



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0105568
(43) 공개일자 2013년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0090475(분할)
(22) 출원일자 2013년07월30일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2011-0113099
원출원일자 2011년11월02일
심사청구일자 2011년11월02일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
장양수
서울특별시 서초구 방배본동 752-36 방배대림 아크로리버 101-701
신동직
서울특별시 영등포구 문래동6가 베어스타운아파트 102-1503
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

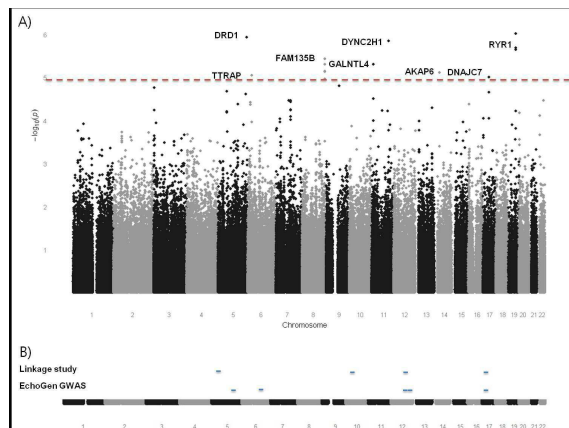
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 좌심실비대와 연관된 단일염기다형성 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 좌심실비대 진단용 키트 및 좌심실비대의 마커를 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 좌심실비대에 몇몇 SNP들이 연관되어있다는 강력한 증거를 발견하였다. 이들 중요 SNP들의 존재여부에 대한 분석을 통해 좌심실비대를 예측할 수 있어 환자의 심혈관계 질환 상황을 예상하여 궁극적으로 심혈관 관련 질환의 간단한 유전학적 체외진단에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이상학

서울특별시 강남구 압구정동 464 현대아파트
61-508

오범석

서울특별시 서초구 반포2동 래미안퍼스트지
113-902

홍경원

서울특별시 성북구 종암동
삼성래미안아파트112-1904

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A000385
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	심혈관계질환 유전체연구
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2000.11.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

RYR1(ryanodine receptor 1) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제1서열의 301번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스 rs2071090), 서열목록 제3서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs2960321), *DRD1*(dopamine receptor D1) 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제4서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs265992), *TTRAP*(*toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein*) 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제5서열의 256번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs9295629), *FAM135B*(*family with sequence similarity 135, member B*) 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제6서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs6577840), 서열목록 제7서열의 502번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs4909705), 서열목록 제8서열의 301번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs7825068), 서열목록 제9서열의 960번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs7840530), *GALNTL4*(*UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4*) 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제10서열의 301번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs17446021), *DYNC2H1* (*dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1*) 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제11서열의 251번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs11225822) 및 *DNAJC7* (*DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7*) 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제12서열의 401번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs4239268)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단일염기다형성 부위를 포함하는 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 좌심실비대(left ventricular hypertrophy) 진단용 키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 키트는 *RYR1*(ryanodine receptor 1) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제1서열의 301번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스 rs2071090) 또는 서열목록 제3서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs2960321)를 포함하는 10-100개의 연속 뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 키트는 *RYR1*(ryanodine receptor 1) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제1서열의 301번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스 rs2071090)를 포함하는 10-100개의 연속 뉴클레오타이드에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단일염기다형성 부위를 가진 인간은 증가된 좌심실비대 질환 위험도를 나타내는 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 상기 좌심실비대 질환 위험도는 심전도기록법(electrocardiography, ECG)에 의해 계산된 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단일염기다형성 부위를 가진 인간은 증가된 심혈관 질환 위험도를 나타내는 것을 특징

으로 하는 진단용 키트.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 심혈관 질환은 부정맥, 고혈압, 뇌졸중, 동맥경화증, 죽상경화증, 협심증, 심근경색증 또는 심부전증인 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 키트는 아시아인에게 적용되는 것을 특징으로 하는 좌심실비대 진단용 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 좌심실비대에 연관된 단일염기다형성(SNP) 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 좌심실비대(left ventricular hypertrophy, LVH)는 심혈관계 질환의 발병 및 사망에 있어 주요한 원인이다. 좌심실비대는 심전도기록법(electrocardiography, ECG) 또는 초음파심장검진법(echocardiography, ECHO)을 통해 진단한다(Kannel WB et al., *Am J Cardiol* 60(17):851-931(1987), Levy D et al., *N Engl J Med* 322(22):1561-1566(1990), Prineas RJ et al., *J Electrocardiol* 34(2):91-101(2001), Schillaci G et al., *Hypertension* 35(2):580-586(2000).

[0003] ECHO는 좌심실비대를 진단하는데 있어 ECG에 비해 더욱 민감하고 특이적인 방법이나, 높은 비용 및 운영상 고려 사항 때문에 사용이 대규모 집단 연구 및 임상 시험에 제한되어 있다(Reichek N et al., *Circulation* 63(6):1391-1398(1981).

[0004] 반면, ECG는 보다 폭넓게 사용가능하고, 저렴하며 장비를 조작하는 사람에 덜 의존적이다(Rautaharju PM et al., *J Electrocardiol* 31(1):17-29(1998)). ECG 데이터는 거의 모든 환자 및 전염병 연구 참여자들에게서 얻을 수 있다(Mayosi BM et al., *Eur Heart J* 23(24):1963-1971(2002)).

[0005] 좌심실비대는 다원적인 특성을 나타내는데, 좌심실비대의 주요한 결정 요인으로 혈압, 나이, 성별 및 비만을 포함한다(Post WS et al., *Curr Opin Cardiol* 9(5):534-541(1994)). 또한, 안지오텐신 변환 효소(angiotensin-converting enzyme, ACE)(Doolan G et al., *Int J Cardiol* 96(2):157-163(2004)), 구아닌 핵산 결합 단백질(guanine nucleotide-binding protein, GNB3)(Semplicini A et al., *Am J Hypertens* 14(12):1191-1195(2001)), 인슐린양 성장인자(insulin-like growth factor, IGF-1)(Nagy Z et al., *J Am Soc Nephrol* 10(8):1709-1716(1999)) 및 신경 펩타이드 Y(neuropeptide Y, NPY)(Kuch-Wocial A et al., *Clin Chim Acta* 345(1-2):43-47(2004))가 좌심실비대의 발달을 조절한다.

[0006] 여러 연구에서 좌심실비대는 레닌-안지오텐신-알도스테론 전달계(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)와 연관된 다양한 유전자와 관련이 있다고 보고되었다(Frey UH et al., *Eur Heart J* 29(7):888-897(2008), Smilde TD et al., *Am J Hypertens* 20(10):1097-1103(2007)) and nitric oxide synthase (NOS)(Xin Y et al., *Clin Sci(Lond)*117(2):67-73(2009)).

[0007] 최근, 예코젠 컨소시움(5개 공동체 집단을 기초로 한 n=16,706의 유럽인 계통)은 ECHO 측정을 기초로 한 심장 구조의 전체 유전체 연관 연구(genomewide association study, GWAS)를 수행하였다(Vasan RS et al., *JAMA* 302(2):168-178(2009)). GWAS를 통해 좌심실 심장확장기의 크기와 연관되어 있는 1 좌위(6q22) 및 대동맥 기부 크기와 연관되어 있는 4 좌위(5q23, 12p12, 12q14 및 17p13)를 확인하였다. 하지만, 이러한 결과들은 관찰된 특성 변동의 단지 1-3% 라고 설명하고 있다(Vasan RS et al., *JAMA* 302(2):168-178(2009)). 좌심실 질량의 유전력 추정 범위가 0.17-0.59인 것을 고려하면, 밝혀져야 하는 많은 유전적 요소들이 남아있다(Arnett DK et al., *Am J Hypertens* 14(12):1226-1230(2001), Bella JN et al., *J Hypertens* 22(2):281-286(2004), Post

WS et al., *Hypertension* 30(5):1025-1028(1997), Sharma P et al., *J Hypertens* 24(2):321-324(2006)).

[0008] 대부분의 연구에서 좌심실비대에 대한 유전적인 영향을 확인하기 위해 좌심실 질량을 측정하는 ECHO를 이용하였다. Mayosi 그룹의 연구에 따르면 ECG에 의해 측정된 좌심실비대(ECG-LVH)(39-41%)는 ECHO에 의해 측정된 좌심실비대(ECHO-LVH)(21-29%) 보다 더 높게 측정되며, 이것은 ECG-LVH가 더욱 민감하다는 것을 암시한다(Mayosi BM et al., *Eur Heart J* 23(24):1963-1971(2002), Mayosi BM et al., *Eur Heart J* 29(4):525-530(2008)).

[0009] 본원 발명은 지역사회기반 코호트(population-based community cohorts)를 이용한 최초의 ECG-LVH GWAS이며, 병원 유래 샘플에 있어 ECG-LVH의 발달에 유전적 위험 요소가 영향을 미치는지 검증하였다.

[0010] 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

[0011] 본 발명자들은 심혈관계 질환의 주요 원인인 좌심실비대에 관한 간편하고 신뢰성 높은 체외진단 시스템을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, *RYR1* 유전자를 포함하는 유전좌위에서 좌심실비대에 연관된 일련의 SNP들을 동정함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 좌심실비대 진단용 키트를 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 좌심실비대의 마커를 검출하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 *RYR1*(ryanodine receptor 1) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제1서열의 301번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스 rs2071090), 서열목록 제2서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스 rs10500279), 서열목록 제3서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs2960321), *DRD1*(dopamine receptor D1) 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제4서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs265992), *TTRAP*(toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein) 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제5서열의 256번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs9295629), *FAM135B*(family with sequence similarity 135, member B) 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제6서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs6577840), 서열목록 제7서열의 502번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs4909705), 서열목록 제8서열의 301번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs7825068), 서열목록 제9서열의 960번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs7840530), *GALNTL4*(UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetyltransferase-like 4) 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제10서열의 301번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs17446021), *DYNC2H1* (dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1) 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제11서열의 251번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs11225822) 및 *DNAJC7* (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7) 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제12서열의 401번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs4239268)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단일염기다형성(SNP) 부위를 포함하는 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 좌심실비대(left ventricular hypertrophy) 진단용 키트를 제공한다.

[0016] 본 발명자들은 좌심실비대에 관한 간편하고 신뢰성 높은 체외진단 시스템을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 *RYR1* 유전자를 포함하는 유전좌위에서 좌심실비대에 연관된 일련의 SNP들을 발견하였다.

[0017] 좌심실비대는 고혈압의 중요한 합병증의 하나이며 심혈관계 질환의 주요 원인이 되며, 특히 소아 청소년기에 고

혈압으로 인한 심혈관 변화는 초음파상의 좌심실비대만이 유일한 경우가 많다.

