



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0019707
(43) 공개일자 2019년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G16B 20/00 (2019.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/68 (2013.01)
G01N 33/6848 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0104977
(22) 출원일자 2017년08월18일
심사청구일자 2017년08월18일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
노규철
서울특별시 영등포구 신길로 1
최치원
대전광역시 유성구 과학로 169-148 한국기초과학
지원연구원
김경옥
인천광역시 남동구 남동대로774번길 21 가천대학
교 길병원
(74) 대리인
특허법인 티앤아이

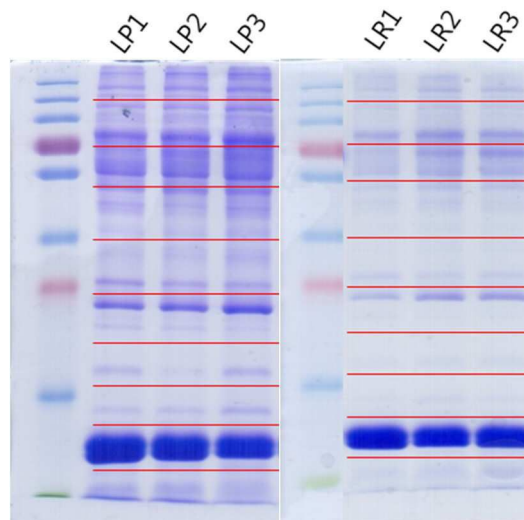
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 프로테오믹스 기법을 이용한 혈소판 풍부 혈장 내의 조직치유 관련 단백질 분류방법

(57) 요약

본 발명은 프로테오믹스 기법을 이용한 혈소판 풍부 혈장 내의 조직치유 관련 단백질 분류방법으로서, (1) 혈액으로부터 혈소판 풍부 혈장을 수득하는 단계; (2) 상기 혈소판 풍부 혈장으로부터 단백질을 동정하는 단계; 및 (3) 유전자 온톨로지 분석을 통해 상기 (2)단계에 따라 동정된 전체 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하는 단계를 포함하는 혈소판 풍부 혈장 내의 조직치유 관련 단백질 분류방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 혈소판 풍부 혈장으로부터 동정된 전체 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류할 수 있고, 이에 따라 혈소판 풍부 혈장이 지닌 잠재적 기능을 파악할 수 있으며, 앞으로 규명해야 할 조직 치유에 관련한 기초의학 연구에 바탕이 될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G16B 20/00 (2019.02)

G01N 2570/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

프로테오믹스 기법을 이용한 혈소판 풍부 혈장 내의 조직치유 관련 단백질 분류방법으로서,

- (1) 혈액으로부터 혈소판 풍부 혈장을 수득하는 단계;
- (2) 상기 혈소판 풍부 혈장에서부터 단백질을 동정하는 단계; 및
- (3) 유전자 온톨로지 분석을 통해 상기 (2)단계에 따라 동정된 전체 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하는 단계;를 포함하는 단백질 분류방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (1)단계는,

- (1-1) 상기 혈액을 항응고제와 혼합하는 단계; 및
- (1-2) 상기 (1-1)단계에 따라 얻어진 혼합물을 원심분리하여 혈소판 풍부 혈장을 수득하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 분류방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 원심분리는 1,000 ~ 4,000 rpm의 속도에서 1 ~ 30분간 수행되는 것을 특징으로 하는 단백질 분류방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 혈소판 풍부 혈장은 순수-혈소판 풍부 혈장(pure-platelet rich plasma, P-PRP), 백혈구 결핍-혈소판 풍부 혈장(leukocyte poor-platelet rich plasma, LP-PRP) 및 백혈구 풍부-혈소판 풍부 혈장(leukocyte rich-platelet rich plasma, LR-PRP)으로 이루어진 군에서 선택되는 일종 이상인 것을 특징으로 하는 단백질 분류방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (2) 단계는,

- (2-1) 등전점 전기영동(Isoelectric focusing, IEF) 및 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)으로 구성된 2차원 전기영동에 의해 혈소판 풍부 혈장에서부터 단백질을 분자량에 따라 분리한 후, 겔 내 절단(in-gel digestion)하는 단계;및
- (2-2) 상기 (2-1)단계에 따라 절단된 단백질에 대한 질량분석을 실시하는 단계를 포함하는 단백질 분류방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 질량분석에는 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS), 전기분무 이온화 질량분석(Electrospray Ionization mass spectrometry, ESI MS) 및 액체 크로마토그래피-이중 질량분석(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 방법이 사용되는 것을 특징으로 하는 단백질 분류방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (3)단계는,

(3-1) 상기 (2)단계에 따라 혈소판 풍부 혈장으로부터 동정된 전체 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하기 위한 키워드를 선정하는 단계;

(3-2) 상기 키워드에 해당되는 단백질을 유전자 온톨로지 데이터 베이스에서 검색하는 단계; 및

(3-3) 상기 데이터베이스에서 검색된 단백질과 상기 동정된 단백질 전체를 매칭하여 상기 혈소판 풍부 혈장으로부터 동정된 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하는 단계를 포함하는 단백질 분류방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 유전자 온톨로지 데이터 베이스는 AmiGo2 유전자 온톨로지 데이터 베이스 또는 IPA(Ingenuity Pathway Analysis) 유전자 온톨로지 데이터 베이스인 것을 특징으로 하는 단백질 분류방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 프로테오믹스 기법을 이용한 혈소판 풍부 혈장(platelet-rich plasma, PRP) 내의 조직치유 관련 단백질 분류방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 프로테오믹스 분석을 통해 상기 혈소판 풍부 혈장에 포함된 단백질 전체를 동정한 후 유전자 온톨로지 분석을 수행함으로써 상기 단백질들을 조직치유 기능에 따라 분류하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈소판 풍부 혈장(platelet-rich plasma, PRP)이란 혈소판을 다량으로 함유한 자가 혈액의 혈장 성분으로서, 일반적으로 약 2 ~ 5배 이상 농축된 혈소판을 함유하고 있다.

[0003] 상기 혈소판에는 알파 과립(α -granule), 치밀 과립(dense granule) 및 리소좀 과립(lysosomal granule)이 포함되어 있다. 그 중에서 혈소판의 알파 과립에는 성장 인자(growth factor), 사이토카인(cytokine)과 같은 생물학적 활성 단백질(bioactive proteins)이 다량 함유되어 있으며, 이는 지혈과 조직 치유에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 예컨대, 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)와 형질전환성장인자 베타(transforming growth factor beta, TGF- β) 등은 조직의 치유에 관련된 성장 인자들로 혈소판의 알파 과립에 함유되어 있다. 또한, 혈소판의 농도가 증가하면 이러한 PDGF와 TGF- β 의 농도가 비례하여 증가한다는 것이 밝혀졌으며, 이는 혈소판 풍부 혈장의 임상적 사용에 대한 근거가 되고 있다. 이러한 성장 인자들은 신생혈관 생성(angiogenesis), 섬유아세포(fibroblast)의 활성화, 교원질(collagen) 및 글리코사아미노글리칸(glycosaminoglycan)의 합성 증가, 세포의 이동(migration)과 증식(proliferation) 과정 등을 통해 조직 치유를 촉진하는 것으로 알려져 있고, 혈소판 풍부 혈장을 통해 조직 치유 과정이 2 ~ 3배 촉진된다는 보고도 있다.

[0004] 이에, 생물학적 활성 단백질이 다량 함유된 혈소판이 고농도로 농축되어 있는 혈소판 풍부 혈장이 손상된 조직의 재생 및 치유를 촉진하는 목적으로 다양하게 사용되고 있다.

