



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0089918
(43) 공개일자 2007년09월04일

(51) Int. Cl.

G01N 27/447(2006.01)

- (21) 출원번호 10-2007-7011797
- (22) 출원일자 2007년05월25일
심사청구일자 없음
번역문제출일자 2007년05월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2005/003519
국제출원일자 2005년11월24일
- (87) 국제공개번호 WO 2006/056861
국제공개일자 2006년06월01일
- (30) 우선권주장 PD2004A000301 2004년11월26일 이탈리아(IT)

(71) 출원인

엘레트로포르 에스.에이.에스. 디 루게로 마시모 앤 씨.

이탈리아공화국, 45100 로비고, 6, 비아 아르제리니

지프 에스.알.엘.

이탈리아공화국, 35020 포조노보, 14, 비아 단테

(72) 발명자

밀리오니, 레나토

이탈리아공화국, 아이-35100 파도바, 16, 리브. 무사토

구아다그니노, 안토니오

이탈리아공화국, 아이-35134 파도바, 6, 비아 브리오니

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박영순

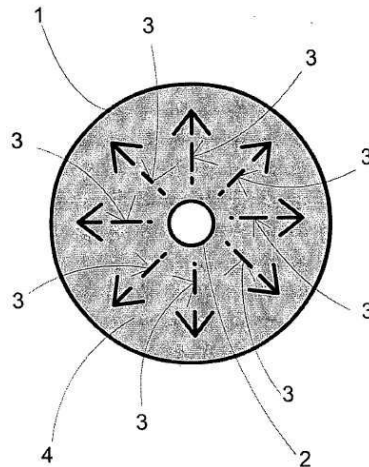
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 생체 분자를 이차원 전기영동에 의해 동시에 분리하기 위한방법 및 장치

(57) 요약

본 특허는 이차원 전기영동에 의해 생체 분자를 동시에 및 반복적으로 분리하는 방법 및 그것을 수행하기에 유용한 장치를 설명한다. 특히 본 발명은 매트릭스에서 특정의 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 다른 매트릭스에 미리 정렬된 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드 성분을 이동시키고 분리시키는 방법 및 장치에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

미우조, 마누엘라

이탈리아공화국, 아이-32032 펠트레, 12, 비아 푸
시나

바리나, 엘리사

이탈리아공화국, 아이-35100 파도바, 6, 비아 마닌

살라타, 토마소

이탈리아공화국, 아이-35100 파도바, 5, 비아 필리
아시

리게토, 피에르지오르시오

이탈리아공화국, 아이-20129 밀라노, 14, 비아 아
르끼메데

특허청구의 범위

청구항 1

하나 이상의 생체 시료에 함유된 생체 분자를 동시에 분리하기 위한 이차원 전기영동 방법으로서,

상기 생체 분자가 상기 생체 시료에 포함되어 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 정렬되어 있는 하나 이상의 제1 매트릭스로부터, 상기 생체 분자가 상호 분리되는 하나 이상의 제2 매트릭스로 이동시키는 단계로서, 상기 생체 분자의 이동 및 분리 모두가 비평행 역선을 가지는 전기장의 인가에 의해 유도되는 단계

를 적어도 포함하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

시료(들)를 처리하여 제1 매트릭스 상의 시료(들)에 함유된 생체 분자의 제1 분리를 수행하는 단계; 및

전 단계에서 수득된 시료(들)를 함유하는 상기 제1 매트릭스를 처리하여 생체 분자에 일정한 전하/질량 비를 제공하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 제1 차원에서의 분리가 대역 (zonal) 전기영동, 디스크 전기영동, 등속영동, 또는 양쪽성 가용성 완충제에서의 등전 초점집중, 또는 적절한 비대류 매트릭스를 통해 고정화된 pH 구배에 의해 수득되는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 비대류 매트릭스가 연속적이거나 과립으로 되어 있고, 폴리아크릴아미드, 아가로스, 아세트산염 겔, 또는 가교결합된 텍스트란으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 1 차원용 상기 비대류 매트릭스가 플라스틱 지지체, 또는 전류 투과성 다공성 지지체에 고정되는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 지지체가 플라스틱으로 제조될 때에는 겔 본드 PAG, 겔 본드 아가로스로 이루어진 군에서 선택되며, 다공성 지지체일 때에는 아세트산 셀룰로오스 시트, 나일론 메쉬, 또는 섬유유리 시트로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 2차원 전기영동 전지에 적절히 삽입된 상기 제1 매트릭스가 상기 제2 매트릭스의 직접 현장 중합에 의해 상기 제2 매트릭스에 융합되어, 두 매트릭스 사이의 틈새 간극을 제거하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 제2 매트릭스가 연속 또는 불연속 완충제의 존재 하에서 일정한 농도 또는 다공성 구배를 가지는 중합체인 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 중합체가 아크릴아미드, 비스아크릴아미드, 아가로스, 및 아세트산 셀룰로오스로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 전기영동 분리 이전에 시료를 처리하는 단계를 추가로 포함하며, 변성 및/또는 환원을 임의적으로 포함하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 변성은 열적인 것이며, 시료를 가열하여 유도하거나 또는 변성제 및/또는 환원제를 가하여 수득가능한 화학제품에 의해 유도되는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 변성제가 우레아, 티오우레아, 계면활성제, 및/또는 유기 용매, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 상기 환원제가 베타-머캅토에탄올, 디티오프레이톨, 및 트리부틸포스핀으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 전기영동 분리 이전에 시료(들)를 처리하는 단계를 추가로 포함하며, 변성 및/또는 환원 및 이어서 알킬화를 임의적으로 포함하는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 알킬화는 요오도아세트아미드, 아크릴아미드, N-치환 아크릴아미드, 및 비닐피리딘으로 이루어진 군에서 선택되는 작용제로 얻어지는 방법.

청구항 16

제 15 항의 방법을 사용하여 생체 착체 시료를 특성화하는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 제2 매트릭스에 함유되며 전기영동 분리되는 생체 시료를 가시화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 가시화가 농도분석, 방사능 사진촬영, 화학발광, 형광발광 또는 생체활성 검정에 의해 수득가능한 방법.

청구항 19

하나 이상의 생체 시료에 함유된 생체 분자를 동시에 분리하기 위한 이차원 전기영동 방법으로서,

생체 시료를 준비하는 단계;

화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 시료에 함유된 생체 분자를 정렬하는 하나 이상의 제1 매트릭스에서 예비 분리를 수행하는 단계;

상기 제1 매트릭스를 처리하여, 전하를 기준으로 시료의 상기 생체 분자를 균일하게 하는 단계;

상기 제1 매트릭스를 적어도 두 전극들을 함유하는 장치에 삽입하고, 상기 전극들 중 제1 전극 및 상기 전극들 중 제2 전극에 가까이 배치된 적어도 제2 매트릭스 사이에 상기 제1 매트릭스를 배치하는 단계;

전해 용액을 상기 전극들 사이에 포함되며 비평행 역선을 가지는 전기장이 생성되는 상기 매트릭스를 포함하는 영역에서 상기 장치에 가하는 단계; 및

상기 매트릭스가 제1 매트릭스에 미리 정렬된 상기 생체 분자를 추가의 분리가 일어나는 제2 매트릭스로 이동시키도록 배치되는 상기 전극들 사이의 영역에서 비평행 역선을 가지는 하나 이상의 전기장을 생성시키는 단계를

포함하는 방법.

