(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0015388
(43) 공개일자 2009년02월12일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0079677
(22) 출원일자 2007년08월08일
심사청구일자 2007년08월08일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
설동근
서울시 중구 신당 4동 약수하이츠아파트 111-106호
(74) 대리인
이문섭, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 3 항

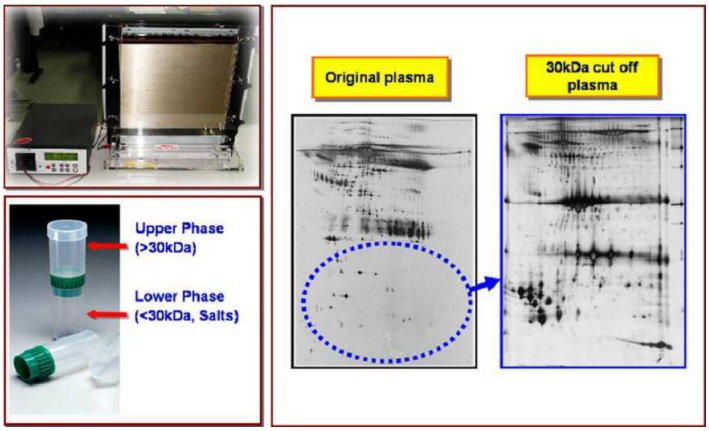
(54) 저분자 혈장 단백질의 분리정제용 버퍼 조성물

(57) 요 약

본 발명은 저분자 혈장 단백질의 분리정제용 버퍼 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 30kDa 컷오프 막과 신규 버퍼 시스템 개발을 통한 저분자 혈장 단백체의 분석 기법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 혈장 내에 존재하는 주요 고분자 단백질(MAHP)들로 인한 극미량의 저분자 혈장 단백질을 마스킹(masking) 하는 문제를 해결하기 위해 컷오프(cut off) 막과 새로운 버퍼 시스템을 이용함으로써 MAHP 제거 및 저분자 혈장단백질의 고효율 농축이 가능하다. 또한, 본 발명의 저분자 혈장 단백체의 프로파일링 방법을 통하여 인간의 혈액 또는 혈장으로부터 질환 또는 독성 물질에 대한 의미 있는 생체지표를 발굴할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R0608601
부처명	한국과학재단
연구사업명	MRC
연구과제명	PAH 및 Dioxin 환경에 노출된 근로자에서의 혈장 단백체생체독성지표 발굴
주관기관	의무산학협력실
연구기간	2003년 ~ 2012년

특허청구의 범위

청구항 1

6-8M 우레아(Urea), 1-3M 티오우레아(Thiourea), 20-30mM 암모늄바이카보네이트(Ammonium bicarbonate) 및 15-25% 아세토니트릴(Acetonitrile) (pH 8.0-8.5)를 함유하는 저분자 혈장 단백질의 분리정제용 버퍼 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 저분자 혈장 단백질은 혈장 샘플을 30kDa 컷오프(cut off) 막(membrane)을 이용하여 초여과 원심분리하여 얻어진 30kDa 이하의 저분자 혈장 단백질인 것을 특징으로 하는 버퍼 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항의 버퍼 조성물에 용해된 혈장 샘플을 30kDa 컷오프(cut off) 막(membrane)을 이용하여 초여과 원심분리하여 저분자 혈장 단백질를 준비하는 단계 및 상기 저분자 혈장 단백질을 1 차원(DE) 또는 2 차원(DE) 전기영동을 실시하는 단계를 포함하는 저분자 혈장 단백체의 프로파일링 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 저분자 혈장 단백질의 분리정제용 버퍼 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 30kDa 컷오프 막과 신규 버퍼 시스템 개발을 통한 저분자 혈장 단백체의 분석 기법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 혈장의 경우 인체 각 조직을 순환하면서 조직으로부터 유래하는 단백질의 가수분해 산물 및 각종 초기 바이오마커를 포함하고 있을 가능성이 매우 높다. 따라서 혈장 단백질을 분석함으로써 질병의 초기 마커를 찾으려는 연구가 이루어지고 있다.

<3> 혈장 단백체중에는 22종의 고분자 단백체들이 존재하여 단백체 분석 방법을 통한 생체지표 발굴 분석에 어려움을 주고 있다. 이러한 문제점을 극복하기위하여 혈장 단백체 분석시 고분자 단백체들의 제거가 필요한데 기존의 개발되어진 방법들은 albumin과 Immunoglobulin G (IgG)등을 antibody를 이용하여 분리하는 방법과 6종류의 antibody를 컬럼에 동시에 집약시켜 6종류의 고분자 혈장단백체들을 제거하는 방법이다.

<4> 알부민(albumin)과 IgG을 제거하는 Kit의 경우 일정한 단백체 회수율을 주지 못하며 6종류의 고분자 제거 항체 컬럼의 경우에도 16개의 고분자가 남게 되어 저분자의 혈장 단백체 분석에 어려움을 주고 있다.

<5> 항체이용 고분자 단백체 분리의 문제점과 더불어 Cut Off Membrane을 사용하는 Ultrafiltration 방법이 개발되어졌으나 buffer system이 일정한 회수율을 주지 못하고 단백체들의 분해가 발생하여 단백체 분석에 적용이 되어지지 않았다.

<6> Radhakrishna S.등은 혈장 내에 존재하는 major high molecule weight proteins(MAHP)들을 제거하기위한 방법 개발로 cut off membrane 과 25mM Ammonium bicarbonate, 20% Acetonitrile buffer를 사용하여 저분자 혈장 샘플 정제 방법을 제시하였다 (Molecular & Cellular Proteomics (2) 1096-1103). 그러나, 상기 buffer system 조성의 경우 각 membrane 별 회수율이 크고 단백체의 분해가 발견되어지는 반면, 본 발명자들이 개발한 buffer system 조성에서는 각 membrane별 일정한 회수율 양산 및 단백체의 분해가 발견되지 않음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 따라서, 본 발명의 목적은 인간 저분자 혈장 단백체 분석에서 고분자 혈장 단백체를 제거하고 저분자 혈장 단백체를 정제하기 위하여 컷오프(Cut Off) 막과 신규 버퍼 시스템을 이용하여 일정한 회수율을 양산하는 저분자 혈

장 단백체 분석기법 기술를 확립하는 데 있다.

