



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년10월16일
(11) 등록번호 10-0863466
(24) 등록일자 2008년10월08일

(51) Int. Cl.

C12M 1/00 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0080131

(22) 출원일자 2007년08월09일

심사청구일자 2007년08월09일

(56) 선행기술조사문헌

Plant Physiol.(1980) Vol.66, pp442-445*

KR100276837 B1

US5110733 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김찬화

서울 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교 생명공학원 416호

박승아

서울 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교 생명공학원 특수동109호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤여강, 이문섭

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 정재철

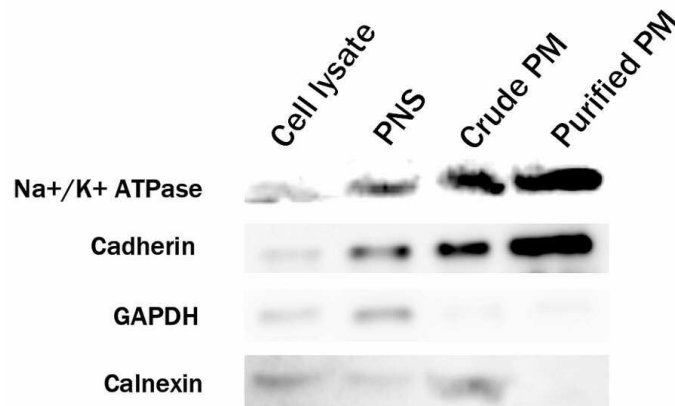
(54) 동물세포로부터 세포막 단백질의 분리 방법

(57) 요약

본 발명은 동물세포로부터 세포막 단백질을 정제하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 Percoll을 이용한 초원심분리와 수성 이성분계 추출(aqueous two-phase extraction)의 두 단계 방법을 이용하여 적은 양의 세포에서도 우수한 질과 양의 세포막 단백질을 분리할 수 있는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 세포막 자체의 양이 적고, 강한 소수성 때문에 그의 분리 및 정제가 어려웠던 세포막 단백질을 저렴하면서도 빠르게 정제할 수 있다. 이 방법은 세포막 수용체, 세포의 형태 및 이동을 이해하는 데 중요한 연구를 편리하게 수행할 수 있다.

대표도 - 도3a



(72) 발명자

김미령

서울 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교 생명공학
원 416호

한기연

서울 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교 생명공학
원 특수동109호

특허청구의 범위

청구항 1

동물세포를 파쇄한 후 원심분리하여 핵을 다운시키는 단계; 상기 핵을 제거하고 난 상등액을 퍼콜(Percoll)를 이용하여 초원심분리시키는 단계; 및 상기 퍼콜에 형성된 조 세포막(crude PM) 밴드를 뽑아낸 후 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)과 덱스트란(dextran)의 이성분계 추출(two-phase extraction) 방법을 이용하여 세포막(PM) 단백질을 추출하는 단계를 포함하는, 동물세포로부터 세포막 단백질의 분리 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 동물세포의 파쇄는 균질기(homogenizer)를 이용하는 것을 특징으로 하는 동물세포로부터 세포막 단백질의 분리 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 퍼콜은 25-35%(W/V) 퍼콜을 사용하는 것을 특징으로 하는 동물세포로부터 세포막 단백질의 분리 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 이성분계 추출 방법은 6-7%(W/V)의 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)과 6-7%(W/V)의 덱스트란(dextran)을 사용하는 것을 특징으로 하는 동물세포로부터 세포막 단백질의 분리 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 이성분계 추출 방법은 폴리에틸렌글리콜과 덱스트란의 혼합물과 조세포막 물질을 넣은 튜브와 폴리에틸렌글리콜과 덱스트란의 혼합물과 포타슘포스페이트 용액을 넣은 튜브를 원심분리하고, 양 튜브의 상층부를 서로 바꿔서 혼합한 다음 다시 원심분리한 후, 상층부만을 모아 초원심분리하여 세포막 단백질을 다운시키는 것을 특징으로 하는 동물세포로부터 세포막 단백질의 분리 방법.

