

## 명세서

### 발명의 명칭: 그람 음성균 유래 원형 단백질의 분리 방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 삼투압 자극 및/또는 유기용매를 이용하여 그람 음성균을 용해시킴으로써 그람 음성균 유래 원형 단백질을 효율적으로 분리하는 방법에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 특정 병원균의 표지자가 되는 유전자 또는 단백질의 신속하고 정확한 검출은 병원균 감염 여부의 진단 뿐 아니라 해당 병원균의 항생제 내성과 같은 표현형 분석을 통한 치료 전략의 조기 수립에 있어 매우 중요한 과제이다. 실시간 PCR 등을 이용한 유전자 진단기술은 유전자 추출 및 증폭 과정을 비롯한 복잡한 공정이 요구되며, 고비용의 시료 전처리를 거쳐야 하고, 타겟 유전자의 염기서열에 대한 사전정보가 필수적이라는 점 등 신속, 정확한 대량 진단에 적용하기에는 한계를 가지고 있다.
- [4] 한편, MALDI-TOF를 비롯한 질량 분석법은 PCR 등에 의한 서열분석 방법에 비하여 저비용 고효율의 동정 시스템으로서 미생물의 신속한 동정에 필요한 중요한 수단이 될 수 있는데, 균주 배양 후 시료 처리에서 동정까지 10분 이내에 가능할 뿐 아니라, 미지의 균주에 질량분석 데이터를 통해 구축한 데이터베이스내의 질량 데이터와 비교하여 질량값이 일치되는 균주를 신속하게 동정할 수 있다.
- [5] 그러나, 질량 분석을 위해서는 박테리아의 세포벽 내에 존재하는 표지자 단백질을 배양 환경 밖으로 노출시키는 과정에 필수적인데, 기존의 미생물 단백질 추출 방법은 물질의 수소결합을 억제하는 카오토로픽제(chaotropic agent), 이온성 또는 비이온성 계면활성제를 사용하거나 초음파 파쇄법을 통해 미생물을 용해 또는 파쇄시키는 것이 일반적이었다. 이러한 방법은 질량 분석기의 감도에 영향을 주며, 질량분석 스펙트럼 상에서 많은 노이즈를 발생시키기 때문에 분석 전 별도의 정제 과정이 필수적이었다. 이에 분석 전의 전처리 공정에 많은 시간과 비용이 소요되며, 고가의 장비가
- [6] 필요하다는 단점이 있다. 따라서, 균주 감염의 진단 또는 시료의 생물학적 구성의 신속하고 정확한 분석을 위해, 보다 효율적인 시료 전처리 방법의 개발이 요구되고 있다.

[7]

- [8] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의

내용이 보다 명확하게 설명된다.

[9]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [10] 본 발명자들은 병원성 박테리아를 비롯한 다양한 원핵생물을 효율적으로 용해시키면서도 유래 단백질을 원형(intact) 그대로 수득할 수 있는 효율적인 단백질 용출 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 원핵생물이 포함된 시료에 저급 알코올 또는 니트릴 유도체를 포함하는 유기 용매를 접촉시키는 간단한 공정을 통해 원핵 생물의 세포벽을 용이하게 파쇄하면서도 물리적, 화학적, 효소적 손상 없이 원형 그대로의 단백질을 수득함으로써 진단 또는 시료 분석 등의 다양한 목적을 위한 단백질 동정에 유용하게 적용될 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [11] 따라서 본 발명의 목적은 원핵세포의 단백질 용출 방법을 제공하는 데 있다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 원핵세포의 단백질 용출용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [13] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[14]

