



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0028508
(43) 공개일자 2015년03월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0107177
(22) 출원일자 2013년09월06일
심사청구일자 2013년09월06일

(71) 출원인
엠앤디 (주)
강원도 원주시 흥업면 복원로 1389, 연세대학교원
주캠퍼스원주환경친화기술센터 408호
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자
이혜영
강원도 원주시 시청로 92 무실주공3단지아파트
309-105
최응호
서울특별시 성동구 왕십리로 280 삼부아파트
101-903
왕혜영
전라북도 군산시 서당길 21 현대아파트 109-1201

(74) 대리인
한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **아토피 환자의 유전자 돌연변이 검출용 프라이머, 프로브 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 아토피 환자의 유전자 돌연변이 검출용 프라이머, 프로브 및 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

Filaggrin(FLG) 및 SPINK5 유전자 상의 유전자 단편을 PCR 증폭하기 위한 서열번호 1 내지 서열번호 14에 기재된 서열을 갖는 프라이머 조성물.

청구항 2

SPINK5 및 kallikrein(KLK)7 유전자 상의 유전자 단편을 PCR 증폭하기 위한 서열번호 15 내지 서열번호 24에 기재된 서열을 갖는 프라이머 조성물.

청구항 3

서열번호 25 내지 서열번호 52에 기재된 서열을 갖는 FLG, SPINK5, 및 KLK7 유전자 상의 유전자 돌연변이 동시 검출용 올리고머 프로브 조성물.

청구항 4

- a) 검체 시료로부터 DNA를 분리하는 단계;
- b) 프라이머로서 제1항의 조성물을 사용하여, 상기 DNA로부터 SPINK5 및 KLK7 유전자의 유전자 단편을 PCR 증폭하는 단계; 및
- c) 제3항의 올리고머 프로브가 부착되어 있는 막과, 상기 단계 b)에서 얻어진 PCR 증폭산물을 하이브리드형성시키는 리버스 블랏 하이브리드형성 단계;를 포함하는 아토피 환자의 유전자 상의 유전자 돌연변이 동시 검출 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 b)단계의 유전자 단편은 KLK7 유전자의 경우에는 155bp, SPINK5 유전자의 경우에는 100bp, 120bp, 145bp, 130bp, 153bp, 및 135bp 크기의 단편인 것을 특징으로 하는 아토피 환자의 유전자 상의 유전자 돌연변이 동시 검출 방법.

청구항 6

- a) 검체 시료로부터 DNA를 분리하는 단계;
- b) 프라이머로서 제2항의 조성물을 사용하여, 상기 DNA로부터 FLG 및 SPINK5 유전자의 유전자 단편을 PCR 증폭하는 단계; 및
- c) 제2항의 올리고머 프로브가 부착되어 있는 막과, 상기 단계 b)에서 얻어진 PCR 증폭산물을 하이브리드형성시키는 리버스 블랏 하이브리드형성 단계;를 포함하는 아토피 환자의 유전자 상의 유전자 돌연변이 동시 검출 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 b)단계의 유전자 단편은 SPINK5 유전자 경우에는 170bp, 150bp, 및 140bp, FLG의 경우에는 160bp 및 103bp 크기의 단편인 것을 특징으로 하는 유전자 돌연변이 동시 검출 방법.

청구항 8

표면에 카르복실기를 갖는 막(membrane); 및

제 3항에 기재된 올리고머 프로브;를 포함하되,

상기 올리고머 프로브는 5' 말단에 아미노기가 부착되어 있으며, 상기 올리고머 프로브의 5' 말단에 부착된 아미노기와 상기 막 표면의 카르복실기가 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 올리고머 프로브가 부착된 막.

청구항 9

제 1항 또는 제2항에 기재된 프라이머 조성물, 및 제 4항에 기재된 올리고머 프로브 조성물을 포함하는 아토피 환자의 유전자 상의 유전자 돌연변이 동시 검출용 키트.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 아토피 환자의 유전자 돌연변이 검출용 프라이머, 프로브 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아토피피부염은 심한 가려움증을 동반하며 재발하는 습진성 피부병변을 특징으로 하는 만성 염증성 피부질환으로 유아와 소아에서 많이 발생한다(Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. Lancet 2003;361: 150-60; Sturgil S, Bernard LA. Atopic dermatitis update. Curr Opin Pediatr 2004;16:396-401.). 알레르기 비염, 천식과 함께 가장 대표적인 알레르기 질환으로 유소아에서는 10~30%의 유병률을 보이고 성인에서는 1~3%의 유병률을 보인다고 알려져 있다(Ozakaya E. Adult-onset atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol 2005;52:579-82). 지난 30년간 유소아에서 유병률이 23배 증가하고 있고(Larsen FS, Hanifin JM. Secular change in the occurrence of atopic dermatitis. Acta Dermatol Venereol (Stockh) 1992;176: 7-12), 근래에는 성인에서도 유병률이 크게 증가하고 있다(Sandstrom MH, Faergemann J. Br J Dermatol 2004;150:103-10).

[0003] 현재까지 아토피피부염의 원인 및 발생기전으로는 유전적으로 발생하는 비정상적인 면역학적 반응과 표피투과 및 항균 장벽기능의 이상이 중요한 원인으로 제시되고 있으며. 여기에 환경적인 요소가 중요하게 관여하는 복합적인 원인의 질환으로 알려져 있다(Wolf R, Wolf D. Clin Dermatol 2012;30:329-34). 그 외에 아토피피부염의 발생률 증가에 영향을 미치는 요인으로 대기오염, 핵가족화, 모유수유 감소, 수입과 교육수준의 증가, 항생제 사용 증가로 인한 항원에 대한 노출의 증가, 주거환경 변화, 공업 발달로 인한 새로운 항원물질의 등장 등이 관여하는 것으로 고려되고 있다(Wollenberg A, Kraft S, Oppel T, Bieber T. Clin Exp Dermatol 2000;25:530-4).

[0004] 아토피피부염에서 유전적 요인이 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있는데, 부모 중 한 사람이 아토피피부염, 기관지 천식, 알레르기 비염이 있는 경우에 자녀의 약 50%에서 아토피피부염이 나타날 수 있으며 부모 모두가 이들 질환을 가졌을 경우에는 자녀의 약 80%에서 아토피피부염이 발생할 수 있다고 알려져 있다.

[0005] 아토피피부염도 기관지 천식의 구분처럼 외인성(extrinsic) 및 내인성(intrinsic) 으로 구분 하고 있다(Bruijnzeel P, Hamelink M, Prins J, Remmert G, Meyling FG. Agents Actions Suppl 1989;28:233-8; Humbert M, Menz G, Ting S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, et al. Immunol Today 1999;20:528-33). 즉, 외부 항원에 대한 혈청 특이 IgE 증가가 나타나는 외인성 아토피피부염과 이들 인자와는 상관관계가 없는 내인성 아토피피부염으로 나뉜다(Akdis CA, Akdis M. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2002;2:403-6). 내인성 아토피피부염의 경우 외인성 아토피피부염에 비해 질환의 경과가 경하고, 여성에서 많이 나타나며, 호흡기질환의 동반이 적으며, 늦은 나이에 발생하는 특징을 보인다(Schmid-Grendelmeier P, Simon D, Simon HU, Akdis CA, Wurthrich B. Allergy 2001;56:841-9).

