



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월03일
(11) 등록번호 10-2150837
(24) 등록일자 2020년08월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/72 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 30/7206 (2013.01)
G01N 2030/8813 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0021461
(22) 출원일자 2019년02월22일
심사청구일자 2019년03월08일
(65) 공개번호 10-2020-0103246
(43) 공개일자 2020년09월02일
(56) 선행기술조사문헌
Dong Sheng Ming 등, Journal of chromatography
b, 2011, 879권, 페이지 421-428.(2011.12.31.)*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
김경현
서울특별시 서초구 서초중앙로 200 18동 805호
(서초동,삼풍아파트)
차훈석
서울특별시 강남구 일원로 81 류머티스내과 (일
원동,삼성의료원)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 6 항

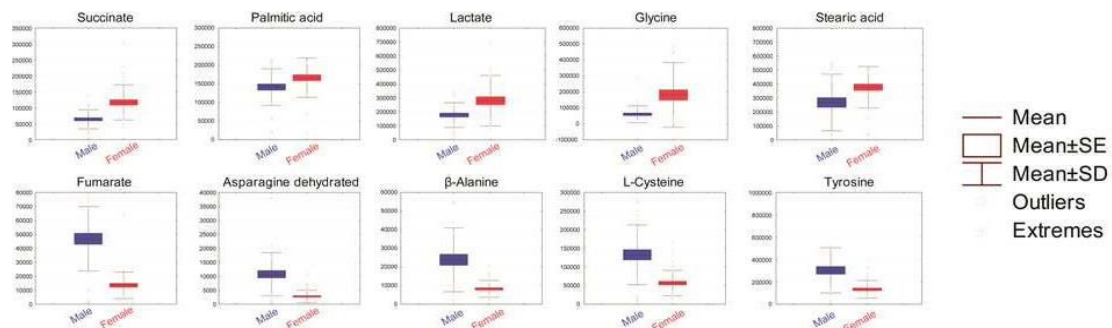
심사관 : 박성철

(54) 발명의 명칭 소변의 대사체 분석을 위한 소변 샘플 처리 방법

(57) 요약

본 발명은 소변 시료의 대사체를 변화 없이 가능한 많은 양을 재현성있게 추출하기 위한 대사체 샘플링 및 분석 방법에 관한 것으로, 소변 시료 내 대사체 샘플링을 위한 최적 조건을 확립하고, 또한 이에 기반한 서로 다른 그룹 간의 대사물질 비교 분석법을 제시함으로써, 질병 등의 바이오마커 검출법을 제시하는 효과가 있다.

대표도



(72) 발명자

안중경

서울특별시 종로구 새문안로 29 류마티스내과 (평동, 강북삼성병원)

김정연

서울특별시 동대문구 신이문로8길 44 2층 (이문동)

(56) 선행기술조사문헌

Sili fan 등, Scientific reports, 2018,
DOI:10.1038/s41598-018-29592-3.(2018.12.31.)*

W02017204636 A2

KR1020100100154 A

KR1020160134106 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018022589
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)기초연구실육성사업
연구과제명	이소화학감각수용체 응용 연구실
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

아스파라진 디하이드레이트(asparagine dehydrated)의 소변 대사체에 대한 정량 장치를 포함하되,
상기 대사체는 우레아제 및 정치배양을 비처리하여 추출되며,
아스파라진 디하이드레이트의 농도가 증가되는 경우 남성을 나타내고 농도가 감소되는 경우 여성을 나타내는,
성별 구별용 키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β -alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 소변 대사체에 대한 정량 장치를 추가로 포함하되,

푸마르산 (fumarate), 베타-알라닌 (β -alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 및 티로신 (tyrosine) 중에서 하나 이상의 농도가 증가하고 숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate), 스테아르산 (stearic acid) 및 글라이신 (glycine) 중에서 하나 이상의 농도가 감소되는 경우에는 남성을 나타내고,

숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate), 스테아르산 (stearic acid) 및 글라이신 (glycine) 중에서 하나 이상의 농도가 증가하고, 푸마르산 (fumarate), 베타-알라닌 (β -alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 및 티로신 (tyrosine) 중에서 하나 이상의 농도가 감소되는 경우에는 여성을 나타내는 성별 구별용 키트.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

정량 장치는 GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기기인 성별 구별용 키트.

청구항 4

삭제

청구항 5

소변에 우레아제(urease) 처리 없이 순수 메탄올 또는 포름산과 메탄올의 혼합 용매를 사용하여 대사체를 추출하는 대사체 샘플링 단계;

추출된 대사체를 GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기기로 분석하는 단계;

GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 단계; 및

변환된 수치를 부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)을 수행하여 두 생체시료군 간의 유의적인 차이를 나타내는 대사체 바이오마커를 분석 및 검증하는 단계

를 포함하되,

상기 포름산과 메탄올의 혼합 용매는 포름산과 메탄올이 0.05~0.5 : 99.5~99.95의 부피 비로 혼합되며,

상기 대사체 바이오마커는 아스파라진 디하이드레이티드(asparagine dehydrated)이 포함되고,

부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)의 로딩 값이 양수인 것은 대사체 바이오마커의 증가 경향을, 로딩 값이 음수인 것은 대사체 바이오마커의 감소 경향을 나타내는,

소변 시료 내 성별 구분을 위한 대사체 차별성을 분석하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 대사체 바이오마커는 숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β -alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이 추가로 포함되는, 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 단계는 총 분석시간을 단위시간 간격으로 나누어 단위 시간 동안 나타난 크로마토그램 피크의 면적 또는 높이 중 가장 큰 수치를 단위시간 동안의 대표값으로 정하는 것인, 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소변의 대사체 분석을 위한 소변 샘플 처리 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 소변은 건강 검진에 가장 유용하게 사용되는 생체 시료이다. 소변 시료는 비침투적으로 편리하게 채취할 수 있으며 다양한 대사 물질을 많이 함유하고 있으므로 질병 진단에 일상적으로 이용될 수 있다. 당뇨, 통풍, 단백뇨 등의 질병이나 임신과 같은 특이적인 생리학적 변화는 생체 내 대사물질의 분비를 변화시키고 소변에 함유된 대사물질의 조성을 바꾼다. 따라서 질병 및 생리학적 변화에 특이적으로 변화하는 소변 내 대사물질을 찾고 정량하여 바이오마커를 제시하는 연구는 예로부터 많이 진행되어왔다. 이러한 특이적 상태 변화에 따른 대사물질들의 변화를 찾는 연구를 대사체학이라고 한다.

