

단백질칩의 연구 동향 - IV

1990년부터 시작된 게놈 프로젝트(genome project)의 진전에 힘입어 최근 인간유전자의 구조가 대부분 밝혀지면서 인체를 구성하는 유전자의 기능연구에 대한 관심이 급증하고 있다. 유전자는 단백질을 발현해 세포 내에서 그 기능을 수행하기 때문에 게놈의 기능연구는 단백질에 대한 연구로 귀결되며, 이에 따라 최근 프로테오믹스(proteomics, 단백질체학)라는 새로운 연구분야가 국내외적으로 많은 관심을 불러일으키고 있다[1]. 프로테오믹스는 게놈(genome)에 의해 발현되는 모든 단백질들의 총합을 일컫는 프로테오姆(proteome)을 다루는 학문이고, 어떤 단백질이 얼마의 양으로 어떤 환경에서 발현되는가를 파악하는 것을 목적으로 한다[2]. 생명체의 게놈이 생명체가 수행하는 기능의 이론적인 면만을 제시할 수 있음에 반해, 프로테오姆은 세포가 처해있는 환경에 따라 세포의 실제적인 기능을 표현해 준다. 이러한 이유로 급속한 속도로 밝혀지고 있는 미지의 유전자들의 기능을 밝혀내고자 하는 기능유전체학(functional genomics)의 한 부분으로 새롭게 부각되고 있고, 세포 내에서 일어나는 실제적인 현상들을 전체 단백질 단계에서 통합적으로 파악하는 수단으로 제공된다. 이러한 프로테오믹스 연구에 필수적으로 이용될 수 있는 핵심기술이 단백질 칩이며, 이는 수십 내지 수백 개의 단백질을 작은 칩 상에 고정해 동시다발적으로 단백질의 결합을 분석하는 자동화 기기 시스템이다[3]. 이는 질병의 진단, 단백질의 발현 및 기능연구, 단백질의 상호작용 연구, 신약개발 등 다양한 응용분야를 가지고 있어 의학, 약학, 생명과학분야에서 광범위하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 DNA 칩에 비해서 단백질 칩의 수요는 그 이용 분야의 다양성으로 인해서 지속적으로 증가하고 있다. 아래의 그림1은 DNA 칩과 단백질 칩의 누적 논문의 참조횟수를 비교한 그림으로 Medline의 정보를 기반으로 했다.

그림1.

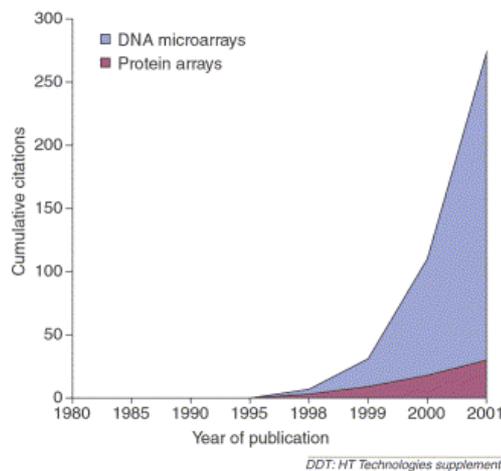


그림1. DNA 칩과 단백질 칩의 누적 논문 인용횟수 비교

위의 그림은 DNA 칩의 연구보다 단백질 칩의 연구가 보다 활발히 일어나고 있음을 나타내고 있다.

