



등록특허 10-2157438



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월21일

(11) 등록번호 10-2157438

(24) 등록일자 2020년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/689 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0044448

(22) 출원일자 2019년04월16일

심사청구일자 2019년04월16일

(56) 선행기술조사문헌
International Journal of Gynecology &
Obstetrics (2018) 142(3):308-314
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)

(72) 발명자

안기훈

서울특별시 강남구 삼성로 417 대치포스코더샵아
파트 103-1801

김희윤

서울특별시 성북구 고려대로27길 52-18

(74) 대리인

공병욱

전체 청구항 수 : 총 9 항

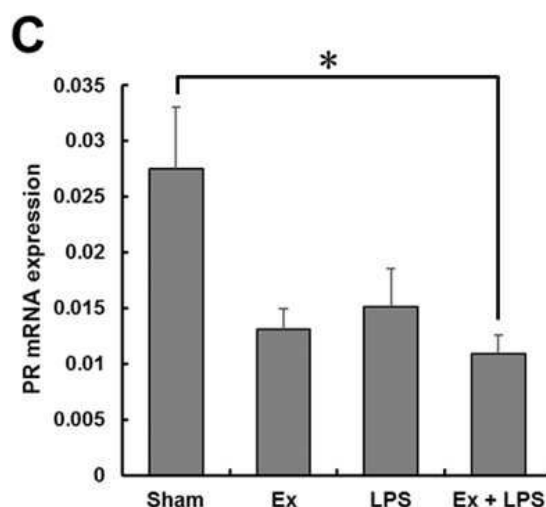
심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 조산 진단 방법 및 키트

(57) 요약

본 발명은 조산 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해 ER α 또는 PR 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법 및 ER α 또는 PR 유전자에 대한 프라이머 또는 프로브; 또는 ER α 또는 PR 단백질에 대한 항체를 포함하는 조산 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의하면 간단하고 쉽게 조산의 진단에 대한 신뢰성 있는 정보를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/723 (2013.01)
G01N 2800/368 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (2009) 94(6):1886-1889*
PLoS ONE (2013) 8(12):e81340
KR1020090123875 A
US20120046261 A1
US20160003837 A1
US20140186332 A1
American Journal of Obstetrics and Gynecology (2005) 193(6)Supplement:S175(26th Annual Meeting of the Society for Maternal-Fetal Medicine, Abstract 615)*
김희운, "Postpartum hormonal change in cervical excision-induced preterm delivery", 석사학위논문, 고려대학교 (2018)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2014R1A1A1002300
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구
연구과제명	자궁경부결손 및 손상으로 인한 조산 동물모델의 구축과 그 유효성 확인을 위한 기
초연구	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2014.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 산모의 조산의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법:

대상자(subject)의 자궁 경부로부터 분리한 생물학적 시료로부터 에스트로겐 수용체 알파(Estrogen Receptor alpha, ER α) 또는 프로게스테론 수용체(Progesterone Receptor, PR) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
상기 PR 유전자 발현 수준의 측정은 대상자의 자궁 경부 상피에서 분리한 생물학적 시료로부터 측정되는 것이고, PR 유전자의 발현 수준이 정상대조군보다 감소되어 있는 경우, 산모의 조산의 위험성이 높은 것으로 판정하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계에서 측정된 유전자의 발현 수준을 정상대조군의 생물학적 시료로부터 측정된 유전자의 발현수준과 비교하는 단계를 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유전자의 발현수준의 측정은 유전자의 mRNA 발현 수준, 또는 단백질 발현 수준의 측정인 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준의 측정은 유전자의 mRNA를 RT-PCR에 의해 증폭하는 단계에 의해 수행되는 것인, 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준의 측정은 단백질을 면역 분석(immunoassay)하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 측정된 대상자의 ER α 유전자의 발현 수준이 정상대조군보다 증가되어 있는 경우, 산모의 조산의 위험성이 높은 것으로 판정하는 단계를 추가적으로 포함하는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 대상자의 혈액으로부터 분리한 생물학적 시료로부터 에스트론(estrone, E1) 또는 프로게스테론(progesterone, P4)의 수준을 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 단계에서 측정된 E1 또는 P4의 수준을 정상대조군의 혈액으로부터 분리한 생물학적 시료로부터 측정된 E1 또는 P4의 수준과 비교하는 단계를 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 대상자의 에스트론 및 프로게스테론의 수준이 정상대조군보다 감소되어 있는 경우 산모의 조산 위험성이 더 높은 것으로 판정하는 단계를 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 조산 진단 방법 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 임신 20주 내지 37주 기간 동안의 분만을 조산이라고 하며, 전체 분만 중 5-18%를 차지한다. 약 75%의 출생 전 후의 사망률이 조산에 기인하고, 조산된 신생아는 신경학적, 호흡기, 및 위장관 계열의 합병증을 가질 위험성이 높다. 따라서, 임신의 유지에 있어 필요한 과정과 조산의 잠재적인 원인을 잘 이해하는 것은 매우 중요하다. 조산은 조산 경험, 다태임신, 자궁 경부 기능이상, 흡연 비정상적 체질량 지표, 음주(alcohol consumption), 산모의 연령(maternal age), 스트레스, 및 유전적 요인과 같은 원인들에 기인한다. 그러나, 상기와 같은 조산에 영향을 미치는 요소들이 알려져 있음에도 불구하고, 아직까지 조산을 간단하고 쉽게 진단할 수 있는 방법은 개발된 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Romero R et al., Preterm labor: one syndrome, many causes. Science 2014;345:760-5.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 산모의 조산 위험성을 판정하고, 조산을 쉽고 간단하게 진단하기 위한 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 조산 산모의 경우 근위부 자궁 경부의 평활근 조직에서 에스트로겐 알파 수용체 유전자의 발현이 크게 증가하고, 근위부 자궁 경부의 상피 조직에서 프로게스테론 수용체 유전자의 발현이 크게 감소하는 경향이 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 대상자(subject)의 자궁 경부로부터 분리한 생물학적 시료로부터 에스트로겐 수용체 알파(Estrogen Receptor alpha, ER α) 또는 프로게스테론 수용체(Progesterone Receptor, PR) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 산모의 조산의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 에스트로겐 수용체 알파(Estrogen Receptor alpha, ER α) 또는 프로게스테론 수용체(Progesterone Receptor, PR)의 유전자 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브; 또는 에스트로겐 수용체 알파(Estrogen Receptor alpha, ER α) 또는 프로게스테론 수용체(Progesterone Receptor, PR)의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 산모의 조산 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 산모의 조산의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[0011] 대상자(subject)의 자궁 경부로부터 분리한 생물학적 시료로부터 에스트로겐 수용체 알파(Estrogen Receptor alpha, ER α) 또는 프로게스테론 수용체(Progesterone Receptor, PR) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계.