<8> 본 발명의 인간 저분자 혈장 단백체 분석 기술은 질환 및 독성 단백체 생체 지표 발굴 연구에 효율적으로 사용될 수 있다.

과제 해결수단

<9> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 6-8M 우레아(Urea), 1-3M 티오우레아(Thiourea), 20-30mM 암모늄바이카보네이트(Ammonium bicarbonate) 및 15-25% 아세토니트릴(Acetonitrile) (pH 8.0-8.5)를 함유하는 저분자 혈장 단백질의 분리정제용 버퍼 조성물을 제공한다.

<10> 본 발명에서는, 저분자 혈장 단백질을 분리 정제하기 위하여 다양한 버퍼 시스템을 시험한 결과, 가장 바람직하게는 7M 우레아, 2M 티오우레아, 25mM 암모늄바이카보네이트, 20% 아세토니트릴, pH 8.2를 갖는 버퍼 시스템에서 각 membrane별 일정한 회수율 양산 및 단백체의 분해가 발견되지 않음을 확인하였다.

<11> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 저분자 혈장 단백질은 혈장 샘플을 30kDa 컷오프(cut off) 막(membrane)을 이용하여 초여과 원심분리하여 얻어진 30kDa 이하의 저분자 혈장 단백질인 것을 특징으로 한다. 본 발명에서는 Membrane 제조사(Millipore, Vivagen, PALL)별로 30, 50, 70, 100 kDa 등의 다양한 cut off membrane을 사용한 결과, 30kDa 컷오프(cut off) 막을 이용하는 것이 각종 질환 또는 독성물질의 생체지표가 될 수 있는 저분자 혈장 단백질을 분리하는 데 유용하다는 것을 알아냈다.

<12> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 버퍼 조성물에 용해된 혈장 샘플을 30kDa 컷오프(cut off) 막(membrane)을 이용하여 초여과 원심분리하여 저분자 혈장 단백질를 준비하는 단계 및 상기 저분자 혈장 단백질을 1 차원(DE) 또는 2 차원(DE) 전기영동을 실시하는 단계를 포함하는 저분자 혈장 단백체의 프로파일링 방법을 제공한다. 상기 1차원 전기영동은 SDS-PAGE를 사용하여 단백질을 분자량(MW)에 따라 분리하는 것이고, 상기 2차원 전기영동은 IPGphor를 사용하여 단백질을 등전점(pI)에 따라 분리한 후 SDS-PAGE를 사용하여 분자량(MW)에 따라 분리하는 것으로서, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 실시될 수 있다.

<13> 본 발명에서는, 구체적으로 30kDa cut off membrane system을 사용한 30kDa 이하의 저분자 혈장 단백체 프로파일을 통하여 질환 또는 독성 물질에 대한 의미 있는 생체지표를 발굴하기 위하여 buffer system 개발하였다. 또한, 다양한 Cut off membrane system과 다양한 buffer system들의 recovery 효용성, reproducibility 등을 확인하여 본 발명의 buffer system을 확립할 수 있었다. 본 발명자들은 인간 혈장에서의 cut off membrane system에 적합한 buffer system의 개발을 실시하여 7M Urea, 2M Thiourea, and 25mM NH_4HCO_3 +20% ACN (pH 8.2) buffer system이 인간 혈장 단백체 분석에 적합한 system임을 확인하였다. 도 1은 30 컷오프 막 시스템과 롱 젤(Long gel) 시스템을 적용한 저분자 혈장 단백체 분석 결과를 나타낸 것이다.

<14> 본 발명에 따르면, 상기 저분자 혈장 단백체의 프로파일링 방법을 통하여 인간의 혈액 또는 혈장으로부터 질환 또는 독성 물질에 대한 의미 있는 생체지표를 발굴할 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 혈장 내에 존재하는 major high molecule weight proteins(MAHP)들로 인한 극미량의 저분자 혈장 단백질을 masking 하는 문제를 해결하기 위해 cut off membrane과 새로운 buffer system의 적극 활용을 통하여 MAHP 제거 및 저분자 혈장단백질의 고효율 농축이 가능하다. 현재 인간혈장 단백체 분석을 위하여 사용되어지는 단일항체 컬럼 분리법은 22종의 MAHP전체를 제거 할 수가 없어서 저분자 혈장 단백체 분석의 어려움을 갖고 있다. 이에 반하여 본 발명은 물리적으로 MAHP를 제거하여 저분자 혈장 단백체를 정제, 농축하는 방법을 제시함으로써 실험적 편리성과 경제성을 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<15> 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.

<16> 실시예 1: 혈장 샘플 준비

<17> 이 연구를 위해 10명의 건강한 남자(20-25세)를 선별하여 금식 시켰다. 모든 사람들은 담배를 피우지 않았다. 혈액 샘플은 BD EDTA 항응혈성 튜브(vacutainers)에 담았다. 혈액 샘플을 분주하여 HIV, HBV, HCV 검사를 하고, 1300 x g, 4 ℃에서 10분 centrifugation하여 혈장을 얻었다. 혈장 샘플에 Protease inhibitor cocktail (Roche사, Germany)을 첨가하고, 혈장의 단백질 농도는 Bradford assay를 사용하여 측정하였다. 모든 사람들은 이 연구에 참여하기 위한 동의서를 작성하였으며, 이것은 고려대학교 의과대학의 인간생명윤리 위원회에 의해

인증되었다.

