



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0067162
(43) 공개일자 2023년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6848 (2013.01)

G01N 2333/40 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0152980

(22) 출원일자 2021년11월09일

심사청구일자 2021년11월09일

(71) 출원인

창원대학교 산학협력단

경상남도 창원시 의창구 창원대학교 20(퇴촌동)

(72) 발명자

임재민

경상남도 창원시 성산구 원이대로579번길 13, 10
8동 1104호

조재윤

경상남도 창원시 진해구 조천북로98번길 10, 106
동 105호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤대웅

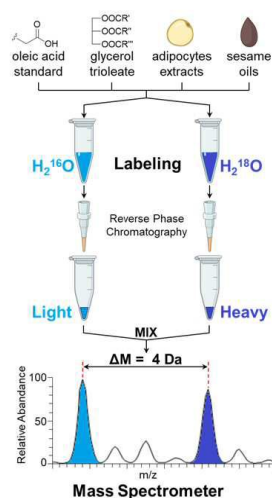
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 라이페이스와 ^{18}O -물을 이용한 지방산의 동위원소표지법 및 이를 이용한 질량분석법

(57) 요약

본 발명은 라이페이스 (Lipase)와 ^{18}O -물을 이용한 지방산의 동위원소표지법 및 이를 이용한 질량분석법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 동위원소 표지법 및 질량분석법은 라이페이스와 ^{18}O -물의 효소적 가수분해를 이용하여 지방산의 카르복실기에 ^{18}O 동위원소 표지함에 따라 다양한 생체 시료에 대한 지질체학 연구에 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 2333/916 (2013.01)

G01N 2458/15 (2013.01)

(72) 발명자

응오, 당 쭈옹 하이

경상남도 창원시 의창구 창원대학교로 20, 2동 2211호

윤지희

경상남도 창원시 의창구 용지로 295

주성민

경상남도 창원시 성산구 원이대로 774, 101동 310호

장영훈

경상남도 창원시 의창구 중동로 34, 103동 2604호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711114344

과제번호 2018R1A2B6008287

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 동위원소표지 포도당을 이용한 글라이켄의 생체내 동위원소표지법 개발과 정량적 글

라이코믹스의 응용

기 여 율 30/100

과제수행기관명 창원대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345334181

과제번호 2021R1I1A3060501

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)

연구과제명 화학적·대사적 동위원소표지에 의한 글리칸의 비교 및 절대정량 질량분석법 개발

기 여 율 70/100

과제수행기관명 창원대학교

연구기간 2021.06.01 ~ 2024.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 지방산의 동위원소 표지방법:

라이페이스 (Lipase) 및 $H_2^{18}O$ 를 포함하는 라벨링제를 지방산을 포함하는 분석체와 접촉시키는 표지 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 라벨링제는 터트-부탄올 (t-BuOH), 아세토니트릴 (acetonitrile; ACN) 및 디메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide; DMSO)로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것인, 동위원소 표지방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 라벨링제는 디메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide; DMSO)를 더 포함하고, 상기 $H_2^{18}O$ 와 상기 DMSO의 부피비 (v:v)는 3:7인 것인, 동위원소 표지방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 라이페이스는 상기 라벨링제에 5 내지 25 LU/mL (Lipase unit/mL)로 포함되는 것인, 동위원소 표지방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 표지 단계는 30 내지 50도의 온도범위에서 수행되는 것인, 동위원소 표지방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 라이페이스는 캔디다 엔탁티카 (*Candida antarctica*) 유래의 라이페이스 B (*Candida antarctica* lipase B: CalB)인 것인, 동위원소 표지방법.

청구항 7

질량분석법을 통해 분석체 내의 지방산 검출을 위한 조성물로서,

라이페이스 (Lipase) 및 $H_2^{18}O$ 를 포함하는, 지방산 검출용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 라벨링제는 터트-부탄올 (t-BuOH), 아세토니트릴 (acetonitrile; ACN) 및 디메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide; DMSO)로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것인, 지방산 검출용 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 라벨링제는 디메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide; DMSO)를 더 포함하고, 상기 $H_2^{18}O$ 와 상기 DMSO의 부피비 (v:v)는 3:7인 것인, 지방산 검출용 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 라이페이스는 상기 라벨링제에 5 내지 25 LU/mL (Lipase unit/mL)로 포함되는 것인, 지방산 검출용 조성물.

청구항 11

다음 단계를 포함하는 질량분석방법:

라이페이스 (Lipase) 및 $H_2^{18}O$ 를 포함하는 제1라벨링제를 지방산을 포함하는 제1분석체와 접촉시키는 제1표지 단계; 및

라이페이스 (Lipase) 및 $H_2^{16}O$ 를 포함하는 제2라벨링제를 지방산을 포함하고 상기 제1분석체와 동일한 양의 제2 분석체와 접촉시키는 제2표지 단계; 및

표지된 제1분석체, 제2분석체 및 제1분석체 및 제2분석체가 혼합된 혼합물 각각의 질량분석 스펙트럼을 질량분석기를 통해 얻는 질량 분석 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 라벨링제는 터트-부탄올 (t-BuOH), 아세토니트릴 (acetonitrile; ACN) 및 디메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide; DMSO)로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것인, 질량분석방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 라벨링제는 디메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide; DMSO)를 더 포함하고, 상기 $H_2^{18}O$ 와 상기 DMSO의 부피비 (v:v)는 3:7인 것인, 질량분석방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 라이페이스는 상기 라벨링제에 5 내지 25 LU/mL (Lipase unit/mL)로 포함되는 것인, 질량분석방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 표지 단계는 30 내지 50도의 온도범위에서 수행되는 것인, 질량분석방법.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 방법은 상기 각각의 질량분석 스펙트럼을 비교하는 비교 단계를 더 포함하는 것인, 질량 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 라이페이스 (Lipase)와 ^{18}O -물을 이용한 지방산의 동위원소표지법 및 이를 이용한 질량분석법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 라이페이스와 ^{18}O -물의 효소적 가수분해를 이용하여 지방산의 카르복실기에 ^{18}O 동위원소 표지를 하는 동위원소 표지방법 및 이를 이용한 질량분석법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지질체 (lipidome)는 지질혼합물로서, 생명체의 대사경로를 통하여 체내에 저장되어 에너지원으로 사용되며 신진대사를 조절하는데 필수적인 생체물질이다. 다른 오믹스 (omics)의 발달에 비해 비교적 최근에 활성화된 지질체학 (리피도믹스, lipidomics)은, 다양한 질병 (동맥경화, 당뇨, 암, 알츠하이머)의 발병 및 진행 정도에 따라 지질체의 변화가 수반된다는 것이 확인되면서 그 중요성이 더욱 대두되었다.

[0003] 생명체의 대사경로는 그 생리학적 상태에 따라 변화되어 그 산물을 일정한 패턴을 가지게 만들고, 이들의 변화를 민감하게 감지할 수 있는 분석 기술의 개발은 질병의 진단적, 치료적 목적으로 사용될 수 있다. 오믹스 연구를 위해 다양한 분석기법들이 응용되어져 왔지만 복잡한 생고분자들의 분자구조를 밝혀내고 미량의 생체분자를 검출하여 정량하는 질량분석법 (mass spectrometry)은 오믹스 연구의 발전을 이끄는 핵심 분석도구이다.

