(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0114251
(43) 공개일자 2021년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/92 (2006.01) *G01N 1/30* (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/92 (2013.01)
G01N 1/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0029718
(22) 출원일자 2020년03월10일
심사청구일자 2020년03월10일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김민식
경기도 수원시 영통구 덕영대로1555번길 20 941동 102호(영통동, 벽적골롯데아파트)
정준양
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 해부학교실 (회기동)
김민정
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 실험연구동A 101호(서천동)
(74) 대리인
특허법인한얼

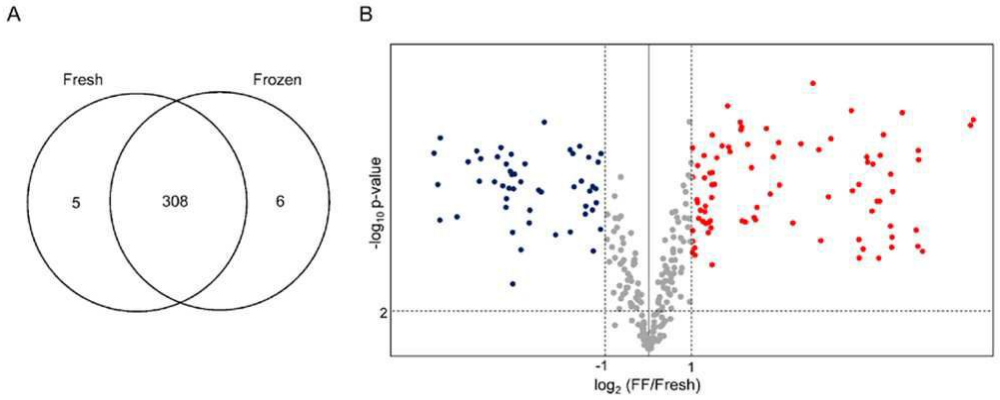
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **생체 조직 내 지질 분석 방법**

(57) 요 약

본 발명은 생체 조직 내 지질 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 생체 조직 고정 방법은 대부분의 지질에 변형을 일으키지 않는 바, 지질 분석용으로 적용 가능하다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
G01N 30/7233 (2013.01)
G01N 2030/8813 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2017M3C7A1027472
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 뇌과학원천기술개발사업
연구과제명 단백체 분석을 이용한 자폐증 관련 분자표적 발굴 및 검증
기 여 율 1/3
과제수행기관명 대구경북과학기술원
연구기간 2017.05.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 KHU-20161378
부처명 경희대학교
과제관리(전문)기관명 경희대학교 산학협력단
연구사업명 교비연구비지원사업
연구과제명 포말린-픽스트, 파라핀-임베디드(FFPE) 시료의 멀티 오믹스 분석 파이프라인 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2018R1D1A1B07040282
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기본연구지원사업
연구과제명 역분화 슈반세포 자가이식을 이용한 신경해부학적 분석 기반 혁신적 뇌질환 치료 전략 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2018.06.01 ~ 2023.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) 생체 조직을 포름알데히드로 고정하는 단계; 및

b) 고정된 생체 조직에 포함된 지질을 분석하는 단계;를 포함하는, 뇌 조직 내 지질 분석 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 a) 단계는 생체 조직을 1 내지 5 ℃ 온도의 포름알데히드에서 3 내지 7일 동안 침지하는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 a) 단계 이후에 고정된 생체 조직을 에탄올(ethanol) 또는 자일렌(xylene) 등으로 세척하지 않는 것인, 뇌 조직 내 지질 분석 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 포름알데히드는 2 내지 5 %(v/v)의 농도인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 포름알데히드는 파라포름알데히드(paraformaldehyde)인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 생체 조직은 뇌 조직인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생체 조직 내 지질 분석 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 환자 유래 임상 시료는 일반적으로 장기 보관 및 향후 사용을 위해 고정되어 보존된다. 고정된 샘플을 사용한 조직 마이크로어레이(tissue microarray)는 지난 10 년 동안 가장 많이 사용되었다. 현재 RNA 서열 및 질량 분석(mass spectrometry)을 기반으로 한 단백질체학(proteomic)을 포함한 고처리량(high-throughput) 기술의 발전에 따라, 고정 조직에서 생체 분자 분석이 가능하다. 알코올 고정제와 비교하여 조직학에서 가장 일반적으로 사용되는 고정제는 포름알데히드(formalaldehyde)로 알려져 있다. 이 화학 시약은 분자내 및 분자간 가교 종(cross-linked species)을 형성하는 생체 분자와 반응한다. 그리고 효소 활성을 억제하는 단백질에서 라이신(lysine), 아르기닌(arginine), 티로신(tyrosine), 아스파라긴(asparagine) 및 글루타민(glutamine)과 가교(cross-linking)가 일어난다.

[0004] 한편, 지질은 대부분 화학적 골격 구조에 따라 분류된다. 각 지질 분류 및 화합물은 다음과 같이 세포 시스템에서 중요한 생물학적 역할을 한다: 1) 생존하기 위해 에너지 저장; 2) 세포 신호전달; 3) 세포막의 구조적 성분으로 작용; 4) 생물학적 시스템의 세포 메신저 역할.