청구항 20

하나 이상의 생체 시료에 함유된 생체 분자를 동시에 분리하기 위한 이차원 전기영동 장치로서,
 상기 장치가 하나 이상의 제1 매트릭스 내에서 비평행 역선을 가지는 하나 이상의 전기장을 생성시키고, 상기 생체 시료의 상기 생체 분자를 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 하나 이상의 제2 매트릭스에 정렬하며, 상기 생체 분자를 분리시키고, 상기 생성된 전기장이 상기 생체 분자를 상기 제1 매트릭스로부터 상기 제2 매트릭스로 이동시키는 수단이며 상기 생체 분자를 분리하는 수단인 전기영동 장치.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 역선을 가지는 전기장을 생성시키는 적어도 두 전극을 포함하며, 역선이 상기 전극의 적절한 형상 및/또는 매트릭스의 형태, 및/또는 상기 전극에 대한 배치, 및/또는 상기 전극과 상기 매트릭스 사이에 포함되는 전도성 물질에 의해 결정되는 전기영동 장치.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 전극의 적어도 두 개는 서로 근접하여 배치되는 상기 제1 매트릭스와 상기 제2 매트릭스 및 전도성 물질을 함유하기에 적합한 영역에 배치되는 전기영동 장치.

청구항 23

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서, 상기 전극의 제1 전극은 원주를 따라 평면에 배치되고 상기 전극의 제2 전극은 상기 원주의 중심에 배치되며, 상기 제2 전극은 편티폼 전극이며 제1 전극에 반대의 전하를 가지는 전기영동 장치.

청구항 24

제 20 항에 있어서, 상기 제1 매트릭스가 제3 매트릭스를 보유하기에 적합한 틈새 간극에 의해 상기 제2 매트릭스에 의해 분리되고 상기 제3 매트릭스가 상기 제1 및 상기 제2 매트릭스 사이에 연속성을 허용하도록 사용되는 전기영동 장치.

청구항 25

제 20 항에 있어서, 비평행 역선을 가지는 상기 전기장이 연속 또는 불연속적이며, 분리될 시료에 따라 다양한 지속기간 및 세기를 가지는 전기영동 장치.

청구항 26

제 20 항에 있어서, 전체 전기영동 공정 동안 온도를 조절하기에 적합한 전기영동 장치.

청구항 27

하나 이상의 생체 시료에 함유된 생체 분자를 동시에 분리하기 위한 이차원 전기영동 장치로서,
 하나 이상의 평면에서 한정된 영역에서 전기장을 생성시키기에 적합한 적어도 두 전극들을 포함하며,
 상기 전기장이 비평행 역선을 가지며, 상기 하나 이상의 평면은 상기 전극들 사이의 상기 한정된 영역에서 서로 근접하여 배치되는 하나 이상의 매트릭스를 함유하기에 적합한 하나 이상의 지지체를 포함하며,
 (i) 하나 이상의 생체 시료로부터의 상기 생체 분자가 특정의 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 미리 정렬되며 상기 제1 전극의 적어도 하나에 근접하여 배치되는 하나 이상의 제1 매트릭스;
 (ii) 상기 생체 시료로부터의 생체 분자가 제1 매트릭스로부터 이동하여 제1 매트릭스에서 얻어진 생체 분자에 대해 추가로 분리를 수행하며 상기 제1 매트릭스와 하나 이상의 상기 제2 전극 근방 사이에 배치되는 하나 이상의 제2 매트릭스;
 (iii) 전도성 물질로서 사용되는 전해 용액;
 (iv) 장치 자체의 일부이거나 또는 외부적으로 연결되는 하나 이상의 전기장 전원을 추가로 포함하는 전기영동

장치.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 일정한 온도로 유지하기에 적합한 하나 이상의 수단을 추가로 포함하는 전기영동 장치.

청구항 29

제 27 항 또는 제 28 항에 있어서, 상기 전기장이 비평행 역선을 가지며, 역선이 상기 전극의 적절한 형상, 및/또는 매트릭스의 형태, 및/또는 상기 전극에 대한 배치, 및/또는 상기 전극과 상기 매트릭스 사이에 포함되는 전도성 물질의 형태에 의해 결정되는 전기영동 장치.

청구항 30

생체 시료를 특성화하기 위한, 제 1 항 내지 제 19 항의 방법 또는 제 20 항 내지 제 29 항의 장치의 용도.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 생체 분자, 특히 비평행 역선(lines of force)을 가지는 전기장을 인가하여 수득되는 생체 시료에 함유된 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드 성분을 이차원 전기영동에 의해 분리하는 방법, 및 그것에 유용한 장치에 관한 것이다.

배경기술

<2> 실제로 생체 분자, 특히 단백질을 분리하기 위해 수많은 기법들이 사용되고 있다. 사실상 다수의 전기영동 기법(예컨대, 폴리아크릴아미드 겔 상의 전기영동, 모세관 전기영동, 등전 초점집중) 및 크로마토그래피 기법(예컨대, 이온교환, 친화력, 겔여과 크로마토그래피)을 사용하고 있다. 공지된 바와 같이, 오늘날 수천 개의 단백질을 동시에 분리하는 가장 효율적인 분리 방법은 이차원 전기영동(2-D PAGE)이며, 이 방법은 하기 단계들을 포함한다:

- <3> - 등전 초점집중(IEF, 일차원), 즉 등전위점에 따른 폴리아크릴아미드 매트릭스 상의 단백질 분리;
- <4> - 일정한 전하/질량 비의 단백질을 수득하게 하는 평형;
- <5> - 단백질을 분자량에 따라 분리하는 도데실황산나트륨(SDS PAGE, 이차원)에서 폴리아크릴아미드 매트릭스 상의 전기영동;
- <6> - 반점에 함유된 단백질을 가시화하는 겔의 착색;
- <7> - 얻어진 데이터의 검토;
- <8> - 반점의 샘플링.
- <9> 샘플링된 단백질을 이어서 질량 분광 분석 또는 다른 공지의 기술을 통해 확인한다.

<10> 이 기법의 상세한 설명이 미국특허번호 제4088561호에 기재되어 있다. 공정의 상태들의 보다 양호한 통합에 관한 추가적 진보 기술이, 보다 최근의 특허, JP 58193446, US 4874490, WO 0226773에 기재되어 있다.

<11> 이차원 전기영동은 단백질체 분석학의 연구분야의 기초를 이루고 있으며, 세포내 발현된 전체 단백질 군을 결정하는 것을 목표로 하는 과학이다. 목표로 하는 바는, 건강한 세포의 단백질 군을 병든 세포의 단백질 군과 비교하여, 후자에 대한 병상을 결정하고, 이에 따라 신규한 특효 치료제의 개발을 돕는 것이다.

