



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0035048
(43) 공개일자 2019년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/72 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 30/7266 (2013.01)
G01N 30/88 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0123823
(22) 출원일자 2017년09월26일
심사청구일자 2017년09월26일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
문명희
경기도 광주시 오폭읍 수레안길 70-4
이종철
충북 충주시 주덕읍 풍덕안길 47-1
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 10 항

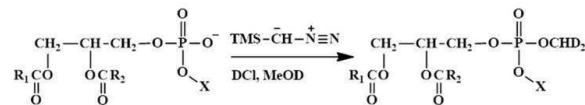
(54) 발명의 명칭 동위원소치환-메틸레이션 방법을 이용한 생체 내 지질 정성정량분석방법

(57) 요약

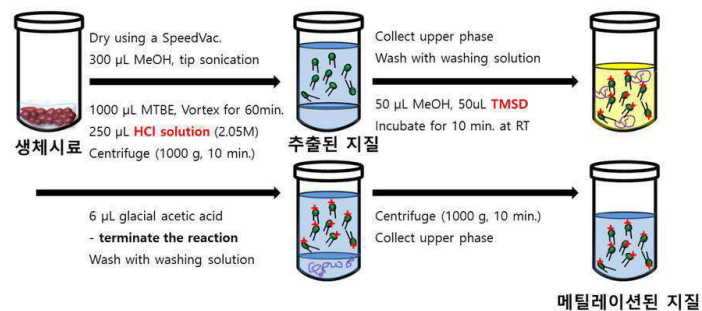
본 발명은 생체 내 지질을 추출하는 추출 단계; 추출된 지질에 동위원소가 치환된 알킬기를 도입하는 알킬레이션 단계; 및 액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기 시스템을 이용하여 알킬화된 지질을 분석하는 분석 단계를 포함하는 생체 내 지질 분석방법을 제공한다.

대표도 - 도1

1) 동위원소치환-메틸레이션 개요도



2) TMSD를 이용한 동위원소치환-메틸레이션 과정



(52) CPC특허분류

G01N 2030/8813 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016900411

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 분석체계 기반 생활습관병의 미래형 진단/분석법 개발(2/3)(2015.5.1~2018.4.30)

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

생체 내 지질을 추출하는 추출 단계;

추출된 지질에 동위원소가 치환된 알킬기를 도입하는 알킬레이션 단계; 및

액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기 시스템을 이용하여 알킬화된 지질을 분석하는 분석 단계를 포함하는 생체 내 지질 분석방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

동위원소는 중수소인 것을 특징으로 하는 생체 내 지질 분석방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

알킬레이션은 메틸레이션인 것을 특징으로 하는 생체 내 지질 분석방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

지질은 인지질인 것을 특징으로 하는 생체 내 지질 분석방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

지질의 인산기에 메틸레이션이 이루어지는 것을 특징으로 하는 생체 내 지질 분석방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

추출 단계 및 알킬레이션 단계에서 MEOD, DC1 및 D₂O 중 하나 이상을 사용하는 것을 특징으로 하는 생체 내 지질 분석방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

분석 단계에서 이온화 매개체를 포함하는 이동상을 이용하는 것을 특징으로 하는 생체 내 지질 분석방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

이온화 매개체는 포름산 암모늄, 수산화 암모늄, 아세트산 암모늄 중에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 생체 내 지질 분석방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기 시스템은 펌프; 분석칼럼; 밸브; 금속 와이어; 상기 펌프, 분석

칼럼, 밸브 및 금속 와이어와 각각 연결된 마이크로크로스; 및 밸브에 연결된 압력 모세관을 포함하는 것을 특징으로 하는 생체 내 지질 분석방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

분석 단계에서 지질의 용리 시에 압력 모세관을 조절하여 이동상이 분석칼럼과 질량분석기 방향으로 300 내지 500 nL/min의 속도로 흘러가게 하는 것을 특징으로 하는 생체 내 지질 분석방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 내 지질의 정성 및 정량 분석방법에 관한 것으로, 특히 동위원소 치환 및 메틸레이션 방법을 이용하여 생체 내 지질을 정성 및 정량 분석하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지질은 종래에는 생체막을 이루는 구성성분이나 에너지 저장의 역할을 한다고 알려져 있었지만, 이외에도 세포 간에 다양한 신호전달뿐만 아니라 최근에는 질병과 관련된 바이오마커의 역할로도 보고되고 있기 때문에 많은 관심을 모으고 있다. 이러한 지질을 분석하는 학문을 뜻하는 지질체학(lipidomics)이라는 용어가 등장할 정도로 관련 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.

[0003] 일례로 제2형 당뇨병에 걸렸을 경우에는 인슐린저항이 존재하는데, 그 원인으로서는 비지방조직에 과량의 지질이 축적되어 발생하는 지질독성(lipotoxicity)이 지목되고 있기 때문에, 당뇨병환자에서 지질 분석 연구가 수행되고 있다. 많은 연구를 통해 디아실글리세롤 및 트리아실글리세롤 등의 글리세롤 지질이 당뇨 환자에 있어서 큰 변화를 보이는 것으로 밝혀지고 있지만, 세포사멸 및 미토콘드리아 기능 등에 관련 있다고 알려져 있는 PA(phosphatidic acid) 및 카디올리핀(cardiolipin)을 포함한 인지질을 미량으로 존재하는 종까지 분석하는 것은 여전히 과제로 남아있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 생체시료 내에 미량으로 존재하고 있는 인지질 및 카디올리핀을 효과적으로 정성 및 정량 분석할 수 있는 분석방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 상술한 목적을 달성하기 위해, 생체 내 지질을 추출하는 추출 단계; 추출된 지질에 동위원소가 치환된 알킬기를 도입하는 알킬레이션 단계; 및 액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기 시스템을 이용하여 알킬화된 지질을 분석하는 단계를 포함하는 생체 내 지질 분석방법을 제공한다.

[0006] 본 발명에서 동위원소는 중수소일 수 있다.

[0007] 본 발명에서 알킬레이션은 메틸레이션일 수 있다.

[0008] 본 발명에서 지질은 인지질일 수 있다.

[0009] 본 발명에서 지질의 인산기에 메틸레이션이 이루어질 수 있다.

[0010] 본 발명의 추출 단계 및 알킬레이션 단계에서 MeOD, DCI 및 D₂O 중 하나 이상을 사용할 수 있다.

[0011] 본 발명의 분석 단계에서 이온화 매개체를 포함하는 이동상을 이용할 수 있다.

[0012] 본 발명에서 이온화 매개체는 포름산 암모늄, 수산화 암모늄, 아세트산 암모늄 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0013] 본 발명에서 액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기 시스템은 펌프; 분석칼럼; 밸브; 금속 와이어; 상기 펌프, 분석칼럼, 밸브 및 금속 와이어와 각각 연결된 마이크로크로스; 및 밸브에 연결된 압력 모세관을 포함

할 수 있다.

[0014] 본 발명의 분석 단계에서 지질의 용리 시에 압력 모세관을 조절하여 이동상이 분석칼럼과 질량분석기 방향으로 300 내지 500 nL/min의 속도로 흘러가게 할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 동위원소치환-메틸기 도입 방법과 액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기를 이용한 인지질 정성정량분석 방법을 개발함으로써, 생체시료 내에 미량으로 존재하고 있는 인지질 및 카디올리핀을 효과적으로 정성 및 정량 분석할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 동위원소치환-메틸레이션을 도시한 것으로서, 1)에는 메틸레이션 전/후 인지질의 구조를 나타낸 것이고, 2)에는 TMSD(trimethylsilyldiazomethane)를 이용한 일련의 메틸레이션 과정을 자세히 나타낸 것이다.

도 2는 액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기 시스템을 도시한 것이다.

도 3은 메틸레이션한 경우와 하지 않은 경우 18종의 인지질 표준물질을 검출한 크로마토그램으로서, 1)은 메틸레이션 하지 않은 경우이고, 2)는 메틸레이션한 경우이다.

도 4는 수소치환-메틸레이션과 중수소치환-메틸레이션한 인지질의 상대 비율을 나타낸 것이다.

도 5는 DU145 세포주에서 메틸레이션된 카디올리핀의 정성분석 과정을 나타낸 것이다.

도 6은 이온화 효율에 미치는 이동상의 이온화 매개체의 영향을 나타낸 것이다.

도 7은 nUPLC-ESI-MSⁿ 분석에 의해 얻은 H- 및 D-메틸화된 PL 분자의 스펙트럼을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명에 따른 지질 분석방법은 생체 내 지질을 추출하는 추출 단계; 추출된 지질에 동위원소가 치환된 알킬기를 도입하는 알킬레이션 단계; 및 액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기 시스템을 이용하여 알킬화된 지질을 분석하는 분석 단계를 포함할 수 있다.

[0019] 추출 단계에서는 메탄올(MeOH), MTBE(Methyl Tertiary Butyl Ether), HCl 등을 이용하여 생체 내 지질을 추출할 수 있으며, 이때 바람직하게는 MeOD, DCI 및 D₂O 중 하나 이상, 더욱 바람직하게는 모두를 사용할 수 있다. 생체는 인간과 동물을 포함한 모든 생물의 세포와 조직 등일 수 있다. 지질은 바람직하게는 인지질(phospholipid)일 수 있다.

[0020] 알킬레이션(alkylation) 단계에서는 추출된 지질에 동위원소가 치환된(isotope-labeled) 알킬기를 도입한다. 동위원소는 바람직하게는 중수소(D)일 수 있다. 알킬레이션은 바람직하게는 메틸레이션(methylation)일 수 있다. 특히, 지질의 인산기에 메틸레이션이 이루어질 수 있다. 알킬레이션 단계에서는 메탄올과 (트리메틸실릴)디아조메탄(TMSD) 등을 사용할 수 있으며, 이때 바람직하게는 MeOD 및 D₂O 중 하나 이상을 사용할 수 있다.

