



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0010892
(43) 공개일자 2010년02월02일

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0131470

(22) 출원일자 2008년12월22일

심사청구일자 2008년12월22일

(30) 우선권주장

1020080071404 2008년07월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

정태성

경상남도 진주시 신안동 평거현대아파트 201동 106호

노성원

경상남도 진주시 가좌동 1898번지 104호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

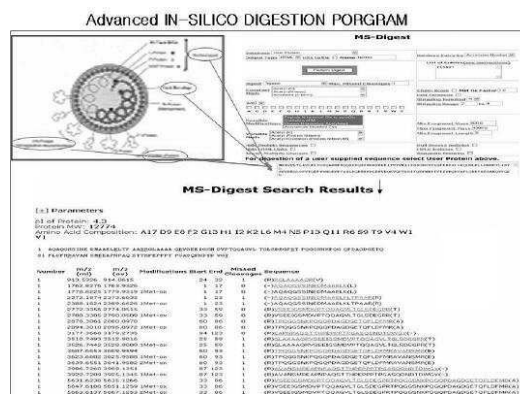
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 바이러스 진단 방법 및 시스템

(57) 요약

본 발명은 (a) 시료를 수득하고, 시료내 바이러스를 용균시키는 단계; (b) 상기 용균된 시료를 특정 프로테아제로 처리하여, 시료내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계; (c) 질량 측정 장치로 상기 시료내 펩타이드의 질량을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된, 공지의 바이러스 단백질 유래 펩타이드의 질량과, 상기 시료내 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 상기 시료 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계를 포함하는 바이러스 진단 방법 및 상기 진단 방법에 이용될 수 있는 바이러스 진단 시스템에 관한 것이다.

대표도 - 도3



도 2

도 4-6 참조

(72) 발명자

장호빈

경상남도 진주시 가좌동 풍경채아파트 105동 905호

차인석

경상남도 진주시 금산면 현대아이파크아파트 109동 1606호

박성빈

경상남도 양산시 소주동 세신아파트 2동 409호

김영림

경상남도 진주시 칠암동 526-6번지 402호

하미애

경상남도 사천시 사천읍 구암리 524 원광이안애아파트 105동 1404호

신용승

경상남도 진주시 금산면 중천리 755-7번지

신기욱

서울특별시 성동구 사근동 293-17번지

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 시료를 수득하고, 시료 내 바이러스를 용균시키는 단계;
 - (b) 상기 용균된 시료를 특정 프로테아제로 처리하여, 시료 내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계;
 - (c) 질량 측정 장치로 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 측정하는 단계; 및
 - (d) 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된, 공지 바이러스 단백질 유래 펩타이드의 질량과, 상기 시료 내 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 상기 시료 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계;
- 를 포함하는 바이러스 진단 방법.

청구항 2

- 제 1항에 있어서,
- 상기 (a) 단계에서, 시료로부터 바이러스를 분리하여 용균하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

- 제 1항에 있어서,
- 상기 (a) 단계에서, 필수성분으로 DTT 및 Triton X-100을 함유한 용균용 완충용액을 처리하여 용균시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

- 제 3항에 있어서,
- 상기 (a) 단계 후, 상기 용균액을 여과시켜 용균용 완충용액의 구성성분을 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

- 제 1항에 있어서,
- 상기 (b) 단계에서, 마이크로파를 추가로 조사하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

- 제 1항에 있어서,
- 상기 (c) 단계에서, 상기 질량 측정 장치는 질량 분석기인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

- 제 1항에 있어서,
- 상기 (d) 단계에서, 상기 프로테아제로 절단된, 공지 바이러스에 특이적으로 존재하는 펩타이드 질량의 세트와 매칭되는, 상기 시료 내 펩타이드의 질량 세트의 존재 여부를 확인함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

- 바이러스 단백질로부터 유래된 펩타이드 질량 정보를 저장하고 있는 데이터베이스;
- 시료 내 펩타이드의 질량을 측정하는 질량 측정 장치; 및
- 측정된 시료 펩타이드의 질량 정보와 상기 데이터베이스의 펩타이드 질량 정보를 대비하여 상기 시료 펩타이드의 바이러스 단백질 정보와 매칭되는 정보의 필터링을 수행하여 측정된 시료 펩타이드의 유래 정보를 확인하는 바이러스 단백질 매칭 필터링부;

를 포함하는 바이러스 진단 시스템.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 질량 측정 장치는 질량 분석기인 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 10

