

TSPN15082-085-12

캐나다 캠브리지 베이 기후변화 실험
모사구에서의 지방산 분석

Analysis of fatty acids from a district for climate change
simulation in Cambridge Bay, Canada



송실대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “북극권 동토층의 환경변화 특성 규명” 과제의 위탁연구 “캐나다 캄브리지 베이 기후변화 실험 모사구에서의 지방산 분석” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



(본과제) 총괄연구책임자	:	이 유 경
위탁연구기관명	:	송실대학교
위탁연구책임자	:	김 윤 곤
위탁참여연구원	:	김 경 진
“	:	황 철 환

보고서 초록

위탁연구과제명	캐나다 캠브리지 베이 기후변화 실험 모사구에서의 지방산 분석				
위탁연구책임자	김윤곤	해당단계 참여연구원수	3	해당단계 연구비	30,000,000 원
연구기관명 및 소속부서명	송실대학교		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	29
<p>▶ 토양 시료로부터 효율적 지방 회수 방법 적용</p> <ul style="list-style-type: none"> • 토양 시료 내 지방산 표지 인자 분석을 위한 추출 조건 최적화 • 토양으로부터 지방산을 추출 및 분석을 수행하여 표지인자 탐색 <p>▶ PLFA 지방산 라이브러리 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> • 토양 시료 내 PLFA의 정성 및 정량 분석을 위한 방법 구축 • microbial group별 분류를 통한 PLFA 지방산 library 구축 및 확대 • 토양 시료 내 미생물 군집 분석을 위한 여러 PLFA marker 분석 <p>▶ 캠브리지 베이로부터의 토양 시료 확보 및 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> • 샘플링할 장소 별로 일정량의 토양을 회수하여 분석에 사용할 시료 확보 • 확보된 토양 시료의 PLFA 지방산 분석 및 순수 분리된 미생물들의 성장 특정 및 효소분비, 기질이용 특이성 등의 실험 수행 <p>▶ 캠브리지 베이 토양미생물 지질 대사체 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> • 미생물의 Lipid A 구조 분석 및 육상 미생물과의 비교를 통해 미생물의 안전성 예측 모델을 개발함 					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	토양, 지질 대사체, 토양 미생물, 지방산 라이브러리, 질량분석기			
	영 어	Soil, Lipid metabolite, Soil microorganism, Fatty acid library, Mass spectrometry			

요 약 문

I. 제 목

캐나다 캠브리지 베이 기후변화 실험 모사구에서의 지방산 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

토양과 토양 내 미생물의 상호작용을 기반으로 한 미생물의 분석은 토양의 상태와 변화를 추측할 수 있는 효과적인 지표로 사용될 수 있으며 이는 과거 및 미래의 식생과 기후 변화와 관련한 학문적, 산업적인 연구를 가능하게 함. 그렇기 때문에 현재 효과적으로 토양 내 미생물 분석할 수 있는 기술의 개발이 중요한 화두임. 본 연구에서는 지역의 지형에 따른 토양 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술을 수립하여 극지 유래 토양 속 lipid marker의 분석을 통한 PLFA 지방산 라이브러리 구축과 캐나다의 캠브리지 베이 주변 토양 미생물의 지질 대사체 분석 및 분석을 통한 지질 대사체 라이브러리를 구축을 목표로 함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

▶ 토양 시료로부터 효율적 지방 회수 방법 적용

- 토양 시료 내 지방산 표지 인자 분석을 위한 추출 조건 최적화
- 토양으로부터 지방산을 추출 및 분석을 수행하여 표지인자 탐색

▶ PLFA 지방산 라이브러리 구축

- 토양 시료 내 PLFA의 정성 및 정량 분석을 위한 방법 구축
- microbial group별 분류를 통한 PLFA 지방산 library 구축 및 확대
- 토양 시료 내 미생물 군집 분석을 위한 여러 PLFA marker 분석

▶ 캠브리지 베이로부터의 토양 시료 확보 및 분석

- 샘플링할 장소 별로 일정량의 토양을 회수하여 분석에 사용할 시료 확보
- 확보된 토양 시료의 PLFA 지방산 분석 및 순수 분리된 미생물들의 성장 특징 및 효소분비, 기질이 용 특이성 등의 실험 수행

▶ 캠브리지 베이 토양미생물 지질 대사체 분석

- 캠브리지 베이 토양 미생물의 추위대응 기작 및 탄소원 저장 형태를 알기 위한 다양한 미생물에서의 전체 대사체 분석을 수행
- 위의 분석 결과를 통한 여러 토양 미생물의 지질 대사체 라이브러리를 구축

IV. 연구개발성과

▶ 캠브리지 베이 토양 내 미생물 연구 플랫폼은 다양한 토양 미생물 연구에 활용되어 토양 미생물 연구의 저변 확대 및 산업적 영향력을 극대화 할 수 있으며 토양층의 유기물 변화의 관측은 토양 미생물 및 토양 식물의 성장에 영향을 미치는 인자를 파악할 수 있는 좋은 자료가 됨으로 향후 기후 변화에 따른 영향을 예측할 수 있는 근거가 되어 식량자원이나 관광자연 관련 산업에 큰 영향을 미칠 것으로 사료됨.

V. 연구개발성과의 활용계획

▶ 본 연구의 연구 결과는 토양과 토양 내 미생물 군주들에 대한 체계적인 연구로 토양의 유기물 변화를 모니터링 하며, 지방 대사체 프로파일링 기술을 이용한 신규 토양 미생물의 대사산물 규명을 통해 뛰어난 생리활성을 가진 유용 생물 소재 확보 및 안전성 평가 모델로써 적극 활용될 수 있음.

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

I. Title

Analysis of fatty acids from a district for climate change simulation in Cambridge Bay, Canada

II. Purpose and Necessity of R&D

Analysis of microorganisms based on the interaction of soil and soil microorganisms can be used as an effective indicator that can assume the status and changes of soil associated with this climate change. That is why today the development of effective microorganisms technology that can analyze soil being an important topic. PLFA fatty acid and lipid metabolism in the Cambridge Bay soil in Canada can monitor changes in soil organic matter in accordance with the topography of the area marker analysis techniques derived from soil polar lipid marker.

III. Contents and Extent of R&D

▶ Application of lipid extraction method from soil

- Optimization of lipid extraction method from soil
- Analysis of soil lipids for searching lipid marker molecules

▶ Development of PLFA library from soil

- Establishment of qualitative and quantitative analysis of PLFA from soil
- PLFA library fatty build and expand through microbial group-specific classification
- Several PLFA marker analysis for microbial community analysis in soil samples

▶ Acquisition and analysis of soil samples from Cambridge Bay

- Collection of soil samples to analyze PLFA
- Analysis of PLFA and characterization of the isolated microorganisms

▶ Analysis of total lipids in soil microbial from Cambridge Bay

- Perform a full analysis of metabolites in a variety of microorganisms to know the cold response mechanisms and carbon storage in the form of soil microbial Cambridge Bay
- Development of fatty acid metabolite library from soil microorganism

IV. Expected Contribution

▶ Cambridge soil microbial research platform has been utilized in a variety of soil microbial research to maximize the impact of industrial expansion and soil microbial research. The observation of changes in soil organic matter identify the factors influencing the growth of soil microbes and soil plants be a good material is the basis for predicting the effects of climate change being considered to have a significant impact on natural food resources and tourism-related industries.

▶ Results of this study and monitor changes in soil organic matter as a systematic study of soils and soil microbial strains, fat metabolite profiling techniques useful organisms with superior physiological activity through the identification of new metabolites by soil microorganisms

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발성과의 활용계획



제1장 연구개발과제의 개요

- 토양과 토양 내 미생물의 상호작용을 기반으로 한 미생물의 분석은 토양의 상태와 변화를 추측할 수 있는 효과적인 지표로 사용될 수 있으며 이는 과거 및 미래의 식생과 기후 변화와 매우 밀접한 관련이 있음
- 때문에 본 연구에서는 지역의 지형에 따른 토양 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술을 수립하여 극지 유래 토양 속 lipid marker의 분석을 통한 PLFA 지방산 라이브러리 구축과 캐나다의 캠브리지 베이 주변 토양 미생물의 지질 대사체 분석 및 분석을 통한 지질 대사체 라이브러리를 구축을 하고자 함
- 지구 온난화와 같은 문제로 인해 미래의 기후는 현재와 다르게 변화할 것이며 생태계의 변화 또한 나타날 것으로 예상됨. 동토층의 유기물 변화의 관측은 그에 따른 영향을 예측할 수 있는 중요한 근거가 될 수 있기 때문에 미래의 식량자원이나 관광자원 관련 산업에 중요한 영향을 미칠 것으로 기대됨.
- 토양 미생물의 지질 대사체 분석 및 지방산 분석을 구축하는 것은 미래 산업에 주요한 키워드가 될 친환경 제제나 오염원들에 의한 토양 미생물 군집 변화 연구에 중요한 영향을 미칠 것임.
- 토양 미생물 연구 플랫폼의 구축을 통하여 다양한 연구에 적용함으로써 토양 미생물의 연구의 저변 확대 및 산업적 영향력을 극대화하는데 중요한 지표가 될 것임.
- 토양 미생물 분석 방법 및 해석과 관련한 종합적인 연구는 토양미생물의 군집과 활성 분석과 나아가 토양과 토양미생물의 상호작용에 대한 연구를 수행할 수 있게 하며 이를 통하여 미래의 식생과 기후에 어떠한 영향을 미치게 될 것인지에 대한 연구와 기후, 식생의 산업적, 환경적, 학문적 연구를 가능하게 함.

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 대상기술의 수준

세계적 수준

개념정립 단계	✓	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

○ 국내 수준

- 토양분야에서 매우 중요한 토양 미생물의 분석 방법 중에 인지질 지방산 방법에 대한 연구는 토양 생태계를 이루는 미생물 분석에 있어 상대적으로 간단하고, 빠르며, 민감하고, 비싸지 않으며, 재현성이 있어 효율적인 시스템이므로 널리 사용되어 왔지만 국내에서는 과학자들의 연구를 지원하는 시스템이 있는 DNA나 배양에 의한 방법에 비해 과학자들이 분석 기관들에 의뢰하는 것이 어려움.
- 실험을 위한 분석법 확립이 필요하며, 이를 위한 추출법, 분획법, 분석법, 해석법 등에 대한 종합적인 연구가 필요한 실정이며 이는 토양미생물의 군집과 활성 분석과 나아가 토양과 토양미생물의 상호작용에 대한 연구를 통하여 미래의 식생과 기후에 어떠한 영향을 미치게 될 것인지에 대한 연구와, 기후, 식생의 산업적, 환경적, 학문적 파급력이 있다고 할 수 있음.

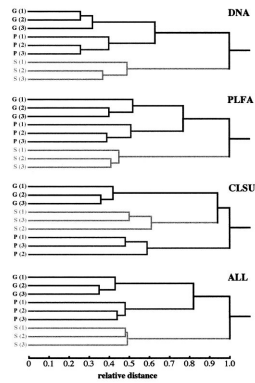
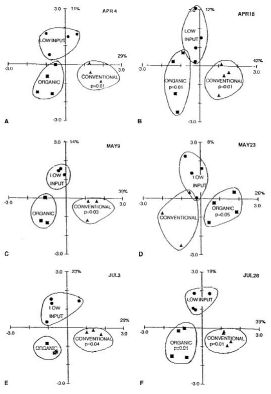
○ 국외 수준

- 지방산 중에서 특정 지방산은 특정 토양 미생물군의 지표가 될 수 있는데, 이 지표를 이용하여 각 미생물 군의 차이를 관찰하거나 모든 지방산 구성을 다변량 분석으로 미생물 군락의 차이를 확인 가능함.
- Biolog 방법은 96 well plate에 약 1000여개의 다른 대사 물질을 통하여 미생물들을 배양하여 대사 가능 여부를 지시약과 자동화된 장비를 사용하여 빠르게 분석할 수 있는 방법으로 균주의 대사 경로와 탄소원, 질소원 스크리닝에 사용되거나 영양분에 따른 군집 분석의 방법으로 활용하고 있음.
- NGS와 같은 최신 기술은 수백에서 수천 개 이상의 균주들을 한 번에 찾아낼 수 있는 기술로 토양뿐만 아니라 장내 세균 연구 등에도 널리 쓰이고 있음

○ 참여기관의 해당 연구분야 핵심기술 보유내용 및 수준

- 토양에는 미생물의 활동이 다른 환경에 비하여 매우 미미하여 토양 속 지방산을 분석하기 위해서는 효과적인 추출법이 요구됨. 지질 추출에 사용되는 Bligh&dye법을 활용하여 수율이 높은 추출 조건이 확립돼 있으며 최적의 유도제화법을 확인.
- 미생물 단위에서의 지방산 생산 관측 및 지방산 프로파일링이 가능함을 확인하였고, 미생물의 지방산 축적을 가능하게 하는 최적의 생산 조건을 확인