- [0004] 질량분석법에 의한 생체시료 분석물의 정량분석은 다양한 생리학적 상태 (질병, 생애, 서식지) 등에 따라 구성 물질의 상대적 존재비를 밝히는 상대정량분석 (relative quantification)과, 농도를 알고 있는 준비된 표준물질과의 비교를 통해 시료 내에 존재하는 분석물의 절대적인 양 (농도)을 밝혀내는 절대정량분석 (absolute quantification)으로 구분한다.
- [0005] 질량분석기반 상대정량분석은 주로 안정한 동위원소를 함유하고 있는 동위원소표지 시약을 이용하여 화학적, 효소적, 대사적으로 생체분석물질에 표지하는 기법으로 발전하였다. 이는 비표지 분석물질과 동위원소표지 분석물질 사이는 분자량을 제외한 화학적 특성이 동일하기 때문에 이온화 효율 (ionization efficiency)과 머무름 시간 (retention time)이 같음을 기대할 수 있어 질량분석에 아주 유용하게 사용된다. 따라서 질량 스펙트럼에서 얻어진 분석물질과 동위원소표지 물질은 각 피크의 높이 (또는 면적)를 비교하여 정량적인 정보를 얻는다.
- [0006] 특히 지질체학에서 대사적 동위원소표지법으로서 효모의 일종인 *Pichia pastoris*를 이용한 LILY (lipidome isotope labeling by yeast)가 개발되어 물질공급원으로 간단한 동위원소 함유화합물을 제공하여 생체체의 대사 경로를 통해 동위원소가 표지된 대사 결과물을 얻는 방법이다. 이 방법은 복잡한 형태의 모든 대사체를 쉽게 합성할 수 있는 장점이 있지만, 복잡한 대사경로와 에너지 대사의 결과로 소비되는 단량체에 의해 합성된 목표물질의 절대적인 양을 조절할 수 없다는 정량적 한계가 존재한다.
- [0007] 화학적 동위원소표지법은 생체외 (*in vitro*) 동위원소표지법으로서, 안정한 동위원소를 분석물 분자의 특정 작용기에 화학적 반응으로 결합시키는 전략이다. 비교적 간단한 경로로 합성되기 때문에 정량적으로 명확할 수 있지만 화학반응의 부가 반응을 통해 분석물 분자의 원치 않는 변형이 일어나 본래 함유하고 있던 정보를 잃을 위험성이 있다.
- [0008] 효소적 동위원소표지법은 생체촉매인 효소를 활용한 생체외 표지법으로서, 효소가 기질로서 인지하는 모든 분자에 대해 적용이 가능하며, 표지 메커니즘이 복잡하지 않아 정량적으로도 단순하다. 또한 효소의 높은 특이성으로 부반응의 위험 없이 온전한 표지물질을 얻을 수 있으며, 반응 조건 또한 생체조건 (상온, 중성 pH, 대기압)으로 후속처리도 용이하다는 장점이 있다.
- [0009] 다양한 생체물질의 효소적 동위원소표지법은 주로 ^{18}O -물과 효소의 가수분해 촉매반응을 활용하여 ^{18}O 를 생체분자에 표지하는 질량분석법이 개발되었다. 특히 단백질체학 (proteomics)에서 단백질 분해효소와 ^{18}O -물을 이용한 펩타이드의 C-말단 카르복실기에 ^{18}O 이 표지되는 기법을 활용하여 다양한 단백질의 상대정량 질량분석법에 적용되었다. 아울러 당질체학 (glycomics)의 경우 당질분해효소 (glycosidase)와 ^{18}O -물을 이용하여 글리칸의 환원 말단에 ^{18}O 가 표지되는 기술로 GREOL (glycan reducing-end ^{18}O labeling), GREDIL (glycan reducing end dual isotopic labeling), PCGOL (PNGase F-catalyzed glycan ^{18}O labeling) 등이 개발되어 보고되었다.
- [0010] 이러한 가수분해효소와 ^{18}O -물에 의한 효소적 동위원소표지법이 단백질과 글리칸에 적용되어 상대정량 질량분석법으로 개발된 점에 착안하여 본 발명에서는 지질체에 이를 적용하는 기술을 제안하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이에 본 발명자들은 라이페이스와 ^{18}O -물의 효소적 가수분해를 이용하여 지방산의 카르복실기에 ^{18}O 동위원소 표지를 하는 동위원소 표지방법 및 이를 이용한 질량분석법을 개발하였고, 본 발명에 따른 동위원소 표지방법의 효율이 월등히 우수한 것을 확인하였다.
- [0012] 이에, 본 발명의 목적은 동위원소 표지방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 질량분석 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 지방산 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 라이페이스 (Lipase)와 ^{18}O -물을 이용한 지방산의 동위원소표지법 및 이를 이용한 질량분석법에 관한

것으로, 본 발명에 따른 동위원소표지법 및 질량분석법은 높은 효율로 지방산에 동위원소의 표지가 가능하고, 정확한 질량분석이 가능하다.

[0016] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0018] 본 발명의 일 양태는 다음 단계를 포함하는 지방산의 동위원소 표지방법이다:

[0019] 라이페이스 (Lipase) 및 $H_2^{18}O$ 를 포함하는 라벨링제를 지방산을 포함하는 분석체와 접촉시키는 표지 단계.

[0020] 본 명세서 상의 용어 "라이페이스"는 지방을 분해하는 효소를 의미한다. 구체적으로 중성지방에 작용하여 트라이아실글리세리드에서 다이아실글리세리드와 모노아실글리세리드를 거쳐서 지방산과 글리세린으로 분해하는 효소를 의미한다. 라이페이스는 대체로 동물의 체장액에 풍부하게 포함되어 있고, 식물에서는 밀, 아주까리, 콩 등의 종자에 포함되어 있다. 본 발명에 있어서 라이페이스는 지방을 분해하는 생물학적 활성을 지닌 효소라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어, 캔디다 엔탁티카 (*Candida antarctica*) 유래의 라이페이스 B (*Candida antarctica* lipase B: CalB), 슈도모나스 플루오레스센스 (*Pseudomonas fluorescens*) 유래의 라이페이스 TliA (thermostable lipase) 또는 포토박테리움 리포리티쿰 (*Photobacterium lipolyticum*) 유래의 라이페이스 M37일 수 있다. 라이페이스는 구형 효소로서 활성부위가 효소 중앙 깊숙한 곳에 위치해 있으며, 활성부위는 리드 모티프 (lid motif)에 의해 덮여있고, 이로인해 binary interface에서 효소활성이 증가하는 인터페이스 활성화 (interface activation)을 갖는다. 하지만, 캔디다 엔탁티카 유래의 라이페이스 B의 경우 이러한 인터페이스 활성화가 특징적으로 일어나지 않고 물과 섞이지 않는 추가적인 용매를 사용할 필요가 없어 표지조건을 쉽게 최적화할 수 있다는 장점이 있다.