[0004] 대사체학 연구는 시료 내 대사물질의 변화를 막고 가능한 많은 물질을 변화없이 재현성 있게 추출하는 것이 매우 중요하다. 소변 대사체학의 경우, 표준화된 소변 대사체 추출법이 nature protocol에 제시된 바 있다 (비특

허문헌 1). 그러나 이 추출 방법은 실험적 연구에 기반하지 않고, 기존에 사용해왔던 방법을 차용 및 정리한 것이라 최적의 소변 대사체 추출법이라고 할 수 없다. 표준화 소변 대사체 추출법은 소변 내 우레아(urea)를 제거하기 위하여 우레아제(urease)를 처리하고, 메탄올을 투여하여 소변 내 단백질 침전 및 대사체 추출을 시행한다. 그러나 우레아제의 처리는 37℃에서 1 시간 동안 반응시키므로 소변 내 효소 등의 활성에 의해 대사물질의 변화를 일으킬 수 있으며, 메탄올은 그 추출 효율 및 재현성이 다른 추출 용매와 비교, 분석된 바가 없어서 최적의 추출 용매라고 할 수 없다. 따라서 기존의 표준화 방법에서 우레아제 처리가 미치는 영향을 살펴봄과 동시에 다양한 추출 용매를 비교 분석함으로써, 소변 시료의 대사체를 변화 없이 원 상태로, 가능한 많이 재현성 있게 추출하는 최적화된 추출법을 제시하는 것이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Chan EC et al., 2011, Nat. Protoc. vol. 6, pp. 1483-1499.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명자들은 소변 시료의 대사체를 변화 없이 가능한 많은 양을 재현성 있게 추출하기 위하여, 우레아제 처리 없이 최적의 추출 용매를 사용한 소변 대사체 추출법 및 이에 기반한 서로 다른 그룹(예, 성별, 질병 등) 간의 대사체 분석법을 확립함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서, 본 발명은 소변 시료 내 대사체 추출에 의한 성별 구별용 키트를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0008] 또한, 본 발명은 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이트드 (asparagine dehydrated), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β -alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 성별 구별용 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은

[0013] 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법으로서,

[0014] 소변에 우레아제(urease) 처리 없이, 순수 메탄올 또는 포름산과 메탄올의 혼합 용매를 사용하여 대사체를 추출하는 대사체 샘플링 단계를 포함하는, 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 소변 시료의 대사체를 변화 없이 가능한 많은 양을 재현성있게 추출하기 위하여 소변 시료에서 우레아제 비처리, 다양한 추출 용매 간 추출 효율 및 추출 재현성 비교를 통해 최적화된 소변 시료의 대사체 추출법을 제시하는 효과가 있다. 또한, 이에 기반한 서로 다른 그룹 간의 대사물질 비교 분석법을 제시함으로써, 성별, 질병 등의 바이오마커 검출법을 제시하는 효과가 있다.

[0017] 본 발명은 소변 시료의 대사체 분석을 통한 다양한 병리학 및 바이오마커 제시 연구에 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 PLS-DA를 이용한 우레아제 의 처리 및 37 ℃에서 1시간 정치배양군(UI), 우레아제 비처리 및 37 ℃에서 1시간 정치 배양군(WI), 우레아제 및 정치 배양 비처리군(DE) 간의 대사체 프로파일 (A: score plot; B: loading plot)을 나타낸 것이다.

도 2는 PLS-DA를 이용한 우레아제 및 정치 배양 비처리군(DE)에서 남성 (DE_Male) 과 여성 (DE_Female) 간의

대사체 프로파일 (A: score plot; B: loading plot)을 나타낸 것이다.

도 3은 남성과 여성을 구분 짓는 10개의 대사체의 양을 박스 플롯으로 나타내어 비교한 것이다.

도 4는 소변의 순수 메탄올 (MeOH), 순수 에탄올 (EtOH), 아세트니트릴:물 혼합물 (50ACN; 1:1, v/v), 물:2-프로판올:메탄올 혼합물 (WiPM; 2:2:5, v/v/v), 포름산:메탄올 혼합물 (AM; 0.125:99.875, v/v) 기반 대사체 추출 시의 추출율 비교 박스 플롯을 나타낸 것이다.

도 5는 소변의 순수 메탄올 (MeOH), 순수 에탄올 (EtOH), 아세트니트릴:물 혼합물 (50ACN; 1:1, v/v), 물:2-프로판올:메탄올 혼합물 (WiPM; 2:2:5, v/v/v), 포름산:메탄올 혼합물 (AM; 0.125:99.875, v/v) 기반 대사체 추출 시의 변동 계수 (%CV) 비교 박스 플롯을 나타낸 것이다.

도 6은 소변의 순수 메탄올 (MeOH), 순수 에탄올 (EtOH), 아세트니트릴:물 혼합물 (50ACN; 1:1, v/v), 물:2-프로판올:메탄올 혼합물 (WiPM; 2:2:5, v/v/v), 포름산:메탄올 혼합물 (AM; 0.125:99.875, v/v) 기반 대사체 추출 시의 단백질 침전을 비교 박스 플롯 (A) 및 사진 (B)을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 소변의 대사체 분석을 위한 소변 샘플 처리 방법에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에서, 소변 시료의 대사체를 변화 없이 가능한 많은 양을 재현성있게 추출하기 위하여 소변 시료에서 우레아제 처리 없이 대사체를 바로 추출한다.
- [0022] 또한, 본 발명의 일 구현예에서, 소변 시료의 대사체를 기반으로 서로 다른 그룹을 구별하고, 바이오마커를 찾을 수 있는 연구 방법을 제시하기 위하여 소변 시료에서 우레아제 처리 없이 정치 배양하여 추출된 대사체를 기반으로 서로 다른 그룹 간의 비교 분석한다.
- [0023] 상기 정치 배양은 30~45 °C에서 0.5~2시간 동안 수행하는 것이 바람직하다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에서, 소변의 대사체를 가능한 많은 양을 재현성있게 추출하고, 단백질을 적절히 침전시킬 수 있는 추출 용매로는 순수 메탄올 또는 포름산과 메탄올의 혼합 용매를 사용한다.
- [0025] 본 발명자들은 소변 시료 내 두 생체시료군 간의 대사체 차별성을 구별하는 바이오마커를 찾기 위해 소변에 우레아제(urease) 처리 없이 포름산과 메탄올의 혼합 용매를 사용하여 대사체를 추출하고 GC/TOF MS를 이용하여 소변 대사체 전처리 방법 및 성별에 따른 대사체 프로파일 차이를 비교 분석하고, 이 차이를 이용하여 대사체에 기반하여 성별을 구별할 수 있는 바이오마커 발굴 연구를 수행하였다.
- [0026] 그 결과, 아민류, 아미노산류, 당 및 당 알코올류, 지방산류, 인산류, 유기산류 등을 포함한 107개 및/또는 113개의 대사체가 동정되었다.
- [0027] 소변 시료에서 서로 다른 전처리 방법 기반으로 샘플링하여 생체 시료를 비교하였을 때, 부분최소자승판별분석 (PLS-DA)을 통해 서로 다른 전처리 방법으로 추출했을 시의 대사체 프로파일의 명확한 차이를 확인하였으며 (도 1), 성별에 따른 대사체 프로파일의 명확한 차이도 확인하였다 (도 2). 이 중 성별을 구분하는 모델은, 각각의 대사물질에 대해 PLS-DA 모델의 VIP 값을 기준으로 상위 10종의 대사체를 선별하고 성별 구분의 신규 바이오마커 후보 물질로 선정하였다(표 4).
- [0028] 따라서, 본 발명은 숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이트 (asparagine dehydrated), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 성별 구별용 키트를 포함한다.
- [0029] 또한, 남성은 대사체 중에서 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이트 (asparagine dehydrated), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 및 티로신 (tyrosine)은 증가하는 경향을, 스테아르산 (stearic acid), 숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate) 및 글라이신 (glycine)은 감소하는 경향을 나타낸다.
- [0030] 여성은 대사체 중에서 숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate), 스테아르산 (stearic acid) 및 글라이신 (glycine)은 증가하는 경향을, 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이트 (asparagine dehydrated), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 및 티로신 (tyrosine)은 감소

