



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0015645
(43) 공개일자 2024년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6851 (2018.01) C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6851 (2018.05)
C12Q 1/686 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2023-7041517
(22) 출원일자(국제) 2022년05월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년11월30일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/022187
(87) 국제공개번호 WO 2022/255378
국제공개일자 2022년12월08일
(30) 우선권주장
JP-P-2021-091505 2021년05월31일 일본(JP)

(71) 출원인
카오카부시킴이샤
일본국도쿄도주오쿠니혼바시가야바초1초메14반10고
(72) 발명자
우에다 유이
일본 도치기켄 하가군 이치카이마치 아카바네
2606 카오카부시킴이샤 쟁큐쇼 나이
이노우에 다카요시
일본 도치기켄 하가군 이치카이마치 아카바네
2606 카오카부시킴이샤 쟁큐쇼 나이
우에하라 유아
일본 도치기켄 하가군 이치카이마치 아카바네
2606 카오카부시킴이샤 쟁큐쇼 나이
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **피부 표상 지질 검체 내부 표준 유전자**

(57) 요약

피부 표상 지질 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량을 측정할 때에 사용하는 내부 표준 유전자 및 그 내부 표준 유전자를 사용하는 피부 표상 지질 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량의 측정 방법의 제공. PCR 에 있어서 특정한 52 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자를 내부 표준 유전자로서 사용하는 것을 포함하는, 피부 표상 지질 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량을 측정하는 방법.

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6876 (2018.05)

C12Q 2545/101 (2013.01)

C12Q 2600/166 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

PCR 에 있어서 하기 표 1 ~ 3 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자를 내부 표준 유전자로서 사용하는 것을 포함하는, 피부 표상 지질 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량을 측정하는 방법.

[표 1]

Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol
FAU	RAC1	EEF1G
ARF1	RPL29	PCBP2
RPS8	CSNK2B	RPL12
RPL30	RPS15A	IER5
UBA52	BZW1	GNB2L1
RPL10A	RPL32	RPS19
RAB7A	OAZ1	RPL38
PSMB3	RPS10	RPL27
RPL36	ATP5B	RPS11
EIF1	BRK1	

[표 2]

Gene Symbol	Gene Symbol
ARL8B	NOTCH2NL
PCBP1	RPS15
ARPC4	RPL36A
DNAJB6	CHMP1B
RPL4	MYL12A
RPL11	RPL18A
ARPC2	DDX6
TMEM66	RPL35
SUMO2	YWHAE
RPS23	

[표 3]

Gene Symbol
SUPT4H1
PPP4C
RPL13A
RPL27A

청구항 2

제 1 항에 있어서,

목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의 양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 내부 표준 유전자가 상기 표 1 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, 측정 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 내부 표준 유전자가 FAU, ARF1, RPS8, RPL30, UBA52, RPL10A, RAB7A, PSMB3, RPL36, EIF1, RAC1, RPL29, CSNK2B, RPS15A, 및 BZW1 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, 측정 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 내부 표준 유전자가 FAU 및 ARF1 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, 측정 방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 내부 표준 유전자가 UBA52, PSMB3, RPL36, EIF1, RPS15A, BZW1, OAZ1, ATP5B, BRK1, EEF1G, PCBP2, RPL12, IER5, ARL8B, PCBP1, RPL4, TMEM66, SUMO2, RPS23, NOTCH2NL, RPL36A, CHMP1B, MYL12A, RPL18A, DDX6, YWHAE, SUPT4H1, PPP4C, 및 RPL27A 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, 측정 방법.

청구항 7

상기 내부 표준 유전자와 특이적으로 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오티드를 함유하는, 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 사용되는 피부 표상 지질 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량의 측정용 키트.

청구항 8

상기 표 1 ~ 3 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자의, PCR 을 사용한 피부 표상 지질 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량의 측정에 있어서의 내부 표준 유전자로서의 사용.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 피부 표상 지질 검체 내부 표준 유전자 및 이것을 사용하는 유전자 발현량 측정 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현 해석에는, 이전에는 노던 블로트법이 사용되고 있었지만, 최근에는, 간편성이 우수하고, 미량의 DNA 또는 RNA 로부터도 해석 가능한 리얼타임 PCR 법으로 대표되는 PCR 법이 범용되고 있다. 리얼타임 PCR 법에 의한 목적 유전자의 발현량의 정량 해석에 있어서는, 크게 나누어 절대 정량법 및 상대 정량법이 사용된다. 절대 정량법은, 카피수 등의 절대량이 이미 알려진 표준 샘플로부터 검량선을 작성하고, 이것을 이용하여 검체 중의 목적 유전자의 발현량의 절대량을 정량하는 수법이다. 이에 반해, 상대 정량법은, 검체 중의 목적 유전자의 발현량을 내부 표준 유전자의 발현량으로 보정하여, 목적 유전자의 상대적인 발현량을 정량하는 수법이다.

[0003] 내부 표준 유전자는, 조직간이나 실험계에 의해 발현량이 변동되지 않는 유전자인 것이 중요하며, 일반적으로는 GAPDH 나 ACTB 와 같은 하우스키핑 유전자가 사용된다. 그러나, 하우스키핑 유전자여도, 조직에 의해 발현이 변동되어, 내부 표준 유전자로서 기능할 수 없는 경우가 있는 것이 보고되어 있다 (비특허문헌 1 및 2).

[0004] 표피 각화 세포를 사용한 연구에 있어서는, GAPDH, 1B15, RPLP0, actin, tubulin 을 비롯한 하우스키핑 유전자

가 내부 표준 유전자로서 이용되어 왔는데, RPLP0 은 내부 표준 유전자로서 유용하지만, 모든 하우스키핑 유전자가 내부 표준 유전자로서 적합한 것은 아닌 것이 보고되어 있다 (비특허문헌 3).

[0005] 한편, 특허문헌 1 에는, 피부 표상 지질 (skin surface lipids ; SSL) 에 피험체의 피부 세포에서 유래하는 RNA 가 포함되어 있는 것, SSL 에 포함되는 RNA 가 생체의 유전자 발현 해석용의 시료로서 유용한 것, SSL 로부터 표피, 한선 (汗腺), 모포 (毛包) 및 피지선의 마커 유전자를 검출할 수 있는 것이 기재되어 있다. 그러나, SSL 을 사용한 유전자 발현 해석에 있어서의 적절한 내부 표준 유전자에 대해서는 밝혀지지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 국제 공개공보 제2018/008319호

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Journal of Investigative Dermatology, 2009, 129 (3) : 535-537
 (비특허문헌 0002) Acta Biochem Biophys Sin, 2014, 46 (4) : 330-337
 (비특허문헌 0003) Journal of Investigative Dermatology, 2009, 129 (3) : 770-773

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은, 이하의 (1) ~ (3) 에 관련된 것이다.
 [0009] (1) PCR 에 있어서 하기 표 1 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자를 내부 표준 유전자로서 사용하는 것을 포함하는, SSL 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량을 측정하는 방법.
 [0010] (2) 상기 내부 표준 유전자와 특이적으로 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오티드를 함유하는, (1) 의 방법에 사용되는 SSL 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량의 측정용 키트.
 [0011] (3) 하기 표 1 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자의, PCR 을 사용한 SSL 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량의 측정에 있어서의 내부 표준 유전자로서의 사용.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 명세서 중에서 인용된 모든 특허문헌, 비특허문헌, 및 그 밖의 간행물은, 그 전체가 본 명세서 중에 있어서 참고로서 인용된다.
 [0013] 본 명세서에 있어서, 「핵산」, 「뉴클레오티드」, 「올리고뉴클레오티드」 또는 「폴리뉴클레오티드」라는 용어는, DNA 또는 RNA 를 의미한다. DNA 에는, cDNA, 게놈 DNA, 및 합성 DNA 모두가 포함되고, RNA 에는, total RNA, mRNA, rRNA, tRNA, non-coding RNA 및 합성의 RNA 모두가 포함된다.
 [0014] 본 명세서에 있어서, 「유전자」란, 인간 게놈 DNA 를 포함하는 2 본쇄 DNA 외에, cDNA 를 포함하는 1 본쇄 DNA (정 (正) 사슬), 당해 정 사슬과 상보적인 서열을 갖는 1 본쇄 DNA (상보 사슬), 및 이들의 단편을 포함하는 것으로서, DNA 를 구성하는 염기의 서열 정보 안에, 어떠한 생물학적 정보가 포함되어 있는 것을 의미한다.
 [0015] 또, 당해 「유전자」는 특정한 염기 서열로 나타내는 「유전자」뿐만 아니라, 이들의 동족체 (즉, 호몰로그 혹은 오솔로그), 유전자 다형 등의 변이체, 및 유도체를 코드하는 핵산이 포함된다.
 [0016] 본 명세서 중에 개시되는 유전자의 명칭 (Gene Symbol) 및 Gene ID 는, NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/]) 에 기

재가 있는 Official Symbol 및 Gene ID 에 따른다.

