



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년09월07일
 (11) 등록번호 10-1180879
 (24) 등록일자 2012년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C40B 40/08* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2010-0058661
 (22) 출원일자 2010년06월21일
 심사청구일자 2010년06월21일
 (65) 공개번호 10-2011-0138651
 (43) 공개일자 2011년12월28일
 (56) 선행기술조사문헌
 W02009124090 A1

(73) 특허권자
중앙대학교 산학협력단
 서울 동작구 흑석동 221
 (72) 발명자
윤유식
 서울특별시 영등포구 국제금융로 79, 한양아파트
 H동 1106호 (여의도동)
이해용
 서울특별시 강서구 초록마을로34길 33-5, 동우주
 택 나동 401호 (화곡동)
배성민
 경기도 고양시 일산서구 현중로 5, 1502동 206호
 (탄현동, 탄현마을)
 (74) 대리인
양부현, 김승진

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **천식 진단용 유전자 마커 및 이를 이용한 천식 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 천식의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해 피험자의 생물학적 시료로부터 TRIM64, NCRNA00158, KCNB2, RIOK1, KCTD1, ZNF136, YIPF7, PTPRG, LECT2, UGT2B11, MOBKL2B, POTES, LOC644192, ADAD1, ASH1L, ZNF776, CHRN1, DLEC1의 유전자 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유전자 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 천식 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 방법과 키트를 이용하면 천식이 의심되는 피험자에게서 천식 발병 여부 판단에 관한 유용한 유전학적 기초 자료를 제공할 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0039626

부처명 중소기업청

연구사업명 산학연공동기술개발지원사업

연구과제명 유전자 분석을 통한 천식의 치료단계 판별기술개발

주관기관 중앙대학교 산학협력단

연구기간 2009년 06월 01일 ~ 2010년 05월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

천식의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해 피험자의 생물학적 샘플로부터 유전자 KCTD1(Homo sapiens potassium channel tetramerisation domain containing 1, Genbank Accession No. NM_198991)의 발현 수준을 측정하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 유전자 발현 수준의 측정은 상기 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하여 행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈청, 혈장, 혈액, 소변, 뇌척수액, 양수, 활액 (synovial fluid), 또는 세척액(lavage fluid)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

유전자 KCTD1(Homo sapiens potassium channel tetramerisation domain containing 1, Genbank Accession No. NM_198991)에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 천식 진단용 키트.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 하기 유전자들로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 한 개 이상의 유전자의 발현 수준 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

TRIM64 (Homo sapiens tripartite motif-containing 64, Genbank Accession No. NM_001136486), NCRNA00158 (Homo sapiens non-protein coding RNA 158, Genbank Accession No. NR_024027), KCNB2 (Homo sapiens potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2, Genbank Accession No. NM_004770), RIOK1 (Homo sapiens RIO kinase 1 (yeast), Genbank Accession No. NM_031480), ZNF136 (Homo sapiens zinc finger protein 136, Genbank Accession No. NM_003437), YIPF7 (Homo sapiens Yip1 domain family, member 7, Genbank Accession No. NM_182592), PTPRG (Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, G, Genbank Accession No. NM_002841), LECT2 (Homo sapiens leukocyte cell-derived chemotaxin 2, Genbank Accession No. NM_002302), UGT2B11 (Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B11, Genbank Accession No. NM_001073), MOBKL2B (Homo sapiens MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast), Genbank Accession No. NM_024761), POTES (POTE ankyrin domain family, member D, Genbank Accession No. NM_174981), LOC644192 (hypothetical LOC644192, Genbank Accession No. AK000872), ADAD1 (adenosine deaminase domain containing 1 (testis-specific), Genbank Accession No. NM_139243), ASH1L (ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila), Genbank Accession No. NM_018489), ZNF776 (zinc finger protein 776, Genbank Accession No. NM_173632), CHRNB1 (cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle), Genbank Accession No. NM_000747) 및 DLEC1 (deleted in lung and esophageal cancer 1, Genbank Accession No. NM_007335).