- [0018] 본 발명자들은 총 8,830명의 KARE 대상자 집단 및 804명의 반복 연구 대상자의 샘플의 유전자형을 분석한 결과, 몇몇 SNP들이 좌심실비대와 연관되어있다는 강력한 증거를 발견하였다. 본 발명에 따르면, *RYR1*(ryanodine receptor 1) 유전자에 위치하는 3개의 SNP가 좌심실비대와 강하게 연관되어 있으며, *DRD1*(dopamine receptor D1) 유전자에 위치하는 1개의 SNP, *TTRAP*(toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein) 유전자에 위치하는 1개의 SNP, *FAM135B*(family with sequence similarity 135, member B) 유전자에 위치하는 4개의 SNP, *GALNT4*(UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglactosaminyltransferase-like 4) 유전자에 위치하는 1개의 SNP, *DYNC2H1*(dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1) 유전자에 위치하는 1개의 SNP 및 *DNAJC7*(DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7) 유전자에 위치하는 1개의 SNP가 좌심실비대와 연관 되어있다는 사실을 발견하였다. 본 발명의 키트는 상기의 SNP들을 포함하는 각 유전자 서열의 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용하여 인간의 좌심실비대의 위험도를 예측할 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서, 용어 “연관(association)”은 특정한 유전자의 다형성과 당해 유전자를 가진 개체의 표현형 간의 관계가 통계학적으로 유의한 경우를 의미하며, 보다 구체적으로는 특정 SNP의 존재와 ECG를 통해 측정된 좌심실비대 간의 관계를 나타내는 통계학적 결과의 p -값(p -value)의 크기가 1×10^{-5} 이하인 경우를 말한다. 상기에서 나열한 총 12개의 SNP들은 KARE GWAS 결과, 1×10^{-5} 이하의 매우 작은 p -값을 보임으로서 좌심실비대와 강하게 연관되어 있음을 보여주었고(표 2), 특히 연관도가 강한 3개의 SNP rs2071090, rs10500279 및 rs2960321의 p -값은 각각 $p=2.2 \times 10^{-6}$, $p=9.5 \times 10^{-7}$ 및 $p=2.0 \times 10^{-6}$ 이었다.
- [0020] 본 명세서에서, 용어 “뉴클레오타이드”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0021] 본 명세서에서 용어 “단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)”은 게놈에서 단일염기(A, T, C 또는 G)가 종의 멤버들 간 또는 한 개체(individual)의 쌍 염색체 간에 다른 경우에 발생하는 DNA 서열의 다양성을 의미한다. 예를 들어, 서로 다른 개체의 세 개의 DNA 단편들(예: AAGT[A/A]AG, AAGT[A/G]AG, AAGT[G/G]AG)처럼 단일염기에서 차이를 포함하는 경우, 두 개의 대립 유전자(C 또는 T)라고 부르며, 일반적으로 거의 모든 SNPs는 두 개의 대립 유전자를 가진다. 한 집단(population)내에서, SNP는 소수 대립인자 빈도(minor allele frequency, MAF; 특정 집단에서 발견되는 유전자위치(locus)에서 가장 낮은 대립인자 빈도)로 할당될 수 있다. 인간 집단 내에서 변이성(variations)이 존재하며, 지질학적 또는 민족적 군에서 공통적인 하나의 SNP 대립 유전자는 매우 희귀하다. 단일염기는 폴리뉴클레오타이드 서열에 변화(대체), 제거(결실) 또는 첨가(삽입)될 수 있다. SNP는 번역 프레임의 변화를 유발할 수 있다.
- [0022] 단일염기다형성은 유전자의 코딩 서열, 유전자의 비-코딩 부위 또는 유전자 사이의 내부 지역(intergenic regions)에 포함될 수 있다. 유전자의 코딩 서열 내의 SNP는 유전암호의 중복성(degeneracy)으로 인해 반드시 타겟 단백질의 아미노산 서열 상에 변화를 일으키지는 않는다. 동일한 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 동의적(synonymous)이라 하고(침묵 돌연변이라고도 불리움), 다른 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP의 경우 비-동의적(non-synonymous)이라고 한다. 비-동의적 SNP는 미스센스 또는 넌센스일 수 있으며, 미스센스 변화는 다른 아미노산을 발생시키는 반면에 넌센스 변화는 비성숙 종결코돈을 형성한다. 단백질-코딩 부위가 아닌 곳에 존재하는 SNP는 유전자 사일런싱, 전사인자 결합 또는 비-코딩 RNA 서열을 유발시킬 수 있다.
- [0023] 인간의 DNA 서열 상의 변이성은 병의 발병 및 인간이 어떻게 병원체, 화학물질, 약물, 백신 및 다른 시약에 반응하는가에 영향을 미칠 수 있다. 또한, SNP는 맞춤형 의학의 개념을 실현하기 위한 중요한 도구(key enabler)로 생각된다. 무엇보다도, 최근에 마커로서 활발하게 개발되고 있는 SNP는 질병을 가지거나 또는 가지지 않는 군들 간에 게놈 부위를 비교함으로써 질병을 진단하는 생의학적 연구에서 가장 중요하다. SNP는 인간 게놈의 가장 많은 변이이며, 1.9 kb 당 하나의 SNP 비율로 존재하는 것으로 추측되고 있다(Sachidanandam et al., 2001). SNP는 매우 안정된 유전적 마커이고, 때때로 표현형에 직접적인 영향을 미치며, 자동화된 유전자형규명 시스템에 매우 적합하다(Landegren et al., 1998; Isaksson et al., 2000). 또한, SNP 연구는 곡식 및 가축 육성 프로그램에서도 중요하다.
- [0024] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적

인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보 뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.

[0026] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산의 제1위치에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 본 명세서에서, 프라이머 서열과 관련하여 사용되는 용어, “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.

[0027] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 용어 “어닐링” 또는 “프라이밍”은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.

[0028] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상술한 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.

[0029] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

[0030] 본 발명의 키트에서 출발물질이 gDNA인 경우, gDNA의 분리는 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Rogers & Bendich (1994)).

[0031] 출발물질이 mRNA인 경우에는, 당업계에 공지된 통상의 방법에 총 RNA를 분리하여 실시된다(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 Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 분리된 총 RNA는 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성된다. 상기 총 RNA는 인간(예컨대, 비만 또는 당뇨 환자)으로부터 분리된 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)).

[0032] 본 발명의 키트에 있어서, 상기 특정 서열을 규명하는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 응용될 수 있는 기술은, 형광 인 situ 혼성화 (FISH), 직접적 DNA 서열결정, PFGE 분석, 서던 블롯 분석, 단일-가닥 컨퍼메이션 분석(SSCA, Orita et al., *PNAS, USA* 86:2776(1989)), RNase 보호 분석(Finkelstein et al., *Genomics*, 7:167(1990)), 닷트 블롯 분석, 변성 구배 젤 전기영동(DGGE, Wartell et al., *Nucl.Acids Res.*, 18:2699(1990)), 뉴클레오타이드 미스매치를 인식하는 단백질WartE. coli의

mutS 단백질ucI.Ac는 방법(Modrich, *Ann. Rev. Genet.*, 25:229-253(1991)), 및 대립형-특이 PCR을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0033] 서열변화가 단일-가닥 분자내 염기 결합의 차이를 초래하여, 이동성이 다른 밴드를 출현하게 하는 데, SSCA는 이 밴드를 검출한다. DGGE 분석은 변성 구배 젤을 이용하여, 야생형 서열과 다른 이동성을 나타내는 서열을 검출한다.
- [0034] 다른 기술들은 일반적으로 본 발명의 SNP들을 포함하는 서열에 상보적인 프로브 또는 프라이머를 이용한다.
- [0035] 예를 들어, RNase 보호 분석에서, 본 발명의 SNP들을 포함하는 서열에 상보적인 리보프로브가 이용된다. 상기 리보프로브와 인간으로부터 분리한 DNA 또는 mRNA를 혼성화시키고, 이어 미스매치를 검출할 수 있는 RNase A 효소로 절단한다. 만일, 미스매치가 있어 RNase A가 인식을 한 경우에는, 보다 작은 밴드가 관찰된다.
- [0036] 혼성화 시그널을 이용하는 분석에서, 본 발명의 SNP를 포함하는 서열에 상보적인 프로브가 이용된다. 이러한 기술에서, 프로브와 타겟 서열의 혼성화 시그널을 검출하여 직접적으로 DM 또는 MS 여부를 결정한다.
- [0037] 본 명세서에서, 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 바람직하게는, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이다. 프로브는 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오타이드이다.
- [0038] 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 프로브는 본 발명의 SNP를 포함하는 10-30개의 연속 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 프로브의 3' -말단 또는 5' -말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3' -말단 또는 5' -말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다.
- [0039] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격한 조건(stringent condition)은 온도, 이온세기(완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다.
- [0040] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것(예컨대, 대사 이상 또는 당뇨병의 동정), 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 SNP들을 다중 마커로 하여 이들의 존재가 상술한 방법을 통해 확인되면 좌심실비대 수치가 높아 심혈관 질환 합병증의 위험도가 높은 것으로 판단된다.
- [0041] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 단일염기 다형성 부위를 가진 인간은 증가된 좌심실비대 질환 위험도를 갖는다.
- [0042] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 좌심실비대는 심전도기록법(electrocardiography, ECG)에 의해 측정되었다. 좌심실비대는 미네소타 코드 분류 시스템에 기초한 ECG에 의해 진단되었으며(Tuinstra CL et al., *J Electrocardiol* 15(4):345-350(1982)), V5 또는 V6에서 R 진폭이 26 mm 이상 일 때, 유도 I, II 또는 III에서 R 진폭이 20 mm 이상일 때 또는 유도 aVL에서 aVF 또는 R 진폭이 12 mm일 때 좌심실 비대로 판단하였다.
- [0043] 본 발명자들은 ECG에 의해 좌심실비대로 진단된 케이스 및 대조군의 통계결과에 신뢰성을 높이기 위해 항고혈압 약물 치료 상태, 집단, 나이, 성별, 신체 용적 지수, 수축기 혈압, 이완기 혈압, 고밀도 지질 단백질, 저밀도 지질 단백질, 트리글리세리드 및 공복 글루코오스 수치와 같은 공변인(covariate)으로서 포함시켜 이를 보정

(adjust)하였다.