### 과제 해결 수단

- [15] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 원핵세포(prokaryote)를 포함하는 생물학적 시료에  $C_1$ - $C_4$  알코올 및  $R-CN$ ( $R$ 은 직쇄 또는 분쇄의  $C_1$ - $C_3$  알킬이다)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유기 용매를 첨가하는 단계를 포함하는 원핵세포의 단백질 용출 방법을 제공한다.
- [16] 본 발명자들은 병원성 박테리아를 비롯한 다양한 원핵생물을 효율적으로 용해시키면서도 유래 단백질을 원형(intact) 그대로 수득할 수 있는 효율적인 단백질 용출 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 원핵생물이 포함된 시료에 저급 알코올 또는 니트릴 유도체를 포함하는 유기 용매를 접촉시키는 간단한 공정을 통해 원핵생물의 세포벽을 용이하게 파쇄하면서도 물리적, 화학적, 효소적 손상 없이 원형 그대로의 단백질을 수득함으로써 진단 또는 시료 분석 등의 다양한 목적을 위한 단백질 동정에 유용하게 적용될 수 있음을 발견하였다.
- [17]
- [18] 본 명세서에서 용어“원핵세포”는 핵막으로 둘러싸인 구분되는 핵을 가지지 않는 세포성 유기체를 의미한다. 원핵세포는 외형에 따라 막대기 모양의 간균(bacillus), 구형의 구균(coccus), 나선형의 나선균(spirillum)의 세 종류로 분류되며, 외막, 내막 또는 세포질막, 핵영역, 리보솜, 저장과립체, 플루틴 등으로 구성된다. 외막(outer membrane)은 외부 환경 속에서 세포가 원형을 보존할 수 있도록 지지하는 역할을 하고, 내막(inner membrane) 또는 세포질 막은

외부로부터 세포가 필요로 하는 이온이나 양분을 선택적으로 수송하고 또한 그 수송 속도를 조절하기 때문에 구조적 유실이 발생하면 세포 용혈(cell lysis)이 일어난다.

- [19] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 원핵세포는 그람 음성 박테리아이다. 본 명세서에서 용어“그람 음성 박테리아(Gram-negative bacteria)”는 그람 염색 시 붉은 색으로 염색되며, 색소 및 계면활성제에 대한 강한 내성을 가지는 박테리아를 의미한다. 본 발명의 방법이 적용되는 그람 음성 박테리아는 예를 들어 대장균(*Escherichia coli*), 시트로박터 코세리(*Citrobacter koseri*), 엔테로박터 애로진스(*Enterobacter aerogenes*), 에스케리키아 알버티(*Escherichia albertii*), 에스케리키아 블라태(*Escherichia blattae*), 에스케리키아 페르구소니(*Escherichia fergusonii*), 에스케리키아 헤르마니(*Escherichia hermannii*), 에스케리키아 불네리스(*Escherichia vulneris*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 아시네토박터 주니(*Acinetobacter junii*), 아시네토박터 보이시에리(*Acinetobacter boissieri*), 아시네토박터 칼코아세티쿠스(*Acinetobacter calcoaceticus*), 아시네토박터 해모리티쿠스(*Acinetobacter haemolyticus*), 아시네토박터 노소코미알리스(*Acinetobacter nosocomialis*), 아시네토박터 쉰들레리(*Acinetobacter schindleri*), 아시네토박터 유르싱기(*Acinetobacter ursingii*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*), 임질균(*Neisseria gonorrhoeae*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*), 쉬겔라(*Shigella*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 헤모필루스(*Haemophilus*), 브루셀라(*Brucella*), 레지오넬라(*Legionella*), 버크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 비브리오균(*Vibrio*) 및 스테노프로포모나스 말토펴리아(*Stenotrophomonas maltophilia*)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [20] 본 명세서에서 용어 "단백질"은 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 본 발명에서 용출하고자 하는 단백질은 시료 내의 원핵세포의 유무(즉, 감염 여부의 진단); 이의 종류; 또는 이의 항생제 내성을 비롯한 표현형을 동정할 수 있는 생물학적인 표지자가 되는 단백질일 수 있다.
- [21] 본 명세서에서 용어“진단”은 특정 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는 지 여부의 판정, 및 특정 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다. 본 발명의 취지 상 본 명세서에서 용어“진단”은 주로“병원균 감염 여부의 판정”을 의미한다.
- [22] 본 명세서에서“항생제에 대한 내성을 가진다”고 함은 특정 병원성 미생물에 대한 항생제가 고농도로, 또는 유효량으로 존재하는 환경 내에서도 해당 미생물이 생육 가능한 경우를 의미한다. 항생제 내성 여부는 병원성 미생물이

분비하는 단백질로서 해당 항생제를 분해하여 그 활성을 제거하거나 저하시키는 분해 효소의 존재를 검출함으로써 판별할 수 있다. 예를 들어, 세균의 세포벽 합성을 억제하는 베타-락탐계 항생제인 페니실린, 세팔로스포린, 모노박탐, 카바페넴 등은 베타-락타마제( $\beta$ -lactamase)에 의해 무력화되어 이를 발현하는 병원균을 억제하지 못한다. 이에, 이들 단백질의 검출 여부에 따라 해당 미생물의 항생제 내성 여부를 판정할 수 있다. 따라서, 용어“내성”은“저항성” 또는“낮은 치료적 반응성”과 동일한 의미로 사용된다.