[0005] 이러한 지질을 분석하기 위해, LC-MS(liquid chromatograph mass spectrometry), HPLC(High Performance Liquid Chromatography), TLC(Thin layer chromatography), GC(Gas chromatography), ESI(electrospray ionization), ESI 기반 MRM(multiple reaction monitoring), MALDI 질량 분석법(MALDI-TOF MS, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometer) 및 NMR(nuclear magnetic resonance) 등 다양한 방법이 있다. 특히, LC-MS(liquid chromatograph mass spectrometry)은 높은 감도, 높은 특이성, 높은 처리량 및 높은 정확도로 인해 지질 분석에 유용한 기술이며, ESI 기반 MRM(multiple reaction monitoring)은 표적 지질 분자를 분석하는 데 매우 유용한 방법이다.

[0006] 그러나, 기존 뇌 지질 분석시, 뇌 조직을 고정시키지 않고 직접 시료로 이용한 LC-MS 분석을 통해 뇌의 지질을 정량하거나 비교 분석하였다. 뇌 조직을 고정시킬 경우, LC-MS 분석 전 이를 에탄올(ethanol) 또는 자일렌(xylene) 등으로 세척하는 과정이 필요하나 세척 과정을 통해 지질이 제거되어 지질 분석이 불가능하기 때문이다.

[0007] 또한, 포름알데히드로 인해 여러 아미노산이 변형되는 것으로 알려져 있기 때문에 지질에도 이와 유사한 반응이 일어날 수 있음을 우려하여 지질 분석시에 포름알데히드를 사용하지 않았다. 그러나, 포르말린 고정이 지질 분석을 위한 지질 추출 프로토콜에 미치는 영향에 대한 체계적인 연구는 아직까지 없다.

[0008] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 포름알데히드로 뇌 조직을 고정 시 대부분의 지질에 변형이 없음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 a) 생체 조직을 포름알데히드로 고정하는 단계; 및 b) 고정된 생체 조직에 포함된 지질을 분석하는 단계;를 포함하는, 생체 조직 내 지질 분석 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 a) 생체 조직을 포름알데히드로 고정하는 단계; 및 b) 고정된 생체 조직에 포함된 지질을 분석하는 단계;를 포함하는, 생체 조직 내 지질 분석 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명에 있어서, 용어 "고정(fixation)"은 생체 조직의 내부를 관찰 또는 성분을 분석하기 위해 조직의 변형을 막고 구조적 보관을 유지하면서 시료를 현미경으로 관찰할 수 있도록 하기 위해 취하는 단계이다. 고정법은 주로 용액을 사용하는 화학고정법과 열을 사용하는 물리고정법으로 구분될 수 있다. 일반적인 열을 사용하는 물리고정법은 시료 내에서 생기는 열전도의 차이로 인하여 고정 정도가 일정하지 않고 조직 내의 물질이 대량 축출될 가능성이 있으므로 선호도가 낮은 방법이다. 화학고정법으로는 현미경 관찰을 위하여 생체시료를 고정하는 방법으로 알데히드(aldehyde) 계통, 과망간산 칼륨($KMnO_4$)계통 및 오스뮴산(Osumium tetraoxide: OsO_4) 계통 등의 화학고정액을 이용하는 방법이 흔히 사용되고 있다. 이러한 화학고정은 고정액의 종류, ph, 온도에 따라 관찰시 조직의 염색 정도에 있어서 질적 차이를 보일 수 있다.

[0017] 본 발명의 방법은 알데히드 계통의 화학고정액인 포름알데이드(formaldehyde)를 사용하여 조직을 고정하는 것일 수 있다. 상기 "알데히드 계통의 화학고정액"으로는 전술한 포름알데히드뿐만 아니라, 이의 일종인 파라포름알

데히드(paraformaldehyde), 아크로레인(acrelein) 및 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 등이 있으나, 당업계에서 통상적으로 사용되는 화학고정액이라면 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 포름알데히드는 파라포름알데히드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 상기 포름알데히드의 농도는 1 내지 20 %(v/v), 1 내지 10 %(v/v), 1 내지 5 %(v/v)일 수 있고, 구체적으로는 2 내지 5 %(v/v), 보다 구체적으로는 4 %(v/v)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 상기 농도 범위보다 높은 농도에서 고정할 경우 조직 내 세포의 세포질 영역이 감소함에 따라 조직의 단위면적당 핵 수가 증가하여 분석 결과가 부정확할 수 있고, 낮은 농도에서 고정할 경우 고정이 잘 이루어지지 않을 수 있다.

[0021] 상기 a) 단계는 생체 조직을 1 내지 5℃ 온도의 포름알데히드에서 3 내지 7일 동안 침지하는 것일 수 있고, 구체적으로 4℃ 온도의 포름알데히드에서 5 일 동안 침지하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 상기 온도 범위보다 높은 온도에서 고정할 경우 조직 내 세포의 핵 수가 감소함에 따라 분석 결과가 부정확할 수 있고, 낮은 온도에서 고정할 경우 핵 내 물질이 변형될 수 있다.

