

Analysis of Low Molecular Weight Proteome from *H. pylori* Cell Extract Using the High Performance Liquid Chromatography

Jung Won Park¹, Kyung Ja Lee², Kyung Mi Kim², Jung Soo Joo², Yung Chul Kwon²,
Hee Shang Youn³, Jae Young Song², Hyung Lyun Kang², Kon Ho Lee², Seung Chul Baik²,
Woo Kon Lee², Myung Je Cho² and Kwang Ho Rhee^{2*}

¹Research Institute for Subtropical Horticulture, Jeju National University, Jeju, Korea

²Department of Microbiology, ³Department of Pediatrics, School of Medicine,
Gyeongsang National University, Jinju, KOREA

Low molecular proteins (LMPs) which are smaller than 20 kDa are difficult to visible on a standard two-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (2-D SDS-PAGE) map. LMPs must be enriched appropriately to be analyzed. We isolated LMPs of *Helicobacter pylori* 26695 from 1-D polyacrylamide gel and digested by pepsin. Pepsin-digested LMPs were separated by HPLC and each fraction was analyzed by hybrid tandem mass spectrometer. Seventy nine peptides, representing 27 genes, including copper ion binding protein (CopP, 7 kDa), thioredoxin (TrxA, 11.9 kDa) and ribosomal protein L23 (Rpl23, 10.5 kDa) were identified. Some proteins larger than 40 kDa including Omp2, Omp21, Omp27, Omp30, Omp32, catalase and HP1083 were also identified. This work may give researchers a useful way to analyse the expressed LMPs which could not be identified on the conventional 2-D SDS-PAGE.

Key Words: *Helicobacter pylori*, Hybrid tandem mass spectrometer, Low molecular protein

서 론

*Helicobacter pylori*는 그람 음성의 만곡형 세균으로, 1983년 Marshall과 Warren에 의해 처음으로 분리 배양되었다 (1). 이 균은 미호기성 균으로 사람의 위점막에서 서식하며 B형 날문방 위염 (type B antral gastritis)의 원 인균이며 위십이지장 궤양의 발병원으로 알려졌다 (2~7). 이 세균의 감염이 위암의 일차적인 발병결정인자라는 역학적 사실이 증명됨으로써 (8), 1994년 세계보건 기구 (WHO)에서는 *H. pylori*를 명확한 발암원 (group I carcinogen)으로 정의하였다 (9). 전 세계 인구의 절반 이 상이 이 세균에 감염되어 있는 것으로 알려졌으며 (10),

한국인은 95% 이상이 이 균에 감염되어 일생 동안 보균 자가 된다 (11~13).

현재는 오믹스 (omics)의 시대이다. 현대 유전체학 (genomics)의 발달로 약 200종에 가까운 세균의 유전체 염기서열이 결정되었고 더 많은 유용한 미생물, 특히 병 원성 미생물의 유전체 염기서열 결정작업이 진행되고 있 어서 유전정보를 한 개체 단위로 일괄 이해할 수 있는 수단이 마련되었다. *H. pylori*의 경우, 26695, J99, B38, G27, P12, Shi470 그리고 HPAG1에 대한 유전체 전체의 염기 서열이 결정되어 보고되었다 (14~16). *H. pylori* 유전체 에서 1,450~1,590개의 유전자가 확인되었으며 그 중 약 30%는 다른 생물 종에서는 상동성이 확인되지 않는 생물 학적 기능을 모르는 유전자이다. 다른 세균의 유전체에서 도 확인되었지만 기능을 모르는 유전자가 약 10% 정도 이다. 또한 유전체 염기서열 자료만으로는 특정 유전자가 발현하는 산물의 질적 및 양적 양상을 추정할 수 없을 뿐만 아니라 유전자가 실제 단백질로 발현되는가의 여부 를 확인할 수 없기 때문에 유전체 염기서열의 분석으로

Received: November 26, 2009/ Revised: April 14, 2010

Accepted: May 12, 2010

*Corresponding author: Kwang Ho Rhee. Department of Microbiology, School of Medicine, Gyeongsang National University Chiram-dong 92, Jinju, Gyeongnam 660-752, Korea.
Phone: +82-55-751-8781, Fax: +82-55-759-1588
e-mail: khrhee1@gnu.ac.kr

만 특정 생명체의 생물학적 특성을 구체적으로 파악할 수는 없다. 하지만 최근 이러한 문제를 해결하기 위하여 유전체에서 발견되는 단백질을 일괄적으로 분석하는 프로테옴 (proteome)의 개념이 정립되고 그 응용방법이 확립되었다. *H. pylori*에 대해서도 프로테옴 분석을 통한 여러 연구가 보고되었다. 전체 *H. pylori*에서 발견되는 전체 프로테옴에 대한 연구 (17, 18), 프로테옴 연구 기법을 이용한 외막 단백질 분석 (19), 분비 단백질 (20), 그리고 사람의 혈청에 대해 immunoreactivity를 가지는 단백질 (21) 등에 대한 연구가 보고되고 있다. 현재까지 이차원 전기영동과 질량 분석기를 이용한 프로테옴 연구를 통하여 *H. pylori*의 유전자 중 단백질로 발견되는 250개 유전자를 동정하였으며, 이는 *H. pylori*가 가지고 있는 1,600여 개의 ORF의 20% 정도이다.

