



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0099499
(43) 공개일자 2020년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 23/04 (2018.01) C08F 20/56 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 23/043 (2013.01)
C08F 20/56 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0018216
(22) 출원일자 2020년02월14일
심사청구일자 2020년02월14일
(30) 우선권주장
1020190017154 2019년02월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
(72) 발명자
남기현
서울특별시 성북구 인촌로17가길 64, 106동 1404호(안암동1가, 래미안 안암)
조윤제
경상북도 포항시 남구 지곡로 155 (지곡동,교수아파트) 9동 503호
(74) 대리인
특허법인 다해

전체 청구항 수 : 총 9 항

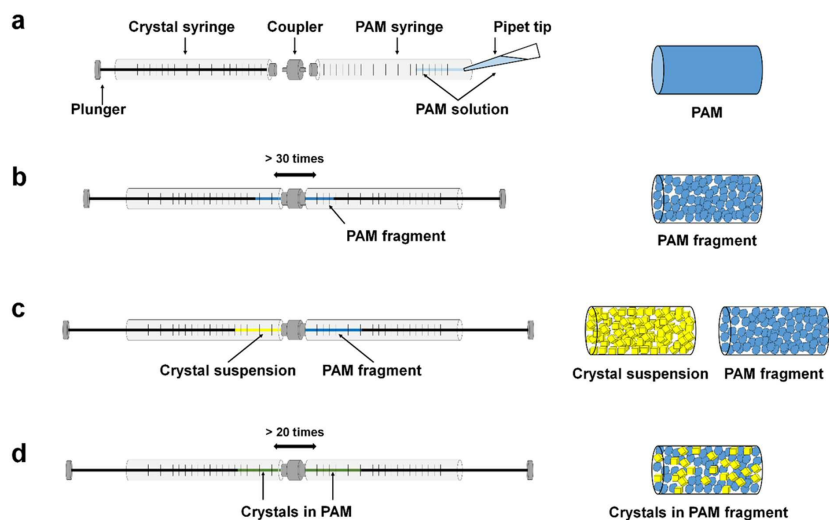
(54) 발명의 명칭 연속 결정학을 위한 폴리아크릴아마이드 배송물질

(57) 요약

본 발명은 X선 결정학(X-ray crystallography) 시료 배송에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 연속 결정학(serial crystallography) 연구에서 시료 소비를 절감하기 위해서 배송물질로 polyacrylamide를 사용한 기술 개발에 관한 것이다.

단백질 시료들이 PAM과 상호작용을 하지 않기 때문에 결과적으로 단백질 결정 시료 또한 PAM과 화학적 반응이 발생하지 않는다. 이는 SFX 연구를 수행할 때 모든 단백질 결정 시료가 배송물질로서 PAM을 사용 할 수 있다. 또한, 물질로부터 발생하는 X선 배경 산란이 없으므로 결정학에서 위상(phasing)을 찾아야 하는 데이터에서 우수한 SNR (signal / noise ratio)을 제공하여 실험 성공률을 높일 수 있다. 결과적으로 기존에 보고된 배송물질에 비해서 다양한 결정 시료의 응용이 가능하며, 우수한 데이터 품질을 보장하게 된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2223/1016 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711064834

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)

연구과제명 XFEL 기반 고효율 결정 스캔 기술 및 선도 물질 검색 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 포항공과대학교

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

폴리아크릴아마이드를 포함하는, 엑스선 결정학 분석용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폴리아크릴아마이드는 분석 대상 시료를 X선에 전달하는 것인, 엑스선 결정학 분석용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 폴리아크릴아마이드는 단편(fragment) 형태인 것인, 엑스선 결정학 분석용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 엑스선 결정학 분석은 연속 결정학 분석인 것인, 엑스선 결정학 분석용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 분석 대상 시료는 단백질 시료로서, 상기 단백질 시료는 라이소자임 또는 켈모라이신인 것을 특징으로 하는, 엑스선 결정학 분석용 조성물.

청구항 6

하기 단계를 포함하는, 폴리아크릴아마이드를 배송물질로 사용하는 엑스선 결정학 분석 방법:

폴리아크릴아마이드 및 분석 대상 시료를 혼합하여 폴리아크릴아마이드 주입 매트릭스를 제조하는 단계(S1); 및

상기 폴리아크릴아마이드 주입 매트릭스를 X선에 전달하는 단계(S2); 및

상기 X선 전달 후 회절 이미지를 수집하여 분석 대상 시료의 결정 구조를 분석하는 단계(S3).