[0021] 본 명세서 상의 용어 "동위원소"는 원자번호가 같지만 원자량이 다른 원소를 말하고, 본 발명의 목적상 동위원소는 ^{18}O 일 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 동위원소 표지방법은 지방산에 ^{18}O 를 표지하는 것을 목적할 수 있다.

[0022] 본 명세서 상의 용어 "지방산"은 탄화수소 사슬 및 이의 말단에는 카르복실기 ($-COOH$)를 포함하는 물질로, 탄화수소 사슬은 소수성을 보유하나 말단의 카르복실기를 통해 친수성인 물질과 상호작용할 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서 지방산은 불포화 지방산 또는 포화 지방산인 것일 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서 지방산은 지방산은 포름산 ($HCOOH$, form acid), 아세트산 (CH_3COOH , acetic acid), 프로피온산 (C_2H_5COOH , propanoic acid), 부티르산 (C_3H_7COOH , butyric acid), 발레르산 (C_4H_9COOH , valeric acid), 카프로산 ($C_5H_{11}COOH$, Caproic acid), 에난트산 ($C_6H_{13}COOH$, enanthic acid), 카프릴산 ($C_7H_{15}COOH$, caprylic acid), 펄라르곤산 ($C_8H_{17}COOH$, pelargonic acid), 카프르산 ($C_9H_{19}COOH$, capric acid), 운데실산 ($C_{10}H_{21}COOH$, undecylic acid), 라우르산 ($C_{11}H_{23}COOH$, lauric acid), 트리데실산 ($C_{12}H_{25}COOH$, Tridecylic acid), 미리스틴산 ($C_{13}H_{27}COOH$, Myristic acid), 펜타데실산 ($C_{14}H_{29}COOH$, pentadecylic acid), 팔미트산 ($C_{15}H_{31}COOH$, palmitic acid), 헵타데실산 ($C_{16}H_{33}COOH$, Heptadecanoic acid), 스테아르산 ($C_{17}H_{35}COOH$, stearic acid), 노나데칸산 ($C_{18}H_{37}COOH$, nonadecanoic acid), 아라크산 ($C_{19}H_{39}COOH$, Arachidic acid), 베헨산 ($C_{21}H_{43}COOH$, Behenic acid), 리그노세르산 ($C_{23}H_{47}COOH$, Lignoceric acid), 세로트산 ($C_{25}H_{51}COOH$, Cerotic acid), 헵타코산산 ($C_{26}H_{53}COOH$, Heptacosanoic acid), 몬탄산 ($C_{28}H_{57}COOH$, Montanic acid), 멜리스산 ($C_{29}H_{59}COOH$, Melissaic acid), 락세르산 ($C_{31}H_{63}COOH$, Lacceroic acid), 아크릴산 ($CH_2=CHCOOH$, Acrylic acid), 크로톤산 ($CH_3CH=CHCOOH$, Crotonic Acid), 이소크로톤산 ($CH_3CH=CHCOOH$, isocrotonic acid), 운데실렌산 ($CH_2=CH(CH_2)_8COOH$, Undecylenic acid), 올레산 ($C_{17}H_{33}COOH$, oleic acid), 엘라이드산 ($C_{17}H_{33}COOH$, elaidic acid), 세톨레산 ($C_{21}H_{41}COOH$, cetoleic acid), 에루크산 ($C_{21}H_{41}COOH$, Erucic acid), 브라시드산 ($C_{21}H_{41}COOH$, brasidic acid), 소르브산 (C_5H_7COOH , sorbic acid), 리놀레산 ($C_{17}H_{31}COOH$, linoleic acid), 리놀렌산 ($C_{17}H_{29}COOH$, linolenic acid), 아라키돈산 ($C_{19}H_{31}COOH$, arachidonic acid) 및 프로피올산 ($CH\equiv CCOOH$, Propiolic acid)으로 이루어지는 그룹에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0025] 본 명세서 상의 용어 "라벨링제"는 지방산에 동위원소를 표지하기 위한 물질로, 지방산과 접촉함에 따라 효소적 가수분해를 일으켜 지방산에 동위원소를 표지하는 물질을 의미한다. 본 발명에 있어서 라벨링제는 라이페이스 및 $H_2^{18}O$ 를 포함할 수 있다.
- [0026] 본 명세서 상의 용어 "분석체"는, 본 발명에 따른 라벨링제에 의하여 분석되는 물질을 의미한다. 분석체는 동물성 또는 식물성 시료를 포함할 수 있고 분석체 내에는 단백질, 탄수화물 또는 지질이 포함될 수 있으며, 구체적으로, 분석체는 지방산을 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서 라벨링제는 터트-부탄올 (t-BuOH), 아세토니트릴 (acetonitrile; ACN) 및 디메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide; DMSO)로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 라벨링제는 디메틸설폭사이드를 포함할 수 있다. 라벨링제에 디메틸설폭사이드가 포함되는 경우 디메틸설폭사이드는 $H_2^{18}O$ 와 일정비율을 구성하며 라벨링 제에 포함될 수 있다. 예를 들어, 디메틸설폭사이드는 $H_2^{18}O$ 와 1:9 내지 5:5, 1:9 내지 4:6, 1:9 내지 3:7, 2:8 내지 5:5, 2:8 내지 4:6, 2:8 내지 3:7, 3:7 내지 5:5, 3:7 내지 4:6 또는 3:7의 부피비 (v:v)를 이루도록 라벨링제에 포함될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에서, 라이페이스는 라벨링제에 1 내지 50, 1 내지 45, 1 내지 40, 1 내지 35, 1 내지 30, 1 내지 25, 1 내지 20, 1 내지 15, 1 내지 10, 5 내지 50, 5 내지 45, 5 내지 40, 5 내지 35, 5 내지 30, 5 내지 25, 5 내지 20, 5 내지 15, 5 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 45, 10 내지 40, 10 내지 35, 10 내지 30, 10 내지 25, 10 내지 20, 10 내지 15 또는 10 LU/mL (Lipase unit/mL)의 농도로 포함될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 표지 단계는 라이페이스의 활성을 고려하여 라이페이스 활성도를 고려한 최적의 온도에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 표지 단계는 30 내지 50 도, 30 내지 45 도, 30 내지 40 도 또는 37.5 도에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에서, 라벨링제는 $H_2^{18}O$ 와 디메틸설폭사이드를 1:9 내지 5:5, 1:9 내지 4:6, 1:9 내지 3:7, 2:8 내지 5:5, 2:8 내지 4:6, 2:8 내지 3:7, 3:7 내지 5:5, 3:7 내지 4:6 또는 3:7의 부피비 (v:v)를 이루도록 포함하고, 라이페이스를 1 내지 50, 1 내지 45, 1 내지 40, 1 내지 35, 1 내지 30, 1 내지 25, 1 내지 20, 1 내지 15, 1 내지 10, 5 내지 50, 5 내지 45, 5 내지 40, 5 내지 35, 5 내지 30, 5 내지 25, 5 내지 20, 5 내지 15, 5 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 45, 10 내지 40, 10 내지 35, 10 내지 30, 10 내지 25, 10 내지 20, 10 내지 15 또는 10 LU/mL로 포함하고, 표지 단계는 30 내지 50 도, 30 내지 45 도, 30 내지 40 도 또는 37.5 도에서 수행되는 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에서, 라벨링제는 $H_2^{18}O$ 와 디메틸설폭사이드를 3:7 부피비로 포함하고, 10 LU/mL의 라이페이스를 포함하고, 표지 단계는 37.5 도의 온도범위에서 수행되는 것일 수 있다. 본 발명자들은 도 4a 내지 4d에서 확인할 수 있듯이 라벨링제가 디메틸설폭사이드와 $H_2^{18}O$ 를 3:7의 부피비 (v:v)로 포함하고, 라벨링제가 라이페이스를 10 LU/mL 농도로 포함하며, 표지 단계가 37.5 도에서 수행되는 경우 동위원소의 표지 효율 (Labeling Efficiency)을 최대화 할 수 있음을 확인하였고, 이에 상기 조건에 따라 표지 단계가 수행되는 경우 동위 원소 표지 효율은 최대 94.4%를 달성할 수 있었다.
- [0033] 본 발명에 따른 동위원소 표지방법은 도 1과 같은 메커니즘으로 구현될 수 있다. 구체적으로, 라이페이스의 활성부위는 세린, 히스티딘, 산성 잔기 (아스파르트산 또는 글루탐산)로 이루어진다. 라이페이스의 활성은 이 세 잔기의 양성자 매개를 통한 친핵성 공격과 후속적인 가수분해의 두 단계 메커니즘으로 이루어지며, 본 발명에 따른 동위원소 표지법은 라이페이스와 함께 $H_2^{18}O$ 를 공급하여 생성물인 지방산의 카르복실기에 ^{18}O 를 표지하는 전략을 사용한다. 나아가, 라이페이스는 분해된 지방산을 여전히 기질로 인지하여 활성부위 세린 잔기의 지속적인 결합-분해를 통해 두 번째 ^{18}O 를 표지하게 된다. 후속적인 ^{18}O 의 표지에 의해 최종적으로 생성된 $^{18}O_2$ -표지 지방산은 기존의 비표지 지방산에 대하여 도 2와 같이 4 Da의 질량차이를 보이게 되며, 이를 통해 정량 질량분석법에 활용이 가능하다. 또한, 본 발명에 따른 동위원소 표지방법은 효소를 매개로 하여 수행되기 때문에 효소의 높은 특이성으로 부반응이 일어날 가능성을 최소화할 수 있고, 반응 조건 또한 상온, 중성 pH 및 대기압 조건에서 수행될 수 있어 반응 후 후속 처리가 용이한 장점이 있다.

