

최 종
연구보고서

Proteomics 방법에 의한 진단유전자 개발 연구

Development of diagnostic genes
by a proteomic method

연구기관
대 구 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Proteomics 방법에 의한 진단유전자 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 8 일

주관연구기관명 : 대구대학교

총괄연구책임자 : 강 선 철

연 구 원 : 오 지 훈

연 구 원 : 서 해 정

연 구 원 : 태 언 희

연 구 원 : 최 난 희

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 임 진 규

협동연구책임자 : 변 명 대

요 약 문

I. 제 목

Proteomics 방법에 의한 진단유전자 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

21세기는 biotechnology의 시대라고 할만큼 유전자원의 확보와 이용은 한 나라의 경제적 흥망을 결정할 만큼 중요한 분야가 될 것으로 전문가들은 예견하고 있다. 가축의 오줌이나 혈청의 2-D gel proteomic map을 만들면 이것을 기준으로 질병, 우수형질, 생리적 변화, 스트레스 등의 차이를 간단하게 알아낼 수 있을 뿐 아니라 밝혀진 특이유전자를 이용하여 진단방법 개발, 유전육종 등에 사용할 수 있다. Proteomics를 바탕으로 한 유전자 기능연구나 특이유전자 탐색은 genome project 이후 가장 각광을 받고 있는 분야의 하나로써 21세기에 많은 발전을 보일 것으로 예상된다. 이에 발 맞추어 본 연구와 같이 농업 분야에서도 기초적인 연구부터 응용분야까지 기반을 구축하는 것이 필요하다.

소를 대상으로 proteomic map을 만들고 이 map을 중심으로 질병, 임신, 우수형질, 스트레스 등에 특이적인 단백질을 선별할 수 있는데 이를 위해 오줌이나 혈청을 이용하면 반복성이 높고 시료 채취가 간단한 장점이 있다. 그 동안 소의 임신특이 단백질을 찾는데 있어 많은 사람들이 성공적이지 못했던 이유는, 단백질이 많은 소의 혈액으로부터 소량으로 존재하는 임신특이 단백질을 찾기 어려웠던 것이고 단백질 정제방법도 단백질 양이 어느 정도 이상일 때 성공적일 수 있는 전통적인 단백질 정제방법들을 (ion-exchange chromatography, affinity chromatography, fractionation 등) 사용해 왔기 때문이다 (Wooding and Beckers, 1987; Sasser *et al.*, 1989; Zoli *et al.*, 1991). 그 동안 소의 체액에서(오줌, 피, 유즙) 임신특이 단백질을 찾지 못하였고 찾았다 하더라도 임신특이도가 떨어져서 임신진단을 위한 marker로는 사용하기 어려운 점이 있었다 (Morton *et al.*, 1987 and 1992; Lynch and Abbott, 1988). 그러나 proteomics 방법을 이용하면 위와 같이 소량

으로 존재하는 단백질이라도 특별한 정제기술 없이 이차원 전기영동(2-D gel)과 image 분석방법을 통해 특이발현을 보이는 단백질을 선별할 수 있고, mass spectrometry 방법과 amino acid sequencing 방법 등을 이용하여 단백질의 기능 및 해당 단백질의 유전자를 쉽게 찾을 수 있다. Genome project가 포괄적이고 막대한 연구비를 필요로 한다면 proteomics project는 개별적인 연구실에서 용도에 맞는 소규모의 시도가 가능하다. 특별히 본 연구에서 오줌을 중심으로 질병, 임신, 유용형질 등을 선별 하고자 하는 것은 시료 채취가 간단하고 반복성이 높으며 동물의 생리상태 변화에 비교적 민감하게 차이를 보이기 때문이다 (Young and Tracy, 1995; Ito *et al*, 1998; Pedraza-Chaverri *et al*, 1996).

Human genome project의 완료와 앞으로 국제적인 우수 연구회사가 proteomics 연구에 전력을 하게 됨으로써 유전자원의 특허권 전략화는 유전자원을 확보하지 못한 나라들에게는 큰 부담이 아닐 수 없다. 그러나 proteomics project는 genome project와는 달리 세부적인 조건변화에 따른 특이적 유전자를 찾는 것이기 때문에 특허권 문제를 피해갈 수 있다. 가축에 대한 proteomics 연구는 토종 가축의 특이 유전자(질병특이 유전자, 임신특이 유전자, 기타 유용유전자) 발굴에 유리하므로 토종가축의 선별방법 개발, 임신진단방법 개발, 유용유전자를 이용한 육종 등에 활용할 수 있게 되어 유전자원의 산업화가 가능하다. 특히 오줌, 혈청에서 발견되는 특이단백질은 쉽게 진단시약개발에 이용될 수 있다.

본 연구를 통하여 생명공학의 새로운 연구방향으로서 proteomics 연구기반을 확보함으로써 세계적 추세와 보조를 같이할 수 있으며, 특히 토종 한우의 유전자원 확보와 이용으로 외국의존 일변도의 국내 동물 유전자원 활용 분야에 자긍심을 줄 수 있다. 그리고 기술-노동 집약적인 proteomics 연구는 genome project와는 달리 적절한 방향과 목표를 설정하면 활용 가능한 유전자원을 비교적 손쉽게 특허화 할 수 있기 때문에 우리나라 기술수준과 여건에 적합한 연구분야이며, biotechnology 산업의 중심추의 역할을 할 유전자원의 확보 및 기반기술의 개발은 이 분야에서 국제경쟁력을 갖게 할 뿐 아니라 21세기 첨단산업으로 많은 인력을 흡수할 수 있는 분야가 된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내의 주종 가축인 소의 오줌에 들어있는 단백질들의 2-D gel electrophoresis map을 만들고 gel상에 전개된 단백질들의 mass spectrometry 분석을 통한

단백질의 fingerprint database를 구축한다. 그리고 이 database를 기반으로 임신특이단백질과 유전자를 선별하여 이를 진단 Kit 개발에 응용하고자 한다. 이와 같은 목표를 달성하기 위한 주요 연구내용으로는 (1) 수의과적, 일반 사양측면에서 정상인 소의 오줌단백질에 대한 2-D gel map 작성 (2) 분리된 단백질의 mass spectrometry 분석을 통한 protein mass fingerprint database 확립 (3) 임신소의 오줌단백질의 2-D gel map 작성과 정상 오줌단백질 map과의 비교를 통한 특이 단백질 선별 (4) 특이단백질의 mass spectrometry 및 아미노산 분석 등을 통한 단백질 정성분석과 해당 유전자 클로닝 (5) 특이 유전자를 이용한 면역학적(ELISA) 진단 Kit 개발 등이 되며 아래에 보다 자세히 설명하였다.

정상소 및 임신소의 오줌 채취를 위하여 외형, 증체량, 사료섭취량, 행동 등이 정상인 암컷과 수컷 소를 각각 10마리씩 선별하여 오줌을 채취한다. 암컷의 경우 처녀소나 비임신이 확인된 것을 선별한다. 사료급여나 개체간의 차이를 고려하여 3개의 완전히 구별된 농장에서 똑같은 방법과 기준으로 오줌을 채취한다.

단백질 분리와 2-D gel electrophoresis를 위하여 total 단백질을 얻고 염분을 제거하기 위하여 단백질을 TCA (trichloroacetic acid)로 침전시킨다. 침전된 단백질을 Isoelectric focusing을 위한 sample buffer에 녹인다. Isoelectric focusing은 IPG-strip (BioRad, USA)을 이용하여 실험의 반복성을 높인다. 이차원 전기영동은 SDS-PAGE로 하는데 단백질을 서서히 이동시켜 해상력을 좋게한다. 단백질이 전개된 gel을 silver staining 방법으로 염색한 후 PDQUEST (Bio-Rad) image 분석용 program을 이용하여 분석한다. 반복실험과 개체간의 차이를 비교하여 공통적으로 존재하는 단백질들을 확정한다.

Mass spectrometry 분석 및 microsequencing에 의한 단백질 정성분석을 위해서 먼저 단백질 spot을 2-D gel에서 잘라내고 gel spot에 들어 있는 단백질을 trypsin으로 자른후 peptide를 gel에서 elution한다. Elution된 peptide를 matrix에 고정시키고 이것을 MALDI-TOF mass spectrometer(PE-Biosystem, USA)로 분석하여 peptide mass fingerprint를 얻는다. Fingerprint data는 단백질의 정체를 밝히는데 중요한 자료가 되며 기존의 database(SWISS-PROT, UCSF database 등)에 존재하지 않는 경우 단백질 N-terminal sequence를 조사하여 Blast search한다. 두 경우 모두 정체가 밝혀지지 않으면 새로운 단백질이 선별된 것으로 추정한다.

특이 단백질의 유전자 획득을 위해 database에 들어 있는 단백질은 바로 유전자 정보를 알 수 있으므로 PCR 방법으로 유전자를 얻을 수 있다. Database에 없는 단백질은 N-terminal sequencing 방법으로 아미노산 서열을 밝힌 후 PCR primer를 고안하여 유전

자를 cloning한다. 특이 유전자의 확인을 위하여 RNA(total 또는 mRNA)로부터 RT-PCR을 수행하여 특이유전자를 확인한다. 유전자가 특이유전자임이 확인되면 검사 대상소를 각 군당 20두로 늘려서 임신 시기별, 개체별 확인 실험을 진행하여 최종적으로 가장 특이도가 뛰어난 유전자를 선발하여 진단 Kit용으로 사용한다.

특이단백질에 대한 항체생산을 위해서 N-terminal 및 internal peptides 중에서 효율적 항체생산이 유력한 N-terminal peptide와 internal peptide 각 1개씩 총 2개를 선발하여 peptide를 합성하고 이를 정제하였다. 이와같이 얻어진 peptides를 각각 토끼와 생쥐에 주사하여 polyclonal 항체 및 monoclonal 항체를 제조하였다. 항체의 특이성을 확인하기 위해 정제된 단백질, 오줌 단백질 등을 대상으로 ELISA, Western blotting 등을 실시하여 항체의 specificity와 titre를 측정하였다.

특이단백질에 대한 면역학적 진단방법 개발을 위해서 오줌이나 혈청 내에 발현되는 특이단백질을 ELISA plate나 polystyrene bead에 토끼 혹은 생쥐로부터 얻은 항체 1종류를 결합시키고, 생쥐로부터 얻은 다른 항체에는 HRP 효소를 화학적으로 결합시킨 conjugate를 만들어서 특이단백질의 정성, 정량 분석을 진행한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 소의 오줌에 대한 proteomics 연구를 통하여 소의 임신특이 유전자를 발굴함으로써 이를 이용한 polyclonal antibody 및 monoclonal antibody를 제조하여 궁극적으로 소임신특이 진단 Kit를 개발하여 이를 실용화 하는데 그 목적이 있다. 이를 위하여 먼저 실험동물인 소를 사육 관리하였다. 또한 소의 인공수정 및 임신진단을 위하여 농협에서 제공되는 동결정액을 구매하여 지속적 발정을 처음 관찰한 후 10 ~ 12시간에 수정용 피펫을 사용하여 수정하였다. 임신상태는 인공수정한 다음 35 ~ 60일에 직장검사를 통하여 임신여부를 최종 판정하였다. 이상의 방법으로 인공수정한 소의 인공수정 성공률은 약 90%였으며, 이 결과는 일반농가의 인공수정 성공률 약 80%에 비해서는 상당히 높은 인공수정률을 나타내었다.

정상소 및 임신소의 오줌 채취를 위하여 방광 또는 요도에 염증이 없는 임상상 건강한 소를 택하여 채취하였다. 비임신 소는 이상적인 난소기능을 나타내는 임상징후가 없는 소이며, 임신소는 임신기간이 1.5 ~ 6개월인 소로서 배뇨시 또는 맛사지 법을 이용하여 최

소한 1 liter 이상의 오줌을 채취하였다.

각 목장에서 채취한 임신소 및 비임신소의 오줌시료로부터 임신특이단백질을 분리하기 위하여 소임신특이 단백질을 효과적으로 분리하고 이를 2-D gel electrophoresis로 확인하는 반복성 높은 단백질 분리 및 확인방법을 성공적으로 확립하였다. 얻어진 오줌단백질은 IEF(isoelectric focusing)로 1차 전기영동하였으며, 곧바로 SDS-PAGE로 2차 전기영동하여 임신소 및 비임신소에 대한 proteomic map pattern을 얻었으며, 이를 비교분석하여 임신특이단백질을 확인하였다. 또한 임신기간이 증가함에 따라 소의 임신특이 단백질의 발현량 증가유무를 확인하기 위하여 임신기간별 2-D gel pattern을 조사하였다. 그 결과 임신기간이 증가함에 따라 spot의 크기가 증가하는 임신특이 단백질이 다수 확인되었으며 특히 #2 spot은 임신기간이 경과함에 따라 단백질의 발현량이 뚜렷이 증가함을 확인할 수 있었다.

Spot #2 단백질이 임신특이 단백질이라는 확신을 갖게 됨에 따라 이 단백질을 좀더 정확하게 분석하기 위하여 단백질의 N-terminal 및 internal amino acid sequence를 밝히고자 하였다. 그 결과, spot #2 단백질의 N-terminal sequence는 collagen과 유사하였으나 internal sequence는 collagen과는 전혀 다른 아미노산 서열을 가짐을 알았다. 소의 유전자 및 단백질 database가 아직 많이 부족하기 때문에 소단백질과 match되는 것은 얻기 힘들 뿐 아니라 data가 충분한 인간과 mouse와도 현재로서는 80% 이상의 homology를 갖는 단백질은 발견되지 않았으므로 #2 spot 단백질은 새로운 단백질로 확인되었다.

한편 임신 및 비임신의 오줌을 채취하여 2-D gel을 전개하고 #2 spot 단백질의 발현 여부를 기록하여 얻은 통계 결과에 따르면 임신소에서 가음성이 나올 확률은 약 15%, 비임신소에서 가양성이 나올 확률은 약 16% 정도인 것으로 나타났다. 이상의 결과는 최소한 84% 이상의 양성과 85% 이상의 음성을 감지할 수 있는 결과를 의미하므로 임신특이 antibody를 사용하지 않고 얻은 결과로서는 대단히 높은 통계 값으로서 차후에 antibody를 제조하여 진단 Kit로 사용하면 훨씬 높은 결과가 예상됨으로 임신진단 marker로써 성공가능성이 매우 큰 것으로 판단된다.

2-D gel 분석을 통해 선발된 임신특이 단백질들과 일반적으로 나타나는 오줌단백질들의 protein mass fingerprint database 구축을 위해 각 spot을 분리하여 mass spectrometry 분석을 수행하였다. 정제된 추출 peptide는 MALDI-TOF MS로 분석하였으며, 그 결과 12종의 임신특이 단백질 및 18종의 일반 오줌단백질에 대한 protein mass fingerprint

database를 성공적으로 구축하였다. 또한 앞에서 수행한 2-D gel 분석결과를 이용하여 PDQUEST program으로 image analysis를 수행하여 proteomic map을 작성하였으며, 비임신소에 비해 임신소에서 특이적으로 양이 증가하는 10개의 spot(#2, #5, #6, #9, #10, #12, #13, #15, #16, #17) 및 오히려 양이 감소하는 2개의 spot(#8, #11)을 임신특이 단백질로서 최종 확인하였다. 그 중에서도 특히 분자량 20,000 Da과 6.2의 pI값을 갖는 spot #2가 임신 중 가장 뚜렷한 양의 증가를 보였으므로 이를 임신특이성 단백질로 다시 확인하고 집중적으로 연구를 수행하였다. 비임신 특이 단백질도 선별되고 반복성이 확인되었으며 이 단백질들의 성질은 spot #9가 Kexin-like protein PC7A precursor (쥐)으로 spot #12가 HLA class I histocompatibility antigen (개)으로 판명되었다. 이상의 결과로부터 소의 오줌단백질을 이용하여 성공적으로 임신소와 비임신소의 proteomic map을 작성할 수 있었으며, 이 중에서 임신특이 단백질 spot #2를 bovine pregnant associated protein(bPAP 2)로 신규 명명하였다.

선발된 소 임신특이단백질의 mass spectrometry 분석을 위하여 적어도 30 두의 임신 및 비임신소의 오줌단백질을 2-D gel로 분석하여 반복성 있게 나타나는 단백질들을 중심으로 peptide mass fingerprint 방법으로 각 단백질들의 성질을 규명하고자 하였다. MALDI-TOF mass spectrometry 분석결과 각 spot의 pI 값과 분자량을 고려하여 분석결과 얻은 data 중에서 가장 가능성이 높은 단백질들을 선별하였다. 완성된 2-D image에 나타난 protein spot의 갯수는 개체별로 다소간의 차이를 보였으나 약 140개 정도였다. 각 spot을 gel로부터 잘라낸 후, MALDI-TOF을 이용하여 각 단백질을 확인하여 지금까지 총 140개 spot 중에서 72개 spot의 단백질을 최종 확인하였다. 최적화된 MALDI-TOF mass spectrometry 실험조건에서 얻은 peptide mass 값을 가지고 database를 검색하여 본 연구에서 선별한 임신소의 오줌단백질들의 성질을 규명하였다. 현재까지 소의 database가 충분치 못한 관계로 아직까지는 100% 신뢰할 수 있는 결과로 단정할 수는 없지만 현재까지 가능한 자료를 토대로 어느 정도는 단백질의 성질을 예측할 수 있었다. 뿐만아니라 앞으로 database가 점점 확장됨에 따라 우리가 확립한 peptide 값만을 단순히 입력하여 database를 검색하여도 단백질의 성질을 규명할 수 있는 방법적 기틀을 마련하였다는 데 중요한 의미가 있다.

한편 HPLC에 의한 peptide 분리가 한계를 가질 수밖에 없으므로 보다 많은 peptide sequencing을 위해 Q-TOF MS(Mass spectrophotometry)의 방법을 이용하기 위하여 ESI-TOF MS실험과 Q-TOF MS/MS 실험을 실행하였다. 그 결과 bPAP 2 (#2 spot)의

peptide 서열을 새로이 밝힐 수 있었으며, 이것은 각각 V-L-G-A-G-Q-P-L-P과 E-L-E-L-V-G-G-G-S-A-Q로 확인되었다.

본 연구의 최종목표는 proteomics 방법으로 소의 오줌으로부터 분리한 임신 특이단백질을 이용하여 간편하면서도 정확한 임신특이 진단 Kit의 제조에 있음으로 polyclonal antibody를 제조하고자 하였다. 이를 위하여 지금까지 확보한 임신특이 단백질 spot #2의 peptides에 대한 아미노산 sequence를 이용하여 N-terminal sequence 1개와 internal sequences 중에서 1개를 선택하여 두종류의 peptide를 먼저 합성하였다. 합성된 peptides를 각각 정제한 후 정제된 peptides를 토끼에 주사하여 polyclonal 항체를 성공적으로 제작하였으며, 그 결과를 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 분석하였다. 그러나 제조된 polyclonal 항체는 specificity가 아주 좋지는 않아서 상당한 background를 나타내었지만, Western blot 분석결과에서는 spot #2 단백질(bPAP 2)에 대하여 비임신소의 오줌단백질에서는 감지하지 않았고 임신소의 오줌에서는 특이하게 감지할 수 있었다. 이 polyclonal 항체의 specificity를 높이기 위해 합성 peptide가 결합된 affinity resin을 제조하여 이를 이용한 column chromatography를 수행하여 polyclonal 항체를 정제하였다. 정제된 항체는 정제되지 않은 항체에 비하여 매우 높은 specificity를 나타내었으며 Western blotting으로 재분석하였을 때 spot #2 단백질을 매우 선택적으로 감지하였다. 항체를 가지고 분석한 임신소와 비임신소의 오줌 단백질의 결과는 앞으로 개발하게 될 임신소 진단시약 개발에 대단히 높은 성공가능성을 보여주고 있다. 한편 이 항체를 이용하여 spot #2 단백질이 어느 정도로 정확한 임신진단을 할 수 있는지를 판단하기 위해 progesterone의 혈중 level과 polyclonal anti-spot #2 항체를 이용한 Western blot 분석결과를 비교분석하였다. 현재까지 가장 정확한 임신진단기법인 RIA(radio immunoassay) 방법에 의한 progesterone level의 측정 및 follow-up 실험을 통한 임신여부 측정과 동일한 소에 대하여 본 연구를 통하여 제조된 polyclonal anti-spot #2 단백질에 대한 항체를 이용한 Western blot 분석을 통한 임신여부 결과를 상호비교했을 때 false negative 가 5% 미만이었으며, false positive가 10% 정도로 나타났다. 이상의 결과는 본 연구팀이 제작한 임신특이 항체가 적어도 90% 이상의 정확도를 나타냄을 보여주고 있다. 이와 같은 성적은 지금까지 보고된 여타의 소임신진단 Kit 분석에 의한 임신진단 결과보다 20% 이상 우수한 결과이다.

또한 소임신특이 단백질에 대하여 polyclonal antibody에 비해 특이성이 보다 높은 monoclonal antibody를 제조하고자 하였다. 그 결과 bPAP 2에 대한 2종류의 monoclonal antibody 즉 Mono-1 및 Mono-2를 성공적으로 제작하여 각각 5mg/ml의 농도로 6ml씩 총

30mg의 양으로 순수 정제하였다. 이상에서 정제된 monoclonal antibody를 이용하여 소의 오줌에 존재하는 bPAP 2 단백질에 대한 특이적 감지능력을 평가하기 위하여 ELISA test와 Western blotting을 수행하였다. ELISA test 결과 Mono-1과 Mono-2는 희석배율을 높여도 계속 높은 값을 유지하였으며, 특히 Mono-1은 100,000배 희석까지도 원액과 비슷한 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 이 결과는 생산된 두 종류의 monoclonal antibody가 bPAP 2에 매우 특이적으로 반응한다는 것을 보여주는 것이다. 또한 Western blotting 분석 결과에서는 이전에 보여준 polyclonal antibody를 사용했을 때의 결과에 비해 background가 거의 없을 뿐만 아니라 비특이적 bands도 거의 없음을 알 수 있다. 이상의 결과들을 종합하면 제작된 monoclonal antibody가 bPAP 2와의 결합에 있어서 polyclonal antibody 보다 훨씬 뛰어난 특이성과 감지 능력을 갖고 있다는 것을 알 수 있다. 결론적으로 본 연구를 통하여 제조된 monoclonal antibody를 이용하면 기존의 다른 방법에 비해 훨씬 우수하고, 간편하며, 고감도의 소임신틱이 진단 Kit를 제작할 수 있는 것으로 평가된다.

한편 본 연구와의 직접적 비교를 위하여 국내에서 개발된 임신진단용 Kit의 성능검정을 실시하였다. 이를 위해 (주)녹십자에서 개발, 판매되고 있는 progesterone에 대한 면역적 chromatographic 진단 Kit를 이용한 임신소 및 비임신소의 판별과 분석방법의 정확성을 평가하였다. 현재까지 국내외에서 개발된 모든 진단 Kit는 progesterone을 이용한 정성방법으로서 분석결과 임신소의 판정에서는 약 20% 정도가 판독이 어려웠으며, 비임신소의 경우 약 40% 정도가 판독이 어려웠다. 따라서 전체적으로 약 30%가 판독이 어려운 것으로 나타나 기존의 진단시약이 아직까지 specificity의 문제점을 안고 있음을 알 수 있다. 이에 비해 본 연구팀이 개발한 소 임신틱이 단백질의 peptide를 이용하여 제조한 polyclonal antibody 및 monoclonal antibody는 최소 90% 이상의 specificity를 보여줌으로써 보다 특이성이 높은 Kit를 개발할 가능성이 매우 큼을 알 수 있다.

SUMMARY

In this research, we developed a method for the localization of pregnancy-specific protein from cow urine on 2-D gel. The proteins were transferred to membrane and microsequenced. One of the proteins, bovine pregnancy-associated protein 2 (bPAP 2), was identified, characterized by N-terminal and internal sequencing, and mass spectrometric analysis, and the pregnancy-association was confirmed by Western blot analysis. It will be a good candidate for developing a cow pregnancy detection assay.

Total proteins from pregnant and non-pregnant cow urine were obtained with addition of trichloroacetic acid. Approximately 0.35 mg protein of each sample was loaded onto each first dimension isoelectric focusing gel. Generally, the protein concentration of 60 ~ 90 mg/L in pregnant urine was about three-folds higher than that of non-pregnant urine. Interestingly though, the total proteins in the four urine samples from the different cows in terms of age and status of pregnancy showed similar migration patterns on 2-D gels. For better separation and improved spot intensity on the gel, urine samples were fractionated with ammonium sulfate. When the proteins were separated on 2-D gels after the 50% ammonium sulfate fraction, several pregnancy-associated and non-pregnancy specific spots were found on the gels. In particular, spot 2 was isolated very well at 20 kDa and PI 6.2, and expressed at a significant level in pregnancy-associated urine. Considering the spot intensity after silver staining, the amount of the protein in the spot was believed to be in the tens of nanograms range. Throughout this experiment, we focused on proteins whose expression was pregnancy-associated.

To determine a correlation between the expression level of the proteins and duration of pregnancy, the relative expression levels of spots 1 and 2 in the urine of cow #46 was compared at 2, 4 and 5 months of pregnancy. In this period, the expression of the spot 2 protein increased significantly while that of the spot 1 protein remained constant as the pregnant state proceeded. The possibility of the influence of feeding conditions

or other genetic differences on the expression of the pregnancy-associated proteins localized on the 2-D gel was ruled out by analyzing pregnant and non-pregnant cow urine from another institute housing a different lineage of cows and receiving different feed. Interestingly, the profiles of the total urine protein of the cows from two different institutes were highly similar on 2-D gels. As the pregnant cow was artificially inseminated four months before the urine sampling and the protein was expressed at a significant level, it is possible to speculate that this protein is expressed much earlier than the four-months state, and perhaps even earlier than two months after artificial insemination.

Proteomic analysis of the urine proteins separated on 2-D gels was not very informative. Among over 200 spots analyzed, only <5% of the proteins could be annotated by PMF (peptide mass fingerprinting) due to the incomplete nature of existing bovine genomic and protein databases. Some of the protein spots were identified with low MOWSE scores. The spot 2, bPAP 2, showed a similarity to human (or bovine) collagen by PMF. The collagen-like sequence in the N-terminus of bPAP 2 could be digested by trypsin to form some responsible peptides matched to collagen, which is a huge molecule with repetitive Gly-X-X sequence. The pregnancy-association of bPAP 2 was analyzed and other additional pregnancy-associated proteins were sought on the 2-D gel. Due to the variations of urine protein components among individual cows, isolation of pregnancy-associated protein by comparing 2-D gels required many urine samples from pregnant and non-pregnant cows. From the analysis of the spots on the gel stained with Coomassie Brilliant Blue R-250, we set the cutoff for pregnancy-specific proteins as repeatedly positive in pregnant urines and negative in non-pregnant urines from at least three cows in different gestation periods and feeding conditions. Proteins from 30 pregnant and 20 non-pregnant urines were prepared, separated on 2-D gels, and analyzed using the image analysis software, PDQuest. The bPAP 2 protein spot was the only pregnancy-associated detected protein on 2-D gels stained with Coomassie Brilliant Blue. There were two false positive and on false negative urines among 20 non-pregnant and 30 pregnant urine samples, respectively, in terms of bPAP 2 expression. Considering the high correlation of bPAP

expression to bovine pregnancy (over 97%) and low background (10%), the bPAP 2 protein can be utilized for the diagnosis of bovine pregnancy by an immunological format.

The expression of bPAP 2 in the non-pregnant urine was compared with that of the pregnant urine using a silver nitrate staining. Non-pregnant or pregnant urine proteins in gels were first stained with Coomassie Brilliant Blue. The gel images were scanned and stained with silver nitrate. In the Coomassie Brilliant Blue stained gels, the bPAP 2 protein was clearly apparent in the pregnant urine but not in the non-pregnant urine. The bPAP 2 protein not shown by the Coomassie Brilliant Blue staining could be detected as a faint smear on the silver nitrate stained gel. Urine (50 ~ 100 mL) was fractionated with 50% ammonium sulfate to run one 2-D gel, suggesting that the basal expression of bPAP 2 is lower than the detection limit of silver staining, at the nmol level. The concentration of bPAP 2 protein in urine increases with the onset of pregnancy and reached a concentration higher than the nmol level, as detected by Coomassie Brilliant Blue staining.

The identification of bPAP 2 was pursued by N-terminal and internal sequencing. Several spots of bPAP 2 on PVDF membranes were investigated for Edman degradation and 18 amino acid sequences from the N-terminus of bPAP 2 were identified. Database search by BLAST using the amino acid sequence suggested that the N-terminus of the protein has a high similarity to collagen alpha. The similarity residues in the four Gly-X-X repeats in the sequence, which is the typical repeat of collagen proteins. Further sequence analysis by internal sequencing provided an extension of the collagen-like Gly-X-X repeats up to 37 amino acids with some ambiguities. However, the other internal sequence of bPAP 2 did not show similarities to collagen but to several different protein within short sequence ranges without any common features. Given that the molecular mass of the protein is about 20 kDa and the average molecular mass of an amino acid is 110 Da, the protein should have about 190 amino acids and at least 20% of the protein should form a collagen-like structure. The rest of the sequence forms a different kind of structure. This structural feature of bPAP 2 shows similarity to human and bovine lung surfactant protein D (SP-D).

SP-D forms a quaternary structure with the oligomers of trimeric subunits. Likewise, bPAP 2 protein could form a quaternary structure *via* the collagen-like structure.

The amino acid sequence data obtained by a MS/MS spectrometric analysis of the tryptic peptides of bPAP 2 are summarized in Table 2. The peptide sequences do not identify any bovine protein but show limited similarities to various proteins from different species. The early stage of bovine protein and genomic databases limit the proteomic approaches to identify proteins from bovine tissues. Although it might be an inefficient way to identify bovine proteins by PMF or peptide sequencing by a MS/MS spectrometry until the full-length bovine genome sequencing is completed, in the current study, the results from the mass spectrometric analyses provided an ample amount of sequence and structural information of bPAP 2.

Polyclonal antibodies and monoclonal antibodies against the peptide sequences obtained by N-terminal sequencing (DSELAGPRGARG) and MS/MS analysis (DGQELELVSSG) of bPAP 2 were generated rabbits and mice, respectively. The polyclonal antibodies showed such high nonspecific binding that the antisera could not show the specific bPAP 2 band until the anti-bPAP 2 antibodies were purified using the affinity column. The specificity of the antibodies was analyzed by Western blot analysis on 2-D gel separated pregnant and non-pregnant urines. Both antibodies indicated the bPAP 2 protein to have a pI of 6.2 and mass of 20 kDa. However, the affinity purified antibody against the peptide of DGQELELVSSG still showed high nonspecificity in Western blotting. Thus, the antibody to the peptide of DSELAGPRGARG was used for Western blot analysis. Approximately 5 ~ 15 mL of the bovine urines at different gestation periods were fractionated with 50% ammonium sulfate, separated by SDS-PAGE, and transferred to the PVDF membrane. The blot was blocked with blocking buffer and incubated with the affinity purified polyclonal antibody in blocking buffer. Result shows that the purified antibody selectively recognized the 20 kDa band and that the intensity of the band was not correlated with the gestation period. The antibody recognized nonspecific bands with molecular mass lower than 20 kDa in some non-pregnant urines. The specific recognition of the bPAP protein by the antibody was not changed although the urines were collected at different

times and places. In other words, the bPAP 2 protein in the pregnant urine is expressed in a pregnancy-associated manner. This result suggests that bPAP 2 is a bovine pregnancy-associated protein and that the expression of the protein in the urine varies in the individual cows. From our screening experiments, we saw <10% of false positives and <3% of false negatives. These results suggest that there could be veterinary reasons for this variation of the fluctuation of the expression level among individual cows. If the bPAP 2 protein expression level during pregnancy can be quantitated, the correlation between the embryonic mortality which accounts for major reproductive wastage in farm animals, and the fluctuation of bPAP 2 can possibly be investigated. We have successfully produced a more specific monoclonal antibodies, Mono-1 and Mon-2, to develop a diagnostic Kit for bovine pregnancy test.

