

Protein Microarray의 응용 및 발전 전망

오영희 · 한민규 · † 김학성

KAIST 생명과학과

(접수 : 2007. 11. 1., 게재승인 : 2007. 12. 14.)

Applications and Developmental Prospect of Protein Microarray Technology

Young-Hee Oh, Min-Kyu Han, and Hak-Sung Kim†

Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST),

Daejeon 305-701, Korea

(Received : 2007. 11. 1., Accepted : 2007. 12. 14.)

Analysis of protein interactions/functions in a microarray format has been of great potential in drug discovery, diagnostics, and cell biology, because it is amenable to large-scale and high-throughput biological assays in a rapid and economical way. In recent years, the protein microarray have broaden their utility towards the global analysis of protein interactions on a proteome scale, the functional activity analysis based on protein interactions and post-translational modifications (PTMs), and the discovery of biomarkers through profiling of protein expression between sample and reference pool. As a promising tool for proteomics, the protein microarray technology has advanced outstandingly over the past decade in terms of surface chemistry, acquisition of relevant proteins on a proteomic level, and detection methods. In this article, we briefly describe various techniques for development of protein microarray, and introduce developmental state of protein microarray and its applications.

Key Words : Protein microarray, biochip, high-throughput system

서 론

Protein Microarray란?

생물체를 구성하는 세포의 기능과 구성요소 간 상호작용의 이해를 바탕으로, 이를 모방하여 진단, 신약 스크리닝, 고밀도 정보처리, 환경오염 검출 등에 이용하고자 하는 바이오칩 (biochip) 기술은 단일 분자수준에서 생체분자의 기능을 구현할 수 있는 잠재력이 매우 큰 기술로 주목받고 있다. 생체 내에 존재하는 수 천 종의 서로 다른 단백질은 1 : 1 interaction 에 의한 것이 아니라 systemically network를 이루고 있기 때문에, 수십~수천 개 또는 수만 개의 단백질을 작은 기판 위에 고정된 후 단백질의 결합을 동시다발적으로 분석하고 이들 정보들을 보다 광범위하게 활용할 수 있는 초고속 분석 시스템의 개발이 요구된다(1). 세포 내의 기능 요소인 단백

질은 DNA로부터 전사 후 변형과정 (Post-translational modifications, PTMs)을 거쳐 세포 내에서의 다른 단백질과의 상호작용 뿐 아니라 단백질의 상태, 위치 등의 생물학적 기능을 수행하기 때문에 DNA microarray 기반의 분석은 한계를 지니고 있다. 전사 후 변형과정의 기작을 조절하고, 그의 표적 (target) 단백질이나 저해제 (inhibitor)를 선별 (screening)하려는 노력은 치료제로서의 잠재력으로 인해 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 단백질 마이크로 어레이 (protein microarray) 기반의 연구는 Genome sequencing의 완성과 그에 따른 genomic, proteomic information의 급격한 증가와 함께 단백질 상호작용과 관련된 결과를 빠르게 분석하고 이들 정보들을 보다 광범위하게 활용할 수 있도록 해주는 high-throughput 분석이 가능할 것이다(2, 3).

Protein microarray는 고체 표면 위에 다양한 생체분자 (capture molecule)를 spotting이나 patterning 기술을 이용하여 고정화시키고, 분석하고자 하는 생체분자 (target molecule)가 포함된 시료 용액을 첨가한 다음, capture molecule과 결합했을 때 나타나는 신호 변화의 양상을 high-throughput으로 분석할 수 있는 방법이다. 일반적으로 protein microarray는 크게 단백질 고정화를 위한 표면 기술, 분석하고자 하는 생체

† Corresponding Author : Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Daejeon 305-701, Korea

Tel : +82-42-869-2616, Fax : +82-42-869-2610

E-mail : hskim76@kaist.ac.kr

분자의 종류나 고정화 방법, 원하는 연구를 위한 분석 기술의 3가지 핵심 기술에 의해 고감도 분석과 상용화를 이끌어 낼 수 있다(Fig. 1).

상용화를 위한 protein microarray를 제작하기 위해서는 여러 가지 중요한 요소가 충족되어야 하는데, 우선 capture molecule을 고정화할 표면을 선택하는 것이 중요하다. 단백질의 구조가 예상치 못하게 바뀌면 결합능을 비롯한 각종 활성에 좋지 않은 영향을 미치므로 표면을 어떤 반응기 및 구조를 갖도록 수식화하고, capture molecule을 어떤 화학 반응을 이용하여 고정화하는지에 따라 제작된 protein chip의 성능이 크게 달라질 수 있다(5). 또한 보통 생체 내에 존재하는 단백질이 수 만 종류에 이르므로 표면에 고정화할 capture molecule이 특정 target molecule과 선택적으로 결합할 수 있도록 높은 특이성을 가지고 있어야 한다(6).

본 논문에서는 protein microarray 개발에 필요한 여러 가지 기술들을 간략하게 기술하고, 현재까지의 protein microarray의 개발 현황과 이의 활용에 대해 소개하고자 한다.

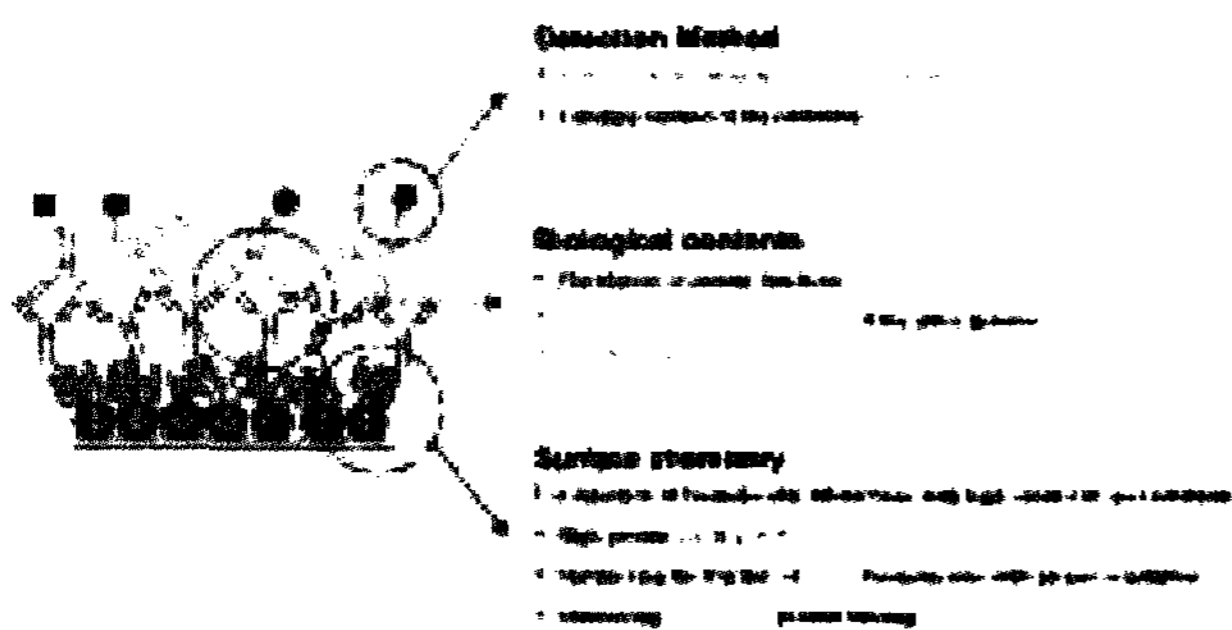


Figure 1. The protein microarray concept.

Protein chip의 개발에 필요한 요소 기술

고체 표면의 capture molecule을 고정화하기 위한 표면 기술

일반적으로 단백질의 생체 내 농도가 수 mg/ml에서 pg/ml까지 변하므로, 아주 낮은 농도의 단백질도 검출해 낼 수 있는 높은 민감도를 갖는 검출 방법의 개발 및 선택도 매우 중요한 요소가 된다(6).

신뢰할 만하고, 재현성 높은 protein microarray 시스템을 구현하기 위해서, 고체 표면의 capture molecule을 활성 가능한 상태로 고정, 유지시키는 것이 중요하다. 생물학적 활성은 단백질의 구조와 배향에 의해 좌우되기 때문에, 이를 고려하여 표면에 고정하는 다양한 방법을 연구, 개발하고 있다. Capture molecule을 고정화하기 위한 chip 표면은 크게 3가지 고정 방법의 범주로 나눌 수 있다. 물리적 (physical) 고정, 화학적 공유결합 (covalent)에 의한 고정, 그리고 특정 biomolecule에 의한 특이적 친화도를 이용한 고정 방법이다(Fig. 2).