<12> 이 기법은 생체 시료에 존재하는 다양한 다수의 성분들을 분리하는데 단점을 가지는 것으로 공지되어 있는 바이며, 특히 분리되는 혼합물에 소량으로 존재하는 성분들을 가시화하는데 한계가 있다. 단점은, 유사한 분자량(MW)과 등전위점(pI)을 갖지만, 상이한 상대 풍부도, 즉 검출가능한 양이 서로 매우 다른 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드의 존재로 인한 것이다. 이는 대다수 실험 시료를 확인할 수 있는 가능성이 적다는 것과 적절히 분리되지 않는 단일 반점들을 수동으로 분리하기에 어렵다는 것을 의미한다.

- <13> 또 다른 단점은, 단일 단백질이 다른 단백질로부터 적절히 분리되지 않을 때 단백질을 특성화하고 확인하기 어렵다는 것이며, 하나의 단일 단백질로 이루어지는 반점이 종종 유사한 특징들을 갖는 상이한 단백질로 형성되고 있는 것으로 여겨진다. 이 반점(당업자에 의해 공지된 기술, 예를 들면 질량 분광법으로 결정됨)의 특성화 및 확인은 실행 가능하지 않거나, 경우에 따라서는 더욱 다량으로 존재하는 단백질만을 확인할 수 있을 뿐이다.
- <14> 본 발명의 목적은 한정적이지는 않지만 주로 생체 분자, 특히 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드 성분의 분리에서 분해능을 크게 증가시킬 수 있도록 전술된 단점들을 극복하는 것이다.
- <15> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 정의된 바와 같이 향상된 분해능을 제공하고 공정 종료 시에 출발 시료로부터 단일 성분들을 더욱 실용적으로 추출하여, 궁극적으로 이 성분들을 더욱 빠르게 특성화할 수 있도록 확실히 하는 전기영동 기술을 제공하는 것이다.
- <16> 본 발명의 또 다른 목적은 출발 시료의 단일 성분을 더욱 정밀하게 확인할 수 있도록 특성화된 전기영동 기술을 제공하는 것이다.
- <17> 본 발명의 또 다른 목적은 재현 가능한 방식으로 경제적으로 또한 쉽게 사용할 수 있는 전기영동 기술을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 시료의 정제/농축의 예비단계를 최소화하여, 결과적으로 시료의 손실을 줄이는 전기영동 기술을 제공하는 것이다.
- <18> 상기 목적 및 다른 목적들은 생체 시료에 함유된 생체 분자, 특히 특정의 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 미리 정렬된 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드 성분들의 분리에 적용 가능한, 본 발명의 전기영동 기술에 의해 충족된다.

발명의 상세한 설명

- <27> [발명의 개요]
- <28> 본 발명자들이 달성한 경험들로부터, 기기의 관점에서 생체 시료를, 특히 유사한 특성들(예를 들면, 분자량 및/또는 등전위점)을 가지는 상이한 단백질 성분들로의 분리에서 분해능의 한계는 2-D PAGE의 전형인 평행 역선을 특징으로 하는 전기장의 인가에 모두 기인하는 것임이 인식되었다.
- <29> 본 발명은 특정의 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 매트릭스 A에 미리 정렬된 생체 시료의 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드 성분들을 매트릭스 B에서 이동시키고 분리시킬 수 있는 비평행 역선을 가지는 전기장을 사용하는 것을 특징으로 하는 이차원형 전기영동 기술이다.
- <30> 따라서, 본 발명의 목적은 하나 이상의 생체 시료에 함유된 생체 분자를 동시에 분리하기 위한 이차원 전기영동 방법으로서, 상기 생체 분자가 상기 생체 시료에 포함되어 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 정렬되어 있는 하나 이상의 제1 매트릭스로부터, 상기 생체 분자가 상호 분리되는 하나 이상의 제2 매트릭스로의 이동을 수행 하되, 상기 생체 분자의 이동과 분리 모두 비평행 역선을 가지는 전기장을 인가하여 유도해내는 단계를 적어도 포함하는 것을 특징으로 하는 방법이다.
- <31> 본 발명의 또 다른 목적은 하나 이상의 생체 시료에 함유된 생체 분자를 동시에 분리하기 위한 이차원 전기영동 장치로서, 상기 장치가 하나 이상의 제1 매트릭스 내에서 비평행 역선을 가지는 하나 이상의 전기장을 생성시키고, 상기 생체 분자는 상기 생체 시료에 포함되며 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 하나 이상의 제2 매트릭스에 제공하고, 상기 생체 분자를 분리시키고, 생성된 전기장이 상기 생체 분자를 상기 제1 매트릭스로부터 상기 제2 매트릭스로 이동시키는 수단이며 상기 생체 분자를 분리하는 수단인 것을 특징으로 하는 장치이다.
- <32> 바람직하게는 그것을 수행하는 방법 및 장치를, 유사한 화학적 및/또는 물리적 특성을 가지는 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드를 분리하는데 사용하며, 단백질 성질의 성분을 함유하는 생체 시료를 특성화하는데 사용한다.
- <33> [발명의 상세한 설명]
- <34> 본 발명의 목적인 전기영동 방법 및 장치의 목적 및 이점을, 본 발명의 필수적인 양태 및 가능한 실시양태를 기재하고 있는 하기 발명의 상세한 설명으로 더 잘 이해할 수 있을 것이다.
- <35> 생체 시료에 함유된 생체 분자를 동시에 분리하는 전기영동 방법은 적절한 지지체 상의 적당한 매트릭스에서 생체 분자, 특히 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드를 비평행 역선을 가지는 전기장을 인가하여 분리하는 단계를 포함하며 전기장의 역선을 적어도 두 전극으로 결정하는 장치에서 수행하는 실질적인 이차원 전기영동

방법이며, 전극의 적어도 하나는 양극이고 적어도 하나는 음극이다. 상기 역선은 실험할 생체 시료를 함유하는 제1매트릭스 A 및 생체 분자 성분, 특히 단백질 특징을 가지는 성분을 이동시키고 분리하는 제2매트릭스 B에서 전극의 적절한 형상 및/또는 매트릭스의 형태 및/또는 전극에 관한 배치 및/또는 전극과 매트릭스 사이에 함유되는 도전물질(전해 완충제)에 의해 결정한다.

