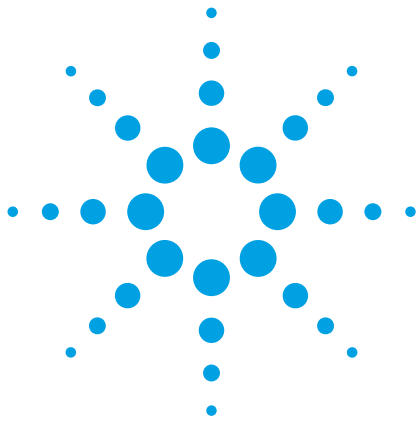




High Resolution Diffusion-Ordered Spectroscopy(HR-DOSY)

응용 자료

저자

Péter Sándor
Agilent Technologies GmbH
D64289 Darmstadt
Germany

개요

이 응용 자료에서는 VnmrJ 3.1 소프트웨어의 DOSY 패키지를 사용하여 복잡한 혼합물에 대해 2D 및 3D HR-DOSY 분석을 수행할 수 있음을 증명합니다. 먼저 에폭시 혼합물(2D)의 두 가지 성분의 존재를 밝히고, 단백질 혼합물의 부성분이 사실상 주성분(3D)의 유도체 부산물임을 입증합니다.

서론

High Resolution Diffusion-Ordered Spectroscopy(HR-DOSY)는 분자 크기가 작거나 중간인 혼합물 상에서 구조적 정보를 매우 효과적으로 얻을 수 있는 도구입니다. 혼합물 분석에 사용되는 다른 물리적 분석법이나, 액체 크로마토그래피와 결합된 NMR(HPLC-NMR) 또는 질량 분석기와 결합된 NMR과 달리, HR-DOSY에서는 분리 기술이 필요하지 않습니다. 이러한 특징은 분리가 불가능(식품 시료, 체액 등) 하거나, 효과적이지 않거나, 예상할 수 없는 상황일 때 특히 중요합니다. 확산 계수를 정확하게 측정하면 혼합물 성분의 NMR 스펙트럼을 분리할 수 있으며 실험적으로 수력학적 반지름을 추정하여 분자량을 예측할 수 있습니다. 확산 데이터는 용액 상태의 응집 또는 리간드와 거대분자 간의 결합을 모니터링하는 데도 종종 사용됩니다.

이 응용 자료에서는 VnmrJ 3.1 소프트웨어를 사용하여 에폭시 수지 혼합물과 미량 단백질같은 서로 다른 두 가지 복잡한 분자 혼합물을 분석할 수 있음을 보여 줍니다. 방향족 및 메틸기 영역에서 매우 시그널이 집중적으로 중첩되었음에도 2D HR-DOSY를 사용하여 에폭시 monomer와 octamer 간에 뛰어난 확산 분해능을 얻을 수 있었습니다. 소량의 dimer가 포함된 것으로 예상되는 단백질에 대해 3D HR-DOSY 분석을 수행한 결과, 사실상 부성분이 주성분보다 이동성이 약간 더 높아 분자량이 낮은 것으로 확인되었습니다.

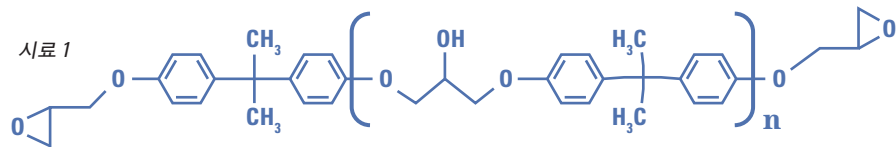


Agilent Technologies

실험

시료

시료 1(영국 웰링에 위치한 International Paint의 Simon Welsh 제공)은 시중에서 구입할 수 있는 Dow Chemical Company의 두 가지 에폭시 수지를 혼합한 것입니다. 이 두 가지 성분은 구조적으로 매우 유사($n=0$ 인 D.E.R. 331 “액체 수지”, $n\sim 7$ 인 EPIKOTE 1007 “고체 수지”)이며 ^1H NMR 스펙트럼의 방향족 및 메틸기 구역에서 확산 분광기의 특수 문제점인 시그널의 집중적인 중첩이 나타납니다. CDCl_3 용액에서는 방향족 및 메틸기 두 종류의 시그널 강도를 비교하기 위해 상대 농도를 선택했습니다.



