(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2010 년 7 월 22 일 (22.07.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/082743 A2

(51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) *C07K 1/26* (2006.01)
G01N 33/60 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2010/000147

(22) 국제출원일: 2010 년 1 월 11 일 (11.01.2010)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2009-0002900 2009 년 1 월 14 일 (14.01.2009) KR
10-2009-0095903 2009 년 10 월 9 일 (09.10.2009) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY)** [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내, 446-701 Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **하상수 (HAH, Sang Soo)** [KR/KR]; 경기도 남양주시 도농동 부영그린타운 아파트 210 동 1201 호, 472-792 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **유수미 (YU, Su Mi)**; 서울특별시 강남구 역삼동 601-18 은성빌딩 5 층, 135-080 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

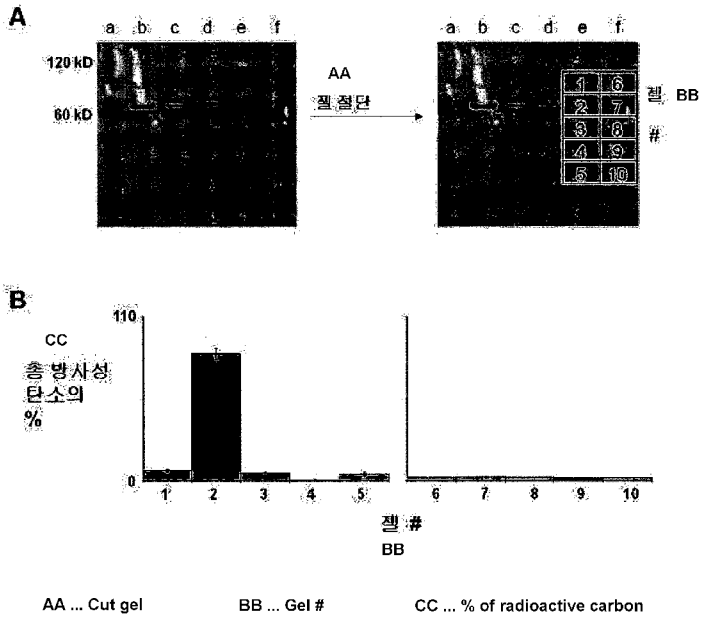
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: METHOD FOR CHECKING AND QUANTIFYING PROTEIN-LIGAND INTERACTION BY COMBINING A CROSSLINKING METHOD AND ACCELERATOR MASS SPECTROSCOPY

(54) **발명의 명칭** : 가교결합과 가속 질량 분석법의 조합에 의한 단백질-리간드 상호작용의 확인 및 정량화 방법

[Fig. 1]



AA ... Cut gel BB ... Gel # CC ... % of radioactive carbon

(57) **Abstract**: The present invention provides a novel method for quantifying the production of a protein-ligand composite. Further, the present invention provides a method for checking and quantifying in vitro and in vivo protein-DNA interaction by combining a crosslinking method and accelerator mass spectroscopy. Further, the present invention provides a method for defining a nucleotide excision repair (NER) pathway.

(57) **요약서**: 본 발명은 단백질-리간드 복합체 형성의 정량화를 위한 새로운 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 가교결합 방법과 가속 질량 분석법의 조합에 의해 단백질-DNA 상호작용을 인비트로와 인비보에서 확인하고 정량하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 뉴클레오티드 제거 복구(nucleotide excision repair, NER) 경로를 밝히는 방법을 제공한다.

WO 2010/082743 A2

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 가교결합과 가속 질량 분석법의 조합에 의한 단백질-리간드 상호작용의 확인 및 정량화 방법

기술분야

[1] 본 발명은 단백질-리간드 복합체 형성의 확인 및 정량화 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 가속 질량 분석법(Accelerator Mass Spectrometry)과 가교결합법의 조합에 의해 단백질-리간드 복합체 형성을 확인하고 정량화하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 지금까지 약 30,000개의 인간 유전자가 발견되었으며, 유전체학 연구는 이들 유전자가 생명의 복잡성을 형성하는 메카니즘을 밝히는 데 초점을 맞추고 있다. 관심이 증가하고 있는 한 가지 분야는 동적인 대사 과정을 드라이브하기 위해 형성되는 분자 복합체의 구성요소와 동력학을 이해하는 것이다. 주요 관심 주제는 결합 파트너들의 확인, 특이적 인식 부위의 정의 및 관련되는 분자들의 차지하는 수준의 정량이다.

[3] 오늘날까지, 다양한 인 비보 및 인 비트로 방법들을 이용하여 단백질-리간드 상호작용을 밝혀왔다. 이들 상호작용을 연구하기 위한 가장 간단하고 직접적인 방법 중 하나는 가교결합 방법을 이용하는 것이며, 예를 들어, 단백질을 그들의 타겟 분자에 공유적으로 부착시키기 위하여 자외선 광 또는 포름알데히드를 이용하는 것이다. 이들 방법이 분자 복합체를 규명하는 데 있어서의 진전을 가능하게 했지만, 모든 분자 또는 상호작용 부위가 그러한 기술로 확인가능하지는 않으며 결합 동력학과 속도의 정량은 검출 민감성과 정확도의 부족으로 제한을 받아 왔다.

[4] 가교결합된 생성물의 정량에서 더 큰 민감성과 정확성을 허용하는 방법은 결합 및 억제 속도의 보다 상세한 평가를 가능하게 할 것이며, 중요하게도 더 낮은 농도의 분자를 이용하여 이들을 연구할 수 있도록 하여 작은 샘플에서 그리고 생물학적 관련 농도에서 분자 복합체 형성과 속도의 동력학의 보다 정량적인 평가를 제공한다. 이것은 대사 네트워크의 연구와 세포 기능에서 후생유전적(epigenetic) 인자들의 역할 연구를 위한 새로운 기회를 제시한다.

[5] 한편, 단백질-리간드 상호작용의 친화성과 특이성의 인 비트로 측정이 오랫동안 많은 단백질에 대해 이용가능했다. 그러나, 이들 상호작용은 리간드와 경쟁하는 복잡한 세포내 환경 및 다른 분자에 의해 거의 확실히 변형된다. 만일 우리가 인 비보에서 특이적인 단백질-리간드 상호작용을 측정할 수 있다면, 우리는 단백질이 어떻게 행동하는 지에 대한 보다 정확한 설명을 얻을 수 있을 뿐만 아니라, 인 비트로와 인 비보에서 결합을 비교함으로써, 단백질의 본질적인 결합 특이성이 세포에서 어떻게 변형되는 지를 이해할 수 있을 것이다.

[6] 그러나, 인 비보에서 상호작용을 정량하는 것은 인 비트로에서보다 상당히 더 어려움이 입증되었다. 그러나, 지난 10년에 걸쳐, 인 비보에서 DNA에 단백질을 공유적으로 가교결합시키는 방법(종래의 가교결합 방법)이 개발되어 게놈 DNA와의 서열-특이적 DNA-결합 단백질의 상호작용을 측정할 수 있다. 가교결합 방법을 간단히 요약하면, 자외선, 포름알데히드와 같은 가교결합제를 이용하여 단백질과 DNA 간의 공유적 가교결합을 유도한 후, 가교결합된 단백질-DNA 복합체를 정제하고, 제한 효소 등을 이용하여 절단한다. 이어서 단백질-DNA 복합체를 면역침전시킨 후, 서던 블롯 또는 PCR 증폭 등을 이용하여 면역침전된 DNA-단백질 복합체를 확인한다. 초기의 작업들은 단지 소수의 유전자 단편과 단백질의 상호작용을 연구하는 것으로 그쳤다. 보다 최근의 연구는 DNA 마이크로어레이 기술을 인 비보 가교결합과 결합시켜 효모에서 몇몇 서열-특이적 전사 인자와 효모 게놈 전체에 걸친 수천 가지의 잠재적인 결합 부위의 상호작용을 측정하였다. 그러나, 종래의 가교결합 전략은 몇몇 단점이 있는 바, 1) 그 결합 파트너를 조사하기 위하여 미리 대상 단백질을 특정해야 하며, 2) 대상 단백질을 위한 특이적 항체가 면역침전 단계를 위해 이용가능해야 한다는 것이다.

[7] 한편, 가속 질량 분석법은 지질연대학 및 고고학 연구를 위해 처음 개발되었다. 가속 질량 분석법은 분리된 샘플에서 매우 드문($<1:10^9$) 동위원소의 농도를 정확하게 결정하기 위한 동위원소비(isotope ratio) 질량 분석법이다. 가속 질량 분석법은 따라서 붕괴 카운팅이 정량화를 위한 비효율적인 방법이 되는, ^{14}C와 같은 오래-지속되는(long-lived) 방사성 동위원소의 농도를 측정하는 데 적용된다. 우주선(cosmic ray) 상호작용은 $1.2:10^{12}$의 거의 일정한 방사성탄소 농도로 대기를 유지하며, 이 탄소는 이들을 먹는 모든 식물과 동물을 단위 "모던(Modern)"으로 근사치화되는 수준인 동일한 농도로 라벨시킨다. 모던은 밀리그램 당 6.11 펨토큐리(fCi) 또는 밀리그램 탄소 당 0.0136 dpm에 상응하는, 밀리그램 당 97.8 아토몰(amol)^{14}C까지 추적가능하다(표준 기준 물질- 4990). 그러한 지질연대학 측정은 모던 재료에 대해 ±0.25%로 그리고 홍적세 샘플에 대해서는 ±10%로 이루어진다. 가속 질량 분석법은 매우 간단한 분석으로 매우 민감하고 정밀한 정량화를 생성한다. 가속 질량 분석법은 약동학 분석을 위한 일반적인 도구가 되었으며, 여기서는 라벨된 부분을 함유한 작은(μg) 투여량이 이차 표준 또는 대사 경로에 대한 사전 지식에 기대지 않고도 크로마토그래피 분리에서 직접 정량된다. 가속 질량 분석법은 사전 특정화 또는 분자 변형 또는 내부 표준을 도입하지 않고서, 임의의 생물학적 또는 화학적 매질내의 라벨된 화합물만에 특이적이다. ^{14}C의 상대적으로 낮고 거의 일정한 천연 백그라운드는 안정한 동위원소 또는 다른 탐침(TRACER)에 비하여 높은 정량적 민감성을 가속 질량 분석법에 제공한다. 일부 형광법은 amol 수준으로 정량하는 반면, 이들은 인 비보 추적(tracing)에 적합하지 않은 유도체화 과정을 필요로 하며, 화학적으로 등가가 아닌 탐침을 생성하며, 그리고 많은 생화학 시스템에 일반적으로

적용하기 힘들다.