제 8항에 있어서,

시료 수용부; 및

시료 수용부로 프로테아제를 투입하기 위한 프로테아제 저장부;

를 포함한 시료 처리부를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 시료 처리부는

시료 수용부에 마이크로파를 조사하기 위한 마이크로파 발생원을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 12

제 8항에 있어서,

추출된 바이러스 단백질 정보를 토대로 시료에 포함된 바이러스 정보를 출력하는 바이러스 정보 출력 장치;

를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 바이러스 진단 시스템.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 바이러스 정보 출력 장치는,

상기 시료에 포함된 바이러스 정보가 둘 이상인 경우, 각각의 바이러스 정보를 별도로 출력하는 것을 특징으로 하는 바이러스 진단 시스템.

청구항 14

제 8항에 있어서,

상기 데이터베이스, 질량 측정 장치, 바이러스 단백질 추출 장치, 바이러스 정보 출력 장치는 네트워크를 통해 연결되는 것을 특징으로 하는 바이러스 진단 시스템.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 (a) 시료를 수득하고, 시료내 바이러스를 용균시키는 단계; (b) 상기 용균된 시료를 특정 프로테아제로 처리하여, 시료내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계; (c) 질량 측정 장치로 상기 시료내 펩타이드의 질량을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된, 공지된 바이러스 단백질 유래 펩타이드의 질량과, 상기 시료내 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 상기 시료 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계를 포함하는 바이러스 진단 방법 및 상기 진단 방법에 이용될 수 있는 바이러스 진단 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이러스는 DNA 또는 RNA로 이루어진 유전 물질과 단백질로 이루어진 감염체를 말한다. 크기는 종류에 따라 다르지만, 보통 10~1000nm 사이이다. 스스로 신진대사를 할 수 없기 때문에 자신의 DNA 또는 RNA를 세균, 동, 식물과 같은 숙주 세포 안에 침투시킨 후 숙주 세포의 소기관을 이용하여 이들을 복제하고, 자신과 같은 바이러스들을 생산하며 이로 인해 대개 숙주 세포는 파괴된다.

[0003] 일부 바이러스는 숙주에 감염된 경우 바이러스의 종류, 숙주의 면역 상태 등에 따라 질병을 일으키지 않기도 있지만, 일부 바이러스는 급속하게 복제 및 전파되어 숙주를 사망에 이르게 하거나, 경제적으로 막대한 피해를 유발하기도 한다. 최근 국 · 내외적으로 인수 공통 측면에서 커다란 위협 요소가 되고 있는 조류 인플루엔자(Avian Influenza, AI)의 고병원성을 나타내는 H5N1의 경우, 2003년 이후 중국, 태국, 베트남, 인도네시아 등 14개국에서 330명이 감염되어 240명이 사망한 매우 높은 치사율을 나타내었다. 이들 바이러스에 의한 질병에 대하여 즉각적인 치료와 예방 대책을 수립하기 위해서는 매우 신속하고 정확한 진단이 요구된다. 그러나, 이들 질병들을 적절하게 감별진단할 수 있는 진단법이 만족스럽지 않아 경제적으로 막대한 손실을 초래하고 있는 실정이다.

[0004] 현재 바이러스를 진단하는 방법으로는 바이러스 자체, 바이러스의 단백질 및 핵산을 검출하는 진단법으로 종란 접종법, 면역크로마토그래피법 등이 이용되고 있다. 즉, 종란 접종법의 경우 검출의 민감도는 높으나 바이러스를 확인하기 위해서는 2~5일의 실험기간이 필요하고, 면역크로마토그래피를 이용한 진단법은 단시간에 바이러스 단백질을 확인할 수 있으나, 검출 민감도가 낮다는 단점이 있어 간이 진단에는 이용할 수 있으나, 정밀 진단용으로는 부적합하다. 또한, 혈청 검사방법으로 혈구응집억제반응(Haemagglutination inhibition (HI) test), ELISA 반응 등이 이용되고 있으나, 이들 진단법은 병원성을 확인하기 위하여 추가적인 실험이 필요하다.