- [0017] 본 명세서에 있어서, 「내부 표준 유전자」란, 내재성 컨트롤 유전자나 레퍼런스 유전자라고도 하며, 유전자 발현 해석에 있어서 목적 유전자의 발현량의 보정 (표준화) 의 기준이 되는 유전자를 의미한다. 「보정」은, 전형적으로는, 목적 유전자의 발현량을 내부 표준 유전자의 발현량으로 나눔으로써 이루어진다. 「발현량」 또는 「양」은, 발현의 절대량 및 다른 유전자의 발현량 등에 대한 상대 발현량을 포함한다.
- [0018] 또, 본 명세서에 있어서, 「하우스키핑 유전자」란, 세포의 유지나 증식에 불가결한 유전자로서, 많은 조직이나 세포에 공통적으로 일정량 발현하는 유전자를 의미한다. 일반적인 하우스키핑 유전자로는, 예를 들어, GAPDH, ACTB 등이 알려져 있다 (Genome Analysis, 2003, 19 (7) : 362-365 참조).
- [0019] 본 명세서에 있어서, 「피부 표상 지질 (skin surface lipids ; SSL)」이란, 피부의 표상에 존재하는 지용성 화합물을 말하며, 피지라고 불리는 경우도 있다. 일반적으로, SSL 은, 피부에 있는 피지선 등의 외분비선으로부터 분비된 분비물을 주로 포함하고, 피부 표면을 덮는 얇은 층의 형태로 피부 표상에 존재하고 있다. SSL 은, 피부 세포에서 발현한 RNA 를 포함한다 (상기 특허문헌 1 참조). 본 명세서에 있어서, 피검체로부터 채취한 SSL 을 SSL 검체라고도 한다.
- [0020] 본 명세서에 있어서, 「피부」란, 특별히 한정하지 않는 한, 각층, 표피, 진피, 모포, 그리고 한선, 피지선 및 그 밖의 선 등의 조직을 포함하는 영역의 총칭이다.
- [0021] 본 발명은, SSL 에 포함되는 목적 유전자의 발현량을 보다 정확하게 측정하기 위한 내부 표준 유전자와, 그 내부 표준 유전자를 사용하는 SSL 에 포함되는 목적 유전자의 발현량의 측정 방법을 제공하는 것에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명자들은, SSL 검체의 망라적 유전자 발현 데이터를 분석함으로써, 검체간의 발현 변동이 작은 52 유전자를 알아내고, 그 유전자가 정량적 PCR (qPCR) 에 있어서의 내부 표준 유전자로서 우수한 것을 알아냈다.
- [0023] 본 발명의 내부 표준 유전자는, SSL 검체간에 있어서의 발현 변동이 작고, 특히 일반적으로 내부 표준 유전자로서 사용되는 공지된 하우스키핑 유전자인 GAPDH 및 ACTB 와 비교하여 발현 변동이 작다. qPCR 에 있어서의 내부 표준 유전자로서 그 내부 표준 유전자를 사용함으로써, SSL 에 포함되는 목적 유전자의 발현량을 보다 정확하게 측정하는 것이 가능해진다.
- [0024] 본 발명의 표 1 에 나타내는 52 종의 유전자는, 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이, 피험자 사이에서 SSL 유래 RNA 의 발현량의 변동이 작은 것을 알아낸 유전자이다.

[표 1]

Gene Symbol	Gene ID	Gene Symbol	Gene ID	Gene Symbol	Gene ID	Gene Symbol	Gene ID
FAU	2197	RPS15A	6210	RPL38	6169	NOTCH2NL	388677
ARF1	375	BZW1	9689	RPL27	6155	RPS15	6209
RPS8	6202	RPL32	6161	RPS11	6205	RPL36A	6173
RPL30	6156	OAZ1	4946	ARL8B	55207	CHMP1B	57132
UBA52	7311	RPS10	6204	PCBP1	5093	MYL12A	10627
RPL10A	4736	ATP5B	506	ARPC4	10093	RPL18A	6142
RAB7A	7879	BRK1	55845	DNAJB6	10049	DDX6	1656
PSMB3	5691	EEF1G	1937	RPL4	6124	RPL35	11224
RPL36	25873	PCBP2	5094	RPL11	6135	YWHAE	7531
EIF1	10209	RPL12	6136	ARPC2	10109	SUPT4H1	6827
RAC1	5879	IER5	51278	TMEM66	51669	PPP4C	5531
RPL29	6159	GNB2L1	10399	SUMO2	6613	RPL13A	23521
CSNK2B	1460	RPS19	6223	RPS23	6228	RPL27A	6157

- [0026]
- [0027] 표 1 에 나타내는 52 유전자는, 정상 남성 803 명 (이하, 간단히 남성이라고도 한다), 정상 여성 1150 명 (이하, 간단히 여성이라고도 한다), 함께 1953 명의 피험자의 SSL 로부터 추출된 RNA 의 발현량의 데이터 (리드 카운트값) 를, 남성, 여성, 그리고 남성 및 여성의 3 종의 데이터 세트 (이하 각각을, 남성의 데이터 세트, 여성의 데이터 세트, 그리고 남성 및 여성의 데이터 세트라고 칭한다) 로 나누고, Log2 RPM 법 및 RLE 법의 2 종의 정규화 수법을 사용하여, 데이터 세트마다 유전자 검출률이 80 % 이상 (Log2 RPM 법) 또는 90 % 이상 (RLE 법) 인 유전자를 해석 대상으로 하여 발현량의 데이터를 정규화한 결과, 3 종의 데이터 세트의 적어도 1 종의 데이터 세트에 있어서, 양 수법에서 공통적으로 안정 발현을 인정한 유전자이다. 발현 안정성의 평가에는,

CV Z-score 를 지표로서 사용하였다. 「CV Z-score」란, 분포의 평균값으로부터의 측정값의 어긋남을 나타내고, 측정값과 분포의 평균값의 차를 분포의 표준 편차로 나눈으로써 산출되는 변동 계수 (CV) 를 표준화하여 얻어지는 값 (Z-score) 이며, CV Z-score 의 값이 작을수록, 유전자 발현의 편차가 작은 것을 나타내고 있다 (CV Z-score 자체의 평균값은 0, 표준 편차는 1 이다). 본 발명에서는, 2 종의 정규화 수법의 CV Z-score 의 평균값 (이하, 2 종의 정규화 수법에 기초하는 CV Z-score 라고 칭한다) 을 발현 안정성의 평가 지표로 하고, 이것이 -1.11 이하인 유전자를 안정 발현하고 있는 유전자로 판정하였다. 상기 52 유전자는, 후기하는 실시예에 나타내는 바와 같이, 일반적으로 내부 표준 유전자로서 적합하다고 여겨지는 공지된 하우스키핑 유전자인 GAPDH 및 ACTB, 나아가 표피 각화 세포의 유전자 발현 해석에 있어서의 내부 표준 유전자로서 바람직한 RPLP0 과 비교하여, CV Z-score 가 동등하거나 그것보다 작아, SSL 에 있어서 안정 발현하고 있는 것이 확인되었다.

[0028] 따라서, 이러한 52 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 유전자는, SSL 에 포함되는 목적 유전자의 발현량을 측정할 때의, qPCR 에 있어서의 내부 표준 유전자 (이하, 본 발명의 내부 표준 유전자라고도 한다) 로서 사용할 수 있다. 내부 표준 유전자로는, 어느 1 유전자를 단독으로 사용해도 되고, 2 이상의 유전자를 조합하여 사용해도 된다.

[0029] 후술하는 실시예에 나타내는 바와 같이, 상기 52 유전자 중, 표 2 의 29 유전자는, 3 종의 데이터 세트 전부에서 공통적으로 안정 발현하고 있는 유전자이다. 표 2 중, CV Z-score 는, 전체 3 종 각각의 데이터 세트에 있어서의 2 종의 정규화 수법에 기초하는 CV Z-score 의 평균값을 나타낸다. 표 3 (표 3-1 및 표 3-2) 의 19 유전자는, 3 종의 데이터 세트 중 어느 2 종의 데이터 세트에서 공통적으로 안정 발현하고 있는 유전자이고, 표 3-1 의 12 유전자는, 남성의 데이터 세트 그리고 남성 및 여성의 데이터 세트에서 공통적으로 안정 발현하고 있는 유전자이고, 표 3-2 의 7 유전자는, 여성의 데이터 세트 그리고 남성 및 여성의 데이터 세트에서 공통적으로 안정 발현하고 있는 유전자이다. 표 3 중, CV Z-score 는, 해당하는 2 종 각각의 데이터 세트에 있어서의 2 종의 정규화 수법에 기초하는 CV Z-score 의 평균값을 나타낸다. 표 4 (표 4-1 및 표 4-2) 의 4 유전자는, 3 종의 데이터 세트 중 어느 1 종의 데이터 세트에서 안정 발현하고 있는 유전자이고, 표 4-1 의 2 유전자는, 남성의 데이터 세트에서 안정 발현하고 있는 유전자이고, 표 4-2 의 2 유전자는, 남성 및 여성의 데이터 세트에서 안정 발현하고 있는 유전자이다. 표 4 중, CV Z-score 는, 해당하는 데이터 세트에 있어서의 2 종의 정규화 수법에 기초하는 CV Z-score 를 나타낸다.

