

(72) 발명자

김명순

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 406동 60
7호

이중훈

대전 유성구 원촌동 싸이언스빌 10-402

장일성

대전광역시 중구 대사동 충남대학교병원 외과

특허청구의 범위

청구항 1

유방암 특이적 발현감소 유전자인 *CHL1* 유전자(NM_001257, 칼슘 의존적 세포접착 단백질, Cadherin 13, H-cadherin (heart)) 또는 *TF* 유전자(NM_001063, 철이온 결합 수송 단백질, 트랜스페린)의 프로모터 부위의 메틸화된 CpG를 포함하는 유방암 또는 그 진행단계 진단용 바이오마커.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 유방암 또는 유방암 진행단계의 진단용 바이오마커.

청구항 3

다음 단계를 포함하는 유방암 또는 유방암 진행단계의 검출방법:

- (a) 임상샘플에서 DNA를 분리하는 단계; 및
- (b) 상기 분리된 DNA에서 *CHL1* 유전자(NM_001257, cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)) 또는 *TF* 유전자(NM_001063, 트랜스페린)의 메틸화를 검출하는 단계.

청구항 4

제3항에 있어서, *CHL1* 유전자(NM_001257, cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)) 또는 *TF* 유전자(NM_001063, 트랜스페린)의 메틸화 검출은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 가지는 DNA 부위에서 수행되는 것을 특징으로 하는 유방암 또는 유방암 진행단계의 검출방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 메틸화 검출은 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이셀파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 유방암 또는 유방암 진행단계의 검출방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 임상 샘플은 암 의심 환자 또는 진단 대상 유래의 조직, 객담, 세포, 혈액, 혈장 및 소변으로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 유방암 또는 유방암 진행단계의 검출방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

본 발명은 유방암 특이적인 바이오마커를 이용한 유방암의 검출방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 유방암

[0001]

특이적 발현감소 유전자인 *CHL1* 유전자(NM_001257, 칼슘 의존적 세포접착 단백질, Cadherin 13, H-cadherin (heart)) 또는 *TF* 유전자(NM_001063, 철이온 결합 수송 단백질, 트랜스페린)의 프로모터 부위의 메틸화된 CpG 섬을 포함하는 유방암 또는 그 진행단계 진단용 바이오마커 및 상기 바이오마커를 이용한 유방암 및 그 진행단계의 검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 유방암은 유방에 생기는 악성 종양을 말하며, 대부분 유즙(모유)을 만드는 조직이나 유즙이 밖으로 나오는 관에서 가장 바깥쪽 세포인 상피세포에서 암세포로의 변이가 생겨 발생하는 것으로 알려져 있다. 유방암은 선진국 여성들에게 가장 많이 발생하는 것으로 알려져 있으며, 우리나라의 경우 위암 다음으로 많은 암이다. 또한, 위암, 간암, 자궁암, 폐암에 이어 다섯 번째로 사망률이 높은 암으로 서양에서와 마찬가지로 빈도가 매년 증가하는 추세이다.
- [0003] 이러한 유방암의 증가추세는 생활습관의 변화나, 서구식 생활, 첫월경이 어려워지는 추세라든지 아이를 적게 낳고, 수유를 피하며 피임약을 사용하는 등 생활패턴의 변화에 기인할 가능성이 높다. 이와 같은 현상은 이웃 일본에도 현저하여 일본여성에게서 가장 흔한 암은 유방암이 되었으며, 우리나라도 머지않아 유방암이 자궁암을 추월하여 여성암에서 수위를 차지하리라는 추측은 그리 어렵지 않다.
- [0004] 특히, 우리나라 유방암의 특징은 서구에서는 주로 50대에 발병하는 것과는 달리 40대에 빈도가 높아 비교적 젊은 연령층에서 유방암이 많이 발생한다는 점이다. 따라서 서구의 유방암 관리 지침과는 다른 우리나라에 맞는 유방암 관리 지침서가 필요하다.
- [0005] 유방암은 조기에 진단하여 조기에 치료하면 타 암종에 비하여 좋은 결과를 기대할 수 있는 암으로 무엇보다 조기진단이 중요하다. 유방암을 조기에 발견할 경우 10년 생존율이 약 85% 이상이라고 알려져 있으며, 또한 일부만 절제하기 때문에 유방을 보존할 수도 있다. 암이라고 하면 흔히 몸이 피곤해지거나 식욕이 없고 빈혈이 일어나는 등의 증세가 나타나는 것으로 생각하기 쉬우나, 유방암의 초기에는 이런 증세가 전혀 없으며, 유방이나 응어리가 아픈 경우도 없다. 때문에 깨닫지 못하는 수도 많고, 어지간히 커진 응어리로 발견되는 경우도 많다. 따라서, 환자의 생존 기간을 늘리려면 병변 범위가 작을 때 조기 진단하는 것이 가장 좋은 방법이므로, 기존의 각종 유방암 진단 방법보다 효율적인 진단 방법, 즉 조기 진단이 가능하고, 대용량으로 검체를 처리할 수 있으며, 민감도 및 특이도가 높은 유방암 특이적 바이오마커의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.
- [0006] 이에, 최근에는 DNA 메틸화 측정을 통하여 암을 진단하는 방법들이 제시되고 있는데, DNA 메틸화는 주로 특정 유전자의 프로모터 부위의 CpG 섬(CpG island)의 시토신(cytosine)에서 일어나고, 그로 인하여 전사 인자의 결합이 방해받게 되어 특정 유전자의 발현이 차단되는 것으로서, 종양 억제 유전자의 프로모터 CpG 섬의 메틸화를 검색하는 것이 암 연구에 큰 도움이 되며, 이를 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR, 이하, "MSP"라고 함)이나 자동 염기 분석 등의 방법으로 검사하여 암의 진단과 스크리닝 등에 이용하려는 시도가 활발하게 이루어지고 있다.
- [0007] 프로모터 CpG 섬의 메틸화가 발암을 직접 유발하는지, 또는 발암의 2차적인 변화를 일으키는지에 대해 논란이 있으나, 여러 암에서 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene), DNA 수선 유전자(DNA repair gene), 세포 주기 조절 유전자 등이 과메틸화(hyper-methylation)되어 있어 이들 유전자의 발현이 차단되어 있다는 것이 확인되었으며, 특히 암 발생의 초기 단계에서 특정 유전자의 프로모터 부위에 과메틸화가 일어난다는 것이 알려져 있다.
- [0008] 따라서, 종양 관련 유전자의 프로모터 메틸화가 암의 중요한 지표이며, 이를 암의 진단 및 조기 진단, 발암 위험의 예측, 암의 예후 예측, 치료 후 추적 조사, 항암 요법에 대한 반응 예측 등 다방면으로 이용할 수 있다. 실제 혈액이나 객담, 침, 대변, 소변 등에서 종양 관련 유전자의 프로모터 메틸화를 조사하여 각종 암 진료에 사용하려는 시도가 최근 활발하게 이루어지고 있다 (Esteller, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 59:67, 1999; Sanchez-Cespedez, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 60:892, 2000; Ahlquist, D.A. *et al.*, *Gastroenterol.*, 119:1219, 2000).
- [0009] 이에, 본 발명자들은 유방암을 효과적으로 검출할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 유방암 특이적으로 메틸화되는 메틸화 관련 유전자의 프로모터를 바이오마커로 이용하여 메틸화 정도를 측정하는 경우, 유방암 및 유방암의 진행단계를 효과적으로 검출할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 유방암 진단에 효과적으로 사용될 수 있는 유방암에서 특이적으로 메틸화되는 유전자의 메틸화된 프로모터 부위의 CpG 섬을 포함하는 유방암 진단용 바이오마커를 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 유방암 특이적 바이오마커를 이용한 유방암 및 그 진행단계의 검출방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유방암 특이적 발현감소 유전자인 *CHL1* 유전자{NM_001257, 칼슘 의존적 세포접착 단백질, Cadherin 13, H-cadherin (heart)} 또는 *TF* 유전자(NM_001063, 철이온 결합 수송 단백질, 트랜스페린)의 프로모터 부위의 메틸화된 CpG 섬을 포함하는 유방암 또는 그 진행단계 진단용 바이오마커를 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, (a) 임상샘플에서 DNA를 분리하는 단계; 및 (b) 상기 분리된 DNA에서 *CHL1* 유전자{NM_001257, cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)} 또는 *TF* 유전자(NM_001063, 트랜스페린)의 메틸화를 검출하는 단계를 포함하는 유방암 또는 유방암 진행단계의 검출방법을 제공한다.

효과

- [0014] 본 발명의 바이오마커를 이용하면, 통상적인 방법보다 정확하고 빠르게 유방암의 조기 진단이 가능하며, 비침습적 시료인 혈청을 샘플로 이용할 수 있어, 보다 간편하고 정확하게 유방암을 진단할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0015] 일 관점에서, 본 발명은 유방암 특이적 발현감소 유전자인 *CHL1* 유전자{NM_001257, 칼슘 의존적 세포접착 단백질, Cadherin 13, H-cadherin (heart)} 또는 *TF* 유전자(NM_001063, 철이온 결합 수송 단백질, 트랜스페린)의 프로모터 부위의 메틸화된 CpG 섬을 포함하는 유방암 또는 그 진행단계 진단용 바이오마커에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 바이오마커는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 따른 메틸화 바이오마커는 하기의 방법으로 스크리닝하였다: (a) 형질전환된 세포주 및 비형질전환된 세포주를 대상으로 형질전환된 세포주에서만 DNA 과메틸화가 된 유전자를 선택하는 단계; (b) 형질전환된 유방암 조직세포 및 연접부위의 비형질전환 조직 세포의 메틸화 경향을 비교하여, 형질전환 조직 세포에서 과메틸화된 유전자의 목록을 분류하는 단계; (c) 형질전환된 유방암 세포주를 메틸화 저해제로 처리하고, 처리하지 않은 형질전환된 유방암 세포주와 비교하여, 메틸화 저해제를 처리한 형질전환된 유방암 세포주에서 더 많이 발현하는 유전자의 목록을 분류하는 단계; 및 (a), (b) 및 (c) 단계에서 얻은 유전자 목록을 비교하여, 두 목록에 공통적으로 존재하는 유전자를 비형질전환 상태에서 형질전환된 유방암세포 형태로 전환 중인 세포의 계놈에서 메틸화에 의해 조절되는 바이오마커로 선별하는 단계.
- [0018] 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 임상샘플에서 DNA를 분리하는 단계; 및 (b) 상기 분리된 DNA에서 *CHL1* 유전자{NM_001257, 칼슘 의존적 세포접착 단백질, Cadherin 13, H-cadherin (heart)} 또는 *TF* 유전자(NM_001063, 철이온 결합 수송 단백질, 트랜스페린)의 메틸화를 검출하는 단계를 포함하는 유방암 또는 유방암 진행단계의 검출방법에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명에 있어서, *CHL1* 유전자{NM_001257, 칼슘 의존적 세포접착 단백질, Cadherin 13, H-cadherin (heart)}

