

(19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.⁷
C12Q 1/68

(11) 공개번호 10-2005-0094521
(43) 공개일자 2005년09월28일

(21) 출원번호 10-2004-0019671
(22) 출원일자 2004년03월23일

(71) 출원인 연세대학교
서울특별시 서대문구 신촌동 134번지

(72) 발명자 박태선
서울시 서대문구 연희동 740 연희성원아파트 104동 1306호
박건구
강원도 춘천시 후평동 893 동아아파트 104동 105호
박성희
서울특별시마포구합정동447-26번지청정빌라502호

(74) 대리인 신동인

심사청구 : 있음

(54) 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자를이용한 알코올성 간질환의 진단방법 및 진단키트

요약

본 발명은 알코올 섭취 또는 알코올성 간질환의 진단방법 및 진단키트에 관한 것으로, 보다 상세하게는 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자를 이용하여 조직세포에서 분리한 mRNA를 역전사시켜 수득된 cDNA와 혼성화시켜 유전자 활성의 증가를 확인하는 알코올 섭취여부의 진단방법 및 진단키트에 관한 것이다.

본 발명에 의한 진단키트는 알코올 섭취여부의 진단 및 알코올성 간질환의 진단이 가능하며, 알코올성 지질대사를 개선하기 위한 식품소재의 효능검증 및 작용기작 규명을 위한 도구로 응용될 수 있다.

대표도

도 3

색인어

알코올, cDNA 마이크로어레이, 진단키트

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 의한 cDNA 마이크로어레이의 제작에 관한 개략도이고,

도 2은 쥐(Sprague-Dawley)에 대한 8주간의 실험식이의 실시 후, 누적 체중증가량의 변화를 나타낸 그래프이고,

도 3는 대조군(CD)(초록색-Cy3)과 에탄올 섭취군(ED)(붉은색-Cy-5)에서 특이적으로 발현이 변화된 유전자 양상을 cDNA 마이크로어레이에 의해 확인한 스캐닝분석 사진이고,

도 4은 상기 cDNA 마이크로어레이를 통하여 발현변화가 나타난 유전자들의 스캐터 플롯(scatter plot)을 나타낸 도면이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자를 이용한 알코올성 간질환의 진단방법 및 진단키트에 관한 것이다.

만성적인 알코올 섭취는 영양장애 및 이로 인한 알코올성 간손상을 유발할 수 있다. 만성적인 알코올 섭취가 고지혈증 및 지방간을 유발하는 기전에 관하여 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase) 및 알데히드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase)에 의한 알코올의 대사결과, 간세포내 NADH/NAD⁺ 비율을 증가시키게 되고, 이와 같은 변화는 간세포내에서 지방산의 산화, TCA cycle 활성화 및 글루코네오제네시스(gluconeogenesis) 활성을 저해시키는 반면, 트리글리세리드(triglyceride)의 모체가 되는 글리세롤 3-포스페이트(glycerol-3-phosphate)와 지방산(fatty acid) 합성을 증가시킴으로써 결과적으로 중성지방 합성 능력을 증가시키고 지방간을 초래하게 된다고 보고하고 있다(Decarli M.S. et al., *Journal of Nutrition*, 91, pp331-336, 1967).

또한, 알코올 자체가 신체 주요기관에 독소로 작용할 수 있다. 즉, 알코올 산화에 의해 간세포에 산소결핍증과 괴사가 초래되며, 알코올대사시 생성되는 지질과산화물, 아세트알데히드와 지방산 에틸에스터(fatty acid ethylester) 자체가 독성을 나타내어 주요 장기에 손상을 입히는 것으로 알려져 있다(Laposata E.A. et al., *Science*, 231, pp497-499, 1986). 특히 에탄올은 주로 간에서 지방이나 포도당보다 우선적으로 대사되는데, 주요 당질대사인 포도당 대사와 글리코겐(glycogen) 대사에 주로 영향을 미치므로 간의 글리코겐 저장상태에 따라서 고혈당 또는 저혈당이 생길 수 있다. 즉, 지방산, 포도당 및 아미노산은 에탄올에 의해 글리코겐 인산화효소(glycogen phosphorylase)의 활성이 촉진되어 글리코겐의 분해는 증가되고 합성은 감소되므로 혈당이 높아진다(정병선, *한국식품영양학회지*, 4, pp207-211, 1991).

알코올 섭취는 시토크롬(cytochrome) P450에 의존적인 산화적 시스템을 유도하여 다양한 카시노젠(carcinogen)을 활성화시키고, DNA 수선(repair) 기전을 저해시킴으로써 암을 유발시키게 된다. 아울러 만성적인 에탄올 섭취는 자유 라디칼(free radical)에 의한 조직손상을 유도하며, TNF- α 의 생성을 촉진시켜 시토크롬 c의 방출을 초래하고, 케스페이즈(caspase) 3를 활성화시켜 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 것으로 보고되고 있다(Higychi H. et al., *Clinical and Experimental Research*, 20, pp340A-346A, 1996).

또한, 약물이나 기능성 식품의 효과는 유전자의 발현 변화를 통하여 나타난다고 하는 이론이 정립되어가고 있음에도 불구하고, 알코올성 손상에 대한 보호효과를 나타내는 영양·식이 성분, 더 나아가 다양한 생리활성을 나타내는 기능성 식이 성분에 의해 발현이 조절되는 유전자는 체계적으로 발굴되어 있지 않다.

기능성 식이성분의 생리활성을 밝히고자 하였던 기존의 연구들은 대부분 활성성분의 예측되는 생리작용을 시험관내(*in vitro*) 및 생체내(*in vivo*)에서 스크리닝한 후 작용기전을 규명하는 접근방식을 사용하고 있다.

한편, 최근 32억 개의 염기서열을 분석한 인간 게놈 프로젝트가 완료된 후, 생체내에 많은 유전자의 기능을 효율적으로 해석하기 위한 대표적인 기술로서 DNA 칩('DNA 마이크로어레이'라고도 함)이 대두되고 있다. 또한, 지금까지 밝혀진 암이나 기타 질병과 관련된 수백개의 유전자 돌연변이도 계속 증가되고 있는 추세이기 때문에, DNA 칩의 중요성은 더욱 커지고 있는 실정이다. 급속히 발달한 DNA 칩 기술은 수많은 세포 전사체들의 발현 변이를 일시에 관찰할 수 있도록 해주었다(Schena et al., *Science*, 270:467-470, 1995; DeRisi et al., *Science*, 278:680-686, 1997; Iyer et al., *Science*, 283:83-87, 1999).

따라서, 본 발명자들은 cDNA 마이크로어레이를 이용하여 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자들을 발견하고, 상기 유전자들을 이용한 진단키트가 알코올성 간질환의 개선을 위한 식품의 효능검증에 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자를 동정하고, 동정된 유전자를 이용한 알코올 섭취 또는 알코올성 간질환의 진단방법 및 진단키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자를 동정하고, 동정된 유전자를 이용한 알코올성 간질환의 진단방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자를 이용한 알코올성 간질환의 진단용 진단키트를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자를 동정하고, 동정된 유전자를 이용한 알코올성 간질환의 진단방법을 제공한다.

구체적으로, 예를 들어 간조직에서 mRNA를 분리한 후, 분리된 mRNA를 대조군 -Cy3(초록색)와 에탄올섭취군-Cy5 (붉은색)로 각각 라벨링한 다음 역전사하여 cDNA를 합성한다. 합성된 cDNA를 혼성화 카세트(Hybridization cassette)인 cDNA 마이크로어레이 칩에 넣고, 표적(target) DNA와 혼성화한 후, 스캐닝을 하여 유전자 발현 유전자발현 양상의 차이를 분석한다(도 2 참조). 그 결과, cDNA 칩 상에 존재하는 5,029개의 유전자 중에서 Cy5/Cy3의 비율이 1.5배 이상 증가한 유전자는 2%(5029개의 유전자 중 102개)(표 5 내지 8 참조)에 해당된다. 이때, 발현이 증가된 유전자들을 기능별로 분류하면 상향-조절된 유전자들은 탄수화물 대사(carbohydrate metabolism), 지방산/콜레스테롤 대사(fatty acid/cholesterol metabolism), 및 신호전달(signal transduction)에 관련된 유전자이다.