[0030] 본 발명의 내부 표준 유전자는, 바람직하게는 표 2 및 3 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자이고, 보다 바람직하게는 표 2 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자이고, 더욱 바람직하게는 FAU, ARF1, RPS8, RPL30, UBA52, RPL10A, RAB7A, PSMB3, RPL36, EIF1, RAC1, RPL29, CSNK2B, RPS15A, 및 BZW1 의 15 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자이고, 더욱 바람직하게는 FAU, ARF1, RPS8, RPL30, UBA52, RPL10A, RAB7A, 및 PSMB3 의 8 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자이고, 더욱 바람직하게는 FAU, ARF1, RPS8, 및 RPL30 의 4 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자이고, 더욱 바람직하게는 FAU 및 ARF1 의 2 유전자에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자이다.

[0031] [표 2]

Gene Symbol	CV Z-score	Gene Symbol	CV Z-score
FAU	-1.363	RPL32	-1.194
ARF1	-1.328	OAZ1	-1.193
RPS8	-1.328	RPS10	-1.181
RPL30	-1.326	ATP5B	-1.175
UBA52	-1.290	BRK1	-1.170
RPL10A	-1.288	EEF1G	-1.170
RAB7A	-1.278	PCBP2	-1.168
PSMB3	-1.267	RPL12	-1.161
RPL36	-1.248	IER5	-1.143
EIF1	-1.237	GNB2L1	-1.139
RAC1	-1.234	RPS19	-1.137
RPL29	-1.225	RPL38	-1.127
CSNK2B	-1.207	RPL27	-1.124
RPS15A	-1.205	RPS11	-1.115
BZW1	-1.200		

[0032]

[0033] [표 3-1]

Gene Symbol	CV Z-score	Gene Symbol	CV Z-score
ARL8B	-1.292	NOTCH2NL	-1.176
PCBP1	-1.227	CHMP1B	-1.171
DNAJB6	-1.226	MYL12A	-1.155
RPL4	-1.210	RPL18A	-1.151
RPL11	-1.205	DDX6	-1.123
SUMO2	-1.193	YWHAE	-1.114

[0034]

[0035] [표 3-2]

Gene Symbol	CV Z-score	Gene Symbol	CV Z-score
ARPC4	-1.226	RPS15	-1.175
ARPC2	-1.203	RPL36A	-1.171
TMEM66	-1.201	RPL35	-1.123
RPS23	-1.178		

[0036]

[0037] [표 4-1]

Gene Symbol	CV Z-score
SUPT4H1	-1.212
PPP4C	-1.188

[0038]

[0039] [표 4-2]

Gene Symbol	CV Z-score
RPL13A	-1.140
RPL27A	-1.129

[0040]

[0041]

또, 상기 52 유전자 중, UBA52, PSMB3, RPL36, EIF1, RPS15A, BZW1, OAZ1, ATP5B, BRK1, EEF1G, PCBP2, RPL12, IER5, ARL8B, PCBP1, RPL4, TMEM66, SUMO2, RPS23, NOTCH2NL, RPL36A, CHMP1B, MYL12A, RPL18A, DDX6, YWHAE, SUPT4H1, PPP4C, 및 RPL27A 의 29 유전자는, 지금까지 하우스키핑 유전자라는 보고가 없는 유전자이며, 내부 표준 유전자로서 기능할 수 있는 것은 전혀 의외였다. 따라서, 일 실시형태에 있어서, 본 발명의 내부 표준 유전자는, 바람직하게는 상기 29 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자이고, 보다 바람직하게는 UBA52, PSMB3, RPL36, EIF1, RPS15A, BZW1, OAZ1, ATP5B, BRK1, EEF1G, PCBP2, RPL12, IER5,

ARL8B, PCBP1, RPL4, TMEM66, SUMO2, RPS23, NOTCH2NL, RPL36A, CHMP1B, MYL12A, RPL18A, DDX6, 및 YWHAE 의 26 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자이고, 더욱 바람직하게는 UBA52, PSMB3, RPL36, EIF1, RPS15A, BZW1, OAZ1, ATP5B, BRK1, EEF1G, PCBP2, RPL12, 및 IER5 의 13 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자이다.

[0042] 또한, 본 발명의 내부 표준 유전자에는, 유전자 발현 해석에 있어서의 내부 표준이 될 수 있는 한, 당해 유전자를 구성하는 DNA 의 염기 서열과 실질적으로 동일한 염기 서열을 갖는 유전자도 포함된다. 여기서, 실질적으로 동일한 염기 서열이란, 예를 들어, 상동성 계산 알고리즘 NCBI BLAST 를 사용하여, 기대값 = 10 ; 갭을 허용한다 ; 필터링 = ON ; 매치 스코어 = 1 ; 미스매치 스코어 = -3 의 조건에서 검색을 한 경우, 당해 유전자를 구성하는 DNA 의 염기 서열과 90 % 이상, 바람직하게는 95 % 이상, 보다 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 동일성이 있는 것을 의미한다.

[0043] 본 발명의 내부 표준 유전자는, SSL 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량의 측정 방법 (이하, 본 발명의 방법이라고도 한다) 에 바람직하게 사용된다. 일 실시형태에 있어서, 본 발명의 방법은, SSL 검체에 대해, 목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의 양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 포함한다. 바람직한 일 실시형태에 있어서, 본 발명의 방법은, SSL 검체에 대해, 목적 유전자를 증폭시키는 것, 내부 표준 유전자를 증폭시키는 것, 및 목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의 양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 포함한다. 보다 바람직한 일 실시형태에 있어서, 본 발명의 방법은, 피험체로부터 채취한 피부 표상 지질 검체로부터 RNA 를 추출하는 것, 추출된 RNA 를 기초로 하여 목적 유전자를 증폭시키는 것, 추출된 RNA 를 기초로 하여 내부 표준 유전자를 증폭시키는 것, 및 목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의 양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 포함한다.

[0044] 본 발명에 있어서, 목적 유전자는, 특별히 한정되지 않고, SSL 검체에 포함될 수 있는 유전자이면 되고, 1 종이어도 되고 2 종 이상이어도 된다.

[0045] 본 발명에 있어서, SSL 이 채취되는 피험체는, 피부 상에 SSL 을 갖는 생물이면 된다. 피검체의 예로는, 인간 및 비인간 포유 동물을 포함하는 포유 동물을 들 수 있고, 바람직하게는 인간이다. 바람직하게는, 그 피검체는, 자신의 핵산의 해석을 필요로 하거나 또는 희망하는 인간 또는 비인간 포유 동물이고, 보다 바람직하게는 인간이다.

[0046] 피험체의 피부로부터의 SSL 의 채취에는, 피부로부터의 SSL 의 회수 또는 제거에 사용되고 있는 모든 수단을 채용할 수 있다. 바람직하게는, 후술하는 SSL 흡수성 소재, SSL 접착성 소재, 또는 피부로부터 SSL 을 문질러 떨어뜨리는 기구를 사용할 수 있다. SSL 흡수성 소재 또는 SSL 접착성 소재로는, SSL 에 친화성을 갖는 소재이면 특별히 한정되지 않고, 예를 들어 폴리프로필렌, 펄프 등을 들 수 있다. 피부로부터의 SSL 의 채취 순서의 보다 상세한 예로는, 기름 제거 종이, 기름 제거 필름 등의 시트상 소재에 SSL 을 흡수시키는 방법, 유리판, 테이프 등에 SSL 을 접착시키는 방법, 스펀지, 스크레이퍼 등에 의해 SSL 을 문질러 떨어뜨려 회수하는 방법 등을 들 수 있다. SSL 의 흡착성을 향상시키기 위해, 지용성이 높은 용매를 미리 포함시킨 SSL 흡수성 소재를 사용해도 된다. 한편, SSL 흡수성 소재는, 수용성이 높은 용매나 수분을 포함하고 있으면 SSL 의 흡착이 저해되기 때문에, 수용성이 높은 용매나 수분의 함유량이 적은 것이 바람직하다. SSL 흡수성 소재는, 건조한 상태에서 사용하는 것이 바람직하다. SSL 이 채취되는 피부의 부위로는, 특별히 한정되지 않고, 머리, 얼굴, 목, 체간, 수족 등의 신체의 임의의 부위의 피부를 들 수 있고, 피지의 분비가 많은 부위, 예를 들어 얼굴의 피부가 바람직하다.