또는 TF 유전자(NM_001063, 철이온 결합 수용 단백질, 트랜스페린)의 메틸화 검출은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 가지는 DNA 부위에서 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0020] 본 발명항에 있어서, 상기 메틸화 검출은 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 마이크로시퀀싱 및 바이오플레이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 임상 샘플은 암 의심 환자 또는 진단 대상 유래의 조직, 객담, 세포, 혈액, 혈장 및 소변으로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 상기 메틸화 바이오마커 유전자의 선별방법으로 유방암뿐만 아니라, 유방암으로 진행 중인 여러 이형증 단계에서 다양하게 메틸화되는 유전자를 찾아낼 수 있으며, 선별된 유전자는 유방암 스크리닝, 위험성 평가, 예측, 병명 확인, 병의 단계 진단 및 치료 타겟의 선정에도 사용될 수 있다.
- [0023] 유방암 및 여러 단계의 이상에서 메틸화되는 유전자를 확인하는 것은 정확하고 효과적으로 유방암을 조기 진단할 수 있게 하며, 다중 유전자를 사용한 메틸화 목록 확립 및 치료를 위한 새로운 타겟을 확인할 수 있다. 추가로, 본 발명에 따른 메틸화 데이터는 다른 비-메틸화 연관 바이오마커 검출 방법과 연계하면 더욱 정확한 유방암 진단 시스템을 확립할 수 있을 것이다.
- [0024] 본 발명의 상기 방법으로, 검체로부터 얻어진 하나 이상의 핵산 바이오마커의 메틸화 단계를 결정하는 것을 포함하는 여러 단계 또는 기(期)의 유방암 진행을 진단할 수 있다. 유방암의 각 단계의 검체에서 분리된 핵산의 메틸화 단계를 유방 조직의 세포 증식성 이상을 갖지 않는 검체로부터 얻어진 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계와 비교하여, 검체의 유방암의 특정 단계를 확인할 수 있으며, 상기 메틸화 단계는 하이퍼메틸화일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일례로, 핵산은 유전자의 조절 부위에서 메틸화될 수 있다. 다른 예로, 메틸화는 유전자의 조절 부위의 외곽에서부터 시작되어 내부로 진행되기 때문에, 조절 부위의 외곽에서 메틸화를 검출하는 것으로 세포 형질 전환에 관여하는 유전자를 조기 진단할 수 있다.
- [0026] 다른 예로, 본 발명에서는 CDH13 (NM_001257, Cadherin 13, H-cadherin (heart))과 TF (NM_001063, Transferrin) 유전자 프로모터 부위의 메틸화 상태를 키트를 이용하여 검출하는 것에 의하여, 검체에 존재하는 유방 조직의 세포 성장성 이상(이형증)을 진단할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 방법에 따르면, 검체의 유방 조직의 세포 성장성 이상 성향(이형증 진행도)을 결정할 수 있다. 상기 방법은 검체로부터 분리한 하나 이상의 핵산의 메틸화 상태를 결정하는 것을 포함하고, 상기 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계는 유방 조직의 세포 성장성 이상 성향(이형증)이 없는 검체로부터 분리한 핵산의 메틸화 단계와 비교하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 상기 방법은 검체로부터 분리한 하나 이상의 핵산을 포함하는 시료를 하나 이상의 메틸화 상태를 결정할 수 있는 제제와 접촉시키는 것을 포함한다. 상기 방법은 하나 이상의 핵산에서 하나 이상의 부위의 메틸화 상태를 확인하는 것을 포함하고, 상기 핵산의 메틸화 상태는 유방 조직의 세포 성장성 이상(이형증 진행)을 가지지 않는 검체의 핵산에서의 동일한 부위의 메틸화 상태와 차이가 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 양태에서, 상기 검출방법은 키트의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 검출방법에 사용되는 키트는 샘플을 담는 구획된 캐리어 수단, 비메틸화 시토신을 민감하게 절단하는 제제를 함유하는 첫번째 용기, CpG 함유 핵산을 증폭하기 위한 프라이머를 함유하는 두번째 용기 및 절단된 또는 절단되지 않은 핵산의 존재를 검출하는 수단이 함유된 세번째 용기를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 본 발명에 따라 사용되는 프라이머는 서열번호 3~6에 기재된 서열, 기능적 조합 및 그 단편을 포함한다. 기능적 조합 또는 단편은 게놈상에서 메틸화가 일어났는지의 여부를 검출하는 프라이머로 사용된다. 상기 캐리어 수단은 병, 튜브와 같은 하나 이상의 용기를 함유하기에 적합하고, 각 용기는 본 발명의 방법에 사용되는 독립적 구성 요소들을 함유한다. 본 발명의 명세서에서, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자는 용기 중의 필요한 제제를 손쉽게 분배할 수 있다. 예를 들면, 메틸화 민감성 제한 효소를 함유하는 용기를 하나의 용기로 구성할 수 있다. 하나 이상의 용기는 중요 핵산 로커스와 상동성을 가지는 프라이머를 포함할 수 있다. 또한, 하나 이상의 용기는 메틸화 민감성 제한효소의 이소키소머를 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 양태에서, 상기 키트를 이용하여, 유방암을 검출하는 방법은 (1) 임상샘플에서 지놈 DNA를 분리하는 단계 (2) 상기 분리된 지놈 DNA를 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계 (3) 상기 메틸화 민감성

제한효소로 처리된 지노믹 DNA를 본 발명의 유방암 진단용 바이오마커를 증폭시킬 수 있는 프라이머를 사용하여 증폭시키는 단계 및 (4) 상기 증폭된 산물에서 유방암 진단용 바이오마커의 존재유무를 판별하는 단계를 거칠 수 있으며, 바이오마커 단편이 존재하는 시료를 유방암 또는 유방암진행단계의 시료로 진단할 수 있으며, 상기 키트는 포함된 프라이머를 이용한 PCR 증폭 산물의 유무를 확인하기 위하여 유방암 진단용 바이오마커와 엄격한 조건에서 하이브리다이제이션할 수 있는 단편을 추가로 함유할 수 있다.

[0031] 또한, 상기 유방암 진단용 바이오마커의 존재유무를 판별하는 방법으로는 bisulfate sequencing, pyrosequencing, methylation-specific PCR, MethyLight, methylated DNA binding 단백질을 이용한 PCR 및 DNA chip 등을 사용할 수 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 실시 예에서는 상기 메틸화 유전자 마커를 이용하여 유방암을 형성할 가능성이 있는 세포의 조기 진단이 가능하다. 암세포에서 메틸화된다고 확인된 유전자가 임상적으로 또는 형태학적으로 정상으로 보이는 세포에서 메틸화되면, 상기 정상으로 보이는 세포는 암화가 진행되고 있는 것이다. 그러므로, 정상으로 보이는 세포에서의 유방암 특이적 유전자 프로모터 부위의 메틸화를 확인함으로써, 유방암을 조기 진단할 수 있다.

[0033] 본 발명은 일 양태에서, CDH13유전자와 TF 유전자의 프로모터 메틸화 여부는 다음 단계를 포함할 수 있다: (a) 임상샘플로부터 샘플 DNA를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 DNA에 바이설파이트(bisulfite)를 처리하는 단계; (c) CDH13과 TF 유전자 프로모터의 CpG 섬을 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 증폭된 결과물을 이용하여 파이로시퀀싱을 수행하여 프로모터부위의 메틸화 여부를 결정하는 단계.

[0034] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 유방암에서 특이적으로 메틸화되는 유전자의 메틸화 빈도를 검토하고, 유방암 진행가능성을 가지는 조직의 메틸화 빈도를 정하는 것에 의하여 조직의 유방암으로의 발전 가능성을 평가할 수 있다.

[0035] 본 발명에서 사용된 "세포 형질전환"은 정상에서 비정상으로, 비-종양성에서 종양성으로, 미분화에서 분화로, 줄기세포에서 비-줄기세포로와 같이 세포의 특징이 한 형태에서 다른 형태로 바뀌는 것을 의미한다. 추가적으로, 상기 형질전환은 세포의 형태, 표현형, 생화학적 성질 등에 의하여 인식될 수 있다.

[0036] 본 발명에서 암의 "조기 확인"은 전이되기 전에 암의 가능성을 발견하는 것으로, 바람직하게는 검체 조직 또는 세포에서 형태학적 변화가 관찰되기 전에 발견하는 것이다. 추가적으로, 세포 형질전환의 "조기 확인"은 세포가 형질전환되는 형태가 되기 전에 초기 단계에서 형질전환이 일어날 가능성 높은 것을 말한다.

[0037] 본 발명에서 "하이퍼메틸화"는 CpG 섬의 메틸화를 의미한다.

[0038] 본 발명에서, "샘플" 또는 "검체 샘플"은 수행되는 분석의 종류에 따라, 개개인, 체액, 세포주, 조직 배양 등에서 얻어지는 모든 생물학적 샘플을 포함하는 폭넓은 범위의 샘플을 의미한다. 포유동물로부터 체액 및 조직 생검을 획득하는 방법은 통상적으로 널리 알려져 있다. 바람직한 소스는 유방의 생검(biopsy)이다.

[0039] 메틸화 조절 바이오마커의 스크리닝

[0040] 본 발명에서는 세포 또는 조직이 형질전환되거나 세포의 형태가 다른 형태로 변화될 때에 메틸화되는 바이오마커 유전자를 스크리닝하였다. 여기서, "형질전환" 세포는 정상형태가 비정상형태로, 비-종양성이 종양성으로, 미분화형태가 분화형태로 바뀌는 등의 세포 또는 조직의 형태가 다른 형태로 변화되는 것을 의미한다.

