(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0002053
(43) 공개일자 2021년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 1/14 (2006.01) *G01N 1/00* (2006.01)
G01N 23/20008 (2018.01) *G01N 33/483* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 1/14 (2013.01)
G01N 23/20008 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0079520
(22) 출원일자 2020년06월29일
심사청구일자 2020년06월29일
(30) 우선권주장
1020190077134 2019년06월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
(72) 발명자
남기현
서울특별시 성북구 인촌로17가길 64, 106동 1404호(안암동1가, 래미안 안암)
조윤제
경상북도 포항시 남구 지곡로 155 (지곡동,교수아파트) 9동 503호
(74) 대리인
특허법인 다해

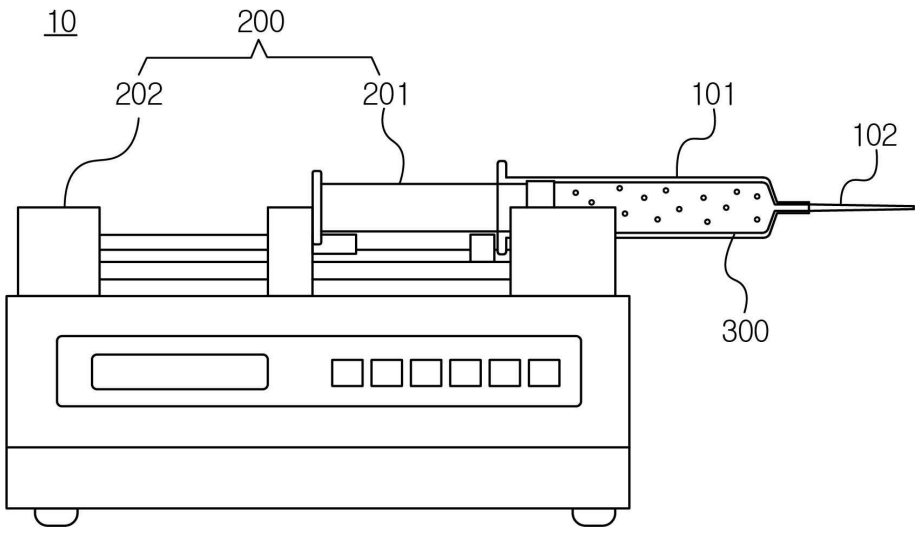
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **연속 결정학을 위한 시료 배송 장치, 이를 포함하는 연속 결정학 분석 시스템 및 이를 이용한 연속 결정학 분석 방법**

(57) 요 약

본 발명은 시료가 저장되는 실린지 본체; 상기 본체와 결합되어 본체로부터 시료를 압출하는 압출부; 및 상기 본체와 연결되어 시료가 배출되는 바늘을 포함하는, 연속 결정학 분석을 위한 시료 배송 장치, 상기 장치를 포함하는 연속 결정학 분석 시스템 및 상기 장치를 이용한 연속 결정학 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명의 실린지 기반 시료 배송 장치는 종래 복잡했던 시료 배송 방법을 간소화할 수 있어, 결정학 분석을 용이하게 하는 장점이 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/483 (2013.01)
G01N 2001/002 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711064834
과제번호	2017M3A9F6029736
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	XFEL 기반 고효율 결정 스캔 기술 및 선도 물질 검색 시스템 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	포항공과대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

시료가 저장되는 실린지 본체;

상기 본체와 결합되어 본체로부터 시료를 압출하는 압출부; 및

상기 본체와 연결되어 시료가 배출되는 바늘을 포함하는, 연속 결정학 분석을 위한 시료 배송 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 압출부는 플런저; 및 가압 수단을 포함하는 것인, 연속 결정학 분석을 위한 시료 배송 장치.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 가압 수단은 실린지 펌프인 것인, 연속 결정학 분석을 위한 시료 배송 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 시료는, 분석대상물질 및 전달 매질을 포함하는 것인, 연속 결정학 분석을 위한 시료 배송 장치.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 전달 매질은 점성을 갖는 매질로, 지질입방위상 물질(lipidic cubic phase), 폴리아크릴아마이드, 스타치, 쇼트닝 및 알지네이트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 점성 물질인 것인, 연속 결정학 분석을 위한 시료 배송 장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 장치는 바늘의 방향을 조정하기 위한 수동 스테이지 또는 측각기를 더 포함하는 것인, 연속 결정학 분석을 위한 시료 배송 장치.

청구항 7

시료가 저장되는 실린지 본체; 상기 본체와 결합되어 본체로부터 시료를 압출하는 압출부; 및 상기 본체와 연결되어 시료가 배출되는 바늘을 포함하는, 시료 배송 장치;

시료에 X-선을 조사하는 X-선 빔 방출기; 및

상기 조사된 X-선이 반사되어 회절된 이미지를 수집하는 검출기를 포함하는, 연속 결정학 분석 시스템.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 시료 배송 장치는, 시료 배송 장치가 설치되는 면과 수평 내지 수직으로 설치되는 것인, 연속 결정학 분석 시스템.

청구항 9

시료가 저장되는 실린지 본체; 상기 본체와 결합되어 본체로부터 시료를 압출하는 압출부; 및 상기 본체와 연결되어 시료가 배출되는 바늘을 포함하는, 시료 배송 장치를 준비하는 단계(S1);

상기 시료 배송장치의 바늘로부터 압출되는 시료의 흐름이 X-선 빔이 방출되는 경로에 있도록 정렬하는 단계(S2);

상기 시료 배송장치의 압출부에 압력을 가하여 시료를 압출하는 단계(S3); 및

X-선 빔을 방출하고, 시료로부터 반사되어 회절된 이미지를 수집하는 단계(S4)를 포함하는, 연속 결정학 분석 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 S3 단계의 배송은 1 nl/min 내지 1000 nl/min의 유량으로 수행되는 것인, 연속 결정학 분석 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 연속 결정학을 위한 시료 배송 장치, 이를 포함하는 연속 결정학 분석 시스템 및 이를 이용한 연속 결정학 분석 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] X선 결정학 연구는 단백질 및 핵산 등을 고해상도 관찰할 수 있는 기회를 제공하는 기술이다. 일반적인 X선 결정학 연구에서는 단백질 결정 시료를 X선에 노출하여 회절 데이터를 수집하고, 이를 통해 3차원 구조 정보를 획득하게 된다. 하지만, 이러한 일련의 실험과정에서 X선에 지속적으로 노출되는 결정 시료들은 방사선에 의하여 시료가 손상(radiation damage) 된다. 이를 극복하고자 저온에서 회절 데이터를 수집하는 것이 보편적으로 사용되고 있다. 비록 저온에서 회절 데이터 수집은 방사선에 의한 시료 손상을 줄일 수 있다는 장점이 있지만, 일반적인 바이오 분자들은 실온 이상에서 존재하기 때문에 저온에서 수집된 구조들은 생물학적으로 관련성이 적을 수 있다. 이를 극복하기 위해서 다수의 결정 시료를 실온에서 연속적으로 X선에 노출시켜 회절 데이터를 수집하는 연속 결정학(serial crystallography)가 최근 각광을 받고 있다. XFEL(X-ray free electron laser) 또는 방사광 X-ray 를 이용한 연속 결정학에서는 결정 시료에 radiation damage 가 없거나 최소화 할 수 있다.