[23]

[24] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 용출하고자 하는 단백질은 원핵세포의 세포 간극 단백질일 수 있다. 본 명세서에서 용어“세포 간극 단백질(periplasmic protein)”은 원핵세포의 외막(outer membrane)과 내막(inner membrane) 사이의 세포 간극(periplasmic space)에 존재하는 모든 단백질을 총칭하는 의미이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포 간극 단백질은 외막 또는 내막에 직접 또는 간접적으로 결합하고 있는 막-결합 단백질(membrane-associated protein)일 수 있다. 본 발명자들은 내막과 외막의 이중막 구조로 이루어진 원핵세포에서 막 사이 공간에 존재하는 단백질은 세포막의 총체적인 용해가 아닌, 외막 만을 붕괴시켜 세포 간극을 노출시킬 수 있을 정도의 최소한의 물리, 화학적 자극만으로도 용출이 가능하다는 점에 착안하여, 저급 알코올 또는 니트릴 등의 유기 용매를 가함으로써 원형 그대로의 세포 간극 단백질을 손상 없이 용출할 수 있음을 확인하였다.

[25] 본 명세서에서 용어“단백질 용출”은 생물학적 시료에 포함된 원핵세포 내 단백질을 세포벽 밖의 외부 환경으로 추출하는 과정을 의미한다. 따라서 용어 단백질의“용출”은 단백질의“추출”및 단백질의“분리”와 동일한 의미로 사용된다.

[26] 본 명세서에서 용어“알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필 등을 포함한다.  $C_1$ - $C_3$  알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유니트를 가지는 알킬기를 의미하며,  $C_1$ - $C_3$  알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[27] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 알코올은 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 1-부탄올 및 2-부탄올로 구성된 군으로부터 선택된다.

[28] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 R-CN은  $C_1$ -CN(아세토니트릴)이다.

[29] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 유기용매는 1-프로판올이다. 보다 구체적으로는 20-60 v/v%의 1-프로판올이며, 가장 구체적으로는 30-60 v/v%의 1-프로판올이다.

[30] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 유기용매는 1-부탄올이다. 보다 구체적으로는 3-12 v/v%의 1-부탄올이며, 가장 구체적으로는 5-10 v/v%의 1-부탄올이다.

[31] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 유기용매는

0.3-1.1의 옥탄올-물 분배계수(octanol-water partition coefficient, Kow)를 가지며, 보다 구체적으로는 0.4 - 1의 Kow를 가지고 가장 구체적으로는 0.5 - 0.9의 Kow를 가진다. 본 명세서에서 용어“옥탄올-물 분배계수”는 섞이지 않는 두 용매인 물 상과 기름 상 사이에서의 투여된 시료의 상대적으로 분배된 비를 의미하며, 1 보다 클 경우 소수성을, 1 보다 작을 경우 친수성을 나타낸다.

[32]

[33] 본 발명에서 용어“생물학적 시료”는 표적 단백질 또는 이를 발현하는 세포, 미생물, 이들의 배양액 등을 포함할 가능성이 있는 여하한 물질로서 생체로부터 분리된 시료(혈액, 혈장, 뇨, 타액, 조직, 기관 등), 환경(예를 들어, 물, 대기, 토양 등)으로부터 채취한 물질 또는 인위적으로 혼합된 시료 등을 총칭하는 의미로 사용된다.

[34] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 원핵세포(prokaryote)를 포함하는 생물학적 시료에 고장액(hypertonic solution) 또는 저장액(hypotonic solution)을 첨가하는 단계를 포함하는 원핵세포의 단백질 용출 방법을 제공한다.

[35] 본 발명에서 단백질을 분리하고자 하는 원핵세포 및 이를 포함하는 생물학적 시료에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기제를 생략한다.

[36] 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 원핵세포가 포함된 시료에 고장액 또는 저장액을 첨가하여 삼투 자극을 가할 경우, 삼투 용해(osmotic lysis)에 의해 원핵세포의 세포벽이 효율적으로 용해되면서 손상되지 않은 원핵세포 유래 단백질을 온전하게 수득할 수 있으며, 별도의 정제과정 없이 수득된 단백질의 분석을 개시할 수 있음을 발견하였다.