시료 2(스페인 그라나다 대학의 Nico van Nuland와 벨기에 브뤼셀에 위치한 VIB의 NMR 센터 소속 Jean Jeneer 제공)는 92% $\text{H}_2\text{O}/8\%$ D_2O , $\text{pH}=3.5$ 에 1 mM의 ^{15}N -labeled chimeric SH3-domain 단백질 SPCp41¹(75 아미노산 잔류물)이 용해된 용액입니다. 이 시료는 크로마토그래피 분석을 실시한 결과 순수한 물질로 밝혀졌지만 ^{15}N - ^1H HMQC(Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) 스펙트럼에서 4:1의 비율의 두 가지 성분 즉, 예상되는 주성분과 SH3 단백질(유효 농도 ~ 0.8 mM)이 있는 것으로 분명히 나타났습니다. 주 conformer의 dimer 형태의 부성분(유효 농도 0.2 mM)을 확인할 수 있도록 3D-DOSY-HMQC 실험을 시행하였습니다.

기기 및 실험 조건

시료 1은 5 mm OneNMR probe와 Performa I 그레디언트 증폭기(최대 그레디언트 강도 ~ 20 G/cm)가 장착된 Agilent MR-400 NMR 분광기를 사용하여 399.86 MHz에서 분석했습니다. 3 밀리초 동안 인코딩/디코딩 그레디언트 쌍에 대해 2~20 G/cm 범위에 있는 31개의 값을 얻었습니다. 적절한 시그널 감쇠 효과를 얻기 위해 상대적으로 긴(300 밀리초) 확산 지연을 사용해야 했습니다. 점도가 낮고 확산 지연이 긴 클로로포름 용액은

대류 가능성을 배제할 수 없으므로, 부수적인 열 대류를 보상하는 pulse field gradient double stimulated echo(Dpfgdste) 펄스 시퀀스를 사용했습니다. 이 데이터는 활성 시료 온도를 25°C로 제어한 상태에서 수집했습니다.

시료 2는 3개의 RF 채널, 실온의 5 mm HCN probe, Performa IV 그레디언트 증폭기(최대 그레디언트 강도 ~ 60 G/cm)가 장착된 VNMRs600 기기를 사용하여 599.715 MHz에서 분석했습니다. 8 가지 위상 감응, 2D gradient compensated stimulated echo ^{15}N - ^1H HMQC(Dgcstehmqc) 실험이 25°C, 확산 지연 100 msec, 그레디언트 펄스 폭 2 msec, 그레디언트 진폭 범위 5~55 G/cm 조건에서 실시되었습니다. HMQC 단계에서 coherence pathway를 선택하기 위해 그레디언트는 사용하지 않았습니다. 스펙트럼 폭은 F2 및 F1에서 10 kHz 및 2.2 kHz로 설정했으며 복합 데이터 획득 지점은 각각 1024와 128이었습니다. 각 자유 유도 감쇠(FID)는 평균 64 개의 스캔 수로 획득하였습니다. F1의 FID 크기는 선형 예측에 의해 두 배로 증가했으며 푸리에 변환이 일어나기 전에 1024 복합 지점까지 제로값으로 되었습니다. 매칭 코사인 제곱 윈도우 함수가 F2와 F1에 모두 적용되었습니다.

결과 및 토의

DOSY를 이용한 확산 계수 측정

Diffusion pulse 시퀀스는 gradient stimulated echo를 기반으로 하며 그 외에 다양한 변이형 시퀀스들이 있습니다.

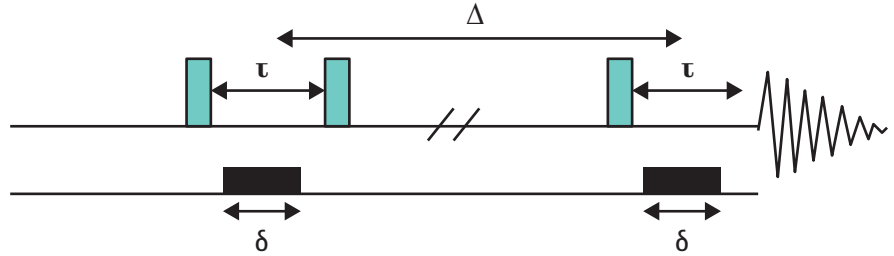
DOSY 실험에서 diffusion-encoding gradient의 강도가 배열되고 감쇠 시그널 강도(2D DOSY) 또는 체적 적분(3D DOSY)은 Stejskal-Tanner 표현식에 맞춰집니다.

$$S(G_{zi}) = S(0) \exp(-D \gamma^2 \delta^2 (G_{zi})^2 (\Delta - \delta/3))$$

여기에서 $S(G_{zi})$ 와 $S(0)$ 는 그레디언트 강도가 각각 G_{zi} 와 0일 때 얻은 시그널 강도이며, D 는 확산 계수를, γ 는 자기 회전 상수를, δ 는 그레디언트 펄스 시간을, Δ 는 확산 지연을 각각 나타냅니다.

