



(51) 국제특허분류:

G01N 27/62 (2006.01) G01N 1/40 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01) H01J 49/40 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01) H01J 49/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/005907

(22) 국제출원일: 2016년 6월 3일 (03.06.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0082601 2015년 6월 11일 (11.06.2015) KR

(71) 출원인: 충남대학교산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHUNG-NAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 34134 대전시 유성구 대학로 99 (궁동, Daejeon (KR)). 한국기초과학지원연구원 (KOREA BASIC SCIENCE INSTITUTE) [KR/KR]; 34133 대전시 유성 과학로 169-148 (어은동), Daejeon (KR).

(72) 발명자: 안현주 (AN, Hyun Joo); 34071 대전시 유성구 지족로 343, 211 동 2002 호 (지족동, 반석마을아파트), Daejeon (KR). 김재한 (KIM, Jae-Han); 34071 대전시 유성구 지족로 343, 211 동 2002 호 (지족동, 반석마을아파트), Daejeon (KR). 김범진 (KIM, Bum Jin); 13969 경기도 안양시 만안구 석천로 174, 1 동 502 호 (석수동, 쌍봉주택), Gyeonggi-do (KR). 최종순 (CHOI, Jong-Soon); 34138 대전시 유성구 농대로 55, E-1 호 (궁동, 대동빌리지), Daejeon (KR). 이동기 (LEE, Dong-Gi); 35216 대전시 서구 청사로 65, 118 동 601 호 (월평동, 황실타운아파트), Daejeon (KR). 권요셉 (KWON, Joseph); 55063 전라북도 전주시 완산구 호암로 41, 803 동 902 호 (효자동, 아르펠리스휴먼시아아파트), Jeollabuk-do (KR).

(74) 대리인: 강성혜 (KANG, Seong-Hea); 34077 대전시 유성구 지족로 364 번길 19, 303-2 호 (지족동, 성훈프라자), Daejeon (KR).

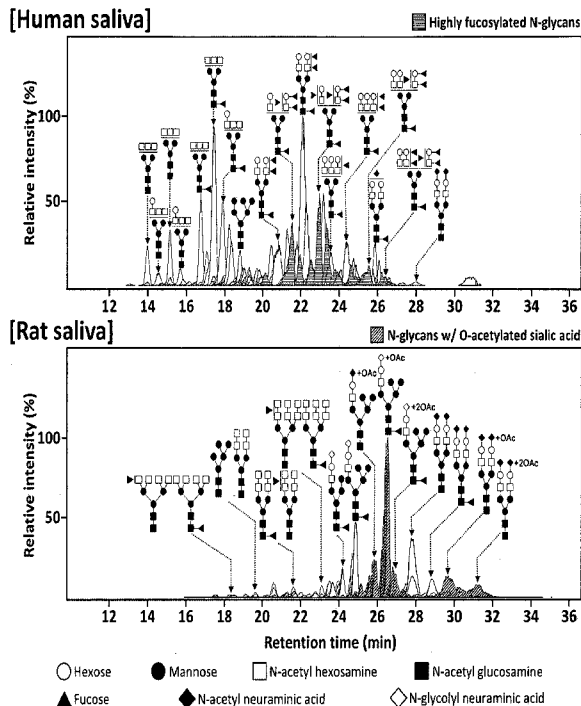
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR EXAMINING HUMAN SALIVA BY USING SUGAR CHAINS SPECIFIC TO HUMAN SALIVA

(54) 발명의 명칭 : 인간 타액 특이적 당사슬을 이용한 인간 타액 검증방법

[도8]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for examining human saliva by using sugar chains specific to human saliva. Mass spectrometry was performed by using N-glycan isolation and purification on human body fluids including human saliva, rat saliva, and the like, and results showed that human saliva is distinguished from other human body fluids or saliva of other animals by being composed of at least 50% highly fucosylated N-glycans including at least 4 fucoses, and thus the present invention can be applied to the field of forensics and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 인간 타액 특이적 당사슬을 이용하여 인간 타액을 검증하는 방법에 관한 것이다. 인간 타액을 비롯한 인간 체액들과 쥐 타액 등을 대상으로 N-당사슬을 분리 및 정제하여 질량분석을 수행한 결과, 인간 타액에는 네 개 이상의 푸코스를 포함하는 고푼코실화 N-당사슬이 50% 이상 함유되어 다른 인간 체액이나 다른 동물의 타액과 구별되는 특징이 있어, 법의학 분야 등에 응용할 수 있다.



CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ,

UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 인간 타액 특이적 당사슬을 이용한 인간 타액 검증방법

기술분야

- [1] 본 발명은 인간 타액 특이적 당사슬을 이용하여 인간 타액을 검증하는 방법에 관한 것이다. 인간 타액을 비롯한 인간 체액들과 쥐 타액 등을 대상으로 N-당사슬을 분리 및 정제하여 질량분석을 수행한 결과, 고평코실화 N-당사슬 14종을 발견하였으며, 그 중 2종은 인간 타액에 공통적으로 존재함을 확인하였고, 정량적으로 푸코실화 N-당사슬이 전체 N-당사슬 중에 50%이상 함유되어 다른 인간 체액이나 다른 동물의 타액과 구별되는 특징이 있어 법의학 분야 등에 응용할 수 있다.

배경기술

- [2] 법과학 및 법의학 분야에서, 범죄 현장에서 발견되는 다양한 인간 체액의 식별은 법적 효력이 있는 증거의 확보, 수사의 진행 방향 설정, 사망의 원인 및 종류의 규명, 사후 시간 추정, 사건의 용의자 및 범죄인의 검거 등에서 중요한 역할을 한다. 그러나, 인간 체액은 범죄 현장의 복잡성, 증거물의 희귀성 및 양적 제한성 등의 이유로 채취 및 확인이 어려우며, 특히 다른 체액보다도 인간 타액은 타액이 가진 특성과 기존 확인 방법의 한계로 인해 타액만을 선별 및 확인할 수 있는 방법이 부족한 상황이다.
- [3] 인간 체액 (혈액, 눈물, 모유, 정액 등) 내에 존재하는 당사슬은 정성 및 정량적으로 서로 구분이 되고, 타액에 특이적으로 존재하는 당사슬이 있어 인간 타액의 진위 여부를 확인하는 것이 가능하다. 또한, 질량분석기를 기반으로 하는 당사슬 분석 방법은 극미량의 시료만으로도 분석이 가능하므로, 현장의 보존이 중요하고 증거물의 양에 한계가 있는 법과학 분야에서 기존 타액 확인법을 보완하거나 대체할 수 있다.
- [4] 범죄 현장에서 발견되는 타액의 식별 및 검증은 혈흔, 정액, 질액 등과 같은 인간 체액과 마찬가지로 사건을 재구성하고 해결할 수 있는 중요한 증거이다. 예컨대, 성범죄 현장에서 타액의 채취 및 식별은 피해자와 피의자의 접촉을 증명하는 법적 증거자료로 이용될 수 있고, 폭행 및 상해치사 사건에서 신체 접촉으로 타액이 남게 되는 경우 사건해결의 중요한 증거가 될 수 있다.
- [5] 당사슬화(Glycosylation)는 대표적인 단백질 번역 후 변형과정 (Post translational modification) 중의 하나로서, 단백질의 기능 및 유지를 결정하고 생화학적 환경 변화에 매우 민감하여 각종 질병의 진단 마커가 될 수 있다. 인간 단백질의 약 50% 이상은 당단백질로 이루어져 있으며 타액을 포함한 혈액, 콧물, 눈물, 정액, 모유, 점액 등 다양한 인간 체액에 존재한다고 알려져 있다.
- [6] N-당사슬은 당사슬의 한 종류로서 2개의 N-아세틸글루코사민과 3개의

만노스로 구성된 고유의 코어를 가지고 있고, 이 코어를 기반으로 N-당사슬의 합성이 이루어지며 크게 3가지 타입으로 분류된다. 고만노즈 (High mannose) 타입은 기본 코어에 만노즈만 추가적으로 더해진 구조이며, 복합(Complex) 타입은 N-아세틸글루코사민과 갈락토즈가 더해지고 부가적으로 퓨코스와 시알산이 결합되는 형태이며 하이브리드 타입은 기본 코어의 한쪽 가지에는 복합 타입이, 다른 한쪽 가지에는 고만노즈 타입이 합성되는 형태를 말한다. N-당사슬은 PNGase F 효소를 통해서 선택적으로 당단백질에서 추출이 가능하며 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 결합한 고체상 추출법을 이용하면 당사슬을 선택적으로 분획 및 정제할 수 있다.