[37] 명세서에서 용어“삼투 용해”는 세포에 고장액(hypertonic solution) 또는 저장액(hypotonic solution)을 가하여 야기된 삼투 불균형을 통해 과량의 물이 세포 외부로 유출되거나 또는 내부로 확산되도록 함으로써 세포를 용해시키는 과정을 의미한다. 고장액은 세포 용해에 충분한 정도의 물이 유출될 수 있을 만큼 세포 또는 이의 배양액과 농도 차이를 가지는 고농도 용액이라면 다양한 용질의 용액이 제한 없이 사용될 수 있다. 저장액은 세포 용해에 충분한 정도의 물이 유입될 수 있을 만큼 세포 또는 이의 배양액과 농도 차이를 가지는 저농도 용액이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들어 증류수가 사용될 수 있다.

[38] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 상기 생물학적 시료에 고장액을 가함으로써 수행된다.

[39] 보다 구체적으로는, 상기 고장액은 글루코스(Glucose), 스크로오스(Sucrose)나, 만니톨(Mannitol), 트레할로오스(trehalose), 솔비톨(sorbitol), 염화칼륨(KCl) 및 염화나트륨(NaCl)으로 구성된 군으로부터 선택되는 용질을 포함한다.

[40] 보다 구체적으로는, 상기 고장액은 100 mM - 5 M의 염화나트륨(NaCl) 용액이며 보다 더 구체적으로는 200 mM - 3 M의 염화나트륨 용액이고, 가장 구체적으로는 400 mM - 1.5 M의 염화나트륨 용액이다.

- [41]
- [42] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 생물학적 시료 내 원핵세포(prokaryote)의 단백질 검출 방법을 제공한다:
- [43] (a) 전술한 본 발명의 단백질 용출방법을 이용하여 원핵세포의 단백질을 용출하는 단계; 및
- [44] (b) 상기 용출된 단백질에 대해 질량분석을 수행하는 단계.
- [45]
- [46] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight) 질량분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight) 질량분석, ESI-TOF(Electrospray ionisation time-of-flight) 질량분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 및 LC-MS/MS (liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry)로 구성된 군으로부터 선택되는 질량분석 방법을 이용하여 이루어진다.
- [47] 보다 구체적으로는 MALDI-TOF 질량분석을 이용하여 이루어진다.
- [48] MALDI-TOF 질량분석은 매트릭스(matrix)로 지지되어 있는 시료에 레이저를 조사하여 탈착 및 이온화시킨 후, 생성된 이온들이 검출기에 도달하는데 소요되는 시간(Time-of-Flight)을 측정하여 이온들의 분자량을 분석하는 방법으로, 타겟 물질의 절편화(fragmentation)가 일어나지 않기 때문에 단백질과 같은 거대 생체분자의 질량을 신속하고 정확하게 측정할 수 있다. 이온화된 분자가 전기장에 의해 가속되고 비행시간이 측정되면 질량 대 전하 비율(mass-to-charge ratio)(m/z)이 생성되는데, 이러한 m/z 값을 통해 타겟 물질의 분자량을 측정할 수 있다.
- [49] 본 발명에 따르면, 유기 용매 또는 삼투압 자극을 적용하는 본 발명의 단백질 용출방법은 최종 배경 (background) 산물이 질량분석 시 스펙트럼에 영향을 줄 수 있는 염(salt)이 포함되어 있지 않기 때문에 별도의 탈염(desalting) 과정 없이 바로 분석에 사용할 수 있으며, 박테리아의 파쇄 방법으로서 종래에 사용되어온 초음파, 계면활성제, 우레아 및 OG 처리 방법 등에 비하여 그람 음성균의 세포 간극(periplasmic space) 단백질 또는 막-결합 단백질(membrane-associated protein)의 질량 분석에 특히 현저히 우수한 신뢰도와 민감성을 보임을 확인하였다.
- [50]
- [51] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알코올 및 R-CN(R은 직쇄 또는 분쇄의 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이다)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유기 용매를 유효성분으로 포함하는 원핵세포(prokaryote)의 단백질 용출용 조성물을 제공한다.
- [52] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 고장액(hypertonic solution) 또는 저장액(hypotonic solution)을 유효성분으로 포함하는 원핵세포(prokaryote)의

단백질 용출용 조성물을 제공한다.

