(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0072785
(43) 공개일자 2010년07월01일

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0131294
(22) 출원일자 2008년12월22일
심사청구일자 2008년12월22일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
이서구
서울시 종로구 사직동 9번지 광화문 풍림스페이스본 104동 1408호
조춘석
서울특별시 서대문구 북아현동 201-14, 101호
이석묵
서울특별시 동대문구 청량리1동 61-169
(74) 대리인
이문섭

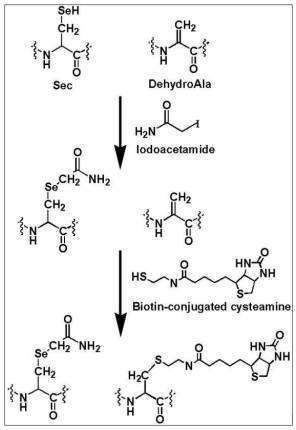
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 산화스트레스에 의해 셀레노시스테인으로부터 전환된 디하이드로알라닌의 검출 방법

(57) 요 약

본 발명은 시료 내 셀레노시스테인(selenocysteine) 아미노산 잔기가 산화스트레스에 의해 손상되어 셀레늄이 없는 디하이드로알라닌(dehydroalanine)으로 변화되는 바 상기 디하이드로알라닌 (dehydroalanine)을 화학적 방법에 의해 측정하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 (a) 친화성 물질쌍(A+B) 중 한 물질(A)과 접합되고 디하이드로알라닌의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 관능기를 가지는 물질(A)-접합된 링커화합물,과 디하이드로알라닌이 포함된 시료를 반응시키는 단계; (b) 상기 반응물을 라벨이 표지된 친화성 물질쌍(A+B) 중 나머지 물질(B)과 반응시키는 단계; 및 (c) 상기 (b)의 반응물의 라벨을 정량적으로 분석하는 단계를 포함한다. 본 발명에 따르면 산화스트레스에 의한 셀레노시스테인의 손상 정도를 면역분석법으로 정량적으로 용이하게 측정할 수 있기 때문에 신체내 산화스트레스의 정도를 나타내주는 새로운 지표로서 사용될 수 있는 가능성이 충분하다고 할 수 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

하기 단계들을 포함하는 시료 내 디하이드로알라닌(dehydroalanine)을 검출하는 방법:

(a) 친화성 물질쌍(A+B) 중 한 물질(A)과 접합되고 디하이드로알라닌의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 관능기를 가지는 물질(A)-접합된 링커화합물,과 디하이드로알라닌이 포함된 시료를 반응시키는 단계;

(b) 상기 반응물을 라벨이 표지된 친화성 물질쌍(A+B) 중 나머지 물질(B)과 반응시키는 단계; 및

(c) 상기 (b)의 반응물의 라벨을 정량적으로 분석하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 링커화합물은 디하이드로알라닌의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 관능기로 설프히드릴기(-SH)를 가지는 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 링커화합물은 시스타민(cysteamine)인 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 친화성 물질쌍(A+B)은 비오틴(biotin; A)+아비딘(avidin ;B), 비오틴(biotin ;A)+스트렙타비딘(streptavidin ;B), 플루오세인(A)+안티-플루오세인(B), 퍼옥시데이즈(peroxidase ;A)+ 안티-퍼옥시데이즈(B), 디니트로페놀(DNP ;A)+항-2,4-디니트로페놀(anti-2,4-dinitrophenol ;B), 디곡시제닌(A)+항-디곡시제닌(anti-digoxigenin ;B) 및 리간드(A)+수용체(B)로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 물질(A)-접합된 링커화합물은 바이오틴-접합된 시스타민(biotin-conjugated cysteamine)인 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 디하이드로알라닌은 시료 내 셀레노시스테인 (selenocysteine) 아미노산 잔기가 산화스트레스에 의해 손상되어 셀레늄이 없는 디하이드로알라닌(dehydroalanine)으로 전환된 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 시료는 박테리아, 세포, 조직-유래 추출물, 파쇄물(lysate), 정제물, 혈액, 혈장, 혈청, 및 림프로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 세포는 적혈구인 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 시료의 분석 대상은 셀레노시스테인을 가지고 있는 효소인 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 효소는 글루타티온 페록시다아제(glutathione peroxidase) 또는 사이오레독신 리덕테이즈(thioredoxin reductase)인 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계전에 알킬화제(alkylating reagents)로 시료 내의 유리 설프히드릴기 (free -SH)나 셀레노기(-SeH)를 블로킹 (blocking)시키는 (a') 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 알킬화제는 요도아세테이트 (iodoacetate) 또는 요도아세타미드 (iodoacetamide) 인 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 라벨은 방사선동위원소, 발색효소 및 형광물질로 이루어진 군 중에서 선택된 것으로 표지되는 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 라벨의 분석은 방사면역분석법(Radio immuno assay), 효소면역분석법(enzyme immunoassay), 형광면역분석법(fluorescence immuno assay) 및 웨스턴블럿법(Western blot method)으로 이루어진 군 중에서 선택된 방법으로 분석하는 것을 특징으로 하는 디하이드로알라닌을 검출하는 방법.

청구항 15

하기 단계들을 포함하는 시료 내 셀레노시스테인 (selenocysteine) 아미노산 잔기가 산화스트레스에 의해 손상되어 셀레늄이 없는 디하이드로알라닌(dehydroalanine)으로 전환된 정도를 측정하는 방법:

(a) 친화성 물질쌍(A+B) 중 한 물질(A)과 접합되고 디하이드로알라닌의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 관능기를 가지는 물질(A)- 접합된 링커화합물,과 디하이드로알라닌이 포함된 시료를 반응시키는 단계;

(b) 상기 반응물을 라벨이 표지된 친화성 물질쌍(A+B) 중 나머지 물질(B)과 반응시키는 단계; 및

(c) 상기 (b)의 반응물의 라벨을 정량적으로 분석하는 단계.

청구항 16

시료 내 셀레노시스테인 아미노산 잔기가 디하이드로알라닌으로 전환된 정도를 측정하는 것을 포함하여 시료의 산화스트레스의 정도를 측정하는 방법.

청구항 17

친화성 물질쌍(A+B) 중 한 물질(A)과 상기 한 물질(A)과 결합능이 있는 제1 관능기 및 디하이드로알라닌의 CH_2 기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 하는 제2 관능기를 갖는 링커화합물을 반응하여 만든 물질(A)-접합된 링커화합물을 포함하는 디하드로알라닌 검출용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 시료 내 셀레노시스테인(selenocysteine) 아미노산 잔기가 산화스트레스에 의해 손상되어 셀레늄이 없는 디하이드로알라닌(dehydroalanine)으로 변화될 때 상기 디하이드로알라닌 (dehydroalanine)을 화학적 방법에 의해 측정하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 (a) 친화성 물질쌍(A+B) 중 한 물질(A)과 접합되고 디하이드로알라닌의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 관능기를 가지는 물질(A)-접합된 링커화합물,과 디하이드로알라닌이 포함된 시료를 반응시키는 단계; (b) 상기 반응물을 라벨이 표지된 친화성 물질쌍(A+B) 중 나머지 물질(B)과 반응시키는 단계; 및 (c) 상기 (b)의 반응물의 라벨을 정량적으로 분석하는 단계를 포함한다.

배 경 기 술

[0002] 산화스트레스(oxidative stress)란 살아 있는 세포에서 항산화 방어기전 (antioxidant defense mechanism, ROS)에 대하여 산화 기전이 우세하여 세포 단백, 지질, 핵산의 산화 손상을 일으키는 상태라고 정의할 수 있다. 산화스트레스는 활성산소 (reactive oxygen species)에 의해 발생되며, 산소이온, 유리 라디칼, 과산화물 등을 말한다. 활성산소는 세포전달체계에서 생성되어 축적되며 항생제, 항암제, 독성 화합물, 기타 전이 금속 등의 작용과 같은 여러 가지 기전 등에 의해서도 생성된다. 인체에서는 산화스트레스가 생리학적, 병리학적 과정의 매개체로 작용하여 만성과 급성의 염증질환을 유발하기도 하고 환경적으로 스트레스를 받는 상황에서 그 농도가 높아져 세포를 사멸시키기도 한다. 즉, 지질 과산화, 아미노산 (특히 cysteine)의 산화, 단백질간의 크로스 링크, DNA 손상, DNA strand 붕괴, 단백질의 분절이 유발 되고 세포사멸에 의한 세포 죽음 뿐만 아니라 돌연변이와 암, 노화, 심혈관계 질병, 자가 면역 질환, 신경 퇴화성 질환 등 100 여종 이상의 질병을 일으키는 것으로 추정되고 있을 뿐만 아니라 노화 과정에서도 주요한 인자로 보고 있다.