[8] 가속 질량 분석법의 높은 민감성은 몇몇 방식으로 실험 디자인에 영향을 줄 수 있다: 1) 방사성 동위원소 조사량이 방사선분해, 해로운 폐기 스트림, 및 인간 대상 노출의 하찮은 수준으로 감소될 수 있으며, 2) 생물학적 시스템에의 화학적 조사량이 생리학적 및 독성 수준 미만으로 최소화되어, 낮은 화학적 조사량으로부터 생기는 효과의 현실적 분석이 가능하며, 3) 샘플링된 물질이 정량화 전에 특이적 생물분자로 분획화되어야 한다 할지라도, 잘-한정되고, 종종-비침입성인 과정으로부터 얻어질 수 있는 양으로 샘플 크기가 감소될 수 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명자는 가속 질량 분석법 검출법을 이용하여 가교결합 후 단백질-리간드 복합체 형성의 확인 및 정량화를 위한 새로운 방법을 발명하였다. 이 방법은 또한 결합 속도의 정량화에서 증가된 민감성과 잠재적으로 더 높은 정확성을 제공한다. 가속 질량 분석법과 잘-확립된 가교결합법을 결합시킴으로써, 단백질-리간드 상호작용을 관찰할 수 있을 뿐 아니라, 종래의 염료-기반 염색법보다 더 높은 민감성을 얻을 수 있다.

[10] 따라서, 본 발명의 목적은 단백질-리간드 복합체 형성의 정량화를 위한 새로운 방법을 제공하는 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 단백질-리간드 상호작용의 정량화에서 가교결합 방법과 가속 질량 분석법을 조합함으로써 종래 방법보다 더 높은 정확성과 민감성을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[11] 또한, 본 발명의 목적은 가교결합 방법과 가속 질량 분석법의 조합에 의해 단백질-DNA 상호작용을 인비트로와 인비보에서 확인하고 정량하는 방법을 제공하는 것이다.

[12] 또한, 본 발명의 목적은 가교결합 방법과 가속 질량 분석법의 조합에 의해 뉴클레오티드 제거 복구(nucleotide excision repair, NER) 경로를 밝히는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[13] 일 태양에서, 본 발명은 단백질-리간드 상호작용을 확인하고 정량분석하는 방법을 제공한다.

[14] 구체적으로, 본 발명은 i) 방사성 라벨된 리간드 분자를, 인 비트로(in vitro), 엑스 비보(ev vivo) 또는 인 비보(in vivo) 시스템에 도입하는 단계, ii) 리간드 분자를 타겟 단백질에 공유적으로 가교결합시키는 단계, iii) 단백질-리간드 복합체를 분리하는 단계, iv) 분리된 단백질-리간드 복합체를 가속 질량 분석법(Accelerator Mass Spectrometry, AMS)에 의해 측정하는 단계, 및 v) 종래 검출 방법으로부터의 시그널과 가속 질량 분석법으로부터의 시그널을 비교하는 단계를 포함하는, 단백질-리간드 상호작용을 확인하고 정량분석하는 방법을

제공한다.

[15] 본 방법의 제 1 단계는 방사성 라벨된 리간드 분자를 인 비트로, 엑스 비보 또는 인 비보 시스템에 도입하는 단계이다.

[16] 본 방법의 상기 1 단계에 있어서, 방사성 라벨된 분자는 방사성 동위원소로 라벨된 약물, 호르몬, 대사물, DNA 또는 RNA 중의 뉴클레오티드, 또는 단백질 등일 수 있는, 그 결합 단백질을 확인하고자 하는 리간드 분자이다. 이때 리간드의 라벨링을 위해 이용될 수 있는 방사성 동위원소의 예로는 ^{14}C가 있으며 이로 한정되지는 않으며, 라벨링하고자 하는 리간드의 종류에 따라 다른 동위원소가 사용될 수도 있다. 바람직하게는 ^{14}C로 라벨링된 리간드를 이용한다.

[17] 방사성 동위 원소로 라벨링된 리간드는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 캠브리지 아이소토프 래보래토리즈(Cambridge Isotope Laboratories), 아메리칸 래디오레이블드 케미컬, 인코포레이티드(American Radiolabeled Chemical, Inc.), 모라벡 바이오케미컬스(Moravek Biochemicals)와 같은 회사들로부터 구입하여 사용할 수 있으며, 화학 합성을 통해 얻을 수도 있다.

[18] 본 방법의 1 단계에서 사용되는 인 비트로, 엑스 비보 또는 인 비보 시스템으로는 정제된 단백질, 세포 추출물, 핵 추출물, 원핵 세포, 진핵 세포 등과 같은, 라벨링된 리간드 분자와 결합할 수 있는 후보 단백질을 함유하는 임의의 시스템일 수 있다.

[19] 본 방법의 제 2 단계는 리간드 분자를 타겟 단백질에 공유적으로 가교결합시키는 단계로서, 방사성 라벨된 리간드 분자를 타겟 단백질에 공유결합시키기 위한 가교결합제로서는 UV 광, 포름알데히드, 글루타르알데히드, 또는 광활성화 링커 등과 같은, 단백질과 리간드 간의 공유적 가교결합 유도에 통상적으로 이용되는 가교결합제를 이용할 수 있다.

[20] 본 방법의 제 3 단계는 가교결합에 의해 형성된 리간드-단백질 복합체를 분리하는 단계로서, 단백질-리간드 복합체의 분리를 위해서는 단백질 등의 분리를 위해 보편적으로 사용되는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동(PAGE), 고성능액체크로마토그래피(HPLC), 고속단백질액체크로마토그래피(FPLC) 등을 사용할 수 있다.

[21] 단백질 또는 DNA 등의 분리를 위한 폴리아크릴아미드 젤 전기영동, 고성능액체크로마토그래피, 고속단백질액체크로마토그래피 등의 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 참고 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press] 등에서 확인할 수 있다.

[22] 본 방법의 제 4 단계는 전기영동 등을 통해 분리한 단백질-리간드 복합체를 가속 질량 분석법에 의해 측정하는 단계이다.

[23] 폴리아크릴아미드 젤 전기영동에 의해 단백질-리간드 복합체를 분리하는 경우에는, 전기 영동 후, 젤을 일정한 크기로 잘라내어, 그 젤 조각들을 각각 가속 질량 분석법에 의해 측정한다.

[24] 젤을 가속 질량 분석법에 의해 측정하기 위해서는 젤을 건조시킨 후,

산화구리(CuO)를 이용하여 산화시키고, 발생하는 이산화탄소를 포집한다. 이어서 얻어진 이산화탄소를 티타늄 하이드라이드로 환원시켜 고체 형태의 그라파이트(graphite)를 얻은 후, 제조사의 설명서에 따라 가속 질량 분석기로 측정한다.

[25] 고성능액체크로마토그래피 또는 고속단백질액체크로마토그래피에 의해 단백질-리간드 복합체를 분리하는 경우에는 크로마토그래피에 의해 시간에 따라 얻어지는 각 분획을 수집한 후, 용매를 제거하고, 각 분획에 남아 있는 유기물질을 건조시킨 후, 산화구리(CuO)를 이용하여 산화시키고, 발생하는 이산화탄소를 포집한다. 이어서 얻어진 이산화탄소를 티타늄 하이드라이드로 환원시켜 고체 형태의 그라파이트(graphite)를 얻은 후, 가속 질량 분석기로 측정한다.

[26] 본 방법의 제 5 단계는 가속 질량 분석법에 의해 측정한 시그널과 종래의 시그널 검출 방법에 의한 시그널을 비교 분석하는 단계로서, 가속 질량 분석법에 의해 측정한 시그널과 비교하기 위한 시그널의 종래 검출 방법으로는 젤 전기영동에서 가장 보편적으로 사용되는 염료를 이용한 염색 방법 등이 있다. 이러한 염색 방법에 사용될 수 있는 염료로는 쿠마시(Coomassie)® 염료 용액(바이오-라드(Bio-Rad)) 등이 있다.

[27] 본 방법의 제 3 단계에서 단백질-리간드 복합체의 분리를 위하여 고성능액체크로마토그래피 또는 고속단백질액체크로마토그래피 등의 방법을 이용하는 경우에는, 크로마토그래피로 얻은 각 분획에 대해 가속 질량 분석법에 의해 얻은 시그널을 크로마토그램과 비교한다.

[28] 이와 같이 가속 질량 분석법에 의한 시그널은 아주 적은 양의 단백질-리간드 복합체의 확인과 정량을 가능하게 하므로 단백질과 리간드 간의 상호작용을 종래 방법에 비하여 보다 정확하고 민감하게 정량할 수 있다.

[29] 한편, 본 발명 방법에서 방사성 동위원소 분석을 위하여 가속 질량 분석법 대신 액체 신틸레이션 카운터(Liquid Scintillation Counter, LSC)를 이용할 수도 있다.

[30] 액체 신틸레이션 카운터를 이용하기 위해서는 방사성 동위원소를 포함하는 물질을 유니버셜 용매(universal solvent)에 균일하게 용해시켜야 하지만, 젤의 경우엔 고분자여서 용해되지 않으므로, 젤에서 단백질-리간드 복합체를 필름을 이용하여 블롯팅(blotting)한 후 물과 같은 용매에 용해시켜 액체 신틸레이션 카운터에 의해 분석한다.