[0006] 표피 각질층 분화와 자연보습인자의 형성에 중요한 역할을 하는 필라그린(fillagrin) 유전자의 기능결함 돌연변이(Loss of function mutation)가 아토피피부염의 발병과 밀접하게 연관되어 있다는 것이 보고되었으며(Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, az-Lacava A, et al. J Allergy Clin Immunol 2006;118:214-9), 필라그린은 표피의 과립세포에 존재하는 케라토하이알린 과립(keratohyalin granule)을 구성하는 분자량이 큰 단백질인 프로필라그린(profilaggrin)이 분해되어 생성되는 히스티딘(histidine)이 풍부한 단백질로서 각질세포 내에서 케라틴을 응집하는 역할을 한다. 또한 필라그린이 분해되면 urocanic acid, pyrrolidone carboxylic acid와 같은 자연보습인자(natural moisturizing factor)로 변하여 각질층의 수분을 유지시키는 역할을 하게 된다(Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, az-Lacava A, et al. J Allergy Clin Immunol 2006;118:214-9). 이처럼 피부장벽기능을 담당하는 중요한 단백질인 필라그린을 발현하는 유전자에 기능결함이 생기면 각질세포의 구조 변화와 피부장벽기능 저하를 일으키게 될 뿐만 아니라 각질층의 수분함유 능력을 감소시켜 아토피피부염에서 특징적으로 나타나는 건조한 피부를 유발하게 된다. 선천적으로 심한 건조피부와 미세한 비늘을 특징으로 하는 보통비늘증(Ichthyosis vulgaris) 환자에서도 필라그린 유전자내의 돌연변이가 있음이 보고되었고(Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, Nemoto-Hasebe I, Sakai K,

Nagasaki A, Ota M, Hata H, Evans AT, Palmer CN, Shimizu H, McLean WH. J Invest Dermatol 2008;128:1436-4), 아토피피부염과 보통비늘증이 동반되어 있는 것은 이 두 질환의 병인에 필라그린 유전자 이상이 관여하기 때문이라는 사실이 확인되었기 때문에 (Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, Nemoto-Hasebe I, Sakai K, Nagasaki A, Ota M, Hata H, Evans AT, Palmer CN, Shimizu H, McLean WH. J Invest Dermatol 2008;128:1436-41) 필라그린 단백질의 소실 또는 감소가 피부건조증을 비롯한 아토피피부염의 다양한 임상 증상을 유발하게 된다고 정리되고 있다 (Irvine AD, McLean WH. J Invest Dermatol 2006;126:1200-2).

[0007]

아토피피부염 환자에서 피부장벽기능의 이상은 병변 및 건조한 피부뿐만 아니라 정상적으로 보이는 피부에서도 관찰된다. 이는 각질층에서 지질의 감소, 특히 세라마이드의 감소가 주된 원인으로 생각되고 있는데, 세라마이드는 각질세포간 지질의 약 50%를 이루는 가장 중요한 구성 요소로서, 각질층 주지질인 콜레스테롤, 자유 지방산과 결합하여 다층의 이중막 구조(multi-lamellar structure)를 형성하게 되며, 각질세포 사이에 있는 다층 이중막은 외부로의 수분증발을 막아서 각질세포가 수분을 함유하도록 기능한다. 따라서 아토피피부염에서 보이는 건조피부의 중요한 원인의 하나로 세라마이드 감소를 제시하고 있다.

[0008]

표피의 pH 기울기는 피부장벽의 항상성을 유지하는데 매우 중요한데, 아토피피부염 병변은 비병변부보다 피부표면 pH가 더 높다고 알려져 있다 (Hachem JP, Man MQ, Crumrine D, Uchida Y, Brown BE, Rogiers V, Roseeuw D, Feingold KR, Elias PM. J Invest Dermatol 2005;125:510-20). 이러한 pH의 증가는 세라마이드 합성에 중요한 효소인 beta-glucocerebrosidase와 acid sphingomyelinase의 기능 감소를 일으킬 뿐만 아니라 단백분해효소인 serine protease(SP)의 활성도를 증가시킨다(Hachem JP, Man MQ, Crumrine D, Uchida Y, Brown BE, Rogiers V, Roseeuw D, Feingold KR, Elias PM. J Invest Dermatol 2005;125:510-2). 증가된 pH에 의해 활성화된 serine protease(SP)는 beta-glucocerebrosidase와 acidic sphingomyelinase의 분해를 유발하고 pretease-activated receptor-2(PAR-2)의 활성화를 통해 층판소체(lamellar body)의 분비를 억제하여 각질세포간 지질막의 층판구조 형성을 방해하고 결과적으로 피부장벽을 손상시키는 것으로 알려져 있다(Hachem JP, Man MQ, Crumrine D, Uchida Y, Brown BE, Rogiers V, Roseeuw D, Feingold KR, Elias PM. J Invest Dermatol 2005;125:510-20). 또한 증가된 SP의 활성은 각질교소체를 분해하여 각질세포의 탈락을 유도하고 각질층의 견고함을 감소시켜 피부장벽의 손상을 더욱 촉진한다. 또한 표피에서 사이토카인 분비를 활성화시켜 염증반응을 일으키고 항균 펩티드를 분해하여 항균작용과 염증반응에 영향을 미친다(Kato T, Takai T, Fujimura T, Matsuoka H, Ogawa T, Murayama K, Ishii A, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Mite Allergy. 2009 Sep;64(9):1366-74)(도 1).

[0009]

SP의 작용은 SP 억제제에 의해 조절되는데 일부 아토피피부염 환자에서는 이러한 SP 억제제를 발현시키는 유전자인 SPINK5의 변이가 있어 억제제 생성이 결핍되므로 SP가 더욱 활성화된다는 것이 보고되었다(Kato A, Fukai K, Oiso N, Hosomi N, Murakami T, Ishii M. Br J Dermatol 2003;148:665-9). 또한 아토피피부염 환자에서 SP의 하나인 Kallikrein 7(KLK 7)의 발현을 조절하는 유전자의 기능향진 변이가 보고되었다(Vasilopoulos Y, Sharaf N, di Giovine F, Simon M, Cork MJ, Duff GW, Tazi-Ahnini R. J Dermatol Sci 2011;61:131-3). 아토피피부염에서는 이러한 여러 가지 요인에 의해 내인성 단백분해효소의 활성이 증가되고, 단백분해효소를 가지고 있는 항원의 침투에 의해 외인성 단백분해효소의 활성 또한 증가하게 되어 단백분해효소의 직접적인 영향 또는 이들과 결합하는 수용체인 protease activated receptor-2(PAR-2)의 활성화를 매개로 한 영향을 통해 피부장벽 기능이 저하된다고 할 수 있다(Wollenberg SK, Oppel T, Beiber T. Clin Dermatol 2000;25:530-4).

[0010]

아토피피부염에서는 필라그린 유전자의 기능저하 돌연변이, 세라마이드의 감소, 단백분해효소와 그 억제제 간 균형의 깨짐, 각질층 pH의 상승 등이 서로 밀접한 영향을 주면서 피부장벽의 손상이 유발된다. 이러한 피부장벽의 손상은 표피증식과 건조피부의 원인이 되고, 건조피부가 가려움증을 유발하며 가려움증으로 피부를 긁으면 이로 인해 다시 피부장벽이 손상되는 악순환이 반복되는데 손상된 피부장벽을 통한 외부 항원의 쉽게 투과하여 항원에 대한 감각이 유도됨으로써 내인성인 non-atopic form의 피부염이 외인성인 atopic form의 피부염으로 진행하게 된다(Elian E.A, Phyllis I, Catharina M, Robert Lindeboom, J. Henk, et al. J Am Acad Dermatol 2008;58:407-14).

[0011]

아토피피부염과 같이 복합적이고 다양한 유전 양상을 보이는 질환에서 원인 유전자를 찾는 것은 쉽지 않다. 현재까지 알려진 유전질환의 원인을 규명하는데 가장 좋은 도구는 모든 유전자에 존재하는 polymorphic markers를 찾는 것인데(Namkung JH, Lee JE, Kim E, Byun JY, Kim S, Shin ES, Cho EY, Yang JM. Exp Dermatol 2010;19:1048-53), 이러한 유전적 마커와 마커에 대한 돌연변이의 여부를 확인하는 방법은 지금까지 sequencing 방법을 이용하고 있으나 이 방법은 해당되는 부위를 각각 확인해야 하는 번거로움이 있어서 여러 유전자가 복합적으로 관여하는 아토피피부염의 경우에는 시간과 비용의 문제가 발생하고 이것이 이상이 생긴 유전자를 찾는 데

에 가장 큰 장애가 된다.

[0012] [관련 특허문헌]

[0013] 대한민국 특허공개번호 제1020090103175호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 아토피피부염을 유발하는 각 유전자에서 발생빈도가 높은 유전자부위를 선택하여 각각의 돌연변이의 여부를 한 번에 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 FLG 및 SPINK5 유전자 상의 유전자 단편을 PCR 증폭하기 위한 서열번호 1 내지 서열번호 14에 기재된 서열을 갖는 프라이머 조성물을 제공한다.

