



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0083320  
(43) 공개일자 2011년07월20일

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01) G01N 29/44 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0003487

(22) 출원일자 2010년01월14일

심사청구일자 2010년01월14일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

(72) 발명자

박영재

충청남도 아산시 배방읍 장재리 70 연화마을휴먼  
시아8단지 806-201

박정호

서울특별시 은평구 역촌동 28-75호 3층

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

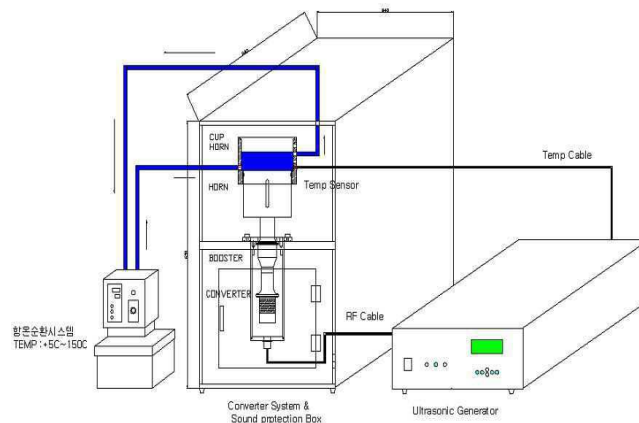
전체 청구항 수 : 총 7 항

#### (54) 극미량 병원성 프리온 단백질 검출방법 및 장치

##### (57) 요약

본 발명은 개선된 초음파 장비를 이용한 전염성해면상뇌증(일명; 프리온 질환)의 극미량 진단법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 개선된 초음파 장비와 완충액(buffer) 및 계면활성제(surfactant)등 첨가제의 조합으로 극미량의 병원성 프리온 단백을 검출하는 것이다. 본 발명의 개선된 초음파 장비는 기존 PMCA(Protein misfolding cyclic amplification) 기능을 향상시켜 병원성 프리온 단백질의 검출한계(detection limit)를 향상시켰으며, 완충액 및 계면활성제등의 첨가제 조합을 통하여 기존 PMCA 조건보다 더욱 극미량 검출이 가능함을 확인하였다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**정병훈**

강원도 춘천시 후평동 세경3차아파트 302동 815호

**최진규**

경기도 남양주시 일패동 529-3

**최은경**

경기도 안양시 동안구 평촌동 인덕원 대우아파트  
109동 1902호

**김용선**

강원도 춘천시 석사동 820 퇴계주공아파트 303동  
1103호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A085082

부처명 보건복지가족부

연구관리전문기관

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 국내 발생 인간 프리온 질환의 병원체 시료확보를 통한 발병기전, 중간전이, 조기진단  
및 치료법 개발연구

기여율

주관기관 한림대학교산학협력단

연구기간 2008년 11월 01일 ~ 2013년 03월 31일

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

(i) 시료와 일정량의 비병원성 이형태체(non-pathogenic conformer)를 접촉시키고,  
 (ii) 시료와 비병원성 이형태체를 항온처리하고,  
 (iii) 상기 (i) 또는 (ii) 단계 동안 형성된 임의의 응집체를 분해하고,  
 (iv) 시료 내의 병원성 이형태체의 존재 또는 함량을 측정하는 단계로 구성되며, 상기 (ii) 단계 및 (iii) 단계는 (iv) 단계 실시예 앞서 2회 이상 반복 실시되는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 장치에 있어서,  
 상기 (iii)의 응집체를 분해하는 단계를 수행하기 위하여 초음파를 발생시키기 위해 전기에너지를 제공하는 초음파 발생기, 상기 초음파 발생기에 의해 제공되는 전기 에너지를 초음파 진동으로 변환시키는 압전소자를 포함하는 컨버터, 상기 컨버터에 의해 변환된 초음파 진동을 증폭시키는 부스터, 상기 부스터에 의해 증폭된 초음파 진동을 시료에 전달하는 혼, 상기 혼의 상부에 결합되며 그 내부에 항온수조가 형성되어 시료를 항온처리할 수 있는 컵혼 수조, 상기 컵혼 수조에 물을 공급하고 배출시키는 항온순환시스템을 포함하여 구성됨을 특징으로 하는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 장치.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 항온순환시스템은 컵혼 수조의 물 또는 시료의 온도를 측정하는 온도센서를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 장치.

### 청구항 3

(i) 시료와 일정량의 비병원성 이형태체(non-pathogenic conformer)를 접촉시키고,  
 (ii) 시료와 비병원성 이형태체를 항온처리하고,  
 (iii) 상기 (i) 또는 (ii) 단계 동안 형성된 임의의 응집체를 분해하고,  
 (iv) 시료 내의 병원성 이형태체의 존재 또는 함량을 측정하는 단계로 구성되며, 상기 (ii) 단계 및 (iii) 단계는 (iv) 단계 실시예 앞서 2회 이상 반복 실시되는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 방법으로 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법에 있어서,  
 완충액으로서 pH 7.0~8.0의 술폰산 함유 완충액을 가하는 것을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질 검출방법.

### 청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 술폰산 함유 완충액은 2-(*N*-모르폴리노)에탄술폰산(MES), 피페라진-*N,N'*-비스(2-에탄술폰산)(PIPES), *N*-2-아세트아미도-2-아미노에탄술폰산(ACES), 3-(*N*-모르폴리노)-2-히드록시프로판술폰산(MOPSO), *N*-트리스(히드록시메틸)메틸-2-아미노에탄술폰산(TES) 및 *N*-2-히드록시에틸피페라진-*N'*-2-프로판술폰산(HEPPS)으로 이루어진 군 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질 검출방법.

### 청구항 5

청구항 3에 있어서,

상기 완충액에 비이온 계면활성제를 임계 마이셀 농도 이하 또는 이상으로 가하는 것을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질 검출방법.

## 청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 비이온 계면활성제는 Tween 80, Triton X-100, Brij, Lubrol 및 폴리에틸렌글라이콜로 이루어진 그룹 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질 검출방법.

## 청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 비이온 계면활성제는 0.5~2%(w/w) 범위임을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질 검출방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 개선된 초음파 장치를 이용한 전염성해면상뇌증(프리온 질환)의 극미량 진단법에 관한 것으로서, 좀 더 자세하게는 개선된 초음파 장비와 완충액 및 계면활성제등 첨가제의 조합으로 극미량의 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 프리온 질환은 전염성해면상뇌증(transmissible spongiform encephalopathy, TSE)이라고도 하며 뇌조직의 해면형(spongiform) 변화를 특징으로 하는 질환이다. 동물에서 발생하는 프리온 질환에는 양이나 염소에서 발생하는 스크래피(scrapie), 멍크에서 발생하는 전염성멍크뇌증(transmissible mink encephalopathy, TME), 사슴에서 발생하는 만성 소모성 질환(chronic wasting disease, CWD)과 소에서 발생하는 우해면상뇌증(bovine spongiform encephalopathy, BSE), 일명 광우병(mad cow disease) 등이 있고, 사람에서 발생하는 프리온 질환에는 쿠루(kuru), 저스만 스트라우슬러 쉐커병(Gerstmann-Strsyndrome, GSS), 치명적 가족성 불면증(fatal familial insomnia, FFI)과 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)이 있다. CJD의 경우 병인에 의해 다시 산발성(sporadic CJD, sCJD), 의원성(iatrogenic CJD, iCJD), 가족성(familial CJD, fCJD) 및 광우병에 걸린 쇠고기 섭취에 의해 발병되는 것으로 추정되는 변이형(variant CJD, vCJD) 등으로 분류할 수 있다 (Prusiner S.B., Prion biology and diseases, Second edition, Gold spring Harbor Laboratory Press. 2004, P 1-61).

[0003] 프리온 질환의 주된 전염경로는 병원체가 구강을 통해 감염된 후 림프절과 비장에서 1차적으로 증식하여 말초신경계에 감염되고 그 후 중추 신경계로 침범하는 병리기전일 것으로 제안되고 있으며, 전염성 감염질환임에도 불구하고 전자현미경상 바이러스의 특징적 구조들이 발견되지 않고 바이러스의 일반적 특징인 고압, 고열, 자외선에 의한 감염인자의 사멸이 없는 특이한 질환군이다. 1982년 스크래피에 감염된 동물의 뇌조직으로부터 병원체를 분리하는 과정에서 27-30kDa 크기의 단백질 분해효소 K(Proteinase K, PK)에 저항성을 나타내는 단백구조물을 발견하였고, 이 단백질이 높은 감염력을 가질 뿐만 아니라 이 단백질에 핵산을 제거하는 DNase나 RNase를 처리한 후에도 감염력에 지장을 주지 않음을 발견하였다. 이러한 발견으로 이 병원체는 유전정보인 핵산을 포함하지 않고 오직 단백질로만 구성된 병원체라는 가설이 제시되었고 1993년 프루시너 박사에 의해 이를 프리온(prion, proteinaceous infectious only)이라고 명명하게 되었으며, 이 업적으로 프루시너 박사는 1997년 노벨상을 수상하였다(Prusiner S.B., Prion biology and diseases, Second edition, Gold spring Harbor Laboratory Press. 2004, P 1-61).