In conclusion, from the proteomic analysis of urine proteins from Holstein cows, a bovine pregnancy-associated protein was characterized by 2-D gel and image analysis, PMF (proteomic mass fingerprinting), N-terminal sequencing and MS/MS analysis. Due to the incomplete nature of current bovine genomic and protein databases, the identification of the protein was not quite successful. However, using the peptide sequence information, antibodies against the bPAP 2 protein were generated. Western blot analysis using the purified antibody to bPAP 2 showed the protein is indeed a pregnancy-associated protein and that the bPAP 2 concentration in the urine of pregnant cows fluctuates among individuals. The correlation between the fluctuation of bPAP 2 expression and veterinary symptoms need to be analyzed. This antibodies can be utilized to develop a reagent for the demonstration of bovine pregnancy and should be a valuable aid to help understand embryonic mortality in bovine pregnancy.

CONTENTS

Chapter 1. Overview	19
Chapter 2. Background	20
Chapter 3. Subjects and results	22
[1] Subjects	22
[2] Materials and methods	23
[3] Results	29
1. Artificial insemination and breeding of cow	29
2. Urine sampling of non-pregnant and pregnant cow	29
3. Isolation of urine proteins from non-pregnant and pregnant cow	32
4. Time-dependent comparison of cow's pregnant-specific urine proteins	39
5. Quality analysis of bovine pregnancy-associated proteins through amino acid microsequencing	41
6. Establishment of protein fingerprint database for the urine proteins of non-pregnant and pregnant cow	44
7. Proteomic map for the bovine urine proteins and selection of its pregnancy-associated proteins	56
8. Mass spectrometry analysis of the bovine pregnancy-associated proteins	60
9. Production of polyclonal antibody for the bPAP 2 and Western blotting	79

10. Production of monoclonal antibody for the bPAP 2 and Western blotting	94
11. Efficiency evaluation of cow pregnancy tests by using diagnostic Kit	109
Chapter 4. Level of accomplishment and contribution in rerated fields	111
[1] Research goal	111
[2] Factors for research evaluation	111
[3] Level of accomplishment	112
1. 1st year	112
2. 2nd year	113
3. 3rd year	115
Chapter 5. Application plans of results	118
Chapter 6. Information from foreign researchers	119
Chapter 7. References	120

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	19
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	20
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	22
제1절. 연구개발 수행 내용	22
제2절. 연구재료 및 방법	23
제3절. 연구개발 결과	29
1. 소의 인공수정 및 실험동물 사육	29
2. 정상소 및 임신소의 오줌 채취	29
3. 정상소, 임신소의 오줌단백질 분리	32
4. 임신기간별 임신특이 단백질의 발현량 변화조사	39
5. 선발된 특이단백질의 amino acid microsequencing 분석을 통한 단백질 정성분석	41
6. 정상소, 임신소의 오줌단백질의 protein fingerprint database 구축	44
7. 오줌단백질의 proteomic map 작성 및 특이단백질 선발	56
8. 선발된 특이단백질의 mass spectrometry 분석	60
9. 소임신특이 단백질에 대한 polyclonal antibody 제조 및 Western blotting	79
10. 소임신특이 단백질에 대한 monoclonal antibody 제조 및 Western blotting	94
11. 소의 임신진단용 Kit의 성능검정	109

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	111
제1절. 연구개발의 최종목표	111
제2절. 연구평가의 착안점	111
제3절. 연구개발 목표의 달성도	112
1. 제 1차년도	112
2. 제 2차년도	113
3. 제 3차년도	115
제 5 장. 연구개발결과의 활용계획	118
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	119
제 7 장. 참고문헌	120

제 1 장. 연구개발과제의 개요

본 연구팀은 proteomics 방법으로 지난 5년간의 실험을 통하여 임신 소의 오줌 단백질과 비임신 소 오줌단백질들을 2-D gel 상에서 분리하여 비교함으로써 현재까지 보고된 바 없는 소 조기임신폭이 단백질들을 선별할 수 있었다(임 and 강, 1999, Hwang and Lim, 1999). 따라서 본 연구는 소를 대상으로 proteomic map을 만들고 이 map을 중심으로 임신 특이적인 단백질을 선별할 수 있는데 이를 위해 오줌을 이용하면 반복성이 높고 시료 채취가 간단한 장점이 있다. 그 동안 소의 임신특이 단백질을 찾는데 있어 많은 사람들이 성공적이지 못했던 이유는, 단백질이 많은 소의 혈액으로부터 소량으로 존재하는 임신특이 단백질을 찾기 어려웠던 것이고 단백질 정제방법도 단백질 양이 어느 정도 이상일 때 성공적일 수 있는 전통적인 단백질 정제방법들을 사용해 왔기 때문이다(Wooding and Beckers, 1987; Sasser *et al.*, 1989; Zoli *et al.*, 1991). 그 동안 소의 체액에서(오줌, 피, 유즙) 임신특이 단백질을 찾지 못하였고 찾았다 하더라도 임신특이도가 떨어져서 임신진단을 위한 marker로는 사용하기 어려운 점이 있었다 (Morton *et al.*, 1987 and 1992; Lynch and Abbott, 1988). 그러나 proteomics 방법을 이용하면 위와 같이 소량으로 존재하는 단백질이라도 특별한 정제기술 없이 이차원 전기영동(2-D gel)과 image 분석방법을 통해 특이발현을 보이는 단백질을 선별할 수 있고, mass spectrometry 방법과 amino acid sequencing 방법 등을 이용하여 단백질의 기능 및 해당 단백질의 유전자를 쉽게 찾을 수 있다. Genome project가 포괄적이고 막대한 연구비를 필요로 한다면 proteomics project는 개별적인 연구실에서 용도에 맞는 소규모의 시도가 가능하다. 특별히 본 연구에서 오줌을 중심으로 임신특이 단백질을 선별 하고자 하는 것은 시료 채취가 간단하고 반복성이 높으며 동물의 생리상태 변화에 비교적 민감하게 차이를 보이기 때문이다 (Young and Tracy, 1995; Ito *et al.*, 1998; Pedraza-Chaverri *et al.*, 1996).

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

Proteomics는 2-D gel electrophoresis 결과 얻은 단백질을 mass spectrometry와 같은 분석방법으로 정성분석 하는 것과, 얻은 data를 조직적으로 정리하여 database화하는 것으로 단순화 할 수 있다. 이런 점에서 볼 때 분석을 위한 2-D gel electrophoresis, mass spectrometry, database를 위한 bioinformatics와 image 분석 등으로 핵심기술을 대별할 수 있다. 즉 2-D gel electrophoresis 기술의 핵심은 반복성과 분리능력, 해상력이다. 선진국에서는 이러한 점을 감안하여 IPG strip (immobilized pH gradient)을 이용하는데 단가가 비싸고 실험자의 필요에 맞는 pH 영역을 필요에 따라 선택해서 사용하기가 어렵다. 이 기술은 특허시효가 지난 기술이므로 국내에서도 개발하여 사용할 수 있으며, 본 연구팀에서는 이미 상기기술을 확립하여 적용하고 있다. 또한 Image analysis에서는 computer software를 이용하여 2-D gel상에 전개된 단백질을 개별적으로 비교하는 것인데 국내시장의 수요가 작아서 국내 자체개발이 현 단계로서는 어렵다. 그러나 이미 국제시장에서 시판되고 있는 PDQUEST (미국)나 Melanie (스위스) 같은 software가 국내에서 쓰이고 있다. Mass spectrometry는 화학자들이 합성한 화합물을 분석하기 위해 이미 보편적으로 사용하고 있으나 분자량이 크고 구조가 훨씬 복잡한 단백질은 기존의 기술과 장비로는 분석이 불가능하다. PE-Biosystem, Bio-Rad, AP-Biotechnology와 같은 미국 내 굴지의 Biotechnology 회사에서 경쟁적으로 단백질 분석을 위한 mass spectrometry 개발과 응용에 급속한 진보를 보이고 있다. Bioinformatics는 단백질의 아미노산 서열, 유전자서열, 단백질의 mass spectrum fingerprint, 단백질 기능 등을 체계적으로 database화하여 새로운 단백질이나 유전자 서열을 이용하여 단백질의 기능을 알 수 있도록 하는 것이다. 현재 국내의 수준은 국제적 수준에 비하면 유아적인 수준이기는 하지만 국내의 우수 전자전산 분야를 고려하면 가장 빠른 시간 내 손쉽게 국제 경쟁력을 가질 수 있는 분야이다.

한편 Human genome project 이 후 Celera사는 다음 연구분야로 proteomics를 지목했고 연구비로 수십조원을 조성하여 이 분야에 총력을 기울이고 있고 그외 여러 venture 회사들이 유사한 수준으로 경합을 벌이고 있다. 유전자의 서열이 밝혀진 후 최대의 관심은 유전자의 기능을 밝히는 것이기 때문에 단백질에 대한 연구가 hot topic으로 진행되고 있다. 국내에서는 proteomics 기술을 이용한 단백질 연구분야에서 학계는 5 ~ 8 groups,

몇몇 venture 회사를 뽑을 수 있는 데 기술 수준이나 자금 수준은 매우 취약한 편이다.

위와 같은 상황을 고려할 때 선진국에서 추구하는 목표를 국내에서 단순 경쟁하여 성취한다는 것은 불가능하다. 그러나 단백질의 발현은 조직별, 조건별, 시간대별로 다르기 때문에 우리 여건에 적합한 특정분야를 선별 연구한다면 외국과도 충분히 경쟁할 수 있다. 이러한 관점에서 가축동물의 오줌에 대한 proteomic map을 만들고 이를 이용하여 유용유전자를 선별하는 연구는 국제 경쟁력도 있고 연구결과를 쉽게 산업화할 수 있는 장점이 있다.

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발수행 내용

1. 제 1차년도 :

- 정상소, 임신소의 오줌 채취
- 정상소, 임신소의 오줌단백질 분리
- 오줌단백질의 2-D gel 분석에 의한 proteomic map 작성 및 특이단백질 선발
- 선발된 특이단백질의 mass spectrometry 분석
- 선발된 특이단백질의 amino acid microsequencing 분석을 통한 단백질 정성분석
- 소의 인공수정 및 실험동물 사육

2. 제 2차년도 :

- 임신소의 오줌 채취
- 임신소의 오줌단백질 분리
- 오줌단백질의 2-D gel 분석에 의한 proteomic map 작성 및 특이단백질 선발
- 선발된 특이단백질의 mass spectrometry 분석

- 선발된 특이단백질의 amino acid microsequencing 분석을 통한 단백질 정성분석
- 정상소, 임신소의 오줌단백질의 protein fingerprint database 구축
- 소의 인공수정 및 실험동물 사육

3. 제 3차년도 :

- 임신특이 유전자의 cloning 및 선발
- 임신특이 유전자의 대량발현 및 발현단백질의 분리, 정제
- 임신특이 단백질에 대한 면역학적 진단방법 개발을 위한 항체 생산
- PCR 방법을 이용한 소의 임신특이 진단 Kit 개발
- 면역학적(ELISA) 방법을 이용한 소의 임신특이 진단 Kit 개발
- 소의 임신진단용 Kit의 성능검정
- 실험동물 사육

제 2 절. 연구재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리 : 실험동물은 대구시 소재의 경북대학교 부속목장, 경북 경산시 소재의 영남대 부속목장 및 경북 군위군 소재 일반농가의 목장에서 사육중인 체

중 600 Kg 내외의 Holsteins 젖소중 임상상 건강한 비임신소 및 임신소를 실험재료로 공시하였다. 실험동물의 사육은 자동급이기(Seoil Co., Korea)가 설치된 계류장 (free stall)에서 사육, 관리하였으며 물과 무기물은 자유급식토록 하였다.

2. 소의 인공수정 및 임신진단 : 소의 인공수정은 농협에서 제공되는 동결정액(1.0ml, straw)을 구매하여 지속적 발정을 처음 관찰한 후 10 ~ 12시간에 수정용 피펫을 사용하여 수정(교배)하였다.
3. 정상소, 임신소의 오줌 채취 : 외형, 증체량, 사료섭취량, 행동 등이 정상인 임신소 및 비임신소의 오줌을 채취하기 위하여 각 목장에서 수집한 비임신소 및 임신소 오줌을 가능한 빨리 ice bath에서 냉장시키고 0.45 um filter로 여과하여 미생물이나, 세포, 오물 등을 제거하였다. 처리된 오줌은 즉시 동결시켜 protease의 작용을 저해시켰다. 실험실로 가져온 sample을 서서히 녹인 후 침전된 단백질을 제거하기 위해 원심분리 후에 상등액을 취하고 이것을 다시 filter 했다. 각 sample은 1 liter 이상 채취했으며 채취한 병에 임신 여부와 일련번호 등을 기록했다.
4. 소 오줌단백질 분리 : 600ml의 소 오줌 sample을 각각 취해서 전체 sample 량의 30% 수준의 ammonium sulfate로 4시간 이상 단백질을 침전시킨 후, 원심분리 후에 상등액을 취해서 50% 수준의 ammonium sulfate로 4시간 이상 단백질을 침전시켰다. 원심분리 후에 생성된 단백질 침전물을 30ml의 PBS(phosphate buffered saline) 용액에 용해시킨 후에 10%의 trichloro acetic acid(TCA)로 4시간 동안 처리하여 침전된 단백질을 원심분리하여 모으고 pellet을 ethanol로 세척 후 건조시킴으로써 salt를 제거했다. 침전된 단백질을 100% ethanol로 세척, 원심분리 하는 방법을 5회 이상 실시하여 salt를 최대한 제거하였다. 이 후에 Speed-Vac.을 이용하여 단백질을 건조시켰다. 건조된 단백질을 적당량의 rehydration buffer로 녹였다. 단백질 농도결정은 Bradford 방법으로 결정하였고, standard로는 소 면역글로불린 G를 이용하였다.
5. 2-D gel electrophoresis : Rehydration buffer에 녹아있는 단백질 sample을 취하여 IPG strip(BioRad, USA)에 loading 하여 전기영동을 수행하였다. 단백질간의 pI 값

의 차이에 따른 분리를 위해 IPG strip run 조건은 22°C에서 rehydration 과정은 passive로 3시간, active로 10시간으로 하고 ramping 5시간, isoelectric focusing 6시간, total 24시간으로 하였다. Isoelectric focusing 과정이 끝난 IPG strip을 12% polyacrylamide gel에 loading 하여 단백질의 size에 따른 분리를 수행하였다. 이차원 전기영동이 끝난 후, gel을 silver staining 혹은 coomassie brilliant blue로 염색한 후 PDQUEST (Bio-Rad) image 분석용 program을 이용하여 분석한다. 반복실험과 개체간의 차이를 비교하여 공통적으로 존재하는 단백질들을 확정한다.

6. Mass spectrometry 분석 : 선발한 단백질의 정체를 밝히기 위해 먼저 단백질 spot을 2-D gel에서 잘라내고 gel spot에 들어 있는 단백질을 trypsin으로 자른후 peptide를 gel에서 elution한다. Elution된 peptide를 matrix에 고정시키고 Voyager DE-STR MALDI-TOF MS 분석기 (Applied Biosystems, USA)로 분석했다. 스펙트럼은 delayed extraction-reflector 모드에서 20,000V acceleration 전압, 150ns delay time의 표준상태에서 얻었다. 펩타이드는 분자량 700 ~ 3,500 Dalton 사이의 것을 선택했다. 스펙트럼은 평균 300 individual laser shot에서 얻었고 트립신의 autolytic products인 m/z 842.5, 1045.6, 2211.1을 가지고 internally/externally 보정을 했다. Fingerprint data는 단백질의 정체를 밝히는데 중요한 자료가 되며 기존의 database(SWISS-PROT, UCSF database 등)에 존재하지 않는 경우 Q-TOF MS 방법으로 peptides의 amino acid sequence를 새로 조사하여 Blast search한다. 두 경우 모두 정체가 밝혀지지 않으면 새로운 단백질이 선발된 것으로 추정한다.
7. Tandem-MS 분석 : Tandem electrospray 질량 분석은 Micromass CapLC capillary column에 붙어있는 flight spectrometer (Micromass, Manchester, UK)의 Q-TOF hybrid quadrupole/orthogonal acceleration time으로 수행했다. 트립신을 처리한 시료는 용액 상태의 5% formic acid로 녹였고, 염 제거 컬럼인 Pepmap C18 (LC packings, Amsterdam, NL)으로 염을 제거하고 농축했다. 5% formic acid가 함유된 60% acetonitrile로 추출한 펩타이드를 질량분석기에 주사하였다. 그 장치는 MS/MS의 survey scan mode에서 수행했다. 질량 스펙트럼은 m/z 400 ~ 1,800 Da 범위에서 선택하였다. 펩타이드를 선택할 때, Q-TOF는 선택된 이온만을 통과시키기 위해 사중극자 모드 (RFDC 모드)를 이용했다. Autolysis된 트립신 조각이나 케라틴에서

유래된 이온들은 자동적으로 걸러지게 된다. 아미노산 서열은 PepSeq 프로그램을 이용하여 알아내었다. 얻어진 서열은 NCBI의 BLAST검색으로 검색하였다.

8. Microsequencing에 의한 단백질 정성분석 : 이차원 겔에서 분리한 단백질을 PVDF 막(BioRad, USA)으로 20% 메탄올이 포함된 이동 buffer에서 120V로 1.5시간 동안 이동시킨다. 막으로 옮겨진 단백질은 Ponsau-S로 염색하여 나타난 단백질 밴드를 면도칼로 잘라낸다. 그 단백질의 N말단 서열 분석은 Edman degradation 형식의 자동 서열 분석기(Applied Biosystem 492 Procise, USA)를 사용하였다. Internal 서열 분석을 위하여 관심이 가는 단백질을 gel로부터 분리하여 트립신 처리 후, 펩타이드를 추출 buffer를 이용하여 추출하고 HPLC 분석을 위하여 4um C18 Nova-Pak column 3.9 × 150mm (Waters, USA) 역상 크로마토그래피로 정제하였다. Well에 모여진 펩타이드 피크를 N말단 서열 분석기로 분석하였다.
9. Image analysis : 염색된 겔은 Epson GT-9500 스캐너로 스캔했고, 그 이미지는 이미지 분석 프로그램인 PDQuest(Bio-Rad, USA)로 분석했다. 특정 수준 이상의 강도를 나타내는 단백질 spot을 감지했고, 그 spots은 자동 spot 감지기능으로 그 수를 세었다. 겔 상의 spot의 강도를 노멀라이즈 한 후, 표준 이미지 겔과 비교하였다.
10. 소 오줌단백질의 peptide 분석 : 소 오줌단백질의 peptides 분석을 위해 UCSF (<http://prospector.ucsf.edu/>)의 Protein Prospector에 있는 MS-Fit program을 사용하였다.
11. Polyclonal 항체 제작과 정제 : N말단 서열 분석과 Q-TOF 질량 분석을 통해서 얻어진 N-terminal 및 internal 펩타이드 서열을 기초로 하여 폴리펩타이드 (DSELAGPRGARG와 DGQELELVSSG)에 대한 polyclonal 항체를 제작하였다. 항원 peptides를 각각 토끼에 주사하여 immunization하였으며, 항원주사 후 2 ~ 3주 간격으로 총 3차례의 boosting을 수행한 후 혈청을 test하여 항원의 antigenicity를 결정하였다. 혈청 내에 충분한 농도의 항체가 만들어 졌을 때 토끼의 심장으로 부터 모든 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 polyclonal 항체를 완성하였다. 이때 얻은 항체는 필요한 경우 Affi-Gel 10 column(Bio-Rad, USA)을 이용하여 정제하였다.

12. Monoclonal 항체 제작과 정제 : Polyclonal 항체제작에 사용된 두 종류의 peptides를 항원으로 사용하여 monoclonal 항체를 제조하였다. 즉 immunization을 위하여 주사하도록 준비되어진 항원을 4 ~ 6주령 Balb/c mouse에 주사하였다. 항원 주사 후 2 ~ 3주 간격으로 총 3차례의 boosting을 수행한 후 혈청을 test하여 항원의 antigenicity를 결정하고, 혈청 내에 충분한 농도의 항체가 만들어졌을 때, mouse로부터 spleen을 얻어내어, myeloma cell과 융합을 준비하였다. 이 과정을 보다 자세히 설명하면 먼저 쥐를 죽인 뒤 충분히 소독 후 spleen을 상처 없이 깨끗하게 떼어 낸 후 세척한다. 세척된 spleen으로부터 splenocytes를 모아 connective tissue를 제거하고 적혈구를 분해하여 깨끗하게 준비된 splenocytes의 수를 센다. 항체를 생산하는 spleen cells은 수명이 한정되어 있기 때문에 불멸화된 림프구 암세포 (myeloma)와 hybridoma를 형성하게 하여 무한 성장을 할 수 있게 한다. 불멸화된 myeloma는 8-azaguanine을 함유한 배지에서 자라게 함으로써 변형된 세포를 선별, 제거한 후, 선택된 세포들의 수를 센다. 준비된 splenocytes와 myeloma cells을 융합하였다. 세포막을 융합시키는 물질인 polyethylene glycol (PEG) 내에서 두 세포를 함께 원심 분리하여 융합시켰다. 융합 후 약 20일 후, ELISA 방법으로 hybridoma를 screening 하였다. Screening 후 항체를 생산하는 세포를 선발하여, 'limiting dilution' 방법으로 cloning을 수행하여 단일 clone임을 확인하고 culture를 통해 그 세포를 확장하여 단일 clone인 hybridoma를 선택한다. 이 cell을 증식시켜 protein G purification을 수행하여 monoclonal antibody를 정제하였다.

13. Western blot 분석 : 50% ammonium sulfate로 분획화된 소의 오줌단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF 막으로 단백질을 이동시켰다. 이를 위해 사용된 buffer는 transfer buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% methanol)이며, electro-transferring 장치는 Trans-BlotR SD Blotting Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)이었다. 단백질이 옮겨 붙은 blots은 5% non-fat dry milk in 0.1% Tween 20 in PBS (PBS/T)을 사용하여, 4°C에서 16 시간 동안 또는 실온에서 1시간 동안 blocking하였다. Blocking 후, 항체가 포함되어 있는 토끼 혈청을 1 : 400 (polyclonal 항체) 또는 쥐의 spleen으로부터 만들어진 항체를 1 : 2000 (monoclonal 항체)의 비율로 blocking buffer (5% non-fat dry milk in PBS/T)에 희석하여 실

온에서 4시간 동안 반응시켰다. PBS/T로 세척 후, 2차 항체가 1차 항체를 감지하게 하기 위해서, Horseradish peroxidase가 결합되어 있는 2차 항체를 1 : 3000의 비율로 세척 buffer (PBS/T)에 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고, PBS/T로 세척하였다. 세척 후 Supersignal family (Pierce, Rockford, IL, USA)의 반응에 의해 단백질 band를 film에 현상하였다.

14. 소 임신검사 : 공시동물은 발정 후 수정시키고 19 ~ 20 일경에 경정맥에서 10 ml의 혈액을 syringe로 채취하였다. 채취된 혈액은 polystyrene 시험관에 옮기고 4℃에서 2,500 ~ 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 사용 전까지 -20℃에서 냉동보관 하였다. 공시동물의 임신검사는 황체호르몬 (progesterone) 정성검사에 의한 소 비임신(공태) 진단 Kit인 제네디아 프로테스트 (Genedia Protest, Green Cross Life Science Corp, Korea)를 사용하여 immunochromatographic assay법으로 진단하였다. 결과 판정으로 양성, 음성을 보인 소에 progesterone 정량검사를 radioimmuno assay (RIA) 방법으로 분석하였고 그 후 양성으로 판정된 소에 대하여 60일 후 직장검사으로써 임신유무를 다시 확인하여 임신소로 확진하였다.

제 3 절. 연구개발 결과

1. 소의 인공수정 및 실험동물 사육 :

가. 실험동물 사육 : 실험동물은 체중 600 Kg 내외의 Holsteins 젖소중 임상상 건강한 임신소 및 비임신소를 실험재료로 사양관리하였으며 대구시 소재의 경북대학교 부속목장 30두, 경기도 수원시 소재의 서울대 부속목장 2두, 경북 경산시 소재의 영남대 부속목장 20두 및 경북 군위군 소재 일반농가의 목장에서 사육중인 4두를 중점 관리하였다. 실험동물의 사육방법은 자동급이기(Seoil Co., Korea)가 설치된 계류장(free stall)에서 사육하였으며 물과 무기물은 자유급식토록 하였다.

나. 소의 인공수정 및 임신진단 : 소의 인공수정은 농협에서 제공되는 동결정액 (1.0ml, straw)을 구매하여 지속적 발정을 처음 관찰한 후 10 ~ 12시간에 수정용 피펫을 사용하여 수정(교배)하였다. 임신상태는 인공수정(AI, artificial insemination)한 다음 35 ~ 60일에 직장검사를 통하여 임신여부를 최종 판정하였다. 이상의 방법으로 인공수정한 소의 인공수정 성공률은 약 90%였으며, 이 결과는 일반농가의 인공수정 성공률 약 80%에 비해서는 상당히 높은 인공수정률을 나타내었다.

2. 정상소 및 임신소의 오줌 채취 :

임신소 및 비임신소의 오줌채취는 방광 또는 요도에 염증이 없는 임상상 건강한 소를 택하여 채취하였다. 비임신 소는 이상적인 난소기능을 나타내는 임상징후가 없는 소이며, 임신소는 임신기간이 1.5 ~ 6개월인 소로서 배뇨시 또는 맛사지 법을 이용하여 최소한 1 liter 이상의 오줌을 채취하였다. 맛사지법은 암소의 질 주위를 손으로 부드럽게 맛사지하여 인공적으로 방뇨하도록 하는 방법이며, 1회 방뇨량은 평균 약 150ml 정도가 된다. 채취한 오줌은 즉시 얼음주머니에 담아서 일시 보관하였으며,

충분한 오즙이 모이면 -20°C 에 냉동하여 장기보관 하였다. 보관된 오즙시료는 proteomics 분석시험 시 녹여서 사용하였다. 아래의 Table 1은 본 연구를 위하여 각 목장에서 채취한 총 50종의 오즙시료에 대한 목장별, 소별, 임신기간별 채취현황을 나타내었다.

Table 1. Sampling of the urine from pregnant and non-pregnant cows

Ranch	ID	Date of birth	Body weight (Kg)	Periods at the sampling (month)	
				Pregnancy	Non-pregnancy
Kyungpook National University	19	1991. 7. 20	605	3 and 5	-
	40	1994. 8. 9	600	2 and 4	-
	29	1992. 12. 8	602	2 and 4	3
	88	2000. 8. 29	597	2	-
	46	1994. 12. 10	613	1.5, 4, and 5	2
	60	1997. 6. 22	599	-	2
	64	1997. 12. 22	603	5	-
	65	1998. 1. 9	601	5	-
	78	1999. 8. 12	611	3 and 5	2 and 4
	70	1998. 5. 4	602	3 and 5	-
	48	1995. 3. 22	613	5 and 6	1 and 4
	30	1993. 1. 31	621	3	2 and 4
	50	1995. 10. 7	590	3	3
Seoul National University	S01	1997. 9. 14	617	4	-
	S02	1997. 9. 10	597	-	14
Youngnam University	Y506	1996. 6. 5	605	4	3
	Y717	1998. 4. 20	611	-	2
	Y226	1996. 10. 5	591	3	2
	Y303	2000. 2. 17	589	4	-
	Y430	1999. 11. 6	604	5	-
	Y513	1998. 8. 3	611	4	-
	Y704	1997. 1. 27	602	4	-
	Y228	1995. 12. 5	611	5	-
	Y117	1999. 7. 13	603	4	3
	Y302	1996. 3. 2	599	6	-
	Y1003	1997. 6. 22	607	4	-
Kunwee Dairy Farm	K23	1995. 6. 23	618	4	-
	K33	1998. 10. 5	605	7	-
	K14	1993. 2. 19	601	-	4
	K30	1998. 3. 5	607	-	3

3. 정상소, 임신소의 오줌단백질 분리 :

각 목장에서 채취한 임신소 및 비임신소의 오줌시료로부터 임신특이단백질을 분리하기 위하여 다양한 예비실험을 수행하였다. 그 결과 본 연구팀은 Fig. 1에서 보여주는 바와 같이 임신특이 단백질을 효과적으로 분리하고 이를 2-D gel electrophoresis로 확인하는 반복성 높은 단백질 분리 및 확인방법을 성공적으로 확립하였다.

본 연구에 사용된 각각의 오줌시료는 1 liter이었으며, filtration 후에는 600ml씩 사용하였다. 이때 초기 오줌속의 총단백질 농도는 약 0.1mg/ml이었다. 이것을 30 ~ 50%로 ammonium sulfate fractionation 후 30ml의 PBS buffer로 녹여서 농축한 오줌단백질의 농도는 1.0mg/ml이었으며, 투석 후 10% TCA용액에서 침전하여 재농축한 오줌단백질의 최종농도는 5.0mg/ml이었다. 이상에서 얻은 오줌단백질을 IEF(isoelectric focusing; Bio-Rad, USA)로 1차 전기영동하였으며, 곧바로 SDS-PAGE로 2차 전기영동하여 임신소 및 비임신소에 대한 proteomic map pattern을 얻었으며, 이를 비교분석하여 임신특이단백질을 확인하였다(Fig. 2 ~ 6). Fig. 2에서는 비임신소의 총단백질을 pH 3 ~ 10 범위의 IPG strip을 사용하여 2-D gel electrophoresis pattern을 보여주는 결과이다. 또한 Fig. 3에서는 비임신소와 임신소를 비교한 2-D gel 사진을 보여주었으며, Fig. 4에서는 50% ammonium sulfate로 fractionation한 후의 임신소와 비임신소의 2-D gel pattern을 보여주었다. Fig. 3과 Fig. 4의 결과를 비교하면 총단백질에 비해 ammonium sulfate로 fractionation한 후의 2-D gel pattern이 단백질의 중첩성이 낮은 훨씬 선명한 결과를 얻을 수 있었다. 단백질 spot을 보다 명확히 구분하기 위하여 pH 범위를 4 ~ 7로 축소한 IPG strip을 사용하여 임신소 및 비임신소의 2-D gel을 비교분석하여 그 결과를 Fig. 5에 보여주었다. 그리고 Fig. 6에서는 다른 목장에서 채취한 오줌시료도 동일한 2-D gel pattern을 보여준다는 것을 확인한 실험결과이다.

