(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0017363
(43) 공개일자 2019년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6845 (2013.01)
G01N 33/6848 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0102116
(22) 출원일자 2017년08월11일
심사청구일자 2017년08월11일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이현우
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
이창욱
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

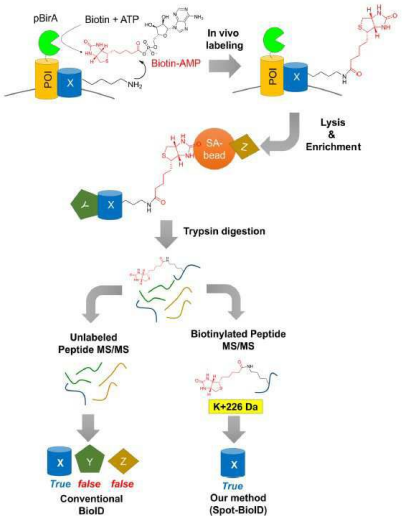
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **바이오틴을 이용한 단백질의 상호작용체를 확인하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은, 관심 단백질에 pBirA(Promiscuous biotin ligase)를 부착하여 세포에서 발현시키는 단계; 상기 세포에 바이오틴을 처리하여 바이오틴을 표지하는 단계; 상기 세포를 용해시키는 단계; 상기 단계에서 수득된 세포 용해물에 스트렙트아비딘 비드를 첨가하는 단계; 스트렙트아비딘 비드가 첨가된 상기 용해물에 트립신을 도입하는 단계; 및 상기 단계에서 생성된 펩티드를 용리하여 질량분석하는 단계;를 포함하는, 단백질의 상호작용체를 확인하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 2440/32 (2013.01)
G01N 2458/00 (2013.01)
(72) 발명자
서정곤
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
이송이
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
이학봉
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1C1B2013956
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인연구지원
연구과제명 Proximity 레이블링 반응을 이용한 포유동물세포의 퍼옥시좀 단백질체의 규명
기 여 율 1/2
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI16C0091000017
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발
연구과제명 APEX를 이용한 미토콘드리아 국소단백질체 맵핑 및 새로운 미토콘드리아 Biogenesis 메커니즘의 규명
기 여 율 1/2
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

관심 단백질에 pBirA(Promiscuous biotin ligase)를 부착하여 세포에서 발현시키는 단계;

상기 세포에 바이오틴을 처리하여 바이오틴을 표지(labeling)하는 단계;

상기 세포를 용해시키는 단계;

상기 단계에서 수득된 세포 용해물에 스트렙트아비딘 비드를 첨가하는 단계;

스트렙트아비딘 비드가 첨가된 상기 용해물에 트립신을 도입하는 단계; 및

상기 단계에서 생성된 펩티드를 용리하여 질량분석하는 단계;

를 포함하는, 단백질의 상호작용체를 확인하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 관심 단백질은 FRB(mTOR 키나아제(mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase)의 FKBP-라파마이신 결합 도메인)인 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질의 상호작용체는 FKBP25(Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3, 여기서, FKBP는 FK501 binding proteins이다.)인 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 질량분석하는 단계는, 바이오틴화된 펩티드(biotinylated peptide)를 질량 분석기를 사용하여 확인하는 것인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 질량분석하는 단계에서, 상기 펩티드의 질량 수치 범위가 700 Da 내지 4000 Da의 범위인 경우에, 바이오틴화된 펩티드의 존재를 확인하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바이오틴을 이용한 단백질의 상호작용체를 확인하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 다양한 생리활성 물질간의 역동적인 상호작용에 의해서 여러 가지 생리적인 기능이 조절되고, 이러한 상호작용이 적절히 일어나지 못하거나, 상호작용이 일어나지 않아야 할 분자 사이에 상호작용 발생하는 비정상적인 상황에서 질병이 초래되기도 한다. 일반적으로 상보적인 구조의 두 개의 단백질은 상호작용하고, 생리활성 화합물은 단백질 3차 구조의 특정부위에 특이적으로 상호작용하는데, 이들 생리활성 화합물은 대상 단백질의 기능을 조절함으로써, 당해 단백질과 관련된 질환의 진단 또는 예방, 치료 및 경감시킬 수 있는 치료제 후보물질이 될 수 있다.

[0003] 이러한 단백질간의 상호작용 및 단백질과 소분자 화합물 간의 상호작용을 분석함으로써, 질병 표적 또는 치료제를 스크리닝하고자 하는 연구가 지속되어 왔다. 그 예로, 파지디스플레이(Sche et al., Chem. Biol., 6: 707, 1999), 효모 2종-/3종-하이브리드 분석(Licitra et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 12817, 1996), 이종결손(heterologous deletions)이 일어난 효모균주의 평행분석(Zheng et al., Chem. Biol., 11: 609, 2004) 등과 같은 기술을 들 수 있다. 그러나, 이들 기술들은 높은 배경(high background), 위양성(false positive), 낮은 민감도(low sensitivity) 등과 같은 문제점을 가지고 있고, 시험관내 조건에서의 반응 또는 비포유동물 세포를 사용한 반응의 경우, 실험결과를 100% 신뢰하기 어려운 단점을 가지고 있다.