Amine group, epoxy group, aldehyde group 등의 반응기를 linker와 함께 단분자막으로 제조하여 단백질 내 아미노산

이 가지고 있는 amine group 등과 공유결합을 하도록 하거나, poly-L-lysine을 단분자막으로 만들어 단백질과 electrostatic interaction을 통하여 결합하도록 만든다. 이 방법은 대체로 높은 농도의 capture molecule을 표면에 고정화할 수 있는 장점을 가지고 있지만, 빠른 속도로 물이 증발하여 단백질의 3차원 구조에 영향을 줄 수 있다는 단점이 있다. 또는, acrylamide gel, agarose gel이나 nitrocellulose membrane을 표면에 붙임으로써 capture molecule이 3차원 구조를 안정적으로 유지하면서 target molecule과 결합할 수 있는 충분한 공간을 제공해 주는 고정화 방법도 최근 개발되고 있다. 그러나 이런 표면을 사용할 경우 분석 결과의 편차가 커질 수 있다는 단점이 있다(5, 11).

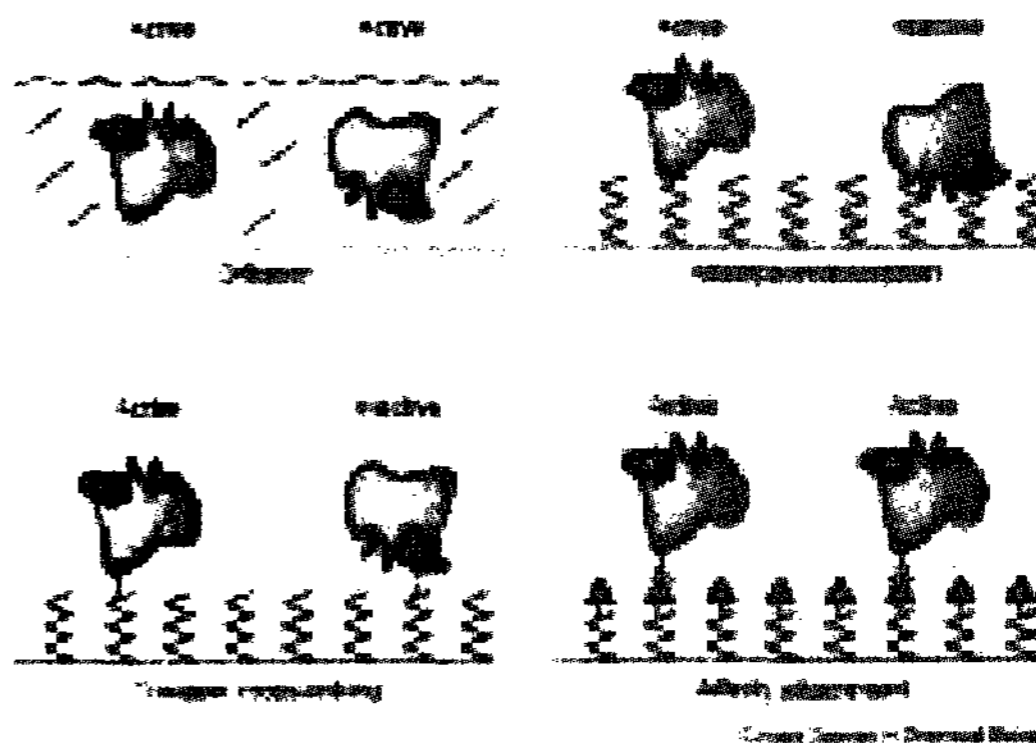


Figure 2. 표면 고정화를 위한 다양한 방법(42).

위에 기술한 방법들은 모두 capture molecule이 특별한 방향성을 가지지 않고 무작위로 chip 표면에 고정화된다. 단백질은 target molecule과 결합할 수 있는 부분이 정해져 있으므로, 무작위로 표면에 고정화될 경우 결합부위가 표면에 노출되지 않아 결합효율이 낮아진다. 이러한 문제점을 해결하고자, capture molecule의 배향성 (orientation)을 조절하면서 chip 표면에 고정화시키는 방법이 시도되었다. 즉, capture molecule에 특정 tag를 붙이고 이 tag와 affinity-binding할 수 있는 표면을 만드는 방법이 이용되었다(Fig. 2). 예를 들어 His-tag을 단백질의 결합부위 반대쪽에 fusion시키고 Ni-NTA를 chip 표면에 제조한 후에, capture molecule을 반응시키면, 단백질의 결합부위가 표면의 반대쪽이 바깥을 향하게 할 수 있다. 항체를 capture molecule로 사용할 경우 Fc 부분에 결합하는 Protein A, Protein G 등을 미리 표면에 붙여서 사용하는 방법이 보고되었다(7, 8). 이렇듯 특정 tag에 대한 affinity-binding할 수 있는 표면을 사용하여 protein chip을 제작할 경우, 대체로 배향성은 확보할 수 있지만 표면에 결합하는 capture molecule의 양이 적어지는 단점이 생길 때가 많다. 이를 해결하기 위하여 저자의 연구실에서는 표면에 dendrimer를 먼저 붙인 뒤, 그 위에서 방향성을 줄 수 있는 biotin-streptavidin 반응을 실험하는 방식을 시도한 바 있다. 그 결과 보통의 단분자막에 비해서 더 많은 양의 streptavidin이 표면에 결합하여 있음을 확인하여, 배향성과 결합하는 양을 동시에 개선할 수 있었다(9).

Chip 표면을 수식할 반응기의 선택과 capture molecule의 고정화 방법에 따라 target molecule과의 결합 효율과 분석

민감도 등이 크게 영향을 받으므로 capture molecule의 선택과 고정화 방법의 선택이 매우 중요하다.

Capture molecules

일반적으로, 표면에 고정화하는 capture molecule과 샘플에 존재하는 target의 조합에 따라 어떤 시스템의 ligand binding assay라도 소형화하여 array format으로 가능하다(Fig. 3). Microarray를 이용하여 특정 단백질을 분석하고자 할 때 고려해야 할 점은 target molecule과 특이적으로 결합하는 capture molecule의 선정이다. 단백질 사이의 상호작용을 확인하거나 효소의 활성을 측정하고자 할 경우, 또는 단백질 자체의 기능 변화를 protein microarray를 통하여 관찰하는 것이 목적일 경우, 해당 단백질을 높은 순도로 분리 정제하여야 한다. 그러나 최근에 분리 정제의 단계를 거치지 않고 *in vitro* translation 방법 등을 통하여 microarray surface 위에서 바로 단백질을 발현하여 고정화 후 원하는 분석이 가능한 초고속 발현 분석에 최적의 protein microarray system이 연구되고 있다(10).