제2절 국내외 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황																																																																								
<p>Institute of Terrestrial Ecology (Switzerland)</p>	 <ul style="list-style-type: none"> • 토양 미생물 분석을 3가지 (DNA 기반 분석, PLFA 기반 분석, CLSU fingerprint 기반 분석)로 수행하여 비교함 	<ul style="list-style-type: none"> • 토양 미생물 분석에 있어 다양한 방법을 수행하여 비교 및 보완함으로써 방대한 data를 얻는데 활용 • 다양한 토양 미생물 분석 기반의 방법들로 획득한 data를 비교하기 위한 기술을 개발 																																																																								
<p>University of Vienna (Austria)</p>	<table border="1" data-bbox="550 840 877 996"> <thead> <tr> <th></th> <th>Control</th> <th>Girdling</th> <th>Difference G - C (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="4"><i>PLFA concentration in fine roots (µg g⁻¹ dry matter)</i></td> </tr> <tr> <td>18:1ω9</td> <td>59.02 (4.31)</td> <td>25.72 (5.80)</td> <td>-56.4</td> </tr> <tr> <td>18:2ω6,9</td> <td>303.41 (15.18)</td> <td>125.25 (37.62)</td> <td>-58.7</td> </tr> <tr> <td>18:3ω3,6,9</td> <td>130.24 (5.45)</td> <td>30.69 (12.23)</td> <td>-76.4</td> </tr> <tr> <td>18:0</td> <td>30.09 (6.80)</td> <td>17.47 (2.51)</td> <td>-41.9</td> </tr> <tr> <td>20:0</td> <td>7.64 (2.75)</td> <td>2.99 (1.52)</td> <td>-60.8</td> </tr> <tr> <td>16:0</td> <td>145.98 (19.39)</td> <td>75.56 (6.96)</td> <td>-48.2</td> </tr> <tr> <td>17:0</td> <td>6.05 (0.76)</td> <td>3.40 (1.81)</td> <td>-43.8</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" data-bbox="550 1019 877 1176"> <thead> <tr> <th></th> <th>Control</th> <th>Girdling</th> <th>Difference G - C (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="4"><i>PLFA concentration in soils (µg g⁻¹ dry soil)</i></td> </tr> <tr> <td>18:1ω9</td> <td>7.46 (1.45)</td> <td>7.15 (1.05)</td> <td>-4.1</td> </tr> <tr> <td>18:2ω6,9</td> <td>4.34 (0.44)</td> <td>1.82 (0.27)</td> <td>-58.0</td> </tr> <tr> <td>18:3ω3,6,9</td> <td>0.28 (0.06)</td> <td>0.12 (0.05)</td> <td>-56.6</td> </tr> <tr> <td>18:0</td> <td>1.82 (0.38)</td> <td>1.98 (0.31)</td> <td>+9.1</td> </tr> <tr> <td>20:0</td> <td>0.56 (0.22)</td> <td>0.81 (0.05)</td> <td>+45.3</td> </tr> <tr> <td>16:0</td> <td>7.79 (1.79)</td> <td>6.24 (1.42)</td> <td>-19.9</td> </tr> <tr> <td>17:0</td> <td>0.51 (0.06)</td> <td>0.44 (0.07)</td> <td>-12.5</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> • PLFA 지방산 분석 기반의 토양 분석을 수행하여 fungi의 다양한 PLFA marker의 상대적 정량성을 비교함 		Control	Girdling	Difference G - C (%)	<i>PLFA concentration in fine roots (µg g⁻¹ dry matter)</i>				18:1ω9	59.02 (4.31)	25.72 (5.80)	-56.4	18:2ω6,9	303.41 (15.18)	125.25 (37.62)	-58.7	18:3ω3,6,9	130.24 (5.45)	30.69 (12.23)	-76.4	18:0	30.09 (6.80)	17.47 (2.51)	-41.9	20:0	7.64 (2.75)	2.99 (1.52)	-60.8	16:0	145.98 (19.39)	75.56 (6.96)	-48.2	17:0	6.05 (0.76)	3.40 (1.81)	-43.8		Control	Girdling	Difference G - C (%)	<i>PLFA concentration in soils (µg g⁻¹ dry soil)</i>				18:1ω9	7.46 (1.45)	7.15 (1.05)	-4.1	18:2ω6,9	4.34 (0.44)	1.82 (0.27)	-58.0	18:3ω3,6,9	0.28 (0.06)	0.12 (0.05)	-56.6	18:0	1.82 (0.38)	1.98 (0.31)	+9.1	20:0	0.56 (0.22)	0.81 (0.05)	+45.3	16:0	7.79 (1.79)	6.24 (1.42)	-19.9	17:0	0.51 (0.06)	0.44 (0.07)	-12.5	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Fagus sylvatica</i> 주변 토양 속 존재하는 PLFA marker를 확인할 수 있는 분석 방법을 수행 • fungal biomarker 중 가장 많은 비중을 차지하는 PLFA 지방산을 확인
	Control	Girdling	Difference G - C (%)																																																																							
<i>PLFA concentration in fine roots (µg g⁻¹ dry matter)</i>																																																																										
18:1ω9	59.02 (4.31)	25.72 (5.80)	-56.4																																																																							
18:2ω6,9	303.41 (15.18)	125.25 (37.62)	-58.7																																																																							
18:3ω3,6,9	130.24 (5.45)	30.69 (12.23)	-76.4																																																																							
18:0	30.09 (6.80)	17.47 (2.51)	-41.9																																																																							
20:0	7.64 (2.75)	2.99 (1.52)	-60.8																																																																							
16:0	145.98 (19.39)	75.56 (6.96)	-48.2																																																																							
17:0	6.05 (0.76)	3.40 (1.81)	-43.8																																																																							
	Control	Girdling	Difference G - C (%)																																																																							
<i>PLFA concentration in soils (µg g⁻¹ dry soil)</i>																																																																										
18:1ω9	7.46 (1.45)	7.15 (1.05)	-4.1																																																																							
18:2ω6,9	4.34 (0.44)	1.82 (0.27)	-58.0																																																																							
18:3ω3,6,9	0.28 (0.06)	0.12 (0.05)	-56.6																																																																							
18:0	1.82 (0.38)	1.98 (0.31)	+9.1																																																																							
20:0	0.56 (0.22)	0.81 (0.05)	+45.3																																																																							
16:0	7.79 (1.79)	6.24 (1.42)	-19.9																																																																							
17:0	0.51 (0.06)	0.44 (0.07)	-12.5																																																																							
<p>University fo California (California)</p>	 <ul style="list-style-type: none"> • 토양 샘플을 날씨, 토양 종류에 따라 PLFA 지방산 분석을 수행 	<ul style="list-style-type: none"> • 기후와 같은 환경적인 요인과 토양 종류에 따라 PLFA 지방산 프로파일이 달라진다는 것을 확인 • PLFA 지방산 분석 방법을 기후에 따른 토양의 평가에 활용 																																																																								

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 PLFA 라이브러리 구축을 통한 극지 미생물 분포 확인

- 토양 시료로부터 효율적 지방 회수 방법 적용
 - 토양시료의 채취와 수급은 캠브리지 베이에 직접 방문하여 채취하려함.
 - 토양 시료 내 지방산 표지 인자 분석을 위한 추출 조건 최적화/지방산 및 탄소 저장 물질 분석 기술 수립을 통한 지역·환경 간 표지 인자 비교 분석

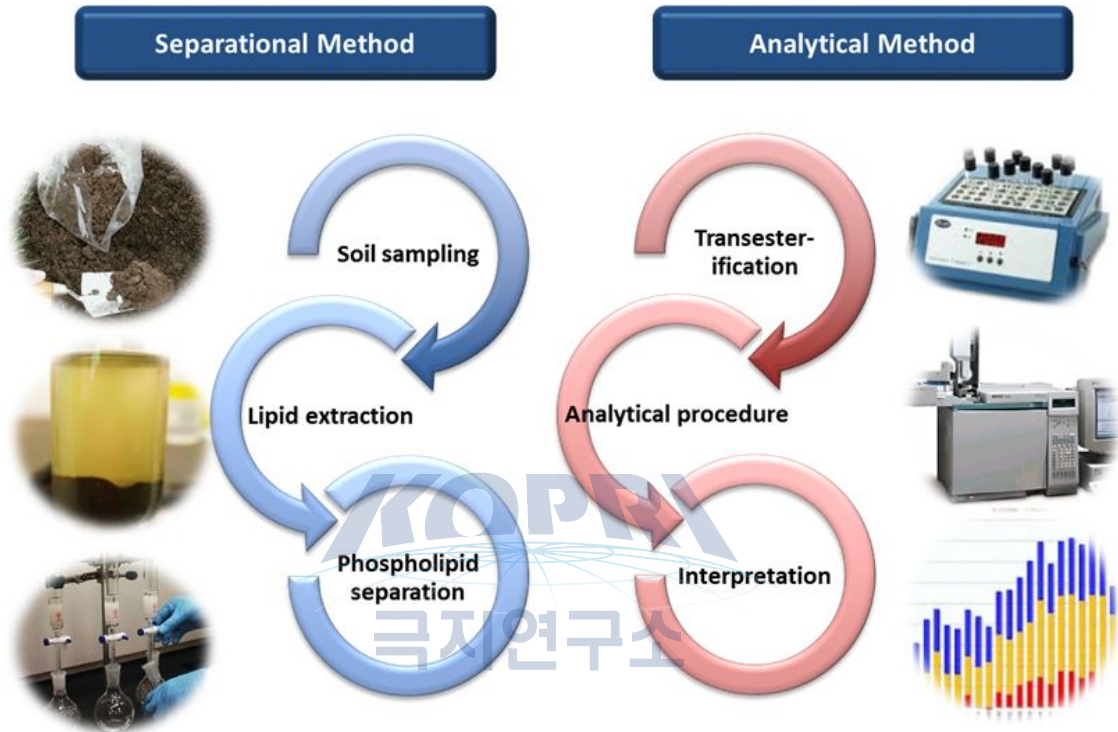


그림 3. 미생물의 막에 존재하는 인지질 분석을 통한 토양 내 미생물 군집분포 예측 work-flow

- 캠브리지 베이 토양으로부터 지질을 추출하는 방법을 최적화하고 지방산을 분석하여 표지인자 탐색
- 토양으로부터 지방산 추출법
 - ① 30 g 의 토양 시료를 채취하여 멸균된 튜브에 담고 여기에 메탄올 20 ml, 클로로폼 10 ml, phosphate buffer 10 ml을 차례로 넣은 후 밀봉한다.
 - ② 2분간 vortexing을 한 후 15분 동안 sonication을 하여 토양 내 lipid를 solvent로 용출시킨다.
 - ③ 원심분리(3000 rpm, 10분)를 행하여 유리 피펫으로 상층 액을 빨아들인 후 아래층(chloroform층)을 새 용기에 옮겨 담는다.
 - ④ 앞의 지질추출 과정을 2-4회 반복한다.
- 지질 추출법 확립 후 추출된 지질을 silicic acid 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 3가지 class(Neutral lipid, glycolipid and phospholipid)로 분리
- 분리된 지질 중 미생물 군집분포 분석에 미생물 막의 구성성분인 phospholipid를 이용함

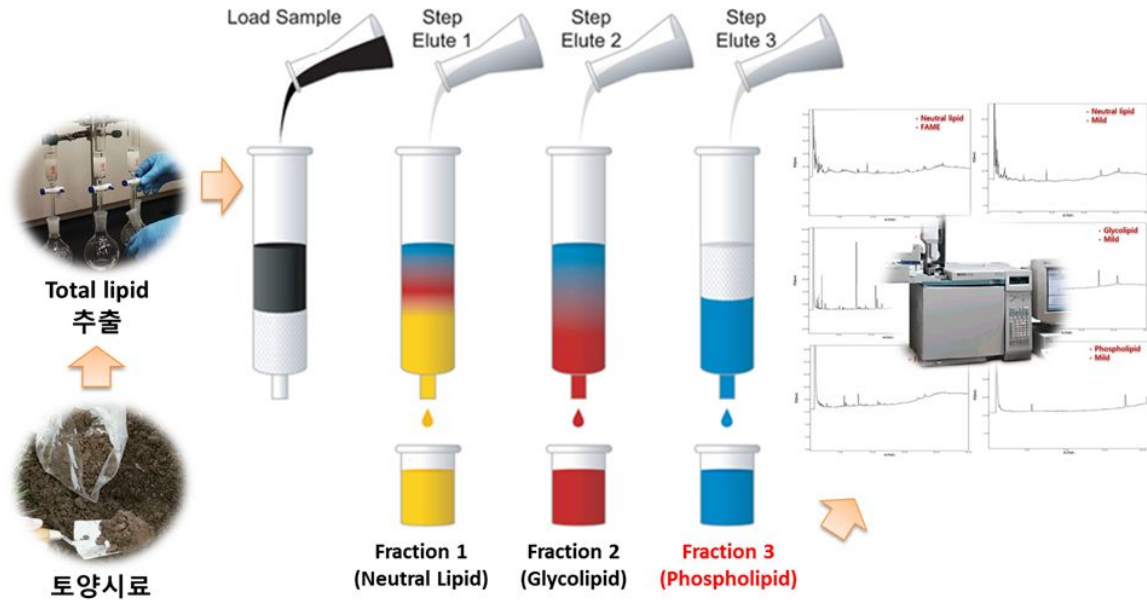


그림 4. 토양으로부터 지질을 추출하고 컬럼크로마토그래피로 지질을 분리하는 과정

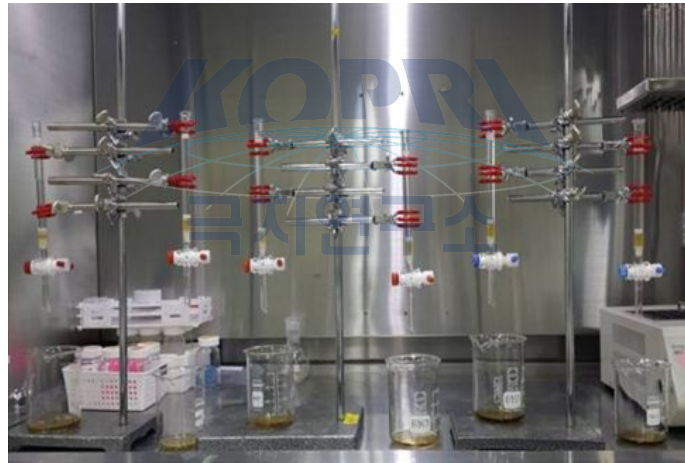


그림 5. 폼 후드 안에서 컬럼 크로마토그래피 적용 사진

- 분리된 3종의 지질 (Neutral lipid, glycolipid and phospholipid)을 strong 또는 mild derivatization 수행
- GC-FID기반의 지방산 측정을 위하여 저온(37 °C), 알칼리 조건인 mild reaction을 적용함
- 분석 method 최적화 결과
 - ◆ Minimize sample size : 30 → 10 g
 - ◆ Lipid extraction volume : 50 → 25 ml
 - ◆ Column chromatography diameter : 2 → 1.1 cm
 - ◆ 동시 분석가능한 최대 갯수 : 6 columns
 - ◆ Save process time and solvent amount
- Internal standard(IS)를 사용한 정량분석 method

