

굴의 껍각으로부터 추출된 단백질의 특성연구

이승우, 신나영, 최청송
서강대학교 화학공학과

Characteristics of protein extracted from oyster shell

Seung Woo Lee, Na Young Shin, Cheong Song Choi
Department of Chemical Engineering, Sogang University

We showed the result that an appreciable difference of secondary structures in the intracrystalline protein was observed between Normal and Deform shells. In order to understand the exact secondary structure of proteins, we investigated the changes in protein conformation from the specific layers via Fourier Self-Deconvolution(FSD) techniques, using ATR(Attenuated Total Reflection) information.

서론

단백질의 2차 구조 분석에는 Amide I 밴드가 광범위하게 사용되고 있다[1]. 각각의 2차 구조(α -helix, β -sheet, turn, unordered structure)[2]는 원칙적으로 IR 스펙트럼의 amide I 영역에서 각각 다른 C=O 신축 진동수를 나타낸다. Amide I 밴드의 해석은 단백질 2차 구조의 정성적 해석뿐만 아니라 정량적 해석도 가능하게 해준다. 그러나 단백질 구조해석에서 IR 사용의 문제점은 여러 가지 2차 구조에 의해 기인한 amide I 영역 고유의 넓은 밴드폭이다. 중첩되는 여러 가지 구조의 밴드폭은 종종 주변 밴드의 최대 흡광도로부터 분리된 것보다 크다. 그러므로 amide I 흡광도는 흔히 단일 피크

형태로 나타난다. 피크의 중첩은 측정장비의 해상도를 증가하기 때문에 이를 극복하는 방법의 하나로 Fourier self- deconvolution (FSD) 방법이 사용되고 있다. 이 FSD 방법은 Stone[3]에 의해 처음으로 제게되었고, Kauppinen[4]에 의해 논의 되었으며, 90년대에 들어 IR, UV, X선, Raman등 다양하게 이용되고 있다. 본 실험에서 사용된 단백질의 참굴(*Crassostrea gigas*)의 패각으로부터 추출되었다. 참굴은 우리나라 연안에 광범위하게 분포되어 있다는 점과 일생을 통해 활동범위가 거의 제한되어 있어 여러 가지 오염물질들을 농축시킨다는 점 때문에 오염물질 감시를 위한 지표생물로 이용되고 있다[5].

재료 및 방법

1) 패각 전처리

패각을 6% 수산화칼륨, 또는 수산화나트륨 용액에 4시간 함침 (impregnation)시킨 후 증류수로 세척하여 표면의 흙, 기타 유기물질 등을 제거하였다. 잔여 알카리 제거와 표면 표백을 위해 1M 염산에 3분 동안 함침한 후 증류수를 이용 여러번 세척하고, 음파처리 (Branson Sonifier)로 약 1분간 세척, 완전 건조하였다. 또한 미니연삭기를 이용하여 패각의 각층을 분리하였다.

2) 투석

투석하고자 하는 시료 30g과 50ml 증류수를 혼합한 투석액을 10 l, 2% 초산 또는 염산을 이용하여 투석(SIGMA 투석튜브, 12,000-14,000Da 분자량컷오프)하였다. 이때 추출용매인 초산 또는 염산은 물론 투석액도 잘 섞이게 하기 위해 투석튜브를 회전축에 장착하여 회전시키며 투석하였다. 패각이 완전히 녹은 후(48h), 원심분리기(Dupont Instrument, Newton, CT)를 이용하여 15,000g에서, 10분 동안 원심분리하여 가용성단백질과 불용성단백질로 분리하고 가용성 단백질을 초순수 물을 이용, 4°C에서 재 투석하였다. 물을

여러 차례 갈아주며 투석한 후(72h) 다시 원심분리한 후, 동결건조 (Labconco 동결건조기)하여 -4°C 에서 보관하였다.