이차원 전기영동과 질량 분석기를 이용한 단백질의 동정 기술은 병원성 세균의 질병에 관계되는 생물지표 (biomarker)의 선별에 탁월하다 (22). 보다 많은 수의 발견 단백질을 분석하기 위해서는 발견량이 적은 유전자와 기술적으로 분석이 어려운 단백질을 분석하기 위한 방법의 모색이 필요하다. 본 연구에서는 이차원 전기영동으로 분석하기 어려운 저분자 단백질을 동정하기 위하여 단백질의 in-gel digestion, HPLC에 의한 절단된 펩타이드의 분획화, 그리고 hybrid tandem mass spectroscopy를 이용한 분석을 하였다. 그 결과 이 전의 연구에서는 보고되지 않았던 10개의 저분자량 단백질을 포함해 27개의 단백질 동정되었다. 이러한 방법은 유전자의 크기가 작아서 Northern blotting이나 이차원 전기영동법 등의 방법으로는 전사되는 유전자임을 확인하기 어렵거나 또는 단백질 발현의 확인이 어려운 경우에 유용하다고 판단된다.

재료 및 방법

세균과 배양조건

H. pylori 26695 균주를 헬리코박터 파이로리 분리균주 은행 (*H. pylori* Korean Type Culture Collection, Gyeongsang National University, Jinju, Korea)에서 제공 받아 사용하였다. 액체질소에 냉동 보관한 균주를 37°C 항온수조에서 녹인 뒤 소 혈청이 10% 첨가된 *Brucella* 한천배지에 접종하고 5% O₂, 100% 습도가 유지되는 37°C 배양기 (Sanyo, Osaka, Japan)에서 18시간 배양하였다.

SDS-겔로부터 저분자량 단백질 추출

배양한 균체를 50 mM tris 완충액 (pH 7.2)으로 2회 세척하고 동일한 완충액에 부유시킨 후 초음파 파쇄기 (Sonic & Materials, Danbury, CT, USA)로 균체를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 15% polyacrylamide 겔에 전기영동하였다. 전기영동 후 단백질 표준 물질 (Pre-Stained Standard, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 비교하여 20 kDa 이하에 해당하는 부분의 겔을 잘라내었다. 잘라낸 겔은 수술용 칼을 이용하여 조각 내고 겔이 잠길 정도의 200 mM ammonium bicarbonate 용액을 넣고 교반하였다. 겔 조각을 증류수로 씻고, 겔 조각이 불투명한 흰색이 될 때까지 진탕하여 탈수시킨 후 30분 동안 진공 건조시켰다.

단백질 조각의 in-gel digestion

In-gel digestion은 O'Connell & Stults의 방법으로 수행하였다 (23). 겔이 담긴 튜브를 얼음에 두고 트립신이 포함된 효소 반응액을 겔 조각이 충분히 잠기도록 첨가하여 얼음에 45분간 정치하여 재수화시켰다. 효소 반응액을 제거하고 digestion buffer (50 mM NH₄HCO₃, 5 mM CaCl₂)를 겔이 충분히 잠길 정도로 넣고 37°C 배양기에서 하룻밤 동안 정치하였다. 이후 동량의 acetonitrile을 튜브에 넣은 후 30분간 교반하고 원심 후 상층액을 새로운 튜브에 옮긴 후 증류수를 겔이 잠길 정도로 충분히 넣고 10분간 진탕 후 동량의 acetonitrile을 첨가하여 30분간 진탕하고 원심 후 상층액을 취하였다. 이 상층액을 진공 건조기로 완전히 건조시켰다.

HPLC를 이용한 저분자량 펩타이드 혼합물의 분리

In-gel digestion한 펩타이드 혼합물은 HPLC (Beckman Coulter, Proteome Lab PF 2D, HPRP Module, Fullerton, CA, USA)에 C18 reverse phased column (particle size: 5 µm, pore size: 300 Å, PerSeptive Biosystem, Foster City, CA, USA)을 이용하여 분리하였다. 건조된 펩타이드 혼합물을 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 증류수에 재부유시키고 정량하여 2 mg/ml로 보정한 후 공극 (pore size)이 0.2 µm인 필터를 이용하여 불순물을 제거하고 filtrate 50 µl를 column에 loading하고 100% 용매 A (0.1% TFA를 함유한 증류수)로 10분간 세척 후 75분간 용매 B (0.08%를 함유한 acetonitrile)를 0~100%의 농도 구배로 용출하였다.

