



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0035342
(43) 공개일자 2008년04월23일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0101919

(22) 출원일자 2006년10월19일

심사청구일자 2006년10월19일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거동 산29

(72) 발명자

김기수

서울특별시 강남구 개포동 현대2차아파트 208동 804호

고정민

서울시 송파구 방이동 89 올림픽 선수,기자촌 아파트 312-1701

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 골다공증 예측용 다형성 마커, 이를 이용한 골다공증 예측방법 및 골다공증 예측 키트

(57) 요약

본 발명은 골다공증 예측용 다형성 마커, 이를 이용한 골다공증 예측 방법 및 골다공증 예측 키트에 관한 것으로서, 구체적으로 골밀도 및 혈청내 오스테오칼신과의 연관성을 갖는 카탈라제(catalase)의 유전자 다형성을 확인 함으로써 골다공증을 예측할 수 있는 마커, 이를 이용한 골다공증 예측 방법 및 골다공증 예측 키트에 관한 것이다. 본 발명의 마커 및 키트를 이용하면 미리 골다공증 발병 여부를 예방할 수 있을 것이다.

대표도 - 도3

	ID1			
	-20T>C	+144C>T	+22348C>T	+33078A>G
-20T>C	-	1	1	1
+144C>T	0.173	-	1	1
+22348C>T	0.349	0.498	-	1
+33078A>G	0.828	0.145	0.291	-

(72) 발명자

김신윤

대구 남구 봉덕2동 효성타운 205동 805호

박의균

대구 수성구 만촌3동 만촌우방1차아파트 108동 801호

오범석

서울 동작구 대방동 대림APT 104-601

이종영

경기 고양시 일산구 대화동 장성마을3단지304-803

특허청구의 범위

청구항 1

골다공증 예측용 카탈라제(Catalase) 다형성 마커.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 마커는 카탈라제 유전자의 전사 시작점으로부터 +22348번째 염기가 T이고, 상기 +22348번째 염기를 포함하는 20 ~ 100개의 연속적인 DNA 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 카탈라제 다형성 마커.

청구항 3

골다공증 예측용 카탈라제 일배체형(haplotype) 마커.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 마커는 카탈라제 전사시작점으로부터 -20번째 염기가 T, +114번째 염기가 C, +22348번째 염기가 T 또는 +33078번째 염기가 A인 것을 특징으로 하는 일배체형 마커.

청구항 5

1) 검사 대상의 혈액 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;
2) 단계 1)에서 분리한 게놈 DNA 상에 존재하는 제 1항의 마커 내의 다형성 부위를 검출하는 단계; 및
3) 단계 2)에서 검출된 다형성 부위와 골다공증 표현형 변화와의 연관성을 분석하는 단계를 포함하는 골다공증 예측 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 단계 2)는 시퀀싱 분석, 마이크로어레이(microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적인 PCR(allele specific PCR), 다이내믹 대립 유전자 혼성화 방법(dynamic allele-specific hybridization, DASH), PCR 연장 분석 또는 TaqMan 기법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 골다공증 예측 방법.

청구항 7

카탈라제 유전자의 +22348C>T 다형성 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍을 포함하는 골다공증 예측용 키트.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 1 내지 4 프라이머인 것을 특징으로 하는 골다공증 예측용 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<4> 본 발명은 골다공증 예측용 다형성 마커, 이를 이용한 골다공증 예측 방법 및 골다공증 예측 키트에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 골밀도 및 혈청내 오스테오칼신과의 연관성을 갖는 카탈라제(catalase)의 유전자 다형성을 측정하므로써 골다공증을 예측할 수 있는 마커, 이를 이용한 골다공증 예측 방법 및 골다공증 예측 키트에 관한 것이다.