- ◆ C21:0(internal standard) spiking 후 TIC에서 일치하는 RT 적분값으로 정량
- ◆ C8과 C21의 같은 농도에 대한 관계식을 구하고, C21을 1로 했을 때 해당되는 상수값을 구함
- ◆ 회수율 변환상수, FMAE-FA 변환상수를 반영함

○ PLFA 지방산 라이브러리 구축

- 토양 내 PLFA의 정성 및 정량 분석을 위하여 FAME standard(BAME mix, Supelco 47080)의 측정 및 standard calibration하여 지방산 분석법 적용
- Internal standard (C21:0, Methyl heneicosanoate)를 이용하여 GC-MS의 적분 결과로부터 PLFA를 정량하는 방법을 구축

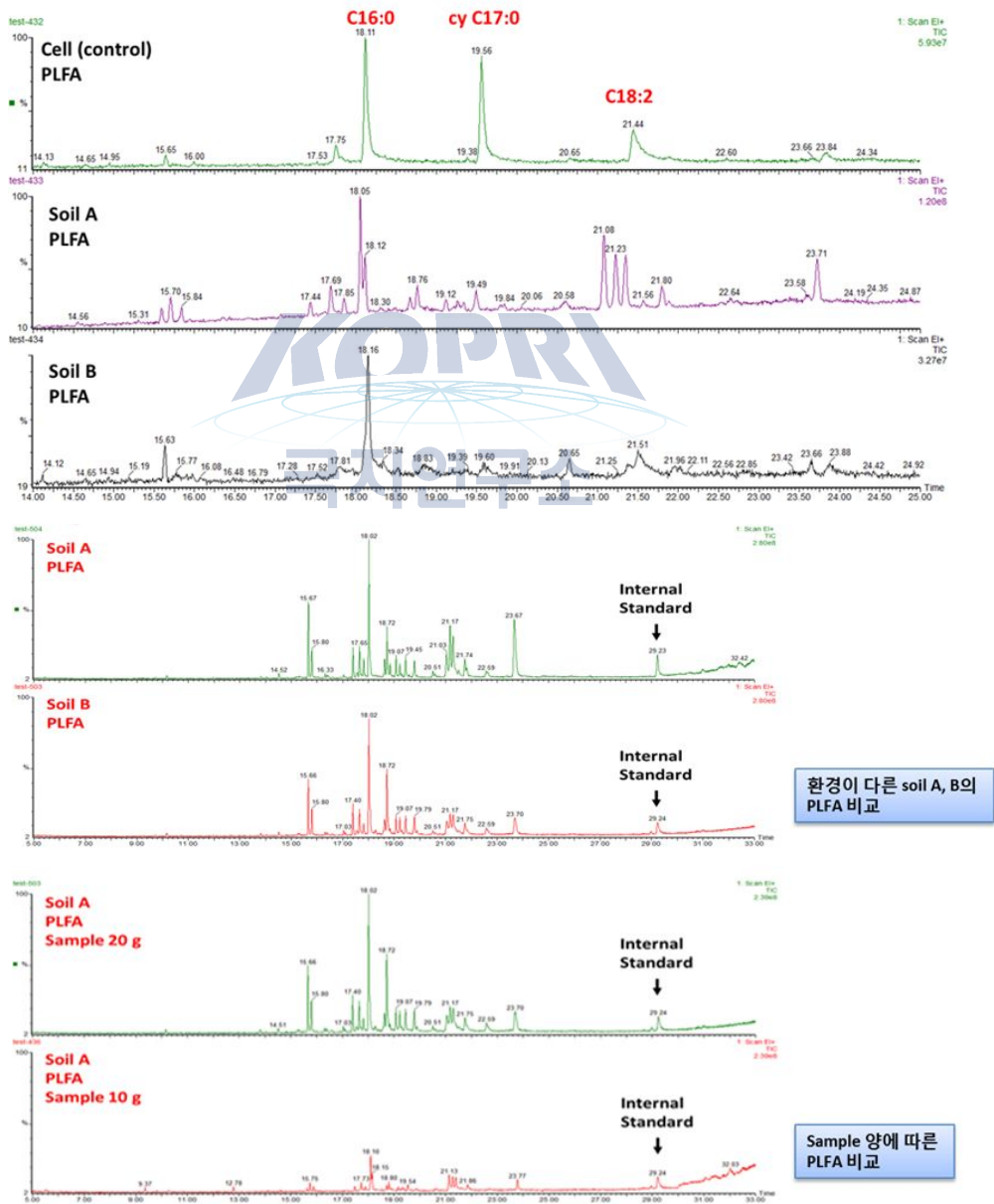


그림 6. PLFA 정성, 정량 분석을 위한 FAME standard 샘플의 농도별 준비 및 GC-MS를 이용한 분석 크로마토그램. Soil A : 일감호 주변, 풀과 나무 Soil B : 공대 앞 언덕, 숲

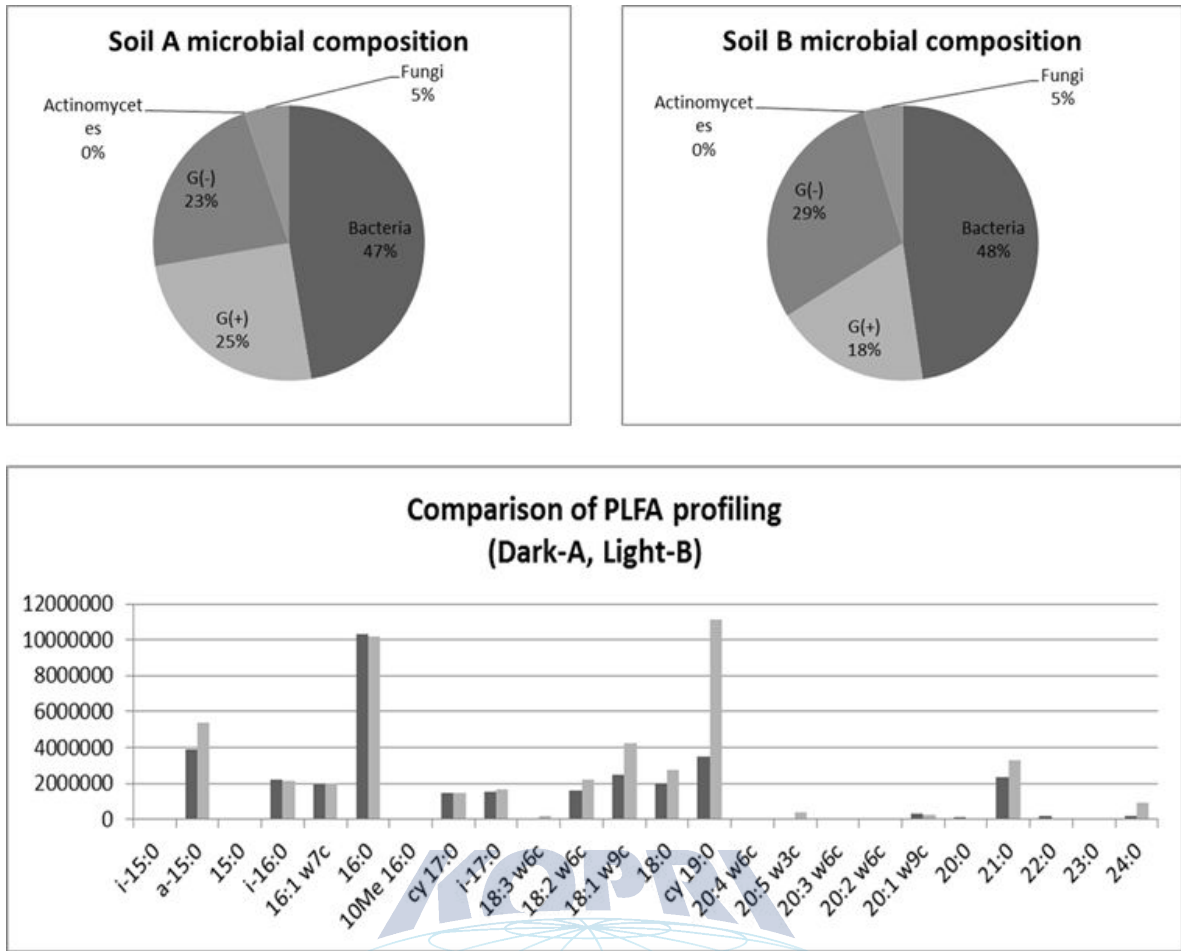


그림 7. Soil A와 B의 미생물 군집비교와 total PLFA 프로파일링

- Total bacterial PLFA는 비슷하지만 토양 A와 B의 미생물 군집 비교 결과 토양 B에서 Gram(-)균이 상대적으로 높은 비율을 차지

Microbial group	Specific PLFA markers	PLFA group
Bacteria	15:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, i18:0, cy17:0, cy19:0, 16:1w7, 17:1w9, 18:1w7	Multiple groups
Gram(+)	i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, i18:0	Branched
Gram(-)	cy17:0, cy19:0, 16:1w7, 17:1w9, 18:1w7	Cyclopropyl, mono
Fungi	18:2w6,9c, 18:3w6, 18:3w3	Polyunsaturated
Actinomycetes	10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0, i17:1w7c	10-Methyl branched
Eukaryote	16:0, 16:1w9c, 16:1w5c, 18:1w9c, 18:1w7c, 18:1w7t, 20:1, 21:0	
Methanobacter	16:1w8c, 18:1w8	
Anaerobe	14:1w7cDMA, i15:0DMA, 16:1w7cDMA, 18:0DMA, 18:2DMA, 19:0cy9,10DMA	
Protozoa	20:2w6, 20:3w6, 20:4w6	Polyunsaturated
Plants	18:1w9c, 18:1w11c, 18:3w3, 20:5w3, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0, 25:0, 26:0	Long saturated, straight

그림 8. Microbial group별 PLFA 마커분류

- 이전 연구와 문헌을 참고하여 현재까지 알려진 PLFA marker를 microbial group별로 분류하여 library 구축
- 총 25종의 PLFA 마커 분석을 통해 미생물 군집에 대한 group분포 파악

Group	Concentration (mg/kg soil)			
<i>Microbial PLFA components</i>	B1 WP organic2	B1 WP mineral	B1 NWP organic2	B1 NWP mineral
Total (mg/kg soil)	5.26	4.26	5.19	3.26
Bacteria	2.65	1.95	2.72	1.59
G+	0.34	0.35	0.34	0.24
G-	0.61	0.45	0.71	0.41
Fungi	0.00	0.00	0.00	0.00
Eukaryote	2.31	2.09	2.08	1.47
Protozoa	0.00	0.00	0.00	0.00
Actinomycete	0.30	0.23	0.38	0.20
Fungi/Bacteria	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Microbial stress indicator</i>				
Sat/Monosat	0.74	0.87	0.87	0.94
Iso/Anteiso	1.60	1.72	1.70	1.76

Group	Concentration (mg/kg soil)			
<i>Microbial PLFA components</i>	B2 NWP organic2	B2 NWP mineral	B2 NWNP organic2	B2 NWNP mineral
Total (mg/kg soil)	3.92	3.52	3.77	5.86
Bacteria	2.13	1.98	2.05	3.02
G+	0.24	0.22	0.25	0.45
G-	0.51	0.45	0.50	0.69
Fungi	0.00	0.00	0.00	0.00
Eukaryote	1.52	1.33	1.44	2.48
Protozoa	0.00	0.00	0.00	0.00
Actinomycete	0.27	0.21	0.28	0.36
Fungi/Bacteria	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Microbial stress indicator</i>				
Sat/Monosat	0.80	0.77	0.86	0.81
Iso/Anteiso	1.73	1.38	1.55	1.65

그림 8. PLFA 분석을 통해 얻은 Alaska 토양의 미생물 군집 분포도 및 스트레스 정도

- 토양에 대한 PLFA의 정량 결과를 바탕으로 미생물 군집에 대한 예측방법을 확립함
- 또한 토양미생물에 대한 스트레스영향도 지방산 분석을 통해 유추 가능. 토양 샘플에 온도 혹은 기질 농도가 달라질 때 토양미생물의 스트레스에 따라 변화하는 지방산(Sat/Monosat, Iso/Anteiso)을 추적 분석함

지방산 지표들	지표의 수치	해석
Total PLFA	높을수록	살아 있는 생물량이 높음.
Fungi/Bacteria	> 1	토양유기물 함량이 높음.
Monounsaturated/Saturated	> 1	호기성과 높은 기질 농도 조건을 가짐.
Trans/Cis-monoenoic	> 1	Toxic한 물질에 노출되었음.
cy19:0/18:1ω7c cy17:0/16:1ω7c	> 1	불량한 환경적 특성, stress와 toxicity가 증가함, 양분 결핍, 낮은 pH, 중금속 오염, 제조제, 경운, 고온 등의 환경지표.
Anteiso/Iso	> 1	저온 스트레스에 노출되었음.
Gram (+)/Gram (-)	> 1	탄소영양원이 증가하고 있음, 온도가 낮아짐.