[0016] 또 본 발명은 SPINK5 및 KLK7 유전자 상의 유전자 단편을 PCR 증폭하기 위한 서열번호 15 내지 서열번호 24에 기재된 서열을 갖는 프라이머 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 서열번호 25 내지 서열번호 52에 기재된 서열을 갖는 FLG, SPINK5, 및 KLK7 유전자 상의 유전자 돌연변이 동시검출용 올리고머 프로브 조성물을 제공한다.

[0018] 또 본 발명은 a) 검체 시료로부터 DNA를 분리하는 단계; b) 프라이머로서 상기 본 발명의 조성물을 사용하여, 상기 DNA로부터 SPINK5 및 KLK7 유전자의 유전자 단편을 PCR 증폭하는 단계; c) 상기 본 발명의 올리고머 프로브가 부착되어 있는 막과, 상기 단계 b)에서 얻어진 PCR 증폭산물을 하이브리드 형성시키는 리버스 블랏 하이브리드형성 단계를 포함하는 아토피 환자의 유전자 상의 유전자 돌연변이 동시 검출 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 b)단계의 유전자 단편은 KLK7 유전자의 경우에는 155bp, SPINK5 유전자의 경우에는 100bp, 120bp, 145bp, 130bp, 153bp, 및 135bp 크기의 단편인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0020] 또 본 발명은 a) 검체 시료로부터 DNA를 분리하는 단계; b) 프라이머로서 상기 본 발명의 조성물을 사용하여, 상기 DNA로부터 FLG 및 SPINK5 유전자의 유전자 단편을 PCR 증폭하는 단계; c) 상기 본 발명의 올리고머 프로브가 부착되어 있는 막과, 상기 단계 b)에서 얻어진 PCR 증폭산물을 하이브리드 형성시키는 리버스 블랏 하이브리드형성 단계를 포함하는 아토피 환자의 유전자 상의 유전자 돌연변이 동시 검출 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 b)단계의 유전자 단편은 SPINK5 유전자 경우에는 170bp, 150bp, 및 140bp, Filaggrin의 경우에는 160bp 및 103bp 크기의 단편인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0022] 또 본 발명은 표면에 카르복실기를 갖는 막(membrane) 및 상기 본 발명에 기재된 올리고머 프로브를 포함하되, 상기 올리고머 프로브는 5' 말단에 아미노기가 부착되어 있으며, 상기 올리고머 프로브의 5' 말단에 부착된 아미노기와 상기 막 표면의 카르복실기가 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 올리고머 프로브가 부착된 막을 제공한다.

[0023] 또한 본 발명은 상기 본 발명에 기재된 프라이머 조성물 및 올리고머 프로브 조성물을 포함하는 아토피 환자의 유전자 상의 유전자 돌연변이 동시 검출용 키트를 제공한다.

[0024] 이하 본 발명을 설명한다.

[0025] 본 발명은 모든 유전자에 존재하는 polymorphic markers 를 찾는 방법의 단점을 보완 하고자 REBA (reverse blot hybridization assay)를 통하여 아토피 질환을 유발하는 각 유전자 (FLG, SPINK5, KLK7)에서 발생빈도가 높은 유전자부위를 선택하여 각각의 돌연변이의 여부를 한 번에 확인하고자 하였다.

[0026] 발명의 효과

[0027] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 방법은 아토피 환자의 돌연변이 여부는 물론 나아가서 신생아의 아토피피부염의 돌연변이 여부를 모니터링 할 수 있도록 도움을 주는 유용한 방법이다.

발명의 효과

[0028] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 방법은 아토피 환자의 돌연변이 여부는 물론 나아가서 신생아의 아토피피부염의 돌연변이 여부를 모니터링할 수 있도록 도움을 주는 유용한 방법이다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 아토피피부염에서 증가된 pH가 피부장벽을 손상시키는 기전
 도 2는 REBA Atopy-ID를 위한 PCR 증폭산물의 결과
 도 3은 REBA Atopy-ID 결과
 도 4는 제작된 probe의 특이도를 위한 sequencing 결과
 도 5는 아토피 환자의 임상검체에서의 REBA Atopy-ID 결과

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0031] 실시예 1. 재료 및 genomic DNA 추출

[0032] 연세대학교 원주의과대학 원주세브란기독병원 피부과에 의뢰된 혈액 78 검체와 중앙대학교병원 피부과에서 제공받은 17 검체를 대상으로 실시하였다. 제공된 혈액은 QIAamp Blood kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 사용설명서에 따라 핵산을 분리하였다. 분리된 핵산은 REBA Atopy screening을 수행하기 위한 PCR의 주형으로 사용되었다.

[0033] 실시예 2. REBA Atopy-ID의 유전자 수집 및 분석

[0034] 미국 국립생물정보센터 (National center for biotechnology information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Genbank 에서 표적으로 하는 PCR primer와 올리고뉴클레오타이드 프로브는 아토피피부염의 정확한 돌연변이 유무를 위해 한국인 아토피피부염 환자에서 가장 흔한 돌연변이가 나타난다고 알려진 Filaggrin과 SPINK5 유전자의 부위를 선택하여 제작하였다. 즉, Filaggrin의 두 부위인 3321delA와 K4022X 에서, Spink5의 A210G, G316A, A603T, A800G, A1103G, A1156G, C1188T, G1258A, T1851C, A2015C, G2475T 11개의 부위에서, 그리고 KLK7 돌연변이에 관여하는 유전자 부위를 검색하여 염기서열을 수집하였다. 멀티얼라인 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>)을 수행한 후 표적으로 하는 각각의 유전자들이 공통으로 가지는 염기서열 부위에서 2쌍의 primer를 디자인하였고, 그 중 reverse primer에는 PCR-REBA법을 위해 biotin을 5말단에 붙였다. 그리고 2쌍의 primer 내부에 존재하는 특이 부위에서 각각의 Filaggrin, Spink5, KLK7의 표적 유전자 부위를 검출할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 디자인 하였고 각 올리고뉴클레오타이드 프로브에는 짧은 막과 펩타이드 결합을 할 수 있도록 하기 위해 5말단에 amine기를 붙였다. 디자인한 primer와 올리고뉴클레오타이드 프로브는 바이오니아(대전, 한국)에 합성을 의뢰하였다.

[0035] 실시예 3. Multiplex PCR

[0036] 혈액검체에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 상용화된 Prime Taq Premix (2X) (Genet Bio, 논산, 한국)를 이용하여 PCR을 수행하였다. Prime Taq Premix (2X)의 조성은 primer Taq polymerase 1unit/10 μ l, 2X reaction buffer, 4mM MgCl₂, enzyme stabilizer, sediment, loading dye, pH 9.0, 0.5mM의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP이다. PCR을 위한 각 조성은 Prime Taq premix (2X) 10 μ l, 한 쌍의 10 pmole primer를 각각 1 μ l, ultrapure water 3 μ l, 각 균주의 genomic DNA 5 μ l로 총량을 20 μ l로 하였다. PCR 반응은 초기 변성과정을 위해 95 $^{\circ}$ C 5분, 일차 증폭을 위해 95 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초 반응을 10번 반복, 2차 증폭을 위해 95 $^{\circ}$ C 30초, 54 $^{\circ}$ C 30초 반응을 40번 반복 후 완전한 신장반응을 위해 72 $^{\circ}$ C 10분간 반응시켰다. PCR 반응이 완료된 PCR 산물은 2% TBE (Tris-borate-ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate) agarose gel (W/V ratio)에서 100 volt로 20분간 전기영동하여 ethidium bromide에 10분간 염색 후 자외선 투과조명기로 100-200bp 사이의 PCR 산물의 증폭여

부를 확인하였다.

[0037]

[0038]

실시예 4. REBA Atopy-ID의 수행

[0039]

증폭한 PCR 산물을 이용한 REBA Atopy-ID는 제조자가 제시한 실험조건을 이용하여 시행하였으며 실험방법은 다음과 같다. PCR 산물에 동량의 Denaturation solution (0.2N NaOH, 0.2mM EDTA)을 섞어 실온에 5분간 반응시켜 이중가닥의 PCR 반응산물을 단일가닥으로 변성하였다. 반응하는 동안 Filaggrin, Spink5, KLK7 유전자 특이 올리고뉴클레오타이드 프로브가 부착된 얇은막 REBA Atopy-ID membrane(M&D, Korea)에 2X SSPE/0.1% SDS으로 희석시켜 minitray에 넣은 후 55 에서 30분간 반응시키고, WS (washing solution)을 이용하여 62℃에서 10분간 두 번 씻어준 후 1:2000 (v/v)으로 희석한 alkaline phosphatase-labeled streptavidin conjugate (Roche, Mannheim, Germany)을 처리하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 Strip을 CDS (Conjugate Dilution Solution)로 실온에 1분간 2회 세척하고, alkaline phosphatase에 반응하는 발색용 기질 용액인 NBT/BCIP (Roche, Germany)에 10분간 감광시킨후 검출 여부를 판단하였다.