[0047] 피험체로부터 채취된 RNA 함유 SSL 검체는, 즉시 후술하는 RNA 추출 공정에 사용되어도 되고, 또는, 일정 기간 보존되어도 된다. 채취된 SSL 검체는, 함유하는 RNA 의 분해를 최대한 억제하기 위해, 채취 후 가능한 한 신속하게 저온 조건에서 보존하는 것이 바람직하다. 본 발명에 있어서의 그 RNA 함유 SSL 의 보존의 온도 조건은, 0 °C 이하이면 되고, 바람직하게는 -20 ± 20 °C ~ -80 ± 20 °C, 보다 바람직하게는 -20 ± 10 °C ~ -80 ± 10 °C, 더욱 바람직하게는 -20 ± 20 °C ~ -40 ± 20 °C, 더욱 바람직하게는 -20 ± 10 °C ~ -40 ± 10 °C, 더욱 바람직하게는 -20 ± 10 °C, 더욱 바람직하게는 -20 ± 5 °C 이다. 그 RNA 함유 SSL 검체의 그 저온 조건에서의 보존의 기간은, 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 12 개월 이하, 예를 들어 6 시간 이상 12 개월 이하, 보다 바람직하게는 6 개월 이하, 예를 들어 1 일간 이상 6 개월 이하, 더욱 바람직하게는 3 개월 이하, 예를 들어 3 일간 이상 3 개월 이하이다.

[0048] 본 발명의 방법에 있어서, 바람직한 양태로서, SSL 검체에 포함되는 RNA 를 추출하고, 역전사에 의해 cDNA 로

변환하고, 그 cDNA 를 주형으로 하여 목적 유전자 및 내부 표준 유전자를 PCR 로 증폭시킨 후, 그 증폭 산물이 측정된다.

- [0049] SSL로부터의 RNA의 추출에는, 생체 시료로부터의 RNA의 추출 또는 정제에 통상적으로 사용되는 방법, 예를 들어, 페놀/클로로포름법, AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 법, 또는 TRIzol (등록상표), RNeasy (등록상표), QIAzol (등록상표) 등의 칼럼을 사용한 방법, 실리카를 코팅한 특수한 자성체 입자를 사용하는 방법, Solid Phase Reversible Immobilization 자성체 입자를 사용하는 방법, ISOGEN 등의 시판되는 RNA 추출 시약에 의한 추출 등을 사용할 수 있다.
- [0050] 그 역전사에는, 해석하고자 하는 특정한 RNA를 표적으로 한 프라이머를 사용해도 되지만, 보다 포괄적인 핵산의 보존 및 해석을 위해서는 랜덤 프라이머를 사용하는 것이 바람직하다. 그 역전사에는, 일반적인 역전사 효소 또는 역전사 시약 키트를 사용할 수 있다. 바람직하게는, 정확성 및 효율성이 높은 역전사 효소 또는 역전사 시약 키트가 사용되고, 그 예로는, M-MLV Reverse Transcriptase 및 그 개변체, 혹은 시판되는 역전사 효소 또는 역전사 시약 키트, 예를 들어 PrimeScript (등록상표) Reverse Transcriptase 시리즈 (다카라 바이오사), SuperScript (등록상표) Reverse Transcriptase 시리즈 (Thermo Scientific 사) 등을 들 수 있다. SuperScript (등록상표) III Reverse Transcriptase, SuperScript (등록상표) VILO cDNA Synthesis kit (모두 Thermo Scientific 사) 등이 바람직하게 사용된다.
- [0051] 그 역전사에 있어서의 신장 반응은, 온도를 바람직하게는 $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 보다 바람직하게는 $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 더욱 바람직하게는 $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 조정하고, 한편, 반응 시간을 바람직하게는 60 분간 이상, 보다 바람직하게는 80 ~ 120 분간으로 조정하는 것이 바람직하다.
- [0052] 역전사로 얻어진 cDNA를 주형으로 한 목적 유전자 또는 내부 표준 유전자의 증폭은, 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 PCR의 순서에 따라 실시할 수 있다. PCR의 수법으로는, conventional PCR, 멀티플렉스 PCR, 리얼타임 PCR (정량 PCR (quantitative PCR ; qPCR) 이라고도 한다), 멀티플렉스 리얼타임 PCR, 디지털 PCR 등을 들 수 있다.
- [0053] 여기서, 역전사에 의한 cDNA 합성 (RT) 및 PCR은, 1 스텝으로 실시해도 되고, 2 스텝으로 실시해도 되며, 목적에 따라 어느 것을 적절히 선택하면 된다. 1 스텝 RT-PCR은, 단일 튜브 내에서 RT 및 PCR의 일련의 반응을 연속적으로 실시하는 것으로, 간편성이 우수하고, RT와 PCR의 조각간의 컨테미네이션을 방지할 수 있다. 한편, 2 스텝 RT-PCR에서는, RT에 랜덤 프라이머를 사용할 수 있기 때문에, 단일의 RNA 검체로부터 복수의 목적 유전자의 발현량을 측정할 수 있다. RT-PCR에 있어서의 PCR로는, 상기의 PCR과 동일한 것을 들 수 있다.
- [0054] PCR에서는, 해석하고자 하는 특정한 DNA를 표적으로 한 프라이머 페어를 사용하여 그 특정한 DNA만을 증폭시켜도 되지만, 복수의 프라이머 페어를 사용하여 복수의 DNA를 동시에 증폭시켜도 된다. 복수의 DNA를 동시에 증폭시키는 수법으로는, 멀티플렉스 PCR 및 멀티플렉스 리얼타임 PCR을 들 수 있다. 주형 DNA량의 오차를 억제하여 보다 정확하게 발현량을 측정할 수 있는 점에서, 목적 유전자 및 내부 표준 유전자를 동시에 증폭시키는 멀티플렉스 해석을 실시하는 것이 바람직하다. 이러한 멀티플렉스 해석은, 시판되는 키트 (예를 들어, Ion AmpliSeqTranscriptome Human Gene Expression Kit ; 라이프 테크놀로지스 재팬 주식회사 등)를 사용하여 실시할 수 있다.
- [0055] 증폭 산물의 검출에는, 증폭 산물을 특이적으로 인식할 수 있는 공지된 수단을 사용할 수 있다. 예를 들어, 미리 RI, 형광 물질 등으로 표지해 둔 프라이머를 사용하여 PCR을 실시함으로써 산생되는 표지 2 본쇄 DNA를 검출하는 방법 등을 사용할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서는, 정량적 PCR (qPCR)의 수법으로서, PCR의 증폭 산물량을 실시간으로 모니터하고 해석하는 리얼타임 PCR 또는 멀티플렉스 리얼타임 PCR을 사용하는 것이, 신속성, 간편성 및 정량성의 점에서 바람직하다. 리얼타임 PCR 또는 멀티플렉스 리얼타임 PCR에 있어서의 증폭 산물의 검출법으로는, 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 방법, 예를 들어, 인터칼레이터법, TaqMan (등록상표) 프로브법 등을 들 수 있다.
- [0057] 인터칼레이터법은, 2 본쇄 DNA에 들어감으로써 형광을 발하는 물질 (인터칼레이터, 예를 들어, SYBR (등록상표) GreenI 등)을 PCR 반응계에 공존시키고, 증폭 산물의 생성에 수반하여 증가하는 형광을 검출함으로써 증폭 산물량을 모니터하는 방법이다.
- [0058] TaqMan 프로브법은, 5' 말단을 형광 물질 (FAM 등)로, 3' 말단을 켄처 물질 (TAMRA 등)로 수식한 표적 서열 특이적인 올리고뉴클레오티드 (TaqMan 프로브)를 PCR 반응계에 공존시키는 방법이다. 그 방법에서는,

TaqMan 프로브가 PCR 반응의 어닐링 스텝에서 주형 DNA 에 특이적으로 하이브리다이징하는데, 이 상태에서는, 프로브 상에 켄처 물질이 존재하기 때문에, 여기광을 조사해도 형광의 발생은 억제된다. 이어서, 신장 반응 스텝시에, Taq DNA 폴리머라아제가 갖는 5' → 3' 엑소뉴클레아제 활성에 의해, 주형에 하이브리다이징한 TaqMan 프로브가 분해되면, 형광 물질이 프로브로부터 유리되고, 켄처 물질에 의한 억제가 해제되어 형광을 발한다. 그 형광을 검출함으로써 증폭 산물량을 모니터링할 수 있다.

