



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0069610  
(43) 공개일자 2011년06월23일

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01) B01D 59/44 (2006.01)  
C07K 1/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0126411

(22) 출원일자 2009년12월17일

심사청구일자 2009년12월17일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

정태성

경상남도 진주시 평거동 하우스토리 203-202호

노성원

경상남도 진주시 가좌동 1898번지 104호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 16 항

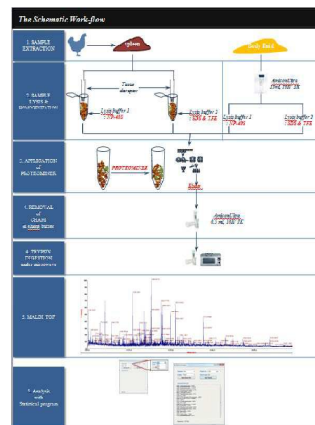
(54) 질량분석기를 이용한 병원체 진단 및 바이오마커 분석

### (57) 요약

본 발명은 (a) 시료를 수득하고 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액(lysis buffer)으로 처리하여 용해(lysis)시키는 단계; (b) 상기 용해된 시료를 특정 프로테아제로 처리하여, 시료 내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계; (c) 질량 측정 장치로 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된, 공지의 펩타이드의 질량과, 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 상기 시료 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계를 포함하는 단백질 분석, 동정 방법 및 이의 시스템에 관한 것으로,

상기(a)단계에 (ㄱ)계면활성제의 제거 단계를 추가하거나, (ㄴ)다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계를 추가하거나 또는 (ㄷ)계면활성제의 제거 단계와 함께 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계를 추가함으로써 단백질 분석 및 동정의 정확도를 더 향상시킨 단백질 분석, 동정 방법 및 이의 시스템에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**장호빈**

경상남도 진주시 가좌동 풍경채 아파트 105-905

**차인석**

경상남도 진주시 금산면 장사리 금산아이파크아파트 109-1606

**박성빈**

경상남도 양산시 소주동 세신아파트 2-409

**김영림**

경상남도 진주시 칠암동 526-6번지 402호

**하미애**

경상남도 사천시 사천읍 구암리 524 원광이안애아파트 105-1404

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0083914

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 핵심연구지원(협동연구)

연구과제명 In-solution digestion & In-silico digestion program과 결합한 Mass Spectrometry를 이용한 virus 진단 방법 개발, AI 및 ND virus 비교 및 적용

기여율

주관기관 경상대학교

연구기간 2008년 09 월 01일 ~ 2011년 08월 31일

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

시료를 특정 프로테아제로 처리하여 시료 내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계와, 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된, 공지의 펩타이드의 질량과, 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 상기 시료 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 분석 및 동정 방법.

### 청구항 2

(a) 시료를 수득하고 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액(lysis buffer)으로 처리하여 용해(lysis)시키는 단계;  
 (b) 상기 용해(lysis)된 시료를 특정 프로테아제로 처리하여, 시료 내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계;  
 (c) 질량 측정 장치로 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 측정하는 단계; 및  
 (d) 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된, 공지의 펩타이드의 질량과, 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 상기 시료 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 분석 및 동정 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서,  
 상기(a)단계에 (ㄱ)계면활성제의 제거 단계를 추가하거나, (ㄴ)다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계를 추가하거나 또는 (ㄷ)계면활성제의 제거 단계와 함께 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계를 추가하는 것을 특징으로 하는 단백질 분석 및 동정 방법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서,  
 상기 (a) 단계에서, 시료로부터 미생물을 분리하여 용해하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

제 2항에 있어서,  
 상기 (a) 단계에서, 상기 계면활성제에는 NP-40, TX-100 및 SDS(sodium dodecyl sulfate)로부터 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함 함을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

제 2항에 있어서,  
 상기 (a) 단계 후, 상기 용해액을 여과시켜 용해용 완충용액의 구성성분을 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

제 3항에 있어서,  
 상기 (ㄱ) 단계에서, 계면활성제의 제거제에는 우레아(urea), 아미콘울트라튜브(AmiconUltra tube)로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함 함을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8

제 3항에 있어서,  
 상기 (ㄷ)단계에서, 상기 계면활성제를 제거하는 단계는 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키기

전에 하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 계면활성제의 제거제에는 우레아(urea)가 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 10

제 3항에 있어서,

상기 (ㄷ) 단계에서, 상기 계면활성제를 제거하는 단계는 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시킨 후에 하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 계면활성제의 제거제에는 아미콘울트라튜브(AmiconUltra tube)를 포함 함을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 12

제 2항에 있어서,

상기 (b) 단계에서, 마이크로파를 추가로 조사하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 13

제 2항에 있어서,

상기 (c) 단계에서, 상기 질량 측정 장치는 질량 분석기인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 14

제 2항에 있어서,

상기 (d) 단계에서, 상기 프로테아제로 절단된, 공지의 단백질에 특이적으로 존재하는 펩타이드 질량의 세트와 매칭되는, 상기 시료 내 펩타이드의 질량 세트의 존재 여부를 확인함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단백질은 바이오마커를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 16

단백질로부터 유래된 펩타이드 질량 정보를 저장하고 있는 데이터베이스;

시료 내 펩타이드의 질량을 측정하는 질량 측정 장치; 및

측정된 시료 펩타이드의 질량 정보와 상기 데이터베이스의 펩타이드 질량 정보를 대비하여 상기 시료 펩타이드의 단백질 정보와 매칭되는 정보의 필터링을 수행하여 측정된 시료 펩타이드의 유래 정보를 확인하는 단백질 매칭 필터링부;

를 포함하는 단백질 분석 및 동정 시스템.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 시료 내 단백질을 신속하고 정확하게 분석하고 동정함으로써, 미생물의 동정, 질병의 진단, 육류의 부위판별, 종간의 혈통 구분, 종간의 유연관계 분석, 바이오마커의 개발 등 다양한 분야에 활용 가능한 단백질의 분석, 동정방법 및 이의 시스템에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 단백질은 생체를 구성하는 주 영양소로, 호르몬, 항체, 효소 등을 구성하며 거의 대부분의 생체반응은 단백질에 의해 지배되고 있기에 생물에 있어 단백질은 필수적이다. 단백질은 생물체내의 부위와 기능에 따라 그 형태와 구성성분이 매우 다양하며 질량도 상이하며, 건강한 개체와 병약한 개체 간에도 단백질 성분과 구조의 차이가 나타날 수 있고, 단백질은 대부분이 생물종간의 차이를 보이는 종간 단백질 특이성이 있기에 이러한 종간의 단백질 구조의 차이는 진화학적인 유연관계를 알 수 있는 좋은 지표가 되기도 한다.

[0003] 이와 같이, 단백질은 세포, 조직, 개체 및 종간의 차이를 나타내는 독특한 특이성을 지니기에, 단백질들에 대한 전반적인 분석과 동정은 세포 및 생물에 있어서 다양한 생명활동을 이해하고, 나아가 새로운 질병 진단법을 찾는 데 있어서도 매우 중요한 역할을 한다.

[0004] 한편, 문명이 발달함에 따라 1950년대 이후 새롭게 등장한 주요 전염병만 해도 20여개에 달할 정도로 신종 전염병이 득세하며 높은 치사율을 보이고 있고, 전염병을 전달하는 매개통로도 점점 다양해지고 지역, 국가 간의 교류확대로 이전보다 더 빠르고 은밀하게 변이하면서 퍼지고 있기에, 이러한 질병에 대하여 즉각적인 치료와 예방 대책을 수립하기 위해서는 매우 신속하고 정확한 진단이 요구된다. 그러나, 이들 질병들을 신속하고 적절하게 감별하여 진단할 수 있는 진단법이 만족스럽지 않아 경제적으로 막대한 손실을 초래하고 있는 실정이다.