[0040]

상기 실시예의 결과는 하기와 같다.

[0041]

1. PCR 증폭결과

[0042]

분리한 genomic DNA를 이용하여 Set I primer mixture인 KLK7에서 155bp, Spink5의 A210G의 100bp, G316A의 120bp, A603T의 145bp, A800G의 130bp, A1103G와 A1156G, 그리고 C1188T부위의 153bp, G1258A의 135bp, SetII primer mixture인 T1851C의 170bp, A2015C의 150bp, G2475T의 140bp와 Filaggrin의 3321delA의 160bp, K4022X의 103bp의 PCR 증폭산물을 확인 할 수 있었다(도 2).

[0043]

2. 각 probe에 대한 변이 여부 결과

[0044]

제공받은 혈액 DNA를 이용하여 제작된 각 probe의 특이도 검사를 실시하였으며(도 3) 변이여부에 해당되는 검체에 대해서는 sequencing을 통하여 일치도를 확인하였다(도 4).

[0045]

3. 임상검체를 이용한 PCR-REBA의 유용성 평가

[0046]

원주세브란스기독병원 피부과에서 제공받은 아토피피부염환자 60 검체, 비아토피 정상인 17 검체, 중앙대학교병원 피부과에서 제공받은 아토피피부염환자 17 검체를 통하여 PCR-REBA를 수행하였다(도 5). KLK7, Spink5, Filaggrin의 각 유전자 부위의 변이 여부의 전체 결과를 보면 다음과 같다(표 1). 아토피환자 77검체 중 각 유전자 부위에서 변이가 1에서 10까지 다양하였으며 가장 많은 변이 부위는 5개로 19/77 (24.7%)로 나타났다(표 2). 또한 각 KLK 7, Spink5, Filaggrin의 유전자 부위별로 가장 많은 변이가 나타난 부위는 Spink5의 C1188T 33/77 (42.9%)와 G2475T 21/77 (27.3%)순으로 나타났다(표 3).

[0047]

정상인 17검체에 대한 결과는 다음과 같다(표 4). Filaggrin 유전자에서는 모두 WT로 나왔고, KLK 7과 Spink5 부위에서는 WT와 WT-MT mix이 대부분 나왔으나 Spink5의 3부위 (C1188T, G1258A, G2475T)에서는 변이가 나타났다(표 5).

표 1

MT(*)	번호		나이	성별	IgE	EASI score	KLK 7
1	8	A11	6	F	정상	11.2	WT
1	2	A19	16	F	583.2	5.4	WT
1	65	A39	41	F			WT
2	60	A34	23	M			WT
2	14	X5	28	M	216.1	XLI	MT
3	13	A1	19	F	1305.1	9.6	WT
3	24	A4	12	F	1271.5	12.1	WT
3	30	A7	36	M	1052.1	31.6	WT-MT mix
3	55	A29	2	M			WT-MT mix
3	64	A38	40	F			WT-MT mix
3	22	X4	21	M		XLI	MT
4	31	A6	31	M	3000<	4.8	WT-MT mix
4	12	A8	21	M	3000<	4.4	WT-MT mix
4	41	A18	7	F	자료없음	8.8	WT
4	4	X8	8	M		XLI	WT-MT mix
4	19	V3	9	M		XLI	MT
4	71	V6	4	M			WT
4	51	V7					WT
5	1	A5	9	F	2117.5	30.4	WT
5	15	A9	19	F	3000<	21.4	MT
5	9	A10	21	M	3000<	12	WT-MT mix
5	5	A12	11	F	자료없음	0.4	WT-MT mix
5	43	A14	4	F	14.4	7.5	WT
5	6	A21	28	M	261	8.3	WT
5	44	A23					MT
5	45	A24					WT
5	47	A26					WT-MT mix
5	57	A31	19	M			WT
5	62	A36	18	F			WT-MT mix
5	66	A40	6	F			MT
5	67	A41	23	M			WT
5	68	A42	2	F			WT
5	29	X2	16	M	54.7	XLI	WT-MT mix
5	20	X3	26	M	138.2	XLI	WT-MT mix
5	40	V2	10	M		XLI	WT-MT mix
5	52	V8					WT-MT mix
6	42	A3	15	M	1000<	22.7	WT-MT mix
6	11	A13	23개월	M	자료없음	0.2	WT
6	7	A15	6	F	12	0.4	WT
6	26	A16	33	F	69	3.4	WT
6	28	A20	48	M	자료없음	14	WT-MT mix
6	10	A22	29	M	2220.1	3.4	WT-MT mix
6	48	A27					WT-MT mix
6	58	A32	14	M			WT-MT mix
6	59	A33	5	F			MT
6	63	A37	29	M			MT
6	69	A43	24	M			WT-MT mix
6	33	V4	19	M		XLI	MT
6	72	V11	19	M			WT
7	70	A0					WT-MT mix
7	3	A2	24	M	3000<	22.6	MT
7	56	A30	33	F			MT
8	49	A28					WT-MT mix
8	16	X6	39	M		XLI	MT
8	17	X7	20	M		XLI	MT
8	50	V5					WT-MT mix
9	46	A25					WT-MT mix
9	35	X1	22	M	1126.5	XLI	WT-MT mix
10	61	A35	18	M			MT
10	21	V1	4	F	863.7	IV	WT-MT mix
6	600	K4022X	8	F	6.1	36.1	WT-MT mix
8	709	K4022X	5	M	1.5	70.6	WT-MT mix
7	713	K4022X	34	F	0.7	138.0	WT
9	715	K4022X	34	F	0.0	7.7	WT
7	722		6	F	0.6	386.0	WT-MT mix
4	875		13	F	27.0	3362.0	WT
6	916		33	F	0.4	820.0	MT
6	960		8	M	16.7	2003.0	WT-MT mix
9	1009		29	M			WT-MT mix
7	1048		2y9m	M	0.0	52.9	WT-MT mix
8	1050		2y9m	M			MT
6	1060		3y3m	M			WT
7	1064		1y3m	M	2.3	8.2	WT-MT mix
10	1079		7	F	6.6	48.8	MT
5	1088		19	M	10.4	807.0	WT-MT mix
6	1104		9	M	6.6	118.0	WT-MT mix
4	1264		10	M	16.5	1242.0	WT

[0048]