[0041] 그러므로, 본 발명에서는 유방암 세포로의 형질전환에서 메틸화 조절 마커 유전자를 체계적인 방법으로 확인하였다. 상기 방법의 일 실시예로 (1) 유방암 조직 및 인접하는 정상조직 조직시료로부터 게놈 DNA를 분리하였다. 상기 게놈 DNA를 메틸화된 DNAdp 결합하는 MDB2bt 단백질과 반응시킨 후, MBD2bt 단백질에 결합하는 메틸화된 DNA를 증폭하였다. 유방암 조직 유래 증폭 DNA는 Cy5로, 인접한 정상조직 조직 유래 증폭 DNA는 Cy3로 표지한 다음, human CpG 마이크로어레이에 하이브리다이제이션시켜 인접한 정상조직과 유방암조직간 메틸화 정도의 차이가 큰 유전자를 선별하였다. 또한, (2) 형질전환된 유방암 세포주를 메틸화 저해제로 처리하고, 처리하지 않은 형질전환된 유방암세포주와 비교하여, 메틸화 저해제를 처리한 형질전환된 유방암 세포주에서 발현이 증가하는 유전자의 목록을 선별하였다. (1)과 (2)의 단계에서 획득한 유전자 목록을 비교하여, 두 목록에 모두 존재하는 유전자를 비형질전환 상태에서 형질전환된 유방암세포 형태로 전환 중인 세포의 게놈에서 메틸화에 의해 조절되는 마커 유전자로 간주하였고, 총 6개의 유전자를 선별하였다.

- [0042] 본 발명에서는 상기 6개의 바이오마커가 메틸화되었는지 추가로 확인하기 위하여, 유방암 세포주 대상으로 파이로시퀀싱을 수행하였다.
- [0043] 즉, 유방암 세포주 MCF-7 및 MDAMB-231로부터 전체 게놈 DNA를 분리하여 바이셀파이트를 처리한 후, 바이셀파이트로 전환된 게놈 DNA를 각 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 이후, 상기 증폭된 PCR 산물을 파이로시퀀싱을 수행하여 메틸화 정도를 측정하였다. 그 결과, 상기 8개의 바이오마커 유전자 중 총 2개의 바이오마커가 유방암 세포주에서 메틸화되어 있다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0044] **유방암에 대한 바이오마커-정상세포와의 비교를 위한 암세포의 용도**
- [0045] 본 실시예에서, "정상" 세포는 비정상적 세포 형태 또는 세포학적 성질의 변화를 나타내지 않은 세포를 의미한다. "종양"세포는 암 세포를 의미하고, "비종양" 세포는 병증 조직의 일부이지만, 종양 부위는 아니라고 판단되는 세포를 의미한다.
- [0046] 본 발명은 일 관점에서, 유방암과 다음에 기재된 2개 유전자의 프로모터 하이퍼메틸화 사이의 관련성의 발견에 기반을 둔 것이다: CDH13 (NM_001257) - 칼슘 의존적 세포접착 단백질 (Cadherin 13, H-cadherin (heart), Calcium dependent cell adhesion protein); TF (NM_001063) - 철이온 결합 수송 단백질 (Transferrin, iron binding transport protein); 유전자.
- [0047] 본 발명의 진단용 키트의 다른 용도로, 검체에서 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계를 결정하여 검체의 유방 조직의 세포 성장성 이상을 조기 진단할 수 있다. 상기 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계는 유방 조직의 세포 성장성 이상을 가지고 있지 않은 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화 상태와 비교하는 것을 특징으로 할 수 있다. 핵산은 CpG 섬과 같은 CpG-함유 핵산인 것이 바람직하다.
- [0048] 본 발명의 진단용 키트의 다른 용도로, 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화를 결정하는 것을 포함하는 검체의 유방 조직의 세포 성장성 이상 소양을 진단할 수 있다. 상기 핵산은 CDH13 (NM_001257) - 칼슘 의존적 세포접착 단백질 (Cadherin 13, H-cadherin (heart), Calcium dependent cell adhesion protein); TF (NM_001063) - 철이온 결합 수송 단백질 (Transferrin, iron binding transport protein); 유전자 및 그의 조합을 코딩하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계는 유방 조직의 세포 성장성 이상에 대한 소양을 가지고 있지 않은 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화 상태와 비교하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0049] 상기 "소양"은 상기 세포 성장성 이상에 걸리기 쉬운 성질을 의미한다. 소양을 가진 검체는 아직은 세포 성장성 이상을 가지고 있지 않지만, 세포 성장성 이상이 존재하거나 존재할 경향이 증가된 검체를 말한다.
- [0050] 본 발명은 다른 관점에서, 검체의 핵산을 포함하는 시료를 시료의 메틸화 상태를 결정할 수 있는 제제와 접촉시키고, 하나 이상의 핵산의 하나 이상의 부위의 메틸화를 확인하는 것을 포함하는 검체의 유방 조직의 세포 성장성 이상을 진단하는 방법을 제공한다. 여기서, 하나 이상의 핵산의 하나 이상의 부위의 메틸화는 세포 성장성 이상을 가지지 않는 검체의 동일한 핵산의 동일한 부위의 메틸화 단계와 다른 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 방법은 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 하나 이상의 부위의 메틸화를 결정하는 단계를 포함한다. 여기서, "핵산" 또는 "핵산 서열"이란 올리고뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드를 의미하거나 이들의 단편, 단일가닥 또는 이중가닥의 게놈 기원 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA, 센스 또는 안티센스 가닥의 게놈 기원 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA, PNA(peptide nucleic acid) 또는 자연 기원 또는 합성 기원의 DNA 양 또는 RNA 양 물질을 말한다. 핵산이 RNA이면, 테옥시뉴클레오타이드 A, G, C 및 T를 대신하여, 각각 리보뉴클레오타이드 A, G, C 및 U로 대체된다는 것은 당해 분야 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명하다.
- [0052] 서로 다르게 메틸화된 CpG 섬의 존재를 검출할 수 있는 핵산이라면 어떤 것이든 사용할 수 있다. 상기 CpG 섬은 핵산 서열에서 CpG가 풍부한 부위이다.
- [0053] **메틸화(methylation)**
- [0054] 본 발명에서의 정제되거나 정제되지 않은 형태의 어떠한 핵산도 사용될 수 있으며, 타겟 부위(예를 들면, CpG-함유 핵산)를 함유하는 핵산 서열을 함유하고 있거나 함유할 것으로 추정되는 어떠한 핵산도 사용될 수 있다. 차별적으로 메틸화될 수 있는 핵산 부위가 CpG 섬이고, 이는 다른 디뉴클레오타이드 CpG 핵산 부위와 비교하여 높

은 CpG 밀도를 가지는 핵산 서열이다. 이중(doublet) CpG는 G*C 염기쌍의 비율로 예측하였을 때, 척추동물 DNA에서 단 20% 정도의 확률로 나타난다. 특정 부위에서, 이중 CpG의 밀도는 게놈의 다른 부위와 비교하여 10배나 더 높다. CpG 섬은 평균 G*C 비율이 약 60%로, 보통의 DNA의 G*C 비율은 평균 40%를 나타낸다. CpG 섬은 전형적으로 약 1~2kb 길이를 가지고, 인간 게놈에는 약 45,000개의 CpG 섬이 존재한다.

[0055] 여러 유전자에서, CpG 섬은 프로모터의 업스트림(upstream)에서 시작하여, 다운스트림의 전사 부위까지 확장된다. 프로모터에서 CpG 섬의 메틸화는 보통 유전자의 발현을 억제시킨다. CpG 섬은 또한 유전자 코딩 부위의 3' 부위뿐만 아니라, 유전자 코딩 부위의 5' 부위를 둘러싸고 있을 수 있다. 그러므로, CpG 섬은 프로모터 부위를 포함하는 조절 부위의 코딩 서열 업스트림, 코딩 부위(예를 들어, 엑손영역), 코딩 부위의 다운스트림, 예를 들면, 인핸서 부위 및 인트론을 포함하는 여러 부위에서 발견된다.

[0056] 통상적으로, CpG-함유 핵산은 DNA이다. 그러나, 본 발명의 방법은 예를 들면, DNA 또는 DNA와 mRNA를 포함하는 RNA를 함유하는 시료를 적용할 수 있으며, 여기서 DNA 또는 RNA는 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있으며, 또는 DNA-RNA 하이브리드를 함유한 시료인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0057] 핵산 혼합물 또한 사용할 수 있다. 검출될 특이적인 핵산 서열은 큰 분자의 분획일 수 있고, 처음부터 특이 서열이 전체 핵산 서열을 구성하는 분리된 분자 형태로 존재할 수 있다. 상기 핵산 서열은 순수한 형태로 존재하는 핵산일 필요는 없으며, 핵산은 전체 인간 DNA가 포함되어 있는 것과 같이 복잡한 혼합물 내의 적은 분획일 수도 있다. 시료에 포함된 핵산의 메틸화 정도를 측정하는 데 사용되거나, 메틸화된 CpG 섬을 검출하는 데 사용되는 시료에 포함된 핵산은 Sambrook 등(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY., 1989)에 기재된 여러 가지 방법으로 추출될 수 있다.

[0058] 핵산은 정보를 코드하거나 핵산의 전사를 조절하는 DNA 부위인 조절 부위를 포함할 수 있다. 조절 부위는 적어도 하나의 프로모터를 포함한다. "프로모터"는 전사를 지시하는데 필요한 최소한의 서열이고, 프로모터-의존성 유전자에서 세포 타입 특이적, 조직 특이적 또는 외부 시그널이나 체제에 의한 유도성을 조절할 수 있다. 프로모터는 유전자의 5' 또는 3' 부위에 위치한다. 프로모터 부위의 전체 또는 부분의 핵산 수는 CpG 섬 부위의 메틸화를 측정하는데 적용될 수 있다. 타겟 유전자 프로모터의 메틸화는 외곽에서부터 내부로 진행된다. 그러므로, 세포 전환의 초기 단계는 프로모터 부위의 외곽에서의 메틸화를 분석함으로써 검출할 수 있다.