[0004] 한편, 최근 빛에 의해 유도되는 단백질간 상호작용(protein-protein interaction)이 보고되었으며, 이를 이용한 단백질간 상호작용 분석방법들 역시 개발되어 오고 있다(Shimizu-Sato et al., Nat. Biotechnol., 20: 1041-1044, 2002; Levskaya et al., Nature. 461: 997-1001, 2009; Yazawa et al., Nat. Biotechnol., 27: 941-945, 2009; Tyszkiewicz et al., Nat. Methods, 5: 303-305, 2008).

[0005] 그러나 상기 방법들은 위양성(false-positive), 위음성(false-negative)의 가능성을 완전히 제거하지 못하고 있다는 단점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은, 종래의 방법과 비교하여 위양성(false-positive) 발견의 가능성이 현저히 낮은, 바이오틴을 이용한 단백질의 상호작용체를 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 실시예는, 관심 단백질에 pBirA(Promiscuous biotin ligase)를 부착하여 세포에서 발현시키는 단계; 상기 세포에 바이오틴을 처리하여 바이오틴을 표지(labeling)하는 단계; 상기 세포를 용해시키는 단계; 상기 단계에서 수득된 세포 용해물에 스트렙트아비딘 비드를 첨가하는 단계; 스트렙트아비딘 비드를 첨가된 상기 용해물에 트립신을 도입하는 단계; 및 상기 단계에서 생성된 펩티드를 용리하여 질량분석하는 단계;를 포함하는, 단백질의 상호작용체를 확인하는 방법을 제공한다.

[0009] 일측에 따르면, 상기 관심 단백질은 FRB일 수 있다.

[0010] 일측에 따르면, 상기 단백질의 상호작용체는 FKBP25일 수 있다.

[0011] 일측에 따르면, 상기 질량분석하는 단계는, 바이오틴화된 펩티드(biotinylated peptide)를 질량 분석기를 사용하여 확인할 수 있다.

[0012] 일측에 따르면, 상기 질량분석하는 단계에서, 상기 펩티드의 질량 수치 범위가 700 Da 내지 4000 Da의 범위인 경우에, 바이오틴화된 펩티드의 존재를 확인할 수 있다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 단백질의 상호작용체를 확인하는 방법을 제공하여, 질량분석 방법을 활용하여, 위양성(false-

psitive)의 발견이 거의 없는 정확한 확인을 가능하게 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은, 본 발명의 일 실시예에 따른 단백질의 상호작용체를 확인하는 방법의 개념도이다.

도 2는, 본 발명의 실시예에 따라, Rapamycin의 유무에 따라 특이적으로 검출된 단백질을 나타낸 것이다.

도 3은, 본 발명의 실시예에 따라, FKBP25와 rapamycin의 결합 정도를 검증하기 위한 실험 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하에서, 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0016] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 구성을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 구성들 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0017] 본 발명의 일 실시예는, 관심 단백질(Protein of interest, POI)에 pBirA(Promiscuous biotin ligase, 비특이적 바이오틴 단백질 결합효소)를 부착하여 세포에서 발현시키는 단계; 상기 세포에 바이오틴을 처리하여 바이오틴을 표지(labeling)하는 단계; 상기 세포를 용해시키는 단계; 상기 단계에서 수득된 세포 용해물에 스트렙트아비딘 비드를 첨가하는 단계; 스트렙트아비딘 비드를 첨가된 상기 용해물에 트립신을 도입하는 단계; 및 상기 단계에서 생성된 펩티드를 용리하여 질량분석하는 단계;를 포함하는, 단백질의 상호작용체를 확인하는 방법을 제공한다.

[0018] 도 1은, 본 발명의 일 실시예에 따른 관심 단백질의 상호작용체를 확인하는 방법의 개념도이다.

[0019] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 관심 단백질(POI)에 pBirA를 부착하여 세포를 발현시키고, 이에 비오틴을 첨가하여 pBirA가 세포내에 존재하고 있던 ATP를 사용하여 비오틴을 비오틴-AMP로 바꿔주며 비오틴-AMP는 주변단백질에 존재하는 라이신 아미노산과 반응하여 최종적으로 라이신에 바이오틴이 바인딩하여, 생체내 라벨링(in vivo labeling)을 하고, 상기 세포를 용해시키고 세포 용해물에 스트렙트아비딘 비드를 첨가하고, 이에 트립신을 도입하여 스트렙트아비딘 비드가 첨가된 상기 용해물을 분해시키고, 이를 용리한 후에 질량분석을 하여 관심 단백질의 상호작용체를 확인할 수 있는 것이다.

