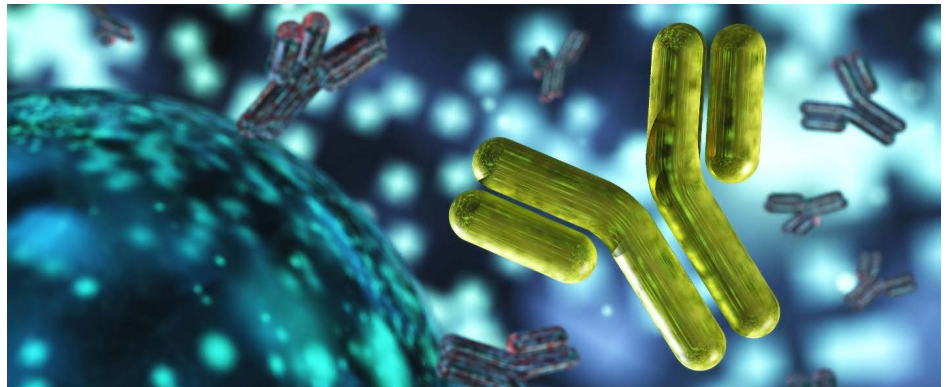


Agilent Cary 630 FTIR 분광기를 사용한 단백질 2차 구조 추정

FTIR을 이용한 단백질 2차 구조 평가를 위한 빠르고
유연한 방법



저자

Ravindra Gudihal 및
Wesam Alwan
Agilent Technologies, Inc.

개요

단백질은 특히 거의 무한한 형태로 접힐 수 있다는 점에서 다양한 분자 기능을 수행합니다. 따라서 α -나선, β -시트, 턴, 랜덤 코일 단백질의 2차 구조의 정도를 평가하는 것은 단백질 기능을 이해하는 데 필수적입니다. 이 응용 자료에서는 **감쇠 전반사(ATR)** 기능을 갖춘 **Agilent Cary 630 FTIR** 분광기와 **Agilent MicroLab Expert** 소프트웨어를 사용하여 푸리에 변환 적외선(FTIR) 분광법을 적용함으로써 용액 내 단백질의 2차 구조를 빠르게 추정합니다. FTIR 결과를 X선 결정 구조 분석기로부터 얻은 문헌 값과 비교해 보면 이 접근 방식이 용액 내에서 단백질 2차 구조를 추정하는 빠르고 유연한 방법으로 유용하다는 사실을 알 수 있습니다.

소개

대형 펩타이드와 단백질의 2차 구조에 대한 초기 연구 중 일부는 적외선 분광법을 사용하여 수행되었습니다.¹ 원이색법(CD)과 X선 결정 구조 분석 또한 단백질 구조를 평가하는 데 필수적인 것으로 입증되었지만^{2,3}, 두 기술 모두의 사용에는 제한이 따릅니다. X선 분석을 위해서는 단백질이 결정 형태여야 하므로 복잡하고 시간이 많이 걸리는 시료 전처리가 필요하고, CD는 제한된 광학 밀도 범위 내에서만 적용할 수 있으므로 시료 농도가 약 0.1-1mg/mL로 제한됩니다.

FTIR 기술은 시료에 대한 이러한 제한이 적고, FTIR 스펙트럼은 단백질 백본 아미드 기에 사용 가능한 진동 모드, 즉 2차 구조의 존재에 대한 귀중한 정보를 전달하는 흡수 대역을 나타냅니다.¹ 아미드 I 대역 주파수는 2차 구조를 결정하는 데 매우 중요한 파라미터입니다. 아미드 I 대역은 단백질의 2차 구조를 추정하는 데 민감한 것으로 알려져 널리 사용되고 있습니다. 일반적으로 1,600-1,700cm⁻¹ 사이에서 발견되는 적외선 스펙트럼의 이 영역은 주로 단백질의 2차 구조를 나타내는 C=O와 C-N 그룹의 신축 진동에 의해 제어됩니다. 이 대역 내의 α-나선과 β-시트에 대한 특징적인 주파수 범위를 통해 이러한 구조를 할당할 수 있습니다. FTIR은 X선 결정 구조 분석법이나 핵자기 공명(NMR) 분광법의 높은 분해능에는 미치지 못하지만, 반응이 더 빠르고 조작이 쉬우며 2차 구조 추정에 더 폭넓게 적용할 수 있습니다.