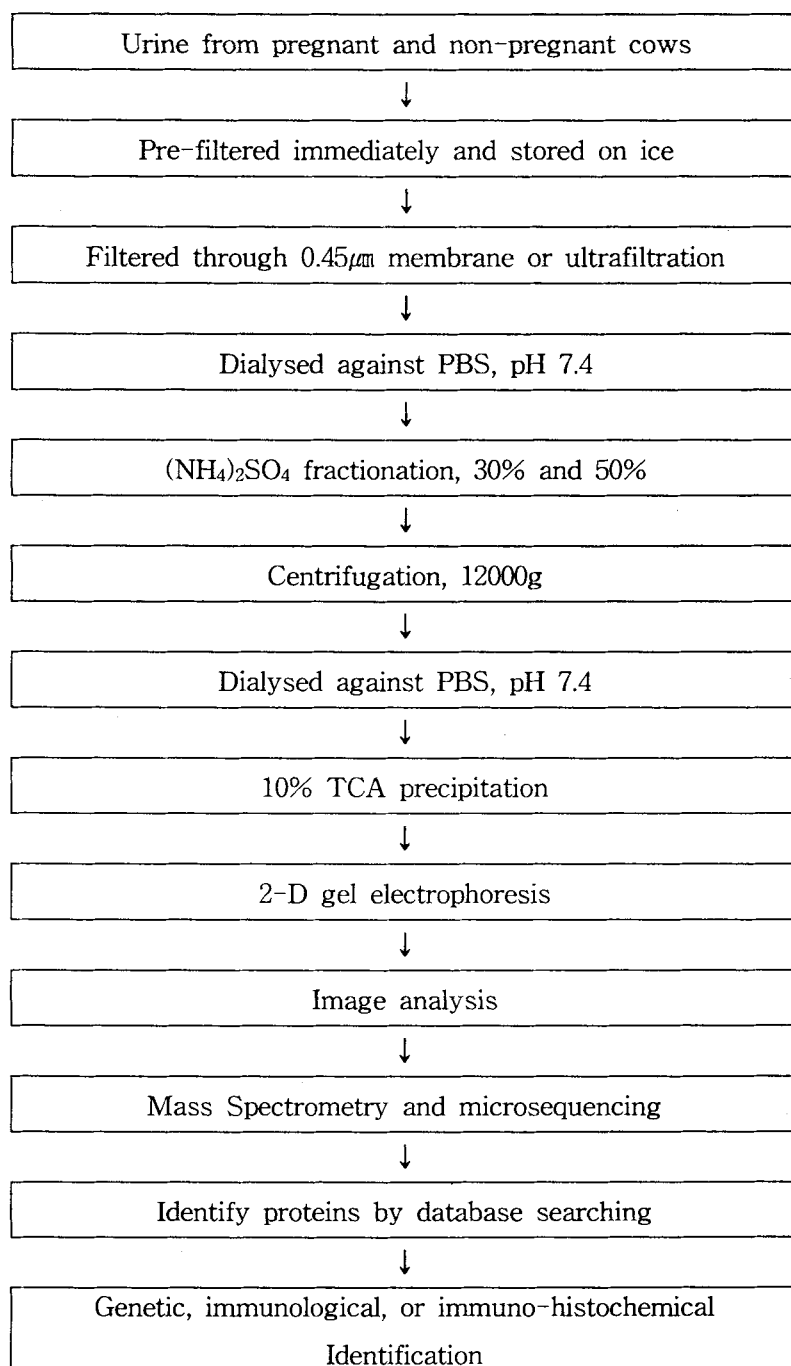


Fig. 1. Established flow chart for the isolation and identification of cow urine proteins

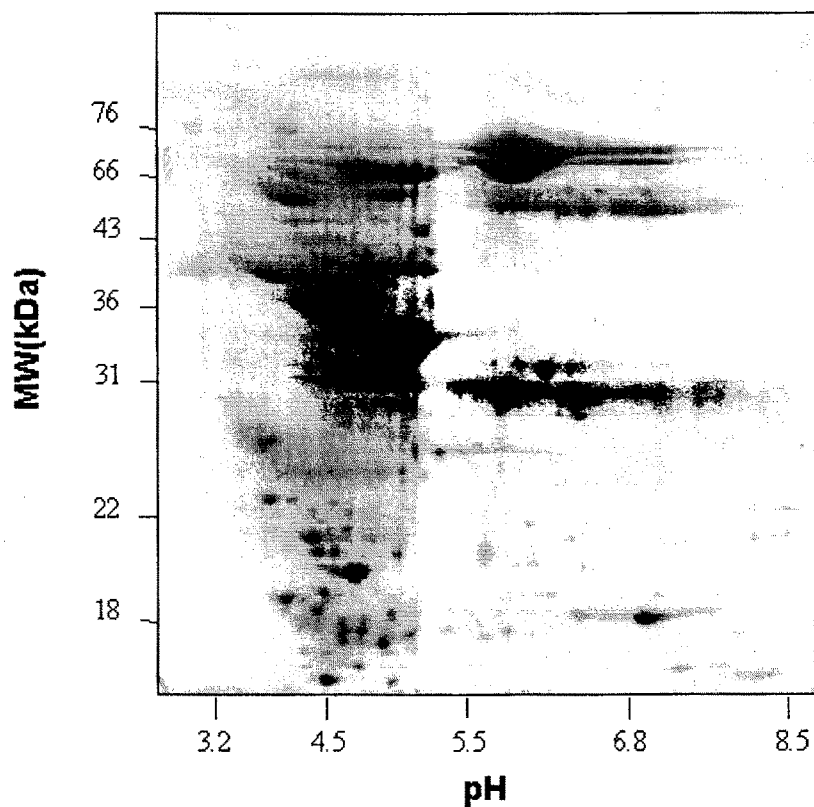


Fig. 2. Representative 2-D gel protein profile of normal non-pregnant cow urine. The urine proteins were separated on a pH 3 ~ 10 linear gradient the IPG strip, further separated second dimensionally on SDS-polyacrylamide gel, and stained by Coomassie Brilliant Blue R250.

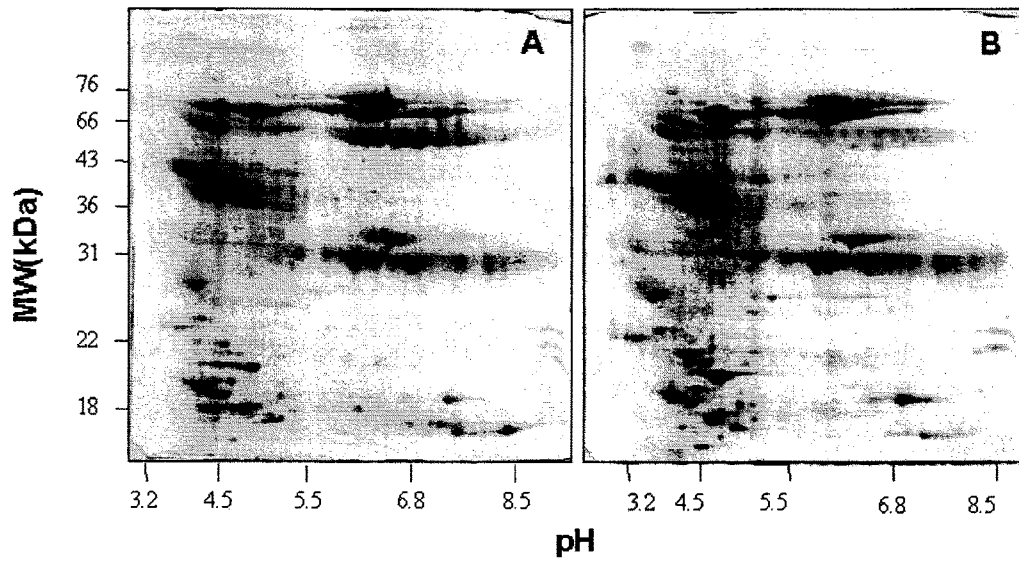


Fig. 3. Comparison of the total urine proteins on pH 3 ~ 10 IPG gels. The cows #30 (A) was non-pregnant and #48 (B) was pregnant for 6 months at the time of sampling.

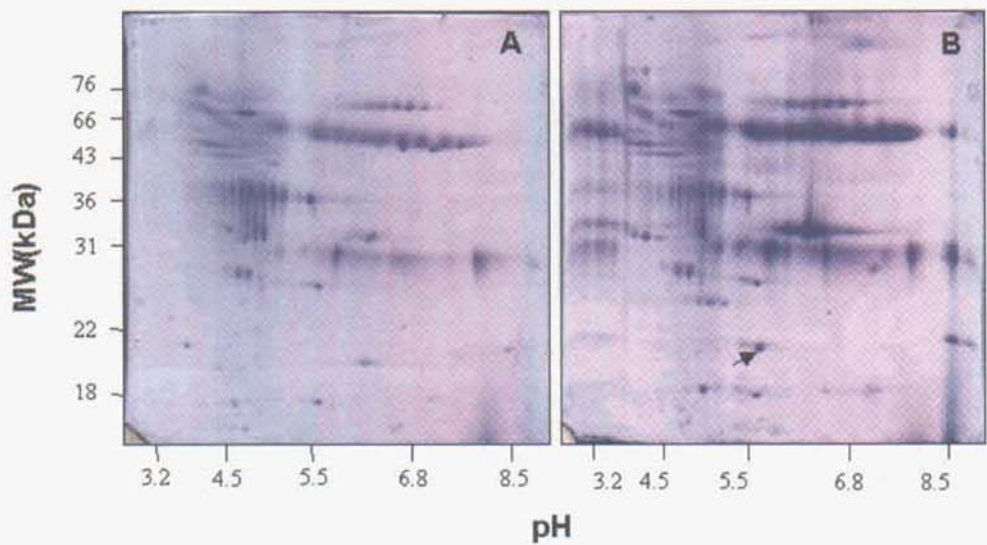


Fig. 4. Comparison of the urine proteins pelleted at 50% ammonium sulfate saturation on pH 3 ~ 10 IPG gels. The non-pregnant cows was #50 (A), and the cows #48 (B) was pregnant for 5 months at the time of sampling. The arrow indicates the pregnancy-associated protein.

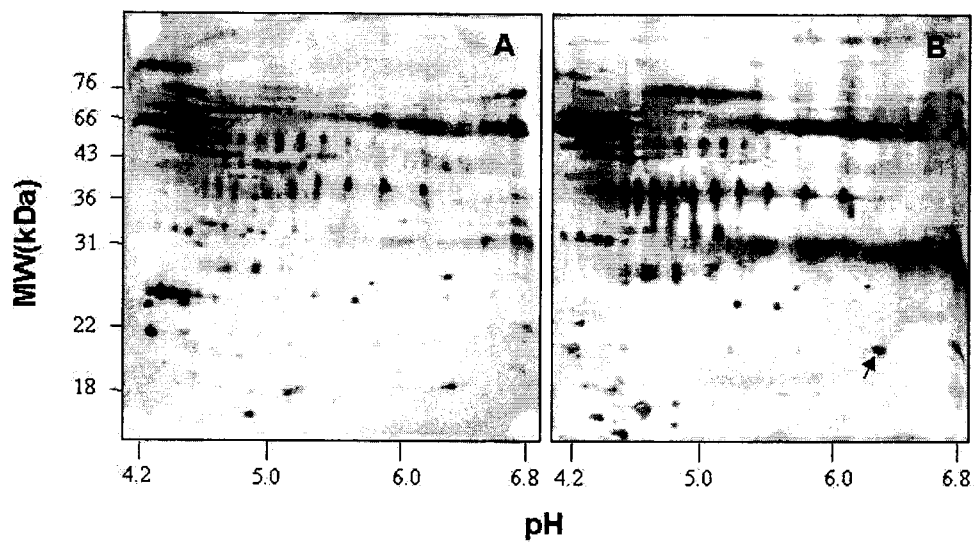


Fig. 5. Comparison of the urine proteins pelleted at 50% ammonium sulfate saturation on pH 4 ~ 7 IPG gels. The cows #48 (A) was non-pregnant and #46 (B) was pregnant for 2 months at the time of sampling. The arrow indicates the pregnancy-associated protein.

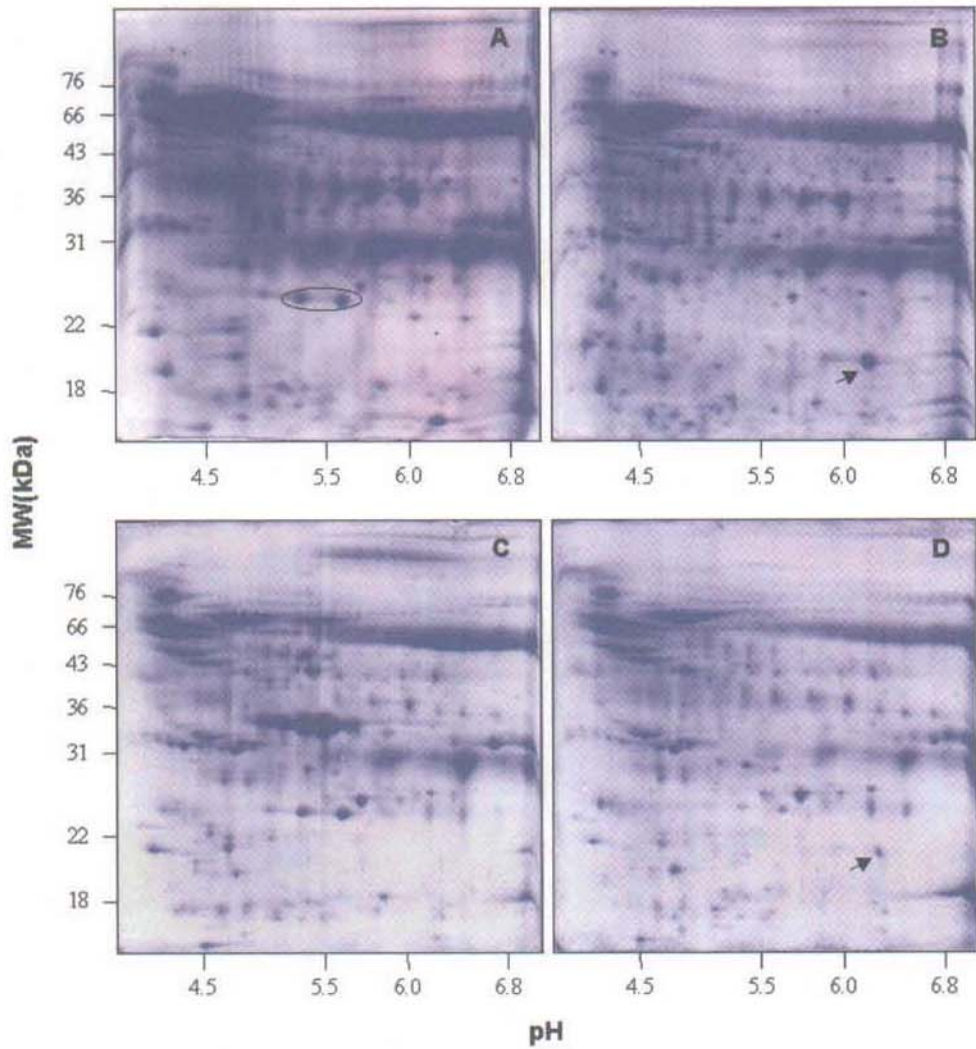


Fig. 6. Comparison of the urine proteins pelleted at 50% ammonium sulfate saturation on pH 4 ~ 7 IPG gels. The urine #30 and #46 was obtained from a Kyungpook National University's dairy farm. The cows #30 (A) was non-pregnant and #46 (B) was pregnant for 4 months at the time of sampling. The urine #K30 and #K33 was obtained from a Kunwee-Gun dairy farm. The cows #K30 (C) was non-pregnant and #K33 (D) was pregnant for 6 months at the time of sampling.

4. 임신기간별 임신특이 단백질의 발현량 변화조사 :

임신기간이 증가함에 따라 소의 임신특이 단백질의 발현량 증가유무를 확인하기 위하여 임신기간별 2-D gel pattern을 조사하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보여주는 바와 같이, 임신기간이 증가함에 따라 spot의 크기가 증가하는 임신특이 단백질이 다수 확인되었으며 특히 #2 spot은 임신기간이 경과함에 따라 단백질의 발현량이 뚜렷이 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

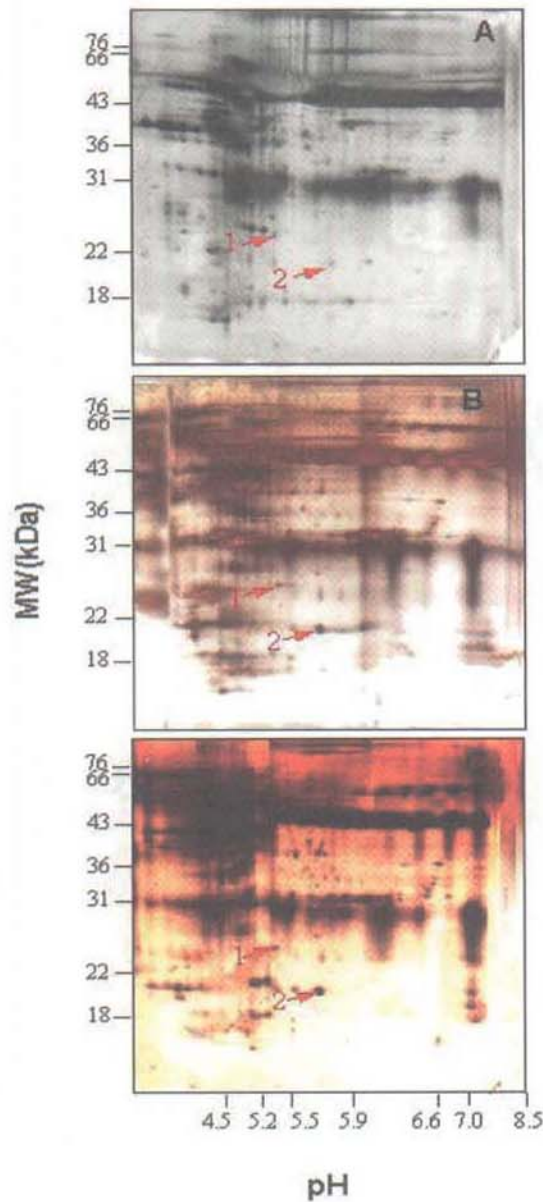


Fig. 7. Time-dependent comparison of the pregnant cow's urine proteins pelleted at 50% ammonium sulfate saturation on pH 3 ~ 10 IPG gels. The cows No. 46 was pregnant for 1.5 (A), 4 (B) and 5 months (C) at the time of sampling. The arrow indicates the pregnancy-associated protein.

5. 선발된 특이단백질의 amino acid microsequencing 분석을 통한 단백질 정성분석 :

임신기간별 단백질 발현량 변화조사(Fig. 7) 및 다양한 단백질 분석결과로부터 #2 spot 단백질이 임신특이 단백질이라는 확신을 갖게 됨에 따라 이 단백질을 좀더 정확하게 분석하기 위하여 단백질의 internal amino acid sequence를 밝히고자 하였다. Internal amino acid sequence를 알게 되면 단백질의 정체를 더 정확하게 밝힐 수 있을 뿐 아니라 아미노산 서열로부터 primer를 제작하여 cDNA cloning에 사용할 수 있기 때문이다. Internal sequencing을 위해 충분한 양의 단백질이 필요하므로 Spot #2를 5개의 2D-gel로부터 단백질 spot을 모아서 tryptic digestion을 하였다. Gel에서 extraction한 단백질의 peptide를 LC로 분리하여 Fig. 8과 같은 profile을 얻었고 화살표로 표시한 peak의 peptide를 N-terminal sequencing 방법으로 아미노산의 서열을 밝혔다 (Table 2). Internal sequencing의 결과, spot#2 단백질의 internal sequence는 collagen과는 전혀 다른 아미노산 서열을 가짐을 알았다. 이 결과는 spot #2 단백질이 N-terminal은 collagen과 유사한 구조를 갖고 나머지는 또 다른 구조를 갖는 단백질임을 알 수 있었으며 이러한 성질을 고려하여 항체 제조를 진행하고자 한다.

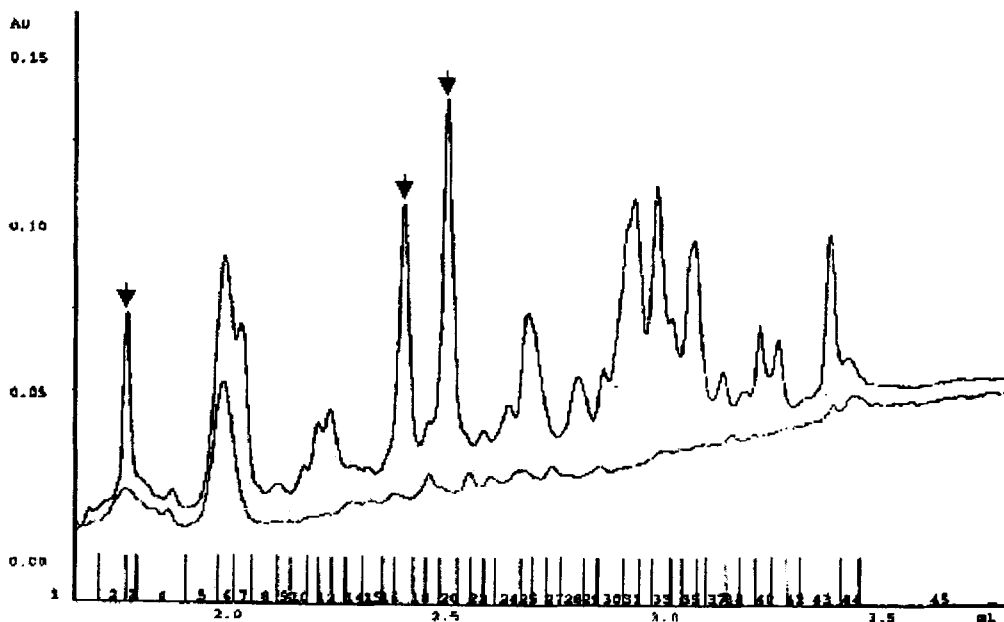


Fig. 8. Peptide profile of fractions from reverse phase HPLC after tryptic digestion of #2 spot protein. Upper line is the sample treated by In-gel digestion of #2 spot with trypsin, and the under line is the blank spot digested with trypsin. The arrows indicate the selected fractions for sequencing.

Table 2. Internal sequence of #2 spot protein and queried results through BLAST searching program

Fraction Number	Internal Sequences	Matched Proteins
3	LRREESEK	Actinin-like protein
		Golgi resident protein GCP60
		CG14998 gene product
17	VWLESKK	M protein precursor
		M protein
20	AL,GU,GD,LS,VH,E, KQ,AQ,SA,GS,SG	Mixed peptide

* The used parameters are as follows. Database, NCBI nr.02.07.2001. Molecular weight range, 1,000–100,000 Da (588157 entries). pI range 3.00 to 10.00 (616977 entries). Species, *Bos taurus* (3360 entries). The search with the combined molecular weight, pI and species selected 3174 entries. MS-Fit search selected 9 entries.

Table 2의 결과를 통해 볼 때, 소의 유전자 및 단백질 database가 아직 많이 부족하기 때문에 소단백질과 match되는 것은 얻기 힘들뿐 아니라 data가 충분한 인간과 mouse와도 현재로서는 80% 이상의 homology를 갖는 단백질은 발견되지 않았으므로 #2 spot 단백질은 새로운 단백질로 확인되었다.

또한 임신 및 비임신의 오줌을 채취하여 2-D gel을 전개하고 분자량 20 KDa, pI 6.2 의 #2 spot 단백질의 발현 여부를 기록하여 얻은 통계 결과에 따르면 임신소에서 가음성이 나올 확률은 약 15%, 비임신소에서 가양성이 나올 확률은 약 16% 정도인 것으로 나타났다(Table 3). 이상의 결과는 최소한 84% 이상의 양성과

85% 이상의 음성을 감지할 수 있는 결과를 의미하므로 임신특이 antibody를 사용하지 않고 얻은 결과로서는 대단히 높은 통계 값으로서 차후에 antibody를 제조하여 진단 Kit로 사용하면 훨씬 높은 결과가 예상됨으로 임신진단 marker로써 성공 가능성이 매우 큰 것으로 판단된다.

Table 3. Comparison of #2 spot protein expression patterns in urine proteins of pregnant and non-pregnant cows

Ranch \ Cow	No. of pregnant	No. of non-pregnant	No. of false positive cow*	No. of false negative cow#
Kyungpook Nat'l Univ.	20	10	3	2
Youngnam Univ.	10	10	2	2
Chunan Dairy Farm	10	10	2	1
Kunwee Dairy Farm	2	2	0	0
Total No. of cow	42	32	7	5
Statistic analysis(%)			$7/42 \times 100 = 14.9$	$5/32 \times 100 = 15.6$

*, false positive cow means no detection of #2 spot protein in 2-D gel analysis of pregnant cow urine.

#, false negative cow means detecting #2 spot protein in 2-D gel analysis of non-pregnant cow urine.

6. 정상소, 임신소의 오줌단백질의 protein fingerprint database 구축 :

2-D gel 분석을 통해 선발된 임신특이 단백질들과 일반적으로 나타나는 오줌단백질들의 protein mass fingerprint database 구축을 위해 각 spot을 분리하여

mass spectrometry 분석을 수행하였다(Fig. 9). 이를 위한 시료제조는 연구방법에서 설명한 대로 행하였으며, 정제된 추출 peptide는 MALDI-TOF MS로 분석하였다. Table 4에서는 임신특이 단백질에 대한 protein mass fingerprint에 대한 결과를 보여주고 있으며, Table 5에서는 일반 오줌단백질에 대한 protein mass fingerprint 결과를 나타내었다. 이상의 결과를 종합하면 12종의 임신특이 단백질 및 18종의 일반 오줌단백질에 대한 protein mass fingerprint database를 성공적으로 구축하였다.

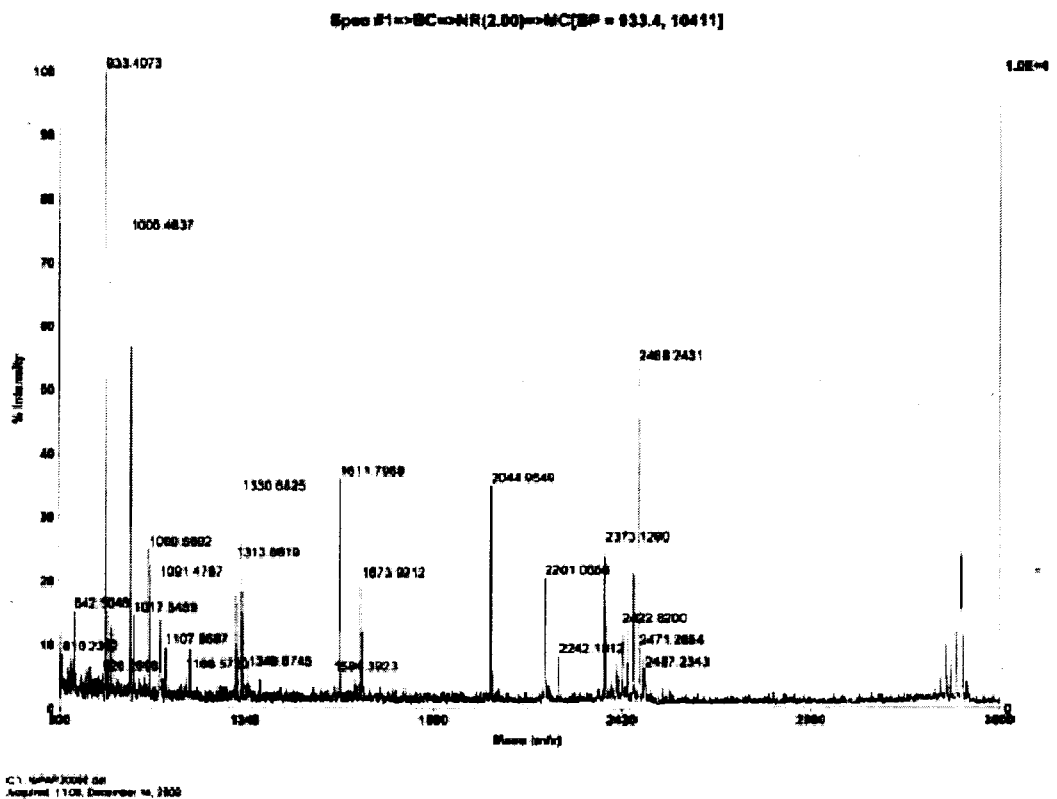


Fig. 9. Protein mass fingerprint of peptides from #2 spot protein after trypsin in-gel digestion. Each peaks has the peptide mass of 933.41, 1005.48, 1091.48, 1313.66, 1330.68, 1610.80, 1672.92, 2043.96, 2200.07, 2372.11, 2451.27, 2467.24 and 3389.75.