이때, 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자는 유전자 등록번호(Genebank) AA819622(응집인자 II 수용체(coagulation factor II receptor)), AI045872(아르기닌 바소프레신 수용체1A(arginine vasopressin receptor 1A)), AA964628(글루코스-6-포스페이트(glucose-6-phosphatase, catalytic)), AI070028(UDP 글리코실 전이효소 1 패밀리(UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6)), AA858453(알도라제 A(aldolase A)), AA901316(6-피루보일-테트라하이드로프테린 신테이즈/간세포 핵인자 1α의 이성화 조효소(6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha)), AA997902(글루쿠로니다제(Glucuronidase, beta)), AI072330(락테이트 탈수소효소 A(lactate dehydrogenase A)), AI029454(포스포프рук토키나제(Phosphofructokinase, liver, B-type)), AI045558(미토콘드리아 내막 44와 호몰로그의 전이효소(translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog)), AA997541(스쿠알렌 에폭시다제(squalene epoxidase)), AA819663(아실-CoA(dihydroxyacetonephosphate acyltransferase)), AA955840(포스포리타제C(phospholipase C, delta 4)), AA998890(아넥신 III(Annexin III, Lipocortin III)), AA819465(아포리포단백질C-III(apolipoprotein C-III)), AA923919(카텝신 E(cathepsin E)), AA858866(5 뉴클레오티다제(5 nucleotidase)), AA858966(시토크롬 P450(Cytochrome P450, subfamily IIC6)), AA818499(시토크롬 P450, 4a10), AA818226(시토크롬 c 옥시다제, 서브유닛 4a), AA901407(베타인-호모시스테인 메틸트랜스퍼라제(betaine-homocysteine methyltransferase)), AA899878(파라티모신(parathymosin)), AA858865(핵 수용체 활성인자(nuclear receptor coactivator GT198)), AA924917(미토젠-활성화 단백질 키나제 12(mitogen-activated protein kinase 12)), AI044524(V-1 단백질), AI146077(고나도트로핀-해리 호르몬 수용체(gonadotropin-releasing hormone receptor)), AA924231(퍼옥시좀 막 단백질 4(peroxisomal membrane protein 4)), AA925425(베지클-결합 막 단백질 3(vesicle-associated membrane protein 3)), AI045501(뉴런 펜트락신 수용체(neuronal pentraxin receptor)), AA859339(스캐폴딩 단백질 SLIPR(scaffolding protein SLIPR)), AI059648(안지오텐시노젠(angiotensinogen)), AA858998(RAN(RAS 온코진 패밀리 멤버)), AA819424(단백질 티로신 포스파타제 IVA 형(protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2)), AI029599(핵수용체 서브패밀리 3(nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2), AA901045(전사 억제자 NAC1(transcriptional repressor NAC1)), AA924402(일반전사인자 IIa(general transcription factor IIa), 2 (12kD

subunit)), AI030913(크로모그라닌 B(chromogranin B)), AI044488(페레독신 1(ferredoxin 1)), AI111917(용질 캐리어 패밀리(solute carrier family) 16, member 7), AA924637(ESTs), AA819289(ESTs), AA818129(ESTs, GTP-결합 단백질과 약간 유사), AA900185(ESTs), AA858862(ESTs, RIKEN cDNA와 고도로 유사), AA901084(ESTs), AA858828(ESTs), AA926301(ESTs), AA819266(ESTs, A53047 6-포스포프룩토키나제와 고도로 유사), AA899544(ESTs, 작은 GTP-결합 단백질 rab5와 고도로 유사), AI111879(ESTs), AA900778(ESTs, β -1,4-갈락토실 트랜스퍼라제 3과 중간 유사), AA818812(ESTs), AA819217(ESTs, JC4667 TB2/DP1 단백질 상동성 마우스와 고도로 유사), AA924773(ESTs, TBR1_MOUSE T-brain-1 단백질과 고도로 유사), AA901329(ESTs), AA923999(ESTs), AA875529(ESTs), AA818912(ESTs), AA925113(ESTs, RIKEN cDNA 1810008A14와 중간 유사), AA818784(ESTs), AA859003(ESTs, S46997 B-세포 수용체 결합 단백질 BAP 29 마우스와 중간 유사), AA925163(ESTs, IF42_MOUSE 진행 개시인자 4A-II와 고도로 유사), AA924416(ESTs, 콘드로이친-4-술포트랜스퍼라제(chondroitin 4-sulfotransferase)와 약간 유사), AA925352(ESTs), AA818380(ESTs), AA924498(ESTs), AA925265(ESTs, 3-옥소산 CoA 트랜스퍼라제(3-oxoacid CoA transferase)과 고도로 유사), AA924500(ESTs), AI070147(ESTs), AA818922(ESTs, TATA-결합 단백질과 중간 유사), AA924948(ESTs), AA924429(ESTs), AA818809(ESTs), AA924793(ESTs, RIKEN cDNA 0610041D24와 고도로 유사), AA818811(ESTs), AA926313(ESTs), AA924795(ESTs), AA818783(ESTs, ROD_RAT 외래성 핵 리보핵단백질 D0(Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0)와 약간 유사), AA899472(ESTs, DSPP_RAT 덴틴 시알로포스포단백질 전구체(Dentin sialophosphoprotein precursor)와 약간 유사), AA818372(ESTs, ER23_HUMAN ER 루멘 단백질 함유 수용체 3(lumen protein retaining receptor 3)과 고도로 유사), AA925133(EST, S12207 가상 단백질(hypothetical protein)과 중간 유사), AA818475(ESTs, RIKEN cDNA 2310008M10와 고도로 유사), AI111895(ESTs), AA819702(ESTs, 에탄올 유도된 6(ethanol induced 6)와 약간 유사), AA818786(ESTs, BRD2_HUMAN 브로모도메인-함유 단백질 2와 고도로 유사), AA900508(ESTs), AA899910(ESTs, 가상 단백질 FLJ11280와 중간 유사), AA818815(ESTs), AA925335(ESTs), AA899578(ESTs), AA924523(ESTs, RIKEN cDNA 2400003B06와 중간 유사), AA858996(ESTs), AA965119(ESTs), AA926359(ESTs), AA818806(ESTs), AA925442(ESTs), AA818846(ESTs), AA899309(ESTs, JE0175 프레즐드 단백질-1b 인간(frezzed protein-1b human)과 중간 유사), AA899696(ESTs), AA875660(ESTs), AA900296(ESTs) 및 AA818792(ESTs)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자이다.

상기 유전자들을 동정한 다음, RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)을 수행하여 상기 유전자들의 발현변화 정도를 분석하고, 실시간 PCR(real-time PCR)에 의해 정량한다. RT-PCR은 cDNA 마이크로어레이의 결과를 확인하여 정확성을 높이는 데 사용되는 바, 본 발명의 유전자들은 마이크로어레이의 결과 및 RT-PCR의 결과와 높은 상관성을 나타낸다.

따라서, 본 발명은 조직세포에서 분리한 mRNA를 역전사시켜 수득된 cDNA와 상기 유전자들을 혼성화시켜 유전자 활성의 증가를 확인함을 특징으로 하는 알코올 성 간질환을 진단한다. 이때, 조직세포는 이에 한정하는 것은 아니나, 간세포 조직인 것이 바람직하다. 에탄올은 거의 모든 장기에 직접, 간접적인 영향을 미쳐 대사작용의 변화 및 기질적인 변화를 일으키나, 특히 간에서 지방 또는 포도당보다 에탄올이 우선적으로 대사되므로, 알코올 섭취시 간의 글리코겐 저장상태에 따라 고혈당 또는 저혈당을 유발할 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 쥐의 간 세포 조직 샘플(sample)에서 mRNA를 분리한 후, 이를 RT-PCR 또는 실시간 PCR을 수행하여 cDNA를 합성한 후, 상기에서 언급된 유전자 마커들의 프라이머를 제작하여 합성된 cDNA와 혼성화한다. 이때, 나타나는 유전자 발현의 증가양상을 확인함으로써 샘플의 알코올 섭취여부의 진단이 가능하다.

또한, 본 발명은 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자를 이용한 알코올성 간질환의 진단용 진단키트를 제공한다.

이때, 상기 진단키트는 i) 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 상기의 유전자, ii) 혼성화에 사용되는 완충용액, iii) RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소 및 iv) 발현여부를 확인하기 위한 염색시약을 포함한다. 구체적으로, 본 발명에 따른 키트에는 필요에 따라 i) 목적 DNA(시료)를 생성할 수 있는 프라이머, ii) cNTPs 및 rNTPs(사전 혼합형 또는 분리 공급형), iii) 독특한 표식물질로 표식해 높은 dNTPs 및 rNTPs, iv) 형광 염색제의 화학적 유도체와 같은 표식시약(post synthesis labeling agent), v) 역전사 효소, DNA 중합효소와 같은 효소, vi) 혼성화 완충용액, 세척 완충용액 등과 같은 완충용액, vii) 스핀 컬럼(spin column)과 같은 표식 탐침 정제용 시약 및 기구, 및 viii) 스트렙타비딘-알칼리 탈인산화효소 접합물질(streptavidin-alkaline phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescent) 또는 화학발광물질(chemiluminescent)의 기질 등의 다양한 시약이 포함될 수 있으나 이에 한정하는 것은 아니다.