<18> 실시예 2: 2차원(2 Dimensional) 전기영동

<19> 2.1 저분자 혈장 단백질의 준비

<20> 저분자 혈장 단백질은 실시예 1에서 준비한 혈장 샘플을 cut off membrane(Centriplus, MWCO 30,000)을 사용하여 초여과 원심분리하여 분리하였다. 원심분리 여과 membrane은 증류수로 3000rpm에서 30min 씻어준다. 혈장 3mL를 12mL의 denaturing buffer: 1) 25mM NH4HCO3 + 20% ACN (pH 8.2), 2) 8M urea +20% ACN, 3) PBS(pH 7.4) +0.5% triton x-100 +5 mM EDTA, 4) PBS(pH 7.4) +0.2% SDS, 5) PBS(pH 7.4) +0.5% triton x-100, 6) 8M urea, 10mM DTT, 10mM Tris-HCl (pH 8.2), 0.2% SDS, 7) PBS(pH 7.4) +0.2% SDS +5 mM EDTA, 8) 40mM Tris-HCl + 20% ACN (pH 8.2), 9) 2M thiourea, 7M urea, 10) 2M thiourea, 7M urea +20% ACN, 11) 2M thiourea, 7M urea, 65mM DTT, 40mM Tris-HCl, 5mM EDTA(pH8.5), 12) 7M Urea, 2M Thiourea, 25mM NH4HCO3 +20% ACN (pH 8.2), 13) 7M Urea, 2M Thiourea, 40mM Tris-HCl +20% ACN (pH 8.2), 14) 8M urea, 2%NP-40, 40mM Tris-HCl + 20% ACN (pH8.2)를 첨가하여 희석한다. 희석된 샘플을 3~5시간 얼음 안에서 인큐베이션 시키고, 매 시간마다 sonication 해준다. 그 후 샘플을 여과 membrane에 옮기고, 옮겨진 샘플의 90%가 membrane을 통화할 때까지 swing rotor centrifuge (Union 32R Plus, Hanil co.)로 3000xg 에서 원심분리 한다. 여과된 sample(~14mL)은 cut off membrane (Vivaspin, MWCO 3,000)을 사용하여 200uLfh 농축 시키고, 정량은 변화된 Bradford assay를 사용하여 확인하였다. 샘플 준비 후, 1-DE와 2-DE는 SDS-PAGE (15%T/2.6%C and 16.5 % T/3.3%C tricine gel)로 실행하였다. 단백질을 순차적으로 추출하기 위해 친수성 혈장 단백질은 40mM Tris-HCl + 20% ACN (pH 8.2) 또는 25mM NH4HCO3 + 20% ACN (pH 8.2)버퍼와 섞어 원심분리 후 반응된 혈장의 상층액으로부터 추출하였고, 소수성 혈장 단백질은 7M urea / 2M thiourea, 25mM NH4HCO3 +20% ACN (pH 8.2) 또는 8M urea, 2%NP-40, 40mM Tris-HCl + 20% ACN (pH8.2) 버퍼를 사용하여 침전물로부터 추출하였다. 혈장에서 추출된 모든 단백질들의 회수율과 단백질의 젤 패턴은 2-DE를 통해 확인하였다.

<21> 2.2 IEF 및 SDS-PAGE

<22> 단백질 샘플 용액(300ug)은 8 M urea, 2%CHAPS, 1 %IPG buffer, 65mM DTT, 약간의bromophenol blue (BPB) 을 포함하는 재수화(rehydration) 버퍼와 혼합하여 총 샘플 볼륨이 450ul가 되도록 한다. IEF는 IPGphor (Amersham Biosciences, Amersham, UK)와 immobilized pH gradients (pH 4-7 and 3-10, 24 cm)를 사용하였다. 젤은 샘플과 함께 10시간 rehydration 시키고, 60kVh에서 focusing 하였다. IEF 후, IPG gel strips은 상온에서 Equilibration 을 15분 동안 2회 천천히 흔들어준다. 이때 첫 번째 equilibration 버퍼 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 1%w/v SDS)에는 1% DTTfmf 넣고, equilibration 버퍼 buffer에는 2.5% idoacetamide를 넣어준다. 이차원 전기영동인 SDS-PAGE에서는, 단백질을 Owl separation system runner (Owl Separation System, Portamouth, NH, USA)를 사용하여 16.5% tricine gel (35X45cm)안에서 그들의 분자량에 따라 분리하였다. 분리 조건은 냉각시설 안에서 gel당 1W로 1시간 분리 후 20W로 BPB가 바닥에 도달할 때까지 약40시간 동안 분리한다.

<23> 실시예 3: 시각화(Visualization) 및 이미지 분석

<24> 단백질은 SDS-GAGE 젤에서 분리된 후, 이미지 분석을 위해 은 염색을 이용하여 가시화하였다. 간단하게 설명하면, 젤은 50% methanol과 12% acetic acid에 고정 시키고, 50% ethanol에서 20분씩 3회 씻었다. 젤은 감도를 높이기 위해 0.02% sodium thiosulfate에서 인큐베이션 된 후 20초씩 3회 씻어졌다. 그 후, 젤은 0.1% silver nitrate안에 20분 동안 처리하고, 20초씩 2회 씻어졌다. Development 단계는 6%sodium carbonate와 0.05% formaldehyde (37%)안에서 이루어졌다. 마지막으로 40mm EDTA-Na2안에서 반응을 멈추었다. 준비된 젤은 40% methanol와 5% acetic acid안에서 60분 동안 고정되고, colloidal coomassie blue(0.1% Brilliant Blue G-250, 34% methanol, 3% phosphoric acid, 17% ammonium sulfate)용액 에서 4시간 도안 염색되었다. 염색된 젤은 젤은 바탕이 깨끗해질 때까지 1% acetic acid에서 씻고, 플라스틱 호일 안에서 4℃에 보관되었다. Silver로 염색된 젤은 300dpi 스케너(Epson expression 10000XL)를 사용하여 스캔 되고, 이미지 파일은 회색조를 사용하여 Tagged Image File (TIF)형태로 저장되었다. 흑백의 다양한 명암을 사용하는 구경측정 필터는 가시광선 농도 단위 안에서 명암이 변화하는 화소에 적용하였다.