[0005] 종래에 사용되던 질병 진단방법의 일례로는, 미생물 자체, 미생물이 면역시스템에 의하여 인식되어 반응하여 나타나는 항체의 유무를 조사하는 혈청 검사방법, 미생물 및 항체를 검사하는 면역크로마토그래피법, 핵산을 검출하는 유전자 진단법 등이 이용되고 있다. 면역크로마토그래피를 이용한 진단법은 단시간에 미생물 단백질을 확인할 수 있으나, 검출 민감도가 낮다는 단점이 있어 간이 진단에는 이용할 수 있으나, 정밀 진단용으로는 부적합하며, 또한, 혈청 검사방법으로 혈구응집억제반응(Haemagglutination inhibition (HI) test), ELISA 반응 등이 이용되고 있으나, 이들 진단법은 병원성을 확인하기 위하여 추가적인 실험이 필요하다. 또한, 널리 사용하고 있는 진단법인, 각각의 미생물의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 사용하여 중합반응이 일어나는지의 여부로 미생물 유전자의 존재 여부를 결정하는 RT-PCR의 경우, 피검체의 분변이나 장기로부터 추출한 시료 내에 존재하는 폴리사카라이드, 염과 같은 오염물질 및 시료 내에 저/고 병원성 미생물이 공존함에 따라 가음성(false negative) 결과가 나타날 수 있다. 또한 RT-PCR에 사용하는 프라이머에 따라 병원성/비병원성 균주의 감별이 어렵다. 게다가, 이러한 진단법은 사전에 병력청취, 혈액학적 분석 및 의심질병에 대한 사전조사 등의 과정이 선행되어야 하고, 이에 이어서 특정한 실험실 분석 후 진단이 이루어지는 것이 일반적이기에, 질병에 대한 신속한 조치가 불가능했고 시간적으로나 비용적인 면에서 손실이 불가피하다는 문제점이 있다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

[0006] 시료를 그대로 용해(lysis)하고 프로테아제 처리한 후 시료 내 펩타이드의 질량을 질량 분석기로 측정하는 다음, 이렇게 측정된 펩타이드의 질량과 공지된 단백질로부터 유래된 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 시료 내 단백질을 신속하고 정확하게 분석 및 동정하여 시료내 단백질이 유래된 미생물, 동물 또는 식물의 조직, 동물 또는 식물의 기관, 개체, 종 등을 신속하고 정확하게 확인하고자 하며, 또한 상기 결과를 이용하여 새로운 바이오마커를 개발하고자 한다.

### 과제 해결수단

[0007] 본 발명에서는 미지의 시료내 단백질을 신속하고 정확하게 분석, 동정함으로써 시료내 단백질이 유래된 미생물, 조직, 개체, 종을 신속히 판별하고, 상기 분석결과를 이용하여 새로운 바이오마커를 개발하고자 한다.

[0008] 본 발명자는 질병진단시 요구되었던 병력청취, 혈액학적 분석 및 의심질병에 대한 사전조사 등의 과정을 거친 다음에 특정한 실험실 분석 후 진단이 이루어지는 복잡한 절차 및 낭비되는 시간과 비용을 단축시키고자 연구를

거듭하던 중 종래의 사전절차 없이 시료내의 총체적인 단백질을 분석함으로 간단한 절차, 정확성 및 정교한 감수성을 지닌 진단이 가능한 새로운 분석 및 진단 방법을 개발하였고, 또한 이를 통해 단순히 질병의 진단뿐 아니라 미생물의 동정, 육류의 부위판별, 종간의 혈통 구분, 종간의 유연관계 분석 등 세포, 조직, 기관, 종 등의 단백질 차이가 요구되는 분석 및 동정이 필요한 모든 분야에 이를 활용할 수 있고, 분석된 단백질을 이용하여 바이오마커로 활용가능함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0009] 이하, 본 발명을 상세히 설명하도록 하겠다.

[0010] 본 발명에서는 (a) 시료를 수득하고 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액(lysis buffer)으로 처리하여 용해(lysis)시키는 단계; (b) 상기 용해(lysis)된 시료를 특정 프로테아제로 처리하여, 시료 내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계; (c) 질량 측정 장치로 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된, 공지의 펩타이드의 질량과, 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 상기 시료 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계를 포함하고,

[0011] 상기(a)단계에 (ㄱ)계면활성제의 제거 단계를 추가하거나, (ㄴ)다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계를 추가하거나 또는 (ㄷ)계면활성제의 제거 단계와 함께 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계를 추가하는 것을 특징으로 하는 단백질 분석, 동정 방법 및 이의 시스템을 제공하고자 한다(도 1).

[0012] (a) 시료를 수득하고 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액(lysis buffer)으로 처리하여 용해(lysis)시키는 단계

[0013] 본 발명에서 ‘시료’는 단백질이 함유된 모든 시료를 말하는 것으로 바이러스, 미생물, 세포, 동물 또는 식물의 조직, 동물 또는 식물의 기관, 이들의 체액 등이 포함되며, 이러한 시료의 일례로, 질병의 진단시 비장과 같은 면역기관과 그 외 체액성분, 조직 등과 같이 다양한 샘플이 될 수 있으며, 특정 질병 조직, 바이오마커를 지닌 조직, 병원성 미생물 호발 부위 시료 (예, 혈액, 조직, 객담, 뇨, 분변 등), 세포배양을 통해 증식된 시료 또는 자연계의 시료를 모두 포함하는 것일 수 있다. 상기 시료는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수득할 수 있다. 채취한 시료는 균질화(homogenation) 및 계단 희석(serial dilution) 과정을 거치는 것이 바람직하다.

[0014] 이렇게 수득된 시료에 분석하고자 하는 단백질 외에 많은 불순물이 포함되어 있는 경우, 이들을 제거하기 위하여 시료로부터 불순물을 분리하는 단계를 추가로 진행될 수 있다. 시료로부터 분석하고자 하는 단백질을 분리할 수 있다면 당업계에 공지된 어떠한 방법이든지 이용 가능하다. 한 양태로서, 다양한 적은 펩타이드를 흡착할 수 있는 항체, 레진 또는 비드를 이용하는 방법을 채택할 수 있다. 그러한 방법의 한 예로는 면역자기분리법(Immuno-Magnetic Separation, IMS)이 있다.

[0015] 시료를 그대로 사용할 수도 있고 또는 완충용액으로 처리하거나, 소니케이터, 열처리 등을 할 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서의 완충용액은 당업계에서 통상적으로 단백질 분리를 용이하게 하거나 불순물을 제거하기 위해 사용되는 것으로 완충용액의 종류는 특별히 한정되는 것은 아니나, 일례로, NP-40, NaCl, Tris-Cl, Triton X-100, SDS 또는 DTT (DL-Dithiothreitol)을 포함하는 완충용액을 사용할 수 있다.