[0003] 혈액은 많은 항산화 분자를 포함하고 있는데, 예를 들어 고밀도지단백(HDL)에 존재하는 paroxonase, arylesterase나 Glutathione, Ceruloplasmain, vitamin E, vitamin C 등이 있다. 많은 산화 스트레스의 표지자 검사가 제시되었고 많은 연구가 진행되었지만 아직 임상적으로 확실히 증명된 검사는 드물며 임상검사실에서 쉽게 검사할 수 있는 것들은 많지 않다.

[0004] 활성 산소(Reactive oxygen species, ROS)는 전자배열에 따라 전자를 획득하기 쉬운 상태가 되어 강력한 산화제가 될 수 있다. 세포 내의 호흡과정에서 산소분자는 네 개의 전자에 의해 환원되어 물로 바뀐다. 그러나 산소분자가 불완전하게 환원되면 강력한 산화제가 되며 이러한 것을 활성 산소라고 한다. 산소분자가 한 개, 두 개 혹

은 세 개의 전자에 의해 환원된 것을 각각 O_2^-(superoxide radical anion), H_2O_2 (hydrogen peroxide) 혹은 OH^- (hydroxyl radical)이라고 하며 이들 모두 강력한 산화제들이다. 여러 종류의 산화제 즉 래디칼들이 화학적 혹은 효소반응과 연결되어 생성되고 있다. Superoxide dismutase (SOD)는 O_2^-를 H_2O_2로 바꾸며 H_2O_2 는 Fe^{2+} 존재하에 OH^-를 생성한다(Fenton reaction). 일부 화학반응이나 방사능은(UVA) 산소분자를 singlet oxygen이라는 흥분상태로 바꾸기도 한다. 세포의 기본적인 대사과정에서도 활성 산소가 꾸준히 생산되고 있다. 미토콘드리아내막은 매우 잘 조절된 전자 전달계지만 전자의 누출에 의해서 계속 O_2가 활성 산소로 변환되고 있다. 이러한 현상은 미토콘드리아 외에도 NADPH oxidase, xanthine oxidase, monoamine oxidase 등에 의해서 생기고 있다.

[0005] 이상 언급한 바와 같이 활성 산소는 세포 내에서 꾸준히 형성되고 있다. 따라서 이러한 활성 산소의 축적이나 해로운 산화작용을 막기 위해서 세포내에서는 활성 산소제거 시스템이 작동하고 있다. Thiol기를 함유하는 성분(glutathione의 cysteine residue)은 환원력을 가지고 있어서 활성 산소에 전자를 제공함으로써 활성 산소의 산화능을 제거한다. 세포 내의 glutathione 함량은 5~10 mM로써 세포의 형이나 세포 내 부위에 따라 약간씩 다르다. glutathione은 모든 세포에 존재하는 항산화 시스템이며 그 외에 활성 산소를 제거하는 몇 가지 효소시스템이 있다. SOD(superoxide dismutase)는 O_2^-를 H_2O_2로 바꾸며, Catalase와 peroxiredoxin, glutathione peroxidase는 H_2O_2를 제거하는데, 특별히 glutathione peroxidase는 lipidperoxides (ROOH)를 알코올(ROH)로 환원시킨다. cysteine-rich metallothionein 또한 항산화능이 있으며 quinone reductase, haem oxygenase도 산소에 의한 래디칼 형성을 억제한다. 이상의 각종 항산화 시스템은 기능적인 산화-환원 반응 분자들 예를 들면 thioredoxin(Trx), redox factor 1 (Ref-1) 혹은 래디칼 소거제인 vitamin C 와 vitamin E 등과 함께 산화스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 수행한다.

[0006] 셀레노시스테인이라는 아미노산을 함유한 여러 가지 셀레늄 단백질들이 미생물, 동물 등으로부터 발견되고 있는데 그 중의 한 가지가 항산화 효소로 잘 알려진 glutathione peroxidase이다. 항산화제들은 여러 가지 활성 산소(reactive oxygen species, ROS)들로부터 세포를 보호하는 역할을 하는데, 이러한 항산화성은 암의 발생과 진행을 조절한다는 보고들이 있다. 셀레늄 공급에 의한 항암효과는 간, 유선, 대장, 피부 등 다양한 부위에서 작용하는데 몇 가지 경우 vitamin A 와 vitamin E의 공급으로 상승효과를 보이기도 한다. 매일 200㎍의 셀레늄 투여로 폐암, 대장암, 직장암, 전립선암 환자들에 대하여 매우 좋은 효과를 보았다는 보고도 있다.

[0007] 셀레늄은 생체 내에서 다양한 형태로 존재하는데 여러 가지 존재 형태의 셀레늄 화합물들 중에서 이 원소는 단백질과 일부 tRNA 변형된 염기로서 존재하기도 한다. 더욱이 셀레늄을 지닌 단백질인 셀레늄단백질의 경우, 셀레늄이 현재 21번째 아미노산으로 불리우는 셀레노시스테인(selenocysteine)의 형태로 단백질 내에 존재하는데, 매우 특이하게 일반적으로 단백질 합성 중지 신호인 UGA codon을 중지 신호로 인식하지 아니하고 이곳에 매우 특이적인 작용기작에 의하여 셀레노시스테인이 단백질 내로 삽입되게 된다.

[0008] 현재까지 알려진 셀레늄단백질들 중 셀레노시스테인의 역할이 밝혀진 것은 극히 일부이다. 가장 잘 알려진 예로는 대표적인 항산화 효소인 glutathione peroxidase Thyroxine(T4)에서 iodine을 제거하여 생물학적으로 더 활성이 있는 triiodothyronine(T3)로 전환시킴으로 갑상선 호르몬 대사에서 매우 중요한 5'- deiodinase, 최근 셀레늄단백질로 밝혀진 thioredoxin reductase가 있다.

[0009] 셀레노시스테인은 생체내 대사와 효소활성에 중요한 활성사이트로 작용한다. 셀레노단백질이 함유한 셀레노시스테인의 셀레놀(SeH)은 pKa값이 5.2~5.7로 pKa값이 8.5인 시스테인의 사이올그룹(SH)보다 더 산성이며 이러한 성질로 인해 생체학적인 pH농도에서 셀레놀은 수소가 해리된 셀레노레이트(Se-)로 존재한다. 이는 생체환경내에서 효소활성에 큰 장점이 된다. 특히 유해한 활성 산소(reactive oxygen species)를 중화시키는 상기 고등생물의 글루타치온 페록시다아제(glutathione peroxidase), 5'-deiodinase, 사이오레독신 리덕테이즈(thioredoxin reductase)등의 항산화 효소에서 중요한 활성사이트는 셀레노시스테인이다.

[0010] 종래 인비트로상에서 세포 또는 세포 내 단백질을 정제, 분리 또는 분해하는 과정에서 셀레노시스테인으로부터 셀레늄이 소실될 수 있다고 보고된 바 있다 (Ma, S., R. M. Caprioli, K. E. Hill, and R. F. Burk. 2003. Loss of selenium from selenoproteins: conversion of selenocysteine to dehydroalanine in vitro. J Am Soc Mass Spectrom 14:593-600, Palacios, O. a. L., R. 2007. Investigation of the stability of selenoproteins during storage of human serum by size-exclusion LC-ICP-MS. Talanta 71:1813-1816). 그러나 산화적스트레스가 직접적인 원인이 되어 셀레노시스테인에서 셀레늄이 유리되는지 여부에 대해서는 전혀 보고된 바 없다.

[0011] 뿐만 아니라 종래, 유리된 셀레늄의 양을 광학적인 방법으로 측정함으로써 디하이드로알라닌 (dehydroalanine)이 생성되었다는 것을 간접적으로 예상하는데 그칠 수 밖에 없는 한계 및 그 측정방법의 불편함과 기계 사용의 용이성이 떨어져 접근성이 떨어지는 단점을 극복한다. 또한 종래 질량분석법은 세포 파쇄물 내 셀레노스테인을 검출하기에 부적합하고, 정제된 단백질 내 셀레노스테인의 검출시에는 사용 가능하나 정량적인 분석이 어렵다.