<25> TIF형식으로 저장된 이미지는 분석을 위해 Progenesis Discovery 2-D 젤 이미지 분석 소프트웨어(Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK)로 옮겨졌다. 이 소프트웨어는 자동으로 개개의 단백질 스팟을 검출하고, 모든 젤을 교차시켜 동일한 단백질 스팟을 매치 시킨다. 가장 많은 스팟을 가진 젤을 대조 젤로 선택되고, 다른

2-D젤 안에 스팟의 자동매치와 와핑을 위해 사용된다. 이 소프트웨어는 노이즈의 측정과 교정을 위한 독점적인 알고리즘을 사용하여 스팟 볼륨을 측정하고 노이즈를 제거한다. 자동 매치 후 손으로 스팟 검출과 매칭을 적당히 검사하고 수정한다. 각 단백질 스팟의 명암은 각 젤의 총 볼륨값을 기초로 하여 평준화 되고, 각 스팟 부분의 화소 명암은 젤 안에 모든 스팟의 합에 의해 분할된다.

<26> 실시예 4: 젤내 분해(In-gel digestion)

<27> 단백질 스팟들은 gel에서 떨어져 나와 Guerreiro의 방법에 따라 디스테인된다. 그 후, 30 mM의 potassium ferricyanide 와 100mM sodium thiosulfate (1:1, v/v) 30-50mL을 젤 조각에 첨가하고, 젤 조각의 갈색이 노란색 또는 색이 없어질 때까지 가끔 섞어준다. 젤 조각은 증류수로 몇 번 씻어주고 50mM ammonium bicarbonate 100mL을 첨가하여 20분 인큐베이션 한다. 원심분리 후, 상층액은 버리고 젤 조각은 100% acetonitrile에서 젤 조각이 불투명한 흰색이 될 때까지 탈수화 시킨다. 디스테인된 젤 조각은 영매를 재거하고, 50 mM ammonium bicarbonate, 5 mM calcium chloride, and 12.5 ng/mL trypsin을 담고 있는 digestion buffer와 함께 37℃에서 12-16시간 인큐베이션 되어 재수화 된다. 펩타이드들은 100% acetonitrile고 함께 추출되어 회수되고, 이 과정은 반복된다. 추출된 펩타이드들은 합쳐져 진공상태에서 냉동되고 nano-LC-ESI-MS/MS를 위해 4℃ 에서 보관된다.

<28> 실시예 5: 나노-LC-ESI-MS/MS를 이용한 단백질 동정

<29> 펩타이드 확인을 위한 모든 MS/MS 실험은 HPLC system (Surveyor, USA)로 구성되어 있는 nano LC/MS system과 nano-ESI소스를 갖춘 ESI-4중극 이온 트랩MS (LCQ Deca XP-Plus, Thermo Finnigan, USA)를 사용하여 시행된다. 샘플 10ul은 오토 샘플러(Surveyor, USA)를 사용하여 C18 트랩 컬럼(id 300 mm, length 5mm, particle size 5 mm; LC Packings)에 주입하고, 20ul/min으로 흘리면서 용출하였다. 펩타이드들은 microcapillary 컬럼(length 150mm)안에서 분리되고 75-μm silica tubing (8-μm id orifice)안에서 C18 resin (particle size 5 mm)과 피크를 형성한다. 이동상 A, B는 0% 와 90% CAN로 구성되어있고, 각각 0.05% TFA 와 0.1% acetic acid를 포함한다. 변화도는 15분 동안 10% B로 시작해서, 3분 동안 20% B로, 65분 동안 60%, 5분 동안 100%로 흘리고, 마지막으로 20분 동안 95%로 멈춰졌다. 컬럼은 다음 분석이 시작되기 전 10분 동안 10% B로 균일화 되었다. MS와 MS/MS 스팩트라는 35%로 설정된 충돌 에너지와 2.5kV의 ESI 전압, 220℃온도로 가열된 모세관에서 얻어진다. 데이터 의존형 피크는 MS로부터 가장 풍부한 MS이온 세가지를 선택하여 사용한다. 역동적인 배출은 강하게 2회 반복하고, 0.5분 동안 반복하며 3분 동안 배출을 지속한다. Mass spectrometer 스캔 기능과 HPLC 용매 증감도는 Xcalibur 데이터 시스템(Therom Finnigan, USA)에 의해 조절되었다. MS/MS 의 매스 피크 리스트는 Bioworks (version 3.3, Thermo Electron corporation, USA)소프트웨어를 사용하여 b 와 y이온에 의해 분리되었다. SEQUEST는 the European Bioinformatics Institute (EBI) (http://www.ebi.ac.uk/)의 IPI 인간 데이터베이스 (IPI.- HUMAN.v.3.18, the number of entries were 60,090)에 일치하는 펩타이드의 MS/MS 스팩트라와 National Center for Biontechnology Information (NCBI)(the number of entries were 191,093)(ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/)에서 다운로드된 인간 서열을 사용하였다. 펩타이드/ 스팩드럼 일치의 타당성은 연관된 상호관련 스코어(XCorr)인 SEQUEST 피정의 변수 파라미터를 사용하였고, 연관된 상호관련 스코어(ΔCn)안에서 다양하게 평준화 되었다. 일치된 펩타이드 서열은 일시적으로 동일화 하기 위해 필터까지 통과해야 하고, SEQUEST는 검색한 결과를 자동저장 하였다. 단백질의 융합을 포함한 SRF파일은 필터와 종류로 설정하고, 높은 값에서 단백질 부분과 비율을 선택하고, 설정된 조전에서 종류별 펩타이드/스펙트럼을 일치시켰다. 이때 복합적인 단백질은 확인되었고, 우리는 2-DE 젤에서 측정된 pI 및 분자량과 유사한 경우에만 선택하였다. 이 연구에서 SEQUEST와 일치하는 단백질이 표시되었으며, 이 단백질들은 하나 또는 둘 이상의 펩타이드로 확인되었다. 어떤 단백질은 하나의 펩타이드로 확인되는데, BLAST 탐색이 시행되면 어떤 펩타이드 서열들은 다양한 단백질 그룹과 공존하는 것을 찾을 수 있었다.