청구항 6

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 동물세포로부터 세포막 단백질을 정제하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 Percoll을 이용한 초원심분리와 수성 이성분계 추출(aqueous two-phase extraction)의 두 단계 방법을 이용하여 적은 양의 세포에서도 우수한 질과 양의 세포막 단백질을 분리할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 세포막 단백질은 세포의 기능을 하는데 중요한 역할을 한다. 물질 및 에너지 교환을 하고, 신호전달을 하는데 첫 번째 단계이며 세포간 또는 세포와 환경의 상호작용을 하는데 필수적이다. 특히 이 발명에서는 줄기세포를 직접 적용하여 확인하였으며, 줄기세포의 증식과 분화와 연관된 신호전달 수용체를 찾는 연구에 중요한 역할을 하는 방법이라 할 수 있다. 실제로 중간엽 줄기세포를 이식한 4일후에 99%의 세포가 죽는 것으로 확인되었고, 이는 이식한 세포와 이식받은 사람의 세포의 부착정도가 결정한다. 이를 anoikis라 하며 세포의 죽음을 극복하기 위해서 세포막에 있는 단백질의 분포가 어떻게 다른지 알아볼 필요성이 제기되고 있다. 게다가 세포막 단백질의 반 이상이 의약품 원료물질의 대상이고, 최근 개발되는 치료용 단클론 항체의 대상이기도 하다. 그러므로, 세포막 단백질의 연구는 필수적이라 할수 있다.
- <3> 많은 연구자들이 이런 중요성에 입각해 세포막 단백질을 연구하려고 하고 있으나, 준비하는데 많은 문제점을 가지고 있다. 첫째, 세포막은 많은 지방과 당을 가지고 있어서 정제하기가 어렵다. 그리고, 위의 특성 때문에 정

제과정 중에 상당한 양을 잃어버린다는 점이다. 또 다른 문제점은 세포막 단백질 자체의 양이 워낙 적어서 충분한 양의 세포막 단백질을 얻어낼 수 없다. 현재, 이를 위해 많은 양의 세포와 배지, 시간, 노동력이 들어가서 보통 동물에서 분리한 조직에서는 연구가 많이 이루어져도 세포수준에서는 그보다 연구의 수가 적다.