[0012] 이에 본 발명자들은 셀레노시스테인은 산화스트레스 통해 유해한 활성 산소와 반응하여 셀레노시스테인이 산화될 때 셀레늄이 유리되어 떨어져 셀레늄이 없는 형태의 디하이드로알라닌(dehydroalanine)으로 전환된다는 것을 확인하고, 상기와 같은 문제점을 해결하고 경제적이고 용이한 측정이 가능하도록, 면역분석법을 통하여 전환된 디하이드로알라닌을 정량적으로 분석하는 방법을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 시료 내 디하이드로알라닌(dehydroalanine)을 검출하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0014] 본 발명의 목적은 시료 내 셀레노시스테인 아미노산 잔기가 산화스트레스에 의해 손상되어 셀레늄이 없는 상태로 전환된 디하이드로알라닌을 검출하기 위한 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0015] 본 발명의 목적은 시료 내 셀레노시스테인 아미노산 잔기가 디하이드로알라닌으로 전환된 정도를 측정하는 것을 포함하는 시료의 산화스트레스의 정도를 측정하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0016] 본 발명의 목적은 디하드로알라닌 검출용 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

[0017] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 시료 내 디하이드로알라닌(dehydroalanine)을 검출하는 방법을 제공한다.

[0018] (a) 친화성 물질쌍(A+B) 중 한 물질(A)과 접합되고 디하이드로알라닌의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 관능기를 가지는 물질(A)-접합된 링커화합물,과 디하이드로알라닌이 포함된 시료를 반응시키는 단계;

[0019] (b) 상기 (a)의 반응물을 라벨이 표지된 친화성 물질쌍(A+B) 중 나머지 물질(B)과 반응시키는 단계; 및

[0020] (c) 상기 (b)의 반응물의 라벨을 정량적으로 분석하는 단계

[0021] 상기 "디하이드로알라닌 (Dehydroalanine 또는 (alpha)-(beta)-di-dehydroalanine)"은 불포화 아미노산으로 수산화나트륨(NaOH)와 같은 알카리나 열 처리한 음식 내 단백질에 존재한다. 상기 처리는 단백질 사슬에서 세린을 제거시킬 수 있다. 음식 내에서 디하이드로알라닌은 리신을 알킬레이크시켜 크로스링킹 아미노산 lysinoalanine (LAL)을 만들어 낸다. lysinoalanine (LAL)는 독성이 있을 수 있다. 대다수의 디하이드로알라민을 포함하는 펩티드는 독성이 있거나 항생능을 가진다.

[0022] 본 발명에 있어서의 용어, "검출"은 시료 내 디하이드로알라닌의 존재 및/또는 그 양을 확인하는 과정을 말한다.

[0023] 본 발명에서의 용어 "링커화합물"은 디하이드로알라닌의 베타 카본에 해당되는 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있도록 디하이드로알라닌과 반응성을 가지는 화합물을 말한다. 바람직하게는 본 발명에서의 링커화합물은 (A)물질과 접합된 상태로 이용될 수 있으며, 디하이드로알라닌과 반응하여 결합하면 본 링커화합물에 접합된 (A)물질과 친화성 물질쌍을 이루는 나머지 물질 (B)과 반응하여 물질 (B)에 표지된 라벨이 디하이드로알라민을 검출하는 데 사용된다.

[0024] 상기 "마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)"이란 마이클 수용체가 뉴클레오필릭(nucleophilic)한 마이클 공여체와 반응하여 이중결합 탄소 사슬을 단일결합 탄소 사슬로 연장하는 공지 공정으로 마이클 첨가 반응은 예를 들어 알티 모리슨(RT Morrison) 및 알엔 보이드(RN Boyd)에 의해 Organic Chemistry(제 3판, Allyn and Bacon 출판사, 1973년)에, 그리고, 클레멘스(Clemens) 및 렉터(Rector)(Journal of Coatings Technology, 제 61권, 제 770호, 1989년)에 의해 교시되어 있다. 본 발명에 있어서 마이클 수용체는 디하이드로알라닌을 의미하고, 마이클 공여체는 적어도 하나의 마이클 공여체 관능 그룹을 가진 화합물이며, 이 그룹은 뉴클레오필릭 어택(nucleophilic attack)을 할 수 있도록 활성화된 그룹이다. 바람직하게는 상기 마이클 공여체 관능 그룹은 적어도 하나의 마이클 활성 수소 원자를 함유한 관능 그룹이고, 이 활성 수소는 여분의 전자쌍 내지는 비공유 전자쌍을 가지는 뉴클레오필릭(nucleophilic)한 원자에 결합한 수소 원자이다.

[0025] 본 발명의 상기 (a) 단계에서의 용어 "반응"이란 상기 "마이클 첨가 반응"을 말한다.

[0026] 본 발명의 링커화합물은 디하이드로알라닌(마이클수용체)의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 화학구조를 가지는 마이클공여체이고, 친화성 물질쌍(A+B) 중 한 물질(A)과 접합될 수 있다면 어떤 화합물이든 포함할 수 있다. 상기 디하이드로알라닌(마이클수용체)의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 화학구조는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 응용하여 설정할 수 있으나 일례로 링크화합물 일 말단의 관능기를 응용하여 마이클 첨가 반응을 할 수 있도록 설정할 수 있다.

[0027] 바람직하게는 상기 링커화합물은 디하이드로알라닌의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 화학구조로 설프히드릴기(-SH)로 관능화된 말단을 가질 수 있다.

[0028] 보다 바람직하게는 상기 디하이드로알라닌의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 화학구조로 설프히드릴기(-SH)로 관능화된 말단을 가는 링커화합물은 시스타민(cysteamine)을 들 수 있다.

[0029] 본 발명에서의 용어, "친화성 물질쌍"이란 선택된 분자가 다른 하나에 결합된 둘 이상의 친화력을 가지는 분자를 의미한다. 선택된 분자의 특정 작용기 또는 결합 잔기가, 표적 분석물과 선택적으로 결합하여 화학적으로 부착되는 원리에 의존한다.

[0030] 일반적으로, 첫 번째 선택된 분자는 두 번째 선택된 분자와 간접적으로 즉 예를 들어, 스페이서 가지(arm), 그룹, 분자, 브릿지, 운반체, 또는 특이적 인지 파트너의 개입을 통하여, 또는 직접적으로 예를 들어, 스페이서 가지, 그룹, 분자, 브릿지, 운반체, 또는 특이적 인지 파트너 없이 결합할 수 있다. 다른 비공유적 결합은 뉴클레오타이드 및 비뉴클레오타이드 분자의 접합을 의미하며, 예를 들면, 이온결합, 소수성 상호작용, 리간드-뉴클레오타이드 결합, 킬레이팅제/금속 이온 쌍 또는 특이적 결합 쌍을 포함한다.

[0031] 본 발명에서 사용한 용어인, "친화성 물질쌍(A+B)"에서 "+"는 상호간 친화력을 가지는 물질(A)와 물질(B)가 이온결합, 소수성 상호작용, 리간드-뉴클레오타이드 결합, 킬레이팅제/금속 이온 쌍 또는 특이적 결합으로 결합(interaction)된 상태가 될 수 있는 물질쌍을 말한다.

[0032] 본 발명에 있어서 (b)단계에서 사용한 용어인 "반응"은 상기 물질 (A)와 물질(B)이 이온결합, 소수성 상호작용, 리간드-뉴클레오타이드 결합, 킬레이팅제/금속 이온 쌍 또는 특이적 결합으로 결합(interaction)되는 것을 말한다. 보다 구체적으로 예를 들어, 물질(A)가 바이오틴이고 물질(B)가 아비딘인 경우 상기 반응은 특이적 결합을 말한다.

[0033] 본 발명에서 친화성 물질 쌍 중 물질(A)는 링커화합물에 접합(conjugation)할 수 있고, 물질(B)와 특이적인 방식으로 결합하여 친화성 물질쌍(A+B)을 이룰 수 있는 친화력을 가지는 것이라면 뉴클레오타이드 및 비뉴클레오타이드를 불문한다. 물질(A)는 링커화합물에 접합되었을 때 디하이드로알라닌을 포함하는 단백질 또는 펩티드와 링커화합물이 충분히 반응할 수 있는 화학구조, 크기 등을 가지는 것이 바람직하고, 뉴클레오타이드 또는 비뉴클레오타이드일 수도 있다. 링커화합물과의 접합(conjugation)능을 가지는 물질 (A)는 링커화합물에 따라 당업계에 공지된 다양한 조건을 고려하여 상당한 범주를 설정할 수 있고 특정한 반응을 일으키면서 접합할 것을 요하지 않으며 링커화합물과의 특이성을 요하지 않는다. 따라서, 본 발명에서 (a)단계에서의 용어 "접합"은 이온결합, 공유결합, 수소결합, 반데르발스결합, 금속결합 등을 모두 포함한다. 일 례로 물질 (A)는 링커화합물의 제2 관능기(링커화합물 내 관능기 중 디하이드로알라민의 CH_2기와 결합하는 제1 관능기 외의 관능기)에 접합될 수 있고 본 발명의 구체화된 예에 따르면 링커화합물이 시스타민인 경우 물질(A)는 링커화합물의 제2 관능기에 접합되며 예를 들어, 링커화합물 중 시스타민의 아민기(-NH)에 접합된다. 보다 구체적으로 예를 들어, 물질(A)가 바이오틴이고 링커화합물이 시스타민인 경우 접합이란 공유결합을 말한다.