[0005] 또한, 널리 사용하고 있는 진단법인, 각각의 바이러스의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 사용하여 증합반응이 일어나는지의 여부로 바이러스 유전자의 존재 여부를 결정하는 RT-PCR의 경우, 피검체의 분변이나 장기로부터 추출한 시료 내에 존재하는 폴리사카라이드, 염과 같은 오염물질 및 시료 내에 저/고 병원성 바이러스가 공존함에 따라 가음성(false negative) 결과가 나타날 수 있다. 또한 RT-PCR에 사용하는 프라이머에 따라 병원성/비병원성 균주의 감별이 어렵다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명자는 바이러스를 포함한 시료를 그대로 용균하고 프로테아제 처리한 후 시료내 펩타이드의 질량을 질량 분석기로 측정할 다음 이렇게 측정된 펩타이드의 질량과 공지된 바이러스 단백질로부터 유래된 펩타이드의 질량을 비교함으로써 시료내 바이러스를 신속하고 정확하게 동정할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0007] 따라서, 본 발명은 한 관점으로서, (a) 시료를 수득하고, 시료내 바이러스를 용균시키는 단계; (b) 상기 용균된 시료를 특정 프로테아제로 처리하여, 시료내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계; (c) 질량 측정 장치로 상기 시료내 펩타이드의 질량을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된, 공지의 바이러스 단백질 유래 펩타이드의 질량과, 상기 시료내 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 상기 시료 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계를 포함하는 바이러스 진단 방법을 제공하고자 한다.

[0008] 다른 관점으로서, 바이러스 단백질로부터 유래된 펩타이드 질량 정보를 저장하고 있는 데이터베이스; 시료내 펩타이드의 질량을 측정하는 질량 측정 장치; 및 측정된 시료 펩타이드의 질량 정보와 상기 데이터베이스의 펩타이드 질량 정보를 대비하여 상기 시료 펩타이드의 바이러스 단백질 정보와 매칭되는 정보의 필터링을 수행하여 측정된 시료 펩타이드의 유래 정보를 확인하는 바이러스 단백질 매칭 필터링부를 포함하는 바이러스 진단 시스템을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

[0009] 본 발명은 한 관점으로서,

[0010] (a) 시료를 수득하고, 시료내 바이러스를 용균시키는 단계;

[0011] (b) 상기 용균된 시료를 특정 프로테아제로 처리하여, 시료내 단백질을 펩타이드로 절단하는 단계;

[0012] (c) 질량 측정 장치로 상기 시료내 펩타이드의 질량을 측정하는 단계; 및

[0013] (d) 상기 프로테아제와 동일한 프로테아제로 절단된, 공지의 바이러스 단백질 유래 펩타이드의 질량과, 상기 시료내 펩타이드의 질량을 비교함으로써, 상기 시료 펩타이드가 유래된 단백질을 확인하는 단계를 포함하는 바이러스 진단 방법에 관한 것이다. 이하, 각 단계별로 구체적으로 설명한다.

[0014] **단계 (a) 시료의 수득과 용균**

[0015] 본 발명에서 '시료'는 바이러스 호발 부위 시료 (예, 혈액, 조직, 객담, 뇨, 분변 등), 세포배양을 통해 증식된 시료 및 자연계의 시료를 모두 포함하는 용어이다. 상기 시료는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수득할 수 있다. 채취한 시료는 균질화(homogenation) 및 계단 희석(serial dilution) 과정을 거치는 것이 바람직하다.

[0016] 이렇게 수득한 시료가 진단하고자 하는 바이러스 이외의 많은 불순물을 포함하고 있는 경우에는 이들을 제거하기 위하여 시료로부터 바이러스를 분리하는 단계를 추가로 진행할 수도 있다. 시료로부터 바이러스를 분리하는 단계는 시료로부터 바이러스를 분리할 수 있다면 당업계에 공지된 어떠한 방법든지 이용 가능하다. 한 양태로서, 다양한 작은 펩타이드를 흡착할 수 있는 항체, 레진 또는 비드를 이용하는 방법을 채택할 수 있다. 그러한 방법의 한 예로는 면역자기분리법(Immuno-Magnetic Separation, IMS)이 있다.

[0017] 시료를 그대로 또는 시료로부터 분리된 바이러스를 용균 완충용액으로 처리하거나, 소니케이터, 열 처리 등을 하여 용균시킬 수 있다. 본 발명에서는 용균 완충용액으로 처리하는 것을 예로서 드는데, 이를 위한 완충용액은 Triton X-100 및 DTT (DL-Dithiothreitol)을 함유하는 것이 바람직하다. Triton-100은 비이온성 계면활성제로서 세포 멤브레인의 투과성을 높이는 역할을 하기 때문에 바이러스를 용균시키는데 유용하고, DTT는 3차원 단백질 구조에서 디설파이드 결합을 절단하는 역할을 하여 3차원 구조에 의한 효소 등의 접근의 어려움을 완화시킬 수 있다. 본 발명의 용균 완충용액은 NaCl, Tris-HCl을 추가로 함유할 수도 있다. 이 단계를 통하여 시료 내에 존재하는 바이러스가 용균될 것이다.