- [53] 본 발명에서 이용되는 유기용매, 저장액 및 고장액과, 이를 통해 단백질을 분리하고자 하는 원핵세포 등에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[54]

### 발명의 효과

- [55] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

- [56] (a) 본 발명은 원핵세포의 단백질 용출 방법을 제공한다.

- [57] (b) 본 발명은 병원성 박테리아 등을 포함하는 시료에 저급 알코올 또는 니트릴 유도체를 포함하는 유기 용매를 첨가하거나 또는 삼투압 자극을 가하는 단순한 공정을 통해 박테리아의 세포벽을 용이하게 파쇄하면서도 원형 그대로의 단백질을 손상 없이 수득할 수 있다.

- [58] (c) 본 발명은 특히 그람 음성균의 세포 간극 단백질(periplasmic protein)을 별도의 정제 과정 없이 신속하고 정확하게 동정하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

[59]

### 도면의 간단한 설명

- [60] 도 1a는 본 발명의 삼투압 방법을 이용하여 그람 음성균 유래 단백질을 용출한 결과와 종래의 단백질 추출법(초음파 처리; 소듐도데실 황산염(SDS)용액 처리; 우레아 처리 및 OG(옥틸 β-글루코사이드) 처리)에 의한 분리 결과를 SDS-PAGE 분석을 통해 비교한 결과를 나타낸다. 도 1b는 본 발명의 삼투압 방법에 사용된 각 염화나트륨 용액 농도 별 단백질 추출결과를 보여주는 그림이다.

- [61] 도 2는 본 발명의 삼투압 방법을 이용하여 용출된 다양한 그람 음성균 유래단백질들에 대한 SDS-PAGE 분석 결과를 보여주는 그림이다.

- [62] 도 3은 1-프로판올(도 3a 및 도 3d)과 아세트니트릴, 메탄올, 2-프로판올, 에탄올, 1-부탄올 및 2-부탄올(도 3b 및 도 3c)을 이용하여 용출된 그람 음성균 유래 단백질에 대한 SDS-PAGE 분석 결과를 각각 보여주는 그림이다.

- [63] 도 4는 본 발명의 방법으로 용출된 KPC-2 및 CTX-M-1 원형 단백질에 대한 MALDI-TOF 분석결과를 보여주는 그림이다.

- [64] 도 5는 본 발명의 방법으로 용출된 KPC-2 원형 단백질의 고분해능 질량분석결과를 Q Exactive HF-X(도 5a) 및 Q-TOF(도 5b)로 각각 나타낸 그림이다.

- [65] 도 6은 본 발명의 방법으로 용출된 CTX-M-1 원형 단백질의 고분해능 질량분석 결과(Q Exactive HF-X)를 나타낸 그림이다.

[66]

### 발명의 실시를 위한 형태

- [67] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [68]
- [69] 실시예
- [70] 실시예 1: 발현 단백질 용출을 위한 전처리
- [71] 세포 배양
- [72] KPC-2, CTX-M-1, NDM-1 유전자를 포함한 플라스미드의 형질전환 대장균을 50 $\mu$ g/ml의 암피실린 항생제가 포함된 Luria-bertani 액체 배지에 접종하고, 37°C에서 16시간 이상 배양하였다.
- [73]
- [74] 세포 용해
- [75] 삼투압 농도 구배를 이용한 시료 전처리
- [76] 시료 전처리를 위해 KPC-2 단백질이 발현된 균주 배양액을 4,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 상층액을 제거하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포에 고장액(500mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH8.0)을 첨가하여 재부유(resuspension)하였다. 현탁액은 상온에서 10분 동안 반응시켰다. 이후 4°C에서 14,000 g로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 남겨진 세포에 3차 증류수를 처리하여 재부유한 후 상온에서 10분 간 반응시켰다. 이후 4°C에서 14,000 g로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 보관하였다. SDS-PAGE 분석을 통해 삼투압 방법과 기존 단백질 추출법들을 비교하여, 삼투압 방법의 효율을 확인하였다(도 1). 또한 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter koseri*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*와 같은 다양한 그람 음성균을 삼투압 방법으로 용출하여, 단백질이 효율적으로 추출될 수 있음을 확인하였다(도 2).
- [77]
- [78] 유기용매를 이용한 시료 전처리
- [79] 시료 전처리를 위해 CTX-M-1, NDM-1 단백질이 발현된 균주 배양액은 4,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 상층액을 제거하여 세포를 수확하였다. 수확된 CTX-M-1이 발현된 균주 세포에 10~90%의 1-프로판올을 처리하여 상온에서 10분 간 반응시켰다. 이후 4°C에서 14,000g로 10분간 원심분리하여 상층액을 모아주었다. 상층액 시료에 대한 SDS-PAGE 분석을 통해 용출되어 나온 단백질들의 크기를 확인하였다(도 3a). 질량분석시에 유기용매의 비율은 10~70%의 분획을 사용하였다.
- [80] 나아가, 추가적인 유기용매로서 아세토니트릴, 메탄올, 2-프로판올, 에탄올, 1-부탄올, 2-부탄올을 NDM-1이 발현된 균주에 동일한 방법으로 전처리 실험을 진행하여, 용출되어 나온 단백질들을 확인하였다(도 3b). 박테리아의 막-결합