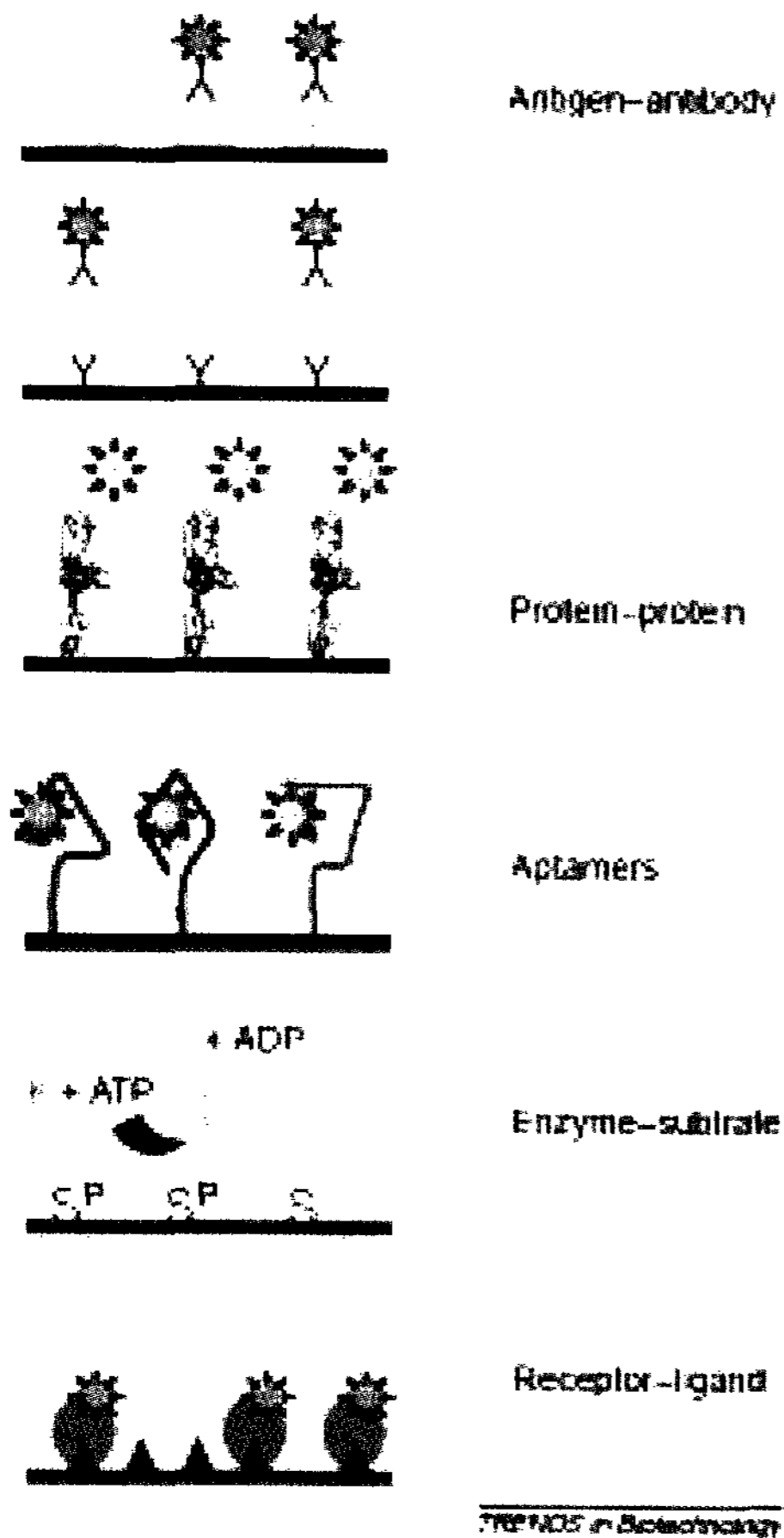


Figure 3. protein microarray의 다양한 capture molecules(44).

단백질의 expression profiling을 분석하고자 할 경우 생체 시료 내에 존재하는 단백질의 종류가 수만 가지에 이르며 각각의 단백질 농도 편차가 매우 크므로, target molecule과 특이적으로 결합하는 capture molecule을 확보하는 것이 중요하다. 이런 관점에서 capture molecule로 가장 적합하게

사용될 수 있는 것이 항체이다. 비교적 높은 특이성으로 항원과 결합하는 특성 때문에 많이 쓰이지만, 생산 방법이 복잡하고 비용이 높은 것이 제약요인이다. 때문에 최근에는 scFv나 aptamer 등의 항체를 대신할 수 있는 capture molecule이 많은 관심을 끌고 있으며 이들의 사용이 서서히 증가하고 있는 추세이다(11, 12).

Capature molecule의 microarray 방법

Protein microarray는 보통 수 nl 이하를 결합시키기 때문에 아주 적은 양으로도 target molecule을 분석할 수 있고, 제작된 protein microarray에 포함된 각각의 spot 크기가 100~200 μ m 수준이므로 분석에 필요한 시료의 양 또한 크게 줄일 수 있으며, 최대 수 만개의 spot을 glass slide에 제작할 수 있기 때문에 대량분석이 가능하다. chip 표면 위에 capture molecule을 100~200 μ m 크기의 spot으로 array시킬 때에는 일반적으로 microarrayer 또는 microspotter라는 장치를 이용한다. Capture molecule을 array시키는 방식에 따라 contact printing과 non-contact printing으로 구분하는데, contact printing은 매우 가는 공간이 속에 있는 pin을 이용해서 capture molecule을 chip 표면에 array시킨다. Capture molecule이 포함된 용액의 방울이 pin 바깥으로 약간씩 나오는데, 이것을 표면에 직접 접촉시켜서 array시키는 방식으로, 짧은 시간에 여러 종류의 capture molecule을 array시킬 수 있는 장점이 있으나 용액의 부피를 정확하게 조절할 수 없으므로 균일성이 낮아질 수 있다. 반면 non-contact printing은 표면의 바로 위에 위치한 가는 관에 capture molecule이 포함된 용액을 넣은 후 일정한 압력을 가함으로써 직접적인 접촉 없이 표면 위에 capture molecule을 array시키는 방법이다. 이 방법은 contact printing과 달리 어느 정도의 capture molecule을 한 spot에 올릴 것인지를 정확하게 결정하는 것이 가능하지만, 관 전체를 씻는 과정이 들어가야 하기 때문에 많은 종류를 옮길 경우 시간이 오래 걸린다는 단점도 가지고 있다. Printing 방법 외에도 단백질 발현 시스템 전체를 바로 표면 위에 올리거나 짧은 peptide의 경우 photolithography 방법으로 직접 합성하는 등의 non-printing 방법도 있다(13, 14).

검출 방법

시료 내에 존재하는 단백질의 농도가 ng/ml 이하인 경우, 이를 정확히 측정하기 위해서는 capture molecule에 결합하여있는 target molecule의 신호를 증폭하여 검출해내는 것이 필요하다. Protein chip에서는 신호 물질로 보통 Cy dye, Alexa 같은 유기 염료를 많이 사용하는데, target molecule에 염료를 conjugation시키는 여부에 따라 direct labeling과 indirect labeling으로 구분한다(5). 염료를 직접 target molecule에 conjugation시키는 direct labeling은 target molecule이 포함된 시료를 capture molecule과 반응시키는 한 단계만이 요구되어 시간을 절약할 수 있으나, target molecule에 따라 labeling을 새로 해야 하는 불편함이 있고, conjugation된 염료로 인해 capture molecule과 결합하는 것을 방해받을 수도 있다. 이런 단점을 극복하기 위해 target molecule과 특이적으로 결합하는 다른 molecule에 염료를

붙여 신호를 검출해내는 방법을 사용할 수도 있는데 이것이 indirect labeling이다. 이 경우, 특정 tag을 달고 있는 target molecule을 사용한 뒤 이 tag에 대한 항체를 쓰기도 하고, target이 항체일 때에는 secondary antibody나 Protein A 등을 이용한다. 이러한 염료를 붙인 secondary molecule은 상업화된 것이 많기 때문에 따로 직접 labeling을 할 필요가 없고 target molecule의 구조에 심각한 영향을 주지 않아도 되는 장점이 있지만, incubation이 두 번 이상 요구되어 분석시간이 더 오래 걸리고 다른 tag을 가지고 있는 여러 target molecule들을 동시에 분석하기에는 적당하지 않다는 단점도 가지고 있다.

유기 염료를 직접 이용하는 방법 외에, 민감도를 더 높이기 위하여 효소의 활성을 이용하는 방법이 있다. Rolling circle amplification (RCA)(15)와 tyramide signal amplification (TSA)(16)가 대표적인데, RCA는 항체에 붙인 primer와 polymerase를 이용해서 일정한 DNA sequence를 무한 복제한 후 그 sequence에 상보적인 DNA strand에 염료를 붙여 신호를 증폭하는 방식이다. TSA는 단백질 내에 있는 tyrosine에 염료-tyramide를 붙이는 방법으로 신호를 증폭한다. 지금까지 서술한 방법들은 모두 염료 등을 labeling하는 방식을 취하는데, 이 단계를 피하기 위해 labeling 없이 신호를 검출하는 방법으로 surface plasmon resonance (SPR)가 대표적으로 사용되고 있다(17).