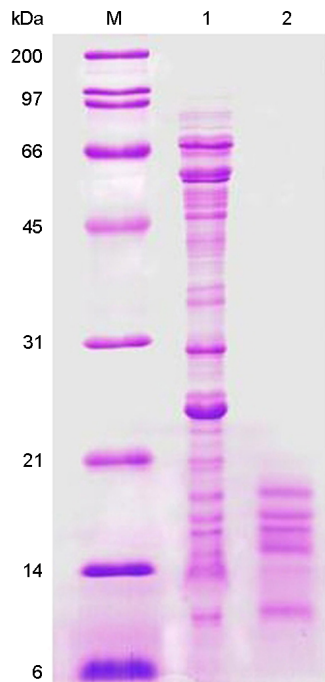


Figure 1. Extraction of the *H. pylori* LMW proteins. In lanes: M, molecular weight marker; 1, whole cell proteins of *H. pylori* 26695; 2, extracted low molecular proteins.

Hybrid tandem mass spectrometer를 이용한 HPLC 분획의 동정

HPLC 분획을 진공 건조시키고, 5 μ l의 주입 용매 (70% 메탄올, 3% 초산)에 재부유 후 단백질 동정에 사용하였다. MS/MS 분석은 QSTAR pulsar-i mass spectrometry 시스템 (AB/MDS Sciex, Toronto, Canada)을 이용하였으며, source는 nanoelectrospray ion source (MDS Protana, Odense, Denmark)를 이용하였고, 5 μ l의 시료를 long spray capillary (MDS Protana)에 주입 후 capillary 끝을 분무가 가능하도록 절단하여 사용하였다. Ion spray voltage는 900~950 volt로 사용하였고, 이온 형태는 positive mode로 TOF-MS 범위는 400~1,600 Da (m/z)로 설정하여 사용하였다. MS/MS 측정을 위한 MS 범위는 80~2,000 Da (m/z)으로 사용하였으며, 각 펩타이드에 대한 collision energy (CE)값은 수동으로 최적화시켜 사용하였다. 이렇게 얻어진 MS/MS raw data는 MASCOT 프로그램 (<http://www.matrixscience.com>)으로 NCBI 데이터 베이스를 이용하여 단백질을 동정하였고, 다시 MS/MS 피크 데이터는 수동으로 아미노산 서열을 확인한 후 이를 NCBI 데이터 베이스로 재확인하여 최종적인 단백질을 동정하였다.

저분자 단백질의 이차원 전기영동

일차원 전기영동 겔로부터 추출한 저분자 단백질의 등전점 전기영동, 평형화, 이차원 전기영동, 그리고 은염색은 Cho 등 (17)의 방법을 사용하였다.

결 과

저분자량 단백질의 reverse phased HPLC 분리

*H. pylori*의 전체 단백질을 추출하기 위하여 *H. pylori* 균체를 초음파 파쇄기로 파쇄한 후 15% SDS 아크릴아마이드 겔에 전개하였다. 겔로부터 20 kDa 이하의 저분자량 단백질 부분만을 잘라낸 후 트립신으로 in-gel digestion하여 저분자량 펩타이드 혼합물을 얻었다 (Fig. 1). 얻어진 펩타이드 혼합물을 reverse phased HPLC를 통해 분획한 결과 많은 수의 펩타이드 peak로 분리된 스펙트럼을 얻었다 (Fig. 2).

Hybrid tandem mass spectrometer를 이용한 HPLC 분획의 동정

Reverse phased HPLC를 통해 분획한 *H. pylori* 저분자량 단백질 펩타이드를 펩타이드의 아미노산 서열을 결정하여 동정하는 방법인 hybrid tandem mass spectrometer를 이용하여 동정하였다. 그 결과 이전의 연구에서는 확인되지 않았던 10개의 저분자량 단백질을 포함해 27개의 단백질의 발현이 확인되었다. 특히, 분자량이 7 kDa으로 매우 낮은 copper ion binding protein (HP1093)과 등전점이 염기성인 ribosomal protein (HP0083, HP0084, HP1295, HP1317)들을 비롯하여 이차원 전기영동으로는 분리가 어려운 단백질들이 확인되었다 (Table 1).

일차원 겔에서 추출한 저분자 단백질의 이차원 전기영동

일차원 겔에서 20 kDa 이하의 단백질을 추출하고 이차원 전기영동을 수행한 결과, 약 80개의 단백질 반점을 확인하였다 (Fig. 3). 등전점이 5~8 사이의 단백질은 14 kDa보다 작은 것들이 대부분이나 등전점이 6~11 사이인 것은 대부분 14~21 kDa의 분자량 분포를 보였다.

