(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0056868
(43) 공개일자 2009년06월03일

(51) Int. Cl.
B82B 1/00 (2006.01) *B82B 3/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0119056
(22) 출원일자 2008년11월27일
심사청구일자 2008년11월27일
(30) 우선권주장
1020070123943 2007년11월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
이상원
서울 성북구 안암동1가 안암래미안아파트 106동 503호
이광렬
경기 남양주시 퇴계원면 강남아파트 130동 603호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
현종철

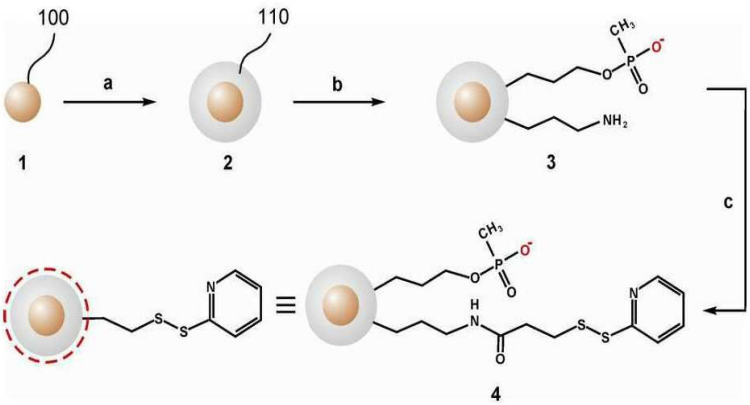
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 펩티드 분리용 나노입자, 그 제조방법 및 이를 이용한 펩티드 분리방법

(57) 요 약

본 발명은 펩티드 분리용 나노입자와 제조방법 및 이를 이용한 펩티드 분리방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 자성 나노입자의 표면에 티올(thiol) 선택성을 갖는 제1기능기가 결합되어, 시스테인을 포함하는 펩티드와 선택적으로 결합하는 펩티드 분리용 나노입자를 이용하여 특정 펩티드를 분리하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 특정 펩티드를 매우 선택적으로 간단하고 신속하게 분리할 수 있어, 암과 같은 질병 치료 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이제선

경기 성남시 분당구 정자동 정든마을한진아파트 809동 1304호

허지영

서울 성북구 동소문동4가 75

김민식

서울 양천구 목6동 목동아파트 133동 1203호

이연지

경기 오산시 원동 788-6

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	FPR05A1-400
부처명	과학기술부
연구사업명	프로테오믹스이용기술개발사업
연구과제명	고효율, 고정보력 프로테오믹스 핵심 신기술의 개발 및 적용
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2005년 04월 01일 ~ 2008년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

자성 나노입자의 표면에 티올(thiol) 선택성을 갖는 제1기능기가 결합되어, 시스테인을 포함하는 펩티드와 선택적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1기능기는 2-피리딜디설파이드 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 실리카층으로 코팅되어 있으며, 상기 제1기능기는 상기 실리카층에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 나노입자의 표면에 입자의 응집을 방지하는 제2기능기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자.

청구항 5

제4에 있어서, 상기 제2기능기는 포스포네이트 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 산화철, 망간 또는 아연 중 어느 하나 이상이 도핑된 산화철, 코발트 및 니켈로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 나노입자의 직경은 25 내지 35㎚인 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자.

청구항 8

자성입자의 표면을 실리카층으로 코팅하여 자성 나노입자를 제조하는 단계; 및 시스테인을 포함하는 펩티드와 선택적으로 결합하는 티올 선택성을 갖는 제1기능기를 상기 실리카층에 결합시키는 단계를 포함하는 펩티드 분리용 나노입자 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 실리카층의 코팅 단계는 자성입자를 분산제와 함께 용매에 분산시키는 단계; 자성입자가 분산된 상기 용액에 암모니아(NH_3)와 테트라에틸오르쏘실리케이트(TEOS)를 첨가하여 상기 자성입자의 표면을 실리카층으로 코팅하는 단계; 상기 실리카 코팅된 자성입자를 침전시킨 후 용매로부터 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 제1기능기는 2-피리딜디설파이드 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 제1기능기의 결합단계는 나노입자를 용매에 분산시키는 단계; 상기 나노입자가 분산된 용매에 3-아미노프로필트리에톡시실란을 첨가하여 상기 나노입자의 실리카층에 3-아미노프로필 잔기를 포함하는 작용기를 결합시키는 단계; 3-아미노프로필 잔기를 포함하는 작용기가 결합된 상기 나노입자 분산액에 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트를 첨가하여 상기 나노입자에 2-피디딜디설파이드 잔기를 포함하는 작용

기를 결합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자 제조방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 입자의 응집을 방지하는 제2기능기를 상기 실리카층에 결합시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 제2기능기는 포스포네이트 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 제2기능기의 결합단계는 상기 나노입자를 용매에 분산시키는 단계; 및 나노입자가 분산된 상기 용매에 3-(트리히드록시실릴)프로필메틸포스포네이트를 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자 제조방법.

청구항 15

특정 펩티드와 선택적으로 결합하는 제1기능기를 갖는 자성 나노입자와 펩티드 혼합물을 혼합하는 단계; 상기 펩티드 혼합물 중 상기 제1기능기와 결합하는 특정 펩티드를 상기 나노입자와 결합시키는 단계; 및 상기 특정 펩티드와 결합된 나노입자를 상기 펩티드 혼합물로부터 분리하는 단계를 포함하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 나노 입자와 상기 특정 펩티드의 결합은 공유 결합인 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 특정 펩티드와 결합된 나노입자를 상기 펩티드 혼합물로부터 분리하는 단계는 자성 물질을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 특정 펩티드와 결합된 나노입자를 상기 펩티드 혼합물로부터 분리시키는 단계 이후에, 상기 나노입자로부터 특정 펩티드를 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 제1기능기는 티올 선택성을 갖는 작용기이며, 상기 제1기능기와 결합하는 특정 펩티드는 시스테인을 포함하는 펩티드인 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 티올 선택성을 갖는 작용기는 2-피리딜설파이드 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 입자의 응집을 방지하는 제2기능기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 제2기능기는 포스포네이트 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 23

제15항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 산화철, 망간 또는 아연 중 어느 하나 이상이 도핑된 산화철, 코발트 및 니켈로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 24

제15항에 있어서, 상기 자성 나노입자의 표면이 실리카층으로 코팅되어 있는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 25

제15항에 있어서, 상기 펩티드 혼합물은 단백질 또는 혈청(serum)인 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 나노입자와 결합하는 특정 펩티드는 전처리 과정에 의해 환원된 시스테인 또는 자연적으로 환원 상태로 존재하는 시스테인을 포함하는 펩티드 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 나노입자와 결합된 자연적으로 환원 상태로 존재하는 시스테인을 포함하는 단백질을 분리하여 전체 시스테인 함유 단백질 중에서 환원 상태로 존재하는 시스테인을 포함하는 단백질의 비율을 측정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 펩티드 분리용 나노입자와 제조방법 및 이를 이용한 펩티드 분리방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 자성 나노입자의 표면에 티올(thiol) 선택성을 갖는 제1기능기가 결합되어, 시스테인을 포함하는 펩티드와 선택적으로 결합하는 펩티드 분리용 나노입자를 이용하여 특정 펩티드를 분리하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 특정 펩티드를 매우 선택적으로 간단하고 신속하게 분리할 수 있어, 암과 같은 질병 치료 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

배 경 기 술

<2> 현재의 생물학 관련 연구는 연구의 결과로 얻어지는 정보들을 어떻게 체계화하고 저장하며 이들을 어떻게 활용하는가에 초점이 모아지고 있다. 지식 정보화 사회에서의 생물학 정보는 양적인 면에서 종래보다 대량으로 만들어지고 있으며 그 정보 생산 속도 또한 매우 빠르게 진행되고 있다. 또한 이러한 현상은 인간 게놈 프로젝트가 발효된 이후 인간의 유전자 염기서열이 완전히 해독이 되고 있는 현 시점에서 더욱 본격화되고 있다.