Protein chip의 활용 분야

단백질의 상호작용 분석

생체 내에서의 생명 현상은 대부분 단백질과 다른 생체 분자 사이의 상호작용으로부터 비롯되므로, 수많은 단백질들이 상호작용하는 생체분자들에 대한 정보는 생명현상의 규명이나 질병의 진단 및 치료에 결정적인 단서를 제공한다. Bedford 그룹은 단백질 사이의 상호작용을 매개하는 domain 8가지를 nitrocellulose membrane 위에 고정화시켜 protein-domain chip을 제작하였다(Fig. 4)(18). 제작된 chip을 이용하여 target protein이 cell lysate에 존재하는 경우에도 domain과 특이적으로 결합한다는 것을 보여주었으며, 최종적으로 signaling molecule인 sam68과 core small nuclear ribonucleoprotein인 SmB'의 domain-binding profile을 분석하였다. 비슷한 연구로 Oschkinat 그룹은 cellulose membrane에 printing하는 방법으로 WW domain의 microarray를 제작하고(19), 이 array 위에 peroxidase-labeled peptide를 고정화 시킴으로써 WW domain과 결합할 수 있는 peptide sequence를 확인하였고, 그 결과를 토대로 WW domain들을 분류하는 연구를 수행하였다. Brock 그룹과 MacBeath 그룹은 domain의 일부를 protein microarray로 제작하여, 단백질 domain과 peptide의 상호작용 여부를 분석하였다(20, 21).

Transcription factor 단백질의 경우, 단백질 사이의 상호작용뿐만 아니라 단백질과 DNA 사이의 상호작용도 중요한 관찰 요소가 된다. 최근 Snyder 그룹에서는 300종에 가까운 DNA transcription factor를 microarray 표면에 고정화시키고 oligonucleotide와의 상호작용을 분석하였다(22). 이 연구

를 통해 새로 확인된 DNA-binding protein Yjl103의 binding site를 찾아내어 이 단백질의 잠재적인 target 유전자를 확인하였다. Seitz 그룹은 DNA와 binding하는 domain을 His-tagging된 형태로 nitrocellulose membrane 위에 고정화시킨 microarray system을 제작하여 Cy5가 conjugation된 oligonucleotide와 반응을 시켰다(23). 이때 본래의 domain에서는 신호가 나타나지만 돌연변이를 일으킨 domain에서는 신호가 발생하지 않음을 확인함으로써, domain chip을 이용하여 DNA binding profile을 분석할 수 있다는 것을 보고하였다. DNA이나 단백질의 상호작용 외에도 Snyder 그룹은 단백질과 lipid의 상호작용을 protein microarray를 이용하여 분석한 결과도 보여주고 있다(24).

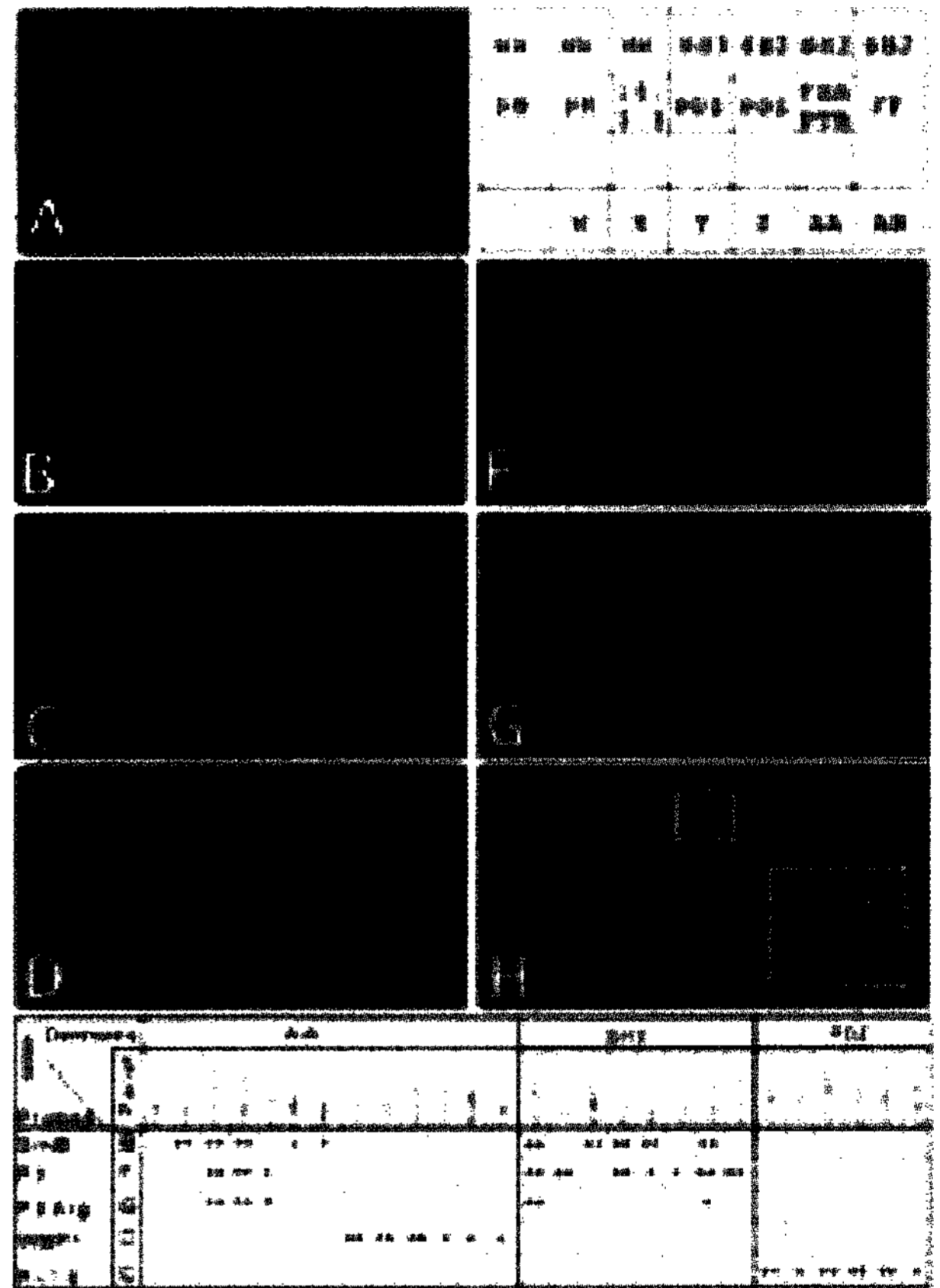


Figure 4. Domain chip과 peptide들의 결합 측정(18).

단백질의 생화학적 분석

한 번의 실험을 통해 multiplexed assay를 가능하게 하는 protein microarray의 장점은 단백질의 생화학적 특성 분석에도 적용할 수 있다. Snyder 그룹은, 17개의 kinase 기질을 PDMS로 만든 microwell에 고정시키는 방식으로 protein microarray를 제작하였고, 119 종류의 yeast kinase가 각 기질에 대해 갖는 활성을 ^{33}P -ATP와 phosphoimager를 이용한 검출 방법으로 분석하였다(25). 이 실험을 통해 새로운 kinase-substrate 관계를 분석하였을 뿐만 아니라 전체 kinase 중 tyrosine kinase의 비중이 예상보다 많다는 사실도 밝혀내었으므로, protein microarray가 효소 단백질의 생화학적인 활성을 high-throughput으로 분석하는데 유용하게 쓰일 수 있

다는 것을 보여주었다. Kinase의 활성을 실험한 비슷한 예로, Mrksich 그룹은 10여 종류의 peptide를 array 표면에 고정화시킨 후, phosphoimaging, SPR 그리고 형광 염료를 통한 검출에서 phosphopeptide만이 특이적으로 신호를 발생한다는 것을 확인하여 kinase assay를 peptide microarray를 이용하여 수행할 수 있다는 가능성을 보고 하였다(26). 또한, 이 그룹은 kinase에 대한 kinase inhibitor의 inhibition constant를 peptide microarray를 이용하여 분석할 수 있다는 결과도 보여주었다.

Lahiri 그룹에서는 G-protein-coupled receptor (GPCR)를 chip 표면에 고정화시켜 protein microarray를 제작한 후 GPCR이 agonist 또는 antagonist에 의하여 활성화되는 과정을 확인하는 연구를 하였다(27). 이 실험에서는 pin을 이용하여 GPCR을 chip 표면에 고정화하였고, GPCR이 활성화되었을 경우 결합하는 GTP에 형광 물질을 붙여 검출에 이용하였다. Chip 표면에 존재하는 여러 종류의 GPCR이 각각 특이적으로 해당하는 agonist에 의해서만 활성화되며, 활성화되어 있는 GPCR은 특정 antagonist에 의해서 비활성화된 상태로 돌아갈 수 있다는 사실과 protein microarray에서 얻은 결과를 통해 binding constant와 inhibition constant까지 계산할 수 있음을 보여주었다. 이는 신약 물질의 표적 단백질로 많은 주목을 받고 있는 GPCR의 생화학적 특성을 protein microarray를 이용하여 빠른 속도로 할 수 있다는 것을 증명한 것이다.