실험

기기

이 연구에서는 ZnSe 광학 장치를 갖춘 Cary 630 FTIR 분광기와 단일 반사 다이아몬드 ATR 모듈을 사용했습니다. 이 모듈은 짧은 경로 길이를 갖춰 점성 시료와 같은 농도가 상대적으로 높은 단백질 시료의 분석이 가능합니다(그림 1). 데이터 수집은 (표 1)에 표시한 파라미터를 사용하여 MicroLab Expert 소프트웨어로 수행했습니다.



그림 1. Agilent Cary 630 FTIR을 단일 반사 다이아몬드 ATR 모듈과 함께 사용했습니다.

표 1. Agilent Cary 630 FTIR에 대한 실험 파라미터.

파라미터	값
스펙트럼 범위	4,000 - 650cm ⁻¹
시료/백그라운드 스캔	140
분해능	4cm ⁻¹
Zero Fill Factor(제로 필 팩터)	없음
Apodization(아포다이제이션)	Triangular(삼각)
Phase Correct(위상 보정)	Mertz
샘플링 기술	ATR

시료: 소 혈청 알부민(05470), 리소자임(달걀 흰자, L-6876), 파파인(P4762), β-카제인(C6905) 및 미오글로빈(M1882)은 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입했습니다. 단일 클론 항체(mAb)는 싱가포르의 현지 약국 유통업체에서 구입했습니다. mAb 시료는 Vivaspin 500 원심 농축기 스피ن 컬럼(10kDa MWCO; Sartorius)을 사용하여 농축했습니다.

시료 전처리: 소 혈청 알부민(BSA), mAb, 파파인은 10mg/mL로 사용했습니다. 리소자임, β-카제인, 미오글로빈은 25mg/mL로 사용했습니다. 각 단백질 시료는 10μL를 취하여 측정기에 사용했습니다. 초순수는 0.22μm의 멤브레인 point-of-use 카트리지를(Merck Millipore)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다. 순수한 물의 FTIR 스펙트럼을 단백질 용액의 FTIR 스펙트럼에서 차감하여 얻은 스펙트럼을 분석했습니다.

데이터 분석

데이터 분석에는 MicroLab Expert 소프트웨어(버전 1.1.0.1)를 사용했습니다.

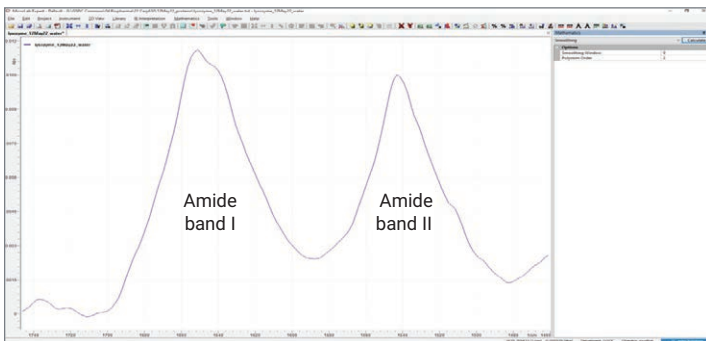
- 세 번 측정된 평균 스펙트럼을 데이터 처리에 사용했습니다.
- Mathematics(수학) 탭의 Spectrum Arithmetic(스펙트럼 산술)에 있는 Subtract Spectra(스펙트럼 감산) 기능을 사용해 바탕 스펙트럼(예: 물 또는 제제 완충액)을 평균 스펙트럼에서 차감했습니다.
- 스펙트럼에서 차감된 블랭크는 2D View(2D 보기) 탭의 Merge View(보기 통합)을 사용해 병합했습니다.
- Mathematics(수학) 탭에서 평활화 창 9와 다항식 차수 3을 사용하여 추가적인 평활화를 수행했습니다.
- 2차 미분 스펙트럼에는 Savitzky Golay 2차 미분 및 Mathematics(수학) 탭 아래의 평활화 창 9를 적용했습니다.

