(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0088890
(43) 공개일자 2012년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0108283
(22) 출원일자 2010년11월02일
심사청구일자 2012년05월07일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
정태성
경상남도 진주시 진양호로239번길 13, 하우스토리 203동 202호 (평거동)
노성원
경상남도 진주시 가좌동 1898번지 104호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

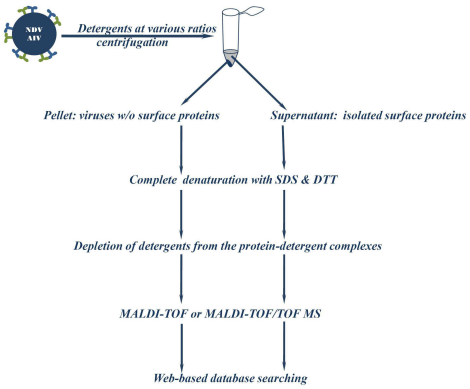
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **질량분석기를 이용한 바이러스 분석 및 동정 방법**

(57) 요 약

본 발명은 (i) 시료를 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액으로 처리하여 시료 내 바이러스를 용균시키는 단계; (ii) 상기 용균된 시료를 원심분리하는 분석 전 분리(prefractionation) 단계; 및 (iii) 상기 원심분리된 용해액의 가용성 부분과 비가용성 부분 내 포함된 펩타이드의 질량을 별도로 분석하는 단계를 포함하는, 바이러스 분석 및 동정 방법 및 상기 방법에 이용될 수 있는 바이러스 진단 시스템에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

장호빈

경상남도 진주시 가좌안골길21번길 5, 풍경채 아파트 105동 905호 (가좌동)

차인석

경상남도 진주시 금산면 중천로 82, 109동 1606호 (금산아이파크)

박성빈

경상남도 양산시 번영로 441, 2동 409호 (소주동, 세신아파트)

김영림

경상남도 진주시 강남로167번길 14, 402호 (칠암동)

하미애

경상남도 사천시 사천읍 구암두문로 254-9, 105동 1404호 (원광 이안애 아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0083914

부처명 교육과학기술부

연구사업명 핵심연구지원(협동연구)

연구과제명 In-solution digestion & In-silico digestion program과 결합한 Mass Spectrometry를 이용한 virus 진단 방법 개발, AI 및 ND virus 비교 및 적용

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2008.09.01 ~ 2011.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 시료를 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액(lysis buffer)으로 처리하여 용해(lysis)시키는 단계;

(b) 상기 용해된 시료를 프로테아제로 처리하여, 시료 내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계;

(c) 상기 절단된 펩타이드가 포함된 시료를 원심분리하여 가용성 부분과 비가용성 부분으로 분리(prefractionation)한 후 계면활성제를 제거하는 단계;

(d) 상기 원심분리된 용해액의 가용성 부분 및 비가용성 부분에 포함된 펩타이드의 질량을, 상기 (b) 단계의 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된 공지의 펩타이드의 질량과 비교하여, 상기 시료 내 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계;를 포함하는, 바이러스 분석 및 동정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는 시료로부터 미생물을 분리하여 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액으로 처리하여 용해시키는 단계인 것을 특징으로 하는, 바이러스 분석 및 동정 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 계면활성제는 NP-40S, OG, TX-100 및 SDS(sodium dodecyl sulfate)로부터 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 바이러스 분석 및 동정 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (c)단계에서 계면활성제의 제거는 우레아(urea) 또는 아미콘울트라튜브(AmiconUltra tube)를 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는, 바이러스 분석 및 동정 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계는 프로테아제로 절단된, 공지의 단백질에 특이적으로 존재하는 펩타이드 질량의 세트와 매칭되는, 시료 내 펩타이드의 질량 세트의 존재 여부를 확인함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는, 바이러스 분석 및 동정 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 바이러스는 조류 바이러스 또는 뉴캣슬병 바이러스인 것을 특징으로 하는, 바이러스 분석 및 동정 방법.

청구항 7

(1) 바이러스 단백질로부터 유래된 펩타이드 질량 정보를 저장하고 있는 데이터베이스;

(2) 시료 내 펩타이드의 질량을 측정하는 질량 측정 장치; 및

(3) 시료 내 가용성 부분과 비가용성 부분을 분리한 후 측정된 시료 펩타이드의 질량 정보와 상기 데이터베이스의 펩타이드 질량 정보를 각각 대비하여, 상기 시료 펩타이드의 바이러스 단백질 정보와 매칭되는 정보의 필터링을 수행하여 측정된 시료 펩타이드의 유래 정보를 확인하는 바이러스 단백질 매칭 필터링부;를 포함하는 바이러스 진단 시스템.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 (i) 시료를 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액으로 처리하여 시료 내 바이러스를 용균시키는 단계; (ii) 상기 용균된 시료를 원심분리하는 분석 전 분리(prefractionation) 단계; 및 (iii) 상기 원심분리된 용해액의 가용성 부분과 비가용성 부분 내 포함된 펩타이드의 질량을 별도로 분석하는 단계를 포함하는, 바이러

스 분석 및 동정 방법 및 상기 방법에 이용될 수 있는 바이러스 진단 시스템에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이러스는 DNA 또는 RNA로 이루어진 유전 물질과 단백질로 이루어진 감염체를 말한다. 크기는 종류에 따라 다르지만, 보통 10~1000nm 사이이다. 스스로 신진대사를 할 수 없기 때문에 자신의 DNA 또는 RNA를 세균, 동, 식물과 같은 숙주 세포 안에 침투시킨 후 숙주 세포의 소기관을 이용하여 이들을 복제하고, 자신과 같은 바이러스들을 생산하며 이로 인해 대개 숙주 세포는 파괴된다.

[0003] 일부 바이러스는 숙주에 감염된 경우 바이러스의 종류, 숙주의 면역 상태 등에 따라 질병을 일으키지 않기도 있지만, 일부 바이러스는 급속하게 복제 및 전파되어 숙주를 사망에 이르게 하거나, 경제적으로 막대한 피해를 유발하기도 한다. 문명이 발달함에 따라 1950년대 이후 새롭게 등장한 주요 전염병만 해도 20여개에 달할 정도로 신종 전염병이 득세하고 있고 전염병을 전달하는 매개통로도 점점 다양해지고 지역, 국가 간의 교류확대로 이전보다 더 빠르고 은밀하게 변이하면서 퍼지고 있다. 최근 국 ? 내외적으로 인수 공통 측면에서 커다란 위험 요소가 되고 있는 조류 인플루엔자(Avian Influenza, AI)의 고병원성을 나타내는 H5N1의 경우, 2003년 이후 중국, 태국, 베트남, 인도네시아 등 14개국에서 330명이 감염되어 240명이 사망한 매우 높은 치사율을 나타내었다. 이들 바이러스에 의한 질병에 대하여 즉각적인 치료와 예방 대책을 수립하기 위해서는 매우 신속하고 정확한 진단이 요구된다. 그러나, 이들 질병들을 적절하게 감별진단할 수 있는 진단법이 만족스럽지 않아 경제적으로 막대한 손실을 초래하고 있는 실정이다.

[0004] 현재 바이러스를 진단하는 방법으로는 바이러스 자체, 바이러스의 단백질 및 핵산을 검출하는 진단법으로 종란 접종법, 면역크로마토그래피법 등이 이용되고 있다. 즉, 종란 접종법의 경우 검출의 민감도는 높으나 바이러스를 확인하기 위해서는 2~5일의 실험기간이 필요하고, 면역크로마토그래피를 이용한 진단법은 단시간에 바이러스 단백질을 확인할 수 있으나, 검출 민감도가 낮다는 단점이 있어 간이 진단에는 이용할 수 있으나, 정밀 진단용으로는 부적합하다. 또한, 혈청 검사방법으로 혈구응집억제반응(Haemagglutination inhibition (HI) teat), ELISA 반응 등이 이용되고 있으나, 이들 진단법은 병원성을 확인하기 위하여 추가적인 실험이 필요하다.

[0005] 종래에 사용되던 질병 진단방법의 일례로는, 미생물 자체, 미생물이 면역시스템에 의하여 인식되어 반응하여 나타나는 항체의 유무를 조사하는 혈청 검사방법, 미생물 및 항체를 검사하는 면역크로마토그래피법, 핵산을 검출하는 유전자 진단법 등이 이용되고 있다. 면역크로마토그래피를 이용한 진단법은 단시간에 미생물 단백질을 확인할 수 있으나, 검출 민감도가 낮다는 단점이 있어 간이 진단에는 이용할 수 있으나, 정밀 진단용으로는 부적합하며, 또한, 혈청 검사방법으로 혈구응집억제반응(Haemagglutination inhibition (HI) teat), ELISA 반응 등이 이용되고 있으나, 이들 진단법은 병원성을 확인하기 위하여 추가적인 실험이 필요하다. 또한, 널리 사용하고는 있는 진단법인, 각각의 미생물의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 사용하여 중합반응이 일어나는지의 여부로 미생물 유전자의 존재 여부를 결정하는 RT-PCR의 경우, 피검체의 분변이나 장기로부터 추출한 시료 내에 존재하는 폴리사카라이드, 염과 같은 오염물질 및 시료 내에 저/고 병원성 미생물이 공존함에 따라 가음성(false negative) 결과가 나타날 수 있다. 또한 RT-PCR에 사용하는 프라이머에 따라 병원성/비병원성 균주의 감별이 어렵다. 게다가, 이러한 진단법은 사전에 병력청취, 혈액학적인 분석 및 의심질병에 대한 사전조사 등의 과정이 선행되어져야 하고, 이에 이어서 특정한 실험실 분석 후 진단이 이루어지는 것이 일반적이기에, 질병에 대한 신속한 조치가 불가능했고 시간적으로나 비용적인 면에서 손실이 불가피하다는 문제점이 있다.

[0006] 따라서, 본 발명자는 이러한 문제점을 해결하기 위해 특허출원 제10-2008-0131470호에서 바이러스의 진단방법으로서 바이러스를 포함한 시료를 그대로 용균하고 프로테아제 처리한 후 시료내 펩타이드의 질량을 질량 분석기로 측정한 다음 이렇게 측정된 펩타이드의 질량과 공지된 바이러스 단백질로부터 유래된 펩타이드의 질량을 비교하는 방법을 제안한 바 있다.

[0007] 그러나 상기 질량 분석을 기반을 한 바이러스 진단 방법은 신속하고 비교적 정확한 결과를 얻을 수 있는 장점에도 불구하고, 반드시 추가적인 통계학적 분석이 선행되어야 한다는 단점이 있다. 즉, 상대적으로 많은 단백질로 이루어진 바이러스(SIN 바이러스, AIV 등)에 상기 방법들을 적용할 경우 발생하는 용균은 바이러스의 구조적/비구조적 단백의 공존을 유도하게 되고 이는 질량 분석 결과에서 여러 단백에서 유래한 펩타이드의 공존 즉, 복잡한 MALDI-MS 결과가 나타나게 한다. 결과적으로 이는 웹을 기반으로 한 단백 분석 프로그램과는 다른 분해된 펩타이드의 질량값에 대한 정보 구축과 그것에 통계학적 개념을 추가한 새로운 통계학적 알고리즘의 필요를 야기하게 되는 문제점이 있다.

[0008] 뿐만 아니라, 상기 방법에 의할 때는 일반적으로 하나 혹은 두 개의 단백에 대한 동정만이 가능하여 여러 개의

단백에서 유래한 펩타이드들의 공존은 상기 프로그램의 사용을 불가능하게 하거나 위양성 혹은 위음성의 결과를 도출할 수 있다. 이러한 펩타이드 공존의 문제 외에도 기존의 용액상 효소 분해법과 비효소 분해법(이하, 직접적인 용액상 분해법)을 조류 인플루엔자 바이러스에 적용할 경우, 상기 바이러스의 단백질 간 구성비의 차이에 의한 이온 저해 효과로 질량 분석 결과 나타나는 스펙트라의 수, 상대적 강도가 영향을 받을 수 있으며, 이는 결국 재연성의 문제를 야기시킨다.

[0009] 따라서, 지문 분석법에 의한 최대한 정확하고 신속한 동정 효과를 위해선 가능한 많은 펩타이드의 생성과 높은 질량 정확도가 수반될 수 있으며 이온 저해 효과를 극복하여 재연성을 확보할 수 있는 새로운 바이러스 분석 및 검출 방법이 필요하다.

[0010] 이에, 본 발명자는 계면 활성제를 바탕으로 한 바이러스의 용균과 그것의 분별 원심으로 이루어진 분석 전 분리를 통하여 바이러스를 가용성 표면 단백질 부분과 그것을 제외한 비가용성 바이러스 물질로 분리한 후 이들에 대해 웹을 기반으로 한 단백질을 동정한 결과 바이러스의 아류형에 대한 동정까지 수 시간 내에 정확하게 분석 및 검출할 수 있었으며, 이온 저해 현상과 겹침 현상을 극복할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 (i) 시료를 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액으로 처리하여 시료 내 바이러스를 용균시키는 단계; (ii) 상기 용균된 시료를 원심분리하는 분석 전 분리(prefractionation) 단계; 및 (iii) 상기 원심분리된 용해액의 가용성 부분과 비가용성 부분 내 포함된 펩타이드의 질량을 별도로 분석하는 단계를 포함하는, 바이러스 분석 및 동정 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 이용될 수 있는 바이러스 진단 시스템을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (i) 시료를 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액으로 처리하여 시료 내 바이러스를 용균시키는 단계; (ii) 상기 용균된 시료를 원심분리하는 분석 전 분리(prefractionation) 단계; 및 (iii) 상기 원심분리된 용해액의 가용성 부분과 비가용성 부분 내 포함된 펩타이드의 질량을 별도로 분석하는 단계를 포함하는, 바이러스 분석 및 동정 방법을 제공한다. 이하 각 단계 별로 구체적으로 기술한다.

