(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월16일
(11) 등록번호 10-2134534
(24) 등록일자 2020년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *C12Q 1/6851* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
C12Q 1/6851 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0004170
(22) 출원일자 2019년01월11일
심사청구일자 2019년01월11일
(56) 선행기술조사문헌
KR101445243 B1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
홍수종
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, 서울아산병원(풍납동)
김봉수
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교 생명과학관 8309호(옥천동)
손두헌
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교 생명과학관 8309호(옥천동)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

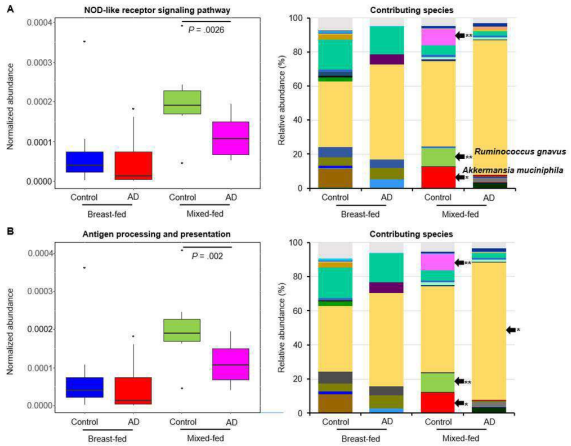
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 **장내 미생물 군집의 변화를 이용한 유아의 아토피피부염 조기 진단용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 유아의 아토피피부염의 조기 진단을 위한 조성물 및 이의 이용에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 유아의 분변 시료에서 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 또는 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*)를 검출함으로써 유아의 아토피피부염 발병 가능성을 간단하고 신속하게 진단할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2545/101 (2013.01)
C12Q 2561/113 (2019.08)
C12Q 2600/158 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
Nature Medicine (2016) 22(10)1187-1191
Journal of Allergy and Clinical Immunology (2013) 132(3):601-607.e8
BMC Microbiology (2012) 12:95*
Allergy, Asthma & Immunology Research (2018.02.26.) 10(4):354-362
Journal of Allergy and Clinical Immunology (2016) 137(3):852-860
김종화, "(The) gut microbiome and atopic dermatitis : association and potentials for probiotics and fecal microbiota transplantation", 박사학위논문, 중앙대학교 (2018)
International Archives of Allergy and Immunology (2018) 175(1/2):77-84
Gastroenterology (2018) 154(1):154-167*
PLoS One (2016) 11(11):e0166026*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711072976 (2017M3A9F3043834)
부처명 원천기술개발사업
연구관리전문기관 바이오·의료기술개발사업
연구사업명 한국연구재단
연구과제명 아토피피부염 질환군의 면역기전연구를 통한 장내 마이크로바이옴 기반 파마바이오틱스 발굴
기 여 율 1/1
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2017.05.25 ~ 2019.12.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

유아의 분변 시료에서 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*)의 포스포에놀피루브산 카르복시키나아제(phosphoenolpyruvate carboxykinase)를 암호화하는 GTP 유전자, 아커만시아 뮤시니필라의 SDR 계열 산화-환원 효소(Short-chain Dehydrogenase/Reductase family oxidoreductase carboxykinase)를 암호화하는 fabG 유전자, 또는 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*)의 당전이효소(glycosyltransferase)를 암호화하는 GTFs 유전자를 검출할 수 있는 제제로서, 서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 유아의 아토피피부염 조기 진단용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

내부대조군으로 대장균(*E.coli*)을 검출할 수 있는 제제를 추가로 포함하는, 유아의 아토피피부염 조기 진단용 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 또는 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 유아의 아토피피부염 조기 진단용 키트.

청구항 6

(a) 유아의 분변으로부터 DNA를 추출하는 단계;

(b) 상기 추출된 DNA에 서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 또는 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*)에 특이적인 프라이머를 반응시키는 단계; 및

(c) 상기 반응물을 증폭시키는 단계를 포함하는, 유아의 아토피피부염 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 단계 (c)는 중합효소반응을 통해 수행되는 것인, 유아의 아토피피부염 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 단계 (c)의 증폭산물의 양을 정상 유아의 분변 시료로부터 얻어진 DNA의 증폭산물과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 유아의 아토피피부염 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 유아의 분변으로부터 검출된 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 또는 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*)의 증폭산물의 양이 정상 유아와 비교하여 더 감소한 경우, 아토피피부염 발생 위험성이 높은 것으로 평가하는, 유아의 아토피피부염 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유아의 아토피피부염의 조기 진단을 위한 조성물 및 이의 이용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 아토피피부염(Atopic Dermatitis, AD)은 만성적인 염증성 피부질환으로서, 환경적 자극에 대한 피부 과민 반응과 관련이 있으며, 소아의 15% 이상에게 영향을 줄 수 있다. 일반적으로 아토피피부염은 유아기와 유년기에 나타나지만 청소년기와 성인기까지 지속될 수 있다. 아토피피부염의 다양한 임상 및 연구에도 불구하고 그 원인은 정확하게 알려져 있지 않다. 다양한 연구에 의하면 알츠하이머 병을 앓고 있는 유아의 미생물 군이 알츠하이머 병이 없는 유아의 미생물 군과 다르다는 사실이 밝혀졌다(Fujimura KE, Nat Med 2016; 22: 1187-91). 미생물이 면역 발달 및 면역 반응과 연관되어 있기 때문에 미생물이 알러지 질환 발병에 중요한 역할을 할 수 있다고 추측하는 것은 합리적이다.

[0004] 장내 미생물의 차이가 알러지 질환의 발현에 선행하기는 하지만, 건강한 유아와 질환을 가진 유아 사이의 장내 미생물 차이의 원인은 장내 미생물 군집화에 영향을 미치는 많은 교란 인자 때문에 결정하기가 어렵다. 수유 유형은 유아의 장내 마이크로바이옴의 군집화(colonization)에 가장 큰 영향을 미치므로 아토피피부염의 발생에 영향을 미칠 수 있다. 그러나, 유아 시기에 수유 방식에 따른 장내 마이크로바이옴과 아토피피부염의 복합 관계에 대한 연구는 부족한 실정이다.

[0005] 본 발명자들은 아토피피부염 유아들은 정상적인 유아에 비해 장내 미생물의 면역 발달 기능이 저해되어 있으며, 이는 해당 대사시스템에서 아커만시아 뮤니시필라(*Akkermansia muciniphila; A. muciniphila)* 및 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus; R. gnavus)*의 참여가 줄어들면서 나타나는 것을 확인하였다(Lee et al., 2018. Perturbation of gut microbiome genes in infants with atopic dermatitis according to feeding type. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 141(4), 1310-1319). 유아의 장내 미생물들의 가장 중요한 역할 중에 하나가 면역 발달에 역할을 하는 것이다. 이 연구 결과를 바탕으로 아토피피부염 유아와 정상 유아의 차이를 나타내는 *A. muciniphila*와 *R. gnavus*의 존재와 이들의 NOD-유사 수용체 신호경로(NOD-like receptor signaling pathway), 항원의 가공과 제시(Antigen processing and presentation) 대사 시스템에 관여하는 특이적인 유전자를 유아의 분변 샘플에서 검출할 수 있다면, 아토피피부염 발달에 두 미생물 종 부재에 의한 면역 발달 저해를 확인할 수 있다. 이에, 본 발명자들은 이들 미생물을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 혼합 수유군 유아의 장내 미생물을 특성화하고, 유전자 서열 분석을 사용하여 아토피피부염을 조