- <4> 현재 세포막 단백질을 분리하는 방법으로는 biotin을 부착시켜서 세포를 깨고 biotin이 붙은 세포막을 얻어내는 것인데, 이는 정제능이 아주 높지만, 한 번에 얻어낼 수 있는 양이 그 다음 단계로 실험하기에 상당히 부족한 편이다. 또한 biotin의 가격도 비싸다. 또 다른 방법으로는 초원심분리기를 사용하여 분리하는데, 농도구배 분리배지를 보통 sucrose를 사용한다. 이는 작업 시간이 오래 걸리고, sucrose를 여러 농도를 따로 만들어야 하는 불편함이 있다.
- <5> 이에, 본 발명자들은 이러한 단점을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 30% percoll을 이용한 초원심분리와 two-phase extraction 의 두 단계만으로도 세포막 단백질의 좋은 수득률과 순도를 나타냈으며, 그 외에 다른방법과 비교해 편리성과 시간 절약을 나타내는 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <6> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 세포수준에서 수득률과 순도가 높은 세포막 단백질의 분리 방법을 제공하는 데 있다.
- <7> 본 발명의 다른 목적은 상기 세포막 단백질에 대한 정제키트를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <8> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 동물세포를 파쇄한 후 원심분리하여 핵을 다운시키는 단계; 상기 핵을 제거하고 난 상등액을 퍼콜(Percoll)을 이용하여 초원심분리시키는 단계; 및 상기 퍼콜에 형성된 조 세포막(crude PM) 밴드를 뽑아낸 후 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)과 텍스트란(dextran)의 이성분계 추출(two-phase extraction) 방법을 이용하여 세포막(PM) 단백질을 추출하는 단계를 포함하는, 동물세포로부터 세포막 단백질의 분리 방법을 제공한다.
- <9> 본 발명에 있어서, 상기 동물세포의 파쇄는 동물세포의 세포막을 파괴할 수 있는 어떤 방법도 사용될 수 있으나, 바람직하게는 균질기(homogenizer)를 이용하는 것을 특징으로 한다.
- <10> 본 발명에 있어서, 상기 퍼콜은 농도구배를 만들 수 있는 어떤 농도의 퍼콜도 사용될 수 있으나, 바람직하게는 25-35%(W/V) 퍼콜을 사용하는 것을 특징으로 한다.
- <11> 본 발명에 있어서, 상기 이성분계 추출 방법은 Albertson에 의해 발견된 단백질의 추출방법으로서 친수성 고분자인 텍스트란이나 폴리에틸렌글리콜을 첨가하면 서로 섞이지 않는 두개의 수용액상을 형성하는데 단백질은 표면물성에 따라 PEG가 풍부한 위쪽상에 혹은 텍스트란이 풍부한 아래쪽상에 우세하게 용해될수 있다. 본 발명에서는 세포막 단백질이 주로 위쪽의 PEG 층에 용해된다.
- <12> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 이성분계 추출 방법은 6-7%(W/V)의 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)과 6-7%(W/V)의 텍스트란(dextran)을 사용하는 것을 특징으로 한다. 또한, 바람직하게는 Dextran은 분자량 400-600, PEG (polyethylene glycol)는 분자량 3200-3500의 물질을 사용하는 것이 본 발명의 two-phase extraction에 유리하다.
- <13> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 이성분계 추출 방법은 폴리에틸렌글리콜과 텍스트란의 혼합물과 조세포막 물질을 넣은 튜브와 폴리에틸렌글리콜과 텍스트란의 혼합물과 포타슘포스페이트 용액을 넣은 튜브를 원심분리하고, 양 튜브의 상층부를 서로 바꿔서 다시 원심분리한 후, 상층부만을 모아 초원심분리하여 세포막 단백질을 다운시키는 것을 특징으로 한다. 상기와 같이 2개의 튜브를 사용한 후 상층부를 서로 바꿔줌으로써 이성분계 추출 방법을 2번 반복함으로써 세포막 단백질의 회수율(yield) 및 순도(purity)를 더욱 높일 수 있다.
- <14> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 핵을 제거한 세포 파쇄물로부터 조세포막 물질을 분리하기 위한 퍼콜(Percoll) 및 조 세포막 물질로부터 이성분계 추출방법에 의해 세포막 단백질을 분리하기 위한 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)과 텍스트란(dextran)을 포함하는 세포막 단백질 정제 키트를 제공한다.
- <15> 본 발명에서, hMSCs란 사람 중간엽 줄기세포 (human mesenchymal stem cell)이며 연구의 재료로 쓰였다.