- [7] 범죄현장에서 발견되는 혈흔 및 정액과 같은 인간 체액에 대한 추측 및 정확한 확인 방법은 구축이 되어 있으나, 타액은 다른 유체에 비해 구성 성분이 복잡하고 고체 입자가 부족한 특성 때문에 추정 방법만 있을 뿐 다른 체액들과 구분할 수 있는 확인 방법이 없다.
- [8] 자외선 기반의 ALS (alternate light source)는 간단히 타액의 존재 유무를 추정할 수는 있으나, 소변 및 정액 등 다른 체액에도 반응을 하는 한계가 있다.
- [9] 타액 확인법으로 가장 널리 사용되고 있는 방법은 타액 내 아밀라아제의 화학 반응에 의한 색 변화를 통해 확인하는 요오드-녹말 반응, Phadebas®, Amylose Azure, Rapignost®-Amylase 등이 있다. 하지만 아밀라아제는 타액뿐만 아니라 모유, 땀, 침, 정액, 질액 등에도 존재하므로 타액 특이적 확인법이라고 하기는 어려우며, 요오드-녹말 반응은 혈액이나 정액 내 알부민 및 감마-글로블린과 화학반응을 일으켜 더욱 구분을 어렵게 한다.
- [10] 면역학 기반의 ELISA 방법은 알파-아밀라아제의 반응성을 측정하여 타액의 존재 유무를 추정할 수 있으나, 혈청과 같은 다른 인간 체액과의 교차반응이 생기며, 미량의 타액 시료에서는 정확도가 떨어져 타액 확인법으로는 한계가 있으며, 타액 내 칼륨의 상대적인 양을 측정하여 타액을 추정하는 SEM-EDX 방법은 백그라운드 스펙트럼의 역전 때문에 정확한 확인이 어렵다.
- [11] RT-PCR 방법은 타액 특이적 유전자인 "Statherin (STATH)"과 "Histatin3 (HTN3)"을 검출하여 확인하는 방법으로 최근 개발된 타액 확인법 중에 가장 민감도가 높고 적은 양에도 적용할 수 있으나, 정액과 혈액 내에도 같은 유전자가 존재하므로 확인시 오차가 발생할 수 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 따라서, 본 발명은 상기 문제점들을 해결하고 인간 타액을 검증하는 효과적인 방법을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 인간 타액을 비롯한 인간 체액들과 쥐 타액 등을 대상으로 N-당사슬을 분리 및 정제하여 질량분석 및

프로파일링을 수행한 결과, 인간 타액 시료에서 네 개 이상의 퓨코스를 포함하는 14종의 고틱코실화 N-당사슬을 발견하였고, 이 중 인간 타액에 공통적으로 존재하는 2종의 고틱코실화 N-당사슬을 밝혔으며, 정량적으로 고틱코실화 N-당쇄가 전체 N-당쇄 중에 50% 이상 함유되어 다른 인간 체액이나 다른 동물의 타액과 구별되는 특징이 있음을 밝혔다.

발명의 효과

- [14] 본 발명의 방법에 의하면 인간 타액으로부터 총 단백질을 별도로 분리한 후 당사슬만 선택적으로 분리하는 것이 아니라, 인간 타액에서 곧바로 당사슬만 선택적으로 추출 및 분리할 수 있다.
- [15] 본 발명에 의하면, 고체상 추출법에서 20% 아세트나이트릴 분획시, 고틱코실화 (highly fucosylated) N-당사슬 중 퓨코스 잔기 5개 이상을 포함하는 고틱코실화 N-당사슬을 선택적으로 추출할 수 있다.
- [16] 또한, 본 발명에 의하면 고성능 질량 분석기를 이용하여 10 μ l 이하의 미량의 타액 시료로부터 N-당사슬 분석이 가능하다.
- [17] 또한, 본 발명에 의하면 고틱코실화 N-당사슬 14종 중 2종은 시험 대상 18명의 인간 타액에서 공통적으로 발견되며, 인간 타액 N-당사슬의 상대적인 양 중 절반 이상은 고틱코실화 N-당사슬이 차지하고 있으므로, 이 결과를 이용하면 인간의 타액과 다른 동물의 타액을 구분할 수 있고, 인간의 여러 가지 체액과 인간의 타액을 구분할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 본 발명에서 미량의 인간 타액 시료에서 N-당사슬의 추출 및 분획, 그리고 질량분석을 이용한 분석에 대한 개념도이다. 남성 8명, 여성 11명의 타액을 실험용 튜브에 직접 채취하고 원심분리를 통해 타액 단백질이 포함된 상층액만 취하고, 이후 PNGase F를 처리하여 N-당사슬을 선택적으로 추출하고, PGC 카트리지를 결합한 고체상 추출 (solid phase extraction; SPE)을 통해 N-당사슬들을 정제 및 분획하고, 준비된 타액 당사슬은 질량분석방법을 이용하여 정성 및 정량 분석하였다.
- [19] 도 2는 본 발명에서 인간 체액 시료로부터 N-당사슬을 분석한 결과에 따라 인간의 타액임을 입증하는 방법에 관한 흐름도이다. 이하 발명의 상세한 설명, 도면 및 청구범위에서 당 구조 중 ●은 만노스, ■은 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc), ○은 육탄당 (Hex), □은 N-아세틸헥소사민 (HexNAc), ◆은 N-아세틸뉴라민산 (NeuAc), ▼, ◀, ▶ 또는 ▲은 퓨코스 (Fuc)이다.
- [20] 도 3은 고체상 추출법을 이용하여 N-당사슬을 크기와 성질에 따라 분획하여 얻은 시료를 각각 MALDI-MS를 이용하여 분석한 결과를 나타낸다. 표시한 각 피크들은 하단에 정의된 것과 같이 당 조성 및 개수로 표시하였다.
- [21] 도 4는 인간 타액 특이적인 고틱코실화 N-당사슬에 대해 LC/MS/MS를 실시하여 구조분석한 결과이다. 위에서부터 차례대로 Hex₆HexNAc₅Fuc₄; Hex₆

HexNAc₅Fuc₅; Hex₆HexNAc₅Fuc₆; Hex₆HexNAc₅Fuc₇ 이다. 각 당 조성은 도 3 하단에 표시된 것과 동일하다.

[22] 도 5는 인간 타액에서 검출된 N-당사슬들을 푸코스 결합 유무에 따라 군을 나눈 다음, 그 상대적인 양을 원형 그래프를 이용하여 18개의 시료 각각에 대하여 도식화한 결과이다.

[23] 도 6은 혈액형(남성 O형, 여성 A형)과 나이가 동일한 남성 2명과 여성 2명을 선정하여 시료 수집 날짜 (1, 2, 7, 30일)에 따라 총 4회 타액을 수집한 후, 타액 내 N-당사슬을 비교 분석한 결과이다.

[24] 도 7a, 7b, 7c는 인간의 체액 중 타액, 혈청 및 모유의 당사슬을 LC/MS 분석한 다음 크로마토그램을 통해 정성적 및 정량적으로 비교, 분석한 결과이다. 크로마토그램 내 각각의 피크들은 각각의 N-당사슬을 의미하며, 대표적인 N-당사슬을 구조만 나타내었다. 각 당 조성은 도 3 하단에 표시된 것과 동일하다.

[25] 도 8은 인간 타액 내 당사슬과 동물 모델 쥐 타액 내 당사슬을 LC/MS 분석 후 크로마토그램을 정성적, 정량적으로 비교 분석한 결과이다. 크로마토그램 내 각각의 피크들은 각각의 N-당사슬을 의미하며, 대표적인 N-당사슬을 구조만 나타내었다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[26] 본 발명은

[27] 가) 시료를 원심분리하여 상층액을 얻는 단계;

[28] 나) 얻은 상층액에 PNGase F를 처리하여 N-당사슬을 분리하는 단계;

[29] 다) 분리한 N-당사슬을 농축 및 정제하는 단계; 및

[30] 라) 농축 및 정제된 N-당사슬에 대하여 질량분석 및 프로파일링을 수행하는 단계;를 포함하는 인간 타액 검증방법에 관한 것이다.

[31] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계를 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 결합한 고체상 추출법으로 수행함을 특징으로 하는 인간 타액 검증방법에 관한 것이다.

[32] 또한, 본 발명은 상기 나) 단계에서 특별한 당단백질 추출 과정 없이, 당단백질 및 비당단백질의 혼합 단백질로부터 N-당사슬 추출 효율을 이용하여 N-당사슬만을 선택적으로 추출함을 특징으로 하는 인간타액 검증방법에 관한 것이다.

[33] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계에서 아세트나이트릴 용액을 농도구배로 가하여 분획함을 특징으로 하는 인간 타액 검증방법에 관한 것이다.

[34] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계에서 20% 농도의 아세트나이트릴 용액을 이용하여 고평코실화 N-당사슬을 선택적으로 분획함을 특징으로 하는 인간 타액 검증방법에 관한 것이다.

[35] 또한, 본 발명은 라) 단계의 질량분석 및 프로파일링 결과, 전체 N-당사슬 내에 푸코스 잔기 네 개 이상을 포함하는 고평코실화 N-당사슬 함량이 50% 이상인 경우 및/또는 인간 타액 시료에서 발견된 14종의 고평코실화 N-당사슬 중에 인간

타액에 공통적으로 존재하는 2종의 고퓨코실화 N-당사슬 중에 최소 하나라도 발견되는 경우 인간 타액인 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 인간 타액 검증방법에 관한 것이다.