- [0004] 현재 프리온 단백질에 대한 많은 분자생물학적 연구를 통해 이 단백질의 근원이 외부에서 유입된 병원체의 이중 단백질이 아닌, 사람의 경우 20번 염색체의 단원에서 유래되는 동정단백질로 밝혀졌다. 프리온 단백질은 신체 내 다양한 조직에서 발현되나, 주로 중추 신경계에 있는 신경세포에서 가장 많이 발현되는 것으로 알려져 있다. 정상 뇌조직에서 분리된 정상 프리온 단백질(normal prion protein, PrP<sup>C</sup>)은 33kDa의 크기를 가지고 있으며 단백질 분해효소로 처리하면 완전히 소실되어 없어지는 반면, 프리온 질환의 뇌조직에서 분리된 병원성 프리온 단백질(scrapie-associated prion protein, PrP<sup>Sc</sup>)은 PrP<sup>C</sup>와 동일한 크기와 아미노산 서열을 가지고 있지만 단백질 분해효소로 처리하면 모두 절단되어 소실되지 않고 단백질 분해효소에 저항성을 가지는 27kDa 크기의 단백질 분획이 남게 된다. 이 두 단백질의 중요한 차이점은 3차원적인 구조에서 나타나는데 PrP<sup>C</sup>의 경우 β-시트(sheet) 구조가 전체의 3%인 반면 PrP<sup>Sc</sup>는 약 43%의 β-시트 구조를 나타낸다. 이러한 구조적인 차이점으로 인하여 PrP<sup>Sc</sup>는 단백질 분해효소에 저항성을 가지게 되고, 주로 중추 신경계 내에 축적되어 신경세포를 손상시키게 된다(김용선, 광우병과 변종 크로이츠펔트 야콥병, 가정의학회지, 2004, 25, 509-518).
- [0005] 전 세계에서 산발적으로 발생하는 프리온 질환의 확진을 위한 분자생물학적 실험방법으로는 면역조직화학법 및 웨스턴블롯 등이 있다. 면역조직화학법은 뇌의 해면상으로의 변화, 별아교세포증, 신경세포의 소실, 뇌실질의 공포화 및 vCJD에 나타나는 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)를 관찰하고, 전자현미경을 통하여 스크래피-연관 원섬유(scrapie-associated fibrils, SAF)를 살핀다. 웨스턴 블롯 방법으로는 단백질 분해효소에 저항성을 나타내는 PrP<sup>Sc</sup>의 검출 및 당화의 패턴을 통하여, 타입 1-6으로 감별진단을 행한다.
- [0006] 전 세계적으로 크로이츠펔트 야콥병(CJD) 진단은 특징적인 임상적 증상과 함께 뇌파/뇌척수액/방사선 검사 및 임상 경과를 지켜보고 실험실적 검사방법을 통해 확진을 수행한다. 실험실적 진단으로는 뇌척수액에서 14-3-3 단백질 검출, CJD 환자의 뇌와 편도 조직에서 PrP<sup>Sc</sup> 검출, 프리온 유전자의 염기서열 분석 및 조직병리학적 검사가 이루어진다. 하지만, 이 모든 진단법은 질병 발병 후 진단 및 확진을 위한 검사법으로서 사전 예방을 위한 조기 진단은 불가능한 것이 현실이다. 또한 혈액 수혈로 인한 CJD 감염은 프리온 질환의 조기진단 연구가 절박함을 부각시켰다.
- [0007] 국내에서도 인간 프리온 질환의 확진은 병에 걸린 환자가 사망한 후 뇌조직에서 PrP<sup>Sc</sup> 검출을 통해서만 이루어지고 있다. 또한, CJD에 걸려 사망한 환자의 부검은 기피되고 있다. 뿐만 아니라, CJD에 감염된 초기에는 PrP<sup>Sc</sup>가 충분히 축적되지 않아 진단에 어려움이 있다. 따라서, 극미량 PrP<sup>Sc</sup>의 검출한계 문제점을 해결하기 위하여 민감도와 정확성이 높은 진단기술을 개발하려는 연구가 진행되고 있다. 최근에는 극미량 검출에 효율적인 PMCA(protein misfolding cyclic amplification) 기법, 면역-PCR 기법, QUIC 반응(Quaking-induced conversion) 등의 최신 검출 분석법이 연구되고 있다(Aguzzi A. et al., *Annu Rev Neurosci.*, 2008, 31, 439-477).
- [0008] PMCA(protein misfolding cyclic amplification) 기법은 2001년 Claudio Soto 연구진이 Nature에 발표한 이후, PMCA 장치를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다(Saborio G.P., et al., *Nature*, 2001, 411, 810-813). 뇌조직보다 구하기 쉬운 시료(뇌척수액, 혈액, 소변 등)에서 진단할 수 있도록 민감도와 정확성이 높은 진단기술 개발연구가 진행되었는데, 2004년 이후로는 PMCA를 이용한 조기진단 검출법에 관한 논문이 발표되고 있으며, 실험 동물 혈액에서 조기진단이 가능한 것으로 발표되었다. 2007년 일본 Yuichi Murayama 연구진과 2008년 Claudio Soto 연구진은 실험동물 소변에서 PrP<sup>Sc</sup> 검출에 관한 논문을 발표하였다. PMCA를 이용한 변형 프리온의 증폭은 인간 프리온 병원체의 확인 및 극미량 검출을 가능하게 만들었다(Saa P. et al., *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 35245-35252).

[0009] PMCA 원리를 이용한 장치는 Claudio Soto 연구진과 미국 Misonix사와 제휴로 자동화된 PMCA 모델을 판매 중에 있으며(Castilla J. et al., *Methods Enzymol.*, 2006, 412, 3-21), 전세계의 많은 과학자들이 Misonix사의 자동화 PMCA 장치를 연구에 이용하고 있다. 따라서 본 발명자들도 'Misonix Model 4000'을 구입하여 실험을 진행하였으나 혼(horn)의 부식(corrosion), 컵혼(cup horn)의 온도 불균일(공냉식열유지기 방식), 출력파워 등의 문제점이 발생되었다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 상기 지적인 종래 PMCA 장치를 개선한 PMCA 장치를 제공하려는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 완충액, 계면활성제 등의 첨가제 조합을 이용하여 효과적으로 극미량 PrP<sup>Sc</sup>를 검출하는 방법을 제공하려는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 자동화된 PMCA 장비를 이용하여 극미량 PrP<sup>Sc</sup>를 검출하고자 노력한 결과, 기존 PMCA 장치에서 압전소자, 혼(horn), 부스터(booster), 컨버터(converter) 등 초음파를 발생시키는 소자를 개선하는 등 PMCA 장치를 개선하여 검출 한계가 향상된 PCMA 장치(이하 발명의 상세한 설명 및 도면에서 "Ilsong-PMCA"와 혼용함)를 발명하였으며, PrP<sup>Sc</sup> 검출 방법을 개선하여 완충액 및 계면활성제 등을 첨가함으로써 더욱 극미량의 PrP<sup>Sc</sup> 검출이 가능하게 되어 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0013] 본 발명은

[0014] (i) 시료와 일정량의 비병원성 이형태체(non-pathogenic conformer)를 접촉시키고,

[0015] (ii) 시료와 비병원성 이형태체를 향온처리하고,

[0016] (iii) 상기 (i) 또는 (ii) 단계 동안 형성된 임의의 응집체를 분해하고,

[0017] (iv) 시료 내의 병원성 이형태체의 존재 또는 함량을 측정하는 단계로 구성되며, 상기 (ii) 단계 및 (iii) 단계는 (iv) 단계 실시예 앞서 2회 이상 반복 실시되는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 장치에 있어서,

[0018] 상기 (iii)의 응집체를 분해하는 단계를 수행하기 위하여 초음파를 발생시키기 위해 전기에너지를 제공하는 초음파 발생기, 상기 초음파 발생기에 의해 제공되는 전기 에너지를 초음파 진동으로 변환시키는 압전소자를 포함하는 컨버터, 상기 컨버터에 의해 변환된 초음파 진동을 증폭시키는 부스터, 상기 부스터에 의해 증폭된 초음파 진동을 시료에 전달하는 혼, 상기 혼의 상부에 결합되며 그 내부에 향온수조가 형성되어 시료를 향온처리할 수 있는 컵혼 구조, 상기 컵혼 구조에 물을 공급하고 배출시키는 향온순환시스템을 포함하여 구성됨을 특징으로 하는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 장치를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명에서 상기 향온순환시스템은 컵혼 구조의 물 또는 시료의 온도를 측정하는 온도센서를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 또한, 본 발명은

[0021] (i) 완충액 내에서 시료와 일정량의 비병원성 이형태체(non-pathogenic conformer)를 접촉시키고,

[0022] (ii) 완충액 내에서 시료와 비병원성 이형태체를 향온처리하고,

[0023] (iii) 완충액 내에서 상기 (i) 또는 (ii) 단계 동안 형성된 임의의 응집체를 분해하고,

[0024] (iv) 시료 내의 병원성 이형태체의 존재 또는 함량을 측정하는 단계로 구성되며, 상기 (ii) 단계 및 (iii) 단계는 (iv) 단계 실시예 앞서 2회 이상 반복 실시되는 단백질 미스폴딩 사이클 증폭(protein misfolding cyclic amplification) 방법으로 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법에 있어서,

