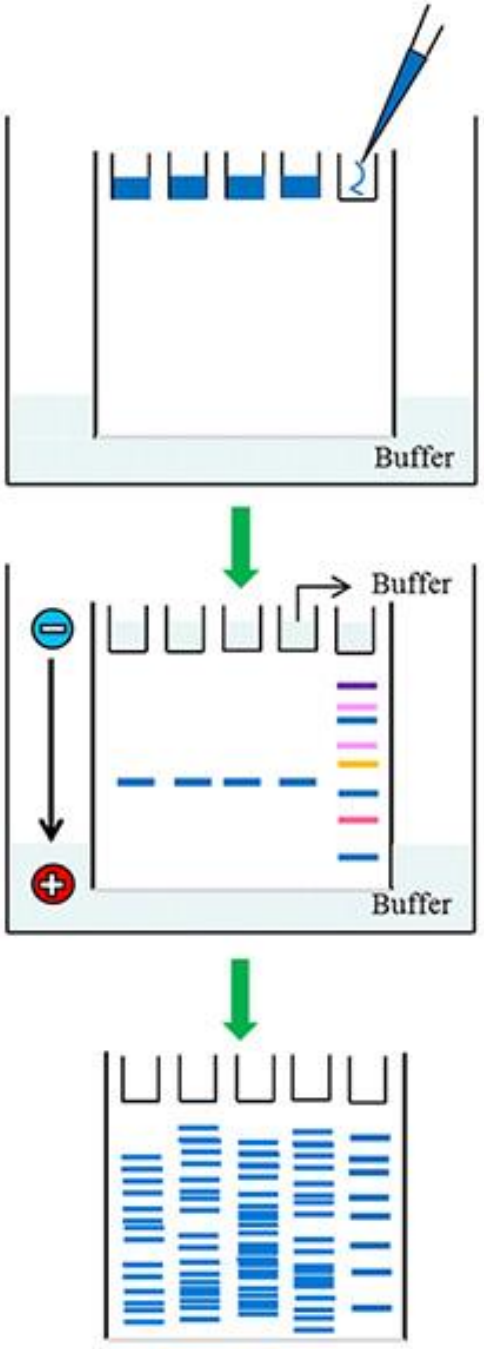


- 모세관 현상으로 고정상인 박층(얇은막)을 타고 올라가는 속도 차이를 이용한 크로마토그래피
- 고정상의 흡착성을 조절 가능, 해상도 확대 가능
- 혼합물 물질의 종류와 순도 파악하기 위해 사용

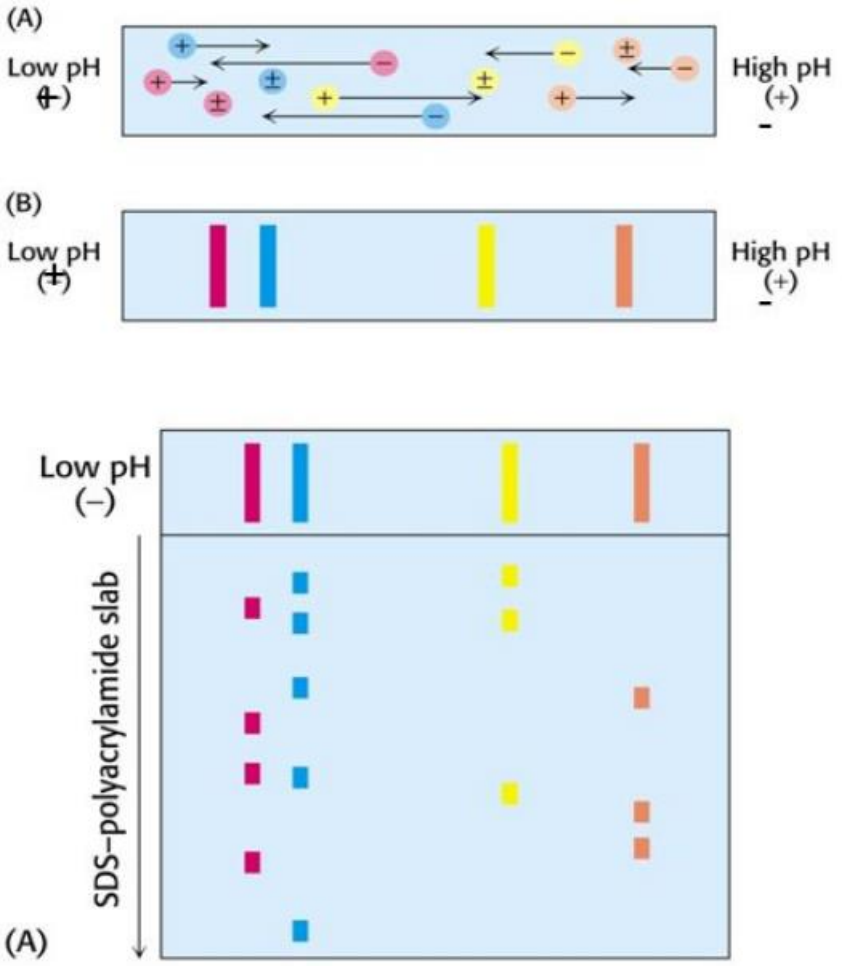
단백질 순도는 폴리아크릴아마이드젤 전기영동(PAGE)을 통해 확인한다

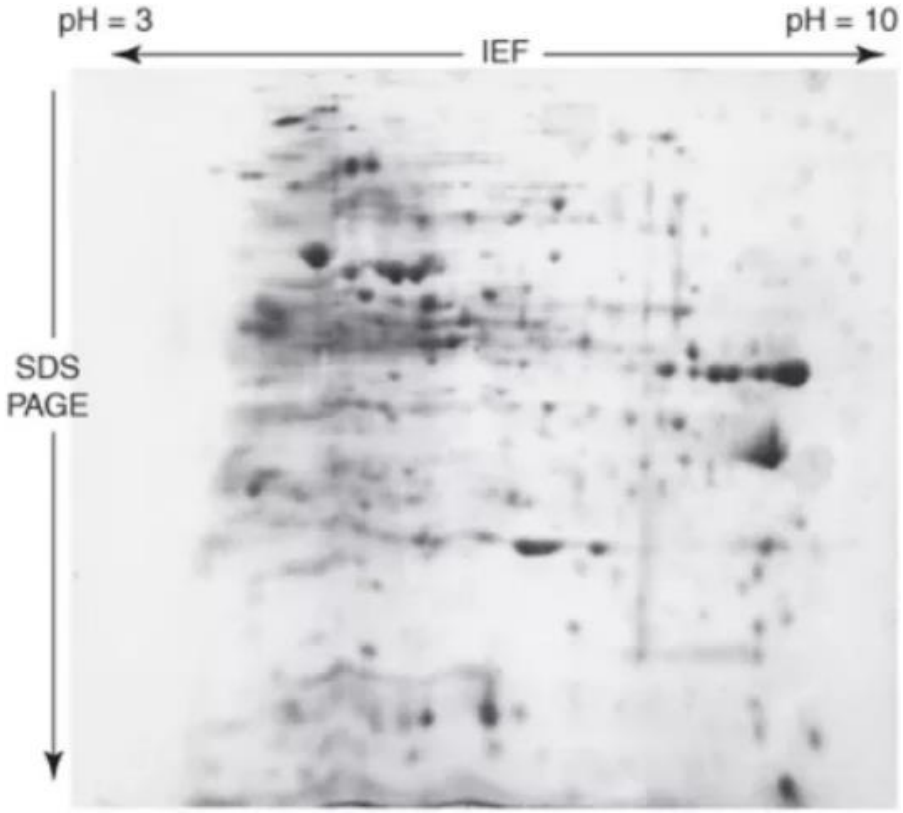
- SDS-PAGE: 가장 광범위하게 사용하는 방법
  - SDS: Sodium dodecyl sulfate
  - PAGE: 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (Polyacrylamide gel electrophoresis)

