



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0014920
(43) 공개일자 2009년02월11일

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0079260

(22) 출원일자 2007년08월07일

심사청구일자 2007년08월07일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

설동근

서울시 중구 신당 4동 약수하이츠아파트 111-106호

정운원

경기 고양시 일산동구 중산동 중산마을 1001동 702호

(74) 대리인

이문섭, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 5 항

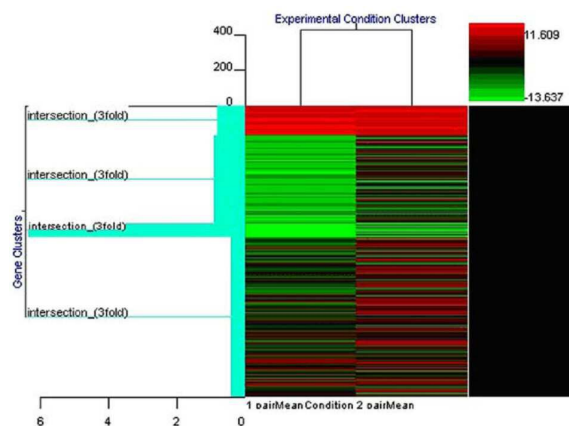
(54) 포름알데히드 노출 여부 진단용 바이오 마커 유전자

(57) 요약

본 발명은 포름알데하이드에 흡입 노출된 폐 조직에서의 독성 유전체 지표에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 포름알데히드 노출 여부 진단용 바이오 마커 유전자 및 이를 포함하는 마이크로어레이 및 진단키트에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 마이크로어레이 칩을 이용한 계층 분석을 통하여 포름알데히드 노출에 의해 2개의 유전자가 증가-조절되고 19개의 유전자가 감소-조절된다는 것을 보여주었다. 이러한 21개 유전자 중 9개의 유전자는 정량적 RT-PCR 분석에 의해 확인되었고, 이 유전자들은 포름알데히드 노출과 관련된 인간 질병에 대한 유용한 마커로서 제공될 것이다. 또한, 상기 바이오마커 유전자들은 포름알데히드 노출과 관련된 인간 질병의 진단을 위한 마이크로어레이 또는 휴대용 측정 키트의 개발에 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0608601, R0604891

부처명 한국과학재단, 환경부

연구사업명 MRC, 차세대 핵심기술개발사업

연구과제명 PAH 및 Dioxin 환경에 노출된 근로자에서의 혈장단백체생체독성지표 발굴, 가족 단위 환자
대조군 연구방법 및 면역학적 방법을 이용한 실내 및 대기오염에 의한 천식, 알러지 및 화학물질 증후군 인체건강
영향 모니터

주관기관 의무산학협력실, 산학연

연구기간 2003년~2012년, 2004년~2008년

특허청구의 범위

청구항 1

포름알데히드 노출에 따라 발현이 변화하는 하기 군에서 선택된 폐조직 유래의 유전자를 유효성분으로 포함하는 포름알데히드 노출여부 진단용 바이오 마커:

- ① 서열번호 1의 염기서열을 갖는 시토크롬 P450, 패밀리 2, 서브패밀리 d, 폴리펩타이드 2(Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 2) 유전자 (NCBI 수탁번호 AB008423),
- ② 서열번호 2의 염기서열을 갖는 히드록시메틸빌란 신테이즈(Hydroxymethylbilane synthase) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM013168),
- ③ 서열번호 3의 염기서열을 갖는 글루타티온 환원효소(Glutathione reductase) 유전자 (NCBI 수탁번호 U63923),
- ④ 서열번호 4의 염기서열을 갖는 카르보닉 안하이드레이즈 2(Carbonic anhydrase 2) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM019291),
- ⑤ 서열번호 5의 염기서열을 갖는 나트리우레틱 펩티드 리셉터 3(Natriuretic peptide receptor 3) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM012868),
- ⑥ 서열번호 6의 염기서열을 갖는 리소좀-연관 단백질 트랜스멤브레인 5(Lysosomal-associated protein transmembrane 5) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM053538),
- ⑦ 서열번호 7의 염기서열을 갖는 G-단백질 신호전달 조절자 3(Regulator of G-protein signaling 3) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM019340),
- ⑧ 서열번호 8의 염기서열을 갖는 올팩토메딘 관련 ER 국소화 단백질(Olfactomedin related ER localized protein) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM053573), 및
- ⑨ 서열번호 9의 염기서열을 갖는 폴리(ADP-리보스) 중합효소-1(Poly(ADP-ribose) polymerase-1) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM013063).

청구항 2

제 1항에 따른 바이오 마커 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 프로브를 기관상에 포함하는 포름알데히드 노출여부 진단용 마이크로어레이.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 프로브는 서열번호 10 내지 27의 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 포름알데히드 노출여부 진단용 마이크로어레이.

청구항 4

제 1항에 따른 바이오 마커 유전자를 증폭할 수 있는 하나 이상의 프라이머를 포함하는 포름알데히드 노출여부 진단용 RT-PCR 키트.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 10 내지 27의 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 포름알데히드 노출여부 진단용 RT-PCR 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 포름알데하이드에 흡입 노출된 폐 조직에서의 독성 유전체 지표에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는

포름알데히드 노출 여부 진단용 바이오 마커 유전자 및 이를 포함하는 마이크로어레이 및 진단키트에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 포름알데히드 (formaldehyde, FA)는 동물에서는 축적된 증거의 결과로서, 인간에서는 제한된 범위에서 역학적 연구 (epidemiological study, IARC, 1995)를 통해 IARC (International Agency for Research on Cancer)에 의해 그룹 2A 발암물질로서 분류되었다. 포름알데히드는 직업적 환경 (병원, 식물, 합성수지, 목재 합성물)과 실내 환경 (단열재, 합판, 식물, 난방, 조리열 방출)에서 빈번하게 사용되었으며, 빌딩증후군 (sick building syndrome)의 원인이 되는 주요소 중 하나로 여겨지고 있다 (Kim et al. 2002; Kita et al. 2003; Nakazawa et al. 2005).
- <3> 포름알데히드는 세포독성, 혈액독성, 면역독성, 및 유전독성의 특성들을 가진다고 보고되어 왔다. 유전-독성학적 연구는 환경에서 주위의 낮은 농도의 포름알데히드는 다양한 인간 세포형에서, 쥐(rat)의 기관지 상피세포의 일차배양에서, 및 마우스 세포에서 UV 조사 후 DNA 손상, 성장저해, 및 DNA 수선의 지연을 유도한다는 것을 보고하였다.
- <4> 포름알데히드는 단백질, 핵산과 같은 서로 다른 세포내 거대분자 및 아미노산과 같은 저분자량의 분자들과 반응하는 잘 알려진 가교제이다 (Cheng et al. 2003; Liteplo et al. 2003; Metz et al. 2004). 따라서, 코 세포 (nasal cells)에서 포름알데히드-유도된 DNA 부산물의 수준 (levels)은 포름알데히드 노출 및 그 유해효과의 바이오마커로서 사용될 수 있다고 예상되어 왔다 (Zong and Que Hee 2004). 이전 연구에서, 독성 효과들 (DNA 단일 가닥 파손 및 DNA 부산물의 형성)은 생물체에서 유전자 조절과 단백질 발현을 변경하는 것으로 알려져 있다 (Crafstrom 1990; Heck and Casanova 1999; Oh et al. 2004; Ross and Shipley 1980).
- <5> 최근, 유전체학, 특히 여기서 파생된 분야인 독성유전체학은 특히 생물학적 시스템에서 유전자 발현에 대한 화학제와 약제의 효과에 대한 연구를 가능하게 하는 빠르게 발전하는 기술로 보인다 (Corvi 2002). 독성학에 대한 마이크로어레이 기술의 폭 넓은 적용은 독성 화학제의 다양한 바이오마커를 생산할 가능성이 있는 전통적인 독성학적 방법들과 병합하여 효율적인 연구 도구를 제공해왔다. 따라서, 본 발명에서는 포름알데히드의 어떤 바이오마커들이 인간의 질병과 관련되어 있는지를 밝혀내기 위하여 유전체 분석을 수행하였다.
- <6> 본 발명자들은 포름알데히드의 3가지 다른 농도 선택하여 흡입에 의해 포름알데히드 처리된 쥐의 폐 세포에서 유전독성 및 세포독성 분석을 수행하고 이어서 일어나는 유전자 발현에 대한 포름알데히드의 효과를 유전체 분석에 의하여 확인하였다.
- <7> 본 발명은 포름알데하이드에 흡입노출된 쥐의 폐조직의 유전체를 Genomics 기법을 사용하여 독성물질에 의해 민감하고 특이적으로 변화되어지는 유전체를 발굴한 것이며, 현재까지 이와 같은 기법을 이용한 쥐의 폐조직에서의 포름알데하이드 독성 유전체 지표 관한 연구결과가 보고되어진 적이 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 포름알데하이드 독성 유전체 지표가 될 수 있는 바이오마커 유전자를 제공하는 데 있다.
- <9> 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오마커 유전자를 이용한 환경 유해/독성 물질의 위해성 평가를 위한 진단 칩 또는 키트를 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

- <10> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 포름알데히드 노출에 따라 발현이 변화하는 하기 군에서 선택된 폐조직 유래의 유전자를 유효성분으로 포함하는 포름알데히드 노출여부 진단용 바이오 마커를 제공한다:
- <11> ① 서열번호 1의 염기서열을 갖는 시토크롬 P450, 패밀리 2, 서브패밀리 d, 폴리펩타이드 2(Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 2) 유전자 (NCBI 수탁번호 AB008423),
- <12> ② 서열번호 2의 염기서열을 갖는 히드록시메틸빌란 신테아제(Hydroxymethylbilane synthase) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM013168),

- <13> ③ 서열번호 3의 염기서열을 갖는 글루타티온 환원효소(Glutathione reductase) 유전자 (NCBI 수탁번호 U63923),
- <14> ④ 서열번호 4의 염기서열을 갖는 카르보닉 안하이드레이즈 2(Carbonic anhydrase 2) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM019291),
- <15> ⑤ 서열번호 5의 염기서열을 갖는 나트리우레틱 펩티드 리셉터 3(Natriuretic peptide receptor 3) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM012868),
- <16> ⑥ 서열번호 6의 염기서열을 갖는 리소좀-연관 단백질 트랜스멤브레인 5(Lysosomal-associated protein transmembrane 5) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM053538),
- <17> ⑦ 서열번호 7의 염기서열을 갖는 G-단백질 신호전달 조절자 3(Regulator of G-protein signaling 3) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM019340),
- <18> ⑧ 서열번호 8의 염기서열을 갖는 올팩토메딘 관련 ER 국소화 단백질(Olfactomedin related ER localized protein) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM053573), 및
- <19> ⑨ 서열번호 9의 염기서열을 갖는 폴리(ADP-리보스) 중합효소-1(Poly(ADP-ribose) polymerase-1) 유전자 (NCBI 수탁번호 NM013063).
- <20> 본 발명에서, 포름알데히드 노출에 따라 발현이 변화한다는 것은 유전자의 발현이 상향(up) 또는 하향(down) 조절되는 것을 의미한다. 또한, 상기 유전자들의 염기서열은 공지된 NCBI로부터 얻을 수 있다.
- <21> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 바이오 마커 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 프로브를 기관상에 포함하는 포름알데히드 노출여부 진단용 마이크로어레이를 제공한다.
- <22> 본 발명에 있어서, 상기 프로브는 상기 서열번호 1 내지 9 중 어느 하나의 염기서열 또는 그 단편에 상보적인 서열을 갖는 어떤 올리고뉴클레오타이드도 될 수 있으나, 바람직하게는 상기 프로브는 서열번호 10 내지 27의 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 포름알데히드 노출여부 진단용 마이크로어레이를 제공한다.
- <23> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 바이오 마커 유전자를 증폭할 수 있는 하나 이상의 프라이머를 포함하는 포름알데히드 노출여부 진단용 RT-PCR 키트를 제공한다.
- <24> 본 발명에 있어서, 상기 프라이머는 상기 서열번호 1 내지 9 중 어느 하나의 염기서열 또는 그 단편에 상보적인 서열을 갖는 어떤 올리고뉴클레오타이드도 될 수 있으나, 바람직하게는 상기 프라이머는 서열번호 10 내지 27의 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 포름알데히드 노출여부 진단용 RT-PCR 키트를 제공한다.
- <25> 본 발명의 상기 서열번호 10 내지 27의 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 포름알데히드 노출에 따라 발현이 변화하는 폐조직 유래의 서열번호 1 내지 9의 염기서열을 갖는 바이오 마커 유전자들에 특이적으로 결합함으로써, 상기 바이오 마커 유전자들을 특이적으로 RT-PCR 증폭할 수 있는 프라이머 서열로 사용될 수 있고, 또한 상기 바이오 마커 유전자들과 특이적으로 혼성화할 수 있는 프로브 서열로도 사용될 수 있다.
- <26> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기 프로브는 데옥시뉴클레오타이드(DNA), 리보뉴클레오타이드(RNA) 같은 전통적인 핵산뿐만 아니라, 펩타이드뉴클레오타이드(PNA), 락크드뉴클레오타이드(LNA) 및 디-핵시톨뉴클레오타이드(HNA)에서 선택된 핵산유사체도 될 수 있다. 상기 핵산 유사체는 핵산분해효소(nuclease)등 효소에 안정하고, 구조상으로 염기서열에 매우 특이적 결합을 하며, 열에 안정적인 장점이 있다. 즉, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 표적 서열과 혼성화할 수 있는 그 염기서열에 특징이 있으므로, 상기 염기서열과 동일한 염기서열을 가지는 한 상기 핵산유사체를 포함하는 개념으로 이해되어야 한다.
- <27> 본 발명의 마이크로어레이에서, 상기 프로브는 센스(sense) 또는 안티센스(antisense)용으로 제작될 수 있다. 따라서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 상기 서열번호들의 염기서열 또는 이에 상보적인 서열을 가질 수 있다.
- <28> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기 지지체는 슬라이드글라스, 플라스틱, 멤브레인, 반도체 칩(semiconductive chip), 실리콘, 젤(gel), 나노(nano) 재료, 세라믹, 금속재료, 광섬유 또는 이들을 조합하여 만들릴 수 있다. 본 발명의 마이크로어레이는 당업계에 알려진 통상의 핀 마이크로어레이(pin microarray)(Microarray printing technology, Don Rose, Ph.D., Cartesian Technologies, Inc., Anal