[0059] 검체로부터 분리된 핵산은 검체의 생물학적 시료에 의하여 얻어진다. 유방암이나 유방암의 진행 단계를 진단하고 싶다면, 스크랩이나 생검으로 유방 조직에서 핵산을 분리하여야 한다. 이러한 시료는 당해 분야에서 알려진 여러 의학적 과정에 의하여 얻어질 수 있다.

[0060] 본 발명에서, "과메틸화" 또는 "하이퍼메틸화"란 종양세포의 특정 CpG 위치 또는 CpG에 연결된 부위에서의 메틸화 정도가 정상세포에 비해 높은 상태를 나타낸다.

[0061] 샘플(sample)

[0062] 본 발명은 유방암의 조기 확인에 대하여 기술하고 있으며, 유방암 특이적 유전자 메틸화를 이용하고 있다. 유방암 특이적 유전자의 메틸화는 종양 부위의 부근 조직에서도 일어났다. 그러므로, 유방암의 조기 확인 방법은 액체 또는 고체 조직을 포함하는 모든 샘플로 유방암-특이적 유전자의 메틸화의 유무를 확인할 수 있다. 상기 샘플은 조직, 세포, 소변, 혈청 또는 혈장을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0063] 개별 유전자 및 패널

[0064] 본 발명은 진단 또는 예측 마커로서 각 유전자를 개별적으로 사용하거나, 두 개의 마커 유전자를 조합하여 패널 디스플레이 형태로 하여 사용할 수 있으며, 두 개의 마커 유전자는 함께 메틸화된 유전자의 유무 및 정도에 따라 가중치를 둘 수 있으며, 암으로 발전할 가능성의 수준을 선정할 수 있다. 이러한 알고리즘은 본 발명에 속한다.

[0065] 메틸화 검출 방법

[0066] 메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR)

[0067] 지노믹 DNA에 바이설파이트를 처리하면 5'-CpG-3' 부위의 시토신이 메틸화된 경우에는 그대로 시토신으로 남아 있고, 비메틸화된 경우에는 우라실로 변하게 된다. 따라서, 바이설파이트 처리 후 변환된 염기서열을 대상으로 5'-CpG-3' 염기서열이 존재하는 부위에 해당하는 PCR 프라이머를 제작하였다. 이때 메틸화된 경우에 해당되는 PCR 프라이머와 비메틸화된 경우에 해당하는 두 종류의 프라이머를 제작하였다. 지노믹 DNA를 바이설파이트로 변환시킨 다음, 상기 두 종류의 프라이머를 이용하여 PCR을 하면 메틸화된 경우에는 메틸화된 염기서열에 해당되는 프라이머를 사용한 것에서 PCR 산물이 만들어지게 되고, 반대로 비메틸화된 경우에는 비메틸화에 해당되는 프라이머를 이용한 것에서 PCR 산물이 만들어진다. 메틸화 여부는 아가로즈겔 전기영동방법으로 정성적으로 확인할 수 있다.

[0068] **실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR)**

[0069] 실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화 특이 PCR 방법을 실시간 측정방법으로 전환한 것으로, 지노믹 DNA에 바이설파이트를 처리한 후, 메틸화된 경우에 해당하는 PCR 프라이머를 디자인하고, 이들 프라이머를 이용하여 실시간 PCR을 수행하는 것이다. 이때, 증폭된 염기서열과 상보적인 TanMan 프로브를 이용하여 검출하는 방법과 Sybergreen을 이용하여 검출하는 두 가지 방법이 있다. 따라서, 실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화된 DNA만을 선택적으로 정량 분석할 수 있다. 이때, *in vitro* methylated DNA 샘플을 이용하여 표준곡선을 작성하고, 표준화를 위하여 염기서열내에 5'-CpG-3' 서열이 없는 유전자를 음성대조군으로 함께 증폭하여 메틸화 정도를 정량 분석하였다.

[0070] **파이로시퀀싱**

[0071] 파이로시퀀싱 방법은 바이설파이트 시퀀싱 방법을 정량적인 실시간 시퀀싱으로 변환한 방법이다. 바이설파이트 시퀀싱과 마찬가지로 지노믹 DNA를 바이설파이트를 처리하여 전환시킨 다음, 5'-CpG-3' 염기서열이 없는 부위에 해당하는 PCR 프라이머를 제작하였다. 지노믹 DNA를 바이설파이트로 처리한 후, 상기 PCR 프라이머로 증폭한 다음, 시퀀싱 프라이머를 이용하여 실시간 염기서열 분석을 수행하였다. 5'-CpG-3' 부위에서 시토신과 티민의 양을 정량적으로 분석하여 메틸화 정도를 메틸화 지수로 나타내었다.

[0072] **메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 또는 정량 PCR 및 DNA 칩**

[0073] 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 또는 DNA 칩 방법은 메틸화 DNA에만 특이적으로 결합하는 단백질을 DNA와 섞어주게 되면, 메틸화 DNA에만 특이적으로 단백질이 결합하기 때문에 메틸화 DNA만을 선택적으로 분리할 수 있다. 지노믹 DNA를 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질과 섞어준 후, 메틸화된 DNA만을 선택적으로 분리하였다. 이들 분리된 DNA를 프로모터 부위에 해당하는 PCR 프라이머를 이용하여 증폭한 후, 아가로즈 전기영동으로 메틸화 여부를 측정하였다.

[0074] 또한, 정량 PCR 방법으로도 메틸화 여부를 측정할 수 있으며, 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질로 분리한 메틸화 DNA는 형광 염료로 표지하여 상보적인 프로브가 집적된 DNA칩에 하이브리다이제이션시킴으로써 메틸화 여부를 측정할 수 있다. 여기서 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질은 McrBt에 제한되지 않는다.

[0075] **차별적 메틸화의 검출-메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제**

[0076] 차별적 메틸화의 검출은 메틸화되지 않은 CpG 부위만을 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제와 핵산 샘플을 접촉시켜 비메틸화된 핵산을 절단하는 것으로 수행할 수 있다.

[0077] 별도의 반응으로, 상기 샘플을 메틸화 및 비메틸화 CpG 부위를 모두 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머(isochizomer)와 접촉시켜, 메틸화된 핵산을 절단하였다.

[0078] 특이적 프라이머를 핵산 샘플에 첨가하고, 통상의 방법으로 핵산을 증폭시켰다. 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제를 처리한 샘플에서 증폭 산물이 존재하고, 메틸화 및 비메틸화 CpG 부위를 모두 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머를 처리한 샘플에서 증폭 산물이 존재하지 않으면, 분석된 핵산 부위에 메틸화가 일어난 것이다. 그러나, 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제를 처리한 샘플에서 증폭 산물이 존재하지 않

고, 메틸화 및 비메틸화 CpG 부위를 모두 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머를 처리한 샘플에서도 증폭 산물이 존재하지 않는다는 것은 분석된 핵산 부위에 메틸화가 일어나지 않은 것이다.

[0079] 여기서, "메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제"는 인식 부위에 CG를 포함하고, C가 메틸화되지 않았을 때와 비교하여 C가 메틸화되었을 때 활성을 가지는 제한효소이다 (예를 들면, *SmaI*). 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 비제한적 예로써, *MspI*, *HpaII*, *BssHII*, *BstUI* 및 *NotI*이 포함된다. 상기 효소들은 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 다른 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레오티드로는 예를 들어, *SacII* 및 *EagI*를 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0080] 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머는 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레아제와 동일한 인식 부위를 갖는 제한 엔도뉴클레아제이지만, 메틸화된 CGs와 비메틸화된 CGs를 모두 절단하며, 예를 들면, *MspI*를 들 수 있다.

[0081] 본 발명의 프라이머는 증폭될 로커스의 각 가닥과 "대체적으로" 상보성을 가지도록 제작되고, 상기에서 설명한 바와 같이, 적당한 G 또는 C 뉴클레오티드를 포함한다. 이것은 중합반응을 수행하는 조건에서 프라이머가 대응하는 핵산 가닥과 하이브리다이제이션 되기에 충분한 상보성을 가지는 것을 의미한다. 본 발명의 프라이머는 증폭 과정에 사용되며, 상기 증폭 과정은 예를 들면, PCR과 같은, 타겟 로커스가 많은 반응 단계를 거치면서 기하급수적인 숫자로 증가하는 효소 연속 반응이다. 전형적으로, 한 프라이머(안티센스 프라이머)는 로커스의 네가티브(-) 가닥에 대하여 상동성을 가지고, 나머지 하나의 프라이머(센스 프라이머)는 포지티브(+) 가닥에 대하여 상동성을 가진다. 변성된 핵산에 프라이머가 어닐링되면, DNA 폴리머라아제 I(Klenow) 및 뉴클레오티드와 같은 효소 및 반응물들에 의하여 사슬이 신장되고, 그 결과, 타겟 로커스 서열을 함유하는 + 와 - 가닥이 새롭게 합성된다. 상기 새로이 합성된 타겟 로커스가 주형으로도 사용되어 변성, 프라이머 어닐링 및 사슬 신장의 사이클이 반복되면 타겟 로커스 서열의 기하급수적인 합성이 진행된다. 상기 연속 반응의 산물은 반응에 사용된 특이 프라이머의 말단과 대응하는 말단을 가지는 독립적인 이중가닥 핵산이다.

[0082] 상기 증폭 반응은 당해 분야에서 보편적으로 사용되고 있는 PCR인 것이 바람직하다. 그러나, 리얼타임 PCR 또는 등은 효소를 사용한 선형증폭과 같은 대체적인 방법도 사용할 수 있으며, 멀티플렉스 증폭 반응 역시 사용할 수 있다.

[0083] 차별적 메틸화의 검출-바이설파이트 시퀀싱 방법

[0084] 메틸화 CpG를 함유한 핵산을 검출하는 다른 방법은 핵산을 함유한 시료를 비메틸화 시토신을 변형시키는 제제와 접촉시키는 단계 및 CpG-특이적 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 시료의 CpG-함유 핵산을 증폭시키는 단계를 포함한다. 여기서, 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머는 변형된 메틸화 및 비메틸화 핵산을 구별하여 메틸화 핵산을 검출하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 증폭 단계는 선택적이고, 바람직하지만 필수적인 것은 아니다. 상기 방법은 변형된(예를 들면, 화학적으로 변형된) 메틸화 및 비메틸화 DNA를 구별하는 PCR 반응에 의존하는 것이다. 상기와 같은 방법은 미국특허 5,786,146에 개시되어 있으며, 상기 특허에는 메틸화 핵산의 검출을 위한 바이설파이트(bisulfite) 시퀀싱과 관련하여 기재되어 있다.