단백질에 속하는 NDM-1 단백질의 경우, 유기용매를 사용하여 선택적으로 분리할 수 있음을 확인하였다. 용질의 친수성과 소수성을 파악하기 위해 광범위하게 사용되는 옥탄올-물 분배계수(octanol-water partition coefficient)를 통해 유기용매 특성에 따른 막-결합 단백질을 용출시킬 수 있었다. 유기용매 중 1-프로판올이 용출효과가 가장 우수하였으며(도 3c), 다양하게 적용된 농도 중 30-60% 조건이 높은 용출 효율을 보임을 확인하였다(도 3d).

[81]

[82]     **실시예 2: 질량분석법을 통한 원형 단백질의 확인**[83]     저분해능 질량 분석기를 이용한 원형 단백질 분석

[84]     Bruker Biotyper Smart LT MALDI-TOF MS 장비를 활용하여 KPC-2 단백질의 질량분석 스펙트럼을 얻었다. 먼저 삼투압 방법에서 얻어진 상층액 1 $\mu$ l를 MALDI 플레이트 위에 스폿팅하여 말린 후, Matrix인 SA(20 mg/mL in 0.1% TFA/50% acetonitrile) 1 $\mu$ l를 스폿팅하여 덮어준 후 완전히 건조시켜 MALDI-TOF 분석을 실시하였다. 파동 이온 추출(Pulse ion extraction) 시간은 120 ns였으며 스펙트럼 측정은 ion source 1과 2에서 18 kV와 16.29 kV의 가속전압, 5.4 kV의 렌즈 전압을 사용하였고, 일반모드(linear mode)에서 측정하였다. Laser power는 75%로 설정하였으며, 40 shot씩 총 200 shot의 레이저를 조사하여 각 스펙트럼 데이터를 누적하여 수득하였다. 12,600에서부터 36,000 m/z 구간의 범위에 대하여 발현된 KPC-2 원형 단백질의 질량 분석 스펙트럼을 얻었으며, +1가와 +2가의 단백질도 동시에 검출되었다. 삼투압 방법의 용출 효과를 검증하기 위해 동일한 양의 시료를 비이온성 계면활성제인 n-옥틸-b-D-글루코피라노사이드(OG)를 사용하여 균을 용해시킨 후, MALDI-TOF 분석을 수행하였다. 그 결과, 삼투압 방법의 용출 방법을 적용한 경우 강도가 약 10배 정도 증가한 순도 높고 정제된 데이터값을 수득할 수 있었다(도 4). 또한 CTX-M-1 단백질이 발현된 균주를 1-프로판올로 용해시킨 후 10% 분획을 사용하여 동일한 방법으로 MALDI-TOF 분석을 수행하여, 용출되어 나온 CTX-M-1 원형 단백질의 스펙트럼 결과를 얻었다(도 4)

[85]

[86]     고분해능 질량분석기를 이용한 원형 단백질 분석

[87]     균주 내에서 발현되는 원형 단백질의 서열 및 범위를 확인하기 위해 Thermo Q Exactive HF-X, Agilent Q-TOF 질량분석기 시스템을 이용하여 액체 크로마토그래피 및 고분해능 질량분석을 수행하였다.