[0005] 구체적으로, 혈소판 풍부 혈장을 사용하기 시작한 것은 1987년 개심술에 동종 혈액 물질 수혈을 위한 성분으로 사용하면서부터이다. 사용 초기에는 보철물 수술과 임플란트 삽입과 같은 구강 수술에 사용되었으며, 악안면 수술 등에서 골 재생을 위한 보조적인 수단으로 사용되었다. 이후, 피부과, 성형외과, 이비인후과, 비뇨기과 그리고 신경외과 분야 등 다양한 영역에서 사용이 보고되고 있다. 정형외과 및 스포츠의학 분야에서는 주로 자가 성장 인자를 손상 부위에 직접 주입하여 손상된 조직의 치유를 촉진하려는 목적으로 사용하고 있으며, 슬관절 내측 측부 인대 파열, 족관절 외측 측부 인대 파열과 같은 급성 인대 손상과 회전근개 파열, 주관절외상파열, 슬개건염, 족저근막염, 아킬레스건염과 같은 만성 건 손상, 급성 근육파열에도 사용이 시도되고 있다.

- [0006] 이러한 종래의 방법으로서, 특허문헌 1(대한민국 공개특허공보 제10-2017-0026092호)에는 혈소판 풍부 혈장을 포함하는 약학적 조성물이 공지되어 있고, 상기 약학적 조성물을 이용하여 감각신경성 난청 또는 이명을 예방 또는 치료할 수 있다고 기재하고 있다.
- [0007] 현재, 상기한 바와 같은 혈소판의 알파 과립에 대한 활성 단백질의 구성이나 발현 양상 등에 대한 연구가 이루어졌고, 혈소판 풍부 혈장에서 조직 치유와 관련된 성장인자에 대한 분석이 진행되어 왔다. 그리고, 이러한 연구와 분석에 근거하여 혈소판 풍부 혈장을 손상된 조직의 재생 및 치유에 적용하는 방법에 대한 연구개발이 시도되어 왔다.
- [0008] 그러나, 아직까지 혈소판 풍부 혈장의 생물학적 특성을 규정할 수 있는 어떤 결정 요소나 인자들에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 특히, 혈소판 풍부 혈장에는 고농도의 혈소판뿐만 아니라 응고 인자 및 혈액에 분비된 단백질도 포함되어 있는데, 혈소판 풍부 혈장 자체에 포함된 활성 단백질 전체 구성 및 그 기능에 대해서는 연구가 이루어진 바가 없다. 따라서, 혈소판 풍부 혈장의 특성에 대한 표준화가 이루어지지 않은 실정이고, 그 분류와 기준도 명확하게 제시되어 있지 않다. 뿐만 아니라, 혈소판 풍부 혈장의 최적의 상태와 적용 방법이 무엇인지에 대한 연구도 미비한 상태이다.
- [0009] 이에, 혈소판 풍부 혈장에 포함된 단백질 전체의 구성을 살펴보고, 각각의 단백질을 그 기능에 따라 분류하는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) KR 1020170026092 A

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 혈소판 풍부 혈장에 대한 프로테옴 분석을 통해 상기 혈소판 풍부 혈장에 포함된 단백질 전체를 동정한 후, 유전자 온톨로지 분석을 수행함으로써 상기 단백질들을 조직치유 기능에 따라 분류하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 프로테오믹스 기법을 이용한 혈소판 풍부 혈장 내의 조직치유 관련 단백질 분류방법으로서, (1) 혈액으로부터 혈소판 풍부 혈장을 수득하는 단계; (2) 상기 혈소판 풍부 혈장으로부터 단백질을 동정하는 단계; 및 (3) 유전자 온톨로지 분석을 통해 상기 (2)단계에 따라 동정된 전체 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하는 단계;를 포함하는 혈소판 풍부 혈장 내의 조직치유 관련 단백질 분류방법을 제공한다.
- [0013] 상기 (1)단계는, (1-1) 상기 혈액을 항응고제와 혼합하는 단계; 및 (1-2) 상기 (1-1)단계에 따라 얻어진 혼합물을 원심분리하여 혈소판 풍부 혈장을 수득하는 단계;를 포함할 수 있다. 이때, 상기 원심분리는 1,000 ~ 4,000 rpm의 속도에서 1 ~ 30분간 수행될 수 있다.
- [0014] 상기 혈소판 풍부 혈장은 순수-혈소판 풍부 혈장(pure-platelet rich plasma, P-PRP), 백혈구 결핍-혈소판 풍부 혈장(leukocyte poor-platelet rich plasma, LP-PRP) 및 백혈구 풍부-혈소판 풍부 혈장(leukocyte rich-platelet rich plasma, LR-PRP)으로 이루어진 군에서 선택되는 일종 이상일 수 있다.
- [0015] 상기 (2) 단계는, (2-1) 등전점 전기영동(isoelectric focusing, IEF) 및 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴 아마이드 겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)으로 구성된 2차원 전기영동에 의해 혈소판 풍부 혈장으로부터 단백질을 분자량에 따라 분리한 후, 겔 내 절단(in-gel digestion)하는 단계; 및 (2-2) 상기 (2-1)단계에 따라 절단된 단백질에 대한 질량분석을 실시하는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 상기 질량분석에는 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS), 전기분무 이온화 질량분석(Electrospray Ionization mass spectrometry, ESI MS) 및 액체 크로마토그래피-이중 질량분석(liquid chromatography-tandem mass

spectrometry, LC-MS/MS)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 방법이 사용될 수 있다.

[0016] 상기 (3)단계는, (3-1) 상기 (2)단계에 따라 혈소판 풍부 혈장으로부터 동정된 전체 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하기 위한 키워드를 선정하는 단계; (3-2) 상기 키워드에 해당되는 단백질을 유전자 온톨로지 데이터 베이스에서 검색하는 단계; 및 (3-3) 상기 데이터베이스에서 검색된 단백질과 상기 동정된 단백질 전체를 매칭 하여 상기 혈소판 풍부 혈장으로부터 동정된 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 상기 유전자 온톨로지 데이터 베이스는 AmiGo2 유전자 온톨로지 데이터 베이스 또는 IPA(Ingenuity Pathway Analysis) 유전자 온톨로지 데이터 베이스일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따르면, 프로테옴 분석을 통해 상기 혈소판 풍부 혈장에 포함된 단백질 전체를 동정한 후, 유전자 온톨로지 분석을 수행함으로써 상기 단백질들을 조직치유 기능에 따라 분류할 수 있다.

[0018] 이러한 혈소판 풍부 혈장 내의 단백질 구성에 대한 연구는 혈소판 풍부 혈장이 지닌 잠재적 기능을 파악할 수 있게 해주고, 앞으로 규명해야 할 조직 치유에 관련한 기초의학 연구에 바탕이 될 수 있다. 더욱이, 혈소판 풍부 혈장에 포함된 각각의 단백질의 기능 및 역할을 규명함으로써 혈소판 풍부 혈장의 최적의 상태와 적용 방법을 연구하는데 도움이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 전혈로부터 LP-PRP 제조하는데 사용된 키트의 사진이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 전혈로부터 LR-PRP 제조하는데 사용된 키트의 사진이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 LP-PRP 및 LR-PRP에 대한 SDS-PAGE 분석결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0021] 본 발명은 프로테오믹스 기법을 이용한 혈소판 풍부 혈장 내의 조직치유 관련 단백질 분류방법에 관한 것으로서, 상기 분류방법은 (1) 혈액으로부터 혈소판 풍부 혈장을 수득하는 단계; (2) 상기 혈소판 풍부 혈장으로부터 단백질을 동정하는 단계; 및 (3) 유전자 온톨로지 분석을 통해 상기 (2)단계에 따라 동정된 전체 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하는 단계;를 포함한다.

