



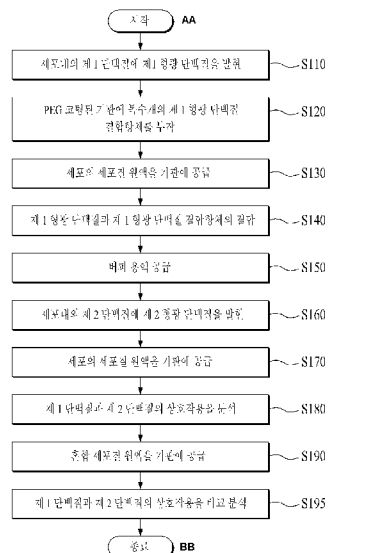
- (51) 국제특허분류: *G01N 33/533* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01) *G01N 33/52* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/003077
- (22) 국제출원일: 2012년 4월 20일 (20.04.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0036942 2011년 4월 20일 (20.04.2011) KR
10-2011-0088062 2011년 8월 31일 (31.08.2011) KR
10-2011-0088084 2011년 8월 31일 (31.08.2011) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국 과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-701 대전광역시 유성구 구성동 373-1, Daejeon (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 윤태영 (YOON, Tae-Young) [KR/KR]; 305-340 대전광역시 유성구 도룡동 카이스트교수아파트 1동 302호, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 맥 (MAC PATENT & LAW FIRM); 137-130 서울특별시 서초구 양재동 15-3 화승빌딩 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR ANALYZING PROTEIN-PROTEIN INTERACTION ON SINGLE-MOLECULE LEVEL WITHIN THE CELLULAR ENVIRONMENT

(54) 발명의 명칭: 세포 환경 내에서의 단일 분자 수준의 단백질-단백질 상호작용 분석 방법 및 장치

[Fig. 1]



AA ... Start
BB ... Finish
S110 ... Express 1st fluorescent protein on 1st protein inside cell
S120 ... Couple plurality of 1st fluorescent protein fixing antibodies with PEG-coated substrate
S130, S170 ... Supply cytoplasm fluid of cell to substrate
S140 ... Couple 1st fluorescent protein and 1st fluorescent protein fixing antibody
S150 ... Supply buffer solution
S160 ... Express 2nd fluorescent protein on 2nd protein inside cell
S180 ... Analyze interaction between 1st protein and 2nd protein
S190 ... Supply mixed cytoplasm fluid to substrate
S195 ... Compare and analyze interaction between 1st protein and 2nd protein

(57) Abstract: A method and an apparatus for analyzing protein-protein interaction on a single-molecule level are disclosed. The present invention is implemented through a process with the following steps: supplying a first protein to a substrate, on which a biomolecular sieve is coupled to a first marker that is provided on a first protein, for inducing the coupling of the first marker and the biomolecular sieve; supplying to the substrate the cytosol of a cell having a second protein that is provided with a second marker, when the first marker and the biomolecular sieve are coupled; and analyzing the interaction between the first protein and the second protein while the cytosol is supplied to the substrate. According to the present invention, the protein-protein interaction can be analyzed even on a single-molecule level inside an actual cell environment.

(57) 요약서: 단일 분자 수준까지의 단백질-단백질 상호작용 분석 방법 및 분석 장치가 개시된다. 본 발명은, 제1 단백질에 구비된 제1 표지자와 결합되는 생체 분자체가 부착된 기판에 제1 단백질을 공급하여 제1 표지자와 생체 분자체의 결합을 유도하고, 제1 표지자와 생체 분자체가 결합된 경우에, 제2 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 기판에 공급하며, 세포 용액이 기판에 공급된 상태에서, 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 분석하는 과정을 통해 구현된다. 본 발명에 따르면, 실제 세포 환경 내에서의 단백질-단백질 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석할 수 있게 된다.



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(48) 본 정정판 공개일:

2013 년 1 월 31 일

(15) 정정사항에 관한 정보:

2013 년 1 월 31 일 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 세포 환경 내에서의 단일 분자 수준의 단백질-단백질 상호작용 분석 방법 및 장치

기술분야

- [1] 본 발명은 단백질-단백질 상호작용 분석 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 실제 세포 환경 내에서의 단백질-단백질 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석할 수 있을 뿐만 아니라, 실제 세포 환경 내에서 다른 단백질이 관여된 경우에 특정 단백질-단백질 상호작용에 대한 영향도를 분석할 수 있는 단백질-단백질 상호작용 분석 방법 및 분석 장치에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 세포는 다양하고 복잡한 단백질-단백질 상호작용을 통하여 유전자 표현, 세포성장, 세포 주기, 대사, 신호전달 등의 여러 생물학적 기능을 수행함으로써 생명현상을 유지하고 있다. 따라서 세포내에서의 단백질-단백질 상호작용 및 상호작용의 기능을 이해하는 것은 생명현상들을 이해하는 초석이 되며 신약개발 및 질병 치료의 중요한 기반이 된다.
- [3] 시험관 내에서 단백질-단백질 상호작용을 조사하기 위한 방법으로는 대표적인 방법으로는 친화성 크로마토 그래피(affinity chromatography) 방법이 있다.
- [4] 단백질 친화성 크로마토그래피(Protein affinity chromatography)의 경우, 정제된 단백질이 준비되어야하는 어려움이 있다. 또한 단백질 간 상호작용 확인이 시험관 내에서 일어나므로, 세포내에서는 상호작용하지 않는 단백질들이 컬럼을 통과하는 동안 정전기적 상호작용에 의하여 결합하는 것처럼 보일 수 있는 false-positive 결과를 도출 할 수 있다.
- [5] 즉, 정량적 측정을 위해서 종래 기술에 따른 단백질-단백질 상호작용을 조사하기 위한 방법은 단백질-단백질 상호작용을 분석하기 위해서 세포 내에 존재하는 각각의 단백질을 정제하여 이들을 세포 내의 다른 물질들과 분리한 상태에서 상호작용을 분석하기 때문에, 다른 단백질 등이 혼재되어 있는 실제 세포 환경 내에서의 단백질-단백질 상호작용을 단일 분자 수준에서 분석할 수는 없다는 한계가 있다.
- [6] 뿐만 아니라, 종래 기술에 따른 단백질-단백질 상호작용을 조사하기 위한 방법은 실제 세포 환경 내에서 기타의 다른 단백질이 관여된 경우에 특정 단백질-단백질 상호작용에 대한 영향도를 분석할 수 없다는 한계가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 따라서, 본 발명의 목적은, 실제 세포 환경 내에서의 단백질-단백질 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석할 수 있을 뿐만 아니라, 실제 세포 환경 내에서 다른 단백질이 관여된 경우에 특정 단백질-단백질 상호작용에 대한 영향도를 분석할

수 있는 단백질-단백질 상호작용 분석 방법 및 분석 장치를 제공함에 있다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법은, 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 방법에 있어서, (a) 상기 제1 단백질에 구비된 제1 표지자와 결합되는 생체 분자체가 부착된 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체의 결합을 유도하는 단계; (b) 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체가 결합된 경우에, 제2 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기 기관에 공급하는 단계; 및 (c) 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하는 단계를 포함한다.
- [9] 한편, 본 발명에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법은, 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 방법에 있어서, (a) 상기 제1 단백질이 결합되는 생체 분자체인 제1 단백질 결합 분자체가 부착된 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체의 결합을 유도하는 단계; (b) 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체가 결합된 경우에, 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기 기관에 공급하는 단계; 및 (c) 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하는 단계를 포함한다.
- [10] 또한, 상기 (c) 단계는, 상기 제1 단백질과 결합된 상기 제2 단백질에 구비된 표지자에 의해 발생하는 특정 파장의 형광 신호를 근접장을 발생시키는 광학장치를 이용하여 측정하는 단계를 포함한다.
- [11] 또한, 상기 (c) 단계는, 상기 특정 파장의 형광 신호를 소정의 시간 동안 적분 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [12] 또한, 상기 (c) 단계는, 상기 기관에 상기 공급된 세포 용액이 존재하는 상황에서, 상기 특정 파장의 형광 신호를 실시간 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [13] 또한, 상기 (a) 단계는, 상기 제1 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기 기관에 공급하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [14] 또한, 상기 (b) 단계 이전에, 상기 기관에 버퍼 용액을 공급하는 단계를 더 포함한다.
- [15] 또한, 상기 제1 표지자, 및 상기 제2 표지자는 서로 다른 파장을 갖는 형광 단백질인 것을 특징으로 한다.
- [16] 한편, 본 발명에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법은, 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 방법에 있어서, (a) 상기 제1 단백질에 구비된 제1 표지자와 결합되는 생체 분자체가 부착된 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체의 결합을 유도하는 단계; (b) 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체가 결합된 경우에, 제2 표지자가

구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기 기관에 공급하는 단계; (c) 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하여 제1 분석값을 획득하는 단계; (d) 상기 (a) 단계에서의 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체가 결합된 상태의 기관과 동일한 기관에 상기 (b) 단계에서의 상기 세포 용액과 분석 대상 세포 용액을 혼합한 혼합 세포 용액을 공급하는 단계; (e) 상기 혼합 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하여 제2 분석값을 획득하는 단계; 및 (f) 상기 제1 분석값과 상기 제2 분석값을 비교분석하는 단계를 포함한다.

