



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년06월21일  
(11) 등록번호 10-1992060  
(24) 등록일자 2019년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6883 (2018.05)  
G01N 33/6896 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-0131309  
(22) 출원일자 2018년10월30일  
심사청구일자 2018년10월30일  
(56) 선행기술조사문헌  
US20180067133 A1\*  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
아주대학교산학협력단  
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)  
(72) 발명자  
박선아  
서울특별시 양천구 오목로 299 트라펠리스 EA동  
2702호  
(74) 대리인  
손민

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 김승범

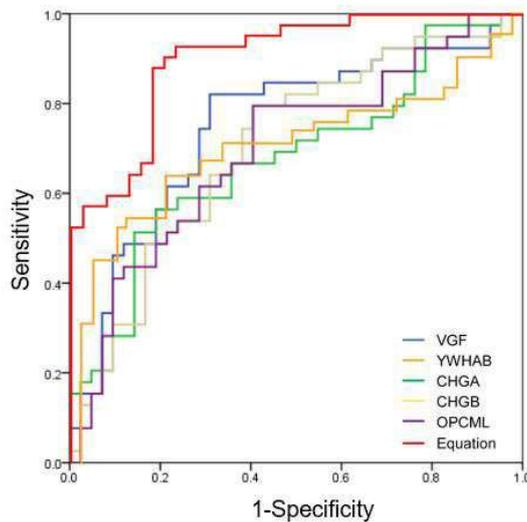
(54) 발명의 명칭 알츠하이머치매 진단 체액 바이오마커 후보 단백질4종

(57) 요약

본 발명은 OPCML(오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자), YWHAB(14-3-3 단백질  $\beta/\alpha$ ), CHGA(크로모그라닌-A) 및 CHGB(시크리토그라닌-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물; 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 키트; 및 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하고, 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 알츠하이머성 치매 진단용 조성물은 5종의 단백질(OPCML, YWHAB, CHGA, CHGB 및 VGF)의 발현양을 측정하여, 정상 대조군과 비교함으로써, 높은 민감도 및 특이도로 알츠하이머성 치매의 진단이 가능하다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)  
G01N 2800/2821 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20120178637 A1  
US20160327572 A1  
US20070031908 A1  
JP2016516202 A  
Journal of Proteome Research (2014)  
13(4):2056-2068  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C1942  
부처명 보건복지부  
연구관리전문기관 보건산업진흥원  
연구사업명 질환극복증개연구  
연구과제명 조기발현 퇴행치매 위험예측 알고리즘 개발 위한 단백질-유전체 통합 네트워크 분석  
기여율 2/5  
주관기관 한국과학기술원  
연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2018R1A2B6009439  
부처명 과학기술정보통신부  
연구관리전문기관 한국연구재단  
연구사업명 중견연구  
연구과제명 타우병리 전파에서 타우상호작용 단백질의 역할연구  
기여율 3/5  
주관기관 아주대학교 산학협력단  
연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

*YWHA*B(14-3-3 단백질  $\beta/\alpha$ ), *CHGA*(크로모그라닌-A) 및 *CHGB*(시크리토그라닌-1) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것인, 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 또는 앵타머를 포함하는 것인, 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물.

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유전자는 *VEGF*(신경분비단백질 VGF) 또는 *OPCM*L을 추가로 포함하는 것인, 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제3항 및 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 알츠하이머성 치매의 진단용 키트.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트 또는 단백질 칩 키트인 것인, 알츠하이머성 치매의 진단용 키트.

#### 청구항 8

(a) 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 뇌척수액에서, *YWHA*B, *CHGA* 및 *CHGB* 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 뇌척수액에서 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 알츠하이머성 치매의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준은 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting), 또는 DNA칩 분석법(DNA chip technology assay)에 의하여 측정되는 것인, 방법.

**청구항 10**

제8항에 있어서, 상기 단백질의 수준은 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 이용하여 측정되는 것인, 방법.

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

제8항에 있어서, 상기 유전자는 *VEGF* 또는 *OPCML*을 추가로 포함하는 것인, 방법.