- [0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 단일염기 다형성 부위를 가진 인간은 증가된 심혈관 질환 위험도를 나타낸다. 보다 바람직하게는, 심혈관 질환은 부정맥, 고혈압, 뇌졸중, 동맥경화증, 죽상경화증, 협심증, 심근경색증 또는 심부전증이다.
- [0045] 부정맥은 비정상적인 심장의 리듬으로 불규칙적이고, 너무 빠르거나 너무 느린 박동수를 나타낸다. 심장 전도계에 어떤 이상이 있어 심장박동이 불규칙하거나 가슴이 가만히 있어도 심장이 빨리 뛰거나 또는 너무 천천히 뛰는 상태를 부정맥이라 하는데, 이런 부정맥의 원인으로는 동맥경화증, 바이러스, 약물, 전해질이상, 알코올, 선천성 또는 각종 심장병이 있다.
- [0046] 고혈압은 혈압이 올라가서 내려가지 않고 높은 상태가 계속되는 것으로 혈압을 잴 때의 자세, 측정시간 및 계절, 운동, 정서 등 여러 가지 요인에 따라서 상당히 변동이 있을 수 있지만 고혈압이라고 하면 항상 높은 상태가 유지될 때를 말한다. 상세하게는 수축기 혈압이 120-139 mmHg 또는 이완기 혈압이 80-89 mmHg인 경우 직전고혈압, 수축기 혈압이 140-159 mmHg 또는 이완기 혈압이 90-99 mmHg인 경우 경증고혈압, 수축기 혈압이 160-179 mmHg 또는 이완기 혈압이 100-109 mmHg인 경우 경증중고혈압 및 수축기 혈압이 180 mmHg 이상 또는 이완기 혈압이 110 mmHg인 경우 중증고혈압으로 구분된다.
- [0047] 뇌졸중은 뇌의 혈류장애로 발생하는 뇌의 손상을 말하는데 출혈성 뇌졸중, 혈전성 뇌졸중 및 색전성 뇌졸중으로 구분된다. 출혈성 뇌졸중은 뇌 실질 내 또는 뇌 및 두개골 사이에서 출혈이 발생하면 출혈 주위 혈관들이 경련에 의해 수축되고 주변 지역의 혈류량이 부족하게 되어 발생하는 뇌 손상을 말한다. 혈전성 뇌졸중은 뇌혈관 안에 생긴 혈전이 혈류를 막아 발생하는데, 보통 지방성분이 혈관벽에 들러붙는 동맥경화증에 의해 좁아진 동맥 안에서 발생한다. 색전성 뇌졸중은 혈전이나 작은 덩어리가 혈관을 따라 뇌로 이동하여 뇌혈관을 막아 발생하는데 보통 심장 내에서 느린 혈류로 인해 생성된 혈전 때문에 발생한다. 이는 부정맥의 일종인 심방세동이나 심한 심부전으로부터 발생할 수 있다.
- [0048] 동맥경화증은 동맥이 여러 이유로 그 내면에 지방질이 끼기 시작하고 점차 그 양이 많아지며, 동맥 내벽 역시 비정상적으로 계속 두꺼워져 동맥의 내경이 좁아지고, 탄력성을 잃는 증상을 말한다. 동맥경화증은 정상적인 노화 현상, 지질대사 이상이나 호르몬대사 이상, 유전적 요인, 식생활, 운동 부족 등 여러 가지 요인에 의해 발생하는데, 보통 한가지만의 원인이 아니라 여러 원인이 서로 겹쳐서 발생되며 구체적인 요인으로 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 흡연, 비만 스트레스 등이 있다.
- [0049] 협심증은 심장 근육이 일시적으로 충분한 혈액을 공급받지 못하여 흉부압박감 또는 흉통을 느끼는 것으로 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥이 부분적으로 좁아져 발생하는 관상동맥질환의 하나로 안정협심증, 불안정협심증 및 이형 협심증(프린즈메탈 협심증) 등으로 나눈다. 안정협심증은 동맥경화증 등이 주된 원인으로 운동을 하거나 과식할 때, 정서적으로 불안하거나 흥분상태에 있을 때 또는 겨울철 집안에 있다가 갑자기 찬 공기에 노출되었을 때 주로 통증이 나타난다. 불안정성협심증은 쉬고 있거나 야간수면중에도 통증이 발생하거나 기존에 있던 흉통의 빈도나 강도가 점차 증가하는 것으로 심장마비의 위험이 있으므로 불안정협심증이 의심될 때에는 반드시 의사의 진찰 및 검사를 받고 적절한 조치를 취해야 한다. 이형성 협심증은 관상동맥이 경련처럼 수축하여 흉통이 발생하는 경우로 야간 수면중이나 새벽에 흉통이 발생하고 낮에 활동 중에는 괜찮은 경우가 많고 심근경색증, 돌연사의 원인이 될 수 있으며 흡연이 중요한 위험요인으로 남자에서 많이 발생한다.
- [0050] 심근경색증은 심장으로 가는 혈액의 공급이 원활하지 못하게 되어 어느 순간 혈관이 혈전 등으로 완전히 막히면 피가 통하지 못하여 심장 근육의 일부분이 파괴되어 죽는 것을 말한다. 흔히 심장 마비로 급사하는 경우는 대개 심근경색증 때문이다. 심근경색증의 원인은 대부분 관상동맥경화증이며, 위험 인자로서 고혈압, 흡연, 당뇨병, 고지혈증, 비만증이 있다. 관상동맥이 동맥경화로 인하여 약 70%이상 막히게 되면 협심증이 생기고, 심하게 좁아진 부위에 혈전 등으로 딱 막히게 되면 심근경색증이 유발된다.
- [0051] 심부전증은 심장의 펌프작용이 저하되어 필요한 양의 혈액을 신체의 다른 기관에 내보내지 못하게 된 상태를 말하며, 많은 심장질환들이 심장의 수축능력과 이완능력에 장애를 일으켜 심부전을 일으킬 수 있다. 심부전은 보통 수년에 걸쳐 느리게 진행되며 심장이 점차적으로 펌프하는 능력을 잃게 된다. 심부전의 가장 흔한 원인은 고혈압이다.
- [0052] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 본 발명의 키트는 아시아인에게 적용된다.

- [0053] 본 발명에서 용어 “아시아”는 한국, 중국 및 일본 등을 비롯한 몽골계 인종이 거주하는 극동 지역을 의미한다. “아시아인”이란 조상이 아시아인인 개체군을 의미하며, 바람직하게는 적어도 10대 이상의 조상이 아시아인인 개체군을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 아시아인은 한국인이다.
- [0054] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 좌심실비대의 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여 인간의 생물학적 시료에 있는 *RYR1* 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제1서열의 301번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스 rs2071090), 서열목록 제2서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스 rs10500279), 서열목록 제3서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs2960321), *DRD1* 유전자의 단일염기다형성(SNP) 부위로서 서열목록 제4서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs265992), *TTRAP* 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제5서열의 256번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs9295629), *FAM135B* 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제6서열의 201번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs6577840), 서열목록 제7서열의 502번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs4909705), 서열목록 제8서열의 301번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs7825068), 서열목록 제9서열의 960번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs7840530), *GALNTL4* 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제10서열의 301번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs17446021), *DYNC2H1* 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제11서열의 251번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs11225822) 및 *DNAJC7* 유전자의 단일염기다형성 부위로서 서열목록 제12서열의 401번째 위치(GenBank SNP 데이터베이스, rs4239268)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단일염기다형성 부위를 검출하는 단계를 포함하는 좌심실비대의 마커를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0055] 본 발명의 방법은 상술한 프라이머를 필수 구성요소로 하는 바, 프라이머에 대한 상세한 설명은 본 발명의 방법에 이용되는 프라이머에도 적용된다. 따라서, 반복적인 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0056] 본 발명의 방법이 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 방법은 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 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 방법은 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 본 발명의 방법은 마이크로어레이 방식 또는 유전자 증폭 방식으로 실시된다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 증폭은 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 프라이머는 유전자 증폭 반응(amplification reactions)에 이용된다.
- [0058] 본 명세서에 기재된 용어 “증폭 반응”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(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 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)(21, 22) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)(23)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.
- [0059] 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 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 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.

[0060] 본 발명의 방법을 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열을 분석하여 진단한다. 본 발명은 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열을 검출하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 게놈 DNA)에서 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열을 결정함으로써 조사하여 MS 또는 DM을 결정할 수 있다.

[0061] 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.

[0062] 본 발명의 방법은 마이크로어레이 방식으로 실시될 수도 있다. 본 발명의 방법이 마이크로어레이 방식에 의하는 경우에는, 마이크로어레이의 고상표면에 프로브가 고정화 되어 있다.

[0063] 본 발명의 방법에서 이용되는 프로브는 상기 나열한 본 발명의 SNP들을 포함하는 각 유전자상의 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 갖는다.

[0064] 프로브 제작 시 참조하여야 하는 본 발명 마커의 뉴클레오타이드 서열은 GenBank에서 확인할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 마커 중 하나인 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드는 GenBank SNP 데이터베이스 rs2071090, 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드는 GenBank SNP 데이터베이스 rs10500279에 뉴클레오타이드 서열이 개시되어 있으며, 이 서열을 참조하여 프로브를 디자인할 수 있다.

[0065] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 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 기체에 결합될 수 있다.

[0066] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0067] 프로브의 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 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

[0068] 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다. 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.

[0069] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충

액 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. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65°C 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다.

[0070] 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, 호스라디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시제닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(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; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 나이트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다. 따라서 본 발명의 마커를 검출하는 방법을 혼성화에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브를 핵산 시료에 혼성화시키는 단계; (ii) 상기 혼성화 반응 발생 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 혼성화 과정에 의한 혼성화 시그널의 세기를 분석함으로써, 비만, 당뇨 또는 심혈관 질환 합병증의 위험도를 판단할 수 있다. 즉, 시료에서 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열에 대한 혼성화 시그널이 정상 시료보다 강하게 나오는 경우에는 좌심실비대 질환의 위험도가 높은 것으로 진단된다.

[0071] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 단일염기다형성 부위가 검출된 경우 진단 대상인 인간은 증가된 좌심실비대 질환 위험도를 가진다.

[0072] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면 본 발명의 좌심실비대 질환 위험도는 심전도기록법(electrocardiography, ECG)에 의해 계산된다.

[0073] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 아시아인에게 적용된다.

발명의 효과

[0074] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0075] (a) 본 발명은 좌심실비대 진단용 키트 및 좌심실비대의 마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0076] (b) 본 발명은 좌심실비대 또는 심혈관 관련 질환의 간단한 유전학적 체외진단에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 지역기반 LVH군(n=398) 및 대조군(n=8,432)을 이용하여 수행한 333,651개 SNP의 GWAS에 대한 변위치(Quantile)-변위치 플롯을 나타낸 그림이다.

도 2는 는 GWAS 결과에 대한 맨하탄 플롯을 나타낸 그림이다.

도 3은 ECG-LVH GWAS의 8개 관련 유전자와 각각의 시그널 플롯을 나타낸 그림이다.

(a) 5q35.1(rs265992), (b) 6p22.3-22.1(rs9295629), (c) 8q24.2(rs4909705), (d) 11p15(rs17446021), (e) 11q21-q22.1(rs11225822), (f) 14q12(rs1956217), (g) 17q11.2(rs4239268), (h) 19q13.1(rs10500279)

