(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0064994
(43) 공개일자 2011년06월15일

(51) Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0121807
(22) 출원일자 2009년12월09일
심사청구일자 2009년12월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
설동근
서울특별시 중구 신당4동 동아약수하이츠아파트 111-106
(74) 대리인
특허법인다나

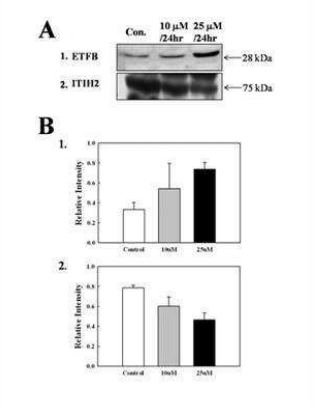
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 환경 유해물질 프탈레이트류 노출 여부 확인용 단백체 생체지표

(57) 요 약

본 발명은 환경 유해물질 프탈레이트류 노출 여부 확인용 단백체 생체지표에 관한 것으로, 벤질부틸 프탈레이트에 노출된 간세포, 또는 혈액 등에서 프로테옴 분석을 통해 특이적으로 단백질 발현이 증가 또는 감소하는 단백체 생체지표를 발굴하여 프탈레이트류 노출의 정량적 평가뿐만 아니라 프탈레이트류 노출로 인한 질병 발생을 예방 또는 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2008-09001-0075-0
부처명 환경부
연구관리전문기관
연구사업명 차세대핵심기술개발사업
연구과제명 환경유해물질 프탈레이트류에 대한 특이 단백체 생체지표 발굴 및 현장 랩언어칩 탐지키트개발
기여율
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2009년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

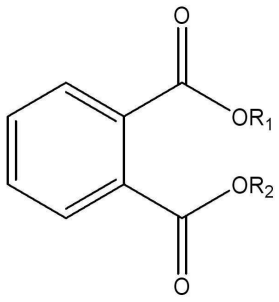
ETFB(Isoform 1 of electron transfer flavoprotein subunit beta) 및 ITIH-2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백체 생체지표(biomarker).

청구항 2

제1항에 있어서,

프탈레이트는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백체 생체지표:

[화학식 1]



상기 식에서,

R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 탄소수 6 내지 12의 아릴로 치환되거나 비치환된 탄소수 1 내지 24의 알킬, 또는 탄소수 6 내지 12의 아릴을 나타낸다.

청구항 3

제2항에 있어서,

R_1은 탄소수 1 내지 12의 알킬이고,

R_2는 탄소수 6 내지 12의 아릴로 치환된 탄소수 1 내지 12의 알킬인 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백체 생체지표.

청구항 4

제2항에 있어서,

화학식 1의 화합물이 벤질부틸 프탈레이트인 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백체 생체지표.

청구항 5

제1항에 있어서,

ETFB(Isoform 1 of electron transfer flavoprotein subunit beta)는 프탈레이트 노출에 의해 발현이 증가되는 것인 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백체 생체지표.

청구항 6

제1항에 있어서,

ITIH-2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2)는 프탈레이트 노출에 의해 발현이 저하되는 것인 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백체 생체지표.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 단백체 생체지표를 포함하는 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백질 어레이.

청구항 8

제7항에 있어서,

단백체 생체지표는 동위원소, 또는 Cy3, Cy5, FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 및 로다민으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 형광물질로 표지되어 있는 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백질 어레이.

청구항 9

제7항 또는 제8항 중 어느 한 항에 따른 단백질 어레이를 포함하는 프탈레이트 노출 여부 확인용 키트.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 단백체 생체지표를 이용한 프탈레이트 노출 여부 확인방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

피검체의 단백질 시료 및 표지된 단백체 생체지표를 접촉시키는 단계; 및

상기 접촉에 따른 단백체 생체지표의 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는 프탈레이트 노출 여부 확인방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

단백질 시료는 피검체의 체세포 또는 혈액에서 분리한 것인 프탈레이트 노출 여부 확인방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

피검체의 체세포는 간세포인 프탈레이트 노출 여부 확인방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

