

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2021년 7월 8일 (08.07.2021)



(10) 국제공개번호

WO 2021/137645 A1

(51) 국제특허분류:

G01N 33/68 (2006.01) G01N 27/64 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)
G01N 30/96 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/019464

(22) 국제출원일: 2020년 12월 30일 (30.12.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0177683 2019년 12월 30일 (30.12.2019) KR
10-2020-0012108 2020년 1월 31일 (31.01.2020) KR

(71) 출원인: (재)씨젠의료재단 (SEEGENE MEDICAL FOUNDATION) [KR/KR]; 04805 서울시 성동구 천호대로 320, Seoul (KR).

(72) 발명자: 천종기 (CHUN, Jong Kee); 04805 서울시 성동구 천호대로 320, Seoul (KR). 백제현 (BAEK, Je Hyun); 13827 경기도 과천시 윗배랭이길 54, 301호, Gyeonggi-do (KR). 양원석 (YANG, Won Suk); 14774 경기도 부천시 소사로78번길 70, 112동 903호, Gyeonggi-do (KR). 이세영 (LEE, Saeyoung); 16361 경기도 수원시 장안구 율전로 73, 104동 509호, Gyeonggi-do (KR). 서한슬 (SUH, Hanseul); 11515 경기도 양주시 백석읍 꿈나무로 320, 502동 1201호, Gyeonggi-do (KR). 장희정 (JANG, Heejeung); 02603 서울시 동대문구 천호대로 257, 오피스텔동 1916호, Seoul (KR). 박윤하 (PARK, Yoon-Ha); 04805 서울시 성동구 용답29길 8, 201호, Seoul (KR). 황서현 (HWANG, Seohyun); 01755 서울시 노원구 동일로 214길 21, 403동 512호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베델회관 8층, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

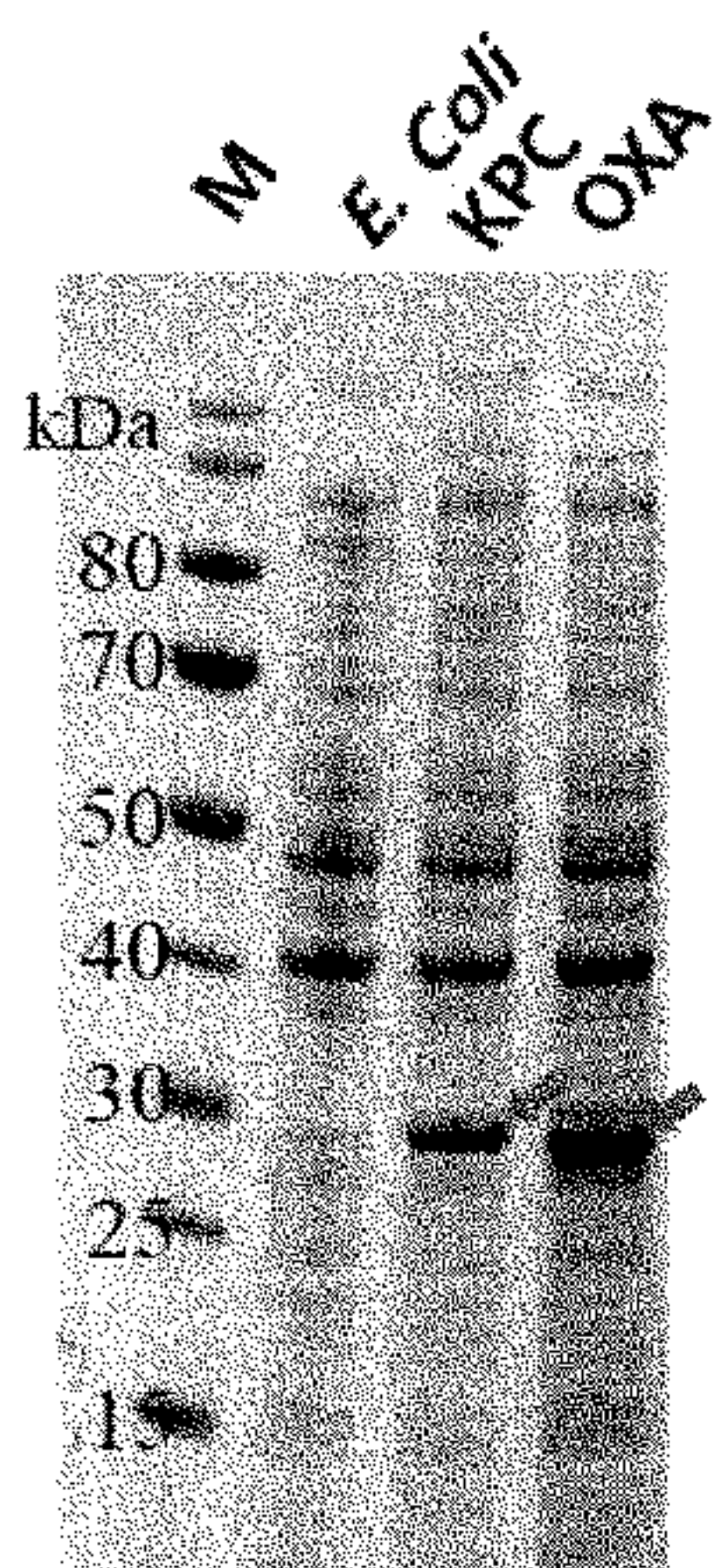
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: DIRECT DETECTION METHOD FOR PATHOGENIC STRAIN HAVING RESISTANCE TO CARBAPENEM ANTIBIOTICS

(54) 발명의 명칭: 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주의 직접 검출 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for detecting a pathogenic strain having resistance to carbapenem antibiotics in a biological sample. In the present invention, by directly confirming, through mass spectroscopy, carbapenem antibiotic degradation enzymes, particularly KPC, OXA, NDM, IMP, VIM, and/or GES protein(s), not only whether the pathogenic strain is resistant to antibiotics but also the type of resistance-related protein can be rapidly determined. In the present invention, by discovering in-vivo physical and chemical properties of respective enzymes, such as the cleavage length of a unique N-terminus according to the type of carbapenemase, and the oxidation and disulfide bond formation of methionine residues, and reflecting same in a reference mass value, the presence of an antibiotic-resistant strain can be more thoroughly detected with high reliability. Thus, the method can be effectively used in establishing strategies for appropriate antibiotic administration in the early stages of infection.

(57) 요약서: 본 발명은 생물학적 시료 내 카바페넴 항생제(Carbapenem antibiotics)에 대한 내성을 가지는 병원성 균주의 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명은 질량분석법을 통해 카바페넴 항생제 분해효소, 구체적으로는 KPC, OXA, NDM, IMP, VIM 및/또는 GES 단백질을 직접적으로 확인함으로써 병원성 균주의 항생제 내성 여부는 물론 내성관련 단백질의 종류까지 신속하게 판별할 수 있다. 본 발명은 카바페넴 분해 효소의 종류에 따른 고유한 N-말단의 절단 길이, 메티오닌 잔기의 산화 및 이황화 결합 형성 등 각의 효소가 생체 내에서 가지는 물리적, 화학적 특성을 발굴하고 이를 기준 질량값에 반영함으로써 항생제 내성 균주의 존재를 높은 신뢰도로 보다 빈틈없이 검출할 수 있으며, 이를 통해 감염 초기에 적절한 항생제 투여전략을 수립하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

WO 2021/137645 A1

명세서

발명의 명칭: 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주의 직접 검출 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 탑-다운(top-down) 질량 분석을 통해 검체 시료에 대한 전처리 없이 카바페넴 항생제를 분해하는 효소인 KPC, OXA, NDM, IMP, VIM 및/또는 GES에 대한 생체 내 활성형 단백질을 직접 검출하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 항생제 내성균의 지속적 증가로 인해 상용화된 항생제의 치료 효율이 급감하는 상황에서 병원균에 감염된 환자에 대한 적절한 항생제 투여 및 항생제 내성균의 저감화를 동시에 유도함으로써 치료효율을 향상시키기 위한 전략이 활발하게 연구되고 있다. 현재 항생제 내성 여부를 판별하기 위해 최소억제농도(Minimum Inhibition Concentration, MIC) 검사가 시행되고 있으나 필수적 단계인 미생물 배양에 18시간 이상의 시간이 소요되고 정확성도 떨어져 신속한 판별 및 감염 초기의 최적 항생제 선정이 불가능하다. 실시간 PCR 등을 이용한 유전자 진단기술 역시 유전자 추출 및 증폭 과정 등에서 복잡하고 고비용의 시료 전처리를 거쳐야 하고 타겟 유전자의 염기서열에 대한 사전정보가 필수적이라는 점, 이미 항생제 분해 활성을 잃은 효소의 유전자 검출 등으로 인해 내성 여부에 대한 부정확한 정보가 포함되는 점 등 신속, 정확한 대량 진단에 적용하기에는 한계를 가지고 있다.
- [4] MALDI-TOF를 비롯한 질량분석법은 PCR 등에 의한 서열분석 방법에 비하여 저비용 고효율의 동정 시스템으로서 미생물의 신속한 동정에 필요한 중요한 수단이 될 수 있는데, 균주 배양 후 시료 처리에서 동정까지 10분 이내에 가능할 뿐 아니라, 미지의 균주에 질량분석 데이터를 통해 구축한 데이터베이스내의 질량 데이터와 비교하여 질량값이 일치되는 균주를 신속하게 동정할 수 있다.
- [5] 그러나, 종래의 질량 분석법은 정확한 항생제 내성 단백질의 종류를 판별하지 못할 뿐 아니라, 타겟 내성 단백질을 가수분해 효소를 이용하여 펩타이드 단위로 분해한 뒤 이들 절편들의 질량 값을 통해 간접적으로 내성 단백질의 종류를 유추하는 것으로 절차의 번거로움은 물론 신뢰성에서 적지 않은 문제가 있었다.
- [6] 이에, 본 발명자들은 베타-락탐계 항생제, 구체적으로는 카바페넴 항생제 내성에 직접적으로 관여하는 단백질을 선별하고, 이들의 생체 내 활성형의 정확한 질량값을 측정함으로써 카바페넴 내성 균주의 존재 여부에 대한 정확한 기준 데이터를 구축함으로써 카바페넴 내성 균주 감염에 대한 신속하고 정확한 진단 방법을 제공하고자 하였다.

[7]

- [8] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명자들은 베타-락탐계 항생제 내성에 관여하는 항생제 분해 효소를 시료 내에서 간단하면서도 높은 신뢰도로 검출함으로써 항생제 내성 균주에 의한 감염 여부를 신속하게 판정할 수 있는 효율적 진단방법을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 베타-락탐계 항생제인 카바페넴(Carbapenem)을 분해하는 효소, 구체적으로는 KPC, OXA, NDM, IMP, VIM 및 GES 단백질이 생체 내에서 일정 길이의 N-말단 잔기가 절단된 활성형(active form)으로 존재한다는 사실을 새로이 발견하고, 내성 균주가 분비하는 카바페넴 분해 효소의 다수를 차지하는 이들 단백질의 활성형을 질량분석법을 통해 직접적으로 확인함으로써 병원성 균주의 항생제 내성 여부는 물론 내성관련 단백질의 종류까지 신속하고 정확하게 판별하여, 감염 초기에 적절한 항생제 투여전략을 수립할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [11] 따라서 본 발명의 목적은 생물학적 시료 내 카바페넴 항생제(Carbapenem antibiotics)에 대한 내성을 가지는 병원성 균주, 구체적으로는 KPC, OXA, NDM, IMP, VIM 및/또는 GES를 발현하는 병원성 균주의 검출 방법을 제공하는 데 있다.
- [12]
- [13] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.
- [14]
- ### 기술적 해결방법
- [15] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 생물학적 시료 내 카바페넴 항생제(Carbapenem antibiotics)에 대한 내성을 가지는 병원성 균주의 검출 방법을 제공한다:
- [16] (a) 대상체로부터 분리된 생물학적 시료 내에서 병원성 균주가 발현하는 단백질을 분리하는 단계; 및
- [17] (b) 상기 분리된 단백질에 대해 탑-다운(top-down) 질량 분석을 수행하는 단계,
- [18] 상기 질량 분석 결과 N-말단의 21개 또는 22개 아미노산 잔기가 제거된 KPC(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) 또는 OXA 카바페넴 분해 효소와 동일한 질량의 단백질이 검출되거나, 또는 N-말단의 18, 19, 20, 21 또는 26개 아미노산 잔기가 제거된 NDM(New Delhi Metallo-beta-lactamase),

IMP(imipenemase), VIM(Verona integron-borne metallo- β -lactamase) 및 GES(Guiana extended spectrum β -lactamase)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 카바페넴 분해 효소와 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다.

- [19] 본 발명자들은 베타-락탐계 항생제 내성에 관여하는 항생제 분해 효소를 시료 내에서 간단하면서도 높은 신뢰도로 검출함으로써 항생제 내성 균주에 의한 감염 여부를 신속하게 판정할 수 있는 효율적 진단방법을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 베타-락탐계 항생제인 카바페넴(Carbapenem)을 분해하는 효소, 구체적으로는 KPC, OXA, NDM, IMP, VIM 및 GES 단백질이 생체 내에서 일정 길이의 N-말단 잔기가 절단된 활성형(active form)으로 존재한다는 사실을 새로이 발견하고, 내성 균주가 분비하는 카바페넴 분해 효소의 다수를 차지하는 이들 단백질의 활성형을 질량분석법을 통해 직접적으로 확인함으로써 병원성 균주의 항생제 내성 여부는 물론 내성관련 단백질의 종류까지 신속하고 정확하게 판별하여, 감염 초기에 적절한 항생제 투여전략을 수립할 수 있음을 발견하였다.
- [20] 본 명세서에서“병원성 균주”는 예를 들어 포도상구균, 연쇄상구균, 대장균, 폐렴간균, 녹농균, 수도모나스 애루기노사, 수도모나스 오티티디스, 마이크로코커스 루테우스, 시트로박터 코세리, 프로투스 미라빌리스 및 미코박테리움 울서란스를 포함하나, 이에 제한되지 않고 감염 또는 질환의 원인으로 작용하는 모든 세균을 포함한다.
- [21] 본 명세서에서“항생제에 대한 내성을 가진다”고 함은 특정 병원성 미생물에 대한 항생제가 고농도로, 또는 유효량으로 존재하는 환경 내에서도 해당 미생물이 생육 가능한 경우를 의미한다. 항생제 내성 여부는 병원성 미생물이 분비하는단백질로서 해당 항생제를 분해하여 그 활성을 제거하거나 저하시키는 분해 효소의 존재를 검출함으로써 판별할 수 있다. 예를 들어, 세균의 세포벽 합성을 억제하는 베타-락탐계 항생제인 페니실린, 세팔로스포린, 모노박탐, 카바페넴 등은 베타-락타마제(β -lactamase)에 의해 무력화되어 이를 발현하는 병원균을 억제하지 못한다. 따라서, 용어“내성”은“저항성”,“낮은 치료적 반응성”및“낮은 예방적 반응성”과 동일한 의미로 사용된다.
- [22] 본 명세서에서 용어“치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 따라서“치료적 반응성”은 카바페넴을 비롯한 베타-락탐계 항생제가 병원성 균주에 감염된 환자에게 치료적 유효량으로 투여되었을 때 생체 내에서 위와 같은 작용을 하는 정도를 의미한다.
- [23] 본 명세서에서, 용어“예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다. 따라서 “예방적 반응성”은 카바페넴을

비롯한 베타-락탐계 항생제가 아직 감염이 확진되지 않은 정상인에게 예방적 유효량으로 투여되었을 때 생체 내에서 감염을 억제하는 작용을 하는 정도를 의미한다.

[24] 본 발명에서 용어“생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, 카바페넴 등의 베타-락탐계 항생제로 억제하고자 하는 병원성 균주를 포함하고 있거나 포함할 가능성이 있는 모든 시료로서, 혈액, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[25] 본 명세서에서 용어“대상체”는 카바페넴 등의 베타-락탐계 항생제로 억제하고자 하는 병원성 균주의 존재 또는 상기 균주의 항생제 내성 여부를 조사하기 위한 시료를 제공하고, 궁극적으로 항생제 내성을 가지는 병원성 균주에 의해 감염되었는지 여부의 분석 대상이 되는 개체를 의미한다. 개체는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함하며, 구체적으로는 인간이다. 본 발명의 조성물은 카바페넴 등의 베타-락탐계 항생제의 치료적 반응성 뿐 아니라 예방적 반응성을 예측하기 위한 정보도 제공하기 때문에, 본 발명의 개체는 균주에 감염된 환자일 수도 있고 아직 감염이 확진되지 않은 정상 개체(healthy subject)일 수도 있다.

[26] 본 명세서에서 용어“탑-다운(top-down) 질량 분석”은 단백질을 펩타이드 조각으로 절편화(fragmentation)하는 과정을 거치지 않고도 전장 단백질에 대한 질량값을 직접 측정하는 분석을 의미하며, 구체적으로는 단백질 시료가 질량 분석기에 주입되기 전에 타겟 단백질의 절편화가 이루어지지 않는 분석을 의미한다. 본 발명의 또 다른 특징 중 하나는, 트립신 등의 단백질 분해효소를 이용한 단백질의 무작위적인 분해 없이 전장(full length) 단백질에 대한 직접적인 질량 분석을 수행함으로써 절차가 보다 단순화될 뿐 아니라, 분해된 절편에 대한 질량정보를 수집하고 다양한 단백질들의 절편화 경향에 대한 방대한 정보를 취합하여 간접적으로 단백질을 동정하는 종래 방법에 비해 훨씬 짧은 시간 동안 현저하게 높은 신뢰도로 타겟 단백질의 존재 여부를 판단할 수 있다는 점이다.

[27] 본 명세서에서“단백질의 질량이 동일”하다 함은 본 발명의 질량분석 방법을 통해 측정된 질량 값과 참조(reference) 질량 값, 예를 들어 아미노산 서열 및 분자량이 알려진 각 카바페넴 분해 효소에서 N-말단의 18, 19, 20, 21, 22 또는 26개 아미노산 잔기가 제거된 질량 값에 해당하는 수치와 실질적으로 동일한 경우를 의미한다. “실질적인 동일”이란 예를 들어 측정된 Da 값 또는 $m/z \times z$ 값이 참조 질량 값의 ± 10 범위 내에 존재하는 경우, 보다 구체적으로는 ± 7 범위 내에 존재하는 경우, 보다 더 구체적으로는 ± 5 범위 내에 존재하는 경우, 가장 구체적으로는 ± 3 범위 내에 존재하는 경우를 의미한다. 실질적인 동일 여부를 판단하기 위한 기준이 되는 카바페넴 분해 효소의 질량값은 1개 내지 3개의 메티오닌 잔기가 산화된 상태로 존재하거나(즉, 알려진 질량값에서 16, 32 또는 48 만큼 증가), 두 개의 Cys 잔기 사이에 이황화결합(disulfide bond)이 형성된

- 상태(즉, 알려진 질량값에서 2만큼 감소)의 질량값을 포함한다.
- [28] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 방법은 상기 단계 (a)에서 분리된 단백질에 대해 이온교환 크로마토그래피를 수행하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [29] 본 명세서에서 용어 “이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography)”는 이온 또는 하전된 화합물이 정전기적인 힘(electrostatic force)에 의해 이온교환수지에 결합하는 현상을 이용하여 비균질성 혼합물로부터 전하를 띄는 목적 물질을 분리해내는 분리 및 정제방법을 의미한다. 이온교환 크로마토그래피는 다양한 작용기가 결합된 이온교환수지(ion exchange resin)를 가지는데, 음이온 교환수지는 양전하를 띄는 작용기를 가져 혼합물 내 음전하를 띄는 목적물질과 정전기적 인력으로 결합하고, 양이온 교환수지는 양전하를 띄는 목적물질과 특이적으로 결합한다.
- [30] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 이온교환 크로마토그래피는 음이온교환 크로마토그래피, 양이온교환 크로마토그래피 및 이들의 순차적 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.
- [31] 본 발명에서 이용되는 음이온교환수지는 예를 들어 디에틸아미노에틸(DEAE) 또는 사차 암모늄(Quaternary ammonium) 작용기를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않고 지지체에 양의 전하를 제공하는 통상적인 양이온성 작용기라면 제한없이 사용될 수 있다. 강염기성의 음이온교환 그룹에는 예를 들어 Q Sepharose Fast Flow, Q Sepharose High Performance, Resource Q, Source 15Q, Source 30Q, Mono Q, Mini Q, Capto Q, Capto Q ImpRes, Q HyperCel, Q Cermic HyperD F, Nuvia Q, UNOsphere Q, Macro-Prep High Q, Macro-Prep 25 Q, Fractogel EMD TMAE(S), Fractogel EMD TMAE Hicap (M), Fractogel EMD TMAE (M), Eshmono Q, Toyopearl QAE-550C, Toyopearl SuperQ-650C, Toyopearl GigaCap Q-650M, Toyopearl Q-600C AR, Toyopearl SuperQ-650M, Toyopearl SuperQ-650S, TSKgel SuperQ-5PW (30), TSKgel SuperQ-5PW (20) 및 TSKgel SuperQ-5PW를 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 모든 음이온교환수지를 사용할 수 있다.
- [32] 본 발명에서 이용되는 양이온교환수지는 예를 들어 술폰기나 카복시기를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않고 지지체에 음의 전하를 제공하는 통상적인 양이온성 작용기라면 제한없이 사용될 수 있다. 예시적인 상기 양이온교환 수지는 프락토겔(Fractogel), CM(카르복시메틸), SE(술폰에틸), SP(술폰프로필), P(포스페이트), S(술폰네이트), PROPAC WCX-10™ (Dionex), 캡토 S(Capto S), S-세파로스 FF(S-Sepharose FF), 프락토겔 EMD SO3M, 토요펠 메가캡 II SP 550C(Toyopearl Megacap II SP 550C), 포로스 50 HS(Poros 50 HS), 포로스 XS 및 SP-세파로스 매트릭스(SP-sepharose matrix)로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 구체적으로는 SP(술폰프로필) 레진이 사용될 수 있다. 컬럼 완충액으로는 인산나트륨 완충액, 구연산 완충액, 아세트산 완충액 등

당업계에 공지된 이퀄리브레이션 버퍼(equilibration buffer), 세척버퍼(wash buffer) 및 용출버퍼(elution buffer)를 사용할 수 있다.

[33] 이와 같은 이온교환 크로마토그래피는 분리/정제하고자 하는 단백질의 전하 및 분리하고자 하는 순서에 따라 적절하게 분리할 수 있으며, 예를 들어 양전하를 띠는 단백질과 음전하를 띠는 단백질을 순차적으로 분리하기 위해 양이온교환 크로마토그래피를 수행한 뒤 이의 완료 후 음이온교환 크로마토그래피를 순차적으로 수행할 수 있다.

[34] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)는 상기 생물학적 시료에 계면활성제를 첨가함으로써 이루어진다.

[35] 본 발명은 단백질 분해효소를 이용한 절편화(fragmentation) 과정 없이도 전장 단백질에 대한 탑-다운(top-down) 방식의 직접 질량 분석이 가능함을 전술한 바와 같다. 본 발명자들은 분석하고자 하는 생물학적 시료에 계면활성제를 첨가할 경우 세포막 또는 세포질 내에 존재하는 온전한 상태의 전장 단백질이 포집(encapsulation)됨으로써 효소에 의한 무작위적인 단백질 분해 없이도 신속하고 정확하게 타겟 단백질을 동정할 수 있음을 발견하였다.

[36] 본 발명에서는 전장 단백질을 포집할 정도의 미포(micelle)를 형성할 수 있는 일반적인 계면활성제라면 이온성, 비이온성 또는 양쪽이온성(zwitterionic) 계면활성제 모두 제한 없이 사용될 수 있다. 구체적으로는, 본 발명에서 사용되는 계면활성제는 이온성 계면활성제 또는 비이온성 계면활성제이다.

[37] 본 발명에서 이용될 수 있는 이온성 계면활성제는 예를 들어 DOC(Sodium Deoxycholate), 메디알란 A(Medialan A), 퀴터늄-60, 세틸피리디늄 클로라이드(cetylpyridinium chloride), 세틸피리디늄 브로마이드(cetylpyridinium bromide), 세틸트리메틸암모늄 클로라이드(cetyltrimethylammoniumchloride), 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide) 및 가디놀(Gardinol)을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[38] 본 발명에서 이용될 수 있는 비이온성 계면활성제는 예를 들어 OG(*n*-octyl- β -D-glucopyranoside), OTG(*n*-octyl- β -D-thioglucopyranoside), OGNG(Octyl Glucose Neopentyl Glycol) 및 DDM(*n*-Dodecyl- β -D-maltopyranoside), DDTM (*n*-Dodecyl- β -D-thiomaltopyranoside)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[39] 보다 구체적으로는, 상기 단계 (a)는 상기 생물학적 시료에 라이시스 완충액을 추가적으로 첨가함으로써 이루어진다. 즉, 본 발명의 계면활성제는 병원성 균주가 발현하는 단백질을 분리하기 위해 세포를 용해하는 단계에서 라이시스 완충액과 함께 사용될 수 있다. 구체적으로는, 상기 라이시스 완충액은 휘발성 완충액일 수 있다.

[40] 본 발명에서 이용될 수 있는 휘발성 완충액(volatile buffer)은 예를 들어 탄산수소암모늄, 아세트산, 포름산, 암모니아, 탄산암모늄 및 피리딘/트리에탄올아민을 포함하나, 이에 제한되지 않고 시료 내 수소이온 농도를 일정 범위 내로 유지하면서 낮은 끓는 점을 가져 대기 중으로 쉽게

증발되는 모든 완충액이 사용될 수 있다.

[41]

[42] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 상기 단계 (a)와 상기 단계 (b) 사이에 초음파 처리(sonication) 단계를 추가적으로 포함한다.

[43]

[44] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 MALDI-TOF(Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight) 질량분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight) 질량분석, ESI-TOF(Electrospray ionisation time-of-flight) 질량분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 및 LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry)로 구성된 군으로부터 선택되는 질량분석 방법을 이용하여 이루어지며, 보다 구체적으로는 MALDI-TOF(Matrix Desorption/ Ionization Time of Flight) 질량분석을 이용하여 이루어진다.

[45] MALDI-TOF 질량분석은 매트릭스(matrix)로 지지되어 있는 시료에 레이저를 조사하여 탈착 및 이온화시킨 후, 생성된 이온들이 검출기에 도달하는데 소요되는 시간(Time-of-Flight)을 측정하여 이온들의 분자량을 분석하는 방법으로, 타겟 물질의 절편화(fragmentation)가 일어나지 않기 때문에 단백질과 같은 거대 생체분자의 질량을 신속하고 정확하게 측정할 수 있다. 이온화된 분자가 전기장에 의해 가속되고 비행시간이 측정되면 질량 대 전하 비율(mass-to-charge ratio)(m/z)이 생성되는데, 이러한 m/z 값을 통해 타겟 물질의 분자량을 측정할 수 있다. 예를 들어 $m/z=30000$ ($z=+1$) 또는 15000 ($z=+2$)일 경우 분자량은 $m/z \times z = 30000$ 이 된다.

[46] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 카바페넴 분해 효소는 KPC 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 21개 아미노산 잔기가 제거된 KPC 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다.

[47] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 카바페넴 분해 효소는 OXA 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 22개 아미노산 잔기가 제거된 OXA 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다.

[48] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 카바페넴 분해 효소는 NDM 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 19개 또는 20개 아미노산 잔기가 제거된 NDM 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다.

- [49] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 카바페넴 분해 효소는 IMP 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 18 내지 20개 아미노산 잔기가 제거된 IMP 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다.
- [50] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 카바페넴 분해 효소는 VIM 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 25 또는 26개 아미노산 잔기가 제거된 VIM 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다.
- [51] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 카바페넴 분해 효소는 GES 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 18개 아미노산 잔기가 제거된 GES 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다.
- [52] 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 카바페넴 분해 효소가 생체 내에서 카바페넴에 대한 분해 활성을 가지기 위해서는 일정 길이의 N-말단 잔기가 제거된 채(active form) 존재하여야 할 뿐 아니라, 활성 유지를 위해 제거되어야 하는 N-말단 잔기의 길이가 효소의 종류에 따라 각각 상이하다는 사실을 확인하였다. 따라서, 대상체에 감염된 균주가 실제로 카바페넴 내성을 가지는지 여부를 정확하게 판단하기 위해서는 N-말단의 21개 아미노산 잔기가 제거된 KPC 단백질 및/또는 N-말단의 22개 아미노산 잔기가 제거된 OXA 단백질과 동일한 질량값이 검출되는지; 그리고 후술하는 바와 같이 N-말단의 19개 또는 20개 아미노산 잔기가 제거된 NDM 단백질; N-말단의 18 내지 21개 아미노산 잔기가 제거된 IMP 단백질; N-말단의 25 또는 26개 아미노산 잔기가 제거된 VIM 단백질; 및/또는 N-말단의 18개 아미노산 잔기가 제거된 GES 단백질과 동일한 질량값이 검출되는지 여부를 기준으로 판단하여야 한다. 본 발명은 이들 공지된 카바페넴 분해효소들의 전장 아미노산 질량값을 기계적으로 검출하던 종래기술에 비해 현저히 향상된 정확도와 진단 신뢰도를 제공한다.
- [53]
- [54] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량 분석 결과 28720, 28746, 28737, 28780, 28678, 28728, 28704, 28806, 28736, 28738, 28688, 28562, 28877, 28676, 28686, 28733, 28690, 28557, 28718, 28963, 28716, 28588, 29105, 28795, 28825, 28769, 29631, 28760, 28656, 28776, 28975, 29086, 28748, 30433, 28730 및 이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량 값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다. 보다 구체적으로는, 이 경우 시료 내에 존재하는 병원성 균주는 KPC 단백질을 생산하는 균주이다.

- [55] 본 발명에 따르면, 상기 나열된 질량값들은 KPC 서브타입 단백질에서 N-말단의 21개 아미노산 잔기가 제거된 질량값들이다. 상술한 바와 같이 본 발명자들은 카바페넴 분해효소인 KPC의 서브타입 단백질들이 모두 생체 내에서 N-말단의 21개 아미노산 잔기가 제거된 상태에서만 카바페넴 분해 활성을 유지한다는 사실을 발견하였다. 따라서, 질량분석 결과 이에 해당하는 어느 하나 이상의 질량값이 검출될 경우, KPC 서브타입 단백질 중 하나 이상을 발현하는 균주, 즉 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주에 감염된 것으로 판정할 수 있다.
- [56] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량값($m/z \times z$)은 각 질량값에서 16 또는 32만큼 증가된 질량값을 추가적으로 포함한다.
- [57] 보다 구체적으로는, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량값에서 2만큼 감소된 질량값을 추가적으로 포함한다.
- [58] 하기 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명자들은 KPC 단백질 3개의 메티오닌 잔기(Met49, Met116, Met151) 중 1개의 메티오닌 잔기가 산화된 상태로 존재할 수 있음을 발견함으로써, 상기 나열된 질량값에서 산소 원자 1개 만큼 증가된 분자량(+16)이 측정된 경우에도 역시 시료 내에 KPC 단백질을 발현하는 균주가 존재하는 것으로 판정할 수 있다. 아울러, 본 발명자들은 또한 KPC 단백질이 Cys68과 Cys237 사이에 이황화결합된 상태로 존재할 수 있음을 발견함으로써, 상기 나열된 질량값에서 이황화결합에 따른 2개의 수소원자 이탈에 해당하는 분자량(-2)이 측정된 경우에도 역시 시료 내에 KPC 단백질을 발현하는 균주가 존재하는 것으로 판정함으로써, 항생제 내성 균주의 존재를 보다 빈틈없이 검출할 수 있다.
- [59]
- [60] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량 분석 결과 28147, 28098, 28117, 27679, 28172, 28158, 28282, 28032, 28048, 28252, 27673, 28190, 28260, 27718, 28126, 27900, 27653, 28002, 28175, 28149, 27877, 28161, 27955, 28151, 28131, 28215, 28191, 27978 및 이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다. 보다 구체적으로는, 이 경우 시료 내에 존재하는 병원성 균주는 OXA 단백질을 생산하는 균주이다.
- [61] 본 발명에 따르면, 상기 나열된 질량값들은 OXA 서브타입 단백질에서 N-말단의 22개 아미노산 잔기가 제거된 질량 값들이다. 본 발명자들은 OXA의 서브타입 단백질의 경우 생체 내에서 N-말단의 22개 아미노산 잔기가 제거된 상태에서만 카바페넴 분해 활성을 유지한다는 사실을 발견함에 따라, 질량 분석 결과 이에 해당하는 어느 하나 이상의 질량 값이 검출될 경우, OXA 서브타입 단백질 중 하나 이상을 발현하는 균주, 즉 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주에 감염된 것으로 판정할 수 있다.

[62]

[63] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 16, 32 또는 48만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함한다.

[64]

하기 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명자들은 OXA 단백질 내 6개의 메티오닌 잔기(Met115, Met138, Met195, Met237, Met239, Met241) 중 1개 내지 3개의 메티오닌 잔기가 산화된 상태로 존재할 수 있음을 발견함으로써, 상기 나열된 질량값에서 산소 원자 1개(+16), 2개(+32) 또는 3개(+48)만큼 증가된 분자량이 측정된 경우에도 시료 내에 OXA 단백질을 발현하는 균주가 존재하는 것으로 판정함으로써, 역시 항생제 내성 균주 감염 여부를 보다 면밀하게 진단할 수 있다.

[65]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량 분석 결과 26439, 26413, 26438, 26421, 26435, 26467, 26420, 26363, 26587, 26407, 26479, 26381, 26449, 26434, 27043, 26448, 26416, 26465, 26453, 26455, 26466, 26510, 26484, 26509, 26492, 26506, 26538, 26491, 26434, 26658, 26478, 26550, 26452, 26520, 26505, 27114, 26519, 26487, 26536, 26524, 26526, 26537 및 이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량 값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다. 보다 구체적으로는, 이 경우 시료 내에 존재하는 병원성 균주는 NDM 단백질을 생산하는 균주이다.

[66]

본 발명에 따르면, 상기 나열된 질량값들은 NDM 서브타입 단백질에서 N-말단의 19개 아미노산 잔기가 제거된 질량값들로서, 질량분석 결과 이들 중 어느 하나 이상의 질량값이 검출될 경우, NDM 서브타입 단백질 중 하나 이상을 발현하는 균주, 즉 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주에 감염된 것으로 판정할 수 있다.

[67]

본 명세서에서 용어“질량 값($m/z \times z$)”은 검출 대상 단백질의 평균 분자량 또는 이를 대표하는 Dalton 값을 의미하나, 이를 통해 유추할 수 있는 다른 기준 질량값(예를 들어 단일 동위원소 질량값)을 이용하여 동일한 단백질을 검출하는 경우 본 발명과 동일한 구성으로 판단된다. 예를 들어 NDM-1의 단일동위원소 질량인 26493.16을 기준으로 NDM 발현 균주의 감염 여부를 판정하는 경우, 이는 상기 단일 동위원소 질량값을 통해서 당업자가 용이하게 유추할 수 있는 평균 분자량인 26510 $m/z \times z$ 을 기준값으로 NDM 발현 균주의 감염 여부를 판정하는 것과 동일한 구성이 된다.

[68]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 16 또는 32만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함한다.

[69]

하기 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명자들은 NDM 단백질의 7개의 메티오닌 잔기(39, 67, 126, 129, 245, 248, 265) 중 1개 또는 2개의 메티오닌 잔기가 산화된 상태로 존재할 수 있음을 발견하였다. 이에, 상기 나열된 질량값에서 산소 원자 1개(+16) 또는 2개(+32) 만큼 증가된 분자량이 측정된 경우에도 역시

시료 내에 NDM 단백질을 발현하는 군주가 존재하는 것으로 판정함으로써, 항생제 내성 군주의 존재를 보다 빈틈없이 검출할 수 있다.

- [70] 보다 구체적으로는, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 14, 28 또는 42 만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함한다
- [71] 후술하는 바와 같이, 본 발명자들은 NDM 단백질에 1개, 2개 또는 3개의 메틸화(methylation)가 일어난 상태로 존재할 수 있음을 발견함으로써, 상기 나열된 질량값에서 1개 메틸화(+14), 2개 메틸화(+28) 또는 3개 메틸화(+42)로 인한 증가된 분자량이 측정된 경우에도 역시 시료 내에 NDM 단백질을 발현하는 군주가 존재하는 것으로 판정할 수 있다.
- [72] 보다 구체적으로는, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 238 만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함한다.
- [73] 하기 실시예에서 보는 바와 같이, NDM 단백질에서는 팔미트화(Palmitoylation)된 단백질형에 해당하는 피크들이 관찰됨으로써, 팔미트화에 따른 질량값(+238) 만큼 증가된 분자량이 측정된 경우에도 역시 시료 내에 NDM 단백질 발현 군주가 존재하는 것으로 판정함으로써, 항생제 내성 군주 감염 여부에 대한 보다 면밀한 진단이 가능하다.
- [74] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량 분석 결과 25113, 25151, 25011, 25080, 25020, 25083, 25025, 24952, 25192, 25161, 24973, 24988, 25078, 25365, 25268, 25006, 25186, 24994, 25043, 24945, 25208, 25000, 24980, 25128, 25216, 24983, 25115, 25112, 25116, 25414, 25205, 25041, 25139, 25254, 25050, 24910, 25101, 25021, 25212, 25073, 24961, 25105, 24831, 25353, 25234, 24995, 25071, 25094, 25351, 25174, 25156, 25199, 25129, 24981, 25018, 25335, 25232, 24872, 24982, 25204, 24796, 25259, 25214, 25085, 25135, 25131, 25141, 25145, 25172, 25126, 24990 및 이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량 값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 군주가 존재하는 것으로 판정한다. 보다 구체적으로는, 이 경우 시료 내에 존재하는 병원성 군주는 IMP 단백질을 생산하는 군주이다.
- [75] 본 발명에 따르면, 상기 나열된 질량값들은 IMP 서브타입 단백질에서 N-말단의 18개, 19개, 20개 또는 21개 아미노산 잔기가 제거된 질량값들로서, 질량분석 결과 이들 중 어느 하나 이상의 질량값이 검출될 경우, IMP 서브타입 단백질 중 하나 이상을 발현하는 군주에 감염된 것으로 판정할 수 있다.
- [76]
- [77] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량 분석 결과 25322, 25515, 25488, 25391, 25339, 25516, 25464, 25485, 25527, 25531, 25414, 25455, 25421, 25499, 25542, 25129, 25405, 25534, 25446, 25472, 25444, 25298, 25338, 25367, 25355, 25508, 25264, 25306, 25336, 25352, 25543, 25407, 25268, 25419, 25514, 25501, 25487, 25445, 25341, 25364, 25424, 25458, 25491, 25513, 25348, 25518, 25350 및

이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량 값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다. 보다 구체적으로는, 이 경우 시료 내에 존재하는 병원성 균주는 VIM 단백질을 생산하는 균주이다.

[78] 본 발명에 따르면, 상기 나열된 질량값들은 VIM 서브타입 단백질에서 N-말단의 25개 또는 26개 아미노산 잔기가 제거된 질량값들로서, 질량분석 결과 이들 중 어느 하나 이상의 질량값이 검출될 경우, VIM 서브타입 단백질 중 하나 이상을 발현하는 균주에 감염된 것으로 판정할 수 있다.

[79]

[80] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량 분석 결과 29217, 29274, 29186, 29216, 29247, 29246, 29259, 29203, 29231, 29201, 29273, 29261, 29237, 29248, 29230, 29213, 29275, 29278, 29221, 29194, 29338, 29232, 29227, 29251, 29202, 29175, 29369, 29661 및 이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량 값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다. 보다 구체적으로는, 이 경우 시료 내에 존재하는 병원성 균주는 GES 단백질을 생산하는 균주이다.

[81] 본 발명에 따르면, 상기 나열된 질량값들은 GES 서브타입 단백질에서 N-말단의 18개 아미노산 잔기가 제거된 질량값들로서, 질량분석 결과 이들 중 어느 하나 이상의 질량값이 검출될 경우, GES 서브타입 단백질 중 하나 이상을 발현하는 균주에 감염된 것으로 판정할 수 있다.

[82] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 16 또는 32만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함한다. 보다 구체적으로는, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 2만큼 감소된 질량 값을 추가적으로 포함한다.

[83] 후술하는 바와 같이, 본 발명자들은 GES 단백질의 6개의 메티오닌 잔기(62, 95, 112, 143, 164, 181) 중 1개 또는 동시에 2개의 메티오닌 잔기가 산화된 상태로 존재할 수 있음을 발견함으로써, 상기 나열된 질량값에서 산소 원자 1개(+16) 또는 2개(+32) 만큼 증가된 분자량이 측정된 경우에도 역시 시료 내에 GES 단백질을 발현하는 균주가 존재하는 것으로 판정할 수 있다. 아울러, 본 발명자들은 또한 GES 단백질이 Cys63과 Cys233 사이에 이황화결합된 상태로 존재할 수 있음을 발견하였다. 이에, 상기 나열된 질량값에서 이황화결합에 따른 2개의 수소원자 이탈에 해당하는 분자량(-2)이 측정된 경우에도 역시 시료 내에 GES 단백질을 발현하는 균주가 존재하는 것으로 판정함으로써, 항생제 내성 균주 감염 여부를 보다 면밀하게 진단할 수 있다.

[84]

발명의 효과

- [85] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [86] (a) 본 발명은 생물학적 시료 내 카바페넴 항생제(Carbapenem antibiotics)에 대한 내성을 가지는 병원성 균주의 검출 방법을 제공한다.
- [87] (b) 본 발명은 질량분석법을 통해 카바페넴 항생제 분해효소, 구체적으로는 KPC, OXA, NDM, IMP, VIM 및/또는 GES 단백질을 직접적으로 확인함으로써 병원성 균주의 항생제 내성 여부는 물론 내성관련 단백질의 종류까지 신속하게 판별할 수 있다.
- [88] (c) 본 발명은 카바페넴 분해 효소의 종류에 따른 고유한 N-말단의 절단 길이, 메티오닌 잔기의 산화 및 이황화 결합 형성 등 각의 효소가 생체 내에서 가지는 물리적, 화학적 특성을 발굴하고 이를 기준 질량값에 반영함으로써 항생제 내성 균주의 존재를 높은 신뢰도로 보다 빈틈없이 검출할 수 있으며, 이를 통해 감염 초기에 적절한 항생제 투여전략을 수립하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

[89]

도면의 간단한 설명

- [90] 도 1은 항생제 내성 균주 유래 KPC와 OXA 단백질(도 1a), 3종류의 MBL(Metallo- β -Lactamase, 이하 MBL) 패밀리 단백질인 NDM, IMP 및 VIM, 그리고 Class A 카바페넴 분해효소인 GES 단백질의 발현 및 크기에 대한 SDS-PAGE 분석 결과(도 1b)를 보여주는 그림이다. KPC, OXA, NDM, IMP, VIM, GES의 서브타입 단백질의 발현 및 크기에 대한 SDS-PAGE 분석결과는 도 1c부터 도 1h까지 각각의 결과를 보여주는 그림이다.
- [91] 도 2는 임상균주 유래 KPC와 OXA 단백질(도 2a), MBL 단백질인 NDM(도 2b), IMP(도 2c), VIM(도 2d)과 GES-5 단백질(도 2e)의 발현 및 크기에 대한 SDS-PAGE 분석 결과를 보여주는 그림이다.
- [92] 도 3은 황산아연($ZnSO_4$) 농도에 따른 MBL 단백질들의 발현 정도와 크기를 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.
- [93] 도 4는 시료 전처리 후, 조추출액과 조효소액의 단백질 차이를 비교한 결과이다. KPC와 OXA 단백질에 대하여 비이온성 계면활성제(도 4a), 이온성 계면활성제(도 4b) 및 휘발성(Volatile) 완충용액(도 4c)를 각각 사용하여 세포를 파쇄한 후 각 단백질의 발현 및 용해도(Solubility)를 SDS-PAGE 겔로 확인하였다. 또한 비이온성 계면활성제를 사용하여 세포를 파쇄한 MBL 단백질(도 4d)과 휘발성(Volatile) 완충용액으로 세포를 파쇄시킨 GES 단백질(도 4e)의 발현 및 용해도도 SDS-PAGE 겔로 확인하였다.
- [94] 도 5는 이온 크로마토그래피를 사용한 타겟 단백질의 분리 및 정제 결과를 보여주는 그림이다. 음이온 교환수지 컬럼을 이용하여 KPC(도 5a), OXA(도 5b), NDM(도 5c), IMP(도 5d), VIM(도 5e) 그리고 GES-5(도 5f)를 분리 정제하였다.
- [95] 도 6은 KPC 단백질 및 OXA 단백질, 3종류의 MBL 단백질들 및 GES 단백질의 대표적 동정범위(회색)와 산화되는 메티오닌 잔기들(굵은글씨 밑줄)을 비교하여

나타낸 정렬 결과(도 6a 내지 6f)를 각각 보여준다.

- [96] 도 7은 각 단백질의 N-말단으로 동정된 펩타이드의 텐덤 스펙트럼 결과를 나타낸다. 도 7a는 KPC 펩타이드의 분리 크로마토그램을, 도 7b는 KPC의 N-말단 펩타이드 동정 결과를 나타낸다. 도 7c는 OXA 펩타이드의 분리 크로마토그램을, 도 7d는 OXA의 N-말단 펩타이드 동정 결과를 나타낸다. 도 7e는 NDM 펩타이드의 분리 크로마토그램의 예를, 도 7f는 NDM의 N-말단 펩타이드 동정 결과를 나타낸다. 도 7g은 IMP 펩타이드의 분리 크로마토그램의 예를, 도 7h는 IMP의 N-말단 펩타이드 동정 결과를 나타낸다. 도 7i는 VIM 펩타이드의 분리 크로마토그램의 예를, 도 7j는 VIM의 N-말단 펩타이드 동정 결과를 나타낸다. 도 7k는 GES 펩타이드의 분리 크로마토그램의 예를, 도 7l는 GES의 N-말단 펩타이드 동정 결과를 나타낸다. 도 7m 내지 7t는 각 펩타이드의 대표적 아형에 대한 예시적 N-말단 동정결과로서, 각각 KPC-3(도 7m), KPC-17(도 7n), OXA-181(도 7o), IMP-1(도 7p), IMP-4(도 7q), VIM-1(도 7r), VIM-4(도 7s), GES-1(도 7t)의 N-말단 동정결과를 각각 나타낸다.
- [97] 도 8은 ClustalW 프로그램을 사용한 KPC(도 8a), OXA(도 8b), MBL(도 8c-8e) 단백질들과 GES(도 8f) 단백질 아미노산 서열의 다중 정렬(multiple alignment) 분석결과와 보존적 아미노산 서열의 동정 결과의 예시를 보여주는 그림이다. 검정색 박스는 N-말단 서열 부위를 나타낸다.
- [98] 도 9는 KPC(도 9a), OXA(도 9b), NDM(도 9c), IMP(도 9d), VIM(도 9e)과 GES(도 9f) 단백질에 대한 계통수 분석 결과 그림이다.
- [99] 도 10은 고분해능 질량분석기를 이용한 KPC, OXA, NDM, IMP, VIM 및 GES 단백질 동정 결과를 보여주는 그림이다. 도 10a는 다중 전하된 KPC 단백질의 질량 스펙트럼(단일 동위원소 질량: 28,700.69 m/z $\times$ z, 평균분자량: 28,718.13 m/z $\times$ z)을 나타내고, 도 10b는 +17가의 KPC 단백질 이온에 대한 텐덤 스펙트럼과 22-293 서열에 대한 동정 결과($E = 1.8E-9$)를 각각 나타낸다. 도 10c는 다중 전하된 OXA 단백질의 질량 스펙트럼(단일 동위원소 질량: 28,129.28 m/z $\times$ z, 평균분자량: 28,146.69 m/z $\times$ z)을 나타내고, 도 10d는 +27가의 OXA 단백질 이온에 대한 텐덤 스펙트럼과 23-265 서열에 대한 동정 결과 ($E = 3.47E-42$)를 각각 나타낸다. 도 10e는 다중 전하된 NDM 단백질의 질량 스펙트럼을 나타내고, 도 10f는 +25가의 NDM 단백질 이온에 대한 텐덤 스펙트럼과 20-270 서열에 대한 동정 결과를 각각 나타낸다. 도 10g는 다중 전하된 IMP 단백질의 질량 스펙트럼을 나타내고, 도 10h는 +30가의 IMP 단백질 이온에 대한 텐덤 스펙트럼과 19-246 서열에 대한 동정 결과 ($E = 2.99E-76$)를 각각 나타낸다. 도 10i는 다중 전하된 VIM 단백질의 질량 스펙트럼을 나타내고, 도 10j는 +20가의 VIM 단백질 이온에 대한 텐덤 스펙트럼과 27-266 서열에 대한 동정 결과 ($E = 4.76E-49$)를 각각 나타낸다. 도 10k는 다중 전하된 IMP 단백질의 질량 스펙트럼을 나타내고, 도 10l은 +20가의 GES 단백질 이온에 대한 텐덤 스펙트럼과 19-287 서열에 대한 동정 결과($E = 7.12E-8$)를 각각 나타낸다.

- [100] 도 11은 고분해능 질량분석기를 통한 탐다운 질량분석법에 의해 얻어진 NDM 단백질의 변형된 질량값을 나타낸다. 도 11a는 팔미트화된 단백질형을 나타내고, 도 11b는 NDM 단백질의 메틸화된 단백질에 대한 결과와 그에 따른 용출시간차이를 나타낸다
- [101] 도 12은 고분해능 질량분석기를 통한 탐다운 질량분석법에 의해 얻어진 KPC(도 12a), OXA(도 12b), NDM(도 12c), IMP(도 12d), VIM(도 12e)과 GES(도 12f) 단백질에 대한 서열동정범위를 나타낸다.
- [102] 도 13는 저분해능 질량분석기(MALDI-TOF)를 이용한 KPC 단백질(도 13a), OXA 단백질(도 13b), MBL 단백질인 NDM(도 13c), IMP(도 13d), VIM(도 13e) 및 GES 단백질(도 13f)에 대한 질량분석 스펙트럼의 일 예를 보여주는 그림이다.

[103]

발명의 실시를 위한 형태

- [104] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[105]

[106] 실시예

[107] 실험방법

[108] 실시예 1: β -락탐계 항생제 내성 유전자의 클로닝 및 항생제 내성 균주의 제작

[109] 카바페넴 분해효소에 대한 유전자로부터 얻어진 유전자

서열(유럽분자생물학연구소(EMBL), 데이터베이스 식별번호: KPC = CP026395.1, 882nt, OXA = AY236073.2, 798nt, NDM = CAZ39946.1, 813nt, VIM = AY884050.1, 801nt, IMP = AB616660.2, 741nt, GES = DQ236171.1, 864nt)의 정보를 기반으로 원하는 유전자 서열을 합성 제작하였다(표 1). 합성유전자를 사용하여, 다음과 같은 프라이머를 제작하였다.

[110] 1) KPC

[111] 프라이머 1: 5'- AACTGCAGGATGTCACTGTATCGCCGTCTA-3'(30mer)

[112] 프라이머 2: 5'- GGAATTCTTACTGCCCCGTTGACGCC-3'(25mer)

[113] 2) OXA

[114] 프라이머 1: 5'- AACTGCAGGATGCGTGTATTAGCCTTATCGG-3'(31mer)

[115] 프라이머 2: 5'- GGAATTCCTAGGGAATAATTTTTTCCTGTTTGA-3'(33mer)

[116] 3) NDM

[117] 프라이머 1: 5' - AAC TGC AGG ATG GAA TTG CCC AAT ATT ATG CA - 3' (32mer)

[118] 프라이머 2: 5' - GGA ATT CTC AGC GCA GCT TGT CGG - 3' (24mer)

[119] 4) IMP

- [120] 프라이머 1: 5' - AAC TGC AGG ATG AGC AAG TTA TCT GTA TTC TTT ATA T - 3' (37mer)
- [121] 프라이머 2: 5' - GGA ATT CTT AGT TGC TTG GTT TTG ATG GTT TTT - 3' (33mer)
- [122] 5) VIM
- [123] 프라이머 1: 5' - AAC TGC AGG ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG TTA TTG - 3' (36mer)
- [124] 프라이머 2: 5' - GGA ATT CCT ACT CAA CGA CTG AGC GAT T - 3' (28mer)
- [125] 6) GES
- [126] 프라이머 1: 5' - AAC TGC AGG ATG CGC TTC ATT CAC GCA CTA T - 3' (31mer)
- [127] 프라이머 2: 5' - CGG AAT TCC TAT TTG TCC GTG CTC AGG AT - 3' (29mer)
- [128] 프라이머는 클로닝을 위해 제한효소 사이트를 추가하였고, 클로닝 벡터에서 직접적인 발현을 유도하기 위해서 ORF(Open Reading Frame)를 맞추어 제작하였다.
- [129] 3종류의 주형 DNA로부터 PCR을 통해 타겟 유전자를 증폭하였다. PCR 수행시, 반응액은 주형 DNA 3 μ l, 5'프라이머 1.25 μ l, 3'프라이머 1.25 μ l, dNTPs 1 μ l, 5X 버퍼 10 μ l, 5X GC enhance 버퍼를 사용하여 총 50 μ l PCR 반응액으로 만든 후, PCR을 다음과 같은 조건에서 수행하였다: 1)변성(Denaturation)-98°C에서 10초; 2)어닐링(Annealing)- 57°C에서 30초; 3)확장(Extension)- 72°C에서 30초. 타겟 유전자를 포함한 재조합 발현 벡터 제작을 위한 클로닝은 다음과 같이 시행하였다; 1)삽입유전자와 벡터는 제한효소를 사용하여 DNA의 양쪽 끝을 점착성 말단(Sticky end)으로 절단하고, 2)DNA 라이게이즈 효소를 사용하여 삽입유전자를 벡터에 접합하였다. 3)이후, 대장균(*E. coli* Top10)에 형질전환하고, 4) White/Blue 스크린 방법으로 재조합 대장균을 선별하였다. 5)선별된 균주로부터 재조합 플라스미드를 추출하였고, 6)추출된 플라스미드는 제한효소를 처리하여 DNA 크기를 확인하였다. 7)최종적으로 DNA염기서열분석을 통해 삽입유전자를 확인하였다.

[130] [표 1]

카바페넴 분해효소	
KPC	ATGTCACTGTATCGCCGTCTAGTTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGGCCG CTGGCTGGCTTTTCTGCCACCGCGCTGACCAACCTCGTCGCGGAACC ATTCGCTAAACTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACG CGATGGATACCGGCTCAGGCGCAACTGTAAGTTACCGCGCTGAGGA GCGCTTCCCCTGTGTCAGCTCATTCAAGGGCTTTCTTGCTGCCGCTGT GCTGGCTCGCAGCCAGCAGCAGGCCGGCTTGCTGGACACACCCATC CGTTACGGCAAAAATGCGCTGGTTCCGTGGTCAACCATCTCGGAAAA ATATCTGACAACAGGCATGACGGTGGCGGAGCTGTCCGCGGCCGCC GTGCAATACAGTGATAACGCCGCCGCCAATTTGTTGCTGAAGGAGTT GGGCGGCCCGGCCGGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGAT ACCACGTTCCGTCTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAACTCCGCCAT CCCAGGCGATGCGCGCGATACCTCATCGCCGCGCGCCGTGACGGAA AGCTTACAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGCGCCGCGAGC GGCAGCAGTTTGTTGATTGGCTAAAGGGAAACACGACCGGCAACCA CCGCATCCGCGCGGCGGTGCCGGCAGACTGGGCAGTCGGAGACAAA ACCGGAACCTGCGGAGTGTATGGCACGGCAAATGACTATGCCGTCTG TCTGGCCCCTGGGCGCGCACCTATTGTGTTGGCCGTCTACACCCGG GCGCCTAACAAGGATGACAAGCACAGCGAGGCCGTATCGCCGCTG CGGCTAGACTCGCGCTCGAGGGATTGGGCGTCAACGGGCAGTAA
OXA	ATGCGTGTATTAGCCTTATCGGCTGTGTTTTTGGTGGCATCGATTATC GGAATGCCTGCGGTAGCAAAGGAATGGCAAGAAAACAAAAGTTGG AATGCTCACTTTACTGAACATAAATCACAGGGCGTAGTTGTGCTCTG GAATGAGAATAAGCAGCAAGGATTTACCAATAATCTTAAACGGGCG AACCAAGCATTTTTTACCCGCATCTACCTTTAAAATTCCCAATAGCTT GATCGCCCTCGATTTGGGCGTGGTTAAGGATGAACACCAAGTCTTTA AGTGGGATGGACAGACGCGCGATATCGCCACTTGGAATCGCGATCA TAATCTAATCACCGCGATGAAATATTCAGTTGTGCCTGTTTATCAAG AATTTGCCCGCCAAATTGGCGAGGCACGTATGAGCAAGATGCTACA TGCTTTCGATTATGGTAATGAGGACATTTCGGGCAATGTAGACAGTT TCTGGCTCGACGGTGGTATTCGAATTTTCGGCCACGGAGCAAATCAGC TTTTAAAGAAAGCTGTATCACAATAAGTTACACGTATCGGAGCGCAG CCAGCGTATTGTCAAACAAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGGTGAC TATATTATTCGGGCTAAAACCTGGATACTCGACTAGAATCGAACCTAA GATTGGCTGGTGGGTCGGTTGGGTTGAACTTGATGATAATGTGTGGT TTTTGGCGATGAATATGGATATGCCCACATCGGATGGTTTAGGGCTG

	CGCCAAGCCATCACAAAAGAAGTGCTCAAACAGGAAAAAATTATTC CCTAG
ND M	ATGGAATTGCCCAATATTATGCACCCGGTCGCGAAGCTGAGCACCG CATTAGCCGCTGCA TTGATGCTGAGCGGGTGCATGCCCGGTGAAATCCGCCCCGACGATTG GCCAGCAAATGGAA ACTGGCGACCAACGGTTTGGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACC GAATGTCTGGCAG CACACTTCCTATCTCGACATGCCGGGTTTCGGGGGCAGTCGCTTCCAA CGGTTTGATCGTC AGGGATGGCGGGCCGCGTGCTGGTGGTCGATACCGCCTGGACCGATG ACCAGACCGCCCAG ATCCTCAACTGGATCAAGCAGGAGATCAACCTGCCGGTCGCGCTGG CGGTGGTGACTCAC GCGCATCAGGACAAGATGGGCGGTATGGACGCGCTGCATGCGGGCGG GGATTGCGACTTAT GCCAATGCGTTGTCGAACCAGCTTGCCCCGCAAGAGGGGGATGGTTG CGGCGCAACACAGC CTGACTTTCGCCGCCAATGGCTGGGTCGAACCAGCAACCGCGCCCA ACTTTGGCCCCGCTC AAGGTATTTTACCCCGGGCCCCGGCCACACCAGTGACAATATCACCGT TGGGATCGACGGC ACCGACATCGCTTTTGGTGGCTGCCTGATCAAGGACAGCAAGGCCA AGTCGCTCGGCAAT CTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTACGCCGCGTCAGCGCGCGCGTT TGGTGCGGCGTTC CCCAAGGCCAGCATGATCGTGATGAGCCATTCCGCCCCCGATAGCC GCGCCGCAATCACT CATACGGCCCCGCATGGCCGACAAGCTGCGCTGA
IMP	ATGAGCAAGTTATCTGTATTCTTTATATTTTTGTTTTGCAGCATTGCT ACCGCAGCAGAG TCTTTGCCAGATTAAAAATTGAAAAGCTTGATGAAGGCGTTTATGT TCATACTTCGTTT GAAGAAGTTAACGGGTGGGGCGTTGTTTCCTAAACATGGTTTGGTGGT TCTTGTAATGCT GAGGCTTACCTAATTGACACTCCATTTACGGCTAAAGATACTGAAAA GTTAGTCACTTGG

	TTTGTGGAGCGTGGCTATAAAATAAAAGGCAGCATTTCTCTCATTT TCATAGCGACAGC ACGGGCGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCGATCTATCCCCACGTATGC ATCTGAATTAACA AATGAACTGCTTAAAAAAGACGGTAAGGTTCAAGCCACAAATTCAT TTAGCGGAGTTAAC TATTGGCTAGTTAAAAATAAAATTGAAGTTTTTTATCCAGGCCCGGG ACACACTCCAGAT AACGTAGTGGTTTGGTTGCCTGAAAGGAAAATATTATTCGGTGGTTG TTTTATTAAACCG TACGGTTTAGGCAATTTGGGTGACGCAAATATAGAAGCTTGGCCAA AGTCCGCCAAATTA TTAAAGTCCAAATATGGTAAGGCAAACTGGTTGTTCCAGGTCACA GTGAAGTTGGAGAC GCATCACTCTTGAAACTTACATTAGAGCAGGCGGTTAAAGGGTTAA ACGAAAGTAAAAAA CCATCAAAACCAAGCAACTAA
VIM	ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAGTTATTGGTCTATTTGACCGCGTCTATC ATGGCTATTGCG AGTCCGCTCGCTTTTTCCGTAGATTCTAGCGGTGAGTATCCGACAGT CAGCGAAATTCCG GTCGGGGAGGTCCGGCTTTACCAGATTGCCGATGGTGTTTGGTCGCA TATCGCAACGCAG TCGTTTGATGGCGCAGTCTACCCGTCCAATGGTCTCATTGTCCGTGA TGGTGATGAGTTG CTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCGAAAAACACAGCGGCACTTCT CGCGGAGATTGAG AAGCAAATTGGACTTCCTGTAACGCGTGCAGTCTCCACGCACTTTCA TGACGACCGCGTC GGCGGCGTTGATGTCCTTCGGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCAT CACCGTCGACACGC CGGCTAGCCGAGGTAGAGGGGAACGAGATTCCCACGCACTCTCTAG AAGGACTCTCATCG AGCGGGGACGCAGTGCGCTTCGGTCCAGTAGAACTCTTCTATCCTGG TGCTGCGCATTCG ACCGACAACCTAGTTGTGTACGTCCCGTCTGCGAGTGTGCTCTATGG TGGTTGTGCGATT

	TATGAGTTGTCACGCACGTCTGCGGGGAACGTGGCCGATGCCGATCT GGCTGAATGGCCC ACCTCCATTGAGCGGATTCAACAACACTACCCGGAAGCACAGTTCGT CATTCCGGGGGCAC GGCCTGCCGGGGCGGTCTAGACTTGCTCAAGCACACAACGAATGTTGT AAAAGCGCACACA AATCGCTCAGTCGTTGAGTAG
GES	ATGCGCTTCATTCACGCACTATTACTGGCAGGGATCGCTCACTCTGC ATATGCGTCGGAA AAATTAACCTTCAAGACCGATCTTGAGAAGCTAGAGCGCGAAAAAG CAGCTCAGATCGGT GTTGCGATCGTCGATCCCCAAGGAGAGATCGTCGCGGGGCCACCGAA TGGCGCAGCGTTTT GCAATGTGCTCAACGTTCAAGTTTCCGCTAGCCGCGCTGGTCTTTGA AAGAATTGACTCA GGCACCGAGCGGGGGGGATCGAAAACTTTCATATGGGCCGGACATGA TCGTCGAATGGTCT CCTGCCACGGAGCGGTTTCTAGCATCGGGACACATGACGGTTCTCGA GGCAGCGCAAGCT GCGGTGCAGCTTAGCGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAG AAATTGGCGGACCT GCTGCAATGACGCAGTATTTTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCG GCTAGACCGGAAA GAGCCGGAGATGAGCGACAACACACCTGGCGACCTCAGAGATACAA CTACGCCTATTGCT ATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCTATGGCGGCGCACTGACGTC CACCTCGACCCAC ACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAACGGGAGACGCGACAC TACGAGCGGGTTTT CCTAAAGATTGGGTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACCTGCGCCAACG GGGGCCGGAACGAC ATTGGTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAGCGGTGTA TACAACGGCCCCG AAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTCTGGTCA AGTTATTACACAA CTCATCCTGAGCACGGACAAATAG

[132] 실시예 2: 타겟 단백질 발현 및 크기 확인

[133] (1) 타겟 단백질 생산 및 확인

[134] 타겟 유전자를 포함한 플라스미드의 형질전환한 대장균은 50mg/L의 암피실린 항생제가 포함된 Luria-bertani 액체배지에 접종하고, 37°C에서 16시간이상 배양하였다. 타겟 단백질의 발현과 크기를 확인하기 위해 배양액은 4,000rpm에서 15분간 원심분리하고, 상등액을 제거하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 SDS-샘플 완충액을 넣고 95°C에서 5분 동안 가열한 뒤, 15,000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 준비된 샘플을 사용하여 SDS-PAGE 젤 분석을 통해 타겟 단백질의 발현과 크기를 확인하였다(도 1).

[135]

[136] (2) 임상균주 유래 KPC와 OXA의 유전형 확인 및 단백질 확인

[137] 임상균주 유래 KPC와 OXA를 확인하기 위해 ESBL(Extended Spectrum β -Lactamase) 양성으로 확인된 균주를 수집하였다. 수집된 균주는 KPC와 OXA 유전자 증폭에 사용한 프라이머를 이용하여 콜로니 PCR을 수행하였다. 이를 통해 증폭된 PCR 산물은 한천젤 전기영동을 통해 타겟 유전자의 크기를 확인하였다. 크기가 확인된 PCR산물은 DNA 염기서열분석을 통하여 정확한 KPC와 OXA 유전자의 유전형을 확인하였다.

[138] 유전형이 확인된 균주는 LB 액체배지에서 배양하고, SDS-PAGE 젤 분석을 통해 KPC와 OXA 단백질의 발현유무를 확인하였다. 또한 기존의 KPC와 OXA 유전자가 삽입된 벡터를 포함한 재조합 균주와 동일하게 임상균주 유래 KPC와 OXA 유전자를 포함하는 재조합 균주를 제작하고 재조합 균주도 임상균주와 동일하게 SDS-PAGE 젤 분석을 통하여 실제 발현된 KPC와 OXA 단백질의 크기를 확인하였다(도 2).

[139] 임상균주 유래 KPC와 OXA 단백질은 Q-TOF MS 방법을 통하여 각각을 동정하였다. KPC의 경우, 동정된 펩타이드에 대한 서열범위는 전체 단백질 서열에서는 62.46%(183/293)로, N-말단이 제외된 활성형으로는 67.28%(183/272)로 확인했다. 또한, OXA의 경우는 동정된 펩타이드를 통하여 전체 단백질 아미노산 서열을 적용하였을 때, 16.98%(45/265)로, 활성형 단백질의 서열을 기준으로 18.52%(45/243)로 각각 확인했다.

[140]

[141] (3) MBL 단백질 생산 및 확인

[142] 타겟 MBL 유전자를 포함한 플라스미드의 형질전환한 대장균은 50mg/L의 암피실린 항생제와 황산아연(0.01 mM ~ 1 mM ZnSO₄)이 포함된 Luria-bertani 액체배지에 접종하고, 37°C에서 16시간이상 배양하였다. 타겟 단백질의 발현과 크기를 확인하기 위해 배양액은 4,000rpm에서 15분간 원심분리하고, 상등액을 제거하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 SDS-샘플 완충액을 넣고 95°C에서 5분 동안 가열한 뒤, 15,000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 준비된 샘플을 사용하여 SDS-PAGE 젤 분석을 통해 타겟 단백질의 발현과 크기를

확인하였다(도 3).

[143]

[144] 실시예 3: 시료 전처리 방법 및 조효소액으로부터의 타겟 단백질 확인

[145] (1) 비이온성 계면활성제를 이용한 시료 전처리

[146] 시료 전처리를 위해 배양액은 4,000rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 상등액을 제거하여 세포를 수확하였다. 조추출액을 확보하기 위해 완충용액(0.25 mM Tris-HCl, 2% OG)을 처리하고 상온에서 10분 동안 반응시켰다. 만들어진 조추출액은 4°C에서 15,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상등액(이하, 조효소액)과 침전물로 분리하였다. 조효소액으로부터 SDS-PAGE 분석을 통해 타겟 단백질의 발현과 크기를 확인하였다(도 4).

[147]

[148] (2) 이온성 계면활성제를 이용한 시료 전처리

[149] 다음의 단계로 시료 전처리를 수행하였다: 1) 발현된 세포배양액 100μl를 원심분리하여 세포를 회수하고, 2) 상등액을 제거한 후, 비이온성 계면활성제인 DOC(Sodium Deoxycholate) 2%를 포함한 완충용액(0.25 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 2% DOC)을 첨가하였다. 3) 혼탁액은 10분간 상온에서 인큐베이션하고 4) 4°C에서 15,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 조효소액을 확보하였다.

[150] 이온성 계면활성제(DOC)를 처리한 조추출액과 조효소액은 각각 SDS-PAGE 젤 분석을 통하여 단백질의 발현 및 크기를 확인하였다(도 4b).

[151]

[152] (3) 휘발성 완충용액을 이용한 시료 전처리

[153] 시료전처리 방법은 다음과 같다: 1) 50 mM 탄산수소암모늄(이하, ABC) 용액을 수확한 세포에 첨가한 후, 2) 파이펫으로 재부유(resuspension)한 다음, 3) 12,000rpm, 4°C, 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 처리한 조추출액과 조효소액은 SDS-PAGE 젤 분석을 통해 단백질의 발현 및 크기를 확인하였다(도 4c 및 4e).

[154]

[155] (4) 초음파 파쇄법을 이용한 시료 전처리

[156] 상기 (1) ~ (3)번 방법으로 처리된 혼탁액은 Sonic bath(JAC 2010, 한솔테크, 한국)를 이용하여 40Hz, 200W로 5 ~ 10분간 초음파로 세포를 파쇄하였고, 15,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하였다.

[157]

[158] 실시예 4: 타겟 단백질 분리/정제

[159] 타겟 단백질의 분리/정제를 위해 이온교환 크로마토그래피를 사용하였다. 이온교환 수지는 음이온의 경우 Q-레진이 포함된 컬럼을 양이온은 SP-레진이 포함된 컬럼을 사용하였다.

[160]

[161] (1) 음이온 교환수지 크로마토그래피

[162] Q-레진이 포함된 컬럼에 조효소액을 로딩한 뒤 용출되는 용액을 수집하였다. 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액 1 ml을 사용하여 세척하고, 완충용액에 100 mM NaCl, 200 mM NaCl, 300 mM NaCl, 400 mM NaCl, 500 mM NaCl 1M을 각각 포함한 용출용액을 순차적으로 250 μ l씩 로딩하고 각각 구획별로 용출액을 수집하였다.

[163]

[164] (2) 양이온 교환수지 크로마토그래피

[165] SP-레진이 포함된 컬럼을 이용하여 (1) 음이온 교환수지 크로마토그래피와 동일한 방법으로 타겟 단백질을 분리 정제하였다.

[166] 최종적으로 상기의 이온교환 크로마토그래피방법을 통해 원하는 6 종류의 타겟 단백질을 분리/정제하였다(도 4). 최종적으로, 위와 같은 방법을 사용하여 세포파쇄액으로부터 순도 높은 각 단백질들을 분리/정제하였다.

[167]

[168] 실시예 5: 타겟 단백질의 확인 발현 및 크기 확인

[169] SDS-PAGE 겔에서 발현과 크기가 확인된 단백질은 In-gel digestion 방법과 nano-LC-MS/MS 방법을 사용하여 동정함으로써 실제로 균주에서 발현된 항생제 내성 단백질의 종류를 확인하였다(도 7).

[170] (1) In-Gel Digestion

[171] SDS-PAGE 겔에서 타겟 단백질 크기에 해당하는 밴드부분만 확보하고, 염색되어 있는 겔을 탈색(destain)하였다. 탈색된 겔은 환원/알킬화(Reduction/alkylation) 과정을 거친 후, 트립신 효소를 사용하여 단백질을 선택적으로 절단(digestion)하였다. 절단된 펩타이드를 회수하고 DK-Tip(C18 Tip)을 사용하여 탈염하였다.

[172]

[173] (2) nano-LC-MS/MS

[174] 균주 내에서 발현되는 활성 단백질(Active protein)의 서열 및 범위를 확인하기 위해 나노액체크로마토그래피 및 고분해능 질량분석을 수행하였다(Q-Exactive HF-X 질량분석기 시스템). 탈염된 펩타이드 시료를 0.1% 포름산 용액으로 용해시킨 후, 컬럼에 시료를 주입하였다. C18 컬럼(75 μ m x 70cm)과 나노유속 액상 크로마토그래피를 이용하여 펩타이드 시료를 분리하였다. 이때 사용한 시료 로딩 및 분리용 구배(gradient) 조건의 예는 다음과 같다:

[175] - 버퍼 A: 물 내의 0.1% 포름산/ 버퍼 B: 아세토니트릴 내의 0.1% 포름산

[176] - 시료 로딩: 0 - 5분, 5%(B), 유속 5 μ L/min

[177] - 분리 농도 구배:

[178] 5 - 7분, 5%에서 10%(B), 유속 300nL/min

[179] 7 - 38분, 10%에서 40%(B), 유속 300nL/min

[180] 38 - 38.5분, 40%에서 80%(B), 유속 300nL/min

[181] 38.5 - 39.5분, 80%(B), 유속 300nL/min

- [182] 39.5 - 40분, 80%에서 5%(B), 유속 300nL/min
- [183] 40 - 60분, 5%(B), 유속 300nL/min
- [184]
- [185] 이때 사용된 질량분석기의 파라미터의 예는 다음과 같다:
- [186] -분해능: Full MS 60,000, MS2 30,000
- [187] -Full MS: 350~2,000 m/z, 100 msec
- [188] -MS2: 50 msec, NCE 28, 1, >6가로 이온화 물질은 MS2 대상에서 제외
- [189] Bottom-up 데이터로 펩타이드 및 단백질을 동정하기 위해 Thermo사의 'Proteome Discoverer(v2.4)' 소프트웨어를 활용하였으며, 단백질/펩타이드 동정은 FDR(false discovery rate) 1%를 기준으로 선별하였다. *E. Coli* 유래 단백질 중에서 KPC, OXA, MBL 단백질 혹은 GES 단백질이 동정되었으며, KPC 단백질에서는 200개의 펩타이드(표 2), OXA의 경우는 177개의 펩타이드(표 3), NDM 단백질은 109개의 펩타이드(표 4), IMP의 경우는 146개의 펩타이드(표 5), VIM 단백질에서는 159개의 펩타이드(표 6), GES의 경우 111개의 펩타이드(표 7)가 동정되었다.

[190] [표2]

KPC로 동정된 각 펩타이드의 위치 및 서열 펩타이드 정보

개 시	종 결	서열	산화 부위	z	SEQU EST XCorr	SEQU EST delta Cn	관찰 된 m/z	실제지 량 (Da)
22	35	(S)ATALTNLVAEPFAK(L)		2	4.48	0.67	723.4 0	1,444.7 9
23	35	(A)TALTNLVAEPFAK(L)		2	4.56	0.67	687.8 8	1,373.7 5
24	35	(T)ALTNLVAEPFAK(L)		2	3.17	0.53	637.3 6	1,272.7 1
25	35	(A)LTNLVAEPFAK(L)		2	3.38	0.56	601.8 4	1,201.6 7
26	36	(L)TNLVAEPFAKL(E)		2	2.05	0.27	601.8 4	1,201.6 7
26	60	(L)TNLVAEPFAKLEQDFGGSI GVYAmDTGSGATVSYR(A)	M(49)	3	2.99	0.50	1,223. 26	3,666.7 6
27	35	(T)NLVAEPFAK(L)		2	2.25	0.33	494.7 8	987.54
29	35	(L)VAEPFAK(L)		1	2.65	0.43	761.4 1	760.41
34	47	(F)AKLEQDFGGSIGVY(A)		2	3.15	0.52	742.3 8	1,482.7 4
34	60	(F)AKLEQDFGGSIGVYAmDT GSGATVSYR(A)	M(49)	3	5.39	0.72	932.7 8	2,795.3 1
34	60	(F)AKLEQDFGGSIGVYAMDT GSGATVSYR(A)		3	3.97	0.62	927.4 5	2,779.3 2
36	60	(K)LEQDFGGSIGVYAmDTGS GATVSYR(A)	M(49)	2	6.81	0.78	1,299. 10	2,596.1 8
36	60	(K)LEQDFGGSIGVYAMDTGS GATVSYR(A)		2	6.83	0.78	1,291. 10	2,580.1 8
42	60	(G)GSIGVYAmDTGSGATVSY R(A)	M(49)	2	2.01	0.25	954.4 4	1,906.8 7

45	60	(I)GVYAMDTGSGATVSYR(A)		2	2.35	0.36	817.8 8	1,633.7 4
48	59	(Y)AmDTGSGATVSY(R)	M(49)	2	2.84	0.47	588.2 5	1,174.4 8
48	59	(Y)AMDTGSGATVSY(R)		2	2.67	0.44	580.2 5	1,158.4 9
48	60	(Y)AmDTGSGATVSYR(A)	M(49)	2	3.30	0.55	666.3 0	1,330.5 8
48	60	(Y)AMDTGSGATVSYR(A)		2	3.92	0.62	658.3 0	1,314.5 9
50	60	(M)DTGSGATVSYR(A)		2	2.25	0.33	557.2 7	1,112.5 2
60	67	(Y)RAEERFPL(C)		2	1.76	0.15	509.2 8	1,016.5 4
60	71	(Y)RAEERFPLcSSF(K)		2	2.80	0.46	749.8 6	1,497.7 1
61	67	(R)AEERFPL(C)		2	1.98	0.24	431.2 3	860.44
61	72	(R)AEERFPLcSSFK(G)		2	4.26	0.65	735.8 6	1,469.7 0
62	72	(A)EERFPLcSSFK(G)		2	3.39	0.56	700.3 4	1,398.6 7
63	72	(E)ERFPLcSSFK(G)		2	3.86	0.61	635.8 2	1,269.6 2
65	72	(R)FPLcSSFK(G)		2	2.35	0.36	493.2 5	984.48
68	74	(L)cSSFKGF(L)		2	2.16	0.31	416.6 9	831.36
72	80	(F)KGFLAAAVL(A)		2	2.57	0.42	445.2 8	888.54
72	82	(F)KGFLAAAVLAR(S)		2	2.01	0.25	558.8 5	1,115.6 9
73	82	(K)GFLAAAVLAR(S)		2	3.21	0.53	494.8 0	987.59

74	82	(G)FLAAAVLAR(S)		2	1.97	0.24	466.2 9	930.56
75	82	(F)LAAAVLAR(S)		2	2.96	0.49	392.7 6	783.50
76	82	(L)AAAVLAR(S)		1	2.24	0.33	671.4 2	670.41
81	96	(L)ARSQQQAGLLDTPIRY(G)		2	3.60	0.58	908.9 9	1,815.9 6
83	95	(R)SQQQAGLLDTPIR(Y)		2	4.74	0.68	713.8 8	1,425.7 5
83	98	(R)SQQQAGLLDTPIRYGK(N)		2	5.57	0.73	887.9 8	1,773.9 4
84	95	(S)QQQAGLLDTPIR(Y)		2	2.45	0.39	670.3 7	1,338.7 3
85	95	(Q)QQAGLLDTPIR(Y)		2	3.39	0.56	606.3 4	1,210.6 7
87	95	(Q)AGLLDTPIR(Y)		2	2.37	0.37	478.2 8	954.55
90	96	(L)LDTPIRY(G)		2	1.96	0.23	439.2 4	876.47
96	11 0	(R)YGKNALVPWSPISEK(Y)		2	1.87	0.20	844.9 5	1,687.8 9
97	10 4	(Y)GKNALVPW(S)		2	1.89	0.21	442.7 5	883.50
97	11 1	(Y)GKNALVPWSPISEKY(L)		2	4.27	0.65	844.9 6	1,687.9 0
99	11 0	(K)NALVPWSPISEK(Y)		2	3.22	0.53	670.8 6	1,339.7 1
10 0	11 0	(N)ALVPWSPISEK(Y)		2	2.11	0.29	613.8 4	1,225.6 7
10 2	11 0	(L)VPWSPISEK(Y)		1	2.69	0.44	1,042. 55	1,041.5 4
10 3	11 0	(V)PWSPISEK(Y)		2	2.19	0.31	472.2 5	942.48

105	111	(W)SPISEKY(L)		2	1.90	0.21	412.22	822.42
105	112	(W)SPISEKYL(T)		2	1.87	0.20	468.76	935.50
105	121	(W)SPISEKYLTGmTVAEL(S)	M(116)	2	3.60	0.58	928.47	1,854.93
111	139	(K)YLTTGmTVAELSAAAVQYSDNAAANLLLK(E)	M(116)	2	8.51	0.82	1,508.27	3,014.53
111	139	(K)YLTTGMTVAELSAAAVQYSDNAAANLLLK(E)		2	8.88	0.83	1,500.27	2,998.53
112	121	(Y)LTTGmTVAEL(S)	M(116)	2	1.90	0.21	526.27	1,050.53
113	139	(L)TTGMTVAELSAAAVQYSDNAAANLLLK(E)		2	3.10	0.52	1,362.20	2,722.39
117	139	(M)TVAELSAAAVQYSDNAAANLLLK(E)		2	5.53	0.73	1,167.12	2,332.23
122	128	(L)SAAAVQY(S)		1	1.62	0.07	709.35	708.35
122	139	(L)SAAAVQYSDNAAANLLLK(E)		2	4.23	0.65	910.48	1,818.94
123	139	(S)AAAVQYSDNAAANLLLK(E)		2	3.20	0.53	866.97	1,731.92
125	139	(A)AVQYSDNAAANLLLK(E)		2	3.41	0.56	795.93	1,589.84
128	139	(Q)YSDNAAANLLLK(E)		2	3.76	0.60	646.85	1,291.68
129	137	(Y)SDNAAANLL(L)		1	2.19	0.32	888.45	887.44
129	139	(Y)SDNAAANLLLK(E)		2	2.65	0.43	565.31	1,128.61
138	147	(L)LKELGGPAGL(T)		2	3.57	0.58	477.79	953.56
139	150	(L)KELGGPAGLTAF(M)		2	2.89	0.48	580.82	1,159.63

14 0	15 2	(K)ELGGPAGLTAFmR(S)	M(15 1)	2	3.56	0.58	668.3 4	1,334.6 7
14 0	15 2	(K)ELGGPAGLTAFMR(S)		2	3.94	0.62	660.3 4	1,318.6 7
14 2	15 2	(L)GGPAGLTAFmR(S)	M(15 1)	2	2.11	0.29	547.2 8	1,092.5 4
14 3	15 2	(G)GPAGLTAFmR(S)	M(15 1)	2	2.63	0.43	518.7 7	1,035.5 2
14 4	15 2	(G)PAGLTAFmR(S)	M(15 1)	2	2.42	0.38	490.2 5	978.49
14 8	15 9	(L)TAFmRSIGDTTF(R)	M(15 1)	2	3.43	0.56	681.8 2	1,361.6 3
14 8	15 9	(L)TAFMRSIGDTTF(R)		2	3.89	0.61	673.8 3	1,345.6 4
15 1	15 9	(F)mRSIGDTTF(R)	M(15 1)	2	2.57	0.42	522.2 5	1,042.4 8
15 1	15 9	(F)MRSIGDTTF(R)		2	2.52	0.40	514.2 5	1,026.4 9
15 3	16 0	(R)SIGDTTFR(L)		2	2.15	0.30	448.7 3	895.44
15 3	16 3	(R)SIGDTTFR(LDR(W)		2	2.55	0.41	640.8 3	1,279.6 5
15 3	17 7	(R)SIGDTTFR(LDRWELELNSA IPGDAR(D)		3	1.99	0.25	944.8 2	2,831.4 3
15 4	16 0	(S)IGDTTFR(L)		2	2.08	0.28	405.2 1	808.41
15 4	16 3	(S)IGDTTFR(LDR(W)		2	1.88	0.20	597.3 2	1,192.6 2
15 5	16 3	(I)GDTTFR(LDR(W)		2	1.85	0.19	540.7 8	1,079.5 4
15 6	16 3	(G)DTTFR(LDR(W)		2	1.92	0.22	512.2 7	1,022.5 2
16 1	17 7	(R)LDRWELELNSAIPGDAR(D)		2	3.95	0.62	978.0 0	1,953.9 9

16 1	18 3	(R)LDRWELELNSAIPGDARD TSSPR(A)		3	2.59	0.42	866.7 7	2,597.2 9
16 4	17 7	(R)WELELNSAIPGDAR(D)		2	4.22	0.64	785.9 0	1,569.7 8
16 4	18 3	(R)WELELNSAIPGDARDTSSP R(A)		3	3.34	0.55	738.7 0	2,213.0 8
16 5	17 7	(W)ELELNSAIPGDAR(D)		2	3.42	0.56	692.8 6	1,383.7 0
18 4	19 1	(R)AVTESLQK(L)		2	2.27	0.34	438.2 4	874.47
18 4	20 3	(R)AVTESLQKLTLSGALAAP QR(Q)		2	3.16	0.53	1,027. 58	2,053.1 5
18 5	19 1	(A)VTESLQK(L)		2	1.97	0.24	402.7 3	803.44
19 2	20 3	(K)LTLGSALAAPQR(Q)		2	4.07	0.63	599.3 5	1,196.6 9
19 2	20 4	(K)LTLGSALAAPQRQ(Q)		2	1.85	0.19	663.3 8	1,324.7 5
19 3	20 3	(L)TLGSALAAPQR(Q)		2	2.24	0.33	542.8 1	1,083.6 1
19 3	20 6	(L)TLGSALAAPQRQQF(V)		2	4.04	0.63	744.4 0	1,486.7 9
19 4	20 3	(T)LGSALAAPQR(Q)		2	3.44	0.56	492.2 8	982.56
19 5	20 6	(L)GSALAAPQRQQF(V)		2	2.10	0.29	637.3 4	1,272.6 6
19 9	20 9	(L)AAPQRQQFVDW(L)		2	3.25	0.54	673.3 4	1,344.6 6
19 9	21 0	(L)AAPQRQQFVDWL(K)		2	1.82	0.18	729.8 8	1,457.7 4
20 4	21 1	(R)QQFVDWLK(G)		2	2.89	0.48	532.2 8	1,062.5 5
20 4	21 9	(R)QQFVDWLKGNTTGNHR(I)		2	2.91	0.48	950.9 8	1,899.9 4

21 0	22 8	(W)LKGNTTGNHRIRAAVPAD W(A)		3	1.93	0.22	693.0 4	2,076.1 1
21 2	21 9	(K)GNTTGNHR(I)		2	2.39	0.37	428.7 0	855.39
22 2	23 3	(R)AAVPADWAVGDK(T)		2	2.66	0.44	600.3 1	1,198.6 0
22 2	23 5	(R)AAVPADWAVGDKTG(T)		2	3.29	0.54	679.3 4	1,356.6 7
22 2	23 6	(R)AAVPADWAVGDKTGT(C)		2	3.82	0.61	729.8 6	1,457.7 1
22 2	25 4	(R)AAVPADWAVGDKTGTcG VYGTANDYAVVWPTGR(A)		3	3.57	0.58	1,142. 54	3,424.6 0
22 3	23 3	(A)AVPADWAVGDK(T)		2	2.43	0.38	564.7 9	1,127.5 6
22 4	23 3	(A)VPADWAVGDK(T)		2	2.89	0.48	529.2 7	1,056.5 2
22 5	23 3	(V)PADWAVGDK(T)		2	3.15	0.52	479.7 3	957.46
22 6	23 3	(P)ADWAVGDK(T)		1	2.59	0.42	861.4 1	860.40
22 9	24 0	(W)AVGDKTGTcGVY(G)		2	3.20	0.53	614.2 9	1,226.5 6
22 9	24 6	(W)AVGDKTGTcGVYGTAND Y(A)		2	3.02	0.50	924.9 1	1,847.8 1
23 4	25 4	(K)TGTcGVYGTANDYAVVW PTGR(A)		2	3.04	0.51	1,123. 02	2,244.0 2
23 8	25 4	(C)GVYGTANDYAVVWPTGR (A)		2	4.23	0.65	913.4 5	1,824.8 8
23 9	25 4	(G)VYGTANDYAVVWPTGR(A)		2	4.11	0.64	884.9 4	1,767.8 6
24 0	25 4	(V)YGTANDYAVVWPTGR(A)		2	3.37	0.55	835.4 0	1,668.7 9
24 1	25 4	(Y)GTANDYAVVWPTGR(A)		2	1.98	0.24	753.8 7	1,505.7 3

24 5	25 4	(N)DYAVVWPTGR(A)		2	2.69	0.44	582.2 9	1,162.5 8
24 7	25 9	(Y)AVVWPTGRAPIVL(A)		2	2.21	0.32	689.9 2	1,377.8 2
25 1	26 2	(W)PTGRAPIVLAVY(T)		2	2.40	0.38	628.8 7	1,255.7 3
25 5	26 4	(R)APIVLAVYTR(A)		2	3.49	0.57	551.8 3	1,101.6 5
25 5	27 1	(R)APIVLAVYTRAPNKDDK(H)		3	1.75	0.14	624.3 5	1,870.0 3
25 6	26 4	(A)PIVLAVYTR(A)		2	2.99	0.50	516.3 2	1,030.6 2
25 7	26 4	(P)IVLAVYTR(A)		2	1.99	0.25	467.7 9	933.56
26 0	28 3	(L)AVYTRAPNKDDKHSEAVI AAAARL(A)		4	3.51	0.57	642.6 0	2,566.3 7
26 3	28 3	(Y)TRAPNKDDKHSEAVIAAA ARL(A)		3	5.25	0.71	745.4 1	2,233.2 0
26 3	28 5	(Y)TRAPNKDDKHSEAVIAAA ARLAL(E)		3	3.67	0.59	806.7 8	2,417.3 3
26 5	28 2	(R)APNKDDKHSEAVIAAAAR (L)		2	5.92	0.75	932.4 9	1,862.9 6
26 6	28 2	(A)PNKDDKHSEAVIAAAAR(L)		3	5.88	0.74	598.3 1	1,791.9 2
26 7	28 2	(P)NKDDKHSEAVIAAAAR(L)		2	4.96	0.70	848.4 4	1,694.8 7
26 8	28 2	(N)KDDKHSEAVIAAAAR(L)		2	5.04	0.70	791.4 2	1,580.8 2
26 9	28 2	(K)DDKHSEAVIAAAAR(L)		2	3.34	0.55	727.3 7	1,452.7 3
27 0	28 2	(D)DKHSEAVIAAAAR(L)		3	2.12	0.29	446.9 1	1,337.7 1
27 1	28 2	(D)KHSEAVIAAAAR(L)		2	3.35	0.55	612.3 5	1,222.6 8

27 2	28 2	(K)HSEAVIAAAAR(L)		2	3.92	0.62	548.3 0	1,094.5 8
27 3	28 2	(H)SEAVIAAAAR(L)		2	2.34	0.36	479.7 7	957.52
28 3	29 1	(R)LALEGLGVN(G)		1	2.36	0.36	885.5 0	884.49
28 3	29 3	(R)LALEGLGVNGQ(-)		2	3.66	0.59	535.8 0	1,069.5 8
28 4	29 3	(L)ALEGLGVNGQ(-)		2	2.09	0.28	479.2 5	956.49

[191]

[192] [표3]

OXA로 동정된 각 펩타이드의 위치 및 서열 펩타이드 정보

개 시	종 결	서열	산화 부위	z	SEQ UEST XCor r	SEQU EST delta Cn	관찰 된 m/z	실제 질량 (Da)
23	29	(A)KEWQENK(S)		2	2.01	0.25	481.2 4	960.4 7
23	39	(A)KEWQENKSWNAHFTEHK(S)		4	5.28	0.72	550.5 2	2198. 03
28	39	(E)NKSWNAHFTEHK(S)		2	3.06	0.51	749.8 7	1497. 72
30	37	(K)SWNAHFTE(H)		2	1.78	0.16	496.2 2	990.4 3
30	38	(K)SWNAHFTEH(K)		2	3.14	0.52	564.7 5	1127. 48
30	39	(K)SWNAHFTEHK(S)		2	3.71	0.60	628.8 0	1255. 58
31	39	(S)WNAHFTEHK(S)		2	3.47	0.57	585.2 8	1168. 54
32	39	(W)NAHFTEHK(S)		2	3.09	0.51	492.2 4	982.4 6
32	39	(W)NAHFTEHK(S)		3	2.80	0.46	328.5 0	982.4 7
33	39	(N)AHFTEHK(S)		2	2.06	0.27	435.2 2	868.4 2
38	51	(E)HKSQGVVVLWNENK(Q)		2	5.32	0.72	819.4 5	1636. 88
40	49	(K)SQGVVVLWNE(N)		2	2.56	0.41	565.8 0	1129. 58
40	51	(K)SQGVVVLWNENK(Q)		3	3.90	0.62	458.2 5	1371. 71
40	60	(K)SQGVVVLWNENKQQGFTNN LK(R)		2	4.90	0.69	1202. 14	2402. 26

40	61	(K)SQGVVVLWNENKQQGFTNN LKR(A)		3	6.25	0.76	853.7 8	2558. 33
42	51	(Q)GVVVLWNENK(Q)		2	3.13	0.52	579.3 2	1156. 63
49	60	(N)ENKQQGFTNNLK(R)		2	2.79	0.46	710.8 7	1419. 72
49	61	(N)ENKQQGFTNNLK(R)(A)		3	4.16	0.64	526.2 8	1575. 82
50	60	(E)NKQQGFTNNLK(R)		2	3.50	0.57	646.3 4	1290. 67
50	61	(E)NKQQGFTNNLK(R)(A)		3	5.40	0.72	483.2 7	1446. 77
51	60	(N)KQQGFTNNLK(R)		2	3.73	0.60	589.3 2	1176. 63
51	61	(N)KQQGFTNNLK(R)(A)		2	2.07	0.28	667.3 7	1332. 73
52	60	(K)QQGFTNNLK(R)		2	3.28	0.54	525.2 7	1048. 53
52	61	(K)QQGFTNNLK(R)(A)		3	3.92	0.62	402.5 5	1204. 64
53	61	(Q)QGFTNNLK(R)(A)		2	2.93	0.49	539.2 9	1076. 57
54	60	(Q)GFTNNLK(R)		1	2.16	0.31	793.4 2	792.4 1
54	61	(Q)GFTNNLK(R)(A)		2	2.44	0.38	475.2 6	948.5 1
55	61	(G)FTNNLK(R)(A)		2	2.40	0.37	446.7 5	891.5 0
61	72	(K)RANQAFLPASTF(K)		2	2.99	0.50	661.8 5	1321. 68
61	73	(K)RANQAFLPASTFK(I)		2	4.14	0.64	725.9 0	1449. 78
62	72	(R)ANQAFLPASTF(K)		2	2.30	0.35	583.8 0	1165. 58

62	73	(R)ANQAFLPASTFK(I)		2	3.95	0.62	647.8 5	1293. 68
62	76	(R)ANQAFLPASTFKIPN(S)		2	2.10	0.29	809.9 4	1617. 86
63	73	(A)NQAFLPASTFK(I)		2	3.07	0.51	612.3 3	1222. 64
64	73	(N)QAFLPASTFK(I)		2	3.31	0.55	555.3 1	1108. 60
65	73	(Q)AFLPASTFK(I)		2	1.95	0.23	491.2 8	980.5 4
66	73	(A)FLPASTFK(I)		1	2.53	0.41	910.5 1	909.5 0
67	73	(F)LPASTFK(I)		1	3.04	0.51	763.4 3	762.4 3
74	87	(K)IPNSLIALDLGVVK(D)		2	3.39	0.56	726.4 5	1450. 88
74	94	(K)IPNSLIALDLGVVKDEHQVF K(W)		3	8.46	0.82	779.1 1	2334. 30
74	100	(K)IPNSLIALDLGVVKDEHQVF KWDGQTR(D)		5	2.45	0.39	616.5 3	3077. 63
75	94	(I)PNSLIALDLGVVKDEHQVFK(W)		4	5.10	0.71	556.3 1	2221. 20
77	94	(N)SLIALDLGVVKDEHQVFK(W)		2	4.75	0.68	1006. 07	2010. 12
80	94	(I)ALDLGVVKDEHQVFK(W)		2	2.13	0.30	849.4 6	1696. 91
81	94	(A)LDLGVVKDEHQVFK(W)		2	1.82	0.18	813.9 5	1625. 88
82	94	(L)DLGVVKDEHQVFK(W)		2	3.04	0.51	757.4 0	1512. 79
83	94	(D)LGVVKDEHQVFK(W)		2	3.16	0.53	699.8 9	1397. 77
83	100	(D)LGVVKDEHQVFKWDGQTR(D)		3	3.36	0.55	714.7 1	2141. 11

84	94	(L)GVVKDEHQVFK(W)		2	3.26	0.54	643.3 5	1284. 68
88	95	(K)DEHQVFKW(D)		2	2.60	0.42	544.7 6	1087. 51
88	100	(K)DEHQVFKWDGQTR(D)		2	3.91	0.62	823.3 9	1644. 77
89	100	(D)EHQVFKWDGQTR(D)		3	1.82	0.18	510.9 2	1529. 74
90	100	(E)HQVFKWDGQTR(D)		3	3.49	0.57	467.9 1	1400. 70
92	100	(Q)VFKWDGQTR(D)		2	1.92	0.22	568.8 0	1135. 58
96	107	(W)DGQTRDIATWNR(D)		3	3.29	0.54	478.2 4	1431. 69
10 1	107	(R)DIATWNR(D)		2	2.13	0.30	438.2 2	874.4 3
10 1	110	(R)DIATWNRDHN(L)		2	1.94	0.23	621.2 9	1240. 56
10 1	116	(R)DIATWNRDHNLITAmK(Y)	M(115)	3	5.46	0.73	638.9 9	1913. 94
10 1	116	(R)DIATWNRDHNLITAMK(Y)		3	5.23	0.71	633.6 6	1897. 95
10 3	116	(I)ATWNRDHNLITAmK(Y)	M(115)	3	6.00	0.75	562.9 5	1685. 83
10 3	116	(I)ATWNRDHNLITAMK(Y)		3	3.52	0.57	557.6 2	1669. 84
10 4	116	(A)TWNRDHNLITAmK(Y)	M(115)	3	2.18	0.31	539.2 7	1614. 79
10 5	128	(T)WNRDHNLITAMKYSVVPVY QEFAR(Q)		3	2.26	0.34	979.8 3	2936. 46
10 7	116	(N)RDHNLITAMK(Y)		2	2.89	0.48	599.8 2	1197. 63
10 8	116	(R)DHNLITAmK(Y)	M(115)	2	3.80	0.61	529.7 7	1057. 53

108	116	(R)DHNLITAMK(Y)		2	3.45	0.56	521.77	1041.53
108	128	(R)DHNLITAmKYSVVPVYQEFA R(Q)	M(115))	4	2.38	0.37	625.07	2496.25
109	116	(D)HNLITAMK(Y)		2	3.74	0.60	464.26	926.50
116	128	(M)KYSVVPVYQEFAR(Q)		2	3.73	0.60	793.43	1584.84
117	125	(K)YSVVPVYQE(F)		2	1.93	0.22	542.27	1082.53
117	126	(K)YSVVPVYQEF(A)		2	2.25	0.33	615.81	1229.60
117	128	(K)YSVVPVYQEFAR(Q)		2	3.11	0.52	729.38	1456.74
121	128	(V)PVYQEFAR(Q)		2	1.86	0.19	505.26	1008.51
138	152	(K)mLHAFDYGNEDISGN(V)	M(138))	2	2.27	0.34	849.86	1697.71
138	155	(K)MLHAFDYGNEDISGNVDS(F)		2	2.38	0.37	992.43	1982.84
138	163	(K)mLHAFDYGNEDISGNVDSF WLDGGIR(I)	M(138))	3	3.08	0.51	982.11	2943.31
138	163	(K)MLHAFDYGNEDISGNVDSF WLDGGIR(I)		2	3.14	0.52	1464.67	2927.32
143	153	(F)DYGNEDISGNV(D)		2	2.50	0.40	591.75	1181.49
147	163	(N)EDISGNVDSFWLDGGIR(I)		2	2.56	0.41	940.44	1878.87
153	163	(N)VDSFWLDGGIR(I)		2	2.90	0.48	632.82	1263.63
164	174	(R)ISATEQISFLR(K)		2	4.43	0.66	632.85	1263.68
164	175	(R)ISATEQISFLRK(L)		2	4.21	0.64	696.90	1391.79

16 5	174	(I)SATEQISFLR(K)		2	2.42	0.38	576.3 1	1150. 60
16 5	175	(I)SATEQISFLRK(L)		2	3.50	0.57	640.3 6	1278. 70
16 6	174	(S)ATEQISFLR(K)		2	2.46	0.39	532.7 9	1063. 56
16 6	175	(S)ATEQISFLRK(L)		2	3.28	0.54	596.8 4	1191. 67
16 7	174	(A)TEQISFLR(K)		2	2.28	0.34	497.2 7	992.5 3
16 7	175	(A)TEQISFLRK(L)		2	2.74	0.45	561.3 2	1120. 63
16 9	175	(E)QISFLRK(L)		3	2.05	0.27	297.8 5	890.5 4
17 5	186	(R)KLYHNKLHVSER(S)		3	2.58	0.42	508.6 2	1522. 84
17 6	186	(K)LYHNKLHVSER(S)		3	2.90	0.48	465.9 2	1394. 75
19 0	206	(R)IVKQAmLTEANGDYIIR(A)	M(195)	2	3.21	0.53	976.0 3	1950. 04
19 3	200	(K)QAMLTEAN(G)		1	2.61	0.42	877.4 1	876.4 0
19 3	206	(K)QAmLTEANGDYIIR(A)	M(195)	2	3.19	0.53	805.8 9	1609. 77
19 3	206	(K)QAMLTEANGDYIIR(A)		2	4.43	0.66	797.9 0	1593. 79
19 4	206	(Q)AmLTEANGDYIIR(A)	M(195)	2	3.76	0.60	741.8 7	1481. 73
19 6	206	(M)LTEANGDYIIR(A)		2	2.90	0.48	632.8 3	1263. 65
20 7	218	(R)AKTGYSTRIEPK(I)		3	2.31	0.35	450.9 2	1349. 74
20 9	218	(K)TGYSTRIEPK(I)		2	2.21	0.32	576.3 1	1150. 60

21 0	218	(T)GYSTRIEPK(I)		2	1.81	0.17	525.7 9	1049. 56
21 9	250	(K)IGWWVGWVELDDNVWFFA mNmDmPTSDGLGLR(Q)	M(237 , 239,24 1)	4	1.86	0.19	952.1 8	3804. 69
23 5	250	(F)FAMNMDMPTSDGLGLR(Q)		2	3.17	0.53	878.4 0	1754. 78
23 6	250	(F)AMNmDmPTSDGLGLR(Q)	M(239 ,241)	2	3.15	0.52	820.8 6	1639. 71
23 6	250	(F)AMNMDMPTSDGLGLR(Q)		2	2.98	0.50	804.8 6	1607. 71
23 8	250	(M)NmDMPTSDGLGLR(Q)	M(239)	2	3.11	0.52	711.8 2	1421. 63
23 8	250	(M)NMDMPTSDGLGLR(Q)		2	2.95	0.49	703.8 2	1405. 63
23 9	250	(N)mDmPTSDGLGLR(Q)	M(239 ,241)	2	2.39	0.37	662.8 0	1323. 58
24 5	265	(S)DGLGLRQAITKEVLKQEKIIP(-)		3	2.55	0.41	783.8 0	2348. 39
25 1	262	(R)QAITKEVLKQEK(I)		2	4.24	0.65	707.9 2	1413. 82
25 6	262	(K)EVLKQEK(I)		2	2.55	0.41	437.2 6	872.5 0
25 6	265	(K)EVLKQEKIIP(-)		2	2.11	0.29	598.8 7	1195. 72

[193] [표4]

NDM 단백질로 동정된 각 펩타이드의 위치 및 서열 정보

		서열	산화 부위	전 하 (z)	SEQ UES T XCo rr	SE QU ES T delt aCn	관찰 된 m/z	실제 질량 값 (Da)
2 8	4 5	(M)PGEIRPTIGQQmETGDQR(F)	M (39)	3	3.61	0.58	677.00	2027.9 8
2 8	4 5	(M)PGEIRPTIGQQMETGDQR(F)		3	2.30	0.35	671.67	2011.9 9
3 0	4 5	(G)EIRPTIGQQMETGDQR(F)		3	1.64	0.09	620.31	1857.9 1
3 3	4 5	(R)PTIGQQmETGDQR(F)	M (39)	2	2.33	0.36	738.84	1475.6 7
3 3	4 5	(R)PTIGQQMETGDQR(F)		2	2.31	0.35	730.84	1459.6 8
3 5	4 5	(T)IGQQmETGDQR(F)	M (39)	2	2.27	0.34	639.79	1277.5 7
4 5	5 2	(Q)RFGDLVFR(Q)		2	1.39	0.00	505.29	1008.5 6
4 6	5 2	(R)FGDLVFR(Q)		2	2.72	0.45	427.23	852.45
4 7	5 2	(F)GDLVFR(Q)		1	1.19	0.00	706.39	705.38
5 3	6 1	(R)QLAPNVWQH(T)		2	1.33	0.00	546.79	1091.5 6
5 3	7 6	(R)QLAPNVWQH(SYLDMPGFGAVA SN(G)		2	1.97	0.24	1302.1 3	2602.2 5
5 3	8 1	(R)QLAPNVWQH(SYLDmPGFGAVA SNGLIVR(D)	M (67)	3	3.91	0.62	1053.2 0	3156.5 8
5	8	(R)QLAPNVWQH(SYLDMPGFGAVA		3	5.86	0.74	1047.8	3140.6

3	1	SNGLIVR(D)					7	0
5	8	(R)QLAPNVWQHTSYLDMPGFGAVA		4	1.61	0.07	814.92	3255.6
3	2	SNGLIVRD(G)						4
5	8	(R)QLAPNVWQHTSYLDmPGFGAVA	M	4	2.41	0.38	886.45	3541.7
3	5	SNGLIVRDGGR(V)	(67)					7
5	8	(N)VWQHTSYLDMPGFGAVASNGLI		3	2.26	0.34	873.45	2617.3
8	1	VR(D)						4
6	8	(H)TSYLDmPGFGAVASNGLIVR(D)	M	2	3.46	0.57	1042.5	2083.0
2	1		(67)				3	5
6	8	(M)PGFGAVASNGLIVR(D)		2	2.92	0.49	679.39	1356.7
8	1							6
7	8	(F)GAVASNGLIVR(D)		2	1.41	0.00	528.82	1055.6
1	1							2
8	9	(R)VLVVDTA(W)		1	0.79	0.00	716.42	715.41
6	2							
8	1	(R)VLVVDTAWTDDQTAQIL(N)		2	2.06	0.27	944.49	1886.9
6	0							7
	2							
8	1	(R)VLVVDTAWTDDQTAQILNWIK(		2	4.86	0.69	1215.1	2428.2
6	0	Q)					5	8
	6							
9	1	(D)TAWTDDQTAQILNWIK(Q)		2	1.98	0.24	952.49	1902.9
1	0							6
	6							
9	1	(W)TDDQTAQILNWIK(Q)		2	2.84	0.47	773.40	1544.7
4	0							9
	6							
9	1	(D)DQTAQILNWIK(Q)		2	1.71	0.12	665.37	1328.7
6	0							2
	6							
1	1	(N)WIKQEINLPVALAVVTHAHQDK(		3	1.84	0.19	837.47	2509.4
0	2	M)						0
4	5							
1	1	(K)QEINLPVALAVVTH(A)		2	2.24	0.33	752.43	1502.8

0 7	2 0							5
1 0 7	1 2 1	(K)QEINLPVALAVVTHA(H)		2	2.26	0.34	787.95	1573.8 9
1 0 7	1 2 4	(K)QEINLPVALAVVTHAHQD(K)		3	3.06	0.51	652.35	1954.0 3
1 0 7	1 2 5	(K)QEINLPVALAVVTHAHQDK(M)		3	7.39	0.80	695.05	2082.1 3
1 1 0	1 2 5	(I)NLPVALAVVTHAHQDK(M)		3	2.55	0.41	571.66	1711.9 5
1 1 1	1 2 5	(N)LPVALAVVTHAHQDK(M)		2	2.58	0.42	799.96	1597.9 0
1 1 2	1 2 5	(L)PVALAVVTHAHQDK(M)		3	5.46	0.73	495.95	1484.8 2
1 1 4	1 2 5	(V)ALAVVTHAHQDK(M)		2	3.84	0.61	645.35	1288.6 9
1 1 5	1 2 5	(A)LAVVTHAHQDK(M)		2	3.89	0.61	609.84	1217.6 6
1 1 6	1 2 5	(L)AVVTHAHQDK(M)		2	3.30	0.55	553.29	1104.5 7
1 1 7	1 2 5	(A)VVTHAHQDK(M)		2	2.14	0.30	517.78	1033.5 4
1 1 8	1 2 5	(V)VTHAHQDK(M)		1	1.59	0.06	935.47	934.46

1 1 9	1 2 5	(V)THAHQDK(M)		1	0.55	0.03	836.40	835.39
1 2 6	1 3 5	(K)mGGmDALHAA(G)	M (126) , M (129)	2	1.65	0.09	503.21	1004.4 1
1 2 6	1 4 0	(K)mGGmDALHAAGIATY(A)	M (126) , M (129)	2	1.40	0.00	755.84	1509.6 7
1 2 6	1 4 0	(K)MGGMDALHAAGIATY(A)		2	1.63	0.08	739.85	1477.6 8
1 2 6	1 4 2	(K)MGGmDALHAAGIATYAN(A)	M (129)	2	1.93	0.00	840.38	1678.7 5
1 2 6	1 4 2	(K)mGGmDALHAAGIATYAN(A)	M (126) , M (129)	2	2.78	0.46	848.38	1694.7 5
1 2 6	1 4 2	(K)MGGMDALHAAGIATYAN(A)		2	2.25	0.33	832.39	1662.7 6
1 2 6	1 4 4	(K)MGGMDALHAAGIATYANAL(S)		2	2.24	0.33	924.45	1846.8 8
1 2 6	1 4 6	(K)mGGMDALHAAGIATYANALS(NQ)	M (126)	2	2.18	0.04	1032.9 8	2063.9 5
1 2 6	1 4 6	(K)MGGMDALHAAGIATYANALS(NQ)		2	2.10	0.29	1024.9 9	2047.9 6

1 2 6	1 5 9	(K)mGGmDALHAAGIATYANALSNQ LAPQEGMVAAQH(S)	M (126 , M (129)	3	2.59	0.42	1147.8 8	3440.6 1
1 2 6	1 5 9	(K)MGGMDALHAAGIATYANALSN QLAPQEGMVAAQH(S)		3	3.73	0.60	1137.2 2	3408.6 3
1 2 6	1 6 1	(K)MGGMDALHAAGIATYANALSN QLAPQEGMVAAQHSL(T)		3	3.83	0.61	1203.9 2	3608.7 4
1 2 6	1 6 3	(K)MGGMDALHAAGIATYANALSN QLAPQEGMVAAQHSLTF(A)		3	3.62	0.59	1286.6 3	3856.8 5
1 2 6	1 6 6	(K)MGGMDALHAAGIATYANALSN QLAPQEGMVAAQHSLTFAAN(G)		3	2.81	0.47	1372.0 0	4112.9 8
1 4 3	1 8 1	(N)ALSNQLAPQEGmVAAQHSLTFA ANGWVEPATAPNFGPLK(V)	M (153)	4	2.20	0.32	1013.2 5	4048.9 7
1 4 3	1 8 1	(N)ALSNQLAPQEGMVAAQHSLTFA ANGWVEPATAPNFGPLK(V)		3	4.58	0.67	1345.3 6	4033.0 5
1 6 7	1 8 1	(N)GWVEPATAPNFGPLK(V)		2	1.99	0.25	792.41	1582.8 1
1 6 8	1 8 1	(G)WVEPATAPNFGPLK(V)		2	2.36	0.36	763.91	1525.8 0
1 6 9	1 8 1	(W)VEPATAPNFGPLK(V)		2	2.04	0.26	670.87	1339.7 2
1 7 1	1 8 1	(E)PATAPNFGPLK(V)		2	2.24	0.33	556.81	1111.6 1

1 7 3	1 8 1	(A)TAPNFGPLK(V)		2	1.59	0.05	472.77	943.52
1 7 5	1 8 1	(A)PNFGPLK(V)		2	2.07	0.28	386.72	771.43
1 8 2	2 0 2	(K)VFYPGPGHTSDNITVGIDGTD(I)		2	2.26	0.34	1081.5 1	2161.0 1
1 8 2	2 0 7	(K)VFYPGPGHTSDNITVGIDGTDIAF GG(C)		2	1.78	0.16	1304.1 3	2606.2 4
1 8 2	2 0 8	(K)VFYPGPGHTSDNITVGIDGTDIAF GGc(L)		2	2.85	0.47	1384.1 4	2766.2 6
1 8 2	2 1 1	(K)VFYPGPGHTSDNITVGIDGTDIAF GGcLIK(D)		3	6.14	0.76	1041.1 9	3120.5 4
1 8 2	2 1 4	(K)VFYPGPGHTSDNITVGIDGTDIAF GGcLIKDSK(A)		3	8.25	0.82	1151.2 4	3450.7 1
1 8 2	2 1 6	(K)VFYPGPGHTSDNITVGIDGTDIAF GGcLIKDSKAK(S)		4	3.32	0.55	913.47	3649.8 4
1 8 5	2 1 6	(Y)PGPGHTSDNITVGIDGTDIAFGGc LIKDSKAK(S)		3	1.88	0.20	1081.2 0	3240.5 9
1 9 0	2 1 4	(H)TSDNITVGIDGTDIAFGGcLIKDS K(A)		3	3.11	0.52	866.43	2596.2 8
1 9 3	2 1 1	(D)NITVGIDGTDIAFGGcLIK(D)		2	4.00	0.63	982.52	1963.0 3
1 9	2 1	(N)ITVGIDGTDIAFGGcLIK(D)		2	2.98	0.50	925.50	1848.9 8

4	1							
1	2	(N)ITVGIDGTDIAFGGcLIKDSK(A)		3	1.93	0.22	727.38	2179.1
9	1							2
4	4							
2	2	(D)GTDIAFGGcLIK(D)		2	1.56	0.04	626.33	1250.6
0	1							4
0	1							
2	2	(D)GTDIAFGGcLIKDSK(A)		2	2.57	0.42	791.41	1580.8
0	1							0
0	4							
2	2	(D)IAFGGcLIKDSK(A)		2	1.63	0.08	654.86	1307.7
0	1							0
3	4							
2	2	(K)AKSLGNLGDADTEHYAASAR(A)		2	4.25	0.65	1024.0	2045.9
1	3						0	9
5	4							
2	2	(K)SLGNLGD(A)		1	0.69	0.00	675.33	674.32
1	2							
7	3							
2	2	(K)SLGNLGDADTEHY(A)		2	1.87	0.20	696.31	1390.6
1	2							1
7	9							
2	2	(K)SLGNLGDADTEHYAA(S)		2	1.75	0.14	767.35	1532.6
1	3							9
7	1							
2	2	(K)SLGNLGDADTEHYAAS(A)		2	2.34	0.36	810.87	1619.7
1	3							2
7	2							
2	2	(K)SLGNLGDADTEHYAASAR(A)		2	5.99	0.75	924.43	1846.8
1	3							5
7	4							
2	2	(K)SLGNLGDADTEHYAASARAFGA		3	4.83	0.69	879.77	2636.2
1	4	AFPK(A)						8
7	2							
2	2	(S)LGNLGDADTEHYAASAR(A)		3	2.68	0.44	587.61	1759.8

1 8	3 4							1
2 1 9	2 3 4	(L)GNLGDADTEHYAASAR(A)		2	4.78	0.69	824.37	1646.7 3
2 2 0	2 3 4	(G)NLGDADTEHYAASAR(A)		2	2.16	0.31	795.86	1589.7 0
2 2 1	2 3 4	(N)LGDADTEHYAASAR(A)		2	4.99	0.70	738.85	1475.6 8
2 2 2	2 3 4	(L)GDADTEHYAASAR(A)		2	4.57	0.67	682.30	1362.5 8
2 2 5	2 3 4	(A)DTEHYAASAR(A)		2	1.83	0.18	560.75	1119.4 9
2 3 5	2 4 2	(R)AFGAAFPK(A)		2	2.26	0.34	404.72	807.43
2 3 5	2 5 6	(R)AFGAAFPKASmIVMSHSAPDSR(A)	M (245)	2	2.65	0.00	1147.5 6	2293.1 1
2 3 5	2 5 6	(R)AFGAAFPKASmIVmSHSAPDSR(A)	M (245) , M (248)	3	1.86	0.19	770.71	2309.1 1
2 3 5	2 5 6	(R)AFGAAFPKASMIVMSHSAPDSR(A)		2	3.89	0.61	1139.5 6	2277.1 1
2 3 6	2 4 2	(A)FGAAFPK(A)		2	1.97	0.24	369.20	736.39
2	2	(F)GAAFPK(A)		1	1.22	0.00	590.33	589.32

3 7	4 2							
2 4 3	2 5 4	(K)ASMIVMSHSAPD(S)		2	1.67	0.10	623.29	1244.5 6
2 4 3	2 5 6	(K)ASmIVMSHSAPDSR(A)	M (245)	3	5.03	0.70	502.24	1503.6 9
2 4 3	2 5 6	(K)ASmIVmSHSAPDSR(A)	M (245) , M (248)	3	4.91	0.69	507.57	1519.6 9
2 4 3	2 5 6	(K)ASMIVMSHSAPDSR(A)		3	5.74	0.74	496.91	1487.6 9
2 4 4	2 5 6	(A)SmIVmSHSAPDSR(A)	M (248)	2	1.67	0.10	725.33	1448.6 4
2 4 4	2 5 6	(A)SMIVMSHSAPDSR(A)		2	4.54	0.67	709.33	1416.6 5
2 4 5	2 5 6	(S)MIVmSHSAPDSR(A)	M (248)	2	2.85	0.47	673.82	1345.6 2
2 4 5	2 5 6	(S)MIVMSHSAPDSR(A)		2	3.54	0.58	665.82	1329.6 2
2 4 6	2 5 6	(M)IVmSHSAPDSR(A)	M (248)	2	3.10	0.52	608.29	1214.5 7
2 4 7	2 5 6	(I)VMHSAPDSR(A)		2	3.06	0.51	543.76	1085.5 0
2	2	(H)SAPDSR(A)		1	0.54	0.00	632.30	631.29

5 1	5 6							
2 5 7	2 6 4	(R)AAITH TAR(M)		2	2.74	0.45	420.74	839.46
2 5 8	2 6 4	(A)AITH TAR(M)		2	1.81	0.17	385.22	768.42
2 5 9	2 6 4	(A)ITH TAR(M)		1	1.38	0.00	698.39	697.39
2 6 5	2 7 0	(R)mADKLR(-)	M (265)	2	2.08	0.28	375.20	748.39

[194] [표5]

IMP 단백질로 동정된 각 펩타이드의 위치 및 서열 정보

시작	종료	서열	산화부위	전하(z)	SEQUEST XCorr	SEQUEST deltaCn	관찰된 m/z	실제 질량값 (Da)
19	26	(A)AESLPDLK(I)		2	2.48	0.40	436.74	871.47
19	29	(A)AESLPDLKIEK(L)		2	3.47	0.57	621.85	1241.69
20	26	(A)ESLPDLK(I)		2	2.06	0.27	401.22	800.43
20	29	(A)ESLPDLKIEK(L)		2	3.20	0.53	586.33	1170.65
21	29	(E)SLPDLKIEK(L)		3	2.53	0.41	348.21	1041.61
22	29	(S)LPDLKIEK(L)		2	2.99	0.50	478.29	954.57
23	29	(L)PDLKIEK(L)		2	3.04	0.51	421.75	841.49
27	37	(K)IEKLDEGVYVH(T)		3	2.29	0.34	434.56	1300.67
27	51	(K)IEKLDEGVYVHTSFEVNGWGVVVPK(H)		3	5.36	0.72	944.49	2830.44
30	37	(K)LDEGVYVH(T)		2	2.43	0.38	466.23	930.45
30	51	(K)LDEGVYVHTSFEVNGWGVVVPK(H)		2	6.47	0.77	1231.11	2460.20
38	51	(H)TSFEVNGWGVVVPK(H)		2	2.67	0.44	774.89	1547.76
52	59	(K)HGLVVLVN(A)		2	1.88	0.20	425.76	849.51
52	72	(K)HGLVVLVNAEAYLIDTPFTAK(D)		2	6.65	0.77	1136.13	2270.25

52	76	(K)HGLVVLVNAEAYLI DTPFTAKDTEK(L)		2	5.68	0.74	1372. 74	2743.46
58	72	(L)VNAEAYLIDTPFTA K(D)		2	3.34	0.55	826.9 3	1651.85
60	72	(N)AEAYLIDTPFTAK(D)		2	3.60	0.58	720.3 8	1438.74
60	76	(N)AEAYLIDTPFTAKD TEK(L)		2	4.60	0.67	956.9 8	1911.95
61	72	(A)EAYLIDTPFTAK(D)		2	1.97	0.24	684.8 6	1367.70
64	72	(Y)LIDTPFTAK(D)		2	1.84	0.19	503.2 9	1004.56
64	76	(Y)LIDTPFTAKDTEK(L)		2	3.50	0.57	739.9 0	1477.78
73	84	(K)DTEKLVTFWVER(G)		2	3.91	0.62	761.9 0	1521.79
73	87	(K)DTEKLVTFWVERG YK(I)		3	3.36	0.55	624.3 3	1869.97
75	84	(T)EKLVTWFVER(G)		2	2.62	0.43	653.8 6	1305.72
76	84	(E)KLVTWFVER(G)		2	2.32	0.35	589.3 4	1176.67
77	84	(K)LVTWFVER(G)		2	2.62	0.43	525.2 9	1048.57
77	85	(K)LVTWFVERG(Y)		2	2.43	0.38	553.8 1	1105.60
77	87	(K)LVTWFVERGYK(I)		2	2.49	0.40	699.3 9	1396.76
78	84	(L)VTWFVER(G)		2	1.85	0.19	468.7 5	935.49
88	99	(K)IKGSISSHFHSD(S)		3	3.27	0.54	438.8 9	1313.64
88	100	(K)IKGSISSHFHSDS(T)		3	2.29	0.35	467.9 0	1400.67

88	102	(K)IKGSISSHFHSDSTG(G)		3	2.29	0.34	520.59	1558.74
88	105	(K)IKGSISSHFHSDSTGGIE(W)		2	5.14	0.71	929.96	1857.90
88	110	(K)IKGSISSHFHSDSTGGIEWLNSR(S)		3	8.19	0.82	839.08	2514.23
90	98	(K)GSISSHFHS(D)		2	1.88	0.20	479.73	957.44
90	99	(K)GSISSHFHSD(S)		3	1.85	0.19	358.49	1072.46
90	101	(K)GSISSHFHSDST(G)		2	2.83	0.47	631.28	1260.54
90	102	(K)GSISSHFHSDSTG(G)		2	3.51	0.57	659.79	1317.56
90	105	(K)GSISSHFHSDSTGGIE(W)		2	3.89	0.61	809.36	1616.71
90	110	(K)GSISSHFHSDSTGGIEWLNSR(S)		3	8.69	0.83	758.69	2273.05
90	111	(K)GSISSHFHSDSTGGIEWLNSRS(I)		3	2.00	0.25	787.70	2360.09
97	110	(F)HSDSTGGIEWLNSR(S)		2	4.66	0.68	779.87	1557.72
98	110	(H)SDSTGGIEWLNSR(S)		2	3.76	0.60	711.34	1420.67
99	110	(S)DSTGGIEWLNSR(S)		2	2.13	0.30	667.82	1333.63
100	110	(D)STGGIEWLNSR(S)		2	2.80	0.46	610.31	1218.61
103	110	(G)GIEWLNSR(S)		2	2.33	0.36	487.76	973.50
104	110	(G)IEWLNSR(S)		2	2.09	0.28	459.25	916.48
111	125	(R)SIPTYASELTNELLK(K)		2	4.29	0.65	839.95	1677.88

111	126	(R)SIPTYASELTNELLK K(D)		3	4.86	0.69	603.0 0	1805.98
111	127	(R)SIPTYASELTNELLK KD(G)		2	3.35	0.55	961.5 1	1921.02
111	129	(R)SIPTYASELTNELLK KDGK(V)		3	4.29	0.65	703.0 5	2106.13
113	125	(I)PTYASELTNELLK(K)		2	4.75	0.68	739.8 9	1477.76
113	126	(I)PTYASELTNELLKK(D)		3	7.19	0.79	536.3 0	1605.87
113	129	(I)PTYASELTNELLKKD GK(V)		3	3.48	0.57	636.3 4	1906.00
114	126	(P)TYASELTNELLKK(D)		2	3.89	0.61	755.4 2	1508.82
115	126	(T)YASELTNELLKK(D)		3	1.96	0.24	470.2 6	1407.77
116	125	(Y)ASELTNELLK(K)		2	1.77	0.15	559.3 1	1116.61
116	126	(Y)ASELTNELLKK(D)		2	2.90	0.48	623.3 6	1244.70
116	129	(Y)ASELTNELLKKDGK (V)		2	3.63	0.59	773.4 3	1544.84
118	126	(S)ELTNELLKK(D)		3	1.83	0.18	363.2 2	1086.63
126	136	(K)KDGKVQATNSF(S)		2	1.99	0.25	597.8 1	1193.61
126	145	(K)KDGKVQATNSFSGV NYWLVK(N)		2	5.39	0.72	1121. 09	2240.16
127	136	(K)DGKVQATNSF(S)		2	2.04	0.26	533.7 6	1065.51
127	140	(K)DGKVQATNSFSGVN (Y)		2	2.68	0.44	712.3 5	1422.68
127	141	(K)DGKVQATNSFSGVN Y(W)		2	3.35	0.55	793.8 8	1585.74

127	145	(K)DGKVQATNSFSGVNYWLVK(N)		2	6.57	0.77	1057.04	2112.07
129	145	(G)KVQATNSFSGVNYWLVK(N)		2	6.17	0.76	971.02	1940.03
130	136	(K)VQATNSF(S)		1	2.42	0.38	766.38	765.37
130	141	(K)VQATNSFSGVNY(W)		2	2.28	0.34	643.81	1285.60
130	145	(K)VQATNSFSGVNYWLVK(N)		2	5.47	0.73	906.97	1811.92
132	145	(Q)ATNSFSGVNYWLVK(N)		2	4.10	0.63	793.41	1584.80
133	145	(A)TNSFSGVNYWLVK(N)		2	3.14	0.52	757.89	1513.76
134	145	(T)NSFSGVNYWLVK(N)		2	2.64	0.43	707.36	1412.71
135	145	(N)SFSGVNYWLVK(N)		2	3.07	0.51	650.34	1298.67
137	145	(F)SGVNYWLVK(N)		1	2.26	0.34	1065.58	1064.57
146	157	(K)NKIEVFYPGPGH(T)		2	3.85	0.61	679.35	1356.68
146	158	(K)NKIEVFYPGPGHT(P)		2	2.75	0.45	729.88	1457.74
146	160	(K)NKIEVFYPGPGHTPD(N)		2	4.74	0.68	835.92	1669.82
146	161	(K)NKIEVFYPGPGHTPDN(V)		2	4.79	0.69	892.94	1783.86
146	169	(K)NKIEVFYPGPGHTPDNVVWLPER(K)		3	7.92	0.81	921.81	2762.41
146	170	(K)NKIEVFYPGPGHTPDNVVWLPERK(I)		3	7.59	0.80	964.51	2890.52
147	170	(N)KIEVFYPGPGHTPDNVVWLPERK(I)		3	1.79	0.16	926.50	2776.48

148	160	(K)IEVFYPGPGHTPD(N)		2	2.83	0.47	714.8 5	1427.68
148	161	(K)IEVFYPGPGHTPDN(V)		2	2.54	0.41	771.8 7	1541.72
148	169	(K)IEVFYPGPGHTPDN VVVWLPER(K)		2	4.76	0.69	1261. 15	2520.28
148	170	(K)IEVFYPGPGHTPDN VVVWLPERK(I)		3	5.72	0.74	883.8 0	2648.37
152	170	(F)YPGPGHTPDNVVV WLPERK(I)		3	1.99	0.25	721.0 4	2160.11
153	170	(Y)PGPGHTPDNVVVW LPERK(I)		3	2.90	0.48	666.6 9	1997.05
155	169	(G)PGHTPDNVVVWLPE R(K)		3	3.66	0.59	572.6 4	1714.89
157	169	(G)HTPDNVVVWLPER(K)		3	3.39	0.56	521.2 8	1560.81
158	169	(H)TPDNVVVWLPER(K)		2	4.30	0.65	712.8 8	1423.75
158	170	(H)TPDNVVVWLPERK(I)		2	2.16	0.31	776.9 3	1551.85
161	170	(D)NVVVWLPERK(I)		2	2.01	0.25	620.3 7	1238.72
162	169	(N)VVVWLPER(K)		2	2.01	0.25	499.3 0	996.58
162	170	(N)VVVWLPERK(I)		2	2.25	0.33	563.3 5	1124.68
170	176	(R)KILFGGc(F)		2	1.99	0.25	397.7 2	793.42
170	177	(R)KILFGGcF(I)		2	1.76	0.15	471.2 5	940.49
170	179	(R)KILFGGcFIK(P)		2	3.85	0.61	591.8 4	1181.67
170	181	(R)KILFGGcFIKPY(G)		2	3.83	0.61	721.9 0	1441.79

170	185	(R)KILFGGcFIKPYGLG N(L)		2	4.54	0.67	892.4 9	1782.96
170	196	(R)KILFGGcFIKPYGLG NLGDANIEAWPK(S)		3	3.74	0.60	993.5 3	2977.58
171	181	(K)ILFGGcFIKPY(G)		2	2.71	0.45	657.8 5	1313.69
171	182	(K)ILFGGcFIKPYG(L)		2	1.99	0.25	686.3 6	1370.71
171	196	(K)ILFGGcFIKPYGLGN LGDANIEAWPK(S)		2	3.43	0.56	1425. 75	2849.48
177	196	(C)FIKPYGLGNLGDANI EAWPK(S)		3	2.71	0.45	735.0 6	2202.16
178	196	(F)IKPYGLGNLGDANIE AWPK(S)		2	3.24	0.54	1028. 55	2055.08
180	196	(K)PYGLGNLGDANIEA WPK(S)		2	2.53	0.41	907.9 6	1813.91
182	196	(Y)GLGNLGDANIEAWP K(S)		2	4.68	0.68	777.9 0	1553.79
182	199	(Y)GLGNLGDANIEAWP KSAK(L)		2	2.71	0.45	920.9 9	1839.96
184	196	(L)GNLGDANIEAWPK(S)		2	3.70	0.59	692.8 5	1383.69
186	196	(N)LGDANIEAWPK(S)		2	3.55	0.58	607.3 2	1212.62
205	225	(K)YGKAKLVVPGHSE VGDAASLLK(L)		3	5.90	0.75	723.4 1	2167.21
206	225	(Y)GKAKLVVPGHSEV GDAASLLK(L)		3	3.58	0.58	669.0 6	2004.15
208	220	(K)AKLVVPGHSEVGD(A)		2	2.98	0.50	654.3 5	1306.69
208	224	(K)AKLVVPGHSEVGD ASLL(K)		2	3.35	0.55	846.4 8	1690.94
208	225	(K)AKLVVPGHSEVGD ASLLK(L)		2	5.43	0.72	910.5 2	1819.03

208	233	(K)AKLVVPGHSEVGD ASLLKLTLEQAVK(G)		3	2.13	0.30	901.5 2	2701.54
209	225	(A)KLVVPGHSEVGDAS LLK(L)		3	5.50	0.73	583.6 7	1747.99
210	219	(K)LVVPGHSEVG(D)		2	1.83	0.18	497.2 7	992.53
210	220	(K)LVVPGHSEVGD(A)		2	2.52	0.41	554.7 9	1107.56
210	221	(K)LVVPGHSEVGDA(S)		2	1.89	0.21	590.3 1	1178.60
210	224	(K)LVVPGHSEVGDASL L(K)		2	2.71	0.45	746.9 0	1491.79
210	225	(K)LVVPGHSEVGDASL LK(L)		2	4.77	0.69	810.9 6	1619.90
210	226	(K)LVVPGHSEVGDASL LKL(T)		2	1.99	0.25	867.5 0	1732.98
210	233	(K)LVVPGHSEVGDASL LKLTLLEQAVK(G)		3	3.22	0.53	835.1 4	2502.41
211	225	(L)VVPGHSEVGDASLL K(L)		2	3.87	0.61	754.4 1	1506.81
212	225	(V)VPGHSEVGDASLLK (L)		2	5.14	0.71	704.8 8	1407.74
213	225	(V)PGHSEVGDASLLK(L)		2	5.48	0.73	655.3 4	1308.67
214	225	(P)GHSEVGDASLLK(L)		2	4.50	0.67	606.8 1	1211.61
215	225	(G)HSEVGDASLLK(L)		2	4.18	0.64	578.3 0	1154.59
216	225	(H)SEVGDASLLK(L)		2	2.52	0.41	509.7 8	1017.54
219	225	(V)GDASLLK(L)		2	2.38	0.37	352.2 0	702.39
225	233	(L)KLTLEQAVK(G)		2	3.47	0.57	515.3 2	1028.62

225	239	(L)KLTLEQAVKGLNES K(K)		2	4.55	0.67	829.4 8	1656.95
226	233	(K)LTLEQAVK(G)		2	2.44	0.38	451.2 7	900.53
226	239	(K)LTLEQAVKGLNESK (K)		2	4.86	0.69	765.4 3	1528.85
226	246	(K)LTLEQAVKGLNESK KPSKPSN(-)		4	6.74	0.78	567.8 2	2267.25
227	233	(L)TLEQAVK(G)		2	2.31	0.35	394.7 3	787.45
227	246	(L)TLEQAVKGLNESKK PSKPSN(-)		3	8.03	0.81	719.0 6	2154.17
228	246	(T)LEQAVKGLNESKKP SKPSN(-)		3	5.99	0.75	685.3 8	2053.11
229	246	(L)EQAVKGLNESKKPS KPSN(-)		3	6.06	0.75	647.6 9	1940.03
230	246	(E)QAVKGLNESKKPSK PSN(-)		3	5.71	0.74	604.6 7	1810.98
231	246	(Q)AVKGLNESKKPSKP SN(-)		3	4.71	0.68	561.9 9	1682.94
232	246	(A)VKGLNESKKPSKPS N(-)		3	3.90	0.62	538.3 0	1611.89
234	246	(K)GLNESKKPSKPSN(-)		2	4.18	0.64	693.3 7	1384.73
238	246	(E)SKKPSKPSN(-)		2	2.49	0.40	486.7 8	971.54

[195] [표6]

VIM 단백질로 동정된 각 펩타이드의 위치 및 서열 정보

시작	종료	서열	산화부위	전하(z)	SEQU EST XCorr	SEQU EST delta Cn	관찰된 m/z	실제 질량값 (Da)
27	45	(S)VDSSGEYPTVSEIPVGEVR(L)		2	5.08	0.70	1010.50	2018.99
28	45	(V)DSSGEYPTVSEIPVGEVR(L)		2	3.43	0.56	960.97	1919.92
29	45	(D)SSGEYPTVSEIPVGEVR(L)		2	4.55	0.67	903.45	1804.89
31	45	(S)GEYPTVSEIPVGEVR(L)		2	3.85	0.61	816.42	1630.83
33	45	(E)YPTVSEIPVGEVR(L)		2	2.45	0.39	723.39	1444.76
34	45	(Y)PTVSEIPVGEVR(L)		2	4.25	0.65	641.86	1281.70
34	46	(Y)PTVSEIPVGEVRL(Y)		2	2.80	0.47	698.40	1394.78
34	47	(Y)PTVSEIPVGEVRLY(Q)		2	4.39	0.66	779.93	1557.85
35	45	(P)TVSEIPVGEVR(L)		2	1.97	0.24	593.33	1184.65
36	45	(T)VSEIPVGEVR(L)		2	2.91	0.48	542.81	1083.60
37	45	(V)SEIPVGEVR(L)		2	1.74	0.14	493.27	984.53
46	56	(R)LYQIADGVWSH(I)		2	2.76	0.46	644.82	1287.63
46	60	(R)LYQIADGVWSHIATQ(S)		2	2.67	0.44	851.44	1700.86
55	62	(W)SHIATQSF(D)		2	2.15	0.30	445.72	889.43

55	67	(W)SHIATQSFDGAVY(P)		2	3.51	0.57	698.3 3	1394.6 5
55	72	(W)SHIATQSFDGAVYPSNGL (I)		2	4.66	0.68	932.4 5	1862.8 9
55	75	(W)SHIATQSFDGAVYPSNGL IVR(D)		2	4.76	0.68	1116. 58	2231.1 4
57	75	(H)IATQSFDGAVYPSNGLIV R(D)		2	3.76	0.60	1004. 53	2007.0 5
59	75	(A)TQSFDGAVYPSNGLIVR(D)		2	3.29	0.54	912.4 7	1822.9 2
60	75	(T)QSFDGAVYPSNGLIVR(D)		2	2.97	0.49	861.9 5	1721.8 8
63	75	(F)DGAVYPSNGLIVR(D)		2	3.00	0.50	680.8 7	1359.7 2
68	80	(Y)PSNGLIVRDGDEL(L)		2	3.43	0.56	692.8 6	1383.7 1
68	81	(Y)PSNGLIVRDGDELL(L)		2	5.05	0.70	749.4 0	1496.7 9
73	81	(L)IVRDGDELL(L)		2	2.27	0.34	515.2 8	1028.5 5
76	90	(R)DGDELLIDTAWGAK(N)		2	3.70	0.59	808.9 2	1615.8 2
77	90	(D)GDELLIDTAWGAK(N)		2	2.13	0.30	751.4 0	1500.7 9
81	87	(L)LLIDTAW(G)		1	1.63	0.08	831.4 6	830.46
81	90	(L)LLIDTAWGAK(N)		2	1.77	0.15	544.3 1	1086.6 1
88	96	(W)GAKNTAALL(A)		2	1.85	0.19	429.7 6	857.50
88	10 9	(W)GAKNTAALLAEIEKQIGL PVTR(A)		3	6.16	0.76	765.1 2	2292.3 3
89	10 1	(G)AKNTAALLAEIEK(Q)		3	2.13	0.29	457.9 4	1370.7 8

90	10 1	(A)KNTAALLAEIEK(Q)		2	4.46	0.66	650.8 8	1299.7 4
91	10 1	(K)NTAALLAEIEK(Q)		2	3.92	0.62	586.8 3	1171.6 5
91	10 9	(K)NTAALLAEIEKQIGLPVTR(A)		2	5.72	0.74	1019. 10	2036.1 8
92	10 1	(N)TAALLAEIEK(Q)		2	3.40	0.56	529.8 1	1057.6 1
92	10 9	(N)TAALLAEIEKQIGLPVTR(A)		3	4.81	0.69	641.7 2	1922.1 3
93	10 1	(T)AALLAEIEK(Q)		1	2.41	0.38	957.5 6	956.56
95	10 1	(A)LLAEIEK(Q)		1	2.47	0.00	815.4 9	814.48
96	10 9	(L)LAEIEKQIGLPVTR(A)		2	3.17	0.53	783.9 7	1565.9 2
96	11 5	(L)LAEIEKQIGLPVTRAVSTHF(H)		2	5.38	0.72	1105. 13	2208.2 5
97	10 9	(L)AEIEKQIGLPVTR(A)		3	2.86	0.47	485.2 9	1452.8 3
97	11 5	(L)AEIEKQIGLPVTRAVSTH(F)		2	4.43	0.66	1048. 58	2095.1 5
97	12 6	(L)AEIEKQIGLPVTRAVSTH(F)HDDR VGGVDVL(R)		3	4.13	0.64	1086. 92	3257.7 4
10 0	10 9	(I)EKQIGLPVTR(A)		2	2.16	0.30	570.8 4	1139.6 7
10 2	10 9	(K)QIGLPVTR(A)		2	2.81	0.47	442.2 7	882.53
10 2	11 9	(K)QIGLPVTRAVSTH(F)HDDR (V)		4	2.34	0.36	513.0 2	2048.0 7
10 3	10 9	(Q)IGLPVTR(A)		2	1.84	0.19	378.2 4	754.47
10 9	12 7	(T)RAVSTH(F)HDDR VGGVDVLR(A)		4	4.65	0.68	534.7 8	2135.1 1

11 0	11 7	(R)AVSTHFHD(D)		2	1.97	0.24	457.2 1	912.41
11 0	11 9	(R)AVSTHFHDDR(V)		2	3.67	0.59	592.7 8	1183.5 4
11 0	12 1	(R)AVSTHFHDDRVG(G)		2	1.88	0.20	670.8 2	1339.6 3
11 0	12 2	(R)AVSTHFHDDRVGG(V)		3	1.99	0.24	466.5 6	1396.6 6
11 0	12 4	(R)AVSTHFHDDRVGGVD(V)		2	2.94	0.49	806.3 8	1610.7 5
11 0	12 7	(R)AVSTHFHDDRVGGVDVL R(A)		2	3.95	0.62	990.5 1	1979.0 0
11 0	14 0	(R)AVSTHFHDDRVGGVDVL RAAGVATYASPSTR(R)		4	1.86	0.19	803.9 1	3211.6 3
11 1	11 9	(A)VSTHFHDDR(V)		2	2.62	0.43	557.2 6	1112.5 0
11 1	12 7	(A)VSTHFHDDRVGGVDVLR (A)		3	4.76	0.68	637.0 0	1907.9 7
11 2	11 9	(V)STHFHDDR(V)		2	2.67	0.44	507.7 2	1013.4 3
11 2	12 7	(V)STHFHDDRVGGVDVLR(A)		3	4.15	0.64	603.9 7	1808.9 0
11 3	12 7	(S)THFHDDRVGGVDVLR(A)		3	1.76	0.15	574.9 6	1721.8 7
11 4	12 7	(T)HFHDDRVGGVDVLR(A)		3	3.69	0.59	541.2 8	1620.8 2
11 5	12 7	(H)FHDDRVGGVDVLR(A)		2	2.80	0.46	742.8 8	1483.7 6
11 6	12 6	(F)HDDRVGGVDVL(R)		2	2.89	0.48	591.3 0	1180.5 9
11 6	12 7	(F)HDDRVGGVDVLR(A)		2	2.93	0.49	669.3 5	1336.6 9
11 6	13 4	(F)HDDRVGGVDVLRRAAGV ATY(A)		3	4.41	0.66	657.6 8	1970.0 0

11 6	14 0	(F)HDDR VGGVDVLR AAGV ATYASPSTR(R)		3	2.16	0.31	857.4 4	2569.2 9
11 7	12 7	(H)DDR VGGVDVLR(A)		2	2.87	0.48	600.8 2	1199.6 2
11 8	12 7	(D)DR VGGVDVLR(A)		3	2.35	0.36	362.5 4	1084.6 0
12 0	12 7	(R)VGGVDVLR(A)		2	2.83	0.47	407.7 4	813.47
12 0	14 0	(R)VGGVDVLR AAGVATYAS PSTR(R)		3	4.02	0.63	683.0 4	2046.0 9
12 1	12 7	(V)GGVDVLR(A)		1	1.28	0.00	715.4 1	714.40
12 5	14 0	(D)VLRAAGVATYASPSTR(R)		3	2.14	0.30	540.6 4	1618.8 9
12 7	13 4	(L)RAAGVATY(A)		2	1.82	0.18	404.7 2	807.43
12 8	14 0	(R)AAGVATYASPSTR(R)		2	3.99	0.62	626.3 2	1250.6 3
12 8	14 1	(R)AAGVATYASPSTRR(L)		2	3.09	0.51	704.3 7	1406.7 3
12 9	14 0	(A)AGVATYASPSTR(R)		2	3.22	0.53	590.8 0	1179.5 9
12 9	14 1	(A)AGVATYASPSTRR(L)		2	1.87	0.20	668.8 5	1335.6 9
13 0	14 0	(A)GVATYASPSTR(R)		2	2.80	0.46	555.2 9	1108.5 6
13 0	14 1	(A)GVATYASPSTRR(L)		2	3.03	0.51	633.3 4	1264.6 6
13 1	14 0	(G)VATYASPSTR(R)		2	2.63	0.43	526.7 7	1051.5 3
13 2	14 1	(V)ATYASPSTRR(L)		2	2.27	0.34	555.2 9	1108.5 7
13 5	15 5	(Y)ASPSTRRLAEVEGNEIPT HSL(E)		4	2.34	0.36	566.8 0	2263.1 7

13 5	15 8	(Y)ASPSTRRLAEVEGNEIPT HSLEGL(S)		4	4.13	0.64	641.5 8	2562.3 1
14 1	15 3	(R)RLAEVEGNEIPTH(S)		3	2.33	0.36	488.9 2	1463.7 4
14 1	15 5	(R)RLAEVEGNEIPTHSL(E)		3	2.98	0.50	555.6 3	1663.8 6
14 1	15 6	(R)RLAEVEGNEIPTHSLE(G)		2	2.51	0.40	897.4 6	1792.9 0
14 1	15 7	(R)RLAEVEGNEIPTHSLEG(L)		3	3.43	0.56	617.6 5	1849.9 2
14 1	15 8	(R)RLAEVEGNEIPTHSLEGL(S)		3	4.87	0.69	655.3 4	1963.0 1
14 1	16 3	(R)RLAEVEGNEIPTHSLEGL SSSGD(A)		3	3.95	0.62	799.7 3	2396.1 7
14 1	16 6	(R)RLAEVEGNEIPTHSLEGL SSSGDAVR(F)		4	8.05	0.81	681.6 0	2722.3 8
14 2	15 5	(R)LAEVEGNEIPTHSL(E)		2	3.01	0.50	754.8 9	1507.7 6
14 2	15 8	(R)LAEVEGNEIPTHSLEGL(S)		2	2.70	0.44	904.4 7	1806.9 3
14 2	16 3	(R)LAEVEGNEIPTHSLEGLSS SGD(A)		2	3.54	0.58	1121. 03	2240.0 5
14 2	16 6	(R)LAEVEGNEIPTHSLEGLSS SGDAVR(F)		2	7.36	0.80	1284. 13	2566.2 5
14 3	15 5	(L)AEVEGNEIPTHSL(E)		2	2.41	0.38	698.3 4	1394.6 7
14 3	15 8	(L)AEVEGNEIPTHSLEGL(S)		2	3.41	0.56	847.9 2	1693.8 2
14 3	16 6	(L)AEVEGNEIPTHSLEGLSSS GDAVR(F)		2	4.68	0.68	1227. 60	2453.1 9
14 3	16 7	(L)AEVEGNEIPTHSLEGLSSS GDAVR(F)(G)		3	6.07	0.75	867.7 6	2600.2 5
14 4	16 6	(A)EVEGNEIPTHSLEGLSSSG DAVR(F)		3	5.10	0.71	795.0 5	2382.1 4

14 5	16 6	(E)VEGNEIPTHSLEGLSSSGD AVR(F)		3	5.67	0.74	752.0 4	2253.0 9
14 6	16 6	(V)EGNEIPTHSLEGLSSSGD AVR(F)		2	5.27	0.72	1078. 02	2154.0 2
14 7	16 6	(E)GNEIPTHSLEGLSSSGDA VR(F)		3	5.07	0.70	676.0 0	2024.9 8
14 8	16 6	(G)NEIPTHSLEGLSSSGDAV R(F)		3	4.97	0.70	656.9 9	1967.9 6
14 9	16 6	(N)EIPTHSLEGLSSSGDAVR(F)		3	4.99	0.70	618.9 8	1853.9 1
15 1	16 6	(I)PTHSLEGLSSSGDAVR(F)		2	5.07	0.70	806.9 0	1611.7 9
15 3	16 6	(T)HSLEGLSSSGDAVR(F)		2	3.24	0.54	707.8 5	1413.6 9
15 4	16 6	(H)SLEGLSSSGDAVR(F)		2	3.10	0.52	639.3 2	1276.6 3
15 6	16 6	(L)EGLSSSGDAVR(F)		2	2.69	0.44	539.2 6	1076.5 1
15 6	16 7	(L)EGLSSSGDAVR(F)(G)		2	2.59	0.42	612.7 9	1223.5 7
15 7	16 6	(E)GLSSSGDAVR(F)		2	2.61	0.42	474.7 4	947.47
15 9	16 7	(L)SSSGDAVR(F)(G)		2	2.27	0.34	463.2 2	924.43
15 9	17 2	(L)SSSGDAVRFGPVEL(F)		2	2.68	0.44	710.8 6	1419.7 1
16 7	17 9	(R)FGPVELFYPGAAS(S)		2	3.73	0.60	702.8 5	1403.6 9
16 7	18 0	(R)FGPVELFYPGAAS(T)		2	2.07	0.28	746.3 7	1490.7 3
16 7	18 2	(R)FGPVELFYPGAASSTD(N)		2	2.59	0.42	854.4 1	1706.8 0
17 4	18 7	(F)YPGAASSTDNLVVY(V)		2	2.45	0.39	753.8 7	1505.7 2

18 8	19 4	(Y)VPSASVL(Y)		1	2.07	0.28	672.3 9	671.39
18 8	20 1	(Y)VPSASVLYGGcAIY(E)		2	2.36	0.37	728.8 6	1455.7 1
19 1	20 5	(S)ASVLYGGcAIYELSR(T)		2	1.88	0.20	829.9 2	1657.8 2
19 2	20 5	(A)SVLYGGcAIYELSR(T)		2	2.70	0.44	794.4 0	1586.7 8
19 3	20 5	(S)VLYGGcAIYELSR(T)		2	3.12	0.52	750.8 8	1499.7 5
19 5	20 5	(L)YGGcAIYELSR(T)		2	3.62	0.59	644.8 1	1287.6 0
19 6	20 5	(Y)GGcAIYELSR(T)		2	2.09	0.28	563.2 7	1124.5 3
19 7	20 5	(G)GcAIYELSR(T)		2	2.29	0.35	534.7 6	1067.5 1
19 7	22 5	(G)GcAIYELSR TSAGNVADADLA EWPTSIER(I)		3	3.45	0.56	1051. 50	3151.4 8
19 9	20 5	(C)AIYELSR(T)		2	2.15	0.30	426.2 4	850.46
20 2	21 6	(Y)ELSR TSAGNVADADL(A)		2	3.79	0.60	759.8 8	1517.7 4
20 6	21 5	(R)TSAGNVADAD(L)		1	1.87	0.20	920.4 0	919.39
20 6	21 8	(R)TSAGNVADADLAE(W)		2	2.97	0.50	617.2 9	1232.5 6
20 6	22 5	(R)TSAGNVADADLAEWPTS IER(I)		2	6.34	0.76	1052. 00	2101.9 9
20 8	22 5	(S)AGNVADADLAEWPTSIE R(I)		2	2.78	0.46	957.9 7	1913.9 2
21 1	22 5	(N)VADADLAEWPTSIER(I)		2	4.37	0.66	836.9 2	1671.8 2
21 4	22 5	(D)ADLAEWPTSIER(I)		2	2.27	0.34	694.3 5	1386.6 8

21 6	22 5	(D)LAEWPTSIER(I)		2	3.20	0.53	601.3 2	1200.6 2
22 0	23 5	(W)PTSIERIQQHYPEAQF(V)		2	2.77	0.46	972.4 9	1942.9 6
22 6	23 4	(R)IQQHYPEAQ(F)		2	2.41	0.38	557.2 7	1112.5 3
22 6	23 9	(R)IQQHYPEAQFVIPG(H)		2	2.40	0.37	813.9 2	1625.8 4
22 6	24 0	(R)IQQHYPEAQFVIPGH(G)		3	4.16	0.64	588.6 4	1762.8 9
22 6	24 2	(R)IQQHYPEAQFVIPGHGL(P)		3	1.97	0.24	645.3 4	1932.9 9
22 6	24 4	(R)IQQHYPEAQFVIPGHGLP G(G)		3	2.41	0.38	696.7 0	2087.0 7
22 6	24 5	(R)IQQHYPEAQFVIPGHGLP GG(L)		3	2.70	0.45	715.7 1	2144.0 9
22 6	24 6	(R)IQQHYPEAQFVIPGHGLP GGL(D)		3	3.95	0.62	753.4 0	2257.1 8
22 6	24 7	(R)IQQHYPEAQFVIPGHGLP GGLD(L)		3	4.63	0.68	791.7 4	2372.2 0
22 6	24 8	(R)IQQHYPEAQFVIPGHGLP GGLDL(L)		3	2.67	0.44	829.4 4	2485.2 8
22 6	24 9	(R)IQQHYPEAQFVIPGHGLP GGLDLL(K)		3	2.70	0.44	867.1 3	2598.3 7
22 6	25 0	(R)IQQHYPEAQFVIPGHGLP GGLDLLK(H)		3	7.74	0.81	909.8 3	2726.4 7
22 6	25 4	(R)IQQHYPEAQFVIPGHGLP GGLDLLKHTTN(V)		4	2.63	0.43	795.9 3	3179.6 9
22 6	25 7	(R)IQQHYPEAQFVIPGHGLP GGLDLLKHTTNVVK(A)		5	3.45	0.57	702.1 9	3505.8 9
23 5	25 0	(Q)FVIPGHGLPGGLDLLK(H)		3	2.23	0.33	544.9 9	1631.9 5
23 6	24 6	(F)VIPGHGLPGGL(D)		2	1.98	0.24	508.8 0	1015.5 9

23 6	24 8	(F)VIPGHGLPGGLDL(L)		2	2.70	0.44	622.8 6	1243.7 0
23 6	25 0	(F)VIPGHGLPGGLDLLK(H)		2	3.04	0.51	743.4 5	1484.8 9
23 7	25 0	(V)IPGHGLPGGLDLLK(H)		2	3.93	0.62	693.9 1	1385.8 0
23 8	25 0	(I)PGHGLPGGLDLLK(H)		2	4.71	0.68	637.3 7	1272.7 2
24 1	25 0	(H)GLPGGLDLLK(H)		2	1.80	0.17	491.8 0	981.59
24 3	25 0	(L)PGGLDLLK(H)		2	2.19	0.32	406.7 5	811.48
25 1	25 7	(K)HTTNVVK(A)		2	2.44	0.38	399.7 3	797.44
25 1	26 2	(K)HTTNVKAHTNR(S)		3	2.09	0.28	459.9 2	1376.7 4
25 1	26 6	(K)HTTNVKAHTNRSVVE(-)		3	2.25	0.33	597.9 9	1790.9 5

[196] [표7]

GES 단백질로 동정된 각 펩타이드의 위치 및 서열 정보

시작	종료	서열	산화부위	전하(z)	SEQU EST XCorr	SEQU EST delta Cn	관찰된 m/z	실제 질량값 (Da)
19	25	(A)SEKLTFK(T)		2	2.70	0.45	426.75	851.48
22	30	(K)LTFKTDLEK(L)		3	2.62	0.43	365.54	1093.61
22	33	(K)LTFKTDLEKLER(E)		3	4.22	0.64	498.29	1491.84
26	33	(K)TDLEKLER(E)		2	3.65	0.59	502.28	1002.54
26	35	(K)TDLEKLEREK(A)		3	2.55	0.41	420.90	1259.68
27	33	(T)DLEKLER(E)		2	2.31	0.35	451.75	901.49
34	55	(R)EKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHR(M)		4	7.82	0.81	565.31	2257.21
36	55	(K)AAQIGVAIVDPQGEIVAGHR(M)		2	6.48	0.77	1001.05	2000.08
38	55	(A)QIGVAIVDPQGEIVAGHR(M)		3	3.42	0.56	620.34	1858.01
39	55	(Q)IGVAIVDPQGEIVAGHR(M)		2	3.98	0.62	865.98	1729.94
40	55	(I)GVAIVDPQGEIVAGHR(M)		2	2.90	0.48	809.44	1616.86
41	55	(G)VAIVDPQGEIVAGHR(M)		3	4.05	0.63	520.95	1559.84
42	55	(V)AIVDPQGEIVAGHR(M)		2	4.01	0.63	731.40	1460.78
43	55	(A)IVDPQGEIVAGHR(M)		3	3.70	0.59	464.25	1389.73

44	55	(I)VDPQGEIVAGHR(M)		2	2.44	0.38	639.3 3	1276.6 5
45	55	(V)DPQGEIVAGHR(M)		2	2.91	0.48	589.8 0	1177.5 8
46	55	(D)PQGEIVAGHR(M)		2	3.02	0.50	532.2 8	1062.5 6
60	67	(R)FAmcSTFK(F)	M (62)	2	2.60	0.42	504.2 2	1006.4 3
60	67	(R)FAMcSTFK(F)		2	2.15	0.30	496.2 2	990.44
60	77	(R)FAmcSTFKFPLAALVFER (I)	M (62)	3	2.17	0.31	717.7 0	2150.0 8
61	67	(F)AMcSTFK(F)		1	1.54	0.03	844.3 7	843.36
68	77	(K)FPLAALVFER(I)		2	3.43	0.56	581.8 4	1161.6 6
70	77	(P)LAALVFER(I)		2	1.94	0.23	459.7 8	917.54
71	77	(L)AALVFER(I)		2	2.40	0.37	403.2 3	804.44
78	84	(R)IDSGTER(G)		2	2.17	0.31	389.1 9	776.37
78	87	(R)IDSGTERGDR(K)		3	2.03	0.26	369.1 8	1104.5 2
88	10 5	(R)KLSYGPDMIVEWSPATE R(F)	M (95)	3	4.89	0.69	699.0 1	2094.0 1
88	10 5	(R)KLSYGPDMIVEWSPATE R(F)		3	3.35	0.55	693.6 8	2078.0 1
89	10 5	(K)LSYGPDMIVEWSPATER(F)	M (95)	2	4.26	0.65	983.9 7	1965.9 2
89	10 5	(K)LSYGPDMIVEWSPATER (F)		3	2.26	0.34	650.9 8	1949.9 1
106	11 8	(R)FLASGHmTVLEAA(Q)	M (112)	2	2.65	0.43	681.8 4	1361.6 6

106	11 8	(R)FLASGHMTVLEAA(Q)		2	2.68	0.44	673.8 4	1345.6 7
106	12 0	(R)FLASGHmTVLEAAQA(A)	M (112)	3	3.34	0.55	521.2 6	1560.7 6
106	12 0	(R)FLASGHMTVLEAAQA(A)		3	3.39	0.56	515.9 3	1544.7 6
106	12 1	(R)FLASGHmTVLEAAQAA(V)	M (112)	3	4.55	0.67	544.9 4	1631.8 0
106	12 1	(R)FLASGHMTVLEAAQAA(V)		3	2.84	0.47	539.6 1	1615.8 0
106	12 3	(R)FLASGHmTVLEAAQAA VQ(L)	M (112)	3	3.89	0.61	620.6 5	1858.9 3
106	12 3	(R)FLASGHMTVLEAAQAA VQ(L)		3	2.07	0.28	615.3 2	1842.9 3
106	13 5	(R)FLASGHmTVLEAAQAA VQLSDNGATNLLLR(E)	M (112)	3	3.22	0.53	1043. 21	3126.5 9
106	13 5	(R)FLASGHMTVLEAAQAA VQLSDNGATNLLLR(E)		3	2.64	0.43	1037. 87	3110.6 0
110	13 5	(S)GHmTVLEAAQAAVQLS DNGATNLLLR(E)	M (112)	3	3.49	0.57	903.8 0	2708.3 9
110	13 5	(S)GHMTVLEAAQAAVQLS DNGATNLLLR(E)		3	4.30	0.65	898.4 7	2692.3 9
116	13 5	(L)EAAQAAVQLSDNGATN LLLR(E)		3	2.95	0.49	685.7 0	2054.0 7
119	13 5	(A)QAAVQLSDNGATNLLL R(E)		3	4.24	0.65	595.3 3	1782.9 6
121	13 5	(A)AVQLSDNGATNLLLR(E)		3	3.96	0.62	528.9 6	1583.8 6

122	13 5	(A)VQLSDNGATNLLLR(E)		3	3.38	0.56	505.2 8	1512.8 2
124	13 5	(Q)LSDNGATNLLLR(E)		3	2.56	0.42	429.5 7	1285.7 0
125	13 5	(L)SDNGATNLLLR(E)		2	3.40	0.56	587.3 2	1172.6 2
128	13 5	(N)GATNLLLR(E)		2	2.09	0.28	429.2 6	856.51
136	14 8	(R)EIGGPAAmTQYFR(K)	M (143)	2	3.76	0.60	728.8 5	1455.6 8
136	14 8	(R)EIGGPAAMTQYFR(K)		2	3.68	0.59	720.8 5	1439.6 9
136	14 9	(R)EIGGPAAmTQYFRK(I)	M (143)	2	3.26	0.54	792.9 0	1583.7 8
138	14 8	(I)GGPAAmTQYFR(K)	M (143)	2	2.28	0.34	607.7 8	1213.5 5
149	15 6	(R)KIGDSVSR(L)		2	2.47	0.39	431.2 4	860.48
149	15 9	(R)KIGDSVSRLDR(K)		3	2.38	0.37	415.9 0	1244.6 9
150	15 9	(K)IGDSVSRLDR(K)		2	1.90	0.21	559.3 0	1116.5 9
157	17 3	(R)LDRKEPEmSDNTPGDRLR (D)	M (164)	3	5.69	0.74	663.6 5	1987.9 3
157	17 3	(R)LDRKEPEMSDNTPGDRLR (D)		3	6.08	0.75	658.3 2	1971.9 3
160	17 3	(R)KEPEmSDNTPGDRLR(D)	M (164)	3	4.63	0.68	535.5 8	1603.7 3
160	17	(R)KEPEMSDNTPGDRLR(D)		2	3.84	0.61	794.8	1587.7

	3						7	2
160	18 1	(R)KEPEmSDNTPGDLRDTT TPIAM(A)	M (164)	3	2.39	0.37	812.3 7	2434.0 9
160	18 1	(R)KEPEmSDNTPGDLRDTT TPIAm(A)	M (164) , M (181)	3	1.82	0.18	817.7 0	2450.0 9
160	18 3	(R)KEPEmSDNTPGDLRDTT TPIAMAR(T)	M (164)	4	5.52	0.73	666.3 2	2661.2 5
160	18 3	(R)KEPEmSDNTPGDLRDTT TPIAmAR(T)	M (164) , M (181)	4	5.33	0.72	670.3 2	2677.2 4
160	18 3	(R)KEPEmSDNTPGDLRDTT TPIAMAR(T)		3	4.74	0.68	882.7 6	2645.2 4
161	17 3	(K)EPEmSDNTPGDLR(D)	M (164)	2	3.35	0.55	738.8 2	1475.6 3
161	17 3	(K)EPEmSDNTPGDLR(D)		2	2.84	0.47	730.8 2	1459.6 2
161	18 1	(K)EPEmSDNTPGDLRDTT PIAM(A)	M (164)	3	1.99	0.24	769.6 7	2306.0 0
161	18 3	(K)EPEmSDNTPGDLRDTT PIAmAR(T)	M (181)	3	4.07	0.63	845.3 9	2533.1 4
161	18 3	(K)EPEmSDNTPGDLRDTT PIAmAR(T)	M (164) , M (181)	4	3.75	0.60	638.2 9	2549.1 4

161	18 3	(K)EPEMSDNTPGDLRDTT PIAMAR(T)		3	3.93	0.62	840.0 6	2517.1 5
174	18 3	(R)DTTTPIAmAR(T)	M (181)	2	2.49	0.40	546.7 7	1091.5 2
174	18 3	(R)DTTTPIAMAR(T)		2	2.35	0.36	538.7 8	1075.5 4
184	20 4	(R)TVAKVLYGGALTSTSTH TIER(W)		3	3.36	0.55	735.7 3	2204.1 8
188	19 6	(K)VLYGGALTS(T)		1	2.08	0.28	880.4 8	879.47
188	19 7	(K)VLYGGALTST(S)		1	2.23	0.33	981.5 2	980.52
188	20 0	(K)VLYGGALTSTSTH(T)		2	2.92	0.49	653.8 3	1305.6 5
188	20 4	(K)VLYGGALTSTSTHTIER(W)		3	5.96	0.75	602.6 6	1804.9 5
188	21 7	(K)VLYGGALTSTSTHTIER WLIGNQTGDATLR(A)		4	2.09	0.28	808.6 7	3230.6 6
189	20 4	(V)LYGGALTSTSTHTIER(W)		2	3.77	0.60	853.9 4	1705.8 6
190	20 4	(L)YGGALTSTSTHTIER(W)		3	4.90	0.69	531.9 3	1592.7 7
191	20 4	(Y)GGALTSTSTHTIER(W)		2	4.04	0.63	715.8 7	1429.7 3
192	20 4	(G)GALTSTSTHTIER(W)		2	4.06	0.63	687.3 5	1372.6 8
193	20 4	(G)ALTSTSTHTIER(W)		3	1.81	0.17	439.5 6	1315.6 7
195	20 4	(L)TSTSTHTIER(W)		2	2.43	0.38	566.7 8	1131.5 5
205	21 7	(R)WLIGNQTGDATLR(A)		3	3.79	0.60	482.2 6	1443.7 4
206	21	(W)LIGNQTGDATLR(A)		2	2.56	0.41	629.8	1257.6

	7						4	7
218	22 9	(R)AGFPKDWVVGEK(T)		3	3.90	0.62	444.9 0	1331.6 9
219	22 9	(A)GFPKDWVVGEK(T)		2	2.45	0.39	631.3 3	1260.6 5
220	22 9	(G)FPKDWVVGEK(T)		2	2.70	0.44	602.8 2	1203.6 3
221	22 9	(F)PKDWVVGEK(T)		2	3.42	0.56	529.2 9	1056.5 6
223	22 9	(K)DWVVGEK(T)		2	1.96	0.23	416.7 2	831.42
230	24 5	(K)TGTcANGGRNDIGFFK(A)		3	2.49	0.40	572.2 8	1713.8 1
239	24 5	(R)NDIGFFK(A)		2	2.68	0.44	420.7 2	839.42
239	24 9	(R)NDIGFFKAQER(D)		2	2.34	0.36	662.8 4	1323.6 7
246	25 6	(K)AQERDYAVAVY(T)		2	1.83	0.18	642.8 1	1283.6 1
246	26 1	(K)AQERDYAVAVYTTAPK(L)		3	4.80	0.69	594.9 8	1781.9 1
250	26 1	(R)DYAVAVYTTAPK(L)		2	3.62	0.59	649.8 4	1297.6 6
262	27 2	(K)LSAVERDELVA(S)		2	2.48	0.39	601.3 2	1200.6 3
262	27 5	(K)LSAVERDELVASVG(Q)		2	2.56	0.41	722.8 8	1443.7 5
262	27 6	(K)LSAVERDELVASVGQ(V)		3	1.99	0.25	524.9 4	1571.8 1
262	27 9	(K)LSAVERDELVASVGQVI T(Q)		3	1.78	0.16	629.3 4	1885.0 1
262	28 0	(K)LSAVERDELVASVGQVI TQ(L)		3	3.75	0.60	672.0 3	2013.0 7
262	28	(K)LSAVERDELVASVGQVI		3	1.76	0.15	709.7	2126.1

	1	TQL(I)					3	6
262	28	(K)LSAVERDELVASVGQVI		4	4.56	0.67	696.8	2783.5
	7	TQLILSTDK(-)					9	3
273	28	(A)SVGQVITQLILSTDK(-)		2	2.98	0.50	801.4	1600.9
	7						6	0
274	28	(S)VGQVITQLILSTDK(-)		3	2.82	0.47	505.6	1513.8
	7						3	7
276	28	(G)QVITQLILSTDK(-)		2	2.76	0.46	679.9	1357.7
	7						0	8
277	28	(Q)VITQLILSTDK(-)		2	3.08	0.51	615.8	1229.7
	7						7	2
280	28	(T)QLILSTDK(-)		2	1.80	0.17	459.2	916.52
	7						7	
281	28	(Q)LILSTDK(-)		1	2.28	0.34	789.4	788.46
	7						7	

- [197] KPC 단백질의 경우 3개의 메티오닌 잔기(49, 116, 151) 중 각 1개 메티오닌이 산화된 형태의 펩타이드가 동정되었다(도 6a). OXA의 경우는 6개의 메티오닌 잔기(115, 138, 195, 237, 239, 241) 중 1개 또는 동시에 2~3개의 메티오닌이 산화된 형태의 펩타이드로 동정되었다(도 6b).
- [198] 특이하게도, KPC 단백질의 경우는 1-21번 잔기, OXA 단백질의 경우는 1-22번 잔기의 N-말단 서열 펩타이드는 검출되지 않았으며, 이 KPC의 경우 1-21번을 제외한 서열을 고려했을 때 모든 서열 범위에 걸친 펩타이드가 동정되어 서열 동정범위는 92.8%(272/293)에서 100%(272/272)로 증가되었다. 또한, OXA의 경우 1-22번을 제외한 서열을 적용하면 91.7%(243/265)에서 100%(243/243)로 증가하였다.
- [199] NDM 단백질의 경우 7개의 메티오닌 잔기(39, 67, 126, 129, 245, 248, 265) 중 각 1개 메티오닌이 산화된 형태의 펩타이드가 동정되었다(도 6c). GES의 경우는 6개의 메티오닌 잔기(62, 95, 112, 143, 164, 181) 중 1개 또는 동시에 2개의 메티오닌이 산화된 형태의 펩타이드로 동정되었다(도 6f). IMP와 VIM의 경우, 메티오닌이 산화된 형태의 펩타이드는 동정되지 않았다(도 6d, 6e)
- [200] IMP와 VIM 단백질의 경우는 각각 1-18번 잔기와 1-26번 잔기의 N-말단 서열 펩타이드는 검출되지 않았으며, GES의 경우에도 1-18번의 N-말단 서열 펩타이드가 검출되지 않았다. 타겟 단백질의 N-말단이 제외한 서열을 고려했을 때 확인된 서열 동정범위는 NDM은 97.2(243/250), IMP는 97.8%(223/228), VIM은 100%(240/240), GES는 98.5%(265/269)로 확인되었다.

- [201]
- [202] (3) N-말단 서열의 동정(도 7)
- [203] KPC
- [204] - N-말단 서열: (S)/ATALTNLVAEPFAK(L) (semi-tryptic)
- [205] KPC-3
- [206] - N-말단 서열: (S)/ATALTNLVAEPFAK(L) (semi-tryptic)
- [207] KPC-17
- [208] - N 말단 서열: (S)/ATALTNLVAEPFAK(L) (semi-tryptic)
- [209] OXA
- [210] - N-말단 서열: (A)/KEWQENK(S) (semi-tryptic)
- [211] OXA-181
- [212] - N-말단 서열: (A)/KEWQENKSWNAHFTEHK(S) (semi-tryptic)
- [213] NDM
- [214] - N말단 서열: (M)PGEIRPTIGQQMETGDQR(F) (semi-tryptic)
- [215] IMP
- [216] - N말단 서열: (A)AESLPDLK(I) (semi-tryptic)
- [217] IMP-1
- [218] - N-말단 서열: (A)/AESLPDLK(I) (semi-tryptic)
- [219] IMP-4
- [220] - N-말단 서열: (A)/AESLPDLK(I) (semi-tryptic)
- [221] VIM
- [222] - N말단 서열: (S)/VDSSGEYPTVSEIPVGEVR(L) (semi-tryptic)
- [223] VIM-1
- [224] - N-말단 서열: (S)/GEPSGEYPTVNEIPVGEVR(L) (semi-tryptic)
- [225] VIM-4
- [226] -N-말단 서열: (S)/GEPSGEYPTVNEIPVGEVR(L) (semi-tryptic)
- [227] GES
- [228] - N말단 서열: (A)SEKLTFK(T) (semi-tryptic)
- [229] GES-1
- [230] - N-말단 서열: (A)/SEKLTFK(T) (semi-tryptic)
- [231]
- [232] **실시예 6: 각 단백질들의 아미노산 서열 분석 및 특성 확인**
- [233] 상기 실시예 5의 MS2 결과를 바탕으로, 현재까지 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 데이터베이스에서 알려진 전체 43개의 KPC 서브타입 단백질(도 8a), 660개의 OXA 서브타입 단백질(도 8b), 27개의 NDM 서브타입 단백질(도 8c)과 79개의 IMP 서브타입 단백질(도 8d), 66개의 VIM 서브타입 단백질(도 8e)과 43개의 GES 서브타입 단백질(도 8f)에 대한 다중정렬 분석을 수행하였다.

[234] KPC와 OXA 단백질

[235] KPC-2를 포함한 42개의 단백질의 전체 아미노산 서열의 97.3%이상이 보존되어 있고, OXA 단백질의 경우 카바페넴 항생제 내성을 보유한 OXA-48을 포함한 30개의 단백질이 전체 아미노산 서열의 91.3%이상 보존되어 있는 것을 확인하였다. 각각의 단백질 특성을 분류하기 위하여 MEGA X 프로그램을 통해 KPC와 OXA의 계통수(pyrogenetic tree)분석을 실행하였다(도 9a-9b). KPC는 특이적으로 KPC 단백질들은 43개의 서브타입 단백질 모두 동일한 N-말단 펩타이드(1-21 a.a)를 포함하고 있었고, 그 중 KPC-2를 포함한 35개의 서브그룹 단백질들이 293개의 아미노산 서열로 구성되어 있었다. OXA의 경우, 동일한 N-말단 펩타이드(1-22 a.a)를 포함한 OXA 단백질은 30개로 확인하였고, 23개 종류의 OXA 단백질들은 265개의 동일한 아미노산 서열로 구성된 OXA-48과 동일한 서열의 특징을 보여주었다.

[236]

[237] MBL 단백질들과 GES 단백질

[238] 전체 서열 유사성은 90.9%(NDM), 44.8%(IMP), 63.5%(VIM), 86.5%(GES)로 각각 확인되었다. 동일한 N-말단을 가지는 서브타입 단백질의 경우, NDM은 27개로 동일하게 확인되었고 IMP는 23개(89.4%), VIM은 26개(92.1%), GES는 35개(87.9%)로 각각 확인되었다. N-말단 서열과 펩타이드 개수가 동일하고 전체 아미노산 서열이 같은 NDM은 26개(92.6%), IMP는 23개(89.4%), VIM은 25개(93.6%), GES는 34개(88.9%)로 확인되었다. 각각의 단백질 특성을 분류하기 위하여 MEGA X 프로그램을 통해 MBL 단백질들과 GES 단백질의 서브타입 단백질들에 대한 계통수(pyrogenetic tree)분석을 실행하였다(도 9c-9f). 그 결과, 다중정렬 분석에서 확인된 결과와 동일하게 NDM-1, IMP-6, VIM-2, GES-5을 각각 포함하고 있는 서브그룹들이 계통수 분석에서 그룹화가 되는 것을 확인 할 수 있다.

[239]

[240] **실시예 7: 질량 분석법을 이용한 타겟 단백질 동정 (Top-down 방법)**

[241] 균주에서 발현되는 활성 단백질(Active protein)의 질량값을 확인하기 위한 Top-Down 질량분석을 진행하였다. 정확한 단백질의 질량 값을 확인하기 위해서 균주 유래 조 단백질 추출액에서 부분 정제를 통해 얻은 시료를 사용하였으며 Top-Down 분석이 가능한 LC-MS/MS 시스템(Nano-LC 및 Q-Exactive HF-X 질량분석기 시스템)을 활용하였다.

[242] (1) 정제된 단백질의 질량분석

[243] 부분 정제된 단백질 시료 약 0.5 μ g의 시료를 주입하였다. 컬럼없이 직접 주입 방식(Direct Infusion)방식과 나노유속펌프를 이용하여 분석하였다. 이때 사용한 시료 분석 조건은 다음과 같다.

[244] - 버퍼 A: 물 내의 0.1% 포름산

[245] - 시료 분석: 0 - 10분, 고정버퍼(A) 100%, 고정유속 4 μ L/min

[246]

[247] (2) 고분해능 질량분석기를 이용한 타겟 단백질 질량분석

[248] Q-Exactive HF-X 질량분석기의 Protein Mode Analysis 방법을 이용하여 온전한(Intact) 단백질의 질량값과 단백질들의 텐덤 스펙트럼을 얻어 동정하였다. 이때 사용된 파라미터는 다음과 같다.

[249] - 분해능: Full MS 120,000, MS2 60,000 또는 120,000으로 사용

[250] - Full MS: 620~2,400 m/z, 100 msec

[251] - MS2: 1~2 마이크로스캔 사용, 1,000 msec, NCE 30, 1~8가로 이온화 물질은 MS2 대상에서 제외함.

[252] Top-Down 데이터로 단백질을 동정하기 위한 소프트웨어는 미국 PNNL (Pacific Northwest National Laboratory)에서 개발한 'Informed Proteomics'를 활용하였다.

[253] KPC와 OXA 단백질[254] 다중 하전된 KPC 단백질($z = +13 \sim +20$) 혹은 OXA 단백질 ($z = +22 \sim +37$)

피크들이 여럿 확인되었으며(도 10a 및 10b), 해당 피크를

역합성곱(deconvolution)하여 수득한 대표적 질량값은 평균 분자량 28,718.13 m/z $\times z$, 단일 동위원소 질량(Monoisotopic mass)으로는 28,700.69 m/z $\times z$ 로

확인되었다. 확인된 대표적인 질량값은 KPC 단백질의 Cys68과 Cys237이

이황화결합된 상태의 질량값을 나타낸다. 또한, 메티오닌 산화로 발생한 다른

피크들이 관측되었다(예를 들어, 1개의 메티오닌이 산화된 폴리펩타이드의 경우 평균 분자량 $28,718 + 16 \text{ m/z} \times z$ 로 나타남). 이들은 In-Gel

Digestion(Bottom-up방식)을 통해 얻은 KPC 또는 OXA 단백질 서열 내의 산화된

메티오닌 잔기위치(KPC의 경우: 49, 116, 151, OXA의 경우: 115, 138, 195, 237,

239, 241)와 부분적으로 일치하였다. Top-down 방식의 분석에서도 KPC의 경우,

1-21의 N말단, OXA의 경우, 1-22의 N말단 서열을 포함한 폴리펩타이드는

관측되지 않았다. 각각의 N말단 서열을 제외하면, KPC(22-293)와 OXA(23-265)

모두 해당서열에 대하여 동정범위 100%를 나타낸다(도 12a 및 12b).

[255]

[256] MBL 단백질들과 GES 단백질

[257] 다중 하전된 MBL 단백질들과 혹은 GES 단백질 피크들이 여럿

확인되었으며(도 10c, 10e, 10g, 10i), 해당 피크를 역합성곱(deconvolution)하여

수득한 대표적 질량값은 NDM의 경우 평균분자량 26,724 m/z $\times z$, 단일 동위원소

질량(Monoisotopic mass)으로는 26,707 m/z $\times z$ 로 확인되었고, IMP의 경우

평균분자량 25082.68 m/z $\times z$, 단일 동위원소 질량(Monoisotopic mass)으로는

25,067.19 m/z $\times z$ 로 확인되었고, VIM의 경우 평균분자량 25,515.42 m/z $\times z$, 단일

동위원소 질량(Monoisotopic mass)으로는 25,499.92 m/z $\times z$ 로 확인되었고, GES의

경우 평균분자량 29,245.15 m/z $\times z$, 단일 동위원소 질량(Monoisotopic

mass)으로는 29,226.92 m/z $\times z$ 로 확인되었다. NDM의 경우, 확인된 대표적인

질량값은 팔미트화(Palmitoylation)된 단백질형으로 확인되었다(도 11a). 또한,

메티오닌 산화와 메틸화로 발생한 다른 피크들이 관측되었다(예를 들어, 1개의 메티오닌이 산화된 폴리펩타이드의 경우 평균분자량 $26724 + 16 m/z \times z$ 로 나타내고, 1개의 메틸화된 폴리펩타이드의 경우 평균분자량 $26724 + 14 m/z \times z$ 로 나타냄)(도 11b). 반면, IMP 및 VIM의 경우는 특별한 단백질 수식화는 발견되지 않았다. GES의 경우는 Cys63과 Cys233사이의 이황화 결합이 확인되었고, 이 또한 메티오닌 산화로 발생한 다른 피크들이 관측되었다. In-Gel Digestion(Bottom-up 방식)을 통해 얻은 NDM 또는 GES 단백질 서열 이내의 산화된 메티오닌 잔기위치(NDM의 경우: 39, 67, 126, 129, 245, 248, 265, OXA의 경우: 62, 95, 112, 143, 164, 181)와 부분적으로 일치하였다. Top-down 방식의 분석에서도 NDM의 경우 1-19 또는 1-20의 N-말단, IMP의 경우 1-18의 N-말단, VIM의 경우 1-26의 N-말단, 마지막으로 GES의 경우 1-18의 N-말단 서열을 포함하는 폴리펩타이드는 관측되지 않았다. 각각의 N말단 서열을 제외하면 NDM 단백질은 21-270 범위에서 100% 동정되었고(도 12c), IMP 단백질은 19-246 범위에서 100% 동정되었으며(도 12d), VIM 단백질은 27-266 범위에서 100% 동정되었다(도 12e). GES 단백질의 경우, 19-287 범위에서 100% 동정되었다(도 12f).

[258]

[259] (3) 저분해능 질량분석기를 이용한 타겟 단백질 질량분석

[260] 저분해능 질량분석장비(1, SciEX 4800; 2, Bruker Biotyper MALDI-TOF MS)를 활용하여 각 단백질들의 질량분석 스펙트럼을 얻었다. 먼저, SA(Sinapinic acid, 0.1% TFA/50% 아세토니트릴 내 10mg/mL으로 존재) 매트릭스 1 μ L와 약 100ng의 정도의 단백질을 플레이트 spot 위에 올려놓고, 완전 건조시켜 질량분석을 실시하였다. 단백질 샘플은 고체배양에서 배양된 콜로니, 액체배양에서 수확된 세포, 세포파쇄후 조추출액과 조효소액, 정제 후 확보한 정제 단백질 모두를 사용할 수 있다. 이때 사용한 에너지는 최대 30%, 무작위 위치 취득(random position acquisition)을 수행하였으며, 40 shot씩 총 2,000 shot의 레이저를 조사하고 각 스펙트럼 데이터를 누적하여 취득하였다. 10,000에서부터 40,000 m/z(KPC, OXA) 또는 35,000 m/z(MBL, GES) 구간의 범위에 대하여 질량분석 스펙트럼을 얻었으며, +1가의 타겟 단백질은 물론 +2가의 타겟 단백질도 동시에 검출하였다(도 13). NDM의 경우, 저분해능 질량분석결과, 3종류의 MBL 단백질들과 GES 단백질모두 +1가와 +2가 모두 검출되었고 특별히 NDM 단백질의 경우, 세포막에 앵커링(anchoring)되는 단백질로써 팔미트화(Ave. mass = 238.4136, Mono. mass = 238.22966)되어있는 형태 분자량과 팔미트화가 되지 않은 분자량 모두 함께 확인되었다.

[261]

[262] (4) 각 단백질 서브타입의 질량값 비교

[263] 상기의 방법을 통하여 KPC, OXA, MBL 및 GES 단백질의 정확한 질량값을 확인하였고, 확인된 질량값을 바탕으로 N-말단 펩타이드가 제거된 활성

단백질들의 질량값을 확인할 수 있었다. 따라서 NCBI에서 확인된 모든 KPC, OXA, MBL 및 GES 단백질들은 고분해능 또는 저분해능 질량분석기를 통하여 활성 단백질(Active protein)의 정확한 질량값을 확인할 수 있고, 질량분석을 통하여 다양한 종류의 각 서브타입 단백질에 대한 신속/정확한 동정이 가능하다(표 8 - 표 13).

[264] [표8]

KPC 단백질의 질량 데이터

Sub types	전장 KPC 단백질			전장 KPC 단백질 (이황화결합 포함)			활성형 단백질			활성형 단백질 (이황화결합 포함)			N-말단
	Da	평균 분자량	단일 동위 원소 질량	Da	평균 분자량	단일 동위 원소 질량	Da	평균 분자량	단일 동위 원소 질량	Da	평균 분자량	단일 동위 원소 질량	
2	31115	31115.35	31095.98	31113	31113.33	31093.96	28720	28720.43	28702.71	28718	28718.41	28700.69	1 ~ 21aa
3	31141	31141.39	31121.99	31139	31139.37	31119.97	28746	28746.46	28728.71	28744	28744.44	28726.69	1 ~ 21aa
4	31132	31132.34	31112.99	31130	31130.32	31110.97	28737	28737.42	28719.71	28735	28735.40	28717.69	1 ~ 21aa
5	31174	31174.42	31155.03	31172	31172.40	31152.01	28779	28779.50	28761.76	28777	28777.48	28759.74	1 ~ 21aa
6	31073	31073.27	31053.94	31071	31071.25	31051.92	28678	28678.35	28660.66	28676	28676.33	28658.64	1 ~ 21aa
7	31123	31123.35	31104.03	31121	31121.33	31101.01	28728	28728.43	28710.76	28726	28726.41	28708.74	1 ~ 21aa
8	31099	31099.30	31079.94	31097	31097.28	31077.92	28704	28704.38	28686.67	28702	28702.36	28684.65	1 ~ 21aa
10	31200	31200.46	31181.04	31198	31198.44	31178.02	28805	28805.53	28787.76	28803	28803.51	28785.74	1 ~ 21aa

11	311 31	31131. 39	31112 .02	31 12 9	31129. 37	3111 0.00	28 73 6	28736. 47	2871 8.74	28 73 4	28734. 45	2871 6.72	1 ~ 21aa
12	311 33	31133. 38	31113 .94	31 13 1	31131. 36	3111 1.92	28 73 8	28738. 46	2872 0.67	28 73 6	28736. 44	2871 8.65	1 ~ 21aa
13	310 83	31083. 35	31063 .98	31 08 1	31081. 33	3106 1.96	28 68 8	28688. 43	2867 0.71	28 68 6	28686. 41	2866 8.69	1 ~ 21aa
14	309 57	30957. 19	30937 .92	30 95 5	30955. 17	3093 5.90	28 56 2	28562. 27	2854 4.64	28 56 0	28560. 25	2854 2.62	1 ~ 21aa
15	312 72	31271. 58	31252 .11	31 27 0	31269. 56	3125 0.09	28 87 7	28876. 66	2885 8.84	28 87 5	28874. 64	2885 6.82	1 ~ 21aa
16	310 71	31071. 29	31051 .98	31 06 9	31069. 27	3104 9.96	28 67 6	28676. 37	2865 8.70	28 67 4	28674. 35	2865 6.68	1 ~ 21aa
17	310 81	31081. 33	31062 .00	31 07 9	31079. 31	3105 9.98	28 68 6	28686. 41	2866 8.73	28 68 4	28684. 39	2866 6.71	1 ~ 21aa
18	311 29	31129. 38	31110 .00	31 12 7	31127. 36	3110 7.98	28 72 0	28720. 43	2870 2.71	28 71 8	28718. 41	2870 0.69	1 ~ 21aa
19	311 28	31128. 39	31108 .99	31 12 6	31126. 37	3110 6.97	28 73 3	28733. 47	2871 5.72	28 73 1	28731. 45	2871 3.70	1 ~ 21aa
21	310 85	31085. 32	31066 .01	31 08 3	31083. 30	3106 3.99	28 69 0	28690. 40	2817 9.59	28 68 8	28688. 38	2817 7.57	1 ~ 21aa
22	309 52	30952. 17	30932 .94	30 95 0	30950. 15	3093 0.92	28 55 7	28557. 25	2853 9.67	28 55 5	28555. 23	2853 7.65	1 ~ 21aa
23	311 13	31113. 33	31093 .96	31 11	31111. 31	3109 1.94	28 71	28718. 41	2870 0.68	28 71	28716. 39	2869 8.66	1 ~ 21aa

				1			8			6			
24	310 56	31056. 28	31036 .94	31 05 4	31054. 26	3103 4.92	28 72 0	28720. 43	2870 2.71	28 71 8	28718. 41	2870 0.69	1 ~ 21aa
25	313 58	31357. 63	31338 .11	31 35 6	31355. 61	3133 6.09	28 96 3	28962. 70	2894 4.84	28 96 1	28960. 68	2894 2.82	1 ~ 21aa
26	311 31	31131. 35	31111 .98	31 12 9	31129. 33	3110 9.96	28 72 0	28720. 43	2870 2.71	28 71 8	28718. 41	2870 0.69	1 ~ 21aa
27	311 11	31111. 36	31092 .01	31 10 9	31109. 34	3108 9.99	28 71 6	28716. 44	2869 8.74	28 71 4	28714. 42	2869 6.72	1 ~ 21aa
28	309 83	30983. 23	30963 .92	30 98 1	30981. 21	3096 1.90	28 58 8	28588. 31	2857 0.65	28 58 6	28586. 29	2856 8.63	1 ~ 21aa
29	315 00	31499. 74	31480 .14	31 49 8	31497. 72	3147 8.12	29 10 5	29104. 82	2908 6.86	29 10 3	29102. 80	2908 4.84	1 ~ 21aa
30	310 96	31096. 30	31076 .94	31 09 4	31094. 28	3107 4.92	28 72 0	28720. 43	2870 2.71	28 71 8	28718. 41	2870 0.69	1 ~ 21aa
31	311 89	31189. 47	31170 .03	31 18 7	31187. 45	3116 8.01	28 79 5	28794. 55	2877 6.75	28 79 3	28792. 53	2877 4.73	1 ~ 21aa
32	312 20	31219. 56	31200 .02	31 21 8	31217. 54	3119 8.00	28 82 5	28824. 64	2880 6.74	28 82 3	28822. 62	2880 4.72	1 ~ 21aa
33	311 63	31163. 44	31144 .02	31 16 1	31161. 42	3114 2.00	28 76 9	28768. 52	2875 0.75	28 76 7	28766. 50	2874 8.73	1 ~ 21aa
34	320 26	32026. 29	32006 .40	32 02 4	32024. 27	3200 4.38	29 63 1	29631. 37	2961 3.12	29 62 9	29629. 35	2961 1.10	1 ~ 21aa
35	310	31099.	31079	31	31097.	3107	28	28704.	2868	28	28702.	2868	1 ~

	99	31	.95	09 7	29	7.93	70 4	39	6.68	70 2	37	4.66	21aa
36	311 55	31155. 41	31136 .00	31 15 3	31153. 39	3113 3.98	28 76 0	28760. 49	2874 2.73	28 75 8	28758. 47	2874 0.71	1 ~ 21aa
37	310 51	31051. 31	31032 .02	31 04 9	31049. 29	3103 0.00	28 65 6	28656. 39	2863 8.75	28 65 4	28654. 37	2863 6.73	1 ~ 21aa
38	311 13	31113. 33	31093 .96	31 11 1	31111. 31	3109 1.94	28 71 8	28718. 41	2870 0.68	28 71 6	28716. 39	2869 8.66	1 ~ 21aa
39	311 71	31171. 41	31152 .00	31 16 9	31169. 39	3114 9.98	28 77 6	28776. 49	2875 8.72	28 77 4	28774. 47	2875 6.70	1 ~ 21aa
40	313 70	31369. 63	31350 .10	31 36 8	31367. 61	3134 8.08	28 97 5	28974. 71	2895 6.83	28 97 3	28972. 69	2895 4.81	1 ~ 21aa
41	314 81	31480. 78	31461 .18	31 47 9	31478. 76	3145 9.16	29 08 6	29085. 86	2906 7.90	29 08 4	29083. 84	2906 5.88	1 ~ 21aa
42	310 85	31085. 32	31065 .97	31 08 3	31083. 30	3106 3.95	28 69 0	28690. 40	2867 2.70	28 68 8	28688. 38	2867 0.68	1 ~ 21aa
43	311 43	31143. 41	31124 .03	31 14 1	31141. 39	3112 2.01	28 74 8	28748. 49	2873 0.75	28 74 6	28746. 47	2872 8.73	1 ~ 21aa
44	328 28	32828. 19	32807 .81	32 82 6	32826. 17	3280 5.79	30 43 3	30433. 27	3041 4.54	30 43 1	30431. 25	3041 2.52	1 ~ 21aa
45	311 42	31142. 42	31123 .03	31 14 0	31140. 40	3112 1.01	28 74 8	28747. 50	2872 9.76	28 74 5	28745. 48	2872 7.74	1 ~ 21aa
46	311 25	31125. 34	31105 .96	31 12 3	31123. 32	3110 3.94	28 73 0	28730. 42	2871 2.68	28 72 8	28728. 40	2871 0.66	1 ~ 21aa

[265] [표9]

OXA 단백질의 질량 데이터

Subtypes	전장 OXA 단백질			활성형 단백질			
	Da	평균분자 량	단일동위 원소질량	Da	평균분자 량	단일동위 원소질량	N-말단
48	30359	30358.76	30339.55	28147	28146.97	28129.28	1 ~ 22aa
54	30280	30279.68	30260.45	28098	28097.89	28080.23	1 ~ 22aa
162	30329	30328.74	30309.54	28117	28116.94	28099.27	1 ~ 22aa
163	29891	29891.19	29872.27	27679	27679.40	27662.00	1 ~ 22aa
181	30313	30312.74	30293.55	28172	28172.02	28154.31	1 ~ 22aa
199	30299	30298.71	30279.52	28158	28157.99	28140.29	1 ~ 22aa
204	30423	30422.85	30403.60	28282	28282.14	28264.37	1 ~ 22aa
232	30244	30243.63	30224.48	28032	28031.83	28014.21	1 ~ 22aa
244	30260	30259.63	30240.47	28048	28047.83	28030.20	1 ~ 22aa
245	30393	30392.82	30373.57	28252	28252.11	28234.34	1 ~ 22aa
247	29814	29814.11	29795.25	27673	27673.39	27656.02	1 ~ 22aa
252	30331	30330.71	30311.52	28190	28189.99	28172.29	1 ~ 22aa
370	30401	30400.80	30381.56	28260	28260.08	28242.33	1 ~ 22aa
405	29859	29859.19	29840.28	27718	27718.48	27701.04	1 ~ 22aa
416	30401	30400.84	30381.60	28260	28260.13	28242.37	1 ~ 22aa
436	30285	30284.74	30265.51	28126	28125.97	28108.35	1 ~ 22aa
438	30111	30111.42	30092.35	27900	27899.62	27882.08	1 ~ 22aa
439	29865	29865.16	29846.26	27653	27653.36	27635.99	1 ~ 22aa
484	30214	30213.60	30194.47	28002	28001.80	27984.20	1 ~ 22aa
505	30389	30388.79	30369.56	28147	28146.97	28129.28	1 ~ 22aa
514	30387	30386.82	30367.58	28175	28175.02	28157.31	1 ~ 22aa
515	30361	30360.73	30341.53	28149	28148.94	28131.26	1 ~ 22aa
517	30088	30088.47	30069.42	27877	27876.68	27859.15	1 ~ 22aa
519	30373	30372.79	30353.57	28161	28160.99	28143.30	1 ~ 22aa
535	30185	30184.62	30165.45	27955	27954.78	27937.26	1 ~ 22aa

538	30363	30362.75	30343.53	28151	28150.96	28133.26	1 ~ 22aa
546	30343	30342.76	30323.56	28131	28130.97	28113.29	1 ~ 22aa
547	30427	30426.88	30407.63	28215	28215.09	28197.36	1 ~ 22aa
566	30403	30402.77	30383.54	28191	28190.98	28173.27	1 ~ 22aa
567	30190	30189.58	30170.47	27978	27977.78	27960.2	1 ~ 22aa

[266] [표10]

NDM 단백질의 질량 데이터

Subtypes	전장 NDM 단백질			활성형 단백질 (N-말단 1-19)			활성형 단백질 (N-말단 1-20)		
	Da	평균분 자량	단일동 위 원소질 량	Da	평균분 자량	단일동 위 원소질 량	Da	평균분 자량	단일동위 원소질량
1	2849 9	28499.4 6	28481.2 2	2651 0	26510.0 4	26493.1 6	2643 9	26438.9 6	26422.12
2	2847 3	28473.4 2	28455.2 0	2648 4	26484.0 0	26467.1 4	2641 3	26412.9 2	26396.10
3	2849 8	28498.4 8	28480.2 3	2650 9	26509.0 5	26492.1 7	2643 8	26437.9 8	26421.14
4	2848 1	28481.4 3	28463.2 6	2649 2	26492.0 1	26475.2 0	2642 1	26420.9 3	26404.16
5	2849 5	28495.4 5	28477.2 7	2650 6	26506.0 3	26489.2 2	2643 5	26434.9 5	26418.18
6	2852 8	28527.5 1	28509.2 5	2653 8	26538.0 9	26521.1 9	2646 7	26467.0 1	26450.15
7	2848 0	28480.4 4	28462.2 7	2649 1	26491.0 2	26474.2 2	2642 0	26419.9 4	26403.18
8	2842 3	28423.3 9	28405.2 5	2643 4	26433.9 7	26417.1 9	2636 3	26362.8 9	26346.16
9	2849 9	28498.5 2	28480.2 7	2650 9	26509.1 0	26492.2 1	2643 8	26438.0 2	26421.17
10	2864 8	28647.5 8	28629.2 5	2665 8	26658.1 5	26641.1 9	2658 7	26587.0 8	26570.16
11	2846 7	28467.4 0	28449.2 4	2647 8	26477.9 8	26461.1 8	2640 7	26406.9 0	26390.15
12	2853 9	28539.4 6	28521.2 6	2655 0	26550.0 4	26533.2 1	2647 9	26478.9 6	26462.17
13	2848 0	28480.4 4	28462.2 7	2649 1	26491.0 2	26474.2 2	2642 0	26419.9 4	26403.18

14	2844 1	28441.4 2	28423.2 1	2645 2	26452.0 0	26435.1 5	2638 1	26380.9 2	26364.11
15	2850 9	28509.4 8	28491.2 9	2652 0	26520.0 6	26503.2 3	2644 9	26448.9 8	26432.19
16	2848 0	28480.4 1	28462.1 7	2649 1	26490.9 9	26474.1 1	2642 0	26419.9 1	26403.08
17	2849 5	28494.5 1	28476.3 3	2650 5	26505.0 9	26488.2 7	2643 4	26434.0 1	26417.23
18	2910 3	29103.1 0	29084.4 9	2711 4	27113.6 7	27096.4 3	2704 3	27042.6 0	27025.40
19	2850 9	28508.5 0	28490.3 1	2651 9	26519.0 7	26502.2 5	2644 8	26448.0 0	26431.21
20	2847 6	28476.4 1	28458.2 3	2648 7	26486.9 9	26470.1 7	2641 6	26415.9 1	26399.14
21	2852 5	28525.4 8	28507.2 8	2653 6	26536.0 6	26519.2 3	2646 5	26464.9 8	26448.19
22	2848 1	28481.4 3	28463.2 6	2649 2	26492.0 1	26475.2 0	2642 1	26420.9 3	26404.16
23	2849 9	28499.4 6	28481.2 2	2651 0	26510.0 4	26493.1 6	2643 9	26438.9 6	26422.12
24	2851 3	28513.4 9	28495.2 3	2652 4	26524.0 7	26507.1 7	2645 3	26452.9 9	26436.14
25	2851 5	28515.4 6	28497.2 1	2652 6	26526.0 4	26509.1 5	2645 5	26454.9 6	26438.11
27	2852 7	28526.5 3	28508.2 6	2653 7	26537.1 1	26520.2 0	2646 6	26466.0 3	26449.17
28	2852 8	28527.5 1	28509.2 5	2653 8	26538.0 9	26521.1 9	2646 7	26467.0 1	26450.15

[267] [표11]

IMP 단백질의 질량 데이터

Subtypes	전장 IMP 단백질			활성형 IMP 단백질			
	Da	평균분자 량	단일동위 원소질량	Da	평균분자 량	단일동위 원소질량	N-말단
1	27120	27120.19	27103.24	25113	25112.71	25097.2	1 ~ 18aa
2	27180	27180.25	27163.13	25151	25150.65	25135.08	1 ~ 19aa
3	27018	27018.1	27001.21	25011	25010.62	24995.17	1 ~ 18aa
4	27087	27087.2	27070.24	25080	25079.72	25064.2	1 ~ 18aa
5	27176	27176.24	27159.12	25020	25019.56	25004.05	1 ~ 19aa
6	27090	27090.16	27073.23	25083	25082.68	25067.19	1 ~ 18aa
7	27134	27134.24	27117.21	25025	25024.6	25009.15	1 ~ 19aa
8	27053	27053.06	27036.02	24952	24952.38	24936.94	1 ~ 20aa
9	27277	27277.22	27260.01	25192	25191.61	25175.97	1 ~ 18aa
10	27168	27168.23	27151.24	25161	25160.75	25145.2	1 ~ 18aa
11	27061	27061.01	27044.05	24973	24973.34	24957.93	1 ~ 19aa
12	27101	27101.29	27084.27	24988	24987.6	24972.09	1 ~ 19aa
13	27212	27212.26	27195.02	25078	25077.56	25061.95	1 ~ 20aa
14	27441	27440.57	27423.32	25365	25364.9	25349.23	1 ~ 18aa
15	27139	27139.07	27121.93	25011	25011.44	24995.94	1 ~ 19aa
16	27298	27298.24	27281.06	25268	25267.62	25251.96	1 ~ 18aa
17	27141	27141.14	27123.95	25006	25006.44	24990.88	1 ~ 20aa
18	27199	27199.28	27182.22	25186	25185.69	25170.14	1 ~ 18aa
19	27095	27095.14	27078.06	24994	24994.46	24978.98	1 ~ 20aa
20	27143	27143.19	27126.06	25043	25042.5	25026.98	1 ~ 20aa
21	27033	27032.96	27016.02	24945	24945.29	24929.9	1 ~ 19aa
22	27224	27224.16	27207.03	25208	25207.56	25191.95	1 ~ 18aa
23	27101	27101.11	27084.02	25000	25000.42	24984.94	1 ~ 20aa
24	27081	27081.08	27064.02	24980	24980.39	24964.94	1 ~ 20aa
25	27120	27120.19	27103.24	25113	25112.71	25097.2	1 ~ 18aa

26	27135	27135.24	27118.24	25128	25127.76	25112.2	1 ~ 18aa
27	27303	27303.26	27286.12	25216	25215.59	25200	1 ~ 19aa
28	27139	27139.19	27122.09	24983	24982.5	24967.02	1 ~ 19aa
29	27219	27219.17	27202.09	25115	25114.53	25098.96	1 ~ 19aa
30	27119	27119.25	27102.29	25112	25111.77	25096.25	1 ~ 18aa
31	27176	27176.19	27159.15	25116	25115.56	25100.01	1 ~ 18aa
32	27490	27489.64	27472.34	25414	25413.98	25398.25	1 ~ 18aa
33	27211	27211.26	27194.09	25205	25204.69	25189.08	1 ~ 18aa
34	27048	27048.12	27031.22	25041	25040.64	25025.18	1 ~ 18aa
35	27257	27257.13	27240.07	25139	25139.45	25123.91	1 ~ 19aa
37	27388	27388.44	27371.1	25254	25253.74	25238.03	1 ~ 20aa
38	27057	27057.17	27040.23	25050	25049.69	25034.19	1 ~ 18aa
39	27011	27011.07	26994.03	24910	24910.39	24894.95	1 ~ 20aa
40	27108	27108.13	27091.2	25101	25100.65	25085.16	1 ~ 18aa
41	27109	27109.05	27092.05	25021	25021.38	25005.93	1 ~ 19aa
42	27219	27219.32	27202.32	25212	25211.84	25196.28	1 ~ 18aa
43	27182	27182.28	27165.21	25073	25072.65	25057.15	1 ~ 19aa
44	27049	27048.96	27032.01	24961	24961.29	24945.9	1 ~ 19aa
45	27247	27247.2	27230	25105	25104.53	25088.94	1 ~ 19aa
46	26841	26840.97	26824.13	24831	24831.37	24816.02	1 ~ 18aa
48	27429	27428.51	27411.29	25353	25352.85	25337.19	1 ~ 18aa
49	27247	27247.32	27230.22	25234	25233.73	25218.14	1 ~ 18aa
51	27104	27104.21	27087.2	24995	24994.58	24979.14	1 ~ 19aa
52	27078	27078.11	27061.19	25071	25070.63	25055.15	1 ~ 18aa
53	27237	27237.16	27219.98	25094	25094.49	25078.92	1 ~ 19aa
54	27427	27426.54	27409.31	25351	25350.88	25335.21	1 ~ 18aa
55	27147	27147.34	27130.36	25174	25173.88	25158.3	1 ~ 18aa
56	27169	27169.25	27152.21	25156	25155.66	25140.13	1 ~ 18aa
58	27272	27272.2	27255.03	25199	25198.56	25182.93	1 ~ 19aa
59	27136	27136.27	27119.26	25129	25128.79	25113.22	1 ~ 18aa
60	27119	27119.25	27102.29	25112	25111.77	25096.25	1 ~ 18aa

61	27119	27119.24	27102.28	25112	25111.76	25096.24	1 ~ 18aa
62	27109	27109.04	27091.92	24981	24981.42	24965.93	1 ~ 19aa
63	27131	27131.31	27114.28	25018	25017.62	25002.1	1 ~ 19aa
64	27317	27317.29	27300.14	25216	25215.59	25200	1 ~ 19aa
65	27411	27410.54	27393.31	25335	25334.88	25319.22	1 ~ 18aa
66	27168	27168.23	27151.24	25161	25160.75	25145.2	1 ~ 18aa
67	27319	27319.26	27302.11	25232	25231.59	25216	1 ~ 19aa
68	27031	27030.98	27014.04	24872	24872.24	24856.89	1 ~ 20aa
69	27083	27083.09	27066.03	24982	24982.4	24966.95	1 ~ 20aa
70	27120	27120.19	27103.24	25113	25112.71	25097.2	1 ~ 18aa
71	27217	27217.3	27200.21	25204	25203.71	25188.13	1 ~ 18aa
73	27106	27106.18	27089.18	24796	24796.35	24781.04	1 ~ 21aa
74	27346	27346.28	27329.06	25259	25258.61	25242.94	1 ~ 19aa
75	27227	27227.34	27210.23	25214	25213.74	25198.15	1 ~ 18aa
76	27092	27092.13	27075.21	25085	25084.65	25069.17	1 ~ 18aa
77	27142	27142.15	27125.19	25135	25134.67	25119.15	1 ~ 18aa
78	27138	27138.21	27121.23	25131	25130.73	25115.19	1 ~ 18aa
79	27148	27148.2	27131.25	25141	25140.72	25125.21	1 ~ 18aa
80	27152	27152.23	27135.25	25145	25144.75	25129.2	1 ~ 18aa
82	27255	27255.22	27238.03	25113	25112.56	25096.98	1 ~ 19aa
83	27185	27185.25	27168.21	25172	25171.66	25156.13	1 ~ 18aa
84	27260	27260.31	27243.02	25126	25125.61	25109.95	1 ~ 20aa
85	27146	27146.22	27129.11	24990	24989.53	24974.04	1 ~ 19aa

[268] [표12]

VIM 단백질의 질량 데이터

Subtypes	전장 VIM 단백질			활성형 VIM 단백질			
	Da	평균분자 량	단일동위 원소질량	Da	평균분자 량	단일동위 원소질량	N-말단
1	28024	28024.46	28007.22	25322	25322.13	25306.78	1 ~ 26aa
2	28327	28326.94	28309.51	25515	25515.42	25499.92	1 ~ 26aa
3	28300	28299.96	28282.53	25488	25488.44	25472.94	1 ~ 26aa
4	28094	28093.57	28076.29	25391	25391.24	25375.85	1 ~ 26aa
5	28042	28041.57	28024.32	25339	25339.25	25323.88	1 ~ 26aa
6	28328	28327.97	28310.54	25516	25516.45	25500.95	1 ~ 26aa
7	28112	28111.92	28094.63	25464	25463.74	25448.26	1 ~ 25aa
8	28297	28296.91	28279.5	25485	25485.39	25469.91	1 ~ 26aa
9	28339	28338.99	28321.54	25527	25527.47	25511.95	1 ~ 26aa
10	28343	28342.94	28325.5	25531	25531.42	25515.91	1 ~ 26aa
11	28300	28299.91	28282.5	25488	25488.39	25472.91	1 ~ 26aa
12	28117	28116.55	28099.25	25414	25414.23	25398.81	1 ~ 26aa
13	28220	28219.63	28202.29	25455	25455.24	25439.83	1 ~ 26aa
14	28124	28123.59	28106.3	25421	25421.27	25405.86	1 ~ 26aa
15	28311	28310.94	28293.51	25499	25499.42	25483.92	1 ~ 26aa
16	28353	28353.02	28335.56	25542	25541.5	25525.97	1 ~ 26aa
17	28345	28344.97	28327.46	25515	25515.42	25499.92	1 ~ 26aa
18	27941	27940.58	27923.37	25129	25129.06	25113.79	1 ~ 26aa
19	28108	28107.64	28090.35	25405	25405.31	25389.9	1 ~ 26aa
20	28346	28345.98	28328.55	25534	25534.46	25518.96	1 ~ 26aa
23	28258	28257.83	28240.44	25446	25446.31	25430.85	1 ~ 26aa
24	28284	28283.91	28266.49	25472	25472.39	25456.9	1 ~ 26aa
25	28147	28146.76	28129.42	25444	25444.43	25428.98	1 ~ 26aa
26	28000	28000.47	27983.25	25298	25298.15	25282.81	1 ~ 26aa
27	28040	28040.46	28023.22	25338	25338.13	25322.78	1 ~ 26aa
28	28070	28069.58	28052.32	25367	25367.26	25351.88	1 ~ 26aa

29	28058	28057.57	28040.32	25355	25355.25	25339.88	1 ~ 26aa
30	28354	28353.96	28336.52	25542	25542.44	25526.93	1 ~ 26aa
31	28320	28319.95	28302.54	25508	25508.43	25492.96	1 ~ 26aa
32	27966	27966.42	27949.22	25264	25264.1	25248.78	1 ~ 26aa
33	28008	28008.46	27991.23	25306	25306.13	25290.79	1 ~ 26aa
34	28038	28038.48	28021.24	25336	25336.16	25320.8	1 ~ 26aa
35	28054	28054.48	28037.23	25352	25352.16	25336.79	1 ~ 26aa
36	28355	28354.99	28337.55	25543	25543.47	25527.96	1 ~ 26aa
37	28110	28109.56	28092.29	25407	25407.24	25391.85	1 ~ 26aa
38	28052	28051.59	28034.4	25367	25367.3	25351.91	1 ~ 26aa
39	27970	27970.45	27953.24	25268	25268.12	25252.8	1 ~ 26aa
40	28122	28121.62	28104.32	25419	25419.29	25403.88	1 ~ 26aa
41	28326	28325.95	28308.52	25514	25514.43	25498.93	1 ~ 26aa
42	28038	28038.48	28021.24	25336	25336.16	25320.8	1 ~ 26aa
43	28122	28121.62	28104.32	25391	25391.24	25375.85	1 ~ 26aa
44	28313	28312.87	28295.46	25501	25501.35	25485.87	1 ~ 26aa
45	28339	28338.99	28321.54	25527	25527.47	25511.95	1 ~ 26aa
46	28333	28332.9	28315.46	25487	25487.36	25471.89	1 ~ 26aa
47	28240	28239.62	28222.26	25455	25455.24	25439.83	1 ~ 26aa
48	28361	28360.96	28343.49	25515	25515.42	25499.92	1 ~ 26aa
49	28058	28057.57	28040.32	25355	25355.25	25339.88	1 ~ 26aa
50	28257	28256.88	28239.48	25445	25445.36	25429.89	1 ~ 26aa
51	28355	28354.99	28337.54	25543	25543.47	25527.95	1 ~ 26aa
52	28044	28043.5	28026.27	25341	25341.18	25325.82	1 ~ 26aa
53	28210	28209.74	28192.41	25487	25487.36	25471.89	1 ~ 26aa
54	28067	28066.54	28049.28	25364	25364.22	25348.84	1 ~ 26aa
55	28127	28126.68	28109.39	25424	25424.36	25408.95	1 ~ 26aa
56	28243	28242.82	28225.44	25458	25458.37	25442.9	1 ~ 26aa
57	28024	28024.46	28007.22	25322	25322.13	25306.78	1 ~ 26aa
58	28304	28303.9	28286.47	25458	25458.37	25442.9	1 ~ 26aa
59	28044	28043.5	28026.27	25341	25341.18	25325.82	1 ~ 26aa

60	28303	28302.96	28285.53	25491	25491.44	25475.94	1 ~ 26aa
61	28161	28160.99	28143.65	25513	25512.82	25497.28	1 ~ 25aa
62	28355	28354.99	28337.54	25515	25515.42	25499.92	1 ~ 26aa
63	28327	28326.94	28309.51	25515	25515.42	25499.92	1 ~ 26aa
64	28051	28050.54	28033.28	25348	25348.21	25332.83	1 ~ 26aa
65	28327	28326.94	28309.51	25515	25515.42	25499.92	1 ~ 26aa
66	28329	28329.04	28311.58	25518	25517.52	25502	1 ~ 26aa
67	28299	28298.88	28281.48	25487	25487.36	25471.89	1 ~ 26aa
68	28053	28052.51	28035.26	25350	25350.19	25334.81	1 ~ 26aa

[269] [표13]

GES 단백질의 질량 데이터

Sub types	전장 GES 단백질			전장 GES 단백질 (이황화결합포함)			활성형 단백질			활성형 단백질 (이황화결합포함)		
	D a	평균 분자 량	단일동 위원소 질량	D a	평균 분자 량	단일동 위원소 질량	D a	평균 분자 량	단일동 위원소 질량	D a	평균 분자 량	단일동 위원소 질량
1	3115 1 1 5 4	3115 4.48	31134.97	3115 1 1 5 2	3115 2.46	31132.95	2921 9 2 1 7	2921 7.14	29198.92	2921 9 2 1 5	2921 5.12	29196.90
2	3121 1 2 1 2	3121 1.53	31191.99	3120 1 2 1 0	3120 9.51	31189.97	2927 9 2 7 4	2927 4.19	29255.94	2927 9 2 7 2	2927 2.17	29253.92
3	3112 1 1 2 3	3112 3.45	31104.03	3112 1 1 2 1	3112 1.43	31102.01	2918 9 1 8 6	2918 6.11	29167.97	2918 9 1 8 4	2918 4.09	29165.95
4	3115 1 1 5 3	3115 3.48	31134.04	3115 1 1 5 1	3115 1.46	31132.02	2921 9 2 1 6	2921 6.14	29197.99	2921 9 2 1 4	2921 4.12	29195.97
5	3118 1 1 8	3118 4.50	31164.98	3118 1 1 8	3118 2.48	31162.96	2924 9 2 4	2924 7.17	29228.93	2924 9 2 4	2924 5.15	29226.91

	5			2			7			5		
6	3 1 1 8 4	3118 3.56	31164.03	3 1 1 8 2	3118 1.54	31162.01	2 9 2 4 6	2924 6.23	29227.98	2 9 2 4 4	2924 4.21	29225.96
7	3 1 1 5 4	3115 3.54	31134.02	3 1 1 5 2	3115 1.52	31132.00	2 9 2 1 6	2921 6.20	29197.97	2 9 2 1 4	2921 4.18	29195.95
8	3 1 1 9 7	3119 6.56	31177.01	3 1 1 9 5	3119 4.54	31174.99	2 9 2 5 9	2925 9.22	29240.96	2 9 2 5 7	2925 7.20	29238.94
9	3 1 1 8 5	3118 4.50	31164.98	3 1 1 8 2	3118 2.48	31162.96	2 9 2 4 7	2924 7.17	29228.93	2 9 2 4 5	2924 5.15	29226.91
10	3 1 1 2 8	3112 8.40	31108.91	3 1 1 2 6	3112 6.38	31106.89	2 9 2 0 3	2920 3.12	29184.90	2 9 2 0 1	2920 1.10	29182.88
11	3 1 1 6	3116 8.50	31148.98	3 1 1 6	3116 6.48	31146.96	2 9 2 3 3	2923 1.17	29212.93	2 9 2 2 2	2922 9.15	29210.91

	9			6			1			9		
12	3 1 1 3 8	3113 8.48	31118.97	3 1 1 3 6	3113 6.46	31116.95	2 9 2 0 1	2920 1.14	29182.92	2 9 1 9 9	2919 9.12	29180.90
13	3 1 2 1 1	3121 0.59	31191.04	3 1 2 0 9	3120 8.57	31189.02	2 9 2 7 3	2927 3.25	29254.99	2 9 2 7 1	2927 1.23	29252.97
14	3 1 1 9 9	3119 8.53	31178.99	3 1 1 9 7	3119 6.51	31176.97	2 9 2 6 1	2926 1.20	29242.94	2 9 2 5 9	2925 9.18	29240.92
15	3 1 1 7 4	3117 4.47	31154.96	3 1 1 7 2	3117 2.45	31152.94	2 9 2 3 7	2923 7.13	29218.90	2 9 2 3 5	2923 5.11	29216.88
16	3 1 1 8 5	3118 5.49	31165.96	3 1 1 8 3	3118 3.47	31163.94	2 9 2 4 8	2924 8.15	29229.91	2 9 2 4 6	2924 6.13	29227.89
17	3 1 1 6	3116 7.56	31148.03	3 1 1 6	3116 5.54	31146.01	2 9 2 3 3	2923 0.23	29211.98	2 9 2 2 2	2922 8.21	29209.96

	8			6			0			8		
18	3 1 1 9 9	3119 8.53	31178.99	3 1 1 9 7	3119 6.51	31176.97	2 9 2 6 1	2926 1.20	29242.94	2 9 2 5 9	2925 9.18	29240.92
19	3 1 1 8 3	3118 2.53	31163.00	3 1 1 8 1	3118 0.51	31160.98	2 9 2 3 1	2923 1.17	29212.93	2 9 2 2 9	2922 9.15	29210.91
20	3 1 1 9 9	3119 8.53	31178.99	3 1 1 9 7	3119 6.51	31176.97	2 9 2 4 7	2924 7.17	29228.93	2 9 2 4 5	2924 5.15	29226.91
21	3 1 1 5 0	3115 0.49	31130.99	3 1 1 4 8	3114 8.47	31128.97	2 9 2 1 3	2921 3.15	29194.94	2 9 2 1 1	2921 1.13	29192.92
22	3 1 1 5 0	3115 0.47	31131.02	3 1 1 4 8	3114 8.45	31129.00	2 9 2 1 3	2921 3.14	29194.97	2 9 2 1 1	2921 1.12	29192.95
23	3 1 1 5	3115 4.48	31134.97	3 1 1 5	3115 2.46	31132.95	2 9 2 1 1	2921 7.14	29198.92	2 9 2 1 1	2921 5.12	29196.90

	4			2			7			5		
24	3 1 1 5 4	3115 4.42	31134.98	3 1 1 5 2	3115 2.40	31132.96	2 9 2 1 7	2921 7.08	29198.93	2 9 2 1 5	2921 5.06	29196.91
25	3 1 1 8 6	3118 6.48	31166.98	3 1 1 8 4	3118 4.46	31164.96	2 9 2 7 5	2927 5.18	29256.93	2 9 2 7 3	2927 3.16	29254.91
26	3 1 1 6 9	3116 8.50	31148.98	3 1 1 6 6	3116 6.48	31146.96	2 9 2 1 7	2921 7.14	29198.92	2 9 2 1 5	2921 5.12	29196.90
27	3 1 2 1 6	3121 5.52	31195.98	3 1 2 1 4	3121 3.50	31193.96	2 9 2 7 8	2927 8.18	29259.93	2 9 2 7 6	2927 6.16	29257.91
28	3 1 1 8 4	3118 3.52	31163.99	3 1 1 8 2	3118 1.50	31161.97	2 9 2 4 6	2924 6.18	29227.94	2 9 2 4 4	2924 4.16	29225.92
29	3 1 1 5	3115 8.47	31138.96	3 1 1 5	3115 6.45	31136.94	2 9 2 2	2922 1.13	29202.91	2 9 2 1	2921 9.11	29200.89

	8			6			1			9		
30	3 1 1 3 1	3113 1.46	31111.88	3 1 1 2 9	3112 9.44	31109.86	2 9 1 9 4	2919 4.12	29175.83	2 9 1 9 2	2919 2.10	29173.81
31	3 1 1 5 5	3115 4.52	31135.00	3 1 1 5 3	3115 2.50	31132.98	2 9 2 1 7	2921 7.19	29198.95	2 9 2 1 5	2921 5.17	29196.93
32	3 1 2 3 3	3123 3.48	31214.02	3 1 2 3 1	3123 1.46	31212.00	2 9 3 3 8	2933 8.23	29320.02	2 9 3 3 6	2933 6.21	29318.00
33	3 1 1 5 4	3115 3.54	31134.02	3 1 1 5 2	3115 1.52	31132.00	2 9 2 1 6	2921 6.20	29197.97	2 9 2 1 4	2921 4.18	29195.95
34	3 1 1 6 9	3116 9.49	31149.98	3 1 1 6 7	3116 7.47	31147.96	2 9 2 3 2	2923 2.16	29213.93	2 9 2 3 0	2923 0.14	29211.91
35	3 1 1 6	3116 4.50	31145.04	3 1 1 6	3116 2.48	31143.02	2 9 2 2	2922 7.16	29208.99	2 9 2 2	2922 5.14	29206.97

	5			2			7			5		
36	3 1 1 8 4	3118 3.56	31164.03	3 1 1 8 2	3118 1.54	31162.01	2 9 2 4 6	2924 6.23	29227.98	2 9 2 4 4	2924 4.21	29225.96
37	3 1 1 8 8	3118 8.49	31168.97	3 1 1 8 6	3118 6.47	31166.95	2 9 2 5 1	2925 1.16	29232.92	2 9 2 4 9	2924 9.14	29230.90
38	3 1 1 4 0	3113 9.51	31119.99	3 1 1 3 7	3113 7.49	31117.97	2 9 2 0 2	2920 2.17	29183.94	2 9 2 0 0	2920 0.15	29181.92
39	3 1 1 1 2	3111 2.44	31092.95	3 1 1 1 0	3111 0.42	31090.93	2 9 1 7 5	2917 5.10	29156.90	2 9 1 7 3	2917 3.08	29154.88
40	3 1 2 1 3	3121 2.56	31193.01	3 1 2 1 1	3121 0.54	31190.99	2 9 2 6 1	2926 1.20	29242.94	2 9 2 5 9	2925 9.18	29240.92
41	3 1 2 6	3126 4.45	31244.98	3 1 2 6	3126 2.43	31242.96	2 9 3 6 6	2936 9.20	29350.98	2 9 3 6 6	2936 7.18	29348.96

	4			2			9			7		
42	3	3159	31578.21	3	3159	31576.19	2	2966	29642.16	2	2965	29640.14
	1	7.98		1	5.96		9	0.65		9	8.63	
	5			5			6			6		
	9			9			6			5		
	8			6			1			9		
43	3	3120	31180.96	3	3119	31178.94	2	2923	29218.90	2	2923	29216.88
	1	0.50		1	8.48		9	7.13		9	5.11	
	2			1			2			2		
	0			9			3			3		
	1			8			7			5		

[270]

[271] 실시예 8: 임상균주 유래 MBL 단백질들과 GES의 유전형 확인 및 단백질 확인

[272] 임상균주 유래 NDM, IMP, VIM(MBL 단백질)과 GES(Class A 카바페넴

단백질)을 확인하기 위해 CRE(Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae) 양성으로 확인된 균주를 수집하였다. 수집된 균주는 PCR 방법을 사용하여 각각의 유전자에 대한 유전형을 확인하였다.

[273] 유전형이 확인된 균주는 LB 액체배지를 사용하여 배양하였고, SDS-PAGE 겔 분석을 통해 MBL 단백질(NDM, IMP, VIM) 및 GES 단백질의 발현유무를 확인하였다(도 2).

[274] 임상균주 유래 MBL 단백질들과 GES 단백질은 in-gel digestion 방법을 통하여 단백질을 절단하였고, Q-Exactive HF-X plus 장비를 사용하여 Bottom-Up 방법으로 각각을 동정하였다. NDM의 경우, 동정된 펩타이드에 대한 서열범위는 전체 단백질 서열에서는 61.11%(165/270)로, N-말단이 제외된 활성형으로는 65.74%(165/251)로 확인했다. IMP와 VIM의 경우, 동정된 펩타이드에 대한 서열범위는 전체 단백질 서열에서는 각각 22.76%(56/246)과 44.74%(119/266)로, N-말단이 제외된 활성형으로는 각각 24.56%(56/228)와 49.58%(119/240)로 확인했다. 또한, GES의 경우는 동정된 펩타이드를 통하여 전체 단백질 아미노산 서열을 적용하였을 때, 67.25%(193/287)로, 활성형 단백질의 서열을 적용하면 71.75%(193/269)로 각각 확인했다.

[275]

[276] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본

발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 다음의 단계를 포함하는 생물학적 시료 내 카바페넴 항생제(Carbapenem antibiotics)에 대한 내성을 가지는 병원성 균주의 검출 방법:
 (a) 대상체로부터 분리된 생물학적 시료 내에서 병원성 균주가 발현하는 단백질을 분리하는 단계; 및
 (b) 상기 분리된 단백질에 대해 탑-다운(top-down) 질량 분석을 수행하는 단계,
 상기 질량 분석 결과 N-말단의 21개 또는 22개 아미노산 잔기가 제거된 KPC(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) 또는 OXA 카바페넴 분해 효소와 동일한 질량의 단백질이 검출되거나, 또는 N-말단의 18, 19, 20, 21 또는 26개 아미노산 잔기가 제거된 NDM(New Delhi Metallo-beta-lactamase), IMP(imipenemase), VIM(Verona integron-borne metallo-β-lactamase) 및 GES(Guiana extended spectrum β-lactamase)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 카바페넴 분해 효소와 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정한다.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 방법은 상기 단계 (a)에서 분리된 단백질에 대해 이온교환 크로마토그래피를 수행하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서, 상기 이온교환 크로마토그래피는 음이온교환 크로마토그래피, 양이온교환 크로마토그래피 및 이들의 순차적 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 상기 생물학적 시료에 계면활성제를 첨가함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 상기 생물학적 시료에 라이시스 완충액을 추가적으로 첨가함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제 4 항에 있어서, 상기 방법은 상기 단계 (a)와 상기 단계 (b) 사이에 초음파 처리(sonication) 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 MALDI-TOF(Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight) 질량분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight) 질량분석, ESI-TOF(Electrospray ionisation time-of-flight) 질량분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 및 LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry)로 구성된 군으로부터 선택되는 질량분석 방법을 이용하여

이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

- [청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight) 질량분석을 이용하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 카바페넴 분해 효소는 KPC 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 21개 아미노산 잔기가 제거된 KPC 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 카바페넴 분해 효소는 OXA 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 22개 아미노산 잔기가 제거된 OXA 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제 1 항에 있어서, 상기 카바페넴 분해 효소는 NDM 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 19개 또는 20개 아미노산 잔기가 제거된 NDM 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제 1 항에 있어서, 상기 카바페넴 분해 효소는 IMP 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 18 내지 21개 아미노산 잔기가 제거된 IMP 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제 1 항에 있어서, 상기 카바페넴 분해 효소는 VIM 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 25 또는 26개 아미노산 잔기가 제거된 VIM 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제 1 항에 있어서, 상기 카바페넴 분해 효소는 GES 단백질이고, 상기 질량 분석 결과 N-말단의 18개 아미노산 잔기가 제거된 GES 단백질과 동일한 질량의 단백질이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제 1 항에 있어서, 상기 질량 분석 결과 28720, 28746, 28737, 28780, 28678, 28728, 28704, 28806, 28736, 28738, 28688, 28562, 28877, 28676, 28686, 28733, 28690, 28557, 28718, 28963, 28716, 28588, 29105, 28795, 28825, 28769, 29631, 28760, 28656, 28776, 28975, 29086, 28748, 30433, 28730 및

이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량 값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.

- [청구항 16] 제 15 항에 있어서, 상기 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주는 KPC 단백질을 생산하는 균주인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 17] 제 15 항에 있어서, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 16만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 18] 제 15 항 또는 제 17 항에 있어서, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 2만큼 감소된 질량 값을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 19] 제 1 항에 있어서, 상기 질량 분석 결과 28147, 28098, 28117, 27679, 28172, 28158, 28282, 28032, 28048, 28252, 27673, 28190, 28260, 27718, 28126, 27900, 27653, 28002, 28175, 28149, 27877, 28161, 27955, 28151, 28131, 28215, 28191, 27978 및 이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량 값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 20] 제 19 항에 있어서, 상기 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주는 OXA 단백질을 생산하는 균주인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 21] 제 19 항에 있어서, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 16, 32 또는 48만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 22] 제 1 항에 있어서, 상기 질량 분석 결과 26439, 26413, 26438, 26421, 26435, 26467, 26420, 26363, 26587, 26407, 26479, 26381, 26449, 26434, 27043, 26448, 26416, 26465, 26453, 26455, 26466, 26510, 26484, 26509, 26492, 26506, 26538, 26491, 26434, 26658, 26478, 26550, 26452, 26520, 26505, 27114, 26519, 26487, 26536, 26524, 26526, 26537 및 이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량 값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 23] 제 22 항에 있어서, 상기 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주는 NDM 단백질을 생산하는 균주인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 24] 제 22 항에 있어서, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 16 또는 32만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 25] 제 22 항 또는 제 24 항에 있어서, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 14, 28 또는 42 만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 26] 제 22 항 또는 제 24 항에 있어서, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서

238 만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 27] 제 25 항에 있어서, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 238 만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 28] 제 1 항에 있어서, 상기 질량 분석 결과 25113, 25151, 25011, 25080, 25020, 25083, 25025, 24952, 25192, 25161, 24973, 24988, 25078, 25365, 25268, 25006, 25186, 24994, 25043, 24945, 25208, 25000, 24980, 25128, 25216, 24983, 25115, 25112, 25116, 25414, 25205, 25041, 25139, 25254, 25050, 24910, 25101, 25021, 25212, 25073, 24961, 25105, 24831, 25353, 25234, 24995, 25071, 25094, 25351, 25174, 25156, 25199, 25129, 24981, 25018, 25335, 25232, 24872, 24982, 25204, 24796, 25259, 25214, 25085, 25135, 25131, 25141, 25145, 25172, 25126, 24990 및 이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량 값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 29] 제 28 항에 있어서, 상기 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주는 IMP 단백질을 생산하는 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 30] 제 1 항에 있어서, 상기 질량 분석 결과 25322, 25515, 25488, 25391, 25339, 25516, 25464, 25485, 25527, 25531, 25414, 25455, 25421, 25499, 25542, 25129, 25405, 25534, 25446, 25472, 25444, 25298, 25338, 25367, 25355, 25508, 25264, 25306, 25336, 25352, 25543, 25407, 25268, 25419, 25514, 25501, 25487, 25445, 25341, 25364, 25424, 25458, 25491, 25513, 25348, 25518, 25350 및 이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량 값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.

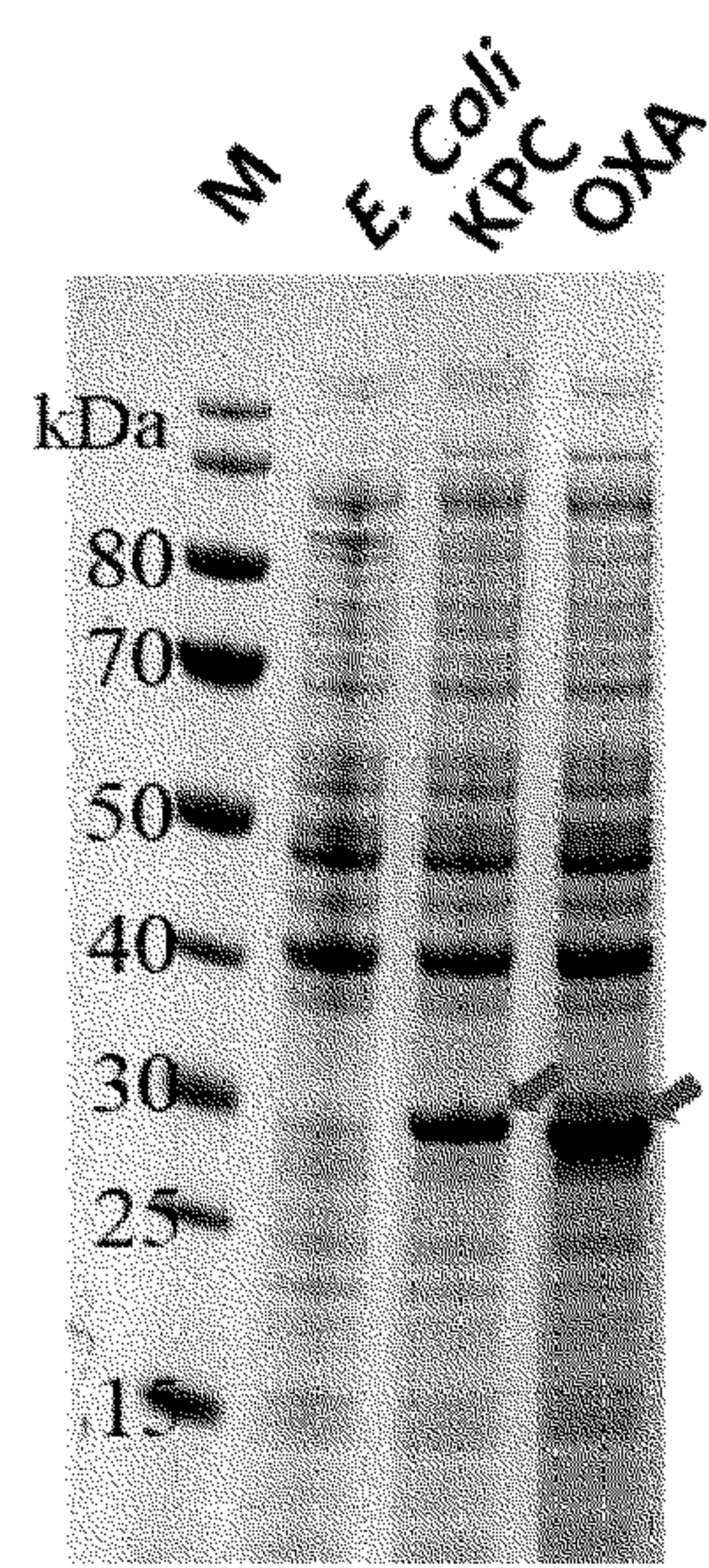
[청구항 31] 제 30 항에 있어서, 상기 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주는 VIM 단백질을 생산하는 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 32] 제 1 항에 있어서, 상기 질량 분석 결과 29217, 29274, 29186, 29216, 29247, 29246, 29259, 29203, 29231, 29201, 29273, 29261, 29237, 29248, 29230, 29213, 29275, 29278, 29221, 29194, 29338, 29232, 29227, 29251, 29202, 29175, 29369, 29661, 및 이들 값의 ± 5 범위 내의 값으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질량 값($m/z \times z$)이 검출된 경우, 상기 생물학적 시료 내에는 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.

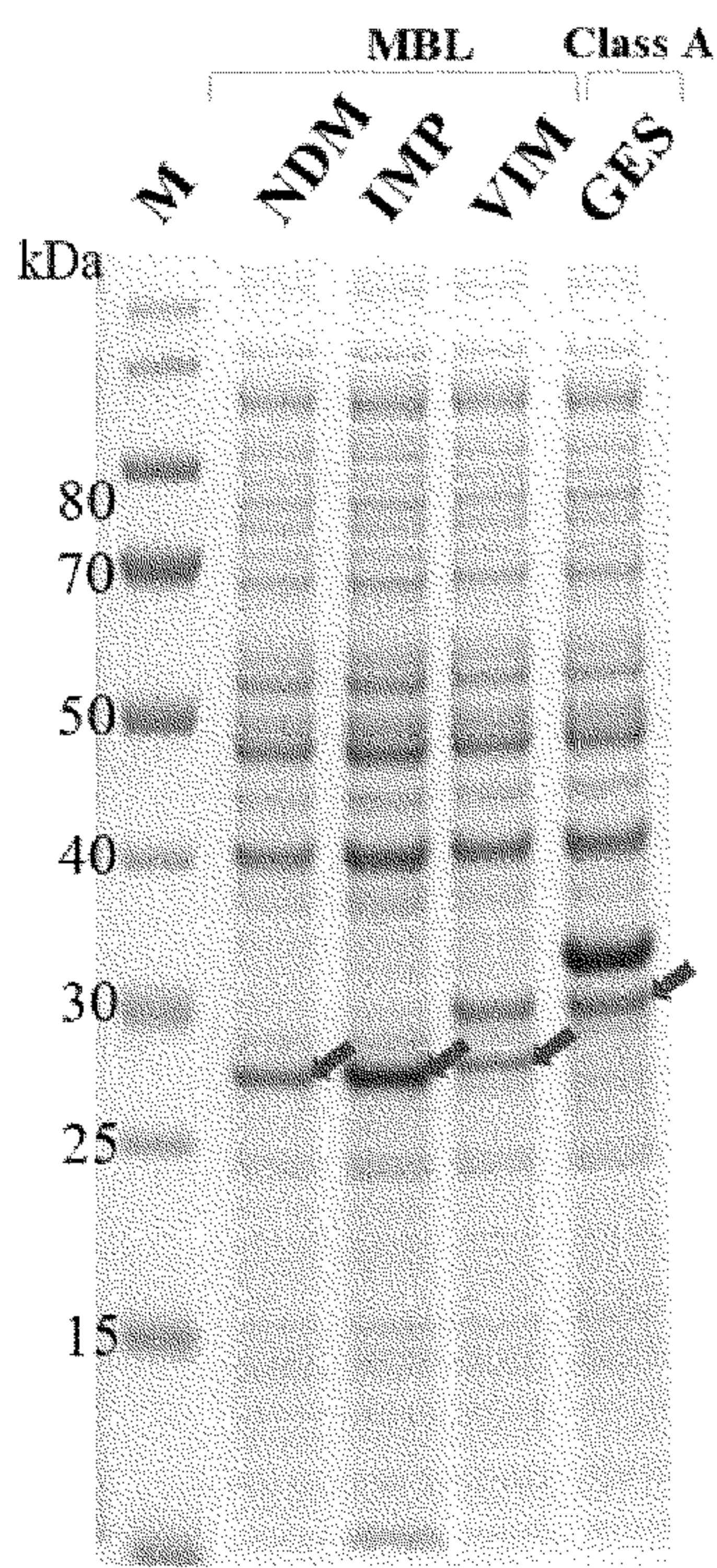
[청구항 33] 제 32 항에 있어서, 상기 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주는 GES 단백질을 생산하는 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

- [청구항 34] 제 32 항에 있어서, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 16 또는 32만큼 증가된 질량 값을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 35] 제 32 항 또는 제 34 항에 있어서, 상기 질량 값($m/z \times z$)은 각 질량 값에서 2만큼 감소된 질량 값을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

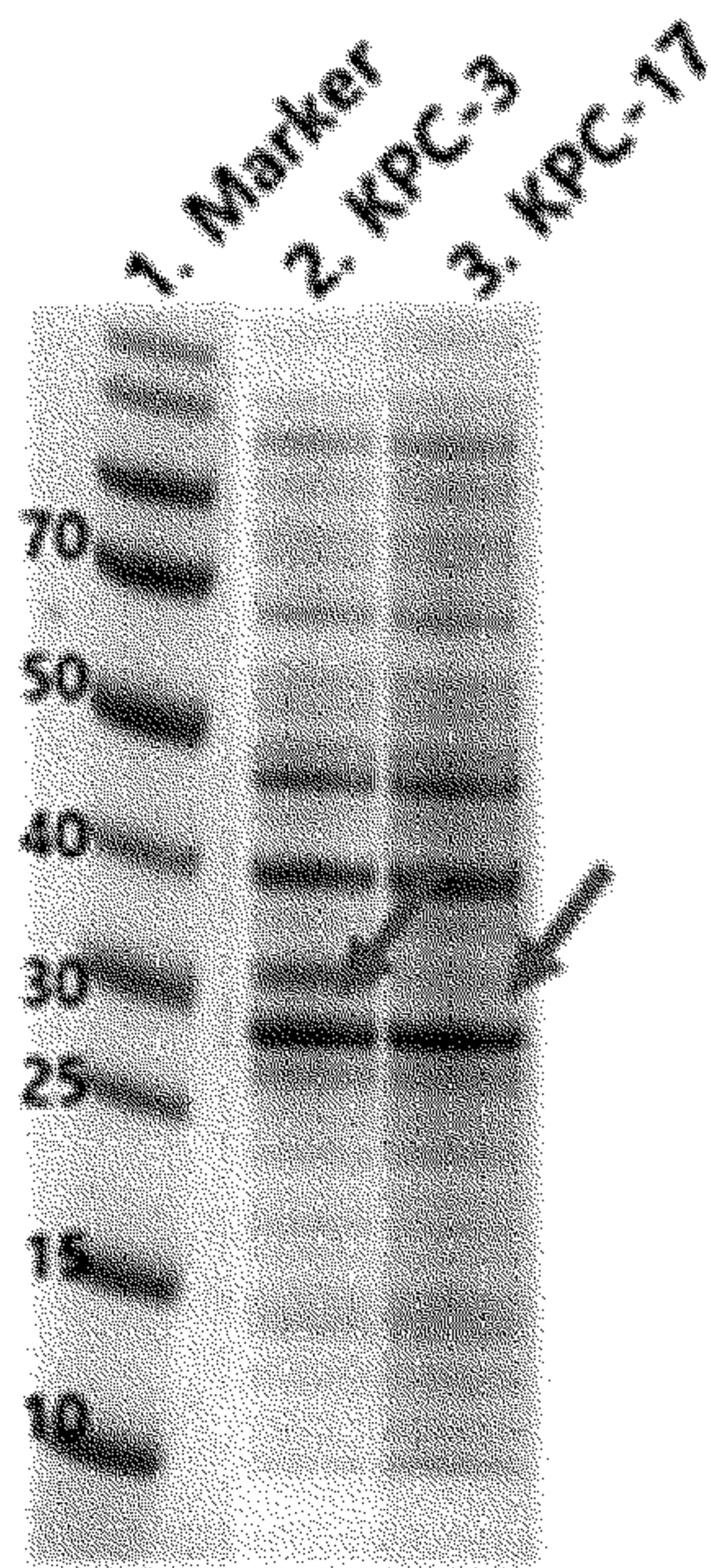
[도 1a]



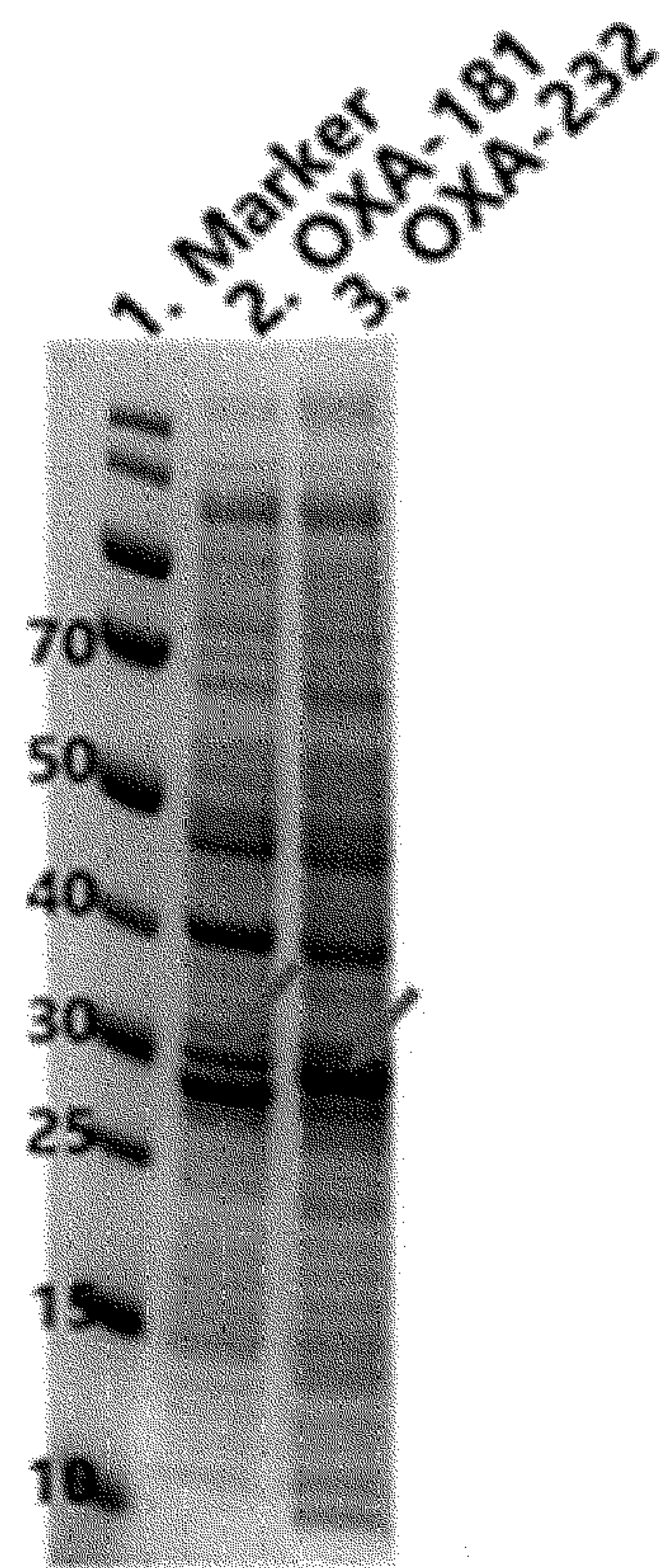
[도 1b]



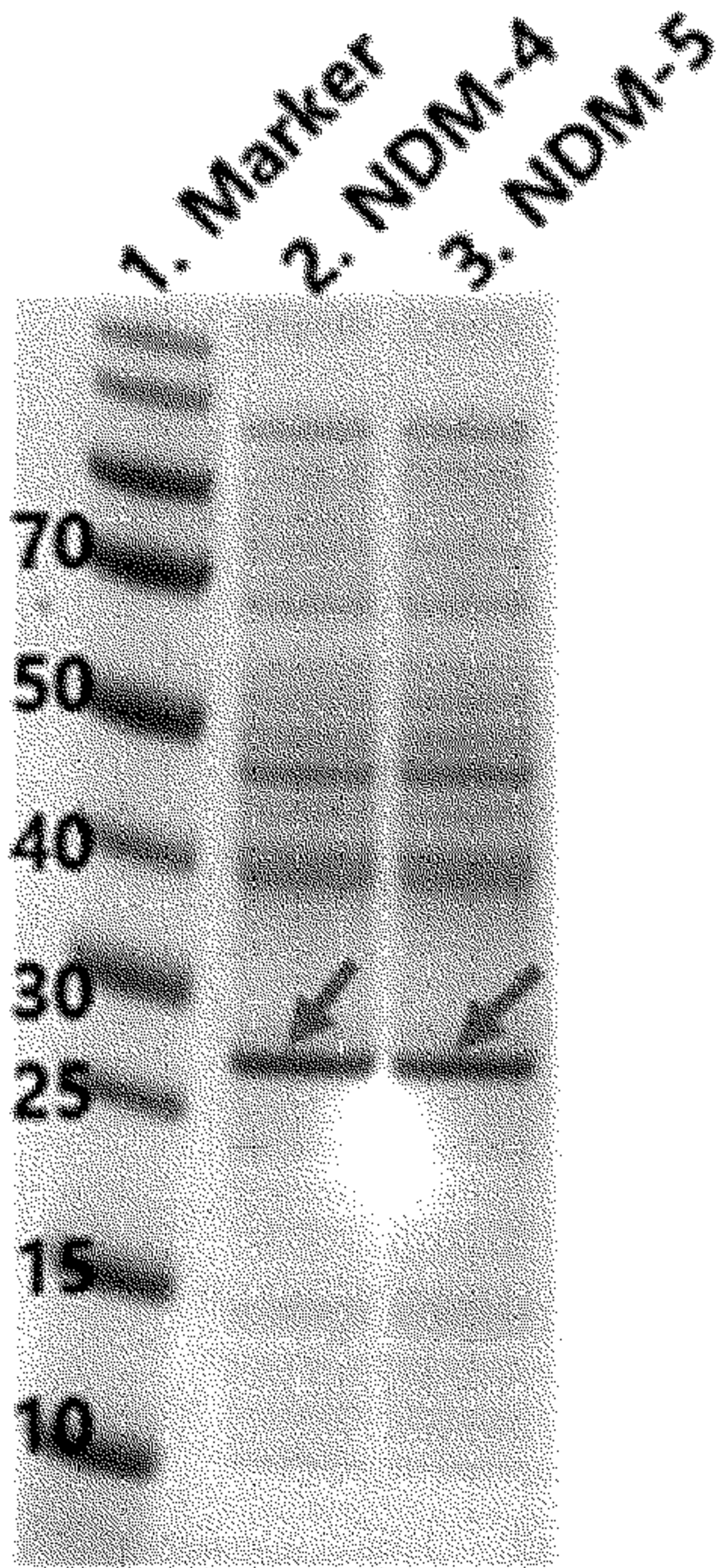
[도1c]



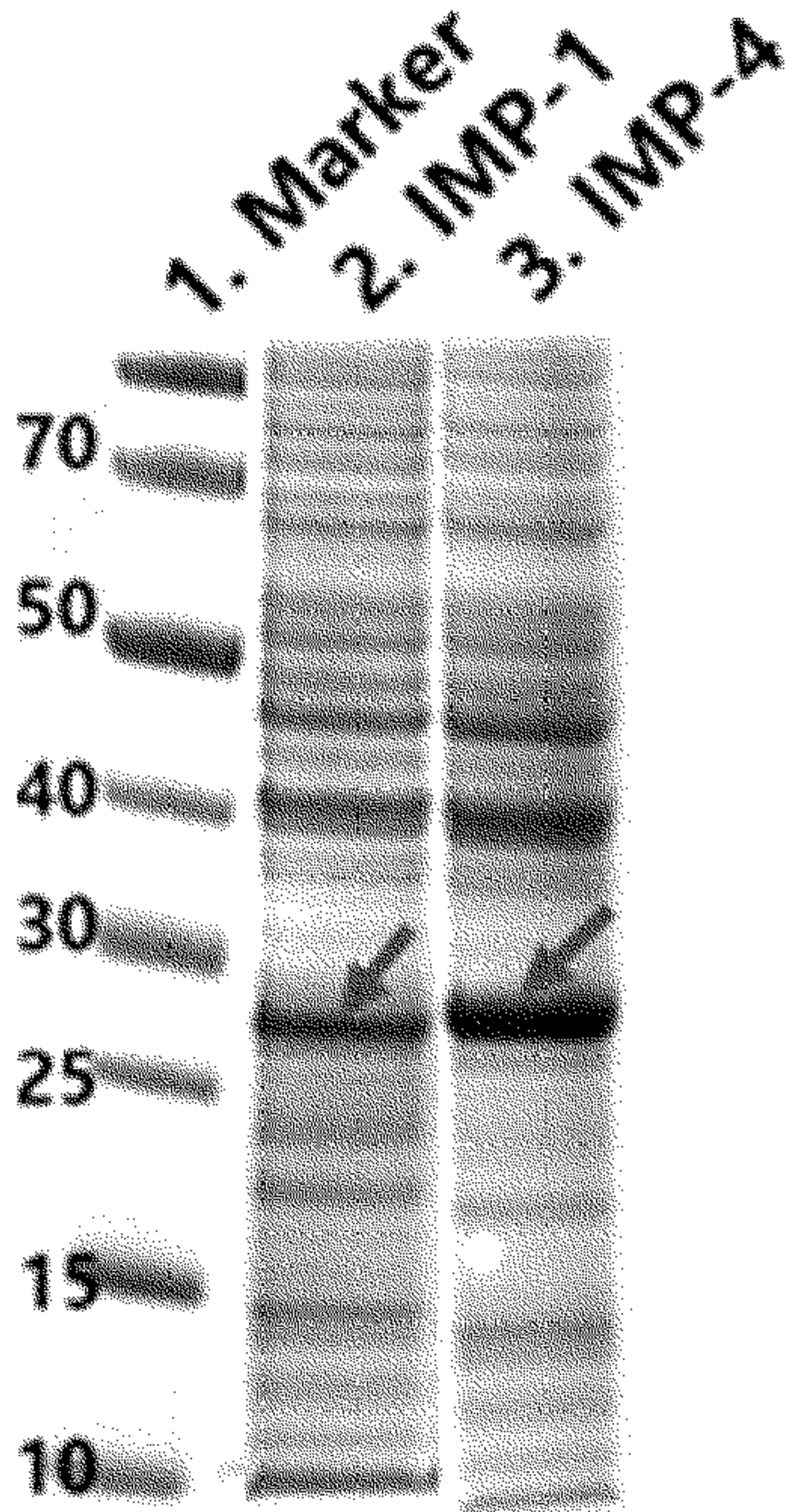
[도1d]



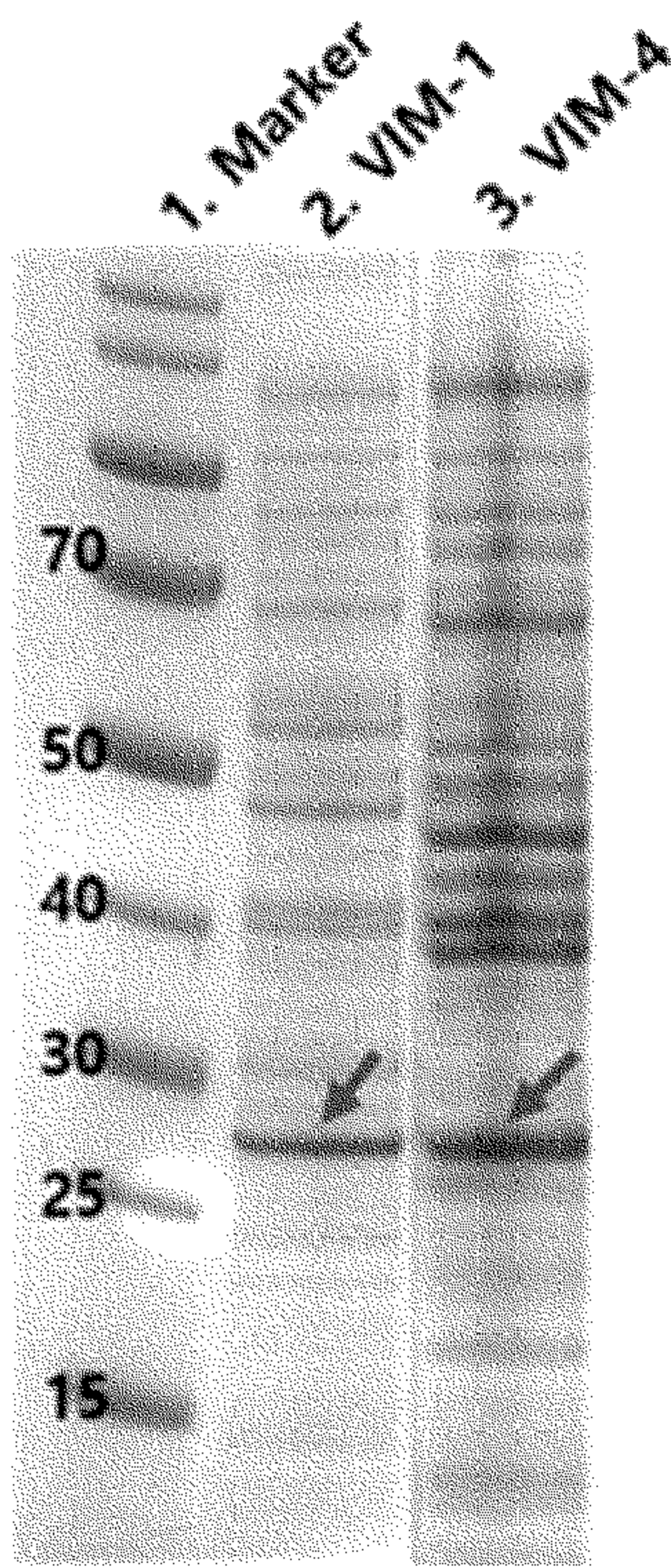
[도1e]



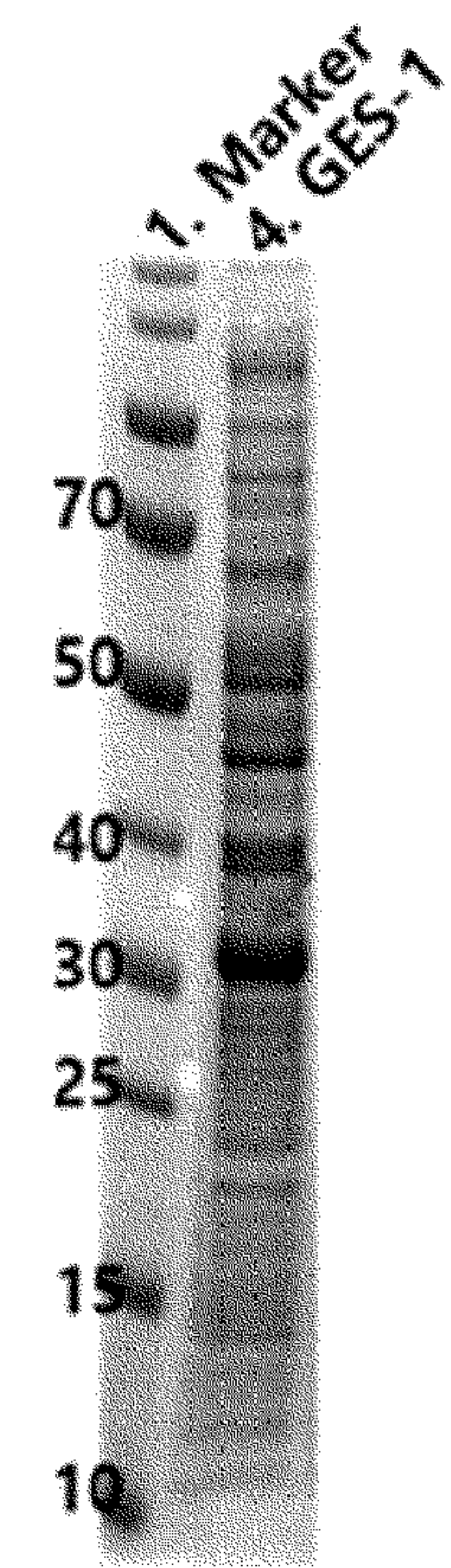
[도1f]



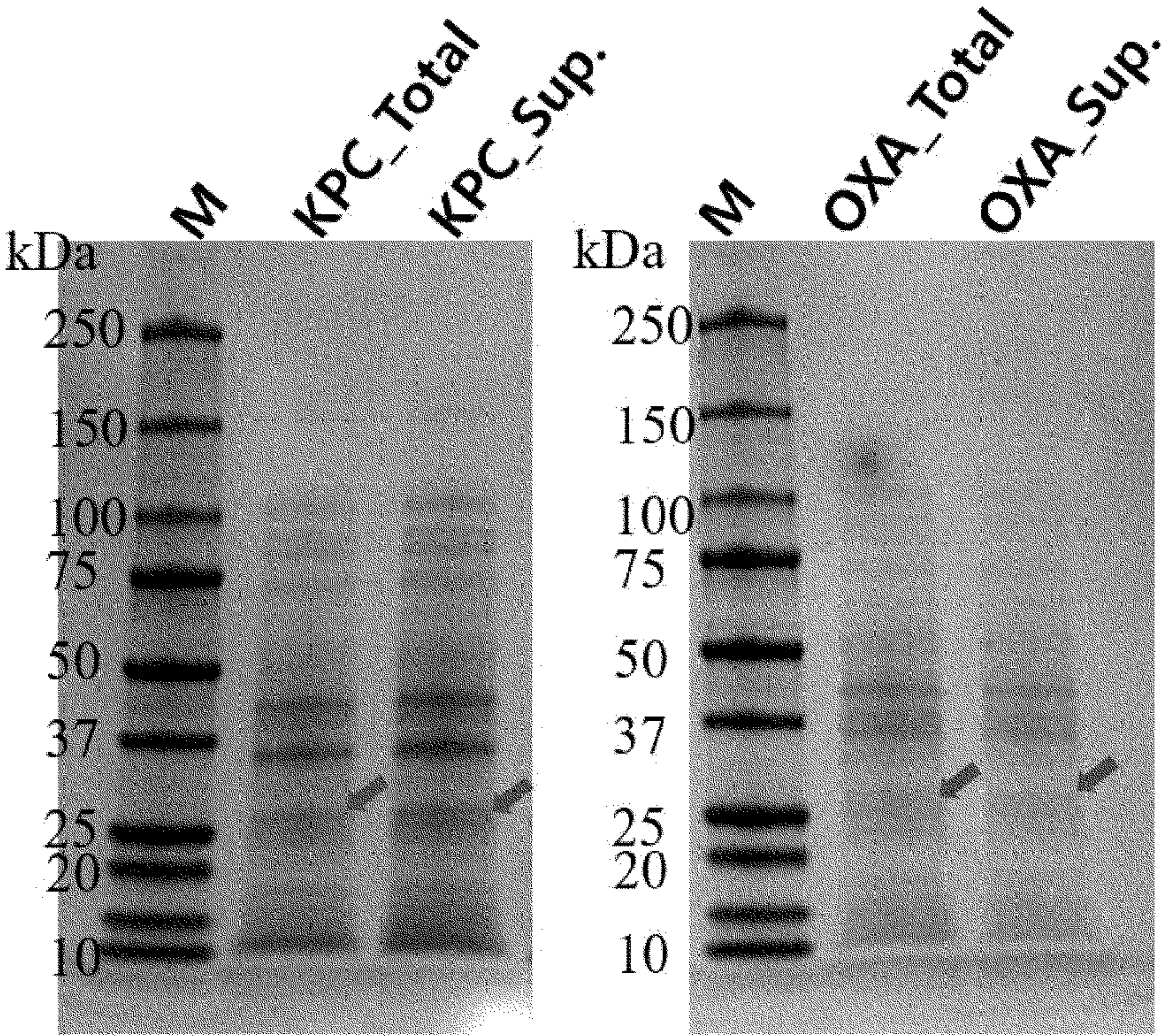
[도 1g]



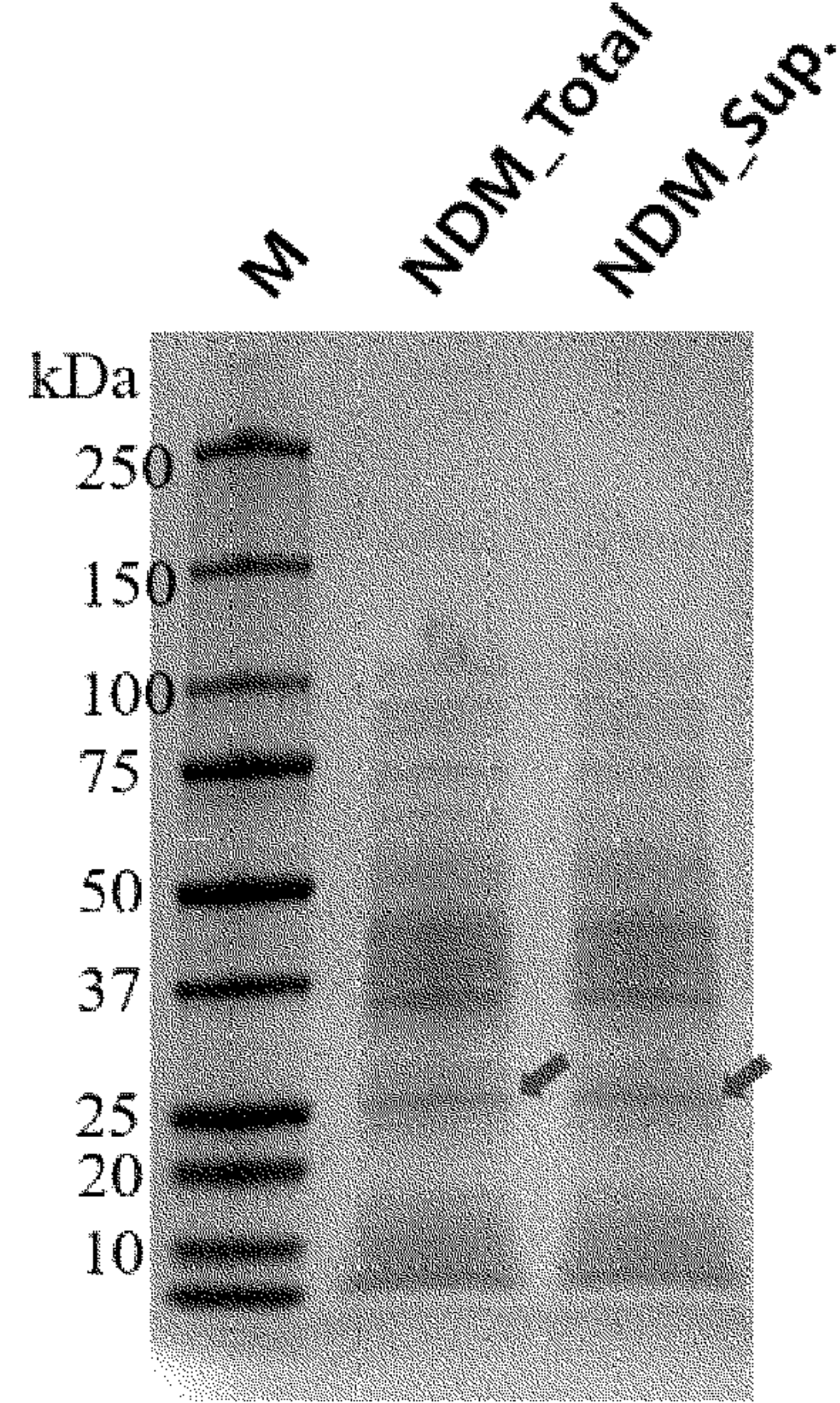
[도 1h]



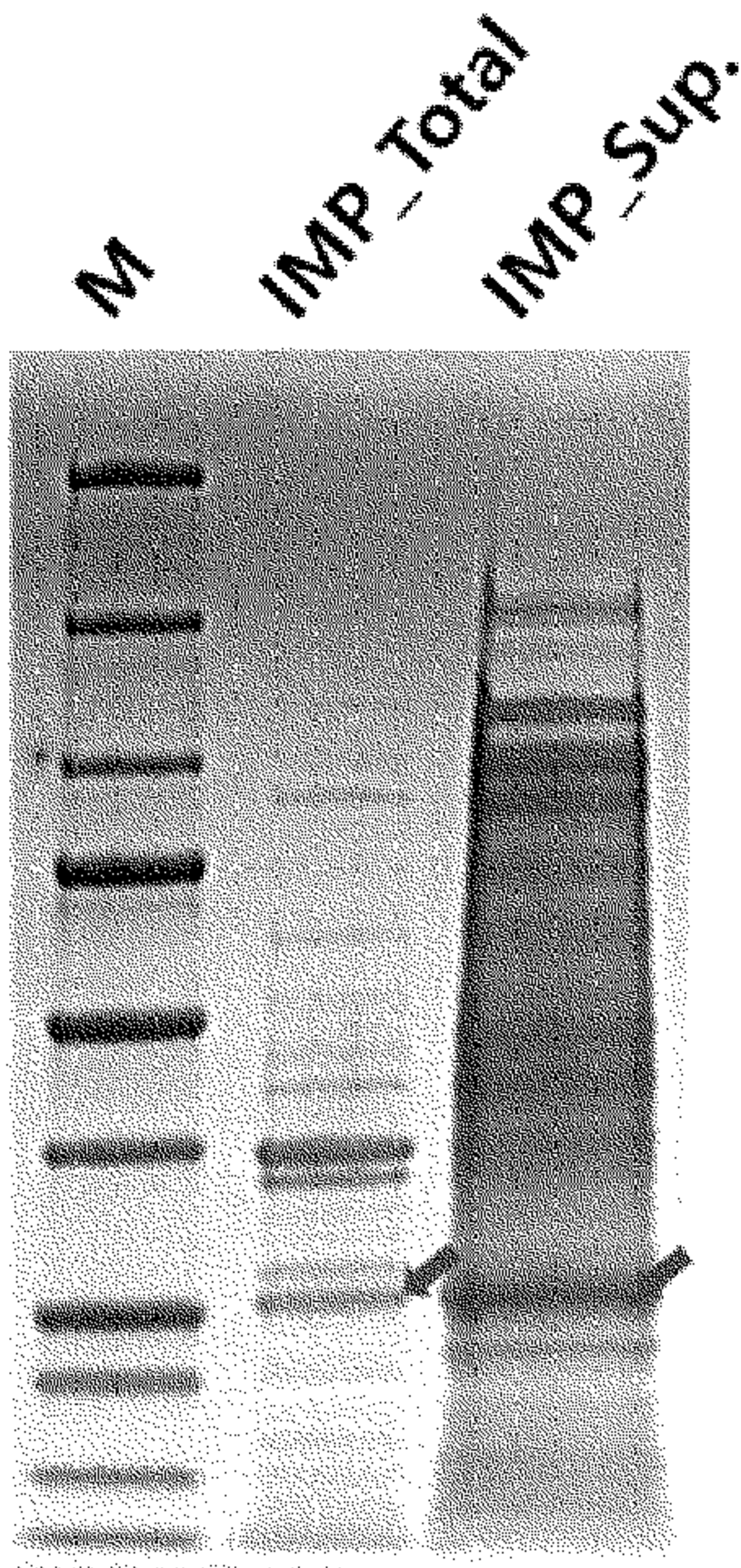
[도2a]



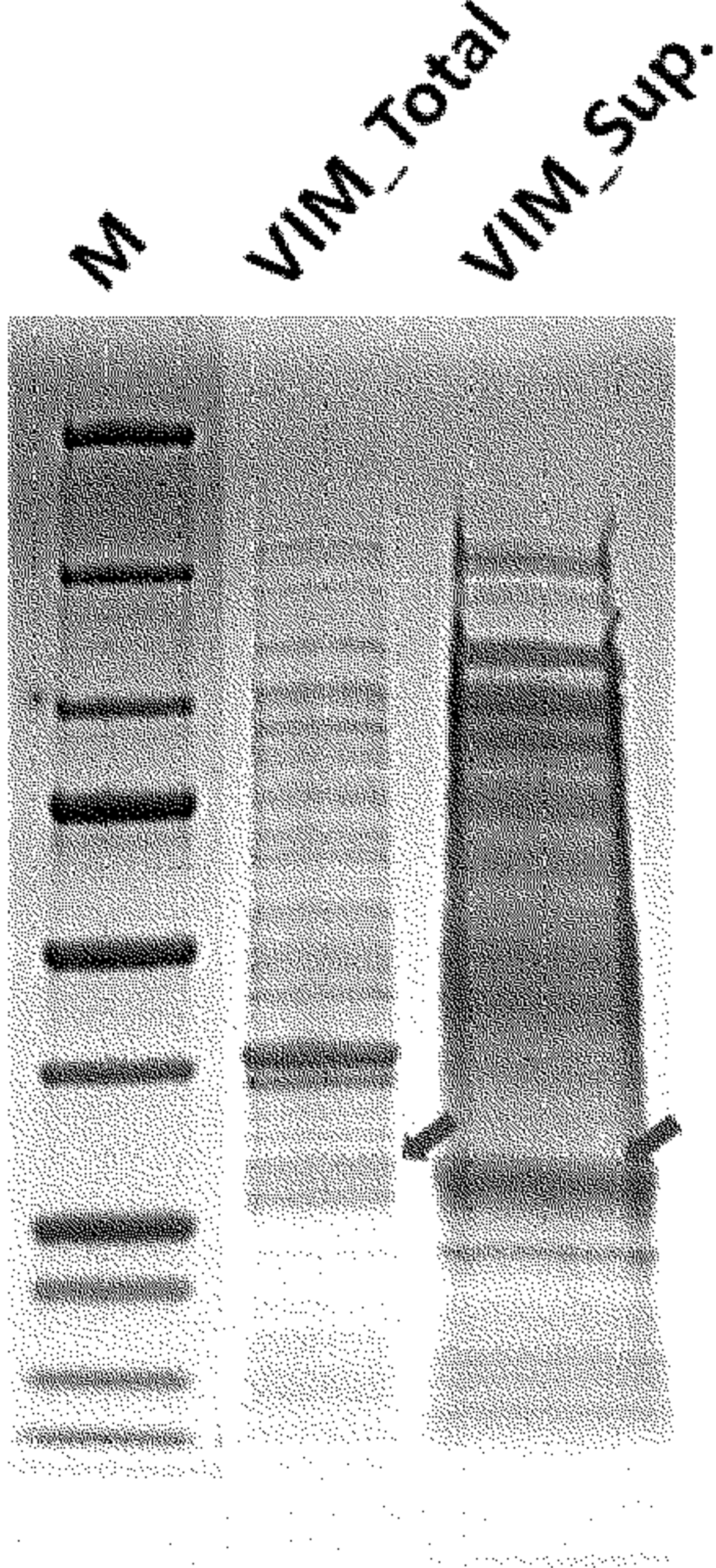
[도2b]



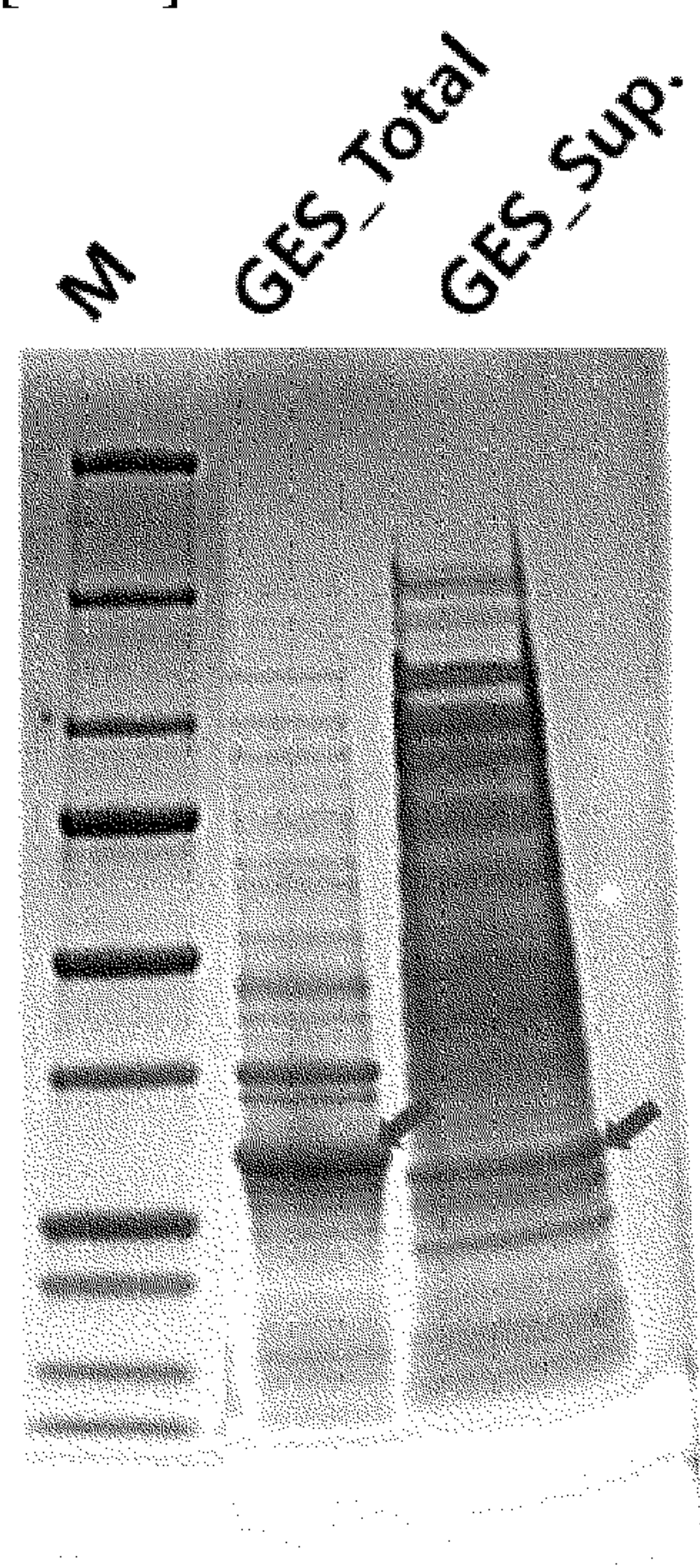
[도2c]



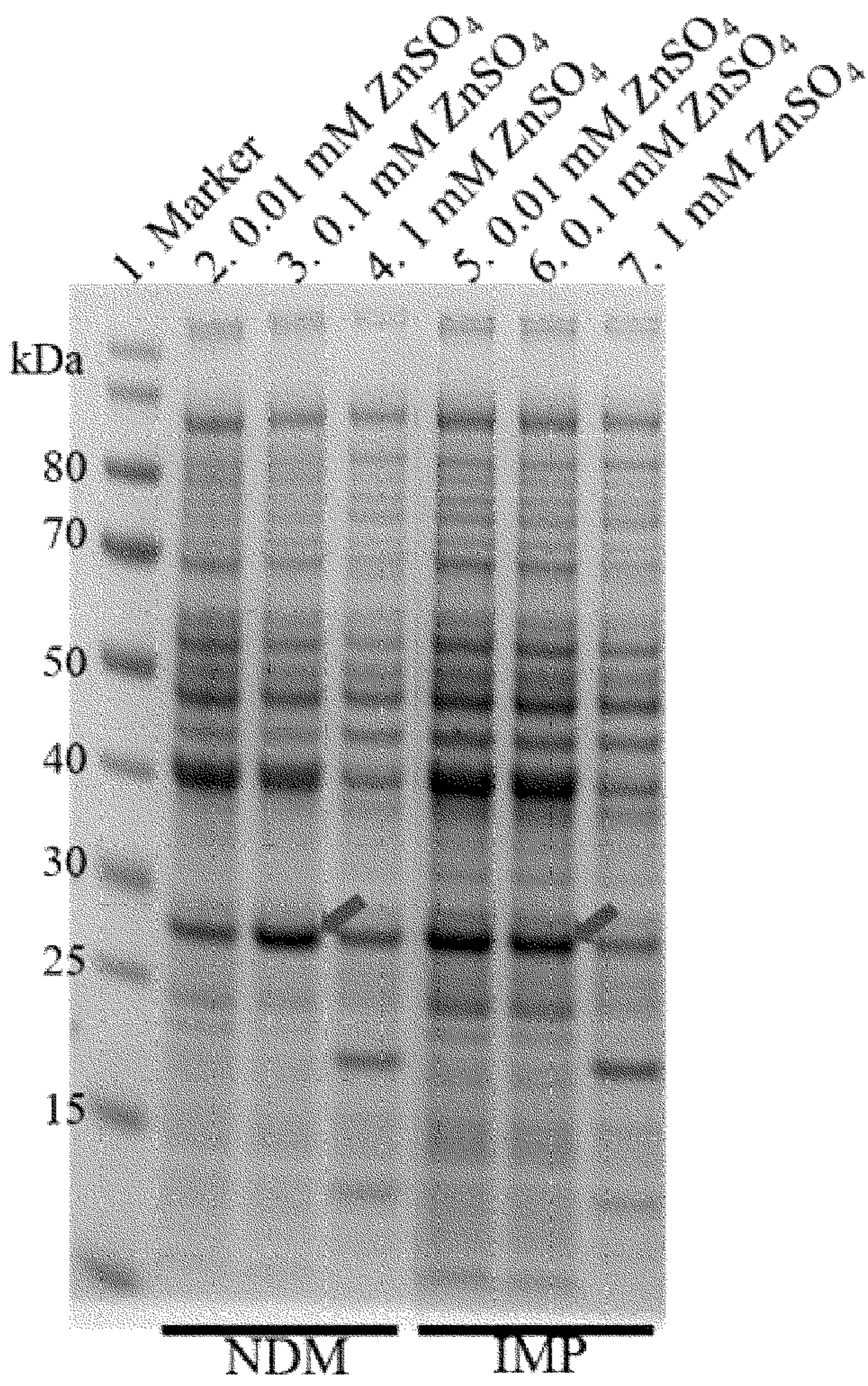
[도2d]



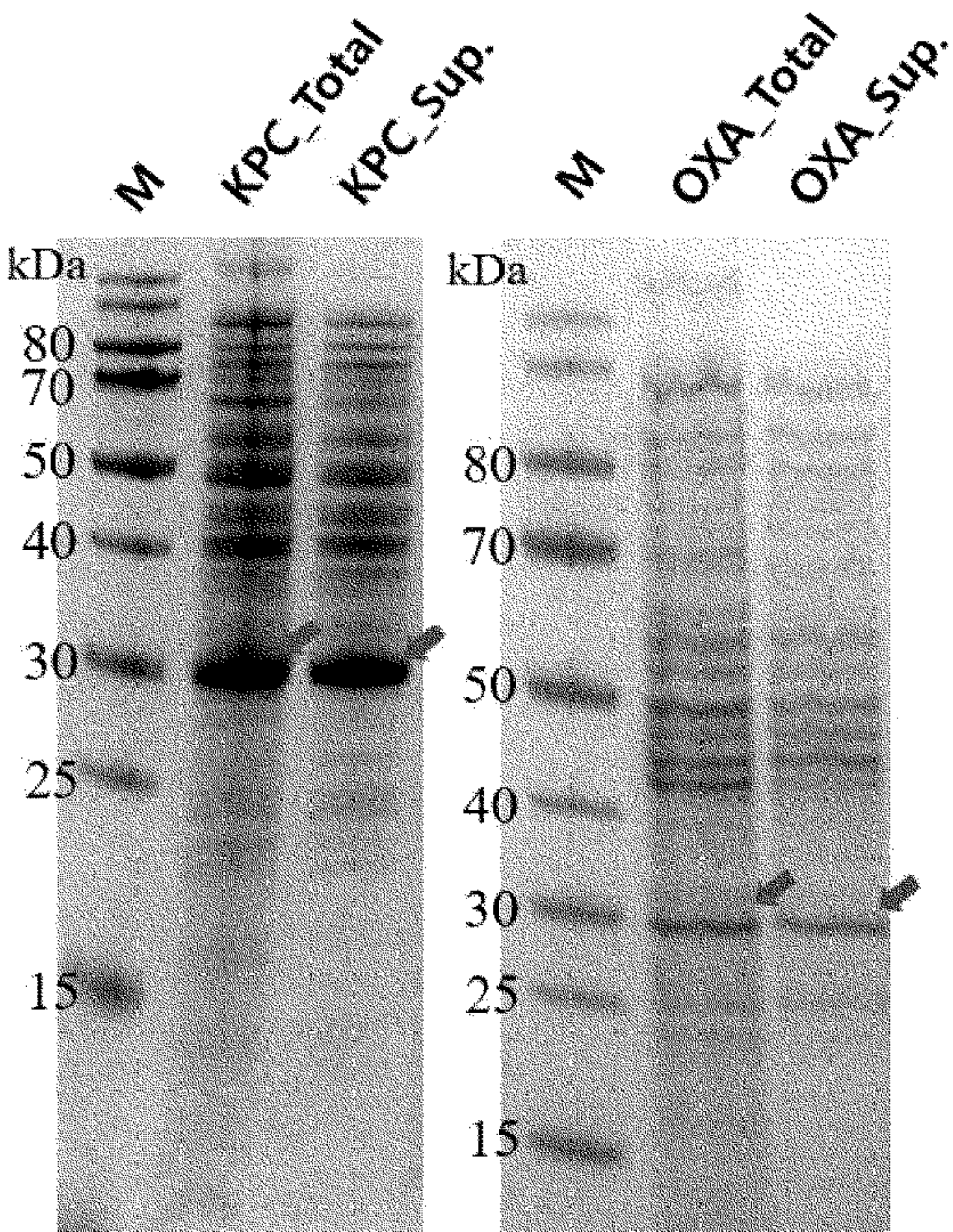
[도2e]



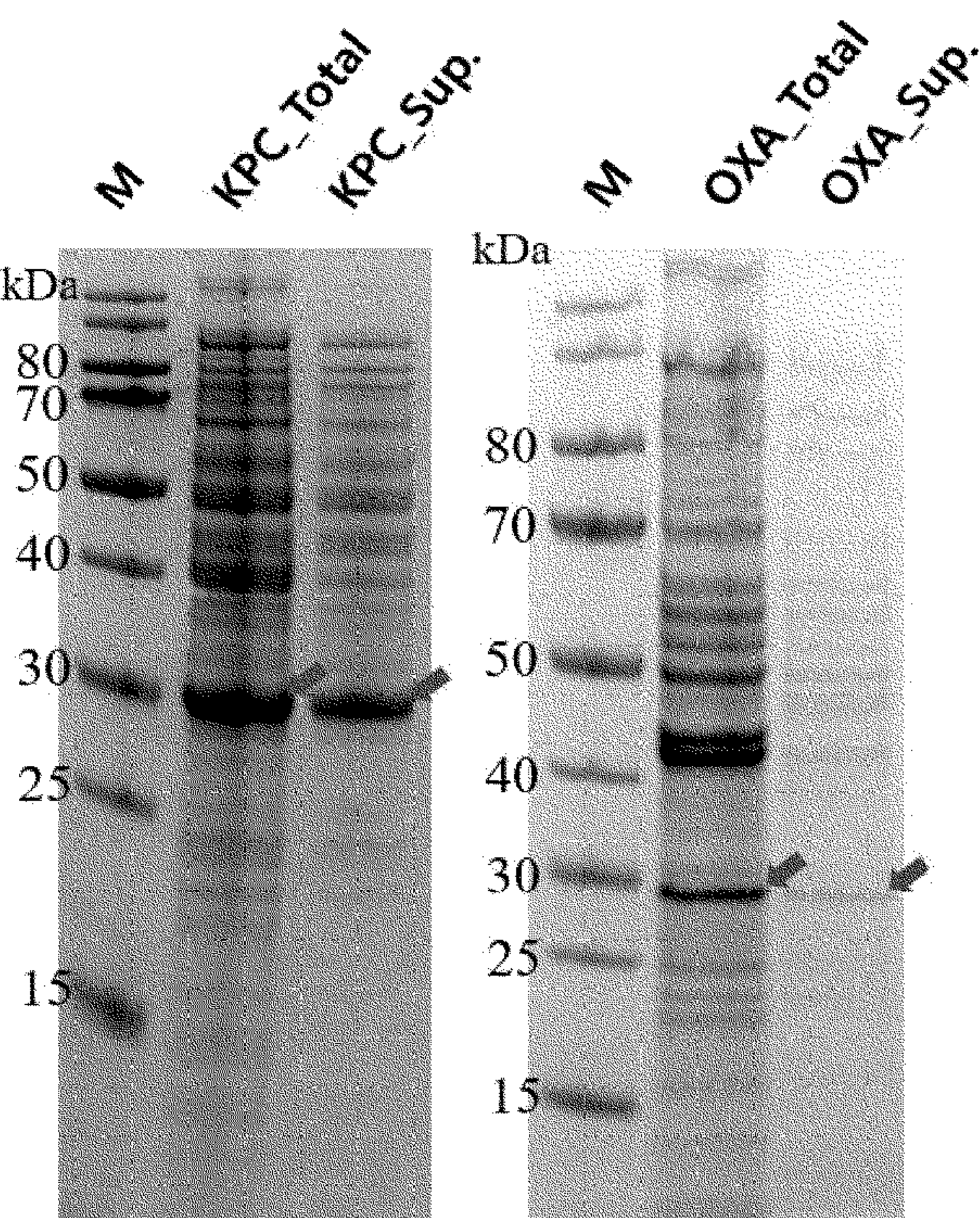
[도3]



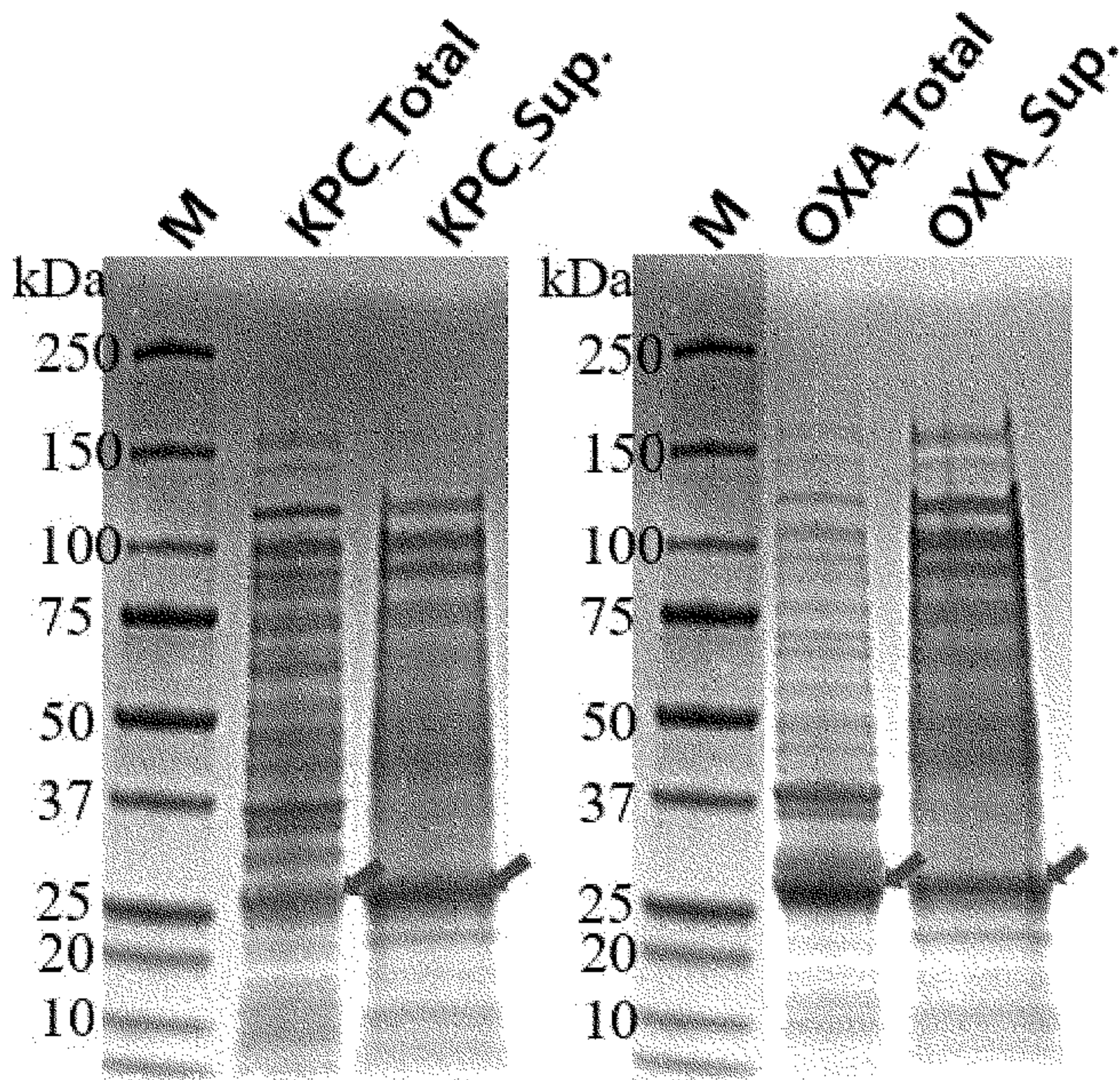
[도4a]



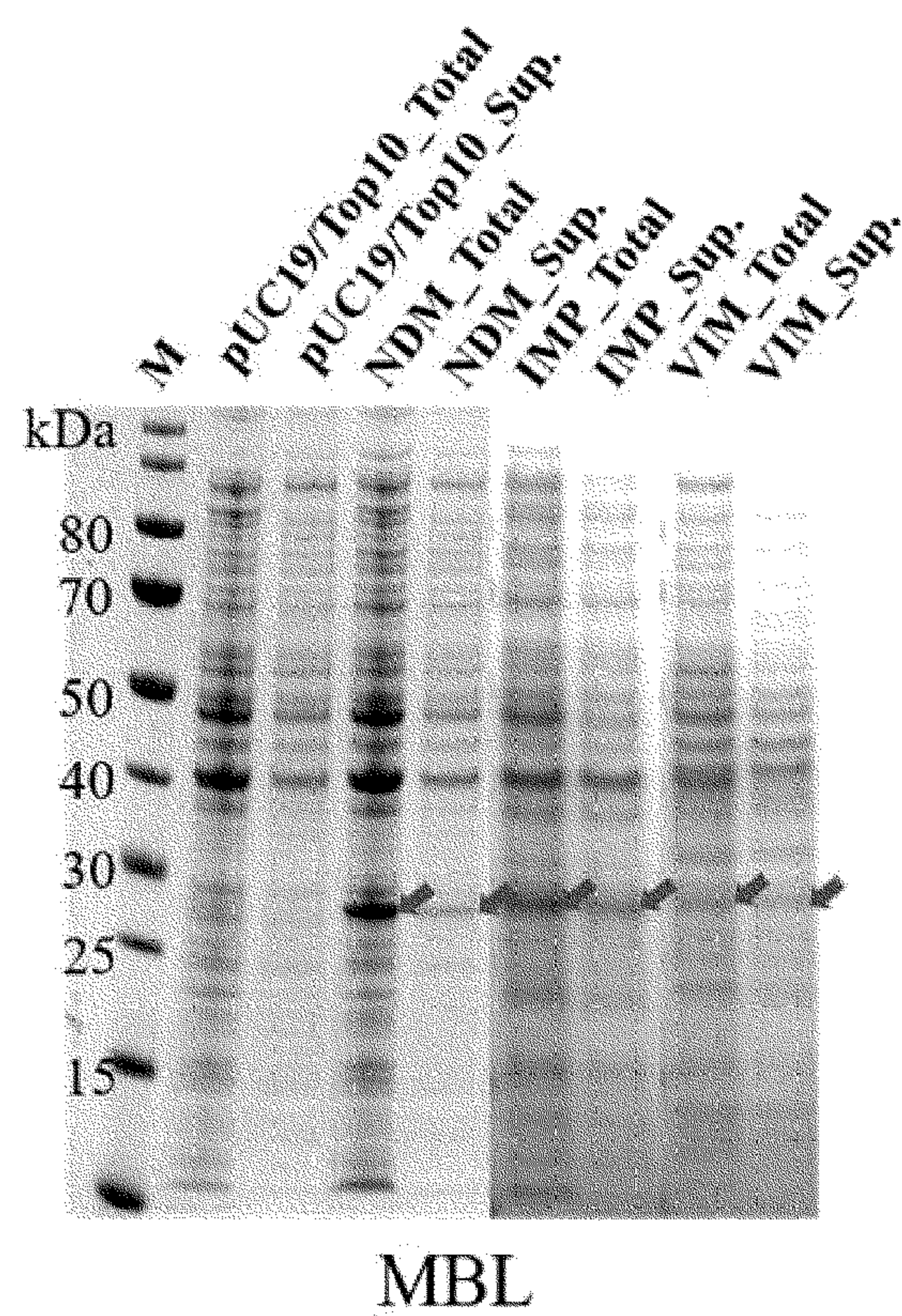
[도4b]



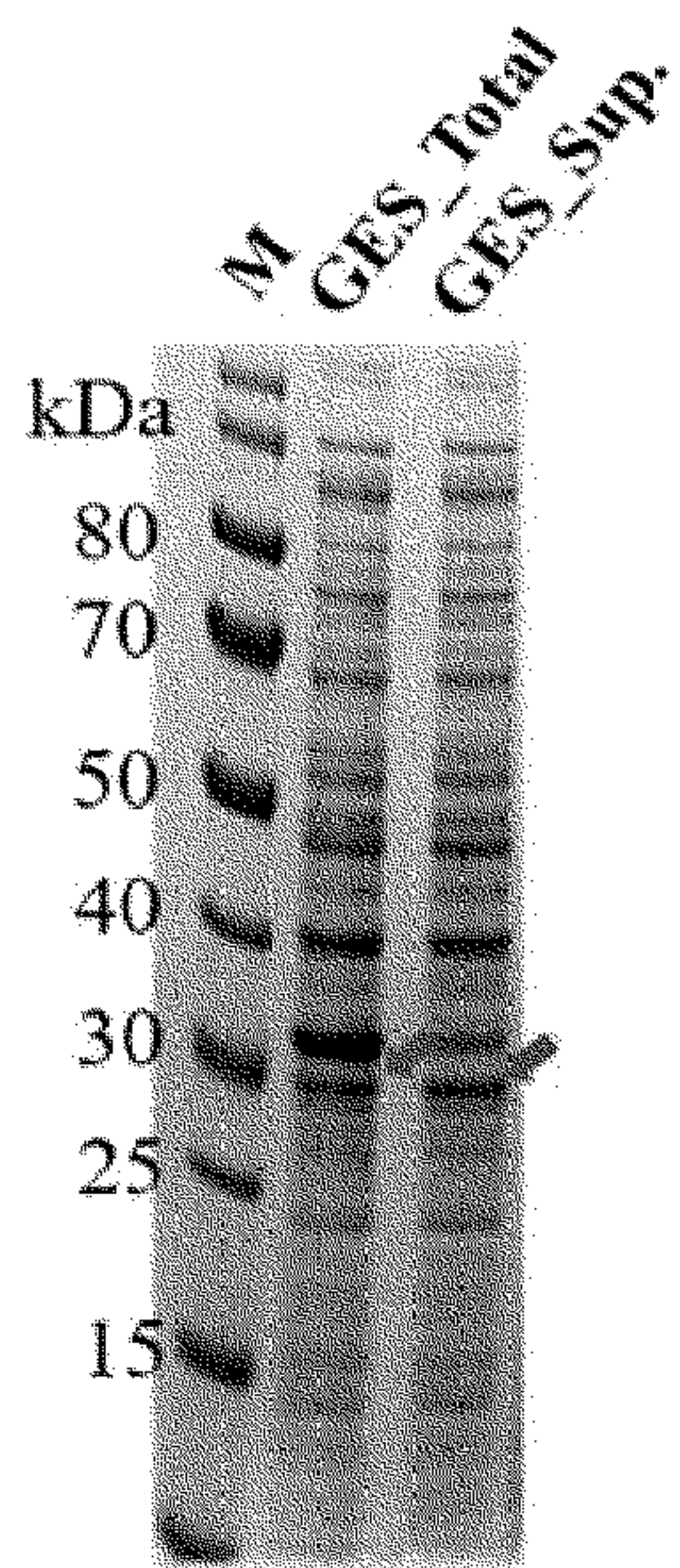
[도4c]



[도4d]

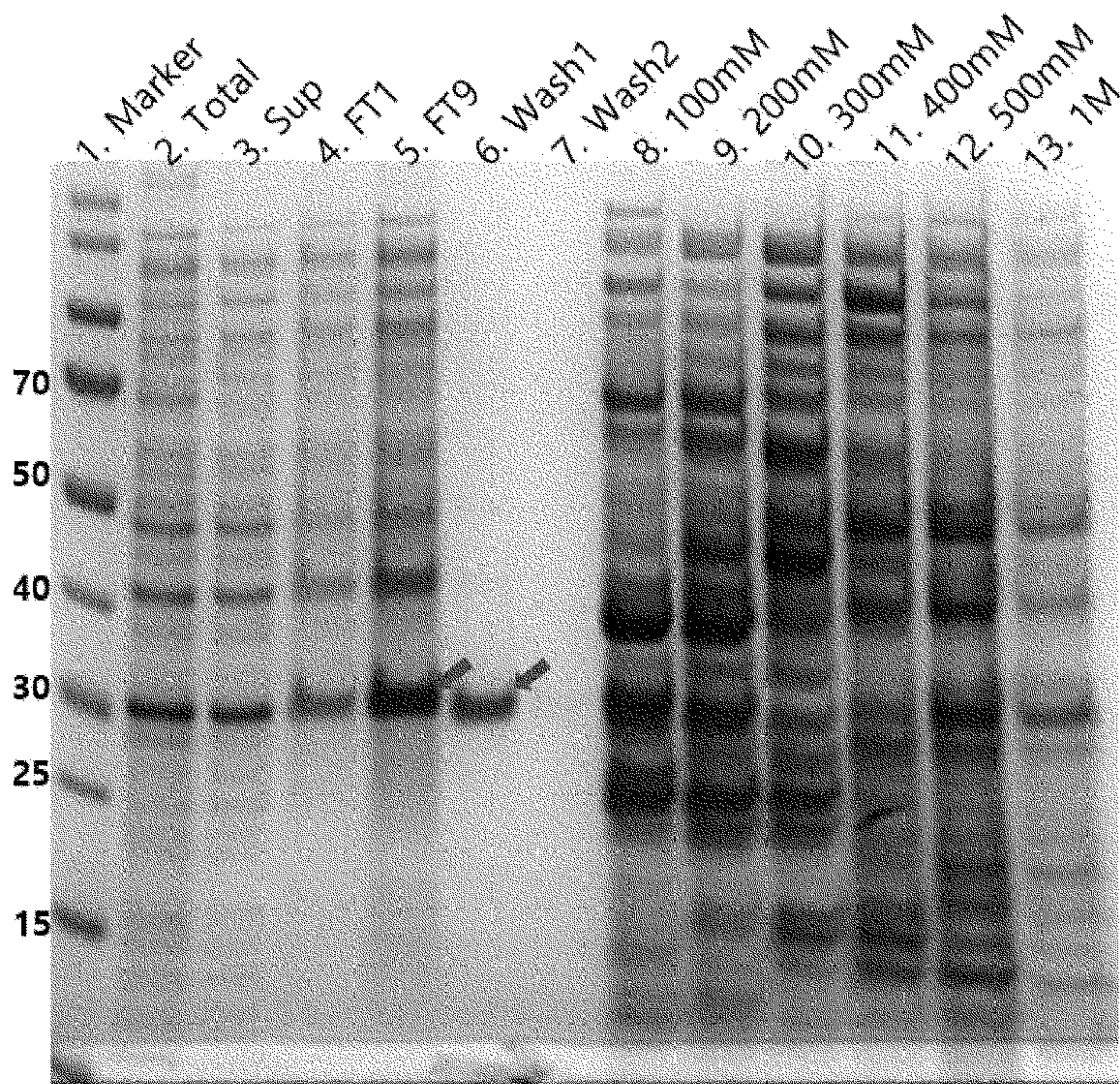


[도4e]

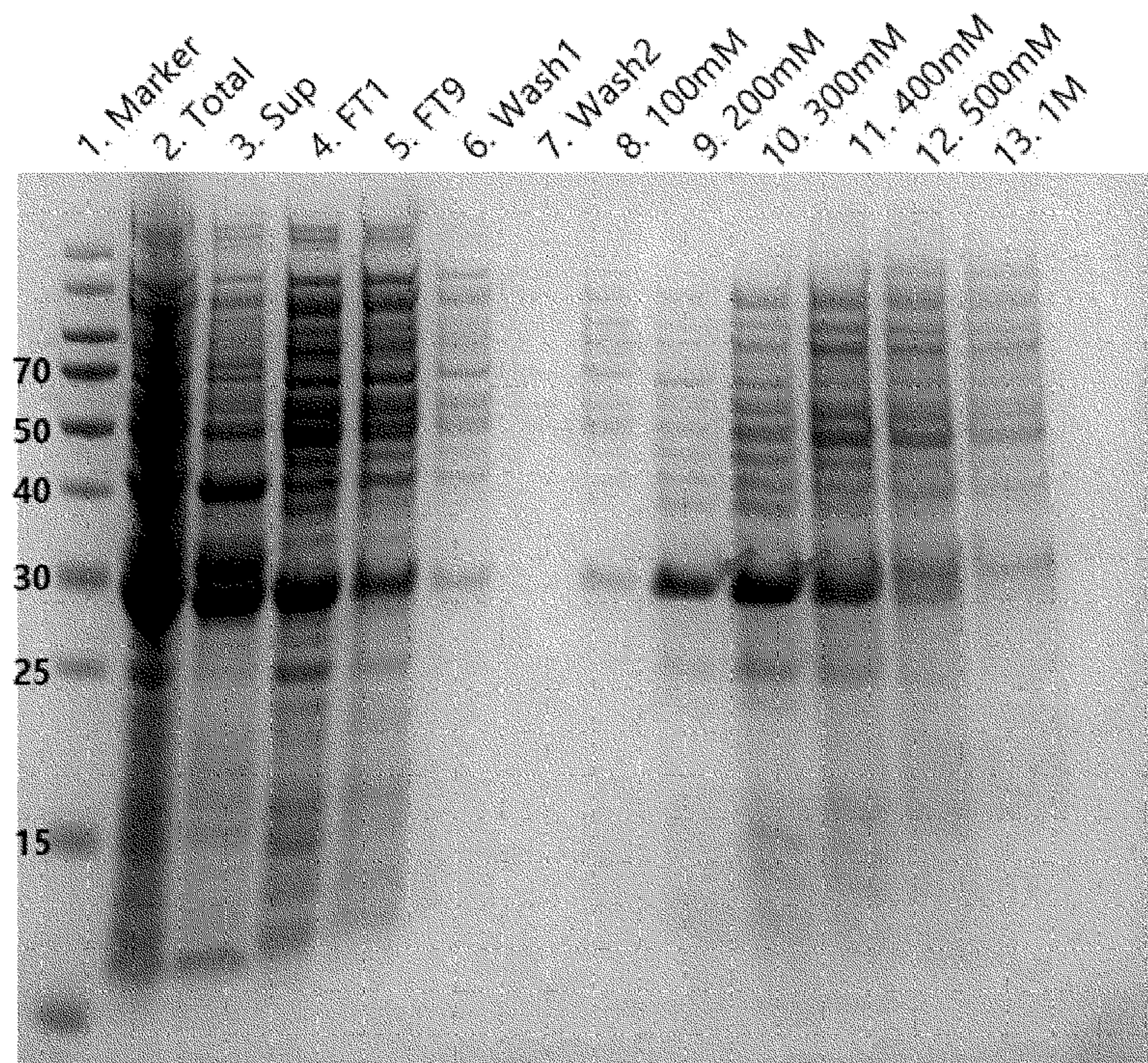


Class A
carbapenemase

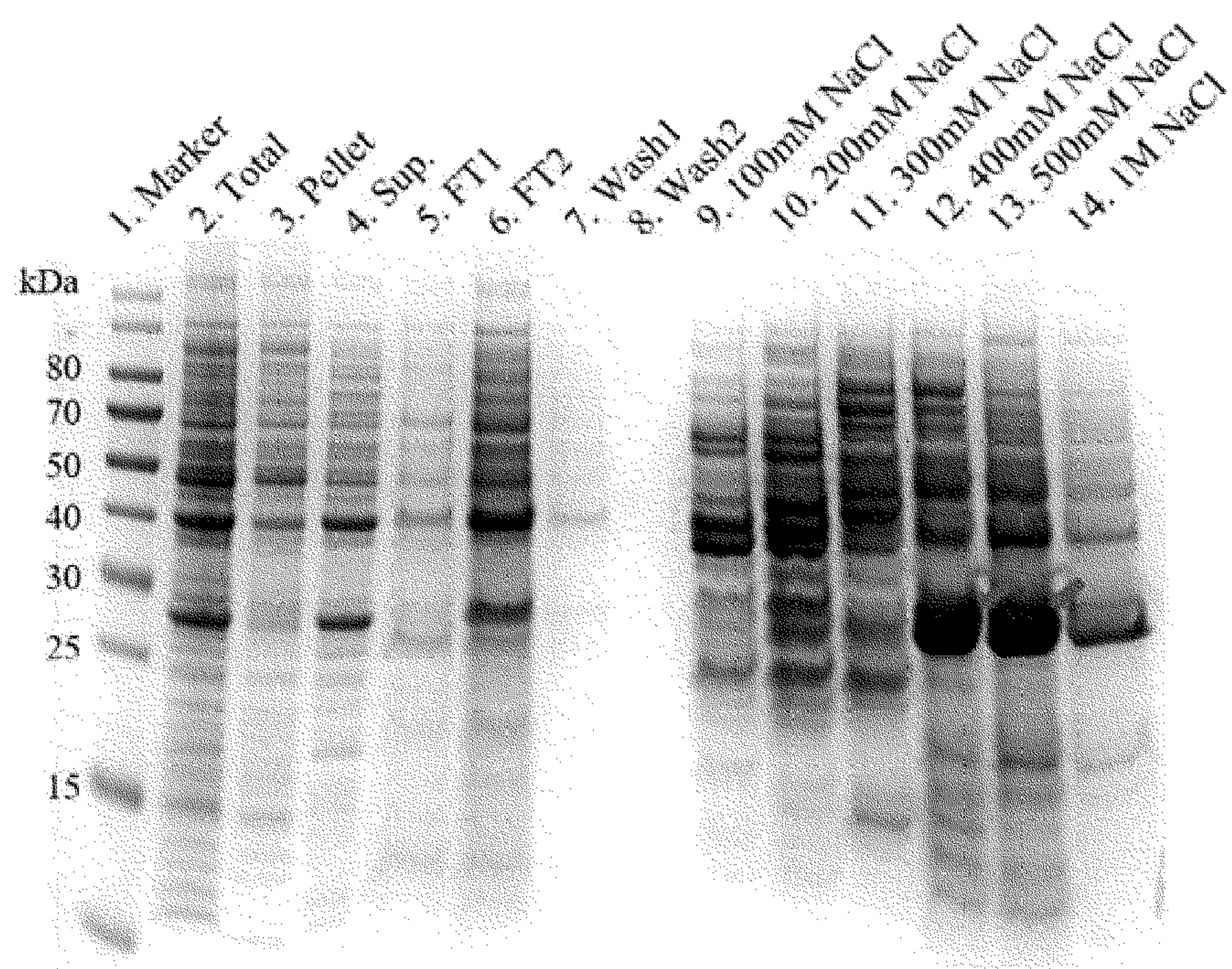
[도5a]



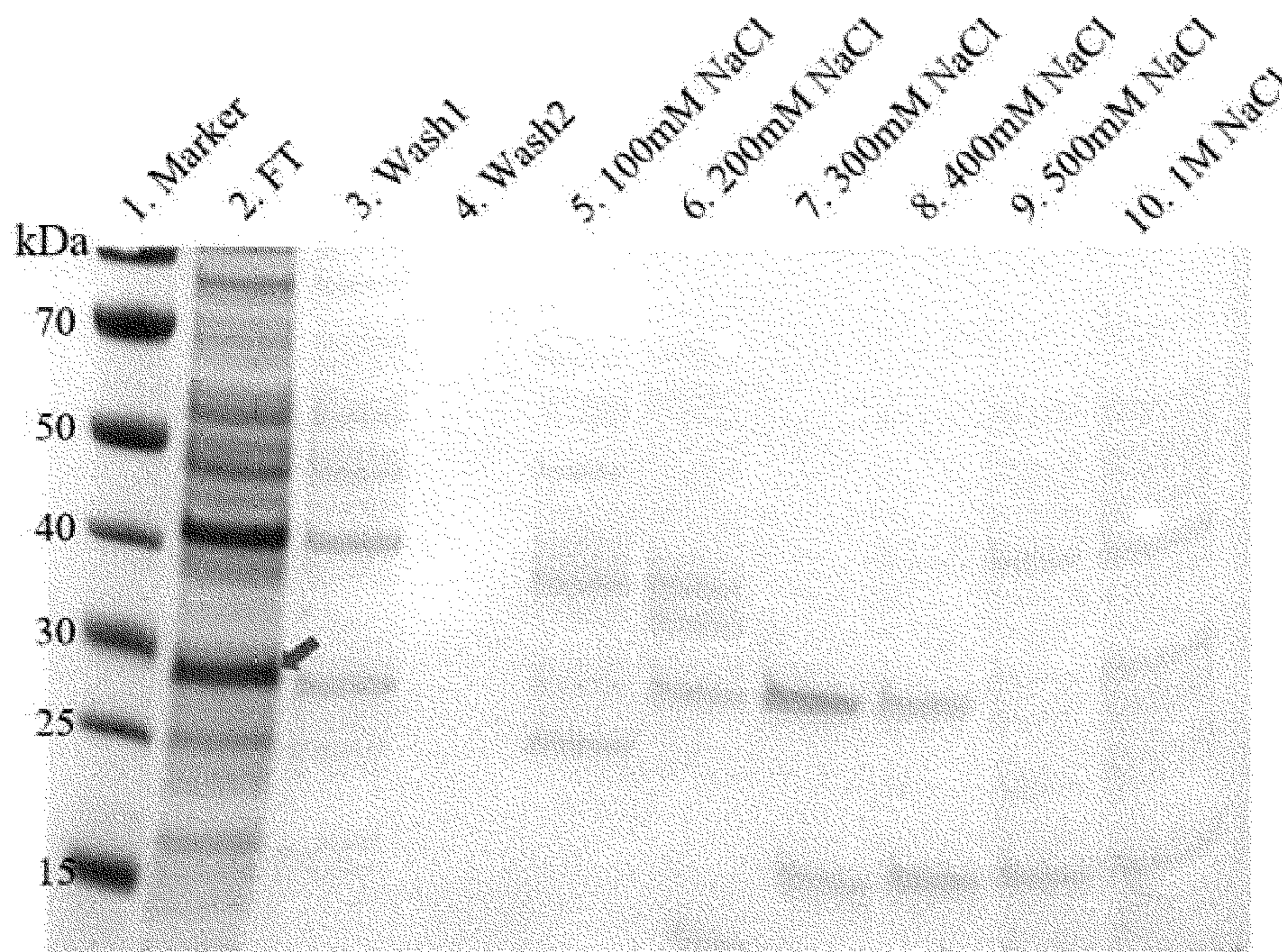
[도5b]



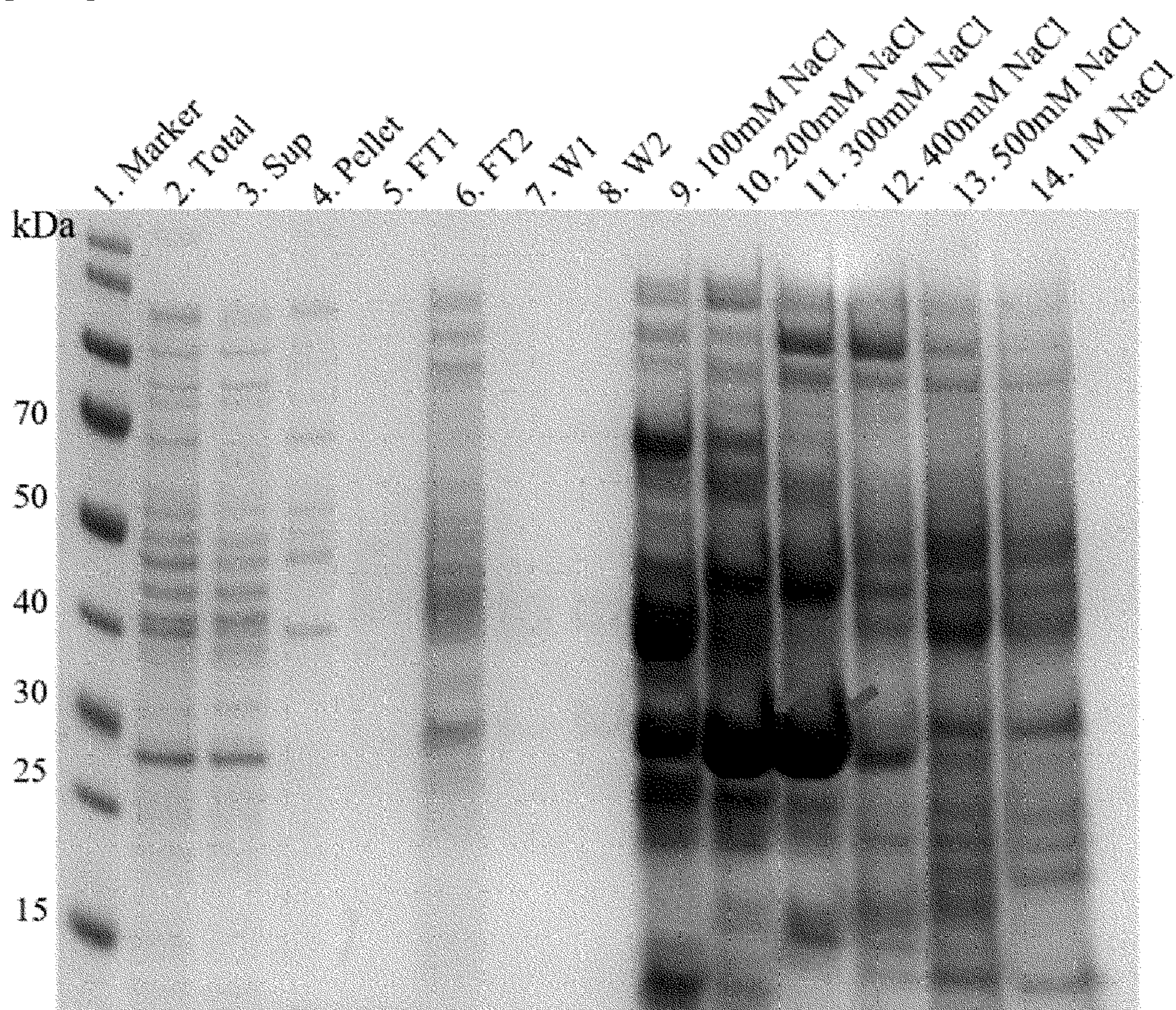
[도5c]



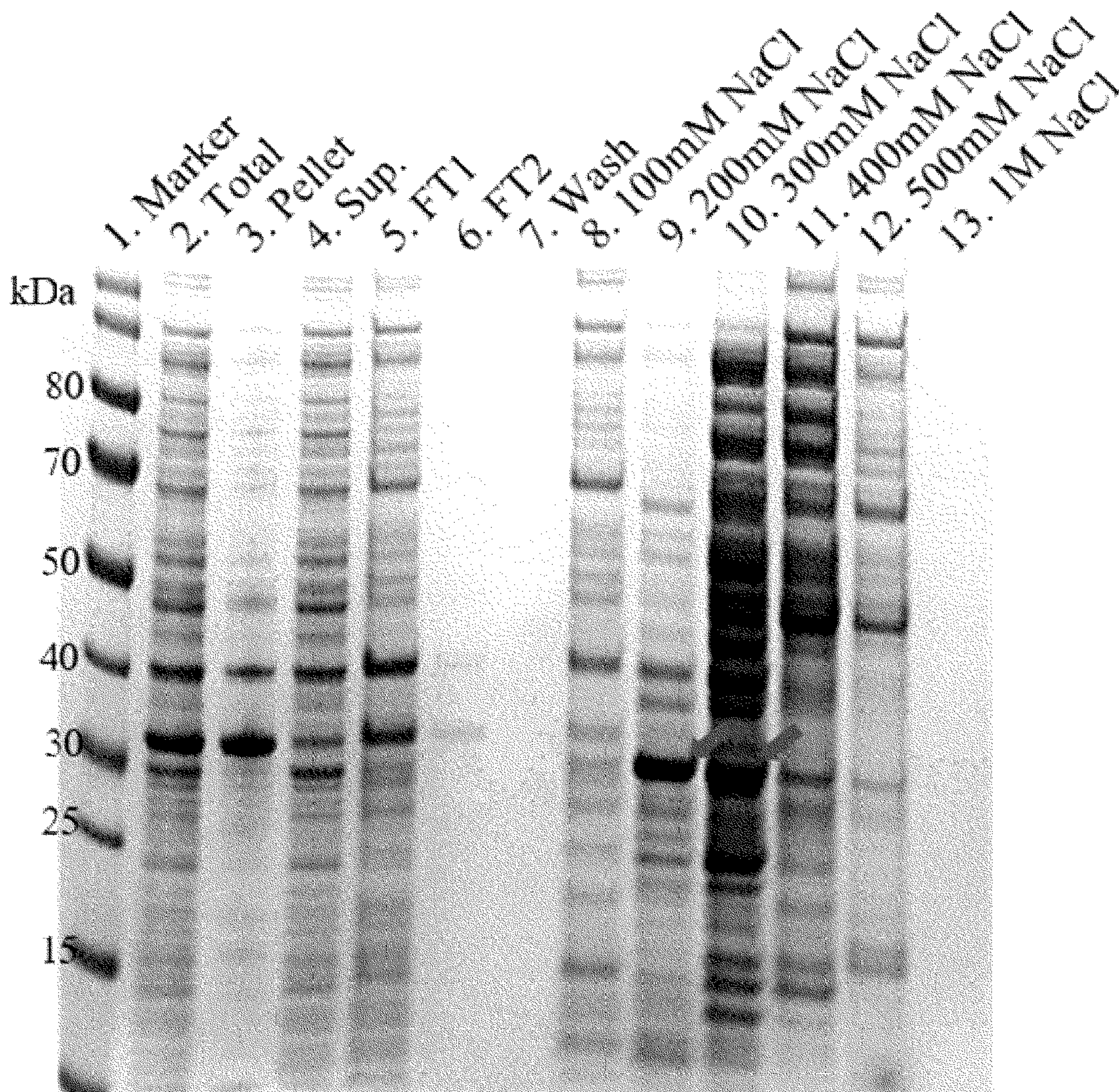
[도5d]



[도5e]



[도5f]



[도6a]

22-MSLYRRLVLLSCLSWPLAGFSATALTNLVAEPFAKLEQDFGGSIGVYAMDTGSGATVSYRAEERFPLCSSFKGF
 LAAAVLARSQQQAGLLDTPIRYGKNALVPWSPISEKYLTGMTVAELSAAAVQYSDNAAANLLLKELGGPAGLTAFM
 RSIGDTTFRLDRWELELNSAIPGDARDTSSPRAVTESLQKLTLSALAAPQRQQFVDWLKGNTTGNHRIRAAVPADW
 AVGDKTGTGCVYGTANDYAVVWPTGRAPIVLAVYTRAPNKDDKHSEAVIAAAARLALGLGVNGQ-293

M: Oxidation sites

[도6b]

23-MRVLALSAVFLVASIIGMPAVAKEWQENKSWNAHFTEHKSQGVVVLWNENKQQGFTNNLKRANQAFLPASTFKI
 PNSLIAIDLGVVKDEHQVFKWDGQTRDIATWNRDHNLIAMKYSVVPVYQEFARQIGEARMSKMLHAFDYCNEDISG
 NVDSFWLDGGIRISATEQISFLRKLYHNKLHVSESRQRIVKQAMLTEANGDYIIRAKTCYSTRIEPKIGWWVGWVEL
 DDNVWFFAMNMDMPTSDGLGLRQAITKEVLKQEKIIP-265

[도6c]

1-MELPNIMHPVAKLSTALAAALMLSGCMPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLVFRQLAPNVWQHTSYLDMPGFGAVAS
 NGLIVRDGGRVLVYDTAWTDDQTAQILNWIKQEINLPVALAVVTHAHQDKMGMDALHAAGIATYANALSNQLAPQE
 GMVAAQHSALTFAANGWVEPATAPNFGPLKVFPYPGGHTSDNITVGI DGTDIAFGCCLIKDSKAKSLGNLGDADTEHY
 AASARAFGAAPPKASMIVMSHSAPDSRAAITHARMADKLR-270

M: Oxidation sites

[도6d]

1-MSKLSVFFIFLFCSIATAAESLPDLKIEKLDEGVYVHTSFEEVNGWGVVPKHGLVVLVNAEAYLIDTPFTAKDTE
 KLVTFVVERGYKIKGSISSHFHSDSTGGIEWLNSRSIPTYASELTNELLKKGKVGQATNSFSGVNYWLVKNKIEVFY
 PGPGHTPDNVVVWLPERKILFGGCFIKPYGLGNLGDANIEAWPKSAKLLKSKYGKAKLVVPGHSEVGDASLLKLTLE
 QAVKGLNESKKPSKPSN-246

M: Oxidation sites

[도6e]

1-MFKLLSKLLVYLTASIMAIASPLAFSVDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQSF DGAVYPSNGLIVR
 DGDELLLIDTAWGAKNTAALLAEIEKQIGLPVTRAVSTHFHDDR VGGVDVLRAAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPT
 HSLEGLSSSGDAVRFGPVELFYPGA AHSTDNLVVYVPSASVLYGGCAIYELSRTSAGNVADADLAEWPTSIERIQQH
 YPEAQFVIPGHGLPGGLDLLKHTTNVVK AHTNRSVVE-266

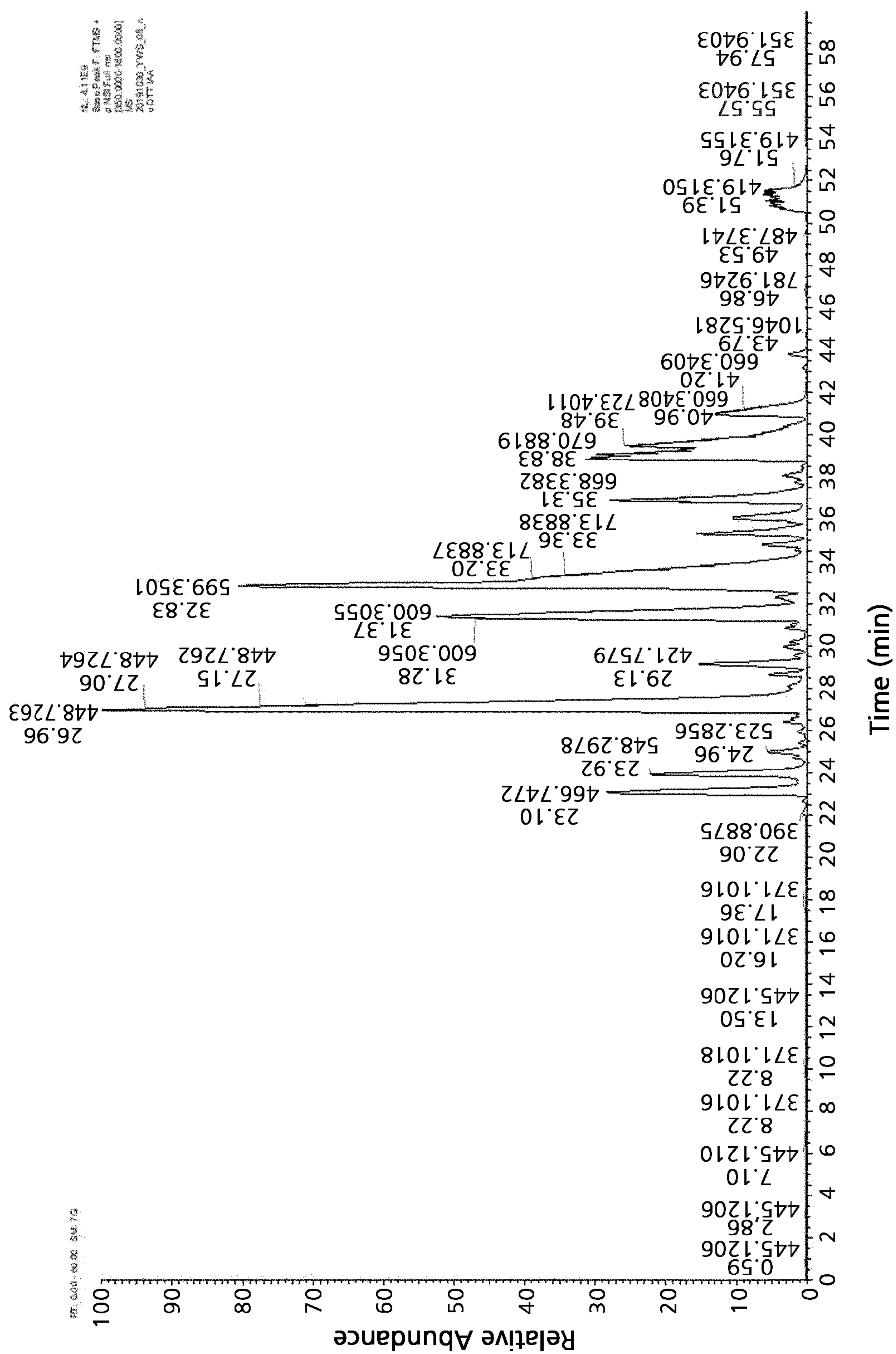
M: Oxidation sites

[도6f]

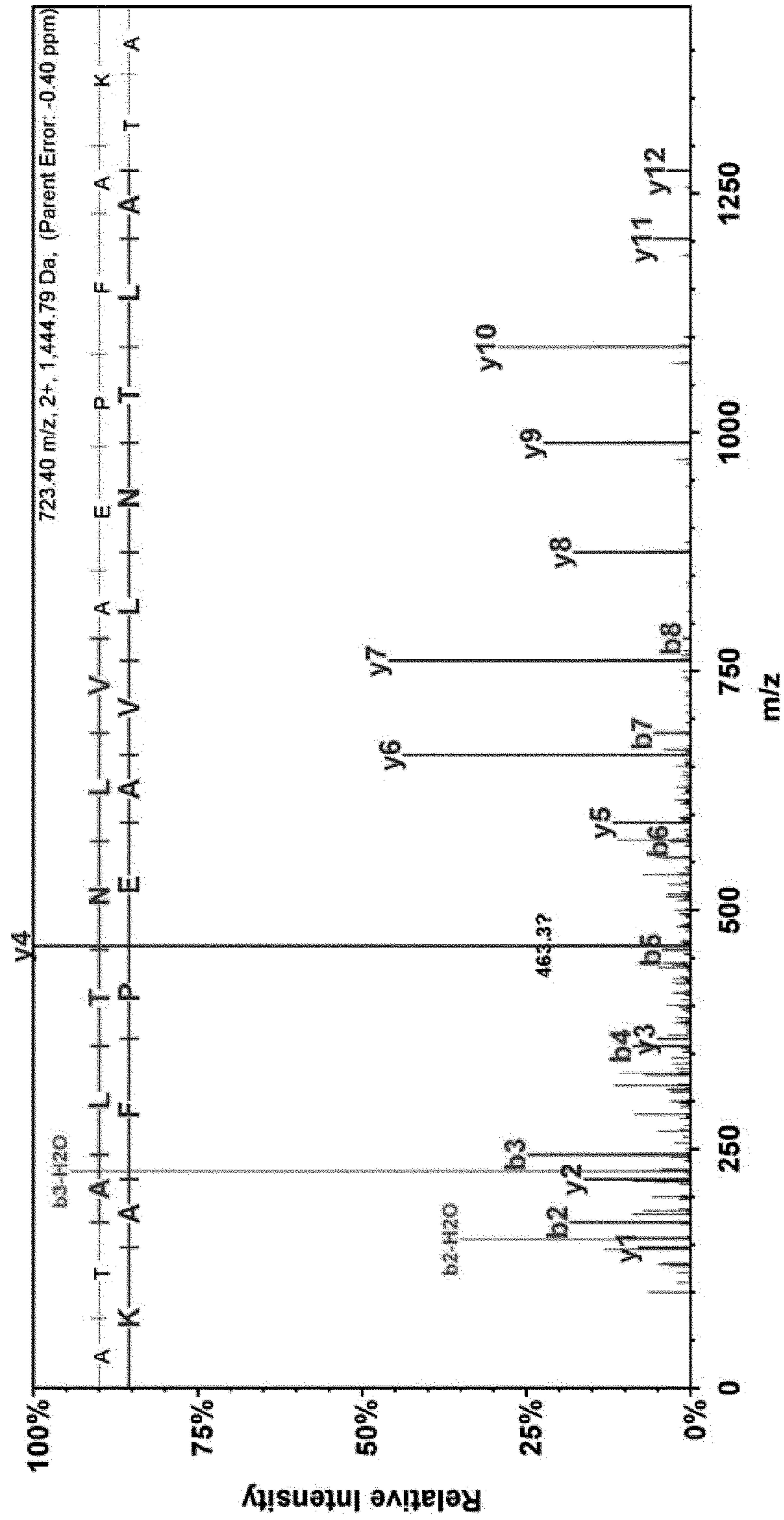
1-MRFIHALLLAGIAHSAYASEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRFAMCSTFKFPLAALVF
 ERIDSGTERGDRKLSYGPDMIVEWSPATERFLASGHMTVLEAAQAAVQLSDNGATNLLLREIGGPAAMTQYFRKIGD
 SVSRLDRKEPEMSDNTPGDLRDTTTPIAMARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLI GNQTGDATLRAGFPKDWVVEK
 TGTCANGGRNDIGFFKAQERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGQVITQLILSTDK-287

M: Oxidation sites

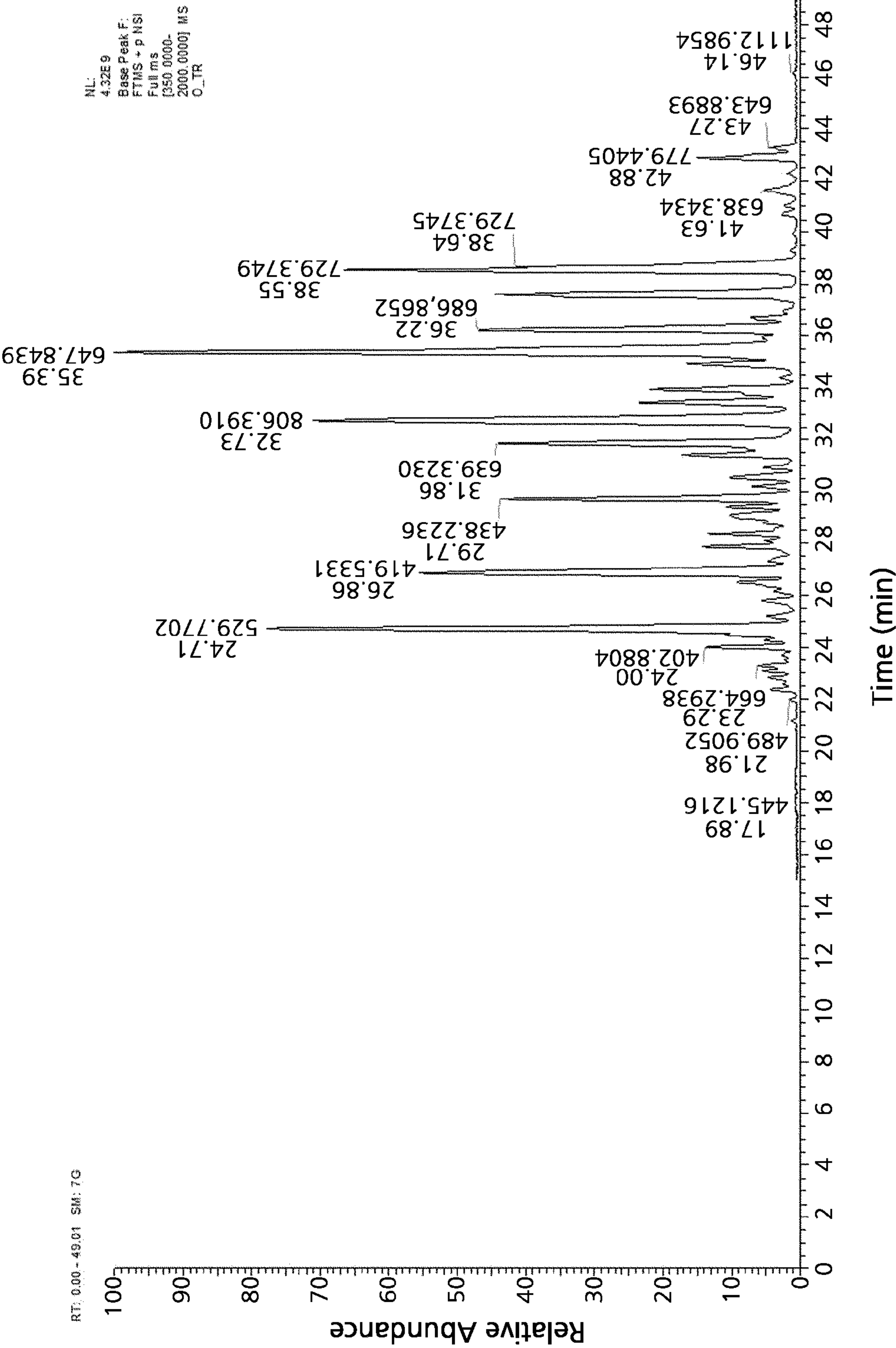
[도 7a]



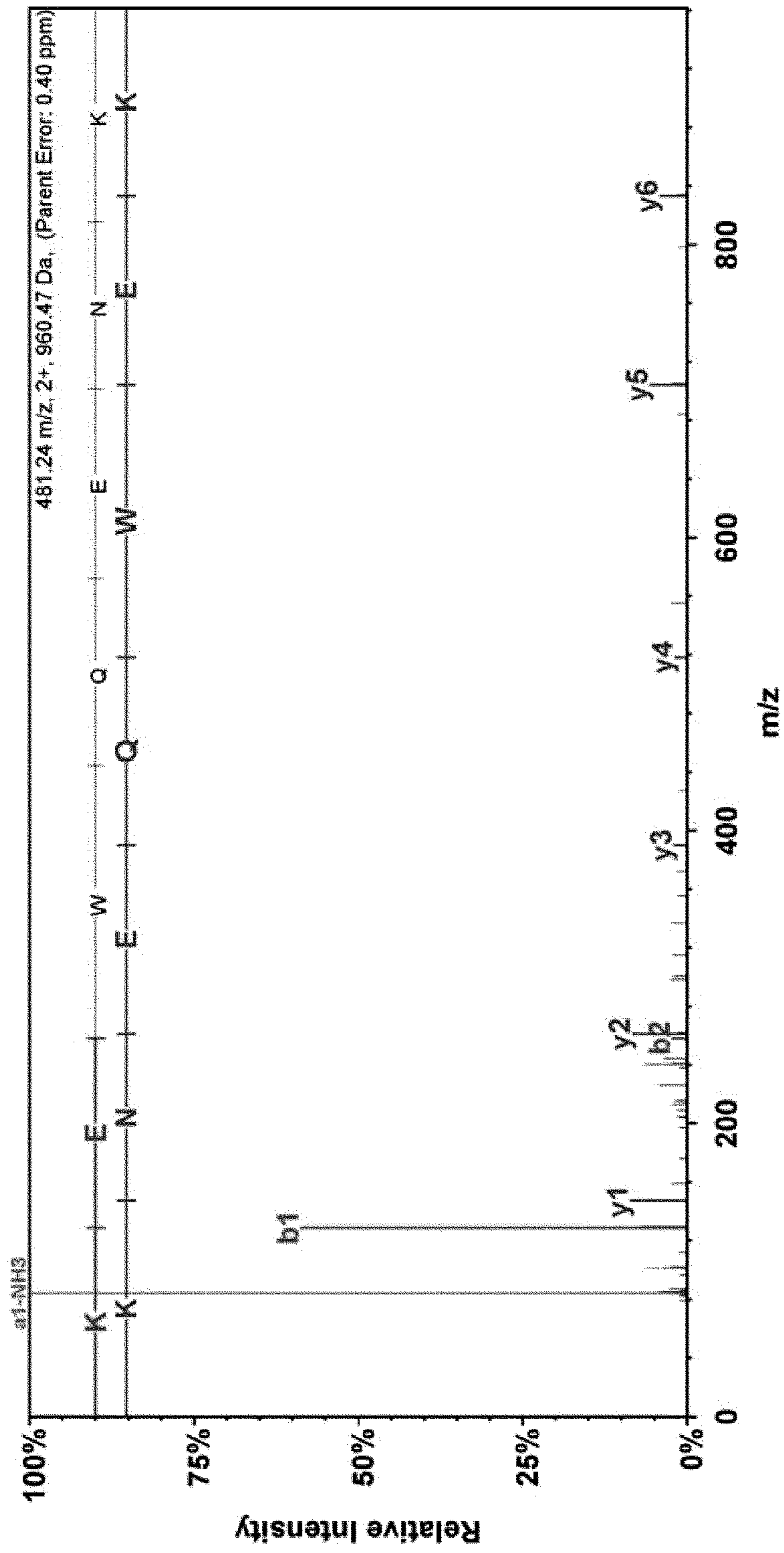
[도7b]



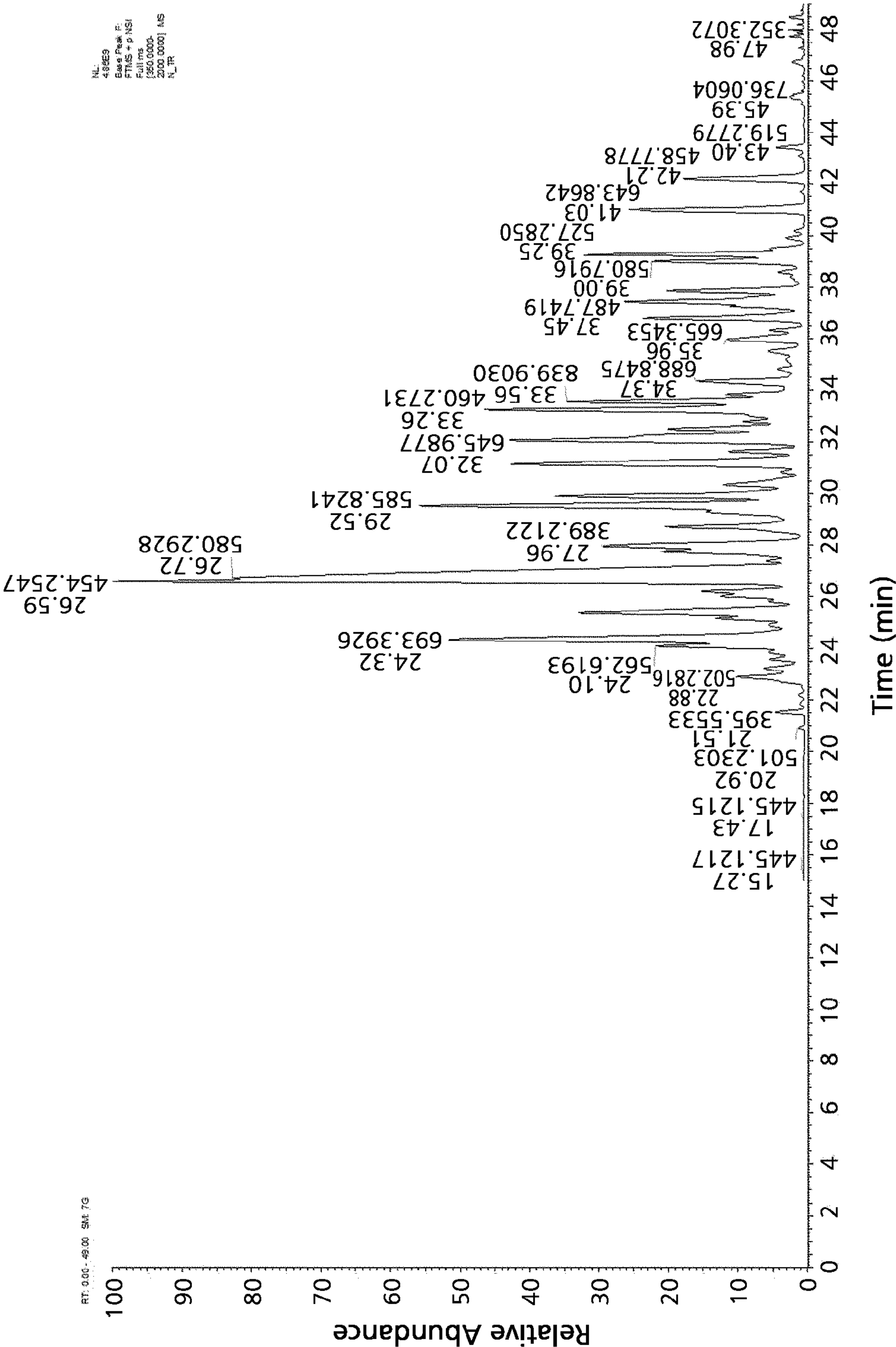
[도7c]



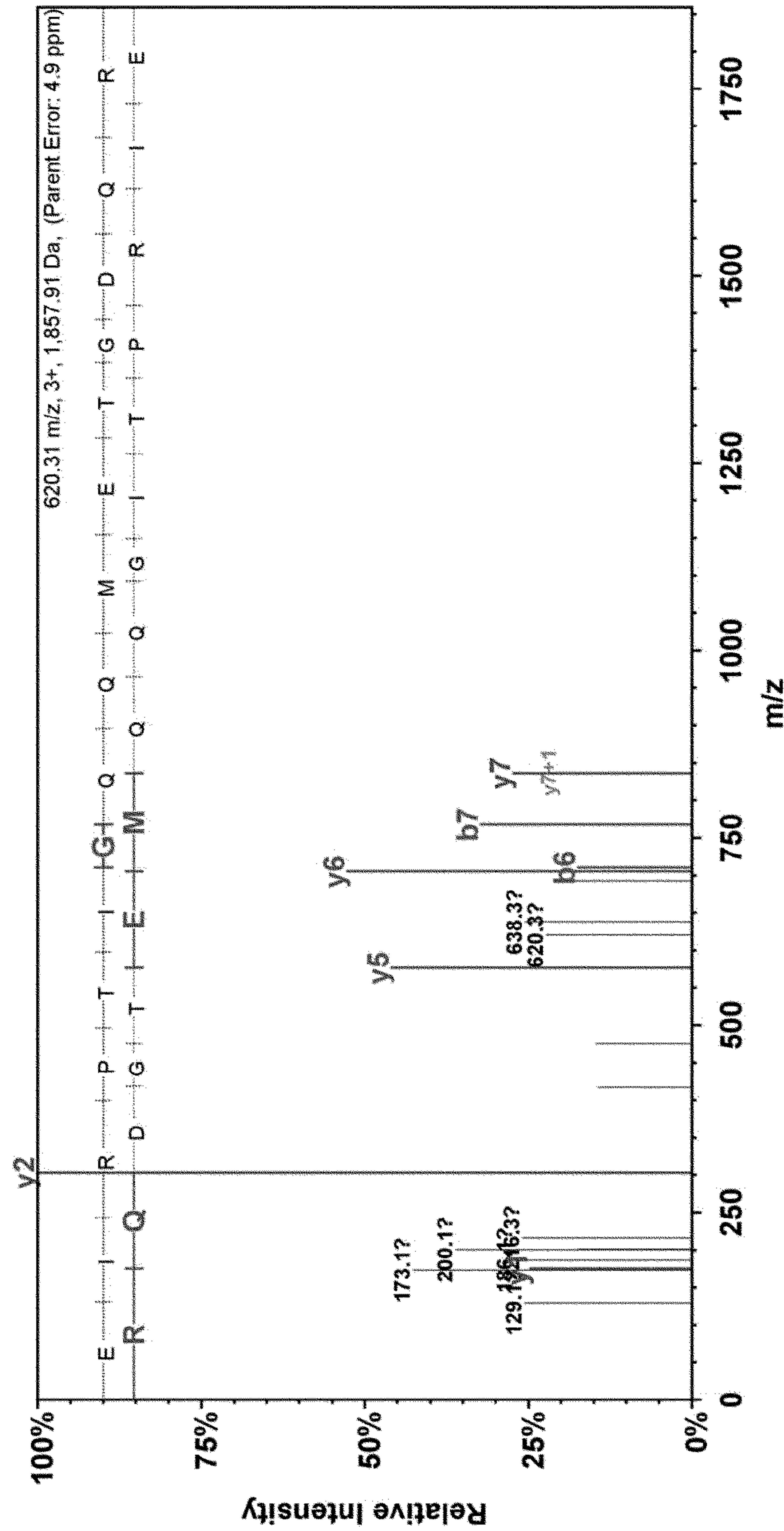
[도7d]



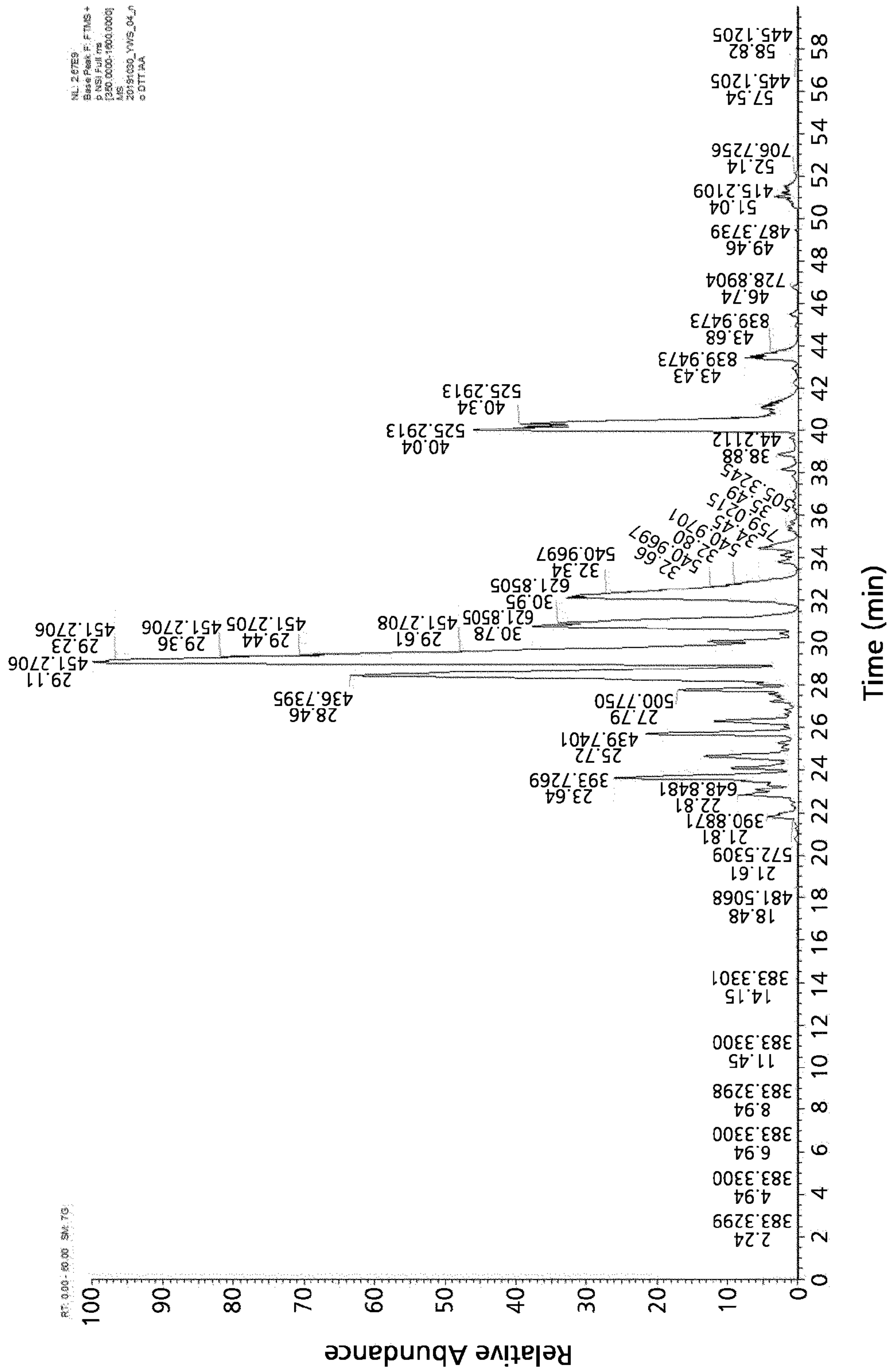
[도7e]



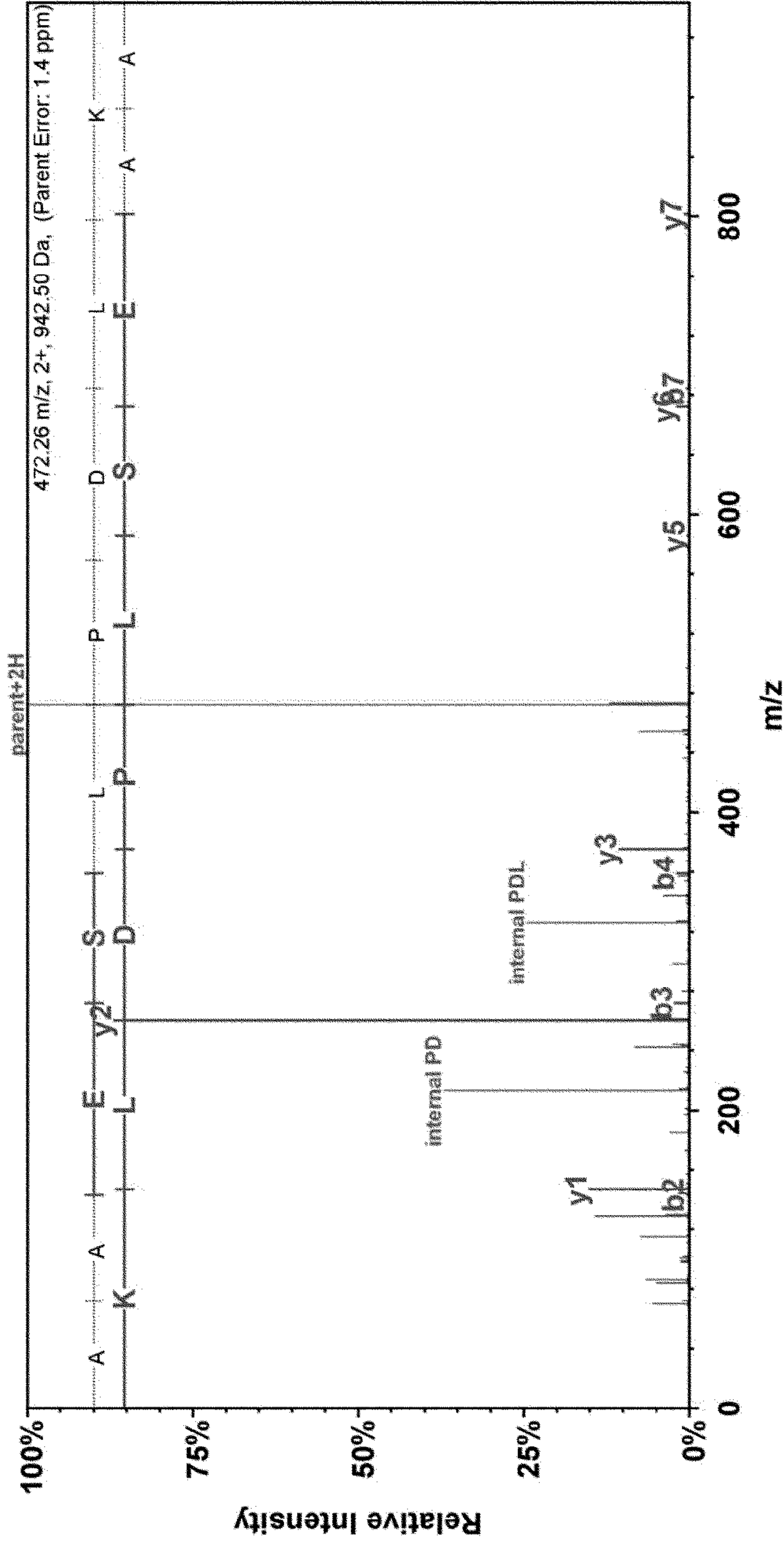
[도 7f]



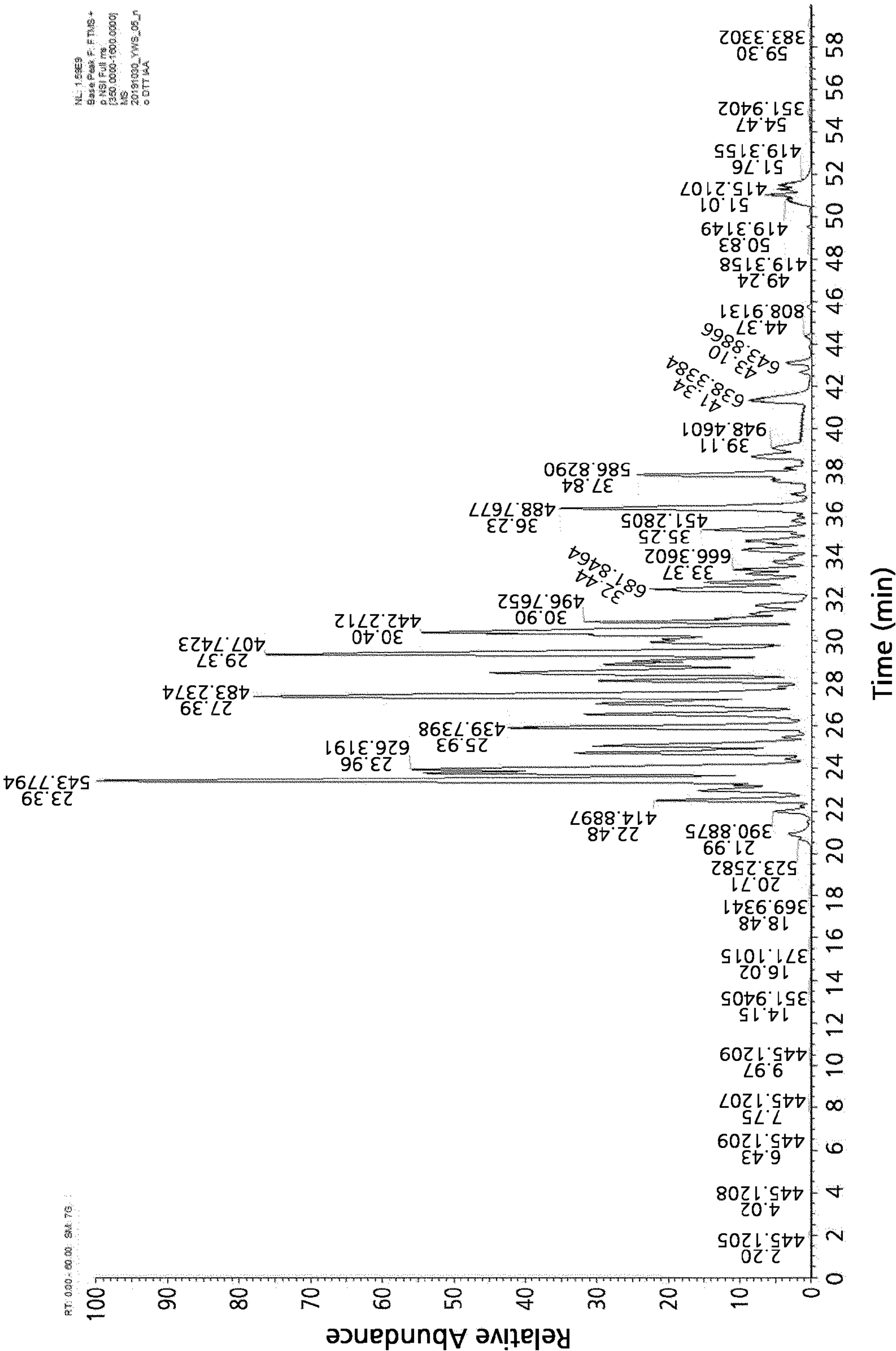
NL 287E9
Base Peak F FMS +
p NSI FULL MS
1350.0000-1500.0000
MS
20151030_YWS_04_0
o DITAA



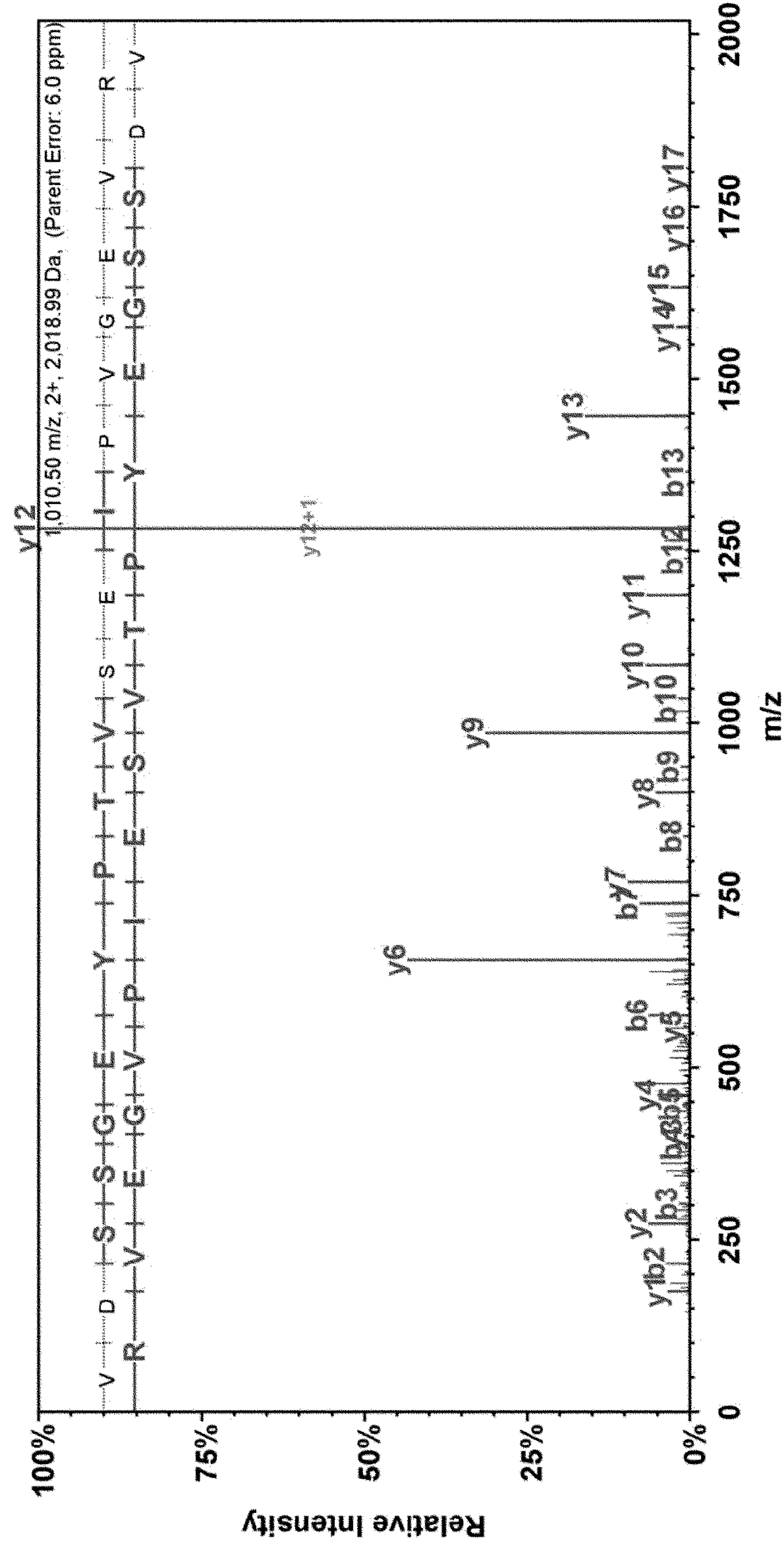
[도 7h]



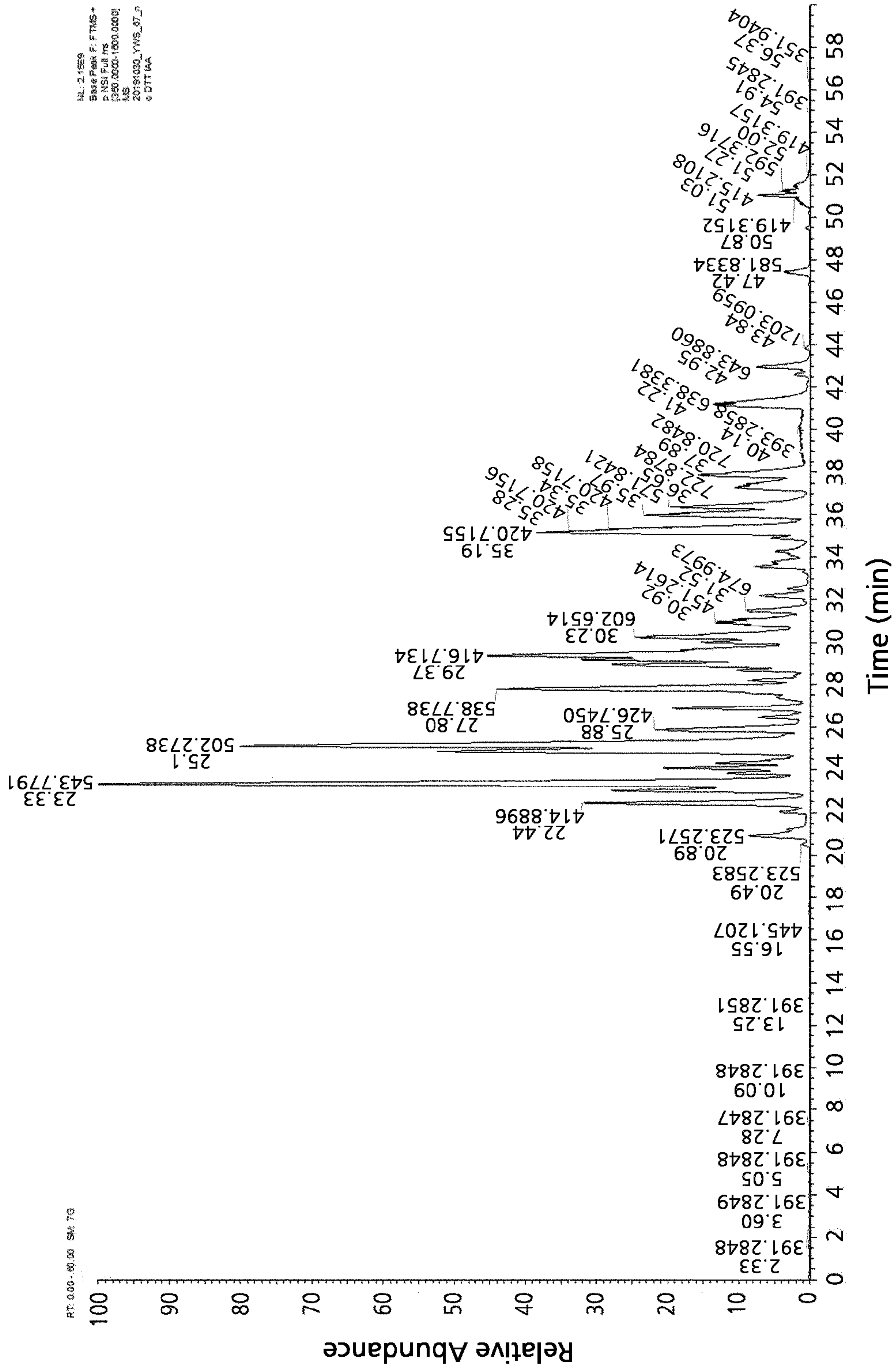
[도 7]



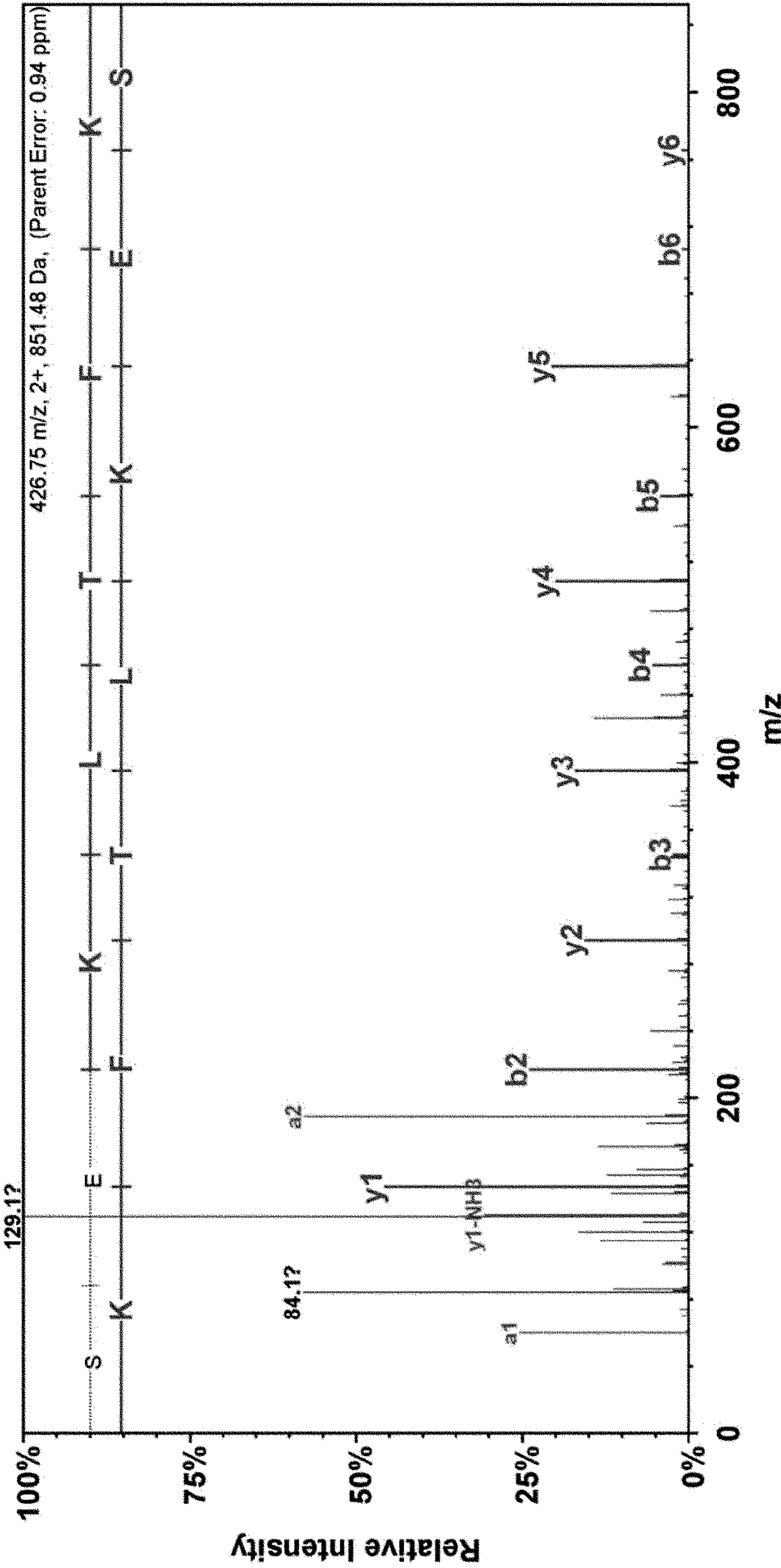
[도7]



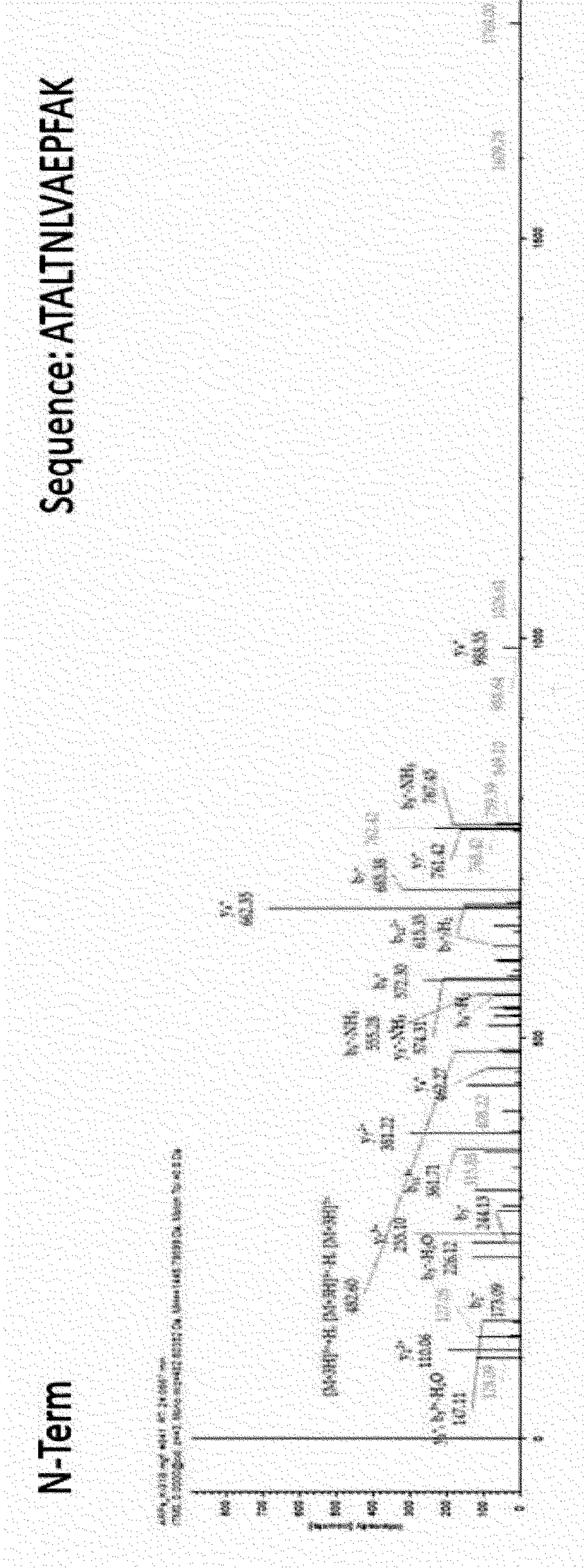
[도7k]



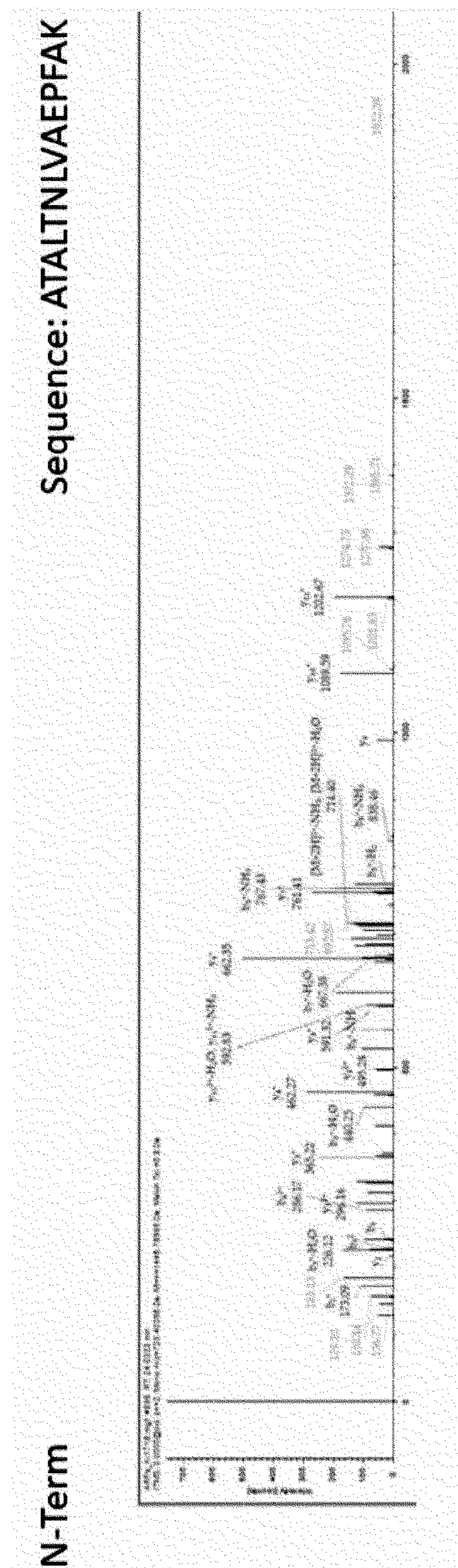
[도 7]



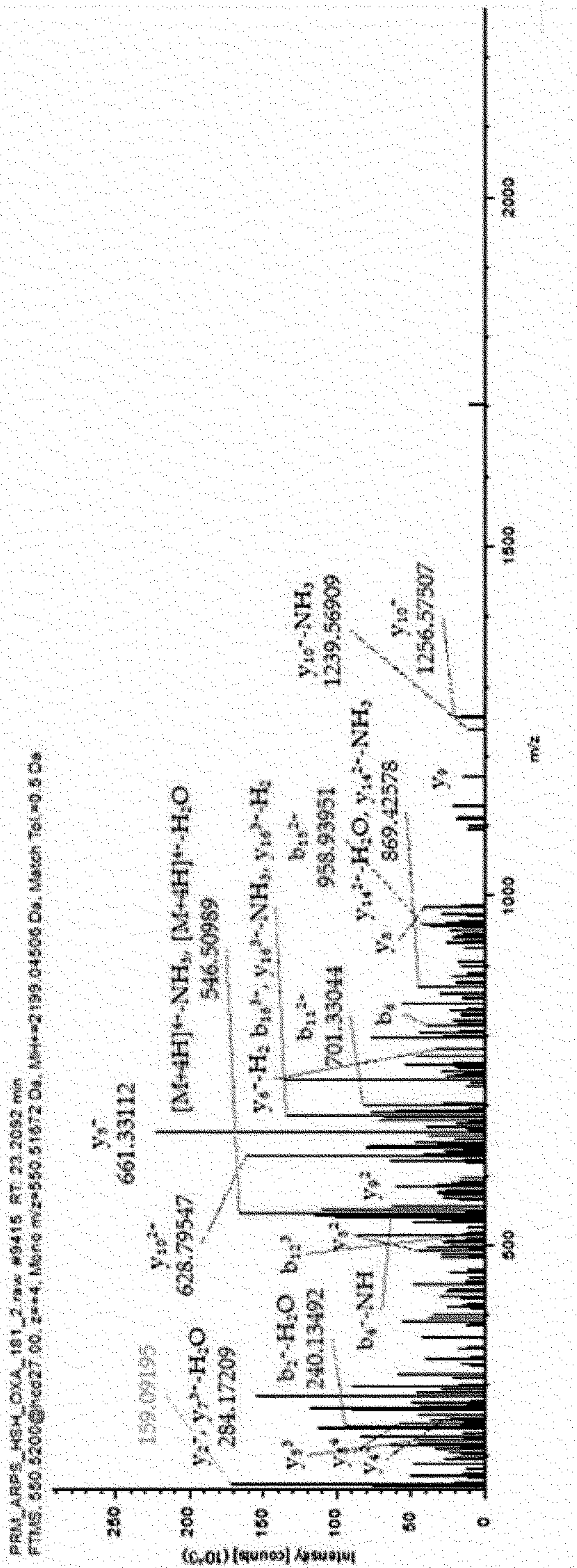
[도7m]



[57n]

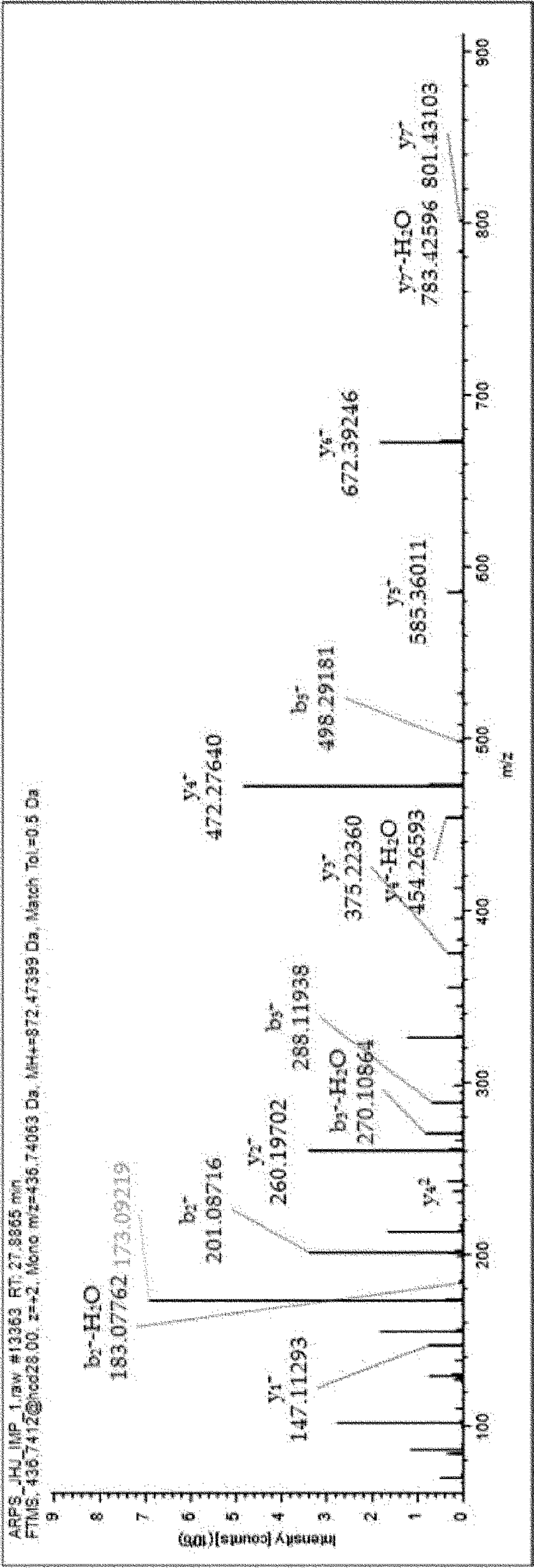


Sequence: KEWQENKSWNAHFTTEHK



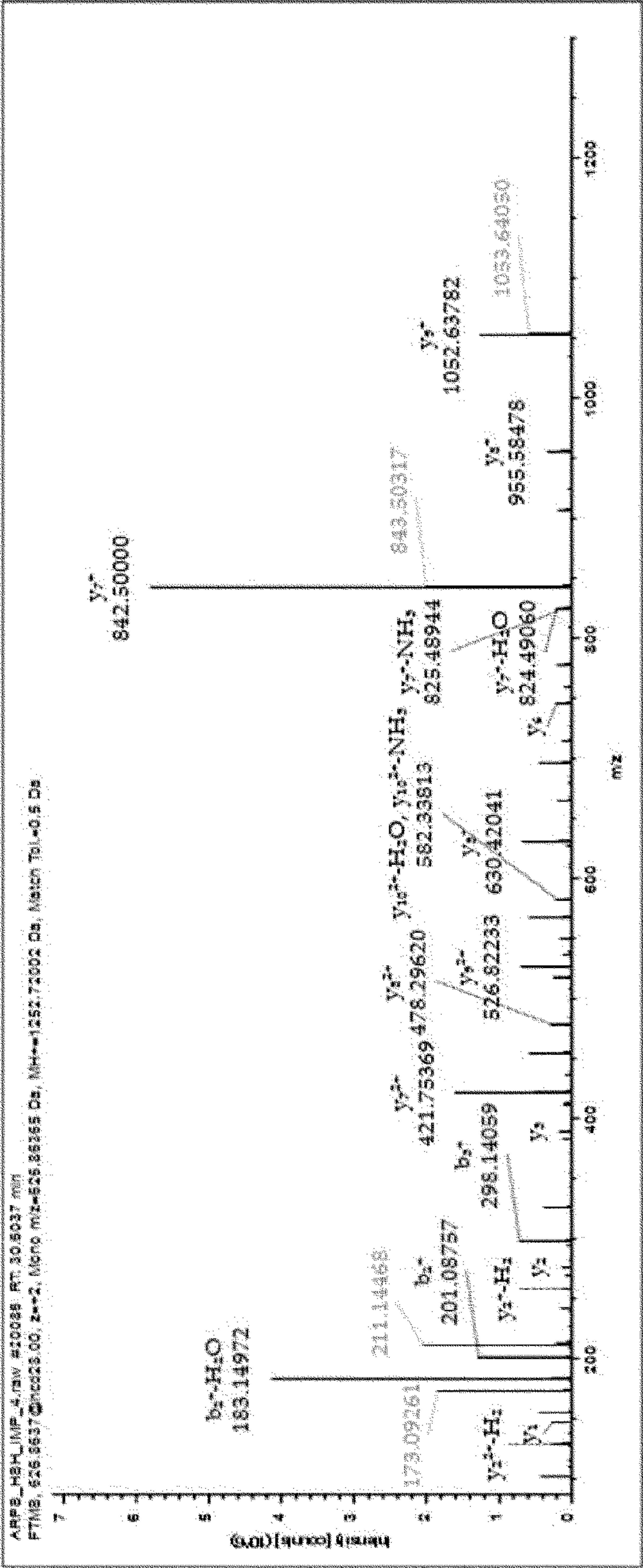
[도7p]

N-Term
Sequence: AESLPDLK



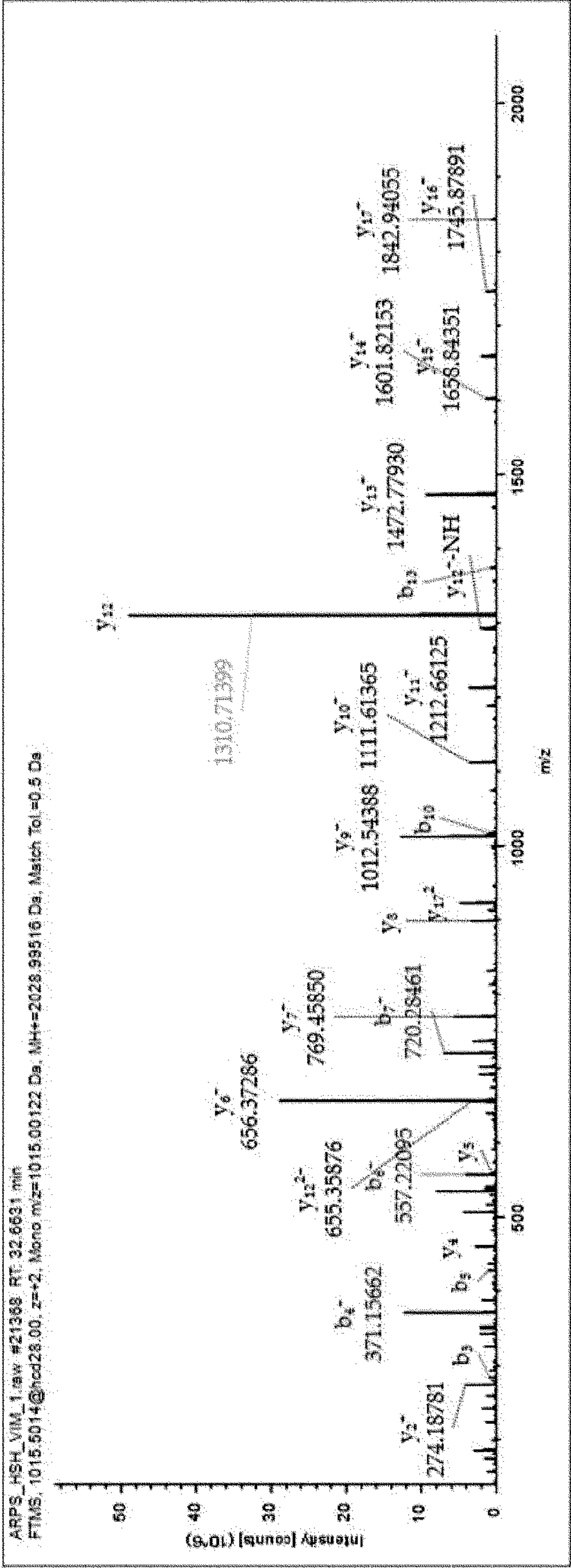
[도7q]

N-Term
Sequence: AESLPDLK



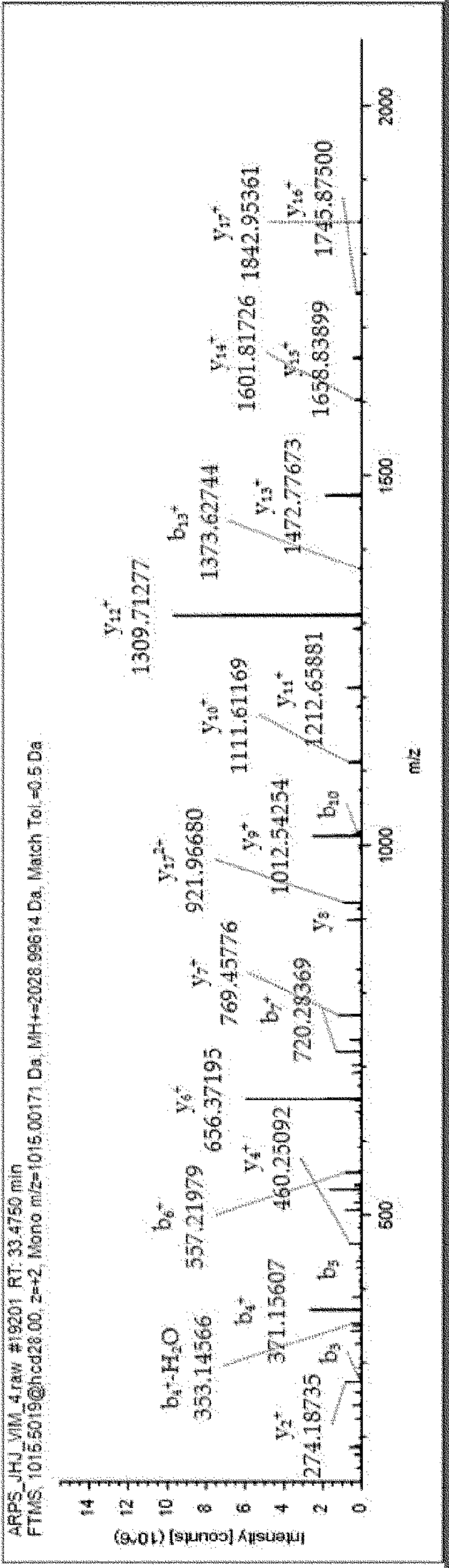
[57r]

N-Term Sequence: GEPSGEYPTVNEIPVGEVR



[도 7s]

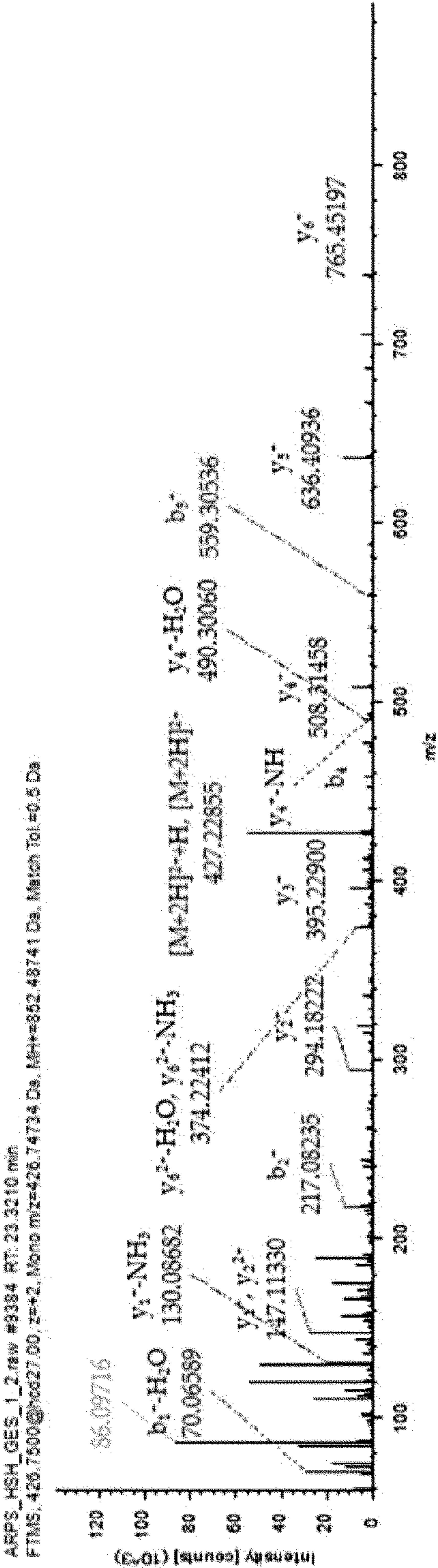
N-Term Sequence: GEPSGEYPTVNEIPVGEVR



[도7t]

Sequence: SEKLTFK

N-Term



Consensus
KPC-2
KPC-3
KPC-4
KPC-5
KPC-6
KPC-7
KPC-8
KPC-10
KPC-11
KPC-12
KPC-13
KPC-14
KPC-15
KPC-16
KPC-17
KPC-18
KPC-19
KPC-21
KPC-22
KPC-23
KPC-24
KPC-25
KPC-26
KPC-27
KPC-28
KPC-29
KPC-30
KPC-31
KPC-32
KPC-33
KPC-34
KPC-35
KPC-36
KPC-37
KPC-38
KPC-39
KPC-40
KPC-41
KPC-42
KPC-43
KPC-44
KPC-45
KPC-46

MRVLALS	SAVFLV	ASII	GM	PAVA	K	EW	Q	EN	K	S	W	N	A	H	F	T	E	H	K	S	Q	G	V	W	L	W	N	E	K	Q	G	F	T	N	N	L	K	R	A	N	Q	A	F	L	P	A	S	T	F	K	I	P	N	S	L	I	A	L	D	L	G	V	Y	K	D	E	H	Q	V	F	K	W	D	G	Q	T	R	D	I	A	W	N	R	D	H	110
MRVLALS	SAVFLV	ASII	GM	PAVA	K	EW	Q	EN	K	S	W	N	A	H	F	T	E	H	K	S	Q	G	V	W	L	W	N	E	K	Q	G	F	T	N	N	L	K	R	A	N	Q	A	F	L	P	A	S	T	F	K	I	P	N	S	L	I	A	L	D	L	G	V	Y	K	D	E	H	Q	V	F	K	W	D	G	Q	T	R	D	I	A	W	N	R	D	H	110
MRVLALS	SAVFLV	ASII	GM	PAVA	K	EW	Q	EN	K	S	W	N	A	H	F	T	E	H	K	S	Q	G	V	W	L	W	N	E	K	Q	G	F	T	N	N	L	K	R	A	N	Q	A	F	L	P	A	S	T	F	K	I	P	N	S	L	I	A	L	D	L	G	V	Y	K	D	E	H	Q	V	F	K	W	D	G	Q	T	R	D	I	A	W	N	R	D	H	110
MRVLALS	SAVFLV	ASII	GM	PAVA	K	EW	Q	EN	K	S	W	N	A	H	F	T	E	H	K	S	Q	G	V	W	L	W	N	E	K	Q	G	F	T	N	N	L	K	R	A	N	Q	A	F	L	P	A	S	T	F	K	I	P	N	S	L	I	A	L	D	L	G	V	Y	K	D	E	H	Q	V	F	K	W	D	G	Q	T	R	D	I	A	W	N	R	D	H	110
MRVLALS	SAVFLV	ASII	GM	PAVA	K	EW	Q	EN	K	S	W	N	A	H	F	T	E	H	K	S	Q	G	V	W	L	W	N	E	K	Q	G	F	T	N	N	L	K	R	A	N	Q	A	F	L	P	A	S	T	F	K	I	P	N	S	L	I	A	L	D	L	G	V	Y	K	D	E	H	Q	V	F	K	W	D	G	Q	T	R	D	I	A	W	N	R	D	H	110
MRVLALS	SAVFLV	ASII	GM	PAVA	K	EW	Q	EN	K	S	W	N	A	H	F	T	E	H	K	S	Q	G	V	W	L	W	N	E	K	Q	G	F	T	N	N	L	K	R	A	N	Q	A	F	L	P	A	S	T	F	K	I	P	N	S	L	I	A	L	D	L	G	V	Y	K	D	E	H	Q	V	F	K	W	D	G	Q	T	R	D	I	A	W	N	R	D	H	110
MRVLALS	SAVFLV	ASII	GM	PAVA	K	EW	Q	EN	K	S	W	N	A	H	F	T	E	H	K	S	Q	G	V	W	L	W	N	E	K	Q	G	F	T	N	N	L	K	R	A	N	Q	A	F	L	P	A	S	T	F	K	I	P	N	S	L	I	A	L	D	L	G	V	Y	K	D	E	H	Q	V	F	K	W	D	G	Q	T	R	D	I	A	W	N	R	D	H	110
MRVLALS	SAVFLV	ASII	GM	PAVA	K	EW	Q	EN	K	S	W	N	A	H	F	T	E	H	K	S	Q	G	V	W	L	W	N	E	K	Q	G	F	T	N	N	L	K	R	A	N	Q	A	F	L	P	A	S	T	F	K	I	P	N	S	L	I	A	L	D	L	G	V	Y	K	D	E	H	Q	V	F	K	W	D	G	Q	T	R	D	I	A	W	N	R	D	H	110
MRVLALS	SAVFLV	ASII	GM	PAVA	K	EW	Q	EN	K	S	W	N	A	H	F	T	E	H	K	S	Q	G	V	W	L	W	N	E	K	Q	G	F	T	N	N	L	K	R	A	N	Q	A	F	L	P	A	S	T	F	K	I	P	N	S	L	I	A	L	D	L	G	V	Y	K																						

Consensus

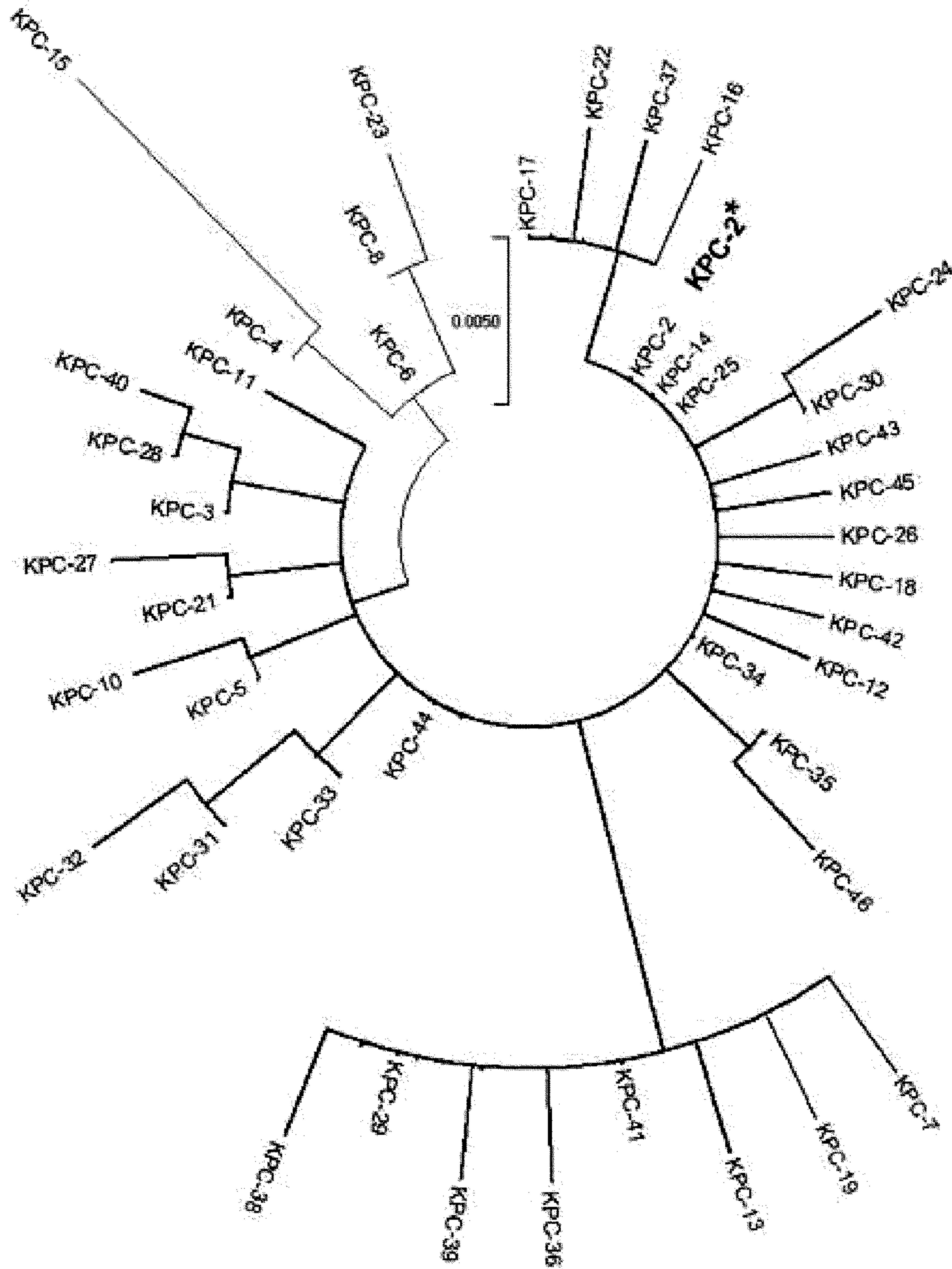
[illegible]

Consensus	M	KL	V	C	I	LPDLKIEKL	GV	VHTISFEEV	GW	V	KHGLV	LV	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	GV	IKG	S	HFN	DS	6IEWLNS	
IMP-19	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-20	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-2	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-8	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-24	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-22	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-69	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-13	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-37	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-84	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-17	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-33	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	SSS	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-39	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	BAAL	PDLKIEKL	EEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ	
IMP-27	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	GET	PNLRV	KEKL	EEGVVYVHTS	VEE	K	GW	GV	IT	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ
IMP-67	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	GET	PNLRV	KEKL	EEGVVYVHTS	VEE	K	GW	GV	IT	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ
IMP-64	KKKLFVLCVCF	LC	CS	ITAA	SET	PNLRV	KEKL	EEGVVYVHTS	VEE	K	GW	GV	IT	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ
IMP-42	MSKLSVFF	IF	FL	CS	SIATA	AESL	PDLKIEKL	DEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ
IMP-61	MSKLSVFF	IF	FL	CS	SIATA	AESL	PDLKIEKL	DEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ
IMP-66	MSKLSVFF	IF	FL	CS	SIATA	AESL	PDLKIEKL	DEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ
IMP-1	MSKLSVFF	IF	FL	CS	SIATA	AESL	PDLKIEKL	DEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGVYKIKG	TS	SHF	HS	DS	TGG	IEWLNSQ
IMP-52	MSKLSVFF	IF	FL	CS	SIATA	AESL	PDLKIEKL	DEGVVYVHTS	FEEVNGWGVMS	KHGLV	LV	NTD	AVLIDTP	TA	DTE	LV	WF	VERGV						

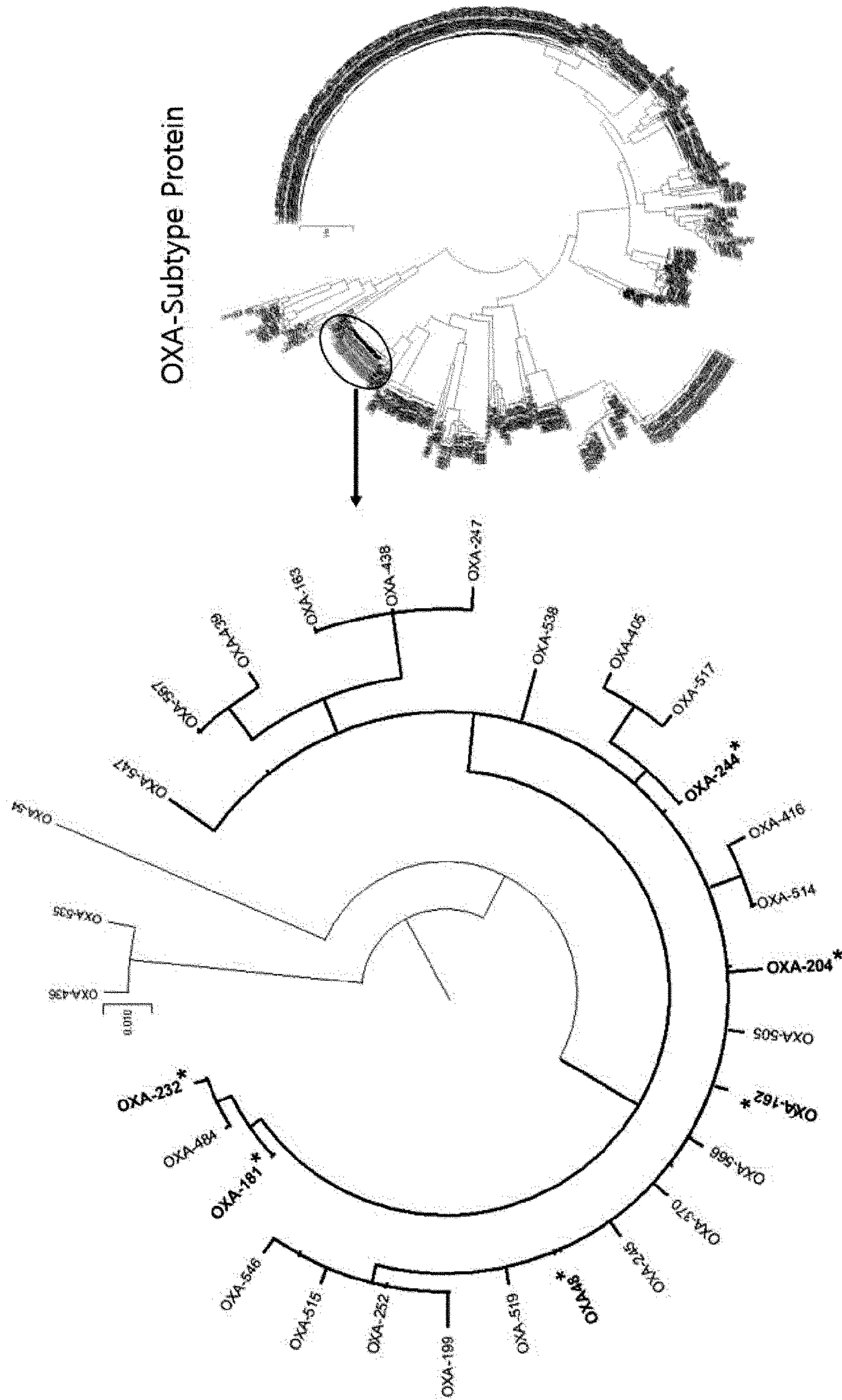
Consensus
GES-7
GES-13
GES-6
GES-34
GES-33
GES-3
GES-4
GES-10
GES-24
GES-1
GES-8
GES-23
GES-22
GES-35
GES-11
GES-12
GES-17
GES-38
GES-9
GES-2
GES-19
GES-40
GES-46
GES-20
GES-14
GES-5
GES-21
GES-18
GES-30
GES-36
GES-15
GES-43
GES-27
GES-29
GES-37
GES-28
GES-42
GES-25
GES-16
GES-39
GES-31
GES-32
GES-41

[도9a]

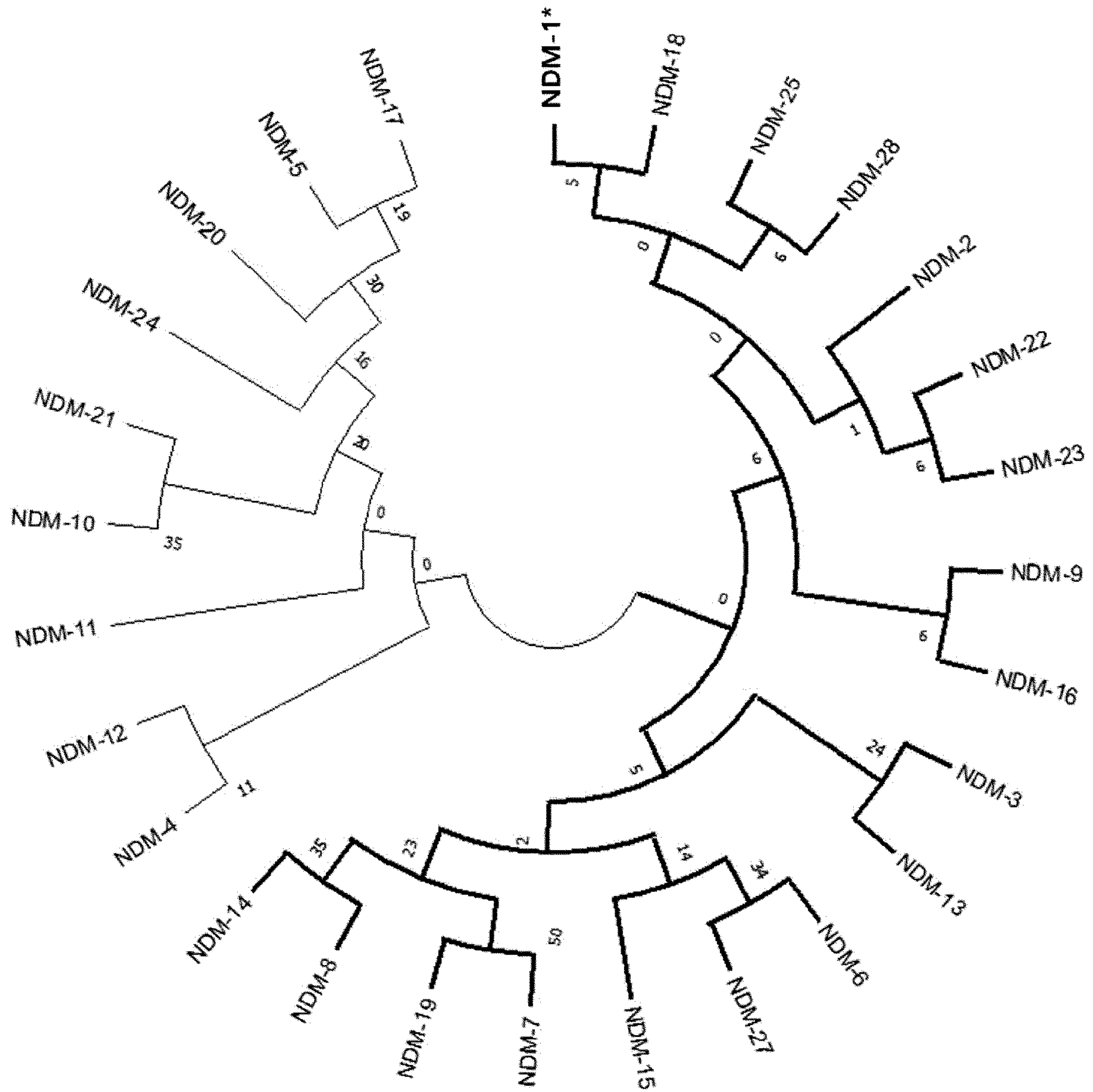
KPC-Subtype Protein



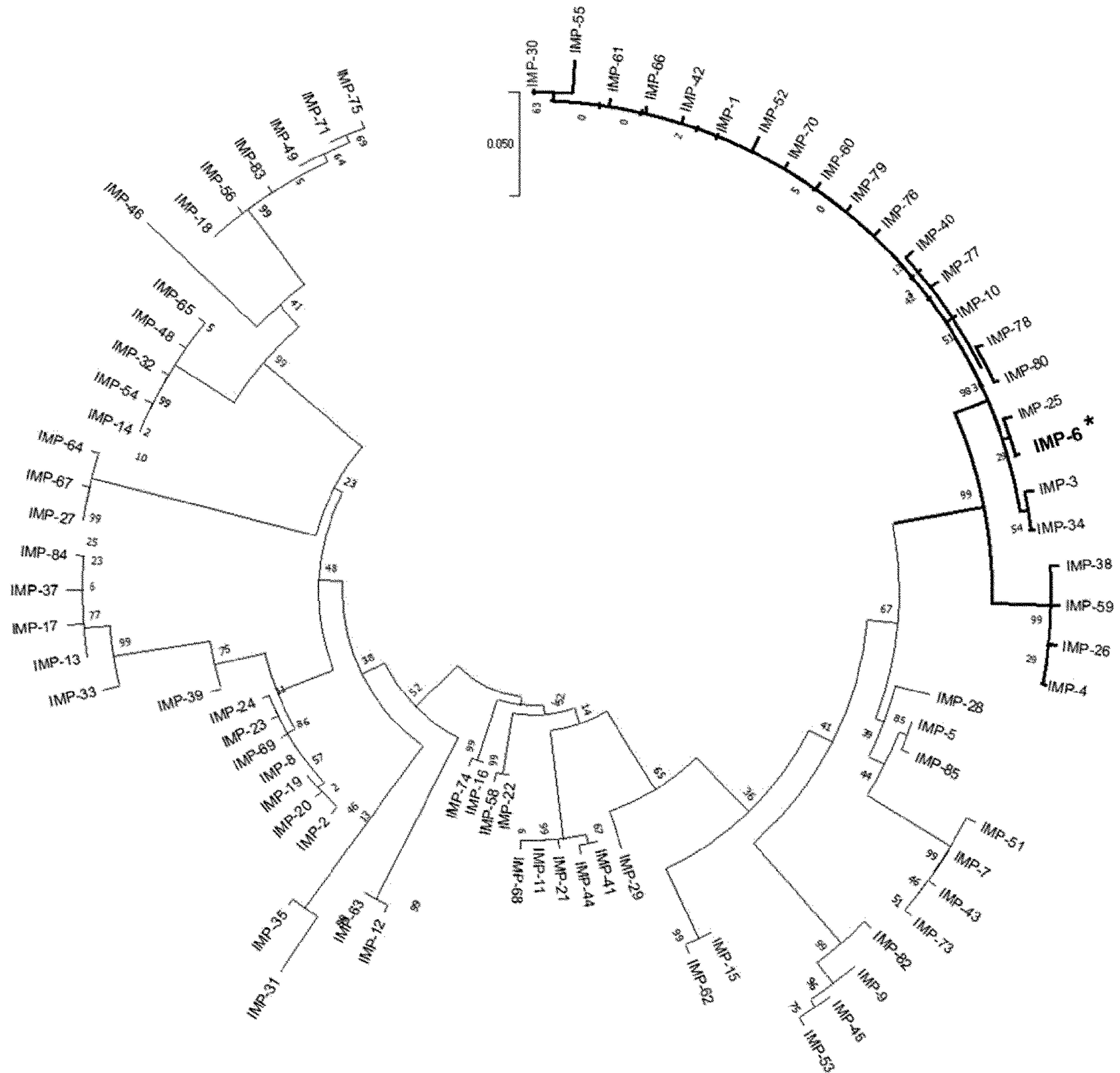
[도9b]



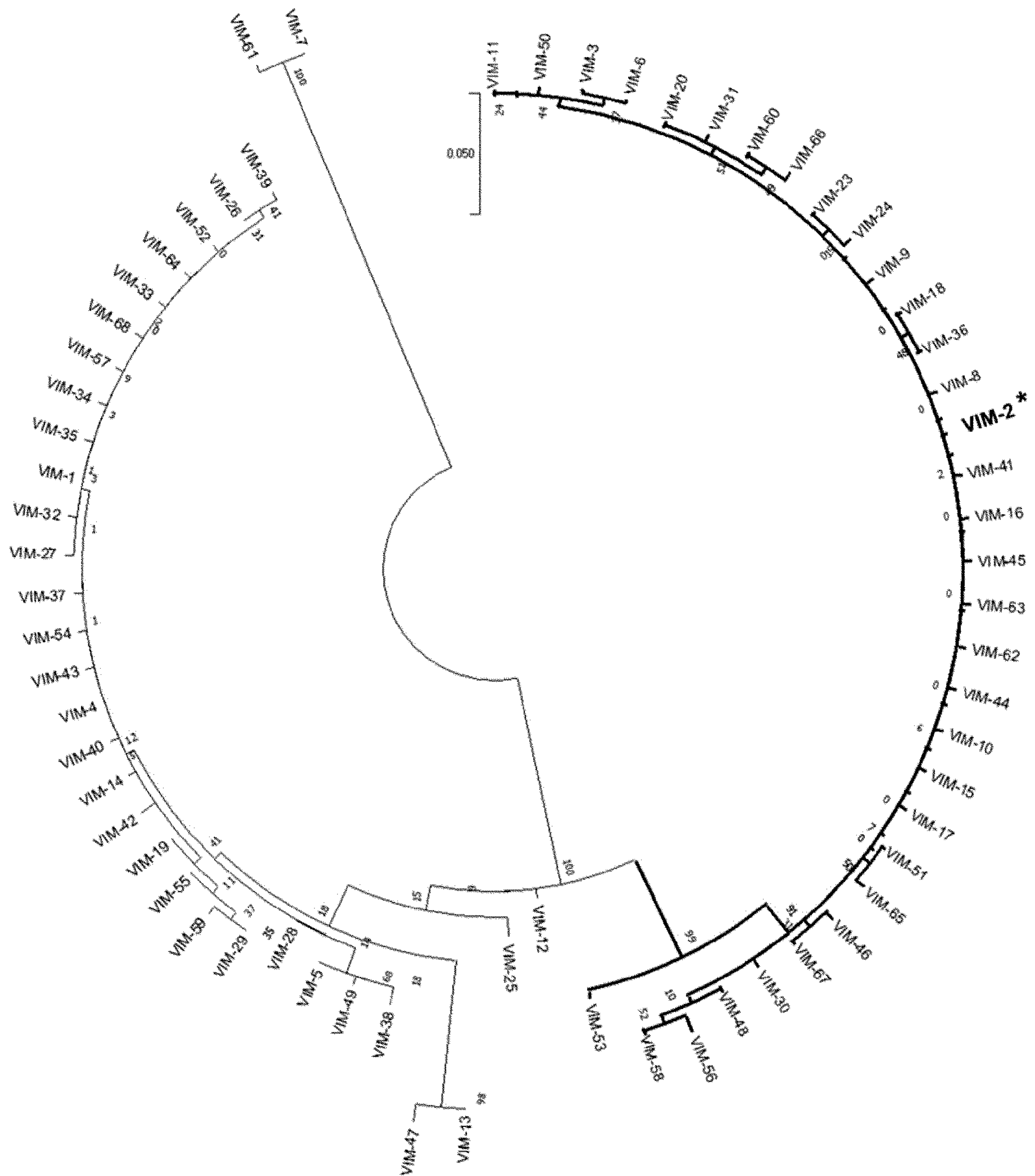
[도9c]



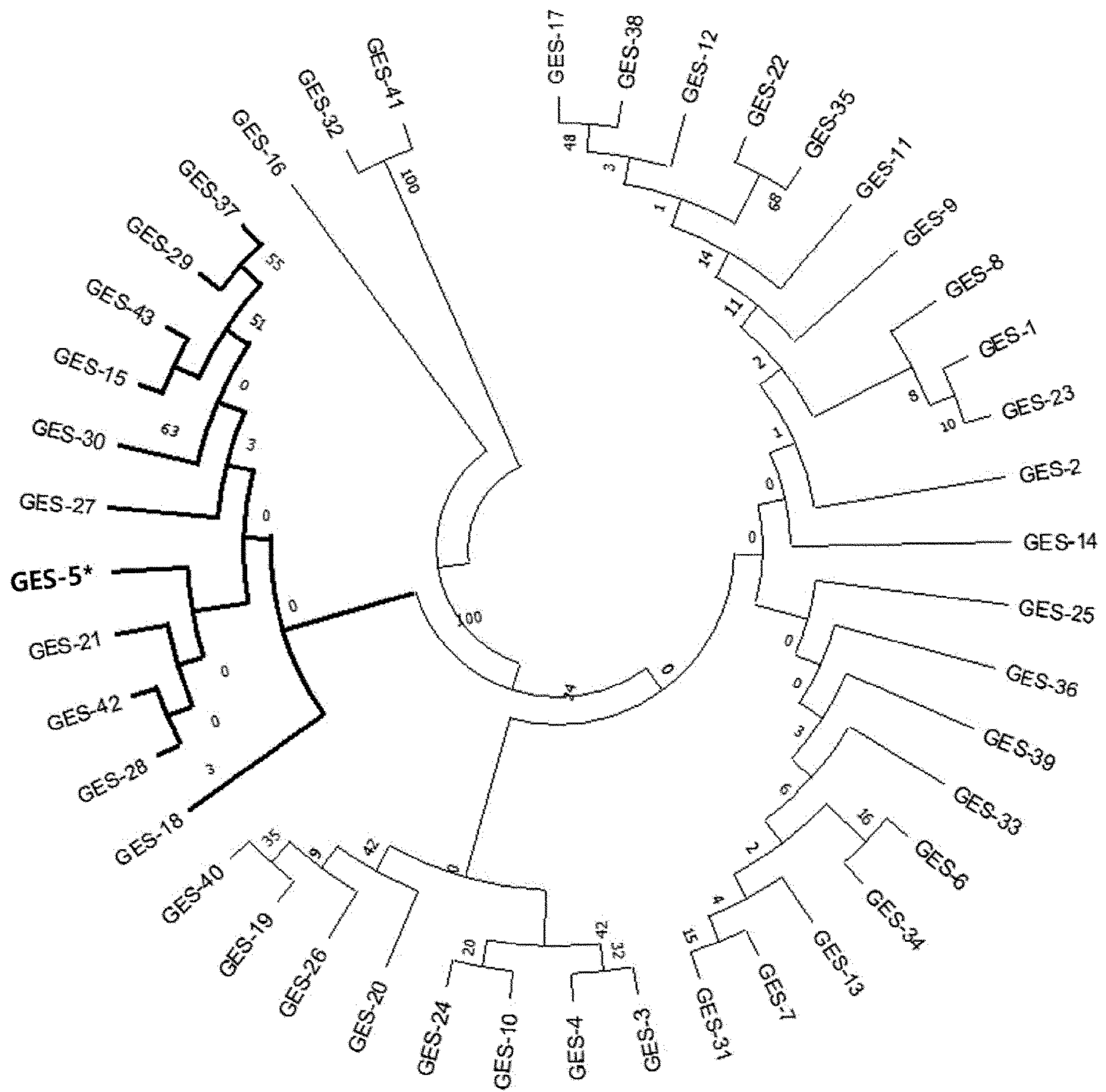
[도9d]



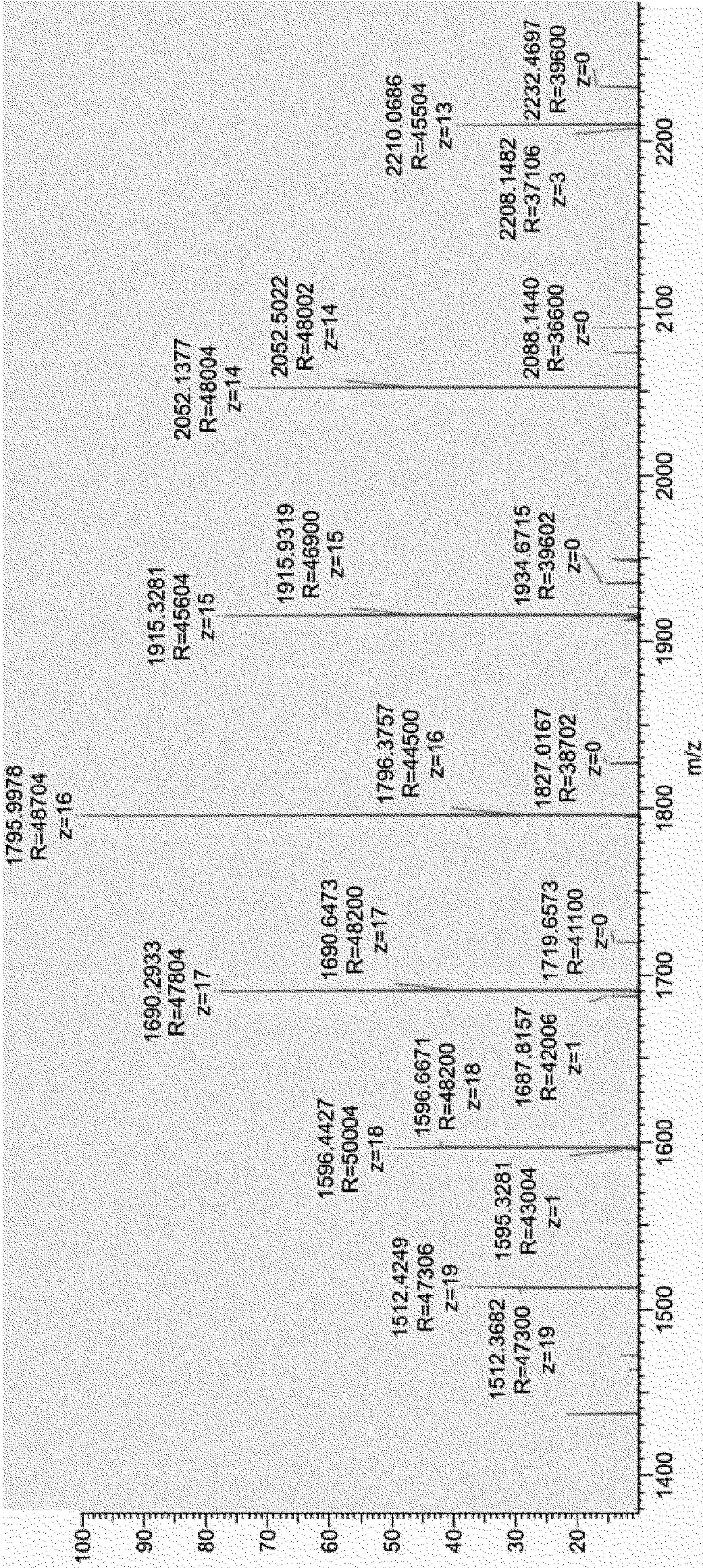
[도9e]



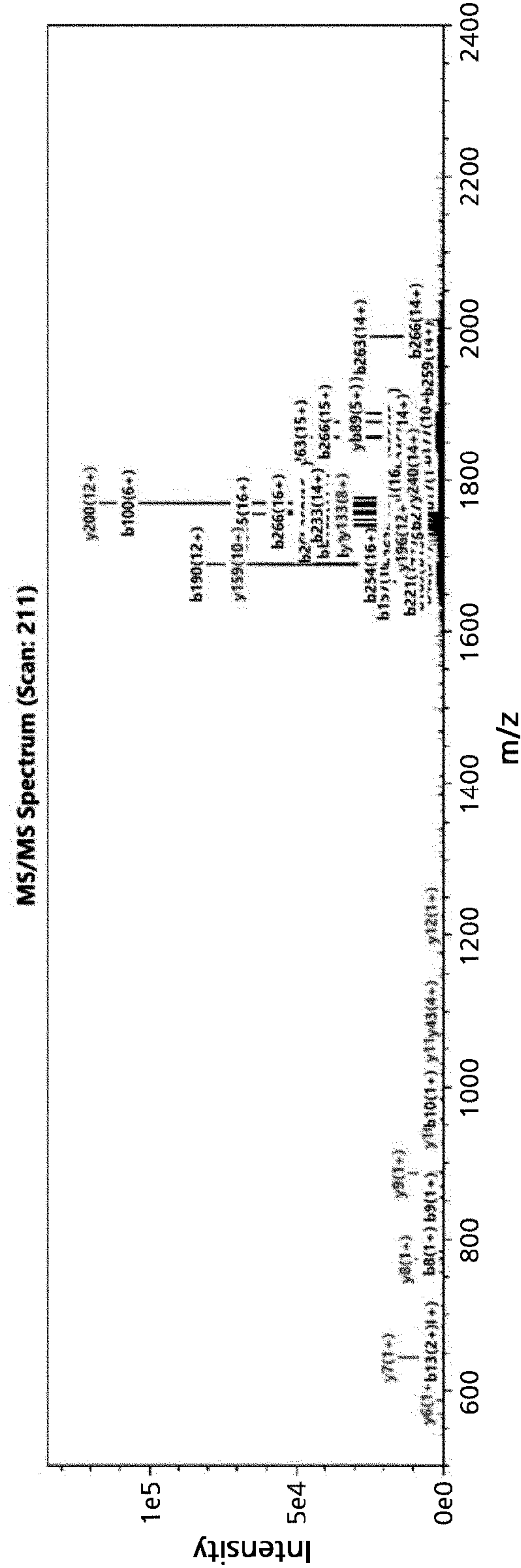
[도9f]



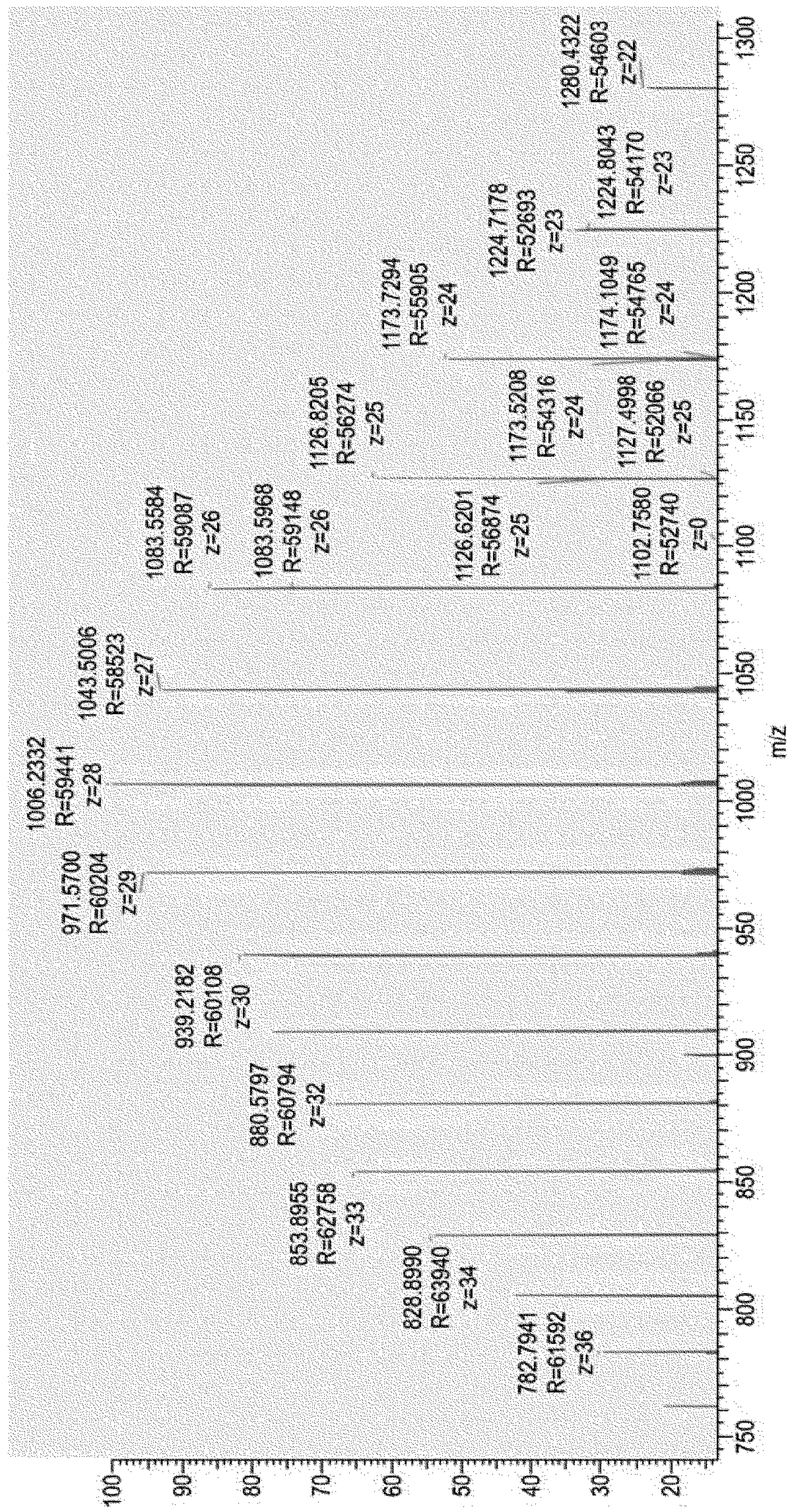
[도 10a]



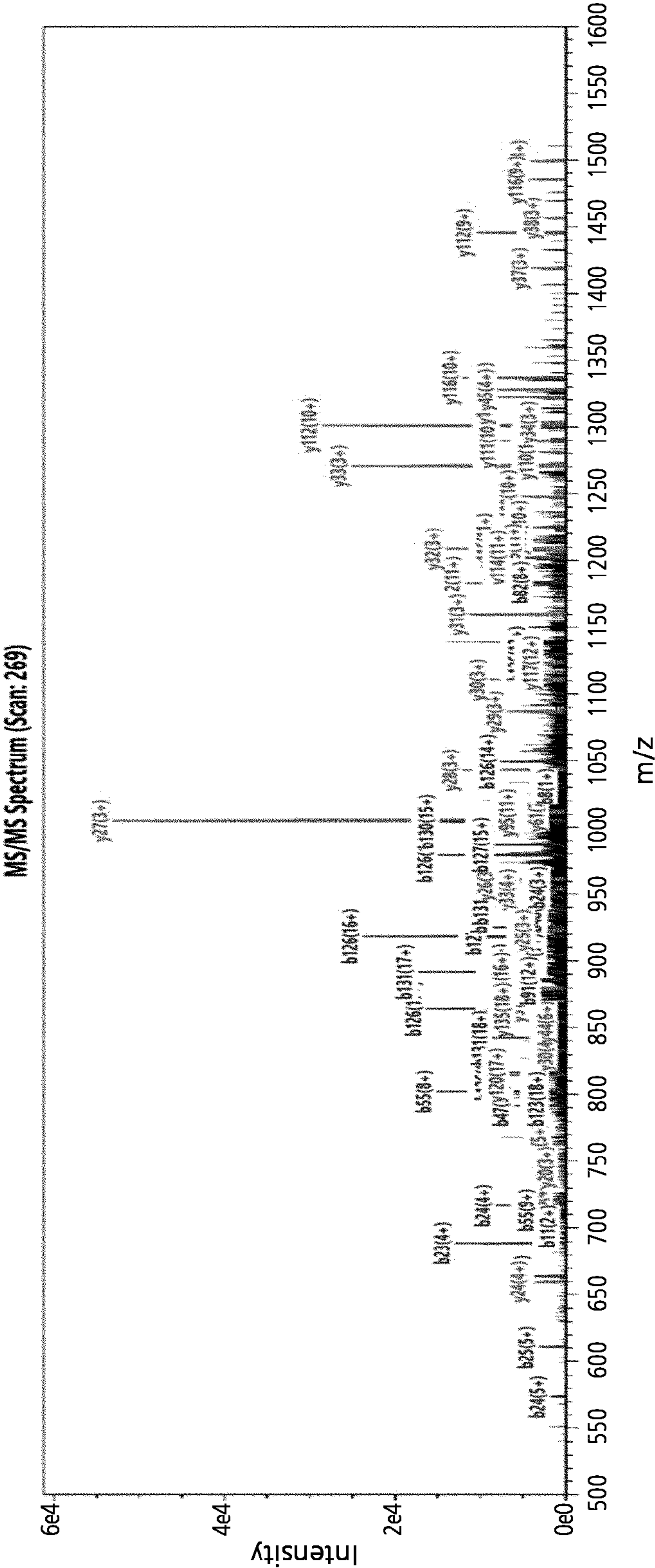
[도 10b]



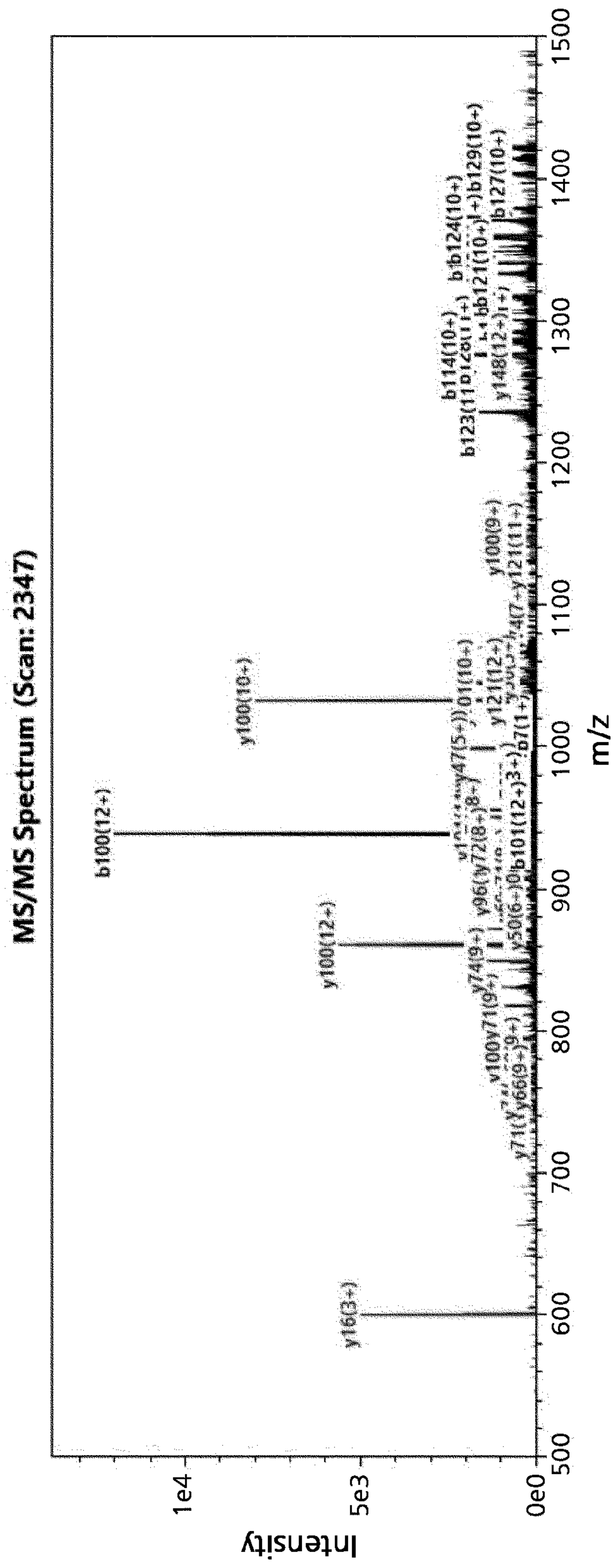
[도10c]



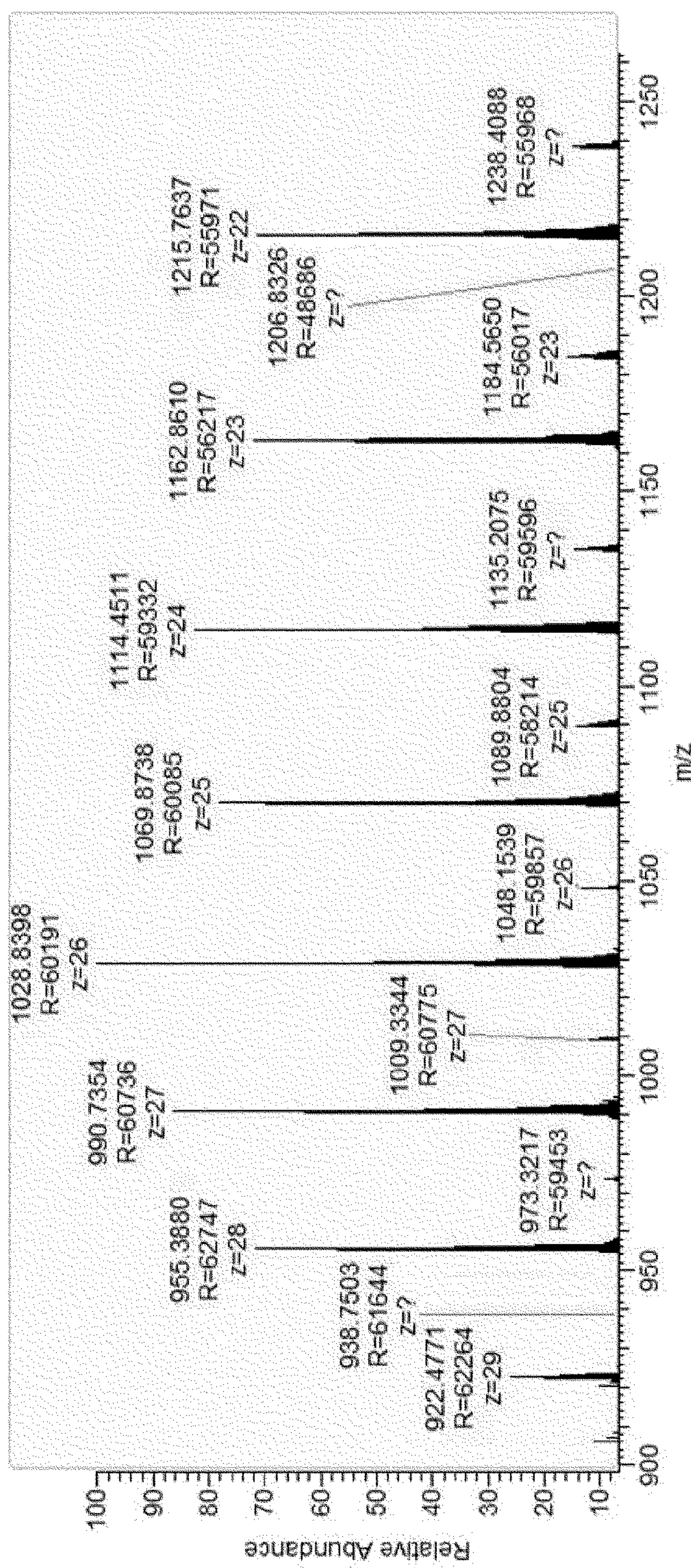
[도 10d]



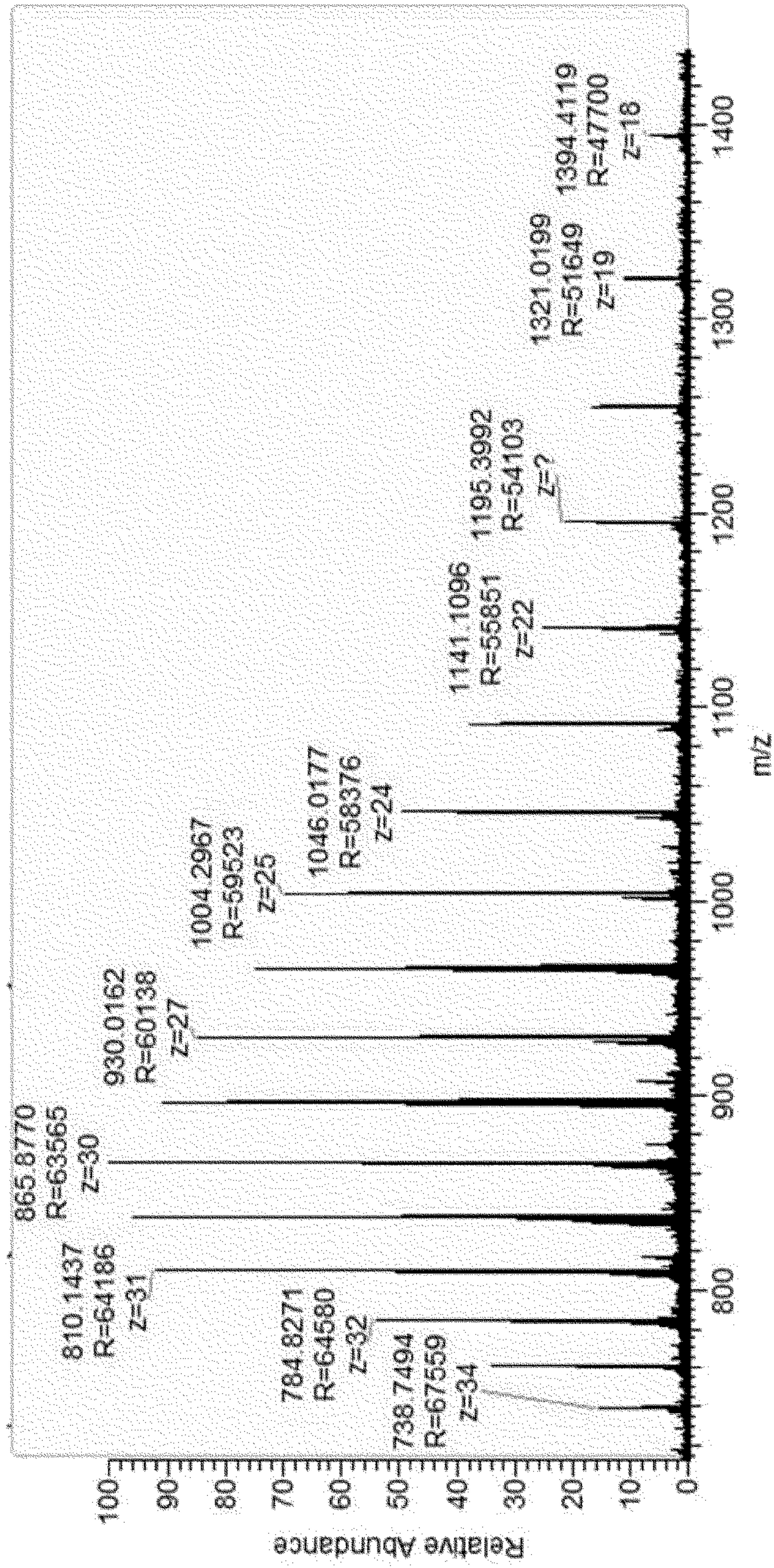
[도 10e]



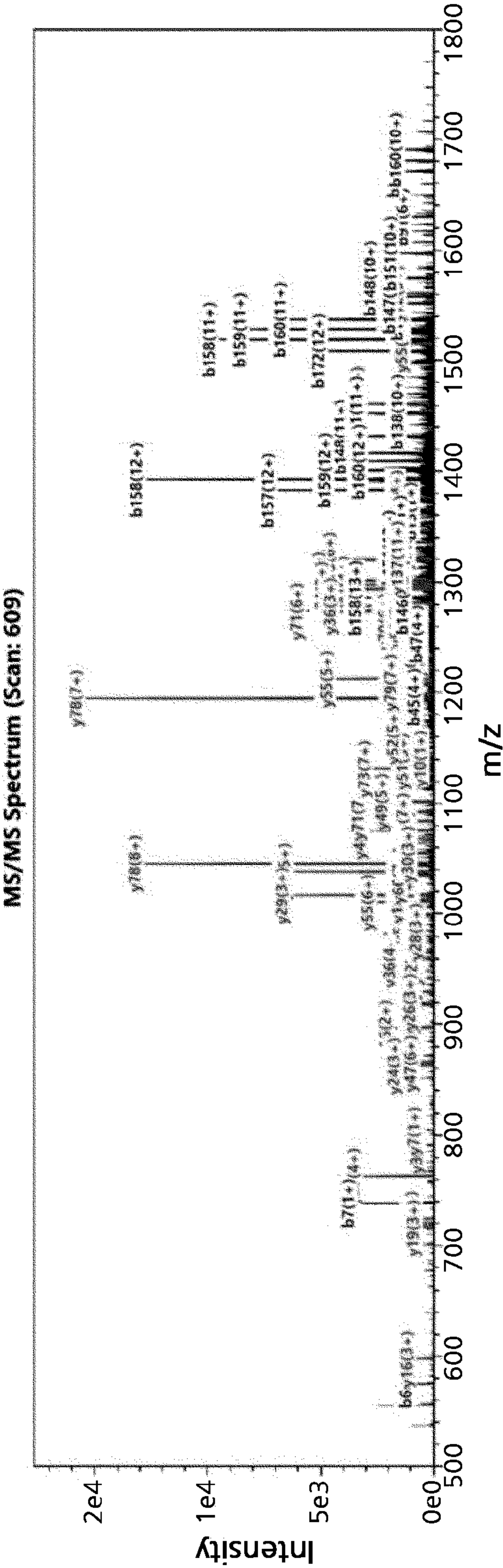
[도 10f]



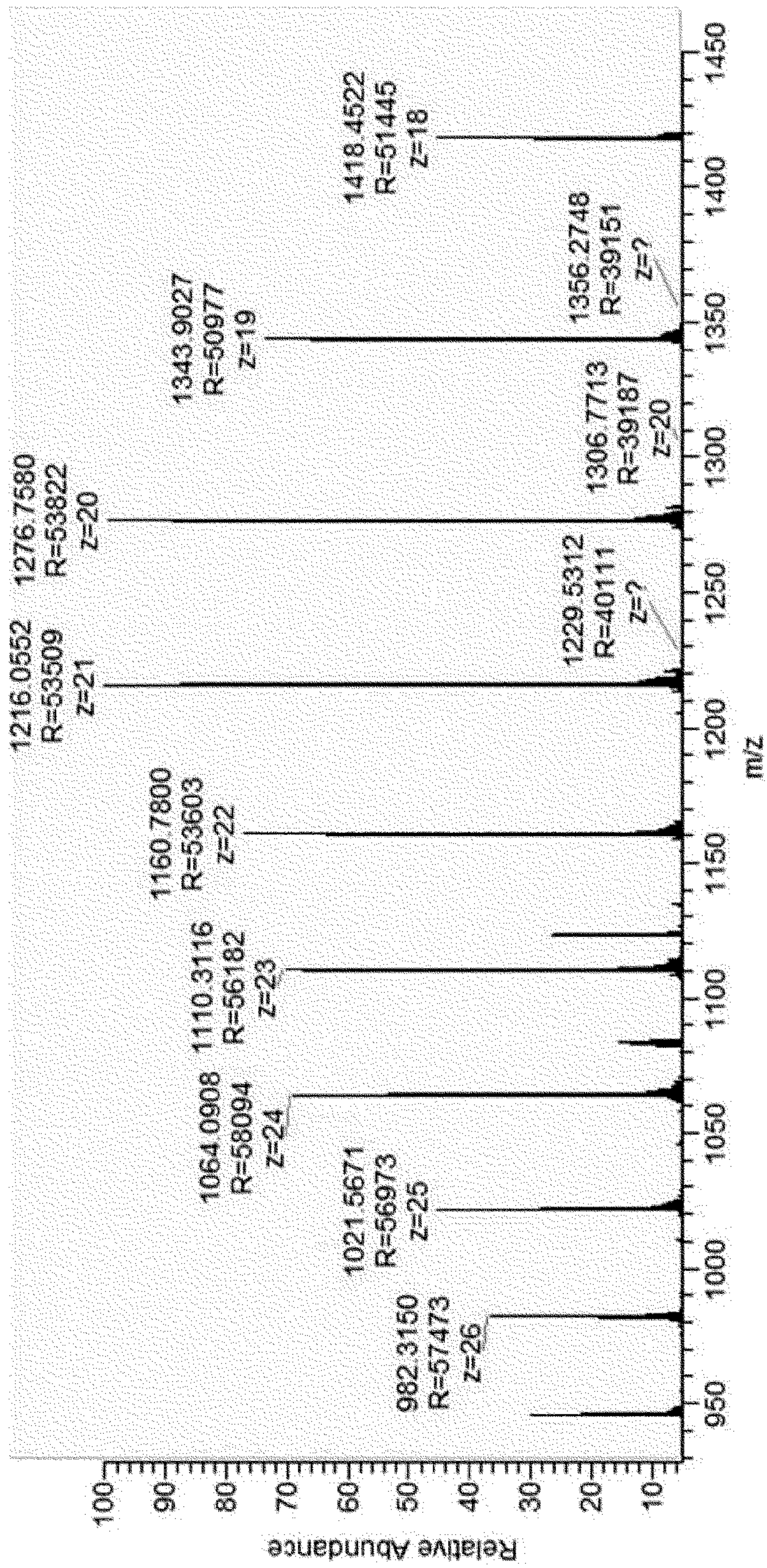
[도 10h]



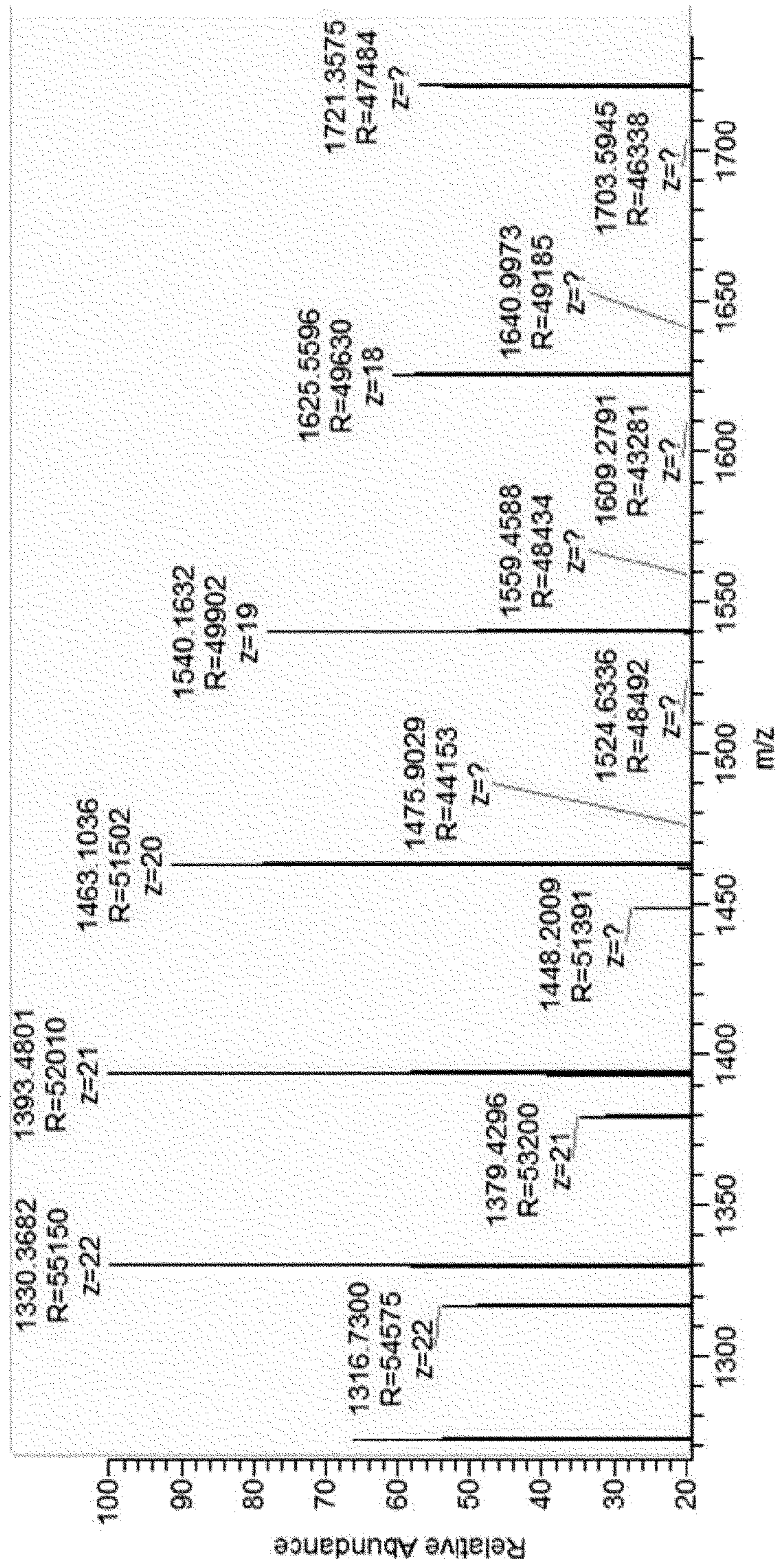
[도 10i]



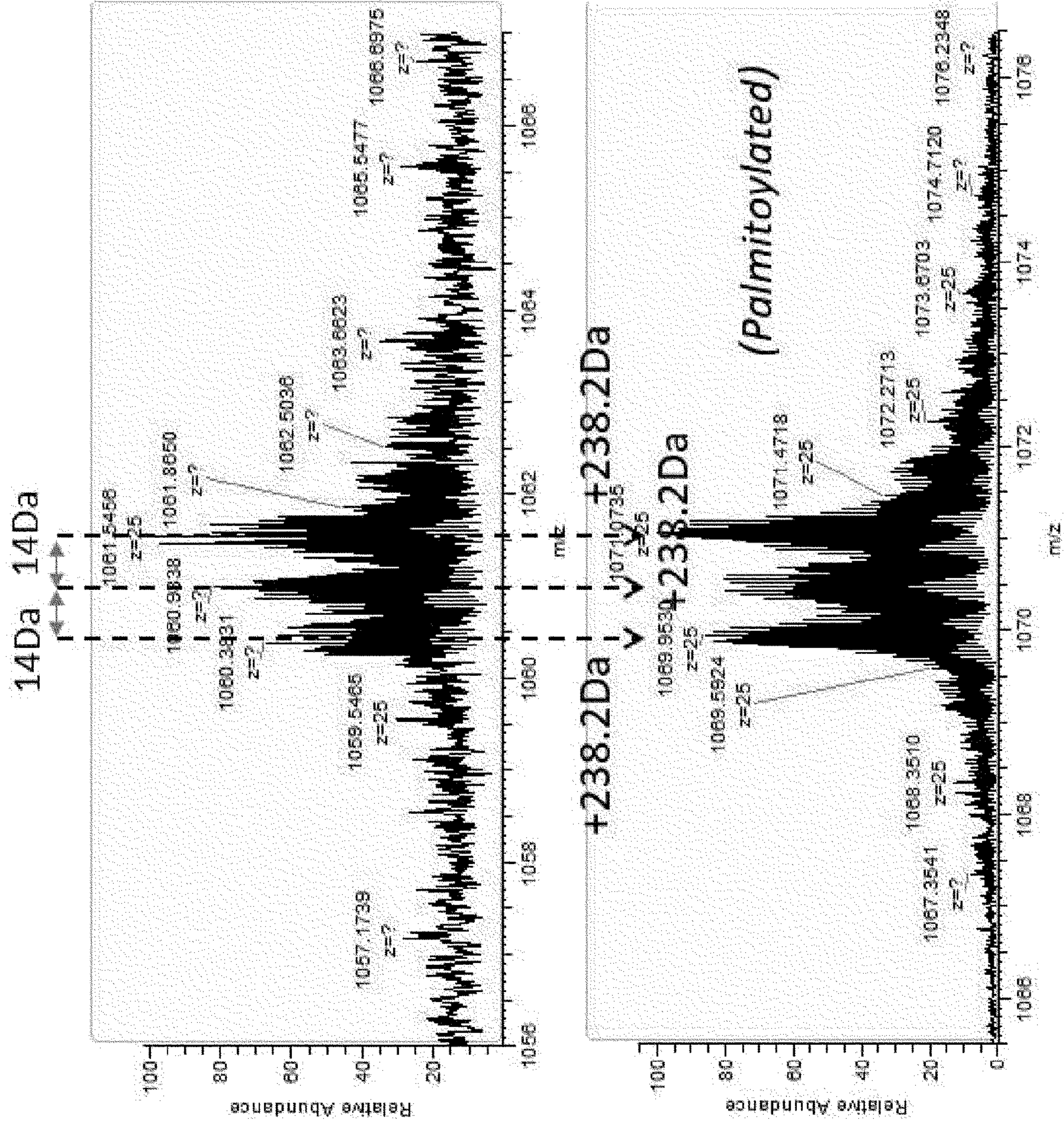
[도10j]



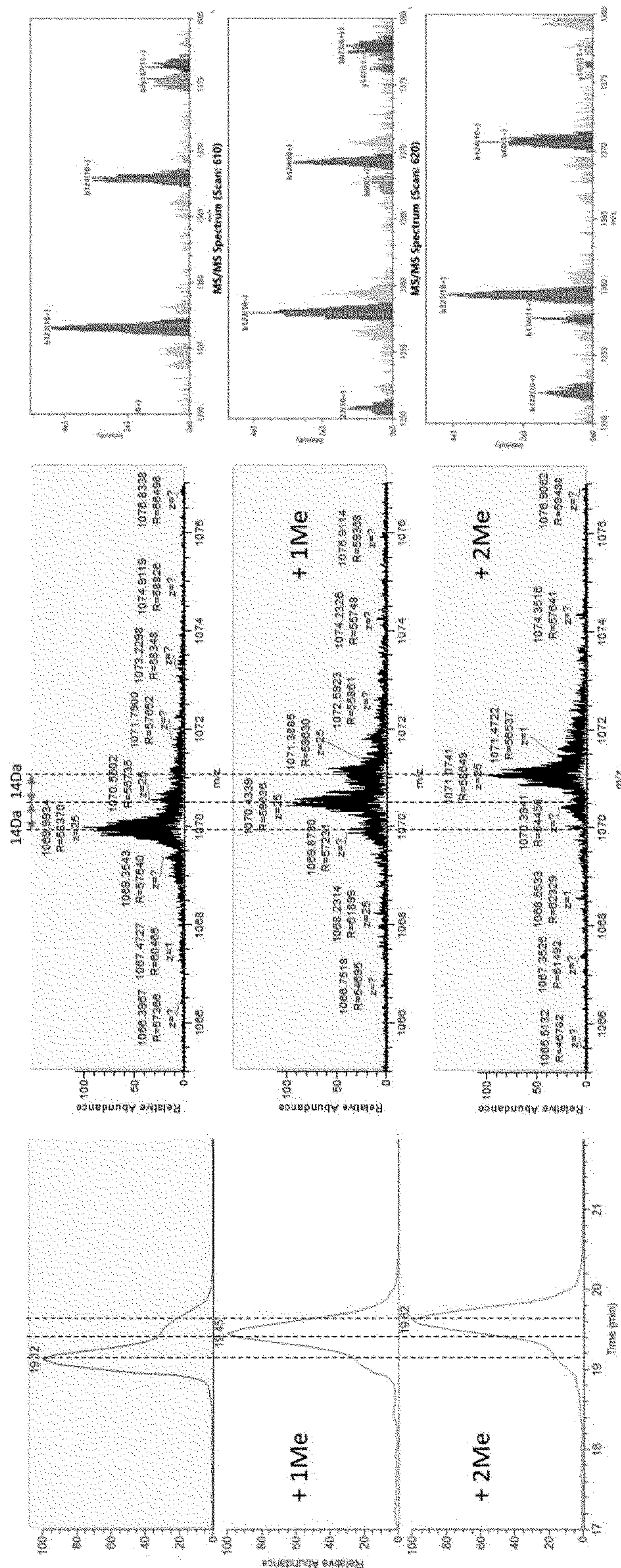
[도10]



[도11a]



[도11b]



[도12a]

22-ATALTNLVAEPFAKLEQDFGGSIGVYAMDTGSGATVSYRAEERFPLCSSFKGFLAAAVLARSQQQAG
 LLDTPIRYGKNALVPWSPISEKYLTG^MMTVAELSAAAVQYSDNAAANLLLKELGGPAGLTAF^MMRSIGDTT
 FRLDRWELELNSAIPGDARDTSSPRAVTESLQKLTLGSALAAPQRQQFVDWLKGNTTGNHRI RAAVPADW
 AVGDKTGT^CGVYGTANDYAVVWPTGRAPIVLAVYTRAPNKDDKHSEAVIAAAARLALEGLGVNGQ-293

^M: Oxidation sites

^C: 이황화결합 부위

[㉔12b]

23-KEWQENKSWNAHFTEHKSQGVVVLWNNKQQGFTNNLK RANQAFLPASTFKI P NSLI ALDLGVVKD
EHQVFKWDGQTRDIATWNRDHNLI T A M KYSVVPVYQEFARQI GEAR M SKMLHAFDYG NEDI SGNVDSFW
LDGGIRISATEQISFLRKLYHNKLHV SERSQRIVKQA M L TEANGDYII RAKTGYSTRI EPKIGWWVGWV
ELDDNVWFFA M N M D M P TSDGLGLRQAITKEVLKQEKIIP-265

M: Oxidation sites

[㉔12c]

21-LMLSG C MPGEIRPTIGQQ M ETGDQRFGDLVFRQLAPNVWQHTSYLD M PGFGAVASNGLI VRDGG RVLVVD TAWT
DDQTAQILNWI KQEINLPVALAVVTHAHQDK M GG M DALHAAGIATYANALS NQLAPQEG M VAAQHSLTFAANGWVEP
ATAPNFGPLKVFPYPGGHTSDNITVGIDGTDI AFGGCLIKDSKAKSLGNLGDADTEHYAASARA FGA A FPKAS M I V M
SHSAPDSRAAITH TARM M ADKLR-270

M: Oxidation sites C: Palmitoylation site

[㉔12d]

19-AESLPDLKIEKLDEGVYVHTSFEEVNGWGVVPKHGLVVLVNAEAYLIDTPFTAKDTEKLVTWFVERGYKIKGSI
SSHFHSDSTGGIEWLNSRSIPTYASELTNELLKKDGKVQATNSFSGVNYWLVKNKIEVFYPGPGHTPDNVVWVLP
KILFGGCFIKPYGLGNLGDANIEAWPKSAKLLKSKYGKAKLVVPGHSEVGDA SLLKLTLEQAVKGLNESKKPSKPSN
-246

M: Oxidation sites

[㉔12e]

27-VDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQSF DGAVYPSNGLI VRDGD ELLI DTAWGAKNTAALLAEIE
KQIGLPVTRAVSTHFHDDR VGGVDVLRAAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLEGLSSSGDAVRFGPVELFYPGA
AHSTDNLVYVPSASVLYGGCAIYELSRTSAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIPGHGLPGGLDLLKHTTN
VVKAH TNRSVVE-266

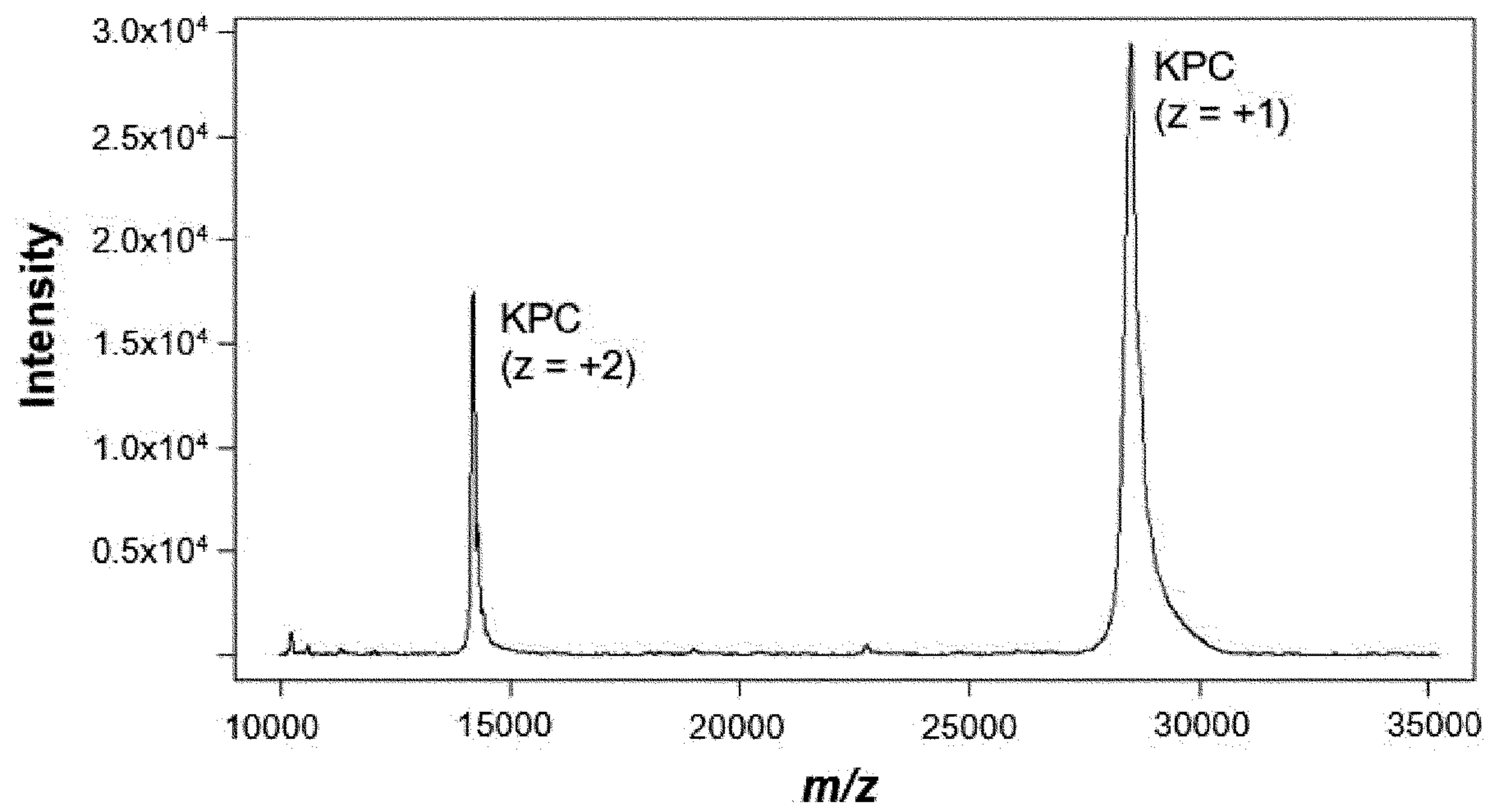
M: Oxidation sites

[㉔12f]

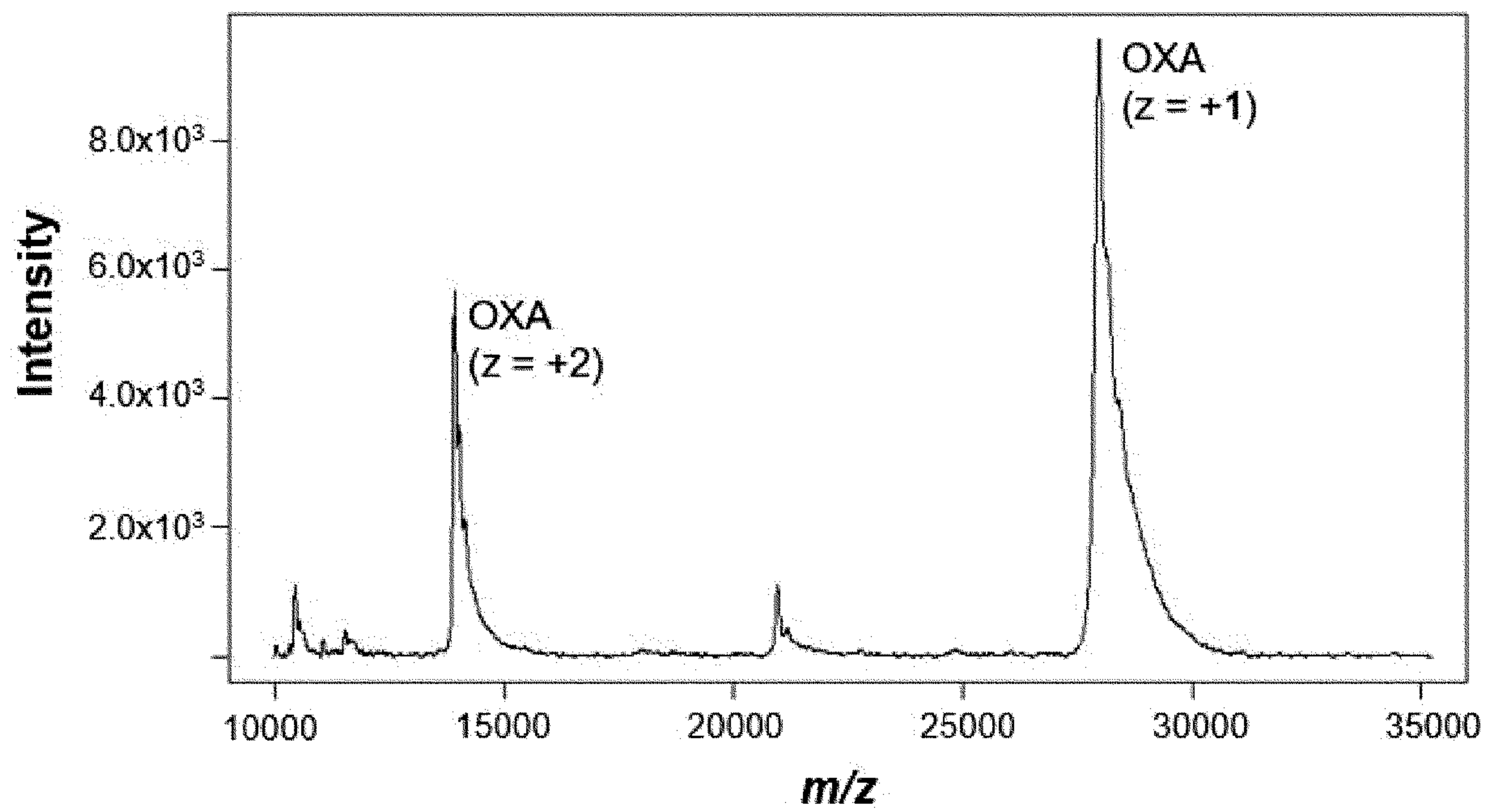
19-SEKLTFKTDLEKLEREKAAQIGVAIVDPQGEIVAGHRMAQRFA M CSTFKFPLAALVFERIDSGTERGDRKLSYG
PD M I VEWSPATERFLASGH M TVLEAAQA AVQLSDNGATNLLLREIGGPA M T QYFRKIGDSVSRLDRKEPE M SDNTP
GDLRDTTTPIAMARTVAKVLYGGALTSTSTHTIERWLI GNQTGDATLRAGFPKDWVVG EKTGT CANGGRNDIGFFKA
QERDYAVAVYTTAPKLSAVERDELVASVGQVITQLILSTDK-287

M: Oxidation sites

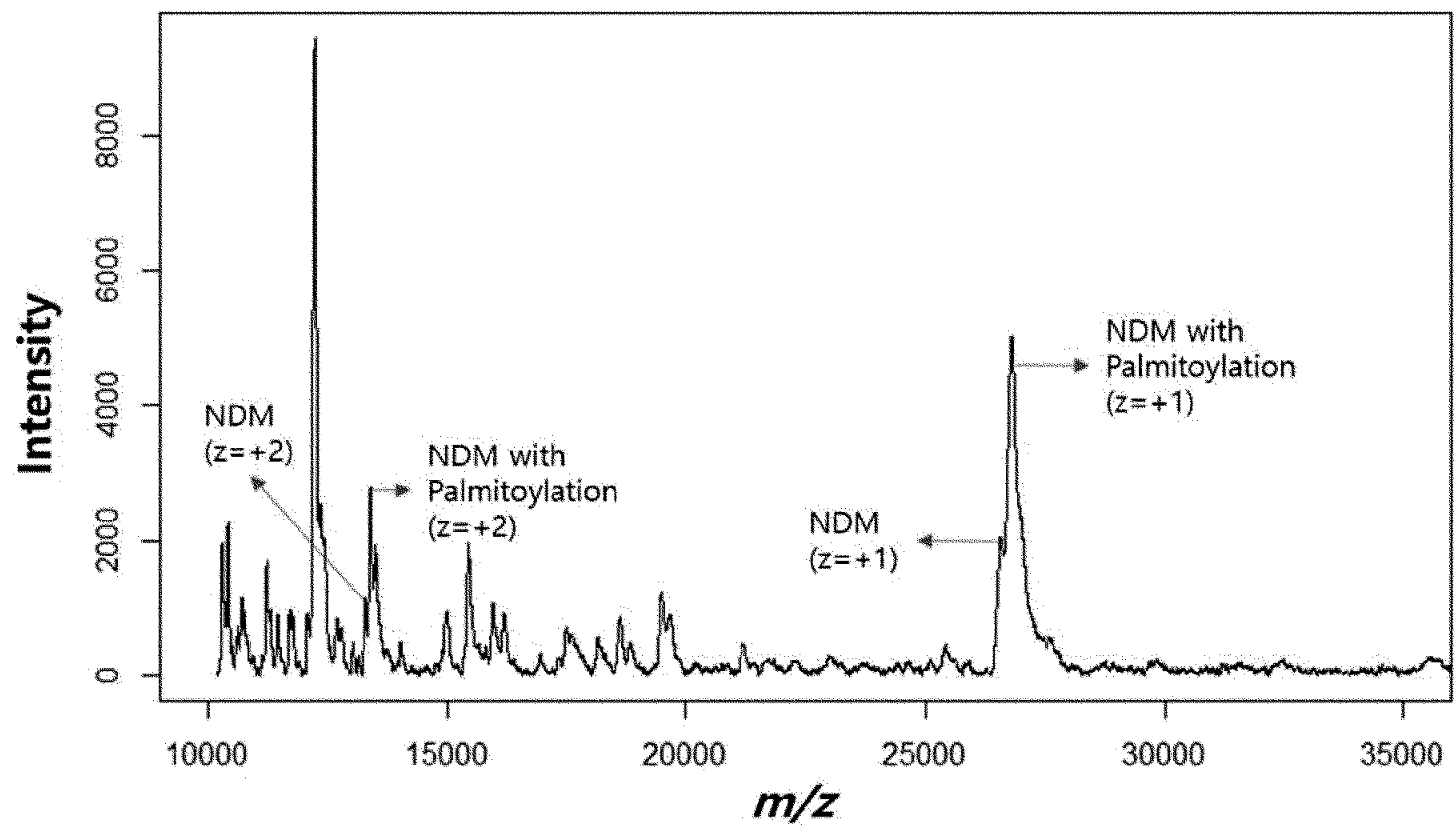
[도13a]



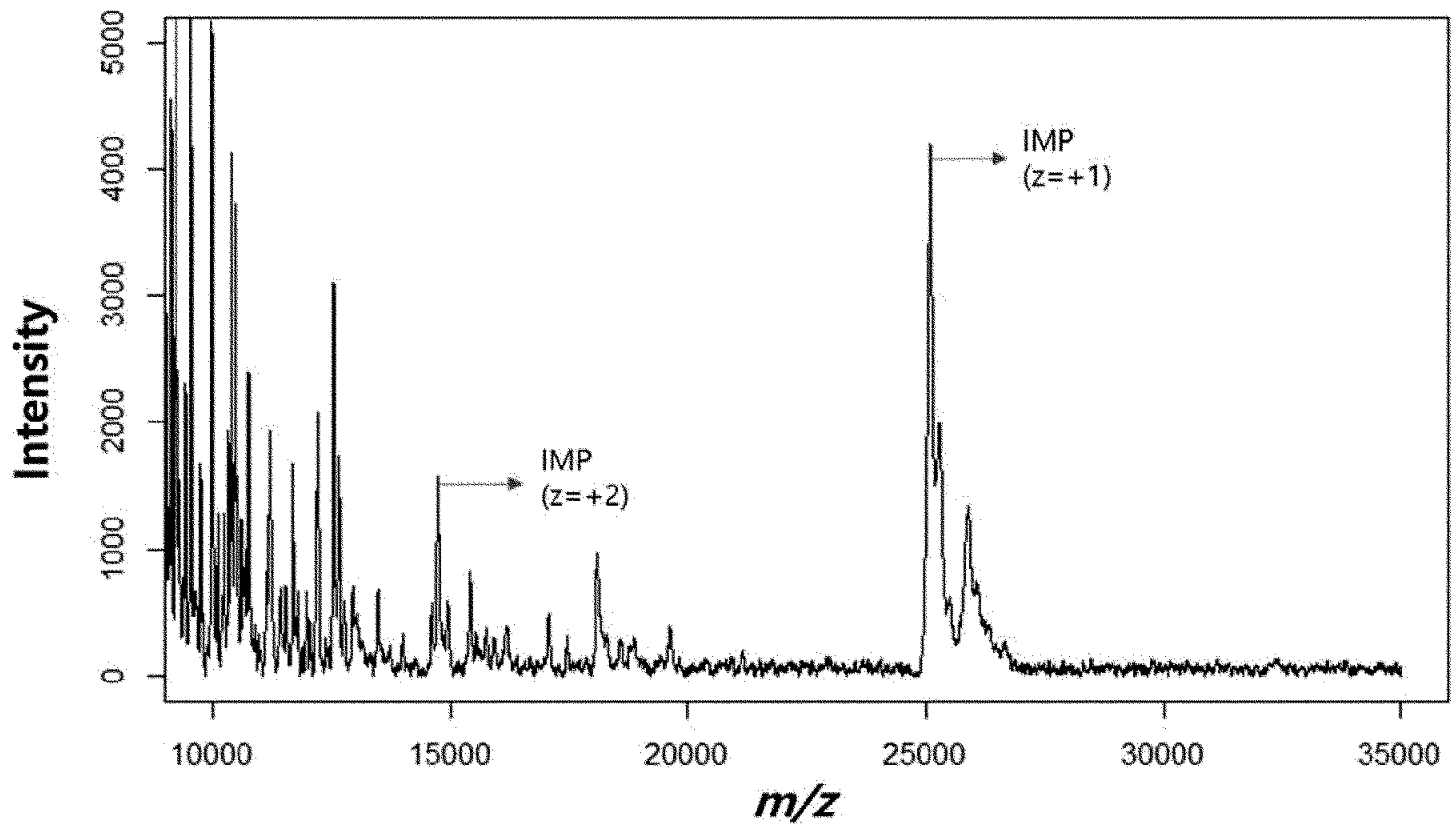
[도13b]



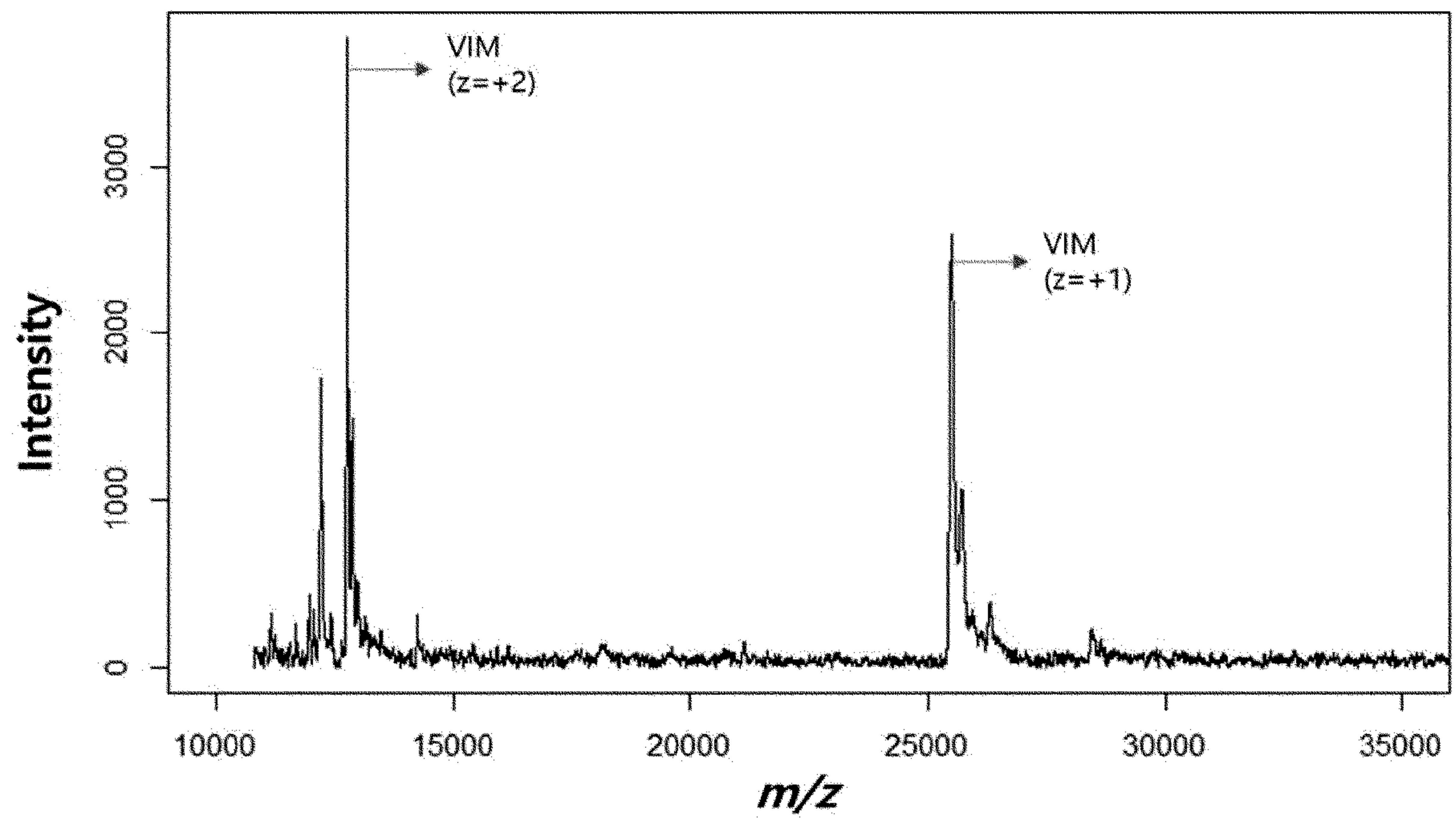
[도13c]



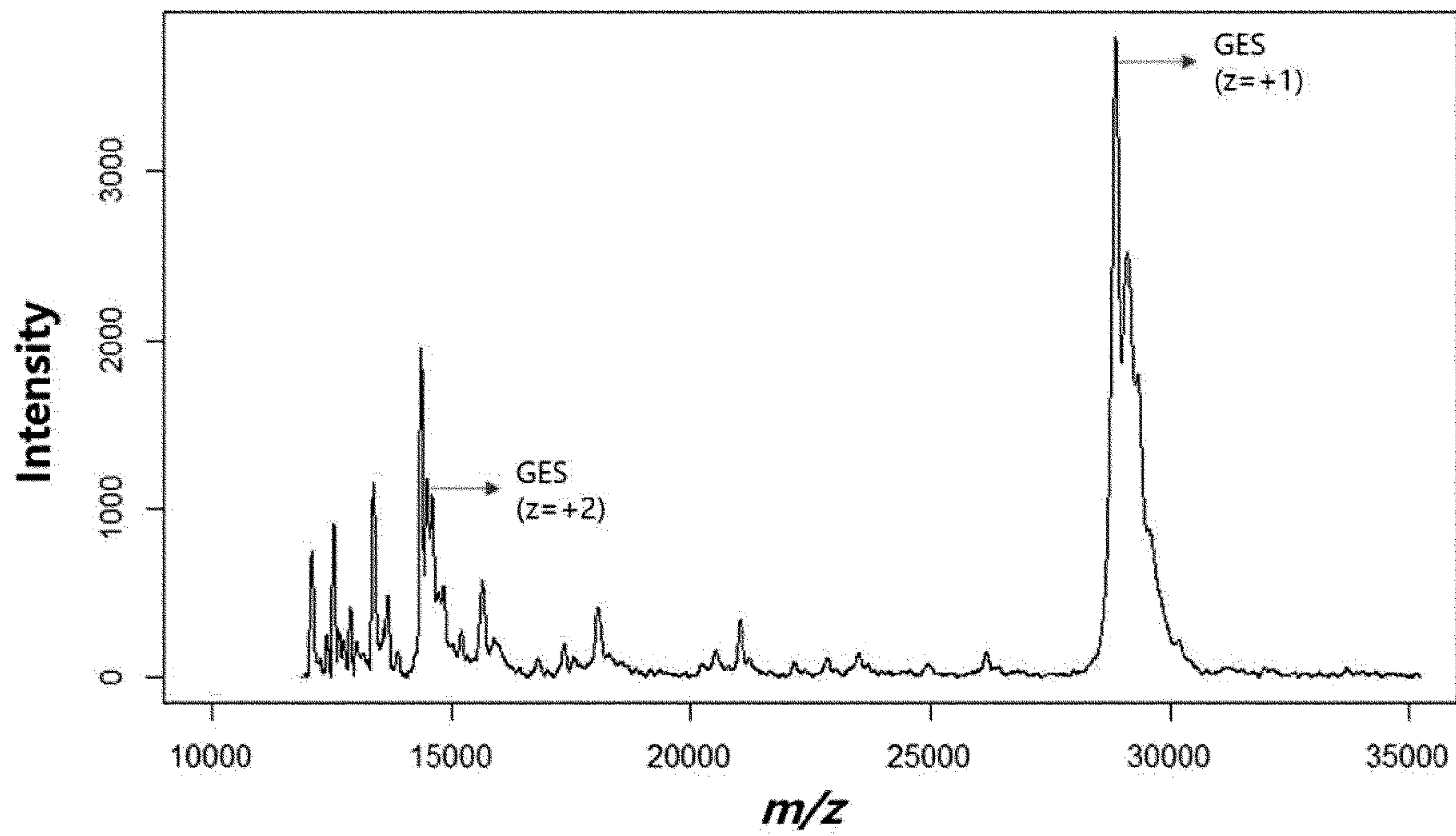
[도13d]



[도13e]



[도13f]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/019464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i; G01N 30/72(2006.01)i; G01N 30/96(2006.01)i; G01N 27/64(2006.01)i; C12Q 1/04(2006.01)i; G01N 30/88(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/68(2006.01); A61K 38/46(2006.01); C12M 1/34(2006.01); C12N 9/86(2006.01); C12Q 1/04(2006.01); C12Q 1/06(2006.01); G01N 27/62(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 카바페넴(carbapenem), 항생제(antibiotics), KPC(klebsiella pneumoniae carbapenemase), OXA(oxacillinase-48), NDM(new delhi metallo-beta-lactamase), IMP(imipenemase), VIM(verona integron-encoded metallo-β-lactamase), GES(guiana extended spectrum-β-lactamase), 질량분석(mass analysis)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GHEBREMEDHIN, B. et al. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2016, vol. 15, Article number:5, inner pp. 1-6. See abstract, inner pages 2-5 and figure 1.	1-35
A	KR 10-1999574 B1 (DIATECH KOREA CO., LTD.) 27 September 2019 (2019-09-27) See paragraphs [0066], [0098] and [0107], claims 1, 4, 5 and 10 and figures 3-4.	1-35
A	KR 10-2009-0046787 A (IPSAT THERAPIES OY) 11 May 2009 (2009-05-11) See paragraphs [0013], [0043]-[0054] and [0079].	1-35
A	JP 2017-038620 A (ERASMUS UNIV MEDICAL CENTER ROTTERDAM) 23 February 2017 (2017-02-23) See claims 1 and 4-7.	1-35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 April 2021

Date of mailing of the international search report

13 April 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2014-514566 A (BIOMERIEUX INC.) 19 June 2014 (2014-06-19) See claims 1, 2 and 8.	1-35
A	KR 10-2017-0041773 A (BIOMERIEUX) 17 April 2017 (2017-04-17) See claims 1, 5 and 6.	1-35
A	JP 2013-528387 A (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 11 July 2013 (2013-07-11) See claims 10, 16 and 28.	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/019464

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-35 pertain to a method for determining the presence of a pathogenic strain having a resistance to carbapenem antibiotics when, as a result of mass spectrometry, a protein, having the same mass as that of KPC or OXA carbapenemase in which 21 or 22 amino acid residues are removed, has been detected, or a protein, having the same mass as that of carbapenemase of any one or more selected from the group consisting of NDM, IMP, VIM and GES in which 18, 19, 20, 21 or 26 amino acid residues of N-terminus are removed, has been detected.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant’s protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant’s protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/019464

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-1999574	B1	27 September 2019	WO	2020-027390	A1	06 February 2020
KR	10-2009-0046787	A	11 May 2009	AU	2007-262916	A1	27 December 2007
				AU	2007-262916	B2	05 December 2013
				BR	PI0713726	A2	30 October 2012
				CA	2659691	A1	27 December 2007
				CA	2659691	C	19 May 2015
				CN	101484577	A	15 July 2009
				EP	2038411	A1	25 March 2009
				EP	2038411	B1	26 February 2014
				ES	2452321	T3	31 March 2014
				FI	119190	B	29 August 2008
				FI	119190	B1	29 August 2008
				FI	20065431	A0	21 June 2006
				FI	20065431	D0	21 June 2006
				JP	2009-540814	A	26 November 2009
				JP	5306191	B2	02 October 2013
				KR	10-1609243	B1	05 April 2016
				NO	20090297	A	19 January 2009
				NO	20090297	L	19 January 2009
				NO	342006	B1	12 March 2018
				NZ	573696	A	30 September 2011
				RU	2009101795	A	27 July 2010
				US	2009-0181004	A1	16 July 2009
				US	7989192	B2	02 August 2011
				WO	2007-147945	A1	27 December 2007
				WO	2007-147945	A8	27 December 2007
				ZA	200810460	A	30 December 2009
				ZA	200810460	B	30 December 2009
JP	2017-038620	A	23 February 2017	JP	6232115	B2	15 November 2017
JP	2014-514566	A	19 June 2014	CA	2833456	A1	26 October 2012
				CA	2833456	C	21 January 2020
				CA	3062219	A1	26 October 2012
				CA	3062224	A1	26 October 2012
				CN	103765216	A	30 April 2014
				CN	103765216	B	11 August 2017
				CN	107271686	A	20 October 2017
				CN	107271686	B	10 September 2019
				EP	2702407	A2	05 March 2014
				EP	2702407	B1	06 June 2018
				ES	2686336	T3	17 October 2018
				JP	6216711	B2	18 October 2017
				US	2015-0031063	A1	29 January 2015
				US	2017-082636	A1	23 March 2017
				US	9551020	B2	24 January 2017
				US	9874568	B2	23 January 2018
				WO	2012-143535	A2	26 October 2012
				WO	2012-143535	A3	13 December 2012
KR	10-2017-0041773	A	17 April 2017	CN	106574293	A	19 April 2017
				EP	3174994	A1	07 June 2017
				EP	3174994	B1	30 January 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/019464

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				EP	3495492	A1		12 June 2019	
				ES	2722112	T3		07 August 2019	
				FR	3024465	A1		05 February 2016	
				FR	3024465	B1		05 February 2016	
				JP	2017-523420	A		17 August 2017	
				JP	2020-122794	A		13 August 2020	
				JP	6685279	B2		22 April 2020	
				RU	2017105467	A		28 August 2018	
				RU	2017105467	A3		17 January 2019	
				RU	2698139	C2		22 August 2019	
				SG	11201700450	A		27 February 2017	
				US	2017-0211123	A1		27 July 2017	
				WO	2016-016580	A1		04 February 2016	
				ZA	201700534	B		30 May 2018	
JP	2013-528387	A	11 July 2013	EP	2576811	A1		10 April 2013	
				JP	5808398	B2		10 November 2015	
				US	2011-0300552	A1		08 December 2011	
				US	2013-0288356	A1		31 October 2013	
				US	8481281	B2		09 July 2013	
				US	9353396	B2		31 May 2016	
				WO	2011-152899	A1		08 December 2011	

A.발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/68(2006.01)i; G01N 30/72(2006.01)i; G01N 30/96(2006.01)i; G01N 27/64(2006.01)i; C12Q 1/04(2006.01)i; G01N 30/88(2006.01)i

B.조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/68(2006.01); A61K 38/46(2006.01); C12M 1/34(2006.01); C12N 9/86(2006.01); C12Q 1/04(2006.01); C12Q 1/06(2006.01); G01N 27/62(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 카바페넴(carbapenem), 항생제(antibiotics), KPC(klebsiella pneumoniae carbapenemase), OXA(oxacillinase-48), NDM(new delhi metallo-beta-lactamase), IMP(imipenemase), VIM(verona integron-encoded metallo-β-lactamase), GES(guiana extended spectrum-β-lactamase), 질량분석(mass analysis)

C.관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	GHEBREMEDHIN, B. 등, MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2016년, 15권, Article number:5, 내부페이지 1-6 요약, 내부페이지 2-5 및 도면 1	1-35
A	KR 10-1999574 B1 (다이아텍코리아 주식회사) 2019.09.27 단락 [0066], [0098], [0107], 청구항 1, 4, 5, 10 및 도면 3-4	1-35
A	KR 10-2009-0046787 A (아이피에스에이티 테라피즈 오와이) 2009.05.11 단락 [0013], [0043]-[0054], [0079]	1-35
A	JP 2017-038620 A (ERASMUS UNIV MEDICAL CENTER ROTTERDAM) 2017.02.23 청구항 1, 4-7	1-35
A	JP 2014-514566 A (BIOMERIEUX INC.) 2014.06.19 청구항 1, 2, 8	1-35

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일
2021년04월13일(13.04.2021)

국제조사보고서 발송일
2021년04월13일(13.04.2021)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
2. ☐추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1999574 B1	2019/09/27	WO 2020-027390 A1	2020/02/06
KR 10-2009-0046787 A	2009/05/11	AU 2007-262916 A1	2007/12/27
		AU 2007-262916 B2	2013/12/05
		BR PI0713726 A2	2012/10/30
		CA 2659691 A1	2007/12/27
		CA 2659691 C	2015/05/19
		CN 101484577 A	2009/07/15
		EP 2038411 A1	2009/03/25
		EP 2038411 B1	2014/02/26
		ES 2452321 T3	2014/03/31
		FI 119190 B	2008/08/29
		FI 119190 B1	2008/08/29
		FI 20065431 A0	2006/06/21
		FI 20065431 D0	2006/06/21
		JP 2009-540814 A	2009/11/26
		JP 5306191 B2	2013/10/02
		KR 10-1609243 B1	2016/04/05
		NO 20090297 A	2009/01/19
		NO 20090297 L	2009/01/19
		NO 342006 B1	2018/03/12
		NZ 573696 A	2011/09/30
		RU 2009101795 A	2010/07/27
		US 2009-0181004 A1	2009/07/16
		US 7989192 B2	2011/08/02
		WO 2007-147945 A1	2007/12/27
		WO 2007-147945 A8	2007/12/27
		ZA 200810460 A	2009/12/30
		ZA 200810460 B	2009/12/30
JP 2017-038620 A	2017/02/23	JP 6232115 B2	2017/11/15
JP 2014-514566 A	2014/06/19	CA 2833456 A1	2012/10/26
		CA 2833456 C	2020/01/21
		CA 3062219 A1	2012/10/26
		CA 3062224 A1	2012/10/26
		CN 103765216 A	2014/04/30
		CN 103765216 B	2017/08/11
		CN 107271686 A	2017/10/20
		CN 107271686 B	2019/09/10
		EP 2702407 A2	2014/03/05
		EP 2702407 B1	2018/06/06
		ES 2686336 T3	2018/10/17
		JP 6216711 B2	2017/10/18
		US 2015-0031063 A1	2015/01/29
		US 2017-082636 A1	2017/03/23
		US 9551020 B2	2017/01/24
		US 9874568 B2	2018/01/23
		WO 2012-143535 A2	2012/10/26
		WO 2012-143535 A3	2012/12/13
KR 10-2017-0041773 A	2017/04/17	CN 106574293 A	2017/04/19
		EP 3174994 A1	2017/06/07

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

청구항 1-35는 질량 분석 결과 N-말단의 21개 또는 22개 아미노산 잔기가 제거된 KPC 또는 OXA 카바페넴 분해 효소와 동일한 질량의 단백질이 검출되거나, N-말단의 18, 19, 20, 21 또는 26개 아미노산 잔기가 제거된 NDM, IMP, VIM 및 GES로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 카바페넴 분해 효소와 동일한 질량의 단백질이 검출되는 경우 카바페넴 항생제에 대한 내성을 가지는 병원성 균주가 존재하는 것으로 판정하는 방법에 관한 것입니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☒ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

- 이의신청에 관한 기재 ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 3174994 B1	2019/01/30
		EP 3495492 A1	2019/06/12
		ES 2722112 T3	2019/08/07
		FR 3024465 A1	2016/02/05
		FR 3024465 B1	2016/02/05
		JP 2017-523420 A	2017/08/17
		JP 2020-122794 A	2020/08/13
		JP 6685279 B2	2020/04/22
		RU 2017105467 A	2018/08/28
		RU 2017105467 A3	2019/01/17
		RU 2698139 C2	2019/08/22
		SG 11201700450 A	2017/02/27
		US 2017-0211123 A1	2017/07/27
		WO 2016-016580 A1	2016/02/04
		ZA 201700534 B	2018/05/30
JP 2013-528387 A	2013/07/11	EP 2576811 A1	2013/04/10
		JP 5808398 B2	2015/11/10
		US 2011-0300552 A1	2011/12/08
		US 2013-0288356 A1	2013/10/31
		US 8481281 B2	2013/07/09
		US 9353396 B2	2016/05/31
		WO 2011-152899 A1	2011/12/08