도 4는 GWAS(●), 반복 연구 시그널(★) 및 결합분석(☆)에서 RYR1 좌위에 대한 시그널 플롯을 나타낸

그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0078] 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.
- [0079] 실시예
- [0080] 재료 및 방법
- [0081] 연구 대상
- [0082] 한국인 유전체 분석사업(Korea Association Resource, KARE)은 2007년에 시작되어 안성(n=5018) 및 안산(n=5020) 지역사회 기반 코호트의 10,038명의 참여자들(40세-70세) 중에서 대규모 GWA 분석을 착수하였다(Cho YS et al., *Nat Genet* 41(5):527-534(2009)).
- [0083] 피험자들 중 유전자형 정확도 98% 이하, 높은 미싱 지노타입 콜 레이트(missing genotype call rates)($\geq 4\%$), 높은 이형접합성($>30\%$) 또는 성별의 불일치는 차후 분석들로부터 제외되었다. 종양을 가진 사람은 제외되었으며 추정된 IBS(identity-by-state) 값이 0.80 이상인 경우도 제외되었다. 이러한 단계를 거친 후, 8,842개 샘플이 선택되었으며 이중 12개 샘플은 ECG를 수행하지 않았다. 최종적으로 8,830명의 GWA 지노타입을 연관성 분석에 포함시켰다.
- [0084] 좌심실비대는 미네소타 코드 분류 시스템에 기초한 ECG에 의해 진단되었으며(Tuinstra CL et al., *J Electrocardiol* 15(4):345-350(1982)), V5 또는 V6에서 R 진폭이 26 mm 이상 일 때, 유도 I, II 또는 III에서 R 진폭이 20 mm 이상일 때 또는 유도 aVL에서 aVF 또는 R 진폭이 12 mm일 때 좌심실 비대로 판단하였다(모든 기준은 정상 박동수의 끝에서 두번째에서 측정되었다). 혈압은 반듯이 누운 상태에서 3차례 측정되었으며, 평균값을 GWAS에 사용하였다. 첫번째 측정 이전에 피험자들은 5분간 휴식을 취했으며, 혈압은 적어도 3분의 간격을 두고 측정한 혈압이 보다 높은 한쪽 팔에서 측정하였다. 콜레스테롤 수치 및 공복 글루코오스 수치와 같은 다른 심혈관 위험 요소들은 밤새 공복을 유지한 후 채취한 혈액 샘플에서 측정하였다.
- [0085]
- [0086] 유전자형 분석
- [0087] DNA 샘플은 피험자들의 말초혈로부터 분리하였으며, 유전자형 분석은 Affymetrix Genomewide Human SNP array 5.0(Affymetrix, Inc., SantaClara, CA)를 이용하여 수행하였다. 유전자형 분석의 품질관리 단계는 Cho YS 등의 연구(Cho YS et al., *Nat Genet* 41(5):527-534(2009))를 참조하였다. 간략하게는 유전자형 분석의 정확도는 마할라노비스 거리 유전자형 분석 알고리즘을 이용한 베이저안 로버스트 선형 모델에 의해 결정된다(Rabbee N et al., *Bioinformatics* 22(1):7-12(2006)). 하디-와인버그 평형(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)($p > 1 \times 10^{-6}$)으로부터 편차가 없고, 소수 대립 유전자 빈도(minor allele frequency, MAF) 0.01 이상, 유전자형 콜 레이트(call rate) 0.1 미만을 제외한 333,651개의 SNP를 남겼다.
- [0088]
- [0089] 반복 연구 대상
- [0090] 반복 연구는 207명의 좌심실비대 환자 및 597명의 대조군을 포함하였으며, 연세대학교 건강 시스템 심혈관 유전체 센터의 환자 데이터베이스로부터 선택되었다. 환자 및 대조군은 본래 GWAS 연구에 비의존적이다.
- [0091] 환자 데이터베이스는 세브란스 심혈관 병원 심장학과의 외래환자 병동에 출입한 40-70세의 환자 또는 2002년 5월-2007년 11월 사이에 입원한 40-70세의 환자들의 데이터로 구성되었다. ECG-LVH는 미네소타 코드 분류 시스템 GWAS와 같은 기준을 적용하여 진단하였다(Tuinstra CL et al., *J Electrocardiol* 15(4):345-350(1982)). 본 발명은 지역 윤리위원회의 허가를 받아 진행되었으며, 모든 환자로부터 고지에 입각한 동의를 받았다.
- [0092]

[0093] 반복 연구 유전자형 분석

[0094] 반복 연구를 위한 SNP 선정은 유의한 p -값($<1 \times 10^{-5}$)을 기초로 하였다. SNP 유전자형 분석은 TaqManTM fluorogenic 5' nuclease assay(Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 수행하였다. 유전체 DNA, TaqManTM Universal PCR Master Mix 및 40X predesigned TaqMan probe Assay Mix를 혼합하여 PCR 반응액을 제조하였다. 50° C에서 2분동안 정치하여 우라실 엔-글리코실레이즈 활성화 및 오염을 방지하고 95° C에서 10분 동안 정치한 후, 95° C에서 15초 및 60° C에서 1분의 조건으로 45회 반복하여 PCR을 수행하였다.

[0095] PCR 반응액은 384-웰 플레이트에 넣어 Dual 384-Well GeneAmpPCRSytem9700(Applied Biosystems, Foster City, CA)에서 PCR 반응을 하였고, 결과는 ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System(Applied Biosystems, Foster City, CA)에서 측정하였다. 중복 샘플 및 음성대조군은 유전체 분석 데이터의 정확도를 보장하기 위해 포함시켰다.

[0096]

[0097] 통계학적 분석

[0098] ECG-LVH 케이스 및 대조군은 항고혈압 약물 치료 상태, 집단, 나이, 성별, 신체 용적 지수, 수축기 혈압, 이완기 혈압, 고밀도 지질 단백질, 저밀도 지질 단백질, 트리글리세리드 및 공복 글루코오스 수치와 같은 공변으로 회기분석하였다.

[0099] 통계학적 분석은 PLINK(Purcell S et al., *Am J Hum Genet* 81(3):559-575(2007))(버전 1.07) 및 SPSS(버전 15.0)을 이용하여 수행하였다. 공변의 다중 공선성을 피하기 위해 오차 및 분산팽창지수를 측정하였다(표 1). 점근적 HWE 테스트는 PLINK로 수행하였다.

표 1

[0100] KARE 및 반복 연구 피험자들의 임상학적 특징

-	KARE GWAS		케이스 대 대조군 p - 값 ^a	공선형 통계		반복연구		케이스 대 대조군 p - 값 ^a	결합분석	
	대조군	케이스		오차	VIF	대조군	케이스		오차	VIF
총	8432	398	-	-	-	597	207	-	-	-
처리 ^b (%)	1217(14)	72(18)	4.3×10^{-2}	0.90	1.11	99(17)	194(95)	4.8×10^{-43}	0.77	1.30
인간(%)	3916(46)	261(66)	3.0×10^{-8}	0.90	1.11	430(72)	161(78)	2.5×10^{-1}	0.89	1.12
-	Mean (SD)	-	-	-	-	Mean(SD)	-	-	-	-
나이	52.1(8.9)	55.1(9.2)	2.2×10^{-11}	0.81	1.24	57.4(7.5)	58.3(8.0)	1.2×10^{-2}	0.88	1.14
신체용적지수	24.6(3.1)	23.6(2.9)	1.1×10^{-11}	0.80	1.24	24.2(2.6)	24.5(3.4)	3.0×10^{-1}	0.92	1.09
수축기 혈압(mmHg)	117.1(18.0)	128.0(20.8)	1.7×10^{-31}	0.29	3.41	124.3(17.9)	126.9(21.0)	2.7×10^{-1}	0.42	2.35
이완기혈압(mmHg)	74.9(11.5)	79.4(11.7)	1.6×10^{-14}	0.32	3.08	78.4(10.9)	77.6(11.2)	2.6×10^{-1}	0.43	2.34
고밀도지질 단백질(mg/dL)	44.6(10.1)	45.3(10.6)	1.7×10^{-1}	0.80	1.25	48.9(15.2)	44.0(12.9)	9.7×10^{-9}	0.90	1.11
저밀도지질 단백질(mg/dL)	116.0(32.2)	110.3(32.7)	6.8×10^{-4}	0.93	1.07	120.1(35.3)	97.0(33.7)	1.2×10^{-2}	0.87	1.15
트리글리세 라이드(mg/dL)	163.0(106.1)	162.6(98.6)	9.4×10^{-1}	0.77	1.30	140.8(95.0)	135.1910(3.0)	5.6×10^{-1}	0.91	1.10
공복 글루코 오스 수치(mg/dL)	87.7(22.0)	86.9(19.4)	4.8×10^{-1}	0.94	1.06	96.1(27.4)	114.1(52.1)	1.6×10^{-6}	0.84	1.20

- [0101] SD: 표준편차(Standard deviation), VIF: 분산팽창요인(Variance inflation factor)
- [0102] ^a대조군 및 케이스 간의 p -값은 성비 및 양적형질에 대한 스튜던트 t -검정을 이용하여 계산되었다.
- [0103] ^b항고혈압 약물 투여 피험자
- [0104] **실험결과**
- [0105] *피험자들의 기준치 특성*
- [0106] 8,830명의 KARE 피험자들 중 398명은 미네소타 코드 분류 시스템에 의해 ECG-LVH로 진단되었다. 인구학 및 임상학적 특징은 표 1에 나타내었다. 항고혈압 치료 상태, 성별, 나이, 신체 용적 지수, 수축기 혈압, 이완기 혈압, 저밀도 지질 단백질 수치는 KARE GWAS의 ECG-LVH 그룹 및 대조군 그룹간에 상당한 차이를 보였다. GWAS에 있어 대조군의 1,217명(14%)이 항고혈압 약물치료를 받았고, ECG-LVH 그룹의 72명(18%)이 항고혈압 약물치료를 받았다.
- [0107] 병원-기반 반복 연구에서 ECG-LVH 그룹과 대조군간의 항고혈압 약물치료 상태, 나이, 고밀도 지질 단백질, 저밀도 지질 단백질 및 공복 글루코오스 수치는 상당한 차이를 보였다. 대조군의 99명(17%), ECG-LVH 그룹의 194명(94%)이 항고혈압 약물치료를 받았다. 본 발명자들은 공변의 다중공선성을 피하기 위해 오차 및 분산팽창지수를 측정된 결과, 낮은 공변 다중공선성을 의미하는 5보다 높은 수치는 나타나지 않았다.
- [0108] *ECG-LVH GWAS*
- [0109] ECG-LVH GWAS은 Cho 등의 연구(*Nat Genet* 41(5):527-534(2009))에서 알려진 KARE 유전자형 분석 데이터를 이용하였다. 333,651개 SNP의 GWAS는 지역기반 LVH군($n=398$) 및 대조군($n=8,432$)을 이용하여 수행하였으며, Q-Q(quantile-quantile) 플롯은 도 1에 나타내었다. 유전체 팽창 인자(λ)는 1.00이었으며 이는 전체적 집단 층화(population stratification) 또는 팽창된 결과에 대한 증거이다.
- [0110] 도 2A는 GWAS 결과의 맨하탄 플롯을 보여주며 이들의 p -값(유의확률)은 표 2에 나타내었다. 연관성에 대한 어떤 p -값도 다중 비교 기준을 충족시키지 않았다(본페로니 교정 p -값 $<1.5 \times 10^{-7}$). 따라서, 본페로니 교정 기준 대신에 덜 엄격한 p -값($<1 \times 10^{-5}$)이 반복 샘플에 대한 연구에 적용되었다. ECG-LVH GWAS는 8개의 관련 유전자좌에서 14개의 SNP를 동정하였다: 5q35.1(rs265992, $p=1.2 \times 10^{-6}$)로부터 1개의 SNP, 6p22.3-22.1(rs9295629, $p=9.0 \times 10^{-6}$)로부터 1개의 SNP, 8q24.2(rs4909705, $p=3.7 \times 10^{-6}$)로부터 5개의 SNP, 11p15(rs17446021, $p=4.9 \times 10^{-6}$)로부터 1개의 SNP, 11q21-q22.1(rs11225822, $p=1.4 \times 10^{-6}$)로부터 1개의 SNP, 14q12(rs1956217, $p=7.9 \times 10^{-6}$)로부터 1개의 SNP, 17q11.2(rs4239268, $p=9.9 \times 10^{-6}$)로부터 1개의 SNP 및 19q13.1(최적 SNP: rs10500279, $p=9.5 \times 10^{-7}$)로부터 3개의 SNP. 8개 유전자좌 각각의 시그널 플롯은 도 3a-h에 예측되었다.
- [0111]
- [0112] *반복 샘플의 확인*
- [0113] 본 발명자들이 동정한 14개의 SNP 중 12개를 반복 샘플(207개 케이스 및 597개 대조군)에서 유전자형 분석을 수행하였다. 모든 유전자형은 낮은 미싱 레이트(0.1-3.2%)을 나타내며 HWE 기준을 만족시키지 못한 SNP는 없었다. 12개 SNP 중, 19q13.1의 리아노딘 수용체1(폴격)에 위치한 *RYR1*의 3개 SNP는 병원-유래 샘플에서 p -값의 범위가 2.7×10^{-2} - 3.6×10^{-2} 인 것으로 확인되었다(도 4 및 표 2).
- [0114] 더욱이 KARE/반복 샘플의 분석 결과는 3개 SNP의 연관 시그널이 전체 유전체 연관 분석의 유의적 임계수준을 넘었음을 입증하였다($p < 7.2 \times 10^{-8}$)(Dudbridge F et al., *Genet Epidemiol* 32(3):227-234(2008)). *RYR1* 유전자의 인트론 및 rs10500279에 위치하는 3개의 SNP는 가장 중요한 SNP로서 1.58(CI: 1.35-1.85)의 오즈비(odds ratio) 및 $p=1.0 \times 10^{-8}$ 값을 갖는다(도 4 및 표 2).