[0012] 본 명세서에서 용어 “대상자(subject)”는 조산의 가능성이 있을 것으로 추정되어 조산의 위험성에 대한 정보를 얻고자 하는 대상자를 의미하며, 임신이 가능한 포유류를 의미한다. 구체적으로 상기 포유류는 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 마우스, 랫트, 또는 인간(human)을 의미하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0013] 본 발명의 구체적인 구현예에 있어서, 상기 대상자는 조산 동물 모델이고, 보다 구체적으로는 조산 마우스/랫트 모델이며, 자궁 경부가 절제되고, 및/또는 LPS가 투여된 것을 특징으로 한다. 본 발명의 구체적인 일 구현예에 따른 상기 조산 동물 모델의 제조방법은 대한민국 공개특허 제10-2017-0125708호에 기재되어 있다.
- [0014] 본 발명자들은 조산의 발병시, 근위부 자궁 경부의 평활근 조직에서 에스트로겐 알파 수용체 유전자의 발현이 크게 증가하고, 근위부 자궁 경부의 상피 조직에서 프로게스테론 수용체 유전자의 발현이 크게 감소하는 경향을 발견하였다. 따라서, 본 발명은 근위부 자궁 경부의 평활근 조직에서의 에스트로겐 알파 수용체 유전자의 발현 수준 증가, 또는 근위부 자궁 경부의 상피 조직에서의 프로게스테론 수용체 유전자의 발현수준 감소; 및 산모에서 조산의 발병과의 상관성에 기초한다.
- [0015] 따라서, 본 발명의 구체적인 구현예에 있어서, 상기 에스트로겐 수용체 알파 유전자의 발현 수준은 대상자의 근위부 자궁 경부의 평활근 조직에서 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 또한, 본 발명의 다른 구체적인 구현예에 있어서, 상기 프로게스테론 수용체 유전자의 발현 수준은 대상자의 근위부 자궁 경부의 상피 조직에서 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명은 상기 측정된 대상자의 ER α 또는 PR 유전자의 발현 수준을 정상대조군의 생물학적 시료로부터 측정된 유전자의 발현수준과 비교하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0018] 본 발명의 구체적인 구현예에 있어서, 상기 ER α 또는 PR 유전자의 발현수준의 측정은 유전자의 mRNA 발현 수준, 또는 단백질 발현 수준의 측정을 통해 이루어진다.
- [0019] 본 발명의 방법에서, 상기 ER α 또는 PR 유전자의 mRNA 발현 수준의 측정은 ER α 또는 PR 유전자의 mRNA를 RT-PCR에 의해 증폭하는 단계에 의해 수행된다.
- [0020] 본 발명의 구체적인 구현예에 있어서, 상기 ER α 의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 RT-PCR은 서열번호 3 및 4의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프라이머 쌍을 이용하여 수행된다.
- [0021] 본 발명의 다른 구체적인 구현예에 있어서, 상기 PR의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 RT-PCR은 서열번호 7 및 8의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프라이머 쌍을 이용하여 수행된다.
- [0022] 본 발명의 방법에서, 상기 ER α 또는 PR 유전자 단백질의 발현 수준의 측정은 ER α 또는 PR 유전자의 단백질을 면역 분석(immunoassay)하는 단계에 의해 수행된다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 방법은 상기 측정된 대상자의 ER α 유전자의 발현 수준이 정상대조군보다 증가되어 있는 경우, 산모의 조산의 위험성이 높은 것으로 판정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0024] 본 발명의 다른 일 구현예에 있어서, 본 발명의 방법은 상기 측정된 대상자의 PR 유전자의 발현 수준이 정상대조군보다 감소되어 있는 경우, 산모의 조산의 위험성이 높은 것으로 판정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 있어서, 본 발명의 방법은 상기 측정된 대상자의 ER α 유전자와 PR 유전자의 발현 수준의 비(ER α /PR)가 정상대조군보다 증가되어 있는 경우 산모의 조산의 위험성이 높은 것으로 판정하는 단계를 포함한다.
- [0026] 본 발명의 ER α 유전자와 PR 유전자의 발현 수준의 비(ER α /PR)에 있어서, 상기 ER α 은 근위부 자궁 경부의 ER α 이고, 구체적으로는 근위부 자궁 경부의 평활근 조직의 ER α 이다. 또한, 상기 PR은 근위부 자궁 경부의 PR이고, 구체적으로는 근위부 자궁 경부의 상피 조직의 PR이다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 있어서, 본 발명의 방법은, 대상자의 혈액으로부터 분리한 생물학적 시료로부터 에스트론(estrone, E1) 또는 프로게스테론(progesterone, P4)의 수준을 측정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0028] 또한, 본 발명의 방법은 상기 단계에서 측정된 E1 또는 P4의 수준을 정상대조군의 혈액으로부터 분리한 생물학적 시료로부터 측정한 E1 또는 P4의 수준과 비교하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0029] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 있어서, 상기 대상자의 에스트론 및 프로게스테론의 수준이 정상대조군보다 감소되어 있는 경우에는 산모의 조산 위험성이 더 높은 것으로 판정한다.
- [0030] 본 발명의 방법에서 ER α 또는 PR 유전자의 발현 수준을 측정하여 조산의 발병 위험성을 판단하는 것은 크게 두 가지의 방법, 즉 유전적 분석(genetic analysis) 방법과 면역 분석(immunoassay)방법으로 실시할 수 있다.
- [0031] 유전적 분석에 기초하여 본 발명을 실시하는 경우, ER α 또는 PR 유전자 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머

또는 프로브가 이용된다. 프라이머를 이용하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 ER α 또는 PR 유전자의 발현 정도를 조사한다. 본 발명은 ER α 또는 PR 유전자의 발현 정도를 분석하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 세포 또는 조직)에서 ER α 또는 PR mRNA 발현양을 조사하여 ER α 또는 PR 유전자의 발현 정도를 결정한다. 따라서 본 발명은 원칙적으로 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다. mRNA를 얻기 위하여, 먼저 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당 업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다. 예컨대, Trizol을 이용하여 용이하게 세포 내의 총 RNA를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 인간의 시료로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다. 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다.

[0032] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어 이중체 구조를 형성한다. 이러한 이중체 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 등 공지문헌에 개시되어 있다.

[0033] 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, E. coli DNA 중합효소 I의 "클레나우" 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus (Tth), Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus litalis, 및 Pyrococcus furiosus (Pfu)를 포함한다.

[0034] 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 요청된다.

[0035] 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.

[0036] 본 명세서에 기술된 용어 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(이하 PCR이라 한다), 역전사-중합효소 연쇄반응(이하 RT-PCR로 표기한다)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), Gap-LCR, 복구연쇄 반응(repair chain reaction), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication), 타겟 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0037] 본 발명의 구체적인 구현예에 의하면, 본 발명에서 증폭 반응에 이용되는 프라이머는 ER α 또는 PR 유전자의 cDNA 서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드이다. 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 프라이머쌍은 주형인 ER α 또는 PR cDNA 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다.

[0038] 본 발명의 프라이머는 ER α 또는 PR 유전자의 mRNA (즉, cDNA) 서열에 상보적인 서열로 제조될 수 있다. 이러한 프라이머는 ER α 또는 PR 유전자의 cDNA 서열을 참조하여 당업자가 용이하게 디자인할 수 있다. 이렇게 증폭된 핵산 분자를 적합한 방법으로 분석하여 ER α 또는 PR 유전자의 발현 정도를 조사한다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 ER α 또는 PR 유전자의 발현 정도를 조사한다. 이러한 증폭 반응을 통하여, ER α 유전자의 발현이 정상인 자궁 경부로부터 분리한 시료에

서의 발현 수준에 비해 높은 것으로 확인되는 경우에는 조산 위험성이 높은 것으로 판정된다.

[0039] 또한, 이러한 증폭 반응을 통하여 PR 유전자의 발현이 정상인 자궁 경부로부터 분리한 시료에서의 발현 수준에 비해 낮은 것으로 확인되는 경우에는 조산 위험성이 높은 것으로 판정된다.

[0040] 또한, 본 발명의 방법은 ER α 또는 PR 유전자 또는 ER α 또는 PR의 cDNA에 혼성화 되는 프로브를 이용하여 혼성화-기초 분석을 통해 시행할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 "프로브"는 단일쇄 핵산 분자이며, 타겟 핵산 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 프로브의 이점, 즉 혼성화 특이성의 개선이 손상되지 않는 범위 내에서, 본 발명의 프로브를 변형할 수 있다. 이들 변형, 즉 표지(label)는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신, 피코에리트린, 로다민, 리사민, 그리고 Cy3와 Cy5), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사성동위원소(P³², 및 S³⁵), 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 형광, 방사능, 발색측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

[0041] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, ER α 또는 PR 유전자의 cDNA에 혼성화되는 본 발명의 프로브는 불용성 담체(예컨대, 니트로셀룰로오스 또는 나일론 필터, 유리판, 실리콘 및 플루오로카본 지지체)에 고정화되어, 마이크로어레이를 제조할 수 있다. 불용성 담체로서의 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 담체에 결합될 수 있다.

[0042] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다.

[0043] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스레드 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-BI-포스페이트(naphthol-AS-BI-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium)등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 니트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다.

[0044] 다음으로, 본 발명에서 ER α 또는 PR 단백질의 발현 수준은 면역분석 방법에 따라 측정할 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석(immunoassay) 또는 면역염색(immunostaining) 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.

[0045] 상기 면역분석 또는 면역염색 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색, 면역조직화학 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C¹⁴, I¹²⁵, P³² 및 S³⁵)로 표지된 항체가 ER α 또는 PR 단백질을 검출하는 데 이용될 수 있다. ER α 또는 PR 단백질에 대한 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. ER α 또는 PR 단백질에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature,

352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

[0047] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 분석하고자 하는 시료 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차 항체로서 ER α 또는 PR 단백질에 대한 항체와 상기 시료 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다. 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이다. 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR, TMB, ABTS, o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT 및 m-PMS와 같은 기질이 이용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 ER α 또는 PR 단백질에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 시료 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 표지가 결합되어 있고, ER α 또는 PR 단백질에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 표지로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.

[0049] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 표지를 가지고 있다. 상기 표지는 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P450), 방사성 물질(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 밖의 다양한 표지 및 표지화 방법은 당 업계에 공지되어 있다.

[0050] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다.

[0052] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 에스트로겐 수용체 알파(Estrogen Receptor alpha, ER α) 또는 프로게스테론 수용체(Progesterone Receptor, PR)의 유전자 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브; 또는 에스트로겐 수용체 알파(Estrogen Receptor alpha, ER α) 또는 프로게스테론 수용체(Progesterone Receptor, PR)의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 산모의 조산 진단용 키트를 제공한다.

[0053] 본 발명의 조산 진단용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus (Tth), Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus litoralis 또는 Pyrococcus furiosus (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다.

[0054] 본 발명의 구체적인 구현예에 있어서, 상기 본 발명의 에스트로겐 수용체 알파의 유전자 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머는 서열번호 3 및 4의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프라이머쌍이 사용될 수 있고, 상기 프로게스테론 수용체의 유전자 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머는 서열번호 7 및 8의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프라이머쌍이 사용될 수 있다.