세포 내에 존재하는 많은 단백질은 세포 내에서 post-translational modification (PTM)이라는 다양한 수정 과정을 통해 여러 가지 기능을 발휘하게 되는 경우가 많다. 따라서 특정 단백질이 어떤 PTM 과정을 거쳐 활성화되는지를 분석하는 것은 단백질의 생화학적인 기능을 확인하는데 매우 중요하다. 최근 저자의 연구실에서는 small ubiquitin-like modifier (SUMO)라는 작은 단백질이 표적 단백질에 결합하여 localization 등을 유도하는 PTM의 일종인 sumoylation을 chip 표면에서 분석할 수 있다는 연구를 보고하였다(Fig. 5)(28). Ran GTPase-activating protein 1 (RanGAP1)을 고정화한 chip 표면에서 직접 sumoylation을 진행시키고, 이를 형광 염료를 이용하여 분석하였다. 향후 proteome chip을 만들 경우 전체 proteome을 대상으로 sumoylation을 비롯한 PTM 과정을 분석할 수 있을 가능성을 제시하였다.

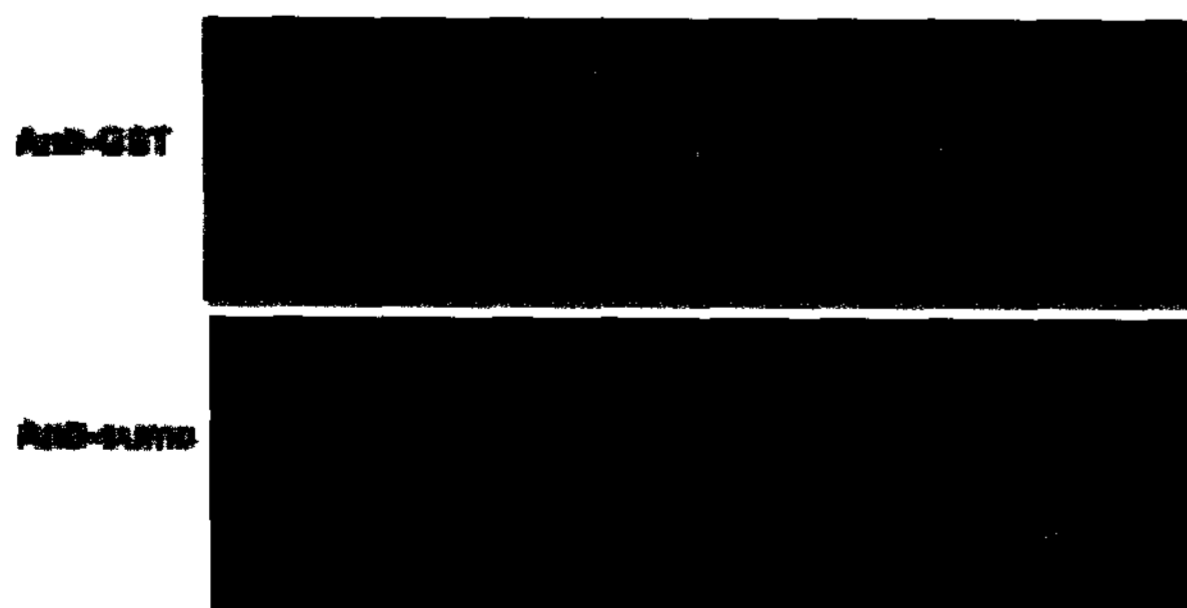


Figure 5. Protein microarray를 이용한 SUMOylation 활성 분석.

단백질의 expression profiling 분석

서로 다른 두 개의 시료 내에 존재하는 특정 단백질의

상대적인 발현 정도를 분석하는 연구는 다시 언급할 질병의 진단이나 biomarker의 탐색 등에 광범위하게 활용될 수 있다. 생체 내 존재하는 수많은 단백질의 종류를 고려할 때, 간단한 실험으로 수많은 단백질들의 expression profiling을 분석할 수 있는 기술이 필요한데, 이를 가능하게 하는 것이 항체를 이용한 antibody microarray이다. 분석하고자 하는 단백질들을 특이적으로 인지하는 항체들을 제조하여 chip 표면에 고정시키고 두 시료를 각각 다른 형광 염료 labeling한 후 단백질들의 발현양상을 동시에 분석하는 것이다. Brown 그룹에서는 100여 종의 단백질이 포함된 항체 chip과 항원 chip 각각에서 염료를 labeling한 항원과 항체를 결합시켜 그 결과를 정량적으로 분석하였다(29). 이 연구에서는 target protein의 실제 농도와 측정된 값이 상당한 차이를 나타냈으며, 이를 해결하기 위해서는 internal control protein을 반드시 시료 내에 포함해야 한다고 제안되었다. Chaga 그룹이 최근 발표한 연구에서는, 같은 시료를 다른 염료로 labeling한 후 같은 microarray를 이용하여 분석했을 경우에도 실제로 기대되는 값에서 벗어나는 결과를 보여주었는데, 이런 현상을 극복하기 위해서 internally normalization ratio (INR)라는 분석 방법을 도입하였다(30). 저자의 연구실에서 최근 진행한 antibody chip을 이용한 E. coli strain들 사이의 상대적인 단백질 발현 양상 비교분석 연구에서도 실제 값과 microarray에서 얻은 값이 차이를 나타내는 것을 확인할 수 있는데, 이런 차이의 이유가 상당 부분 항체의 cross-reactivity 때문이라는 것을 확인한 바 있다(Fig. 6)(31). 그 외에도 microarray 전체에서 얻은 두 염료의 총 신호량이 같다는 가정을 하고 결과를 분석할 수도 있으므로(32), 다양한 방법 중에서 실험의 목적에 따라 적절한 방법을 선택해야 한다.