[0018] 본 발명에서 단계 (a) 후에 바로 단계 (b)를 실시할 수도 있지만, 이 두 단계 사이에 시료 용균액을 여과하는 단계를 추가할 수도 있다. 이에 의하여 상기 용균액으로부터 용균에 이용된 완충용액의 구성성분 등을 제거하고 질량 측정 장치에 의한 분석을 용이하게 하면서 순수한 분쇄된 바이러스 입자만을 수득할 수 있다.

[0019] **단계 (b) 프로테아제 처리**

[0020] 알려진 바와 같이 프로테아제(protease)는 단백질을 펩타이드로 분해한다. 이 단계에서는 마이크로파 조사를 동반하는 것이 바람직하다. 마이크로파에 의해 발생하는 파장과 높은 온도는 단백질간 분자간 충돌을 유발하여 프로테아제에 의한 바이러스 단백질의 절단이 용이하게 되며, 이 과정에서 나타날 수 있는 단백질의 집합, 즉 단백질의 재결합을 억제함으로써 단백질 절단에 소요되는 시간을 단축시킬 수 있다. 또한, 마이크로파에 의해 단축된 반응 시간은 단백질의 3차원 구조를 풀어줌으로써 단백질 분해 효소의 단백질 작용 부위로의 접근성을 용이하게 하기 위해 처리한 화합물(예, DTT)과 그것에 의해 잘려진 디설파이드 결합의 재결합을 막기 위해 수행하여야 했던 알킬레이션(alkylation) 과정을 불필요하게 하여 반응 시간을 단축시킬 수 있다.

[0021] **단계 (c) 펩타이드 질량 측정**

[0022] 본 발명은 이상과 같이 바이러스 (즉, 바이러스를 구성하는 총 단백질)를 프로테아제로 분해하여 수득한 펩타이드에 대한 질량을 질량 측정 장치로 측정하는 것을 특징으로 한다. 상기 질량 측정 장치로는 질량 분석기를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 질량 분석의 방식으로 MALDI-TOF MS(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of flight Mass Spectrometry) 방식을 이용하고, 예로서 Voyager De STR MALDI-TOF MS를 사용할 수 있다. 그러나 단백질 측정이 가능한 다양한 형태의 Mass spectrometry(MS) 및 MS/MS 종류는 제한적이지 않다. 여기서, 매트릭스로는 예를 들면 시나프산(sinapic acid) 등을 이용할 수 있다. 검출 효율에 영향을 미치는 요인으로는 (1) 지연 시간(delay time, DE) - 레이저 조사 후 다음 조사까지의 시간차(nano second); (2) 그리드 전압(grid voltage, %) - MALDI-TOF MS 진공관 안에서 펩타이드 이온들이 비행하여 검출기에 검출되는 데까지 필요한 에너지의 크기; (3) 질량 범위(Mass Range) - 검출하고자 하는 펩타이드의 질량 범위; (4) 레이저 강도(laser intensity) - 레이저의 조사량 등이 있다. 이러한 요인들은 당업자에 의해 적절하게 설정될 수 있다.

[0023] **단계 (d) 측정된 펩타이드 질량과 공지된 펩타이드 질량의 비교**

[0024] 공지된 바이러스 단백질 유래 펩타이드 질량은 예를 들면 다음과 같이 확보할 수 있다. 프로테아제는 아미노산 서열을 인식하여 특정 부위를 절단하는 효소이다. 따라서, 특정한 아미노산 서열로 이루어진 바이러스

스의 단백질을 지정된 프로테아제로 처리할 경우 수득할 수 있는 펩타이드의 서열이 추정되고, 이 펩타이드의 질량은 아미노산의 질량이 공지되어 있으므로 이를 참조로 하여 계산함으로써 확보할 수 있다. 이렇게 확보한 공지된 바이러스 단백질 유래 펩타이드 질량으로부터 측정된 펩타이드의 질량과 일치하거나 가장 유사한 질량을 갖는 펩타이드를 선별하여 그 질량을 갖는 펩타이드가 어떤 바이러스 단백질로부터 유래된 것인지 확인함으로써 바이러스를 동정할 수 있다.

[0025] 또한, 단계 (d)는 상기 프로테아제로 절단된 공지의 바이러스에 특이적으로 존재하는 펩타이드 질량의 세트와 매칭되는, 상기 시료내 펩타이드의 질량 세트의 존재 여부를 확인함으로써 수행될 수도 있다.