[0055] 본 발명에서 조산 진단용 키트가 면역분석방법에 적용되는 경우 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

발명의 효과

- [0058] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0059] 본 발명은 조산 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해 ER α 또는 PR 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법 및 ER α 또는 PR 유전자에 대한 프라이머 또는 프로브; 또는 ER α 또는 PR 단백질에 대한 항체를 포함하는 조산 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명은 근위부 자궁 경부에서 ER α 유전자의 발현 수준의 증가 및 PR 유전자의 발현 수준의 감소가 조산의 발병과 상관관계가 있음을 발견한 것에 기초한다.
- [0061] 본 발명의 방법에 의하면 간단하고 쉽게 조산의 진단에 대한 신뢰성 있는 정보를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0063] 도 1a 내지 도 1c는 qRT-PCR을 이용한 산후 생쥐 자궁 경부 조직에서 ER α , ER β 및 PR의 mRNA 발현을 나타낸 도이다. (1a) ER α , (1b) ER β 및 (1c) PR RNA 발현. 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다. * = $p < 0.05$. ER : 에스트로겐 수용체, PR : 프로게스테론 수용체, Ex : 자궁 경부 절제.
- 도 2a 내지 도 2e는 웨스턴 블롯을 통해 측정한 자궁 경부 조직에서의 ER α , ER β 및 PR의 단백질 발현을 나타낸 도이다. (2a) ER α , (2b) ER β , (2c) PR-A, (2d) PR-B 및 (2e) PR-A / PR-B 발현의 단백질 발현. 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다. * = $p < 0.05$. ER : 에스트로겐 수용체, PR : 프로게스테론 수용체, Ex : 자궁 경부 절제.
- 도 3a 내지 도 3i는 면역조직화학을 사용하여 결정된 근위 및 원위 자궁 경부의 ER α , ER β 및 PR의 국소화 및 발현 수준을 나타낸 도이다. (3a) 자궁 경부에서 ER α 의 발현 (x200). (3b) IHC 자궁 경부 상피의 ER α 점수. (3c) 자궁 경부의 평활근 층에서 ER α 의 IHC 점수. (3d) 자궁 경부의 ER β 의 발현 (x200). (3e) 자궁 경부의 상피에서 ER β 의 IHC 점수. (3f) 자궁 경부의 평활근 층에서 ER β 의 IHC 점수. (3g) 자궁 경부의 PR의 표현 (x200). (3h) IHC는 자궁 경부의 상피에서 PR의 점수. (3i) 자궁 경부의 평활근 층에서의 PR의 IHC 점수. 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다. EPI : 상피, SML : 평활근 층, P : 근위부 자궁 경부, D : 원위부 자궁 경부, ER : 에스트로겐 수용체, Ex : 자궁 경부 절제.
- 도 4a 내지 도 4d는 근위 및 원위 자궁 경부의 ER / PR 발현을 나타낸 도이다. (4a) 자궁 경부 상피에서 ER α / PR의 발현. (4b) 자궁 평활근 층에서 ER α / PR의 발현. (4c) 자궁 경부 상피에서 ER β / PR의 발현. (4d) 자궁 경부 평활근 층에서 ER β / PR의 발현. EPI : 상피, SML : 평활근 층, P : 근위부 자궁 경부, D : 말초 자궁 경부, PR : 프로게스테론 수용체, Ex : 자궁 경부 절제. 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다. * = $p < 0.05$.
- 도 5a 내지 도 5c는 혈청 에스트로겐과 프로게스테론 수치를 비교하여 나타낸 도이다. (5a) 혈청 에스트론 (E1) 수준, (5b) 혈청 17 β 에스트라다이올 (E2) 수준, (5c) 혈청 프로게스테론 (P4) 수준. 값은 평균 SEM으로 표시되었다. * = $p < 0.05$.
- 도 6은 자궁 경부 절제와 관련된 조산과 분만에서 자궁 경부의 ER α 와 PR 시스템의 역할에 대한 이론적 모델을 나타낸 도이다. "Muscle fatigue, 근육 피로"는 근위부 자궁 경부에서 ER α 와 PR의 발현 비가 증가하고 기능성 프로게스테론이 제거되고, 근육 세포의 수축이 발생할 때 발생한다. "근육 피로" 이후 자궁 경부의 internal os가 약화되고 조산이 발생한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0064] 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.
- [0066] 실시예
- [0068] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.
- [0070] 실험재료 및 실험방법
- [0072] 1. 동물모델 및 처치
- [0073] 모든 동물실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다 (KOREA-2016-0070). 성 성숙된

C57BL/6 마우스가 사용되었다. 대조군 마우스(sham group)에는 일반 생리식염수(NS)를 임신 16일에 주사하였고(n=10), 절개 마우스군(Excision group, Ex)에는 일반 생리 식염수를 주사하였으며(n=9), LPS군에는 LPS를 주사하였고(n=10), Ex+LPS 군에는 자궁 경부를 절개하고 LPS를 주사하였다(n=10). 자궁 경부 절개는 5주령의 암컷 마우스에 실시되었다. 상기 마우스들은 이소플루란으로 호흡마취 하에 질을 통하여 자궁 경부 절개가 이루어졌다. 3주 후, 암수 마우스간에 교배가 이루어졌다. 교배 후 점액전(mucus plug)이 발견되는 날짜를 "임신 1일"로 설정하였다. 동물들은 물과 사료를 무제한 급여하였고, 22-24℃에서 12시간 명암주기 하에 사육되었다. 임신 16일에, 마우스들은 NS(100 μ l) 또는 NS에 용해시킨 LPS(100 μ g/)를 투여받았다. 다음으로 마우스들은 이소플루란으로 마취한 후, 개복하여 제1 및 제2 태낭 사이의 자궁강에 LPS를 주사하였다. 피하조직은 vicryl 로 봉합되었고, 피부는 검은 명주실(black silk)로 봉합되었다.

2. 조직의 수집

분만 직후, 자궁 경부와 혈액을 수집하였다. 자궁 경부는 4% 완충 포르말린으로 실온에서 24시간동안 고정되었고, 파라핀에 포매하여 면역조직화학 분석에 사용되었다. 자궁 경부의 일부는 액체 질소 처리하고, -80° C에 보관하였다가 RNA 및 단백질 추출에 사용하였다.

3. RNA 추출, cDNA 합성, 및 정량적 실시간 PCR

총 RNA는 냉동한 마우스의 자궁 경부를 TRIzol 용액(79306; Qiagen, CA, USA)에서 균질화시킨 후 추출하였다. RNA 농도를 측정하고, 260/280 nm에서 NanoDrop 분광광도계(Thermo scientific, Massachusetts, USA)를 사용하여 순도를 확인하였다. cDNA 합성은 총 RNA 1 μ g을 사용하여 수행되었다. PCR 증폭은 SYBR Green (TOPreal qPCR 2x PreMIX; Enzynomics, Daejeon, South Korea)을 사용하여 수행되었다. 정량적 실시간 PCR은 CFX96™ real-time system (Bio-Rad, CA, USA)을 통하여 수행되었다. qRT-PCR 분석은 샘플당 3회씩 반복 수행되었다. 타겟 유전자에 대한 프라이머의 서열은 하기 표 1에 기재하였다.

표 1

정량적 실시간 PCR에 사용된 마우스 프라이머 서열

유전자	방향	서열(5' to 3')	SEQ ID NO
GAPDH	Forward	TTGAGGTCAATGAAGGGGTC	1
	Reverse	TCGTCCCGTAGACAAAATGG	2
ER α	Forward	CCTCCCGCCTTCTACAGGT	3
	Reverse	CACACGGCACAGTAGCGAG	4
ER β	Forward	CTGTGATGAACACTACAGTGTCCC	5
	Reverse	CACATTGGGGCTTGCAGTCTG	6
PR	Forward	CTCCGGG1ACCGAACAGAGT	7
	Reverse	ACAACAACCCCTTGGTAGCAG	8

4. 단백질 추출 및 웨스턴 블랏

NS 또는 LPS를 주사한 임신한 마우스의 자궁 경부를 프로테아제 억제제 카테일을 포함하는 RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% SD, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA; Biosesang, Sungnam, South Korea)에서 균질화 하였다. 조직은 15℃에서 19,000 g 로 15분간 원심분리되었다. 단백질 농도는 브래드포드 방법(Protein assay dye reagent concentrate buffer; Bio-Rad, CA, USA)을 사용하여 정량화되었다. 단백질(레인 당 20 μ g)은 8% SDS PAGE 겔에서 100V로 전기영동하여 분리되었다. 사이즈 분별을 위해 Pre-stained marker(161-0374; Bio-Rad, CA, USA)를 포함시켰다. 전기영동이 완료된 겔은 니트로 셀룰로오스 멤브레인으로 100V에서 120분간 트랜스퍼하였다. 멤브레인은 3% 스킵 밀크로 블로킹하고, TBS-T(Tris-완충식염수 및 Tween 20)로 희석한 후, 1차 항체로 처리하여 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다: ER α (1:1000, sc8005; Santa Cruz, Texas, USA), ER β (1:1000, sc8974; Santa Cruz), PR (1:250, MA1-410; Invitrogen, CA, USA), HPRT (1:1000, sc376559; Santa Cruz), 및 β -actin (1:1000, sc47778; Santa Cruz). 1차 항체와 인큐베이션 된 멤브레인을 TBS-T (pH 7.4)로 세척하고, HRP로 컨쥬게이션 된 항-마우스 및 항-토끼 2차 항체(1:5000; Jackson Immuno Research, PA, USA)로 2시간 동안 인큐베이션하였다. 밴드는 화학발광을 이용하여 검출하였다. 블롯은 ECL 키트 (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate; Thermo scientific, Massachusetts, USA)를 이용하여 현상하고, 의료용 X-레이 필름 (EA8EC; Agra-Gevaert, Mortsel, Belgium)에 노출시킨 후

Image J software를 사용하여 분석하였다.