[0023] 또한, 상기 기간보다 짧거나 긴 시간 고정하는 경우, 고정이 잘 이루어지지 않거나 고정에 불필요한 시간이 소요될 수 있다.

[0024] 본 발명의 목적상, 본 발명의 방법은 상기 a) 단계 이후에 고정된 생체 조직을 에탄올(ethanol) 또는 자일렌(xylene) 등으로 세척하지 않는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 종래 뇌 조직을 고정시킨 후 지질 분석을 하는 경우, 분석 전 에탄올 또는 자일렌 등으로 세척하는 단계를 거쳤으나, 상기 세척 단계로 인해 지질이 제거되어 지질 분석 결과가 매우 부정확했던 단점이 있었다. 그러나, 본 발명의 방법은 고정된 생체 조직을 상기 용매로 세척하지 않고, 물 등으로 가볍게 세척함으로써 지질 손실을 최소화하여 지질 분석 결과가 신선한 조직에 가까운, 높은 정확도를 나타낼 수 있다는 점에서 의의가 있다.

[0026] 상기 b) 단계에서 지질 분석은 이를 위한 분석법이 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, LC-MS(liquid chromatograph mass spectrometry), HPLC(High Performance Liquid Chromatography), TLC(Thin layer chromatography), GC(Gas chromatography), ESI(electrospray ionization), ESI 기반 MRM(multiple reaction monitoring), MALDI 질량 분석법(MALDI-TOF MS, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometer) 및 NMR(nuclear magnetic resonance) 등의 방법을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 분석법은 LC-MS일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 상기 생체 조직은 생체로부터 수득할 수 있는 조직이면 제한없이 사용할 수 있고, 구체적으로는 뇌 조직일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029]

[0030] 세포의 지질은 생체 분자의 중요한 부류 중 하나이며, 이는 상태의 대리자로 사용될 수 있다. 따라서, 생물 의학 연구에서 지질을 모니터링 하기 위한 많은 연구가 수행되었다. 최근 시퀀싱 기술의 발전으로 수집된 샘플 세트에서 고처리량 방식으로 생체 분자를 연구할 수 있다. 일반적으로 조직은 향후 분석을 위해 포르말린으로 고정하여 보존된다. 이에, 체계적으로 질량 분광계를 사용 하여 고정 지질 과정 중 어떤 클래스의 지질이 변경되는지 찾기 위해 지질을 분석했다. 동결 동안 큰 변화가 없었지만 포르말린-고정에 의한 약간의 변화가 발견되었다. 본 발명의 일 실시예에서는, 총 319 개의 지질을 정량적으로 스크리닝했으며, 이 중 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine, PtdEtn)을 포함한 몇 가지 지질 등급이 변경되었다. PtdEtn 지질 부류는 포르말린에 의해 변형된 것으로 알려진 단백질 상의 리신 아미노산의 측쇄(lysine side chain)와 같은 1 차 아민 작용기를 함유한다. 포르말린에 의한 PtdEtn에서의 이러한 유형의 변형을 확인한 결과, 모든 이동된 질량이 포르말린의 카르보닐기의 질량과 관련이 있음을 발견하였다. 결론적으로, 대부분의 지질은 고정에 의해 영향을 받지 않은 반면, PtdEtn, 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine, lysoPtdEtn) 및 콜레스테릴 에스테르(cholesteryl ester, CE)를 포함한 몇몇 분자는 변하는 것을 확인하였다.

[0031] 이에, 본 발명에 따른 방법은 1 차 아민 작용기를 함유하는 지질을 제외한 지질에 변형을 일으키지 않는 바, 지

질 분석시 적용 가능하며, 조직을 고정하지 않고 분석했던 종래 기술보다 신선한 조직에 가까운, 높은 정확도를 나타낼 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따른 생체 조직 고정 방법은 대부분의 지질에 변형을 일으키지 않는 바, 지질 분석용으로 적용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 본 발명에 따른 실시예의 전반적인 흐름이다.

도 2는 조직 내 지질의 상대적 풍부도이다. 총 20 개의 상이한 지질 부류가 관찰되었다. 액체 크로마토그래피(liquid chromatographic) 곡선 아래의 면적은 각 지질의 존재비를 나타내는 것으로 추정되었다. (A) 신선한 뇌와 냉동 뇌 사이의 지질 Log2(풍부)의 산포도(R^2 0.9319), (B) 신선한 뇌와 포르말린-고정 뇌 사이의 Log2(풍부) 지질의 산포도(R^2 0.6242).

도 3은 고정에 의해 변형된 지질을 나타낸 도이다. (A) 벤 다이어그램은 신선한 또는 냉동 뇌에서 검출된 많은 지질을 나타내며, 총 308 개의 지질이 공통적으로 관찰되었다. (B) Volcano plot은 신선한 지질 대비 고정시 변형된 지질을 나타낸다(p-value < 0.01, fold change ≥ 2).