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 엑스선 결정학 분석은 연속 결정학 분석인 것인, 엑스선 결정학 분석 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 폴리아크릴아마이드는 단편(fragment) 형태인 것인, 엑스선 결정학 분석 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 분석 대상 시료는 단백질 시료로서, 상기 단백질 시료는 라이소자임 또는 쥘모라이신인 것을 특징으로 하는, 엑스선 결정학 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 X선 결정학(X-ray crystallography) 시료 배송에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 연속 결정학(serial crystallography) 연구에서 시료 소비를 절감하기 위해서 배송물질로 polyacrylamide를 사용한 기술 개발에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] XFEL(X-ray free-electron laser)은 전례없는 수준의 광도(brilliance), 탁월한 공간적 일관성(coherence) 및 펨토초(femtosecond)의 펄스(pluse) 지속 시간을 갖춘 X선이다. XFEL을 사용하는 연속 펨토초 결정학(SFX: serial femtosecond crystallography)은 고해상도 구조를 시각화할 새로운 기회를 제공하는데, 이 기술은 기존 방사광 가속기와 비교하면 생물학적으로 보다 신뢰성 있는 실온에서의 결정 구조를 제공할 뿐만 아니라 초고속 X선 펄스를 사용하여 시간 분해 연구를 통한 분자의 동역학 정보를 제공한다.
- [0004] SFX 연구의 초기 단계에서 결정 시료들은 가스 동적 가상 노즐(GDVN: gas dynamic virtue nozzle)을 사용하는 액체 제트 분사기(liquid jet sample injector)를 이용하여 X선에 결정 시료를 전달하였다(대한민국 공개특허 제2016-0035783호). 이러한 배송방법을 통해서 성공적으로 고해상도 결정 구조를 규명할 수 있었다. 그러나 빠른 유속으로 시료 배송하기 때문에 결정 시료가 많이 소비된다는 문제점이 있었다.
- [0005] 이에 이러한 시료 소비를 줄이며 결정 시료를 X선 펄스로 전달하기 위해 전기분사(electrospinning), LCP(lipidic cubic phase) 인젝터, Acoustic 인젝터, 또는 고정-목표 스캐닝(fixed-target scanning)과 같은 시료 전달 방법이 개발되었다. 이러한 방법들은 인젝터에서 시료가 유출되는 속도를 줄이거나 결정 시료와 X선 펄스 사이의 적중률을 증가시키게 된다. 시료 소비를 줄이는 다양한 방법 중에서 점도가 높은 물질을 이용하여 배송하는 것은, 주입기에서 시료 유속을 낮춤으로써 결정 시료 소비를 획기적으로 감소시켰다.
- [0006] 이전에 단백질 결정 구조 연구에서 monoolein, grease, agarose, 탄수화물 기반의 물질 및 폴리머 기반의 배송 물질들이 성공적으로 사용되었다. 하지만 이러한 전달 매체는 화학적 반응이나 물리적 효과로 인해 특정 단백질 시료에 사용할 수 없는 경우가 많다. 예를 들어, 지질-결합 단백질 또는 셀룰라아제와 같은 단백질은 monoolein 또는 cellulose기반 배송물질과 혼합할 경우, 단백질 결정 현탁액은 배송물질과 화학적 반응에 의해서 약화되거나 용해될 수 있다.
- [0007] 이와 같이 배송물질을 이용한 SFX 연구를 수행할 때에는, (i) 배송물질 내에서의 결정 시료의 안정성, 및 (ii) 배송물질로부터 나오게 되는 X선 산란강도의 최소화가 고려되어야 한다. 기존에 배송물질로 보고된 물질들의 문제점을 예로 든다면, monoolein은 lipid 결합 단백질 결정 시료와 혼합할 경우 결정 시료에 녹아 손상이 되며, X선에 노출시 4.5 Å 주변에서 monoolein에서 발생하는 X선 산란을 제공한다. grease 기반 배송물질은 물질 자체의 균일성이 낮으며 monoolein과 유사하게 저 해상도 영역에서 X선 배경 산란을 발생한다. carbohydrate 기반 물질들의 경우 당과 관련된 결정 시료와 혼합할 경우 특이적 또는 비특이적인 반응에 의해 결정 시료를 녹여 결정의 안정성을 저해한다. 결과적으로 결정 시료가 배송물질 내에서 화학반응에 의해서 안정성이 저해될 경우 결정 시료의 회절강도는 줄어들거나 결정이 녹는 문제가 발생하게 된다. 또한 물질로부터 발생하는 X선 산란 배경이 클 경우 연구 데이터의 품질이 저하된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상기와 같은 문제를 극복할 수 있는, 폴리아크릴아마이드를 포함하는, 엑스선 결정학 분석용 조성물과 상기 조성물을 이용한 엑스선 결정학 분석 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은, 폴리아크릴아마이드를 포함하는, 엑스선 결정학 분석용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일구현예로, 상기 폴리아크릴아마이드는 분석 대상 시료를 X선에 전달하는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 폴리아크릴아마이드는 단편(fragment) 형태인 것을 특징으로 한다.
- [0015] 본 발명의 또다른 구현예로, 상기 엑스선 결정학 분석은 연속 결정학 분석인 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명의 또다른 구현예로, 상기 분석 대상 시료는 단백질 시료로서, 상기 단백질 시료는 라이소자임 또는 쉘 모라이신인 것을 특징으로 한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 폴리아크릴아마이드를 배송물질로 사용하는 엑스선 결정학 분석 방법을 제공한다:
- [0018] 폴리아크릴아마이드 및 분석 대상 시료를 혼합하여 폴리아크릴아마이드 주입 매트릭스를 제조하는 단계(S1); 및
- [0019] 상기 폴리아크릴아마이드 주입 매트릭스를 X선에 전달하는 단계(S2); 및
- [0020] 상기 X선 전달 후 회절 이미지를 수집하여 분석 대상 시료의 결정 구조를 분석하는 단계(S3).