[0021] 분석 단계에서는 액체크로마토그래피(LC)-전기분무이온화(ESI)-질량분석기(MS) 시스템을 이용하여 알킬화된 지질을 분석한다. LC는 초고성능 LC(UPLC)일 수 있다. LC는 2가지 이상의 이동상(예를 들어, 친수성 이동상 및 소수성 이동상)을 이용할 수 있고, 이때 이동상의 농도 구배를 이용할 수 있다. 이온화 효율 등을 개선할 목적으로, 이동상에는 이온화 매개체(ionization modifier)를 첨가할 수 있다. 이온화 매개체로는 포름산 암모늄, 수산화 암모늄, 아세트산 암모늄 중에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0022] LC-ESI-MS 시스템은 오토샘플러를 구비한 LC 펌프; 지질 분리를 위한 분석칼럼; 흐름 제어를 위한 밸브; 전기분무이온화를 위한 금속 와이어; 상기 펌프, 분석칼럼, 밸브 및 금속 와이어와 각각 연결된 마이크로크로스(microcross); 및 밸브에 연결된 압력 모세관(pressure capillary)을 포함할 수 있다. 이온화 효율 등을 개선할 목적으로, 지질의 용리 시에 압력 모세관을 조절하여 이동상이 분석칼럼과 질량분석기 방향으로 300 내지 500 nL/min의 속도로 흘러가게 할 수 있다. 분석 단계에서 지질의 이온화 효율은 92% 이상, 바람직하게는 96%일 수 있다.

- [0023] 이하, 첨부도면을 참조하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0024] 도 1-1은 본 발명의 분석 대상인 인지질의 구조를 나타낸 것이다. 인지질은 글리세롤(glycerol) 기본 골격에 꼬리부분을 이루고 있는 두 개의 아실체인(acyl chain)과 인산기(phosphate group)로 치환되어 있고, 인산기에 붙어있는 머리부분(head group, X)으로 이루어져 있으며, 인산기에 있는 산소에 음전하를 띠는 것을 알 수 있다. TMSD와 중수소 치환된 시약을 사용하여 메틸레이션한 후에는, 인산기에 있는 산소에 중수소 치환된-메틸기(CHD_2)가 도입될 수 있다. 일반 수소 치환된-메틸레이션의 경우 CH_3 가 도입된다.
- [0025] 도 1-2에 설명되어있는 메틸레이션 과정은 크게 2단계로 구성되는데, 먼저 지질을 추출하고, 그 다음에 TMSD로 반응시켜서 메틸레이션하는 순서로 이루어져 있다. 메탄올(MeOH)과 MTBE로 이루어져 있는 유기용매와 수용액상인 HCl 용액으로 생체시료에 있는 지질을 추출할 수 있다. 추출된 지질에 메탄올과 TMSD를 넣어서 반응시켜준 후, 과량으로 남아있는 TMSD를 제거해내면 최종적으로 메틸레이션된 지질을 얻을 수 있다. 이때 중수소 치환된-메틸기를 얻기 위해서는, 사용된 MeOH , HCl 용액을 중수소 치환된 시약인 MeOD , DCl 용액을 이용하면 된다.
- [0026] 도 2는 메틸레이션한 지질을 분석하는 액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기(LC-ESI-MS) 시스템 구조를 나타낸 것이다. 초고성능액체크로마토그래피(UPLC)는 예를 들어 이동상 용매 A(물 $90 \pm 5\%$, 아세트로나이트릴 $10 \pm 5\%$, v/v)와 이동상 용매 B(메탄올 $20 \pm 5\%$, 아세트로나이트릴 $20 \pm 5\%$, 이소프로판올 $60 \pm 5\%$, v/v)를 이용할 수 있다. 마이크로크로스는 LC 펌프와 분석칼럼을 이어주며, 전기분무이온화를 위한 전극을 걸어 주기 위하여 플래티늄 와이어(Pt wire)가 연결되고, 유체의 흐름을 제어하기 위하여 밸브도 연결될 수 있다. 분석칼럼은 예를 들어 내경이 $100 \pm 10 \mu\text{m}$ 인 모세관에 $1.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 크기의 C_{18} 충전제를 $7 \pm 3 \text{ cm}$ 길이로 채워 제작할 수 있다.
- [0027] 추출된 지질은 자동시료주입기(autosampler)를 통해 칼럼에 주입 될 수 있다. 먼저, 도 2에서 실선으로 표시된 밸브 연결 상태에서 펌프로부터 나온 이동상 100% A가 모두 분석 칼럼으로만 이동하기 때문에 지질이 칼럼 앞부분에 분배될 수 있다. 그 후 밸브를 점선 상태로 바꿔주고 이동상 B의 %를 점차 늘려주어 흘려주면, 칼럼 입구에 분배되어 있던 지질들이 이동상 B에 의하여 용리되기 시작하며, 정지상(C_{18})과 상호작용하는 정도에 따라 순서대로 분리되어 질량분석기로 들어가게 된다. 이때 펌프에서 흘러나오는 용매는 수 $\mu\text{L}/\text{min}$ 단위이지만, 압력 모세관(pressure capillary)을 조절하여 분석칼럼과 질량분석기 방향으로 300~500 nL/min 정도가 흘러가도록 함으로써, 질량분석시 용매를 최소화하여 이온화 효율을 높여줄 수 있다.
- [0028] 도 3은 본 발명을 이용한 지질 표준물질들을 검출한 결과이다. Dionex Ultimate 3000 RSLCnano system과 LTQ Velose를 장착하여 분석하였다. 메틸레이션 하지 않은 경우에는 음전하 모드에서 분석되기 때문에, 이를 위하여 수산화 암모늄 매개체(modifier)를 넣어준 후 분석하였다. 메틸레이션 한 경우에는 양이온 모드에서 분석되기 때문에, 포름산 암모늄 매개체를 넣어서 분석하였다. 먼저, 분석칼럼으로만 이동상 A가 이동하도록 밸브 위치를 조절한 후 $0.7 \mu\text{L}/\text{min}$ 으로 10분간 흘려주었다. 그 후 밸브 위치를 바꾸고, $7 \mu\text{L}/\text{min}$ 속도로 0.1분간 60% 이동상 B로, 다음 5분 동안 75% 이동상 B로, 그 다음 10분간 80%로 올렸다가 마지막으로 99% 이동상 B로 5분간 올려주어 분석하였다. 칼럼으로 들어가는 유체의 속도는 300 nL/min으로 유지하였다.
- [0029] 두 크로마토그램은 지질 표준물질들 각 1 pmol씩 주입하여 테스트하였으며, 표준물질의 종류를 각 피크(peak) 번호와 같이 나타내었다. 메틸레이션 했을 경우 머무름시간(체류시간)이 전체적으로 증가하는 것을 확인할 수 있으며, 이는 인지질의 구조가 메틸레이션 되면서 더 비극성 성질이 강해져서 LC로 분리되는 중에 C_{18} 입자와의 상호작용이 증가한 결과로 파악된다. 포스파티드산(PA)이나 카디올리핀(cardiolipin, CL)을 포함하여 전체적인 피크 세기가 증가한 것은 결국 이온화 효율이 증가한 것으로 생각할 수 있는데, 이는 비극성 성질이 증가한 PA나 카디올리핀이 전기분무이온화 과정 중에 액적-공기 계면(droplet-air interface)으로 이동하려는 성질이 강해져서 이온화 효율이 증가했다고 예상할 수 있다. 이를 통해 생체 내 미량으로 존재하는 생체 내 인지질을 더 효과적으로 검출할 수 있음을 예측 가능하다.
- [0030] 도 4는 일반적인 수소치환-메틸레이션과 중수소치환-메틸레이션한 인지질을 비교한 것이다. Waters사의 nanoACQUITY UPLC system과 Thermo Scientific사의 TSQ Vantage를 장착하여 분석하였고, 매개체로서 포름산 암모늄을 넣어서 분석하였다. 먼저 분석칼럼으로만 이동상 A가 이동하도록 밸브 위치를 조절한 후 $0.7 \mu\text{L}/\text{min}$ 으로 10분간 흘려주었다. 그 후 밸브 위치를 바꾸고 $14 \mu\text{L}/\text{min}$ 속도로 0.1분간 70% 이동상 B로, 다음 5분 동안 80% 이동상 B로, 마지막으로 100% 이동상 B로 10분간 올려주어 분석하였다. 칼럼으로 들어가는 유체의 속도는 300 nL/min으로 유지하였다. 도 4-1은 16:0/18:1-PS의 경우를 대표적으로 나타낸 것으로서, 수소치환-메틸레이션한 샘플과 중수소치환-메틸레이션한 샘플을 2:8, 4:6, 5:5, 6:4, 8:2의 비율로 섞어준 혼합 샘플을 각각 분석한 후에 나온 피크 면적 비를 y축에 나타낸 것이다. 좋은 직선성이 나오는 것을 통해, 일반 수소치환-메틸레이션과

중수소치환-메틸레이션이 비슷한 정도로 인지질에 도입된다고 볼 수 있으며, 두 메틸레이션의 머무름시간이 동일한 것 또한 확인할 수 있다.

[0031] 도 4-2는 최종적으로 이 방법을 전립선암 세포주(cell line)인 DU145에 적용하기 위하여 매트릭스 효과를 테스트해본 것이다. 홀수 체인을 지니는 인지질 표준물질들을 DU145에 첨가(spiking)하여 도 4-1과 같이 분석하였을 때, 여러 종류의 다양한 아실 체인을 지니는 인지질에 대하여 각 비율에서 예상되는 비율에 근접한 값이 나오는 것을 통해, 실제 생체 시료에서도 일반 수소치환-메틸레이션과 중수소치환-메틸레이션이 비슷한 정도로 도입된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0032] TMSD를 이용한 메틸레이션 방법을 DU145 세포주에 적용한 후에, 액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기를 이용하여 정성분석을 진행하였다. 도 5는 72:5-카디오리핀을 예로 들어 나타낸 것으로서, 도 5-1에서 32.76분에 검출된 도 5-2의 질량분석 스펙트럼에서 m/z 값 1501.5를 지니는 72:5-카디오리핀을 예상할 수 있다. 카디오리핀에 있는 네 개의 아실체인 충돌유도해리 스펙트럼(collision induced dissociation spectra, MSⁿ spectra)을 이용해서 확인할 수 있다. 먼저 도 5-3에서 MS² 스펙트럼에서 나타난 m/z 값 601.5와 603.5를 통해 각각의 아실체인 쌍을 검출할 수 있고, 추가로 MS³ 스펙트럼에서 세부적인 구조를 파악하여 72:5-카디오리핀이 (18:1,18:2), (18:1,18:1)-카디오리핀임을 확인할 수 있다.

[0033] 최종적으로 DU145 세포주에 있는 4종류의 인지질(PG, PS, PA, CL)을 정성분석한 결과를 표 1에 나타내었다. 메틸레이션을 하지 않았을 경우에는 79개를 검출하였지만, 메틸레이션을 했을 때 112개를 검출하였다. 특히 CL은 25개나 더 검출할 수 있었는데, 이는 다른 문헌에서 세포나 조직에서 일반적으로 메틸레이션하지 않고 검출한 개수보다 월등히 많은 것이다. 따라서 메틸레이션했을 때 미량으로 존재하는 카디오리핀까지 분석할 수 있다고 판단할 수 있다. 표 1은 DU145 세포에서 검출한 4종류의 인지질 개수이다.