[0014] (i) 시료를 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액으로 처리하여 시료 내 바이러스를 용균시키는 단계

[0015] 본 발명에서 '시료'는 단백질이 함유된 모든 시료를 말하는 것으로 바이러스, 미생물, 세포, 동물 또는 식물의 조직, 동물 또는 식물의 기관, 이들의 체액 등이 포함되며, 이러한 시료의 일례로, 질병의 진단시 비장과 같은 면역기관과 그 외 체액성분, 조직 등과 같이 다양한 샘플이 될 수 있으며, 특정 질병 조직, 바이오마커를 지닌 조직, 병원성 미생물 호발 부위 시료 (예, 혈액, 조직, 객담, 뇨, 분변 등), 세포배양을 통해 증식된 시료 또는 자연계의 시료를 모두 포함하는 것일 수 있다. 상기 시료는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수득할 수 있다. 채취한 시료는 균질화(homogenation) 및 계단 희석(serial dilution) 과정을 거치는 것이 바람직하다.

[0016] 이렇게 수득된 시료에 분석하고자 하는 단백질 외에 많은 불순물이 포함되어 있는 경우, 이들을 제거하기 위하여 시료로부터 불순물을 분리하는 단계를 추가로 진행될 수 있다. 시료로부터 분석하고자 하는 단백질을 분리할 수 있다면 당업계에 공지된 어떠한 방법이든지 이용 가능하다. 한 양태로서, 다양한 적은 펩타이드를 흡착할 수 있는 항체, 레진 또는 비드를 이용하는 방법을 채택할 수 있다. 그러한 방법의 구체적인 예로는 면역자기분리법(Immuno-Magnetic Separation, IMS)에 의한 바이러스 입자 분리 , 근년에 나온 Monolithic column (CIM: convective interaction media®)의 Ionic exchange (이온 교환 크로마토그래피) 즉, 양이온성 (cationic) 혹은 음이온성 (anionic) 크로마토그래피를 이용한 바이러스 입자 분리, 혹은 항체를 결합한 Monolithic column을 이용한 바이러스 입자 분리를 채택할 수 있다.

[0017] 시료를 그대로 사용할 수도 있고 또는 완충용액으로 처리하거나, 소니케이터, 열처리 등을 할 수 있지만 이에

한정되는 것은 아니다. 본 발명에서의 완충용액은 당업계에서 통상적으로 단백질 분리를 용이하게 하거나 불순물을 제거하기 위해 사용되는 것으로 완충용액의 종류는 특별히 한정되는 것은 아니나, 일례로, NP-40S, OG, NaCl, Tris-Cl, Triton X-100, SDS 또는 DTT (DL-Dithiothreitol)을 포함하는 완충용액을 사용할 수 있다. 바람직하게, (i) 단계의 계면활성제는 NP-40S, OG, TX-100 및 SDS(sodium dodecyl sulfate)로부터 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것일 수 있다.

[0018] 상기 NP-40S 는 하기 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계의 적용을 용이하게 하기 위한 샘플처리 단계에 사용이 적합한 계면활성제이며, NaCl은 효소나 세포활성에 맞도록 이온의 세기를 맞춰주는 역할을 하고, Tris-Cl은 약산, 약염기가 들어 왔을 때 pH가 변하지 않도록 해주는 역할을 할 수 있다. SDS(sodium dodecyl sulfate)은 세포막의 지질분자를 제거하고 단백질 변성에 의한 미생물의 용해(lysis)를 촉진시킬 수 있는데, SDS사용 일례로, 미생물의 경우 2 내지 4% SDS를 사용할 수 있으며, 조직의 경우 4% SDS를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. Triton-100은 비이온성 계면활성제로서 세포 멤브레인의 투과성을 높이는 역할을 할 수 있으며, DTT는 3차원 단백질 구조에서 디설파이드 결합을 절단하는 역할을 하여 3차원 구조에 의한 효소 등의 접근의 어려움을 완화시킬 수 있다. 완충용액에는 시료에 포함되어 있는 프로테아제의 작용을 억제시키는 목적으로 프로테아제 제어제 혹은 EDTA를 첨가할 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 (i) 단계는 (a) 시료를 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액(lysis buffer)으로 처리하여 용해(lysis)시키는 단계; 및 (b) 상기 용해된 시료를 특정 프로테아제로 처리하여, 시료 내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 상기 (i) 단계는 시료로부터 미생물을 분리하여 계면활성제를 함유한 용해용 완충용액으로 처리하여 용해시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명에서 상기 (a) 단계 후에 바로 (b) 단계를 실시할 수도 있지만, 이 두 단계 사이에 시료 완충용액을 여과하는 단계를 추가할 수도 있다. 이에 의하여 상기 완충용액의 구성성분 등을 제거하고 질량 측정 장치에 의한 분석을 용이한 단백질을 수득할 수 있다.

[0021] 알려진 바와 같이 프로테아제(protease)는 단백질을 펩타이드로 분해한다. 이 단계에서는 마이크로파 조사를 동반하는 것이 바람직하다. 마이크로파에 의해 발생하는 파장과 높은 온도는 단백질간 분자간 충돌을 유발하여 프로테아제에 의한 시료내 단백질의 절단이 용이하게 되며, 이 과정에서 나타날 수 있는 단백질의 집합, 즉 단백질의 재결합을 억제함으로써 단백질 절단에 소요되는 시간을 단축시킬 수 있다. 또한, 마이크로파에 의해 단축된 반응 시간은 단백질의 3차원 구조를 풀어줌으로써 단백질 분해 효소의 단백질 작용 부위로의 접근성을 용이하게 하기 위해 처리한 화합물(예, DTT)과 그것에 의해 잘려진 디설파이드 결합의 재결합을 막기 위해 수행하여야 했던 알킬레이션(alkylation) 과정을 불필요하게 하여 반응 시간을 단축시킬 수 있다.

[0022] (ii) 상기 용균된 시료를 원심분리하는 분석 전 분리(prefractionation) 단계

[0023] 종래 용액상 효소 분해법과 비효소 분해법(효소를 이용하지 않음)은 단백질의 동정을 매우 용이하게 해줄 수 있다는 장점으로 바이러스의 동정을 위한 MALDI 방법의 질량 분석에 있어 주요한 방법으로 사용되었다. 또한 최근 인플루엔자 바이러스 (이하 AIV)의 대유행과 함께, 용액상 단백질 분해법은 AIV를 이루는 몇몇 단백 분석에 초점을 둔 유형과 아류형의 질량 분석에서도 이용되었다. 하지만 이와 같이 다양한 바이러스의 질량 분석을 통한 동정에 사용되었던 상기 용액상 단백질 분해법은 myxovirus와 같은 표면 단백 (당단백)의 동정에서는 다음과 같은 한계를 지니고 있다. 즉, 바이러스를 이루고 있는 단백 간 구성비 차이는 상대적으로 높은 구성비를 가지는 구조적 단백 (상대적으로 높은 구성비)에 의해 유형과 아류형을 밝히기 위해 중요한 의미를 지니는 표면 단백 (상대적으로 적게 분포)의 이온 저해 효과를 일으켜 질량 분석상에서의 검출을 어렵게 하였고 이는 결국 재연성의 문제를 야기시키게 되었다. 또한, 구조적/ 비구조적 단백으로부터 유래한 펩타이드들이 공존하는 하나의 결과에서 정확한 바이러스의 동정을 위한 타겟이 되는 단백 (표면 단백)에 관한 펩타이드를 찾기 위해서는 복잡한 통계학적 분석이 반드시 병행되어야 한다는 단점을 지니고 있었다.

[0024] 따라서 본 발명은 상기와 같은 단점을 극복하기 위해 분별 원심과 계면 활성제 (용액상)를 적용한 바이러스의 분석 전 분리(prefractionation) 단계를 통해 온전한 바이러스 (intact virus)로부터 가용성 바이러스 표면 단백을 분리하였으며 이는 결국 일반적으로 사용되고 있는 웹상에서의 분석 프로그램과 In-house 단백 분석 프로그램의 적용을 가능케 하였다.

[0025] 최근 MALDI를 이용한 질량 분석-MALDI-MS-은 짧은 시간 안에 높은 정확도의 분석이 가능하다는 장점으로 인해

바이러스의 진단에 있어 강력한 방법 중 하나로 새로이 인정받고 있다. 이러한 방법에 의해 단백질 분석은 수초 안에 가능하게 된다. 이러한 질량 분석을 기반으로 한 바이러스 진단 방법은 계면 활성제를 바탕으로 한 용균, 용액상 효소 분해와 비효소 분해로 요약될 수 있으며 이는 일반적으로 whole (전체) 바이러스를 위해 하나의 용액 안에 부유시키는 과정을 포함하고 있다. 이들 중, 단순한 샘플 준비가 가능하고 몇몇 바이러스 단백의 직접적인 분석이 야기할 수 있는 위양성/위음성의 가능성을 최소화할 수 있는 장점에 의해 용액상 효소 분해와 비효소 분해법에 의한 지문 분석법이 사용되고 있다.

[0026] 본 발명에서, 용어 "지문 분석법(peptide fingerprint)"이란, 상기 두 가지 방법에 의해 생성된 바이러스를 이루고 있는 각각의 단백에 대한 펩타이드의 질량값을 이론적으로 분해되어 생성될 수 있는 이론적인 값과 비교하여 일치하는 정도에 의해 동정하는 방법을 의미하며, 바이러스의 진단뿐만 아니라 다양한 단백질의 동정에 이용되고 있다.

[0027] 하지만 상기 지문 분석법을 이용한 방법은 반드시 추가적인 통계학적 분석이 선행되어야 한다는 단점이 있다. 즉, 상대적으로 많은 단백질로 이루어진 바이러스(SIN 바이러스, AIV)에 상기 방법들을 적용할 경우 발생하는 용균은 바이러스의 구조적/ 비구조적 단백의 공존을 유도하게 되고 이는 질량 분석 결과에서 여러 단백에서 유래한 펩타이드의 공존 즉, 복잡한 MALDI-MS 결과가 나타난다. 결과적으로 이는 웹을 기반으로 한 단백 분석 프로그램과는 다른 분해된 펩타이드의 질량값에 대한 정보 구축과 그것에 통계학적 개념을 추가한 새로운 통계학적 알고리즘의 필요를 야기하게 된다. 웹을 기반으로 한 단백 분석 프로그램은 MASCOT search program http://matrixscience.com.과 UCSF Protein Prospector http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard를 이용할 수 있는데, 이는 일반적으로 하나 혹은 두 개의 단백에 대한 동정만이 가능하여 여러 개의 단백에서 유래한 펩타이드들의 공존은 상기 프로그램의 사용을 불가능하게 하거나 위양성 혹은 위음성의 결과를 도출할 수 있다.

[0028] 뿐만 아니라, 펩타이드 공존의 문제 이외에도, 기존의 용액상 효소 분해법과 비효소 분해법(이하 직접적인 용액상 분해법)을 바이러스 분석 및 검출에 적용할 경우, 이온 저해 현상을 초래하게 된다. 본 발명에서 용어, 이온 저해 현상이란 바이러스 내 상대적으로 많이 존재하는 단백질은 직접적인 용액상 분해법을 적용할 경우 용액 내 많이 존재하게 될 것이나, 이는 결국 상대적으로 적게 존재하는 단백질에 대한 펩타이드의 검출을 저하시키는 상대적 효과를 나타내게 되는 현상을 의미한다. 이 경우 적은 수의 펩타이드가 낮은 강도를 가지는 질량 분석에서의 스펙트라 형태로 나타나는데, 상기 낮은 강도의 스펙트라는 동일한 조건에서의 반복된 실험에서 일정한 존재의 유무를 나타내지 못하게 되어 결국 재연성의 문제를 일으키게 된다. 이러한 질량 분석 상에서의 재연성의 문제는 동정 결과의 확실성에 상당한 문제를 야기하고, 인플루엔자 A 바이러스의 경우, 상대적으로 적게 존재하는 단백질인 HA와 NA이 4:1에서 5:1의 비율로 존재한다는 것을 고려한다면 AIV 아류형을 결정하는데 있어 중요한 역할을 하는 NA 유래의 펩타이드는 거의 검출이 불가능하게 되는 문제점이 있다.

[0029] 따라서, 본 발명자는 질량 분석에 의한 정확한 유형/ 아류형 분석과 동시에 복잡한 통계적 분석의 노력을 경감하고자, 계면 활성제를 바탕으로 한 바이러스의 용균과 그것의 분별 원심으로 이루어진 분석 전 분리를 통하여 바이러스를 가용성 표면 단백 부분과 그것을 제외한 비가용성 바이러스 물질로 분리하는 단계를 포함하는 방법을 개발하여 이러한 문제를 해결하였다.