[0003] 연속 결정학 연구 수행에서 가장 중요한 기술적인 단계는 결정 시료를 X선 위치에 연속적으로 제공하는 것이다. 가장 보편적으로 사용하는 배송 기법은 인젝터를 이용하는 것이다. 연속 결정학에서 사용되는 인젝터의 노즐은 capillary 또는 3D print 기법을 이용하여 정교하게 제작된다. 일반적인 nozzle은 내부 capillary 와 외부 capillary가 존재하며, 내부에서는 결정 시료를 포함한 배송물질이 흐르고, 외부에서는 헬륨가스 등을 이용하여 분출되는 시료를 가이드하는 역할을 한다. 한편, 시료를 분출하기 위해서는 인젝터 내부의 시료를 분출할 수 있도록 밀어주는 물리적인 힘이 필요하며, 일반적으로, HPLC 를 사용하고 있다.

[0004] 상술한 바와 같이, 인젝터 기반 시료 배송법이 보편적으로 사용되고 있지만, 인젝터 및 노즐을 만드는 것은 정

교한 기술이 필요할 뿐만 아니라, 제작에 많은 시간과 기술이 필요하다. 또한, 시료를 밀어주는 HPLC pump 의 경우 부피가 클 뿐만 아니라, 많은 비용이 발생한다. 결과적으로, 일반 연구자들이 개별 연구로 접근하기에는 어려움이 많다.

[0005] 따라서, 이러한 문제를 극복할 수 있는 시료 배송이 용이한 시스템에 대한 연구개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2008-0004729호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 종래 인젝터 기반 시료 배송 방법에서 요구되었던 (1) 정밀한 노즐 제작과 (2) 고사양/고비용의 부피가 큰 HPLC pump 기반 시료 배송을 다른 장치로 대체하여 사용할 수 있는 연속 결정학을 위한 실린지 기반 시료 배송 장치를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 이에 본 발명은 시료가 저장되는 실린지 본체;

[0011] 상기 본체와 결합되어 본체로부터 시료를 압출하는 압출부; 및

[0012] 상기 본체와 연결되어 시료가 배출되는 바늘을 포함하는, 연속 결정학 분석을 위한 시료 배송 장치를 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예로, 상기 압출부는 플런저; 및 가압수단을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 가압수단은 실린지 펌프인 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또다른 구현예로, 상기 시료는, 분석대상물질 및 전달 매질을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또다른 구현예로, 상기 전달 매질은 점성을 갖는 매질로, 상기 전달 매질은 점성을 갖는 매질로, 지질입방위상 물질(lipidic cubic phase), 폴리아크릴아마이드, 스타치, 쇼트닝 및 알지네이트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 점성 물질인 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 또다른 구현예로, 상기 장치는 바늘의 방향을 조정하기 위한 수동 스테이지 또는 측각기를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 시료가 저장되는 실린지 본체; 상기 본체와 결합되어 본체로부터 시료를 압출하는 압출부; 및 상기 본체와 연결되어 시료가 배출되는 바늘을 포함하는, 시료 배송 장치;

[0019] 시료에 X-선을 조사하는 X-선 빔 방출기; 및

[0020] 상기 조사된 X-선이 반사되어 회절된 이미지를 수집하는 검출기를 포함하는, 연속 결정학 분석 시스템을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예로, 상기 시료 배송 장치는 장치가 설치되는 면과 수평 내지 수직으로 설치되는 것을 특징으로 한다.

[0022] 아울러, 본 발명은 시료가 저장되는 실린지 본체; 상기 본체와 결합되어 본체로부터 시료를 압출하는 압출부; 및 상기 본체와 연결되어 시료가 배출되는 바늘을 포함하는, 시료 배송 장치를 준비하는 단계(S1);

[0023] 상기 시료 배송장치의 바늘로부터 압출되는 시료의 흐름이 X-선 빔이 방출되는 경로에 있도록 정렬하는 단계(S2);

[0024] 상기 시료 배송장치의 압출부에 압력을 가하여 시료를 압출하는 단계(S3); 및

[0025] X-선 빔을 방출하고, 시료로부터 반사되어 회절된 이미지를 수집하는 단계(S4)를 포함하는, 연속 결정학 분석 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 일 구현예로, 상기 S3 단계의 배송은 1 nl/min 내지 1000 nl/min의 유량으로 수행되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 연속 결정학을 위한 시료 배송 장치를 이용하여 시료를 배송하여 연속 결정학 분석을 수행할 경우, 종래 복잡했던 시료 배송 방법을 간소화할 수 있으므로, 연구에 사용되는 장치 비용을 절감할 수 있다.

[0029] 또한 일반 연구자들이 접근할 수 있도록 시스템을 간소화 하기 때문에 연구 접근이 용이한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명의 시료 배송 장치를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 시료 배송 장치의 일부분을 상세하게 나타낸 도면이다.

도 3은 실시예에서 사용한 실험장치를 나타낸 도면이다. 도 3a는 실린지와 실린지 펌프를 이용한 시료 전달 실험설정을 나타내는 도면이며, 도 3b와 3c는 각각 LCP 및 10%(w/v) PAM 전달 매체의 시료 압출 사진을 나타내는 도면이다.

도 4는 전달 매질에 따른 시료의 배송 형태를 확인한 결과를 나타낸 것으로, 도 4a는 100mM 소듐 아세테이트(pH 4.6), 5% PEG 8000 및 10%(w/v) NaCl에 포함되는 라이소자임 결정 현탁액을 이용한 시료 배송 형태를 확인한 것이고, 도 4b는 라이소자임 결정을 포함하는 LCP 전달 매질을 사용한 시료 배송 형태를 확인한 것이며, 도 4c는 라이소자임 결정을 포함하는 PAM 배송 매질을 이용한 시료 배송 형태를 확인한 것이다(스케일바는 718um에 해당함).

도 5a 및 도 5b는 각각 LCP 및 PAM을 통해 전달된 라이소자임의 실온 회절 패턴을 나타내는 도면이며, 도 5c는 LCP(갈색) 및 PAM(파란색)의 산란 강도의 2차원 프로파일을 나타내는 그래프이다.

도 6a 및 6b는 각각 LCP 및 PAM을 통해 전달된 상온 라이소자임 구조의 2Fo-Fc 전자 밀도지도를 나타낸 도면이다(회색 망선, 1.5σ).

도 7는 라이소자임의 Cys24-Cys145, Cys82-Cys98 및 Cys94-Cys112의 이황화 결합에서 방사선 손상을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 인젝터를 사용한 샘플 배송은 연속 결정학 (SX)에서 널리 사용되며 실온에서 결정 구조의 결정에 크게 기여했다. 그러나 정교한 인젝터 노즐 제작 방법과 X선 경로로의 시료 배송 작업이 필요하여, 여전히 일반 사용자가 SX 연구를 하는 것은 어렵다. 이에 본 발명자들은 SX 실험을 위한 간단하고 쉽게 접근할 수 있는 시료 배송 방법을 연구하였다.