- [0059] PCR 의 조건은, 특별히 한정되지 않고, PCR 마다 최적 조건을 정하면 되는데, 예를 들어, 이하의 조건을 들 수 있다.
- [0060] 1) 2 분쇄 DNA 의 1 분쇄 DNA 로의 열 변성 : 온도는 바람직하게는 94 ~ 99 °C 이고, 시간은 10 ~ 60 초간이다.
- [0061] 2) 어닐링 : 온도는, 통상적으로 50 °C 이상, 바람직하게는 52 °C 이상, 보다 바람직하게는 55 °C 이상이고, 통상적으로 65 °C 이하, 바람직하게는 63 °C 이하, 보다 바람직하게는 60 °C 이하이다. 또, 통상적으로 50 ~ 65 °C, 바람직하게는 52 ~ 63 °C, 보다 바람직하게는 55 ~ 60 °C 이다. 시간은, 통상적으로 5 초 이상, 바람직하게는 10 초 이상이고, 통상적으로 2 분 이하, 바람직하게는 1 분 이하이다. 또, 통상적으로 5 초 ~ 2 분, 바람직하게는 10 초 ~ 1 분이다.
- [0062] 3) DNA 신장 반응 : 온도는, 통상적으로 65 °C 이상, 바람직하게는 68 °C 이상이고, 통상적으로 74 °C 이하, 바람직하게는 72 °C 이하이다. 또, 통상적으로 65 ~ 74 °C 정도, 바람직하게는 68 ~ 72 °C 이다. 시간은, 통상적으로 5 초 이상, 바람직하게는 10 초 이상이고, 통상적으로 2 분 이하, 바람직하게는 1 분 이하이다. 또, 통상적으로 5 초 ~ 2 분, 바람직하게는 10 초 ~ 1 분이다.
- [0063] 여기서, 어닐링과 DNA 신장 반응은 나누지 않고 동시에 실시하는 것도 가능하다.
- [0064] 상기 1) ~ 3) 의 반응을 1 사이클로 하여, 이것을 통상적으로 30 사이클 이상, 바람직하게는 35 사이클 이상, 또, 통상적으로 50 사이클 이하, 바람직하게는 45 사이클 이하로 실시하면 된다.
- [0065] 상기와 같은 온도 및 시간으로의 역전사 및 PCR 은, 일반적으로 PCR 에 사용되는 서멀 사이클러 또는 서멀 사이클러와 분광 형광 광도계를 일체화한 리얼타임 PCR 전용의 장치를 사용하여 실시할 수 있다.
- [0066] PCR 의 증폭 산물의 사슬 길이는, PCR 의 증폭 시간의 단축 등의 요소를 감안하여 적절히 선택할 수 있다. 예를 들어, PCR 증폭 산물의 사슬 길이는, 1000 bp 이하가 바람직하고, 700 bp 이하가 보다 바람직하고, 500 bp 이하가 더욱 바람직하다. 한편, PCR 증폭 산물의 사슬 길이는, PCR 에 있어서의 비특이적 하이브리다이징을 피할 수 있는 15 염기 부근의 프라이머를 사용하는 경우의 PCR 증폭 산물의 사슬 길이인 30 ~ 40 bp 가 하한이 되고, 50 bp 이상이 바람직하고, 100 bp 이상이 보다 바람직하다. 또, PCR 증폭 산물의 사슬 길이는, 30 ~ 1000 bp 가 바람직하고, 50 ~ 700 bp 가 보다 바람직하고, 100 ~ 500 bp 가 더욱 바람직하다.
- [0067] 상기의 측정에 사용되는 프로브 또는 프라이머, 즉, 목적 유전자, 내부 표준 유전자, 또는 그들에서 유래하는 핵산을 특이적으로 인식하고 증폭시키기 위한 프라이머, 또는 그 목적 유전자, 내부 표준 유전자, 또는 그들에서 유래하는 핵산을 특이적으로 검출하기 위한 프로브가 이것에 해당하는데, 이들은, 그 목적 유전자 또는 내부 표준 유전자를 구성하는 염기 서열에 기초하여 설계할 수 있다. 여기서 「특이적으로 인식한다」란, 예를 들어 RT-PCR 법에 있어서, 실질적으로 목적 유전자, 내부 표준 유전자 또는 그것에서 유래하는 핵산만이 증폭되는 것과 같이, 그 검출물 또는 생성물이 그 유전자 또는 그것에서 유래하는 핵산인 것으로 판단할 수 있는 것을 의미한다.
- [0068] 구체적으로는, 본 발명의 목적 유전자 또는 내부 표준 유전자를 구성하는 염기 서열로 이루어지는 DNA 또는 그 상보 사슬에 상보적인 일정수의 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 이용할 수 있다. 여기서 「상보 사슬」이란, A : T (RNA 의 경우에는 U), G : C 의 염기쌍으로 이루어지는 2 분쇄 DNA 의 일방의 사슬에 대한 타방의 사슬을 가리킨다. 또, 「상보적」이란, 당해 일정수의 연속된 뉴클레오티드 영역에서 완전히 상보 서열인 경우에 한정되지 않고, 바람직하게는 80 % 이상, 보다 바람직하게는 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상, 보다 더욱 바람직하게는 98 % 이상의 염기 서열상의 동일성을 가지면 된다. 염기 서열의 동일성은, 상기 BLAST 등의 알고리즘에 의해 결정할 수 있다.
- [0069] 이러한 올리고뉴클레오티드는, 프라이머로서 사용하는 경우에는, 특이적인 어닐링 및 사슬 신장을 할 수 있으면 되고, 통상적으로, 예를 들어 10 염기 이상, 바람직하게는 15 염기 이상, 보다 바람직하게는 20 염기 이상, 또한 예를 들어 100 염기 이하, 바람직하게는 50 염기 이하, 보다 바람직하게는 35 염기 이하의 사슬 길이를 갖는

것을 들 수 있다. 또, 프로브로서 사용하는 경우에는, 특이적인 하이브리다이제이션을 할 수 있으면 되고, 본 발명의 목적 유전자 또는 내부 표준 유전자를 구성하는 염기 서열로 이루어지는 DNA (또는 그 상보 사슬)의 적어도 일부 혹은 전부의 서열을 갖고, 예를 들어 10 염기 이상, 바람직하게는 15 염기 이상, 또한 예를 들어 100 염기 이하, 바람직하게는 50 염기 이하, 보다 바람직하게는 25 염기 이하의 사슬 길이의 것이 사용된다.

[0070] 또한, 여기서, 「올리고뉴클레오타이드」는, DNA 혹은 RNA 일 수 있으며, 합성된 것이어도 되고 천연의 것이어도 된다. 또, 하이브리다이제이션에 사용하는 프로브는, 통상적으로 표지한 것이 사용된다.

[0071] PCR의 주형 DNA 양이 미량인 경우나 표적 서열과 유사한 서열이 많은 경우에는, 네스티드 PCR에 의해 증폭 산물의 수율 및 특이성을 높일 수 있다. 네스티드 PCR에서는, 제 1 프라이머 페어를 사용하여 1 라운드째의 PCR을 실시하여, 표적 서열을 증폭시키고, 이어서 증폭 산물을 주형으로 하여 제 1 프라이머 페어에 의한 증폭 영역의 내측에 설계된 제 2 프라이머 페어를 사용하여 2 라운드째의 PCR을 실시하여, 증폭 산물을 얻을 수 있다. 정량성의 점에서, 2 라운드째의 PCR 중 적어도 2 라운드째의 PCR은, 리얼타임 PCR 또는 멀티플렉스 리얼타임 PCR로 하는 것이 바람직하다.

[0072] 이렇게 하여, SSL 검체로부터 추출된 RNA를 기초로 하여, 목적 유전자 및 내부 표준 유전자가 증폭되고, 그 증폭 산물에 기초하여 목적 유전자의 발현량이 산출된다. 목적 유전자의 발현량은, 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 상대 정량법에 따라 산출할 수 있다. 그 상대 정량법으로는, 예를 들어, 목적 유전자의 증폭 산물과 내부 표준 유전자의 증폭 산물을 전기 영동에 제공하고, 겔 상의 밴드의 농도를 비교하여, 내부 표준 유전자에 대한 목적 유전자의 상대 발현량을 산출하는 수법, 리얼타임 PCR의 상대 정량의 수법으로서 공지된 검량선법, $-\Delta Ct$ 법, $\Delta \Delta Ct$ 법 (비교 Ct 법) 등을 들 수 있다. 상대 정량법 중, 검량선이 불필요한 점에서 $-\Delta Ct$ 법 또는 $\Delta \Delta Ct$ 법이 바람직하다.

[0073] 상대 정량의 수법으로서 검량선법을 사용하는 경우에는, 예를 들어, 하기와 같이 상대 정량을 실시하면 된다. 먼저, 표준 샘플의 희석 계열을 조제하고, 이것을 주형으로 하여 목적 유전자 및 내부 표준 유전자의 각각을 PCR로 증폭시켜, Ct 값을 구한다. 여기서, Ct 값이란, PCR의 증폭 산물량이 일정량에 도달할 때의 사이클 수 (threshold cycle)를 의미한다. PCR에서는, 이론적으로는 1 사이클마다 증폭 산물이 2 배씩 증가하기 때문에, 표준 샘플의 농도와 결정한 Ct 값을 플롯하면, 양자는 직선으로 나타내는 관계가 되고, 이것을 검량선으로서 사용할 수 있다. 이어서, 검체에 대해서도, 동 조건하에서 PCR을 실시하여, Ct 값을 구하고, 이 값과 검량선으로부터, 검체 중의 목적 유전자 및 내부 표준 유전자의 정량 결과를 얻는다. 또한, 목적 유전자의 정량 결과를 내부 표준 유전자의 정량 결과로 나눔으로써, 목적 유전자의 발현량을 내부 표준 유전자의 발현량으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출한다. 목적 유전자의 발현량은, 검체간의 발현량의 차를 파악하기 쉽도록, 어느 검체의 결과를 1로 한 경우의 상대량으로서 나타내도 된다.

