



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0093064
(43) 공개일자 2021년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/483 (2006.01) G01N 27/62 (2021.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/483 (2013.01)
G01N 27/62 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2020-0006780
(22) 출원일자 2020년01월17일
심사청구일자 2020년01월17일

(71) 출원인
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대학교 20(퇴촌동)
(72) 발명자
임재민
경상남도 창원시 의창구 원이대로579번길 13, 10
8동 1104호 (용호동, 용지아이파크)
팜 티 타오
경상남도 창원시 의창구 사림로123번길 6 (사림동)
김지연
경상남도 창원시 진해구 웅천동로 16, 405호 (남문동, 남문1차 시티프라디움)
(74) 대리인
김순웅

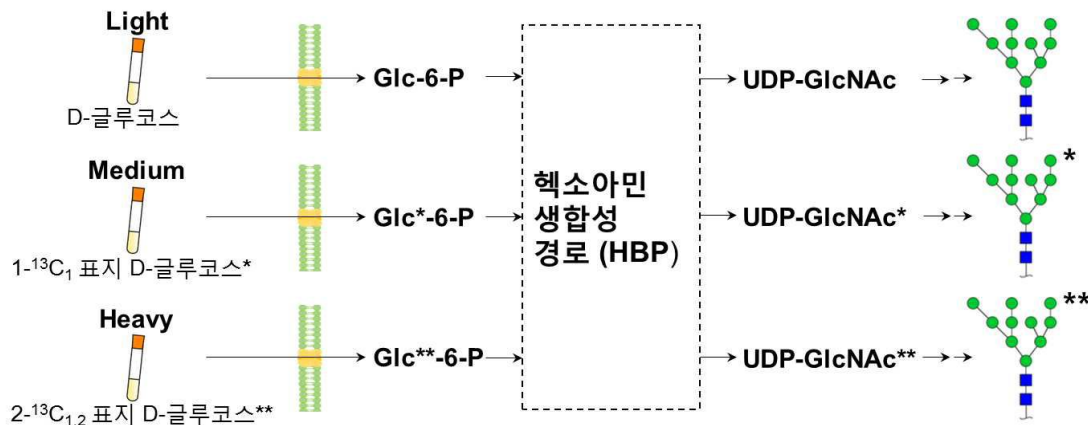
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양에서 대사적 동위원소 표지 글리칸에 의한 삼중정량 글리코믹스 법 개발

(57) 요약

본 발명은 대사적 동위원소표지 글리칸 및 이를 이용한 삼중정량 글리코믹스법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서로 다른 세 가지 생물학적 조건을 갖는 세포배양으로 대사적 동위원소표지된 글리칸을 제조하고, 이를 이용하여 삼중정량하는 고감도 비교정량 질량분석법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2400/10 (2013.01)

G01N 2458/15 (2013.01)

G01N 2560/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R 1A2B6008287

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구

연구과제명 동위원소표지 포도당을 이용한 글라이켄의 생체내 동위원소표지법 개발과 정량적 글

라이코믹스의 응용

기 여 율 1/1

과제수행기관명 창원대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

^{12}C 글루코오스를 포함하는 제1 배지; 동위원소가 표지된 $1-^{13}\text{C}_1$ 글루코오스를 포함하는 제2 배지 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스;가 포함된 제 3배지에 세포주를 각각 배양하는 단계;

대사작용에 의해 각각 ^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민을 각각 합성하는 단계;

^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민으로부터 각각 정상 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸을 수득하는 단계; 및

상기 정상 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량스펙트럼을 얻고, 상기 세 종류의 질량스펙트럼을 비교정량하는 단계;를 포함하는 대사적 동위원소표지를 이용한 삼중정량 비교질량 분석법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 글리칸은 N-연결형 글리칸, O-연결형 글리칸 및 당지질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 대사적 동위원소표지를 이용한 삼중정량 비교질량 분석법.

청구항 3

제2항에 있어서,

N-연결형 글리칸 및 O-연결형 글리칸의 동시 비교정량이 가능한 것인, 대사적 동위원소표지를 이용한 삼중정량 비교질량 분석법.

청구항 4

제1항에 있어서,

정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 5 Da 내지 8 Da인, 대사적 동위원소표지를 이용한 삼중정량 비교질량 분석법.

청구항 5

제1항에 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

정상 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이의 2배인, 대사적 동위원소표지를 이용한 삼중정량 비교질량 분석법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 글리칸은 만노오즈가 8 내지 14개인 고만노오즈 글리칸인, 대사적 동위원소표지를 이용한 삼중정량 비교질

량 분석법.

청구항 7

제1항에 있어서,

비교정량은 질량 스펙트럼을 측정한 후, 피크 면적(peak area)을 계산하여 상대 정량하는 것인, 대사적 동위원소표지를 이용한 삼중정량 비교질량 분석법.

청구항 8

^{12}C 글루코오스를 포함하는 제1 배지; 동위원소가 표지된 $1-^{13}\text{C}_1$ 글루코오스를 포함하는 제2 배지 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스;가 포함된 제 3배지에 세 종류의 생물학적으로 상이한 조건의 시료를 각각 첨가하여 배양하는 단계;

대사작용에 의해 각각 ^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민을 각각 합성하는 단계;

^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민으로부터 각각 정상 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸을 수득하는 단계;

상기 정상 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량스펙트럼을 얻고, 상기 세 종류의 질량스펙트럼을 비교정량하는 단계; 및

세 종류의 생물학적으로 상이한 조건의 시료에서 변형 여부 및 변형 정도를 분석하는 단계;를 포함하는 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 포유류, 조류, 파충류, 양서류 및 어류 유래의 시료로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 시료인 것을 특징으로 하는, 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 글리칸은 N-연결형 글리칸, O-연결형 글리칸 및 당지질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 5 Da 내지 8 Da인, 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

정상 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이의 2배인, 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 13