표 1

[0034]

| Class | 메틸레이션 | |
|-------|-------|-----|
| | X | O |
| PG | 34 | 34 |
| PS | 15 | 15 |
| PA | 12 | 20 |
| CL | 18 | 43 |
| Total | 79 | 112 |

[0035] 본 발명은 유기시약을 이용한 레이블링 방법에 기반을 두고 있으며, 생체 시료에 존재하는 수많은 인지질을 레이블링한 후에, 소수성 성질을 지닌 충전제를 채운 모세관으로 만든 칼럼이 장착된 액체크로마토그래피를 통해 분리한 후, 전기분무이온화-질량분석기를 통해 검출하는 방식으로 진행될 수 있다.

[0036] 유기시약은 TMSD를 사용할 수 있고, 이외에 인지질 추출 용매로서 메탄올(MeOH), MTBE, HCl, 물(H₂O), 중수소치환된 메탄올(MeOD), DCI, 중수소 치환된 물(D₂O)이 필요할 수 있다. 액체크로마토그래피는 두 가지 이동상 용매를 사용할 수 있는데, 하나는 인지질이 칼럼의 정지상에 분배될 수 있는 친수성 액체이고, 다른 하나는 인지질을 칼럼에서 용리한 뒤 전기분무이온화-질량분석기까지 이동시켜 검출하기 위한 소수성 액체일 수 있다.

[0037] 이러한 정량분석법은 메틸화된 인지질의 이온화 효율 증가로 인한 감도 향상으로, 기존에는 분석하기 어려웠던 지질 종을 검출할 수 있는 장점을 지닌다. 특히, 카디오리핀에 있어서 미량으로 존재하는 종까지 검출할 수 있으며, 복잡한 구조를 지닌 4개의 아실 체인의 구조분석이 가능하다는 장점이 있다. 또한 전기분무이온화-질량분석 과정 중에 이온화 변동에 의한 재현성 문제를 줄일 수 있어서, 더 신뢰성 있는 정량분석이 가능하다는 장점을 가진다.

[0038] 기존 인지질 분석방법은 질량분석기로 지질분자가 주입되기 전에 전기분무이온화 단계에서 이온화 변동을 보정해주는 방식으로 내부표준물질을 이용하였다. 내부표준물질은 생체 시료에 있는 지질분자와 성질은 비슷하지만 시료에는 없는 물질을 사용하는 것이 중요한 요소이기 때문에, 홀수 아실 체인을 지니는 합성된 지질분자를 내부표준물질로서 사용한다. 하지만 생체시료 내 수많은 지질분자를 보정해주기 위한 내부표준물질의 수는 한정되어 있다.

- [0039] 기존의 내부표준물질을 이용한 지질분석 방법을 보완할 수 있도록, 본 발명에서는 동위원소치환-레이블링 방법을 이용하였고, 특히 인지질에 메틸기를 도입시키는 방법을 이용하였다. 또한, 본 발명에서는 액체크로마토그래피를 사용하였기 때문에, 생체 내에 있는 많은 수의 지질분자를 분석할 수 있다. 동위원소치환-레이블링 방법과 액체크로마토그래피를 결합하면, 생체 내 지질분석에 있어서 시너지효과를 낼 수 있다. 비교 분석하려는 두 샘플을 각각 분석하지 않고, 한번의 분석을 통해 수많은 지질 양을 비교할 수 있으며, 더 재현성 있는 결과를 얻을 수 있다.
- [0040] 특히 카디오리핀의 경우 레이블링 방법에 의해 분석한 사례는 전무하다고 할 수 있으며, 미토콘드리아 막을 이루고 있는 주요성분뿐만 아니라 질병-관련 바이오파마코로서 역할을 할 수 있는 잠재력이 있는 지질분자임에도 분석에 어려움이 있었다. 본 발명은 이러한 문제점을 극복할 수 있어 진단의학 분야에서 매우 큰 잠재력을 지니고 있음을 알 수 있다.
- [0041] 진단의학 분야에서 사용되는 분석방법이 갖춰야 할 중요한 조건은 정확하게 매 시험마다 재현성 있는 결과를 얻을 수 있는 신뢰성 있는 방법일 것이다. 본 발명에서는 비교 분석하려는 두 샘플을 한번의 분석으로 검출하기 때문에 분석할 때마다 발생하는 오차를 최소화할 수 있다. 또한 본 발명에서 사용되는 지질 추출 및 메틸레이션 시약은 값비싼 내부표준물질보다 가격적으로 저렴하기 때문에 경제적인 장점이 있다.
- [0042] 이하, 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.
- [0043] [실시예]
- [0044] 본 실시예에서는 동위원소-레이블링된 메틸레이션(ILM) 방법을 이용한 지질 분석을 nUPLC-ESI-MSⁿ에 적용하였고, 이동상 및 이온화 매개체를 포함하는 최적 설정을 다양한 변경을 통해 확립하였다. 상기 방법은 TMSD를 이용한 세포 내 PL의 전반적인 동정 및 정량에 의해 평가하였다.
- [0045] 본 실시예에서 PL의 메틸레이션 효율의 체계적인 평가는 nUPLC-ESI-MSⁿ에 의해 선택 반응 모니터링(SRM) 방법으로, PL 표준물질(포스파티딜글리세롤(PG), 라이소PG(LPG), 포스파티딜이노시톨(PI), 라이소PI(LPI), 포스파티딜세린(PS), 라이소PS(LPS), 포스파티드산(PA), 라이소PA(LPA), 및 카디오리핀(CL))을 이용하여 H-레이블링된(-CH₃) 및 D-레이블링된(-CHD₂) 메틸레이션의 혼합 비율(H/D)을 변경하면서 수행하였다. 또한, 양이온 모드에서 메틸화된 PL의 검출에 미치는 이온화 매개체의 영향을 조사하였다. 이 방법은 천연적으로 존재하는 단당류이고 호중구에서 활성 산소종(ROS) 레벨을 감소시킴으로써 다양한 암 세포주의 증식을 억제하는 것으로 알려진 D-알로오스의 처리 후에, 호르몬-불응성 전립선 암(HRPC) 세포주(DU145)의 지질 추출물에 적용하였다. 본 실시예는 nUPLC-ESI-MSⁿ과 결합한 ILM이 D-알로오스 처리된 전립선 암 세포의 PL 프로파일에서의 상대적인 변화를 정량하는 강력한 도구로서 역할을 할 수 있음을 증명하였다. 본 실시예는 또한 세포 사멸과 밀접하게 관련된 PS 및 CL의 향상된 검출과 고속 정량에 초점을 맞추었다. 암 세포의 PL의 ILM-기반 정량은 분석용 샘플에 내부 표준물질의 첨가를 이용하는 개별 정량과 비교하였다.
- [0046] 1. 실험
- [0047] (1) 재료 및 시약
- [0048] 질량분석기는 Thermo Scientific(San Jose, CA, USA)사의 LTQ Velose와 TSQ Vantage, LC는 Thermo Scientific사의 Dionex Ultimate 3000 RSLCnano system과 Waters(Milford, MA, USA)사의 nanoACQUITY UPLC를 사용하였다. 분석칼럼과 연결용 모세관은 Polymicro Technology, LLC(Phoenix, AZ, USA)사의 제품을 사용했으며, 외경은 365 μ m이다. 충전제는 Waters사의 ACQUITY UPLC BEH C18 column(2.1 mm \times 100 mm)에서 뽑아낸 1.7 μ m 크기의 BEH particles을 이용했다. 실험에 사용된 모든 지질 표준물질은 Avanti Polar Lipids Inc.(Alabaster, AL, USA)에서 구매하였고, LC에 사용된 모든 HPLC grade 용매는 Avantor Performance Materials(Center Vally, PA, USA)에서 구입하였으며, 이온화를 도와주기 위하여 용매에 섞어준 포름산 암모늄, 수산화 암모늄 modifier는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. CD₃OD(MeOD), D₂O, DCI, TMSD는 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구매했고, HCl은 Samchun Pure Chemicals Co. Ltd.(Seoul, Korea)에서 구입했으며, glacial acetic acid는 Duksan Pure Chemicals Co. Ltd.(Ansan, Korea)에서 구입하였다.
- [0049] (2) 세포 배양 및 지질 추출
- [0050] DU145 HRPC 세포주를 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구하였다. 세포는 100 mm 페트리 접시에서 10% 열 불활성

화 소태아혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 RPMI 1640 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)로 배양한 후, 5% CO₂를 포함한 가습화 대기의 37℃ 인큐베이터에서 48 내지 72시간 동안 배양하였다. D-알로오스 처리를 위해, 40 mM D-알로오스를 배양 배지에 첨가하였다. 세포가 접시 면적의 90% 넘게 점유하였을 때, 0.25% 트립신-EDTA를 첨가하여 세포들을 탈착시켰다. 이때의 세포 농도는 약 6×10^6 세포/mL이었다.

[0051] 지질의 추출은 MTBE/MeOH를 이용한 변형된 Folch 방법에 따라 수행하였다. 요컨대, 수집된 세포 펠릿을 진공-건조한 후, MeOH (300 μ l)를 첨가하였다. 균질화를 위해 샘플을 1분 동안 초음파 처리하였다. 이후, 1 mL의 MTBE를 균질화물에 첨가하고 샘플을 1시간 동안 볼텍싱하였다. 이후, 250 μ l의 2.05 M HCl을 혼합물에 첨가하였다. 샘플을 10분 동안 볼텍싱하고 1000 g에서 10분 동안 원심 분리하였다. 상부 유기층을 새로운 튜브에 옮기고, 남은 하부층을 MTBE/MeOH/H₂O(10:3:2.5, v/v/v) 혼합물의 유기 (상부) 층 400 μ l를 이용하여 재-추출한 후, 10분 동안 볼텍싱하고 1000 g에서 5분 동안 원심 분리하였다. 상부층을 이전에 수집된 유기층과 함께 모았다. 합쳐진 유기층을 상기 용매 혼합물(MTBE/MeOH/H₂O)의 수성 (하부) 층 500 μ l로 10분 동안 볼텍싱하면서 세척한 후, 1000 g에서 5분 동안 원심 분리하였다. 유도체화를 위해 최종 유기층을 또 다른 튜브로 옮겼다.