기에 예측하는 장내 미생물 군집 및 이들의 면역 발달에 관여하는 특이적인 유전자를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 본 발명에서는 혼합 수유군 유아의 장내 마이크로바이옴을 분석하여 아토피피부염 발생 가능성을 시사하는 예측 표지자를 발굴함으로써 유아의 아토피피부염 발생을 조기에 예방하거나 치료하는데 기여하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 유아의 분변 시료에서 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 또는 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*)를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 유아의 아토피피부염 조기 진단용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는, 유아의 아토피피부염 조기 진단용 키트를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, (a) 유아의 분변으로부터 DNA를 추출하는 단계; (b) 상기 추출된 DNA에 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 또는 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*)에 특이적인 프라이머를 반응시키는 단계; 및 (c) 상기 반응물을 증폭시키는 단계를 포함하는, 유아의 아토피피부염 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 유아의 아토피피부염을 조기에 진단할 수 있는 미생물 바이오마커를 제공하며, 이를 이용하면 간단한 분변 채취를 통하여 아토피피부염 발병 가능성을 간단하고 신속하게 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 아토피 유아의 수유 방식에 따른 미생물의 다양성, 군집 구성 및 미생물 수를 비교한 도면으로,

A는 수유 방식에 따라 정상대조군과 아토피피부염군의 미생물 다양성 및 군집 구성을 비교한 결과이고,

B는 Shannon 다양성 지수를 군 별로 비교한 결과이고,

C는 분변에서 미생물 수를 군 별로 비교한 결과이고,

D는 모유수유군에서 정상대조군과 아토피피부염군의 군집 구성을 비교한 결과이고,

E는 혼합수유군에서 정상대조군과 아토피피부염군의 군집 구성을 비교한 결과이고,

F는 분유 수유군에서 정상대조군과 아토피피부염군의 군집 구성을 비교한 결과이다.

도 2는 아토피 유아의 장내 미생물의 면역 발달에 관여하는 A) NOD-유사 수용체 신호경로 (NOD-like receptor signaling pathway)와 B) 항원의 가공과 제시 (Antigen processing and presentation) 대사 시스템 차이를 비교한 도면이다.

도 3은 *A. muciniphila* 특이 프라이머의 1차 증폭 특이성 확인 결과로서, 모든 프라이머가 예측한 target size에 증폭 산물을 특이적으로 생성함을 확인한 결과이다.

도 4는 *R. gnavus* 특이 프라이머의 1차 증폭 특이성 확인 결과로서, 모든 프라이머가 예측한 target size에 증폭 산물을 특이적으로 생성함을 확인한 결과이다.

도 5는 *A. muciniphila* 특이 프라이머의 2차 증폭 특이성 확인 결과로서, *A. muciniphila* 특이 프라이머 중 일부가 *E. coli* 와 *R. gnavus* DNA를 증폭하지 않거나 target size를 만들지 않는다는 것을 확인한 결과이다.

도 6은 *R. gnavus* 특이 프라이머의 2차 증폭 특이성 확인 결과로서, *R. gnavus* 특이 프라이머 중 일부가 *E. coli* 와 *A. muciniphila* DNA를 증폭하지 않거나 target size를 만들지 않는다는 것을 확인한 결과이다.

도 7은 혼합 균주 DNA 시료에서 선별된 특이 프라이머의 증폭 특이성을 확인한 결과로서, 모든 프라이머가 target 미생물과 target size를 증폭하는 것을 통해 그 특이성을 확인하였다(① *E. coli* + *R. gnavus* + *A. muciniphila*, ② *E. coli* + *A. muciniphila*, ③ *E. coli* + *R. gnavus*, ④ *R. gnavus* + *A. muciniphila* DNA 혼합 시료).

도 8은 유아의 실제 분변 시료에서, 선별된 프라이머의 증폭 특이성을 확인한 결과로서, 3쌍의 프라이머 (R_G5,

A_G6, A_01)들만 정상 유아에서 증폭이 되고, 아토피피부염 유아 장내 미생물 DNA에서 증폭이 되지 않는 것을 확인한 결과이다.

도 9는 유아의 실제 분변 시료에서, 혼합 프라이머의 증폭 특이성을 확인한 결과로서, 두 혼합 프라이머 세트 모두 정상 유아의 장내 미생물 DNA에서만 증폭 된 것을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명에서는, 수유 방식을 달리한 유아의 분변에서 미생물 커뮤니티의 구성이 아토피피부염에 미치는 영향을 분석한 결과, 모유 수유군과 모유/분유 혼합 수유군의 아토피피부염 유아의 장내 미생물 분포와 양이 상이한 것을 확인하였으며, 혼합 수유군의 경우 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 또는 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*)의 감소가 아토피피부염에 영향을 주는 것으로 확인하였다.

[0019] 따라서, 본 발명에서는 유아의 분변 시료에서 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 또는 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*)를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 유아의 아토피피부염 조기 진단용 조성물, 키트 및 방법을 제공한다.

[0020] 본 명세서에서 용어 “유아”는 생후 1년에서 4세까지의 아동뿐 아니라 출생부터 1세까지의 “영아”(infant) 및 미취학 아동을 포함하는 넓은 개념으로 사용되며, 아토피피부염 조기 진단 측면에서는 생후 6개월 내지 1세까지의 영아로 해석될 수 있다.

[0021] 바람직한 일구현예로, 본 발명에서는 생후 6개월의 아토피 영아와 정상 영아의 장내 마이크로바이옴의 차이점을 분석하고 이른 시기에 아토피피부염 발생 가능성을 시사하는 예측 표지자를 발굴하였다.

[0022] 본 명세서에서 용어 "마이크로바이옴"은 인간의 몸속에서 함께 공존하고 있는 미생물들의 유전정보 전체를 일컫는 용어로, 본 발명에서 장내 마이크로바이옴은 장내 존재하는 미생물들의 유전정보 전체를 의미한다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "검출할 수 있는 제제"란 분변 내에서 유아의 아토피피부염 조기 진단 마커인 아커만시아 뮤시니필라 및/또는 루미노코커스 그나부스의 존재를 검출하기 위하여 사용될 수 있는 물질을 의미한다. 예를 들어, 아커만시아 뮤시니필라 및/또는 루미노코커스 그나부스에 특이적으로 존재하는 단백질, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 등과 같은 유기 생체 분자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 압타머, 또는 항체 등이 될 수 있다.

[0024] 바람직하게, 본 발명에서 검출할 수 있는 제제는 아커만시아 뮤시니필라 및/또는 루미노코커스 그나부스의 게놈 서열을 특이적으로 검출하고 다른 미생물의 게놈 서열에는 특이적으로 결합하지 않는 것이 바람직하다. 상기 제제는 아커만시아 뮤시니필라 및/또는 루미노코커스 그나부스의 16S rRNA를 증폭할 수 있는 프라이머 일 수 있고, 보다 바람직하게, 아커만시아 뮤시니필라 및/또는 루미노코커스 그나부스의 NOD-유사 수용체 신호경로(NOD-like receptor signaling pathway) 또는 항원의 가공과 제시(Antigen processing and presentation) 대사 시스템에 관여하는 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 일 수 있다. 본원에서 용어, "프라이머"란, 주형 가닥에 상보적인 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 7개 내지 50개의 핵산서열을 의미한다. 프라이머는 보통 합성하지만 자연적으로 생성된 핵산에서 이용할 수도 있다. 프라이머의 서열은 반드시 주형의 서열과 정확히 같을 필요는 없으며, 충분히 상보적이어서 주형과 혼성화될 수 있으면 된다. 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 혼입할 수 있는 추가의 특징의 예로 메틸화, 캡화, 하나 이상의 핵산을 동족체로의 치환 및 핵산 간의 변형 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 바람직하게, 본 발명의 프라이머는 아커만시아 뮤시니필라 및/또는 루미노코커스 그나부스의 NOD-유사 수용체 신호경로 (NOD-like receptor signaling pathway) 또는 항원의 가공과 제시 (Antigen processing and presentation) 대사에 관여하는 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 일 수 있다.