Table 4. Protein mass fingerprints of bovine pregnancy-associated proteins prepared from pregnant cow urine

Spot #	m/z Submitted	MH+ Matched	Delta ppm	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence
1	1017.4313	1017.558	-125		690	698	1	(K) AKEETSKPK (A)
	1165.5811	1165.6217	-35		37	46	1	(K) EHTEPKSLPK (H)
	1389.6729	1389.7967	-89		670	683	1	(K) KPASVPKHLGNGGK (A)
	1428.7191	1428.6494	49		433	445	0	(K) EADPEDGKPVEDK (V)
	1584.746	1584.6488	61		316	328	0	(K) CGEDEETVPSEYR (L)
	1939.7981	1939.9878	-98		606	622	1	(K) YQHLLDDNKEGTPGKPK (D)
2	1015.5075	1015.5676	-59		1798	1806	0	(K) TVLEIDTPK (V)
	1078.6833	1078.6625	19		1063	1074	0	(R) GLPGPVGALGLK (G)
	1089.5566	1089.5978	-38		176	184	0	(K) NVTLILDCK (K)
	1098.5752	1098.518	52		838	848	1	(R) GEDGPEGPKGR (G)
	1147.5725	1147.5972	-22		1392	1403	1	(K) RGPPGAPGPEGR (Q)
	1160.5778	1160.5952	-15		631	642	0	(R) GFDGLAGLPGEK (G)
	1182.6003	1182.6635	-53		867	878	0	(K) LGVPLPGYPGR (Q)
	1296.687	1296.582	81		1285	1298	0	(K) GEPGEAGEPGPSGR (S)
	1332.6786	1332.5757	77		1827	1838	0	(K) FGFEVGPACFMG (-)
	1407.7141	1407.7021	8.5		949	963	0	(R) GPNGPQGPTGFPGPK (G)
	1433.7131	1433.7137	-0.43		1393	1407	1	(R) GPPGAPGPEGRQGEK (G)
	1488.6995	1488.7447	-30		628	642	1	(K) GDRGFDGLAGLPGEK (G)
	1491.6594	1491.8059	-98		1794	1806	1	(K) GYQKTVLEIDTPK (V)
	1554.6992	1554.7263	-17		811	825	1	(K) GEDGFPGFKGDMGIK (G)
	1837.9839	1837.8945	49		972	989	1	(K) DGLPGHPGQRGETGFQGK (T)
	1844.9228	1844.9295	-3.6		879	897	1	(R) QGPKGSIGFPGFPGANGEK (G)

Spot #	m/z Submitted	MH+ Matched	Delta ppm	Modifi- cations	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence
3	1121.4767	1121.5301	-48		588	597	0	(K) EACFAVEGPK (L)
	1145.6512	1145.6431	7.1		236	245	1	(K) AWSVARLSQK (F)
	1163.6078	1163.6312	-20		66	75	0	(K) LVNELTEFAK (T)
	1166.5495	1166.5298	17		499	507	0	(K) CCTESLVNR (R)
	1249.6051	1249.6217	-13		35	44	1	(R) FKDLGEEHFK (G)
	1283.7005	1283.7112	-8.3		361	371	0	(R) HPEYAVSVLLR (L)
	1305.6816	1305.7167	-27		402	412	0	(K) HLVDEPQNLIK (Q)
	1308.6976	1308.7276	-23		558	568	1	(K) HKPKATEEQLK (T)
	1399.6836	1399.6932	-6.8		569	580	0	(K) TVMENFVAFVDK (C)
	1415.6319	1415.6881	-40	1Met-ox	569	580	0	(K)TVMENFVAFVDK(C)
	1433.6992	1433.7099	-7.4		89	100	0	(K) SLHTLFGDELCK (V)
	1439.8048	1439.8123	-5.2		360	371	1	(R) RHPEYAVSVLLR (L)
	1457.7066	1457.6582	33		286	297	0	(K) YICDNQDTISSK (L)
	1479.8034	1479.796	5		421	433	0	(K) LGEYGFQNALIVR (Y)
	1491.734	1491.6208	76		76	88	0	(K) TCVADESHAGCEK (S)
	1511.8339	1511.8433	-6.2		438	451	0	(K) VPQVSTPTLVEVSR (S)
	1567.7482	1567.7433	3.1		347	359	0	(K) DAFLGSFLYEYSR (R)
	1639.94	1639.9383	1		437	451	1	(R) KVPQVSTPTLVEVSR (S)
	1670.8154	1670.7597	33	pyroGlu	118	130	1	(K)QEPERNECFLSHK(D)
	1687.8141	1687.7862	17		118	130	1	(K) QEPERNECFLSHK (D)
	1738.847	1738.8508	-2.2		469	482	0	(R) MPCTEDYLSLILNR (L)
	1791.7362	1791.71	15		267	280	0	(K) ECCHGDLLCADDR (A)
	1888.9136	1888.9274	-7.3		169	183	0	(R) HPYFYAPELLYYANK (Y)
	1894.9315	1894.9373	-3.1		508	523	0	(R) RPCFSALTPDETYVPK (A)
	1921.9	1921.937	-19		529	544	0	(K) LFTFHADICTLPDTEK (Q)
	1969.8594	1969.8458	6.9		581	597	1	(K) CCAADDKEACFAVEGPK (L)

Spot #	m/z Submitted	MH+ Matched	Delta ppm	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence
4	1054.4532	1054.4852	-30		335	342	1	(K) DKTHSCHR (H)
	1107.5575	1107.5039	48		220	227	1	(K) EQQMCNRK (S)
	1271.6435	1271.54	81	pyroGlu	325	334	0	(K)QVCEPENPCK(D)
	1580.7332	1580.7603	-17		199	212	1	(R) TRVCNSPEPQHGGK (D)
	1673.979	1673.8611	70		309	324	1	(K) GNQPFVGLAARTEK (Q)
	1846.9222	1846.8322	49		9	23	0	(R) FFAENETWVVDSTK (C)
	1923.847	1923.8904	-23		88	104	0	(R) SCDVTSNTCLGPSIQTR (A)
	1091.498	1091.6326	-123		329	337	1	(R) RALAQLTYR (S)
5	1133.5478	1133.6353	-77	1Met-ox	78	87	1	(K)AGTLEMVLKR(V)
	1181.5751	1181.6505	-64		276	285	0	(R) CLPGLHPVFK (L)
	1246.7524	1246.7233	23		192	202	0	(K) QYLAAPLVMLK (M)
	1444.8471	1444.7218	87		338	349	1	(R) SLCPLDDLARR (L)
	1856.9271	1856.9904	-34	1Met-ox	149	164	1	(R)LVLPSPGMEELRAQLER(E)
	1860.8784	1860.9604	-44	pyroGlu 1Met-ox	192	208	1	(K)QYLAAPLVMLKMDPSGK(L)
	1994.0757	1994.0673	4.2		70	86	1	(R) LDFEWTLKAGTLEMVLK (R)
	1060.5665	1060.5468	19	pyroGlu	168	175	0	(R)QWVIQEFK(L)
	1173.6434	1173.6553	-10		298	307	0	(K) ALELCEILAK (E)
	1252.64	1252.5639	61		57	65	0	(K) FQDVYDYFR (A)
1269.6547	1269.6401	12	1Met-ox	220	229	0	(R)EVQYTLEMIK(L)	
1983.0928	1982.9419	76		323	340	1	(R) SLQSKHSTESDPPTNVQQ (-)	
7	1109.5507	1109.5301	19		342	350	1	(K) ENLKDCGLF (-)
	1165.5987	1165.604	-4.5	1Met-ox	301	309	0	(K)VQFLELNMR(R)
	1182.6156	1182.5213	80		129	138	0	(K) DSGIQACFDR (A)
	1371.7694	1371.716	39		177	188	0	(K) TTGHETQFSFK (D)
	1540.7078	1540.743	-23		83	96	0	(R) AMTTLNIQYGDSAR (Q)
	1556.7148	1556.7379	-15	1Met-ox	83	96	0	(R)AMTTLNIQYGDSAR(Q)
	1163.6412	1163.6312	8.6		42	51	0	(K) LVNELTEFAK (T)
	1166.6226	1166.5298	80		473	481	0	(K) CCTESLVNR (R)
	1226.7035	1226.6819	18		261	274	1	(K) YICBBZBTISSK (E)
	1483.7635	1483.783	-13		256	272	1	(R) ADLAKYICBBZBTISSK (L)
	1487.796	1487.895	-67	pyroGlu	523	535	1	(K)QTALVELLKHKPK(A)
	1511.8061	1511.8433	-25		412	425	0	(K) VPQVSTPTLVEVSR (S)
	1553.8228	1553.8361	-8.6		457	469	1	(R) LCVLHEKTPVESK (V)
	1567.8826	1567.7433	89		322	334	0	(K) DAFLGSFLYEYSR (R)
1590.8349	1590.7838	32		115	127	0	(K) LKPDPTLCDEFK (A)	
1607.8005	1607.7634	23		430	442	1	(K) VGTRCCTKPESER (M)	

Spot #	m/z Submitted	MH+ Matched	Delta ppm	Modifi- cations	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence
8	1295.6619	1295.6636	-1.3		203	213	0	(K) DFPLSGYVELR (Y)
	1423.7	1423.7585	-41		202	213	1	(R) KDFPLSGYVELR (Y)
	1664.8227	1664.8899	-40		59	73	0	(K) QLSAFGEYVAELPK (Y)
	1870.9689	1871.0179	-26		128	142	1	(R) FEIVYNLLSLRFNSR (I)
	1920.9035	1920.9918	-46	pyroGlu	249	266	1	(R)QPPELKLKLEAGDTKPEAK(-)
9	1212.6397	1212.6186	17	1Met-ox	142	151	0	(K)LAEYTDLMLK(L)
	1433.7365	1433.7276	6.2		223	234	0	(K) QDLINNIPYK (K)
	1544.8082	1544.796	7.9	pyroGlu	223	235	1	(K)QDLINNIPYKK(S)
	1634.9	1634.8754	15		246	260	1	(K) LYRTDLALILSAGDN (-)
	1710.7974	1710.9503	-89		34	47	1	(K) ELQNLIQELQQARK (K)
10	1077.3618	1077.4999	-128		85	92	1	(K) EDENCLRK (Y)
	1202.5953	1202.4757	99	pyroGlu	96	104	0	(R)QCMQDMHQK(L)
	1217.6197	1218.4706	-698	pyroGlu 1Met-ox	96	104	0	(R)QCMQDMHQK(L)
	1390.7949	1391.5982	-577	1Met-ox	95	104	1	(R)RQCMQDMHQK(L)
	1432.7969	1431.7378	740		48	59	1	(K) EILRQMSSPQSR (D)
	1505.7861	1504.7834	666		71	82	1	(R) KMSVQEYELIHK (D)
	1530.7846	1531.724	-613		34	47	1	(K) LESESDSVAHSHK (E)
	1600.8824	1600.895	-7.9		133	146	0	(K) ITTIVVHIYEDGIK (G)
	1634.8753	1635.8052	-568	1Met-ox	72	84	1	(K)MSVQEYELIHKDK(E)
	1914.0525	1912.7251	694	3Met-ox	231	245	0	(K)EMHVLEQTNMEEDME(-)

Spot #	m/z Submitted	MH+ Matched	Delta ppm	Modifi- cations	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence
11	1047.5244	1047.4933	30		65	72	0	(K) CIASTYYR (G)
	1672.9204	1672.8005	72		29	42	1	(K) NYKATIGVDFEMER (F)
	1681.8484	1681.8186	18		169	183	0	(K) AEYWAVSSLTGENVR (E)
	1688.8615	1688.7954	39	1Met-ox	29	42	1	(K)NYKATIGVDFEMER(F)
	1706.8167	1706.8601	-25		118	133	0	(K) DLSVSVPPVVGEDFTSR (Q)
	1732.8808	1732.9485	-39		102	117	1	(K) ENDPSSVLLFLVGSKK (D)
	1745.8747	1745.9689	-54		189	204	0	(R) VAALTFEVNVLAELEK (S)
	1834.896	1834.9551	-32		117	133	1	(K) KDLSVSVPPVVGEDFTSR (Q)
12	1086.5993	1086.5254	68		285	293	0	(K) SHCIAEVEK (D)
	1142.6253	1142.7149	-78		522	531	1	(K) KQTALVELLK (H)
	1163.6412	1163.6312	8.6		42	51	0	(K) LVNELTEFAK (T)
	1166.6226	1166.5298	80		473	481	0	(K) CCTESLVNR (R)
	1226.7035	1226.6819	18		261	274	1	(K) YICBBZBTISSK (E)
	1483.7635	1483.783	-13		256	272	1	(R) ADLAKYICBBZBTISSK (L)
	1487.796	1487.895	-67	pyroGlu	523	535	1	(K)QTALVELLKHKPK(A)
	1511.8061	1511.8433	-25		412	425	0	(K) VPQVSTPTLVEVSR (S)
	1553.8228	1553.8361	-8.6		457	469	1	(R) LCVLHEKTPVESK (V)
	1567.8826	1567.7433	89		322	334	0	(K) DAFLGSFLYEYSR (R)
	1590.8349	1590.7838	32		115	127	0	(K) LKPDNTLCDEFK (A)
	1607.8005	1607.7634	23		430	442	1	(K) VGTRCCTKPESER (M)

Table 5. Protein mass fingerprints of bovine proteins prepared from normal non-pregnant cow urine

Spot #	m/z Submitted	MH+ Matched	Delta ppm	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence
31	1121.4767	1121.5301	-48		588	597	0	(K) EACFAVEGPK (L)
	1145.6512	1145.6431	7.1		236	245	1	(K) AWSVARLSQK (F)
	1163.6078	1163.6312	-20		66	75	0	(K) LVNELTEFAK (T)
	1166.5495	1166.5298	17		499	507	0	(K) CCTESLVNR (R)
	1249.6051	1249.6217	-13		35	44	1	(R) FKDLGEEHFK (G)
	1283.7005	1283.7112	-8.3		361	371	0	(R) HPEYAVSVLLR (L)
	1305.6816	1305.7167	-27		402	412	0	(K) HLVDEPQNLIK (Q)
	1308.6976	1308.7276	-23		558	568	1	(K) HKPKATEEQLK (T)
	1399.6836	1399.6932	-6.8		569	580	0	(K) TVMENFVAFVDK (C)
	1415.6319	1415.6881	-40	1Met-ox	569	580	0	(K)TVMENFVAFVDK(C)
	1433.6992	1433.7099	-7.4		89	100	0	(K) SLHTLFGDELCK (V)
	1439.8048	1439.8123	-5.2		360	371	1	(R) RHPEYAVSVLLR (L)
	1457.7066	1457.6582	33		286	297	0	(K) YICDNQDTISSK (L)
	1479.8034	1479.796	5		421	433	0	(K) LGEYGFQNALIVR (Y)
	1491.734	1491.6208	76		76	88	0	(K) TCVADESHAGCEK (S)
	1511.8339	1511.8433	-6.2		438	451	0	(K) VPQVSTPTLVEVSR (S)
	1567.7482	1567.7433	3.1		347	359	0	(K) DAFLGSFLYEYSR (R)
	1639.94	1639.9383	1		437	451	1	(R) KVPQVSTPTLVEVSR (S)
	1670.8154	1670.7597	33	pyroGlu	118	130	1	(K)QEPERNECFLSHK(D)
	1687.8141	1687.7862	17		118	130	1	(K) QEPERNECFLSHK (D)
	1738.847	1738.8508	-2.2		469	482	0	(R) MPCTEDYLSLILNR (L)
	1791.7362	1791.71	15		267	280	0	(K) ECCHGDLLCADDR (A)
	1888.9136	1888.9274	-7.3		169	183	0	(R) HPHYFYAPELLYYANK (Y)
	1894.9315	1894.9373	-3.1		508	523	0	(R) RPCFSALTPDETYVPK (A)
	1921.9	1921.937	-19		529	544	0	(K) LFTFHADICTLPDTEK (Q)
	1969.8594	1969.8458	6.9		581	597	1	(K) CCAADDKEACFAVEGPK (L)

Spot #	m/z Submitted	MH+ Matched	Delta ppm	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence
35	1054.4532	1054.4852	-30		335	342	1	(K) DKTHSCHR (H)
	1107.5575	1107.5039	48		220	227	1	(K) EQQMCNRK (S)
	1271.6435	1271.54	81	pyroGlu	325	334	0	(K)QVCEPENPCK(D)
	1580.7332	1580.7603	-17		199	212	1	(R) TRVCNSPEPQHGGK (D)
	1673.979	1673.8611	70		309	324	1	(K) GNQPFVGVGLEAARTEK (Q)
	1846.9222	1846.8322	49		9	23	0	(R) FFAENETWVVDSCTK (C)
	1923.847	1923.8904	-23		88	104	0	(R) SCDVTSNTCLGPSIQTR (A)
42	1091.498	1091.6326	-123		329	337	1	(R) RALAQLTYR (S)
	1133.5478	1133.6353	-77	1Met-ox	78	87	1	(K)AGTLEMVLKR(V)
	1181.5751	1181.6505	-64		276	285	0	(R) CLPGLHPVFK (L)
	1246.7524	1246.7233	23		192	202	0	(K) QYLAAPLVMLK (M)
	1444.8471	1444.7218	87		338	349	1	(R) SLCPLDDLADRR (L)
	1856.9271	1856.9904	-34	1Met-ox	149	164	1	(R)LVLPSPGMEELRAQLER(E)
	1860.8784	1860.9604	-44	pyroGlu 1Met-ox	192	208	1	(K)QYLAAPLVMLKMDPSGK(L)
	1994.0757	1994.0673	4.2		70	86	1	(R) LDFEWTLKAGTLEMVLK (R)
50	1060.5665	1060.5468	19	pyroGlu	168	175	0	(R)QWVIQEFK(L)
	1173.6434	1173.6553	-10		298	307	0	(K) ALELCEILAK (E)
	1252.64	1252.5639	61		57	65	0	(K) FQDVYDYFR (A)
	1269.6547	1269.6401	12	1Met-ox	220	229	0	(R)EVQYTLEMIL(L)
	1983.0928	1982.9419	76		323	340	1	(R) SLQSKHSTESDPPTNVQQ (-)
56	1109.5507	1109.5301	19		342	350	1	(K) ENLKDCGLF (-)
	1165.5987	1165.604	-4.5	1Met-ox	301	309	0	(K)VQFLELNMR(R)
	1182.6156	1182.5213	80		129	138	0	(K) DSGIQACFDR (A)
	1371.7694	1371.716	39		177	188	0	(K) TTGHIEQFSFK (D)
	1540.7078	1540.743	-23		83	96	0	(R) AMTTLNIQYGDSAR (Q)
	1556.7148	1556.7379	-15	1Met-ox	83	96	0	(R)AMTTLNIQYGDSAR(Q)

Spot #	m/z Submitted	MH+ Matched	Delta ppm	Modifi- cations	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence
61	1438.7018	1438.6967	3.6		152	163	1	(R) KWEAEGYAESLR (N)
	1441.7016	1441.744	-29		250	262	0	(K) WAALVVPSGEEQR (Y)
	1645.7476	1645.8226	-46		28	41	0	(R) FISVGYVDDTQFVR (F)
	1712.8164	1712.876	-35		13	27	0	(R) YFYTAVSRPGLGEPR (F)
	1753.8524	1753.91	-33		204	217	1	(R) EVTLRCWALGFYPK (E)
62	1052.5963	1052.5376	56		77	85	1	(K) SELSGKFER (L)
	1360.623	1360.6459	-17		97	107	1	(R) YEAKELYDAMK (G)
	1369.6863	1369.7004	-10		216	226	1	(R) VFEEYEKIANK (S)
	1571.7607	1571.8645	-66		36	50	0	(K) GIGTNEQAIIDVLTK (R)
	1677.8003	1677.7352	39		302	316	0	(K) TLSSMIMEDTSGDYK (N)
	1755.9311	1755.8376	53	1Met-ox	209	222	1	(R)SATHLMRVFEEYEK(I)
	1826.9356	1826.9839	-26		262	278	1	(R) LYFAMKGAGTLDGTLIR (N)
72	1071.5014	1071.6162	-107		7	15	0	(K) LNDSIQR (L)
	1171.6086	1171.5278	69		123	132	0	(R) GNHECASINR (I)
	1548.7919	1548.8347	-28	pyroGlu	99	111	0	(K)QSLETICLLLAYK(I)
	1639.822	1639.7756	28		247	260	0	(R) AHQVVEDGYEFFAK (R)
76	1415.6391	1415.6953	-40		271	283	0	(K) DAVIMNSQPEVGR (R)
	1431.6439	1431.6902	-32	1Met-ox	271	283	0	(K)DAVIMNSQPEVGR(R)
	1571.8129	1571.7964	10		271	284	1	(K) DAVIMNSQPEVGRR (V)
	1587.7721	1587.7913	-12	1Met-ox	271	284	1	(K)DAVIMNSQPEVGRR(V)
	1672.9167	1672.7198	118		322	336	0	(R) EPSTNASVYMDLATC (-)

Spot #	m/z Submitted	MH+ Matched	Delta ppm	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence
81	1295.6619	1295.6636	-1.3		203	213	0	(K) DFPLSGYVELR (Y)
	1423.7	1423.7585	-41		202	213	1	(R) KDFPLSGYVELR (Y)
	1664.8227	1664.8899	-40		59	73	0	(K) QLSAFGEYVAEILPK (Y)
	1870.9689	1871.0179	-26		128	142	1	(R) FEIVYNLLSLRFNSR (I)
	1920.9035	1920.9918	-46	pyroGlu	249	266	1	(R)QPPELKLKLEAGDTKPEAK(-)
85	1212.6397	1212.6186	17	1Met-ox	142	151	0	(K)LAEYTDLMLK(L)
	1433.7365	1433.7276	6.2		223	234	0	(K) QDLDDINNIPTYK (K)
	1544.8082	1544.796	7.9	pyroGlu	223	235	1	(K)QDLDDINNIPTYKK(S)
	1634.9	1634.8754	15		246	260	1	(K) LYRTDLALILSAGDN (-)
	1710.7974	1710.9503	-89		34	47	1	(K) ELQNLIQELQQARK (K)
90	1077.3618	1077.4999	-128		85	92	1	(K) EDENCLRK (Y)
	1202.5953	1202.4757	99	pyroGlu	96	104	0	(R)QCMQDMHQK(L)
	1217.6197	1218.4706	-698	pyroGlu 1Met-ox	96	104	0	(R)QCMQDMHQK(L)
	1390.7949	1391.5982	-577	1Met-ox	95	104	1	(R)RQCMQDMHQK(L)
	1432.7969	1431.7378	740		48	59	1	(K) EILRQMSSPQSR (D)
	1505.7861	1504.7834	666		71	82	1	(R) KMSVQEYELIHK (D)
	1530.7846	1531.724	-613		34	47	1	(K) LESESDSVVAHSHK (E)
	1600.8824	1600.895	-7.9		133	146	0	(K) ITTIVVHIYEDGIK (G)
	1634.8753	1635.8052	-568	1Met-ox	72	84	1	(K)MSVQEYELIHKDK(E)
	1914.0525	1912.7251	694	3Met-ox	231	245	0	(K)EMHVLEQTNMEEDME(-)
96	1047.5244	1047.4933	30		65	72	0	(K) CIASTYYR (G)
	1672.9204	1672.8005	72		29	42	1	(K) NYKATIGVDFEMER (F)
	1681.8484	1681.8186	18		169	183	0	(K) AEYWAVSSLTGENVR (E)
	1688.8615	1688.7954	39	1Met-ox	29	42	1	(K)NYKATIGVDFEMER(F)
	1706.8167	1706.8601	-25		118	133	0	(K) DLSVSVPPVVGEDFTSR (Q)
	1732.8808	1732.9485	-39		102	117	1	(K) ENDPSSVLLFLVGSKK (D)
	1745.8747	1745.9689	-54		189	204	0	(R) VAALTFEVNVLAELEK (S)
	1834.896	1834.9551	-32		117	133	1	(K) KDLSVSVPPVVGEDFTSR (Q)

Spot #	m/z Submitted	MH+ Matched	Delta ppm	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Database Sequence
105	1243.6774	1243.588	72		3276	3286	0	(R) LSSFESMTDVK (E)
	1244.6866	1244.6938	-5.8		2900	2909	1	(K) VIQHIRGMYK (V)
	1251.6878	1251.5929	76		111	121	1	(K) NSSSQRSTQEK (L)
	1513.9873	1513.7875	132		3408	3421	0	(R) QLFQSAHASRPGSK (L)
	1550.9563	1550.8153	91		730	741	0	(K) LYNCFNPVLQR (G)
	1562.0253	1561.881	92		471	484	1	(K) ALINNVKIMSTVK (K)
	1578.111	1577.8759	149	1Met-ox	471	484	1	(K)ALINNVKIMSTVK(K)
	1607.0335	1606.8553	111		198	211	1	(K) EDHLTAKLNLSTK (E)
	1649.0876	1648.9096	108		1302	1315	1	(K) EKNIFLLMQQGTVK (N)
	1655.1282	1654.8991	138		2039	2051	1	(K) IFQEKVQSIMYLR (H)
	1667.1158	1666.9024	128		2593	2606	1	(K) FLLAQTDSELLMKMR (S)
	1746.2842	1746.1046	103		590	605	1	(K) SVIVPLLHAFKLPALK (S)
	1817.1702	1817.0424	70		2517	2532	0	(R) VIEDLIVLLGYLQNSK (N)
	1880.3869	1880.1512	125		70	85	0	(R) EELLTLLSLLPLVWK (I)
137	1015.5075	1015.5676	-59		1798	1806	0	(K) TVLEIDTPK (V)
	1078.6833	1078.6625	19		1063	1074	0	(R) GLPGPVGALGLK (G)
	1089.5566	1089.5978	-38		176	184	0	(K) NVTLLDCK (K)
	1098.5752	1098.518	52		838	848	1	(R) GEDGPEGPKGR (G)
	1147.5725	1147.5972	-22		1392	1403	1	(K) RGPPGAGPEGR (Q)
	1160.5778	1160.5952	-15		631	642	0	(R) GFDGLAGLPGEK (G)
	1182.6003	1182.6635	-53		867	878	0	(K) LGVPGLPGYPGR (Q)
	1296.687	1296.582	81		1285	1298	0	(K) GEPGEAGEPGPSGR (S)
	1332.6786	1332.5757	77		1827	1838	0	(K) FGFVGPACFMG (-)
	1407.7141	1407.7021	8.5		949	963	0	(R) GPNGPQGPTGFPGPK (G)
	1433.7131	1433.7137	-0.43		1393	1407	1	(R) GPPGAGPEGRQGEK (G)
	1488.6995	1488.7447	-30		628	642	1	(K) GDRGFDGLAGLPGEK (G)
	1491.6594	1491.8059	-98		1794	1806	1	(K) GYQKTVLEIDTPK (V)
	1554.6992	1554.7263	-17		811	825	1	(K) GEDGFPGFKGDMGIK (G)
	1837.9839	1837.8945	49		972	989	1	(K) DGLPGHPGQRGETGFQGK (T)
	1844.9228	1844.9295	-3.6		879	897	1	(R) QGPKGSIGFPFGANGEK (G)

7. 오줌단백질의 proteomic map 작성 및 특이단백질 선별 :

앞에서 수행한 2-D gel 분석결과를 이용하여 PDQUEST(Bio-Rad, USA) program으로 image analysis를 수행하여 proteomic map을 작성하였으며(Fig. 10 ~ 11), 비임신소에 비해 임신소에서 특이적으로 양이 증가하는 10개의 spot(#2, #5, #6, #9, #10, #12, #13, #15, #16, #17) 및 오히려 양이 감소하는 2개의 spot(#8, #11)을 임신특이 단백질로서 최종 확인하였다(Table 6). 그 중에서도 특히 분자량 20,000 Da과 6.2의 pI값을 갖는 spot #2가 임신중 가장 뚜렷한 양의 증가를 보였으므로 이를 임신특이성 단백질로 다시 확인하고 집중적으로 연구를 수행하였다. 그리고 사육조건에 관계없이 발현됨을 보기 위해 다른 목장에서 사육하고 있는 소의 오줌을 받아 비교하였다. 이것도 동일한 결과를 보여주었다. 즉 spot #2 단백질은 반복성 있게 분자량 20 kDa, pI 6.2의 위치에 나타났다. 이 실험을 통해 spot #2 단백질은 소 임신 특이 단백질을 확인할 수 있었으며 이 단백질의 발현은 임신 연령과 비례적으로 증가함을 알 수 있었다. 비임신 특이 단백질도 선별되고 반복성이 확인되었으며 이 단백질들의 성질은 spot #9가 Kexin-like protein PC7A precursor (쥐)으로 spot #12가 HLA class I histocompatibility antigen (개)으로 판명되었으나 이는 소가 아닌 다른 종의 동물이므로 이들 단백질의 보다 정확한 성질을 규명하기 위하여 단백질의 아미노산 sequence를 Q-TOF로 분석하여 확인하고자 비임신소에서 이들 단백질을 모아 분석하였다. 아직까지 소의 유전자 database는 인간과 mouse의 것에 비해 대단히 부족함으로 PNF 방법으로는 정확한 단백질의 정체를 밝히는데 한계가 있으므로 Q-TOF를 이용한 아미노산 서열분석과 분석된 아미노산 서열을 가지고 미국 NIH의 NCI에서 제공하는 BLAST program을 이용하여 단백질 database를 검색함으로써 좀더 정확한 단백질의 정체를 밝힐 것으로 기대하였으나, 현재까지는 이전에 알려진 단백질과 일치하는 아미노산 서열이 전혀 없으므로 새로운 단백질일 것으로 추정하고 있다. 이상의 결과로부터 소의 오줌단백질을 이용하여 성공적으로 임신소와 비임신소의 proteomic map을 작성할 수 있었으며, 이중에서 임신특이 단백질 spot #2를 bovine pregnant associated protein(bPAP 2)로 신규 명명하였다.

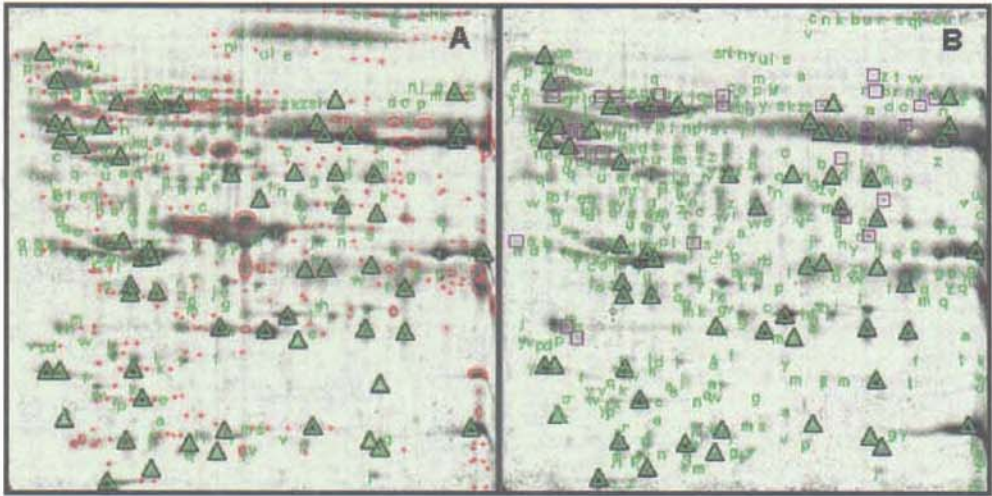


Fig. 10. Match set using 2-D image analysis program. The cows #K30 (A) was non-pregnant and #K33 (B) was pregnant for 6 months at the time of sampling.

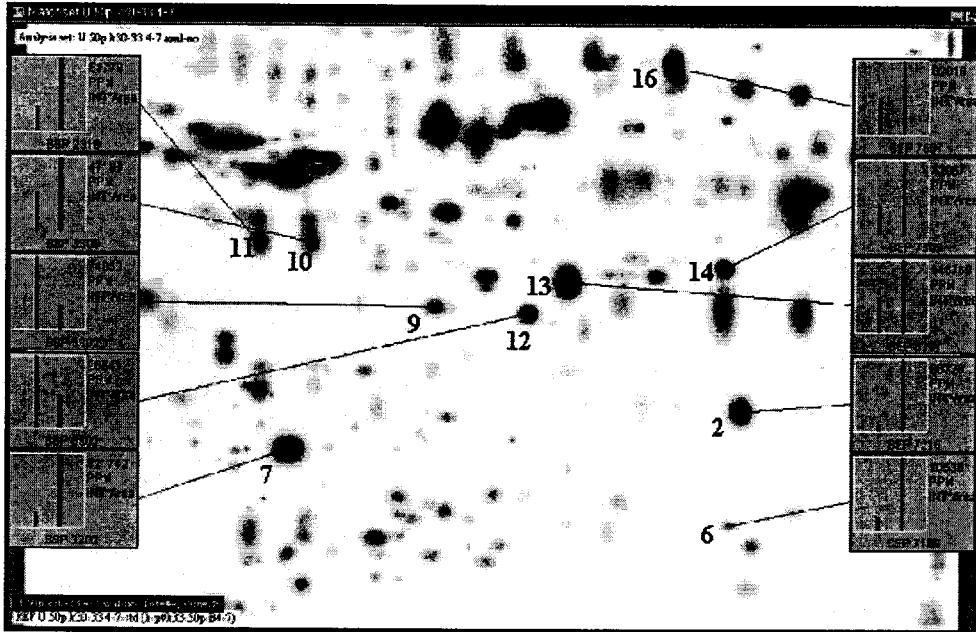


Fig. 11. Analysis set using 2-D image analysis program. The differences between pregnant and non-pregnant cow's urine protein were shown in the margin graphs. As the spot intensity has differences over two folds each other, the graph was shown in the margin. The left bar in margin graph indicates non-pregnant and the right bar indicates pregnant.

Table 6. Catalogue of urine proteins for MALDI-TOF MS analysis verified by PDQUEST(Bio-Rad, USA) image analysis program

Spot Number	Molecular Weight (Da)	pI	Protein expression during pregnancy
2	20,000	6.2	increased
5	18,000	5.7	increased
6	19,000	4.8	increased
7	22,000	4.3	constant
8	24,000	5.4	decreased
9	28,000	4.9	increased
10	28,000	4.7	increased
11	24,000	5.5	decreased
12	26,000	5.6	increased
13	27,000	5.7	increased
14	33,000	5.6	constant
15	36,000	5.7	increased
16	38,000	5.6	increased
17	38,000	5.5	increased

8. 선발된 특이단백질의 mass spectrometry 분석 :

적어도 30 두의 임신 및 비임신소의 오줌단백질을 2-D gel로 분석하여 반복성 있게 나타나는 단백질들을 중심으로 peptide mass fingerprint 방법으로 각 단백질들의 성질을 규명하고자 하였다. 일단 pH 3.0 ~ 10.0의 long range isoelectric focusing을 통해 단백질의 분포를 살펴본 결과 pH 4.0 ~ 7.0의 isoelectric focusing을 하여서 단백질 map을 만들어도 대부분의 오줌단백질을 포함할 수 있음을 알았고 pH range를 줄임으로써 더 많은 단백질을 loading 할 수 있고, 따라서 소량으로 존재하는 단백질의 변화도 분석할 수 있기 때문에 실험 전체를 통해 pH 4.0 ~ 7.0의 IPG strip을 이용해 일차원 전기영동을 하였다. 2-D gel 상에 나타난 단백질을 각각 pipet tip을 이용하여 취한 뒤 peptide mass fingerprinting을 위한 시료처리를 하였다. MALDI-TOF mass spectrometry 분석결과 각 spot의 pI 값과 분자량을 고려하여 분석결과 얻은 data 중에서 가장 가능성이 높은 단백질들을 선 발하였다. 완성된 2-D image에 나타난 protein spot의 갯수는 개체별로 다소간의 차이를 보였으나 약 140개 정도였다(Fig. 12). 각 spot을 gel로부터 잘라낸 후, MALDI-TOF을 이용하여 각 단백질을 확인하여 지금까지 총 140개 spot 중에서 72개 spot의 단백질을 최종 확인하였다(Table 7 ~ 9).