- <36> 전기영동 전지내 바람직한 배치의 예를 제공하고 비평행 역선을 가지는 전기장을 얻기 위해 편티폼 전극 K(J에 반대로 하전)가 제공된 중앙에서 원주를 따라 평면에 전극 J를 제공할 수 있다.
- <37> 공지된 바와 같이 전기영동 전지내에는 전극에 의해 발생하는 전기장의 역선의 방향 및/또는 형상에 영향을 줄 수 있는 상이한 성분들(용기, 매트릭스, 전해 완충제 등)이 존재하므로, 구성요소를 재현 가능한 역선이 얻어지고 제공되는 생체 시료의 분리형태에 적응하는 방식으로 확인하고 배치할 필요가 있다.
- <38> 그러나, 전극들은 전극들 사이에 포함되는 평면영역에서 연속 또는 불연속 전기장을 실질적으로 생성시키는 방식으로 배치되며, 바람직하게는 전기장 자체의 극성, 다양한 지속시간 및 세기, 전기영동에 의해 분리되는 시료의 종류에 따라 발산 또는 수렴하는 비평행 역선을 가지는 전기장이 생성된다.
- <39> 생성시킨 전기장의 특성은 분리에 영향을 준다. 인가 전압은 조작자가 결정하는 인가 시간에 맞춰 선택하며 일반적으로 분리할 필요가 있는 시료의 종류에 따라 매트릭스의 차원 및 전극 사이의 거리를 기준으로 시스템의 전도도와 원하는 수준의 분리를 기준으로 하여 30 내지 600 V의 값이 된다.
- <40> 이차원 전기영동 분리를 얻기 위해서, 출발 생체 시료 또는 시료들을 단백질 재료의 전기영동에 대한 공지의 절차로 처리할 수 있다. 이런 경우, 처리할 생체 시료(들)를 비평행 역선을 가지는 전기장을 통해 전기영동 분리하기 전 예비적으로 및 경우에 따라 아래의 처리를 수행할 수 있다:
- <41> - 생체 분자 특히 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드를 제1 매트릭스에서 화학적 또는 물리적 특성을 기준으로 1차 분리하기 위한 처리;
- <42> - 생체 분자(단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드)를 일정한 전하/질량 비로 제공하기 위한 추가 처리.
- <43> 1 차원, 즉 매트릭스 A에서의 분리는 대역(zonal) 전기영동, 디스크 전기영동, 등속영동, 또는 양쪽성 가용성 완충제에서의 등전 초점집중, 또는 적절한 연속 또는 과립 비대류 매트릭스에서 고정된 pH 구배로 수행할 수 있다. 그러한 매트릭스는 폴리아크릴아미드, 아가로스, 아세트산염 겔, 가교결합된 텍스트라닐 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 1 차원 비대류 매트릭스는 종래의 플라스틱 지지체(예컨대, 겔 본드 PAG, 겔 본드 아가로스) 또는 전류 투과성 다공성 지지체(예컨대, 아세트산 셀룰로오스 시트, 나일론 메쉬, 섬유 유리 시트)에 의해 고정할 수 있다.
- <44> 본 발명의 목적인 이차원 전기영동에 사용 가능한 제2매트릭스는 대신 일정한 농도 또는 다공성 구배를 가지는 중합체일 수 있어, 연속 또는 불연속 완충제의 존재 하에 분자량을 기준으로 단백질/펩티드(고유조건에서 또는 변성제의 존재 하에서)의 분리를 최적화시킨다. 그러한 중합체는 예를 들면 아크릴아미드 및 비스아크릴아미드, 아가로스, 및/또는 아세트산 셀룰로오스의 혼합물일 수 있다.
- <45> 비평행 역선을 가지는 전기장이 생성되는 영역은 제1 매트릭스 A와 제2 매트릭스 B 사이의 틈새 간극으로 제3 매트릭스를 가할 수 있으며, 매트릭스 A와 B 사이에 연속성을 허용하여 매트릭스 A 내지 B의 시료의 이동을 가능하게 한다.
- <46> 또 다른 양태에서는 2차원 전기영동 전지에 적절히 삽입하는 제1 매트릭스 A는 제1 매트릭스 A에 매우 가까이 배치되는 제2 매트릭스 B의 원 위치에서의 비평행 역선, 직접 현장중합에 의해 얻어지는 제2 전기영동 매트릭스 B에 융합되어 틈새 간극을 제거한다.
- <47> 선택적으로는 시료(들)을 가열하여 예비적으로 열변성 키거나, 시료를 예를 들면 우레아, 티오우레아, 계면활성제, 및/또는 유기 용매, 또는 이들의 혼합물 등의 변성제로 처리하여 화학변성시키고/거나, 예를 들면 베타-머캅토에탄올, 디티오트레이톨, 또는 트리부틸포스핀 등의 환원제로 환원시킬 수 있다. 또 다르게는 변성 및/또는 환원에 이어서 시료(들)을 선택적으로 알킬화시킬 수 있다. 알킬화제는 예를 들면 요오도아세트아미드, 아크릴아미드, N-치환 아크릴아미드, 또는 비닐피리딘일 수 있다.
- <48> 따라서 본 발명의 이차원 전기영동은 아래의 단계들을 제공한다:
- <49> 1- 생체 시료의 제조;