[0016] 상기 NP-40는 하기 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계의 적용을 용이하게 하기 위한 샘플처리 단계에 사용이 적합한 계면활성제이며, NaCl은 효소나 세포활성에 맞도록 이온의 세기를 맞춰주는 역할을 하고, Tris-Cl은 약산, 약염기가 들어 왔을 때 pH가 변하지 않도록 해주는 역할을 할 수 있다. SDS(sodium dodecyl sulfate)은 세포막의 지질분자를 제거하고 단백질 변성에 의한 미생물의 용해(lysis)를 촉진시킬 수 있는데, SDS사용 일례로, 미생물의 경우 2 내지 4% SDS를 사용할 수 있으며, 조직의 경우 4% SDS를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. Triton-100은 비이온성 계면활성제로서 세포 멤브레인의 투과성을 높이는 역할을 할 수 있으며, DTT는 3차원 단백질 구조에서 디설파이드 결합을 절단하는 역할을 하여 3차원 구조에 의한 효소 등의 접근의 어려움을 완화시킬 수 있다. 완충용액에는 시료에 포함되어 있는 프로테아제의 작용을 억제시키는 목적으로 프로테아제 제어제 혹은 EDTA를 첨가할 수 있다.

[0017] 본 발명에서 상기(a) 단계 후에 바로 하기(b)단계를 실시할 수도 있지만, 이 두 단계 사이에 시료 완충용액을 여과하는 단계를 추가할 수도 있다. 이에 의하여 상기 완충용액의 구성성분 등을 제거하고 질량 측정 장치에

의한 분석을 용이한 단백질을 수득할 수 있다.

- [0018] 또한, 본 발명은 상기에서 사용된 계면활성제를 제거하는 단계를 추가할 수 있다. 이를 위한 계면활성 제거제의 종류는 특정한 것으로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 일례로, 우레아(urea), 아미콘울트라튜브(AmiconUltra tube)를 사용할 수 있다. 아미콘울트라튜브(AmiconUltra tube)의 종류는 사용되는 시료에 따라 그 종류가 결정되는 것으로, 바람직하게는 미생물 시료의 경우 아미콘울트라튜브(0.5ml)-10K/3K를 사용할 수 있으며, 체액 시료의 경우 아미콘울트라튜브(15ml)-10K/3K를 사용할 수 있고, 조직 시료의 경우 아미콘울트라튜브(15ml)-10K/3K 또는 아미콘울트라튜브(0.5ml)-10K/3K 을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 우레아(urea)는 강력한 키오토티픽제(Chaotropic agent)로 일반적으로 비공유결합을 끊어 주는 역할을 하기에, 계면 활성제에 의해 형성된 마이셀(micelle) 즉, 단백질과 계면활성제의 복합체(complex)로부터 이러한 비공유결합(non-covalent bond)을 끊어주어 단백질과 계면 활성제를 분리가능하게 해 줄 수 있으며, 상기 아미콘울트라튜브는 일반적인 튜브가 아닌 MWCO (molecular-weight cut off)의 방식으로 desalting하는 컬럼(column)으로 샘플내의 계면 활성제나 염 등의 순수한 단백질 정제에 불필요한 불순물들을 분자량 크기에 근거하여 제거해 줄 수 있다.
- [0020] 본 발명에서는 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계를 포함할 수 있으며, 이는 여과 전 혹은 여과 후 단계에서 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계에 적용되는 기술은 특별히 제한되는 것은 아니지만, 프로테오마이너(proteominer) 기술을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0022] 상기 ‘프로테오마이너’ 기술이란 복잡한 생물학적 샘플(biological sample) 내에서 소량의 단백질을 검출하기 위해 개발된 샘플 준비방법이다. 시료 내에 다량의 단백질(high-abundance protein, 예를 들면 serum이나 plasma 내의 albumin, IgG 등)은 적당량(medium-)과 소량의 단백질(low-abundance protein)의 검출을 어렵게 하므로 원하는 단백질의 확인을 어렵게 하기에, 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시켜, 결과적으로 시료내에 단백질 dynamic range가 감소시켜 적당량(medium-)과 소량의 단백질(low-abundance protein)을 확인할 수 있게 하는 기술이다(도 2).
- [0023] 상기 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계를 적용하기 전에 계면활성제를 제거하는 단계를 선택적으로 포함할 수 있는데, 상기 계면활성제 제거제는 그 종류가 특별히 한정되어 있는 것은 아니며, 일례로 우레아(urea)를 사용할 수 있다. 상기 우레아(urea)는 강력한 키오토티픽제(Chaotropic agent)로 일반적으로 비공유결합을 끊어 주는 역할을 하기에, 계면 활성제에 의해 형성된 마이셀(micelle) 즉, 단백질과 계면 활성제의 복합체(complex)로부터 이러한 비공유결합(non-covalent bond)을 끊어주어 단백질과 계면 활성제를 분리가능하게 해 준다.
- [0024] 상기 프로테오마이너 기술의 사용 후에 계면활성제를 제거하는 단계를 선택적으로 포함할 수 있는데, 이를 위한 계면활성 제거제의 종류는 한정되는 것은 아니며, 일례로 우레아(urea), 아미콘울트라튜브를 사용할 수 있는데, 아미콘울트라튜브(AmiconUltra tube)의 종류는 사용되는 시료에 따라 그 종류가 결정되는 것으로, 바람직하게는 미생물 시료의 경우 아미콘울트라튜브(0.5ml)-10K/3K를 사용할 수 있으며, 체액 시료의 경우 아미콘울트라튜브(15ml)-10K/3K를 사용할 수 있고, 조직 시료의 경우 아미콘울트라튜브(15ml)-10K/3K 또는 아미콘울트라튜브(0.5ml)-10K/3K 을 사용할 수 있다.
- [0025] 상기 우레아(urea)는 강력한 키오토티픽제(Chaotropic agent)로 일반적으로 비공유결합을 끊어 주는 역할을 하기에, 계면 활성제에 의해 형성된 마이셀(micelle) 즉, 단백질과 계면활성제의 복합체(complex)로부터 이러한 비공유결합(non-covalent bond)을 끊어주어 단백질과 계면 활성제를 분리가능하게 해 줄 수 있으며, 상기 아미콘울트라튜브는 일반적인 tube가 아닌 MWCO (molecular-weight cut off)의 방식으로 desalting하는 컬럼(column)으로 샘플내의 계면 활성제나 염 등의 순수한 단백질 정제에 불필요한 불순물들을 분자량 크기에 근거하여 제거해 줄 수 있다.
- [0026] (b) 상기 용해된 시료를 특정 프로테아제로 처리하여, 시료 내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계
- [0027] 알려진 바와 같이 프로테아제(protease)는 단백질을 펩타이드로 분해한다. 이 단계에서는 마이크로파 조사를 동반하는 것이 바람직하다. 마이크로파에 의해 발생하는 과장과 높은 온도는 단백질간 분자간 충돌을 유발하여 프로테아제에 의한 시료내 단백질의 절단이 용이하게 되며, 이 과정에서 나타날 수 있는 단백질의 집합, 즉 단백질의 재결합을 억제함으로써 단백질 절단에 소요되는 시간을 단축시킬 수 있다. 또한, 마이크로파에 의해 단축된 반응 시간은 단백질의 3차원 구조를 풀어줌으로써 단백질 분해 효소의 단백질 작용 부위로의 접근성을 용

이하에 하기 위해 처리한 화합물(예, DTT)과 그것에 의해 잘려진 디설파이드 결합의 재결합을 막기 위해 수행하여야 했던 알킬레이션(alkylation) 과정을 불필요하게 하여 반응 시간을 단축시킬 수 있다.