**청구항 14**

제8항 내지 제10항 및 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

정상 개체로부터 분리된 뇌척수액에서 측정된 수준과 비교하여, 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 뇌척수액에서 측정된 *YWHAB* 유전자의 mRNA 또는 단백질의 수준이 높은 경우 또는 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 *VEGF*, *CHGA*, *CHGB* 및 *OPCML* 유전자의 mRNA 또는 단백질의 수준이 낮은 경우, 알츠하이머성 치매의 발병 위험이 높다고 판정하는 것인, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 *OPCML*(오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자), *YWHAB*(14-3-3 단백질 β/α), *CHGA*(크로모그라닌-A) 및 *CHGB*(시크리토그라닌-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물; 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 키트; 및 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하고, 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 전 세계적으로 초고령화 현상으로 인한 치매 환자의 증가는 현재 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 2014년 국회 예산정책처에 따르면 65세 이상의 치매 유병률은 2020년에 84만명, 2050년에 217만명으로 늘어날 것으로 예상되며, 이에 따라 치매로 인한 사회적 비용의 규모 역시 2013년 11조7000억원에서, 2030년 23조 1000억원, 2040년 34조 2000억원, 2050년 43조 2000억원으로 급격히 늘어날 것으로 예상된다고 한다.

[0005] 현재, 알츠하이머성 치매 진단을 위해서 사용되고 있는 진단 방법에는 유전자 검사, 신경심리검사 및 인지기능 검사, 뇌척수액 검사, 뇌영상 검사(MRI, PET)가 있다. 유전자 검사는 ApoE4라는 알츠하이머성 치매 특이적 유전자에 대한 검사를 통해 알츠하이머성 치매 위험성을 감지하는 검사이다. 그러나, ApoE4라는 유전자는 치매 발명의 위험률을 높일 수는 있으나, 결정적인 인자가 아니기 때문에, 해당 검사만으로는 알츠하이머성 치매 진단이 어렵다. 또한, 신경심리검사 및 인지기능 검사는 설문지를 통해 환자의 인지장애 정도를 측정하는 방법으로, 간이 정신상태검사(MMSE), 몬트리올 인지검사(MoCA), SNSB 등이 있다. 이는 설문지 형태의 진단 방법으로서, 비용이 적게 들고 진단시 물리적 고통이 없다는 장점이 있으나, 반복된 검사로 인해 학습, 나이 및 학력 차이 등에 의한 결과 변화, 주관성 개입 등으로 인해 정확성에 문제가 생길 수 있으며, 결정적으로 해당 인지장애가 알츠하이머성 치매의 주요 인자인 베타-아밀로이드에 의한 인지장애인지, 다른 종류의 질환에 의한 것인지 확인할 수 없다는 문제가 있다. 또한, 뇌척수액을 통한 검사는 뇌척수액을 추출하여 알츠하이머 유발인자로 알려진 베타-아밀로이드 또는 타우 단백질을 정량 진단하는 방법으로서, 진단의 정확성은 높으나, 뇌척수액을 얻기 위한 척추 천자 방법은 환자에게 큰 고통을 줄 수 있어 거부감을 일으킬 수 있다. 또한, 시술에 있어서 전문성이 높지 않은 일반 병원에서는 이용하기 힘들며, 비용적인 한계도 존재한다. 뇌영상 검사(MRI, PET)는 MRI 또는 PET 영상촬영을 통해 뇌손상 정도 및 알츠하이머 유발인자인 베타-아밀로이드와 타우 단백질을 뇌에서 분석하는 방법이다. 진단에 대한 높은 정확성을 가지고 있으나, 알츠하이머성 치매 진단시 고가의 장비와 영상촬영에 대한 전문성을 요구하므로, 유통의 한계가 있고, 높은 진단 비용을 요구한다는 문제가 있다. 이와 같이, 현재 알츠하이머성 치매 진단을 위한 다양한 기술이 존재하나, 각각의 기술은 정확성 문제, 비용적 문제, 시간적 문제 및 육체적 고통의 수반 등 다양한 한계점이 존재한다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 5종의 단백질의 발현양이 정상 대조군과 비교하여 알츠하이머성 치매 환자에서 유의적인 발현량 차이가 나타남을 확인하였다. 5종의 단백질, 보다 구체적으로 3종의 단백질(*YWHA*B(14-3-3 단백질  $\beta/\alpha$ ), *CHGA*(크로모그라닌-A) 및 *CHGB*(시크리토그라닌-1)) 수준의 동시 비교를 통해 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후 예측과 관련된 정보를 보다 정확히 획득할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 *OPCML*(오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자), *YWHA*B(14-3-3 단백질  $\beta/\alpha$ ), *CHGA*(크로모그라닌-A) 및 *CHGB*(시크리토그라닌-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서, *OPCML*, *YWHA*B, *CHGA* 및 *CHGB*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0015] 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0017] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 *OPCML*(오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자), *YWHA*B(14-3-3 단백질  $\beta/\alpha$ ), *CHGA*(크로모그라닌-A) 및 *CHGB*(시크리토그라닌-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 조성물은 상기 4종의 유전자 중 1종의 유전자 또는 2종, 3종 또는 4종의 유전자 조합을 포함할 수 있다. 구체적으로, *YWHA*B, *CHGA* 및 *CHGB*를 포함하는 3종의 유전자 조합을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 유전자 조합에 *OPCML* 또는 *VGF* 유전자를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 조성물은 상기 유전자는 알츠하이머성 치매 환자에서 정상 개체와 비교하여 상기 유전자의 유의적인