[0020] 일측에 따르면, 상기 관심 단백질은 어떠한 물질을 사용하여도 무방하나, 바람직하게는 FRB일 수 있다. 상기 FRB는, 포유류 라파마이신 키아나제 표적 (mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase)의 FKBP-라파마이신 결합 도메인(FKBP-rapamycin binding (FRB) domain)을 의미한다.

[0021] pBirA(Promiscuous biotin ligase, 비특이적 바이오틴 단백질 결합효소)는, 관심 단백질에 부착하기 위한 것으로, BirA의 R118G mutant이다. 즉, 상기 BirA는 대장균(Escherichia coli) 단백질이고, 35-kDa DNA-binding biotin protein ligase 이며, acetyl-CoA carboxylase만 비오틴화(biotinylation) 시키지만, R118G mutation을 주어서 특정 단백질이 아닌 주변 여러 단백질에 비오틴화가 가능하게 할 수 있다.

[0022] 세포에서 발현시키는 조건은, 일반적으로 세포를 발현시킬 수 있는 조건을 사용하여도 무방하나, 바람직하게 15 시간 내지 25 시간 동안 35 내지 38 ℃에서 배양하여 하에서 발현시킬 수 있다.

[0023] 스트렙트아비딘 비드가 첨가된 상기 용해물에 트립신을 도입하는 단계에서, 트립신은 단백질을 펩티드로 분해하는 물질이다. 이 단계에서는 마이크로파 조사를 더 동반할 수 있다. 즉, 마이크로파에 의해 발생하는 파장과 높은 온도는 단백질간 분자간 충돌을 유발하여 트립신에 의한 단백질의 절단이 용이하게 되며, 이 과정에서 나

타날 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 용이하게 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.

[0024] 일측에 따르면, 상기 단백질의 상호작용체는 상기 관심 단백질에 대해 상호작용하는 물질이라면 어떠한 물질이여도 무방하나, 바람직하게는 FKBP25(Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3, FKBP는 “FK501 binding proteins”이다.)일 수 있다.

[0025] 일측에 따르면, 상기 질량분석하는 단계는, 바이오틴화된 펩티드(biotinylated peptide)를 질량 측정 장치를 사용하여 측정할 수 있다. 상기 질량 측정 장치로는 질량 분석기를 사용하는 것이 바람직하다. 질량 분석의 방식으로서, 단백질 측정이 가능한 다양한 형태의 Mass spectrometry(MS)를 사용할 수 있다. 예를 들어, LC-MS 장치를 사용할 수 있으며, 예를 들어, LTQ-Orbitrap mass spectrometer를 사용할 수 있다.

[0026] 일측에 따르면, 상기 질량분석하는 단계에서, 상기 펩티드의 질량 수치 범위가 700 Da 내지 4000 Da의 범위인 경우에, 바이오틴화된 펩티드의 존재를 확인할 수 있다. 상기 펩티드의 질량 수치 범위는 4000 Da 이하로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게 700 Da 내지 4000 Da의 범위로 포함될 수 있다.

[0027] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0028] 단백질의 상호작용체를 확인하는 방법은 도 1을 참조하여, 다음과 같이 확인하였다.

[0029] **실시예**

[0030] (1) FRB-pBirA 벡터 제작

[0031] FRB에 pBirA를 부착하기 위해서, FRB 유전자와 pBirA 유전자가 연결되어 들어있는 플라스미드 벡터를 제조하였다. Addgene에서 구입한 pEGFP-FRB (Plasmid #25919) 벡터에서 FRB 부분을 PCR하고(forward primer : GCTAGCatggcttctagaatcctctggcatga, reverse primer : gaattcactagtctttgagattcgtcggaacac), NheI과 EcoRI 제한효소 (NEB)를 37 ℃에서 1시간동안 처리하고, 상기 같은 효소로서 37 ℃에서 한시간 digestion한 pBirA-HA 벡터 (Plasmid #36047, A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells., Roux et al J Cell Biol. 2012 Mar 12.)를 섞은 후에 T4 DNA ligase (NEB)를 처리하여 실온에서 1시간 ligation 반응을 수행하였다. 이후에 DH5alpha cell (Invitrogen)에 heat shock transformation을 시킨 후 Ampicilin-Agar plate에서 18시간 배양하여 해당 벡터를 함유하고 있는 콜로니를 따서 액체 배지(Agar broth)에 넣은 후 18시간 배양 하였고, 플라스미드 DNA를 추출하였다. FRB-pBirA의 서열목록은 하기의 표 1과 같다.