발명의 효과

- [0022] 본 발명은 폴리아크릴아마이드를 배송물질로 사용하는 X선 결정학 분석 방법, 보다 상세하게는 폴리아크릴아마이드를 배송물질로 사용하는 연속 결정학 분석 방법을 제공하는 것으로, 본 발명의 폴리아크릴아마이드는 단백질 시료와 상호작용을 하지 않으므로 단백질 시료를 안정적으로 배송할 수 있는 장점이 있고, 배송물질로부터 나오는 X선 산란 강도가 최소화된 것으로, 우수한 품질의 결정학 분석 결과를 제공할 수 있는 배송물질로 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 본 발명에 따른 PAM 배송물질을 준비하는 과정을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 PAM 배송물질을 이용하여 획득한 Lysozyme의 회절 이미지에 관한 것이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 PAM 배송물질을 이용하여 획득한 Lysozyme의 전자 밀도 지도에 관한 것이다.
- 도 4는 Lysozyme, thermolysin 및 broken thermolysin의 결정을 확인한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 PAM 배송물질을 이용하여 획득한 thermolysin의 회절 이미지에 관한 것이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 PAM 배송물질을 이용하여 획득한 thermolysin의 전자 밀도 지도에 관한 것이다.
- 도 7은 본 발명에서 PAM과 monoolein의 X선 배경 산란을 비교한 결과에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명에서는 단백질 결정 시료가 상호작용하지 않으며 X선 배경 산란이 없는 폴리아크릴아마이드 (PAM) 배송물질을 제공한다. PAM은 acrylamide subunit으로 구성되었으며 독성이 없는 폴리머 ($-\text{CH}_2\text{CHCONH}_2-$)이다. 가교된 PAM은 물에 녹지 않으며, gel 특성을 갖게 된다. PAM은 단백질, 핵산 및 기타 생체 분자를 분리하는 전기영동에 널리 사용되며, 광범위한 pH 간격 (pH, 3-11)에서 안정성을 나타낸다. 특히 PAM은 단백질과의 비특이적 또는 특이적 결합 상호작용이 없으므로 천연 겔 (native gel) 전기영동에서 가능하다. 결과적으로 본 발명에서는 새롭게 개발된 PAM 배송물질을 이용한 SFX 분석을 수행할 수 있다는 것을 확인한 것이다.
- [0026] 단백질 시료들은 PAM과 상호작용을 하지 않기 때문에 결과적으로 단백질 결정 시료 또한 PAM과 화학적 반응이 발생하지 않는다. 이는 SFX 연구를 수행할 때 모든 단백질 결정 시료가 배송물질로서 PAM을 사용 할 수 있다. 또한, 물질로부터 발생하는 X선 배경 산란이 없으므로 결정학에서 위상(phasing)을 찾아야 하는 데이터에서 우수한 SNR (signal / noise ratio)을 제공하여 실험 성공률을 높힐 수 있다. 결과적으로 기존에 보고된 배송물질에 비해서 다양한 결정 시료의 응용이 가능하며, 우수한 데이터 품질을 보장하게 된다.
- [0027] 이에, 본 발명은 폴리아크릴아마이드를 포함하는, 엑스선 결정학 분석용 조성물과, 폴리아크릴아마이드 및 분석 대상 시료를 혼합하여 폴리아크릴아마이드 주입 매트릭스를 제조하는 단계(S1); 상기 폴리아크릴아마이드 주입 매트릭스를 X선에 전달하는 단계(S2); 및 상기 X선 전달 후 발생한 회절 이미지를 수집하여 분석 대상 시료의 결정 구조를 분석하는 단계(S3)를 포함하는 엑스선 결정학 분석 방법을 제공할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 폴리아크릴아마이드는 결정학 분석에 있어 배송물질로서 활용되는 것으로, 상기 결정학 분석 방법은 상세하게는 연속 결정학 분석으로서, 상기 연속 결정학 분석의 방법은 본 발명의 실시예에 기재된 방법에 따라 수행될 수 있으나 폴리아크릴아마이드를 분석 대상 시료의 배송물질로서 사용되는 결정학 분석이라면 상기 방식에 제한되지 않는 것은 통상의 기술자에게 자명할 것이다.
- [0029] 본 발명의 폴리아크릴아마이드는 10 내지 50 %(w/v)의 농도로 사용될 수 있으나, 상기 농도에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 폴리아크릴아마이드는 분석대상 시료와 혼합되어 폴리아크릴아마이드 주입 매트릭스를 형성할 수 있다. 상기 S2 단계에서와 같이 폴리아크릴아마이드 주입 매트릭스는 노즐이 구비된 분사기를 통해 X선 펄스에 전달될 수 있다. 상기 분사는 전기분사 등에 의해 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명에서 상기 폴리아크릴아마이드는 단편(fragment) 형태인 것을 특징으로 한다. 본 발명의 폴리아크릴아마이드는 단편 형태를 가짐으로써, 분석 대상 시료의 물리적 손상을 방지하는 것이다. 본 발명의 폴리아크릴아마이드는 단편 형태를 가지기 위하여 중합 전 PAM 용액을 주사기에 넣고 약 10분동안 방치하여 열을 제거한 후, 빈 주사기를 커플러를 통해 상기 주사기와 연결한 후, 상기 주사기의 플런저를 30회 이상 앞뒤로 눌러주며 단편화 시켜준 것이다.
- [0032] 본 발명에서 상기 분석 대상 시료는 단백질 시료일 수 있다. 상기 단백질 시료는 라이소자임 또는 켈모라이신일 수 있으나 단백질 시료라면 이에 제한되지 않고 SFX 분석에 사용가능하다.
- [0033] 본 발명에서 상기 폴리아크릴아마이드는 monoolein, grease, 및 agarose로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 배송물질과 혼합되어 사용될 수도 있고, 상기 배송물질의 종류에는 제한이 없다.
- [0034] 본 발명의 S3 단계는 상기 X선 전달 후 발생한 회절 이미지를 수집하여 분석 대상 시료의 결정 구조를 분석하는 단계이다. 상기 X선 전달 후 발생한 산란 신호 데이터를 수집하여 분석하는 방법은 종래 알려진 방법을 통해 제한 없이 이용이 가능하다.
- [0035] 본 발명의 실시예에서는 폴리아크릴아마이드를 배송물질로서 사용하여 단백질 시료에 대하여 SFX 분석을 수행하였고, 상기 분석 결과 방사선 손상없이 명확한 구조 분석이 가능하다는 것을 확인하였다.
- [0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0039] [실시예]

[0040] **실시예 1. 연속 펩토초 결정학을위한 폴리 아크릴 아마이드 주입 매트릭스의 제조**

[0041] 종래의 PAM 제작 과정에서 과황산 암모늄(Ammonium persulfate)과 N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민 (TEMED)을 첨가하는데, 이 중합 과정 중에 열이 발생된다. 발생하는 열은 잠재적으로 단백질 결정 격자에 물리적 영향을 미칠 수 있다. 이를 해결하기 위해서 중합 전 PAM 용액을 주사기에 넣고 10분 동안 방치하여 중합과정에서의 열을 제거한 것으로 이를 도 1a에 나타내었다.