[31] 고성능액체크로마토그래피 또는 고속단백질크로마토그래피에 의해 단백질-리간드 복합체를 분리하는 경우에는 균일한 용액을 얻을 수 있으므로, 블롯팅 등의 추가 과정 없이 액체 신틸레이션 카운터에 의해 방사성 동위원소를 분석할 수 있다.

[32] 다른 태양에서, 본 발명은 가교결합 방법과 가속 질량 분석법의 조합에 의해 단백질과 DNA의 상호작용을 확인하고 정량하는 방법을 제공한다.

[33] 구체적으로, 본 발명은 i) 방사성 동위원소-라벨된 분자를 게놈 또는 세포

DNA에 도입하는 단계, ii) 상기 방사성 동위원소-라벨된 분자를 함유한 게놈 또는 세포 DNA와 세포 추출물 또는 핵 추출물을 항온처리하고, DNA와 단백질을 가교결합시키는 단계, iii) 단백질-DNA 복합체를 추출하여 분해시키는 단계, iv) 단백질-DNA 복합체를 분리하는 단계, v) 단백질-DNA 복합체를 가속 질량 분석법에 의해 측정하는 단계, 및 vi) 가속 질량 분석법에 의한 시그널과 DNA-단백질 복합체 확인을 위한 종래의 방법에 의한 시그널을 비교하는 단계를 포함하는, 단백질과 DNA의 상호작용의 확인 및 정량화 방법을 제공한다.

[34] 본 방법의 제 1 단계는 방사성 동위원소-라벨된 분자를 게놈 또는 세포 DNA에 도입하는 단계로서, 방사성 동위원소-라벨된 분자는 방사성 동위원소로 라벨링된 정상 뉴클레오시드, 산화된 뉴클레오시드 또는 DNA-손상 제제(damaging agent) 등이다.

[35] 본 방법에서 이용될 수 있는 DNA-손상 제제는 백금계 항암 약물, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드, 멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판 및 티오테파를 포함하며 이로 한정되지 않는 DNA-손상 항암 약물일 수 있다.

[36] 방사성 동위원소로 라벨링된 정상 뉴클레오시드, 산화된 뉴클레오시드 또는 DNA-손상 제제(damaging agent) 등은 상기한 바와 같은 방사성 동위원소로 라벨링된 화학물질을 판매하는 여러 회사들로부터 구매하거나 합성을 의뢰할 수 있으며, 또한 화학 합성을 통해 얻을 수도 있다. 이때 라벨링을 위해 이용될 수 있는 방사성 동위원소의 예로는 ^{14}C가 있으며 이로 한정되지는 않으며, 라벨링하고자 하는 분자에 따라 다른 동위원소가 사용될 수도 있다. 바람직하게는 ^{14}C가 라벨링에 이용된다.

[37] 방사성 동위원소 라벨링된 뉴클레오시드 또는 항암 약물 등을 게놈 또는 세포 DNA에 도입하는 것은 본 기술 분야에 알려진 바와 같이, 상기와 같은 방사성 동위원소 라벨링된 분자를 함유한 배양액에서 세포를 배양함으로써 이루어질 수 있다(PNAS, 104, 11203-11208(2007), DOI: 10. 1073/pnas.0701733104, Chem.Res.Toxicol.20, 1745-1751(2007), DOI:10.1021/tx700376a, 및 Chem.Res.Toxicol.19, 622-626(2006), DOI:10.1021/tx060058c 참조).

[38] 본 방법의 제 2 단계는 방사성 동위원소 라벨된 DNA를 세포 추출물 또는 핵 추출물과 항온처리하고 DNA를 단백질과 가교결합시키는 단계로서, 방사성 동위원소 라벨된 DNA와 단백질을 가교결합시키기 위해서는 UV 광, 포름알데히드, 글루타르알데히드, 또는 광활성화 링커 등을 포함하며 이로 한정되지 않는, 본 기술 분야에서 보편적으로 사용되는 가교결합제를 이용할 수 있다.

[39] 본 방법의 제 3 단계는 단백질과 결합된 DNA를 반응물로부터 추출하여 분해하는 단계로서, 단백질과 가교결합된 DNA의 추출을 위해서는 본 기술 분야에 공지된 기술을 이용할 수 있으며, 예를 들어, 나이트로셀룰로오스(nitrocellulose) 또는 나일론, PVDF 등을 이용하여

블롯팅함으로써 DNA-단백질 복합체를 추출할 수 있다. DNA의 분해를 위해서는 특정 서열의 부위를 특이적으로 절단하는 본 기술 분야에 공지된 다양한 제한 효소(restriction enzyme)를 사용할 수 있으며, DNA 서열을 고려하여 적합한 제한 효소를 선택하여 사용할 수 있다.

[40] 본 방법의 제 4 단계는 상기와 같이 분해된 단백질-DNA 복합체를 분리하는 단계로서, 젤 전기영동 또는 고성능액체크로마토그래피 또는 고속단백질액체크로마토그래피 등을 이용할 수 있다.

[41] 단백질-DNA 복합체의 분리를 위한 젤 전기영동은 1D 또는 2D 폴리아크릴아미드 젤 전기 영동을 이용할 수 있다. 젤 전기 영동법은 본 기술 분야에 잘 알려져 있으며 예를 들어 참고 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press] 등에서 찾을 수 있다. 젤 전기 영동에 의한 단백질-DNA 복합체의 분리 후 복합체의 위치 확인을 위해서는 쿠마시® 염료 용액(바이오 라드) 등을 이용한 염색법을 이용할 수 있다.

[42] 단백질-DNA 복합체의 분리를 위해 고성능액체크로마토그래피 또는 고속단백질액체크로마토그래피를 이용할 경우에는, 크로마토그래피에 의해 얻어지는 각 분획들을 수집하여 이후 가속 질량 분석법을 위해 이용한다.

[43] 본 방법의 제 5 단계는 단백질-DNA 복합체를 가속 질량 분석법에 의해 측정하는 단계로서, 젤 전기영동에 의해 단백질-DNA 복합체를 분리한 경우에는 젤을 가속 질량 분석법에 의해 측정하기 위해 젤을 일정한 작은 크기의 조각으로 절단하고, 이들 젤 조각을 그라파이트로 전환시킨 후, 가속 질량 분석기에 의해 방사성 동위원소 레벨을 측정한다. 젤 조각을 그라파이트로 전환시키고 가속 질량 분석기에 의해 방사성 동위원소 레벨을 측정하는 방법은 상기한 바와 같다.

[44] 가속 질량 분석기에 의해 확인된 시그널과 젤 전기영동 후 젤의 염색에 의해 확인된 DNA-단백질 복합체 위치를 비교하고 방사성 동위원소 함량을 결정함으로써, DNA에 결합하는 결합 단백질을 인비트로와 인비보에서 확인하고 정량할 수 있다.

[45] 또한, 단백질-DNA 복합체의 분리를 위하여 젤 전기영동 대신 고성능액체크로마토그래피 또는 고속단백질액체크로마토그래피 등을 이용하는 경우에는, 상기한 바와 같이 크로마토그래피에 의해 시간에 따라 얻어지는 각 분획을 수집한 후, 용매를 제거하고, 각 분획에 남아 있는 유기 물질을 건조시킨 후, 산화구리(CuO)를 이용하여 산화시키고, 발생하는 이산화탄소만을 포집한다. 이어서 얻어진 이산화탄소를 티타늄 하이드라이드로 환원시켜 고체 형태의 그라파이트(graphite)를 얻은 후, 가속 질량 분석기로 측정한다.

[46] 또한, 본 발명 방법에서 방사성 동위원소 분석을 위하여 가속 질량 분석법 대신 액체 신틸레이션 카운터를 이용할 수도 있음은 상기한 바와 같다.

[47] 또 다른 태양에서, 본 발명은 셔틀 벡터(Shuttle vector)와 가속 질량 분석법을 이용하여 특정 DNA 서열에 대한 결합 단백질을 확인하는 방법을 제공한다.

[48] 구체적으로, 본 발명은 i) 방사성 라벨된 뉴클레오티드를 이용하여 주어진 위치에서 방사성 동위원소를 함유한 올리고뉴클레오티드를 제조하는 단계, ii) 상기 올리고뉴클레오티드를 상보성 올리고뉴클레오티드에 어닐링시켜 듀플렉스(duplex) DNA를 형성하는 단계, iii) 상기 듀플렉스 DNA를 플라스미드에 라이게이션(ligation)시키는 단계, iv) 상기 듀플렉스 DNA를 함유한 플라스미드를 인 비보 또는 엑스 비보 시스템에 도입하는 단계, v) 플라스미드와 단백질을 공유 결합시키는 단계, vi) 플라스미드 DNA-단백질 복합체를 분리하여 분해하는 단계, vii) 상기 플라스미드 DNA-단백질 복합체 분해물을 분리하는 단계, viii) 분리된 DNA-단백질 복합체를 가속 질량 분석법에 의해 측정하는 단계를 포함한다.

[49] 상기와 같은 과정에 의해, 특정 서열을 가진 올리고뉴클레오티드에 결합하는 신규의 결합 단백질을 확인할 수 있다.

[50] 셔틀 벡터는 두 가지 상이한 숙주 종에서 증식할 수 있도록 제작된 플라스미드로서, 셔틀 벡터내에 삽입된 DNA는 두 가지 상이한 세포 유형에서 시험되거나 조작될 수 있다.

[51] 방사성 라벨된 뉴클레오티드를 이용하여 주어진 위치에서 방사성 동위원소를 함유한 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법, 상보성 올리고뉴클레오티드와의 어닐링에 의해 듀플렉스 DNA를 형성하는 방법, 듀플렉스 DNA를 플라스미드에 라이게이션시키는 방법 등은 본 기술 분야의 통상적인 기술 방법으로서 잘 알려져 있으며, 이러한 방법들은 예를 들어, 참고 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press] 등에 상세히 설명되어 있다.