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 키트는 하기 유전자들로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 한 개 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 추가적으로 포함하는 천식 진단용 키트:

TRIM64 (Homo sapiens tripartite motif-containing 64, Genbank Accession No. NM_001136486), NCRNA00158 (Homo sapiens non-protein coding RNA 158, Genbank Accession No. NR_024027), KCNB2 (Homo sapiens potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2, Genbank Accession No. NM_004770), RIOK1 (Homo sapiens RIO kinase 1 (yeast), Genbank Accession No. NM_031480), ZNF136 (Homo sapiens zinc finger protein 136, Genbank Accession No. NM_003437), YIPF7 (Homo sapiens Yip1 domain family, member 7, Genbank Accession No. NM_182592), PTPRG (Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, G, Genbank Accession No. NM_002841), LECT2 (Homo sapiens leukocyte cell-derived chemotaxin 2, Genbank Accession No. NM_002302), UGT2B11 (Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B11, Genbank Accession No. NM_001073), MOBKL2B (Homo sapiens MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast), Genbank Accession No. NM_024761), POTES (POTE ankyrin domain family, member D, Genbank Accession No. NM_174981), LOC644192 (hypothetical LOC644192, Genbank Accession No. AK000872), ADAD1 (adenosine deaminase domain containing 1 (testis-specific), Genbank Accession No. NM_139243), ASH1L (ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila), Genbank Accession No. NM_018489), ZNF776 (zinc finger protein 776, Genbank Accession No. NM_173632), CHRNB1 (cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle), Genbank Accession No. NM_000747) 및 DLEC1 (deleted in lung and esophageal cancer 1, Genbank Accession No. NM_007335).

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 천식 진단 용도의 유전자 마커 및 천식의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해 상기 유전자 마커의 발현 수준을 측정 하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 기관지천식이란 기도의 만성염증으로 인해서 기관지가 과민해지고 간헐적인 기도 수축이 발생하여 호흡곤란 증상을 유발하는 만성질환으로서, 아직까지는 그의 완치방법이 없는 것으로 알려져 있다 (National Asthma Education and Prevention Program.,1997). 이러한 기관지천식은 우리나라를 포함하여 세계적으로 대다수의 국가들에서 전체 인구 중 약 5 - 10%의 인구가 이 질병을 앓고 있는 것으로 보고될 만큼 매우 흔한 질병으로서, 또한 최근 들어 환경적인 변화에 따라 그 유병율이 세계적으로 더욱 증가되고 있는 실정이다 (Sears MR. Lancet 1997;350 (Suppl 2):1-4.).
- [0003] 통상적으로 기관지천식은 외부환경에 존재하는 집먼지 진드기나 꽃가루 등의 알레르기 반응을 일으키는 물질 (알레르기 유발물질; 알레르겐)이 원인이 되어 발생한다고 알려져 있다(Lemanske RF Jr, et al. JAMA 1997;278:1855-1873). 즉, 외부환경에 존재하는 이들 알레르기 유발물질이 공기를 통하여 비점막 또는 기관지점막에 접촉될 경우 이 물질에 대해 과도한 면역반응(알레르기반응)을 보임에 따라 기도 점막조직에 염증이 발생하고, 이에 따라 기침, 호흡곤란 등의 천식 증상의 발생과 더불어 콧물, 재채기, 또는 코막힘과 같은 비염 증상이 발생한다고 여겨지고 있다(National Asthma Education and Prevention Program.,1997 ; Dykewicz MS, et al. Ann Allergy Asthma Immunol 1998;81:463-468). 그러나 기관지천식을 가진 환자들 중 상당수(40-50%)에서 환경에 존재하는 외부물질에 대한 알레르기 반응을 보인다는 증거를 찾지 못하는 경우가 있으며, 이들 환자들은 비알레르기성 천식 및 비염으로 분류되어 왔으나, 아직 이들 환자에서 질병의 원인 및 발생기전이 명확하게 밝혀지지 않은 상태이다.
- [0004] 현재 기관지 천식과 만성비염의 진단은 주로 임상적인 증상에 대한 병력청취와 더불어 이학적 소견에 대한 관찰 및 객관적인 검사들을 통한 확인에 의해서 이루어지도록 권장되고 있다(National Asthma Education and Prevention Program., 1997; Dykewicz MS, et al. Ann Allergy Asthma Immunol 1998;81:463-468). 임상적으로 기관지천식의 진단은 병력상 간헐적인 기침, 호흡곤란 증상과 천명음 소견 등의 임상 양상을 보이고, 객관적인 검사로 폐기능 검사를 이용하여 기도폐쇄 소견과 기관지 확장제 흡입 후에 기도폐쇄의 완화 소견을 증명하거나, 비특이적 기도 자극물질(메타콜린, 히스타민 등)의 흡입에 의해서 정상인에 비해 과민한 기도수축을 나타내는지 여부가 확인될 경우 진단될 수 있다.
- [0005] 기관지천식 환자에서는 원인적인 진단 및 알레르기 소인 존재 여부에 따른 분류의 목적으로 외부환경에 존재