[0030] 본 발명의 구체적 실시예에 의하면, 조류 인플루엔자 바이러스에 대하여 상기 분석 전 분리 방법을 포함하는 본 발명의 방법을 사용한 결과, HA, NA의 구조적 단백과 M-1, NP의 비구조적 단백 모두의 웹을 기반으로 한 단백질의 동정이 가능하였으며, 이러한 결과로부터 4개의 주요 단백의 분석을 바탕으로 AIV의 유형과 아류형에 의한 동정이 최대 5시간 안에 가능함을 확인할 수 있었다. 또한, NDV를 이용한 실험도 병행하여 이를 확인하였다. 또한, 본 발명에서는 바이러스 내 단백질의 구성비 차이가 직접적인 용액상 분해법 적용 시 나타내는 질량 분석 결과에서의 이온 저해 현상과 겹침 현상을 입증하고 분석 전 분리와의 차이를 비교하기 위해, 전체 바이러스의 용액 상 분해법을 control로서 실험하였다.

[0031] 상기 (ii) 단계는 시료 내 포함된 펩타이드를 원심분리하여 가용성 부분과 비가용성 부분으로 분리한 후 계면활성제를 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

[0032] 상기 계면활성제를 제거하는 단계에 있어서, 계면활성 제거제의 종류는 특정한 것으로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 일례로, 우레아(urea), 아미콘울트라튜브(AmiconUltra tube)를 사용할 수 있다. 아미콘울트라튜브(AmiconUltra tube)의 종류는 사용되는 시료에 따라 그 종류가 결정되는 것으로, 바람직하게는 미생물 시료의

경우 아미콘울트라튜브(0.5ml)-10K/3K를 사용할 수 있으며, 체액 시료의 경우 아미콘울트라튜브(15ml)-10K/3K를 사용할 수 있고, 조직 시료의 경우 아미콘울트라튜브(15ml)-10K/3K 또는 아미콘울트라튜브(0.5ml)-10K/3K 을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게 상기 계면활성제의 제거는 우레아(urea), 또는 아미콘울트라튜브(AmiconUltra tube)를 이용하여 수행할 수 있다.

[0033] 상기 우레아(urea)는 강력한 키오트로픽제(Chaotropic agent)로 일반적으로 비공유결합을 끊어 주는 역할을 하기에, 계면 활성제에 의해 형성된 마이셀(micelle) 즉, 단백질과 계면활성제의 복합제(complex)로부터 이러한 비공유결합(non-covalent bond)를 끊어주어 단백질과 계면 활성제를 분리가능하게 해 줄 수 있으며, 상기 아미콘울트라튜브는 일반적인 튜브가 아닌 MWCO (molecular-weight cut off)의 방식으로 desalting하는 컬럼(column)으로 샘플내의 계면 활성제나 염 등의 순수한 단백질 정제에 불필요한 불순물들을 분자량 크기에 근거하여 제거해 줄 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 상기 (ii) 단계에서는 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계를 포함할 수 있으며, 이는 여과 전 혹은 여과 후 단계에서 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명에서 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계에 적용되는 기술은 특별히 제한되는 것은 아니지만, 프로테오마이너(proteominer) 기술을 사용하는 것이 바람직하다.

[0036] 상기 '프로테오마이너' 기술이란 복잡한 생물학적 샘플(biological sample) 내에서 소량의 단백질을 검출하기 위해 개발된 샘플 준비방법이다. 시료 내에 다량의 단백질(high-abundance protein, 예를 들면 serum이나 plasma 내의 albumin, IgG 등)은 적당량(medium-)과 소량의 단백질(low-abundance protein)의 검출을 어렵게 하므로 원하는 단백질의 확인을 어렵게 하기에, 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시켜, 결과적으로 시료내에 단백질 dynamic range가 감소시켜 적당량(medium-)과 소량의 단백질(low-abundance protein)을 확인할 수 있게 하는 기술이다.

[0037] 상기 다량의 단백질을 제거하고 소량의 단백질을 농축시키는 단계를 적용하기 전에 계면활성제를 제거하는 단계를 선택적으로 포함할 수 있으며, 상기 프로테오마이너 기술의 사용 후에 계면활성제를 제거하는 단계를 선택적으로 포함할 수 있다. 이를 위한 계면활성 제거제의 종류는 한정되는 것은 아니며, 앞에서 기재한 바와 같다.

[0038] (iii) 상기 원심분리된 용해액의 가용성 부분과 비가용성 부분 내 포함된 펩타이드의 질량을 별도로 분석하는 단계

[0039] 상기 (iii) 단계는 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된 공지의 펩타이드의 질량과, 상기 시료 내 가용성 부분에 포함된 펩타이드 및 상기 비가용성 부분에 포함된 펩타이드의 질량을 비교하여, 상기 시료 내 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[0040] 또한, 상기 (iii) 단계에서, 상기 프로테아제로 절단된, 공지의 단백질에 특이적으로 존재하는 펩타이드 질량의 세트와 매칭되는, 상기 시료 내 펩타이드의 질량 세트의 존재 여부를 확인함으로써 수행할 수 있다.

[0041] 상기 (iii) 단계는 질량 측정 장치로 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0042] 상기 질량 측정 장치로는 질량 분석기를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 질량 분석의 방식으로서 MALDI-TOF MS(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of flight Mass Spectrometry) 방식을 이용하고, 예로서 Voyager De STR MALDI-TOF MS 혹은 MALDI-TOF/TOF를 사용할 수 있다. 그러나 단백질 측정이 가능한 다양한 형태의 Mass spectrometry(MS) 및 MS/MS 종류는 제한적이지 않다.

[0043] 검출 효율에 영향을 미치는 요인으로는 (1) 지연 시간(delay time, DE) - 레이저 조사 후 다음 조사까지의 시간차(nano second); (2) 그리드 전압(grid voltage, %) - MALDI-TOF MS 진공관 안에서 펩타이드 이온들이 비행하여 검출기에 검출되는 데까지 필요한 에너지의 크기; (3) 질량 범위(Mass Range) - 검출하고자 하는 펩타이드의 질량 범위; (4) 레이저 강도(laser intensity) - 레이저의 조사량 등이 있다. 이러한 요인들은 당업자에 의해 적절하게 설정될 수 있다.

[0044] 본 발명은 이상과 같이 시료내의 총단백질을 프로테아제로 분해하여 수득한 펩타이드에 대한 질량 및 아미노산 서열을 측정 장치로 측정하는 것을 특징으로 한다. 이에 관한 측정 장치의 종류는 한정되어 있지 않지만 MALDI-TOF/TOF를 사용하는 것이 바람직하다.

[0045] 또한, 상기 (iii) 단계는 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된, 공지의 펩타이드의 질량과, 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 상기 시료 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[0046] 공지된 세포, 조직, 기관, 생물 등의 단백질 유래된 펩타이드 질량은 예를 들면 다음과 같이 확보할 수 있다. 프로테아제는 아미노산 서열을 인식하여 특정 부위를 절단하는 효소이므로, 특정한 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 지정된 프로테아제로 처리할 경우 수득할 수 있는 펩타이드의 서열이 추정되고, 이 펩타이드의 질량은 아미노산의 질량이 공지되어 있으므로 이를 참조로 하여 계산함으로써 확보할 수 있다. 이렇게 확보한 공지된 특정 단백질 유래 펩타이드 질량으로부터 측정된 펩타이드의 질량과 일치하거나 가장 유사한 질량을 갖는 펩타이드를 선별하여 그 질량을 갖는 펩타이드가 어떤 세포, 조직, 생물 등의 단백질로부터 유래된 것인지 확인함으로써 시료내 단백질을 동정할 수 있다.

[0047] 또한, 상기 (iii) 단계는 상기 프로테아제로 절단된 공지의 세포, 조직, 기관, 생물 등에 특이적으로 존재하는 펩타이드 질량의 세트와 매칭되는, 상기 시료내 펩타이드의 질량 세트의 존재 여부를 확인함으로써 수행될 수도 있다.

[0048] 한편, 좀 더 정확한 분석 및 동정을 위하여 질량 및 아미노산 서열을 동시에 결정할 수 있는 측정기기를 사용할 수 있다. 이는 특정 펩타이드의 질량을 비교할 뿐 아니라, 특정 펩타이드의 아미노산 서열을 결정할 수 있음으로 인하여 좀 더 정확한 단백질 분석 및 동정에 활용할 수 있다.

[0049] 본 발명의 바이러스 분석 및 검출 방법에 따르면, 기존 용액상 분해법에서 나타날 수 있는 이온 저해 현상과 질량 분석에서의 스펙트럼 겹침 현상을 최소화함으로써 주요 단백질의 분석을 바탕으로 한 바이러스의 유형/ 아류형 분석을 단시간내에 가능하게 할 수 있다.

[0050] 본 발명의 구체적 실시예에 따르면, 기존 용액상 단백 분해법과 비교했을 경우, AIV의 아류형 분석의 타겟이 되는 HA와 NA 단백에서 유래한 펩타이드 수가 HA의 경우, 기존 7개에서 18개, NA의 경우 1개에서 11개로 늘어나는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과에 의해 본 발명의 바이러스 분석 및 검출 방법은 기존 방법의 단점 (이온 저해, 이온 겹침, 통계적 분석의 필요)을 극복함으로써 AIV의 유형과 아류형을 동시에 분석 가능한 효과가 있다.

[0051] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 바이러스 단백질로부터 유래된 펩타이드 질량 정보를 저장하고 있는 데이터베이스; 시료 내 펩타이드의 질량을 측정하는 질량 측정 장치; 및 시료 내 가용성 부분과 비가용성 부분을 나누어 측정된 시료 펩타이드의 질량 정보와 상기 데이터베이스의 펩타이드 질량 정보를 각각 대비하여 상기 시료 펩타이드의 바이러스 단백질 정보와 매칭되는 정보의 필터링을 수행하여 측정된 시료 펩타이드의 유래 정보를 확인하는 바이러스 단백질 매칭 필터링부를 포함하는 바이러스 진단 시스템을 제공한다.

[0052] 본 발명에서 상기 질량 측정 장치는 이에 제한되는 것은 아니지만, 질량 분석기인 것이 바람직하다.

[0053] 본 발명에 적용되는 데이터베이스는 유전자 정보(아미노산 서열 또는 염기서열)를 바탕으로 특정한 세포, 조직, 생물 등의 단백질을 지정된 프로테아제로 분해한 경우에 수득할 수 있는 아미노산 서열 정보를 저장하고/하거나 펩타이드에 대한 질량을 계산하여 얻은 이론적 질량으로서 저장하도록 구현된 것일 수 있다. 이 때, 펩타이드 질량과 그 펩타이드가 유래된 세포, 조직, 생물 등의 단백질 명칭, 이용된 프로테아제의 명칭에 대한 정보가 서로 연계되도록 구현한다. 본 발명의 데이터베이스에 포함될 특정 단백질과 프로테아제 종류를 제한적이지 않다. 본 발명의 데이터베이스는 추후 미지의 생물, 단백질 및 프로테아제에 대한 정보도 포함하여 확장될 수도 있다.

[0054] 본 발명의 단백질 동정, 분석 시스템은 시료 수용부 및 상기 시료 수용부로 프로테아제를 투입하기 위한 프로테아제 저장부를 포함하는 시료 처리부를 추가로 포함할 수도 있다. 상기 시료 처리부는 시료 수용부에 마이크로파를 조사하기 위한 마이크로파 발생원을 더 포함할 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명의 단백질 분석, 동정 시스템은 추출된 단백질 정보를 토대로 시료에 포함된 정보를 출력하는 단백질 정보 출력 장치를 추가로 포함할 수 있다. 상기 단백질 정보 출력 장치는 상기 시료에 포함된 단백질 유래된 세포, 조직, 기관, 생물 등에 관한 정보가 둘 이상인 경우, 각각의 정보를 별도로 출력할 수 있다.

[0056] 아울러, 본 발명의 단백질 분선 및 동정 시스템에서 데이터베이스, 질량 측정 장치, 아미노산 서열 측정 장치, 단백질 추출 장치, 단백질 유래된 세포, 조직, 생물 등에 관한 정보 출력 장치는 네트워크를 통해 연결되는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0057] 본 발명에 따른 바이러스 분석 및 검출 방법은 전체 바이러스의 가용성/ 비가용성 부분을 분리하는 분석 전 분리 단계를 통해 기존 용액상 분해법에서 나타날 수 있는 이온 저해 현상과 질량 분석에서의 스펙트럼 겹침 현상을 최소화하여 전체 바이러스의 질량 분석에서 나타날 수 있는 복잡하게 혼합된 결과에 의한 민감도를 향상시킴으로써, 주요 단백질의 분석을 바탕으로 한 바이러스의 유형/ 아류형 분석을 단시간내에 가능하게 하고 기존의 연구에서 반드시 필요했던 추가적인 통계학적 개념의 도입과 고가의 기계 없이도 AIV의 유형 및 아류형에 관한 정확한 동정이 가능한 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 본 발명의 전체적인 개략도를 나타낸 것이다.

도 2는 200:1- to-50:1 의 OG 및 800:1 의 NP-40S로 부분 정제한 NDV B1의 분석 전 분리(prefractionation) 후 얻은 상층액 및 펠렛 샘플의 SDS-PAGE 결과이다 (Lane 1, protein marker; lane2, whole NDV; lane 3, 6, 8, 10: 3, HN, M; 6, HN, M; 8, HN, F, M; 10, HN, F, M - 상층 분획; lane 4, 7, 9, 11: 4, HN, F, NC, M; 7,HN, F, NC,M; 9, F, NC, M; 11, NC, M - 펠렛 분획임. 본 발명에서 약자 표기는 HN, Hemagglutinin-neuraminidase: F, fusion protein: NC, nucleocapsid protein: M, matrix protein임).