[0074] 상대 정량의 수법으로서 $-\Delta Ct$ 법을 사용하는 경우에는, 예를 들어, 하기와 같이 상대 정량을 실시하면 된다. 먼저, 검체 A 중의 목적 유전자 및 내부 표준 유전자의 각각을 PCR로 증폭시켜, Ct 값을 구하고, 목적 유전자의 Ct 값과 내부 표준 유전자의 Ct 값의 차 (ΔCt)를 산출한다. 여기서, ΔCt 는, 목적 유전자의 정량 결과를 내부 표준 유전자의 정량 결과로 보정한 값이다. 비교 대상인 검체 B에 대해서도, 동 조건하에서 PCR을 실시하여, Ct 값 및 ΔCt 를 구한다. 이어서, 얻어진 ΔCt 를, 식 ($2^{-\Delta Ct}$)에 대입하여, 산출된 상대 발현량에 기초하여, 검체 A와 B 사이의 발현량의 비교를 실시한다.

[0075] 상대 정량의 수법으로서 $\Delta \Delta Ct$ 법을 사용하는 경우에는, 예를 들어, 하기와 같이 상대 정량을 실시하면 된다. 먼저, 검체 A 중의 목적 유전자 및 내부 표준 유전자의 각각을 PCR로 증폭시켜, Ct 값을 구하고, 목적 유전자의 Ct 값과 내부 표준 유전자의 Ct 값의 차 (ΔCt)를 산출한다. 여기서, ΔCt 는, 목적 유전자의 정량 결과를 내부 표준 유전자의 정량 결과로 보정한 값이다. 비교 대상인 검체 B에 대해서도, 동 조건하에서 PCR을 실시하여, Ct 값 및 ΔCt 를 구한다. 이어서, 검체 A의 ΔCt 와 검체 B의 ΔCt 의 차 ($\Delta \Delta Ct$)를 구한다. 여기서, $\Delta \Delta Ct$ 는, 검체간의 목적 유전자의 발현량의 차를 반영하는 값이다. 또한, 얻어진 $\Delta \Delta Ct$ 를, 식 ($2^{-\Delta \Delta Ct}$)에 대입한다. 여기서 얻어지는 값은, 검체 A에 있어서의 목적 유전자의 발현량이 검체 B에 있어서의 목적 유전자의 발현량보다 몇 배 발현이 높은지 또는 낮은지를 나타낸다. 즉, 검체 A의 목적 유전자의 발현량은, 검체 B에 있어서의 발현량을 1로 한 경우의 상대량으로서 나타낸다.

[0076] 본 발명의 방법에 사용되는 피부 표상 지질 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량의 측정용 키트는, 피험체로부터 채취한 SSL에 있어서의 본 발명의 내부 표준 유전자의 발현량을 측정하기 위한 검사 시약을 함유하는 것이다. 구체적으로는, 본 발명의 내부 표준 유전자 또는 그것에서 유래하는 핵산과 특이적으로 결합 (하이브

리다이즈) 하는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, PCR 용의 프라이머 또는 프로브) 를 포함하는, 핵산 증폭, 하이브리다이제이션을 위한 시약 등을 들 수 있다. 당해 키트에 포함되는 올리고뉴클레오티드는, 상기 서술한 바와 같이 공지된 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0077] 또, 당해 키트에는, 상기 핵산 외에, 검량선 작성용 표준 샘플, RT 시약, PCR 시약, 표지 시약, 완충액이나, 시험에 필요한 기구나 컨트롤, SSL 을 채취하기 위한 용구 (예를 들어, SSL 을 채취하기 위한 기름 제거 필름 등), 채취한 SSL 을 보존하기 위한 시약, 보존용의 용기, 채취한 SSL 로부터 RNA 를 추출·정제하기 위한 시약 등을 포함할 수 있다.

[0078] 상기 서술한 실시형태에 관하여, 본 발명에 있어서는 추가로 이하의 양태가 개시된다.

[0079] <1> PCR 에 있어서 하기 표 5 ~ 7 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자를 내부 표준 유전자로서 사용하는 것을 포함하는, 피부 표상 지질 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량을 측정하는 방법.

[0080] [표 5]

Gene Symbol	Gene Symbol	Gene Symbol
FAU	RAC1	EEF1G
ARF1	RPL29	PCBP2
RPS8	CSNK2B	RPL12
RPL30	RPS15A	IER5
UBA52	BZW1	GNB2L1
RPL10A	RPL32	RPS19
RAB7A	OAZ1	RPL38
PSMB3	RPS10	RPL27
RPL36	ATP5B	RPS11
EIF1	BRK1	

[0081]

[0082] [표 6]

Gene Symbol	Gene Symbol
ARL8B	NOTCH2NL
PCBP1	RPS15
ARPC4	RPL36A
DNAJB6	CHMP1B
RPL4	MYL12A
RPL11	RPL18A
ARPC2	DDX6
TMEM66	RPL35
SUMO2	YWHAE
RPS23	

[0083]

[0084] [표 7]

Gene Symbol
SUPT4H1
PPP4C
RPL13A
RPL27A

[0085]

[0086] <2> 목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의 양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 추가로 포함하는, <1> 의 방법.

[0087] <3> 목적 유전자를 증폭시키는 것 ;

- [0088] 내부 표준 유전자를 증폭시키는 것 ; 및
- [0089] 목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의 양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 추가로 포함하는, <1> 의 방법.
- [0090] <4> 피험체로부터 채취한 피부 표상 지질 검체로부터 RNA 를 추출하는 것 ;
- [0091] 추출된 RNA 를 기초로 하여 목적 유전자를 증폭시키는 것 ;
- [0092] 추출된 RNA 를 기초로 하여 내부 표준 유전자를 증폭시키는 것 ; 및
- [0093] 목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의 양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 추가로 포함하는, <1> 의 방법.
- [0094] <5> 피험체로부터 채취한 피부 표상 지질 검체로부터 RNA 를 추출하는 것 ;
- [0095] 추출된 RNA 를 주형으로 하여 cDNA 를 합성하는 것 ;
- [0096] 얻어진 cDNA 를 주형으로 하여 목적 유전자를 증폭시키는 것 ;
- [0097] 얻어진 cDNA 를 주형으로 하여 내부 표준 유전자를 증폭시키는 것 ; 및
- [0098] 목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의 양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 추가로 포함하는, <1> 의 방법.
- [0099] <6> 상기 내부 표준 유전자가 상기 표 5 및 6 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <1> ~ <5> 중 어느 하나의 방법.
- [0100] <7> 상기 내부 표준 유전자가 상기 표 5 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <1> ~ <6> 중 어느 하나의 방법.
- [0101] <8> 상기 내부 표준 유전자가 바람직하게는 FAU, ARF1, RPS8, RPL30, UBA52, RPL10A, RAB7A, PSMB3, RPL36, EIF1, RAC1, RPL29, CSNK2B, RPS15A, 및 BZW1 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자, 보다 바람직하게는 FAU, ARF1, RPS8, RPL30, UBA52, RPL10A, RAB7A, 및 PSMB3 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자, 더욱 바람직하게는 FAU, ARF1, RPS8, 및 RPL30 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자, 더욱 바람직하게는 FAU 및 ARF1 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <1> ~ <7> 중 어느 하나의 방법.
- [0102] <9> 상기 내부 표준 유전자가 UBA52, PSMB3, RPL36, EIF1, RPS15A, BZW1, OAZ1, ATP5B, BRK1, EEF1G, PCBP2, RPL12, IER5, ARL8B, PCBP1, RPL4, TMEM66, SUMO2, RPS23, NOTCH2NL, RPL36A, CHMP1B, MYL12A, RPL18A, DDX6, YWHAЕ, SUPT4H1, PPP4C, 및 RPL27A 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <1> ~ <5> 중 어느 하나의 방법.
- [0103] <10> 상기 내부 표준 유전자가 UBA52, PSMB3, RPL36, EIF1, RPS15A, BZW1, OAZ1, ATP5B, BRK1, EEF1G, PCBP2, RPL12, IER5, ARL8B, PCBP1, RPL4, TMEM66, SUMO2, RPS23, NOTCH2NL, RPL36A, CHMP1B, MYL12A, RPL18A, DDX6, 및 YWHAЕ 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <1> ~ <5> 및 <9> 중 어느 하나의 방법.
- [0104] <11> 상기 내부 표준 유전자가 UBA52, PSMB3, RPL36, EIF1, RPS15A, BZW1, OAZ1, ATP5B, BRK1, EEF1G, PCBP2, RPL12, 및 IER5 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <1> ~ <5>, <9> 및 <10> 중 어느 하나의 방법.
- [0105] <12> 상기 목적 유전자 및 상기 내부 표준 유전자를 qPCR 에 의해, 바람직하게는 멀티플렉스 qPCR 에 의해 증폭시키는 것인, <1> ~ <11> 중 어느 하나의 방법.
- [0106] <13> 상기 내부 표준 유전자와 특이적으로 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오티드를 함유하는, <1> ~ <12> 중 어느 하나의 방법에 사용되는 피부 표상 지질 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량의 측정용 키트.
- [0107] <14> 상기 표 5 ~ 7 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자의, PCR 을 사용한 피부 표상 지질 검체에 포함되는 목적 유전자의 발현량의 측정에 있어서의 내부 표준 유전자로서의 사용.
- [0108] <15> 상기 목적 유전자의 발현량의 측정이, 목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의

양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 추가로 포함하는, <14> 의 사용.