- <5> 산화스트레스는 ROS(reactive oxygen stress)의 생성과 항산화 시스템 간에 균형이 깨지는 것을 의미한다(Betteridge DJ. *Metabolism* 49:3-8, 2000). 과산화수소와 같은 ROS가 축적되면 OH(hydroxyl radical) 등의 더 강력한 산화제로 전환되어 지질, 단백질, DNA 등에 손상을 가져와 궁극적으로 세포에 치명적인 영향을 줄 수 있다(Muzykantov VR. *J Control Release* 71:1-21, 2001; Mignotte B, Vayssiere JL. *Eur J Biochem* 252:1-15, 1998).
- <6> 최근 산화스트레스가 조골세포의 분화와 생존을 조절하여 골 형성을 감소시키며(Liu AL., *et al.*, *Cell Biol Int* 28:905-911, 2004; Bai XC, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 314:197-207, 2004), 파골세포에 영향을 주어 골 흡수를 촉진하는 한편(Suda N., *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1157:318-323, 1993; Lee NK., *et al.*, *Blood* 106:852-859, 2005; Lean JM, *et al.*, *Endocrinology* 146:728-735, 2005), 콜라겐의 교차결합(cross-link)을 방해해서 골의 질을 떨어뜨림으로(Daumer KM, *et al.*, *J Biol Chem* 275:34681-34692, 2000) 골다공증의 발생에 기여한다고 보고 되었다(Lean JM, *et al.*, *J Clin Invest* 112:915-923, 2003; Yagi K., *Acta Biochim Pol* 44:701-709, 1997).
- <7> 카탈라제(Catalase)는 과산화수소를 물과 산소로 전환시켜 세포의 손상을 막는 주된 항산화 효소이다(Mates JM, Sanchez-Jimenez F. *Front Biosci* 4:D339D345, 1999; Rohrdans E, Kahl R. *Free Radic Biol Med* 24:27-38, 1998). 카탈라제의 활성이 떨어지는 사람에서는 동맥경화증(Cojocaru IM, *et al.*, *Rom J Intern Med* 42:423-429, 2004), 당뇨병(Goth L, Eaton JW. *Lancet* 356: 1820-1821, 2000; Goth L. *Clin Chem* 46:564-566, 2000), 이상지질혈증(Goth L. *Clin Chem* 46:564-566, 2000) 및 신경퇴화질환(Bogdanovic N, *et al.*, *Dement Geriatr Cogn Disord* 12:364-370, 2001) 등 산화스트레스와 관련된 질환이 빈번하게 유발된다. 이와는 대조적으로 쥐 실험에서 카탈라제 유전자를 과발현시키는 경우, 동맥경화증을 줄이거나 진행을 늦출 수 있는 것이 보고되었다(Schriner SE, *et al.*, *Science* 308:1909-1911, 2005; Yang H, *et al.*, *Circ Res* 95:1075-1081, 2004). 이러한 연구 결과들은 산화스트레스와 관련된 질환이 카탈라제의 활성과 연관이 있음을 시사하고 있다.
- <8> 지금까지 카탈라제 유전자 다형성과 고혈압(Jiang Z, *et al.*, *Hum Genet* 109:95-98, 2001), 당뇨(Chistiakov DA, *et al.*, *Diabetes Metab Res Rev* 20:219-224, 2004), 알츠하이머 병(Goulas A, *et al.*, *Neurosci Lett* 330:210-212, 2002) 및 백반증(Casp CB, *et al.*, *Pigment Cell Res* 15:62-66, 2002) 등의 질환에 대해서는 연구된 바가 있으나 아직 골다공증과의 연관성에 대해서는 보고된 바 없다.
- <9> 이에 본 발명자들은 카탈라제의 활성이 떨어지는 유전자를 가진 사람은 산화스트레스에 대해 더 민감할 것이고 폐경 등의 산화스트레스가 증가하는 상황에서 골 대사의 속도가 증가되어 골다공증이 더 쉽게 발생할 수 있다는 가정 하에 폐경 후 여성을 대상으로 수집한 골밀도 및 혈청 오스테오칼신 농도와 카탈라제 유전자 다형성이 관련이 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <10> 본 발명의 목적은 골다공증 예측용 카탈라제 다형성 마커 및 이를 이용한 골다공증 예측 방법과 골다공증 예측 키트를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <11> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 골다공증 예측용 카탈라제(catalase) 다형성 마커를 제공한다.
- <12> 또한, 본 발명은 골다공증 예측용 카탈라제 일배체형(haplotype) 마커를 제공한다.
- <13> 또한, 본 발명은 카탈라제 유전자의 -22348C>T 다형성 부위를 확인하여 골다공증을 예측하는 방법을 제공한다.
- <14> 아울러, 본 발명은 카탈라제 유전자의 -22348C>T 다형성 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머를 포함하는 골다공증 예측용 키트를 제공한다.
- <15> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- <16> 본 발명은 골다공증 예측용 카탈라제 다형성 마커를 제공한다.
- <17> 본 발명자들은 서울아산병원을 내원한 건강한 폐경후 여성을 대상으로 나이, 체중, 신장, 폐경후 기간을 조사한 후, 요추골 및 대퇴골 목부위의 골밀도를 측정하여, 각 골밀도 수치가 기존의 연구 결과와 동일하게 나이, 체중, 신장, 폐경후 기간과 유의한 상관관계를 보임을 관찰하여 본 연구의 대상자들이 골다공증을 연구하기에 적합한 대상군임을 확인하였다(표 1 참조).