[0085] 기질

[0086] 타겟 핵산 부위가 증폭되면 핵산 서열의 존재를 검출하기 위하여, 상기 핵산 증폭 산물은 고체 지지체(기질)에 고정된 알려진 유전자 프로브와 하이브리다이제이션될 수 있다.

[0087] 여기서, "기질"은 물질, 구조, 표면 또는 재료, 비생물학적이고, 합성되고, 무생물, 평면, 구형 또는 특이적 결합, 평편한 표면의 물질을 포함하는 혼합물 수단으로, 하이브리다이제이션 또는 효소 인식 부위 또는 대다수의 다른 인식 부위 또는 표면, 구조 또는 재료로 구성된 수많은 다른 분자 종을 넘어서는 수많은 다른 인식 부위를 포함할 수 있다. 상기 기질은 예를 들면, 반도체, (유기)합성 메탈, 합성 반도체, 인슐레이터 및 도판트; 금속, 합금, 원소, 화합물 및 미네랄; 합성되고, 분해되며, 예칭되고, 리소그래프되며, 프린트되고 마이크로패브리케이션된 슬라이드, 장치, 구조 및 표면; 산업적, 폴리머, 플라스틱, 멤브레인, 실리콘, 실리콘이트, 유리, 금속 및 세라믹; 나무, 종이, 카드보드, 면, 울, 천, 직조 및 비직조 섬유, 재료 및 패브릭일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0088] 몇몇 형태의 멤브레인은 당해 분야에서 핵산 서열에 대하여 부착력을 가진다고 알려져 있다. 이러한 멤브레인의

특이적이고 비제한적인 예로 니트로셀룰로오스 또는 폴리비닐클로라이드, 디아조티즈드(diazotized) 페이퍼 및 GENESCREEN™, ZETAPROBE™(Biorad) 및 NYTRAN™ 등의 상업적으로 사용되는 멤브레인과 같이 유전자 발현 검출용 멤브레인을 들 수 있다. 비드, 글래스, 웨이퍼 및 금속 기질도 포함된다. 이러한 목적물에 핵산을 부착시키는 방법은 당해 분야에서 잘 알려져 있다. 이와 다르게, 액체 상에서도 스크리닝을 수행할 수 있다.

[0089] **하이브리다이제이션 조건**

[0090] 핵산 하이브리다이제이션 반응에서, 엄격한 특정 수준을 달성하기 위하여 사용되는 조건은 하이브리다이제이션되는 핵산의 성질에 따라 다양하다. 예를 들면, 하이브리다이제이션되는 핵산 부위의 길이, 상동성 정도, 뉴클레오타이드 서열 조성(예를 들면, GC/AT 조성비) 및 핵산 타입(예를 들면, RNA, DNA)등이 하이브리다이제이션 조건을 선택하는데 고려된다. 추가적인 고려 조건은 핵산이 예를 들면, 필터 등에 고정화되어 있는지의 여부이다.

[0091] 매우 엄격하게 진행되는 조건의 예를 들면 다음과 같다: 실온의 2X SSC/0.1% SDS(하이브리다이제이션 조건); 실온의 0.2X SSC/0.1% SDS(엄격성이 낮은 조건); 42℃에서의 0.2X SSC/0.1% SDS(보통의 엄격성을 가지는 조건); 68℃에서 0.1X SSC(높은 엄격성을 가지는 조건). 세척 과정은 이들 중 한가지 조건을 사용하여 수행할 수 있고, 예를 들면 높은 엄격성을 가지는 조건, 또는 상기 조건을 각각 사용할 수 있으며, 상기 기재된 순서대로 각각 10~15분씩, 상기 기재된 조건을 전부 또는 일부 반복하여 수행할 수 있다. 그러나 상기에 기술한 바와 같이, 최적 조건은 포함된 특별한 하이브리다이제이션 반응에 따라 다양하며, 실험을 통하여 결정할 수 있다. 일반적으로, 중요한 프로브의 하이브리다이제이션에는 높은 엄격성을 가지는 조건이 사용된다.

[0092] **표지(Label)**

[0093] 중요한 프로브는 검출할 수 있도록 표지되며, 예를 들면 방사선 동위원소, 형광 화합물, 바이오 발광 화합물, 화학 발광 화합물, 금속 킬레이트 또는 효소로 표지될 수 있다. 상기와 같은 프로브를 적당하게 표지하는 것은 당해 분야에서 널리 알려진 기술이며, 통상적인 방법을 통하여 수행할 수 있다.

[0094] **키트(Kit)**

[0095] 본 발명에 의하면, 검체의 세포 성장성 이상을 검출하는 데 유용한 키트를 제공하고 있다. 본 발명의 키트는 샘플을 담는 구획된 캐리어 수단, 비메틸화 시토신을 민감하게 절단하는 제제를 함유하는 첫번째 용기, CpG 함유 핵산을 증폭하기 위한 프라이머를 함유하는 두번째 용기 및 절단된 또는 절단되지 않은 핵산의 존재를 검출하는 수단이 함유된 세번째 용기를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 본 발명에 따라 사용되는 프라이머는 서열번호 5~21 기재된 서열, 기능적 조합 및 그 단편을 포함한다. 기능적 조합 또는 단편은 게놈상에서 메틸화가 일어났는지의 여부를 검출하는 프라이머로 사용된다.

[0096] 캐리어 수단은 병, 튜브와 같은 하나 이상의 용기를 함유하기에 적합하고, 각 용기는 본 발명의 방법에 사용되는 독립적 구성 요소들을 함유한다. 본 발명의 명세서에서, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자는 용기 중의 필요한 제제를 손쉽게 분배할 수 있다. 예를 들면, 메틸화 민감성 제한 효소를 함유하는 용기를 하나의 용기로 구성할 수 있다. 하나 이상의 용기는 중요 핵산 로커스와 상동성을 가지는 프라이머를 포함할 수 있다. 또한, 하나 이상의 용기는 메틸화 민감성 제한효소의 이소코소머를 포함할 수 있다.

실시예

[0097] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0098] **실시예 1: 유방암 조직샘플에서 과메틸화되어 있는 유전자의 선별**

[0099] 유방암에서 과메틸화된 유전자를 선별하기 위하여 유방암 조직 및 인접하는 정상조건 조직시료를 이용하여 아래

와 같이 선별하였다.

[0100] 우선 각 조직 시료로부터 게놈 DNA를 분리하였다. 상기 게놈 DNA 500ng을 초음파파쇄법 (Vibra Cell, SONICS)으로 300-400bp 크기로 절편을 만들고, Methylcapture™ (Genomictree 사, 대한민국)을 이용하여 각 세포주에서 메틸화 DNA를 선택적으로 분리하였다. 분리한 메틸화 DNA를 GenomePlex™ Complete Whole Genome Amplification Kit (Sigma, 미국)를 사용하여 증폭한 후, 유방암 조직 유래 증폭 DNA는 Cy5-dUTP로 표지하고, 인접한 정상조직 유래 증폭 DNA는 Cy3-dUTP로 표지하여 혼합한 다음, 인간 유전체에 존재하는 27,800 여개의 CpG 섬에 존재하는 CpG에 대한 프로브가 집적되어 있는 CpG 마이크로어레이 (Agilent 사, 제조국)를 사용하여 하이브리다이제이션을 수행하였다. 상기 하이브리다이제이션 후, 일련의 세척 과정을 거친 다음, Agilent scanner를 이용하여 스캐닝하였다. 마이크로어레이 이미지로부터 시그널 값의 계산은 Feature Extraction 프로그램 v. 9.5.3.1(Agilent)을 이용하여 인접한 정상조직 유래와 유방암 조직 시료 간 시그널의 상대적인 강도 차이를 계산하고, 분석 프로그램인 GeneSpringGX (Agilent 사)를 이용하여 인접한 정상조직과 유방암조직간 메틸화 정도의 차이가 큰 유전자를 선별하였다. 통계적 기법을 통하여 유방암 조직에서 과메틸화된 후보 유전자를 60개 선별하였으며, 유전자군에 있는 유전자가 다수 선별되었다 (도 1).

[0101] 실시예 2: 탈메틸화에 의해 재활성화되는 유전자 선별

[0102] 실시예 1에서 선별된 유전자가 프로모터 메틸화에 의하여 발현이 조절되는지 확인하기 위하여, 유방암 세포주 MCF-7 (KCLB(한국세포주은행) 30022) 및 MDAMB-231 (KCLB 30026)에 디메틸화제인 5-아자-2-데옥시사이티딘 (DAC, Sigma, USA)을 200nM 농도로 5일간 처리하였다. 처리하지 않은 세포주와 처리한 세포주를 Tri reagent로 처리하여 전체 RNA를 분리하였다.

[0103] DAC 비처리 세포주 및 DAC 처리 세포주간의 전사 수준을 직접적으로 비교하여, DAC 처리에 의한 유전자 발현 변화를 측정하기 하였다. 그 결과, DAC를 처리하지 않은 대조군에 비하여, DAC를 처리하였을 경우, 103개의 유전자가 발현이 상승하는 것을 확인하였다. 실시예 1에서 획득한 60개의 유방암 특이적 과메틸화 유전자 목록과 103개의 디메틸화에 의하여 2배 이상 재발현된 유전자를 비교한 결과, 6개의 공통된 유전자를 선별하였다 (도 1 및 표 1).

표 1

[0104] 선별유전자 리스트

Gene Symbol	GenBank No.	Description	Chr. location
<i>CHL1</i>	NM_001257	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)	3p26.1
<i>TF</i>	NM_001063	transferrin	3q22.1
<i>CGNL1</i>	NM_032866	cingulin-like 1	15q21.3
<i>ITGB8</i>	NM_002214	integrin, beta 8	7p15.3
<i>LAMA3</i>	NM_198129	laminin, alpha 3	18q11.2
<i>NTRK2</i>	NM_001007097	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	9q22.1

[0105] 실시예 3: 암 세포주에서의 바이오마커 유전자의 메틸화 측정

[0106] 실시예 2에서 선별된 6개 유전자의 메틸화 상태를 추가적으로 확인하기 위하여, 각각의 프로모터에 대해 바이설파이트 파이로시퀀싱을 수행하였다.