발현 차이가 나타남을 이용하여 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후 예측을 위한 유용한 정보를 획득할 수 있는 것이다. 이는 지금까지 알려진 바 없으며, 본 발명에 의해 최초로 밝혀진 것으로, 높은 민감도 및 특이도로 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후 예측이 가능한 점에서 그 의의가 크다.

- [0021] 본 발명의 용어, "*OPCML*"은 오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자(Opioid-binding protein/cell adhesion molecule)를 코딩하는 유전자로서, 이의 mRNA는 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자는 종의 진화 동안 매우 잘 보존되므로, 포유류 시스템에서 근본적인 역할을 할 것으로 알려져 있다.
- [0022] 본 발명의 용어, "*YWHA B*"은 모든 진핵 세포에서 발견되는 보존 조절 분자(conserved regulatory molecules)에 속하는 단백질인 14-3-3 단백질 베타/알파(14-3-3 proteins  $\beta/\alpha$ )를 코딩하는 유전자로서, 이의 mRNA는 서열번호 2의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 14-3-3 단백질은 키나아제, 포스파타아제, 막관통 수용체를 포함하여, 다양한 신호 단백질과 결합할 수 있으며, 200개 이상의 신호 단백질이 14-3-3 리간드로 알려져 있다. 또한, 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease) 환자의 뇌 척수액에서 14-3-3 단백질의 양이 증가하는 것으로 발견된 바 있다.
- [0023] 본 발명의 용어, "*CHGA*"는 신경내분비성 단백질의 그라닌(granin) 군에 속하는 단백질인, 부갑상샘 분비 단백질 1(parathyroid secretory protein 1)로도 불리는, 크로모그라닌 A(Chromogranin A)를 코딩하는 유전자로서, 이의 mRNA는 서열번호 3의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 크로모그라닌 A는 이자의 섬형 베타 세포 분비 과립(islet beta cell secretory granules)과 같은 뉴런 및 내분비 세포의 분비 소포에 위치해 있다. 또한, 크로모그라닌 A는 체장암 및 전립선 암의 지표로 사용될 수 있을 것으로 보고된 바 있다.
- [0024] 본 발명의 용어, "*CHGB*"는 신경내분비성 단백질의 그라닌 군에 속하는 단백질인, 시크리토그라닌 I(Secretogranin I)로도 불리는, 크로모그라닌 B(Chromogranin B)를 코딩하는 유전자로서, 이의 mRNA는 서열번호 4의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 크로모그라닌 B는 신경내분비계 종양의 예후 바이오마커로 이용될 수 있을 것으로 보고된 바 있다.
- [0025] 본 발명의 용어, "*VGF*"는 신경분비 단백질 VGF(Neurosecretory protein VGF)를 코딩하는 유전자로서, 이의 mRNA는 서열번호 5의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 신경분비 단백질 VGF는 에너지 항상성, 대사 및 시냅스 가소성(synaptic plasticity)을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0027] 본 발명의 상기 5종의 유전자들의 mRNA는 각 서열번호 1 내지 5로 구성된 염기서열뿐만 아니라, 상기 서열과 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 98% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기 서열로서 실질적으로 상기 각 유전자와 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 유전자 서열이라면 제한없이 포함한다. 또한 이러한 상동성을 갖는 염기서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 염기서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "상동성"은 두 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 모이어 사이의 동일성의 퍼센트를 말한다. 하나의 모이어로부터 다른 하나의 모이어까지의 서열 간 상동성은 알려진 당해 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 상동성은 서열정보를 정렬하고 용이하게 입수 가능한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 두 개의 폴리뉴클레오티드 분자 또는 두 개의 폴리펩타이드 분자 간의 서열 정보를 직접 정렬하여 결정될 수 있다. 