- <16> A375 cell이란 human melanoma cell 로써 hMSCs와 다른 조직의 재료로 쓰였다.
- <17> PNS (post nuclear supernatant)란 핵을 제거하고 난 다음의 부유액을 말하고, 세포막 분리과정의 중간단계 생산물이다.
- <18> crude PM (plasma membrane)은 초원심 분리기를 사용한 후에 세포막 특이적인 밀도에서 얻어낸 분리과정의 중간 단계 생산물이다.
- <19> purified PM 은 crude PM을 얻어낸 이후 two-phase extraction을 거치고 완전히 정제된 생산물을 말한다.
- <20> Percoll은 초원심 분리시 밀도 배지로 사용하고, 원심력이 작용함과 동시에 밀도를 스스로 형성하는 장점이 있다.
- <21> Dextran 500은 이 중합체의 분자량이 500이란 뜻으로 본 발명의 two-phase extraction에 이용하는 물질로써 가장 바람직하다.
- <22> PEG (polyethylene glycol)3350은 분자량이 3350이란 뜻으로 본 발명의 two-phase extraction에 이용하는 물질로써 가장 바람직하다.
- <23> 본 발명은 percoll을 농도구배 배지로 이용하여 초원심 분리를 하고 이어서 PEG와 Dextran을 이용한 two-phase extraction 두 단계로 형성된다. 샘플은 각각 다른 조직인 hMSCs와 A375에서 반복 실험한다.
- <24> 본 발명의 순도 측정을 위해, 본 발명은 세포를 파쇄후 균질화 시킨 전체 세포 용해물 (whole cell lysate)과 핵을 제거하고 난 PNS, 초원심 분리를 하고 난 crude PM, 초원심 분리와 two-phase extraction을 한 purified PM 을 샘플로 하고 세포막 마커와 세포내 소기관의 마커를 항체로 하여 western blotting 을 하였다.
- <25> 본 발명의 수득률 측정을 위해, 전체 세포 용해물과 PNS, crude PM, purified PM을 샘플로 하여 전체 단백질 양을 측정하였다.
- <26> 본 발명의 이물질 오염정도 측정을 위해, 이차원(2-D) 전기영동으로 지방과 당의 함유정도를 확인하였다.
- <27> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 수득률, 순도 뿐만 아니라 편리성과 시간과 비용절약면에서 세포막 분리 정제 키트를 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <28> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- <29> 실시예 1: 시료준비 (Sample preparation)
- <30> hMSCs는 국립 보건원 연구실에서 받았고, A375는 ACCT에서 구입을 하였으며, 두 세포를 10% FBS, 1% Gentamicin를 포함한 각각 alpha-MEM과 DMEM에서 키우고, 조건은 37도에서 5%의 이산화탄소 농도였다. 모두 gibco제품을 사용하였다.
- <31> 80% 정도 dish에 찻을때 scraper로 세포를 모아 dounce 균질기로 30번정도 동일한 힘으로 피스톤 운동을 해주어 세포를 파쇄시킨다. 그 후 1000 x g에서 10분 동안 원심분리를 하면 핵은 pellet으로 하층부에 가라앉으므로 상층부에 있는 PNS를 조심스럽게 얻어낸다.
- <32> 실시예 2: PM 분리방법
- <33> 가. percoll을 이용한 초원심분리
- <34> 30%(W/V) percoll을 미리 만들어서 4℃에서 하루정도 보관을 한 후, SW 28Ti tube에 23ml을 담는다. 그 위에 10ml의 PNS를 조심스럽게 올린다. Beckman SW 28 Ti bucket에 장착을 한후 84,000 x g에서 35분동안 4℃조건으로 초원심분리를 한다. crude PM은 튜브의 바닥에서 5cm 정도 되는 부근에 밴드를 형성하게 된다. (도 1)
- <35> 나. Two-phase extraction
- <36> Dextran 500 6.6%(w/v)는 미리 만들어 놓은 20% Dextran 500 (GE healthcare)로부터 희석하여 사용하고, PEG 3350 6.6%(w/v)는 미리 만들어 놓은 40% PEG 3350(sigma-aldrich)로부터 희석하여 사용한다. 두 중합체 용액을 섞는데, 희석액은 sucrose 용액 (0.25M sucrose, 5mM potassium phosphate, pH7.2)로 한다. 두 개의 튜브를 준

비하여 한 튜브에는 위의 섞인 용액 14g과 crude PM 2g을 넣고, 다른 튜브에는 위의 섞인 용액 14g과 0.2M potassium phosphate 용액 (pH 7.2)을 넣어서 40번정도 뒤집어 준다. 두 개의 튜브를 원심분리기에 넣고 750 x g로 10분동안 4℃에서 돌려준다. 각 튜브는 두 개의 층이 생기는데, 서로의 상층부를 바꿔서 40번 정도 뒤집어 주고, 다시 750 x g로 10분동안 4℃에서 돌려준 후 상층부만 모아 초원심 분리기 튜브에 넣어준다. 그의 5배 정도 되는 1mM sodium bicarbonate buffer를 넣어 100,000 x g에게 2시간 동안 돌려주면 purified PM protein이 pellet으로 튜브의 하층부에 떨어진다. (도 2)