- [0034] 본 발명의 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 질량분석방법이다:
- [0035] 라이페이스 (Lipase) 및 $H_2^{18}O$ 를 포함하는 제1라벨링제를 지방산을 포함하는 제1분석체와 접촉시키는 제1표지 단계; 및
- [0036] 라이페이스 (Lipase) 및 $H_2^{16}O$ 를 포함하는 제2라벨링제를 지방산을 포함하고 제1분석체와 동일한 양의 제2분석체와 접촉시키는 제2표지 단계; 및
- [0037] 표지된 제1분석체, 제2분석체 및 제1분석체 및 제2분석체가 혼합된 혼합물 각각의 질량분석 스펙트럼을 질량분석기를 통해 얻는 질량 분석 단계.
- [0038] 본 발명에 있어서 제1라벨링제 및 제2라벨링제는 터트-부탄올 (t-BuOH), 아세토니트릴 (acetonitrile; ACN) 및 디메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide; DMSO)로 이루어지는 그룹에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 제1라벨링제 및 제2라벨링제는 디메틸설폭사이드를 포함할 수 있다. 제1라벨링제 및 제2라벨링제에 디메틸설폭사이드가 포함되는 경우 디메틸설폭사이드는 $H_2^{18}O$ 또는 $H_2^{16}O$ 와 일정비율을 구성하며 라벨링제에 포함될 수 있다. 예를 들어, 디메틸설폭사이드는 $H_2^{18}O$ 또는 $H_2^{16}O$ 와 1:9 내지 5:5, 1:9 내지 4:6, 1:9 내지 3:7, 2:8 내지 5:5, 2:8 내지 4:6, 2:8 내지 3:7, 3:7 내지 5:5, 3:7 내지 4:6 또는 3:7의 부피비 (v:v)를 이루도록 제1라벨링제 및 제2라벨링제에 포함될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일 구현예에서, 라이페이스는 제1라벨링제 및 제2라벨링제에 1 내지 50, 1 내지 45, 1 내지 40, 1 내지 35, 1 내지 30, 1 내지 25, 1 내지 20, 1 내지 15, 1 내지 10, 5 내지 50, 5 내지 45, 5 내지 40, 5 내지 35, 5 내지 30, 5 내지 25, 5 내지 20, 5 내지 15, 5 내지 10, 10 내지 50, 10 내지 45, 10 내지 40, 10 내지 35, 10 내지 30, 10 내지 25, 10 내지 20, 10 내지 15 또는 10 LU/mL (Lipase unit/mL)의 농도로 포함될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 제1표지 단계 및 제2표지 단계는 라이페이스의 활성을 고려하여 라이페이스 활성도를 고려한 최적의 온도에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 제1표지 단계 및 제2표지 단계는 30 내지 50 도, 30 내지 45 도, 30 내지 40 도 또는 37.5 도에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 일 구현예에서, 제1라벨링제는 $H_2^{18}O$ 와 디메틸설폭사이드를 3:7 부피비로 포함하고, 10 LU/mL의 라이페이스를 포함하고, 제1표지 단계는 37.5 도의 온도범위에서 수행되는 것일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예에서, 제2라벨링제는 $H_2^{16}O$ 와 디메틸설폭사이드를 3:7 부피비로 포함하고, 10 LU/mL의 라이페이스를 포함하고, 제2표지 단계는 37.5 도의 온도범위에서 수행되는 것일 수 있다.
- [0044] 본 명세서 상의 용어 "질량분석기"는 양극선에 자장과 전장을 걸어 그 진로를 구부림으로써 질량이 다른 분자나 원자를 정량적으로 분석하는 장치를 의미한다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에서, 방법은 상기 각각의 질량분석 스펙트럼을 비교하는 비교 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 비교 단계는 ^{16}O 표지된 시료와 ^{18}O 표지된 시료 및 ^{16}O 표지된 시료와 ^{18}O 표지된 시료가 혼합된 혼합물에 대해 각각 질량분석을 수행하여 질량스펙트럼을 획득한 후 각각의 질량스펙트럼을 비교하고 분석하는 분석 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 그리고, 두 질량스펙트럼의 비교를 통해 시료내 포함된 각각의 지방산의 상대적 존재비를 계산할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 구현예에서, 질량 분석 단계는 질량 분석법, Q-TOF 질량 분석법, 이온 트랩 질량 분석법, 삼중 4극자 질량분석법, MALDI-TOF 질량 분석법, MALDI 질량 분석법, 하이브리드 이온 트랩/4극자 질량 분석법 및/또는 비행 시간 질량 분석법으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 방법에 의해 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 양태는, 질량분석법을 통해 분석체 내의 지방산 검출을 위한 조성물로서, 라이페이스 (Lipase) 및 $H_2^{18}O$ 를 포함하는, 지방산 검출용 조성물이다.