2D DOSY 분석 결과는 일차원(F2) 축에서 화학적 이동이 나타나고 다른 차원인 (F1) 축에서는 분산된 시그널이 나타나는 2D 스펙트럼입니다. 교차 피크 위치는 계산된 확산 계수 (D)에 따라 결정되며 확산 차원의 “선 너비”는 D 값의 표준 편차(그림 1)에 따라 결정됩니다.

DOSY 실험의 데이터 품질(확산 계수의 정확도 및 정밀도)과 “크로마토그래피” 분해능 간에 밀접한 상관 관계가 있다는 것은 그리 놀라운 일이 아닙니다. 통계 오차(일반적으로 충분하지 못한 시그널 대 노이즈 비와 관련)는 파라미터를 올바르게 설정하여 방지해야 합니다. 반면 계통 오차는 가능할 때마다 수정해야 합니다. 시그널 감쇠가 급격하게 증가하지 않을 경우 복잡하고 강력한 처리 분석법이라 할지라도 응용성이 크게 제한될 수 있습니다.



NMR을 이용한 확산 측정의 물리적 배경

D_2O 확산 지연 = 300 msec에서 AMP와 무기 인산염이 혼합된 혼합물의 2D ^{31}P -DOSY 분석

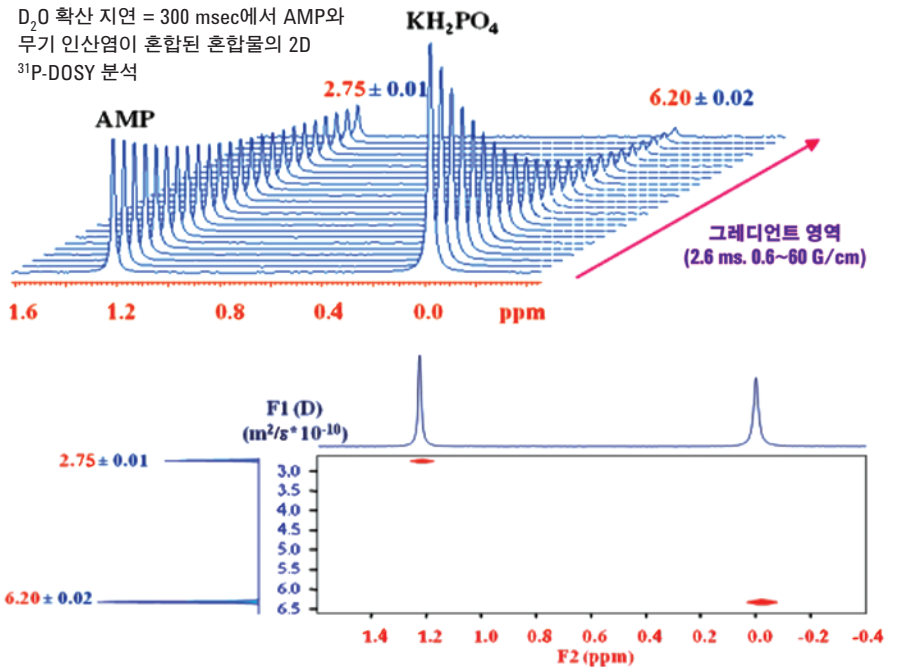


그림 1. 위: AMP와 무기 인산염이 혼합된 혼합물의 그레디언트 영역이 증가함에 따라 시그널이 감쇠됩니다. 빨간색 숫자는 계산된 D 값을 나타내며 파란색 숫자는 표준 편차를 나타냅니다. 아래: DOSY 처리 후의 2D 디스플레이.