<3> 이러한 생물학 관련 대량 정보 생산방식은 DNA 어레이, 프로테오믹스(proteomics), 조합화학라이브러리(combinatorial chemical library, CCL), 로봇공학을 이용한 HTS(high throughput screening), 생물정보학(bioinformatics) 기술 등에 의해 주도되고 있으며, 이미 많은 양의 생물학 및 의약 관련 정보가 축적되고 있다. 하지만, 10만 여개로 추정되고 있는 인간의 유전자 중에서 만 여개의 유전자만이 그 기능이 알려져 있으며, 그 외 동식물을 포함한 생물계의 나머지 알려지지 않은 부분에 대해서는 앞으로의 연구에 의해서 밝혀져야 할 부분으로 남겨져 있다. 이러한 기능이 알려지지 않은 유전자의 기능을 연구하는 기능성 유전학의 한 분야로서의 프로테오믹스는 유전자 또는 단백질의 기능을 연구하는 효과적인 기술로서 활용되고 있다.

<4> 프로테오믹스는 생물학 관련, 질병관련 유전자 또는 단백질의 발현변화와 변형 상태 또는 생화학적인 활성상태 등에 대한 정보를 대량으로 빠르게 제공해줄 수 있다. 따라서 이러한 정보 획득 능력을 바탕으로 유용한 정보들을 생산, 축적하며 이 정보들을 효과적으로 활용하여 생물학, 의약관련 연구 및 산업적으로 이용할 수 있도록 하기 위해서는 이러한 대량 정보 생산 방식을 도입하고 빠르게 정착시켜 생물 및 의학 관련 연구능력을 발전시

킬 수 있다.

<5> 이러한 프로테오믹스 기술은 현재의 분석 플랫폼이 가지는 적용 범위의 한계를 극복하기 위하여 연구되고 있다. 특히, 세포에 낮은 비율로 존재하는 종류의 단백질이 갖는 복합성을 감소시켜, 물리적 화학적 특성에 따라 포스포펩티드, 및 시스테인 펩티드와 같은 대상 펩티드의 농도를 증가시킴으로써, 프로테오믹스 정보를 보다 신뢰성 있게 만드는 기술이 요구된다.

<6> 현재 일반적인 분리 기술은 마이크론 단위 이상의 비드를 이용한 펩티드의 선택적 분리 방법인데, 이 기술은 고감도 프로테오믹스 기술이 요구하는 수준의 선택성과 효율성, 그리고 신속성을 가지지 못한다는 한계가 있으며, 공정 시간이 길어짐에 따라 불순물에 의한 선택성 저하 및 농축 및 세정 단계에서 발생하는 펩티드 손실 등과 같은 문제가 있다.

<7> 한편 한국공개특허공보 10-2004-0074807호에 자성 나노입자에 관한 발명이 개시되고 있다. 그러나 상기 기술은 임의의 단백질을 분리하기 위한 자성 나노입자를 제안하고 있으므로, 대단히 복잡한 단백질 조합 중 낮은 비율로 존재하는 특정 펩티드 또는 단백질만을 선택적으로 분리할 수 없으며, 프로테오믹스 실험을 위하여 추가 분리공정을 거쳐야 한다는 단점이 있다.

<8> 또한 한국등록특허공보 10-0762969에는 기능성 실리카 코팅 자성 나노입자를 이용한 핵산 분리 정제 방법이 개시되어 있는데, 나노입자 표면은 아민기 및 알킬기를 포함하고 있어, 임의의 모든 인산기와 정전기적 인력에 따라 결합함으로써 핵산을 분리할 수 있지만, 특정 핵산 또는 단백질만을 분리할 수 없으며, 또한 형성되는 결합이 전기적 작용에 의한 정전기적 결합이므로, 용매 등의 조건 변화에 따라 결합이 매우 취약해질 수 있다는 문제가 있다.

<9> 또한 한국공개특허공보 10-2007-0018501은 아미노 치환기를 가지는 실리카 코팅 자성 나노입자를 이용하여 DNA를 분리 정제하는 방법이 제안되어 있으나 이 역시 특정 펩티드의 선택적 분리가 불가능하고, 농축 및 세정 단계에서 알킬기의 소수성 상호작용에 따라 결합된 펩티드가 다시 소실된다는 단점이 있었다.

<10> 따라서 이상의 종래의 기술 중 어떠한 것도 고감도 프로테오믹스이 요구하는 특정 펩티드의 분리에 대한 대안을 제시하고 있지 못하는 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<11> 본 발명의 첫 번째 과제는 펩티드 혼합물로부터 특정 펩티드를 매우 선택적으로 간단하고 신속하게 분리할 수 있는 자성 나노입자를 제공하는데 있다.

<12> 본 발명의 두 번째 과제는 상기 펩티드 분리용 나노입자의 제조 방법을 제공하는데 있다.

<13> 본 발명의 세 번째 과제는 상기 펩티드 분리용 나노입자를 이용하여 특정 펩티드를 분리하는 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<14> 상기 첫 번째 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 자성 나노입자의 표면에 티올(thiol) 선택성을 갖는 제1기능기가 결합되어, 시스테인을 포함하는 펩티드와 선택적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 펩티드 분리용 나노입자를 제공한다.

<15> 본 발명의 일실시예 따르면, 티올 선택성을 갖는 제1기능기는 2-피리딜디설파이드 잔기를 포함하는 것이 바람직하다.

<16> 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 상기 나노입자는 실리카층으로 코팅되어 있을 수 있으며, 이 경우 제1기능기는 실리카층에 결합되는 것이 일반적이다.

<17> 또한 본 발명의 또 다른 일실시예에 따르면, 펩티드 분리용 나노입자의 표면에 입자의 응집을 방지하는 제2기능기를 더 포함할 수 있으며, 제2기능기는 포스포네이트 잔기를 포함하는 것이 바람직하다.

<18> 본 발명에 사용될 수 있는 자성 나노입자는 예를 들어, 산화철, 망간 또는 아연 중 어느 하나 이상이 도핑된 산화철, 코발트 및 니켈 중에서 선택될 수 있으며, 본 발명에 따른 펩티드 분리용 나노입자의 직경은 25 내지

35nm인 것이 바람직하다.

<19> 상기 두 번째 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 자성입자의 표면을 실리카층으로 코팅하여 자성 나노입자를 제조하는 단계; 및 시스테인을 포함하는 펩티드와 선택적으로 결합하는 티올 선택성을 갖는 제1기능기를 상기 실리카층에 결합시키는 단계를 포함하는 펩티드 분리용 나노입자 제조방법을 제공한다.

<20> 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 실리카층의 코팅 단계는 자성입자를 분산제와 함께 용매에 분산시키는 단계; 자성입자가 분산된 상기 용액에 암모니아(NH_3)와 테트라에틸오르쏘실리케이트(TEOS)를 첨가하여 상기 자성입자의 표면을 실리카층으로 코팅하는 단계; 상기 실리카 코팅된 자성입자를 침전시킨 후 용매로부터 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

<21> 또한 본 발명의 실시예에 따르면, 티올 선택성을 갖는 제1기능기는 2-피리딜디설파이드 잔기를 포함하는 것이 바람직하다. 이때, 제1기능기의 결합단계는 나노입자를 용매에 분산시키는 단계; 상기 나노입자가 분산된 용매에 3-아미노프로필트리에톡시실란을 첨가하여 상기 나노입자의 실리카층에 3-아미노프로필 잔기를 포함하는 작용기를 결합시키는 단계; 3-아미노프로필 잔기를 포함하는 작용기가 결합된 상기 나노입자 분산액에 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트를 첨가하여 상기 나노입자에 2-피디딜디설파이드 잔기를 포함하는 작용기를 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

<22> 또한 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 본 발명에 따른 펩티드 분리용 나노입자의 제조 방법은 입자의 응집을 방지하는 제2기능기를 실리카층에 결합시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 나노입자의 실리카층에 결합하는 제2기능기는 포스포네이트 잔기를 포함하는 것이 바람직하며, 이를 위해 상기 나노입자를 용매에 분산시키는 단계; 및 나노입자가 분산된 상기 용매에 3-(트리히드록시실릴)프로필메틸포스포네이트를 첨가하는 단계를 포함할 수 있다.