상기 컴퓨터 프로그램은 BLAST(NCBI), CLC Main Workbench(CLC bio), MegAlignTM(DNASTAR Inc) 등일 수 있으나, 상동성을 결정할 수 있는 프로그램이라면 제한 없이 이용할 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드 간 상동성은 상동 영역 간의 안정된 이중가닥을 이루는 조건하에서 폴리뉴클레오티드를 혼성화한 후, 단일-가닥-특이적 뉴클레아제로 분해시켜 분해된 단편의 크기를 결정함으로써 결정할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 상기 5종의 유전자와 관련하여, 본 발명의 일 실시예에서는, 정상 개체와 알츠하이머성 치매 환자에서 유의적으로 발현량 차이가 나타나는 5종의 단백질(*VGF*, *YWHA B*, *CHGA*, *CHGB* 및 *OPCML*)을 동정하였고, 이들 중에서도 3종의 단백질(*YWHA B*, *CHGA* 및 *CHGB*)을 동시 측정하는 경우 높은 민감도 및 특이도로 알츠하이머성 치매의 진단이 가능함을 확인하였다. 이를 통해, 상기 3종 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하여, 알츠하이머성 치매의 진단에 효과적으로 활용될 수 있음을 확인하였다(도 2).
- [0032] 본 발명의 용어, "mRNA의 수준을 측정하는 제제"는 시료에 포함된 본 발명의 5종의 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여, 상기 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준을 측정하는 방법에 사용되는 제제를 의미한다. 구체적으로 상기 제제는 RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅

(Northern blotting), DNA 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 표적 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0033] 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.

[0034] 구체적으로, 상기 5종의 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 방법에 사용되는 각각의 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

유전자	서열번호	염기서열
OPCML	6	F: CCTAGGTCCTCTGAGCAACG
	7	R: GGTCAAGGTAGCAGGAGCAG
YWHAB	8	F: GGAAGGAAGAGGTCATCTCGC
	9	R: TGCTTCTCTATCCACAGCCG
CHGA	10	F: CCTGTGAACAGCCCTATG
	11	R: GGAAAGTGTGTCGGAGAT
CHGB	12	F: CAACTGGACCAGCTCCTCAC
	13	R: GCACAGTCATTGTCATAAGCATGT
VGF	14	F: CCTCTGGTCATGAAAGC
	15	R: GGCTCTTTATGCTCAGAG

[0036] 한편, 상기 "프로브"는 상기 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 프로브가 될 수 있고, 상기 각 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 한, 상기 프로브의 뉴클레오티드 서열은 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명의 용어, "단백질의 수준을 측정하는 제제"는 시료에 포함된 본 발명의 5종의 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법에 사용되는 제제를 의미한다. 구체적으로, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 또는 앵타머를 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 제제는 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법에 사용되는 항체를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 상기 "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미한다. 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 등이 될 수 있다.

[0040] 상기 "앵타머"는 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앵타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다.

[0041] 본 발명의 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있으나 이들에 한정되지 아니한다. 본 발명의 앵타머는 상기 5종의 유전자에 의해 코딩되는 단

백질에 대하여 사용될 수 있다. 상기 단백질에 결합 활성을 갖는 앵타머는 각각의 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.

