



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0116497
(43) 공개일자 2023년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/58 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/582 (2013.01)
G01N 33/6845 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0013509
(22) 출원일자 2022년01월28일
심사청구일자 2022년01월28일

(71) 출원인
(주)오투메디
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 울산과
학기술원 106동 805-6호
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
권태혁
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
남정승
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인 정안

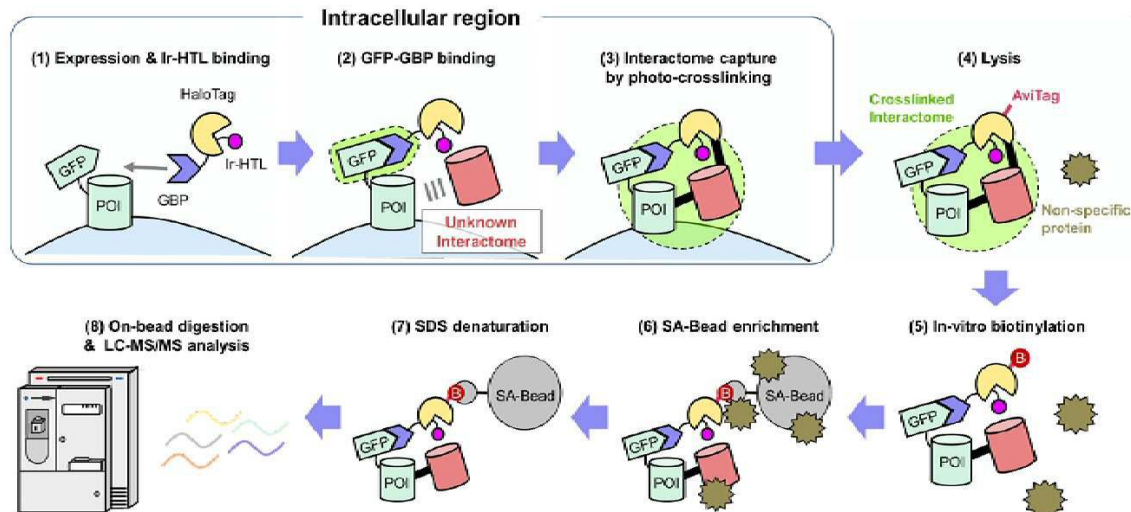
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 상호작용체 분석용 키트 및 이를 이용한 상호작용체 분석법

(57) 요약

본 발명은 상호작용체 분석용 키트와 이를 활용한 광고차 결합을 이용한 상호작용체 분석법에 관한 것이다. 본 발명의 일 측면인 상호작용체 분석용 키트 및 이를 이용한 상호작용체 분석법에 의할 경우, 상호작용체를 공유결합을 통해 하나로 연결하므로 분석오류를 줄일 수 있다. 또한, 본 발명에 의할 경우, 살아있는 세포 내의 상호작용체를 분석할 수 있고, 세포 핵 내의 상호작용체를 분석할 수 있다. 또한, 본 발명에 의할 경우, 상호작용체 형성 시점을 조절할 수 있으므로, 특정 상황 또는 시점에서의 타겟 단백질과 상호작용체의 분석이 가능하다는 장점이 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711131152
과제번호	2021R1A2C2009504
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	단백질 상호작용체 지도 완성을 위한 광교차결합 화학도구 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- i) 타겟 단백질(Protein of Interest, POI) 코딩부, 및 형광 단백질 코딩부를 포함하는 제1 벡터;
- ii) 형광 단백질 바인딩 단백질 코딩부, 및 할로태그(HaloTag)코딩부를 포함하는 제2 벡터; 및
- iii) 할로태그 표적 리간드(HaloTag tageting ligand, HTL)를 포함하는 광촉매를 포함하는, 상호작용체 분석용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 형광 단백질은 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)를 포함하는, 상호작용체 분석용 키트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 형광 단백질 바인딩 단백질은 녹색 형광 단백질 바인딩 단백질(GFP Binding Protein, GBP)를 포함하는, 상호작용체 분석용 키트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 광촉매는

금속; 및

할로태그 리간드(Halotag Ligand, HTL)의 결합체를 포함하는, 상호작용체 분석용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 금속은 이리듐을 포함하는, 상호작용체 분석용 키트.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 키트는,

세포내의 상호작용체 분석을 위한 것인, 상호작용체 분석용 키트.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제2 벡터는 핵 위치 서열(nuclear localization sequence, NLS) 코딩부를 더 포함하는, 상호작용체 분석용 키트.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 상호작용체 분석용 키트를 활용한, 광교차 결합을 이용한 상호작용체 분석법으로서,