[0086] **5. 면역조직화학 및 점수화**

[0087] 4% 완충 포르말린에서 1시간 동안 고정시키고 파라핀 블록으로 포매된 조직의 조직학은 다음과 같이 분석되었다. 파라핀 블록을 4 μ m의 절편으로 세절하고, 실란(silane) (5116-20F; MUTO, Tokyo, Japan)으로 코팅된 슬라이드 위에 마운팅한 후 염색하였다. 모든 슬라이드들은 현미경 (BX61; Olympus, Tokyo, Japan)으로 분석하였다. 파라핀으로 포매된 절편은 ER α (1:35, M7047; Dako, CA, USA), ER β (1:30, sc8974; Santa Cruz), 및 PR (1:70, sc538; Santa Cruz) 항체로 염색되었다. 절편들은 자일렌으로 왁스를 제거하고, 농도구배 에탄올로 재수화시켰다. 다음으로 절편들을 수돗물로 세척하고, 15분간 구연산 완충액에서 가열한 후, 실온에서 30분간 두었다. 절편들을 0.1% H₂O₂ 로 10분간 처리하여 내재적인 퍼옥시다아제를 블로킹하고, Tris 완충 생리식염수 (Tween 20, 1x, pH 7.4; Scytek, UT, USA)로 세척한 후, Super block (Scytek, UT, USA)으로 10분간 블로킹하였다.

[0088] ER α , ER β , 및 PR의 수준은 절편들을 ER α , ER β , 및 PR에 대한 1차 항체와 인큐베이션하여 측정하였다. 이어서, 절편들을 Tris 완충 식염수로 세척하고, 비오틴화된 2차 항체와 인큐베이션하였다. 발색은 슬라이드를 DAB 시약과 인큐베이션하여 이루어졌다. 절편들은 헤마톡실린으로 역염색, 탈수, 및 마운팅되었다. 모든 단계는 실온에서 수행되었다. 절편들은 Rotary Microtome (RM2255; Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 분석되었다. 면역염색 점수는 발색 수준에 따라 0에서 3까지 평가되었다. 점수화는 염색의 강도에 기초하여 다음과 같이 이루어졌다:

[0089] 음성(0) - 염색이 되지 않거나 10% 미만이 염색;

[0090] 약한 염색(+1) - 10% 초과 부분이 염색;

[0091] 약함 내지 중간 염색(+2) - 34% 초과 부분이 염색; 및

[0092] 강한 염색(+3) - 67% 초과 부분이 염색.

[0094] **6. 혈청 호르몬의 정량**

[0095] 혈액을 수집하여 3,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 혈청을 분리하고 -80°C에서 보관하였다. 혈청 에스트론 (Serum estrone, E1), 17 β 에스트라디올 (17 β estradiol, E2), 에스트리올 (estriol, E3), 및 프로게스테론 (P4) 수준은 ELISA를 사용하여 확인하였다. Mouse E1 ELISA kit (1:50, MBS766232; Mybiosource, CA, USA), E2 ELISA kit (ab108667; Abcam, MA, USA), E3 ELISA kit (KA0316; Abnova, Taipei, Taiwan), 및 P4 ELISA kit (1:300, ADI-900-011; Enzo, NY, USA)가 제조사의 지침에 따라 사용되었다. 혈청 E3는 결과를 표시하지는 않았으나, 반복된 실험에도 검출되지 않았다.

[0097] **7. 통계적 분석**

[0098] 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현되었다. 각 실험의 결과들은 ANOVA(one-way analysis of variance)를 사용하여 분석하였고, 평균은 Tukey's and Duncan post hoc multiple comparisons으로 비교하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정하였다. 통계적 분석은 SPSS 소프트웨어를 사용하여 수행하였다 (version 13.0; SPSS Inc, Chicago, IL).

[0100] **결과**

[0101] **1. 자궁 경부에서 ER 및 PR의 mRNA 발현**

[0102] 자궁 경부에서 ER 및 PR의 mRNA 발현은 정량적 PCR을 이용하여 측정하였다. 유사한 패턴은 ER α 및 ER β 의 발현에서 발견되었다. Ex 및 LPS 군에서 ER α 및 ER β 의 발현은 sham과 다른 그룹에서 유사하게 나타났다 (도 1a, 및 도 1b). 자궁 경부에서 PR의 발현은 sham 군에서보다 Ex 및 LPS 군에서 더 낮게 나타나는 경향이 있었다. Ex + LPS 군에서의 자궁 경부 PR 발현은 sham 군보다 유의적으로 낮았다 (도 1c).

[0104] **2. ER 및 PR의 단백질 수준**

[0105] Ex군의 ER α 발현은 sham 군 및 LPS 군보다 유의하게 높았다 (도 2a). 자궁 경부의 ER β 발현은 군간에 차이가 없었다 (도 2b). Ex 및 Ex + LPS 군에서의 PR-A 발현은 sham 및 LPS 군에서의 발현보다 유의하게 낮았다 (도 2c). Ex 및 Ex + LPS 군에서의 PR-B 발현은 LPS 군에서의 발현보다 유의하게 낮았다 (도 2d). PR-A와 PR-B는 그룹 간에 유사한 발현 양상을 보였으므로 그룹 간의 PR-A/PR-B는 유의적인 차이가 없었다 (도 2e).

[0107] 3. 자궁 경부에서 ER 및 PR 수용체의 국소화 및 발현(Localization and expression of ER and PR receptors in the cervix)

[0108] 자궁 경부에서 성 호르몬 수용체의 발현 경향을 보다 구체적으로 파악하기 위하여, 본 발명자들은 면역조직화학을 이용하였다. 구체적으로, ER과 PR의 발현 수준과 부위를 확인하기 위해, 자궁 경부를 근위 및 원위로 나누어 조직 절편을 제작하였고, 절편당 3 부위를 무작위로 선택하여 ER 및 PR 발현을 평가하였다. 발현의 평균값을 계산하였다. 보다 구체적으로는, 상피 세포 (epithelium, EPI)와 평활근 세포 (smooth muscle layer, SML)의 발현 수준을 구별하여 기록하였다.

[0109] Ex + LPS 군에서 근위부 자궁 경부의 SML의 ER α 발현은 sham 군보다 높았다. 그러나 EPI에서는 차이가 없었다 (도 3a-3c). 그룹 간의 ER β 발현은 차이가 없었다 (도 3d-3f). 근위 경부의 EPI에서 PR 발현은 Ex + LPS 군에서 sham 군보다 유의하게 낮았다. 그러나 자궁 경부 EPI에서는 차이가 없었다 (도 3g-3i). 근위 경부 EPI에서의 ER과 PR의 비율(ER α /PR)은 Ex + LPS군에서 sham과 LPS 군보다 유의하게 높았다 (도 4).

[0110] 상기 결과로부터, 조산의 경우 근위부 자궁 경부의 평활근에서 ER α 의 발현이 증가되고, 근위부 자궁 경부의 상피세포에서 PR의 발현이 감소됨을 알 수 있다.

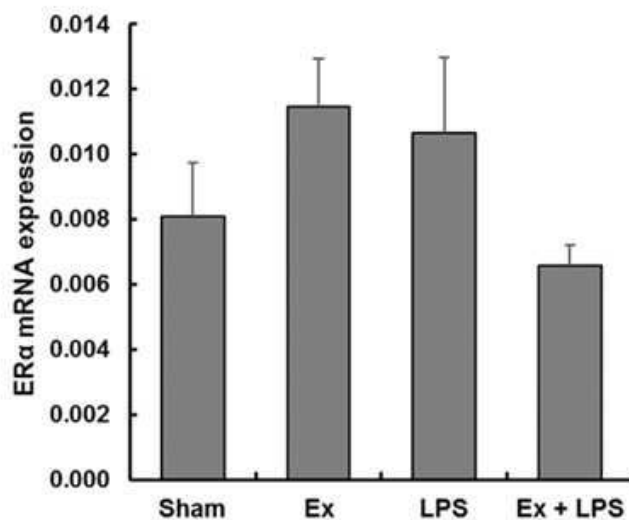
[0112] 4. 모체의 에스트로겐 및 프로게스테론의 혈청 내 수준

[0113] 에스트론(E1)은 Ex 군과 Ex + LPS 군에서 sham 군보다 낮았다 (도 5a). 17 β 에스트라디올 수준은 그룹 간에 차이가 없었다 (도 5b). Ex, LPS 및 Ex + LPS 군에서 프로게스테론(P4) 수준은 sham 군보다 유의하게 낮았다 (도 5c).

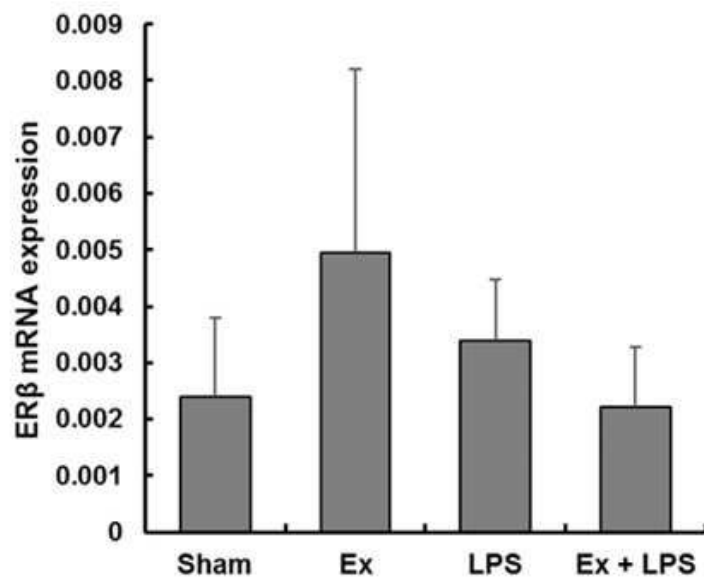
[0114] 상기 결과로부터, 조산의 경우 모체의 에스트론(E1) 및 프로게스테론(P4)의 혈청 내 수준이 감소함을 알 수 있다.