[0022] 본 명세서에서 사용된 용어 "프로테오믹스"는 단백질(프로테옴)을 대량으로 분석하는 기술을 총칭하는 것으로, 특정한 생리적인 조건하에서 존재하는 전체 단백질을 대상으로 종류, 분포, 소재, 존재량, 성질, 상호 연결망 및 기능 등을 체계적이고 총체적인 수준에서 연구하는 기법이다. 이러한 프로테옴 분석은 특정 단백질의 발현 양상의 변화, 단백질간의 상호 작용과 단백질 전체 수준에서의 구성 및 기능 등을 연구하여 생체 내 변형과정을 생리적 과정과 연계시켜 총괄적으로 이해할 수 있는 연구 분야이다. 본 발명에서는 혈소판 풍부 혈장 내에 존재하는 전체 단백질을 동정하기 위한 방법으로 상기 프로테옴 분석이 사용되었으며, 상기 프로테옴 분석을 위하여 2차원 전기영동 및 질량분석법이 사용되었다. 2차원 전기 영동을 사용할 경우, 한 개체 내에서 발현되는 단백질의 발현 양상과 생리적, 환경적 변화에 따른 발현 정도의 변화도 관찰할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에 따른 혈소판 풍부 혈장 내의 조직치유 관련 단백질 분류방법에 대해 단계별로 살펴보면 하기와 같다.

[0024] (1) 혈소판 풍부 혈장 수득 단계

[0025] 이 단계는 혈액으로부터 혈소판 풍부 혈장을 수득하는 단계이다. 구체적으로, 이 단계는 (1-1) 상기 혈액을 항 응고제와 혼합하는 단계; 및 (1-2) 상기 (1-1)단계에 따라 얻어진 혼합물을 원심분리하여 혈소판 풍부 혈장을 수득하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0026] 상기 원심분리는 1,000 ~ 4,000 rpm의 속도에서 1 ~ 30분간 수행될 수 있다. 원심분리 속도 및 시간이 상기 범위 내에 포함될 경우 혈액으로부터 고농도의 혈소판이 포함된 혈소판 풍부 혈장을 획득할 수 있어 바람직하다.

[0027] 상기 혈소판 풍부 혈장은 순수-혈소판 풍부 혈장(pure-platelet rich plasma, P-PRP), 백혈구 결핍-혈소판 풍부 혈장(leukocyte poor-platelet rich plasma, LP-PRP) 및 백혈구 풍부-혈소판 풍부 혈장(leukocyte rich-platelet rich plasma, LR-PRP)으로 이루어진 군에서 선택된 일종 이상일 수 있다. 예컨대, 상기 LP-PRP는

Arthrex사의 ACP™(Autologous Conditional Plasma) 이중 주사기 시스템(Double Syringe System)을 이용하여 제조될 수 있고, 상기 제조에 사용 가능한 ACP™키트가 도 1에 도시되어 있다. 또한, LR-PRP는 예컨대, Biomet Biologics사의 GPS™ III(Gravitational Platelet Separation System)을 이용하여 제조될 수 있고, 상기 제조에 사용 가능한 GPS™ 키트가 도 2에 도시되어 있다.

[0028] (2) 단백질 동정 단계

[0029] 이 단계는 상기 (1)단계에 따라 수득된 상기 혈소판 풍부 혈장으로부터 단백질을 동정하는 단계이다. 구체적으로, 이 단계는 (2-1) 등전점 전기영동(isoelectric focusing, IEF) 및 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)로 구성된 2차원 전기영동에 의해 혈소판 풍부 혈장으로부터 단백질을 분자량에 따라 분리한 후, 겔 내 절단(in-gel digestion)하는 단계; 및 (2-2) 상기 (2-1)단계에 따라 절단된 단백질에 대한 질량분석을 실시하는 단계를 포함할 수 있다.

[0030] 상기 2차원 전기영동은 혈소판 풍부 혈장으로부터 단백질을 1차적으로 분리하기 위해 등전점 전기영동을 실시하는 단계 및 상기 단백질을 분자량에 따라 분리하기 위해 SDS-PAGE를 실시하는 단계를 포함할 수 있다. 즉, 2차원 전기영동은 전기영동을 이용하여 단백질을 2차원으로 전개하는 것으로, X 방향과 Y 방향으로 2회 전기영동하는 방법이다.

[0031] 상기 질량 분석(mass spectrometry, MS)이란, 물질을 이온화시켜 질량 대 전하의 비(m/z)를 측정하는 방법으로, 분자량을 측정하고 이온의 조개짐 형태를 분석하여 분자의 구조를 규명하는 방법이다. 구체적으로, 전하를 띤 물질은 전기장 하에서 움직이게 되는데, 이 운동의 크기는 물질의 질량과 전하의 비에 따라 결정된다. 즉, 물질이 움직인 거리나 비행시간을 알면 질량을 구할 수 있다.

[0032] 상기 질량분석에는 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS), 전기분무 이온화 질량분석(Electrospray Ionization mass spectrometry, ESI MS) 및 액체 크로마토그래피-이중 질량분석(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 방법이 사용될 수 있다. 예컨대, 질량분석기(mass spectrometer, MS)를 이용한 단백질 분리방법으로서 단백질에 파괴하지 않고 이온화시키는 MALDI 방법과 ESI 방법이 비행시간 질량 분석기(Time-Of-Flight mass spectrometer, TOF MS)와 함께 사용됨으로써 펩타이드와 단백질을 분석하는 방법이 사용될 수 있다.

[0033] 구체적으로, 상기 MALDI 방법을 사용할 경우, 시료를 매트릭스와 섞어 말린 후 레이저를 쏘아주면, 상기 매트릭스가 레이저를 흡수하여 기체화되면서 시료를 기체로 만들며, 이 과정에서 기체화된 시료가 전하를 띠게 된다. 이렇게 전하를 띤 시료는 질량-대-전하(mass-to-charge)의 비율에 따라 다른 속도로 질량분석기(MS)로 주입되는데, 상기 전하를 띤 시료들이 질량분석기를 통과하여 검출기까지의 도달시간을 측정하여 분자량을 측정할 수 있다.

[0034] 한편, ESI 방법은 시료와 용매가 함께 섞인 액체 용액에 강력한 전기장을 걸어주어 이온화시키는 방법이다. 구체적으로, 시료가 포함된 용액이 분무장치 말단부를 통해 나올 때, 상기 용액은 고전위의 전기효과로 인해 많은 전하를 띤 이온방울의 안개를 만들어 내고, 이 이온방울은 질량분석기의 도입부로 이동하게 된다. 이때, 상기 이온방울 내의 용매가 질량분석기 내에서 증발되어 시료가 전하를 띤 기체 상태로 되는 것이다. 상기 ESI는 액체 상의 시료를 이온화시키는 방식이므로 액체크로마토그래피와 같은 분리방법과 직접 연결이 용이하다.

[0035] (3) 단백질 분류 단계

[0036] 이 단계는 유전자 온톨로지 분석을 통해 상기 (2)단계에 따라 동정된 전체 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하는 단계이다. 구체적으로, 이 단계는 (3-1) 상기 (2)단계에 따라 혈소판 풍부 혈장으로부터 동정된 전체 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하기 위한 키워드를 선정하는 단계; (3-2) 상기 키워드에 해당되는 단백질을 유전자 온톨로지 데이터 베이스에서 검색하는 단계; 및 (3-3) 상기 데이터베이스에서 검색된 단백질과 상기 동정된 단백질 전체를 매칭하여 상기 혈소판 풍부 혈장으로부터 동정된 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하는 단계를 포함할 수 있다.

[0037] 이때, 상기 유전자 온톨로지 데이터 베이스로서는 AmiGo2 유전자 온톨로지 데이터 베이스 또는 IPA(Ingenuity Pathway Analysis) 유전자 온톨로지 데이터 베이스 등과 같이 이미 알려진 유전자 온톨로지 데이터 베이스가 제한없이 사용될 수 있다. 더욱이, 본 발명에 따른 단백질 분류방법은 추후 알려질 새로운 데이터베이스에 기반한

분석 및 적용 또한 용이하다.