상기 분석법은,

i) 제1 벡터 및 제2 벡터를 이용하여,

타겟 단백질 및 형광 단백질을 포함하는 제1 구조체와, 형광 단백질 바인딩 단백질, 할로태그, 및 핵 위치 서열을 포함하는 제2 구조체를 세포 내에서 발현시키는 단계;

ii) 할로태그 표적 리간드를 포함하는 광촉매를 세포에 처리하는 단계;

iii) 광원을 조사하여, 타겟 단백질과 상호작용체간 광교차결합 화학반응을 유도하는 단계; 및

iv) 광교차결합된 단백질들을 추출하는 단계를 포함하는, 광교차 결합을 이용한 상호작용체 분석법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 분석법은,

iii) 단계 이후에, 세포를 용해시키는 단계를 포함하는, 광교차 결합을 이용한 상호작용체 분석법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 분석법은,

iv) 단계 이후에, 질량 분석을 통해 상호작용체를 포함하는 단백질을 분석하는 단계를 포함하는, 광교차 결합을 이용한 상호작용체 분석법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 상호작용체 분석용 키트와 이를 활용한 광교차 결합을 이용한 상호작용체 분석법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간의 질병을 이해하고 치료하기 위해서는 인간을 구성하는 기본 단위인 세포의 생리적 기능에 대한 정확한 이해가 필요하다. 또한, 세포의 생리적 기능은 대부분 유전체에 의해 발현된 단백질이 관여하므로, 어떠한 단백질들이 서로 상호작용하며 이러한 상호작용이 어떻게 관여하는지 이해하는 것이 매우 중요하다고 볼 수 있다. 이러한 단백질을 이해하고, 단백질 간의 상호작용을 규명하는 학문을 프로테오믹스(proteomics)와 인터렉토믹스(interectomics)라고 하며, 최근 들어 이들 학문에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 프로테오믹스와 인터렉토믹스 연구를 위한 방법으로는 (i)면역 침강법, (ii) 효소 기반 라벨링법, 및 (iii) 화학반응기반 라벨링법이 알려져 있다(도 1a 내지 도 1e 참조).

[0004] 현재까지 보고된 상호작용체 분석 방법은 특정 목적단백질(protein of interest, POI)에만 적용할 수 있거나, 살아있는 세포에 이용 불가능하며, 상호작용체에 대한 선택성, 민감성, 시공간적 해상도가 매우 낮다는 한계가 존재한다(도 1f 참조).

[0005] 상호작용체 분리 및 분석을 위해 최초로 제시된 방법론은, POI에 특정하게 붙을 수 있는 항체를 이용하는 면역 침강법(Immunoprecipitation)이다. 그러나, 면역침강법은 POI와 상호작용 단백질들 사이의 물리흡착을 이용하기 때문에, 상호작용 단백질들뿐만 아니라 주변의 다른 단백질까지 함께 흡착되어 긍정 오류(False-positive)의 발생 가능성이 높아, 상호작용체 분석에 대한 시공간해능과 선택성이 매우 낮다는 한계가 있었다(도 1a 참조).

[0006] 이에, 면역침강법의 한계를 극복하고자 개발된 방법이 화학적 라벨링(Chemical labeling)이며, 이는 단백질과 화학물질 사이에 국부적으로 발생하는 화학적 개질(chemical modification)을 이용하는 방법이다. 단백질의 화학적 개질을 일으키는 방법은 대표적으로 효소 기반 라벨링과 화학반응 기반 라벨링이 알려져 있다(도 1b 내지 도 1e).

[0007] 효소 기반 라벨링의 경우에는 대개 바이오틴-페놀(Biotin-phenol)과 효소 사이의 전자전이(Electron transfer)로 생성되는 중간생성물(Intermediate)인 바이오틴-페녹실 라디칼(Biotin-phenoxy radical)이 주변 단백질에 붙어 상호작용체를 효과적으로 라벨링할 수 있으나, 바이오틴-페녹실 라디칼의 긴 생존수명(Lifetime)과 확률은

확산 거리로 인해 라벨링 반경이 약 70~100nm일 정도로 공간적 해상도와 상호작용체에 대한 선택성이 낮다는 한계가 있었다(도 1b 참조).

[0008] 이에 대한 대안으로 제시된 방법이 화학 반응기반 라벨링법이며, 화학 반응기반 라벨링법에는 대표적으로 (i) μ Map법, (ii) 리간드 직접 화학법, (iii) 화학적 교차결합법이 있다(도 1c 내지 도 1e 참조).

[0009] μ Map법의 경우, 생존수명이 짧은 카빈(Carbene) 중간생성체를 이용하여 효소 기반 라벨링법과 비교하여 라벨링 반경을 수십 nm에서 수 nm로 대폭 개선했으나, 항체(Antibody)를 이용하여 목적 단백질을 표적하기 때문에 세포 내 영역(intracellular region)으로는 적용하기 어려우므로 적용 가능한 목적 단백질 범위가 매우 제한적이라는 한계가 있었다(도 1c).

[0010] 리간드 직접 화학법의 경우, 추가적인 단백질의 세포 내 발현 없이 오직 화학물질의 반응만을 이용해서 POI 라벨링이 가능하지만, POI마다 맞춤형 화학물질이 필요하여, 리간드가 개발되지 못한 POI의 경우 분석 자체가 불가능하다는 한계가 있다(도 1d).

[0011] 화학적 교차결합법의 경우, 동정된 세포 용해물에서는 적용할 수 있지만, 산발적 화학반응으로 인해 POI가 아닌 다른 단백질들까지 전체적으로 교차결합을 이루기 때문에, 시공분해능이 없고, 살아있는 세포에 적용하기 어렵다는 한계가 있다(도 1e).

