(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월07일
(11) 등록번호 10-1766131
(24) 등록일자 2017년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) *C08B 37/00* (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01) *G01N 27/62* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)
C08B 37/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0032101
(22) 출원일자 2016년03월17일
심사청구일자 2016년03월17일
(56) 선행기술조사문헌
Molecular & Cellular Proteomics, Vol. 12, pp. 2468-2480 (2013.05.29.)*
Curr. Protoc. Chem. Biol., Vol. 2, pp. 55-69 (2010.04.01.)*
Journal of Proteome Research, Vol. 8, pp. 3816-3823 (2009.)
Glycobiology, Vol. 20, pp. 865-871 (2010.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
기술이전 희망 : **기술양도**

(73) 특허권자
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대학로 20(퇴촌동)
(72) 발명자
임재민
경상남도 창원시 의창구 도계로 136, 201동 1003호 (명서동, 두산위브아파트)
이용일
경상남도 창원시 성산구 원이대로 774, 503동 404호 (상남동, 성원아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김종선, 이형석

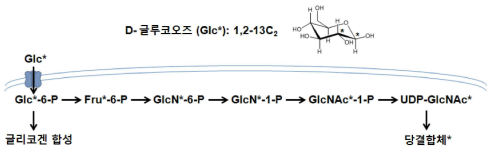
전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 **대사작용에 의한 1,2-13C 동위원소가 표지된 글리칸과 이의 제조방법 및 동위원소 표지된 글리칸의 비교정량 질량분석방법**

(57) 요 약

본 발명은 N-연결형 글리칸 및 O-연결형 글리칸의 비교정량 질량분석이 가능한 새로운 비교정량 질량분석 방법에 관한 것으로, 제 1 글루코오즈($^{12}C_6$)을 포함하는 제 1 배지 및 동위원소가 표지된 제 2 글루코오즈(1,2-$^{13}C_2$)를 포함하는 제 2배지에서 세포주를 배양하는 단계; 상기 제 1 배지 및 상기 제 2 배지에서 배양된 세포에서 단백질 추출 및 지질을 제거하는 단계; 상기 추출된 단백질에서 펩타이드를 추출하는 단계; 및 상기 추출된 펩타이드로부터 글리칸을 분리시키는 단계;를 포함하는 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법을 제공한다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 미지시료의 글리칸의 비교정량 및 구조분석하는데 적용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 1/28 (2013.01)
G01N 27/62 (2013.01)
G01N 2400/10 (2013.01)
(72) 발명자
김상진
대구광역시 달성군 논공읍 논공로11길 34-11
서현경
경상남도 창원시 의창구 사림로 153 (사림동)
김진화
경상남도 창원시 의창구 창이대로321번길 37 (봉곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345146330
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자지원
연구과제명 Endoglycosedase 효소반응에 의한 N-linked 당단백체와 복합다당류의 분석법 개발
기 여 율 2/3
주관기관 창원대학교 산학협력단
연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010-0029634
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소 지원사업
연구과제명 차세대 다기능성 산화물 하이브리드 재료개발 및 특성연구
기 여 율 1/3
주관기관 창원대학교 산학협력단
연구기간 2010.12.01 ~ 2013.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

동위원소가 표지된 1,2-$^{13}C_2$ 글루코오즈를 포함하는 배지에서 세포주를 배양하는 단계;

동위원소가 표지된 1,2-$^{13}C_2$ 글루코오즈를 대사작용에 의해 동위원소가 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAC)으로 합성하는 단계;

상기 합성된 동위원소가 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAC)으로 부터 동위원소가 표지된 글리칸을 분리하는 단계;를 포함하는, 동위원소가 표지된 글리칸을 제조하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 글리칸은 N-연결형 글리칸인, 동위원소가 표지된 글리칸을 제조하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 글리칸은 O-연결형 글리칸인, 동위원소가 표지된 글리칸을 제조하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 배양하는 단계에서 배양 배지는 글루코오즈, DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium), 소디움피루브산염(Sodium pyruvate), 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 페니실린(Penicillin)을 포함하는, 동위원소가 표지된 글리칸을 제조하는 방법.

청구항 5

제 2항에 있어서,

상기 동위원소가 표지된 N-연결형 글리칸과 일반적인 N-연결형 글리칸의 질량차이가 16 Da인, 동위원소가 표지된 글리칸을 제조하는 방법.

청구항 6

제 3항에 있어서,

상기 동위원소가 표지된 O-연결형 글리칸과 일반적인 O-연결형 글리칸의 질량차이가 10 Da인, 동위원소가 표지된 글리칸을 제조하는 방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 동위원소가 표지된 글리칸을 제조하는 방법으로 제조된 동위원소가 표지된 글리칸을 이용하여 동위원소 표지 비교정량 질량분석하는 방법.

청구항 8

제 1 글루코오즈($^{12}C_6$)을 포함하는 제 1 배지 및 동위원소가 표지된 제 2 글루코오즈(1,2-$^{13}C_2$)를 포함하는 제 2 배지에서 세포주를 배양하는 단계;

상기 제 1 배지 및 상기 제 2 배지에서 배양된 세포에서 단백질 추출 및 지질을 제거하는 단계;

상기 추출된 단백질에서 펩타이드를 추출하는 단계; 및

상기 추출된 펩타이드로부터 글리칸을 분리시키는 단계;를 포함하는, 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 글리칸은 일반적인 N-연결형 글리칸 및 동위원소가 표지된 N-연결형 글리칸을 포함하는, 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 일반적인 N-연결형 글리칸과 동위원소가 표지된 N-연결형 글리칸의 질량차이는 16 Da인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법.