도 4는 포르말린에 의한 PtdEtn의 변형을 나타낸 도이다. (A) 1 차 아민기를 나타내는 PtdEtn 구조, (B) PtdEtn (20 : 0) 및 포르말린-변형 PtdEtn (20 : 0)의 MALDI 스펙트럼.

도 5는 지질 분류 및 관찰된 지질 전이의 수를 나타낸 도이다.

도 6은 포르말린 고정 뇌에서 과잉, 덜 대표되는 지질의 상위 10 %를 나타낸 도이다(P-value < 0.01, Fold change > 2).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

[0038] **실시예 1. 실험 방법**

[0039] **1-1. 조직 고정**

[0040] 5 주령 수컷 C57BL/6 마우스를 CO_2에서 질식시켜 희생시킨 후 뇌를 적출하고, 즉시 지질 추출하였다. 조직을 고정시키기 위해 4 %(v/v) 파라포름알데히드(paraformaldehyde, PFA)에서 4 ℃에서 5 일 동안 유지시켰다. 이어서, 조직을 물로 세척하였다.

[0041] 모든 의학적 절차와 희생은 대한의학회의 지침과 경희대학교 동물 연구 위원회의 승인에 따라 수행되었다.

[0043] **1-2. 고정된 조직 내 지질 추출**

[0044] 각 지질 표준물질을 클로로포름(chloroform)/메탄올(methanol) 용액(1 : 1, v/v)에 용해시키고 -20 ℃에서 저장한 후, 추출을 위해 원하는 농도로 희석시켰다. 더 많은 음이온성 지질을 추출하기 위해, 산성 지질과 단백질 사이의 이온 상호 작용을 방해 할 수 있는 2 단계 추출 방법을 사용하였다.

[0045] 먼저, 적출된 뇌를 내부 표준물질로서 상기 지질 1 μg/mL 용액을 포함하는 1 ml의 클로로포름/메탄올 용액(1 : 2, v/v)에 첨가하였다. 균질화기(hand type homogenizer)를 사용하여 시료를 균질화하고 1 분 동안 초음파 처리

하였다. 이어서 시료를 30 초간 3 회 볼텍싱하고(vortexing) 10 분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 원심 분리(13,800 x g, 4 ℃에서 2 분) 후, 950 μL의 상청액을 새로운 1.5 mL 튜브로 옮겼다. 펠릿을 750 μL 클로로포름/메탄올/37 % HCl 용액(40 : 80 : 1, v/v/v)에 용해시키고 30 초간 3회 볼텍싱하면서 실온에서 15 분 동안 배양하였다. 이어서, 250 μL의 차가운 클로로포름 및 450 μL의 차가운 0.1 N HCl을 시료에 첨가하였다. 시료를 1 분 동안 볼텍싱하고 원심 분리(6,500 x g, 4 ℃에서 2 분)하였다. 하부의 유기상(organic phase)을 수집하고, 이전 추출물에 모았다. 이어서, 시료를 2 개의 분액(aliquots)으로 균등하게 나누고 SpeedVac 농축기로 건조시켰다. 건조된 시료 중 하나를 중성 및 양성 지질 분석을 위해 200 μL의 용매 A(20 mM 암모늄 포르메이트 및 0.1 %(v/v) 포름산(formic acid)을 갖는 메탄올-아세토니트릴(acetonitrile)-물 (19 : 19 : 2))/용매 B(20 mM 암모늄 포르메이트(ammonium formate) 및 0.1 % (v/v) 포름산을 포함하는 2-프로판올(2-propanol)) 용액(2 : 1, v/v)에 용해시키고, 다른 시료를 음이온성 지질 분석을 위한 트리메틸실릴디아조메탄(Trimethylsilyldiazomethane, TMSD) 메틸화 반응을 위해 200 μL 메탄올에 용해시켰다.

[0047] **1-3. TMSD 메틸화**

[0048] LC-MS에 의해 산성 지질을 분석하는 것은 피크 테일링(peak tailing)으로 인한 어려움이 있으므로, TMSD 메틸화 방법을 사용하였다. 헥산(hexane) 중의 TMSD 2M 용액을 메탄올에 용해된 지질 추출물에 첨가하여, 용액의 색을 황색으로 변화시켰다. 30 초 동안 볼텍싱 한 후, 37 ℃에서 15 분 동안 메틸화시켰다. 빙초산(Glacial acetic acid)을 첨가하여 메틸화 반응을 정지시키고 LC-MS 분석을 수행하였다.