<30> 실시예 6: Statistical Analysis (통계 분석)

<31> 통계적인 분석은 SAS version 9.1을 사용하여 시행하였다. COM(Cut-Off Membrane)의 막 회수율 변동을 시험하기 위해 two-way mixed-effect 모델로 변화를 분석(분산분석)하였다. 27개의 COM들의 효과는 무작위로 관찰되었고, 단백질 밴드의 고정효과가 관찰되었다. COM 효과의 다양한 성분 측정은 중요하며, 막 회수율은 각 COM안에 교차하는 밴드의 상대적인 값에 의해 변환되었다. 가능한 최대 측정은 다양한 성분을 측정하는데 사용됐다. 그 결과 $p<0.05$일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났다.

<32> 실험결과 1. 초여과(ultrafiltration) 유무에 따른 인간 혈장의 1-DE-PAGE 분석

<33> 3 ml의 혈장을 15 ml의 20 mM ammonium bicarbonate, 20% acetonitril, pH 8.2로 1:5 희석하고, 30 KDa COM을 통해 투입된 혈장의 90%가 통과될 때까지 3,000 x g로 초여과시켰다. 전체 또는 초여과된 혈장의 분액들을 1-DE SDS-PAGE 시키고 실버로 염색하였다. 상기 1-DE SDS-PAGE그 결과를 도 2에 나타내었다. 레인 1: 비여과된 5 ug의 전체 혈장; 레인 2, 3 및 4: 각각 1, 2, 5 ug의 초여과된 혈장.

<34> 실험결과 2: 다양한 buffer system에서의 혈장 단백질 recovery 효용성 비교 연구

<35> 다양한 변성(denaturing) 버퍼 조성물을 이용하여 1-DE-PAGE 분석을 수행하였다. 도 3은 다양한 버퍼 시스템과 30 KDa 컷오프 막으로부터 얻어진 저분자 혈장 샘플의 1-DE 패턴이다. 도 3A에서 레인 1: 25mM NH4HCO3 +20% ACN (pH8.2); 레인 2: 8M urea +20% ACN; 레인 3: PBS(pH 7.4) +0.5% triton x-100 +5 mM EDTA; 레인 4: PBS(pH 7.4) +0.2% SDS; 레인 5: PBS(pH 7.4) +0.5% triton x-100; 레인 6: 8M urea, 10mM DTT, 10mM Tris-HCl(pH 8.2), 0.2% SDS; 레인 7. PBS(pH 7.4) +0.2% SDS +5 mM EDTA. S: Sonication를 나타낸다. 도 3B에서 레인 1, 2, 및 3: 2M thiourea, 7M urea +20% ACN; 레인 4, 5, 및 6: 2M thiourea, 7M urea; 레인 7: 2M thiourea, 7M urea, 65mM DTT, 40mM Tris-HCl, 5mM EDTA (pH8.5)를 나타낸다. 작은 단백질 스팟들이 저분자 분획에서 15 KDa 영역 주위에서 검출되었으나, 상당량의 혈장 단백질들은 저분자 분획에서 검출되지 않았다. 2M thiourea, 7M urea +20% ACN를 함유하는 버퍼 시스템에서 가장 높은 혈장 단백질의 회수율을 나타내었다. 또한, 상기 urea 버퍼 시스템에서 다양한 버퍼링 시약을 가지고 1-DE-PAGE 분석을 수행하였다. 도 4는 상기 1-DE-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다. 레인 1 및 2: 25mM NH4HCO3 + 20% ACN (pH 8.2); 레인 3 및 4: 40mM Tris-HCl + 20% ACN (pH 8.2); 레인 5 및 6: 7M Urea, 2M Thiourea + 20% ACN; 레인 7 및 8: 7M Urea, 2M Thiourea, 25mM NH4HCO3 +20% ACN (pH 8.2); 레인 9 및 10: 7M Urea, 2M Thiourea, 40mM Tris-HCl +20% ACN (pH 8.2). 7M Urea, 2M Thiourea, 25mM NH4HCO3 + 20% ACN (pH 8.2)를 함유하는 버퍼 시스템에서 가장 높은 혈장 단백질의 회수율을 나타내었다.

<36> 실험결과 3: 다양한 버퍼 시스템에서의 2-DE PAGE 분석 비교

<37> 다양한 버퍼 조성물을 이용하여 2-DE-PAGE 분석을 수행하였다. 그 2-DE-PAGE 분석 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서, A: Supernatant : 40mM Tris-HCl + 20% ACN (pH8.2), B: Supernatant: 25mM NH4HCO3 + 20% ACN (pH8.2), C: Supernatant: 7M urea / 2M thiourea, 25mM NH4HCO3 +20% ACN (pH 8.2), (pI 3-10 NL, 24 x 20 cm)이다.

<38> 실험결과 4: 27 COM 및 크로마토그래피를 이용한 혈장 단백질 회수의 검증

<39> 인간 혈장에서의 30 kDa의 cut off membrane 및 buffer system의 reproducibility 실험을 실시하여 system의 안정성을 확인하였다. 혈장을 본 발명의 버퍼 시스템(7M Urea, 2M Thiourea, 25mM NH4HCO3 +20% ACN (pH 8.2)으로 1:4 희석하고 27개의 서로 다른 30 KDa COMs를 사용하여 초여과하였다. LPMM 샘플을 1-DE SDS-PAGE 시켰다. 도 6A는 27개의 cut off membrane을 사용하여 1-DE 분석결과를 나타내며, 도 6B는 1-DE상에 나타나는 단백질 Band들의 reproducibility를 이미지 분석 및 CAMAG Scanner분석을 통하여 통계적으로 검증한 것이다. 상대적 강도(relative intensity)를 이미지 분석기로 측정하여 각 밴드의 회수율을 분석하였다. 도 6C는 27 COMs로부터 얻어진 단백질 밴드들의 상대적 강도의 분포를 나타낸 것이다. 그 결과, 상기 회수 강도들은 27개 서로다른 COM으로부터 얻어진 밴드들간에 유의한 차이를 보이지 않았다.

