



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월02일
(11) 등록번호 10-2259198
(24) 등록일자 2021년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) C12Q 1/6851 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
C12Q 1/6851 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-0122385
(22) 출원일자 2018년10월15일
심사청구일자 2018년10월15일
(65) 공개번호 10-2020-0042168
(43) 공개일자 2020년04월23일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020120103387 A
Journal of Molecular Diagnostics Vol.17(1),
pages 90-99 (2015.01.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
부산가톨릭대학교 산학협력단
부산광역시 금정구 오류대로 57(부곡동)
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
김성현
부산광역시 부산진구 시민공원로 11, 101동 2302
호(부암동, 서면쌍용스윗닷홈SKY)
장희경
부산광역시 해운대구 마린시티2로 38, 1동 5506
호(우동, 해운대아이파크)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인남춘

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 이준혁

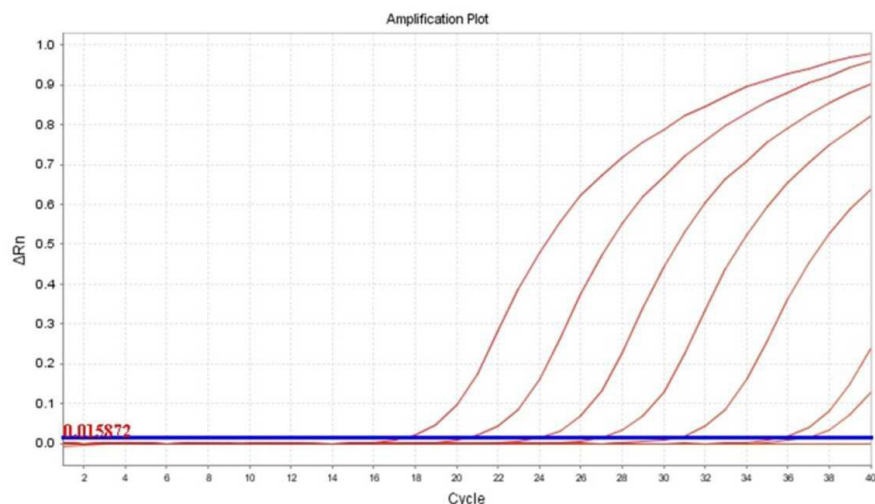
(54) 발명의 명칭 인체 조직검체로부터 분리된 핵산의 mRNA를 타겟으로 하는 실시간 역전사효소 중합반응을 이용한 결핵의 진단을 위한 정보제공방법 및 이를 위한 결핵 진단용 키트

(57) 요약

본 명세서에는 인체 조직검체로부터 분리된 특정 바이오마커 DNA의 mRNA를 타겟으로 하는 실시간 역전사 중합효소반응을 이용한 결핵의 진단을 위한 정보제공방법 및 이를 위한 결핵 진단용 키트가 개시된다. 본 발명은 기존의 결핵균 유래의 바이오마커를 표적으로 한 진단검사법과 더불어, 결핵균 감염 의심 부위의 조직검체로부터 분리된 총 7종의 인체 유래 바이오마커인, IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 또는 TNFR의 mRNA 발현량을 측정할 수 있는 RT-PCR 반응 기반 분자진단법을 추가적으로 실시함으로써, 기존 진단검사법에 비해 보다 높은 민감도와 특이도로 결핵을 진단할 수 있다.

대표도 - 도2a

1x10 ⁷ copy, 1x10 ⁶ copy	
1x10 ⁵ copy	
1x10 ⁴ copy	
1x10 ³ copy	
1x10 ² copy	
1x10 copy	
1 copy	



(52) CPC특허분류

C12Q 2537/143 (2013.01)
C12Q 2545/107 (2013.01)
C12Q 2561/113 (2019.08)
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/16 (2013.01)

(72) 발명자

이혜영

서울특별시 서초구 바우피로 91, 109동 1106호(양재동, 우성아파트)

박성배

부산광역시 해운대구 재반로241번길 16-49, 302호(반여동, 대경빌라)

최윤성

부산광역시 남구 전포대로20번길 15, 109동 2101호(문현동, 문현동삼성아파트)

배진영

부산광역시 해운대구 달맞이길62번길 5-42, 나동 303호(중동, 해운비치빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1C1B1008888
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구자지원사업
연구과제명	결핵 고위험군 신속 선별을 위한 전혈 내 전사체 바이오마커 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부산가톨릭대학교 산학협력단
연구기간	2016.06.01 ~ 2019.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

결핵의 진단을 위한 정보제공방법으로서, 상기 정보제공방법은

(1) 결핵 의심 환자 유래의 생물학적 시료로부터 전장 RNA(total RNA)를 분리하는 단계;

(2) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계;

(3) 상기 합성된 cDNA를 인터페론-감마(IFN- γ , interferon-gamma); 종양괴사인자-알파(TNF- α , Tumor Necrosis Factor-alpha); 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 10(CXCL10, Chemokine (C-X-C motif) ligand 10); 및 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 9(CXCL9, Chemokine (C-X-C motif) ligand 9), 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 11(CXCL11, Chemokine (C-X-C motif) ligand 11), 과립구대식구집락자극인자(GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) 및 종양괴사인자 수용체(TNFR, Tumor Necrosis Factor Receptor)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍, 및 상기 IFN- γ ; TNF- α ; CXCL10; 및 CXCL9, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자;의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 제 2 프라이머 쌍을 이용하여 RT-PCR(real time-PCR)을 수행하는 단계; 및

(4) 상기 증폭된 IFN- γ ; TNF- α ; CXCL10; 및 CXCL9, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자;의 mRNA 발현수준, 및 대조군 유전자인 GAPDH의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계;를 포함하고,

상기 생물학적 시료는 결핵균 감염 의심 부위의 조직 또는 세포이고, 혈장 또는 혈청이 아니며,

상기 정보제공방법은 상기 생물학적 시료를 결핵균 특이 항원으로 감작시키는 단계를 포함하지 않는, 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (3) 단계는 상기 합성된 cDNA를 IFN- γ ; TNF- α ; CXCL10; 및 CXCL9, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제1 프라이머 쌍, 증폭된 부위에 결합할 수 있는 제 1 프로브; 및

대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 제 2 프라이머 쌍과 증폭된 대조군 유전자 부위에 결합할 수 있는 제 2 프로브를 이용하여 RT-PCR을 수행하는 것인, 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 대조군 유전자는 GAPDH인 것인, 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 IFN- γ ; TNF- α ; CXCL10; 및 CXCL9, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍은

서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 10 및 11로 구성되는 프라이머 쌍; 및 서열번호 7 및 8으로 구성되는 프라이머 쌍, 서열번호 13 및 14로 구성되는 프라이머 쌍, 서열번호 16 및 17로 구성되는 프라이머 쌍, 및 서열번호 19 및 20으로 구성되는 프라이머 쌍으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍이고,

상기 대조군 유전자를 증폭할 수 있는 제 2 프라이머 쌍은 서열번호 22 및 23으로 구성되는 프라이머 쌍인, 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (4) 단계 이후, 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을 기준으로 IFN- γ ; TNF- α ; CXCL10; 및 CXCL9, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자;의 mRNA 발현수준을 상대적으로 비교하는 단계를 더 포함하는, 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 제 1 프로브는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브; 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브; 서열번호 12의 염기서열로 이루어지는 프로브; 서열번호 9의 염기서열로 이루어지는 프로브, 서열번호 15의 염기서열로 이루어지는 프로브, 서열번호 18의 염기서열로 이루어지는 프로브, 및 서열번호 21의 염기서열로 이루어지는 프로브로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로브인, 결핵의 진단을 위한 정보 제공방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 제 2 프로브는 서열번호 24의 염기서열로 이루어지는 프로브인, 결핵의 진단을 위한 정보 제공방법.

청구항 8

IFN- γ ; TNF- α ; CXCL10; 및 CXCL9, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍을 유효성분으로 포함하고, 상기 제 1 프라이머 쌍은

서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 10 및 11로 구성되는 프라이머 쌍; 및 서열번호 7 및 8으로 구성되는 프라이머 쌍, 서열번호 13 및 14로 구성되는 프라이머 쌍, 서열번호 16 및 17로 구성되는 프라이머 쌍, 및 서열번호 19 및 20으로 구성되는 프라이머 쌍으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍이고,

생물학적 시료로서 결핵균 감염 의심 부위의 조직 또는 세포이고, 혈장 또는 혈청이 아닌 생물학적 시료에 대하여 진단하는 것인, 결핵 진단용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 조성물은 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하기 위하여 상기 대조군 유전자에 특이적으로 결합하는 제 2 프라이머 쌍을 더 포함하는, 결핵 진단용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제 2 프라이머 쌍은 서열번호 22 및 23으로 구성되는 프라이머 쌍인, 결핵 진단용 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 조성물은 제 1 프로브 및 제 2 프로브를 더 포함하고,

상기 제 1 프로브는 IFN- γ ; TNF- α ; CXCL10; 및 CXCL9, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자;의 증폭된 부위에 결합할 수 있고,

상기 제 2 프로브는 증폭된 대조군 유전자 부위에 결합할 수 있는, 결핵 진단용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 제 1 프로브는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브; 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브; 서열번호 12의 염기서열로 이루어지는 프로브; 서열번호 9의 염기서열로 이루어지는 프로브, 서열번호 15의 염기서열로 이루어지는 프로브, 서열번호 18의 염기서열로 이루어지는 프로브, 및 서열번호 21의 염기서열로 이루어지는 프로브로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로브인, 결핵 진단용 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 제 2 프로브는 서열번호 24의 염기서열로 이루어지는 프로브인, 결핵 진단용 조성물.

청구항 14

IFN- γ ; TNF- α ; CXCL10; 및 CXCL9, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자;를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍을 유효성분으로 포함하고, 상기 제 1 프라이머 쌍은

서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 10 및 11로 구성되는 프라이머 쌍; 및 서열번호 7 및 8으로 구성되는 프라이머 쌍, 서열번호 13 및 14로 구성되는 프라이머 쌍, 서열번호 16 및 17로 구성되는 프라이머 쌍, 및 서열번호 19 및 20으로 구성되는 프라이머 쌍으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 쌍이고,

생물학적 시료로서 결핵균 감염 의심 부위의 조직 또는 세포이고, 혈장 또는 혈청이 아닌 생물학적 시료에 대하여 진단하는 것인, 결핵 진단용 키트.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 키트는 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하기 위하여 상기 대조군 유전자에 특이적으로 결합하는 제 2 프라이머 쌍을 더 포함하는, 결핵 진단용 키트.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 키트는 제 1 프로브 및 제 2 프로브를 더 포함하고,

상기 제 1 프로브는 IFN- γ ; TNF- α ; CXCL10; 및 CXCL9, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자;의 증폭된 부위에 결합할 수 있고,

상기 제 2 프로브는 증폭된 대조군 유전자 부위에 결합할 수 있는, 결핵 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서에는 인체 조직검체로부터 분리된 특정 바이오마커의 mRNA를 타겟으로 하는 실시간 역전사 중합효소반응을 이용한 결핵의 진단을 위한 정보제공방법 및 이를 위한 결핵 진단용 키트가 개시된다.

배경 기술

[0003] 결핵은 마이코박테리움. 튜베르쿨로시스(M. tuberculosis)로 감염되어 유발되는 만성 감염성 질병으로 매우 치명적인 인체 감염성 질환이다. 개발도상국에서 주요 질병일 뿐 아니라 최근에는 선진국에서도 그 심각성이 증가하고 있으며, 매년 약 8백만명의 환자가 새로 발생하고 있으며, 약 3백만명의 환자가 사망한다. 결핵은 감염되어도 상당한 시간 동안 증상이 없을 수 있지만, 이 질병은 가장 통상적으로 폐의 급성 염증으로 나타나서 열 및 비생산적 기침을 초래하며, 이를 치료하지 않으면, 통상적으로 심각한 합병증을 초래하고 사망에 이르게 된다. 대부분의 결핵은 폐결핵(Pulmonary tuberculosis)이 차지하고 있지만, 최근 진단법의 발달에 따라 폐외결핵(Extrapulmonary tuberculosis)의 발생률 또한 증가하고 있는 상황이기 때문에 결핵의 정확한 조기 진단이 치료를 위해 무엇보다도 중요하다.

