(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0092693
(43) 공개일자 2014년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0005068
(22) 출원일자 2013년01월16일
심사청구일자 2013년01월16일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
주식회사 그래미
강원도 철원군 갈말읍 갈말로 32-30
(72) 발명자
황적준
경기도 구리시 아치울길 107 (아천동)
남종현
서울 송파구 양산로8길 24, 207동 502호 (거여동, 거여2단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 5 항

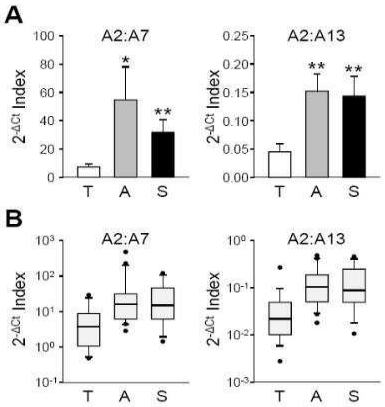
(54) 발명의 명칭 **열충격단백질군의 mRNA 발현 양상 분석을 통한 사인 추정방법**

(57) 요 약

본 발명은 열충격단백질군(Heat shock proteins, HSPs)의 mRNA 발현 양상을 이용한 사인 추정방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 사체의 뇌 조직에서 HSPs 이성질체의 mRNA 발현비율을 분석비교하여 사망원인을 추정하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 사인을 알 수 없는 사체부검 시 HSPs 이성질체의 발현비율을 측정함으로서 사망원인을 추정할 수 있어 법의학적으로 유용하다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

손기훈

서울 영등포구 도신로 68, 105동 807호 (신길동, 신길우성아파트)

고광수

서울특별시 은평구 통일로73길 5-9 대림월드빌 102호 (대조동)

정옥희

서울특별시 성북구 삼선교로23길 23, 103동 507호 (삼선동4가, 코오롱아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

사체의 뇌 조직에서 추출된 열충격단백질(HSPs) 이성질체인 HSPA2, HSPA7 및 HSPA13 간의 발현비율을 분석하여 사망원인을 추정하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 사망원인은 외상성 부상(TI), 기계적 질식(ASP), 급성심장사(SCD)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, HSPA2:HSPA7의 발현비율이 1.4992~4.4342이거나, HSPA2:HSPA13의 발현비율이 0.00867~0.02413인 경우, 사망원인은 외상성 부상(TI)로 추정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, HSPA2:HSPA7의 발현비율이 9.3628~45.7326이거나, HSPA2:HSPA13의 발현비율이 0.0657~0.1831인 경우, 사망원인은 기계적 질식(ASP)으로 추정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 사체의 뇌 조직은 28S rRNA:18S rRNA의 비율이 1.0~1.2인 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 열충격단백질군(Heat shock proteins, HSPs)의 mRNA 발현 양상 분석을 통한 사인 추정방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 사체의 뇌 조직에서 HSPs 이성질체의 mRNA 발현비율을 분석비교하여 사망원인을 추정하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지난 수 십년 동안 법의학분야 특히, 법의유전학분야는 분자생물학적 지식의 축적과 분석기법의 진보에 의해 매우 빠르게 발전해 왔다. 대체적으로 안정적이기 때문에 다루기가 용이한 DNA에 비해, 반감기가 짧고 RNA 분해효소 (Ribonuclease; RNase)에 의해 보다 쉽고 빠르게 분해가 일어나 다루기가 어려운 RNA는 법의학 분야에서는 관심의 대상이 아니었다. 그러나 RNA가 기대했던 것보다 훨씬 안정적이라는 몇몇 보고에 의해 법의학자들은 RNA 연구에 대한 관심이 증가하게 되었다(Pardue *et al.*, *Cell Mol Neurobiol* 14:341, 1994; Castensson *et al.*, *Genome Res* 10:1219, 2000; Trotter *et al.*, *Brain Research* 942:120, 2002). 특히, 사후 RNA 발현양상은 기존의 형태학적, 병리학적 검사와 더불어 진보된 분자 부검을 지지하는 법의학의 새로운 분야로 대두되고 있으며, RT-PCR(reverse transcription - polymerase chain reaction)의 개발로 인해 mRNA 검출의 민감도와 정확도가 개선되면서 다른 생화학 물질들에 비해 즉각적인 반응성, 화학적 안정성 및 정량분석에서의 기술적 편의 측면에서 장점을 가지고 있다. 지금까지는 사망의 원인과 죽음에 이르는 과정, 생존 기간, 사후경과시간(PMI), 그리고 질병 및 부상의 병리생리학적 조건들을 포함하는 법의학에서의 필수적인 문제를 해결하기 위해 죽음의 순간에