- <50> 2- 제1 매트릭스 A에서의 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 시료의 생체 분자, 특히 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드 성분을 구하기 위한 제1분리;
- <51> 3- 매트릭스 A에 함유된 성분들을 전하를 기준으로 균일하게 하기 위한 매트릭스 A의 처리;
- <52> 4- 매트릭스 A를 적어도 전극과 적어도 제2 전극에 가깝게 배치되는 적어도 제2 매트릭스 B 사이에 배치시키는 방식으로의 매트릭스 A의 장치로의 삽입;
- <53> 5- 매트릭스가 제공되고 전기장이 유도되어 있는 전극들 사이에 포함된 영역에서의 전해 용액의 장치로의 투입;
- <54> 6- 추가 분리를 수행하기 위한 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 미리 정렬된 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드 성분의 이동에 적합한 비평행 역선을 가지는 전기장의 매트릭스 A 내지 B로의 인가.
- <55> 이차원 전기영동은 적어도 제1 매트릭스 A가 적어도 제1 전극에 가까이 있으며 적어도 제2 매트릭스 B가 제1 매트릭스 A와 적어도 제1 전극에 반대인 전하를 가지는 제2 전극 사이에 제공되는 순차적으로 배치되는 적어도 두 개의 매트릭스를 포함하는 영역에서 비평행 역선을 가지는 전기장을 인가하는 단계를 포함한다.
- <56> 이차원 전기영동을 종료하면, 단백질을 가시화하고 매트릭스 B로부터 샘플링할 수 있으며, 이들을 배열 및/또는 질량 분광분석 및/또는 당업자에게 공지된 다른 방법으로 분리 및 확인해 왔다.
- <57> 방법을 또한 생체 시료의 특성화에 사용할 수 있으며, 분리된 단백질을 농도분석, 방사능 사진촬영, 화학발광 또는 형광발광으로 가시화하거나 또는 확인을 위해 검사하기 전에 생체활성(예를 들면 항원-항체 반응 또는 효소도)으로 분석한다.
- <58> 따라서, 본 발명의 제1 측면에서는 특정의 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 정렬된 하나 이상의 생체 시료의 성분 특히 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드 성분으로의 분리를 전기영동 장치에서 수행하며, 전기영동 장치는 내부에 하기 요소들을 포함한다:
 - <59> - 비평행 역선을 가지는 전기장을 생성시키기에 적합한 적어도 두 전극;
 - <60> - 비평행 역선을 특징으로 하는 전기장을 생성시키는 전극들 사이에 적어도 영역을 포함하는 하나 이상의 평면으로서, 평면은 전극들 사이에 포함되는 영역에서 서로 가까이 배치되는 적어도 하나 이상의 매트릭스를 함유하기에 적합한 적어도 지지체를 포함하며, i) 하나 이상의 생체 시료로부터의 생체 분자 특히 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드 성분이 특정의 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 미리 정렬된 제1 매트릭스 A; 및 ii) 생체 시료로부터의 생체 분자를 제1 매트릭스 A로부터 이동시켜서 제1 매트릭스 A에서 수행된 분리에 대해 추가의 분리를 수행할 수 있도록 하는 제2 매트릭스 B에 있어서, 선택적으로 제1 매트릭스 A와 제2 매트릭스 B가 별도의 지지체에 배치될 수 있으며 매트릭스들의 지지체가 서로 다르더라도 지지체는 동일한 평면에 포함되고 전극에 대해 동일한 형태를 유지하며, 평면이 수평 하거나 수직일 수 있는 평면;
 - <61> - 적어도 장치의 일부이거나 또는 외부로 부착될 수 있는 전기장용 전원 공급부;
 - <62> - 적어도 선택적으로 소정의 일정한 온도에서 시스템을 유지시킬 수 있는 수단, 예를 들면 온도조절기. 온도조절기 대신에 장치를 온도조절대에 배치할 수 있음.
 - <63> 원하는 이차원 전기영동 분리를 얻기 위해서는 전기영동 매트릭스가 배치되는 영역을 포함하는 평면은 단백질 물질의 원하는 동시분리를 얻는데 필요한 원하는 비평행 역선을 가지는 전기장을 제조하는데 사용된다면 어떠한 형태도 가질 수 있으며, 예를 들면 원형 또는 다른 형태를 가질 수 있다.
 - <64> 가능한 실시양태에서는, 장치의 구조는 실질적으로 전기영동 원통형 전지이며 내부에 전극을 포함한다. 전지가 폐쇄되어 있을 때 전극이 배치되는 부분을 더욱 한정하며 전극들 사이에 포함되는 부분을 한정한다. 또한 그러한 전지는 전기적으로 비전도성으로 알려진 임의의 물질로 이루어질 수 있으므로, 안전을 위해서뿐만 아니라 적절한 전력공급에 의해 생성되며 전극들 사이에 포함되는 영역을 통과하는 전류를 누전시키거나 분산시키지 않는다. 그러한 물질은 예를 들면 폴리메틸아크릴레이트, 폴리카보네이트, 폴리프로필렌, 또는 폴리에틸렌 등의 중합체; 유리; 탄성체일 수 있다.
 - <65> 또한 전지는 전류를 전극에 연결시키는 전기 커넥터를 포함할 수 있다.
 - <66> 바람직한 실시예에서 전지는 비평행 역선을 가지는 전기장이 생성되는 상이한 영역들을 더 포함할 수 있다. 바람직하게는 전기장이 생성되는 영역은 생체 시료로부터 단백질 물질을 분리하는데 일반적으로 사용되는 종류의 적절한 지지체에 배치된 매트릭스이며, 상기 매트릭스는 예를 들면 폴리아크릴아미드의 혼합물로 구성될 수 있

으며 분리의 형태에 따라 다양한 밀도를 가질 수 있다. 이 경우 생체 분자를 상이한 생체 시료로부터 동시 분리할 수 있다.

- <67> 전극은 당업계의 숙련자에게 공지된 물질로 이루어지며 예를 들면 백금으로 코팅된 티타늄으로 이루어지나 전극으로 작용하기에 적절한 다른 물질을 포함하는 것을 배제하지 않는다. 양의 전극을 바람직하게는 음의 전극에 대해 동일 평면에 배치시킨다. 전기장이 생성될 전극들 사이에 배치되는 매트릭스는 동일한 전극들, 바람직하게는 동일 축을 가질 필요는 없는 전극들에 의해 한정된다. 대체적으로 전지는 실질적으로 원통형 또는 평행사변형 또는 목적에 적합한 다른 형태일 수 있다.
- <68> 또한, 비평행 역선을 가지는 전기장이 생성되는 매트릭스에 의해 형성되는 상이한 영역은 바람직하게는 수직으로 또는 오히려 나란하게 중첩되도록 배치될 수 있다. 전극을 배치하는 장치의 부분은 전극 및 비평행 역선을 가지는 전기장을 생성시키는 영역에 배치되는 매트릭스 사이에서 연속 전하이동을 허용하는 전해 용액에 담근다. 이로써 전위차의 작용하에 분리될 단백질 물질이 이동한다.
- <69> 전해 용액의 온도는 바람직하게는 일정한 소정온도에서 시스템을 유지시키기에 적합한 온도조절기로 조절한다.
- <70> 또한 장치는 자체 전원을 가질 수도 있거나, 외부 전원에 연결될 수도 있다.
- <71> 본 발명의 기술을 실행하는 양식은 바람직한 및 비예시적인 실시예의 일부 형태를 보여주는 첨부된 도면을 참고하여 하기의 상세한 설명에서 더욱 명백해 질 것이다.
- <72> 도 1은 원형 왕관 형태의 비평행 및 발산 역선을 가지는 전기장이 방사상 확산에서 전기적으로 상이한 두 전극에 의해 생기는 영역을 개략적으로 나타내는 것으로서, (1)은 하나 이상의 전극이 배치되는 전기장의 외부이고, (2)는 제1 전극과 다른 전하를 가지는 하나 이상의 제2 전극이 배치되는 전기장의 내부이며, (3)은 전기장에 의해 생성되는 역선을 나타내고, 및 (4)는 전기장 자체이며;
- <73> 도 2는 원형 형태의 비평행 역선을 가지는 전기장이 방사상 확산에서 적어도 두 전극에 의해 생기는 영역을 개략적으로 나타내는 것으로서, (1), (2), (3), 및 (4)는 도1에서와 동일한 의미를 가지며;
- <74> 도 3은 비평행 역선을 가지는 전기장이 실시예의 대체형태에 따라 두 개를 초과하는 전극에 의해 생기는 영역을 개략적으로 나타내는 것으로서, (1)은 동일한 전하를 가지는 전극이 배치되는 전기장의 부분이며, (2)는 서로 동일하지만 (1)과는 다른 전하를 가지는 전극이 배치되는 전기장의 부분이며, (3)은 전기장에 의해 생성되는 역선을 나타내며, 및 (4)는 전기장 자체이다.
- <75> 따라서 도시된 도면을 참조하면 본 발명이 목적으로 하는 전기영동법을 수행하는데 사용되는 장치는 하나 이상의 전극 예를 들면 음극(2) 및 하나 이상의 제2 전극, 예를 들면 양극(1)에 연결되는 전원에 의해 얻어지는 비평행 역선(3)을 특징으로 하는 하나 이상의 전기장(4)을 포함한다.
- <76> 도 4는 생체 분자 특히 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 미리 정렬된 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드를 전원에 연결된 상이한 적어도 두 전극(1) 및 (2)에 의해 방사상 확산에서 비평행 역선을 가지는 전기장을 통해 분리하는데 사용되는 온도 조절장치를 개략적으로 나타내며, 특히 도 4는 리드(8) 및 지지 기재(7)에 의해 말단에 한정되는 원통형 구조물을 나타내는 것으로, 이는
- <77> 냉각액;
- <78> 냉각 효과를 확산시키는 팬(11);
- <79> 온도조절기로 냉각액을 교환하는 홀(9);
- <80> 팬(11)의 작동을 지지하는 전원(10)
- <81> 을 포함한다.
- <82> 장치는 예를 들면 생체 시료의 분리를 위한 영역을 내부에 포함한다. 각 영역에서는 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 정렬된 생체 시료가 배치될 수 있는 전극(2) 주위에 매트릭스 A(13)를 배치하고, 매트릭스 B(14)를 비평행 역선을 가지는 전기장의 작용으로 인해 매트릭스 A(13)으로부터의 생체 시료의 이동을 결정하는데 적합하며 전극(1) 및 매트릭스 A(13)에 의해 한정되는 영역에서 자체 지지체(15)에 배치하고, 이어서 성분들로 분리해 낸다.
- <83> 또한 본 발명의 범주를 벗어나지 않은 채, 팬(11), 온도조절기로 냉각액을 교환하는 홀(9), 및 팬(11)의 전원