[0012] 따라서, 본 발명자들은 연구진은 상기의 기존 기술들의 단점들을 극복할 수 있는 단백질 화학적 개질 방법으로 광교차결합(Photo-crosslinking)을 이용(도 2)하여, 살아있는 세포에서 화학적으로 접근이 어려웠던 핵에 위치한 POI에 적용 가능한 고정밀·고민감·고해상의 새로운 프로테오믹스·인터랙토믹스 분석법을 제시하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) KR 10-2019-0017363 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 기존의 상호작용체 분석 방법의 단점을 개선하는 것이다.

[0015] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 단백질간 상호작용을 정밀하게 분석하는 것이다.

[0016] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 상호작용체 분석에 있어 정확도를 개선하는 것이다.

[0017] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 시간적·공간적 제약 없이 상호작용체를 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 세포 내에서의 상호작용체 분석을 수행하는 것이다.

[0019] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 살아있는 세포에 존재하는 상호작용체를 분석하는 것이다.

[0020] 일 측면에서, 본 발명의 목적은 살아있는 세포의 핵에 위치한 상호작용체를 분석하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 일 측면에서, i) 타겟 단백질(Protein of Interest, POI) 코딩부, 및 형광 단백질 코딩부를 포함하는 제1 벡터; ii) 형광 단백질 바인딩 단백질 코딩부, 및 할로태그(HaloTag)코딩부를 포함하는 제2 벡터; 및 iii) 할로태그 표적 리간드(HaloTag tageting ligand, HTL)를 포함하는 광촉매를 포함하는, 상호작용체 분석용 키트를 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 일 측면에서, 상호작용체 분석용 키트를 활용한, 광교차 결합을 이용한 상호작용체 분석법을 제공하며, 상기 분석법은, i) 제1 벡터 및 제2 벡터를 이용하여, 타겟 단백질 및 형광 단백질을 포함하는 제1 구조체와, 형광 단백질 바인딩 단백질, 할로태그, 및 핵 위치 서열을 포함하는 제2 구조체를 세포 내에서 발현시키는 단계; ii) 할로태그 표적 리간드를 포함하는 광촉매를 세포에 처리하는 단계; iii) 광원을 조사하여, 타

겟 단백질과 상호작용체간 광고차결합 화학반응을 유도하는 단계; 및 iv) 광고차결합된 단백질들을 추출하는 단계를 포함하는, 광고차 결함을 이용한 상호작용체 분석법을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 일 측면인 상호작용체 분석용 키트 및 이를 이용한 상호작용체 분석법에 의할 경우, 상호작용체를 공유결합을 통해 하나로 연결하므로 분석오류를 줄일 수 있다. 또한, 본 발명에 의할 경우, 살아있는 세포 내의 상호작용체를 분석할 수 있고, 세포 핵 내의 상호작용체를 분석할 수 있다. 또한, 본 발명에 의할 경우, 상호작용체 형성 시점을 조절할 수 있으므로, 특정 상황 또는 시점에서의 타겟 단백질과 상호작용체의 분석이 가능하다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1a는 기존의 면역 침강법의 메커니즘을 보이는 도이다.
 도 1b는 기존의 효소기반 라벨링법의 메커니즘을 보이는 도이다.
 도 1c 기존의 화학반응 기반 라벨링법 중 μ Map법의 메커니즘을 보이는 도이다.
 도 1d 기존의 화학반응 기반 라벨링법 중 리간드 직접 화학법의 메커니즘을 보이는 도이다.
 도 1e 기존의 화학반응 기반 라벨링법 중 화학적 교차결합법의 메커니즘을 보이는 도이다.
 도 1f는 본 발명과 기존 기법의 효과차이를 비교한 것이다.
 도 2는 본 발명에 따른 광고차 결함의 메커니즘의 예시이다.
 도 3은 본 발명에 따른 할로태그 시스템과, GFP-GBP 시스템 병용에 따른 효과를 설명하는 도이다.
 도 4는 본 발명의 일 구현예인 광고차 결함을 이용한 상호작용체 분석법의 공정을 보이는 도이다.
 도 5는 본 발명의 분석법에 의할 때, PTBP1의 상호작용체인 RAVR1, MART3, SFPQ가 검출된 결과를 보이는 사진이다.
 도 6은 PTBP1-RAVR1의 상호작용을 확인한 결과를 보이는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하에서, 각 구성을 보다 상세히 설명한다.

[0026] 이하의 설명은 하나의 예시에 불과할 뿐, 본 발명의 권리범위가 다음 내용에 의해 제한되지 아니한다.

[0027] 또한, 본 발명의 명세서 및 청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정 해석되지 아니하며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0028] 본 발명의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0029] 일 측면에서, 본 발명은 i) 타겟 단백질(Protein of Interest, POI) 코딩부, 및 형광 단백질 코딩부를 포함하는 제1 벡터; ii) 형광 단백질 바인딩 단백질 코딩부, 및 할로태그(HaloTag)코딩부를 포함하는 제2 벡터; 및 iii) 할로태그 표적 리간드(HaloTag targeting ligand, HTL)를 포함하는 광촉매를 포함하는, 상호작용체 분석용 키트이다.