[0048] 본 발명에 따른 지방산 검출용 조성물은 본 발명에 따른 동위원소 표지방법의 라벨링제와 동일한 성분을 포함하므로, 둘 사이에 중복되는 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 회피하기 위하여 생략한다.

발명의 효과

[0049] 본 발명은 라이페이스 (Lipase)와 ^{18}O -물을 이용한 지방산의 동위원소표지법 및 이를 이용한 질량분석법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 동위원소 표지법 및 질량분석법은 라이페이스와 ^{18}O -물의 효소적 가수분해를 이용하여 지방산의 카르복실기에 ^{18}O 동위원소 표지함에 따라 다양한 생체 시료에 대한 지질체학 연구에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 라벨링제의 라이페이스와 ^{18}O -물에 의한 지방산의 효소적 ^{18}O 동위원소표지 반응 메커니즘을 보여주는 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 지방산의 효소적 ^{18}O 동위원소표지법에 의한 정량 질량분석법의 도식이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 라벨링제의 라이페이스와 ^{18}O -물에 의한 올레산의 동위원소표지 질량스펙트럼을 나타내는 그래프이다 ((a) $2\text{-}^{16}\text{O}$ 올레산, (b) $2\text{-}^{18}\text{O}$ 올레산 (c) 비표지와 ^{18}O 동위원소표지 올레산의 1:1 혼합).

도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른 라벨링제의 라이페이스와 ^{18}O -물에 의한 글리세롤 트리올레산 (glycerol trioleate)의 올레산에 혼입된 ^{18}O 동위원소의 반응용액의 종류에 따른 표지 최적화 조건을 보여주는 그래프이다.

도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 라벨링제의 라이페이스와 ^{18}O -물에 의한 글리세롤 트리올레산의 올레산에 혼입된 ^{18}O 동위원소의 디메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide; DMSO)의 혼합비율에 따른 표지 최적화 조건을 보여주는 그래프이다.

도 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른 라벨링제의 라이페이스와 ^{18}O -물에 의한 글리세롤 트리올레산의 올레산에 혼입된 ^{18}O 동위원소의 라이페이스의 농도에 따른 표지 최적화 조건을 보여주는 그래프이다.

도 4d는 본 발명의 일 실시예에 따른 라벨링제의 라이페이스와 ^{18}O -물에 의한 글리세롤 트리올레산의 올레산에 혼입된 ^{18}O 동위원소의 효소활성 온도에 따른 표지 최적화 조건을 보여주는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 동위 원소 표지 방법에 의한 글리세롤 트리올레산의 올레산에 대한 질량 스펙트럼과 상대정량 검정선을 나타내는 도면이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 질량분석법을 이용하여, *M. musculus*의 견갑골 갈색지방세포 배양추출물에 대한 질량스펙트럼을 도출한 결과를 나타내는 그래프이다 ((a) 비표지, (b) 동위원소표지, (c) 비표지/동위원소표지 혼합).

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 질량분석법을 이용하여, *S. indicum*의 추출물에 대한 질량스펙트럼을 도출한 결과를 나타내는 그래프이다 ((a) 비표지, (b) 동위원소표지, (c) 비표지/동위원소표지 혼합).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0053] 실시예 1: ^{18}O 의 지방산의 표지 질량스펙트럼과 표지효율의 최적화

[0054] 본 발명에 따른 질량분석법의 실제적인 정량 가능성 평가를 위해 글리세롤 트리올레이트 (glycerol trioleate)

를 표준물로 하여 지방산의 ^{18}O 동위원소표지 질량스펙트럼을 획득하였다. 구체적으로, 0.5 mL 에펜도르프 튜브 (Eppendorf tube)에 표지물질 (지방산 표준물 및 실제 추출물)을 첨가하고, speed vacuum concentrator로 수분을 제거하고 및 농축하였다. 이후, 라이페이스를 최종 용액 부피에 대한 최적 양만큼 첨가하고 speed vacuum concentrator로 수분을 제거하고 농축하였다. 표지용액 (DMSO, H_2O)를 첨가하고 가볍게 볼텍싱한 뒤, 인큐베이터를 통해 18시간 동안 반응시켰다. 그리고, 고체상 추출 (solid-phase extraction, SPE)을 통해 탈염 및 정제한 후, 질량분석을 수행하였다.

[0055] 또한, 라이페이스를 이용한 동위원소 표지에 있어서 다양한 동위원소표지 조건에 대한 표지효율을 최적화하였다. 실험은 도 4와 같이 반응용액의 종류와 혼합비율 (co-solvent의 종류 및 그 비율)과 라이페이스 (Candida antarctica lipase B)의 농도, 효소활성 온도에 대해 동위원소표지 최적화 조건을 도출하였다. 각각의 반응용액, 라이페이스 농도 및 효소 활성 온도에 대해 18시간 동안 반응을 수행한 후 질량스펙트럼 얻었으며 $^{16}\text{O}_2$ -올레산과 $^{18}\text{O}_2$ -올레산의 피크면적을 비교하여 동위원소 표지 효율을 비교하여 도 4a 내지 4b 및 표 1 내지 4에 나타내었다.

표 1

	100% H_2O	30% t-BuOH	30% ACN	30% DMSO	30% EtOH	30% MeOH
표지 효율 (Labeling Efficiency)	44.5%	80.1%	89.0%	94.4%	-	-

표 2

	DMSO 비율 (%)					
	0.0	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0
표지 효율 (Labeling Efficiency)	56.3%	86.5%	92.3%	94.4%	92.8	92.3

표 3

	Lipase 농도 (LU/mL)					
	0.5	2.5	5.0	10.0	25.0	50.0
표지 효율 (Labeling Efficiency)	42.7%	87.3%	93.6%	94.4%	93.3%	94.0%

표 4

	반응 온도 ($^{\circ}\text{C}$)					
	10	20	30	37.5	50	60
표지 효율 (Labeling Efficiency)	91.8%	92.6%	93.2%	94.4%	93.4%	87.0%

[0061] 실험 결과, 각 반응 인자에 대하여, $\text{DMSO}/\text{H}_2^{18}\text{O} = 3:7(\text{v}:\text{v})$ 의 용액조성, 10.0 LU/mL의 라이페이스 농도, 37.5 $^{\circ}\text{C}$ 의 효소활성 온도일때, 라이페이스를 통한 동위원소 표지 효율이 가장 좋았으며, 상기 조건의 경우 동위원소의 표지 효율은 94.4% ($^{18}\text{O}_2$ -올레산/ $^{16}\text{O}_2$ -올레산*100%)로 나타났다.