[0042] SFX 실험을 위해 20% (w/v) PAM과 단백질 결정 용액을 1:1 혼합하여 최종 10% (w/v)의 PAM 주입 매트릭스를 제조하여 사용하였다.

[0043] 20% (w/v) PAM은 강도가 높고 결정 시료가 직접 섞이면 물리적으로 결정을 훼손할 수 있고, 이는 결정 시료의 mosaicity를 높이거나 회절 강도를 감소시킬 수 있다. 이에 배송과정에서 결정 시료의 물리적 손상을 방지하기 위해 주사기에서 30번 이상 반복하여 PAM 조각을 먼저 생산하였다(도 1b). 이후 PAM 단편을 하나의 주사기로 옮기고 다른 주사기에는 결정 용액을 넣은 후 두 주사기를 커플러 (coupler)를 이용하여 연결하였다(도 1c).

[0044] PAM과 결정 용액을 부드럽게 20번 이상 분배하여 PAM을 조각내에 결정시료를 고르게 분포시켰다(도 1d). 이후 결정 시료를 포함한 PAM 단편은 SFX 실험에 사용하였다.

[0046] **실시예 2. 폴리 아크릴 아마이드 주입 매트릭스를 이용한 연속 된 펩토초 결정학**

[0047] 개발된 PAM 배송물질을 적용을 입증하기 위해 lysozyme과 thermolysin을 모델 시료로 사용하여 SFX 연구를 수행하였다. lysozyme 결정 크기는 $30 \times 30 \times 30 \mu\text{m}^3$ 이고 결정 밀도는 약 $6.7 \times 10^7/\text{ml}$ 이었다. SFX 실험 동안 상온에서 lysozyme에 대한 총 25,603개의 이미지를 수집하였다. 회절 이미지 수집 동안, 사용된 총 결정 부피 $10 \mu\text{l}$ 이었으며, 0.5mg의 lysozyme을 사용하였다. 20 개 이상의 브래그 피크 (bragg peak)가 포함된 이미지를 peakfinder8 알고리즘을 사용하여 Cheetah 프로그램 필터링하여 17,675개의 회절 이미지(hit rate=69%)를 획득하였다. 회절 이미지는 CrystFEL에 의해 인덱싱되었으며, 이는 입력 셀 매개 변수를 허용 오차로 기본값으로 수렴하였다. 총 11,936개의 색인된(indexed) 이미지 (indexing rate= 67.52%)을 획득하였고 이를 도 2에 나타내었다. 고유 반사 (unique reflection) 수는 14,007개였다. 전반적인 신호대 잡음비 (SNR)는 4.32이며 100% 완전성 (completeness)을 나타냈다. 전체 R_{split} 및 Pearson 상관 효율 (CC *)은 각각 15.31% 및 99.2%였다(표 1, 데이터 수집 및 구조분석 통계).

표 1

[0049]

수집된 데이터	Lysozyme	Thermolysin
에너지(Energy, eV)	9700	9692
광자/펄스(Photons/pulse)	$\sim 2 \times 10^{11}$	$\sim 2 \times 10^{11}$
펄스폭(Pulse width)	20 fs	20 fs
Space group	P4 ₃ 2 ₁ 2	P6 ₁ 22
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	78.61, 90.55, 73.42	92.66, 92.66, 128.59
수집된 회절 이미지의 수(No. collected diffraction images)	25603	221595
히트수(No. of hits)	17676	47865
인덱싱된 이미지의 수(No. of indexed images)	11936	22213
유니크한 반사의 수(No. of unique reflections)	14007 (1353)	30878 (3028)
Resolution (Å)	80.0-1.70 (1.76-1.70)	131.57-1.80 (1.86-1.80)
Completeness	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundancy	965.3 (676.7)	663.8 (471.0)
I/σ(I)	4.32 (1.39)	4.67 (1.16)
R _{split}	15.31 (73.37)	14.63 (84.09)

CC	0.970 (0.644)	0.975 (0.617)
CC*	0.992 (0.885)	0.993 (0.874)
Wilson B factor ($\text{\AA}^2$)	38.88	33.18
Refinement statistics		
Resolution ($\text{\AA}$)	26.04 - 1.70	38.3 - 1.80
R _{factor} / R _{free} (%)	19.61 / 21.74	17.27 / 20.24
B-factor (Averaged)		
Protein	45.32	37.66
Metal	45.80	29.57
Water	46.20	41.00
Product		40.22
R.m.s. deviations		
Bond lengths ($\text{\AA}$)	0.008	0.011
Bond angles ($^\circ$)	0.94	1.01
Ramachandran plot (%)		
favored	97.64	96.82
allowed	2.36	3.18

[0051] Lysozyme 구조의 해상도는 1.7 $\text{\AA}$ 이었고 R_{work}와 R_{free}는 각각 19.61%와 21.74%였다. 전자 밀도 지도(electron density map)는 Lys1에서 Leu129까지의 아미노산을 해석 할 때 매우 명확하였다. Lysozyme의 활성 부위에 있는 촉매 아미노산 (Glu35와 Asp52)은 명확히 관찰되었다(도 3 아래).