표 1

[0032]

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTT
GTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGG
TTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT
CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGA
CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCT
TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGAT
AGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAAT
GTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACC
CCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGC[a] atggcttctagaatcctctggcatgagat
gtggcatgaaggcctggaagaggcatctcgtttgtactttggggaaaggaacgtgaaaggcatgtttgaggtgctggagcccttgcatgctat
gatggaacggggcccccagactctgaaggaaacatcctttaatcaggcctatggtcgagatttaatggaggcccaagagtggtgcaggaagta
catgaaatcagggaatgtcaaggacctcctccaagcctgggacctctattatcatgtgttccgacgaatctcaaagactagt[b] gaattc[c] gga
tccaaggacaacaccgtgcccctgaagctgatcgccctgctggccaacggcgagttccactctggcgagcagctgggagagaccctgggaatg
agcagagccgccatcaacaagcacatccagacactgagagactggggagtggacgtgttcaccgtgcctggcaagggctacagcctgcctgag
cctatccagctgctgaacgccaagcagatcctgggacagctggatggcggaagcgtggccgtgctgcctgtgatcgactccaccaatcagtac
ctgctggacagaatcggagagctgaagtccggcgacgcctgcatcgccgagtaccagcaggctggcagaggaggcagaggacggaagtggttc
agcccattcggagccaacctgtacctgtccatgttctggagactggagcagggacctgctgctgccatcggactgagtctggtgatcggaatc
gtgatggccgaggtgctgagaaagctgggagccgacaaggtgagagtgaagtggcctaatgacctgtacctccaggaccgcaagctggctggc
atcctggtggagctgacaggcaagacaggcgatgccgctcagatcgtgatcggagccggaatcaacatggccatgagaagagtggaggagagc
gtggtgaaccagggctggatcaccctgcaggaggctggcatcaacctggaccggaacaccctggccgccatgctgatcagagagctgagagcc
gctctggagctgttcgagcaggagggactggctccttacctgagcagatgggagaagctggacaacttcatcaacagacctgtgaagctgatc
atcggcgacaaggaaatcttcggcatctccagaggaatcgacaagcagggagctctgctgctggagcaggacggaatcatcaagccctggatg
ggcggagaaatctccctgagaagcgcagagaaggct[d] taccttacgatgtaccggattacgca[e] tag[f] CTCATCATTGGAAAACGTTCTTCG
GGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTC
ACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTC
CTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTT
CCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

[0033] 표 1에서, a) NheI, b) FRB, c) EcoRI d) pBirA e) HA tag f) stop

[0034] (2) 단백질 발현과 바이오틴 레이블링

[0035] ATCC에서 구입한 HEK293T 세포를 10% FBS (Gibco), 50 units/mL penicillin (Thermo Fisher) 및 50 μg/mL streptomycin (Thermo Fisher)를 첨가한 MEM (Minimum Essential Media, Gibco)에서 37 ℃, 5% CO_2배양기 (Esco)에서 배양하였다. 세포가 60-80% 정도 찼을 때 Lipofectamine 2000 (Life technologies)를 사용하여 FRB-pBirA 벡터를 도입시켰다. 도입 4시간 후, 새로운 미디아에 Biotin(Amresco) 50uM을 첨가하고 18-24시간 동안 배양하였다. 이때 rapamycin 특이적으로 결합하는 단백질을 알아내기 위해 rapamycin(Fluka) 100nM도 함께 처리하였다(도 2의 (a)).

[0036] (3) 바이오틴 표지된 펩타이드의 수득

[0037] 18-24시간 레이블링 후, 두 개의 T75 플라스크에서 키운 세포를 DBPS (Gibco)용액으로 3번 씻어주고, 1X 프로테아좀 저해제 칵테일(1x protease inhibitor cocktail, sigma Aldrich)과 1mM PMSF(sigma Aldrich)가 첨가된 리파용해버퍼 (Elpis bio) 3ml 로 4 ℃에서 10분간 세포를 용해시킨다. 원심 분리기를 이용하여 20분간 4 ℃에서 16000 rcf로 원심 분리하여 상층액만을 수득하였다. 레이블링 후 남은 바이오틴을 제거하기 위해 상층액을 Amicon filter (Merck Millipore)에 담고, 원심 분리기를 이용하여 15분간 4 ℃에서 7500 rcf로 원심 분리한 후, PBS를 채워 같은 조건에서 3회 더 원심분리하였다. 마지막 원심분리 후, 필터에 남은 시료를 eppendorf tube에 담고, 1ml까지 맞추었다. 바이오틴과 강한 비공유결합을 한다고 알려진 스트렙타아비딘 (streptavidin, SA)이 코팅된 자성 비드 (Invitrogen) 300ul를 넣고 25℃에서 1시간 동안 천천히 돌려주었다. 자성 비드를 3회 PBS로 세척 후, PBS를 모두 제거하고, 100ul의 6M Urea(sigma aldrich), 2M Thiourea (sigma Aldrich), 10mM Hepes (Sigma Aldrich)를 넣어 골고루 섞었다. 50mM Ammonium bicarbonate(ABC)에 들어있는 100mM DTT(dithiothreitol, sigma Aldrich)를 20ul 넣어주고 Thermomixer(Eppendorf)를 사용하여 56 ℃에서 800rpm으로 돌려주었다. 50mM Ammonium bicarbonate(ABC)에 들어있는 300mM Iodoacetamide(sigma Aldrich)를 35ul 넣어주고 Thermomixer(Eppendorf)를 사용하여 25℃에서 800rpm으로 돌려주었다. 50mM ABC를 840ul 첨가 후, 1ug/ul 트립신골드 (promega) 8ul를 넣어준 후, Thermomixer(Eppendorf)를 사용하여 37℃에서 6-18시간동안 800rpm으로 돌려주었다.

