

Analytical Instruments for the Identification of Target Protein(1)

- Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry

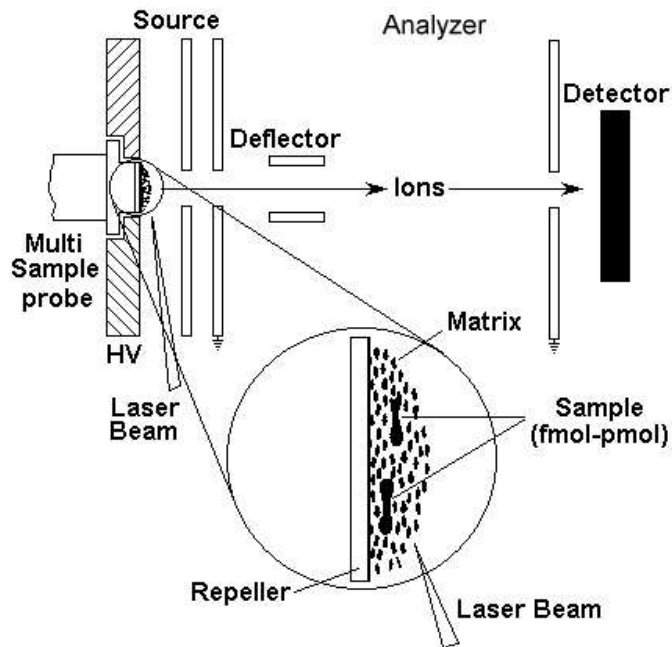
Introduction

최근, 다 성분 혼합체로부터 특정 유전자 또는 단백질을 검출, 정량하기 위한 방법으로 전자공학기술을 응용한 칩(Chip)개념이 대두되기 시작하였다. 일반적으로 생물학적 활성을 갖고 있는 분자를 고체상태의 소형 박막에 공유결합 또는 비 공유결합 형태로 부착시킨 모든 재료를 바이오 칩(Bio-Chip)이라 부르는데, 최근 들어 생물학적 분자들의 정량 및 정성 분석을 위한 미세장비까지도 포함시켜 일컫는 경향이 있다. 바이오 칩은 고체기판 위에 형성되는 박막 재료와 분석하고자 하는 대상에 따라 그 명명을 달리하는데, 실리콘이나 고분자 합성체의 박막에 DNA를 붙여 DNA를 분석하고자 한다면 DNA Chip을 구성하고, 여러 종류의 다당체(Polysaccharide)를 붙이면 Polysaccharide Chip이 되고, 단백질을 붙여 단백혼합체를 분석하고자 한다면 Protein Chip이 된다.

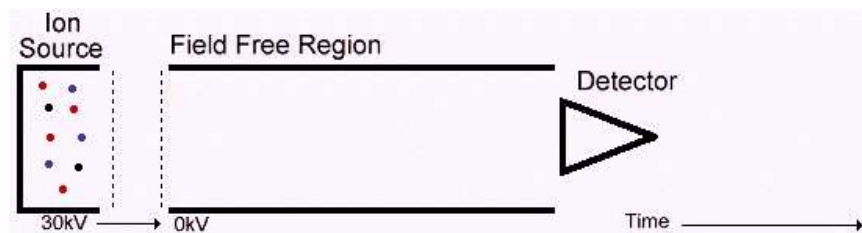
유전자 분석을 위한 DNA Chip의 경우에는 극미량의 특정 유전자를 PCR(Polymerase Chain Reaction)방법으로 증폭하여 분석 가능한 양으로 만들 수 있지만, 단백질의 경우에는 환자의 조직, 혈액, 타액 혹은 기타 생물학적 시료로부터 단백질의 절대량을 증폭시키기가 현재의 기술로는 불가능하다. 따라서, 극소량의 특정 단백질을 검출, 정량하기 위해서는 기존에 제시된 분석방법보다 정밀도가 높은 새로운 분석장치의 개발이 요구된다. 최근, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight)방법을 적용한 질량분석기와 SPR-BIA(Surface Plasmon Resonance based Biomolecular Interaction Analysis)가 개발됨에 따라, 생체 고분자의 질량과 단백질 상호작용에 따른 시료의 선택적인 분석이 가능하게 되어, 기존 방법 보다 빠르고 정확한 분석을 가능하게 하였다.

Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry

생체 고분자와 같은 비휘발성, 열적 불안정성을 갖는 시료의 분자량을 측정하기 위해서는 시료를 자외선 발광흡수체인 유기화합물 Matrix에 시료를 희석, 분산시킨 후, 짧고 강한 펄스레이저를 입사시켜, 순간적인 상 변화와 탈착 이온화를 유도하며, 이 때 생성되는 유사-분자이온을 검출하여 분자량을 측정하게 된다. 일반적으로 생체물질의 분자량 측정을 위한 이온화 기술 중 가장 대표적인 것으로는 전기분무이온화법(Electrospray ionization; ESI)과 매트리스-보조 레이저 탈착 이온화법을 들 수 있다. ESI방법은 시료를 용액 상태에서 곧바로 이온화 시키기 때문에 상당히 정량적이며 HPLC등의 분석장치와 on-line연결이 용이하다. 그리고 다중전하 이온화가 가능하여 사중극자 분석관(quadrupole analyzer)과 같이 m/z범위가 낮은 검출기를 사용하는 것도 가능하다. 그러나 시료가 매우 순수해야 하며, 염이 섞여 있으면 이온화 효율이 현격히 떨어진다. 또 복잡한 다중전하 생성이 스펙트럼 해석을 어렵게 하기도 한다. 이에 비해 MALDI는 시료에 존재하는 불순물에 크게 영향을 받지 않으며 시료준비가 간편하고 주로 생성되는 이온이 단일 전하를 띠는 이온이므로 스펙트럼이 간단해 혼합물 측정에 매우 유리하다. 2D-Gel로 분리한 단백질을 겔상 가수분해 시킨 후 추출하여 얻은 시료는 수십 개의 펩티드들로 구성되어 있는 복잡한 혼합물이고, 시료준비과정에서 불순물들이 다량 함유되어 있으므로 이를 분석하기 위해서는 MALDI방법이 더 적합하다.



펄스형태의 이온화원이라는 특성 때문에 MALDI의 질량분석법으로 가장 많이 쓰이는 방법이 비행시간(time of flight; TOF) 질량분석법이다. TOF방법은 10,000Da 이상의 분자량을 갖는 생체 고분자의 분자량을 측정할 수 있는 장점이 있다. 질량대 전하비를 결정하기 위하여 생성된 분자이온이 분석관을 비행하는 시간을 측정하고, 이미 알고있는 거리를 날아가는데 걸리는 시간을 측정하게 되면, 그 이온의 분자량을 측정할 수 있게 된다. 주사방식이 아니므로 다른 분석관에 비해 감도가 매우 좋아, 현재까지 보고된 TOF의 검출한계는 attomole 수준이다. 그러나 탈착과 가속과정에서 이온들이 힘을 받기 시작하는 위치가 일정치 않아, 동일한 질량대 전하비를 갖는 이온들 중에도 운동에너지의 분포가 생겨 해상도가 떨어진다는 단점이 있었다. 이러한 결점을 보완하기 위해, 탈착되어 나오는 이온들을 가속시키는 시간을 지연시킨 후 동시에 출발시키는 delayed extraction(DE) 방법과, 이온진행방향 반대편에서 이차가속을 시킴으로서 이온뭉치(ion packet)의 불규칙한 운동에너지 분포는 좁혀주는 reflection방법을 사용하면서 해상도는 급격히 향상되었다.



MALDI-TOF를 이용하여 질량분석을 수행할 때는 일반적으로 시료를 결정화 시킨다. 주로, UV영역의 빛은 강하게 흡수하는 유기물질을 매트릭스로 사용하는데, 펩티드 검출에 가장 많이 사용되는 매트릭스는 a-cyano-4-hydroxy cinnamic acid(CHCA)이다. 매트릭스와 분석시료가 함께 들어있는 용액을 시료판에 적하, 건조하여 결정화 과정동안 시료가 매트릭스의 결정구조에 균일하게 분포하게 되고, 여기에 H⁺이온 또는 Na⁺이온들이 부과되기도 한다. 이렇게 만든 매트릭스/시료 결정들을 이온화원에 장착한다. 이곳에 레이저 빔 펄스를 쬐이면 매트릭스 유기분자들이 에너지를 흡수하고 그 에너지를 시료이온에 전가한다. 이 때 시료는 내부 에너지가 증가하게 되어 매트릭스 결정으로부터 탈착한다. 그리고 탈착된 이온은 진공 상태에서 질량분석관으로 유입되어 각각의 질량 대 전하비(m/z)로 검출된다. 즉 매트릭스는

시료분자 각각을 분리시키는 역할과 그것을 안정하게 연성이온화(soft ionization)시키는 역할을 하는 것이다. 가장 많이 사용하는 레이저는 337nm파장을 갖는 질소 레이저를 이용한다.

References

- 1.J. Preisler, F. Foret, B.L. Karger, Anal. Chem. 70, 5278-5287(1998).
- 2.M.L. Vestal, P. Juhasz, S.A. Martin, Rapid Commun. Mass Spectrom. 9,1044-1050(1995).
- 3.J.R. Yates, III, J. Mass Spectrom. 33, 1-19(1998).