[0050] **1-4. HPLC-MS를 이용한 뇌 시료의 지질 분석**

[0051] 바이너리 펌프(binary pump, G20A), 오토 샘플러(autosampler, G4226A), 컬럼 구획(column compartment, G1316C) 및 온도 조절기(G1330B)가 장착된 Agilent 1290 Infinity 시리즈 HPLC 기기(Agilent Technologies, Santa Clara, USA)를 이용하여 HPLC 분석하였다. 지질 분리를 위해 Hypersil GOLD 컬럼(2.1 x 100 mm ID; 1.9 μm, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 사용하였다. 샘플 트레이(tray) 및 컬럼 오븐의 온도를 4 ℃ 및 40 ℃로 조정하였다. 용매 A 및 용매 B의 유속은 0.25 mL/분이고 주입량은 각 실행에 대해 4 μL였다. 33 분 동안의 구배를 다음과 같이 수행하였다: 0-5 분, B 5 %; 5-15 분, B 30 %; 15-22 분, B 90 % 및 5 분 동안 유지. 이후, 컬럼은 재사용 전에 5 분 동안 B 5 %로 평형화되었다. 뇌 조직의 지질 분석은 3 중 4 중 극자 질량 분석(triple quadrupole mass spectrometry)은 3 중 4 중 극자 질량 분석기(QQQ LC-MS 6490 시리즈, Agilent Technologies)에 의해 수행되었다. 작동원 조건 설정은 다음과 같았다: 모세관 전압 4,000V, 노즐 전압 500V. 가스 유량 및 분무기 가스 유량 13 L/분 및 40 psi. 모든 지질을 최적화된 조건 하에서 분석하였고 각 지질 분류에 대해 계산된 전이를 사용한 MRM 모드에서 수행하였다.

[0053] **1-5. MRM에 의해 수득한 개별 데이터의 데이터 처리**

[0054] 데이터 수집 소프트웨어(Agilent Mass Hunter Workstation Data Acquisition software)를 사용하여 LC-MS 데이터를 처리하였다. 정성 분석 B.06.00 소프트웨어(Qualitative Analysis B.06.00 software, Agilent Technologies)를 사용하여 전구체 이온, 생산물 이온 및 체류 시간의 m/z를 확인하였다. 지질 피크는 지방산 조성에 따라 분리되기 때문에 각 지질 클래스 내부 표준의 체류 시간과 비교하여 지질 피크를 지정하였다. 복수의 실험으로부터 각각 지정된 지질의 MRM 데이터는 소프트웨어(Skyline software package, MacCoss Laboratory, University of Washington)를 사용하여 지정된 지질의 피크 면적을 산출하였다.

[0056] **1-6. 포르말린으로 변형된 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine, PtdEtn)의 MALDI-TOF 실험**

[0057] 총량이 10 μg인 PtdEtn을 4 % 포르말린 또는 포르말린 없이 밤새 4 ℃에서 인큐베이션하였다. PtdEtn 샘플을 C18 컬럼으로 탈염한 다음, 70 %에서 바이너리 매트릭스(binary matrix) 용액(70 %메탄올에 용해된 0.1% TFA 1 ml에 각각 7 mg으로 혼합된 2,5-디히드록시벤조산(2, 5-dihydroxybenzoic acid, DHB) 및 α-시아노-4-히드록시시나민산(α-cyano-4-hydroxycinamic acid, HCCA))에 혼합하였다. 다음으로, 총 1.5 μl의 샘플을 384-표적 플레이트(384-target plate, BrukerDaltonics)에 스포팅(spotted)하고 균일한 매트릭스 결정화를 위해 건조기에서 건조시켰다. MALDI-MS 분석은 포지티브 모드에서 이온화 소스로 200Hz 스마트 빔 레이저가 장착된

UltrafleXtreme 질량 분광계에 의해 수행되었다. 모든 질량 스펙트라는 delay time, 180 nsec; ion source 1 voltage, 25 kV; ion source 2 voltage, 21.65 kV; 및 lens voltage, 9.2 kV 조건으로 설정되었다. MALDI-TOF 질량 분석법의 검출 범위는 500 Da 내지 1,200 Da이고 평균 1000 shots/spot을 수득하였으며, MS 데이터가 수득될 때마다 PtdEtn 표준을 사용하여 외부 교정을 수행하였다.

[0059] **실시예 2. 실험 결과**

[0060] **2-1. 신선한 뇌와 냉동 뇌의 지질 간 차이 분석**

[0061] 샘플들 간의 변이를 최소화하기 위해, 마우스 뇌를 30 분 미만의 희생 시간 동안 절개한 다음, 지질 표준의 존재 하에 i) 신선한 뇌, ii) 냉동된 뇌 또는 iii) 포르말린-고정된 뇌로부터 지질을 추출하기 위해 수동형 균질화기로 신속하게 균질화하였다. 메틸화에 의한 비교적 빠르고 간단한 유도체화 방법을 인산기에 적용하여 피크 테일링을 줄였다. 그런 다음 신선한 뇌와 냉동 뇌 사이의 비교 지질 분석을 수행하여 스냅 냉동 과정과 이후의 깊은 냉동고로의 저장이 지질 분석에 영향을 미치는지 확인하였다. 도 5는 지질 분류 및 관찰된 지질 전이의 수이다. 예를 들어, PtdEtn 지질 부류 내에서 시도된 93 개의 지질 중에서 32 개의 지질이 측정되었다.