[0030] 상기 제1 벡터 및 제2 벡터는 제한되지 않고, 플라스미드, 박테리오파지, 코스미드, 세균 인공 염색체(bacterial artificial chromosomes, BACs), 효모 인공 염색체(yeast artificial chromosomes, YACs), 바이러스 등을 포함할 수 있다.

[0031] 상기 벡터는, 단백질의 발현을 위해 필요한 벡터가 갖추어야 할 인자들, 예컨대, 복제기원(origin), 다중 복제부위(multiple cloning sites), 선택 표지자 등을 포함할 수 있다.

[0032] 일 측면에서, 상기 키트는, 상기 벡터들이 발현되어 형성된 단백질들을 포함한 형태일 수 있고, 구체적으로, 타겟 단백질 및 형광 단백질의 결합체, 형광 단백질 바인딩 단백질, 할로태그, 및 핵 위치 서열의 결합체, 및 할

로태그 표적 리간드를 포함하는 광촉매를 포함할 수 있다.

- [0033] 일 측면에서, 상기 형광 단백질은 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP)를 포함할 수 있으며, 상기 형광 단백질 바인딩 단백질은 녹색 형광 단백질 바인딩 단백질(GFP Binding Protein, GBP)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 일 측면에서, 본 발명은 할로태그 시스템과 GFP-GBP시스템을 모두 이용함으로써, 세부 위치별로 POI와 상호작용체를 분석할 수 있다(도 3 참조). 즉, 할로태그 시스템을 포함함으로써, 할로태그 표적 리간드와 결합한 광촉매가 할로태그 단백질에 특이적으로 결합할 수 있고, 할로태그만 이용할 경우, 단백질 분석시 상호작용체 외 함께 검출되는 타단백질의 백그라운드 시그널을 제거할 수 없다는 단점을 보완하기 위해 GFP-GBP 시스템을 함께 도입하였다.
- [0035] 또한, 상기 광촉매는, 금속; 및 할로태그 리간드(Halotag Ligand, HTL)의 결합체를 포함할 수 있다.
- [0036] 또한, 일 측면에서, 상기 금속은 이리듐을 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명은 이리듐을 포함하는 촉매를 이용함으로써, 세포 내에서의 광교차결합을 수행할 수 있다.
- [0038] 한편, 본 발명은 광교차 결합을 활용함으로써, 빛을 이용하여 상호작용체를 라벨링하는 시점을 자유롭게 조절할 수 있다(도 2 참조).
- [0039] 일 측면에서, 상기 키트는, 세포 내의 상호작용체 분석을 위한 것일 수 있으며, 핵 내에 존재하는 상호작용체 분석을 위한 것일 수 있다.
- [0040] 일 측면에서, 상기 POI는, PTBP1, POU2F1, 또는 PSMA2일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 일 측면에서, 상기 제2 벡터는, 핵 위치 서열(nuclear localization sequence, NLS) 코딩부를 더 포함할 수 있다.
- [0042] 일 측면에서, 본 발명은 상기 상호작용체 분석용 키트를 활용한, 광교차 결합을 이용한 상호작용체 분석법이다.
- [0043] 본 발명에 따른 광교차 결합의 메커니즘의 예시는 도 2에 도시되어 있다.
- [0044] 구체적으로 본 발명에 따른 상호작용체 분석법은, i) 제1 벡터 및 제2 벡터를 이용하여, 타겟 단백질 및 형광 단백질을 포함하는 제1 구조체와, 형광 단백질 바인딩 단백질, 할로태그, 및 핵 위치 서열을 포함하는 제2 구조체를 세포 내에서 발현시키는 단계; ii) 할로태그 표적 리간드를 포함하는 광촉매를 세포에 처리하는 단계; iii) 광원을 조사하여, 타겟 단백질과 상호작용체간 광교차결합 화학반응을 유도하는 단계; 및 iv) 광교차결합된 단백질을 추출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0045] 일 측면에서, 상기 제1 구조체는 제1 벡터가 발현된 결과물(또는 단백질 복합체)을 의미할 수 있으며, 상기 제2 구조체는 제2 벡터가 발현된 결과물을 의미할 수 있다.
- [0046] 일 측면에서, 발현된 제2 구조체는 할로태그 표적 리간드를 포함하는 광촉매와 상호 결합한 후, 상기 결합물은 다시 발현된 제1 구조체와 결합할 수 있다.
- [0047] 일 측면에서, 광원을 조사함으로써, 금속, 예컨대 이리듐을 포함하는 광촉매가 광활성화되면서, POI와 상호작용체 사이에 광교차 결합 화학 반응이 발생할 수 있다.
- [0048] 상기 분석법은, 상기과 같이, POI와 상호작용체 사이에 광교차 결합 화학 반응이 발생한 후에 세포를 용해시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0049] 일 측면에서, 상기 분석법은 세포를 용해시키는 단계 이후에, 광교차결합된 단백질을 추출하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0050] 상기 추출하는 단계는 바이오틴화법(biotinylation)을 이용할 수 있다. 구체적으로, 할로태그 단백질에 바이오틴화시키는 방법을 포함할 수 있으며, 예컨대, 한국특허 공개공보 제10-2019-0017363호에 기재되어 있는 방법을 활용할 수 있다.
- [0051] 그 후, 상기 분석법은, 스트렙타비딘(streptavidin, SA) 마그네틱 비드를 이용하여 세포 용해물로부터 바이오틴화 단백질을 분리하는 단계(enrichment)를 더 포함할 수 있다.
- [0052] 일 측면에서, 상기 분석법은 상기 바이오틴화 단백질을 분리하는 단계 이후에, 이온 결합, 소수성 결합 등으로

인해 바이오틴화 단백질에 흡착되어 있는 비특이적 단백질을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이 때, 비특이적 단백질을 제거하는 단계는 SDS-denaturation을 포함할 수 있다.