- <18> 이후 실험 대상의 말초혈액 백혈구로부터 DNA를 추출하였으며, 상기 실험 대상의 DNA 검체 외에 24명의 한국인 DNA 검체에서 카탈라제 유전자의 엑손(exon) 부위, 그의 경계 및 프로모터 부위의 서열 분석을 통해 유전자 다형성을 조사하였다. 그 결과, 프로모터 부위에 3개, 엑손 부위에 4개, 인트론(intron) 부위에 9개 및 3'-측면 지역(flanking region)에 2개의 총 18개의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 동정하였다(도 1 참조). 이 중 11개 SNP가 연관 불균형(absolute linkage disequilibrium, $|D'|=1$ 및 $r^2=1$) 상태에 있었다. 18개의 SNP 중 연관 불균형과 SNP의 빈도를 고려하여 -20T>C, +114C>T, +22348C>T 및 +33078A>G의 유전자 다형성을 선별하였고, 선별된 4개의 유전자 다형성의 유전자 빈도는 하디-와인버그 평형(Hardy-Weinberg equilibrium) 상태에 있었다(표 5 참조).
- <19> 실험 대상자들에 대해, 상기 선별된 4개의 유전자 다형성의 서열, 요추골 및 대퇴골 목부위의 골밀도, 혈청 내 오스테오칼신 농도를 조사하여 카탈라제 유전자 다형성과 골밀도 및 오스테오칼신 농도와의 상관성을 조사하였다. 그 결과, 4개의 유전자 다형성 중 +22348C>T 유전자 다형성에서 T 대립인자(TT 및 CT)를 가진 경우가 T 대립인자를 가지지 않은 경우보다 요추골의 골밀도가 높게 나타났으며, 대퇴골 목부위 골밀도에서도 경계성 수준의 상관관계를 보임을 확인하였으며, 혈청내 오스테오칼신의 농도가 낮아짐을 확인하였다(표 6 참조).
- <20> 상기 결과를 통해 카탈라제 인트론 9에 존재하는 +22348C>T는 골다공증과 유의한 연관성이 있음을 확인하였다.
- <21> 또한, 본 발명은 골다공증 예측용 카탈라제 일배체형(haplotype) 마커를 제공한다.
- <22> 본 발명자들은 4개의 유전자 다형성은 다양하게 조합한 일배체형을 설정한 후 빈도가 0.1이 넘는 것을 선별하여 골밀도 및 오스테오칼신의 농도와 연관성이 있는지 조사하였다(도 1b 참조). 이 중 ht4(-20번째 염기가 T, +114번째 염기가 C, +22348번째 염기가 T, +33078번째 염기가 A)는 요추골 골밀도 및 혈청 오스테오칼신 농도와 상관성이 있음을 확인하여(표 6 참조) 본 발명의 카탈라제 일배체형 또한 골다공증과 유의한 연관성이 있음을 확인하였다.
- <23> 또한, 본 발명은
- <24> 1) 검사 대상의 혈액 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- <25> 2) 단계 1)에서 분리한 게놈 DNA 상에 존재하는 제 1항의 마커 내의 다형성 부위를 검출하는 단계; 및
- <26> 3) 단계 2)에서 검출된 다형성 부위와 골다공증 표현형 변화와의 연관성을 분석하는 단계를 포함하는 골다공증 예측 방법을 제공한다.
- <27> 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 다형성 부위 검출 방법은 시퀀싱 분석, 마이크로어레이(microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적인 PCR(allele specific PCR), 다이내믹 대립 유전자 혼성화 방법(dynamic allele-specific hybridization, DASH), PCR 연장 분석 또는 TaqMan 기법에 의하여 수행될 수 있다.
- <28> 아울러, 본 발명은 카탈라제 유전자의 +22348C>T 다형성 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는 골다공증 예측용 키트를 제공한다.
- <29> 상기 키트는 카탈라제 유전자의 +22348C>T 다형성 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍을 포함하고, 상기 프라이머는 바람직하게는 +22348C>T 다형성 부위에 대해 순서대로 각각 서열번호 1 내지 4에서 제공한 프라이머로, 이를 이용한 PCR 산물을 수득하여 염기서열을 분석함으로써 +22348C>T 다형성 부위의 서열을 확인하여 골다공증을 예측할 수 있다. 상기 프라이머쌍은 상기 다형성 부위를 증폭할 수만 있다면 크기 및 주형에 결합하는 위치가 제한되지 않으며, 당업자라면 통상의 프라이머 선정용 소프트웨어를 이용하여 용이하게 프라이머 디자인이 가능하다.
- <30> 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명을 한정하는 것은 아니다.
- <31> <실시예 1> 실험대상의 선정
- <32> 실험 대상은 서울아산병원에 내원한 560명의 건강한 폐경후 여성을 대상으로 하였다(Kim GS, *et al.*, *J Bone Miner Res* 20:1342-1348, 2005). 이때 폐경은 1년 이상 무월경이 지속된 경우로 혈청내 FSH(Follicle stimulating hormone)의 농도가 30 IU/ℓ 이상이 된 경우로 정의하였다. 실험 대상 중 40세 이전에 폐경한 실험 대상, 골 대사에 영향을 미칠 만한 약제를 6개월 이상 또는 12개월 이내에 투여받은 실험 대상 및 골 대사에 영향을 미칠만한 질환을 앓은 실험 대상은 제외하였다. 실험은 서울아산병원의 임상시험심사위원회의 승인을

받았으며 각 대상자에게 서명동의서를 받았다.