NM7)	번호	나이	성별	키	Score		A210G	G16A	A69T	A80G	A119G	A119G	C118T	G129A	T181C	A201C	G247T
1	8	A11	6	F	장강	11.2	WT	WT	WT>MT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT>MT
1	2	A19	16	F	583.2	5.4	WT	WT	WT>MT	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT	WT
65	A39	41	F				WT>MT mix	WT	(MT)	(MT)	WT	WT	WT	WT	(MT)	WT	WT
2	60	A34	23	M			WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
2	14	X5	28	M	216.1	X1	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT
3	13	A1	19	F	1305.1	96	WT	WT	WT	(WT>MT mix)	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT<MT
3	24	A4	12	F	1271.5	12.1	WT	WT	WT>MT	WT>MT mix	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT
3	30	A7	36	M	1052.1	31.6	WT	WT	WT	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	(MT)	WT	WT
3	55	A29	2	M			WT	WT	WT	WT	WT	MT	WT	WT	WT	WT	WT
3	64	A38	40	F			WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MT
3	22	X4	21	M		X1	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MT
4	31	X6	31	M	3000<	4.8	WT	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MT
4	12	A8	21	M	3000<	4.4	WT	WT	WT	(WT>MT mix)	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT<MT
4	41	A18	7	F	기묘영음	8.8	WT	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT>MT mix
4	4	X8	8	M		X1	WT	WT	WT>MT	WT>MT mix	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT>MT mix
4	19	V3	9	M		X1	WT	WT	WT>MT	WT>MT mix	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT
4	71	V6	4	M			WT	WT	WT>MT mix	WT>MT	WT	WT	MT	MT	WT	WT	WT
4	51	V7		F	2117.5	30.4	WT	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	WT
5	1	A5	9	F			WT	WT	(WT>MT mix)	(MT)	MT	WT>MT mix	MT	MT	WT	WT	WT
5	15	A9	19	F	3000<	21.4	WT	WT	WT	(WT>MT mix)	WT	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	WT<MT
5	9	A10	21	M	3000<	12	WT	WT	WT		MT	WT>MT mix	MT	WT>MT mix		WT	WT
5	5	A12	11	F	기묘영음	0.4	WT	WT	WT>MT	WT>MT mix	MT	WT>MT mix	MT	MT	WT	WT	WT>MT
5	48	A14	4	F	144	7.5	WT	WT	WT	MT	MT	WT>MT mix	MT	MT	WT	WT	WT>MT mix
5	6	A21	28	M	261	8.3	WT	WT	WT>MT	WT>MT mix	MT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT>MT mix
5	44	A23					WT	WT	WT	MT	MT	WT>MT mix	MT	MT	WT	WT	WT
5	45	A24					WT	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	WT>MT mix
5	47	A26					WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT
5	57	A31	19	M			WT>MT	WT>MT	WT>MT mix	MT	WT	WT>MT mix	MT	MT	WT	WT	WT
5	62	A36	18	F			WT	WT	WT>MT mix	(WT>MT mix)	WT	WT	MT	MT	WT	WT	WT
5	66	A40	6	F			WT	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	MT	MT	WT	WT	WT
5	67	A41	23	M			WT	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	MT	MT	WT	WT	WT
5	68	A42	2	F			WT	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	MT	MT	WT	WT	WT
5	29	X2	16	M	547	X1	WT	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	MT	WT>MT mix	MT	WT	WT	WT	WT
5	20	X3	26	M	1382	X1	WT	WT	WT>MT	WT>MT mix	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	WT	WT
5	40	V2	10	M		X1	WT	WT	WT	WT>MT mix	WT	WT	WT>MT mix	WT>MT mix	WT	WT	WT<MT

표 3

[0054]

		WT	WT-MT mix	MT	total
KLK 7		25 (32.5%)	35 (45.5%)	17 (22.1%)	77
Spink5 (11)	A210G	57 (74%)	20 (26%)		77
	G316A	56 (72.7%)	21 (27.3%)		77
	A603T	37 (48.1%)	40 (51.9%)		77
	A800G	24 (31.2%)	39(50.6%)	14 (18.2%)	77
	A1103G	60 (77.9%)		17 (22.1%)	77
	A1156G	47 (61%)	23 (29.9%)	7 (9.1%)	77
	C1188T	22 (28.6%)	22 (28.6%)	33 (42.9%)	77
	G1258A	34 (44.2%)	34 (44.2%)	9 (11.7%)	77
	T1851C	55 (71.4%)	22 (28.6%)		77
	A2015C	55 (71.4%)	22 (28.6%)		77
	G2475T	37 (48.1%)	19 (24.7%)	21 (27.3%)	77
Filaggrin (2)	3321delA	73 (94.8%)	4 (5.2%)		77
	K4022X	64 (83.1%)	12 (15.6%)	1 (1.3%)	77

[0055]

표 3은 아토피환자에서 각 유전자 부위에 따른 변이 여부

표 4

	나이	성별	KLK7	3321d4a	Fila K4Q2X	A210G	G316A	A603T	A103G	A1156G	C118T	G1238A	T1351C	A2015C	G2475T
N01	28	M	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	(MT)	WT	WT
N02	26	M	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	(MT-MT mix)	WT	WT	WT	WT-MT mix
N03	26	M	WT-MT mix	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT-MT mix	(MT-MT mix)	WT	WT	WT	WT
N04	29	F	WT	WT	WT	WT	WT	WT-MT	WT	WT	(MT-MT mix)	WT	WT	WT	WT-MT mix
N05	25	F	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	(MT)	WT	WT	WT-MT mix
N06	33	M	WT-MT mix	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	(MT-MT mix)	WT	WT	WT	WT-MT mix
N07		M	WT-MT mix	WT	WT	WT	WT	WT-MT	WT	WT	(MT-MT mix)	WT	WT	WT	WT-MT mix
N08	28	M	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	(MT-MT mix)	WT	(MT)	WT	WT-MT mix
N09	25	F	WT	WT	WT	WT-MT mix	WT-MT mix	WT	WT	WT	(MT-MT mix)	WT	WT-MT mix	WT-MT mix	WT
N10	24	F	WT-MT mix	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	(MT-MT mix)	WT	WT	WT	WT-MT
N11	25	M	WT-MT mix	WT	WT	WT	WT	WT-MT mix	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT-MT
N12	23	M	WT	WT	WT	WT	WT	WT-MT mix	(MT)	(WT-MT mix)	MT	MT	WT	WT	WT-MT
N13	25	F	WT	WT	WT	WT-MT mix	WT-MT mix	WT	WT	WT	WT	WT	WT-MT mix	WT-MT mix	WT-MT mix
N14	25	M	WT-MT mix	WT	WT	WT	WT	WT-MT mix	WT	WT	(MT-MT mix)	WT	WT	WT	WT-MT mix
N15	24	M	WT-MT mix	WT	WT	WT	WT	WT-MT mix	WT	WT	(MT-MT mix)	WT	WT	WT	WT-MT mix
N16	25	M	WT-MT mix	WT	WT	WT	WT	WT-MT mix	WT	WT	MT	WT-MT mix	WT	WT	WT-MT mix
N17	25	F	WT-MT mix	WT	WT	WT	WT	WT-MT mix	WT	WT	MT	WT-MT mix	WT	WT	WT-MT mix

[0056]

[0057] 표 4는 REBA Atopy-ID를 이용한 정상인 임상검체에서의 KLK 7, Spink5, Filaggrin 유전자 변이 여부

표 5

		WT	WT-MT mix	MT	total
KLK 7		8 (47.1%)	9 (52.9%)		17
Spink5 (11)	A210G	15 (88.2%)	2 (11.8%)		17
	G316A	15 (88.2%)	2 (11.8%)		17
	A603T	9 (52.9%)	8 (47.1%)		17

[0058]

	A800G	4 (23.5%)	13 (71.5%)		17
	A1103G	17 (100%)			17
	A1156G	14 (82.4%)	3 (17.6%)		17
	C1188T	4 (23.5%)	8 (47.1%)	5 (29.4%)	17
	G1258A	12 (70.6%)	4 (23.5%)	1 (5.9%)	17
	T1851C	15 (88.2%)	2 (11.8%)		17
	A2015C	15 (88.2%)	2 (11.8%)		17
	G2475T	4 (23.5%)	11 (64.7%)	2 (11.8%)	17
Filaggrin (2)	3321delA	17 (100%)			17
	K4022X	17 (100%)			17

[0059]

표 5는 정상인에서 각 유전자 부위에 따른 변이 여부

표 6

[0060]