- [0038] 본 발명에서는, 상기 (3-1)단계에서 키워드 선정 시 손상된 조직의 치유 과정 즉, 신생혈관 생성(angiogenesis), 섬유아세포(fibroblast)의 활성화, 교원질 및 글리코사아미노글리칸(Glycosaminoglycan)의 합성 증가에 초점을 두었다. 예컨대, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 단백질 분류(classification)를 위한 주된 키워드로서 'Wound healing'을 선정하고, 조직 치유 과정에 구체적으로 해당하는 키워드로 'Angiogenesis involved in wound healing', 'Fibroblast migration', 'Collagen biosynthetic process', Glycosaminoglycan biosynthetic process', 및 'Glycosaminoglycan binding'으로부터 선택된 일종 이상을 선정하였으나, 상기 키워드는 분류 목적에 따라 다양하게 선정할 수 있다.
- [0039] 상기한 과정을 거쳐, 본 발명에 따르면 혈소판 풍부 혈장에 포함된 전체 단백질을 작용 기능에 따라 분류할 수 있다. 본 발명에 따른 연구의 경우, 활성화된 혈소판, 혈소판의 분비 물질, 혈소판 막(membranes), 혈소판 유래 극미립자(microparticle) 등 혈소판에 대해서 국소적으로 시행되어 왔던 기존의 프로테옴 분석 연구와 달리, 혈소판 풍부 혈장 자체에 대한 프로테옴 분석이 시행되었다는 점에 의의가 있다. 또한, 알파 과립 등 혈소판에 국한되지 않고 혈소판 풍부 혈장이 포함하고 있는 전체 단백질을 확인하고 그 기능에 따라 세부적으로 분류함으로써, 혈소판 풍부 혈장이 지닌 잠재적 기능을 파악할 수 있고, 앞으로 규명해야 할 조직 치유에 관련된 기초의학 연구의 바탕이 될 수 있다. 그리고, 본 발명에 따라 단백질 분류를 통해 각 혈소판 풍부 혈장의 효과를 파악하는 것은, 아직까지 논란이 되고 있는 혈소판 풍부 혈장 제조의 표준화에도 도움을 줄 수 있으며, 기초의학적 근거를 바탕으로 새로운 분야의 치료에 시도되는데 이용할 근거가 될 수 있다.
- [0040] 이하, 실시예들을 들어 본 발명에 관하여 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명이 이러한 실시예들에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] < 실시예 >
- [0042] 1. 연구 대상
- [0043] 기저 질환이 없는 30대 남성 3명을 연구대상으로 하였으며, 1명당 각 3회씩 총 9개의 전혈을 채취하였다.
- [0044] 2. 혈소판 풍부 혈장 제조
- [0045] 상기 연구대상 1명당 채취된 3개의 전혈을 이용하여 순수 전혈 표본, 백혈구 결핍-혈소판 풍부 혈장(leukocyte poor-platelet rich plasma, LP-PRP) 표본 및 백혈구 풍부-혈소판 풍부 혈장(leukocyte rich-platelet rich plasma, LR-PRP) 표본을 준비하여, 총 9개의 표본을 마련하였다. 이때, 상기 LP-PRP 및 LR-PRP는 하기의 방법에 따라 제조되었다.
- [0046] LP-PRP 제조
- [0047] 상기 LP-PRP는 ACPTM 이중 주사기 시스템(Autologous Conditional Plasma Double Syringe System)을 이용하여 제조하였다. 도 1에는 LP-PRP 제조에 사용된 ACPTM 키트(Arthrex사)가 도시되어 있다.
- [0048] 구체적으로, 항응고제가 들어간 ACPTM 키트의 이중 주사기로 연구대상의 정맥혈 9cc를 추출한 후, 채취된 혈액과 항응고제를 잘 섞어 주었다. 이어서, 상기 이중 주사기를 원심분리기에 장착한 후, 원심분리기를 1500rpm의 속도로 5분간 구동하였다. 이어서, 혈장과 적혈구가 섞이는 것을 방지하면서, 형성된 5cc의 자가 혈장(Autologous Conditioned Plasma, ACP)을 내부 주사기로 이동시켜 LP-PRP를 획득하였다.
- [0049] LR-PRP 제조
- [0050] 상기 LR-PRP는 GPSTM III (Gravitational Platelet Separation System)을 이용하여 제조하였다. 도 2에는 LR-PRP 제조에 사용된 GPSTM 키트(Biomet사)가 도시되어 있다.
- [0051] 구체적으로, GPSTM 키트의 60cc 주사기에 6cc의 항응고제를 담고, 연구대상의 54cc의 정맥혈을 추출한 후, 채취된 혈액과 항응고제를 잘 섞어 주었다. 이어서, 상기 GPSTM 키트를 원심분리기에 장착한 후, 원심분리기를 3200rpm 속도로 15분간 구동하였다. 이어서, 상기 GPSTM 키트 내의 주사기를 이용하여 용기 상단의 투명한 황색의 혈소판 부족 혈장(Platelet Poor Plasma, PPP)을 제거하고, 용기를 30초간 회전하며 잘 섞은 다음, 형성된 6cc의 LR-PRP를 획득하였다.

[0052] 세포구성 평가

[0053] 3명의 연구대상으로부터 얻은 전혈(whole blood), LP-PRP 및 LR-PRP 표본의 세포 구성을 알아보고자 일반 혈액 검사(complete blood cell count, CBC)를 시행하였으며, 그 결과를 하기의 표 1에 나타내었다.

표 1

[0054]

	전혈		LP-PRP		LR-PRP	
	백혈구	혈소판	백혈구	혈소판	백혈구	혈소판
연구대상1	$6.42 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$179 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$1.37 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$321 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$22.78 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$636 \times 10^3 / \mu\text{L}$
연구대상2	$4.65 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$210 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$0.47 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$323 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$41.77 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$682 \times 10^3 / \mu\text{L}$
연구대상3	$6.78 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$187 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$3.4 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$470 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$40.49 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$840 \times 10^3 / \mu\text{L}$
평균	$5.95 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$192 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$1.75 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$371 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$35.01 \times 10^3 / \mu\text{L}$	$719 \times 10^3 / \mu\text{L}$

[0055] 상기 표 1을 살펴보면, 3명 평균의 전혈 구성이 백혈구 5,950/ μL , 혈소판 192,000/ μL 인 것에 비해 LP-PRP는 백혈구 1,750/ μL , 혈소판은 371,000/ μL , LR-PRP는 백혈구 35,010/ μL , 혈소판 719,000/ μL 로 나타났다. 즉, LP-PRP의 혈소판은 전혈의 혈소판에 비해서 평균 2배 정도, LR-PRP의 혈소판은 평균 3배 이상 농축되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0056] 3. 단백질 동정

[0057] 본 실시예에서 단백질 동정은 연구대상 3명으로부터 각각 수득한 혈소판 풍부 혈장(LP-PRP 및 LR-PRP)을 대상으로 수행하였다. 구체적으로, 3명의 연구대상으로부터 얻은 총 6개의 표본을 대상으로 2차원 전기영동(two-dimensional gel electrophoresis, 2DE)을 실시한 후, 겔 내 절단(in-gel digestion) 및 질량분석 과정을 거쳐 프로테옴 분석을 실시하였다. 이때, 상기 질량분석은 하나의 표본당 3회 반복하였다. 하기에 단백질 동정 절차에 대하여 구체적으로 나타내었다.