Biochem, 320(2):281-91(2003)), 잉크젯(ink jet)(Nat Biotech, 18:438-441(2000), Bioconjug Chem, 13(1):97-103(2002)), 포토리소그래피(photolithography)(Cur Opin Chem Biol, 2:404-410(1998), Nature genetics supplement, 21:20-24(1999)), 또는 전기어레이(electric array)(Ann Biomed Eng. 20(4):423-37(1992), Psychiatric Genetics, 12:181-192(2002)) 방법등으로 제작될 수 있다.

- <29> 본 발명의 마이크로어레이는 진단키트의 형태로 제공될 때, 본 발명의 마이크로어레이외에 표적 DNA를 분리하기 위한 추출용 시약, 표적유전자를 증폭하기 위한 프라이머가 포함된 PCR 키트, 혼성화 반응용액, 비혼성화 반응 DNA 세척용 용액, 커버슬립, 염료, 비염료 결합 세척용 용액 및 사용설명서 등을 더 포함할 수 있다.
- <30> 본 발명의 마이크로어레이를 이용하여 포름알데히드 노출여부를 진단하는 방법에서, 핵산의 분리는 통상의 DNA 또는 RNA 분리방법이나 키트를 사용하여 수행될 수 있으며, DNA 증폭은 통상의 PCR 또는 RT-PCR 방법으로 수행될 수 있으며, PCR 검출 방법은 통상의 아가로스 겔을 이용하여 전기영동 분석 방법으로 수행하거나, 마이크로어레이 시그널 검출은 통상의 Cy5 또는 Cy3 등 형광 염료 결합 및 시그널 검출용 스캐너를 이용하여 수행될 수 있다.
- <31> 본 발명자들은 유전자들의 서로 다른 발현을 조사하기에 앞서 폐조직에서 포름알데히드의 유전독성 및 세포독성 효과를 측정하였다. comet assay는 DNA 손상과 MDA 분석을 확인하기 위하여 사용되었으며, spectro-immunoassays는 지질 과산화 수준과 DNP-접합 단백질의 존재여부를 각각 측정하기 위하여 사용되었다.
- <32> FA는 N-methyl-N-nitrosourea 노출에 의해 당초에 손상된 기관지 세포에서 지속적인 DNA 손상을 일으키고, UV 조사로 유도된 단일 가닥 DNA 파손의 수선을 저해하는 것으로 밝혀졌다 (Grafstrom et al. 1983). 본 발명은 DNA 손상이 FA 노출 증가에 의해 마우스의 폐에서 현저하게 유도되는 것과 같은 유사한 결과를 제시하였다.
- <33> 성장의 서로 다른 단계에서 마우스 고환 생식세포 (testicular germ cells)에서의 MDA 수준은 높은 수준의 포름알데히드에 노출되었을 때 현저하게 증가되었다고 보고되어 왔다 (Tang et al. 2003). 일반적으로, 지질 과산화는 생체막 (biomembranes)과 리포단백질 (lipoprotein)과 같은 복합 지방성 단백질 집합체 (complex lipid protein assemblies)의 구조적 변형을 초래하는 유해한 과정으로 여겨지고 있고, 보통 세포의 기능장애 (malfunction)와 관련되어 있다 (Kunn and Borchert 2002). 본 발명에서는, 10 ppm 농도의 포름알데히드가 폐 조직에서 MDA의 수준에 의해 측정된 지질 과산화를 현저하게 증가시켰으며, 투여량-의존적 방법에서 역시 증가되는 것으로 밝혀졌다. 또한, 포름알데히드는 세포내 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)의 증가를 통하여 자유 라디칼 (free radicals)로 세포독성효과를 유도하는 것으로 보고되어 왔는데 (Saito Y et al. 2005), 이러한 ROS, 예컨대 자유 라디칼 (free radical species)은 지질, 단백질 및 DNA에 산화적 손상을 유도한다 (Dalle-Donne et al. 2003). 본 발명에서, 단백질 산화 시 패턴은 쥐의 폐에서 지질 과산화와 유사하게 나타났다. 요컨대 포름알데히드는 쥐의 폐조직 단백질에서 카르보닐기 함량의 현저한 증가를 유도하였다.
- <34> 단백질에 자유 라디칼 손상은 몇몇의 물질대사 효소들의 산화적 불활성화 (inactivation)와 관련되어 있다 (Fagan et al. 1999). 계놈 분석은 물질대사와 관련되어 있는 여러 유전자를 보여준다. 이러한 유전자들은 쥐의 폐에서 포름알데히드에 의해 감소-조절되는 Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 2, Hexokinase 1, Hydroxymethylbilane synthase, Glutathione reductase, Carbonic anhydrase 2, 및 Phospholipase 2A, group 5를 포함한다. 이러한 유전자들 중에서, 글루타티온 환원효소 (Glutathione reductase)는 GSSG를 2 분자의 GSH로 변화게 하고, 자유 라디칼과 활성산소의 해독과 같은 몇몇 중대한 세포 기능을 가능하게 하는 물질대사 효소로서 알려져 있다. 세포에서 글루타티온 환원효소 활성의 감소는 세포에서 몇몇 질병과 관련되어 있는 한 과정인 감소된 글루타티온 수준을 유도한다 (Erat and Ciftei 2006). 포름알데히드는 자유 라디칼을 해독하는 능력의 손실을 초래하는 글루타티온 환원효소 발현의 감소를 유도하였고, 그 결과 현저한 지질 과산화와 단백질 산화를 초래하였다. 포스포리파제 2A (Phospholipase 2A)는 포름알데히드에 의해 현저하게 감소-조절되었고 포스포리파제 2A는 아라키돈산 (arachidonic acids)을 분비하게 하는 인지질 가수분해 (phospholipids hydrolysis) 효소로서 알려져 있는데, 이는 활성산소, 지질 과산화물, 및 독성 알데히드의 형성을 초래한다 (Adibhatla and Hatcher 2006; Adibhatla et al. 2006). 포스포리파제 2A의 감소-조절은 지질 과산화를 환원시키기 위하여 세포내 항상성에서 기능을 하는 것으로 보인다.
- <35> Hydroxymethylbilane synthase는 쥐의 폐에서 포름알데히드 노출에 의해 현저하게 감소되었다. Hydroxymethylbilane synthase는 헴 생합성경로 (heme biosynthetic pathway)에서 세 번째 효소로서 언급되어져 있다. 급성 간헐성 피린증 (acute intermittent porphyria)은 헴 생합성과 관련한 장애이며 포르피린 (porphyrins) 또는 그 전구체의 과도한 분비로 특성화된다 (Schneider-Yin et al. 2006; Yoo et al. 1993). 특정 polychlorinated chemical agent, 예를 들어 헥사클로로벤젠 (hexachlorobenzene)이 헴 경로에 영향을 주는

거처럼, 이 혈액 질환은 아마도 유전되거나 후천적일 것이다 (Mazzetti et al. 2004). 현재의 게놈 연구는 포름알데히드가 아마도 헴 경로 또는 피린중에 영향을 주는 다른 환경 화학적 요소라는 것을 나타낸다.

<36> 또한, 포름알데히드는 면역독성의 특성을 가지는 것으로 알려져 있다. 매우 낮은 농도의 포름알데히드 (0.07-0.55 ppm)가 면역글로불린 G 항체를 자극하고 peripheral T 세포들의 비율을 감소시키는 것으로 나타나긴 하였으나 (Thrasher et al. 1987), 포름알데히드 에어로졸 (1%)의 흡입은 쥐의 코 점막에서 인터페론-감마 (Interferon-gamma), 인터루킨 (IL)-2 (interleukin-2), IL-4, 및 IL-5와 같은 Th-1 및 Th-2 관련 사이토카인들을 저하시켰다 (Ohtsuka et al. 2003). 본 발명의 게놈 연구에서, 본 발명자들은 Complement component 4 binding protein alpha와 Fc receptor, IgG, Low affinity III를 포함하는 면역 관련 유전자들이 5 또는 10 ppm 포름알데히드에 노출된 쥐의 폐에서 감소되었음을 증명하였다.

<37> 세포내 수송 (intracellular transport)에 관련된 유전자들의 발현에 대한 본 발명은 transthyretin은 감소-조절되지만, potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12 및 translocase of inner mitochondrial membrane 8 (yeast) homolog A는 증가-조절되었음을 나타낸다.

<38> 신호 전달에 대한 포름알데히드의 효과에 관해서는, 2개의 신호-관련 유전자가 현저하게 감소-조절되었다. Natriuretic peptide receptor 3은 제거기능 (clearance function)에 대하여 가장 잘 알려져 있으며, 또한 아마도 adenylate cyclase를 억제하거나 phosphoinositol pathway를 활성화하는 G-protein과 상호작용 할 것이다 (Savinova et al. 1997). 본 발명자들은 포름알데히드에 의해 G-protein signaling 3의 조절이 현저하게 감소-조절되었음을 증명하였다. 게다가, 성장과정 (development process), 응고 (coagulation), 유전자 발현, 세포 항상성, 및 종양형성 (oncogenesis)와 기능적으로 관련된 유전자들은 포름알데히드에 의해 모두 감소-조절되었다. 따라서 본 발명의 게놈 연구의 결과는 포름알데히드가 쥐의 폐에서 세포 기능에 대한 다양한 효과를 가진다는 것이다.