[0052] (3) 동위원소-레이블링된 메틸레이션(ILM)

[0053] PL의 인산기의 메틸레이션은 PL 표준물질 혼합물 또는 세포 추출물의 유기층에 50 μ l의 MeOH 및 50 μ l의 TMSD (헥산에서 2 M, 황색)의 첨가로 시작한 후, 실온에서 10분 동안 혼합물을 볼텍싱하였다. 반응을 중단하기 위해, 6 μ l의 빙초산을 혼합물에 첨가하였고, 이후 황색 용액이 투명색으로 변하는 것을 확인한다. 이 혼합물에, 세척을 위해 MTBE/MeOH/H₂O(10:3:2.5, v/v/v)의 새로운 용매 혼합물의 수성 (하부) 층 500 μ l를 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 볼텍싱하고 1000 g에서 5분 동안 원심 분리하였다. 최종 유기층을 진공-건조하고, 보관을 위해 200 μ l의 MeOH/CHCl₃(9:1, v/v)에 용해시켰다. 이 혼합물을 nUPLC-ESI-MS/MS 분석을 위해 MeOH/H₂O(8:2, v/v)로 희석하였다. ILM은 모든 추출 및 유도체화 과정 중에 MeOH, H₂O 및 HCl을 각각 CD₃OD, D₂O 및 DCl로 대체함으로써 달성하였다.

[0054] (4) nUPLC-ESI-MSⁿ 분석

[0055] 2개의 nUPLC-ESI-MS/MS 시스템을 본 실험에서 사용하였다. 비표적 지질 동정은 Thermo Scientific(San Jose, CA)의 LTQ Velos 이온 트랩 질량분석기를 구비한 오토샘플러를 갖는 Dionex Ultimate 3000 RSLCnano 시스템을 이용하여 수행하였다. 지질의 SRM 정량은 Thermo Scientific의 TSQ Vantage triple-stage 4중극자 MS 시스템에 연결된 Waters의 nanoACQUITY UPLC 시스템을 이용하여 수행하였다. 분석 칼럼은 실험실에서 준비하였다. 지질 분리에 사용된 이동상은 A로서 (9.5:0.5, v/v) H₂O/CH₃CN 및 B로서 (2:2:6, v/v/v) MeOH/CH₃CN/IPA이었고, 음이온 모드에서 이온화 매개체로서 0.05% 수산화암모늄(AH) 및 양이온 모드에서는 5 mM 포름산암모늄(AF)을 첨가하였다.

[0056] 세포 지질의 비표적 분석을 위해, 10 μ g(2 μ l, 5 μ g/ μ l)의 지질 추출물을 분석 칼럼에 로딩하였고, 이때 이동상 A를 700 nL/min로 10분 동안 흘려주고 스위칭 밸브는 오프로 하였다. 주입 후에, 스위칭 밸브를 온으로 바꾸고, 펌프 유속을 7 μ l/min으로 설정하고, 칼럼 유속을 300 nL/min으로 조절하였다. 구배 용리 I(운전 조건 I)은 이동상 B를 0.1분 동안 0 내지 60%에서, 5분 동안 75%로, 10분 동안 80%로, 10분 동안 90%로, 그리고 추가로 5분 동안 99%로 증가시킴으로써 시작하였다. 99%에서, 이동상 B를 20분 동안 유지하여 칼럼을 세척한 후 칼럼 재-평형을 위해 10분 동안 0%로 하였다. 이온 트랩 MS를 위한 ESI 전압은 3.0 kV로 설정하였다. 전구체 스캔 MS의 m/z 범위는 400 내지 1600이었고, 데이터-의존 CID 분석은 40% 정상화 충돌 에너지에서 수행하였다. 지질의 분자 구조는 LiPilot 소프트웨어, 지질 분자의 분획 이온 스펙트럼을 기반으로 하고 실험실에서 개발하고 매뉴얼 검토로 확인한 알고리즘에 의해 결정하였다.

[0057] 메틸화된 지질의 SRM-기반 정량은 서로 다른 분석 조건에서 수행하였다. DU145 세포주의 지질 추출물은 H-레이블링된 메틸레이션으로 처리하고, D-알로오스-처리된 세포의 추출물은 D-레이블링된 메틸레이션으로 처리하였다. 메틸화된 지질 샘플들을 1:1 (H/D) 비율(각 지질 샘플에 대해 10 μ g/ μ l)에서 혼합하고 nUPLC-ESI-MS/MS 분석을 수행하였다. 지질 혼합물(2 μ l, 10 μ g)을 비표적 동정에서 사용된 동일한 분석 칼럼에 로딩하였고, 10분 동안 700 nL/min의 유속에서 이동상 A를 이용하였다. 샘플 로딩 후에, 스위칭 밸브를 온으로 바꾸고 펌프 유속을 14 μ l/min으로 증가시킴으로써, 칼럼 유속을 300 nL/min으로 조절할 수 있었다. 구배 용리 II는 이동상 B를 0.1분 동안 70%로, 5분 동안 80%로, 그리고 최종적으로 10분 동안 100%로 증가시킴으로써 시작

하였다. 이후, 칼럼 세척을 위해 100%에서 10분 동안 유지하고 5분 동안 0%로 하였다. 메틸화된 PL의 검출은 양이온 모드에서 3.0 kV의 ESI에서 m/z 1.0의 스캔 폭 및 0.001 s의 스캔 시간으로 수행하였다. 메틸화된 지질의 SRM 정량은 모든 종류에 대해 25 V의 CID에서 수행하였다. m/z 값 >1500을 갖는 CL 종의 경우, SRM 정량은 이온 트랩 MS를 이용하여 수행하였다. ILM 방법에서 얻어진 결과를 평가하기 위해, 통상적인 정량 실험은 홀수 아실 체인을 갖는 내부 표준물질 세트(0.5 pmol/ μ l)와 함께 개별 지질 추출물을 분석함으로써 수행하였다. 각 개별 지질 분자에서의 상대적인 변화는 두 샘플의 보정된 피크 면적(각 표준물질의 피크 면적 대비)의 비율 계산함으로써 분석하였다.

[0058] 2. 결과 및 토의

[0059] (1) 메틸화된 PL의 nUPLC-ESI-MSⁿ 분석

[0060] 서로 다른 헤드 기: PG, PI, PS, PA, PIP_n(이노시톨 기에서 서로 다른 정도의 인산화를 갖는 PIP 분자), CL 및 Cer1P를 갖는 PL 표준물질의 혼합물에 대해 메틸레이션을 수행하였다. 인산기의 메틸레이션은 PL의 소수성을 증가시켜 이온화 효율을 개선하였는데, 그 이유는 소수성 분자가 액적의 표면에 머무르는 경향에 의해 ESI 중에 다른 간섭 화합물들로부터 쉽게 분리되려는 경향을 가지기 때문이며, 그 결과 이온화 효율을 증가시켰다. 또한, 소수성의 증가는 역상 칼럼에서 긴 머무름시간을 유발하였고, 그 결과 고 비율의 유기 용매를 갖는 조건에서 용리되는 물질의 경우, 하전된 액적을 발생시키는데 더 유리하였다. 따라서, LC의 이동상에 첨가된 이온화 매개체의 영향을 조사할 필요가 있었다. 본 실험에서, 29개 PL 표준물질 포스트 H-메틸레이션을 이용하여 이들의 MS 신호세기를 비교함으로써 3개의 이온화 매개체를 시험하였다. 양이온 및 음이온 모드 모두에서 보편적인 매개체로서 이용되었던 혼합 매개체(5 mM AF + 0.05% AH), 메틸화된 포스포이노시티드의 MS 분석에 이용된 5 mM 아세트산 암모늄(AA) 및 5 mM AF를 포함한 이온화 매개체가 메틸화된 PL의 MS 신호세기에 미치는 영향을 도 6에 나타냈다. 대부분의 PL이 양성자화된 형태($[M+H]^+$)로 검출되었다. 그러나, PG, PI, PA 및 CL은 주로 암모늄 부가체 이온($[M+NH_4]^+$)으로 검출되었다. 이들은 양성자화된 형태($[M+H]^+$)로도 검출되었지만, 무시할만한 것으로 고려될 수 있다. 도 6에서 볼 수 있듯이, 5 mM AF는 PIP_n 분자를 포함한 모든 PL 그룹에 대해 가장 높은(~2배까지) 이온화 효율을 나타냈다. 따라서, 5 mM AF를 추가 분석용 이동상 용액의 이온화 매개체로서 이용하였다.

[0061] 메틸레이션 시에 PL의 소수성 증가로 머무름시간과 극성 PL의 이온화 효율을 증가되었다. 도 3은 1) 이동상에 첨가된 0.05% AH를 이용한 음이온 모드에서 얻은 18개 온전한 PL 표준물질 혼합물(각각 1 pmol) 및 2) nUPLC-ESI-MS/MS에 의해 얻은 5 mM AF를 이용한 양이온 모드에서 H-메틸화된 PL 표준물질의 추출된 이온 크로마토그램(EIC)을 나타낸다. 도 3의 2)의 크로마토그램은 H-메틸화 및 D-메틸화된 PL 표준물질(각각 1 pmol)의 1:1 혼합물을 이용하여 얻었다. PL의 메틸레이션 결과 머무름시간이 증가하였다(도 3의 2)). 그러나, 피크 번호 13 내지 18의 폭은 현저하게 감소하면서 신호세기는 증가하였다: 반폭치에 근거하여 온전한 것의 경우 0.25분 대 H-메틸화된 (14:0)₄-CL(피크 번호 18)의 경우 0.09분. 메틸레이션의 정도는 PL의 극성 헤드 기의 수(PI 및 PG의 경우 1, PS, PA 및 CL의 경우 2, PIP의 경우 3, PIP₂의 경우 5, PIP₃의 경우 7)에 따라 변하기 때문에, 연장된 머무름시간은 온전한 분자와 비교하여 고도의 메틸레이션을 갖는 분자(피크 번호 1, 4, 6, 8 및 18)에서 얻어졌다. 또한, 온전한 조건 하의 PIP_n 분자는 이노시톨에서 추가적인 인산기의 존재 때문에 MS의 음이온 모드에서 성공적으로 검출되지 않았다(도 3의 1). 그러나, 말단 인산기의 메틸레이션은 소수성 증가 때문에 피크 번호 11 및 12의 검출 효율을 향상시켰다. 추가로, Cer1P(번호 10) 및 PA(번호 13 및 17) 분자 또한 메틸레이션 했을때 MS 신호세기가 증가되었다. 여기서 주목해야 하는 것은 메틸레이션 이후 카디올리핀(CL)(피크 번호 18)에서 머무름시간이 현저히 증가하였지만 검출이 성공적으로 수행되었다는 것이다. MS와 역상 LC(RPLC)에 의한 CL 분석은 CL 분자에서 4개의 아실 체인의 존재로 인한 긴 머무름시간 때문뿐만 아니라 2개의 인산기로 인한 ESI 중 낮은 이온화 때문에 상대적으로 어려웠다. 메틸레이션은 미토콘드리아에서 특징적으로 발견된 미량의 CL의 선택적인 프로파일링에 큰 잠재력을 가졌다. 미토콘드리아 기능장애가 신경퇴행적 장애의 서막이기 때문에, CL의 효율적인 분석은 미토콘드리아 관련 질환에서 지질의 개입의 평가에 매우 유용한 것으로 판명될 수 있다. 세포 추출물의 CL 프로파일링의 향상은 추후 상세하게 논의될 것이다.