[88]

삼투압 농도 구배를 이용하여 전처리된 시료는 nano-drop 정량분석기기를 이용하여 280nm 파장에서 단백질의 농도를 측정하였으며 Q Exactive 분석 시 50ng, Q-TOF 분석 시 200ng에 해당하는 단백질이 컬럼에 주입되었다. 유기용매를 이용하여 전처리된 시료는 speed-vac 기기를 사용하여 유기용매를 모두 말려준 후, 0.1% 포름산에 잘 녹여준 후 nano-drop 정량분석기기를 이용하여 280nm 파장에서 단백질의 농도를 측정하였으며 삼투압 방법과 동일한 양이 컬럼에

주입되었다.

- [89]
- [90] 1) QExactive HF-X 분석
- [91] PLRP-S 컬럼(100 $\mu$ m x 600 mm)과 나노액체 크로마토그래피법을 이용하여 단백질 시료를 분리하였으며, 이때 사용한 시료의 로딩 및 분리용 구배 조건은 다음과 같다:
- [92] - 완충액 A: 물에 용해된 0.1% 포름산; 완충액 B: 아세토니트릴에 용해된 0.1% 포름산.
- [93] - 시료로딩: 0-5 분, 5% (B), 유속 4  $\mu$ L/min
- [94] - 분리 구배:
- [95] 5.0 - 5.1분, 5% -> 20% (B), 유속 1000 nL/min
- [96] 5.1 - 14분, 20% -> 95% (B), 유속 1000 nL/min
- [97] 14 - 15.5분, 95% (B), 유속 1000 nL/min
- [98] 15.5 - 16분, 95% -> 5% (B), 유속 1000 nL/min
- [99] 16 - 20분, 5% (B), 유속 1000 nL/min
- [100] - 질량분석 파라미터
- [101] 분해능: 전장 MS 240,000, MS2 120,000
- [102] 범위: 전장 MS 800 - 1,100 m/z 또는 1,300 - 2,000 m/z, 1500 ms
- [103] MS2 : 1500 ms, NCE(HCD) 35, 1-8가 이온화 물질은 MS2 대상에서 제외
- [104] AGC : 1e6
- [105] 2) Q-TOF 분석
- [106] C18 컬럼(2.1 x 150 mm)과 마이크로 액체 크로마토그래피법을 이용하여 단백질 시료를 분리하였으며, 이때 사용한 분리용 gradient 조건은 다음과 같다.
- [107] - 완충액 A: 물에 용해된 0.1% 포름산; 완충액 B: 아세토니트릴에 용해된 0.1% 포름산.
- [108] - 분리 구배:
- [109] 0 - 1분, 5% -> 10% (B), 유속 200 $\mu$ L/min
- [110] 1 - 25분, 10% -> 80% (B), 유속 200 $\mu$ L/min
- [111] 25 - 27분, 80% (B), 유속 200 $\mu$ L/min
- [112] 27 - 28분, 80% -> 5% (B), 유속 200 $\mu$ L/min
- [113] 28 - 30 분, 5% (B), 유속 200 $\mu$ L/min
- [114] - 질량분석 파라미터
- [115] Gas Temp 320°C, Drying Gas 8 l/min, Nebulizer 35 psi, Sheath Gas Temp 350 °C, Sheath Gas Flow 11 l/min
- [116] 범위: 전장 MS : 1,300~2,000 m/z
- [117] 획득 속도 3 spectra/s, Time 333.3 ms/spectrum
- [118] Q Exactive HF-X로 질량 분석된 원형 단백질을 동정하기 위한 소프트웨어는 미국 일리노이 NorthWestern 대학교에서 개발한 'Prosight Light' 프로그램을

활용하였다. 질량 분석된 원형 단백질의 MS1과 MS2 결과를 KPC-2와 CTX-M-1의 단백질 시퀀스와 매칭을 시켜보았을 때 KPC-2 단백질의 경우 4.68 ppm 차이로 MS1이 매칭이 되었으며 MS2의 경우 51개의 절편이 매칭이 되었다(도 5a). CTX-M-1은 -32.83 ppm 차이로 MS1이 매칭이 되었으며, 38개의 절편이 MS2 매칭이 되었다(도 5b). KPC-2 단백질은 1 - 21번 잔기 위치의 신호 펩타이드가 잘려진 활성형 형태로(AA 22-293) 동정되었으며, 68번, 237번 위치의 시스테인(cysteine)에 이황화 결합(disulfide bond)이 존재하는 것을 확인하였다. CTX-M-1의 경우에는 1 - 28번 위치의 신호 펩타이드가 잘려진 활성형 형태로 동정되었다(AA 29-291).