<실시예 2> 골밀도 조사

골밀도는 이중에너지 X-선 흡수계측기(Lunar, WI, USA)를 이용해서 요추골(L2-L4)과 대퇴골 목부위에서 측정하였다. 상기 기계의 변이계수(coefficient of variation)는 요추골에서 0.82%, 대퇴골 목부위에서 1.12%였다. 이후 실험 대상의 나이, 폐경후 기간, 체중, 키, 골밀도 계측기의 종류를 공변량(covariate)으로 하여 다중회귀 분석을 시행하였다. 통계적 분석은 통계분석 소프트웨어 SPSS 11.5(SPSS Inc., IL, USA)를 이용하였고 $p < 0.05$ 인 경우를 유의한 경우로 판단하였으며, 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

임상적 양상	요추골(Lumbar Spine) BMD*				대퇴골 목부위(Femoral neck) BMD*		
	변수	Mean±SD	회수계수	표준오차	P	회수계수	표준오차
나이(year)	59.4±7.2	-0.004	0.002	0.01	-0.003	0.001	0.005
체중(kg)	56.5±7.4	0.006	0.001	<0.0001	0.003	0.001	<0.001
신장(cm)	154.8±5.3	0.003	0.001	0.013	0.002	0.001	0.09
폐경후 기간(year)	10.4±8.2	-0.003	0.002	0.02	-0.005	0.001	<0.001
Adjusted R ² =0.254				Adjusted R ² =0.342			

* BMD : bone mineral density

그 결과, 나이, 체중, 신장 및 폐경후 기간은 요추골 및 대퇴골 목부위의 골밀도와 유의한 상관관계를 보임은 알 수 있었다.

<실시예 3> 혈청내 오스테오칼신(osteocalcin) 농도 측정

혈청내 오스테오칼신 농도는 실험 대상들이 8시간 이상 금식한 상태에서 아침 8시에서 10시 사이에 채혈을 하여 검사를 하였다. 채혈 후 시간 이내에 혈청을 분리하여 영하 80℃에서 보관 후 측정하였다. 혈청내 농도는 면역방사선계측법(Immunoradiometric assay)을 이용한 키트(OSTEO-RIACT, CIS Bio international, Gif-sur-Yvette, France)를 이용하여 측정하였다.

<실시예 4> 카탈라제(catalase) 유전자 다형성 분석

본 발명자들은 실험 대상의 말초혈액 백혈구로부터 게놈 DNA 추출 키트(WizardR genomic DNA purification kit, Promega, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 DNA를 추출하였다. 모든 엑손 부위와 그의 경계 및 프로모터 부위(약 1.5 kb)에서 DNA 서열 분석기(ABI PRISM 3730 DNA analyzer, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 실험 대상자 및 실험 대상자 이외의 24명의 한국인 DNA 검체에서 서열 분석을 통해 유전자 다형성을 조사하였다. DNA 증폭을 위한 16개의 프라이머 세트 제작과 서열 분석은 GenBank 데이터 베이스를 기초로 하였으며(CAT mRNA NM_001752 contig: NT_009237), 프라이머 세트 서열은 표 2와 같다. PCR 후 수득한 산물의 서열 변이는 각각의 크로마토그램(chromatogram)을 통해 확인하였다.

그 결과, 프로모터 부위에 3개, 엑손 부위에 4개, 인트론 부위에 9개 및 3' -측면 지역에 2개로 총 18개의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 동정하였다(도 1a).

본 발명자들은 각 SNP의 빈도가 하디-와인버그 평형에 적합한지 확인하기 위하여 2 검정을 수행하였다. 각각의 유전자 사이에서 Lewontin's D'(|D'|)와 연관 불균형 계수(linkage disequilibrium coefficient, r^2)를 구하였고(Hedrick PW. *Genetics* 117:331-341, 1987) Stephens 등(Stephens M, *et al.*, *Am J Hum Genet* 68:978-89, 2001)이 제안한 Bayesian 접근 방법을 이용한 PHASE 알고리즘을 통해 일배체형을 구성하였다(도 2 및 3).

그 결과, 18개의 SNP 중 11개의 SNP가 연관 불균형(absolute linkage disequilibrium, |D'|=1 및 r^2 =1)을 이루고 있음을 확인하였다.

<44> 본 발명자들은 연관 불균형과 SNP의 빈도를 고려하여 4개의 SNP를 선별하였고, 선별된 4개의 SNP 유전자 빈도는 하디-와인버그 평형 상태에 있었다(표 3).