[0004] 활동성 폐결핵의 진단은 대부분 객담, 유도 객담 및 기관지 세척액 등 호흡기 검체를 이용한 항산성 균 도말(Acid fast bacilli, AFB) 염색법, 결핵균 배양법, 결핵균 DNA를 검출하는 핵산증폭검사를 통해 이루어지고 있다. 하지만, 침습성 폐결핵 및 다른 부위의 조직에서 나타나는 폐외결핵의 경우 결핵성 병변이 의심되는 부위의 조직을 생검을 통해 채취하여 AFB 염색, 핵산증폭검사를 통해 결핵균의 균체 및 결핵균 DNA를 검출하는 방법과 결핵균에 의해 형성된 인체 조직의 특성을 조직병리학적 분석에 의해서만 의존해 왔다.

[0005] 마이코박테리아의 세포벽은 두꺼운 Waxy 물질로 덮여 있어 염색이 쉽게 되지 않고 일단 염색이 되면 acid alcohol로도 탈색이 되지 않는 성질을 가지고 있어 항산균(AFB)라고 한다. 이러한 원리를 이용한 검사 방법이 AFB 도말염색이다. 검체를 Ziehl-Neelsen 염색이나 형광염색 처리를 하여 현미경으로 관찰하기 때문에 검사 결과를 빠르게 얻을 수 있고, 균이 얼마나 있는지 대략적으로 파악할 수 있는 장점이 있지만, 결핵균 외에도 비결핵마이코박테리아(Nontuberculous mycobacteria, NTM), 노카디아(Nocardia), 로도코코스(Rhodococcus)와 같은 다른 종의 세균들도 AFB 염색 상이 동일하게 나타나기 때문에, 검사의 특이도에 한계점이 있으며, 결핵균 검출 민감도 또한 매우 낮은 제한점이 있다.

[0006] 결핵균 검출을 위한 핵산증폭검사(Nucleic acid amplification test, NAAT)는 결핵균에만 존재하는 특이적인 DNA 가닥을 증합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 증폭시켜 확인하는 검사법이다. 이 검사는 AFB 도말 염색법에 비해 검출 민감도(sensitivity)가 매우 높고 결과를 얻기까지 걸리는 시간이 매우 짧은 장점이 있어 널리 사용되고 있지만, 검체 전처리, DNA 추출, 검사 시약 제조 시 검사실 환경의 오염에 의한 위양성 문제가 크게 대두되고 있으며, 특히 조직검체와 같이 결핵균이 매우 적게 포함되어 있거나, 결핵균이 증식을 시작한 시점에서의 민감도 한계가 있으며, 특히 FFPE (Formalin-fixed paraffin embedded) 조직의 경우 시료 제조 시 극소로 존재하는 결핵균의 DNA가 손상되어 검출 민감도가 감소하여, 환자의 임상적 증상은 있으나 핵산증폭검사에서는 신뢰성 있는 결과를 얻지 못한다는 제한점이 보고되고 있다.

[0007] 위의 내용과 같이 이러한 방법들은 결핵균의 균체 및 결핵균의 DNA를 검출하기 때문에, 결핵균이 조직 내에서 잠복 중이거나 미세하게 증식 중인 상황에서는 균체 수가 매우 적기 때문에 임상적 증상은 있으나, 진단적 검출 민감도가 제한적이어서 정확한 진단을 통한 치료를 실시하기 힘든 상황이다. 따라서, 본 발명에서는 결핵균이 감염된 인체 조직으로부터 결핵균 균체 및 DNA를 포함하는 결핵균 유래 바이오마커에 추가적으로 결핵균 감염 시 조직으로부터 증가하는 인체(숙주) 바이오마커를 제시하고, 이를 검출하기 위한 Oligonucleotide primer, TaqMan probe의 염기서열과 이를 분석하기 위한 조건을 개발하여 제시함으로써, 기존의 결핵에 대한 임상증상은 있으나, 조직검체를 이용한 진단이 애매하거나 어려웠던 검체들의 특이도와 민감도를 높이려 하였다. 따라서, 기존의 진단법에 추가적으로 본 발명에서 제시하는 인체 유래 바이오마커를 추가적으로 분석할 경우 조직검체에서 보다 정확한 결핵균 감염 진단이 가능하고, 분자진단법이 적용되기 때문에 자동화로의 적용으로 인해 검사의 편리성과 재현성에 있어서도 기존 검사법에 비해 객관적이고 일률적인 결과를 제시할 수 있을 것으로 판단된다.

[0008] 기존에 조직검체로부터 결핵균 감염 진단을 위해 사용되었던 대표적인 결핵균 유래 바이오마커에 진단의 민감도와 특이도를 높이기 위한 인체 유래 바이오마커를 찾기 위해 기존 연구 결과를 참고하였다. 이전 연구 문헌에서 결핵균이 감염되었을 때 인체 내에서 증가하게 된다고 밝혀진 대표적인 인체 유래 바이오마커인 인터페론감마(Interferon gamma, IFN- γ), 인터루킨-2 (Interleukin-2, IL-2), IL-2 receptor (IL-2R), C-X-C 모티프 케모카인 9(CXCL9), C-X-C 모티프 케모카인 10, C-X-C 모티프 케모카인 11, 종양괴사인자알파(Tumor necrosis factor alpha, TNF- α)에 대한 mRNA 발현량의 차이를 결핵균의 감염이 확인된 조직검체와 결핵균이 감염되지 않은 조직검체에서 비교하였다. 그 중 총 5 가지 인체 유래 바이오마커인 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11이 결핵균이 감염된 조직검체에서 그렇지 않은 검체에서보다 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

[0009] 위에서 언급한 기존에 밝혀진 5 가지의 결핵균 감염 시 발현이 증가하는 인체 유래 바이오마커 외에 추가적인 인체 유래 바이오마커 탐색을 위해 결핵균이 감염된 조직검체와 결핵균이 감염되지 않은 조직검체에서 total RNA를 추출한 이후 총 25종의 면역과 관련된 인체 유래 바이오마커 선별을 위해 Luminex multiplex bead array를 이용해 분석하였으며, 그 결과 두 종류의 인체 유래 바이오마커인 GM-CSF와 TNF-receptor (TNFR)의 mRNA 발현량이 결핵균의 감염이 확인된 조직검체에서 그렇지 않은 조직검체에 비해 특이적으로 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

[0010] 따라서, 본 발명에서는 기존의 결핵균 유래의 바이오마커를 표적으로 한 진단검사법과 더불어 총 일곱 종의 인체 유래 바이오마커인, IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 또는 TNFR의 mRNA 발현량을 측정할 수 있는 실시간 역전사효소 연쇄증합반응 기반 분자진단법을 추가적으로 실시함으로써, 조직검체에서 기존 진단검사법에 비해 보다 높은 민감도와 특이도를 지닌 결핵 진단법을 발명하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 일 측면에서, 본 발명의 목적은, (1) 결핵 의심 환자 유래의 생물학적 시료로부터 전장 RNA(total RNA)를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계; (3) 상기 합성된 cDNA를 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍, 및 상기 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 제 2 프라이머 쌍을 이용하여 RT-PCR(real time-PCR)을 수행하는 단계; 및 (4) 상기 증폭된 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현수준, 및 대조군 유전자인 GAPDH의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계;를 포함하고, 상기 생물학적 시료는 결핵균 감염 의심 부위의 조직 또는 세포인, 결핵의 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0013] 다른 측면에서, 본 발명의 목적은, IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍을 유효성분으로 포함하고, 상기 제 1 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 8으로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 10 및 11로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 14로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 16 및 17로 구성되는 프라이머 쌍; 및 서열번호 19 및 20으로 구성되는 프라이머 쌍;으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 결핵 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 발명의 목적은, IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍을 유효성분으로 포함하고, 상기 제 1 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 8으로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 10 및 11로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 14로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 16 및 17로 구성되는 프라이머 쌍; 및 서열번호 19 및 20으로 구성되는 프라이머 쌍;으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 결핵 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 일 측면에서, 본 발명은, (1) 결핵 의심 환자 유래의 생물학적 시료로부터 전장 RNA(total RNA)를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계; (3) 상기 합성된 cDNA를 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍, 및 상기 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 제 2 프라이머 쌍을 이용하여 RT-PCR(realtime-PCR)을 수행하는 단계; 및 (4) 상기 증폭된 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현수준, 및 대조군 유전자인 GAPDH의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계;를 포함하고, 상기 생물학적 시료는 결핵균 감염 의심 부위의 조직 또는 세포인, 결핵의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0017] 다른 측면에서, 본 발명은, IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍을 유효성분으로 포함하고, 상기 제 1 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 8으로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 10 및 11로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 14로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 16 및 17로 구성되는 프라이머 쌍; 및 서열번호 19 및 20으로 구성되는 프라이머 쌍;으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 결핵 진단용 조성물을 제공한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은, IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍을 유효성분으로 포함하고, 상기 제 1 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 8으로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 10 및 11로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 14로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 16 및 17로 구성되는 프라이머 쌍; 및 서열번호 19 및 20으로 구성되는 프라이머 쌍;으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 결핵 진단용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 기존의 결핵균 유래의 바이오마커를 표적으로 한 진단검사법과 더불어, 결핵균 감염 의심 부위의 조직검체로부터 분리된 총 7종의 인체 유래 바이오마커인, IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 또는 TNFR의 mRNA 발현량을 측정할 수 있는 RT-PCR 반응 기반 분자진단법을 추가적으로 실시함으로써, 기존 진단검사법에 비해 보다 높은 민감도와 특이도로 결핵을 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 7종의 유전자(IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR) 각각의 mRNA 타겟 qRT-PCR을 위한 제 1 프라이머 쌍 및 제 1 프로브(TaqMan 프로브) 제작과 관련된 도이다. 구체적으로, 도 1a는 IFN- γ , 도 1b는 TNF- α , 도 1c는 CXCL9, 도 1d는 CXCL10, 도 1e는 CXCL11, 도 1f는 GM-CSF, 도 1g는 TNFR 유전자에 관한 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 7종의 유전자(IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및

TNFR) 각각의 mRNA 타겟 제 1 프라이머 쌍과 제 1 프로브(TaqMan 프로브)의 민감도를 측정한 결과를 나타낸 도이다. 구체적으로, 각각의 타겟 유전자는 도 4a는 IFN- γ , 도 2b는 TNF- α , 도 2c는 CXCL9, 도 2d는 CXCL10, 도 2e는 CXCL11, 도 2f는 GM-CSF, 도 2g는 TNFR 유전자이다.

도 3은 결핵균이 감염된 조직(MTB positive group)과 감염되지 않은 조직(MTB negative group) 각각에서 분리된 조직검체에 대하여 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 7종의 유전자(IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR) 각각을 타겟으로 하는 제 1 프라이머 쌍과 제 1 프로브, 및 대조군 유전자인 GAPDH를 타겟으로 하는 제 2 프라이머 쌍과 제 2 프로브를 이용하여 qRT-PCR 결과를 비교한 도이다. 구체적으로, 도 3a는 IFN- γ , 도 3b는 TNF- α , 도 3c는 CXCL9, 도 3d는 CXCL10, 도 3e는 CXCL11, 도 3f는 GM-CSF, 도 3g는 TNFR 유전자의 mRNA를 타겟으로 하는 제 1 프라이머 쌍과 제 1 프로브를 이용한 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 7종의 유전자(IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR) 각각의 mRNA 타겟 제 1 프라이머 쌍과 제 1 프로브(TaqMan 프로브)의 특이도 및 민감도를 측정한 결과를 나타낸 도이다. 구체적으로, 각각의 타겟 유전자는 도 4a는 IFN- γ , 도 4b는 TNF- α , 도 4c는 CXCL9, 도 4d는 CXCL10, 도 4e는 CXCL11, 도 4f는 GM-CSF, 도 4g는 TNFR 유전자이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025]

일 측면에서, 본 발명은 (1) 결핵 의심 환자 유래의 생물학적 시료로부터 전장 RNA(total RNA)를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계; (3) 상기 합성된 cDNA를 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍, 및 상기 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 제 2 프라이머 쌍을 이용하여 RT-PCR(real time-PCR)을 수행하는 단계; 및 (4) 상기 증폭된 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현수준, 및 대조군 유전자인 GAPDH의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계;를 포함하고, 상기 생물학적 시료는 결핵균 감염 의심 부위의 조직 또는 세포인, 결핵의 진단을 위한 정보제공방법을 제공할 수 있다.