하는 경향을 나타낸다.

- [0031] 상기 증가 또는 감소 경향이란 대사체 농도의 증가 또는 감소를 의미하는 것으로, 용어 “대사체 농도의 증가”는 남성 대비 여성 소변 대사체 농도가, 혹은 여성 대비 남성 소변 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 본 명세서에서, 용어 “대사체 농도의 감소”는 남성 대비 여성 소변 대사체 농도가, 혹은 여성 대비 남성 소변 대사체 농도가 대비 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 감소된 것을 뜻한다.
- [0032] 본 발명의 키트에 포함된 정량 장치는 크로마토그래피/질량분석기일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피는 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography), 액체-고체 크로마토그래피(Liquid-Solid Chromatography, LSC), 종이 크로마토그래피(Paper Chromatography, PC), 박층 크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography, TLC), 기체-고체 크로마토그래피(Gas-Solid Chromatography, GSC), 액체-액체 크로마토그래피(Liquid-Liquid Chromatography, LLC), 포말 크로마토그래피(Foam Chromatography, FC), 유화 크로마토그래피(Emulsion Chromatography, EC), 기체-액체 크로마토그래피(Gas-Liquid Chromatography, GLC), 이온 크로마토그래피(Ion Chromatography, IC), 겔 여과 크로마토그래피(Gel Filtration Chromatography, GFC) 또는 겔 투과 크로마토그래피(Gel Permeation Chromatography, GPC)를 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 정량용 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피는 GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 대사체는 가스 크로마토그래피에서 각 성분들이 분리되며, TOF MS를 거쳐 얻어진 정보를 이용하여 정확한 분자량 정보뿐만 아니라 구조 정보(elemental composition)를 통해 구성 성분을 확인한다.
- [0035] 본 발명은 또한 소변 내 서로 다른 그룹 간 구별하기 위한 대사체 차별성을 분석하는 방법을 포함한다.
- [0036] 일 구현예로, 본 발명은 소변 시료 내 서로 다른 그룹(예, 성별, 질병 등) 간의 구별하기 위한 대사체 차별성을 분석하는 방법으로서,
- [0037] 소변 시료를 우레아제(urease) 처리 없이 순수 메탄올 또는 포름산과 메탄올의 혼합 용매를 사용하여 대사체를 추출하는 대사체 샘플링 단계를 포함하는, 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 구별하기 위한 대사체 차별성을 분석하는 방법을 포함한다.
- [0038] 상기 대사체 차별성을 분석하는 방법은 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간 차별성을 분석하는 방법으로써, 우선, 퀀칭(quenching) 과정과 대사체 추출 과정을 포함하는 대사체 샘플링 단계를 거친다.
- [0039] 대사체 샘플링은 소변 시료를 우레아제 처리 없이 추출 용매로 순수 메탄올, 순수 에탄올, 아세트니트릴:물 혼합물, 물:2-프로판올:메탄올 혼합물, 포름산:메탄올 혼합물을 사용하여 대사체를 추출한다. 특히, 포름산:메탄올의 혼합 용매를 사용하는 것이 보다 바람직하다. 포름산과 메탄올의 혼합 비는 0.05~0.5 : 99.5~99.95 의 부피 비가 더욱 바람직하다.
- [0040] 이때, 소변과 추출 용매는 1:8~10의 부피비로 처리되는 것이 실험의 오차를 줄일 수 있으므로 바람직하다.
- [0041] 상기 대사체 샘플링 단계에서 추출된 대사체에 대해서는 다음의 분석 단계를 거친다:
- [0042] 추출된 대사체를 GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기기로 분석하는 단계;
- [0043] GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 단계; 및
- [0044] 변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 상기 서로 다른 그룹의 차별성을 검증하는 단계를 더 포함한다.
- [0045] 다음으로, 대사체의 프로파일링 차이를 비교하기 위해 부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)을 수행하여 서로 다른 그룹 간의 유의적인 차이를 나타내는 대사체 바이오마커를 선정하고, 분석 및 검증한다.
- [0046] 일 구현예로서, 본 발명의 분석 방법은 GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 단계는 총 분석시간을 단위시간 간격으로 나누어 단위시간 동안 나타난 크로마토그램 피크의 면적 또는 높이 중 가장 큰 수치를 단위시간 동안의 대표값으로 정한다.
- [0047] 변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 상기 두 생체시료군의 차별성을 검증하는 단계는 부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)을 수행하여 두 생체시료군 간의 유의적인 차이를 나

타내는 대사체 바이오마커를 분석 및 검증한다.

- [0048] 본 발명의 일 구현예에 따른 상기 대사체 바이오마커는 남성과 여성의 성별 구별한다.
- [0049] 대사체 바이오마커는 숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이트 (asparagine dehydrated), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β -alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 구성된다.
- [0050] 부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)의 로딩 값이 양수인 것은 대사체 바이오마커의 증가 경향을, 로딩 값이 음수인 것은 대사체 바이오마커의 감소 경향을 나타낸다.
- [0051] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 성별을 구별하기 위한 바이오마커로, 숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이트 (asparagine dehydrated), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β -alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0052] 상기 바이오마커들 중 남성에서는 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이트 (asparagine dehydrated), 베타-알라닌 (β -alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 및 티로신 (tyrosine)은 증가하는 경향을, 숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate), 스테아르산 (stearic acid) 및 글라이신 (glycine)은 감소하는 경향을 나타낸다.
- [0053] 상기 바이오마커들 중 여성에서는 숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate), 스테아르산 (stearic acid) 및 글라이신 (glycine)은 증가하는 경향을, 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이트 (asparagine dehydrated), 베타-알라닌 (β -alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 티로신 (tyrosine)은 감소하는 경향을 나타낸다.
- [0055] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0057] **[실시예]**
- [0058] **실시예 1: PLS-DA를 이용한 68 개 소변 샘플의 대사체 프로파일링**
- [0059] 68 명의 건강한 성인 (표 1)에서 얻은 소변 샘플을 우레아제의 처리 및 37°C에서 1시간 정치배양군(UI), 우레아제 비처리 및 37°C에서 1시간 정치배양군(WI), 우레아제 및 정치배양 비처리군(DE)으로 나누어 처리한 후, 기존에 많이 사용되고 있는 순수 메탄올을 추출 용매로 이용하여 대사체를 추출한 후 GC/TOF MS로 분석하였다.
- [0060] 아민류, 아미노산류, 당 및 당 알코올류, 지방산류, 유기산류 등을 포함한 107개의 대사체를 동정하였다(표 2).
- [0061] 대사체 프로파일링 차이를 비교하기 위하여 우레아 (urea)를 제외한 106개의 대사체를 기반으로 PLS-DA를 실시하였다. 우레아제 및 정치배양 처리군과 urease 비처리 및 정치배양 처리군, 우레아제 및 정치배양 비처리군 각각에서 서로 다른 대사체 패턴을 가짐을 살펴보았다 (도 1, 표 3). 따라서 우레아제의 처리나 정치 배양 각각의 처리방법이 우레아뿐만 아니라 다른 소변 본연의 대사체를 변화시킴을 밝혔다.