그림 9. 지방산 지표에 따른 토양미생물 상태 해석

- 캠브리지 베이로부터 얻은 토양 샘플 2종을 분석하여 PLFA 분석을 수행하며, 모든 분석 후에는 PCA(Principle component analysis)법을 통해 데이터 해석

제2절 극지미생물 지질대사체 lipid A의 화학적 구조 규명

- 극지 토양유래 미생물의 안전성 평가기술 개발
 - 극지 토양내에 존재하는 미확인 미생물들에 대하여 안정성 평가가 필요함
 - 특히 지질대사체인 Gram(-)균에 존재하는 내독소(Endotoxin; LPS)는 동식물에 독성을 띄는 주요 인자로서 그 구조를 규명하여 극지 토양내에서 새로 발견되는 미생물들에 대한 독성평가 방법으로 적용하고자 함

Sequence ID: lc|Query_44971 Length: 840 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 820 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1343 bits(727)	0.0	790/821(96%)	2/821(0%)	Plus/Plus

Query	20	ATGCTAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGT	79
Sbjct	2	ATGCAAGTCGAGCGGTAG-AGAGGTGCTTGACCT-CTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGT	59
Query	80	AATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGC	139
Sbjct	60	AATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGC	119
Query	140	ATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGG	199
Sbjct	120	ATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGG	179
Query	200	TCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGA	259
Sbjct	180	TCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGA	239
Query	260	GAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	319
Sbjct	240	GAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	299

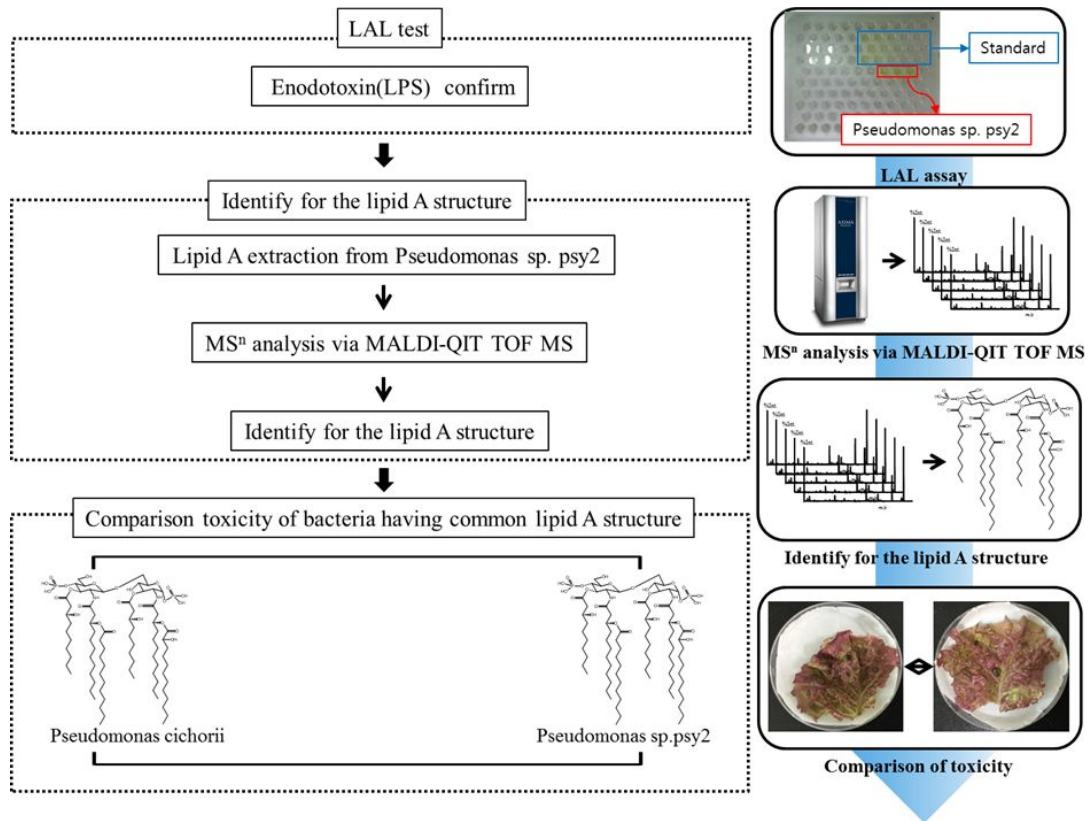


그림 10. 미확인 극지토양 유래 미생물의 내독소검출 및 안전성 평가기술 work-flow

- 극지토양샘플 상층액을 배양하여 배양된 콜로니들을 16s RNA sequencing 한 결과 pseudomonas속 과 96% 일치하는 새로운 종의 미생물을 발견
- LPS(Lipopolysaccharide) 확인을 위해 LAL(Limulus amoebocyte lysate) assay를 수행한 결과 bacteria 내에 LPS가 존재함을 확인
- LPS로부터 가수분해를 통해 Lipid A를 추출하고 MALDI-QIT TOF MS 기반의 질량분석을 수행 함
- MALDI-QIT TOF MS는 이온화 한 물질을 다중으로 반복하여 구 구조를 조각낼 수 있는 질량분석기로써 전하대비 질량 수치만으로도 본 구조 예측을 가능하게 함