- [36] 또한, 본 발명은 상기 퓨코스 잔기 네 개 이상을 포함하는 고퓨코실화 N-당사슬이
- [37] Hex5-HexNAc4-Fuc4 당사슬 (2225.831 m/z, [M+H]⁺),
- [38] Hex5-HexNAc5-Fuc4 당사슬 (2428.910 m/z, [M+H]⁺),
- [39] Hex3-HexNAc7-Fuc4 당사슬 (2510.964 m/z, [M+H]⁺),
- [40] Hex6-HexNAc5-Fuc4 당사슬 (2590.963 m/z, [M+H]⁺),
- [41] Hex6-HexNAc6-Fuc4 당사슬 (2794.043 m/z, [M+H]⁺),
- [42] Hex5-HexNAc4-Fuc4-NeuAc1 당사슬 (2516.926 m/z, [M+H]⁺),
- [43] Hex6-HexNAc5-Fuc4-NeuAc1 당사슬 (2882.059 m/z, [M+H]⁺),
- [44] Hex5-HexNAc4-Fuc5 당사슬 (2371.889 m/z, [M+H]⁺),
- [45] Hex5-HexNAc5-Fuc5 당사슬 (2574.968 m/z, [M+H]⁺),
- [46] Hex6-HexNAc5-Fuc5 당사슬 (2737.021 m/z, [M+H]⁺),
- [47] Hex6-HexNAc5-Fuc5-NeuAc1 당사슬 (3028.117 m/z, [M+H]⁺),
- [48] Hex6-HexNAc5-Fuc6 당사슬 (2883.079 m/z, [M+H]⁺),
- [49] Hex6-HexNAc5-Fuc6-NeuAc1 당사슬 (3174.174 m/z, [M+H]⁺) 및
- [50] Hex6-HexNAc5-Fuc7 당사슬 (3029.137 m/z, [M+H]⁺) 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 인간 타액 검증방법에 관한 것이다.
- [51] 또한, 본 발명은 Hex₅HexNAc₄Fuc₄ (m/z 2225.831) N-당사슬 및 Hex₆HexNAc₅Fuc₄ (m/z 2590.963) N-당사슬 중 1종 이상을 포함하는 인간 타액 검증용 마커에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [52] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.
- [53]
- [54] <실험방법> (도 1)
- [55] 1. 성인 남성 7명 (27.6±0.8세)과 여성 11명 (26.1±0.8세)으로부터 타액을 실험용 튜브에 직접 수집하였다. 타액을 수집하기 2시간 전에 양치를 하고 물과 음식을 섭취하지 않았다. 수집한 타액은 -40°C 냉동고에 보관하였다.
- [56] 2. 수집한 타액은 원심분리기를 이용하여 상층액과 침전물로 분리한 후 상층액만을 취하였다. 준비된 타액 시료 50 μ l에 200mM NH₄HCO₃ (10mM DTT(Dithiothreitol 포함) 50 μ l를 넣고 격렬하게 교반하고 뜨거운 물과 차가운 물에 번갈아가며 2분 동안 10초씩 담가 단백질 변성을 유도하였다.
- [57] 3. 당단백질로부터 N-당사슬을 추출하기 위해 New England BioLabs (Ipswich,

MA)에서 구입한, PNGase F (peptide N-glycosidase F; 500,000 unit/mL) 2 μ l를 상기 준비한 시료에 가하고 마이크로웨이브 (400W, 37°C, 10분)를 이용하여 배양하였다.

- [58] 4. 배양이 끝난 시료에 차가운 상태의 에탄올 400 μ l를 가한 후, -40°C에서 60분간 동결하였다. 이후 원심분리기 (14,000rpm, 4°C, 20분)를 이용하여 N-당사슬이 포함된 상층액과 펩타이드와 단백질이 포함된 침전물로 분리한 후 상층액만 취하였다. 준비된 시료는 완전히 건조하고 다시 1ml의 증류수를 넣은 후 격렬하게 교반하여 정제를 위한 N-당사슬 시료를 준비하였다.
- [59] 5. 시료로부터 N-당사슬만을 선택적으로 정제 및 분획하기 위하여 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 결합한 고체상 추출법을 사용하였다. 시료 주입 전 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 증류수와 80% 아세토나이트릴 (0.1% 트리플루오로아세트산 함유)을 이용하여 세척하고 시료를 전부 주입한 후 증류수를 이용하여 염 및 불순물을 제거하였다. 이후 10% 아세토나이트릴, 20% 아세토나이트릴 그리고 40% 아세토나이트릴 (0.05% 트리플루오로아세트산 함유) 용액을 순차적으로 주입하여 N-당사슬을 분획하고 완전히 건조하였다.
- [60] 6. 질량분석은 MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization)와 TOF (Time of flight)가 결합된 질량분석기 (Ultraflextreme, Bruker)를 사용하여 기록하였다. 매트릭스는 2,5-DHB (2,5-dihydroxy benzoic acid)가 25 μ g/ μ l (ACN:H₂O=1:1, v/v)의 농도로 사용되었다. 10% 와 20% 아세토나이트릴 분획은 스테인리스 플레이트에 시료 1 μ l, 0.01M NaCl 0.3 μ l, 그리고 매트릭스 0.5 μ l를 순차적으로 도포하고 진공 건조한 후 양성 모드에서 분석을 수행하였다. 40% 아세토나이트릴 분획은 스테인리스 플레이트에 시료 1 μ l 그리고 매트릭스 0.8 μ l를 순차적으로 도포하고 진공 건조한 후, 음성 모드에서 분석을 수행하였다.
- [61] 7. 질량분석은 나노LC 칩 (nanoLC chip)과 HPLC (high performance liquid chromatography)를 결합한 Q-TOF (quadrupole-time of flight) 질량분석기 (Agilent6540, Agilent Technologies)를 통해서 기록하였다. 4mm 길이, 40 μ l 용량 한계의 농축 컬럼 및 43mm 길이, 0.075mm 내경의 분석 컬럼에 5 μ m 다공성 흑연화 탄소가 정지상으로 충전되어 있는 PGC 나노LC 칩이 사용되었다. HPLC에 사용된 이동상은 (A) 3.0% 아세토나이트릴 (0.1% 포름산 포함) 및 (B) 90.0% 아세토나이트릴 (0.1% 포름산 포함)이며 총 65분의 분석시간 동안 분당 0.3 μ l씩 흘려주었으며 아래와 같이 이동상 (B)의 조성을 변화해가며 분석을 진행하였다.
0~2.5분: 0% 2.5~20분: 0%~16% 20~30분: 16%~44% 30~35분: 44%~100%
35~45분: 100%~100% 45~45.01분: 100%~0% 45.01~65분: 0%.
- [62] 8. MALDI-TOF/MS의 데이터는 Flexanalysis (Bruker) 소프트웨어와 Glycomod 웹사이트를 이용하여 분석하였고, nanoLC chip/Q-TOF MS 데이터는 Mass Hunter Qualitative Analysis (version B.05.00 SP1, Agilent Technologies) 소프트웨어에 포함된 분자 특성 추출 알고리즘 (Molecular Feature Extractor algorithm)을

이용하여 분석하였다.

[63]

[64] <실험결과>

[65] 1. 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 미량의 인간 타액 시료로부터 N-당사슬을 추출 및 분획하고 이를 질량분석하는 개념도이다.

[66] 인간 타액 시료를 원심분리기를 이용하여 분리하면 타액 단백질은 상층액에, 구강 상피막은 침전물에 존재하게 된다. 타액 단백질을 함유한 상층액을 취한 뒤에 PNGase F를 처리하면 N-당사슬을 선택적으로 추출할 수 있다.

[67] 얻은 N-당사슬에 대해 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 결합한 고체상 추출법을 이용하여 N-당사슬만을 선택적으로 분획 및 정제하고, MALDI-TOF MS를 이용하여 신속하게 타액 내 N-당사슬을 확인하고 정성 분석을 진행한 다음, nanoLC chip/Q-TOF MS를 사용하여 시료별 N-당사슬의 정량 분석 및 타액 특이적 N-당사슬의 구조분석까지 수행하였다.

[68]

[69] 2. 표 1, 표 2는 인간 타액에 존재하는 인간 타액 특이적인 N-당사슬 목록이다.(주: 표 1과 표 2는 연결된 하나의 표이나 편의상 두 개의 표로 나누었다.)

[70] 18명 (남 7, 여 11)의 인간 타액 시료로부터 총 100개의 N-당사슬 구조를 발견하였고, 이중에 39개의 N-당사슬은 18명의 인간 타액에서 모두 발견 되었다. 퓨코스 잔기를 포함하는 퓨코실화 N-당사슬 타입이 전체 100개 중에 71개로 정성적으로 제일 많이 발견되었다 (퓨코스와 시알산이 같이 있는 N-당사슬 포함). 인간 타액에서 발견한 71개의 퓨코실화 N-당사슬 중에 타액 특이적인 고퍍코실화 N-당사슬 14개에 대해서 표식화하였다. 당사슬에 4개 이상의 퓨코스가 결합되어 있는 것을 고퍍코실화 (highly fucosylation)라 정의하였으며, 각각의 구조에 대해서 Tandem MS 구조 분석법을 이용하여 추정되는 구조를 도식화하였다.

[71]

[72] 3. 도 2는 본 발명에서 인간 체액 시료로부터 N-당사슬을 분석한 결과에 따라 인간의 타액임을 확증하는 방법에 관한 흐름도이다.

[73] 인간 체액으로부터 상기 실험 절차를 따라 N-당사슬을 추출하고 질량분석기를 이용하여 분석을 진행한 결과, 정성 분석시, 검출된 14개의 고퍍코실화 N-당사슬 중 18명의 인간 타액에서 공통적으로 검출되는 Hex₅HexNAc₄Fuc₄ (*m/z* 2225.831)과 Hex₆HexNAc₅Fuc₄ (*m/z* 2590.963) N-당사슬 중에 적어도 하나 이상이 검출되고/되거나, 정량 분석시, 전체 N-당사슬 중에 고퍍코실화 N-당사슬이 차지하는 함량이 50% 이상이 되어야 인간 타액이라고 확증할 수 있다.

[74]

[75] 4. 도 3은 고체상 추출법을 이용하여 N-당사슬을 크기와 성질에 따라 분획하여 얻은 시료를 각각 MALDI-MS를 이용하여 분석한 결과이다.