도면

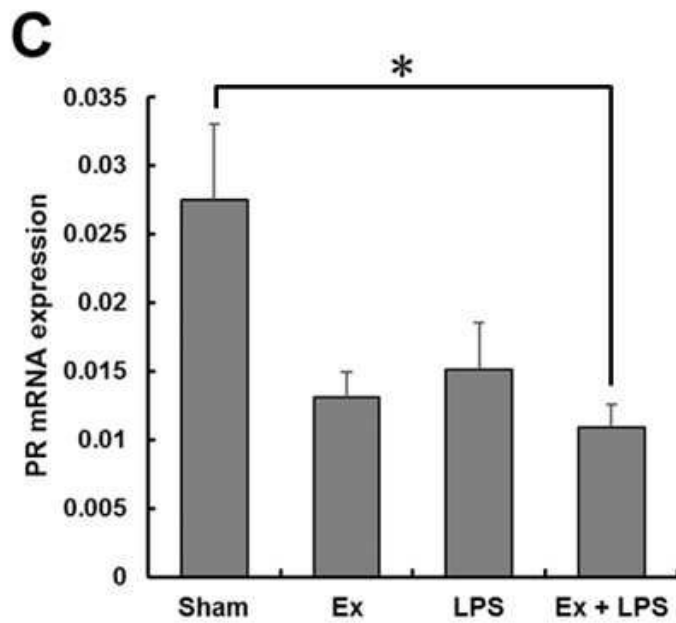
도면1a



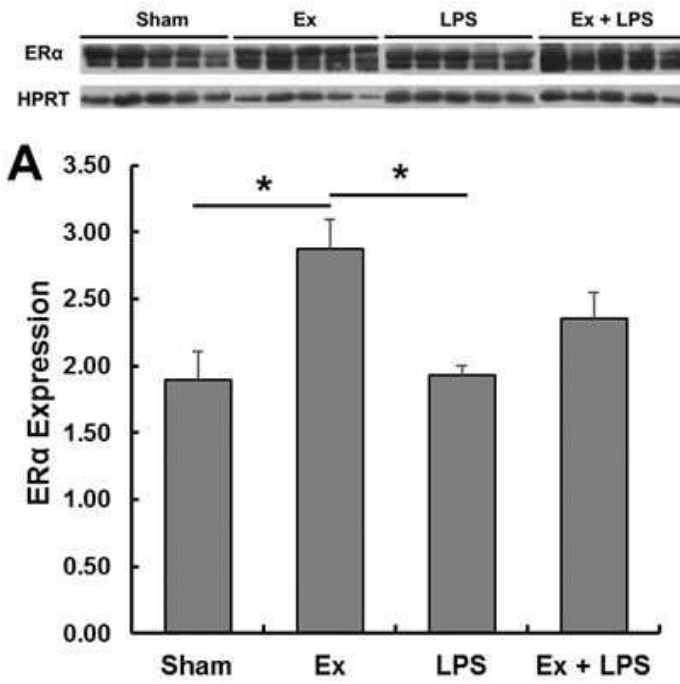
도면1b



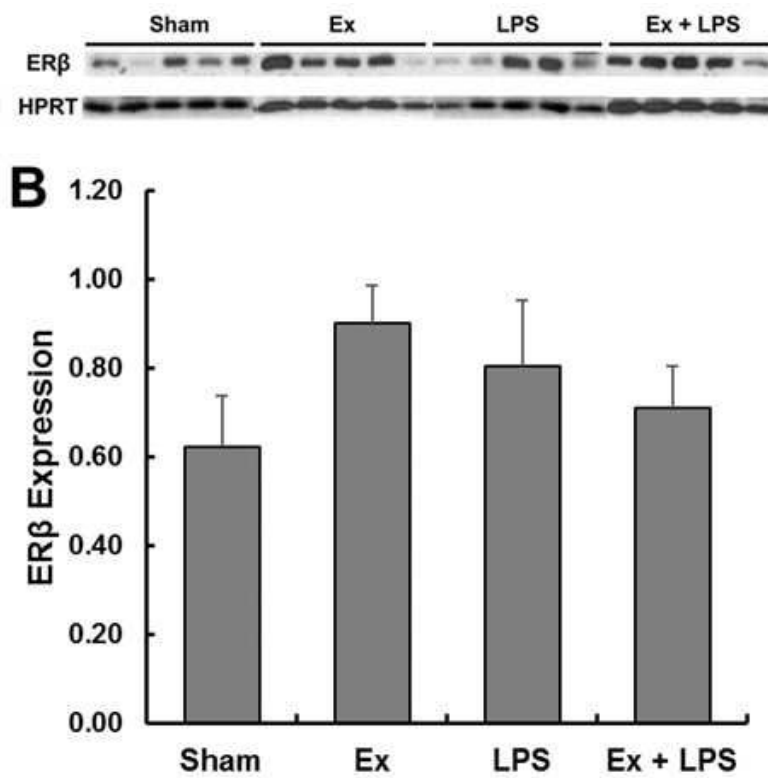
도면1c



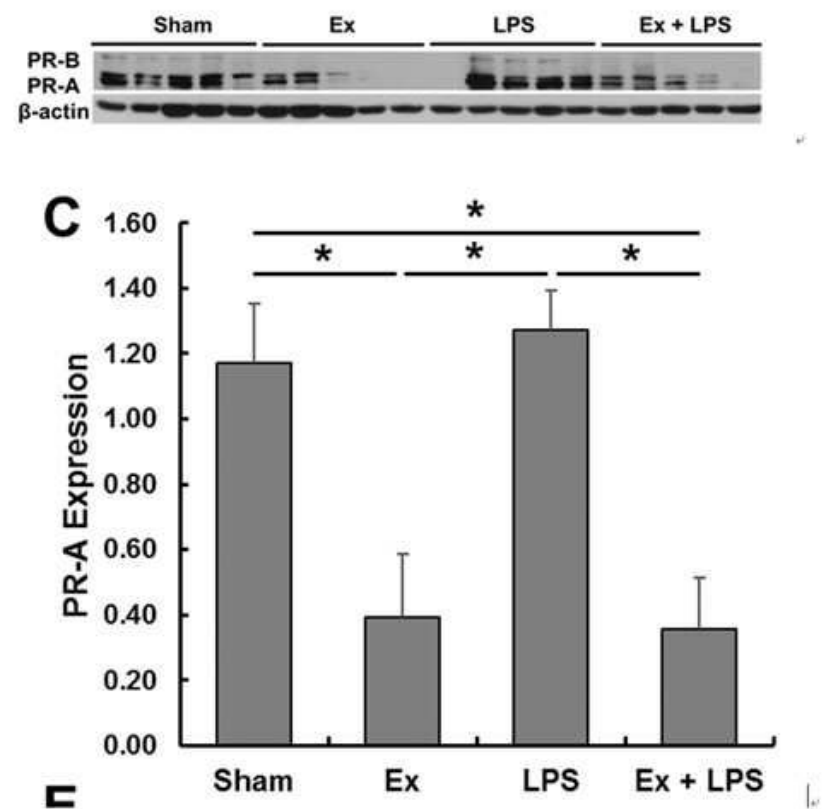
도면2a



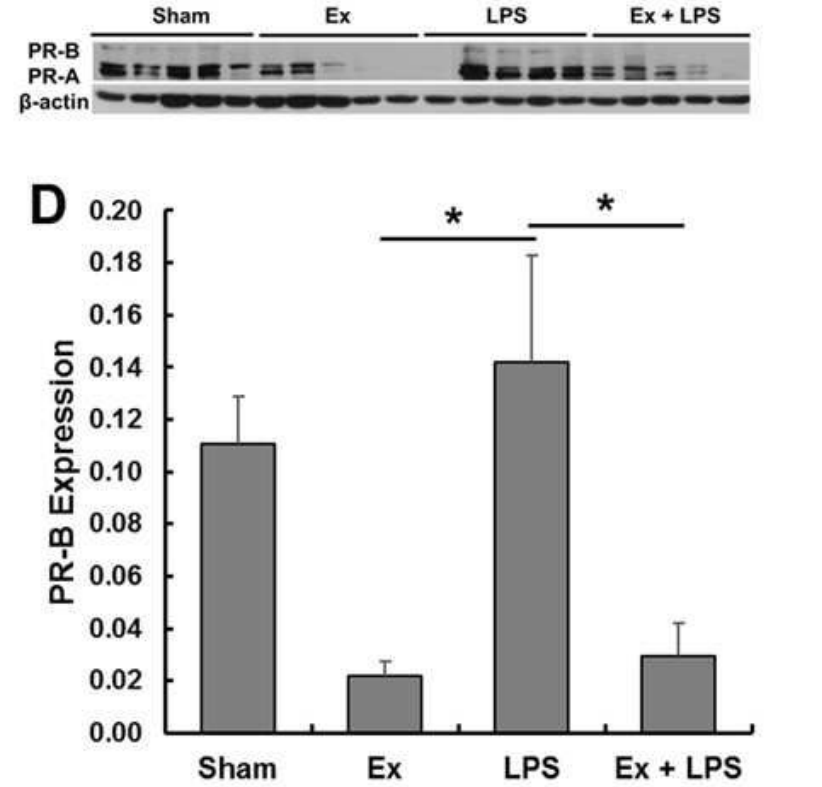
도면2b



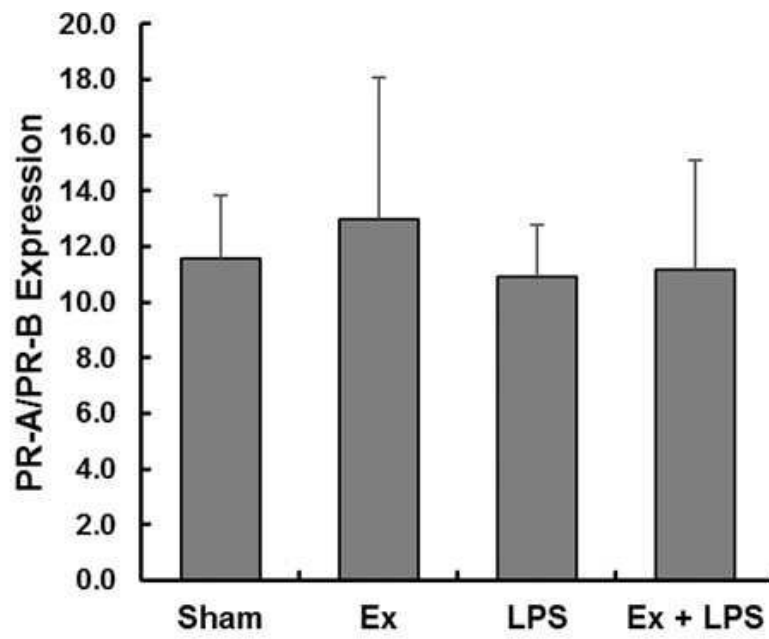
도면2c



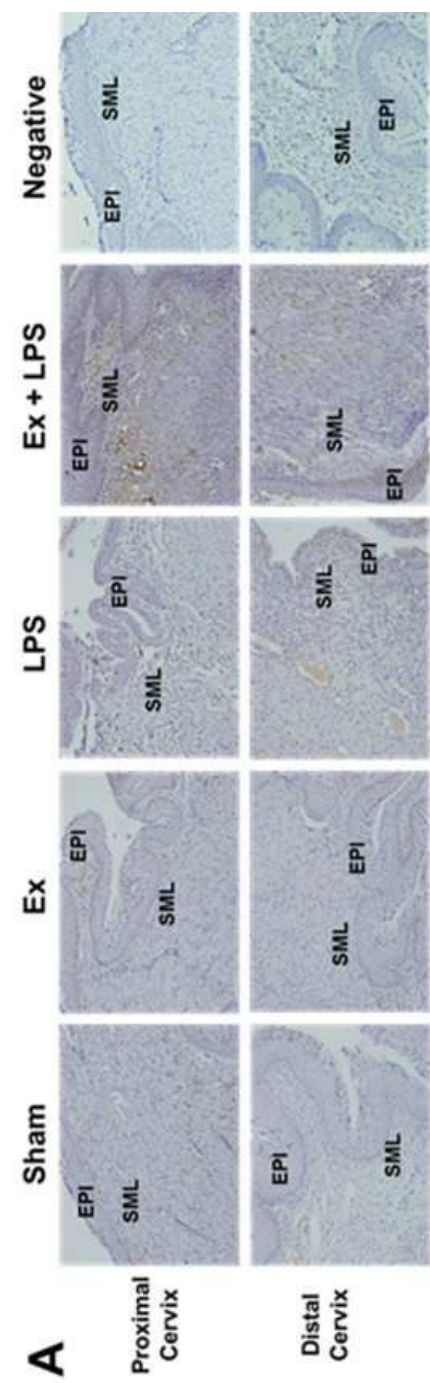
도면2d



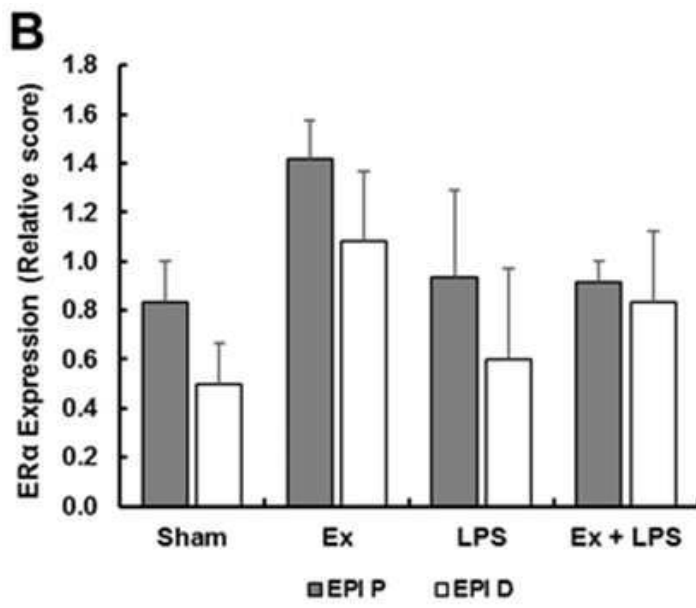
도면2e



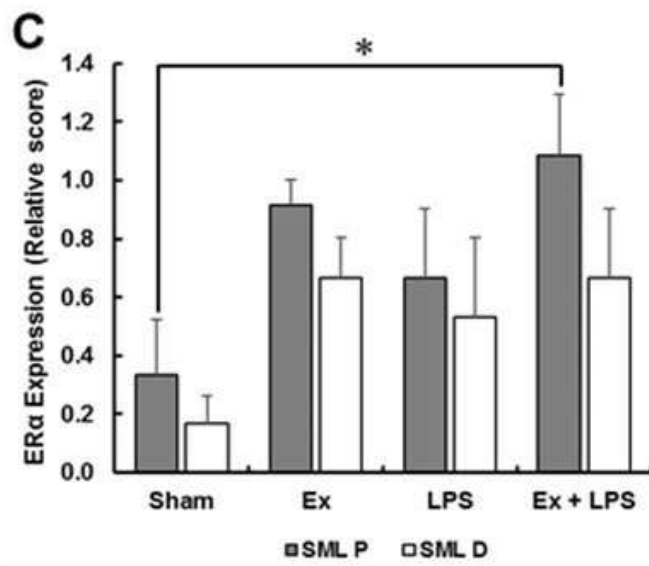
도면3a



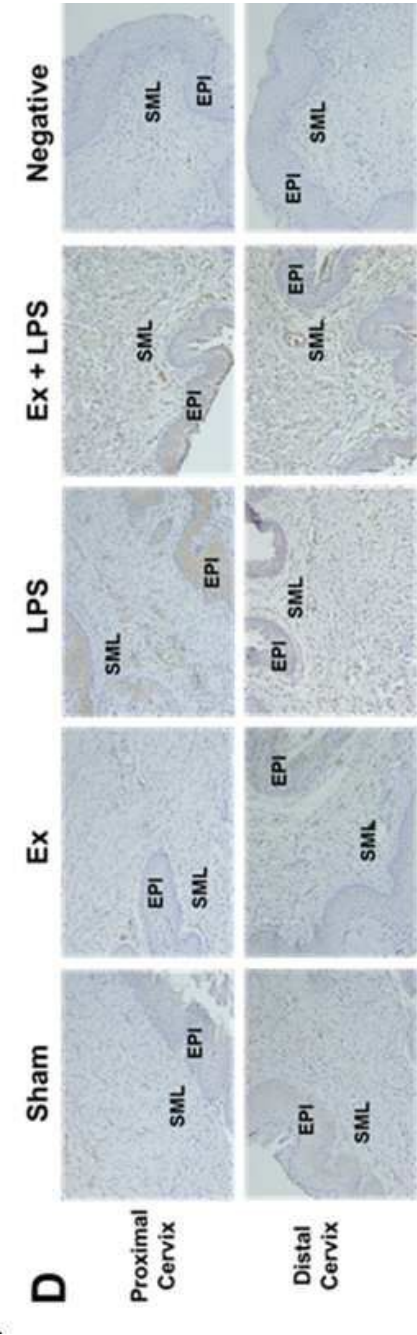
도면3b



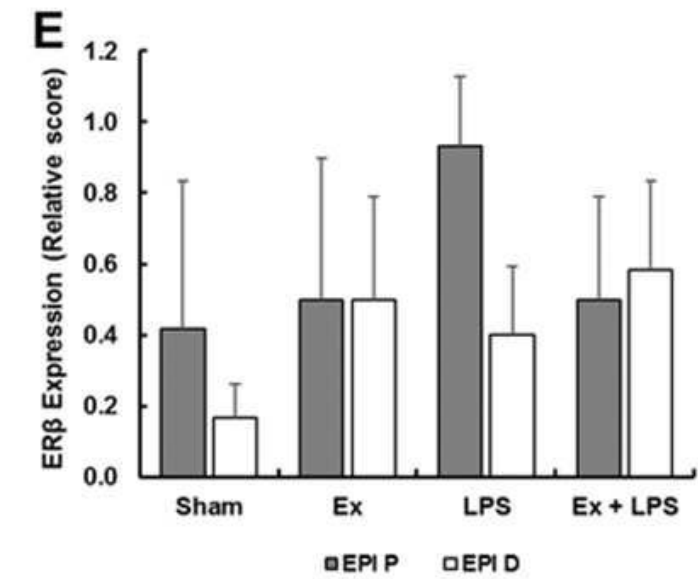