Gene	position	Primer	Sequence	Modification
KLK 7	KLK 7	F	CGCCGATGACCTATGAAGTCAAAT(서열번호 1)	
		R	TGACTCTTCTCCAGCACTGAGGGT(서열번호 2)	5'-biotin
SPINK5	A210G	F	ATATTTTCAATGTTGAAGGGAGATCTGG(서열번호 3)	
	100bp	R	TAAGTCTCTCTCAGCCTAGCCTGG(서열번호 4)	5'-biotin
	G316A	F	GTCTTTTGAGCTGAATTGTGATGATT(서열번호 5)	
	120bp	R	CCCATCTGTGCCACAAACAGCTTC(서열번호 6)	5'-biotin
	A603T	F	TTCAGCAATTCGTAGCAGAGGATAT(서열번호 7)	
	145bp	R	CTAGTTTCACCTCTCGCTTGGCATT(서열번호 8)	5'-biotin
	A800G	F	GTAACATGAAGATCGAAGCATCTCT(서열번호 9)	
	130bp	R	ACTGATTCTCACCACAATTCTCTTTAACT(서열번호 10)	5'-biotin
	1103-1188	F	GGCCAACTTACTTCTTCTATCTCGG(서열번호 11)	
	153bp	R	GAAGACCTCACATGGAGCAGGTG(서열번호 12)	5'-biotin
	G1258A	F	GAGATCACTTCTAATGTGGCGATTC(서열번호 13)	
	190bp	R	AGGGCCATATCCCTCTGAGTTGCT(서열번호 14)	5'-biotin
	T1851C	F	GTATGTATTGGGTGCTAGGAATGATTG(서열번호 15)	
	170bp	R	TGCAAAATCTCATCTTTTATTGCAGTA(서열번호 16)	5'-biotin
	A2015C	F	GGGATGGTGAATTTGGGAA(서열번호 17)	
	150bp	R	TTTCTAGAACTGTGAATCTTGGCCATT(서열번호 18)	5'-biotin
	G2475T	F	TGAGGCGTTTGTCTACTTTGATTGA(서열번호 19)	
	140bp	R1	TCATTGCTCTTTCTCCTGTATTGC(서열번호 20)	5'-biotin
Filaggrin	3321delA	F	GGTCCAGTGGTAGTCAGGCCAGT(서열번호 21)	
	160bp	R-1	AGATGAAAGACCTGAACGTCCAGA(서열번호 22)	5'-biotin
	K4022X	F	CAAGGAAAGATCTGATATCTGTAAAGCAAGT(서열번호 23)	
	103bp	R	AGAATGGCCACATAAACCTGGGT(서열번호 24)	5'-biotin

[0061]

표 6은 본 발명에서 사용된 primer

표 7

[0062]

Gene	position	Probe	Sequence	Modification
KLK 7	KLK 7	WT	ATTTAAACCTCATGCCCTGTTGAT(서열번호 25)	5'-Amine
		MT	TATTTAAACCAACCTCATGCCCTG(서열번호 26)	5'-Amine
SPINK5	A210G	WT	TCTGTGTCCACTTCTGAACATGCTAC(서열번호 27)	5'-Amine
		MT	TTCTGTGTCCGCTTCTGAACATG(서열번호 28)	5'-Amine
	G316A	WT	AAAGGAGAAAGAGATGGGGATTTTATC(서열번호 29)	5'-Amine
		MT	AAAGGAGAAAGAAATGGGGATTTTATC(서열번호 30)	5'-Amine

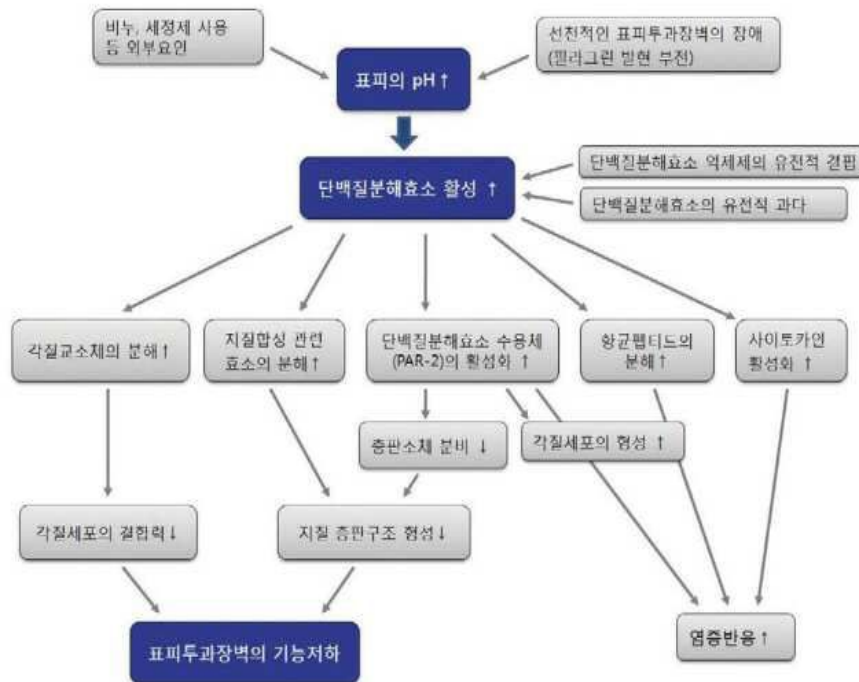
	A603T	WT	AGGACTGAGGATACTGAAAATATGATTGAGT(서열번호 31)	5'-Amine
		MT	AGGACTGAGGATACTGTAAATATGATTGAGT(서열번호 32)	5'-Amine
	A800G	WT	CAGCAAGCAGCGTTTTTCAGAG(서열번호 33)	5'-Amine
		MT	CAGCAAGCGCGTTTTTCA(서열번호 34)	5'-Amine
	A1103G	WT	GAGCTTTGCAGTGAATATCGA(서열번호 35)	5'-Amine
		MT	CAGAGCTTTGCAATGAATATCGA(서열번호 36)	5'-Amine
	A1156G	WT	CACCAGAGAGAACAATCCTATCCA(서열번호 37)	5'-Amine
		MT	CCAGAGAGAACGATCCTATCCA(서열번호 38)	5'-Amine
	C1188T	WT	GGAAAGTGCATGGCAACAC(서열번호 39)	5'-Amine
		MT	AAAGTGCACGGCAACACCTG(서열번호 40)	5'-Amine
	G1258A	WT	GAAAAAGAAGGAAGTAAATCAAGAAACAA(서열번호 41)	5'-Amine
		MT	AGAAGGAAGGTGAATCAAGAAACAAAAG(서열번호 42)	5'-Amine
	T1851C	WT	GAAAGAGCTGAACCCAGAGCAAA(서열번호 43)	5'-Amine
		MT	AAAGAGCCGAACCCAGAGCAA(서열번호 44)	5'-Amine
	A2015C	WT	CCTTACAGTAATAGAAACAGAAGGTTATCTGTA(서열번호 45)	5'-Amine
		MT	CCTTACAGTAATAGAACAGAAGGTTATCTGTA(서열번호 46)	5'-Amine
	G2475T	WT	AAGAAAGAGGAGGAAGACAGGAGCA(서열번호 47)	5'-Amine
		MT	AAGAAAGATGATGAAGACAGGAGCA(서열번호 48)	5'-Amine
Filaggrin	3321delA	WT	ACTGGTCAGGGGAAGGTCTG(서열번호 49)	5'-Amine
		MT	ACTGGTCGGGGGAAGGTCTG(서열번호 50)	5'-Amine
	K4022X	WT	CGTTTGGTAAAGATCATCCAAGGT(서열번호 51)	5'-Amine
		MT	CGTTTGGTTAAGATCATCCAAGGT(서열번호 52)	5'-Amine

[0063]