<23> 상기 세 번째 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 특정 펩티드와 선택적으로 결합하는 제1기능기를 갖는 자성 나노입자와 펩티드 혼합물을 혼합하는 단계; 상기 펩티드 혼합물 중 상기 제1기능기와 결합하는 특정 펩티드를 상기 나노입자와 결합시키는 단계; 및 상기 특정 펩티드와 결합된 나노입자를 상기 펩티드 혼합물로부터 분리하는 단계를 포함하는 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법을 제공한다. 일반적으로 본 발명에 따른 나노 입자와 특정 펩티드의 결합은 공유 결합이다. 또한 특정 펩티드와 결합된 나노입자를 펩티드 혼합물로부터 분리하는 단계는 상기 자성 나노 입자를 움직일 수 있는 자성 물질을 이용하여 수행될 수 있다.

<24> 본 발명의 일실시예에 따르면, 특정 펩티드와 결합된 나노입자를 펩티드 혼합물로부터 분리시키는 단계 이후에, 나노입자로부터 특정 펩티드를 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

<25> 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 펩티드 분리 방법에 사용되는 제1기능기는 티올 선택성을 갖는 작용기이고, 제1기능기와 결합하는 특정 펩티드는 시스테인을 포함하는 펩티드일 수 있으며, 티올 선택성을 갖는 작용기는 2-피리딜설파이드 잔기를 포함하는 것이 바람직하다.

<26> 또한 본 발명의 또 다른 일실시예에 따르면, 펩티드 분리 방법에 사용되는 자성 나노입자는 입자의 응집을 방지하는 제2기능기를 더 포함할 수 있으며, 제2기능기는 포스포네이트 잔기를 포함하는 것이 바람직하다.

<27> 본 발명에 따른 펩티드 분리 방법에 사용되는 자성 나노입자는 산화철, 망간 또는 아연 중 어느 하나 이상이 도핑된 산화철, 코발트 및 니켈로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 자성 나노입자의 표면은 실리카층으로 코팅되어 있는 것이 바람직하다.

<28> 본 발명에 따른 펩티드 분리 방법은 단백질 또는 혈청(serum)에서 특정 펩티드를 분리하는데 사용될 수 있다. 일반적으로 단백질은 본 발명에 따른 나노입자와 결합시키기 위하여 전처리 과정을 통해 환원시킨 후 사용된다. 그러나 환원 처리 과정을 거치지 않은 단백질에 본 발명에 따른 나노입자를 적용할 경우에도, 자연적으로 환원 상태로 존재하는 시스테인을 포함하는 펩티드를 매우 선택적으로 분리할 수 있다.

효 과

<29> 본 발명에 따른 자성 나노입자는 그 표면에 특정 펩티드와 선택적으로 반응하는 제1기능기가 결합되어 있어, 이를 이용하여 펩티드 혼합물 또는 단백질을 분리할 경우 원하는 펩티드를 간단한 공정을 통해 매우 선택적으로 신속하게 분리할 수 있어, 단백질 대사와 관련된 여러 가지 질병 치료제 등의 연구 분야에 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<30> 이하 실시예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

<31> 본 발명에 따른 펩티드 분리용 나노입자는 자성 나노입자의 표면에 티올(thiol) 선택성을 갖는 제1기능기가 결합되어, 시스테인을 포함하는 펩티드와 선택적으로 결합하는 것이 특징이다. 티올 선택성을 갖는 제1기능기로는 2-피리딜디설파이드 잔기를 포함하는 기능기를 들 수 있다.

<32> 본 발명에 있어서, 자성 나노입자는 실리카층으로 코팅되어 있을 수 있으며, 이 경우 제1기능기는 실리카층에 결합되는 것이 일반적이다.

<33> 본 발명에서 제1기능기는 결합시키고자 하는 펩티드에 대하여 선택성이 있는 한 특별히 제한되지 않으나, 본 발명의 실시예는 시스테인과 이황 교환을 할 수 있도록, 티올 선택성을 갖는 2-피리딜디설파이드 잔기를 제1기능기로 제안한다. 이 경우 시스테인은 2-피리딜디설파이드 잔기와 교환반응하여 공유결합 형태로 나노입자에 결합되므로, 추후 진행되는 세정 공정 등에 의하여도 소실되지 않게 된다.

<34> 또한 본 발명에 따른 펩티드 분리용 나노입자는 제1기능기 이외에 나노입자의 응집(aggregation)을 방지하는 제2기능기를 더 포함할 수 있다. 본 발명에서 제2기능기는 동일 전하를 띠고 있어, 나노 입자표면의 큰 (-)제타 포텐셜을 발생시키므로 나노입자의 분산상태를 유지시킬 수 있다. 이러한 제2기능기로는 여러 가지 작용기가 사용될 수 있으나, 음전하를 띠고 있으며 추후 펩티드와의 결합에 관여하지 않는 포스포네이트 잔기를 사용하는 것이 바람직하다.

<35> 본 발명에 사용될 수 있는 자성 나노입자는 추후 분리공정 시 자성물질과 반응하여 움직일 수 있는 한 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어, 산화철, 망간 또는 아연 중 어느 하나 이상이 도핑된 산화철, 코발트 및 니켈 중에서 선택될 수 있으며, 본 발명에 따른 펩티드 분리용 나노입자의 직경은 25 내지 35nm인 것이 바람직하다. 상기 범위보다 적은 나노입자는 제조하기가 어렵고, 또한 상기 자성입자의 직경이 상기 범위보다 큰 자성입자가 사용되는 경우 나노입자의 크기가 증가하여 특정 펩티드에 대한 나노입자의 유효 결합면적이 감소하는 문제가 있다.

<36> 한편 본 발명에 따른 펩티드 분리용 나노입자 제조방법은 자성입자의 표면을 실리카층으로 코팅하여 자성 나노입자를 제조하는 단계; 및 시스테인을 포함하는 펩티드와 선택적으로 결합하는 티올 선택성을 갖는 제1기능기를 실리카층에 결합시키는 단계를 포함한다.

<37> 본 발명에 있어서, 실리카층의 코팅 단계는 자성입자를 분산제와 함께 용매에 분산시키는 단계; 자성입자가 분산된 용액에 암모니아(NH_3)와 테트라에틸오르쏘실리케이트(TEOS)를 첨가하여 자성입자의 표면을 실리카층으로 코팅하는 단계; 실리카 코팅된 자성입자를 침전시킨 후 용매로부터 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

<38> 또한 제1기능기는 2-피리딜디설파이드 잔기를 포함하는 것이 바람직하며, 이때, 제1기능기의 결합단계는 나노입자를 용매에 분산시키는 단계; 나노입자가 분산된 용매에 3-아미노프로필트리에톡시실란을 첨가하여 나노입자의 실리카층에 3-아미노프로필 잔기를 포함하는 작용기를 결합시키는 단계; 3-아미노프로필 잔기를 포함하는 작용기가 결합된 나노입자 분산액에 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트를 첨가하여 나노입자에 2-피디딜디설파이드 잔기를 포함하는 작용기를 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

<39> 또한 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 본 발명에 따른 펩티드 분리용 나노입자의 제조 방법은 입자의 응집을 방지하는 제2기능기를 실리카층에 결합시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 제2기능기는 나노입자의 (-)제타 포텐셜을 증가시켜, 나노입자들의 응집을 방지하는 역할을 수행하는데, 예를 들어, 제2기능기가 포스포네이트기인 경우, 나노입자를 용매에 분산시키는 단계; 및 나노입자가 분산된 용매에 3-(트리히드록시실릴)프로필메틸포스포네이트를 첨가하는 단계를 포함하여 제조할 수 있다.

<40> 또한 본 발명에 따른 자성 나노입자를 이용한 펩티드 분리방법은 특정 펩티드와 선택적으로 결합하는 제1기능기를 갖는 자성 나노입자와 펩티드 혼합물을 혼합하는 단계; 상기 펩티드 혼합물 중 상기 제1기능기와 결합하는 특정 펩티드를 상기 나노입자와 결합시키는 단계; 및 상기 특정 펩티드와 결합된 나노입자를 상기 펩티드 혼합물로부터 분리하는 단계를 포함하는 것이 특징이며, 이때 나노 입자와 특정 펩티드의 결합은 일반적으로 공유결합이다. 특정 펩티드와 결합된 나노입자를 펩티드 혼합물로부터 분리하는 단계는 자성 나노 입자를 움직일 수 있는 자성 물질을 이용하여 수행될 수 있다.