표 1

68 명의 소변 샘플 정보

남자 성인 샘플	나이	여자 성인 샘플	나이
Male_1	M/33	Female_1	F/32
Male_2	M/32	Female_2	F/36
Male_3	M/32	Female_3	F/37
Male_4	M/37	Female_4	F/34
Male_5	M/36	Female_5	F/37
Male_6	M/32	Female_6	F/39
Male_7	M/38	Female_7	F/39
Male_8	M/37	Female_8	F/38
Male_9	M/39	Female_9	F/34
Male_10	M/37	Female_10	F/37
Male_11	M/30	Female_11	F/36
Male_12	M/34	Female_12	F/38
Male_13	M/35	Female_13	F/39
Male_14	M/41	Female_14	F/36
Male_15	M/41	Female_15	F/45
Male_16	M/42	Female_16	F/44
Male_17	M/49	Female_17	F/47
Male_18	M/41	Female_18	F/48
Male_19	M/48	Female_19	F/43
Male_20	M/44	Female_20	F/42
Male_21	M/46	Female_21	F/40
Male_22	M/43	Female_22	F/46
Male_23	M/42	Female_23	F/42
Male_24	M/41	Female_24	F/41
Male_25	M/48	Female_25	F/43
Male_26	M/50	Female_26	F/53
Male_27	M/54	Female_27	F/50
Male_28	M/51	Female_28	F/51
Male_29	M/52	Female_29	F/50
Male_30	M/51	Female_30	F/51
Male_31	M/53	Female_31	F/51

[0062]

[0063] (계속)

		Female_32	F/54
		Female_33	F/53
		Female_34	F/52
		Female_35	F/52
		Female_36	F/65
		Female_37	F/63

[0064]

표 2

68 명의 소변 샘플에서 순수 메탄올을 이용해 추출한 107 개의 대사체

Identification of metabolites			
Amines			
2-hydroxypyridine	3-hydroxypyridine	5-deoxy-5-methylthioadenosine	adenosine
benzamide	carnitine	glycocyanine	hypoxanthine
inosine	nicotinamide	O-phosphorylethanolamine	spermidine
thymine	tyrosine	uracil	urea
uric acid	uridine	xanthine	
Amino acids			
alanine	asparagine dehydrated	glycine	histidine
isoleucine	L-allothreonine	L-cysteine	L-homoserine
lysine	methionine	methionine sulfoxide	N-methylalanine
ornithine	oxoproline	phenylalanine	proline
serine	threonine	tryptophan	valine
β-alanine			
Fatty acids			
1-monopalmitin	1-monostearin	arachidic acid	capric acid
heptadecanoic acid	lignoceric acid	myristic acid	palatinitol
palmitic acid	pelargonic acid	stearic acid	
Organic acids			
2-hydroxyvalerate	2-ketoadipate	3-hydroxypropionate	5-aminovalerate
adipate	aspartate	citramalate	citrate
DL-3-aminoisobutyrate	fumarate	galactonate	galacturonate
gluconic acid lactone	glycerate	glycolate	guaiacol
hexonate	indole-3-lactate	lactate	lactobionate
malate	malonate	oxalate	oxamate
pyrrole-2-carboxylate	pyruvate	succinate	

[0065]

(계속)

Sugars and sugar alcohols			
1,5-anhydroglucitol	3,6-anhydro-D-galactose	arabitol	dihydroxyacetone
fructose	galactinol	galactose	glucose
glycerol	glycerol-1-phosphate	lactose	lyxose
maltotriose	mannitol	mannose	melibiose
myo-inositol	ribose	sucrose	tagatose
threitol	threose	trehalose	xylose
Miscellaneous			
1,2,4-benzenetriol	caffeic acid	phosphate	taurine
xanthurenic acid			

[0067]

표 3

PLS-DA를 이용한 우레아제의 처리 및 37°C에서 1시간 정치배양군(UI), 우레아제 비처리 및 37°C에서 1시간 정치배양군(WI), 우레아제 및 정치배양 비처리군(DE) 간의 대사체 프로파일에서 각 대사체의 로딩 값.

대사물질	로딩 1	로딩 2
1,2,4-benzenetriol	0.015	0.174
1,5-anhydroglucitol	-0.043	0.020
1-monopalmitin	0.001	-0.013
1-monostearin	-0.058	-0.047
2-hydroxypyridine	0.048	0.269
2-hydroxyvalerate	-0.111	-0.025
2-ketoadipate	0.001	0.078
3,6-anhydro-D-galactose	-0.102	0.052
3-hydroxypropionate	-0.134	-0.067
3-hydroxypyridine	-0.058	0.120
5-aminovalerate	-0.055	0.037
5'-deoxy-5'-methylthioadenosine	-0.130	-0.067
adenosine	-0.128	-0.004
adipate	-0.035	0.095

[0068]

[0069] (계속)

alanine	-0.085	0.067
arabitol	-0.019	0.122
arachidic acid	-0.080	0.072
asparagine dehydrated	-0.076	-0.010
aspartate	-0.076	0.029
benzamide	-0.031	0.134
β -alanine	-0.043	0.035
caffeic acid	-0.023	0.112
capric acid	-0.160	-0.135
carnitine	0.041	0.135
citramalate	-0.098	0.035
citrate	0.009	0.080
dihydroxyacetone	-0.002	0.064
DL-3-aminoisobutyrate	0.018	0.041
fructose	-0.052	0.059
fumarate	0.037	0.246
galactinol	-0.069	-0.007
galactonate	-0.158	-0.032

[0070]