[0026] 본 발명에 따른 바이러스 진단 방법은 하기 구성으로 이루어진 시스템을 이용하여 실시될 수 있다.

[0027] 본 발명의 다른 관점은

[0028] 바이러스 단백질로부터 유래된 펩타이드 질량 정보를 저장하고 있는 데이터베이스;

[0029] 시료내 펩타이드의 질량을 측정하는 질량 측정 장치; 및

[0030] 측정된 시료 펩타이드의 질량 정보와 상기 데이터베이스의 펩타이드 질량 정보를 대비하여 상기 시료 펩타이드의 바이러스 단백질 정보와 매칭되는 정보의 필터링을 수행하여 측정된 시료 펩타이드의 유래 정보를 확인하는 바이러스 단백질 매칭 필터링부를 포함하는 바이러스 진단 시스템에 관한 것이다.

[0031] 본 발명에서 상기 질량 측정 장치는 이에 제한되는 것은 아니지만, 질량 분석기인 것이 바람직하다.

[0032] 본 발명에 적용되는 데이터베이스는 유전자 정보(아미노산 서열 또는 염기서열)를 바탕으로 특정한 바이러스의 단백질을 지정된 프로테아제로 분해한 경우에 수득할 수 있는 펩타이드에 대한 질량을 계산하여 얻은 이론적 질량으로서 저장하도록 구현된 것일 수 있다. 이 때, 펩타이드 질량과 그 펩타이드가 유래된 바이러스의 단백질 명칭, 이용된 프로테아제의 명칭에 대한 정보가 서로 연계되도록 구현한다. 본 발명의 데이터베이스에 포함될 바이러스 단백질과 프로테아제 종류를 제한적이지 않다. 본 발명의 데이터베이스는 추후 미지의 바이러스, 단백질 및 프로테아제에 대한 정보도 포함하여 확장될 수도 있다.

[0033] 본 발명의 바이러스 진단 시스템은 시료 수용부 및 상기 시료 수용부로 프로테아제를 투입하기 위한 프로테아제 저장부를 포함하는 시료 처리부를 추가로 포함할 수도 있다. 상기 시료 처리부는 시료 수용부에 마이크로파를 조사하기 위한 마이크로파 발생원을 더 포함할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 바이러스 진단 시스템은 추출된 바이러스 단백질 정보를 토대로 시료에 포함된 바이러스 정보를 출력하는 바이러스 정보 출력 장치를 추가로 포함할 수 있다. 상기 바이러스 정보 출력 장치는 상기 시료에 포함된 바이러스 정보가 둘 이상인 경우, 각각의 바이러스 정보를 별도로 출력할 수 있다.

[0035] 아울러, 본 발명의 바이러스 진단 시스템에서 데이터베이스, 질량 측정 장치, 바이러스 단백질 추출 장치, 바이러스 정보 출력 장치는 네트워크를 통해 연결되는 것이 바람직하다.

효 과

[0036] 본 발명에 의하면 바이러스를 신속하고 정확하게 진단할 수 있다. 특히, 본 발명에서는 진단하고자 하는 바이러스의 전체 단백질을 프로테아제로 분해함에 있어서, 마이크로파를 조사함으로써 단백질의 펩타이드로의 분해에 소요되는 시간을 현저하게 단축시킴으로써 바이러스를 진단하는데 요구되는 시간도 단축시킬 수 있다. 또한, 바이러스를 진단함에 있어서, 바이러스 용균 후 바이러스 내에 존재하는 비구조적 단백질을 유리시킴으로써 바이러스의 일부 단백질만을 이용하여 진단하는 것이 아니라 전체 단백질을 이용하여 진단하는 것이므로 바이러스의 혈청형 분석, 병원성 분석 및 백신 바이러스 등 다양한 분석도 가능하다. 뿐만 아니라, 사람 유래, 동물 유래 및 식물 유래 바이러스를 동일 또는 유사한 방식으로 진단 가능하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0038] 실시예 1: 시료의 수득

[0039] 뉴캐슬 바이러스에 걸린 것으로 의심되는 닭으로부터 조직, 혈액, 객담, 뇨, 분변의 표본을 수집하여

균질화한 후 계단 희석하여 다음 실시예 2에 적용하였다.