[0053] 일 측면에서, 상기 분석법은 상기 비특이적 흡착 단백질을 제거하는 단계 이후에, 질량 분석을 통해 상호작용체를 포함하는 단백질을 분석하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0054] 이 때, 질량 분석에 앞서 트립신을 처리하여, 바이오틴화 단백질을 구성하는 구성 펩티드 또는 단백질로 분해하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0055] 상기의 본 발명의 분석법의 예시는 도 4에 설명되어 있다.

[0057] 이하 실시예를 통하여 본 발명에 대해 구체적으로 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0059] [실험예] 상호작용체 분석법의 신뢰성 증명

[0060] 본 발명의 분석법의 신뢰성을 증명하기 위해, 타겟 단백질(POI)로, 상호작용체가 어느정도 알려져 있는 PTBP1을 선정하였다.

[0061] 그 후, 아래와 같은 순서에 의하여 분석을 수행하였다.

[0062] (1) PTBP1-GFP와 GBP-HaloTag-NLS의 두 구조체를 TurboFect® (ThermoFisher Scientific) 시약을 이용하여 (DNA 1000 ng 당 2 uL 사용) 세포의 형질주입을 통해 발현시킴

표 1

Plasmid name (expected size)	Features	Promotor / vector
PTBP1-EGFP (86.6 kDa)	Not I-PTBP1-BamHI-EGFP-STOP-XhoI	CMV / pCDNA3
GBP-V5-Halotag-AP-NLS (54.2 kDa)	KpnI-GBP-BamHI-V5-Halotag-TEV site-AP-Not I-NLS-STOP-XhoI	CMV / pCDNA5

[0065] (2) 광촉매인 Ir-HTL 2 uM의 미디어를 이용하여 37 °C, 5% 이산화탄소 조건에서 2 시간 배양한 뒤 추가적으로 광촉매 없는 미디어로 8 시간 배양하여 GBP-HaloTag-NLS에 표적화된 뒤 결합되지 않은 광촉매들을 제거함

[0067] (3) GBP-HaloTag-NLS-Iridium의 GFP-PTBP1 결합

[0068] (4) Iridium 촉매의 광활성에 의한 PTBP1와 상호작용체 사이의 상온 조건에서 광교차결합 화학반응

[0069] (5) 반응 후 4℃ 에서 RIPA 용해 버퍼를 이용한 세포 용해

[0070] (6) 광교차결합된 단백질들을 분리시키기 위해 HaloTag 단백질에 in-vitro 비오틴화 (biotinylation)

[0071] (7) AMICON 필터를 이용하여 용액에 남아있는 free 비오틴 제거

[0072] (8) 스트렙타비딘 마그네틱 비드를 이용하여 lysate에서 비오틴화 HaloTag 단백질 분리 (Enrichment)

[0073] (9) 이온 결합 및 소수성 결합으로 인해 함께 나오는 non-specifically adsorbed 단백질을 10% SDS 용액으로 wash하여 제거 (SDS denaturation)

[0074] (10) 비드에 붙어있는 교차결합된 단백질을 10 mM Dithiothreitol (DTT) 용액을 이용하여 37 °C 에서 1시간 동안 반응 (환원 반응)

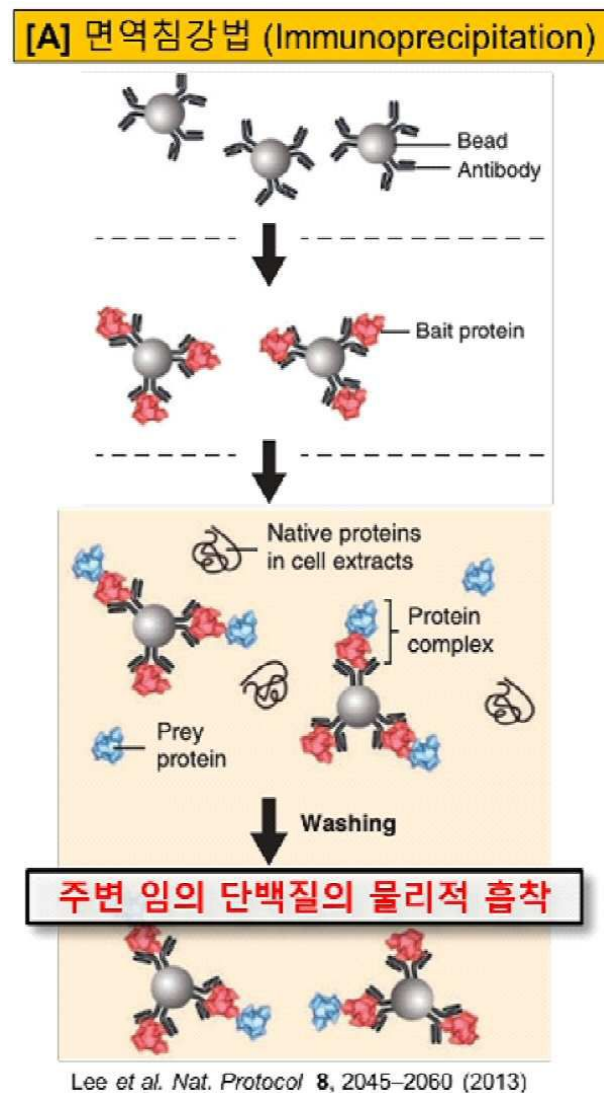
[0075] (11) DTT 용액 제거 후 55 mM Iodoacetamide (IAM) 용액을 이용하여 37 °C에서 1시간동안 빛을 차단 후 반응 (알킬화 반응)