[0026]

본 명세서에서, 유전자 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR는 결핵균이 감염된 인체 조직에서 검출되는 결핵균 유래 바이오마커가 아닌 결핵균 감염 시 숙주인 인체에서 발현이 증가하는 인체 유래 바이오마커이다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따르면 결핵균 감염이 의심되는 국소 부위 조직에서 결핵균 유래 DNA를 검출하는 방법 대신에 결핵균 특이 항원에 반응한 T 세포가 분비하는 사이토카인(Cytokine)의 mRNA 발현수준을 통해 결핵 감염을 판단하는 정보를 제공하기 위한 것으로서, 본 발명의 일 실시예에 따르면 사이토카인의 단백질의 발현수준의 정량이 아닌 mRNA 발현수준의 정량을 통해 결핵을 진단하기 위한 정보를 제공할 수 있다.

[0027]

구체적으로, 유전자 IFN- γ 는 2형 인터페론이라고도 불리며, 면역 세포 활성화에 기여하며 자연살해(Natural killer, NK)세포와 T-세포로부터 자극을 받으면 분비된다. IFN- γ 는 대표적으로 NK세포 활성화, 대식세포 활성화, IgG 항체 동형 전환 유도, Th2-세포 억제, MHC 발현 등을 유도한다. 대식세포는 단핵구가 감염을 인지하고, 감염 부위로 이동하여 분화된 것으로, 활성화 이전에는 항원을 완전히 분해하는 능력을 보유하고 있지 않아, MHC Class II를 통해서 잘게 분해한 펩티드를 NK세포나 Th- 세포에게 전달하거나 IL-12를 분비하여, NK세포나 Th-세포를 활성화시킨다. 이로 인해 활성화된 NK세포 및 Th-세포는 IFN- γ 를 분비하는데, 이 때 직접적으로 작용하는 것이 아니라 CD40 리간드(CD40L)과 CD40 수용체(CD40R)의 작용을 IFN- γ 가 보조하게 된다. 또한 IFN- γ 는 형질세포의 항체에 동형 전환을 유도하여 IgG 항체 분비를 유도한다. 결핵균에 대한 면역기전은 주로 세포매개성 면역, 특히 Th1-세포 면역이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 결핵균 항원에 감염된 T-세포는 이러한 IFN- γ 를 분비하고 분비된 IFN- γ 는 결핵균을 포식하고 대식세포를 자극하여 결핵균을 사멸하게 된다.

[0028]

TNF- α (또는 TNF)는 염증반응에 포함되고 급성기 반응(Acute-phase protein)의 구성원인 사이토카인이다. TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에 의해 분비되는데, 보조 T-세포, NK세포, 그리고 손상된 신경세포 등의 다양한 세포에서도 분비된다. TNF- α 의 가장 중요한 역할은 면역 세포의 조절이다. TNF- α 는 체내 발열원으로써, 발열, 세포 자살, IL-1과 IL-6의 생산을 통해 패혈증, 악액질, 감염 등을 유발하며 중앙 생성과 바이러스 복제를 억제하는 능력을 갖는다. 또한 TNF- α 의 비정상적인 조절은 알츠하이머 병, 암, 우울증, 그리고 염증성장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)등의 인간의 질병에서 나타난다고 알려져 있으며 결핵에 관련하여서는 결핵

균을 탐식한 대식세포 및 T-세포가 TNF- α 를 분비한다고 알려져 있다.

- [0029] CXCL11은 IFN- γ -유도성 T-세포 알파화학주성인자 (I-TAC) 및 인터페론-감마-유도성 단백질 9 (IP-9)로도 불리는 CXC 케모카인 계통에 속하는 작은 사이토카인이다. CXCL11의 유전자 발현은 주로 말초혈액의 백혈구, 채장 및 간에서 높게 발현되며, IFN- γ 및 IFN- γ 에 의해 강하게 유도되고, IFN- α 에 의해 약하게 유도된다. 이 케모카인은 수용체인 CXCL9 및 CXCL10에 대한 다른 리간드보다 높은 친화성으로 세포 표면 케모카인 수용체 CXCR3과 상호 작용함으로써 표적 세포에 대한 효과를 유도한다.
- [0030] CXCL9는 IFN- γ 에 의해 유도되는 T-세포 화학 유인 물질로 IFN- γ 에 의해 유도된 모노키틴으로(MIG) 알려진 CXC 케모카인 계통에 속하는 작은 사이토카인이다. 이는 인간 염색체 4의 CXCL9 유전자 근처에 존재하는 CXCL10 및 CXCL11이라고 불리는 두 가지 다른 CXC 케모카인과 밀접한 관련이 있으며, CXCL9, CXCL10 및 CXCL11은 모두 케모카인 수용체 CXCR3과 상호 작용하여 화학 주성 기능을 유도한다.
- [0031] GM-CSF는 콜로니 자극인자 2 (CSF2)라고도 알려져 있으며, 대식세포, T-세포, 비만세포, NK세포, 내피세포 및 섬유 아세포에 의해 분비되어 백혈구 성장 인자 사이토카인 처럼 기능을 하는 단량체 당 단백질(Monomeric glycoprotein)이다. 호중구의 증식과 성숙을 촉진시키는 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)와 달리 GM-CSF는 더 많은 세포 유형, 특히 대식세포와 호산구에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. GM-CSF는 줄기 세포를 자극하여 과립구(호중구, 호산구 및 호염기구)와 단구를 생산한다. 단핵구는 순환을 빠져 나가 조직으로 이동하고, 그 후에 대식세포와 수지상 세포로 성숙하게 된다. 따라서, 면역/염증 캐스케이드의 일부분으로서, 소수의 대식세포의 활성화가 신속하게 그들의 양을 증가시킬 수 있으며, 이는 감염과 싸우는데 결정적인 과정이다. GM-CSF는 또한 면역계의 성숙한 세포에 약간의 영향을 미친다. 한 예로, 호중구의 이동을 억제하고 세포 표면에 발현되는 수용체를 변화시키는 것을 포함한다. 따라서, GM-CSF는 면역 시스템을 촉진하고 감염에 대한 방어를 촉진한다.
- [0032] TNFR은 CD120 또는 TNF라고도 알려져 있으며, 저친화성 TNF수용체-1(p55TNF수용체/CD120a)와 고친화성 TNF수용체 II(p75 TNF수용체/CD120b)가 있다. 이 2개의 TNF수용체(TNF- α , TNF- α) 양쪽에 R결합한다. 모두가 세포 외에 시스테인이 많은 모티프의 반복구조를 하며, 이 구조가 신경성장인자 수용체(NGF 수용체)와 상동성이 있는 점에서 TNF/NGF 수용체과를 형성하고 있다. 수용체 세포내에 사멸영역이라는 세포자살을 유도하는 수용체에 보존하는 영역이 있지만 수용체 II에는 존재하지 않는다. 그러나 어떤 수용체에서도 TNF 3합체의 결합으로 세포사(死), 세포증식, 염증반응이라는 다양한 반응을 유도하는 신호전달을 하고 있는 것이 알려져 있다.
- [0033] 상기 7종의 인체 유래 바이오마커인 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF, TNFR의 단백질을 표적으로 한 ELISA, Luminex bead array 등의 검사법이 이미 개발 되어있으나, 혈장 및 혈청 검체가 아닌 조직검체에서 이러한 여러 종류의 바이오마커를 단백질 수준에서 동시에 분석하는 데에는 많은 제한점이 따른다. 또한 기존의 단백질 분석법들은 검출되는 바이오마커의 양을 절대 정량법을 통해서만 검출해 내기 때문에 조직검체 내에 포함되어 있는 면역세포 수 등의 보정 인자가 전혀 사용되지 않는다는 한계가 있다. 따라서, 본 발명에서는 이러한 한계를 극복하여 미량의 조직검체로부터 한번 추출한 전장 RNA(Total RNA)로부터 상기 7종의 인체 유래 바이오마커를 mRNA 수준에서 동시에 분석하고, 상대정량법을 적용함으로써, 조직검체에 포함되어 있는 세포 수에 대한 보정을 위해 내재 대조군(Endogenous control) 유전자인 GAPDH의 mRNA 발현량을 보정 인자로 사용함으로써 환자마다 또는 검체마다 각 조직검체 시료에 포함되어 있는 세포의 수 대비 계산하고자 하는 타겟 바이오마커의 상대적인 발현량을 계산 가능케 하였고, 인체 유래 바이오마커를 mRNA 수준에서 검출함으로써, mRNA 추출부터 cDNA 합성, 실시간 연쇄증폭반응, 상대정량을 통한 유전자 발현량 분석까지 원스텝으로 자동화까지 적용 가능하다.
- [0034] 본 발명은 (1) 결핵 의심 환자 유래의 생물학적 시료로부터 전장 RNA(total RNA)를 분리하는 단계를 포함하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법일 수 있다.
- [0035] 상기 생물학적 시료는 결핵균 감염 의심 부위의 조직 또는 세포일 수 있다. 본 발명은 조직검체라는 제한된 검체에서 상기 7종의 유전자(IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF, TNFR)의 사이토카인을 단백질 발현 수준이 아닌 mRNA 발현 수준에서 동시에 상대 정량법을 통해 분석하기 때문에 검체간의 오차와 에러율을 최소화할 수 있으며, 요구되는 검체의 양과 검사비용, 검사 시간을 현저하게 저감 가능하다. 추가적으로, 기존 결핵균 유래 바이오마커 검출방법과 병행하여 사용할 경우 검사의 검출 민감도는 극대화 가능하고, 기존에 조직검체에 포함된 결핵균의 수가 매우 적었던 검체에 대해 정확한 진단이 어려웠던 부분들도 보완이 가능하다. 또한, 상기 결핵균 감염 의심 조직은 직접적으로 결핵균에 의해 면역반응을 강하게 나타내기 때문에 많은 사이토카인을 발현할 수 있다. 최종적으로 모든 과정의 자동화가 가능하기 때문에, 검사결과에 대한 객관성과 신뢰성 또한 확보할 수 있다. 구체적으로, 상기 (1) 단계는, 결핵 의심 환자의 감염 의심 부위 FFPE 조직을 이용해 전장

RNA(Total RNA)를 분리하는 단계일 수 있다. 종래의 결핵 검사에서 사용되는 침습성 폐결핵 및 폐외결핵의 경우 결핵성 병변으로 의심되는 조직을 생검하여 항상성 균 도말 염색이나 핵산증폭검사를 통해 결핵균의 균체 및 결핵균 유래 DNA를 검출하는 방법과 결핵균에 의해 형성된 조직의 특성을 조직병리학적 분석에 의해서만 의존해 왔다. 하지만, 이러한 방법들은 민감도와 특이도가 제한적이고, 존재하는 결핵균의 수가 적을 경우 정확한 진단을 내리기가 힘든 상황이다. 따라서, 기존의 진단법에 추가적으로 본 발명에서 제시하는 인체 유래 바이오마커를 추가적으로 분석할 경우 보다 정확한 결핵균 감염 진단이 가능하고, 분자진단법이 적용되기 때문에 자동화로의 적용으로 인해 검사의 편리성과 재현성에 있어서도 기존 검사법에 비해 객관적이고 일률적인 결과를 제시할 수 있다.

[0036] 본 발명은 (2) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계를 포함하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법일 수 있다.

[0037] 상기 (1) 및 (2) 단계는 실시간 역전사효소 중합반응(real-time PCR, RT-PCR)을 수행하기 위한 예비단계로서 일반적으로 사용되는 전장 RNA(Total RNA)를 분리하는 방법 및 이로부터 cDNA를 합성하는 방법은 공지된 방법을 통해 수행될 수 있으며, 이 과정에 대한 자세한 설명은 Joseph Sambrook 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); 및 Noonan, K. F. 등에 개시되어 있어 본 발명의 참조로서 삽입될 수 있다.