[0071] (계속)

galactose	-0.093	0.090
galacturonate	-0.159	-0.044
gluconic acid lactone	-0.084	0.025
glucose	-0.111	0.057
glycerate	-0.075	-0.032
glycerol	-0.153	-0.080
glycerol-1-phosphate	-0.043	0.129
glycine	0.048	0.136
glycocyanine	-0.090	0.070
glycolate	-0.130	-0.046
guaiacol	0.038	0.175
heptadecanoic acid	-0.147	0.047
hexonate	-0.152	-0.096
histidine	-0.104	-0.057
hypoxanthine	-0.045	0.135
indole-3-lactate	-0.075	0.026
inosine	-0.080	-0.001
isoleucine	-0.165	-0.095

[0072]

[0073] (계속)

lactate	-0.076	0.010
lactobionate	-0.099	-0.090
lactose	-0.218	-0.261
L-allothreonine	-0.009	0.147
L-cysteine	-0.101	0.009
L-homoserine	-0.143	-0.131
lignoceric acid	-0.092	-0.041
lysine	-0.066	0.014
lyxose	-0.052	0.063
malate	-0.060	0.076
malonate	0.032	0.108
maltotriose	-0.071	-0.076
mannitol	-0.026	0.036
mannose	-0.047	0.134
melibiose	-0.063	-0.008
methionine	-0.131	-0.065
methionine sulfoxide	-0.132	0.026
myo-inositol	-0.049	0.048

[0074]

[0075] (계속)

myristic acid	-0.112	0.034
nicotinamide	0.008	0.211
N-methylalanine	-0.137	-0.078
O-phosphorylethanolamine	-0.129	-0.048
ornithine	-0.083	0.015
oxalate	-0.177	-0.128
oxamate	0.166	0.193
oxoproline	-0.008	0.252
palatinitol	-0.128	-0.080
palmitic acid	-0.164	0.019
pelargonic acid	-0.127	-0.018
phenylalanine	-0.137	-0.030
phosphate	-0.033	-0.019
proline	-0.105	-0.128
pyrrole-2-carboxylate	-0.074	-0.017
pyruvate	-0.027	-0.051
ribose	-0.131	0.015
serine	-0.187	-0.175

[0076]

[0077] (계속)

spermidine	0.006	0.126
stearic acid	-0.013	0.152
succinate	-0.042	0.103
sucrose	-0.166	-0.127
tagatose	-0.052	0.045
taurine	-0.087	-0.019
threitol	-0.010	0.079
threonine	0.006	0.126
threose	-0.096	-0.138
thymine	-0.016	0.214
trehalose	-0.207	-0.232
tryptophan	-0.099	0.019
tyrosine	-0.086	0.046
uracil	-0.068	0.070
uric acid	-0.037	0.077
uridine	-0.096	0.036
valine	-0.150	-0.051
xanthine	-0.076	0.118

[0078]

[0079] (계속)

xanthurenic acid	-0.084	0.093
xylose	-0.125	-0.033

[0080]

[0082] 실시예 2: 68 개 소변 샘플의 주요 대사체 선정

[0083] 실시예 1로부터 나온 PLS-DA 분석을 이용하여, 68 개 소변 샘플의 우레아제의 처리 및 37°C에서 1시간 정치배양군(UI), 우레아제 비처리 및 37°C에서 1시간 정치배양군(WI), 우레아제 및 정치배양 비처리군(DE) 세 개의 그룹을 분리하는데 높은 기여를 한 주요 대사체를 VIP값 기준으로 상위 10개를 선정하였다 (표 4).

표 4

PLS-DA를 이용한 우레아제의 처리 및 37°C에서 1시간 정치배양군(UI), 우레아제 비처리 및 37°C에서 1시간 정치배양군(WI), 우레아제 및 정치배양 비처리군(DE) 간의 대사체 프로파일에서 큰 차이를 보이는 10개의 주요 대사체의 VIP (variable importance in projection) score 값

대사물질	VIP value
succinate	2.650
palmitic acid	2.468
1-monostearin	2.093
1-monopalmitin	1.873
benzamide	1.786
heptadecanoic acid	1.724
malate	1.696
β -alanine	1.632
histidine	1.573
gluconic acid lactone	1.567

[0085]

[0087] 실시예 3: PLS-DA를 이용한 68 개 소변 샘플의 남성 및 여성을 구분하는 대사체 프로파일링

[0088] 68 명의 건강한 성인 (표 1)에서 얻은 소변 샘플 중 31명의 남성 소변 샘플과 37명의 여성 소변 샘플에 기존에 많이 사용되고 있는 순수 메탄올을 추출 용매로 이용하여 대사체를 추출한 후 GC/TOF MS로 분석하였다. 이 후 각 성별을 구분지을 수 있도록 우레아를 제외한 106개의 대사체를 이용하여 PLS-DA 모델을 생성하였다 (도 2, 표 5).

[0089] 도 2에 나타난 바와 같이 남성과 여성의 소변 내 대사체는 서로 다른 패턴을 가지며, PLS-DA 모델을 기반으로 통계적으로 유의적 차이를 보였다. 즉, 남성 구분 시의 대사체 프로파일은 스코어 플롯에서 대부분의 샘플이 [t]1 및 [t]2 값 기준으로 양수를, 여성 구분 시의 대사체 프로파일은 스코어 플롯에서 [t]1 및 [t]2 값 기준으로 음수를 띠어 성별에 따른 대사체 프로파일이 완전히 구분되었다. 이러한 대사체 프로파일의 차이를 나타내는 주요 대사물질들을 선정하기 위해서 표 5에서의 로딩 1과 로딩 2 모두에서 동일한 경향을 보이고 그 값이 큰 대사체를 선별하였다.

표 5

PLS-DA를 이용한 68 개 소변 샘플의 남성 및 여성을 구분하는 대사체 프로파일링에서 차이를 나타내는 대사체 프로파일에서 각 대사체의 로딩 값.

대사물질	로딩 1	로딩 2
1,2,4-benzenetriol	0.070	-0.043
1,5-anhydroglucitol	-0.043	-0.120
1-monopalmitin	0.132	0.155
1-monostearin	0.140	0.161
2-hydroxypyridine	0.082	-0.028
2-hydroxyvalerate	0.047	-0.038
2-ketoadipate	0.047	0.105
3,6-anhydro-D-galactose	0.110	-0.011
3-hydroxypropionate	-0.068	-0.229
3-hydroxypyridine	0.103	0.012
5-aminovalerate	0.055	-0.034
5'-deoxy-5'-methylthioadenosine	-0.015	-0.123
adenosine	0.111	0.004
adipate	0.009	-0.074

[0090]

[0091] (계속)

alanine	0.119	0.031
arabitol	0.122	0.071
arachidic acid	0.046	-0.030
asparagine dehydrated	0.210	0.139
aspartate	-0.022	-0.195
benzamide	0.023	-0.075
β-alanine	0.195	0.149
caffeic acid	-0.015	-0.073
capric acid	0.116	0.058
carnitine	0.021	0.060
citramalate	0.091	-0.019
citrate	-0.111	-0.236
dihydroxyacetone	0.039	0.089
DL-3-aminoisobutyrate	0.079	0.019
fructose	0.006	-0.151
fumarate	0.250	0.231
galactinol	-0.040	-0.102
galactonate	0.015	-0.149