[0033] 본 발명자들은 지질입방상물질(LCP) 또는 폴리아크릴아미드 (PAM) 전달 매질에 임베딩(embedding)된 리소자임 결정을 함유하는 시료를 포함하는 실린지를 내경이 168 μm 인 바늘에 연결한 후, 실린지 펌프에 설치하였다. 이후 실린지 펌프를 구동시킴으로써 실린지 플런저를 밀어 결정 시료를 안정된 방식으로 X-선 빔 위치로 전달하였다. 그 결과, 상기 배송 장치를 이용하여, 각각 1.56 Å 및 1.75 Å에서 LCP 및 PAM에 매립된 라이소자임의 실온 결정 구조를 측정할 수 있다는 것을 확인하였다. 이하 도면을 통해 본 발명의 시료 배송 장치를 보다 상세하게 설명한다.

[0034] 도 1에 나타낸 것과 같이 본 발명은, 시료(300)가 저장되는 실린지 본체(101);

[0035] 상기 본체와 결합되어 본체로부터 시료를 압출하는 압출부(200); 및

[0036] 상기 본체와 연결되어 시료가 배출되는 바늘(102)을 포함하는, 연속 결정학 분석을 위한 시료 배송 장치(10)를 제공한다.

[0037] 본 발명에서 상기 시료 배송 장치(10)는 일반적인 실린지의 구조와 유사한 구조를 갖는 것으로, 도 1에 나타난 것과 같이 시료(300)가 저장되는 실린지 본체(101)와, 상기 본체의 한쪽 말단에 구비되는, 내용물을 밀어낼 수 있는 압출부(200)와, 상기 압출부가 구비된 측의 반대측에 구비되는, 내용물이 배출되는 바늘(102)을 포함하는 것이다. 상기 실린지 본체에 저장된 시료를 바늘을 통해 외부로 배출해낼 수 있는 압출부는 시료와 직접 접촉해 있는 플런저(plunger, 201); 및 압력을 가하는 가압 수단(202)을 포함할 수 있다. 상기 가압 수단의 형태에는 제한이 없으나 본 발명의 실시예와 같이 실린지 펌프를 통해 압력을 가하여 시료를 바늘을 통해 배송 장치의 외부로 배출시킬 수 있다.

[0038] 상기 실린지 펌프(202)는 도 1과 같이 실린지의 플런저(201)와 직접적으로 결합되어 있을 수도 있고, 실린지와 소정 거리를 두고 떨어진 거리에 위치하여 튜빙을 통해 실린지의 플런저와 결합되어 있을 수 있다.

[0039] 본 발명에서 도 2에 나타낸 것과 같이, 상기 시료(300)는 분석대상물질(302) 및 전달 매질(301)을 포함한다. 상기 전달 매질은 점성을 갖는 매질로서, 지질입방위상 물질(lipidic cubic phase) 폴리아크릴아마이드, 스타치, 쇼트닝 또는 알지네이트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 점성 물질일 수 있다. 상기 지질입방위상 물질은, 모노올레인, 그리스, 아가로스, 및 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 전달 매질에 분석대상물질이 매립(embedding)되어 있으며, 상기 바늘을 통해 배출된 시료에 X-선 빔이 조사되어, 시료에 포함되는 분석대상물질의 결정을 분석할 수 있는 것이다. 상기 분석대상물질은 결정화된 물질일 수 있고, 특히 단백질 결정일 수 있다. 상기 분석 대상 물질의 결정화 방법은 종래 알려진 방법 중 통상의 기술자가 선택하여 사용할 수 있다.

[0040] 상기 시료 배송 장치(10)는, 배출된 시료의 스트림이 X-선 경로와 만날 수 있도록 정렬되어야 한다. 상기 시료 배송 장치의 바늘의 방향을 조정하기 위해 수동 스테이지 또는 측각기(goniometer) 등을 포함할 수 있다.

[0042] 또한 본 발명은, 상기 시료 배송 장치;

[0043] 시료에 X-선을 조사하는 X-선 빔 방출기; 및

[0044] 상기 조사된 X-선이 반사되어 회절된 이미지를 수집하는 검출기를 포함하는, 연속 결정학 분석 시스템을 제공한다.

[0045] 본 발명에서 상기 X-선 빔 방출기와 이미지를 수집하는 검출기는 통상적인 연속 결정학 분석 시스템에서 사용되는 장치(예를 들어, 시료의 온도를 저온으로 유지하는 저온 장치 등)를 사용할 수 있다. 상기 방출기 및 검출기 외에, 수집된 이미지를 저장하는 저장장치를 더 포함할 수 있고, 상기 저장장치에 수집된 이미지를 처리하고 분석하는 것은 CrystFEL과 같은 프로그램을 통해 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 상기 시료 배송 장치는, 시료 배송 장치가 설치되는 면(지면)과 수평 내지 수직으로 설치될 수 있다. 본 발명에서는 X-선 빔 방출기와의 간섭을 최소화할 수 있도록 수평으로 설치되었으나, 장치를 지면으로부터 수직으로 세워서 바늘이 지면 방향을 향하도록 설치할 수도 있다.

[0048] 아울러, 본 발명은, 상기 시료 배송 장치를 준비하는 단계(S1);

[0049] 상기 시료 배송장치의 바늘로부터 압출되는 시료의 흐름이 X-선 빔이 방출되는 경로에 있도록 정렬하는 단계(S2);

[0050] 상기 시료 배송장치의 시료에 압력을 가하여 시료를 압출하는 단계(S3); 및

[0051] X-선 빔을 방출하고, 시료로부터 반사되어 회절된 이미지를 수집하는 단계(S4)를 포함하는, 연속 결정학 분석 방법을 제공할 수 있다.

[0052] 상기 S1 단계에서 시료 배송 장치는 상술한 것과 같이 분석대상물질 및 전달 매질을 포함하는 시료가 저장되어 있는 것이다.

[0053] S2 단계에서 준비된 시료 배송 장치는 배송 장치가 설치되는 면과 수평 내지 수직으로 설치된다. 상기 설치 이후 수동 스테이지를 사용하여 시료 배송 장치의 위치를 미세하게 조정해 줄 수 있다. 장치가 설치되면 역시 X-

선 빔이 방출되는 경로를 고려하여 바늘을 정렬할 수 있다. 상기 바늘의 정렬에는 측각기 등의 장치가 사용될 수 있으나, 상기 장치와 바늘의 위치를 조정하기 위한 기구는 상기 수동 스테이지나 측각기에 제한되지 않는다.