표 2

참고셀만 식물치로 상대, 코호트, 나이, 성별 및 성별관계 위험 요소를 제외한 GWAS 및 복제연구의 로지스틱회귀 분석 결과

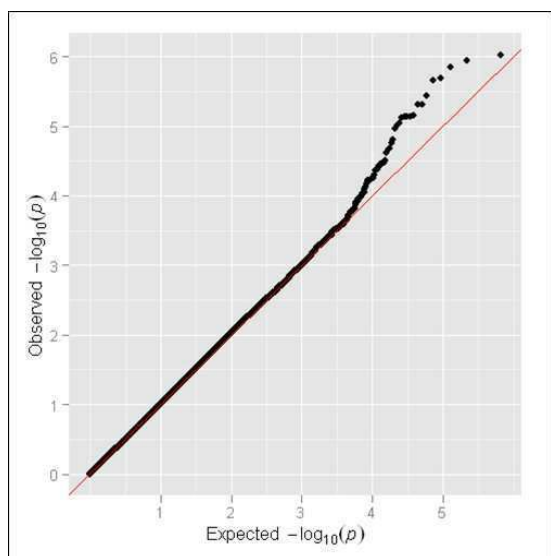
크로모 좀	rsID	위치	좌위	유전자	M KAS (KAS 케이스 398 대조군 8412)					반복 연구 (케이스 207 대조군 597)					합동 분석 (케이스 605 대조군 9929)					
					MAF	OR	1.95	0.95	P-값	MAF	OR	1.95	0.95	P-값	OR	1.95	0.95	P-값		
5	rs20588		1748466	5q26.1	DNM1	A	0.1	1.70	1.37	2.10	1.2E-0	0.068	0.76	0.39	1.48	4.2E-0	1.46	1.20	1.78	1.6E-0
2	rs20588	5									8					1				4
6	rs20588	2465406	6p22.3	TTNP	T	0.038	1.99	1.47	2.71	9.0E-0	0.037	0.61	0.17	2.13	4.4E-0	1.62	1.21	2.18	1.2E-0	
29				22.1							6					1				3
9	rs5778	13880543	8q24.2	PMI358	C	0.159	1.52	1.27	1.63	7.1E-0	0.153	0.94	0.59	1.51	8.1E-0	1.38	1.18	1.63	9.2E-0	
40		2									6					1				5
8	rs6037	13880578	8q24.2	PMI358	T	0.16	1.54	1.28	1.85	3.7E-0	0.149	1.00	1.00	1.01	7.7E-0	1.42	1.20	1.67	2.6E-0	
05		8									6					1				5
8	rs78250	13880758	8q24.2	PMI358	T	0.159	1.53	1.28	1.84	5.0E-0	0.154	0.94	0.58	1.50	7.8E-0	1.39	1.18	1.63	8.0E-0	
68		0									6					1				5
8	rs7845	13881148	8q24.2	PMI358	A	0.162	1.51	1.28	1.81	7.3E-0	0.153	0.93	0.58	1.51	7.6E-0	1.38	1.17	1.62	9.6E-0	
30		0									8					1				5
11	rs17446	11781070	11p15	GALNT4	A	0.014	2.81	1.60	4.37	4.9E-0	0.011	5.63	0.74	42.88	9.5E-0	2.28	1.47	3.48	2.3E-0	
021											6					2				4
11	rs11225	10334503	11q21.4	DNM3H	C	0.067	1.71	1.38	2.13	1.4E-0	0.091	1.35	0.74	2.48	3.3E-0	1.62	1.33	1.97	1.2E-0	
822		0	22.1								6					1				6
17	rs42382	40154777	17q11.2	DNM37	C	0.15	1.52	1.26	1.82	9.9E-0	0.131	0.88	0.51	1.46	5.3E-0	1.38	1.17	1.63	1.5E-0	
68											6					1				4
19	rs20710	39015454	19q13.1	PMI	G	0.219	1.49	1.28	1.78	2.2E-0	0.236	1.59	1.05	2.41	2.7E-0	1.49	1.30	1.72	3.6E-0	
90											6					2				8
19	rs10500	3903098	19q13.1	PMI	G	0.157	1.57	1.31	1.88	9.5E-0	0.173	1.65	1.08	2.65	3.6E-0	1.58	1.35	1.85	1.0E-0	
279											7					2				8
19	rs29603	39046163	19q13.1	PMI	A	0.212	1.49	1.27	1.76	2.0E-0	0.232	1.59	1.04	2.42	3.1E-0	1.50	1.30	1.73	2.5E-0	
21											6					2				8

[0115]

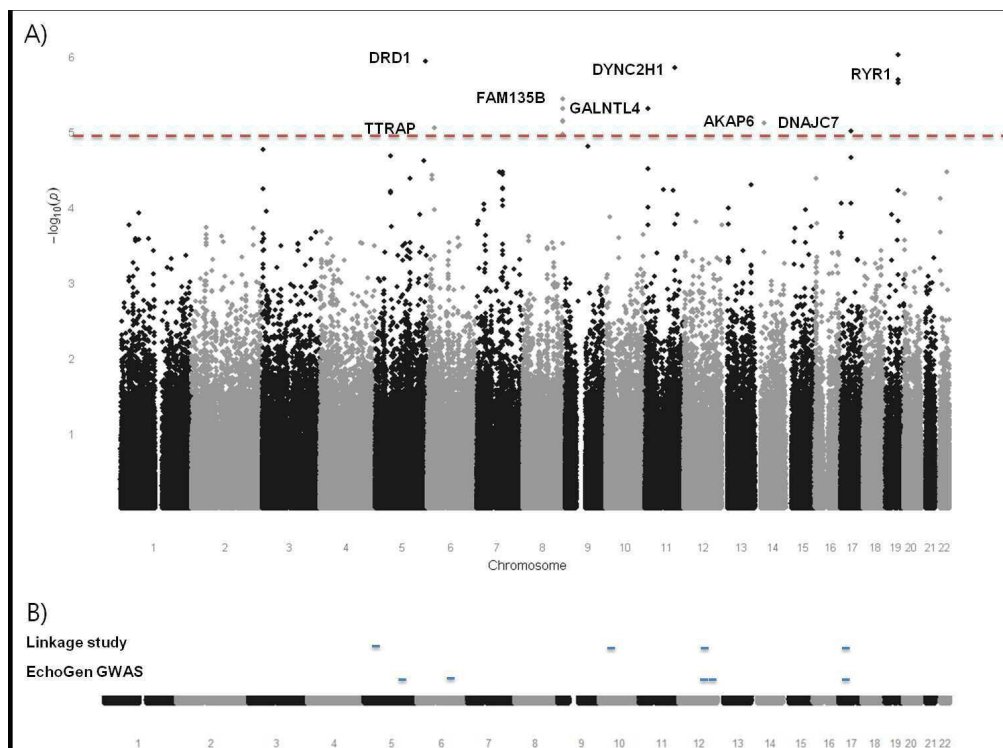
[0116] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