또한, 상기 진단키트는 cDNA 마이크로어레이의 형태로 제작이 가능하다.

구체적으로, 본 발명에 의해 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자가 기관 위에 고정화된 것을 특징으로 하는 알코올 섭취여부의 진단용 cDNA 마이크로어레이이다. 본 발명의 한 실시예에서는 탐침 DNA를 제조하기 위해 상기 단일 유전자 DNA가 각각 삽입된 재조합 박테리아(competent bacteria)를 제조한 후, 그 콜로니로부터 PCR을 수행하여 탐침 DNA를 획득한다.

또한, 상기 탐침 DNA 분자를 DNA 칩의 기관상에 고정화시키기 위해 파이프조일렉트릭(piezoelectric)방식을 이용한 마이크로피펫팅(micropipetting)법, 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명에서는 핀 형태의 스폿터인 마이크로어레이를 이용한다. 상기 DNA 마이크로어레이의 기관은 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-L-lysine) 및 알데히드(aldehyde)로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 활성기가 코팅된 것이 바람직하나, 이에 한정하는 것은 아니다. 또한, 상기 기관은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막, 및 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 본 발명의 바람직한 실시예에서는 아미노-실란이 코팅된 슬라이드 글래스를 이용한다.

이하, 본 발명을 하기 참고예 및 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이에 의해 제한되는 것은 아니다.

참고예 1. 알코올 섭취에 대한 체중변화 및 조직 무게의 분석

본 발명자들은 에탄올 섭취에 따른 체중변화 및 조직무게의 변화에 미치는 영향을 살펴보았다.

1-1. 실험동물의 식이

본 발명자들은 체중 110 ~ 120g의 스프래그 다우리(Sprague-Dawley)종 수컷 쥐 20마리를 실험재료로 사용하였다. 상기 실험용 쥐에게 3일간은 일반 고형사료를 먹이시켜 적응기를 두고, 1주일간은 액체상태의 대조식이(purified liquid diet, control diet)시켜 재적응 시킨 후, 난괴법(completely randomized design)에 의해 대조군(CD) 및 에탄올섭취군(ED)의 2가지 군으로 나누어 8주간 사육하였다. 이때, 에탄올 섭취군은 3일간 액체식에 적응시킨 후, 에탄올 농도를 2%에서부터 시작하여 3일 간격으로 3%, 4% 및 5%로 점차로 늘려가면서 에탄올섭취에 대해 적응하는 기간을 두었다.

동물 사육실의 환경은 온도 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$, 및 12시간의 명암주기를 유지하였다. 매 1주일마다 식이를 급여하기 전 체중을 측정하였다.

1-2. 실험식이의 조성

모든 실험식이는 에탄올이 함유된 액체식이를 장기간 섭취시켜 지방간을 유도시킨 공지의 방법(DeCarli L.M. et al., *Journal of Nutrition*, 91, pp331-336, 1967; Yamada S. et al., *J. Nutr.*, 115(10), pp1285-1290, 1985)의 방법)에 따라 액체형태로 제조하였다.

구체적으로, 대조군의 경우 총 열량의 18%는 단백질, 35%는 지방, 그리고 나머지 47%는 당질을 제공하였고, 에탄올 섭취군의 경우 총열량의 18%는 단백질, 35%는 지방, 11%는 당질, 그리고 36%는 에탄올을 제공하였다(표 1).

표 1.
정제된 액체 식이에 있어서 에너지 조성(총 열량에 대한 %)

	단백질	지방	탄수화물	에탄올
CD	18	35	47	-
ED	18	35	11	36

CD: 대조군 식이(Control Diet), ED: 에탄올 식이(Ethanol Diet)

한편, 각 실험식이의 구체적인 구성성분은 하기 표 2에 개시된 바와 같다. 에탄올 섭취군의 경우 대조군에 비해 식이섭취량이 감소할 우려가 있으므로 모든 실험군의 쥐를 동일양 식이 공급(pair-feeding)시켰다. 즉, 에탄올 섭취군이 하루동안 섭취한 식이의 양을 측정하여 그 다음날 대조군의 쥐에게 동량을 제공함으로써 두 군의 식이섭취량을 일정하게 유지시켰다.

표 2.
정제된 액체 식이의 조성

성분	실험식이(g/L)	
	CD	ED
카제인(Casein)	41.4	41.4
옥수수 오일(Corn oil)	8.5	8.5
올리브 오일(Olive oil)	28.4	28.4
사플라워 오일(Safflower oil)	2.7	2.7
덱스트린-말토스 (Dextrin-maltose) ¹⁾	115.2	25.6
비타민 혼합물 ²⁾	2.5	2.5
미네랄 혼합물 ³⁾	8.75	8.75
콜린 비타르테이트 (Choline bitartrate)	0.53	0.53
섬유질(Fiber) ⁴⁾	10.0	10.0
소듐 카라제네이트 (Sodium carrageenate)	2.0	2.0
에탄올(Ethanol)	-	50.0

1) 덱스트린 : 말토스 = 80 : 20

2) 비타민 혼합물 (g/kg)

: 티아민·HCl(Thiamin·HCl) 0.6g, 리보플라빈(Riboflavin) 0.6g, 니코틴아미드(Nicotinamide) 25g, 피리독신·HCl(Pyridoxine·HCl) 0.7g, 니코틴산(Nicotinic acid) 3g, D-칼슘 판토텐네이트(D-calcium Pantothenate) 1.6g, 엽산(Folic acid) 0.2g, D-비오틴(D-biotin) 0.02g, 시아노코발라민(Cyanocobalamin; Vitamin B₁₂) 0.001g, 레티닐 팔미테이트(Retinyl palmitate)(250,000 IU/gm) 1.6g, DL- α -토코페롤 아세테이트(DL- α -tocopherol acetate)(250 IU/gm) 20g, 콜레칼시페롤(Cholecalciferol; Vitamin D₃) 0.25g, 메나퀴논(Menaquinone; Vitamin K₂) 0.05g 및 정제된 수크로스 분말 972.9g.

3) AIN-76 미네랄 혼합물 (g/kg)

: CaHPO₄ 500g, NaCl 74g, K₂H₆O₇H₂O 220g, K₂SO₄ 52g, MgO 24g, MnCO₃ 3.57g, Fe(C₆H₅O₇)·6H₂O 6g, ZnCO₃ 1.6g, CuCO₃ 0.3g, KIO₃ 0.01g, Na₂SeO₃·5H₂O 0.01g, CrK(SO₄)₂ 0.55g 및 정제된 수크로스 분말 118.00g.

4) 카르복시메틸 셀룰로스 소듐염(Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt)

이때, 모든 자료의 통계분석은 통계적 분석 시스템(Statistical Analysis System)(SAS version 8.01, SAS Institute Inc, Cary, NC) PC 패키지를 사용하여 실시하였고, 분석 수치는 평균 \pm SEM(표준편차)으로 나타내었다. 대조군(CD)과 에탄올 섭취군(ED) 간의 평균값의 차이는 독립적-샘플 t-테스트(independent-sample t-test)를 이용하여 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 또는 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

그 결과, 에탄올 섭취군(ED)의 경우 대조군(CD)에 비해 실험사육 1주 후부터 체중 증가폭이 더 적게 나타났고, 3주째부터 시작하여 8주째까지 체중 증가폭이 유의하게 더 낮아짐을 확인하였다($p < 0.05$)(표 2). 구체적으로, 에탄올 섭취군(ED)의 누적 체중증가량은 191 ± 5.9 g/8주로서 대조군(CD, 220 ± 7.9 g/8주)에 비해 유의적으로 더 낮았다($p < 0.01$). 일일 식이섭취량은 ED군과 CD군 간에 유의한 차이가 없었으나, 식이효율(FER)은 ED군이 CD군에 비해 유의적으로 더 낮았다($p < 0.01$). 상기와 같이 동량의 식이를 섭취하였음에도 불구하고 ED군의 체중증가량이 CD군에 비해 더 낮게 나타난 것은, 만성적인 알코올 섭취로 인해 영양소의 흡수가 감소하거나 또는 영양소의 배설이 증가하였기 때문으로 사료된다.

한편, 체중 100 g 당 간조직의 무게는, CD군($6.02 \pm 0.14 \text{g}/100\text{g}$ 체중)보다 ED군($5.30 \pm 0.09 \text{g}/100\text{g}$ 체중)에서 유의적으로 더 무거웠고($p < 0.001$), 신장의 무게 역시 CD군에 비해 ED군에서 유의적으로 더 무거웠다($p < 0.01$). 비장의 무게는 실험 군간에 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나, ED군이 CD군에 비해 더 높은 경향을 나타냄을 확인하였다(표 3).