- [0043] 본 발명의 용어 “알츠하이머성 치매”는 알츠하이머 질환에 의하여 유발된 치매 증상을 의미한다. 상기 알츠하이머성 질환은 독일의 알츠하이머 박사에 의하여 최초로 보고된, 치매를 유발하는 가장 일반적인 퇴행성 뇌질환을 의미하는데, 상기 알츠하이머 질환이 진행됨에 따라 기억력을 포함하는 전체적인 인지기능이 점진적으로 약화된다고 알려져 있다.
- [0044] 본 발명의 용어, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것 또는 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위해 개체의 상태를 모니터링 하는 것을 포함한다. 본 발명의 목적상, 진단은 알츠하이머성 치매의 발병 여부 또는 알츠하이머성 치매의 발병 단계를 확인하는 것이다.
- [0046] 본 발명의 다른 양태로서 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 키트를 제공한다. 상기 용어 "알츠하이머성 치매", "진단" 등에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0047] 본 발명의 키트는 알츠하이머성 치매의 진단하기 위하여, 상기 *OPCML*, *YWHA8*, *CHGA*, *CHGB* 및 *VGF* 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 용도로 사용될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzymelinked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 구체적으로, 본 발명의 상기 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 상기 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조구 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명의 키트는 DNA 칩 분석법을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 분석용 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기관은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.
- [0051] 아울러, 본 발명의 키트는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 수준을 측정하기 위한 단백질 칩 분석용 키트가 될 수 있는데, 상기 키트는 특별히 이에 제한되지 않으나, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기 기재는 특별히 이에 제한되지 않으나 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 특별히 이에 제한되지 않으나 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있으며, 형광물질은 특별히 이에 제한되지 않으나 FITC, RITC 등이 될 수 있고, 발색 기질액은 특별히 이에 제한되지 않으나 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서 (a) 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서, *OPCML*, *YWHA8*, *CHGA* 및 *CHGB*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 상기 용어 "알츠하이머성 치매", "진단" 등에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0055] 본 발명의 용어, "개체"는 알츠하이머성 치매를 진단하거나 알츠하이머성치매의 예후를 예측하고자 하는 대상을 의미한다. 이때, 상기 개체는 사람을 비롯하여, 개, 말, 소, 쥐, 염소, 토끼, 닭, 오리, 거위 등의 알츠하이머성 치매가 발병될 수 있는 동물이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 용어, "시료"란 이에 제한되는 것은 아니나, 알츠하이머성 치매 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장 외에도, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하며, 구체적으로는, 뇌척수액을 의미할 수 있다.

[0057] 본 발명의 용어, "정상 개체"란 알츠하이머성 치매로 진단되지 않은 개체를 의미하며, 정상 개체로부터 분리된 시료와 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후를 예측하고자 하는 개체로부터 분리된 시료에서 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하고, 비교함으로써, 알츠하이머성 치매 발병이 의심되는 개체의 알츠하이머성 치매 발병 여부 또는 알츠하이머성 치매의 예후를 정확하게 예측할 수 있다.

[0059] 본 발명에 있어서, 용어, "mRNA 발현수준 측정"이란 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후를 예측하기 위하여 생물학적 시료에서 마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA칩 분석법(DNA chip technology assay) 등이 있다.

[0060] 본 발명에 있어서, 용어, "단백질 발현수준 측정"이란 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후를 예측하기 위하여 생물학적 시료에서의 본 발명의 5종의 유전자에 의해 코딩된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로켓 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 본 발명의 알츠하이머성 치매의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법은, 알츠하이머성 치매 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정한 결과, 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정되는 수준 보다 유의적으로 높거나 낮은 경우, 알츠하이머성 치매의 발병 위험이 높거나, 그 예후가 나쁘다고 관정될 수 있다.

**발명의 효과**

[0064] 본 발명의 알츠하이머성 치매 진단용 조성물은 5종의 단백질(OPCML, YWHAB, CHGA, CHGB 및 VGF)의 발현양을 측정하여, 정상 대조군과 비교함으로써, 높은 민감도 및 특이도로 알츠하이머성 치매의 진단이 가능하다.