제8항 내지 제12항 따른 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법으로 취득된 정보를 이용하는, 포유류, 조류, 파충류, 양서류 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 체내 변형의 위치 지도화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대사적 동위원소표지 글리칸 및 이를 이용한 삼중정량 글리코믹스법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서로 다른 세 가지 생물학적 조건을 갖는 세포배양으로 대사적 동위원소표지된 글리칸을 제조하고, 이를 이용하여 삼중정량하는 고감도 비교정량 질량분석법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 포스트 게놈 연구 시대가 시작되면서 과학은 단백질의 번역 후 변형(Post-translational protein modifications, PTMs)을 포함한 프로테오믹스 접근에 더욱 집중되기 시작했다. 그러나 대부분의 프로테오믹스 프로젝트는 단백질, 지질, 프로테오글리칸의 글리코실화반응에 대해 분석학적, 기능학적인 면에서 상세하게 설명하지 못해 왔다. 이러한 프로테오믹스 프로젝트의 단점을 보완하고 실질적인 생물학의 이해를 높이기 위하여 글리코믹스(glycomics)라고 불리는 당생물학(glycobiology), 당쇄공학(glycotechnology) 형태의 개념이 소개되었다. 글리코믹스는 당단백질의 글리칸을 연구하는 학문으로 현재 바이오시밀러와 같은 의학분야 연구에 핵심적인 연구분야이다. 글리코믹스에서 진행되고 있는 연구분야는 당단백질의 발현에 따른 글리칸의 구조와 생합성에 대해, 글리칸이 어떻게 정량적으로 변하는지에 대해 결정하는 것으로, 글리칸의 정량적인 변화는 많은 질병의 진단과 연관되어 있기 때문에 글리칸의 정량 분석에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0003] 글리코실레이션은 진핵생물 시스템에서 가장 일반적인 번역 후 변형 중 하나로 생물학적 사건에 필요한 단백질의 구조, 안정성, 활동성, 결합특성, 세포내 위치 등에 중요한 역할을 한다. 글리칸은 종, 발달, 조직 등 다양한 세포 단계에 의존하여 발현되고, 유전적이며 생리적 상태 등의 다양한 요소에 영향을 받는다. 암, 염증, 선천적 장애 등을 포함하는 다양한 내재적 또는 후천적 질병과 관련된 글리칸의 변화에 대하여 정성적이고 정량적인 연구가 요구된다. 따라서 글리칸은 유망한 바이오마커로 대두되었으며, 글리칸의 변화에 대한 정량이 다양한 생물학적인 조건 및 질병과 관련하여 글리코믹스에서 중요해졌다. 그러나 글리칸 구조의 변이가 제공하는 글리칸의 미소이질성(microheterogeneity)에 의하여 특정 글리칸을 분리하고 규명하는 어려움이 있으며, 이에 고감도 및 고출력 분석 기술의 개발이 요구된다.

[0004] 질량분석법은 복잡한 글리칸 혼합물을 분석하는데 빠르고 신뢰할 정보를 제공하는 요구를 충족하여 글리코믹스 연구에 광범위하게 사용된다. 특히, 특정 글리칸 변이에 따른 정량적 분석을 위한 도구들 또한 질량분석법을 기반으로 발전하였다. 정량적 프로테오믹스의 발전 방향과 마찬가지로 비교 글리코믹스에 대하여 글리칸 변이를 결정하는 정량적 분석은 글리칸과 결합시키는 안정한 동위원소표지 전략들이 생체의 및 생체내에 따라 다양하게 개발되었다.

[0005] 화학적 생체의(chemical *in vitro*) 표지 방법으로 헤비 아이오도메탄($^{13}\text{CH}_3\text{I}$)에 의한 글리칸의 완전메틸화(permethylation), $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ 및 CH_2DI 를 이용한 완전메틸화로 동중원소 표지에 의한 정량(Quantitation by isobaric labeling; QUIBL), 동위원소 화학적 유도체화(Isotope chemical derivatization)를 이용한 글리칸 환원 동위원소표지(glycan reductive isotope labeling; GRIL) 등이 개발되었으며, 효소적 생체의(enzymatic *in vitro*) 표지법으로 ^{18}O -water를 이용한 글리칸 환원-말단 ^{18}O 표지(Glycan reducing-end ^{18}O labeling; GREOL) 전략들이 개발되었다.

[0006] 글리칸의 대사적 생체내 표지법은 Orlando 등에 의해 쥐의 배아줄기세포를 이용하여 비교 글리코믹스 연구를 위해 개발되었다. 글루타민을 이용한 아미노당의 동위원소 검출(Isotopic detection of aminosugars with glutamine; IDAWG)이라고 하는 이 전략은 헥소아민 생합성 경로(hexoamine biosynthetic pathway; HBP)를 통한 뉴클레오타이드 당의 생산과정에서 아미노당을 위한 질소의 유일한 단일 공여체로 사용되는 아미드- ^{15}N 글루타민을 이용한다. IDAWG는 글루칸의 생체내 동위원소표지법으로 글루칸에 존재하는 아미노당 한개당 1 Da의 질량을 증가시켜 글루칸을 비교정량한다. 그러나 글루칸의 구조에서 아미노당의 개수는 실험종과 고만노오즈 타입의 글리칸과 O-연결형 글리칸 같은 글리칸의 종류에 따라 제한적인 수를 가지게 되는 경우가 많다. 따라서 동위원소 쌍

간에 충분한 질량차이를 제공하지 못함에 따라 겹침에 의한 질량 스펙트럼의 간을 피하기 어려운 경우가 많다.

[0007] 이러한 문제의 해결책으로 글리칸의 새로운 정량법인 metabolic isotope labeling of polysaccharide with isotopic glucose(MILPIG)가 비의 조직 배양을 통하여 제안되었다. MILPIG 법은 세포배양 동안 글루코스가 없는 배양액에 동위원소표지 포도당($1-^{13}\text{C}_1$)을 도입하여 글리칸에 있는 각각의 당에 동위원소들을 표지하는 기법이다. 이 방법은 글리칸 구조에서 당의 수에 따라 1 Da 씩 증가하는 질량차이를 제공하는 비교 정량성을 증명하였다. 그러나 이와 같은 분석법 이외에 고감도의 새로운 비교 정량 분석법이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 세포배양에서 대사적 동위원소 표지 글리칸을 제조하고 이를 이용하여 일정한 질량 차이 값을 갖는 두 가지 타입의 동위원소가 표지된 글리칸을 이용하여 삼중정량하는 대사적 동위원소표지를 이용한 삼중정량 비교질량 분석법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 대사적 동위원소표지를 이용한 삼중정량 비교질량 분석법을 이용한 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법을 이용한 포유류, 조류, 파충류, 양서류 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 체내 변형의 위치 지도화 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ^{12}C 글루코오스를 포함하는 제1 배지; 동위원소가 표지된 $1-^{13}\text{C}_1$ 글루코오스를 포함하는 제2 배지 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코오스;가 포함된 제 3배지에 세포주를 각각 배양하는 단계;

[0012] 대사작용에 의해 각각 ^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민을 각각 합성하는 단계;

[0013] ^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민으로부터 각각 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸을 수득하는 단계; 및

[0014] 상기 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량스펙트럼을 얻고, 상기 세 종류의 질량스펙트럼을 비교정량하는 단계;를 포함하는 대사적 동위원소표지를 이용한 삼중정량 비교분석법을 제공한다.

[0015] 본 발명에 의하면, 상기 글리칸은 N-연결형 글리칸, O-연결형 글리칸 및 당지질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0016] 본 발명에 의하면, N-연결형 글리칸 및 O-연결형 글리칸의 동시 비교정량이 가능한 것일 수 있다.