[0052] 또한, 결정 구조의 디설파이드 (disulfide) 결합이 명확히 관찰됨으로서 방사선 손상 없이 구조를 관찰된 것을 확인하였다. 이전에 실온에서 GDVN 액체 체트 인젝터 (PDB code 4ET8)와 물방울 주사기 (5DM9)를 사용하여 규명된 lysozyme 구조와 함께 PAM을 이용한 구조를 비교하면 모든 Ca 원자에 대해 r.m.s.deviation이 <0.1691 $\text{\AA}$ 이었다.

[0053] 도 4에 lysozyme, thermolysin 및 broken thermolysin의 결정구조를 나타내었다. thermolysin 결정 크기는 약 $8 \times 8 \times 200 \mu\text{m}^3$ 이고 결정 밀도는 약 $3.6 \times 10^7/\text{ml}$ 이었다(도 4(b)). 이에 마이크로 원심 분리 관에서 피펫을 사용하여 결정의 크기가 약 $8 \times 8 \times 8 \mu\text{m}^3$ 가 되도록 만들어 실험에 사용하였다. Thermolysin의 데이터 처리 진행은 lysozyme의 처리 진행과 동일하였다. 총 228,304장의 thermolysin 이미지를 실온에서 수집하였다. 회절 이미지 수집 동안, 1.0 mg의 thermolysin을 사용하였다. 총 47,865 개의 회절 이미지 (hit rate=20.96%)를 수집하였다(도 5). 고유 반사 (unique reflection) 수는 30,878개였다. 전반적인 신호대 잡음비 (SNR)는 4.67이며 100% 완전성 (completeness)을 나타내었다. 전체 R_{split} 및 Pearson 상관 효율 (CC *)은 각각 14.63%와 99.3%였다 (표 1). Thermolysin 구조의 해상도는 1.8 $\text{\AA}$ 이었고, R_{work}와 R_{free}는 각각 17.27%와 20.24%였다. 전자 밀도 지도는 Ile1에서 Lys316까지의 해석에서 매우 명확하였다. Thermolysin의 활성 부위의 아연 이온은 His142, His146 및 Glu166에 의해 배위되었다(도 6). 활성에 직접적으로 관여하는 칼슘 이온은 방사선 손상 없이 관찰되었다. 이전에 실온에서 나노 플로액 주입기 (PDB code 4OW3), drop-on-demand (5HQD) 용 음향 주입기, 합성 그리스 슈퍼 윤활제 (5WR2)와 hydroxyethyl cellulose (5WR3)를 사용한 thermolysin 구조와 함께 PAM을 이용한 구조를 비교하면 모든 Ca 원자에 대해 r.m.s.deviation이 0.1902-0.3439 $\text{\AA}$ 이었다.

[0055] 실시예 3. 배경 산란 측정

[0056] X선 산란 신호는 결정 시료에서의 회절 신호뿐만 아니라 전달 매체로부터도 생성된다. 전달 매체로부터 생성된 X선 산란을 최소화하는 것은 데이터 처리 중에 회절 패턴의 SNR을 향상시키는 데 중요한 역할을 한다. SFX용 전달 매체는 지금까지 특정 각에 대해 고유한 X선 산란 신호를 제공했다. 이 배경 산란의 분석은 결정 샘플의 회절 한계를 고려한 배송 물질 선택에 중요한 정보를 제공한다. SFX 연구에서 널리 사용되는 monoolein과 PAM의 X선 산란 측정 비교했다. 10% (w/v) PAM 및 60% (v/v) monoolein은 약 2×10^{11} photon/pulse의 X선을 사용하여 회절 이미지만을 추출하여 분석하였다. 평균 산란 강도는 XFEL의 강도 변동을 고려한 1,000개 이미지에서 얻

었으며 PAM 및 monoolein부터의 산란 신호는 빔 중심에서 1.6Å로 분석되었다(도 7).

[0057] PAM은 3.2Å의 해상도에서 확산 산란을 보였으며, 이는 PAM matrix가 아닌 물을 함유한 용매에서 비롯된 것으로 간주된다(도 7a). 용매로부터의 평균 최대 산란 강도는 약 275ADU였다. 한편, monoolein은 지질 사슬에서 유래한 것으로 여겨지는 4.5Å 해상도에서 확산 산란을 보였다(도 7b). Monoolein으로부터의 평균 최대 산란 강도는 약 510ADU이었다. 따라서 최대 산란 영역의 PAM은 monoolein보다 낮은 배경 산란을 보였다(도 7c).

[0059] 하기에 본 발명의 실시예에서 사용한 재료 및 방법을 보다 상세하게 기재하였다.

[0061] **<재료 및 방법>**

[0062] **Lysozyme 및 thermolysin 준비**

[0063] 라이소자임은 Hampton Research에서 구매하여 사용하였다 (Cat No. HR7-110). 단백질 분말을 10mM Tris-HCl, pH 8.0 및 200mM NaCl를 포함하는 완충액에 용해시켰다. 라이소자임 용액(200 μl; 50mg/ml)은 0.1 M 소듐 아세테이트, pH 4.0, 6 % (w/v) 폴리에틸렌 글리콜 8000 및 10 % (w/v) mM NaCl을 함유하는 결정화 용액(200 μl)과 1.5mL 미세원심분리 튜브에서 10초동안 3000rpm에서 와류기계를 사용하여 혼합하였다. 20℃에서 4시간 동안 인큐베이션한 후, 결정 크기의 성장을 피하기 위하여 혼합물 용액의 상청액을 제거하였다. 이에 더하여 결정 샘플은 0.1M 소듐 아세테이트(pH 4.0) 및 0.2M NaCl을 포함하는 용액에 저장해두었다.