피검체의 혈액은 혈장인 프탈레이트 노출 여부 확인방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 환경 유해물질 프탈레이트류 노출 여부 확인용 단백체 생체지표에 관한 것으로, 벤질부틸 프탈레이트에 노출된 간세포, 또는 혈액 등에서 프로테옴 분석을 통해 특이적으로 단백질 발현이 증가 또는 감소하는 단백체 생체지표를 발굴하여 프탈레이트류 노출의 정량적 평가뿐만 아니라 프탈레이트류 노출로 인한 질병 발생을 예방 또는 치료할 수 있는 환경 유해물질 프탈레이트류 노출 여부 확인용 단백체 생체지표에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 환경문제에 대한 국민들의 관심이 높아지고 있는데, 환경 유해물질이 낮은 농도로 노출되는 수준에서의 건강문제에 관련되어 많은 논란이 있는 실정이며, 현재까지는 통계적 모델링에 의한 위해도 평가(risk assessment) 방법에 의존하고 있는 실정이다.

[0003] 현재 세계적으로 추구되고 있는 분자수준의 생물지표를 기반으로 하는 차세대 독성평가의 주요 토픽은 단백체학(Proteomics)과 전사체학(Transcriptomics)의 유전체학(Genomics)과 대사체학(Metabolomics)을 기반으로 하는 독성 유전체학(Toxicogenomics) 연구들이다.

[0004] 독성 단백체 연구는 환경 유해물질의 특이 생체지표 발굴을 통하여 인간 건강 위해성 평가를 정량적으로 평가할 수 있으므로 환경 유해물질 노출의 위해성 평가와 더불어 환경 유해물질로 인한 향후 질환 발생의 예방조치를 취할 수가 있다.

[0005] 독성 단백체학을 기반으로 한 단백체 지표 발굴연구 및 진단 키트개발을 통한 환경 유해물질의 노출 및 위해성 평가기법 개발은 연구의 체계화 및 표준화를 확립하여 분자 수준의 단백체 생체지표를 이용한 진보된 차세대 환경 유해물질 노출 및 위해성 평가기법을 정립하여 국가차원의 전략기술로 활용될 수 있다.

[0006] 그러나, 아직까지 프탈레이트류의 노출 여부를 확인할 수 있는 단백체 지표는 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 환경 유해물질인 프탈레이트류의 생체 내 노출 여부를 확인할 수 있는 단백체 생체지표를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ETFB(Isoform 1 of electron transfer flavoprotein subunit beta) 및 ITIH-2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백체 생체지표(biomarker)를 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 단백체 생체지표를 포함하는 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백질 어레이를 제

공한다.

[0010] 본 발명은 또한 본 발명의 단백질 어레이를 포함하는 프탈레이트 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 단백체 생체지표를 이용한 프탈레이트 노출 여부 확인방법을 제공한다.

효 과

[0012] 본 발명은 환경 유해물질인 프탈레이트류의 생체 내 노출 여부를 정량적으로 검출할 수 있고, 나아가 환경 유해물질 관련 질환의 예방 또는 치료에 중요 정보로 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

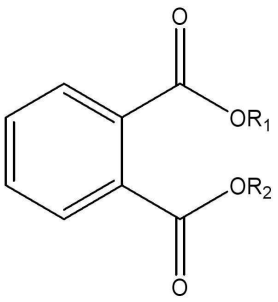
[0013] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0014] 본 발명은 ETFB(Isoform 1 of electron transfer flavoprotein subunit beta) 및 ITIH-2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백체 생체지표(biomarker)에 관한 것이다.

[0015] 본 발명의 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백체 생체지표는 프탈레이트류 화합물에 노출된 인간 체세포, 또는 혈액 등에서 발현 빈도에 차이를 보이는 단백질인 것을 특징으로 한다. 상기 단백체의 발현 빈도의 차이는 프탈레이트류 화합물에 노출된 생체에서의 발현 증가 또는 저하로 이해될 수 있다.