[0076] (12) 20 μg/mL trypsin 용액을 이용하여 단백질의 on-bead trypsin digestion

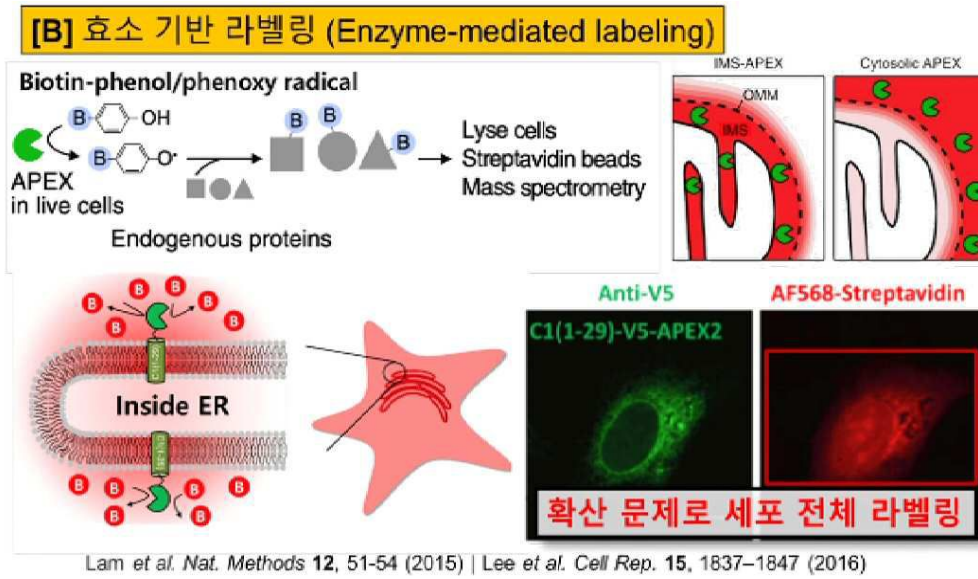
- [0077] (13) Digested peptide 솔루션을 STAGE Tips을 이용하여 Desalting과정을 진행한 후 LC-MS/MS (분석 장비: Thermo-Scientific® Q Exactive Plus equipped with a nanoelectrospray ion source) 분석
- [0078] * STAGE Tips은 다음을 참고하였다: Rappsilber, J., Mann, M., Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Prot.* 2, 1896-1906 (2007).
- [0080] 분석된 단백질들의 결과는 화산 도표(volcano plot)으로 시각화하여, 비교군 대비 검출된 시그널이 2배 이상 ($\log_2(\text{fold change}) > 1$)이며, 반복실험에서의 신뢰도가 95% 이상 ($-\log_2(\text{P-value}) > 1.3$)인 단백질을 선별한 결과, PTBP1의 상호작용 단백질로 알려진 RAVR1, MART3, SFPQ가 검출되었다(도 5).
- [0081] 또한, PTBP1-RAVR1의 상호작용을 확인하기 위해 RAVR1 antibody를 이용하여 PTBP1에서의 광교결합 조건으로 실험을 진행하였을 때, PTBP1을 광촉매(Ir-HTL)가 표적하였을 때 광교차결합이 실제로 RAVR1에서도 발생함을 확인하였으며, 현미경 상의 위치도 PTBP1, RAVR1, 광촉매 각각의 시그널이 잘 겹치는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