하는 흔한 알레르기 반응을 일으키는 물질(알레르기 유발물질; 집먼지진드기, 꽃가루 등)을 이용하여 알레르기 피부반응 검사 또는 혈청 알레르기 유발물질-특이 IgE 검사가 가장 보편적으로 실시되고 있다. 각각의 검사는 외부환경에 존재하는 흔한 알레르기 원인물질(알레르기 유발물질)에 대한 알레르기 반응여부를 알레르기 유발물질 추출물을 이용하여 환자의 피부에 직접 반응시켜 확인하거나 혈청내에 알레르기 유발물질 추출물과 반응하여 알레르기 반응을 매개하는 특이 표지자(IgE항체)의 존재 유무를 면역학적으로 확인하는 검사법이다.

[0006] 현재, 천식의 진단은 천식환자의 초기 진단이 임상적 증상의 관찰 및 의사의 직관에 주로 의지하고 있으므로 정확성이 떨어질 수 있고, 정확한 치료 단계의 판정을 위해서는 의사와 환자가 약물치료에 다른 천식 조절의 상태를 보면서 상당기간의 시행착오 과정을 겪어야 한다는 문제점이 있다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 천식의 진단에 관한 정확한 정보를 제공할 수 있는 바이오 마커를 발굴하기 위해, 정상인과 비교하여 천식 환자에게서 특이적으로 발현 수준이 변화되는 유전자와, 인간 단핵구에 집먼지진드기 추출물을 처리하여 발현 수준이 크게 변화되는 유전자들을 탐색하였고, 이들 탐색된 유전자들 중에서 집먼지진드기 추출물을 처리한 세포 및 천식환자에서 공통적으로 발현이 증가되거나 감소되는 유전자들의 발현 패턴을 분석하면 천식의 진단에 유용하게 활용할 수 있음을 확인하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 천식의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해 피험자의 생물학적 샘플로부터 특정 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법을 제공하는 것에 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 특정 유전자 염기 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 천식 진단용 키트를 제공하는 것에 있다.

[0011] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 천식의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해 피험자의 생물학적 샘플로부터 하기 유전자 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법을 제공한다: TRIM64 (Homo sapiens tripartite motif-containing 64, GenBank Accession No. NM_001136486, 서열목록 제1서열), NCRNA00158 (Homo sapiens non-protein coding RNA 158, GenBank Accession No. NR_024027, 서열목록 제2서열), KCNB2 (Homo sapiens potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2, GenBank Accession No. NM_004770, 서열목록 제3서열), RIOK1 (Homo sapiens RIO kinase 1 (yeast), GenBank Accession No. NM_031480, 서열목록 제4서열 또는 제5서열), KCTD1 (Homo sapiens potassium channel tetramerisation domain containing 1, GenBank Accession No. NM_198991, 서열목록 제6서열, 제7서열 또는 제8서열), ZNF136 (Homo sapiens zinc finger protein 136, GenBank Accession No. NM_003437, 서열목록 제9서열), YIPF7 (Homo sapiens Yip1 domain family, member 7, GenBank Accession No. NM_182592, 서열목록 제10서열), PTPRG (Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, G, GenBank Accession No. NM_002841, 서열목록 제11서열), LECT2 (Homo sapiens leukocyte cell-derived chemotaxin 2, GenBank Accession No. NM_002302, 서열목록 제12서열), UGT2B11 (Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B11, GenBank Accession No. NM_001073, 서열목록 제13서열), MOBKL2B (Homo sapiens MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast), GenBank Accession No. NM_024761, 서열목록 제14