[0026] 바람직한 일구현예로, 본 발명에서는 면역 발달 도움 대사인 NOD-유사 수용체 신호경로 (NOD-like receptor signaling pathway), 항원의 가공과 제시(Antigen processing and presentation), PI3K-Akt 신호경로 및 에스트로겐 신호경로에 관여된 다양한 유전자 중에서, 아커만시아 뮤시니필라에서 특이적인 염기서열을 가진 i) phosphoenolpyruvate carboxykinase를 암호화 하는 GTP 유전자, ii) SDR family oxidoreductase를 암호화 하는 fabG 유전자 및 루미노코커스 그나부스에서 특이적인 염기서열을 가진 Glycosyltransferase를 암호화하는 GTFs

유전자를 이용하여 프라이머를 제작하였다.

[0027] 본원에서 용어, "16S rRNA"란, 원핵생물 리보솜의 30S 소단위체를 구성하고 있는 rRNA로, 모든 종에 공통적인 보존 영역(conserved region)과 특정 종을 분류할 수 있는 초가변 영역(hypervariable region)이 존재하므로 염기서열분석을 통하여 미생물을 동정할 수 있다. 특히 동종 간에는 다양성이 거의 없는 반면에 타종 간에는 다양성이 나타나므로 16S rRNA의 서열을 비교하여 원핵생물을 유용하게 동정할 수 있다. 또한 16S rDNA 는 16S rRNA를 코딩하는 유전자이므로, 16S rDNA 를 활용하여 미생물을 동정할 수도 있다.

[0028] 바람직한 일구현예로, 본 발명에서 상기 프라이머는 아커만시아 뮤시니필라 및/또는 루미노코커스 그나부스의 존재를 검출할 수 있다. 프라이머를 이용한 서열 증폭 방법은 당업계에 알려진 다양한 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들어, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR), 멀티플렉스 PCR, 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR, 부스터(booster) PCR, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 인버스(inverse) 중합효소 연쇄반응, 벡토레트(vectorette) PCR, TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR), 리가아제 연쇄 반응, 복구 연쇄 반응, 전사-중재 증폭, 자가 유지 염기서열 복제, 또는 타깃 염기서열의 선택적 증폭 반응을 이용할 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 제한되지는 않는다.

[0029] 또한, 본 발명에서 미생물 검출 제제는, 항체일 수 있으며, 항원-항체 반응을 기반으로 한 면역학적 방법을 사용하여 해당 미생물을 검출할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS(Fluorescence activated cell sorter), 또는 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 그 외, 당업계에 널리 사용되는 분자 및 면역학적 방법이 본 발명의 미생물을 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 상기 미생물 검출 제제를 포함하는 진단용 조성물은, 진단 키트 형태로 구현되어 제공될 수 있다. 본 발명의 키트는 해당 미생물을 검출하기 위한 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 압타머, 또는 항체 등의 검출 제제를 포함할 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0033] 구체적인 일례로, 본 발명에서 아커만시아 뮤시니필라 및/또는 루미노코커스 그나부스에 특이적인 프라이머를 포함하는 키트는, PCR 등의 증폭 반응을 수행하기 위한 필수 요소들을 포함하는 키트 일 수 있다. 예를 들어, 상기 PCR 용 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 또는 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 유아의 분변으로부터 아커만시아 뮤시니필라 및/또는 루미노코커스 그나부스를 검출함으로써, 유아의 아토피피부염을 조기 진단하는 방법을 제공한다. 달리 말하면, 본 발명은 유아의 아토피피부염 조기 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 유아의 분변으로부터 아커만시아 뮤시니필라 및/또는 루미노코커스 그나부스를 검출하는 방법을 제공한다. 또는, 유아의 분변으로부터 아커만시아 뮤시니필라 및/또는 루미노코커스 그나부스를 검출하는 단계를 포함하는, 아토피피부염 조기 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0036] 바람직한 일례로, 상기 방법은 다음의 단계를 포함하여 구현될 수 있다:

[0037] (a) 유아의 분변으로부터 DNA를 추출하는 단계;

[0038] (b) 상기 추출된 DNA에 아커만시아 뮤시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 또는 루미노코커스 그나부스(*Ruminococcus gnavus*)에 특이적인 프라이머를 반응시키는 단계; 및

[0039] (c) 상기 반응물을 증폭시키는 단계.

[0040] 상기 단계 (b) 에서 유아의 분변으로부터 게놈 DNA의 추출은 당업계에 알려진 일반적인 기술을 적용하여 수행할 수 있으며, 아커만시아 뮤시니필라 또는 루미노코커스 그나부스에 특이적인 프라이머는 위에서 설명한 바와 같다.

[0041] 상기 단계 (c)에서 반응물을 증폭시키는 방법은 당업계에 알려진 일반적인 증폭 기술들, 예를 들어 중합효소 연쇄반응, 역전사-중합효소 연쇄반응, 멀티플렉스 PCR, 터치다운 PCR, 핫 스타트 PCR, 네스티드 PCR, 부스터 PCR,

실시간 PCR, 분별 디스플레이 PCR, cDNA 말단의 신속 증폭, 인버스 PCR, 벡토레트 PCR, TAIL-PCR, 리가아제 연쇄 반응, 복구 연쇄 반응, 전사-중재 증폭, 자가 유지 염기서열 복제, 타깃 염기서열의 선택적 증폭 반응을 이용할 수 있으나, 본 발명의 범위가 이에 제한되지는 않는다.

[0042] 상기 단계 (c)에서, 반응물의 증폭 산물의 양을 정상 유아 분변의 증폭산물 과 비교하는 단계를 추가로 수행할 수 있으며, 유아 분변에서 아커만시아 뮤시니필라 또는 루미노코커스 그나부스의 증폭 산물이 정상 유아 분변의 증폭산물과 비교하여 유의적으로 감소되었다고 판단될 경우, 해당 유아는 아토피피부염 발생 위험성이 높은 것으로 판단할 수 있다.

[0044] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0046] **[실시예]**

[0047] **실시예 1. 연구 대상군 선별 및 샘플의 수집**

[0048] 6 개월 된 유아 아토피 환자 63명(아토피피부염군; AD)과 아토피 증상이 없는 66명(정상 대조군)을 코호트를 통해 모집하여, 아토피피부염군(AD)은 6개월 및 1, 2세에 의사진단에 의거하여 선정하고, 중증도(severity)는 SCORAD를 기준으로 선별하였다. 계란 및 우유 항원에 특이적인 혈청 IgE 수치는 12개월에 ImmunoCAP™(Phadia AB, Uppsala, Sweden)을 이용하여 형광 효소 면역 측정법(fluorescent enzyme immunoassay)으로 측정하였고, 계란 및 우유 항원에 특이적인 혈청 IgE 수치가 0.35 이상이면 아토피 환자로 판단하였다. 마이크로바이옴 분석은 propensity score matching 을 이용하여 AD군과 대조군을 유사하게 맞추어 진행하였으며, 분변은 수집 즉시에 얼렸고, DNA를 추출하기 전까지 -80℃에서 보관하였다.

[0050] **실시예 2. DNA 추출 및 파이로시퀀싱**

[0051] Power Microbiome RNA/DNA Isolation Kit (MOBIO/Qiagen, Carlsbad, Calif)를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 실시예 1의 분변 샘플에서 박테리아 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 -80℃에서 보관하였다.