[0058] 2차원 전기영동 및 겔 내 절단

[0059] 먼저, 상기 6개의 표본에 대하여 등전점 전기영동(isoelectric focusing)을 실시하여 상기 각각의 표본으로부터 단백질을 1차적으로 분리한 후, 각각의 분리된 상기 단백질 시료 15 μg 에 SDS-PAGE(Mini-PROTEAN, Bio-Rad)를 수행하는 2차원 전기영동을 실시하였다. 이때, 상기 SDS-PAGE에 의해 단백질이 분자량에 따라 분리되었다. 상기 SDS-PAGE이 끝난 겔은 쿠마씨 브릴리언트 블루 R-250(Coomassie Brilliant Blue R-250, Bio-Rad)으로 염색하고, 10% 아세트산(acetic acid) 및 30% 메탄올(methanol)이 첨가된 탈색용액으로 탈색한 후 겔 사진을 확인하였다. 도 3에는 상기 LP-PRP 및 LR-PRP에 대한 SDS-PAGE 결과가 도시되어 있다. 이때, 상기 도 3에서 LP1, LP2 및 LP3은 연구대상 1, 2, 및 3으로부터 얻은 각각의 LP-PRP에 대한 SDS-PAGE 결과를 나타내는 것이고, LR1, LR2 및 LR3은 연구대상 1, 2 및 3으로부터 얻은 각각의 LR-PRP에 대한 SDS-PAGE 결과를 나타내는 것이다.

[0060] 이어서, 상기 겔 사진을 이용하여 SDS-PAGE가 끝난 겔을 단백질의 분자량에 따라 10개의 구역으로 나눈 후, 각각의 겔을 1 mm²의 크기로 절단하는 겔 내 절단(in-gel digestion)을 수행하였다. 상기 도 3을 살펴보면, 겔이 단백질 분자량에 따라 10개의 구역으로 분획된 모습이 빨간색 선으로 표시되어 있다.

[0061] 이어서, 상기 절단된 각각의 겔은 단백질 내 시스테인(Cysteine)의 알킬화(Alkylation) 및 환원(Reduction) 처리과정을 거친 후, 트립신(1.2 μg)으로 37℃에서 16시간 동안 분해하였다. 분해된 트립신 펩타이드(tryptic peptide)는 추출 용액[50mM 탄화수소암모늄(Ammonium bicarbonate), 50% 아세토니트릴(Acetonitrile), 0.5% 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetic acid)]으로 추출하였다. 상기 추출에 의해 얻어진 트립신 펩타이드(tryptic peptide) 용액을 진공건조기를 이용하여 완전히 건조시킨 후, 건조물을 0.1% 포름산(Formic acid)이 들어있는 증류수 10 μL 에 용해시켜 펩타이드 시료를 수득하였다.

[0062] 상기 "2차원 전기영동 및 겔 내 절단"과정을 통해, 연구대상들로부터 수득한 총 6개의 표본이 단백질 분자량에 따라 각각 10개로 분획 및 절단된 후 펩타이드 시료로 제조되었는바, 총 60개의 펩타이드 시료가 준비되었다.

[0063] 질량분석(Mass Spectrometry)

[0064] 준비된 총 60개의 펩타이드 시료에 대한 질량분석을 위해 LC-MS/MS를 수행하였으며, 상기 분석은 한 시료당 3번씩 반복하였다. 상기 LC-MS/MS는 한국 기초과학 지원 연구원(KBSI)에서 on-line Nano-LC 시스템 및 Hybrid

Quadrupole-OrbitrapTM Mass Spectrometry에 의해 시행하였다.

- [0065] 구체적으로, 상기 각각의 펩타이드 시료 5 μ l를 Ultimate 300 UPLC 시스템(Dionex)을 이용하여 분리하였고, 나노 전기분무 이온 공급원(nanoelectrospray ion source, Dionex)이 장착된 질량분석기(Q-Exactive plus mass spectrometer, Thermo scientific)로 분석하였다. 이때, 상기 펩타이드 분리에 사용된 칼럼은 15cm $\times$ 75 μ m의 Acclaim[®] PepMap RSLC C18 reversephase(Thermo Scientific) 칼럼으로, 흐름 300nl/분, 2시간동안 5-65% 아세트나이트릴 (ACN)으로 농도구배(gradient)를 실시하였다. 상기 질량분석기(Q Exactive plus mass)에서 모든 MS와 MS/MS 스펙트럼은 “data-dependent top 10” 모드로 진행하였다. 전체 MS 스캔 레인지는 150 m/z ~ 2,000 m/z 이고, 해상도는 70,000(m/z 200), AGC 목표값(AGC target value)은 1 x 10⁶으로 진행하였고, 동적 배제(Dynamic exclusion)는 30초로 진행하였다. 고-에너지 충돌 이온해리(Higher-energy collisional dissociation, HCD) 조건은 고정 주입시간 120ms와 35,000(m/z) 해상도에 민감한 방법으로 쪼개짐이 진행되었다. 이온화 분무전압은 1.7kV, 캐필러리 온도는 280 $^{\circ}$ C, HCD 충돌 에너지는 25%로 실시하였다.
- [0066] 상기 LC-MS/MS 결과로부터 상기 펩타이드 시료 내에 포함된 단백질을 동정하기 위해 MASCOT(Matrix science, version 2.41, www.matrixscience.com)을 이용하여 검색하였고, 여기에 사용된 데이터베이스는 “UniprotHuman의 단백질 서열”이다. 상기 질량분석 과정에서 질량 허용차와 쪼개진 파편 이온은 10 ppm이고 시스테인의 카바미도메틸레이션(Carbamidomethylation)과 메티오닌(Methionine)의 산화(Oxidation)는 MS/MS 분석에서 트립신 분해 펩티드의 변수로 고려하였다.
- [0067] 단백질 동정 결과
- [0068] 상기 LC-MS/MS(총 60개의 펩티드 시료, 시료당 3회 반복) 결과, LP-PRP와 LR-PRP를 합쳐 1번이라도 동정된 전체 단백질은 1555개로 나타났다. 표본의 일관성을 높이기 위해서, 총 3명의 연구대상 중 2명 이상에게 존재하고, 상기 연구대상 1명당 수득한 LP-PRP와 LR-PRP 표본 중 적어도 1개 이상에서 동정된 단백질을 하기의 “4. 단백질 분류”에서의 분류대상으로 하였으며, 그에 해당하는 단백질은 상기한 전체 단백질 1555개 중 664개였다. 이밖에, 3회 반복 중 2회 이상 검출된 단백질은 LP-PRP에서 표본(LP1, LP2 및 LP3) 당 각각 414개, 369개, 407개, 그리고 LR-PRP에서 표본(LR1, LR2 및 LR3) 당 각각 633개, 587개, 750개로 동정 되었다. 이 중에서, 2개의 표본 이상에서 동정된 단백질은 LP-PRP는 379개이고, LR-PRP는 618개였으며, 이 두 가지 PRP에 공통으로 동정된 단백질은 333개로 나타났다.
- [0069] 4. 단백질 분류
- [0070] 상기 분류대상 단백질 664개를 대상으로 각각의 기능을 알아보고, 그에 따른 분류를 하기 위해서 유전자 온톨로지 분석을 시행하였으며, 상기 분석은 AmiGo 2 유전자 온톨로지의 데이터 베이스(amigo.geneontology.org)에 근거하였다.
- [0071] 먼저, 혈소판 풍부 혈장으로부터 동정된 분류대상 단백질을 조직치유 기능에 따라 분류하기 위한 키워드를 선정하고, 상기 키워드에 해당되는 단백질을 유전자 온톨로지 데이터베이스에서 검색하였다.
- [0072] 상기 분류대상 단백질을 기능에 따라 분류하기 위한 주된 키워드로서, AmiGo2의 유전자 온톨로지에서의 조직의 치유를 통합적으로 포함하는 용어인 “Wound healing”을 선정하였다. 상기 AmiGo 2에서는 “Wound healing”에 대해서 “The series of events that restore integrity to a damaged tissue, following an injury.”로 정의하고 있으며, 이에 해당하는 단백질은 778개이다.
- [0073] 그리고, 조직 치유 과정에 구체적으로 해당하는 키워드로서 “Angiogenesis involved in wound healing”, “Fibroblast migration”, “Collagen biosynthetic process”, “Glycosaminoglycan biosynthetic process” 및 “Glycosaminoglycan binding”을 추가로 선정하였으며, 호모사피엔스로 한정하였다. AmiGo 2에서 상기 “Angiogenesis involved in wound healing”은 “Blood vessel formation when new vessels emerge from the proliferation of pre-existing blood vessels and contribute to the series of events that restore integrity to a damaged tissue, following an injury.”로 정의하고 있으며, 이에 해당하는 단백질은 23개이다. 그리고, 상기 “Fibroblast migration”은 “Cell migration that is accomplished by extension and retraction of a fibroblast pseudopodium. A fibroblast is a connective tissue cell which secretes an extracellular matrix rich in collagen and other macromolecules.”로 정의하고 있으며, 이에 해당하는 단백질은 30개이다. 상기 “Collagen biosynthetic process”는 “The chemical reactions and pathway resulting in formation of collagen, any of a group of fibrous proteins of very high tensile strength that form the