- [76] 10% 아세트나이트릴을 사용하여 분획한 시료에서는 고만노즈 타입, 육탄당과 N-아세틸헥소사민으로만 이루어진 복합체 타입, 푸코스가 4개까지 붙는 복합체 타입이 검출되었다.
- [77] 또한, 20% 아세트나이트릴을 사용하여 분획한 시료에서는 푸코스가 결합된 복합체 타입의 N-당사슬이 주로 검출되었고 푸코스가 7개까지 붙는 고평코실화(highly fucosylated) N-당사슬도 검출되었다.
- [78] 또, 40% 아세트나이트릴 (0.05% 트리플루오로아세트산 함유) 을 사용하여 분획한 시료에서는 시알산 (sialic acid)을 포함한 복합체 타입의 N-당사슬이 검출되었다.
- [79] 이 방법과 같이 고체상 추출법 이용시 아세트나이트릴을 농도별로 증가시켜 N-당사슬을 순차적으로 분획하면 당사슬의 크기와 성질에 따라 분획할 수 있고, 상대적으로 적은 양을 차지하는 N-당사슬도 손실 없이 얻을 수 있다.
- [80]
- [81] 5. 도 4는 타액 특이적인 고평코실화 (highly fucosylated) N-당사슬에 대해 LC/MS/MS를 이용하여 구조분석을 수행한 결과를 나타낸다. 육탄당 6개와 N-아세틸헥소사민 5개로 이루어진 당사슬에 푸코스가 4개부터 7개까지 붙은 N-당사슬을 대상으로 진행하였다. 기본적으로 N-당사슬 코어의 N-아세틸글루코사민에 푸코스 1개가 붙고, 나머지 푸코스는 코어에 가지로 붙어 있는 육탄당 + N-아세틸헥소사민에 최대 3개까지 결합 가능한 구조로 되어있다. 본 발명에 따라 인간 타액 특이적인 고평코실화 N-당사슬에 대해 구조를 명확히 증명할 수 있기 때문에 고평코실화 N-당사슬의 존재 유무에 따라 인간 타액인지 여부를 검증할 수 있다.
- [82]
- [83] 6. 도 5는 인간 타액에서 검출된 N-당사슬들을 푸코스 결합 유무에 따라 그 상대적인 양을 원형 그래프를 이용하여 18명 각각에 대해 도식화한 결과를 나타낸다.
- [84] 각 시료에서 검출된 푸코실화 N-당사슬의 상대적인 양을 비교한 결과 공통적으로 최소 50% 이상인 것으로 나타났다. 즉, 성별, 나이, 혈액형에 관계없이 인간 타액에는 푸코실화 N-당사슬이 과반 이상 존재하고 있다는 사실을 확인하였다.
- [85]
- [86] 7. 타액의 수집 날짜에 따른 N-당사슬 비교 분석
- [87] 도 6은 혈액형과 나이가 동일한 남성 2명과 여성 2명을 선정하여 수집 날짜 (1, 2, 7, 30일)에 따라 총 4회 타액을 수집한 후, 타액 내 N-당사슬을 비교 분석한 결과이다.
- [88] 왼쪽의 도넛형 그래프는 날짜별로 수집한 타액의 N-당사슬을 푸코스 결합 유무에 따라 나눈 뒤 상대적인 양을 도식화한 것이고, 오른쪽 그림은 날짜별로 수집한 타액 내 N-당사슬의 통계적인 상관관계 정도를 Heat-map과 산점도의 R

값을 이용하여 나타낸 것이다. 수집 날짜에 따른 N-당사슬의 정성 및 정량적 변화에는 통계적으로 유의성은 없으나, 동일인의 타액을 서로 다른 날짜에 수집했더라도 푸코스가 포함된 N-당사슬의 상대적인 양이 과반수 이상 나오는 것을 확인하였고, 검출되는 N-당사슬 간에는 높은 상관관계 ($R: 0.74\sim 0.97$)를 보이는 것을 확인하였다. 이 결과는, 인간 타액 N-당사슬이 개인과 수집 날짜와 관계없이 일정한 경향성을 보이므로 상기 방법으로 N-당사슬을 검출하면 안정적으로 인간 타액을 확인 및 검증하는데 이용할 수 있다는 것을 보여준다.

[89]

[90] 8. 도 7a, 7b, 7c는 인간 체액 중 타액, 혈청 및 모유의 당사슬을 LC/MS 분석 후 크로마토그램을 통해서 정성 및 정량적으로 비교 분석한 결과이다.

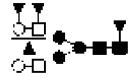
[91] 인간 혈청에는 시알산이 포함된 복합체 타입의 N-당사슬인 Hex₅HexNAc₄NeuAc₁ (m/z 1932.695, [M+H]⁺)와 Hex₅HexNAc₄NeuAc₂ (m/z 2223.790, [M+H]⁺)가 상대적으로 가장 많이 검출되고, 인간 모유에는 N-당사슬이 존재하지 않고 다른 당사슬 종류인 자유기 (Free) 당사슬, Hex₄HexNAc₂Fuc₁ (m/z 1219.446, [M+H]⁺), Hex₃HexNAc₁NeuAc₁ (m/z 999.351, [M+H]⁺), Hex₄HexNAc₂Fuc₁NeuAc₁ (m/z 1510.541, [M+H]⁺) 등이 대부분을 차지하고 있다. 본 발명의 인간 타액 N-당사슬 검출 결과와 비교할 때, 혈청에서 확인된 당사슬의 종류는 타액과 같은 N-당사슬이지만 N-당사슬 구성과 상대적인 양이 타액과 크게 다르며 타액 특이적인 고푸코실화 N-당사슬이 혈청에서는 검출되지 않았다. 또한, 모유에서 검출되는 당사슬은 타액에서 검출되는 당사슬의 종류와 원천적으로 다르며 가장 많이 나오는 당사슬의 모양과 양을 비교해 보더라도 크게 다르므로 타액과 다른 인간 체액 (혈청 및 모유)은 명확히 구분 및 검증이 가능하다.

[92]

[93] 9. 도 8은 인간 타액 내 당사슬과 동물 모델 쥐 타액 내 당사슬을 LC/MS 분석 후 크로마토그램을 통해서 정성 및 정량적으로 비교 분석한 결과이다.

[94] 쥐 타액 내에는 O-아세틸화 시알산을 포함한 N-당사슬과 N-글라이코릴뉴라민산 (N-glycolyl neuraminic acid)을 포함하는 시알산화 (sialylated) N-당사슬이 가장 많이 검출되었으며 LacdiNAc N-당사슬 형태도 소량 존재함을 확인하였다. 이를 인간 타액 N-당사슬 검출 결과와 비교해 보면, 동물 모델 쥐에서는 고푸코실화 N-당사슬이 검출되지 않았다는 점에서 큰 차이가 있으며, 인간 타액에는 존재하지 않는 다른 형태의 N-당사슬 즉, O-아세틸화 시알산을 포함한 N-당사슬, N-글라이코릴 뉴라민산을 포함하는 시알산화 N-당사슬, 그리고 LacdiNAc N-당사슬이 쥐 타액에서는 다량 존재하는 것으로 나타났다. 따라서, 타액 당사슬 프로파일링을 통하여 다른 동물 타액과 인간 타액을 명확히 구분 및 확인할 수 있다.

[95] [표 1]

No	Mass [M+H] ⁺	Composition*				Putative structure
		Hex	HexNAc	Fuc	NeuAc	
1	2225.831	5	4	4	0	
2	2428.910	5	5	4	0	
3	2510.964	3	7	4	0	
4	2590.963	6	5	4	0	
5	2794.043	6	6	4	0	
6	2516.926	5	4	4	1	
7	2882.059	6	5	4	1	

[96] [표2]

No	Mass [M+H] ⁺	Composition*				Putative structure
		Hex	HexNAc	Fuc	NeuAc	
8	2371.889	5	4	5	0	
9	2574.968	5	5	5	0	
10	2737.021	6	5	5	0	
11	3028.117	6	5	5	1	
12	2883.079	6	5	6	0	
13	3174.174	6	5	6	1	
14	3029.137	6	5	7	0	

*Composition: Hex, hexose; HexNAc, N-acetyl hexoamine; Fuc, fucose; NeuAc, N-acetyl neuraminic acid

○ Hexose

□ N-acetyl hexosamine

◆ N-acetyl neuraminic acid

● Mannose

■ N-acetyl glucosamine

▲ Fucose

[97] 위의 표 1, 2에 개시된 4개 이상의 푸코스를 가진 고틱코실화 N-당사슬 14종은 인간 혈청, 인간 모유, 쥐 타액에서 발견되지 않은 고틱코실화 N-당사슬만을 추린 것이다. 시험대상 시료 분석 결과, 표 1, 2에 개시된 14종의 고틱코실화 N-당쇄의 종류가 많을수록 인간 타액일 가능성이 높아지며, 적어도 Hex5HexNAc4Fuc4 및 Hex6HexNAc5Fuc4 N-당사슬 중 1종 이상은 발견되어야 인간 타액일 가능성이 높아진다.

산업상 이용가능성

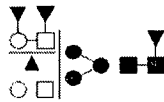
[98] 본 발명은 인간 타액을 검증하는 방법에 관한 것으로서, 인간의 다른 체액이나 동물의 체액 및 타액과 구별되는 특징이 있어 법의학 분야 등에서 유용하다.

[99]

[100] 본 출원은 미래창조과학부가 지원하고 한국기초과학지원연구원이 관리하며 한국기초과학지원연구원이 주관하는 "첨단 과학수사 분석기술 개발"(과제번호 T35780)에 의하여 수행된 것임을 밝힌다.