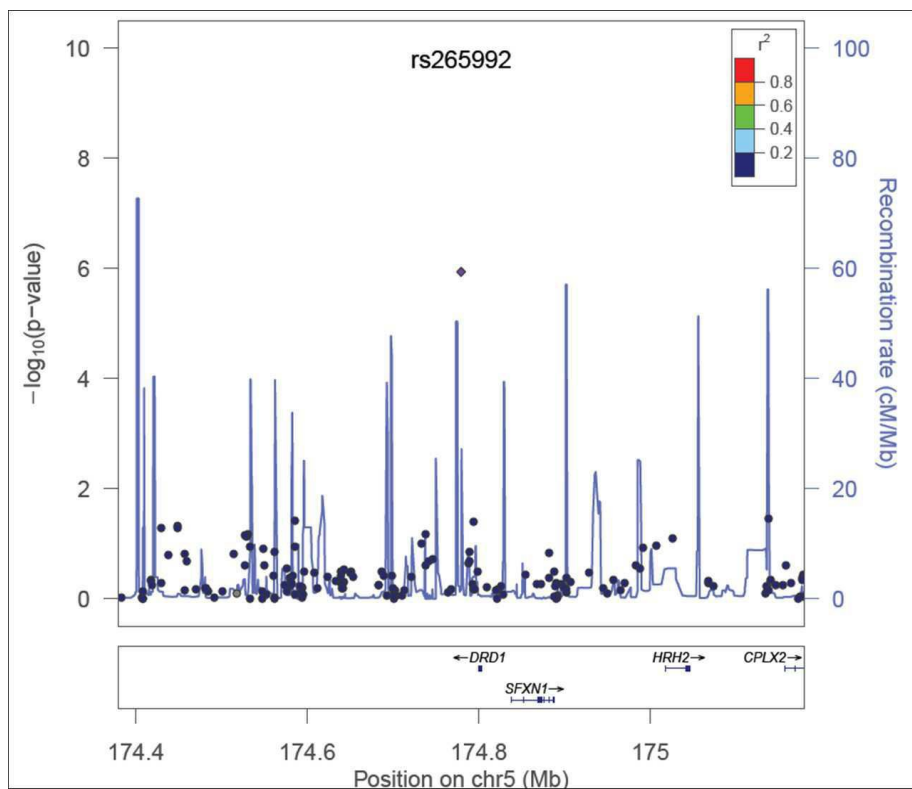
도면1



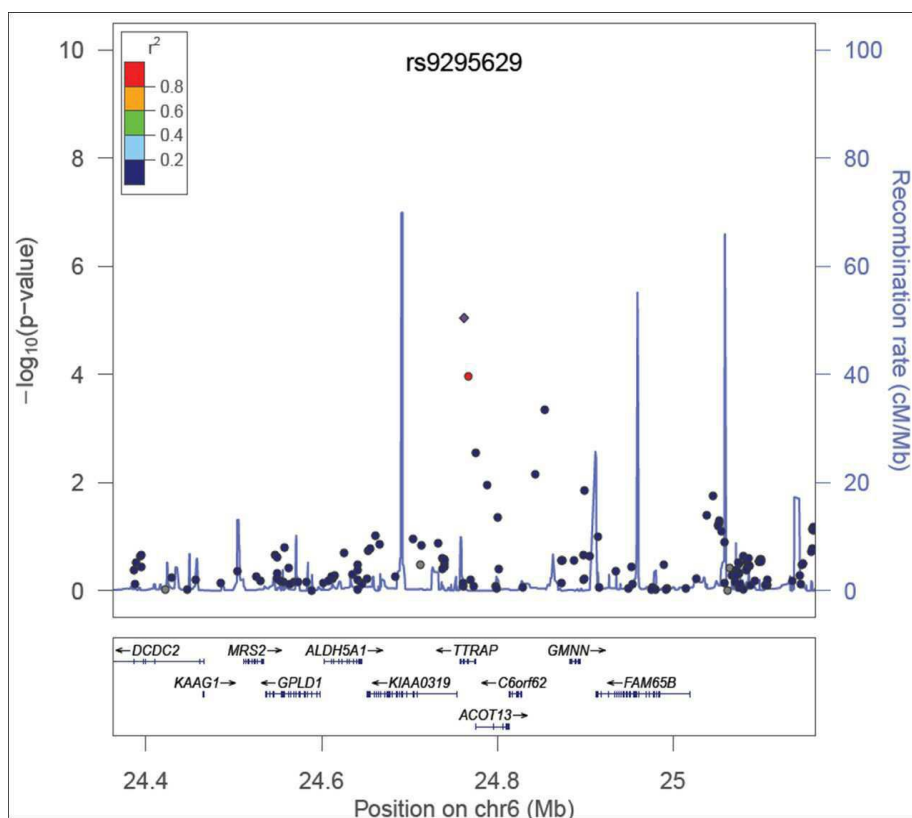
도면2



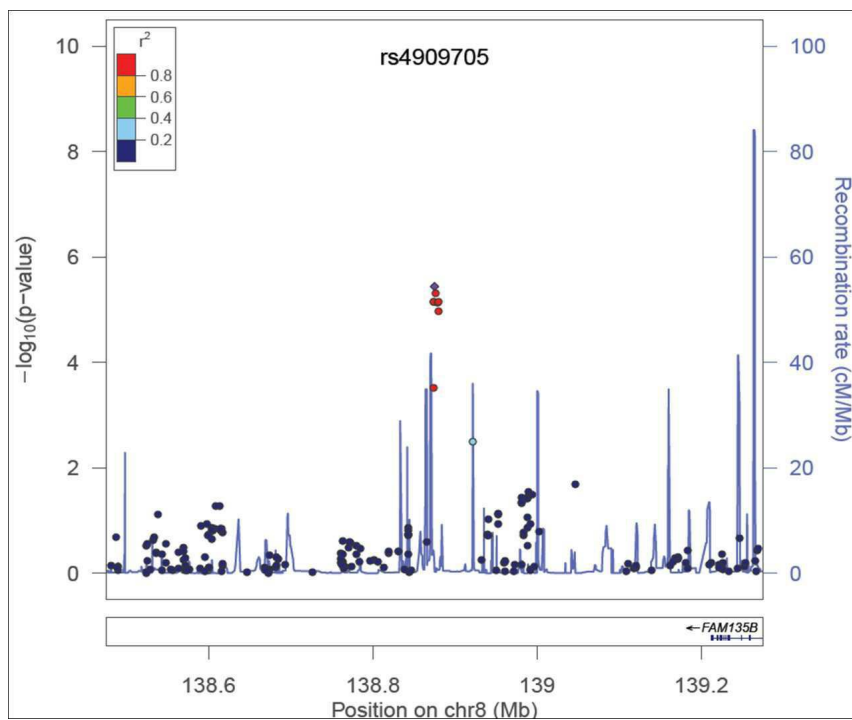
도면3a



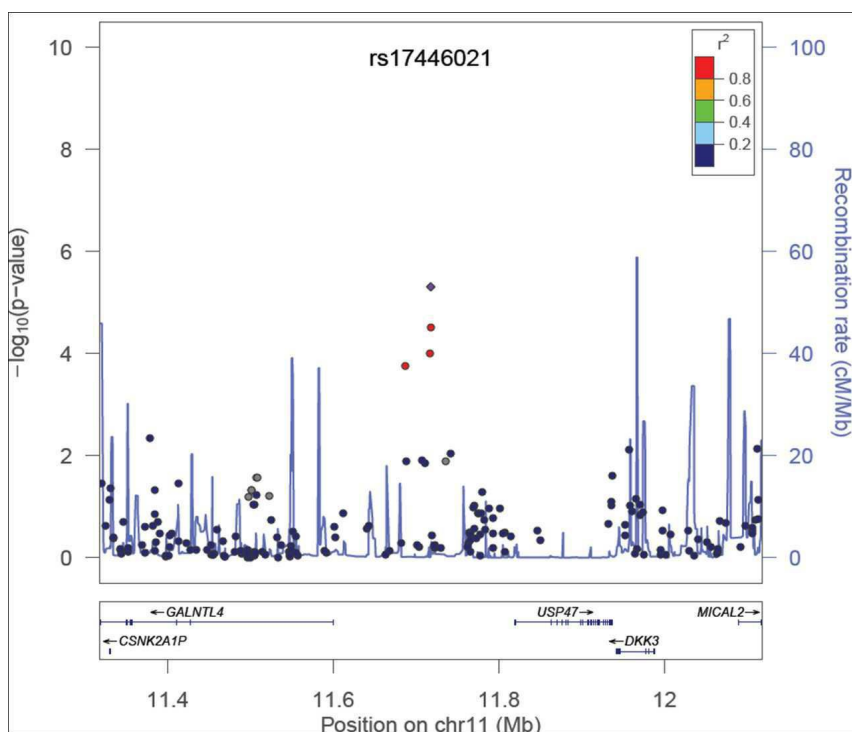
도면3b



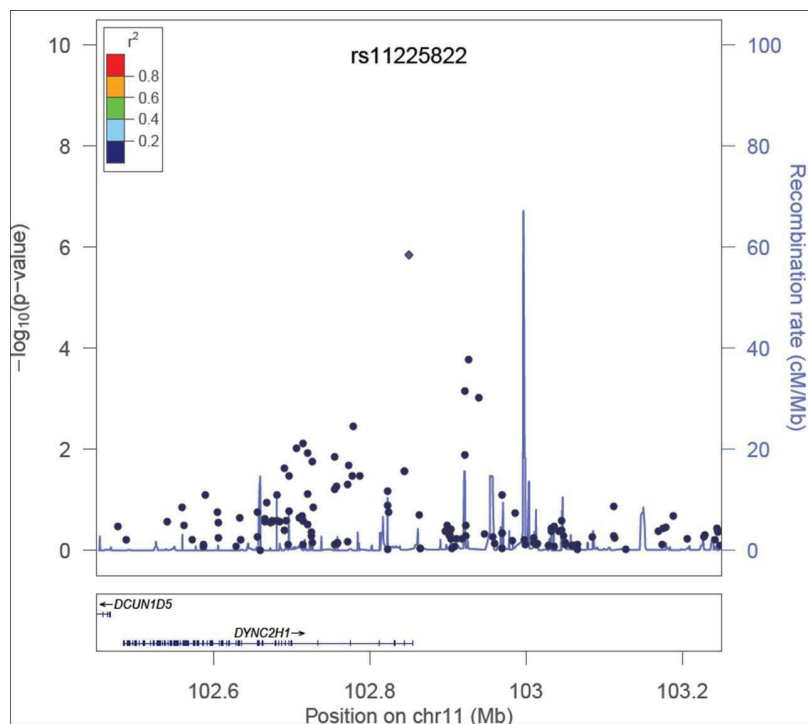
도면3c



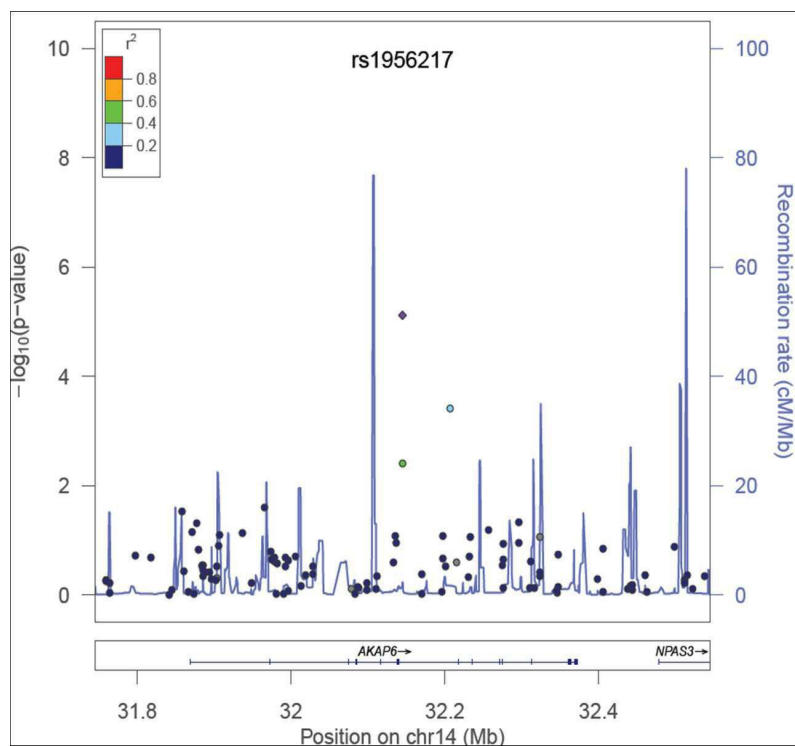
도면3d



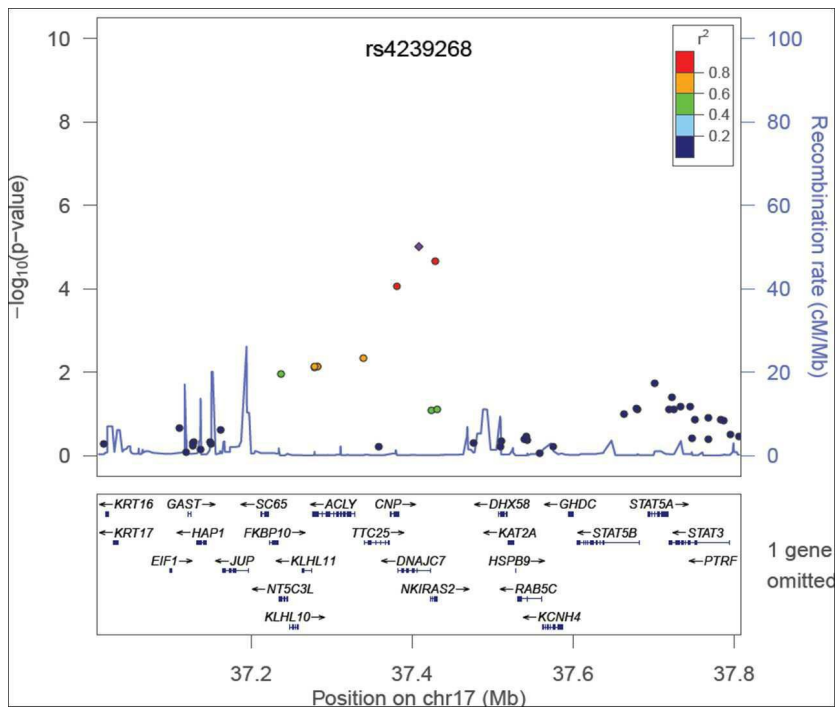
도면3e



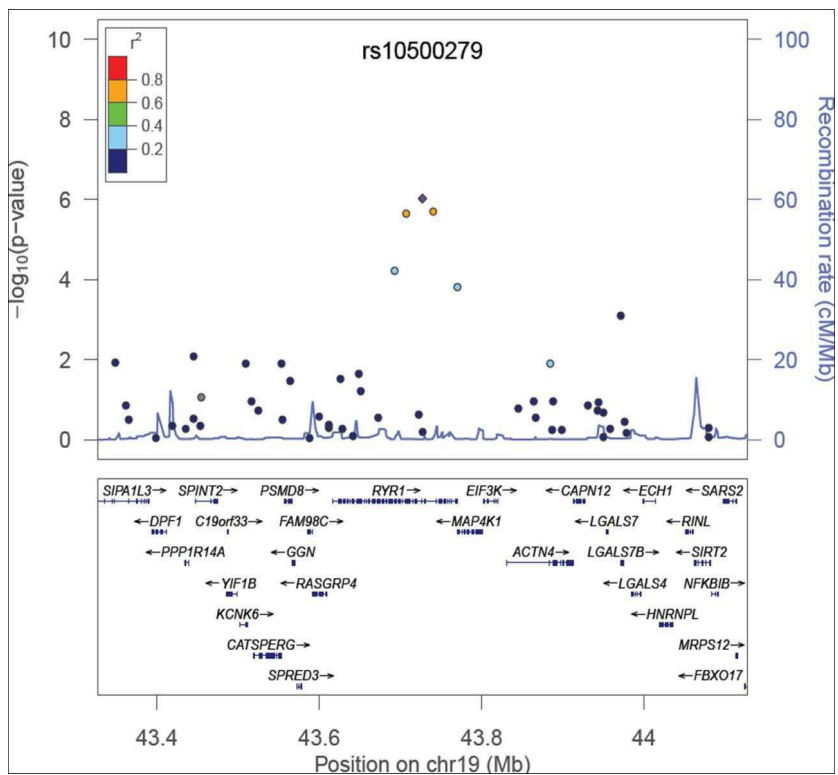
도면3f



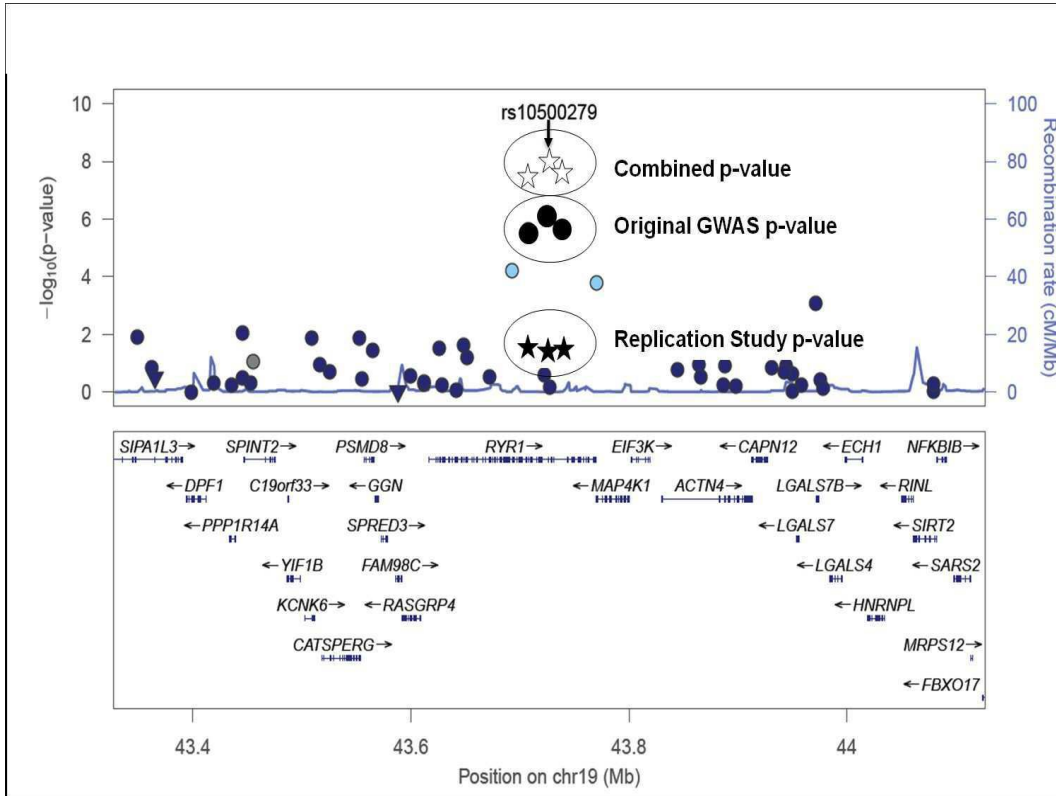
도면3g



도면3h



도면4



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, Yonsei University
- <120> PN110512
- <130> PN110512
- <160> 12
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 601
- <212> DNA
- <213> RYR1 SNP 301
- <400> 1

```

tcattgctcaa agttgccagc cggcgtggat gtggctctgc caaaagctt gtcacaggg      60
cttctcgctg gcgtgactgg ggtggccctg gccccgggtc tgcaccaag gctccagaac      120
acggctgtgg gactctgtgc cctgtgtctc tgcctccaga tctttctgga tgtctcttgc      180
atctttggtc ttctgtctc ctgtctttt tcagtctctc agtgtctttt tcttgcaact      240

tctcttgtcg ctgaaactct ttgtggacct gcattttgt ttattcttg agaacttgg      300
yttgggatgt gaagtgtggg gttgtgcatg ctgtggaggg ggtattgtac tggggttct      360
aggggattct ggaagaggac tgctagaagt tgagacaggc ccagaacggg ggaaaatctg      420
    
```

gatgggcctg ggtagaaat tggagccagg caagcatggt ggtatgtgcc tgtagtccca 480
gctacttggg aggctgaggc aggaggatca cttagagcca agagttcaag tccagcctgg 540
gcaacatggc aagacaccat ctctaaaaat aaatttgttt aaaaaacaag aaactgggaa 600
t 601

<210> 2

<211> 701

<212> DNA

<213> RYR1 SNP 201

<400> 2

tctagattag agcctggggc tgaggaaatg ttttgccttct ttatcttact tgcggcagat 60
gacaccata tcaggcattc atgatgtaag gtccctgttg agcaccacct tccatttcca 120
taatccttgt tcctctttcc ctacccctt tgcagccttg ccaatgtctc acgaacactt 180
aatccatttg ctctgcttct stctggtaac tatattcaag gctgccatat actgttccgc 240
aggtcgtgca ctgcacaaag gcacgatctc tgagagcatt cacatcctac acataatggt 300
gtatttatta caatagtita gtttccagc agatggcagt aaagcatcca gcatgttata 360

acttccctac aggaagtgtt ttaggggacg ctttttttc taatttgctc aaaggtgccc 420
caggggctgg cagaaacct aattcggtgt catctgactt tttaaaagga gttaaactta 480
gaatgcaatt cctccgtgct acagcagctg aagtgtgct gttggatcc taaaattcta 540
gagagtgttg gtatcatcat gtagaattcc aaatcctgca gggctaattc atccgccacc 600
atctagtcta ggttgcaaaa gctagaaatc cagtgcacaaag tgggtggctta agaaaaataa 660
agaatttatc agttcatatt acagatccag ggcttagagt g 701

<210> 3

<211> 701

<212> DNA

<213> RYR1 SNP 201

<400> 3

gagccactg tgggggctga tagtccagtg ggaaggggca gatgcaaata acgaaataca 60
cgaagtaatt gcaggttata atctgtggtc tgaaggggtgt gggagtgagc aggggtgtgt 120
aagccctgta aaccggctgg tggcggaagg ctttctgcag gaggggacag cgaagctgag 180
agttgaaaga taccatatga mtcagcagg ctgtggtgtc ccaggcaaag gggacagtaa 240
atggaaaggc tgaaaaatgg gaacaaggagg gacagagagc agcctgggca acatggcgaa 300
accaaaccct gtccctacaa aaaatacaaa aattagctag gcatgggtggc ctatgcctga 360

agtcacagct acttgggagg ctgaggcaag agaatacatt gaacccagga gggggagggt 420

gctgtgagcc aagatcgctg cattgcactc cagcctgggt gacaagagcg aaattctgtc 480

tcaaaaaaaaa gaaataaaaa tacaaaaatt agctaggcat ggtggtgcat gcctgtattc 540