main component of connective tissue in animals. Collagen is highly enriched in glycine and proline, occurring predominantly as 3-hydroxyproline."이라고 정의하고 있으며, 이에 해당하는 단백질은 47개이다. 상기 "Glycosaminoglycan biosynthetic process"은 "The chemical reactions and pathways resulting in the formation of glycosaminoglycan, any of group of polysaccharides that contain amino sugars."로 정의하고 있으며, 이에 해당하는 단백질은 166개이다. 상기 "Glycosaminoglycan binding"은 "Interacting selectively and non-covalently with any glycan (polysaccharide) containing a substantial proportion of aminomonosaccharide residues."로 정의하고 있으며, 이에 해당하는 단백질은 246개이다.

[0074] 키워드에 따른 단백질 분류 결과

[0075] (1) Wound healing

[0076] 상기 AmiGo 2에서 검색된 키워드 "Wound healing"에 해당되는 단백질은 778개였으며, 상기 LC-MS/MS에 따라 동정된 분류대상 단백질 664개 중에서 상기 "wound healing"의 범주에 포함되는 것은 125개였다. 하기의 표 2에는 상기 125개의 단백질 목록이 기재되어 있다. 특히, 상기 분류대상 단백질 664개 중 LP-PRP에서만 분석된 단백질은 46개이며, 그 중 "wound healing" 관련 단백질은 8개(FGG, SERPING1, RAP1B, VCL, FLNA, FBLN1, CLU)이다. 그리고, LR-PRP에서만 분석된 단백질은 285개이며, 그 중 "wound healing" 관련 단백질은 36개(ANXA2, CAPZA1, ANXA6, SERPING1, TF, NACA, KRT5, MYL12A, WDR1, F9, KNG1, FGG, HSPA5, GP1BB, RAC2, VCL, C4BPB, FLNA, ARPC4, TUBA4A, PDIA6, CPB2, AQP1, CFL1, CFD, GNAI2, ITGB3, COL1A2, LAMP2, GP9, CSRP1, MYL9, RAP1B, CALM1, DMTN, PRTN3)이다.

표 2

Accessions	Gene	Description	MW	pI	log(LR/LP)	LP-avg	LR-avg
P68871	HBB	Hemoglobin subunit beta	15988	6.75	-0.4024	16.4054	6.4952
P02042	HBD	Hemoglobin subunit delta	16045	7.85	-0.8284	1.5339	0.2277
P02647	APOA1	Apolipoprotein A-I	30759	5.56	-1.3736	0.7818	0.0331
P02787	TF	Serotransferrin	77014	6.81	-1.1261	0.4467	0.0334
P01009	SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin	46707	5.37	-1.3403	0.3790	0.0173
C9JPQ9	FGG	Fibrinogen gamma chain (Fragment)	13538	6.71	-0.9718	0.2901	0.0310
P02675	FGB	Fibrinogen beta chain	55892	8.54	-0.9665	0.2621	0.0283
P02679	FGG	Fibrinogen gamma chain	51479	5.37		0.2438	
P04264	KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	65999	8.15	-0.9365	0.2012	0.0233
P06702	S100A9	Protein S100-A9	13234	5.71	-1.3119	0.1839	0.0090
P02768	ALB	Serum albumin	69321	5.92	-0.8207	0.2830	0.0428
P01024	C3	Complement C3	187030	6.02	-1.1381	0.2093	0.0152
P01023	A2M	Alpha-2-macroglobulin	163188	6.03	-1.1543	0.1424	0.0100
P01008	SERPINC1	Antithrombin-III	52569	6.32	-1.2737	0.1694	0.0090
P69892	HBG2	Hemoglobin subunit gamma-2	16116	6.64	-1.0744	0.2943	0.0248
P69891	HBG1	Hemoglobin subunit gamma-1	16130	6.64	-1.0034	0.2923	0.0290
P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2	21878	5.66	-0.9406	0.0634	0.0073
P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	41766	5.31	-0.8823	0.0961	0.0126
P05109	S100A8	Protein S100-A8	10828	6.51	-1.3153	0.0934	0.0045
P62937	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	18001	7.68	-1.2966	0.0997	0.0050
P02671	FGA	Fibrinogen alpha chain	94914	5.7	-1.3215	0.0715	0.0034
P02538	KRT6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A	60008	8.09	-0.8133	0.0530	0.0081
P02649	APOE	Apolipoprotein E	36132	5.65	-1.2883	0.0841	0.0043
P07737	PFN1	Profilin-1	15045	8.44	-1.7137	0.1011	0.0020
P63104	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	27728	4.73	-1.3797	0.0637	0.0027
P13647	KRT5	Keratin, type II cytoskeletal 5	62340	7.59	-0.8210	0.0467	0.0071
P04114	APOB	Apolipoprotein B-100	515283	6.58	-1.1547	0.0768	0.0054
P02775	PPBP	Platelet basic protein	13885	9.04	-1.1697	0.0524	0.0035
P05155	SERPING1	Plasma protease C1 inhibitor	55119	6.09		0.0529	
P23528	CFL1	Cofilin-1	18491	8.22		0.0494	
P61224-3	RAP1B	Isoform 3 of Ras-related protein Rap-1b	18767	8.72		0.0310	
P01042-2	KNG1	Isoform LMW of Kininogen-1	47853	6.29	-1.2372	0.0470	0.0027
P02749	APOH	Beta-2-glycoprotein 1	38273	8.34	-1.1881	0.0397	0.0026
P00734	F2	Prothrombin	69992	5.64	-0.8933	0.0569	0.0073
P04075	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	39395	8.3	-0.9852	0.0301	0.0031
C9JF17	APOD	Apolipoprotein D (Fragment)	24142	5.46	-1.2510	0.0276	0.0015
P00747	PLG	Plasminogen	90510	7.04	-1.1048	0.0363	0.0029
P10909-2	CLU	Isoform 2 of Clusterin	57796	6.24	-1.2176	0.0250	0.0015
P02743	APCS	Serum amyloid P-component	25371	6.1	-1.2721	0.0187	0.0010
P04196	HRG	Histidine-rich glycoprotein	59541	7.09	-1.0939	0.0198	0.0016
O00299	CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1	26906	5.09	-1.4667	0.0247	0.0008
P11142	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	70854	5.37	-1.0269	0.0132	0.0012
P02776	PF4	Platelet factor 4	10838	8.93	-1.3767	0.0406	0.0017
P05546	SERPIND1	Heparin cofactor 2	57034	6.41	-1.1263	0.0214	0.0016

[0077]