[0016] 상기 프탈레이트류 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다:

[0017] [화학식 1]

[0018] 

[0019] 상기 식에서,

[0020] R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 탄소수 6 내지 12의 아릴로 치환되거나 비치환된 탄소수 1 내지 24의 알킬, 또는 탄소수 6 내지 12의 아릴을 나타낸다.

[0021] 본 발명의 화학식 1의 화합물의 치환체의 정의에 사용된 용어는 하기와 같다.

[0022] "알킬"은 다른 기재가 없는 한, 탄소수 1 내지 24의 직쇄 또는 분지쇄의 포화 탄화수소를 가리킨다. C_{1-24} 알킬기의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 이소프로필, 이소부틸, sec-부틸 및 tert-부틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 이소헥실, 이소헵틸, 이소옥틸, 이소노닐 및 이소데실이 포함되나, 이들에 제한되지 않는다

[0023] "아릴"은 다른 기재가 없는 한, 6 내지 12-원의 방향족 고리화합물을 가리킨다. 아릴기의 예로는 페닐, 비페닐, 나프틸 및 안트라세닐을 포함하나, 이들에 제한되지 않는다.

[0024] 화학식 1의 화합물은 구체적으로는,

[0025] R_1은 탄소수 1 내지 12의 알킬이고,

[0026] R_2는 탄소수 6 내지 12의 아릴로 치환된 탄소수 1 내지 12의 알킬일 수 있다.

[0027] 가장 구체적으로, 상기 화학식 1의 화합물은 벤질부틸 프탈레이트일 수 있다.

[0028] 상기 단백체 생체지표는 벤질부틸 프탈레이트에 대한 생체 노출 시 발현이 증가 또는 저하하는 단백질로,

[0029] 구체적으로, ETFB(Isoform 1 of electron transfer flavoprotein subunit beta)는 프탈레이트 노출 시 발현이 증가되는 단백질로, 상기 ETFB는 공지된 인간 유래의 ETFB 아미노산 서열이라면 특별히 제한하지는 않으나, http://www.uniprot.org/에 등록된 accession no. IPI00004902.1에 기재된 아미노산 서열을 사용할 수 있다.

[0030] 또한, ITIH-2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2)는 프탈레이트 노출 시 발현이 저하되는 단백질로, 상기 ITIH-2는 공지된 인간 유래의 ITIH-2 아미노산 서열이라면 특별히 제한하지는 않으나, http://www.uniprot.org/에 등록된 accession no. IPI00305461.2에 기재된 아미노산 서열을 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명은 또한 본 발명의 단백체 생체지표를 포함하는 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백질 어레이에 관한 것이다.

[0032] 본 발명의 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백질 어레이에 포함된 단백체 생체지표는 시료에 존재하는 단백질의 양을 정량하기 위해 유사 또는 동일한 유사체에 대한 비교로 사용되는, 양을 알고 있는 절대량의 비교물질인 것으로 이해할 수 있다.

[0033] 상기 시료의 단백질은 피검체의 체세포, 또는 혈액으로부터 얻을 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0034] 상기 체세포는 간세포 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0035] 본 명세서에 사용된 "어레이"는 고형 지지체 상 및/또는 용기 배열중에 존재하는 원소배열(예컨대 폴리펩티드)이다. 어레이는 가장 흔히 특정 공간-물리적 관계를 갖는 물리적 원소로 생각되며, 본 발명은 직선 공간 조직을 갖지 않는 "로지칼" 어레이를 사용할 수 있다. 예컨대, 컴퓨터 시스템을 이용하여 물리적으로 상이한 성분 중 또는 물리적으로 상이한 성분 상에 존재하는 하나 또는 몇 개의 해당 성분의 위치를 추적하기 위해 사용될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 어레이 구성원의 물리적 위치의 "색인" 표를 제공하는 것에 의해 로지칼 어레이를 창제한다. 따라서, 이동중인 성분도 어레이의 구성원이 특정되고 위치가 확인될 수 있는 한, 로지칼 어레이의 일부일 수 있다. 이것은 본 발명의 어레이가 유동 마이크로스케일 시스템으로 존재하는 경우 또는 하나 이상의 미소적정 트레이로 존재할 때 적절하다.