[0107] 바이설파이트(bisulfite)를 이용하여 메틸화되지 않은 시토신을 우라실로 변형하기 위하여, 유방암 세포주 MCF-7(KCLB 30022) 및 MDAMB-231(KCLB 30026)로부터 전체 게놈 DNA를 분리하고, 200ng의 게놈 DNA에 EZ DNA methylation-Gold kit(Zymo Research, USA)를 이용하여 바이설파이트를 처리하였다. DNA를 바이설파이트로 처리하면, 비메틸화된 시토신은 우라실로 변형되고, 메틸화된 시토신은 변화없이 남게 된다. 상기 바이설파이트가 처리된 DNA를 멸균 증류수 20μl로 용출시켜 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하였다.

[0108] 상기 6개의 유전자에 대한 파이로시퀀싱을 수행하기 위한 PCR 및 시퀀싱 프라이머는 PSQ assay design 프로그램 (Biotage, USA)을 이용하여 설계하였다. 각 유전자의 메틸화 측정을 위한 PCR 및 시퀀싱 프라이머는 표 2 및 표 3에 나타내었다.

표 2

[0109] PCR 프라이머 및 조건

유전자	프라이머	서열 (5'→3')	서열 번호	CpG 위치 ^a	앰플리콘 크기
CHL1	forward	GTG TAA AGG GAG GGA AGA TAA G	3	-227, -224, -208, -205	70bp
	reverse	Biotin-CCT CTA CTC CCT TCC TAA ATT CT	4		
TF	forward	AGT AAG GAA GGG GGG TTG	5	-55, -46, -37	108bp
	reverse	Biotin-TCC CTT TAT TCC ATT CCC	6		
CGNL1	forward	AAG GGA AAG GGG TAA ATT GAG T	7	-367, -364, -358, -352, -350	82bp
	reverse	Biotin-CCT CTC CAA ATT CCT AAC CTA CAA	8		
LAMA3	forward	GGG TAT TGG GGT TAG TAT T	9	+136, +139, +142, +145	276bp
	reverse	Biotin-AAA CCC TCA CCT AAA TAA TAT AAC	10		
ITGB8	forward	GGG GAG GTT TTT TGA TTT TA	11	-721, -712, -709, -702	101bp
	reverse	Biotin-ACA AAC CCC AAT CTC TCA	12		
NTRK2	forward	GAG TAA GGG TTT GGG ATG TTT TA	13	+270, +285, +287	105bp
	reverse	Biotin-TCA TTT TCT CTC ATC CTT TAA CCT	14		

[0110] ^a 전사 개시점(+1)으로부터의 거리(nucleotide): 메틸화 측정에 사용된 CpG 부위의 게놈 DNA 상의 위치

표 3

[0111] 메틸화 마커 유전자의 시퀀싱 프라이머 서열

유전자	서열	서열번호
CHL1	GTA AAG GGA GGG AAG AT	15
TF	GGG AGG TTA AAG ATT	16
CGNL1	AAA GGG GTA AAT TGA GTT	17
LAMA3	GGG TAT TGG GGT TAG TA	18
ITGB8	GGG GTA GTG AGT ATT T	19
NTRK2	GGG TTT GGG ATG TTT TA	20

[0112] 상기 바이설파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng을 PCR로 증폭하였다. PCR 반응 용액(바이설파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng, 10X PCR 버퍼(Enzymomics, Korea) 5 μ l, Taq polymerase(Enzymomics, Korea) 5units, 2.5mM dNTP(Solgent, Korea) 4 μ l, PCR 프라이머 2 μ l(10 pmole/ μ l))을 95℃에서 5분 동안 처리한 후, 95℃에서 40초, 60℃에서 45초, 72℃에서 40초로 총 45회 실시한 다음, 72℃에서 5분 동안 반응시켰다. 상기 PCR 산물의 증폭 여부는 2.0% 아가로오스젤을 사용한 전기영동으로 확인하였다.

[0113] 상기 증폭된 PCR 산물에 PyroGold 시약(Biotage, USA)을 처리한 후, PSQ96MA 시스템(Biotage, USA)을 이용하여 파이로시퀀싱을 수행하였다. 상기 파이로시퀀싱 후, 메틸화 지수(methylation index)를 계산함으로써 메틸화 정도를 측정하였다. 메틸화 지수는 각 CpG 부위에서 시토신이 결합하는 평균율을 구하여 계산하였다.

[0114] 6개의 바이오마커의 유방암 세포주에서의 메틸화 정도를 파이로시퀀싱 방법을 이용하여 정량적으로 나타낸

결과, 상기 6개의 바이오마커 유전자 중 3개의 마커가 두 세포주에서 높은 수준으로 메틸화되어 있는 것을 확인하였다 (도 2).

[0115] 실시예 4: 유방암 조직에서의 바이오마커 유전자의 과메틸화 측정

[0116] 실시예 1~3에서 나타난 바와 같이, 유방암 조직에서 과메틸화 되어 있으며, 디메틸화 조건에서 마커의 발현이 재활성화되며, 프로모터 부위에 CpG 섬을 함유하고 있고, 유방암 세포주에서 과메틸화 되어 있는 *CHL1*, *TF*, *CGNL1* 유전자를 이용하여 유방암 진단용 바이오마커로 사용할 수 있는지 검증하기 위하여, 10명의 정상인의 유방조직과 23명의 유방암 조직 임상 검체를 이용하여 3개의 바이오마커에 대하여 메틸화 어세이를 수행하였다. 메틸화 어세이는 파이로시퀀싱 방법을 사용하여 실시예 3에 기재된 방법으로 수행하였다.

[0117] 그 결과, 정상인의 유방조직에 비해 유방암환자의 조직에서 *CGNL1*을 제외한 *CHL1*과 *TF* 유전자는 매우 높은 정도의 메틸화 수준을 나타내었다 (도 3). 그리고, ROC(receiver operating calculation) 커브 분석을 수행하여 유방암 환자 진단을 위한 메틸화 지수 cut-off를 결정하고, 민감도와 특이도를 결정하였다. 그 결과, *CHL1*은 민감도 36.4%, 특이도 100%를 보이며, *TF*는 민감도 95.5% 및 특이도 100%의 결과를 나타냄으로써 우수한 유방암 진단용 바이오마커임을 확인하였다. 또한, 두 마커 유전자를 패널로 사용하였을 경우, 민감도와 특이도가 각각 100%, 100%로 산출되어 이상적인 유방암 진단마커로서의 가능성을 보여주었다.

표 4

[0118] 메틸화 마커 유전자 프로모터의 서열

유전자	서열번호
<i>CHL1</i>	1
<i>TF</i>	2

[0119] 실시예 5: 혈청을 이용한 바이오마커 유전자의 과메틸화 측정

[0120] 비침습적 샘플인 혈청(serum)을 이용하여 바이오마커의 메틸화 검출이 가능함을 확인한 여러 보고가 있으며, 유방암의 조기 및 재발 여부를 serum을 이용할 경우 환자 편의적 진단이 가능하기 때문에, 혈청에서의 *CHL1*과 *TF* 유전자의 과메틸화 정도를 확인하였다. 15명의 정상인 혈청과 15명의 유방암 환자 혈청을 대상으로 *CHL1*과 *TF* 유전자에 대하여 메틸화 특이 PCR 분석 방법을 사용하여 실험을 수행하였다.

[0121] 비침습적 샘플인 혈청을 대상으로 파이로시퀀싱을 적용하여 과메틸화를 검출하였을 때 검출 민감도의 한계 때문에, 정상 혈청샘플과 암환자의 샘플사이의 메틸화 차이를 대변하지 못하는 것을 확인한 보고가 있었기 때문에 (Yulia Korshunova *et al.*, *Genome Res.*, 18:19-29, 2008), 이에 비침습적 샘플인 혈청을 대상으로 한 임상검증의 경우, 민감도가 상대적으로 높은 메틸화 특이 PCR 분석방법을 적용하였다.

[0122] 상기 *CHL1*과 *TF* 유전자의 비침습적 샘플의 과메틸화 정도를 확인하기 위해 혈청시료로부터 실리카겔을 이용하여 free-DNA를 정제하였다. 정제한 free-DNA 200ng에 EZ DNA methylation-Gold kit(Zymo Research, USA)를 이용하여 바이설파이트를 처리하였다. 상기 바이설파이트가 처리된 DNA를 멸균 증류수 20 μ l로 용출시켜 메틸화 특이 PCR (methylation-specific PCR) 분석을 수행하였다.

[0123] 메틸화 특이 PCR 분석을 수행하기 위한 메틸화 및 비메틸화 특이적 프라이머는 MethPrimer 프로그램을 이용하여 설계하였다. 바이설파이트 처리 후 변환된 염기서열을 대상으로 5'-CpG-3' 염기서열이 존재하는 부위에 해당하는 PCR 프라이머를 제작하였다. 이때, 메틸화된 경우에 해당되는 PCR 프라이머와 비메틸화된 경우에 해당하는 프라이머 두 종류의 프라이머를 제작하였으며, 각 프라이머의 서열은 표 3에 나타내었다.

[0124] 상기 바이설파이트가 처리된 게놈 DNA 20ng에 메틸화 특이적 프라이머와 비메틸화 특이적 프라이머를 각각 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 처리하는 것을 한 사이클로 하여 총 40회 수행하였고, 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 신장하였다. 이후, 상기 증폭된 산물을 각각 아가로즈젤로 확인하여 메틸화 특이적 산물이 증폭되었는지를 확인하고, 메틸화 특이적 산물이 확인된 경우, 샘플이 메틸화된

유전자를 포함하고 있다고 판단하였다.

[0125] 그 결과, 정상인의 혈청에 비해 유방암환자의 혈청시료에서 CHL1 및 TF 유전자의 과메틸화 정도가 높게 측정됨을 알 수 있었다 (도 4). CHL1과 TF 유전자의 혈청을 대상으로 한 유방암 진단에 대한 민감도(sensitivity)는 각각 66.7% 및 46.2%였으며, 이에 대한 특이도(specificity)는 각각 93.3% 및 80%로 매우 우수한 것으로 나타났다 (표 5). 따라서, 비침습적 임상검체인 혈청을 이용하여 CHL1과 TF 유전자의 DNA 과메틸화를 측정함으로써 유방암의 조기진단, 재발여부, 약물처리 후의 모니터링 그리고 수술 후의 재발 여부의 모니터링 등 유방암의 다양한 진단에 적용할 수 있음을 확인하였다.