[0052] 파이로시퀀싱 (pyrosequencing)을 위해 추출한 DNA를 16S rRNA 유전자의 V1-V3 영역을 표적으로하는 바코드 프라이머 [Forward: 5'-barcode-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'(서열번호 1), Reverse: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'(서열번호 2)]를 사용하여 증폭하였다. DNA 증폭은 94℃에서 5분간 변성 후, 30 cycles의 94℃에서 30초 동안 변성, 55℃에서 30초 동안 어닐링, 72℃에서 30초 동안 신장 후 마지막 신장 72℃에서 7분 동안 이루어졌다. 증폭 산물은 AMPure XP bead kit (Agencout Bioscience, Beverly, MA, USA)를 이용하여 정제하였다. 시퀀싱은 Roche/454 FLX Titanium system (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 진행하였다.

[0054] **실시예 3. 전체 유전자 시퀀싱과 시퀀스 분석**

[0055] 실시예 1의 분변 샘플에서 40개의 분변 샘플(아토피피부염군과 정상 대조군 각각 20개의 샘플)을 랜덤하게 선택하고, 선택한 샘플의 메타게놈 DNA는 Covaris M220 sonicator (Covaris, Woburn, Mass)를 이용하여 준비하고, TruSeq DNA sample preparation kit (Illumina, San Diego, Calif)를 이용하여 메타게놈 라이브러리를 준비하였다. 각 라이브러리(2nM)은 Illumina adapter sequence 프라이머 [Forward: 5'-ATACGGCGACCACCGAGATC-3'(서열번호 3), Reverse: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAG-3'(서열번호 4)]를 이용하여 정량적 실시간 PCR을 통해 계산하였다.

[0056] 일루미나 HiSeq2000 (Illumina HiSeq 2000)을 이용하여 전체 유전자 시퀀스(whole-genome sequence)를 얻었다. DNA 라이브러리를 만들어서, 250 bp의 페어드 엔드 리드(250-bp paired ends read)를 얻었으며, sequencing data analysis toolset (ver. 0.127, http://www.vicbioinformatics.com/software.nesoni.shtml) 를 이용하여 Illumina adapter sequences(150 bp), 짧은 길이의 리드(150 bp)및 낮은 Q 스코어 (Q < 15)는 제거하였다. BBMap (http://sourceforge.net/project/bbmap)을 이용하여 오염된 human genes를 제거하였고, UniRef50 IDs를 KO (KEGG Orthology)로 변형하여 K-numbers를 매칭한 후 그룹에 따른 KO 카테고리를 설정하여 분석하였다.

[0058] **실시예 4. 면역 발달 특이적인 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머의 제작 및 특이성 검증**

[0059] *A. muciniphila*와 *R. gnavus*의 면역 발달 도움 대사 특이적인 유전자를 생물정보학적 기법을 이용하여 검출하여, *A. muciniphila* 특이적인 프라이머 14쌍 (forward 14개, reverse 14개)과 *R. gnavus* 특이적인 프라이머 10쌍 (forward 10개, reverse 10개)를 제작하였다.

[0060] 구체적으로, 면역 발달 도움 대사인 NOD-like receptor signaling pathway, Antigen processing and

presentation, PI3K-Akt signaling pathway, Estrogen signaling pathway에 관여하는 유전자 중에서, 장내에 존재하는 다른 미생물들과 *A. muciniphila*와 *R. gnavus*를 구분 지을 수 있는 유전자를 선택하고자 하였으며, 최종적으로, *A. muciniphila*에만 관찰되는 특이적인 염기서열을 가진 phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP), SDR family oxidoreductase (fabG) 와 *R. gnavus*에서만 관찰되는 특이적인 염기서열을 가진 Glycosyltransferase (GTFs) 유전자를 이용하여 프라이머를 제작하였다.

[0061] 다음으로, 제작한 프라이머의 특이성 검증을 위해 *A. muciniphila*, *R. gnavus* 및 *Escherichia coli*의 균주를 순수 배양한 후 그 DNA를 추출하여 특이성 검증을 수행하였다. 특이성 검증은 프라이머를 이용한 PCR 증폭을 통해 확인하였으며, 사용한 PCR 조건은 다음과 같다.

[0062] **[표 1]**

[0063] **PCR 조성**

Reagent		1 Tube
Buffer 10X + MgCl2	10X	5 ul
dNTPs	10mM	1 ul
Primer (Forward/Reverse)	20pmol/ul	2 ul
Taq polymerase	5U/ul	0.25 ul
DNA (~100ng)		1 ul
Molecular Biology Grade Water		40.7 ul

[0064]

[0065] **[표 2]**

[0066] **PCR 증폭 조건**

Step	°C	Min	Cycle
Initial denaturation	94	5:00	
Denaturation	94	0:30	
Annealing	60	0:30	30
Extension	72	0:30	
Final extension	72	7:00	
Hold	4		

[0067]

[0069] **[실험결과]**

[0070] **수유 방식이 장내 미생물 군집에 미치는 효과**

[0071] 6 개월 유아의 경우 장내 미생물의 형성에 수유 방식이 중요한 역할을 하며, 특히 이는 정상 유아 그룹과 아토피 유아 그룹의 장내 미생물의 군집 구성과 미생물 다양성이 수유 방식에 따라 다르다는 것을 통해 알 수 있었다.

[0072] 도 1에 나타낸 바와 같이, 수유 방식에 따라 정상 그룹과 아토피 그룹의 미생물 다양성 지수가 서로 다르다는 것을 확인할 수 있었으며(도 1의 A, B, C), 수유 방식에 따라 정상 그룹과 아토피 그룹의 우점 phylum의 비율이 서로 다르다는 것을 확인할 수 있었다(도 1의 D, E, F). 또한, 모유 수유와 혼합 수유의 경우 정상 그룹에 비해 아토피 그룹의 장내 미생물 수가 적다는 것을 확인할 수 있어 아토피 그룹 유아의 경우 장내 미생물 형성이 잘 되지 않고 있다는 것을 알 수 있었다(도 1의 C).

[0074] **유아 아토피 마이크로바이옴의 면역기능의 변화**

[0075] 어린 유아의 경우 수유를 통해 영양분을 섭취하므로, 장 내 마이크로바이옴이 이용할 수 있는 영양분이 부족한 상황이며, 이 시기에 뮤신-분해 미생물들이 정착하여 뮤신을 분해하여 다른 미생물들이 이용할 수 있는 당을 생성하면서 장 내 마이크로바이옴이 발달하는데, 아토피피부염 유아에서는 뮤신-분해 미생물들이 정상 유아들에

비해 적게 존재한다는 것을 확인하였다.

[0076] 전체 메타게놈 분석을 통해 뮤신-분해 미생물들의 정착 불균형이 면역 발달에 관련된 Oxidative phosphrylation, Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling, Estrogen signaling, Nucleotide-binding domain like receptor signaling, Antigen processing presentation pathway 관련 마이크로바이옴 유전자가 감소되어 아토피피부염 유아의 면역 발달에 문제가 발생할 수 있음을 확인하였다(도 2).

[0078] **제작 프라이머의 1차 특이성 검증**

[0079] 우선 실시예 4를 통해 제작된 *A. muciniphila* 특이 프라이머를 *A. muciniphila* DNA에 잘 증폭이 되는지를 확인하였다. 확인 결과 제작된 총 14쌍의 프라이머는 모두 *A. muciniphil*의 DNA를 잘 증폭하였으며, 정확한 증폭산물 크기를 만든다는 것을 확인하였다(도 3).

