

AIChE



11•3 — 11•8
Indianapolis, IN

Nov 03, 2002

오전 8 시부터 시작하는 session 에 참가하기 위해 6 시 이전에 기상하여 (사실은 시차가 적응이 아직 안돼서 일찍 일어나고 말았습니다.) 좀 서둘러 숙소에서 나왔습니다. 오늘이 일요일인 까닭에 이곳 사람들이 거리에 그리 많이 나와있지는 않더군요. 서둘러 학회장소인 Indianapolis Convention Center 에 도착하여 등록을 마친 시각이 8 시 10 분경... 아침식사로 베이글과 라떼 한잔을 먹는 중 마는 중 오전 8 시 30 분부터 시작하는 2D Gel Electrophoresis Workshop 에 참가하기 위해 다시 걸음을 재촉했습니다.



이른 아침의 Indianapolis 중심가 전경

첫번째 session 으로 2D Gel Electrophoresis 를 선택한 이유는 최근 들어 genome sequencing 작업 이후의 생명공학 연구가 proteomics 에 상당히 무게중심을 두고 있기 때문입니다. 생물체의 metabolism pathway 각 단계에서는 protein 이 관여하지 않는 단계가 거의 없을 정도로 다양한 종류와 발현양을 보이곤 합니다. 이러한 protein 정보를 통해 아직 알려지지 않은 pathway 나 metabolism 을 규명하거나 대사작용에 결정적인 역할을 하는 gene 에 대한 정보를 제공하고 noble enzyme 혹은 gene 을 찾아내는 proteomics 는 functional genomics 분야의 주요 학문으로 자리매김하고 있는 것이 사실입니다. 어제 취재하겠다고 말씀드렸던 Faculty Workshop 은 너무나 규모가 작고 내용이 부실하여(역시 직접 봐야지, 제목과 초록만으로는 내용을 가능하기가

어렵군요.) 급하게 취재내용을 변경하였음을 양지바랍니다. 첫번째 session 의 발표순서와 발표자는 다음과 같습니다.

American Electrophoresis Society 2D Electrophoresis Workshop

Sunday November 3, 2002

Current Techniques in 2D Electrophoresis

8:30-8:55 **“Tube Gel 2D: Core Lab Experiences”** Dr. Nancy Kendrick, Kendrick Labs Inc, Madison, WI

9:00-9:25 **“Setting up an IPG Strip Core Lab”** Dr. Mu Wang, Director, Proteomics Core Facility, Indiana Univ. School of Medicine, Indianapolis, IN

9:30-9:55 **“Integrated Protein Analysis form 2D-gels using PDQuest Software”** Dr. David Garfin, Biorad Labs, Hercules, CA

15 min break

10:15-10:40 **“New Advances in Fluorescent Detection Technologies”** Dr. Wayne Patton, Molecular Probes, Eugene, OR

10:45-11:10 **“Computerized Analysis of 2D Gels”** Dr. Steve Noblitt, NonLinear USA, Durham, NC

11:15-11:45 **“Glycoproteomics and Glycosuite”** Dr. Ben Herbert, Prteome Systems, Sidney, Australia
(Cancelled)

Lunch

1:00-1:55 **“2D Fluorescence Difference Gel 2D Electrophoresis”** Dr. Philip Beckett, Amersham Biosciences

2:00-2:55 **“The Investigator Proteomic Systems for 2D Spot Picking, Automated Protein Digestion and MALDI”** Drs Jennifer Krone & Greg Kinch, Genomic Solutions, Ann Arbor, MI

3:00-3:55 **“Accelerate Proteomics through Bioinformatics: Hands-On Introduction to the Sentient Platform for the Life Sciences”** Dr. Erich Gombocz, BioSentients Inc, Emeryville, CA *(Absent)*