청구항 11

제 8항에 있어서,

상기 글리칸은 일반적인 O-연결형 글리칸 및 동위원소 표지된 O-연결형 글리칸을 포함하는, 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 동위원소 표지된 O-연결형 글리칸과 동위원소가 표지되지 않은 O-연결형 글리칸의 질량차이는 10 Da인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 글루코오즈와 대사작용에 의한 동위원소가 표지된 글리칸의 제조방법 및 동위원소 표지된 글리칸의 비교정량 질량분석방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 미지시료에 대해, 동위원소가 표지된 N-연결형 글리칸 및 O-연결형 글리칸의 비교정량분석 및 구조분석이 동시에 가능한 새로운 형태의 비교정량 질량분석법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 포스트 게놈 연구 시대가 시작되면서 과학은 단백질의 번역 후 변형(PTM)을 포함한 프로테오믹스 접근에 더욱 집중되기 시작했다. 그러나 대부분의 프로테옴 프로젝트는 단백질, 지질, 프로테오글리칸의 글리코실화반응에 대해 분석학적, 기능학적인 면에서 상세하게 설명하지 못해 왔다. 이러한 프로테옴 프로젝트의 단점을 보완하고 실질적인 생물학의 이해를 높이기 위하여 글리코믹스(glycomics)라고 불리는 당생물학(glycobiology), 당쇄공학(glycotechnology) 형태의 개념이 소개되었다. 글리코믹스는 당단백질의 글리칸을 연구하는 학문으로 현재 바이오시밀러와 같은 의학분야 연구에 핵심적인 연구분야이다. 글리코믹스에서 진행되고 있는 연구분야는 당단백질의 발현에 따른 글리칸의 구조와 생합성에 대해, 글리칸이 어떻게 정량적으로 변하는 지에 대해 결정하는 것으로, 글리칸의 정량적인 변화는 많은 질병의 진단과 연관되어 있기 때문에 글리칸의 정량 분석에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0003] 글리칸의 정량 분석에 있어서, 고감도 분석법을 제공하는 중요한 분석기술 중 하나가 질량분석법(mass spectrometry, MS)이다. 질량분석기는 복잡한 글리칸의 구조 분석 및 비교정량을 분석하기에 빠르고 믿을 수 있는 분석정보를 제공하고 있어 글리코믹스 연구 분야에 많이 이용되고 있다.

[0004] 일반적으로 질량분석법은 입자의 질량 값의 직접 측정 또는 스펙트럼 데이터를 이용한 다른 물리적 양의 측정으로, 입자의 질량 값을 결정한다. 질량 분석법은 흔히 이온화된 분자 또는 성분의 질량 대 전하 비를 결정하는 것을 포함한다. 이온화된 입자의 전하가 알려져 있다면, 질량 값들의 스펙트럼으로부터 입자의 질량을 결정할

수 있다.

[0005] 지금까지 개발된 글리칸의 비교정량 질량분석법은 동위원소 표지를 이용한 ^{13}C아이오도메테인($^{13}CH_3I$), QUIBL(Quantification by Isobaric Labeling), IDAWG(Isotopic Detection of Aminosugars With Glutamine)와 같은 기술로 생물학적으로 다른 조건의 시료에 대한 응용에 이용되고 있다.

[0006] 종래에는 상기 IDAWG기술로 ^{15}N-글루타민을 이용하여, 헥소사민 생합성 경로(Hexosamine Biosynthesis Pathway, HBP)에 ^{15}N 표지된 글루타민의 ^{15}N 하나가, 아미노당에 표지되는 기술이 개시되었다(US 2010/0297609). 이 기술은 아미노당에만 1 Da의 질량차이를 내는 기술이기 때문에 질량차이가 작아, 질량 분광분석 시, 이온의 겹침 등이 발생하여 작은 O-연결형 글리칸의 경우, 정확한 정량 분석 및 구조를 파악하는 것에 어려움이 있어 왔다.

[0007] 따라서, 이와 같은 분석법 외에 본 발명의 새로운 비교정량 질량분석법에 대한 요구가 있어 왔다. 따라서, 본 발명의 비교정량 질량분석법 개발은 향후 글리코믹스 연구의 획기적인 발전에 기여할 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 부응하고자 개발된 것으로, 1,2-$^{13}C_2$ 글루코오즈를 이용한 대사작용에 의한 동위원소가 표지된 글리칸 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명의 두번째 목적은 일정한 질량 차이 값을 갖는 동위원소가 표지된 글리칸을 이용한 글리칸의 비교정량 질량분석법 제공하는 것에 있다.

[0010] 또한, 본 발명은 N-연결형 글리칸 및 O-연결형 글리칸의 비교정량이 동시에 가능한 비교정량 질량분석법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위한, 본 발명에 따른 동위원소가 표지된 글리칸을 제조하는 방법은 동위원소가 표지된 1,2-$^{13}C_2$ 글루코오를 포함하는 배지에서 세포주를 배양하는 단계;동위원소가 표지된 1,2-$^{13}C_2$ 글루코오즈를 대사작용에 의해 동위원소가 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAC)으로 합성하는 단계;상기 합성된 동위원소가 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAC)으로 부터 동위원소가 표지된 글리칸을 분리하는 단계;를 포함한다.

[0012] 상세하게는 상기 글리칸은 N-연결형 글리칸인 동위원소가 표지된 글리칸 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한, 상기 글리칸은 O-연결형 글리칸인 동위원소가 표지된 글리칸 제조방법이다.

[0014] 보다 상세하게는, 상기 배양 단계에서의 배양 배지는 v 글루코오즈 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium), 소디움피루브산염(Sodium pyruvate), 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 페니실린(Penicillin)을 포함하는 인 동위원소가 표지된 글리칸 제조방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 동위원소가 표지된 N-연결형 글리칸과 일반적인 N-연결형 글리칸의 질량차이가 16 Da인 동위원소가 표지된 글리칸 제조방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명의 일 실시예에서, 상기 동위원소가 표지된 O-연결형 글리칸과 일반적인 O-연결형 글리칸의 질량차이가 10 Da인 동위원소가 표지된 글리칸 제조밥법을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기와 같은 동위원소 표지된 글리칸 제조방법으로 제조된 동위원소 표지된 글리칸을 이용하여, 동위원소 표지 비교정량 질량분석하는 방법을 제공한다.

[0018] 보다 바람직하게는 본 발명은, 제 1 글루코오즈($^{12}C_6$)을 포함하는 제 1 배지 및 동위원소가 표지된 제 2 글루코오즈(1,2-$^{13}C_2$)를 포함하는 제 2배지에서 세포주를 배양하는 단계;상기 제 1 배지 및 상기 제 2 배지에서 배양된 세포에서 단백질 추출 및 지질을 제거하는 단계;상기 추출된 단백질에서 펩타이드를 추출하는 단계; 및 상기 추출된 펩타이드로부터 글리칸을 분리시키는 단계;를 포함하는 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법을 제공한다.

[0019] 상세하게는 상기 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법에서의 상기 글리칸은 일반적인 N-연결형 글리칸 및 동위원소가 표지된 N-연결형 글리칸을 포함한다. 더욱 상세하게는 상기 일반적인 N-연결형 글리칸과 동위원소가 표지된 N-연결형 글리칸의 질량차이는 16 Da인 것을 특징으로 하는 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법을 제공한다.