[0080] 또한, *R. gnavus*의 제작 프라이머가 *R. gnavus*의 DNA에 잘 증폭이 되는지 확인을 하였다. 확인 결과 컴퓨터 예측으로 제작한 총 10쌍의 프라이머가 모두 *R. gnavus*를 증폭하며, 정확히 target size의 증폭산물을 만들어 특이성이 있다는 것을 확인하였다(도 4).

[0082] ***A.muciniphila* 특이 프라이머의 선별**

[0083] 두 미생물에 대한 특이 프라이머들이 모두 각 미생물에 대해 특이적으로 증폭이 된다는 것을 확인한 후에, 각 프라이머가 다른 미생물을 동일하게 증폭을 시키지는 않는지 확인을 하였다. *E. coli*의 경우 장내에서 일반적으로 존재하는 장내 미생물로 제작한 특이 프라이머가 타겟 미생물들만 특이적으로 증폭하는지 확인을 하고, 아토피 그룹 유아의 경우 면역 발달 metabolism에 *E. coli*의 관여율이 높으므로, 해당 metabolism의 *A. muciniphila*와 *R. gnavus*의 특이 검출을 위해 *E. coli*가 증폭되지 않아야 아토피 그룹과 구분을 할 수 있으므로 대조군으로 사용을 하였다. *A.muciniphila*의 특이 프라이머를 *E. coli* 와 *R.gnavus* DNA를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0084] 그 결과 *A. muciniphila* 특이 프라이머는 *E. coli* 와 *R. gnavus* DNA를 증폭하지 않거나, target size를 만들지 않는다는 것을 확인하였다(도 5). target size를 증폭하지는 않지만 *A. muciniphila*의 특이 프라이머가 *E. coli* 와 *R. gnavus*의 DNA를 non-specific하게 증폭시킬 수 있는 것은 *A. muciniphila*의 특이 프라이머 후보에서 제외 하였다 (표 3).

[0085] **[표 3]**

[0086] ***A. muciniphila* 특이 프라이머의 특이성 확인 요약**

[0087]

DNA	Primer	PCR	DNA	Primer	PCR	DNA	Primer	PCR
A. muciniphila	A_H1	O	*E. coli*	A_H1	X	*R. gnavus*	A_H1	O
A. muciniphila	A_H2	O	*E. coli*	A_H2	O	*R. gnavus*	A_H2	O
A. muciniphila	A_H3	O	*E. coli*	A_H3	O	*R. gnavus*	A_H3	O
A. muciniphila	A_H4	O	*E. coli*	A_H4	X	*R. gnavus*	A_H4	X
A. muciniphila	A_H5	O	*E. coli*	A_H5	X	*R. gnavus*	A_H5	O
A. muciniphila	A_H6	O	*E. coli*	A_H6	X	*R. gnavus*	A_H6	O
A. muciniphila	A_G1	O	*E. coli*	A_G1	X	*R. gnavus*	A_G1	O
A. muciniphila	A_G2	O	*E. coli*	A_G2	X	*R. gnavus*	A_G2	O
A. muciniphila	A_G3	O	*E. coli*	A_G3	X	*R. gnavus*	A_G3	O
A. muciniphila	A_G4	O	*E. coli*	A_G4	O	*R. gnavus*	A_G4	O
A. muciniphila	A_G5	O	*E. coli*	A_G5	O	*R. gnavus*	A_G5	X
A. muciniphila	A_G6	O	*E. coli*	A_G6	X	*R. gnavus*	A_G6	X
A. muciniphila	A_O1	O	*E. coli*	A_O1	X	*R. gnavus*	A_O1	X
A. muciniphila	A_O2	O	*E. coli*	A_O2	X	*R. gnavus*	A_O2	O

[0088] [표 3]에 나타낸 바와 같이, *A. muciniphila* 특이 프라이머 중 *A. muciniphila*를 특이적으로 증폭하면서 다른 미생물인 *E. coli*와 *R. gnavus*를 증폭하지 않는 프라이머는 총 3개의 쌍 (A_H4, A_G6, A_O1; 하이라이트)으로 나왔다.

[0090] ***A.muciniphila* 특이 프라이머의 선별**

[0091] 다음은 *R. gnavus*의 특이 프라이머를 *E. coli* 와 *A. muciniphila* DNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. 수행 결과

*R. gnavus*의 특이 프라이머는 *E. coli*와 *A. muciniphila* DNA를 증폭하지 않거나 target size를 만들지 않았다(도 6). 하지만, *R. gnavus*의 특이 프라이머가 *E. coli*나 *A. muciniphila*를 비특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머는 특이 프라이머 후보에서 제외하였다 (표 4).

[0092] **[표 4]**

[0093] ***R. gnavus* 특이 프라이머의 특이성 확인 요약**

DNA	Primer	PCR	DNA	Primer	PCR	DNA	Primer	PCR
R. gnavus	R_H1	O	*E. coli*	R_H1	X	*A. muciniphila*	R_H1	O
R. gnavus	R_H2	O	*E. coli*	R_H2	O	*A. muciniphila*	R_H2	O
R. gnavus	R_H3	O	*E. coli*	R_H3	O	*A. muciniphila*	R_H3	O
R. gnavus	R_G1	O	*E. coli*	R_G1	X	*A. muciniphila*	R_G1	O
R. gnavus	R_G2	O	*E. coli*	R_G2	X	*A. muciniphila*	R_G2	X
R. gnavus	R_G3	O	*E. coli*	R_G3	X	*A. muciniphila*	R_G3	O
R. gnavus	R_G4	O	*E. coli*	R_G4	X	*A. muciniphila*	R_G4	O
R. gnavus	R_G5	O	*E. coli*	R_G5	X	*A. muciniphila*	R_G5	X
R. gnavus	R_G6	O	*E. coli*	R_G6	O	*A. muciniphila*	R_G6	X
R. gnavus	R_G7	O	*E. coli*	R_G7	O	*A. muciniphila*	R_G7	O

[0094]

[0095] [표 4]에 나타낸 바와 같이, *R. gnavus* 특이 프라이머 중 *R. gnavus* 를 특이적으로 증폭하면서 다른 미생물인 *E. coli*와 *R. gnavus*를 증폭하지 않는 프라이머는 총 2개의 쌍 (R_G2, R_G5; 하이라이트)으로 나왔다.

[0097] **혼합 균주 DNA 시료에서 선별된 프라이머의 특이성 검증**

[0098] 선별된 특이 프라이머들이 여러 미생물이 섞여 있는 상황에서도 균주와 유전자 target 특이성을 나타내는지 확인을 하기 위해, DNA를 섞어 준 후에 각 프라이머를 이용하여 PCR 증폭 실험을 수행하였다. DNA 혼합은 ① *E. coli* + *R. gnavus* + *A. muciniphila*, ② *E. coli* + *A. muciniphila*, ③ *E. coli* + *R. gnavus*, ④ *R. gnavus* + *A. muciniphila*로 만들어 준 후 각각의 혼합 DNA를 선별 프라이머를 이용하여 증폭 실험을 하였다.

[0099] 그 결과 모든 DNA 혼합 시료에서 특이 프라이머의 target 미생물이 존재할 때만 증폭이 되었으며, 정확히 target size를 증폭하는 것을 확인하여, 선별 프라이머들이 균주가 혼합되어 있을 때도 특이성이 높다는 것을 확인하였다(표 5 및 도 7).