- [0109] <16> 상기 목적 유전자의 발현량의 측정이,
- [0110] 목적 유전자를 증폭시키는 것 ;
- [0111] 내부 표준 유전자를 증폭시키는 것 ; 및
- [0112] 목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의 양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 추가로 포함하는, <14> 의 사용.
- [0113] <17> 상기 목적 유전자의 발현량의 측정이,
- [0114] 피험체로부터 채취한 피부 표상 지질 검체로부터 RNA 를 추출하는 것 ;
- [0115] 추출된 RNA 를 기초로 하여 목적 유전자를 증폭시키는 것 ;
- [0116] 추출된 RNA 를 기초로 하여 내부 표준 유전자를 증폭시키는 것 ; 및
- [0117] 목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의 양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 추가로 포함하는, <14> 의 사용.
- [0118] <18> 상기 목적 유전자의 발현량의 측정이,
- [0119] 피험체로부터 채취한 피부 표상 지질 검체로부터 RNA 를 추출하는 것 ;
- [0120] 추출된 RNA 를 주형으로 하여 cDNA 를 합성하는 것 ;
- [0121] 얻어진 cDNA 를 주형으로 하여 목적 유전자를 증폭시키는 것 ;
- [0122] 얻어진 cDNA 를 주형으로 하여 내부 표준 유전자를 증폭시키는 것 ; 및
- [0123] 목적 유전자의 증폭 산물의 양을 내부 표준 유전자의 증폭 산물의 양으로 보정하여, 목적 유전자의 발현량을 산출하는 것을 추가로 포함하는, <14> 의 사용.
- [0124] <19> 상기 내부 표준 유전자가 상기 표 5 및 6 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <14> ~ <18> 중 어느 하나의 사용.
- [0125] <20> 상기 내부 표준 유전자가 상기 표 5 에 나타내는 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <14> ~ <19> 중 어느 하나의 사용.
- [0126] <21> 상기 내부 표준 유전자가 바람직하게는 FAU, ARF1, RPS8, RPL30, UBA52, RPL10A, RAB7A, PSMB3, RPL36, EIF1, RAC1, RPL29, CSNK2B, RPS15A, 및 BZW1 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자, 보다 바람직하게는 FAU, ARF1, RPS8, RPL30, UBA52, RPL10A, RAB7A, 및 PSMB3 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자, 더욱 바람직하게는 FAU, ARF1, RPS8, 및 RPL30 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자, 더욱 바람직하게는 FAU 및 ARF1 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <14> ~ <20> 중 어느 하나의 사용.
- [0127] <22> 상기 내부 표준 유전자가 UBA52, PSMB3, RPL36, EIF1, RPS15A, BZW1, OAZ1, ATP5B, BRK1, EEF1G, PCBP2, RPL12, IER5, ARL8B, PCBP1, RPL4, TMEM66, SUMO2, RPS23, NOTCH2NL, RPL36A, CHMP1B, MYL12A, RPL18A, DDX6, YWHAE, SUPT4H1, PPP4C, 및 RPL27A 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <14> ~ <18> 중 어느 하나의 사용.
- [0128] <23> 상기 내부 표준 유전자가 UBA52, PSMB3, RPL36, EIF1, RPS15A, BZW1, OAZ1, ATP5B, BRK1, EEF1G, PCBP2, RPL12, IER5, ARL8B, PCBP1, RPL4, TMEM66, SUMO2, RPS23, NOTCH2NL, RPL36A, CHMP1B, MYL12A, RPL18A, DDX6, 및 YWHAE 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <14> ~ <18> 및 <22> 중 어느 하나의 사용.
- [0129] <24> 상기 내부 표준 유전자가 UBA52, PSMB3, RPL36, EIF1, RPS15A, BZW1, OAZ1, ATP5B, BRK1, EEF1G, PCBP2, RPL12, 및 IER5 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 유전자인, <14> ~ <18>, <22> 및 <23> 중 어느 하나의 사용.
- [0130] <25> 상기 목적 유전자 및 상기 내부 표준 유전자를 qPCR 에 의해, 바람직하게는 멀티플렉스 qPCR 에 의해 증

폭시키는 것인, <14> ~ <24> 중 어느 하나의 사용.

- [0131] 실시예
- [0132] 이하, 실시예에 기초하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이것에 한정되는 것은 아니다.
- [0133] 실시예 1 SSL 의 채취, RNA 추출, 및 망라적 유전자 발현 해석
- [0134] 1) 피험자
- [0135] 정상 남성 803 명 (20 ~ 80 대), 정상 여성 1150 명 (20 ~ 80 대) 의 합계 1953 명을 피험자로 하였다.
- [0136] 2) SSL 의 채취
- [0137] 기름 제거 필름 (5.0 cm × 8.0 cm, 3M 사) 을 사용하여, 피검사자의 얼굴 전체로부터 피부 표상 지질 (SSL) 을 채취하였다. 피지의 크로스 컨태미네이션을 방지하기 위해, 피검사자마다 채취자의 래버러토리 글러브는 교환하였다. 피지를 채취한 기름 제거 필름은 즉시 1 g 의 몰레큘러 시브스를 포함하는 RNase-free (건열 처리 완료) 의 20 mL 유리 바이알병, 혹은 1 g 의 몰레큘러 시브스를 포함하는 5 mL 튜브 (Eppendorf DNA LoBind 5 mL, PCR clean) 에 넣고, 드라이아이스 상에 정지 (靜置) 하고, 그 후 -80 °C 에서 보관하였다.
- [0138] 3) RNA 추출 및 시퀀싱
- [0139] 상기 2) 의 피지를 채취한 기름 제거 필름을 적당한 크기로 절단하고, QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) 를 사용하여, 부속된 프로토콜에 준하여 RNA 를 추출하였다. 추출된 RNA 를 기초로, SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (라이프 테크놀로지스 재팬 주식회사) 를 사용하여 42 °C, 90 분간 역전사를 실시하여 cDNA 의 합성을 실시하였다. 역전사 반응의 프라이머에는, 키트에 부속되어 있는 랜덤 프라이머를 사용하였다.
- [0140] 얻어진 cDNA 로부터, 멀티플렉스 PCR 에 의해 20802 유전자에서 유래하는 DNA 를 포함하는 라이브러리를 조제하였다. 멀티플렉스 PCR 은, Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit (라이프 테크놀로지스 재팬 주식회사) 를 사용하여, [99 °C, 2 분 → (99 °C, 15 초 → 62 °C, 16 분) × 20 사이클 → 4 °C, Hold] 의 조건에서 실시하였다. 얻어진 PCR 산물은, Ampure XP (백크만 · 쿨터 주식회사) 로 정제한 후에, 버퍼의 재구성, 프라이머 서열의 소화, 어댑터 라이게이션과 정제, 증폭을 실시하여, 라이브러리를 조제하였다.
- [0141] 조제한 라이브러리를 Ion 540 Chip 에 로딩하고, Ion S5/XL 시스템 (라이프 테크놀로지스 재팬 주식회사) 을 사용하여 시퀀싱하였다. 시퀀싱으로 얻어진 각 리드 서열을 인간 게놈의 레퍼런스 서열인 hg19 AmpliSeq Transcriptome ERCC v1 에 대해 유전자 매핑함으로써, 각 리드 서열이 유래하는 유전자를 결정하였다.
- [0142] 실시예 2 내부 표준 유전자의 동정
- [0143] 실시예 1 에서 얻어진 데이터를 기초로, 남성의 데이터 세트, 여성의 데이터 세트, 남성 및 여성을 합친 데이터 세트를 작성하고, 이들 3 종의 데이터 세트를 대상으로 하여, 이하의 해석을 실시하였다.
- [0144] 3 종의 데이터 세트 (남성의 데이터 세트/여성의 데이터 세트/남성 및 여성의 데이터 세트) 마다, 유전자 검출률이 80 % 이상 (Log2 RPM 법) 혹은 90 % 이상 (RLE 법) 인 유전자를 해석 대상으로 하여 (Gene Threshold), Log2 RPM 법 및 RLE 법의 2 수법으로 정규화를 실시하였다. RLE 법은, Size factor 라고 불리는 계수를 계산하고, 이 계수를 이용하여 각 샘플의 리드 카운트 데이터를 정규화하는 수법이고, Log2 RPM 법은, 각 유전자의 발현량을 총 리드수를 1 million 으로 한 경우의 보정값으로서 산출하여 정규화하는 수법이다. RLE 법에 있어서의 Size factor 는 데이터 사이즈에 의존하기 때문에, 통합 데이터를 이용하여 내부 표준 유전자를 추출할 때, 범용성이 부족한 유전자를 선발할 가능성이 위구됐기 때문에, Log2 RPM 법에 의한 정규화 데이터도 사용하여, 양 보정값에 공통적으로 일정 비율의 안정 발현을 인정하는 범용성의 유전자를 선발하였다. 유전자의 발현 안정성은, CV Z-score 를 이용하여 평가하였다. 3 종 중 어느 것의 데이터 세트의 양 보정 데이터의 평균값에 있어서, CV Z-score 가 -1 이하인 것보다 발현 안정성이 높은 유전자를 추출한 결과, 남성의 데이터 세트에서는 58 종, 여성의 데이터 세트에서는 46 종, 또한 남성 및 여성의 데이터 세트에서는 70 종의 유전자가 추출되었다. 이들 CV Z-Score ≤ -1 을 인정하는 유전자는, 해석 대상 유전자 중 발현 변동이 작은 상위 15.87 % 에 해당하고 있었다. 일반적으로 내부 표준 유전자로서 사용되는 GAPDH 및 ACTB 의 CV Z-Score 는, GAPDH = -0.345, ACTB = -0.505 이고, SSL 유래의 RNA 를 대상으로 하는 경우에는, CV Z-Score ≤ -1 의 발현 안정성이 높은 유전자에는 해당하지 않는 것이 분명해졌다. 한편, 표피 각화 세포의 유전자 발현 해석에 있어서의 내부 표준 유전자로서 적합하다고 여겨지는 RPLP0 의 CV Z-Score 는, -1.111 이었다. 또한, 이들 CV Z-Score 는, 3 종의 데이터 세트와 2 종의 정규화 수법으로부터 얻어진 6 개의 CV Z-Score 의