도 3은 200:1- to-50:1 의 OG 및 800:1 의 NP-40S로 부분 정제한 조류 인플루엔자 바이러스 (H9N2; MS96/96)의 분석 전 분리(prefractionation) 후 얻은 상층액 및 펠렛 샘플의 SDS-PAGE 결과이다 (Lanes 1, protein marker; lane 2, 4, 6, 8: 2, HA, M-1; 4, HA, M-1; 6, HA, NA, M-1; 8, HA, NA, M-1 - 상층 분획; lane 3, 5, 7, 9: 3, HA, NA, NP, M-1; 5, HA, NA, NP, M-1; 7, HA, NP, M-1; 9, NP, M-1 - 펠렛 분획임; lane 10, whole AIV임. 본 발명에서 약자 표기는 HA, hemagglutin; NA, neuraminidase; NP, nucleoprotein; M-1, matrix-1 protein임)

도 4는 분석 전 분리과정 없이 수행한 NDV로부터 얻은 트립틱 펩타이드의 MALDI-TOF mass spectra (A), 분석 전 분리과정을 거친 후의 통해 NDV로부터 얻은 트립틱 펩타이드의 MALDI-TOF mass spectra (B) 및 (C) 를 나타낸 것이다 ((A) A typical spectrum of tryptic digest of an entire NDV lysate solubilized SDS; (B) mass spectra of insoluble NDV material; and, (C) soluble surface proteins).

도 5는 분석 전 분리과정 없이 수행한 AIV(H9N2; MS96/96) 로부터 얻은 트립틱 펩타이드의 MALDI-TOF 를 이용하여 분석한 mass spectra (A), 분석 전 분리과정을 거친 후의 통해 AIV로부터 얻은 트립틱 펩타이드의 MALDI-TOF 를 이용하여 분석한 mass spectra (B), 및 분석 전 분리과정을 거친 후의 통해 AIV로부터 얻은 트립틱 펩타이드의 MALDI-TOF/TOF를 이용하여 분석한 mass spectra (C) 를 나타낸 것이다 ((A) A typical spectrum of tryptic digest of an entire AIV lysate solubilized in SDS; (B) mass spectra of insoluble AIV materials; and, (C) soluble surface

proteins).

도 6은 AIV 상층액 분획(A), 펠렛 분획(B), 및 전체 AIV 용균액(C)의 마스코트 조사 결과를 나타낸 것이다 (first analysis using MALDI-TOF (C-1) and second analysis using MALDI-TOF (C-2), interrogating the NCBInr database with mass tolerance of 20 ppm and no taxonomical restriction on species).

도 7은 상기 도 6의 결과 내, HA의 개별적 분석이 정확한 아류형의 동정을 가능하게 하는지에 대하여 알아보기 위해 동정 결과 수를 최대 50개로 정하여 실시한 마스코트 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 상기 도 6의 결과 내, NA의 개별적 분석이 정확한 아류형의 동정을 가능하게 하는지에 대하여 알아보기 위해 동정 결과 수를 최대 50개로 정하여 실시한 마스코트 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의

범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않으며 권리범위 또한 제한되지 않는다.

[0060] **실시예 1: 실험 재료의 준비**

[0061] **재료**

[0062] 10일령 계태아의 요막강에 Influenza A virus (A/Chicken/ Korea/MS96/96(H9N2)) 와 Newcastle disease virus (NDV B1) 접종한 샘플을 강원대로부터 제공 받아 sucrose 밀도 구배에 의한 방법에 의해 순수 분리하여 -70℃에 보관 하였으며 상기 두 개의 바이러스는 Biohazard Level Two에 의거하여 취급하였다. Acetonitrile (ACN), ammonium bicarbonate, dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA), Nonidet P-40 substitute (NP-40S) Tergitol® solution, octyl-β-D-glucopyranoside (OG), sodium deoxysulfate (SDS), trifluoroacetic acid (TFA; 99%), urea, 및 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)로부터 구매하였다. Sequencing-grade modified trypsin 는Promega (Madison, WI, USA)로부터 구매하였다. The Bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent kit 는Thermo Scientific (Bonn, Germany)로부터 구매하였다. Millipore Milli-Q-system (Bedford, MA)로부터 준비한 Ultrapure 18.2-MΩwater는 샘플 버퍼를 제조하기 위해 사용되었다.

[0063] **실시예 2 : 단백질 정량법**

[0064] 본 실험의 단백질 정량은 BCA 단백 정량법을 이용하여 정해진 실험 방법에 의거하여 실시하였다 (BSA를 기준 단백으로 함.)

[0065] **실시예 3 : 선택적 전체 바이러스 분리**

[0066] OG/NP-40S 혼합에 있어 효과적인 바이러스의 internal (비구조적) 과 external proteins (구조적 단백)의 분리를 나타내는 비율을 알아보기 위해, 비이온성 계면 활성제인 OG 와 NP-40S 를 바이러스 단백 총량에 대해 200:1- to- 50:1 (protein to OG, w/w) 과 800:1 (protein to NP-40S, w/w) 이 되도록 ultrapure 18.2-MΩ water에 녹여 각각 준비하였다. 100 ㎕ of H9N2 과 NDV (180 ㎍의 총 단백 함유) 각각을 200 ㎕의 OG/ NP-40S 혼합물과 실온에서 30분 반응시켰다. 반응 중 수 회의 피펫팅에 의한 혼합 실시하였다. 그 후 Allegra® 64R centrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)에서 18,000 Xg for 40 min at 4 ℃ 에서 원심 분리하였다. 그런 다음, 상층액의 경우, fine needle을 이용하여 새로운 튜브에 옮겼다. 남은 펠렛의 경우 200 ㎕ TNE buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)에 재부유 시켰다. 100 ㎕ SDT lysis buffer (2% [w/v] SDS, 100 mM Tris/HCl, 100 mM DTT pH 7.6)를 상층액과 재부유된 펠렛에 첨가 후 95℃ for 3 min 동안 항온 수조에서 반응하여 추가적인 바이러스의 안쪽 단백의 유리와 단백 변성을 일으켰다. 또한, control 로서 100 ㎕의 순수 분리된 H9N2와 NDV (180 ㎍)를 100 ㎕ SDT lysis buffer (2% [w/v] SDS, 100 mM Tris/HCl, 100 mM DTT pH 7.6)에 용균 후, 상층액과 펠렛의 경우와 동일한 방법으로 변성 유도하였다.

[0067] **실시예 4 : 계면 활성제의 제거**

[0068] 바이러스 용균액으로부터 완전한 계면 활성제의 제거를 위해, filter-aided sample preparation (FASP)을 본 발명자가 제10-2008-0131470호 및 제10-2009-0126411호에서 사용한 과정에서 몇몇 과정을 변형하여 아래와 같이 적용하였다. 상기 제10-2008-0131470호 및 제10-2009-0126411호에 개시된 방법은 본 발명에 모두 참고로서 병합된다.

[0069] 본 발명의 실험에서는 상층액과 펠렛을 분리하여 각각을 실험하였다. 60 ㎕ 상층액과 펠렛 각각을 400 ㎕ of 8 M urea (100mM Tris/HCl, pH8.5)와 혼합하여 Amicon® Ultra YM-10 (Millipore) filter tubes에 첨가한 후 14,000X g for 15 min at 25℃에서 반복하였다. 200 ㎕의 50 mM IAA in 8 M urea/100 mM Tris/HCl (pH 8.5)을 첨가 후 thermo-mixer를 이용하여 간단히 mix한 후 10 min 방치 후, 14,000X g for 15 min at 25 ℃에서 원심

하였다. 200㎕ 8M urea을 첨가 후 세 번 반복하여 원심 후, 400 ㎕ 50mM ammonium bicarbonate 세 번 반복하였다. 계면 활성제가 제거된 샘플의 획득은 샘플이 들어있는 filter device을 뒤집은 후, 1,000X g for 2min at 25 ℃에서 원심하였다. 그 후 BCA protein assay 로 단백 농도 측정. 획득한 상층액과 펠렛 단백의 용액 내 분해는 trypsin (0.1 ㎍/10 ㎕ in 50 mM ammonium bicarbonate)을 1:50 (enzyme to protein, w/w)의 비율이 되도록 첨가 후, 가정용 microwave oven (model RE-442B, Samsung, Suweon, Korea, 700 W at 2,450 MHz)에서 150 초 동안 조사하여 실시하였다.

[0070] AIV 펠렛 샘플의 경우 샘플의 획득을 위해 다른 방법을 이용하였다. 400 ㎕ 50mM ammonium bicarbonate 세 번 반복하는 단계까지는 동일하나 그 후, filter device에 직접 trypsin을 1:50 (enzyme to protein, w/w)이 되도록 첨가하였다. 150 seconds 동안 microwave 조사하고 그대로 14,000X g for 20 min 하여 filter device를 통해 유리된 tryptic digests을 획득하였다. Filter device내 잔존하는 digests는 50 ㎕ 0.5 M NaCl을 참가하여 원심함으로서 획득하였다. 단백 분해 반응은 동량의 0.5% (v/v) TFA를 참가하여 정지하며 각각의 트립신에 의해 분해된 펩타이드 내 불순물은 C_{18} ZipTips (Millipore)를 이용한 탈염화과정에 의해 제거하였다.

[0071] **실시예 5 : 일차전기영동**

[0072] 구조적/ 비구조적 단백의 분리 정도를 확인하기 위해 상층액과 펠렛, 전체 바이러스를 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 각 샘플 1.5 ㎍ 을 5X SDS-PAGE sample buffer (60 mM Tris-HCl, 25% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol and 0.1% (w/v) bromophenol blue)이 1X가 되도록 첨가 후, 10 min동안 끓이고 바로 아이스에서 식혔다. 그 후, 12.5% (w/v) SDS 겔에 loading 하여 처음 10 min은 50 V에서 그 후100 V에서 전기 영동함. 각각의 겔은 a kit (Amersham Biosciences)을 이용하여 silver-stain 하였다.

[0073] **실시예 6 : 질량 분석과 해석**

[0074] 트립신에 의해 분해된 펩타이드의 탈염화 후, NDV 상층액과 펠렛, AIV 펠렛 샘플용액 내 펩타이드 분석은 Voyager-DE STR MALDI-TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA) 질량 분석기를 이용 다음과 같은 조건으로 실시하였다. 337-nm nitrogen laser, in positive ion mode, with delayed extraction using reflectron mode. MALDI matrix 로 사용한 CHCA는 70% ACN/ ultrapure 18.2-MΩwater (v/v) containing 0.1% (v/v) TFA에 50 mMdml 농도가 되도록 제조 후 dried droplet 방법을 이용하여 타겟팅하였다. 보다 자세하게는 본 발명자가 제10-2008-0131470호 및 제10-2009-0126411호에서 개시한 방법이 본 발명에 모두 참고로서 병합된다.

[0075] ACTH fragment 18-39 ($[M+H]^+$ of 2,465.199) 과 Angiotensin II ($[M+H]^+$ of 1,046.542)을 이용하여 calibration 하였하였다. 질량 분석 결과의 de-isotoping을 위해 Data Explorer 4.0 (Applied Biosystems)를 이용하였다. 각 단백의 동정은 NCBInr and MSDS databases을 기반으로 한 MASCOT search program the UCSF Protein Prospector를 이용하여 실시하였다. AIV 상층액의 경우, ABI 4800 Plus MALDI-TOF/TOF instrument (Applied Biosystems)의 질량 분석기를 사용하였으며 MALDI matrix로 사용된 CHCA의 제조는 상기 방법과 동일하며 일차적으로 ABI 4800 Plus MALDI-TOF/TOF instrument를 이용하여 TOF의 결과를 얻은 후, HA 와 NA 에 20 ppm내에서 matching이 되는 peptides를 manual로 선택하여 다음과 같은 조건에서 MS/MS (TOF/TOF) 분석을 실시하였다. 2 kV mode, 800-1,000 consecutive laser shots, the collision gas: airs. calibration은 calibration Mixture 1 of the Peptide Mass Standard Kit 을 이용하였다. 질량 분석 후, 그것의 해석은 NCBInr database를 기반으로 한 ProteinPilot v3.0 (with MASCOT as the database search engine)을 이용하여 실시함. 조건은 다음과 같았다. TOF의 경우, 20ppm과 TOF/TOF의 경우 50 ppm. 상기 모두의 단백 분석 프로그램의 적용 시, 다음과 같은 조건으로 실행하였다. carbamidomethylation of cysteine residues and acetylation of protein N-termini.

[0076] **실시예 7 : 데이터 베이스에 의한 분석**

[0077] 본 실험에서의 궁극적인 목적인 직접적인 용액상 분해법의 적용에 의한 낮은 정량의 바이러스 단백의 질량 분석 결과에서의 영향 (펩타이드 수, 상대적 강도)을 알아보기 위해 전체 바이러스의 용균액의 결과로부터 이론적인 펩타이드의 추가적인 분석을 실시하였다.