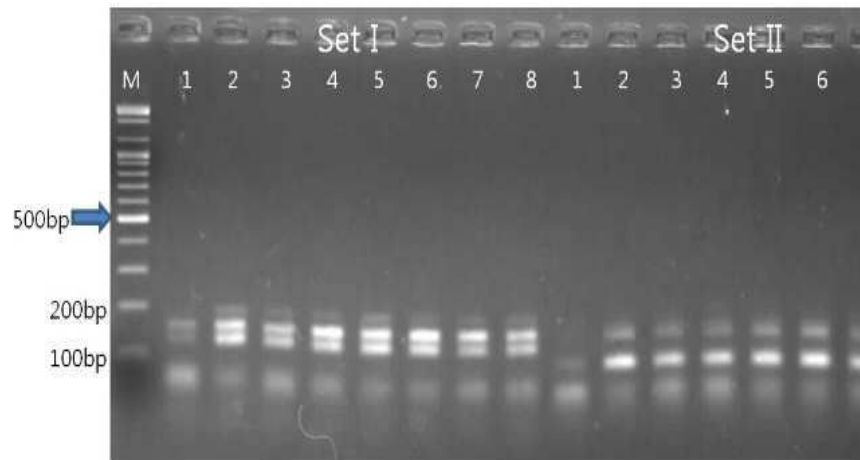
표 7은 본 발명에서 사용된 probe

도면

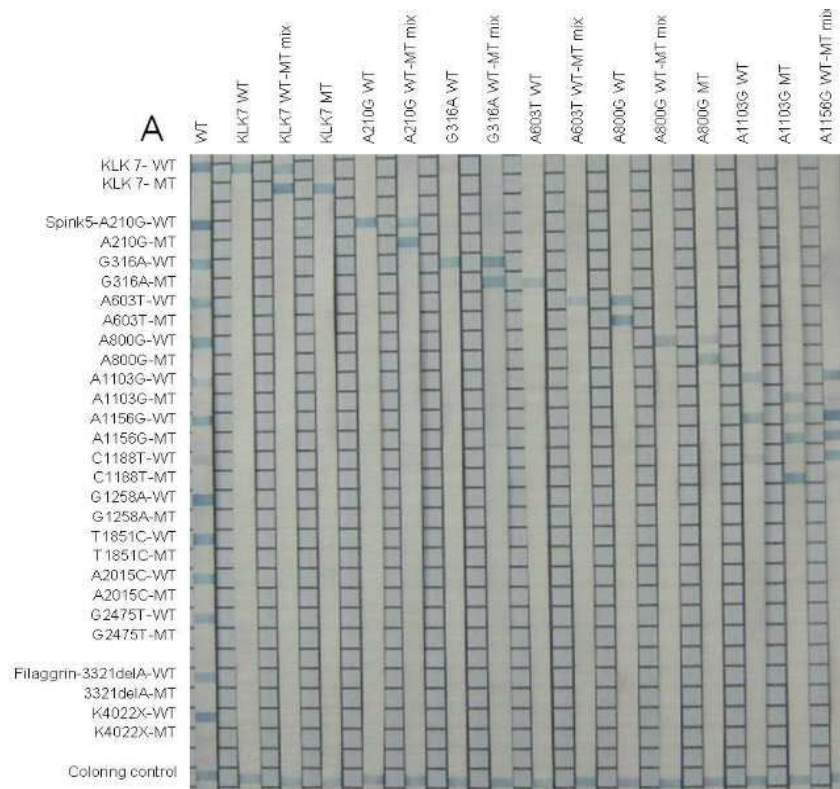
도면1



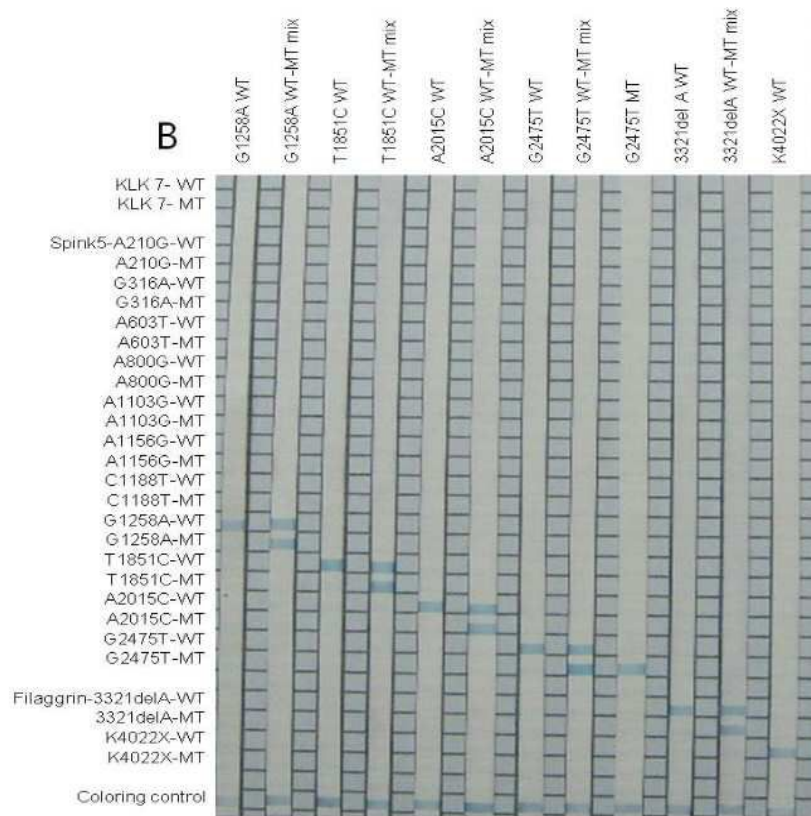
도면2



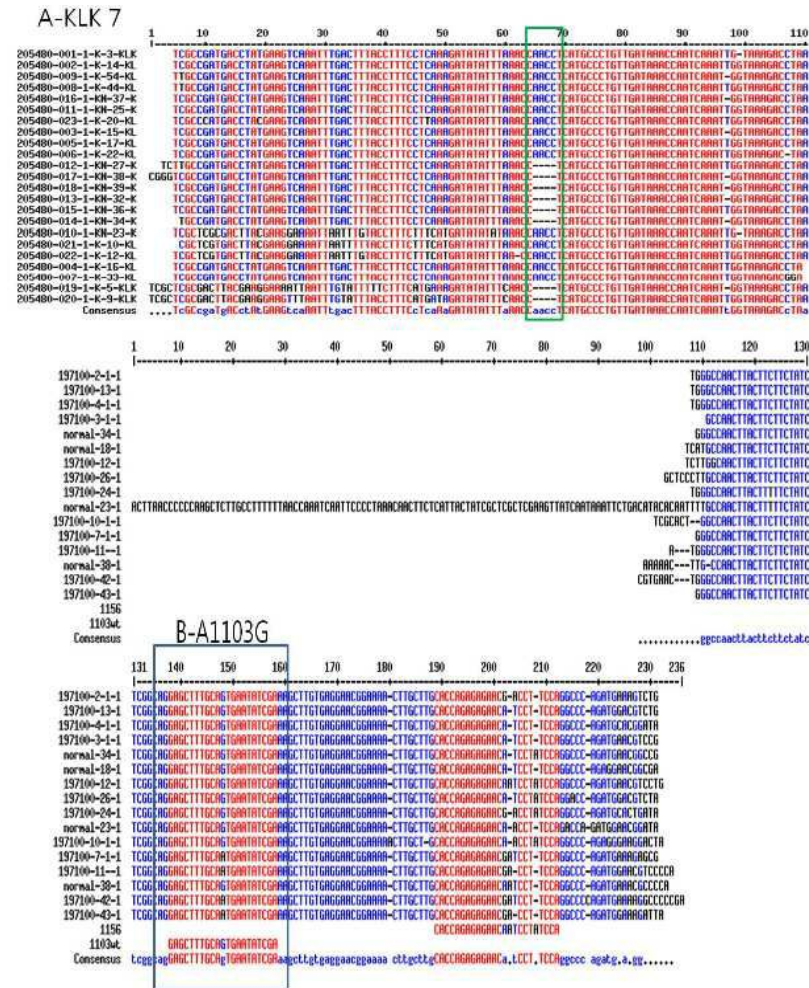
도면3a



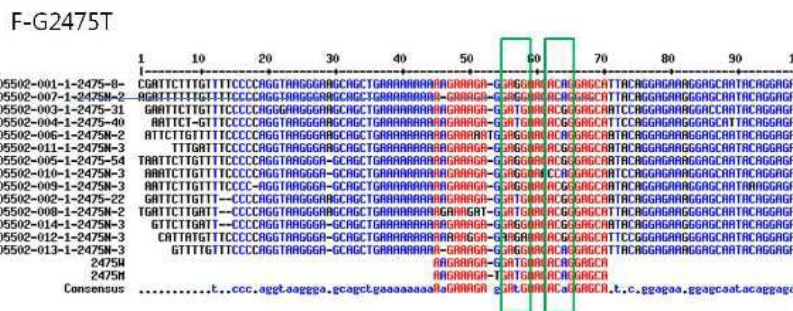
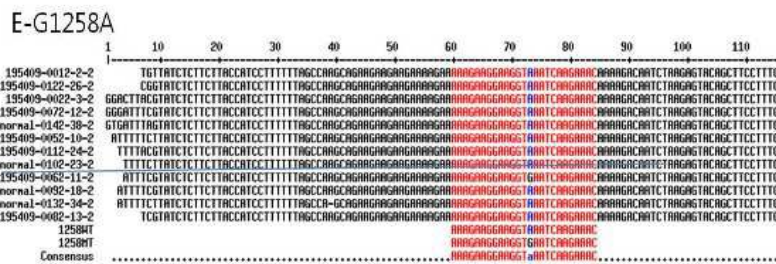
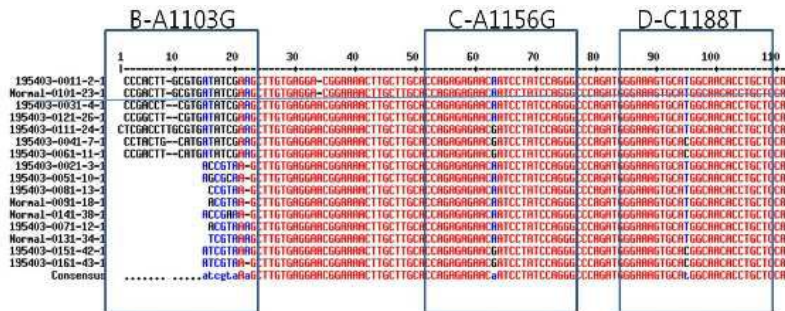
도면3b