[0040] 실시예 2: 용균(lysis)

[0041] 시료로부터 바이러스를 분리한 후 이 분리된 바이러스의 부분표본(aliquot) 100 μ l 중 10 μ l (농도: 4.811 μ g의 바이러스/ μ l)을 e-tube로 옮기고, 여기에 바이러스 용균용 완충용액[1% Triton X-100(Amresco), 2mM DTT(DL-Dithiothreitol, Promega), 150mM NaCl(Amresco), 10mM Tris-HCl(Amresco), pH: 7.4] 20 μ l를 넣은 후 실온에서 15분간 방치하여 반응시켰다. 후술된 Microcon 이용에 앞서, 최대 산출농도를 위해 470 μ l의 레진 워터를 넣었다.

[0042] 실시예 3: 용균액의 여과

[0043] Micron Centrifugal filter device (YM-3, Nominal molecular weight limit in Dalton; 3,000, Amicon)를 이용하여 여과하여 실시예 2에서 수득한 분쇄된 바이러스 입자와 바이러스 분쇄 완충용액이 혼합된 반응액으로부터 분쇄된 바이러스 입자만을 순수 분리하였다.

[0044] 실시예 4: 마이크로파 조사에 의한 단백질의 분해

[0045] 실시예 3에서 수득한 분쇄된 바이러스 입자 용액 10 μ l에 10mM DTT를 25 μ l 넣고 20분간 가볍게 믹싱하였다. 1ml의 20 μ g 트립신/50mM NH_4HCO_3 에서 20 μ l를 넣은 후 e-tube의 캡에 시린지로 3~4개 정도 천공한 다음 마이크로파(domestic microwave-SAMSUNG RE-442B)에서 10분 동안 조사하였다. 조사 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 식혀준 후 Calibrant(insulin from bovine pancreas, FW=5733, SIGMA) 20 μ l를 넣었다.

[0046] 실시예 5: 본 발명의 방법에 의한 바이러스의 진단

[0047] A. MALDI-TOF 이온화 플레이트 (ID:100)

[0048] 매트릭스로서 시나프산(sinapic acid, Fluka)을 이용하였고, 플레이트 상에서 바이러스 단백질의 타겟팅(targeting) 방법으로는 샌드위치 방법(sandwich method)을 이용하였다.

[0049] 구체적으로, 25% 트리플루오로아세트산 (TFA: MERCK)40 μ l와 레진 워터 960 μ l를 섞어 1% TFA를 제조하였다. 500 μ l의 1% TFA와 500 μ l의 아세토니트릴(ACN:99.93+%HPLC 등급, Sigma Aldrich)을 혼합한 용액에 20mg의 시나프산(sinapic acid, Fluka)을 넣은 후 30분간 볼텍싱한 용액 1 μ l를 이온화 플레이트에 떨어뜨린 후 air-dry 하였다. 이어서, 실시예 5에서 얻은 시료 용액 1 μ l를 떨어뜨렸다. 그리고, 아세톤(99+%, HPLC grade, sigma Aldrich) 990 μ l와 레진 워터 10 μ l 혼합한 용액에 SA 200ml를 넣은 후 볼텍싱한 용액 1 μ l를 떨어뜨린 후 air-dry 하였다.

[0050] B. MALDI-TOF MS의 수행

[0051] Voyager DE STR MALDI-TOF MS reflector mode를 이용하여 지연 시간(DE)은 100ns, 그리드 전압(%)은 68%, 질량 범위는 800~10000, 레이저 강도는 2205로 설정해서 MALDI-TOF MS를 실시하고 질량 스펙트럼을 얻었다.

[0052] 상기 실시예 5에서 측정된 펩타이드의 질량값을 질량 분석 스펙트럼(도 1)과 엑셀 파일 형태 (도 2)로 얻은 후 측정된 질량값을 본 발명의 진단 시스템에 대입하여 진단하였다 (도 3). 진단결과, 뉴캐슬 바이러스의 fusion protein (도 4), 뉴캐슬 바이러스의 matrix protein (도 5), 뉴캐슬 바이러스의 RNA-dependent RNA polymerase(도 6)로 각각 진단되어 뉴캐슬 바이러스로 정확하게 진단할 수 있었다.