발현되는 유전자에 대한 광범위한 연구들이 수행되었다(Maeda *et al.*, *Forensic Sci Int* 203:83, 2010; Vennemann and Koppelkamm, *Forensic Sci Int* 203:71, 2010). 예를 들어, immediate early genes (IEGs), hypoxia-inducible factor-1 (HIF1), erythropoietin (EPO), vascular endothelial growth factor (VEGF), glucose transporter-1 (GLUT1), surfactants (SP) 그리고 dual specificity phosphatase 1 (Dusp1) 등 유전자의 사후 발현양상은 사망의 원인과 상황에 관련이 있다고 제안되었다(Ikematsu *et al.*, *Leg Med (Tokyo)* 8:128, 2005; Zhao et al., *Leg Med (Tokyo)* 8:258, 2006; Zhao *et al.*, *Forensic Sci Int* 177:176, 2008; Ikematsu et al., *Forensic Sci Int* 179:152, 2008; Takahashi *et al.*, *Leg Med (Tokyo)* 11:181, 2009; Zhao *et al.*, *Leg Med (Tokyo)* Suppl 1:S290, 2009; Miyazato *et al.*, *Int J Legal Med* 126:581, 2012). 그러나 핵산 생체 마커를 이용하여 살아있는 사람의 체액이나 조직을 동정하는 것과는 달리(Juusola and Ballantyne, *Forensic Sci Int* 135:85, 2003; Zubakov *et al.*, *Int J Legal Med* 122:135, 2008; Haas *et al.*, *Forensic Sci Int Genet* 3:80, 2009; Zubakov et al., *Int J Legal Med* 124:217, 2010; Courts and Madea, *J Forensic Sci* 56:1464, 2011), 죽음의 과정에서 사후의 유전자 발현양상에 근거한 분자병리학적 검사를 적용하는 것은 여전히 과제로 남아있다. 민감도와 표준화에 대한 어려움을 해결하는데 있어 기술적인 진보에도 불구하고(Catts, *Brain Res Mol Brain Res* 138:164, 2005; Lee *et al.*, *FASEB J* 19:1356, 2005; Heinrich *et al.*, *Int J Legal Med* 121:136, 2007) 죽는 순간의 분자병리학적 이해가 부족하고 잘 정립된 법의학적 RNA 생체마커는 여전히 없는 실정이다.

[0003] 따라서 생사중간기반응(supravital reaction)과 같은 치명적인 결과에 반응하는 사전(agonal) 반응은 세포손상에 주로 관여하고 있기 때문에 세포의 스트레스를 매개로 하는 사후 RNA 발현양상에 대한 변화를 검사하는 것은 가치가 있다. 실제로, 세포의 스트레스 반응, 단백질 생합성, 세포주기 조절 및 세포사멸에 관련된 주요 세포의 대사경로가 급성 사후 기간 중에 유도되는 현상이 유전체 및 단백질체 분석을 통해 확인된 바 있다(Sanoudou *et al.*, *Physiol Genomics* 16:222, 2004; Bjarnadet *et al.*, *J Agric Food Chem* 58:7408, 2010; Jardine *et al.*, *Physiol Genomics* 43:974, 2011).

[0004] HSPs는 온도의 증가, 방사선, 독성 물질에 노출, 산화 스트레스와 각종 생리와 병리학적 자극과 같은 세포의 광범위한 stress에 대항하는 세포 stress 반응을 중재하는 중추적인 역할을 한다(Calabrese *et al.*, *Antioxid Redox Signal* 8:444, 2006; Anne Stetler *et al.*, *Prog Neurobiol* 92:184, 2010; Romi *et al.*, *Eur Neurol* 66:65, 2011). HSP는 HSPAs/HSP70s, HSPBs/small HSPs, HSPCs/HSP90s, HSPD/HSP60, HSPE/HSP10와 HSPHs/HSP105/110처럼 분자무게와 구조적 특성에 따라서 수십개의 subfamily로 분류할 수 있다. HSPs는 원래 stress에 유도되는 단백질로 발견되었지만, 현재 그 중 일부는 heat shock factor-1 (HSF1)의 통제하에 유도되는 것으로 잘 알려져 있는 반면, 그외 다른 HSPs는 housekeeping으로서의 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다(Fujimoto and Nakai, *FEBS J* 277:4112, 2010; Anne Stetler *et al.*, *Prog Neurobiol* 92:184, 2010).

[0005] 신경세포에서는 HSPs이 많이 발현되고, 에너지 항상성의 장애를 일으키는 hypoxia/anoxia와 같은 세포의 다양한 stress에 매우 취약하다. 또한 뇌조직은 사후의 유전자 전사물들이 상대적으로 안정적이고 더 오래된 PMI에서도 보존이 잘 되는 것으로 입증되었기 때문에 RNA의 추출과 정량적 분석으로 사후의 RNA profiling에 적용하기에 실질적인 이점이 있다(Leonard *et al.*, *Biol Psychiatry* 33:456, 1993; Heinrich et al., *Int J Legal Med* 121:136, 2007; Heinrich et al., *Forensic Sci Int Genet* 1:163, 2007; Popova et al., *BMC Genomics* 9:91, 2008).

[0006] 종래에는 심장질환 또는 기타 질병을 앓고 있는 환자의 혈액 샘플에서 유전자 발현양상을 확인하는 방법에 있어서 다수의 유전자 중 하나로 HSP를 사용한 기술(미국등록특허 US 8101358, 미국등록특허 US 8148072)과, 알츠하이머 질환 또는 뇌질환으로 사망한 사람의 뇌조직을 채취하는 시간 간격에 따라 HSP70의 발현량이 달라진다는 내용의 문헌(Pardue S *et al.*, *Cell Mol Neurobiol.* 14(4):341, 1994)이 있지만, HSP의 발현양상으로 사인을 추정하는 방법은 아직까지 보고된 바 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 사체 뇌조직에서 HSPs mRNA 전사물의 하위그룹을 정량적으로 분석하여 서로 다른 사망과정이 세포의 스트레스에 반응하는 HSPs mRNA 발현양상에 영향을 주는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 사체의 뇌 조직에서 HSPs의 발현양상을 분석하여 사망원인을 추정하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 사체의 뇌 조직에서 추출된 열충격단백질(HSPs) 이성질체인 HSPA2, HSPA7 및 HSPA13 간의 발현비율을 분석하여 사망원인을 추정하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, HSPs 이성질체의 발현비율을 측정함으로서 사망원인을 추정할 수 있어 법의학적으로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 사체의 뇌 조직에서 다양한 HSPs의 상대적인 mRNA level을 나타낸 것이다.