도면3c



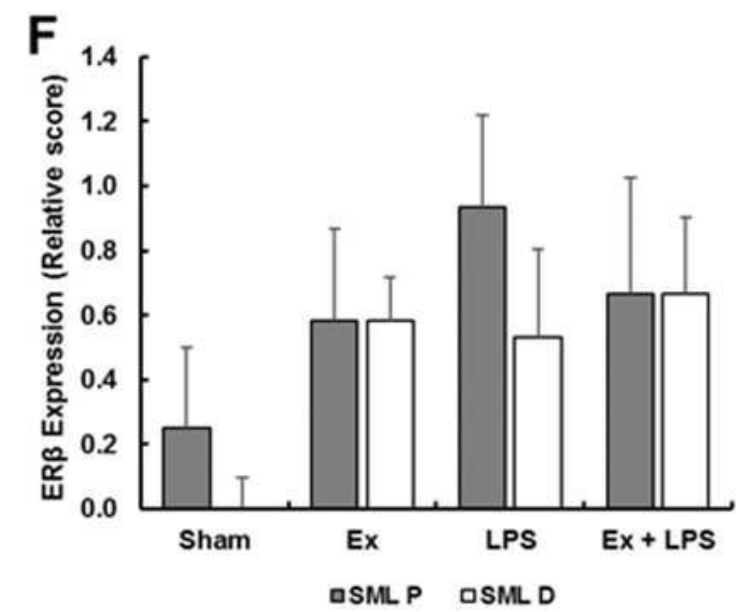
도면3d



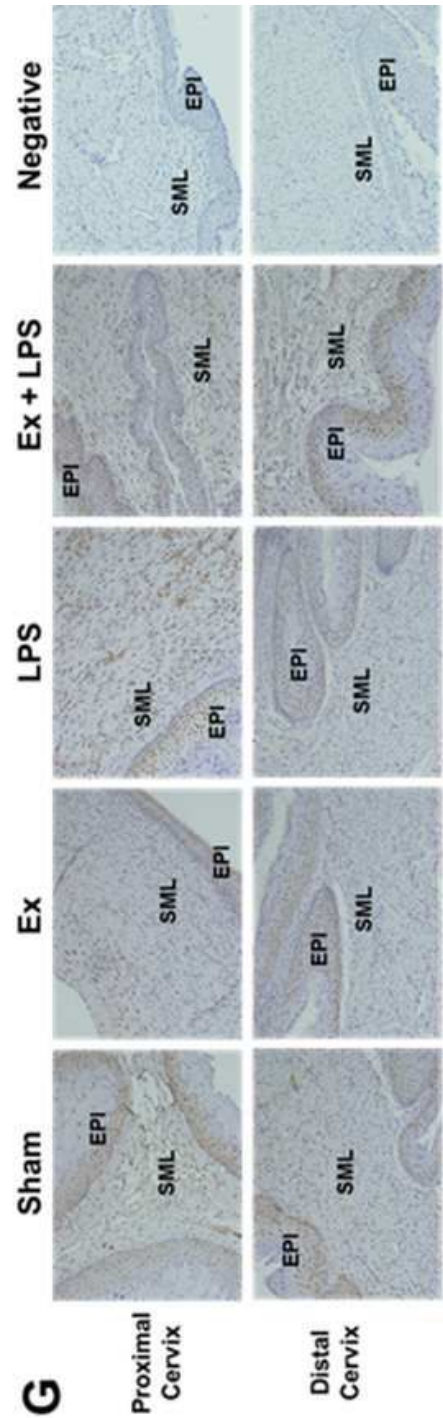
도면3e



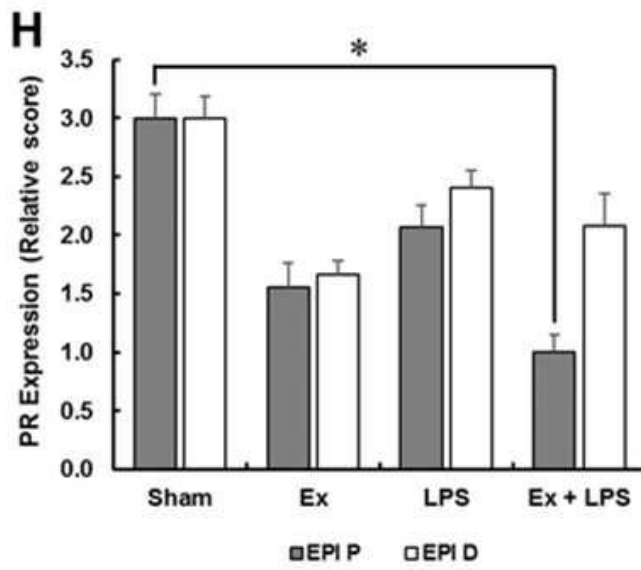
도면3f



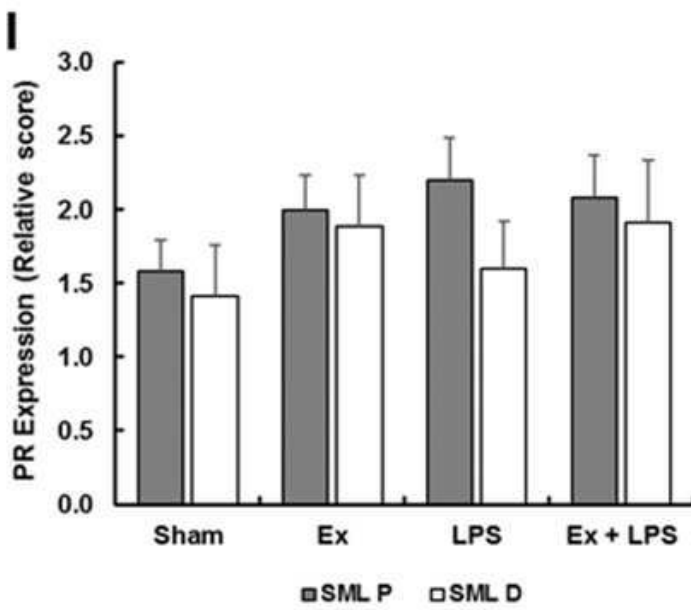
도면3g



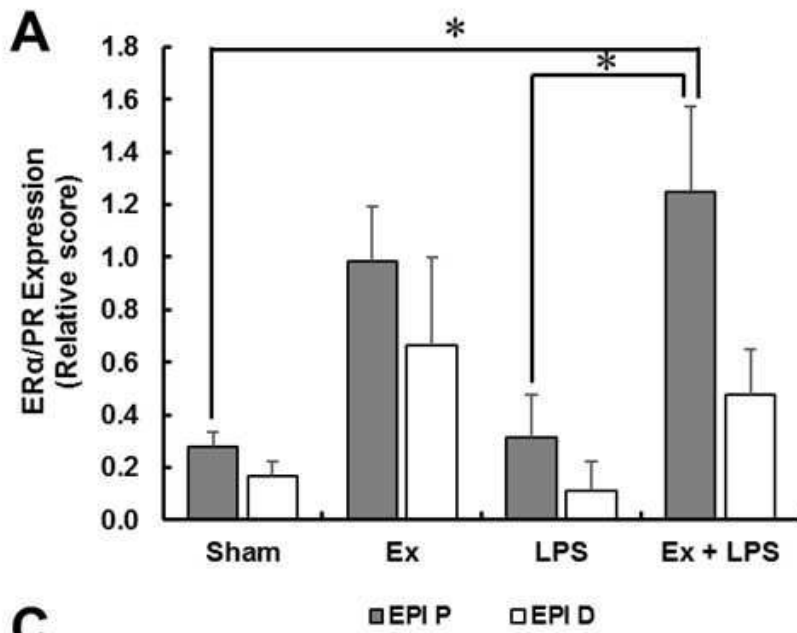
도면3h



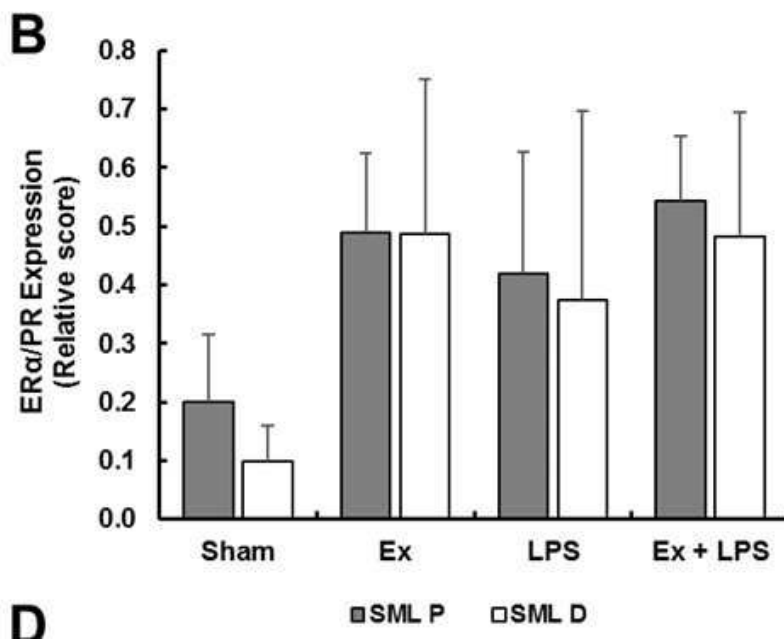
도면3i



도면4a

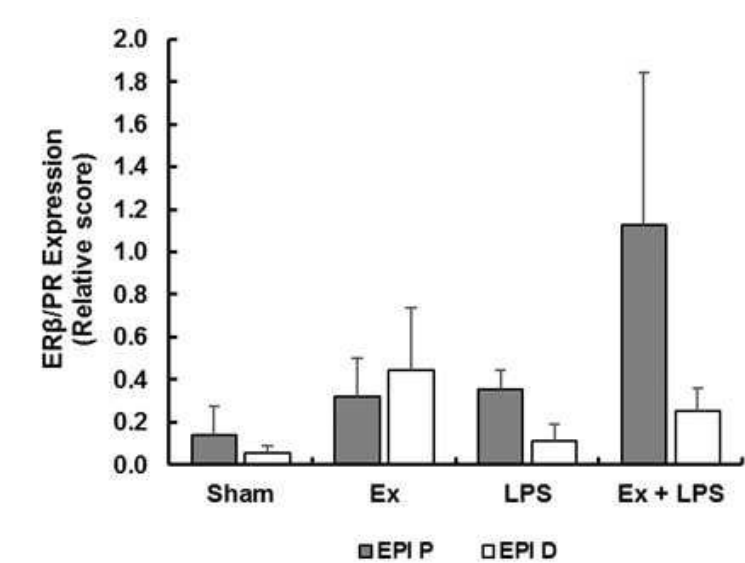


도면4b

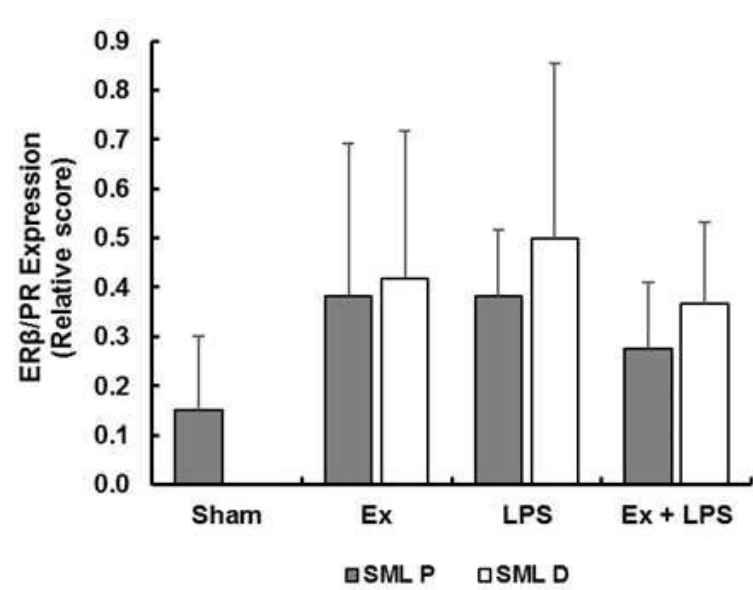


D

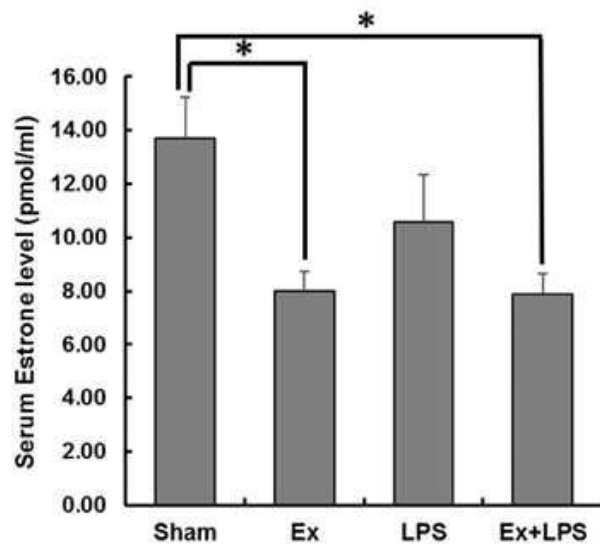
도면4c



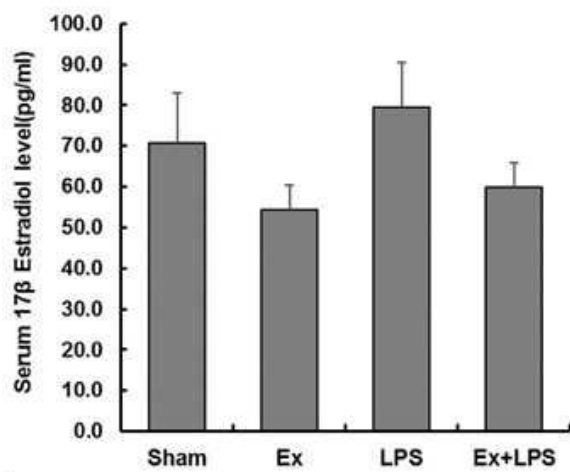
도면4d



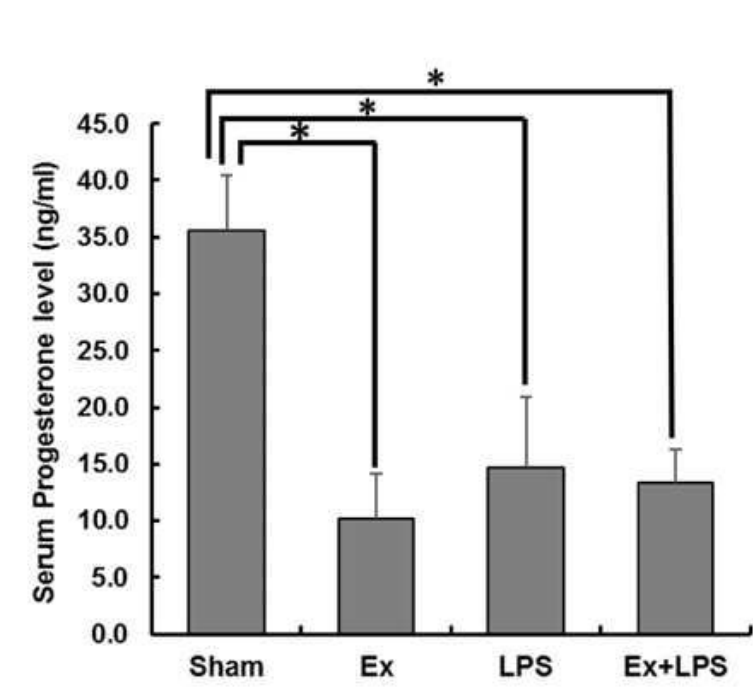