<39> 요약하면, 세포독성 분석, 지질 과산화 및 카르보닐기의 단백질 산화는 세포독성 효과가 흡입된 포름알데히드의 수준을 증가시키는 것에 반응하여 증가한다는 것을 나타내었다. 마이크로어레이 칩을 사용하는 게놈 분석은 포름알데히드 노출 후 2개의 유전자가 증가-조절되고 19개의 유전자가 감소-조절된다는 것을 보여주었다. 이러한 21개 유전자 중, cytochrome P450, hydroxymethylbilane synthase, glutathione reductase, carbonic anhydrase 2, natriuretic transmembrane 5, regulator of G-protein signaling 3, olfactomedin-related ER localized protein, 및 poly (ADP-ribose) polymerase-1을 포함하는 9개의 유전자는 정량적 RT-PCR 분석에 의해 확인되었고, 이 유전자들은 포름알데히드 노출과 관련된 인간 질병에 대한 유용한 마커로서 제공될 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<40> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<41> 실시예 1: 실험재료 및 실험 디자인

<42> 포름알데히드 (FA), 트리클로로아세트산 (TCA), 2-티오바비투릭산 (TBA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 및 1,1,3,3-테트라에톡시프로판 (TEP)는 Sigma Chemical (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 2,4-딘트로페닐 히드라진 (DNPH)는 Fluka (Buchs, Switzerland)로부터 구입하였다. HPLC 등급 아세톤, 에틸아세테이트, 에탄올, 메탄올 및 증류수는 J.T. Baker (Deventer, The Netherlands)로부터 구입하였다. 실험동물로서, 특이 병원체 무감염 수컷, Sprague-Dawley 쥐(rat)는 Samtaco Animal Breeding Company (오산, 한국)로부터 입수하였으며, 표준 실험실 조건 (Tm, 24± 2°C; 습도 50± 10% 및 12-h 낮/밤 주기)에서 사육하였다. 동물들을 1-2주간 사육시설에 순응시킨 후 비정상적인 행동을 관찰하였다. 동물들을 표준 먹이 섭취와 임의대로 물을 섭취할 수 있도록 하였고, 본 발명에서 노출 첫날은 6-8주째였다. 2개의 포름알데히드 노출군 (5와 10 ppm) 및 노출되지 않은 대조군을 본 발명에 사용하였다. 동물들을 흡입 노출 챔버에서 5일/주 및 6h/일씩 2주간 포름알데히드에 노출시켰다. 포름알데히드 농도를 측정하기 위하여, 공기 샘플을 수집해서 포름알데히드 농도를 HPLC로 측정하였다. 쥐 10마리씩 3번의 실험에 노출시켰다 (n=30 마리). 마지막으로 쥐들을 70% CO₂를 사용하여 희생시키고 혈액 오염을 최소화하기 위하여 차가운 인산완충용액을 쥐들의 폐에 부렸다. 그 다음 유전자 분석 및 단백질 산화와 지방 과산화의 정도를 측정을 위하여 폐 조직 샘플을 채취하고 액체질소에 동결하였다.

<43> 실시예 2: 포름알데히드 노출

<44> 포름알데히드 노출은 1-m³ 스테인리스스틸-글라스 흡입 챔버에서 2주간 수행되었다. 포름알데히드 농도 (5와 10

ppm)는 Permeater PD-1B (Gastec, Japan)를 사용하여 제조하고 2차 혼합 챔버에서 습기가 있는 공기흐름을 변경함으로써 조절하였다. 노출 챔버 공기는 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 와 습도 $50 \pm 5\%$ 로 조정하였다. 흡입 시 포름알데히드 농도는 HPLC로 모니터하였다. 실험 2주가 지난 뒤 도달한 실제 평균 포름알데히드 농도는 5.10 ± 0.01 및 10.08 ± 0.01 ppm이었다.

<45> 실시예 3: DNA 손상의 측정

<46> Singh에 의해 기술된 바와 같이 약간 변형된 코멧 어세이(comet assay)를 수행하였다 (Singh et al., 1988). 요컨대, 전자렌지로 가열하여 정상 녹는점 아가로즈와 낮은 녹는점 아가로즈 (Ameresco, NMA)를 PBS (Gibco, BRL)에 녹였다. 그 다음, 단단한 부착을 위하여 1% NMA 100 μl 를 1% NMA 50 μl 로 precoat된 완전히 결빙된 슬라이드에 첨가하였으며, 상기 슬라이드를 커버 슬립으로 덮어 냉장고에서 5분간 고형화시켰다. 겔의 고형화 후, 커버 슬립을 제거하고 1% LMA 50 μl 와 혼합된 폐 세포 50 μl 를 첨가하였다. 커버 슬립을 상기 층 (the layer)에 덮고 상기 슬라이드를 다시 냉장고에서 5분간 고형화시켰다. 커버 슬립을 제거한 후, 0.5% LMA 100 μl 을 3번째 층에 첨가하고, 슬라이드를 커버 슬립으로 덮어 다시 냉장고에서 5분간 두었다. 슬라이드를 lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-2Na, 10 mM Tris-HCl, pH 10; 1% Triton X-100 및 10% DMSO, pH 10을 새로 첨가하였다)에 1시간 동안 담갔다. 그 후, 상기 슬라이드를 unwinding buffer (1 mM EDTA와 300 mM NaOH, pH 13)에 20분간 방치한 뒤 동일한 용액을 사용하여 20분간 25V 300mA (0.8V/cm)에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, 슬라이드를 중화버퍼 (400 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 5분씩 3번 세척하여 중화시키고 10 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide 50 μl 로 염색하였다. 상기 슬라이드를 515-561 nm 여기필터 (excitation filter)와 590 nm 차단필터 (barrier filter)가 갖춰진 Olympus BX50 형광현미경으로 고정된 Comet 4.0 이미지 분석 시스템 (Kinetic Imaging, Liverpool, UK)을 사용하여 측정하였다. 각각의 처리군에 대하여, 2개의 슬라이드를 준비하고 각 50개의 랜덤하게 선택된 세포 (총 100 세포)를 수작업으로 점수를 매겼다. 파라미터인 olive tail moment $[(\text{Tail.mean} - \text{Head.mean}) * \text{Tail\%DNA}/100]$ 는 global comet description에 사용되는 Comet 4.0 이미지 분석 시스템을 사용하여 자동적으로 계산되었다.

<47> 실시예 4: 말론다이알데히드 (malondialdehyde, MDA)의 측정

<48> Agarwal과 Chase (2002)에 의해 기술된 MDA에 대한 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC) 방법은 폐 샘플의 분석을 위해 다음과 같이 약간 변형하여 사용되었다. 폐 MDA는 Synergi Polar-RP C18 5 μm 컬럼 (내경 4.6 mm 및 길이 300 mm)이 갖춰진 aa HPLC (Gilson, France)를 사용하여 측정되었다. 20% 폐 균질액 15 마이크로리터를 0.05% BHT 50 μl , 0.44 M 인산용액 (H_3PO_4) 400 μl , 및 TBA 용액 100 μl 와 혼합하였다. 그 다음, 상기 샘플을 100°C water bath에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후, TBA-MDA 부가 생성물을 n-부탄올로 추출하였다. n-부탄올 층으로부터 부분표본 (aliquots) 100 μl 을 제거한 뒤, HPLC 시스템에 주입하였다. 표준 및 품질관리 샘플을 97% TEP (0, 0.125, 0.5, 1.0, 및 2.0 $\mu\text{mol/l}$)를 사용하여 제조하였다.

<49> 실시예 5: 단백질 산화

<50> 약간 변형된 Fagan (Fagan et al., 1988)에 따라 spectrometric DNPH assay를 이용하여 폐에서 단백질 카르보닐기 (protein carbonyls)를 측정하였다. 요컨대, PBS (pH 7.2), 1% Triton x100, 1 mM EDTA 및 1x protease inhibitor cocktail을 포함하는 lysis buffer에서 초음파 처리로 폐 조직을 균질화하였으며, 불용성 세포 잔여물은 원심분리로 제거하였다. 단백질 샘플의 부분표본을 10배 용량의 HCl-aceton (3:100)으로 침전시킨 뒤, 10% TCA 용액 5 ml로 세척하였다. 펠릿 (pellets)을 500 μl 의 완충용액에 녹인 뒤, 10 mM DNPH () 500 μl 와 15분간 교반(vortexing)함으로써 반응시켰다. 단백질 blank는 2M HCl 용액 500 μl 로 하였다. 혼합 후, 30% TCA 500 μl 를 각 튜브에 첨가하고 교반하여 얼음에 10분간 방치하였다. 반응하지 않은 DNPH를 제거하기 위해, 원심 분리된 펠릿을 20% TCA 5 ml와 ethanol:ethylacetate 혼합물 (1:1)(v/v) 5 ml로 세척하였다. 최종 제조물을 6 M guanidine HCl 1 ml에 용해시키고, DNPH와 HCl 처리된 샘플에 대하여 380 nm에서의 흡광도를 측정하였다. DNPH와 HCl는 백그라운드로서 제외하였다. 카르보닐기 함량은 380 nm에서 흡광도 측정과 흡광계수 (absorption coefficient) 22,000 mol/cm^2 로부터 계산되었다.

<51> 실시예 6: RNA 추출

<52> 쥐(rat)의 폐 조직에서 total RNA를 TRIzol 시약(Invitrogen사, USA)을 사용하여 제조사에서 제공하는 추출방법으로 추출하고 사용 시까지 -80°C 에서 보관하였다. RNA의 농도와 순도는 260 nm에서 광전광도계 (spectrophotometer)로 측정하였고 Agilent사의 bioanalyzer로 분석하였다.

<53> **실시예 7: 마이크로어레이를 이용한 유전자 발현분석**

<54> 유전자발현은 CodeLink 쥐(rat) 총 게놈 Bioarrays (<34,000 genes; Amersham, Piscataway, NJ, USA)를 사용하였고 제조사가 제공한 방법에 따라 분석하였다. 분석방법은 first strand cDNA 합성을 위해, 2 µg의 total RNA를 control bacterial mRNA와 T7 oligo(dT) primer와 함께 혼합하고 70℃에서 10분간 방치하였다. 10분 방치 후 42℃에서 2시간 동안 first-strand 제조시약 (10x buffer, 5 mM dNTP, RNase inhibitor 및 역전사효소)과 함께 반응시켰다.

<55> Second strand cDNA는 first-strand cDNA 생성물과 second-strand 제조시약(10x buffer, 5mM dNTP, Rnase H, DNA 중합효소)과 혼합하고 16℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 제작된 second strand cDNA를 Ququick kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)로 정제하고 추출하였다. 최종 제작된 double strand cDNA는 IVT 혼합액 (10x reaction buffer, biotinylated UTP, UTP, ATP, CTP, GTP 및 T7 효소)과 함께 37℃에서 14시간 반응시켜 체외 전사물 (in vitro transcript)인 cRNA를 제작하였다. 바이오틴 (biotin)이 표지된 cRNA는 Qiagen Rneasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)로 정제하고 추출하였고 광전광도계와 Agilent™ Bioanalyzer로 농도 및 순도를 결정하였다. 10 µg 의 cRNA와 5x fragmentation buffer를 혼합하고 94℃에서 20분간 반응시키고 교잡반응 용액을 넣고 증류수로 최종용량을 260 µl로 하여 90℃에서 5분간 반응하였다. 교잡반응 반응물은 얼음에서 10분간 방치한 후 chip slide에 천천히 주입하고 밀봉하였다. Chip slide를 shaker를 사용하여 300 rpm으로 37℃에서 18-24시간 동안 반응시켰다. 교잡반응 후 chip을 미리 데워진 0.75x TNT buffer [1x TNT: 0.1 M TrisHCl (pH 7.6), 0.15 M NaCl, 및 0.05% Tween 20]에 넣고 46℃에서 1시간 동안 반응시키고 다시 한번 Cy5-스트렙토아비딘 반응액 (Cy5-streptavidin working solution) 3.4 ml에 넣고 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 chip slide를 1x TNT buffer에 넣고 5분씩 4번에 걸쳐 세척하고 0.1x SSC/0.05% Tween™ 용액에서 30초 동안 세척하였다. 세척된 chip slide는 ScanArray Express scanner (Packard BioScience, Meriden, CT, USA)를 이용하여 635 nm로 형광을 측정하였고 ImaGene 6.0 와 Genesight 4.1 프로그램을 이용하여 결과를 분석하였다.