[0034] 이와 상응하여 본 발명에서 친화성 물질 쌍 중 나머지 물질(B)는 물질(A)와특이적인 방식으로 결합하여 친화성 물질쌍(A+B)을 이룰 수 있는 친화력을 가지는 것으로 뉴클레오타이드 및 비뉴클레오타이드 모두가 포함될 수 있고 물질(B)에는 라벨이 표지된다. 물질 (B)는 뉴클레오타이드 예를 들어 물질(A)의 항체 및 비뉴클 레오타이드 모두가 포함될 수 있다.

[0035] 바람직하게는 친화성 물질쌍(A+B)은 비오틴(biotin; A)+아비딘(avidin ;B), 비오틴(biotin ;A)+스트렙타비딘(streptavidin ;B), 플루오세인(A)+안티-플루오세인(B), 퍼옥시데이즈(peroxidase ;A)+ 안티-퍼옥시데이즈(B), 디니트로페놀(DNP ;A)+항-2,4-디니트로페놀(anti-2,4-dinitrophenol ;B), 디곡시제닌(A)+항-디곡시제닌(anti-digoxigenin ;B) 및 리간드(A)+수용체(B)로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있고 가장 바람직하게는 비오틴(biotin; A)+아비딘(avidin ;B)이다. 상기 예로 든 각 물질(A) 및 물질(B) 중 펩티드 또는 단백질은 키메라와 위상적인 구조의 변경, 활성 도메인에 다른 아미노산을 유입, 치환하거나 재배열되었으되 친화성 물질쌍(A+B)를 이룰 수 있는 것이라면 본 범주에 포함한다.

[0036] 상기 아비딘(avidin)은 당단백질로 달걀흰자에서 발견되어 새의 조직과 다른 생물에서도 발견되었으며 특히 박테리아 Streptomyces avidinii에서 나온 유사단백질이 스트렙타비딘(streptavidin)이다. Avidin과 streptavidin은 구조적으로나 기능적으로 서로 같은 단백질이다.

[0037] 아비딘 및 스트렙타비딘은 비타민 B의 하나인 바이오틴(biotin)에 특별한 친화력을 가지는바 비오틴(biotin; A)+아비딘(avidin ;B) 및 비오틴(biotin ;A)+스트렙타비딘(streptavidin ;B) 친화성 물질쌍은 열과 pH와 단백질분해효소에 상당히 안전하다.

[0038] 또한, 바람직하게는 물질(A)-접합된 링커화합물은 바이오틴-접합된 시스타민(biotin-conjugated cysteamine)이다.

[0039] 본 발명의 방법에서는 물질 (A)는 링커화합물에 접합된 상태에서 물질(B)와 특이적으로 결합하여 친화성물질쌍(A+B)을 이루도록 하고 그 다음 단계에서 물질 (B)에 표지된 라벨을 통하여 면역분석방법을 수행한다.

[0040] 상기 "면역분석방법(Immunoassay)"이란 항원-항체의 특이적인 반응을 이용하는 것으로 동위 원소, 효소, 형광물질 등을 표지로서 부가한 항원 또는 항체를 사용하여, 이와 특이적으로 반응하는 항체 또는 항원의 유무를 검출하는 방법이다. 면역분석법은 분석물질의 항체를 얻어 항체와 항원(분석물질) 사이의 반응(결합)을 측정함으

로써 분석물질을 정량한다. 면역분석방법은 항체의 항원에 대한 높은 친화도와 특이성으로 인하여 감도가 높고 전처리 과정이 거의 불필요하며 신속하고 비용이 적게든다는 장점이 있다. 면역분석방법은 표지 항원이나 표지 항체에 결합한 물질의 종류에 따라 방사면역분석법, 효소면역분석법, 형광면역분석법, 웨스턴블랏법 등으로 구분된다.

[0041] 1) 방사면역분석법(Radio immuno assay, RIA)

[0042] 인체의 물질대사기능, 호르몬의 정량, 혈액진환의 진단, 종양 marker의 분석, 간염 virus의 확인, allergy 질환과 관계있는 물질을 분석하거나 수용체들을 분석하는데 활용된다.

[0043] Conjugate하는 방사선동위원소(isotope)의 종류를 구분하면 B-ray를 발산하는 동위원소는 3H, 14C, 35S, 32P 등이며, 베타선계측기(B-scintllation counter)로 방사선량을 측정하고, r-ray를 발산하는 동위원소는 125 I, 131 I, 57Co, 75Se, 99mTc 등이며, 감마선계측기(r-scintlltion counter)로 방사선량을 측정하며 (일반적으로 많이 사용하는 동위원소는 125 I)이다.

[0044] 검체 내에 항원성 물질과 표지항원을 경쟁적으로 반응시킨 방법은 방사선량이 많이 측정될수록 검체의 농도는 낮고, 표지항체와 검체항원을 비경쟁적으로 직접 반응시킨 샌드위치 방법(diret sandwich method)은 방사선량이 많이 측정될수록 검체의 농도는 높다.

[0045]

[0046] 2) 효소면역분석법(enzyme immunoassay, EIA)

[0047] conjugate에 활성이 있는 퍼옥시다제(peroxidase ;POD)나 알칼리 포스파타제(alkaline phosphatase)등과 같은 효소를 labelling하고, 관심이 있는 항원성 물질과 conjugate와의 결합체가 기질과 반응하여 발색한 유색 농도를 광도계에 의하여 분석하는 방법이다.

[0048] 최근에는 RIA의 방사선동위원소의 처리 및 방사선에의 피폭 위험성 때문에 EIA법을 선호하는 경향이 있다. 임상에서 응용되고 있는 분야는 바이러스성 간염진단, 풍진(rubella)등의 전염병 진단, carcinoembryonic antigen(CEA)등과 암 표지물질, ferritin등과 같은 생리적 활성 물질 등을 분석하는데 널리 활용되고 있다.

[0049] 검체 내에 항원성 물질과 표지항원을 경쟁적으로 반응시킨 방법은 효소활성이 낮을수록 농도가 높고, 샌드위치 방법으로 직접 반응시키는 경우에는 효소활성이 높을수록 검체내의 농도가 높다.

[0050]

[0051] 3) 형광면역분석법(fluorescence immuno assay)

[0052] 주로 면역조직화학(immunohistochemistry)에서 사용되며 조직표본상에서 세포내의 단백질이나 핵 내의 단백질을 검출 분석하는데 사용된다. 또한 cytofluorometer를 사용하여 부유세포의 표면항원을 분석하는데도 활용된다. 조직화학에서는 형광색소 대신에 peroxidase를 표지한 ELA법을 사용하기도 한다. 이 분석법에 사용되는 conjugate에 결합하는 형광색소는 녹색 형광색소인 fluorescein isothiocyanate나 적색 형광색소인 tetramrthyl rhodamine isothiocyanate을 주로 사용한다.

[0053]

[0054] 4) 웨스턴블럿법(Western blot method)

[0055] 웨스턴블럿법은 관심이 있는 유전자가 합성한 단백질에 대한 항체에 방사선동위원소나 퍼옥시다제(peroxidase)와 같은 효소를 labelling한 probe로 특이적인 항원 항체 반응을 이용하였기 때문에 특정 단백질을 확인하는데 유용한 방법이다. 인체 내의 특정 유전자나 배양세포의 유전자 발현에 합성된 단백질을 확인하기 위하여 검체를 단백질 marker와 함께 SDS-PAGE를 실시한다. 단백질 분획들을 nitrocelluilse membrane에 이동 흡수시킨 후 관심이 있는 단백질에 대한 항체에 방사선 동위원소를 부착한 probe를 가하여 특이적인 항원항체 반응을 실시한 membrane을 분석하면 특정 단백질의 합성을 확인할 수 있다.