- 전기영동: 전하를 띤 생분자들을 전기장에 적용하여 이동하는 속도에 따라 분리
- 크기가 작은 물질은 멀리 이동



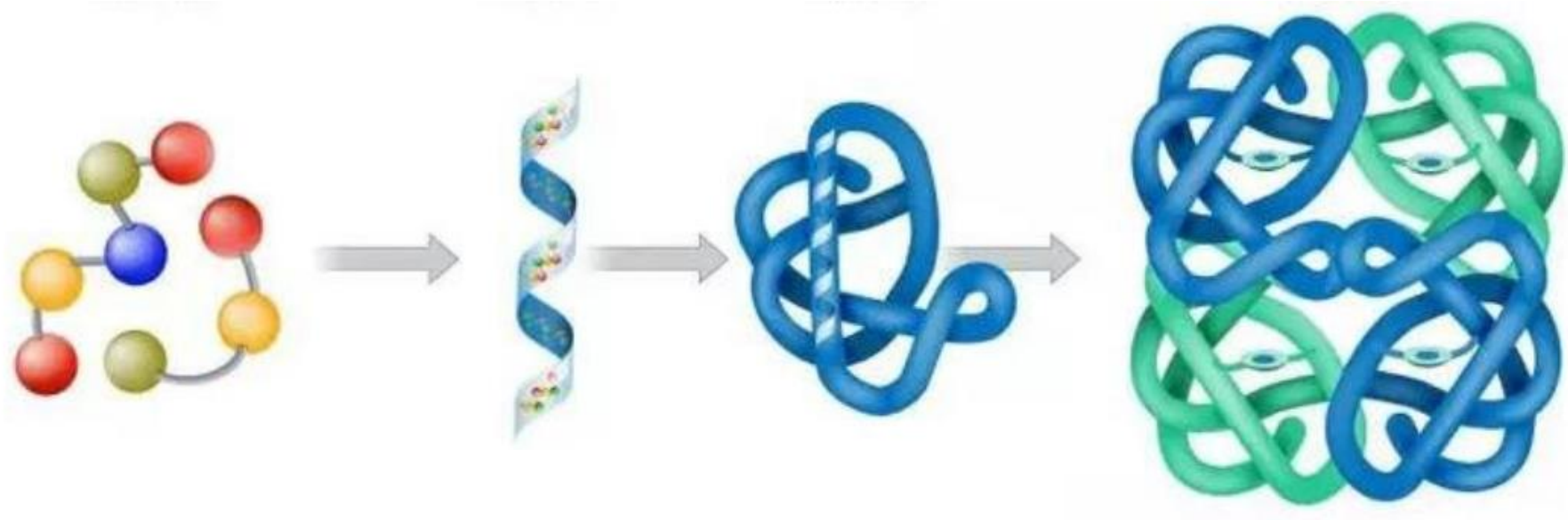
등전점 전기영동(IEF)


(A)
Low pH
(+)
High pH
(+)
-
(B)
Low pH
(+)
High pH
(+)
-
Low pH
(–)
SDS–polyacrylamide slab
(A)


pH = 3
IEF
pH = 10
SDS
PAGE

단백질의 구조

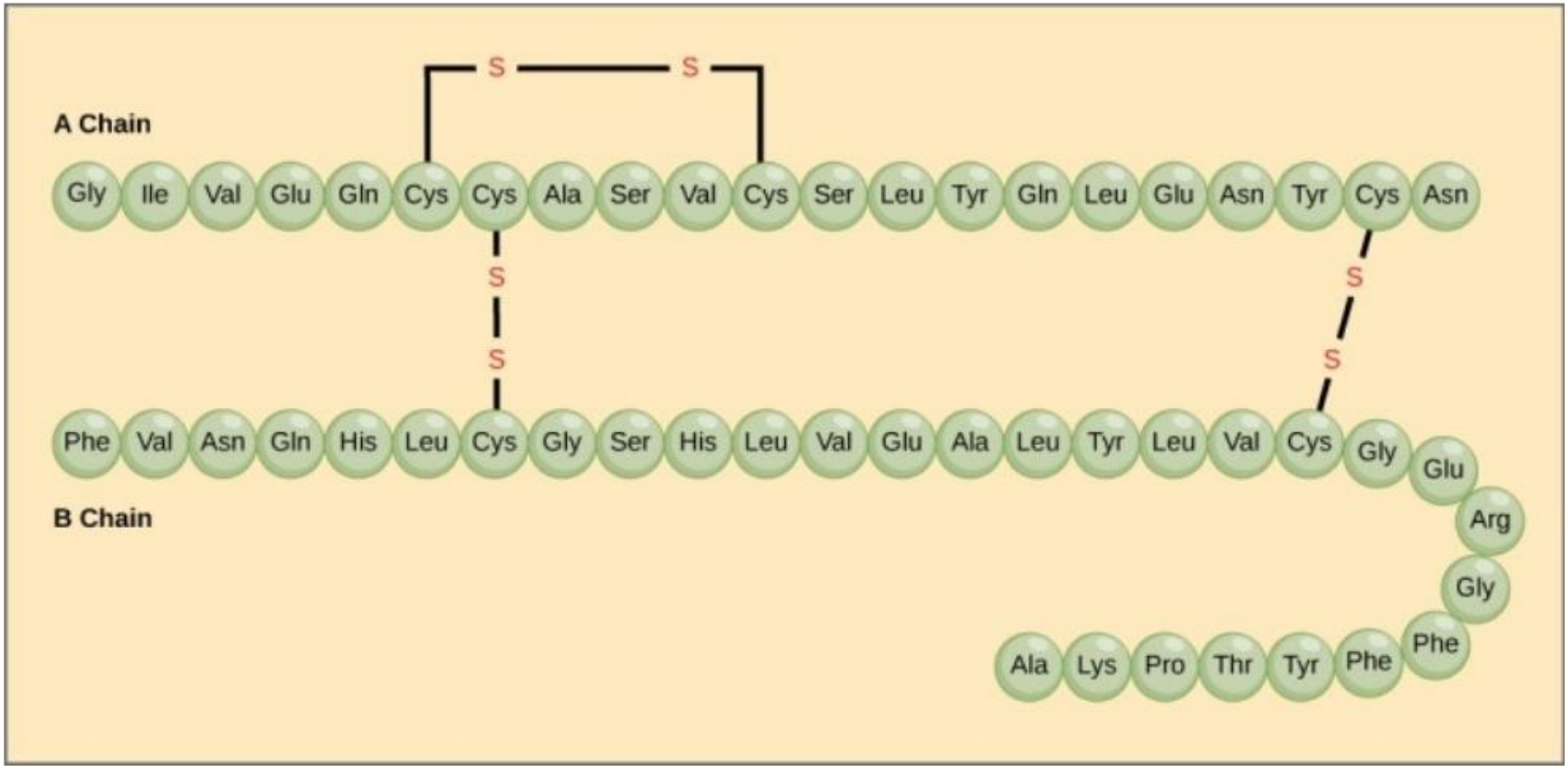
- 단백질의 구조를 1차, 2차, 3차, 4차로 나누어 구분
- 차수가 낮을수록 미시적, 높을수록 거시적
- 낮은 단계의 구조가 높은 단계의 구조에 영향을 줌