Accessions	Gene	Description	MW	pI	log(LR/LP)	LP-avg	LR-avg
P04004	VTN	Vitronectin	54271	5.55	-1.2602	0.0218	0.0012
P08567	PLEK	Pleckstrin	40099	8.51	-1.1288	0.0128	0.0009
P06396	GSN	Gelsolin	85644	5.9	-0.9385	0.0184	0.0021
P18206	VCL	Vinculin	123722	5.5		0.0124	
P13796	LCP1	Plastin-2	70244	5.29	-1.2317	0.0226	0.0013
Q9Y490	TLN1	Talin-1	269599	5.77	-0.7896	0.0116	0.0019
P14618	PKM	Pyruvate kinase PKM	57900	7.96	-1.0094	0.0102	0.0010
P30044	PRDX5	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	22073	8.93	-1.2382	0.0133	0.0008
H0YAC1	KLKB1	Plasma kallikrein heavy chain (Fragment)	76834	8.44	-1.1729	0.0133	0.0009
P04083	ANXA1	Annexin A1	38690	6.57	-1.0674	0.0134	0.0011
P00441	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	15926	5.7	-0.5889	0.0092	0.0024
P08697	SERPINF2	Alpha-2-antiplasmin	54531	5.87	-0.8600	0.0125	0.0017
P58546	MTPN	Myotrophin	12887	5.27	-1.3515	0.0084	0.0004
P47756-2	CAPZB	Isoform 2 of F-actin-capping protein subunit beta	30609	5.69	-1.0683	0.0066	0.0006
P00488	F13A1	Coagulation factor XIII A chain	83215	5.75	-1.1058	0.0095	0.0007
P07225	PROS1	Vitamin K-dependent protein S	75074	5.48	-1.0333	0.0105	0.0010
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	129300	4.71	-1.0377	0.0072	0.0007
P02748	C9	Complement component C9	63133	5.43	-0.9586	0.0074	0.0008
P61225	RAP2B	Ras-related protein Rap-2b	20491	4.73	-0.8462	0.0042	0.0006
Q01518	CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	51869	8.24	-1.1315	0.0091	0.0007
P35579	MYH9	Myosin-9	226392	5.5	-0.4699	0.0042	0.0014
P07203	GPX1	Glutathione peroxidase 1	22075	6.15	-0.9224	0.0066	0.0008
P12814-3	ACTN1	Isoform 3 of Alpha-actinin-1	105502	5.25	-0.8220	0.0074	0.0011
Q5HY54	FLNA	Filamin-A	276378	5.69		0.0056	
B7Z596	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	31733	4.85	-1.5487	0.0069	0.0002
P00748	F12	Coagulation factor XII	67748	8.04	-1.2771	0.0070	0.0004
P08758	ANXA5	Annexin A5	35914	4.94	-1.0381	0.0056	0.0005
Q86UX7	FERMT3	Fermitin family homolog 3	75905	6.52	-0.2384	0.0011	0.0007
B1AHL2	FBLN1	Fibulin-1	78277	5.23		0.0022	
P09486	SPARC	SPARC	34610	4.73	-1.2785	0.0040	0.0002
P04275	VWF	von Willebrand factor	309058	5.29	-0.9560	0.0016	0.0002
P40197	GP5	Platelet glycoprotein V	60921	9.73	-1.3185	0.0049	0.0002
P07355-2	ANXA2	Isoform 2 of Annexin A2	40386	8.53			0.0004
P52907	CAPZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	32902	5.45			0.0005
P07359	GP1BA	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	71495	5.87	-1.0671	0.0025	0.0002
P04070-2	PROC	Isoform 2 of Vitamin K-dependent protein C	57518	6.24	-0.8879	0.0011	0.0001
P00742	F10	Coagulation factor X	54697	5.68	-0.9400	0.0030	0.0003
P15924	DSP	Desmoplakin	331569	6.44	-0.3691	0.0008	0.0004
P08514	ITGA2B	Integrin alpha-IIb	113306	5.21	-0.7814	0.0025	0.0004
P08519	LPA	Apolipoprotein(a)	500995	5.58	-1.4881	0.0006	0.0000
Q13201	MMRN1	Multimerin-1	138023	8.15	-0.7667	0.0004	0.0001
A6NN80	ANXA6	Annexin	75229	5.46			0.0001
H0YI76	KRT5	Keratin, type II cytoskeletal 5 (Fragment)	23096	4.82			0.0118
J3QRS3	MYL12A	Myosin regulatory light chain 12A	20444	4.62			0.0018
O75083	WDR1	WD repeat-containing protein 1	66152	6.17			0.0002
P00740	F9	Coagulation factor IX	51745	5.34			0.0003

[0078]

Accessions	Gene	Description	MW	pI	log(LR/LP)	LP-avg	LR-avg
P01042	KNG1	Kininogen-1	71912	6.34			0.0014
P02679-2	FGG	Isoform Gamma-A of Fibrinogen gamma chain	49465	5.7			0.0314
P05154	SERPINA5	Plasma serine protease inhibitor	45646	9.3	-1.2347	0.0060	0.0003
P05160	F13B	Coagulation factor XIII B chain	75461	6.01	-0.8708	0.0023	0.0003
P11021	HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	72288	5.07			
P12259	F5	Coagulation factor V	251546	5.68	-0.8708	0.0007	0.0001
P13224-2	GP1BB	Isoform 2 of Platelet glycoprotein Ib beta chain	43130	10.81			0.0001
P15153	RAC2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	21415	7.52			0.0004
P18206-2	VCL	Isoform 1 of Vinculin	116649	5.83			0.0012
P20851	C4BPB	C4b-binding protein beta chain	28338	5.05			0.0008
P21333	FLNA	Filamin-A	280564	5.7			0.0013
P59998-2	ARPC4	Isoform 2 of Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	71673	5.59			0.0001
P60953	CDC42	Cell division control protein 42 homolog	21245	6.15	-0.9405	0.0071	0.0008
P68366	TUBA4A	Tubulin alpha-4A chain	49892	4.95			0.0014
Q04695	KRT17	Keratin, type I cytoskeletal 17	48076	4.97	-0.8242	0.0249	0.0037
Q15084-5	PDIA6	Isoform 5 of Protein disulfide-isomerase A6	53228	5.35			0.0001
Q96IY4	CPB2	Carboxypeptidase B2	48393	7.61			0.0003
H0YAS8	CLU	Clusterin beta chain (Fragment)	16167	5.51		0.0616	
B4E220	AQP1	Aquaporin-1	35552	5.32			0.0001
E9PK25	CFL1	Cofilin-1	22714	8.51			0.0020
P00746	CFD	Complement factor D	27016	7.64			0.0003
P04899-4	GNAI2	Isoform sGi2 of Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	41522	5.66			0.0003
P05106	ITGB3	Integrin beta-3	87000	5.09			0.0003
P08123	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain	129235	9.08			0.0000
P13473-3	LAMP2	Isoform LAMP-2C of Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	45141	5.6			0.0001
P14770	GP9	Platelet glycoprotein IX	19034	5.89			0.0005
P21291	CSRP1	Cysteine and glycine-rich protein 1	20554	8.9			0.0002
P24844	MYL9	Myosin regulatory light polypeptide 9	19814	4.8			0.0015
P61224	RAP1B	Ras-related protein Rap-1b	20812	5.65			0.0040
P62158	CALM1	Calmodulin	16827	4.09			0.0004
Q08495	DMTN	Dematin	45486	8.94			0.0004
U3KPS2	PRTN3	Myeloblastin	23596	8.49			0.0007
B4E1F0	SERPING1	Plasma protease C1 inhibitor	55734	5.97			0.0026
C9JB55	TF	Serotransferrin (Fragment)	7985	4.52			0.0092
E9PAV3	NACA	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	205295	9.6			0.0000

[0079]

[0080]

(2) Angiogenesis involved in wound healing

[0081]

상기 LC-MS/MS에 따라 동정된 분류대상 단백질 중에서 상기 AmiGo 2에서 검색된 키워드 "Angiogenesis involved in wound healing"의 범주에 포함되는 단백질은 모두 3개이며, 하기의 표 3에 그 단백질 목록이 기재되어있다. 구체적으로, LP-PRP에는 GPX1이, 그리고 LR-PRP에는 GPX1, H3BM21 및 ITGB3이 포함되어있다.