<41> 본 발명에 따른 펩티드 분리 방법은 특정 펩티드와 결합된 나노입자를 상기 펩티드 혼합물로부터 분리시키는 단

계 이후에, 상기 나노입자로부터 특정 펩티드를 분리하는 단계를 더 포함할 수 있는데, 이는 당업계에서 일반적으로 사용되는 한 특별히 제한되지 않는다.

<42> 본 발명에 따른 펩티드 분리 방법은 단백질 또는 혈청(serum)에서 특정 펩티드를 분리하는데 사용될 수 있다. 일반적으로 단백질은 본 발명에 따른 나노입자와 결합시키기 위하여 전처리 과정을 통해 환원시킨 후 사용된다. 그러나 환원 처리 과정을 거치지 않은 단백질에 본 발명에 따른 나노입자를 적용할 경우에도, 자연적으로 환원상태로 존재하는 시스테인을 포함하는 펩티드를 매우 선택적으로 분리할 수 있다.

<43> 이하 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명자는 환원된 시스테인을 포함하는 에놀라제 단백질을 거의 완벽하게 분리하는데 성공했다. 도 5는 본 발명의 실험에 사용된 에놀라제 단백질의 나선 구조를 보여주는 모식도이다. 효모 에놀라제 단백질은 아미노산 서열상 단 한 개의 시스테인을 포함하고 있으며, 이 시스테인은 에놀라제 분자간 디설파이드 결합을 형성하고 있기 때문에 대부분의 에놀라제 단백질은 다이머(dimer)로 존재한다. 이 중 매우 소량의 에놀라제 단백질만이 시스테인이 환원된 모노머(monomer) 상태로 존재하고 있는데, 본 발명에 따라 제조된 자성 나노입자는 이와 같이 소량으로 존재하는 시스테인 환원상태의 단백질을 선택적으로 분리 및 농축 시킬 수 있는 것이 특징이다.

<44> 실재로 생체 내에서는 시스테인의 산화 환원 반응에 따라서 여러 가지 중요한 대사가 조절되는데 어떤 대사조절 단계에서 어느 만큼의 시스테인이 환원 상태로 존재하느냐는 대사 조절과 그에 따른 질병 유발에 있어 상당히 유용한 정보를 제공한다. 본 발명에 따른 나노 입자는 산화 상태로 존재하는 대부분의 시스테인 가운데 실재로 극소량 존재하는 환원상태의 시스테인을 가진 단백질만을 선택적으로 분리할 수 있는 기술을 제공하기 때문에 단백질과 그 대사 조절에 대한 연구 및 관련 질병에 관한 연구에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

<45> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하지만, 하기의 실시예 등은 본 발명을 예시하기 위한 참고적인 정보만을 제공하며, 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되지는 않는다.

<46> 실시예 1: 펩티드 분리용 나노입자의 제조

<47> 실시예 1-1: 실리카층의 코팅

<48> 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 펩티드 분리용 나노입자의 제조방법을 나타내는 도면이다.도 1을 참조하면, 먼저 Fe_3O_4 자성입자(100)에 실리카층(110)이 코팅된다(단계 a).

<49> 상기 실리카층의 코팅 방법을 상세히 설명하면, 먼저 12nm의 직경을 갖는 Fe_3O_4 90mg을 초음파처리하에 비극성용매인 시클로헥산 120mL에서 1시간 동안 50℃로 올레산(2mL; Aldrich, 90%)과 함께 분산시켜 용액 A를 준비하고, 분산제인 Igepal CO-520(24g, Aldrich)를 1-L용량의 삼각 플라스크에서 마그네틱 교반을 이용, 시클로헥산(300mL)에 용해시키고, 이 용액에 300mL의 시클로헥산과 함께 상기 용액 A를 혼입한 후, 혼합액을 10분간 교반하였다. 상술한 단계에서 비극성용매인 시클로헥산이 사용된 이유를 살펴보면, 시클로헥산에서 계면활성제인 Igepal은 역-마이셀(reverse micelle)을 형성하게 되는데, 내부에는 Igepal의 극성부분이 존재하게 된다. 나노크기의 작은 자성입자 표면 각각을 별도의 실리카층으로 균일하게 코팅하기 위해서는 상기 역-마이셀의 크기가 작은 것이 바람직하다. 만약 역-마이셀의 내부가 크다면 하나의 마이셀 단위에 복수의 자성입자가 존재하게 될 것이고, 그렇다면 하기 도 2에 나타나는 것과 같은 각각의 자성입자에 실리카층이 코팅된 형태를 얻을 수 없고, 대신 많은 나노입자들이 하나의 실리카층을 공유하게 될 것이기 때문이다.

<50> 이후, 실리카층을 코팅하는 데 있어 촉매역할을 수행하게 되는 28-40% 암모니아 수용액을 주사기를 이용하여 상기 교반된 혼합물에 방울단위로 혼입하고, 5분 동안 교반하였다. 그 다음 주사기를 이용하여 상기 자성입자의 표면을 코팅하는 TEOS를 방울단위로 혼입하여, 자성입자의 표면을 Si-O-Si의 형태인 실리카층으로 코팅하였다. 다시 상온에서 20시간동안 더 교반하고, 상기 나노입자를 침전물 형태로 얻기 위하여 메탄올 500mL를 첨가하였다. 이후, 나노입자의 침전물이 얻어진 후 상층액을 제거하고, 3500rpm에서 원심분리기를 이용, 침전물을 수득하였다. 상기 침전물을 헥산(3 x 90mL)에서 초음파처리, 클로로포름(30mL)에 의한 침전 및 원심분리(3500rpm)라는 일련의 과정을 통하여 정제하였고, 이러한 정제과정을 1회 더 반복하였다.

<51> 상기 과정을 통하여 얻어진 침전물은 중심입자인 Fe_3O_4 및 상기 중심입자를 코팅하는 실리카층으로 이루어진 나노입자이었다. 하지만 상기 나노입자의 표면에는 분산제인 Igepal이 흡착되어 있기 때문에, 펩티드 분리에 방해가 되므로 Igepal을 나노입자로부터 제거하였다.

<52> 도 2a 및 2b는 TEOS에 의하여 표면이 코팅되기 전 후의 나노입자에 대한 TEM 이미지이다. 도 2a를 참조하면, 나

노입자 내부에 존재하는 Fe_3O_4입자가 구형의 형태로 존재하는 것을 알 수 있으며, 도 2b를 참조하면, 본 발명에 따른 방법에 의하여 상기 Fe_3O_4입자의 표면은 일정한 두께의 실리카로 코팅되어 있는 것을 알 수 있다.

<53> 실시예 1-2: 3-(트리히드록시실릴)프로필메틸포스포네이트(THPMP) 및 3-아미노프로필트리에톡시실란(APTS)에 의한 나노입자 개질(도 1의 단계 b)

<54> 상기 실시예에 의하여 분말 형태로 얻어진 나노입자 150mg을 250mL의 둥근바닥 플라스크에서 메탄올(50mL)과 혼합시킨 후, 1시간 동안 초음파처리하였다. 3-아미노프로필트리에톡시실란(2.75μmol/mg, 75μL, Adrich, 이하 'APTS') 및 3-(트리히드록시실릴)프로필메틸포스포네이트(2.2μmol/mg, 149.5μL, Adrich, 이하 'THPMP')를 상기 플라스크에 첨가한 후, 임펠러를 이용하여 기계적으로 교반(350rpm)하였다. 이후, 7시간 동안 80℃에서 가열하면서 환류시켜 나노입자를 처리하였고, 처리된 나노입자를 메탄올(3 x 25mL)로 세척한 후 건조시켜 APTS 및 THPMP가 결합된 나노입자를 얻었다.

<55> 실시예 1-3: N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP)로 나노입자의 표면처리(도 1의 단계 c)

<56> APTS 및 THPMP로 표면처리된 나노입자 100mg을 1시간 동안 초음파 처리함으로써 메탄올(9.5mL)에 분산시키고, N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(0.2μmol/mg, 6.2mg, Calbiochem, 이하 'SPDP',)와 500μL의 DMSO 용액을 첨가한 후, 메탄올(3 x 25mL)로 세척하고 건조시켰다. 이로써 티올-반응성 2-피리딜디설파이드 잔기를 포함하는 작용기가 표면에 공유결합된 펩티드 분리용 나노입자를 제조하였다.