산업이용 가능성

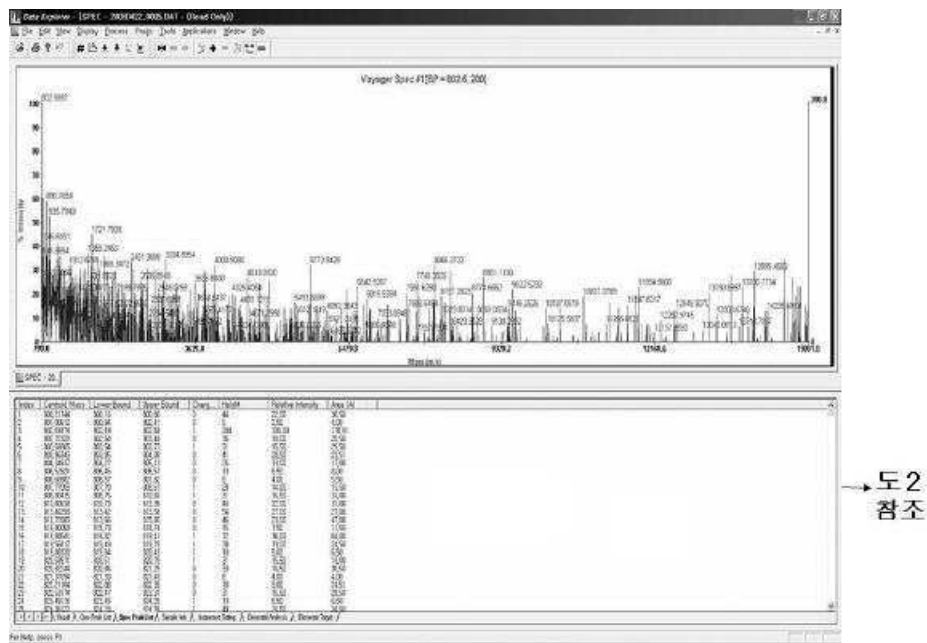
[0053] 본 발명에서는 진단하고자 하는 바이러스의 전체 단백질을 프로테아제로 분해함에 있어서, 마이크로파를 조사함으로써 단백질의 펩타이드로의 분해에 소요되는 시간을 현저하게 단축시킴으로써 바이러스를 진단하는데 요구되는 시간도 단축시킬 수 있다. 또한, 바이러스를 진단함에 있어서, 바이러스의 일부 단백질만을 이용하여 진단하는 것이 아니라 전체 단백질을 이용하여 진단하는 것이므로 바이러스의 혈청형 분석, 병원성 분석 및 백신 바이러스 등 다양한 분석도 가능하다. 뿐만 아니라, 사람 유래, 동물 유래 및 식물 유래 바이러스를 동일 또는 유사한 방식으로 진단 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0054] 도 1은 본 발명에 따라 질량 분석기로 측정된 펩타이드의 질량 분석 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- [0055] 도 2는 본 발명에 따라 질량 분석기로 측정된 펩타이드의 질량값을 엑셀 파일 형태로 나타낸 것이다.
- [0056] 도 3은 본 발명에 따라 질량 분석기로 측정된 펩타이드의 질량값을 본 발명의 진단 시스템에 대입하는 과정을 나타낸 것이다.
- [0057] 도 4는 본 발명의 진단 시스템을 통하여 진단된 결과를 나타낸 것으로, 뉴캐슬병 바이러스가 가장 높은 일치도로 진단되었다.
- [0058] 도 5는 본 발명의 진단 시스템을 통하여 진단된 결과를 나타낸 것으로, 뉴캐슬병 바이러스가 가장 높은 일치도로 진단되었다.
- [0059] 도 6은 본 발명의 진단 시스템을 통하여 진단된 결과를 나타낸 것으로, 뉴캐슬병 바이러스가 가장 높은 일치도로 진단되었다.