[0064] Bacillus thermoproteolyticus의 썰모라이신 역시 Hampton Research에서 구매하여 사용하였다(Cat No. HR7-098). 단백질 분말은 20분 동안 탈 이온수에 저장되었다. NaOH (0.1M)가 첨가되고, 최종 썰모라이신 (25 mg/mL) 용액은 50mM NaOM 용액으로 제조되었다. 단백질 용액은 10mM Tris-HCl(pH 8.0) 및 200mM NaCl을 포함하는 용액으로 Centricon-30 YM filter (Millipore)를 이용하여 교환되었다. 단백질 용액(100 mg/mL)은 4℃에서 인큐베이션된 후 미세결정이 2달 후에 나타났다.

[0066] **폴리아크릴아마이드 제조**

[0067] 아크릴아마이드/비스-아크릴아마이드(Acrylamide/bis-acrylamide) [500 μl; 20% (v/v)] 용액, 암모늄 퍼설파이트(ammonium persulphate) (5 μl; 15%), 및 TEMED (0.5 μl)는 미세원심분리 튜브에서 혼합되었고, PAM 용액(50 μl)은 Hamilton syringe (81065-1710RNR)로 이동되었다. PAM 용액을 주사기에서 중합한 후, 빈 주사기를 상기 주사기에 커플러를 이용하여 연결해주었다. PAM 조각을 만들기 위해 상기 주사기 플런저(plunger)를 앞뒤로 30회 움직여, PAM이 커플러의 좁은 내경을 통과하여 파손되게 하였다. 상기 PAM 조각은 하나의 주사기로 이동시켰고, 결정 현탁액(50 μl)이 담긴 반대편 주사기를 준비하였다. PAM 조각 및 결정 현탁액은 플런저를 부드럽게 앞뒤로 움직여 혼합해주었다. 결정 펠렛의 최종 비율은 총 주입 매트릭스에서 약 20-25%였다. PAM 조각에 섞여 있는 결정 샘플은 SFX 분석을 위하여 CMD(carrier matrix deliver) 인젝터에 옮겨주었다.

[0069] **데이터 수집**

[0070] PAM 주입 매트릭스를 사용한 X선 결정 회절 데이터는 PAL-XFEL의 NCI (Nano Crystallography and Coherence Imaging) 실험 허치에서 수집되었다. X-선 에너지는 9.7 keV (1.2782 Å)로 약 500 μJ의 펄스 에너지 갖으며, 30Hz로 제공되었다. X선 펄스당 $1-2 \times 10^{11}$ 개의 광자가 들어 있으며, X선 펄스의 간격은 20fs 였다. X-선 펄스는 Kirkpatrick-Baez 미러에 의해 $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (FWHM)에 집속되었다. 샘플은 MICOSS (분자 구조 연구를 위한 다양한 주입 챔버) 시스템에서 실온에서 대기(라이소자임) 또는 헬륨 (썰모라이신) 환경에서 데이터 수집을 수행했다. 회절 데이터는 MX225-HS (Rayonix, LLC) 검출기의 픽셀을 4×4 비닝 모드 (픽셀 크기 : $156 \times \mu\text{m} \times 156$)로 수집하였다.

[0072] **데이터 처리 및 구조 결정**

[0073] 회절 패턴은 OnDA 프로그램으로에 의해 실시간으로 모니터링 되었다. hit image는 Cheetah program에 의해 필터

링되었다. 회절 이미지는 CrystFEL program에 의해 인텍싱되고, 스케일 그리고 병합되었다. 라이소자임의 위상 문제는 라이소자임 (PDB 코드 4ET8)을 검색 모델로서 PHENIX의 Phaser-MR을 사용하여 분자 대체에 의해 해결되었다. 켈모라이신 (PDB 코드 5DM9)을 검색 모델로 사용하여 PHENIX의 Phaser-MR을 사용하여 켈모라이신의 위상을 구했다. 모델 구축 및 개선은 PHENIX의 Coot 및 Phenix.refinement를 사용하여 수행되었고, 기하학적 분석은 MolProbity를 사용하여 수행되었다. 그림은 PyMOL (<https://pymol.org/>)에 의해 생성되었다.

[0075] **화학적 호환성 테스트**

[0076] PAM과 결정화 침전제 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{NaCl}, \text{PEG } 400, \text{PEG } 1000, \text{PEG } 4000, 2\text{-메틸-2,4-펜탄디올(MPD)}]$ 사이의 화학적 상용성 연구는 실온에서 수행하였다. 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5)을 함유하는 용액을 사용하여 최종 10% (w/v) 또는 15 % (w/v) PAM을 생성하였다. PAM (50 μl) 및 각 침전제 (50 μl)는 두 개의 결합 된 Hamilton 주사기를 사용하여 혼합되었다. 혼합물의 점도 및 주입 스트림 특성은 시각적으로 압출된 거동에 기반하여 판단 하였다. 혼합물을 168 μm 내경(ID)을 갖는 바늘을 통해 Hamilton 주사기로부터 수동으로 압출시켰다.