[0078] 바이러스 NDV B1의 HN 과 NC 단백과 HA, AIV (A/Chicken/ Korea/MS96/96(H9N2))의 NA, NP, M-1 단백에 대한 아미노산 서열 정보는 NCBInr protein database 를 통해 얻었으며 각각의 이론적인 펩타이드 질량값은 MS-digested software (http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest)를 이용하여 얻었다. 조건은 다음과 같았다. Database: NCBInr 2010. 3. 30, trypsin digest with maximum missed cleavage of 1, constant modification: carbamidomethyl (C)과 variable modification: acetyl (N), peptide mass range: 500 to 4,000 Da. 이론적 질량값과 실험적 측정값에서의 일치는 20ppm의 질량 정확도에 의거하여 MASCOT 분석 프로그램을 이용하여 인정되었다.

[0079] **실험 결과**

[0080] **선택적 전체 바이러스 분리**

[0081] 본 발명에서 직접적인 용액상 분리법에 의한 MALDI를 이용한 질량분석에서의 부정적 효과를 최소화하여 보다 많은 단백 유래 펩타이드를 얻고자 AIV뿐만 아니라 NDV에서도 선택적 전체 바이러스 분리를 실시하였으며, 전체 NDV로부터 효과적인 표면 단백(구조적 단백)을 분리할 수 있는 계면 활성제의 농도 비율을 알아내고자 각각의 조건에서 분리된 가용성 (상층액) 샘플과 비가용성 (펠렛) 샘플로 SDS-PAGE (일차 전기 영동)를 실시하였다.

[0082] 그 결과, 표면 단백의 분리 정도는 비이온성 계면 활성제의 농도에 따라 달라지는 것을 확인할 수 있었다. 50:1 (OG) 과 800:1 (NP40S)의 농도 비율에서 HN과 F 단백으로 이루어진 대부분의 NDV 표면 단백이 상층액에 존재하는 것을 확인할 수 있었으며 반면, 펠렛의 경우 상대적으로 많은 양의 NC단백과 M 단백이 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (도 1a)

[0083] OG/ NP 40S에 의한 AIV의 분리 정도를 SDS-PAGE 상에서 확인해본 결과, OG의 증가에 따라 HA 단백과 NA 단백이 펠렛 샘플로부터 상층액 샘플에서 보다 확연히 관찰되는 것을 볼 수 있었다, NP 단백의 경우 지속적으로 펠렛 샘플에 존재하는 것을 확인할 수 있었으며 M1의 경우 양쪽 모두에, 상대적으로 펠렛에 높은 비중으로, 존재하는 것을 알 수 있었다. 이는 M1 단백의 표면 단백과의 구조적 연관성에 관한 다른 연구와 일치하는 결과를 나타낸다. 따라서, 이와 같은 전체 바이러스의 가용성/ 비가용성 부분의 분리는 전체 바이러스의 질량 분석에서 나타날 수 있는 복잡하게 혼합된 결과에 의한 민감도를 향상시킬 수 있다.

[0084] **계면 활성제의 제거**

[0085] 본 발명에서 Filtered-aided sample preparation (FASP)을 적용하였을 경우, 계면 활성제 제거 후 대부분의 소수성 단백에 대한 획득이 불가능하였다. 본 실험에서는 AIV 펠렛 샘플을 획득하는 과정에서 심각한 샘플 손실이 나타난 것을 확인하고, 상기에서 언급된 것과 같이 단백 획득의 최대화를 위해 각각에 대한 다른 용출 방법을 사용하였다.

[0086] **질량 분석**

[0087] 전체(whole) 바이러스의 직접적인 용액상 분해법의 적용에서 NDV와 AIV의 단백 구성비가 질량 분석에 미치는 민감도 측면에서의 영향을 알아보기 위해 세 가지 서로 다른 접근법이 실행되었다. 도 4 및 도 5에 나타난 것과 같이, 분석 전 분리 (prefractionation)를 실행하여 가용성 표면 단백을 포함한 상층액과 비가용성 바이러스 관련 물질을 포함하는 펠렛과 실행하지 않는 것에 대해 MALDI를 이용한 질량 분석 (MALDI-MS)과 MALDI를 이용한 펩타이드 분석 및 그에 따른 펩타이드의 조각 분석 (MALDI-MS/MS)을 실시하였다.

[0088] **MALDI-TOF를 통한 NDV 단백의 검출**

[0089] 뉴캣슬병의 원인체인 NDV에 대하여 본 발명의 방법을 수행하였다. 상기 NDV의 총 6개의 단백질 중, NC 단백질은 총 바이러스 단백의 45%를 차지하는 주요 단백질이다. NDV의 표면 단백질인 HN 단백질의 경우, F 단백질과 함께 주요한 균력을 나타내는 단백으로써 총 NDV 단백의 20%를 차지하고 있다. 이와 같은 각 단백간 구성비의 차이가 MALDI를 이용한 질량 분석에 미치는 영향은 도 4에 잘 나타나 있다. 전체 바이러스의 용균액 결과, (A)와 비구

조적 단백을 포함하는 비가용성 샘플 (B)의 질량 분석 결과가 유사한 것을 볼 수 있으며 표면 단백을 포함하는 가용성 샘플의 경우, (A)와 (B)에서의 결과와 상이하게 다른 스펙트라의 수적, 상대적 강도의 증가를 볼 수 있다.

[0090] 질량 분석 결과에 존재하는 모든 스펙트라에 대한 펩타이드 질량값 (mass data)을 MASCOT 분석 프로그램에 대입하여 동정한 결과, HN 단백의 경우, 19개의 실제 측정된 펩타이드가 이론적 펩타이드의 질량값과 20ppm의 범주 내에서 일치하였고 총 HN 단백의 아미노산 서열에서 차지하는 부분은 35%이었으며 이 때의 통계학적 기대값은 4.3e-27이었다. 전체 바이러스의 질량 분석 결과와 비교하였을 경우, 일치한 19개의 펩타이드 중, 13개의 펩타이드가 놀랍게도 오직 가용성 샘플의 분석 결과에서만 관찰할 수 있었다 (평균 질량값 차이: 5.08ppm). 또한 양쪽 모두에 존재하는 나머지 6개의 펩타이드에 대해서도 4.48에서 16.75 비율로 상대적 강도가 증가했음을 알 수 있었다 (I_S/I_W; I_S 는 intensity of HN in soluble fraction (C) 의미하며 I_W, intensity of HN in whole virus lyates (A)를 의미함). 또한, NC 단백 유래의 펩타이드 역시 전체 바이러스의 분석의 경우, 13개였던 것이 비가용성 샘플의 분석에서는 19개로 증가하였으며 이는 통계학적 유의성 내에서의 47%의 높은 아미노산 서열 일치도를 나타냈다 (표 1).

표 1

Table 1. Masses of the matched tryptic peptides observed in MALDI mass spectra without and with pre-fraction of NDV B1

m/z (mono)[M+H⁺] observed							m/z (mono)[M+H⁺] observed						
w/o prefraction	*w/ prefraction (soluble fraction)*	amino acid residue	mass error (ppm)		relative intensity (%)		*w/o prefraction*	*w/ prefraction (insoluble fraction)*	amino acid residue	mass error (ppm)		relative intensity (%)	
HN	HN						NC	NC					
M.c.: 101 s.c.: 13 %	M.c.: 322 s.c.: 31%						M.c.:112 s.c.:28%	M.c.:243 s.c.: 47%					
			(a)	(b)	(a)	(b)				(a)	(b)	(a)	(b)
599.3045	599.3045	R.MVHGR.L	-6	-6	2.12	14.73		748.3820	R.AVANSMR.E		7		2.71
	794.4091	K.SSYKPGR.F		-8		3.31	757.4256	757.4313	R.GLAAAAQR.V	-8	0	3.95	4.88
	841.4810	K.YVIYKR.Y		-14		33.88	782.3467	782.3676	K.YMQQGR.V	-19	8	6.17	3.62
	1183.6247	K.SSYKPGRGGGK.R		2		5.9	913.5259	913.5317	R.RGLAAAAQR.V	-7	-1	19.65	6.75
	1193.5548	R.LGFDGQYHEK.D		-3		3.15	1062.5565	1062.5754	R.FAMIAGSLPR.A	-19	-1	100	63.31
	1303.6577	R.SINLDDTQNRK.S		-2		2.98	1083.5515	1083.5638	K.YILYPVCR.S	-13	-2	20.19	14.96
1364.7030	1364.6649	R.LNPASAVFDSTSR.S	17	-11	4.19	41.34	1118.5369	1118.5537	R.SGVSEERAQR.F	-16	-1	20.22	8.88
1380.6730	1380.6494	R.GVFGTMLDGEQAR.L	11	-6	9.32	100	1137.5756	1137.5845	K.YMQQGRVQK.K	-7	1	43.71	20.85
1534.8390	1534.8375	R.ILTVGTSHFLYQR.G	1	-0	9.61	43.1	1176.5075	1176.5147	R.DFMSTSSFWR.L	-6	0	9.09	7.9
	1607.8127	R.LNPASAVFDSTSRSR.I		-1		6.67	1211.6484	1211.6637	K.KYILYPVCR.S	-10	3	3.93	2.5
1811.8040	1811.7745	K.ATETEEEDYNSAVPTR.M	6	-10	9.22	52.18	1417.7761	1417.7686	R.AQRFAMIAGSLPR.A	2	-3	13.03	8.9
	1872.7709	K.SCSVSATPLGCDMLCSK.A		-13		8.95	2078.9685	2078.9465	R.SQGQPEAGDGETQFLDLMR.A	11	1	87.33	100
	1908.9966	K.ITSTLGSNQDVVDRIYK.Q		-3		3.75		2619.2930	K.QNEATLAVLEIDGFANGTPQFNNR.S		5		3.18
	2000.8737	R.KSCSVSATPLGCDMLCSK.A		-9		7.27	2803.3357	2803.3241	M.SSVFDEYEQLLAAQTRPNGAHGGGEK.G	3	-1	5.94	12.31
	2392.0644	K.ATETEEEDYNSAVPTRMVHGR.L		-8		3.2		2933.5120	R.LGVEYAQAQGSSINEDMAAELKLTPAAR.R		15		12.37
	2409.1445	R.VWFSVYGGLKPNTPSDTVQEGK.Y		3		14.83		3409.7783	R.NHVALAGKQNEATLAVLEIDGFANGTPQFNNR.S		16		11.56
	2422.1445	R.CPNSCVTGVYTDPYPLIFYR.N		10		13.22		3489.7584	R.VSEVTSSIDMPTQQVGVLTGLSEGGSQALQGGSNR.S		13		46.61
	2726.3169	R.GVFGTMLDGEQARLNPASAVFDSTSR.S		-1		14.89							
	2851.3971	K.TATLHSPYTFNAFTRPGSIPCQASAR.C		1		18.11	3797.7063	3797.7353	R.AVANSMREAPNSAQGTPQSGPPPTPGPSQDNDTDWGY. -	9	16	18.04	30.28
3665.5961	3665.5961	K.SCSVSATPLGCDMLCSKATETEEEDYNSAVPTR.M	7	7	4.23	70.86							

Abbreviation: HN, hemagglutinin-neuraminidase; NC, nucleocapsid protein; M.c., Mascot score; s.c., sequence coverage; (a): values obtained without (w/o) prefractionation; (b): values obtained with (w/) prefractionation

[0091]

[0092] 이러한 결과는 전체 바이러스에 대한 직접적인 용액상 분해법을 적용하였을 경우 나타나는 이온 억제 효과에 대한 본 연구의 가정에 대해 강한 증거를 제시하는 것이며 따라서 본 발명의 방법을 적용하여 NDV에 대한 질량 분석에 의한 동정 뿐 만이 아니라 바이러스의 균력에 관한 중요한 정보도 알 수 있게 된다.

[0093] **MALDI-TOF와 MALDI-TOF/TOF를 통한 AIV 단백의 검출**

[0094] 앞서 설명한 NDV-B1의 결과에서 알 수 있듯이, 직접적인 용액상 분해법을 전체 바이러스에 적용하였을 경우, 바이러스 내 상대적으로 적게 존재하며 동시에 바이러스의 아류형 분석이나 균력에 대해 중요한 역할을 하는 단백에 대한 동정이 실질적으로 힘들다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 직접적인 용액상 분해법의 적용에 의해 나타날 수 있는 다양한 바이러스 단백 유래 펩타이드들의 복잡한 공존은 MALDI를 이용한 AIV 동정에서 일관된 결과를 나타내지 않는다.

[0095] 도 5a는 동일 조건 하에서 실시한 반복된 질량 분석 결과인데, 여기서 보면, m/z (mass to charge) 2,032.2272에서 2,037.0752의 구간에서 나타나는 낮은 분해능의 이온 무리 (ion cluster)에 의한 monoisotpe 인지의 불일치는 결국 펩타이드 지문 분석에 의한 바이러스의 동정에 심각한 문제를 일으킨다. 즉, Influenza A virus (A/Chicken/Taiwan/2383V/00(H6N1)),(A/swine/Bakum/5/95(H1N1)),(A/duck/Yangzhou/02/2005(H8N4))과 (A/Chicken/Korea/25232-006/96(H9N2))과 같이 반복된 실험에서 서로 다른 결과를 나타냄을 알 수 있었다 (도

6c).