<57> 실험예 1: 나노입자를 이용한 4종의 표준 펩티드에 대한 분리 실험

<58> 시스테인의 산화를 방지하기 위하여, 기체가 제거된 물에 4종의 표준 펩티드인 1.0nmol의 소마토스타틴 절편 2-9(GCKNFFWK)과 0.64nmol의 브래디키닌(RPPGFSPER), 1.28nmol의 앤지오텐신 및 0.332nmol의 아밀로이드 β 절편 17-28(LVFFAEDVGSNK)의 혼합물을 용해시켰다. 상기 펩티드는 Sigma사로부터 구입하였으며, 추가 정제 과정없이 사용하였다.

<59> 이후 50mM의 Tris 및 10mM EDTA(Tris-HCl 완충액; pH 7.5)에서 상기 펩티드 혼합물을 상기 실시예 1에서 제조된 0.1mg의 펩티드 분리용 나노입자와 상온에서 1분간 혼합시켰다. 이후 자성입자와 반응할 수 있는 자성물질(SmCo5 magnet)을 이용 나노입자를 혼합물로부터 간단히 분리한 후, 상층액을 수집하였다.

<60> 분리된 상기 나노입자를 Tris-HCl 완충액(20μL)으로 세척하여 상기 나노입자에 결합되지 않고 잔류하는 펩티드를 분리, 수집하였다. 이후, 분석을 위하여 수집된 상기 상층액과 상기 세척용액을 혼합하고, 세척된 상기 나노입자는 별도로 20μL의 0.1M의 탄산암모늄 용액에 분산시켰다. 이후, 나노입자와 선택적으로 결합한 펩티드를 분리하기 위하여. 0.1M의 트리스(카르복시에틸)포스핀(이하' TCEP')을 상기 나노입자에 첨가하였는데, 이는 시스테인과 나노입자 간의 황결합을 끊음으로써 결합된 시스테인을 분리하는 단계에 해당한다. 본 발명의 실시예에서는 TCEP를 사용하였지만, 이는 하나의 예시일 뿐, 분리하고자 하는 펩티드와의 결합에 따라 당업계에서 사용되는 다양한 방법이 사용될 수 있다.

<61> 이후, 상기 나노입자와의 결합이 끊어진 펩티드를 상기 나노입자로부터 세척과정을 통하여 분리한 후 건조하여 펩티드 A를 얻었다. 한편 세정용액 및 상층액에 존재하는 펩티드 B를 분리한 후, 펩티드 A, B를 모세관 LC/MS/MS 실험으로 분석하였다.

<62> 도 3a는 상기 실험예에서 사용한 표준 시료 펩티드에 대한 크로마토그램이고, 도 3b 및 도 3c는 각각 상기 실험예를 통하여 얻어진 펩티드 B, A에 대한 크로마토그램이다. 도 3a를 참조하면, 소마토스타틴 절편 2-9는 펩티드 시스테인(C)을 포함하는 펩티드인 것을 알 수 있으며, 나머지 세 개의 펩티드는 모두 시스테인을 포함하지 않고 있다는 것을 알 수 있다. 한편 도 3b를 참조하면, 본 발명에 따른 나노입자와 결합하지 않은 펩티드 B는 시스테인(C)을 전혀 포함하고 있지 않다는 것을 알 수 있고, 도 3c를 참조하면, 본 발명에 따라 제조된 나노입자와 결합한 펩티드 A는 시스테인을 포함하는 소마토스타틴 절편 2-9라는 것을 알 수 있다.

<63> 본 실험 결과로부터, 본 발명에 따라 제조된 나노입자는 시스테인에 대하여 특이적으로 결합하고, 그 결과 시스테인을 포함하는 펩티드만 선택적으로 분리할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

<64> 실험예 2: 나노입자를 이용한 에놀라제 단백질 분리(I)

<65> 효모 에놀라제 단백질(1㎍)을 25mM의 탄산암모늄 완충액에서 트립신화시켰다. 얻어진 트린신화-펩티드를 0.1M TCEP로 30분간 25℃에서 환원시키면서 전처리하였다.

<66> 이후 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 본 발명에 따라 제조된 나노입자와 펩티드를 결합시킨 후, 상기 나노입자와 결합된 펩티드와 결합하지 않은 펩티드를 분리, 수집한 후 모세관 LC/MS/MS 실험으로 분석하였다.

<67> 도 4a 내지 4c는 각각 본 발명에 따라 제조된 나노입자와 결합하기 전의 전체 펩티드에 대한 크로마토그램, 상기 나노입자와 결합하지 않은 펩티드에 대한 크로마토그램, 상기 나노입자와 결합하여 전체 펩티드로부터 분리된 펩티드에 대한 크로마토그램이다.

<68> 도 4a 내지 4c를 참조하면, 에놀라제에 존재하는 복수의 펩티드 중 본 발명에 따라 제조된 나노입자에 결합한 후 분리된 펩티드는 시스테인(C)을 포함하고 있지만, 도 4b의 크로마토그램에서 나타난 바와 같이 본 발명에 따라 제조된 나노입자에 결합하지 않은 펩티드는 시스테인을 전혀 포함하고 있지 않았다. 이는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 펩티드 분리용 나노입자는 시스테인에 대한 선택성 및 분리성이 매우 우수하다는 사실을 입증하는 것이다.

<69> 비교예 1: 티오프로필 세파로스 6B에 의한 에놀라제 단백질 분리

<70> 비교를 위하여, 종래 시스테인 분리를 위하여 사용되던 티오프로필 세파로스6B(Thiopropyl Sepahrose 6B)를 물에 15분간 수화시킨 후, 상기 실험예 2와 같은 실험과정을 진행하였으며, 그 결과는 도 4d, 4e 및 4f에 나타내었다.

<71> 도 4d는 에놀라제 펩티드가 티오프로필 세파로스 6B에 결합한 후, 분리되지 않고 남아있는 펩티드의 크로마토그램이다. 도 4e는 에놀라제 펩티드용액에 티오프로필 세파로스 6B를 1시간 동안 분산시킨 후 분리한 펩티드의 크로마토그램이다.

<72> 도 4f는 에놀라제 펩티드용액에 티오프로필 세파로스 6B를 1분 동안 분산시킨 후 분리한 펩티드의 크로마토그램이다.

<73> 도 4c와 4f를 비교하면, 티오프로필 세파로스 6B를 본 발명의 나노입자와 같은 시간인 1분 동안 에놀라제 펩티드 용액에 분산시켜 분리한 펩티드의 베이스 피크 크로마토그램인 4f는 시스테인을 포함한 펩티드의 베이스 피크 자체가 나노입자에 의해 얻어진 시스테인을 포함한 펩티드의 베이스 피크보다 10배 이상 검출강도가 낮았을 뿐만 아니라, 시스테인을 포함한 펩타이드 이외에도 상당히 많은 수의 비특이적 결합에 의해 얻어진 펩티드의 피크를 관찰할 수 있었다.

<74> 또한 도 4c와 4e를 비교하더라도, 1시간 동안 티오프로필 세파로스 6B를 에놀라제 펩티드 용액에 분산시켜 분리한 펩티드의 베이스 피크 크로마토그램인 4e에 의하면, 본 발명에 따른 나노입자에 의해 분리된 시스테인을 포함하는 펩티드의 베이스 피크와 검출강도는 비슷하지만 여전히 비특이적 반응에 의해 나타나는 시스테인을 포함하지 않은 펩티드의 피크들이 상당 수 관찰되었다.

<75> 따라서 상기 비교예 2 및 도 4를 통해 종래 사용되고 있는 마이크로미터 크기의 티오프로필 세파로스 6B 비드에 비해 본 발명의 나노입자가 분리 효율성과 선택성이 훨씬 뛰어나다는 사실을 검증하였다.

<76> 실험예 3: 나노입자를 이용한 에놀라제 단백질 분리(II)

<77> 효모 에놀라제 단백질(1㎍)을 50mM의 Tris 및 10mM EDTA(Tris-HCl 완충액; pH 7.5)에 용해시켰다. 에놀라제 단백질은 대부분 산화되어 시스테인 디설파이드 결합을 하고 있고, 그 중 소량만이 환원상태의 시스테인을 가진 단백질 상태로 존재하고 있다. 본 실험에서는 이와 같이 소량 존재하는 환원 상태의 시스테인을 가진 에놀라제 단백질만을 선택적으로 분리 정제하기 위하여, 상기 실험예 2와 같이 반응 전에 단백질을 모두 환원시켜 나노입자와 결합할 수 있는 상태로 만드는 전처리 과정을 거치지 않았다.

