

(19)대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.⁷
G01N 33/576

(11) 공개번호 10-2005-0094523
(43) 공개일자 2005년09월28일

(21) 출원번호 10-2004-0019673
(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) S S H법에 의해 동정된 유전자를 이용한 알코올성간질환의 진단방법 및 진단키트

요약

본 발명은 알코올 섭취 또는 알코올성 간질환의 진단방법 및 진단키트에 관한 것으로, 보다 상세하게는 SSH(suppression subtracted hybridization)법을 사용하여 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증감되는 유전자를 동정하고, 상기 유전자를 이용하여 조직세포에서 분리한 mRNA를 역전사시켜 수득된 cDNA와 혼성화시켜 유전자 활성의 증감을 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 4

색인어

알코올, SSH(suppression subtracted hybridization), cDNA 마이크로어레이, 진단키트

명세서

도면의 간단한 설명

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

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

도 3a 및 3b는 SSH(suppression subtracted hybridization)법에 의한 서브트랙션 효율을 나타낸 전기영동 사진으로, 도 3a는 정방향(forward)인 ED-CD(알코올 섭취에 의해 발현이 증가된 유전자), 도 3b는 역방향(reverse)인 CD-ED(알코올 섭취에 의해 발현이 감소된 유전자)에 관한 사진이고,

도 4는 대조군(CD)(초록색-Cy3)과 에탄올 섭취군(ED)(붉은색-Cy-5)에서 특이적으로 발현이 변화된 유전자 양상을 cDNA 마이크로어레이에 의해 확인한 스캐닝분석 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증감되는 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 간세포 내에서 지방산의 산화, TCA cycle 활성 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 SSH(suppression subtractive hybridization) 기법을 이용하여 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증감되는 유전자들을 발견하고, 상기 유전자들을 이용한 진단키트가 알코올성 간질환의 개선을 위한 식품의 효능 검증에 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증감되는 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 증감되는 유전자를 SSH(suppression subtractive hybridization)법에 의해 동정하고, 동정된 유전자를 이용한 알코올성 간질환의 진단방법을 제공한다.

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

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

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

SSH(suppression subtractive hybridization)은 비-표적(non-target) DNA를 제거하고 증폭된 표적 cDNA 절편만을 선별하는 방법으로 공지되어 있다. 구체적으로, 예를 들어 간조직에서 mRNA를 분리한 후, 분리된 RNA를 대조군 -Cy3(초록색)와 에탄올섭취군-Cy5 (붉은색)로 각각 라벨링한 후, 역전사하여 cDNA를 합성한다. 그 후, SSH 방법으로 발현양상의 차이를 확인하기 위해 대조군(CD)과 에탄올 섭취군(ED) cDNA 사이의 서브트랙션(subtraction)(정방향: ED-CD, 역방향: CD-ED)을 실시한다(도 3a 및 3b 참조). 그 후, 서브트랙션(Subtraction) 산물을 pGEM^{TE}-T 이지 벡터(Easy vector)에 삽입하여 CD 및 ED에 특이적인 서브트랙트 cDNA 라이브러리(subtracted cDNA library)를 제작한다. 제작된 라이브러리에서 134개의 cDNA 클론을 선별하여 서열분석(sequencing) 한 후, 블라스트 프로그램(Blast program)을 이용하여 진뱅크 데이터베이스(GenBank database)에 등록되어 있는 기존의 염기서열 정보와의 상동성을 검색한다.

그 결과, 진뱅크 등록 유전자와 90%이상의 상동성을 나타내는 유전자는 정방향(forward)에서 13개, 역방향(reverse)에서 5개이고(표 5 내지 표 7 참조), 134개의 유전자 중 32개의 클론이 진뱅크 등록 유전자와 일치하고, 107개는 신규한 유전자임이 확인되었다(표 8 참조).

이때, 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자는 유전자 등록번호(Genebank) U71280(메소크리세투스 아우라투스 시토크롬 P450 알도스테론 신테이즈(Mesocricetus auratus cytochrome P450 aldosterone synthase)), J03536(랫트 L-굴로노-γ-락톤 옥시다제(Rat L-gulonolactone oxidase)), AJ293391(종양성 멜라노마(melanoma)에서 상이하게 발현되는 호모사피엔스 mRNA), D30804(프로테아좀 서브유닛 RC6-1에 대한 랫트 mRNA), M31031(랫트 시토크롬 P-450f mRNA), NM_017158 (래투스 노르베지쿠스 시토크롬 P450(Rattus norvegicus cytochrome P450), 2c39(Cyp2c39)), X16417(β-글로빈에 대한 랫트 mRNA), S79304(랫투스 종 시토크롬 옥시다제 서브유닛 I (Rattus sp. cytochrome oxidase subunit I)), AF504920 (랫투스 노르베지쿠스 ATPase 신테이즈 서브유닛 6(Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6)), AY172581(랫투스 노르베지쿠스 가닥 BN/SsNHsdMCW 미토콘드리아(Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion)), NM_012584(랫투스 노르베지쿠스 하이드록시-δ-5-스테로이드 탈수소효소(hydroxy-δ-5-steroid dehydrogenase)), U11685(랫투스 노르베지쿠스 오판 수용체(orphan receptor) RLD-1 (rld-1)), X70496(Mss4 단백질에 대한 랫투스 노르베지쿠스 mRNA), AJ320269(키니노젠-1(kininogen-1)에 대한 봄비나 배리에가타 (Bombina variegata) mRNA), BC020080(Mus musculus RIKEN cDNA 1110007F12 유전자), AF220033(Mus musculus tripartite 모티프 단백질 TRIM7(Trim7)), AB073372(섬유아세포 성장인자 9/16/20에 대한 시오나 사비니(Ciona savignyi) Cs-Fgf9/16/20 mRNA), AY184710(페로미스쿠스 매니쿨라투스 클론 XGZ368 시토크롬 b(Peromyscus maniculatus clone XGZ368 cytochrome b)), V01270(18S, 5.8S, 및 28S rRNAs에 대한 랫투스 노르베지쿠스 유전자) 및 AJ293392(종양성 멜라노마에서 상이하게 발현되는 호모사피엔스 mRNA) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자이며, 더욱 바람직하게는 유전자 등록번호(Genebank)

U71280(메소크리세투스 아우라투스 시토크롬 P450 알도스테론 신테이즈(Mesocricetus auratus cytochrome P450 aldosterone synthase)), J03536(랫트 L-글로노-γ-락톤 옥시다제(Rat L-gulonono-gamma-lactone oxidase)), AJ293391(종양성 멜라노마(melanoma)에서 상이하게 발현되는 호모사피엔스 mRNA), D30804(프로테아좀 서브유닛 RC6-1에 대한 랫트 mRNA), X16417(β-글로빈에 대한 랫트 mRNA), S79304(랫투스 종 시토크롬 옥시다제 서브유닛 I (Rattus sp. cytochrome oxidase subunit I)), AF504920(랫투스 노르베지쿠스 ATPase 신테이즈 서브유닛 6(Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6)), AY172581(랫투스 노르베지쿠스 가닥 BN/SsNHsdMCW 미토콘드리아(Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion)), U11685(랫투스 노르베지쿠스 오판 수용체(orphan receptor) RLD-1 (rld-1)), X70496(Mss4 단백질에 대한 랫투스 노르베지쿠스 mRNA), AJ320269(키니노젠-1(kininogen-1)에 대한 봄비나 배리에가타 (Bombina variegata) mRNA) 및 BC020080(Mus musculus RIKEN cDNA 1110007F12 유전자)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자이다.

따라서, 본 발명은 조직세포에서 분리한 mRNA를 역전사시켜 수득된 cDNA와 상기 유전자들을 혼성화시켜 유전자 활성의 증감을 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 SSH법에 의해 동정된 알코올 특이적 유전자를 이용한 알코올성 간질환의 진단용 진단키트를 제공한다.

이때, 상기 진단키트는 i) 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 조절되는 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(chemiiluminescent)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 파이조일렉트릭(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 하기의 참고예 및 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이에 의해 제한되는 것은 아니다.

참조예 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 액체식이에 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 $23\pm1^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm5\%$, 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) 텍스트린 : 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(Retinyol 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 ± 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±0.14g/100g 체중)보다 ED군(5.30±0.09g/100g 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℃, 3,000rpm에서 15분간 원심분리하고 분석시까지 -70℃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℃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)]×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. SSH (Suppression subtractive hybridization)

SSH(suppression subtractive hybridization)은 비-표적(non-target) DNA를 제거하고 증폭된 표적 cDNA 절편만을 선별하는 방법으로 공지되어 있다. 본 발명자들은 SSH 방법으로 발현양상의 차이를 확인하기 위해 대조군(CD)과 에탄올 섭취군(ED) cDNA 사이의 서브트랙션(subtraction)(정방향: ED-CD, 역방향: CD-ED)을 실시하였다(도 3).

2-1. 1차 및 2차 가닥 cDNA

멸균된 0.5 ml의 마이크로 원심분리용 튜브(microcentrifuge tube)에 폴리 A⁺ RNA와 cDNA 합성 프라이머를 넣고, 터멀 사이클러(thermal cycler)에서 70℃, 2 분간 배양하였다. 이후, 얼음에서 약 2분간 식힌 다음, 각 튜브에 dNTP 혼합물과 AMV 역전사효소를 첨가하여 1시간 30분간 배양하여 1차가닥 cDNA를 합성하였다. 그 후, 각 튜브에 dNTP 혼합물과 2차 가닥 효소 콕테일(Second-Strand Enzyme Cocktail)을 첨가하여 16℃, 2시간동안 배양하였다. 2 μl(6 units)의 T4 DNA 폴리머라제를 넣은 후 16℃에서 30분간 배양하였다. 그 후, 20×EDTA/글리코젠 4 μl를 첨가하여 혼합한 다음 2차가닥 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA의 정제를 위해 페놀(phenol):클로로포름(chloroform):이소아밀 알코올(isoamyl alcohol) 혼합물 100 μl를 25:24:1로 첨가하여 섞은 후 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 그 후, 클로로포름: 이소아밀 알코올 혼합물 100 μl를 24:1로 첨가하여 두 번의 원심분리를 반복함으로써 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액에 4 M의 NH₄OAc 및 80% 에탄올을 첨가하여 DNA를 침전시키고, 이차증류수로 DNA 침전물을 녹여 -20℃에 보관해 두었다.

2-2. 어댑터(Adapter) 연결을 위한 *Rsa* I 처리

어댑터를 결합에 이용되는 짧은 블런트-말단(blunt-end)의 ds cDNA 조각을 만들기 위하여 제한효소(*Rsa* I)를 처리하였다.

구체적으로, 상기 실시예 2-1에서 합성된 이중가닥 cDNA에 *Rsa* I 와 *Rsa* I 제한효소가 함유된 완충액을 첨가하여 잘 혼합한 다음, 37℃에서 1시간 30분간 배양하였다. 그 후, 2.5 μ l의 20×EDTA/글리코젠을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 한편, 반응물의 정제를 위해 페놀:클로로포름:이소아밀 알코올 혼합물 50 μ l를 25:24:1로 첨가하여 섞은 후 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 그 후, 클로로포름: 이소아밀 알코올 혼합물 50 μ l를 24:1로 첨가하여 두 번의 원심분리를 반복함으로써 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액에 4 M의 NH_4OAc 및 80% 에탄올을 첨가하여 DNA를 침전시키고, 이차증류수로 DNA 침전물을 녹여 -20℃에 보관해 두었다.

2-3. 발현이 변화된 유전자 선별을 위한 어댑터 연결

상기 실시예 2-2에서 *Rsa* I 으로 절단된 1 μ l의 cDNA를 두개의 튜브에 5 μ l의 ddH₂O로 희석하여 넣었다. 희석된 2 μ l의 cDNA에 라이게이션 완충액(ligation buffer), T4 DNA 라이게아제(ligase), 어댑터 1, 어댑터 2R을 첨가하여 잘 혼합하였다. 상기 혼합액을 16℃에서 하룻밤(overnight) 배양한 후, 1 μ l의 EDTA/글리코젠 혼합물을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 그 후, 라이게아제를 불활성화시키기 위해 72℃에서 5분 동안 배양한 후, -20℃에 보관해 두었다.

2-4. 1차 및 2차 혼성화(hybridization)과정

에탄올 침취군(ED) cDNA에 과량의 대조군(CD) cDNA를 첨가하고, 열을 가하여 변성시킨 후 어닐링(annealing) 시켰다. 이때, 선택적으로 발현되는 서열은 ss cDNA로 남게되는 반면, 에탄올 침취군에 존재하는 비-표적 cDNA들은 대조군 DNA와 혼성화되었다. 그 후, 어댑터 1과 어댑터 2R이 결합된 에탄올 침취군 cDNA를 각각 혼성화 완충액에서 *Rsa* I으로 절단된 대조군 cDNA와 혼합하였다. 상기 혼합액을 터멀 사이클러(Thermal cycler)에서 98℃, 1시간 50분 동안 배양한 후, 68℃에서 8시간 동안 배양하여 1차 혼성화 과정을 완료하였다.

2차 혼성화 과정을 위하여 혼성화 완충액과 대조군 cDNA를 첨가하여 터멀 사이클러에서 98℃, 1분 30초간 배양하여 변성시켰다. 상기 변성된 대조군 cDNA를 어댑터 1, 어댑터 2R이 결합된 에탄올 침취군 cDNA와 혼합한 후, 68℃에서 하룻밤동안 배양하였다. 그 후, 200 μ l의 희석 완충액(dilution buffer)을 첨가하여 68℃, 7분 동안 가열한 후, -20℃에 보관해 두었다. 이후, 서브트랙션(Subtraction) 산물을 pGEM[®]-T 이지 벡터(Easy vector)에 삽입하여 CD 및 ED에 특이적인 서브트랙트 cDNA 라이브러리(subtracted cDNA library)를 제작하였다. 제작된 라이브러리에서 134개의 cDNA 클론을 선별하여 서열분석(sequencing) 하였고, 블라스트 프로그램(Blast program)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)을 이용하여 진뱅크 데이터베이스(GenBank database)에 등록되어 있는 기존의 염기서열 정보와의 상동성을 검색하였다.

그 결과, 134개의 유전자 중 32개의 클론이 진뱅크 등록 유전자와 일치하였고, 107개는 신규한 유전자임이 확인되었다. 즉, 진뱅크 등록 유전자와 90%이상의 상동성을 나타내는 유전자는 정방향(forward)에서 13개, 역방향(reverse)에서 5개로 나타났다(표 5). 발현량의 차이를 나타내는 유전자 중 기능이 알려져 있는 유전자를 표에 나타내었다(표 6 및 7).

표 5.
cDNA 라이브러리로부터 서브트랙트된 클론

	클론수	
	정방향 서브트랙트 클론	역방향 서브트랙트 클론
서열이 분석된 클론의 수	77	62
90% 이상의 상동성	13	5
신규	51	56

표 6.

라이브러리로부터 서브트랙트된 cDNA 클론의 동정(정방향)

유전자명	등록번호	유전자 기능
Mesocricetus auratus cytochrome P450 aldosterone synthase	U71280	aldosterone synthesis/ hypertension
Rat L-gulono-gamma- lactone oxidase	J03536	L-ascorbic acid biosynthesis
Homo sapiens mRNA differentially expressed in malignant melanoma	AJ293391	Cancer
Rat mRNA for proteasome subunit RC6-1	D30804	cell death or differentiation
Rat cytochromeP-450f mRNA	M31031	Growth & development Drug metabolism
Rattus norvegicus cytochrome P450, 2c39(Cyp2c39)	NM_017158	Growth & development Drug metabolism
Rat mRNA for beta-globin	X16417	Hemoglobin beta-chain
Rattus sp. cytochrome oxidase subunit I	S79304	Lipid peroxidation
Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6	AF504920	Oxidation
Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion	AY172581	Oxidation
Rattus norvegicus hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase	NM_012584	Progesterone
Rattus norvegicus orphan receptor RLD-1 (rld-1)	U11685	Steroid/hormone nuclear receptor
R. norvegicus mRNA for Mss4 protein	X70496	Transporter interactions
Bombina variegata mRNA for kininogen-1	AJ320269	vasopressor action
Mus musculus RIKEN cDNA 1110007F12 gene	BC020080	Unknown

표 7.

라이브러리로부터 서브트랙트된 cDNA 클론의 동정(역방향)

유전자명	등록번호	기능
Mus musculus tripartite motif protein TRIM7 (Trim7)	AF220033	Cell compartments
Ciona savignyi Cs-Fgf9/16/20 mRNA for fibroblast growth factor 9/16/20	AB073372	Cell growth
Peromyscus maniculatus clone XGZ368 cytochrome b	AY184710	oxidation
Rattus norvegicus genes for 18S, 5.8S, and 28S rRNAs	V01270	Ribosomal Precursor RNA
Homo sapiens mRNA differentially expressed in malignant melanoma	AJ293392	Unknown

실시예 3. 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).

3-1. 프로브의 제조

박테리아 균주(DH 5α)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. 그후, 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 μl의 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 μl의 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 터미네

이터, 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, 겔 파일(gel file)을 이용 서열분석을 실시한 후, 상기 서열들을 NCBI의 유전자은행의 데이터 베이스와 비교하여 동정한 후, 프로브로 이용하였다.

3-2. 대조군(Driver)과 에탄올섭취군(Tester)의 진단 유전자칩

대조군과 에탄올 섭취군의 간조직에서 전체의 RNA를 분리한 후 전기영동으로 그 양을 측정하고, 순도를 결정하였다. 유전자칩에 적용시키기 위하여 전체 RNA(10 µg)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 µl의 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 비율과 감소된 비율을 산정하였다. 이 시점에서 차이가 나는 유전자를 확정할 수 있으며, 자체 제작된 칩에서는 위양성(false positive)의 제거가 가능하다.

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 비슷하게 형광 민감도 값을 조정하였다. 이렇게 취득된 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 증감된 비율을 구하였다. 2배이상 증가하거나 또는 2배 이상 감소한 유전자를 유의하게 변한 것으로 간주하였다.

그 결과, 알코올 cDNA 마이크로어레이의 유전자 발현 변화를 분석한 결과가 SSH 결과와 비슷한 경향을 보였으나(표 6 및 7), SSH 상에서 정방향(forward)으로 발현되었던 시토크롬 P-450f(cytochrome P-450f), 시토크롬 P450 2c39(Cyp2c39), 및 하이드록시-δ-5-스테로이드 탈수소효소(hydroxy-δ-5-steroid dehydrogenase)는 발현되지 않은 것으로 나타났고, 역방향(reverse)로 발현되었던 유전자 대부분은 자체 제작된 cDNA 마이크로어레이 테스트 결과에서 유의적인 유전자 발현 변화를 보이지 않았다(표 8).

표 8.

SSH법에 의해 동정된 유전자를 이용한 cDNA 마이크로어레이 테스트에서 에탄올 섭취에 의해 조절된 유전자

유전자 ID	유전자명	Cy5/Cy3 비율
Aldosterone synteshis/hypertension		
Gene 32	cytochrome p450 aldosteron synthase CYP11B2	33.12
Cancer		
Gene 49	differentially expressed in malignant melanoma (122bp)	27.15
Gene 77	Hsd3b (140bp)	2.32
carbohydrate metabolism		
Gene 47	G3PDH	1.62
Gene 43	G3PDH	1.25
Gene 95	G3PDH	0.93
Gene 91	G3PDH	0.41
Cell death or differentiation		
Gene 84	proteasome subunit RC6-1 (279bp)	2.45
Growth factor		
Gene 82	FGF (fibroblast growth factor)	2.46
Hemoglobin beta-chain		
Gene 12	beta-globin	1.07
L-ascorbic acid biosynthesis		

Gene 72	L-gulono-gamma-lactone oxiase mRNA	1.94
Lipid peroxidation		
Gene 8	cytochrome oxidase subunits1	75.36
Oxidation		
Gene 52	mitochondrion	2.69
Gene 62	cytochrome b gene or unknown	1.94
Gene 36	ATPas synthase subunit6 (259bp)	0.99
Ribosomeal precursor RNA		
Gene 66	18s, 5.8s, 28s ribosomal RNA	1.86
Sterpid/hormone nuclear receptor		
Gene 93	orphan receptor RLD-1 (82bp)	3.57
Transporter		
Gene 0	mss4 or estrogen induced gene	2.87

따라서, 본 발명자들은 자체 제작된 알코올 cDNA 마이크로어레이 테스트 결과에서 유전자 발현을 나타내지 않았던 위양성 클론(false positive clone)인 시토크롬 P-450f, 시토크롬 P450 2c39(Cyp2c39), 및 하이드록시- δ -5-스테로이드 탈수소효소 cDNA를 제외한 나머지 cDNA와 상용칩[TwinChip™ Rat, 디지털지노믹스(주)]에서 알코올 섭취에 의해 발현이 증감된 cDNA를 이용하여 최종적으로 알코올 cDNA 마이크로어레이를 제작하였다.

3-3. 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 M 정도의 DNA가 되도록 총 30 μ l를 96 웰 플레이트(well plate)에 첨가했다. 상기 플레이트를 마이크로어레이어(microarrayer)를 이용하여 마이크로 dot팅(micro-dotting)하였다. dot팅된 슬라이드를 오븐에서 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 조절되는 유전자를 SSH(suppression subtractive hybridization)법에 의해 동정하고, 동정된 유전자를 이용한 알코올성 간질환의 진단방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 조절되는 유전자는 유전자 등록번호(Genebank) U71280(메소크리세투스 아우라투스 시토크롬 P450 알도스테론 신테아제(Mesocricetus auratus cytochrome P450 aldosterone synthase)), J03536(랫트 L-굴로노- γ -락톤 옥시다제(Rat L-gulono-gamma-lactone oxidase)), AJ293391(종양성 멜라노마(melanoma)에서 상이하게 발현되는 호모사피엔스 mRNA), D30804(프로테아좀 서브유닛 RC6-1에 대한 랫트 mRNA), M31031(랫트 시토크롬 P-450f mRNA), NM_017158 (래투스 노르베지쿠스 시토크롬 P450(Rattus norvegicus cytochrome P450), 2c39(Cyp2c39)), X16417(β -글로빈에 대한 랫트 mRNA), S79304(랫투스 종 시토크롬 옥시다제 서브유닛 I (Rattus sp. cytochrome oxidase subunit I)), AF504920 (랫투스 노르베지쿠스 ATPase 신테아제 서브유닛 6(Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6)), AY172581(랫투스 노르베지쿠스 가닥 BN/SsNHsdMCW

미토콘드리아(Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion)), NM_012584(랫투스 노르베지쿠스 하이드록시- δ -5-스테로이드 탈수소효소(hydroxy- δ -5-steroid dehydrogenase)), U11685(랫투스 노르베지쿠스 오관 수용체(orphan receptor) RLD-1 (rld-1)), X70496(Mss4 단백질에 대한 랫투스 노르베지쿠스 mRNA), AJ320269(키니노젠-1(kininogen-1)에 대한 봄비나 배리에가타 (Bombina variegata) mRNA), BC020080(Mus musculus RIKEN cDNA 1110007F12 유전자), AF220033(Mus musculus tripartite 모티프 단백질 TRIM7(Trim7)), AB073372(섬유아세포 성장인자 9/16/20에 대한 시오나 사비니(Ciona savignyi) Cs-Fgf9/16/20 mRNA), AY184710(페로미스쿠스 매니쿨라투스 클론 XGZ368 시토크롬 b(Peromyscus maniculatus clone XGZ368 cytochrome b)), V01270(18S, 5.8S, 및 28S rRNAs에 대한 랫투스 노르베지쿠스 유전자) 및 AJ293392(종양상 멜라노마에서 상이하게 발현되는 호모사피엔스 mRNA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 유전자는 유전자 등록번호(Genebank) U71280(메소크리세투스 아우라투스 시토크롬 P450 알도스테론 신테아제(Mesocricetus auratus cytochrome P450 aldosterone synthase)), J03536(랫트 L-굴로노- γ -락톤 옥시다제(Rat L-gulonolactone oxidase)), AJ293391(종양상 멜라노마(melanoma)에서 상이하게 발현되는 호모사피엔스 mRNA), D30804(프로테아좀 서브유닛 RC6-1에 대한 랫트 mRNA), X16417(β -글로빈에 대한 랫트 mRNA), S79304(랫투스 종 시토크롬 옥시다제 서브유닛 I (Rattus sp. cytochrome oxidase subunit I)), AF504920 (랫투스 노르베지쿠스 ATPase 신테아제 서브유닛 6(Rattus norvegicus ATPase synthase subunit 6)), AY172581(랫투스 노르베지쿠스 가닥 BN/SsNHsdMCW 미토콘드리아(Rattus norvegicus strain BN/SsNHsdMCW mitochondrion)), U11685(랫투스 노르베지쿠스 오관 수용체(orphan receptor) RLD-1 (rld-1)), X70496(Mss4 단백질에 대한 랫투스 노르베지쿠스 mRNA), AJ320269(키니노젠-1(kininogen-1)에 대한 봄비나 배리에가타 (Bombina variegata) mRNA) 및 BC020080(Mus musculus RIKEN cDNA 1110007F12 유전자)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

SSH법에 의해 동정된 알코올 특이적 유전자를 이용한 알코올성 간질환의 진단용 진단키트.

청구항 5.

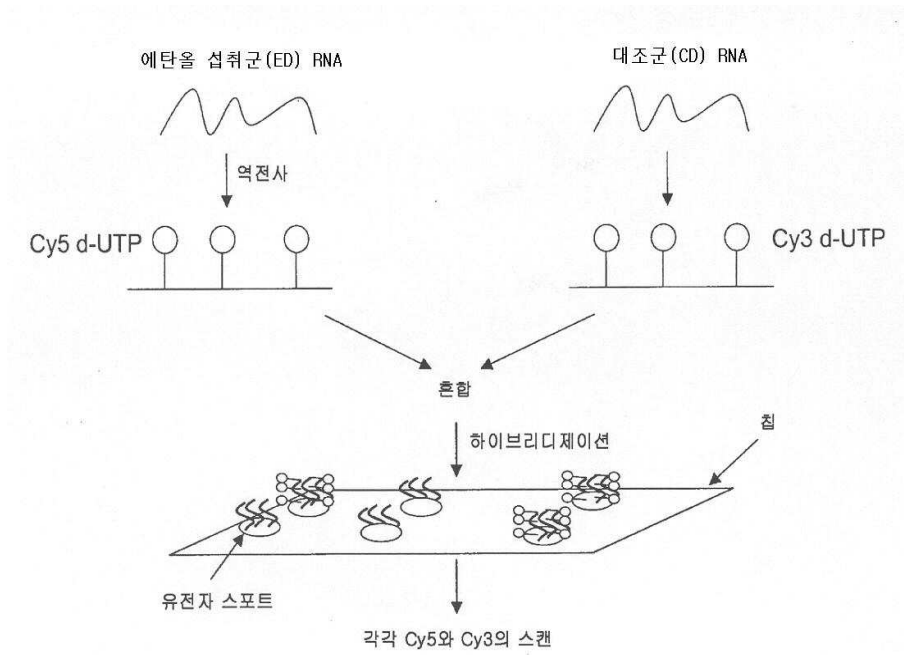
제 4항에 있어서, 상기 진단키트는 i) 제 2항 또는 제 3항의 유전자를 포함하는 알코올 섭취에 의해 특이적으로 발현이 증가되는 유전자 ii) 혼성화에 사용되는 완충용액, iii) RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소 및 iv) 발현여부를 확인하기 위한 염색시약을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단키트.

청구항 6.

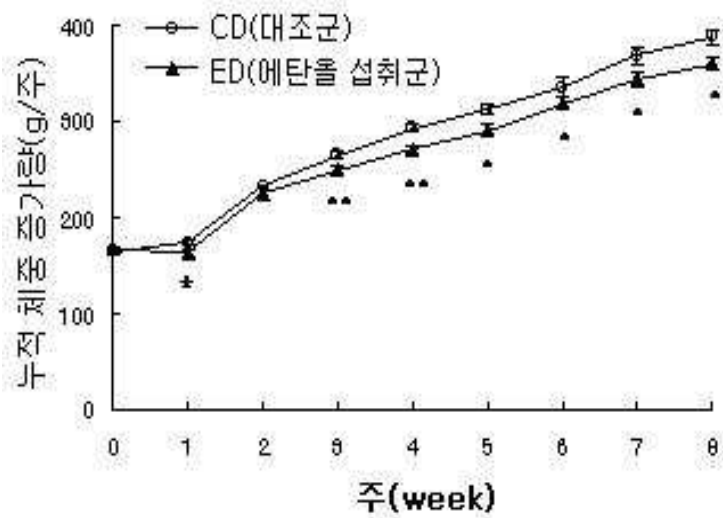
제 4항 또는 제 5항에 있어서, 상기 진단키트는 cDNA 마이크로어레이의 형태로 제작되는 것을 특징으로 하는 진단키트.

도면

도면1



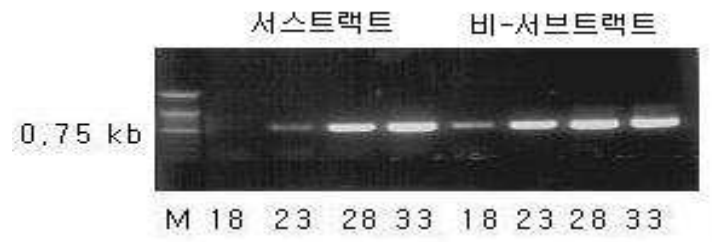
도면2



도면3a



도면3b



도면4