[0092]

[0093] (계속)

galactose	0.110	-0.030
galacturonate	0.094	-0.019
gluconic acid lactone	0.064	-0.038
glucose	0.073	-0.083
glycerate	-0.022	-0.096
glycerol	-0.056	-0.228
glycerol-1-phosphate	0.101	0.044
glycine	-0.132	-0.242
glycocyanine	0.019	-0.146
glycolate	0.074	-0.043
guaiacol	0.040	0.053
heptadecanoic acid	-0.045	-0.203
hexonate	0.060	0.010
histidine	0.138	0.059
hypoxanthine	0.134	0.041
indole-3-lactate	-0.047	-0.124
inosine	-0.020	-0.095
isoleucine	0.164	0.096

[0094]

[0095] (계속)

lactate	-0.119	-0.262
lactobionate	-0.070	-0.219
lactose	-0.057	-0.153
L-allothreonine	0.104	0.128
L-cysteine	0.192	0.102
L-homoserine	0.044	-0.046
lignoceric acid	0.100	0.081
lysine	0.098	0.031
lyxose	0.082	0.034
malate	-0.093	-0.227
malonate	0.125	0.088
maltotriose	-0.054	-0.071
mannitol	0.126	0.112
mannose	0.048	-0.088
melibiose	-0.041	-0.092
methionine	0.157	0.057
methionine sulfoxide	0.117	-0.028
myo-inositol	0.048	-0.023

[0096]

[0097] (계속)

myristic acid	-0.034	-0.152
nicotinamide	0.131	0.012
N-methylalanine	0.128	0.068
O-phosphorylethanolamine	0.096	0.049
ornithine	-0.009	-0.113
oxalate	0.036	-0.008
oxamate	0.066	0.051
oxoproline	0.114	-0.034
palatinitol	0.015	-0.052
palmitic acid	-0.086	-0.281
pelargonic acid	-0.096	-0.220
phenylalanine	0.136	0.001
phosphate	-0.026	-0.094
proline	0.105	0.232
pyrrole-2-carboxylate	0.049	-0.026
pyruvate	0.023	-0.055
ribose	0.064	-0.071
serine	0.107	0.029

[0098]

[0099] (계속)

spermidine	0.088	0.027
stearic acid	-0.107	-0.242
succinate	-0.180	-0.353
sucrose	-0.034	-0.069
tagatose	0.023	-0.079
taurine	0.051	-0.025
threitol	0.068	-0.083
threonine	0.107	0.193
threose	0.016	-0.031
thymine	0.153	0.075
trehalose	-0.018	-0.078
tryptophan	0.154	0.049
tyrosine	0.178	0.088
uracil	-0.007	-0.126
uric acid	0.146	0.131
uridine	0.135	-0.002
valine	0.115	0.012
xanthine	0.017	-0.088

[0100]

[0101] (계속)

xanthurenic acid	0.143	0.034
xylose	-0.026	-0.162

[0102]

[0104] 실시예 4: PLS-DA를 이용한 68 개 소변 샘플의 남성 및 여성을 구분하는 대사체 프로파일링에서 차이를 나타내는 주요 대사체 선정

[0105] 실시예 3으로부터 나온 PLS-DA 분석을 이용하여, 각 성별 그룹이 분리가 됨을 확인하고, 모델 내 각 성별의 분리에 기여하는 정도인 VIP값에서 높은 수치를 보인 주요 대사체 상위 10개를 선정하였다 (표 6). 또한 10개의 대사체의 양을 박스 플롯으로 나타내어 성별에 따른 대사체의 양을 비교하였다 (도 3).

표 6

PLS-DA를 이용한 68 개 소변 샘플의 남성 및 여성을 구분하는 대사체 프로파일링에서 차이를 나타내는 대사체 프로파일에서 큰 차이를 보이는 10개의 주요 대사체의 VIP (variable importance in projection) 값

대사물질	VIP score
succinate	2.045
fumarate	2.003
asparagine dehydrated	1.666
palmitic acid	1.595
β-alanine	1.541
L-cysteine	1.540
lactate	1.494
tyrosine	1.432
glycine	1.420
stearic acid	1.373

[0106]

[0108] 실시예 5: 소변 샘플의 대사체 분석을 위한 최적의 추출 용매 선정

[0109] 소변 샘플에서 대사체 샘플을 얻기 위하여 68 명의 소변 샘플을 동일한 비율로 하나로 합친 후에, 100 μl의 소변에 우레아제 처리 없이 직접 900 μl의 추출용매, 순수 메탄올 (MeOH), 순수 에탄올 (EtOH), 아세트니트릴:물 혼합물 (50ACN; 1:1, v/v), 물:2-프로판올:메탄올 혼합물 (WiPM; 2:2:5, v/v/v), 포름산:메탄올 혼합물 (AM; 0.125:99.875, v/v)을 처리하여 대사체를 추출한 후 GC/TOF-MS로 분석하여 추출 효율을 비교 분석하였다.

[0110] 아민류, 아미노산류, 당 및 당 알코올류, 지방산류, 유기산류 등을 포함한 113 개의 대사체를 동정하였다(표 7).

[0111] 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 추출 용매에 따라서 추출율 및 추출 재현성이 다름을 확인할 수 있었다. 정성 및 상대적으로 정량 분석된 피크 인텐시티가 AM에서 가장 높아, 종합적인 대사체의 추출율이 AM에서 가장 높음을 볼 수 있었다 (도 4). 또한 추출 용매에 따른 재현성을 살펴보면, %CV 값이 AM에서 모두 최적의 수치를 기록하여, 재현성이 제일 높음을 알 수 있었다 (도 5). 또한 단백질의 침전율이 AM에서 두 번째로 높은 수치를 기록하여, AM이 적절한 단백질을 침전능을 가지는 것으로 보였다 (도 6). 이를 통하여 소변의 대사체 분석을 위한 대사체 추출 시에 추출율 및 재현성과 단백질 침전율에 기반한 최적 용매로 AM을 선정하였다.