- [17] 한편, 본 발명에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법은, 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 방법에 있어서, (a) 상기 제1 단백질이 결합되는 생체 분자체인 제1 단백질 결합 분자체가 부착된 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체의 결합을 유도하는 단계; (b) 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체가 결합된 경우에, 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기 기관에 공급하는 단계; 및 (c) 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하여 제1 분석값을 획득하는 단계; (d) 상기 (a) 단계에서의 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체가 결합된 기관과 동일한 기관에 상기 (b) 단계에서의 상기 세포 용액과 분석 대상 세포 용액을 혼합한 혼합 세포 용액을 공급하는 단계; (e) 상기 혼합 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하여 제2 분석값을 획득하는 단계; 및 (f) 상기 제1 분석값과 상기 제2 분석값을 비교분석하는 단계를 포함한다.
- [18] 바람직하게는, 상기 (c) 단계는, 상기 제1 단백질과 결합된 상기 제2 단백질에 구비된 표지자에 의해 발생하는 특정 파장의 형광 신호를 근접장을 발생시키는 광학장치를 이용하여 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [19] 또한, 상기 (c) 단계는, 상기 특정 파장의 형광 신호를 소정의 시간 동안 적분 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [20] 또한, 상기 (c) 단계는, 상기 기관에 상기 공급된 세포 용액이 존재하는 상황에서, 상기 특정 파장의 형광 신호를 실시간 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [21] 또한, 상기 (a) 단계는, 상기 제1 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기 기관에 공급하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [22] 또한, 상기 (b) 단계 이전에, 상기 기관에 버퍼 용액을 공급하는 단계를 더 포함한다.
- [23] 또한, 상기 제1 표지자, 및 상기 제2 표지자는 서로 다른 파장을 갖는 형광 단백질인 것을 특징으로 한다.
- [24] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 장치는, 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기

위한 장치에 있어서, 상기 제1 단백질에 구비된 제1 표지자와 결합되는 생체 분자체가 부착된 기관이 로딩되는 시료 로딩부-상기 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체의 결합이 유도되며, 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체가 결합된 경우에, 제2 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액이 상기 기관에 공급됨-; 상기 시료 로딩부에 로딩된 상기 기관의 표면에 제1 파장을 갖는 근접장을 발생시키는 광학 여기부; 및 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하는 광학 측정부를 포함한다.

- [25] 한편, 본 발명에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 장치는, 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 장치에 있어서, 상기 제1 단백질이 결합되는 생체 분자체인 제1 단백질 결합 분자체가 부착된 기관이 로딩되는 시료 로딩부-상기 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체의 결합을 유도하고, 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체가 결합된 경우에, 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액이 상기 기관에 공급됨-; 상기 시료 로딩부에 로딩된 상기 기관의 표면에 제1 파장을 갖는 근접장을 발생시키는 광학 여기부; 및 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하는 광학 측정부를 포함한다.

- [26] 바람직하게는, 상기 광학 측정부는, 상기 제2 파장의 형광 신호를 소정의 시간 동안 적분 측정하는 것을 특징으로 한다.

- [27] 또한, 상기 광학 측정부는, 상기 기관에 상기 공급된 세포 용액이 존재하는 상황에서, 상기 제2 파장의 형광 신호를 실시간 측정하는 것을 특징으로 한다.

- [28] 또한, 상기 제1 표지자, 및 상기 제2 표지자는 서로 다른 파장을 갖는 형광 단백질인 것을 특징으로 한다.

- [29] 또한, 상기 광학 측정부가 측정한 상기 제2 파장의 형광 신호를 이미지 프로세싱을 통해 분석하는 신호 분석부를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [30] 한편, 본 발명에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 장치는, 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 장치에 있어서, 상기 제1 단백질에 구비된 제1 표지자와 결합되는 생체 분자체가 부착된 기관이 로딩되는 시료 로딩부-상기 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체의 결합을 유도하고, 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체가 결합된 경우에, 제2 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액이 상기 기관에 공급됨-; 상기 시료 로딩부에 로딩된 상기 기관의 표면에 제1 파장을 갖는 근접장을 발생시키는 광학 여기부; 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하는 광학 측정부;

및 상기 광학 측정부가 측정한 상기 제2 파장의 형광 신호를 이미지 프로세싱을 통해 분석하여 제1 분석값을 획득하는 신호 분석부를 포함하며, 상기 시료 로딩부에는 상기 제1 단백질에 구비된 제1 표지자와 결합되는 생체 분자체가 부착된 새로운 기관이 로딩되고, 상기 새로운 기관에 상기 세포 용액과 분석 대상 세포 용액을 혼합한 혼합 세포 용액이 공급되고, 상기 혼합 세포 용액이 상기 새로운 기관에 공급된 상태에서, 상기 광학 측정부는 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하며, 상기 신호 분석부는 상기 광학 측정부가 측정한 상기 제2 파장의 형광 신호를 이미지 프로세싱을 통해 분석하여 제2 분석값을 획득하는 것을 특징으로 한다.

- [31] 한편, 본 발명에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 장치는, 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 장치에 있어서, 상기 제1 단백질이 결합되는 생체 분자체인 제1 단백질 결합 분자체가 부착된 기관이 로딩되는 시료 로딩부-상기 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체의 결합을 유도하며, 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체가 결합된 경우에, 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액이 상기 기관에 공급됨-; 상기 시료 로딩부에 로딩된 상기 기관의 표면에 제1 파장을 갖는 근접장을 발생시키는 광학 여기부; 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하는 광학 측정부; 및 상기 광학 측정부가 측정한 상기 제2 파장의 형광 신호를 이미지 프로세싱을 통해 분석하여 제1 분석값을 획득하는 신호 분석부를 포함하며, 상기 시료 로딩부에는 상기 제1 단백질이 결합되는 생체 분자체인 제1 단백질 결합 분자체가 부착된 새로운 기관이 로딩되고, 상기 새로운 기관에 상기 세포 용액과 분석 대상 세포 용액을 혼합한 혼합 세포 용액이 공급되고, 상기 혼합 세포 용액이 상기 새로운 기관에 공급된 상태에서, 상기 광학 측정부는 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하며, 상기 신호 분석부는 상기 광학 측정부가 측정한 상기 제2 파장의 형광 신호를 이미지 프로세싱을 통해 분석하여 제2 분석값을 획득하는 것을 특징으로 한다.
- [32] 바람직하게는, 상기 제1 분석값과 상기 제2 분석값을 비교분석하는 신호 진단부를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [33] 또한, 상기 광학 측정부는, 상기 제2 파장의 형광 신호를 소정의 시간 동안 적분 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [34] 또한, 상기 광학 측정부는, 상기 기관에 상기 공급된 세포 용액이 존재하는 상황에서, 상기 제2 파장의 형광 신호를 실시간 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [35] 또한, 상기 제1 표지자, 및 상기 제2 표지자는 서로 다른 파장을 갖는 형광 단백질인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [36] 본 발명에 따르면, 실제 세포 환경 내에서의 단백질-단백질 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석할 수 있게 된다.
- [37] 아울러, 본 발명에 따르면, 실제 세포 환경 내에서 다른 단백질이 관여된 경우에 특정 단백질-단백질 상호작용에 대한 영향도를 분석할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