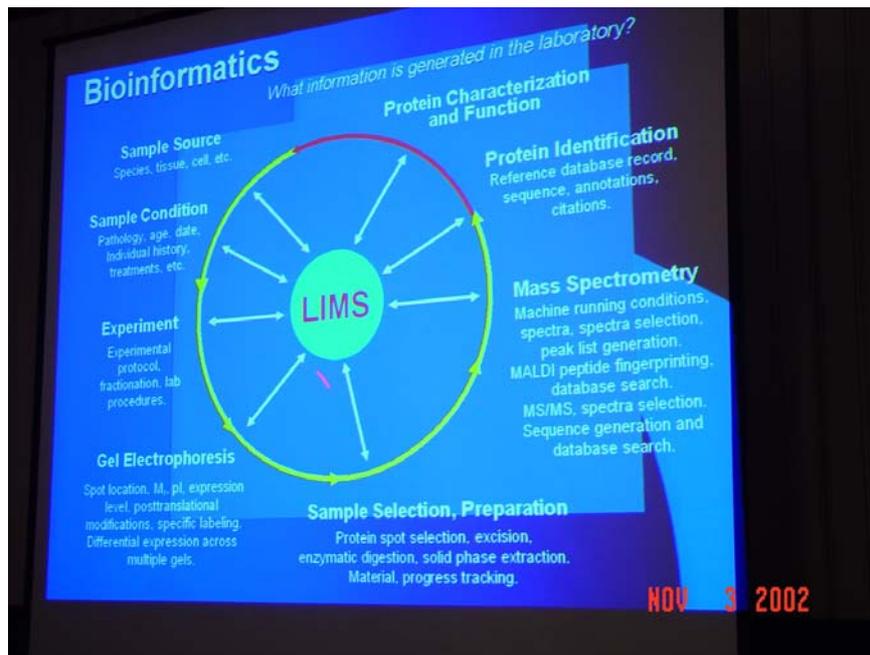
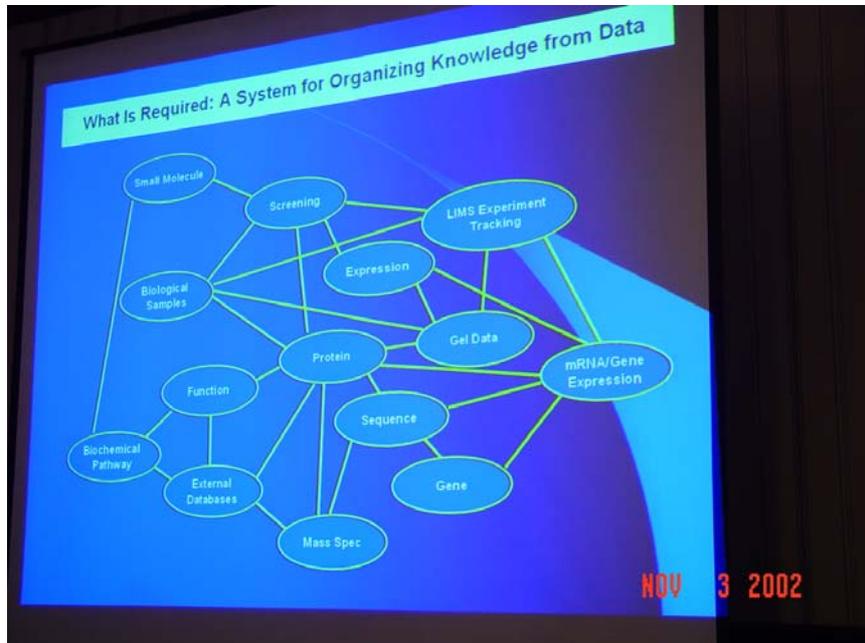
이 workshop 은 각 회사들이 현재 상용화하여 판매하고 있는 2D Electrophoresis 관련 기기 및 기술, 그리고새로운 methodology 에 대해 보고하는 시간이었습니다.

첫번째 speaker 인 Dr. Kendrick 은 연세는 들었지만 아주 매력적이고 정열적인 (연구에 대해서입니다..^^*) 분이었습니다. 이 분이 운영하는 Kendrick Lab, Inc 는 학계와 산업계에 안정적이고 재현성(reproducibility)이 보장된 2D Electrophoresis service 를 주업무로 하는 곳입니다. 국내에도 이러한 서비스를 하는 회사들이 있는데 미국에 산재해 있는 Kendrick Lab 같은 회사보다 어떤 우수한 기술력을 얼마나 보유하고 있는 지 짚어보고 싶었습니다. 물론 Kendrick Lab 은 그리 큰 규모의 회사는 아닌 것으로 보입니다. 다만, Wisconsin Univ, Madison 과 밀접한 연관을 맺으면서 새로운 기술개발에 박차를 가하고 있었습니다. 특히, 아직 상용화되지 않았지만 SDS(sodium

dodecyl sulfate)를 이용하여 protein 을 용융시키는 tube gel running 의 재현성 및 민감도를 증가시키기 위한 새로운 기술개발을 하고 있다고 합니다.(그게 무엇인지는 말 안해주더군요.) 2001년에는 300여명의 학자들로 부터 의뢰받은 knock out mice 에서 immunoprecipitates 까지 2D gel 3000 장을 running 하여 분석하였다고 보고하였습니다. 이들에 대한 gel data 도 상당양 발표하였습니다. 필자가 보기에 gel image 는 상당히 안정되어 있었고 재현성을 강조한 slide 에서는 충분히 그녀의 주장에 공감할 수 있었습니다. 이 그룹은 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 이용하여 protein 을 용융시키는 tube gel 을 주로 사용하고 있었습니다. 2D pattern 을 비교 분석하는 software 로는 Progenesis™ software 를 이용하여 다량의, 다양한 data 를 도출하였더군요. 또한, mRNA data 도 각 조직이나 세포로부터 도출하여 proteome data 와 비교하였는데, 다른 연구자들과 마찬가지로 mRNA data 와 proteome data 는 정확히 일치하지 않으며 동일한 결론을 얻을 수 있는 정보를 동시에 제공하는 경우가 아주 드물다고 발표하였습니다. 이는 모든 protein 은 post-translational modified 된다는 Walsh's rule 을 뒷받침하는 것이라고 주장하였습니다. 지난 추계 생물공학회에서 KAIST 의 이상엽박사님이 이와 동일한 발표를 하셨던 것을 상기시켜 드리고 싶군요. 결국 metabolic engineering 을 완성하기 위해서는 mRNA, protein, metabolite 를 다각적으로 분석, 연결시키지 않고서는 정확한 전체 밑그림을 완성하기 어렵다는 결론에 이르게 됩니다. 우연히 부분적인 연구로 좋은 결과를 얻는 경우도 있을 수 있으나 이는 어디까지나 상당한 운이 작용한 경우이고 대부분의 경우에는 전체 metabolism 을 예측하기가 그리 용이하지 않음을 가늠할 수 있습니다. 이렇게 일일이 다쓰다가는 전체 숲을 못보고 나무에 연연한다는 비난을 면하기 어려울 것 같고 언제 이야기가 마무리될 지도 모르겠군요.