서열), POTE (POTE ankyrin domain family, member D, GenBank Accession No. NM_174981, 서열목록 제15서열), LOC644192 (hypothetical LOC644192, GenBank Accession No. AK000872, 서열목록 제16서열), ADAD1 (adenosine deaminase domain containing 1 (testis-specific), GenBank Accession No. NM_139243, 서열목록 제17서열), ASHL1 (ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila), GenBank Accession No. NM_018489, 서열목록 제18서열), ZNF776 (zinc finger protein 776, GenBank Accession No. NM_173632, 서열목록 제19서열), CHRNB1 (cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle), GenBank Accession No. NM_000747, 서열목록 제20서열), DLEC1 (deleted in lung and esophageal cancer 1, GenBank Accession No. NM_007335, 서열목록 제21서열 또는 제22서열).

- [0013] 본 발명의 방법은 천식 환자에게서 고발현되는 유전자 및 저발현되는 유전자, 또는 강력한 천식 유발자인 집먼지 진드기 추출물의 처리에 의해 발현 증가가 유도되거나 발현 감소가 유도되는 유전자들을 최초로 발굴한 것에 기초한다. 천식이 의심되는 피험자로부터 상기 발굴된 유전자들의 발현 수준을 측정함으로써 천식의 진단에 유용한 정보를 제공할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 하기 구체적인 일 실시예에 의하면, 상기 발굴된 유전자 중에서 TRIM64, NCRNA00158, KCNB2, RIOK1, KCTD1, ZNF136, YIPF7, PTPRG, LECT2, UGT2B11, MOBKL2B, POTE, LOC644192, ADAD1, ASHL1 유전자의 발현 수준은 정상인과 비교하여 천식 환자에게서 크게 증가하며 집먼지 진드기 추출물에 의해 크게 증가한다. 또한, ZNF776, CHRNB1, DLEC1의 유전자의 발현 수준은 정상인에 비해 천식 환자에게서 감소되며 집먼지 진드기 추출물의 처리에 의해서도 감소된다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 유전자 발현 수준의 측정은 상기 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하여 행한다.
- [0016] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 의하면, 상기 피험자의 생물학적 샘플은 혈청, 혈장, 혈액, 소변, 뇌척수액, 양수, 활액 (synovial fluid), 또는 세척액 (lavage fluid)이고, 보다 바람직하게는 혈청, 혈장 또는 혈액이다.
- [0017] 본 발명의 방법에서 천식의 진단에 유용한 정보를 제공하기 위해 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 바람직하게는 유전적 분석 (genetic analysis) 방법으로 실시할 수 있다.
- [0018] 유전적 분석에 기초하여 본 발명을 실시하는 경우, 상기 나열된 표적 유전자 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브가 이용된다.
- [0019] 본 발명에서 프라이머를 이용하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 상기 표적 유전자의 발현 정도를 조사한다. 본 발명은 유전자의 발현 정도를 분석하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료 (예컨대, 세포 또는 조직)에서 표적 유전자의 mRNA 발현량을 조사하여 유전자의 발현 정도를 결정한다. 따라서 본 발명은 원칙적으로 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시할 수 있다. mRNA를 얻기 위하여, 먼저 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에서 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다 (참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press (2001); Tesniere, C. et al., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242 (1991); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156 (1987)). 예컨대, Trizol을 이용하여 용이하게 세포 내의 총 RNA를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 인간의 시료로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다 (참조: PNAS USA, 85:8998 (1988); Libert F, et al., *Science*, 244:569 (1989); 및 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press (2001)). 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다.
- [0020] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.
- [0021] 다양한 DNA 증합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 증합효소 I의 "클레나우" 단편, 열

안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다.