[0020] 또한, 상기 동위원소 표지 비교정량 질량분석방법에서의 상기 글리칸은 일반적인 O-연결형 글리칸 및 동위원소 표지된 O-연결형 글리칸을 포함할 수 있다. 상세하게는 상기 동위원소 표지된 O-연결형 글리칸과 동위원소가 표지되지 않은 O-연결형 글리칸의 질량차이는 10 Da인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 기존의 글리칸의 비교정량 질량분석법과는 달리, N-연결형 글리칸, O-연결형 글리칸 및 당지질과 같은 다양한 형태의 글리칸을 동시에 비교정량 질량분석 및 구조분석이 가능할 것으로 보인다.

[0022] 특히, 본 발명에 따른 비교정량 질량분석법은 서로 다른 생물학적 조건을 가진 세포에 동위원소 표지를 활용하여 분석이 어려운 글리칸의 비교정량 질량분석법을 제공할 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명에 따른 비교정량 질량분석법은 기존의 비교정량 질량분석법의 문제점인 세포배양 단계에서 발생하는 오염원을 최소화 할 수 있어, 순수하게 세포의 대사작용에 의해서만 합성되는 동위원소 표지가 가능한 비교정량 질량분석법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명에 따른 D-글루코오즈(1,2-$^{13}C_2$)가 포함된 세포주의 생합성 경로를 나타낸다.

도 2는 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포로부터 N-연결형 글리칸 및 O-연결형 글리칸의 비교정량 질량분석 방법을 나타내는 흐름도이다.

도 3은 본 발명 따라 비교정량 질량분석된 제 1 N-연결형 글리칸 및 제 2 N-연결형 글리칸의 질량차와 제 1 O-연결형 글리칸 및 제 2 O-연결형 글리칸의 질량차를 나타내는 그림이다.

도 4는 본 발명에 따른 제 1 N-연결형 글리칸 및 제 2 N-연결형 글리칸의 질량스펙트럼을 나타낸다.

도 5는 MS/MS 스펙트럼에 의한 제 2 N-연결형 글리칸의 구조적 특성을 나타낸다.

도 6은 본 발명에 따른 제 1 O-연결형 글리칸 및 제 2 O-연결형 글리칸의 질량스펙트럼을 나타낸다.

도 7은 MS/MS 스펙트럼에 의한 제 2 O-연결형 글리칸의 구조적 특성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명은 동위원소가 표지된 1,2-$^{13}C_2$ 글루코오즈를 포함하는 배지에서 세포주를 배양하는 단계;동위원소가 표지된 1,2-$^{13}C_2$ 글루코오즈를 대사작용에 의해 동위원소가 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAC)으로 합성하는 단계;상기 합성된 동위원소가 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAC)으로 부터 동위원소가 표지된 글리칸을 분리하는 단계;를 포함하는 동위원소가 표지된 글리칸을 제조하는 방법을 제공한다.

[0027] 상기 동위원소가 표지된 글루코오즈를 동위원소가 표지된 UDP-GlcNAc로 합성하는 상기 대사작용의 각 단계는 도 1과 같다. 동위원소가 표지된 D-글루코오즈(v)가 해당작용으로, 중간체인, 동위원소가 표지된 프록토오스-6-인산(Fru*-6-P)이 된다. 동위원소가 표지된 글루코사민-6-인산(GlcN*-6-P)은 동위원소가 표지된 N-아세틸글루코사민-1-인산(GlcNAc*-1-P)를 거쳐 최종적으로, UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc*)로 전환되는 생합성 경로를 따른다. 이 경로에서 제 1 및 속도 결정 단계는 동위원소가 표지된 프록토오스-6-인산(Fru*-6-P)이 동위원소가 표지된 글루코사민-6-인산(GlcN*-6-P)으로 전환하는 단계이다. 이는 글루타민(Gln)이 글루코오즈(Glu)로 변환되는 것과 동시에 일어난다. UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc)은 다시 모든 당결합체(glycoconjugate)의 합성

에 이용된다.

[0028] 본 발명에 있어서, '당결합체(glycoconjugate)'는 탄수화물에, 다른 화학종이 공유결합으로 결합되어 있는 것을 의미한다.

[0029] '동위원소'란, 아이소토프(isotope) 또는 동위체라고도 하며 서로 화학적으로 거의 구별할 수가 없으나 그것을 구성하고 있는 원자의 질량이 서로 다른 것을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 동위원소가 표지된 1,2-$^{13}C_2$ 클루코오즈는 일반적인 글루코오즈인 $^{12}C_6$와는 원자번호는 같으나 1, 2번 탄소만이 다른 질량값을 갖는 것을 의미한다.

[0030] '글루코오즈'는 알데하이드기(aldehyde group)를 가지는 단당류의 일종으로, 일반적으로 포도당이라 한다. 글루코오즈의 분자식은 $C_6H_{12}O_6$ 로 탄소 수가 6개이기 때문에 육탄당(헥소오스, hexose)이라 부른다. 탄수화물은 그것을 구성하는 당의 수에 따라 단당류·이당류·다당류로 구분하는데, 포도당은 단당류의 일종으로 녹말을 형성하는 기본 단위가 되기도 한다. 글루코오즈는 생체 내에서 세포 호흡을 통해 분해, 에너지를 생산하고, 그 에너지는 ATP의 형태로 저장, 발효·호흡 등에 사용된다.

[0031] 상세하게는 상기 각 단계에 따라 제조된 동위원소가 표지된 글리칸은 N-연결형 글리칸일 수 있다. 또는 O-연결형 글리칸일 수 있다.

[0032] 본 발명에서 사용되는 용어 'N-연결형 글리칸' 이란, 시퀀(sequon)의 아스파라진의 곁사슬에 질소(N)가 부착되어 있는것을 의미한다. 시퀀은 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr 시퀀스를 말하며, 여기서 X는 프롤린을 제외한 아미노산 및 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오즈, 뉴라민산, N-아세틸글루코사민, 프룩토오즈, 마노즈, 푸코스, 및 다른 단당류로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0033] 본 발명에서 사용되는 용어 'O-연결형 글리칸' 이란, 진핵세포에서, O-연결형 글리칸은 골지체에서 세린 또는 펩타이드의 트레오닌 잔기가 당 하나에 하나씩 결합되어 있는 것을 의미한다. N-연결형 글리칸과 달리, 아직 공통 서열이 알려져 있지 않다.