표 2

<45>

프라이머		서열
847_CAT-1	Forward(서열번호 5)	GGACTTTGGAGATGAACA
	Reverse(서열번호 6)	CAGGTAAGCAGGAATTTTG
847_CAT-2	Forward(서열번호 7)	GCACCTGAGGAGGTGTAGA
	Reverse(서열번호 8)	GCTCCCGGTATCAG
847_CAT-3	Forward(서열번호 9)	GGGTGGTGCTGATTGG
	Reverse(서열번호 10)	TCCACTTCTCCCCTCACT
847_CAT-4	Forward(서열번호 11)	GCCCATCCTGTCAGATTTT
	Reverse(서열번호 12)	TCTTGCTTACGTCAATTAG
847_CAT-5	Forward(서열번호 13)	TCCCCTTCCTCCAACATA
	Reverse(서열번호 14)	AAAAGAATCCCACTCTGC
847_CAT-6	Forward(서열번호 15)	AATAACCCGGGCACTTAAA
	Reverse(서열번호 16)	AATATACCCACCCTCC
847_CAT-7	Forward(서열번호 17)	AGATGCTAGTTGTCTATGCTGAGTA
	Reverse(서열번호 18)	TCAAGAAATCTGAGGAAGCTG
847_CAT-8	Forward(서열번호 19)	TGTTTTGGCTTTCCTTCAT
	Reverse(서열번호 20)	CCCCAGATGTAAGTATT
847_CAT-9	Forward(서열번호 21)	TTTTGATTTTCTGATTGGAA
	Reverse(서열번호 22)	TCCCCAGAAAAAGTACATC
847_CAT-10	Forward(서열번호 23)	CTGTGAATGAGTGCTTACCAG
	Reverse(서열번호 24)	TCAAGGAATGCTCATTGAAG
847_CAT-11	Forward(서열번호 25)	AGCGGGAAAGGCAG
	Reverse(서열번호 26)	CCAAGGGTCTAAGTCTTGG
847_CAT-12	Forward(서열번호 27)	CAAGCATTTAGCAGATGG
	Reverse(서열번호 28)	AATAAGCCACGTGAAGGAC
847_CAT-13	Forward(서열번호 29)	GTGAAGGACACAACCCAA
	Reverse(서열번호 30)	GCATGCCATCACAC
847_CAT-14	Forward(서열번호 31)	GCTGGCATTGTTAAACAC
	Reverse(서열번호 32)	GCACAGGTGCAGG
847_CAT-15	Forward(서열번호 33)	GCGCTGGGCAATTTAA
	Reverse(서열번호 34)	CATGACGGTGCTCAAGTTA
847_CAT-16	Forward(서열번호 35)	TTTTGACGGATGATTGGA
	Reverse(서열번호 36)	GTCTCAGAAGGCTGTCCA

표 3

유전자좌	-20T>C	+144C>T	+22348C>T	+33078A>G
위치	5'-UTR	인트론 1	엑손 9	3'-UTR
rs#	rs17881315	rs17886119	rs17880449	rs17879188
실험대상자 수	547	549	553	549
지노타입 (실험대상자 수)	TT(259)	CC(287)	CC(186)	AA(284)
	CT(232)	CT(229)	CT(261)	AG(227)
	CC(56)	TT(35)	TT(106)	GG(38)
대립유전자 빈도	T(0.686)	C(0.730)	C(0.572)	A(0.724)
	C(0.314)	T(0.270)	T(0.428)	G(0.276)
HWE*	χ^2	0.144	1.249	0.712
	P	0.930	0.535	0.700
		0.718		

* HWE : P values of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium

<46>

<47>

<실시예 5> 실험 대상의 유전자형 분석

<48>

유전자형의 분석을 위한 프라이머와 프로브는 Livak의 방법과 같이 TaqMan에 적합하게 제작하였다(Livak KJ. *Genet Anal* 14:143-149, 1999). Primer Express(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 PCR 프라이머와 MGB TaqMan probe를 제작한 후, 하나의 대립 유전자는 FAM dye로, 다른 대립유전자는 형광을 띠는 VIC dye로 표기하였다. 프라이머 서열은 표 4와 같다. TaqMan Universal Master(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 PCR 프라이머 900 nM, TaqMan MGB-probe 200 nM, 실험대상에서 얻은 DNA 20 ng을 혼합하여 총 부피를 5 μ l가 되도록 맞추고, PCR을 수행하였다. 상기 혼합물은 thermal cycler(PE 9700, Applied Biosystems, USA)에서 증폭하였으며 50℃에서 2분간, 95℃에서 10분간 전반응을 수행한 후 95℃에서 15초, 60℃에서 1분간을 40회 수행하였다. 이후 Prism 7900HT instrument(Applied Biosystems, USA)를 이용해서 형광 강도(fluorescence intensity)를 측정하였고 이를 자동화된 소프트웨어를 이용해서 분석하였다(SDS 2.1 Applied Biosystems, USA).