[0022] 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg²⁺와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 요청된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.

[0023] 본 발명에서 어닐링 또는 혼성화는 타겟 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열- 의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.

[0024] 본 명세서에 기술된 용어 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에서 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(이하 PCR이라 한다)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(이하 RT-PCR로 표기한다)(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등 (EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19) (WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence

[0025] primed polymerase chain reaction; CP-PCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다. 본 발명의 가장 바람직한 구현예에서, 증폭 과정은 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR (polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.

[0026] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR, TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR) 및 멀티플렉스 PCR이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

[0027] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소)하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 인자, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변이가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 하이브리드 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.

[0028] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서, 본 발명에서의 프라이머쌍은 주형인 표적 유전자 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 본 발명의 프라이머는 표적

유전자의 mRNA (즉, cDNA) 서열에 상보적인 서열로 제조될 수 있다. 이러한 프라이머의 디자인은 표적 유전자의 cDNA 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있다.

[0029] 이렇게 증폭된 표적 유전자의 cDNA를 적합한 방법으로 분석하여 유전자의 발현 정도를 조사한다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 각 유전자의 발현 정도를 조사한다. 이러한 증폭 반응을 통하여, 각 유전자의 발현이 정상인의 발현 수준과 비교하여 높은 수준으로 나오거나 낮은 수준으로 나오는 경우에는 천식으로 진단된다.

[0030] 또한, 상기 표적 유전자 또는 이의 cDNA에 혼성화되는 프로브를 이용하여 혼성화-기초 분석을 하여 천식을 진단할 수도 있다.

[0031] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 단일쇄 핵산 분자이며, 타겟 핵산 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 프로브의 이점, 즉 혼성화 특이성의 개선이 손상되지 않는 범위 내에서, 본 발명의 프로브를 변형할 수 있다. 이들 변형, 즉 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신 (fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민 (lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5 (Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P^{32} 및 S^{35}), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션 (nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법 (Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법 (Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성화, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 표적 유전자 cDNA에 혼성화되는 본 발명의 프로브는 불용성 담체(예컨대, 니트로셀룰로오스 또는 나일론 필터, 유리판, 실리콘 및 플루오로카본 지지체)에 고정화되어, 마이크로어레이로 제조될 수 있다. 마이크로어레이에 있어서 본 발명의 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용된다. 불용성 담체에서의 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 담체에 결합될 수 있다. 각 표적 유전자의 cDNA는 상술한 과정에 의해 얻을 수 있다. 프로브 대신에 유전자의 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다. 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제 (예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스레드시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR (p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS (2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium)등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 니트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다. 상술한 혼성화 과정에 의한 혼성화 시그널의 세기를 분석함으로써, 천식을 진단할 수 있다. 즉, 시료에서 각 표적 유전자 cDNA에 대한 시그널이 정상인에서의 발현 수준의 것 보다 강하게 나오거나 또는 약하게 나오는 경우에는 천식으로 진단될 수 있다.