[0038] 한편, 본 발명에 사용되는 real-time RT-PCR(quantitative RT-PCR ; qRT-PCR)에 비하여 RT-PCR이 상용화 되기 어려운 몇 가지 단점이 있다. 첫째, 증폭과정(PCR) 이후에 cytokine mRNA의 발현량을 분석하기 위해 아가로스 젤 전기영동, EtBr 염색, densitometer (농도측정계) 측정의 과정들이 필요하므로 분석하는 시간이 지연될 수 있다. 둘째, 분석과정이 복잡하기 때문에, 검사를 위해 관련분야의 숙련자들이 필요하므로 검사의 재현성이 떨어질 수 있다. 셋째, 증폭된 증폭산물의 염색을 통한 분석이 이루어지기 때문에, 염색정도에 따른 결과의 민감도가 떨어질 수 있다. 이에 반하여, 본 발명에서 사용되는 qRT-PCR은 전기영동과 EtBr염색과정이 필요없으므로, 기존 총 검사 시간을 줄일 수 있으므로, 보다 빠르게 결핵환자를 판별해낼 수 있다. 또한, 증폭된 산물에 표지된 프로브에 의해 나오는 신호를 기계가 민감하게 읽어 냄으로써, 기존 검사에 비해 보다 민감도가 좋은 검사가 될 수 있다. 나아가, 추가로 형광 등이 표지된 프로브를 사용함으로써, 프라이머쌍에 의해 증폭된 부위의 내부에 또 다른 표지 프로브가 결합할 수 있으므로, 타겟에 대한 보다 높은 특이도를 가질 수 있다.

[0039] 본 발명은 (3) 상기 합성된 cDNA를 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍, 및 상기 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 제 2 프라이머 쌍을 이용하여 RT-PCR(real time-PCR)을 수행하는 단계를 포함하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법일 수 있다.

[0040] 상기 제 1 프라이머 쌍 및 제 2 프라이머 쌍의 프라이머는 포스포라미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다. 상기 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입제(예: 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트화제(예: 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등), 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그널을 직접 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 있다.

[0041] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열(IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF, TNFR, 대조군 유전자)은 검출 가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현 예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광, 화학발광단 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 표지 물질은 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine) Cy-5 또는 Cy-3일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 타겟 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단 및/또는 3' 말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 qRT-PCR을 수행하면 타겟 서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 qRT-PCR 수행시 32P 또는 35S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해

이용된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용할 수 있다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션 (nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법 (Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법 (Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

[0042] 본 발명의 일 측면에 따르면, IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 결핵균 특이항원에 의해 자극된 T세포로부터 분리된 싸이토카인 및 케모카인으로서 본 발명에서는 qRT-PCR을 통해 이를 단백질이 아닌 mRNA 수준에서 발현수준을 측정하게 된다. 이를 위하여 상기 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR 유전자 각각에 특이적으로 결합하는 신규한 제 1 프라이머 쌍과 형광이 표지된 제 1 프로브가 요구된다. 상기 유전자의 mRNA 증폭부위에 결합하는 프라이머 또는 프로브라면 제한되지 아니며, 상기 유전자 각각에 특이적으로 결합하여 검출 가능한 시그널을 제공하여 qRT-PCR을 수행할 수 있는 것이면, 제한 없이 사용될 수 있다. 본 명세서에서 FAM과 Quencher는 형광염료를 의미한다.

[0043] 본 발명의 다른 측면에 따르면, IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 제 2 프라이머 쌍과 형광이 표지된 제 2 프로브를 이용하여 qRT-PCR을 수행할 수 있다. 이 때 본 발명에 적용될 수 있는 대조군 유전자는 상기 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 상대적으로 판단하기 위하여 기준이 되는 유전자로서, 본 발명에서는 상기 대조군 유전자의 일례로서 기존 IFN- γ qRT-PCR특허와 동일한 GAPDH 유전자(NCBI ACCESSION NO : NM_002046)를 사용하여 qRT-PCR을 수행하여 mRNA를 발현시킬 수 있다. GAPDH 유전자는 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)로써 일반적으로 인체의 세포 내에서 최소한의 기능을 유지하기 위해 일정한 양이 지속적으로 발현이 되고 있는 유전자로써, GAPDH 외에도 많은 유전자들이 존재하지만 정량적인 qRT-PCR분석에서는 GAPDH가 가장 많이 사용되고 있다. 본 발명의 대조군 유전자는 GAPDH에 제한되는 것은 아니며, cytokine의 발현수준을 상대적으로 판단하기 위하여 기준이 될 수 있는 유전자는 본 발명에 적용될 수 있다. 한편 본 발명에서는 대조 유전자로서 GAPDH 유전자를 사용하였으므로 상기 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머가 요구되며, 본 발명에 적용되는 qRT-PCR 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 공지의 과정을 통해 수행될 수 있다.

[0044] 본 발명은 (4) 상기 증폭된 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현수준, 및 대조군 유전자인 GAPDH의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법일 수 있다.

[0045] 상기 (4) 단계는 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 및 대조군 유전자의 mRNA의 발현수준을 상대적으로 측정하기 위한 것으로서, 통상의 mRNA 발현수준을 측정할 수 있는 방법이면 제한 없이 사용될 수 있으며, 사용한 프로브 표지의 종류에 따라 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 qRT-PCR을 수행하면 표적서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 qRT-PCR 수행 시32P 또는 35S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 qRT-PCR을 통해 증폭된 PCR 산물에 형광이 표지된 프로브가 붙어 특정 파장의 형광을 내게 되고, 증폭과 동시에 qPCR 장치의 형광 측정기에서 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 또는 TNFR의 mRNA 발현수준 및 대조군 유전자의 mRNA의 발현수준을 실시간으로 측정하고, 측정된 값이 계산되어 PC를 통해 시각화 되게 되어 검사자는 쉽게 그 발현 정도를 확인할 수 있다. 구체적으로, 각각의 생물학적 시료(조직 또는 세포)마다 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현량, 및 GAPDH mRNA의 발현량이 계산되고, IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현량을 GAPDH의 mRNA 발현량에 맞추어 그 값을 보정해 주어 상기 생물학적 시료에서 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현이 얼마나 증가했고 감소하였는지의 정도를 배수로 몇 배가 증가하고 감소하였는지 상대적으로 정량하는 방법을 통해 결핵 환자임을 판별할 수 있는 정보를 제공할 수 있는 것이

다.

- [0047] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명은 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍을 유효성분으로 포함하고, 상기 제 1 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 8으로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 10 및 11로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 14로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 16 및 17로 구성되는 프라이머 쌍; 및 서열번호 19 및 20으로 구성되는 프라이머 쌍;으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 결핵 진단용 조성물을 제공할 수 있다. 또한, 상기 결핵 진단용 조성물은 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하기 위하여 상기 대조군 유전자에 특이적으로 결합하는 제 2 프라이머 쌍을 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 결핵 진단용 조성물은 상기 조성물은 제 1 프로브 및 제 2 프로브를 더 포함할 수 있으며, 상기 제 1 프로브는 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 증폭된 부위에 결합할 수 있고, 상기 제 2 프로브는 증폭된 대조군 유전자 부위에 결합할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍을 유효성분으로 포함하고, 상기 제 1 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 8으로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 10 및 11로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 14로 구성되는 프라이머 쌍; 서열번호 16 및 17로 구성되는 프라이머 쌍; 및 서열번호 19 및 20으로 구성되는 프라이머 쌍;으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 결핵 진단용 키트를 제공할 수 있다. 또한, 상기 결핵 진단용 키트는 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하기 위하여 상기 대조군 유전자에 특이적으로 결합하는 제 2 프라이머 쌍을 더 포함할 수 있다. 상기 결핵 진단용 키트는 제 1 프로브 및 제 2 프로브를 더 포함하고, 상기 제 1 프로브는 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 증폭된 부위에 결합할 수 있고, 상기 제 2 프로브는 증폭된 대조군 유전자 부위에 결합할 수 있다.
- [0050] 상기 진단 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 결핵 진단용 키트일 수 있으며, 구체적으로, 상기 역전사 중합효소반응 키트는 상기 인간 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR 유전자에 대한 특이적인 각각의 제 1 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 제 1 프라이머 쌍의 프라이머는 각 유전자의 염기서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 구체적으로 약 10 bp 내지 30 bp의 길이일 수 있으며, 보다 구체적으로는 제 1 프라이머 쌍(서열번호 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19 및 20) 및 형광 표지된 제 1 프로브(서열번호 3, 6, 9, 12, 15, 18 및 21)를 포함할 수 있다. 또한 대조군 유전자의 염기서열에 특이적인 제 2 프라이머 쌍과 제 2 프로브를 포함할 수 있으며, 구체적으로, GAPDH의 mRNA 발현수준을 측정하기 위하여 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 제 2 프라이머 쌍과 제 2 프로브를 더 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 상기 제 2 프라이머 쌍은 서열번호 22 및 23으로 구성되는 프라이머 쌍 및 서열번호 24로 표시되는 형광표지된 프로브를 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 진단 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시 뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPCwater), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0053] 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예를 통하여 설명한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0055] **[실시예 1] IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR 유전자의 mRNA를 타겟으로 하는 qRT-PCR을 위한 프라이머 및 프로브 제작**
- [0057] 결핵 진단을 위한 정보 제공을 위해 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR GAPDH 유전자의 mRNA를 타겟으로 하는 qRT-PCR용 프라이머 및 프로브를 제작하였다.
- [0058] 구체적으로, NCBI GeneBank에 등록되어 있는 IFN- γ (NCBI ACCESSION NO: NM_000619), TNF- α (NCBI ACCESSION NO: HQ201306), CXCL9 (NCBI ACCESSION NO: NM_002416.1), CXCL10 (NCBI ACCESSION NO: NM_001565), CXCL11 (NCBI ACCESSION NO: NM_005409), GM-CSF (NCBI ACCESSION NO: NM_000758.3) 및 TNFR (NCBI ACCESSION NO: NM_001065.3)의 표준 염기서열을 기초로 증폭 가능한 전방향 및 후방향 프라이머 쌍(제 1 프라이머 쌍)과 TaqMan 프로브(제 1 프로브)를 제작하였다. 상기 제작된 상기 7종의 유전자의 표준 염기서열, 제 1 프라이머 쌍

및 제 1 프로브에 관한 구체적인 염기서열 정보는 도 1a 내지 도 1g와 같다.

[실시에 2] 결핵 의심 환자 유래 조직 검체로부터 7종의 유전자 및 대조군 유전자의 발현량 분석

[실시에 2-1] 결핵균 감염 의심 조직으로부터 total RNA의 분리

결핵균 감염 의심 부위의 조직으로 만든 FFPE(Formalin-fixed Paraffin-embedded; 포르말린-고정 파라핀-임베디드) 검체를 10 μ m 크기로 3 내지 8섹션 하여 멸균된 RNase-free microtube에 두었다. 이 때, FFPE 조직 검체용 RNA 추출키트인 PureLink™ FFPE Total RNA Isolation Kit (Invitrogen, USA)를 이용하였으며, 제조사에서 권장하는 프로토콜을 사용하여 전장 RNA(total RNA)를 추출하였다.

[실시에 2-2] 분리된 total RNA로부터 상보적인 cDNA의 합성

상기 실시예 2-1에서 분리된 total RNA 9 μ l, random hexamer (Invitrogen) 0.25 ug, dNTP (Cosmo gene tech) 250 uM, Tris-HCl (pH 8.3) 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 8mM 와 MMLV 역전사 중합효소 200 units (Invitrogen)을 첨가하고 최종 부피를 22 uL가 되도록 DEPC treated DW를 넣고 교반하였다. 그 뒤 cDNA 합성 반응액을 Thermocycler (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystem)에서 25℃에서 10분, 37℃에서 50분, 70℃에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

[실시에 2-3] 합성된 cDNA를 주형으로 하여 IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF, TNFR 및 GAPDH 증폭

qRT-PCR 반응물의 조성은 KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM(pH8.3), MgCl₂ 1.5 mM, 젤라틴 0.001% (w/v), 250 uM dNTP, 1 unit Tag DNA중합효소(Solgent)와 각각의 유전자의 전방향 프라이머와 후방향 프라이머 10 pmole이다. 덧붙여 형광 다이가 표시된 올리고 프로브를 5 pmole이 되게 첨가해주었다. 여기에 상기 실시예 2-2에서 합성된 cDNA 3 uL를 넣고 최종부피가 20 uL가 되도록 하였다. 첨가된 각각의 프라이머 및 프로브의 염기서열은 하기 표 1과 같으며, IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR 유전자 각각을 타겟으로 하는 프라이머 쌍은 제 1 프라이머 쌍, 상기 유전자를 타겟으로 하는 프로브는 제 1 프로브이며, 대조군 유전자인 GAPDH를 타겟으로 하는 프라이머 쌍은 제 2 프라이머 쌍, 상기 GAPDH를 타겟으로 하는 프로브는 제 2 프로브이다.