도면

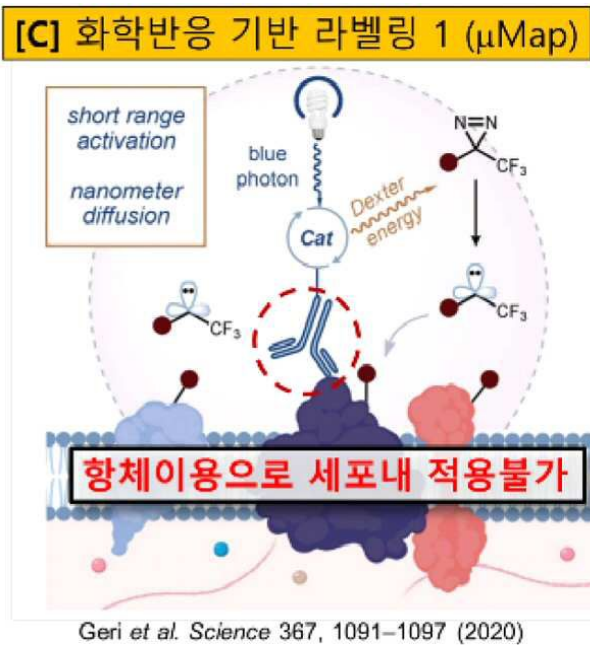
도면1a



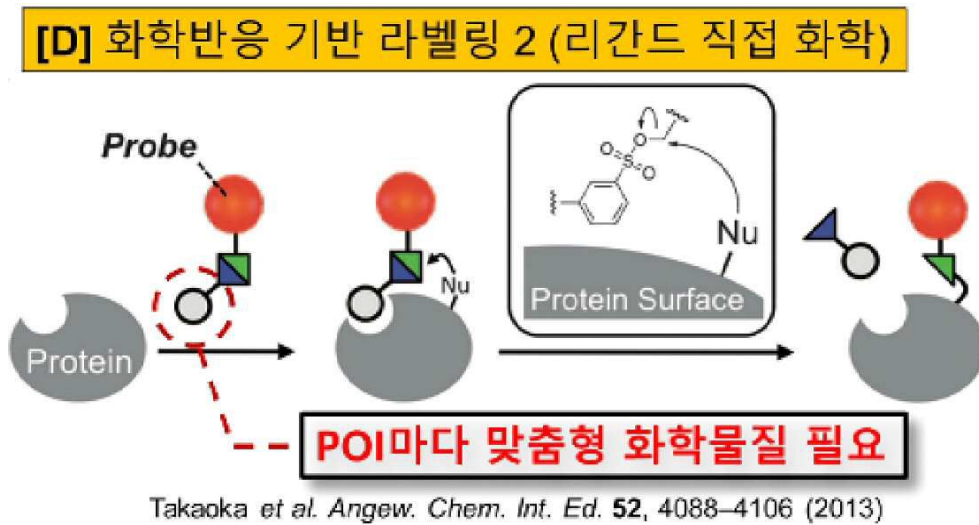
도면1b



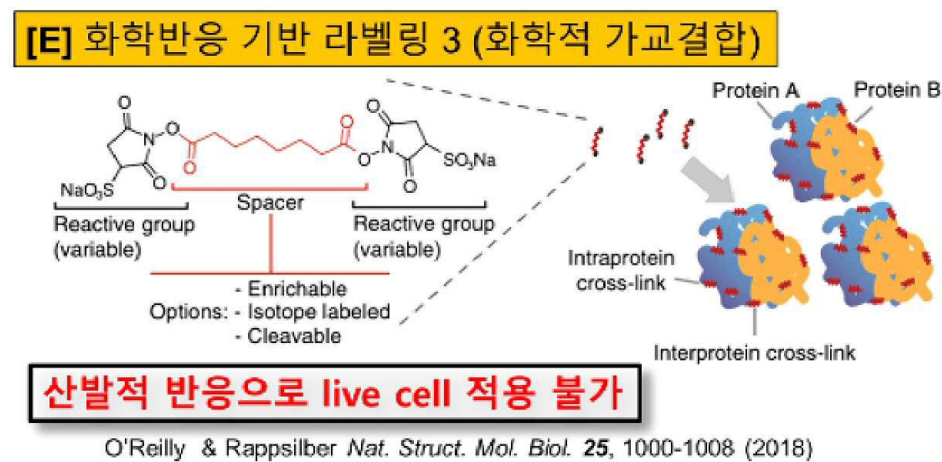
도면1c



도면1d



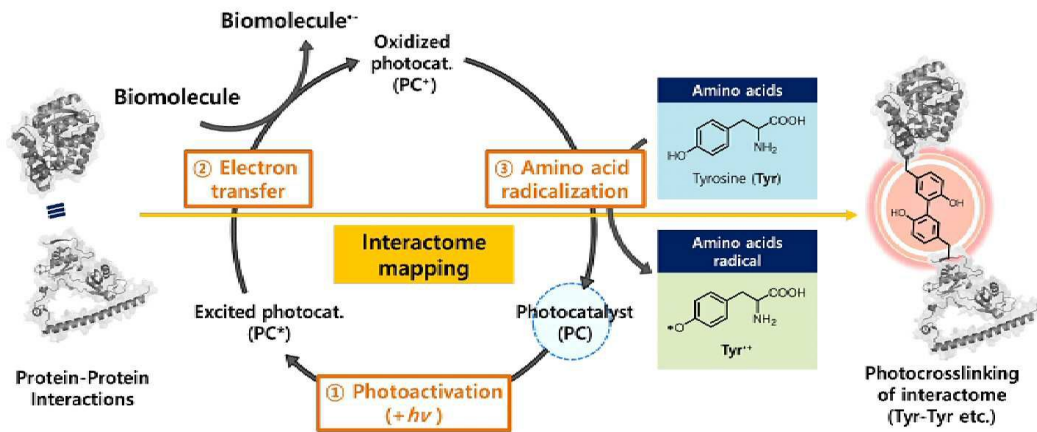
도면1e



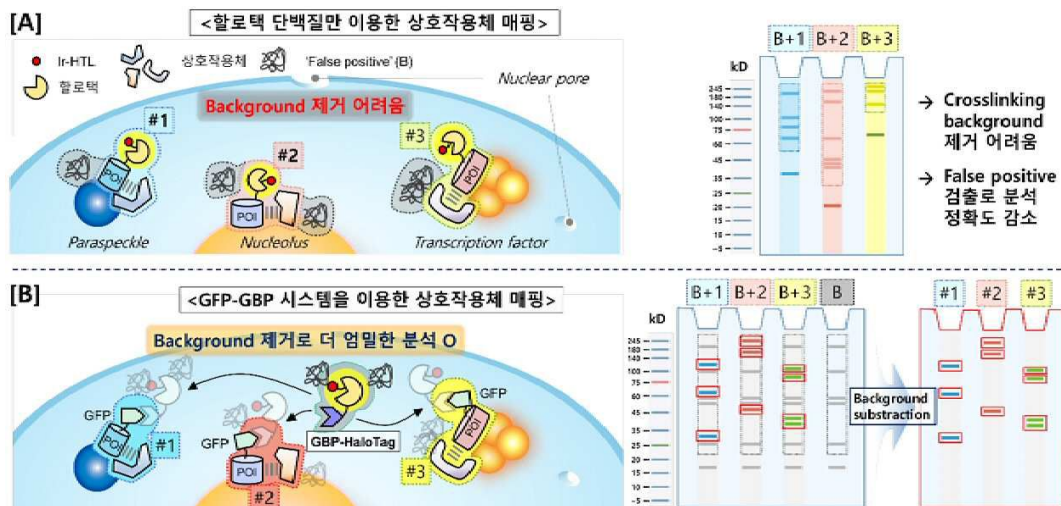
도면1f

상호작용체 라벨링 방법의 필요 조건	면역침강법	효소 기반 라벨링	화학반응 라벨링 