- [0025] 완충액으로서 pH 7.0~8.0의 술폰산 함유 완충액을 선택, 사용하는 것을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 술폰산 함유 완충액이 2-(*N*-모르폴리노)에탄술폰산(MES), 피페라진-*N,N'*-비스(2-에탄술폰산)(PIPES), *N*-2-아세트아미도-2-아미노에탄술폰산(ACES), 3-(*N*-모르폴리노)-2-히드록시프로판술폰산(MOPSO), *N*-트리스(히드록시메틸)메틸-2-아미노에탄술폰산(TES) 및 *N*-2-히드록시에틸피페라진-*N'*-2-프로판술폰산(HEPPS)으로 이루어진 군 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 완충액에 비이온 계면활성제를 임계 마이셀 농도 이하 또는 이상 가하는 것을 특징으로 하는 병원성 프리온 단백질을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 비이온 계면활성제가 Tween 80, Triton X-100, Brij, Lubrol 및 폴리에틸렌글라이콜로 이루어진 그룹 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 비이온 계면활성제가 0.5~2%(w/w) 범위임을 특징으로 한다.
- [0030] PMCA(protein misfolding cyclic amplification) 방법은
- [0031] (i) 시료와 일정량의 비병원성 이형태체(non-pathogenic conformer)를 접촉시키고,
- [0032] (ii) 시료와 비병원성 이형태체를 향온처리하고,
- [0033] (iii) 상기 (i) 또는 (ii) 단계 동안 형성된 임의의 응집체를 분해하고,
- [0034] (iv) 시료 내의 병원성 이형태체의 존재 또는 함량을 측정하는 단계로 구성되며, 통상 상기 (ii) 단계 및 (iii) 단계는 (iv) 단계 실시예 앞서 2회 이상 반복 실시된다. 상기 응집체 분해 단계는 일반적으로 초음파를 이용하여 수행된다. 종래 PMCA 장치도 초음파를 이용하여 응집체를 분해하는 방식을 채택하고 있다.
- [0035] 본 발명의 개선된 PMCA 장치는 상기 (iii)의 응집체를 분해하는 단계를 수행하기 위하여 초음파를 발생시키기 위해 전기에너지를 제공하는 초음파 발생기, 상기 초음파 발생기에 의해 제공되는 전기 에너지를 초음파 진동으로 변환시키는 컨버터, 상기 컨버터에 의해 변환된 초음파 진동을 증폭시키는 부스터, 상기 부스터에 의해 증폭된 초음파 진동을 시료에 전달하는 혼, 상기 혼의 상부에 결합되며 그 내부에 향온수조가 형성되어 시료를 향온처리할 수 있는 컵혼 수조, 상기 혼 및/또는 컵혼 수조에 물을 공급하고 배출시키는 향온순환시스템을 포함하여 구성된다.
- [0036] 본 발명자들은 컨버터에 사용할 압전소자로서 전기기계결합계수 및 기계적품질계수 값이 높아 내구성이 우수하고 고효율을 생산할 수 있는 압전소자를 선택하였다. 압전소자 재료로는 전기에너지를 기계적 진동으로 변환시키는 소자 중에서 PbO, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 및 MnO<sub>2</sub> 등의 복합 압전소자 재료를 선정하였다. 상기 복합 압전소자에 알루미늄 또는 스테인레스 스틸 등의 금속재질로 된 초음파 방사면을 접촉시키고, 통상적으로 60Hz의 전기 신호를 인가하면 20KHz 주파수의 진동이 발생하며, 0 ~ 2000W까지 출력과워 조절기능을 할 수 있도록 컨버터(converter)를 구성하였다. 이 컨버터에 가늘고 긴 금속으로 된 프로브(probe)를 부착시키면 진동이 프로브를 따라 지나면서 진동의 세기가 증폭되게 되는데, 부스터(booster) 및 혼(horn)은 티타늄(titanium) 재질 등으로 만들어 강한 컨버터의 출력을 증폭시키는 소재로 사용하였다. 부스터에 의하여 강력하게 증폭된 초음파는 컵혼(cup horn) 수조 속의 용액으로 퍼져나가도록 설계되었다. 상세한 도면은 도 1에 나타내었다.
- [0037] 종래 PMCA 장치는 37℃로 30분간 유지되는 상태에서 포텐시(potency) 40~60% 초음파를 40초 인가하는 것을 1 사이클(cycle)로 한다. 통상 96사이클을 1라운드(round)로 하여 이틀간 실시한다. Misonix 사의 PMCA 장치는 모두 37℃가 유지되는 인큐베이터(incubator) 내에 넣어 1, 2, 3, ... 라운드를 계속 진행하여 실험하며, 때로는 15일에서 30일까지 계속 사이클을 돌린다. Misonix 사의 PMCA 장비는 공랭식 열유지 방식으로 온도를 유지하게 된다. 프리온 단백질의 증폭이 잘 일어나게 하기 위해서 Supattapone 연구진이 4℃, 25℃ 그리고 37℃에서 PMCA 실험을 진행한 결과 37℃에서 가장 좋은 증폭결과를 얻었다(Lucassen R. et al., *Biochemistry*, 2003, 42, 4127-4135). 그리하여 본 발명자들은 Misonix 사의 PMCA 장치를 인큐베이터에 넣어 실험할 때 발생할 수 있는 온도 변화에 의한 실험적 오차를 개선하고자 하였으며, 균일한 온도조건을 제공할 수 있는 수냉식 열유지 방식의 향온순환시스템을 혼 및/또는 컵혼에 장착하는 것을 발명하였다. 도 1과 같이 컵혼 내부의 향온수조에 물이 들어가고 나오는 입수관을 혼 또는 컵혼 수조 외부에 형성하고, 출수관을 컵혼 수조 외부에 형성하였으며, 컵혼 수조를 혼의 아래 부분과 밀착시켜 혼의 중간 부분에서 컵혼 수조 표면까지 물이 지속적으로 흐름을 형성하도록

모터를 부착하여 온도에 의한 실험오차를 줄였다. 또한 컵혼 수조 내 물의 온도를 실시간 점검 및 조절할 수 있도록 온도센서를 컵혼 수조에 장착하여 고온으로 인한 단백질 변성을 억제할 수 있도록 하였으며, 온도를 유지하며 초음파 소음을 억제할 수 있는 보호 박스(Protection box)도 일체형으로 이동이 가능하게 부가할 수 있다.

[0038] 본 발명자들은 종래 PMCA 장치와 본 발명자들이 개선한 PMCA 장치를 이용하여 프리온 단백질 증폭을 비교 검증하는 실험을 우선 진행하였다. 도 2와 같이,  $\text{PrP}^C$ 는 10% 균질액으로 제조하고,  $\text{PrP}^{Sc}$ 의 함량(10% 균질액을  $10^{-4} \sim 10^{-13}$ 으로 희석함)을 각각 다르게 제조하고, PK의 농도를 다양하게 하여 기초적인 실험을 진행하여 초기조건을 설정하였다. 기초적인 실험조건을 바탕으로 종래 PMCA 장치와 본 발명자들이 개선한 PMCA 장치를 이용하여 프리온 단백질의 증폭을 비교한 결과, 본 발명의 개선된 PMCA 장치가 기존 Misonix사의 장치보다 검출한계가 향상됨을 확인하였다. 이는 개선된 PMCA 장치가 균일한 온도를 유지하여 초음파 인가 후 발생하는 고온으로부터 사용자가 설정한 온도까지 즉시 바꾸어 유지시키므로 고온에 의한 단백질 변성을 억제하여 주기 때문이다. 또한, 컨버터의 압전소자에서 초음파 강도를 0 ~ 2000W까지 다양하게 설정할 수 있으므로 종래 PMCA 장치(최대 600W 파워출력)보다 강한 초음파 인가가 가능하다.

[0039] 본 발명자들은 또한, 종래 PMCA 방법에서 사용하던 CB(conversion buffer)(PBS, 0.15M NaCl, 1% Triton X-100, 완전 프로테아제 저해제 콕테일, pH 7.0 ~ 7.3)을 가한 동일한 조건에서 종래 PMCA 장치 및 개선된 PMCA 장치로 실험한 것을 웨스턴 블롯팅하여 프리온 단백질 검출 결과를 살펴보았을 뿐만 아니라, PMCA 장비에서  $\text{PrP}^{Sc}$ 의 검출한계를 개선하고자 완충액 및 계면활성제를 다양하게 첨가하여 실험하여 보았다. 먼저, PMCA 방법에 우선적으로 적용되던 CB(conversion buffer)인 PBS를 다른 완충액으로 바꾸어 실험을 진행하였다. 2-(*N*-모르폴리노)에탄술포산(MES), 피페라진-*N,N'*-비스(2-에탄술포산)(PIPES), *N*-2-아세트아미도-2-아미노에탄술포산(ACES), 3-(*N*-모르폴리노)-2-히드록시프로판술포산(MOPS), *N*-트리스(히드록시메틸)메틸-2-아미노에탄술포산(TES), *N*-2-히드록시에틸피페라진-*N'*-2-프로판술포산(HEPPS) 등을 이용하였다. PBS가 아닌 MES, PIPES, ACES, HEPES, MOPS, CHES 등의 완충액으로 바꾸어 실험한 결과, 프리온 단백질 검출한계가 더욱 향상되어, 극미량  $\text{PrP}^{Sc}$ 를 검출할 수 있었다.