[0096] 도 6은 분석 전 분리를 적용한 결과와 적용하지 않은 실험에서의 동정 결과를 나타낸 것으로 적용하지 않은 경우, HA로부터 유래한 펩타이드 수는 11개로 적용한 경우 (18개)에 비해 대략 두 배 정도가 적었다. 또한 NA의 경우에도 적용 후 7개의 펩타이드가 11개로 늘어난 것을 볼 수 있었다. 이 중, HA 유래 12개의 펩타이드와 NA 유래 9개 펩타이드가 질량 분석 결과 상에서 높은 해상도를 가지고 확실히 존재하는 것을 볼 수 있었다 (도 5c). 또한, 본 실험의 control로서, 직접적인 용액상 분해법에 의한 질량 분석 결과를 보여주기 위해 적용된 계면 활성제에 의한 바이러스 용균이 일반적인 용액상 효소 분해의 방법보다 효과적인 단백 유래 펩타이드의 생성을 유도할 수 있다는 점을 고려한다면, 본 연구에서의 방법이 HA와 NA 유래 펩타이드의 생성에 있어 상당한 효과를 나타낸다는 것을 유추할 수 있다. 또한 아직까지 펩타이드 지문 분석법에 의한 단백의 동정에 있어 일치도 (sequence coverage)에 대한 정확한 기준은 없으나 본 방법에 의한 관련 단백 (HA, NA)의 분리와 관련 단백 유래 펩타이드의 수적 증가는 결국 추가적인 통계학적 분석이 필요하지 않은 높은 신뢰도의 동정을 가능하게 하였다.

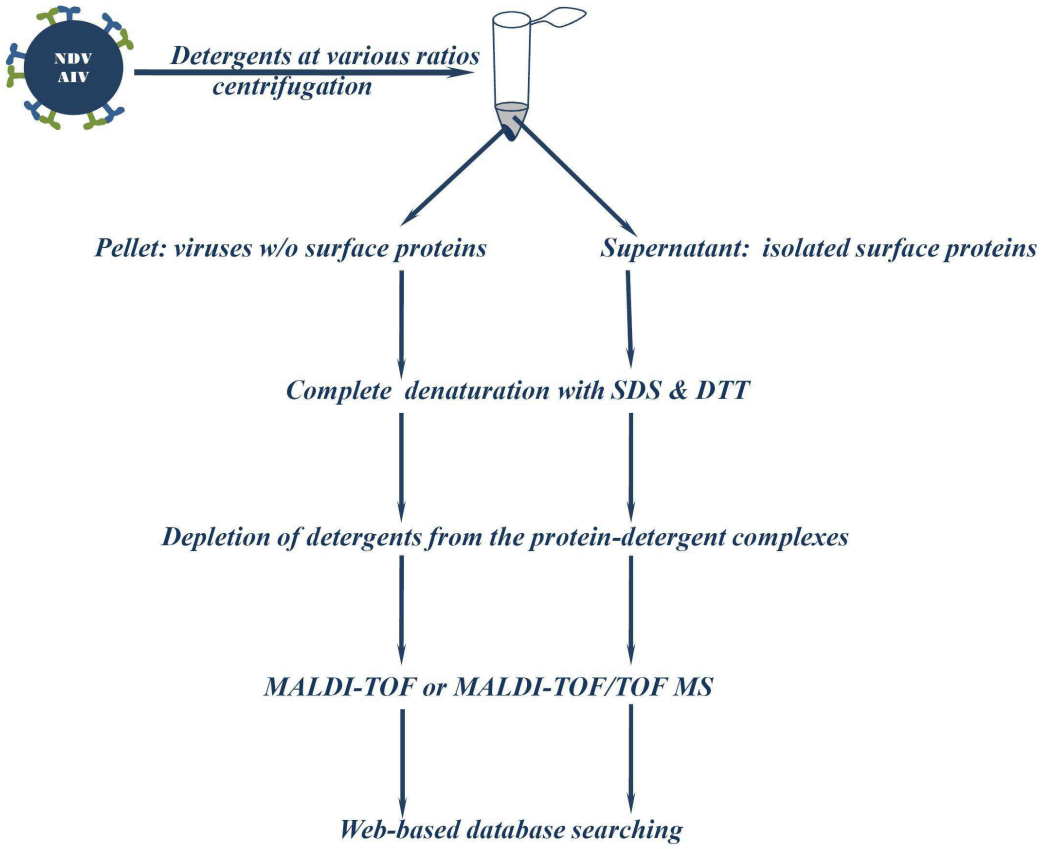
[0097] 상층액 질량 분석 결과에서의 모든 펩타이드에 관한 질량값 정보를 MASCOT, Protein Prospector 분석 프로그램에 대입한 후, NCBInr과 MSDB 데이터베이스를 이용하여 분석한 결과, 상층액의 분석 시 상기 두 개의 분석 프로그램 모두에서 the mixture of hemagglutinin [Influenza A virus (A/Chicken/Korea/MS96-CE6/1996(H9N2))] and neuraminidase subtype 2 [Influenza A virus (A/Chicken/Korea/MS96/96(H9N2))] 이 Mascot score 184 and 100, and MOWSE score 2.2e+7 and 14,446으로 동정되었다 (도 6a). 이론적 단백의 총 서열과 일치하는 정도는 HA(gi|269826347) 의 경우 33%와 NA (gi|7861787)의 경우 25%였다.

[0098] 본 발명에서는 보다 나은 결과의 산출을 위하여 상기 MALDI-TOF의 결과 나타난 각 HA, NA에 일치하는 펩타이드를 매뉴얼로 선택하여 MALDI-TOF/TOF를 실행하였다. 이 같은 MALDI-TOF에서 MALDI-TOF/TOF로 변환되는 본 실험의 설계는 보다 나은 단백의 동정을 산출할 수 있어 결과적으로 HA, NA 단백 분석에 의한 정확한 AIV 아류형을 알 수 있게 해주었다. 또한, 결과 내 HA 혹은 NA의 개별적 분석이 정확한 아류형의 동정을 가능하게 하는지에 대하여 알아보기 위해 동정 결과 수를 최대 50개로 정하여 분석을 실시하였다. 모든 분석 결과는 유의 수준 95% 이상에서 나타났다. 하지만 흥미롭게도 HA의 경우, 39개 NA의 경우 28개의 결과가 H9N2의 정확한 아류형을 나타냈으나 나머지에서는 서로 다른 결과를 나타냈다. 이로부터 질량 분석을 통해 AIV의 정확한 아류형을 알아내기 위해선 HA, NA 모두의 분석이 필요하다는 것을 알 수 있다 (도 7 및 도 8). 따라서 본 발명의 접근 방법으로 HA와 NA 분석에 기반한 AIV 아류형 동정이 가능하게 되고 이는 몇몇 단백의 분석에 의존한 기존의 직접적인 용액상 분해법과는 차별화될 수 있음을 확인할 수 있었다.

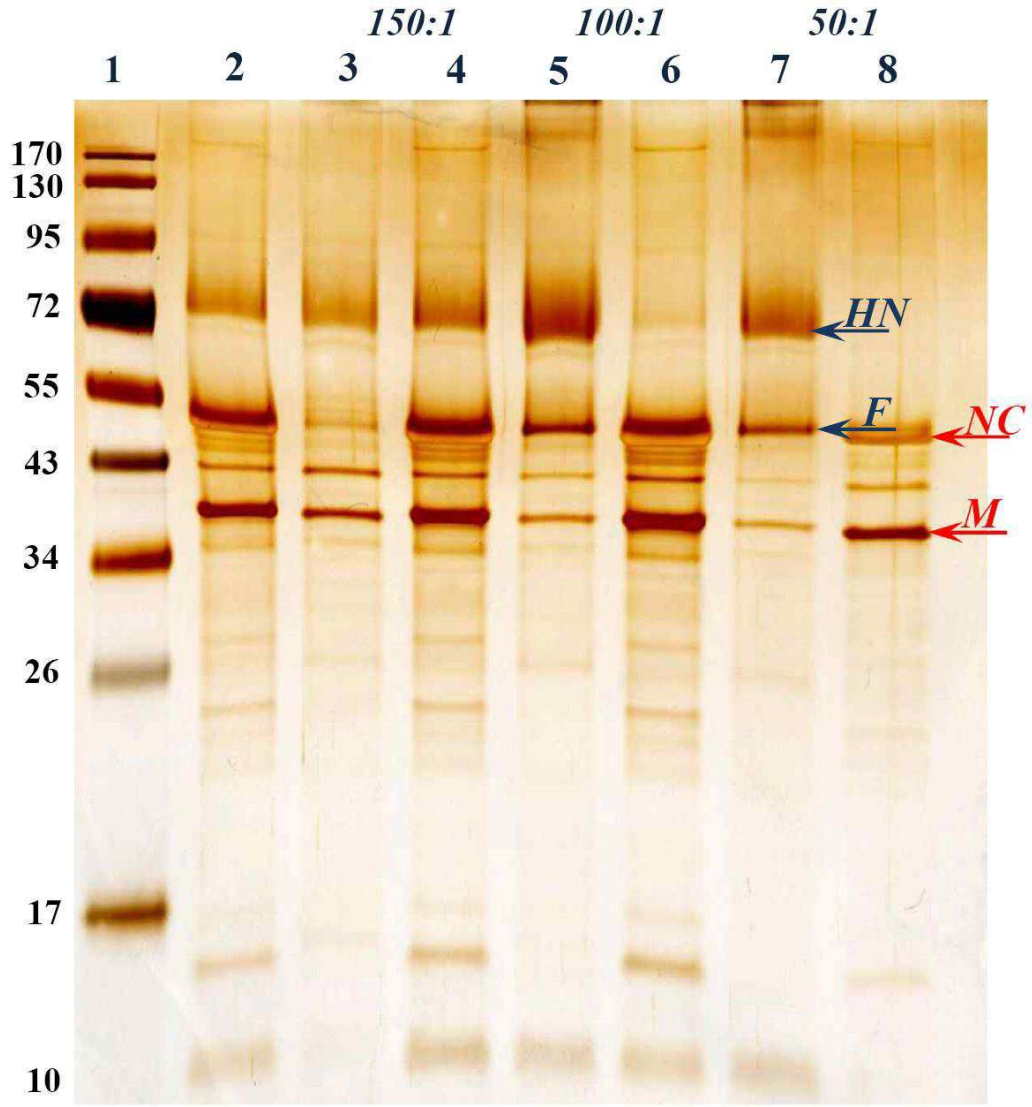
[0099] 펠렛의 경우, 도 6b에서와 같이 동일한 유형 (influenza A type)의 M-1 [influenza A virus (A/duck/Taiwan/WB29/99(H6N1))] (gi|87247013) 혹은[influenza A virus (A/Chicken/Korea/S15/03(H9N2))] (gi|58429267), 과 NP [influenza A virus (A/Chicken/Korea/25232-006/96(H9N2))] (gi|5732293) 의 mixture로 통계적 유의성을 갖고 동정되었다. 예상과 같이, 펠렛의 경우 Amicon 튜브의 여과막과 소수성 단백과의 흡착 문제로 인해 여전히 적은 수의 펩타이드가 질량 분석의 결과 나타났지만, 상기 두 개의 단백 M-1과 NP의 strain 간 아미노산 서열의 유사성을 고려한다면, 본 발명의 M-1, NP 분석 결과는 AIV 유형 분석에 있어 충분한 의미를 지님을 알 수 있었다.

도면

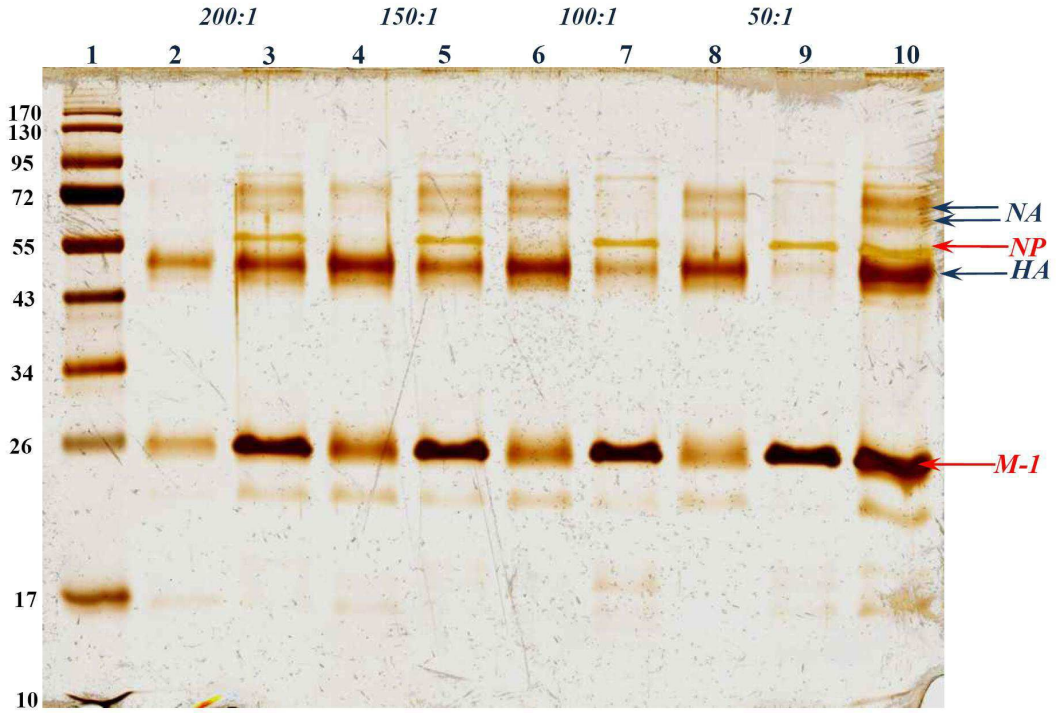
도면1


NDV
AIV
Detergents at various ratios
centrifugation
Pellet: viruses w/o surface proteins
Supernatant: isolated surface proteins
Complete denaturation with SDS & DTT
Depletion of detergents from the protein-detergent complexes
MALDI-TOF or MALDI-TOF/TOF MS
Web-based database searching