[0062] H- 및 D-메틸화된 PL의 분자 구조는 MS/MS/MS(³)에 의해 얻은 데이터-의존 CID 분획 이온 스펙트럼과 함께, 전구체 이온 m/z 값의 차이에 근거하여 구별될 수 있다. nUPLC-ESI-MSⁿ 분석에 의해 얻은 H- 및 D-메틸화된 PL 분자의 스펙트럼을 도 7에 나타냈다. 도 7a에서 피크 번호 13(도 3의 2)에서 t_r = 26.05분에서의 16:0/18:1-

PA)의 전구체 이온 MS 스펙트럼은 2개의 메틸기의 첨가로 인한 4 Da 차이로 m/z 720.5($[M_H+NH_4]^+$, H-메틸레이션의 경우 첨자 H) 및 m/z 724.5($[M_D+NH_4]^+$, D-메틸레이션의 경우 첨자 D)에서 암모늄 부가체의 형태로 2개의 레이브링된 이온의 검출을 나타낸다. 도 7b, c에서 각 MS/MS 스펙트럼은 $[M_H-PO_2(OCH_3)_2]^+$ 및 $[M_D-PO_2(OCHD_2)_2]^+$ 로서 동일한 m/z 577.5를 갖는 현저하고 공통적인 분획 이온의 형성과 함께, m/z 703.6($[M_H+NH_4-NH_3]^+$) 및 m/z 707.7($[M_D+NH_4-NH_3]^+$)에서 NH_3 의 손실을 나타낸다. 도 7d는 도 7b와 c에서 공통 이온 m/z 577.5의 MS³ 스펙트럼을 나타내고, m/z 321.4($[M_H-PO_2(OCH_3)_2-R_1COOH]^+$) 및 m/z 295.4($[M_H-PO_2(OCH_3)_2-R_2COOH]^+$)에서 카르복실산의 손실, m/z 239.3 및 265.3에서 아실륨 이온($[RCO]^+$)의 형태로 아실 체인의 검출, 그리고 m/z 211.3 및 247.3에서 아실륨 이온으로부터 물($[RCO-H_2O]^+$)의 손실을 나타낸다. 특징적인 분획 이온을 이용한 CID 스펙트럼에 근거하여, 이들은 H-메틸화 및 D-메틸화된 16:0/18:1-PA 분자로 쉽게 확인할 수 있다.

[0063] (2) 메틸레이션의 효율

[0064] 메틸레이션 반응의 수율은 HCl을 첨가함으로써 얻은 산성 조건(pH = 1~2)에서 증가하였다. HCl의 첨가 유무에 따른 24개 지질 표준물질의 메틸레이션 효율(%)을 표 2에서 비교하였다. 메틸레이션 효율은 초기 온전한 PL 중 대비 메틸화된 종의 퍼센트를 나타낸다. 메틸화된 종의 양은 메틸레이션하지 않은 동일한 분자의 피크 면적으로부터 메틸레이션 후 비-메틸화된 종의 전구체 이온의 피크 면적(각 특정 PL 종류의 내부 표준물질 대비)을 뺀으로써 계산하였다. ESI 중에 메틸화 및 비-메틸화된 종의 이온화 효율이 메틸화된 종의 소수성 증가로 인해 서로 다르기 때문에, 분자의 피크 면적의 비교는 nUPLC-ESI-MS/MS의 음이온 모드에서 메틸레이션 후 남은 온전한 PL 분자의 양에 근거하여 수행하였다. 표 2에서 나타내듯이, 산성 조건에서 PL의 메틸레이션 효율은 LPI 분자(~92.4%)를 제외하고 대부분의 종류에서 96% 이상이였지만, 반면에 중성 조건에서는 75~94% 효율이 얻어졌다. Cer1P 및 PIP_n의 효율 데이터는 표 2에 포함되지 않았는데, 그 이유는 이들 분자가 역상 nUPLC-ESI-MS/MS에 의해 분석되지 않기 때문이다. 그러나, 이들 분자는 메틸레이션 후 잘 검출되었다. 문헌에 따르면, Cer1P 및 PIP_n의 메틸레이션 효율은 93.8±0.2%로 보고되었다. 이 특정 방법에서 메틸레이션 효율은 잔류하는 온전한 PL 분자의 계산에 근거하였지만, 모든 분자가 메틸레이션되었는지는 확실하지 않다. 이것은 혼합 비율을 변경하면서 H- 및 D-메틸화된 표준물질 혼합물의 상대적인 비율을 측정함으로써 추가로 조사하였다.

표 2

Table 1. Effect of Acid Treatment on Methylation of PLs with TMSD^a

| class | acyl chain | methylation efficiency (%) | | | |
|-------|---------------------|----------------------------|---------|---------------|---------|
| | | normal | RSD (%) | acid | RSD (%) |
| LPG | 14:0 | 84.59 ± 5.33 | 6.30 | 84.59 ± 5.33 | 5.72 |
| PG | 18:0 | 91.29 ± 10.17 | 11.14 | 91.29 ± 10.17 | 10.76 |
| | 12:0/12:0 | 91.10 ± 7.51 | 8.25 | 91.10 ± 7.51 | 7.86 |
| LPI | 14:0/14:0 | 85.68 ± 7.42 | 8.66 | 85.68 ± 7.42 | 7.95 |
| | 16:0/16:0 | 79.08 ± 2.21 | 2.79 | 79.08 ± 2.21 | 2.16 |
| | 18:0 | 90.99 ± 10.47 | 11.51 | 90.99 ± 10.47 | 11.42 |
| PI | 20:4 | 89.24 ± 6.04 | 6.77 | 89.24 ± 6.04 | 6.62 |
| | 16:0/18:1 | 90.21 ± 2.12 | 2.35 | 90.21 ± 2.12 | 2.09 |
| | 18:0/18:0 | 94.13 ± 10.52 | 11.18 | 94.13 ± 10.52 | 10.93 |
| LPS | 18:0/20:4 | 92.46 ± 3.51 | 3.79 | 92.46 ± 3.51 | 3.63 |
| | 16:0 | 89.91 ± 5.22 | 5.81 | 89.91 ± 5.22 | 5.54 |
| PS | 18:1 | 83.07 ± 8.61 | 10.36 | 83.07 ± 8.61 | 9.32 |
| | 12:0/12:0 | 85.96 ± 6.70 | 7.79 | 85.96 ± 6.70 | 7.14 |
| | 14:0/14:0 | 79.61 ± 7.75 | 9.74 | 79.61 ± 7.75 | 8.47 |
| LPA | 16:0/18:1 | 75.45 ± 6.54 | 8.66 | 75.45 ± 6.54 | 7.10 |
| | 18:0/18:1 | 77.69 ± 3.79 | 4.88 | 77.69 ± 3.79 | 3.70 |
| | 18:0/18:0 | 83.21 ± 7.98 | 9.60 | 83.21 ± 7.98 | 8.52 |
| | 14:0 | 80.84 ± 5.65 | 6.99 | 80.84 ± 5.65 | 6.08 |
| PA | 18:0 | 76.82 ± 6.17 | 8.03 | 76.82 ± 6.17 | 6.53 |
| | 12:0/12:0 | 86.15 ± 4.97 | 5.77 | 86.15 ± 4.97 | 5.18 |
| | 14:0/14:0 | 90.90 ± 3.63 | 3.99 | 90.90 ± 3.63 | 3.68 |
| CL | 16:0/18:1 | 93.87 ± 5.09 | 5.42 | 93.87 ± 5.09 | 5.24 |
| | 18:0/18:0 | 91.38 ± 10.81 | 11.83 | 91.38 ± 10.81 | 11.31 |
| | (14:0) ₄ | 86.68 ± 8.81 | 10.16 | 86.68 ± 8.81 | 9.40 |

^aMethylation efficiency is based on the relative amount of methylated species, which was calculated by subtracting the peak area of intact PL molecules in methylated sample mixtures from that of the same PL molecule without undergoing a methylation reaction.

[0066] (3) nUPLC-ESI-MS/MS에 의한 PL의 ILM-기반 정량

[0067] nUPLC-ESI-MS/MS 분석에 의한 ILM-기반 정량은 29개 메틸화된 PL 표준물질 쌍(H- 및 D-메틸레이션)의 정량을 위해 수행하였다. H- 및 D-메틸화된 PL 표준물질을 5개의 다른 비율, 즉 0.25(2:8), 0.67(4:6), 1.00(5:5), 1.50(6:4) 및 4.00(8:2)의 H/D로 혼합하였고, 선택적 반응 모니터링(SRM) 방법에 따른 nUPLC-ESI-MS/MS에 의해 정량화하였다. SRM 정량을 위해, 각 PL 종류에 대한 정량화 이온의 형태는 각 지질 종류의 표준물질 중의 첫 번째 MS/MS 스펙트럼으로부터 선택하였다. 도 4-1의 좌측은 H-/D-메틸화된 16:0/18:1-PS의 계산된 피크 면적 비율(H/D) 및 nUPLC-ESI-MS/MS에 의해 얻어진 혼합 비율 사이의 상관관계를 나타내며, 0.25 내지 4.00의 H/D 사이에서 좋은 선형 관계를 나타낸다. 도 4-1의 우측은 4.19±0.17의 평균 H/D 값을 갖는 H- 및 D-메틸화된 PS 분자(각 샘플의 삼중 측정)의 겹쳐진 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 나타내며, 혼합 비율(4.00)로부터 약 5% 벗어났다. 각 종의 머무름시간은 H- 및 D-메틸화된 PS 양쪽 모두에 대해 14.96±0.04이었고, 편차는 무시할만하였다. 24개 메틸화된 PL 중의 계산된 피크 면적의 비율(H/D)을 표 3에 나타냈다. 평균에 대한 상대 편차가 6.6% 이내인 혼합 비율과 비교한 실험에서 대부분의 종류의 PL은 적절한 H/D 비율을 나타냈지만, 오직 LPI를 포함한 PI만이 예상 값으로부터 실험적 H/D 비율에서 평균 42.6%의 현저한 편차를 나타냈다. 이 차이는 이노시톨 헤드기의 사이클릭 고리에 의해 유발된 입체 장애로부터 기인할 수 있는데, PL의 다른 헤드기와 비교하여 상대적으로 크다. 이는 PI 분자의 메틸레이션이 다른 PL 분자만큼 효율적이지 못함을 나타낸다. 그러나, 다른 정도의 인산화를 갖는 PIP 분자는 예상된 H/D 값을 가지면서 좋은 상관관계(표 3에서 평균에 대해 6.14% 에러 이내)를 나타냈다. PIP, PIP₂ 및 PIP₃에서, 글리세롤 골격의 인산기에서의 메틸레이션 및 이노시톨 헤드기에서 말단 인산기의 메틸레이션(말단 인산기 당 2개의 메틸레이션)이 성공적으로 수행되었다.