[0062] i) 신선한, ii) 냉동 또는 iii) 포르말린 고정된 상태로 각각 저장된 조직에서 추출한 지질이 풍부도에 어떤 변화가 있는지 확인한 결과, 도 2A와 같이, 신선한 뇌와 냉동된 뇌 사이에서 스크리닝된 지질의 양에는 유의한 변화가 없었다. 이 결과는 동결 과정이 지질에 크게 영향을 미치지 않음을 나타내었다.

[0063] 다음으로, 고정된 마우스 뇌에서 추출한 지질을 분석한 결과, 예를 들어, 콜레스테릴 에스테르(cholesteryl ester) 부류에서 23 개 중 12 개의 지질이 검출되었다. 신선한 뇌의 지질과 비교할 때, 유사한 수의 지질이 관찰되었다(도 3A). 도 6은 포르말린-고정 뇌에서 관찰된 지질의 수를 요약한 것이다.

[0065] **2-2. 포르말린 고정에 의한 지질 풍부도의 편향 분석**

[0066] 신선한 뇌와 포르말린-고정 뇌 사이에서 공통으로 검출된 지질의 풍부도를 비교하여 공통으로 308 개의 지질을 측정하였다. 지질의 풍부도에 편향이 있는지 확인하기 위해, 우리는 신선한 뇌 및 포르말린 고정된 뇌 사이에서 공통적으로 관찰되는 지질의 p-값 대 fold-change의 volcano plot을 플롯팅했다(도 3B).

[0067] 그 결과, 대부분의 지질은 포르말린으로의 고정에 의해 변하지 않고 소수의 지질 부류만이 영향을 받는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, CE, lysoPtdSer 부류의 지질은 추출에서 증가한 반면, PtdEtn 부류는 포르말린 고정에 의해 감소되었다. 총 32 개의 변경된 지질이 PtdEtn 클래스로 분류되었다. 이것은 이러한 변경된 지질이 포르말린 고정에 의해 효과적으로 영향을 받는 것을 나타낸다. 도 6은 포르말린으로 고정하는 동안 대표적인 PtdEtn 지질 분자의 존재 비가 감소했음을 나타낸다.

[0069] **3-3. 포르말린 고정에 의한 PtdEtn 의 변형**

[0070] 단백질은 보통 1 차 아민 작용기(예: N-말단 및/또는 리신 측쇄(lysine side chain))에서 발생하는 포르말린으로 변형된다. 흥미롭게도, 포르말린 고정 동안 관찰된 하나의 주요 부류의 변경된 지질은 PtdEtn이며, 이는 도 4A에 도시 된 구조에 1 차 아민을 함유한다. PtdEtn은 PtdEtn 부분이 1 차 아민 작용기뿐만 아니라 글리세롤 치환 부위를 차지하는 글리세로인지질(glycerophospholipid)이며, C-1 및 C-2 위치에 부착된 다양한 길이 및 포화도의 지방산과 많은 상이한 조합을 가질 수 있다. 예를 들어, PtdEtn(20 : 0)으로도 알려진 PtdEtn(10 : 0/10 : 0)은 도 4B에 나타낸 된 바와 같이 C-1 및 C-2 위치에서 2 개의 데카노일 쇄(decanoyl chain)로 구성된다. 고정 중에 포르말린이 PtdEtn을 변형시켰는지 확인하기 위해, PtdEtn(20 : 0)을 4 ℃에서 밤새 포르말린과 인큐베이션하여 MILDI-TOF 질량 분석기에서 샘플을 분석함으로써 인-실리코 제어 실험(in-silico controlled experiment)을 수행하였다.

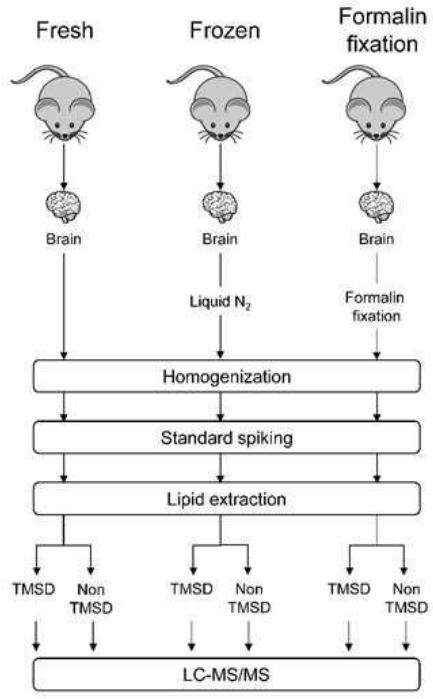
[0071] 그 결과, 도 4B와 같이, 표준 PtdEtn(20 : 0)은 하부 스펙트럼에서 수소, 나트륨 및 칼륨(각각 m/z 524, 546 및 562)을 갖는 부가물 형태로서 몇 개의 주요 피크를 나타내었으며, 여러 피크 최고 스펙트럼에서, 포르말린에 의한 변형을 나타내는 높은 질량에서 이동되는 것으로 확인되었다. 모든 이동된 질량은 포르말린의 카르보닐 질량(-CO, m/z = 28)과 정확하게 연관되어 있다.