MicroLab Expert 소프트웨어에서 검량선 피팅 작업을 이용한 2차 구조 추정

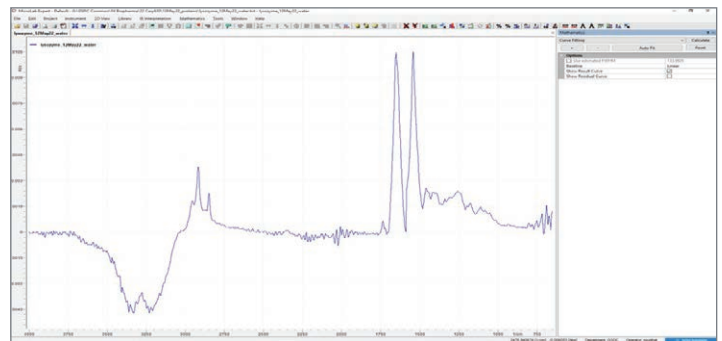
MicroLab Expert 소프트웨어의 Curve Fit(검량선 피팅) 메뉴 명령에서 다음 작업을 수행했습니다.

1. 검량선 피팅을 적용하기 전에 아미드 대역 I($1,600-1,700\text{cm}^{-1}$)에 대한 베이스라인 보정을 수행합니다.
2. 피팅하려는 2D 데이터 대상을 활성화합니다.
3. Mathematics(수학) 메뉴에서 **Curve Fit(검량선 피팅)** 명령을 선택합니다.
4. **더하기** 버튼을 클릭하여 추정 피크 목록에 새로운 피크를 추가합니다.
5. Mathematics(수학) 탭에서 필요한 모든 파라미터(FWHM, 최대 X 및 Y 위치)를 조정합니다.
6. 최적의 피크 수가 정의될 때까지 3단계부터 반복합니다.
7. **Auto Fit(자동 피팅)** 버튼을 클릭합니다.
8. **Calculate(계산)** 버튼을 클릭하여 추정된 피크의 자세한 피크 정보가 담긴 새 표를 만듭니다.

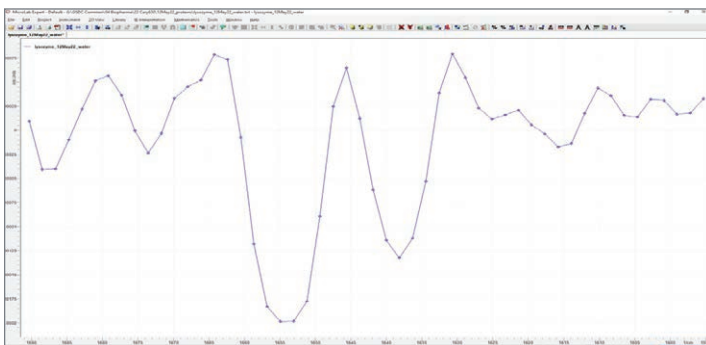
그림 2는 리소자임을 사용한 검량선 피팅의 예입니다.



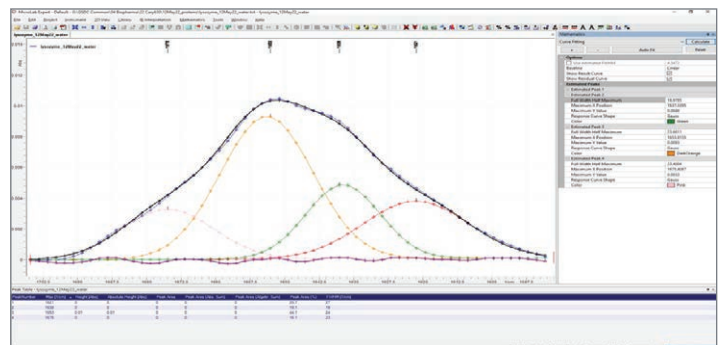
1 Result of subtracting the average lysozyme spectra from the water spectra



2 Perform baseline correction for amide band I ($1,600$ to $1,700\text{ cm}^{-1}$)



3 Use a Savitzky-Golay filter with a smoothing window of 9 to apply a second-order derivative in order to identify concealed peaks



4 Perform curve fitting on the spectrum obtained in step 2, focusing on the spectral range of $1,600$ to $1,700\text{ cm}^{-1}$

그림 2. Agilent MicroLab Expert 소프트웨어의 검량선 피팅 절차를 사용하여 단백질 2차 구조를 추정합니다. 2차 구조에 대한 성분의 기여도는 각 성분 피크의 대역 면적을 계산하여 추산됩니다.

단백질 2차 구조에 대한 성분 기여도는 각 성분 피크의 대역 면적을 사용하여 계산했습니다. 2차 구조는 표 2에 따라 할당되었습니다. 단백질 사이의 수소 결합이 상이하고 단백질이 존재하는 환경 또한 다르므로 모든 할당 값은 범위로 표시됩니다. 동일한 시료로 향후 사용할 경우 “반치전폭”을 기록해 두세요.