[0036] 특정 어레이 포맷은 때때로 "칩" 또는 "바이오칩"으로도 불린다. 어레이는 예컨대 2 내지 약 10개의 번지지정 위치(addressable location)인 저밀도, 약 100개 이상의 위치인 중밀도, 또는 예컨대 1000개 이상의 고밀도 수를 포함할 수 있다. 전형적으로, 칩 어레이 포맷은 용이한 조립, 취급, 배치, 스택, 시약 도입, 검출 및 저장을 허용하는 기하학적으로 일정한 형상이다. 그러나 불규칙적일 수도 있다. 하나의 전형적인 포맷으로서, 어레이는 종횡 포맷으로 구조화되며, 어레이 상의 구성원 세트의 각각의 위치 사이에는 규칙적인 간극이 존재한다. 다르게는, 상기 위치는 균등한 처리 또는 샘플링을 위해 번들화, 혼합화 또는 균질 배합될 수 있다. 어레이는 각 위치가 시약의 고처리량 취급, 자동적 전달, 마스킹 또는 샘플링이 공간적으로 번지지정되도록 구조화된 복수의 번지지정 위치를 포함할 수 있다. 어레이는 레이저 조사에 의한 주사, 공초점 또는 편향 광 수집, CCD 검출 및 화학 발광을 비롯한 특정 수단에 의한 검출 또는 정량을 용이하게 할 수 있으며, 상기 예로 든 것에 한정되지 않는다. 본 명세서에 기재한 바와 같은 "어레이" 포맷은 어레이(즉, 복수 칩의 어레이), 마이크로칩, 마이크로어레이, 단일 칩상에 조립된 마이크로어레이, 마이크로웰 플레이트에 부착된 유생분자의 어레이 또는 해당 시스템과 사용하기 위한 다른 적합한 포맷을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0037] 본 발명의 프탈레이트 노출 여부 확인용 단백질 어레이는 당업자에게 알려진 방법에 의해 제작할 수 있다.

[0038] 구체적으로, 상기 탐색된 단백체 생체지표를 탐침 분자(프로브)로 이용하여 단백질 어레이의 기판상에 고정화시키기 위해 파이조일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로피펫팅(micropipetting)법 또는 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 단백질 어레이의 기판은 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 또는 알데히드(aldehyde) 등에서 선택되는 하나의 활성기가 코팅된 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 기판은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막, 또는 니트로셀룰로스 막 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0039] 상기 탐침 분자로 사용하기 위한 단백체 생체지표는 동위원소, 또는 Cy3, Cy5, FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate), 또는 로다민 등의 형광물질로 표지되어 있을 수 있다.

[0040] 본 발명은 또한 본 발명의 단백질 어레이를 포함하는 프탈레이트 노출 여부 확인용 키트에 관한 것이다.

[0041] 본 발명의 프탈레이트 노출 여부 확인용 키트는 하나 이상의 단백체 생체지표를 포함하여 시료의 단백질을 정량분석함으로써 프탈레이트류 화합물에 대한 노출 여부를 확인할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0042] 본 발명의 키트는 결합된 포장 물질(어레이를 포장하기 위한 물질), 지시자료(예컨대 어레이와 상호작용하는 하나 이상의 시약 또는 샘플을 검출하기 위해 어레이를 사용하는 지시사항), 대조 시약(어레이에 도포된 공지 활성의 시약), 샘플 등과 같은 부가적인 키트 특징과 함께 본 발명의 어레이를 포함한다.

[0043] 본 발명은 또한 본 발명의 단백체 생체지표를 이용한 프탈레이트 노출 여부 확인방법에 관한 것이다.

[0044] 본 발명의 프탈레이트 노출 여부 확인방법은

[0045] 피검체의 단백질 시료 및 표지된 단백체 생체지표를 접촉시키는 단계; 및

[0046] 상기 접촉에 따른 단백체 생체지표의 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.

[0047] 본 발명의 프탈레이트 노출 여부 확인방법에 있어서, 제1단계는 피검체의 단백질 시료와 표지된 단백체 생체지표를 접촉시키는 단계이다.