두번째 연사로 나선 Wang 박사는 인디애나 의과대학의 교수로 재직하고 있으면서 proteomics 연구 전반을 책임지고 있는 분이었습니다. 일단 그의 연구실의 기기와 시설에 거의 정신을 잃을 지경이었습니다. 이 분야에 필요한 모든 기기와 장비가 최신식으로 빼곡하게 가득차있고 이를 운용하는 연구원들 역시 매우 잘 교육을 받은 것으로 보였습니다. 그는 아주 근사한 표현으로 proteomics 연구의 취지를 우리에게 되물었습니다. 그 문구는 “Fishing or Hunting?”이었습니다. 여러분은 이 말이 어떤 의미로 들리십니까? 저도 맨처음에는 이해가 가지않고 궁금증만 더해갔는데 그의 대답을 듣고는 이내 고개를 끄덕이게 되었습니다. Fishing 은 미끼를 던져서 고기가 물기를 기다리는 것을 의미합니다. 즉, 여러 data pool 을 만들기 위해 proteome data 를 축적하면서 이들 중 의미있는 결과를 찾아내는 접근방법을 의미하고 hunting 은 target 이 정확히 정해져 있으면서 그 target 과 연관된 data 를 찾으려는 접근방법을 표현한 것이더군요. 그는 cancer 와 기타 질병에 관한 marker protein 을 찾고 있었는데 hunting 식 접근방법으로 가기에는 축적된 data 가 너무 적다고 엄살을 부렸습니다. 결국 대부분의 연구자들이 그러하듯 fishing 식 접근방법을 사용하는데 워낙 축적되고 분석해야 하는 data 의 양이 방대해서 이것이 성공하기 위해서는 Bioinformatics 가 잘 구성되어야 한다고 주장하였습니다. 그러니까 결국 LIMS

(Laboratory Information Management System)가 어떻게 구성되어 있는냐에 따라 성패가 나뉜다고 주장하였습니다. 이와 관련된 slide 들을 아래에 삽입하였습니다.



3, 4, 5 번째 연사들이 발표한 내용은 주로 자신들의 회사가 개발하여 시장에 내놓은 gel image 분석기술에 대한 소개였습니다.(좀 지루했습니다.) Biorad 사는 워낙 유명하여 굳이 회사에 대해 설명할 필요는 없을 것 같습니다. PDQuest PROS 라는 software 는 gel image viewing 에서 간단한 clustering 기법을 이용한 Bioinformatics 까지를 cover 할 수 있는 좋은 software 였습니다. 많은 proteomics 연구자들이 이 software 를 사용하는 것으로 알고 있습니다. 3 번째 연사인 Dr.

Garfin 을 제외하고는 나머지 두 연사인 Dr. Patton 과 Dr. Noblitt 는 PDQuest 와 차별되는 자신들의 software 를 설명하였는데 이들에 대한 slide 를 아래에 정리해 두었습니다. (필자가 우측에 앉아 촬영을 한 관계로 이미지가 좌측으로 기울어져 있음을 양해바랍니다.)

Dr. Patton's slides

Multiplexed Proteomics technology: A novel fluorescence platform for differential display protein functional analysis.

Wayne F. Patton
Section Head of Proteomics
Molecular Probes, Incorporated

Sunday, November 3, 2002



NOV 4 2002

2D or not 2D?

*"Two D, or not two D: that is the question:
Whether 'tis nobler in mind to suffer
The streaks and blots of intractable proteins
Or to take chips against a sea of genes
And by comparing, find them that
hold the bitter taste of disease and death."*

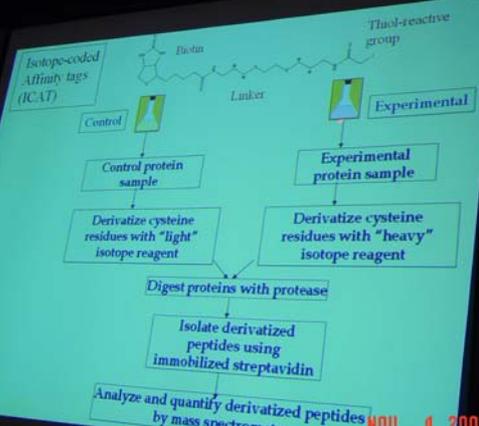
By Stephen Fey and Peter Mose Larsen
(presumably with apologies)
Current Opinion in Chemical Biology (2001) 5: 26-33.

NOV 4 2002

 Problems with 2-D gel electrophoresis:

- 2-D gel electrophoresis suffers from some technical limitations. The process is time-consuming, labor intensive, and requires a high level of technical expertise if quantitatively and positionally reproducible patterns are to be generated.
- The molecular weight and isoelectric point range that can be examined on a gel are limited. High molecular weight and very alkaline proteins are especially difficult to resolve.
- Hydrophobic membrane proteins are difficult to solubilize and thus are often absent from 2-D profiles.
- Gel images are complex. Protein spots in 2-D gels are not arrayed in regimented columns and rows. Spots often overlap as well. Sophisticated image analysis software is required and some manual editing of data is usually necessary.

NOV 4 2002



NOV 4 2002

Perspectives on ICAT and 2DGE:

- Though 2DGE and ICAT are both vital experimental methods for proteomics, neither technology exhaustively identifies all proteins present in a mitochondrial fraction.
- Each technique is somewhat biased and selective with respect to the proteins detected. ICAT selectively detects cysteine-rich proteins, is blind to proteins lacking cysteine residues, and has difficulty detecting acidic proteins with few tryptic cleavage sites. 2DGE has difficulty analyzing very high molecular weight, very low molecular weight or very alkaline proteins.
- Both methods have difficulty in detecting membrane-embedded, hydrophobic proteins.