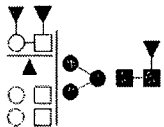
청구범위

- [청구항 1] 시료의 N-당사슬에 대하여 질량분석 및 프로파일링 결과,
 a) 정량 분석 결과, 전체 N-당사슬 내에 푸코스 잔기 네 개 이상을 포함하는 고틱코실화 N-당사슬 함량이 50% 이상인 경우;
 b) 정성분석 결과, 구조의 Hex₅ HexNAc₄ Fuc₄ (m/z 2225.831)



N-당사슬을 포함하는 경우; 및

- c) 정성분석 결과, 구조의 Hex₆ HexNAc₅ Fuc₄ (m/z 2590.963)



N-당사슬을 포함하는 경우; 중 하나 이상을 만족하면 인간 타액인 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 인간 타액 검증방법.

(단, 위 구조 중 ●은 만노스, ■은 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc), ○은 육탄당 (Hex), □은 N-아세틸헥소사민 (HexNAc), ▼ 또는 ▲은 푸코스 (Fuc)이다.)

- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
 상기 푸코스 잔기 네 개 이상을 포함하는 고틱코실화 N-당사슬은 표 1 및 표 2에 개시된 구조의

Hex5- HexNAc4-Fuc4 당사슬 ($2225.831 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex5-HexNAc5-Fuc4 당사슬 ($2428.910 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex3-HexNAc7-Fuc4 당사슬 ($2510.964 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex6-HexNAc5-Fuc4 당사슬 ($2590.963 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex6-HexNAc6-Fuc4 당사슬 ($2794.043 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex5-HexNAc4-Fuc4-NeuAc1 당사슬 ($2516.926 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex6-HexNAc5-Fuc4-NeuAc1 당사슬 ($2882.059 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex5-HexNAc4-Fuc5 당사슬 ($2371.889 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex5-HexNAc5-Fuc5 당사슬 ($2574.968 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex6-HexNAc5-Fuc5 당사슬 ($2737.021 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex6-HexNAc5-Fuc5-NeuAc1 당사슬 ($3028.117 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex6-HexNAc5-Fuc6 당사슬 ($2883.079 m/z$, $[M+H]^+$),
 Hex6-HexNAc5-Fuc6-NeuAc1 당사슬 ($3174.174 m/z$, $[M+H]^+$) 및
 Hex6-HexNAc5-Fuc7 당사슬 ($3029.137 m/z$, $[M+H]^+$) 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 인간 타액 검증방법.

- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,

시료의 N-당사슬은

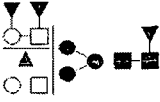
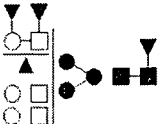
- 가) 시료를 원심분리하여 상층액을 얻는 단계;
 나) 얻은 상층액에 PNGase F를 처리하여 N-당사슬을 분리하는 단계; 및

다) 분리한 N-당사슬을 농축 및 정제하는 단계;를 포함하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 인간 타액 검증방법.

[청구항 4] 청구항 3에 있어서,
상기 다) 단계는 다공성 흑연화 탄소 카트리지를 결합한 고체상 추출법으로 수행함을 특징으로 하는 인간 타액 검증방법.

[청구항 5] 청구항 3에 있어서,
상기 다) 단계에서는 아세트나이트릴 용액을 농도구배로 가하여 분획함을 특징으로 하는 인간 타액 검증방법.

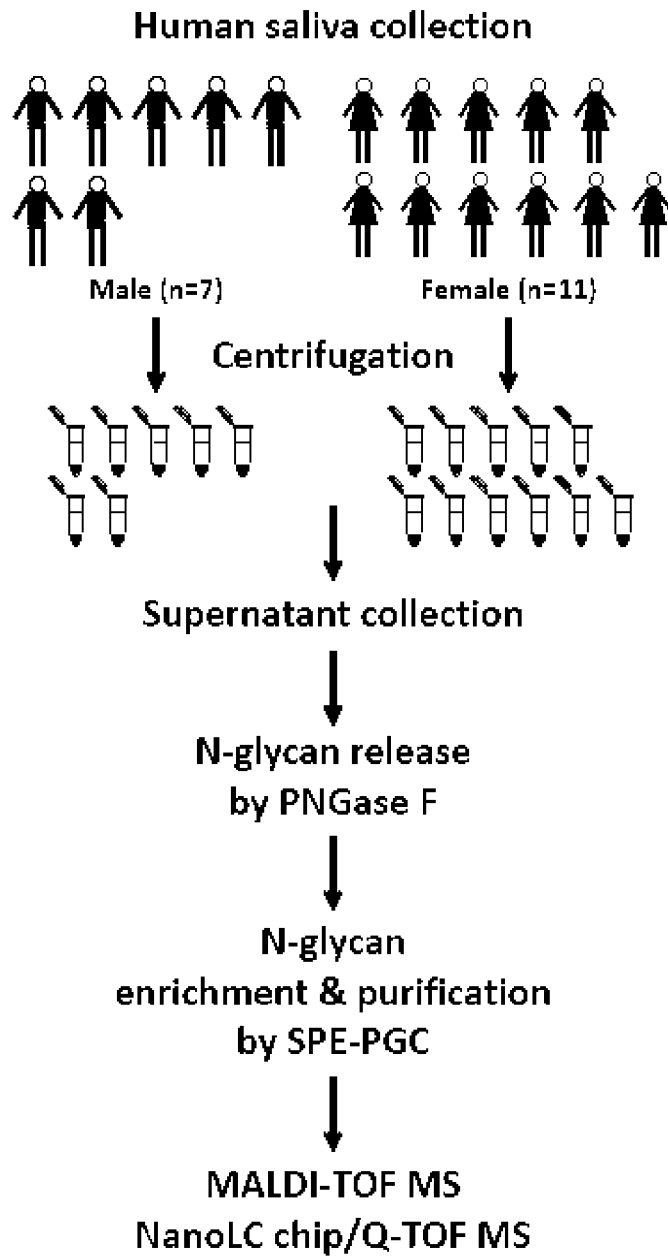
[청구항 6] 청구항 5에 있어서,
상기 다) 단계에서 20% 농도의 아세트나이트릴 용액을 이용하여 푸코스 잔기 다섯 개 이상의 고틱코실화 N-당사슬을 선택적으로 분획함을 특징으로 하는 인간 타액 검증방법.

[청구항 7] 구조의 Hex₅HexNAc₄Fuc₄ (*m/z* 2225.831) N-당사슬 또는

 구조의 Hex₆HexNAc₅Fuc₄ (*m/z* 2590.963) N-당사슬로 이루어진


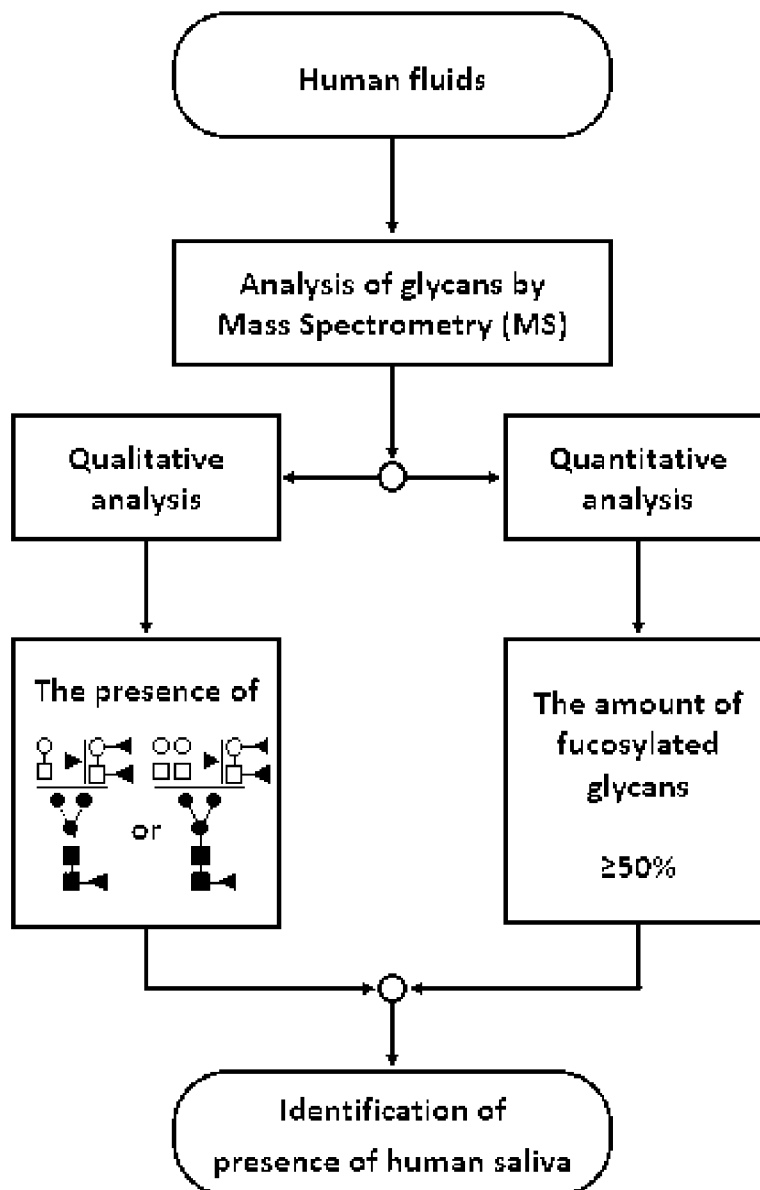
인간 타액 검증용 양성 마커.