그레디언트 검교정 및 비균일 그레디언트(NUG) 교정

비지수적 신호 감쇠의 발생 원인에는 그레디언트 코일이 있을 수 있으며 이는 사용자가 제어할 수 없는 영역입니다. Probe 디자인 시 필연적으로 절충 방식을 택해야 하기 때문에, 생성된 펄드 그레디언트가 실제 시료 용량의 그레디언트 축과 완전히 일치선을 이루지 않습니다. 하지만 다행스럽게도 probe²에서 생성된 실제 그레디언트 모양을 고려하여 수정한 Stejskal-Tanner 방정식에 맞게 데이터를 피팅하면 이러한 그레디언트 비균일 현상을 손쉽게 교정할 수 있습니다. Stejskal-Tanner 방정식에 필요한 수정 사항을 파악하는 데에는 단 한 번의 실험만 진행되면 됩니다. 이 방정식은 이후 모든 DOSY 데이터 처리에 사용할 수 있습니다. 교정은 시스템 관리자가 표준물질인 Doped-D₂O 시료에서 probe별로 한 번 수행하거나 확산 계수가 알려진 시료를 이용하여 수행합니다. 교정 값은 probe 파일에 저장되며 새로운 DOSY 실험을 설정할 때마다 자동으로 사용됩니다. 이 검교정을 통해 NUG 교정 계수와 가장 정확한 그레디언트 진폭을 얻을 수 있습니다. 이 두 가지 파라미터 집합은 신뢰성 높고 정확한 확산 데이터를 얻고 다중 지수 피팅을 사용할 때 중첩된 공진을 올바르게 처리하는 데 반드시 필요합니다. 그레디언트의 비균일 정도는 probe 유형과 출시일에 따라 다를 수 있습니다. 그러나 NUG 교정을 수행하면 초기 버전의 그레디언트 probe에서도 고품질의 DOSY 데이터를 얻을 수 있을 것입니다.

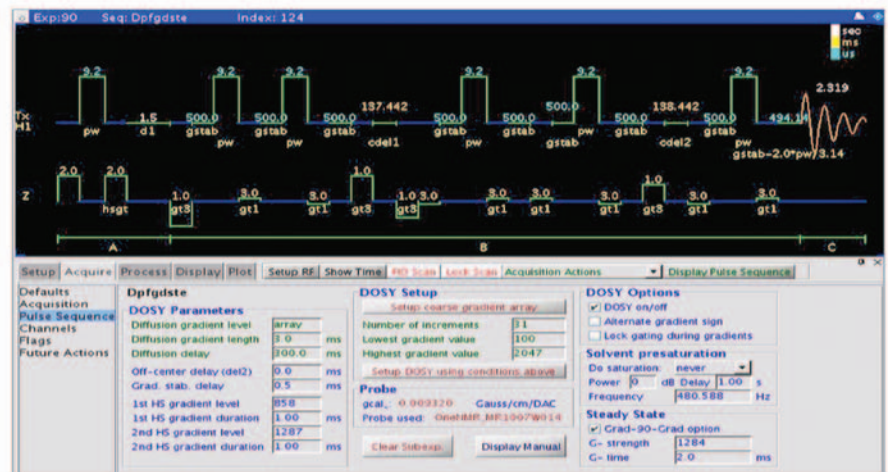
예폭시 수지 혼합물에 대한 2D DOSY 분

예폭시 수지 혼합물(시료 1)의 실험 설정이 그림 2에 요약되어 있습니다. 이 그래픽에는 펄스 시퀀스 도표가 나와 있습니다. 펄스 시퀀스 패널의 입력 필드에서는 시료마다 개별적으로 설정하거나 최적화해야 하는 모든 확산 관련 파라미터(최적의 그레디언트 영역/확산 지연 조합 찾기 등)를 사용할 수 있습니다.

데이터 수집이 완료되면 FID는 DOSY 프로세스 패널(그림 3)을 통해 처리됩니다. 모든 2D DOSY 실험이 동일한 패널에서 진행되므로 펄스 시퀀스와 무관합니다. 모든 어레이 요소의 FID는 16K 데이터 포인트로 제로 필링이 수행되고 지수 감쇠 함수 2 Hz를 곱한 후 푸리에 변환과 베이스라인 교정이 이루어졌습니다. DOSY 처리 시 삼중 지수 피팅으로 NUG 교정(그 전에 적절한 NUG 검교정 수행)을 한 후, 그림 4에 표시된 2D DOSY 스펙트럼을 얻었습니다

프로세스 패널의 가장 오른쪽에 있는 블록에서는 피크-피크 기준으로 데이터 피팅 품질을 검사할 수 있습니다. 결과가 그래픽 영역(그림 3의 맨 위)에 표시되며, 이 결과에는 실험적 감쇠 및 피팅된 시그널 감쇠가 그레디언트 펄스 영역 면적의 함수로 표시되고 실험적 데이터 지점과 피팅된 데이터 지점의 차이도 표시됩니다. 이 지점의 차이는 그래픽 창 아래(지수 100을 곱함)에 표시되고 선택한 피크에 계통 오차가 없음을 분명히 알 수 있습니다. 이 검사 결과에서 하나 이상의 데이터 지점에 평균을 크게 상회하는 오차가 나오면 outlier를 제외한 후 처리를 반복하면 됩니다. 확산 투사 표시 버튼을 마우스로 클릭하면 일반적인 1D NMR 스펙트럼처럼 처리(확장, 도표화 등)할 수 있는 확산 “크로마토그램”(그림 4의 삽화)이 표시됩니다. 또한 패널을 이용해 데이터를 재처리할 필요 없이 최초 NMR 데이터와 DOSY 디스플레이 사이를 전환할 수 있습니다.