[0068] 메틸레이션-기반 정량에 대한 매트릭스 효과는 DU145 세포의 세포 지질 추출물에 홀수 아실 체인 PL 표준물질을 첨가한 후, H- 및 D-메틸레이션에 대해 동일한 분취량의 혼합물을 처리함으로써 평가하였다. 세포 지질 추출물에 함유된 각각의 H- 및 D-메틸화된 PL 표준물질을 혼합 비율을 변경하면서(0.25, 0.67, 1.00, 1.50 및 4.00의 H/D) 동일한 방식으로 혼합하였다. 얻어진 혼합물을 상술한 바와 같이 분석하였다. H/D 메틸화된 종의 계산된 비율에 따르면, 예상된 비율로부터의 편차는 대부분의 종에 대해 평균 6.3% 미만이었으며, 표 3에서 관측된 평균 편차와 거의 유사하였다. 이것은 세포 추출물의 매트릭스 효과가 크지 않음을 암시한다.

표 3

Table 2. Calculated Peak Area Ratio (H/D) of H- and D-Labeled Methylation PL Mixtures at Various Mixing Ratio (H/D) for Nine Different PL Classes

| class | no. of methyl groups | acyl chain | calculated peak area ratio (H/D) | | | | | | | | | |
|------------------|----------------------|---------------------|----------------------------------|---------|-------------------------|---------|-------------------------|---------|-------------------------|---------|-------------------------|---------|
| | | | 0.25 (2:8) ^a | RSD (%) | 0.67 (4:6) ^a | RSD (%) | 1.00 (5:5) ^a | RSD (%) | 1.50 (6:4) ^a | RSD (%) | 4.00 (8:2) ^a | RSD (%) |
| LPG | 1 | 14:0 | 0.27 ± 0.01 | 3.96 | 0.72 ± 0.04 | 5.92 | 1.06 ± 0.04 | 3.49 | 1.59 ± 0.05 | 2.99 | 3.82 ± 0.18 | 4.61 |
| | | 18:0 | 0.26 ± 0.01 | 4.22 | 0.69 ± 0.04 | 5.52 | 1.06 ± 0.09 | 8.61 | 1.56 ± 0.07 | 4.54 | 3.90 ± 0.25 | 6.34 |
| PG | 1 | 12:0/12:0 | 0.25 ± 0.01 | 4.86 | 0.71 ± 0.06 | 7.87 | 0.99 ± 0.09 | 8.95 | 1.45 ± 0.09 | 5.91 | 4.03 ± 0.31 | 7.70 |
| | | 14:0/14:0 | 0.27 ± 0.02 | 7.12 | 0.70 ± 0.04 | 5.49 | 1.06 ± 0.06 | 5.39 | 1.59 ± 0.08 | 4.76 | 3.92 ± 0.16 | 4.05 |
| LPS | 2 | 16:0/16:0 | 0.27 ± 0.02 | 7.85 | 0.66 ± 0.05 | 6.90 | 1.00 ± 0.03 | 3.15 | 1.47 ± 0.10 | 6.70 | 3.78 ± 0.25 | 6.60 |
| | | 16:0 | 0.27 ± 0.02 | 8.75 | 0.72 ± 0.04 | 5.46 | 1.06 ± 0.04 | 4.15 | 1.61 ± 0.19 | 11.47 | 4.24 ± 0.15 | 3.45 |
| PS | 2 | 18:1 | 0.24 ± 0.02 | 9.89 | 0.64 ± 0.04 | 5.99 | 1.07 ± 0.11 | 10.51 | 1.59 ± 0.15 | 9.70 | 4.18 ± 0.12 | 2.81 |
| | | 12:0/12:0 | 0.26 ± 0.01 | 4.43 | 0.64 ± 0.01 | 1.79 | 1.00 ± 0.03 | 2.89 | 1.44 ± 0.02 | 1.16 | 3.85 ± 0.28 | 7.15 |
| | | 14:0/14:0 | 0.27 ± 0.01 | 2.75 | 0.69 ± 0.03 | 4.04 | 0.99 ± 0.04 | 3.68 | 1.48 ± 0.02 | 1.05 | 3.89 ± 0.13 | 3.46 |
| | | 16:0/18:1 | 0.27 ± 0.01 | 2.40 | 0.71 ± 0.02 | 3.29 | 1.05 ± 0.05 | 4.54 | 1.59 ± 0.02 | 1.19 | 4.19 ± 0.17 | 4.08 |
| | | 18:0/18:1 | 0.26 ± 0.01 | 2.95 | 0.71 ± 0.02 | 2.46 | 1.06 ± 0.03 | 3.16 | 1.57 ± 0.01 | 0.54 | 4.21 ± 0.19 | 4.60 |
| | | 18:0/18:0 | 0.27 ± 0.01 | 3.37 | 0.71 ± 0.03 | 4.02 | 1.06 ± 0.02 | 1.46 | 1.61 ± 0.08 | 5.05 | 4.19 ± 0.17 | 4.06 |
| LPA | 2 | 14:0 | 0.28 ± 0.01 | 3.68 | 0.71 ± 0.05 | 6.81 | 1.06 ± 0.07 | 6.79 | 1.57 ± 0.06 | 3.99 | 4.07 ± 0.35 | 8.54 |
| | | 18:0 | 0.27 ± 0.02 | 6.29 | 0.70 ± 0.02 | 2.60 | 1.05 ± 0.05 | 4.72 | 1.59 ± 0.08 | 5.12 | 4.23 ± 0.16 | 3.80 |
| FA | 2 | 12:0/12:0 | 0.27 ± 0.01 | 3.33 | 0.69 ± 0.05 | 6.63 | 1.06 ± 0.08 | 7.92 | 1.58 ± 0.04 | 2.62 | 4.26 ± 0.20 | 4.73 |
| | | 14:0/14:0 | 0.26 ± 0.02 | 6.65 | 0.70 ± 0.06 | 7.93 | 1.04 ± 0.02 | 2.38 | 1.59 ± 0.08 | 4.96 | 4.22 ± 0.30 | 7.02 |
| | | 16:0/18:1 | 0.26 ± 0.01 | 4.26 | 0.71 ± 0.02 | 2.12 | 1.04 ± 0.03 | 3.00 | 1.61 ± 0.11 | 7.00 | 4.13 ± 0.15 | 3.71 |
| | | 18:0/18:0 | 0.27 ± 0.01 | 3.39 | 0.70 ± 0.05 | 6.98 | 1.06 ± 0.03 | 2.68 | 1.60 ± 0.13 | 7.94 | 4.26 ± 0.16 | 3.75 |
| PIP | 3 | 18:1/18:1 | 0.26 ± 0.00 | 0.99 | 0.70 ± 0.01 | 2.10 | 1.06 ± 0.02 | 1.64 | 1.58 ± 0.05 | 2.88 | 4.21 ± 0.11 | 2.72 |
| PIP ₂ | 5 | 18:1/18:1 | 0.26 ± 0.01 | 2.75 | 0.71 ± 0.01 | 1.13 | 1.04 ± 0.01 | 0.65 | 1.57 ± 0.02 | 1.28 | 4.21 ± 0.06 | 1.47 |
| | | 18:0/20:4 | 0.26 ± 0.00 | 1.66 | 0.70 ± 0.01 | 1.60 | 1.01 ± 0.01 | 0.84 | 1.58 ± 0.04 | 2.34 | 4.17 ± 0.10 | 2.39 |
| PIP ₃ | 7 | 18:1/18:1 | 0.28 ± 0.01 | 2.48 | 0.64 ± 0.01 | 1.04 | 0.91 ± 0.01 | 0.81 | 1.37 ± 0.05 | 3.90 | 3.65 ± 0.06 | 1.73 |
| CL | 2 | (14:0) ₂ | 0.27 ± 0.00 | 0.78 | 0.70 ± 0.00 | 0.59 | 1.05 ± 0.01 | 0.81 | 1.55 ± 0.01 | 0.65 | 3.98 ± 0.02 | 0.50 |
| Cer1P | 2 | d18:1/18:1 | 0.26 ± 0.04 | 16.38 | 0.72 ± 0.01 | 2 | 1.03 ± 0.02 | 1.74 | 1.62 ± 0.03 | 1.76 | 4.29 ± 0.36 | 8.42 |

^aMixing ratio of each methylated lipids.

[0069]

[0070] (4) nUPLC-ESI-MS/MS에 의한 HRPC 세포의 PL 추출물의 ILM-기반 정량

[0071] ILM 방법이 D-알로오스의 처리가 있거나 없는 HRPC DU145 세포로부터 추출된 PL의 상대적인 정량을 위해 적용되었다. D-알로오스 처리된 세포의 PL 추출물은 D-메틸화하였고, 온전한 세포의 추출물은 H-메틸화하였다. 동일한 분취량의 두 메틸화된 생성물을 nUPLC-ESI-MS/MS 분석을 위해 함께 혼합하였다. 세포 PL의 ILM-기반 정량은 PG, PS, PA 및 CL 종류에 대해서만 수행하였다. 포스파티딜콜린(PC) 및 포스파티딜에탄올아민(PE)은 ILM-기반 정량에 포함되지 않았는데, 그 이유는 PE의 1차 아민기에서의 메틸레이션이 PC 분자를 형성함으로써, 세포 추출물의 원래 PC 분자로부터 거의 구별될 수 없을 수 있기 때문이다.