(단, 위 구조 중 ●은 만노스, ■은 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc), ○은 육탄당 (Hex), □은 N-아세틸헥소사민 (HexNAc), ▼ 또는 ▲은 푸코스 (Fuc)이다.)

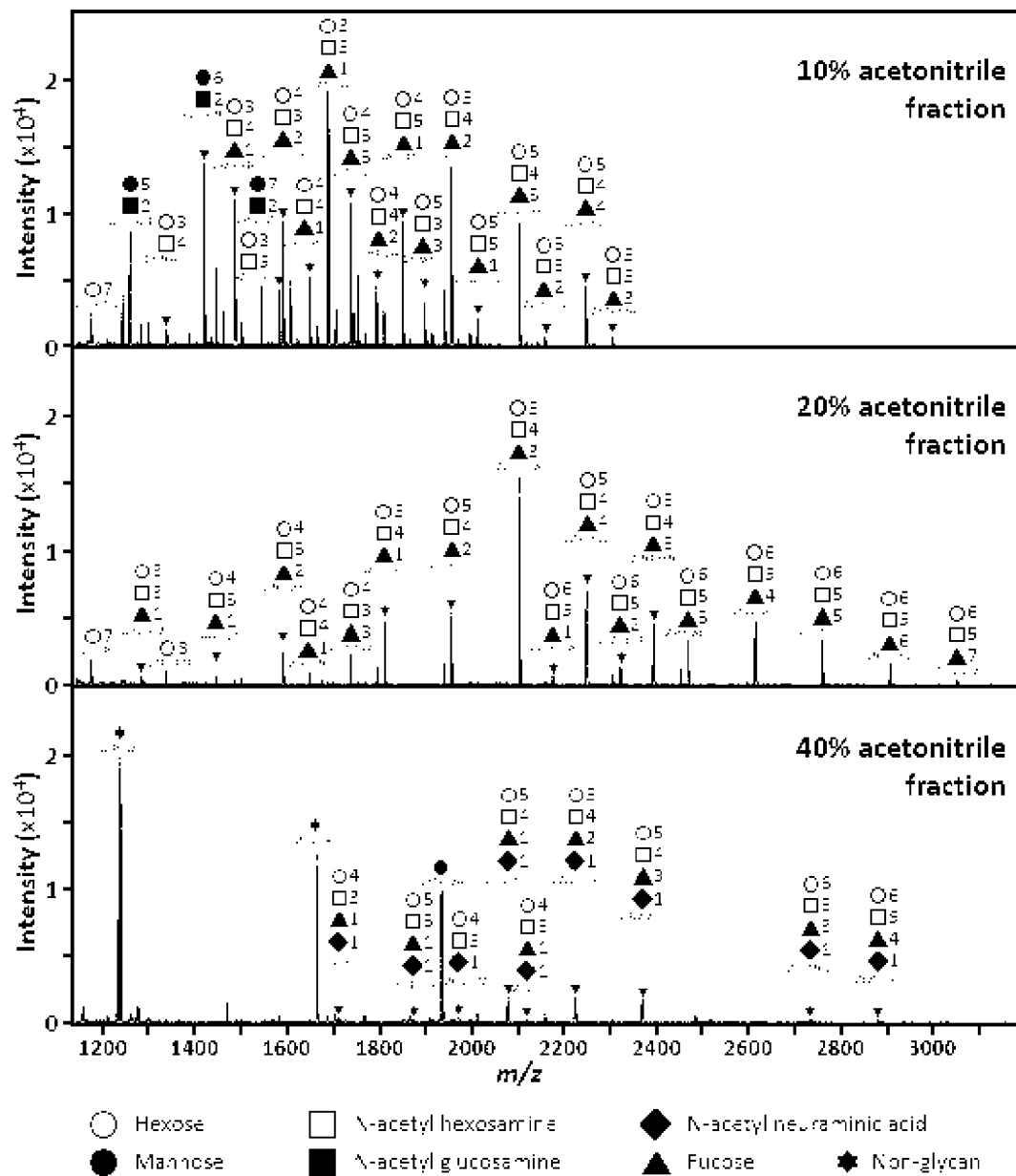
[도1]



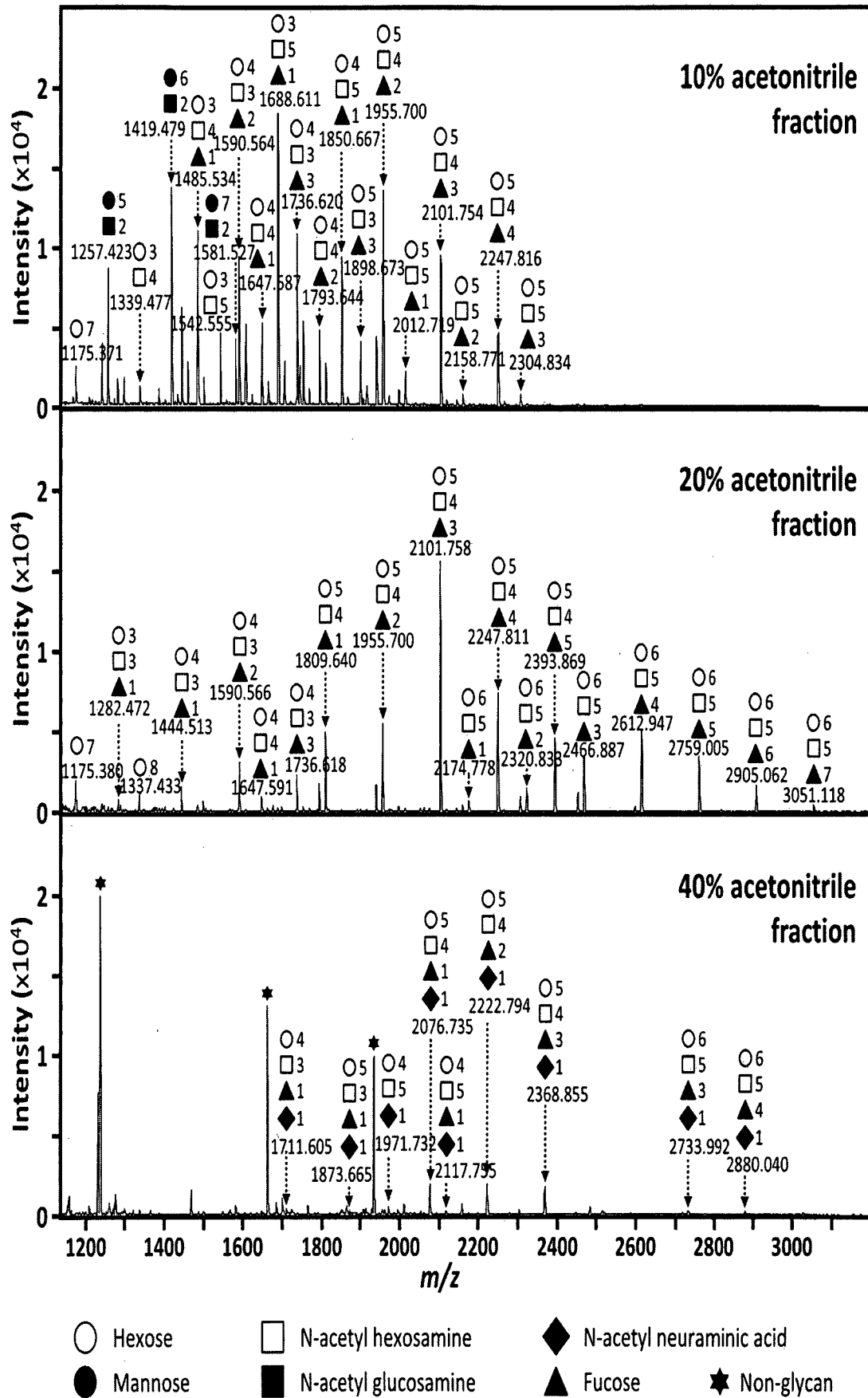
[도2]