NOV 4 2002

Our Multiplexed Proteomics platform

- The same dye is employed to measure proteins across all gels (or blots) in the database.
- Additional dyes with different excitation and/or emission maxima are used to highlight specific functional attributes of the sample.
- This is analogous to fluorescence microscopy, whereby a general purpose dye is used to observe the cell body, and additional colored dyes highlight unique targets of interest, such as mitochondria, within the cell.

NOV 4 2002

Challenge: Multicolor analysis in gels that is on par with what is now done in cells

NOV 4 2002

SYPRO Ruby dye is optimized for automated proteomics environments.

NOV 4 2002

Comparison of the detection sensitivities of SYPRO Ruby dye and silver stain.

SYPRO Ruby Dye Silver stain

NOV 4 2002

Analysis of glycosylation changes in cancer

NOV 4 2002

Analysis of Human Hepatocellular Carcinoma

Figure 2

Normal Cancer

Stained with Pop-O Emitter 300 dye

Stained with SYPRO Ruby dye

NOV 4 2002

Differential Display Maps

Normal Total protein (purple) vs Glycoprotein stain (green)

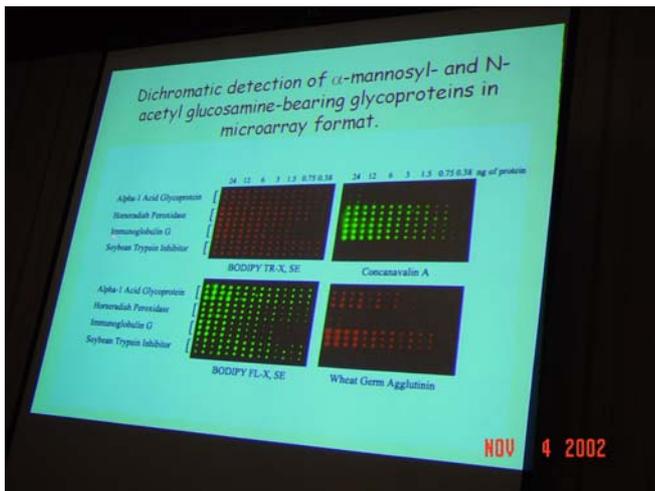
Cancer Total protein (purple) vs Glycoprotein stain (green)

Total protein Normal (purple) vs Cancer extract (green)

Glycoproteins cancer (purple) vs normal extract (green)

Haptoglobin is the major glycoprotein up-regulated in liver cancer.

NOV 4 2002



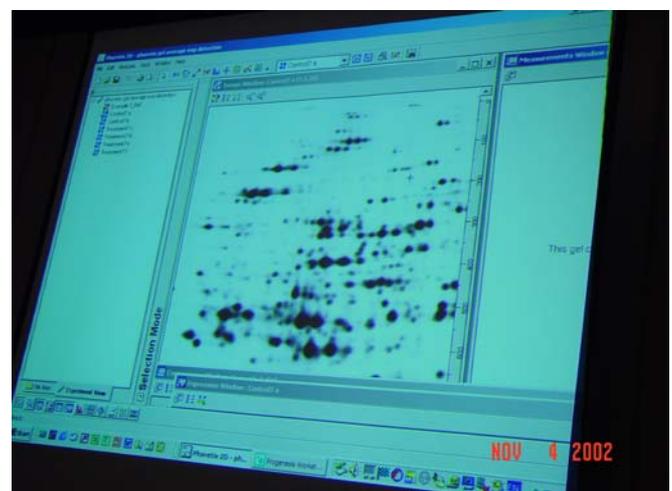
Key references:

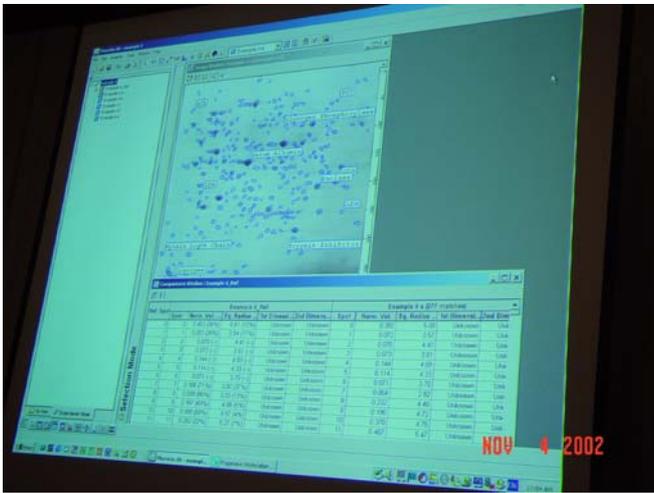
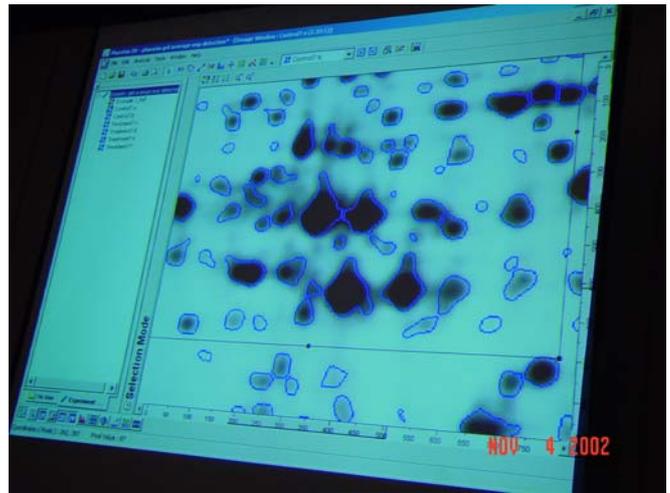
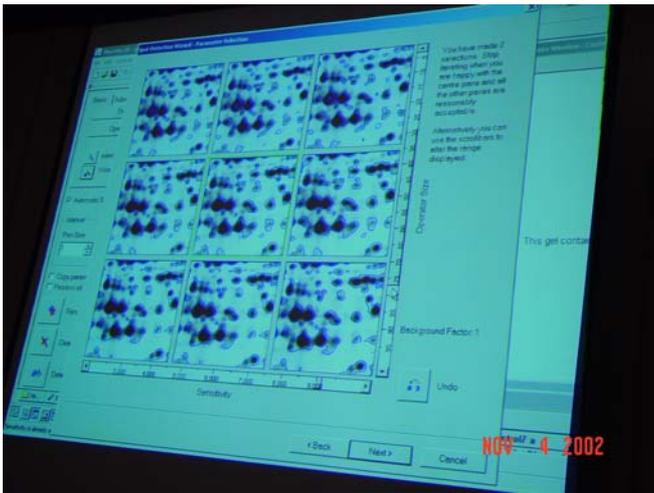
- Patton, Wayne F. and Beechem, Joseph M. (2002) "Rainbow's end: The quest for multiplexed fluorescence quantitative analysis in proteomics." *Current Opinion in Chemical Biology* 6: 63-69.
- Patton, W., Schulenberg, B. and Steinberg, T. (2002) "2-D gel electrophoresis: Better than a poke in the ICAT?" *Current Opinion in Biotechnology* 13: 321-328.