<56> **실시예 8: 실시간(Real time) RT-PCR**

<57> Chip에서 분석된 유전자 발현의 차이가 있는 선택한 유전자에 대해 Roche사의 LightCycler system (Roche Diagnostics, GmbH Mannheim, Germany) 기기에서 SYBR Green 형광법을 이용하여 유전자 발현을 검증하였다. Lightcycler로 분석된 유전자는 Comparative CT method로 상대적 유전자발현을 분석하였다. 실시간 중합효소연쇄반응은 최종용량을 20 µl로 하여 2.0 µl의 10x buffer (50 mM KCl, 10 mM TrisHCl (pH 8.3), 0.001% gelatin), 2.0 µl의 2.5 mM MgCl₂, 1.6 µl의 2.5 mM dNTP, 1.0 µl의 5' primer (10 pmol/µl), 1.0 µl의 3' primer (100.4 µl의 amplitaq (5 U/ml), 10,000x 희석한 1.0 µl의 SYBR Green I (Molecular probes), 1.0 µl의 cDNA와 10.0 µl의 증류수를 혼합하였다. 중합효소연쇄반응의 조건은 95℃에서 3분간 denaturation하고, 52℃에서 5초, 및 72℃에서 12초의 과정을 40회 반복하였다. Beta-globin은 95℃에서 3분간 denaturation하고, 54℃에서 5초, 72℃에서 12초의 과정을 40회 반복하였다. 프라이머의 염기서열 (서열번호 10 내지 27)은 아래의 표 1과 같다. 실시간 중합효소연쇄반응은 각 유전자를 2조씩 분석하였고 반응물은 2.0% 아가로즈에서 single amplicon을 보이는지 확인하였다. 실시간 중합효소연쇄반응의 음성대조군은 각각의 실험에 포함하여 분석하였다. 정량 중합효소연쇄반응의 분석은 lightcycler version 4.0 프로그램으로 분석하였고 각각의 중합효소연쇄반응 반응물은 LightCycler기기를 이용하여 melting curve분석을 통해 검증하였다.

<58> [표 1]. 사용된 primers 와 그들의 증폭산물의 크기

Gene description	Forward/reverse primer	Size of products
Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 2	5'-CCCTTCAATCCCAGCATCCT-3' 5'-GGCAATCACGTTGCTCACAG-3'	51
Glutathione reductase	5'-TGAGAAGTGCGAGGTGAATGG-3' 5'-GTGCTGGCAAGGCATTCC-3'	71
Hydroxymethylbilane synthase	5'-TCTAGATGGCTCAGATAGCATGCA-3' 5'-TGGACCATCTTCTTGCTGAACA-3'	76
Natriuretic peptide receptor 3	5'-AAA GAA GGC CGG TTC AAA AT-3' 5'-AGG AGA GCT GTT GGT GTG CT-3'	105
Olfactomedin related ER localized protein	5'-AGC TGA GGC AGC TAC TGG AG-3' 5'-AAC TTG GAC TCC AGG CCT TT-3'	130
Carbonic anhydrase 2	5'-ACC ACT GGG GAT ACA GCA AG-3' 5'-AGG CTG TAG GGA AGG GTC AT-3'	131
Poly (ADP-ribose) polymerase-1	5'-CGA TGG AAA AGT CCC ACA CT-3' 5'-TGC GGT CTT CTT GAC CTT CT-3'	136
Regulator of G-protein signaling 3	5'-GAA TGT GGA CTG GCA GCT TT-3' 5'-TTG CCT GCA CAG AGA TGA AC-3'	163
Lysosomal-associated protein transmembrane 5	5'-AGT CTC CTG CAG GTT CTC CA-3' 5'-AAC AGT GTG AGC AGG CAC AG-3'	192

<59>

<60> 실시예 9: 통계분석

<61> 통계분석은 SAS version 8.2 프로그램을 이용하여 ANOVA (Duncan and Tukey)법으로 포름알데히드 노출군과 대조군을 분석하였다. 유의도는 모든 경우에 있어서 $P<0.05$ 로 결정하였다.

<62> 실험결과

<63> 실험결과 1: 포름알데하이드의 세포 및 유전독성

<64> 포름알데하이드의 쥐 폐조직에서의 유전독성(폐 세포내의 유전자손상) 및 세포독성(지질 및 단백질 산화손상)을 측정함으로써 유전체 독성 지표 발굴을 위한 포름알데하이드의 독성 농도를 설정하였다. 환경유해 독성물질에 의한 세포내의 DNA손상 측정은 도 1과 같이 단세포 전기영동법을 통하여 수행할 수 있다. 포름알데하이드에 의한 쥐의 폐세포에서의 DNA손상은 도 2와 같이 5ppm과 10ppm에서 유의성을 보였다.

<65> DNA 손상을 관찰하기 위한 폐의 comet assay 결과는 표 2에 나타내었다. 대조군 폐의 Olive tail moment의 평균값은 0.75 ± 0.07 이었다. FA 노출 2주 후, 5 ppm 또는 10 ppm FA에 노출된 쥐로부터 얻은 폐의 Olive tail moment의 평균값은 각각 1.11 ± 0.17 ($P=0.010$)과 1.32 ± 0.34 ($P=0.013$)로, DNA 손상의 현저한 수준을 나타낸다. 림프구의 Olive tail moment의 평균값은 FA 농도를 증가시키는 투여량 의존성 방법에서 증가되었다. 따라서 이러한 데이터는 5 또는 10 ppm FA가 마우스에서 DNA 손상을 일으킨다는 것을 나타낸다.

<66> 지질 과산화를 측정하기 위해, 0, 5, 또는 10 ppm 포름알데히드에 노출 2주 후 동물들에서 얻은 폐 조직을 MDA 분석하였다 (표 2). 5 ppm 포름알데히드 처리된 쥐의 폐에서 MDA의 수준은 대조군과 차이가 없었으나, 동물들이 10 ppm에서 포름알데히드에 노출되었을 때는 현저하게 더 높았다. 대조군 폐의 MDA 평균값은 0.62 ± 0.18 nmol/mg 단백질이었으며, 5 또는 10 ppm에서 포름알데히드에 노출 2주 후 평균 MDA 값은 각각 0.65 ± 0.15 와 1.34 ± 0.48 nmol/mg 단백질 ($P=0.0165$)이었다.

<67> 단백질 산화는 2,4-dinitrophenyl hydrazine와 유도된 아미노산에서 카르보닐기의 함량을 측정함으로써 평가하였다 (표 2). 단백질 산화는 쥐의 폐에서 지질 과산화의 유사한 패턴을 나타내었다. 5 ppm 포름알데히드 처리된 쥐의 폐에서 카르보닐기의 함량의 수준은 대조군과 차이가 없었으나, 단백질 산화의 수준은 10 ppm 수준에서 포름알데히드에 노출된 쥐의 폐에서 현저하게 증가되었다. 대조군 폐의 평균 카르보닐기 함량은 1.80 ± 0.16 nmol/mg 단백질이었으며 포름알데히드 노출 2주 후, 5 또는 10 ppm 포름알데히드에 노출된 쥐에서 이 평균값은 각각 2.15 ± 0.29 와 2.31 ± 0.07 nmol/mg 단백질까지 증가하였다 ($p=0.0011$). 포름알데하이드에 의한 쥐폐세포에서의 지질 및 단백질 산화손상은 5ppm에서는 유의적 증가를 나타내지 않았으나, 10ppm농도에서는 유의성 있는 손상을 보여주었다. (도 3, 4)

<68> [표 2]. 5 및 10 ppm FA로 처리된 쥐의 폐에서 산화적 손상

Concentration of formaldehyde	DNA damage (Olive tail moments)	Lipid peroxidation (MDA: nmol/mg protein)	Protein oxidation (protein carbonyl: nmol/mg protein)
Control	0.75 ± 0.07	0.62 ± 0.18	1.80 ± 0.16
5 ppm	1.11 ± 0.17*	0.65 ± 0.15	2.15 ± 0.29
10 ppm	1.32 ± 0.34*	1.34 ± 0.48*	2.31 ± 0.07*

<69>
<70> *대조군과 5 또는 10 ppm 사이에서 현저히 다름 (P<0.05)

<71> 실험결과 2: 유전체 분석을 통한 유전자 발현 변화

<72> 5 또는 10 ppm의 수준에서 포름알데히드 노출 후, 쥐의 폐에서 포름알데히드 효과에 대한 바이오 마커를 측정하였다. 총 30 유전자-칩 (Gene-Chips)을 대조군, 5 및 10 ppm 수준에 사용하였다. 유전자 발현 변화의 1.4-fold가 정확히 검출될 수 있기는 하지만 (Yue et al. 2001), 본 발명자들은 서로 다른 발현 변화가 3-fold (threefold) 또는 그 이상이고 투여량 의존적으로 증가되거나 통계학적으로 현저한 수준으로 감소 ($p<0.05$)되었던 유전자들을 선택하였다. 대체로, 표 3, 4에서 요약된 것과 같이, 21개 유전자는 ScanArray Express software를 사용하여 포름알데히드-노출된 쥐의 폐에서 증가- 및 감소-조절되는 것으로 밝혀졌다. potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 12 및 translocase fo the inner mitochondrial membrane 8 (yeast) homolog A를 포함하는 2개의 유전자는 투여량 의존적 방법에서 현저하게 증가된 반면, 다른 19개 유전자는 감소되었다. 도 1은 포름알데히드 노출된 쥐의 폐조직과 그들의 대조군의 발현 프로파일을 비교한 것에 대한 산점도 (scatter plot)이다. 동정된 21개는 세포사멸 (apoptosis), 면역, 물질대사, 신호전달, 수송, 응고 및 종양형성 (oncogenesis)과 관련되어 있었다 (표 4). 도 5은 K-means 알고리즘에 의하여 포름알데히드에 노출된 쥐의 폐조직에서 유전자 발현의 군집화 (clustering)를 보여준다. 세로 칸들 (the columns)은 순위가 매겨진 그들의 계층거리 (hierarchical distances)에 따른 유전자들을 나타내는 한편, 레드, 그린 및 블랙 컬러는 평균 발현과 비교하여 각각 높고 낮은 발현을 표시한다 (도 5). 유전체 분석을 통하여 포름알데하이드에 의하여 증가 (Up) 및 감소(down) 조절된 유전자는 다음 표 3과 같다.

<73> [표 3]

Accession no.	Gene description	Fold change(chip)	
		5ppm	10ppm
1. NM053981	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	2.20	2.34
2. NM 053370	translocase of inner mitochondrial membrane 8 (yeast) homolog A	2.73	3.53
3. AB008423	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 2	-2.84	-3.67
4. NM012734	Hexokinase 1	-1.97	-2.69
5. NM013168	hydroxymethylbilane synthase	-1.71	-2.97
6. U63923	Glutathione reductase	-2.47	-2.59
7. NM012681	Transthyretin	-2.85	-3.21
8. NM031971	heat shock 70kD protein 1A	-2.37	-3.45
9. NM012516	complement component 4 binding protein, alpha	-2.02	-2.72
10. NM019291	carbonic anhydrase 2	-1.93	-2.52
11. NM017174	phospholipase A2, group 5	-1.90	-4.66
12. NM012868	natriuretic peptide receptor 3	-1.83	-2.41
13. NM012886	tissue inhibitor of metalloproteinase 3	-1.79	-3.73
14. NM022924	coagulation factor 2	-1.71	-2.30
15. NM053538	lysosomal-associated protein transmembrane 5	-1.67	-2.40
16. NM053843	Fc receptor, IgG, low affinity III	-1.66	-2.52
17. NM130401	membrane-associated protein 17	-1.63	-2.35
18. NM017248	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	-1.59	-1.79
19. NM019340	regulator of G-protein signaling 3	-1.58	-2.04
20. NM053573	olfactomedin related ER localized protein	-1.50	-1.84
21. NM013063	Poly (ADP-ribose) polymerase-1	-1.79	-3.73

<74>

<75> 상기 동정된 유전자들의 세포내 기능에 따라 분류(classification)한 것은 다음 표 4와 같다.