표 3.
실험동물의 누적 체중 증가량 및 조직의 무게변화

	CD	ED
누적 체중 증가량 (g/8주)	222 ± 7.9	191 ± 5.9
식이량 (mL/일)	80.2 ± 0.26	79.3 ± 0.24
FER ¹⁾	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00
조직의 무게 (g/100g 체중)		
간	5.30 ± 0.09	6.02 ± 0.14
비장	0.29 ± 0.01	0.32 ± 0.02
신장	1.04 ± 0.03	1.15 ± 0.03

¹⁾ FER (food efficiency ratio)

= 실험기간 동안의 누적 체중 증가량 (g/일)/실험기간 동안의 식이량 (g/일)

참고예 2. 시료의 수집 및 전처리

상기 참고예 1의 실험식이를 8주간 공급한 후, 실험동물들을 12시간 절식시키고 에테르(ether)로 마취시킨 다음, 헤파린(heparin)을 처리한 주사기를 사용하여 복부대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈장은 4°C , 3,000rpm에서 15분간 원심분리하고 분석시까지 -70°C 에 냉동 보관하였다. 실험동물을 희생하기 전 체중을 측정하고 단두식(decapitation)으로 희생하여 간을 절제하였다. 절제된 간을 즉시 PBS(phosphate buffer saline)로 세척하여 여과지에 놓은 후, 여분의 물을 흡수시키고 무게를 측정한 다음, 액체질소로 급속 냉동시켜 -70°C 에 보관하였다가 실험재료로 사용하였다.

실시예 1. 혈중 지질성분 분석

효소비색법을 이용한 분석 키트(Eiken Chemical Co., Japan)를 사용하여 상기 참고예 2에서 수득한 혈장의 트리글리세리드(Triglyceride), 총 콜레스테롤(total cholesterol) 및 HDL-콜레스테롤 농도를 측정하였다(표 4).

표 4.
혈장 지질의 농도

	CD	ED
트리글리세리드 (mg/dL)	70.9 ± 11.6	61.1 ± 7.1
총 콜레스테롤 (mg/dL)	87.6 ± 3.4	99.8 ± 2.0
HDL-콜레스테롤 (mg/dL)	34.5 ± 1.2	47.9 ± 1.8
HDL-C/총-C (%) ¹⁾	39.9 ± 2.0	48.2 ± 2.0
아트로제닉 인덱스 (Atherogenic index) ²⁾	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.1

¹⁾ [HDL 콜레스테롤 (mg/dL)/총 콜레스테롤 (mg/dL)] $\times 100$

²⁾ [총 콜레스테롤 (mg/dL)-HDL 콜레스테롤 (mg/dL)]/HDL 콜레스테롤(mg/dL)

그 결과, 혈장 총콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도는 ED군에서 CD군에 비해 유의하게 더 높았다($p < 0.01$). 또한, ED군의 경우, CD군에 비해 혈장 HDL 콜레스테롤/총 콜레스테롤 비율($p < 0.01$) 및 동맥경화지표가 유의하게 더 높았다($p < 0.01$). 한편, 혈장 중성지방 농도는 CD군과 ED군 간에 유의한 차이가 없었다.

실시예 2. cDNA 마이크로어레이

상기 참고예 2에서 수득한 에탄올 섭취군(ED) 및 대조군(CD)의 간조직에서 mRNA를 분리한 후, cDNA 상용칩(TwinChip™ Rat, 디지털지노믹스(주))을 이용하여 cDNA 마이크로어레이(microarray)를 수행하였다.

2-1. RNA 분리

전체 RNA를 분석 정량하기 위하여 균질액 1 ml에 쥐의 간 조직 50 mg을 넣고 균질화기(homogenizer)를 이용하여 균질화한 다음 실온에 5분간 방치하였다. 상기 균질액을 3000 g로 10분간 원심분리한 후, 상층액 부분을 전체 RNA 정량에 사용하였다.

구체적으로, 상층액에 100 μ l의 페놀(phenol)과 100 μ l의 클로로포름(chloroform) : 이소아밀알코올(isoamylalcohol)이 24 : 1이 되도록 첨가하여 잘 혼합한 후, 추가적으로 원심분리를 2번 반복하여 상층액을 분리하였다. 또다시, 분리된 상층액과 동량으로 클로로포름 : 이소아밀알코올을 24 : 1이 되도록 첨가한 후, 다시 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 그 후, 0.5 ml의 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)을 처리하여 RNA를 침전시킨 후, 70% 에탄올로 세척하여 자연 건조시켰다. RNAase 유리수(free water)에서 RNA를 녹인 후, RNase-유리(free) DNase를 첨가하여 -70℃에서 보관하여 Cy3 및 Cy5의 라벨링(labelling) 재료로 사용하였다.

2-2. RNA의 Cy3 및 Cy5 라벨링

상기 실시예 2-1에서 분리된 대조군(CD)과 에탄올 섭취군(ED)의 RNA를 Cy3 (초록색)와 Cy-5 (붉은색)로 각각 라벨링하였다. 10~50 μ g의 전체 RNA에 올리고-dT 프라이머, 역전사효소(reverse transcriptase), dNTP, Cy3-dUTP, Cy5-dUTP를 각각 첨가하여 역전사하여 cDNA를 합성하였다. 상기과 같이 합성된 cDNA를 카트리지를 이용하여 정제한 후, 스피드-벡(speed-vec)에서 건조하고, 30 μ l의 혼성화 완충액(hybridization buffer)에 용해시켰다.

2-3. 혼성화 반응 (Hybridization)

상기 실시예 2-2에서 합성한 대조군(CD)과 에탄올 섭취군(ED)의 cDNA를 혼성화 카세트(Hybridization cassette)인 cDNA 마이크로어레이 칩(TwinChip™ Rat, 디지털지노믹스(주))에 넣고, 95~100℃에서 5분간 가열한 표적(target) DNA와 62℃에서 6시간 혼성화시켰다. 혼성화한 후 슬라이드를 1xSSC, 0.1% SDS 용액에서 5분간 2회 세척하고, 0.1xSSC에서 5분간 세척한 후 건조하여 하기의 방법으로 분석하였다.

2-4. 유전자칩의 분석

상기한 바와 같이, 혼성화된 마이크로어레이를 스캔어레이(Scanarray) 4000에서 스캔하여 각 위치에서의 Cy3와 Cy5 형광(fluorescent)을 분석하고, 대조군과 실험 데이터를 비교하여 유전자발현 양상의 차이를 살펴보았다.

그 결과, cDNA 칩 상에 존재하는 5,029개의 유전자 중에서 Cy5/Cy3의 비율이 1.5배 이상 증가한 유전자는 2%(5029개의 유전자 중 102개)이었다(표 5 내지 8). 발현이 증가된 유전자들을 기능별로 분류하면 탄수화물 대사(carbohydrate metabolism), 지방산/콜레스테롤 대사(fatty acid/cholesterol metabolism), 및 신호전달(signal transduction)에 관련된 유전자들이 확인되었다.(도 3)

표 5.
에탄올 섭취군에서 특이적으로 발현이 증가된 유전자(1)

등록번호 (Genebank)	유전자명	중간값의 비 (ratio of median)
--------------------	------	--------------------------------

혈관계(Cardiovascular system)		
AA819622	응집인자 II 수용체(coagulation factor II receptor)	2.87
AI045872	아르기닌 바소프레신 수용체 1A(arginine vasopressin receptor 1A)	1.95
탄수화물 대사(Carbohydrate metabolism)		
AA964628	글루코스-6-포스페이트(glucose-6-phosphatase, catalytic)	2.96
AI070028	UDP 글리코실 전이효소 1 패밀리(UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6)	2.60
AA858453	알도라제 A(aldolase A)	2.55
AA901316	6-피루보일-테트라하이드로프테린 신테아즈/간세포 핵인자 1 α 이성화 조효소(6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha)	2.40
AA997902	글루쿠로니다제(Glucuronidase, beta)	2.08
AI072330	락테이트 탈수소효소 A(lactate dehydrogenase A)	2.00
AI029454	포스포프룩토키나제(Phosphofructokinase, liver, B-type)	1.86
에너지 대사(Energy metabolism)		
AI045558	미토콘드리아 내막 44와 호몰로그의 전이효소(translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog)	2.24
지방산/콜레스테롤 대사(Fatty acid/cholesterol metabolism)		
AA997541	스쿠알렌 에폭시다제(squalene epoxidase)	12.68
AA819663	아실-CoA(dihydroxyacetonephosphate acyltransferase)	3.17
AA955840	포스포리타제 C(phospholipase C, delta 4)	2.45
AA998890	아넥신 III(Annexin III, Lipocortin III)	2.13
AA819465	아포리포단백질 C-III(apolipoprotein C-III)	2.08
면역(Immunology)		
AA923919	카텝신 E(cathepsin E)	2.32
핵산 대사(Nucleotide metabolism)		
AA858866	5 뉴클레오티다제(5 nucleotidase)	2.69
산화/환원(Oxidation/reduction)		
AA858966	시토크롬 P450(Cytochrome P450, subfamily 11C6)	2.90
AA818499	시토크롬 P450, 4a10	1.88
AA818226	시토크롬 c 옥시다제, 서브유닛 4a	1.49
단백질 대사(Protein metabolism)		
AA901407	베타인-호모시스테인 메틸트랜스퍼라제(betaine-homocysteine methyltransferase)	2.27
AA899878	파라티모신(parathymosin)	1.88
신호 전달(Signal transduction)		
AA858865	핵 수용체 활성인자(nuclear receptor coactivator GT198)	6.98
AA924917	미토젠-활성화 단백질 키나제 12(mitogen-activated protein kinase 12)	3.14
AI044524	V-1 단백질	3.01
AI146077	고나도트로핀-해리 호르몬 수용체(gonadotropin-releasing hormone receptor)	2.77

표 6.
에탄올 섭취군에서 특이적으로 발현이 증가된 유전자(2)

등록번호 (Genebank)	유전자명	중간값의 비
AA924231	퍼옥시좀 막 단백질 4(peroxisomal membrane protein 4)	2.73
AA925425	베지클-결합 막 단백질 3(vesicle-associated membrane protein 3)	2.08
AI045501	뉴런 펜트락신 수용체(neuronal pentraxin receptor)	2.03
AA859339	스캐폴딩 단백질 SLIPR(scaffolding protein SLIPR)	1.91
AI059648	안지오텐시노겐(angiotensinogen)	1.67
AA858998	RAN(RAS 온코진 패밀리 멤버)	1.64
AA819424	단백질 티로신 포스파타제 IVA 형(protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2)	1.41
전사(Transcription)		
AI029599	핵수용체 서브패밀리 3, group C, member 2	3.07
AA901045	전사 억제자 NAC1	2.59
AA924402	일반 전사인자 IIa, 2 (12kD subunit)	2.26

AI030913	크로모그라닌(chromogranin) B	1.71
	물질이동(Transport)	
AI044488	페리독신 1	1.70
AI111917	용질 캐리어 패밀리 16, member 7	1.69
	비분류(Nonclassified)	
AA924637	ESTs	3.82
AA819289	ESTs	3.50
AA818129	ESTs, Weakly similar to GTP-binding protein	3.43
AA900185	ESTs	3.39
AA858862	ESTs, Highly similar to RIKEN cDNA 1810046J19	3.37
AA901084	ESTs	3.28
AA858828	ESTs	3.28
AA926301	ESTs	3.26
AA819266	ESTs, Highly similar to A53047 6-phosphofructokinase	3.24
AA899544	ESTs, Highly similar to small GTP-binding protein rab5	3.19
AI111879	ESTs	3.18
AA900778	ESTs, Moderately similar to Beta-1,4-galactosyltransferase 3	3.13
AA818812	ESTs	3.02
AA819217	ESTs, Highly similar to JC4667 TB2/DP1 protein homolog - mouse	3.01
AA924773	ESTs, Highly similar to TBR1_MOUSE T-brain-1 protein	2.98
AA901329	ESTs	2.96
AA923999	ESTs	2.90
AA875529	ESTs	2.90
AA818912	ESTs	2.89
AA925113	ESTs, Moderately similar to RIKEN cDNA 1810008A14	2.87
AA818784	ESTs	2.82

표 7.
에탄올 섭취군에서 특이적으로 발현이 증가된 유전자(3)

등록번호 (Genebank)	유전자명	중간값의 비
AA859003	ESTs, Moderately similar to S46997 B-cell receptor associated protein BAP 29 - mouse	2.72
AA925163	ESTs, Highly similar to IF42_MOUSE Eukaryotic initiation factor 4A-II	2.70
AA924416	ESTs, Weakly similar to chondroitin 4-sulfotransferase	2.69
AA925352	ESTs	2.64
AA818380	ESTs	2.60
AA924498	ESTs	2.49
AA925265	ESTs, Highly similar to 3-oxoacid CoA transferase	2.39
AA924500	ESTs	2.39
AI070147	ESTs	2.38
AA818922	ESTs, Moderately similar to TATA-binding protein-binding protein	2.33
AA924948	ESTs	2.32
AA924429	ESTs	2.27
AA818809	ESTs	2.24
AA924793	ESTs, Highly similar to RIKEN cDNA 0610041D24	2.22
AA818811	ESTs	2.16
AA926313	ESTs	2.12
AA924795	ESTs	2.12
AA818783	ESTs, Weakly similar to ROD_RAT Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	2.12
AA899472	ESTs, Weakly similar to DSPP_RAT Dentin sialophosphoprotein precursor	2.08
AA818372	ESTs, Highly similar to ER23_HUMAN ER lumen protein retaining receptor 3	2.06
AA925133	EST, Moderately similar to S12207 hypothetical protein	2.06
AA818475	ESTs, Highly similar to RIKEN cDNA 2310008M10	2.05

AI111895	ESTs	2.04
AA819702	ESTs, Weakly similar to ethanol induced 6	2.03
AA818786	ESTs, Highly similar to BRD2_HUMAN Bromodomain-containing protein 2	1.97
AA900508	ESTs	1.94
AA899910	ESTs, Moderately similar to hypothetical protein FLJ11280	1.94
AA818815	ESTs	1.91
AA925335	ESTs	1.88
AA899578	ESTs	1.83
AA924523	ESTs, Moderately similar to RIKEN cDNA 2400003B06	1.83
AA858996	ESTs	1.82
AA965119	ESTs	1.80
AA926359	ESTs	1.78
AA818806	ESTs	1.75
AA925442	ESTs	1.70
AA818846	ESTs	1.70

표 8.
에탄올 섭취군에서 특이적으로 발현이 증가된 유전자(4)

등록번호 (Genebank)	유전자 명	중간값의 비
AA899309	ESTs, Moderately similar to JE0175 frezzled protein-1b - human	1.69
AA899696	ESTs	1.57
AA875660	ESTs	1.54
AA900296	ESTs	1.52
AA818792	ESTs	1.50

실시예 3. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

만성적인 알코올 섭취에 의해 유도된 상기 실시예 2의 유전자들의 발현변화 정도를 조사하기 위해 RT-PCR를 실시하였다.

구체적으로, 올리고 dT 프라이머와 슈퍼스크립트 키트(superscript™ II kit, Invitrogen Co., USA)를 이용하여 역전사반응을 수행하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 50 µl의 전체 부피에 10xPCR 완충액, 2.5 mM dNTPs, 2.5 pmole의 센스(sense) 및 안티센스(antisense) 프라이머(표 9)를 넣은 혼합액에 cDNA와 2.5 유닛의 Taq 폴리머라제(Takara Holdings Inc, Japan)를 넣어 수행하였다. 이때 PCR 조건은 94℃ 4분, 30 사이클의 [94℃ (30초), 59℃ (30초), 72℃ (45초)], 72℃ 10분이었다. 그 후, 증폭된 10 µl의 PCR 산물을 1% 아가로스 겔(agarose gel)에 전기영동하고 사진촬영을 한 다음, 덴시토미터(densitometer)(Gel Doc 1000, Bio-Rad, San Diego, CA)로 DNA 밴드를 분석하였다.

표 9.

등록번호	유전자명		PCR 프라이머 서열 (5'-3')	크기 (bps)
AI045872	아르기닌 바소프레신 수용체(arginine vasopressin receptor)	센스 안티 센스	ATGTCTGCCTATCCCACATA TCAGATTCATTCTGTCTCC	120
AA858453	알도라제 A(alcohol dehydrogenase A)	센스 안티 센스	ACAGACAACACTGCACACAC CAGCCAGTGAATCTCTCTTC	166
AA964628	글루코스-6-포스페이트 (glucose-6-phosphatase)	센스 안티 센스	TGAAGACACACTCTGCAAAC GATTCTCTCTCCAAGGTC	127
AA819663	아실-CoA: 디하이드록시아세톤 포스페이트 아실트랜스퍼라제	센스	GGCAGAGTAAGTCCTTTGTG CGGATGTAAGAAGCCAATAG	110

	(dihydroxyacetonephosphate cyltransferase)	안티 센스		
AA8588665	뉴클레오티다제	센스 안티 센스	TGGACTAACCCATTATCTGC GCCCTCCATACTATCCTTTC	128
AA858966	시토크롬 P450	센스 안티 센스	GTAAGCGCTCTACCACTGAG TCTGTACTTCACCCAAAGGA	142
AA901407	b-호모시스테인 메틸트랜스퍼라제(b-homocysteine methyltransferase)	센스 안티 센스	AATGGAAGCAGTCAGAACAG CAAGATCTTTTGAGCAGGAC	115
AA924917	MAP 키나아제 12	센스 안티 센스	AGTGTCCCAAAACCTCTAT TAAGCTTTCTGTCCAAGACC	183
AI029599	핵 수용체 서브패밀리 3	센스 안티 센스	ATGAGGAGCCAGTAACCTCA AACACATACAGCATGCAGAC	143
AA819266	ESTs, A53047 6-포스포프룩토키나제와 고도로 유사	센스 안티 센스	AGCAAGTGATGCTCTCTGAT GAAGCCTGTAATGTTCTCCA	120
AA900778	ESTs, B4G3_HUMAN β-1,4- 갈락토실트랜스퍼라제 3과 중간유사	센스 안티 센스	AGAAGCCAGATCACTCTTGA CAGGGCTTATGACTGTGAAT	143
AA899544	ESTs, 작은 GTP-결합단백질 rab5와 고도로 유사	센스 안티 센스	ACACATGGAGTAGAGCCATT GATCGACCTCACACTTGTCT	129
AA81921	ESTs, JC4667 TB2/DP1 단백질 호모로그-마우스와 고도로 유사	센스 안티 센스	CACACTGTCTACCTGGGACT AGTTCTTCTCCGACCTTTTC	167
AA924773	ESTs, TBR1_MOUSE T-브레인-1 단백질과 고도로 유사	센스 안티 센스	CCGTGTAGATCGTGTATAGT ACTCAGTTCTTCGCTGTCA	112
AA899463	프로콜라겐(procollagen)	센스 안티 센스	TAGCACCATTGTGTAGGACA TGTAAGACCTTGGGTCAAG	139
AI045500	UDP-글루코스 탈수소효소 (UDP-glucose dehydrogenase)	센스 안티 센스	TACAGAAGCTAAGAGGCAGG TGATGAAGGTCTCTGGACTT	189
AA955423	지방산 결합 단백질	센스 안티 센스	GTAACCAACGGTCTGACAT CAATGAGGACTGGCTAACTC	174
AA819624	IL-6 수용체	센스 안티 센스	AAGTCTCTCTGTCTGCTCCA CTATGGCAACCTTAGTGCTC	126
AI070618	RAB2	센스 안티 센스	ATTGGTGTAGAGTTTGGTGC CGTCTTCTAACCAGGTTGTC	196
AA924545	ESTs, RIKEN cDNA 1110001J03와 고도로 유사	센스 안티 센스	AACATCTGAGGACTTTCTGC CTCTGCCTCTTGCAGTAGTAT	165

실시예 4. 실시간 PCR 정량

알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가된 상기 실시예 3의 유전자들을 정량하기 위하여 라이트사이클러 실시간 PCR(Lightcycler Real-time PCR)(Roche molecular biochemical, UK)를 이용하여 정량적인 실시간 PCR을 실시하였다.

구체적으로, PCR 산물을 정량하기 위하여 사이버그린(SYBR Green) I 염색 (Roche molecular biochemical, UK)을 하였다. SYBR Green I 염색은 이중나선 DNA에 결합하는 염색법으로서, PCR 과정동안 이중나선 DNA가 생성될수록 형광 강도(fluorescence intensity)가 증가하게 된다. 먼저 PCR에 이용한 표적 유전자와 내재성(endogenous) 대조군(β -actin)에 대한 프라이머를 SYBR Green 마스터 믹스(Master mix)에 첨가하여 PCR을 실시한 후, 적절한 농도를 선택하는 프라이머 적합화(primer optimization)를 수행하였다. 합성된 cDNA 시료와 각각의 프라이머(표 9)를 혼합하고, SYBR Green 마스터 믹스를 첨가한 후 PCR을 수행하였고, 정량 소프트웨어(software)를 사용하여 분석하였다(표 10).

표 10.
mRNA 수준을 정량한 실시간 PCR

등록번호	유전자명	실시간 PCR (상대적 배율)	cDNA 마이크로어레이 (Cy5/Cy3 비율)
A1045872	아르기닌 바소프레신 수용체	1.30 \pm 0.11	1.95
AA858453	알도라제 A	1.08 \pm 0.13	2.55
AA964628	글루코스-6-포스페이트	1.65 \pm 0.11	2.96
AA819663	아실-CoA:디하이드록시아세톤 포스페이트 아실트랜스퍼라제	1.07 \pm 0.11	3.17
AA955840	포스포리파제 C, delta 4	1.70 \pm 0.53	2.45
AA858866	5 뉴클레오티다제	6.05 \pm 1.00	2.69
AA858966	시토크롬 P450	4.23 \pm 0.19	2.90
AA901407	b-호모시스테인 메틸트랜스퍼라제	1.56 \pm 0.44	2.27
AA924917	MAP 키나아제 12	2.78 \pm 0.09	3.14
A1029599	핵수용체 서브패밀리 3	1.26 \pm 0.48	3.07
AA819266	ESTs, A53047 6-포스포프рук토키나제와 고도로 유사	1.37 \pm 0.02	3.24
AA900778	ESTs, B4G3_HUMAN β -1,4-갈락토실트랜스퍼라제 3과 중간 유사	1.53 \pm 0.43	3.13
AA819217	ESTs, 작은 GTP-결합단백질 rab5와 고도로 유사	2.85 \pm 0.23	3.02
AA924793	ESTs, JC4667 TB2/DP1 단백질 호모로그-마우스와 고도로 유사	2.19 \pm 0.00	2.22
AA899463	프로콜라겐	0.35 \pm 0.00	0.33
Ai045500	UDP-글루코스 탈수소효소	0.84 \pm 0.10	0.39
AA955423	지방산 결합 단백질	0.29 \pm 0.01	0.28
AA819624	IL-6 수용체	0.45 \pm 0.03	0.43
A1070618	RAB2	0.53 \pm 0.07	0.16
AA924545	ESTs,RIKEN cDNA 1110001J03와 고도로 유사	0.42 \pm 0.04	0.30

그 결과, cDNA 마이크로어레이에서 2.69 및 2.90배 발현이 증가한 것으로 나타난 5 뉴클레오티다제(5-nucleotidase)와 시토크롬 P450(cytochrome P450)은 실시간 PCR의 발현증가 폭이 cDNA 마이크로어레이보다 낮게 나타나는 경향을 보였다.

구체적으로, 글루코스-6-포스파타제(Glucose 6-phosphatase)는 글리코겐 분해를 증가시켜 글루코스 합성을 증가시키는데 관여하는 유전자로서, cDNA 마이크로어레이를 수행한 결과, Cy5/Cy3 비율(2.96)이 증가한 것으로 나타났으나, 실시간 PCR에서는 마이크로어레이에서 나타난 결과보다 약간 적게 발현이 증가한 것으로 나타났다. 또한, 시토크롬 P450(CYP450)은 약물대사 속도와 간의 해독 능력을 결정하는 지표(Nebert & Gonzalez, 1987)로 활용되는 유전자로서, 알코올과 같은 외부물질에 의해 유도되어 알코올 대사 및 대사과정에서 유리라디칼을 생성하여 조직의 지질과산화물을 촉진시키는 역할을 하는 바, cDNA 마이크로어레이를 수행한 결과, Cy5/Cy3 비율이 2.90로 발현이 증가한 것으로 나타났고, 실시간 PCR은 4.23 ± 0.19 (relative fold)로 발현이 약간 더 증가한 것으로 나타났다. 또한, 베타인-호모시스테인 메틸트랜스퍼라제(betaine-homocysteine methyltransferase)는 베타인(betaine)으로부터 메틸기(methyl group)를 전이시키도록 촉진하여 호모시스테인(homocysteine)을 메티오닌(methionine)으로 전환하는데 관여하는 효소로서, cDNA 마이크로어레이를 수행한 결과, Cy5/Cy3 비율(2.27) 및 실시간 PCR(1.56 ± 0.44)이 유사하게 나타남을 확인하였다.

실시예 5. 알코올 cDNA 마이크로어레이의 제작

아미노 살린 코팅(Amino silane coating)된 슬라이드를 구입한 후 그 위에 상기 실시예 2의 방법으로 수득한 유전자들의 cDNA를 심어 알코올 cDNA 마이크로어레이를 제작하였다. 그 후 혼성화를 통해 대조군(Cy3 labelling)과 알코올섭취군(Cy5 labelling)의 유전자 발현 변화를 분석하였다(도 1).

5-1. 프로브의 제조

박테리아 균주(DH 5a)을 20ml의 LB 배지에서 하룻밤 배양하였다. 다음날 배양액 중에서 5 ml를 취하여 50 ml의 신선한 LB 배지에 재접종하고, OD₆₀₀이 0.3-0.6이 되면 4℃, 5000rpm에서 10분동안 원심분리하였다. 그 후, 상등액을 TSB (LB Broth pH 6.1, 10% PEG (MW 3350), 5% DMSO, 20mM Mg²⁺ (MgCl₂/MgSO₄)에 현탁시켜 얼음에 10분 방치한 후 액체 질소에 보관해 둔 후 실험에 사용하였다. 이후, 형질전환(Transformation)을 위해 200 μ l의 재조합 박테리아(competent bacteria)에 10~100 ng의 플라스미드 DNA를 넣어 30분간 얼음에 방치한 후, 3 ml의 SOC 배지를 첨가하고, 37℃에서 1 시간 동안 진탕 배양하였다. 상기 박테리아를 5분간 670xg에서 원심분리한 후, 20 μ l의 SOB에 현탁시켜 적당한 아가 플레이트(agar plate)에 접종하고, 하룻밤 동안 37℃에서 배양하였다.

그 후, 96개의 각각의 박테리아 콜로니를 취하여 96 딥-웰 플레이트(deep-well plate)에 각각 접종 한 후 48시간 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리하고, 상등액을 버린 후 밀리포어(Millipore)의 몬타지 키트(Montage kit)를 이용하여 플라스미드 미니-프랩(plasmid mini-prep)을 수행하였다. 구체적으로, 500ng의 플라스미드를 17 프라이머, Big-Dye 터미네이터, 희석 완충액을 가하고 96℃, 2 분동안 수행하고, 96℃ 30초, 50℃ 15초, 60℃ 4분으로 30 사이클을 반복 수행하였다. 이후, 상기 PCR산물을 정제하여 ABI377-96 서열(sequence)에 로딩(loading)하고, 젤 파일(gel file)을 이용 서열분석을 실시한 후, 상기 서열들을 NCBI의 유전자은행의 데이터 베이스와 비교하여 동정한 후, 프로브로 이용하였다.

5-2. 대조군(Driver)과 에탄올 섭취군(Tester)의 진단 유전자칩

대조군과 에탄올 섭취군의 간조직에서 전체의 RNA를 분리한 후 전기영동으로 그 양을 측정하고, 순도를 결정하였다. 유전자칩에 적용시키기 위하여 전체 RNA(10 μ g)를 cDNA로 합성하는 도중 에탄올 섭취군(Tester)은 Cy-5로, 그리고 대조군(Driver)은 Cy-3로 라벨링하였다. 반응이 끝나면, 에탄올 침전에 의해 반응하지 않은 형광을 제거한 후, 두가지의 프로브를 혼합하여 혼성화에 사용하였다. 상기 합성된 cDNA 산물을 정제하고, 농축하여 유전자칩에 혼성화(hybridization)하였다.

이때, 마이크로어레이의 점적된 곳에 커버 글라스(cover glass)를 놓고, 그 사이로 95~100℃에서 5분간 가열한 20 μ l의 프로브를 가했다. 혼성화 카세트(Hybridization cassette)에 상기 마이크로어레이를 넣고, 62℃에서 14 시간동안 혼성화시켰다. 혼성화 된 슬라이드를 실온의 1XSSC, 0.1% SDS 용액에서 5분간 2회 세척하고, 0.1X SSC에서 5분간 세척 후 건조시킨후 스캐너를 이용하여 이미지를 분석하였다. 분석된 데이터를 근거로 하여 각각의 유전자의 발현이 증가된 비율을 산정하였다.

구체적으로, 상기의 혼성화된 마이크로어레이를 스캔어레이(Scanarray) 4000에서 스캔하여 각 위치에서의 형광양상(fluorescent)를 분석하고 대조군과 실험 데이터를 비교하여 유전자발현 양상의 차이를 분석하였다. 이때, 스캐너에 칩(chip)을 삽입하고, Cy3와 Cy5형광을 각각의 레이저광을 이용하여 이미지를 얻었다. 이때, 내부 대조군으로 사용된 GAPDH 스팟(spot)을 기준으로 양쪽의 형광이 같게 BMT값을 조정하였다. 이렇게 수득된 Cy3 이미지와 Cy5 이미지를 비교하여, 각각의 점들에 대한 형광값을 측정하고, 그 주위의 배경(background)값을 빼주어서, 실제 형광값을 계산하였다. Cy3가 대조군이므로 각각의 점들에서 Cy5 형광값을 Cy3 형광값으로 나누어 알코올에 의하여 증가된 비율을 구하였다. 2배이상 증가한 유전자를 유의하게 변한 것으로 간주하였다.

5-3. DNA 마이크로어레이 제작 및 테스트

아미노 살린 코팅(Amino silane coating)된 슬라이드를 구입하여 그 위에 탐침 DNA를 삽입하였다. 탐침 DNA는 미니-프랩(mini-prep)된 cDNA 플라스미드를 주형으로 하여 벡터(vector)상에 존재하는 프라이머인 T7, SP6 프라이머로 증폭하고, PCR 산물 정제 키트를 이용하여 제작하였다. 상기 PCR 산물을 리퀴드 핸들러(Liquid Handler)를 이용하여 3xSSC용액(또는 50% DMSO)에 0.1 μ M정도의 DNA가 되도록 총 30 μ l를 96 웰 플레이트(well plate)에 첨가했다. 상기 플레이트를 마이크로어레이어(microarrayer)를 이용하여 마이크로 돛팅(micro-dotting)하였다. 돛팅된 슬라이드를 오븐

에서 80℃로 2시간 동안 가열하고, 95℃ 중탕(water bath)으로 가열한 후, 95% 에탄올에 1분간 배양하였다. 마이크로플레이트 원심분리기(Microplate centrifuger)로 원심분리하여 건조시킨 후, 사이토60(Cyto60)으로 형광 스캐닝하여 유전자가 잘 찍혀 있음을 확인하였다.