MALDI-TOF mass spectrometry를 이용하여 peptide mass fingerprinting을 하기 위해서는 일단 정확한 mass data를 얻는 것이 생명이다. 여러 차례의 시행착오를 통해 MALDI-TOF mass spectrometry 사용조건을 최적화하였다(Fig. 13). Internal standard control을 넣고 적절한 molecular mass standard를 사용하여 정확한 mass 값을 얻고, 또한 얻은 mass 값이 얼마나 정확한지를 검정하여 다음 단계로 진행을 해야만 한다. 최적화된 실험조건에서 얻은 peptide mass 값을 가지고 database를 검색하여 본 연구에서 선발한 임신소의 오줌단백질들의 성질을 규명하였다(Table 7 ~ 9). 현재까지 소의 database가 충분치 못한 관계로 아직까지는 100% 신뢰할 수 있는 결과로 단정할 수는 없지만 현재까지 가능한 자료를 토대로 어느 정도는 단백질의 성질을 예측할 수 있었다. 뿐만아니라 앞으로 database가 점점 확장됨에 따라 우리가 확립한 peptide 값만을 단순히 입력하여 database를 검색하여도 단백질의 성질을 규명할 수 있는 방법적 기틀을 마련하였다는 데 중요한 의미가 있다.

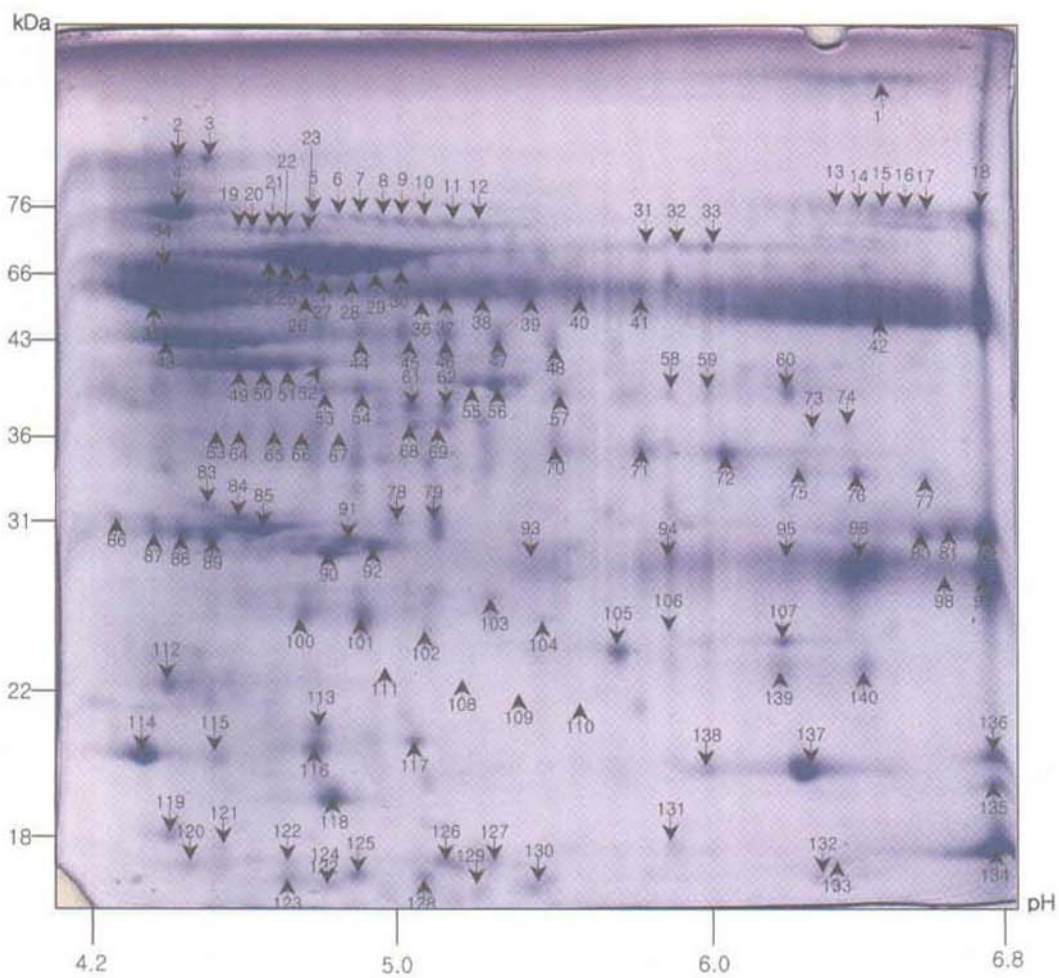


Fig. 12. Urine proteome map of pregnant cow. Number uses for the identification of each proteins in Table 9.

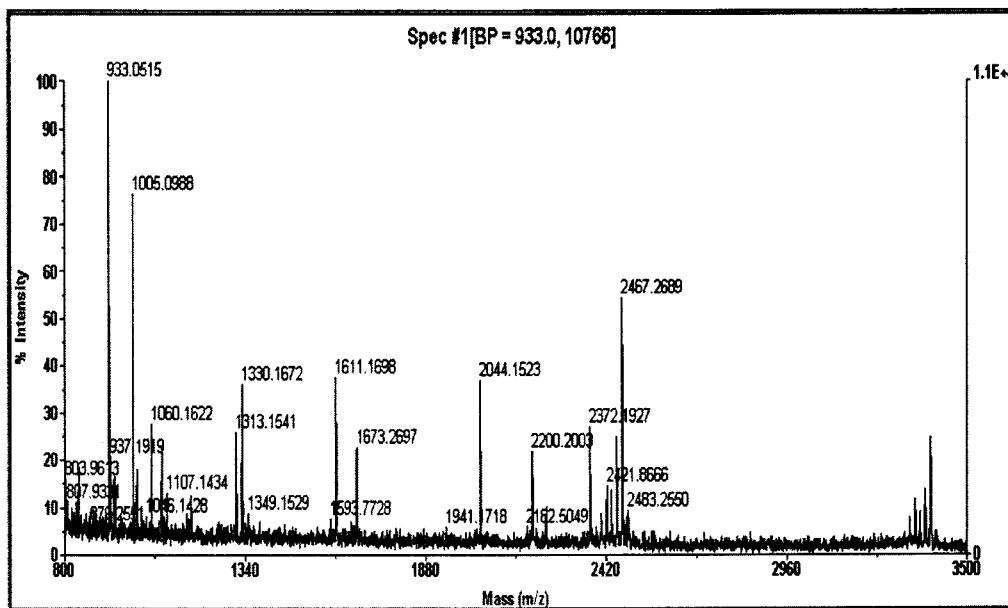


Fig. 13. Peptide mass spectrum of unseparated tryptic digests of the spot 2. The Coomassie Brilliant Blue stained protein spot from a 2-D gel was in-gel digested, and the resulting peptides were extracted and purified. The spectrum was obtained by delayed extraction, reflector MALDI-TOF MS, and the MS-Fit database was searched with the measured tryptic peptide masses.

Table 7. Database searching results of peptide mass fingerprint of bovine pregnancy-associated proteins

ID	MOWSE score	Protein MW(Da)/pI	Species	Protein Name
5	565	23597.5/4.71	Human	Calcium-binding protein CABP4
6	1110	67403.7/5.44	Mouse	Lamin B2
7	4.42	57188.6/8.87	Mouse	(AK004918) Putative
8	549	84514.7/8.05	Mouse	(AK002920) Putative
9	783	71255.4/7.34	Rat	Kexin-like protein PC7A precursor
10	1600	66141.3/5.38	Bos taurus	Albumin
11	37.2	53727.3/5.02	Rattus Norvegicus	Neuronal beta-catenin like protein
12	309	40462.6/5.57	Canfa	DLA class I histocompatibility antigen
13	83.7	22451.0/6.04	Mouse	(AK007469) Putative
14	3.68	65714.9/9.98	Human	Hypothetical L1 protein (third intron on gene TS)
15	99.2	80345.0/5.51	Homo Sapiens	(AB020665) KIAA0858 protein
16	1090	51114.4/5.73	Bovine	Clusterin precursor (Glycoprotein III)
17	241000	51114.4/5.73	Bovine	Clusterin precursor (Glycoprotein III)








* The used parameters are as follows. Search-engine, MS-Fit, Database, NCBIInr.02.07.2001. Molecular weight range, 1,000-100,000 Da (588157 entries). pI range 3.00 to 10.00 (616977 entries). Species, MAMMALS (90949 entries). The search with the combined molecular weight, pI and species selected 3174 entries.

Table 8. Matched parts of peptide sequences with top ranked protein of the other bPAPs using MS-Fit searching program













ID	Peptide mass tolerance	m/z submitted	MH+ matched	No. (%) Masses matched	NCBI nr. Accession No.
5	50 ppm	1521.7888, 2506.2156, 2538.1534, 2554.1177	1521.7841, 2506.2508, 2538. 2406*, 2554.2355*	4/28 (14%)	13431342
6	50 ppm	904.4655, 906.4674, 1021.5119, 1046.5599	904.4740, 906.4757, 1021.4624, 1046.5305	7/57 (12%)	228591
7	80 ppm	803.5063, 826.5152, 842.4968, 946.5698	803.4627, 826.4497, 842.4446*, 946.5209	4/13 (30%)	12836467
8	30 ppm	1033.5121, 1930.9931, 2043.9860, 2451.2987	1033.4889, 1930.9658, 2043.9987, 2451.2448	4/32 (12%)	12833259
9	40 ppm	951.5756, 955.4612, 1066.5291, 1442.7427	951.5627, 955.4889, 1066.5573, 1442.7855	7/46 (15%)	631850
10	10 ppm	712.3765, 1163.6276, 1249.6142, 1283.7068	712.3742, 1163.6312, 1249.6142, 1283.7112	9/50 (18%)	229552
11	70 ppm	700.4757, 839.3853, 855.3369, 1335.6107	700.4609, 839.3973, 855.3922*, 1335.6801	4/25 (16%)	11182352
12	50 ppm	2275.0019, 2282.1605, 2291.0005, 2609.2101	2275.0242, 2282.0802, 2291.0191*, 2609.1603	4/30 (13%)	129896
13	50 ppm	747.3889, 764.4174, 1081.6417, 1154.7116	747.3902, 764. 4167, 1081.6370, 1154.7050	4/11 (36%)	12841036
14	50 ppm	1731.9556, 1874.9170, 1892.0556, 1927.1969	1731.8740, 1874.9421, 1891.9687*, 1927.1017	4/18 (22%)	87765
15	50 ppm	1636.8949, 2330.0135, 2346.0032, 2359.9937	1636.8308, 2330.0909, 2346.0858*, 2360.1105	4/20 (20%)	4240205
16	50 ppm	1526.7554, 1975.9407, 1998.8138, 2014.7983	1526.7855, 1975.9302, 1998.8656, 2014.8605	4/25 (16%)	116530
17	50 ppm	778.4095, 1247.5867, 1411.6590, 1526.7979	778.4212, 1247.5868, 1411.6528, 1526.7855	8/24 (33%)	116530

* The used parameters are as follows. Search-engine, MS-Fit, Database, NCBI nr.02.07.2001. Molecular weight range, 1,000-100,000 Da (588157 entries). pI range 3.00 to 10.00 (616977 entries). Species, MAMMALS (90949 entries). The search with the combined molecular weight, pI and species selected 3174 entries. An asterisk indicates an oxidized methionine.













Table 9. Proteins identified by MALDI-TOF MS-Peptide mass fingerprinting

#	MOWSE Score	#/36(%) Masses Matched	%Cov	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Species	Protein Name
1	4.64	4 (10)	4.0	93989/6.2	 4588120	BOS TAURUS	(AF100170) major fibrous sheath protein precursor
2	14.5	4 (11)	5.0	79648/6.9	 114151 M	BOVINE	Beta-adrenergic receptor kinase 1 (Beta-ARK-1) (G-protein coupled receptor kinase 2)
3	3.82	4 (11)	3.0	97387/5.3	 1706000 M	BOVINE	Coatomer gamma subunit (Gamma-coat protein) (Gamma-COP)
4	17.7	4 (10)	4.0	76015/6.3	 399230 M	BOVINE	Cyclic-nucleotide-gated olfactory channel (Cyclic-nucleotide-gated cation channel 2) (CNG channel 2) (CNG-2) (CNG2)
5	16.2	6 (6)	5.0	78371/8.8	 163328	BOS TAURUS	(M98430) leukemia virus cell receptor
6	43.8	5 (4)	3.0	83498/5.8	 129386 M	BOVINE	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory alpha subunit (PI3-kinase P85-alpha subunit) (PtdIns-3-kinase P85-alpha) (PI3K)
7	1.16	5 (13)	3.0	86648/5.7	 15986411	BOS TAURUS	(AJ414556) IκB kinase-beta
8	1.16	5 (13)	3.0	86648/5.7	 15986411	BOS TAURUS	(AJ414556) IκB kinase-beta
9	52.7	5 (13)	6.0	67555/6.5	 2501510 M	BOVINE	SYNTAXIN BINDING PROTEIN 1 (UNC-18 HOMOLOG) (UNC-18-1)
10	3.84	4 (11)	3.0	97387/5.3	 1706000 M	BOVINE	Coatomer gamma subunit (Gamma-coat protein) (Gamma-COP)
11	7.22	5 (13)	3.0	87319/5.9	 15991082	BOS TAURUS	(AB059430) fibroblast growth factor receptor 3
12	21.9	5 (13)	5.0	79648/6.9	 114151 M	BOVINE	Beta-adrenergic receptor kinase 1 (Beta-ARK-1) (G-protein coupled receptor kinase 2)













* continued on the next page.

#	MOWSE Score	#/36(%) Masses Matched	%Cov	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Species	Protein Name
13	1.58	5 (13)	4.0	89769/5.2	 319945 M	BOVINE (FRAGMENT)	desmocollin 2b precursor
14	23.1	4 (11)	3.0	92129/5.1	 5019612	BOS TAURUS	(A B 0 1 8 3 9 8) hypoxia-inducible factor-1 alpha
15	1.43	5 (13)	4.0	89769/5.2	 319945 M	BOVINE (FRAGMENT)	desmocollin 2b precursor
16	1.45	5 (13)	4.0	89769/5.2	 319945 M	BOVINE (FRAGMENT)	desmocollin 2b precursor
17	1.44	4 (11)	3.0	89769/5.2	 319945 M	BOVINE (FRAGMENT)	desmocollin 2b precursor
18	13.3	4 (11)	4.0	76838/6.6	 125548 M	BOVINE	PROTEIN KINASE C, ALPHA TYPE (PKC-ALPHA)
19	25.5	6 (5)	4.0	92129/5.1	 5019612	BOS TAURUS	(A B 0 1 8 3 9 8) hypoxia-inducible factor-1 alpha
20	0.956	4 (10)	2.0	90211/5.7	 16416471	BOS TAURUS	(AF032866) X-linked zinc finger protein
21	4.24	4 (11)	3.0	92129/5.1	 5019612	BOS TAURUS	(A B 0 1 8 3 9 8) hypoxia-inducible factor-1 alpha
22	19.7	6 (16)	8.0	70357/4.7	 134463 M	BOVINE	Secretogranin II precursor (SGII) (Chromogranin C)
23	1.59	4 (11)	4.0	89769/5.2	 319945 M	BOVINE (FRAGMENT)	desmocollin 2b precursor
24	6.26	4 (11)	2.0	96170/5.7	 5019614	BOS TAURUS	(AB018399) endothelial PAS domain protein 1/hypoxia-inducible factor-2 alpha













* continued on the next page.

#	MOWSE Score	#/36(%) Masses Matched	%Cov	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Species	Protein Name
25	8.83	4 (10)	10.0	69797/5.4	 3121751_M	BOVINE	Annexin VI (Lipocortin VI) (P68) (P70) (Protein III) (Chromobindin 20) (67 kDa calelectrin) (Calphobindin-II) (CPB-II)
26	61.9	5 (13)	9.0	70229/5.7	 2495339_M	BOVINE	HEAT SHOCK 70 KDA PROTEIN 2 (HSP70-2)
27	11.5	4 (10)	6.0	73582/9.2	 11527860	BOS TAURUS	(AF294797) bovine leukemia virus receptor BLVRcp199
28	19.7	5 (13)	8.0	69324/5.8	 2190337_M	BOS TAURUS	(X58989) serum albumin
29	117	5 (12)	9.0	69271/5.8	 418694	BOVINE	serum albumin precursor [validated]
30	52.7	6 (16)	6.0	70251/5.6	 2495338_M	BOVINE	HEAT SHOCK 70 KD PROTEIN 1 (HSP70-1)
31	26.6	4 (11)	5.0	77534/8.4	 118059_M	BOVINE	Guanylate cyclase soluble, alpha-1 chain (GCS-alpha-1) (Soluble guanylate cyclase large subunit)
32	42.9	4 (12)	7.0	69271/5.8	 418694	BOVINE	serum albumin precursor [validated]
33	70.2	6 (16)	7.0	67555/6.5	 2501510_M	BOVINE	SYNTAXIN BINDING PROTEIN 1 (UNC-18 HOMOLOG) (UNC-18-1)
34	34.8	4 (12)	6.0	75133/5.3	 131085_M	BOVINE	Vitamin K-dependent protein S precursor
35	72.7	5 (13)	10.0	68711/6.1	 125506_M	BOVINE	Kininogen, HMW II precursor (Thiol proteinase inhibitor) [Contains: Bradykinin]
36	21.9	6 (17)	10.0	79805/7.3	 114154_M	BOVINE	Beta-adrenergic receptor kinase 2 (Beta-ARK-2) (G-protein coupled receptor kinase 3)













* continued on the next page.

#	MOWSE Score	#/36(%) Masses Matched	%Cov	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Species	Protein Name
37	16.4	4 (11)	6.0	94604/5.7	 16681711	BOS TAURUS	(AF087569) skeletal muscle-specific calpain
38	16.3	4 (11)	8.0	68711/6.1	 125506_M	BOVINE	Kininogen, HMW II precursor (Thiol proteinase inhibitor) [Contains: Bradykinin]
39	16.3	4 (11)	8.0	68711/6.1	 125506_M	BOVINE	Kininogen, HMW II precursor (Thiol proteinase inhibitor) [Contains: Bradykinin]
40	41.3	5 (15)	6.0	75844/4.9	 1352417_M	BOVINE	CALPAIN INHIBITOR (CALPASTATIN)
41	19.3	4 (10)	6.0	66493/7.2	 17638407	BOS TAURUS	(A F 2 4 7 1 8 6) 6-alpha-L-fucosyltransferase
42	1310	4 (12)	14.0	50625/6.1	 108750_M	BOVINE	Ig heavy chain precursor (B/MT.4A.17.H5.A5)
43	229	4 (10)	17.0	46682/8.1	 14850314	BOS TAURUS	(AB004275) vascular endothelial growth factor C
44	4.74	4 (5)	5.0	67555/6.5	 12501510_M	BOVINE	SYNTAXIN BINDING PROTEIN 1 (UNC-18 HOMOLOG) (UNC-18-1)
45	24.0	4 (13)	10.0	61068/5.2	 11707894_M	BOVINE	RAP1 GTPASE-GDP D I S S O C I A T I O N STIMULATOR 1 (SMG P21 STIMULATORY GDP/GTP EXCHANGE PROTEIN) (SMG GDS PROTEIN)
46	844	4 (12)	7.0	48948/5.9	 1833783	BOS TAURUS	(X14338) NADH:ubiquinone oxidoreductase (428 AA)
47	53.0	5 (17)	15.0	42073/7.7	 12780412	BOS TAURUS	(AB006441) lipoyltransferase
48	15.9	4 (11)	12.0	42073/7.7	 12780412	BOS TAURUS	(AB006441) lipoyltransferase

* continued on the next page.

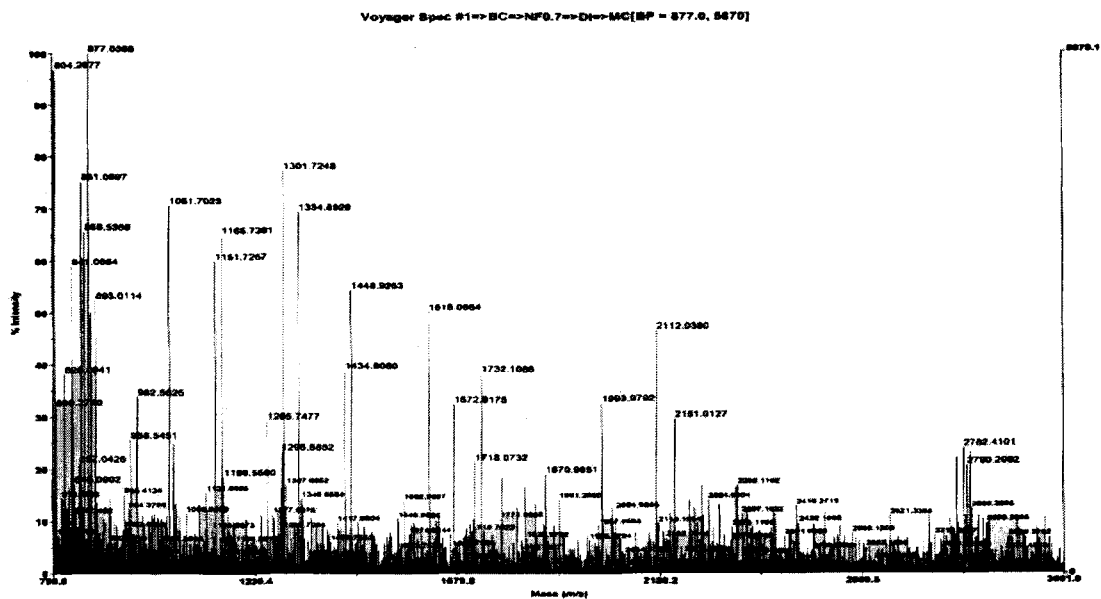
#	MOWSE Score	#/36(%) Masses Matched	%Cov	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Species	Protein Name
49	42.8	4 (11)	10.0	40127/5.3	 359	BOS TAURUS	(X12924) GTP-binding protein G39 (AA 1 - 354)
50	24.9	4 (11)	9.0	41378/6.0	 108712 M	BOVINE	GTP-binding protein GL2 alpha chain
51	26.6	4 (10)	10.0	53185/5.8	 18389980	BOS TAURUS	(AF461261) GASZ
52	53.2	4 (12)	13.0	42073/7.7	 2780412	BOS TAURUS	(AB006441) lipoyltransferase
53	19.4	4 (14)	8.0	40127/5.3	 359	BOS TAURUS	(X12924) GTP-binding protein G39 (AA 1 - 354)
54	137	4 (13)	9.0	40127/5.3	 359	BOS TAURUS	(X12924) GTP-binding protein G39 (AA 1 - 354)
55	210	4 (19)	16.0	37777/5.6	 163148	BOS TAURUS	(J02671) hydroxyindole O-methyltransferase (EC 2.1.1.4)
56	25.1	4 (12)	12.0	39037/5.4	 2864664	BOS TAURUS	(AB008575) MHC class I heavy chain
57	125	4 (14)	13.0	59263/5.1	 108553 M	BOVINE	butyrophilin
58	38.9	4 (14)	16.0	37925/5.6	 2507044 M	BOVINE	HYDROXYINDOLE O-METHYLTRANSFERASE (HIOMT) (ACETYLSEROTONIN O-METHYLTRANSFERASE) (ASMT)
59	275	4 (16)	18.0	37777/5.6	 163148	BOS TAURUS	(J02671) hydroxyindole O-methyltransferase (EC 2.1.1.4)
60	45.3	4 (12)	10.0	38876/9.6	 114511 M	BOVINE	ATP synthase alpha chain liver isoform, mitochondrial precursor (Fragment)

* continued on the next page.

#	MOWSE Score	#/36(%) Masses Matched	%Cov	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Species	Protein Name
61	31.8	4 (13)	11.0	32844/5.3	 585322_M	BOVINE	I N O R G A N I C PYROPHOSPHATASE (P Y R O P H O S P H A T E PHOSPHO-HYDROLASE) (PPASE)
62	41.1	4 (12)	10.0	48500/8.5	 357	BOS TAURUS	(V00110) fibrinogen beta chain
63	29.2	4 (13)	5.0	74806/5.6	 3046232	BOS TAURUS	(U88329) GTP-binding protein
64	27.7	4 (14)	13.0	40289/5.4	 5902736	BOVINE	ADENOSINE DEAMINASE (ADENOSINE AMINOHYDROLASE)
65	34.2	4 (11)	11.0	49112/8.9	 547762_M	HUMAN	NUCLEAR FACTOR NF-KAPPA-B P49 SUBUNIT
66	123	4 (12)	20.0	33083/6.6	 11096291	BOS TAURUS	(AF308633) herpesvirus entry mediator C
67	183	6 (22)	11.0	57927/9.5	 163473	BOS TAURUS	(M17844) steroid 11-beta-hydroxylase
68	54.0	4 (11)	9.0	40906/7.6	 7448290_M	BOVINE	G protein-coupled receptor
69	441	5 (16)	15.0	41775/5.2	 71616	BOVINE	actin, aortic smooth muscle
70	35.6	4 (13)	10.0	46613/7.0	 1170793_M	BOVINE	PLATELET-ACTIVATING FACTOR ACETYLHYDROLASE IB ALPHA SUBUNIT (PAF ACETYLHYDROLASE 45 KDA SUBUNIT) (PAF-AH 45 KDA SUBUNIT) (PAF-AH ALPHA) (PAFAH A L P H A) (LISSENCEPHALY-1 PROTEIN) (LIS-1)
71	278	5 (14)	10.0	43866/6.0	 6647689_M	BOVINE	PLATELET-ACTIVATING FACTOR ACETYLHYDROLASE 2, CYTOPLASMIC (SERINE DEPENDENT PHOSPHOLIPASE A2)
72	391	4 (14)	7.0	51114/5.7	 116530_M	BOVINE	CLUSTERIN PRECURSOR (GLYCOPROTEIN III) (GPIII)

이상의 peptide mass fingerprinting 과정을 그 중에서 #42(bovine Ig heavy chain precursor) 하나만을 예시로서 각 단계별로 설명하면 다음과 같다.

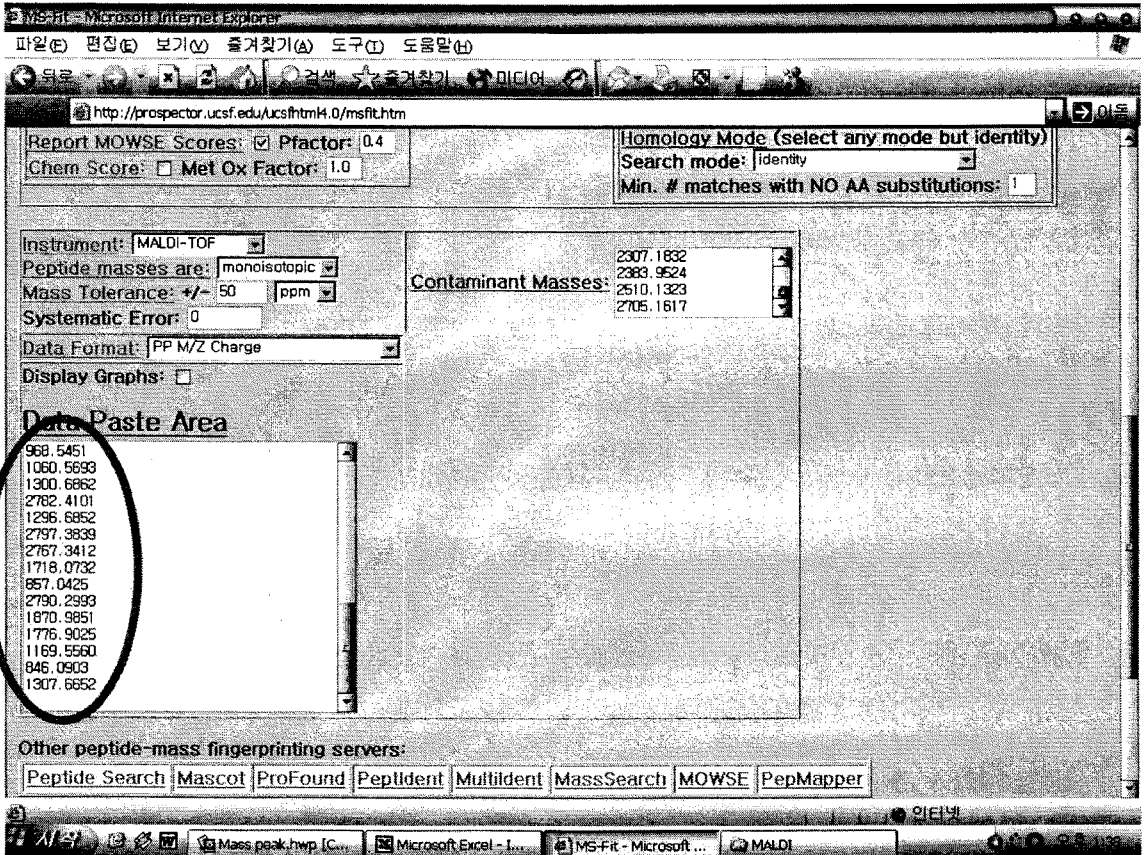
1. 특정 protein spot을 MALDI-TOF로 분석한, peptide 분자량 peaks을 얻는다



2. 분자량 peak을 수치화 하여 크기 순으로 나열한다.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	21	877.0365	877.04	877.04	0	5870	100.00	5870.08				
2	3	804.2677	804.27	804.27	1	5682	96.80	5682.37				
3	55	1301.7248	1301.72	1301.72	1	4540	77.34	4539.9				
4	17	861.0597	861.06	861.06	0	4413	75.18	4413.02				
5	37	1051.7023	1051.7	1051.7	0	4146	70.63	4145.88				
6	57	1334.8929	1334.89	1334.89	0	4075	69.42	4074.9				
7	20	868.5369	868.54	868.54	0	3849	65.57	3848.85				
8	45	1165.7391	1165.74	1165.74	0	3814	64.98	3814.29				
9	44	1151.7257	1151.73	1151.73	0	3521	59.98	3520.68				
10	10	841.0664	841.07	841.07	0	3460	58.94	3460.11				
11	61	1448.8253	1448.93	1448.93	0	3197	54.47	3197.17				
12	25	893.0114	893.01	893.01	0	3079	52.45	3079.15				
13	63	1618.0665	1618.07	1618.07	0	2951	50.28	2951.31				
14	23	882.5534	882.55	882.55	0	2942	50.11	2941.52				
15	79	2112.0380	2112.04	2112.04	0	2737	46.63	2737.35				
16	60	1434.9060	1434.91	1434.91	0	2285	38.93	2285.03				
17	67	1732.1086	1732.11	1732.11	0	2248	38.30	2247.98				
18	7	825.0941	825.09	825.09	0	2239	38.14	2238.57				
19	32	982.5625	982.56	982.56	0	1984	33.80	1984.25				
20	11	842.5004	842.5	842.5	0	1952	33.26	1952.42				
21	74	1993.9792	1993.98	1993.98	1	1916	32.64	1915.78				
22	65	1672.9175	1672.92	1672.92	0	1903	32.43	1903.42				
23	4	806.2740	806.27	806.27	0	1868	31.82	1867.73				
24	81	2151.0127	2151.01	2151.01	0	1740	29.64	1739.62				
25	49	1265.7477	1265.75	1265.75	0	1718	29.26	1717.64				
26	31	968.5451	968.55	968.55	0	1504	25.63	1504.24				
27	38	1060.5693	1060.57	1060.57	0	1473	25.10	1473.31				
28	54	1300.6682	1300.69	1300.69	1	1434	24.43	1433.85				
29	100	2782.4101	2782.41	2782.41	0	1409	24.00	1408.61				
30	53	1296.6852	1296.69	1296.69	0	1373	23.39	1372.85				
31	103	2797.3839	2797.38	2797.38	0	1364	23.24	1364.16				
32	99	2767.3412	2767.34	2767.34	0	1306	22.24	1305.68				
33	66	1718.0707	1718.07	1718.07	0	1254	21.36	1253.90				

3. 분자량 peak을 MS-fit search site에 입력한다.