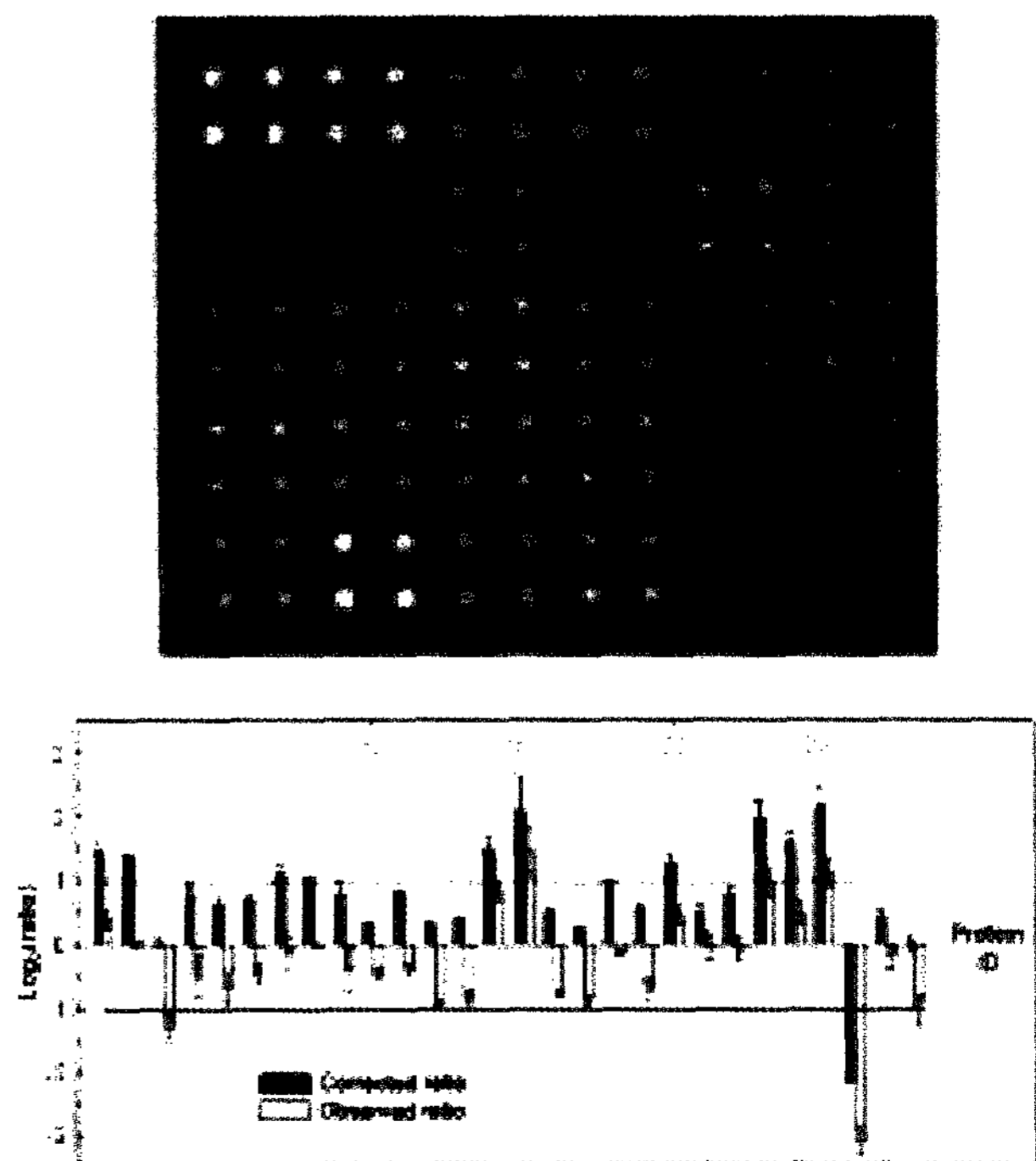


Figure 6. 단백질의 expression profiling 분석.

질병 진단과 biomarker 탐색

Disease Biomarker는 질병을 진단할 수 있는 표적 분자 뿐만 아니라 신약 개발을 위한 target molecule의 후보가 될 수도 있다. 특정 질병에 걸린 환자와 건강한 사람의 serum 내에서 확연하게 발현량의 차이를 나타내는 단백질들을 위에서 언급된 방법을 이용하여 확인할 수 있다. 선구적인 예로 Chinnaiyan 그룹에서는(Fig. 7)(33) 146개의 항체로 구성된 항체 microarray를 이용하여 방사선을 처리한 LoVo colon carcinoma cell과 그렇지 않은 같은 cell에서의 단백질들의 발현양상을 비교 분석하였다. Cy dye를 이용하여 분석한 결과 방사선을 처리한 시료에서 상대적으로 발현량이 많아진 10여개의 단백질들과 반대로 낮아진 1개의 단백질을 확인할 수 있었으며, 각각의 단백질들이 방사선 처리에 의한 세포의 변화에 어떤 영향을 미치는지 기존의 문헌 연구를 통해 확인하였다. 뿐만 아니라 protein microarray를 이용하여 얻어진 결과를 immunoblot 실험을 통해 재확인함으로써 protein microarray 이용의 유용성을 증명하였다. Haab 그룹에서 2003년 발표한 연구에서는 184 종류의 항체를 이용하여 만든 antibody microarray를 이용하여 전립선암 환자와 건강인의 단백질 발현량을 비교 분석하였다(34). Chinnaiyan 그룹의 연구가 세포를 대상으로 한 것인데 반해, Haab 그룹의 연구는 직접 환자에서 얻은 혈청을 분석하여 얻은 결과라는 것이 특기할 만한 점이다. 각각 33명의 암환자에서 얻은 혈청과 20명의 건강인의 혈청을 antibody microarray를 이용하여 비교한 결과, 발현량에서 통계적으로 의미있는 만큼의 차이를 보이는 5개의 단백질을 확인하였다. Kreuzberger 그룹의 연구는 질병 진단을 위한 biomarker 뿐만 아니라 미생물 감염을 확인하기 위한 biomarker의 확인에도 protein chip을 이용할 수 있음을 보여주었다(35). 유행성 전염병을 일으키는 미생물인 *Neisseria meningitidis*에서 분리 정제한 67개의 단백질을 이용하여 protein microarray를 제작하였고, 이를 이용하여 감염 환자의 혈청을 분석함으로써, OpaV라는 단백질을 질병 감염 미생물을 진단하는 데 중요한 biomarker로 활용할 수 있다고 보고하였다.

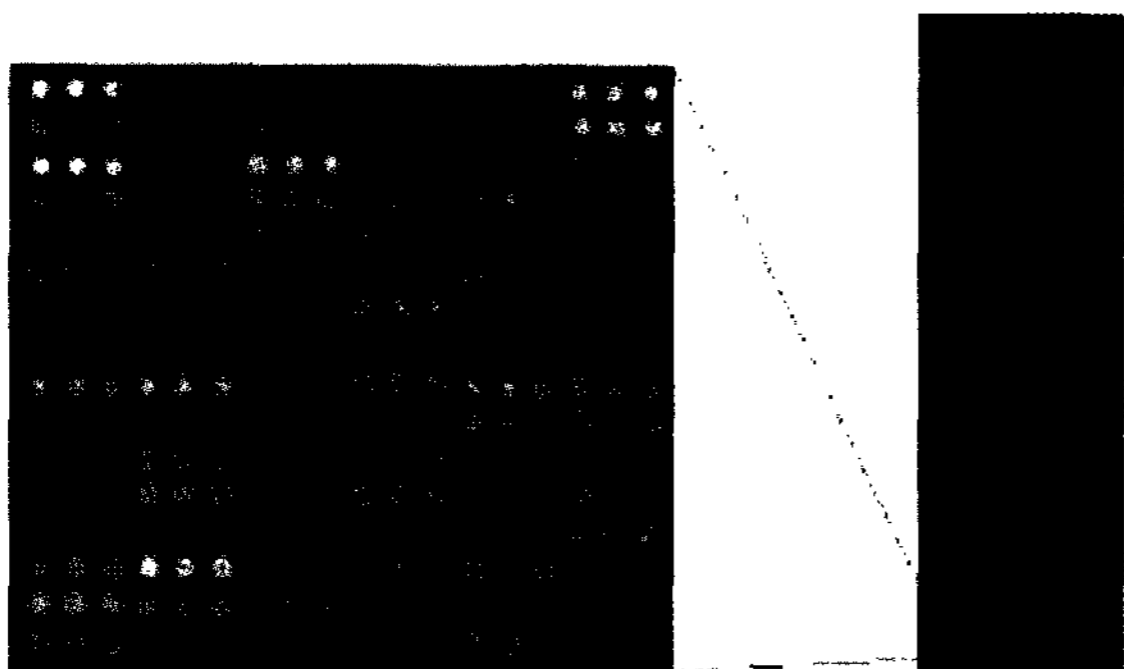


Figure 7. 정상과 환자 혈액 샘플에 대한 폐암 진단을 위한 antibody microarray(36).

Biomarker를 확인하고 실제 질병의 진단에 활용한 연구들도 많이 보고된 바 있다. 일례로, Hanash 그룹의 연구에

서는 Nitrocellulose membrane 위에 84종류의 항체를 고정화시켜 antibody chip을 제작하였고, 이를 이용하여 24명의 폐암 환자의 혈청과 56명의 정상적인 사람에게서 얻은 혈청을 비교 분석하여 7가지 종류의 단백질이 폐암을 진단하는데 활용될 수 있다는 가능성을 보여 주었다(36). 확인된 7가지 단백질 중 5가지 단백질을 선택하여 새로운 혈청을 대상으로 폐암의 여부를 확인한 결과, 24명의 폐암 환자 혈청 중 15개를, 56명의 비 폐암 혈청은 모두를 정확하게 분류하는데 성공하였다. Snyder 그룹에서 최근에 전 세계적으로 문제가 되고 있는 severe acute respiratory syndrome (SARS)의 진단을 위해 SARS coronavirus 등의 미생물로부터 얻어낸 단백질들로 protein microarray를 제작하여 혈청 내에 anti-SARS antibody가 존재하는지를 분석하였다. SARS의 정확한 진단을 위해 5개의 biomarker를 선정하여 400개에 가까운 혈청들을 비교 분석한 결과 90%에 이르는 특이성과 민감도를 갖는 진단 및 예측이 가능하였다(37). Valenta 그룹에서는 allergy를 유발하는 물질인 allergen을 chip표면에 고정화하고 이를 이용하여 환자의 혈청을 직접 분석하는 방법으로 다양한 종류에 대한 allergy를 한 번의 실험으로 진단할 수 있는 allergen chip을 개발하기도 했다(38). 이상의 연구들은, 질병이나 미생물의 감염에 의한 질환을 진단 예측할 수 있는 biomarker를 빠른 속도로 확인하고 이를 이용하여 protein microarray를 제작할 수 있으며 더 나아가 직접 질병을 진단하는데 protein microarray를 활용할 수 있으리라는 사실을 증명하고 있다.