[0063] 실시예 2: 상대 정량 및 검정

[0064] 표지조건을 최적화한 이후, 표지된 $^{16}\text{O}_2$ -올레산과 $^{18}\text{O}_2$ -올레산을 이용하여 상대정량성에 대한 연구를 수행하였다. 동일한 양으로 분취된 두 글리세롤 트리올레이트 (glycerol trioleate) 표준물을 각각 H_2^{16}O 및 H_2^{18}O 로 표지하여 $^{16}\text{O}_2$ -올레산과 $^{18}\text{O}_2$ -올레산을 얻었으며, 동일한 전처리 과정을 통해 정제된 각 물질을 서로 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8의 이론적인 비율($^{16}\text{O}_2 : ^{18}\text{O}_2$, v:v)로 섞은 후 질량스펙트럼을 얻어 상대정량 분석을 평가하였다.

[0065] 평가 결과, 도 5와 같이 각 비율별 혼합물에 대한 전체 질량스펙트럼과 이론적 비율($^{18}\text{O}_2/^{16}\text{O}_2$) 대비 계산된 비율($^{18}\text{O}_2/^{16}\text{O}_2$) 간의 검정선을 도출하였다. 이때, 혼합시료에서 발생하는 $^{16}\text{O}_2$ -지방산 피크와 $^{18}\text{O}_2$ -지방산 피크의 겹침은 별도의 실험에서 얻은 $^{16}\text{O}_2$ -지방산피크의 동위원소 분포비율을 토대로 보정되었다. 도 5에서 확인할 수 있듯이, 검량선은 그 기울기가 1.0448로서 이론값과 실험값이 거의 비례한다는 것을 알 수 있으며, 상관계수(R^2)가 0.9996으로서 1.0에 가까워 좋은 직선성을 가진다는 것을 알 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 상대정량분석은 분석 성능이 우수하다는 것을 확인하였다.

[0067] 실시예 3: 동물성 시료 및 식물성 시료의 상대정량

[0068] 본 발명의 실제시료에 대한 분석 가능성을 확인하기 위해 동물성 시료로서 *M. musculus*의 견갑골 갈색지방세포 배양추출물과 식물성시료로서 *S. indicum*의 추출물을 본 발명에 따른 동위 원소 표지법으로 ^{18}O 동위원소를 표지하여 정량 분석하였다. 도 2 도식과 같이 동일한 분취량(30 μg)에 대해 최적화된 표지조건으로 동일한 조건으로 각각 H_2^{16}O 및 H_2^{18}O 으로 표지한 후 동일하게 전처리되었다. 각 시료는 개별 질량분석 후 동일한 양만큼 혼합되어 질량스펙트럼을 획득하였다. 동물성 시료의 결과는 도 6에 나타내었으며, 검출된 지방산에 대한 정보는 표 5에 나타내었다.

표 5

Fatty Acid	[M-H]		Peak Area Ratio	
	Light	Heavy	Theoretical	Measured
Plamitoleic Acid	253.21	257.22	1.00	1.13±0.14
Palmitic Acid	255.23	259.24	1.00	1.21±0.10
Oleic Acid	281.25	285.26	1.00	1.09±0.17

[0071] 실험결과, 도 6 및 표 1에서 확인할 수 있듯이, 동물성 시료에서는 지방산 분자는 palmitoleic acid (253.2 Da:257.2 Da)와 palmitic acid (255.2 Da:259.2 Da) 및 oleic acid (281.2 Da:285.2 Da)가 확인되었으며, 혼합물의 스펙트럼에서 얻어진 각 봉우리의 비율($^{18}\text{O}_2/^{16}\text{O}_2$)은 palmitoleic acid, linoleic acid 및 oleic acid 각 1.13±0.14, 1.21±0.10 및 1.09±0.17로서 이론적인 비율인 1.00에 매우 근접한 값을 보여주었다.

[0072] 식물성 시료의 결과 또한 도 7에 나타내었으며 검출된 지방산과 그 비율은 표 6에 나타내었다.

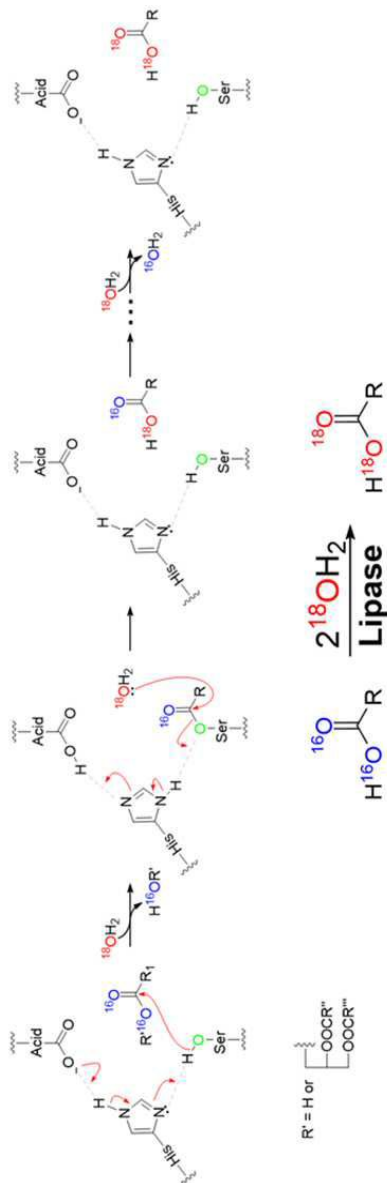
표 6

Fatty Acid	[M-H]		Peak Area Ratio	
	Light	Heavy	Theoretical	Measured
Palmitic Acid	255.23	259.24	1.00	1.08±0.07
Linoleic Acid	279.23	283.24	1.00	1.03±0.11
Oleic Acid	281.24	285.26	1.00	1.14±0.08

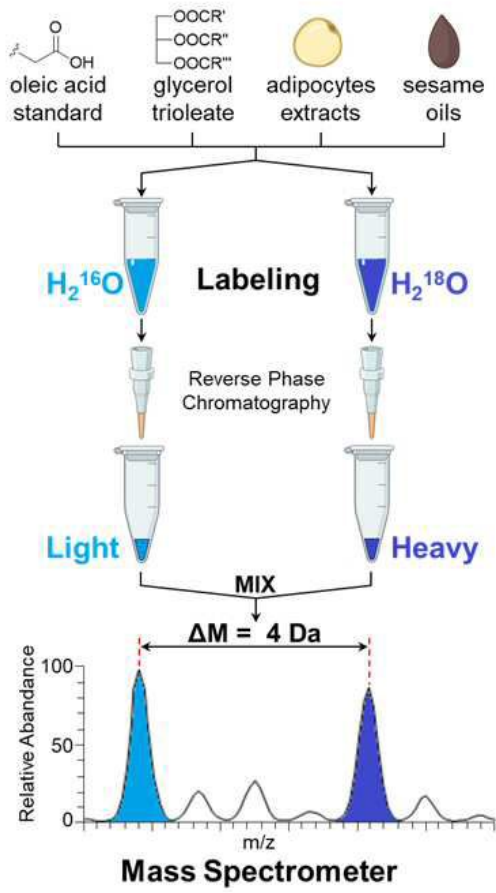
[0074] 전체 질량스펙트럼에서 획득된 지방산 피크는 palmitic acid (255.2 Da:259.2 Da), linoleic acid (279.2 Da:283.2 Da) 및 oleic acid (281.2 Da:285.2 Da)로 질량이동이 관찰되었으며, 혼합시료에서 얻어진 피크의 면적비율은 palmitic acid (1.08 ± 0.07), linoleic acid (1.03 ± 0.11) 및 oleic acid (1.14 ± 0.08)로 동물성 시료와 유사하게 이론적인 값과 거의 일치하는 결과를 확인하였다.