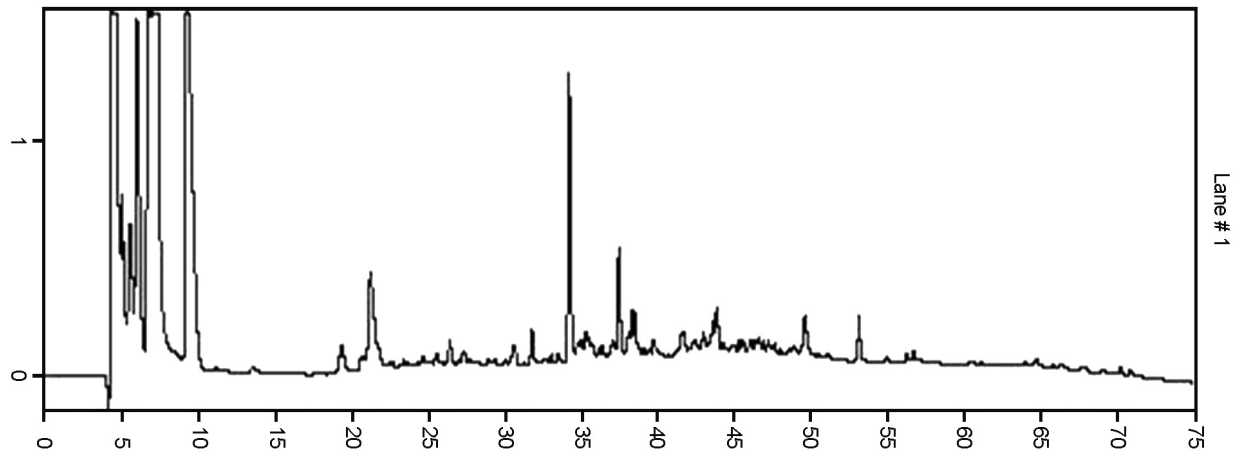


Figure 2. Profile of the *H. pylori* low molecular proteins separated by reverse phased HPLC.

Table 1. Protein identification from reverse phased HPLC fractions of *H. pylori* 26695 low molecular proteins using the hybrid tandem mass spectrometry

Fraction No. [§]	MW (kDa)	Protein name	Match seq.	TIGR locus name
23~24	22.2	Alkyl hydroperoxide reductase (ahpC)	34-NGAILFFWPK-43	HP1563
29~30	11.9	Thioredoxin (trxA)	55-VNTDEQEELSAK-67	HP0824
34~35	17.5	flavodoxin (fldA)	40-EQFNSFTK-47	HP1161
34~35	17.5	flavodoxin (fldA)	112-VVGQTPTDGYHFEASK-127	HP1161
34~35	17.5	flavodoxin (fldA)	25-AIGNAEVVVDVAK-36	HP1161
34~35	16.9	Neutrophil activating protein (napA)	120-VTVTYADDQLAK-131	HP0243
34~35	19.1	Membrane-associated lipoprotein	69-AEDLITNNDVDYSTNQATAK-88	HP1456
36~37	27.8	Hypothetical protein HP0369	9-IQMTFYKL-16	HP0369
36~37	13.0	Co-chaperone (groES)	21-TSSGIIIPDPAK-32	HP0011
38~39	16.9	Neutrophil activating protein (napA)	30-GTDFNFVHK-38	HP0243
38~39	10.5	Ribosomal protein L23 (rpl23)	23-GVLVVQTAQNVTK-35	HP1317
38~39	14.5	Ribosomal protein S9 (rps9)	64-AVVFGGGYSAQAEALR-79	HP0083
38~39	20.4	Hypothetical protein (HP0305)	104-NVIEGDHAGSLTAYVR-119	HP0305
38~39	17.6	Hypothetical protein (HP0721)	34-MAGI(V)VAPQDIVDYTK-48	HP0721
40~41	16.9	Neutrophil activating protein (napA)	94-EILEDYKYLEK-104	HP0243
40~41	18.3	Adhesin thiol peroxidase (tagD)	28-LVNGDLQEVNLLK-41	HP0390
40~41	13.3	Ribosomal protein L7/L12 (rpl7/l12)	31-FGVSATPTVVAGAAVAGGAAAESEK-56	HP1199
40~41	14.0	Ribosomal protein S11 (rps11)	59-STPYAAQQAVESALSK-74	HP1295
42~43	7.2	Copper ion binding protein (copP)	40-SVVVEFDAPATQDLIK-55	HP1093
42~43	17.5	Flavodoxin (fldA)	134-FVGLVIDEDNQDDLTDER-151	HP1161
42~43*	53.1	Hypothetical protein HP1083	322-AGTAGQSLIR-332	HP1083
42~43	17.5	Flavodoxin (fldA)	4-IGIFFGTDSGNAEIAEK-21	HP1161
42~43	69.7	Outer membrane protein (omp27)	610-IPTINTNYYSFLDTK-624	HP1177