도 2는 서로 다른 사망원인에 의해 영향을 받은 뇌조직의 HSPs mRNA level을 나타낸 것이다.

도 3은 GAPDH와 각각의 HSPs mRNA levels의 상관관계와 그룹내의 개체 변이를 나타낸 것이다.

도 4는 서로 다르게 발현된 2개의 HSPs 유전자 전사물 사이의 상대적인 mRNA 발현량을 나타낸 것이다.

도 5는 TI와 ASP 대상들 각각의 profile들과 PMI 그리고 RNA 온전한 정도와의 관계를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 일 관점에서, 사체의 뇌 조직에서 추출된 열충격단백질(HSPs) 이성질체인 HSPA2, HSPA7 및 HSPA13 간의 발현비율을 분석하여 사망원인을 추정하는 방법에 관한 것이다.

[0013] 본 발명에서는 사망원인에 따라 사체 뇌 조직의 HSPs 발현비율에 차이가 있음을 real-time RT-PCR로 확인하고자 하였다.

[0014] 본 발명은 일 실시예에서 사체 뇌조직으로부터 유의하게 검출되는HSP family의 구성원을 동정하기 위해, 후두부의 대뇌피질 조직으로부터 total RNA를 추출하고 마이크로어레이 분석을 수행하였다. GAPDH에 대한 각각의 HSP 유전자의 상대적인 신호강도는 GAPDH의 신호강도의 % 정도로 계산하고 도식화하였다(도 1). 실험에 포함된 HSP mRNA 종 사이에, 70-kDa HSPs (HSP70s)를 암호화하는 HSPA subfamily에 속하는 몇몇의 구성원들(HSPA1A, A2, A4, A5, A8, A9 and A13)은 사후의 뇌조직에서 GAPDH보다 10%이상 높은 신호강도로 유의하게 검출되었다. 반면, HSP subfamily에 속하는 작은 HSP의 mRNA 전사물들은 거의 검출되지 않았고, 발현정도는 음성대조군 probe (GAPDH 전사물의 5%이하)의 평균신호강도와 비교하였다. HSPD1, H1 와 90AA1를 포함하는 또 다른 구성원들이 뇌조직에서 풍부하게 발현되었다. 유전자들의 발현 정도에 근거하여 12개의 HSP 유전자가 선택되었고, qRT-PCR분석을 진행하였다.

[0015] 본 발명은 다른 실시예에서 외상성 부상(TI), 기계적 질식(ASP), 급성심장사(SCD)의 세 가지 사망원인인 대상들로부터 선택된 HSP 유전자의 mRNA profile을 비교하였다(도 2, 표 1).

[0016] 분석한 HSP 유전자의 전사물들 사이에, HSPA2 mRNA의 양은 TI인 대상들에 비해 ASP와 SCD에서 거의 2배 (ASP: 201.73 ± 34.82% of the mean value of TI group; SCD: 184.83 ± 45.12) 정도로 유의하게 더 높은 반면, HSPA7와 A13 mRNA의 양은 ASP와 SCD 샘플 (ASP: 23.70 ± 4.35%; SCD: 21.08 ± 6.85%) 모두 유의하게 더 낮은 것으로 확인되었다. HSPA8, HSPH1 및 HSP90AA1를 포함하는 몇몇의 HSP mRNA 전사물은 큰 차이는 아니지만, SCD 그룹에서 유의하게 낮은 것으로 보였다.

[0017] 본 발명은 또 다른 실시예에서, 부검 검체의 정량적인 mRNA 프로파일링의 결과를 해석하는 데 있어서 이질성과

같은 사망 전에 존재하는 mRNA 질에 관계된 다양한 요인들이 주요한 문제가 될 수 있기 때문에, GAPDH와 같은 housekeeping 유전자를 기반한 표준화 방법으로 평가하기 위해, GAPDH의 순환임계(Ct) 값에 대한 상대적인 각각의 HSP mRNA의 Ct값을 구획하였고, 두 요인 사이에서 상관관계의 선형성을 조사하였다(도 3A, 표 2). HSPA4, A8, A9, H1 및 90AA1처럼 스트레스 자극에 상관없이 높은 기저 발현을 가지는 대부분의 HSP mRNA 종류는 그들의 풍부한 mRNA에서 GAPDH와 강한 상관관계를 보이고 R^2 값은 보통 0.6 보다 높다. 그러나, 짧은 사후시간 동안에 발현이 높게 유도되는 것으로 잘 알려진inducible HSPAs (HSPA1A 와 A1B) 뿐만 아니라 서로 다르게 발현하는 HSPA2, A7 및 A13도GAPDH의 mRNA 발현과는 선형 상관관계가 적다는 것을 보여 주었다(Daugaard *et al.*, *FEBS Lett* 581:3702, 2007; Jardine *et al.*, *Physiol Genomics* 43:974, 2011). 이러한 결과는 다양한 범위로 부분적으로 분해되는 법의 RNA 샘플을 정량분석에 GAPDH mRNA에 의해 보정하는 방법을 적용할 수 있다는 것을 나타낸다. 또한, GAPDH의 mRNA와 상관관계가 적은 HSP의 mRNA종은 사망당시 또는 생사중간기반응 동안에 그들의 발현에 변화가 있을 수 있을 것으로 예측하였다.