[0054] 상기 S2 단계가 완료되면 S3 단계에서 시료 배송 장치의 압출부를 통해 시료에 압력을 가하여 시료를 압출한다. 상기 시료의 압출을 위해 실린지 펌프를 작동할 수 있다. 상기 시료는 점성 매질을 포함하므로 초기 가압 단계에서는 시료의 흐름이 일정하지 않을 수 있으므로, X-선 빔을 방출하는 단계(S4) 이전에 플런저에 압력을 가하여 시료를 배송물질이 포함된 시료를 5 내지 20 mm 정도 미리 흘려주는 과정을 더 포함할 수 있다. 상기 시료를 미리 흘려주는 과정을 통해 시료의 스트림이 일정하게 될 수 있도록 한다. 상기와 같이 시료의 스트림이 일정하게 되면 S4 단계를 수행하여 X-선 빔을 방출하고, 시료에 포함된 분석대상물질의 결정을 분석할 수 있다.

[0055] 상기 S3 단계의 압출이 계속되는 상황에서, S4 단계를 수행하여 X-선 빔을 방출할 수 있다. S4 단계에서 방출된 X-선 빔은 점성 전달 매질에 임베딩된 분석 대상물질에 조사되는 것이고, 상기 시료에서 반사된 회절 이미지들을 분석하여, 분석대상물질에 대한 정보를 획득할 수 있다.

[0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0059] **<실시예>**

[0060] **<실험 방법>**

[0061] **1. 실린지 기반 시료 배송 장치의 준비**

[0062] 실린지 펌프를 이용한 연속 밀리초 결정학 (SMX) 실험은 포항가속기 연구소(Pohang Light Source II)의 마이크로 포커싱 빔라인 11C에서 수행하였다. Kirkpatrick-Baez 거울에 의해 집속된 X-선 빔 크기는 시료 위치에서 4.1 μm (세로)*8.5 μm (가로)였다. 광자 플럭스 및 빔 에너지는 각각 1.3 X 10^{12} 광자 s^{-1} 및 12.659 keV였다. 달걀 흰자에서 나온 라이소자임의 결정화는 이전에 알려진 절차를 사용하여 수행되었다. 라이소자임 결정을 이중 실린지 셋업에서 기계적 혼합을 사용하여 샘플 전달 매질 (LCP 또는 PAM)에 임베딩시켰다. 전달 매질에 임베딩된 결정을 함유하는 100 μl 실린지 (Hamilton, 81065-1710RNR)를 Fusion Touch 100 실린지 펌프 (CHEMYX)에 장착하였다. 빔 직경 허치의 MD2-S 측각기(Arinax)에 설치된 축상 비디오 현미경으로 내경이 168μm 인 실린지 바늘을 관찰하였다(도 3a). 실린지 펌프의 실린지 바늘을 X-선 빔 경로에 맞추기 위해 실린지 펌프 스탠드 아래에 수동 스테이지를 설치하여 x, y 및 z 방향으로 세밀하게 조정하였다. 빔라인 장비와 실린지 펌프의 간섭으로 인해 실린지 및 바늘은 지면과 수평으로 설치되었다(도 3a). 실린지 바늘로부터 전달 매질의 흐름 방향을 고려하여, 실린지의 바늘 끝은 빔 궤적으로부터 대략 100μm 거리에서 대각선으로 45도 상향으로 수동 스테이지를 사용하여 정렬되었다(도 3b 및 3c).

[0064] **2. 실린지 기판 시료 배송 장치를 이용한 연속 결정학 실험**

[0065] 본 실시예 2에서는 개발된 시스템이 실제 연구에 적합한지를 입증하기 위해 lysozyme 시료로 사용하여 연속 결정학 연구를 수행했다. lysozyme 결정 크기는 30~40 ㎛ 였다. LCP 전달 매체의 경우, monoolein 60 ㎕와 결정 현탁액 40 ㎕를 각 100 ㎕ 주사기에 넣었고 커플러(coupler)를 사용하여 연결하였다. 플런저(plunger)는 monoolein과 결정 시료를 균일하게 분포시키기 위해 약 30 번 앞뒤로 부드럽게 밀었다. 그리고, PAM 전달 매체의 경우, 최종 20% (w/v) PAM 용액을 100㎕ 실린지에서 중합시켰고, 이 실린지를 커플러를 사용하여 100㎕ 빈 주사기와 연결시켰다. 플런저를 이중 실린지 셋업에서 30 번 이상 앞뒤로 혼합하여 PAM 단편을 생성하였다. 그런 다음, PAM 단편을 하나의 주사기로 옮기고 결정 현탁액을 다른 주사기 위에 놓고 플런저를 약 20 배 이상 부드럽게 혼합하여 PAM 단편에 균일하게 분배시켰다.

[0066] 상기 실시예 1의 장치에서 실린지 펌프를 구동시킴으로써, LCP- 및 PAM- 함유 결정을 각각 100 nl min^{-1} 및 200 nl min^{-1}의 유량으로 실린지 바늘로부터 X-선 위치로 압출시켰다(도 3b 및 도 3c). 데이터 수집 중에 모든 이미지가 100ms 동안 노출되었다. 허치 내부의 온도 및 습도는 각각 25 ± 0.4 ℃ 및 20 %였다. 이미지는 Cheetah를

사용하여 사전 필터링되고 CrystFEL을 사용하여 처리되었다. 라이소자임 (PDB 코드 6irj)을 검색 모델로 하여 Phaser-MR을 사용하여 분자 교체를 수행하였다. 모델 구축 및 재정비는 각각 Coot와 PHENIX의 Phenix.refinement (PHENIX)를 사용하여 수행되었다. 형상은 MolProbity를 사용하여 분석되었다. 이미지는 PyMOL (https://pymol.org/)에서 생성하였다. 코디디네이트 및 구조 인자는 접근 코드 6JXP (LCP- 라이소자임) 및 6JXQ (PAM- 라이소자임)하에 단백질 데이터 뱅크에 기탁되었다. 회절 이미지는 ID 95 (LCP- 라이소자임) 및 96 (PAM- 라이소자임)하에 CXIDB에 증착되었다. 좌표 및 구조 인자는 단백질 코드 뱅크에 기탁 코드 6JXP (LCP- 라이소자임) 및 6JXQ (PAM- 라이소자임)로 기탁되었다. 회절 이미지는 ID 95 (LCP- 라이소자임) 및 96 (PAM- 라이소자임)하에 CXIDB에 증착되었다.

[0068] **<실험 결과>**

[0069] 본 발명의 장치와 비교를 위해 실린지와 바늘 방향을 수직으로 설정하여 샘플 전달 테스트를 수행하였다 (도 4). 실린지 펌프를 사용하는 크리스탈 서스펜션과 같은 비점성 물질의 전달은 낮은 유속으로 실린지 바늘의 배출구에서 방울을 형성하기 때문에 SX 실험에 적합하지 않은 것이 확인되었다(도 4a). 반대로, 점성 시료 전달 매질인 LCP 및 PAM은 실린지 펌프를 사용하여 100 nl min^{-1} 미만의 낮은 유량에서도 실린지 직경으로부터 168 μm의 매우 안정적인 스트림을 제공하였다(도 4b 및 도 4c).