[0048] 상기 피검체의 단백질 시료는 피검체의 체세포, 또는 혈액 등에서 분리한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0049] 상기 체세포는 간세포 등일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0050] 상기 혈액은 구체적으로 혈장일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0051] 상기 피검체의 체세포, 또는 혈액에서 단백질을 분리하는 방법은 통상의 단백질 추출법을 사용할 수 있어, 특별히 제한하지는 않는다.

[0052] 상기 단백질 시료와 표지된 단백체 생체지표의 접촉은 동위원소; 또는, Cy3, Cy5, FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate), 또는 로다민 등의 하나 이상의 형광물질로 표지된 본 발명의 단백체 생체지표를 포함하는 마이크로타이터 플레이트 내에서 이루어질 수 있다.

[0053] 본 발명의 프탈레이트 노출 여부 확인방법에 있어서, 제2단계는 상기 접촉에 따른 단백체 생체지표의 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계이다.

[0054] 단백체 생체지표의 발현 정도를 확인하는 방법은 당업자에게 알려진 방법을 사용할 수 있어 특별히 제한하지는 않는다.

[0055] 일 구체예로, 표적 단백체의 농도를 계산하기 위하여 적절한 단백체 생체지표와 함께 수득되는 이온 세기를 사용할 수 있다. 단백체 생체지표는 특징적인 하나의 이온 쌍(또는 수개의 이온 쌍)을 이용하여 식별되며, 수득되

는 이온 세기는 단백체 생체지표의 알고 있는 농도와 관련 있어 상응하는 표적 단백체의 정량화가 가능하다. 표적 단백체는 사전에 공지되어 있으며, 미리-주석을 달아둘 수 있다. 따라서, 검출 및 정량된 단백체에는 이미 주석이 달려, 빠르고 직접적인 해석이 가능하다.

[0056] 표적 단백체의 질량 측정은 이온 종들을 구별하기 위해 MSMS 분석이 가능한 질량 측정기를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0057] 상기 결과로부터 단백체의 정량분석에 의한 이온 세기의 증가를 비교하여 프탈레이트류 화합물의 생체 노출 여부를 확인할 수 있는 것이다.

[0058] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 시료에서 ETFB(Isoform 1 of electron transfer flavoprotein subunit beta), 또는 ITIH-2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2)의 이온 세기 증가 또는 감소가 관찰된다면, 벤질부틸 프탈레이트에 노출되었음을 판정할 수 있는 것이다.

[0059] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0060] <실시예 1> 인간 간세포주에서의 환경 유해물질에 대한 세포, 유전 독성 연구

[0061] 벤질부틸 프탈레이트의 인간 간세포주에서의 유전독성 및 세포독성을 측정함으로써 유전체 독성 지표 발굴을 위한 BBP의 독성 농도를 설정하였다.

[0062] 인간 간세포주로 HepG2 (ATCC) 세포를 사용하였으며, MEM(WelGENE Inc., Korea) 배지에서 배양하였다.

[0063] 인간 간세포주의 벤질부틸 프탈레이트 노출은 0.1% DMSO (sigma)에 녹인 0μM ~ 250μM BBP (sigma)를 포함하는 배지에서 37℃에서 24시간 또는 48시간 실시하였다.

[0064] 상기 노출 후 배양 상등액을 수집하고 Microcon YM3 Column(Milipore Co. MA, USA)에서 시료를 정제하였다.

[0065] MTT 및 Comet 분석을 이용하여 간세포주에서의 유전독성 및 세포독성을 실시하였다.

[0066] 도 1은 Comet 분석을 이용한 벤질부틸 프탈레이트의 인간 간세포주에서의 유전독성 결과를 도시한 것으로 2.5μM 이상의 농도에서부터 유의하게 유전 독성을 일으킴을 알 수 있었다.

[0067] 도 2는 MTT 분석을 이용한 벤질부틸 프탈레이트의 인간 간세포주에서의 세포독성 결과를 도시한 것으로 50μM 이상의 농도에서부터 유의하게 세포 독성을 일으킴을 알 수 있었다.