<37> 실시예 3: Western blotting

<38> 가. SDS-PAGE 전기영동: hMSCs와 A375 의 세포막 분리단계마다 (cell lysate, PNS, crude PM, purified PM) 샘플을 모아 각 10 μ g을 12.5% SDS-PAGE 전기영동을 실시한다. 각 샘플에 6X SDS-PAGE loading 완충액 (60 mM Tris-Cl, 2% SDS, 25% Glycerol, 14.4 mM 2-Mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue, pH 6.8) 을 섞어 mini gel (6×8 cm)에서 분자량별(separating gel상에서 120 V로 내린다.)로 분리한다. 이때 사용한 running 완충액의 조성은 0.025 M Tris-Cl, 0.192 M Glycine, 1% SDS(pH 8.3)이다.

<39> 나. Blotting: SDS-PAGE가 끝난 뒤 gel의 단백질을 Semi-dry 형태의 transfer kit(Bio-rad)을 이용하여 NitroCellulose 막으로 transfer시킨다. 50 mA에서 1 시간 30 분 동안 실시한다.

<40> 다. 항체반응: 세포막 마커인 Na/K+ ATPas와 cadeherin, ER 마커인 calnexin, 세포질 마커인 GAPDH를 대상으로 하여 실시한다. Membrane을 5% w/v nonfat dry milk로 실온에서 1시간 동안 blocking시킨다. 일차 항체로는 plasma glutathione peroxidase을 사용하고 plasma glutathione peroxidase은 monoclonal antibody이다. Plasma glutathione peroxidase의 antibody를 4℃에서 24시간동안 반응시킨다. 일차항체의 희석농도는 1/500으로 한다. TBS/T(0.1%, Tris-buffered saline-tween 20)로 washing한 후에 이차 항체로 실온에서 1시간 반응시킨다. 이차항체는 anti-mouse를 사용하고, 희석농도는 anti-mouse는 1/10,000이었다. 이차항체 반응 후에 TBS/T로 세척하고 난 뒤, ECL (Pierce Biotechnology, Inc., USA.)로 가시화 시킨다.

<41> 실시예 4: 이차원 전기영동 (Two dimensional electrophoresis)

<42> 가. 일차원 전기영동(Isoelectrofocusing, IEF):

<43> 시료 완충액으로 처리된 purified PM 단백질 양을 40 μ g과 100 μ g으로 두 그룹으로 나누고, crude PM 단백질 양을 40 μ g으로 하여 일차원 전기영동을 실시한다. 시료의 총 부피가 450 μ l가 되게 rehydration 완충액(8 M urea, 2% CHAPS, 13mM DTT, 1 % IPG buffer)을 섞어 일차원 전기영동을 할 수 있는 24 cm strip holder에 넣은 뒤 pH 4-7 범위의 Drystrip(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 strip holder에 장착한다. 20℃에서 5시간 가량 strip을 rehydration 완충액으로 불려준 뒤 다음과 같은 조건으로 일차원 전기영동을 수행한다: 200 V 30분, 500 V 1분, 8,000 V 45분, 8,000 V 72000 Vhrs, 11시간 30분. 총 146 kVhr. 일차원 전기영동은 IPGphor(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 수행했다.

<44> 나. 이차원 전기영동(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE):

<45> 일차원 전기영동이 끝난 strip을 이차원 전기영동을 하기 위해 일차원 전기영동이 끝난 strip을 cap tube에 넣고 일차 평형화 용액[6 M urea, 50 mM Tris-cl(pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS, 1% DTT] 10 ml에 15분간 반응시킨 후 버리고, 다시 이차 평형화 용액 [6 M urea, 50 mM Tris-cl(pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS, 1.5% IAA] 10 ml을 넣고 10분간 재 반응한다. 11~16%로 만들어진 Polyacrylamide 젤(25×30 cm) 위에 반응이 끝난 strip을 장착하고 0.5% 아가로우즈로 sealing한다. 이차원 전기영동은 Ettan Dalt(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 전기영동 완충액(24 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)을 넣고 전기영동을 실시한다. 전기영동 조건은 다음과 같다: 70 V 1시간, 180 V 2시간, 360 V 2시간, 430 V 3시간 30분.