[0034] 또한, 상기 배양 단계에서의 배양 배지는 일반적인 글루코오즈 또는 동위원소가 표지된 글루코오즈 및 성장 인자, 최소한의 필수적인 배지를 포함하는 것을 특징으로 한다. 보다 상세하게는, 상기 배양 단계에서의 배양 배지는 글루코오즈, DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium), 소디움피루브산염(Sodium pyruvate), 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 페니실린(Penicillin)을 포함한다. 상기 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium)은 가장 일반적으로 사용되는 동물 세포 배양의 배지이다. 또한, 상기 소디움피루브산염 상기 배지에서 배양되는 세포의 에너지 원천이 된다.

[0035] 바람직하게는 본 발명은 상기 동위원소가 표지된 N-연결형 글리칸과 일반적인 N-연결형 글리칸의 질량차이가 16 Da인 동위원소가 표지된 글리칸을 제조하는 방법을 제공한다. 이러한 질량차이는 D-글루코오즈(1,2-$^{13}C_2$)로 부터 상기와 같은 대사작용으로 합성된 N-연결형 글리칸의 경우, 8개의 당에 각각 1,2-$^{13}C_2$의 동위원소가 표지되고, 8개의 당에 의해 16 Da의 일정한 질량차이를 나타내는 것이다. 이는 도 4를 통해 확인할 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명에 따른 상기 동위원소가 표지된 O-연결형 글리칸과 일반적인 O-연결형 글리칸의 질량차이는 10 Da인 것을 특징으로 한다. O-연결형 글리칸의 이러한 질량차이는 도 6과 같이, 5개의 당에 각각 1,2-$^{13}C_2$의 동위원소가 표지되고, 5 개의 당에 의해 총 10 Da의 일정한 질량차이를 갖는 것을 확인할 수 있다.

[0037] 본 발명은 또한, 제 1 글루코오즈($^{12}C_6$)을 포함하는 제 1 배지 및 동위원소가 표지된 제 2 글루코오즈(1,2-$^{13}C_2$)를 포함하는 제 2 배지에서 세포주를 배양하는 단계; 상기 제 1 배지 및 상기 제 2 배지에서 배양된 세포에서 단백질 추출 및 지질을 제거하는 단계; 상기 추출된 단백질에서 펩타이드를 추출하는 단계; 및 상기 추출된 펩타이드로부터 글리칸을 분리시키는 단계;를 포함하는 글리칸의 비교정량 질량분석방법을 제공한다.

[0038] 상기 글리칸의 비교정량 질량분석방법의 각 단계를 도 2를 참조하여 설명한다.

[0039] 본 발명은 도 2에서 보듯이, 상기 제 1 글루코오즈를 포함하는 제 1 배지 및 동원소가 표지된 제 2 글루코오즈를 포함하는 제 2 배지에서 세포주를 배양하는 단계를 포함한다. 상세하게는 상기 세포주는 인간의 유방암 세포

주인, MDA-MB-231 세포이다.

[0040] 상기 제 1 배지 및 제 2 배지에서 배양된 세포들을 혼합하여, 균질화(Homogenization) 및 탈지 반응(delipidation)을 통해, 세포에서 단백질 추출 및지질을 제거한다. 상기 추출된 단백질에 단백질 소화 효소를 처리하여, 펩타이드를 추출한다. 상세하게는 상기 소화 효소는 트립신 효소일 수 있다.

[0041] 상기와 같은 단백질 소화 효소로 추출한 펩타이드에 PNGase F 효소를 처리하여 N-연결형 글리칸을 추출한다. 이렇게 추출된 혼합물은 N-연결형 글리칸 및 N-연결형 글리칸이 포함되어 있지 않은 펩타이드를 포함한다. 상기 혼합물을 C18 역상의 액상 크로마토그래피를 이용하여 추출된 N-연결형 글리칸을 분리(isolation)시킨다.

[0042] 상기와 같이 분리된 N-연결형 글리칸에는 일반적인 제 1 N-연결형 글리칸 및 동위원소가 표지된 제 2 N-연결형 글리칸이 포함되어 있다. 질량분석 결정 전에 상기 N-연결형 글리칸 혼합물을 퍼메틸레이션(permethylation)시킨다. 질량분석 전 이 N-연결형 글리칸 혼합물을 퍼메틸레이션시키는 것은 글리칸의 세부구조 확인 및 이온화를 증가시켜 검출한계를 낮추기 위함이다. 도 2에서와 같이 퍼메틸화된 글리칸은 MS을 통해 분석한다. Full MS로 글리칸의 질량을 확인한 후, 상기 제 1 N-연결형 글리칸과 제 2 N-연결형 글리칸을 비교정량하고 이에 의한 정량화 결과, 두 글리칸의 질량 차이는 $\Delta[M+Na]^+ = 16$ Da 이다. 이는 도 3 및 도 4에서 확인할 수 있다. 또한, 글리칸의 구조를 확인하기 위해 MS/MS에 의한 질량분석 데이타 또한 얻을 수 있다. N-연결형 글리칸의 구조적 특성을 파악하기 위한 구체적인 MS/MS 스펙트럼의 결과는 도 5에 나와있다.

[0043] 반면에 상기 추출한 펩타이드를 β-제거(β-Elimination, 할로겐수소 이탈) 반응 시키면, O-연결형 글리칸을 얻을 수 있다.

[0044] 상기 O-연결형 글리칸은 일반적인 제 1 O-연결형 글리칸 및 동위원소가 표지된 제 2 O-연결형 글리칸이 포함되어 있다. 상기 O-연결형 글리칸 혼합물을 탈이온화시킨 후, 상기 N-연결형 글리칸의 질량분석 방법과 같이 퍼메틸레이션시킨다. 도 2에서와 같이 퍼메틸화된 글리칸은 MS을 통해 분석한다. Full MS로 글리칸의 질량을 확인한 후, 상기 제 1 O-연결형 글리칸과 제 2 O-연결형 글리칸을 비교정량하고 이에 의한 정량화 결과, 두 글리칸의 질량 차이는 $\Delta[M+Na]^+ = 10$ Da 이다. 이는 도 3 및 도 6을 통해 확인할 수 있다. 또한, 글리칸의 구조를 확인하기 위해 MS/MS에 의한 질량분석 데이타 또한 얻을 수 있다. O-연결형 글리칸의 구조적 특성을 파악하기 위한 구체적인 MS/MS 스펙트럼의 결과는 도 7에 각각 나와있다.