[0073] 상기 실시예의 결과로부터, 포르말린에 의한 고정은 뇌 조직에 존재하는 1 차 아민 작용기를 함유하는 지질을 제외한 대부분의 지질에 변형을 일으키지 않는 바, 지질 분석시 적용 가능하며, 조직을 고정하지 않고 분석했던 종래 기술보다 신선한 조직에 가까운, 높은 정확도를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

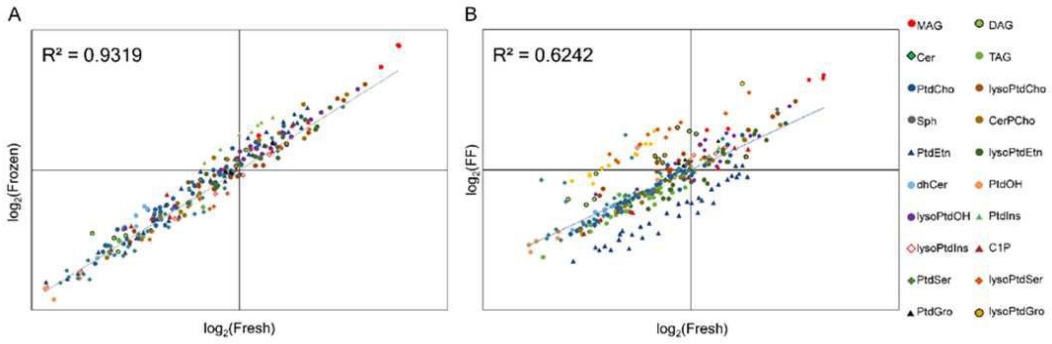
[0075] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