- [0033] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 유전자 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 천식 진단용 키트를 제공한다: TRIM64 (Homo sapiens tripartite motif-containing 64, GenBank Accession No. NM_001136486, 서열목록 제1서열), NCRNA00158 (Homo sapiens non-protein coding RNA 158, GenBank Accession No. NR_024027, 서열목록 제2서열), KCNB2 (Homo sapiens potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2, GenBank Accession No. NM_004770, 서열목록 제3서열), RIOK1 (Homo sapiens RIO kinase 1 (yeast), GenBank Accession No. NM_031480, 서열목록 제4서열 또는 제5서열), KCTD1 (Homo sapiens potassium channel tetramerisation domain containing 1, GenBank Accession No. NM_198991, 서열목록 제6서열, 제7서열 또는 제8서열), ZNF136 (Homo sapiens zinc finger protein 136, GenBank Accession No. NM_003437, 서열목록 제9서열), YIPF7 (Homo sapiens Yip1 domain family, member 7, GenBank Accession No. NM_182592, 서열목록 제10서열), PTPRG (Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, G, GenBank Accession No. NM_002841, 서열목록 제11서열), LECT2 (Homo sapiens leukocyte cell-derived chemotaxin 2, GenBank Accession No. NM_002302, 서열목록 제12서열), UGT2B11 (Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B11, GenBank Accession No. NM_001073, 서열목록 제13서열), MOBKL2B (Homo sapiens MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast), GenBank Accession No. NM_024761, 서열목록 제14서열), POTED (POTE ankyrin domain family, member D, GenBank Accession No. NM_174981, 서열목록 제15서열), LOC644192 (hypothetical LOC644192, GenBank Accession No. AK000872, 서열목록 제16서열), ADAD1 (adenosine deaminase domain containing 1 (testis-specific), GenBank Accession No. NM_139243, 서열목록 제17서열), ASH1L (ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila), GenBank Accession No. NM_018489, 서열목록 제18서열), ZNF776 (zinc finger protein 776, GenBank Accession No. NM_173632, 서열목록 제19서열), CHRNB1 (cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle), GenBank Accession No. NM_000747, 서열목록 제20서열), DLEC1 (deleted in lung and esophageal cancer 1, GenBank Accession No. NM_007335, 서열목록 제21서열 또는 제22서열).
- [0034] 본 발명은 상기 각 표적 유전자의 발현을 측정할 수 있는 프라이머, 또는 프로브를 포함하는 천식 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명의 천식 진단용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소 [예컨대, Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus (Tth), Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus litoralis 또는 Pyrococcus furiosus (Pfu)로부터 취득한 열 안정성 DNA 중합효소], DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0038] (i) 본 발명은 정상인에 비해 천식 환자에게서 발현 수준이 크게 증가되어 있거나 감소되어 있는 유전자 및 인간 단핵구 세포주에서 집먼지 진드기 추출물의 처리에 의해 발현 수준이 증가 또는 감소가 유도되는 유전자를 발견한 것에 기초한 것이다.
- [0039] (ii) 천식이 의심되는 피험자에게서 상기 발굴된 유전자들의 발현 수준을 측정함으로써 천식 발병 여부 판단에 관한 정확한 유전학적 기초 자료를 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명은 천식의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해 피험자의 생물학적 시료로부터 TRIM64, NCRNA00158, KCNB2, RIOK1, KCTD1, ZNF136, YIPF7, PTPRG, LECT2, UGT2B11, MOBKL2B, POTED, LOC644192, ADAD1, ASH1L, ZNF776, CHRNB1, DLEC1의 유전자 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유전자 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 천식 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 방법과 키트를 이용하면 천식이 의심되는 피험자에게서 천식 발병 여부 판단에 관한 유전학적 기초 자료를 제공할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0042] **실시예**

[0043] **실험방법**

[0044] **1. 정상인 및 천식환자에서의 유전자 발현 차이 분석**

[0045] 나이가 유사하고 성별이 동일한 정상인 및 경증천식환자, 중증천식환자 각 5인의 말초혈액을 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 백혈구연층(buffy coat)을 분리하였다. 분리된 백혈구연층(buffy coat)은 RiboPure™ Blood Kit (Ambion)을 이용하여 제조사의 지시서에 따라 총 RNA(total RNA)를 분리 정제하한 후, 마이크로어레이(microarray) 분석을 수행할 때 까지 -80℃에 보관하였다. 타겟 cRNA 프로브의 합성과 혼성화(hybridization)은 Agilent사의 Low RNA Input Linear Amplification kit (Agilent Technology, USA)를 이용하여 진행하였다. 간단하게 설명하면, dsDNA를 합성하기 위하여 1 µg의 총 RNA와 T7 프로모터 프라이머(promoter primer)를 혼합하여 65℃에서 10 분간 반응시킨 후, cDNA 마스터 믹스(master mix) (5X First strand buffer, 0.1M DTT, 10mM dNTP mix, RNase-Out, and MMLV-RT)를 첨가하여 40℃에서 2시간 그리고 65℃에서 15분간 반응시켰다. 전사 마스터 믹스(transcription master mix) (4X Transcription buffer, 0.1M DTT, NTP mix, 50% PEG, RNase-Out, Inorganic pyrophosphatase, T7-RNA polymerase, and Cyanine 3/5-CTP)을 준비한 dsDNA와 혼합하여 40℃에서 2 시간 반응시킨 후, 증폭 및 표지화(labelling)된 cRNA를 cRNA Cleanup Module (Agilent Technology)를 이용하여 정제 및 분리하였다. 준비된 cRNA는 Agilent's Human Oligo Microarray (44K)와 65℃에서 17 시간 동안 상보적 혼성화시킨 후 제조사 제시된 지시서에 따라 세정하였다. 혼성화 이미지(hybridized image)는 Agilent사의 DNA 마이크로어레이 스캐너와 Feature Extraction Software(Agilent Technology, PaloAlto,CA)를 이용하여 측정후, GeneSpringGX 7.3 (AgilentTechnology,USA)를 이용하여 정규화(normalization) 및 폴드-변화 유전자(fold-changed gene)를 선별을 수행하였다. 기능분석은 Gene Ontology™ Consortium (<http://www.geneontology.org/index.shtml>)을 이용하여 행하였다.

[0046] **2. 집먼지 진드기 추출물에 의해 발현 유도되는 유전자 분석**

[0047] 인간 단핵구(monocyte) 세포인 THP1 세포주는 한국세포주 은행에서 구입하여 RPMI(Roswell Park Memorial Institute), 10% FBS (fetal bovine serum), 100 µg/ml의 스트렙토마이신 및 100 units/ml의 페니실린과 함께 37℃, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 12 웰 플레이트(well plate)의 각 웰에 2 X 10⁶/ml의 밀도로 2ml씩 첨가한 후 24시간 동안 안정화시킨 세포에 대해 천식의 가장 강력한 원인물질인 집먼지 진드기 추출물을 저용량(10 µg/ml) 및 고용량 (50 µg/ml)으로 처리하여 48 시간 배양하였다. 48 시간 배양 후, RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 제조사 제시된 지시서에 따라 총-RNA (total RNA)를 분리 정제하였다. 양성 대조군으로서 염증유발물질인 LPS(lipopolysaccharide)를 처리하였다. 분리 정제한 총-RNA (total RNA)에 대해서는 상기 정상인 및 천식환자에서의 유전자 발현 차이 분석의 실험에서 혈액으로부터 유전자 발현 분석방법에서와 동일한 방법에 따라 마이크로어레이를 수행하였다.

[0048] **실험결과**

[0049] 마이크로 어레이상에 탑재된 각 유전자에 대해, 건강인의 발현량에 대한 경증 및 중증 천식환자 발현량의 상대적 비율을 비교하였다. 무처리군의 발현량에 대한 집먼지 진드기 및 LPS 처리군의 발현량의 상대적 비율을

비교하였다.

[0050] 천식 환자에게서 특이적으로 발현이 변화하며 동시에 집먼지 진드기 추출물에 의해 발현이 변화하는 유전자를 탐색하였고, 탐색된 유전자에 관한 정보는 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

[0051]

유전자	이름	UNIGENE_ID /GenBank Acc No.
TRIM64	tripartite motif-containing 64	Hs.454490 /NM_001136486
NCRNA00158	non-protein coding RNA 158	Hs.234016 /NR_024027
KCNB2	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2	Hs.661102 /NM_004770
RIOK1	RIO kinase 1 (yeast)	Hs.437474 /NM_031480
KCTD1	potassium channel tetramerisation domain containing 1	Hs.526630 /NM_198991
ZNF136	zinc finger protein 136	Hs.479874 /NM_003437
YIPF7	Yipl domain family, member 7	Hs.596000 /NM_182592
PTPRG	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	Hs.595541 /NM_002841
LECT2	leukocyte cell-derived chemotaxin 2	Hs.512580 /NM_002302
UGT2B11	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B11	Hs.339811 /NM_001073
MOBKL2B	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast)	Hs.369022 /NM_024761
POTED	POTE ankyrin domain family, member D	Hs.442712 /NM_174981
LOC644192	hypothetical LOC644192	Hs.709996 /AK000872
ADAD1	adenosine deaminase domain containing 1 (testis-specific)	Hs.518957 /NM_139243
ASH1L	ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)	Hs.491060 /NM_018489
ZNF776	zinc finger protein 776	Hs.109540 /NM_173632
CHRNA1	cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)	Hs.330386 /NM_000747
DLEC1	deleted in lung and esophageal cancer 1	Hs.714499 /NM_007335

[0052] 상기 표 1의 유전자중에서 하기 표 2에 나타난 유전자는 천식환자에게서 발현량이 증가되어 있으며, 동시에 인간 단핵구 세포에 집먼지 진드기 추출물의 처리 의해서도 발현 증가가 유도되는 특성을 나타내었다.

표 2

[0053]

유전자	건강인	경증 천식 환자	중증 천식 환자	무처리군	집먼지 진드기 저용량	집먼지 진드기 고용량	LPS
TRIM64	1.00	1.35	4.56	1.00	14.82	11.45	40.79

NCRNA00158	1.00	1.19	3.95	1.00	1.53	3.23	1.65
KCNB2	1.00	1.54	7.86	1.00	17.98	11.29	10.29
RIOK1	1.00	1.77	4.35	1.00	2.17	1.57	3.40
KCTD1	1.00	1.28	6.02	1.00	4.29	2.99	3.02
ZNF136	1.00	1.31	5.36	1.00	2.91	4.17	1.42
YIPF7	1.00	2.02	5.82	1.00	2.61	1.27	1.46
PTPRG	1.00	2.36	7.42	1.00	1.75	2.68	1.08
LECT2	1.00	1.61	4.49	1.00	2.53	1.98	1.69
UGT2B11	1.00	1.13	4.77	1.00	3.21	2.59	1.94
MOBK12B	1.00	1.02	3.61	1.00	2.40	1.55	2.21
POTED	1.00	2.22	7.91	1.00	2.03	1.10	2.47
LOC644192	1.00	2.21	7.38	1.00	1.17	2.65	1.79
ADAD1	1.00	1.39	3.77	1.00	8.55	25.64	4.80
ASH1L	1.00	2.93	9.11	1.00	1.82	1.42	1.83

[0054] 상기 표 1의 유전자중에서 하기 표 3에 나타난 유전자는 천식환자에게서 발현량이 감소되어 있으며 동시에 인간 단핵구 세포를 집먼지 진드기 추출물로 처리한 경우에서도 발현이 감소되는 특성을 나타내었다.

표 3

유전자	건강인	경증 천식 환자	중증 천식 환자	무처리군	집먼지 진드기 저용량	집먼지 진드기 고용량	LPS
ZNF776	1.00	0.71	0.16	1.00	0.19	0.24	0.17
CHRN1	1.00	0.83	0.37	1.00	0.07	0.12	0.12
DLEC1	1.00	0.98	0.46	1.00	0.04	0.05	0.06

[0056] 본 발명의 방법에 의하면, 정상인에 비해 천식환자에게서 발현이 크게 증가되거나 크게 감소되는 유전자 및 집먼지 진드기 추출물의 처리에 의해 인간 단핵구 세포에서 발현이 크게 증가 또는 크게 감소되는 유전자들의 발현 수준을 천식이 의심되는 피험자로부터 측정하면, 천식의 진단에 필요한 유용한 정보를 제공할 수 있다.

[0057] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)