<40> 실험결과 5: 본 발명의 버퍼 시스템의 2-DE분석을 통한 재현성 검증

<41> 신규 개발된 Buffer System을 2-DE분석을 통하여 유효성을 확립하였다. 20종류의 저분자 혈장 샘플을 본 발명의 버퍼 시스템(7M Urea, 2M Thiourea, 25mM NH4HCO3 +20% ACN (pH 8.2)을 이용하여 정제 농축 후 2-DE에 적용한 후 이미지 분석을 통하여 각 단백체 spot들의 재현성을 아래와 같이 검증하였다. 도 7은 4-7 pI 스트립 및 20개 서로다른 COMs을 이용하여 얻어진 2-DE 패턴이다. 단백질 프로파일을 분석하기 위해 Large size gels (35×45 cm)을 사용하였다. 단백질 스팟의 이미지들은 Image Master 2-DE Progenesis Discovery Software를 사용하여 분석하였다. 상기 2-DE 이미지는 초여과를 통해 얻어진 LMPP 패턴들이 재현성이 있음을 보여준다. 상기 2-DE 분석을 통해 30KDa 이하 저분자량 범위에서 587 단백질 스팟이 관찰되었다. 상기 주요 단백질의 동정은 nano-LC-ESI-MS/MS을 이용하여 수행하였다.

산업이용 가능성

<42> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 혈장 내에 존재하는 주요 고분자 단백질(MAHP)들로 인한 극미량의 저분자 혈장 단백질을 마스킹(masking) 하는 문제를 해결하기 위해 컷오프(cut off) 막과 새로운 버퍼 시스템

을 이용함으로써 MAHP 제거 및 저분자 혈장단백질의 고효율 농축이 가능하다. 또한, 본 발명의 저분자 혈장 단백체의 프로파일링 방법을 통하여 인간의 혈액 또는 혈장으로부터 질환 또는 독성 물질에 대한 의미 있는 생체지표를 발굴할 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 저분자 혈장 단백체 분석 기술개발과 더불어 그에 관련된 혈장 샘플 Prep 및 일련의 과정을 kit화 함으로서 산업화 시킬 수 있는 길을 열 수 있을 것으로 예상한다.

도면의 간단한 설명

<43> 도 1은 30 컷오프 막 시스템과 롱 젤(Long gel) 시스템을 적용한 저분자 혈장 단백체 분석 결과를 나타낸 것이다.

<44> 도 2는 초여과(ultrafiltration) 유무에 따른 인간 혈장의 1-DE-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다.

<45> 도 3은 다양한 버퍼 시스템과 30 KDa 컷오프 막으로부터 얻어진 저분자 혈장 샘플의 1-DE 패턴이다.

<46> 도 4는 본 발명의 우레아(urea) 버퍼 시스템에서 다양한 버퍼링 시약을 가지고 수행한 1-DE-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다.

<47> 도 5는 다양한 버퍼 조성물을 이용하여 수행한 2-DE-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다.

<48> 도 6A는 27개의 컷오프(cut off) 막을 사용하여 1-DE 분석결과를 나타낸 것이다.

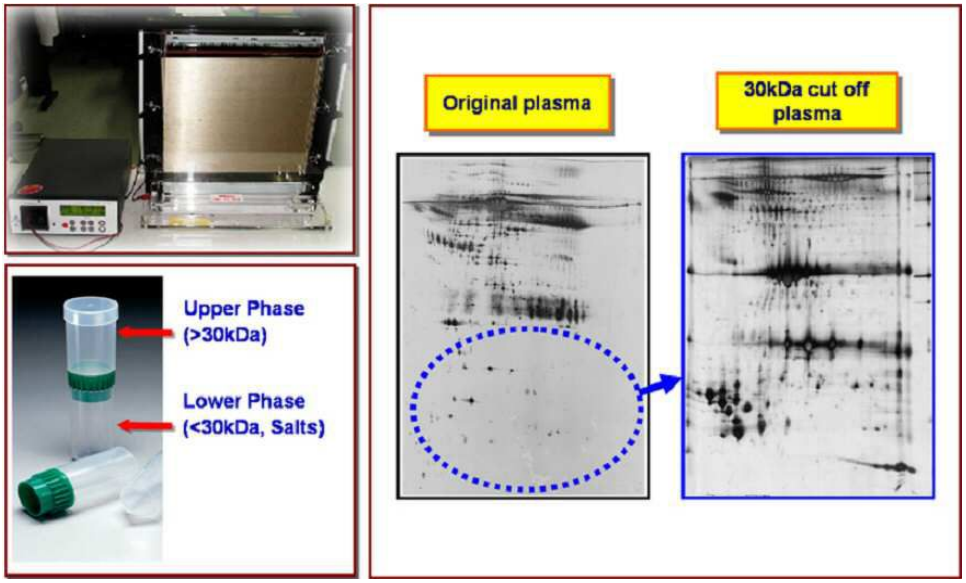
<49> 도 6B는 1-DE상에 나타나는 단백질 밴드들의 크로마토그래피를 나타낸 것이다.

<50> 도 6C는 27 COMs로부터 얻어진 단백질 밴드들의 상대적 강도의 분포를 나타낸 것이다.

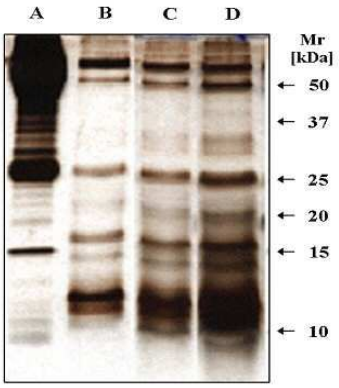
<51> 도 7은 4-7 pI 스트립 및 20개 서로다른 COMs을 이용하여 얻어진 2-DE 패턴이다.