<78> 한편 효모 에놀라제 단백질(1㎍)을 0.1M TCEP로 30분간 25℃에서 환원시키면서 전처리하여 다이머로 존재하는 에놀라제 단백질을 모두 모노머 상태로 만들어 본 발명에 따른 나노입자와 결합시킨 후 결합된 단백질을 분리하여 분석함으로써 시스테인을 포함하는 단백질의 총량을 알아보고자 하였다. 본 실험은 두 단백질 용액을 상기 실시예에서 제조된 0.1mg의 펩티드 분리용 나노입자와 상온에서 한 시간 동안 혼합시키는 방법으로 진행되었다.

<79> 이하 실험은 상기 실험예 2에서와 동일하게 진행하였으며, 분리된 결과는 도 6에 나타내었다. 도 6a는 에놀라제 단백질을 모두 환원처리한 후 본 발명에 따른 나노입자에 결합시켜 분리한 펩티드의 성분을 나타내는 크로마토그램으로서, 모든 에놀라제가 시스테인 환원 상태로 존재하기 때문에 시스테인을 포함하는 펩티드의 총량을 나타낸다.

<80> 한편 도 6b는 환원처리 과정을 거치지 않은 상태의 에놀라제 단백질을 본 발명에 따른 나노입자와 결합시켜 분

리한 펩티드의 성분을 나타내는 크로마토그램으로서, 도 6a와 비교하면 실재로 대부분 산화상태의 시스테인을 가진 에놀라제 단백질 다이머(dimer) 중에 미량 존재하는 환원상태의 시스테인을 가진 에놀라제 단백질 모노머(monomer)에 대한 존재비를 알 수 있다.

<81> 실험예 4: 나노입자를 이용한 인간 혈청 중의 펩티드의 분리

<82> 본 발명에 따라 제조된 나노입자를 인간 혈청 시료에 적용하여 펩티드들 중에서 시스테인을 포함한 펩티드만 선택적으로 분리한 후, 얻어진 펩티드들에 대해 모세관 LC/MS/MS 실험한 결과를 도 7에 나타내었다.

<83> 도 7에 나타낸 크로마토그램은 복잡한 펩티드 혼합물을 나타내는데, 분리된 펩티드는 모두 456 종류였으며, 이 중 무려 450종류의 펩티드(총 펩티드의 98.6%)가 시스테인을 포함하는 것으로 나타났다. 또한 흥미롭게도 시스테인을 포함하지 않은 펩티드는 무시할 수 있을 정도의 낮은 강도로 나타났는데, 기준 피크 강도의 0.1% 미만이었다.

<84> 이상의 결과는 본 발명에 따른 나노입자가 시스테인과 효과적으로 공유결합을 형성함으로써, 시스테인에 대해 선택도가 높으며, 결합 후에도 소실율이 낮다는 사실을 의미한다. 또한 시스테인을 포함하고 있지 않은 펩티드와는 화학결합이 전혀 일어나지 않으므로 매우 효과적으로 시스테인을 포함하는 펩티드를 분리할 수 있다는 사실을 확인할 수 있다.

<85>

도면의 간단한 설명

<86> 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 펩티드 분리용 나노입자의 제조방법을 나타내는 도면이다.

<87> 도 2a는 본 발명의 실시예에 따라 TEOS가 표면이 코팅되기 전의 나노입자에 대한 TEM 이미지이다.

<88> 도 2b는 본 발명의 실시예에 따라 TEOS에 의하여 표면이 코팅된 후의 나노입자에 대한 TEM 이미지이다.

<89> 도 3a는 본 발명의 실험예 1에서 분리되기 전의 표준 펩티드에 대한 크로마토그램이다.

<90> 도 3b는 본 발명의 실험예 1에서 나노입자와 결합하지 않은 펩티드에 대한 크로마토그램이다.

<91> 도 3c는 본 발명의 실험예 1에서 제조된 나노입자에 의하여 분리된 펩티드에 대한 크로마토그램이다.

<92> 도 4a는 본 발명의 실험예 2에서 분리되기 전의 에놀라제 단백질에 대한 크로마토그램이다

<93> 도 4b는 본 발명의 실험예 2에서 나노입자와 결합하지 않은 펩티드에 대한 크로마토그램이다.

<94> 도 4c는 본 발명의 실험예 2에서 나노입자에 의하여 분리된 펩티드에 대한 크로마토그램이다.

<95> 도 4d는 비교예 1에서 상용회된 마이크로 사이즈의 아가로즈 비드와 결합하지 않은 펩티드에 대한 크로마토그램이다.

<96> 도 4e는 비교예 1에서 상용회된 마이크로 사이즈의 아가로즈 비드에 의해 1시간 동안 분산시킨 후 분리된 펩티드에 대한 크로마토그램이다.

<97> 도 4f는 비교예 1에서 상용회된 마이크로 사이즈의 아가로즈 비드에 의해 1분 동안 분산시킨 후 분리된 펩티드에 대한 크로마토그램이다.

<98> 도 5는 일반적인 에놀라제 단백질의 펩티드 나선 구조를 나타내는 모식도이다.

<99> 도 6a은 본 발명의 실험예 3에 따라 에놀라제 단백질을 모두 환원시켜 모노머 상태로 만든 다음 본 발명에 따른 자성 나노입자를 이용하여 분리한 후 측정한 크로마토그램이다.

<100> 도 6b는 본 발명의 실험예 3에 따라 에놀라제 단백질 중에서 모노머 상태로 존재하는 환원된 시스테인을 본 발명에 따른 자성 나노입자를 이용하여 분리한 후 측정한 크로마토그램이다.

<101> 도 7은 본 발명의 실험예 4에서 나노입자에 의하여 분리된 펩티드에 대한 크로마토그램이다.