2D DOSY의 간편한 수집 설정



2D 데이터 분석용 처리 도구

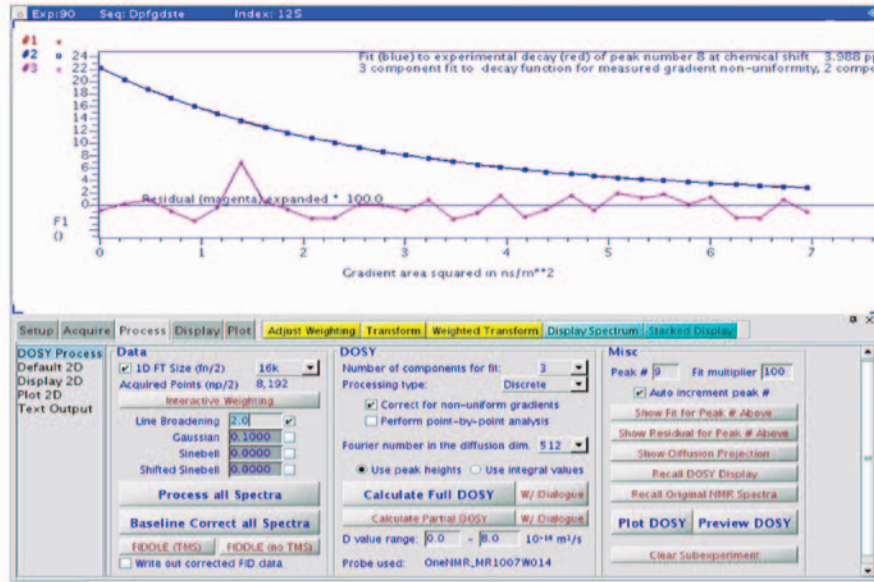


그림 3. 2D DOSY 프로세스 패널(아래)과 방향족 시그널의 데이터 피팅 결과(위). 맨 위의 감쇠 곡선은 실험적 시그널 진폭과 피팅된 곡선을 나타냅니다. 그 아래에는 100을 곱한 후의 실험적 강도와 계산된 강도의 차이가 표시되어 있습니다

그림 4의 2D DOSY 디스플레이는 에폭시 monomer와 octamer 간의 뛰어난 확산 분해능을 보여 줍니다. 특히 주목할 만한 점은, 주파수 영역에서 분리되지 않은 시그널 (방향족, 메틸기 및 에폭시 양성자)이 오버랩되지 않은 시그널(4 ppm과 4.5 ppm 사이의 $-O-CH_2-$ 구역)과 동일한 확산 속성을 나타낸다는 것입니다. 이러한 데이터 품질은 세심한 주의를 기울여 실험적 파라미터와 조건을 선택하고 계통 오차를 방지하거나 적절하게 수정한 경우에만 가능합니다. 확산 실험에서 최고의 분해능을 얻는다는 것은 매우 복잡한 문제³입니다. 무엇보다 혼합물 성분의 농도비, 감쇠 상수 비(D), NMR 스펙트럼의 시그널 대 노이즈 비가 중요합니다.