- [38] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법을 설명하는 절차 흐름도,
- [39] 도 2 내지 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법의 각 단계를 설명하는 도면, 및
- [40] 도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법을 설명하는 절차 흐름도,
- [41] 도 6은 도 1 내지 도 5에서의 단백질-단백질 상호작용 분석 방법이 실행되는 분석 장치의 구조를 나타내는 기능 블록도, 및
- [42] 도 7은 본 발명에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 장치의 광학 측정부가 측정한 신호를 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 이하에서는 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 도면들 중 동일한 구성요소들은 가능한 한 어느 곳에서든지 동일한 부호들로 나타내고 있음에 유의해야 한다. 또한 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 상세한 설명은 생략한다.
- [44] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법을 설명하는 절차 흐름도이다. 도 1을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법을 설명하면, 먼저, 분석자는 특정한 두 개의 단백질인 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위해서, 세포 상태에서 유전자 조작 과정을 거쳐 해당 세포 내에 존재하는 제1 단백질에 표지자로서 제1 형광 단백질이 발현되도록 한다(S110). 한편, 본 발명을 실시함에 있어서는, 제1 형광 단백질을 물리 화학적인 방법에 의해서 제1 단백질에 부착 또는 연결시킬 수도 있을 것이다.
- [45] 본 발명에 따른 실험에 있어서, 제1 단백질은 h-Ras 단백질이고, 제2 단백질은 C-Raf의 Ras-binding domain(RBD) 단백질이며, 제1 형광 단백질은 m-Cherry 단백질로 하였다.
- [46] 그 다음 분석자는 폴리에틸렌 글리콜(polyethyleneglycol:PEG) 코팅처리된 퀴츠 슬라이드(Quartz Slide)인 기판에, 전술한 S110 단계에서 제1 단백질에 표지자로서 발현된 제1 형광 단백질과 결합되는 항체인 제1 형광 단백질 결합항체를 도 2에서와 같이 부착한다(S120).
- [47] 한편, 본 발명을 실시함에 있어서는, 제1 형광 단백질과 결합하는 항체에는,

항체 이외에도 DNA, RNA, 단백질과 결합하는 특정 성분을 갖는 리포솜(liposome) 등의 제1 형광 단백질과 결합하는 생체 분자체가 사용될 수 있을 것이다.

[48] 그 다음, 분석자는 전술한 S110 단계에서 준비해 놓은, 내부의 제1 단백질에 제1 형광 단백질이 발현되어 있는 세포의 세포질 원액을 기관에 공급함으로써(S130), 제1 단백질에 발현된 제1 형광 단백질과 제1 형광 단백질 결합항체의 결합을 유도한다(S140).

[49] 한편, 전술한 S130 단계를 실시함에 있어서 세포질 원액뿐만 아니라, 세포 원액, 희석된 세포질 원액, 또는 희석된 세포 원액 등의 세포 용액이 사용될 수 있을 것이다.

[50] 도 3에서와 같이, 기관상에 부착된 제1 형광 단백질 결합항체와 제1 형광 단백질이 결합된 경우에 분석자가 전반사 현미경을 이용한 기관의 표면 관찰을 수행하면, 분석자는 제1 형광 단백질에 의한 파장 변화로부터(즉, 제1 형광 단백질로부터 발생하는 개개의 단분자 신호를 측정하여) 기관상에 부착된 복수개의 제1 형광 단백질 결합항체에 제1 형광 단백질이 결합되었는지 여부를 확인할 수 있게 된다.

[51] 한편, 본 발명을 실시함에 있어서는, 기관에 부착된 항체와의 결합을 위해 제1 단백질에 발현된 소정의 단백질은 반드시 형광 단백질일 필요는 없을 것이나, 형광 단백질이 아닌 경우에는 항체와의 결합여부를 전반사 현미경을 통해 파악할 수 없는 관계로 제1 단백질에 발현된 단백질은 형광 단백질이 되도록 함이 바람직할 것이다.

[52] 즉, 본 발명에서의 제1 단백질에 발현된 소정의 단백질은 기관에 부착된 항체와의 결합을 하는 항원의 기능을 수행하는 것으로서, 이와 같이 제1 단백질에 부착된 소정의 항원은 반드시 단백질일 필요는 없으며, 항체와의 결합이 가능한 화합물이 될 수도 있을 것이다.

[53] 즉, 제1 단백질에 발현된 단백질이 형광 단백질인 경우에는 항체와의 결합여부를 전반사 현미경을 통해 파악할 수 있으므로, 기관에 부착된 항체와 결합된 형광 단백질의 개수 및 그에 따른 결합 밀도를 정확하게 측정할 수 있게 되는 것이다.

[54] 기관상에 부착된 복수개의 제1 형광 단백질 결합항체에 각각 제1 형광 단백질이 결합된 것으로 확인되면, 분석자는 기관에 버퍼 용액을 공급함으로써, 제1 형광 단백질이 발현된 제1 단백질을 제외한 세포질 원액에 포함되어 있는 나머지 물질들을 기관상에서 제거하게 된다(S150).

[55] 그 다음, 분석자는 전술한 S110 단계에서의 세포와 동일한 다른 세포에서 해당 세포에 존재하는 제2 단백질에 유전자 조작을 통해 표지자로서 제2 형광 단백질이 발현되도록 한다(S160). 한편, 본 발명을 실시함에 있어서는, 제2 형광 단백질을 물리 화학적인 방법에 의해서 제2 단백질에 부착 또는 연결시킬 수도 있을 것이다.

- [56] 한편, 전술한 S160 단계는 원활한 분석의 진행을 위해 전술한 S110 단계와 함께 미리 실행할 수도 있을 것이며, 본 발명을 실시함에 있어서, 제2 형광 단백질은 제1 형광 단백질과 다른 파장역역을 갖는 것이 바람직하므로, 제1 형광 단백질이 m-Cherry 단백질인 경우에 제2 형광 단백질은 녹색형광 단백질인 eGFP(enhanced Green Fluorescent Protein)가 될 수 있을 것이다.
- [57] 그 다음, 분석자는 전술한 S160 단계에서의 내부의 제2 단백질에 제2 형광 단백질이 발현되어 있는 세포의 세포질 원액 전체를 기관에 공급한다(S170).
- [58] 한편, 전술한 S170 단계를 실시함에 있어서 세포질 원액뿐만 아니라, 세포 원액, 희석된 세포질 원액, 또는 희석된 세포 원액 등의 세포 용액이 사용될 수 있을 것이다.
- [59] 기관의 표면에 부착되어 있는 복수개의 제1 형광 단백질 결합항체에는 각각 제1 형광 단백질을 통해 제1 단백질이 결합되어 있으며, 이와 같은 기관의 표면에 제2 단백질이 포함되어 있는 세포질 원액 전체가 공급되면, 기관 표면의 제1 단백질은 세포질 원액에 포함되어 있는 제2 단백질 및 세포 내의 다른 단백질들(Native proteins in whole cell lysate)이 공존하는 세포내 환경에서와 동일한 상태에서 제2 단백질과 상호 작용을 하게 된다.
- [60] 보다 구체적으로, 도 4에서와 같이 기관 표면상에 부착된 각각의 항체에 제1 형광 단백질을 통해 결합되어 있는 각각의 제1 단백질은 제2 단백질과 세포내 환경에서와 동일한 상태에서 단일 분자 수준에서 결합과 분리를 반복하는 상호 작용을 하게 된다.
- [61] 도 4에서와 같이 제1 단백질과 제2 단백질 간의 단일 분자 수준에서의 결합이 있는 경우에 분석자가 473nm의 파장을 갖는 전반사 현미경 등의 근접장을 발생시키는 광학 장치를 통해 기관의 표면을 관찰하면, 제2 단백질에 발현되어 있는 제2 형광 단백질인 eGFP에 의해, 기관 표면에서의 파장이 473nm에서 520nm로 변화한 것을 확인할 수 있다.
- [62] 즉, 제1 단백질과 제2 단백질 간의 결합을 통해 기관 표면에 위치하게 된 제2 형광 단백질(eGFP)로부터 발생되는 특정 파장대역(520nm)의 형광 신호의 검출을 통해 제1 단백질과 제2 단백질의 결합상태를 확인할 수 있게 되고, 분석자는 기관 표면상에 부착된 각각의 항체에서의 파장의 변화를 지속적으로 관찰함으로써, 제1 단백질과 제2 단백질의 결합과 분리의 빈도 등의 상호작용을 단분자 수준에서 분석할 수 있게 된다(S180).
- [63] 아울러, 본 발명에서는 전술한 S170 단계에서 기관에 공급된 세포질 원액이 존재하는 상황에서, 특정 파장의 형광 신호를 실시간 측정함으로써 제1 단백질과 제2 단백질의 결합과 분리의 빈도 등의 상호작용을 세포 환경과 동일한 환경에서 분석할 수 있게 되는 것이다.
- [64] 한편, 제1 단백질과 결합되지 않은 제2 단백질도 기관에 공급된 세포질 원액 내에서 부유이동하는 과정에서, 기관 표면 근처로 이동할 수 있으며, 이러한 경우에도 전반사 현미경을 통한 표면 관찰시 제2 단백질에 발현되어 있는 제2

형광 단백질인 eGFP에 의해, 기관 표면에서의 파장이 473nm에서 520nm로 변화하게 됨으로써, 상호작용 분석의 오류를 초래할 수 있다는 문제점이 제기될 수 있을 것이다.