[119] Q-TOF 질량 분석을 통해서는 KPC-2 원형 단백질의 MS1 스펙트럼을 확인하여 검출하였으며, Q Exactive HF-X와 동일한 m/z 값을 얻었다(도 6)

[120]

[121] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 청구범위

- [청구항 1] 원핵세포(prokaryote)를 포함하는 생물학적 시료에 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알코올 및 R-CN(R은 직쇄 또는 분쇄의 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이다)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유기 용매를 첨가하는 단계를 포함하는 원핵세포의 단백질 용출 방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 알코올은 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 1-부탄올 및 2-부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 R-CN은 아세토니트릴인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 원핵세포는 그람 음성 박테리아인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 그람 음성 박테리아는 대장균(*Escherichia coli*), 시트로박터 코세리(*Citrobacter koseri*), 엔테로박터 애로진스(*Enterobacter aerogenes*), 에스케리키아 알버티(*Escherichia albertii*), 에스케리키아 블라타(*Escherichia blattae*), 에스케리키아 페르구소니(*Escherichia fergusonii*), 에스케리키아 헤르마니(*Escherichia hermannii*), 에스케리키아 불네리스(*Escherichia vulneris*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 아시네토박터 주니(*Acinetobacter junii*), 아시네토박터 보이시에리(*Acinetobacter boissieri*), 아시네토박터 칼코아세티쿠스(*Acinetobacter calcoaceticus*), 아시네토박터 해모리티쿠스(*Acinetobacter haemolyticus*), 아시네토박터 노소코미알리스(*Acinetobacter nosocomialis*), 아시네토박터 쉰들레리(*Acinetobacter schindleri*), 아시네토박터 유르싱기(*Acinetobacter ursingii*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*), 임질균(*Neisseria gonorrhoeae*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 클로스트리듐 디피실리(*Clostridium difficile*), 쉬겔라(*Shigella*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 헤모필루스(*Haemophilus*), 브루셀라(*Brucella*), 레지오넬라(*Legionella*), 버크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 비브리오균(*Vibrio*) 및 스테노프로포모나스 말토펴리아(*Stenotrophomonas maltophilia*)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 원핵세포(prokaryote)를 포함하는 생물학적 시료에 고장액(hypertonic solution) 또는 저장액(hypotonic solution)을 첨가하는 단계를 포함하는 원핵세포의 단백질 용출 방법.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 방법은 상기 생물학적 시료에 고장액을 가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

- [청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 고장액은 글루코스(Glucose), 스크로오스(Sucrose)나, 만니톨(Mannitol), 트레할로오스(trehalose), 솔비톨(sorbitol), 염화칼륨(KCl) 및 염화나트륨(NaCl)으로 구성된 군으로부터 선택되는 용질을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서, 상기 고장액은 100 mM - 5M의 염화나트륨(NaCl) 용액인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제 6 항에 있어서, 상기 원핵세포는 그람 음성 박테리아인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 다음의 단계를 포함하는 생물학적 시료 내 원핵세포(prokaryote)의 단백질 검출 방법:  
 (a) 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 방법을 이용하여 원핵세포의 단백질을 용출하는 단계; 및  
 (b) 상기 용출된 단백질에 대해 질량분석을 수행하는 단계.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 MALDI-TOF(Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight) 질량분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight) 질량분석, ESI-TOF(Electrospray ionisation time-of-flight) 질량분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 및 LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry)로 구성된 군으로부터 선택되는 질량분석 방법을 이용하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 MALDI-TOF(Matrix Desorption/ Ionization Time of Flight) 질량분석을 이용하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14]  $C_1$ - $C_4$  알코올 및 R-CN(R은 직쇄 또는 분쇄의  $C_1$ - $C_3$  알킬이다)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유기 용매를 유효성분으로 포함하는 원핵세포(prokaryote)의 단백질 용출용 조성물.
- [청구항 15] 고장액(hypertonic solution) 또는 저장액(hypotonic solution)을 유효성분으로 포함하는 원핵세포(prokaryote)의 단백질 용출용 조성물.