ccagctactc gggaggctga ggcaggagaa tcgcttgaac ccgggaggcg gaggttgcag 600

tgagccgaga ttgcaccact gcactccagc atgggcaaca gactgagact ctctcaaaaa 660

taaaaataaa taatacaata aaatataaaa taaaataaaa t 701

<210> 4

<211> 739

<212> DNA

<213> DRD1 SNP 201

<400> 4

tgaggtaaag aacactcatt ttattcttat gggctctgaa atccatgtct ttacttttt 60

aagaaatagg attaaagcat caaagaaaag tccttattga agggctttgc gtgactggtc 120

aagagtgaat tcaccagcca tctctccagg ctgctgtcag ctctggccac aggggacagg 180

ccaccattgc cagatcaggg maactaatga accaagaaaa aaggaactac cctttactg 240

aaggcccacc acatgccagg ggcataccac ttgccaagca ctctacacag tctagggatg 300

catagctaaa aggctaaatg cacacaccct ggaaacagcc tctctgggtt tgaagcccaa 360

atctgggcta ttggctggag gccttagtca agtctcttaa cctctccatg cctcagtttc 420

tcctctgcac aatgagggct gtaacactag ctctctcatt gtattgttgt gggttgggat 480

atacagagag cataaagtaa ttcttggtac acagtaagag ttctctttct ttaaataatta 540

accataatta ttactactgt ctttttcgat tcttacacc actctgtgag atagtgggtc 600

tcacctctt ctggtagatg aggaaactgc agctcagagc aacaaggcaa cagtggctgg 660

ggaagtgact ggaagagatg aatttagccc tggtcaggca aagcatgggc ctgtggctctg 720

cactccctca cctccagct 739

<210> 5

<211> 511

<212> DNA

<213> TIRAP SNP 256

<400> 5

caactgaata gaatgtcat tcatactcat acatgtacac ctcttgcaac ttgcaaaagt 60

ttgtcatgg tggtttctct acttggaactc tttttaatat gtatgtctta catattttc 120

agggttcatt tcaaatacca tctcctctat aaaactctca ctaaacaatc tggctaaaag 180
 tcactctccc tttctctaaa ctccacaca tcatttatac ctctcctgtg gcacttatgc 240
 ctttcttatg ttttatttac tatatacaca ctctccctta ctaatctata tactatatca 300
 gagcaagatc ttttttcat ttttgtaagt ctcatagagt aaaatatagc agcatgtata 360
 gagtagaaag taaaaacatt actttaggaa gcaaatgtgg aatgtcagca aactcaaata 420
 ttcttaagaa aataatagac tgagaattct atctgcattt aaaatttatg taaaaatta 480

attttagaga gtgttaaaga ctatctaaaa g 511

<210> 6

<211> 1012

<212> DNA

<213> FAM135B SNP 201

<400> 6

gcattactga gctgctgagc cagcactatg gccacctacc ctcagaaagc ctttgacttc 60
 agatggctaa taccttgact acttaaacat tataaattga tttctgtta cttgcagcaa 120
 aaagtaattt tagctgaaac ggaatttcac actcaaagtg actggggcac tgcaagttac 180
 agaccaagg ataaggattt ractaattag caaatatagt tatagcagga gataagaatc 240
 caacacttgc aggcatgtta gacaggattc ccgcttgacc cccaaggttc ctgcctcttg 300

gtgtactcat acccactctg ttattcagtc catcactaac cgaggtagcg ctgtgaagag 360
 gttttgcaga cataatgaag ttccctaacc aaatgacctt aaattagaaa gactatctaa 420
 atgggtctaa cttagttagc tgaacctttt aaaagcagag agttttctct ggatggctaa 480
 agaagagaaa gtcagagaga tgtgtctaga agttaaaaaa ataaaaaat tttaaaaagc 540
 atgtttggaa ctactatggg agccacatca ttaggcagct ttattgatat gagagacagt 600
 ccttgcccaa cagccaccag gaaaatgcaa cctcagtcac tagctgcaac gaaattaatg 660
 tttccaacaa ttggtgagct tggaaaagac cttgagtctc aaataagaac cacatgctct 720

gccagcatct caatttcacc tctgtgagac cctaagcaga gaaccagcc atgccatcct 780
 gttctccgaa tccatggaaa ccgtgagata tattttaagc tgctagattg cgataatttg 840
 ttatgaagca acagaaaact aatgcagtgg gctaaaagta gttgaccttg gttatagagg 900
 aggaagcatt taattaaaa atctgcgact gcacattgag actaacacca catcccatct 960
 gaggctgtaa tattagggga aaggaaaaaa aaagcataat aatggatatt ta 1012