5. 분자량과 등전점을 봐서 가장 가능성 있는 peptide(=윗그림의 붉은 사각형)의 accession number를 click하면 아래의 결과를 얻는다.

http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/rtbin-post/Entrez/query?db=p&form=6&dopt=g&uid=108750

KEYWORDS glycoprotein; heterotetramer; immunoglobulin; membrane protein.
SOURCE cow
ORGANISM *Bos taurus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovoidea;
 Bovidae; Bovinae; Bos.

REFERENCE 1 (residues 1 to 470)
AUTHORS Symons,D.B., Clarkson,C.A. and Beale,D.
TITLE Structure of bovine immunoglobulin constant region heavy chain
 gamma 1 and gamma 2 genes
JOURNAL Mol. Immunol. 26 (9), 841-850 (1989)
MEDLINE 90097956
PUBMED 2513487

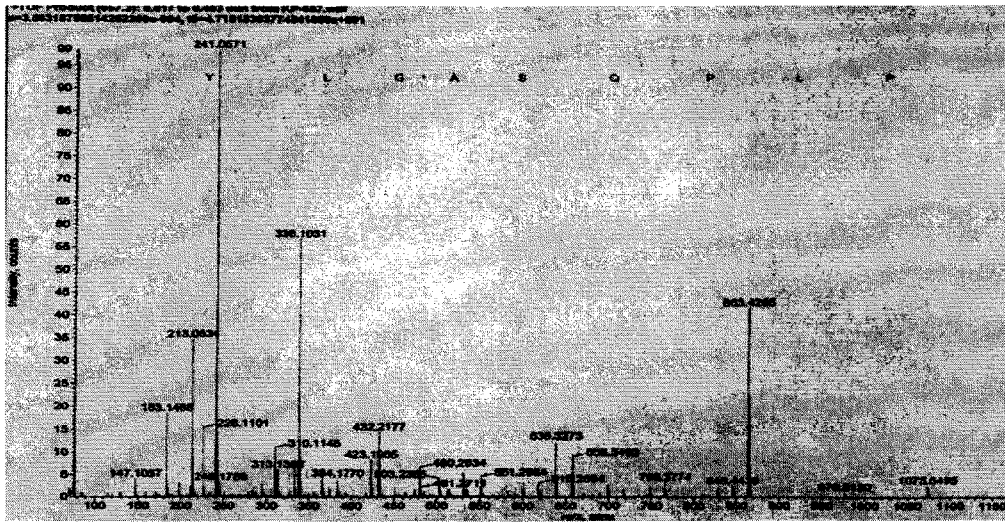
REFERENCE 2 (residues 1 to 470)
AUTHORS Sanders,P.G.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (-NOV-1991) to the EMBL Data Library

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..470
 /organism="Bos taurus"
 /db_xref="taxon:9913"
 Protein 1..470
 /product="Ig heavy chain precursor (B/MT.4A.17.H5.A5)"
 /note="Ig gamma-1 chain C region (clone B.10)"
 Region 161..225
 /region_name="domain"
 /note="immunoglobulin homology #label IMM"
 Site 318
 /site_type="binding"
 /note="carbohydrate (Asn) (covalent)"

ORIGIN
 1 mnpitllfv isapivlsq valresgpl vkpsqtlsit ctvsqfslss valtvrqap
 61 gkalewvsgl tsagttvynp alksrlsitk ensksqvlss vsvtppedta tyycarstyg
 121 evdgaiaada wggllvtvs sasttaokvy plssccgdk sstvtlgclv ssympepvtv
 181 twnsgalksa vhtfpavlsq sglvslssav tvgstsgat ftcnvahpas stkvdkavdp
 241 tckspcdcc pppelpgpps vfifppkpkd titistgpav tcvvdvghd dpevkfswlv
 301 ddventatt kpraqfnt yrvsalriq hdwtdgkfel kckvhnslp apivrtisrt
 361 kparepavy vlappqeels kstvsitcav tsfydylav awarngapes edkygttppq
 421 ldadssyily sklrvdnsw qegdtytcv mhealthhht qkstsksagk
 //

한편 HPLC에 의한 peptide 분리가 한계를 가질 수밖에 없으므로 보다 많은 peptide sequencing을 위해 Q-TOF MS(Mass spectrophotometry)의 방법을 이용하기 위하여 ESI-TOF MS 실험과 Q-TOF MS/MS 실험을 실행하였다(Fig. 14). 이 방법은 ESI-TOF MS 실험으로부터 적절한 peptide fragment를 분리한 후 (Fig. 14A) 이것을 Q-TOF MS/MS 방법으로 더욱 분쇄하여 얻어진 분자의 조각을 얻고 (Fig. 14B) 이 조각들의 combination을 computer로 분석하여 아미노산 sequence를 알아내는 방법인데 현재까지 진행상황으로 볼 때 짧은 시간 안에 단백질의 sequence 결과를 가장 정확하게 얻을 수 있는 최신기법으로 판단된다. 이 방법이 성공적으로 정립되면 2D-gel 상의 여러 임신특이 단백질들의 아미노산 sequence를 전부 알아내고 sequence를 이용하여 BLAST program을 가지고 단백질과 nucleotide databases를 검색할 수 있기 때문에 임신관련 단백질들의 정체를 밝히는 데 큰 진전을 가져올 수 있을 것이다. 이와같은 방법을 이용하여 Fig. 15에서 보여주는 바와 같이 bPAP 2 (#2 spot)의 peptide 서열을 새로이 밝힐 수 있었으며, 이것은 각각 V-L-G-A-G-Q-P-L-P과 E-L-E-L-V-G-G-G-S-A-Q로 확인되었다.

A



B

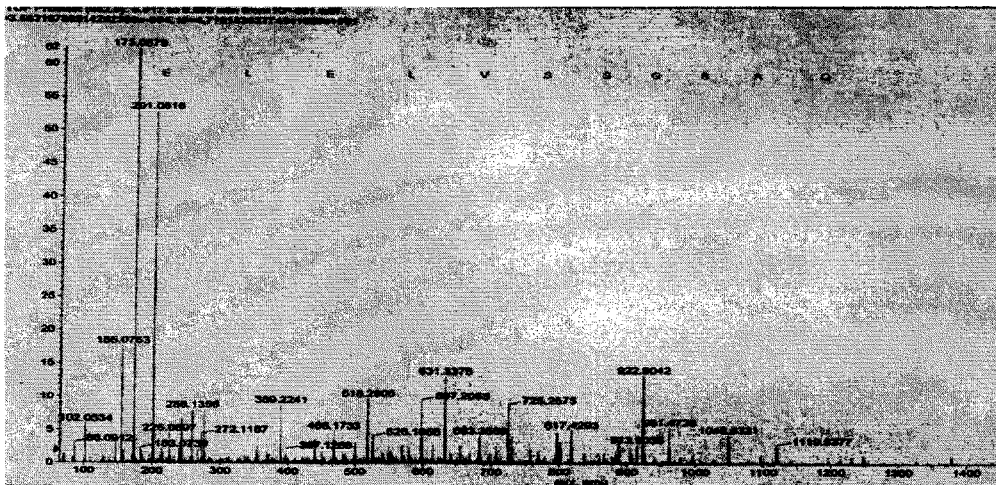


Fig. 15. Q-TOF MS(Mass spectrophotometry) spectrum of peptides from the in-gel digestion of 2-D gel spot 2 protein for the identification of amino acid sequence of two peptides, V-L-G-A-G-Q-P-L-P (A) and E-L-E-L-V-G-G-G-S-A-Q (B).

9. 소임신티 단백질에 대한 polyclonal antibody 제조 및 Western blotting :

본 연구의 최종목표는 proteomics 방법으로 소의 오줌으로부터 분리한 임신 특이단백질을 이용하여 간편하면서도 정확한 임신특이 진단 Kit의 제조에 있으므로 지금까지 확보한 임신특이 단백질 spot #2의 peptides에 대한 아미노산 sequence를 이용하여 N-terminal sequence 1개와 internal sequences 중에서 1개를 선택하여 두종류의 peptide를 합성하였다. 합성된 peptides를 각각 정제한 후 HPLC로 분석한 결과 단일 peak를 보였으므로 잘 정제되었음을 알 수 있다(Fig. 16 ~ Fig. 19). 이와같이 정제된 peptides를 토끼에 주사하여 polyclonal 항체를 성공적으로 제작하였으며, 그 결과를 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 분석하여 Fig. 20 ~ Fig. 25에 나타내었다. 그러나 제조된 polyclonal 항체는 specificity가 아주 좋지는 않아서 상당한 background를 나타내었지만, Fig. 26의 Western blot 분석결과에서 보여주는 바와 같이 spot #2 단백질(bPAP 2)에 대하여 비임신소의 오줌단백질에서는 감지하지 않았고 임신소의 오줌에서는 특이하게 감지할 수 있었다. 이 polyclonal 항체의 specificity를 높이기 위해 합성 peptide가 결합된 affinity resin을 제조하여 이를 이용한 column chromatography를 수행하여 polyclonal 항체를 정제하였다. 정제된 항체는 정제되지 않은 항체에 비하여 매우 높은 specificity를 나타내었으며 Western blotting으로 재분석하였을 때 spot #2 단백질을 매우 선택적으로 감지하였다(Fig. 27). 항체를 가지고 분석한 임신소와 비임신소의 오줌 단백질의 결과는 앞으로 개발하게 될 임신소 진단시약 개발에 대단히 높은 성공가능성을 보여주고 있다. 한편 이 항체를 이용하여 spot #2 단백질이 어느 정도로 정확한 임신 진단을 할 수 있는지를 판단하기 위해 progesterone의 혈중 level과 polyclonal anti-spot #2 항체를 이용한 Western blot 분석결과를 비교분석하였다(Table 10). 현재까지 가장 정확한 임신진단기법인 RIA(radio immunoassay) 방법에 의한 progesterone level의 측정 및 follow-up 실험을 통한 임신여부 측정과 동일한 소에 대하여 본 연구를 통하여 제조된 polyclonal anti-spot #2 단백질에 대한 항체를 이용한 Western blot 분석을 통한 임신여부 결과를 상호비교했을 때 false negative가 5% 미만이었으며, false positive가 10% 정도로 나타났다. 이상의 결과는 본 연구팀이 제작한 임신특이 항체가 적어도 90% 이상의 정확도를 나타냄을 보여주고

있다. 이와 같은 성적은 지금까지 보고된 여타의 소임신진단 Kit 분석에 의한 임신진단 결과보다 20% 이상 우수한 결과이다. 통상적으로 RIA에 의한 progesterone level의 측정 및 결과 판독은 전문가가 아니면 할 수 없는 일이며 follow-up 실험이 아니면 소의 발정 주기에 따른 progesterone level의 등락과 소의 임신 여부를 확신 할 수 없기 때문에 일반용 임신진단 시약으로는 부적절 하다고 평가되고 있다.

M

Individual Sample Report

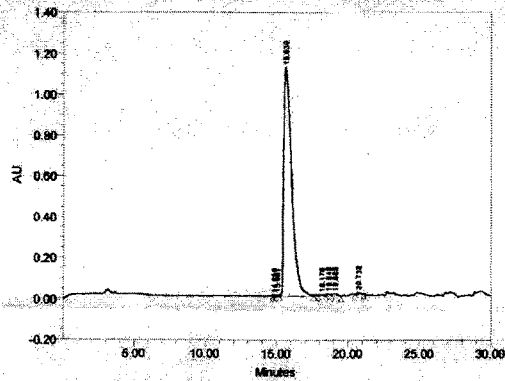
Reported by User: System

Project Name: s200402

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: p11701-11
Sample Type: Unknown
Vial: 67
Injection #: 1
Injection Volume: 100.00 ul
Run Time: 40.0 Minutes
Sample Set Name: 0216

Acquired By: System
Date Acquired: 2004-02-16 오전 11:48:48
Acq. Method Set: method 500
Date Processed: 2004-02-16 오후 2:04:18
Processing Method: 1
Channel Name: 2467Channel 1
Proc. Chnl. Descr.: 214



Retention Time (min)	Area	% Area	Height
14.880	67775	0.15	4585
15.061	54838	0.15	6657
15.639	43107039	97.82	1119575
18.176	178146	0.40	7517
18.648	217646	0.49	11082
19.086	297241	0.67	12021
20.732	134610	0.31	8506

Report Method: peptron

Printed 오후 2:07:2004-02-16

Page: 1 of 1

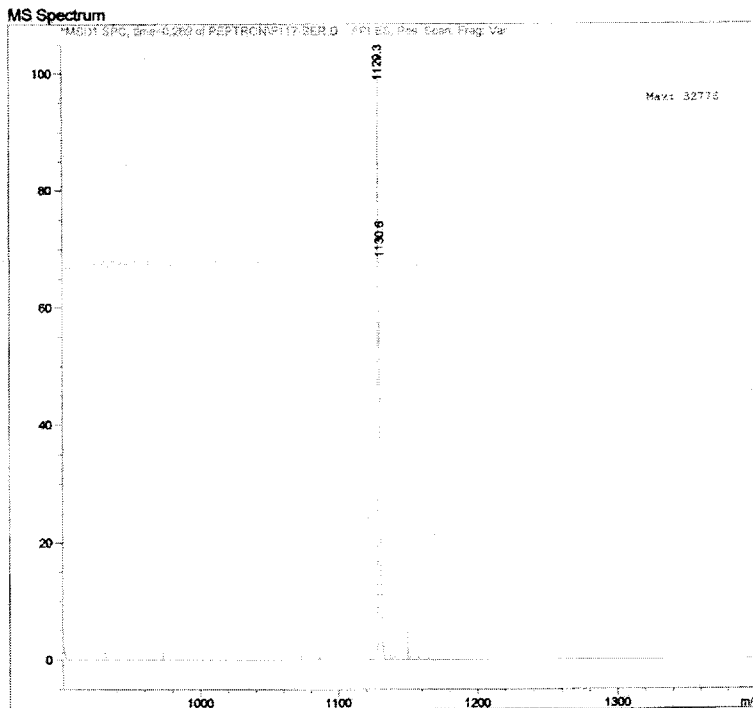
Fig. 16. HPLC elution profile of the synthetic N-terminal peptide of bPAP 2 to evaluate the purity of the synthetic peptide.

Print of window 80: MS Spectrum

=====
Injection Date : 2/16/04 2:12:27 PM
Sample Name : p117-ser Vial : FIA
Acq. Operator : KSD
Inj Volume : 7 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DIRECT.M
Last changed : 2/16/04 2:11:07 PM by KSD
(modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DIRECT.M
Last changed : 2/16/04 2:10:35 PM by KSD
(modified after loading)

Flow Injections :

Inj.	InjTime [min]	Vial	FIA Sample Name	Fragmentor [V]
1	0.000	2	p11701-11	120
2	1.105	3	p11702-11	120



Instrument 1 2/16/04 2:16:09 PM KSD

Page1 of 1

Fig. 17. MS spectrum of the synthetic N-terminal peptide of bPAP 2 to evaluate the purity of the synthetic peptide.

M

Individual Sample Report

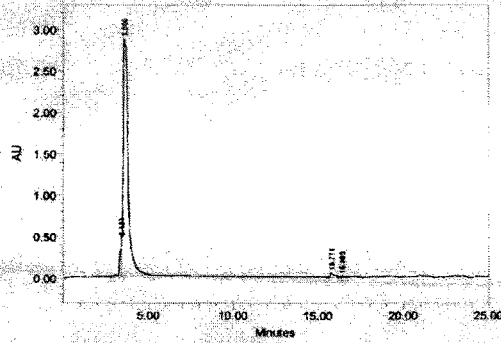
Reported by User: System

Project Name: s200402

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: p11702-11
Sample Type: Unknown
Vial: 35
Injection #: 1
Injection Volume: 100.00 μ l
Run Time: 40.0 Minutes
Sample Set Name: 0216

Acquired By: System
Date Acquired: 2004-02-16 오후 8:18:48
Acq. Method Set: method 500
Date Processed: 2004-02-17 오전 9:59:11
Processing Method: 1
Channel Name: 2487Channel 1
Proc. Chnl. Descr.: 214



Retention Time (min)	Area	% Area	Height
3.433	2854464	4.56	455360
8.600	58716184	93.39	2859690
15.771	1013803	1.61	54725
16.383	274785	0.44	15558

Report Method: peptron

Printed 오전 10:00:2004-02-17

Page: 1 of 1

Fig. 18. HPLC elution profile of the internal peptide of bPAP 2 to evaluate the purity of the synthetic peptide.

Print of window 80: MS Spectrum

Injection Date : 2/16/04 2:12:27 PM
Sample Name : p117-ser Vial : FIA
Acq. Operator : KSD Inj Volume : 7 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DIRECT.M
Last changed : 2/16/04 2:11:07 PM by KSD
(modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DIRECT.M
Last changed : 2/16/04 2:10:35 PM by KSD
(modified after loading)

Flow Injections :

Inj.	InjTime [min]	Vial	FIA Sample Name [V]	Fragmentor
1	0.000	2	p11701-11	120
2	1.105	3	p11702-11	120

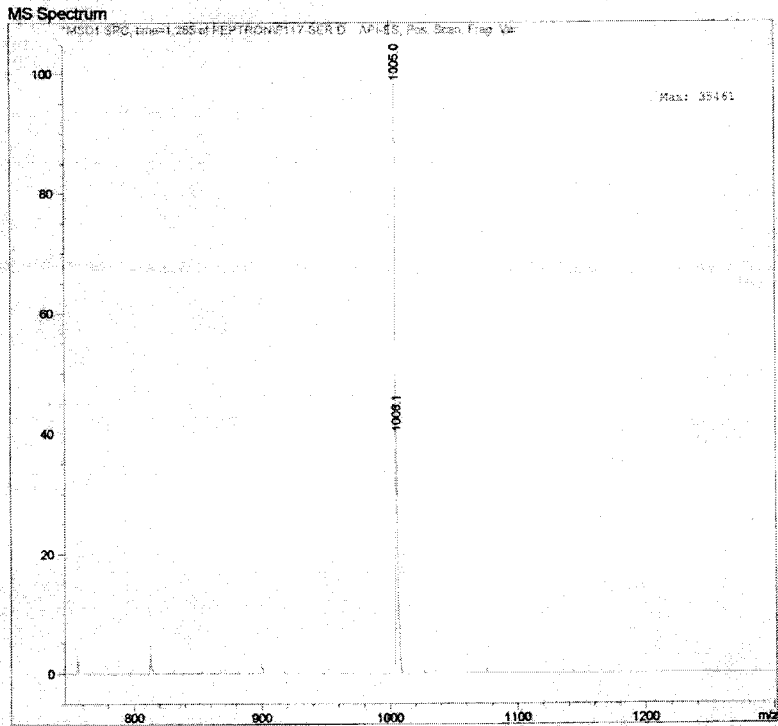


Fig. 19. MS spectrum of the internal peptide of bPAP 2 to evaluate the purity of the synthetic peptide.

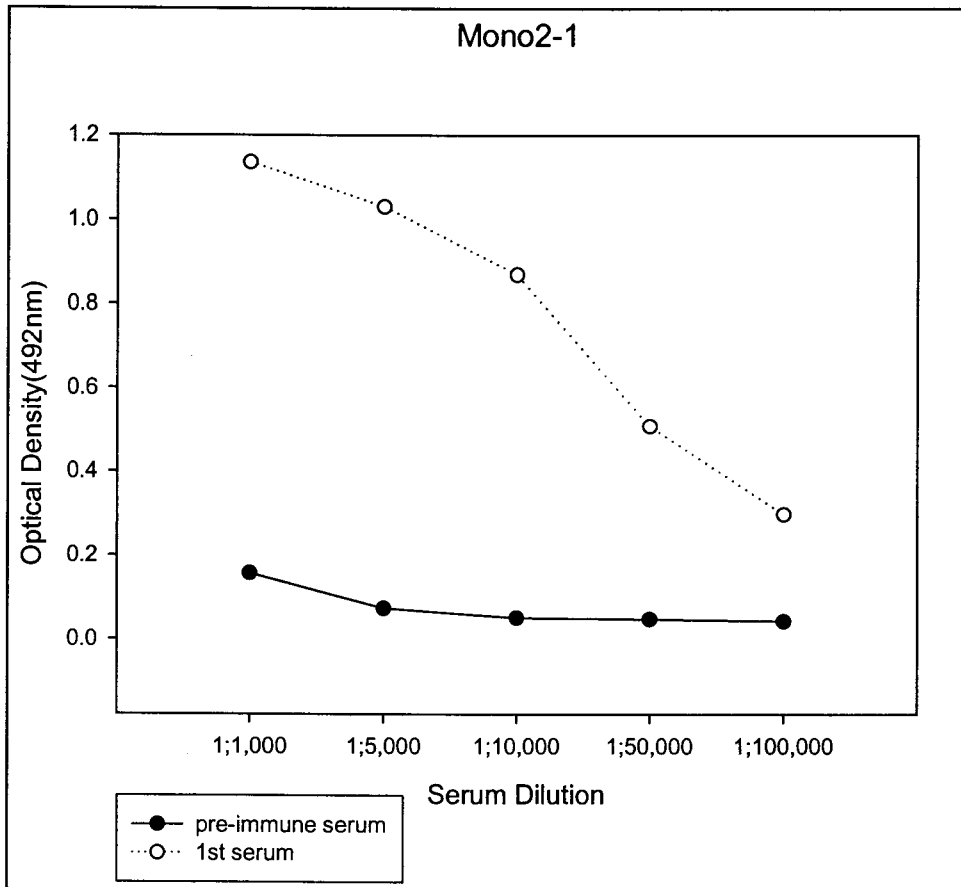


Fig. 20. Result of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test of rabbit R1 serum after first immunization with the N-terminal synthetic peptide of bPAP 2.

Dilution Fold	Pre-Immune	2nd-Immune
1/1,000	0.17	1.354
1/5,000	0.067	1.219
1/10,000	0.045	0.995
1/50,000	0.045	0.611
1/100,000	0.037	0.396

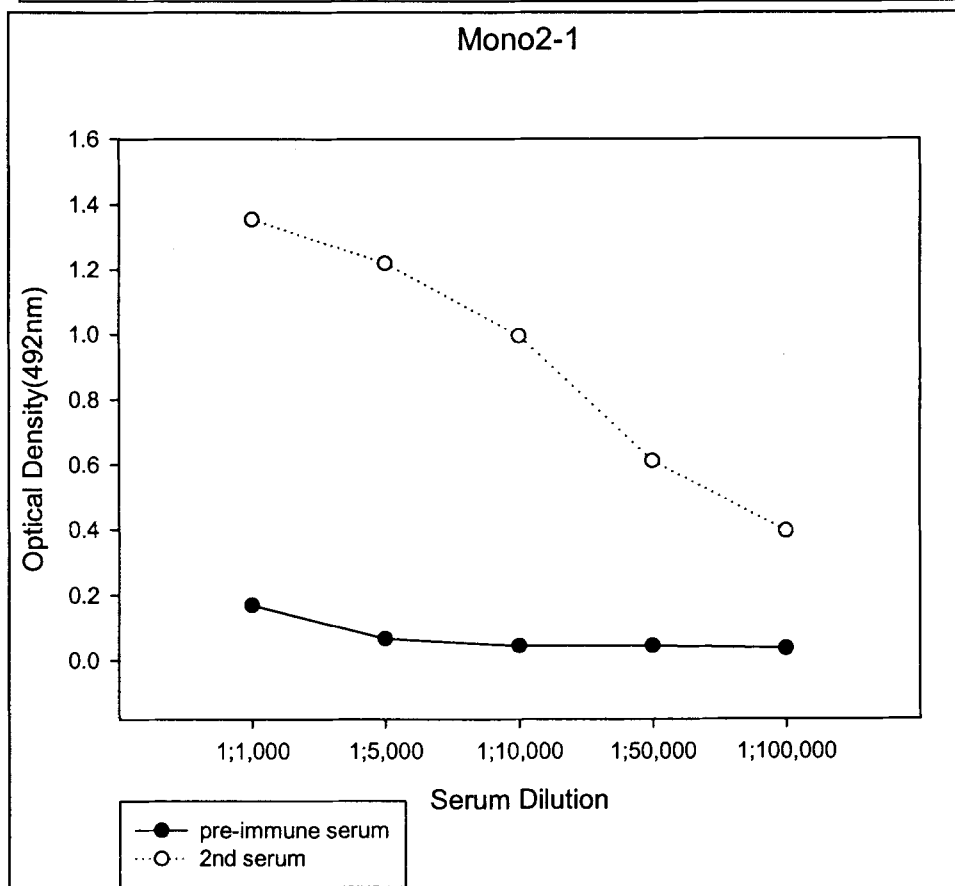


Fig. 21. Result of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test of rabbit R1 serum after second immunization with the N-terminal synthetic peptide of bPAP 2.

Dilution Fold	Pre-Immune	Final-immunized
1/1,000	0.373	1.298
1/5,000	0.138	1.180
1/10,000	0.082	1.066
1/50,000	0.052	0.733
1/100,000	0.044	0.505

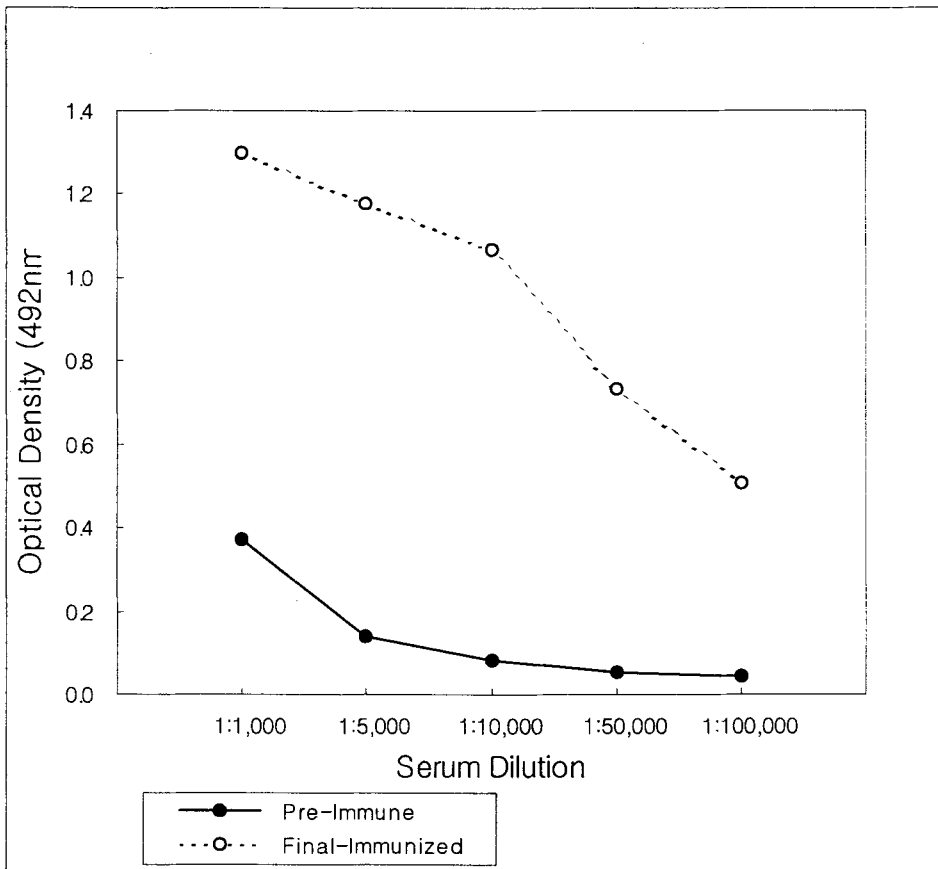


Fig. 22. Result of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test of rabbit R1 serum after third immunization with the N-terminal synthetic peptide of bPAP 2.

Dilution Fold	Pre-Immune	1st-Immunized
1/1,000	1.086	1.212
1/5,000	0.718	1.179
1/10,000	0.469	1.115
1/50,000	0.181	0.978
1/100,000	0.093	0.818

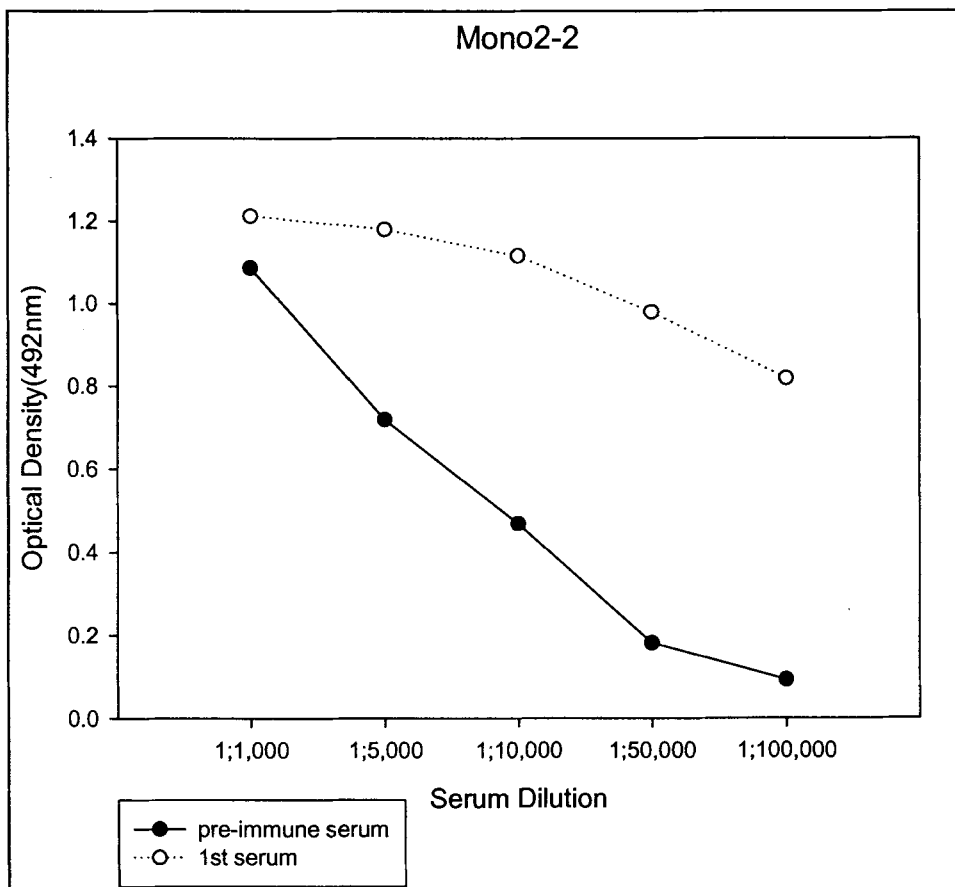


Fig. 23. Result of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test of rabbit R2 serum after first immunization with the internal synthetic peptide of bPAP 2.