[0070] 이에, 본 실시예에서는 점성 전달 매질, 실린지 및 실린지 펌프를 사용하여 SX 데이터를 수집할 수 있는 지 확인하기 위해 SMX 실험을 수행한 것으로, 이상적인 실험 환경에서, 실린지 바늘은 시료 전달 시에 수직으로 설치되어야 하며 시료는 아래로 흐르게 된다. 그러나 빔 라인 장비와 실린지 펌프 사이의 간섭으로 인해 실린지는 수평으로 설치된바 있다. 실린지 바늘로부터 압출된 점성 전달 물질은 초기에 안정적인 스트림을 제공하지 않으면서 굴곡되는 경향이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 실린지 바늘을 먼저 아래로 돌리고 플런저를 수동으로 밀어 전달 재료를 약 10mm 배출하였다. 방출된 전달 물질은 따라서 점도로 인한 중단없이 단일 스트림을 유지하므로 중력으로 인해 아래쪽으로 향하게 된다. 이 상태에서, 전달 물질이 실린지 펌프를 사용하여 낮은 유량으로 가압되면, 이전에 배출된 주입 스트림을 따라 X 선 위치로 연속적이고 안정적으로 전달된다. 거의 대부분의 샘플이 X- 선 빔 경로를 통과하였다(도 3b 및 3c); 그러나, 전달 매체는 종종 X-선 빔 경로에서 벗어나는 것이 확인되었다. 이에 실린지 바늘의 수직 방향이 안정적인 주입 흐름을 유지하는 데 도움이 될 것이고, 추가 SX 실험에서 설정이 적용될 것이라고 판단하였다.

[0071] 2 mg 미만의 라이소자임 샘플을 사용하여 LCP 및 PAM에 임베딩된 라이소자임의 40000개의 이미지를 수집하였다 (표 1). LCP 전달 매체의 경우, 히팅 및 인덱싱된 이미지 수는 각각 24258개(히팅 비율 : 60.64 %) 및 19411개 (인덱싱 비율 : 80.01 %)였다. 회절 이미지는 1.56 Å까지 처리되었다. 이전 연구와 유사하게, LCP를 사용한 회절 이미지는 4.5 Å에서 확산된 배경 산란을 포함했다(도 5a), PAM 전달 매질의 경우, 히팅 및 인덱싱된 이미지 수는 각각 24204개(히팅 비율 : 60.51 %) 및 21,592개(인덱싱 비율 : 89.21 %)였다. 회절 이미지는 1.76 Å까지 처리되었다.

[0072] 이전의 연속 펨토초 결정학 실험에서는, PAM에 매립된 결정은 캐리어 매트릭스 전달 인젝터를 사용하여 전달되었고, 여기서 노즐의 외부 모세관으로부터 He 가스에 압력이 가해져 전달 매질을 X-선 빔 경로로 가이드하였다. 그러나 상기 He 가스는 PAM 전달 샘플의 탈수를 유발했고, 샘플의 유량이 400 nl min^{-1} 미만일 때 4.3 부근에서 산란 링을 나타냈다.

[0073] 이와는 다르게, 본 발명의 SMX 실험에서, 시료는 He 가스를 사용하여 주입 스트림을 안내되지 않고, 실린지 바늘을 통해 200 nl min-1의 유량으로 전달되었다. 본 발명에서 확인한 이미지는 PAM이 탈수되었을 때 발생하는 약 4.3 Å의 배경 산란을 포함하지 않았고, 10 Å 이상의 분해 산란은 회절 이미지에서 관찰되었으나(도 5b), 상기 산란은 상당히 약해서 데이터 처리에서 무시될 수 있었다(도 5c).

[0074] LCP 및 PAM에 매립된 라이소자임 구조의 최종 모델은 각각 1.56 Å 및 1.76 Å로 개선되었다. 두 전자 밀도 지도는 모두 Lys1에서 Leu129까지 아미노산이 명확하게 나타났다(도 6). Cys24-Csy145, Cys82-Csy98 및 Cys94-Csy112의 이황화 결합에서는 특정 방사선 손상이 보이지 않았다(도 7). 상기 도 7은 2Fo-Fc (회색, 1.5σ) 및 Fo-Fc (녹색 및 적색, ± 3.5σ) 전자 밀도 맵으로 (a) LCP 및 (b) PAM을 통해 전달되는 라이소자임에서 이황화 결합의 전자 결합 맵을 나타낸 것이다.

표 1

[0076]

Data collection	LCP	PAM
Diffraction source	11C beamline, PLS-II	
Wavelength (Å)	0.94942	
Temperature (K)	298.15	
Detector	Pilatus 6M	
Crystal-detector distance (mm)	300	
Exposure time per image (s)	100 ms	
Space group	$P4_32_12$	
a, *b*, *c*(Å)	78.41, 78.41, 37.93	78.54, 78.54, 38.02
α, β, γ(°)	90, 90, 90	90, 90, 90
No. of collected images	40000	40000
No. of hits images	24258	24204
No. of indexed images	194411	24594
No. of unique reflections	17418	17368
Resolution range (Å)	78.7-1.56 (1.61-1.56)	79.3-1.76 (1.82-1.76)
Completeness (%)	99.93 (99.23)	100.0 (100.0)
Redundancy	318.4 (15.2)	770.4 (526.1)
$<I/\sigma(I)>$	6.00 (1.26)	7.50 (1.60)
R_{split} [a]	9.87 (88.66)	7.40 (69.08)
CC	0.991 (0.436)	0.994 (0.380)
*CC**	0.997 (0.779)	0.998 (0.742)
Overall *B*factor from Wilson plot ($Å^2$)	23.56	36.99
Refinement		
Resolution range (Å)	55.53-1.56	55.44-1.76
Final R_{cryst}	16.75	17.42
Final R_{free}	20.03	20.19
R.m.s. deviations		
Bonds (Å)	0.010	0.010
Angles (°)	1.022	1.033
Average *B*factors ($Å^2$)		
Protein	31.64	46.43
Water	31.42	46.42
Ramachandran plot		
Most favoured (%)	99.21	99.21
Allowed (%)	0.79	0.79

[0078] 본 실시예에서 점성 매질, 실린지 및 실린지 펌프를 사용하여 간단한 SX 실험을 수행하였다(이 실험 설정은 경제적으로 저렴한 비용으로 가능함). 본 발명의 방법을 사용하면 빔 라인 사용자가 실험실에서 SX 실험에 적합한 샘플 전달 매체를 선택할 수 있다. 실린지 펌프의 휴대성으로 인해, 본 발명에서 사용된 것과 동일한 장치가 SX 실험에서 데이터 수집에도 사용될 수 있다. 데이터 수집 중 시료 전달의 재현성을 향상시킬 뿐만 아니라 빔 시간을 효율적으로 사용할 수 있다. 한편, 본 실시예에서는 내부 직경이 168㎛인 비교적 큰 실린지 바늘을 사용하였으나, 이는 더 작은 직경의 실린지 바늘로 대체되어 샘플 소비와 배경 산란을 줄일 수 있다. 시판되는 실린지 바늘의 가장 작은 내경은 약 51 ㎛으로 이 경우, 크기가 수 마이크로미터인 시료를 사용하는 경우 시료 소비 및 백그라운드 산란 측면에서 실험적인 한계가 발생할 수 있다. 따라서, 상기 상업적인 실린지 바늘을 사용한 시료 전달은 수십 마이크로미터 크기의 결정 샘플을 전달할 때 더 유용할 것이다. 본 발명의 접근 방식은 더 많은 결정학 분석 연구자들이 SX에 보다 쉽게 액세스 할 수 있을 뿐만 아니라 싱크로트론 및 XFEL에서보다 효율적으로 빔 시간을 사용할 수 있게 할 수 있다.