[0018] 일부 HSP mRNA종은 사망 원인에 의해 그룹간에 유이한 차이를 보였지만, 선택된 HSP 유전자는 모두 그룹 내에서 큰변이를 보였다. HSP mRNA 전사물들이 서로 다르게 발현하는 것을 보여주는Box-and-whisker diagram에 따르면 한 그룹에서 측정된 값의 반 이상이 다른 그룹의 값과 중첩되어 분자 부검에 적용하기에는 그 식별력이 낮다는 것을 보여준다(도 3B). 또한, housekeeping mRNA에 비해 어떤 HSP 유전자의 mRNA가 상대적으로 더 많이 발현된다면 그것 자체만으로는 어떠한 유용한 정보를 제공하지 못할 것이라는 것을 의미한다.

[0019] 그러나, 뇌 HSPs 유전자 전사물의 구성을 변형하면 더 나은 해상도를 가진 좀 더 의미있는 지표가 될 수 있을 것이라 판단하고, 이를 확인하기 위하여, Ct 값의 차이를 계산하여 HSPA2와 A7 그리고 A2와 A13 사이에 상대적인 양의 비율을 비교하였다(도 4A). 왼쪽 panel들에서 보이는 것처럼, A7과 A13에 대한 HSPA2의 비율인 $2^{-\Delta Cq}$지수는 TI 그룹에 비해 ASP와 SCD의 대상들에서 더 높았다 (HSPA7에 대한 A2의 비율, TI 그룹의 평균값에 대하여 ASP: 728.07 ± 308.59% 그리고 SCD: 421.64 ± 45.12%; HSPA13에 대한A2의 비율, ASP: 309.82 ± 65.51% and SCD: 318.3672 ± 75.89%). 더욱이 비율들을 보여주는box-and-whisker diagram들은 TI와 다른 그룹 사이에 더 높은 해상도를 보여주며(도 4B), 두 경우 모두 그룹간에 중첩되는 부분이 거의 25% 감소되었다.

[0020] 본 발명은 또 다른 실시예에서, SCD의 경우 PMI가 다소 불확실하기 때문에 이를 제외하고 TI와 ASP 대상들 사이에 간에 PMI 혹은 RNA의 질과 본 발명의 결과와의 상관성을 더 자세히 분석하였다. TI와 ASP의 개체 결과와 PMI와의 상관관계를 비교하였을 때, 사망원인에 의해 HSPA2/GAPDH 비율에 대한 $2^{-\Delta Cq}$지수보다 HSPA2/A7 혹은 HSPA2/A13 비율에 대한 $2^{-\Delta Cq}$지수가 더 명확하게 나뉘었고, 나뉘어진 모양은 PMI에 의해 영향을 적게 받는 다는 것을 보여주었다(도 5A). 오히려, RNA의 보존 정도는 중요한 결정인자가 될 수 있다. 상대적으로 원래상태의 mRNA(28S:18SrRNA 비율에서 1.0이상)의 경우, HSPA2/A7 또는 HSPA2/A13에 대한 $2^{-\Delta Cq}$지수가 TI와 ASP그룹 사이에서는 명확하게 분리되었지만, A2/GAPDH에 대한 $2^{-\Delta Cq}$지수는 그러한 차이를 보이지 않았다(도 5B, 왼쪽 panels). 그러나, 몇몇 분해된 mRNA(28S:18SrRNA 비율에서 1.0 이하)를 확인하였을 때, 모든 지수에서 사망원인을 명확하게 구별할 수 없었다(도 5B, 오른쪽 panels). 따라서, housekeeping 유전자에 의해 보정된 mRNA의 상대적인 level보다는 HSP isoform들의 구성 변화가 사망원인을 구별하기에 더 높은 해상도를 가진 법의 분자 지수가 될 수 있음을 확인하였다.

[0021] [실시예]

[0022] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0023] **실시예 1 : 검체 및 조직 준비**

[0024] 국립수사연구원의 도움으로 법의 부검 사례들 중사후 4일 이내인 사체로부터대뇌피질의 후두부로부터 조직을 채취하였다. 본 연구에 포함된 검체의사망원인은 외상성부상(traumatic injuries; TI), 의사와 교사를 포함하는 급성기계적질식사 (acute mechanical asphyxia; ASP), 일반적인 형태적, 생화학적, 독성학적 소견이급성심장사(sudden cardiac death; SCD)로 분류된 검체들이다(표 1). 수집된 조직들은 즉시 RNAlaterTM solution (Qiagen

GmbH, Hilden, Germany)으로 제조사의 지시서에 따라 처리한 후 사용 전까지 -70℃ 냉동고에서 보관하였다.

[0025] **실시예 2 : Total RNA 추출**

[0026] -70℃ 냉동고에서 보관 중인 사체 뇌조직 20 mg을 cryo tube에 넣고, 액체 질소에 10분간 방치하여 급속 냉각시킨 후, SKMILL-200 (Tokken, Inc.)을 이용하여 조직을 분쇄한 후, RNeasy mini kit (Qiagen)를 사용하여 추출하였다. QIAzol lysis reagent 700 ㎕을 분쇄된 조직에 추가하여 실온에서 5분간 방치 후 chloroform 140 ㎕를 추가하고 15초간 잘 흔들어 섞어준 후 3분간 실온에서 방치하였다. 12,000 g (4 ℃)에서 20분간 원심분리 하여 상층액 320 ㎕를 새로운 tube에 옮기고, 70% ethanol을 480 ㎕를 추가한 다음 vortexing 하고 RNeasy Mini spin column에 잘 섞은 용액을 400 ㎕ 옮긴 후 8,000 g (실온)에서 15초간 원심분리 하였다. 남은 용액을 모두 RNeasy Mini spin column에 옮기고 8,000 g (실온)에서 15초간 원심분리 하였다. 700 ㎕ RWT buffer를 RNeasy Mini spin column에 추가하여 8,000 g (실온)에서 15초간 원심분리 하고, 500 ㎕ RPE buffer를 RNeasy Mini spin column에 추가하고 8,000 g (실온)에서 15초간 원심분리 하는 과정을 2회 반복하였다. RNeasy Mini spin column을 깨끗한 tube로 옮긴 후 30 ㎕ RNase-free water를 추가하고 2분간 실온에 방치 후 2분간 8,000 g 에서 원심분리하여 total RNA를 획득하였다.