[0017] 본 발명에 의하면, 정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 5 Da 내지 8 Da일 수 있으며, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 5 Da 내지 8 Da일 수 있으며, 정상 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 10 Da 내지 16 Da일 수 있다. 본 발명에 의하면, 정상 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이의 2배일 수 있다.

- [0018] 본 발명에 의하면, 상기 글리칸은 만노오즈가 8 내지 14개인 고만노오즈 글리칸일 수 있다.
- [0019] 본 발명에 의하면, 비교정량은 질량 스펙트럼을 측정된 후, 피크 면적(peak area)을 계산하여 상대 정량하는 것일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 ^{12}C 글루코오스를 포함하는 제1 배지; 동위원소가 표지된 $1-^{13}\text{C}_1$ 글루코오스를 포함하는 제2 배지 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스;가 포함된 제 3배지에 세 종류의 생물학적으로 상이한 조건의 시료를 각각 첨가하여 배양하는 단계;
- [0021] 대사작용에 의해 각각 ^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민을 각각 합성하는 단계;
- [0022] ^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민으로부터 각각 정상 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸을 수득하는 단계;
- [0023] 상기 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량스펙트럼을 얻고, 상기 세 종류의 질량스펙트럼을 비교정량하는 단계; 및
- [0024] 세 종류의 생물학적으로 상이한 조건의 시료에서 변형 여부 및 변형 정도를 분석하는 단계;를 포함하는 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 시료는 포유류, 조류, 파충류, 양서류 및 어류 유래의 시료로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 시료일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 의하면, 상기 글리칸은 N-연결형 글리칸, O-연결형 글리칸 및 당지질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0027] 본 발명에 의하면, 정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 5 Da 내지 8 Da일 수 있으며, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 5 Da 내지 8 Da일 수 있으며, 정상 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 10 Da 내지 16 Da일 수 있고,
- [0028] 정상 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이의 2배일 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기한 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법으로 취득된 정보를 이용하는, 포유류, 조류, 파충류, 양서류 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 체내 변형의 위치 지도화 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명에 따른 삼중정량 방법은 종래의 글리칸 비교정량법과 달리 세포배양에서 N-연결형/O-연결형 글리칸의 동시 삼중정량 비교질량분석이 가능하며, 당지질과 같은 모든 당포함체에 대한 동시적 삼중정량이 가능하다. 종래의 비교정량법은 추가하는 동위원소표지 내부 표준물질의 질량에 따라서 다양한 질량의 글리칸이 동시에 측정되며 비교정량 정밀도가 떨어지는 문제점이 있으나, 본 발명에 따른 대사적 동위원소표지 글리칸 및 이를 이용한 삼중정량 글리코믹스법은 순수한 세포의 대사작용에 의해서만 합성되는 동위원소표지 글리칸으로부터 최초로 동시적 삼중정량이 가능하므로 정확한 정량이 가능하다. 본 발명에 따른 방법은 당단백질의 연구와 발전에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스의 대사적 경로에 의한 동위원소표지 글리칸의 생합성 메커니즘을 도식화하여 나타낸 도이다.
- 도 2는 $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스의 대사적 생합성에 의한 동위원소표지된 N-연결형 글리칸(Man10)의 삼중정량 질량스펙트럼 결과이다.
- 도 3은 효모의 배양에서 각각 ^{12}C (Light), $1-^{13}\text{C}_1$ (medium) 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ (heavy) 글루코스 5 mg/ml을 투여하여 3 일 배양 후, 얻은 N-연결형 글리칸의 동위원소 질량스펙트럼 및 질량차이를 보여주는 결과이다.
- 도 4는 1(light):1(medium):1(heavy) 혼합비에서 Man10 글리칸의 절대존재비에 따른 질량스펙트럼 및 각 글리칸의 이온클러스터 면적비교 결과이다.
- 도 5는 1(light):1(medium):1(heavy) 혼합비에서 다양한 N-연결형 글리칸의 삼중정량 동위원소표지 질량스펙트럼 결과이다.
- 도 6은 1(light):1(medium):1(heavy) 혼합비에서 다양한 Man8 ~ Man12 N-연결형 글리칸의 삼중정량 동위원소표지 질량스펙트럼 및 Man10 글리칸의 동위원소 클러스터의 면적 비교 결과이다.
- 도 7은 Man8 ~ Man12 N-연결형 글리칸의 정상(light) 글리칸에 대하여 동위원소표지 (medium 또는 heavy) 글리칸의 질량 및 피크 면적의 비(면적비)를 계산한 결과이다.
- 도 8은 Man8 ~ Man12 N-연결형 글리칸의 정상(light) 글리칸에 대한 동위원소표지(medium 또는 heavy) 글리칸의 면적비를 막대그래프로 도시한 것이다.
- 도 9는 효모에 당단백질 당화 저해제인 튜니카마이신(Tunicamycin)을 0, 0.5 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하여 질량스펙트럼을 측정된 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 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.
- [0034] 본 발명의 발명자들은 동위원소표지 $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스를 이용하여 세포배양 단계에서 대사 작용에 의해 동위원소표지 N-연결형 또는 O-연결형 글리칸의 생합성에 성공하여 삼중정량 비교질량 분석법을 개발하였다.
- [0035] 세포의 대사작용은 글루코스를 이용하여 최종적으로 UDP-GlcNAc를 합성하며 이는 모든 당포함체(glycoconjugate)의 합성 전구체로 글리칸(N-연결형/O-연결형 글리칸과 당지질(glycolipid))의 합성에 이용된다. 이러한 대사작용 메커니즘을 활용함으로써 $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스를 첨가한 배양액에 세포를 배양함으로써 $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 가 표지된 UDP-GlcNAc를 합성하였으며, 이는 다시 $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 가 표지된 글리칸의 합성에 이용되어 최종적으로 동위원소가 표지된 글리칸의 합성이 가능하다. 본 발명의 일 실시 형태에 따르면, 이를 이용하여 서로 상이한 생물학적 조건을 가진 세포의 글리칸에 동위원소표지를 활용함으로써 글리칸의 삼중정량 비교질량분석이 가능하다.
- [0036] 본 발명은 ^{12}C 글루코오스를 포함하는 제1 배지; 동위원소가 표지된 $1-^{13}\text{C}_1$ 글루코오스를 포함하는 제2 배지 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스;가 포함된 제 3배지에 세포주를 각각 배양하는 단계;
- [0037] 대사작용에 의해 각각 ^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민을 각각 합성하는 단계;
- [0038] ^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$

표지된 UDP-N-아세틸글루코사민으로부터 각각 정상 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸을 수득하는 단계; 및