[0038] 마그네틱 스탠드에 꽂아서 상층액은 모아두고, 자성비드를 PBS로 4회 씻어주었다. 95% (v/v) 포름아마이드(Sigma Aldrich), 10mM EDTA, pH8.2 용액을 250ul 첨가하고 95℃에서 10분간 가열하였다. 마그네틱 스탠드에 꽂은 후, 얼음에 두어 식혔다.

[0039] (4) 펩타이드 정제

[0040] 상기 펩타이드 용액은 펩타이드외에도 포름아마이드, EDTA같은 것들이 섞여있기 때문에 정제된 펩타이드를 얻기 위해 Varian Bond ELUT (Agilent)를 이용하여 디솔팅을 수행하였다.

[0041] 1ml의 3% (v/v) 아세토나이트릴/0.1%(v/v) 포름산, 1ml의 100% 아세토나이트릴, 그리고 2ml의 3% (v/v) 아세토나이트릴/0.1%(v/v) 포름산을 흘려주어 컬럼을 활성화 시켰다. 펩타이드 용액 샘플 250ul에 3% (v/v) 아세토나이트릴/0.1%(v/v) 포름산 750ul를 첨가하여 희석후 컬럼에 천천히 흘려주어 펩타이드가 컬럼에 붙게하였다. 2ml의 3% (v/v) 아세토나이트릴/0.1%(v/v) 포름산을 천천히 흘려주어 컬럼을 씻어주었다. 1.4ml의 70% (v/v) 아세토나이트릴/0.1%(v/v) 포름산용액과 500ul의 100% 아세토나이트릴을 천천히 흘려주어 펩타이드를 추출하였다. 추출된 펩타이드 용액은 완전히 말린 후, 2% (v/v) 아세토나이트릴/0.1%(v/v) 포름산에 다시 녹였다.

[0042] (5) 질량분석

[0043] 질량분석은 nanoelectrospray ion source가 장착된 LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo)로 수행되었다. C18 역상 HPLC컬럼(내경 150mm x 75um)을 사용하였으며, 90분동안 10 ℃에서 24% (v/v) Acetonitrile/0.1% (v/v) Formic acid 구배의 용액을 300 nL/min의 속도로 흘려주었다.

[0044] MS/MS 분석을 위해 precursor ion MS spectra (m/z 400-2000)가 Orbitrap spectrometer에 의해 얻어졌다. 20개의 가장 강한 이온을 CID (collisionally induced dissociation, 충돌에 의한 분자 쪼개짐 반응)모드로 분리하고 조각화하였다. MS/MS 분석은 Sequest (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA,USA; version 1.4.1.14)와 X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version CYCLONE(2010.12.01.1))를 이용하여 수행하였다. 구체적으로, Sequest 및 X! Tandem은 호모 사피엔스(Homo sapiens) 단백질 서열 데이터베이스 (89113 entries, UniProt (www.uniprot.org))을 트립신효소에 의한 소화를 가정하여 검색하도록 셋팅하였다. Sequest 및 X! Tandem은 0.60 Da의 조각 이온 질량 허용 (fragment ion mass tolerance)과 10.0 PPM의 상위 이온 허용 조각(parent ion tolerance)을 검색하였다. 카바미도메틸 시스테인 (Carbamidomethyl cysteine)은 fixed modification으로 Sequest 및 X! Tandem에서 지정하였으며, n-terminus의 Glu->pyro-Glu, n-terminus의 ammonia-loss, n-terminus의 gln->pyro-Glu, 메티오닌의 산화 및 라이신의 바이오틴은 variable modification으로 사용하였다.