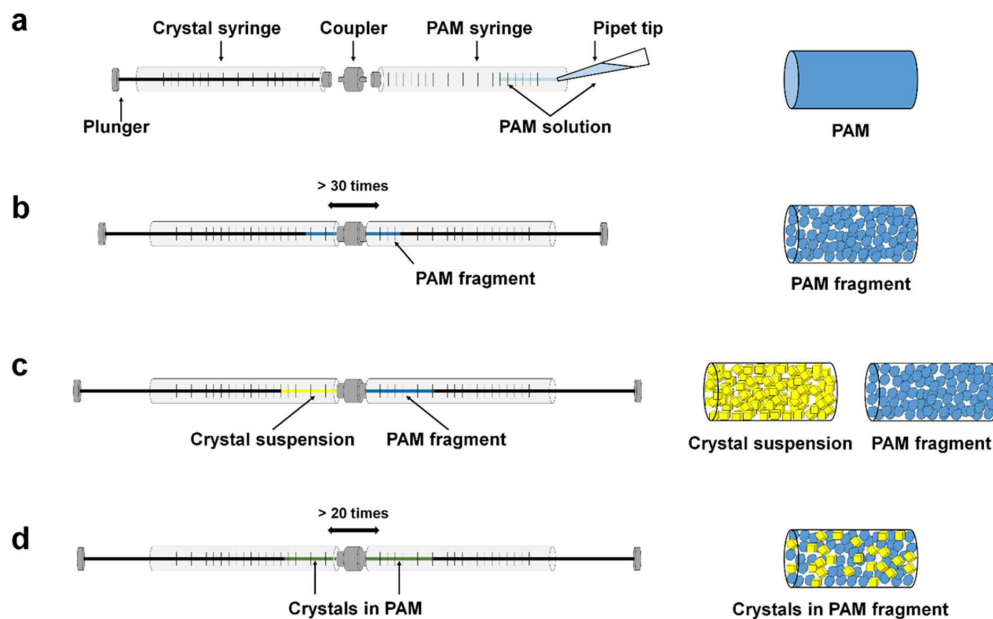
[0078] **접근코드**

[0079] 좌표 및 구조 인자는 Protein Data Bank에 기탁 코드 6IG6 (라이소자임) 및 6IG7 (켈모라이신)으로 기탁되었다. 회절 이미지는 ID84(라이소자임) 및 85 (켈모라이신)로 CXIDB에 저장되었다.

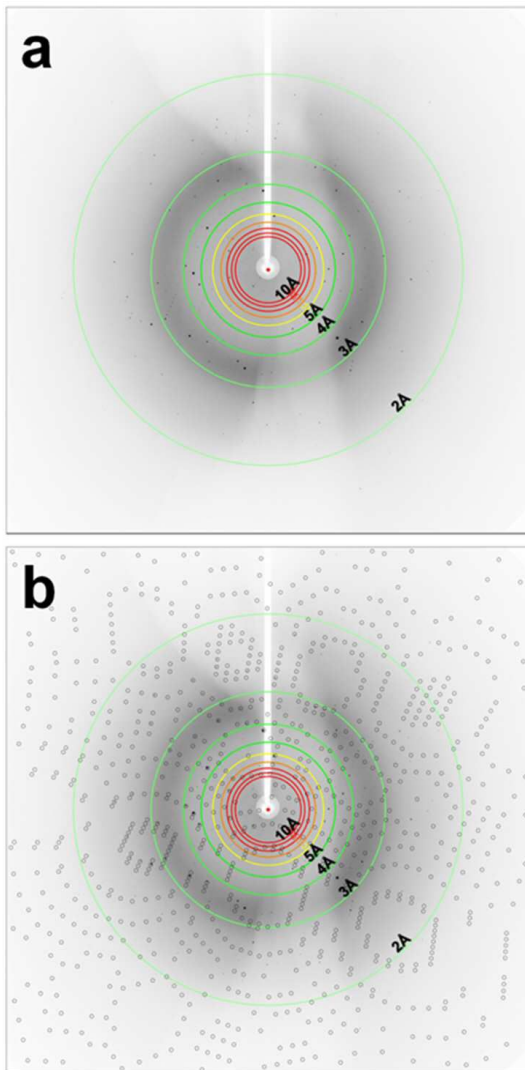
[0081] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