[0056] * Autoradiography: 감광되지 않은 X-ray film에 방사선 동위원소를 함유한 검체를 올려놓고, 냉암소에서 방치하면 방사선 동위원소가 발산하는 방사선에 의하여 X-ray film을 감광하고, 이를 현상하면 감광된 분호기을 확인할 수 있다.

[0057] 본 발명에 있어서, (B)물질에 표지된 라벨은 방사선동위원소, 발색효소 및 형광물질로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있으며, 상기 라벨의 분석은 방사면역분석법(Radio immuno assay), 효소면역분석법(enzyme immunoassay), 형광면역분석법(fluorescence immuno assay) 및 웨스턴블랏법(Western blot method)으로 이루어진 군 중에서 선택된 방법으로 수행될 수 있다.

[0058] 상기 효소변역분석법 또는 웨스턴블랏법을 수행하기 위해 표지되는 효소는 예를 들어, 알칼리 포스파타제(alkaline phosphatase), 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), β-갈락토시다아제, 우레아제(urease), 루시퍼라제(luciferase), 로다민(rhodamine), 플루오레세인 (fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 루미놀, 이소루미놀, 아크리디니움 에스테르가 있다. 각 효소에 적합한 당업계에 공지된 다양한 기질이 사용될 수 있으나 예를 들어, alkaline phosphatase은 soluble-PNPP, insoluble-NBT/BCIP, Fast Red TR/As-MX), beta-galactosidase는 soluble-ONPG, insoluble-BCIG/X-gal, glucose oxidase는 insoluble-NBT/PMS, 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP)는 루미놀 용액과 과산하수소(H_2O_2) 등이 각 효소의 기질로 사용될 수 있다.

[0059] 본 발명의 구체화된 예에 따르면 웨스턴블랏법에 따라 면역분석을 수행하였고, (B)물질에 표지된 효소는 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP)이다.

[0060] 보다 바람직하게는 본 발명의 방법을 이용하여 검출하고자 하는 디하이드로알라닌은 시료 내 셀레노시스테인(selenocysteine) 아미노산 잔기가 산화스트레스에 의해 손상되어 셀레노시스테인으로부터 셀레늄을 소실한 디하이드로알라닌이다.

[0061] 상기 "산화스트레스"는 활성산소 (reactive oxygen species)에 의해 발생되는 것으로 산소이온, 유리 라디칼, 과산화물 등을 포함한다. 과잉의 활성산소가 다양한 생체성분을 다양한 형태로 산화, 손상, 변성시킨다. 활성산소의 생성 원인으로는 내부적 원인과 외부적 원인으로 구분된다. 내부적 원인으로 산소 호흡시 에너지를 만들고 물로 환원되는 과정의 세포전달체계 내에서 축적을 들 수 있고, 항생제, 항암제, 독성 화합물, 기타 전이 금속 등의 작용과 같은 여러 가지 기전 등의 외부적 원인에 의해서 생성되기도 한다.

[0062]

[0063] 본 발명에서의 용어, "시료"에는 산화스트레스를 받아 산화 손상되었을 가능성 있다면 모두 포함되고 박테리아, 세포, 조직-유래 추출물, 파쇄물(lysate), 정제물, 혈액, 혈장, 혈청 및 림프에 한정되지 않는다.

[0064] 바람직하게는 상기 세포는 적혈구이다. 적혈구의 수명은 약 120일로 이 기간 동안 몸 전체의 혈관을 통해 약 400Km에 달하는 거리를 이동하게 되므로 적혈구가 받는 산화적 스트레스는 적혈구의 생존 기간 동안 전체적으로 영향 받는 산화적 스트레스를 반영하게 된다. 적혈구는 유전적인 차이뿐 아니라, 흡연 같은 개개인의 외적인 습관의 차이, 독성물질이나 당뇨나 부분적 염증 같은 병리학적인 차이에 의해서도 많은 산화적 스트레스를 받는다고 알려져 있기 때문에 적혈구내의 GPx1의 디하드로 알라닌을 검출하는 것은 신체내의 산화적 스트레스 정도를 측정하는데 적합한 좋은 지표가 될 수 있다.

[0065] 보다 구체적으로 시료의 분석 대상은 셀레노시스테인을 가지고 있는 효소이며, 예를 들어, 글루타치온 페록시다아제(glutathione peroxidase ;GPx), 5'-deiodinase, 사이오레독신 리덕테이즈(thioredoxin reductase)가 포함된다.

[0066] 또한, 바람직하게는 본 발명의 방법에서 상기 (a) 단계 전에 알킬화제(alkylating reagents)로 시료 내의 유리 설프히드릴기 (free -SH)나 셀레노기(-SeH)를 블로킹 (blocking)시키는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0067] 상기 알킬화제는 예를 들어, 요도아세테이트 (iodoacetate) 또는 요도아세타미드 (iodoacetamide)가 있다.

[0068] Idoacetate와 idoacetamide는 cysteine의 free-SH나 selenocysteine의 SeH기에 선택적으로 반응하여 blockingh 함으로써 디하드로알라닌 검출 과정에서 일어날 수 있는 SH기 산화- SOH, SO2H가 되거나 disulfide 결합-와 SeH

기의 산화-SeOH, SeO2H가 되거나 디하드로알라닌이 되는 것, **seleno-sulfur** bond를 형성하는 것-를 저해하기 때문에 실험과정에서 생기는 산화로 디하드로알라닌이 생기는 것을 초기형성된 디하드로알라닌만을 검출할 수 있다.

[0069] 본 단계는 (a)단계 이전에 수행되기만 하면 되고, 상기 물질(A)-접합된 링커화합물을 만드는 단계와는 선후 불문한다. 따라서 물질(A)-접합된 링커화합물을 만드는 단계 이후에 수행될 수도 있고 본 단계를 수행한 후에 물질(A)-접합된 링커화합물을 만들 수도 있다.

[0070] 본 발명의 다른 양태에 따르면 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 시료 내 셀레노시스테인 (selenocysteine) 아미노산 잔기가 산화스트레스에 의해 손상되어 셀레늄이 없는 디하이드로알라닌(dehydroalanine)으로 전환된 정도를 측정하는 방법을 제공한다.

[0071] (a) 친화성 물질쌍(A+B) 중 한 물질(A)과 접합되고 디하이드로알라닌의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 할 수 있는 관능기를 가지는 물질(A)- 접합된 링커화합물,과 디하이드로알라닌이 포함된 시료를 반응시키는 단계;

[0072] (b) 상기 반응물을 라벨이 표지된 친화성 물질쌍(A+B) 중 나머지 물질(B)과 반응시키는 단계; 및

[0073] (c) 상기 (b)의 반응물의 라벨을 정량적으로 분석하는 단계.

[0074] 본 발명에서의 용어, "셀레노시스테인 아미노산 잔기"는 활성산소와 반응을 진행할 수 있는 잔기를 의미한다.

[0075] 상기 방법은 디하이드로알라닌의 존부 및/양을 검출하는 방법을 제공하되 상기 방법은 산화적스트레스에 의해 셀레노시스테인에서 셀레늄이 유리되어 전환된 디하이드로알라닌을 검출하여 셀레노시스테인에서 디하이드로알라닌으로 전환된 정도를 측정하기 위해 사용된다.

[0076] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면 본 발명은 시료 내 셀레노시스테인 아미노산 잔기가 디하이드로알라닌으로 전환된 정도를 측정하는 것을 포함하여 시료의 산화스트레스의 정도를 측정하는 방법을 제공한다.

[0077] 본 발명자들은 셀레노시스테인은 산화스트레스를 받아 활성 산소와 반응하면 산화되어 셀레늄이 유리되고 셀레늄이 없는 형태의 디하이드로알라닌(dehydroalanine)으로 전환된다는 것을 발견하고, 산화스트레스가 셀레노시스테인의 디하이드로알라닌으로의 전환에 직접적인 원인이 된다는 데에 기초하여 상기 방법을 제공한다. 시료 내 셀레노시스테인의 디하이드로알라닌으로의 전환 정도 측정은 시료의 산화스트레스 정도의 척도가 될 수 있다.

[0078]

[0079] 상기 "산화스트레스"는 활성산소 (reactive oxygen species)에 의해 발생되는 것으로 과잉의 활성산소는 다양한 생체성분을 다양한 형태로 산화, 손상, 변성시킨다. 활성산소의 생성 원인으로는 내부적 원인과 외부적 원인으로 구분된다. 내부적 원인으로 산소 호흡시 에너지를 만들고 물로 환원되는 과정의 세포전달체계 내에서 축적을 들 수 있고, 항생제, 항암제, 독성 화합물, 기타 전이 금속 등의 작용과 같은 여러 가지 기전 등의 외부적 원인에 의해서 생성되기도 한다.