[52] 본 방법에는 가속 질량 분석기에 의해 측정가능한 임의의 방사성 동위원소가 이용될 수 있으며, 바람직하게는 ^{14}C가 이용된다.

[53] 본 방법의 제 4 단계에서 플라스미드 DNA를 인비보 시스템에 도입하기 위해서는 예를 들어, 전기 천공(electroporation)에 의해 플라스미드 DNA를 세포내로 도입할 수 있으며, 엑스 비보 시스템에 도입하기 위해서는 플라스미드 DNA를 핵 추출물 또는 세포 추출물과 항온처리함으로써 이루어질 수 있다.

[54] 본 방법의 제 5 단계에서 DNA와 단백질의 가교결합을 위해서는 UV 광, 포름알데히드, 글루타르알데히드, 또는 광활성화 링커 등을 포함하며 이로 한정되지 않는, 상기한 바와 같은 본 기술 분야에서 보편적으로 사용되는 가교결합제를 이용할 수 있다.

[55] 본 방법의 제 6 단계에서 플라스미드의 분리 및 분해는 본 기술 분야에서 잘 알려진 공지 기술을 이용하여 실시할 수 있으며, 이와 같은 기술은 참고문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press] 등에 잘 개시되어 있으며, 플라스미드의 분해는 공지의 다양한 제한 효소를 이용하여 이루어질 수 있으며 올리고뉴클레오티드의 서열을 고려하여 적절한 제한 효소를 선택하여 사용할 수 있다.

[56] 본 방법의 제 7 단계에서 플라스미드 DNA-단백질 복합체 분해물의 분리는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동, 고성능액체크로마토그래피, 고속단백질액체크로마토그래피 등에 의해 이루어질 수 있으며, 전기영동에 의해 분리한 후에는 쿠마시 등의 염료로 젤을 염색하여 사진을 찍어둠으로써 이후에 젤의 가속 질량 분석법에 의해 얻은 시그널과의 비교에 사용할 수 있다.

[57] 본 방법의 제 8 단계에서 DNA-단백질 복합체의 가속 질량 분석법에 의한 측정은 상기 본 발명의 다른 태양을 위해 기재한 것과 동일한 방식으로 젤 또는 크로마토그래피에 의해 얻은 분획을 그라파이트로 전환시킨 후 가속 질량 분석기에 의해 측정할 수 있다.

[58] 가속 질량 분석법에 의한 시그널을 제 7 단계에서 얻어진 전기영동 젤의 염색 사진과 비교하여, 특정 서열의 DNA에 결합하는 결합 단백질을 확인하고 정량할 수 있다.

[59] 또한, 본 발명 방법에서 방사성 동위원소 분석을 위하여 가속 질량 분석법 대신 액체 신틸레이션 카운터를 이용할 수도 있음은 상기한 바와 같다.

[60] 또 다른 태양에서, 본 발명은 뉴클레오티드 제거 복구(nucleotide excision repair, NER) 경로를 밝히는 방법을 제공한다.

[61] 구체적으로, 본 발명은 i) 방사성 라벨이 상이한 위치에 순차적으로 도입된 올리고뉴클레오티드 세트를 제조하는 단계, ii) 상기 올리고뉴클레오티드 세트의 각 올리고뉴클레오티드에 상보성인 올리고뉴클레오티드를 이용하여 듀플렉스 DNA 세트를 제조하는 단계, iii) 상기 듀플렉스 DNA에 손상(damage)을 도입하는 단계, iv) 상기 듀플렉스 DNA를 NER 효소 또는 핵 추출물과 dNTPs와 항온처리하는 단계, 및 v) 생성된 DNA를 분리하고 가속 질량 분석법에 의해 측정하여 방사성활성을 확인하는 단계를 포함한다.

[62] 상기와 같은 방법에 의해 상이한 위치에 방사성 동위원소를 함유하고 있던 DNA를 NER 효소로 처리한 후의 방사성활성을 확인함으로써, 뉴클레오티드 제거 복구 경로 동안 얼마나 많은 뉴클레오티드가 제거되는지를 확인할 수 있다.

[63] 상기한 바와 같이, 방사성 라벨된 뉴클레오티드를 이용하여 주어진 위치에서 방사성 동위원소를 함유한 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법, 상보성 올리고뉴클레오티드와의 어닐링에 의해 듀플렉스 DNA를 형성하는 방법 등은 본 기술 분야의 통상적인 기술 방법으로서 잘 알려져 있으며, 이러한 방법들은 예를 들어, 참고 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press] 등에 상세히 설명되어 있다.

[64] 본 방법에는 가속 질량 분석기에 의해 측정가능하며 뉴클레오티드에 도입가능한 임의의 방사성 동위원소가 이용될 수 있으며, 바람직하게는 ^{14}C가 이용된다.

[65] 본 방법의 제 3 단계에서 듀플렉스 DNA에 손상을 도입하는 물질과 방법은 본 기술 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 시스플라틴(cisplatin)을 이용할 수 있으며, 참고 문헌[Chem.Res.Toxicol.20, 1745-1751(2007), DOI:10.1021/tx700376a,

및 Chem.Res.Toxicol.19, 622-626(2006), DOI:10.1021/tx060058c]에 개시된 방법 등을 이용할 수 있다.

[66] 본 방법의 제 5 단계에서 DNA의 분리는 상기한 바와 같은 젤 전기영동, 고성능액체크로마토그래피, 고속단백질액체크로마토그래피 등에 의해 이루어질 수 있으며, 분리한 DNA를 가속 질량 분석법에 의해 측정하는 방법은 상기한 바와 같다.

[67] 또한, 본 발명 방법에서 방사성 동위원소 분석을 위하여 가속 질량 분석법 대신 액체 신틸레이션 카운터를 이용할 수도 있음은 상기한 바와 같다.

발명의 효과

[68] 본 발명의 방법은 가교결합 방법을 가속 질량 분석법과 결합시킴으로써, 단백질-리간드 상호작용을 확인하고 정량할 수 있을 뿐만 아니라, 종래의 염료-기반 염색 방법보다 더 높은 정확성과 민감성을 제공할 수 있다. 또한, 특정 서열의 DNA에 특이적으로 결합하는 신규의 단백질을 효율적으로 동정하고 정량할 수 있다.

[69] 또한, 본 발명은 리간드와 단백질의 상호작용을 확인하기 위해 1) 그 결합 파트너를 조사하기 위하여 미리 대상 단백질을 특정해야 하며, 2) 대상 단백질을 위한 특이적 항체가 면역침전 단계를 위해 이용가능해야 하는, 종래의 가교결합 방법의 중요한 단점을 극복할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[70] 도 1A는 에스트로겐 수용체-α(ER-α)와 [^{14}C]E2를 함유한 E2를 가교결합시킨 후 젤 전기영동에 의해 분리한 후의 젤 사진, 및 가속 질량 분석법에 의한 측정을 위하여 잘라낸 젤의 부분들을 나타내는 도면이다.

[71] 도 1B는 도 1A의 젤에서 잘라낸 젤 조각들을 가속 질량 분석법에 의해 측정한 결과 얻어진 각 젤 조각의 방사성탄소 함량을 나타내는 그래프이다.

[72] 도 2는 방사성 동위원소로 라벨링된 분자가 도입된 게놈 DNA 또는 세포 DNA를 이용하여 가교결합법과 가속 질량 분석법에 의해 서열 특이적 결합 단백질을 확인하기 위한 본 발명의 일 태양에 따른 방법을 요약한 도식이다.

[73] 도 3은 방사성 라벨링된 올리고뉴클레오티드를 함유한 플라스미드를 이용하여 가교결합법과 가속 질량 분석법에 의해 서열 특이적 결합 단백질을 확인하기 위한 본 발명의 일 태양에 따른 방법을 요약한 도식이다.

[74] 도 4A는 탄소동위원소로 라벨링된 분자를 도시한다.

[75] 도 4B는 도 4A의 분자와 반응시키기 위한 25 염기쌍의 올리고뉴클레오티드를 도시한다.

[76] 도 4C는 단백질과 DNA의 상호작용을 알아보기 위한 실험 과정을 요약하여 도시한다.

[77] 도 5A는 공유결합된 단백질-DNA 결합체의 SDS-PAGE 결과(좌측) 및 절단된 젤 조각(우측)을 도시한다.

[78] 도 5B는 AMS에 의해 측정한 젤 조각들의 방사성탄소 함량을 도시한다.

[79] 도 6A는 탄소동위원소로 라벨링될 올리고뉴클레오티드를 도시한다.

[80] 도 6B는 상이한 위치에서 탄소동위원소로 라벨링된 올리고뉴클레오티드 세트 및 손상된 DNA에 대한 뉴클레오티드 제거 복구 효소의 경로 분석을 위한 실험 과정을 도시한다.

[81] 도 6C는 AMS에 의해 측정한, 손상된 DNA가 복구된 올리고뉴클레오티드의 방사성탄소 함량을 도시한다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[82] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 본 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위를 이들 실시예로 한정하고자 하는 것이 아니다.

[83] **실시예**

[84] 실시예 1. 인 비트로 단백질-리간드 상호작용을 위한 가속 질량 분석법-기반 가교결합 분석

[85] 에스트로겐 수용체-α(ER-α)와 17β-에스트라디올(E2) 사이의 높은 결합 친화성(~ 0.2 nM)과 이 복합체의 잘-규명된 생화학적 특성 때문에, 인 비트로 단백질-분자 상호작용을 밝히기 위하여 에스트로겐 수용체-α와 방사성탄소-라벨된 17β-에스트라디올을 선택하였다.

[86] E2는 2개의 하이드록실기를 가지고 있으므로, 이들 부분은 포름알데히드와 반응하여, 에스트로겐 수용체-α 단백질 결합 부위상의 반응성 부위와 공유적으로 결합된 복합체를 형성할 것으로 예상되었다.