기존의 단백질 칩은 마이크로 배열장치(pin형, ink jet형)를 이용하여 단백질 결합을 용이하게 하여 줄 수 있는 유기물질로 처리된 고품 기판 위에 특이 단백질(항체)을 고정시키면서 제작된다. 여기에 특이 단백질(항체)이 결합되지 않은 나머지 부분을 항체가 붙지 않는 물질로 피복(blocking)한 후 분석물질(항원)에 반응시킨다. 마지막으로 형광물질이 일반적으로 표지된 2차 항체를 이용하거나, 표면플라즈몬 공명장치(SPR) 등을 이용하여 반응여부를 확인한다. 그러나, 단백질 어레이는 단백질 그 자체의 크기(보통 항체의 크기는 분자량이 155,000 Da정도임)와 단백질 자체의 수용액 상에서 발생하는 집합체(aggregate) 문제 때문에 수백 마이크로 단위 이상에서 컨트롤이 되고, 실질적으로 100 μm 이하의 단위에서 컨트롤이 어려운 단점을 가지고 있다. 그러나 DNA 칩은 30 μm 이하의 단위로 spotting이 가능하다. 따라서 최근엔 칩의 집적도를 높여 반응성을 향상시키기 위해 DNA 칩의 장점을 단백질 칩에 이용하는 연구도 이루어지고 있다. 즉 DNA를 기판에 고정시킨 다음 이와 상보적인 관계의 DNA를 항체와 직접 혹은 간접적으로 결합시켜 단백질 어레이를 만든다. 또한, 일반적 단백질 칩을 제작 시에 항체의 수만큼 일일이 마이크로 배열장치를 이용하여 항체를 기판에 고정화시켜야 한다. 아래의 그림은 DNA 칩과 단백질 칩에서 각각의 고정화 물질을 어레이시킨 그림이다.

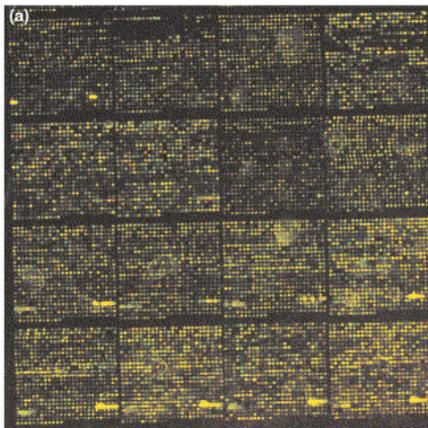


그림2. DNA 칩

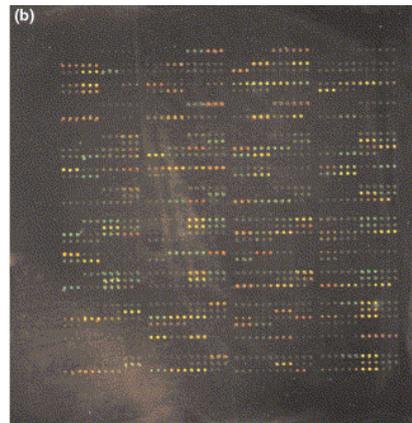


그림3. 단백질 칩

그림2는 형광물질이 표지된 DNA를 어레이한 DNA 칩을 나타낸 그림이고, 그림3은 단백질 칩을 나타낸 그림이다. DNA 칩의 어레이 목적은 유전적 질병을 알아내는데 있다. 즉 게놈 프로젝트에 의해 알려진 염기서열을 분석하여 어떤 부분의 염기 서열에 이상이 있으면 유전적인 질병이 발병되는 것을 알아낸 후 기판 위에 이 염기 서열을 갖는 외가닥 DNA를 고정시킨다. 여기에 검사하고자 하는 대상의 DNA를 PCR 등으로 증폭시킨 DNA를 반응 시켜 상호결합 유무를 형광물질을 이용하여 판별하는 것이 위의 그림이다. 이는 DNA 결합이 상보적으로 일어나는 것에서 착안된 것이다. 단백질 어레이는 단백질 상호간의 여러 가지 작용을 알아보기 위해서 많이 사용되고 있다. 특히 항체를

고정하여 검출하고자 하는 항원의 유무를 알아내는 단백질 검출센서는 이 분야에서 핫 이슈로 떠오르고 있다. 과거엔 검출센서를 일일이 검출하고자하는 항원의 수만큼 제작하여야 했으나 현재는 검출하고자 하는 수만큼의 항체를 기관 위에 고정함으로써 간단히 검출이 된다. 이 단백질 고정 센서를 이용하여 질병의 원인 균의 유무 및 독성 검출을 할 수 있고, 더 나아가서 질병에 대한 새로운 신약의 개발에도 중요한 역할을 하고 있다. 항원 항체의 선택적 결합능을 이용하여 만들어진 신약의 선택적 결합성을 높일 수 있고 분석하고자 하는 단백질의 구조를 알아낼 수도 있다. 또 환자에 대한 질병의 치료 및 호전정도측정 또한 이 분야의 적용 범주에 든다. 이렇게 마이크로 어레이에 (micro-arrayer)의한 다이나믹한 검출방식은 여러 분야에서 이용 가능하기 때문에 개발된 이후로 그 사용량이 꾸준히 증가하고 있다.