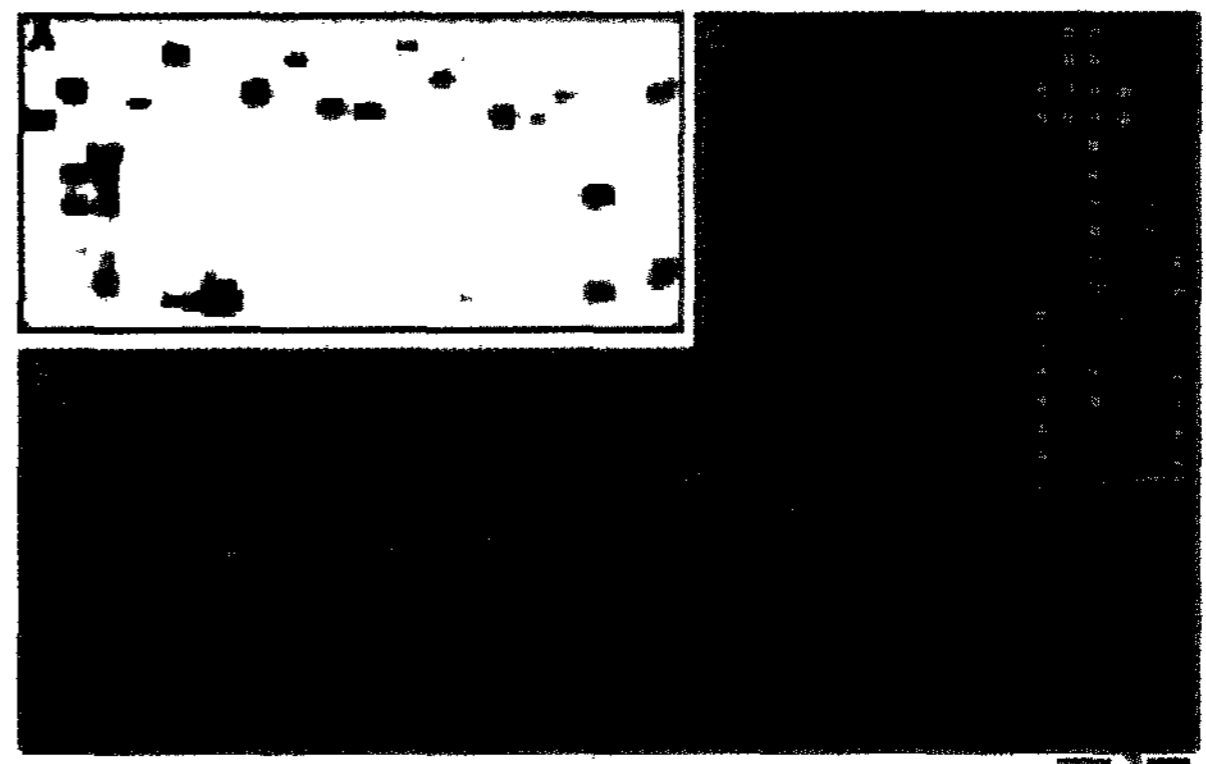


Figure 8. Yeast proteome chip.

Proteome 분석

생체 내 존재하는 전체 단백질을 chip 표면에 고정화하여 모든 단백질들을 동시에 분석할 수 있는 proteome chip은 수십~수백 종류의 단백질만을 가지고 있는 보통의 protein plate와 비교했을 때 훨씬 많은 정보를 얻을 수 있다는 장점이 있지만, 전체 단백질을 높은 순도로 분리 정제하기가 어렵기 때문에 현실화되지는 못하고 있다. Snyder 그룹에서는 GST가 tagging된 형태로 5800여 종의 yeast 단백질을 발현시키고 정제한 후 chip 표면에 고정화하여 protein chip을 제작하고(Fig. 8)(24), 이를 이용하여 calmodulin 또는 lipid와의 interaction을 분석한 결과를 보고하였다. Grayhack 그룹에서도 마찬가지로 yeast proteome chip을 이용하여 단백질의

glycosylation 여부를 전체 proteome 수준에서 연구하였다 (39). Schweitzer 그룹에서는 5000여종의 yeast proteome을 microarray로 제작하여 항체들의 cross-reactivity를 분석하는데 활용한 결과를 보고하였다 (40).

요 약

현재 많은 대학과 기업에서 다양한 방법으로 상용화가 가능한 protein microarray의 개발을 위해 많은 연구를 집중하고 있다. Protein microarray의 제작 및 분석 조건을 최적화하기 위한 연구도 진행되고 있지만 protein microarray로부터 얻은 분석 결과를 모든 연구자들이 공유하고 통합하기 위한 노력이 절실한 실정이다. 뿐만 아니라, PCR 같은 무한 확장 방법이 존재하지 않는 단백질의 특성을 고려할 때, 좀 더 실용적인 protein microarray를 많이 만들기 위해서는 수많은 단백질들과 결합할 수 있는 특이성이 높고 결합력이 강한 capture molecule들을 개발하는 것이 필수적이다. 그러나 이러한 장애에도 불구하고 protein microarray는 아주 적은 시료량으로 high-throughput assay가 가능하다는 장점 때문에 현재의 생명과학의 발전 추세로 볼 때 앞으로 protein microarray가 조만간 실용화될 것이며 이의 시장성은 매우 클 것으로 기대된다. 보다 빠른 실용화를 위해서는 protein microarray의 개발에 필요한 기반 기술의 개발과 동시에 이를 활용하기 위한 contents의 개발도 절실히 요구된다.