도면

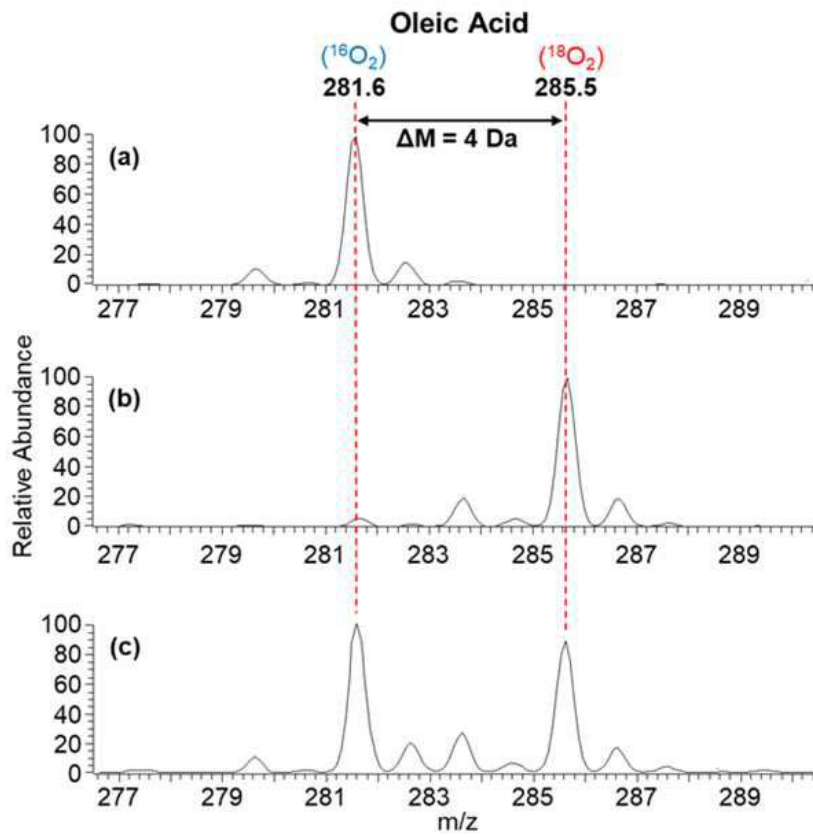
도면1



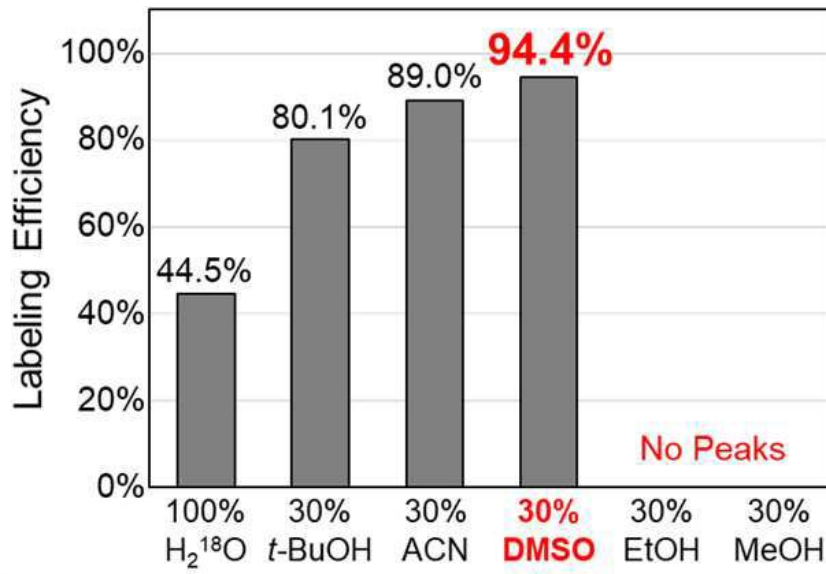
도면2



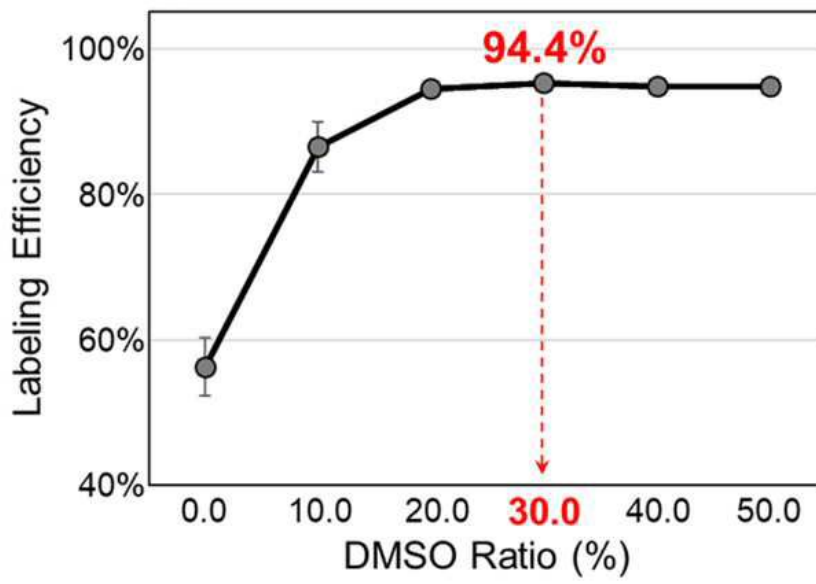
도면3



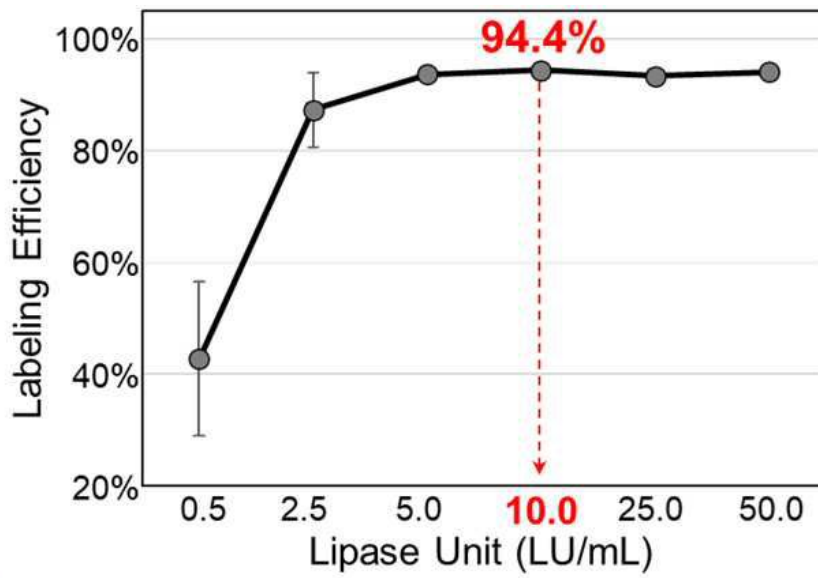