단백질의 구조

1차 구조(primary structure): 아미노산 서열

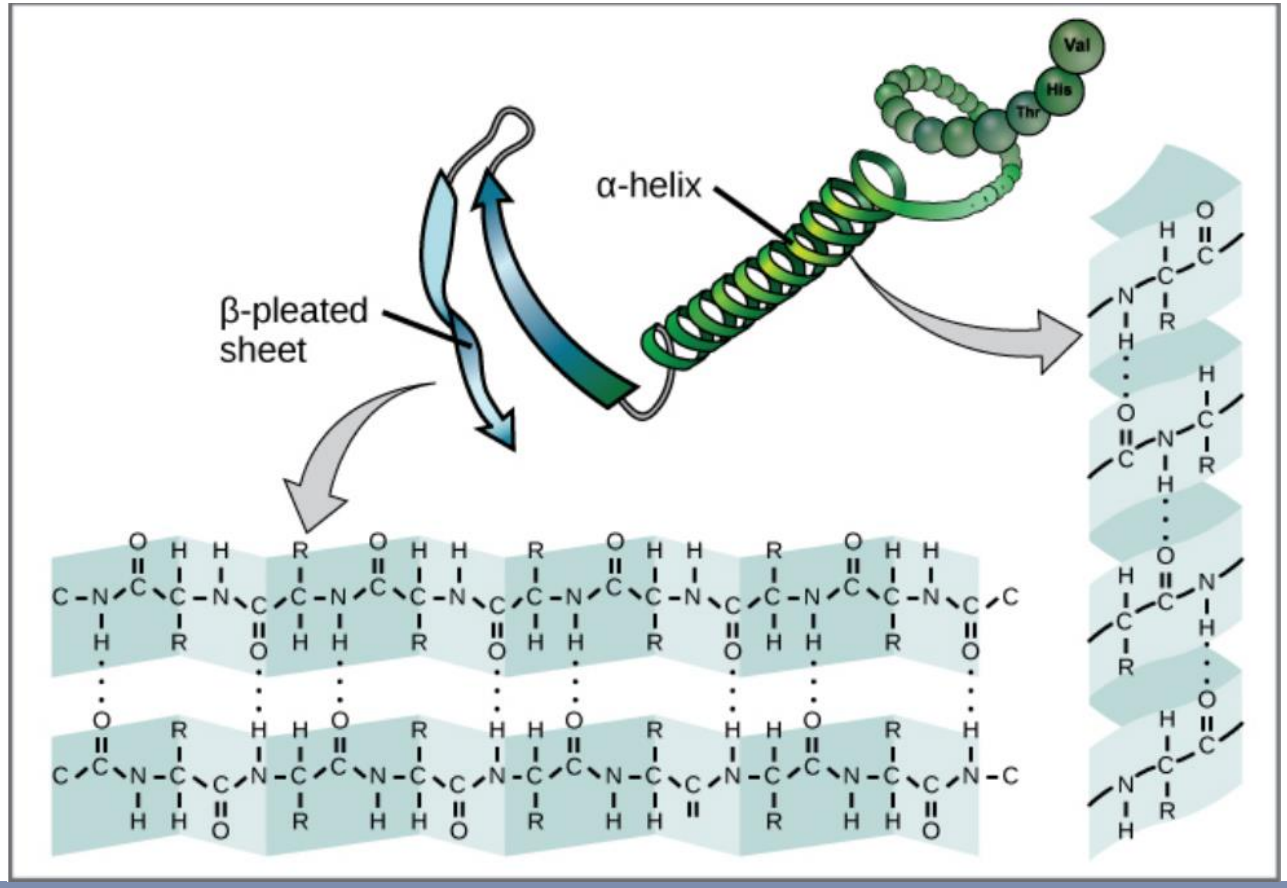
- 펩타이드 결합, 리보솜에서 합성될 당시에 형성



단백질의 구조

2차 구조(secondary structure): 알파나선, 베타면 구조

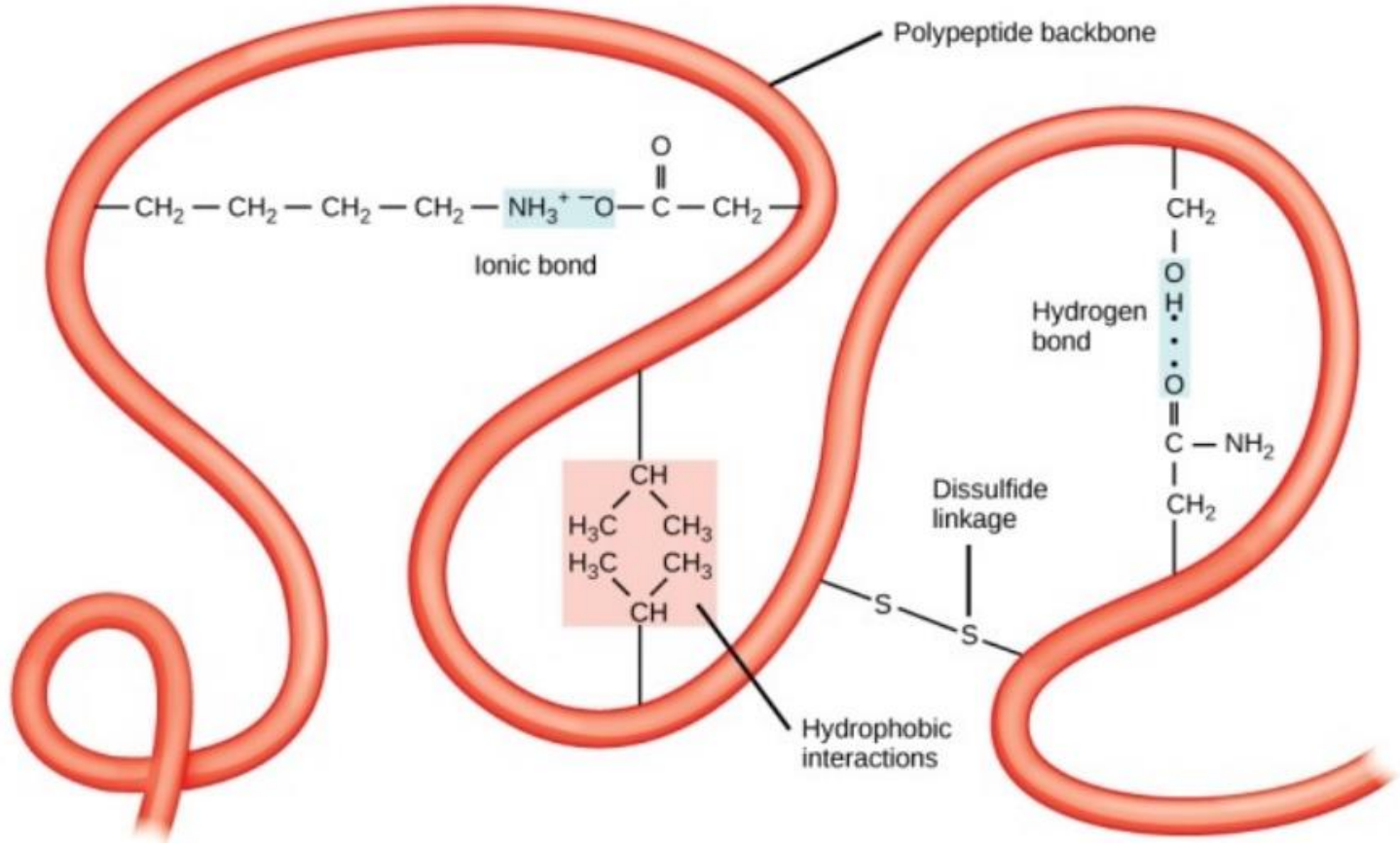
- 뼈대의 수소결합으로 펩타이드가 꼬이거나 접히면서 형성



단백질의 구조

삼차 구조(tertiary structure)

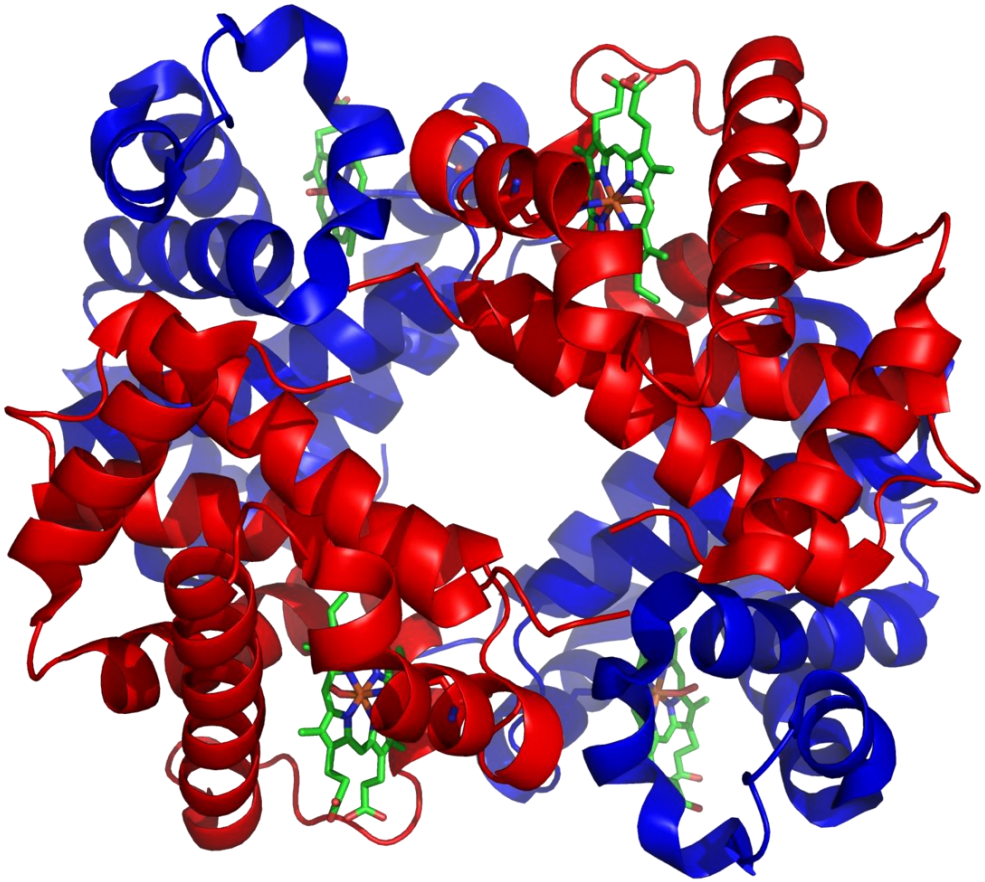
- 곁사슬의 소수성 상호작용(황화결합, 수소결합 등)