(10)을 기재 외의 전기영동 전지의 부분에 배치시킬 수 있다.

<84> 예를 제공하기 위해서 본 발명의 방법에 따른 생체 시료용 전기영동 분석을 종래의 이차원 전기영동과 비교하여 기재한다.

실시예

- <85> 섬유아세포 단백질의 전기영동 분리의 실시예
- <86> 배양된 사람의 섬유아세포로부터 수득되고 8 M 우레아, 4% CHAPS, 2% IPG 완충액(pH 4-7), 60 mM 디티오프레이트(DTT)을 함유하는 증류수 용액에 용해시킨 단백질 시료를 사용하였다.
- <87> 두 기술에서 단백질 시료를 고정된 pH(본 실시예에서는, pH 4-7의 분리 범위)의 구배를 가지는 폴리아크릴아미드의 혼합물에 삽입하고, 이어서 등전 초점집중을 이용하여 등전위점을 기준으로 하여 성분들로 분리하였다. 그 후 시료를 평형 완충제로 처리하여 상기한 성분들의 일정한 전하/질량 비를 최적화하였다.
- <88> 평형 완충제의 조성:
- <89> 50 mM 트리스 HCl(pH 8.8), 6 M 우레아, 30% 글리세롤, 2% SDS, 0.002% 브로모페놀 블루 (w/v).
- <90> 종래의 이차원 전기영동에서는 제1매트릭스에 함유되는 시료를 평행 역선을 특징으로 하는 전기장을 인가하여 직사각형 제2 폴리아크릴아미드 매트릭스로 이동시켜 실험 시료의 성분들을 분자량의 함수로서 추가로 분리하는 SDS-PAGE를 수행하였다.
- <91> 본 발명의 방법에 따르면 등전위점을 기준으로 분리되고 평형을 유지하는 시료의 성분들을 함유하는 제1 매트릭스를 분자량의 함수로서 SDS-PAGE를 수행하도록 된 원형 왕관형태의 제2 폴리아크릴아미드 매트릭스에서 원형화시키고 실험 시료의 성분들을 추가로 분리하는 원형 왕관형태의 전기장에 배치시켰다.
- <92> 두 실험 모두에서 제2 매트릭스의 특징은 아래와 같았다.
- <93> - 조성: 10% 아크릴아미드, 0.4% N,N'-메틸렌비스아크릴아미드, 1% 도데실황산나트륨, 40 mM 트리스-HCl(pH 8.8), 0.5% 과황산암모늄.
- <94> 두 실험 모두에서 SDS-PAGE의 종료 시에 매트릭스와 매트릭스에 함유된 시료를 아래의 단계들을 수행하였다:
- <95> (i) 실온에서 4 시간 동안 쿠마시 블루 착색제로 착색함; 및
- <96> (ii) 실온에서 24 시간 동안 메탄올 및 아세트산을 함유하는 수용액으로 탈색함.
- <97> 마지막으로 이미지의 디지털 획득을 전동 스캐너를 이용하여 수행한다.
- <98> 종래의 방법 및 본 발명의 방법을 이용한 전기영동 공정들 사이의 브로모페놀 블루 추적자의 존재로 인한 차이를 도 5 및 6에 각각 도시한다. 도 5에서 화살표는 전기영동 방향을 나타낸다. 도 6에서는 전기영동의 종료시점에서의 추적자를 도시하고 있다. 도 7 및 8에서는 종래의 방법(도 7) 및 본 발명의 방법(도 8)을 이용하여 수행되는 일군의 단백질 반점의 공정들 사이의 차이점을 도시하고 있으며, 반점들 사이의 상대적 거리가 방사상 분리 동안 증가한다는 점에서 분해능이 향상된다. 방사상 분리가 아닌 경우에는 도 8에 도시된 반점들을 하기도표에서와 같이 상호로부터 명료히 구별해낼 수 없을 것이다.
- <99> 본 발명이 일부 실시양태의 형태로 설명되었으나 발명을 예시하기 위해 제시되었을 뿐 발명을 한정하는 것은 아니며, 상기한 설명의 견지에서 수많은 변형 및 개량이 당업자에게 명백한 것으로 보인다. 본 발명은 첨부되는 특허청구범위의 범위에 속하는 모든 변형 및 개량을 포함한다.