NOV 4 2002

필자가 이들 회사의 salesman 이 아니므로 추가적인 설명은 다음 기회로 미루겠으나 Molecular Probes 사와 Amersham 사의 fluorescent detection 기법은 무척 신선하여 간단한 설명을 드립니다. 용융된 protein 에 형광을 나타내게 하는 물질의 종류를 달리 첨가하여 emission 되는 영역이 구분되게 형광을 발현한 뒤 이들 gel image 를 겹쳐서 하나의 image 로 data 화하는 방법이 신선해 보였습니다. 이렇게 되면 기존의 silver staining 이나 CB 로 염색하는 방법에 비해 감도가 증가되고 기존의 방법으로 나타나지 않는 proteome 들까지 detection 할 수 있다는 장점이 있습니다. 한편, NonLinear 사의 software 는 PDQuest software 에 비해 편의성은 증가한 것으로 보이나 새로운 기술이나 기능이 추가된 것으로는 보이지 않았습니다. 2D Electrophoresis 의 가장 큰 맹점은 reproducibility 에 있다고 해도 과언이 아닙니다. 이를 극복하기 위해 국내의 여러 벤처들은 2D gel electrophoresis 를 안정적으로 'reproducibility' 를 만족시켜줄 만한 연구자나 기술자를 유치하려고 하나 미국 벤처들의 움직임은 이와는 상당히 달라 보였습니다. 그들은 기술적으로 reproducibility 를 해결하려는 노력이 두드러졌습니다.

Dr. Noblitt's Slides

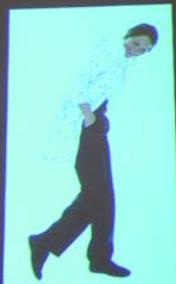




Dr. Noblitt's Slides

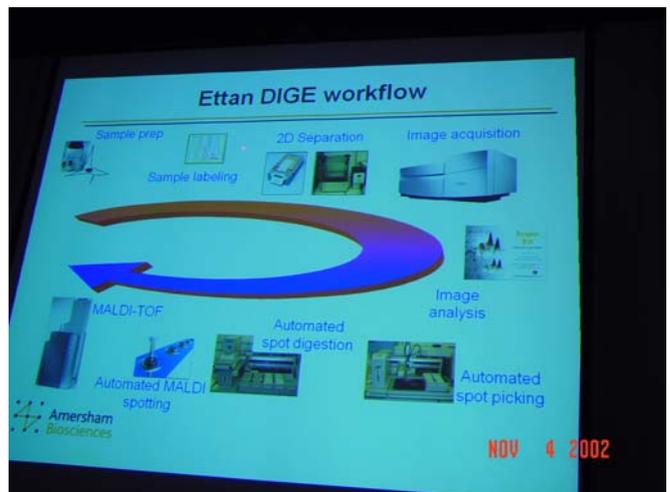
2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis
Ettan™ DIGE