표 4

<49>

프라이머		서열
-20T	Forward(서열번호 37)	AGCCGAGGCCTCC
	Reverse(서열번호 38)	GCCATAGCGTGC GGT
	VIC(서열번호 39)	CTGTGCAGAACA
	FAM(서열번호 40)	TGTGCGGAACA
+144C	Forward(서열번호 41)	GGCGTCGGCAAGTAAA
	Reverse(서열번호 42)	GCGGTACAGTCCCTCC
	VIC(서열번호 43)	CCGGCTTCCCC
	FAM(서열번호 44)	CCGGCTTCTCC
+17091A	Forward(서열번호 45)	TGACTATGGCATCCGGGAT
	Reverse(서열번호 46)	GCCTGATTAAATGTCATGACCTGG
	VIC(서열번호 47)	TTTAAACGCCATTGCC
	FAM(서열번호 48)	AACGCCGTTGCC
+22348C	Forward(서열번호 1)	CTCGAGTGGCCA ACTAC
	Reverse(서열번호 2)	CCTACCCTGATTGTCTGTC
	VIC(서열번호 3)	CATCGGGCCGTCA
	FAM(서열번호 4)	ATCGGGCCATCA

<50>

<실시예 6> 카탈라제 유전자 다형성과 임상 인자와의 상관성 조사

<51> 4개의 SNP를 요추골 및 대퇴골의 골밀도 및 혈청내 오스테오칼신 농도와의 연관성을 조사하여 그 결과를 표 5에 나타내었다.

표 5

유전자좌	C/C	C/R	R/R	P 값		
				공동	우성	열성
				우성		
요추골 BMD(g/cm ²)						
-20T>C	0.88±0.17 [‡]	0.86±0.17	0.87±0.18	0.53	0.50	0.79
+114C>T	0.87±0.18	0.88±0.17	0.88±0.15	0.83	0.89	0.79
+22348C>T	0.85±0.17	0.88±0.18	0.88±0.15	0.02	0.01	0.29
+33078A>G	0.88±0.17	0.86±0.17	0.83±0.19	0.30	0.50	0.22
대퇴골 목부위 BMD(g/cm ²)						
-20T>C	0.73±0.12	0.71±0.13	0.73±0.13	0.68	0.43	0.70
+114C>T	0.72±0.13	0.72±0.13	0.73±0.11	0.96	0.76	0.49
+22348C>T	0.71±0.13	0.73±0.12	0.73±0.12	0.07	0.05	0.35
+33078A>G	0.73±0.12	0.72±0.13	0.71±0.13	0.37	0.44	0.51
혈청 내 오스테오칼신 농도(ng/mL)						
-20T>C	29.2±11.5	30.2±12.0	32.4±12.7	0.09	0.16	0.16
+114C>T	30.4±12.4	29.4±11.8	30.5±9.0	0.58	0.43	0.80
+22348C>T	32.1±12.7	28.9±11.8	28.5±10.1	0.02	0.008	0.23
+33078A>G	29.7±11.8	50.5±13.0	32.3±13.8	0.23	0.31	0.35

‡ BMD의 Mean±SD 및 골 회전지표

C/C: 공유성 대립 유전자

C/R: 이형접합체

R/R: 동형접합체

<52>

<53> 선택된 네 개의 서열변이 부위는 5' -UTR에 있는 -20T>C 서열변이, 인트론 1에 있는 +144C>T 서열변이, +22348C>T 서열변이 및 +33078A>G 서열변이인데 변이의 빈도는 각각 0.32, 0.27, 0.42 및 0.28 이었다. 이 중 +22348C>T 서열변이 이외의 다른 세 부위의 서열변이는 골밀도와 연관이 없었다. 교란변수를 교정한 후에도 엑손에 위치한 +22348C>T 유전자 다형성은 요추골의 골밀도와 연관이 있었는데 T 대립인자(TT 및 CT)를 가진 경우에 T 대립인자를 가지지 않은 경우보다 유의하게 요추골의 골밀도가 높게 나타났으며 ($P=0.01$), 대퇴골 목부위 골밀도에서도 +22348C>T 유전자 다형성은 경계성 수준의 상관관계를 보였다($P=0.05$ in dominant model). 생화학적 골 표지자인 혈청 오스테오칼신 농도는 +22348C>T 유전자 다형성과 유의한 상관관계를 보였는데, 골밀도가 높은 것으로 나타났던 T 대립인자를 가진 실험 대상에 비해 T 대립인자를 갖지 않은 경우에서 오스테오칼신 농도는 낮았다 ($P=0.008$). +22348C>T 외의 유전자 다형성과 오스테오칼신 농도는 연관성을 보이지 않았다.

<54>

<실시예 7> 일배체형과 임상 인자와의 상관성 조사

<55>

네 개의 유전자형을 조합하여 여러가지 일배체형을 설정한 후(도 1b 및 1c) 빈도가 0.1을 넘는 것을 선별하여 골밀도 및 오스테오칼신 농도와의 연관성을 조사하였다(표 6).