[0080] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

부호의 설명

[0082] 10 : 시료 배송 장치 101 : 실린지 본체

102 : 바늘 200 : 압출부

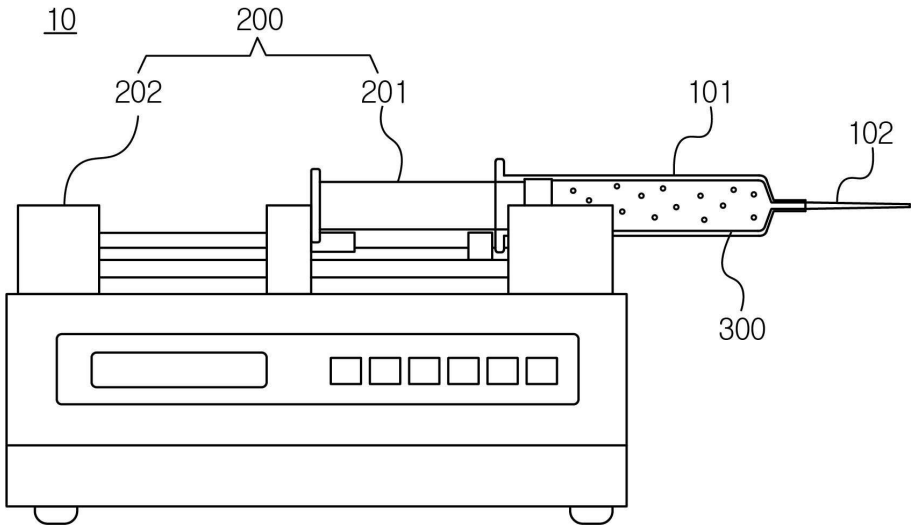
201 : 플런저 202 : 실린지 펌프

300 : 시료 301 : 전달 매질

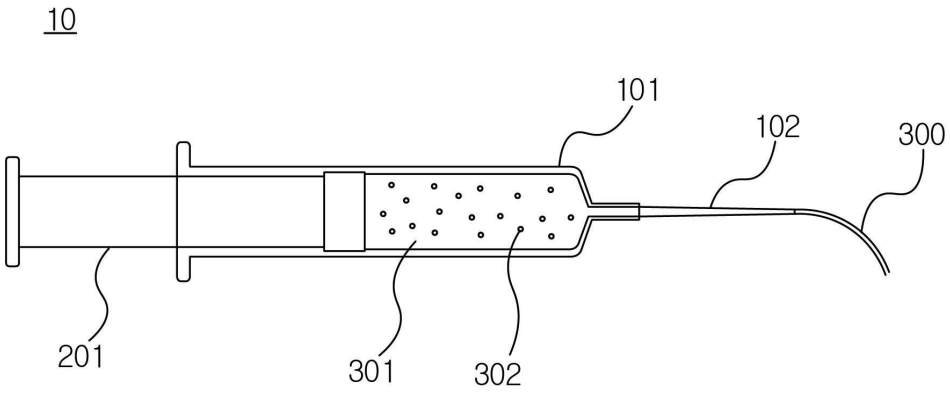
302 : 분석대상물질

도면

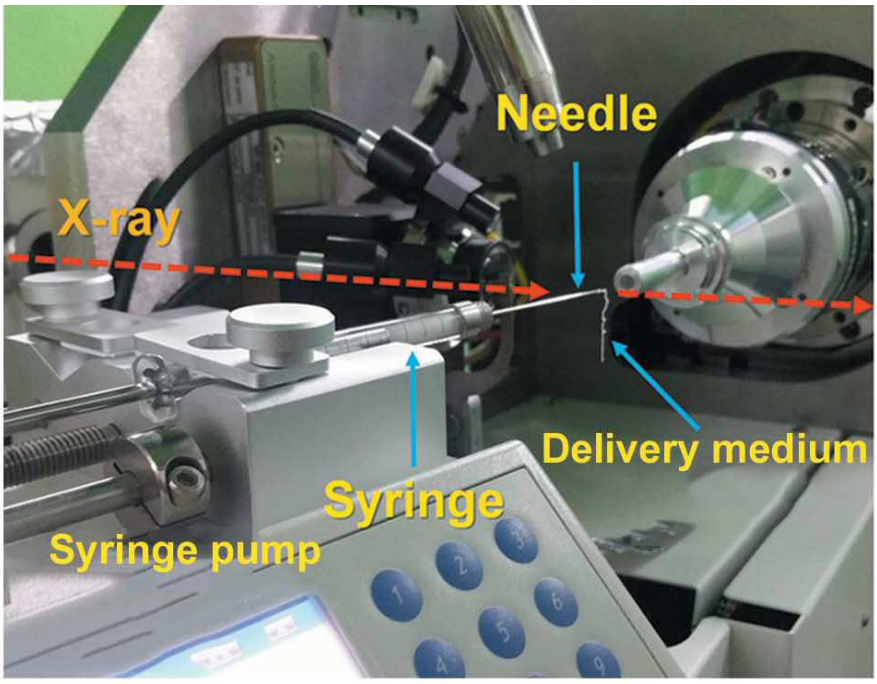
도면1



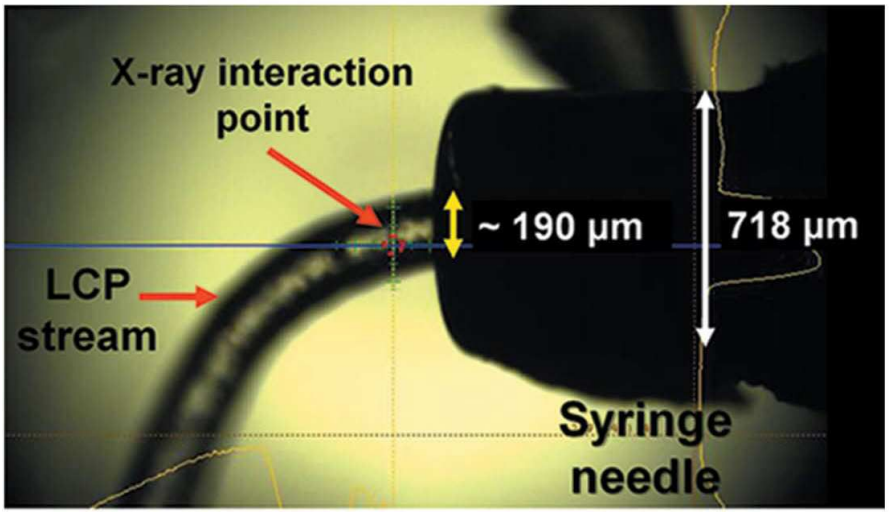