[0045] 본 발명에서 사용된 질량분석기는 'ESI - 이온 트랩 질량분석기' 이다. ESI(electrospray)는 이온화 방법 중 하나로, 대기압 하에서 이온화하여 질량분석기로 이온을 전달하는 방식이다. 강한 전기장(3 ~ 6 kV)을 모세관을 통과하는 낮은 유속의(1 ~ 10 μL/min) 액체에 걸어 10^6 V/m 정도의 전기장을 생성한다. 이 전기장은 모세관 끝에 위치한 액체 표면에 전하를 축적하여 이 액체를 분해한다. 수직으로 주입된 낮은 유속의 가스는 스프레이로부터 분무를 돕고, 이 방울들은 가열된 비활성 기체 또는 가열된 모세관을 통하여 마지막 용매분자를 제거한다. 스프레이는 설정된 전압으로부터 시작되며 용매의 표면장력에 의존한다. 낮은 전압에서 방울은 구의 형태를 띄다가 센 전압에서는 축적된 전하에 의해 모양이 변하고 스프레이가 시작된다. 방울의 용매가 증발하면서 방울이 점점 줄어들고, 줄어든 방울에서는 쿨롱 힘(culombic force)이 늘어나, 방울의 분산을 유도하여 점점 방울이 작아지게 된다. 방울 표면의 전기장이 충분히 커지면 표면에서 이온의 탈착이 일어난다. 이처럼 이온의 탈착은 방울의 표면에서 일어나므로 감도는 그 분석물질이 방울의 표면에 많이 존재하는 것일수록 좋다.

[0046] 이온 트랩(ion trap) 질량분석기는 동일 주파수의 사중극자 범위에 원하는 이온을 잡아 넣고 나머지는 방출시킨다. 일정 범위의 이온들을 고리 전극(ring electrode)과 두 끝자리 전극(endcap electrode) 사이의 공간에 가두고 그 이외의 이온들을 검출기를 향해 방출시키게 된다. 이때 트랩되는 이온들의 m/z 비율의 범위는 사중극자 분석기처럼 전압의 진폭과 진동수에 의해 결정된다. 이온 트랩의 가장 유용한 점은 이 선택된 이온의 분리이며, 분리된 이온은 충돌가스에 의해 분열된다. 또한 이온 트랩 질량분석기는 작은 크기의 이온을 잡아서 축적시키는 능력이 있어, 그 신호대 잡음비가 매우 낮은 것 또한 장점 중 하나이다.

[0047] 상기에서 설명했듯이, 글리칸의 비교정량 질량분석법은 동위원소 표지를 이용한 ^{13}C아이오도메테인($^{13}CH_3I$), QUIBL(Quantification by Isobaric Labeling), IDAWG(Isotopic Detection of Aminosugars With Glutamine)와 같은 기술이 있다.

[0048] ^{13}C 아이오도메테인을 이용한 방법은 퍼메틸레이션 및 ^{13}C로 표지된 메틸아이오다이드($^{13}CH_3I$)를 갖는 올리고당의

동위원소 표지로 시작한다. 올리고당의 분리된 표본은 ^{12}C 또는 ^{13}C 메틸 아이오다이드이고, 표지된 글리칸과 표지되지 않은 글리칸을 알려진 비율로 혼합한 후 MS로 분석한다.

[0049] QUIBL(Quantification by Isobaric Labeling) 방법은, $^{13}CH_3I$ 또는 $^{12}CH_2DI$를 갖는 글리칸의 퍼메틸레이션이, 동일한 질량을 갖는 동종의 유도체 쌍으로 일어나면서 시작된다. 이 경우, 메틸레이션이 일어나는 각각의 위치는 0.002922 Da의 질량 차이를 갖는다. 글리칸은 여러개의 메틸레이션 싸이트를 갖고 있기 때문에, 총 질량 차이는 대략 30000 m/Δm의 분해능에서 분리 및 정량이 가능하다. 또한, 이 방법은 배아 줄기세포의 분화와 관련하여 글리코믹스 변화를 정량화 하는데 적용할 수 있다.

[0050] IDAWG(Isotopic Detection of Aminosugars With Glutamine) 방법에서, 아미드-^{15}N-Gln를 포함하는 배지는 무거운 질소로 표지된 세포의 아미노당이 사용된다. Gln의 아미드 곁 사슬은 GlcNAc, GalNAc, 및 살리실산의 생합성을 위한 질소의 유일한 소스이기 때문에, 아미드-^{15}N-Gln 배지에서 72시간 동안 배양되는 배아 줄기세포의 N-연결형 글리칸 및 O-연결형 글리칸은 ^{15}N와 거의 완벽한 결합이 일어난다. 동위원소의 무거운 단당류 잔여물은 글리칸 분열을 해석하는데 추가적인 정보를 제공하고 MS로 정량화 할 수 있게 한다.

[0051] **<실시예 1: 세포 배양>**

[0052] 실시예 1-1. 제 1 배지

[0053] 인간의 유방암 세포주, MDA-MB-231을 구입하였다. 상기 MDA-MB-231 세포 배양 배지는 10 % FBS 50 mL 및 DEDM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium) 450 mL 배양액으로 구성된다. 또한, 2 mL D-글루코즈($^{12}C_6$), 소디움 피루빈산염(sodium pyruvate) 5 mL, 페니실린(penicillin) 5 mL 와 같은 성장인자를 포함하고 있는 제 1 배지에서 상기 MDA-MB-231 세포를 48시간 동안 배양하였다.

[0054] 실시예 1-2. 제 2 배지

[0055] 제 2 배지(heavy medium)는 2 mL 동위원소가 표지된 D-글루코즈(1,2-$^{13}C_2$)를 포함하고 있는 것을 제외하고는 상기 제 1 배지와 동일한 조건에서 MDA-MB-231 세포를 48시간 동안 배양하였다.

[0056] **<실시예 2: 펩타이드 혼합물 제조>**

[0057] 상기 제 1 및 제 2 배지에서 배양된 각각의 세포 샘플을 혼합했다. 이를 수크로오스(sucrose) 등장액에서 균질화(homogenization)를 통해 단백질을 추출하고, 클로로폼:메탄올:물에서 유기추출 방법을 사용하여 지질을 제거하였다.

[0058] 상기와 같이 추출된 단백질에, 트립신 효소를 통해 펩타이드로 소화시켰다.

[0059] **<실시예 3: 글리칸 분리(isolation)>**

[0060] 실시예 3-1. N-연결형 글리칸 분리(isolation)

[0061] 상기 펩타이드 혼합물을 C18 역상 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)을 시켜, 글리칸을 분리시키고, 이에 PNGase F 소화효소를 첨가하여 N-연결형 글리칸을 추출하였다.