- [0039] 상기 정상 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량스펙트럼을 얻고, 상기 세 종류의 질량스펙트럼을 비교정량하는 단계;를 포함하는 대사적 동위원소표지를 이용한 삼중정량 비교분석법을 제공한다.
- [0040] 본 발명에 의하면, 상기 배지는 통상의 생물학적 시료, 예컨대 세포 또는 세포주의 배양에 사용되는 것이면 제한은 없으며, 정상(Normal) 글루코스 또는 동위원소가 표지된 글루코스; 성장인자, 최소한의 필수적인 배지가 포함된 것일 수 있고, 보다 상세하게는 글루코스 외에, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 소듐피루브산염(Sodium pyruvate), 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 페니실린(Penicillin)을 포함하는 것일 수 있다. 상기 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)은 가장 일반적으로 사용되는 동물 세포 배양의 배지이며, 상기 소듐피루브산염 상기 배지에서 배양되는 세포의 에너지 원천이 된다.
- [0041] 상기 세포주는 서로 다른 생물학적 조건을 가진 세포에 동위원소 표지를 활용하여 분석이 필요한 것이라면 어떠한 세포라도 이용 가능하다. 구체적으로, UDP-GlcNAc를 합성하는 대사작용을 이용하는 세포주라면 어떠한 세포라도 이용 가능하다
- [0042] 동위원소가 표지된 글루코스가 동위원소가 표지된 UDP-GlcNAc로 합성되는 상기 대사작용의 각 단계는 도 1에 도시된 바와 같다. 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 및 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 가 표지된 글루코스가 해당작용으로, 중간체인, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 및 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 가 표지된 프록토오스-6-인산 Fru** -6-P 및 Fru** -6-P 가 된다. 동위원소가 표지된 글루코사민-6-인산 GlcN** -6-P 및 GlcN*** -6-P 은 동위원소가 표지된 N-아세틸글루코사민-1-인산 GlcNAc** -1-P 및 GlcNAc*** -1-P 를 거쳐 최종적으로, UDP-N-아세틸글루코사민 UDP-GlcNAc* 및 UDP-GlcNAc**으로 전환되는 생합성 경로를 따른다. UDP-N-아세틸글루코사민은 다시 모든 당결합체(glycoconjugate)의 합성에 이용된다.
- [0043] 도 1에 나타난 바와 같이, $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스는 헥소아민 생합성 경로(hexoamine biosynthetic pathway; HBP)를 거쳐 최종적으로 동위원소표지 UDP-GlcNAc의 합성에 이용되고, 이는 다시 모든 당화(Glycoconjugate)의 합성에 이용된다. 예를 들어, 만노오스가 10개인 고만노오즈 종류의 N-연결형 글리칸(Man10)의 경우 총 12개의 당이 존재하고, $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스에 의해 각각의 당은 1번 탄소 또는 1, 2번 탄소에 동위원소가 표지되어 정상의 글리칸에 비하여 12 Da 또는 24 Da의 질량차이를 얻을 수 있다. 이를 이용하여 동위원소표지 글리칸의 질량 피크의 세기 또는 면적을 확인함으로써 삼중 정량 질량분석하였다.
- [0044] 본 발명에 있어서, '당결합체(glycoconjugate)'는 탄수화물에, 다른 화학종이 공유결합으로 결합되어 있는 것을 의미한다.
- [0045] '동위원소'란, 아이소토프(isotope) 또는 동위체라고도 하며 서로 화학적으로 거의 구별할 수가 없으나 그것을 구성하고 있는 원자의 질량이 서로 다른 것을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 및 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 가 표지된 글루코스는 일반적인 글루코스인 $^{12}\text{C}_6$ 와는 원자번호는 같으나 각각 1번 탄소 및 1,2번 탄소가 다른 질량 값을 갖는 것을 의미한다.
- [0046] '글루코스'는 알데하이드(aldehyde)기를 가지는 단당류의 일종으로, 일반적으로 포도당이라 한다. 글루코스의 분자식은 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 로 탄소 수가 6개이기 때문에 육탄당(헥소오스, hexose)이라 부른다. 탄수화물은 그것을 구성하는 당의 수에 따라 단당류·이당류·다당류로 구분하는데, 포도당은 단당류의 일종으로 녹말을 형성하는 기본 단위가 되기도 한다. 글루코스는 생체 내에서 세포 호흡을 통해 분해, 에너지를 생산하고, 그 에너지는 ATP의 형태로 저장, 발효·호흡 등에 사용된다.
- [0047] 본 발명에 의하면, 상기 글리칸은 N-연결형 글리칸, O-연결형 글리칸 및 당지질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 사용되는 용어 'N-연결형 글리칸'이란, 시퀀(sequon)의 아스파라진의 곁사슬에 질소(N)가 부착되어 있는것을 의미한다. 시퀀은 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr 시퀀스를 말하며, 여기서 X는 프롤린을 제외한 아미노산

및 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오즈, 뉴라민산, N-아세틸글루코사민, 프룩토오즈, 마노즈, 푸코스, 및 다른 당류로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

- [0049] 본 발명에서 사용되는 용어 'O-연결형 글리칸'이란, 진핵세포에서, O-연결형 글리칸은 골지체에서 세린 또는 펩타이드의 트레오닌 잔기가 당 하나에 하나씩 결합되어 있는 것을 의미한다. N-연결형 글리칸과 달리, 아직 공통 서열이 알려져 있지 않다.
- [0050] 본 발명에 의하면, N-연결형 글리칸 및 O-연결형 글리칸의 동시 비교정량이 가능한 것일 수 있다.
- [0051] 본 발명에 의하면, 정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 5 Da 내지 8 Da일 수 있으며, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 5 Da 내지 8 Da일 수 있으며, 정상 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 10 Da 내지 16 Da일 수 있다. 본 발명에 의하면, 정상 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이의 2배일 수 있다.
- [0052] 본 발명에 의하면, 상기 글리칸은 만노오즈가 8 내지 14개인 고만노오즈 글리칸일 수 있다.
- [0053] 본 발명에 의하면, 상기 제1 배지, 제2 배지 및 제3 배지에서 배양된 세포들을 혼합하여 균질화 및 탈지반응을 통해 세포에서 단백질을 추출 및 지질을 제거한다. 추출된 단백질에 단백질 소화효소를 처리하여 펩타이드를 추출한다. 상기 단백질 소화효소는 예를 들어 트립신 효소일 수 있다.
- [0054] 추출된 펩타이드에 PNGase F 효소를 처리하여 글리칸을 추출하고, 정제하여 목적하는 N-연결형 글리칸을 분리한다. 한편, 추출한 펩타이드를 β -제거 반응시키면, O-연결형 글리칸을 얻을 수 있다.
- [0055] 본 발명에 의하면, 비교정량은 질량 스펙트럼을 측정한 후, 피크 면적(peak area)을 계산하여 상대 정량하는 것일 수 있다. 피크의 면적(peak area)은 성분 물질의 농도에 비례하므로, 피크의 면적을 계산하여 성분 물질의 농도를 정량 분석할 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명은 ^{12}C 글루코오스를 포함하는 제1 배지; 동위원소가 표지된 $1-^{13}\text{C}_1$ 글루코오스를 포함하는 제2 배지 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스;가 포함된 제 3배지에 세 종류의 생물학적으로 상이한 조건의 시료를 각각 첨가하여 배양하는 단계;
- [0057] 대사작용에 의해 각각 ^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민을 각각 합성하는 단계;
- [0058] ^{12}C UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc), 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 UDP-N-아세틸글루코사민으로부터 각각 정상 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸을 수득하는 단계;
- [0059] 상기 정상 ^{12}C 글리칸, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸 및 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량스펙트럼을 얻고, 상기 세 종류의 질량스펙트럼을 비교정량하는 단계; 및
- [0060] 세 종류의 생물학적으로 상이한 조건의 시료에서 변형 여부 및 변형 정도를 분석하는 단계;를 포함하는 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 시료는 포유류, 조류, 파충류, 양서류 및 어류 유래의 시료로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 시료일 수 있다.
- [0062] 본 발명에 의하면, 상기 글리칸은 N-연결형 글리칸, O-연결형 글리칸 및 당지질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0063] 생체 내 조직의 변형과정이 정상적으로 일어날 경우, 각자의 역할을 수행할 수 있는 능력을 가지게 되며, 신진