[87] 21.4 pmol의 ER-α(분자량 66.4 kD, 214 nM 최종 농도)(시그마 알드리치(Sigma Aldrich), 미국 미주리주 세인트루이스 소재)를, [^{14}C]E2 0.91 fmol을 함유한 2.1 fmol의 E2(아메리칸 래디오레이블드 케미컬스, 인크.(American Radiolabeled Chemicals, Inc.), 미국 미주리주 세인트루이스 소재)와 함께 결합 버퍼[40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 10%(v/v) 글리세롤, 10 mM Na_2MoO_4 10 mM DTT]에서 4 ℃에서 16시간 동안 항온처리하였다.

[88] 이어서, 상기 용액에 포름알데히드(0.09% w/v 최종 농도)를 첨가하였다. 실온에서 15분 동안 때때로 혼합하면서 항온처리한 후, 라이신 용액(125 mM 최종 농도)을 첨가하여 반응을 급냉시키고, 생성된 혼합물을 NuPAGE 노벡스(Novex)® 비스-트리스 젤(인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼바드 소재)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 젤 전기영동시켰다. 전기영동 분리를 완료한 후, 젤을 바이오-라드(Bio-Rad) 쿠마시(Coomassie)® 염색 용액으로 염색하고 사진을 찍었다.

[89] 그 결과가 도 1A에 나타난다. 도 1A의 젤 사진에서 각 레인(lane)은 다음과 같았다: (a) 단백질 래더(ladder), (b) 아무것도 처리하지 않은 270 pmol의 ER-α, (c) 아무것도 처리하지 않은 135 pmol의 ER-α, (d) 결합 버퍼중의 ER-α 135 pmol(1.35

μM)을 2.1 fmol의 라벨링되지 않은 E2와 항온처리하고 이어서 포름알데히드와 라이신(각각 0.09% w/v 및 125 mM 최종 농도)으로 처리함, (e) 결합 버퍼중의 21.4 pmol의 ER-α를 0.91 fmol의 [^{14}C]E2를 함유한 E2 2.1 fmol과 항온처리 후 포름알데히드와 라이신((각각 0.09% w/v 및 125 mM 최종 농도)으로 처리함, (f) 결합 버퍼중의 21.4 pmol의 ER-α를 0.91 fmol의 [^{14}C]E2를 함유한 E2 2.1 fmol과 항온처리 후 라이신(125 mM 최종 농도)만으로 처리함.

[90] 이어서 도 1A에 나타난 대로 젤의 레인 (e)와 (f)를 0.8 x 0.4 cm^2 크기의 조각으로 절단하고, 젤 조각들을 진공하에서 건조시킨 후, AMS 측정을 위한 그라파이트로 전환시켰다. 각각의 얻어진 젤 조각을 방사성탄소 함량에 대해 AMS에 의해 측정하였다.

[91] 절단된 젤 조각들의 방사성탄소 함량 측정 결과가 도 1B에 나타나 있다. 도 1B는 레인 (e)로부터의 젤 조각 #2를 제외하고는 모든 젤 조각에서 방사성탄소 수준이 백그라운드와 일치함을 보여준다. 레인 (e)로부터의 젤 조각 #2는 [^{14}C]E2로부터 기원한 첨가된 방사성탄소의 83%를 함유하였다. 젤 조각 #2내의 방사성탄소 수준은 각 젤 조각의 중량이 3.5 mg이라는 가정을 기초로하여, 시스템내의 총 방사성탄소의 약 83%로 추정되었다. 이 밴드는 66 kD의 분자량에 해당하며 쿠마시-염색된 ER-α-E2 가교결합 단백질(레인 (d)) 및 레인 (b)와 (c)에서 나타난 원래의 ER-α단백질 표준과 동일한 상대적 위치에서 공동-용출된다. 젤 전기영동이 변성화(denaturing) 조건을 사용하였기 때문에, 이 데이터는 ER-α 단백질과 E2 리간드 사이의 공유 결합을 나타낸다.

[92] 한편, 대조구 실험으로서, 포름알데히드를 샘플에 첨가하지 않은 것을 제외하고는 동일한 조건하에서 실험을 한 결과(도 1A의 레인 (f)), 레인 (f)로부터의 젤 조각에서는 방사성탄소가 전혀 관찰되지 않아, [^{14}C]E2가 젤로부터 용출되었으며 66 kD ER-α 단백질과 관련된 영역에 체류하지 않았음을 보여준다.

[93] 또한, 라벨링되지 않은 E2와 ER-α를 항온처리한 후 포름알데히드로 처리한 도 1A의 레인 (d)는 아무런 처리를 하지 않은 ER-α(레인 (c))와 비교하여 더 높은 분자량의 복합체의 형성(즉, 더 낮은 이동성)을 확인해주었다.

[94] 이들 결과는 21.4 pmol(~ 1.4 μg)의 ER-α가 AMS에 의해 검출가능하지만 쿠마시 염색법(도 1A의 레인 (e) 또는 (f))에 의해서는 검출할 수 없음을 보여준다. 본 실험에서 염료 결합을 이용한 검출 한계는 135 pmol(~ 9.0 μg)의 ER-α였다(레인 (d)).

[95] 보다 중요하게도, 본 실험에 이용된 ER-α는 부분적으로 정제된 ER-α(제조사에 의해 80% 순도가 보장됨)였으나, 방사성탄소는 공유-결합된 ER-α-[^{14}C]E2 복합체를 함유한 젤 조각에서만 검출되었으므로, 본 발명의 AMS-기반 분석은 ER-α에의 E2의 공유 결합을 비특이적 결합으로부터 구별할 수 있다.

[96] 실시예 2. 단백질-DNA 상호작용을 위한 가속 질량 분석법-기반 가교결합 분석

[97] 단백질과 DNA의 상호작용을 알아보기 위해 도 4A와 같은 탄소동위원소로

라벨링된 분자를 준비하였다(아메리칸 래디오레이블드 케미칼스, 인크 (American Radiolabeled Chemicals, Inc.), 미국 미주리주 세인트루이스 소재).

[98] 또한, 도 4B는 도 4A의 분자와 반응시키기 위한 25 염기쌍의 올리고뉴클레오타이드로서, 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 392 DNA/RNA 합성기를 이용한 포스포르아미다이트(phosporamidite) 방법으로 합성하였으며, 플래티네이션(platination)을 위한 하나의 d(GpG)(도 4B에서 상대적으로 큰 사이즈의 GG)를 가지고 있고, 상보적인 가닥에는 3'비오틴기를 가지고 있다. 이 비오틴기는 도 4A 분자와 25 염기쌍 올리고뉴클레오타이드의 반응 후, 스트렙타비딘기를 가지고 있는 고형 지지체 (스트렙타비딘-코팅된 자기 비드(프로메가(Promega)))를 이용하여 DNA-단백질 가교결합된 부가물(adducts)을 쉽게 분리하기 위해 도입되었다.

[99] 본 실시예의 실험 과정은 도 4C에 요약되어 있으며 하기와 같으며, 그 결과는 도 5에 도시된다.

[100] 도 4A의 탄소동위원소로 라벨링된 분자는, 백금 주위의 코디네이션 스피어(coordination sphere)가 비대칭적이기 때문에, 두 가지의 배향 이성질체(orientational isomers)이다(Pt 이성질체 I과 II). 이 이성질체를 이온 교환 HPLC를 이용해 분리한 후, 각각을 준비된 올리고뉴클레오타이드와 반응시킨 후 (도 5A에서 레인 I, III과 V는 Pt 이성질체 I을, 그리고 레인 II, IV와 VI은 Pt 이성질체 II를 이용한 것임), 플래티네이션된 DNA에 대해 선택적으로 결합하는 것으로 알려진 고-이동성 그룹(high-mobility group) B1 (HMGB1) 전길이 단백질(레인 I, II, III과 IV)과 HeLa 세포 내의 모든 단백질을 가지고 있는 HeLa 핵 추출물(레인 V와 VI)과 결합시킨 후 광-가교결합의 방법으로 가교결합시켰다. 광-가교결합은 UV 스트라타링커(Stratalinker)를 이용하여 365 nm의 빛을 0 ℃에서 2시간 동안 쪼여줌으로써 얻게 되었다. 광-가교결합에 의해 얻어진 공유결합된 단백질-DNA 결합체를 스트렙타비딘-코팅된 자기 비드를 이용해서 분리한 다음, 제조업체의 매뉴얼에 따라 비드에서 분리시키고, 10% SDS-PAGE로 분리하였다. SDS-PAGE의 젤 사진이 도 5A 왼쪽에 도시되어 있다. 도 5A에서, 레인 I과 II는 광-가교결합을 시키지 않은 대조군 실험이고, 레인 III과 IV는 HMGB1 전길이 단백질, 그리고 레인 V와 VI은 HeLa 핵 추출물을 이용한 실험결과이다. 얻어진 젤을 일정한 크기로 자른 후 (도 5A 오른쪽), 절단된 젤 조각들의 방사선탄소 함량을 AMS를 이용하여 측정하였다 (도 5B). 도 5B의 결과는, 주어진 DNA 또는 손상된 DNA에 대해 선택적으로 결합하는 단백질(예를 들면, HMGB1 전길이 단백질)을 아주 높은 민감성과 특이성으로, 본 발명의 방법에 의해 확인가능함을 보여준다.

[101] 실시예 3. <u>손상입은 DNA에 대한 뉴클레오타이드 제거 복구 (nucleotide excision repair, NER) 효소의 경로 분석</u>

[102] 실시예 2에서와 유사한 방법으로, 61 염기쌍의 올리고뉴클레오타이드를 준비하였다 (원하는 위치에 탄소동위원소를 위치시키기 위해서 어플라이드

바이오시스템즈 392 DNA/RNA 합성기를 이용한 스텝-바이-스텝 포스포르아미다이트 방법으로 합성하였다, 도 6A). 도 6B의 별표는 탄소동위원소의 위치를 보여주는데, 각각 도 6A의 DNA 위쪽 가닥의 15번째 아데닌과 56번째 아데닌을 나타낸다. 탄소동위원소를 포함하는 준비된 올리고뉴클레오타이드는 플래티네이션을 위한 하나의 d(GpG)를 가지고 있고, 상보적인 가닥에는 3'비오틴기를 가지고 있다. 실시예 2와 동일하게, 이 비오틴기는 스트렙타비딘기를 가지고 있는 고형 지지체 (스트렙타비딘-코팅된 자기 비드, 프로메가)를 이용하여 마지막 생성물을 쉽게 분리하기 위해 도입되었다.