[0100] **[표 5]**

[0101] **혼합 균주 DNA 시료에서 선별된 프라이머 특이성 확인 요약**

DNA	Primer	Target	PCR
E. coli + *R. gnavus* + *A. muciniphila*	R_G2	*R. gnavus*	O
E. coli + *A. muciniphila*	R_G2	*R. gnavus*	X
E. coli + *R. gnavus*	R_G2	*R. gnavus*	O
R. gnavus + *A. muciniphila*	R_G2	*R. gnavus*	O
E. coli + *R. gnavus* + *A. muciniphila*	R_G5	*R. gnavus*	O
E. coli + *A. muciniphila*	R_G5	*R. gnavus*	X
E. coli + *R. gnavus*	R_G5	*R. gnavus*	O
R. gnavus + *A. muciniphila*	R_G5	*R. gnavus*	O
E. coli + *R. gnavus* + *A. muciniphila*	A_H4	*A. muciniphila*	O
E. coli + *A. muciniphila*	A_H4	*A. muciniphila*	O
E. coli + *R. gnavus*	A_H4	*A. muciniphila*	X
R. gnavus + *A. muciniphila*	A_H4	*A. muciniphila*	O
E. coli + *R. gnavus* + *A. muciniphila*	A_G6	*A. muciniphila*	O
E. coli + *A. muciniphila*	A_G6	*A. muciniphila*	O
E. coli + *R. gnavus*	A_G6	*A. muciniphila*	X
R. gnavus + *A. muciniphila*	A_G6	*A. muciniphila*	O
E. coli + *R. gnavus* + *A. muciniphila*	A_O1	*A. muciniphila*	O
E. coli + *A. muciniphila*	A_O1	*A. muciniphila*	O
E. coli + *R. gnavus*	A_O1	*A. muciniphila*	X
R. gnavus + *A. muciniphila*	A_O1	*A. muciniphila*	O

[0102]

[0104] **유아 분변 샘플에서 프라이머의 특이성 검증 및 최종 프라이머 선택**

[0105] 혼합 균주 DNA에서 특이성이 확인된 프라이머들이 실제 유아 분변 샘플의 장내 미생물 DNA에서 특이적으로 증폭을 하여, 실제 아토피 유아와 정상 유아에서 *A. muciniphila*와 *R. gnavus*의 존재와 면역 발달 도움 유전자가 정확히 검출할 수 있는지를 유아 분변 샘플의 장내 미생물 DNA 추출 시료를 통해 확인을 하였다.

[0106] 그 결과, 3쌍의 프라이머 (R_G5, A_G6, A_O1) 만 *A. muciniphila*와 *R. gnavus*가 존재하는 정상 유아에서 증폭되고, 아토피 유아에서는 증폭되지 않는 것을 확인하여, 3쌍의 프라이머들을 다시 특이 프라이머 후보로 선정을 하였다 (도 8).

[0108] **프라이머의 조합 사용에 따른 검출 결과 확인**

[0109] *A. muciniphila*와 *R. gnavus*의 면역 발달 유전자 특이 프라이머를 조합하여 사용을 하면 3쌍의 프라이머를 이용한 검출률을 높일 수 있으므로, 프라이머 조합을 ① R_G5 + A_G6, ② R_G5 + A_O1을 만들어 다시 정상 유아와 아토피피부염 유아의 장내 미생물 DNA에서 PCR 증폭을 하여 확인하였다.

[0110] 그 결과 두 가지 프라이머 조합이 모두 정상 유아에서만 증폭이 되고, 아토피피부염 유아의 장내 미생물 DNA에서는 증폭이 되지 않았다 (도 9).

[0112] 장내 미생물은 다양한 종들이 공존하면서, 서로 다른 양으로 존재하므로, *A. muciniphila*와 *R. gnavus*의 존재양에 따라 target band가 하나에서 두 개로 나올 수가 있다. 또한, 동일 종 (species)이더라도 균주 (strain) 레벨에서 해당 유전자의 염기 변이가 조금씩 있을 수 있으므로, target size가 예측한 범위에서 ± 50 bp 정도 다르게 나타날 수 있다는 것을 감안하여야 한다.

[0113] 이 결과를 통해 최종적으로 선별된 혼합 프라이머 조합은 유아의 장내 미생물에서 *A. muciniphila*와 *R. gnavus*의 존재 및 이들 종들의 면역 발달 관련 유전자의 존재 여부를 확인할 수 있다. 따라서, 유아의 분변 샘플에서 장내 미생물 DNA를 추출하여 선별된 혼합 프라이머를 사용하면 유아의 장내에서 *A. muciniphila*와 *R. gnavus*가 존재하면서 면역 발달을 시켜 아토피피부염 유발 및 발달을 시키지 않는지를 저비용으로 빠르게 확인을 할 수 있으며, 해당 미생물들이 존재하지 않으면 장내 미생물이 면역 발달을 정상적으로 시키지 않는다는 것을 알 수 있으므로, 적절한 대응책을 사용하도록 할 수 있다. 최종적으로 선별되어 개발한 프라이머의 서열은 [표 6]에 자세히 서술하였다.

[0114] [표 6]

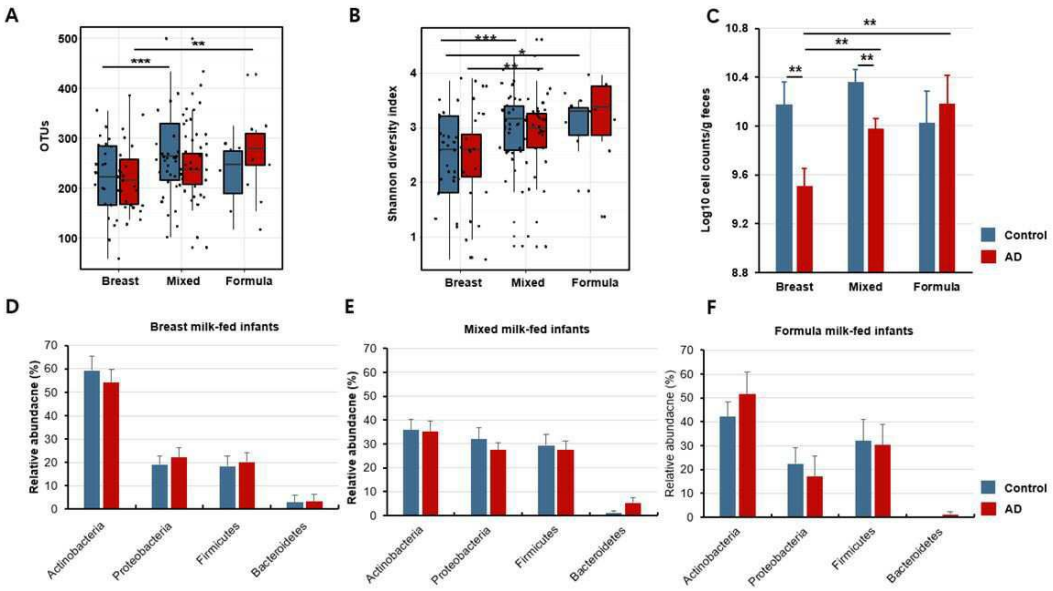
[0115] 최종 선별된 개발 프라이머 서열 정보

이름	정방향 (5´->3´)	역방향 (5´->3´)	증폭산물 크기
R_G5	GCACCTGAGTTCTTGGGAGA (서열번호 5)	GACCGGGATCAAGGAGAGAC (서열번호 6)	435
A_G6	ATGTAGCCCGTGTGGAAGAC (서열번호 7)	CGTCACCGATGATGGAGGTT (서열번호 8)	702
A_O1	CCGCCCAAATTCATCGTTGG (서열번호 9)	CCGGTCATCGCCATAATCTGA (서열번호 10)	220