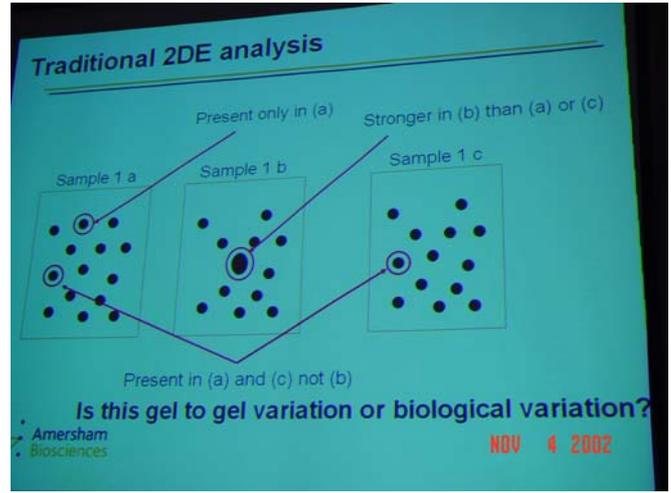
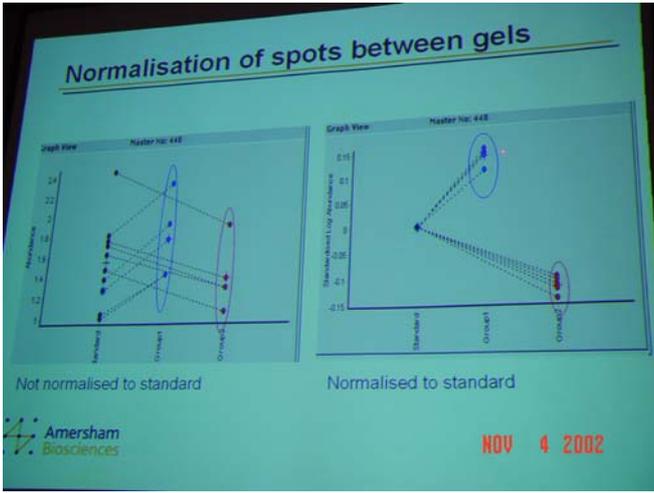
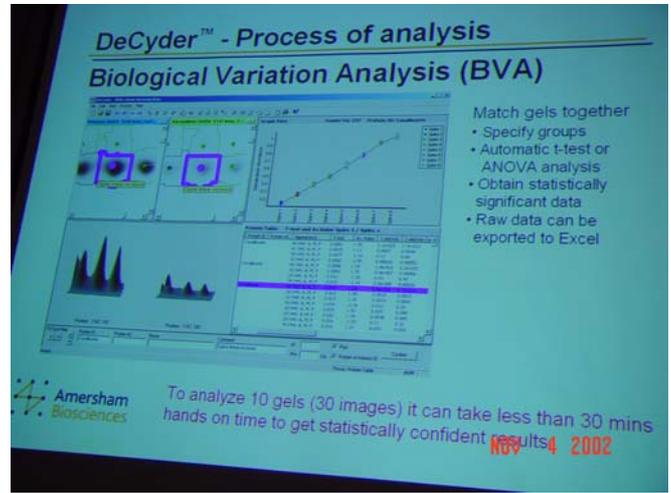
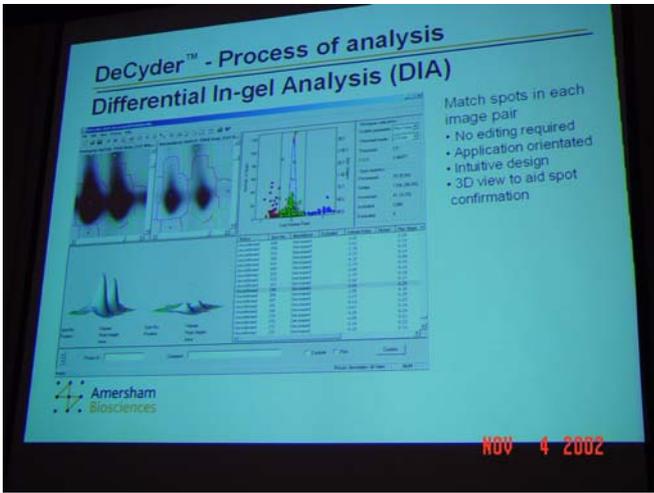
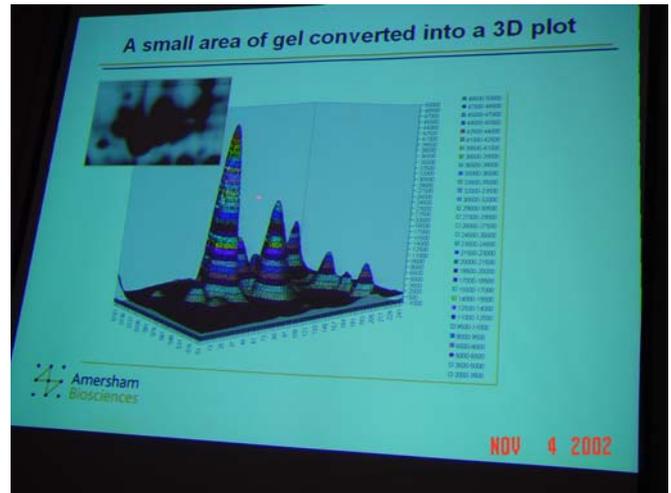
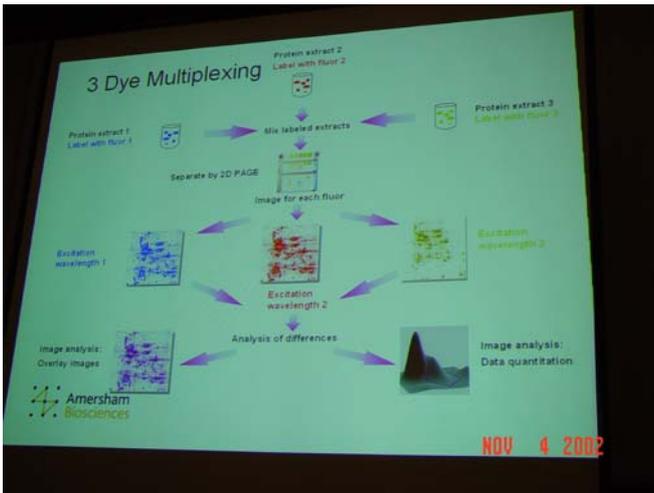
Phil Beckett, Amersham Biosciences
 Current Technologies in
 2D Electrophoresis Workshop
 AES Meeting, AIChE, Indianapolis
 November 3rd, 2002