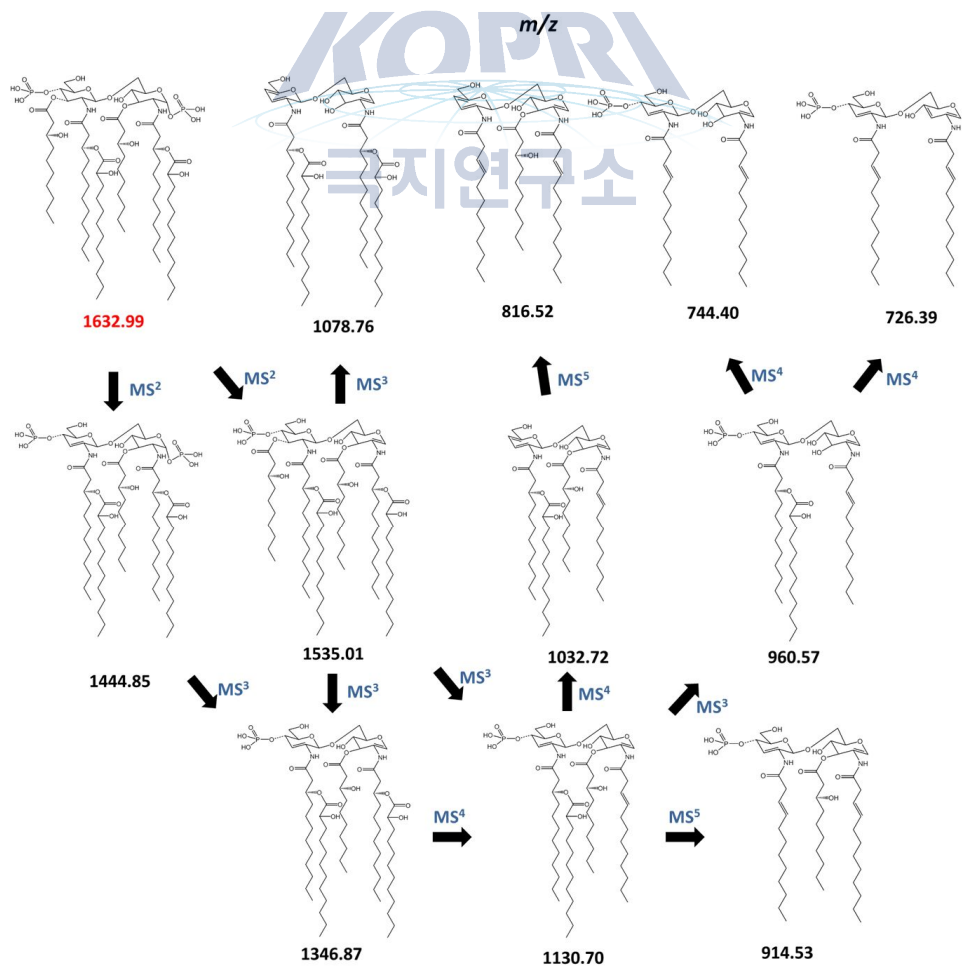
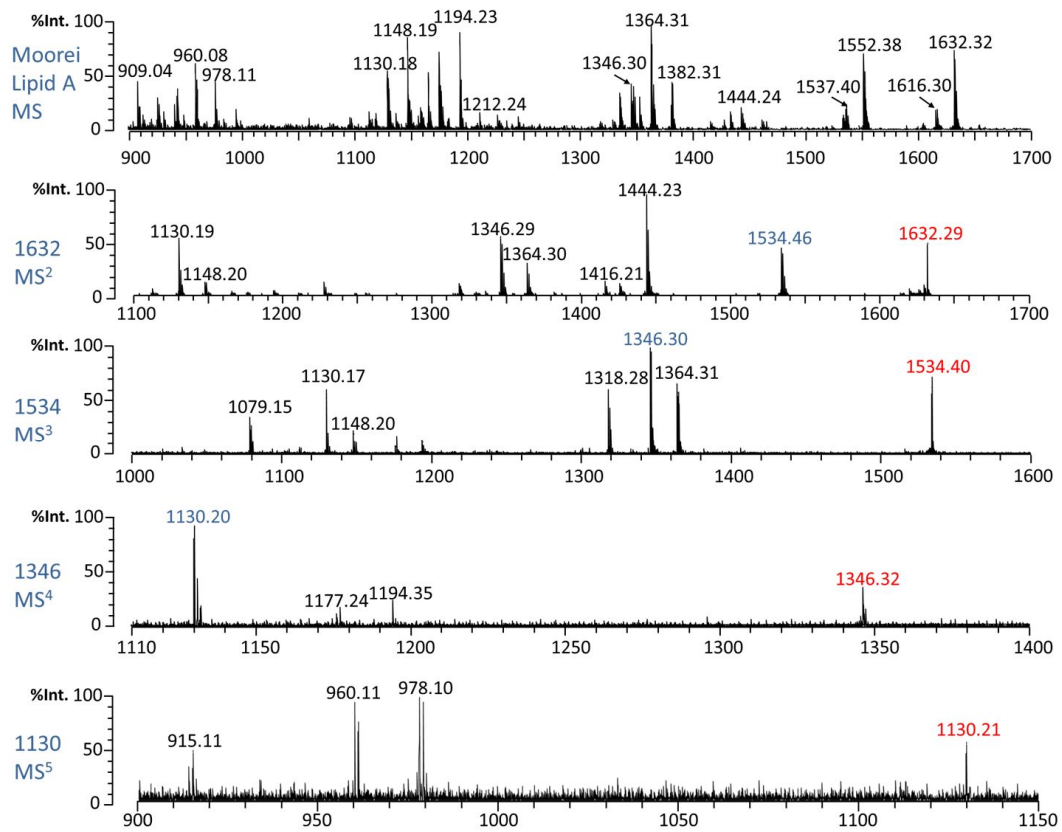
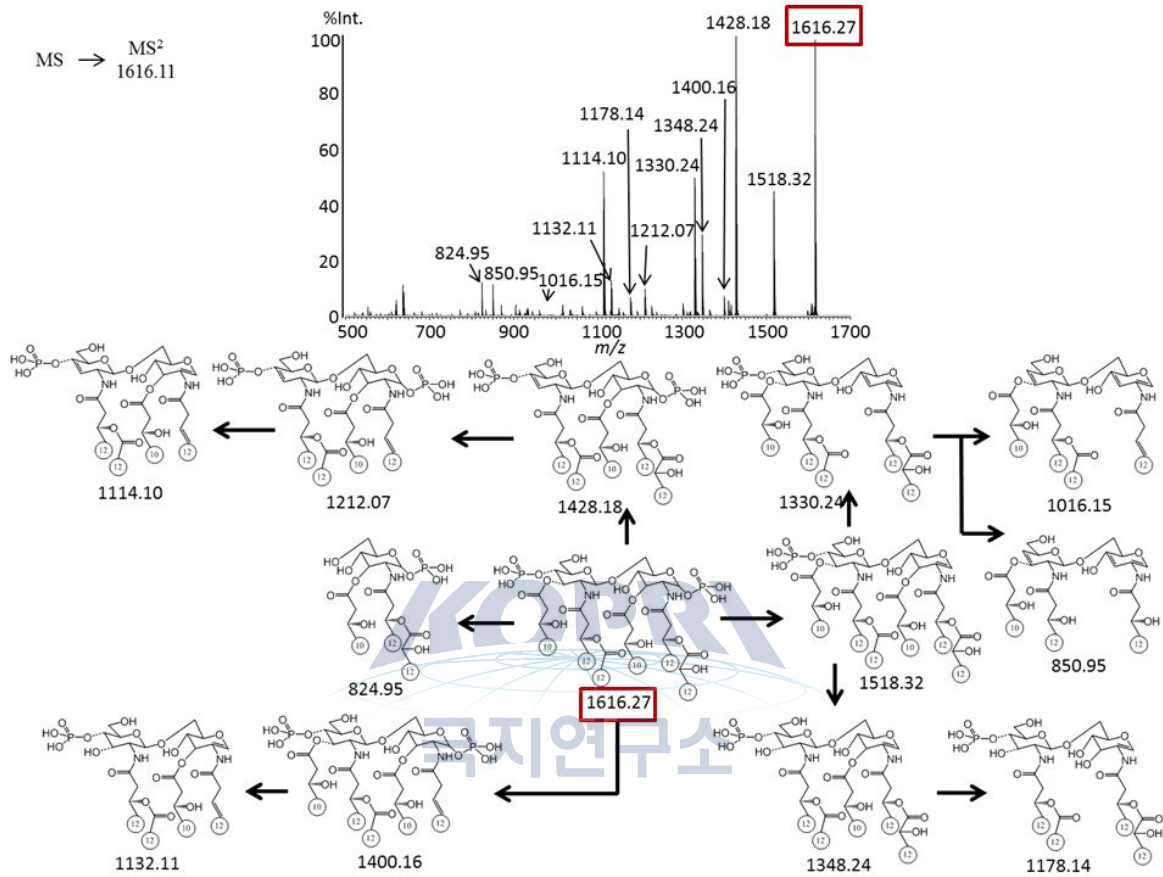
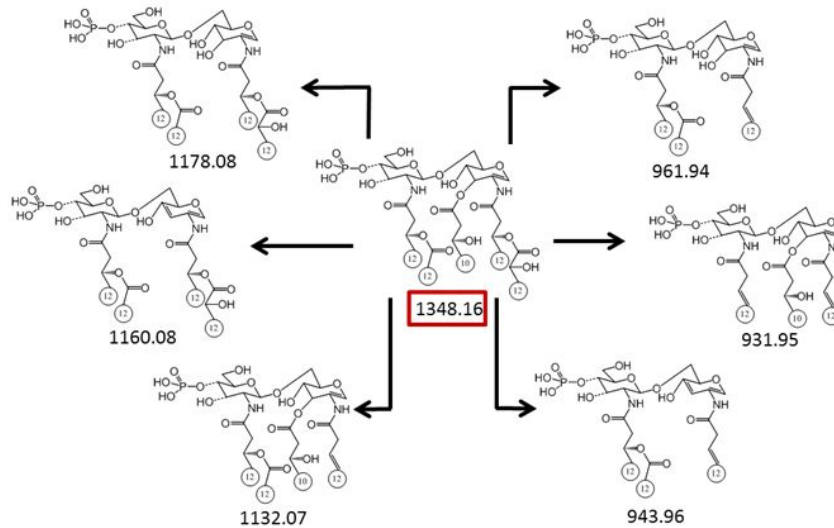
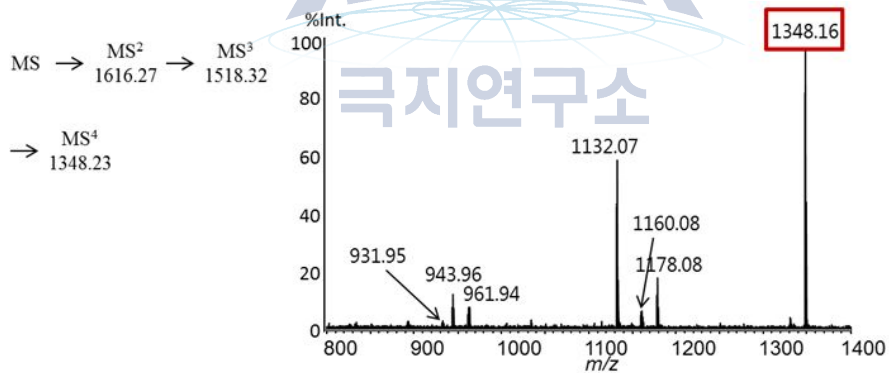
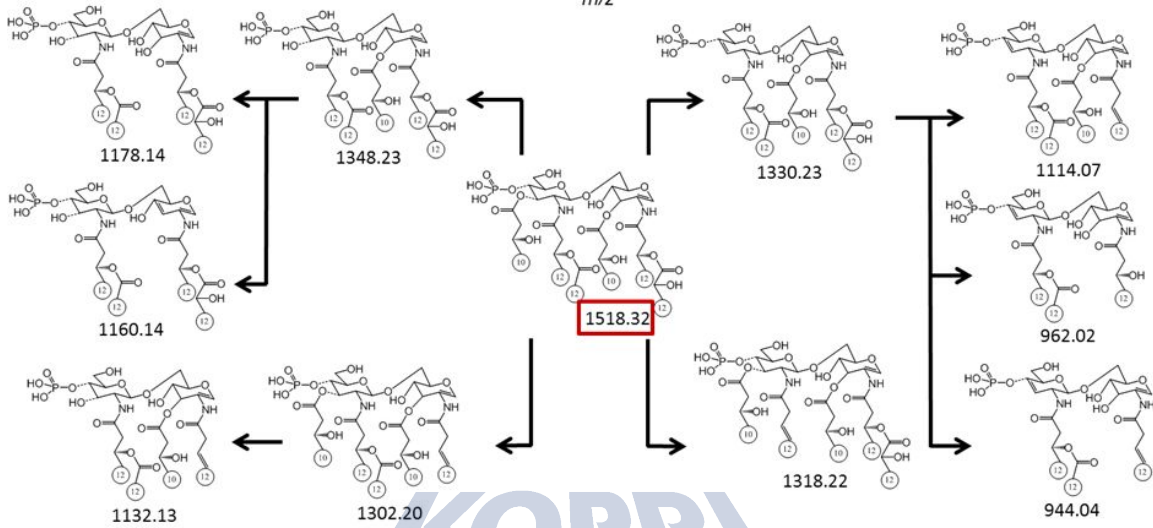
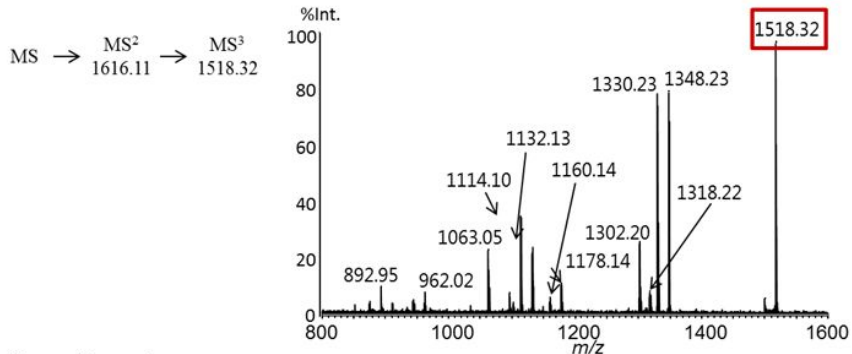


그림 11. 극지토양 유래 미생물(Pseudomonas Moorei)의 lipid A 다중 MS분석

- 극지 토양 유래 미생물중 종까지 확인된 미생물을 선별(*Pseudomonas Moorei*)
- Lipid A 분리 정제 후, 다중 MS분석을 통하여 구조 분석 진행
- 각각의 Lipid A 조각구조에 대한 질량 파악 후, MSⁿ 스펙트럼에서 관찰되는 전하대비 질량 값과 비교분석 수행





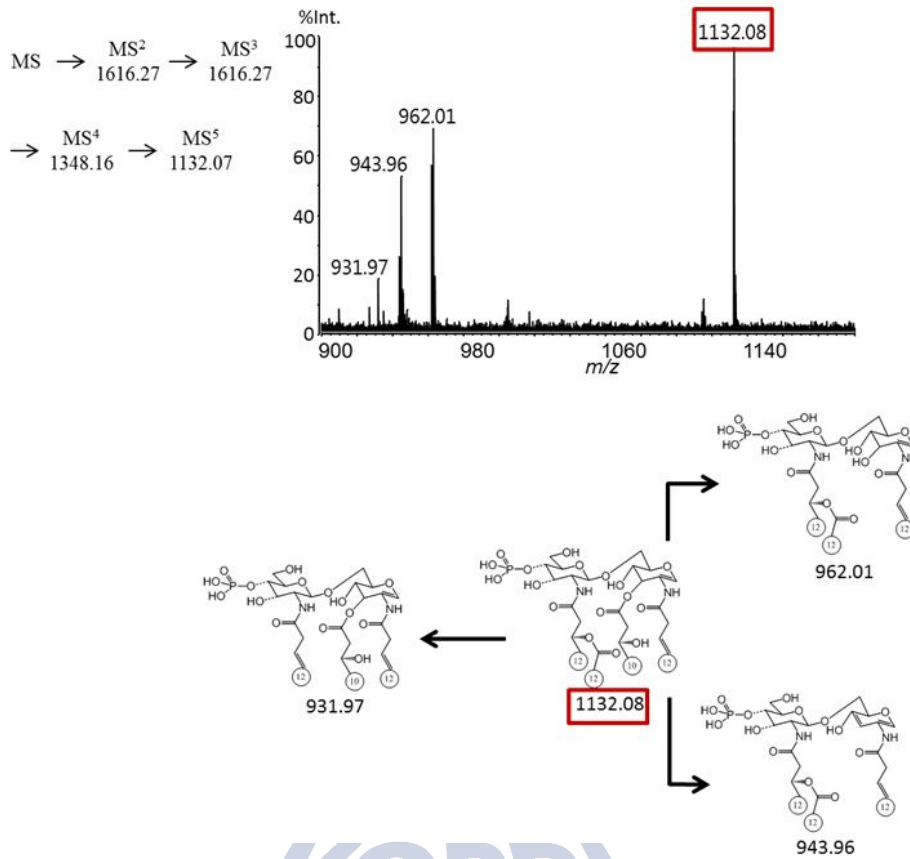


그림 12. MALDI-QIT TOF MS 기반 MSⁿ profiling을 통한 미확인 미생물(*Pseudomonas* sp. psy2) Lipid A 구조분석

- *Pseudomonas*속(sp. psy2로 명명)에 해당하는 미생물의 Lipid A 구조 분석 결과, 기존에 구조가 밝혀져 있던 *Pseudomonas cichorii*의 Lipid A와 그 구조가 같은 것으로 확인됨
- *Pseudomonas cichorii*는 세균성 잎마름 병(bacterial leaf blight)을 유발하는 병원균으로써 이파리에 암초록색 병반이 생긴 후 확대되어 소엽 전체를 시들게 함