[0080] 상기 "활성산소"에는 슈퍼옥사이드래디컬(Superoxideradical), 하이드로옥시래디컬(hydroxyradical), 하이드로젼 퍼옥사이드(hydrogen peroxide), 싱글렛 옥시젼(singlet oxygen)이 포함되고 이에 한정하지 않는다.

[0081] 상기 "시료"에는 산화스트레스를 받아 산화 손상되었을 가능성이 있어 셀레노시스테인으로부터 전환된 디하이드로알라닌이 포함되어 있는지 여부를 확인하고자 하는 대상이라면 모두 포함되고 박테리아, 세포, 조직-유래 추출물, 파쇄물(lysate), 정제물, 혈액, 혈장, 혈청 및 림프에 한정되지 않는다.

[0082] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면 본 발명은 물질(A)-접합된 링커화합물을 포함하는 디하드로알라닌 검출용 조성물을 제공한다. 상기 물질(A)-접합된 링커화합물은 친화성 물질쌍(A+B) 중 한 물질(A)과 상기 한 물질(A)과 결합능이 있는 제1 관능기 및 디하이드로알라닌의 CH_2기와 마이클 첨가 반응(Michael addition reaction)을 하는 제2 관능기를 갖는 링커화합물을 반응시켜 만든 것이다.

[0083] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

효 과

[0084] 본 발명에 따르면 종래 유리된 셀레늄의 양을 광학적인 방법으로 측정함으로써 디하이드로알라닌(dehydroalanine)이 생성되었다는 것을 간접적으로 예상하는데 그칠 수 밖에 없는 한계 및 그 측정방법의 불편함과 기계 사용의 용이성이 떨어져 접근성이 떨어지는 단점을 극복할 수 있을 뿐만 아니라 정제된 단백질 뿐만 아니라 세포 파쇄물을 대상으로 디하이드로알라민의 검출이 가능하다. 또한, 산화스트레스에 의한 셀레노시스테인의 손상정도를 면역분석법으로 정량적으로 용이하게 측정할 수 있기 때문에 신체내의 산화스트레스의 정도를 나타내주는 새로운 지표로서 사용될 수 있는 가능성이 충분하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0085] **실시예 1. 실험 재료 및 실험방법**

[0086] 1) 노화된 적혈구의 준비

[0087] 적혈구의 노화가 진행됨에 따라 활성산소나 그 밖의 스트레스에 의해서 세포내의 구성요소들이 손상을 받아 세포내의 밀도가 높아지는 것은 잘 알려져 있다. 이 같은 특성을 이용해서 적혈구를 밀도차에 의해 상대적인 수명에 따라 원심분리로 분획할 수가 있다. 혈관에서 채취된 혈액 20ml을 PBS buffer에 희석하여 1500 X g로 실온에서 10분간 원심분리하면 혈장이 완전히 제거되고 적혈구는 아래에 남게 되는데 이 과정을 세 번 반복하였다. 이 과정 후 얻은 10ml의 적혈구에 10 ml의 PBS를 첨가하여 50% hematocrit를 만든다. 밀도차에 의한 원심분리를 위해 PBS에 5% BSA와 Percoll을 첨가하되 Percoll이 각각 85, 76, 72, 68, 66%의 농도가 되도록 만든다. 이 농도의 Percoll을 density gradient기구를 이용하여 20ml의 원심분리용 용기에 농도가 높은 것부터 차례대로 아래서부터 4 ml씩 첨가하여 농도구배가 있는 층이 있도록 만든다. 이 층의 가장 상부표면에 농도구배층이 흐트러지지 않도록 50% hematocrit 적혈구를 4ml을 옮긴 뒤에 4000 X g로 4℃에서 15분간 원심분리하면 적혈구의 4개의 층이 생기는데 수명이 오래된 것은 제일 아래에 최근에 만들어진 것은 제일 위에 있게 된다. 이를 위에서부터 F1, F2, F3, F4로 명명하였다.

[0088] 2) 바이오틴과 시스타민을 반응하여 바이오틴이 접합된 시스타민을 만드는 단계

[0089] 도 1은 바이오틴과 시스타민을 반응하여 바이오틴이 접합된 시스타민을 만드는 과정을 보여준다. 우선 0.1 M $NaHCO_3$에 시스타민·2HCl을 50mM 농도로 녹인 150 ㎕과 DMF 에 EZ-linked N-hydroxysuccinimide 바이오틴을 50 mM 농도로 녹인 용액 50 ㎕을 섞은 후에 상온에서 1시간 동안 교반기에서 반응시켰다. 여기에 1M dithiothreitol을 20 ㎕을 첨가하여 상온에서 1시간동안 더 교반기에서 반응시켜 바이오틴-시스타민 합성물이 환원되어 바이오틴-시스타민으로 되도록 하고 이것을 C18 column (4.6 by 25 cm) 에서 시료를 넣어 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 이용해서 환원된 형태의 바이오틴-시스타민을 수득하였다. 그 후, SpeedVac을 이용하여 말린 후에 matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight (MALDI-TOF) 질량분석기(mass spectrometry ; MS)를 이용하여 정확한 분자량을 측정한 후 바이오틴-시스타민이 합성된 것을 확인하였다.

[0090] 3) 바이오틴-접합된 시스타민과 셀레놀이 손상된 형태의 디하이드로알라닌의 반응 유도

[0091] 여러 셀레노프로테인(selenoprotein)중에서 생체내 항산화 작용에 중요한 효소인 글루타티온 페록시다아제 1(glutathione peroxidase 1, Gpx1)에서 디하이드로알라닌(dehydroalanine)의 생성을 알기 위해, 수명에 따라 분획된 적혈구 F1, F2, F3, F4에 글루타치온 퍼록시다제 1에 대한 단일클론 항체로 면역침강(immunoprecipitation)하였다. 이 침강물에 10mM iodoacetamide를 첨가하여 상온에서 30분간 alkylation반응을 시킨 후 trichloroacetic acid 를 10% 되게 첨가하여 단백질을 침전시킨 후 1% SDS가 포함된 100㎕의 0.1M $NaHCO_3$ (pH 10.0)용액에 넣어 녹인후에 여기에 바이오틴-접합된 시스타민 합성물을 5mM이 되게 첨가한 후 37℃에서 18시간 교반 반응시켰다.

[0092] 4) 반응물을 SDS-PAGE로 전기 영동 후에 nitrocelluose나 PVDF membrane에 이동시켜 HRP-streptavidin 단백질과 반응하여 ECL용액으로 감광하는 단계

[0093] 위에서 반응시킨 RBC 분획을 SDS-PAGE로 전기 영동하여 분자량에 따라 나눈 다음 nitrocelluose나 PVDF membrane에 전기이동(transfer)하여 이 membrane에 아비딘(avidin) 단백질에 HRP (Horseradishperoxidase)가 붙은 단백질을 사용하면 아비딘과 바이오틴의 특이적 결합으로 인해 붙게 된다. 여기에 HRP의 기질인 루미놀 용액과 과산화수소(H_2O_2)를 처리한 후 면역학적 감광(western blotting) 방법을 사용하면 글루타치온 퍼록시다제 1의 위치에서 정량적으로 chemiluminescence가 나타나서 이것을 측정할 수 있다.

[0094] **실시예 2. 실험 결과**

[0095] 상기 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여, 적혈구가 노화되면 글루타치온 퍼록시다제 내에 셀레노시스테인이 디하이드로알라닌으로 전환되는지 여부를 확인하였다. HRP-표지된 스트렙타비딘으로 인지된 밴드의 블랏 강도는 적혈구의 노화 정도에 따라 증가되는 양상을 보였다(도 2a). 이는 글루타치온 퍼록시다제의 셀레노시스테인이 헴산화작용(heme autoxidation)에 따른 산화스트레스에 노출되는 기간에 상응하여 디하이드로알라닌으로 전환된다는 것을 보여준다. 즉, 도 2a는 이러한 과정을 통해 디하이드로알라닌(dehydroalanine)이 정량적으로 검출되는 것을 보여주는데 상기 도면에서 나타나는 바와 같이 적혈구가 노화된 상태일수록 검출되는 디하이드로알라닌(dehydroalanine)의 양이 많이지는 것을 알 수 있다.