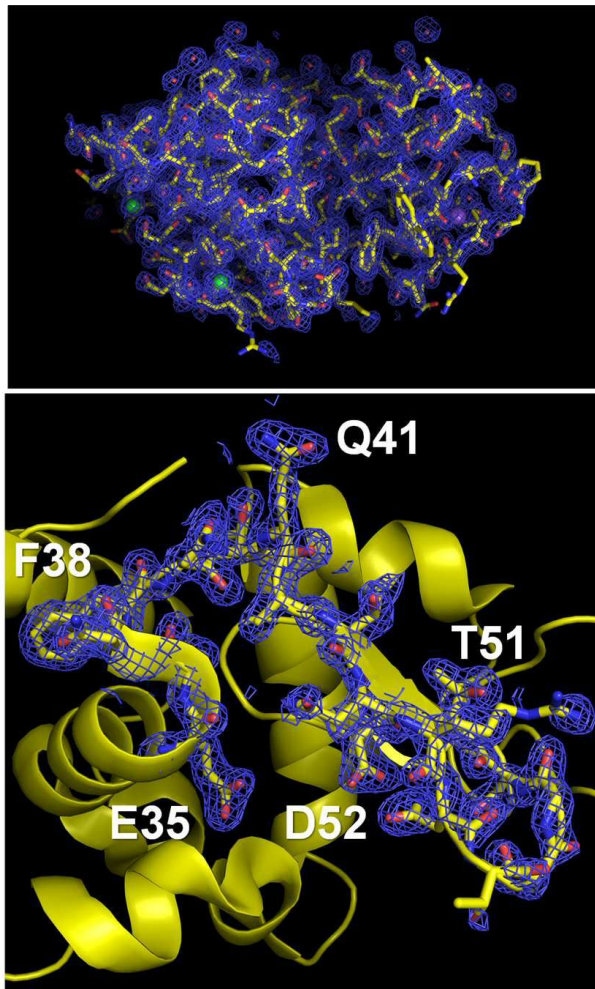
도면1



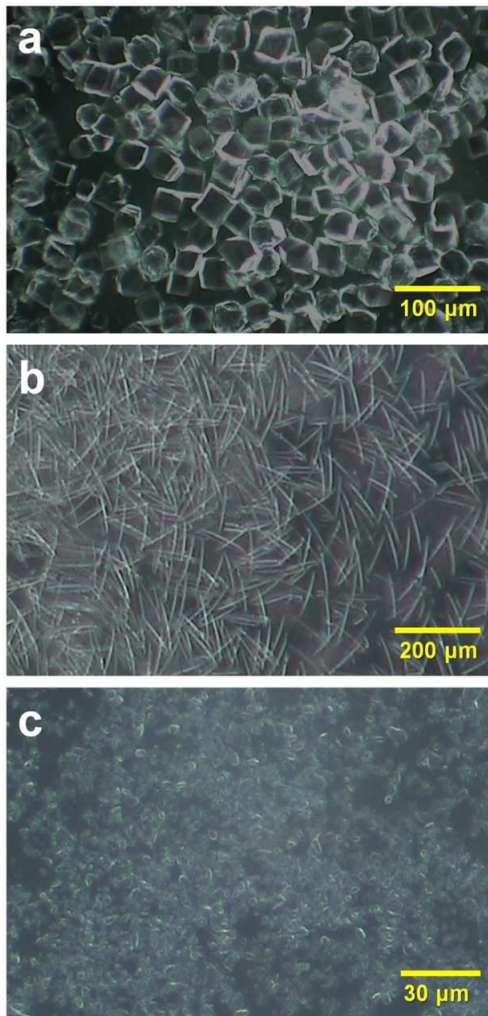
도면2



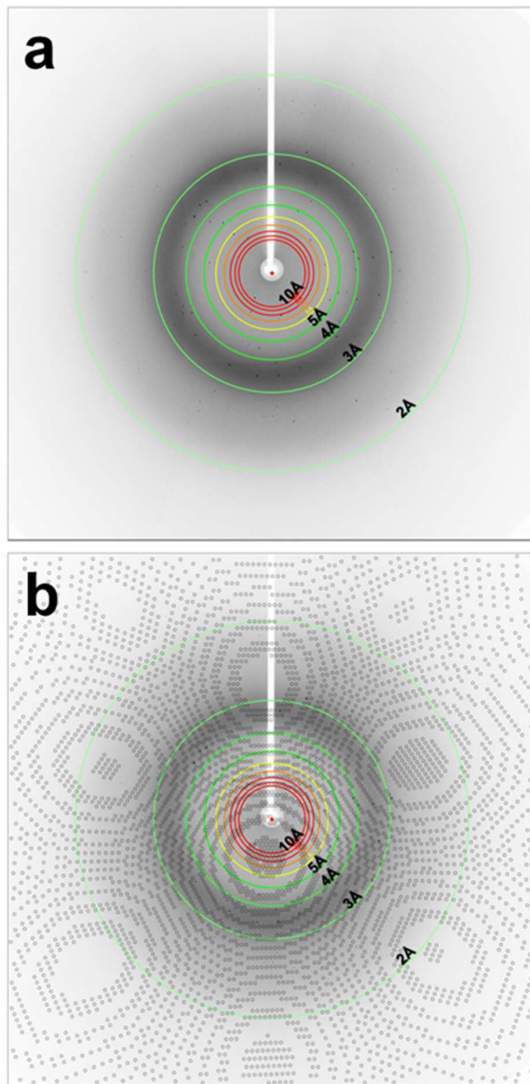
도면3



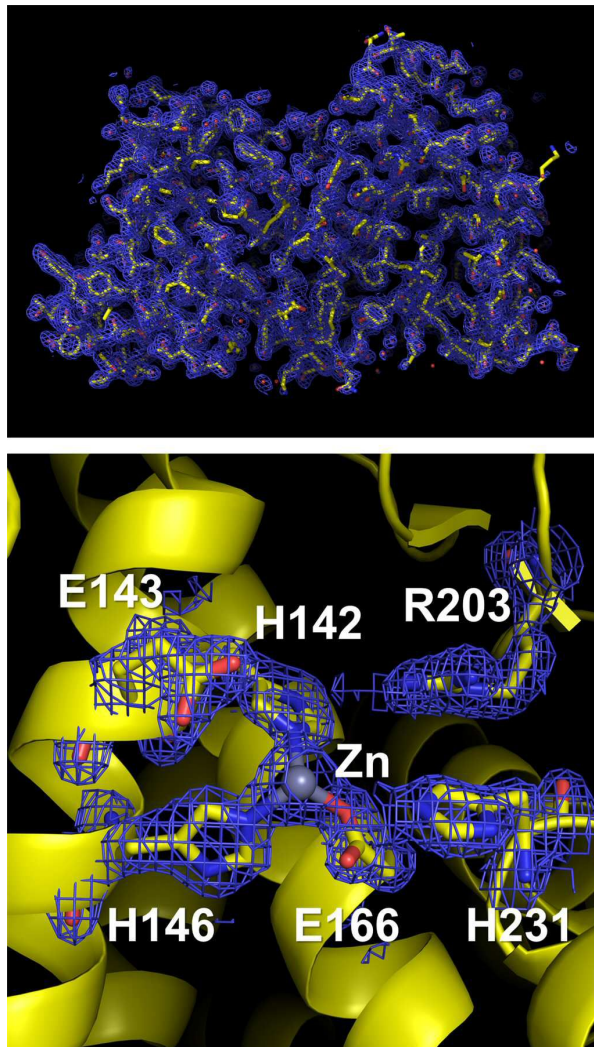
도면4



도면5



도면6



도면7