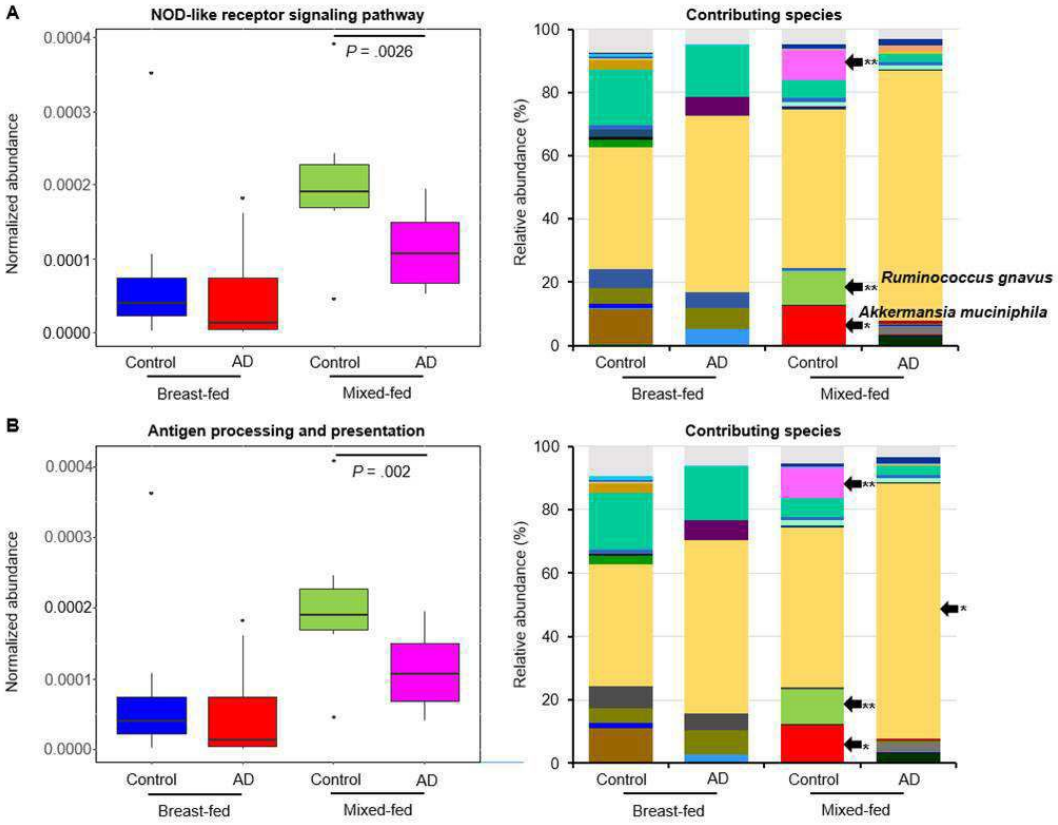
[0116]

도면

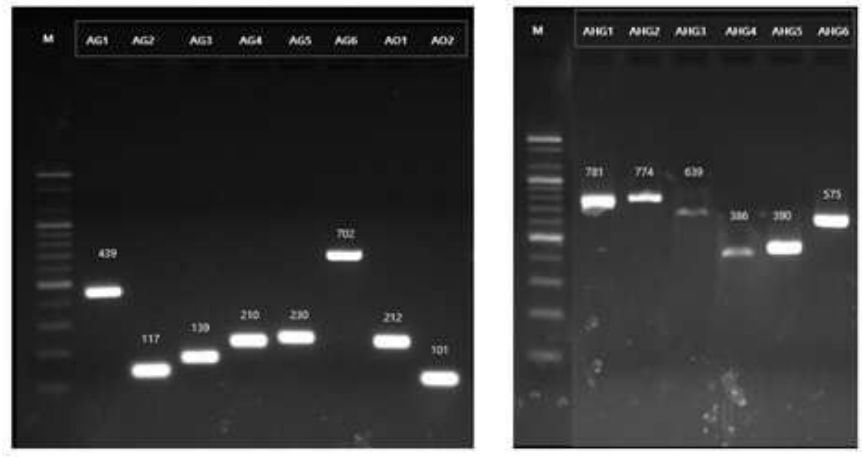
도면1



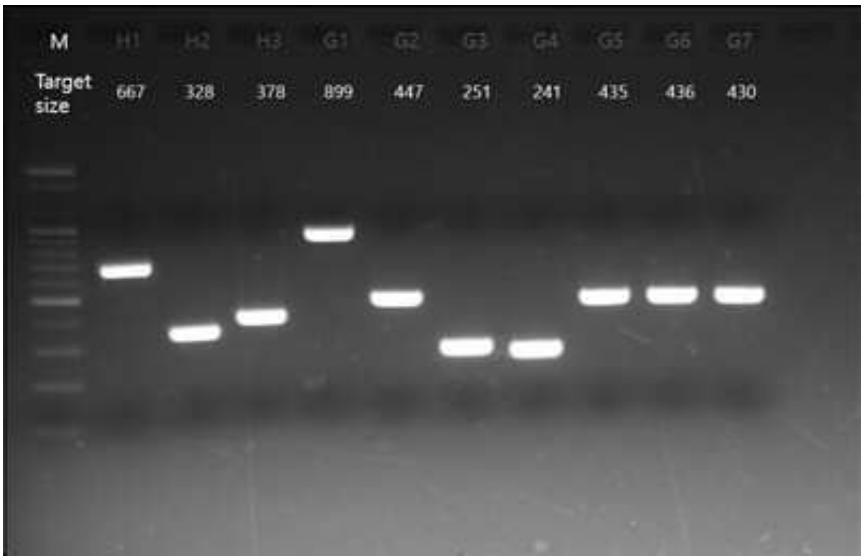
도면2


A
NOD-like receptor signaling pathway
Normalized abundance
P = .0026
Control
AD
Breast-fed
Mixed-fed
Contributing species
Relative abundance (%)
Ruminococcus gnavus
Akkermansia muciniphila
B
Antigen processing and presentation
P = .002

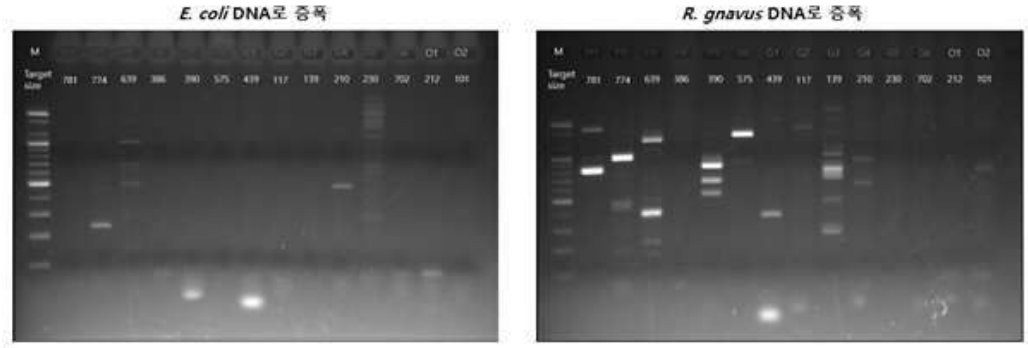
도면3


M
AG1
AG2
AG3
AG4
AG5
AG6
AD1
AD2
439
117
139
210
230
702
212
101
AHG1
AHG2
AHG3
AHG4
AHG5
AHG6
781
774
639
386
390
575

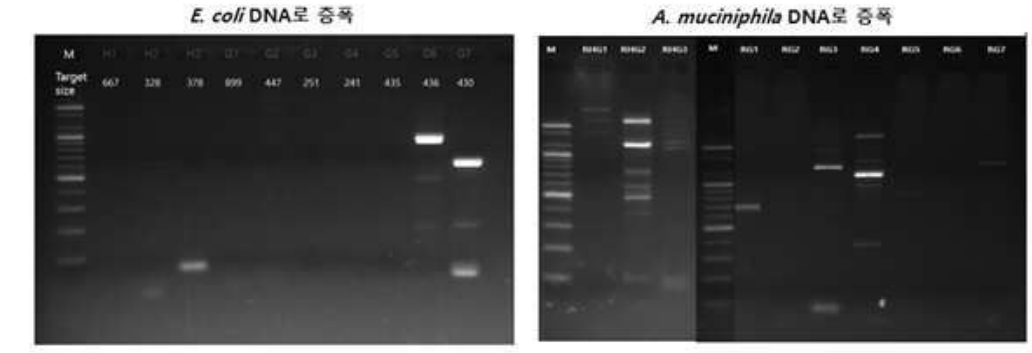
도면4


M
H1
H2
H3
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
Target size
667
328
378
899
447
251
241
435
436
430