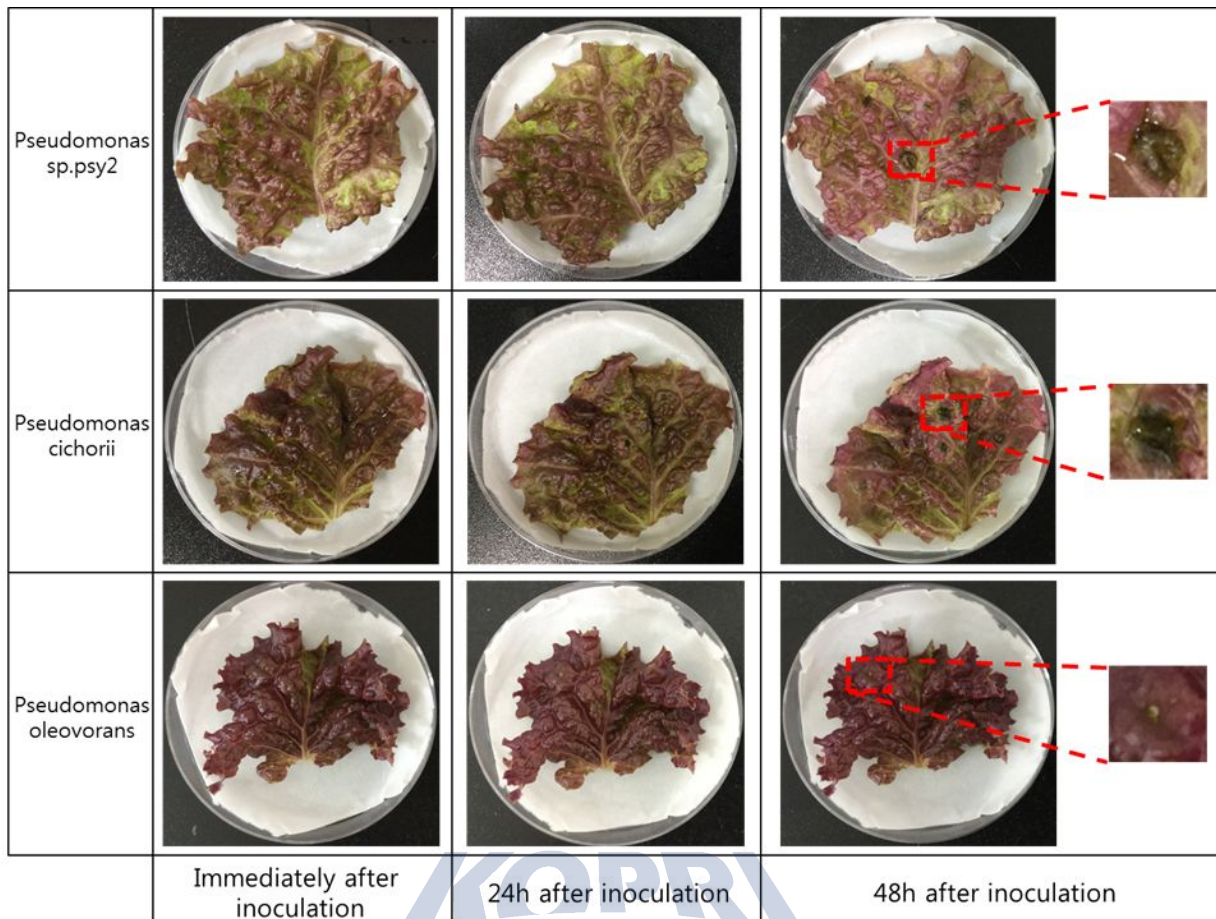


그림 13. MALDI-QIT TOF MS 기반 Lipd A 구조분석 및 안전성 평가기술의 proof of concept test

- MALDI-QIT TOF MS 기반 Lipd A 구조분석 및 안전성 평가기술 검증을 위해 실제 식물 이파리로 POC(proof of concept) test를 수행함
- 본 연구에서 분석한 Pseudomonas sp. psy2와 Pseudomonas cichorii가 똑같이 식물에 병원균으로써 작용하는지 확인하기 위해 상추와 같이 48시간 배양
- 대조균인 Pseudomonas oleovorans와 다르게 두 샘플 모두 병변이 발생함으로써 동일 독성을 확인
- 극지토양으로부터 스크리닝한 미생물의 endotoxin 구조 분석 및 육상 미생물과의 비교를 통해 미생물의 안전성 예측 모델을 개발
- 향후, 더 많은 수의 극지토양 미생물의 안전성 평가를 통해 라이브러리 구축의 필요성이 있음을 제시함

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	년도	세부연구 구목표	세부 연구개발내용 및 범위	평가목표 및 착안점	가중 치	목표 달성도
1차 년도	2015	극지 토양 lipid marker 분석	토양 시료로부터 효율적인 지방 회 수 방법 적용을 통 한 토양 극지 토양 lipid marker 분석 PLFA 지방산 라이 브러리 구축을 통 하여 미생물 군집 분석에 활용	PLFA marker 20 종 이상 분석 가능 여부	40%	캠브리지 베이 토양 샘플로부터 total lipid 추출 후 PLFA 분리 정제 방법에 대하여 최적화 연구 수행. 기존 연구와 본 연구의 PLFA 통합 라이브러리 구축. 총 25종의 PLFA 를 라이브러리 매칭을 통해 미생물 군집 분석 수행. 달성도: 100%
		토양 미생물 지질대 사 분석	토양 시료 분석법 구축 및 활용을 통 한 실제 적용 개시 캠브리지 베이 주 변 토양미생물 지 질 대사체 분석을 통한 지질 대사체 라이브러리 구축	극지 미생물 3종이상의 지 질 대사체 분 석	10%	극지 토양 내 미생물들에 대한 지질라 이브러리 구축의 선행 연구로써, 미확 인 미생물의 LPS 추출 및 Lipid A 분 리 정제 후 구조 분석을 수행. 미확인 1종(Pseudomonas sp. psy2), Pseudomonas Moorei, Pseudomonas chicoli 총 3종에 대한 구조 분석 및 독 성 평가를 실시. 달성도: 100%

제5장 연구개발성과의 활용계획

제1절 연구개발 결과의 활용방안

- 미래 지구 온난화와 같은 환경적 변화로 인해 나타날 수 있는 생태계의 변화를 예측하는데 균주의 지방 표지 인자 정보를 활용할 수 있을 것으로 예상됨.
- 지방 대사체 프로파일링 기술을 이용한 신규 토양 미생물의 대사산물 규명을 통해 뛰어난 생리활성을 가진 유용 생물 소재 확보 기술에 적극 활용될 수 있음.
- 토양 내 유기물 변화의 관측을 통한 토양과 토양 미생물 및 식물 사이의 상호적인 관계를 파악함으로써 향후 기후 변화에 따라 미생물 및 식물이 받을 수 있는 영향을 예측하는데 활용될 수 있음.
- 본 연구에서 수행된 지방산 분석법은 국내 일반토양에도 적용하여 추가적인 연구를 수행할 수 있으며 친환경 제제나 오염원들에 의한 토양 미생물 군집 변화 연구 등에도 충분히 활용될 수 있음.

제2절 기대효과

(1) 기술적 측면

- 본 연구의 연구결과는 캠브리지 베이 미생물 연구에서 동토층과 토양 미생물 균주들에 대한 체계적인 연구로 토양의 유기물 변화를 모니터링하며, 토양 미생물을 통한 저온 미생물의 기능 및 대사체 분석에 활용될 수 있음.
- 본 연구에서 발견된 지방 표지 인자나 특정 균주의 지방 표지 인자 정보는 이후 기후 온난화 정보 시에 유용한 표지 인자로 활용될 수 있으며, 이를 통한 지구 온난화로 인한 미래 생태계 변화의 예측 등에 활용될 수 있음.
- 본 연구를 통하여 주로 유전체 사업에 초점을 맞춘 국내 연구의 다각화에 기여할 수 있으며 산업적으로 중요한 균주 및 단백질의 원천으로써의 극지 연구소의 위상도 올라갈 것으로 보임.

(2) 경제적·산업적 측면

- 전술한 바와 같이 캠브리지 베이의 토양 내 미생물 연구 플랫폼의 구축은 다양한 토양 미생물 연구에 활용되어 토양 미생물 연구의 저변 확대 및 산업적 영향력을 극대화 할 것임. 그 결과로 풍부한 자원의 보고이지만 접근이 쉽지 않고 어렵게 느껴졌던 연구에 대한 인식 전환과 유전체 기반의 연구를 대사체/단백질 기반의 연구들로 다각화 할 수 있는 계기가 될 수 있을 것으로 기대함.
- 동토층의 유기물 변화의 관측은 토양 미생물의 성장에 영향을 미치는 인자를 파악할 수 있는 좋은 자료가 됨으로 미래의 기후 변화에 따른 영향을 예측할 수 있는 근거가 되어 식량자원이나 관광자원 관련 산업에 큰 영향을 미칠 것으로 사료됨.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

A MALDI-MS-based quantitative analytical method for endogenous estrone in human breast cancer cells

Received: 30 December 2015

Accepted: 30 March 2016

Published: 19 April 2016

Kyoung-Jin Kim¹, Hee-Jin Kim¹, Han-Gyu Park¹, Cheol-Hwan Hwang¹, Changmin Sung², Kyoung-Soon Jang³, Sung-Hee Park², Byung-Gee Kim², Yoo-Kyung Lee⁴, Yung-Hun Yang⁵, Jae Hyun Jeong¹ & Yun-Gon Kim¹

The level of endogenous estrone, one of the three major naturally occurring estrogens, has a significant correlation with the incidence of post-menopausal breast cancer. However, it is challenging to quantitatively monitor it owing to its low abundance. Here, we develop a robust and highly sensitive mass-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS)-based quantitative platform to identify the absolute quantities of endogenous estrones in a variety of clinical specimens. The one-step modification of endogenous estrone provided good linearity ($R^2 > 0.99$) and significantly increased the sensitivity of the platform (limit of quantitation: 11 fmol). In addition, we could identify the absolute amount of endogenous estrones in cells of the breast cancer cell line MCF-7 (34 fmol/ 10^6 cells) by using a deuterated estrone as an internal standard. Finally, by applying the MALDI-MS-based quantitative method to endogenous estrones, we successfully monitored changes in the metabolic expression level of estrones (17.7 fmol/ 10^6 letrozole-treated cells) in MCF-7 cells resulting from treatment with an aromatase inhibitor. Taken together, these results suggest that this MALDI-MS-based quantitative approach may be a general method for the targeted metabolomics of ketone-containing metabolites, which can reflect clinical conditions and pathogenic mechanisms.

Estrogens are well known as the most important and ubiquitous steroid hormones in the female body and are responsible for sexual and reproductive development¹. There are three major forms of estrogen (estrone (E1), estradiol (E2) and estriol (E3)) that occur naturally in women. Estrone (E1), which is predominantly found in postmenopausal women, is produced by the conversion of androstenedione *via* the enzyme aromatase². As a growth hormone, the level of estradiol (E2) increases during pregnancy and may have an important role in the maintenance of pregnancy³. It is more potent than estrone owing to its unique chemical structure. Finally, estriol (E3) is only significantly generated from the placenta during pregnancy⁴. The biological effects of these endogenous estrogens are not restricted to effects on reproduction, as they travel through the bloodstream and play critical roles in a variety of physiological events. For example, they are involved in adipocyte development⁵, neuroendocrine and cerebral regulation^{6,7}, immune cell function and cardiovascular function^{6,8,9}.

The levels of circulating estrogens, including estrone (E1) and estrone sulfate, are positively related to the development and growth of breast cancer in postmenopausal females^{10–13}. They participate in the proliferation and apoptosis of breast cells, increasing the likelihood of DNA mutations and carcinogenesis¹⁴. There have been several recent reports demonstrating the relationship between various estrogen metabolites and breast cancer risk^{15–18}. The irreversible hydroxylation at the C-2, -4 or -16 positions of the steroid ring causes DNA damage that can increase the risk of breast cancer *via* various genotoxic pathways^{15,17,18}. Consequently, estrone and estrone metabolites have been the main targets in studies of breast carcinogenesis and drug therapy

¹Department of Chemical Engineering, Soongsil University, Seoul 156-743, Korea. ²School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea. ³Division of Bioconvergence Analysis, Korea Basic Science Institute, Chungbuk 363-883, Korea. ⁴Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 406-840, Korea. ⁵Department of Microbial Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.H.J. (email: nfejhh@ssu.ac.kr) or Y.G.K. (email: ygkim@ssu.ac.kr)

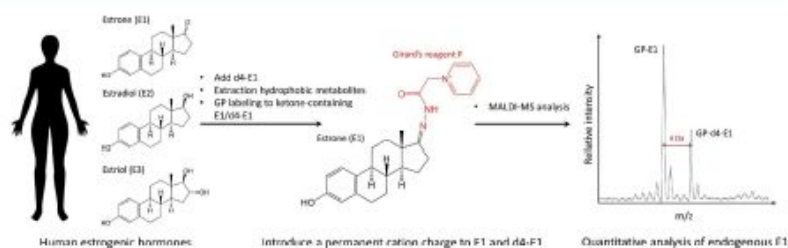


Figure 1. Schematic strategy of the MALDI-MS-based quantitative analysis of ketone-containing endogenous estrones.

mechanisms^{10–18}. To monitor cancer development and the progress of the disease, however, highly sensitive and quantitative estrone analysis tools are required.

Conventional methods for the quantitative analysis of estrone or estrone metabolites include radioimmunoassay (RIA)^{19,20} and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)^{21,22}. However, these methods require an arduous antibody production for detection. Moreover, the concentrations of the circulating free estrones in the serum and plasma are occasionally lower than the limits of detection of the antibody-based assays (51.8 fmol in ELISA²¹, 74 fmol in RIA²⁰). As a nontargeted platform, gas chromatography- or liquid chromatography-tandem mass spectrometry (GC- or LC-MS/MS)-based analytical techniques have been used to physically separate highly complexed metabolites and accurately measure the circulating estrone concentration, which is correlated with breast cancer risk^{23–28}. Tandem mass spectrometry-based methods can directly characterize the chemical structures of endogenous estrone metabolites with sufficient sensitivity, but these methods often are too complex, time-consuming and expensive for use in the clinical quantitation of low circulating estrone metabolites in postmenopausal females^{23,24,26,29–35}. More recent studies have focused on the development of chemical derivatization methods (e.g., using dansyl chloride^{24,26}, Girard's reagent P (GP)²⁵, or bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA)²⁸) for steroid hormones to enhance the sensitivity of LC-MS/MS analysis. However, they require purification processes to remove excess chemical reagents, which can reduce the sensitivity of the electrospray-based detection.