Dilution Fold	Pre-Immune	2nd-Immunized
1/1,000	1.255	1.365
1/5,000	0.939	1.329
1/10,000	0.68	1.206
1/50,000	0.314	0.891
1/100,000	0.165	0.561

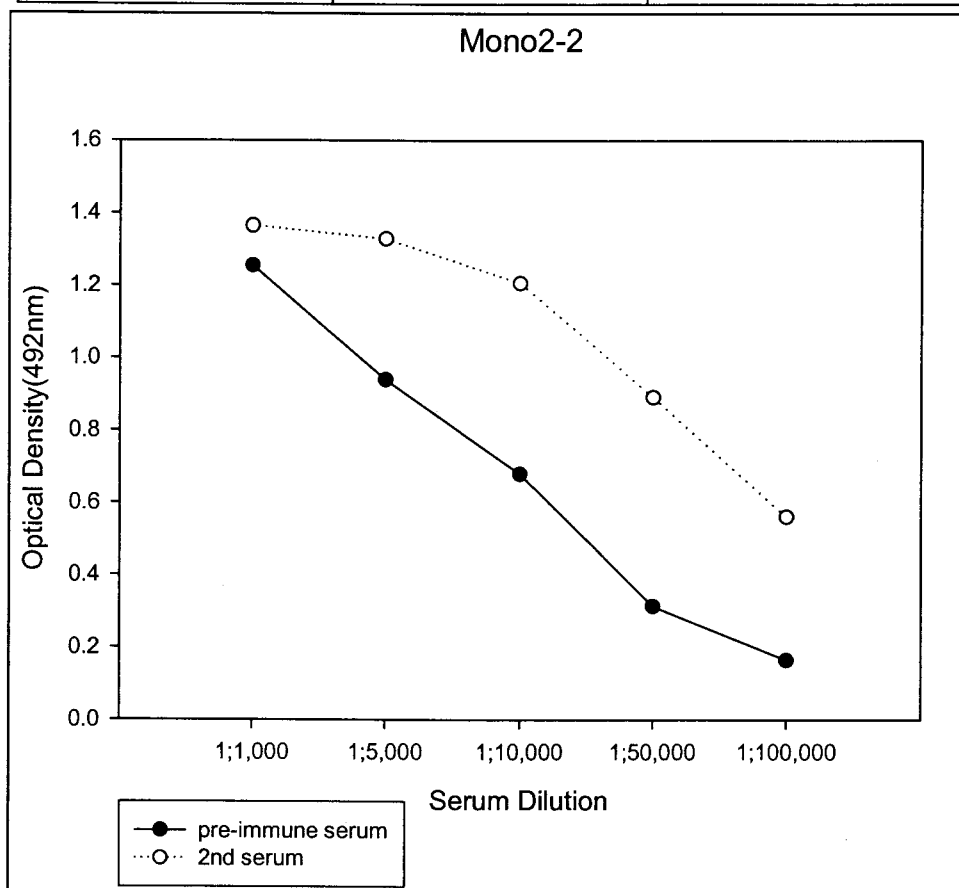


Fig. 24. Result of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test of rabbit R2 serum after second immunization with the internal synthetic peptide of bPAP 2.

Dilution Fold	Pre-Immune	Final-immunized
1/1,000	1.142	1.245
1/5,000	0.868	1.220
1/10,000	0.659	1.130
1/50,000	0.274	0.825
1/100,000	0.150	0.535

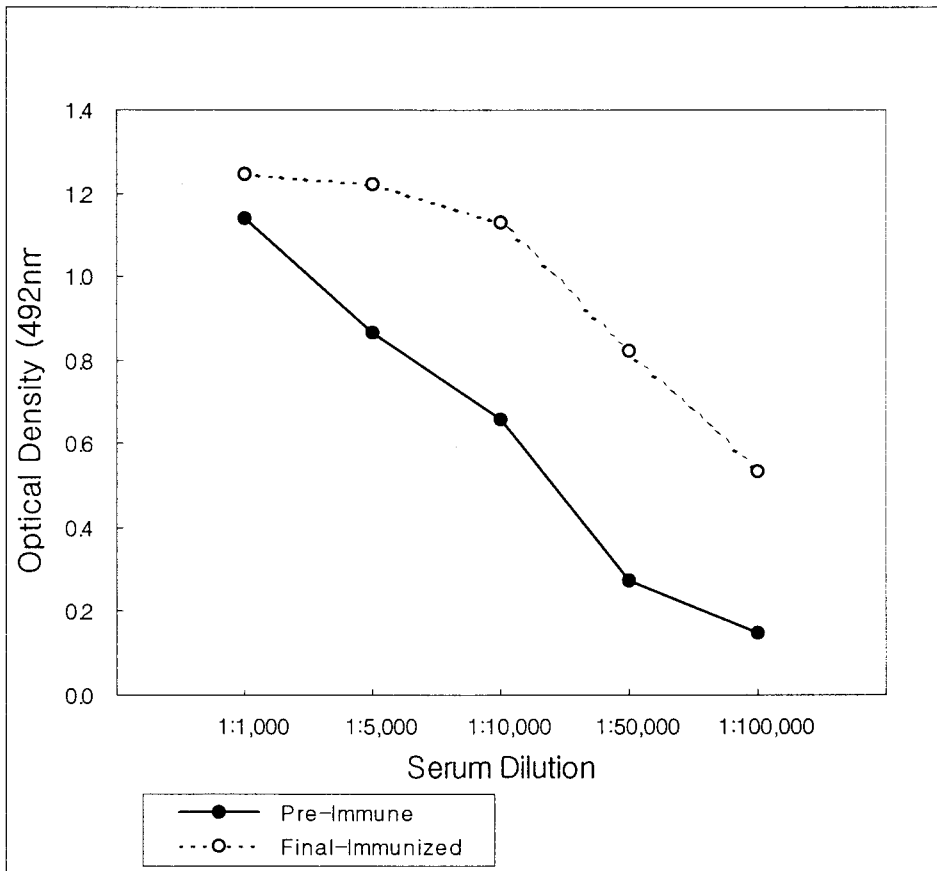


Fig. 25. Result of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test of rabbit R2 serum after third immunization with the internal synthetic peptide of bPAP 2.

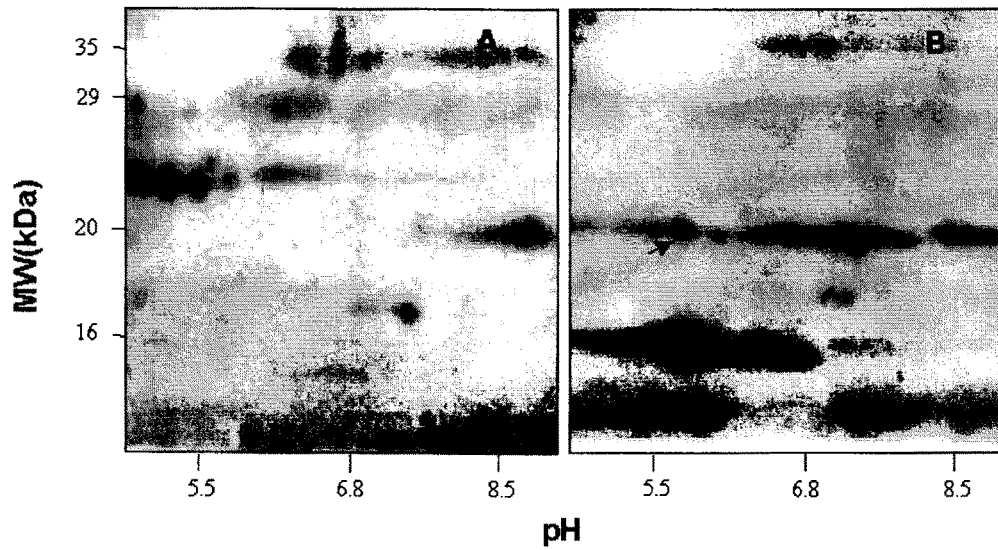


Fig. 26. Detection of pregnancy-associated protein 2 (bPAP 2) in the pregnant cow urine by Western blotting with the polyclonal antibody against the synthetic peptide. The cow #k30 (A) was non-pregnant and #k33 (B) was pregnant for 4 months at the time of sampling. The arrow indicates the bPAP 2.

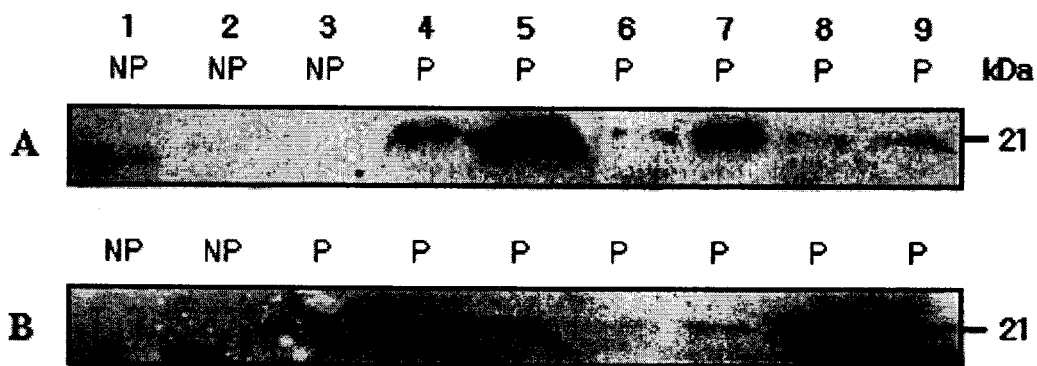


Fig. 27. Western blot analysis of pregnant and non-pregnant bovine urines. Urine were collected from two different farms (A and B) at different gestation periods: A; from 4P to 9P, the gestation period was 2, 4, 4, 5, 5, and 6 months, respectively. Likewise, B; from 3P to 9P, the gestation period was 3, 4, 7, 7, 3, 3, and 3 months, respectively. NP means urine samples from non-pregnant cows and P means urine samples from pregnant cows.

Table 10. Comparison of efficiency between progesterone level test and Western blot analysis of bPAP 2 protein for bovine pregnancy evaluation in pregnant and non-pregnant cow

Samle No.	Bovine ID No.	Progesterone level (ng/ml)	Western blot	Final result
1	98-730	10.44	O	Pregnant
2	98-709	13.45	O	Pregnant
3	97-704	0.73	X	Non-pregnant
4	97-704	0.66	X	Non-pregnant
5	98-621	13.47	O	Non-pregnant*
6	99-601	13.37	O	Pregnant
7	98-409	21.26	O	Pregnant
8	96-302	16.39	O	Pregnant
9	97-178	0.30	X	Non-pregnant
10	99-117	9.83	X	Pregnant**
11	97-112	15.22	O	Pregnant
12	30	6.87	X	Non-pregnant ^a
13	59-1	4.45	O	Pregnant
14	100	1.40	X	Non-pregnant
15	106	2.44	X	Non-pregnant
16	138	5.36	O	Pregnant
17	143-2	1.23	X	Non-pregnant
18	169	5.22	O	Pregnant
19	55-1	0.08	X	Non-pregnant
20	55-2	0.11	X	Non-pregnant
21	280	4.08	O	Pregnant
22	278-2	2.13	O	Pregnant

(*), a false result in both of tests ; (**), a false result in Western blot analysis ; (a), a false result in progesterone level test.

10. 소임신특이 단백질에 대한 monoclonal antibody 제조 및 Western blotting :

Spot #2 단백질(bPAP 2)과 매우 특이적으로 결합할 수 있는 monoclonal antibody를 제작하여 진단 Kit를 제조하면, 95% 이상의 정확도를 갖는 양질의 진단시약을 제조할 수 있을 것으로 기대된다. Monoclonal 항체 제조과정에 대해 Fig. 28에 개략적으로 도식화하였다.

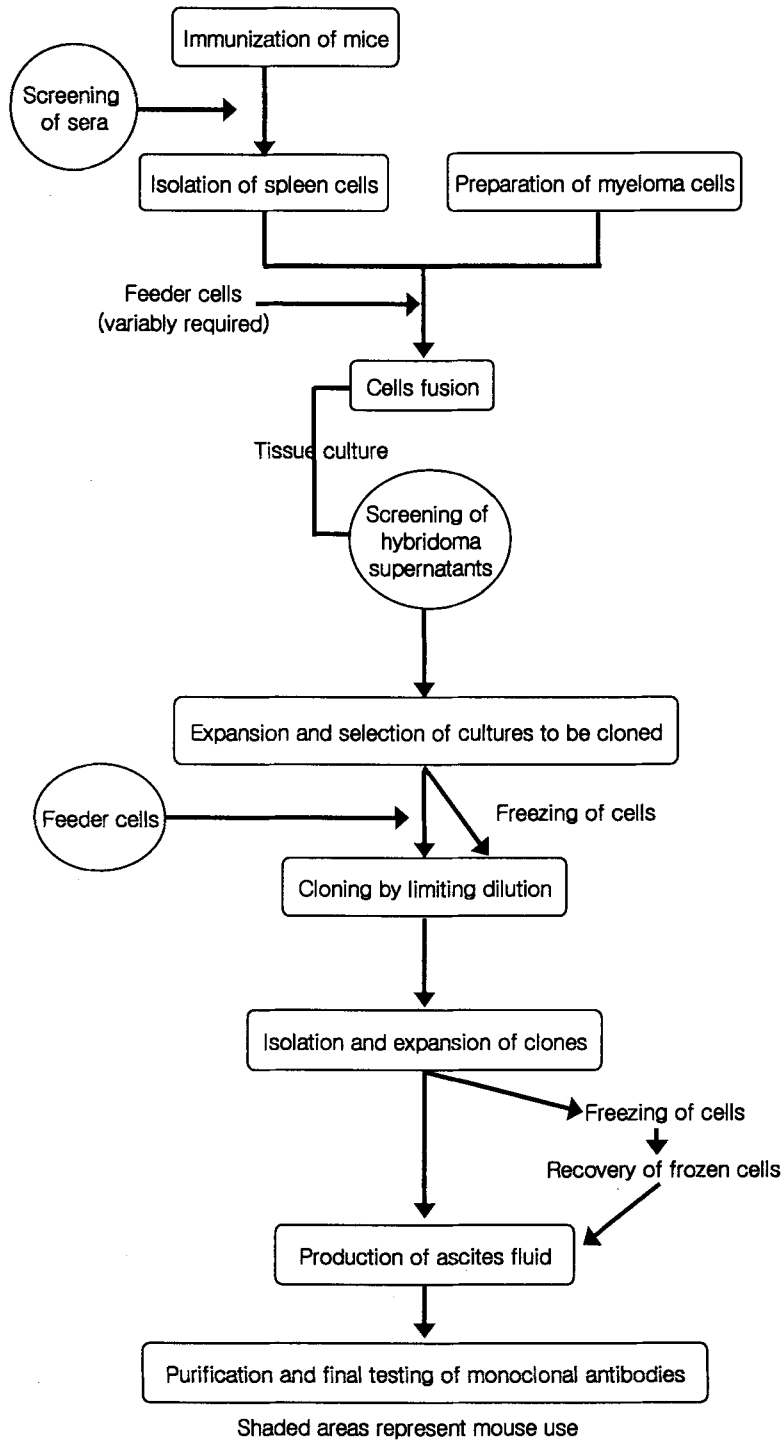


Fig. 28. A schematic diagram for the monoclonal antibody production in this research

가. Immunization 과정 :

Polyclonal antibody 제조를 위하여 미리 준비되어진 bPAP 2의 N-termianl 및 internal peptides에 대한 항원을 4 ~ 6주령 Balb/c mouse에 주사함으로써 immunization한다. 항원 주사 후 2-3주 간격으로 총 3차례의 boosting을 수행하여 혈청을 test하여 항원의 antigenicity를 결정하고, 혈청 내에 충분한 농도의 항체가 만들어졌을 때, mouse로부터 spleen을 얻어내어, myeloma cell과 융합을 준비하였다. 아래의 Table 11은 immunized mouse의 혈청에 대한 ELISA test 결과를 보여주고 있다. 이 결과는 시험된 항원에 대하여 항체가 잘 생성되고 있음을 나타내고 있다.

Table 11. Result of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test of mouse serum after immunization with the synthetic peptides of bPAP 2.

dilution \ mouse #	N-term-1	N-term-2	N-term-3	Int-1	Int-2	Int-3
1:100	1.797	1.955	1.83	1.89	1.841	1.846
1:1000	1.933	1.938	1.83	1.872	1.648	1.728
1:10000	1.855	1.835	1.758	1.715	0.741	0.854
negative c.	0.078	0.087	0.069	0.074	0.074	0.104

나. Fusion 과정 :

Serum test 결과로부터 immunity가 가장 높은 mouse를 사용하여 fusion하였다. 먼저 immunized mouse를 경추 탈골하여 죽인 뒤 충분히 소독 후 spleen을

상처 없이 깨끗하게 떼어 내었다. Tissue culture dish에서 배지에 담근 채 지방 조직 등을 제거하며 세척한 후, 세척된 spleen으로부터 splenocytes를 모은 후 connective tissue를 제거하고 적혈구를 분해하여 splenocytes를 깨끗하게 준비한다. 항체를 생산하는 splenocytes를 림프구 암세포 (myeloma)와 hybridoma를 형성하게 하여 무한 성장할 수 있도록 하였다. 불멸화된 myeloma는 8-azaguanine을 함유한 배지에서 자라게 함으로써 변형된 세포를 선별, 제거하고, 정상적인 세포를 선택하여 사용하였다. Polyethylene glycol (PEG) 내에서 splenocytes와 myeloma를 함께 원심분리하여 융합된 세포는 hypoxanthine aminopterin thymidine (HAT) 선별 배지에서 자라게 된다. 융합 후 약 20일에 ELISA 방법으로 hybridoma를 screening하였으며, 그 결과는 Table 12 ~ Table 13에 나타내었다.

Table 12. Result of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test of hybridoma cells after immunization with the N-terminal synthetic peptide of bPAP 2 to screen a specific monoclonal antibody

0.897	1.038	1.046	0.781	1.102	0.780	1.080	0.815	1.514 ¹	1.054	1.422 ²	1.545 ³
0.760	0.673	0.612	0.505	0.546	0.663	1.073	1.432 ⁴	1.194	1.008	1.164	1.370 ⁹
1.130	0.456	1.305 ⁶	1.401 ⁷	0.572	1.246 ⁸	0.713	0.724	0.091	0.690	0.995	1.247 ⁵
0.810	0.930	1.391 ¹⁰	0.923	1.423 ¹¹	0.731	1.411 ¹²	1.026	0.754	1.078	1.066	1.328 ¹³
1.525 ¹⁴	1.083	1.369 ¹⁵	0.762	0.941	0.988	1.449 ¹⁶	1.483 ¹⁷	1.303 ¹⁸	1.119	1.437 ¹⁹	1.428 ²⁰
1.525 ²¹	1.497 ²²	0.218	0.993	1.236 ²³	1.166	0.641	1.141	1.429 ²⁴	1.471 ²⁵	1.145	1.512 ²⁶
1.283 ²⁷	1.247 ²⁸	1.096	1.240 ²⁹	1.300 ³⁰	1.145	1.117	1.460 ³¹	1.508 ³²	0.993	0.913	0.088
1.289 ³³	1.520 ³⁴	1.378 ³⁵	1.267 ³⁶	1.372 ³⁷	1.083	1.192	1.392 ³⁸	1.401 ³⁹	0.983	1.310 ⁴⁰	0.559
0.749	1.040	0.935	0.508	0.787	0.750	0.840	1.229 ⁴¹	0.661	1.456 ⁴²	0.950	1.451 ⁴³
0.845	1.123	0.933	0.651	0.725	1.484 ⁴⁴	0.979	0.655	0.981	1.140	0.963	0.620
1.005	0.754	0.644	1.123	1.451 ⁴⁵	0.728	0.825	0.715	1.355 ⁴⁶	1.010	0.641	1.227 ⁴⁷
0.613	0.774	0.693	0.671	1.457 ⁴⁸	1.446 ⁴⁹	1.406 ⁵⁰	1.307 ⁵¹	0.842	0.797	0.596	0.526
0.947	1.458 ⁵²	0.947	0.586	0.618	1.197	1.315 ⁵³	1.292 ⁵⁴	0.888	1.347 ⁵⁵	0.763	0.881
0.932	0.962	1.019	1.324 ⁵⁶	0.906	0.850	1.443 ⁵⁷	1.455 ⁵⁸	1.319 ⁵⁹	1.144	0.750	0.507
1.099	1.112	0.786	1.454 ⁶⁰	1.170	1.189	1.408 ⁶¹	1.429 ⁶²	1.290 ⁶³	0.979	1.361 ⁶⁴	0.100
1.025	1.484 ⁶⁵	1.380 ⁶⁶	1.096	1.457 ⁶⁷	0.998	1.456 ⁶⁸	1.311 ⁶⁹	1.005	1.417 ⁷⁰	1.444 ⁷¹	0.478

*, Upper numbers denote the designated number of clones to be selected and stored in liquid nitrogen.

Table 13. Result of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test of hybridoma cells after immunization with the internal synthetic peptide of bPAP 2 to screen a specific monoclonal antibody

0.251	0.778 ¹	0.284	0.243	0.399	0.574	0.324	0.493	0.520	0.901 ²	0.554	1.342 ³
0.239	0.500	0.458	0.788 ⁴	0.388	0.383	0.382	0.482	0.399	0.430	0.424	0.484
0.293	0.320	0.353	0.554	0.443	0.523	0.368	0.288	0.461	1.543 ⁵	0.206	0.445
0.040	0.278	0.392	0.304	0.497	0.309	0.374	0.438	0.531 ¹	0.270	0.373	0.321
0.356	0.782 ⁶	0.246	0.360	0.587	0.378	0.499	0.320	0.588	0.604	0.270	0.312
0.892 ⁷	1.352 ⁸	0.372	0.292	0.363	0.433	0.499	0.706 ⁹	0.529	0.349	0.420	0.364
0.440	0.526	0.324	0.353	0.942 ¹⁰	0.585	0.401	0.969 ¹¹	0.678 ¹²	0.564	0.248	0.708 ¹³
0.271	0.234	0.255	0.416	0.834 ¹⁴	0.619	0.478	0.452	0.962 ¹⁵	0.290	0.266	1.499 ¹⁶
0.435	0.225	0.424	0.420	0.412	0.298	0.252	0.288	1.256 ¹⁷	0.747 ¹⁸	0.387	0.236
0.213	0.503	0.366	0.312	0.248	0.358	0.219	0.320	0.126	0.354	0.349	0.161
0.355	0.355	0.980 ¹⁹	0.419	0.336	0.274	0.867	0.344	0.218	0.287	0.226	0.148
0.259	0.336	0.284	0.739 ²⁰	0.332	0.895 ²¹	0.429	0.349	0.262	0.380	0.254	0.194
0.527	0.300	0.537	0.258	0.421	0.755 ²²	0.331	0.317	1.291 ²³	0.323	0.163	0.200
0.223	0.771 ²⁴	0.345	0.167	0.275	0.404	0.649	0.357	0.347	0.372	0.290	0.215
0.482	0.470	1.099 ²⁵	0.674	0.278	0.606	0.537	0.578	0.396	0.357	0.275	0.167
0.265	0.446	1.135 ²⁶	0.525	0.367	1.433 ²⁷	0.268	0.517	0.225	0.100	0.284	0.225

*, Upper numbers denote the designated number of clones to be selected and stored in liquid nitrogen.

다. Cloning 과정 :

ELISA test 결과, N-terminal과 internal 각각에서 수치가 높은 4 clones을 선별하여 cloning하였다 (Table 14). 'Limiting dilution' 방법으로 cloning을 수행하여 단일 clone임을 확인한 후, culture를 통해 그 세포를 확장하여 단일 clone인 hybridoma를 선택한다.

Table 14. Result of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test of hybridoma cells after cloning process of selected clones which were previously immunized by N-terminal peptide (A) and internal peptide of bPAP 2 (B), respectively, to screen a specific monoclonal antibody

(A)

N-terminal

Clone name	3E12	32F6	48E2	62F8
culture sup.(원액)	1.534	1.463	1.434	1.45
1/2	1.504	1.427	1.423	1.452
1/4	1.459	1.43	1.439	1.468
1/8	1.48	1.436	1.452	1.427
1/16	1.424	1.421	1.452	1.37
1/32	1.476	1.435	1.446	1.395
1/64	1.427	1.41	1.401	1.4
PBS (negative control.)	0.066	0.057	0.057	0.057
Isotyping	IgG2b, k	IgG1, k	IgG2b, k	IgG2b, k

(B)

Internal

Clone name	5F1	8F4	16B5	23H7
culture sup.(원액)	1.548	1.684	1.479	1.51
1/2	1.537	1.705	1.466	1.496
1/4	1.533	1.625	1.458	1.499
1/8	1.543	1.502	1.41	1.21
1/16	1.518	1.331	1.361	1.307
1/32	1.509	1.1	1.232	1.014
1/64	1.501	0.833	0.975	0.695
PBS (negative control.)	0.061	0.053	0.052	0.065
Isotyping	IgG2b, k	IgG3, k	IgG2b, k	IgG2b, k

*, The red boxes denote the finally selected clones for the mass production of bPAP 2-specific monoclonal antibodies.

라. 복수제작 및 monoclonal antibody 정제 :

최종 선택된 bPAP 2의 N-terminal sequence에 특이적인 monoclonal antibody를 생성하는 32F6 clone과 internal sequence 특이적인 5F1 clone을 각각 분리한 후, 5 마리의 mouse로부터 복수(腹水)를 제작하였다. 얻어진 복수로부터 두 종류의 monoclonal 항체 즉 Mono-1, Mono-2를 protein G로 정제하였으며, 그 결과를 Fig. 29 ~ Fig. 32에 나타내었다. 이 결과에 의하면 bPAP 2의 두 clone, 즉 32F6과 5F1으로 생산된 monoclonal antibody가 각각 5mg/ml의 농도로 6ml씩 총 30mg의 양으로 순수 정제되었음을 보여주고 있다. 이상에서 정제된 monoclonal antibody를 이용하여 소의 오줌에 존재하는 bPAP 2 단백질에 대한 특이적 감지능력을 평가하기 위하여 ELISA test와 Western blotting을 수행하였다(Table 15, Fig. 33). Table 15의 ELISA test 결과를 보면 Mono-1과 Mono-2는 희석배율을 높여도 계속 높은 값을 유지하였으며, 특히 Mono-1은 100,000배 희석까지도 원액과 비슷한 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 이 결과는 생산된 두 종류의 monoclonal antibody가 bPAP 2에 매우 특이적으로 반응한다는 것을 보여주는 것이다. 또한 Fig. 33의 Western blotting 분석 결과에서 보여주는 바와 같이 monoclonal antibody를 사용하면 이전에 보여준 polyclonal antibody를 사용했을 때(Fig. 26)의 결과에 비해 background가 거의 없을 뿐만 아니라 비특이적 bands도 거의 없음을 알 수 있다. 이상의 결과들을 종합하면 제작된 monoclonal antibody가 bPAP 2와의 결합에 있어서 polyclonal antibody 보다 훨씬 뛰어난 특이성과 감지 능력을 갖고 있다는 것을 알 수 있다. 결론적으로 본 연구를 통하여 제조된 monoclonal antibody를 이용하면 기존의 다른 방법에 비해 훨씬 우수하고, 간편하며, 고감도의 소임신특이 진단 Kit를 제작할 수 있는 것으로 평가된다.

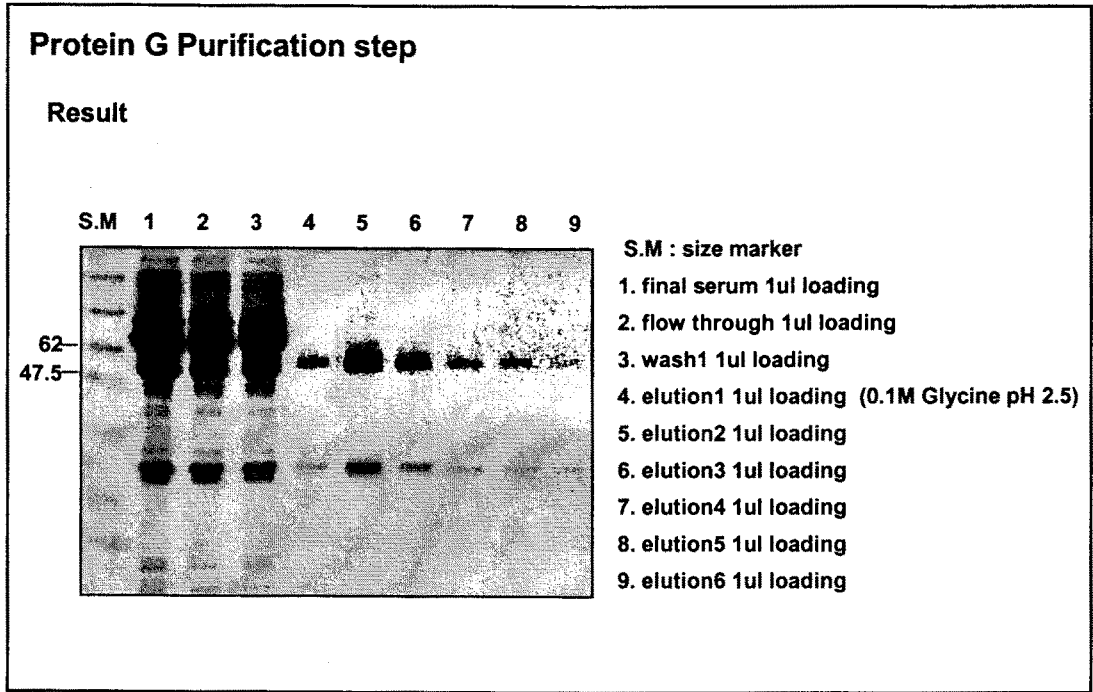


Fig. 29. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electroresis) pattern of a bPAP 2-specific monoclonal antibody Mono-1, which was produced from 32F6 clone, during protein G purification step.

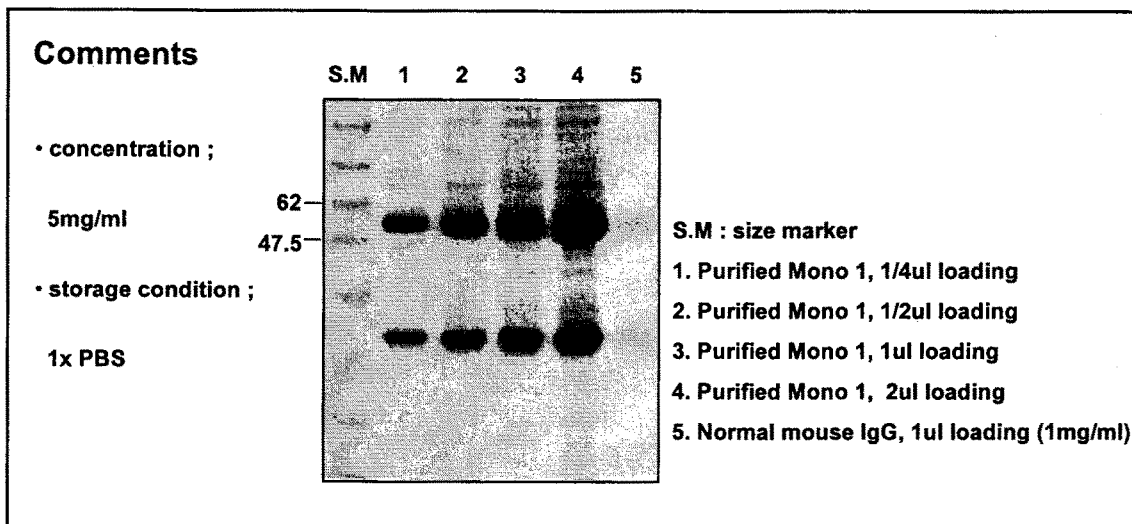


Fig. 30. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) pattern of a purified bPAP 2-specific monoclonal antibody Mono-1, which was immunized with N-terminal peptide of bPAP 2 and produced from 32F6 clone.