Table 1. Continued

Fraction No. [§]	MW (kDa)	Protein name	Match seq.	TIGR locus name
44~45*	19.1	Membrane-associated lipoprotein	152-VFVLVGLDK-160	HP1456
44~45	11.9	Thioredoxin (trxA)	72-SIPTLLFTK-80	HP0824
44~45	26.5	Urease, alpha subunit (ureA)	195-IFGFNALVDR -204	HP0073
44~45	18.3	Adhesin thiol peroxidase (tagD)	147-EIVQNILEEPNYEALLK-163	HP0390
44~45*	26.8	Outer membrane protein (omp30)	90-LKNPNYNNEVVQLAGQVLGK-108	HP1395
44~45	18.3	ubiquinol cytochrome c oxidoreductase, Rieske 2Fe-2S subunit (fbcF)	123-GRFTSDGVNIAGTPPPRPFDIPPFK-145	HP1540
44~45	20.6	Hypothetical protein (HP1173)	159-ISLVGNFDGTGFLTEYK-175	HP1173
46~47*	21.9	lipoprotein, putative (Hypothetical protein)	127-LGIYINPNNQEVFALVR-143	HP0596
46~47	58.6	Catalase	29-GPVLLQSTWFLEK-41	HP0875
46~47	77.7	Outer membrane protein (omp2)	681-IPTINTNYYSLLGTTLQYR	HP0025
46~47	43.0	Outer membrane protein (omp32)	331-IPTLPNYFFK-340	HP1501
46~47	22.2	Alkyl hydroperoxide reductase (ahpC)	112-DYDVLFEAAIALR-124	HP1563
46~47	20.4	Hypothetical protein (HP0305)	87-EAFFALFK-94	HP0305
46~47	16.9	Neutrophil activating protein (napA)	90-DIFKEILEDYK-100	HP0243
46~47	20.4	Hypothetical protein (HP0305)	87-EAFFALFK-94	HP0305
48~49*	16.1	Ribosomal protein L13 (rpl13)	27-LITEIAVLLR-36	HP0084
48~49	57.1	Outer membrane protein (omp21)	465-FQFLFDVGLR-474	HP0913
50~52	22.2	Alkyl hydroperoxide reductase (ahpC)	112-DYDVLFEAAIALR-124	HP1563
42~43*	53.1	Hypothetical protein HP1083	322-AGTAGQSLLIR-332	HP1083
42~43	17.5	Flavodoxin (fldA)	4-IGIFFGTDSGNAEIAIEK-21	HP1161
42~43	69.7	Outer membrane protein (omp27)	610-IPTINTNYYSFLDTK-624	HP1177
44~45*	19.1	Membrane-associated lipoprotein	152-VFVLVGLDK-160	HP1456
44~45	11.9	Thioredoxin (trxA)	72-SIPTLLFTK-80	HP0824
44~45	26.5	Urease, alpha subunit (ureA)	195-IFGFNALVDR -204	HP0073
44~45	18.3	Adhesin thiol peroxidase (tagD)	147-EIVQNILEEPNYEALLK-163	HP0390
44~45*	26.8	Outer membrane protein (omp30)	90-LKNPNYNNEVVQLAGQVLGK-108	HP1395
44~45	18.3	ubiquinol cytochrome c oxidoreductase, Rieske 2Fe-2S subunit (fbcF)	123-GRFTSDGVNIAGTPPPRPFDIPPFK-145	HP1540
44~45	20.6	Hypothetical protein (HP1173)	159-ISLVGNFDGTGFLTEYK-175	HP1173
46~47*	21.9	lipoprotein, putative (Hypothetical protein)	127-LGIYINPNNQEVFALVR-143	HP0596
46~47	58.6	Catalase	29-GPVLLQSTWFLEK-41	HP0875
46~47	77.7	Outer membrane protein (omp2)	681-IPTINTNYYSLLGTTLQYR	HP0025
46~47	43.0	Outer membrane protein (omp32)	331-IPTLPNYFFK-340	HP1501
46~47	22.2	Alkyl hydroperoxide reductase (ahpC)	112-DYDVLFEAAIALR-124	HP1563