- [65] 따라서, 본 발명을 실시함에 있어서는, 전반사 현미경을 통해 기관 표면에서의 파장 변화를 측정하는 경우에 파장 변화를 소정의 시간 동안 적분 측정하는 것이 바람직할 것이다.
- [66] 제1 단백질과 결합되지 않고 세포질 원액 내를 부유하는 제2 단백질은 세포질 원액내에서의 이동속도가 대단히 빠르므로, 제2 단백질이 부유 이동 중에 일시적으로 기관 표면에 접근하였더라도 적분 측정의 시간 구간 내에서 다시 기관 표면으로부터 이탈하게 되기 때문이다.
- [67] 이를 검증하기 위해, 제2 단백질을 제1 단백질과 결합되지 않도록 처리함으로써, 제1 단백질과 결합되는 제2 단백질이 없이 모든 제2 단백질이 세포질 원액내를 부유 이동하게 되는 상태에서 기관 표면에서의 파장 변화를 50msec의 적분 구간으로 적분 측정한 결과, 파장 변화가 전혀 관측되지 않음을 실험적으로 확인하였다.
- [68] 한편, 본 발명을 실시함에 있어서는, 전술한 S180 단계에서의 단백질-단백질 상호 작용 분석값을 제1 분석값으로 확보하고, 후술하는 다른 환경에서의 단백질-단백질 상호 작용 분석값을 제2 분석값으로 확보하여 양자의 비교 분석을 수행할 수도 있을 것이다.
- [69] 즉, 시험자는 전술한 S180 단계에서의 상호 작용 분석값을 제1 분석값으로 확보한 후에, 전술한 S110 단계 내지 S160 단계까지를 동일하게 반복하여 실시한다.
- [70] 한편, 시험자는 전술한 S170 단계를 실행함에 있어서, 전술한 S160 단계에서 내부의 제2 단백질에 제2 형광 단백질이 발현되어 있는 세포의 세포질 원액을 기관에 공급하는 것이 아니라, 해당 세포의 세포질 원액과 암세포 등의 별도의 분석 대상 세포질 원액을 혼합한 혼합 세포질 원액을 기관에 공급하게 된다(S190).
- [71] 한편, 전술한 S190 단계를 실시함에 있어서 혼합 세포질 원액뿐만 아니라, 혼합 세포 원액, 희석된 혼합 세포질 원액, 또는 희석된 혼합 세포 원액 등의 혼합 세포 용액이 사용될 수 있을 것이다.
- [72] 즉, 기관의 표면에 부착되어 있는 복수개의 제1 형광 단백질 결합항체에는 각각 제1 형광 단백질을 통해 제1 단백질이 결합되어 있으며, 제2 단백질이 포함되어 있는 세포질 원액과 분석 대상 세포질 원액을 혼합한 혼합 세포질 원액이 기관의 표면에 공급되면, 기관 표면의 제1 단백질은 혼합 세포질 원액에 포함되어 있는 제2 형광 단백질이 발현되어 있는 제2 단백질 뿐만 아니라, 분석 대상 세포 내의 제2 형광 단백질이 발현되어 있지 않은 제2 단백질 및 기타의 다른 단백질들(Native proteins in whole cell lysate)이 공존하는 환경에서 제2 단백질과 상호 작용을 하게 된다.

- [73] 즉, 전술한 S180 단계에서와는 달리, 제2 형광 단백질이 발현되어 있는 제2 단백질은 분석 대상 세포 내의 제2 형광 단백질이 발현되어 있지 않은 제2 단백질과 공존하는 상태에서 기관 표면의 제1 단백질과 경쟁적으로 상호 작용을 하게 된다. 뿐만 아니라, 분석 대상 세포 내의 다른 단백질에 의해 제2 형광 단백질이 발현되어 있는 제2 단백질은 제1 단백질과의 상호 작용에 있어 영향을 받게 된다.
- [74] 이와 같은 분석 대상 세포 내의 다른 단백질 또는 분석 대상 세포 내의 제2 단백질에 의한 영향의 정도는, 시험자가 전술한 S180 단계에서와 같이 전반사 현미경 등의 근접장을 발생시키는 광학 장치를 통해 기관의 표면을 관찰하여, 기관 표면의 제1 단백질과 제2 형광 단백질이 발현되어 있는 제2 단백질의 결합과 분리의 빈도 등의 상호작용을 단분자 수준에서 분석함으로써 확인할 수 있게 된다(S195).
- [75] 보다 구체적으로, 시험자는 상술한 제1 분석값과 전술한 S195 단계에서의 분석값인 제2 분석값을 비교분석함으로써 제2 단백질의 제1 단백질과의 상호 작용에 있어서의 다른 세포 내의 제2 단백질 및 다른 세포 내의 기타의 단백질에 의한 상호 작용의 촉진 또는 방해 등의 영향 정도를 분석할 수 있게 될 것이다.
- [76] 한편, 도 5는 본 발명의 다른 실시예에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법을 설명하는 절차 흐름도이다. 도 5에서의 본 발명의 다른 실시예에 있어서는 도 1에서의 본 발명의 일 실시예에서와는 달리, 제1 단백질에 제1 형광 단백질을 발현시키지 않고, 기관에 제1 형광 단백질 결합항체가 아니라, 제1 단백질 결합항체를 부착함으로써 제1 단백질이 기관에 부착된 항체에 직접 결합된 상태에서의 제1 단백질과 제2 단백질과의 상호작용을 분석하게 된다.
- [77] 도 5를 참조하여, 본 발명의 다른 실시예에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법을 설명하면, 먼저, 분석자는 특정한 두 개의 단백질인 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준에서 분석하기 위해서, 폴리에틸렌 글리콜(polyethyleneglycol:PEG) 코팅처리된 켈츠 슬라이드(Quartz Slide)인 기관에, 제1 단백질과 결합되는 항체인 제1 단백질 결합항체를 같이 부착한다(S210).
- [78] 한편, 본 발명을 실시함에 있어서는, 제1 단백질과 결합하는 항체에는, 항체 이외에도 DNA, RNA, 단백질과 결합하는 특정 성분을 갖는 리포솜(liposome) 등의 제1 단백질과 결합하는 생체 분자체가 사용될 수 있을 것이다.
- [79] 그 다음, 분석자는 제1 단백질이 포함되어 있는 세포의 세포질 원액을 기관에 공급함으로써(S220), 제1 단백질과 제1 단백질 결합항체의 결합을 유도한다(S230).
- [80] 한편, 전술한 S220 단계를 실시함에 있어서 세포질 원액뿐만 아니라, 세포 원액, 희석된 세포질 원액, 또는 희석된 세포 원액 등의 세포 용액이 사용될 수 있을 것이다.
- [81] 한편, 본 발명의 다른 실시예에서도 분석자는 제1 단백질에 m-Cherry 등의

소정의 형광 단백질이 발현되도록 사전 처리할 수 있을 것이며, 이 경우에 제1 단백질 결합항체와 제1 단백질이 결합된 경우에 분석자가 전반사 현미경을 이용한 기관의 표면 관찰을 수행하면, 분석자는 제1 단백질에 발현되어 있는 제1 형광 단백질에 의한 파장 변화로부터 기관상에 부착된 복수개의 제1 단백질 결합항체에 제1 단백질이 결합되었는지 여부를 확인할 수 있을 것이다.