[0096] 또한, 노화가 진행되는 동안에 퍼록시데이즈 활성도 감소가 셀레놀의 소실에 동반되는 것인지 알아보고자 적혈구 용해물을 ph 6.5에서 BIAM으로 알킬레이션시켰다. BIAM으로 표지된 퍼록시데이즈의 밴드 강도는 노화가 진행될수록 감소한다. 또한, 면역침강을 통해 분석된 바에 따르면 글루타치온 퍼록시데이즈의 양은 동일하거나 혹은 약간 증가했으나 퍼록시데이즈의 활성도는 노화가 진행되면서 감소했다.이것은 수명이 길수록 활성산소에 의한 산화스트레스가 증가하고 이로 인해 적혈구가 손상을 받으며 특히 활성산소에 민감한 셀레노시스테인(selenocysteine)의 손상이 있음을 나타내며 도 2b는 이로 인해 글루타치온 퍼록시다제 1의 효소 활성이 감소되는 것과 깊은 연관이 있음을 보여준다.

[0097] 1-1) 외부의 과량의 H_2O_2에 노출되어 산화적 손상을 입은 적혈구의 준비

[0098] 바이오틴과 시스타민을 반응하여 바이오틴이 접합된 cysteamine을 만드는 단계를 거쳐 바이오틴 -접합된 시스타민과 selenol이 손상된 형태의 dehydroalanine의 반응 유도하였다. 상기 반응물을 SDS-PAGE로 전기 영동 후에 nitrocelluose나 PVDF membrane 에 이동시켜 HRP-streptavidin단백질과 반응하여 ECL용액으로 감광하였다.

[0099] 1-2) 글루코스 옥시데이즈에 의해 세포 외부에서 생산된 H_2O_2에 대한 적혈구 내의 항상화제의 효과

[0100] 하이드로젼 퍼록사이드(Hydrogen peroxide)가 적혈구의 원형질막을 통과하면, 적혈구 내에 항산화제가 활성산소를 제거한다. 항산화제는 외부 환경에서 기인하여 탐식세포(phagocytic cell)나 독성으로 인한 산화 손상으로부터 세포들을 보호하는 역할을 한다. 적혈구 내에 세포외부의 H_2O_2의 효과를 시험하기 위해 고농도의 글루코스(4500 mg/L)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 내 세포 (50% hematocrit)에 다양한 양의

글루코스 옥시데이즈(glucose oxidase)를 첨가하였다. 글루코스 옥시데이즈는 β-D-glucose가 D-glucono-δ-lactone 산화되고 O_2를 H_2O_2 환원되도록 촉매 작용을 한다. 글루코스 옥시데이즈와 적혈구를 37° C 에서 3시간 동안 둔 결과 농도에 비례하여 글루타치온 퍼록시데이즈의 활성도(도 3b) 및 셀레놀의 함량은 감소(도 3c)하였고, 동시에 디하이드로알라닌의 함량은 증가하였다(도 3a).

[0101] 2-1) 내부의 과량의 H_2O_2에 노출되어 산화적 손상을 입은 적혈구의 준비

[0102] 바이오틴과 시스타민을 반응하여 바이오틴이 접합된 시스타민을 만드는 단계를 거쳐 바이오틴 -접합된 시스타민과 셀레놀이 손상된 형태의 디하이드로알라닌의 반응 유도하였다. 상기 반응물을 SDS-PAGE로 전기 영동 후에 nitrocelluose나 PVDF membrane에 이동시켜 HRP-streptavidin단백질과 반응하여 ECL용액으로 감광하였다.

[0103] 2-2) 아닐린(aniline)에 대한 적혈구 내에 항산화제 효과

[0104] 아닐린(aniline)과 같은 산업 화학물질 뿐만 아니라 dapsone, sulfonamides, phenacetin, 및 primaquine 등의 다양한 약물은 용혈성 빈혈(hemolytic anemia)을 일으킨다. 이러한 아릴라민 화합물들이 간에서 대사되어 생긴 N-하드록실아릴아민들이 적혈구내의 헤모글로빈과 반응하여 슈퍼옥사이드 어니언을 생성하게 되면 그 결과 적혈구내 부가 활성산소가 발생한다. 그러한 환경적 화학물질에 의해 생산된 외부 산화스트레스의 효과를 시험하고자 다양한 기간동안 20 mM aniline hydrochloride와 적혈구 50% hematocrit 를 담가두었다. 그 결과 어닐린에 노출된 적혈구 내의 글루타치온퍼록시다제의 셀레놀의 함량(도 4c)과 활성도(도 4b)는 시간이 지날수록 감소하는 반면 디하이드로알라닌의 함량은 점차 증가한다(도 4a)는 것을 알 수 있었다.

산업이용 가능성

[0105] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 산화스트레스에 의한 셀레노시스테인의 손상정도를 면역분석법으로 정량적으로 용이하게 측정할 수 있기 때문에 신체내의 산화스트레스의 정도를 나타내주는 새로운 지표로서 사용될 수 있는 가능성이 충분하다고 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0106] 도 1은 바이오틴과 시스타민을 반응하여 바이오틴이 접합된 시스타민을 만드는 단계를 보여준다.

[0107] 도 2a는 적혈구를 수명에 따라 분획한 후 본 발명에 따라 글루타치온 퍼록시다제 1(Gpx1)의 디하이드로알라닌의 양을 측정한 결과를 나타내는 western blot 결과이다.

[0108] 도 2b는 도 2a의 조건에서 나타나는 글루타치온 퍼록시다제 1의 효소 활성의 정도를 보여준다.

[0109] 도 2c는 도 2a의 조건에서 나타나는 글루타치온 퍼록시다제 1의 셀레놀의 양을 측정한 결과를 나타내는 western blot 결과이다.

[0110] 도 3a는 glucose oxidase를 정량적으로 처리하여 외부에서 H_2O_2를 생성하는 시스템에서 적혈구에 영향을 준 후에 본 발명에 따라 글루타치온 퍼록시다제 1의 디하이드로알라닌의 양을 측정한 결과를 나타내는 western blot 결과이다.

[0111] 도 3b는 도 3a의 조건에서 나타나는 글루타치온 퍼록시다제 1의 효소 활성의 정도를 보여준다.

[0112] 도 3c는 도 3a의 조건에서 나타나는 글루타치온 퍼록시다제 1의 셀레놀의 양을 측정한 결과를 나타내는 western blot 결과이다.

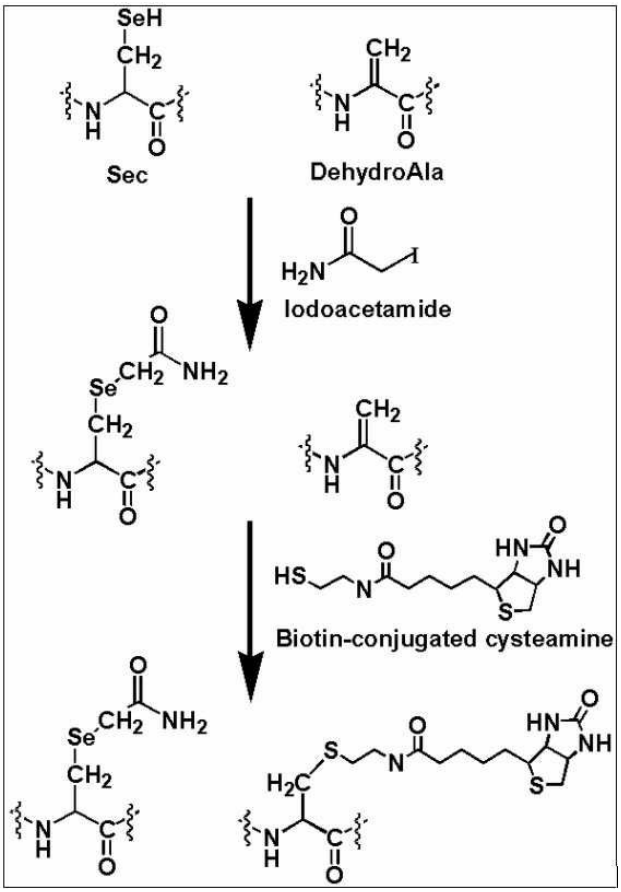
[0113] 도 4a는 aniline hydrochloride를 시간에 따라 처리하여 적혈구 내부에서 H_2O_2를 생성하는 시스템에서 적혈구에 영향을 준 후에 본 발명에 따라 글루타치온 퍼록시다제 1의 디하이드로알라닌의 양을 측정한 결과를 나타내는 western blot 결과이다.