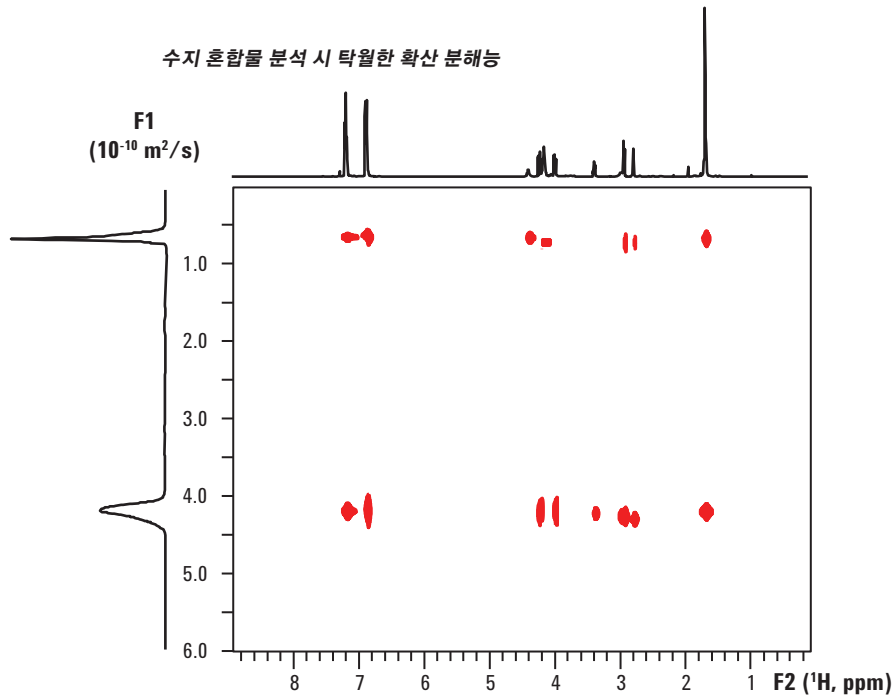


그림 4. 2D DOSY 도표는 DOSY 처리 결과를 보여 줍니다. 맨 위에는 고분해능 1D 스펙트럼이 표시되고 측면에는 계산된 "크로마토그램"이 표시되어 있습니다.

단백질 혼합물의 3D DOSY 분석

매우 복잡한 혼합물과 생체 시료는 거의 예외 없이 1D NMR 스펙트럼에서 허용할만한 수준의 주파수 분해능을 얻을 수 없습니다. 그러므로 시그널 오버랩 정도는 확산 시퀀스와 동행 또는 이핵 2D 상관 관계 펄스 시퀀스를 결합해 3D DOSY 데이터 집합을 만들어 제거하거나 크게 줄일 수 있습니다.

단백질 SPCp41(시료 2)의 ^{15}N - ^1H HMQC 스펙트럼은 크로마토그래피 분석법으로는 쉽게 분리할 수 없는 2개의 분자 또는 2 개의 conformer (약 4:1 비율)가 시료에 포함되어 있음을 분명하게 보여 줍니다. HMQC 스펙트럼의 교차 피크가 대부분 중첩되었지만 주성분과 부성분의 몇몇 교차 피크 쌍에는 확산 연구가 가능한 만큼 충분히 분리된 주파수가 나타났습니다. 처음에는 주성분이 monomer이고 부성분이 dimer라고 예상했고, 이 예측은 확산 측정을 입증하거나 무효화할 수 있는 가설입니다.

그림 5에는 전체 2D ^{15}N - ^1H 화학적 이동 상관 관계 스펙트럼과 개별 체적 적분을 안정적으로 측정할 수 있을 만큼 분리된 교차 피크 쌍의 네 가지 삽화가 나와 있습니다. 삽화에서 숫자는 각 교차 피크의 계산된 확산 계수를 나타내며 괄호 안의 숫자는 D 값의 표준 편차를 나타냅니다. 4개의 교차 피크 쌍 모두에서 부성분이 주성분보다 이동성이 약간 더 높아 분자량이 낮은 것을 확실히 알 수 있습니다. 따라서 dimerization 이론을 분명하게 배제할 수 있습니다. 후속 N-terminal 시퀀싱은 부성분이 N-terminal에서 처음 7개의 아미노산이 누락된 원형 SH3 단백질의 유도체임을 보여 줍니다. 그림 5의 단백질 구조에서 누락된 시퀀스는 파란색으로 표시되고 해당 입체 배치

단백질 혼합물을 구성하는 주성분과 부성분의 상대적 이동성

F1 (^{15}N , ppm)