<46> 다. 염색(Staining):

<47> 이차원 전기영동이 끝난 뒤 젤을 가시화 시키기 위해 silver 염색을 한다. Silver 염색과정은 다음과 같다. 50% methanol, 12% acetic acid로 이루어진 용액에 3시간 가량 반응시켜 고정화 (Fixation)하고, 50% ethanol로 20분간 3회 세척(Washing)하고, 0.2% Sodium thiosulfate 용액으로 1분간 반응시켜 민감화(Sensitizing)하고, D.W.로 세척(Washing)하고, 0.1% Silver nitrate, 0.075% formaldehyde(37%) 용액으로 20분간 반응시켜 반응화 (Improving)하고, D.W.로 다시 세척(Washing)하고, 미리 차게 만든 6% Sodium carbonate, 0.075% formaldehyde(37%) 용액으로 약 7분간 반응시켜 가시화(Developing)하고, 50% methanol, 12% acetic acid 용액으로 처리하여 반응을 정지시킨다.

<48> 상기와 같이 이차원 전기영동실험을 수행한 결과, 다음과 같이 purified PM 단백질이 많이 농축 되었고, 상대적으로 다른 세포소기관의 단백질은 적게 검출 됨을 확인하였다.

<49> 1. 정제 단계마다 PM이 농축된 정도

<50> hMSCs의 전체 세포 용해물 (whole cell lysate), PNS 단백질, crude PM 단백질, purified PM 단백질을 샘플로 하여 western을 한 결과 세포막 단백질 마커인 Na/K ATPase 와 Cadeherin band는 purified PM에서 상당히 진하게 검출 되었고, 소포체 마커인 Calnexin과 세포질 마커인 GAPDH는 purified PM에서 거의 band를 보이지 않았다. (도 3a) 다른 조직인 A375의 전체 세포 용해물, PNS 단백질, Purified PM에서의 Na/K ATPase western 도 같은 결과를 보여주었다. (도 3b) 위의 결과를 이미지 분석을 통하여 통계학적 수치로 나타낸 도 3c에서 보는 것처럼 세포막 단백질은 전체 세포 용해물과 비교해 purified PM에서 26배로 농축되었음을 확인하였고, 유의 확률 0.01내에 포함된다.

<51> 2. 정제 단계마다 얻어진 단백질의 양

<52> hMSCs의 전체 세포 용해물 (whole cell lysate), PNS 단백질, crude PM 단백질, purified PM 단백질을 샘플로 하여 단백질 정량을 한 결과 표 1에서와 같이 Purified PM 단백질의 양은 전체 세포 용해물에 대해 2.74%로 측정이 돼 보통 세포막 단백질의 분포(1.2 ~ 4%)와 유사한 수치를 보여주었다.

<53> [표 1]

	Volume (ml)	Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Total protein (mg)	Yield (%)*
Cell lysate	20.0	0.968 ± 0.04	19.3 ± 0.80	100.0
PNS	20.0	0.708 ± 0.06	14.2 ± 1.20	73.6
Crude PM	6.0	0.306 ± 0.04	1.8 ± 0.24	9.3
Purified PM	0.5	1.060 ± 0.11	0.5 ± 0.05	2.6

<54> 3. 제거된 purified PM 단백질의 제거된 지방과 당의 오염 정도

<55> crude PM 단백질은 도 4a에서 보는 것처럼 분석하기가 불가능할 정도로 지방(lipid) 등 다른 이물질이 많음을 확인하였고, 40 μg 의 purified PM 단백질은 도 4b에서 보는 것처럼 지방과 당이 어느정도 제거됨을 확인하였다. 심지어 100 μg 의 purified PM 단백질도 도 4c에서 보는 것처럼 분석이 가능하다.