표 5

[0126] 혈청시료를 대상으로 한 CHL1 유전자와 TF 유전자의 민감도 및 특이도

유전자	No. of methylation positive sample	No. of methylation negative samples	Sensitivity	Specificity
	Cancer	Normal		
CHL1	6/9	1/15	66.7%	93.3%
TF	6/13	3/15	46.2%	80%

[0127] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

도면의 간단한 설명

[0128] 도 1은 유방암 조직과 인접한 정상소견 조직의 CpG 마이크로어레이 분석과탈메틸화에 의해 재발현되는 유전자의 비교선별과정을 통하여 유방암 진단을 위한 메틸화 바이오마커를 발굴하는 과정을 나타낸 모식도이다.

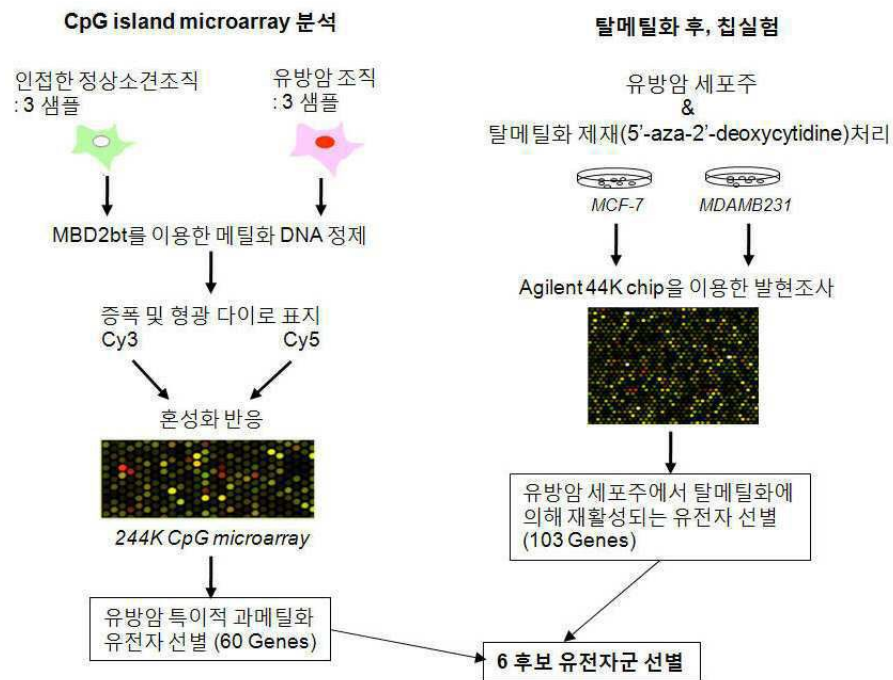
[0129] 도 2는 유방암 세포주에서 6개의 메틸화 유전자의 파이로시퀀싱을 통한 정량적인 메틸화 정도를 나타낸 것이다.

[0130] 도 3은 정상 조직 및 유방암 조직에서 CHL1과 TF 유전자의 메틸화 정도를 측정하고, ROC 커브 분석을 수행하여 유방암 진단 능력을 측정한 것이다. (* criterion: cut-off; Sensitivity: 민감도; Specificity: 특이도).

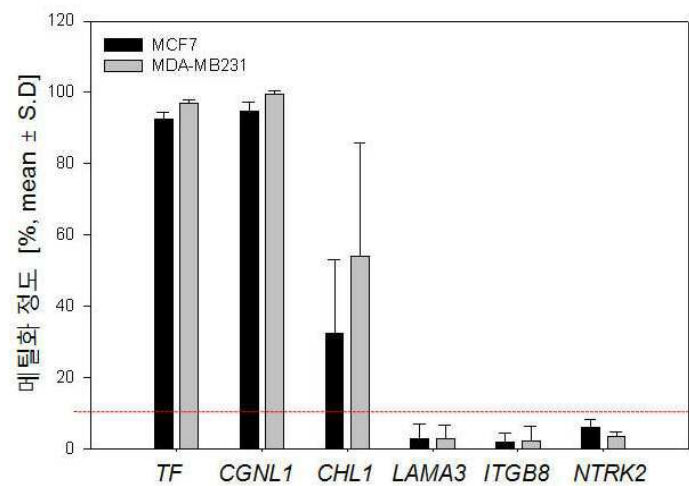
[0131] 도 4는 정상인과 유방암 환자의 혈청 DNA를 이용하여 CHL1과 TF 유전자 프로모터의 메틸화 양성 빈도를 나타낸 것이다(* 붉은 박스 : 메틸화샘플, 회색박스: 비메틸화 샘플)

도면

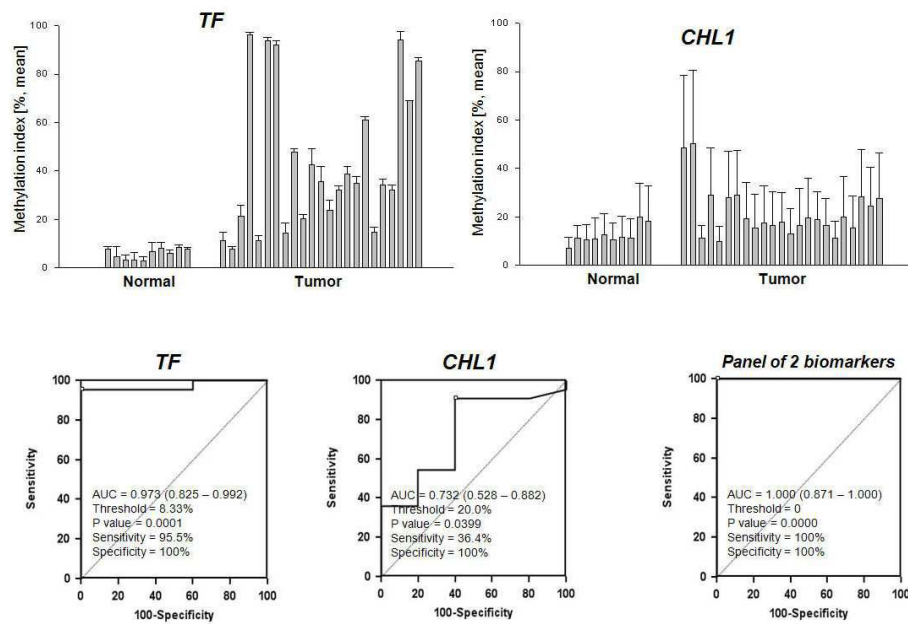
도면1



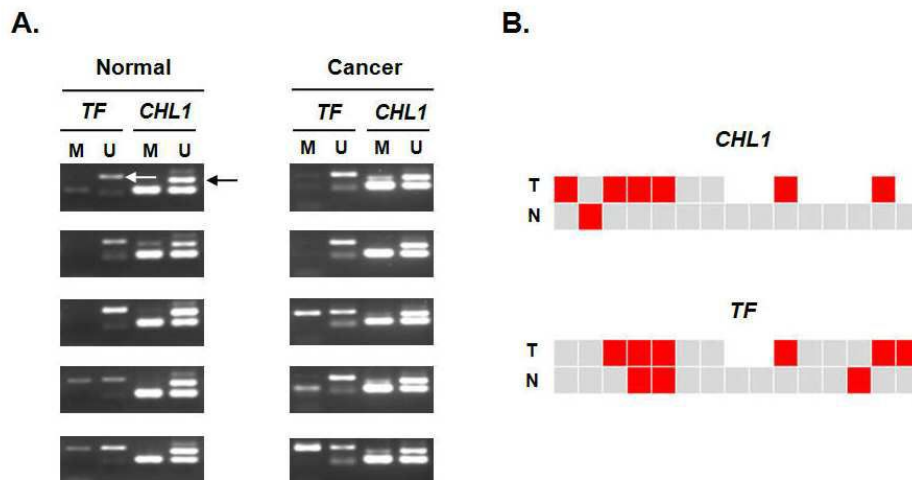
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> GenomicTree, Inc.
 <120> Method for Detecting Breast Cancer Using Breast Cancer Specific Methylation Marker Genes

<130> P09-B038

<160> 20

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 3000

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ctttcgtaaa atttggttgc ctgggataac gtgtattgca tacaagctga cttccttact 60