도면

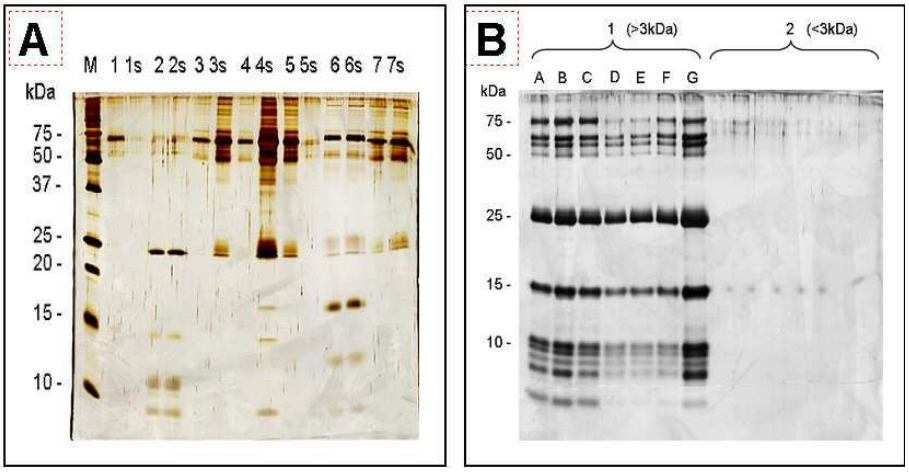
도면1



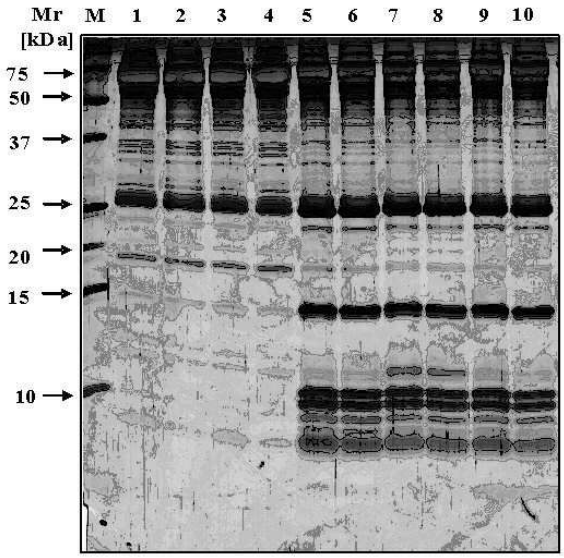
도면2


A
B
C
D
Mr
[kDa]
50
37
25
20
15
10

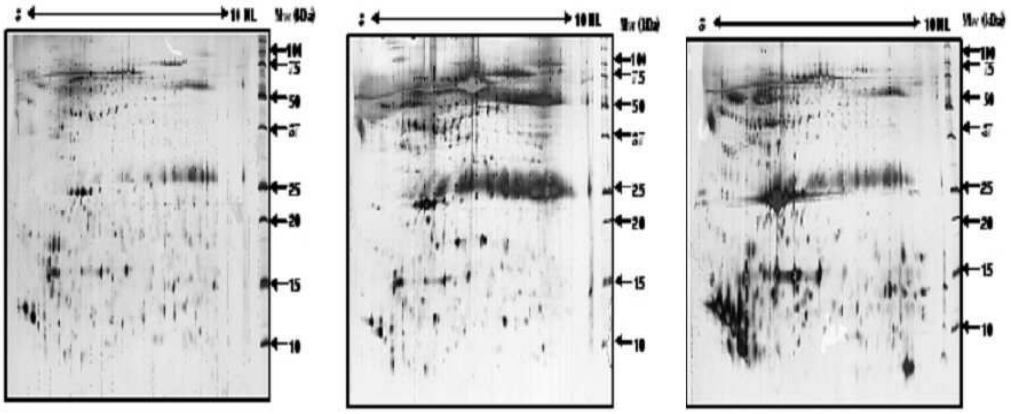
도면3


A
M 1 1s 2 2s 3 3s 4 4s 5 5s 6 6s 7 7s
kDa
75 -
50 -
37 -
25 -
20 -
15 -
10 -
B
1 (>3kDa)
2 (<3kDa)
A B C D E F G
kDa
75 -
50 -
25 -
15 -
10 -

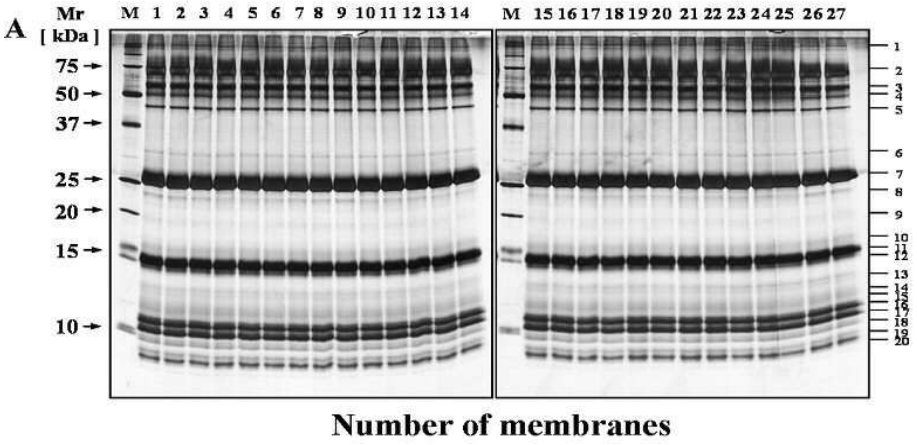
도면4


Mr
[kDa]
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
75
50
37
25
20
15
10