[0040] 본 발명자들은 프리온 단백질 검출 한계를 더욱 높이기 위하여 첨가제로서 계면활성제를 가하였다. 계면활성제는 계면에 흡착하여 계면장력을 현저히 저하시키는 물질로서 용도에 따라 유화제(emulsifier), 가용화제(solubilizer), 습윤제(wetting agent), 세정제(detergent)라 불린다. 구조적으로  $\beta$ -시트의 구성이 높아 용해도(solubility)가 낮은  $\text{PrP}^{Sc}$ 에 계면활성제를 가하는 경우  $\text{PrP}^{Sc}$ 의 용해도를 높일 것으로 예상된다. 따라서 계면활성제를 소량 첨가하여  $\text{PrP}^{Sc}$ 의 용해도를 증가시킴으로써 정상 프리온과 변형 프리온의 접촉을 용이하게 하며, PMCA 기법을 적용하는 동안 접촉된  $\text{PrP}^C$ 가  $\text{PrP}^{Sc}$ 로 전환이 잘 되도록 만들어주었다. 그리하여 변형 프리온 단백질의 용해도를 증가시키기 위하여 소량의 계면활성제를 첨가하면 배양 → 초음파 분쇄의 1사이클 진행과정에서 더욱 많은  $\text{PrP}^C$ 가  $\text{PrP}^{Sc}$ 로 전환되었다는 결과를 얻었다. 하지만, 임계 마이셀농도(critical micelle concentration, CMC) 이상의 농도에서는 수중유형(O/W) 형태의 마이셀(micelle)을 형성하여 마이셀이  $\text{PrP}^C$ 와  $\text{PrP}^{Sc}$ 의 접촉을 억제하는 작용을 할 수 있다. 따라서 계면활성제의 농도가 증가하면 계면활성제의 분자 또는 이온 몇몇이 회합체를 형성하여 용해되며 다양한 회합콜로이드가 형성된다. 이 회합체를 마이셀이라고 하는데 이는 CMC 이상의 농도에서 형성된다. CMC를 경계로 계면활성제의 용해 상태가 용액에서 회합콜로이드로 변하기 때문에 표면장력, 총괄성질 등 용액의 물리화학적 성질이 현저히 변화한다. 본 발명자들은 CMC 농도 이상의 계면활성제를 가한 경우에  $\text{PrP}^C$ 에서  $\text{PrP}^{Sc}$ 로의 전환이 억제된다는 실험결과를 얻었다. 이는 CMC 이상으로 과량 첨가된 계면활성제는 마이셀을 형성하기 때문에 정상 프리온 단백질과 변형 프리온 단백질의 접촉을 억제하는 것으로 보인다. Tween 80, Triton X-100, Brij, 루브롤(Lubrol), PEG 등의 비이온 계면활성제는 1~2% 농도로 첨가하면 프리온 단백질 검출한계가 향상됨을 확인하였다.

## 발명의 효과

- [0041] 상술한 바와 같이, 본 발명은 자동화된 PMCA 장치를 이용한 극미량 병원성 프리온 단백질 검출을 하고자 노력한 결과, 기존 PMCA 장치에서 압전소자, 혼(horn), 부스터(booster), 컨버터(converter)등 초음파를 발생시키는 소자를 개선하였으며, 수냉식 열유지기(항온순환시스템)를 장착하여 온도조절을 용이하게 하였다.
- [0042] 또한, 본 발명은 프리온 단백질의 검출한계를 더욱 향상시키고자 완충액으로서 MES, PIPES, ACES, MOPSO, TES, HEPES 및 HEPPS 중 1종 이상을 이용하였으며 농도는 50 ~ 500mM를 사용하였다.
- [0043] 또한, 본 발명은 0.5 ~ 2% 함량의 Tween 80, Triton X-100, Brij, Lubrol, PEG 등의 비이온 계면활성제를 첨가하여 실험한 결과 더욱 극미량의 병원성 프리온 단백질 검출이 가능하였다.

## 도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 개선된 PMCA 장치를 개략적으로 도시한 것이다.
- 도 2는 PMCA를 위한  $\text{PrP}^C$ 와  $\text{PrP}^{Sc}$  시료 제조 후 예비실험으로서 웨스턴 블롯을 수행한 것이다.  $\text{PrP}^C$  및  $\text{PrP}^{Sc}$ 를 농도별 단백질 분해효소(PK)로 처리한 다음 웨스턴 블롯한 결과이다. PK: 단백질 분해효소, +: 처리함, -: 처리하지 않음.
- 레인 1, 0.05%  $\text{PrP}^C$ , PK 처리하지 않은 것;
- 레인 2, 10%  $\text{PrP}^C$ , PK 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 것;
- 레인 3, 10%  $\text{PrP}^C$ , PK 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 것;
- 레인 4, 10%  $\text{PrP}^C$ , PK 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 것;
- 레인 5, 0.05%  $\text{PrP}^{Sc}$ , PK 처리하지 않은 것;
- 레인 6, 0.1%  $\text{PrP}^{Sc}$ , PK 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 것;
- 레인 7, 0.1%  $\text{PrP}^{Sc}$ , PK 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 것;
- 레인 8, 0.1%  $\text{PrP}^{Sc}$ , PK 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 것;
- 레인 9, 0.5%  $\text{PrP}^{Sc}$ , PK 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 것;
- 레인 10, 0.5%  $\text{PrP}^{Sc}$ , PK 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 것;
- 레인 11, 0.5%  $\text{PrP}^{Sc}$ , PK 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 것.
- 도 3은 종래 PMCA 장치와 개선된 PMCA 장치(Ilsong-PMCA)를 이용한 비교 실험결과이다. (A), (B), (C), (D)의 모든 레인 1은 0.05%  $\text{PrP}^C$ , PK 처리하지 않은 것을 나타내었다. 레인 2는 0.1%( $10^{-3}$ )  $\text{PrP}^{Sc}$ 를 10%  $\text{PrP}^C$ 에 1:10의 농도로 넣은 것을 PMCA를 수행하지 않았을 경우(0 라운드) 증폭되지 않는 것을 볼 수 있다. 레인 3은 10%  $\text{PrP}^C$ 에 0.01%( $10^{-4}$ )  $\text{PrP}^{Sc}$ 를 1:10의 농도로 소량의  $\text{PrP}^{Sc}$ 를 넣고 0과 1 라운드를 수행하고 PK를 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리한 것을 나타낸다. 레인 4 ~ 11은 0.001%( $10^{-5}$ )  $\text{PrP}^{Sc}$ 를 계속 1/10씩 희석한 것을 10%  $\text{PrP}^C$ 에 첨가하여 PMCA를 수행한 결과를 보여준다. (A)의 0 라운드는  $\text{PrP}^{Sc}$ 의 밴드가 관찰되지 않는다. 과량의 10%  $\text{PrP}^C$ 는 모두 PK에 의해 분해되고, PK에 저항성을 가지는  $\text{PrP}^{Sc}$  밴드만 관찰되는 것이다. (B)에 나타낸 종래 PMCA 장치에 의한 결과보다 (C)에 나타낸 본 발명의 PMCA장치(Ilsong-PMCA)를 이용한 결과가 더욱 증폭이 잘 되는 것을 알 수 있다. 또한, (D)와 같이 첨가제(완충액 및 비이온 계면활성제)를 넣어주면 더욱 증폭이 잘 됨을 관찰하였다.
- 도 4a와 4b는 완충액 HEPES와 비이온 계면활성제 PEG, Triton X-100을 첨가하여 종래 PMCA 장치(도 4b)와 본

발명의 개선된 PMCA 장치(도 4a)를 이용하여 비교 실험한 결과이다. (A) PMCA를 수행하지 않은 경우(0 라운드) 0.1%(10<sup>-3</sup>)의 PrP<sup>Sc</sup>에서는 웨스턴 블롯 상에서 밴드가 확인되었다. 하지만 PrP<sup>Sc</sup> 0.01%(10<sup>-4</sup>)부터는 밴드가 나타나지 않았다. 종래 장치와 개선된 장치를 이용하여 1 라운드를 수행한 후 웨스턴 블롯을 수행한 결과 (B)와 같이 종래 장치보다 본 발명의 개선된 장치가 더욱 극미량 검출이 가능함을 확인할 수 있다. 이는 2 라운드를 수행한 결과에서도 확연히 관찰되었다.

도 5a 및 5b는 완충액 및 계면활성제 등 첨가제의 종류와 함유량에 따른 실험결과를 나타내었다.

도 5a의 레인 1은 PBS, NaCl, EDTA 및 완전 프로테아제 저해제 각테일을 CB로 사용하여 PMCA를 수행한 결과 증폭이 되지 않았다. 레인 2는 비이온 계면활성제인 1% Triton X-100을 첨가하여 실험한 결과 증폭되는 변형 프리온 단백질이 관찰되었다. 레인 3은 음이온 계면활성제인 SDS를 1% SDS를 첨가하여 실험한 결과 증폭되는 변형 프리온 단백질이 전혀 없었다.