[0114] 도 4b는 도 4a의 조건에서 나타나는 글루타치온 퍼록시다제 1의 효소 활성의 정도를 보여준다.

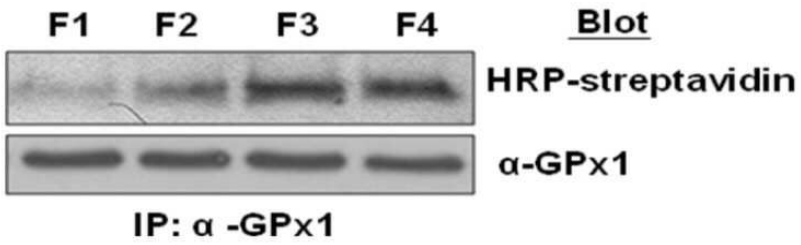
[0115] 도4c는 도 4a의 조건에서 나타나는 글루타치온 퍼록시다제 1의 셀레놀의 양을 측정한 결과를 나타내는 western blot 결과이다.

도면

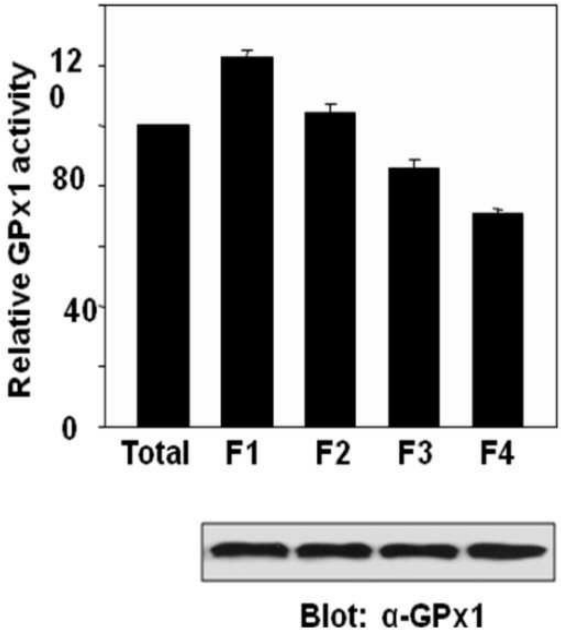
도면1



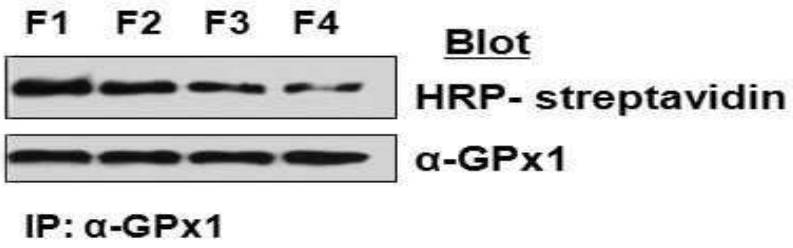
도면2a



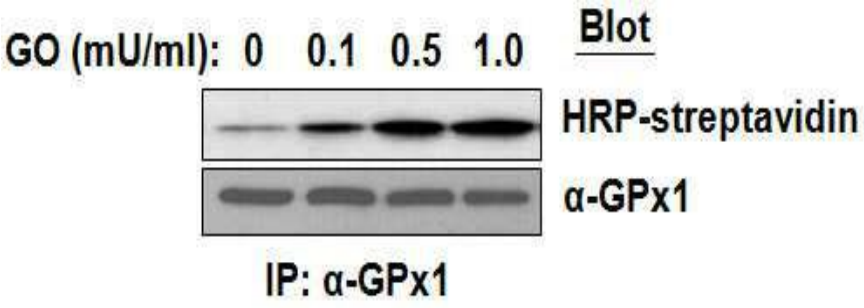
도면2b



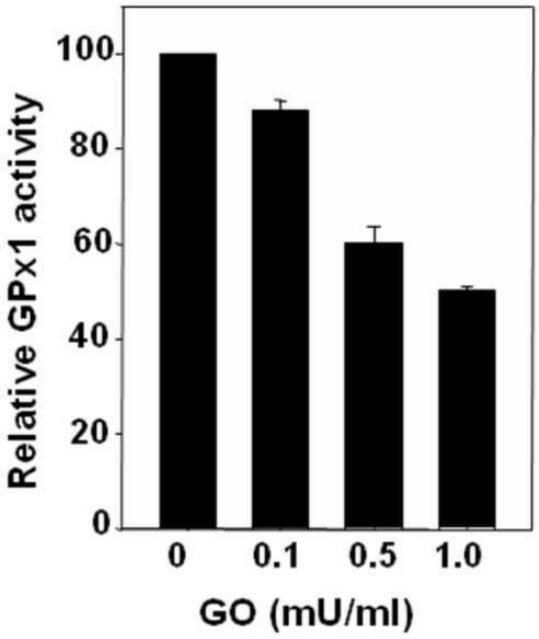
도면2c



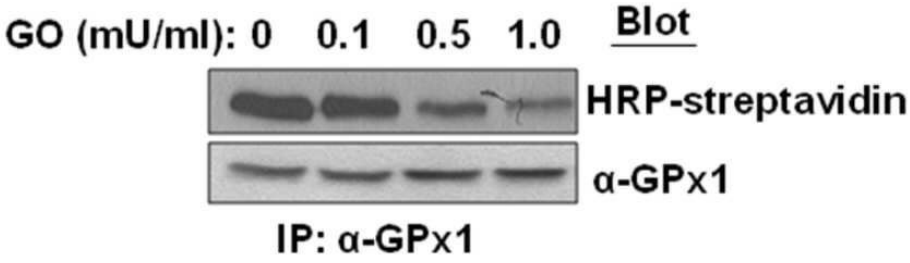
도면3a



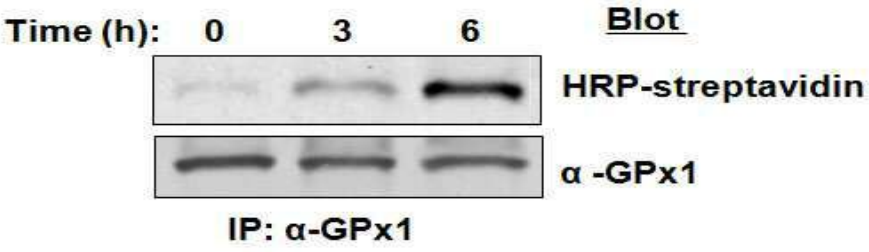
도면3b



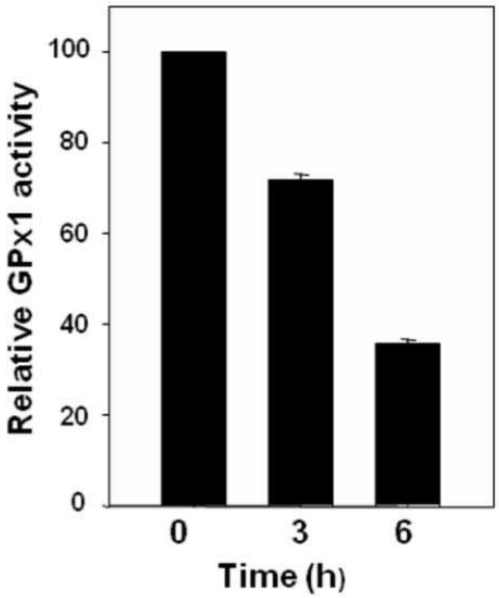
도면3c



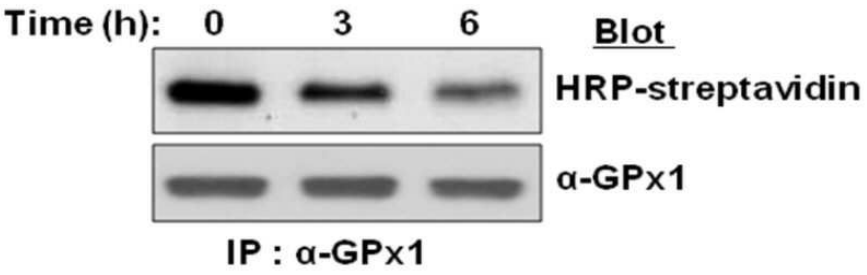
도면4a



도면4b


Relative GPx1 activity
100
80
60
40
20
0
0
3
6
Time (h)

도면4c


Time (h):
0
3
6
Blot
HRP-streptavidin
α-GPx1
IP : α-GPx1