<76> [표 4]

Gene function	Gene
Apoptosis	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3
	Poly (ADP-ribose) polymerase-1
Developmental process	Lysosomal-associated protein transmembrane 5
	Olfactomedin related ER localized protein
Immune	Heat shock 70kD protein 1A
	Complement component 4 binding protein, alpha
	Fc receptor, IgG, low affinity III
Metabolism	Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 2
	Hexokinase 1
	Hydroxymethylbilane synthase
	Glutathione reductase
	Carbonic anhydrase 2
Signal transduction	Phospholipase A2, group 5
	Natriuretic peptide receptor 3
	Regulator of G-protein signaling 3
Transport	Transthyretin
	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12
	Translocase of inner mitochondrial membrane 8 (yeast) homolog A
Others	Coagulation factor 2
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
	Membrane-associated protein 17

<77>

<78> 실험결과 3: 실시간 RT-PCR 확인

<79> 정량적 RT-PCR은 쥐의 폐조직 마이크로어레이에서 서로 다르게 발현된 유전자들의 전사 수준을 확인하기 위하여 수행되었다. 사용된 프라이머와 증폭된 생성물의 크기를 표 1에 요약하였다. cytochrome P450, family 2, subfamily d, poly-peptide 2, hydroxymethylbilane synthase, glutathione reductase, carbonic anhydrase 2, natriuretic peptide receptor 3, regulator of G-protein signalling 3, olfactomedin related ER localized protein, 및 poly (ADP-ribose) polymerase-1을 포함하는 포름알데히드에 의해 조절된 유전자들이 확인되었다. 5와 10 ppm 수준의 포름알데히드에 노출되었을 때 9개의 모든 유전자들은 쥐의 폐에서 감소-조절되었다 (표 5). 유전체 분석 및 RT-PCR 기법을 이용하여 포름알데하이드에 노출되어진 쥐의 폐조직에서의 독성 유전체 지표를 발굴하였다. 하기 표 5는 유전체 분석을 통하여 발굴되어진 유전체중 RT-PCR기법을 이용하여 확인되어진 유전자 지표들이다.

<80> [표 5]

Gene description	Microarray		Quantitative PCR	
	5ppm	10ppm	5ppm	10ppm
Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 2	-2.84	-3.67	-1.25	-1.67
Hydroxymethylbilane synthase	-1.71	-2.97	-3.13	-1.32
Glutathione reductase	-2.47	-2.59	-2.86	-1.67
Carbonic anhydrase 2	-1.93	-2.52	-5.56	-3.57
Natriuretic peptide receptor 3	-1.83	-2.41	-1.27	-1.75
Lysosomal-associated protein transmembrane 5	-1.67	-2.40	-5.56	-1.69
Regulator of G-protein signaling 3	-1.58	-2.04	-1.28	-1.33
Olfactomedin related ER localized protein	-1.50	-1.84	-2.86	-1.11
Poly (ADP-ribose) polymerase-1	-1.79	-3.73	-1.72	-1.67

산업이용 가능성

<82> 이상 설명한 바와 같이, 마이크로어레이 칩을 사용하는 게놈 분석은 포름알데히드 노출 후 2개의 유전자가 증가-조절되고 19개의 유전자가 감소-조절된다는 것을 보여주었다. 이러한 21개 유전자 중 9개의 유전자는 정량적 RT-PCR 분석에 의해 확인되었고, 이 유전자들은 포름알데히드 노출과 관련된 인간 질병에 대한 유용한 마커로서 제공될 것이다. 또한, 상기 바이오마커 유전자들은 포름알데히드 노출과 관련된 인간 질병의 진단을 위한 DNA 칩(chip) 또는 휴대용 측정 키트의 개발에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<83> 도 1은 단세포 전기영동법을 통하여 측정된 환경유해 독성물질에 의한 세포내의 DNA손상을 나타낸 것이다.

<84> 도 2는 포름알데하이드에 의한 쥐의 폐세포에서의 DNA 손상을 나타낸 것이다.

<85> 도 3은 포름알데하이드에 의한 쥐의 폐세포에서의 지질 산화손상을 나타낸 것이다.

<86> 도 4는 포름알데하이드에 의한 쥐의 폐세포에서의 단백질 산화손상을 나타낸 것이다.

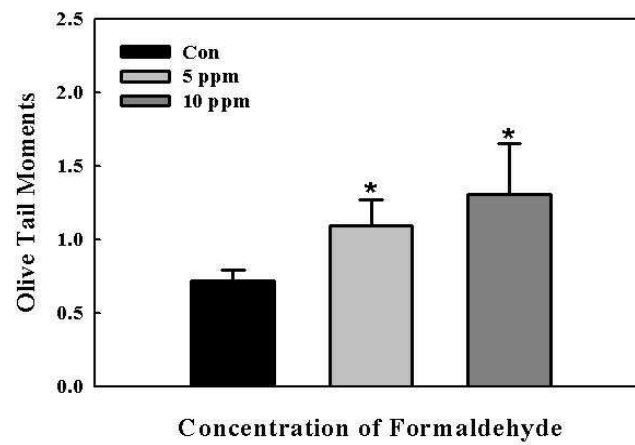
<87> 도 5는 K-means 알고리즘에 의하여 포름알데히드에 노출된 쥐의 폐조직에서 유전자 발현의 군집화 (clustering)를 보여준다.

도면

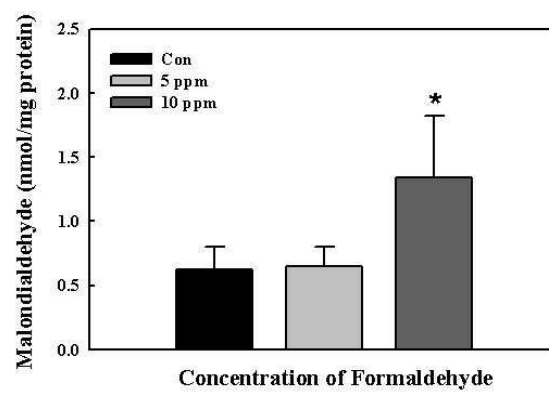
도면1



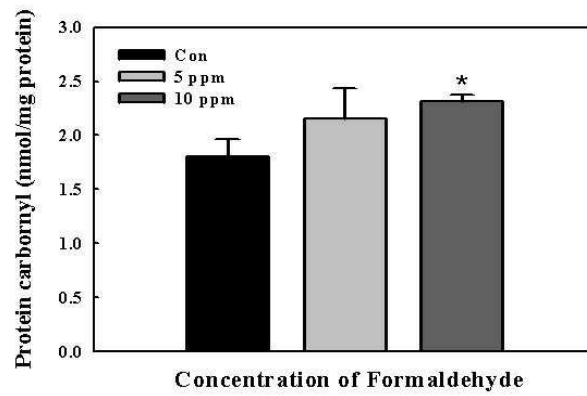
도면2



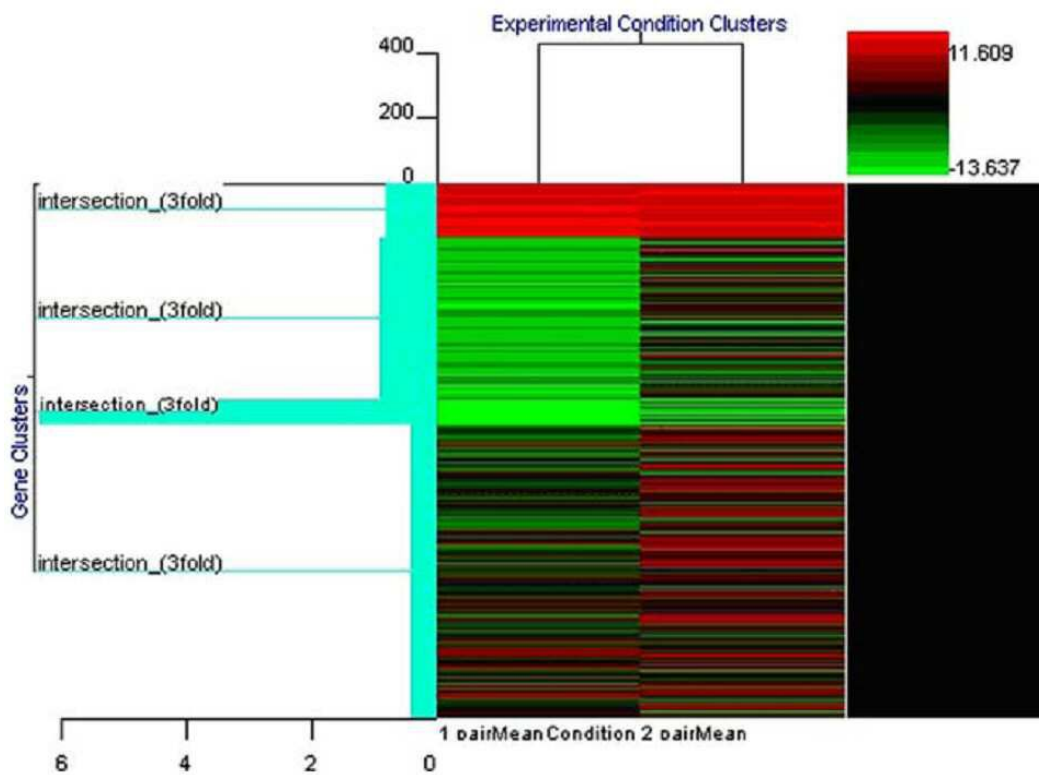
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
- <120> Bio-marker genes for diagnosing exposure to Formaldehyde

<160> 27

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1574

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

atggggctgc tgattggaga tgacctctgg gctgtggtca tattcacagc catcttcttg 60

cttctgggtgg acctgggtgca ccggcacaaa ttctggactg cccactaccc tcccggccct 120

gtgccactcc ctgggctggg aaacctgctg caggtggact ttgagaacat gccatatagc 180

ttatacaagc ttcaagccg ctatgggtgac gtgttcagcc tacagatagc ctggaagcct 240

gtagtgtga tcaacgggct gaaggccgtg cgggaactgc tggtagaccta tggagaggac 300

actgctgacc gccccctact gcccatctat aatcacctgg gctatgggaa caaatcaaaa 360

gggtgtgtcc ttgcacctta cggacctgag tggcgagagc agagacgatt ctctgtgtcc 420

accctgcgtg acttcggcgt gggcaagaaa tcgctggagc agtgggtgac agaggaggcc 480

ggccacctct gtgacacctt cgccaaggag gctgaacatc cttcaatcc cagcatcctc 540

ctgagtaagg ctgtgagcaa cgtgattgcc tcccttgttt atgctcgtcg atttgagtat 600

gaggaccctt tcttcaacag gatgctcaaa acattgaagg agagctttgg agaggacacc 660

ggcttcatgg cagaggtgct gaacgcaatc ccaattctcc ttcagattcc tgggctgcct 720

ggcaaagtct tccccaagct caattcattt atagccttag tggataagat gtttaattgag 780

cacaagaaaa gctgggatcc tgcccagccg ccccgagaca tgactgatgc ctctctagca 840

gagatgcaaa aggccaaggg gaatcctgag agcagcttca atgatgaaaa tctgcgcttg 900

gtggtgattg acctgttcat ggcggggatg gtgaccacct caaccacact gtcttgggcc 960

cttctgctca tgatcctgca tccagatgtg cagcgccgag tccacgagga gattgatgag	1020
gtcatagggc aggtgcgtcg tccagagatg gcagaccagg cacgaatgcc gttaccaat	1080
gctgtcatcc atgaggtgca gcgctttgca gacatcgtcc cgacaaatat accacatatg	1140
acatcccagag acattaaatt ccaaggcttc ctcatccca aggggacaac cctcatcccc	1200
aacctgtcct ccgtgctgaa ggatgagacc gtctgggaga agccctccg ctccatcca	1260
gaacacttcc tggatgccca gggcaacttt gtgaagcatg aggccttcat gccattctca	1320
gcaggccgca gagcatgcct gggggagccc ctggcccga tggagctctt cctcttcttc	1380
acctgcctcc tgcagcgctt cagcttctcg gtgttgccg gccggccccg gccagcacc	1440
catggcgtct acgattgcc agttactcca cagccttacc aactctgtgc agtggctcgc	1500
tagcaggggc aggggtcca ttcttctccc cggtttggc tgattgatgt ccaataaaca	1560
acttctgtat cttc	1574