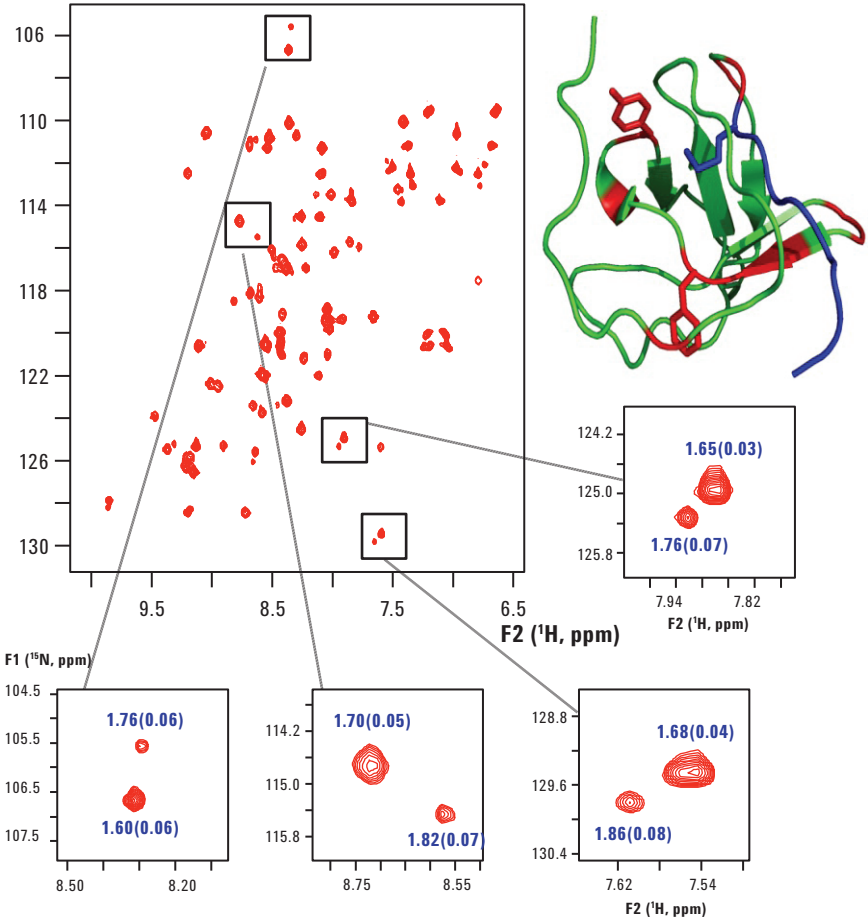


그림 5. 확산 인코딩/디코딩 그래디언트가 가장 낮은 시료 2의 ^{15}N - ^1H HMQC 스펙트럼(위)과 분리된 교차 피크 쌍을 보여 주는 4개의 삽화(아래). 삽화 숫자는 계산된 D 값을 나타내며 괄호 안의 숫자는 통계 오차를 나타냅니다. 부성분의 N-terminal에서 누락된 7개 아미노산 시퀀스가 구조도에 파란색으로 표시되어 있습니다.

변경으로 인해 HMQC 스펙트럼에서 교차 피크가 분리된 지점은 빨간색으로 표시되어 있습니다.

3D DOSY 처리는 소프트웨어를 이용해 자동으로 수행하거나 사용자의 완전한 통제 하에 수동으로 수행할 수 있는 교차 피크 정의 이후에 항상 이루어져야 합니다. 이제 프로세스 패널과

인터랙티브 스펙트럼 디스플레이를 통해 교차 피크를 재정의, 배제 및 결합할 수 있으므로, 관심 피크만 선택하여 확산 분석을 수행할 수 있습니다(그림 6). 피크 정의가 완료 (종종 DOSY 처리 단계에서 대부분의 시간이 소요됨)되면 FID에 피크 할당을 저장하여 데이터 재처리가 필요할 때마다 불러올 수 있습니다.