발명의 효과

상기에 언급한 바와 같이, 본 발명에 의한 cDNA 마이크로어레이 및 진단키트는 알코올 섭취여부 및 알코올성 간질환의 진단이 가능하며, 알코올성 지질대사를 개선하기 위한 식품소재의 효능검증 및 작용기작 규명을 위한 도구로 응용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자를 동정하고, 동정된 유전자를 이용한 알코올성 간질환의 진단방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자는 유전자 등록번호(Genebank) AA819622(응집인자 II 수용체(coagulation factor II receptor)), AI045872(아르기닌 바소프레신 수용체1A(arginine vasopressin receptor 1A)), AA964628(글루코스-6-포스페이트(glucose-6-phosphatase, catalytic)), AI070028(UDP 글리코실 전이효소 1 패밀리(UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6)), AA858453(알도라제 A(aldolase A)), AA901316(6-피루보일-테트라하이드로프로테린 신테이즈/간세포 핵인자 1α의 이성화 조효소(6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha)), AA997902(글루쿠로니다제(Glucuronidase, beta)), AI072330(락테이트 탈수소효소 A(lactate dehydrogenase A)), AI029454(포스포프рук토키나제(Phosphofructokinase, liver, B-type)), AI045558(미토콘드리아 내막 44와 호몰로그의 전이효소(translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog)), AA997541(스쿠알렌 에폭시다제(squalene epoxidase)), AA819663(아실-CoA(dihydroxyacetonephosphate acyltransferase)), AA955840(포스포리타제C(phospholipase C, delta 4)), AA998890(아넥신 III(Annexin III, Lipocortin III)), AA819465(아포리포단백질C-III(apolipoprotein C-III)), AA923919(카텝신 E(cathepsin E)), AA858866(5 뉴클레오티다제(5 nucleotidase)), AA858966(시토크롬 P450(Cytochrome P450, subfamily IIC6)), AA818499(시토크롬 P450, 4a10), AA818226(시토크롬 c 옥시다제, 서브유닛 4a), AA901407(베타인-호모시스테인 메틸트랜스퍼라제(betaine-homocysteine methyltransferase)), AA899878(파라티모신(parathymosin)), AA858865(핵 수용체 활성인자(nuclear receptor coactivator GT198)), AA924917(미토젠-활성화 단백질 키나제 12(mitogen-activated protein kinase 12)), AI044524(V-1 단백질), AI146077(고나도트로핀-해리 호르몬 수용체(gonadotropin-releasing hormone receptor)), AA924231(퍼옥시좀 막 단백질 4(peroxisomal membrane protein 4)), AA925425(베지클-결합 막 단백질 3(vesicle-associated membrane protein 3)), AI045501(뉴런 펜트락신 수용체(neuronal pentraxin receptor)), AA859339(스캐폴딩 단백질 SLIPR(scaffolding protein SLIPR)), AI059648(안지오텐시노젠(angiotensinogen)), AA858998(RAN(RAS 온코진 패밀리 멤버)), AA819424(단백질 티로신 포스파타제 IVA 형(protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2)), AI029599(핵수용체 서브패밀리 3(nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2)), AA901045(전사 억제자 NAC1(transcriptional repressor NAC1)), AA924402(일반전사인자 IIa(general transcription factor IIa), 2 (12kD subunit)), AI030913(크로모그라닌 B(chromogranin B)), AI044488(페레독신 1(ferredoxin 1)), AI111917(용질 캐리어 패밀리(solute carrier family) 16, member 7), AA924637(ESTs), AA819289(ESTs), AA818129(ESTs, GTP-결합 단백질과 약간 유사), AA900185(ESTs), AA858862(ESTs, RIKEN cDNA와 고도로 유사), AA901084(ESTs), AA858828(ESTs), AA926301(ESTs), AA819266(ESTs, A53047 6-포스포프рук토키나제와 고도로 유사), AA899544(ESTs, 작은 GTP-결합 단백질 rab5와 고도로 유사), AI111879(ESTs), AA900778(ESTs, β-1,4-갈락토실 트랜스퍼라제 3과 중간 유사), AA818812(ESTs), AA819217(ESTs, JC4667 TB2/DP1 단백질 상동성 마우스와 고도로 유사), AA924773(ESTs, TBR1_MOUSE T-브레인-1 단백질과 고도로 유사), AA901329(ESTs), AA923999(ESTs), AA875529(ESTs), AA818912(ESTs), AA925113(ESTs, RIKEN cDNA 1810008A14와 중간 유사), AA818784(ESTs), AA859003(ESTs, S46997 B-세포 수용체 결합 단백질 BAP 29 마우스와 중간 유사), AA925163(ESTs, IF42_MOUSE 진행 개시인자 4A-II와 고도로 유사), AA924416(ESTs, 콘드로이친-4-술포트랜스퍼

라제(chondroitin 4-sulfotransferase)와 약간 유사), AA925352(ESTs), AA818380(ESTs), AA924498(ESTs), AA925265(ESTs, 3-옥소산 CoA 트랜스퍼라제(3-oxoacid CoA transferase)과 고도로 유사), AA924500(ESTs), AI070147(ESTs), AA818922(ESTs, TATA-결합 단백질과 중간 유사), AA924948(ESTs), AA924429(ESTs), AA818809(ESTs), AA924793(ESTs, RIKEN cDNA 0610041D24와 고도로 유사), AA818811(ESTs), AA926313(ESTs), AA924795(ESTs), AA818783(ESTs, ROD_RAT 외래성 핵 리보핵단백질 D0(Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0)와 약간 유사), AA899472(ESTs, DSPP_RAT 덴틴 시알로포스포단백질 전구체(Dentin sialophosphoprotein precursor)와 약간 유사), AA818372(ESTs, ER23_HUMAN ER 루멘 단백질 함유 수용체 3(lumen protein retaining receptor 3)과 고도로 유사), AA925133(EST, S12207 가상 단백질(hypothetical protein)과 중간 유사), AA818475(ESTs, RIKEN cDNA 2310008M10와 고도로 유사), AI111895(ESTs), AA819702(ESTs, 에탄올 유도된 6(ethanol induced 6)와 약간 유사), AA818786(ESTs, BRD2_HUMAN 브로모도메인-함유 단백질 2와 고도로 유사), AA900508(ESTs), AA899910(ESTs, 가상 단백질 FLJ11280와 중간 유사), AA818815(ESTs), AA925335(ESTs), AA899578(ESTs), AA924523(ESTs, RIKEN cDNA 2400003B06와 중간 유사), AA858996(ESTs), AA965119(ESTs), AA926359(ESTs), AA818806(ESTs), AA925442(ESTs), AA818846(ESTs), AA899309(ESTs, JE0175 프레즐드 단백질-1b 인간(frezzled protein-1b human)과 중간 유사), AA899696(ESTs), AA875660(ESTs), AA900296(ESTs) 및 AA818792(ESTs)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자를 이용한 알코올성 간질환의 진단용 진단키트.

청구항 4.

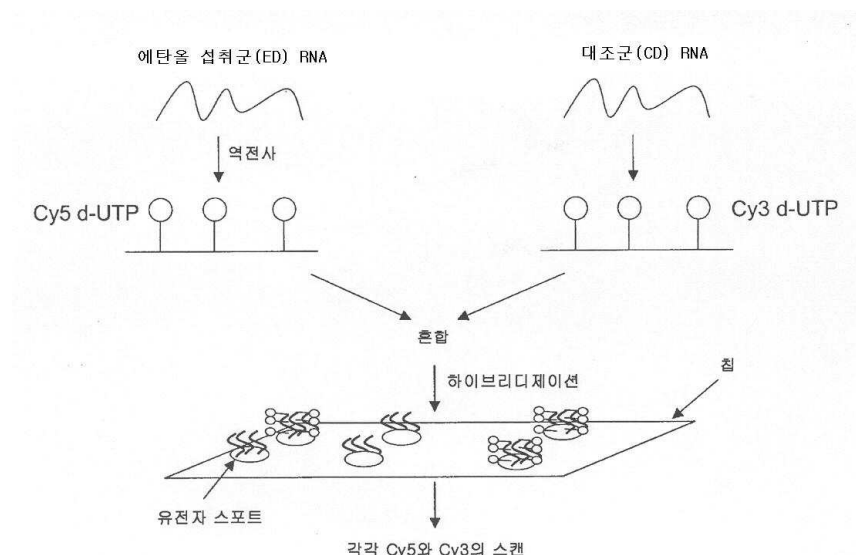
제 3항에 있어서, 상기 진단키트는 i) 제 2항의 유전자, ii) 혼성화에 사용되는 완충용액, iii) RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소 및 iv) 발현여부를 확인하기 위한 염색시약을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단키트.

청구항 5.

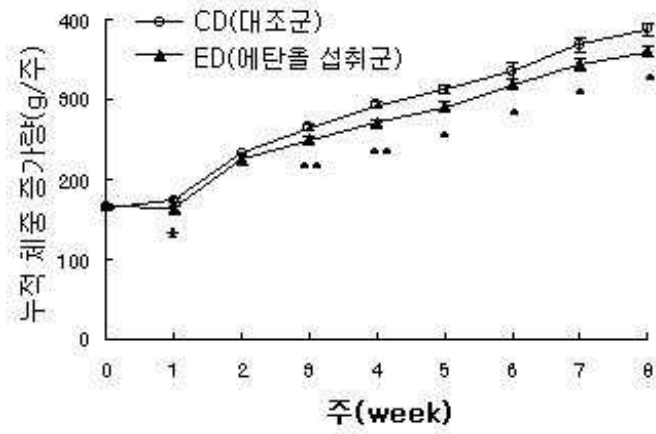
제 3항 또는 제 4항에 있어서, 상기 진단키트는 cDNA 마이크로어레이의 형태로 제작되는 것을 특징으로 하는 진단키트.

도면

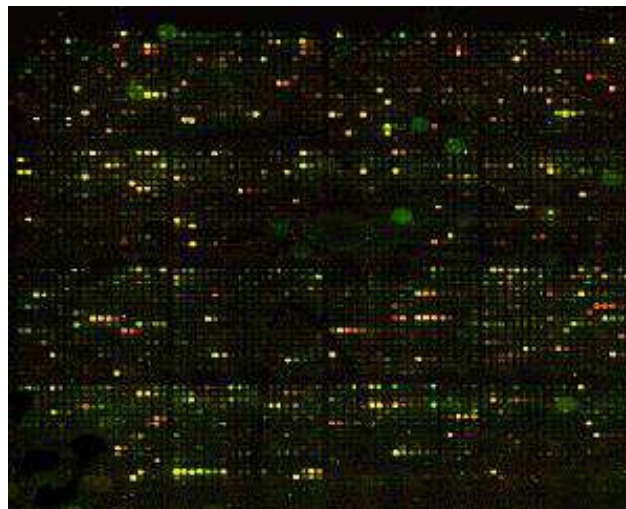
도면1



도면2



도면3



도면4