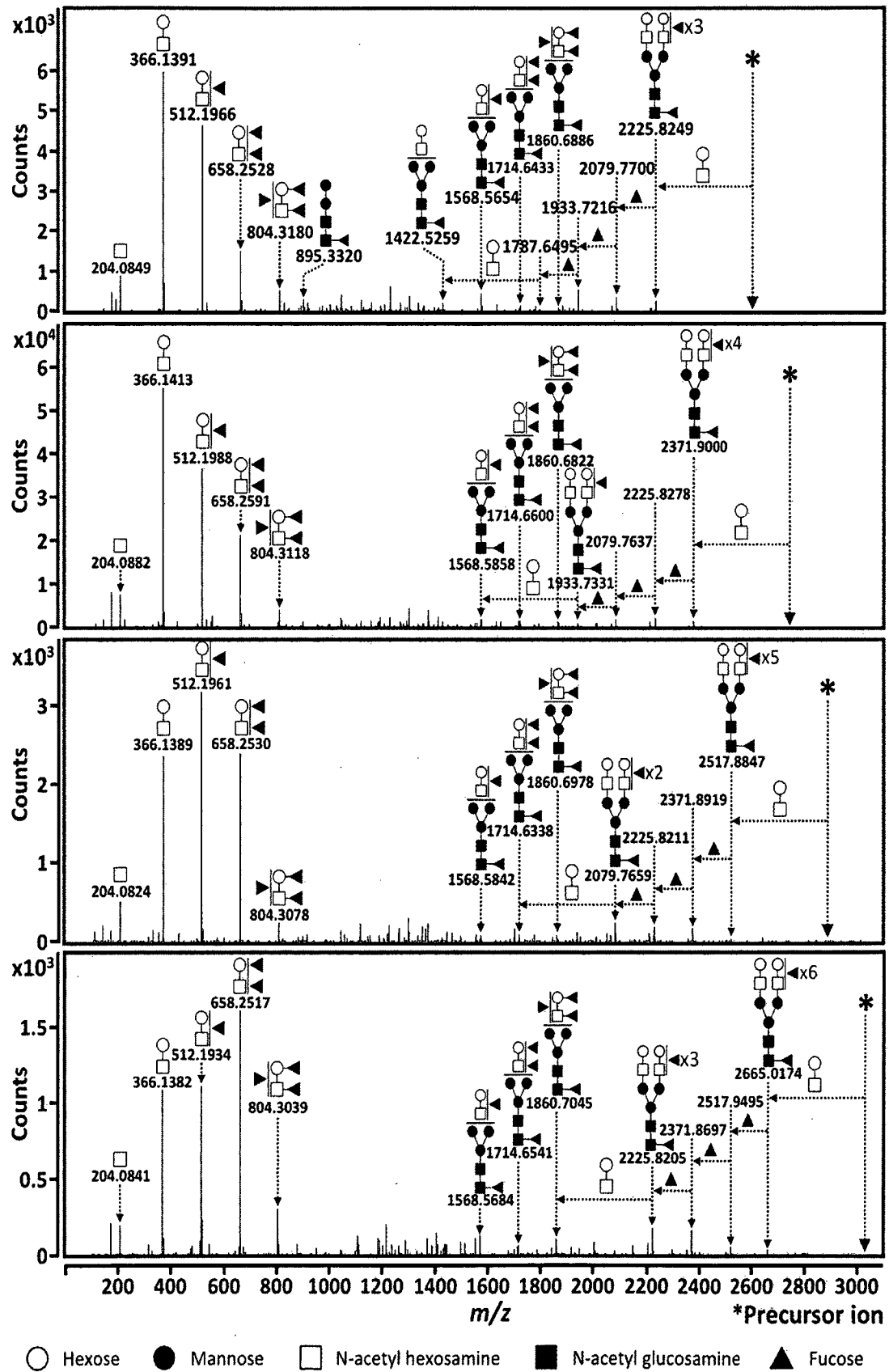
[도3]



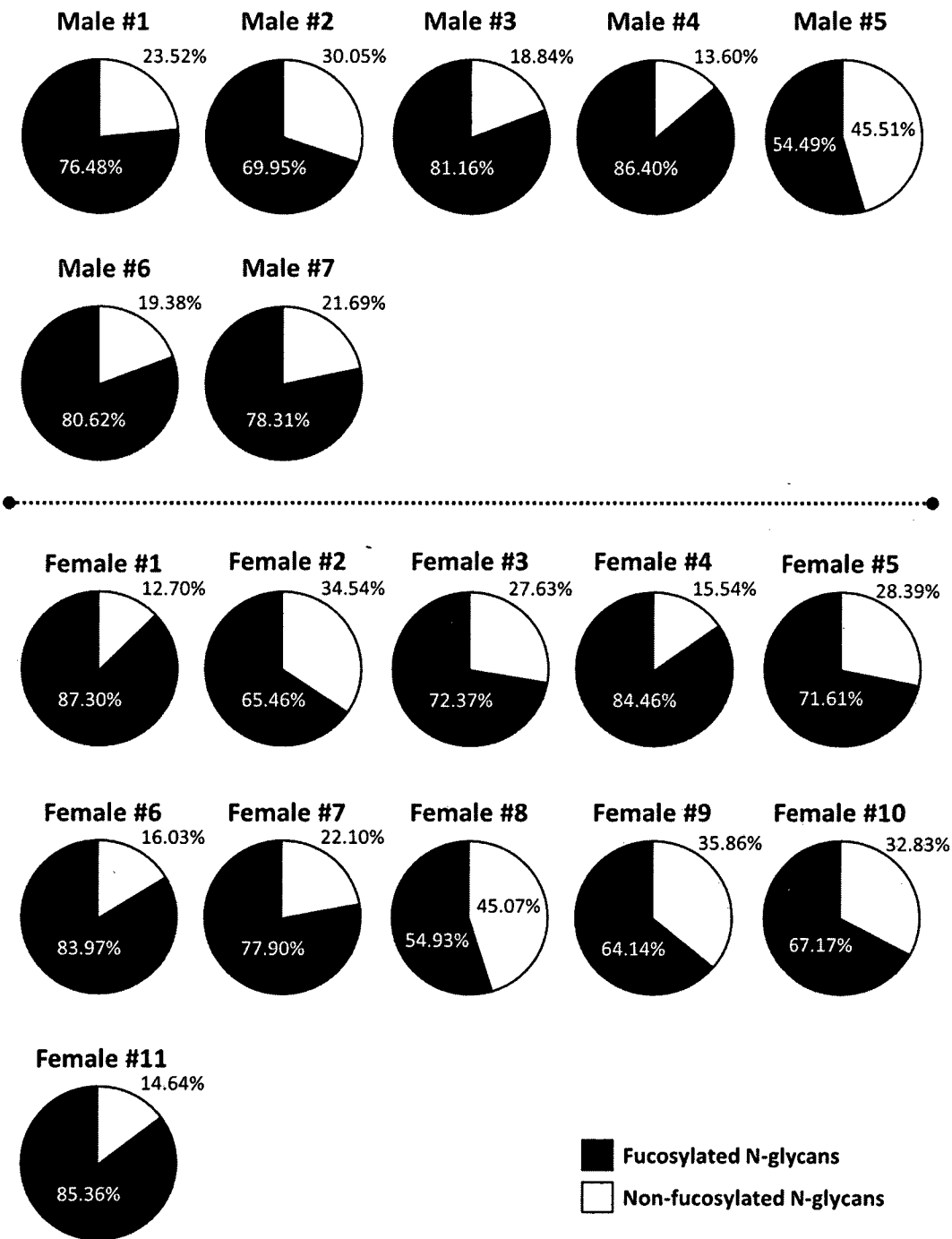
[도3]



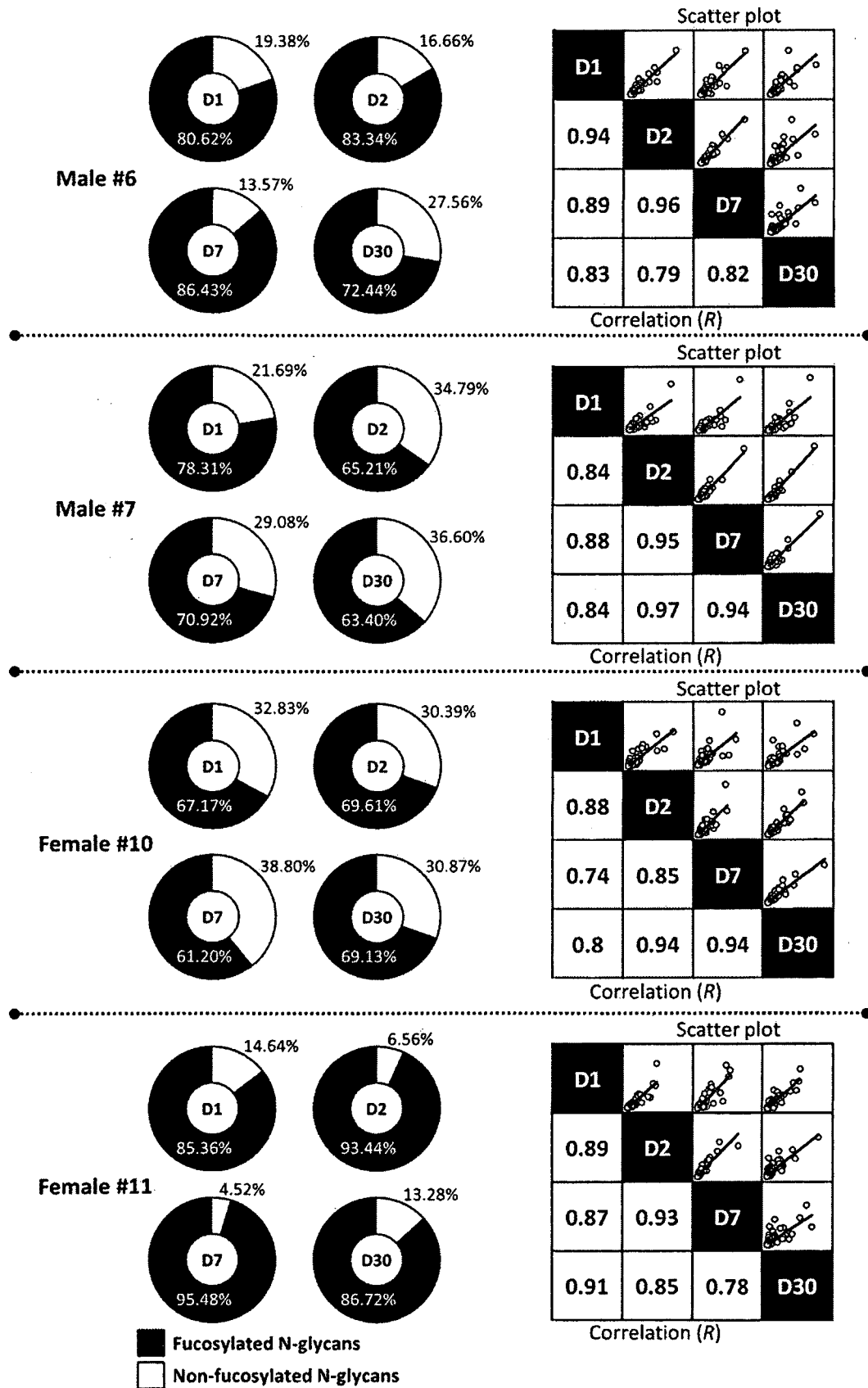
[도 4]