대사가 정상적으로 일어나고 신체의 항상성을 유지할 수 있게 된다. 하지만 이러한 변형 과정에서 이상이 생기게 되면 각종 질병의 원인으로 이루어질 수 있다. 본 발명은 세 종류의 생물학적으로 상이한 조건의 시료에 대한 삼중정량 비교질량 분석법을 수행함으로써 시료의 변형 여부 및 변형 정도 나아가 변형 위치를 정확하고 고감도로 확인할 수 있다.

[0064] 본 발명에 의하면, 정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 5 Da 내지 8 Da일 수 있으며, 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 5 Da 내지 8 Da일 수 있으며, 정상 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 10 Da 내지 16 Da일 수 있다. 바람직하게 정상 글리칸과 동위원소 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 표지된 글리칸의 질량 차이는 정상 글리칸과 동위원소 $1-^{13}\text{C}_1$ 표지된 글리칸의 질량 차이의 2배일 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명은 상기한 생물학적 시료의 변형 여부 및 변형 정도에 관한 정보를 제공하는 방법으로 취득된 정보를 이용하는, 포유류, 조류, 파충류, 양서류 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 체내 변형의 위치 지도화 방법을 제공한다.

[0066] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0068] 이하에서 언급된 시약 및 용매는 특별한 언급이 없는 한, Sigma-Aldrich, TCI 또는 Alfa aesar로부터 구입한 것이며, Mass Spectrum은 Thermo Fishier Scientific사의 Q ExactiveTM Plus Orbitrap mass spectrometer 시스템을 사용하여 얻었다.

[0070] <실시예 1> 세포 배양 및 글리칸의 분리 방법

[0071] 본 연구에서는 효모 (이스트, *Saccharomyces cerevisiae*)를 활용하였으며, 글루코스가 없는 배양액을 준비하고, 정상 글루코스, $1-^{13}\text{C}_1$ 글루코스 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스를 각각 5 mg/ml로 투입하고, 3일을 배양한 후 수확하였으며, 세 조건의 효모를 동일한 양으로 섞은 후 4℃ 및 6,000 g에서 10분 동안 원심분리하고 증류수로 번 세척하고, 다시 4℃ 및 6,000 g에서 10분 동안 원심분리하고 50% 메탄올 1 ml로 1회 세척한 후 Dounce를 이용하여 균질화하였다. 균질화된 시료는 클로로포름/메탄올/물 (4:8:3, v/v/v)의 추출액을 이용하여 지질을 제거한 후 원심분리법을 이용하여 단백질을 정제하였다. 정제된 단백질은 건조 후 PNGase F를 처리하여 글리칸을 분리하였으며 완전메틸화시켜 염을 제거한 뒤, 질량분석기에 도입하여 질량스펙트럼을 얻었다.

[0073] <실시예 2> $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스의 대사적 생합성에 의한 동위원소표지된 N-연결형 글리칸(Man10)의 삼중정량 질량스펙트럼

[0074] $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스의 대사적 생합성에 의한 동위원소표지된 N-연결형 글리칸(Man10)의 삼중정량 질량스펙트럼을 확인하였다. 세포 배양 및 글리칸의 분리는 위 실시예 1의 방법을 이용하였다.

[0075] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0076] 도 2는 $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스의 대사적 생합성에 의한 동위원소표지된 N-연결형 글리칸(Man10)의 삼중정량 질량스펙트럼 결과이다. 도 2는 동위원소표지 글리칸에 의한 삼중정량 질량스펙트럼을 보여주고 있으며, 동일한 양의 글리칸으로부터 얻은 Man10 글리칸의 2가 양이온이 세 개의 다른 질량으로 나타났다. 정상 글루코스에 의한 글리칸 질량은 $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+} = 1311.636 \text{ Da}(\text{mono})$ 이며, $1-^{13}\text{C}_1$ 와 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스에 의한 글리칸의 질량은 각각 1317.656 Da와 1323.676 Da를 얻어 정상 질량의 글리칸에 대하여 질량 차이가 각각 6 Da와 12 Da의 차이가 났다.