표 6

자리	HT4- /HT4-	HT4+ /HT4-	HT4+ /HT4+	P 값		
				공동 우성	우성	열성
BMD 값(g/cm ²)						
요추골 (Lumber spine)	0.86±0.17 (391) [†]	0.90±0.18 (139)	0.90±0.15 (17)	0.0004	0.0004	0.11
대퇴골 목부위 (Femoral neck)	0.69±0.13 (391)	0.73±0.13 (139)	0.72±0.13 (17)	0.11	0.09	0.63
전체 대퇴골 (Total femur)	0.77±0.13 (391)	0.73±0.13 (120)	0.79±0.13 (14)	0.02	0.02	0.25
대퇴골 전자부 (Femoral trochanter)	0.57±0.12 (312)	0.58±0.11 (120)	0.60±0.12 (14)	0.05	0.16	0.03
대퇴골간 부위 (Femoral shaft)	0.97±0.17 (216)	1.00±0.16 (93)	0.99±0.17 (9)	0.07	0.06	0.51
워드 부위 (Ward's area)	0.50±0.147 (312)	0.54±0.15 (120)	0.51±0.17 (14)	0.008	0.007	0.34
혈청내 오스테오칼신 농도(ng/mL)	31.0±112.7 (397)	28.6±11.8 (146)	24.2±7.4 (17)	0.01	0.03	0.10

† BMD의 Mean±SD 및 골 회전지표

<56>

<57>

그 결과, ht4(haplotype 4: -20번째 염기가 T, +114번째 염기가 C, +22348번째 염기가 T, +33078번째 염기가 A)는 요추골 골밀도 및 혈청 오스테오칼신 농도와 연관성이 있었고 워드 부위(Ward's area), 대퇴골 전자부(Femoral trochanter) 및 전체 대퇴골(total femur)의 골밀도도 ht4 유전자형을 가진 경우가 그렇지 않은 경우에 비해 유의성 있게 높은 것으로 나타났다($p=0.03\sim0.007$).

발명의 효과

<58>

상기와 같이 카탈라제의 +22348C>T 유전자 다형성 및 일배체형은 골밀도 및 혈청내 오스테오칼신 농도와 밀접한 관련이 있으므로, 이를 측정함으로써 미리 골다공증 발생 유무를 인지하여 이를 예방하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1>

도 1은 카탈라제(catalase) 유전자 다형성을 나타낸 도면이다.

<2>

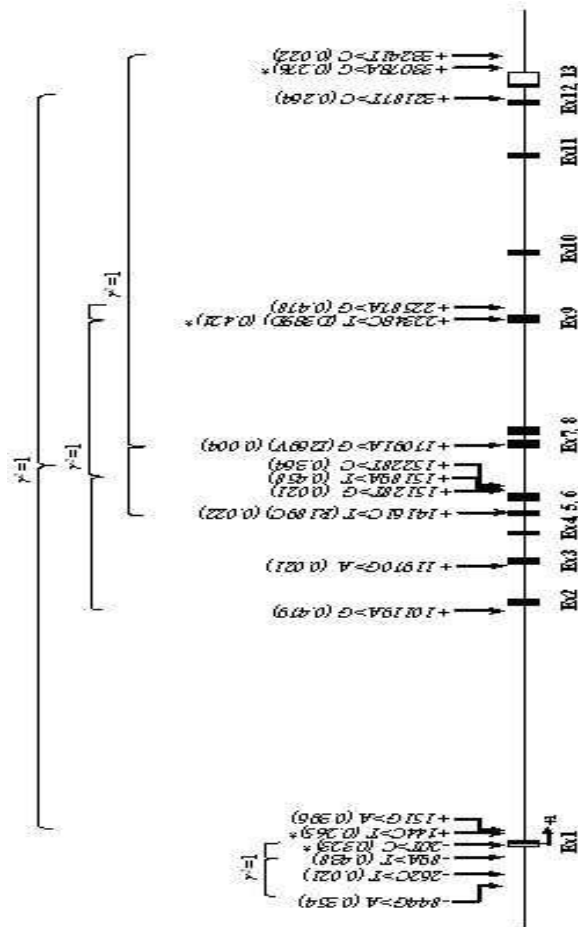
도 2는 카탈라제의 일배체형을 나타낸 도면이다.

<3>

도 3은 4개의 SNP 간의 연관비평형상수 $|D'|$ 와 r^2 를 나타낸 도면이다.