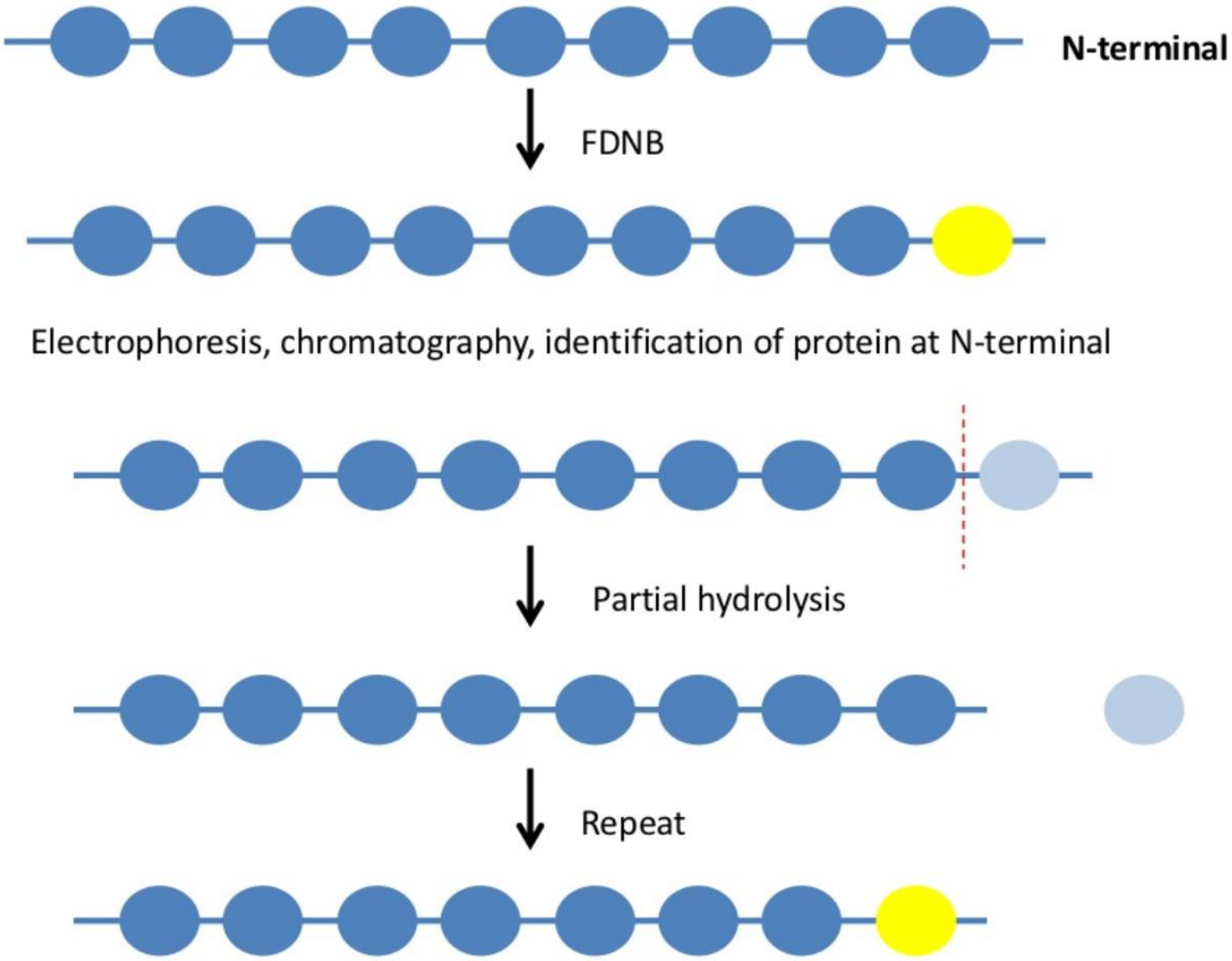
단백질의 구조

사차 구조(quaternary structure)