단백질 어레이를 이용한 센서의 기본 원리 및 문제점을 살펴보기로 하자. 일정 농도의 항체를 로봇 공학을 이용하여 샘플링하여 기관이 있는 위치에 원하는 크기로 spot한 후 건조시킨다. 그리고 항체가 어레이 되지 않은 부분은 nonspecific binding을 막기 위해서 blocking 물질을 이용하여 박막을 형성해준다. 여기에 항원을 반응시키고, 각 항원에 특이적으로 반응하는 형광물질이 표지된 제 2차 항체를 결합시킨다. 이 결합의 유무를 편광현미경 이미지로 스캐닝하여 결합유무를 확인한다.

항체는 항원과 결합에 있어서 특이성을 갖음으로써, 단백질 검출 센서로서 역할을 할 수 있다. 보통 항체를 기관에 고정할 때 일반적으로는 원하는 항체를 전처리과정을 통하여 붙인다. 항체엔 보통 아민기나 카르복실기가 많이 존재한다. 따라서 기관에 이들과 결합이 일어나는 물질에 담지 결합시킨 후에 항체를 결합 시킨다. 그런데 몸밖(in vitro)으로 나온 항체와 항원의 결합능은 몸 속에(in vivo) 있을 때 보다 현저하게 떨어지기 때문에 이를 극복하기 위해서 여러 가지 방법을 사용하고 있다. 항체와 항원의 반응성을 높여주기 위해서 항원과 항체의 결합부위인 Fab(Fragments having the antibody binding site) 부분을 떼어내어 기관에 고정하거나 single chain variable fragment(scFvs)로 만들어 고정시키기도 한다[4]. 또 고정이 일어날 때 입체적으로 제어하여 반응성의 향상을 얻는다. 그러나 항원과 항체의 반응이 100% 정확하게 이루어지지 않는다. 항체는 비교적 넓은 범위의 결합능을 갖음으로써 유사한 형태의 항원을 판독하지 못하고 결합이 일어나는 경우가 있다. 따라서 샘플간의 교차결합이 일어나지 않도록 처리를 해주어야 한다. 또 고정화할 때 항체들간의 가리움 효과에 의해 결합이 일어나지 못하는 현상도 막아주어야 한다. 그리고 보관상, 유통상 목적으로 적어도 8개월 이상 안정성을 유지할 수 있어야한다. 단백질은 매우 불안정한 물질로써 온도나 pH에 매우 민감하여 적정 온도와 pH를 유지하지 못했을 경우 그 결합능이 현저하게 떨어지게 되거나 센서로서 작동을 못하게 된다. 따라서 안정적으로 장시간 보관하는 방법도 연구되고 있다.

보통 항체를 기관위에 고정하는 방법은 여러 가지가 있다. 항체를 고정시키는 기관으로 많이 쓰이는 종류는 다음과 같다. Nitrocellulose 슬라이드[4], 유리 슬라이드[4], gold substrate[4], polystyrene[4], poly(vinylidene fluoride) (PVDF)[4] 막 등이 이용되고 있다. 항체를 기관에 고

정하면 다른 단백질이 기관에 붙지 않도록 기관을 blocking하는 단계가 매우 중요하다. 단백질 칩을 제작하기 위해서는 여러 단계의 세척과정과 다양한 물질의 피복과정이 반복된다. 따라서 항체가 기관 위에 견고하게 고정되어 있지 않는다면 이 과정에서 많은 항체가 소실되기 때문이다. 따라서 항체와 결합력이 강한 디바이스의 제작 및 결합방법도 연구 중에 있다.