- [0077] 본 발명을 바탕으로 세 종류의 생물학적으로 다른 조건의 시료에서 세포 배양을 통한 글리칸의 삼중 정량이 가능함을 확인하였으며, 본 발명에 따른 방법은 당포합체(glycoconjugate)에 적용이 가능하며, 특히 O-연결형 글리칸의 경우도 표지되는 당의 수에 따라 질량 차이를 얻을 수 있어 N-연결형 및 O-연결형 글리칸을 동시에 비교 분석이 가능함을 입증하였다.
- [0079] <실시예 3> 효모의 배양에서 각각 ^{12}C (Light), $1-^{13}\text{C}_1$ (medium) 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ (heavy) 글루코스의 배양 후, 얻은 N-연결형 글리칸의 동위원소 질량스펙트럼 및 질량차이 평가
- [0080] 효모의 배양에서 각각 ^{12}C (Light), $1-^{13}\text{C}_1$ (medium) 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ (heavy) 글루코스 5 mg/ml을 투여하여 3일 배양 후, 얻은 N-연결형 글리칸의 동위원소 질량스펙트럼 및 질량차이를 평가하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0081] $1-^{13}\text{C}_1$ (medium) 표지 글리칸은 Man8 ~ Man13까지의 2가 양이온인 ^{12}C (light) 글리칸에 대하여 글리칸의 당의 수에 따라 각각 5.0 Da에서 0.5 Da씩 증가하여 7.5Da까지의 질량차이를 보여주며, $1,2-^{13}\text{C}_2$ (heavy)표지 글리칸은 $1-^{13}\text{C}_1$ (medium) 표지 글리칸에 대하여 5.0 Da에서 0.5 Da씩 증가하여 7.5Da까지의 질량차이를 보여준다.
- [0083] <실시예 4> 1(light):1(medium):1(heavy) 혼합비에서 Man10 글리칸의 절대존재비에 따른 질량스펙트럼 및 각 글리칸의 이온클러스터 면적비교
- [0084] 1(light):1(medium):1(heavy) 혼합비에서 Man10 글리칸의 절대존재비에 따른 질량스펙트럼 및 각 글리칸의 이온클러스터 면적을 비교하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0085] 도 4에 나타난 바와 같이, 동위원소표지 포도당에 의해 대사적으로 생합성된 동위원소표지 글리칸은 스펙트럼의 겹침 없이 충분한 질량차이를 나타내어 정확한 삼중정량이 가능한 것을 볼 수 있다. 또한, 각각의 스펙트럼은 다른 동위원소 클러스터를 보여주었으나, 면적을 계산한 결과 $3.59\sim 3.73\times 10^7$ 으로 상당히 일치하는 값이 측정되어 본 발명에 따른 방법이 정확한 삼중정량을 제공하는 것으로 확인되었다.
- [0087] <실시예 5> 1(light):1(medium):1(heavy) 혼합비에서 다양한 N-연결형 글리칸의 삼중정량 동위원소표지 질량스펙트럼
- [0088] 1(light):1(medium):1(heavy) 혼합비에서 다양한 N-연결형 글리칸의 삼중정량 동위원소표지 질량스펙트럼을 평가하였으며, 이를 도 5에 나타내었다.
- [0089] 도 5는 Man8 ~ Man12 N-연결형 글리칸의 삼중정량 동위원소표지 질량스펙트럼을 도시한다. 정상(light) 시료와 동위원소표지 (Medium 또는 heavy) 시료 사이의 동위원소 클러스터 상의 겹침이 없이 충분한 질량 차이를 보여주고 있음을 보여주고 있다. 각각의 세 종류의 동위원소 클러스터는 정상에 대하여 피크의 크기가 조금씩 다르게 보이고 있으며, 동위원소표지 글리칸의 경우 상대적으로 넓은 동위원소 클러스터를 보인다. 그러나, 면적비를 계산하면 상당히 일치한다.
- [0091] <실시예 6> 1(light):1(medium):1(heavy) 혼합비에서 다양한 Man8 ~ Man12 N-연결형 글리칸의 삼중정량 동위원소표지 질량스펙트럼 및 Man10 글리칸의 동위원소 클러스터의 면적 비교
- [0092] 1(light):1(medium):1(heavy) 혼합비에서 다양한 Man8 ~ Man12 N-연결형 글리칸의 삼중정량 동위원소표지 질량스펙트럼 및 Man10 글리칸의 동위원소 클러스터의 면적을 비교하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0093] 각각의 세 종류의 동위원소 클러스터는 정상에 대하여 피크의 크기가 조금씩 다르게 보이고 있으며, 동위원소표지 글리칸의 경우 상대적으로 넓은 동위원소 클러스터를 보인다. 그러나, 도 6의 확대 그래프(우측)에서 확인 가능하듯이, 면적비를 계산하면 상당히 일치하는 것을 확인할 수 있다.

[0095] <실시예 7> Man8 ~ Man12 N-연결형 글리칸의 정상(light) 글리칸에 대한 동위원소표지 (medium 또는 heavy) 글리칸의 면적비 평가

[0096] 1(light):1(medium):1(heavy) 혼합비에서 다양한 N-연결형 글리칸의 삼중정량 동위원소표지 질량스펙트럼으로부터 얻은 각각의 면적을 Man8 ~ Man12 N-연결형 글리칸의 정상(light) 글리칸에 대하여 동위원소표지 (medium 또는 heavy) 글리칸의 면적비를 계산하여 도 7에 나타내었으며, 결과 값을 막대그래프로 도시하여 도 8에 나타내었다. 다양한 글리칸에 대한 이론적인 비율인 1에 대하여 대부분의 글리칸에서 오차범위 안으로 이론적 비율에 일치하는 것으로 나타나 우수한 삼중정량성을 확인할 수 있다.

[0098] 상기 실험 결과에 나타난 바와 같이, 본 발명은 효모를 모델시스템으로 사용하여 동위원소표지 $1-^{13}\text{C}_1$ 및 $1,2-^{13}\text{C}_2$ 글루코스를 이용한 세포배양을 통해 대사적 생합성 방법으로 동위원소표지 글리칸을 성공적으로 합성하였고, 이를 삼중정량 질량분석법에 적용함으로써 효과적이고 고감도의 다중정량 비교질량분석법을 확립하였다.

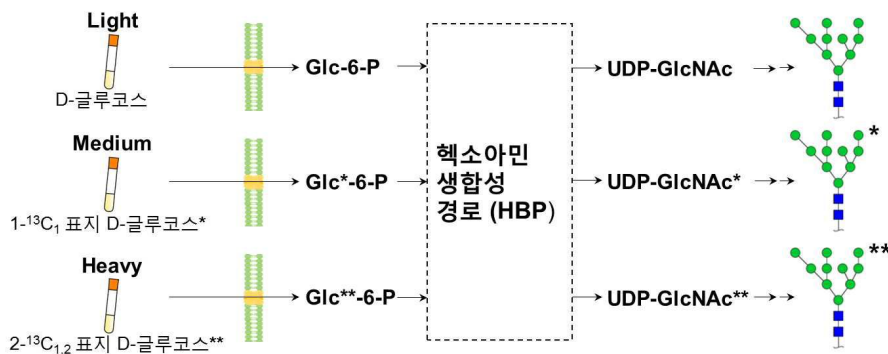
[0100] <실시예 9>

[0101] 효모에 당단백질 당화 저해제인 튜니카마이신(Tunicamycin)을 0, 0.5 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하여 질량스펙트럼을 측정하였으며, 도 9에 나타내었다.

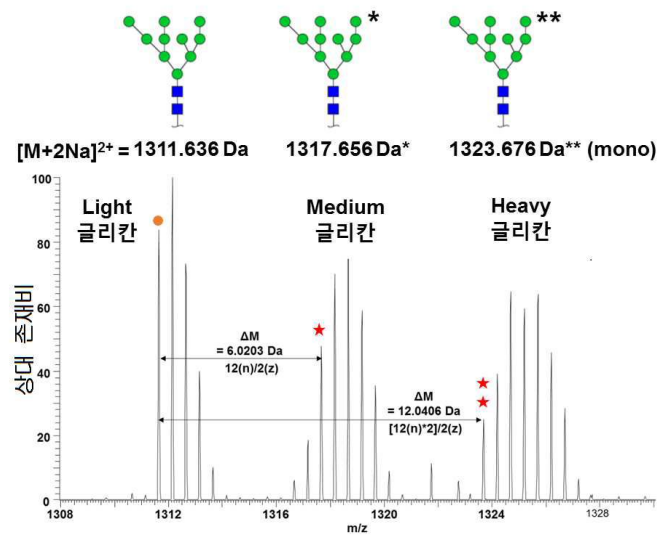
[0102] 상기 실험 결과에 나타난 바와 같이, 각각 다른 면적의 질량스펙트럼을 얻었으며, 스펙트럼의 면적비는 저해제를 반대로 처리한 경우와 비슷한 면적비를 보여주었다.