1 (μMap)	화학반응 라벨링 2 (리간드 직접화학)	화학반응 라벨링 3 (화학적 가교결합)	광교차결합법 (본연구)
A. 상호작용체 선택성 및 민감성	△	△	○	○	△	○
B. 다양한 POI에 대한 적용 가능성	○	○	×	×	×	○
C. 살아있는 세포에 대한 적용 가능성	×	○	△	○	△	○
D. 시공분해능	△	△	○	○	△	○

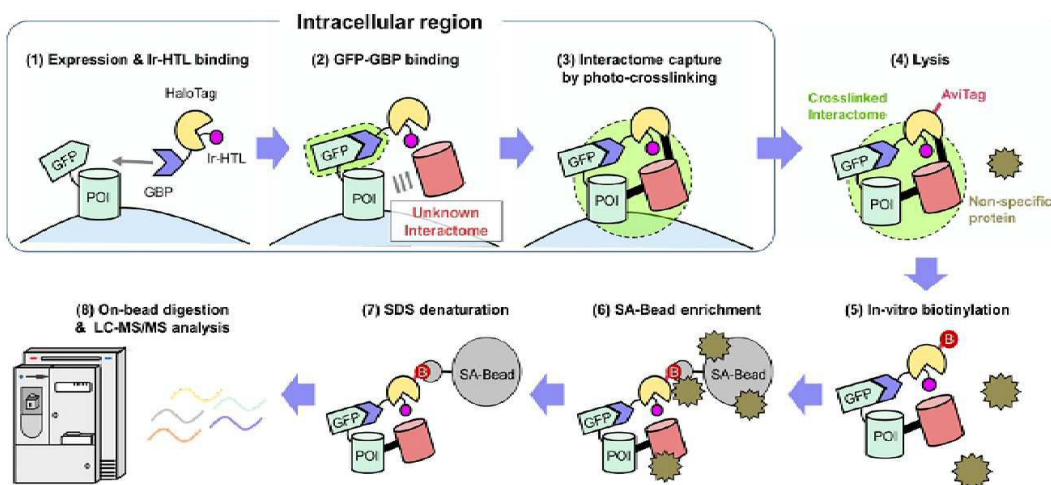
도면2



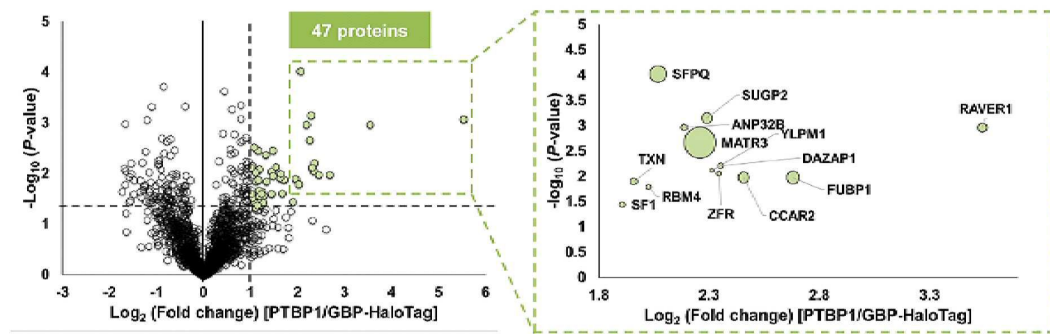
도면3



도면4



도면5



도면6