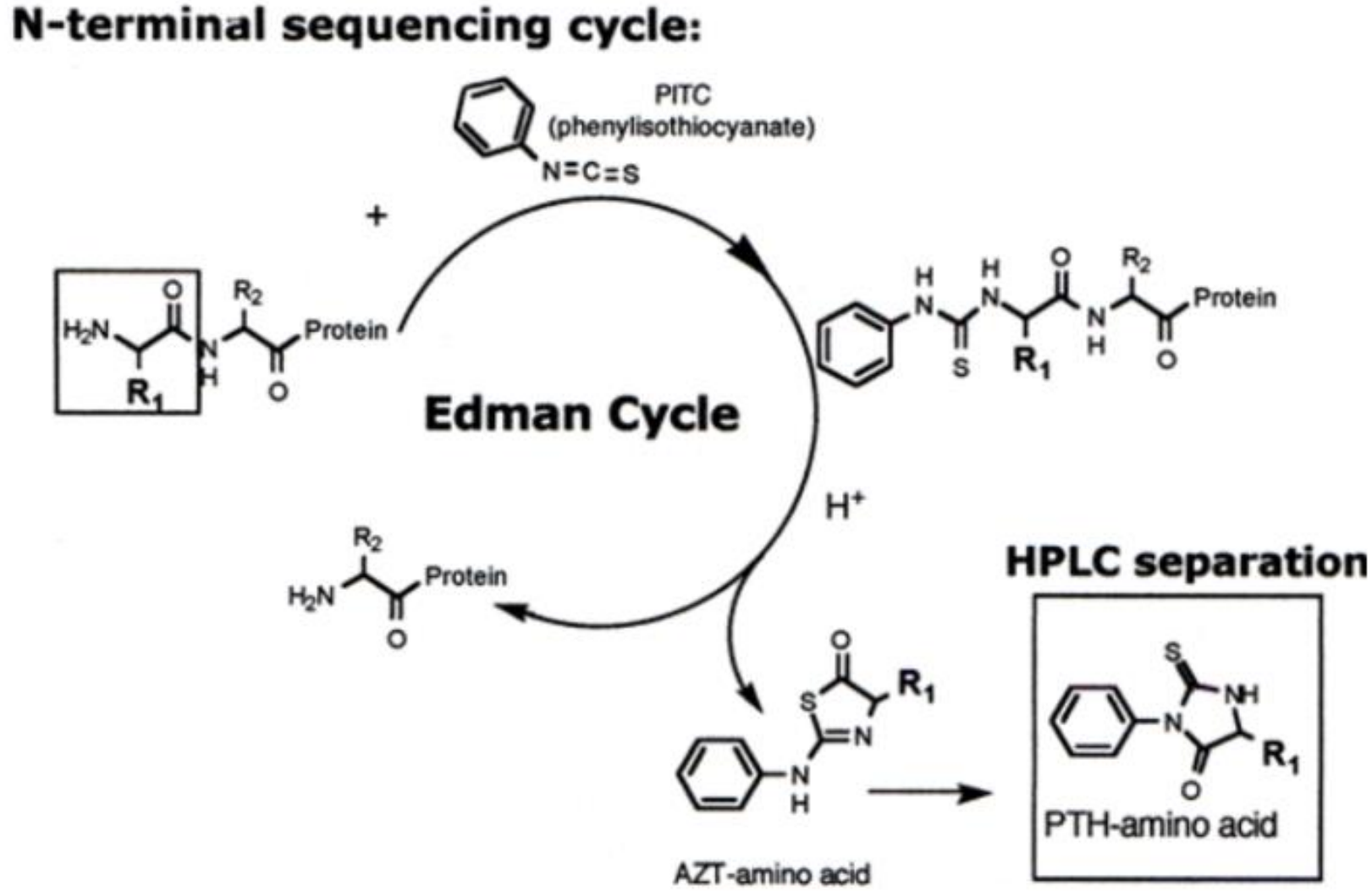
- 비공유결합에 의해 3차 구조의 펩타이드들이 결합



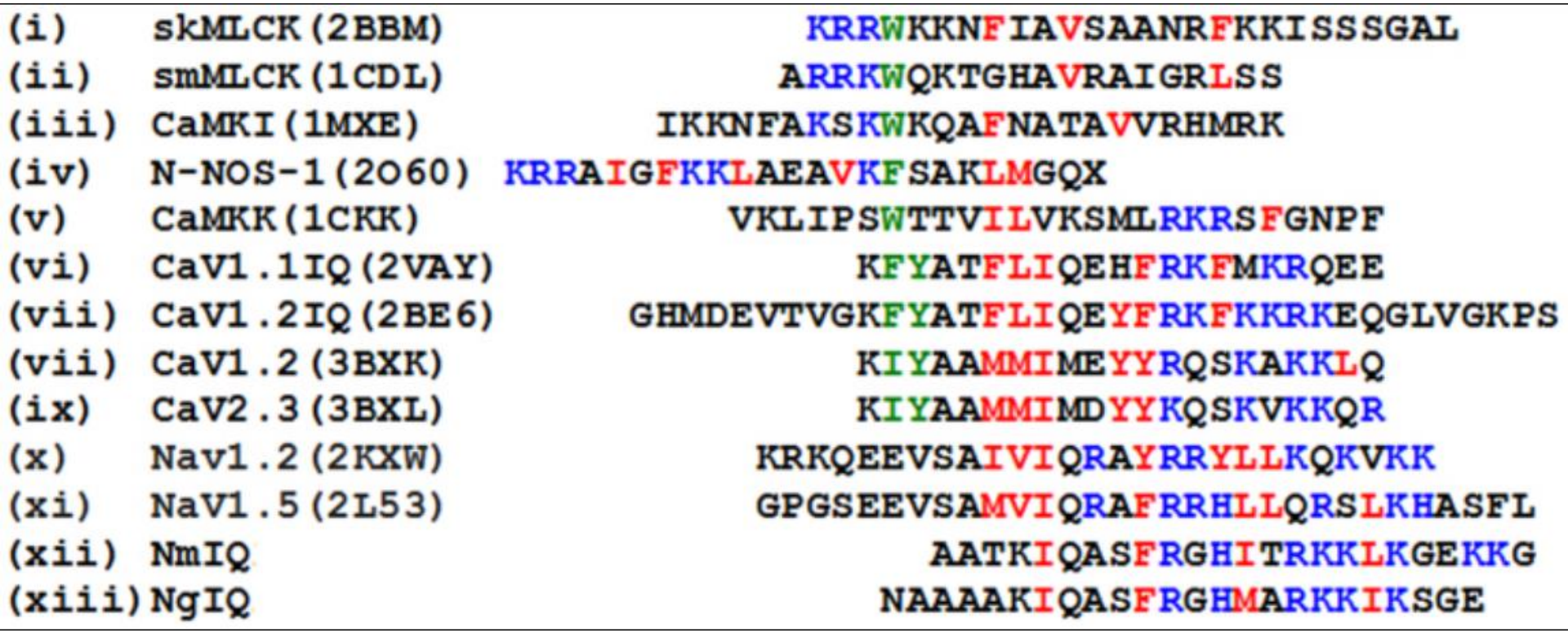
펩타이드 서열 분석


N-terminal
FDNB
Electrophoresis, chromatography, identification of protein at N-terminal
Partial hydrolysis
Repeat

펩타이드 서열 분석

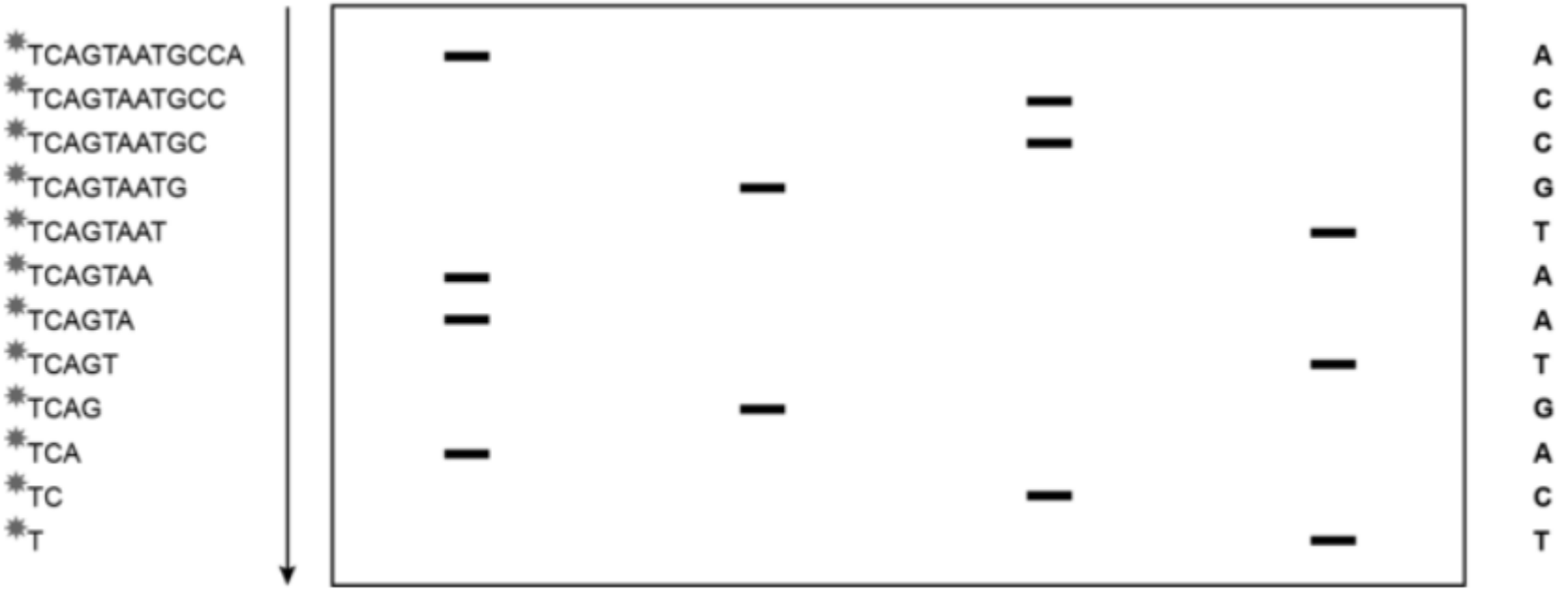

N-terminal sequencing cycle:
PITC
(phenylisothiocyanate)
N=C=S
+
Protein
Edman Cycle
H+
HPLC separation
AZT-amino acid
PTH-amino acid

펩타이드 서열 분석


(i) skMLCK(2BBM) KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL
(ii) smMLCK(1CDL) ARRKWQKTGHAVRAIGRLSS
(iii) CaMKI(1MXE) IKKNFAKSKWKQAFNATAVVRHMRK
(iv) N-NOS-1(2O60) KRRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQX
(v) CaMKK(1CKK) VKLIPSWTTVILVKSMLRKRSFGNPF
(vi) CaV1.1IQ(2VAY) KFYATFLIQEHFRKFMKRQEE
(vii) CaV1.2IQ(2BE6) GHMDEVTVGKFYATFLIQEYFRKFKKRKEQGLVGKPS
(vii) CaV1.2(3BXK) KIYAAMMIMEYYRQSKAKKLQ
(ix) CaV2.3(3BXL) KIYAAMMIMDYYKQSKVKKQR
(x) Nav1.2(2KXW) KRKQEEVSAIVIQRAYRRYLLKQKVKK
(xi) NaV1.5(2L53) GPGSEEVSAMVIQRAFRRHLLQRSLKHASFL
(xii) NmIQ AATKIQASFRGHITRKKLKGEKKG
(xiii) NgIQ NAAAAKIQASFRGHMARKKIKSGE