[103] 도 6B에서 보는 바와 같이, 탄소동위원소가 다른 위치에 라벨링된 준비된 두 가지의 올리고뉴클레오타이드를 시스플라틴(cisplatin)과 각각 반응시킨 후, 손상된 부분의 제거를 위해 dNTPs가 있는 상태에서 HeLa 핵 추출물과 반응을 시켰다. 그 결과로 얻어진 DNA를 스트렙타비딘-코팅된 자기 비드를 이용해 분리한 후, 제조업체의 매뉴얼에 따라 비드에서 분리시키고, 그 방사성탄소 함량을 AMS를 이용하여 측정하였다 (도 6C). 도 6C에서 DNA I의 방사성 탄소의 양이 0이 아닌 것은, 모든 DNA가 시스플라틴에 의해 손상된 것은 아니기 때문이다(도 5A 참조). 이러한 결과는 DNA의 손상된 부분이 NER(Nucleotide Excision Repair)에 의해 제거가 되는데, 본 발명의 방법으로 손상된 부분 주위의 어느 정도까지 복구되는지를 확인할 수 있음을 보여준다.

청구범위

[청구항 1] i) 방사성 라벨된 리간드 분자를, 인 비트로(in vitro), 엑스 비보(ex vivo) 또는 인 비보(in vivo) 시스템에 도입하는 단계,
ii) 리간드 분자를 타겟 단백질에 공유적으로 가교결합시키는 단계,
iii) 단백질-리간드 복합체를 분리하는 단계,
iv) 분리된 단백질-리간드 복합체를 가속 질량 분석법(Accelerator Mass Spectrometry, AMS)에 의해 측정하는 단계, 및
v) 종래 검출 방법으로부터의 시그널과 AMS로부터의 시그널을 비교하는 단계를 포함하는, 단백질-리간드 상호작용을 확인하고 정량분석하는 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 방사성 라벨된 분자는 방사성 동위원소로 라벨된 약물, 호르몬, 대사물, DNA 또는 RNA 중의 뉴클레오티드, 및 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 방사성 동위원소는 ^{14}C인 방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 인 비트로, 엑스 비보 또는 인 비보 시스템은 정제된 단백질, 세포 추출물, 핵 추출물, 원핵 세포, 및 진핵 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 리간드와 단백질의 가교결합은 UV 광, 포름알데히드, 글루타르알데히드, 및 광활성화 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 가교결합제에 의해 이루어지는 방법.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 리간드-단백질 복합체의 분리는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동, 고성능액체크로마토그래피, 및 고속단백질액체크로마토그래피로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법에 의해 이루어지는 방법.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 리간드-단백질 복합체의 분리는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동에 의해 이루어지는 방법.

[청구항 8] i) 방사성 동위원소-라벨된 분자를 게놈 또는 세포 DNA에 도입하는 단계,
ii) 상기 방사성 동위원소-라벨된 분자를 함유한 게놈 또는 세포 DNA와 세포 추출물 또는 핵 추출물을 항온처리하고, DNA와 단백질을 가교결합시키는 단계,
iii) 단백질-DNA 복합체를 추출하여 분해시키는 단계,
iv) 단백질-DNA 복합체를 분리하는 단계,
v) 단백질-DNA 복합체를 가속 질량 분석법에 의해 측정하는 단계, 및
vi) 가속 질량 분석법에 의한 시그널과 DNA-단백질 복합체 확인을

위한 종래의 방법에 의한 시그널을 비교하는 단계를 포함하는, 단백질과 DNA의 상호작용을 확인하고 정량하는 방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 방사성 동위원소-라벨된 분자는 방사성 동위원소로 라벨링된 정상 뉴클레오시드, 산화된 뉴클레오시드 또는 DNA-손상 제제(damaging agent)로부터 선택되는 방법.

[청구항 10] 제9항에 있어서, DNA-손상 제제는 백금계 항암 약물, 질소 머스타드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드, 멜파란(melphalan), 클로람부실, 비스-클로로에틸니트로소우레아, 스트렙토조신, 부설판 및 티오테파로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

[청구항 11] 제8항에 있어서, DNA와 단백질의 가교결합은 UV 광, 포름알데히드, 글루타르알데히드, 및 광활성화 링커로 이루어지는 군으로부터 선택되는 가교결합제에 의해 이루어지는 방법.

[청구항 12] 제8항에 있어서, DNA-단백질 복합체의 분리는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동, 고성능액체크로마토그래피, 및 고속단백질액체크로마토그래피로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법에 의해 이루어지는 방법.

[청구항 13] 제12항에 있어서, DNA-단백질 복합체의 분리는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동에 의해 이루어지는 방법.

[청구항 14] 제8항에 있어서, 방사성 동위원소는 ^{14}C인 방법.

[청구항 15] i) 방사성 라벨된 뉴클레오티드를 이용하여 주어진 위치에서 방사성 동위원소를 함유한 올리고뉴클레오티드를 제조하는 단계,
ii) 상기 올리고뉴클레오티드를 상보성 올리고뉴클레오티드에 어닐링시켜 듀플렉스(duplex) DNA를 형성하는 단계,
iii) 상기 듀플렉스 DNA를, 플라스미드에 라이게이션(ligation)시키는 단계,
iv) 상기 듀플렉스 DNA를 함유한 플라스미드를 인 비보 또는 엑스 비보 시스템에 도입하는 단계,
v) 플라스미드와 단백질을 공유 결합시키는 단계,
vi) 플라스미드 DNA-단백질 복합체를 분리하여 분해하는 단계,
vii) 상기 플라스미드 DNA-단백질 복합체 분해물을 분리하는 단계, 및
viii) 분리된 DNA-단백질 복합체를 가속 질량 분석법에 의해 측정하는 단계를 포함하는 특정 DNA 서열에 대한 결합 단백질을 확인하고 정량하는 방법.

[청구항 16] 제15항에 있어서, DNA와 단백질의 가교결합을 위해 UV 광, 포름알데히드, 글루타르알데히드, 및 광활성화 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 가교결합제를 사용하는 방법.

[청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 듀플렉스 DNA를 함유한 플라스미드를 세포내로 전기천공(electroporation)시킴으로써 인비보 시스템에 도입하는 방법.

[청구항 18] 제15항에 있어서, 상기 듀플렉스 DNA를 핵 추출물 또는 세포 추출물과 항온처리하여 엑스 비보 시스템에 도입하는 방법.

[청구항 19] 제15항에 있어서, 플라스미드 DNA-단백질 복합체 분해물의 분리는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동, 고성능액체크로마토그래피, 및 고속단백질액체크로마토그래피로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법에 의해 이루어지는 방법.

[청구항 20] 제19항에 있어서, 플라스미드 DNA-단백질 복합체 분해물의 분리는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동에 의해 이루어지는 방법.

[청구항 21] 제15항에 있어서, 방사성 동위원소는 ^{14}C인 방법.

[청구항 22] i) 방사성 동위원소 라벨이 상이한 위치에 순차적으로 도입된 올리고뉴클레오티드 세트를 제조하는 단계,
ii) 상기 올리고뉴클레오티드 세트의 각 올리고뉴클레오티드에 상보성인 올리고뉴클레오티드를 이용하여 듀플렉스 DNA 세트를 제조하는 단계,
iii) 상기 듀플렉스 DNA에 손상(damage)을 도입하는 단계,
iv) 상기 듀플렉스 DNA를 NER 효소 또는 핵 추출물과 dNTPs와 항온처리하는 단계, 및
v) 생성된 DNA를 분리하고 가속 질량 분석법에 의해 측정하여 방사성활성을 확인하는 단계를 포함하는 뉴클레오티드 제거 복구(nucleotide excision repair, NER) 경로를 밝히는 방법.