도면4a



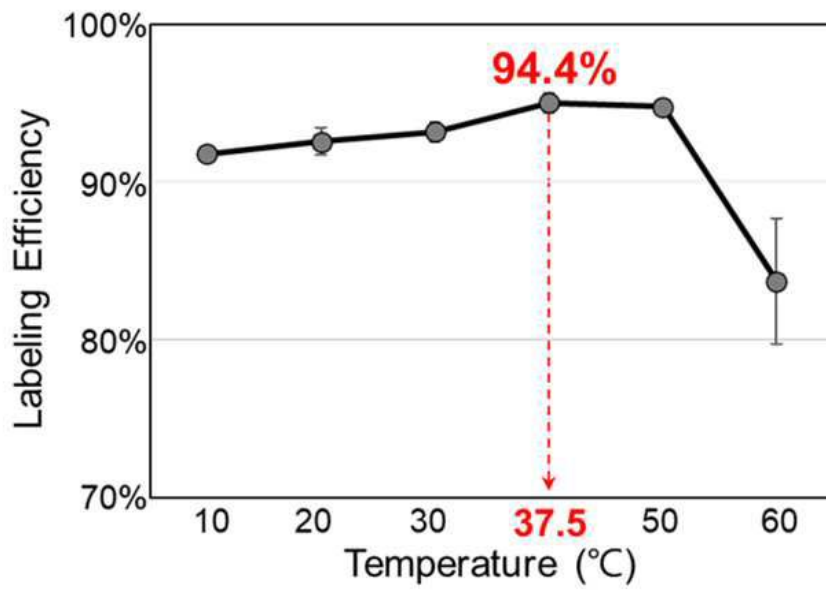
도면4b



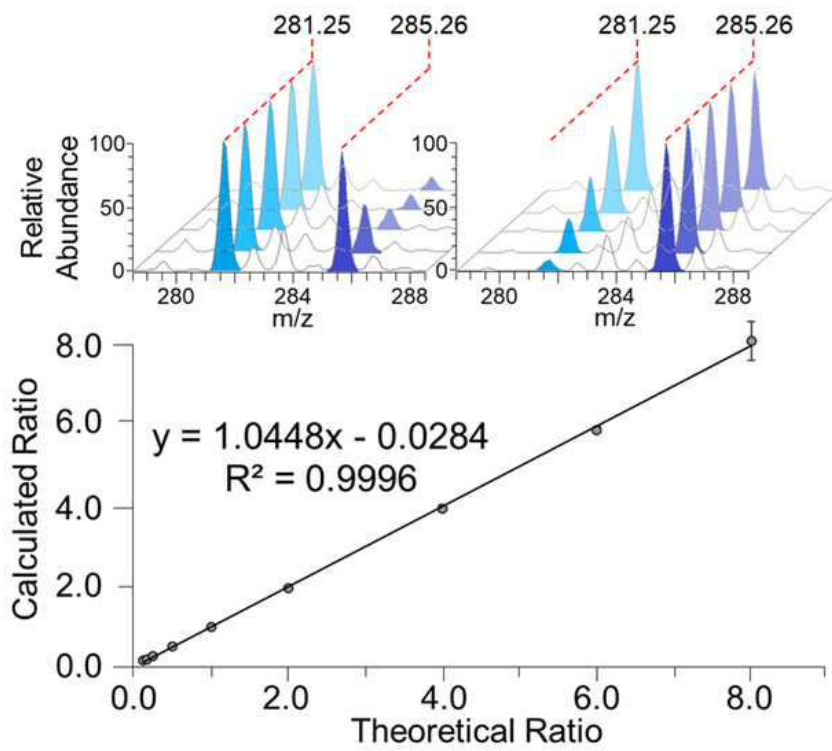
도면4c



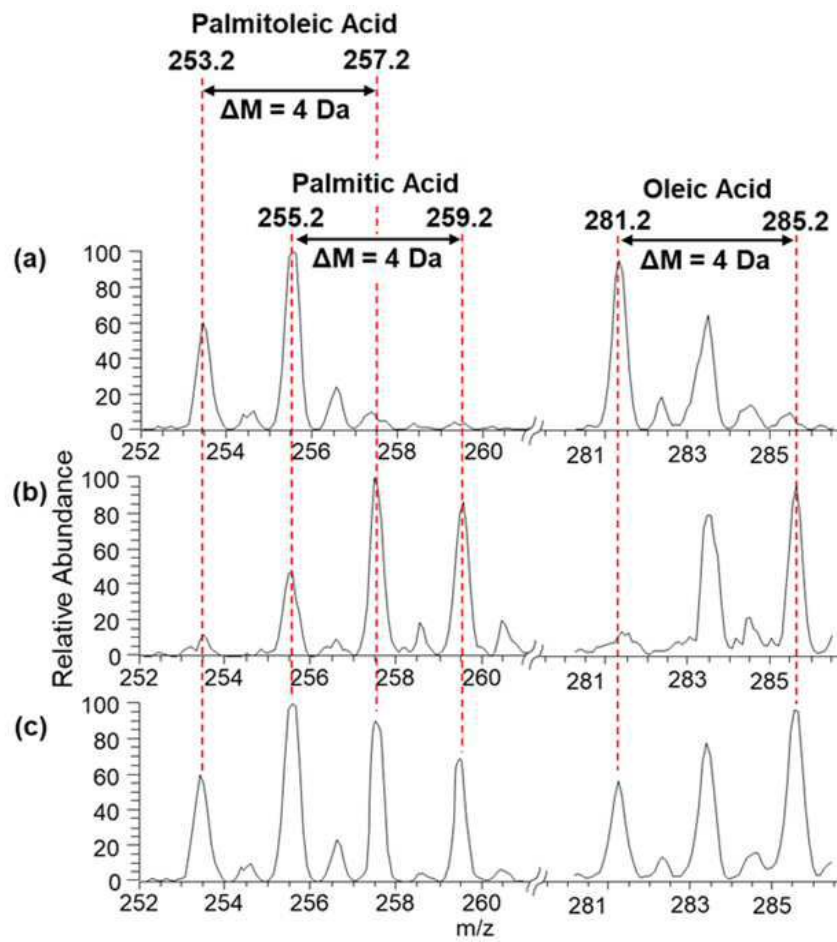
도면4d



도면5



도면6



도면7