[0028] (c) 질량 측정 장치로 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 측정하는 단계

[0029] 본 발명은 이상과 같이 시료내의 총단백질을 프로테아제로 분해하여 수득한 펩타이드에 대한 질량을 질량 측정 장치로 측정하는 것을 특징으로 한다. 상기 질량 측정 장치로는 질량 분석기를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 질량 분석의 방식으로서 MALDI-TOF MS(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of flight Mass Spectrometry) 방식을 이용하고, 예로서 Voyager De STR MALDI-TOF MS 혹은 MALDI-TOF/TOF를 사용할 수 있다. 그러나 단백질 측정이 가능한 다양한 형태의 Mass spectrometry(MS) 및 MS/MS 종류는 제한적이지 않다.

[0030] 검출 효율에 영향을 미치는 요인으로는 (1) 지연 시간(delay time, DE) - 레이저 조사 후 다음 조사까지의 시간차(nano second); (2) 그리드 전압(grid voltage, %) - MALDI-TOF MS 진공관 안에서 펩타이드 이온들이 비행하여 검출기에 검출되는 데까지 필요한 에너지의 크기; (3) 질량 범위(Mass Range) - 검출하고자 하는 펩타이드의 질량 범위; (4) 레이저 강도(laser intensity) - 레이저의 조사량 등이 있다. 이러한 요인들은 당업자에 의해 적절하게 설정될 수 있다.

[0031] 본 발명은 이상과 같이 시료내의 총단백질을 프로테아제로 분해하여 수득한 펩타이드에 대한 질량 및 아미노산 서열을 측정 장치로 측정하는 것을 특징으로 한다. 이에 관한 측정 장치의 종류는 한정되어 있지 않지만 MALDI-TOF/TOF를 사용하는 것이 바람직하다.

[0032] (d) 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된, 공지의 펩타이드의 질량과, 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 상기 시료 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계

[0033] 공지된 세포, 조직, 기관, 생물 등의 단백질 유래된 펩타이드 질량은 예를 들면 다음과 같이 확보할 수 있다. 프로테아제는 아미노산 서열을 인식하여 특정 부위를 절단하는 효소이다. 따라서 특정한 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 지정된 프로테아제로 처리할 경우 수득할 수 있는 펩타이드의 서열이 추정되고, 이 펩타이드의 질량은 아미노산의 질량이 공지되어 있으므로 이를 참조로 하여 계산함으로써 확보할 수 있다. 이렇게 확보한 공지된 특정 단백질 유래 펩타이드 질량으로부터 측정된 펩타이드의 질량과 일치하거나 가장 유사한 질량을 갖는 펩타이드를 선별하여 그 질량을 갖는 펩타이드가 어떤 세포, 조직, 생물 등의 단백질로부터 유래된 것인지 확인함으로써 시료내 단백질을 동정할 수 있다.

[0034] 또한, 단계 (d)는 상기 프로테아제로 절단된 공지의 세포, 조직, 기관, 생물 등에 특이적으로 존재하는 펩타이드 질량의 세트와 매칭되는, 상기 시료내 펩타이드의 질량 세트의 존재 여부를 확인함으로써 수행될 수도 있다(도3).

[0035] 한편, 좀 더 정확한 분석 및 동정을 위하여 질량 및 아미노산 서열을 동시에 결정할 수 있는 측정기기를 사용할 수 있다. 이는 특정 펩타이드의 질량을 비교할 뿐 아니라, 특정 펩타이드의 아미노산 서열을 결정할 수 있음으로 인하여 좀 더 정확한 단백질 분석 및 동정에 활용할 수 있다.

[0036] 본 발명에 따른 특정 단백질 분석 및 동정방법은 하기 구성으로 이루어진 시스템을 이용하여 실시될 수 있다(도4)(도5).

[0037] 본 발명의 다른 관점은

[0038] 세포, 조직, 생물 등으로부터 유래된 펩타이드 질량 및/또는 아미노산 서열 정보를 저장하고 있는 데이터베이스;

[0039] 시료내 펩타이드의 질량 및/또는 아미노산 서열을 측정하는 질량 측정 장치; 및

[0040] 측정된 시료 펩타이드의 질량 정보 및/또는 아미노산 서열 정보와 상기 데이터베이스의 펩타이드 질량 정보 및/또는 아미노산 서열 정보를 대비하여 상기 시료 펩타이드의 단백질 정보와 매칭되는 정보의 필터링을 수행하여 측정된 시료 펩타이드의 유래 정보를 확인하는 세포, 조직, 생물 등의 단백질 매칭 필터링부를 포함하는 단백질 분석 및 동정 시스템에 관한 것이다.

[0041] 본 발명에서 상기 질량 측정 장치는 이에 제한되는 것은 아니지만, 질량 분석기인 것이 바람직하다.

[0042] 본 발명에 적용되는 데이터베이스는 유전자 정보(아미노산 서열 또는 염기서열)를 바탕으로 특정한 세포, 조직,

생물 등의 단백질을 지정된 프로테아제로 분해한 경우에 취득할 수 있는 아미노산 서열 정보를 저장하고/하거나 펩타이드에 대한 질량을 계산하여 얻은 이론적 질량으로서 저장하도록 구현된 것일 수 있다. 이 때, 펩타이드 질량과 그 펩타이드가 유래된 세포, 조직, 생물 등의 단백질 명칭, 이용된 프로테아제의 명칭에 대한 정보가 서로 연계되도록 구현한다. 본 발명의 데이터베이스에 포함될 특정 단백질과 프로테아제 종류를 제한적이지 않다. 본 발명의 데이터베이스는 추후 미지의 생물, 단백질 및 프로테아제에 대한 정보도 포함하여 확장될 수도 있다.

[0043] 본 발명의 단백질 동정, 분석 시스템은 시료 수용부 및 상기 시료 수용부로 프로테아제를 투입하기 위한 프로테아제 저장부를 포함하는 시료 처리부를 추가로 포함할 수도 있다. 상기 시료 처리부는 시료 수용부에 마이크로파를 조사하기 위한 마이크로파 발생원을 더 포함할 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 단백질 분석, 동정 시스템은 추출된 단백질 정보를 토대로 시료에 포함된 정보를 출력하는 단백질 정보 출력 장치를 추가로 포함할 수 있다. 상기 단백질 정보 출력 장치는 상기 시료에 포함된 단백질 유래된 세포, 조직, 기관, 생물 등에 관한 정보가 둘 이상인 경우, 각각의 정보를 별도로 출력할 수 있다.

[0045] 아울러, 본 발명의 단백질 분석 및 동정 시스템에서 데이터베이스, 질량 측정 장치, 아미노산 서열 측정 장치, 단백질 추출 장치, 단백질 유래된 세포, 조직, 생물 등에 관한 정보 출력 장치는 네트워크를 통해 연결되는 것이 바람직하다.

[0046] 본 발명에서는 상기 단백질 분석, 동정 결과 얻어진 펩타이드의 질량 및/또는 아미노산 서열을 기초로 바이오마커를 제공할 수 있다.

[0047] 본 발명에 있어서 ‘바이오마커’는 다른 표현형 상태와 비교하여 하나의 표현형 상태의 대상으로부터 얻어진 샘플 중에 독특하게 존재하는 유기 생체분자일 수 있다.

[0048] 본 발명의 스크리닝 방법으로 얻어진 펩타이드의 아미노산 서열과/또는 질량을 이용하여 바이오마커로 활용하고자 할 경우, 바이오마커는 상이한 그룹 중 바이오마커의 평균 또는 중간 발현 수준이 통계적으로 유의하게 계산되는 경우 상이한 표현형 상태 사이에 독특하게 존재하기에, 이들 중 통계적 유의성에 대한 통상의 테스트가 이루어질 수 있다. 이러한 테스트로는 t-테스트, ANOVA, 크루스칼-월리스(Kruskal-Wallis), 윌콕슨(Wilcoxon), 만-화이트니(Mann-Whitney) 및 오즈 비(odds ratio)를 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 바이오 마커 단독 또는 이의 조합은 대상이 하나의 표현형 상태 또는 다른 표현형 상태에 속하는 상대적 위험의 측정을 제공할 수 있다.