도 5b의 레인 1은 스테로이드 골격을 가지는 음이온 계면활성제 테옥시콜산 1%를 첨가하여 PMCA를 수행한 결과 Triton X-100을 첨가한 경우보다 약한 밴드가 나타났다. 레인 2는 1% HEPES를 첨가하여 PMCA를 수행한 결과 테옥시콜산을 가한 경우보다는 강하고, Triton X-100을 첨가한 경우보다 약하게 나타났다. 레인 3은 50mM HEPES, 1% Triton X-100의 조성으로 실험한 결과 가장 극미량의 변형 프리온 단백질을 검출할 수 있음을 확인하였다. 이는 종래 PMCA 시험시 사용하던 PBS의 조성보다는 설펡산을 함유한 완충액을 50 ~ 500mM의 농도로 가하여 진행한 결과 PrP<sup>C</sup>→PrP<sup>Sc</sup>로 전환이 PMCA의 사이클에서 용이하게 진행됨을 말해준다. 도 5에서는 다양한 종류의 완충액과 계면활성제를 부가한 실험 결과를 모두 나타내지는 않고, 대표적인 실험결과들만 나타내었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 아래 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

#### [0046] 실시예 1: PMCA 장치 개선

[0047] 본 발명자들은 초음파 진동자(ultrasonic transducer)로 이용하기 위하여 세라믹 압전소자 중에서 PbO, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 및 MnO<sub>2</sub> 등의 복합 압전소자 재료를 선정하였다. 60Hz의 전기 신호를 주면 20KHz의 주파수가 나오며, 0~ 2000W까지 출력과위를 조절할 수 있도록 컨버터를 구성하였다. 부스터 및 혼은 티타늄 소재로 제작하였다. PMCA 원리를 적용하기 위하여 종래 기술과 같이 인큐베이터 장치 내에 PMCA 장치를 넣어 배양 과정을 진행시키는 것이 아니라, 컵혼 수조에서 원하는 온도가 균일하게 잘 적용되도록 항온순환시스템을 적용하여 ‘Ilsong-PMCA’ 장치를 제작하였다. 컵혼 수조에 급수 및 배수관을 연결하고 유속을 조절할 수 있도록 하였다. 또한 온도 센서를 컵혼 수조에 장착하여 온도 변화를 최소화하며 실시간으로 수조의 수온을 측정하였다. 시료는 수조에 담겨있음으로 수조의 수온과 시료의 온도는 같다고 볼 수 있다. 실제로 종래 장치에서 초음파가 인가된 후 시료의 온도는 고온(50~60℃)을 나타낸다. 따라서 본 발명자들은 고온에서 단백질의 변성, 수분의 증발로 인한 불균일한 증폭 등의 문제점을 해결하고자 하였다.

#### [0048] 실시예 2: PMCA를 위한 PrP<sup>C</sup>와 PrP<sup>Sc</sup>의 샘플제조

[0049] 실험동물로서 6주령의 인브레드 마우스(C57BL/6J, SJL/J, ICR, MB)와 골든 시리안 햄스터(golden syrian hamster, SHa)를 (주)중앙실험동물로부터 주문하여 사용하였다. 스크래피 질환을 유발하는 스크래피 스트레인 ME7, 139A, 22L, 87V, 263K, 139H는 신경질환연구소(Neuropathogenesis unit, Edinburgh, Scotland)의 알란 디킨스 박사로부터 제공받았다.

[0050] 실험은 스크래피에 감염된 실험군과 동일한 연령의 정상동물로 구성된 대조군으로 나누어 실시하였다. ME7과 139A 스크래피 스트레인은 SJL, ME7, ICR 마우스에 감염시키고, 22L 스크래피 스트레인은 C57BL 마우스에 감염시켰다. 87V 스크래피 스트레인은 MB 마우스에, 263K 및 139H 스크래피 스트레인은 햄스터에 감염시켰다. 감염 방법은 스크래피 스트레인에 감염된 1%(w/v) 뇌 균질액이 포함된 0.01M 인산 완충액(PBS, pH 7.4)을, 마우스의 경우에는 30μl를, 햄스터의 경우에는 50μl를 대뇌에 주입시켰다. 스크래피 스트레인 263K에 감염된 햄스터는 감염 후 70일, 스크래피 스트레인 22L에 감염된 마우스는 152일, 스크래피 스트레인 ME7, 139A 및 139H에 감염된

실험동물은 158일, 스크래피 스트레인 87V에 감염된 실험동물은 287일에 명백하게 발병된 임상적 증상이 있을 때 희생시켜 뇌조직을 적출하였다. 적출에 사용된 각각의 스크래피에 감염된 뇌 및 감염되지 않은 대조군의 뇌 조직을 -70℃에 보관하였다.

[0051] 이렇게 적출하여 보관된 뇌조직을 각각 실험에 맞추어 선정된 CB 완충액에 넣고 균질기(homogenizer)를 사용하여 균질화하여 10%(w/v)의 농도로 만들었다. 그 후 원심분리기를 이용하여 1,500rpm에서 30초간 원심분리를 행하고, 상층액(supernatant)과 침전층(pellet)으로 분리하였다. 이때 상층액을 조심스럽게 취하여 실험에 사용하였다. 감염된 실험동물 뇌조직은 실험을 할 때 바로 뇌조직을 적출하여 사용해야 증폭이 잘 되었다.

### [0052] 실시예 3: PMCA 실험조건

[0053] PMCA 기법은 배양(incubation) → 초음파 분쇄(sonication)를 1 사이클로 하여 반복 구성되는 방법으로서, 본 실시예에서는 배양 과정이 29분 20초 동안 이루어지고, 마지막 40초 동안 초음파 분쇄가 행해졌다. 초음파 분쇄 파워는 40~60% 로 실험에 맞게 최적화하였다. PMCA를 수행하는 동안 온도는 37℃를 유지하는 것이 가장 좋았다. 37℃도 이상에서는 수분이 많이 상승하여 튜브 뚜껑으로 증발되었다. 따라서 실험 시료가 담긴 튜브 내의 상태가 균일하지 못하고, 수분 증발로 인하여 초음파가 인가되는 밑 부분의 농도가 진해지므로 증폭 효율이 떨어졌다. 통상 1 사이클은 30분으로 구성되고, 96 사이클(48시간, 2일)을 1 라운드(round)라 부르며, 보통 1 라운드, 2 라운드, 3 라운드 등으로 계속 진행한다. PMCA 실험과 관련한 실험조건은 Soto C. 연구진의 방법을 사용했다 (Castilla J. et al., *Methods Enzymol.* 2006, 412, 3-21).

### [0054] 실시예 4: PrP<sup>C</sup>와 PrP<sup>Sc</sup>의 웨스턴 블롯 분석

[0055] 웨스턴 블롯은 상기 실시예 2에서 수득한 프리온 질환을 유발시킨 실험동물의 뇌조직에서 변형된 단백질이 병원성 프리온 단백질임을 확인하기 위하여 정상 및 변형 프리온 단백질 농도별로 단백질 분해효소 K(PK)를 우선 처리하였다. 또한, 단백질 분해효소 K의 농도 및 온도, 항-프리온 항체(3F4, 3F10)를 변화시켜가며 기초조건 실험을 진행하였다.

[0056] 스크래피 스트레인에 감염된 햄스터, 마우스의 뇌조직 추출물의 불용성 분획을 버티컬 전기영동장치(Bio-Rad사) 상의 15% SDS 폴리아크릴아미드 겔(SDS-PAGE)에 로딩하여 70V, 30mA에서 전기영동하였다. 이를 니트로셀룰로즈 막으로 옮기고 5% 스킵밀크와 0.1% 트윈-20(Tween-20)이 포함된 TBS를 처리하여 비특이적 면역반응을 방지한 후, 항-프리온 항체 3F10(1: 5,000), 3F4(1: 5,000)를 처리하여 반응시킨 다음 0.1% 트윈-20이 포함된 TBS로 처리하여 니트로셀룰로즈 막을 세척하였다(Choi J.K., et al., *Hybridoma (Larchmt)*, 2006, 25, 271-277). 그 다음 퍼옥시다제가 표지된 항-마우스 IgG를 처리한 후 화학형광발광법을 시행하여 햄스터와 마우스의 뇌조직 프리온 단백질 존재여부와 함량을 탐지하였다. 상기 마우스 단일클론 3F4, 3F10 항-프리온 항체는 PrP<sup>C</sup>와 PrP<sup>Sc</sup>를 모두 검출할 수 있는 항체이다.

[0057] ME7 스크래피 스트레인에 감염된 마우스의 뇌조직 추출물을 단백질 분해효소 K로 처리한 후 수득한 불용성 분획에서는 PrP<sup>Sc</sup>가 검출되었다(도 2, PK: 단백질 분해효소 K, +: 처리함, -: 처리하지 않음).

### [0058] 실시예 5: 종래 PMCA 장치와 개선된 Ilsong-PMCA 장치 비교실험

[0059] 기초적인 실험조건을 바탕으로 최적화된 조건으로 종래 PMCA 장치(Misonix사)와 개선된 Ilsong-PMCA 장치를 이용한 비교실험을 진행하였다. 시료 처리조건, 초음파 강도, 시간 등 모든 조건을 동일하게 하여 실험을 진행하였다. 다만, 종래 PMCA 장치는 공랭식 열유지기 방식으로 온도를 유지하게 되고, 개선된 본 발명의 Ilsong-PMCA 장치는 수냉식 열유지기(항온순환시스템)를 혼(또는 컵혼 수조)에 장착하여 진행하였다.