[0027] **실시예 3 : 마이크로어레이(Microarray)**

[0028] 사체 뇌에서 풍부한 HSPs 유전자 전사물을 확인하기 위한 유전자 발현 profiling은 이전의 연구 방법을 약간 변형하여 마이크로어레이 분석하였다(Choe et al., 2011). 사체 뇌 RNA (임의로 선택된 18구의 사체 뇌 RNA 샘플을 동일한 양으로 섞은) 샘플은 마이크로어레이 분석을 위해 준비하였고, Total RNA 200ng을 사용하여 증폭하고 label하였다. AffymetrixGeneChip Expression Analysis Manual에 따라서 GeneChip Human Gene 1.0 ST arrays (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA)는 5g의 cDNA를 label, wash, stain, scan 하여 hybridized 되었다. 각 HSP 유전자의 정규화된 hybridization 농도는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 농도와 비교하여 분석하였다.

[0029] 마이크로어레이 분석에서 획득된 HSPs의 mRNA level은 GAPDH의 mRNA level로 보정되었다. 2개의 독립적인 반복실험으로부터 신호강도를 평균하고, log 값으로 GAPDH의 신호강도에 해당 %값으로 표현하였다. 음성대조군 probe의 신호에 기초하여 GAPDH의 5% 이상인 HSPs의 mRNA level은 유의하게 검출된 것으로 간주하였다(도 1).

[0030] **실시예 4 : qRT-PCR (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction)**

[0031] mRNA profile의 정량 분석은 이전에 발표된 논문을 변형하여 수행하였다(Choe et al., 2011). Total RNA 는 20~50 mg의 조직으로부터 RNeasy mini kit (Qiagen)를 사용하여 추출한 후, 분광도법으로 정량하였다. 5㎍의 total RNA는 1.2% denaturing agarose gel로 전기영동하였다. 28S와 18S rRNA의 감도는 Bio-1D image analysis software(Vilber-Lourmat, Cedex, France)를 사용하여 측정하였고, 28S에 대한 18S의 신호 비율은 mRNA의 온전한 정도를 나타내는 지표로 사용되었다(표 1).

표 1

[0032] **실험대상정보**

Group	Size	Male/female	Age (years)	28S/18S ratio
			Range (mean ± SE)	(mean $1^{3/4}$ SE)
Injury	n=19	13/6	32-64 (48.11 ± 2.20)	0.932 ± 0.043
Asphyxia	n=22	8/14	25-54 (40.77 ± 1.87)	0.877 ± 0.034
SCD	n=15	15/0	40-69 (53.33 ± 1.73)	0.849 ± 0.026

[0033] qRT-PCR을 위하여, MMLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI)를 사용하여 1 ㎍의 total RNA에 대해 random priming 방법으로 역전사를 수행한 후, 각각의 cDNA는 SYBR Green I (Life Technologies Corp., Madison, WI)을 사용하여 정량 real-time PCR을 수행하였다. PCR 반응액은 1X Gold buffer, 2.5 mM $MgCl_2$,

0.2mM each dNTP, 0.25 uM primer mix, 0.5X ROX (Life Technologies Corp.), 1X SYBR Green I (Life Technologies Corp.), 1.0 U Amplitaq Gold (Applied Biosystems), 2.0 ㎕의 cDNA를 포함하고 40 ㎕도록 멸균된 3차 증류수를 추가하여, 50 ℃ 2분, 90 ℃ 10분 반응시킨 후, 95 ℃ 15초, 62℃ 30초, 72 ℃ 30초,의 순환반응을 50회 실시하였다.

[0034] 기준 cDNA 샘플은 계단 희석하여 회기곡선을 구성하는데 이용되었고,HSP mRNA 발현 정도는 GAPDH에 의해 보정되었다. 모든 PCR 산물은 pGEM-T vector (Promega)로 clone을 만들고, sequencing하여 각각의 염기서열을 확인하였다. Real-time PCR에 사용된 primer의 염기서열은 서열번호 1 내지 서열번호 26으로 표시하였다.

[0035] 서열번호 1 : 5'-GCC TTT CCA AGA TTG CTG TT-3'

[0036] 서열번호 2 : 5'-TCA ACA TTG CAA ACA CAG GA-3'

[0037] 서열번호 3 : 5'-AGG GTG TTT CGT TCC CTT TA-3'

[0038] 서열번호 4 : 5'-CAT TCC CAG CCT TTG TAG TG-3'

[0039] 서열번호 5 : 5'-TCG AGG TGG CCG TTA GTT G-3'

[0040] 서열번호 6 : 5'-AAA GGC GAG CGA CGT TAG G-3'

[0041] 서열번호 7 : 5'-GCA ACA GCA GCA GAC ACC AGC A-3'

[0042] 서열번호 8 : 5'-GCC TTC TTG GCT TGG GGT GGT-3'

[0043] 서열번호 9 : 5'-CAA CCT GCT GGG GCG TTT TGA-3'

[0044] 서열번호 10 : 5'-CCG GCC CTT GTC ATT GGT GAT CTT-3'

[0045] 서열번호 11 : 5'-GGC ATA CCT CCT GCA CCC CGA-3'

[0046] 서열번호 12 : 5'-GTC TTC CTT GCT CAA ACG GCC C-3'