<210> 2
 <211> 1538
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 2 gtctgcagc cggagtgaag tgcgggctcc ggcccatgt gccttcagtc acgaccgcc	60
caggtcgccg gcttctgcag actccagggg accgcagcgg cagtgccgcg cttgcgcct	120
gagcggagcc atgtccggtg acggcggcgc ggccacaacc gcggaagaaa acggctcaat	180
gatgagggtg attcgagtgg gcacccggaa gagtcagctg gctcgcatc agaccgacac	240
tgtggtagcg atgtgaaaa ctttgtacc tggcatacag tttgaaatca ttgctatgtc	300
caccacaggg gacaagattc ttgatactgc actctctaag attggagaga agagcctgtt	360

taccaaggag ctagaaaacg ccctggaaaa aaatgaagtg gacctggttg ttcactccct	420
gaaggatgtg cctaccatac tacctcctgg ctttaccatt ggagccatct gcaaacggga	480
aaacccttgt gatgctgttg tttttcaccc aaagtttatt ggaaagacc tggaaacctt	540
gccagagaaa agtgccgtgg ggaccagctc cctgaggaga gtggcgcagc tacagagaaa	600
gttcctcac ctggaattca agagtattcg gggaaacctc aacacccgcc tacggaagct	660
ggatgagctg caggagtcca gtgccattat cctggctgtg gctggcctac agcgcacatggg	720
ctggcagAAC cgggtgggcc agatcttgca ccagaggaa tgcatgtatg ctgtgggtca	780
gggagccctg gcggtggagg tccgagccaa ggaccaggat atcttggacc tagtgggtgt	840
gttgcacgat cctgaaactc tgcttcgtg catgtctgaa agggcttttc tgaggcacct	900
ggaaggaggc tgtagcgtgc cagtagcagt gcatacagt atgaaggatg ggcaactgta	960
cctgactggt ggagtctgga gtctagatgg ctacagatgc atgcaagaga ccatgcaggc	1020
caccatccag gtccctgttc agcaagaaga tgggtccagag gatgaccac agttggttgg	1080
aatcactgcc cggaacattc caaggaggc ccagctagct gctgagaacc tgggcatcag	1140
cctggcaagc ttgttgctca acaaaggagc taagaacatc ctatagtgtg cacggcagct	1200
taatgatgtg cgctaactgg cctgcagggc acaggaaccg aacccagct gtcactccag	1260
tgcttatgtc tggtgtcaa gtgccctgtg ctcttaaca aggggaatga ttatccagg	1320
agattgaacc agagttgttg agacttcggc cttggaagat atgcctcaac ttggggcctc	1380
catgactgcc tttccctcag tagtttgtgg gcttcacctc tttagagaaa gtccatgcca	1440
atcttttaat gtaaccaatg ccactaatca gttcagaatg tggttctcct ggagttgggg	1500

gaagatatga ataaacccaa agccctttta aacctgaa	1538
<210> 3	
<211> 2180	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 3	
aattcggcac gagcaaacgg agaggccgcg ggaggcgcga agccggcaga aggcgaggga	60
gagcggaggg cgcccatggt ccagccctga agccaaacaa aaaaggccta cttcgaaagc	120
tgtcaacaat gaatgactct aaagatgcc ctaagtccta tgacttcgac ctgatcatca	180
ttggaggagg ctcgggaggc ctggcggcag ctaaggaggc agccaaattt gacaagaagg	240
tgatgtcttt ggacttcgtc acaccaactc ctctcggaac gaatgggggt ctcgggggaa	300
cgtgtgtgaa cgtgggctgc atacctaaaa aactgatgca ccaggcggct ctgttaggac	360
aagctctgaa agactcacgc aactatggct ggaaactcga ggacacagtt aagcatgact	420
gggagaaaat gacagaatct gtgcagaatc atatcggtc gctgaactgg ggctaccgag	480
tagctctccg ggagaagaag gtcgtctatg agaatgctta cgggaaattc attggtcctc	540
acaaaattat ggcaacaaat aacaaaggta aagaaaaagt ttactcagca gagcggttcc	600
tcattgccac cggtgaaagg ccacgctacc tgggcattcc tggagacaaa gagtactgca	660
tcagcagtga cgatcttttc tccttgcttt actgcccggg gaagacccta gtggttggcg	720
cgctctatgt cgccttgga tgtgcaggat tcctggctgg tatcggcctc gacgtcactg	780
taatggtgcg gtccattctc cttagaggat ttgaccagga catggccaac aaaattggtg	840
aacacatgga agagcatggt atcaagttta tcaggcagtt cgtgccgacg aaaattgaac	900
agattgaagc agggacacca ggccgactca aggtgaccgc taaatccaca aacagtgagg	960

agaccataga agacgaattt aacacagtgt tgcctgcagt aggaagagat tcttgtacaa	1020
gaactattgg cttagagacc gtgggcgtga agatcaatga aaagaccggg aagatacctg	1080
tcacggatga ggagcagacc aatgtgcctt acatctacgc cattgggtgac attctggagg	1140
ggaagctgga gctgaccccc gtggccatcc aggcggggag attgctggct cagaggctgt	1200
atggcggtc cactgtcaaa tgtgactatg acaatgtccc aacgactgtg ttactcctt	1260
tggagtatgg ctgctgtggc ctctctgaag aaaaagctgt agagaaattt ggggaagaaa	1320
atattgaagt ttatcacagt ttctctggc cattggaatg gacagttcca tcccgggata	1380
acaacaaatg ttatgcaaaa gtcactgtga accttaaaga caacgaacgt gtcgtgggct	1440
tccacgtact gggtcacaaat gctggagagg tgacgcaggg ctttgagcc gcactcaagt	1500
gcgggtgac caagcagcag ctggacagca ccattggcat ccacccggtc tgtgcagaga	1560
tatttacaac gctgtcgggtg actaagcgtt ctgggggaga catctccag tctggctgct	1620
gaggttaagc cccagtgtgg atgctgttc caagactaca gaccattgct tgcttccttg	1680
tccacacca ggigaagttc aggaaggctc ttgggttctt ggcaccaatt caagggtcta	1740
tcctaaggcc accaggtccc tgggatcttg tgggtaggag gtggcaggtga gaagaaggct	1800
gcagcatcgc actgggggtca ccatgacgga ctgagactga cattcggcag agcatcacgg	1860
tcgtccatg aagtcactag cctcaagccc aagtgggtgg cagtacaga aagctgtcga	1920
tctgttgggt tcaacctttc cctgtagact gttttagtct cgccttcaag ctatgtaatg	1980
tcaattctgt tttttctttt ctccatgggg ttaatgatac tagaggtagg gaatgttagc	2040
aatcagtttt tgtcatggct ggactatcca cagcacggtc gttactgtgt ggaagggggt	2100

cagatggctt atgagagcca aaccagttaa tcctgagaaa gacgaattac cctgtggcta	2160
aaatacactg tttttactaa	2180
<210> 4	
<211> 1459	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 4	
gcgtgactat gtcccaccac tggggataca gcaagagcaa cggaccagag aactggcaca	60
aggagtccc cattgccaat ggagaccgac agtcccctgt ggacattgac accgggactg	120
cccagcatga cctttcccta cagcctctgc tcatatgtta cgataaggtt gcttccaaga	180
gcattgtcaa caatggccat tccttcaacg ttgagtttga tgactcccag gactttgcag	240
tgctgaaaga gggaccctc agtggctcct acagattgat ccagtttcac tttcactggg	300
gtcactctga tggccagggc tctgagcaca ccgtgaacaa aaaaaatat gctgcagagc	360
ttcacttggg tcaactggaac accaaataatg gggatttttg aaaagctgtg cagcaccag	420
atggactggc tgttttgggt attttttga agattggacc tgcctcaca ggccttcaga	480
aaatcactga agcactgcat tccattaaaa caaaggggaa acgtgcagcc ttgctaact	540
ttgatccttg ctcccttctt cctggaaact tggactactg gacatctct ggctctctga	600
ccactccgcc cctgttgaa tgtgtgacct ggatagtgt caaggaacce attactgtca	660
gcagtgaaca gatgtctcat ttccgtaaac tgaacttcaa ttcggagggg gaggtgaag	720
aactgatggt ggacaactgg cgtccagctc agccgtgaa gaacagaaag atcaaggcgt	780
cctttaata aaatgacct gcagctgggg tcaaaaaagc acaagtgtgg ctgcctctct	840
gtagctaagc acagtccgc cttggtgatt cagatccga ctttgcatt gatattgtag	900

gcctttttac ctctcaccca ttgtgcttac taataaaatg tgaaaaggaa gacccaggtg	960
tctcatgtgg tggtagcatg gtggcaggct ggtggttgac ttagggcatc ctttctcagc	1020
cacaacaatg caatgcaaag aacagataatg gcctcttgct tctccacagc catagaataa	1080
tgagtactca ggctgttta ttaaaatgct atttttaaaa ccatataagg tagaatgatt	1140
gtttacaaat ccacatcatg agacaaactg aggcaattta ggcaaatcag gtaaacagt	1200
catagtttta tggttattaa ttagatgaat gttcactatt ccaagatctt atattaaaga	1260
aaaactttta aaaagcttat atattttag caaagttatt cttaaatatg aattatgtt	1320
taacttagtg acttttgatt tctagaggtg taaatgaaga tgtaaaaatt gatatagttg	1380
tgatacacag tatatttccc ttacagataac ttaccataac ctaatggata atgtatttta	1440
gatatattct ctaataaaa	1459

<210> 5
 <211> 1720
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 5 gcttgctggc aacaggatgc ggtccctgct gctgttcact ttctcggcgt gcgtgctgct	60
ggccccggcg ctgctggctg gcggtgcgag tagtggcggg ggggacaccg ggccaggcaa	120
caggcgccgg gagagagagg cgctggcggc tcaaaagatc gaggtgcttg tgctattgcc	180
ccgggacgat tcgtacttgt tctcgtggc cgggtgagg ccggccatcg agtacgcgt	240
gcgtagcgtg gagggcaatg gcaccggcag gaagctgctg ccgccccgca ctgccttcca	300
ggtggcctat gaagactctg actgtggcaa ccgtgcgctc ttcagtttgg tggaccgcgt	360

ggcggcggcg cgccggcgcca agccggacct catcctgggt ccggtgtgcg agtacgtgc	420
ggcgccgggtg gcccggtgg cgtctcactg ggacctgccg atgtgtccg caggagcgct	480
ggccgcggtt ttccagcaca aggacacgga gtactcgac ctcacgcgcg tggcgctgc	540
ctacccaag atgggagaga tgatgtcgc tctgttccg caccaccact ggagccgcg	600
tgccctgctc tacagcgacg acaaaactga gaaaaactgc tacttcactc tcgagggggt	660
ccacgaggtt ttccaggagg agggcttgca cacgtctgcc tacaatttcg acgagaccaa	720
agacttggac ctggacgaca tagtgcgcta catccagggc agtgagcgag tggatgatcat	780
gtgtgccagt ggtgacacca ttccgagaat catgttggcg gtgcacagac acggcatgac	840
cagtggagac tatgctttct tcaacattga actcttcaac agttcttctt acggagatgg	900
ctcgtggaag agaggggaca aacacgactt tgaagctaag caagcttact catccctcca	960
aacagtcacc ctgtgagga ccgcaagcc tgagtttgag aagttttcca tggaggtgaa	1020
aagttctgtt gaaaaacaag ggctcaatga ggaggattac gtgaacatgt tcgttgaagg	1080
cttccatgat gccatcctcc tctacgttct ggctttgcat gaagtgtca gagctggcta	1140
cagcaagaag gatgggggga aaatcatcca gcagacttgg aacaggacat ttgaaggtat	1200
cgccgggcag gtgtccatag atgctaattg ggtcgggtat ggagacttct ctgtggttgc	1260
catgactgat acagaagcag gtaccagga ggtcattggt gattactttg gaaaagaagg	1320
ccggttcaaa atgcgatcca atgtcaaata tccttggggc tctttgaaat tgagaataga	1380
tgaaccaga attgtggagc acaccaacag ctctccttgc aaatcatgtg gcctagaaga	1440
atcagcagtg acaggaattg ttgtgggggc cctactaggt gctggtttgc taatggcctt	1500
ctactttttc aggaagaaat acagaataac catlgagagg cgaaatcacc aagaagaaag	1560