[0062] 실시예 3-2. O-연결형 글리칸 분리(isolation)

[0063] 상기 펩타이드 혼합물에 β-제거(β-Elimination, 할로겐수소 이탈) 반응을 통해, O-연결형 글리칸을 추출하였다.

[0064] **<실시예 4: 글리칸의 퍼메틸레이션>**

[0065] MS에 의한 상기 글리칸의 분석을 위해서, 상기 설명한 것처럼 퍼메틸레이트시켰다. 글리칸은 200 μL의 무수 DMSO 및 250 μL의 NaOH/DMSO 시약(2 mL의 무수 DMSO에 50 mg NaOH 혼합물)에서 서스펜드(suspend)되었다. 초음파처리 및 질산 기체 하에서 볼텍싱(vortexing)한 후에, 100 μL의 아이오도메탄(iodomethane)을 첨가하였고 그 혼합물을 5분 동안 격렬하게 볼텍스해줬다. 그 후, 증류수 2 mL를 첨가하였고 과도한 아이오도메탄을 질소 스트림(stream)으로 버블링함으로써 제거하였다. 또한 2 mL의 디클로로메탄(dichloromethane)을 첨가하였다. 격렬한 혼합 및 원심분리에 의한 상분리 후, 상층의 물 층을 제거하고 버렸다. 샘플을 증류수로 4번 추출하였고

퍼메틸레이트된 글리칸은 건조를 위해 원심성의 증발기로 증발시켰다.

[0066] **<실시예 5: 글리칸의 비교정량 질량분석>**

[0067] 상기 실시예 4에서와 같이 퍼메틸레이트된 글리칸을 이용하여, 하기와 같이 질량분석을 실시하였다.

[0068] 퍼메틸레이트된 글리칸은 1 mM의 NaOH를 포함하는 80 %(v/v)의 50 μL에서 재구성되었고, 용융된 실리카 에미터(emitter)(360 X 75 X 30 μm, SilicaTip™ New Objective, MA)를 갖는 나노스케일의 전기스프레이(nanoelectrospray) 이온 소스를 사용하여, 2.0 kV 커필러리(capillary) 전압, 200 ℃커필러리(capillary) 온도, 및 시린지 펌프에 의한 0.5 μL/분의 유입속도에서 이온 트랩 질량 분석기(LCQ Fleet, Thermo Scientific Inc., San Jose, CA)에 직접 주입하였다. 양이온 및 프로파일 모드에서 기록된, Full MS 스펙트럼는 5 마이크로스캔(microscan) 및 150의 최대 주입 속도에서 30초 동안 400 내지 2000 m/z에서 수집되었다. 해상도 향상을 위해 좁은 질량 창(mass window, 20 Da/charge 미만)의 관심 이온들은 줌-스캔 모드로 측정되었다. 충돌로 유발된 분해(CID)에 따라, 중심 MS/MS 스펙트럼은 정규화된 충돌 에너지의 40 %를 글리칸의 구조를 특징짓기 위해 얻을 수 있다.

[0069] 상기 설명한 것 처럼, 도 4에서 보듯이 상기 제 2 N-연결형 글리칸의 8개의 당에 각각 1,2-$^{13}C_2$의 동위원소가 표지되고, 8개의 당에 의해, 16 Da의 질량차이를 보여준다.

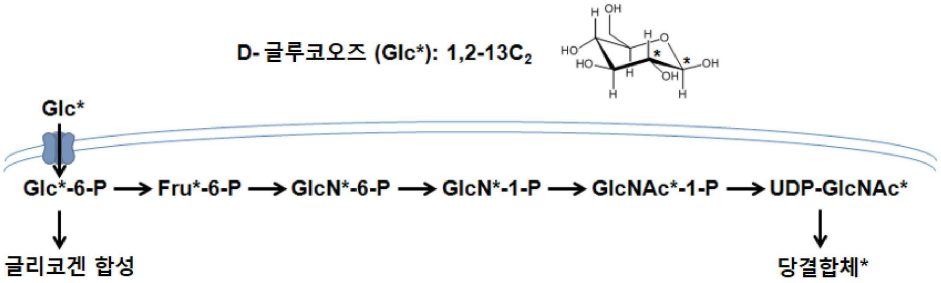
[0070] 또한, 도 6에는 상기 제 2 O-연결형 글리칸의 5개의 당에 각각의 1,2-$^{13}C_2$의 동위원소가 표지되어 있고, 5개의 당에 의한 10 Da 질량차이를 보이고 있음이 나타나 있다.

[0071] 상기와 같이 일정한 질량 차이를 나타내는 본 발명에 따른 비교정량 질량분석 방법은 미지시료의 글리칸에 대한 비교정량 및 구조분석이 가능하다.

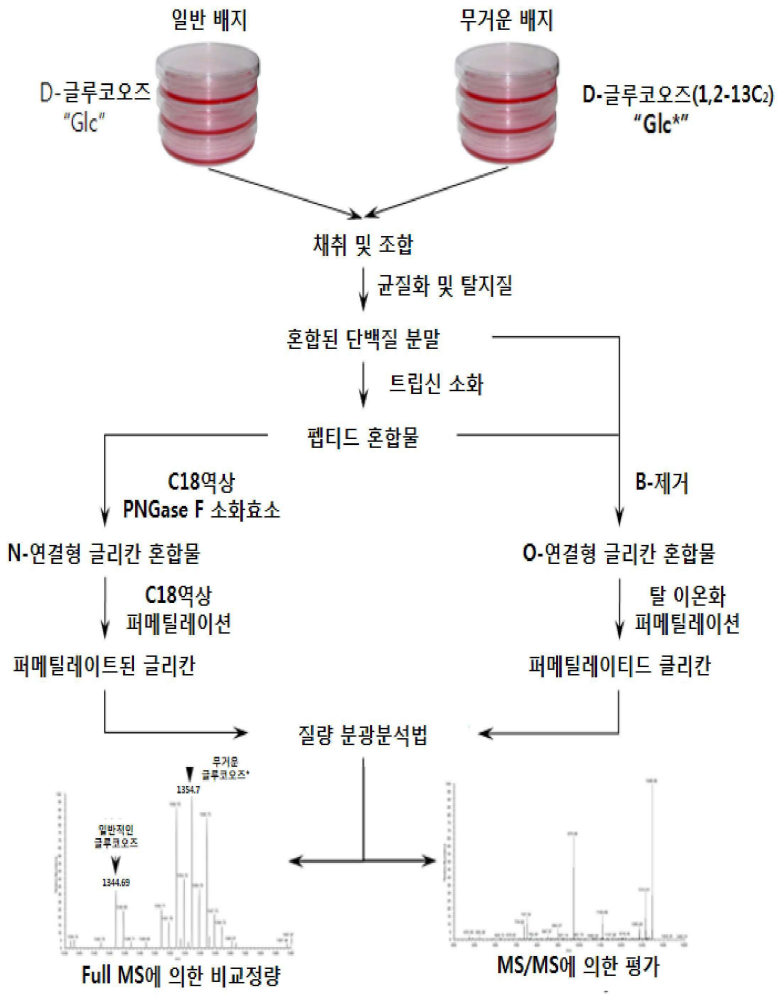
[0072] 이상의 설명은 본 발명의 일 실시예에 불과할 뿐, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 본질적 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현할 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명의 범위는 전술한 실시예에 한정되지 않고 특허 청구범위에 기재된 내용과 동등한 범위 내에 있는 다양한 실시 형태가 포함되도록 해석되어야 할 것이다.