평균값이다.

[0145] 그래서 발현 안정성이 높은 상기의 CV Z-Score ≤ -1 의 유전자 중, RPLP0 과 비교하여, CV Z-Score 가 동등하거나 그것보다 작아, SSL 에 있어서 보다 안정 발현하고 있는 유전자를 추가로 선별하여, 합계 52 종의 유전자를 동정하였다. 이들 52 유전자에 관하여, 3 종의 데이터 세트간에 있어서의 공통성을 확인한 결과, 3 종 모든 데이터 세트에 포함되는 유전자가 29 종 (표 8), 어느 2 종의 데이터 세트에 포함되는 유전자가 19 종 (표 9-1 에 나타내는 남성의 데이터 세트와 남성 및 여성의 데이터 세트에 공통되는 12 종, 및 표 9-2 에 나타내는 여성의 데이터 세트와 남성 및 여성의 데이터 세트에 공통되는 7 종), 어느 1 종의 데이터 세트에 포함되는 유전자가 4 종 (표 10-1 에 나타내는 남성의 데이터 세트에 있어서의 2 종, 표 10-2 에 나타내는 남성 및 여성의 데이터 세트에 있어서의 2 종) 이었다. 표 8, 9-1, 9-2 에 나타내는 CV Z-score 는, 공통성이 확인된 각 데이터 세트에 있어서의 2 종의 정규화 수법에 기초하는 CV Z-score 의 평균값이다. 표 10-1, 10-2 에 나타내는 CV Z-score 는, 해당하는 데이터 세트에 있어서의 2 종의 정규화 수법에 기초하는 CV Z-score 이다. 각 표 중, 하우스키핑 유전자로서 보고가 있는 것에 * 표시를 부여한다 (Genome Analysis, 2003, 19 (7) : 362-365 참조).

[0146] 그 52 종의 유전자는, SSL 유래의 RNA 에 있어서 보다 안정 발현하고 있는 유전자이며, SSL 을 해석 대상 시료로 하여 그 유전자 발현을 해석하는 경우에 있어서 내부 표준 유전자로서 사용 가능한 것이 나타났다.

[0147] [표 8]

Gene Symbol	CV Z-score		Gene Symbol	CV Z-score	
FAU	-1.363	*	RPL32	-1.194	*
ARF1	-1.328	*	OAZ1	-1.193	
RPS8	-1.328	*	RPS10	-1.181	*
RPL30	-1.326	*	ATP5B	-1.175	
UBA52	-1.290		BRK1	-1.170	
RPL10A	-1.288	*	EEF1G	-1.170	
RAB7A	-1.278	*	PCBP2	-1.168	
PSMB3	-1.267		RPL12	-1.161	
RPL36	-1.248		IER5	-1.143	
EIF1	-1.237		GNB2L1	-1.139	*
RAC1	-1.234	*	RPS19	-1.137	*
RPL29	-1.225	*	RPL38	-1.127	*
CSNK2B	-1.207	*	RPL27	-1.124	*
RPS15A	-1.205		RPS11	-1.115	*
BZW1	-1.200				

[0148]

[0149] [표 9-1]

Gene Symbol	CV Z-score		Gene Symbol	CV Z-score	
ARL8B	-1.292		NOTCH2NL	-1.176	
PCBP1	-1.227		CHMP1B	-1.171	
DNAJB6	-1.226	*	MYL12A	-1.155	
RPL4	-1.210		RPL18A	-1.151	
RPL11	-1.205	*	DDX6	-1.123	
SUMO2	-1.193		YWHAE	-1.114	

[0150]

[0151] [표 9-2]

Gene Symbol	CV Z-score		Gene Symbol	CV Z-score	
ARPC4	-1.226	*	RPS15	-1.175	*
ARPC2	-1.203	*	RPL36A	-1.171	
TMEM66	-1.201		RPL35	-1.123	*
RPS23	-1.178				

[0152]

[0153] [표 10-1]

Gene Symbol	CV Z-score	
SUPT4H1	-1.212	
PPP4C	-1.188	

[0154]

[0155] [표 10-2]

Gene Symbol	CV Z-score	
RPL13A	-1.140	*
RPL27A	-1.129	

[0156]

[0157] 실시예 3 리얼타임 PCR 데이터와 NGS 데이터의 상관성의 확인

[0158] 22 명의 정상 여성으로부터 피지를 채취하여, RNA 추출 및 정제를 실시하였다. SSL-RNA 와 RT Mix 를 혼합하여 역전사를 실시하여, 얻어진 역전사 반응물로부터 멀티플렉스 PCR 에 의해 20802 유전자에서 유래하는 DNA 를 포함하는 라이브러리를 조제하였다 (1st round PCR, Ion AmpliSeqTranscriptome Human Gene Expression Kit). Ampure XP 를 이용하여, 얻어진 1st round PCR 산물을 정제하였다. 얻어진 정제 산물을 차세대 시퀀서 해석용과 리얼타임 PCR 측정용으로 분할하였다. 편방의 정제 산물은, 버퍼의 재구성, 프라이머 서열의 소화, 어댑터 라이게이션과 정제, 증폭을 실시하고, 차세대 시퀀서 해석에 의해 망라적 유전자 발현 정보를 취득하여, NGS 데이터로 하였다. 분할한 다른 일방의 1st round PCR 정제 산물은, 리얼타임 PCR 측정의 템플릿으로 하고, 1st round PCR 증폭 영역의 내측에 설계한 프라이머 (nested primer) 를 사용하여, Real-time PCR 을 실시하였다. 22 샘플 각각에 대해, 목적 유전자 (target gene) 로서 선정된 19 종의 유전자 및 내부 표준 유전자 (control gene) 로서 3 종의 유전자 (RPLP0, FAU, ARF1) 의 Ct 값을 취득하였다. 3 종의 내부 표준 유전자 각각에 있어서, Ct 값의 차분 (ΔCt 값 ; $\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{control gene}}$) 을 산출하여, qPCR 데이터로 하였다. 19 종의 목적 유전자에 관하여, RPLP0, FAU, 혹은 ARF1 을 내부 표준 유전자로 한 3 패턴의 qPCR 데이터 (이하, $\Delta RPLP0$, ΔFAU 및 $\Delta ARF1$ 로 기재한다) 와 NGS 데이터 (Log_2RPM) 사이의 데이터 상관성을 확인한 결과, 표 11 에 나타내는 바와 같이 피부에 있어서 내부 표준 유전자로서 일반적으로 이용되고 있는 RPLP0 (CV Z-score = -1.111) 을 내부 표준으로 한 qPCR 데이터 ($\Delta RPLP0$) 와 비교하여, 보다 CV Z-score 가 작아 SSL 내부 표준 유전자로서 적합한 것으로 생각된 FAU (CV Z-score = -1.363), ARF1 (CV Z-score = -1.328) 을 내부 표준 유전자로서 사용한 qPCR 데이터 (ΔFAU , $\Delta ARF1$) 쪽이, PCR 정량 데이터 전체의 상관성이 향상되는 것이 확인되었다.

[0159] [표 11]

NGS data v.s. qPCR data	ΔFAU	$\Delta ARF1$	$\Delta RPLP0$
Pearson's correlation coefficient	0.81	0.80	0.76

[0160]