도면

도면1



도면2

Haplotype	-207>C	+144C>T	+22348C>T	+33078A>G	Freq.
Pat 1	C	C	C	G	0.289
Pat 2	T	T	T	A	0.264
Pat 3	T	C	C	A	0.252
Pat 4	T	C	T	A	0.157
others					0.039

도면3

		D1			
		-20T>C	+144C>T	+22348C>T	+33078A>G
r^2	-20T>C	-	1	1	1
	+144C>T	0.173	-	1	1
	+22348C>T	0.349	0.498	-	1
	+33078A>G	0.828	0.145	0.291	-

서열목록

- <110> KIM, Ghi-Su
KOH, Jung-Min
KIM, Shin-Yoon
PARK, Eui-Kyun
OH, Bermseok
LEE, Jong-young
- <120> A polymorphic marker of prediction of osteoporosis, the prediction method of osteoporosis and the prediction kit of osteoporosis using the same
- <130> 6p-09-53
- <160> 48
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> +22348C>T Forward
- <400> 1
ctcgagtggc caactacca

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> +22348C>T Reverse

<400> 2
 cctaccctga ttgtctgca t 21

<210> 3
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> +22348C>T VIC

<400> 3
 catcgggccg tcacg 15

<210> 4
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> +22348C>T FAM

<400> 4
 atcgggccat cacg 14

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 847_CAT-1 Forward

<400> 5
ggactttgga gatgaacagc 20

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-1 Reverse

<400> 6
caggtaagca ggaatttga a 21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-2 Forward

<400> 7
gcacctgagg aggtgtagaa a 21

<210> 8
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-2 Reverse

<400> 8
gctcccggtt atcagca 17

<210> 9

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 847_CAT-3 Forward

<400> 9
 gggtgggtgct gattggct 18

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 847_CAT-3 Reverse

<400> 10
 tccacttctc ccctcactga 20

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 847_CAT-4 Forward

<400> 11
 gcccatcctg tcagatttta g 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 847_CAT-4 Reverse

<400> 12
tcttgcttac gtcaattagc c 21

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-5 Forward

<400> 13
tcccccttct ccaacatact 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 947_CAT-5 Reverse

<400> 14
aaaagaatcc cactctgcaa 20

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-6 Forward

<400> 15
aataaccg gcacttaa a 21

<210> 16
<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-6 Reverse

<400> 16
aatataccca ccctcccg 18

<210> 17
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-7 Forward

<400> 17
agatgctagt tgtctatgct gagtaaa 27

<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-7 Reverse

<400> 18
tcaagaaatc tgaggaagct gat 23

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-8 Forward

<400> 19
tgttttggct ttccttcata g 21

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-8 Reverse

<400> 20
ccccagatgt aactgatttg a 21

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-9 Forward

<400> 21
ttttgatttt tctgatttgg aaag 24

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-9 Reverse

<400> 22
tccccaggaa aaagtacatc a 21

<210> 23
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 847_CAT-10 Forward

<400> 23

ctgtgaatga gtgcttacca gc

22

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 847_CAT-10 Reverse

<400> 24

tcaaggaatg ctcattgaag aa

22

<210> 25

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 847_CAT-11 Forward

<400> 25

agcgggaaag gcagaa

16

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 847_CAT-11 Reverse

<400> 26

ccaagggtct aagtcttggt g 21

<210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 847_CAT-12 Forward

<400> 27
 caagcattta gcagatggca 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 847_CAT-12 Reverse

<400> 28
 aataagccac gtgaaggacg 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 847_CAT-13 Forward

<400> 29
 gtgaaggaca caacccaaat 20

<210> 30
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-13 Reverse

<400> 30
gcatgccatc acaccg 16

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-14 Forward

<400> 31
gctggcattg ttaaaccct 20

<210> 32
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-14 Reverse

<400> 32
gcacaggtgc agggc 15

<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 847_CAT-15 Forward

<400> 33

gcgctgggca atttaaga 18

<210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 847_CAT-15 Reverse

<400> 34
 catgacggtg ctcaagttat c 21

<210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 847_CAT-16 Forward

<400> 35
 ttttgacgga tgattggatt 20

<210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 847_CAT-16 Reverse

<400> 36
 gtctcagaag gctgtccaaa 20

<210> 37
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> -20T Forward

<400> 37
gagccgaggc ctcc

14

<210> 38
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> -20T Reverse

<400> 38
gccatagcgt gcggtt

16

<210> 39
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> -20T VIC

<400> 39
ctgtgcagaa ca

12

<210> 40
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> -20T FAM

<400> 40

tgtgcggaac a 11

<210> 41
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> +144C Forward

<400> 41
 ggcgtcggca agtaaa 16

<210> 42
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> +144C Reverse

<400> 42
 gcggtacagt ccctcc 16

<210> 43
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> +144C VIC

<400> 43
 ccggcttccc c 11

<210> 44
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> +144C FAM

<400> 44
ccggcttctc c 11

<210> 45
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> +17091A Forward

<400> 45
tgactatggc atccgggat 19

<210> 46
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> +17091A Reverse

<400> 46
gcctgattaa atgtcatgac ctgg 24

<210> 47
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> +17091A VIC

<400> 47

ttttaacgcc attgcc

16

<210> 48
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> +17091A FAM

<400> 48
aacgccgttg cc

12