표 7

인간 소변 샘플에서 순수 메탄올, 순수 에탄올, 아세토니트릴:물 혼합물, 물:2-프로판올:메탄올 혼합물, 포름산:메탄올 혼합물을 이용해 추출한 113 개의 대사체

Identification of metabolites			
Amines			
2-hydroxypyridine	3-hydroxypyridine	5-deoxy-5-methylthioadenosine	adenosine
carnitine	glycocyamine	hypoxanthine	inosine
O-phosphorylethanolamine	thymine	uracil	urea
uric acid	uridine	xanthine	
Amino acids			
alanine	asparagine dehydrated	glycine	histidine
isoleucine	L-allothreonine	L-cysteine	leucine
L-homoserine	methionine	methionine sulfoxide	N-methylalanine
ornithine	oxoproline	phenylalanine	proline
serine	threonine	tryptophan	tyrosine
valine	β-alanine		
Fatty acids			
1-monopalmitin	1-monostearin	2-ketoisocaproic acid	arachidic acid
capric acid	dodecanoic acid	heptadecanoic acid	lignoceric acid
palatinitol	palmitic acid	pelargonic acid	phytol
stearic acid			
Organic acids			
2-hydroxyvalerate	2-ketoadipate	3-hydroxypropionate	5-aminovalerate
adipate	aspartate	citramalate	citrate
DL-3-aminoisobutyrate	fumarate	galactonate	galacturonate
gluconic acid lactone	glycerate	glycolate	guaiacol
hexonate	indole-3-lactate	isothreonate	lactate
lactobionate	malate	malonate	N-carbamoylaspartate
oxalate	oxamate	pyruvate	succinate

[0112]

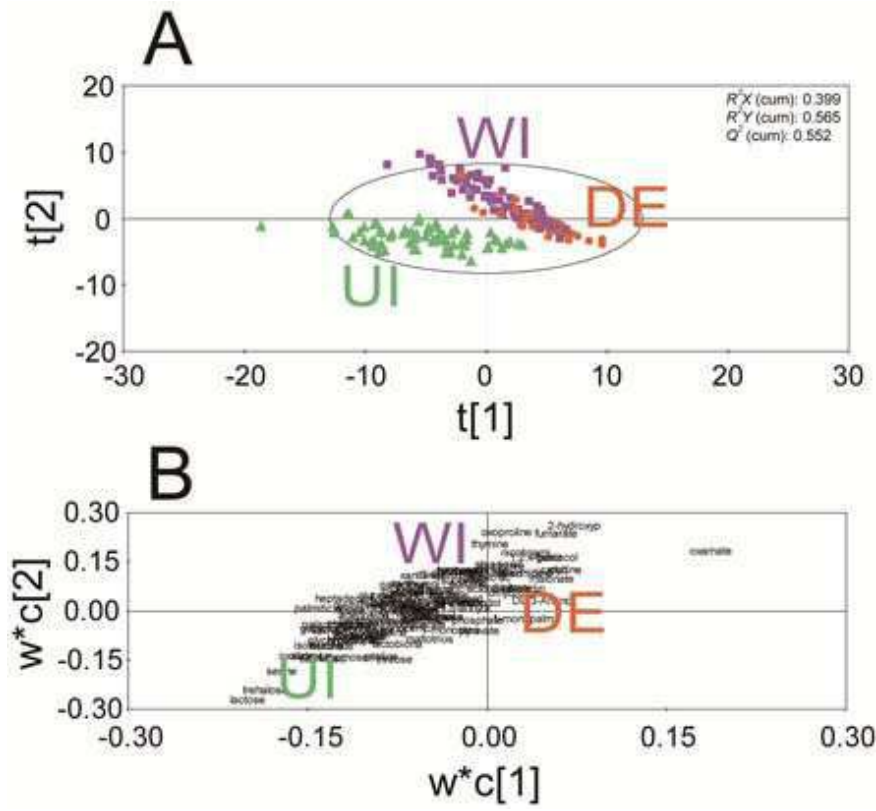
[0113] (계속)

Sugars and sugar alcohols			
1,5-anhydroglucitol	3,6-anhydro-D-galactose	arabitol	dihydroxyacetone
fructose	fucose	galactinol	galactose
glucose	glycerol	glycerol-1-phosphate	lactose
lyxose	mannitol	mannose	melibiose
myo-inositol	ribose	sucrose	tagatose
threitol	threose	trehalose	xylose
β-gentiobiose			
Miscellaneous			
benzoic acid	caffeic acid	ethanolamine	lactamide
nicotinamide	phosphate	salicylic acid	spermidine
taurine	xanthurenic acid		

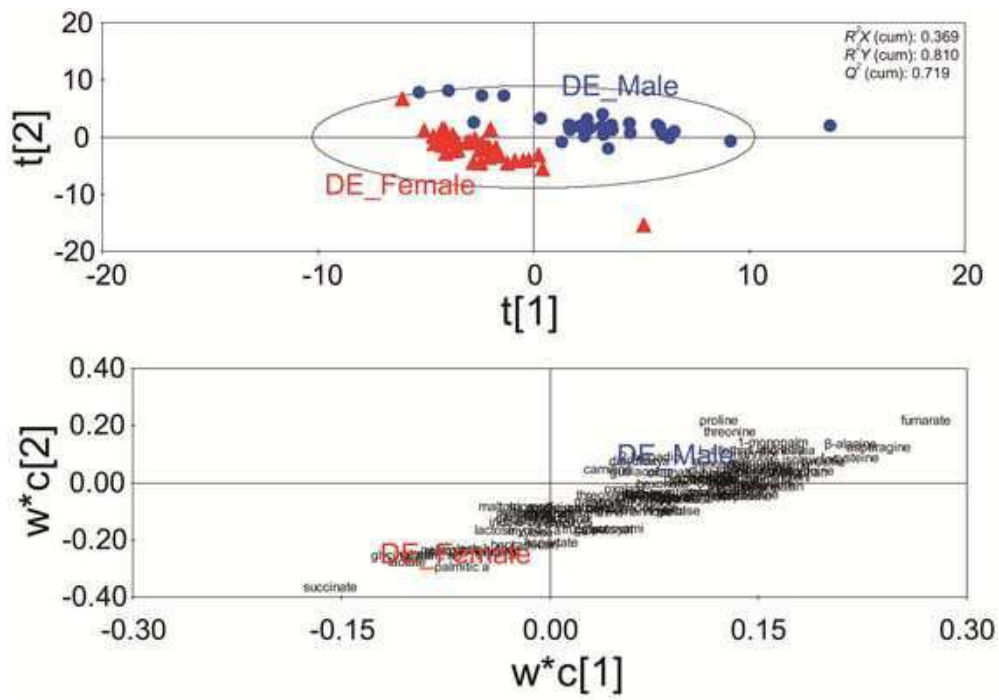
[0114]