쉽게 액세스할 수 있는 3D DOSY 처리 도구

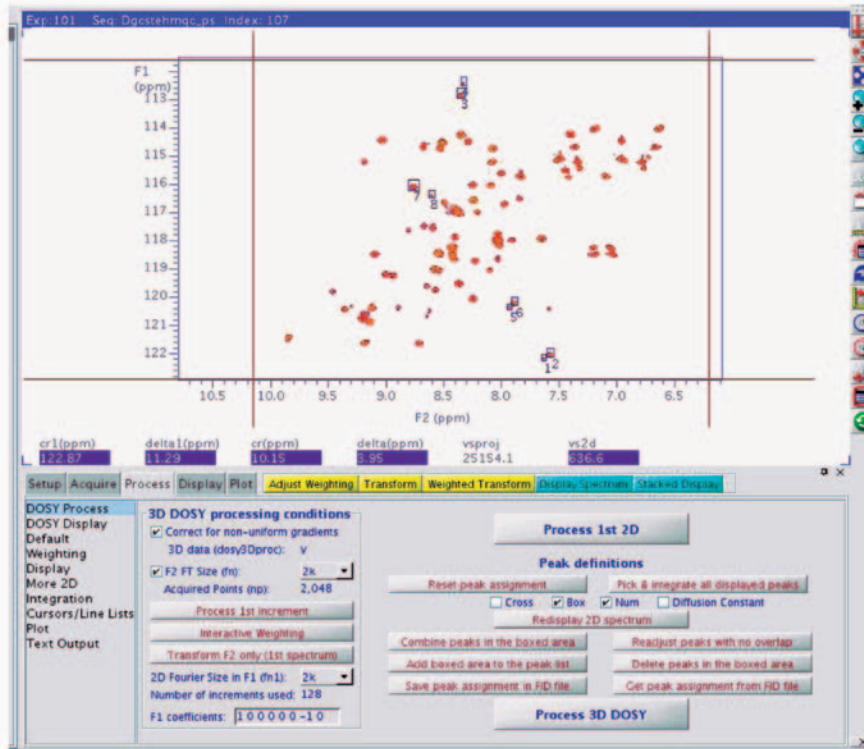


그림 6. 시료 2 분석에 사용된 DOSY 프로세스 패널과 인터랙티브 스펙트럼 디스플레이

결론

VnmrJ 3.1 DOSY 패키지의 향상된 분해능은 확산 계수 측정 시 보다 높은 정확도와 정밀도를 제공합니다. 이제 다중 지수 피팅 기술로, 화학적 이동 스케일 상에서 확산 계수가 서로 다른 분자로 인해 나타나는 중첩 피크를 분리할 수 있습니다. 이로 인한 궁극적인 이점은 보다 많은 정보를 수집할 수 있어 이전에 모호했거나 다루기 힘들었던 분석을 수행할 수 있다는 점입니다. 이 패키지에는 총 17개의 확산 시퀀스가 포함되어 있으며 그 중 일부는 생체 시료에 특히 적합하거나 대류 보상이 가능하도록 설계되었습니다. 각 DOSY 매뉴얼 (High Resolution Diffusion-Ordered Spectroscopy, 애질런트 발행 번호 91001990)은 데이터 수집의 모든

측면을 다루는 매우 자세한 정보를 제공하며 FID 라이브러리는 익숙치 않은 사용자가 데이터 처리를 연습할 수 있도록 구성되었습니다.

새로운 VnmrJ 3.1 DOSY 패키지의 강점은 HR-DOSY를 통해 두 개의 복합 혼합물을 성공적으로 분석함으로써 입증되었습니다. 주파수 영역에서 방향족, 메틸기 및 에폭시 양성자 시그널이 분리되지 않았음에도, 2D DOSY를 사용한 결과 에폭시 혼합물의 두 가지 성분인 monomer와 octamer가 분명하게 드러났습니다. 또한 3D DOSY를 사용하여 단백질 혼합물을 분석한 결과 이전에 dimer라고 생각했던 부성분이 사실은 주성분의 미량 유도체였으며 그 결과 7개의 아미노산이 누락되어 더 짧게 보인다는 사실이 증명되었습니다.

알림

VNMRJ 3.1 DOSY 패키지는 이전 버전에 비해 특히 데이터 처리 부분에서 성능이 크게 개선되었습니다. 이 패키지는 영국의 맨체스터 대학교 (University of Manchester)에서 개발되었으며 동 대학으로부터 사용 허가를 받았습니다.

참조

1. A. M. Candel, F. Conjero-Lara, J. C. Martinez, N. van Nuland and M. Bruix, "The high-resolution NMR structure of a single-chain chimeric protein mimicking a SH3-peptide complex", *FEBS Letters* **581**, 687-692 (2007).
2. M. A. Connell, P. J. Bowyer, P. A. Bone, A. L. Davis, A. G. Swanson, M. Nilsson, and G. A. Morris, "Improving the accuracy of pulsed field gradient NMR diffusion experiments: Correction for gradient non-uniformity." *J. Magn. Reson.* **198**, 121-131 (2009).
3. M. Nilsson, M.A. Connell, A. Davis and G.A. Morris. "Biexponential Fitting of Diffusion-Ordered NMR Data: Practicalities and Limitations." *Anal. Chem.* **78**, 3040-3045 (2006).

추가 정보

자세한 내용:

www.agilent.com

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

국가별 애질런트 고객 센터

www.agilent.com/chem/contactus

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

adinquiry_aplsca@agilent.com

www.agilent.com

이 문서의 제품 사양 및 설명은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2011

2011년 8월 한국에서 발행

발행물 번호 5990-7600KO

서울 강남구 역삼로 542 신사제2빌딩 2층 우) 135-848
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies