



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년12월17일
(11) 등록번호 10-1002068
(24) 등록일자 2010년12월10일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/44 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7008886

(22) 출원일자(국제출원일자) 2002년12월19일

심사청구일자 2007년11월07일

(85) 번역문제출일자 2004년06월09일

(65) 공개번호 10-2004-0068209

(43) 공개일자 2004년07월30일

(86) 국제출원번호 PCT/IT2002/000811

(87) 국제공개번호 WO 2003/056031

국제공개일자 2003년07월10일

(30) 우선권주장

011100 2001년12월21일 아일랜드(IE)

(56) 선행기술조사문헌

J. Neural Transm., Vol.108,
pp.541-557(2001.05.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

악티알 파마수티카 엘디에이.

포르투갈 폰살 (마데이라) 피-9000-082, 260, 루
아 도스 페레이로스

(72) 발명자

드시몬, 클라우디오

이탈리아 알테아 아이-00040, 10, 비아 누오로

(74) 대리인

한라특허법인, 백남훈

전체 청구항 수 : 총 6 항

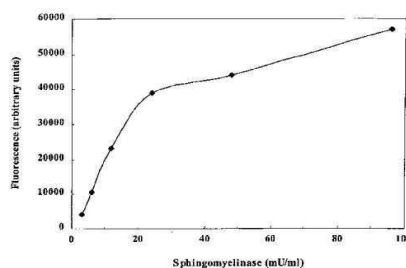
심사관 : 허주형

(54) 알칼리성 스핑고마이엘리나제의 분석학적 검출 방법 및상기 방법에 사용하기 위한 키트

(57) 요약

알칼리성 스핑고마이엘리나제(SMase)는 결장암과 같은 심각한 병리상태의 마커이므로, 상기 스핑고마이엘리나제의 존재에 대한 평가가 필요한 환자의 대변 중에서 상기의 존재를 평가하기 위한 분석학적 형광측정 방법 및 상기 방법과 같은 방법에 사용하기 위한 키트를 개시한다.

대표도 - 도1



형광 분석을 사용한 스핑고마이엘리나제의 검출
각각의 반응물은 특정한 분석 완충액 중에 지시된 양의 세균성
스핑고마이엘리나제를 포함하였다.
반응물을 37 °C에서 1 시간 동안 배양시켰다.
형광강도를 530 nm에서의 여기 및 590 nm에서의 형광 검파를 사용하여
형광 미세플레이트 판독기로 측정하였다.

특허청구의 범위

청구항 1

하기의 단계들을 포함하는, 환자의 대변에서 알칼리성 스펅고마이엘리나제를 검출하는 방법:

- 1) 환자의 대변 샘플을 취하여 건조시키는 단계;
- 2) 상기 건조된 샘플을 3 내지 4 g 칭량하여 0.25 M 슈크로즈, 0.15 M KCl, 50 mM KH_2PO_4 를 함유하는 균질화 완충액(pH 7.4) 20 ml에 현탁시키는 단계;
- 3) 상기 샘플을 +4 °C에서 60 분간 4000 rpm에서 원심분리시키는 단계;
- 4) 상등액을 회수하고 다시 +4 °C에서 15 분간 4000 rpm에서 원심분리시키는 단계;
- 5) 상기 상등액 중의 단백질 함량을 각 샘플에 대해 32 mg/ml 내지 40 mg/ml의 단백질 농도 범위로 표준물질로서 소 혈청 알부민을 사용하여 피어스(Pierce) 단백질 분석에 의해 측정하고 각 샘플 25 μl 를 웰 내에 피펫팅하는 단계;
- 6) 각각의 25 μl 샘플에 50 mM 트리스/HCl, 2 mM EDTA, 0.15 M NaCl(pH 9.0)을 함유하는 분석 완충액 65 μl 및 29 μM 스펅고마이엘린 10 μl 를 가하고 분석 완충액에 담즙 염(TC, TDC, GC, GCDC)을 3 mM의 농도로 가하는 단계;
- 7) 37 °C에서 1 시간 동안 배양시키는 단계;
- 8) 샘플로서 각각의 동결건조된 세균성 스펅고마이엘리나제 표준물 100 μl 및 스펅고마이엘린(29 μM) 10 μl 를 피펫팅하여 37 °C에서 1 시간 동안 배양시키는 단계;
- 9) 1 시간 후에, 50 mM 트리스/HCl(pH 7.4), 10 mM β -글리세로포스페이트, 750 μM ATP, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 100 μM 암플렉스 레드, 8 U/ml 알칼리성 포스파타제, 0.2 U/ml 콜린 옥시다제, 2 U/ml 양고추냉이 페록시다제를 함유하는 반응 완충액 100 μl 를 가하는 단계;
- 10) 상기 반응물을 빛을 차단하여 37 °C에서 1 시간 이상 배양시키는 단계;
- 11) 형광 미세플레이트 판독기에서 530 내지 560 nm 범위의 여기 및 590 nm의 방출 검파를 사용하여 형광성을 측정하는 단계;
- 12) 각 점에 대해서, 스펅고마이엘리나제가 없는 대조군으로부터 얻은 값들을 제하여 배경 형광을 보정하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 생물학적 유체에 적용되는 방법.

청구항 3

하기의 시약 샘플들을 별도로 함유하는 시험 튜브를 포함하는, 환자의 대변 또는 생물학적 유체 중의 알칼리성 스펅고마이엘리나제를 검출하기 위한 키트:

- a) 대변 또는 생물학적 유체 중에 존재하는 알칼리성 스펅고마이엘리나제에 의해 가수분해되어 포스포릴콜린을 제공하는 스펅고마이엘린;
- b) 포스포릴콜린의 콜린으로의 가수분해를 촉진시키는 알칼리성 포스파타제;
- c) 콜린을 과산화 수소로 산화시키는 콜린 옥시다제;
- d) 과산화 수소와 하기 e)의 반응을 돕는 양고추냉이 페록시다제;
- e) 상기 d)와 반응하여 상기 대변 또는 생물학적 유체 중에 존재하는 알칼리성 SMase의 마커인 형광성을 갖는 형광 화합물 레소루핀을 제공하는 앰플러 레드(Ampler Red) 시약(10-아세틸-3.7-디하이드록시페녹사진);

- f) 표준 농축물로서 사용하기 위한 동결건조된 세균성 스펡고마이엘리나제;
- g) EDTA를 포함한 pH 8.9 ~ 9.1 의 분석 완충액;
- h) 담즙 염 TC, TDC, GC, GCDC; 및
- i) EDTA, EGTA, β -글리세로포스페이트 및 ATP 를 포함하는 반응 완충액;

청구항 4

하기의 단계들을 포함하는, 환자의 생물학적 물질에서 알칼리성 스펡고마이엘리나제를 검출하는 방법:

- 1) 상기 생물학적 물질의 샘플을 수거하는 단계;
- 2) 상기 샘플을 pH 7.4로 조절된, 0.24 내지 0.26 M 슈크로즈, 0.14 내지 0.16 M KCl, 45 내지 55 mM KH_2PO_4 를 함유하는 균질화 완충액 중에 현탁시키는 단계;
- 3) 상기 샘플을 1 회 이상 원심분리시키고 상등액을 회수하는 단계;
- 4) 상기 상등액 중의 단백질 함량을 측정하는 단계;
- 5) 상기 상등액의 샘플에 44 내지 55 mM 트리스/HCl, 1.9 내지 2.2 mM EDTA, 0.14 내지 0.16 M NaCl(pH 8.9 내지 9.1), 28 내지 30 μM 스펡고마이엘린을 함유하는 분석 완충액 및 담즙 염(TC, TDC, GC, GCDC)을 2.9 내지 3.1 mM의 농도로 함유하는 분석 완충액을 가하는 단계;
- 6) 상기 분석 혼합물을 37 °C에서 1 시간 동안 배양시키는 단계;
- 7) 상기 단계 6)의 샘플을 28 내지 31 μM 스펡고마이엘린과 혼합하고 37 °C에서 1 시간 동안 배양시키는 단계;
- 8) 45 내지 55 mM 트리스/HCl(pH 7.3 내지 7.5), 9 내지 11 mM β -글리세로포스페이트, 745 내지 755 μM ATP, 4 내지 6 mM EDTA, 4 내지 6 mM EGTA, 95 내지 105 μM 암플렉스 레드(Amplex Red) 시약, 7 내지 9 U/ml 알칼리성 포스파타제, 0.1 내지 0.3 U/ml 콜린 옥시다제 및 1.5 내지 2.5 U/ml 양고추냉이 페록시다제를 함유하는 반응 완충액을 가하는 단계;
- 9) 상기 반응 혼합물을 빛을 차단하여 37 °C에서 1 시간 이상 배양시키는 단계;
- 10) 530 내지 560 nm 범위의 여기 및 590 nm의 방출 검파를 사용하여 형광성을 측정하는 단계.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 각 샘플에 대해 형광성 판독을, 스펡고마이엘리나제가 없는 대조군으로부터 얻은 값을 감함으로써 배경 형광성에 대해 보정하는 방법.

청구항 6

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 단백질 함량을 피어스(Pierce) 단백질 분석에 의해 측정하는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 대변 또는 생물학적 유체 중의 알칼리성 스펡고마이엘리나제의 존재에 대한 평가가 필요한 환자에서 상기 존재를 평가하기 위한 분석학적 방법에 관한 것이다.
- [0002] 보다 특히 본 발명의 방법은, 하기에 상세히 개시하는 바와 같이, 결장암 및 가족 샘종 폴립증과 같은 심각한 병리 상태의 마커인 알칼리성 스펡고마이엘리나제의 검출을 위한 생체 외 형광측정 방법이다.

배경기술

- [0003] 효소 스펡고마이엘리나제(스펙고마이엘린 포스포디에스테라제, SMase)는 스펡고마이엘린의 세라미드와 콜린 포스페이트로의 가수분해를 촉진시킨다.
- [0004] 3 가지 상이한 유형의 SMase(산성, 중성 및 알칼리성)는 지금까지 하기와 같이 다수의 동형체들로서 동정되었다:
- [0005] -리소솜 산성 SMase(A-SMase);
- [0006] -시토졸 Zn^{2+} -의존성 산성 SMase;
- [0007] -막 중성 마그네슘-의존성 SMase(N-SMase);
- [0008] -시토졸 마그네슘-독립성 N-SMase; 및
- [0009] -알칼리성 SMase.
- [0010] SMase는 광범위하게 다양한 생리학적 및 병리학적 과정들, 예를 들어 세포 내 이입된 SM의 리소솜 가수분해, 세라미드 매개된 세포 신호, 종종형성, 말단 분화, 세포 주기 정지, 세포사멸, 염증, 및 진행 중압 반응의 조절에 한 역할을 하는 것으로 나타났다.
- [0011] 일반적으로 각각 리소솜 및 막-결합된 효소로서 세포 중에 존재하는 산성 및 중성 SMase와 대조적으로, 알칼리성 SMase는 조직 및 종 차이를 나타낸다. 인간에서, 상기 알칼리성 SMase는 장 점막 및 담즙에서 발견된다. 알칼리성 SMase는 십이지장에서 나타나기 시작하여, 장, 특히 공장의 말단 부위에서 높은 수준에 도달하며, 결장 및 직장에서 상당량이 발생한다. 상기 SMase는 9.0에서 최적의 알칼리성 pH를 제공하며, Mg^{2+} -독립적이고, 담즙 염-의존적이며 트립신 내성이다.
- [0012] 알칼리성 SMase의 병리학적 중요성은 단지 최근에 인식되었으며, 이는 주로 하기의 이유들로 인해 다수의 연구를 수행할 것을 촉구하였다.
- [0013] 먼저, 상기 효소는 실질적으로 우유, 달걀, 육류 및 생선에서 일어나는 식이성 스펡고마이엘린의 가수분해에 기여할 수 있다. 두 번째로, 상기 효소는 콜레스테롤 흡수를 조절할 수 있다. 세 번째로, 장관을 따라 있는 알칼리성 SMase의 존재 및 직장결장암에서 탐지되는 그의 선택적인 감소는, 상기 효소가 생리적 조건 하에서 세포사멸을 자극하고 암 발생에 대해 장 점막을 보호하기 때문에, 장의 암 발생에 한 역할을 함을 암시한다.
- [0014] 선행 연구들은 또한 생리적 조건 하에서 알칼리성 SMase가 담즙 염에 의해 장 점막에서 관강으로 용해됨을 입증하였다. 그러나, 생리적 조건 하에서 담즙 염 농도가 비정상적으로 증가함으로써 상기 담즙 염에 의한 알칼리성 SMase의 용해가 상기 효소의 생합성을 초과하여 상기 점막에서의 알칼리성 SMase의 활성 수준을 낮추고 변 또는 생물학적 유체, 즉 담즙 중에 상기 효소의 분비를 비정상적으로 증가시킬 수 있다. 결과적으로, 대변 또는 생물학적 유체 중에 정상적인 기본 값 이상으로 분비된 과잉의 알칼리성 SMase는 결장직장암 및 가족 샘종 폴립증에 대한 귀중한 진단 마커로서 해석될 수 있으며, 따라서: 상기 언급한 장관의 병리상태들을 앓고 있는 듯한 환자들의 대변 또는 생물학적 유체 중에서 알칼리성 SMase를 검출하기 위한 신뢰할만한 분석방법이 필요하다.
- [0015] 또한, 일부 세균 균주(예를 들어 스트렙토코커스 써모필러스 락토바실리(*Streptococcus thermophilus*

Lactobacilli))는 높은 수준의 SMase를 함유하며, 알칼리성 SMase의 평가는 상기 세균 수의 변화, 즉 프로바이오틱(probiotic) 및/또는 프로바이오틱-기본 제품으로 처리한 후의 변화를 평가하는 방법을 제공할 수 있다.

[0016] 알칼리성 SMase에 대한 선행의 분석 방법들은 이미 공지되어 있다. 상기 SMase의 활성을, 세포를 SM의 방사성 전구체로 표지하고 이어서 상기 표지된 생성물의 수준을 측정함으로써 생체 내에서 측정하거나 또는 방사성 표지된 SM 또는 SM의 색원체성 동족체 또는 중성 SM의 착색된 형광 유도체를 사용하여 생체 외에서 측정할 수 있다.

[0017] 이러한 공지된 통상적으로 사용되는 분석들은 이들이 방사성 분석인 한은 잠재적으로 매우 위험하고 형광측정 분석보다 덜 민감하기 때문에 전적으로 만족스럽지 못하다.

[0018] 발명의 요약

[0019] 본 발명의 목적은 직장결장암 및 가족 샘종 폴립증, 또는 쓸개 또는 간 질환을 앓고 있는 듯한 환자의 대변 또는 생물학적 유체 중의 알칼리성 SMase에 대한 신뢰성있고 저렴한 분석을 제공하여 상기 공지된 방법들의 결점들을 극복하는 것이다.

[0020] 본 발명의 추가의 목적은 상기 분석에 사용하기 위한 분석 키트를 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은 상이한 건강 상태 하의, 또는 질병에 따른, 또는 약물 또는 프로바이오틱 또는 보충 식품으로 치료한 후의 세균 콜로니 형성에 대한 평가이다.

발명의 상세한 설명

[0022] 본 발명의 형광측정에 의한 간접적인 분석 방법은 하기 반응 순서들에 입각한다.

[0023] 변 또는 다른 생물학적 유체 중에 존재하는 알칼리성 SMase의 작용 하에서, 스핑고마이엘린은 세라미드와 포스포릴콜린으로 가수분해되고, 이는 알칼리성 포스파타제의 작용 하에서 가수분해되어 콜린을 생성시킨다. 콜린 옥시다제의 존재 하에서 콜린은 과산화 수소(H_2O_2)를 생성시킨다.

[0024] 상기 화합물은 양고추냉이 페록시다제의 존재 하에서 H_2O_2 에 대한 민감성 형광원 탐침인 10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진(이후부터 "앰플렉스 레드 시약(Ampllex Red Reagent)"이라 칭함)과 반응을 일으켜 매우 형광성 화합물인 레소루핀을 생성한다. 형광성을 530 내지 560 nm에서의 여기 및 590 nm에서의 형광 검파를 이용하여 형광측정 미세플레이트 형광계로 측정한다.

[0025] 상기 반응 순서 및 형광 검출 수단들을 기본으로 하는, 본 발명의 알칼리성 SMase의 분석 방법은 하기의 단계들(대변에 관한 것이다)을 포함한다. 그러나, 당해 분야의 숙련가가 상기 방법을 또한 적합하게 통상적으로 변화시켜 담즙과 같은 생물학적 유체에도 쉽게 적용시킬 수 있음은 자명할 것이다:

- 1) 환자의 생물학적 물질의 샘플을 수거하는 단계;
- 2) 상기 샘플을 pH 7.4로 조절된, 0.24 내지 0.26 M 슈크로즈, 0.14 내지 0.16 M KCl, 45 내지 55 mM KH_2PO_4 를 함유하는 균질화 완충액 중에 현탁시키는 단계;
- 3) 상기 샘플을 1 회 이상 원심분리시키고 상등액을 회수하는 단계;
- 4) 상기 상등액 중의 단백질 함량을 측정하는 단계;
- 5) 상기 상등액의 샘플에 44 내지 55 mM 트리스/HCl, 1.9 내지 2.2 mM EDTA, 0.14 내지 0.16 M NaCl(pH 8.9 내지 9.1), 28 내지 30 μ M 스핑고마이엘린을 함유하는 분석 완충액 및 담즙 염(TC, TDC, GC, GCDC)을 2.9 내지 3.1 mM의 농도로 함유하는 분석 완충액을 가하는 단계;
- 6) 상기 분석 혼합물을 37 °C에서 1 시간 동안 배양시키는 단계;
- 7) 상기 단계 6)의 샘플을 28 내지 31 μ M 스핑고마이엘린과 혼합하고 37 °C에서 1 시간 동안 배양시키는 단계;
- 8) 45 내지 55 mM 트리스/HCl(pH 7.3 내지 7.5), 9 내지 11 mM β -글리세로포스페이트, 745 내지 755 μ M ATP, 4 내지 6 mM EDTA, 4 내지 6 mM EGTA, 95 내지 105 μ M 앰플렉스 레드(Ampllex Red) 시약, 7 내지 9 U/ml 알칼

리성 포스파타제, 0.1 내지 0.3 U/ml 콜린 옥시다제 및 1.5 내지 2.5 U/ml 양고추냉이 페록시다제를 함유하는 반응 완충액을 가하는 단계;

9) 상기 반응 혼합물을 빛을 차단하여 37 °C에서 1 시간 이상 배양시키는 단계;

10) 530 내지 560 nm 범위의 여기 및 590 nm의 방출 검파를 사용하여 형광성을 측정하는 단계.

보다 바람직하게는,

[0026] 1) 환자의 대변 샘플을 취하여 건조시키는 단계;

[0027] 2) 상기 건조된 샘플을 약 3 내지 4 g 칭량하여 0.25 M 슈크로즈, 0.15 M KCl, 50 mM KH₂PO₄를 함유하는 균질화 완충액(pH 7.4) 20 ml에 현탁시키는 단계;

[0028] 3) 상기 샘플을 +4 °C에서 60 분간 4000 rpm에서 원심분리시키는 단계;

[0029] 4) 상등액을 회수하고 다시 +4 °C에서 15 분간 4000 rpm에서 원심분리시키는 단계;

[0030] 5) 상기 상등액 중의 단백질 함량을 각 샘플에 대해 32 mg/ml 내지 40 mg/ml의 단백질 농도 범위로 표준물질로서 소 혈청 알부민을 사용하여 피어스(Pierce) 단백질 분석에 의해 측정하고 각 샘플 25 μl를 웰 내에 피펫팅하는 단계;

[0031] 6) 각각의 25 μl 샘플에 50 mM 트리스/HCl, 2 mM EDTA, 0.15 M NaCl(pH 9.0)을 함유하는 분석 완충액 65 μl 및 29 μM 스핑고마이엘린 10 μl를 가하고 분석 완충액에 담즙 염(TC, TDC, GC, GCDC)을 3 mM의 농도로 가하는 단계;

[0032] 7) 37 °C에서 1 시간 동안 배양시키는 단계;

[0033] 8) 샘플로서 각각의 표준물질(하기 참조) 100 μl 및 스핑고마이엘린(29 μM) 10 μl를 피펫팅하여 37 °C에서 1 시간 동안 배양시키는 단계;

[0034] 9) 1 시간 후에, 50 mM 트리스/HCl(pH 7.4), 10 mM β-글리세로포스페이트, 750 μM ATP, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 100 μM 암플렉스 레드, 8 U/ml 알칼리성 포스파타제, 0.2 U/ml 콜린 옥시다제, 2 U/ml 양고추냉이 페록시다제를 함유하는 반응 완충액 100 μl를 가하는 단계;

[0035] 10) 상기 반응물을 빛을 차단하여 37 °C에서 1 시간 이상 배양시키는 단계;

[0036] 11) 형광 미세플레이트 판독기에서 530 내지 560 nm 범위의 여기 및 590 nm의 방출 검파를 사용하여 형광성을 측정하는 단계;

[0037] 12) 각 점에 대해서, 스핑고마이엘리나제가 없는 대조군으로부터 얻은 값들을 제하여 배경 형광을 보정하는 단계.

[0038] 본 발명은 또한 앞서 개시된 방법에 따라 환자의 대변 또는 생물학적 유체 중의 알칼리성 스핑고마이엘리나제를 검출하기 위한 키트에 관한 것으로, 상기 키트는 하기의 시약 샘플들을 별도로 함유하는 시험 튜브들을 포함한다:

[0039] a) 대변 또는 생물학적 유체 중에 존재하는 알칼리성 스핑고마이엘리나제에 의해 가수분해되어 포스포릴콜린을 제공하는 스핑고마이엘린;

[0040] b) 포스포릴콜린의 콜린으로의 가수분해를 촉진시키는 알칼리성 포스파타제;

[0041] c) 콜린을 과산화 수소로 산화시키는 콜린 옥시다제;

[0042] d) 과산화 수소와 하기 e)의 반응을 돕는 양고추냉이 페록시다제;

[0043] e) 상기 d)와 반응하여 상기 대변 또는 생물학적 유체 중에 존재하는 알칼리성 SMase의 마커인 형광성을 갖는 형광 화합물 레소루핀을 제공하는 앰플리 레드 시약(10-아세틸-3.7-디하이드록시페녹사진); 및

[0044] f) 표준 농축물로서 사용하기 위한 동결건조된 세균성 스핑고마이엘리나제.

[0045] 본 발명의 분석 방법을 적합하게 수행하기 위해서, 상기 키트 성분들 이외에 하기 추가의 물질 및 장치들이 필요하다:

- [0046] 슈크로즈;
- [0047] 염화 칼륨(KCl);
- [0048] 일염기성 인산 칼륨(KH₂PO₄);
- [0049] 트리즈마 염기;
- [0050] EDTA;
- [0051] 염화 나트륨;
- [0052] 타우로콜레이트(TC);
- [0053] 타우로데옥시콜레이트(TDC);
- [0054] 글리코콜레이트(GC);
- [0055] 글리코케노데옥시콜레이트(GCDC);
- [0056] β-글리세로포스페이트;
- [0057] ATP 이나트륨 염;
- [0058] EGTA;
- [0059] BCA 단백질 분석 시약;
- [0060] 소 혈청 알부민;
- [0061] 냉각 원심분리기;
- [0062] 550 내지 562 nm에서 측정 가능한 미세플레이트 판독기; 및
- [0063] 형광측정 미세플레이트 형광계.
- [0064] SMase 활성의 정량분석을 수행하기 위해서, 하기 측정을 수행해야 한다.

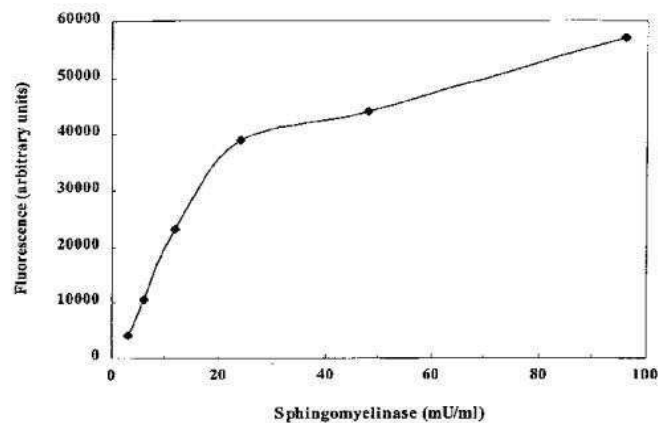
실시예

- [0065] 표준 곡선 작성
- [0066] 상기 키트를 SMase의 표준 제제와 함께 공급하며, 상기 제제는 pH 9에서 작용하는 한 유형의 SMase를 함유하는 세균 추출물로 이루어진다. 하기의 과정들을 수행해야 한다.
- [0067] SMase 눈금 곡선의 작성: 상기 표준 농축물을 희석하여 일련의 희석액을 제조한다.
- [0068] 상기 SMase 표준물을 1 ml의 분석 완충액(pH 9.0)으로 재 조성한다; 상기 재 조성으로 96 mU/ml의 모액을 제조한다.
- [0069] 분석 완충액 0.500 ml을 각 튜브에 피펫팅한다. 상기 모액을 사용하여 일련의 희석물을 제조한다. 다음으로 이동하기 전에 각 튜브를 철저히 혼합한다. 희석되지 않은 표준물은 높은 표준(96 mU/ml)으로서 작용하며, 표준 곡선은 하기의 농도들을 함유할 것이다: 96-48-24-12-6-3(mU/ml). 완충액은 제로 표준(0 mU/ml)으로서 작용한다.
- [0070] 전형적인 표준 곡선
- [0071] 도 1에서, 표준 곡선은 오직 예시를 위해 나타낸다. 표준 곡선을 분석된 각 조의 샘플들에 대해 작성해야 한다.
- [0072] 결과의 계산

- [0073] 각 표준물 및 샘플에 대한 중복 판독치를 평균하고 평균 제로 표준 형광성을 감한다.
- [0074] 표준물 대 상기 표준물의 활성(mU/ml)에 대한 형광성을 플롯팅하고 최상의 곡선을 그린다. 각 샘플의 SMase 활성을 측정하기 위해서, 먼저 y-축 상의 형광 값을 찾고 상기 표준 곡선으로 수평선을 연장시킨다. 교점에서, 수직선을 x-축으로 연장시키고 상응하는 SMase 활성을 읽는다.
- [0075] 상기 개시된 방법은 생체 외 SMase 활성을 분석할 수 있으며; 유기 샘플 중의 알칼리성 SMase를 검출할 목적으로 개발되었다.
- [0076] 알칼리성 SMase를 구체적으로 분석하기 위해서, 상기 방법은 산과 중성 SMase 활성을 검출하는 조건들을 사용한다. 실제로:
- [0077] -균질화 완충액은 중성 pH이나, 상기 완충액은 중성 SMase가 프로테아제 및 포스파타제의 활성에 민감하여 결과적으로 이들 효소에 의해 억제되기 때문에 상기 중성 SMase를 제외시키는 프로테아제 및 포스파타제 억제제를 갖지 않고;
- [0078] -상기 균질화 완충액 중에 Mg 의존성 중성 SMase의 활성을 차단하는 $MgCl_2$ 가 존재하지 않으며;
- [0079] -상기 반응 완충액은 β -글리세로포스페이트 및 ATP를 함유하여 중성 pH에서 더욱 활성인 산 SMase를 제외시키고, 이 완충액 중에는 중성 SMase를 억제시키기 위해 EDTA 및 EGTA가 고 농도로 존재한다.

도면

도면1



형광 분석을 사용한 스팅고마이엘리나제의 검출
 각각의 반응물은 특정한 분석 완충액 중에 지시된 양의 세균성
 스팅고마이엘리나제를 포함하였다.
 반응물을 37 °C에서 1 시간 동안 배양시켰다.
 형광성을 530 nm에서의 여기 및 590 nm에서의 형광 검파를 사용하여
 형광 미세플레이트 판독기로 측정하였다.