도면

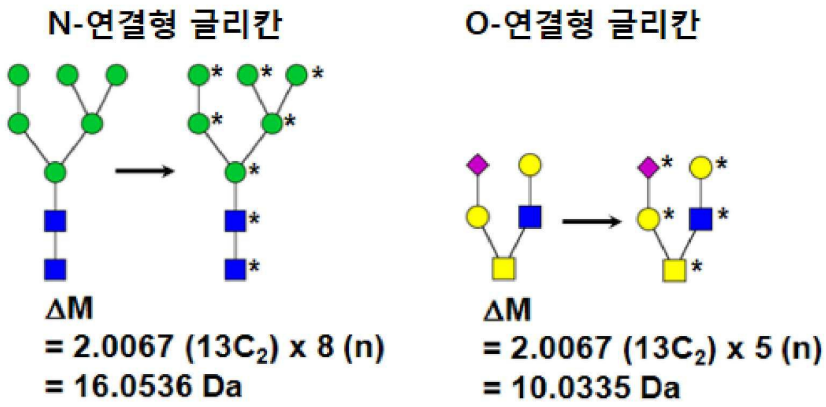
도면1


D- 글루코오즈 (Glc*): 1,2-13C2
Glc*
Glc*-6-P
Fru*-6-P
GlcN*-6-P
GlcN*-1-P
GlcNAc*-1-P
UDP-GlcNAc*
글리코겐 합성
당결합체*

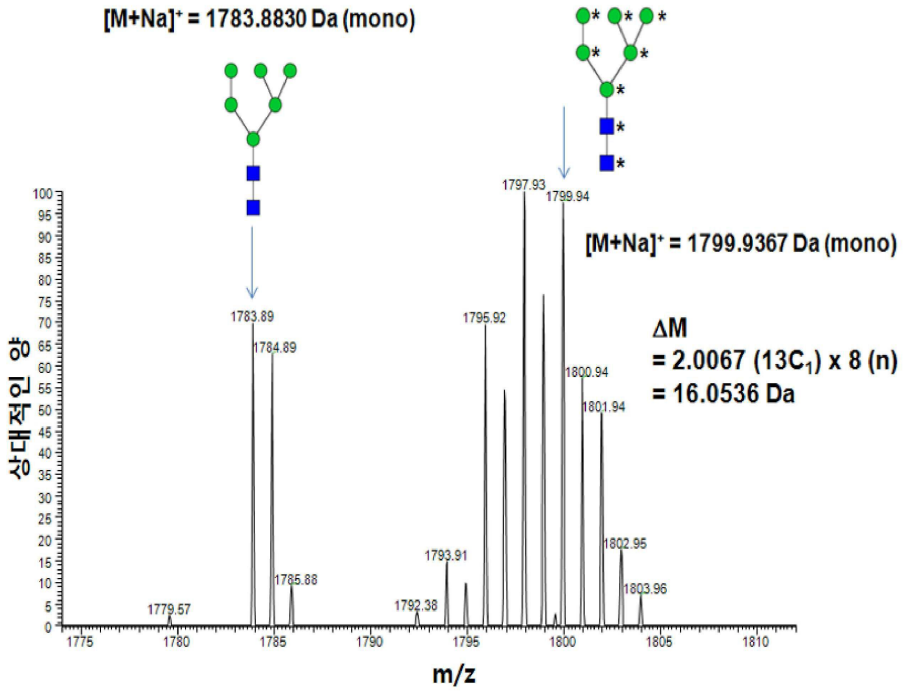
도면2


일반 배지
무거운 배지
D-글루코오즈
"Glc"
D-글루코오즈(1,2-13C2)
"Glc*"
채취 및 조합
균질화 및 탈지질
혼합된 단백질 분말
트립신 소화
펩티드 혼합물
C18역상
PNGase F 소화효소
B-제거
N-연결형 글리칸 혼합물
O-연결형 글리칸 혼합물
C18역상
퍼메틸레이션
탈 이온화
퍼메틸레이션
퍼메틸레이트된 글리칸
퍼메틸레이티드 클리칸
질량 분광분석법
무거운 글루코오즈*
1354.7
일반적인 글루코오즈
1344.69
Full MS에 의한 비교정량
MS/MS에 의한 평가

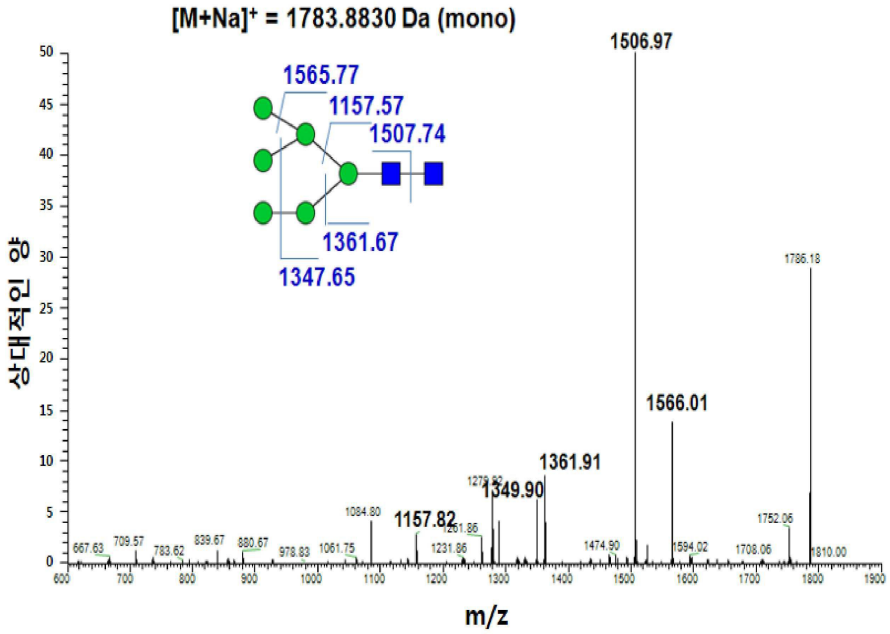
도면3


N-연결형 글리칸
O-연결형 글리칸
ΔM
= 2.0067 (13C2) x 8 (n)
= 16.0536 Da
ΔM
= 2.0067 (13C2) x 5 (n)
= 10.0335 Da