표 2. 2차 구조와 아미드 I 대역 주파수의 상관 관계.⁴

구조	아미드 I 주파수(cm^{-1})
α -나선	1,648 - 1,660
랜덤	1,640 - 1,648
β -시트	1,625 - 1,640
교차- β 구조	1,610 - 1,628
턴	1,660 - 1,699

1,648-1,660 cm^{-1} 사이에 중심을 둔 성분은 α -나선 2차 구조에 할당되었습니다. 1,625-1,640 cm^{-1} 영역의 대역은 일반적으로 β -시트 구조에 할당됩니다(표 2). 무작위 코일 형태는 1,643 및 1,649 cm^{-1} 부근에서 IR 대역을 나타냅니다.

결과 및 토의

서로 다른 알려진 2차 구조를 특징으로 하는 6가지 천연 단백질, 즉 미오글로빈(나선형), 면역글로불린 G(시트형), 리소자임(나선형), 소 혈청 알부민(대부분 나선형), 파파인(혼합형), β -카제인(무질서형)의 적외선 스펙트럼을 조사했습니다. 피크 피팅은 데이터 분석 섹션(그림 2)에 설명된 절차에 따라 물을 뺀 스펙트럼에을 대상으로 수행되었습니다. 아미드 I 대역은 기본 2차 구조 성분에 대한 통찰력을 거의 제공하지 못합니다. 다양한 성분 대역의 폭이 피크 간 거리보다 크기 때문입니다. 숨겨진 피크를 식별하기 위해 스펙트럼의 2차 도함수를 대역 축소/피크 선명화 방법으로 사용했습니다. 그림 3은 6가지 연구 대상 단백질에 대한 전반적인 검량선 피팅을 보여줍니다. 스펙트럼의 아미드 I 영역에는 몇 개의 뚜렷한 피크가 있습니다.

적외선 스펙트럼에서 피팅 곡선 아래의 면적은 아미드 I 대역에 해당하며, α -나선 및 β -시트와 같은 특정 2차 구조를 할당하는 데 사용됩니다. 이 지정은 표 2에서 참조된 특성 주파수 범위를 기초로 합니다. 아미드 I 대역의 피팅 곡선 아래 면적을 분석함으로써 단백질에 존재하는 각 2차 구조의 상대적인 양을 추정합니다.

표 3은 α -나선, β -시트, 턴 및 랜덤 코일 2차 구조에 대한 정량화 결과를 요약한 것입니다.