표 1

타겟 유전자 명	프라이머/프로브	염기서열	서열 번호
IFN- γ (증폭산물의 크기 - 108 bp)	전방향 프라이머	5'-TGA ATG TCC AAC GCA AAG CA-3'	1
	역방향 프라이머	5'-CGA CCT CGA AAC AGC ATC TGA-3'	2
	프로브	5'-FAM-CGC CAG CAG CTA AAA CAG GGA AGC G-Quencher-3'	3
TNF- α (증폭산물의 크기 - 142 bp)	전방향 프라이머	5'-CTC CCC AAG AAG ACA GGG G-3'	4
	역방향 프라이머	5'-GGG AAC TCT TCC CTC TGG GG-3'	5
	프로브	5'-FAM-CAG GCG GTG CTT GTT CCT CAG CCT C-Quencher-3'	6
CXCL9 (증폭산물의 크기 - 107 bp)	전방향 프라이머	5'-CTA ATT CTT GGG TGT TTA TCC TAT C-3'	7
	역방향 프라이머	5'-ACA GTA TTA TTA GGC ACT GTG GAA G-3'	8
	프로브	5'-FAM-TTG TCA GCT CCT TGA GGG CAA GAG-Quencher-3'	9
CXCL10 (증폭산물의 크기 - 145 bp)	전방향 프라이머	5'-CTC CCC AAG AAG ACA GGG G-3'	10
	역방향 프라이머	5'-GGG AAC TCT TCC CTC TGG GG-3'	11
	프로브	5'-FAM-CAG GCG GTG CTT GTT CCT CAG CCT C-Quencher-3'	12
CXCL11 (증폭산물의 크기 - 130 bp)	전방향 프라이머	5'-ATC TAT GTG TCG TAA AAC ATT CCT C-3'	13
	역방향 프라이머	5'-ATT GGT TAT AAA ACA AAC CAA ATG A-3'	14
	프로브	5'-FAM-TCA TGC AAA TAC ACA CTT CTT TCC CC-Quencher-3'	15
GM-CSF (증폭산물의 크기 - 129 bp)	전방향 프라이머	5'-GTC ATC CCC TTT GAC TGC TG-3'	16

TNFR (증폭산물의 크기 - 117 bp)	역방향 프라이머	5'-CTT GGT CCC TCC AAG ATG AC-3'	17
	프로브	5'-FAM-CGG GGA GCT GCT CTC TCA TGA AAC-Quencher-3'	18
	전방향 프라이머	5'-GTT ATT GGA CTG GTC CCT CAC-3'	19
	역방향 프라이머	5'-GTT CCT TTG TGG CAC TTG GTA C-3'	20
	프로브	5'-FAM-CCC CAA GGA AAA TAT ATC CAC CCT C-Quencher-3'	21
	전방향 프라이머	5'-CCA TCT TCC AGG AGC GAG ATC C-3'	22
GAPDH (증폭산물의 크기 - 91 bp)	역방향 프라이머	5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTG-3'	23
	프로브	5'-FAM-TCC ACG ACG TAC TCA GCG CC-Quencher-3'	24

[0072] qRT-PCR 반응 (ABI 7500 FAST real-time PCR system, Applied Biosystems) 은 변성 온도 95℃에서 10분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95℃에서 10초, 어닐링 온도 60℃에서 30초인 사이클을 40회 반복 수행하였다. 총 수행 시간은 1시간 10분(70분)이다.

[0074] [실시예 2-4] Software 분석을 통한 증폭 여부 확인 및 증폭된 산물의 정량

[0075] 상기 실시예 2-3의 qRT-PCR이 끝난 후, 7500 Software V.2.04를 이용해 산물의 증폭을 확인하고, PCR효율 및 Ct 값을 통해 결과를 분석 및 정량하였다.

[0076] 본 발명의 실시예에서 사용되는 튜브로부터의 Ct 값을 확인하였으며, qRT-PCR의 특정 유전자 발현량을 정량하는 방법 중 하나인 Comparative Ct Method를 이용하여 하기 관계식 1에 의거하여 측정하였고, 이 공식은 7500 Software V.2.3에 내재되어 있어 자동으로 계산되어 나온다.

[0078] [관계식 1] 대조군 유전자에서 일곱 가지 표적 유전자의 발현량 분석 관계식

[0079] $\Delta Ct \text{ 값} = 7\text{종의 타겟 유전자}(IFN-\gamma, TNF-\alpha, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF \text{ 및 } TNFR) \text{ 각각의 } Ct \text{ 값} - \text{Reference gene (대조군 유전자, GAPDH)의 } Ct \text{ 값}$

[0080] 여기에서 Ct 값이란 PCR 과정 중 증폭이 뚜렷하게 증가되기 시작한 Cycle의 수치를 나타낸다.

[0081] 상기 ΔCt 값은 도 3a 내지 도 3g 각각에서 y축의 수치(mRNA Expression)를 의미하며, ΔCt 값이 낮을수록 타겟 유전자의 발현량이 많은 것으로 해석한다.

[0083] [실험예 1] 실시예 1의 제 1 프라이머 쌍과 제 1 프로브의 민감도 검사

[0085] 상기 실시예 1에서 제작한 상기 7종의 유전자를 타겟으로 하는 제 1 프라이머 쌍 및 제 1 프로브의 민감도를 검사하였다. 이 때, 모든 타겟 분자($IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR 유전자의 mRNA)의 Cut-off 는 Ct 35를 기준으로 민감도를 판별하였으며, 그 결과를 도 2a 내지 2g 각각에 나타내었다.

[0086] 구체적으로, $IFN-\gamma$ 를 타겟으로 하는 제 1 프라이머 쌍(서열번호 1 및 2)과 제 1 프로브(TaqMan 프로브, 서열번호 3)의 민감도를 분석하기 위해 $IFN-\gamma$ qRT-PCR을 수행한 결과 1×10^3 copy까지 증폭됨을 확인하였다(도 2a). $TNF-\alpha$ 를 타겟으로 하는 제 1 프라이머 쌍(서열번호 4 및 5)과 제 1 프로브(TaqMan 프로브, 서열번호 6)의 민감도를 분석하기 위해 $TNF-\alpha$ qRT-PCR을 수행한 결과 1×10^3 copy까지 증폭됨을 확인하였다(도 2b). CXCL9을 타겟으로 하는 제 1 프라이머 쌍(서열번호 7 및 8)과 제 1 프로브(TaqMan 프로브, 서열번호 9)의 민감도를 분석하기 위해 CXCL9 qRT-PCR을 수행한 결과 1×10^3 copy까지 증폭됨을 확인하였다(도 2c). CXCL10(IP-10)을 타겟으로 하는 제 1 프라이머 쌍(서열번호 10 및 11)과 제 1 프로브(TaqMan 프로브, 서열번호 12)의 민감도를 분석하기 위해 CXCL10 qRT-PCR을 수행한 결과 1×10^4 copy까지 증폭됨을 확인하였다(도 2d). CXCL11을 타겟으로 하는 제 1 프라이머 쌍(서열번호 13 및 14)과 제 1 프로브(TaqMan 프로브, 서열번호 15)의 민감도를 분석하기 위해 CXCL11 qRT-PCR을 수행한 결과 1×10^3 copy까지 증폭됨을 확인하였다(도 2e). GM-CSF를 타겟으로 하는 제 1 프라이머 쌍(서열번호 16 및 17)과 제 1 프로브(TaqMan 프로브, 서열번호 18)의 민감도를 분석하기 위해 GM-CSF qRT-PCR을 수행한 결과 1×10^3 copy까지 증폭됨을 확인하였다(도 2f). TNFR을 타겟으로 하는 제 1 프라이머 쌍(서열번호 19 및 20)과 제 1 프로브(TaqMan 프로브, 서열번호 21)의 민감도를 분석하기 위해 TNFR qRT-PCR을 수행한 결과 1×10^3 copy까지 증폭됨을 확인하였다(도 2g).

[0088] [실험예 2] 결핵균이 감염된 조직과 감염되지 않은 조직에서의 7 종의 바이오마커 분자의 발현양 비교

[0090] 결핵균이 감염된 조직과 감염되지 않은 조직에서의 7 종의 바이오마커(IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, GM-CSF 및 TNFR 유전자) 분자의 발현량을 비교하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0091] 구체적으로, 고신대학교 복음병원 병리과로부터 52개의 인체유래 FFPE 조직검체, AFB 염색결과, 조직병리학적 의사임상진단 검사결과를 제공받았으며, 상기 FFPE 조직검체 제공자의 임상정보는 하기 표 2와 같다.

[0092] [표 2] 인체유래 FFPE 조직검체 제공자의 임상정보

Characteristics	No. of samples (%)
Age (median=51.7 SD+- 16.3 yrs, range=17-87)	
< 30's	11 (21.1)
40-50's	21 (40.4)
> 60's	20 (38.5)
Sex	
Male	35 (67.3)
Female	17 (32.7)
Locations	
Colon	14 (26.9)
Lung	13 (25.0)
Ileum	7 (13.6)
Lymphnode	6 (11.6)
Skin	3 (5.8)
Ear	2 (3.8)
Bronchus	1 (1.9)
Testis	1 (1.9)
Tendon	1 (1.9)
Kidney	1 (1.9)
Appendix	1 (1.9)
Soft tissue (hand)	1 (1.9)
Finger joint	1 (1.9)
Total	52 (100)

[0093]

[0094] 상기 표 2와 같은 다양한 인체 부위의 FFPE 조직 검체로부터 DNA를 추출하여 REBA Myco-ID 검사를 통해 결핵균이 감염된 조직(MTB positive group)과 감염되지 않은 조직(MTB negative group)을 분류하였고, 이후 상기 실시예 2와 동일한 방법으로, 동일 조직 검체로부터 전장 RNA(Total RNA)를 추출하여 cDNA 합성 후 상기 실시예 1에서 제작한 상기 표 1의 제 1 프라이머 쌍과 제 1 프로브, 및 상기 표 1의 대조군 유전자인 GAPDH를 타겟으로 하는 제 2 프라이머 쌍과 제 2 프로브를 이용해 RT-qPCR을 실시하여 결핵균 감염 유무에 따라 일곱 가지 바이오마커의 발현양을 상기 관계식 1로 ΔCt 값을 구해 비교하였으며, 그 결과를 하기 표 3 내지 표 9, 및 도 3a 내지 3g 각각에 나타내었다.