도면2



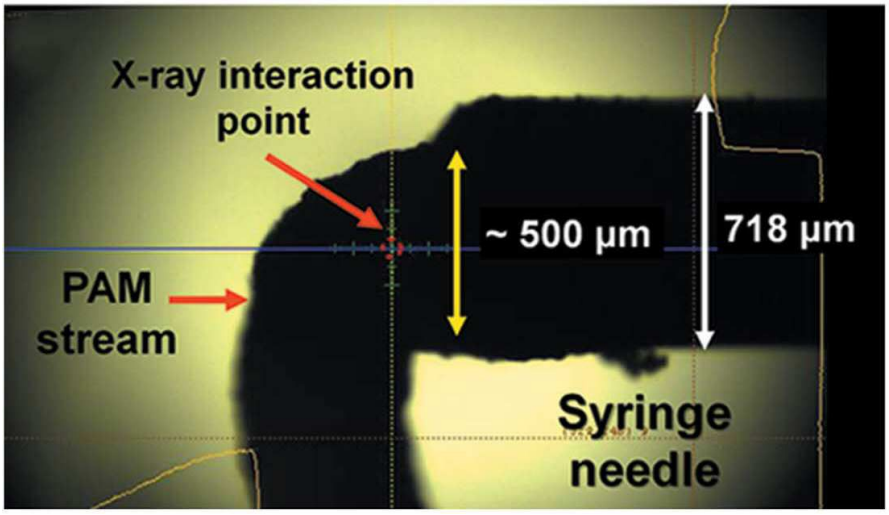
도면3a


Needle
X-ray
Delivery medium
Syringe
Syringe pump

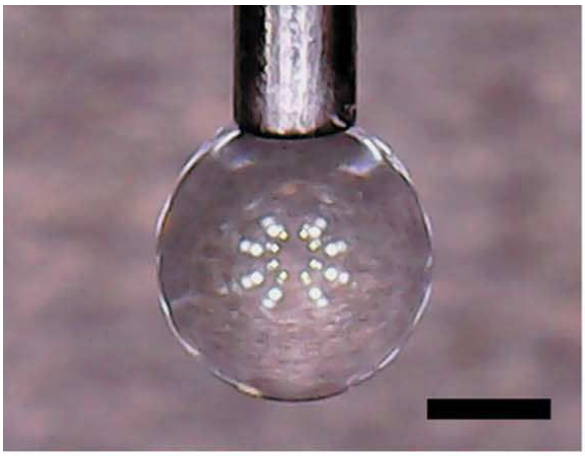
도면3b


X-ray interaction point
~ 190 μm
718 μm
LCP stream
Syringe needle

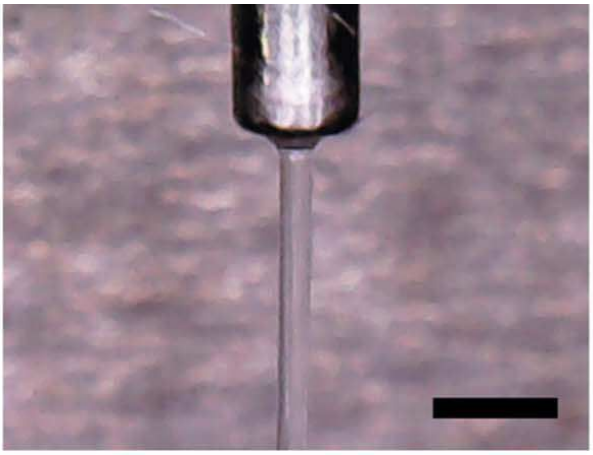
도면3c



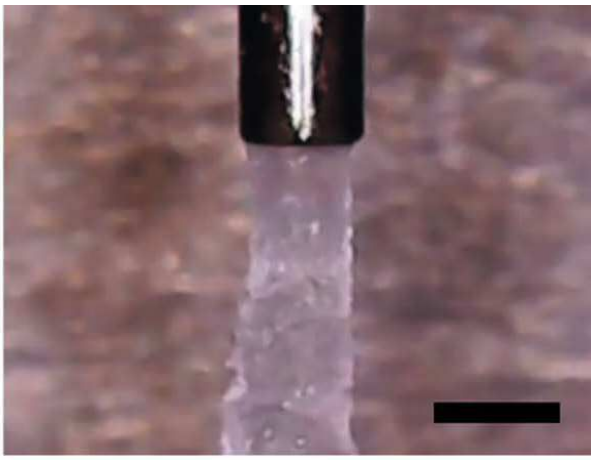
도면4a



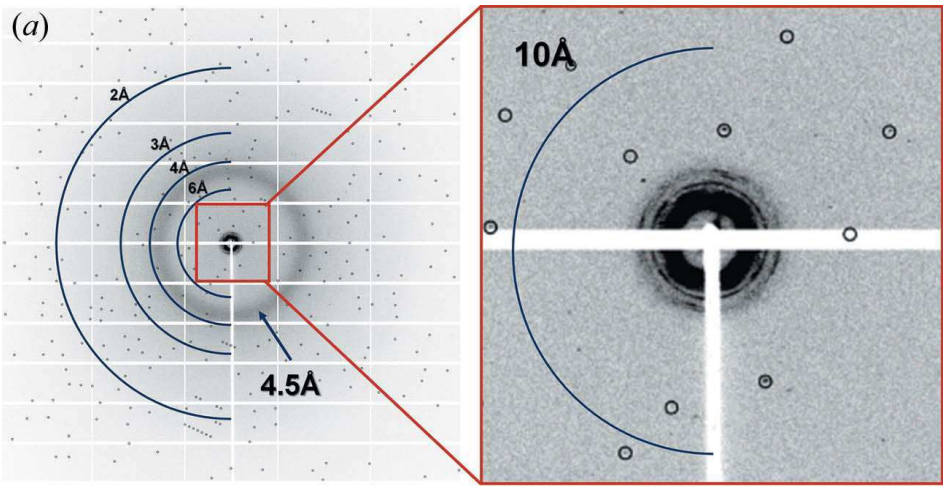