도면

도면1



→ 도 2
참조

도면2

Microsoft Excel - 20090422_0006_Spec.ppt

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1	800.2174	800.15	800.86	0	44	22	88.5
2	2	801.0061	800.94	802.41	0	5	25	88.4
3	3	802.5937	802.49	802.68	1	200	100	178.01
4	4	802.7232	802.58	803.46	0	36	19	20.5
5	5	803.5937	803.54	803.77	1	31	16.5	29.6
6	6	803.9635	803.86	804.08	0	41	20.5	28.51
7	7	804.3404	804.27	805.13	0	26	13	17
8	8	806.5262	806.46	806.57	0	13	6.5	8
9	9	806.6008	806.57	807.62	0	8	4	5.5
10	10	807.7721	807.7	806.67	1	26	14	15.5
11	11	808.8044	808.75	810.65	1	31	16.5	31
12	12	810.8083	810.73	813.35	0	44	22	31
13	13	813.4864	813.42	813.68	0	54	27	27
14	14	813.7269	813.66	815.65	0	46	23	47
15	15	815.8007	815.73	816.74	0	15	7.5	11.5
16	16	816.8884	816.82	819.41	1	72	36	64
17	17	819.5682	819.49	819.76	1	36	19	24.5
18	18	819.8834	819.84	820.43	1	10	5	6.5
19	19	820.5661	820.51	820.78	1	31	16.5	19
20	20	820.8224	820.66	821.25	0	33	16.5	30.5
21	21	821.3709	821.33	821.49	0	8	4	5.5
22	22	822.511	822.08	822.39	0	18	9	24.51
23	23	822.5317	822.47	823.37	0	31	15.5	29.5
24	24	823.4913	823.45	824.2	1	13	6.5	6.5
25	25	824.3512	824.26	824.55	1	49	24.5	34.5
26	26	825.728	825.65	830.42	0	13	6.5	19
27	27	830.5309	830.5	832.97	0	26	13	13
28	28	833.0245	832.95	833.7	1	13	6.5	8
29	29	833.6514	833.78	833.94	1	46	23	33
30	30	834.0947	834.01	835.8	0	46	23	28.1
31	31	835.4008	835.36	836.86	0	38	19	23
32	32	837.0211	836.94	838.53	0	20	10	11.5
33	33	836.6643	836.61	842.05	0	11	5	14
34	34	842.195	842.14	842.26	0	26	13	23
35	35	842.3763	842.3	842.58	0	44	22	27
36	36	842.7347	842.65	842.78	0	20	10	11.5
37	37	842.9539	842.79	845.55	0	31	15.5	19
38	38	846.6951	846.64	847.54	1	54	27	37
39	39	847.6715	847.63	847.71	1	10	5	8.5
40	40	847.843	847.79	848.47	1	31	15.5	25.5
41	41	848.6254	848.55	849.27	1	46	23	33
42	42	849.423	849.38	849.71	1	15	7.5	10
43	43	849.8644	849.79	850.15	1	26	13	14.5
44	44	850.3417	850.29	850.29	0	35	17	23
45	45	851.9561	851.79	854.78	0	32	19	28
46	46	854.9017	854.86	855.02	0	13	6.5	6.5
47	47	855.1413	855.1	856.18	0	31	16.5	16.5

도 4-6 참조

도면3

Advanced IN-SILICO DIGESTION PROGRAM

MS-Digest

Protein Name: (Default: Test Protein, 25 kDa, 100% ID, 100% Score)

Enzyme: (Default: Trypsin)

Modification: (Default: None)

Search: (Default: All)

Database: (Default: All)

MS-Digest Search Results

[1] Parameters

Protein Name: **4.3**

Protein MW: **12774**

Amino Acid Composition: **A17 D9 E6 F2 G13 H1 I2 K2 L6 M4 N5 P13 Q11 R6 S9 T9 V4 W1**

1. Amino Acid Composition: A17 D9 E6 F2 G13 H1 I2 K2 L6 M4 N5 P13 Q11 R6 S9 T9 V4 W1

2. Amino Acid Composition: A17 D9 E6 F2 G13 H1 I2 K2 L6 M4 N5 P13 Q11 R6 S9 T9 V4 W1

Number	MS/MS	MS/MS	Modifications	Start End	Mass	Sequence	
1	915.5926	914.0615		24	39	1	CPVGLAAAGDQV
2	1762.8276	1761.9326		1	37	8	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
3	1778.6225	1777.9319	Met	1	27	8	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
4	2278.1874	2277.6028		1	23	4	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
5	2388.1824	2387.6628	Met	1	23	4	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
6	2779.3368	2774.0615		33	60	8	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
7	3180.3305	3180.0509	Met	33	60	8	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
8	2876.3061	2860.0470		60	86	8	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
9	2999.3010	2995.0972	Met	60	86	8	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
10	3174.3060	3175.8795		84	103	8	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
11	3616.9493	3613.9016		25	89	1	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
12	3626.7442	3629.9009	Met	25	89	1	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
13	3887.6858	3886.9444		80	98	1	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
14	3920.6488	3923.9988	Met	80	98	1	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
15	3930.6584	3931.9988	Met	80	98	1	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
16	3994.7240	3989.1361		87	103	1	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
17	3990.7289	3985.1345	Met	87	103	1	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
18	5531.6230	5531.1066		33	86	1	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
19	5547.6180	5551.1259	Met	33	86	1	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV
20	5562.6127	5567.1329	Met	22	95	1	CPVGLAAAGDQVCPVGLAAAGDQV

도 2

도 4-6 참조