[0068] 상기 결과로부터, 벤질부틸 프탈레이트 농도 및 노출 시간이 증가할수록 유전독성 및 세포독성이 증가함을 알 수 있었으며, 유전 독성을 일으키지만 세포 독성을 일으키지 않는 최대 농도인 10, 25 μM을 선택하여 다음 실험을 실시하였다.

[0069] <실시예 2> 인간 간세포주에서의 BBP에 대한 단백체 지표 발굴

[0070] 인간 간세포주에서의 BBP에 대한 단백체 지표 발굴을 위해, 상기 단백질 시료를 고정된 pH에서 narrow range immobiline dry strips(pH 4-7, pH 6-9, 24cm)을 이용하여 1차원 전기영동을 실시하였다.

[0071] 다음으로, 2-DE 분석(12% SDS-PAGE, 34×45cm, OWL)을 통하여 인간 간세포주에서 단백체를 분리하고, 은 염색 후 이미지 분석(Progenesis Discovery(Nonlinear))을 통하여 BBP에 대한 단백체 생체지표를 발굴하였다(도 3).

[0072] 다음으로, ESI-MS/MS(LCQ Deca XP-Plus, Thermo Finnigan, USA) 및 웨스턴 블랏을 사용하여 European Bioinformatics Institute(EBI)의 IPI 휴먼 데이터베이스를 통해 정확한 단백체 동정을 수행하였다.

표 1

ESI-MS/MS 분석에 따른 과발현 및 저발현 단백질 리스트

		Spot No.	Accession no.	Protein name	Major decision DB	Matched prptides no.	Sequence coverage (%)	Theoretical value(Mr)
BBP Dose-dependent	Up	1757	IPI00007221.1	Plasma serine protease inhibitor	IPI human v3.38	7	18.23	45
		2631	IPI00012066.2	poly(rC) binding protein 2 isoform b	IPI human v3.38	1	5.52	38
		2652	IPI00026314.1	GSN Isoform 1 of Gelsolin	IPI human v3.38	2	4.0	85
		2853	IPI00217966.7	LDHA Isoform 1 of L-lactate dehydrogenase A chain	IPI human v3.38	17	24.40	36
		3007		Unidentified				
		3049	IPI00011290.3	SULT1C2 Isoform Short of Sulfotransferase 1C2	IPI human v3.38	2	4.00	35
		3140	IPI00029507.1	Potassium channel subfamily K member 5	IPI human v3.38	1	2.80	55
		3146	IPI00004902.1	ETFB Isoform 1 of Electron transfer flavoprotein subunit beta	IPI human v3.38	3	12.55	27
		3321	IPI00451401	Triose phosphate isomerase	IPI human v3.38	1		26
		3358	IPI00180956.6	Unidentified	IPI human v3.38	1	10.19	48
		3442	IPI00022314.1	SOD2 Superoxide dismutase [Mn]	IPI human v3.38	6	13.51	24
		3497	IPI00219446	Rafkinase inhibitory protein (RKIP)	IPI human v3.38	1	17.2	21
		3837		Unidentified				
		4110	IPI00218693.8	APRT Adenine phosphoribosyltransferase	IPI human v3.38	5	20.00	195
		4135	IPI00003815	rho GDP inhibitor	IPI human v3.38	1	7.3	23
	Down	2338	IPI00027666.1	CCKAR Cholecystokinin receptor type A	IPI human v3.38	2	4.0	47
		2343	IPI00020021.3	DEK	IPI human v3.38	1	4.3	42
		2608	IPI00303139.2	48kDa protein	IPI human v3.38	1	4.8	48
		3336	IPI00305461.2	ITIH2 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	IPI human v3.38	5	4.30	106
		3662	IPI00032293	cystatin C	IPI human v3.38	4	11.6	16