## 효 과

[0049] 본 발명에 의하면 단백질을 신속하게 분리, 동정할 수 있다. 특히, 본 발명에서는 분석하고자 하는 전체 단백질을 프로테아제로 분해함에 있어서, 마이크로파를 조사함으로써 단백질의 펩타이드로의 분해에 소요되는 시간을 현저하게 단축시킴으로써 단백질을 분석, 동정하는데 요구되는 시간도 단축시킬 수 있고 계면활성제의 제거와 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계를 추가함으로써 정밀도와 정확성이 뛰어난 분석이 가능할 수 있다. 또한, 단백질을 분석, 동정함에 있어서, 시료를 용해(lysis) 후 시료 내에 존재하는 비구조적 단백질을 유리시킴으로써 시료의 일부 단백질만을 이용하여 분석하는 것이 아니라 전체 단백질을 이용하여 분석, 동정할 수 있으며, MALDI-TOF/TOF와 같은 단백질의 질량 분석장치와 아미노산 서열을 동시에 측정 가능한 장치를 사용할 경우, 특정 펩타이드의 질량을 비교할 뿐 아니라, 특정 펩타이드의 아미노산 서열을 확인할 수 있음으로 질병 등의 확진진단에 활용할 수 있을 뿐 아니라, 유사한 미생물간 비교가 가능하여 강독주와 약독주의 구분이 가능하고, 특정 질병의 미세한 변이형태도 추적가능하다. 이와같이 본 발명은 단백질의 혈청형 분석, 병원성 분석 등 다양한 분석도 가능하며, 미생물의 동정, 질병의 진단, 육류의 부위판별, 종간의 혈통 구분, 종간의 유연관계 분석, 바이오마커의 개발 등 단백질의 아미노산 서열 또는 질량의 차이로 인한 분석 및 동정의 결과가 활용될 수 있는 모든 산업분야에 이용가능함으로 산업적 가치가 무한할 것이다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의

범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않으며 권리범위 또한 제한되지 않는다.

[0051] **실시예 1 미생물 진단법**

[0052] 실시예 1-1: 시료의 수득

[0053] 뉴캐슬 바이러스에 걸린 것으로 의심되는 닭으로부터 조직, 혈액, 객담, 뇨, 분변의 표본을 수집하여 균질화한 후 계단 회석하여 다음 실시예 1-2에 적용하였다.

[0054] 실시예 1-2: 용해(lysis)

[0055] 시료로부터 바이러스를 분리한 후 이 분리된 바이러스의 부분표본(aliquot) 100 $\mu$ l 중 10 $\mu$ l (농도: 4.811 $\mu$ g의 바이러스/ $\mu$ l)을 e-tube로 옮기고, 여기에 바이러스 용해용(lysis) 완충용액[1% Triton X-100(Amresco), 2mM DTT(DL-Dithiothreitol, Promega), 150mM NaCl(Amresco), 10mM Tris-HCl(Amresco), pH: 7.4] 20 $\mu$ l를 넣은 후 실온에서 15분간 방치하여 반응시켰다. 후술된 Microcon 이용에 앞서, 최대 산출농도를 위해 470 $\mu$ l의 레진 워터를 넣었다.

[0056] 실시예 1-3: 용해액의 여과

[0057] Micron Centrifugal filter device (YM-3, Nominal molecular weight limit in Dalton; 3,000, Amicon)를 이용하여 여과하여 실시예 2에서 수득한 분쇄된 바이러스 입자와 바이러스 분쇄 완충용액이 혼합된 반응액으로부터 분쇄된 바이러스 입자만을 순수 분리하였다.

[0058] 실시예 1-4: 마이크로파 조사에 의한 단백질의 분해

[0059] 실시예 1-3에서 수득한 분쇄된 바이러스 입자 용액 10 $\mu$ l에 10mM DTT를 25 $\mu$ l 넣고 20분간 가볍게 믹싱하였다. 1 ml의 20 $\mu$ g 트립신/50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>에서 20 $\mu$ l를 넣은 후 e-tube의 캡에 시린지로 3~4개 정도 천공한 다음 마이크로파(domestic microwave-SAMSUNG RE-442B)에서 10분 동안 조사하였다. 조사 후 4℃에서 5분간 식혀준 후 Calibrant(insulin from bovine pancreas, FW=5733, SIGMA) 20 $\mu$ l를 넣었다.

[0060] 실시예 1-5: 본 발명의 방법에 의한 단백질 분석 및 동정

[0061] A. MALDI-TOF 이온화 플레이트 (ID:100)

[0062] 플레이트 상에서 바이러스 단백질의 타겟팅(targeting) 방법으로는 샌드위치 방법(sandwich method)을 이용하거나 CHCA(alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid)를 사용한 dried droplet 방법을 사용할 수 있다.

[0063] 구체적인 예로는, 25% 트리플루오로아세트산 (TFA: MERCK)40 $\mu$ l와 레진 워터 960 $\mu$ l를 섞어 1% TFA를 제조하였다. 500 $\mu$ l의 1% TFA와 500 $\mu$ l의 아세토니트릴(ACN:99.93+%HPLC 등급, Sigma Aldrich)을 혼합한 용액에 20mg의 시나프산(sinapic acid, Fluka)을 넣은 후 30분간 볼텍싱한 용액 1 $\mu$ l를 이온화 플레이트에 떨어뜨린 후 air-dry하였다. 이어서, 실시예 5에서 얻은 시료 용액 1 $\mu$ l를 떨어뜨렸다. 그리고, 아세톤(99+%, HPLC grade, sigma Aldrich) 990 $\mu$ l와 레진 워터 10 $\mu$ l 혼합한 용액에 SA 200ml를 넣은 후 볼텍싱한 용액 1 $\mu$ l를 떨어뜨린 후 air-dry하였다.

[0064]

[0065] B. MALDI-TOF MS의 수행

[0066] Voyager DE STR MALDI-TOF MS reflector mode를 이용하여 지연 시간(DE)은 100ns, 그리드 전압(%)은 68%, 질량 범위는 800~10000, 레이저 강도는 2205로 설정해서 MALDI-TOF MS를 실시하고 질량 스펙트럼을 얻었다.