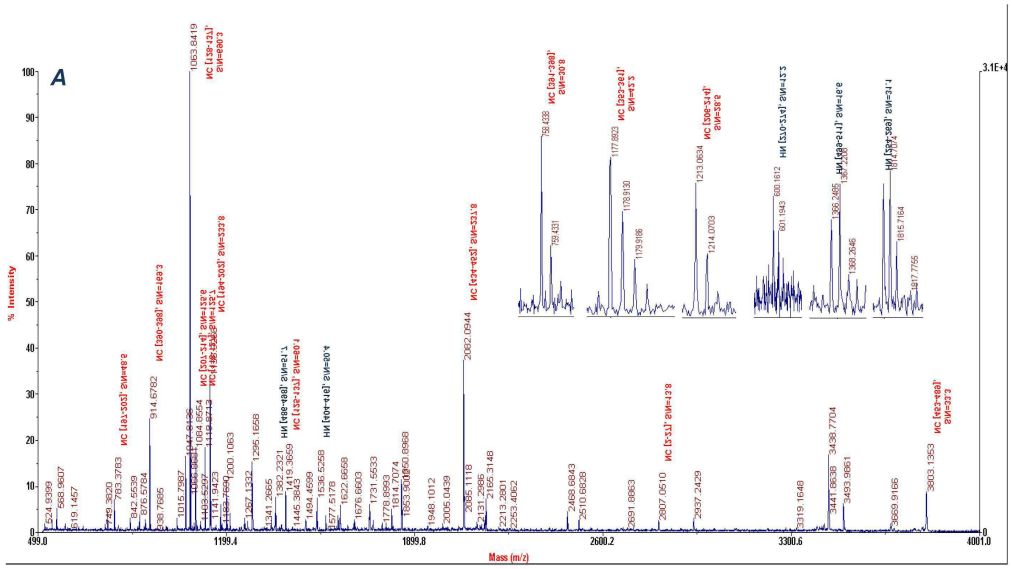
도면2



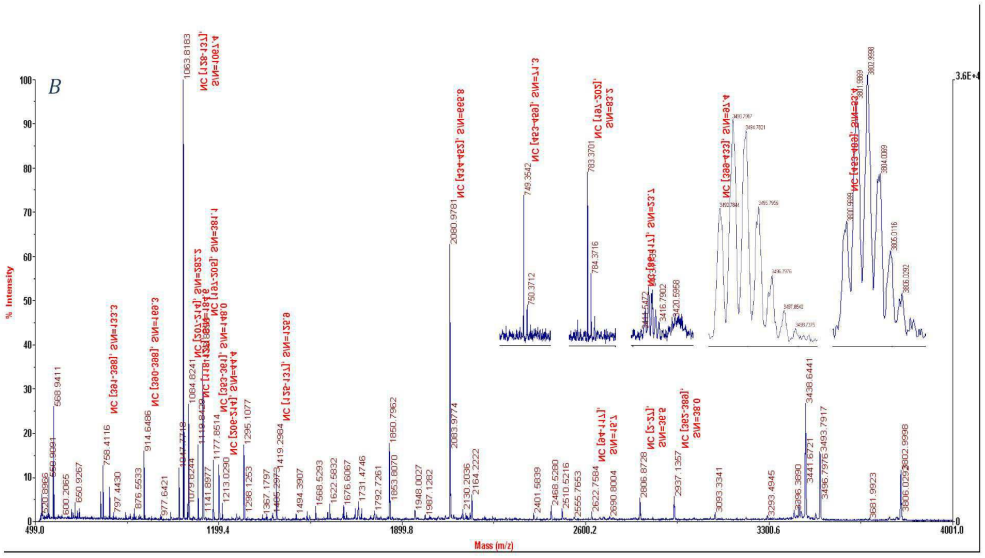
도면3


200:1
150:1
100:1
50:1
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
170
130
95
72
55
43
34
26
17
10
NA
NP
HA
M-1

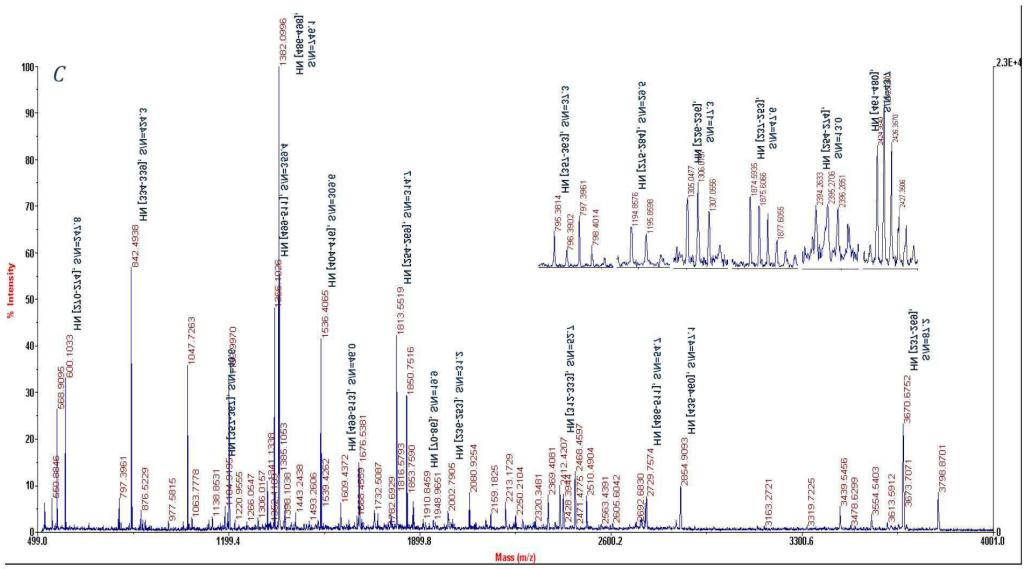
도면4a


A
% Intensity
Mass (m/z)
499.0
1199.4
1899.8
2600.2
3300.6
4001.0

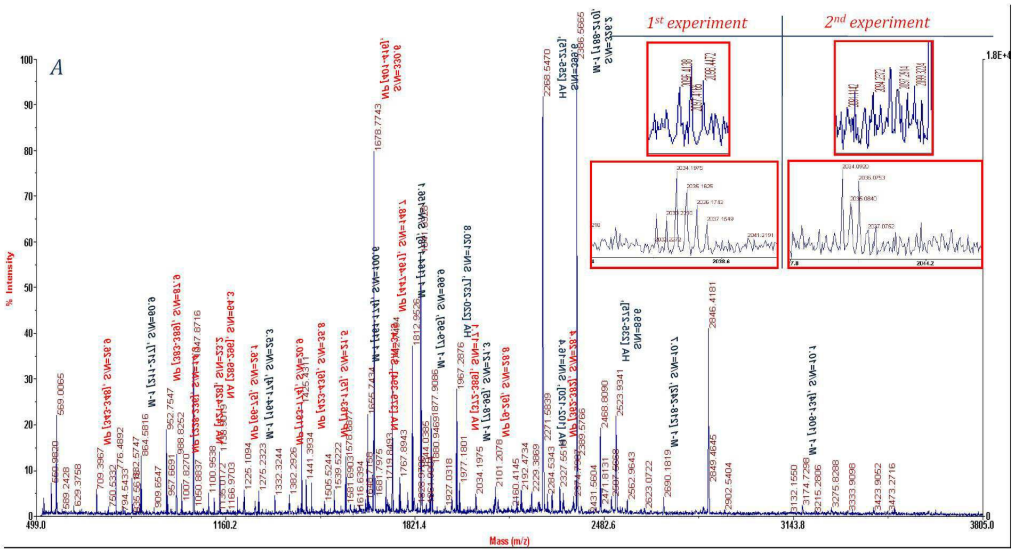
도면4b


B
% Intensity
Mass (m/z)
499.0
1199.4
1899.8
2600.2
3300.6
4001.0
3.6E+4

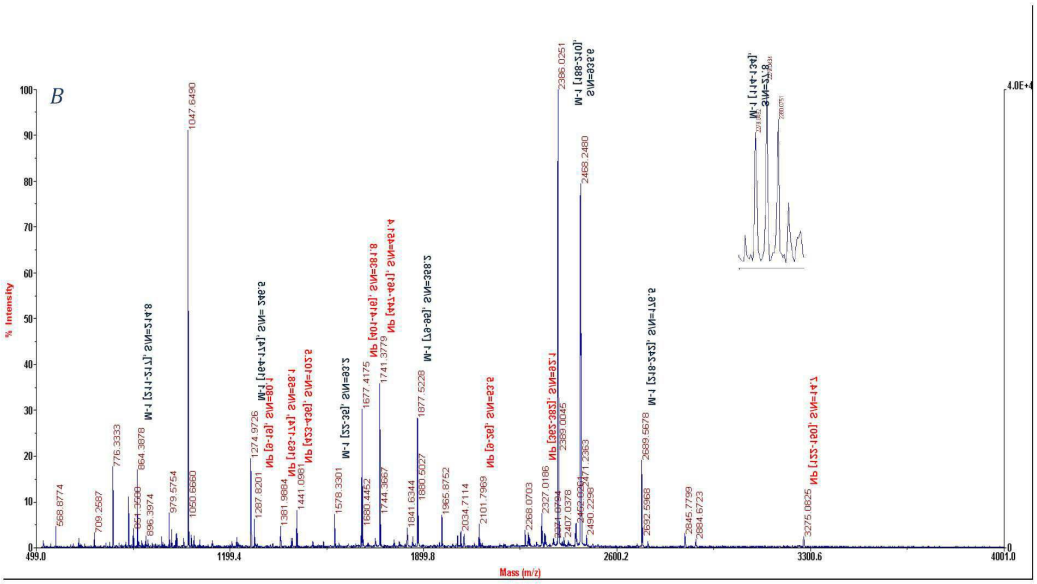
도면4c


C
% Intensity
Mass (m/z)
499.0
1199.4
1899.8
2600.2
3300.6
4001.0
2.3E+4

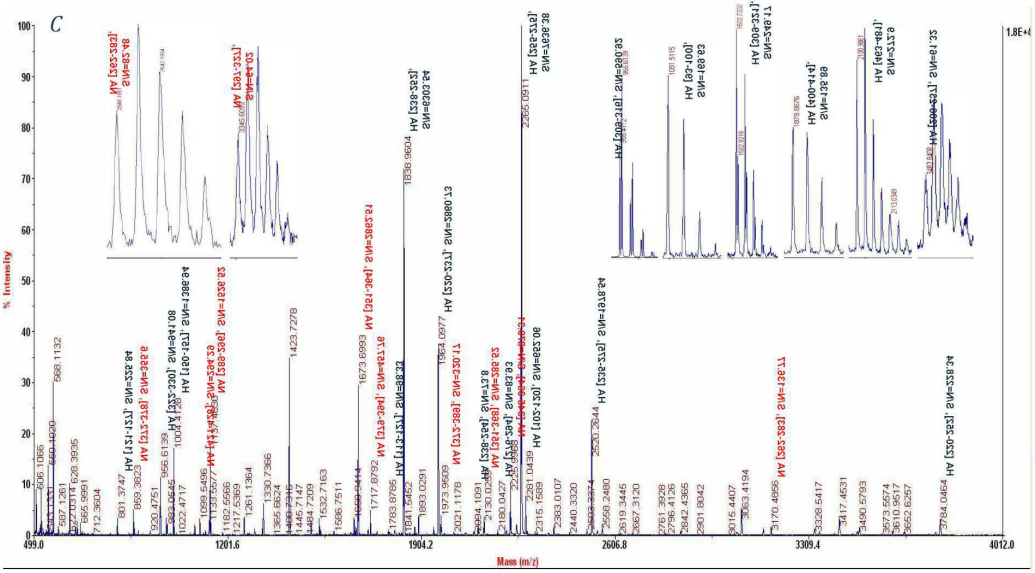
도면5a


A
1st experiment
2nd experiment
% Intensity
Mass (m/z)

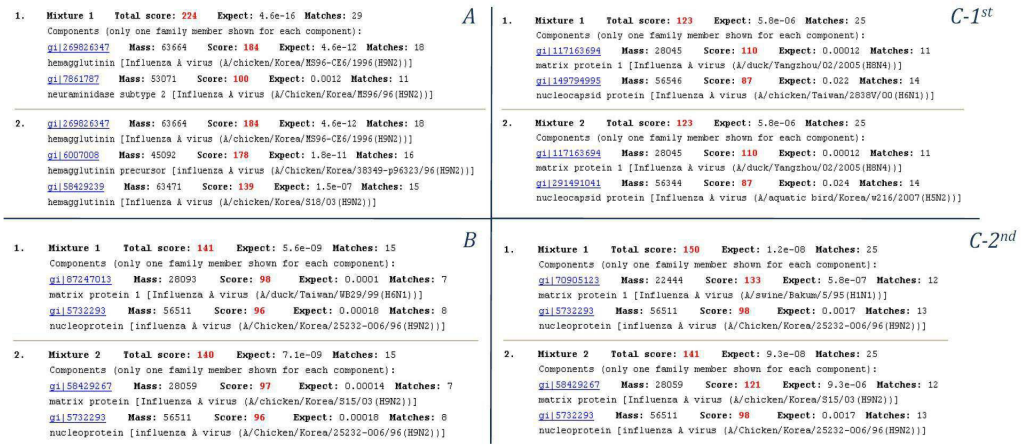
도면5b


B
% Intensity
Mass (m/z)