### [0060] 실시예 6: 완충액 및 계면활성제 등의 첨가제 함유에 따른 비교분석

[0061] PMCA 방법에서 사용되는 완충액을 CB라 명한다(Castilla J. et al., *Methods Enzymol.* 2006, 412, 3-21). PMCA 장치를 고안한 Soto. C 연구진이 추천하는 CB 완충액은 PBS, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 완전

프로테아제 저해제 콕테일(complete protease inhibitor cocktail)로 구성되며 pH 7.0 ~ 7.3이다. 본 발명자들은 pH 7.0 ~ 7.5 영역을 구성하는 2-(*N*-모르폴리노)에탄술폰산(MES), 피페라진-*N,N'*-비스(2-에탄술폰산)(PIPES), *N*-2-아세트아미도-2-아미노에탄술폰산(ACES), 3-(*N*-모르폴리노)-2-히드록시프로판술폰산(MOPSO), *N*-트리스(히드록시메틸)메틸-2-아미노에탄술폰산(TES), *N*-2-히드록시에틸피페라진-*N'*-2-에탄술폰산(HEPES), *N*-2-히드록시에틸피페라진-*N'*-2-프로판술폰산(HEPPS)의 다양한 완충액을 이용하여 PMCA 방법을 실시해 보았다. 이들은 모두 술폰산 및 카르복시산 작용기로 구성된 완충액이다. 이 완충액들을 각각 50 ~ 500mM의 다양한 농도로 하여 실험을 진행하였다.

[0062] 또한, 계면활성제는 전기적 성질에 따라 음이온성/양이온성/비이온성 계면활성제로 나뉘는데, 3가지 계면활성제를 각각 선정하여 농도별로 가하여 PMCA 방법을 실험하였다. 음이온성 계면활성제로는 SDS와 음이온 계면활성제이며 스테로이드 골격을 가지는 담즙산(콜산, 데옥시콜산)을 이용하여 실험하였다. 양이온성 계면활성제는 CTAB 및 CHAPS를 선정하여 실험하였으며, 비이온계면활성제로는 Brij, Emulgen, NP 40, 말토사이드(Maltoside), 글루코사이드(Glucoside), Triton, Tween 계면활성제를 선정하여 실험하였다.

# [0063] 결과 1: 개선된 IIsong-PMCA 장치

[0064] PMCA 원리를 이용한 장치는 미국 Misonix사에서 자동화된 PMCA 모델을 판매 중에 있으며(Castilla, J. et al., *Methods Enzymol.*, 2006, 412, 3-21), 전 세계의 많은 과학자들이 Misonix사의 자동화 PMCA 장비를 이용하여 실험하고 있다. 따라서, 본 발명자들도 'Misonix Model 4000'을 구입하여 실험을 진행하였으나, PMCA 장치의 개선이 필요하였다.

[0065] 개선된 PMCA 장치를 도 1에 나타내었다. 종래 PMCA 장치(Misonix)들은 모두 37℃가 유지되는 공랭식 열유지기 방식의 인큐베이터 내에 넣어 작동시키며, 때로 15일에서 30일까지 계속적으로 작동시킨다. 그러나, 이때 발생하는 온도 변화로 인하여 증폭 효과가 저하된다.

[0066] 그리하여 본 발명자들은 종래 PMCA 장치를 공랭식 열유지기 방식의 인큐베이터에 넣어 실험할 때 발생할 수 있는 온도에 의한 실험적 오차를 개선하고자 공랭식 열유지기 방식을 변형하여 균일한 온도조건을 제공할 수 있는 수냉식 열유지기(항온순환시스템)를 혼에 장착하고, 도 1과 같이 컵혼 수조로 물이 들어오고 나가도록 구성하였다. 본 발명자들은 지름이 100, 150 그리고 180mm가 되도록 세 가지 혼을 제작하였다. 지름 100mm 컵혼 수조는 혼의 아래 부분과 밀착시켜 혼의 중간 부분에서 컵혼 표면까지 물이 항상 흐르도록 제작하여 온도에 의한 실험 오차를 줄였다. 실험 결과 지름이 가장 작은 100mm에서 가장 강력한 초음파가 발생되었다. 그러나, 본 명세서에는 종래 PMCA 장치와 비교하기 위하여 70 × 150mm에서의 실험결과만 나타내었다.

[0067] 본 발명의 일 실시예에 따른 개선된 PMCA 장치에는 온도를 실시간 점검 및 조절할 수 있도록 온도감지센서를 컵혼에 장착하여 설정 온도 범위 이상이 되면 고온으로 인하여 단백질이 변성되는 문제가 발생하므로 이를 억제하기 위하여 공급되는 물의 온도를 낮추도록 하였으며, 온도를 유지하며 초음파 소음을 억제할 수 있는 보호박스(protection box)도 일체형으로 제작하였다.

[0068] 또한, 초음파를 발생시키는 컨버터에 PbO, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, MnO<sub>2</sub> 등의 복합 압전소자 재료를 이용하였으며, 알루미늄 또는 스테인레스 스틸 등의 금속재질로 된 초음파 방사면을 집착시켜 통상 60Hz의 전기 신호를 인가하면 20KHz 주파수의 진동이 발생하며, 0 ~ 2,000W 까지 출력과워 조절기능을 할 수 있도록 컨버터를 구성하였다. 그리하여 사용자의 필요에 따라 0 ~ 2,000W 출력과워를 선택하여 실험할 수 있도록 하였다. 혼을 구성하는 소재는 티타늄으로서 종래 장치의 혼 재질인 알루미늄과 티타늄의 합금보다 강도가 강하며, 강한 혼의 출력을 전달할 수 있도록 컨버터도 티타늄으로 제작하였다. 본 발명의 개선된 PMCA 장치는 사용 결과 안정성이 확보되었음을 확인하였다.

# [0069] 결과 2: PrP<sup>C</sup>와 PrP<sup>Sc</sup>의 웨스턴 블롯 분석

[0070] 인브레드 마우스인 ICR의 뇌조직을 확보하여 단백질 분해효소 K를 농도별로 처리하였다. 50, 100 그리고 200μg/ml을 이용하여 실험조건을 설정하였다. 단백질 분해효소 K(PK)는 45℃, 150rpm의 셰이커에서 처리하였다. 실험 결과 PrP<sup>C</sup>는 모두 분해되어 깨끗한 웨스턴 블롯을 볼 수 있었다(도 2). 하지만, ME7 스트레인에 감염된 ICR의 뇌조직에서는 위와 같이 처리하였을 경우 전형적인 PrP<sup>Sc</sup>의 웨스턴 블롯이 관찰되었다. 감염된 ICR의

뇌조직 농도를 0.1%와 0.5%로 설정하고 각각 단백질 분해효소 K를 50, 100 그리고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 처리하였을 경우, 단백질 분해효소 K의 농도에 비례하여 PrP<sup>Sc</sup>의 분해가 일어나지는 않았다. 즉, 단백질 분해효소 K의 농도가 강하거나 약하거나 PrP<sup>Sc</sup>의 패턴은 동일하게 나타났다.

[0071] **결과 3: 종래 장치와 개선된 장치(Ilsong-PMCA)를 이용한 비교 실험**

[0072] 종래 PMCA 장치와 본 발명자들이 발명한 Ilsong-PMCA 장치를 비교 실험하였다. 도 3과 같이 PMCA를 실시하지 않은 것(0라운드)에서는 웨스턴 블롯 결과 PrP<sup>Sc</sup> 밴드가 나타나지 않는다. 이번 비교실험조건에서는 보통 정상 마우스 뇌조직 10% 균질액을 기질(substrate)로 많은 양 넣어주고, 소량의 PrP<sup>Sc</sup>를 넣어주었다. 보통 감염되어 증상이 나타나는 마우스 뇌조직을 희석(10% 균질액을 10<sup>-4</sup> ~ 10<sup>-13</sup> 으로 희석함)하여 넣어주었다. 비교실험을 위해서는 4%의 PrP<sup>C</sup>를 넣어주었다. 또한 감염된 마우스 뇌조직을 원심분리하여 균질액을 확보할 때 보통 1,500rpm, 30초를 행하나, 여기서는 13,500rpm, 2분을 행하였다. 웨스턴 블롯에서 레인 1은 단백질 분해효소 K를 처리하지 않은 것을 나타낸 것이다. 레인 2는 PrP<sup>Sc</sup> 10<sup>-3</sup>을 첨가한 것으로서, 단백질 분해효소 K를 처리하고 PMCA를 실시하지 않은 것(0라운드)을 나타낸다. 보통 원심분리 1,500rpm, 30초를 행하면 10<sup>-3</sup> 농도에서 PrP<sup>Sc</sup>의 밴드가 나타나지만, 이번 실험에서는 고속원심분리를 통하여 PrP<sup>Sc</sup>의 함량을 줄여서 넣었다. 개선된 Ilsong-PMCA 장치를 이용한 실험에서는 Misonix 장치에 의한 실험보다도 PrP<sup>Sc</sup>의 함량이 더 많이 나타났다. 여기에 완충액 및 계면활성제의 함량을 바꾸어 실험한 결과, PMCA 증폭이 더욱 잘 됨을 관찰하였다.