[0067] **실시예 2 계면활성제의 제거 단계가 첨가된 미생물 진단법**

- [0068] 실시예 2-1: 시료의 수득
- [0069] 10일령 계태아의 allantoic fluid에 접종하여 증폭시킨 바이러스 (H9N2)를 sucrose-gradient에 의한 초원심 분리로 순수 정제하여 시료를 수득하였다.
- [0070]
- [0071] 실시예 2-2: 용해(lysis)
- [0072] \* SDT의 제조: 0.1M Tris/HCLpH7.6 용액에 SDS (sodium dodecyl sulfate)와 DTT가 각각 2%와 0.1M이 되도록 제조한다.
- [0073] SDT 용액을 샘플과의 부피비 1:4으로 첨가한 후 95℃, 5분 반응한 후, 샘플 내 핵산은 sonication으로 제거하였다.
- [0074] 실시예 2-3: 계면활성제의 제거 및 용해액의 여과
- [0075] \* U A 의 제조: 0.1M Tris/HCl pH8.5과 용액에 urea가 8M이 되도록 녹인다
- [0076] \* U B 의 제조: 0.1M Tris/HCl pH8.0과 용액에 urea가 8M이 되도록 녹인다
- [0077] \* IAA 의 제조: UA에 50mM IAA (iodoacetamide) 첨가한다.
- [0078] Amiconultra-3K를 이용하여 16,000g 원심분리하여 상층액을 취하고, Amiconultra-10K에 상기 상층액 30ul와 UA 200ul 첨가후 14,000g 원심분리하였다. UA 200ul 첨가 후 14,000g 원심분리한 후 Amiconultra-10K 내 여과 튜브를 통해 여과된 용액의 제거 후 IAA 100ul 첨가하였다. 1분 동안 vortex 후 5분 상온 방치하고 원심분리한 후, UB 100ul 첨가 후 원심분리하고 UB 100ul 첨가 후 원심분리하는 과정을 두 번 더 반복하였다. filter tube 내 잔존 샘플 용액을 elution하여 Elution된 용액의 농도 측정하였다.
- [0079] 실시예 2-4: 마이크로파 조사에 의한 단백질의 분해
- [0080] 이어서 Trypsin 첨가한 후 마이크로파(domestic microwave-SAMSUNG RE-442B) 조사 하에 3분간 반응을 시킨 후 0.5 % trifluoroacetic acid로 pH를 3이하로 조절하고 ZipTip C18로 desalting하였다.
- [0081] 실시예 2-5: 본 발명의 방법에 의한 단백질 분석 및 동정
- [0082] 이를 실시예 1-5에서와 동일한 방법을 사용하여 MALDI-TOF로 분석하였다.
- [0083] **실시예 3 계면활성 제거제 및 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계가 추가로 첨가된 미생물 진단법**
- [0084] 실시예 3-1: 시료의 수득
- [0085] 뉴캐슬 바이러스에 걸린 것으로 의심되는 닭으로부터 조직, 혈액, 객담, 뇨, 분변의 표본을 수집하여 균질화한 후 계단 희석하여 다음 실시예 3-2에 적용하였다.
- [0086] 실시예 3-2: 용해(lysis)
- [0087] 조직/ 기관 등에서 추출한 시료 5g 를 PBS 용액을 1:3의 w/v 비율로 15ml 첨가한 후, 모터 구동형의 portable homogenizer와 glass homogenizer를 사용하여 균질화한다. 이를 16,000g에서 5분간 원심 후 상층액을 분리하여, 상층액과 1:10 비율로 4% SDS를 첨가 후 sonication한다.
- [0088] 실시예 3-3: 계면활성제의 제거 및 여과

- [0089] 조직액 (상층액 1ml+4% SDS 4~8ml) 5~9ml 중 2ml을 취하여 Amicon Ultra-10K에 넣고 여기에 8M urea 12ml을 넣은 후, 5,000g, 10분 원심 한 후 여과액은 버린 후, 여과 튜브 내 12ml의 8M urea 추가로 첨가하여 계면활성제와 단백질을 분리한다. 5,000g, 10분 원심한 후 여과액은 버린 후 여과 튜브 내에 12ml의 8M urea를 다시 첨가하고, 5,000g, 10분 원심 한 후 여과액은 버린 후 여과 튜브 내에 12ml의 8M urea를 다시 첨가한다. 5,000g, 10분 원심 한 후 여과액은 버린 후 여과 튜브 내에 12ml의 4M urea를 다시 첨가하고 5,000g, 10분 원심 한 후 여과액은 버린 후 여과 튜브 내에 12ml의 증류수( D.W) 를 첨가하며 5,000g, 10분 원심 후 여과액은 버리고 1,000g, 2분 원심하여 100-200ul의 eluate를 얻는다.
- [0090] 실시예 3-4: 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계 및 우레아(urea)와 계면활성제의 제거
- [0091] PROTEOMINER enrichment kit(BIORAD 회사제품)을 사용하여 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시킨 후, elution 된 용액 60ul에 1M NaOH를 넣어 pH를 7~8로 맞춘다. 상기 용액에 증류수(D.W)를 1:1 부피비로 넣은 후 Amicon Ultra-10K로 원심분리하고, 이를 다시 8M urea 200ul 넣은 후 원심분리한 후, 4M urea 200ul 넣은 후 다시 원심분리한다.
- [0092] 실시예 3-5: 마이크로파 조사에 의한 단백질의 분해
- [0093] 상기에서 얻어진 eluate 용액의 농도 측정한 후, trypsin을 eluate와 1:50(w/w)이 되게 넣어 준 다음, 마이크로파(domestic microwave-SAMSUNG RE-442B)에서 10분 동안 조사하고 0.5 % trifluoroacetic acid로 pH를 3이하로 조절하고 ZipTip C18로 desalting하였다.
- [0094] 실시예 3-6: 본 발명의 방법에 의한 단백질 분석 및 동정
- [0095] 이를 실시예1-5에서와 동일한 방법을 사용하여 MALDI-TOF로 분석하였다.
- [0096] 실시예 4 계면활성 제거제 및 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계가 추가로 첨가된 미생물 진단법(도1)
- [0097] 실시예 4-1: 시료의 수득
- [0098] 비장과 같은 면역기관과 그 외 체액성분, 조직 등에서 시료를 수득한다.
- [0099] 실시예 4-2: 용해(lysis)
- [0100] \* Lysis buffer 1 제조방법:10 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.5에 NP-40S가 0.2 ~0.5 % 농도가 되도록 첨가한다.
- [0101] \* Lysis buffer 2-1 제조방법: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT에 SDS를 1~2 %가 되도록 첨가한다.
- [0102] \* Lysis buffer 2-2를 준비하며, 150mM NaCl, 1mM DTT, 20mM Tris, pH7.5에 TFE (trifluoroethanol)가 40% 되도록 첨가한다.
- [0103] 4-2-1. 조직인 경우
- [0104] 1)Lysis buffer 1을 사용한 경우
- [0105] 조직 중량대 버퍼 부피비를 동일하게(1:1 w/v), 즉 추출한 조직 5g에 조직의 중량과 동일한 부피의 Lysis buffer 1을 5ml 넣고 조직과쇄기로 균질화한 후 상온에서 30분간 반응한다. 이후 30초 (10s ON/ 10s OFF)로 sonication하고 12,000g, 5분 원심 후 상층액을 취한다.
- [0106] 2) Lysis buffer 2를 사용한 경우
- [0107] 추출한 조직 5g에 중량당 4배 부피(1:4 w/v) 20ml의 Lysis buffer 2-1을 넣고 조직과쇄기로 균질화한 후, 90℃

에서 5분간 반응한 후 30초 (10s ON/ 10s OFF)간 sonication 처리한다. 3,4000g, 30분 원심 후 상층액 취한 후, 상층액 1ml, acetone 8ml, TCA(trichloroacetic acid) 1ml을 넣어 1:8:1 (v/v) 이 되도록 첨가 후 20분 ice에 방치 후, 3,4000g, 30분 원심 후 펠렛(pellet) 얻은 후 펠렛(pellet)에 lysis 버퍼 2-2을 2ml 넣고 펠렛(pellet)을 부유시킨 후, 부유시킨 것에서 1ml을 취하여 이것을 proteominer에 적용하였다.

[0108] 4-2-2. 체액인 경우

[0109] 체액 Xml (>15ml) 을 AmiconUltra(15ml, 3K/10K)를 통해 14,000g, 20분 원심하여 200배 농축된 (X/200) 부피의 체액을 얻은 후, 4-2-1과 동일한 방법으로 시료를 처리한다.