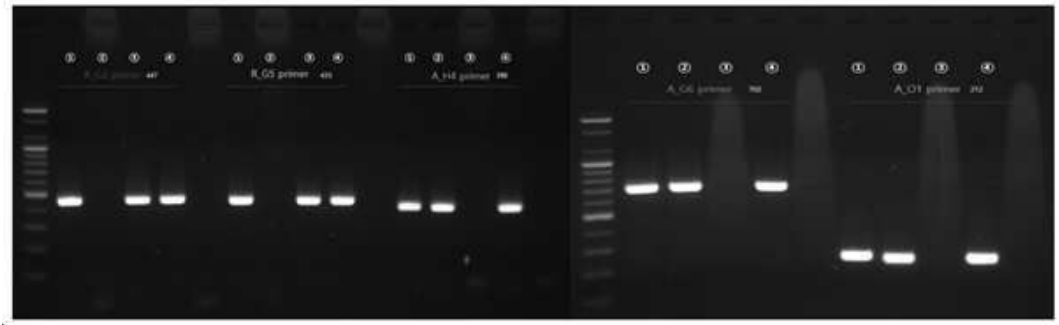
도면5


E. coli DNA로 증폭
R. gnavus DNA로 증폭

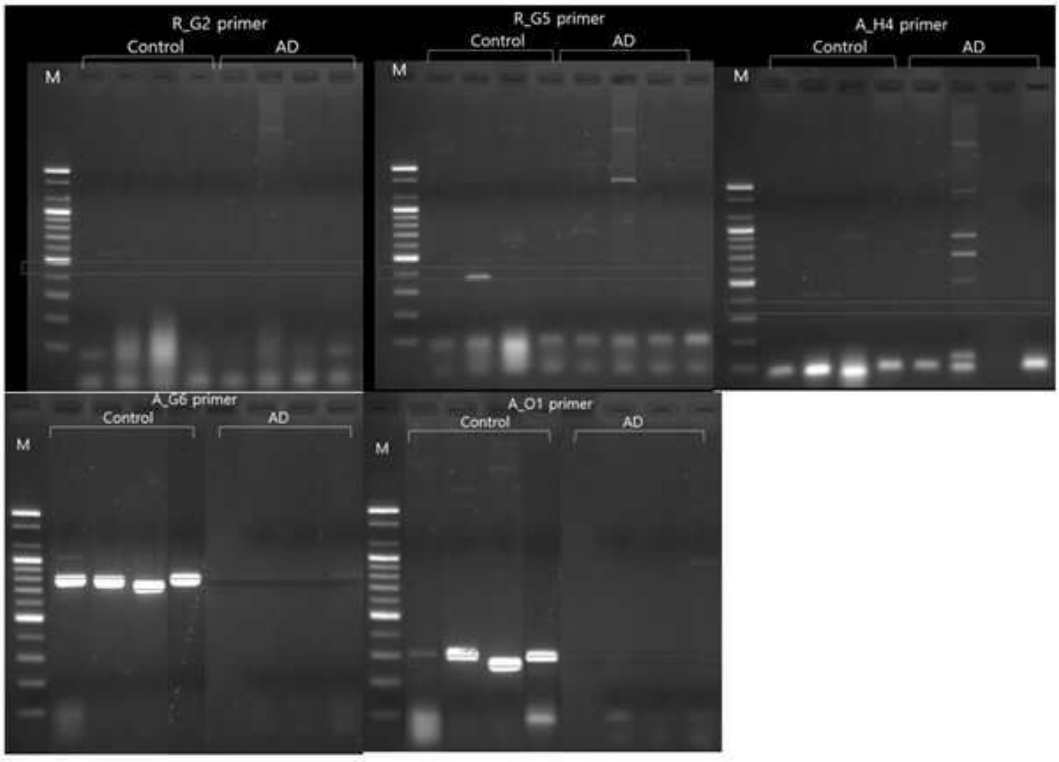
도면6


E. coli DNA로 증폭
A. muciniphila DNA로 증폭

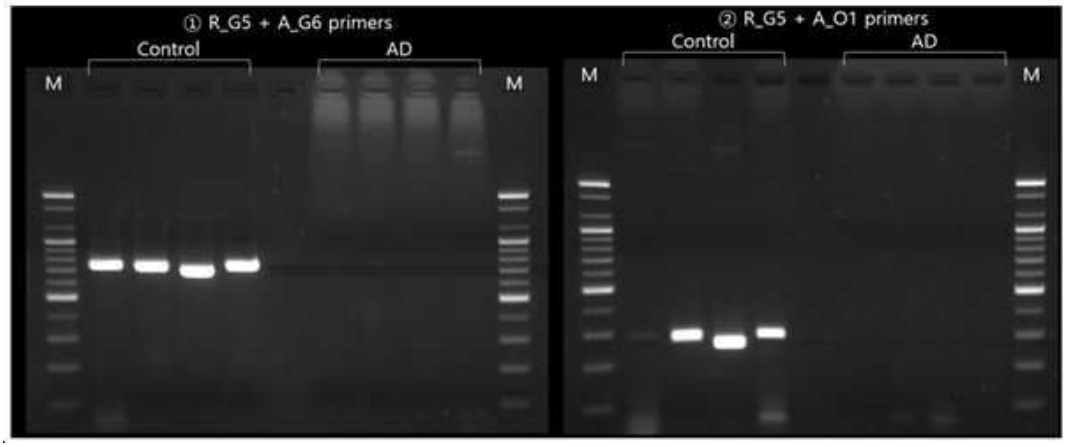
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록

<110> THE ASAN FOUNDATION
INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION OF U1SAN UNIVERSITY
INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION OF HALLYM UNIVERSITY
<120> COMPOSITION FOR EARLY DIAGNOSING ATOPIC DERMATITIS USING CHANGES IN THE GUT MICROBIAL COMMUNITY
<130> 1064186
<160> 10
<170> KoPatentIn 3.0
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> barcode primer-F
<400> 1
agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 2
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> barcode primer-R
<400> 2
attaccgcgg ctgctgg 17
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Illumina adapter sequence primer-F
<400> 3
atacggcgac caccgagatc 20
<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Illumina adapter sequence primer-R

<400> 4

caagcagaag acggcatacg ag 22

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for R_G5

<400> 5

gcacctgagt tcttgggaga 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for R_G5

<400> 6

gaccgggatc aaggagagac 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for A_G6

<400> 7

atgtagcccg tgtggaagac 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for A_G6

<400> 8

cgtcaccgat gatggaggtt 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for A_01

<400

> 9

ccgcccaaat tcatcgttgg 20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for A_01

<400> 10

ccggtcatcg ccataatctg a 21