[0073] **결과 4: 완충액 및 계면활성제 등 첨가제 함유에 따른 실험**

[0074] PMCA 장치를 고안한 Soto. C 연구진이 추천하는 CB는 PBS, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 완전 프로테아제 저해제 콕테일(complete protease inhibitor cocktail)로 이루어져 있고, pH 7.0 ~ 7.3 범위이다. 또한, PMCA를 이용한 많은 논문들을 검색하여 본 결과 위와 같은 조성의 CB 완충액을 많이 사용하였다. 본 발명자들은 pH 7.0 ~ 7.5 영역을 구성하는 다양한 완충액을 선정하여 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산, 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산), N-2-아세트아미도-2-아미노에탄술폰산, 3-(N-모르폴리노)-2-히드록시프로판술폰산, N-트리스(히드록시메틸)메틸-2-아미노에탄술폰산, N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-에탄술폰산, N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-프로판술폰산의 완충용액으로 실험을 진행하였다. 설폰산 및 카복시산 작용기를 가지는 완충액으로서, 50 ~ 500mM의 농도로 나누어 진행하였다.

[0075] 계면활성제는 전기적 성질에 따라 음이온/양이온/비이온 계면활성제로 나뉘는데, 3가지 계면활성제를 각각 선정하여 농도별로 실험하였다. 음이온 계면활성제로는 SDS와 기타 음이온 계면활성제가 있으며, 스테로이드 골격을 가지는 담즙산(콜산, 데옥시콜산)을 음이온 계면활성제로 선택하여 실험하였다. 양이온 계면활성제로는 CTAB, CHAPS로 실험하였으며, 비이온 계면활성제로서 Brij, Emulgen, NP 40, 말토사이드(Maltoside), 글루코사이드(Glucoside), Triton 및 Tween 중 1종 이상을 선정하여 실험하였다.

[0076] 도 5a (1)과 같이 PBS, NaCl, EDTA, 완전 프로테아제 저해제 콕테일(complete protease inhibitor cocktail)로 구성된 CB 완충액을 사용하여(정상 및 감염된 마우스 뇌조직의 균질화 완충액으로도 사용함) PMCA를 실시한 결과 증폭이 되지 않았다. 도 5a (2)는 비이온 계면활성제인 1% Triton X-100을 첨가하여 실험한 결과 증폭되는 변형 프리온 단백질이 관찰되었다. 도 5a (3)은 음이온 계면활성제인 SDS를 상기 완충액에 1% 첨가하여 실험한 결과 증폭되는 변형 프리온 단백질이 전혀 없었다. 도 5b (1)은 스테로이드 골격을 가지는 음이온 계면활성제 데옥시콜산 1%를 첨가하여 PMCA를 실시한 결과 Triton X-100을 가한 경우보다는 약한 밴드가 나타났다. 도 5b (2)는 1% HEPES를 사용하여 PMCA를 실시한 결과 데옥시콜산을 가한 경우보다는 강하고, Triton X-100을 가한 경우보다 약한 밴드가 나타났다. 도 5b (3)은 50mM HEPES 및 1% Triton X-100을 완충액에 가하여 실험한 결과 가장 극미량의 변형 프리온 단백질을 검출할 수 있음을 확인하였다. 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산, 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산), N-2-아세트아미도-2-아미노에탄술폰산, 3-(N-모르폴리노)-2-히드록시프로판술폰산, N-트리

스(히드록시메틸)메틸-2-아미노에탄술폰산, N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-프로판술폰산의 완충용액에서도 같은 결과를 얻었다. PBS의 조성보다는 술폰산 및 카르복시산으로 구성된 완충액을 50 ~ 500mM의 농도로 변화시키며 가하여 실험을 진행한 결과  $\text{PrP}^C \rightarrow \text{PrP}^{Sc}$ 로 전환이 용이하게 진행됨을 확인하였다.

[0077]

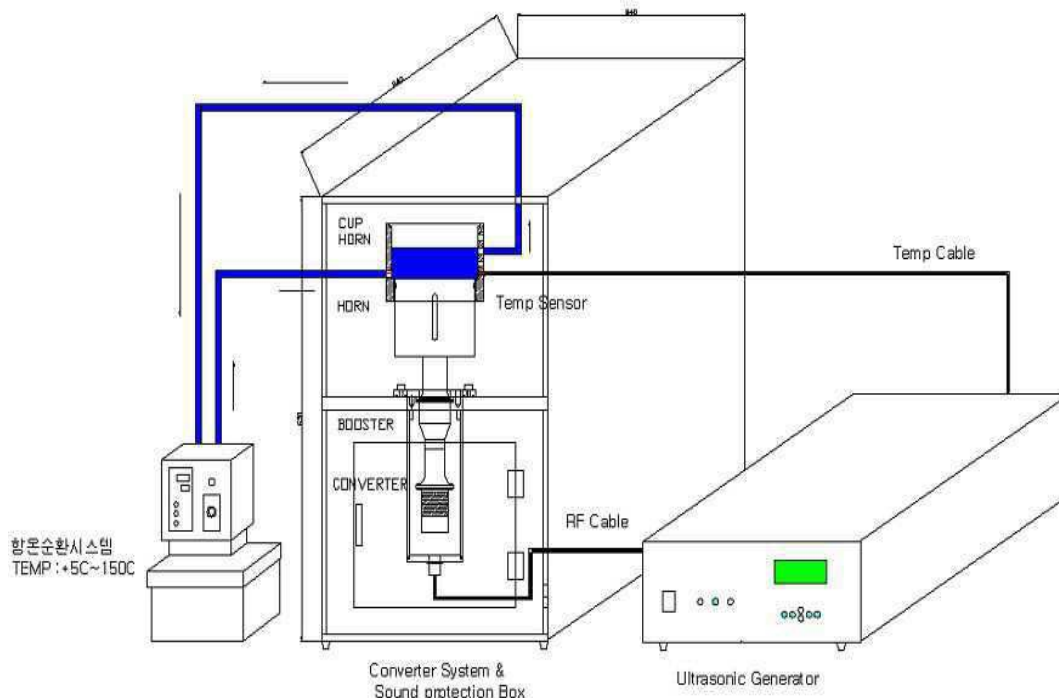
상기 결과는 구조적으로  $\beta$ -시트의 비율이 높아 용해도가 낮은  $\text{PrP}^{Sc}$ 에 비이온 계면활성제가 작용하여 용해도를 높이기 때문인 것으로 보인다. 또한, 음이온 계면활성제를 소량 첨가하는 경우에도  $\text{PrP}^{Sc}$ 의 용해도를 증가시켜 정상 프리온과 변형 프리온의 접촉이 용이하게 되었을 것이라 사료된다. PMCA 방법을 수행하는 동안 소량의 음이온 계면활성제는 접촉된  $\text{PrP}^C$ 가  $\text{PrP}^{Sc}$ 으로 잘 전환되도록 도와주는 것으로 보인다. 하지만, 계면활성제는 임계 마이셀 농도(Critical Micelle Concentration, CMC) 이상의 농도에서는 수중유 형태의 마이셀을 형성하여 이것이  $\text{PrP}^C$ 와  $\text{PrP}^{Sc}$ 의 접촉을 억제하는 것으로 예측된다. CMC를 경계로 계면활성제의 용해 상태가 용액에서 회합콜로이드로 변하기 때문에 표면장력, 총괄성질 등 용액의 물리화학적 성질이 현저히 변화한다. 스테로이드 골격을 갖는 음이온 계면활성제인 디옥시콜산도 소량 첨가했을 경우에는 용해도를 증가시켜 향상된 검출한계를 가질 수 있었다. 따라서  $\text{PrP}^{Sc}$ 의 용해도를 증가시키기 위하여 소량의 계면활성제를 첨가하면 배양  $\rightarrow$  초음파 분쇄의 1사이클을 진행하는 과정에서 더욱 많은  $\text{PrP}^C$ 가  $\text{PrP}^{Sc}$ 로 전환되는 결과를 얻었다. 하지만, 과량 첨가된 비이온성 계면활성제는 마이셀 형성으로  $\text{PrP}^C$ 와  $\text{PrP}^{Sc}$ 의 접촉을 억제하는 기능을 하기에 임계 마이셀 농도 이상에서는  $\text{PrP}^{Sc}$ 의 전환을 억제한다는 실험결과를 얻었다. 따라서 계면활성제 및 설폰산 및 카르복시산 작용기를 가지는 완충액의 선정과 농도가 PMCA 방법에서 증폭 효율을 향상시키는데 중요함을 관찰하였다. 비이온 계면활성제인 Tween 80, Triton X-100, Brij, Lubrol, 폴리에틸렌글라이콜은 0.5 ~ 2%의 농도 범위에서 CMC 이상의 농도에서 검출한계가 향상됨을 확인하였다.