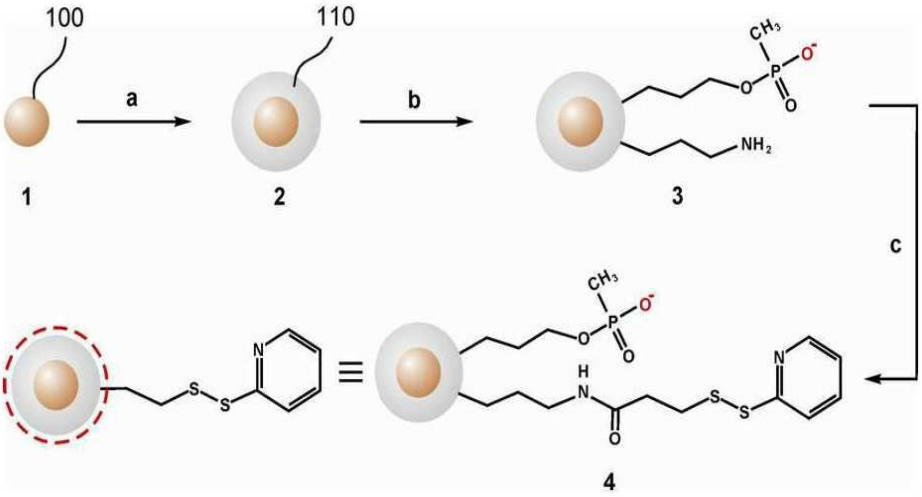
<102> <도면의 주요부호에 대한 설명>

<103> 100: 자성입자

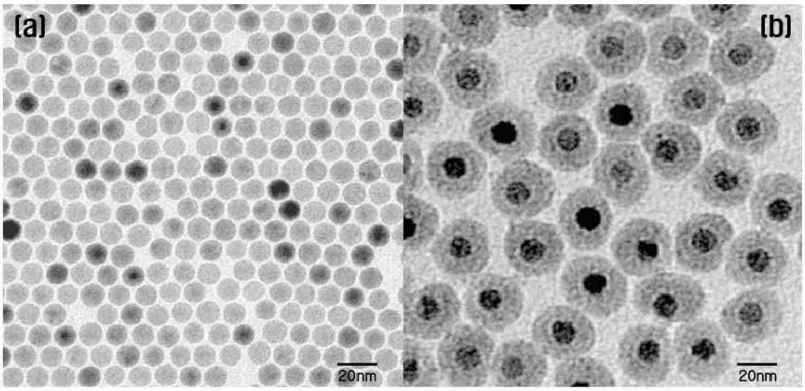
<104> 110: 실리카층

도면

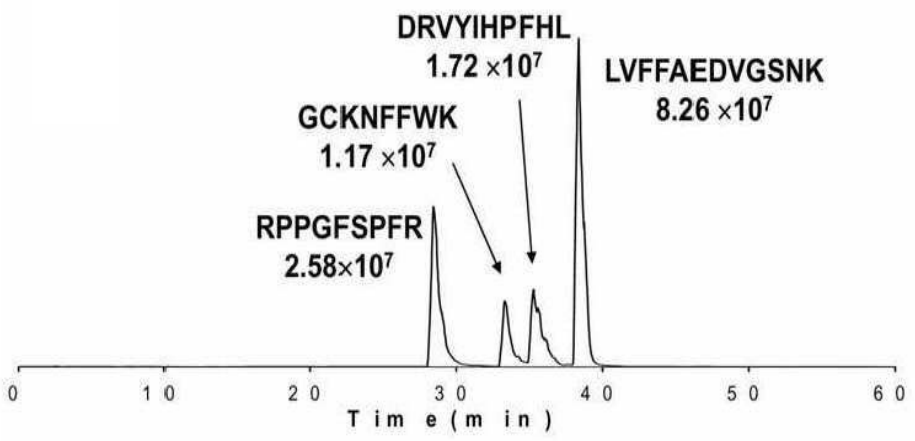
도면1



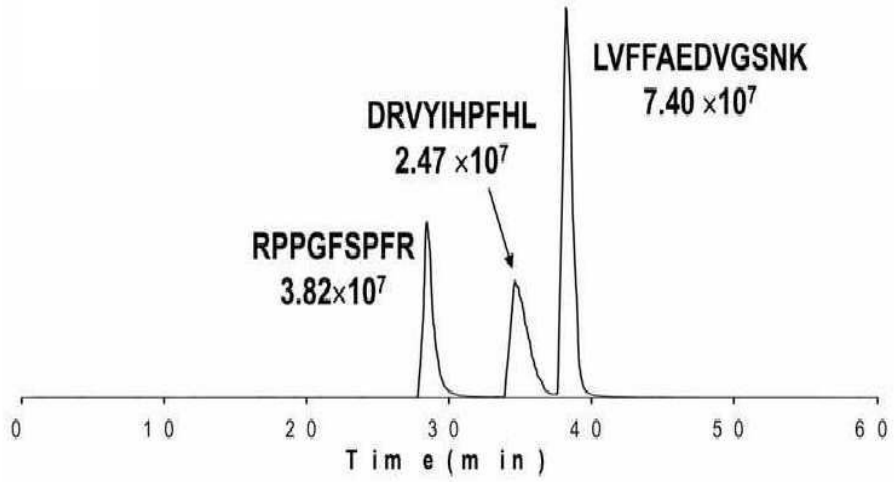
도면2



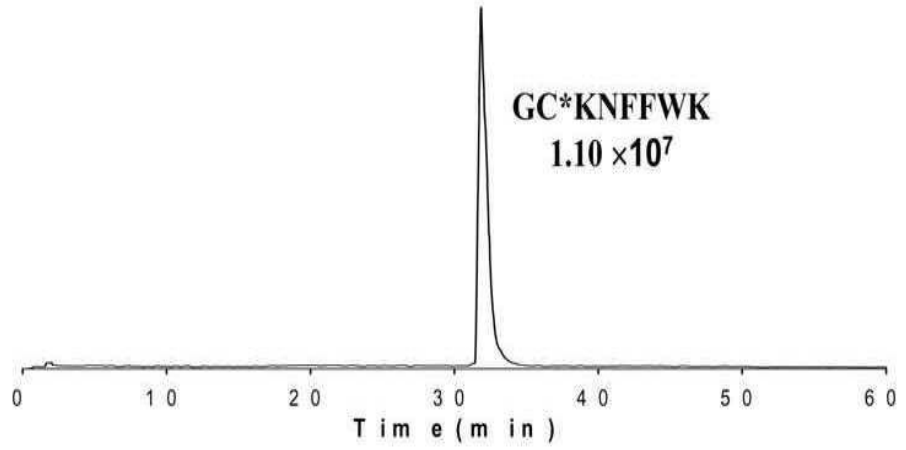
도면3a



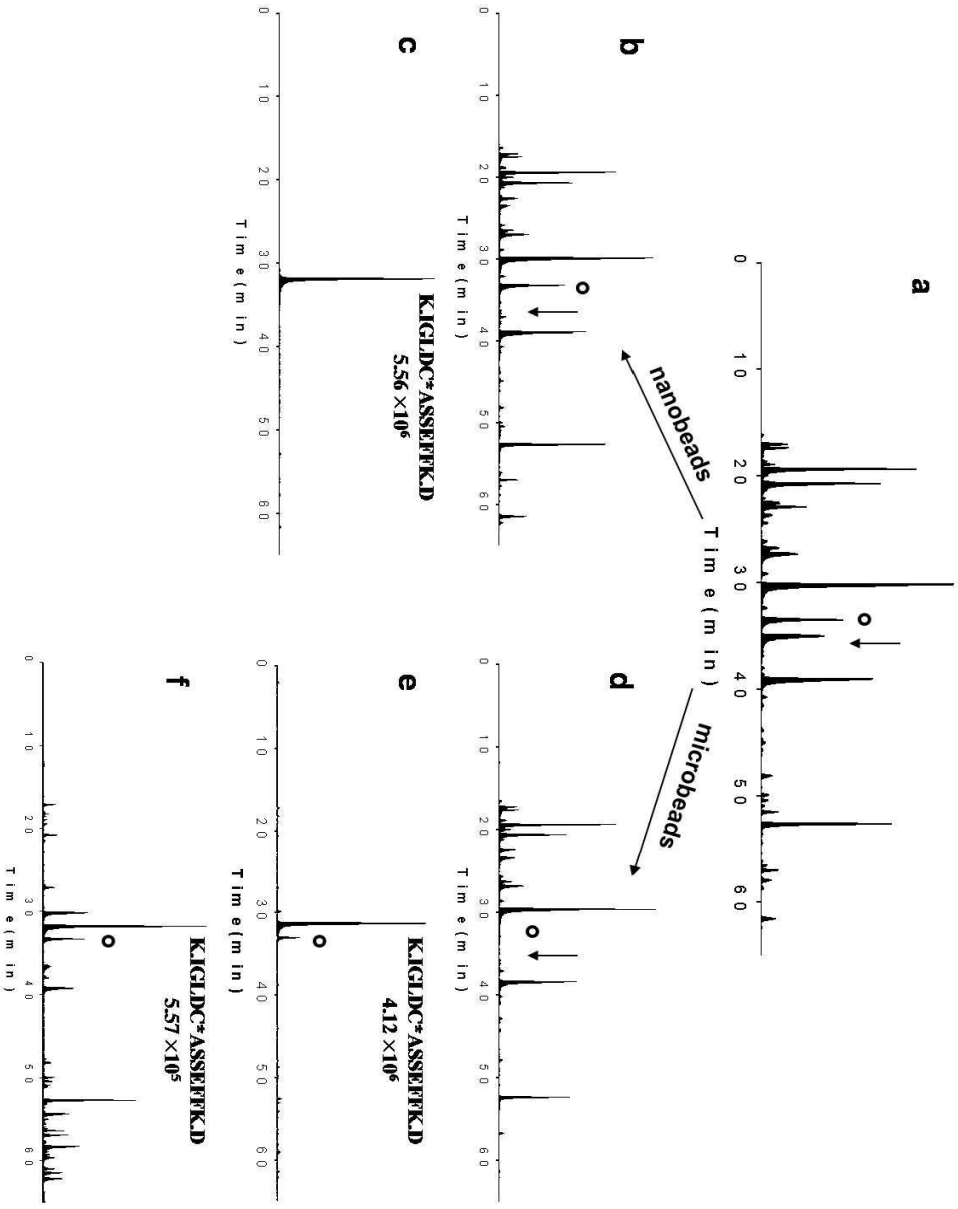
도면3b



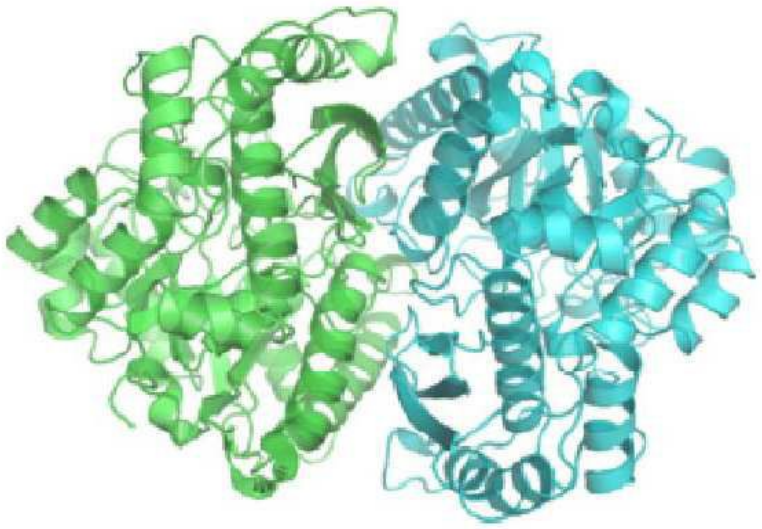
도면3c