산업이용 가능성

<57> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명의 결과로 얻어진 세포막 단백질은 약 2.74%의 양으로 26배 농축되었음을 확인하여 percoll을 이용한 초원심 분리와 two-phase extraction 두 단계만으로도 좋은 수득물과 순도를 나타냄을 확인하였다. 본 발명의 분리 방법은 작업 시간이 4시간 이내로 농도구배배지로 sucrose를 사용하는 것보다 시간이 절약되고, biotinylation 시키는 방법에 비해 한 번에 많은 세포막단백질 양을 얻을 수 있으며, 가격이 저렴하다. 분리방법의 두 단계만으로도 많은 양의 지방과 당을 제거 할 수 있으므로 세포막 단백질 정제 키트 개발에 이용 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<58> 도 1은 percoll을 이용한 초원심분리기 사용 전 후의 사진이다.

<59> 도 2는 two-phase extraction의 실험 모식도 이다.

<60> 도 3a는 인간 골수 중간엽 줄기세포(human mesenchymal stem cell) 로부터 분리 단계마다 세포막 단백질이 얼마나 농축되었고, 다른 세포소기관의 오염이 얼마나 줄었는지를 확인하는 western blotting 이미지이고,

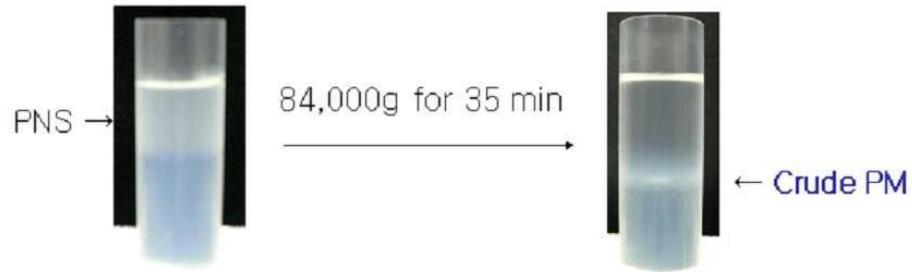
<61> 도 3b는 인간 피부 암세포 (human melanoma A375) 로부터 세포막 단백질이 얼마나 농축되었는지를 확인하는 western blotting 이미지이고,

<62> 도 3c는 세포막 단백질이 얼마나 농축되었는지를 통계 프로그램을 이용하여 보여주는 그래프이다.

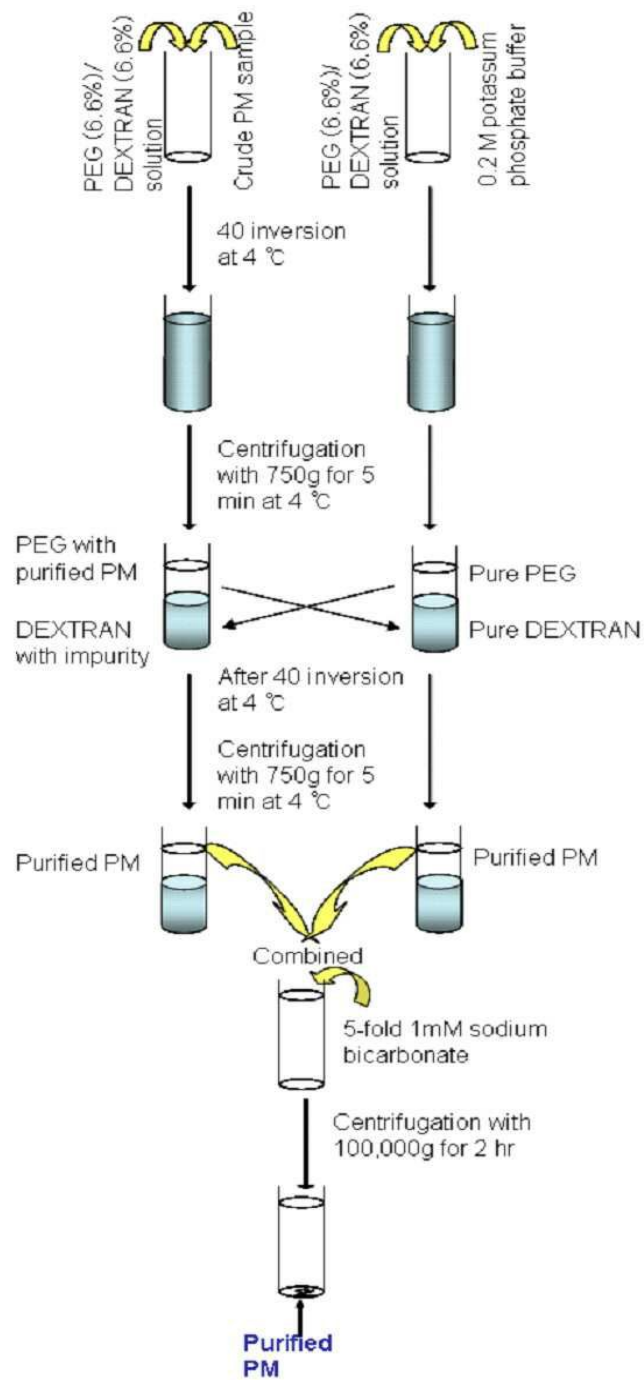
<63> 도 4는 분리된 세포막 단백질의 지질 제거 정도를 나타내는 2D 전기영동 이미지이다.