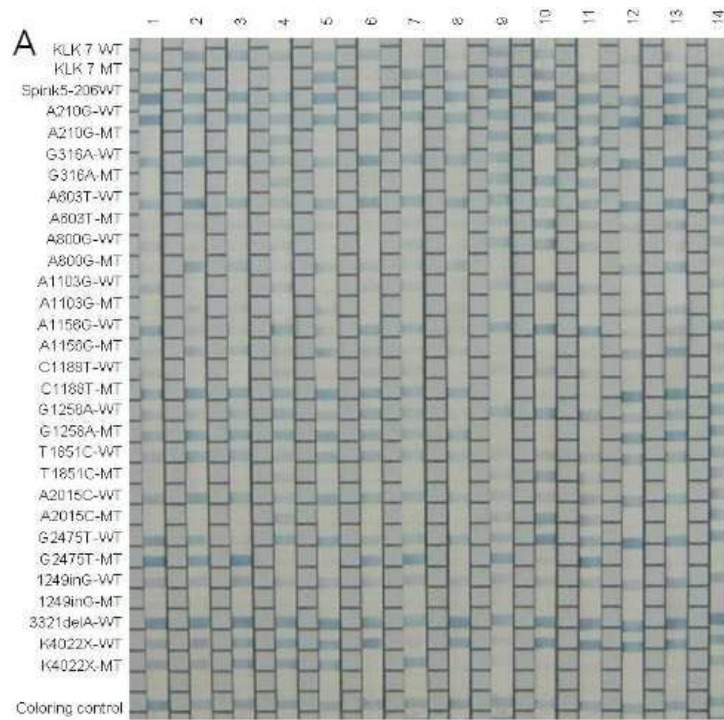
도면4a



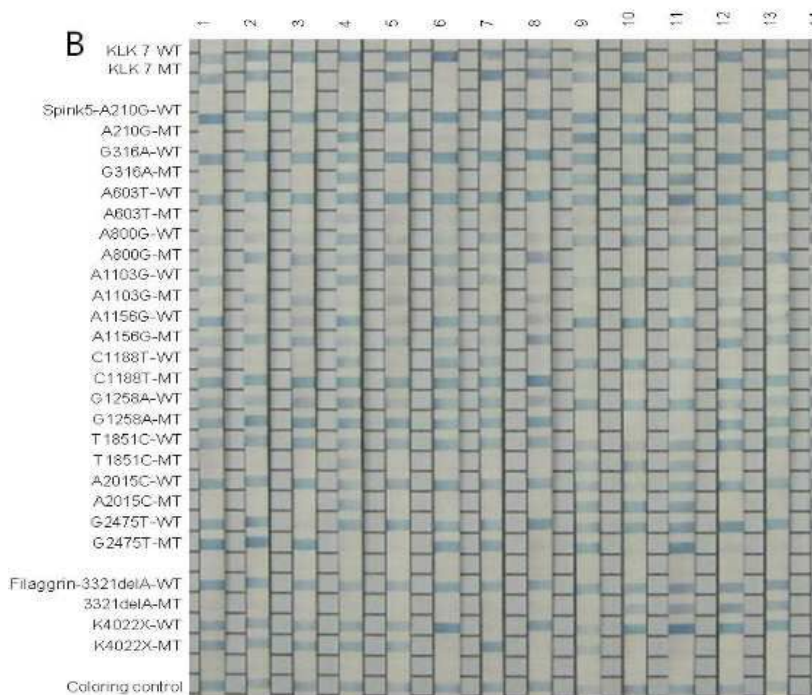
도면4b



도면5a



도면5b



서열목록

<110> Molecules and Diagnostics Inc.

Yonsei University Wonju Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Primer, probe for detecting mutation of atopic subject and method
using the same

<160> 52

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

cgccgatgac ctatgaagtc aaat 24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tgactcttct ccagcactga ggg 24

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

atatttttca atgttgaagg gagatctgg 29

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

taactgctct cctcagccta gcctgg 26

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

gtcttttgca gctgaattgt gatgattt

28

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

cccattctgtg ccacaaacag cttc

24

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ttcagcaatt cgtacagag gatat

25

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ctagtttcac cctctcgctt ggcatt

26

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gtaacatgaa gatcggaagc atctct	26
<210> 10	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 10	
actgattctc accacaattt ctcttttaac t	31
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 11	
ggccaactta cttcttctat ctcgg	25
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 12	
gaagacctca cacatggagc aggtg	25
<210> 13	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 13	
gagatcactt ctaatgtggc gattc	25
<210> 14	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	primer	
<400>	14	
agggccatat	ccctctgagt	tgct
		24
<210>	15	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	15	
gtatgtattg	ggtgctagga	atgattg
		27
<210>	16	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	16	
tgcaaatct	catcctttca	ttgcagta
		28
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	17	
gggatggtgg	aattggggaa	
		20
<210>	18	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	18	
tttctagaac	tgtgaatctt	ggccatt
		27
<210>	19	
<211>	25	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

tgaggcgttt gttcactttg attga

25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

tcattgctcc tttctcctgt attgc

25

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

ggtccagtgg tagtcaggcc agt

23

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

agatgaaaga ccctgaacgt ccaga

25

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

caaggaaaga tctgatatct gtaaagcaag t

31

<210> 24

<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	24	
	agaatggcca cataaacctg ggt	23
<210>	25	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	25	
	atttaaact catgccctgt tgat	24
<210>	26	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	26	
	tatttaaacc aacctcatgc cctg	24
<210>	27	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	27	
	tctgtgtcca cttctgaaca tgctac	26
<210>	28	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	28	

ttctgtgtcc gcttctgaac atg

23

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 29

aaaggagaaa gagatgggga ttttatac

27

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 30

aaaggagaaa gaaatgggga ttttatac

27

<210> 31

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 31

aggactgagg atactgaaaa tatgattgag t

31

<210> 32

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 32

aggactgagg atactgtaaa tatgattgag t

31

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	probe	
<400>	33	
cagcaagcag	cgtttttcag ag	22
<210>	34	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	34	
cagcaagcgg	cgtttttca	19
<210>	35	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	35	
gagctttgca	gtgaatatcg a	21
<210>	36	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	36	
cagagctttg	caatgaatat cga	23
<210>	37	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	37	
caccagagag	aacaatccta tcca	24
<210>	38	
<211>	22	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	38	
	ccagagagaa cgatcctatc ca	22
<210>	39	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	39	
	ggaaagtgca tggcaacac	19
<210>	40	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	40	
	aaagtgcacg gcaacacctg	20
<210>	41	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	41	
	gaaaaagaag gaaggtaaat caagaaaca	30
<210>	42	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	probe	
<400>	42	
	agaaggaagg tgaatcaaga aacaaaag	28
<210>	43	

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 43
 gaaagagctg aaccagagc aaa 23

<210> 44
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 44
 aaagagccga acccagagca a 21

<210> 45
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 45
 ccttacagta atagaaacag aaggttatct gta 33

<210> 46
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 46
 ccttacagta atagaaccag aaggttatct gta 33

<210> 47
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 47

aagaaagagg aggaagacag gagca	25
<210> 48	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> probe	
<400> 48	
aagaaagatg atgaagacag gagca	25
<210> 49	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> probe	
<400> 49	
actggtcagg gggaaggtct g	21
<210> 50	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> probe	
<400> 50	
actggtcggg ggaaggtctg	20
<210> 51	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> probe	
<400> 51	
cgtttggtaa agatcatcca aggt	24
<210> 52	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> probe	

<400> 52

cgtttggtta agatcatcca aggt

24