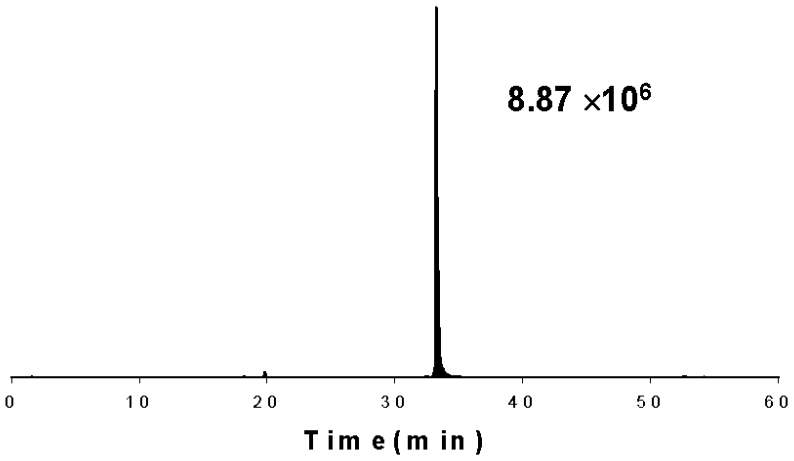
도면4


a
b
c
d
e
f
nanobeads
microbeads
K.IGLDC*ASSEFFK.D
5.56 ×10⁶
K.IGLDC*ASSEFFK.D
4.12 ×10⁶
K.IGLDC*ASSEFFK.D
5.57 ×10⁵
Time (min)

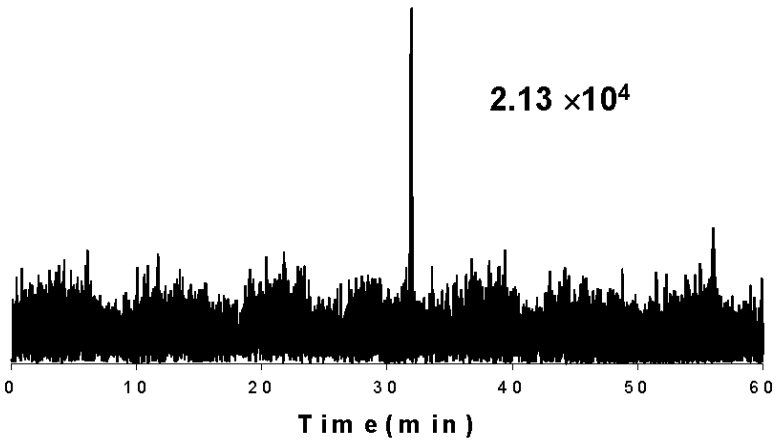
도면5



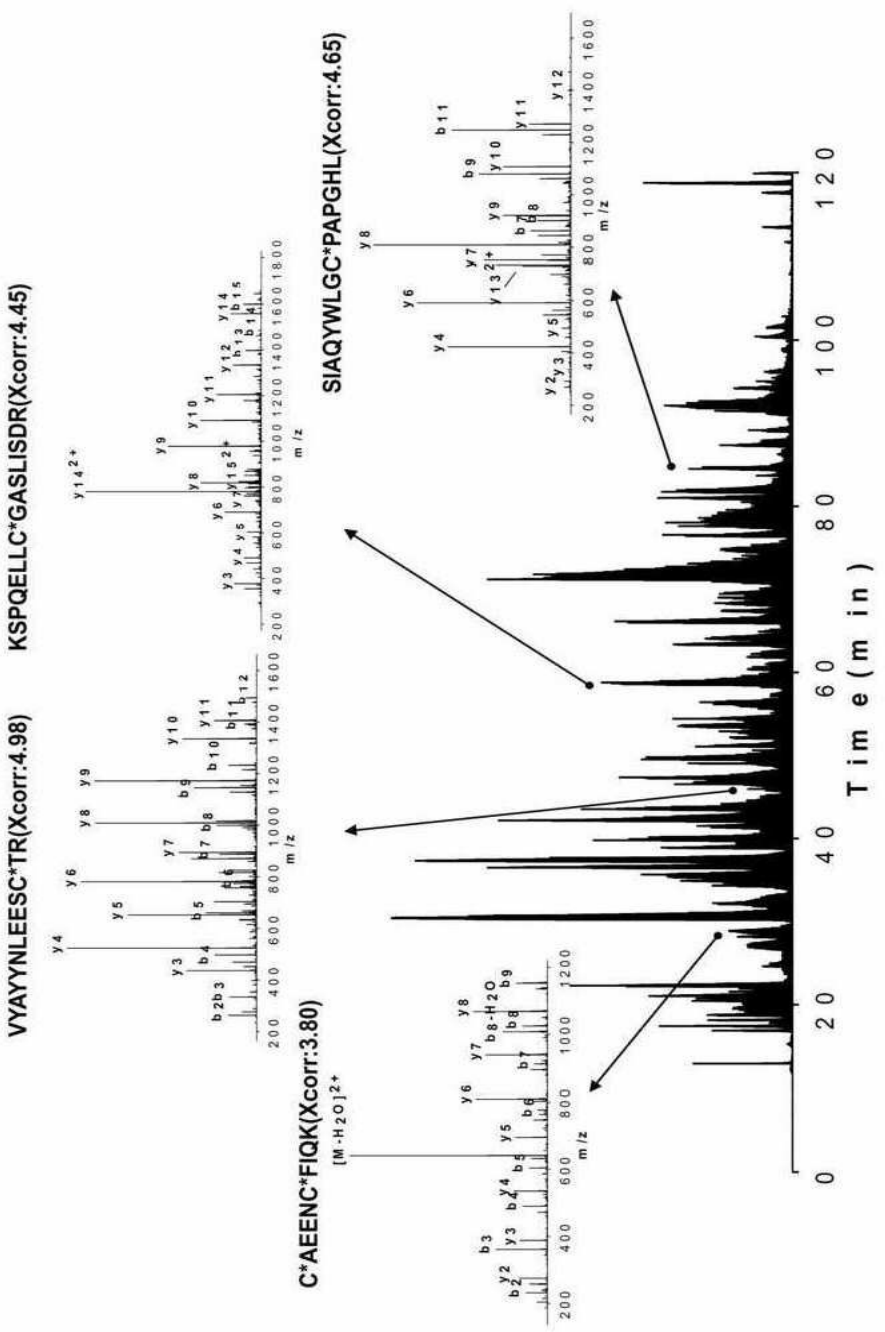
도면6a



도면6b



도면7


VYAYYNLEESC*TR(Xcorr:4.98)
KSPQELLC*GASLISDR(Xcorr:4.45)
C*AEENC*FIQK(Xcorr:3.80)
SIAQYWLGC*PAPGHL(Xcorr:4.65)
Time(min)
m/z