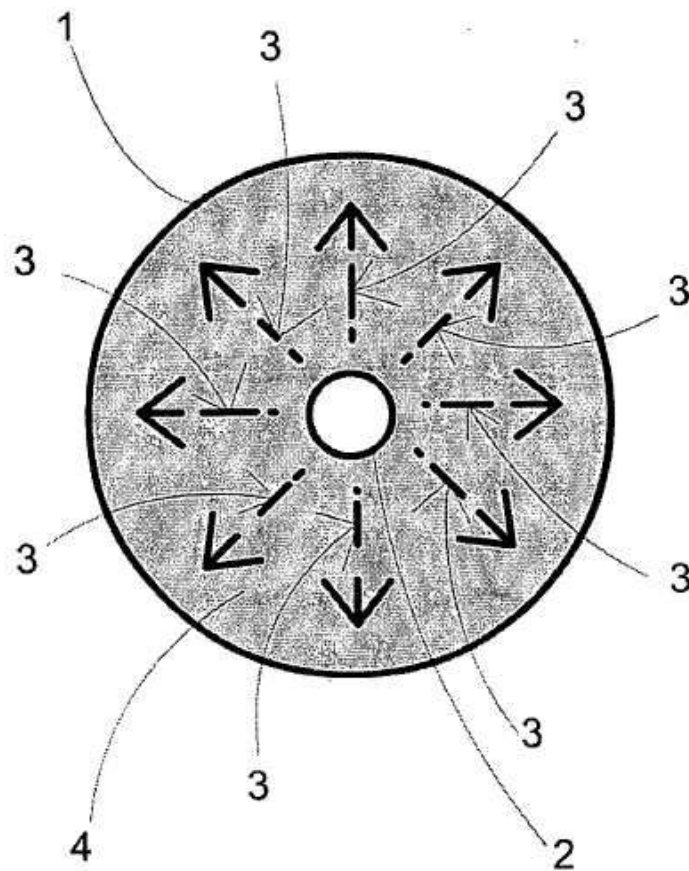
도면의 간단한 설명

- <19> 도 1은 두 전극에 의해 발생하는 방사상 확산을 가지는 전기장의 예를 개략적으로 나타낸다.
- <20> 도 2는 두 전극에 의해 발생하는 방사상 확산을 가지는 원형 형태의 전기장의 예를 개략적으로 나타낸다.
- <21> 도 3은 2개 초과 전극에 의해 발생하는 비평행 역선을 가지는 전기장의 예를 개략적으로 나타낸다.
- <22> 도 4는 특정의 화학적 및/또는 물리적 특성에 따라 정렬된 생체 분자 특히 단백질 및/또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드의 분리를, 방사상 확산에서 비평행 역선을 가지는 전기장을 이용하여 수행하기에 적합한 장치의 한 가능한 실시양태를 개략적으로 나타낸다.

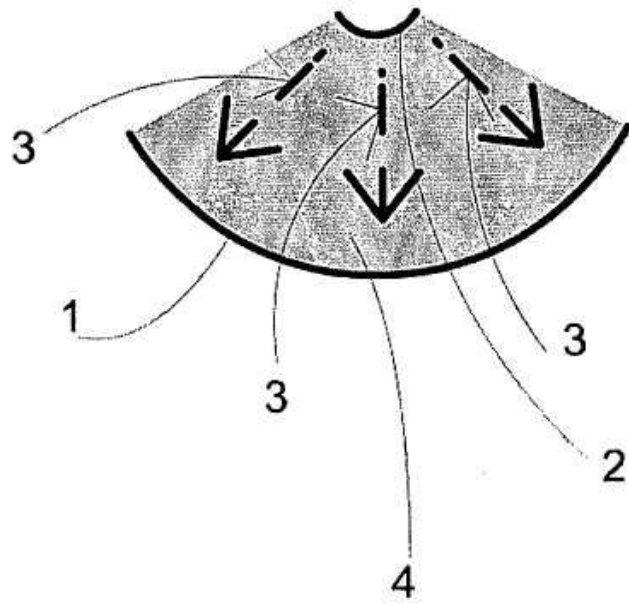
- <23> 도 5는 종래의 이차원 전기영동에 의해 분리된 섬유아세포 단백질의 브로모페놀 블루로 확인된 연속 프런트 (running front)이다.
- <24> 도 6은 본 발명에 따른 이차원 전기영동에 의해 분리된 섬유아세포 단백질의 브로모페놀 블루로 확인된 연속 프런트이다.
- <25> 도 7은 종래의 이차원 전기영동에 의해 분리된 섬유아세포 단백질의 분자량을 기준으로 하는 분리의 이미지이다.
- <26> 도 8은 본 발명에 따른 이차원 전기영동에 의해 분리된 섬유아세포 단백질의 분자량을 기준으로 하는 분리의 이미지이다.