[0072] 이들 4개의 PL 종류의 구조 분석은 전체 112 종을 확인하였다(1 LPG, 33 PG, 1 LPS, 14 PS, 2 LPA, 18 PA 및 43 CL). PA 분자를 제외하고, SRM은 아실 체인의 이성질체 구조를 구별하지 못하기 때문에, 정량은 83개 PL에 대해 수행되었다. CID 실험에 의해 이성질체 형태의 확인된 분자 구조와 함께, PL 종에 대해 계산된 피크 면적 비율(D/H)에 따르면, 112개 종 중에서, 8개 PA 및 25개 CL만이 메틸화된 PL로부터 확인되었는데, 이들은 음이온 모드에서 종래 방법을 이용하여 온전한 PL 추출물에서는 검출되지 않았으며, 이러한 결과는 PA 및 CL을 메틸레이션 시킨 후 분석하였을 때 검출한계를 향상시켰음을 나타낸다. 특히, CL의 확인된 수는 메틸화된 추출물로부터 43개로 증가하였지만, 온전한 PL 추출물로부터는 18개 종만이 확인되었다. 이것은 확인된 CL의 보고된 수(고-해상도 LC-MS를 이용하여 PC-3 세포로부터 24개 및 쥐 간으로부터 28개)와 비교하여 현저히 개선된 결과이다. CL 검출에서의 향상은 소수성 증가로 인해 메틸화된 CL 분자의 이온화 향상에 기인하는 것으로 생각된다. 또한, 그렇지 않으면 어려웠던, 온전한 CL에서 4개의 아실 체인 위치의 결정은 메틸레이션 후 각 쌍의 아실 체인, 즉 (16:0,16:1), (18:1,18:1)-CL 및 (16:1,18:1), (16:0,18:1)-CL에 대해 얻어졌다. 세포 추출물의 메틸화된 CL의 일련의 CID 스펙트럼에 따르면, 두 아실 체인의 각 세트의 분자 구조는 분획 이온($[R_1CO_2CH_2(R_2CO_2)CHCH_2]^+$)의 MS³

실험에서 명확하게 구별될 수 있고, 메틸화된 카디올리핀 분자의 암모늄 부가체의 MS² 실험으로부터 쉽게 얻어졌다. 우리가 아는 한, 이것은 양이온 모드에서 CL의 각 글리세롤 분자에 있는 아실 체인 세트 위치의 확인을 증명하는 첫 번째 보고이다. ILM-기반 정량의 평가를 위해, 측정된 D/H 값을 종래 정량 방법에서 얻은 값과 비교하였으며, 종래 방법에서는 (D-알로오스의 처리가 있거나 없는) 온전한 PL 추출물을 개별적으로 분석하였고 각 종의 양은 각 헤드기에 특징적인 내부 표준물질(IS) 대비 보정된 피크 면적으로 측정하였다. 두 정량 방법의 비교는 스튜던트 테스트에 의해 이성질체 체인 구조를 포함하지 않은 4개 PG, 4개 PS, 10개 PA 및 8개 CL에 대해 수행하였는데, 그 이유는 ILM-기반 정량이 아실 체인에서 탄소 및 이중 결합의 전체 수에 의존하고, 반면에 종래 정량 방법은 개별 이성질체 분자에 의존하기 때문이다. 두 방법으로부터 계산된 p-값은 18:1/18:1-PS를 제외하고 모든 샘플에서 0.05보다 큰 것으로 밝혀졌는데, 이는 ILM-기반 정량 방법이 종래 방법과 통계적으로 다르지 않음을 나타낸다.

[0073] 다른 결과에 따르면, D-알로오스로 처리시, 대부분의 PS, PA 및 CL 종은 감소한 반면에, 일부 PG는 증가하였다. D/H 비율에서 30% 이상의 변화를 나타낸 종이 있었다. PS 및 PA의 양의 감소는 DU145 세포에 대한 D-알로오스의 항-증식성 효과에 기인할 수 있었고, 미토콘드리아-매개된 세포사멸 경로의 결과일 수 있다. PA 및 CL의 감소 경향과 PG의 레벨 증가는 CL이 시티딘 디포스페이트(CDP) 디아실글리세롤의 존재 하에서 CL 생성효소에 의해 PG로부터 합성되고, 전구체로서 시티딘 트리포스페이트(CTP)를 이용하여 PA 시티딜-전이효소에 의해 PA로부터 형성된다는 사실에 의해 설명될 수 있었다. 따라서, D-알로오스 처리 후 PA 양의 현저한 감소(16:0-LPA를 제외하고 모든 19개 PA에 대해 2~3배)는 PG의 CL로의 전환을 억제한 결과로 볼 수 있다.

[0074] 3. 결론

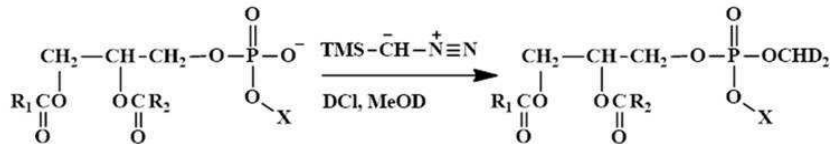
[0075] 본 실시예에서는 ILM-기반 정량 방법의 능력을 최적화된 이온화 매개체인 5 mM AF를 이용하여 양이온 모드에서 평가하였다. 이 방법은 ESI의 효율을 개선하고 PL의 소수성을 증가시킴으로써, 머무름시간을 길게 하였다. H-및 D-메틸화된 지질의 변경된 머무름시간은 거의 동일하였고, 이는 2개의 다른 샘플의 혼합물로부터 PL이 내부 표준물질 없이 동시에 분석될 수 있음을 증명한다. 메틸레이션 효율은 산성조건에서 LPI(~92.4%)를 제외하고 대부분의 PL에서 96%보다 높았다. H-및 D-메틸화된 PL 사이에서 6.6% 미만의 에러 값을 갖는 좋은 선형 관계가 관측되었다. ILM-기반 정량 방법은 모든 종류의 PL에서 내부 표준물질을 이용하는 종래방법과 비교하였고, 18:1/18:1-PS를 제외하고 모든 종류의 지질에 대해 0.05보다 컸던, 스튜던트 테스트의 p-값에 근거하여, 동일하게 효과적인 것으로 밝혀졌다. ILM-기반 방법의 두드러진 이점은 온전한 PL 추출물로부터 검출되지 않았던 추가적인 PL(8개 PA 및 25개 CL)의 검출, 메틸화된 CL의 검출 능력 증가에 의한 CL 분석 개선, 4개 아실 체인의 위치가 구별 가능한 점이다. CL이 미토콘드리아에서 특징적으로 발견됨에 따라 ILM-기반 정량 방법은 특히 미토콘

트리아-관련 질환의 지질체학적 분석에 적용될 수 있다. 현재의 방법은 PC 및 PE에 대해 적용되지 않았지만, C¹³ 레이블링된 TMSD의 이용 결과, 메틸화된 PE는 동일한 아실 체인 구조를 갖는 온전한 PC보다 3 Da 큰 m/z 값을 가졌는데, 그 이유는 PE의 메틸레이션이 1차 아민에서의 3개의 메틸레이션 또는 1차 아민에서의 2개의 메틸레이션과 인산기에서의 메틸레이션의 조합으로 만들어질 수 있는 것으로 알려졌기 때문이다.