[0047] 서열번호 13 : 5'-TGG AAT GCC GGC CAA GCG AC-3'

[0048] 서열번호 14 : 5'-GCC TCA ACC CAG GCA TCA CCA-3'

[0049] 서열번호 15 : 5'-GCA CGC CTT GCG GAA AAG CA-3'

[0050] 서열번호 16 : 5'-GGC ATC TGG ACT CAT CCG CAG C-3'

[0051] 서열번호 17 : 5'-ACC GCA GAA GAG TTG GAG GCT GA-3'

[0052] 서열번호 18 : 5'-TCT GGG GAC ACT GTG ATG GTC TCA-3'

[0053] 서열번호 19 : 5'-TGG CCG TTA CAA TGG GGC CAA-3'

[0054] 서열번호 20 : 5'-AGC AGT GGT AGT GCC ATC CCC A-3'

[0055] 서열번호 21 : 5'-AGG AGT TCC ATA TCC AGA A-3'

[0056] 서열번호 22 : 5'-CAG CTC AAC ATT CAC CAC-3'

[0057] 서열번호 23 : 5'-AGC TCA AGC CCT AAG AGA CAA CT-3'

[0058] 서열번호 24 : 5'-AAG ATG ACC AGA TCC TTC ACA GA-3'

[0059] 서열번호 25 : 5'-GAA ATC CCA TCA CCA TCT TCC AGG-3'

[0060] 서열번호 26 : 5'-GAG CCC CAG CCT TCT CCA TG-3'

[0061] 뇌에서 풍부한 HSPs mRNA 종들은 외상성 부상(T), 기계적 질식(A), 혹은 급성심장사(S)에 의해 사망한 대상들에서 real-time qPCR방법으로 정량 분석하였다. 결과는 GAPDH mRNA level로 보정하고, T 그룹의 평균값을 1로 맞

추고, 임의의 단위로 평균± SE로 표기하였다(도 2, *: p<0.05 vs. T; †: p<0.05 vs. A).

[0062] **실시예 5 : GAPDH와 각각의 HSPs mRNA levels의 상관관계와 그룹내의 개체 변이**

[0063] HSPA2와 A8의 Ct 값은 GAPDH의 값에 대하여 그래프를 그리고, 선형회기는 각 그룹별로 수행하였다(도 3(A) TI: 회색, ASP: 빨간색 and SCD: 파란색 점). 기울기와 선형상관계수는 R2 로 표기하고 표 2에 요약하였다. 서로 다르게 조절된 3개의 HSPs의 상대적인 mRNA levels 은 log 값으로 box-and-whisker diagrams 에 의해 표기 되었다. 중간 값들은 상자 안의 선으로 표기 하였다(도 3(B)).

표 2

[0064] **HSPs 와 GAPDH mRNA 발현수준의 상관관계**

Gene name (*vs.* GAPDH)	Slope (R^2)		
	TI	ASP	SCD
HSPA1A	0.2191 (0.0184)	0.4981 (0.1748)	0.6595 (0.2105)
HSPA1B	0.3977 (0.0602)	0.8076 (0.3977)	0.7671 (0.3392)
HSPA2	0.6440 (0.2532)	0.4944 (0.1100)	0.7468 (0.2596)
HSPA7	0.0672 (0.0016)	0.0285 (0.0031)	-0.0956 (0.0052)
HSPA13	0.0669 (0.0019)	0.1465 (0.0193)	-0.0814 (0.0087)
HSPA4	0.9944 (0.7868)	0.9781 (0.8245)	0.8459 (0.6770)
HSPA8	1.4790 (0.9336)	1.2918 (0.8583)	1.3844 (0.9003)
HSPA9	1.1677 (0.9513)	1.1678 (0.8827)	1.1603 (0.8491)
HSPA12A	1.3192 (0.7621)	1.4035 (0.6470)	0.9991 (0.5962)
HSPD1	0.7583 (0.5742)	0.8311 (0.7421)	0.8386 (0.8277)
HSPH1	1.8179 (0.8058)	1.6483 (0.8318)	1.8931 (0.9326)
HSP90AA1	0.8901 (0.5900)	0.8507 (0.6250)	0.9569 (0.6496)

[0065] **실시예 6: 서로 다르게 발현된 2개의 HSPs 유전자 전사물 사이의 상대적인 mRNA 양**

[0066] HSPA2와 A7 혹은 A13 사이의 상대적인 mRNA 양은 2 mRNA 전사물($\Delta Ct = Ct_{HSPA2} - Ct_{HSPA7 \text{ or } A13}$)의 $2^{-\Delta Ct}$ 지수를 사용하여 계산되었고, 평균± SE값(도 4 (A); *: p<0.05 and **: P<0.01 vs. T)으로 표준막대그래프 혹은 box-and-whisker diagrams (도 4(B))로 도식화하였다.

[0067] **실시예 7: TI와 ASP 대상들 각각의 profile들과 PMI 그리고 mRNA 온전한 정도와의 관계**

[0068] 도 5에 나타난 바와 같이, (A) HSPA2 mRNA의 A7(왼쪽), A13(중간), 혹은 GAPDH (오른쪽)에 대한 상대적인 양은 PMI와의 관계로 도식화 하였다(TI: 빈 원 and ASP: 채워진 원). TI와 ASP의 대상들은 28S:18S rRNA 비율에 따라서 두 서브그룹으로 분류되었고, HSPA2 mRNA의 A7(왼쪽), A13(중간), 혹은 GAPDH (오른쪽)에 대한 상대적인 양은 28S:18S rRNA 비율에 따라서 도식화 하였다(TI: 빈 원 and ASP: 채워진 원).