To address these problems, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS), which is an extremely sensitive and robust method that is suitable for the analysis of complex mixtures, could be a great alternative tool for the analysis of endogenous estrones^{34,35}. Here, we demonstrate a MALDI-based quantitative platform for the quantitation of endogenous estrogenic hormones in human body fluid and cells (Fig. 1). First, we introduced a permanent cationic charge onto the ketone-containing E1 to simplify the MALDI spectra due to alkali metal adducts (e.g., Li⁺, Na⁺, or K⁺). The reliability of the quantitative method was validated using synthetic ketone-containing steroid hormones (i.e., estrone and testosterone). After the chemical derivatization, there are significant improvements in the signal reproducibility and linearity ($R^2 > 0.99$) compared to the underivatized counterparts. We used deuterated estrone (d4-E1) as an internal standard to monitor the change in the absolute amount of endogenous estrones in MCF-7 cells resulting from treatment with an aromatase inhibitor.

Results and Discussion

MALDI-MS-based quantitative analysis for ketone-containing synthetic estrones. Recently, our group has reported MALDI-MS-based quantitative analysis of carbohydrates and bioactive lipids (e.g., N-acyl homoserine lactones) that have an aldehyde or ketone group^{34–36}. Previous studies have demonstrated that chemical derivatization of the target molecules could dramatically enhance the sensitivity (up to 6×10^4 times) and allow more accurate quantitative analysis using only MALDI-MS without prior sample purification³⁶. In this study, we expand the application to steroid hormones for the practical use of MALDI-MS in the quantitative analysis of targeted biomolecules. Figure 1 shows the workflow of the MALDI-MS-based quantitation of endogenous estrone. The total hydrophobic metabolites were collected *via* liquid-liquid extraction using MTBE, and the dried extracts were subsequently treated with Girard's reagent P and subjected to MALDI-MS analysis without any extra purification steps. This robust method also enabled the measurement of the absolute quantity of endogenous estrones by adding deuterated estrone (i.e., d4-estrone) into human serum and MCF-7 cell lysate. To the best of our knowledge, this is the first report of a MALDI-MS-based method for quantifying endogenous estrogenic hormones.

To demonstrate the chemical derivatization method, synthetic estrone and testosterone, sex hormones possessing one ketone group, were used. First, the unlabeled estrone (E1) was identified at 460 m/z corresponding to the estrone-matrix adduct form (i.e., $[M + CHCA + H]^+$), as previously reported (Fig. 2A). The possible mechanism of matrix (i.e., CHCA) adduct formation in MALDI spectra has been reported as π - π interactions or hydrogen bonds between the estrone and CHCA matrix^{37,38}. However, chemical derivatization with Girard's reagent P only enables the production of the $[M]^+$ ion for GP-E1 at 404 m/z without analyte-matrix adduct formation, which dramatically simplifies the MALDI profile (Fig. 2B). Moreover, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis was carried out to validate the chemical conjugation of Girard's reagent P onto the C17-ketone group of estrone. Figure 3 shows the positive ion MS/MS spectrum of the parent 404 m/z ion as GP-derivatized E1 ($[M]^+$). Among the MS/MS fragments, the appearance of a prominent a ion at 325 m/z , which contains the

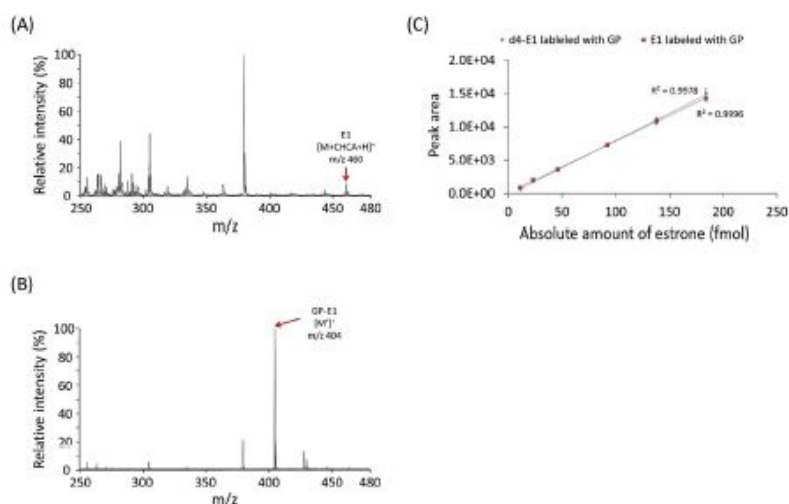


Figure 2. MALDI-MS spectra of (A) estrone (E1) and (B) GP-labeled estrone (GP-E1) with 185 pmol quantity on a MALDI spot and (C) a linear relationship between synthetic estrone quantity and peak area.

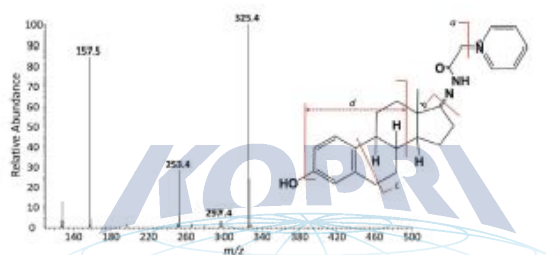


Figure 3. MS/MS profile of GP-labeled estrone: (a) m/z 325.4; (b) m/z 253.4; (c) m/z 297.4; (d) m/z 157.5.

intact estrone and a partial GP fragment, confirms the coupling of Girard's reagent P with an estrone molecule. More interestingly, the c ion at 297 m/z is structurally informative to demonstrate the position (*i.e.*, C17-ketone of estrone) of the chemical derivatization, although it is relatively weak. The results indicate that the C17-ketone of estrone is highly reactive to the hydrazide moiety of Girard's reagent P without steric hindrance. Likewise, the MALDI spectrum of synthetic testosterone shows both the protonated form at 289 m/z and the sodium adduct form at 311 m/z , while the two peaks were replaced with just one peak at m/z 422 after chemical derivatization with GP (Fig. S1). The GP-labeled estrone and testosterone showed improved signal resolution and signal-to-noise ratio (SNR) (up to 17 times) in the mass spectra compared to their unlabeled counterparts. Thus, our straightforward method enables a remarkable improvement in the quality of MALDI spectra for ketone-containing hormones and facilitates a more rapid and high-throughput analysis using a simple MALDI-MS instrument.

Validation of the estrone detection method on estrone-spiked serum. To validate the quantitative linearity, accuracy and reproducibility of the MALDI-MS-based method, different concentrations of GP-E1 and GP-d4-E1 were examined. Figure 2C shows the quantitative correlation between the absolute amounts of the standards and the MALDI peak area. The standard calibration curves of both GP-estrone and GP-d4-estrone present good linearity ($R^2 > 0.99$) in accordance with their absolute quantities. In addition, the MALDI peak intensities of GP-d4-E1 were precisely equivalent to those of GP-E1, which means that GP-d4-E1 is applicable for the absolute quantitation of GP-E1.

To verify that we can detect and quantify estrone and d4-estrone in complex media such as human serum and cell lysates, synthetic estrone and d4-estrone were spiked into human serum in various molar ratios (E1:d4-E1 = 1:1, 1:0.5, 1:0.2). After the MTBE extraction and subsequent GP labeling process, good quantitative recovery was observed without any purification process (Figs 4 and S2). Major peaks with a +4 Da difference in mass were clearly detected, as we intended. At the equivalent spiking (1:1) condition, the relative peak intensities were identical. In the more diluted ratios (1:0.5, 1:0.2), the peak intensities accurately reflected their theoretical molar ratios as well. In addition, we could determine the limit of quantitation (LOQ) of GP-estrone with

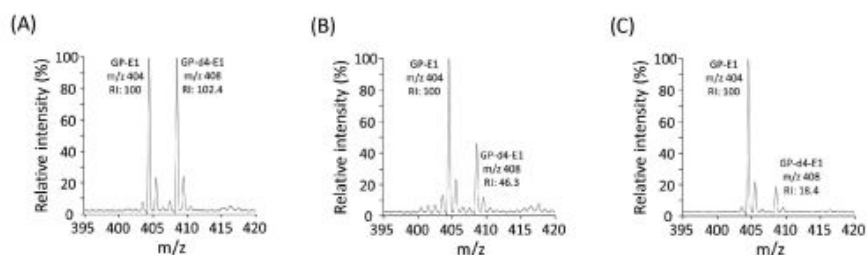


Figure 4. Relative quantitative analysis of estrone (E1) with different molar ratios of deuterated estrone (d4-E1) spiked in human normal sera. The molar ratios of E1 to d4-E1 were (A) 1:1, (B) 1:0.5, and (C) 1:0.2.

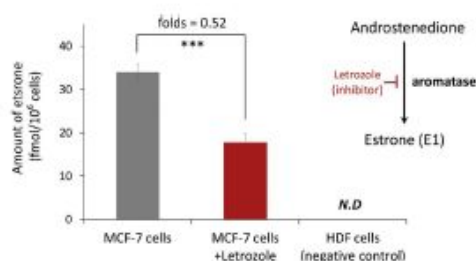


Figure 5. Bar graphs showing the decrease in endogenous estrone level in MCF-7 cells in response to the letrozole treatment. The intensities of GP-E1 from natural and letrozole-treated MCF-7 cells (each 10^6 cells) correspond to 34 fmol and 17.7 fmol of estrone, respectively (***) P value < 0.001; P values were derived from the two-tailed Student's t test, $n = 3$; different MCF-7 cells/letrozole-treated MCF-7 cells. Error bars show SEM.).

the MALDI-MS-based quantitative method (Fig. S3). The GP derivatization significantly improved the LOQ of underivatized estrone (1.6×10^4 -fold, from 185 pmol to 11 fmol on the MALDI plate). Moreover, the GP-estrone spiked in human serum could be assayed at the femtomole level by MALDI-MS. According to the sensitivity of the MALDI-MS-based estrone quantitation, the endogenous estrones are sufficiently detectable. Taken together, these results demonstrate that the GP derivatization method remarkably improves the sensitivity and reproducibility of the endogenous estrones and provides reliable results in MALDI-MS-based estrone quantitation.

Quantitation of endogenous estrone levels in MCF-7 cells. Our MALDI-MS-based method was used to quantify endogenous estrone in cultured MCF-7 cells, a breast cancer cell line. After the lysis of the cells, d4-estrone were spiked for absolute quantitation of the endogenous estrones. The extracted estrones were labeled with GP and subsequently analyzed using our MALDI-MS-based method. Based on the peak intensity of d4-estrone (44 fmol), the amount of endogenous estrone was determined to be 34 fmol in 10^6 MCF-7 cells (Figs 5, S4 and S5), which is comparable to a previous report (29 fmol estrone) and is physiologically realistic^{39,40}. In addition, we would like to monitor changes in the levels of endogenous estrones. Letrozole has been effectively used as a medical therapy for hormonally responsive breast cancers because it can inhibit aromatase activity and thereby regulate endogenous estrone levels. The inhibitor was added to the cell culture, and then the cells were collected to quantify the endogenous estrone. As we expected, letrozole significantly decreased the absolute amount of estrone in the MCF-7 cells (Figs 5 and S5). An MTT assay was used to investigate the cytotoxic effects of letrozole on MCF-7 cells. As shown in Fig. S6A, no significant changes in the viability of cells were observed following treatment with less than 20 μ M of letrozole. Treatment with 20 μ M of letrozole for 48 h also does not affect the monolayered morphology of the cells (Fig. S6). Therefore, this treatment condition (*i.e.*, 20 μ M of letrozole for 48 h) was used in following investigations. This result demonstrates that the MALDI-MS-based estrone quantitation method may be applicable for diagnosing and monitoring hormone-related diseases, such as breast cancers.

Conclusion

In conclusion, we developed a highly sensitive and reliable MALDI-MS-based endogenous estrone quantitation method. To amplify the MALDI signals of estrone, Girard's reagent P was used to label ketone-containing estrones to provide them with a permanent singly positive charge. Compared with previous approaches, the MALDI-MS-based estrone quantitation method offers several advantages. First, the method can rapidly and robustly quantify estrones from human serum or cell lysates without any need for additional chromatographic purification. Second, the use of deuterated estrone enables the quantification of the absolute amount of endogenous estrones. Third, the highly sensitive quantitation of estrones can be achieved at femtomole levels. Finally, the method can be applied to disease diagnosis or monitoring in the clinical setting. It is believed that the

MALDI-MS-based quantitation method may contribute to targeted metabolite or hormone analysis of human specimens such as blood, urine, cells or tissues, which are directly related to various disease phenotypes.