분자생물학이 1차 구조 결정에 혁명을 일으켰다

- PTH 아미노산을 이용하여 서열 분석 → 자동서열분석기
- 생어 염기서열 분석 (sanger sequencing)



- 장점: 기술적 신뢰도가 높고, 자동화 시스템이 갖춰져 이용 편리, 분석 시간도 짧음
- 단점: 거대 DNA 분자 염기서열 분석에 부적합

유전체학(genomics)은 작은 양의 서열 데이터로 단백질을 확인할 수 있게 한다

- 이미 많은 종의 유전체의 DNA 서열이 밝혀져있음
- 유전정보는 GenBank (미국 국립생물공학정보센터 NCBI에서 운영하는 염기서열 데이터베이스)에 올라와있음

```
                     /translation="MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCG
                     ERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSL
                     YQLENYCN"

ORIGIN
        1 ggcggccagg gaaggtctct gccgccaggg aagtgtccca gagacccctg gaggggctgc
       61 tgacaccccc ggtgccccca cctcgagcat gacccagggc tgcctctccc catccttcat
      121 cctccctgct ccacaggaca ttggcctggc gtccctgggg gcctcggatg aggaaattga
      181 gaagctgtcc acggtgggtt gacccctccc tgcagggcct ggggtgtggg tttgggggtc
      241 tgaatccagg cctcaccctc ttgccgtcca ggctgaggcc tctccttcca cccacgaatt
      301 gtgaccctca ccctggcctg cctgcatcct ggcctggcct ccctgggggt ggtatcctgg
      361 tcacgggtga ccaggggctg cccggtgggc ggcagctgtc tctgggctga tgctgcccgg
      421 cttccccgca gctgtactgg ttcacggtgg agttcgggct gtgtaagcag aacggggagg
```

질량분석법은 다양한 형태로 쓰인다

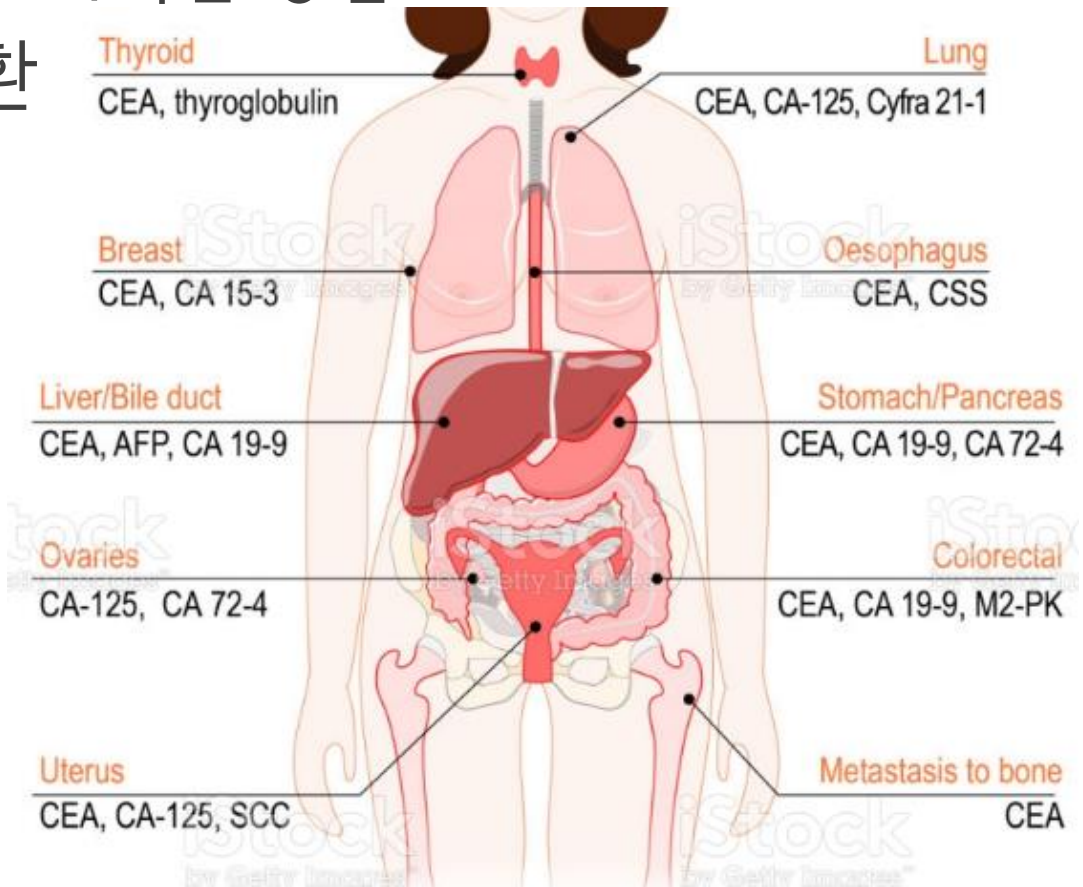
질량분석법(mass spectrometry, MS)

- 민감도, 속도, 다재다능함 모두 월등
- 정량분석, 정성분석이 가능한 강력한 분석 도구
- 아주 적은 양의 시료로 분석 가능
- 탄수화물, 지방, 단백질 등 다양한 대사체 분석 가능
- HPLC-MS, HPLC-MS/MS를 사용
- 대표적으로 ESI (전자분무이온화법), MALDI-TOF