REFERENCES

- Cutler, P. (2003), Protein arrays: the current state-of-the-art, *Proteomics* **3**, 3-18.
- Madoz-Gurpide, J., Wang H., Misek D. E., Brichory F., and S. M. Hanash (2001), Protein based microarrays: a tool for probing the proteome of cancer cells and tissues, *Proteomics* **1**, 1279-1287.
- Andersson, O., M. Kozlowski, T. Garachtchenko, C. Nikoloff, N. Lew, D. J. Litman, and G. Chaga (2005), Determination of relative protein abundance by internally normalized ratio algorithm with antibody arrays, *J. Proteome Res.* **4**, 758-767.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown (1995), Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science* **270**, 467-470.
- Angenendt, P. (2005), Progress in protein and antibody microarray technology, *Drug Discov. Today* **10**, 503-511.
- Mitchell, P. (2002), A perspective on protein microarrays, *Nat. Biotechnol.* **3**, 225-229.
- Tomizaki, K. Y., K. Usui, and H. Mihara (2005), Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements, *Chembiochem.* **6**, 782-799.
- LaBaer, J. and N. Ramachandran (2005), Protein microarrays as tools for functional proteomics, *Curr Opin Chem Biol.* **9**, 14-19.
- Hong, M. Y., D. Lee, and H. S. Kim (2005), Kinetic and equilibrium binding analysis of protein-ligand interactions at poly(amidoamine) dendrimer monolayers, *Anal. Chem.* **77**, 7326-7334.
- Ramachandran, N., E. Hainsworth, B. Bhullar, S. Eisenstein, B. Rosen, A. Y. Lau, J. C. Walter, and J. LaBaer (2004), Self-assembling protein microarrays, *Science* **305**, 86-90.
- Wingren, C., C. Steinhauer, J. Ingvarsson, E. Persson, K. Larsson, and C. A. Borrebaeck (2005), Microarrays based on affinity-tagged single-chain Fv antibodies: sensitive detection of analyte in complex proteomes, *Proteomics* **5**, 1281-1291.
- Bock, C., M. Coleman, B. Collins, J. Davis, G. Foulds, L. Gold, C. Greef, J. Heil, J. S. Heilig, B. Hicke, M. N. Hurst, G. M. Husar, D. Miller, R. Ostroff, H. Petach, D. Schneider, B. Vant-Hull, S. Waugh, A. Weiss, S. K. Wilcox, and D. Zichi (2004), Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis, *Proteomics* **4**, 609-618.
- Holz, C., O. Hesse, N. Bolotina, U. Stahl, and C. Lang (2002), A micro-scale process for high-throughput expression of cDNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Protein Expr. Purif.* **25**, 372-378.
- Kung, L. A. and M. Snyder (2006), Proteome chips for whole-organism assays, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 617-622.
- Zhou, H., K. Bouwman, M. Schotanus, C. Verweij, J. A. Marrero, D. Dillon, J. Costa, P. Lizardi, and B. B. Haab (2004), Two-color, rolling-circle amplification on antibody microarrays for sensitive, multiplexed serum-protein measurements, *Genome Biol.* **5**, R28.
- Varnum, S. M., R. L. Woodbury, and R. C. Zangar (2004), A protein microarray ELISA for screening biological fluids, *Methods Mol. Biol.* **264**, 161-172.
- Kyo, M., K. Usui-Aoki, and H. Koga (2005), Label-free detection of proteins in crude cell lysate with antibody arrays by a surface plasmon resonance imaging technique, *Anal. Chem.* **77**, 7115-7121.
- Espejo, A., J. Cote, A. Bednarek, S. Richard, and M. T. Bedford (2002), A protein-domain microarray identifies novel protein-protein interactions, *Biochem. J.* **367**, 697-702.
- Otte, L., U. Wiedemann, B. Schlegel, J. R. Pires, M. Beyermann, P. Schmieder, G. Krause, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, and H. Oschkinat (2003), WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains, *Protein Sci.* **12**, 491-500.
- Stoevesandt, O., M. Elbs, K. Kohler, A. C. Lellouch, R. Fischer, T. Andre, and R. Brock (2005), Peptide microarrays for the detection of molecular interactions in cellular signal transduction, *Proteomics* **5**, 2010-2017.
- Jones, R. B., A. Gordus, J. A. Krall, and G. MacBeath (2006), A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays, *Nature* **439**, 168-174.
- Ho, S. W., G. Jona, C. T. Chen, M. Johnston, and M. Snyder (2006), Linking DNA-binding proteins to their recognition sequences by using protein microarrays, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 9940-9945.
- Kersten, B., A. Possling, F. Blaesing, E. Mirgorodskaya, J. Gobom, and H. Seitz (2004), Protein microarray technology and ultraviolet crosslinking combined with mass spectrometry for the analysis of protein-DNA interactions, *Anal. Biochem.* **331**, 303-13.
- Zhu, H., M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, and M. Snyder (2001), Global analysis of protein activities using proteome chips, *Science* **293**, 2101-2105.
- Zhu, H., J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed, and M. Snyder (2000), Analysis of yeast protein kinases using protein chips, *Nat. Genet.* **26**, 283-289.
- Houseman, B. T., J. H. Huh, S. J. Kron, and M. Mrksich (2002), Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity, *Nat. Biotechnol.* **20**, 270-274.
- Hong, Y., B. L. Webb, H. Su, E. J. Mozdy, Y. Fang, Q. Wu, L. Liu, J. Beck, A. M. Ferrie, S. Raghavan, J. Mauro, A. Carre, D. Mueller, F. Lai, B. Rasnow, M. Johnson, H. Min, J. Salon, and J. Lahiri (2005), Functional GPCR microarrays, *J. Am. Chem. Soc.*

- 127, 15350-15351.
28. Oh, Y. H., M. Y. Hong, Z. Jin, T. Lee, M. K. Han, S. Park, and H. S. Kim (2007), Chip-based analysis of SUMO (small ubiquitin-like modifier) conjugation to a target protein, *Biosens Bioelectron.* **22**, 1260-1267.
 29. Haab, B. B., M. J. Dunham, and P. O. Brown (2001), Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions, *Genome Biol.* **2**, RESEARCH0004.
 30. Andersson, O., M. Kozlowski, T. Garachtchenko, C. Nikoloff, N. Lew, D. J. Litman, and G. Chaga (2005), Determination of relative protein abundance by internally normalized ratio algorithm with antibody arrays, *J. Proteome Res.* **4**, 758-67.
 31. Han, M. K., M. Y. Hong, D. Lee, D. E. Lee, G. Y. Noh, J. H. Lee, S. H. Kim, and H. S. Kim (2006), Expression Profiling of Proteins in *L*-Threonine Biosynthetic Pathway of *Escherichia coli* by using Antibody Microarray, *Proteomics* **6**, 5929-5940.
 32. Sukhanov, S. and P. Delafontaine (2005), Protein chip-based microarray profiling of oxidized low density lipoprotein-treated cells, *Proteomics* **5**, 1274-1280.
 33. Sreekumar, A., M. K. Nyati, S. Varambally, T. R. Barrette, D. Ghosh, T. S. Lawrence, and A. M. Chinnaiyan (2001), Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins, *Cancer Res.* **61**, 7585-7593.
 34. Miller, J. C., H. Zhou, J. Kwekel, R. Cavallo, J. Burke, E. B. Butler, B. S. Teh, and B. B. Haab (2003), Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers, *Proteomics* **3**, 56-63.
 35. Steller, S., P. Angenendt, D. J. Cahill, S. Heuberger, H. Lehrach, and J. Kreutzberger (2005), Bacterial protein microarrays for identification of new potential diagnostic markers for *Neisseria meningitidis* infections, *Proteomics* **5**, 2048-2055.
 36. Gao, W. M., R. Kuick, R. P. Orzechowski, D. E. Misek, J. Qiu, A. K. Greenberg, W. N. Rom, D. E. Brenner, G. S. Omenn, B. B. Haab, and S. M. Hanash (2005), Distinctive serum protein profiles involving abundant proteins in lung cancer patients based upon antibody microarray analysis, *BMC Cancer* **5**, 110.
 37. Zhu, H., S. Hu, G. Jona, X. Zhu, N. Kreiswirth, B. M. Willey, T. Mazzulli, G. Liu, Q. Song, P. Chen, M. Cameron, A. Tyler, J. Wang, J. Wen, W. Chen, S. Compton, and M. Snyder (2006), Severe acute respiratory syndrome diagnostics using a coronavirus protein microarray, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 4011-4016.
 38. Hiller, R., S. Laffer, C. Harwanegg, M. Huber, W. M. Schmidt, A. Twardosz, B. Barletta, W. M. Becker, K. Blaser, H. Breiteneder, M. Chapman, R. Crameri, M. Duchene, F. Ferreira, H. Fiebig, K. Hoffmann-Sommergruber, T. P. King, T. Kleber-Janke, V. P. Kurup, S. B. Lehrer, J. Lidholm, U. Muller, C. Pini, G. Reese, O. Scheiner, A. Scheynius, H. D. Shen, S. Spitzauer, R. Suck, I. Swoboda, W. Thomas, R. Tinghino, M. Van Hage-Hamsten, T. Virtanen, D. Kraft, M. W. Muller, and R. Valenta (2002), Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment, *FASEB J.* **16**, 414-416.
 39. Gelperin, D. M., M. A. White, M. L. Wilkinson, Y. Kon, L. A. Kung, K. J. Wise, N. Lopez-Hoyo, L. Jiang, S. Piccirillo, H. Yu, M. Gerstein, M. E. Dumont, E. M. Phizicky, and M. Snyder, E. J. Grayhack (2005), Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection, *Genes Dev.* **19**, 2816-2826.
 40. Michaud, G. A., M. Salcius, F. Zhou, R. Bangham, J. Bonin, H. Guo, M. Snyder, P. F. Predki, and B. I. Schweitzer (2003), Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays, *Nat. Biotechnol.* **21**, 1509-1512.
 41. Abbott, A. (2002), Betting on tomorrow's chips, *Nature* **415**, 112-114.
 42. Zhu, H. and M. Snyder (2003), Protein chip technology, *Curr Opin Chem Biol.* **7**, 55-63.
 43. Telechem's protocols
 44. Templin, M. F., S. D. Monika Schrenk, C. P. Traub, C. F. Vöhringer, and O. J. Thomas (2002), Protein microarray technology, *TRENDS in Biotech.* **20**, 160-166.