도면5c



도면6



A: 상층액, B: 펠렛, C-1: 직접적인 용액상 분해법의 반복 실험 1, C-2: 직접적인 용액상 분해법의 반복 실험 2

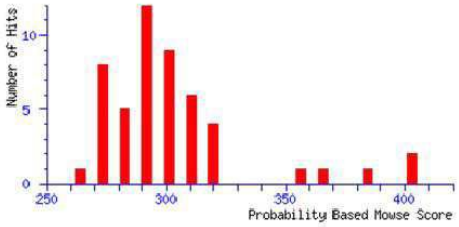
도면7a

Mascot Search Results

```
User            :
Email           :
Search title    : KYS\2010_8_11\2010_8_11\MSMS 23\C13
Database        : NCBInr 20090925 (9760158 sequences; 3332855056 residues)
Taxonomy        : Viruses (618597 sequences)
Timestamp       : 11 Aug 2010 at 13:52:18 GMT
Warning         : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score       : 403 for gi|58429239, hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S18/03(H9N2))]
```

Probability Based Mowse Score

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 70 are significant (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) — Help

Significance threshold p< 0.05 — Max. number of hits 50

Standard scoring ◉ MudPIT scoring ○ — Ions score cut-off 0 — Show sub-sets ☐

Show pop-ups ◉ Suppress pop-ups ○ — Sort unassigned Decreasing Score — Require bold red ☐

Re-Search All | Search Unmatched

도면7b

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi|58429239	63471	403	hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S18/03(H9N2))]
2.	gi|58429225	63499	403	hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S4/03(H9N2))]
3.	gi|6007008	45092	385	hemagglutinin precursor [influenza A virus (A/Chicken/Korea/38349-p96323/96(H9N2))]
4.	gi|7769126	63489	366	hemagglutinin [Influenza A virus (A/ck/Korea/ms96/96)]
5.	gi|237863089	63482	356	hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Korea/01310/2001(H9N2))]
6.	gi|78097849	63234	317	hemagglutinin [Influenza A virus (A/duck/NZL/76/1984(H9N1))]
7.	gi|82653778	63355	317	hemagglutinin [Influenza A virus (A/ruddy turnstone/DE/2731/1987(H9N1))]
8.	gi|157380445	60661	317	hemagglutinin [Influenza A virus (A/duck/Shantou/7488/2004(H9N2))]
9.	gi|145284498	62454	316	hemagglutinin [Influenza A virus (A/duck/Viet Nam/68/2001(H9N3))]
10.	gi|148283758	63547	312	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Korea/KBNP-0028/2000(H9N2))]
11.	gi|58429237	44529	309	hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S16/03(H9N2))]
12.	gi|58429229	44782	309	hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S12/03(H9N2))]
13.	gi|58429231	44913	309	hemagglutinin [Influenza A virus (A/duck/Korea/S13/03(H9N2))]
14.	gi|57335092	51016	306	hemagglutinin precursor [Influenza A virus (A/turkey/Germany/R113/95(H9N2))]
15.	gi|57335090	51073	306	hemagglutinin precursor [Influenza A virus (A/turkey/Germany/R90/95(H9N2))]
16.	gi|37677519	55901	302	hemagglutinin [Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/49/98(H9N2))]
17.	gi|37677525	55700	302	hemagglutinin [Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/31/97(H9N2))]
18.	gi|38229098	55927	302	hemagglutinin [Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/31/97(H9N2))]
19.	gi|31339422	55773	302	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Duck/Hong Kong/86/76(H9N2))]
20.	gi|31339418	56262	302	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Duck/Hong Kong/289/78(H9N2))]
21.	gi|157380407	60588	298	hemagglutinin [Influenza A virus (A/duck/Shantou/163/2004(H9N2))]
22.	gi|31339428	61231	298	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Duck/Shantou/1588/00(H9N1))]
23.	gi|31339430	61360	298	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Duck/Shantou/2030/00(H9N1))]
24.	gi|6007004	62184	297	hemagglutinin precursor [influenza A virus (A/Duck/Hong Kong/168/77(H9N2))]
25.	gi|85658760	63516	296	hemagglutinin [Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/49/98(H9N2))]
26.	gi|78097645	63386	296	hemagglutinin [Influenza A virus (A/duck/HK/147/1977(H9N6))]
27.	gi|82623877	63376	296	hemagglutinin [Influenza A virus (A/knot/DE/2552/1987(H9N5))]
28.	gi|82654896	63422	296	hemagglutinin [Influenza A virus (A/goose/MN/5733-1/1980(H9N2))]
29.	gi|28775926	63407	296	hemagglutinin precursor [Influenza A virus (A/duck/Hong Kong/147/77(H9N6))]
30.	gi|28778236	63374	296	hemagglutinin precursor [Influenza A virus (A/duck/Hong Kong/366/78(H9N2))]
31.	gi|49357112	63401	296	hemagglutinin precursor [Influenza A virus (A/mallard/Alberta/743/83(H9N1))]
32.	gi|116013100	63458	296	haemagglutinin [Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/13/00(H9N2))]
33.	gi|112382768	63324	296	hemagglutinin precursor [Influenza A virus (A/teal/Primorie/3631/02(H9N2))]
34.	gi|112382766	63311	296	hemagglutinin precursor [Influenza A virus (A/teal/Primorie/3628/02(H9N2))]
35.	gi|146455416	63403	296	haemagglutinin [Influenza A virus (A/mallard/Ireland/PV46B/1993(H9N3))]
36.	gi|238837338	63361	296	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Bewick's swan/Netherlands/5/2007(H9N2))]
37.	gi|33317953	44545	287	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Chicken/Korea/99029/99(H9N2))]
38.	gi|58429235	44602	287	hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S15/03(H9N2))]
39.	gi|58429233	44596	287	hemagglutinin [Influenza A virus (A/dove/Korea/S14/03(H9N2))]
40.	gi|31339424	52760	278	hemagglutinin [Influenza A virus (A/Duck/Hong Kong/610/79(H9N2))]
41.	gi|111662642	61612	278	hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Korea/164/04 (H9N8))]
42.	gi|55925898	63418	276	HA [Influenza A virus (A/swine/Korea/S452/2004(H9N2))]
43.	gi|55925914	63449	276	HA [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S1/2003(H9N2))]
44.	gi|187937407	63392	276	hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S21/2004(H9N2))]
45.	gi|187937425	63418	276	hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S21/2004(H9N2))]
46.	gi|90903133	63558	275	hemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Cheongju/ADL0401/2004(H9N2))]
47.	gi|28779295	63438	270	hemagglutinin precursor [Influenza A virus (A/duck/Hong Kong/610/79(H9N2))]
48.	gi|12382129	16752	270	haemagglutinin [Influenza A virus (A/turkey/Italy/VR86/83(H9N2))]
49.	gi|12382149	17152	269	haemagglutinin [Influenza A virus (A/chicken/Italy/B/94(H9N2))]
50.	gi|58429223	44597	264	hemagglutinin [Influenza A virus (A/silky chicken/Korea/S3/03(H9N2))]

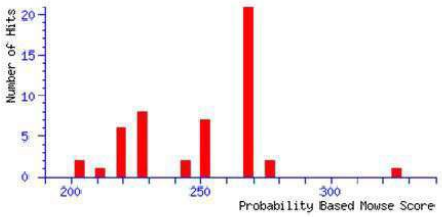
도면8a

Mascot Search Results

```
User            :
Email           :
Search title    : KYS\2010_8_11\2010_8_11\MSMS 25\C11
Database        : NCBInr 20090925 (9760158 sequences; 3332855056 residues)
Taxonomy        : Viruses (618597 sequences)
Timestamp       : 11 Aug 2010 at 14:26:44 GMT
Warning         : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.
Top Score       : 325 for gi|7861787, neuraminidase subtype 2 [Influenza A virus (A/Chicken/Korea/MS96/96(H9N2))]
```

Probability Based Mowse Score

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 70 are significant (p<0.05).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein Summary Report

Format As | Protein Summary (deprecated) | Help

Significance threshold p< 0.05 | Max. number of hits 100

Standard scoring | MudPIT scoring | Ions score cut-off 0 | Show sub-sets

Show pop-ups | Suppress pop-ups | Sort unassigned Decreasing Score | Require bold red

Re-Search All | Search Unmatched

도면8b

Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi|7861787	53071	325	neuraminidase subtype 2 [Influenza A virus (A/Chicken/Korea/MS96/96(H9N2))]
2.	gi|37677533	45309	277	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/13/00(H9N2))]
3.	gi|148532842	50375	273	neuraminidase [Influenza A virus (A/mallard/Italy/1980/1993(H5N2))]
4.	gi|157380411	51543	272	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Shantou/163/2004(H9N2))]
5.	gi|238821865	52964	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/mallard/Netherlands/14/2007(H2N2))]
6.	gi|255630172	52949	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/gadwall/Netherlands/1/2006(H9N2))]
7.	gi|78097386	53198	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Nanchang/1749/1992(H11N2))]
8.	gi|82654727	53134	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/dk/Hong Kong/293/1978(H7N2))]
9.	gi|116235397	53155	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/swan/Shimane/48/1997(H11N2))]
10.	gi|82569997	53149	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Denmark/65047/04(H5N2))]
11.	gi|134026358	53051	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Mongolia/54/2001(H5N2))]
12.	gi|146350802	53106	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Hong Kong/301/1978(H7N2))]
13.	gi|167859368	53231	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Eastern China/36/2002(H3N2))]
14.	gi|167859424	53159	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Eastern China/36/2002(H11N2))]
15.	gi|167859430	53036	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Eastern China/160/2003(H3N2))]
16.	gi|167859436	53229	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Eastern China/301/2003(H11N2))]
17.	gi|167859456	53180	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Eastern China/6/2004(H3N2))]
18.	gi|167859530	53191	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Eastern China/05/2005(H11N2))]
19.	gi|167859548	53005	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Eastern China/64/2004(H5N2))]
20.	gi|238809426	53064	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Tsukuba/4/2005(H9N2))]
21.	gi|238823723	53254	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/barnacle goose/Netherlands/1/2005(H6N2))]
22.	gi|238837343	53218	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/Bewick's swan/Netherlands/5/2007(H9N2))]
23.	gi|255629392	53246	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/mallard/Netherlands/1/2007(H3N2))]
24.	gi|255630043	53148	271	neuraminidase [Influenza A virus (A/Eurasian wigeon/Netherlands/3/2005(H9N2))]
25.	gi|58429293	46231	252	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S12/03(H9N2))]
26.	gi|149127206	51669	250	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Wales/1306/2007(H7N2))]
27.	gi|33317995	52379	248	neuraminidase [Influenza A virus (A/Chicken/Korea/99029/99(H9N2))]
28.	gi|58429299	53218	248	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S15/03(H9N2))]
29.	gi|187937412	53055	248	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S21/2004(H9N2))]
30.	gi|187937430	53152	248	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Korea/S21/2004(H9N2))]
31.	gi|37677529	45061	248	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/49/98(H9N2))]
32.	gi|89111568	53164	242	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/49/98(H9N2))]
33.	gi|167859462	53197	242	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Eastern China/40/2003(H11N2))]
34.	gi|89275020	49327	228	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/South Africa/AL19/02(H6N2))]
35.	gi|33317981	52398	227	neuraminidase [Influenza A virus (A/Ostrich/South Africa/9508103/95(H9N2))]
36.	gi|148532840	52969	227	neuraminidase [Influenza A virus (A/goose/Gui Yang/3799/2005(H5N2))]
37.	gi|111035062	53132	227	NA [Influenza A virus (A/Bewick's swan/Netherlands/1/2005(H6N2))]
38.	gi|237863087	53103	227	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Korea/01310/2001(H9N2))]
39.	gi|238823742	53249	227	neuraminidase [Influenza A virus (A/mallard/Netherlands/71/2006(H6N2))]
40.	gi|238823799	53137	227	neuraminidase [Influenza A virus (A/mallard/Netherlands/26/2005(H11N2))]
41.	gi|167859426	53518	227	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Eastern China/48/2002(H11N2))]
42.	gi|55469765	9709	221	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Korea/SNU0091/00(H9N2))]
43.	gi|55469759	9709	221	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Korea/SNU0037/00(H9N2))]
44.	gi|55469763	9723	221	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Korea/SNU0073/00(H9N2))]
45.	gi|55469761	9724	221	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Korea/SNU0057/00(H9N2))]
46.	gi|55469771	9709	221	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Korea/SNU1035C/00(H9N2))]
47.	gi|55469767	9723	221	neuraminidase [Influenza A virus (A/chicken/Korea/SNU0140/00(H9N2))]
48.	gi|255629670	53117	208	neuraminidase [Influenza A virus (A/mallard/Netherlands/29/2006(H7N2))]
49.	gi|37677527	45071	203	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/9/99(H9N2))]
50.	gi|37677531	45019	203	neuraminidase [Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/26/99(H9N2))]