직렬식 질량분석법은 대사이상을 감지할 수 있다

질량분석법은 현재 임상에서 사용하는 진단기기 중 고감도의 정성 및 정량 분석하는 매우 효과적인 방법

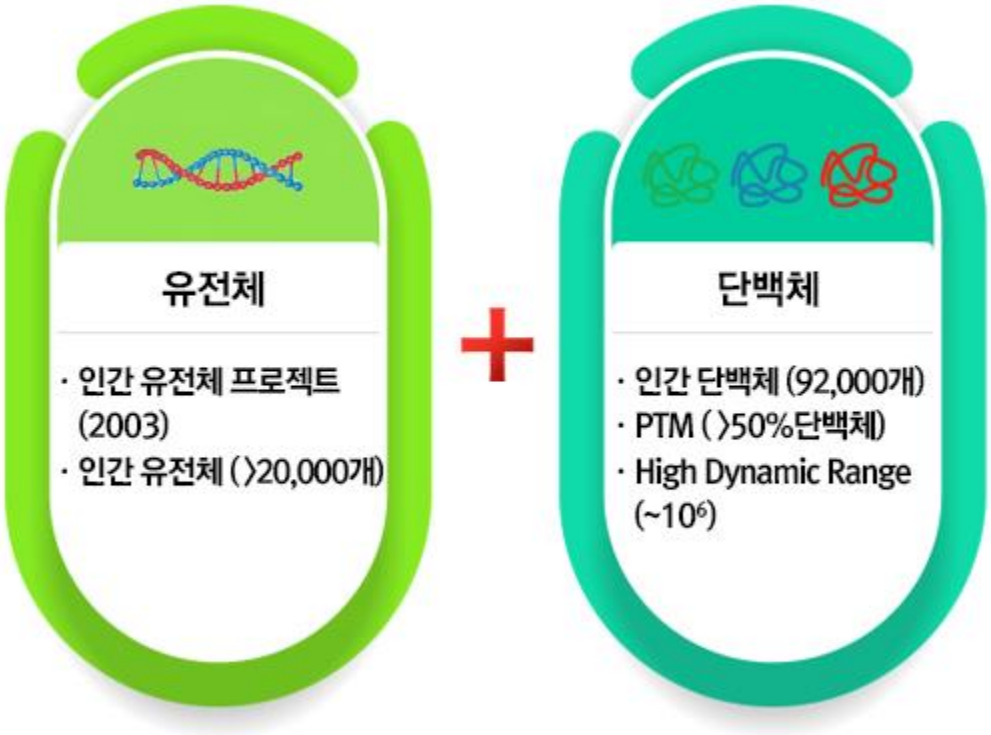
- 조직 병리, 암, 심혈관 질환
- 희귀질환, 내분비 질환
- 미생물 동정 검사
- 약물 대사 (약동학)
- 도핑 검사 등



단백체학의 목표는 다양한 조건에서 한 세포내에 있는 단백질 성분 전체를 확인하는 것이다

단백체학: 세포 또는 개체 안의 모든 단백질을 총체적으로 연구하는 학문

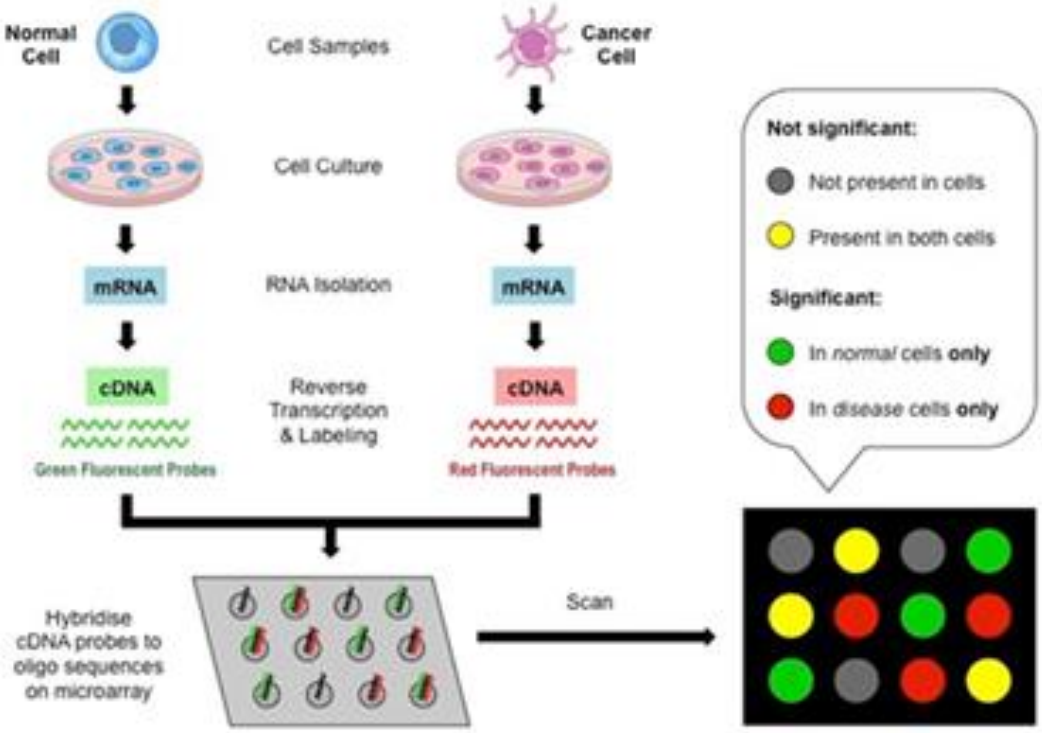
- 다양한 조건에서 단백질 성분 전체를 확인

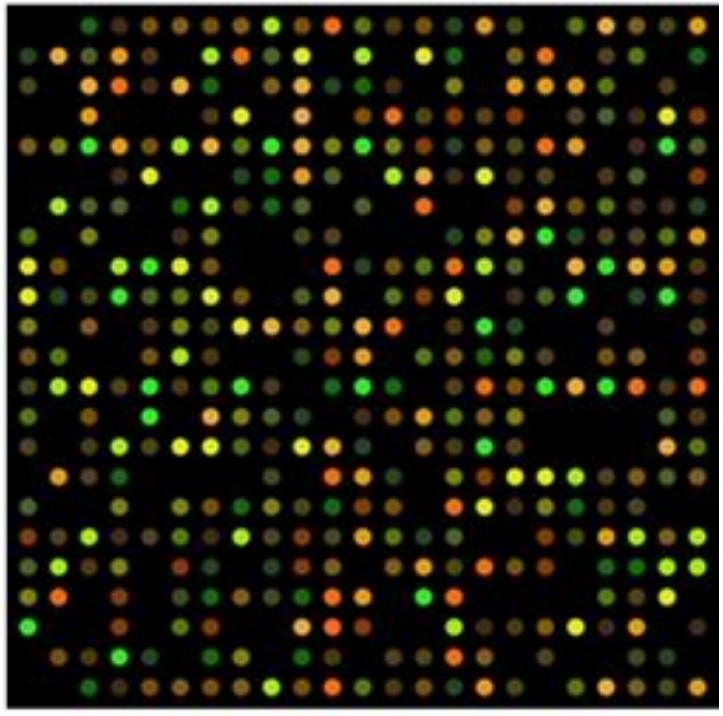


2차원 전기영동과 유전자 칩 미세배열(array)은 단백질 발현을 측정하는데 사용된다

DNA Microarray(유전자 미세배열)

- 겔 영동 분석보다 민감하며 필요한 시료 양 적음
- 많은 표본을 동시에 실험, 짧은 시간에 대량의 데이터 얻음





생물정보학은 단백질의 기능을 확인을 돕는다

- 유전체에 의해 암호화된 단백질의 많은 부분에 대한 기능이 아직 알려지지 않음
- 생물정보학은 아미노산의 배열을 비교 → 단백질의 잠재적인 구조와 기능, 생리적인 역할, 작용기전을 밝히는 실마리 제공

요약

- 폴리펩타이드: 단백질의 기본 구조단위
- 연구에 맞는 다양한 크로마토그래피를 사용
- 단백질의 구조는 1차(아미노산 서열), 2차(알파나선, 베타면), 3차, 4차로 이루어짐
- 유전체학: 뉴클레오타이드 서열분석 기법
- 단백체학: 단백질의 구조와 기능을 규명하는 학문