[0045] (6) 결과

[0046] 결과는 도 2의 (b)에 나타내었으며, Rapamycin의 유무에 따라 특이적으로 검출된 단백질들을 표시하였다.

[0047] 특히 Rapamycin이 있을 때, 발견할 수 있었던 FKBP25는 다른 단백질들에 비해 더 많은 횟수로 검출 할 수 있었고 FRB와 가장 강력하게 결합하는 단백질인 것으로 추측된다.

[0048] (7) 결과검증

[0049] FKBP25가 rapamycin이 있을 때만 FRB와 강하게 결합하는지 확인하는 추가실험을 하였다. HeLa 세포에 FRB-MoA(존스 홉킨스 대학 Prof. Takanari Inoue에게 공여 받았음. 사용 했던 논문: Organelle-Specific, Rapid Induction of Molecular Activities and Membrane Tethering, Toru Komatsu et al. *Naturemethods*,2010)플라스미드 벡터를 Lipofectamine 2000 (Life technologies)을 사용하여 도입시켰다. FRB는 세포질에 퍼져있지만, Monoamine Oxidase A(MoA)라는 미토콘드리아 외막(mitochondrial outer membrane, OMM) 단백질의 일부 (490-527 아미노산)를 붙이면 FRB 미토콘드리아 외막에 타겟팅 되도록 해준다. rapamycin을 친 세포와 안친 세포를 FKBP 안티바디 (Santa cruz, sc-374357, 1000:1 희석) 2차 안티바디인 Alexa Fluor 488-goat anti-mouse IgG (invitrogen, A11001, 1000:1희석)를 이용하여 FV1000SPD (Olympus)로 형광이미징을 하였다(도 3). Rapamycin을 쳤을 때 FKBP가 미토콘드리아로 이동했음을 알 수 있다.

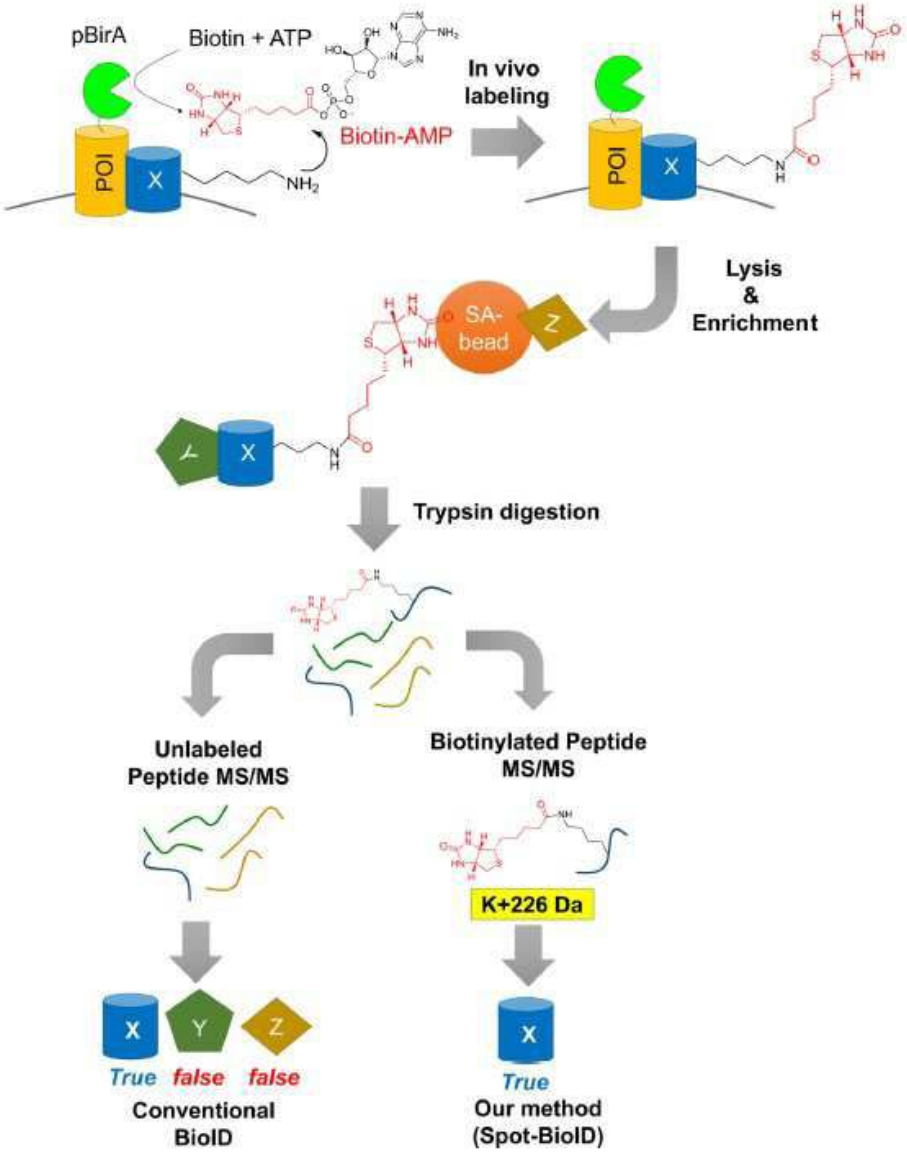
[0050] FRB라는 단백질에 pBirA를 달아서 실험을 한 결과 FRB에 특이적으로 결합하는 단백질들을 바이오틴 레이블링된 것을 본 방법(Spot-BioID)을 통해 매우 선택적으로 검출할 수 있었으며, 이중에 FKBP25는 FRB에 rapamycin 특이적으로 결합하는 단백질임을 새롭게 발견하였다.