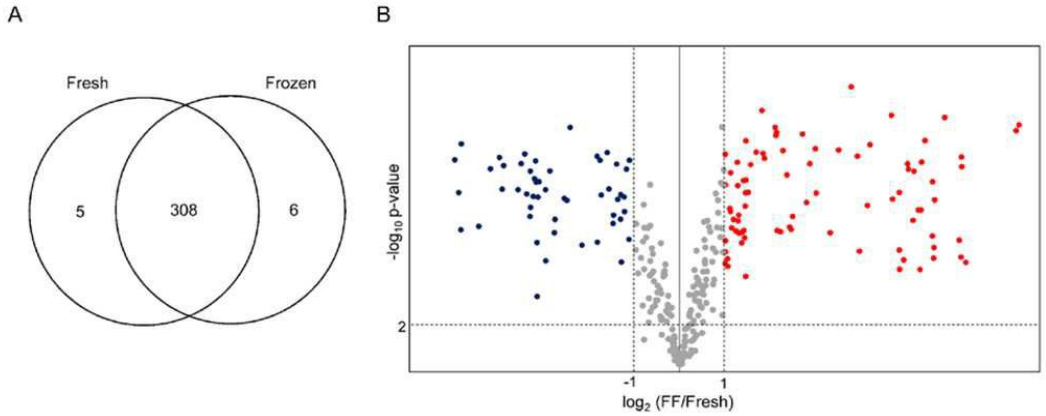
도면1



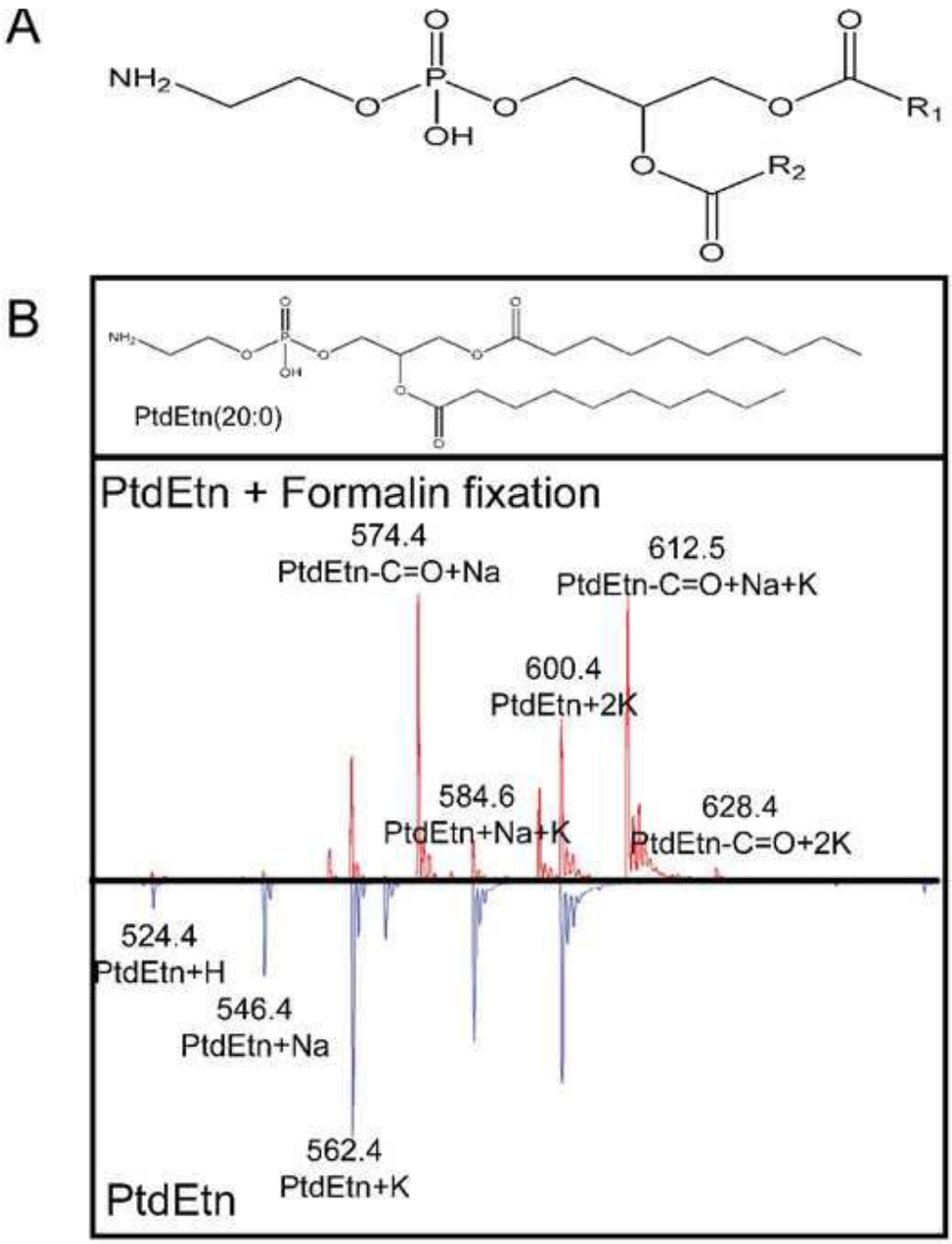
도면2



도면3



도면4


A
NH2
O
P
OH
O
O
R1
O
O
R2
O
B
PtdEtn(20:0)
PtdEtn + Formalin fixation
574.4
PtdEtn-C=O+Na
612.5
PtdEtn-C=O+Na+K
600.4
PtdEtn+2K
584.6
PtdEtn+Na+K
628.4
PtdEtn-C=O+2K
524.4
PtdEtn+H
546.4
PtdEtn+Na
562.4
PtdEtn+K
PtdEtn

도면5

The number of detected lipid transitions / All transitions

Class	Detected	Class	Detected
CE	12/23	dhCer	6/69
Cholesterol	1/1	PtdGro	4/93
MAG	5/23	lysoPtdGro	5/22
DAG	9/93	PtdOH	6/93
TAG	35/194	lysoPtdOH	16/23
PtdCho	44/93	PtdIns	7/93
lysoPtdCho	18/23	lysoPtdIns	5/23
PtdEtn	32/93	PtdSer	32/93
lysoPtdEtn	18/22	lysoPtdSer	11/23
Sph	1/3	C1P	10/68
Cer	12/69	SPA1P	0/3
CerPCho	14/23	S1P	0/3
SPA	0/3	dhCer1P	0/67

Over represented lipids in formalin fixed brain					Less represented lipids in formalin fixed brain				
Species	*Precursor ion*	*Product ion*	*p-value*	*Ratio**	*Species*	*Precursor ion*	*Product ion*	p-value	*Ratio**
PtdSer(32:1) **	762.6	549.3	4.94×10^{-11}	185.87	PtdEtn(38:2)	772.4	631.3	1.53×10^{-9}	0.03
PtdSer(38:4) **	840.6	627.3	8.72×10^{-11}	177.95	PtdEtn(40:2)	800.4	659.3	3.97×10^{-8}	0.03
lysoPtdSer(16:1) **	524.3	311.2	3.94×10^{-5}	82.18	PtdEtn(42:1)	830.4	689.3	1.58×10^{-6}	0.03
CE(20:4)	690.6	369.2	3.06×10^{-9}	77.06	PtdEtn(38:1)	774.4	633.3	3.20×10^{-10}	0.03
Cholesterol	404	369.2	1.18×10^{-9}	76.62	PtdEtn(40:1)	802.4	661.3	1.11×10^{-6}	0.05
lysoPtdSer(22:1) **	608.3	395.2	2.32×10^{-5}	76.16					
lysoPtdSer(20:0) **	582.3	369.2	4.37×10^{-6}	74.23					
PtdSer(38:2) **	844.6	631.3	2.37×10^{-11}	59.31					

*Ratio, formalin fixed brain/fresh brain

**Anionic lipids analyzed after TMSD derivatization

공개특허 10-2021-0114251