- [82] 기관상에 부착된 복수개의 제1 단백질 결합항체에 각각 제1 단백질이 결합된 것으로 확인되면, 분석자는 기관에 버퍼 용액을 공급함으로써, 제1 단백질을 제외한 세포질 원액에 포함되어 있는 나머지 물질들을 기관상에서 제거하게 된다(S240).
- [83] 그 다음, 분석자는 전술한 세포와 동일한 다른 세포에서 해당 세포에 존재하는 제2 단백질에 유전자 조작을 통해 형광 단백질이 발현되도록 조작한다(S250).
- [84] 한편, 전술한 S250 단계는 원활한 분석의 진행을 위해 전술한 S210 단계 이전에 미리 실행할 수도 있을 것이며, 본 발명을 실시함에 있어서, 제2 단백질에 발현되는 형광 단백질 또한 eGFP로 합이 바람직할 것이다.
- [85] 그 다음, 분석자는 전술한 S250 단계에서의, 내부의 제2 단백질에 형광 단백질이 발현되어 있는 세포의 세포질 원액 전체를 기관에 공급한다(S260).
- [86] 한편, 전술한 S260 단계를 실시함에 있어서 세포질 원액뿐만 아니라, 세포 원액, 희석된 세포질 원액, 또는 희석된 세포 원액 등의 세포 용액이 사용될 수 있을 것이다.
- [87] 기관의 표면에 부착되어 있는 복수개의 제1 단백질 결합항체에는 각각 제1 단백질이 결합되어 있으며, 이와 같은 기관의 표면에 제2 단백질이 포함되어 있는 세포질 원액 전체가 공급되면, 기관 표면의 제1 단백질은 세포질 원액에 포함되어 있는 제2 단백질과 세포내 환경에서와 동일한 상태에서 상호 작용을 하게 된다.
- [88] 즉, 기관 표면에 부착된 각각의 항체에 결합되어 있는 각각의 제1 단백질은 제2 단백질과 세포내 환경에서와 동일한 상태에서 단일 분자 수준에서 결합과 분리를 반복하는 상호 작용을 하게 된다.
- [89] 제1 단백질과 제2 단백질 간의 단일 분자 수준에서의 결합이 있는 경우에 분석자가 473nm의 파장을 갖는 전반사 현미경을 통해 기관의 표면을 관찰하면, 제2 단백질에 발현되어 있는 형광 단백질인 eGFP에 의해, 기관 표면에서의 파장이 473nm에서 520nm로 변화하게 되며, 이와 같은 파장의 변화를 통해 제1 단백질과 제2 단백질의 결합상태를 확인할 수 있게 되고, 분석자는 기관 표면에 부착된 각각의 항체에서의 파장의 변화를 지속적으로 관찰함으로써, 제1 단백질과 제2 단백질의 결합과 분리의 빈도 등의 상호작용을 단분자 수준에서 분석할 수 있게 된다(S270).
- [90] 아울러, 도 5에서의 본 발명의 다른 실시예에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법을 실시함에 있어서도, 전술한 S270 단계에서의 단백질-단백질 상호작용 분석값을 제1 분석값으로 확보하고, 후술하는 다른 환경에서의

단백질-단백질 상호 작용 분석값을 제2 분석값으로 확보하여 양자의 비교 분석을 수행할 수도 있을 것이다.

[91] 즉, 시험자는 전술한 S270 단계에서의 상호 작용 분석값을 제1 분석값으로 확보한 후에, 전술한 S210 단계 내지 S250 단계까지를 동일하게 반복하여 실시한다.

[92] 한편, 시험자는 전술한 S260 단계를 실험함에 있어서, 전술한 S250 단계에서 내부의 제2 단백질에 제2 형광 단백질이 발현되어 있는 세포의 세포질 원액을 기관에 공급하는 것이 아니라, 해당 세포의 세포질 원액과 암세포 등의 별도의 분석 대상 세포질 원액을 혼합한 혼합 세포질 원액을 기관에 공급하게 된다(S280).

[93] 한편, 전술한 S280 단계를 실시함에 있어서 혼합 세포질 원액뿐만 아니라, 혼합 세포 원액, 희석된 혼합 세포질 원액, 또는 희석된 혼합 세포 원액 등의 혼합 세포 용액이 사용될 수 있을 것이다.

[94] 즉, 기관의 표면에 부착되어 있는 복수개의 제1 단백질 결합항체에는 각각 제1 단백질이 결합되어 있으며, 제2 단백질이 포함되어 있는 세포질 원액과 분석 대상 세포질 원액을 혼합한 혼합 세포질 원액이 기관의 표면에 공급되면, 기관 표면의 제1 단백질은 혼합 세포질 원액에 포함되어 있는 제2 형광 단백질이 발현되어 있는 제2 단백질뿐만 아니라, 분석 대상 세포 내의 제2 형광 단백질이 발현되어 있지 않은 제2 단백질 및 기타의 다른 단백질들(Native proteins in whole cell lysate)이 공존하는 환경에서 제2 단백질과 상호 작용을 하게 된다.

[95] 즉, 전술한 S270 단계에서와는 달리, 제2 형광 단백질이 발현되어 있는 제2 단백질은 분석 대상 세포 내의 제2 형광 단백질이 발현되어 있지 않은 제2 단백질과 공존하는 상태에서 기관 표면의 제1 단백질과 경쟁적으로 상호 작용을 하게 된다. 뿐만 아니라, 분석 대상 세포 내의 다른 단백질에 의해 제2 형광 단백질이 발현되어 있는 제2 단백질은 제1 단백질과의 상호 작용에 있어 영향을 받게 된다.

[96] 이와 같은 분석 대상 세포 내의 다른 단백질 또는 분석 대상 세포 내의 제2 단백질에 의한 영향의 정도는, 시험자가 전술한 S270 단계에서와 같이 전반사 현미경 등의 근접장을 발생시키는 광학 장치를 통해 기관의 표면을 관찰하여, 기관 표면의 제1 단백질과 제2 형광 단백질이 발현되어 있는 제2 단백질의 결합과 분리의 빈도 등의 상호작용을 단분자 수준에서 분석함으로써 확인할 수 있게 된다(S290).

[97] 보다 구체적으로, 시험자는 상술한 제1 분석값과 전술한 S290 단계에서의 분석값인 제2 분석값을 비교분석함으로써 제2 단백질의 제1 단백질과의 상호 작용에 있어서의 다른 세포 내의 제2 단백질 및 다른 세포 내의 기타의 단백질에 의한 상호 작용의 촉진 또는 방해 등의 영향 정도를 분석할 수 있게 될 것이다.

[98] 한편, 전술한 도 1 내지 도 5에서의 본 발명에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 방법은 도 6에서의 구조를 갖는 분석 장치에서 실행된다.

- [99] 도 6을 참조하면, 본 발명에 따른 단백질-단백질 상호작용 분석 장치(300)는 광학 여기부(320), 시료 로딩부(310), 광학 측정부(330), 신호 분석부(340), 신호 진단부(360), 및 저장부(350)를 포함한다.
- [100] 먼저, 시료 로딩부(310)에서는 전술한 본 발명에서의 단백질-단백질 상호작용 분석 방법에 사용되는 기관이 로딩된다. 광학 여기부(320)는 시료 로딩부에 로딩된 기관의 표면에 제1 파장을 갖는 근접장을 발생시킨다.
- [101] 광학 측정부(330)는 세포질 원액 또는 혼합 세포질 원액이 기관에 공급된 상태에, 기관 표면에 부착된 제1 단백질과 형광 단백질이 구비된 제2 단백질의 상호 작용에 따른 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 파장 변화를 감지한다.
- [102] 본 발명을 실시함에 있어서, 제2 단백질에 구비된 형광 단백질이 eGFP인 경우에, 제1 파장은 473nm이고, 제2 파장은 520nm가 될 것이다.
- [103] 아울러, 광학 측정부(330)는 제2 파장의 형광 신호를 소정의 시간 동안 적분 측정할 뿐만 아니라 기관에 세포질 원액 또는 혼합 세포질 원액이 존재하는 상황에서 제2 파장의 형광 신호를 실시간으로 측정하며, 그 측정에 있어서 단분자 민감도를 갖는 것이 바람직할 것이다.
- [104] 한편, 신호 분석부(340)는 광학 측정부(330)가 측정한 제2 파장의 형광 신호를 이미지 프로세싱을 통해 분석하여 분석값을 산출하고, 산출된 분석값을 저장부(350)에 저장한다.
- [105] 또한, 신호 분석부(340)는 세포질 원액 또는 혼합 세포질 원액 등의 다양한 세포질 원액이 기관에 공급된 각각의 상황에서 광학 측정부(330)가 각각 측정한 제2 파장의 형광 신호에 기초하여 개별적으로 산출한 분석값을 저장부(350)에 저장한다.
- [106] 구체적으로, 신호 분석부(340)는 광학 측정부(330)가 도 7에서와 같은 형광 신호를 측정한 경우에 신호 분석부(340)는 측정된 형광 신호 중에서 도 7에서의 붉은 선으로 표시된 신호 저점(baseline)을 찾아낸다.
- [107] 신호 저점은 대략 10초 내지 20초 사이에 상승하게 되는데 이는 제2 단백질을 포함하고 있는 세포질 원액 또는 혼합 세포질 원액이 광학 측정부(330)의 이미징 영역에 도착하게 된 것을 의미한다.
- [108] 한편, 신호 분석부(340)는 상승된 신호 저점(baseline)을 중심으로 발생하는 변동(fluctuation, 즉, 노이즈(Noise))를 측정한 후, 이를 기준으로 의미있는 단백질-단백질 상호 작용을 정의하는 기준점(Threshold)을 설정한다.
- [109] 신호 저점을 중심으로 발생하는 노이즈는 단백질 간의 상호 작용없이 단순히 빠르게 계속 이동하고 있는 제2 단백질들의 거동에 의해 형성되는 것이며, 신호 분석부(340)는 이와 같이 상호 작용과 무관한 노이즈에 의해 초과할 수 없는 값으로 기준점을 설정한다.
- [110] 기준점을 초과하는 신호가 있는 경우에는 신호 분석부(340)는 해당 시점에 제1 단백질과 제2 단백질의 의미있는 상호 작용이 있는 것으로 판단하고, 상호