## 부호의 설명

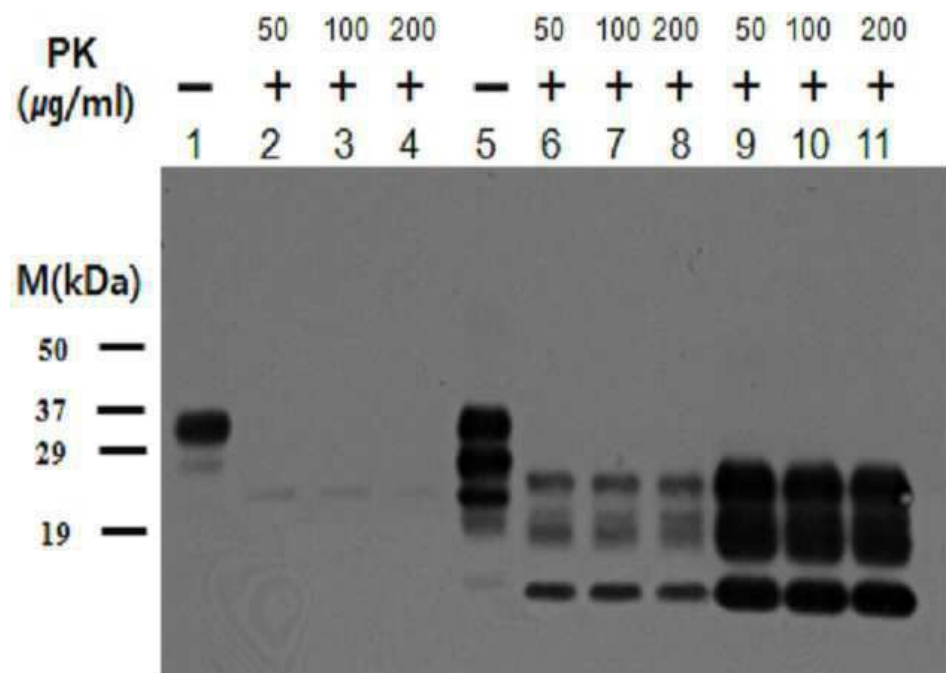
[0078]

## 도면

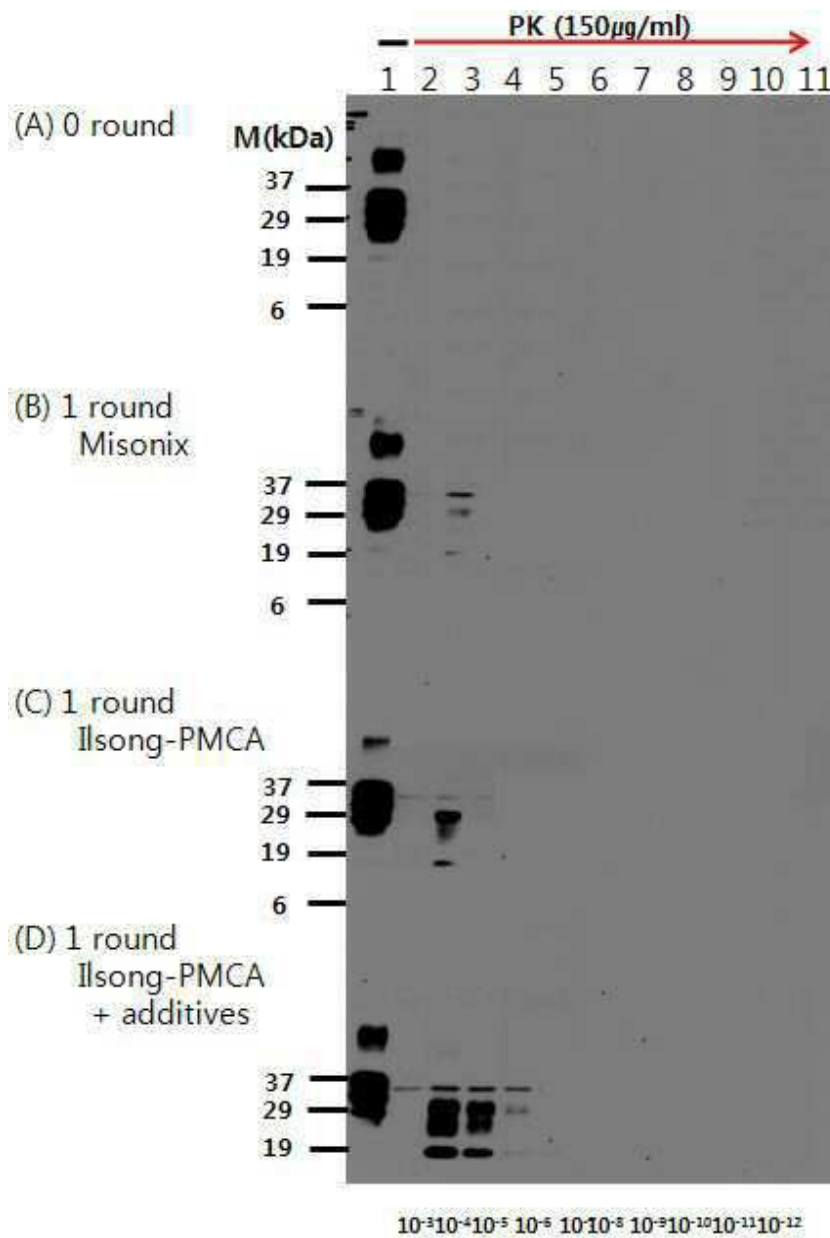
### 도면1



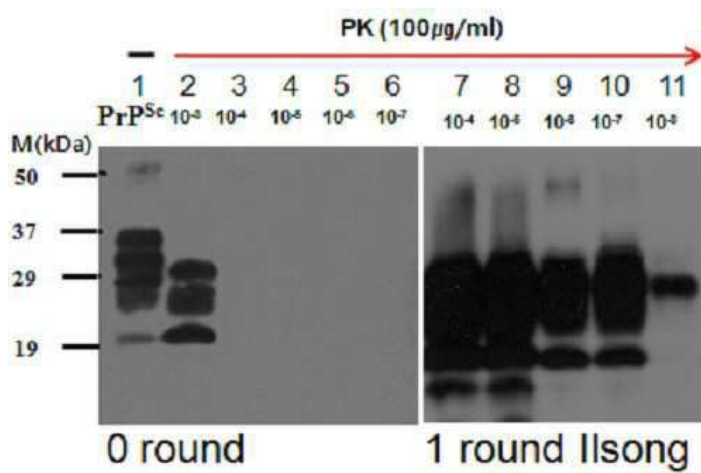
도면2



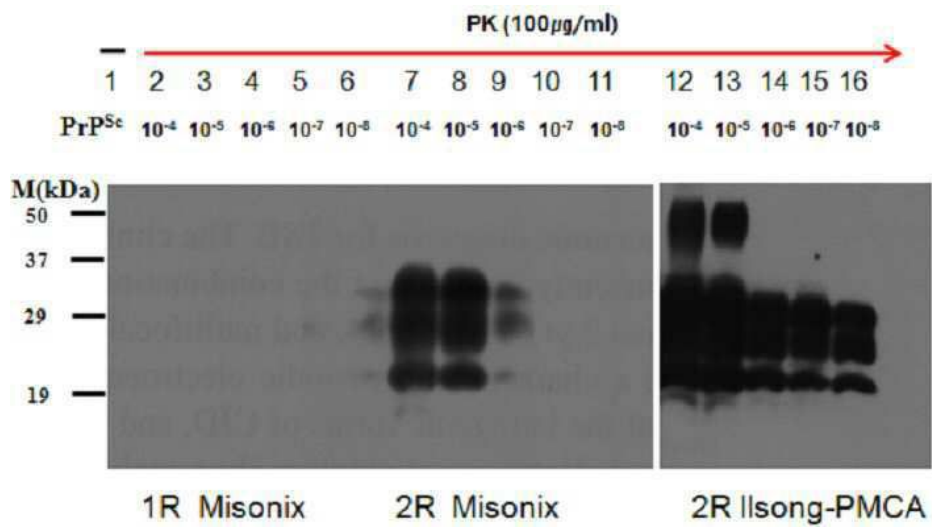
도면3



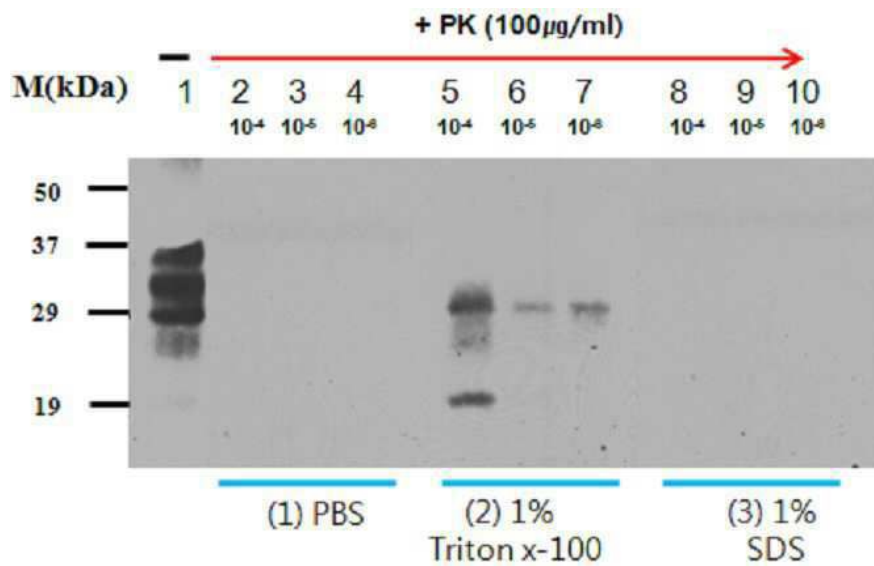
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b