[§] HPLC fraction numbers from figure 2

* Unidentified in references

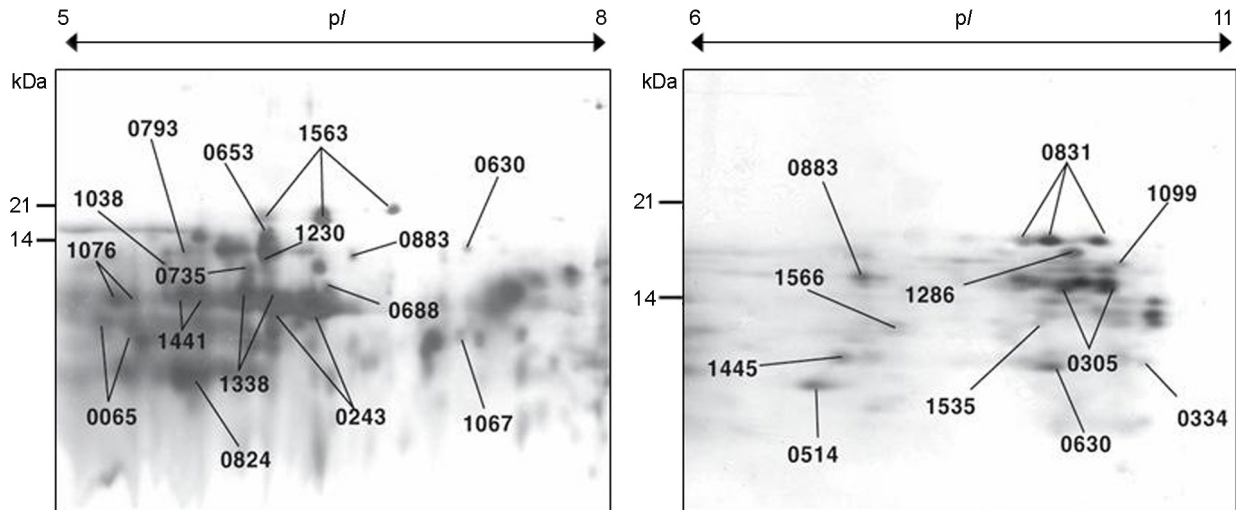


Figure 3. 2-DE map of the low molecular proteins of *H. pylori* that were extracted from 1-DE gel.

고 찰

*H. pylori*는 약 1,600개의 유전자를 가지고 있는 것으로 보고되었다 (14, 15). 그 중 유전자 산물의 기능이 밝혀지거나 염기서열 상동성 연구 또는 아미노산 서열 상동성 연구 등의 방법으로 기능이 유추된 것은 약 60%이다 (14, 15). 나머지의 기능은 *H. pylori*에서 아직 확인되지 않았거나 다른 세균에서의 상동 유전자의 기능도 알려지지 않은 가상 단백질의 유전자이다. 이들 가상 유전자들은 많은 경우 세균 내에서의 발현이 확인되지 않았으며 컴퓨터 프로그램에 의해 유전자로 추측된 염기서열들이다.

H. pylori 유전자 산물들 중 20 kDa 미만 (약 550 bp 이하)의 저분자 단백질을 암호화하고 있는 유전자들은 전체의 16%에 이르며 저분자 단백질의 약 70%가 기능이 알려져 있지 않다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AE000511>). 그러나 기능이 알려진 저분자 단백질들 중 AhpC, TagD, FldA 그리고 NapA 등은 산화적 스트레스 저항성 등 세균의 생존에 필요한 중요 기능을 담당하는 것들로 저분자 단백질의 기능 연구가 세균의 특성 연구 뿐만 아니라 병원성 연구 등에도 중요한 정보를 제공할 것으로 기대되고 있다 (28~30).

프로테오믹스를 이용한 이전의 연구들에서는 약 250개의 *H. pylori* 유전자의 발현이 보고되었다 (17~19, 24~26). 하지만, 중요성에도 불구하고 저분자량 단백질들의

발현 여부를 프로테오믹스를 이용하여 분석한 결과는 미비하다. 저분자량 단백질과 같은 발현량이 적은 단백질을 분석하기 위해 세균, 암세포, 사람의 혈액, 동물 조직 등에서 동위원소표지 (isotope labeling), 초미세여과 (ultrafiltration), 겔여과 (gel filtration) 등의 방법을 통해 분석한 연구보고 등이 있다 (27, 31~33). 예를 들면 사람의 혈청의 경우 혈청 단백질의 대부분을 차지하는 알부민이나 면역글로불린 (Ig)과 같은 발현량이 많은 단백질을 친화 크로마토그래피를 통해 제거하고 발현량이 적은 단백질을 분석한 예가 있다 (31). 하지만 *H. pylori*의 저분자량 단백질의 경우에는 alkylhydroperoxide reductase, neutrophil activating protein, thioredoxin, co-chaperone 등과 같이 발현량이 많은 단백질들이 존재해 겔여과와 같은 방법으로는 발현량이 적은 저분자량 단백질을 분리하는데에는 한계가 있다. 이런 문제를 해결하기 위하여 SDS-아크릴아마이드 겔로부터 단백질을 분리하는 방법을 이용하여 저분자량 단백질을 분리하고, 트립신으로 in-gel digestion한 후 펩타이드 혼합물을 친수성과 소수성에 따라 분리하는 C18 reverse phased column을 이용하여 분획하는 방법을 이용하였다. HPLC를 이용하여 분획한 펩타이드 혼합물을 hybrid tandem mass spectrometer로 펩타이드의 아미노산 서열을 결정함으로써 *H. pylori*의 저분자량 단백질의 분리와 발현량이 적은 단백질을 분석하였다 (Table 1).

이 연구에서는 보통의 SDS-PAGE 상에서는 분리가 잘 되지 않는 분자량이 20 kDa 이하의 단백질을 저분자 단

백질로 정의하였으며 그 수를 약 250개로 예상하였다. 그러나 분석을 통하여 동정이 완료된 것은 57개의 펩타이드로서 27개 유전자의 산물이다. 예로 alkyl hydroperoxide reductase (AhpC), thioredoxin (TrxA), flavodoxin (FldA), neutrophil activating protein (NapA), 그리고 thio peroxidase (TagD) 등의 산화적 스트레스 저항성 관련 유전자 산물과 같이 저분자 단백질들이 동정되었다. 기능이 알려지지 않은 단백질로는 HP0305, HP0369, HP0721, HP1083 그리고 HP1173 등이 확인되었다. 분자량이 작아서 SDS-PAGE나 이차원 전기영동 등에서는 확인이 어렵거나 불가능한 7 kDa의 copper ion binding protein (CopP), 11.9 kDa의 thioredoxin (TrxA) 그리고 10.5 kDa의 ribosomal protein L23 (Rpl23) 등이 확인되었다.