**도면의 간단한 설명**

[0066] 도 1은 3종의 단백질(YWHAB, CHGA 및 CHGB)의 동시 측정을 통한 알츠하이머성 치매의 진단 가능성을 설명할 수 있는, 회귀방정식을 도출하는 과정을 나타낸다.

도 2는 상기 회귀방정식 값(Equation, 빨강)을 통해, 개별적인 단백질 및 3종의 단백질 조합의 알츠하이머성 치매의 진단 유용성을 분석한 결과를 나타낸다. 3종의 단백질 조합으로 구해지는 회귀방정식 값을 통해, 진단 유용성이 높아짐을 ROC 커브 분석에서 확인할 수 있다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0067] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0069] <실시예 1> 실험 재료의 준비 및 분석 방법

[0070] 실시예 1-1: 대상 검체 및 이의 특징

[0071] 알츠하이머성 치매 환자(AD) 및 정상인(Control)으로부터 수득된 뇌척수액의 정확한 단백질 분석을 수행하기 위해 각 조건에 맞게 채취하였다(Park SA 등, J Clin Neurol 2015). 이들 검체는 단백질 분석 전까지 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 이후, 드라이아이스가 포함된 용기에 넣어 단백질 분석 전문 업체로 이동시키고, 해동 후 분석에 활용하였다. 검체 제공자의 임상적 특징은 하기 표 2에 나타내었다(값은 평균 ± 표준편차로 표시함, p-값은 변수의 특성에 따라 독립표본 t-검증 또는 카이-제곱 검정(Chi-squared test)을 통해 결정됨, 약어에 대한 설명: AD, 알츠하이머성 치매; APOE, 아포지단백 E; CDR-SOB, 임상 치매 등급 평가 합계(clinical

dementia rating scale sum of box); CSF, 뇌척수액; MMSE, 간이 정신상태 검사(mini-mental state examination)).

표 2

	정상 대조군(n= 39)	AD(n = 42)	p-값
성별 (남:여)	10 : 29	14 : 28	0.476
샘플링 당시 나이	58.9 ± 6.3	60.3 ± 5.7	0.309
Education(년)	10.2 ± 3.2	10.2 ± 4.0	0.962
유병기간(년)	-	2.0 ± 1.2	-
MMSE	28.3 ± 1.6	18.9 ± 6.4	< 0.001
CDR	0 ± 0	1.1 ± 0.8	< 0.001
CDR-SOB	0 ± 0.1	5.5 ± 5.3	< 0.001
APOEε4 carriers	12.8%	45.2%	0.001
One allele	5	13	
Two allele	0	6	
CSF Aβ42 (pg/mL)	704.2 ± 141.4	348.4 ± 88.5	< 0.001
CSF Ttau (pg/mL)	207.7 ± 55.3	637.8 ± 301.8	< 0.001
CSF pTau181 (pg/mL)	42.2 ± 12.6	78.3 ± 28.1	< 0.001

[0072]

[0074]

알츠하이머성 치매의 진단은 임상적 증상뿐만 아니라, 뇌척수액 내의 베타-아밀로이드 단백질 1-42, 총 타우 단백질, 인산화 타우 단백질의 농도를 측정하여, 알츠하이머성 치매로 진단되는 경우를 알츠하이머성 치매 환자로 분류하여, 매우 정확한 진단 방법에 근거하였다. 즉, 상기와 같은 알츠하이머성 치매 진단에 이용된 방법은 2018년도 NIA-AA 연구 구조(research framework)에 따른 알츠하이머병 진단의 AT(N) 바이오마커 모두를 충족하는 조건이다(Jack Jr CR, 등 Alzheimer's & Dementia 2018).