표 3

Accessions	Gene	Description	MW	pI	log(LR/LP)	LP-avg	LR-avg
P07203	GPX1	Glutathione peroxidase 1	22075	6.15	-0.9224	0.0066	0.0008
H3BM21	H3BM21	Integrin beta (Fragment)	86923	4.93			0.0092
P05106	ITGB3	Integrin beta-3	87000	5.09			0.0000

[0082]

[0083]

(3) Fibroblast migration

[0084] 상기 LC-MS/MS에 따라 동정된 분류대상 단백질 중에서 상기 AmiGo 2에서 검색된 키워드 "Fibroblast migration"의 범주에 포함되는 단백질은 모두 2개이며, 하기의 표 4에 그 단백질 목록이 기재되어있다. 구체적으로, LP-PRP THBS1이, 그리고 LR-PRP에는 THBS1 및 DMTN 2개 포함되어 있다.

표 4

[0085]

Accessions	Gene	Description	MW	pI	log(LR/LP)	LP-avg	LR-avg
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	129300	4.71	-1.0377	0.0072	0.0007
Q08495	DMTN	Dematin	45486	8.94			0.0004

[0086]

(4) Collagen biosynthetic process

[0087] 상기 LC-MS/MS에 따라 동정된 분류대상 단백질 중에서 상기 AmiGo 2에서 검색된 키워드 "Collagen biosynthetic process"의 범주에 해당하는 단백질은 모두 4개이며, 하기의 표 5에 그 단백질 목록이 기재되어있다. 구체적으로, LP-PRP에는 F2, PRDX5 및 SERPINF2이, 그리고 LR-PRP에는 F2, PRDX5, SERPINF2 및 LTBP1이 포함되어있다.

표 5

[0088]

Accessions	Gene	Description	MW	pI	log(LR/LP)	LP-avg	LR-avg
P00734	F2	Prothrombin	69992	5.64	-0.8933	0.0569	0.0073
P30044	PRDX5	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	22073	8.93	-1.2382	0.0133	0.0008
P08697	SERPINF2	Alpha-2-antiplasmin	54531	5.87	-0.8600	0.0125	0.0017
Q14766	LTBP1	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	186673	5.63			0.0001

[0089]

(5) Glycosaminoglycan biosynthetic process

[0090] 상기 LC-MS/MS에 따라 동정된 분류대상 단백질 중에서 상기 AmiGo 2에서 검색된 키워드 "Glycosaminoglycan biosynthetic process"의 범주에 해당하는 단백질은 모두 2개이며, 하기의 표 6에 그 단백질 목록이 기재되어있다. 구체적으로, LP-PRP에는 LUM이, 그리고 LR-PRP에는 LUM 및 CLTC가 포함되어있다.

표 6

[0091]

Accessions	Gene	Description	MW	pI	log(LR/LP)	LP-avg	LR-avg
P51884	LUM	Lumican	38405	6.16	-1.2244	0.0175	0.0010
Q00610-2	CLTC	Clathrin heavy chain 1	191493	5.48			0.0001

[0092]

(6) Glycosaminoglycan binding

[0093] 상기 LC-MS/MS에 따라 동정된 분류대상 단백질 중에서 상기 AmiGo 2에서 검색된 키워드 "Glycosaminoglycan binding" 범주에 해당하는 단백질은 모두 13개이며, 하기의 표 7에 그 단백질 목록이 기재되어있다. 구체적으로, LP-PRP에는 APOE, IGHM, APOB, CFH, HRG, PF4, SERPIND1, VTN, THBS1, ELANE, LPA 및, HABP2이, 그리고 LR-PRP에는 AZU1이 포함되어있다.

표 7

Accessions	Gene	Description	MW	pI	log(LR/LP)	LP-avg	LR-avg
P02649	APOE	Apolipoprotein E	36132	5.65	-1.2883	0.0841	0.0043
P01871	IGHM	Ig mu chain C region	49276	6.35	-1.2318	0.0713	0.0042
P04114	APOB	Apolipoprotein B-100	515283	6.58	-1.1547	0.0768	0.0054
P08603	CFH	Complement factor H	139005	6.21	-1.1192	0.0408	0.0031
P04196	HRG	Histidine-rich glycoprotein	59541	7.09	-1.0939	0.0198	0.0016
P02776	PF4	Platelet factor 4	10838	8.93	-1.3767	0.0406	0.0017
P05546	SERPIND1	Heparin cofactor 2	57034	6.41	-1.1263	0.0214	0.0016
P04004	VTN	Vitronectin	54271	5.55	-1.2602	0.0218	0.0012
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	129300	4.71	-1.0377	0.0072	0.0007
P08246	ELANE	Neutrophil elastase	28500	9.71	-1.4420	0.0120	0.0004
P08519	LPA	Apolipoprotein(a)	500995	5.58	-1.4881	0.0006	0.0000
P20160	AZU1	Azurocidin	26869	9.75			0.0003
Q14520	HABP2	Hyaluronan-binding protein 2	62630	6.09	-1.1242	0.0030	0.0002

[0094]

[0095]

본 발명의 실시예에 따르면, ACPTM와 GPSTM III 키트를 이용하여 사람(연구대상 1~3)의 혈액에서 각각 LP-PRP와 LR-PRP를 분리하는 과정, 및 이들에 대한 2차원 전기영동 및 LC-MS/MS를 실시하는 과정을 통해 빠른 시간 안에 많은 수의 단백질을 동정할 수 있다. 그리고, 혈소판 풍부 혈장으로부터 동정된 전체 단백질에 대한 유전자 온톨로지(Gene Ontology, GO) 분석을 실시하여 각각의 단백질들을 작용 기능에 따라 분류할 수 있다.

[0096]

이를 통해서, 혈소판 풍부 혈장(LP-PRP 및 LR-PRP)으로부터 "Wound healing" 관련 단백질 125개, "Angiogenesis involved in wound healing" 관련 단백질 3개, "Fibroblast migration" 관련 단백질 2개, "Collagen biosynthesis process" 관련 단백질 4개, "Glycosaminoglycan biosynthesis process" 관련 단백질 2개, 그리고 "Glycosaminoglycan binding" 관련 단백질 13개가 동정되었음을 확인할 수 있다. 결과적으로, 기존에 잘 알려진 있던 성장 인자 이외에 혈소판 풍부 혈장에 포함된 다른 단백질을 기능별로 파악할 수 있었다.

[0097]

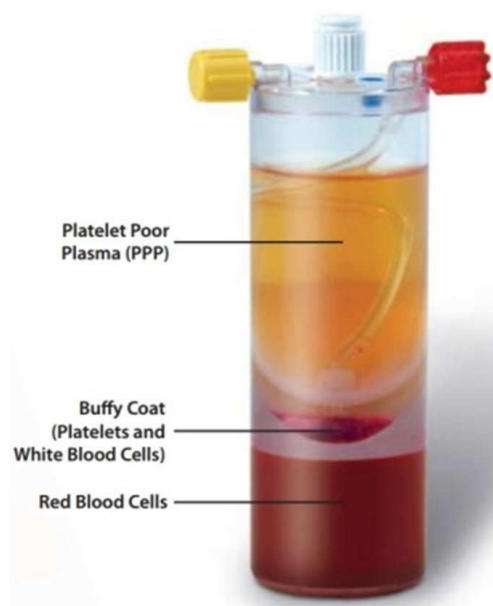
이상, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 권리범위는 아래의 특허청구범위에 의하여 해석되어야 하며 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