도면

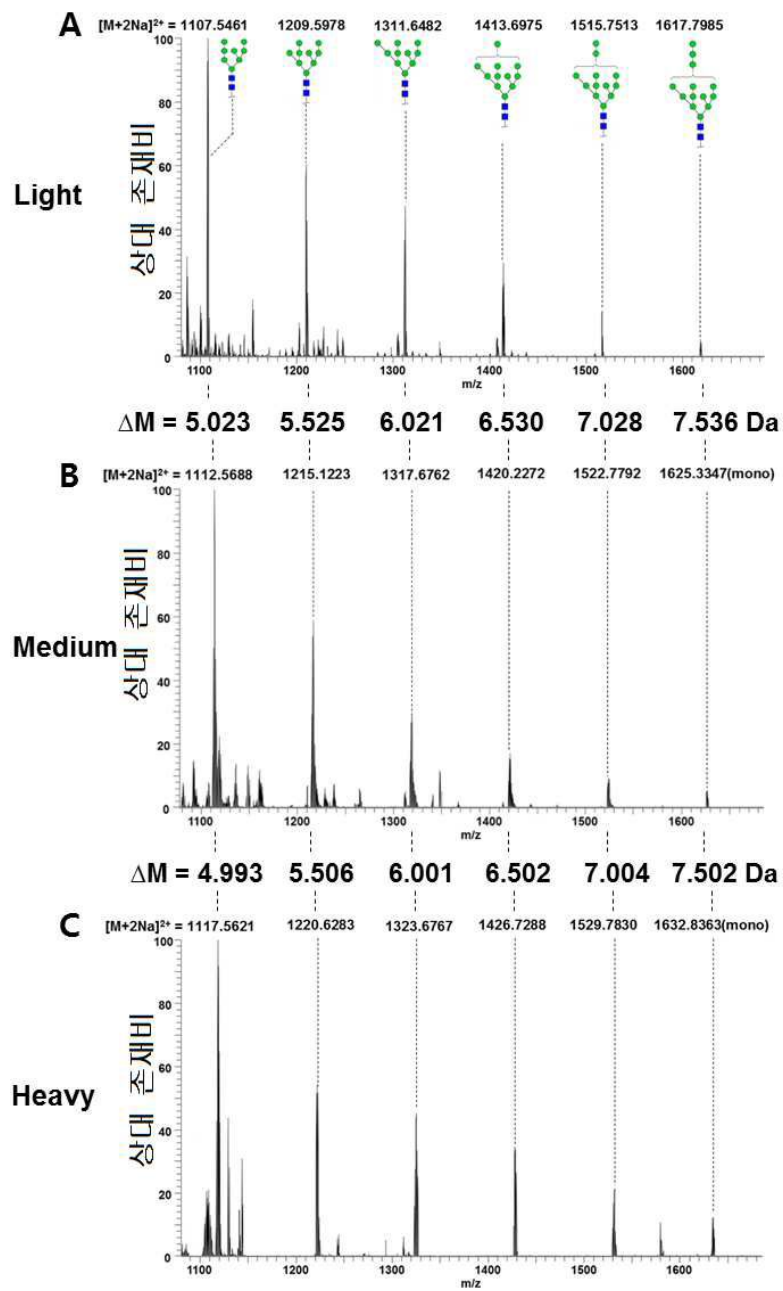
도면1



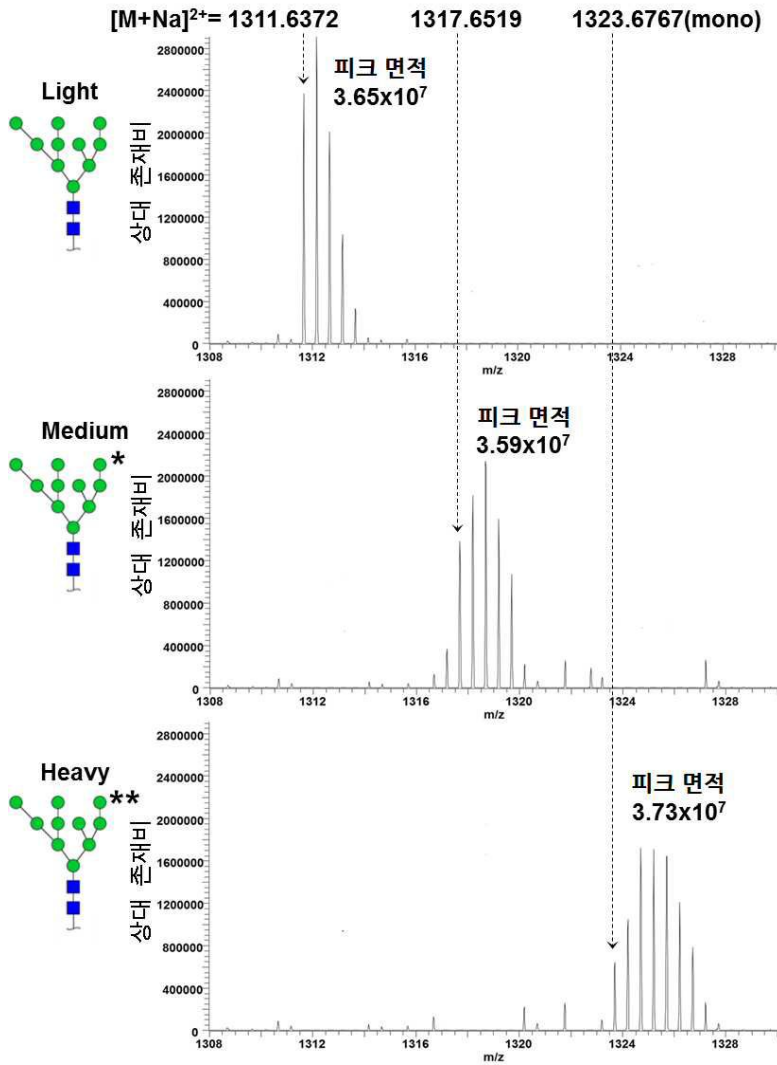
도면2



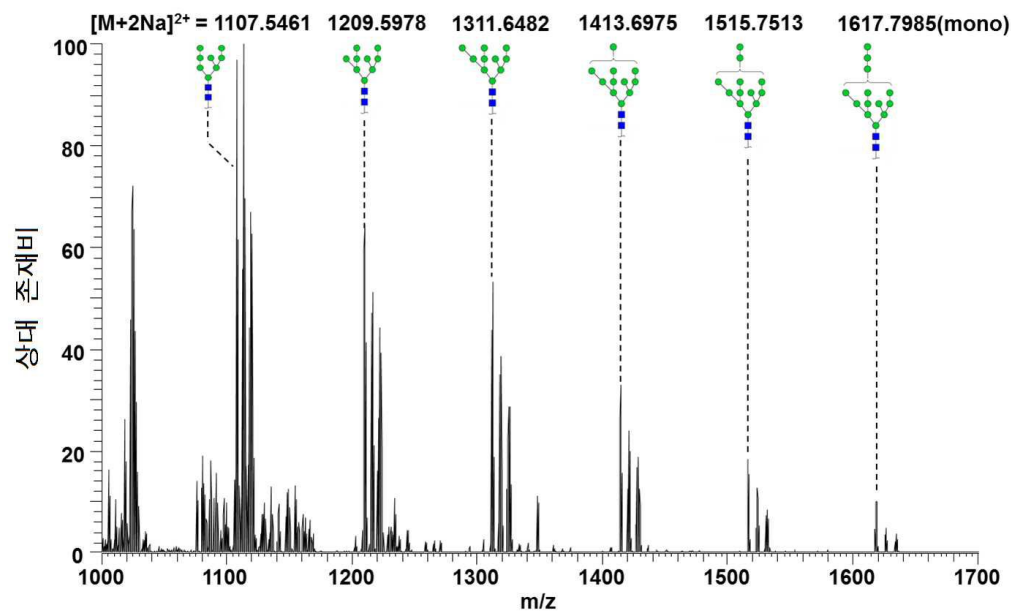
도면3



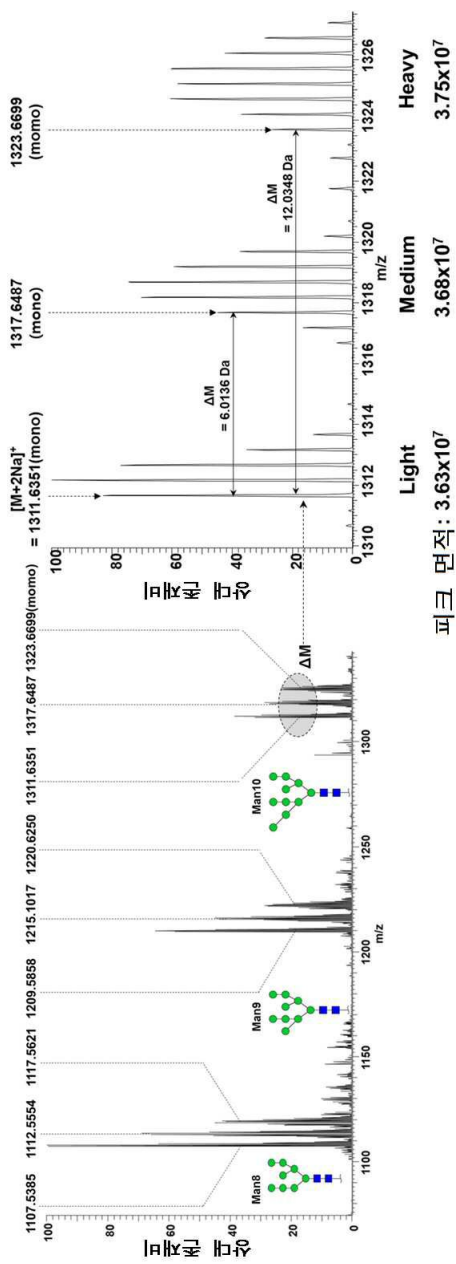
도면4



도면5



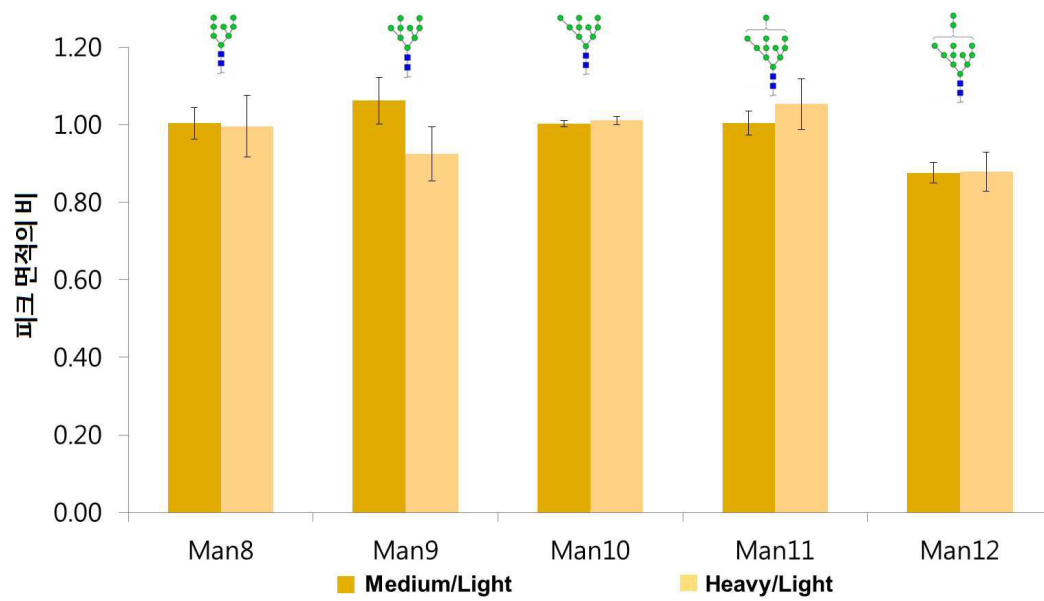
도면6



도면7

조성물	구조	탄소 번호	z	측정된 질량[M+zNa] ⁺ (mono)			피크면적의 비		
				Light (¹² C)	Medium (¹³ C ₁)	Heavy (¹³ C ₂)	이론값 (¹³ C ₁ / ¹² C)	측정값 (¹³ C ₁ / ¹² C)	이론값 (¹³ C ₂ / ¹² C)
Man8GlcNAc2		10	2	1107.5019	1112.5363	1117.5697	1.00	1.00±0.04	1.00
Man9GlcNAc2		11	2	1209.5869	1215.1030	1220.6265	1.00	1.06±0.06	1.00
Man10GlcNAc2		12	2	1311.6393	1317.6532	1323.6744	1.00	1.00±0.01	1.00
Man11GlcNAc2		13	2	1413.6904	1420.2048	1426.7260	1.00	1.01±0.03	1.00
Man12GlcNAc2		14	2	1515.7408	1522.7486	1529.7767	1.00	0.88±0.03	1.00

도면8



도면9