gtccctagta agctatgtgt ggctattatt tcttcattta tatgcaatgc cagaagctta 120

gaagaatgtt atctcccttt cagttaaaaa ctcatagtta agaactggcc atcttcttgt 180

tttgggtatt gtggcttggc actgtctaata atatttggag ggtatttgat tttttaaaaa 240

gctactggcc atgcctattg agtttcctac tgagccagc acccagacca gtgattgatt 300

aaatagtagc tgctcaataa atatttggtt tgtaataat gattctattg tcaagaaaca 360

aatcaccaag aaagaaggag ctatatattt aagagtactc tgttcactcg gccaaaatgg 420

agttccgagt cccttgctca gctgatgttt gttcacccag aagatggtaa actcctgaga 480

ccaacttcgc ttgttgttc tcttgtggtt ccttgacctt ggaaatgttt ttctacaggc 540

agagtatttc cccctgttgg aattttattt aatattctat ctttgtttct actttagaaa 600

acatgccacg tgaataatga tgcctcaggc aaaagaaatc actccagcag tacaatttaa 660

acttaggaca aatcctgccc tcaattgcat tcacaatttg ccaaggcagt tggtagaac 720

tgtgcccaca cacaattga cagaatcgag gccccaaggt tagcgatgat taaaatttaa 780

aagtccattc attcatttc aaaatatattt attcgattgc ttctgaggca gaatcatgag 840

ttgccttcgc ttttctgct cccggtgggt gcatccaact ctgaggatag ctcaccaac 900

tctgaggga gctctgagg gagctaaata tctctattgt tcaatgagct agatgaaaac	960
aaaacgaggc tgtaaggta atctcacagc cttagtggag taaaaattag aagtcaataa	1020
ttctcttacc aacaaagagg acttgcattc aacaggattt tcaaaagtgg tatccgttaa	1080
aaattttgga aaataccacc ataattgaaa aaaaataaag tggcatataa atcaaagtta	1140
glgctaaaaa ttataatttt tccatatgaa ttttggaatc ctaaaatatt tttatgtgtt	1200
tgtggattca taaggcatca gaactggctt ttgactga atatgagtac agaaggcttt	1260
cctctccaat agtgaattaa taaaggataa gtaggaaaaa cgttacgaaa cgatgtggtta	1320
acattataga ctctgtatta gggcaaaaat tgtgagatag tagaagatct gtaaatttaa	1380
gcatgcacaa ttgacagcg gatggtcgta gcatattttg taaattcaat agcaagcccc	1440
accacgccct taaatgaagg aaagcaagaa gacaattttt aatacgtaca tggcaccaca	1500
ccccctaag acgcagcaat gggagaaaag cagattggcg acctgtgtgt gcaacatgaa	1560
ccgagtgaat ccatcgggga ggggtgggg ggcgtttctt ttaaatgtcg cttttgcaga	1620
taaacgagca gggatcctac ctcttttgac cggagatgtt gaaaagcacg accaaagttt	1680
ttggcttggc ctcttgcttt ccacaacgag ataaagtctg aagcctgtaa ctctccctgt	1740
cccgcgggag cgtgcaaagg gaggaagat aagcggcgtg ggtgaggggt ggcggcgag	1800
aaccaggaa gggagcagag gcgagagcca gcctccggca ggaggcgta gacccgggtg	1860
ccagccagaa cggtccagc cttcccgcgg ccagagagcc agcggcgga ggggacgggc	1920
gggacctcg cgacagccc cgggtgcgga ccagcgggca gcggccggcg agacctccc	1980
tggatccgc cagagcttac cggacctgc gcgccccgt cccggctccc ggccggtcg	2040
ggggagaagg cggcgaggg gaggcggcg acagatcgcg ttctggaggc ggcgcaggtg	2100

tgtcaggggt gggggtccgc tggcatctct cgtgccggcg ctgggggggt ctcccggtga	2160
ggaagggctg aagggtctcc gggaggggtc cactcgttat ggaaaggaag cggggcgcg	2220
tcaggtccc tcgtccgag tgggggtggt ccggggccct cagcctgcac ccgggaggag	2280
acgccccctt ttcacgcccc gccccgggtg gccgaggccg gattcggaca gctcggggtc	2340
agtcgacgga gcacaccggg cggcgaatc cgccgggtcc cactcacgcc cgccggccgc	2400
cggtaggttg gccctccgc ttccagcctc cgccaccca tccctcgtg ctctctgagg	2460
aggattccag accccccctg agatctccgc cctctctcgg gtggggctcc gaggtctagc	2520
tggtctgggg gtcagtcccg gcctctgtct ccacccgcgc cctcgtcc cctggacacc	2580
gcctggtgtg tggggctcag accccccag tccactgcc ctgtgtggt cctctctca	2640
ggagaggatt ctagatcca gccccgggg ggttccgaaa atgccgccag cctggagcgg	2700
ggaatccatg gaccgtgggg ttgtggggtt ggggagcacg aaaaccaga gaggggctag	2760
agctccacct cccagaccg ccgaggggcg agaggcgcg ccgggggcg tggttgcat	2820
ggctcctggt agcggagccc ggggggctgg agatgccggt cgcgatggt ccttcttcc	2880
tctttgtgcc tctctcttc tctcgtttt tttttttt tggagtgtga gtgtgcgtgg	2940
ggaggcagca cgagaaaagt gattaatttg ggagcaggg attggagccg ggaggctggg	3000
	3000

<210> 2
 <211> 3000
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2

ctttcgtaaa atttggttgc ctgggataac gtgtattgca tacaagctga ctctcttact	60
gtccctagta agctatgtgt ggctattatt tcttcattta tatgcaatgc cagaagctta	120
gaagaatgtt atctcccttt cagttaaaaa ctcatagtta agaactggcc atcttcttgt	180
tttgggtatt gtggcttggc actgtctaata atatttggag ggtatttgat tttttaaaaa	240
gtcactggcc atgcctatig agtttccctac tgagcccagc acccagacca gtgattgatt	300
aaatagtagc tgctcaataa atatttgttt tgtaataat gattctattg tcaagaaaca	360
aatcaccaag aaagaaggag ctatatattt aagagtactc tgttcactctg gccaaaatgg	420
agttccgagt cccttgctca gctgatgttt gttcacccag aagatggtaa actcctgaga	480
ccaacttcgc ttgtttgttc tcttgtgggt ccttgacctt ggaaatgttt ttctacaggc	540
agagtatttc cccctgttgg aattttattt aatattctat ctttgtttct actttagaaa	600
acatgccacg tgaataatga tgcctcaggc aaaagaaatc actccagcag tacaatttaa	660
acttaggaca aatcctgccc tcaattgcat tcacaatttg ccaaggcagt tggtagaac	720
tgtgcccaca cacaattga cagaatcgag gccccaaggt tagcgatgat taaaatttaa	780
aagtcattc attcatttc aaaatatttt attcgattgc ttctgaggca gaatcatgag	840
ttgccttcgc ttttctgtct cccgttggtg gcatccaact ctgaggatag ctcatccaac	900
tctgagggtg gctctgaggg gagctaaata tctcattgt tcaatgagct agatgaaaac	960
aaaacgaggc tgtaaggcca atctcacagc cttagtggag taaaaattag aagtcaataa	1020
ttctcttacc aacaagagg acttgcatc aacaggattt tcaaaagtgg tatcctgtaa	1080
aaattttgga aaataccacc ataatggaaa aaaaataaag tggcatataa atcaaatgta	1140
gtgctaaaaa ttataatttt tccatatgaa ttttggaatc ctaaaatatt tttatgtgtt	1200

tgtggattca taagcatca gaactggctt ttgcaactga atatgagtac agaagccttt	1260
cctctccaat agtgaattaa taaaggataa gtaggaaaaa cgttacgaaa cgatgtggta	1320
acattataga ctctgtatta gggcaaaaat tgtgagatag tagaagatct gtaaatttaa	1380
gcatgcacaa ttgacagcg gatggtcgta gcataatttg taaattcaat agcaagcccc	1440
accacgccct taaatgaagg aaagcaagaa gacaattttt aatacgtaca tggcaccaca	1500
cccctctaag acgcagcaat gggagaaaag cagattggcg acctgtgtgt gcaacatgaa	1560
ccgagtgaia ccatcgggga ggggtgggg ggcttttctt ttaaatgtcg cttttgcaga	1620
taaacgagca gggatcctac ctcttttgac cggagatgtt gaaaagcacg accaaagttt	1680
ttggcttggc ctcttgcttt ccacaacgag ataaagtctg aagcctgtaa ctctccctgt	1740
cccgcgggag cgtgcaaagg gaggaagat aagcggcgtg ggtgaggggt ggcggcgag	1800
aaccaggaia gggagcagag gcgagagcca gcctccgga ggaggcgta gaccccggtg	1860
ccagccagaa cggtccagc ctcccgcg ggagagagcc agcggcgga ggggacgggc	1920
gggacctccg cgacagccc cgggtgcgga ccagcggga gcggccggcg agacctccc	1980
tggatccgcc cagagcttac cggacctgc gcgccccgt cccggctccc ggccggctcg	2040
ggggagaagg cccccaggg gaggcgccg acagatcgcg ttctggagcg ggcgcaggtg	2100
tgtcaggggt ggggtccgc tggcatctct cgtgccggcg ctgggggggt ctccctgga	2160
ggaagggctg aagtgctcc gggaggggtc cactcgttat ggaaaggaag cggggcgcg	2220
tcagggtccc tcgtccgag tgggggtgtt cggggccct cagcctgcac ccggaggag	2280
acgccccctt ttcagcccc gccccgggtg gccgaggccg gattcggaca gctcgggtc	2340

agtcgacgga gcacaccggg cgcccgaatc cgccgggtcc cactcacgcc cgccggccgc	2400
cggtagggtt gccctccgc ttccagctc cgccaccca tccctcgctg ctctctgagg	2460
aggattccag accccccct agatctccgc cctctctcgg gtggggctcc gaggtctagc	2520
tggctctggg gtcagtccg gcctctgtct ccacccgcgc ccctcgctcc cctggacacc	2580
gcctggtgtg tggggctcag accccccag tccactgccc ctgtgtggct cctcctctca	2640
ggagaggatt ctagatcca gcccgggggg ggttccgaaa atgccgccag cctggagcgg	2700
ggaatccatg gaccgtgggg ttgtggggtt ggggagcacg aaaaccaga gaggggctag	2760
agctccacct cccagaccg ccgaggggcg agagggcgcg ccgggggccg tggttgcat	2820
ggctcctggt agcggagccc ggggggctgg agatgccggt cgcggatggt cccttcttc	2880
tctttgtgcc tctctcttc tctcgtttt ttttttttt tggagtgtga gtgtgcgtgg	2940
ggaggcagca cggagaaagt gattaatttg gggagcaggg attggagccg ggaggctggg	3000
	3000

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 3
 gtgtaaagg aggaagata ag 22

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

cctctactcc cttcctaaat tct

23

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5

agtaaggaag gggggttg

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 6

tccctttatt ccattccc

18

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

aagggaagg ggtaaattga gt 22

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
cctctccaaa ttctaacct acaa 24

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 9
gggtattggg gtagtatt 19

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 10
aaaccctcac ctaaataata taac 24

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

<220>

<223> primer

<400> 11

ggggagggttt ttgatttta

20

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 12

acaaacccca atctctca

18

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 13

gagtaagggt ttgggatgtt tta

23

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 14

tcattttctc tcatacttta acct

24

<210> 15
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 15
gtaaaggag ggaagat

17

<210> 16
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 16
gggaggttaa agatt

15

<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 17
aaagggttaa attgagtt

18

<210> 18
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 18
gggtattggg gtttagta

17

<210> 19
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 19
ggggtagtga gtattt

16

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

<220>
<223> primer

<400> 20
gggtttggga tgtttta

17