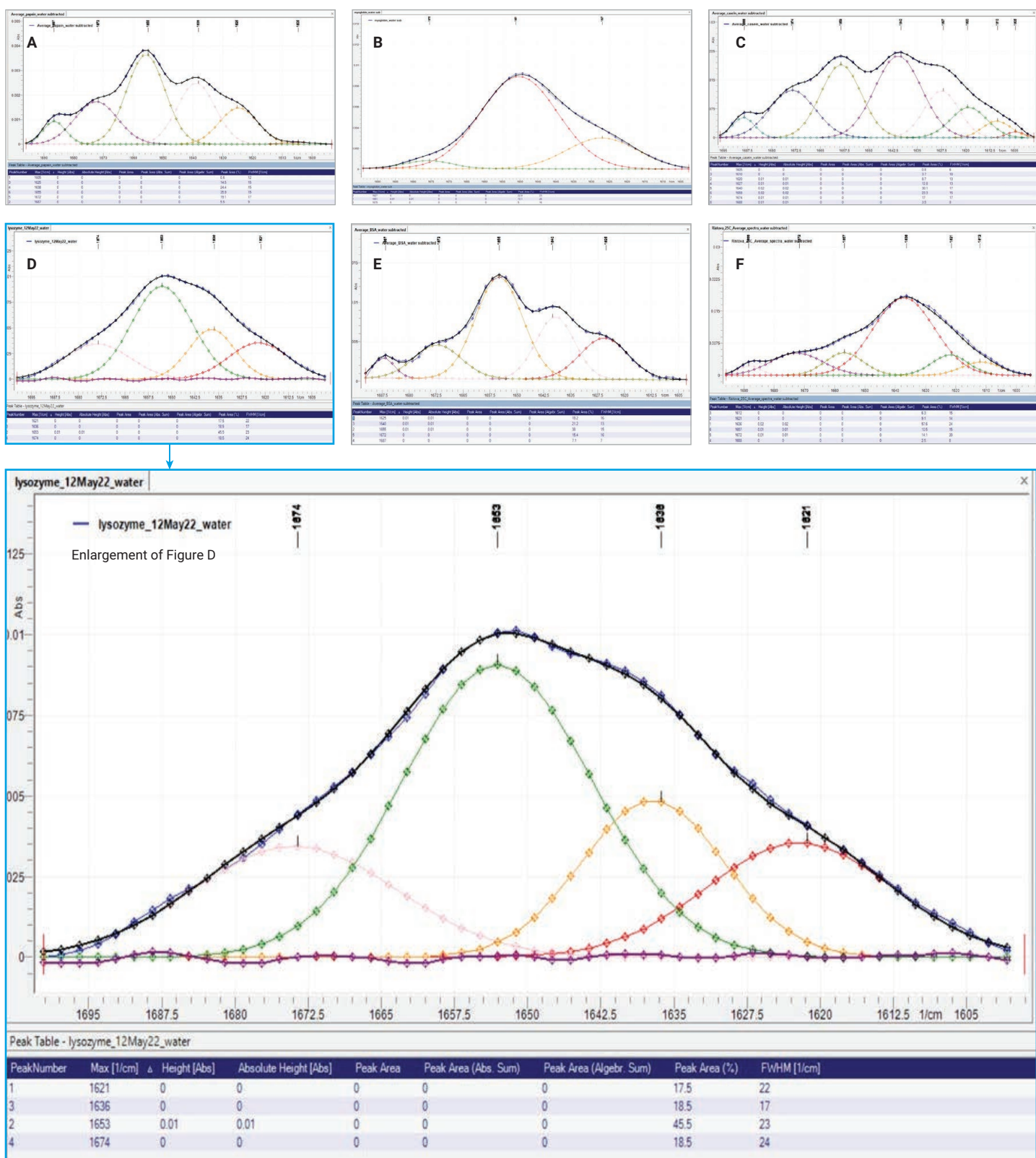


그림 3. 6가지 연구 대상 단백질에 대한 검량선 피팅: (A) 파파인(혼합형); (B) 미오글로빈(나선형); (C) β -카제인(랜덤형); (D) 리소자임(혼합형); (E) 소 혈청 알부민(대부분 나선형); (F) 면역글로불린 G(시트형). 확대한 리소자임 피팅 곡선은 파란색 상자에 강조 표시되어 있습니다.

표 3. FTIR 검량선 피팅을 통해 추정된 단백질 2차 구조의 상대적인 양과 X선 연구와의 비교.⁵⁻⁷

단백질	% 구조							
	α -나선		β -시트		β -턴		랜덤 코일	
	X선	FTIR	X선	FTIR	X선	FTIR	X선	FTIR
BSA	74 ⁽⁷⁾	38	3.1	18	1.4	23	20.6	21
파파인	25 ⁽⁶⁾	36	21	39	4	6	50	19
β -카제인	n.d.	23	n.d.	22	n.d.	21	n.d.	34
리소자임	45 ⁽⁵⁾	44	19	19	23	16	13	21*
IGG (리톡시맵)	3 ⁽⁵⁾	10	67	67	18	14	12	9
미오글로빈	85 ⁽⁵⁾	72	n.d.	23	8	5	7	n.d.

* 교차- β 구조에 할당됨

n.d. = 확실하지 않음

면역글로불린 G에서 물 성분을 차감한 스펙트럼(그림 1B)은 $1,636\text{cm}^{-1}$ 근처에서 매우 강한 최대 아미드 I 대역을 나타내어 X선 연구에서 확인된 높은 β -시트 함량을 반영합니다.⁵ 면역글로불린 G 스펙트럼에서 약 $1,636\text{cm}^{-1}$ 의 피크는 전체 아미드 I 대역 영역의 67%를 차지했습니다. 리소자임에서 물 성분을 차감한 적외선 스펙트럼은 $1,654\text{cm}^{-1}$ 근처에서 최대값을 갖는 비교적 좁은 아미드 I 대역을 나타냈는데, 이는 α -나선 2차 구조의 함량이 높은 단백질의 특징입니다.⁵ 검량선 피팅으로 추정한 바에 따르면, 리소자임은 $1,654\text{cm}^{-1}$ 대역 위치에서 44%의 뚜렷한 α -나선 성분과 19%의 β -시트 성분을 가졌습니다. 미오글로빈 단백질은 주로 α -나선형 2차 구조를 보였지만 β -시트 성분도 보였습니다. BSA, 파파인, 카제인과 같은 단백질도 단백질 2차 구조의 여러 성분에 할당됩니다. BSA의 2차 구조는 다양한 실험 조건에