[도5]

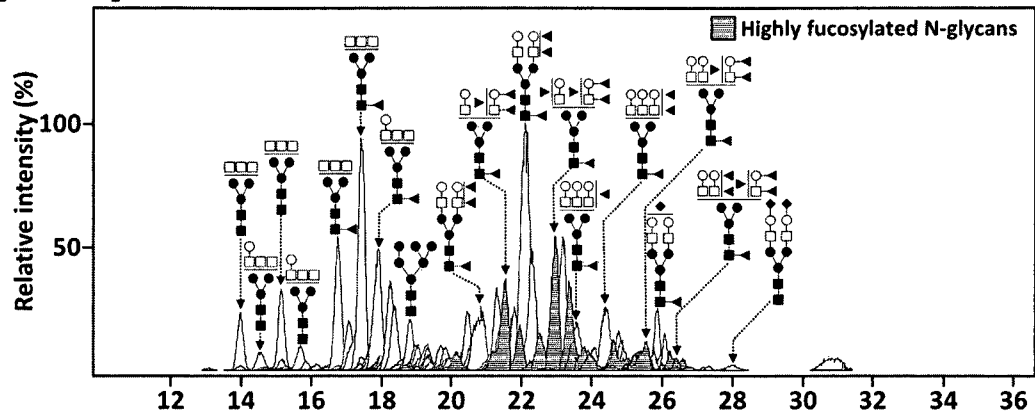


[도6]



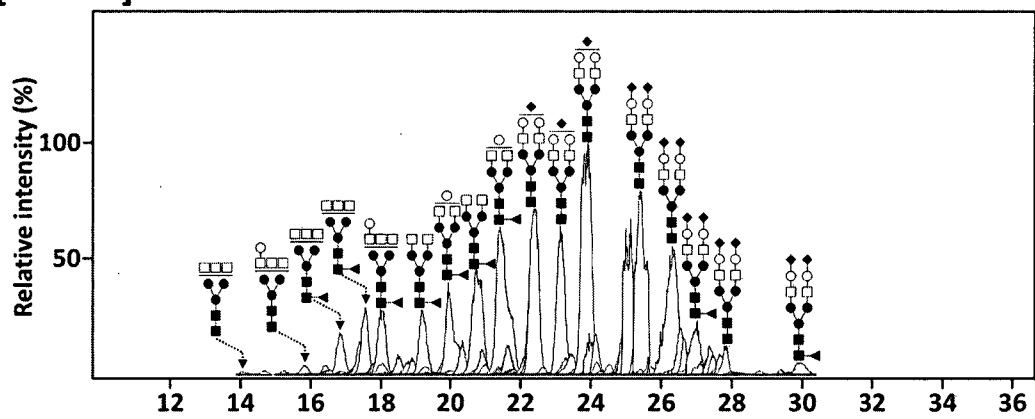
[도7a]

[Saliva]



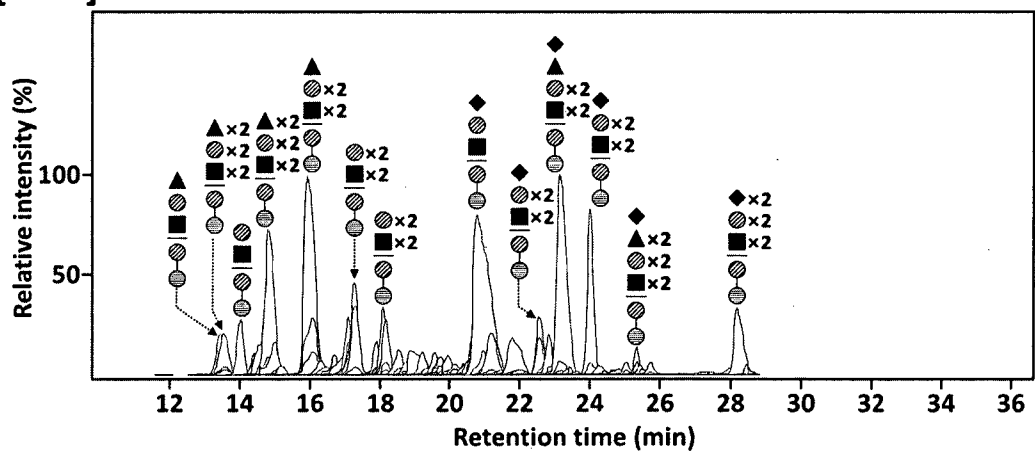
[도7b]

[Serum]



[도7c]

[Milk]

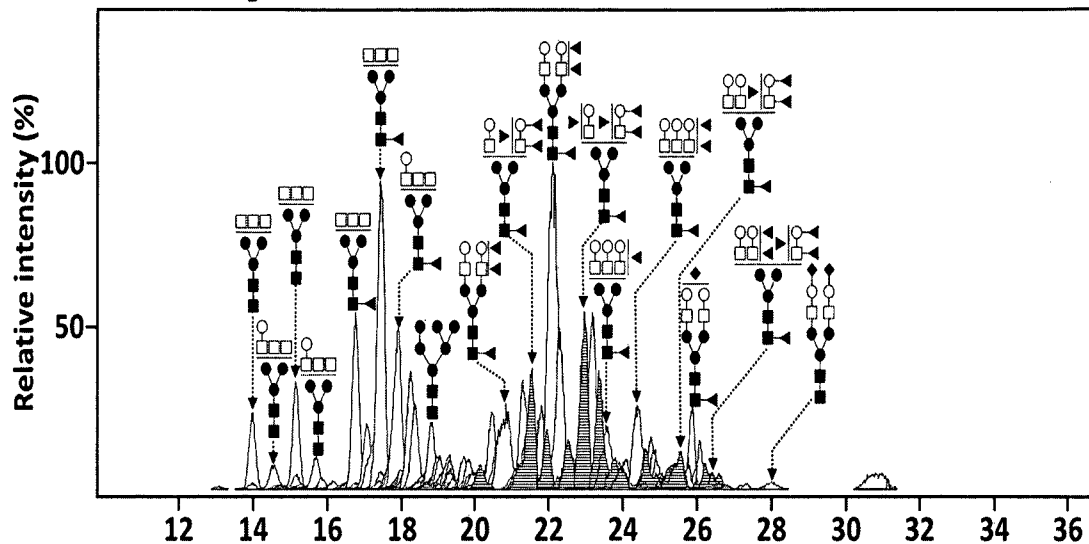


○ Hexose ● Mannose □ N-acetyl hexosamine ◆ N-acetyl neuraminic acid
 ⊙ Glucose ⊗ Galactose ■ N-acetyl glucosamine ▲ Fucose

[도8]

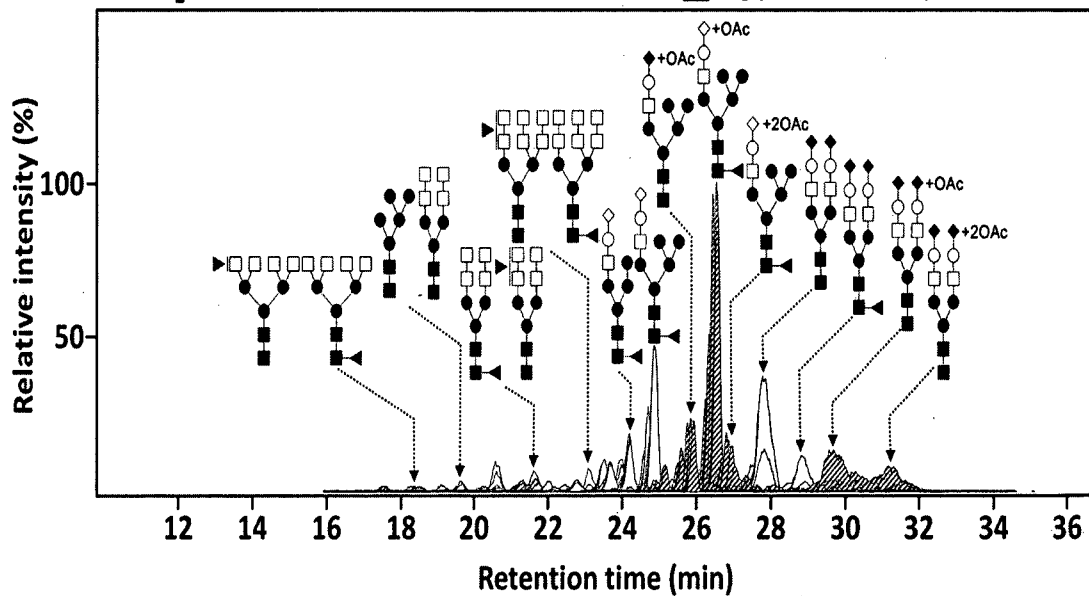
[Human saliva]

■ Highly fucosylated N-glycans



[Rat saliva]

▨ N-glycans w/ O-acetylated sialic acid



○ Hexose ● Mannose □ N-acetyl hexosamine ■ N-acetyl glucosamine
 ▲ Fucose ◆ N-acetyl neuraminic acid ◇ N-glycolyl neuraminic acid