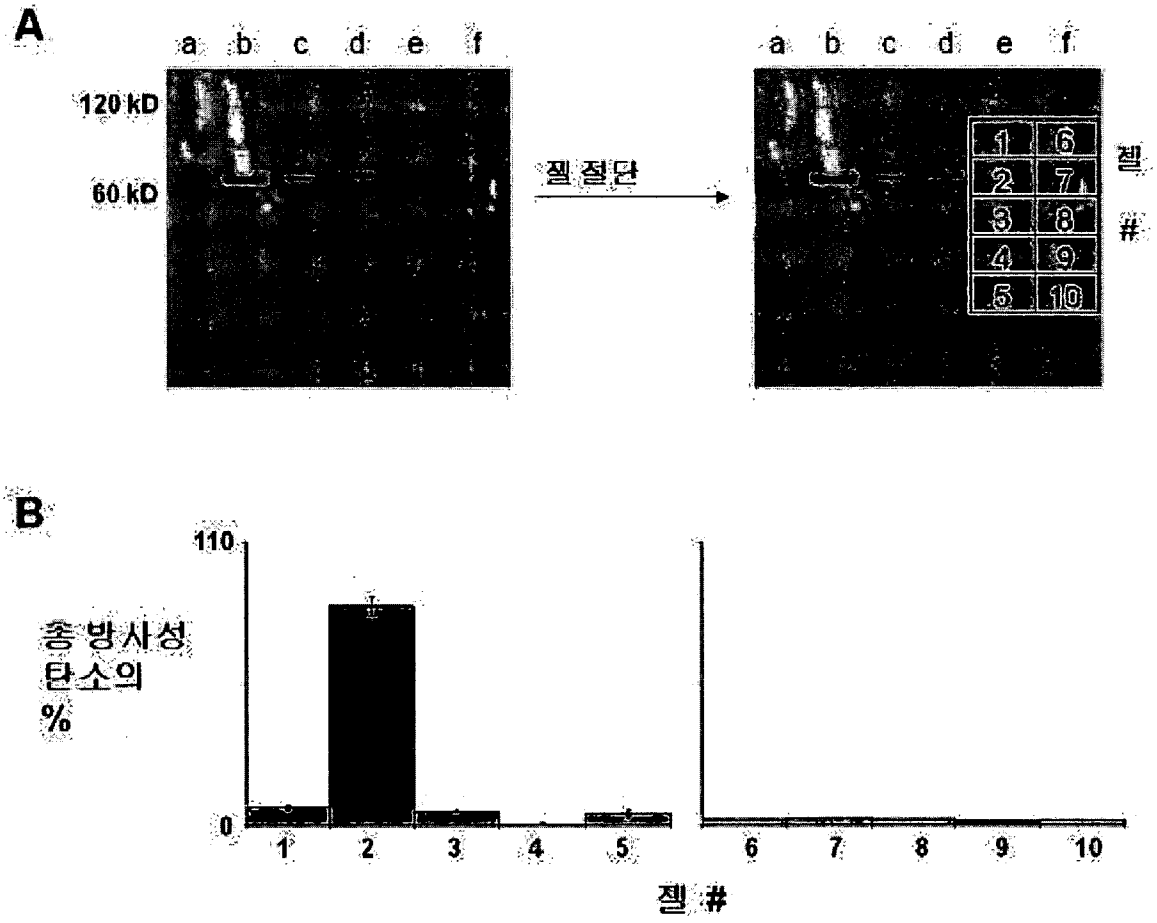
[청구항 23] 제22항에 있어서, 생성된 DNA의 분리는 플라스미드 DNA-단백질 복합체 분해물의 분리는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동, 고성능액체크로마토그래피, 및 고속단백질액체크로마토그래피로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법에 의해 이루어지는 방법.

[청구항 24] 제23항에 있어서, DNA의 분리는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동에 의해 이루어지는 방법.

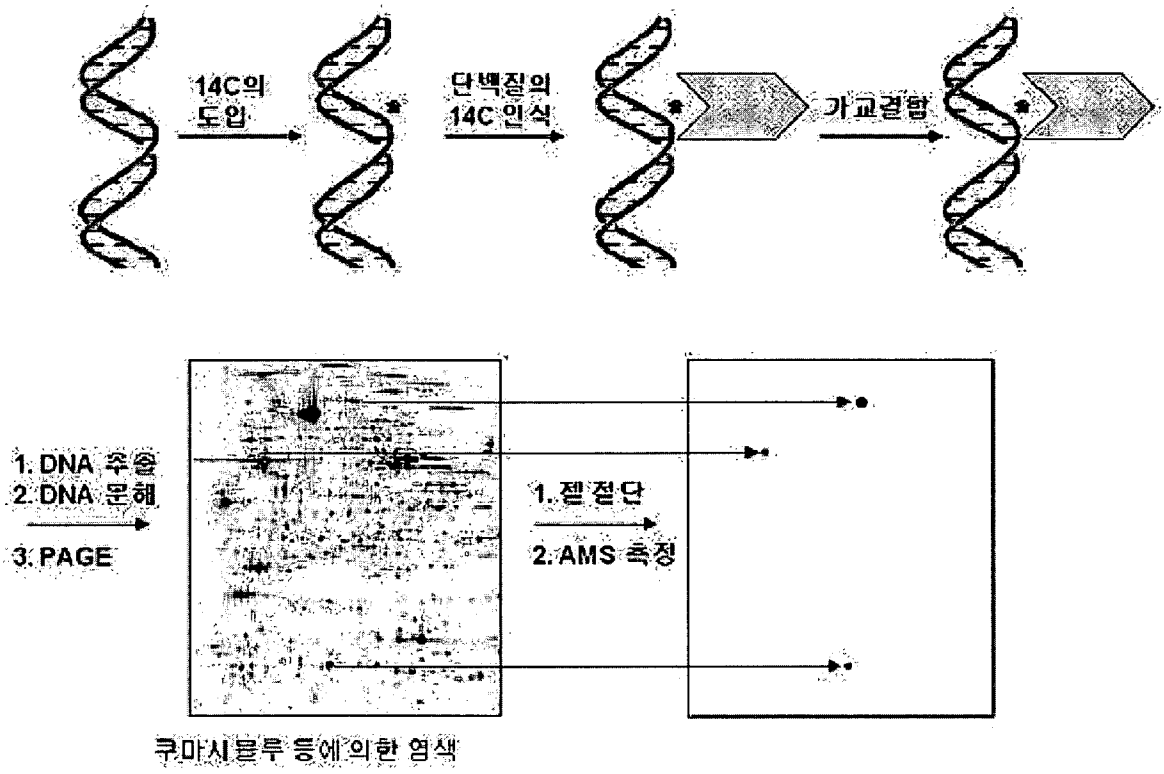
[청구항 25] 제22항에 있어서, 방사성 동위원소는 ^{14}C인 방법.

[청구항 26] 제1항, 제8항, 제15항 및 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 방사성활성의 측정이 가속 질량 분석법 대신 액체 신틸레이션 카운터에 의해 이루어지는 방법.

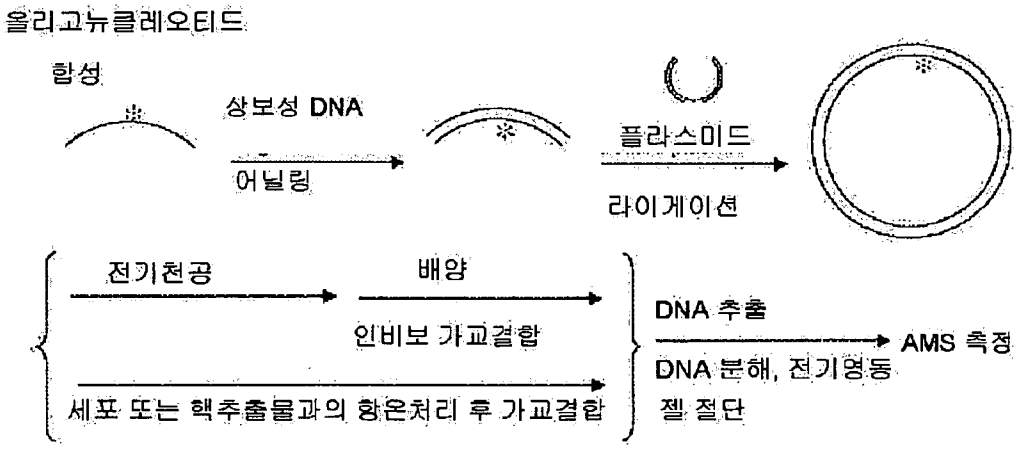
[Fig. 1]


A
a b c d e f
120 kD
60 kD
젤 절단
a b c d e f
1 6
2 7
3 8
4 9
5 10
젤 #
B
110
0
총 방사성 탄소의 %
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
젤 #

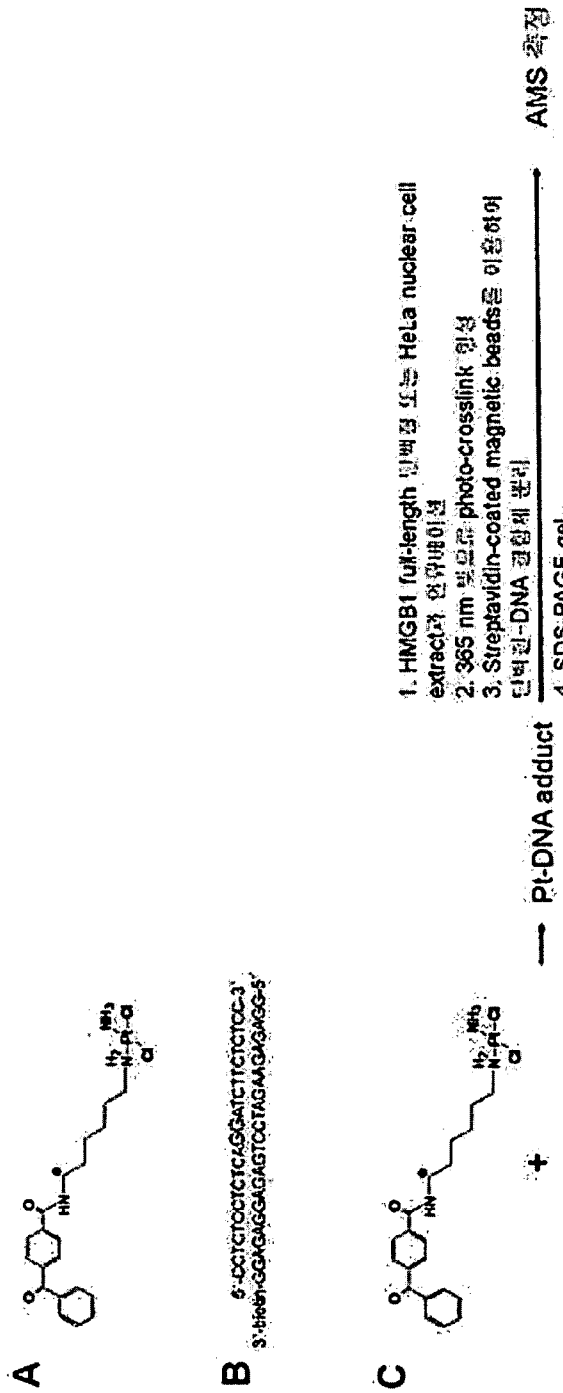
[Fig. 2]


14C의
도입
단백질의
14C 인식
가교결합
1. DNA 추출
2. DNA 분해
3. PAGE
1. 젤 절단
2. AMS 측정
쿠마시블루 등에 의한 염색