[0051] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 본 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예 일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다.

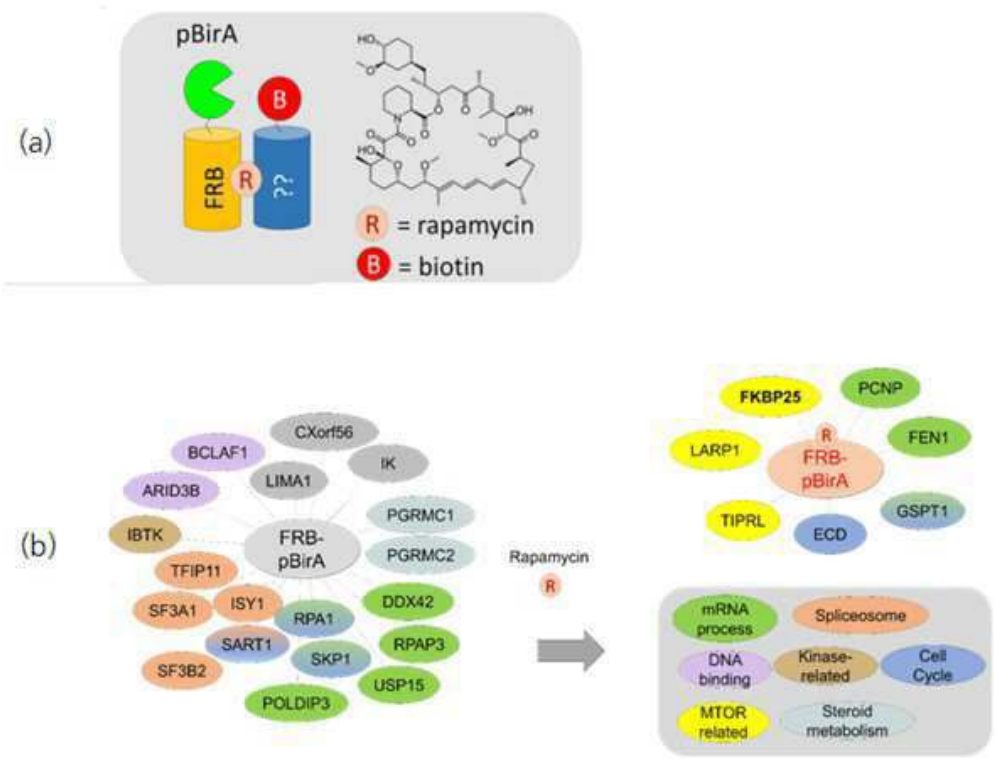
따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

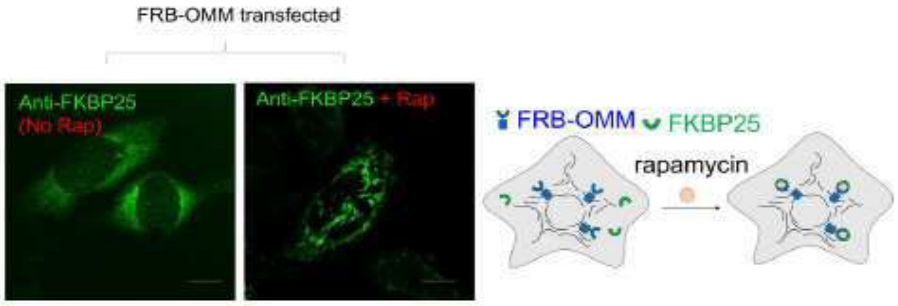
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> UNIST