도면5a



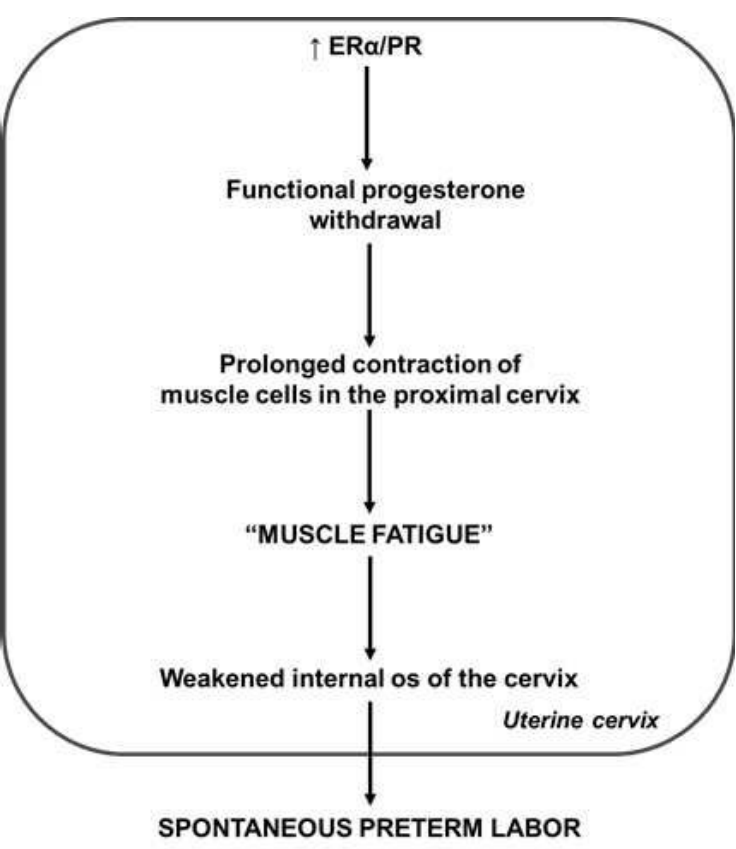
도면5b



도면5c



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method and Kit for diagnosing preterm birth

<130> PN190094
 <160> 8
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH forward primer
 <400> 1
 ttgaggtcaa tgaaggggtc 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH reverse primer
 <400> 2
 tcgtcccgta gacaaaatgg 20

 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ER alpha forward primer
 <400> 3
 cctccgcct tctacaggt 19
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ER alpha reverse primer
 <400> 4
 cacacggcac agtagcgag 19
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> ER beta forward primer

<400> 5

ctgtgatgaa ctacagtgtt ccc 23

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ER beta reverse primer

<400> 6

cacatttggg cttgcagtct g 21

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR forward primer

<400> 7

ctccgggacc gaacagagt 19

<210> 8

<211>

21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PR reverse primer

<400> 8

acaacaacc tttgtagca g 21