도면

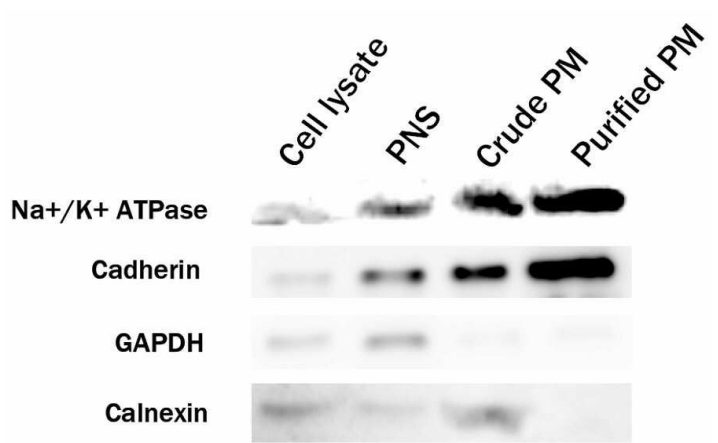
도면1



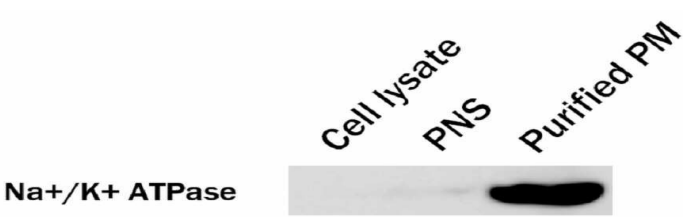
도면2



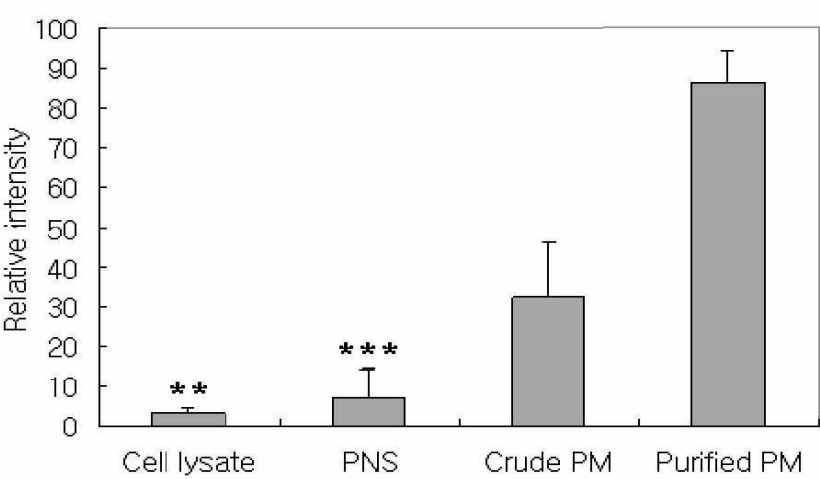
도면3a



도면3b



도면3c



도면4