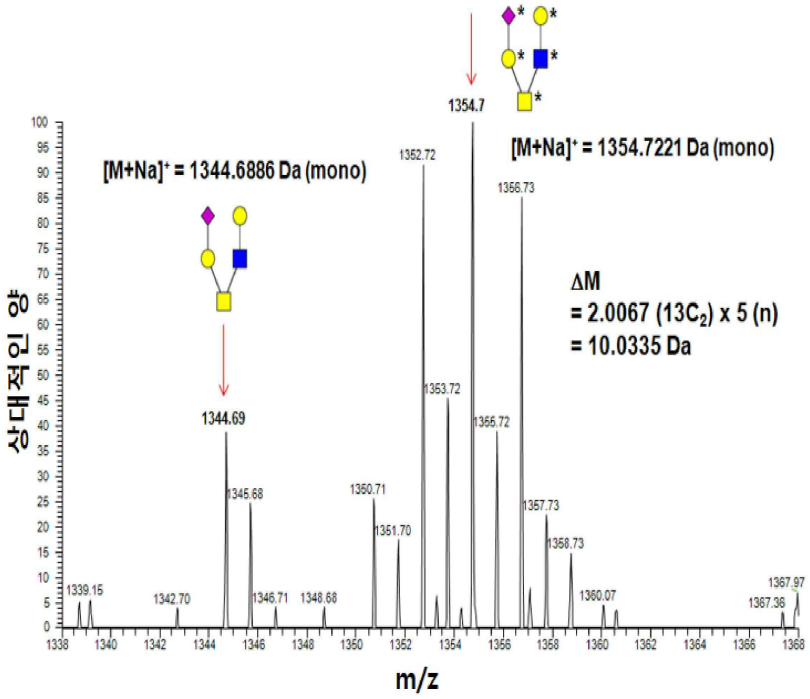
도면4


[M+Na]+ = 1783.8830 Da (mono)
[M+Na]+ = 1799.9367 Da (mono)
ΔM
= 2.0067 (13C1) x 8 (n)
= 16.0536 Da
상대적인 양
m/z
1783.89
1784.89
1785.88
1779.57
1792.38
1793.91
1795.92
1797.93
1799.94
1800.94
1801.94
1802.95
1803.96

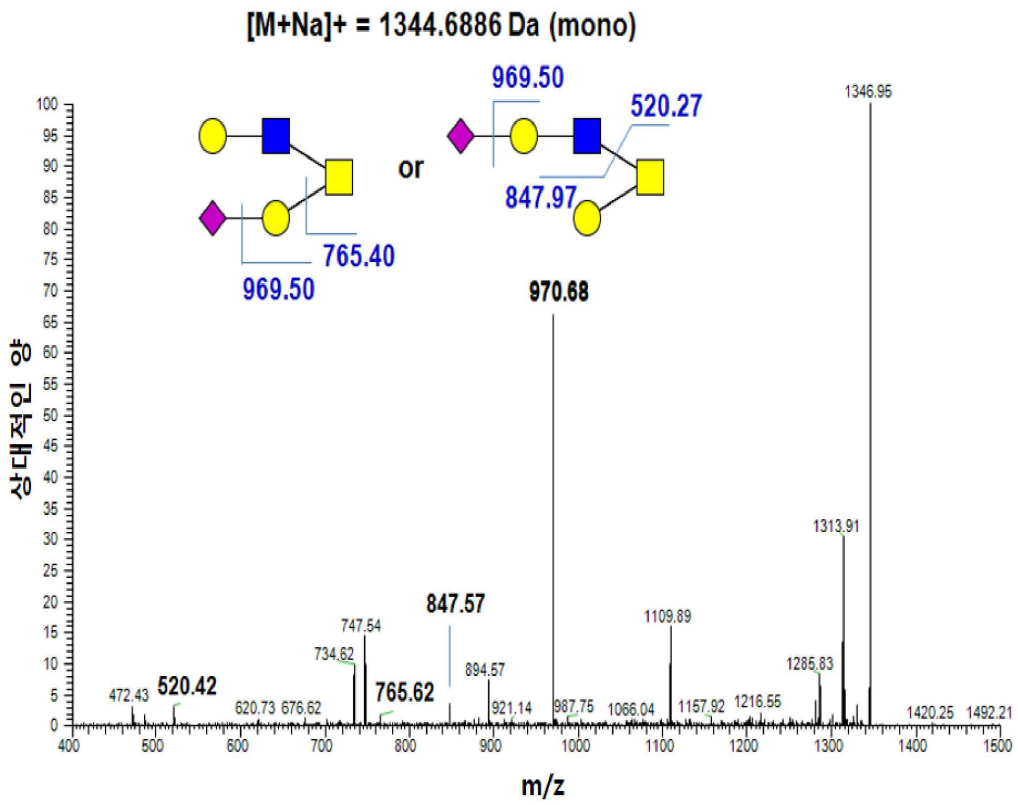
도면5


[M+Na]+ = 1783.8830 Da (mono)
1565.77
1157.57
1507.74
1361.67
1347.65
1506.97
1786.18
1566.01
1361.91
1349.90
1157.82
상대적인 양
m/z

도면6


[M+Na]+ = 1344.6886 Da (mono)
[M+Na]+ = 1354.7221 Da (mono)
ΔM
= 2.0067 (13C2) x 5 (n)
= 10.0335 Da
1344.69
1354.7
상대적인 양
m/z

도면7


[M+Na]+ = 1344.6886 Da (mono)
969.50
520.27
or
847.97
765.40
969.50
970.68
1346.95
1313.91
847.57
747.54
734.62
1109.89
894.57
1285.83
520.42
765.62
472.43
620.73 676.62
921.14
987.75
1066.04
1157.92
1216.55
1420.25
1492.21
상대적인 양
m/z