3) IR 데이터 프로세싱

Mattson의 FT-IR 분광계를 사용하였으며 해상도는 1 cm^{-1} 이다. N_2 가스를 이용하여 측정장치내의 잔여수증기의 흡수밴드를 제거하였으며 KBr 펠릿을 이용, 확인하였다. 결정내부단백질에 의한 amide 1영역($1600\text{--}1700\text{cm}^{-1}$)의 흡수 피크는 이차미분, FSD과 가우시안커브피팅을 수행하였고 이때 사용된 소프트웨어는 ORIGIN 6.0(Microcal. corp)이었다. 이차 도함수 스펙트럼은 9 point Savitzky-Golay filter method에 의해 매끄럽게하였으며 구조인자의 수와 피크 위치를 결정하였다[6]. 2차구조의 정량은 각각의 가우시안 밴드의 면적을 이용하였다[7].

결과 및 고찰

정상과 변형 패각의 각 층별 결정내부단백질을 FSD를 이용하여 아래 그림과 같이 정량화 된 2차 구조 조성 분포를 나타내었다. 각 층은 서로 다른 분율의 2차 구조의 특성을 보이고 있으며, 특히 변형 패각이 정상 패각보다 알려진 2차 구조의 분율이 현저히 저하됨을 확인 할 수 있었다.

정상 패각과 변형 패각을 비교해 볼 때 변형 패각이 정상 패각보다 α -helix와 β -anti의 함량이 상대적으로 적었던 반면, Turns의 함량은 변형 패각의 중간층과 바깥층의 경우 정상 패각보다 더 높은 수치를 보여 주었다.

또한, 정상 패각에서는 수소결합으로 인해 안정한 판상의 β -structure가 각 층마다 54%이상 존재하였다. 이와 같은 구조는 정상 패각이 변형 패각보다 규칙성이 잘 발달되어 있는 상태이며 또한 안정한 상태인 것을 말해준다.

이러한 결과는 정상과 변형 패각이 특성을 달리하고 있음을 의미

한다.

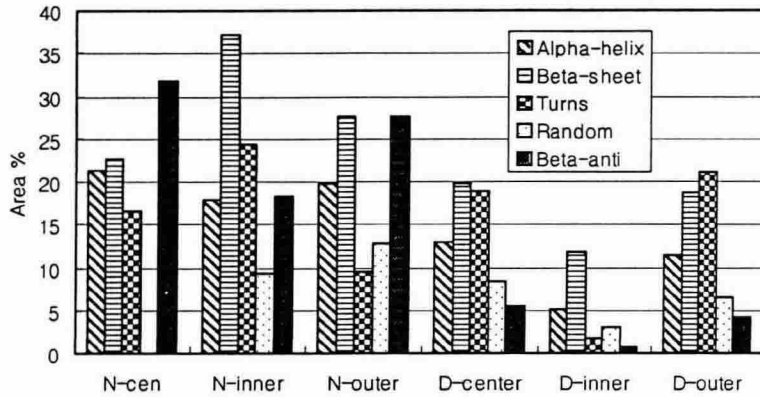


그림. 패각 각 층별 결정 내부 단백질 2차 구조 조성분포

참고문헌

1. Dong A, Caughey WS. *Methods Enzymol.* 1994, 232, 139-175
2. Richardson JS. *Adv. Protein Chem.* 1981, 34, 167-363
3. Stone H. *J. Opt. Soc. Am.* 1962, 52, 998-1003
4. Kauppinen JK, Moffatt DJ, Mantsch HH, Cameron DG. Fourier self-deconvolution: a method for resolving intrinsical overlapped bands. *Appl Spectrosc* 1981, 35, 271-276.
5. NAS : The International Mussel Watch. Washington D.C., National Academy of Sciences, pp. 248, (1980)
6. Choi, C. S. and Kim, Y. W. : *Biomaterial*, 21, 213~222 (2000)
7. Surewicz WK, Mantsch HH. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim Biophys Acta* 1988, 952, 115-130