DNA 칩인 경우엔 반응성을 높이기 위해서 PCR이라는 DNA 증폭기술을 이용하여 반응물의 농도를 높여준다. 단백질 칩에서 신호의 증폭을 위한 반응물질의 농도의 고농도화는 반응성의 면에서 매우 중요하다. 반응성의 향상을 위해 매우 비싼 항체를 고농도로 사용한다는 것은 제품의 단가를 높이는 원인이 되기 때문에 다른 방법에 의해서 농도의 증폭을 할 필요가 있다. 단백질 칩은 Rolling-circle-amplification technique 이라는 방법을 이용하여 반응시키기 전에 증폭시킨다[4]. 최근엔 형광물질을 사용하여 결합유무를 확인하는데 사용되는 형광물질의 발광능력과 편광현미경의 고감도 감광능력에 의해 검출하고자하는 물질의 농도의 문제는 많이 해결되었다. 즉 적은 양의 표지된 단백질의 결합도 결합의 유무를 육안으로 확인할 수 있게 되었다. 많이 쓰이는 형광물질로는 다음과 같다. Fluorescein을(초록색 빛을 발산함) 많이 사용해왔는데 빛에 노출되면 그 발광능력이 현저하게 감소한다는 단점으로 최근엔 많이 사용되지 않고 있다. 최근에 많이 쓰이는 형광 물질로는 Cy 형광 물질과 Alexa 형광 물질이 많이 사용되고 있다[4]. 이 형광물질은 Fluorescein이 갖고있는 문제점을 해결한 형광물질로서 빛의 노출에 강점을 보이고 있다. 보통 최소 검출 농도는 $150\text{fg}\mu\text{l}^{-1}$ 정도까지이다. 형광물질을 이용한 검출방법보다 보다 더 적은 양의 단백질을 검출할 수 있는 방법이 ECL방법이다. 이 방법을 이용하면 검출 감도를 높여줄 수 있어서 적게는 $4\text{fg}\mu\text{l}^{-1}$ 까지 검출 가능하다. 서술한 방법은 기존의 형광물질을 이용하는 방법에 비해 비용이 많이 들어간다는 점과 고정화 기관위에 어레이를 구성할 때 시료 샘플의 점(spot)을 밀집하여 찍을 수 없다는 단점이 있다. Mass spectrometry 역시 다른 단백질 결합 유무 측정 방법이다. 즉 레이저로 샘플을 태워서 증발되는 것을 분석 측정하여 단백질의 결합 유무를 질량의 변화로 측정하는 장치이다. 이 방법 역시 쉽게 반응 유무를 확인할 수 있는 방법 중의 하나이고 최근에 많이 사용되고 있다.

이제까지 단백질 칩의 고정화 방법, 검출방법 등 전반적으로 살펴보았다. 단백질 칩은 아직 DNA 칩에 비해 지속적으로 그 기능의 향상을 위해 연구가 진행중이다. 단백질 칩은 단순히 병원균 검출 센서로서의 기능뿐만 아니라 신약개발의 tool이나 새로운 단백질의 구조 분석 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. 단백질은 매우 앞에서 설명한 바와 같이 매우 불안정한 물질로 칩으로 구현 할 때 안정성의 확보가 중요한 문제이다. 서술한 바와 같이 우리 몸속의(in vivo) 항원 항체의 반응의 효율은 몸 밖에서 (in vitro) 현저하게 낮아지기 때문에 최대한 반응시키는 물질의 농도가 중요하다. 그래서 반응시키는 물질의 농도를 높여주기 위해서 증폭 기술 등이 개발되고 있다. 다른 해결 방법으로 어레이 Spot size를 줄이는 방법도 있다. 어레이 된 점의 크기를 줄여 집적도를 높이면 단위면적 당 결합능이 높아져서 효율을 높일 수 있다. 단백질 칩은 아직 완전히 개발된 단계가 아니고 그 적용 범위 지속적으로 증가하고 있는 추세이다. 따라서 이 분야의 지속적인 투자와 관심이 필요하다.

Reference

- [1]Functional and structural proteomics: a critical appraisal, Journal of Chromatography B, In Press, Uncorrected Proof, Available online 25 August 2002, Ivan Lefkovits
- [2] Function first : a powerful approach to post-genomic drug discovery, stephen F, Susan M. Baxter and Jacquelyn S. Fetrow, DDT vol7, No 16, August 2002
- [3]Protein micro-and macroarray : digitizing the proteome, Mary F. Lopez, Malcolm G. Pluskal, Journal of chromatography B, 000(2002) 000-000
- [4]Antibody arrays: an embryonic but rapidly growing technology, Drug Discovery Today, Sean P. Lal, Richard I. Christopherson and Cristobal G. dos Remedios Volume 7, Issue 18, 15 September 2002, S143-S149