작용이 지속되는 시간(τ_{off})과, 제1 단백질과 제2 단백질의 다음 결합까지의 시간(τ_{on})을 측정하고, 이를 분석값으로서 저장부(350)에 저장한다.

- [111] 신호 분석부(340)가 획득한, 상호 작용이 지속되는 시간(τ_{off}), 및 제1 단백질과 제2 단백질의 다음 결합까지의 시간(τ_{on})의 분석을 통해 단백질-단백질 상호 작용에 대한 일련의 정보를 얻을 수 있게 되며, 신호 진단부(360)는 다양한 세포질 원액이 기관에 공급된 각각의 상황에서 산출된 분석값들을 상호 비교 분석하며, 비교 분석 결과에 따라 각각의 세포질 상태에 대한 생물학적, 의학적 진단을 소정의 진단 알고리즘에 따라 도출하는 기능을 수행한다.

- [112] 이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예 및 응용예에 대하여 도시하고 설명하였지만, 본 발명은 상술한 특징의 실시예 및 응용예에 한정되지 아니하며, 청구범위에서 청구하는 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진자에 의해 다양한 변형실시가 가능한 것은 물론이고, 이러한 변형실시들은 본 발명의 기술적 사상이나 전망으로부터 개별적으로 이해되어져서는 안될 것이다.

산업상 이용가능성

- [113] 본 발명은 의료 산업 분야에서의 산업상 이용 가능성이 인정된다.

청구범위

[청구항 1]

제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 방법에 있어서,
 (a) 상기 제1 단백질에 구비된 제1 표지자와 결합되는 생체 분자체가 부착된 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체의 결합을 유도하는 단계;
 (b) 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체가 결합된 경우에, 제2 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기 기관에 공급하는 단계; 및
 (c) 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하는 단계를 포함하는 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.

[청구항 2]

제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 방법에 있어서,
 (a) 상기 제1 단백질이 결합되는 생체 분자체인 제1 단백질 결합 분자체가 부착된 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체의 결합을 유도하는 단계;
 (b) 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체가 결합된 경우에, 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기 기관에 공급하는 단계; 및
 (c) 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하는 단계를 포함하는 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.

[청구항 3]

제1항 또는 제2항에 있어서,
 상기 (c) 단계는,
 상기 제1 단백질과 결합된 상기 제2 단백질에 구비된 표지자에 의해 발생하는 특정 파장의 형광 신호를 근접장을 발생시키는 광학장치를 이용하여 측정하는 단계를 포함하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.

[청구항 4]

제3항에 있어서,
 상기 (c) 단계는,
 상기 특정 파장의 형광 신호를 소정의 시간 동안 적분 측정하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.

[청구항 5]

제3항에 있어서,
 상기 (c) 단계는,
 상기 기관에 상기 공급된 세포 용액이 존재하는 상황에서, 상기 특정 파장의 형광 신호를 실시간 측정하는 것인 단백질-단백질

- 상호작용 분석 방법.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 (a) 단계는,
상기 제1 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기 기관에
공급하는 단계를 포함하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석
방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 (b) 단계 이전에,
상기 기관에 버퍼 용액을 공급하는 단계를 더 포함하는
단백질-단백질 상호작용 분석 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 제1 표지자, 및 상기 제2 표지자는 서로 다른 파장을 갖는
형광 단백질인 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.
- [청구항 9] 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지
분석하기 위한 방법에 있어서,
(a) 상기 제1 단백질에 구비된 제1 표지자와 결합되는 생체
분자체가 부착된 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1
표지자와 상기 생체 분자체의 결합을 유도하는 단계;
(b) 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체가 결합된 경우에, 제2
표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기
기관에 공급하는 단계;
(c) 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1
단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하여 제1 분석값을
획득하는 단계;
(d) 상기 (a) 단계에서의 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체가
결합된 상태의 기관과 동일한 기관에 상기 (b) 단계에서의 상기
세포 용액과 분석 대상 세포 용액을 혼합한 혼합 세포 용액을
공급하는 단계;
(e) 상기 혼합 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1
단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하여 제2 분석값을
획득하는 단계; 및
(f) 상기 제1 분석값과 상기 제2 분석값을 비교분석하는 단계
를 포함하는 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.
- [청구항 10] 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지
분석하기 위한 방법에 있어서,
(a) 상기 제1 단백질이 결합되는 생체 분자체인 제1 단백질 결합
분자체가 부착된 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1
단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체의 결합을 유도하는 단계;

(b) 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체가 결합된 경우에, 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기 기관에 공급하는 단계; 및

(c) 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하여 제1 분석값을 획득하는 단계;

(d) 상기 (a) 단계에서의 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체가 결합된 기관과 동일한 기관에 상기 (b) 단계에서의 상기 세포 용액과 분석 대상 세포 용액을 혼합한 혼합 세포 용액을 공급하는 단계;

(e) 상기 혼합 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용을 분석하여 제2 분석값을 획득하는 단계; 및

(f) 상기 제1 분석값과 상기 제2 분석값을 비교분석하는 단계를 포함하는 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.

[청구항 11]

제9항 또는 제10항에 있어서,
상기 (c) 단계는,
상기 제1 단백질과 결합된 상기 제2 단백질에 구비된 표지자에 의해 발생하는 특정 파장의 형광 신호를 근접장을 발생시키는 광학장치를 이용하여 측정하는 단계를 포함하는 것인
단백질-단백질 상호작용 분석 방법.

[청구항 12]

제11항에 있어서,
상기 (c) 단계는,
상기 특정 파장의 형광 신호를 소정의 시간 동안 적분 측정하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.

[청구항 13]

제11항에 있어서,
상기 (c) 단계는,
상기 기관에 상기 공급된 세포 용액이 존재하는 상황에서, 상기 특정 파장의 형광 신호를 실시간 측정하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.

[청구항 14]

제9항 또는 제10항에 있어서,
상기 (a) 단계는,
상기 제1 단백질이 포함된 세포의 세포 용액을 상기 기관에 공급하는 단계를 포함하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.

[청구항 15]

제14항에 있어서,
상기 (b) 단계 이전에,
상기 기관에 버퍼 용액을 공급하는 단계를 더 포함하는

- 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.
- [청구항 16] 제9항에 있어서,
상기 제1 표지자, 및 상기 제2 표지자는 서로 다른 파장을 갖는 형광 단백질인 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 방법.
- [청구항 17] 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 장치에 있어서,
상기 제1 단백질에 구비된 제1 표지자와 결합되는 생체 분자체가 부착된 기관이 로딩되는 시료 로딩부-상기 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체의 결합이 유도되며, 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체가 결합된 경우에, 제2 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액이 상기 기관에 공급됨-;
상기 시료 로딩부에 로딩된 상기 기관의 표면에 제1 파장을 갖는 근접장을 발생시키는 광학 여기부; 및
상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하는 광학 측정부
를 포함하는 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.
- [청구항 18] 제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 장치에 있어서,
상기 제1 단백질이 결합되는 생체 분자체인 제1 단백질 결합 분자체가 부착된 기관이 로딩되는 시료 로딩부-상기 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체의 결합을 유도하고, 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체가 결합된 경우에, 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액이 상기 기관에 공급됨-;
상기 시료 로딩부에 로딩된 상기 기관의 표면에 제1 파장을 갖는 근접장을 발생시키는 광학 여기부; 및
상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하는 광학 측정부
를 포함하는 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.
- [청구항 19] 제17항 또는 제18항에 있어서,
상기 광학 측정부는, 상기 제2 파장의 형광 신호를 소정의 시간 동안 적분 측정하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.
- [청구항 20] 제17항 또는 제18항에 있어서,

상기 광학 측정부는, 상기 기관에 상기 공급된 세포 용액이 존재하는 상황에서, 상기 제2 파장의 형광 신호를 실시간 측정하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.