caacattggg aaacatcgag agctgcggga agattccatc agatcacatt tttcggtggc	1620
ttaaaagaaa tgccccctt gctttgtctg cttgagattc cttaaagaga tagttgaagg	1680
acagacatca atggaacaga aagggtgttc ttggagaatt	1720
<210> 6	
<211> 2080	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 6	
gtgcaccatg gcctccctg cagtgccagt caggcagaca tgctgttgtt tcaatgtccg	60
agttgccacc gtagccctgg ccatctacca tatagtcatg agcgtcttgc tgttcattga	120
gcatgtggtg gaggtggccc gcggtaaagt ctctgcagg ttctccaaga tgccatacct	180
caggttggtt gacctgtctt ccagcttctt gtcctcggga gtctcttcca ttatcagcct	240
cagctgtctg ttccgagtgg tcaagaaccg ggagaagtac ctgatacctt tcctgtcctt	300
tcaaatacatg gacttctctg tgtgctgtct cacactgttg ggctcctaca tcgaattacc	360
agcatacctg aagtttgccc ggccccggcc cggctcttct aaggtaccct tgatgacact	420
gcagctgtctg gacttctgtt tgagatcctt gacctgtgac agctcctata tggaagtgcc	480
cacctacctt aacttcaagt ccatgaacca catgaattac ctgccgagtc aggagggcat	540
gccacgcagc cagttcatca acatgatgct catcttttca gtggccttta tcaccgtgct	600
catctgaag gtctacatgt tcaagtgtgt ttggacatgc tacagattca tgaagcacat	660
gaattcggcc gtggaggaca gcagttccaa gctgttccta aaggtggctc tgccgtccta	720
tgaggaagcc ttgtctctgc cactaagac tccagagggg gaccttgac caccceccata	780

ctcggaagtg tgattccac caggctttca gcccttgggc tgggagaggc ggaactcccc	840
gcctcctgct tcttcacttt gatggctgcc atggcctact acaggacagt ctgcttgtgc	900
acccccctc acigtctct ctgcttgggg acctcttact cacaacagag tcaccctggg	960
ctaatgacc ctttgaagct cagagtactic agcctagcat ctcatctagt cttcatcagc	1020
aatgatactt gttcagagaa cagtcgtggc aaattagggg gagtttggtt aacaactact	1080
ggcttgatct gtttagctag atagccaaca ccagcagggg cagcaggaag agaactctgc	1140
caagcaacaa ttcttggtgt cagtcctaac tcagctgtca tgggtcgtgg gtcctgggtc	1200
atgggtcatg gatcatgggt catgatcatg gtgcccattt gctaccccca agtacccaaa	1260
agtgtacaaa taaaacaata ctttcaaatg cgttgcttaa acaaatacca atccagccaa	1320
ccgtgtcat taggcattat gagaaaatct aataagaaaa tgagggtgtca aacgggaggg	1380
aaagaaaaag aaatgaaggt cctccacca ttcactgtag ggacacccat ggacaccctg	1440
cccagcctct gcttgagttt ctctagcatc tggaggctgg gaagtccaac agtcctgcaa	1500
ctgccctgaa cgttctgtc agcatggaaa aaaaaagttg ctcccgtttt aaacaatcct	1560
tcccatgagt caccgctctg aggcaagctg tccttatctt cagtcaagtg tccccatag	1620
ccacacaatg gggaggttcc tgccagggtc actttagcca ctggcggatt taaggcttgg	1680
ttatcaccat gacatcccaa cagccaggtt gttccagcct gtttctcag ggctacgtc	1740
agggggtggc aggcttggaa ttggctgccc tgtgggcagt tgtctgtcac tatgtctgtc	1800
actatggctg cctagttggg ggcaggctag cccatggggt gtgaagagcc agccagagtc	1860
ttgtgtccca tgggtggcagc aaggagggtc agtcaggtg tctctgcca ctttccatt	1920
gtcgggggtt ctagggttg ctaggaaattt gtcctgctt gtggtgtaga tggggtaca	1980

gggctgagag ggccgagaga tgttccact gtgcctgtgt cattgcttgt gtgtgacttg 2040

gaagaagggc caataaaaca gctgcaagct ttaaaaaaaaa 2080

<210> 7
<211> 3720
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 7
gggagagctg ggctttcatg gggaggcagc tgaggcagga tctgcagcca tgaaccgctt 60

caatgggctc tgcaaagtgt gctcagaacg ccgctacagg cagatcacca tccggagggg 120

aaaagacggc tttggcttca ccatctgctg tgactctccg gtccgagtcc aggctgtgga 180

ttctgggggc ccagcagaga gggcggggct gcagcagctg gacacagtac tacagctgaa 240

ttagaggccc gtggaacact ggaaatgtgt ggagctggca cacgagatcc ggagctgtcc 300

cagcgagatc atcctgctcg tgtggcgtgt ggtccccag atcaagccag ggccagatgg 360

cggagtcttg aggcgggcct cctgcaagtc cacacatgat ctctgtcac ccctaacaa 420

gagggagaag aactgtactc acggggctcc aacacgtccc gagcagcgcc acagctgcca 480

cctggtgtgc gacagctctg atgggctact gctcggaggc tgggagcgct aactgaggt 540

gggcaagcgc agcggccagc ataccctgcc tgcaactgtcc cgggccacca cccctactga 600

ccccactac atcatcctgg ccccaactgaa tcctggaagc cagttgctgc ggctgtgta 660

ccaggaggat gccatccctg aagaaccagg gactactact aaagggaat cgtacactgg 720

cctgggcaag aagtctcggt tgatgaagac agtcagacc atgaagggcc acagcaacta 780

ccaagattgc tcagccctga gaccacacat cccacattca agttacggca cctatgtcac 840

cctggccccc aaagtctctg tattccctgt ctttgtcag ccctagatc tctgtaaccc	900
tgcccggaact ctctgtctgt cagaggagct gctgctctat gaggggagga acaagacttc	960
ccaggtgaca ctgtttgcct actcggacct gctgctgttc actaaggagg aggaaccagg	1020
ccgctgtgac gtcttgagaa accccctcia cctccagagt gtgaagctac aggagggttc	1080
ttcagaagac ttgaaattct gtgtgctgta cctggcagag aaggcagagt gcttattcac	1140
tttggaggct cactcgcagg agcagaagaa gagagtgtgc tggcctgt cggagaacat	1200
cgccaagcag caacagctgg ctgcaacacc tacggagagg aagatgtttg agacagaggc	1260
agatgagaag gagatgcccc tggcgcaggg gaaggggcca ggtgctgagg aacgcacacc	1320
cagcaaagac cctctccca gccaggagct gcctccagga caagaactcc caccagcaa	1380
agacctctt cccagccagg agctgcctcc aggacaagaa ctcccacca gcaaagacct	1440
ctctcccagc caggagctgc ctccaggaca agaactccca tccagcaaaa accctctcc	1500
cagccaggag ctctctgcag gacaagacct cccaccagg aaggaatcct ttccaggcca	1560
agaagcagct cctggcccag agtcaccatc cagtgaagac atagcaacct gccaaaacct	1620
ccctcaaagc ccagaaacct caacaagcaa ggactccca ccaggccagg gatcctctcc	1680
aaccacagaa gtcccatctt gccagggact tctgtctggt caagaatcta caagccagga	1740
ccctctgctc agtcaagagc cccctgctat ccagaaatcc tctgcctccg atcagaatgt	1800
tctacctct caggagtcac ctcccagca gggtcccta tcagagaagg cccttctga	1860
gcagaccatc agccccgggg agctaccagc ggccactgca ggtgaacctt cagcctccag	1920
acctaatctt gtgatcccc aggtccgct ggatagtgc tacagccagc aggatggagc	1980
ccatggaggc agctctggtg aggatgagga tgcagaagag ggagaggagg gggaagaagg	2040

ggaggaagat gaggaggacg acaccaacga cgacaactac ggggatcgta atgaggccaa	2100
gcgcagcagc ctgattgaga ctggccaggg cgccgagggt ggcctctcgt tgcgtgtgca	2160
gaactcgctg cggcgccgga cgcacagcga gggcagcctg ctgcaggagg cccgtgggcc	2220
ctgctttgcc tctgacacca ccctacactg cttgatggt gagggcacca catccactg	2280
ggccatccct tctccccga ccctcaaaaa agaactgggt cgtaatggag gtcctatgca	2340
ccacctttcc ctgttttca ctgggcacag gaagatgagt gggactgacc tcgcagatga	2400
cgttgaagcc tcccgaaga gaaagagcaa aaacatagcc aaggatatga agaataagct	2460
ggccatcttc aggcggcgga atgaatctcc tggggcccag ccagccggca aggcagacaa	2520
gacaaccaag tcttcaagc ctacctcga ggaagccctc aagtggagcg agtccttga	2580
aaagctgctg cttcataaat atggtttaga agtgttcag gccttccttc gcacagagtt	2640
cagtgaggag aacctggagt tttggctggc ttgtgaggat ttcaagaagg tcaaatcgca	2700
gtccaagatg gcagccaaag ccaagaagat ctttgctgag ttcatcgca tccaggcttg	2760
caaggaggta aacctggact cgtacacacg agaacacact aaggagaacc tgcagagcat	2820
caccgaggc tgctttgacc tggcacaaaa acgtatcttc gggctcatgg aaaaggactc	2880
ttacctcgc ttctccgct ctgacctta cctggacctc attaaccaga agaagatgag	2940
tccccactc tagggaccac cagtatccag ctacagcttc acaccaagcg gagcgggctc	3000
cctgcccacc cgcctccctt cctgtgacg gaggggacaa gtaagcccc agaggctgtg	3060
tctccggaca gacagatgga catttgaatt cgaggcctgg gccgagagag acccaggcca	3120
ctacaggaag taggaggacc agccgcatcg ggtccttaac gtctgtgtac gaggggacca	3180

agggccctgg caggtcaggg ccctggagga gccagatcgg gagctgtggc tccctgcttt	3240
ggagataatg gactctttac gctgaccaag ttcctttgag aactggctgg ggttgggaca	3300
ggaggcccag gcctgggctc agggccaac ctggggggct gttgggcctc acagctcaga	3360
cctttcccca ttgagtttta tttatttaaa cagtagttgg atgcttggca catgaacggt	3420
aataggagag ccctcacctt gtcagttttc ttaacttaca agtgcaatgt ctacccaag	3480
gccttgtgaa ggccacctgg aggtgtgatc accgtcttac agtttcaggg catttgctgg	3540
tcccaggaac cagtggcggc agctgggcct tctagactga catgaccttg gaggggatgc	3600
tgcagaaatc tggcacccac cctgggtgcc caagagatct gggaaagcat agtgcctcc	3660
ggccacacag aaacaagtgc tgggggcaaa taaaaggcct gtgttattct caaaaaaaaa	3720
	3720