표 3

[0095]

IFN- γ mRNA Expression level (ΔCt)	
MTB Positive	MTB Negative
1.71	11.25
1.62	10.39
-1.31	12.62
-0.11	7.61
6.29	3.91
-1.65	10.50
6.41	3.97
-0.26	2.70
3.96	2.99
-2.08	6.05
4.32	2.81
3.96	2.52
3.20	-2.83
1.51	7.17

1.55	5.69
7.84	12.62
	1.58
	11.28
	5.01
	-1.77
	2.73
	0.49

표 4

[0096]

TNF- α mRNA Expression level (Δ Ct)	
MTB Positive	MTB Negative
3.70	3.19
3.00	10.39
2.45	12.62
1.91	7.61
6.08	9.02
2.44	10.50
4.86	8.12
3.34	4.78
6.03	1.75
0.96	6.50
6.05	2.08
3.62	-0.31
1.51	0.86
3.02	3.20
4.46	7.58
3.81	12.62
	4.96
	11.28
	5.01
	0.24
	2.22
	0.51

표 5

[0097]

CXCL9 mRNA Expression level (Δ Ct)	
MTB Positive	MTB Negative
1.35	6.12
-0.61	4.72
2.15	5.18
6.72	5.85
-1.34	9.95
6.38	7.61
0.71	7.78
-1.03	8.20
-2.37	8.12
6.02	4.42
4.52	6.97
3.02	5.90
3.90	6.92
4.93	1.35
6.66	-1.45

	7.17
	1.35
	9.95
	2.70
	11.28
	-0.51
	5.33
	1.74

표 6

[0098]

CXCL10 (IP-10) mRNA Expression level (Δ Ct)	
MTB Positive	MTB Negative
2.76	-9.61
3.14	10.39
3.25	12.62
2.64	7.61
0.96	2.66
10.14	10.50
0.07	8.12
8.42	1.48
-1.33	2.38
12.62	4.59
3.49	3.47
0.41	-2.18
1.12	9.09
2.45	7.17
2.82	4.11
5.17	12.62
	4.96
	11.28
	5.01
	8.84
	12.03
	1.48

표 7

[0099]

CXCL11 mRNA Expression level (Δ Ct)	
MTB Positive	MTB Negative
1.87	11.25
0.78	11.56
12.47	5.18
0.49	5.39
5.92	12.62
0.56	7.61
5.61	9.02
2.20	10.50
1.98	8.12
-1.80	3.88
5.60	2.65
5.83	5.92
7.15	5.64
5.16	4.97
3.64	-1.44
12.35	7.57
	12.62

11.28
-0.80
5.39
4.32
11.25

표 8

[0100]

GM-CSF mRNA Expression level (ΔCt)	
MTB Positive	MTB Negative
1.54	11.25
-1.36	11.56
1.14	5.18
6.14	4.12
-0.85	8.53
7.4	7.61
1.06	6.90
6.22	10.50
-1.37	6.72
5.16	3.82
6.86	7.38
4.47	7.05
5.95	6.9
5.36	4.79
10.24	-2.16
	7.17
	10.22
	8.53
	4.96
	9.44
	-1.18
	3.98
	2.60

표 9

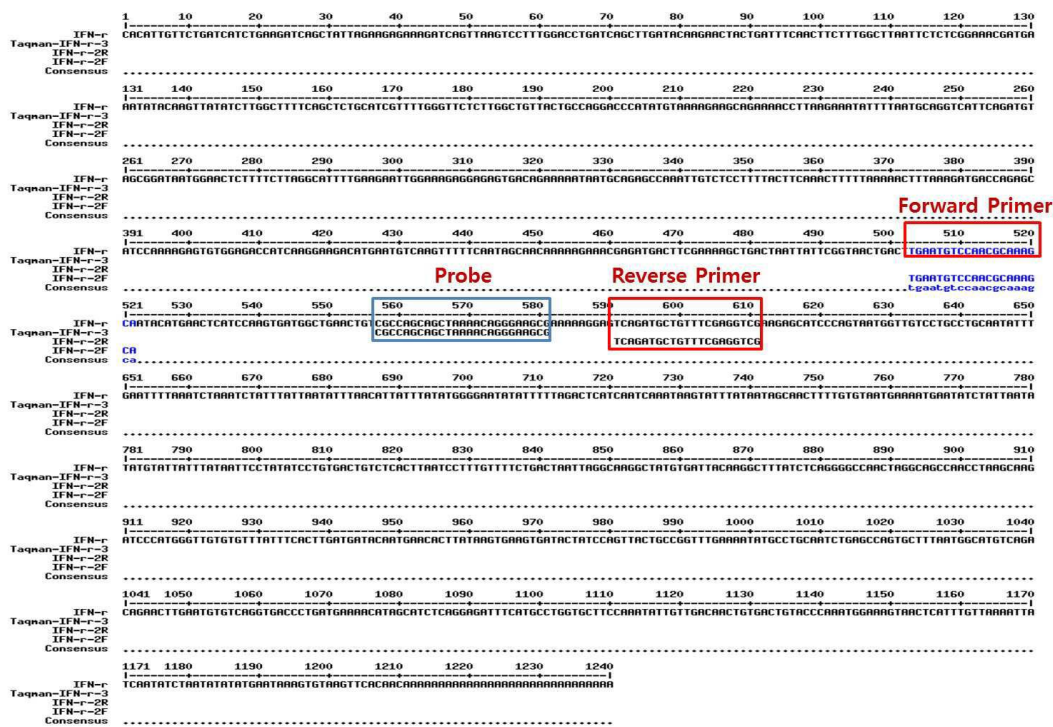
[0101]

TNFR mRNA Expression level (ΔCt)	
MTB Positive	MTB Negative
0.93	3.19
-0.17	4.16
1.45	5.18
6.45	1.88
-1.35	2.87
6.92	2.14
1.48	0.81
2.46	1.82
-1.80	2.14
5.42	4.07
0.21	7.23
2.63	2.66
2.29	6.55
8.98	2.35
3.07	-2.75

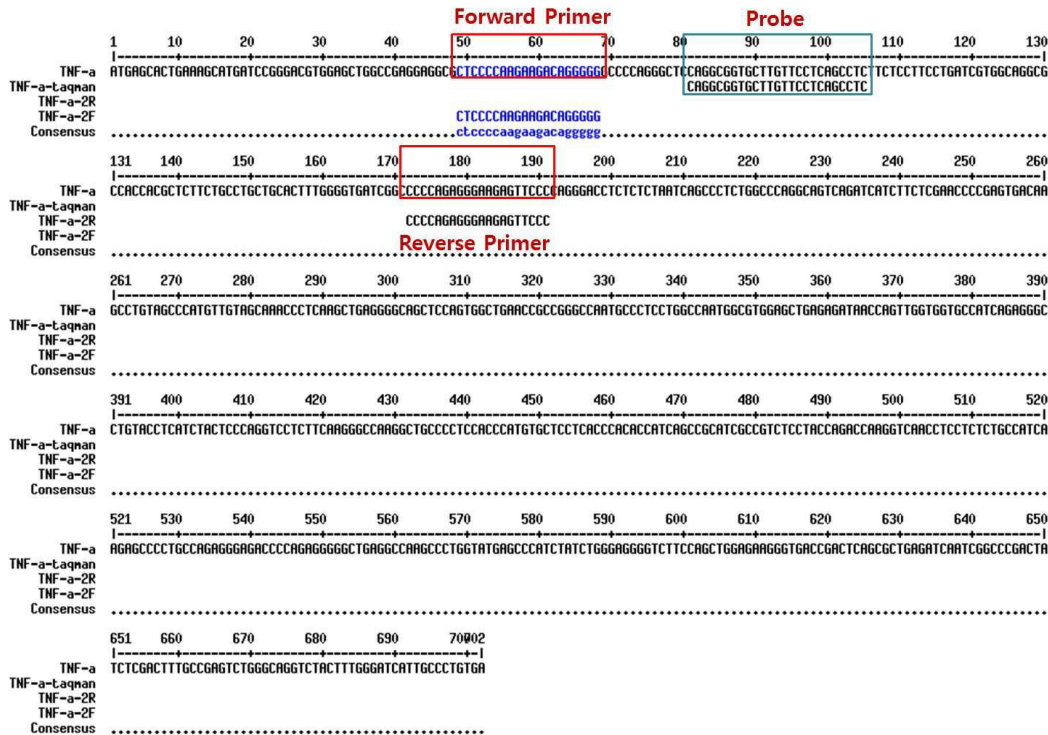
	7.17
	10.22
	2.87
	1.08
	2.59
	-1.12
	2.79
	0.50