[0069] **실시예 8: 통계분석**

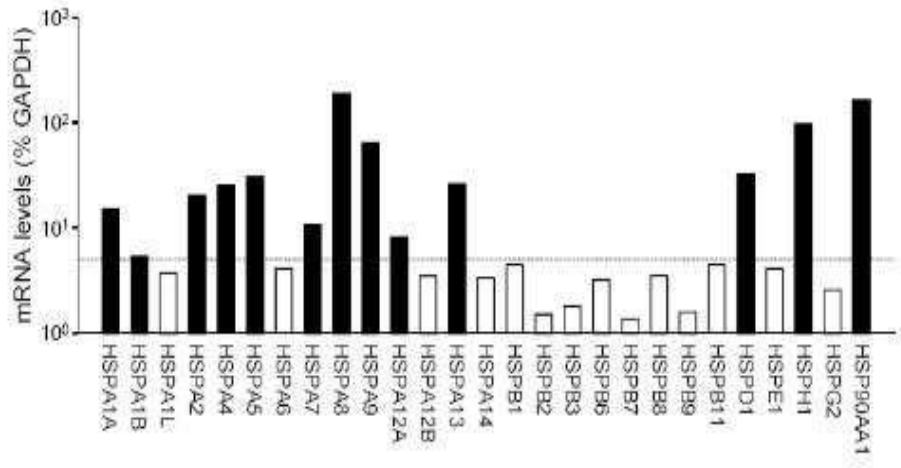
[0070] 서로 다른 그룹간에 HSP 유전자들의 보정된 mRNA 발현정도는 Student's t-test에 의해 통계적으로 계산하였고, 통계적 유의성은 p<0.05로 기준하였다.

[0071] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고

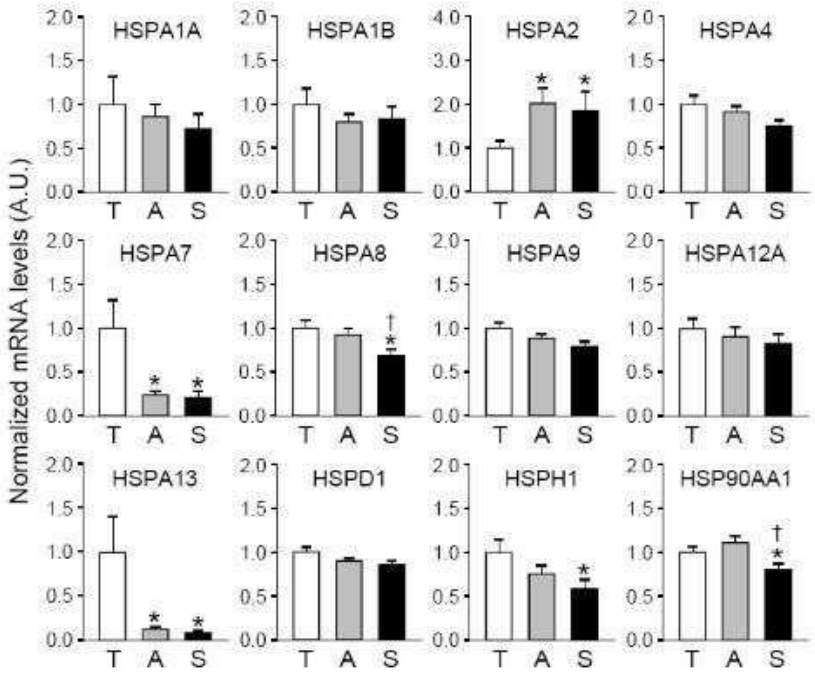
할 것이다.