도면4b



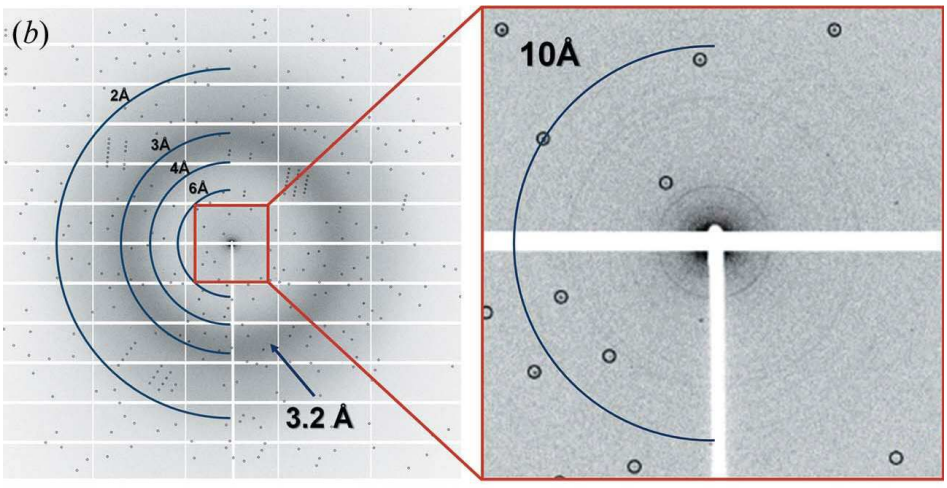
도면4c



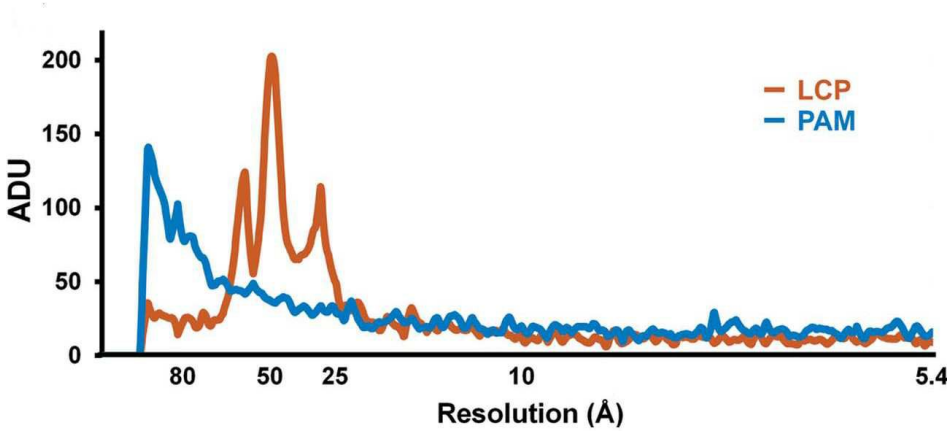
도면5a



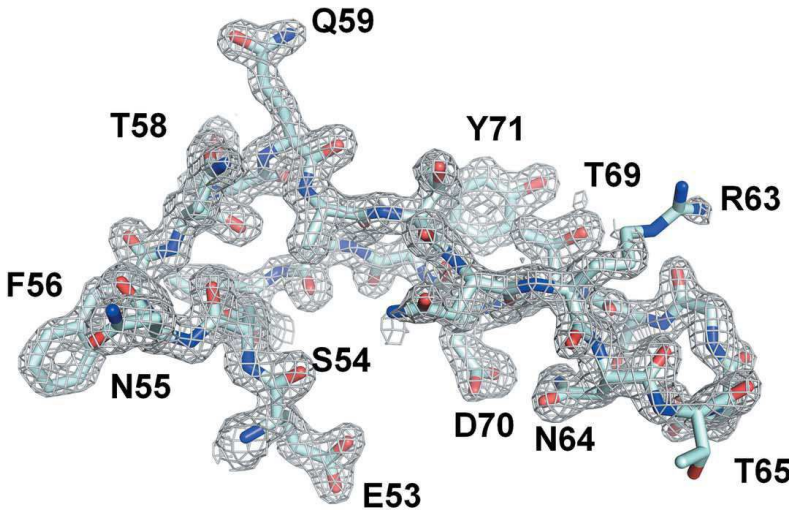
도면5b



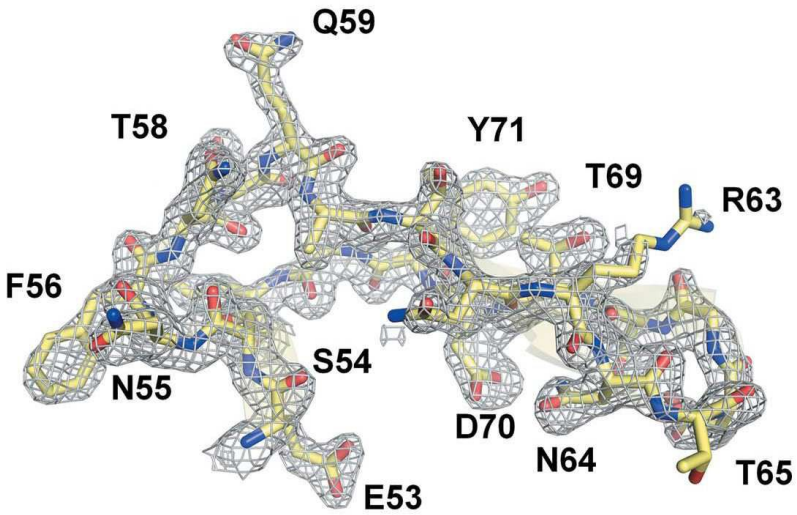
도면5c



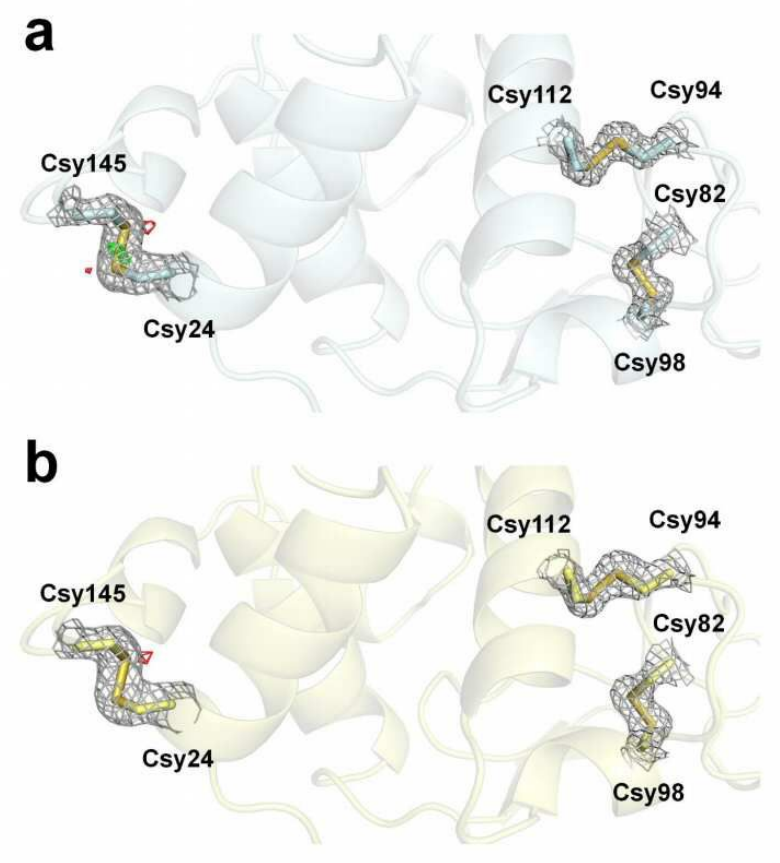
도면6a



도면6b



도면7


a
Csy112
Csy94
Csy145
Csy82
Csy24
Csy98
b
Csy112
Csy94
Csy145
Csy82
Csy24
Csy98