도면

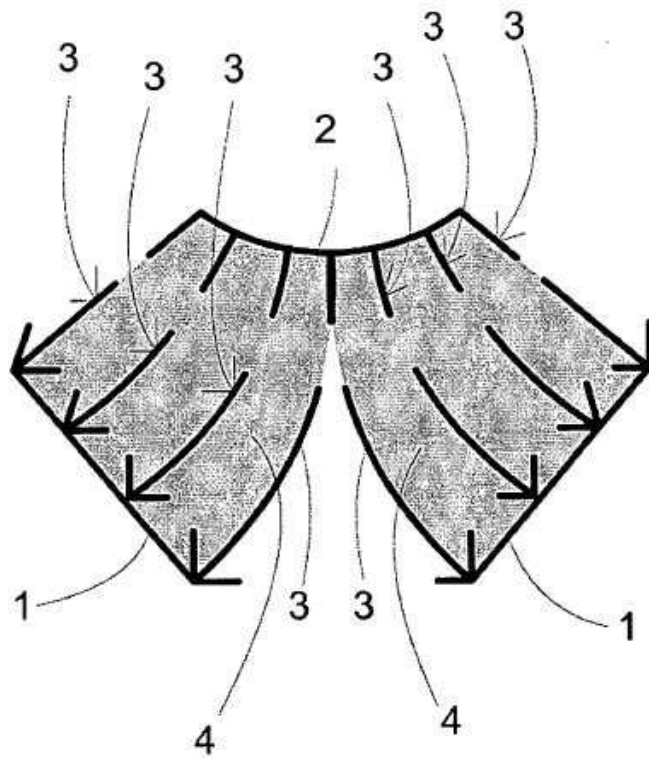
도면1



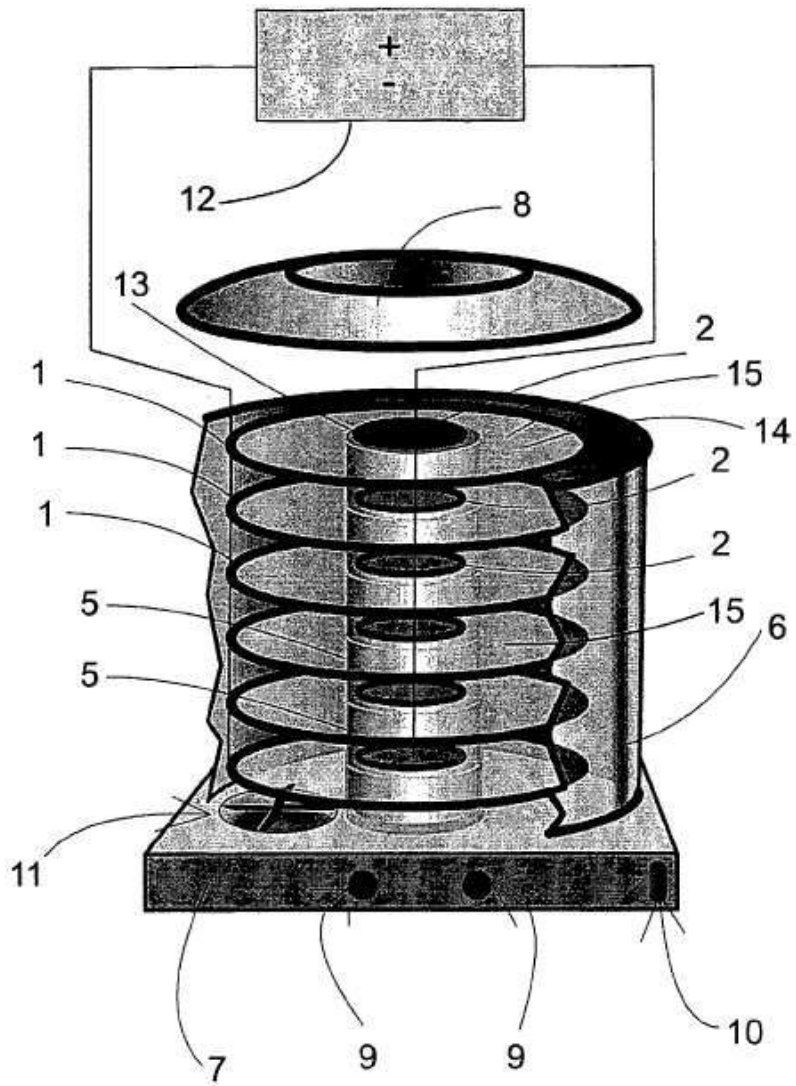
도면2



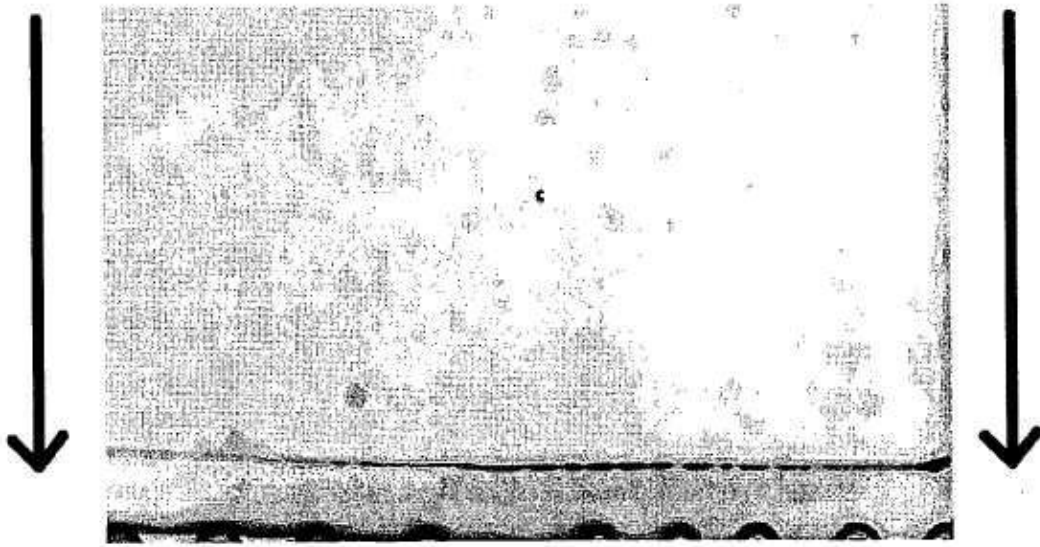
도면3



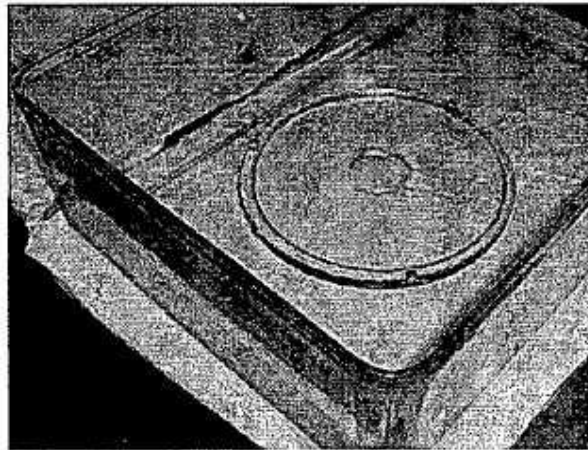
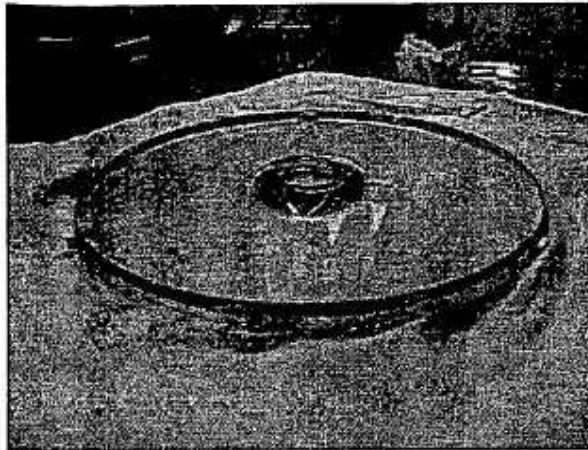
도면4



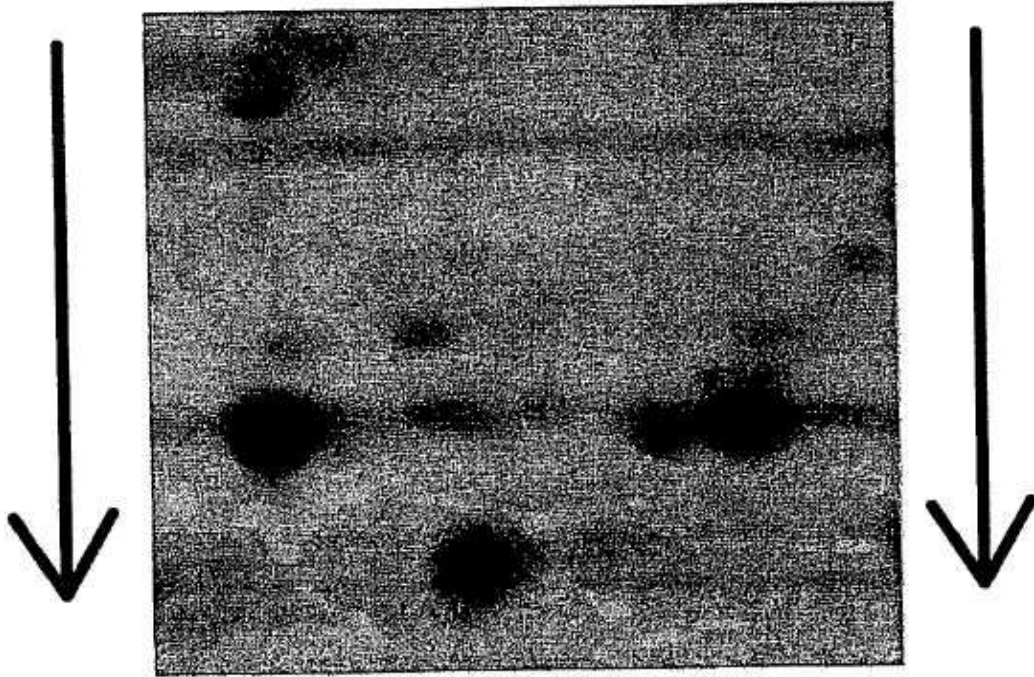
도면5



도면6



도면7



도면8