[청구항 21]

제17항에 있어서,

상기 제1 표지자, 및 상기 제2 표지자는 서로 다른 파장을 갖는 형광 단백질인 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.

[청구항 22]

제17항 또는 제18항에 있어서,

상기 광학 측정부가 측정한 상기 제2 파장의 형광 신호를 이미지 프로세싱을 통해 분석하는 신호 분석부를 더 포함하는 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.

[청구항 23]

제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지 분석하기 위한 장치에 있어서,

상기 제1 단백질에 구비된 제1 표지자와 결합되는 생체 분자체가 부착된 기관이 로딩되는 시료 로딩부-상기 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체의 결합을 유도하고, 상기 제1 표지자와 상기 생체 분자체가 결합된 경우에, 제2 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액이 상기 기관에 공급됨-;

상기 시료 로딩부에 로딩된 상기 기관의 표면에 제1 파장을 갖는 근접장을 발생시키는 광학 여기부;

상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하는 광학 측정부; 및

상기 광학 측정부가 측정한 상기 제2 파장의 형광 신호를 이미지 프로세싱을 통해 분석하여 제1 분석값을 획득하는 신호 분석부를 포함하며,

상기 시료 로딩부에는 상기 제1 단백질에 구비된 제1 표지자와 결합되는 생체 분자체가 부착된 새로운 기관이 로딩되고, 상기 새로운 기관에 상기 세포 용액과 분석 대상 세포 용액을 혼합한 혼합 세포 용액이 공급되고, 상기 혼합 세포 용액이 상기 새로운 기관에 공급된 상태에서, 상기 광학 측정부는 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하며, 상기 신호 분석부는 상기 광학 측정부가 측정한 상기 제2 파장의 형광 신호를 이미지 프로세싱을 통해 분석하여 제2 분석값을 획득하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.

[청구항 24]

제1 단백질과 제2 단백질의 상호작용을 단일 분자 수준까지

분석하기 위한 장치에 있어서,
 상기 제1 단백질이 결합되는 생체 분자체인 제1 단백질 결합 분자체가 부착된 기관이 로딩되는 시료 로딩부-상기 기관에 상기 제1 단백질을 공급하여 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체의 결합을 유도하며, 상기 제1 단백질과 상기 제1 단백질 결합 분자체가 결합된 경우에, 표지자가 구비된 제2 단백질이 포함된 세포의 세포 용액이 상기 기관에 공급됨-;
 상기 시료 로딩부에 로딩된 상기 기관의 표면에 제1 파장을 갖는 근접장을 발생시키는 광학 여기부;
 상기 세포 용액이 상기 기관에 공급된 상태에서, 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하는 광학 측정부; 및
 상기 광학 측정부가 측정한 상기 제2 파장의 형광 신호를 이미지 프로세싱을 통해 분석하여 제1 분석값을 획득하는 신호 분석부를 포함하며,
 상기 시료 로딩부에는 상기 제1 단백질이 결합되는 생체 분자체인 제1 단백질 결합 분자체가 부착된 새로운 기관이 로딩되고,
 상기 새로운 기관에 상기 세포 용액과 분석 대상 세포 용액을 혼합한 혼합 세포 용액이 공급되고, 상기 혼합 세포 용액이 상기 새로운 기관에 공급된 상태에서, 상기 광학 측정부는 상기 제1 단백질과 상기 제2 단백질의 상호작용에 따른 상기 기관 표면에서의 상기 제1 파장의 제2 파장으로의 변화를 감지하며,
 상기 신호 분석부는 상기 광학 측정부가 측정한 상기 제2 파장의 형광 신호를 이미지 프로세싱을 통해 분석하여 제2 분석값을 획득하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.

[청구항 25]

제23항 또는 제24항에 있어서,
 상기 제1 분석값과 상기 제2 분석값을 비교분석하는 신호 진단부를 더 포함하는 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.

[청구항 26]

제23항 또는 제24항에 있어서,
 상기 광학 측정부는, 상기 제2 파장의 형광 신호를 소정의 시간 동안 적분 측정하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.

[청구항 27]

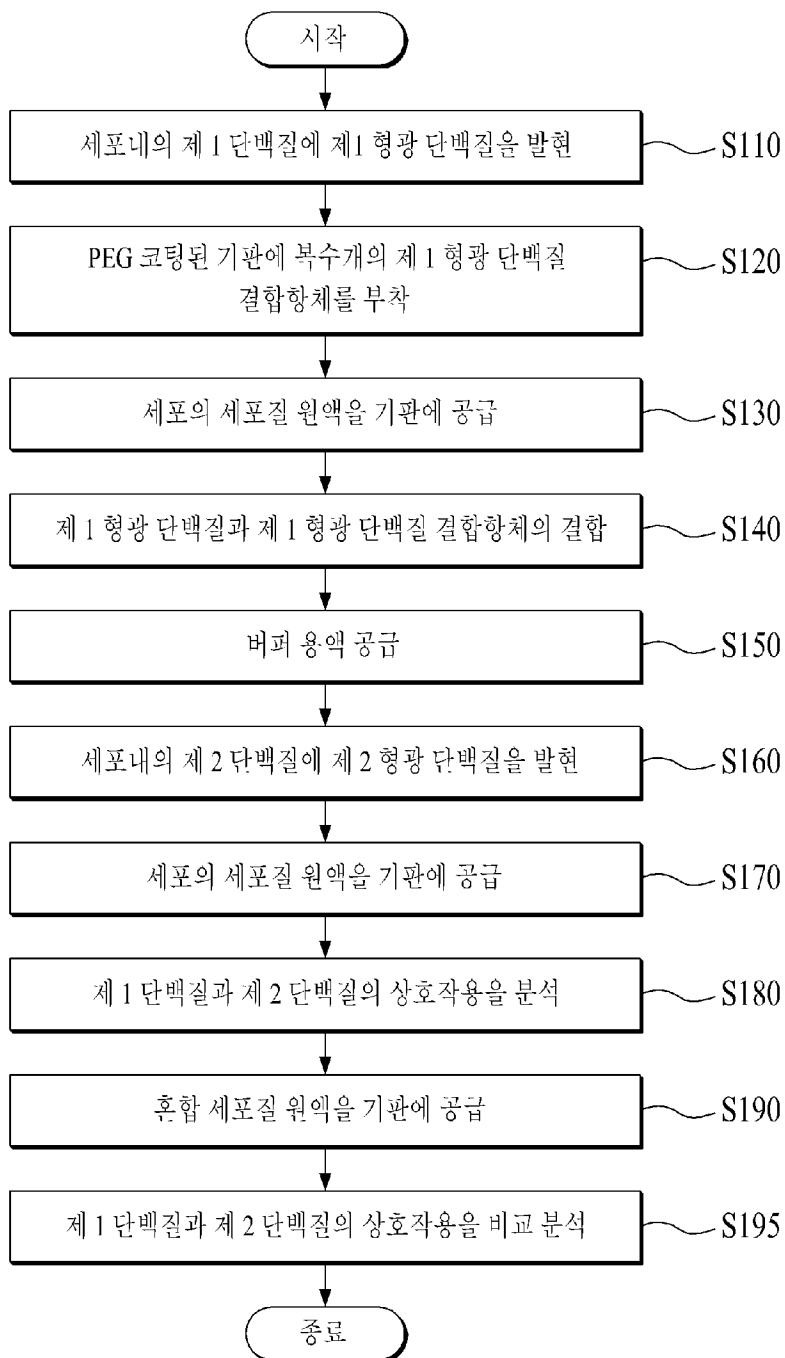
제23항 또는 제24항에 있어서,
 상기 광학 측정부는, 상기 기관에 상기 공급된 세포 용액이 존재하는 상황에서, 상기 제2 파장의 형광 신호를 실시간 측정하는 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.