도면

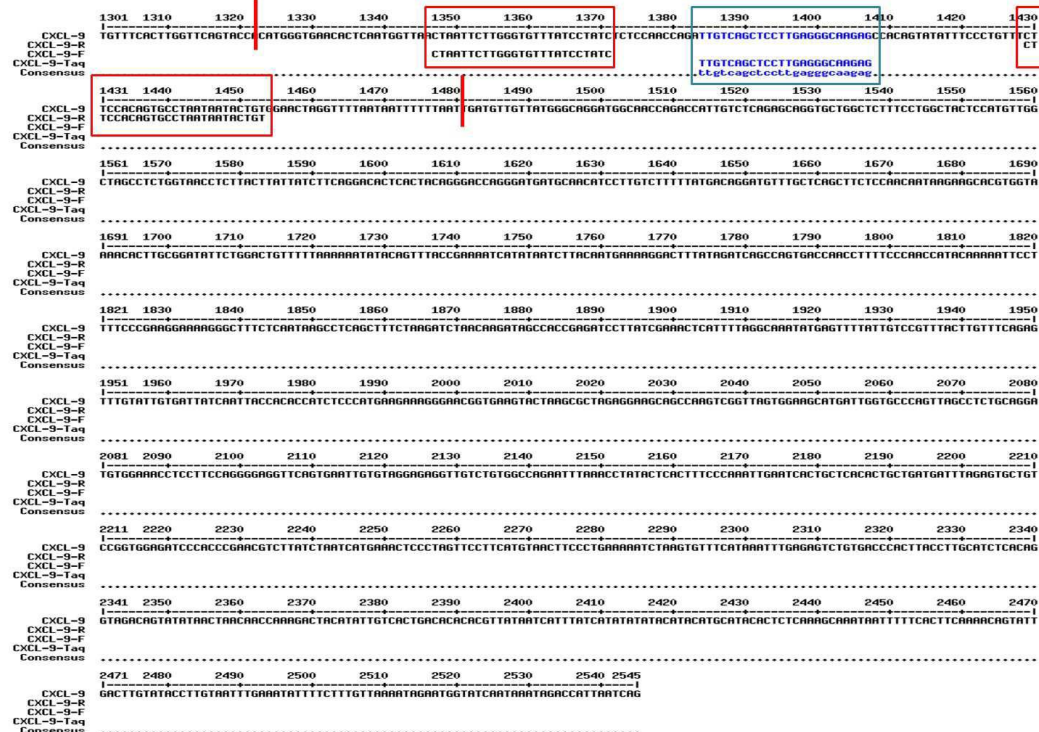
도면1a



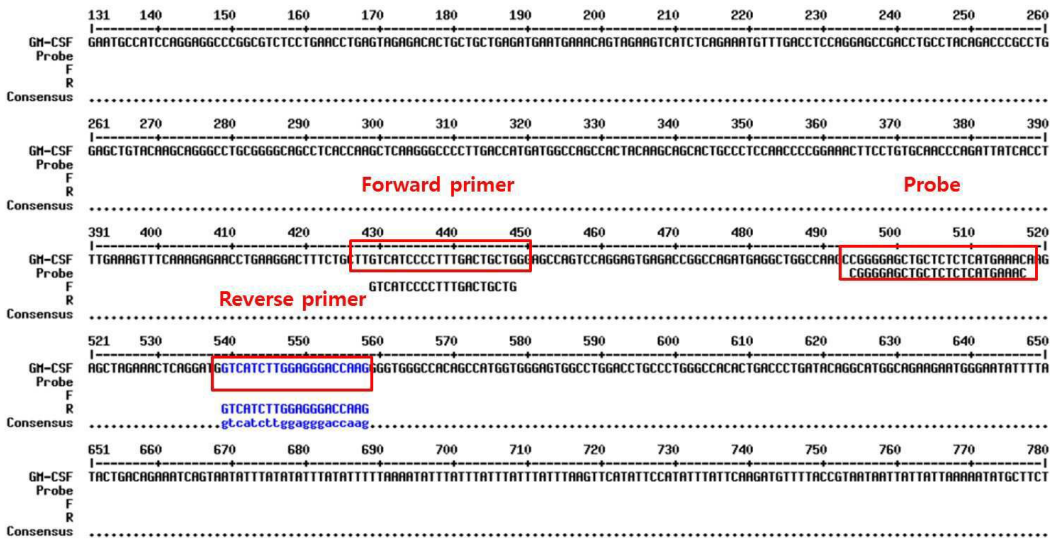
도면1b



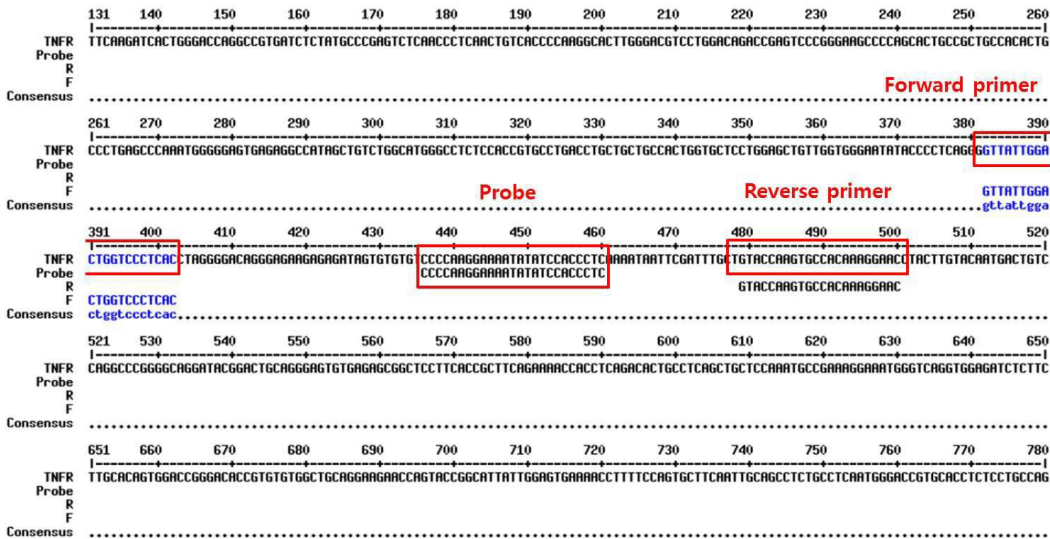
도면1c



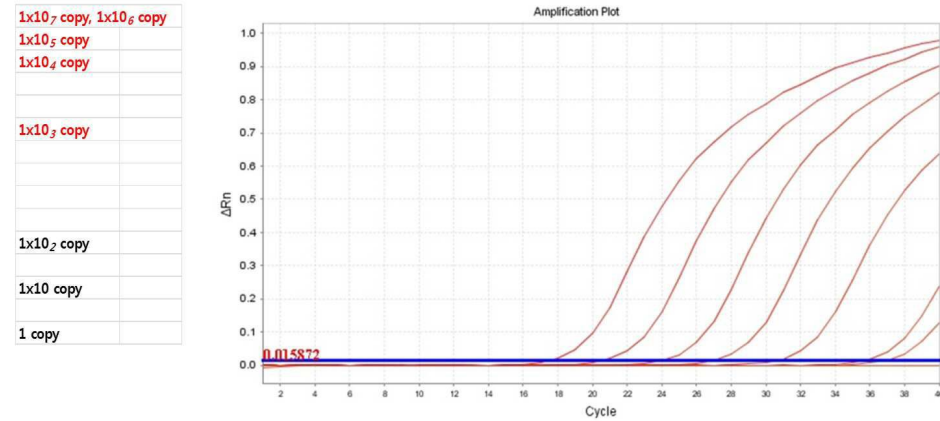
도면1f



도면1g

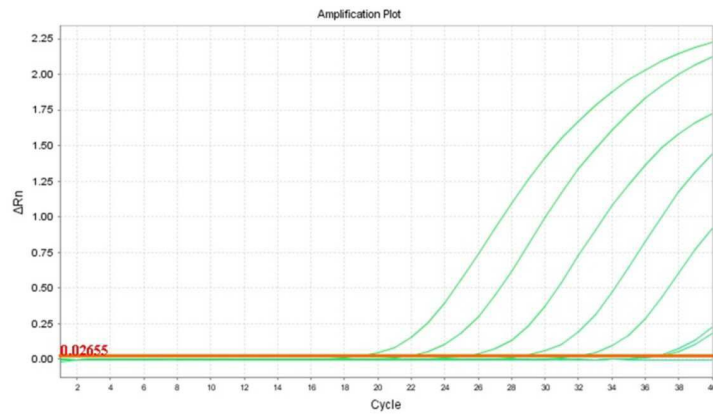


도면2a



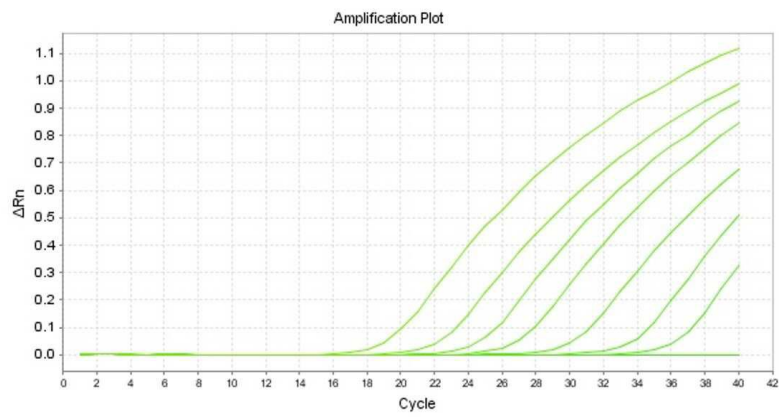
도면2b

1x10 ⁷ copy	
1x10 ⁶ copy	
1x10 ⁵ copy	
1x10 ⁴ copy	
1x10 ³ copy	
1x10 ² copy, 1x10 copy	
N.C.	



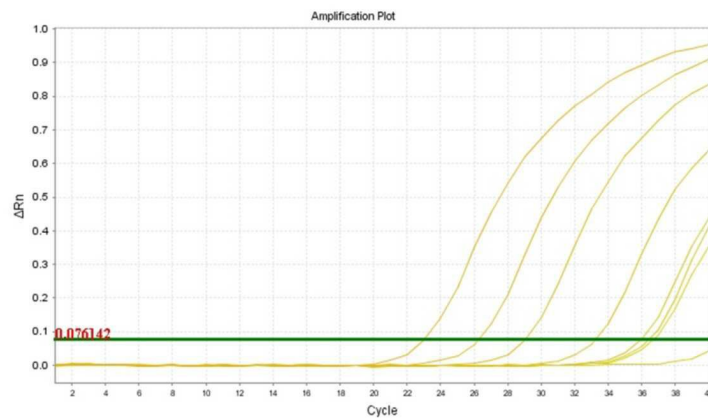
도면2c

1x10 ⁷ copy	
1x10 ⁶ copy	
1x10 ⁵ copy	
1x10 ⁴ copy	
1x10 ³ copy	
1x10 ² copy	
1x10 copy	
N.C	



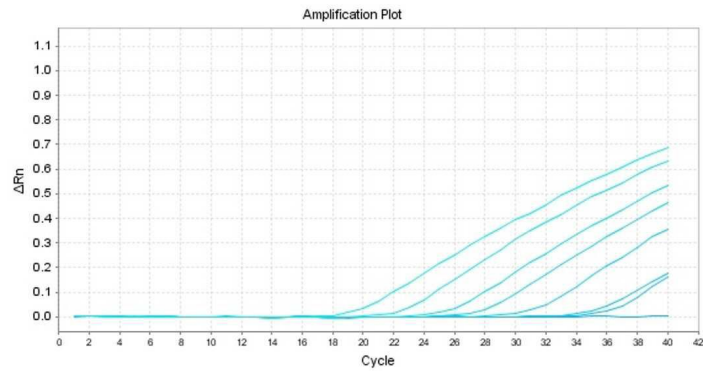
도면2d

1x10 ⁷ copy	
1x10 ⁶ copy	
1x10 ⁵ copy	
1x10 ⁴ copy	
1x10 ³ copy, 1x10 ² copy, 1x10 copy	
N.C.	



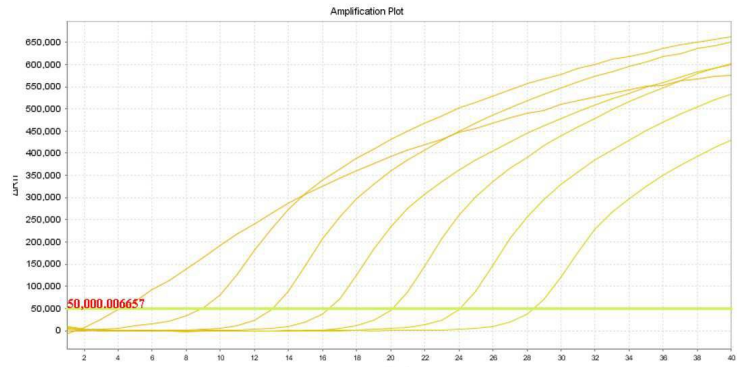
도면2e

1x10 ⁷ copy	
1x10 ⁶ copy	
1x10 ⁵ copy	
1x10 ⁴ copy	
1x10 ³ copy	
1x10 ² copy, 1x10 copy	
N.C	



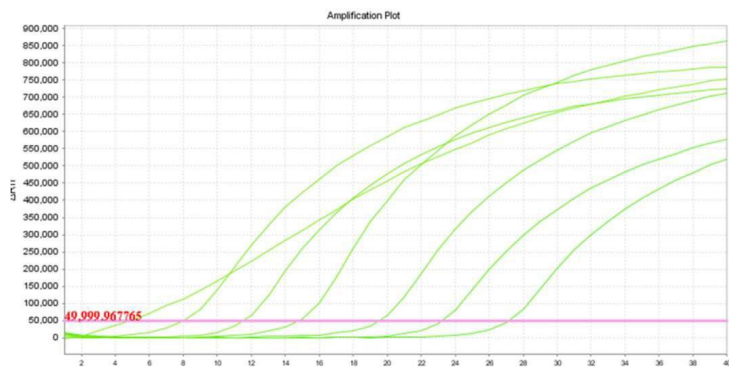
도면2f

1x10 ⁶ copy, 1x10 ⁵ copy	
1x10 ⁴ copy, 1x10 ³ copy	
1x10 ⁷ copy,	
1x10 ² copy	
1x10 copy	

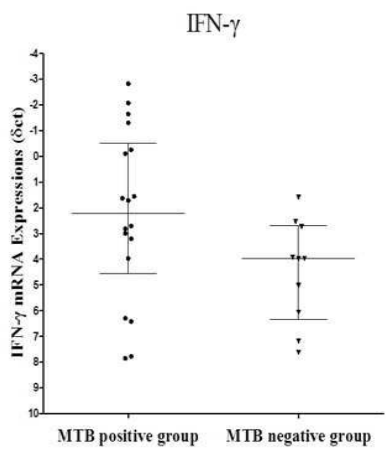


도면2g

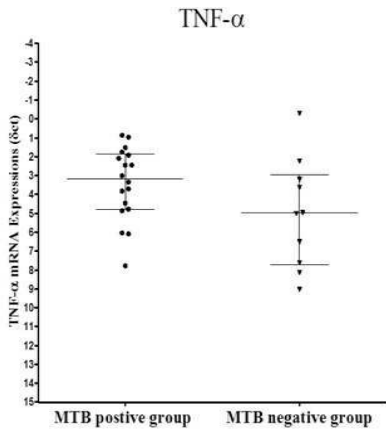
1x10 ⁶ copy	
1x10 ⁵ copy	
1x10 ⁷ copy,	
1x10 ⁴ copy, 1x10 ³ copy	
1x10 ² copy	
1x10 copy	