		Spot No.	Accession no.	Protein name	Major decision DB	Matched prptides no.	Sequence coverage (%)	Theoretical value(Mr)
BBP Time-dependent	Up	2185	IPI00220906.5	ACOT2 Isoform 1 of Acyl-coenzyme A thioesterase 2	IPI human v3.38	5	12.60	53
		2286	IPI00748705.1	Hypothetical protein	IPI human v3.38	1	5.2	28
		3023	IPI00294398.1	HADH Isoform 1 of Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase	IPI human v3.38	5	20.06	34
		3903		Unidentified				
	Down	1211	IPI00783987.2	C3 Complement C3	IPI human v3.38	53	23.21	187
		2233	IPI00027666.1	CCKAR Cholecystokinin receptor type A	IPI human v3.38	2	4.0	47
		3885		Unidentified				
		4168	IPI00477597.1	HPR Isoform 1 of Haptoglobin-related protein	IPI human v3.38	3	4.31	39
		4333	IPI00290085	CDH2 Cadherin-2	IPI human v3.38	4	6.40	100

[0073]

[0074] 표 1, 도 4 및 5에 나타난 바와 같이, DEK, Rho GDI α, Cystatin C, RKIP, TIM, ETFB, Gelsolin, ITIH2 및 HPR이 벤질부틸 프탈레이트에 노출될 경우, 발현 빈도에 차이가 났다.

[0075] 특히, 28kDa의 ETFB(Isoform 1 of electron transfer flavoprotein subunit beta) 및 75kDa의 ITIH-2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2)는 타종의 프탈레이트류 및 타종의 내분비교란물질들과의 상호 일반적, 특이적 생체지표 역할의 유효성 검증을 통해 벤질부틸 프탈레이트에 대한 인간 노출 평가를 위한 단백체 생체 지표로 사용할 수 있는 것으로 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0076] 도 1은 Comet 분석을 이용한 벤질부틸 프탈레이트의 인간 간세포주에서의 유전독성 결과를 도시한 것이다.

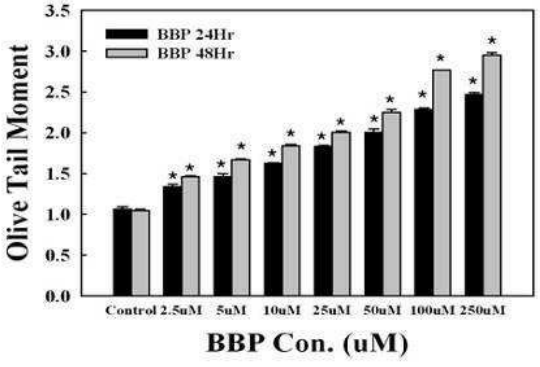
[0077] 도 2는 MTT 분석을 이용한 벤질부틸 프탈레이트의 인간 간세포주에서의 세포독성 결과를 도시한 것이다.

[0078] 도 3은 다양한 IEF 스트립 및 라지 젤 시스템을 이용하여 벤질부틸 프탈레이트에 노출된 인간 간세포주의 단백질의 2차원 전기영동 패턴을 도시한 것이다.

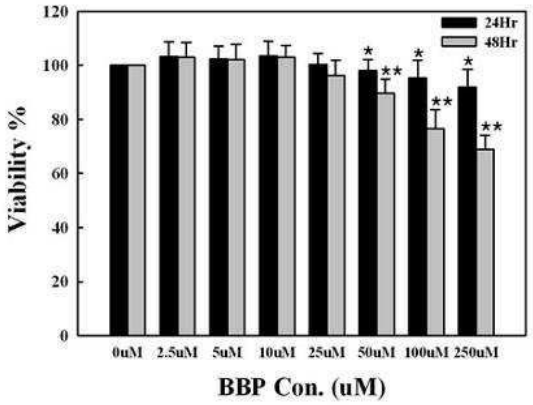
[0079] 도 4 및 5는 웨스턴 블랏 분석에 의한 벤질부틸 프탈레이트에 노출된 인간 간세포주의 단백질의 발현 패턴을 도시한 것이다.