<210> 8
 <211> 2759
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 8	
aacctggtgg cctttctcga cagcggagcg cgcggggacg ctgcagcggc gggcaacgcg	60
ggcaggcagc gcgtccagg cagggccgcc tggtcacctc ccggcgccgg ggcggcgccg	120
cgatggccag ggcgcagagg gaggcagaga ccggcgggcg acggcgggcg gagggggcgc	180
ggggacgcgg ccgggcgccc ctgcccgcc tgggtcccgc cgcctaaggc tgcccggggc	240
gcgggagccg gcgccggcgc ggcgcgggcg caggagacca ctcgaggcgc gatgtcggtg	300
ccgtgctga agatcggggt cgtgctaagc accatggcca tgatcaccaa ctggatgtcc	360
cagacgtgc cctcgtggt gggcctcaat accaccggc tctcgccgc cagcggcggg	420

acgtctggacc gcagcacccg cgtgttgccc accaaccaccg aggagagctg gcaggtgtac	480
agctctgccc aggacagtga gggcaggtgt atctgcacgg tggtcgcccc ccagcagacc	540
atgtgttcac gggatgcccc cacaaaacag ctgaggcagc tactggagaa ggtgcaaac	600
atgtctcaat ccatagaagt cttggacagg cggactcaga gagacctgca gtacgtggag	660
aagatggaga accagatgaa aggcctggag tccaagttca ggcaggtgga ggagagccat	720
aagcagcatc tggccaggca gttcaaggca ataaaagcga aaatggatga acttaggcct	780
ttgattcctg tgttgaaga gtacaaggcc gatgccaaat tggatttgca gtttaaggag	840
gaggtccaga atctgacgtc agtgcttaac gaactgcaag aggaaattgg cgcctatgac	900
tacgatgaac ttcagagcag agtgtccaat ctgaagaaa ggctccgtgc atgcatgcaa	960
aaactagcct gcgggaagct gacaggcata agtgaccggg tgactgtcaa gacctcaggc	1020
tcaaggttcg ggtcctggat gacagaccca ctggccccag aaggtgataa ccgggtctgg	1080
tacatggatg gttatcaca caaccgttt gtccgtgagt acaagtccat ggtggacttc	1140
atgaacacgg ataattttac ctgcaccgt ctccacacc cctggtcggg cacgggccag	1200
gtggtctaca atggctccat ctatttcaac aaattccaga gtcacattat cattagttt	1260
gacctgaaga cagagacgat cctgaagacg cggagcctgg actacgtgg ctacaacaac	1320
atgtaccact atgcctgggg cggccactca gacatcgacc tcattggtgga cgagaacggg	1380
ctctgggccg tctacgccac aaaccagaac gcaggcaaca ttgtcatcag caagctggat	1440
cctgtctcac tgcaaatcct ccagacctgg aacaccagct accccaagcg cagcgccggc	1500
gaggccttca tcattctggg caccctctac gtcaccaacg gttactcggg gggcaccaag	1560

gtccactatg cctaccaaac caacgcctcg acctacgagt acattgacat ccccttcag	1620
aacaaatact ctcacatctc catgctggac tacaacccta aagaccgcgc gctgtacgcc	1680
tggacaacg gccatcagac cctctacaac gtcaccctct tccacgtcat ccgtccgat	1740
gagttgtagc tcccgtttt ccagaagcca agggccaag tccacaccc gagcacattt	1800
tccataaac agctgcaaa tgattccaag aatactataa cagtcctgat ttgagaaat	1860
cagcgcaatt ttgacgccga gagatgggtg cctctctgtg ttcctcctgc tcgtgcaggt	1920
gggccacaga ttccagaaga aaccgccatg tatgtggatg gaactgcagc ccaaggtcc	1980
ttggctgtcc ccattccacc ccattcctct ctggtccaat aactcaaaga agcaaggcga	2040
tgactgttgg cccctctcac ccaagaacaa cccactgcta agattgcatg gacatttct	2100
taggtcgtgc ccagcgagat gacgtgatgg ccattctccc caccacagc cccagcccc	2160
cgtagcgctc ggtgtaggct gcttcggccc acacgtatcg cagctgcctt tttcttgact	2220
gtgttttgt ctcttagatt aactgtgtg agactcccg tagctcatgg acctgtgtct	2280
agtactttcc cgaagcgatg gtgggtgtgc gtagagtga gttgctgtac ccacgttgtt	2340
gaacttgct accctgtagc tagatcgtga ggtgtccgtc tgttatcccc ccaaggtgg	2400
taactccgtg tgttcaattt atgcaatgaa tgtgtcatg cgatgctgta gtttgattg	2460
ataagtggat ggtttctgtt tctaaaaaga aaaaaaatc agtggtcgcc cttataggag	2520
acatagtcaa gttcatgtg ataataacc agtgaaattc ttctctgtc aagttatctg	2580
aatttgttaa ccatagatgg gaaggacgca tcttgggaaa cttcagtttc ctacgggaag	2640
gaactccca agggcagcca tgttgtaaaa gatcattttt taaagaaaa aaaaataagt	2700
caaagagggc aactttgtac tattcagtta tctaaggaac aataagata ttaggagat	2759

<210> 9
 <211> 3540
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 9
 cgacacgtta gcggagcgga cggcgggcgg cgtctgcctg ccgctgcggc acgagaggga 60
 ggatggcgga ggccacggag aggctttacc gattggagta cgctaagagc gggcgcgctt 120
 cttgcaagaa atgcagcgag agtatccca aggactcgct ccgcatggcc atcatggtgc 180
 agtcacccat gttcgatgga aaagtccac actggtatca cttctcctgc ttctggaagg 240
 tgggccactc catccggcag cctgacacag aggtggacgg gttctctgag ctgcggtggg 300
 atgaccagca gaaggtcaag aagaccgcag aggtggagg cgtaggcagg aaaggccagc 360
 atggagggtg cggaaggcg gagaagacgc tgggcgactt tgcggcagag tatgccaagt 420
 ccaacaggag cacatgcaag ggctgcatgg agaagataga gaagggtcag atgcgcctgt 480
 ccaagaagat gctggatcca gagaagccgc aactgggtat gattgaccgc tggtagcatc 540
 caacttgctt tgtaagaac cgggacgagc tgggcttcg gcctgagtag agtgccagcc 600
 agctcaaggc ctttagcctc ctctctgcag aagacaaaga agctctgaag aagcagctcc 660
 cggcagtcaa gattgaagga aagagaaaat gtgacgaggt ggatggaata gatgaagtag 720
 ccaaaaagaa atctaaaaaa ggaaaggaca aggagagtag taaactggaa aaggcgtca 780
 aggtcagaa cgagctggtc tggaatatca aagatgagct gaagaaagcc tgctccacca 840
 acgacctgaa ggagttgctc atcttcaacc agcagcaagt accatctgga gattccgcaa 900
 tcctggaccg agttgctgat ggcatggcgt ttggggccct tctgccctgc aaggagtgtt 960

caggacagct ggTTTTaag agcgacgctt attactgtac tgggatgtc actgcctgga	1020
ccaagtgcac ggTcaagaca cagaatccca gccgaaagga atgggtaact ccaaaggaat	1080
tccgagaaat atcctacctc aagaaattaa agatcaaaaa gcaggaccgg ctgttcctc	1140
cagagagcag cgccccagca ccaccagcac ctcccgctc gatcacctcc gcaccacag	1200
ctgtgaactc ctctgcacca gcagacaaac cctgtctaa catgaagatc ctgactcttg	1260
glaagctctc ccagaacaag gacgaagcaa aggccatgat tgagaaactc ggaggcaagc	1320
tgacaggatc tgccaacaag gcctccttgi gtatcagcac taagaaggag gtggagaaga	1380
tgagtaagaa gatggaggaa gtgaaagcag ccaatgttcg agtcgtgtgt gaggacttcc	1440
tccagatgt gtctgcctca gctaagagcc tccaagagct gctctcagcc catagcttgt	1500
cctcgtgggg ggctgaggtg aaggtagagc ctggtgaagt ggtggcccc aaggggaagt	1560
cagctgcacc ctccaagaag agcaaggggtg ctgtcaagga ggaaggtgtc aacaagtctg	1620
aaaagaggat gaaactaact ctgaaggag gagcagccgt tgatcctgac tctggctctg	1680
aacactctgc acatgtcctg gagaaaggcg ggaaggtgtt cagtgccacg ctggcctgg	1740
tggacattgt gaaagggact aactcctatt acaactgca acttctggag tccgacaagg	1800
agagcaggta ttgatcttc cggctctggg gccgagtggg cacagttatc ggcagtaaca	1860
agcttgagca gatgccgtcc aaagaggatg ctgttgaaca cttcatgaag ttatacgaag	1920
agaagactgg aaatgcctgg cactcgaaaa acttcacaaa gtatcccaag aagttctacc	1980
ctctggagat tgactatggc caggacgaag aggagtaaa gaagctggcg gtgaagcctg	2040
gcactaagtc gaagctgccg aagccggtgc aggagctcgt cgggatgac ttcgacgtgg	2100
agagcatgaa gaaggccttg gtggagtacg agattgacct tcagaagatg cccttgggga	2160

aactgagcag aaggcagatc caggccgcct actctatcct cagtgaggtc cagcaggcag	2220
tgteccaagg cagcagtgaa tctcagatcc tggatctctc caatcgcttc tacaccctca	2280
tccccatga ctttggaatg aagaagcccc cacttctgaa caacacagac agtgtgcagg	2340
ccaaggtgga gatgctggac aacctcctgg acatcgaggt tgcctatagt cttctcaggg	2400
gtgggtctga tgacagcagt aaggacccca tcgatgtcaa ctatgagaag ctcaaaactg	2460
acattaaggt ggttgacaga gattctgaag aggctgaggt catcaggaag tatgtgaaga	2520
acactcacgc gaccacgcac aatgcctatg acctggaagt gatagacatc ttttaagatag	2580
agcgagaggg agagagccaa cgctacaagc ccttcaggca gcttcacaac cggagactgc	2640
tgtggcacgg gtccaggacc accaacttcg caggcatcct gtcacagggt ctgcggatag	2700
ccccacctga agcacctgtg acaggctaca tgtttgggaa aggaatctac tttgctgata	2760
tgggtgtcaa aagtgcgaac tactgccaca cgctcaggg agacccgatt ggcttaatac	2820
tgttgggaga agttgccctt ggaaacatgt acgaactcaa gcatgcttct cacatcagca	2880
agttacccaa gggcaagcac agtgtcaaag gtttgggcaa aaccgcccct gacccttcgg	2940
ccagcatcac cctggatggt gtagagggtc cgctgggaac agggattccg tctggtgtta	3000
atgacacctg cctgctgtat aacgagtaca ttgtctacga cattgctcag gtgaatctga	3060
agtacctact gaaactgaag ttcaatttca agacctcctt gtggtagagt gaaggcgggc	3120
tttgccagca cccggggcct aggggataat gccctagtg cctctgcacc aaacaccaca	3180
acacctcagc catgctgccg cctcagggtg gcacctcac cgaatctcct taggaaggac	3240
tttacacaga taggttgccg tggagtggga cggtgtttg tggtttgtcc aaccaggcac	3300

agccgtgaca gacagctggc agtagaggga aagttgggga gaggtttttg ttgtttgcct	3360
agactagtcc tgagggaaga aaccgccacg tcacagtcac aatgtctgcc ttactggcct	3420
ccccaggga ggaatgtg ctctctcct tctttcaagg gtcatcttt ggtttgattt	3480
tggcaaatg ttaagcattt atttgagct aaaaaataaa aactaatttc atactaaaaa	3540
	3540

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

<220>
 <223> primer or probe

<400> 10	
cccttcaatc ccagcatcct	20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer or probe

<400> 11	
ggcaatcacg ttgctcacag	20

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

<220>
 <223> primer or probe

<400> 12
tgagaagtgc gagtgaaatg g 21

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer or probe

<400> 13
gtgctggcaa ggcattcc 18

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer or probe

<400> 14
tctagatggc tcagatagca tgca 24

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer or probe

<400> 15
tggaccatct tcttgctgaa ca 22

<210> 16

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

<220>
 <223> primer or probe

<400> 16
 aaagaaggcc ggttcaaat 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer or probe

<400> 17
 aggagagctg ttggtgtgct 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer or probe

<400> 18
 agctgaggca gctactggag 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer or probe

<400> 19
aacttgact ccaggccttt 20

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

<220>
<223> primer or probe

<400> 20
accactgggg atacagcaag 20

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

<220>
<223> primer or probe

<400> 21
aggctgtagg gaagggtcat 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer or probe

<400> 22
cgatggaaaa gtccacact 20

<210> 23
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer or probe

<400> 23
tgcggtcttc ttgaccttct 20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer or probe

<400> 24
gaatgtggac tggcagcttt 20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer or probe

<400> 25
ttgcctgcac agagatgaac 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer or probe

<400> 26
agtctcctgc aggttctcca

20

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

<220>
<223> primer or probe

<400> 27
aacagtgtga gcaggcacag

20