Protein G Purification step

Result

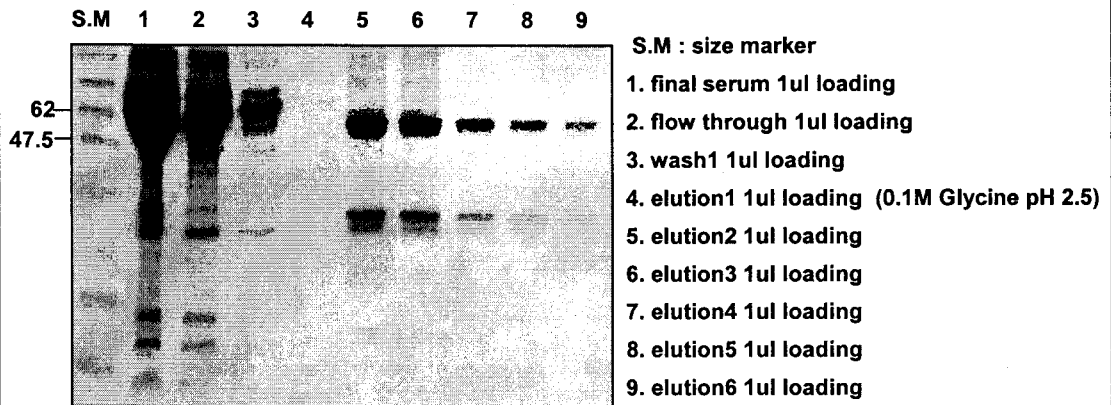


Fig. 31. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) pattern of a bPAP 2-specific monoclonal antibody Mono-2, which was produced from 5F1 clone, during protein G purification step.

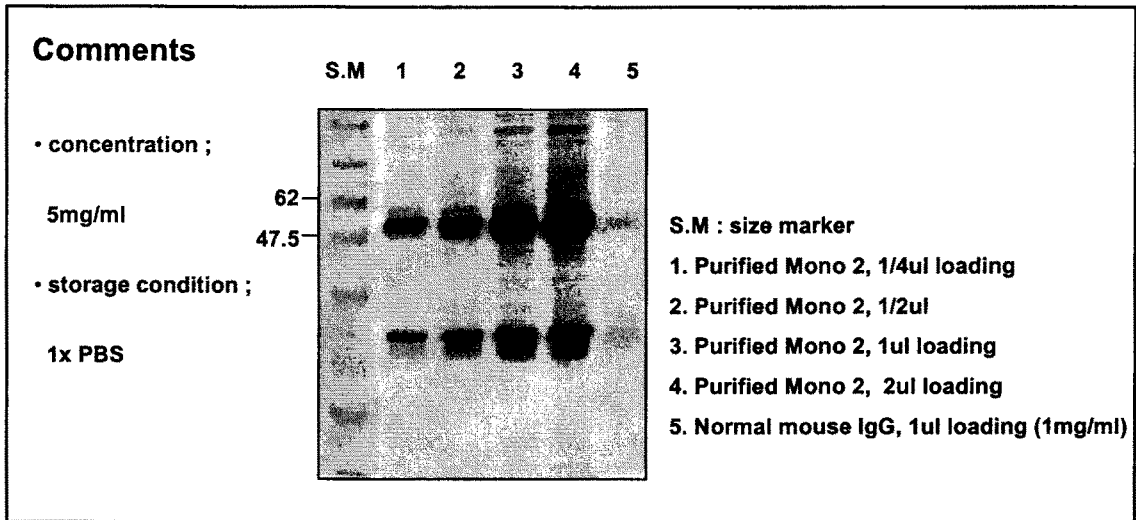


Fig. 32. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electroresis) pattern of a purified bPAP 2-specific monoclonal antibody Mono-2, which was immunized with internal peptide of bPAP 2 and produced from 5F1 clone.

Table 15. Result of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test of two kinds of monoclonal antibodies which were specific to bPAP 2

Dilution \ Monoclonal antibody	Mono-1*	Mono-2**
Negative control	0.067	0.068
1 : 100	1.523	1.560
1 : 1,000	1.455	1.509
1 : 5,000	1.462	1.270
1 : 10,000	1.477	1.113
1 : 50,000	1.443	0.407
1 : 100,000	1.423	0.265

*, Mono-1 was a bPAP 2-specific monoclonal antibody binding to the N-terminal sequence of the target protein.

**, Mono-2 was a bPAP 2-specific monoclonal antibody binding to the internal sequence of the target protein.

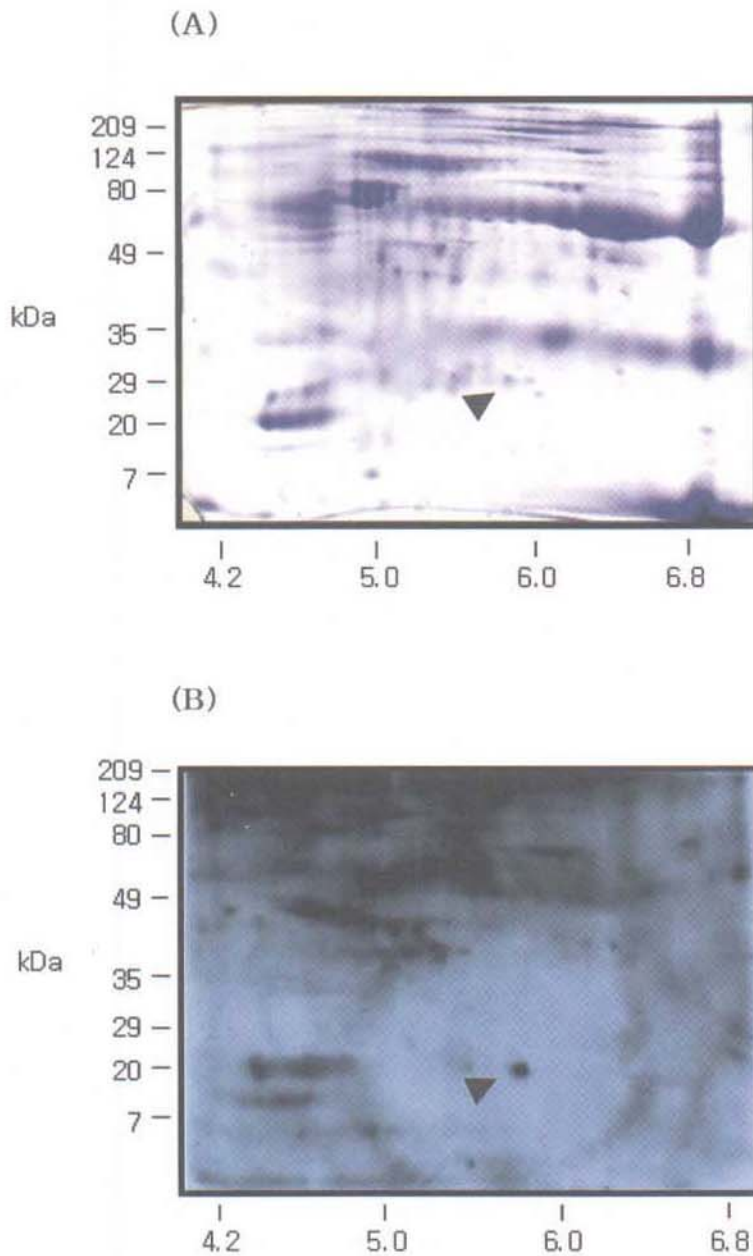
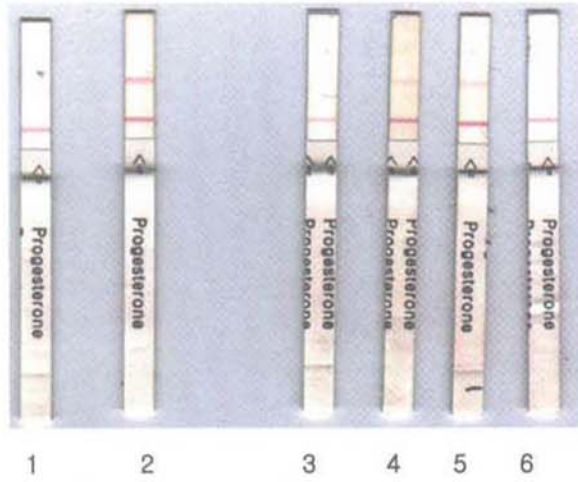


Fig. 33. Comparison of normal 2-D gel (A) and Western blot analysis of the pregnant bovine urine sample incubated with Mono-1 monoclonal antibody as a primary antibody and anti-rabbit antibody as a second one.

11. 소의 임신진단용 Kit의 성능검정 :

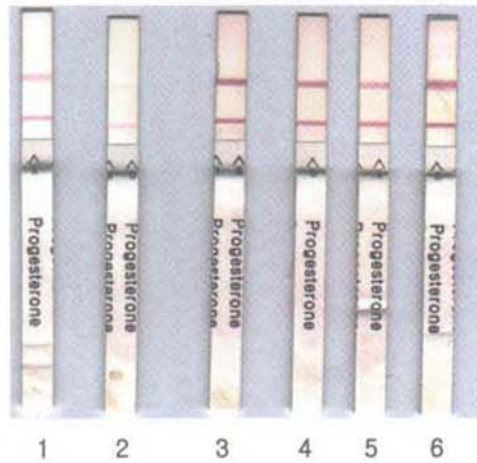
본 연구와의 직접적 비교를 위하여 국내에서 개발된 임신진단용 Kit의 성능검정을 실시하였다. 이를 위해 (주)녹십자에서 개발, 판매되고 있는 progesterone에 대한 면역적 chromatographic 진단 Kit를 이용한 임신소 및 비임신소의 판별과 분석 방법의 정확성을 평가하였다. 현재까지 국내외에서 개발된 모든 진단 Kit는 progesterone을 이용한 정성방법으로서 분석결과 Fig. 34에서 보여주는 바와같이 임신소의 판정에서는 약 20% 정도가 판독이 어려웠으며, 비임신소의 경우 약 40% 정도가 판독이 어려웠다. 따라서 전체적으로 약 30%가 판독이 어려운 것으로 나타나 기존의 진단시약이 아직까지 specificity의 문제점을 안고 있음을 알 수 있다. 이에 비해 본 연구팀이 개발한 소 임신특이 단백질의 peptide를 이용하여 제조한 polyclonal antibody 및 monoclonal antibody는 최소 90% 이상의 specificity를 보여 줌으로써 보다 특이성이 높은 Kit를 개발할 가능성이 매우 큼을 알 수 있다.

A



비 임신 소

B



임신 소

Fig. 34. Pregnancy tests by using progesterone-based diagnostic Kit made from Green Cross Life Science Co. Ltd., Korea.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 연구개발의 최종목표

본 연구에서는 소의 오줌에 대한 proteomics 연구를 통하여 소의 임신특이 유전자를 발굴함으로써 이를 이용한 polyclonal antibody 및 monoclonal antibody를 제조하여 궁극적으로 소임신특이 진단 Kit를 개발하여 이를 실용화 하는데 그 목적이 있다.

제 2절. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도
	착 안 사 항
1차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정상소, 임신소의 오줌단백질 분리 여부 ○ 정상소, 임신소의 오줌단백질에 대한 proteomic map 작성 및 특이단백질 선발 여부 ○ 특이단백질의 mass spectrometry 분석 여부 ○ 특이단백질의 amino acid microsequencing 분석 여부
2차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 임신소의 오줌단백질 분리 여부 ○ 임신소의 오줌단백질에 대한 proteomic map 작성 및 특이단백질 선발 여부 ○ 특이단백질의 mass spectrometry 분석 여부 ○ 특이단백질의 amino acid microsequencing 분석 여부 ○ 소의 오줌단백질의 protein fingerprint database 구축 여부
3차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 임신특이 유전자의 cloning 및 선발 여부 ○ 임신특이 유전자의 대량 발현 및 발현단백질의 분리 여부 ○ 임신특이 단백질에 대한 항체 생산 여부 ○ 면역학적 방법에 의한 임신 특이 진단 Kit 개발 여부
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정상소, 임신소의 오줌단백질에 대한 proteomic map 작성 여부 ○ 임신특이 단백질 선발 및 유전자 cloning 여부 ○ 면역학적 방법에 의한 진단 Kit 개발 여부

제 3절. 연구개발 목표의 달성도

1. 제 1차년도 :

제 1차년도의 연구에서는 계획한 연구목표를 완전히 달성하였다고 평가된다. 구체적인 목표달성 내용은 아래와 같다.

가. 정상소, 임신소의 오줌단백질 분리 여부 : 본 연구팀은 경북대, 영남대, 서울대, 군위군의 일반농가 목장에서 사양관리중인 56두의 Holsteins 젖소를 각각 임신소 및 비임신소로 구분하여 임신기간별로 오줌시료를 50회 이상 채취하였다. 이와같이 채취한 오줌시료를 불순물을 제거한 후 30 ~ 50% 범위의 ammonium sulfate 로 오줌단백질을 분리 및 농축하였다. 농축된 오줌단백질의 최종농도는 약 5.0mg/ml이었으며, 이 단백질을 임신, 비임신 여부 및 임신기간별, 목장별로 구분하여 Isoelectric focusing 방법과 2-Dimensional gel electrophoresis 분석을 실시하여 반복성 높은 단백질 분리 및 확인방법을 성공적으로 확립하였다.

나. 정상소, 임신소의 오줌단백질에 대한 proteomic map 작성 및 특이단백질 선발여부 : 본 연구팀은 2-D gel 분석결과를 이용하여 PDQUEST(Bio-Rad, USA) program으로 image analysis를 수행하여 비임신소 및 임신소에 대한 proteomic map을 완성하였으며 약 140종류의 protein spots을 확인할 수 있었다. 이 중에서 비임신소에 비해 임신소에서 특이적으로 양이 증가하는 10개의 spots(#2, #5, #6, #9, #10, #12, #13, #15, #16, #17) 및 오히려 양이 감소하는 2개의 spots(#8, #11)을 임신특이 단백질로서 최종 확인하였다. 그 중에서도 특히 분자량 20,000 Da과 6.2의 pI값을 갖는 spot #2가 임신중 가장 뚜렷한 양의 증가를 보였다. 이 임신 특이 단백질을 bovine pregnant associated protein 2 (bPAP 2)라 명명하였다.

다. 임신특이단백질의 mass spectrometry 분석 여부 : 적어도 30 두의 임신 및 비임신소의 오줌단백질을 2-D gel로 분석하여 반복성 있게 나타나는 단백질들을 중심으로 peptide mass fingerprint 방법으로 각 단백질들의 성질을 규명하였다. MALDI-TOF mass spectrometry를 이용하여 peptide mass fingerprinting을 하

기 위해서는 일단 정확한 mass data를 얻는 것이 중요하다. 본 연구팀은 여러 차례의 시행착오를 통해 MALDI-TOF mass spectrometry 사용조건을 최적화하였으며, 최적화된 실험조건에서 얻은 peptide mass 값을 가지고 database를 검색하여 본 연구에서 선발한 임신소의 오줌단백질들의 성질을 규명하였다. MALDI-TOF mass spectrometry 분석결과 각 spot의 pI 값과 분자량을 고려하여 분석결과 얻은 data 중에서 가장 가능성이 높은 단백질들을 선발하였다. 완성된 2-D image에 나타난 protein spot의 갯수는 개체별로 다소간의 차이를 보였으나 약 140개 정도였다. 각 spot을 gel로부터 잘라낸 후, MALDI-TOF을 이용하여 각 단백질을 확인하여 지금까지 총 140개 spot 중에서 72개 spot의 단백질을 최종 확인하였다. 특히 임신특이적으로 증가하는 10종의 단백질과 감소하는 2종의 단백질에 대한 분석은 이미 완료하였으며, 각각의 단백질들을 성공적으로 확인하였다.

라. 특이단백질의 amino acid microsequencing 분석 여부 : 임신특이 단백질 중 특이성이 가장 높은 #2 (bPAP 2)에 대하여 N-terminal 아미노산 서열분석을 통한 microsequencing을 수행하였다. 그 결과 이 단백질의 N-terminal 아미노산 서열은 D-S-X-L-A-G-P-P-G-A-D로 밝혀졌다. 이 결과를 BLAST search로 비교했을 때 일치하는 단백질이 발견되지 않았다. 이와같은 결과는 mass spectrometry 분석결과에서도 확인되었다. 따라서 #2 (bPAP 2)는 소에서 임신특이적으로 발견되는 새로운 단백질인 것으로 판단된다.

2. 제 2차년도 :

제 2차년도의 연구에서는 계획한 연구목표를 완전히 달성하였다고 평가된다. 구체적인 목표달성 내용은 아래와 같다.

가. 정상소, 임신소의 오줌단백질 분리 여부 : 본 연구팀은 1차년도에 계속하여 경북대, 영남대, 군위군의 일반농가 목장에서 사양관리중인 54두의 Holsteins 젖소를 각각 임신소 및 비임신소로 구분하여 임신기간별로 오줌시료를 70회 이상 채취하였다. 이와같이 채취한 오줌시료를 불순물을 제거한 후 30 ~ 50% 범위의

ammonium sulfate로 오줌단백질을 분리 및 농축하였다. 농축된 오줌단백질의 최종농도는 약 5.0mg/ml이었으며, 이 단백질을 임신, 비임신 여부 및 임신기간별, 목장별로 구분하여 Isoelectric focusing 방법과 2-Dimensional gel electrophoresis 분석을 실시하여 반복성 높은 단백질 분리 및 확인 실험을 성공적으로 수행하였다.

나. 정상소, 임신소의 오줌단백질에 대한 proteomic map 작성 및 특이단백질 선발여부 : 본 연구팀은 2-D gel 분석결과를 이용하여 PDQUEST program으로 image analysis를 수행하여 비임신소 및 임신소에 대한 proteomic map을 완성하였으며 약 140종류의 protein spots을 확인할 수 있었다. 이 중에서 비임신소에 비해 임신소에서 특이적으로 양이 증가하는 10개의 spots 및 오히려 양이 감소하는 2개의 spots을 임신특이 단백질로서 최종 확인하였다. 그 중에서도 특히 분자량 20 KDa과 6.2의 pI값을 갖는 spot #2가 임신중 가장 뚜렷한 양의 증가를 보였다. 이 임신 특이단백질을 bPAP 2라 명명하였으며, 이 단백질은 다른 목장에서 사육중인 소의 오줌에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

다. 임신특이단백질의 mass spectrometry 분석 여부 : 적어도 50 두의 임신 및 비임신소의 오줌단백질을 2-D gel로 분석하여 반복성 있게 나타나는 단백질들을 중심으로 peptide mass fingerprint 방법으로 각 단백질들의 성질을 규명하였다. MALDI-TOF mass spectrometry를 이용하여 peptide mass fingerprinting을 하기 위해서는 일단 정확한 mass data를 얻는 것이 중요하다. 본 연구팀은 최적화된 실험조건에서 얻은 peptide mass 값을 가지고 database를 검색하여 본 연구에서 선발한 임신소 및 비임신소의 오줌단백질들의 성질을 규명하였다. MALDI-TOF mass spectrometry 분석결과 각 spot의 pI 값과 분자량을 고려하여 분석결과 얻은 data 중에서 가장 가능성이 높은 단백질들을 선발하였다. 완성된 2-D image에 나타난 protein spot의 갯수는 개체별로 다소간의 차이를 보였으나 약 140개 정도였다. 각 spot을 gel로부터 잘라낸 후, MALDI-TOF를 이용하여 각 단백질을 확인하여 지금까지 총 140개 spot 중에서 74개 spot의 단백질을 최종 확인하였다. 특히 임신특이적으로 증가하는 10종의 단백질과 감소하는 2종의 단백질에 대한 분석은 이미 완료하였으며, 각각의 단백질들을 성공적으로 확인하

였다. 또한 보다 많은 peptide sequencing을 위해 Q-TOF MS의 방법을 이용하기 위하여 ESI-TOF MS실험과 Q-TOF MS/MS 실험을 실행하였다. 이 방법을 이용하여 spot #2의 peptide 서열을 새로이 밝힐 수 있었으며, 이것은 각각 V-L-G-A-G-Q-P-L-P과 E-L-E-L-V-G-G-G-S-A-Q로 확인되었다.

라. 특이단백질의 amino acid microsequencing 분석 여부 : 임신특이 단백질 중 특이성이 가장 높은 #2 spot (bPAP 2)에 대하여 N-terminal 아미노산 서열분석은 1차년도에 완성하였다. 2차년도에는 임신특이단백질에 대한 보다 자세한 아미노산 배열정보를 얻기 위하여 internal amino acid sequencing을 수행하였다. 이를 위해서 2D-gel로부터 많은 양의 #2 단백질 spot을 얻어서 tryptic digestion 후 HPLC로 각각의 peptide를 분리하여 peptide sequencing을 수행하였다. 그 결과 L-R-R-E-E-S-E-K 및 V-W-L-E-S-K-K 2개의 새로운 internal sequence data를 성공적으로 확보하였다. 그러나 이 단백질의 internal 아미노산 서열을 BLAST search로 비교했을 때 일치하는 단백질이 발견되지 않았다. 따라서 bPAP는 소에서만 임신특이적으로 발현되는 새로운 단백질인 것으로 판단된다.

마. 소의 오줌단백질의 protein fingerprint database 구축 여부 : 2-D gel 분석을 통해 선발된 임신특이 단백질들과 일반적으로 나타나는 오줌단백질들의 protein mass fingerprint database 구축을 위해 각 spot을 분리하여 mass spectrometry 분석을 수행하였다. 그 결과 12종의 임신특이 단백질 및 18종의 일반 오줌단백질에 대한 protein mass fingerprint database를 성공적으로 구축하였다.

3. 제 3차년도 :

제 3차년도의 연구에서는 계획한 연구목표를 90% 이상 달성하였다고 평가된다. 구체적인 목표달성 내용은 아래와 같다.

가. 정상소, 임신소의 오줌단백질 분리 여부 : 본 연구팀은 1, 2차년도에 계속하여 경북대, 영남대, 군위군의 일반농가 목장에서 사양관리중인 54두의 Holsteins 젖소

를 각각 임신소 및 비임신소로 구분하여 임신기간별로 오줌시료를 100회 이상 채취하였다. 이와같이 채취한 오줌시료를 불순물을 제거한 후 30 ~ 50% 범위의 ammonium sulfate로 오줌단백질을 분리 및 농축하였다. 농축된 오줌단백질의 최종농도는 약 5.0mg/ml이었으며, 이 단백질을 임신, 비임신 여부 및 임신기간별, 목장별로 구분하여 Isoelectric focusing 방법과 2-Dimensional gel electrophoresis 분석을 실시하여 반복성 높은 단백질 분리 및 확인 실험을 성공적으로 수행하였다.

나. 임신특이 단백질에 대한 polyclonal antibody 제조 및 특이성 검정 여부 : 본 연구팀은 polyclonal antibody 제조 및 진단 Kit의 성능검정에 대한 연구를 수행하여 성공적인 연구결과를 얻었다. 1, 2차년도 연구를 통하여 확보한 임신특이 단백질 spot #2 protein의 peptides에 대한 아미노산 sequence를 이용하여 합성 peptide를 만들었으며, 이 peptide를 토끼에 주사하여 polyclonal 항체를 성공적으로 제작하였다. 이 항체를 이용하여 Western blot을 수행한 결과 임신특이 단백질에 대해서 비임신소의 오줌에서는 감지하지 않았고 임신소의 오줌에서 특이하게 감지하였다. 또한 이 항체는 false negative가 5% 미만이었으며, false positive가 10% 정도로 나타났다. 따라서 본 연구팀이 제작한 임신특이 항체는 전체적으로 90% 이상의 정확도를 나타내었다. 이와 같은 성적은 지금까지 보고된 여타의 소임신 진단 Kit에 의한 임신진단 결과보다 20% 이상 우수한 결과이다.

다. 임신특이 단백질에 대한 monoclonal antibody 제조 및 특이성 검정 여부 : 본 연구팀은 소임신특이 단백질에 대하여 polyclonal antibody에 비해 특이성이 보다 높은 monoclonal antibody를 성공적으로 제조하였다. 즉 bPAP 2에 대한 2종류의 monoclonal antibody Mono-1 및 Mono-2를 제작하여 각각 5mg/ml의 농도로 6ml씩 총 30mg의 양으로 순수 정제하였다. 이상에서 정제된 monoclonal antibody를 이용하여 소의 오줌에 존재하는 bPAP 2 단백질에 대한 특이적 감지능력을 평가하기 위하여 ELISA test와 Western blotting을 수행하였으며, 그 결과 생산된 두 종류의 monoclonal antibody가 bPAP 2와의 결합에 있어서 polyclonal antibody 보다 훨씬 뛰어난 특이성과 감지능력을 갖고 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구를 통하여 제조된 monoclonal antibody를 이용하면

기존의 다른 방법에 비해 훨씬 우수하고, 간편하며, 고감도의 소임신평이 진단 Kit를 제작할 수 있는 것으로 평가된다.

라. 소 임신진단용 Kit의 성능검정 여부 : 본 연구와의 직접적 비교를 위하여 국내에서 개발된 소임신평 Kit의 성능검정을 실시하였다. 이를 위해 (주)녹십자에서 개발, 판매되고 있는 progesterone에 대한 면역적 chromatographic 진단 Kit를 이용한 임신소 및 비임신소의 판별과 분석방법의 정확성을 평가하였으며, 그 결과 임신소의 판정에서는 약 20% 정도가 판독이 어려웠으며 비임신소의 경우 약 40% 정도가 판독이 어려웠다. 따라서 전체적으로 약 30%가 판독이 어려운 것으로 나타나 기존의 진단시약이 아직까지 specificity의 문제점을 안고 있음을 알 수 있다. 이에 비해 본 연구팀이 개발한 소 임신특이 단백질의 peptide를 이용하여 제조한 polyclonal antibody 및 monoclonal antibody는 최소 90% 이상의 specificity를 보여줌으로써 보다 특이성이 높은 Kit를 개발할 가능성이 매우 큼을 알 수 있다.

제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 소의 오줌단백질 분석 결과 얻어진 정상소 및 임신소의 proteomic map, 소 임신특이적 단백질을 이용한 polyclonal antibody 및 monoclonal antibody 제조기술, 이를 이용한 소임신진단 Kit 연구개발 결과의 활용방안은 아래와 같다.

1. 정상소의 오줌단백질의 2-D gel에 대한 proteomic map은 질병이나, 생리적 변화, 스트레스 등의 유용형질 발굴에 이용될 수 있다.
2. 소의 임신진단을 조기에 가능케 함으로써 합리적이고 경제성 높은 축산 경영과 사양관리가 가능해진다.
2. 간편한 진단 Kit를 산업화하여 목축농가에 경제적 유익을 줄 수 있다.
3. 소, 돼지, 닭 등의 가축 외에도 식물, 미생물, 곤충 등 모든 생명체의 단백질 변화를 mass spectrometry 방법을 적용하여 효과적으로 분석하면, 목표 단백질 동정과 유전자 cloning이 가능해 진다.
4. 본 연구를 통하여 개발된 진단 방법의 현장보급은 가격, 신뢰도, 정확도의 우위가 확보될 때 가능하다. 따라서 이러한 점을 고려하여 보다 우수한 진단 Kit의 개발을 위한 연구를 지속적으로 진행할 것이다.
5. 진단 Kit를 성공적으로 양산하게 되면 국제수준의 진단 Kit 생산 및 판매를 위해서 미국의 Princeton Biomeditech. Co.(NJ, USA)와 협력할 계획이다.
6. Proteomic map이 완성되고 이에 대한 database가 구축되었으므로 향후 bioinformatics 전문가와 공동연구를 수행할 것이다.

7. 임신진단 Kit 생산에는 기술적 know-how가 중요하며, 별도의 특별한 장비가 필요한 것은 아니다. 따라서 본 연구를 통하여 특이유전자와 특이단백질이 결정되고 진단 Kit 생산에 대한 기술이 확립되었으므로 언제라도 생명공학 관련회사에 기술이전이 가능하다.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

미국, 호주, 유럽 등을 중심으로 소의 임신특이 단백질 및 이를 이용한 진단 Kit 개발에 대한 연구가 대학, 연구소, 기업체에서 활발하게 진행중임.

제 7 장. 참고문헌

1. 임진규, 강선철 (1999) 소의 오줌으로부터 획득한 임신특이 단백질. 대한민국 특허출원 제99-12667호
2. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantity of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
3. Cho, Y. W., Park, E. H. and Lim, C. J. (1999) A second thioltransferase from chinese cabbage: Purification and characterization. *J. Biochem. Mol. Biol.* 32, 133-139.
4. Grg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A., and Weiss, W. (1995) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* 16, 1079-1086.
5. Harry, J. L., Wilkins, M. R., Herber, B. R., Packer, N. H., Gooley, A. A. and Williams, K.L. (2000) Proteomics: Capacity versus utility. *Electrophoresis* 21, 1071-1081.
6. Hickey, G. J. (1990) Pregnancy diagnosis in dairy cattle: present status and future prospects. *Cornell Vet.* 80, 299-302.
7. Humbolt, P., Camous, S., Martal, J., Charlery, J., Jeanguygot, N., Thibier, M., and Sasser, R. G. (1988) Pregnancy-specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *J. Reprod. Fert.* 83,

215-223.

8. Hwang, S. I. and Lim, Jin-kyu (1999) Purification and identification of pregnancy-associated proteins using 2-D gel electrophoresis. *J. Biochem. & Mol. Biol.* 32, 445-450.
9. Ito T., Stein P. C., Parsons C. L. and Schmidt J. D. (1998) Elevated stress protein in transitional cells exposed to urine from interstitial cystitis patients. *Int. J. Urol.* 5, 444-448.
10. James, P. (1997) Breakthroughs and views of genomes and proteomes. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 231, 1-6.
11. Jungblut, P. R., Zimny-Arndt, U., Zeindl-Eberhart, E., Stulik, J., Koupilova, K., Pleibner, K. P., Otto, A., Mller, E. C., Sokolowska-Khler, W., Grabher, G., and Stffler, G. (1999) Proteomics in human disease: Cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis* 20, 2100-2110.
12. Klose, J. and Kobalz, U. (1995) Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16, 1034-1059.
13. Lynch, E. P. and Abbott, P. B. (1988) Progesterone assays in dairy practice: seven questions, seven answers. *Vet. med.* May, 522-527.
14. Molloy, M. P. (2000) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal. Biochem.* 280, 1-10.
15. Morton, H., Rolfe, B. E. and Cavanagh, A. C. (1987) Ovum factor and early pregnancy factor. *Current Topics in Dev. Biol.* 23, 73-92.

16. Morton, H., Rolfe, B. E. and Cavanagh, A. C. (1992) Early pregnancy factor. *Seminars in Reproductive Endocrinol.* 10, 72-82.
17. Natalia P. (2002) Nexus Magazine, Volume 9, Number 4.
18. O'Farrel, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
19. Pandey, A. and Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837-846.
20. Park, J. H., Lee, J. H., Baek, S. H., Moon, T. C., Lee, J. M., Kim, N. S., Nam, K. S. and Chang, H. W. (1997) Detection and characterization of novel extracellular phospholipase A2 in urine of patients with acute pyelonephritis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 30, 101-105.
21. Pedraza-Chaverri J., Sosa G., Cruz C., Medina-Campos O. N., Ibrira-Rubio M. E. (1996) Time course analysis of serum and urinary proteins by SDS-PAGE in experimental nephrotic syndrome. *Ren Fail.* 18, 181-194.
22. Rasmussen, H. H., Orntoft, T. F., Wolf, H. and Celis, J. E. (1996) Towards a comprehensive database of proteins from the urine of patients with bladder cancer. *J. Urol.* 155, 2113-2119.
23. Rauterberg, J., Timple, R. and Furthmayr, H. (1972) Structural characterization of N-terminal antigenic determinants in calf and human collagen. *Eur. J. Biochem.* 27, 231-237.
24. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A*

Laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

25. Sasser, R. G., Crock, J. and Ruder-Montgomery, C. A. (1989) Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 37, 109-113.
26. Wooding, F. B. P. and Beckers, J. F. (1987) Trinucleate cells and the ultrastructural localization of bovine placental lactogen. *Cell Tissue Res.* 247, 667-673.
27. Yates, J. R. III, Eng, J. K. and McCormack, A. L. (1995) Mining Genomes: correcting tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases. *Anal. Chem.* 67, 3202-3210.
28. Young D. S., Tracy R. P. (1995) Clinical application of two-dimensional electrophoresis. *J. Chromatogr.* 698, 163-179.