도면

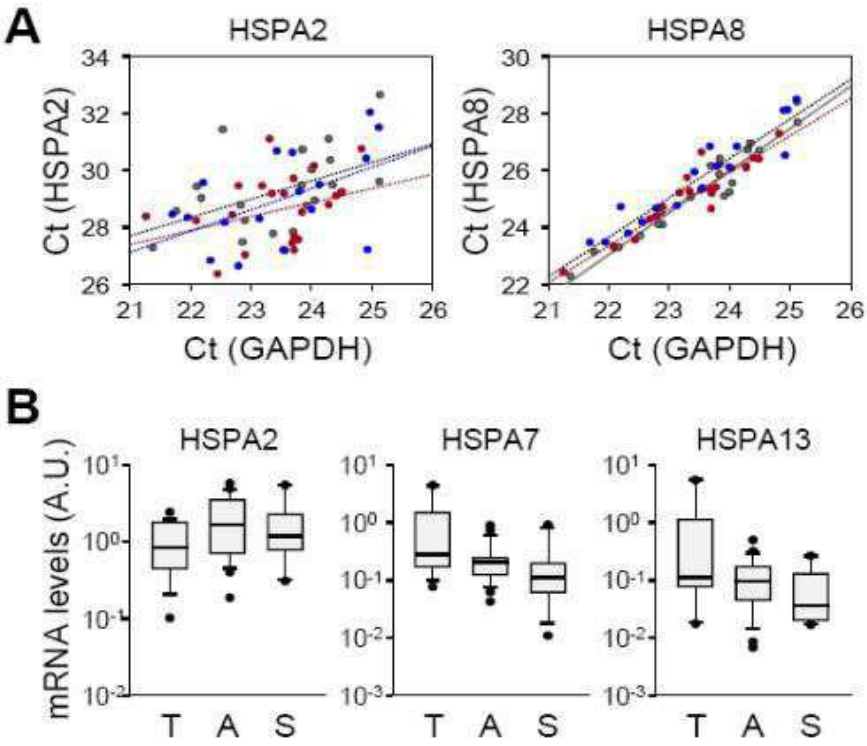
도면1



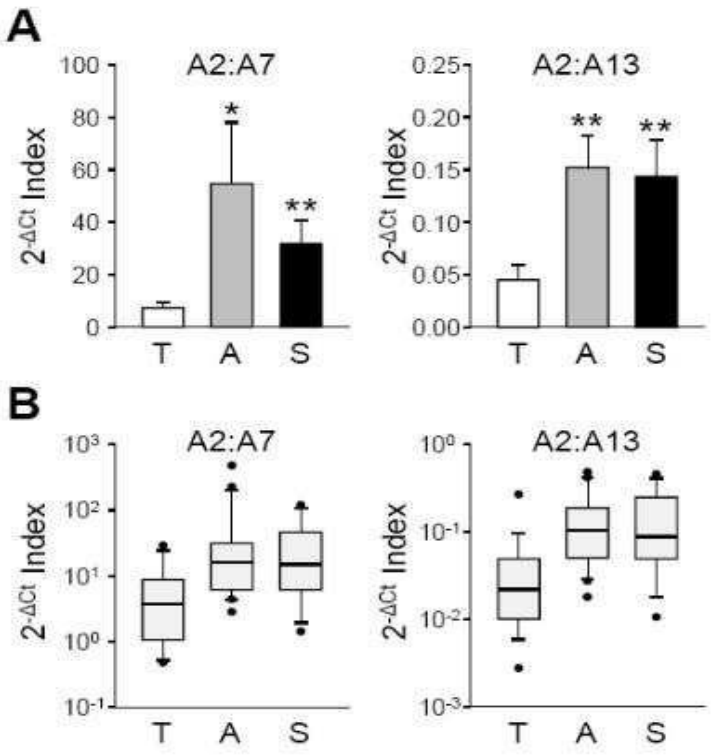
도면2



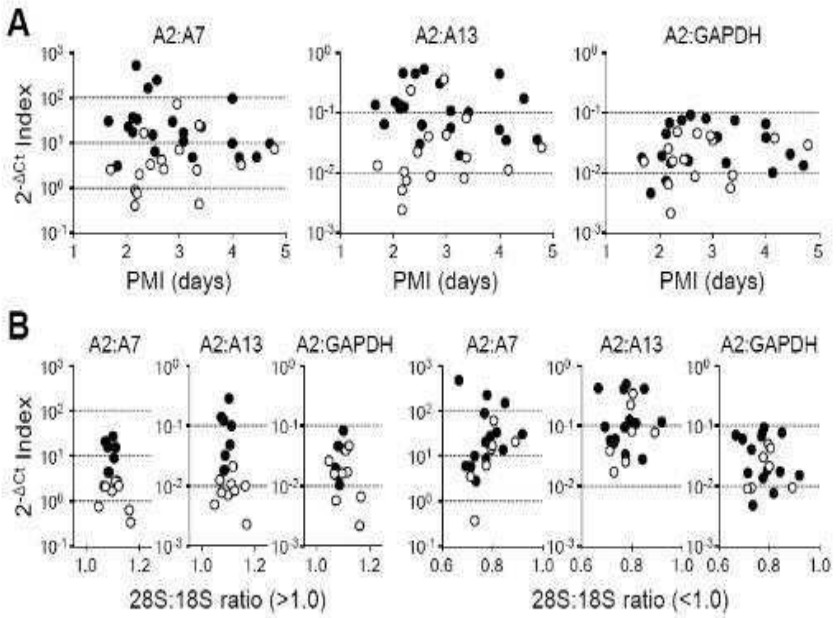
도면3


A
HSPA2
HSPA8
Ct (HSPA2)
Ct (HSPA8)
Ct (GAPDH)
Ct (GAPDH)
B
HSPA2
HSPA7
HSPA13
mRNA levels (A.U.)
T A S

도면4


A
A2:A7
A2:A13
2-ΔCt Index
B
A2:A7
A2:A13
2-ΔCt Index
T A S

도면5



서 열 목 록

<110> GLAMI

<120> Method for Estimating Cause of Death Through the Analysis of mRNA Expression Profile of Heat Shock Proteins

<130> P12-B209

<160> 26

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 1

gcctttccaa gattgctgtt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 2

tcaacattgc aaacacagga 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 3

agggtgtttc gttcccttta 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 4

gcctttccaa gattgctgtt 20

<210> 5

<211

> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 5

tcgaggtggc cgttagttg 19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 6

aaaggcgagc gacgttagg 19

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 7

gcaacagcag cagacaccag ca 22

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 8

gccttcttgg cttggggtgg t 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 9

caacctgctg gggcgttttg a 21

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 10

ccggcccttg tcattggtga tctt 24

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 11

agcagtggta gtgccatccc ca 22

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 12

gtcttccttg ctcaaacggc c 21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 13

tggaatgccg gccaagcgac 20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 14

gcctcaaccc aggcatcacc a 21

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 15

gcacgccttg cggaaaagca 20

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 16

ggcatctgga ctcatccgca gc 22

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 17

accgcagaag agttggaggc tga 23

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 18

tctggggaca ctgtgatggt ctca 24

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 19

tggccgttac aatggggcca a 21

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 20

agcagtggta gtgccatccc ca 22

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 21

aggagttcca tatccagaa 19

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 22

cagctcaaca ttcaccac 18

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 23

agctcaagcc ctaagagaca act 23

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 24

aagatgacca gatccttcac aga 23

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 25

gaaatcccat caccatcttc cagg 24

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequences

<400> 26

gagccccagc cttctccatg 20