도면

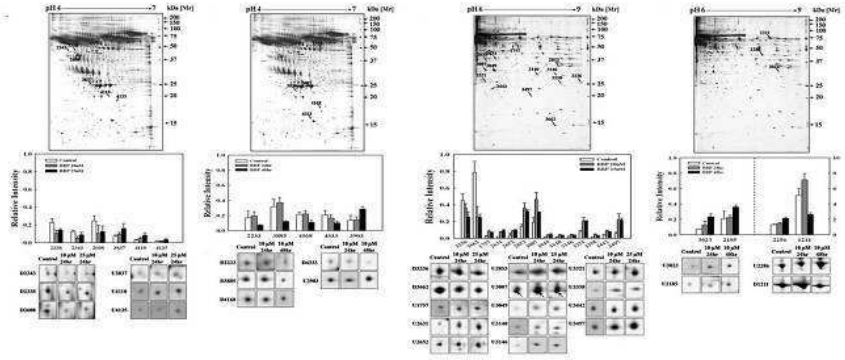
도면1



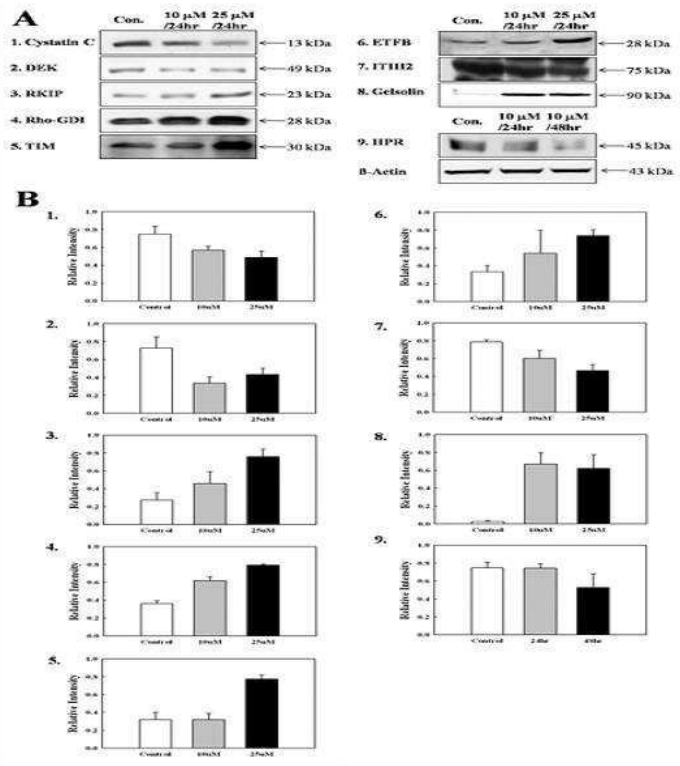
도면2


120
100
80
60
40
20
0
Viability %
24Hr
48Hr
0uM
2.5uM
5uM
10uM
25uM
50uM
100uM
250uM
BBP Con. (uM)

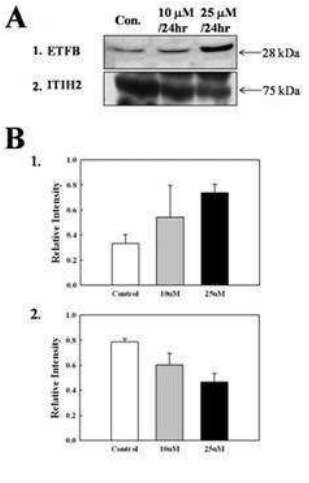
도면3



도면4


A
Con.
10 μM /24hr
25 μM /24hr
1. Cystatin C
2. DEK
3. RKIP
4. Rho-GDI
5. TIM
13 kDa
49 kDa
23 kDa
28 kDa
30 kDa
6. ETFB
7. ITIH2
8. Gelsolin
28 kDa
75 kDa
90 kDa
10 μM /48hr
9. HPR
β-Actin
45 kDa
43 kDa
B
Relative Intensity
Control
10uM
25uM

도면5


A
Con.
10 μM /24hr
25 μM /24hr
1. ETFB
2. ITIH2
28 kDa
75 kDa
B
Relative Intensity
Control
10uM
25uM