<120> METHOD FOR DETECTING INTERACTOME OF PROTEIN USING BIOTIN

<130> APC-2017-0239

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 6641

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRB-pBirA

<400> 1

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60

ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120

cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180

ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240

gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300

tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360

cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420

attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480

atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540

atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600

tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660

actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720

aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780

gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840

ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagacccaa gctggctagc 900

atggcttcta gaatcctctg gcatgagatg tggcatgaag gcctggaaga ggcatctcgt 960

ttgtactttg gggaaaggaa cgtgaaaggc atgtttgagg tgctggagcc cttgcatgct 1020

atgatggaac ggggcccccа gactctgaag gaaacatcct ttaatcaggc ctatggtcga 1080

gatttaatgg aggcccaaga gtggtgcagg aagtacatga aatcagggaa tgtcaaggac 1140

ctcctccaag cctgggacct ctattatcat gtgttccgac gaatctcaaa gactagtgaa 1200

ttcggatcca aggacaacac cgtgcccctg aagctgatcg ccctgctggc caacggcgag 1260

ttccactctg gcgagcagct gggagagacc ctgggaatga gcagagccgc catcaacaag 1320

cacatccaga cactgagaga ctggggagtg gacgtgttca ccgtgcctgg caagggctac 1380

agcctgcctg agcctatcca gctgctgaac gccaagcaga tcctgggaca gctggatggc 1440

ggaagcgtgg ccgtgctgcc tgtgatcgac tccaccaatc agtacctgct ggacagaatc 1500

ggagagctga agtccggcga cgcctgcatc gccgagtacc agcaggctgg cagaggaggc 1560

agaggacgga agtggttcag cccattcgga gccaacctgt acctgtccat gttctggaga 1620

ctggagcagg gacctgctgc tgccatcgga ctgagtctgg tgatcggaat cgtgatggcc 1680

gaggtgctga gaaagctggg agccgacaag gtgagagtga agtggcctaa tgacctgtac 1740

ctccaggacc gcaagctggc tggcatcctg gtggagctga caggcaagac aggcgatgcc 1800

gctcagatcg tgatcggagc cggaatcaac atggccatga gaagagtgga ggagagcgtg 1860

gtgaaccagg gctggatcac cctgcaggag gctggcatca acctggaccg gaacaccctg 1920

gccgccatgc tgatcagaga gctgagagcc gctctggagc tgttcgagca ggagggactg 1980

gctccttacc tgagcagatg ggagaagctg gacaacttca tcaacagacc tgtgaagctg 2040

atcatcggcg acaaggaaat cttcggcatc tccagaggaa tcgacaagca gggagctctg 2100

ctgctggagc aggacggaat catcaagccc tggatgggcg gagaaatctc cctgagaagc 2160

gcagagaagg cttaccctta cgatgtaccg gattacgcat aggcggcctt aagtttaaac 2220

cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctccccc 2280

gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa 2340

attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggt ggggcaggac 2400

agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcatgctg gggatgcggt gggctctatg 2460

gcttctgagg cggaaagaac cagctggggc tctagggggt atccccacgc gccctgtagc 2520

ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc 2580

gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt 2640

ccccgtcaag ctctaaatcg gggcatccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac 2700

ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag 2760

acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa 2820

actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgggg 2880

atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattaattc 2940

tgtggaatgt gtgtcagtta gggtgtggaa agtccccagg ctccccaggc aggcagaagt 3000

atgcaaagca tgcatctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 3060

gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta 3120

actccgccca tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 3180

ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag 3240

tagtgaggag gctttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agctcccggg agcttgtata 3300

tccattttcg gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat 3360

ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca 3420

caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccg 3480

gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg 3540

cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgcag ctgtgctcga cgttgtcact 3600

gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct 3660
caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg 3720
cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt 3780
actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 3840
gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc 3900
gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga 3960
ttcatcgact gtggccggct gggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 4020

cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt 4080
atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga 4140
gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt 4200
tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgttttc cgggacgccg 4260
gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt cttcgcccac cccaacttgt 4320
ttattgcagc ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag 4380
catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg 4440

tctgtatacc gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg 4500
tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgta 4560
aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc tcactgcccg 4620
ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga 4680
gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg 4740
tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag 4800
aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc 4860

gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca 4920
aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt 4980
ttcccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc 5040
tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca atgctcacgc tgtaggtatc 5100
tcagttcggt gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc 5160
ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact 5220
tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg 5280

ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggta 5340

tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca 5400

aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa 5460

aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg 5520

aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc 5580

ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg 5640

acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat 5700

ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg 5760

gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa 5820

taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggtcc tgcaacttta tccgcctcca 5880

tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc 5940

gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tggtgtcacg ctcgtcgttt ggtatggctt 6000

cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa 6060

aagcggttag ctccttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat 6120

cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct 6180

tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga 6240

gttgctcttg cccggcgtca atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag 6300

tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga 6360

gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca 6420

ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg 6480

cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tccttttca atattattga agcatttatc 6540

agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag 6600

gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt c 6641