Amersham Biosciences

NOV 4 2002





Traditional 2DE Solution: Replicate gels

At least 3 times as many gels as you should need,

8 point dose course

3 replicate samples per dose,

3 replicates gels per sample = 72 gels

Makes analysis more complex

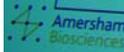
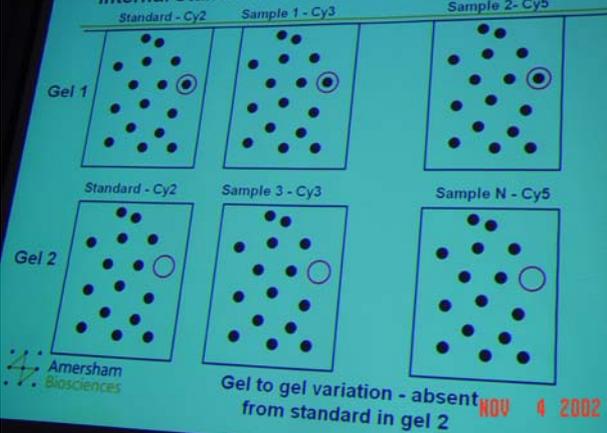
Tries to average out gel to gel variation, not as effective as removing it

... Multiplexing Samples can reduce number of gels



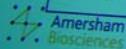
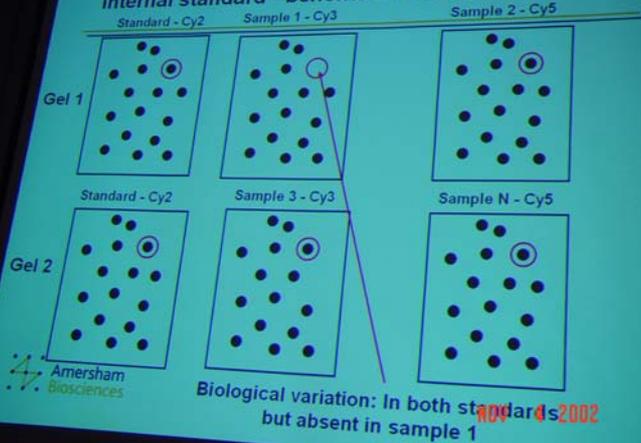
NOV 4 2002

Internal standard - benefits in theory



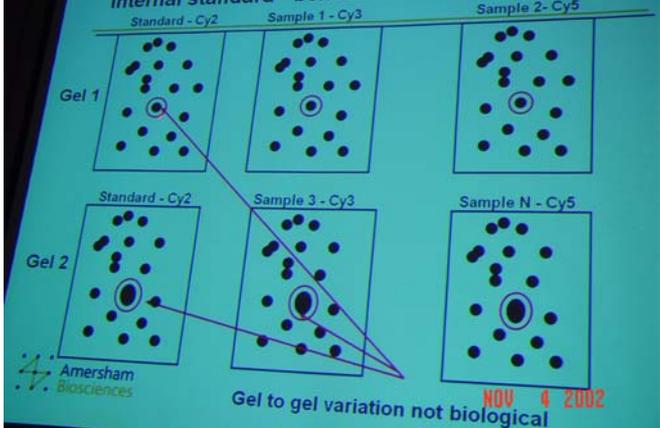
NOV 4 2002

Internal standard - benefits in theory



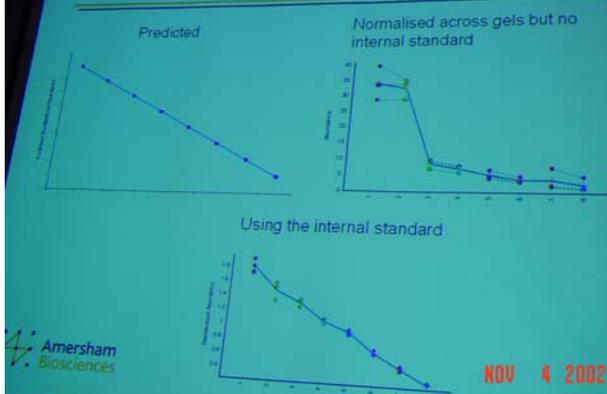
NOV 4 2002

Internal standard - benefits in theory



NOV 4 2002

Results: Predicted vs Actual: BSA



NOV 4 2002

Biological Variation Summary

Quantification across multiple samples is very accurate when using an in-gel standard

Predicted and actual results are very close

Without the internal standard, results were not close to predicted

This could lead to false biological conclusions

Need more than 3 replicate gels per sample to get close to predicted results if using traditional 2DE