[0110] 실시예 4-3: 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계 및 우레아(urea)와 계면활성제의 제거

[0111] 4-3-1. 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계

[0112] Lysis buffer 1을 사용한 조직 또는 체액의 경우는 200ul 시료를 취하여 PROTEOMINER enrichment kit(BIORAD 회사제품)를 사용하고, Lysis buffer 2를 사용한 조직 또는 체액의 경우는 1ml 시료를 취하여 PROTEOMINER enrichment kit(BIORAD 회사제품)를 사용한다.

[0113] 4-3-2. 계면활성제의 제거

[0114] eluate용액 60ul의 9배에 해당하는 100mM DTT 540 ul 넣고 실온에서 10분 vortexing하고 AmiconUltra (0.5ml)-10K/3K 에 vortexing된 용액을 30ul를 취하여 UA 200ul 첨가후 14,000g 30분간 원심분리하고 fow-through를 버리고 다시 동일한 AmiconUltra tube에 UA 200ul 첨가 후 14,000g, 5분간 원심분리한다.AmiconUltra (0.5ml)-10K/3K내 여과 튜브를 통해 여과된 용액의 제거 후 IAA 100ul 첨가하고 1분 동안 vortex 후 5분 상온 방치하고, 14,000g 30분 원심하고 UB 100ul 첨가 후 14,000g 40분 원심한다.

[0115] 실시예 4-4: 마이크로파 조사에 의한 단백질의 분해

[0116] 상기 filter tube내 잔존 샘플 용액을 elution하여 Elution된 용액의 농도 측정하고 이를 다시 두 번 반복한다.

[0117] elution된 용액 내 단백질량과 1:20-1:100(w/w)이 되도록 Trypsin 첨가하고 마이크로파(domestic microwave-SAMSUNG RE-442B)에서 3분 동안 조사하고 0.5% trifluoroacetic acid로 3이하가 되도록 pH를 조절하고 ZipTip C18로 desalting한다.

[0118] 실시예 4-5: 본 발명의 방법에 의한 단백질 동정 및 분석

[0119] 이를 실시예1-5에서와 동일한 방법을 사용하여 MALDI-TOF로 분석하였다.

## 도면의 간단한 설명

[0120] 도1은 본 발명의 전체적인 개략도를 나타낸 것으로, 단백질 분석, 동정 방법 및 이의 시스템을 나타낸 것이다.

[0121] 도 2은 프로테오마이너 기술을 사용하여 원인체의 질량 분석상의 표준화와 이를 조직액의 질량 분석상과 비교한 후 통계적 의미를 산출할 수 있는 분석 프로그램에 의한 진단/ 분석방법을 나타낸 것이다.

[0122] 도3은 본 발명에 따라 질량분석기로 측정된 펩타이드의 질량 분석 스캐프트럼을 나타낸 것이다. 이때,allantoic fluid 유래의 많은 단백질에 대한 트립신에 의해 잘려진 펩타이드는 wash 샘플이며, allantoic fluid 내 존재하는 소량의 단백질(바이러스 단백질 포함)에 대한 트립신에 의해 잘려진 펩타이드는 Eluate 샘플이다.

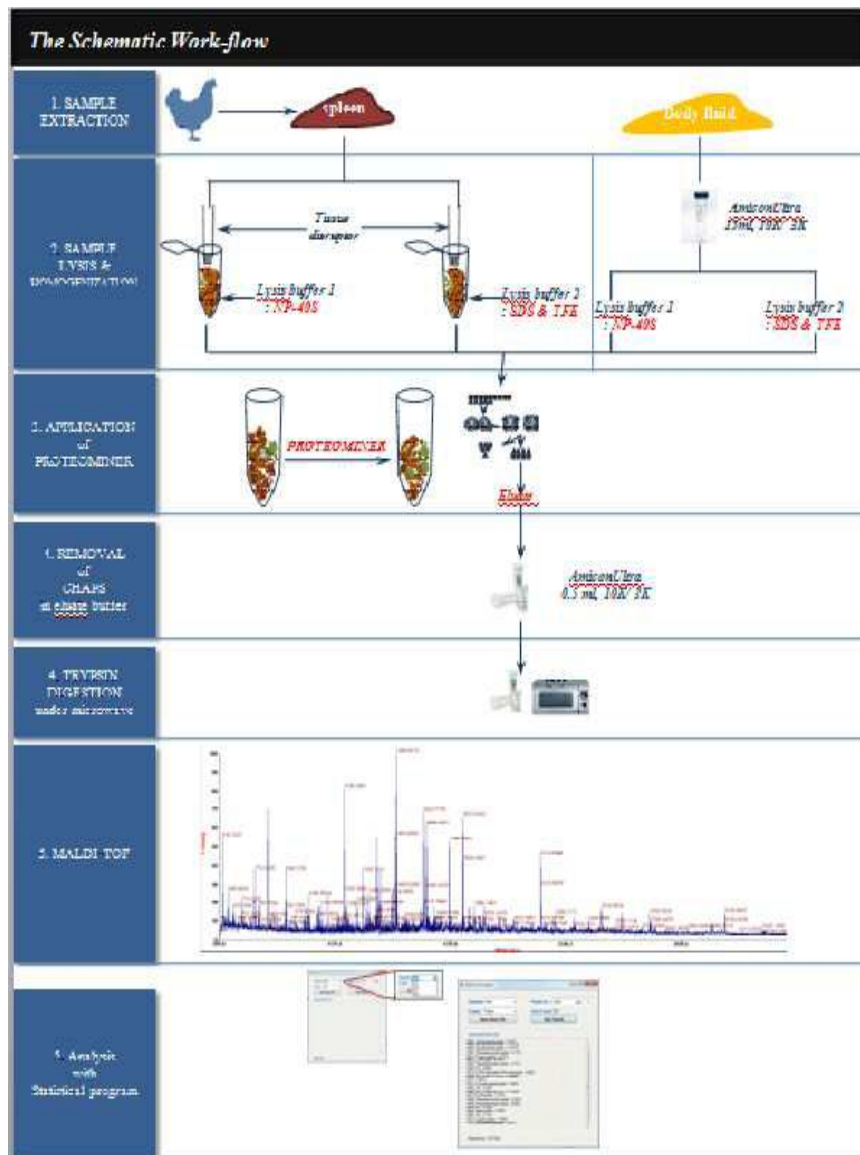
[0123] 도4는 단백질 질량의 분석 및 동정 시스템을 이용하여, 분석된 결과로 시료내의 펩타이드와 일치하는 공지의 펩

타이드를 찾아내어, 이의 유래 생물을 확인하는 과정을 나타내는 것으로, 이때의 질량 분석기 분해능은 40ppm이다.

[0124] 도5는 단백질 질량의 분석 및 동정 시스템을 이용하여, 분석된 결과로 시료내의 펩타이드와 일치하는 공지의 펩타이드를 찾아내어, 이의 유래 생물을 확인하는 과정을 나타내는 것으로, 이때의 질량 분석기 분해능은 50ppm이다.