Materials and Methods

Chemicals and Materials. Estrone, methyl tert-butyl ether (MTBE), α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), dimethyl sulfoxide (DMSO) and letrozole were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol and acetic acid were obtained from Junsei Chemical (Tokyo, Japan). Girard's reagent P (GP) was obtained from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). Estrone-2,4,16,16-d4 was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). ReadyPrep proteomic-grade water was obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium, a phosphate-buffered saline (PBS) buffer, Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) and penicillin-streptomycin (Pen-Strep) were purchased from Gibco (Grand Island, NY). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Human normal sera were kindly provided by Prof. Jun Kyu Lee (Dongguk University Ilsan Hospital, Korea). The blood specimens are samples that were discarded under approved institutional review board protocols.

Analysis of estrone and testosterone. First, 4 nmol of estrone and 0.04 nmol of testosterone in 99% methanol/1% acetic acid was prepared and reacted with Girard's reagent P (GP) for 4 hr at room temperature (RT). Then, the mixture was analyzed using MALDI-TOF MS. The steps are described in detail below.

Sample preparation and estrone extraction. Various concentrations of estrone (1, 10, 100 pmol, 1 nmol) were treated in 20 μ L of human serum and subsequently mixed with 180 μ L of PBS buffer. The extraction of estrone from the serum was performed as described previously. Briefly, 200 μ L each of the serum sample and MCF-7 (10^6 cells) lysate were mixed with 1.5 mL of MTBE for liquid-liquid extraction. After vortex-mixing for 10 min, the sample was incubated on ice for 20 min. The upper (organic) phase was collected and then dried under a stream of nitrogen gas. For the absolute quantification of endogenous estrones, 4.4 pmol (1.21 ng) of d4-estrone was added to the MCF-7 cell lysates prior to extraction.

Girard's reagent P (GP) derivatization. Dried extracts including estrone and/or d4-estrone were dissolved in 10 μ L of 99% methanol/1% acetic acid. The solution was mixed with 100 μ L of GP solution (5 mM in 99% methanol/1% acetic acid) and then incubated at RT for 4 hr. After incubation, the reactants were dried under vacuum without any additional clean-up steps.

MALDI-MS analysis. The dried GP-conjugates were dissolved in 10 μ L of 50% aqueous methanol. One microliter of the GP-estrone conjugates was mixed with 1 μ L of CHCA matrix solution (10 mg/mL in 70% [v/v] acetonitrile/30% water). The mixture (1 μ L) was spotted on a stainless steel MALDI plate, and the plate was dried at RT. Quantitative detection of estrone was performed on a Microflex LRF MALDI-TOF mass spectrometer in reflectron mode (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). MALDI spectra were obtained by scanning a total of 1000 shots from 5 different spots in positive ion mode. The operating conditions were as follows: accelerating voltage = 20 kV, laser frequency = 60 Hz, ion source 1 voltage = 19 kV, ion source 2 voltage = 16 kV, lens voltage = 9.8 kV, detector gain = 5.8 and laser power = 25–35%. The intensity of each ion was obtained by summing from the first to the third isotopic peak areas. Spectral acquisition and processing were performed with FlexAnalysis software (ver. 3.3, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Cell assays. ER-positive human breast adenocarcinoma cell lines (MCF-7, Korean Cell Line Bank) with a passage number lower than three were used in this study. The MCF-7 cells were cultured in a Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640, Gibco) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, American Type Culture Collection, [ATCC]) and 1% (v/v) penicillin-streptomycin (P/S, Gibco). In parallel, human dermal fibroblasts (HDFs, ATCC) were cultured in a M106 medium supplemented with 2% (v/v) low serum growth supplement (Life Technologies) and 1% (v/v) P/S as a control cell line. The cells were cultured as monolayers at 37 °C in a 5% CO₂ and 95% relative humidity environment. The medium was exchanged for a fresh medium every 3 days. The cells were treated for 48 hr with 20 μ M of letrozole in FBS-free medium. The treated cells were collected using 0.25% trypsin and 0.04% EDTA in HBSS (Gibco) and lysed in 1 \times PBS prior to quantification of the estrone (E1) levels.

MTT cell viability assay. The cytotoxic effects of letrozole on MCF-7 cells were quantitatively evaluated using an MTT cell proliferation assay kit (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Invitrogen). The cells were treated with various concentrations of letrozole (up to 100 μ M) for 24 hr and 48 hr. Solvent controls were conducted simultaneously using dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich), with appropriate concentrations corresponding to each treatment. MTT reagent was added, and the cells were incubated for 4 hr. The absorbance of the sample altered with the positively stained metabolically active viable cells was subsequently measured at 570 nm using a microplate spectrophotometer (Multiskan Go., Thermo Scientific). The absorbance was normalized to that measured with untreated cells to quantify the relative cellular metabolic activity.

LC-MS/MS analysis. To verify the conjugation of GP to estrone, tandem MS analysis was performed using an LCQ Deca XP ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) equipped with an Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The analysis parameters were as follows: positive-ion mode, spray voltage of 5 kV, nitrogen sheath gas at a flow rate of 20 arbitrary units, and a heated capillary of 200 °C. 10 μ L of the sample was injected and loaded into a Thermo 20 \times 2.1 mm guard column at a flow rate of 8 μ L/min in 50% ACN containing 0.1% formic acid. The tandem mass analysis of the GP-labeled estrone was performed manually, inducing a collision energy from 20 to 45 eV. The maximum ion collection time was set to 50 ms, and a 3 Da isolation width was used. All LC/MS data were processed by Xcalibur software (Thermo Electron, San Jose, CA).

References

- Nelson, I. R. & Bulun, S. E. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* **45**, S116–124 (2001).
- Bulun, S. E. *et al.* Estrogen production and metabolism in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* **955**, 75–85; discussion 86–78, 396–406 (2002).
- Loriaux, D. L., Ruder, H. J., Knab, D. R. & Lipsett, M. B. Estrone sulfate, estrone, estradiol and estriol plasma levels in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* **35**, 887–891 (1972).
- Taylor, E. S., Bruns, P. D. & Droese, V. E. Estriol in Pregnancy. *Obstet Gynecol* **25**, 177–182 (1965).
- Cooke, P. S. & Naaz, A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**, 1127–1135 (2004).
- Prossnitz, E. R. & Barton, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 715–726 (2011).
- Naftolin, F. *et al.* The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res* **31**, 295–319 (1975).
- Cutolo, M., Sulli, A., Serriolo, B., Accardo, S. & Masti, A. T. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* **13**, 217–226 (1995).
- Villa, A., Rizzzi, N., Vegeto, E., Clana, P. & Maggi, A. Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. *Sci Rep* **5**, 15224 (2015).
- Key, T. J. *et al.* Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1218–1226 (2003).
- Miyoshi, Y., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y. & Noguchi, S. Association of serum estrone levels with estrogen receptor-positive breast cancer risk in postmenopausal Japanese women. *Clin Cancer Res* **9**, 2229–2233 (2003).
- Twohoger, S. S., Rosner, B. A., Willett, W. C. & Hankinson, S. E. The combined influence of multiple sex and growth hormones on risk of postmenopausal breast cancer: a nested case-control study. *Breast Cancer Res* **13**, R99 (2011).
- Adam, H. O., Johansson, E. D., Vegelius, J. & Victor, A. Serum concentrations of estrone, androstenedione, testosterone and sex-hormone-binding globulin in postmenopausal women with breast cancer and in age-matched controls. *Ups J Med Sci* **84**, 259–274 (1979).
- Platel, N., Cathiard, A. M., Glezes, M. & Garcia, M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* **51**, 55–67 (2004).
- Fishman, J., Schneider, J., Hershcopf, R. J. & Bradlow, H. L. Increased estrogen-16 alpha-hydroxylase activity in women with breast and endometrial cancer. *J Steroid Biochem* **20**, 1077–1081 (1984).
- Kabat, G. C. *et al.* Urinary estrogen metabolites and breast cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**, 505–509 (1997).
- Im, A. *et al.* Urinary estrogen metabolites in women at high risk for breast cancer. *Carcinogenesis* **30**, 1532–1535 (2009).
- Bradlow, H. L., Davis, D. L., Lin, G., Sepkovic, D. & Tiwari, R. Effects of pesticides on the ratio of 16 alpha/2-hydroxyestrone: a biologic marker of breast cancer risk. *Environ Health Perspect* **103**, Suppl 7, 147–150 (1995).
- Lipton, A. *et al.* Letrozole (CGS 20267). A phase I study of a new potent oral aromatase inhibitor of breast cancer. *Cancer* **75**, 2132–2138 (1995).
- Wu, C. H. & Lundy, L. E. Radioimmunoassay of plasma estrogens. *Steroids* **18**, 91–111 (1971).
- Zhulan Li, S. W., N. Alice Lee, Robin D. Allan, Ivan & R. Kennedy. Development of a solid-phase extraction—enzyme-linked immunosorbent assay method for the determination of estrone in water. *Analytica Chimica Acta* **503**, 171–177 (2004).
- Ismail, A. M. *et al.* Extra virgin olive oil potentiates the effects of aromatase inhibitors via glutathione depletion in estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells. *Food Chem Toxicol* **62**, 817–824 (2013).
- Fredline, V. F., Taylor, P. J., Dodds, H. M. & Johnson, A. G. A reference method for the analysis of aldosterone in blood by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **252**, 308–313 (1997).
- Kushnir, M. M. *et al.* High-sensitivity tandem mass spectrometry assay for serum estrone and estradiol. *Am J Clin Pathol* **129**, 530–539 (2008).
- Rangiah, K., Shah, S. J., Vachani, A., Ciccimaro, E. & Blair, I. A. Liquid chromatography/mass spectrometry of pre-ionized Girard P derivatives for quantifying estrone and its metabolites in serum from postmenopausal women. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25**, 1297–1307 (2011).
- Xu, X. *et al.* Quantitative measurement of endogenous estrogens and estrogen metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **79**, 7813–7821 (2007).
- Falk, R. T. *et al.* Relationship of serum estrogens and estrogen metabolites to postmenopausal breast cancer risk: a nested case-control study. *Breast Cancer Res* **15**, R34 (2013).
- Diaz-Cruz, M. S., Lopez de Alda, M. J., Lopez, R. & Barcelo, D. Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *J Mass Spectrom* **38**, 917–923 (2003).
- Fiers, T. *et al.* Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* **893–894**, 57–62 (2012).
- Riley, C. P., Mathieu, R. E., Jr. & Wiley, C. Simultaneous Quantitation of Estradiol and Estrone in Serum Using Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol* **1378**, 87–97 (2016).
- Nilsson, M. E. *et al.* Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Endocrinology* **156**, 2492–2502 (2015).
- Hansen, M. *et al.* Determination of steroid hormones in blood by GC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* **400**, 3409–3417 (2011).
- Hsing, A. W. *et al.* Reproducibility of serum sex steroid assays in men by RIA and mass spectrometry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 1004–1008 (2007).
- Kim, K. J. *et al.* A MALDI-MS-based quantitative targeted glycomics (MALDI-QTAG) for total N-glycan analysis. *Biotechnol Lett* **37**, 2019–2025 (2015).
- Kim, K. J. *et al.* Stable isotopic labeling-based quantitative targeted glycomics (1-QTAG). *Biotechnol Prog* **31**, 840–848 (2015).
- Kim, Y. W. *et al.* MALDI-MS-based quantitative analysis for ketone containing homoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Chem* **87**, 858–863 (2015).
- Moon, J. Y., Kim, S. J., Moon, M. H., Chung, B. C. & Choi, M. H. Differential estimation of isomeric 2- and 4-methoxylated estrogens in serum by matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry. *Anal Sci* **29**, 345–351 (2013).
- Schafer, A. I., Akanyeti, I. & Semiao, A. J. Micropollutant sorption to membrane polymers: a review of mechanisms for estrogens. *Adv Colloid Interface Sci* **164**, 100–117 (2011).
- Xu, X. & Veenstra, T. D. Concentration of endogenous estrogens and estrogen metabolites in the NCI-60 human tumor cell lines. *Genome Med* **4**, 31 (2012).
- Geisler, J. *et al.* Letrozole is superior to anastrozole in suppressing breast cancer tissue and plasma estrogen levels. *Clin Cancer Res* **14**, 6330–6335 (2008).

Acknowledgements

This work was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF-2013R1A1A1004998, NRF-2015M1A5A1037196, NRF-2015R1A2A2A04006014, NRF-2015M1A5A1046168, NFR-2015R1C1A1A01053048).

Author Contributions


K.J.K., H.J.K., H.K.P., C.H.H. and C.S. were involved in the design and execution of the experiments. K.S.J., S.H.P., B.G.K., Y.K.L., Y.H.Y., J.H.J. and Y.G.K. were involved in the research design, data interpretation and supervision of the studies. All authors contributed to the writing of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Kim, K.-J. *et al.* A MALDI-MS-based quantitative analytical method for endogenous estrone in human breast cancer cells. *Sci. Rep.* **6**, 24489; doi: 10.1038/srep24489 (2016).

 This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.