그러나 Omp2, Omp21, Omp27, Omp30, Omp32, catalase 그리고 HP1083 등 일부 단백질들은 예측된 분자량이 40~77 kDa으로 매우 큰 단백질들이다. 이것들은 단백질 시료의 준비단계 또는 분리단계에서 분해되었거나 정상적인 노후 단백질의 분해단계일 것으로 추측된다. 한 예로, CagA 단백질은 이차원 전기영동에서 항상 120 kDa으로 나타나지만 시료의 상태에 따라서는 20 kDa의 작은 반점으로 나타나기도 한다 (35). 하지만 보통 왕성하게 자라는 세균에서 단백질을 분리할 경우에는 이 분해된 작은 단백질 반점은 확인되지 않는다. 그러므로 이러한 큰 분자 단백질이 함께 동정되는 것은 왕성하게 자라고 있는 세균을 시료로 사용하는 등의 방법으로 해결될 수 있다. 일부 단백질들은 ribosomal protein으로 동정되었는데, 이는 염기성 특성으로 등전점 전기영동으로는 분리가 어려워 일반적인 프로테옴 분석법으로는 확인이 매우 어렵다.

본 연구의 결과 동정된 27종의 단백질 중 이제까지 보고되지 않았던 새로운 것은 10개이다. 결론적으로 SDS-PAGE 겔로부터 단백질을 분리하고 HPLC를 이용하여 분획 후 동정하는 방법은 저분자량 단백질들과 같은 발현량이 적거나 SDS-PAGE 등의 방법으로 분석이 어려운 단백질을 분석하는 데에 효과적인 방법으로 판단된다. 하지만 상대적으로 많이 발현되는 저분자 단백질이 주로 동정되는 한계는 해결되어야 할 문제이다. SDS-PAGE에서 추출된 저분자 단백질을 이차원 전기영동을 실시한 결과 예상되는 저분자 단백질 약 250개의 1/3 정도인 약 80개의 단백질 반점이 확인되었다 (Fig. 3). 이것은 발현량이 적은 대부분의 저분자 단백질은 여전히 분

석이 어려운 상태라는 의미이거나 또는 발현이 되지 않은 결과로 추측된다. 이러한 한계는 겔여과법이나 FPLC 등을 사용한 저분자 단백질의 고농축과 정밀한 분획 기술의 도입으로 크게 향상될 것으로 기대된다.

본 연구에서는 저분자 단백질들을 동정하기 위하여 일차원 전기영동 겔에서 저분자 단백질을 포함하는 겔을 잘라내고, 겔 속의 단백질의 in-gel digestion, HPLC에 의한 절단된 펩타이드의 분획화, 그리고 hybrid tandem mass spectroscopy를 이용한 분석을 수행하여 27개의 단백질을 동정하였으며 그 중 10개는 이차원 전기영동으로 확인하기 어려운 단백질들이었다. 동정된 단백질들 중 AhpC, NapA, FldA 그리고 TrxA 등 많은 경우 3~6회 반복적으로 동정되고 있어서 발현이 잘되는 단백질이 주로 동정되고 있는 것으로 보이며 발현이 잘 안 되는 저분자 단백질의 동정을 위하여 다양한 농축방법이 필요한 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- 1) Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;16:1311-5.
- 2) Rhee KH, Cho MJ, Kim JB, Choi SK, Park CK, Kim YC, et al. A prospective study on the *Campylobacter pylori* isolated from patients of gastroduodenal inflammatory conditions. *J Kor Soc Microbiol* 1988;23:9-16.
- 3) Rhee KH. *Campylobacter* and *Helicobacter*. In: Ko GG, et al. Recent clinical microbiology. 3rd. Seoul: Seoheung Publishing Company: 1992.p.283-90.
- 4) Blaser MJ. *Helicobacter pylori*; its role in disease. *Clin Infect Dis* 1992;15:386-91.
- 5) Langenberg ML, Tytgat GNJ, Schipper MEI, Rietra PJG, Zanen HC, Burnett RA, et al. *Campylobacter*-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals. *Lancet* 1984;323:1348-9.
- 6) Rauws EA, Langenberg W, Houthoff HJ, Zanen HC, Tytgat GN. *Campylobacter pyloridis*-associated chronic active antral gastritis. A prospective study of its prevalence and the effects of antibacterial and antiulcer treatment. *Gastroenterology* 1988; 94:33-40.
- 7) Price AB, Levi J, Dolby JM, Dunscombe PL, Smith A, Clark J, et al. *Campylobacter pyloridis* in peptic ulcer disease:

- microbiology, pathology, and scanning electron microscopy. *Gut* 1985;26:1183-8.
- 8) Peterson W. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *N Engl J Med* 1991;324:1043-8.
 - 9) World Health Organization. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994;61:177-240.
 - 10) Petersen AM, Krogfelt KA. *Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;36:117-26.
 - 11) Baik SC, Kim JB, Cho MJ, Kim YC, Park CK, Ryou HH, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among normal Korean adults. *J Kor Soc Microbiol* 1990;25: 455-62.
 - 12) Rhee KH, Youn HS, Baik SC, Lee WK, Cho MJ, Choi HJ, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korea. *J Kor Soc Microbiol* 1990;25:475-90.
 - 13) Youn HS, Baik SC, Lee WK, Cho MJ, Ryou HH, Choi HJ, et al. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Kor Soc Microbiol* 1990;25:463-74.
 - 14) Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999;397:176-80.
 - 15) Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388:539-47.
 - 16) Oh JD, Kling-Bäckhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, Fulton LA, et al. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103: 9999-10004.
 - 17) Cho MJ, Jeon BS, Park JW, Jung TS, Song JY, Lee WK, et al. Identifying the major proteome components of *Helicobacter pylori* strain 26695. *Electrophoresis* 2002;23:1161-73.
 - 18) Jungblut PR, Bumann D, Haas G, Zimny-Arndt U, Holland P, Lamer S, et al. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2000;36:710-25.
 - 19) Baik SC, Kim KM, Song SM, Kim DS, Jun JS, Lee SG, et al. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J Bacteriol* 2004; 186:949-55.
 - 20) Bumann D, Aksu S, Wendland M, Janek K, Zimny-Arndt U, Sabarth N, et al. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2002;70: 3396-403.
 - 21) Jungblut PR, Bumann D. Immunoproteome of *Helicobacter pylori*. *Methods Enzymol* 2002;358:307-16.
 - 22) Cash P. Proteomics in medical microbiology. *Electrophoresis* 2000;21:1187-201.
 - 23) O'Connell KL, Stults JT. Identification of mouse liver proteins on two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of in situ enzymatic digests. *Electrophoresis* 1997;18:349-59.
 - 24) Lee HW, Choe YH, Kim DK, Jung SY, Lee NG. Proteomic analysis of a ferric uptake regulator mutant of *Helicobacter pylori*: regulation of *Helicobacter pylori* gene expression by ferric uptake regulator and iron. *Proteomics* 2004;4:2014-27.
 - 25) Lock RA, Cordwell SJ, Coombs GW, Walsh BJ, Forbes GM. Proteome analysis of *Helicobacter pylori*: major proteins of type strain NCTC 11637. *Pathology* 2001;33:365-74.
 - 26) McAtee CP, Hoffman PS, Berg DE. Identification of differentially regulated proteins in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* by proteome techniques. *Proteomics* 2001; 1:516-21.
 - 27) Hood BL, Lucas DA, Kim G, Chan KC, Blonder J, Issaq HJ, et al. Quantitative analysis of the low molecular weight serum proteome using ¹⁸O stable isotope labeling in a lung tumor xenograft mouse model. *J Am Soc Mass Spectrom* 2005;16: 1221-30.
 - 28) Wang G, Alamuri P, Maier RJ. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2006;61:847-60.
 - 29) Cooksley C, Jenks PJ, Green A, Cockayne A, Logan RP, Hardie KR. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. *J Med Microbiol* 2003;52:461-9.
 - 30) Yang HB, Sheu BS, Wang JT, Lin ST, Wu JJ. Serological responses of FldA and small-molecular-weight proteins of *Helicobacter pylori*: correlation with the presence of the gastric MALT tissue. *Helicobacter* 2004;9:81-6.
 - 31) Harper RG, Workman SR, Schuetzner S, Timperman AT, Sutton JN. Low-molecular-weight human serum proteome using ultrafiltration, isoelectric focusing, and mass spectrometry. *Electrophoresis* 2004;25:1299-306.
 - 32) Keller BO, Wang Z, Li L. Low-mass proteome analysis based on liquid chromatography fractionation, nanoliter protein concentration/digestion, and microspot matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B*

- Analyt Technol Biomed Life Sci 2002;782:317-29.
- 33) Dunlop KY, Li L. Automated mass analysis of low-molecular-mass bacterial proteome by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J Chromatogr A 2001;925:123-32.
 - 34) Lollo BA, Harvey S, Liao J, Stevens AC, Wagenknecht R, Sayen R, et al. Improved two-dimensional gel electrophoresis representation of serum proteins by using ProtoclearTM. Electrophoresis 1999;20:854-9.
 - 35) Kang HL, Baik SC. Application of hemin-agarose affinity chromatography to enrich proteome components of *Helicobacter pylori* strain 26695. J Bacteriol Virol 2005;35: 77-85.
-