[청구항 28]

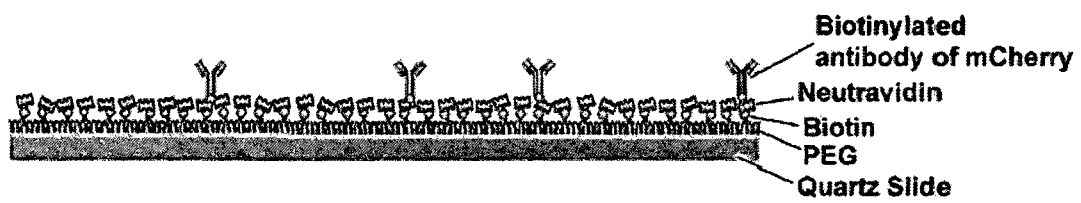
제23항에 있어서,
 상기 제1 표지자, 및 상기 제2 표지자는 서로 다른 파장을 갖는

형광 단백질인 것인 단백질-단백질 상호작용 분석 장치.

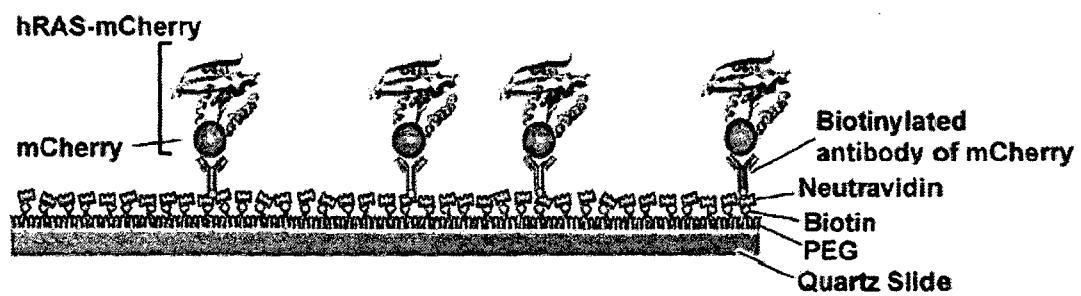
[Fig. 1]



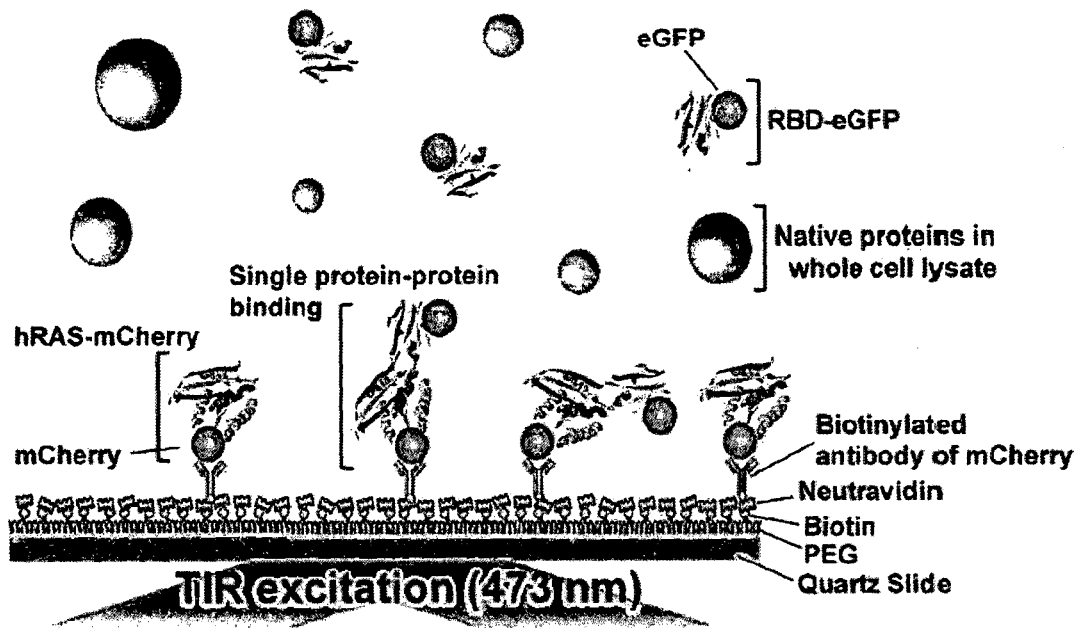
[Fig. 2]



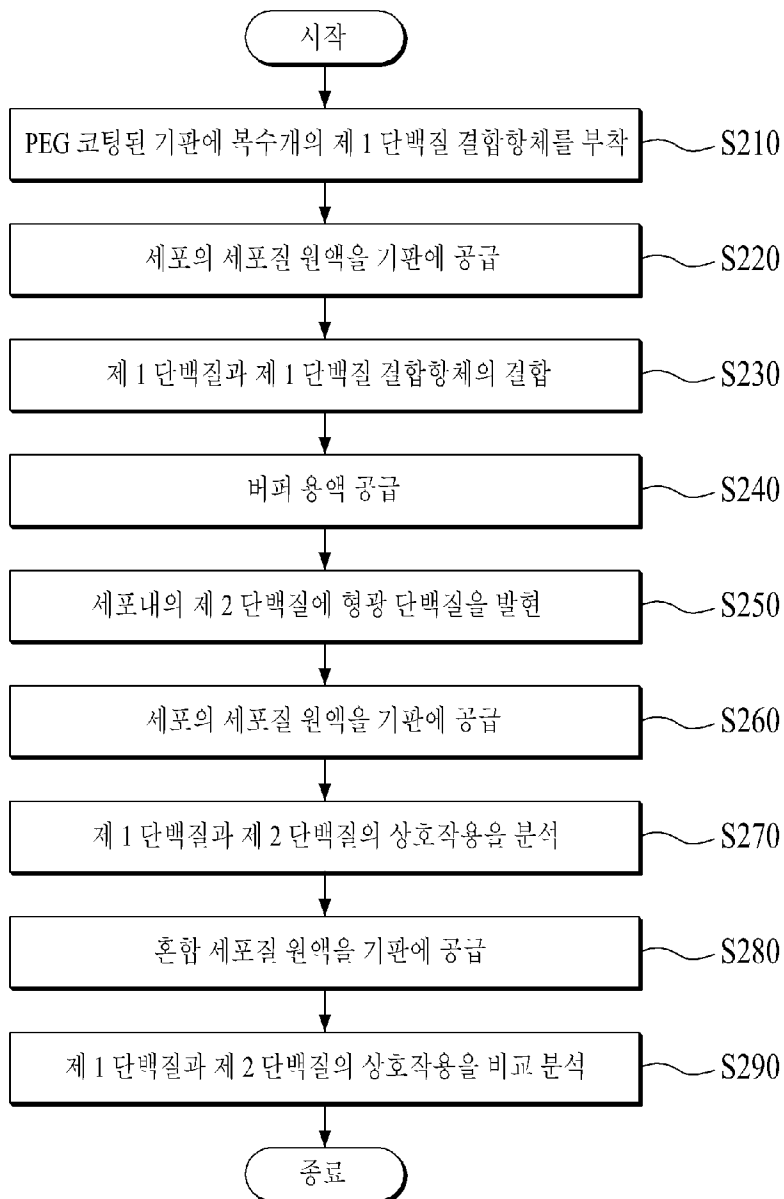
[Fig. 3]



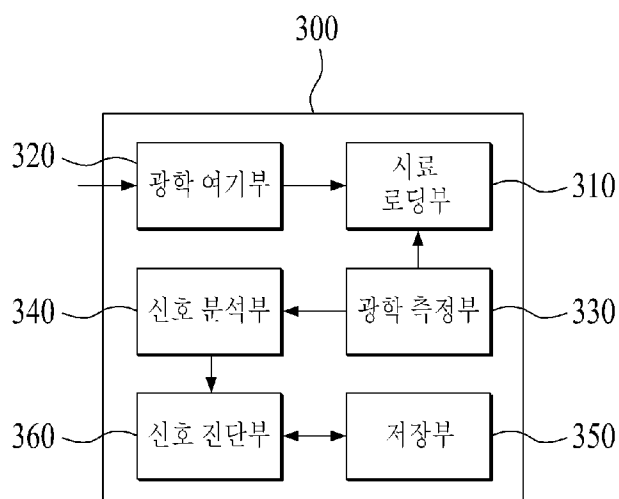
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]