도면

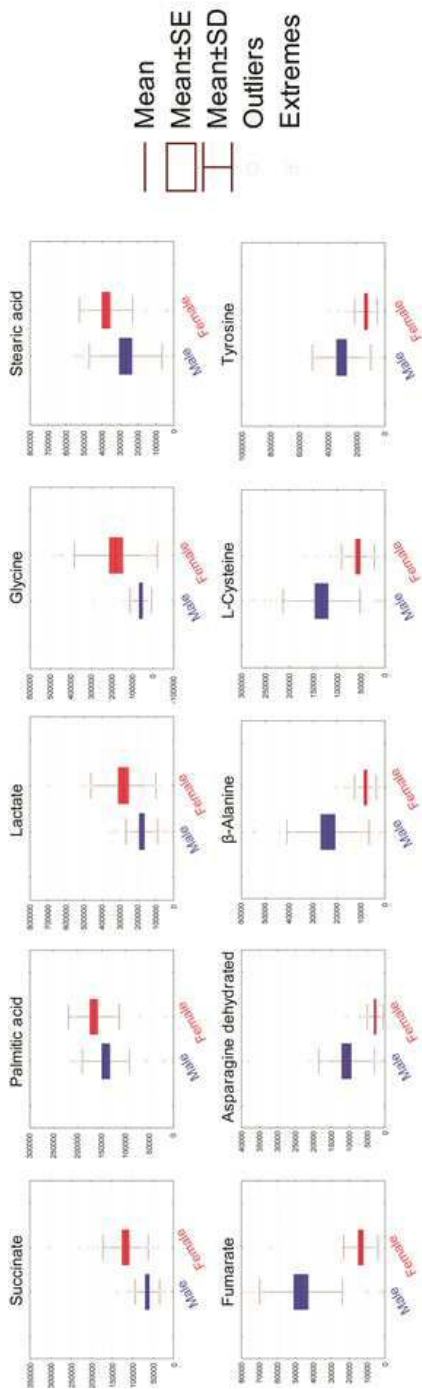
도면1



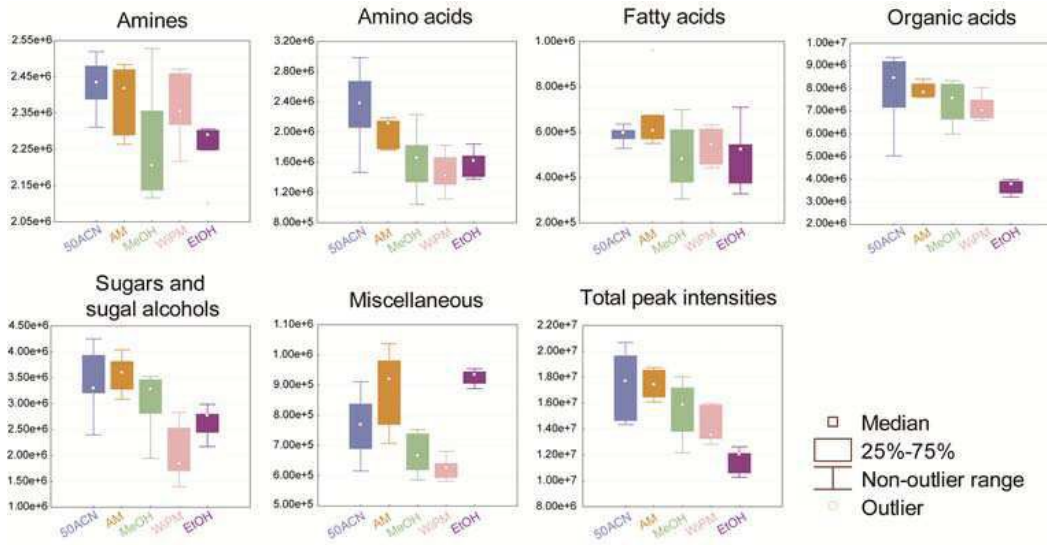
도면2



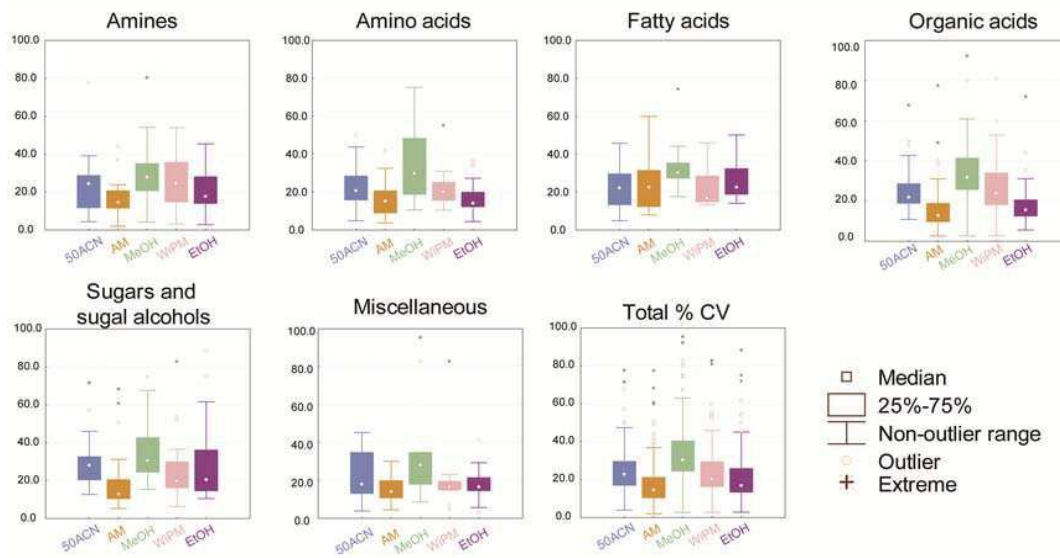
도면3



도면4

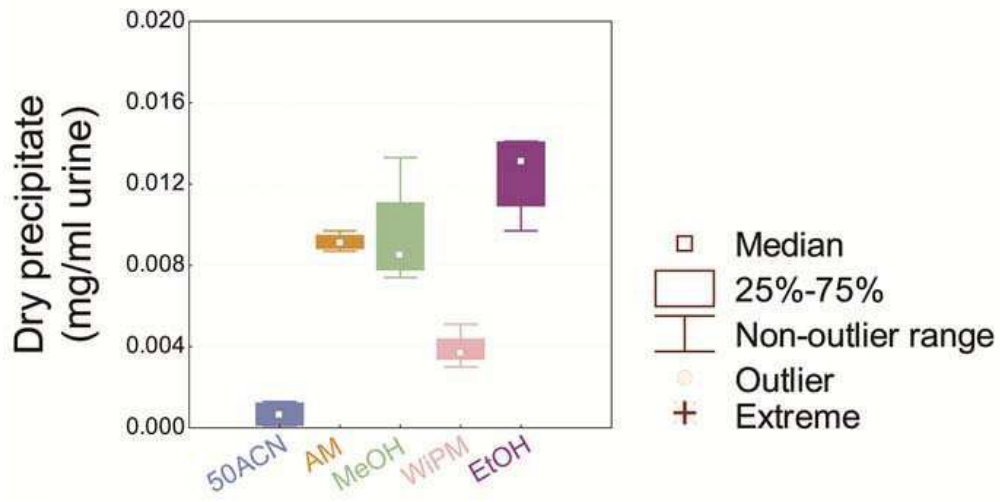


도면5



도면6

A



B