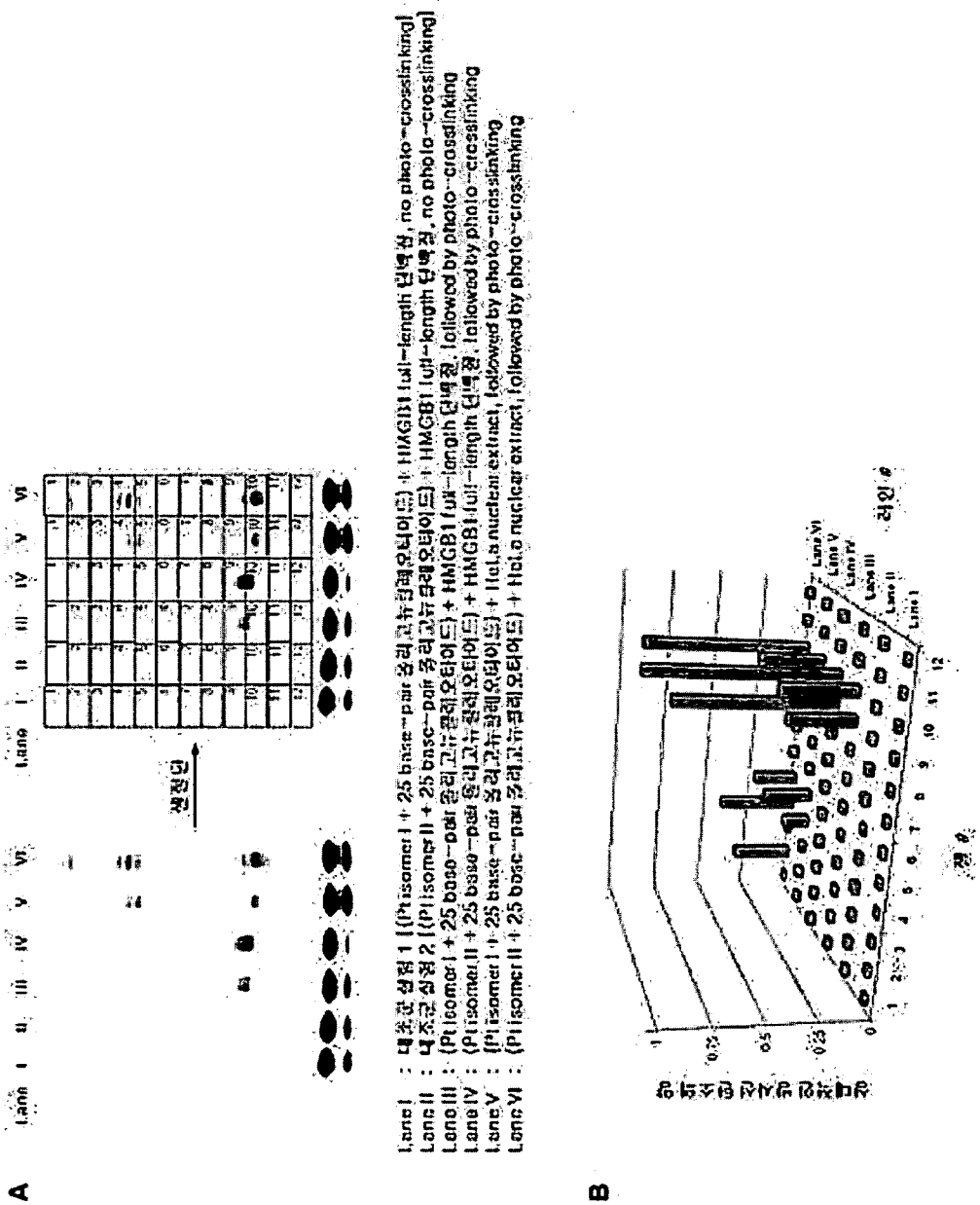
[Fig. 3]


올리고뉴클레오티드
합성
상보성 DNA
어닐링
플라스미드
라이게이션
전기천공
배양
인비보 가교결합
세포 또는 핵추출물과의 항온처리 후 가교결합
DNA 추출
DNA 분해, 전기영동
젤 절단
AMS 측정

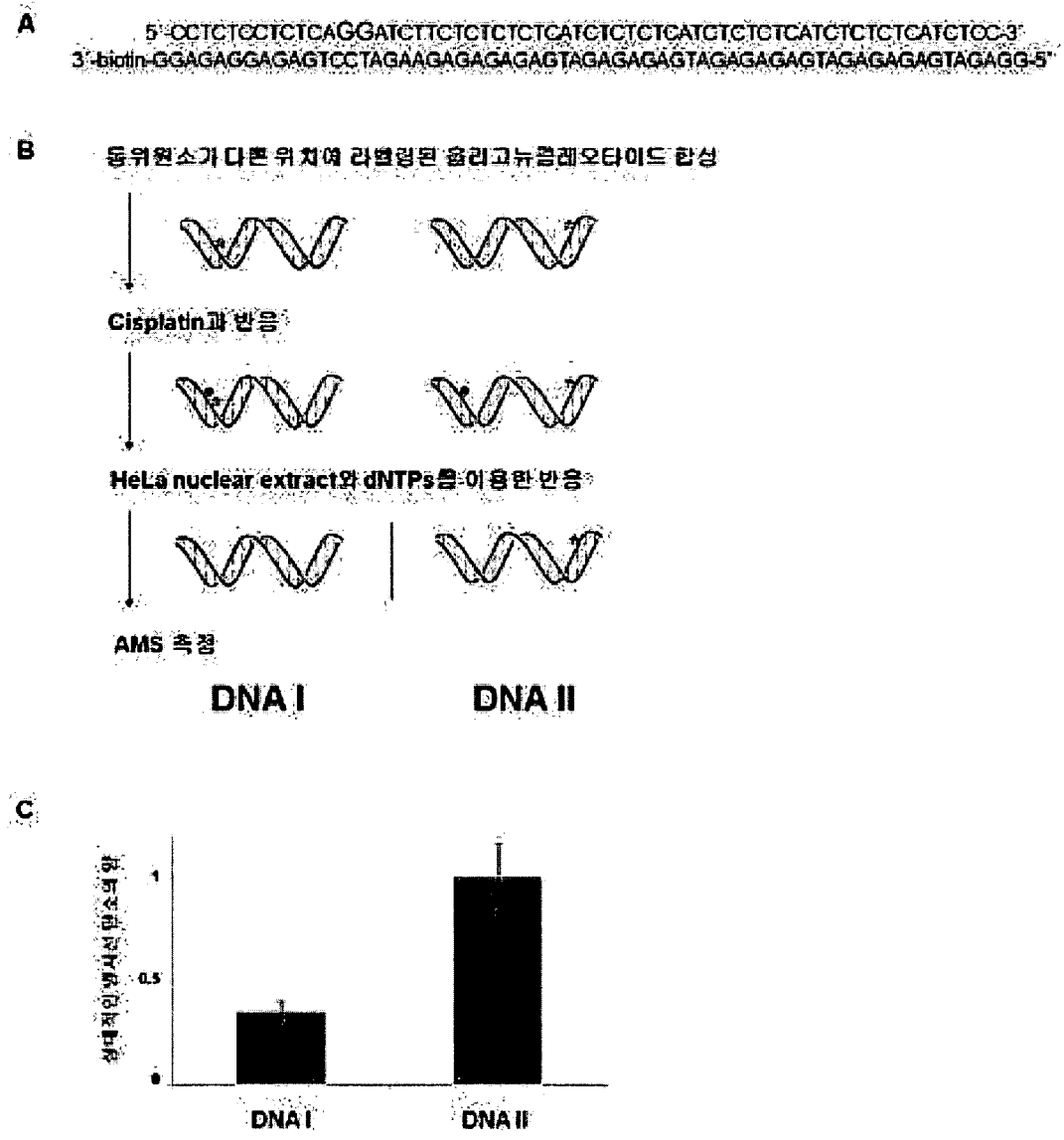
[Fig. 4]


A
B
C
Pt-DNA adduct
1. HMGB1 full-length 단백질 또는 HeLa nuclear cell extract와 인큐베이션
2. 365 nm 빛으로 photo-crosslink 형성
3. Streptavidin-coated magnetic beads를 이용하여 단백질-DNA 결합체 분리
4. SDS-PAGE gel
5. 젤 염색 후 절단
AMS 측정

[Fig. 5]


A
B
Lane I : 대조군 실험 1 (Pt isomer I + 25 base-pair 정리고뉴클레오타이드) + HMGB1 full-length 단백질, no photo-crosslinking
Lane II : 대조군 실험 2 (Pt isomer II + 25 base-pair 정리고뉴클레오타이드) + HMGB1 full-length 단백질, no photo-crosslinking
Lane III : (Pt isomer I + 25 base-pair 정리고뉴클레오타이드) + HMGB1 full-length 단백질, followed by photo-crosslinking
Lane IV : (Pt isomer II + 25 base-pair 정리고뉴클레오타이드) + HMGB1 full-length 단백질, followed by photo-crosslinking
Lane V : (Pt isomer I + 25 base-pair 정리고뉴클레오타이드) + Hela nuclear extract, followed by photo-crosslinking
Lane VI : (Pt isomer II + 25 base-pair 정리고뉴클레오타이드) + Hela nuclear extract, followed by photo-crosslinking
Lane
I
II
III
IV
V
VI
분리능
Lane I
Lane II
Lane III
Lane IV
Lane V
Lane VI
레인 #
결합 #

[Fig. 6]


A
5'-CCTCTCCTCTCAGGATCTTCTCTCTCTCATCTCTCTCATCTCTCTCATCTCTCTCATCTCC-3'
3'-biotin-GGAGAGGAGAGTCCTAGAAGAGAGAGAGTAGAGAGAGTAGAGAGAGTAGAGAGAGTAGAGG-5'
B
동위원소가 다른 위치에 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 합성
Cisplatin과 반응
HeLa nuclear extract와 dNTPs를 이용한 반응
AMS 측정
DNA I
DNA II
C
상대적인 방사선 동위원소의 양
1
0.5
0
DNA I
DNA II