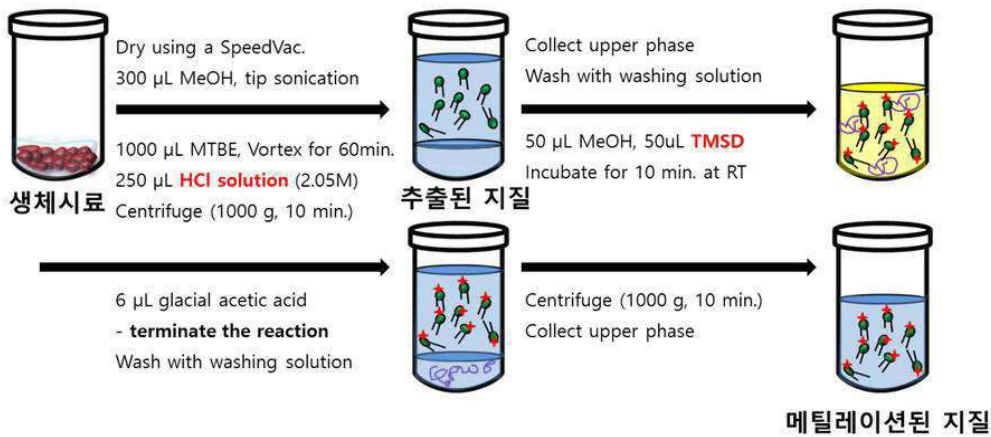
도면

도면1

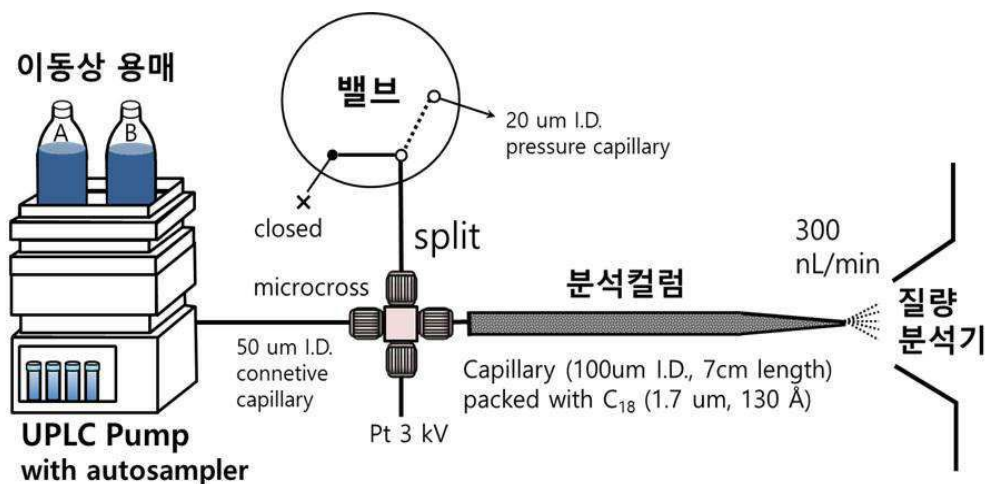
1) 동위원소치환-메틸레이션 개요도



2) TMSD를 이용한 동위원소치환-메틸레이션 과정

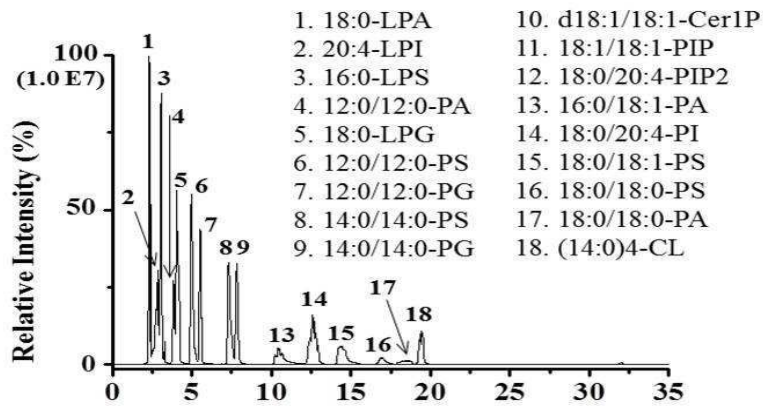


도면2

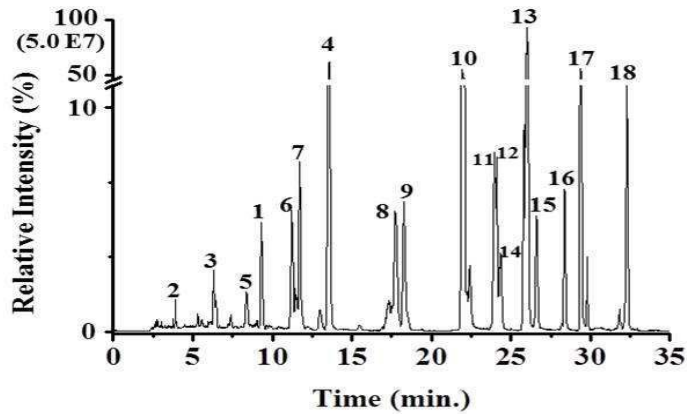


도면3

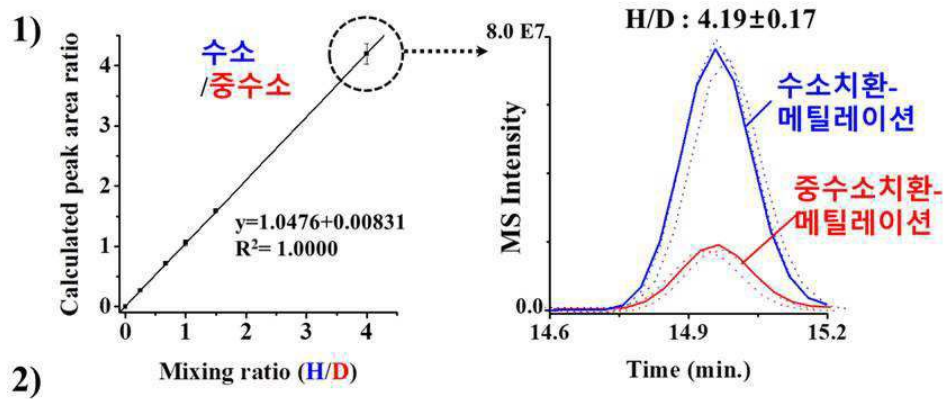
1) 메틸레이션하지 않은 인지질, ESI-



2) 메틸레이션된 인지질, ESI+

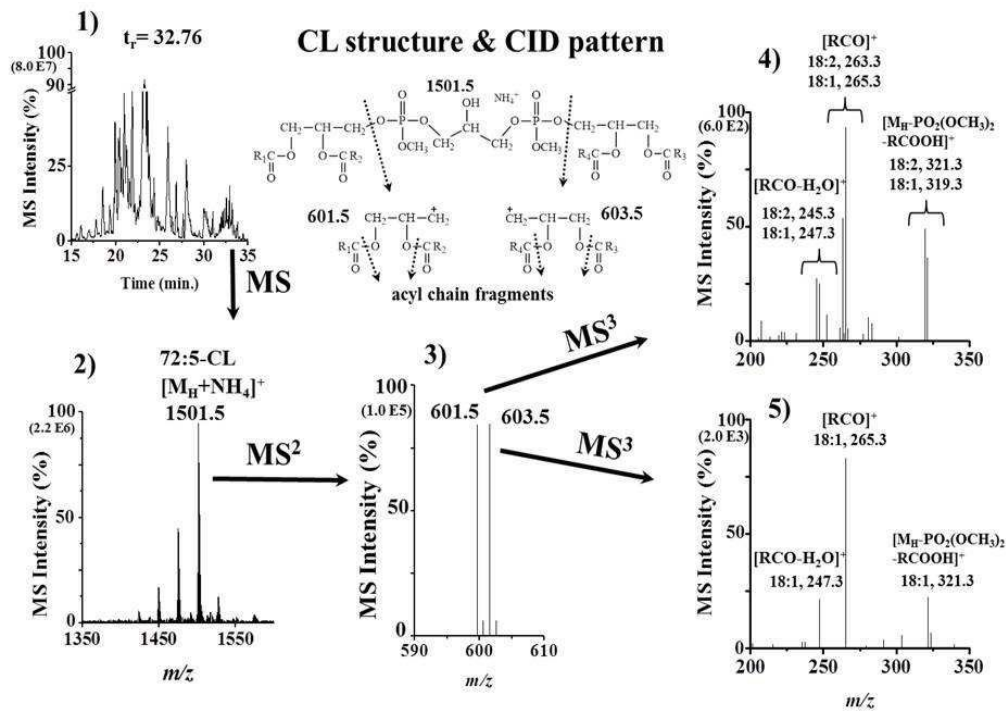


도면4

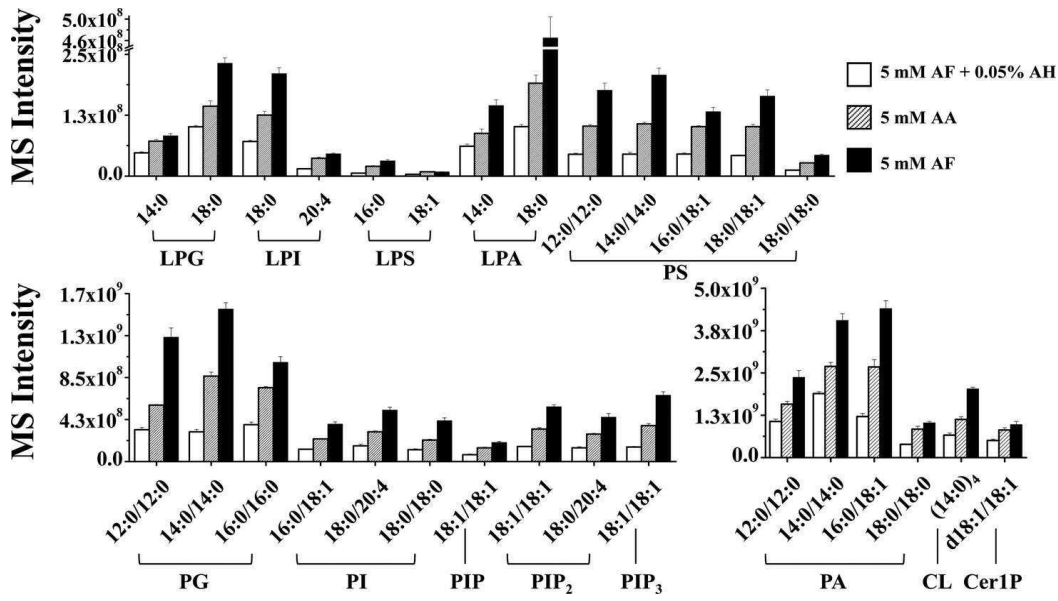


| class | acyl chain | Calculated ratio of H/D methylated PLs | | | | |
|------------------|----------------------------|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 0.25 (2:8) ^a | 0.67 (4:6) ^a | 1.00 (5:5) ^a | 1.50 (6:4) ^a | 4.00 (8:2) ^a |
| LPG | 17:1 | 0.27 ± 0.01 | 0.71 ± 0.07 | 1.05 ± 0.05 | 1.56 ± 0.06 | 3.83 ± 0.27 |
| PG | 15:0/15:0 | 0.27 ± 0.00 | 0.63 ± 0.03 | 0.95 ± 0.05 | 1.43 ± 0.03 | 3.81 ± 0.11 |
| LPS | 17:1 | 0.27 ± 0.03 | 0.71 ± 0.04 | 1.05 ± 0.09 | 1.58 ± 0.05 | 4.21 ± 0.60 |
| PS | 17:0/17:0 | 0.26 ± 0.01 | 0.71 ± 0.01 | 0.95 ± 0.04 | 1.45 ± 0.04 | 3.90 ± 0.04 |
| LPA | 17:0 | 0.24 ± 0.01 | 0.71 ± 0.02 | 0.98 ± 0.04 | 1.52 ± 0.05 | 4.06 ± 0.30 |
| PA | 17:0/17:0 | 0.27 ± 0.00 | 0.71 ± 0.05 | 1.06 ± 0.06 | 1.59 ± 0.03 | 4.27 ± 0.35 |
| PIP | 17:0/20:4 | 0.24 ± 0.01 | 0.69 ± 0.03 | 0.92 ± 0.03 | 1.41 ± 0.04 | 3.98 ± 0.31 |
| PIP ₂ | 17:0/20:4 | 0.24 ± 0.00 | 0.72 ± 0.01 | 0.96 ± 0.04 | 1.53 ± 0.07 | 3.90 ± 0.29 |
| PIP ₃ | 17:0/20:4 | 0.27 ± 0.01 | 0.70 ± 0.04 | 0.89 ± 0.02 | 1.33 ± 0.04 | 3.46 ± 0.15 |
| CL | (14:1) ₃ (15:1) | 0.23 ± 0.01 | 0.69 ± 0.02 | 0.95 ± 0.04 | 1.43 ± 0.05 | 3.94 ± 0.27 |
| Cer1P | d17:1/8:0 | 0.23 ± 0.02 | 0.65 ± 0.04 | 0.97 ± 0.09 | 1.44 ± 0.10 | 3.82 ± 0.17 |

도면5



도면6



도면7