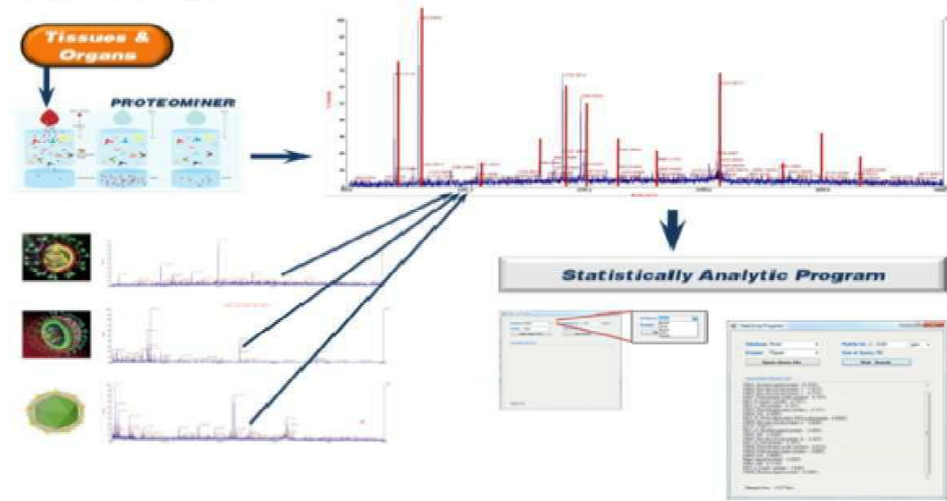
## 도면

도면1

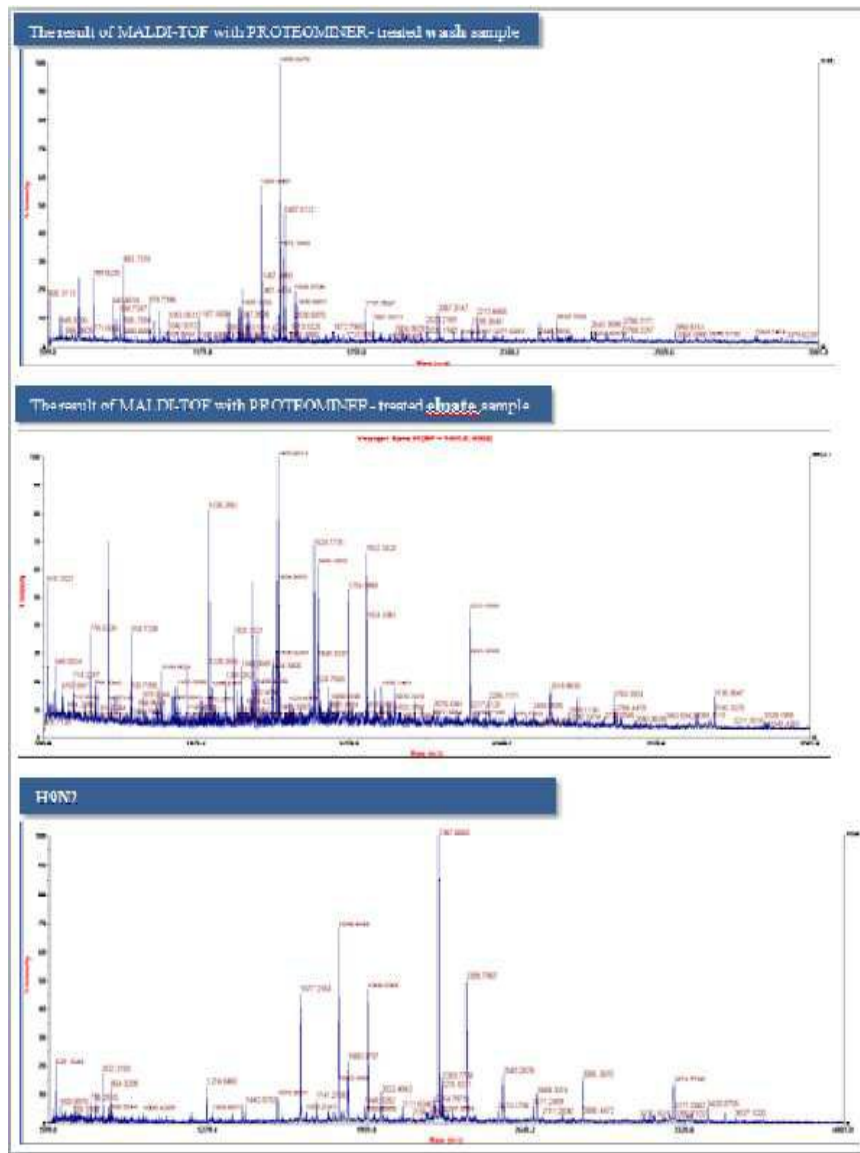


도면2

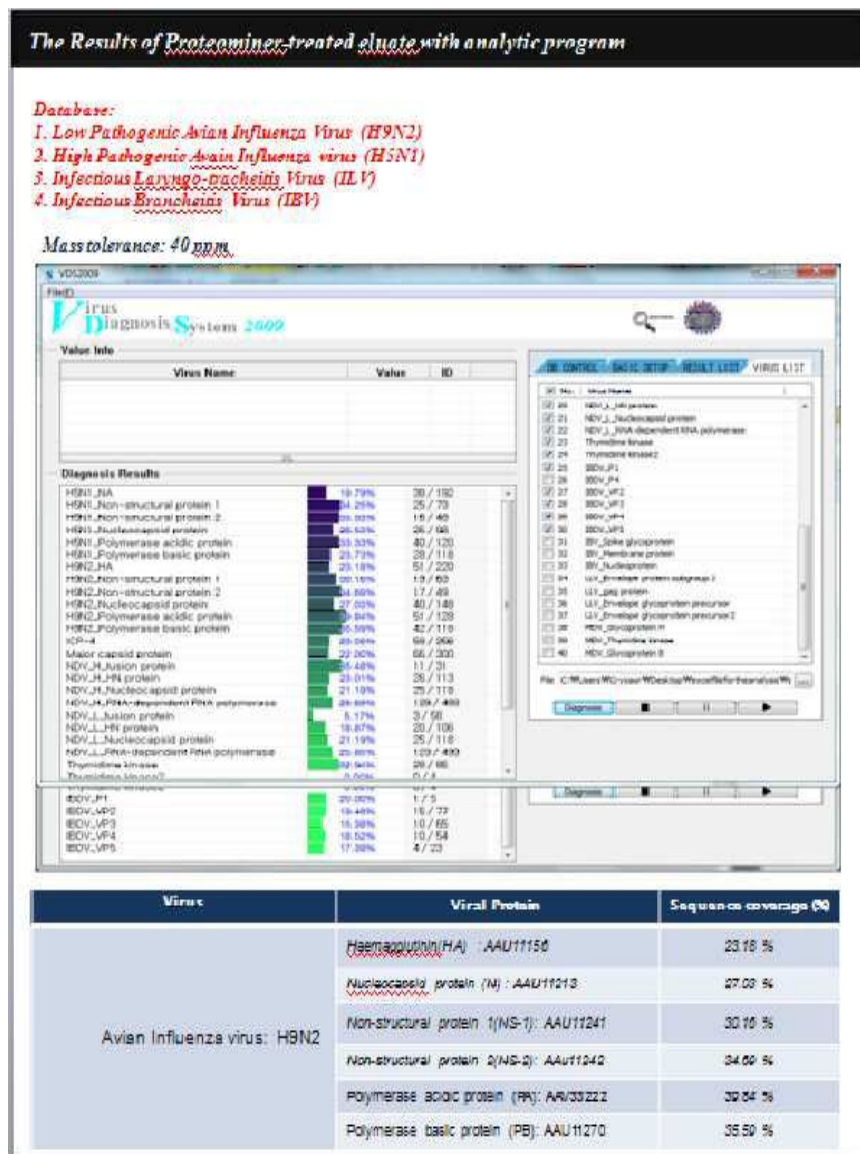
< The Schematic Work-flow >



도면3



도면4



도면5