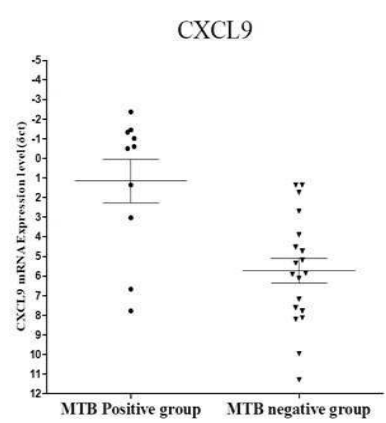
도면3a



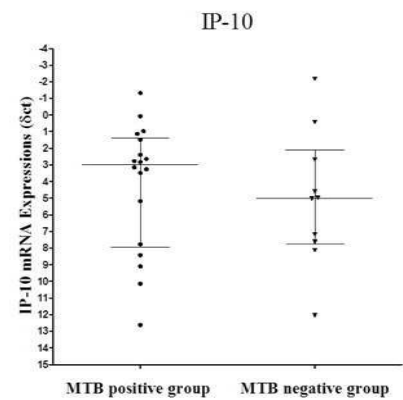
도면3b



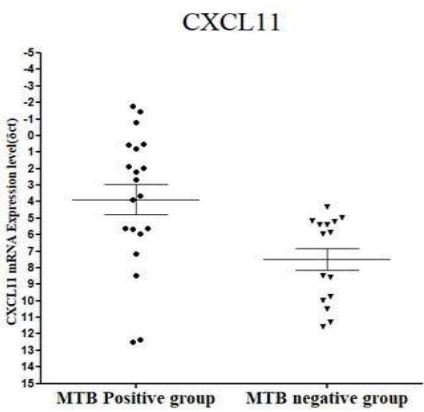
도면3c



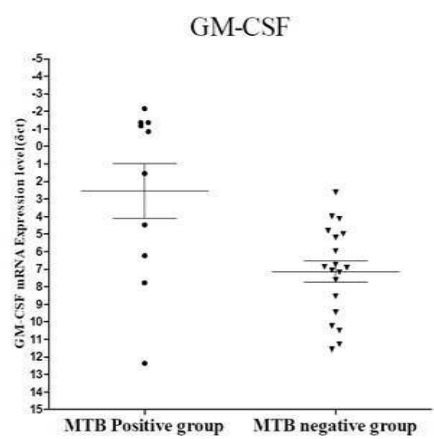
도면3d



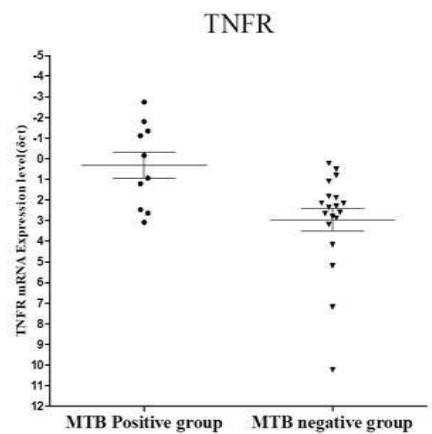
도면3e



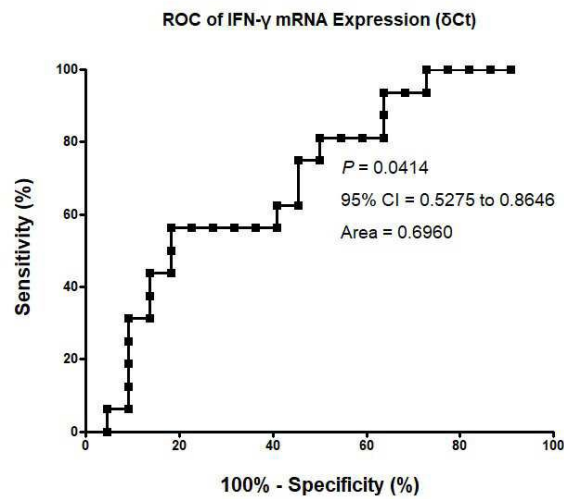
도면3f



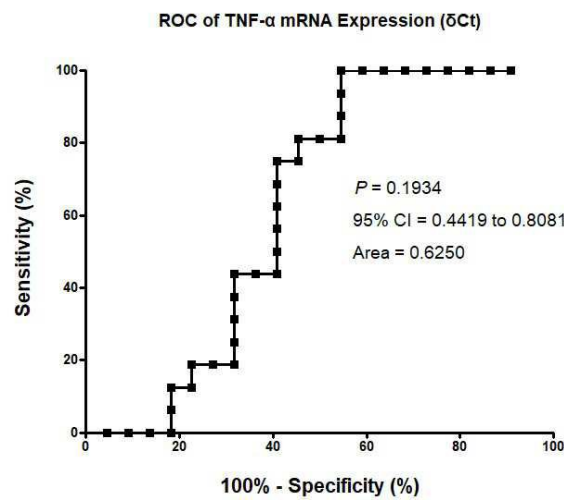
도면3g



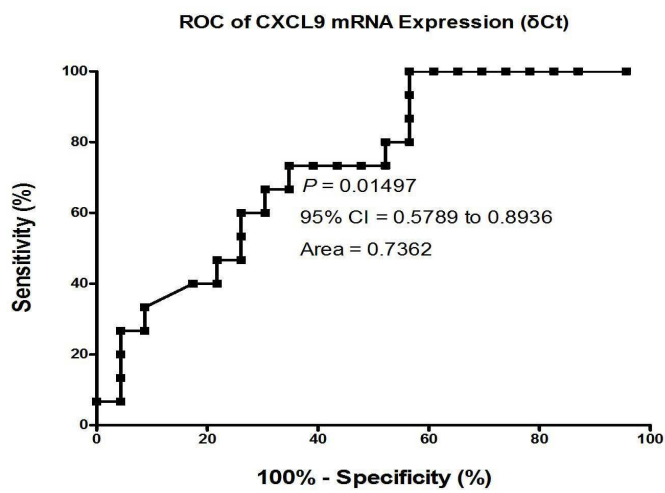
도면4a



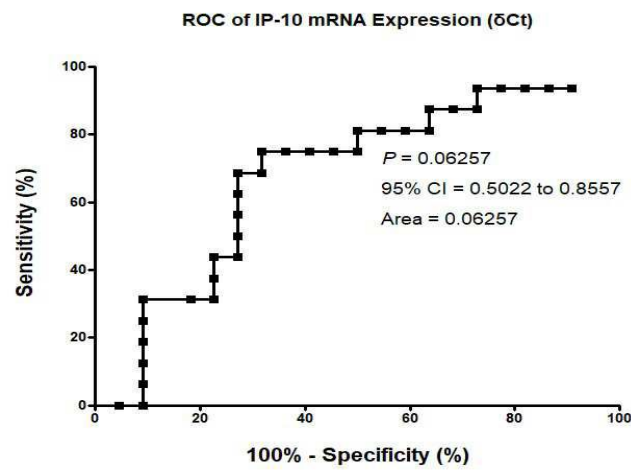
도면4b



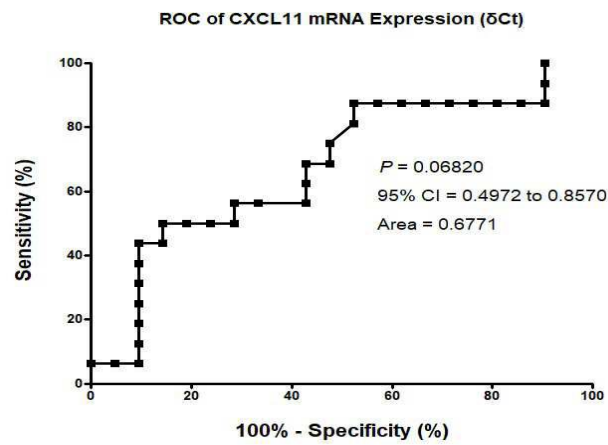
도면4c



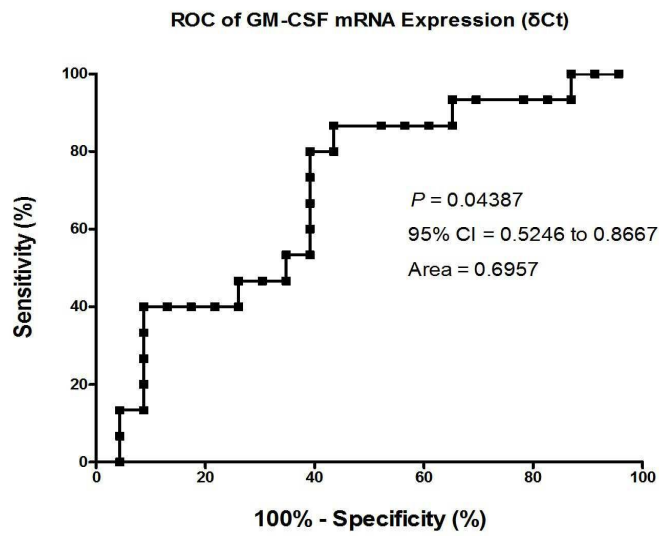
도면4d



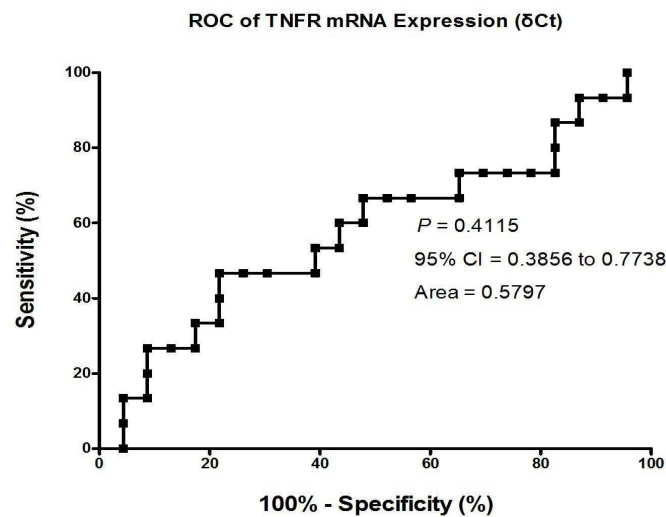
도면4e



도면4f



도면4g



서열목록

- <110> Catholic University of Busan
- <120> Method of providing information for diagnosis of tuberculosis
using quantitative reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR) targeting
mRNA of nucleic acid isolated from a human tissue sample and
diagnostic kit for the same
- <130> 01-000001
- <160> 24
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IFN-gamma forward primer
 <400> 1
 tgaatgtcca acgcaaagca 20

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IFN-gamma reverse primer
 <400> 2
 cgacctcgaa acagcatctg a 21

<210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IFN-gamma probe
 <400> 3
 cgccagcagc taaaacaggg aagcg 25

<210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha forward primer
 <400> 4
 ctccccaaga agacagggg 19

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha reverse primer
 <400> 5
 gggaactctt ccctctgggg 20

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha probe
 <400> 6
 caggcgggtgc ttgttcctca gcctc 25
 <210> 7
 <211>
 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CXCL9 forward primer
 <400> 7
 ctaattcttg ggtgtttatc ctatc 25
 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CXCL9 reverse primer
 <400> 8
 acagtattat taggcactgt ggaag 25
 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CXCL9 probe
 <400> 9
 ttgtcagctc cttgagggca agag 24

 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CXCL10 forward primer

<400>	10	
ctccccaaga agacagggg		19
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CXCL10 reverse primer	
<400>	11	
gggaactctt ccctctggg		20
<210>	12	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CXCL10 probe	
<400>	12	
caggcgggtgc ttgttcctca gcctc		25
<210>	13	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CXCL11 forward primer	
<400>	13	
atctatgtgt cgtaaaacat tcctc		25
<210>	14	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CXCL11 reverse primer	
<400>	14	
attggttata aaacaaacca aatga		25
<210>	15	
<211>	26	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CXCL11 probe	
<400>	15	
	tcatgcaa at acacacttct ttcccc	26
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GM-CSF forward primer	
<400>	16	
	gtcatccct ttgactgctg	20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GM-CSF reverse primer	
<400>	17	
	cttggtccct ccaagatgac	20
<210>	18	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GM-CSF probe	
<400>	18	
	cggggagctg ctctctcatg aaac	24
<210>	19	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TNFR forward primer	
<400>	19	
	gttattggac tggccctca c	21
<210>	20	
<211>	22	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TNFR reverse primer	
<400>	20	
	gttcctttgt ggcacttggt ac	22
<210>	21	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TNFR probe	
<400>	21	
	ccccaaggaa aatatatcca ccctc	25
<210>	22	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH forward primer	
<400>	22	
	ccatcttcca ggagcgagat cc	22
<210>	23	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH reverse primer	
<400>	23	
	atggtggtga agacgccagt g	21
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH probe	
<400>	24	
	tccacgacgt actcagcgcc	20