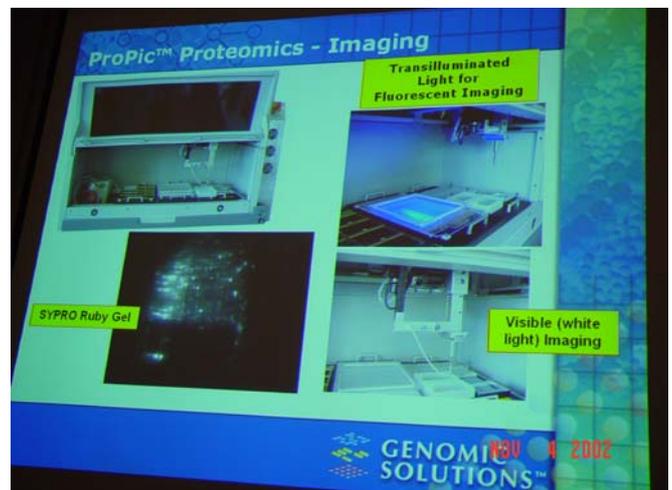
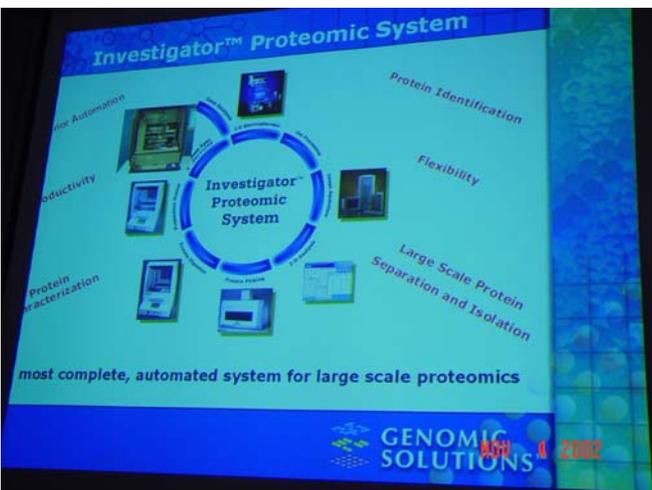
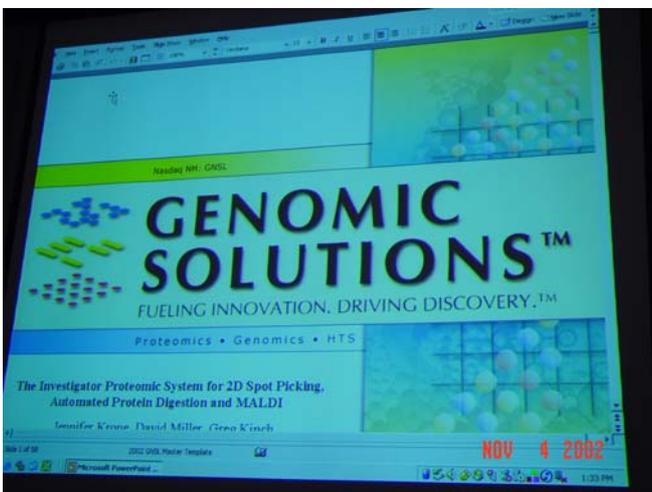


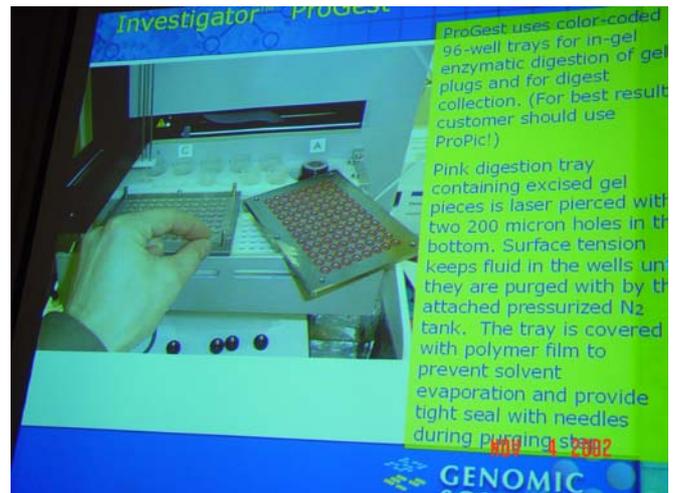
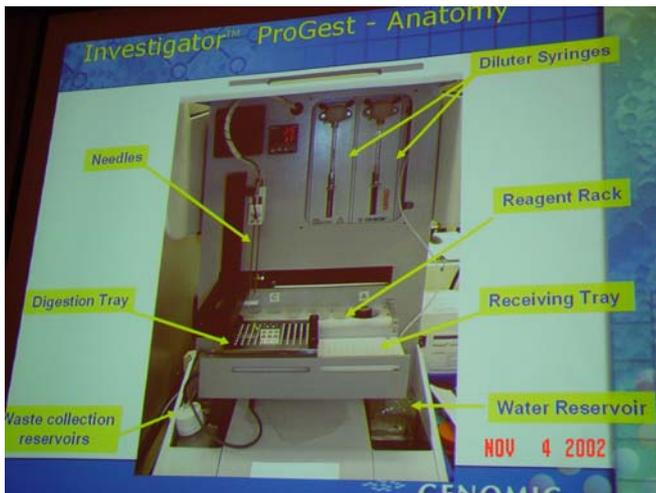
NOV 4 2002

예를 들어 tube gel 이 가지는 단점인 labor intensive, pH gradient instability, irreproducibility 를 해결하기 위해 automation 을 진행하고 intensity 의 평균값을 구하는 통계학적 방법을 새로이 개발하며 일부 spot 의 흔들림을 software 적으로 해결하고 IPG (immobilized pH gradient)를 pH 별로 나누어서 gel electrophoresis 를 할 수 있는 kit 를 생산하는 것이 그것입니다. 근본적인 문제를

기술로 해결하려는 노력이 었보였다거나 할까요? 아직 그 결과가 숙련된 2D Electrophoresis 기술자의 data 보다 훌륭하다는 결론은 내리기에는 시기상조이지만 말입니다. Automation 을 가장 쉽게 할 수 있는 공정은 아마 spot picking 부분일 것입니다. 2D gel 에서 원하는 spot 을 확보하는 작업으로서 그 후의 작업인 Mass 와 amino acid sequence 작업에 있어서 필수적인 부분이라고 할 수 있습니다. 이러한 기기를 만드는 회사로서 대표적인 회사가 바로 Genomic Solutions 인데 이미 NASDAQ 에 상장된 탄탄한 회사입니다. 아래의 slide 로 spot picker 의 여러가지를 감상해 보시죠.

Dr. Krone's Slides





2 부에서 계속됩니다..