민감하며, 이로 인해 구조적 분포가 달라질 수 있습니다. 온도, pH, 계면활성제의 유무와 같은 요인은 나선형 함량을 포함한 단백질의 2차 구조에 상당한 영향을 미칠 수 있습니다. 물 분자와의 상호 작용과 수소 결합에 대한 경쟁은 나선 구조를 불안정하게 만들 수 있으며, 이는 단백질 안정성을 유지하는 상호 작용의 섬세한 균형을 드러내 줍니다. 결정화는 용매를 제거하여 단백질의 본래적 형태를 보존하는 데 도움이 되며, 이는 대부분의 BSA 나선형 형태가 일반적으로 결정 상태에서 관찰되는 이유입니다.⁷⁻⁹

표 3은 α -나선, β -시트, 턴, 무작위 2차 구조의 비율로 정량화 결과를 요약한 것입니다.

결론

이 응용 자료에서는 FTIR을 사용하여 용액 내 단백질 2차 구조를 분석하는 방법을 보여주었습니다. 짧은 경로 길이와 낮은 시료 요구 사항의 특징 때문에 단일 반사 다이아몬드 ATR을 갖춘 Cary 630 FTIR을 사용했습니다. FTIR 분석에는 아미드 I을 구성 성분으로 분리하는 과정이 필요한데, 이를 위해 MicroLab Expert 소프트웨어를 사용했습니다. 주요 2차 구조적 특징의 상대적인 양을 추정하기 위해 대역 검량선 피팅 방법을 사용했으며, FTIR에서 얻은 결과는 문헌에 보고된 내용과 대체로 일치하는 것으로 나타났습니다.

Cary 630 FTIR은 비파괴적인 방식으로 단백질 구조를 연구할 수 있다는 점과 사용 편리성, 최소한의 시료 전처리 등의 특징을 함께 가지고 있어 이 기술을 총 2차 구조적 특성을 신속하게 평가하고 실험적으로 유도된 구조적 변화를 간단히 스크리닝하는 도구로서 사용할 수 있음을 시사합니다.

참고 자료

1. Barth, A. Infrared Spectroscopy of Proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Bioenergetics* **2007**, 1767(9), 1073–1101.
2. Greenfield, N. J. Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nat. Protoc.* **2006**, 1(6), 2876–2890. doi: 10.1038/nprot.2006.202. PMID: 17406547; PMCID: PMC2728378.
3. Shi, Y. A Glimpse of Structural Biology Through X-Ray Crystallography. *Cell* **2014**, 159(5), 995–1014.
4. Jackson, M.; Mantsch, H. H. The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 30, 95-120.
5. Levitt, M.; Greer, J. Automatic Identification of Secondary Structure in Globular Proteins. *J. Mol. Biol.* **1977**, 114, 181-239.
6. Kamphuis, I. G.; Kalk, K. H.; Swarte, M. B. A.; Drenth, J. Structure of Papain Refined at 1.65 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1984**, 179, 233-256.
7. Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W. Structural and Immunologic Characterization of Bovine, Horse, and Rabbit Serum Albumins. *Mol. Immunol.* **2012**, 52, 174–182.
8. Barreto, M. S. C.; Elzinga, E. J.; Alleoni, L. R. F. The Molecular Insights into Protein Adsorption on Hematite Surface Disclosed by In-Situ ATR-FTIR/2D-COS study. *Sci. Rep.* **2020**, 10, 13441.
9. Abrosimova, K. V.; Shulenina, O. V.; Paston, S. V. FTIR Study of Secondary Structure of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin. *Journal of Physics: Conference Series* **2016**, 769.

추가 정보

- Agilent Cary 630 FTIR 분광기
- Agilent MicroLab FTIR 소프트웨어
- Agilent MicroLab Expert
- FTIR 분석 및 응용 가이드
- FTIR 분광기 기초 – FAQ

www.agilent.com/chem/cary630

DE-001141

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 10월 1일, 한국에서 인쇄
5994-7808KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com