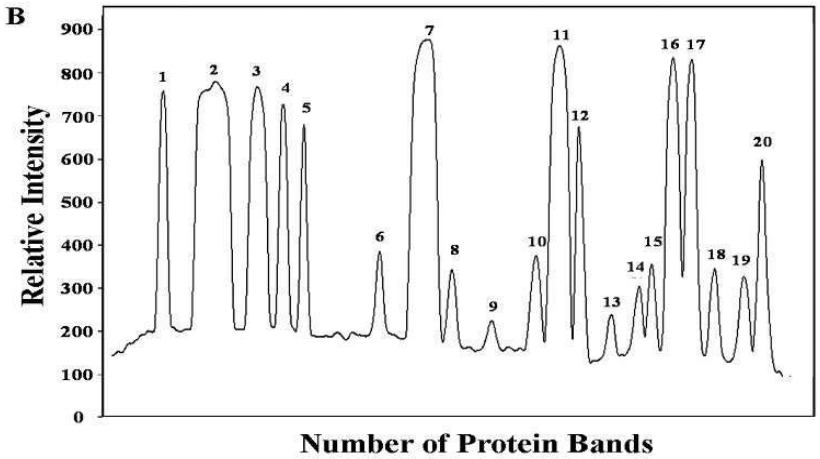
도면5



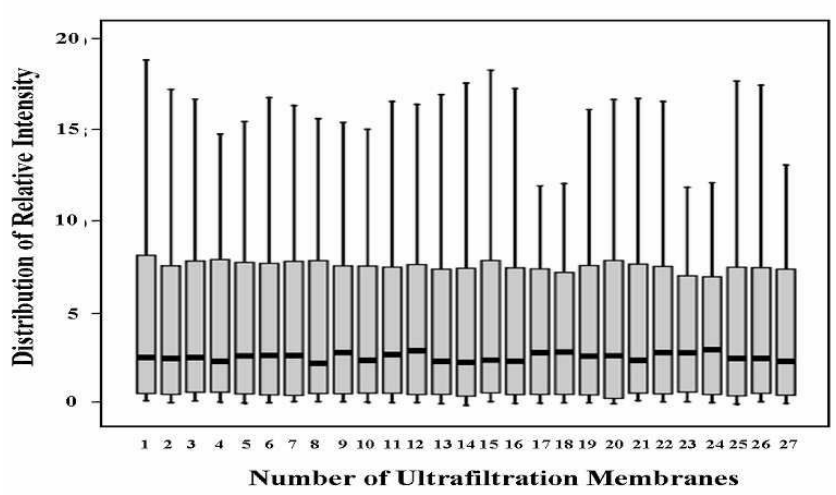
도면6a



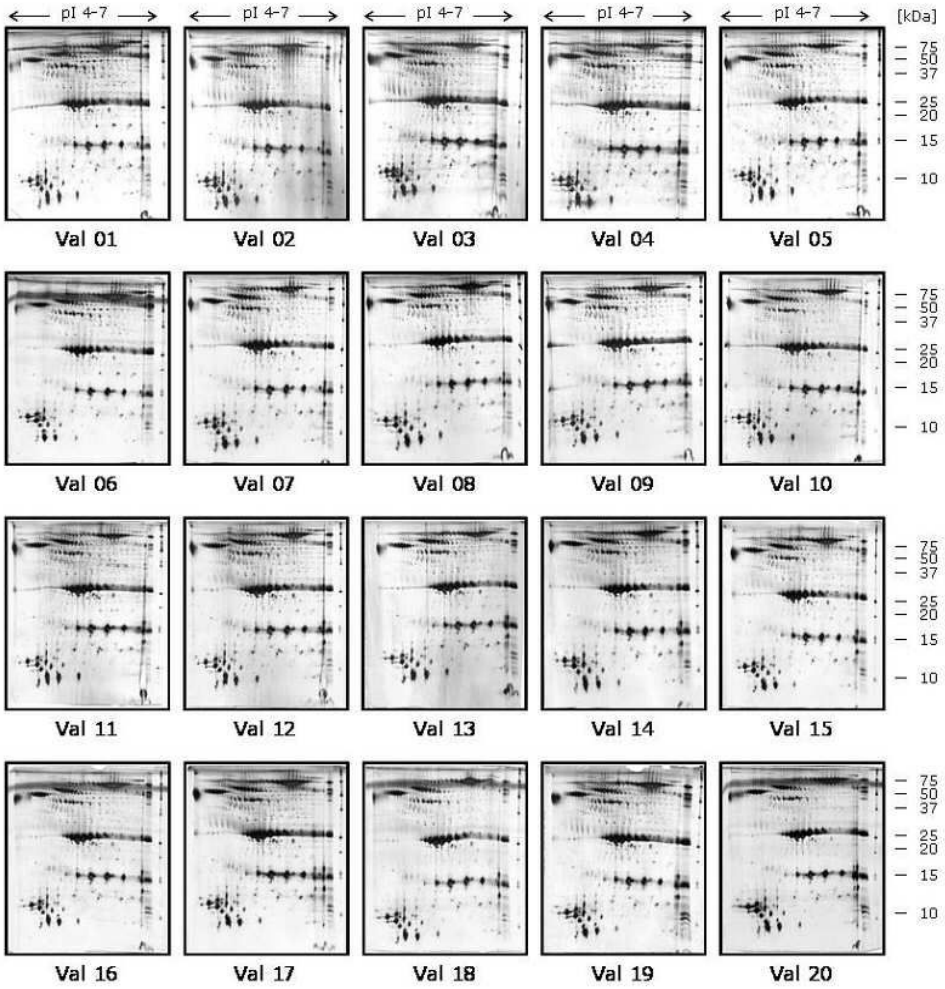
도면6b



도면6c


Distribution of Relative Intensity
20
15
10
5
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
Number of Ultrafiltration Membranes

도면7


pI 4-7
[kDa]
75
50
37
25
20
15
10
Val 01
Val 02
Val 03
Val 04
Val 05
Val 06
Val 07
Val 08
Val 09
Val 10
Val 11
Val 12
Val 13
Val 14
Val 15
Val 16
Val 17
Val 18
Val 19
Val 20