<210> 7

<211> 1011

<212> DNA

<213> FAM135B SNP 502

<400> 7

acttcagatg gctaatacct tgactactta aacattataa attgatattc tgttacttgc 60

agcaaaaagt aattttagct gaaacggaat ttcacactca aagtgactgg ggcaactgcaa 120

gttacagacc caaggataag gatttgacta attagcaaat atagttatag caggagataa 180

gaatccaaca ctgacaggca tgttagacag gattcccgtc tgacccccaa ggttcctgcc 240

tcttggtgta ctcatacca ctctgttatt cagtccatca ctaaccgagg taccgctgtg 300

aagaggtttt gcagacataa tgaagttccc taatcaaatg acctaaaatt agaaagacta 360

tctaaatggg tctaacttag ttacgtgaac cttttaaaag cagagagttt tctctggatg 420

gctaaagaag agaaagtcag agagatgtgt ctagaagtta aaaaaataaa aaaattttaa 480

aaagcatggt tggaactact aygggagcca catcattagg cagctttatt gatatgagag 540

acagtccttg gccaacagcc accaggaaaa tgcaacctca gtcaatagct gcaacgaaat 600

taatgtttcc aacaattggt gagcttgga aagaccttga gtctcaata agaaccacat 660

gctctgccag catctcaatt tcacctctgt gagaccctaa gcagagaacc cagccatgcc 720

atctctgtct ccgaatccat ggaaaccgtg agatatattt taagctgcta gattgcgata 780

atttgttatg aagcaacaga aaactaatgc agtgggctaa aagtagttga ccctggttat 840

agaggaggaa gcatttaatt aaaatatctg cgactgcaca ttgagactaa caccacatcc 900

catctgaggc tgtaatatta ggggaaagga aaaaaaagc ataataatgg atatttaagt 960

ttcttatagt tgtcagcaat gctgtacaac agagatatca gattaggtat g 1011

<210> 8

<211> 601

<212> DNA

<213> FAM135B SNP 301

<400> 8

ccctgtatct ctaaggggat tcattactta atgggtacag tgtatactat ttgcatgatg 60

gataacctaa gactcctgat ttaccaggga tacaacctat gcatgtaata aaattacact 120

tgtctacat acatttacac aaataaataa gataattttc catttggaag tctattattt 180

tacaatgtga agcatttttt ttctgtaggg tacaaggaga cgatgggggtt ttgcagaaaa 240

agaaaaaatg ttcattgtat gaaaataaac agtgggagaa aatcacgtca tgcctaagac 300

ygacttgata atccatatgg ctacagattg ttgttaggca gctggctccc tttgttcat 360

actaaaatgg ccacaaaag cattccatag attgacctca agattccctg cttacaaggt 420

tttgtgatta gttttcaata attatatttg tttagacctcc gcaactccca tacctttgaa	480
acatagttaa ttattgttag gtgattaaac ctcatatcatg ttatttttaa aatcacattt	540
taatgaattg atccttctat gattctcaga gacctttcaa ttcaagcgtc atttggttct	600
a	601

<210> 9

<211> 1793

<212> DNA

<213> FAM135B SNP 960

<400> 9

atgggtataa tcacatctac tgtaaaacca gagaaaatta ccgaggcaag tttcaatcaa	60
tttagagggt aattttgcaa aggtggagaa catgactggg aaaaaggaac aaaaaattgc	120
aggaacacct gtgatcagt ctttcttcaa agagggtttg aggacttgag tatttaaagg	180
ggaaagaatg gacagtaggg aaaagaggaa agaacaagtt ggggtgggtt ggtaaaagag	240
acaagtgggt gtattatatt gaggccttga tccgcattca ccgaattcac attttacatg	300
tgaatggggg aagaagaaca gtcaactatg aattagcctt gcactcagt aatctgtatt	360

tttcatacaa ggtgaaataa acagagtaga ggaagcagtc acatacgcaa ttgtttcaga	420
tgagtggagg gatgacttct agtcctgtct ttgtcctgta ctttttttta gattgtgctt	480
catggatatt ttttttttct ttttgagacg gagtctcgct cttgtcgccc aggcctggagt	540
ggagaggcac aatctcggct cagtgcacac tctgcctccc gggttcaagc tattctcctg	600
cctcagcctc ctgagtacct gggattacag gacgctgcca ccatgcctgg ctaatttttg	660
tacttttagt agagacaggg ttttgccatg ttggccaggc tggctctgaa ctccgaagt	720
caggtgatct gactgcctgc ctcagtctcc caaagtgttg ggattatagg tgtgagccac	780

tgtaccacgc catcattgta ttttttaaaa acatttttct agctttttatt tcaggtccag	840
gggtacatgt gcaggtttat tttaggttca ggggtacatg tgcaggtttg ctatataggt	900
aaattgttgt gttgtggtgg tttggtgtat agcttttttt atcaaccagg taataagcar	960
agtattcagt aggtatgttt ttgaccccca ccctcctccc acactccacc cttaaatagg	1020
ccctgggtgc ccttcgttgt gtcatatgaa ctcatgttt agctccact tgcaagttag	1080
aacataaggt atttcatttt ctgttctgc attagttcac ttaggatgat ggcgtccatc	1140
tcgaacctat ttgctgcaaa ggacataatc tcattctttt aatggctgtg tggtaatccg	1200

tggtgtatat gtacattttc tttatccagt ctaccattga tgggcattta tgttgattcc	1260
atgtcccttt gctattgtga atactgtga catgaacata tgcacacatg tgtgtttatt	1320

gtttgtacc ttgaagata agctgtttat ttacattggc aggataaaat tcaacagaac	1380
tttgttttag ggtaaagata agagggacca cagggttttc cttgtgagca aatgctgagg	1440
aagttcctct ggggtgggtac atgaccttct atctttgcag ctatctacga aggaacaaaa	1500
tgggaggcag ttttgcagga ctcagtttcc aggccttaact ttccctttg gcatagttaa	1560
ttccaggccc taagattttc tttcttttc acaataccat acatccattc caggataaca	1620
agaacttcaa ttgagtcaat gcctgtaaaa attcttcaaa aagcaaggaa ttgaaaaata	1680
ataggtttga gtaatgatga ttgcattgtt gagtcattha gagatcatag ttaaggtagc	1740
ttgaaacacc ttataatfff attgcctcat aaccttcagg agagtaacgc aaa	1793
<210> 10	
<211> 601	
<212> DNA	
<213> GALNTL4 SNP 301	
<400> 10	
tgatcctcag agctcagcaa gtttatactg gaaatgccaa gtttaaaatc tcggaagaa	60
tgatgttcac tcatcccata tactttttga ggatgtatat tccaggcaat gtactcaaca	120
ctggatgtac agcaatgaag aaggctgatg cagtctctgc tctctagagc caacagtata	180
gtgggaaagg ttgtcatfff gcaactaatt acagactcat tatttaatta caactttgac	240
gaatgctgtt aaccaaaaaa tacaggagaa tgagcccagg taatgatata aggtgggagg	300
ygtgaaatca gaaaatgctt cccaaggaa gtggggaagt tcagcccaga gaaaaggtaa	360
ggggtttagc ccaggagaaa gataaggaaa gtgtattcca ggcagaagaa actgtatata	420
caaagactcc gaggcagcag aaacaaggaa ggactaaagg aaggctactg tgcttacaat	480
gtacagaatg aagagaagaa caatacaaga tgagctggag gggggcacgg tggaggcatg	540
gtgggggcat ggagagcatg tgcaggcagg gtttagattca ttaggacctt ttgcactaaa	600
g	601
<210> 11	
<211> 501	
<212> DNA	
<213> DYNC2H1 SNP 251	
<400> 11	
ttcactaaca tttttgtat gttatfffft ttcttcaagg acttattatg aaagtaatga	60
tgttatcact atattgttga aaaatcaggg aagtatatct ttaccaatat acattttgaa	120
acctagctag acattcttaa cagaacaaag tcagagtatt cattgggtggc aagctgtttt	180

gtttcctatt ttgagatfff ttccccccag aattgcatca ctgaattgtg ctacttgtac	240
atacattaga mctccgattt cctatcattt cctcttctaa aaaagaactg ttcattgact	300
tgattataaa cattcagaaa gcatgtgtta aaataagttg gactgtgcat agactgatga	360
atatatfff ttgtgtcttc atatgtgttt tggttatgaaa ttttaattgaa attggccaaa	420
tagctaatat gagtaacgta ataatfff ttctattgtt tggttttgct tttccttgct	480
ttctttgggt tgcaaaactaa g	501
<210> 12	
<211> 801	
<212> DNA	
<213> DNAJC7 SNP 401	
<400> 12	
tgtgtcagca gtataaagct tgtagtcga aagtgaata atgtacaggg ctgctgaaag	60
gtgccctag tctctctctt cctaagacac taccctatg ganggtcggg gagttcagga	120
ctggcttcta gaaaaaatgc aaaggatgat ttgtgtggac agttactaat aactactgag	180
gccaggtact ttccatacag tatcctctat aaaacacagt ccggtgaact tcattattcc	240
catttttcaa aagaggaaat aaggcctggg ggttaaataa ctgacctgag gtcaggatgt	300
tacctatgtt tgtcagaata caaagcttgt gcactttcta ctatgccaaag ctttctctct	360
aatgcttgcc tccgcttact gctaactatt ttgaaaatta rtctgtacta cgaggagtaa	420
gacatggaca atatatgtaa gacatggaca atacatataa atttgtttaa actaagacac	480
acagtacacc ccacatgtaa tattcaaccc cagaacccaa atcggtatff aaataagcta	540
aatgacattc ctaacaatta gtcatagagg aagcagggct cttttctctt taagatgcaa	600
gacctagtga actggactff gcctccccaa agaaatgcat ttcatttttag taaatggtga	660
gtagattcca ttctagagca aacaaagcaa gtaatgtaga gtcagccac agcaaaaaga	720
acaagaagaa ttgtgtgtg acaagttgcc atgtttttaa cctcacactg cacagcatca	780
ggccagaatt agctattccc a	801