[0076]

**실시예 1-2: 단백질 분석 방법**

[0077]

정상인 및 알츠하이머성 치매 환자군에서 뇌척수액을 수집하여, 이들을 비-편향(non-biased) 비-표지(label-free) 단백질 분석을 시행하였다. 단백질 분석 방법 중에서도, 정량의 정확도 및 민감도가 높고, '비표적 단백질 분석'이 가능한 SWATH(Sequential Window Acquisition of all THEoretical fragment-ion spectra)-MS(mass spectroscopy, 질량 분광학) 방법을 이용하였다. SWATH-MS 단백질 분석의 방법의 장점은 선행문헌에 의해 기술된 바 있다(Gillet LC et al, Mol Cell Proteomics 2012).

[0078]

분석 준비 단계는 2개의 뇌척수액(CSF) 검액(pooled sample) 100 μl 을 이용하였다. 단백질을 변성시키고, 전처리 과정을 거치게 하면서 펩티드로 분해시켰다. 펩티드로 잘려진 시료 전체를 각 분획별로 동정하고, 정량을 위한 스펙트럼 라이브러리 확보하였다. 1% FDR조건으로 필터링 후, 총 301개의 동정 단백질을 확보하였다(시퀀스 특이적 펩티드는 총 2,691개, 시퀀스 특이적 스펙트럼은 총 5,366개 확인). 검출되는 모든 단백질의 종류에 대하여 SWATH-MS 정량 분석을 할 수 있는 라이브러리를 확보하였다.

[0079]

검체의 본격적인 분석단계는 81개의 뇌척수액(CSF) 검체에 대해 각각 100 μl을 얻어, 상기 준비단계와 동일한 처리 단계를 거쳐 Triple-TOF™ 5600+(AB Sciex, Concord, Canada)를 이용하여 단백질 분석을 실시하였다. 기기에 연결된 Eksigent NanoLC-2D 및 nanoFlex cHiPLC 시스템(0.075 mm x 75 μm column)을 이용하여 단백질을 찾아 정량하였다. SWATH-MS 분석은 Triple-ToF 5600+ 및 20 Da/매스 윈도우(mass windows)를 이용하여 루프 프로덕트 이온 모드(looped product ion mode)로 시행하였다. 각 SWATH 윈도우는 400-1000 Da 범위에서 1 Da 오버랩을 가지면서 반복 측정하였다(예를 들어, 실험 1은 400~420 Da, 실험 2는 419~440 Da, 이후 실험 31는 979~1000 Da 범위까지 특정함). 얻어진 값에 대해서 ProteinPilot™을 이용하여 단백질들의 스펙트럼을 찾고,

ProteoWizard 및 Skyline 소프트웨어를 이용하여 해당 단백질 및 이의 정량 값을 얻었다. 마지막으로, 개별 라이브러리 스펙트럼과 SWATH 스펙트럼을 확인하여 최종적으로 단백질의 종류와 정량값을 검증하였다.

[0081] <실시예 2> 알츠하이머성 치매 진단의 바이오 마커로서, 5종의 단백질(VGF, YWHAB, CHGA, CHGB, OPCML) 선별

[0082] 42명의 알츠하이머성 치매 환자와 39명의 동일 연령대의 정상대조군의 뇌척수액을 SWATH-MS 방법을 이용하여 모든 시료에서 수행하였다. 미리 2개의 검액(약 6개의 뇌척수액 시료를 합쳐서 1개의 검액을 제조함)을 이용한 예비 실험을 통해서 SWATH-MS 방법으로, 사람의 뇌척수액에서 정확히 찾아낼 수 있는 단백질들의 종류 및 데이터 처리방법을 미리 파악하였다. 그 후, 본 실험으로 81개의 모든 시료에 대해 개별적으로 SWATH-MS 단백질 분석 방법을 시행하여, 274종류의 단백질이 모든 검체에서 공통적으로 검출됨을 확인하고, 이들의 발현량을 얻었다.

[0083] SWATH-MS 분석 및 데이터 처리 과정은 모든 검체에서 동일한 조건으로 시행하였다. 274개 단백질의 발현량은 단백질 분석 스펙트럼에서 해당 단백질 피크의 면적값(AUC: area under the curve)으로 얻을 수 있는데, 이 값은 어떤 농도의 특정 단위로 표현할 수 있는 개념은 아니지만, 동시에 분석된 단백질들의 농도를 상대적 비교가 정확히 가능하므로, 통상적으로 사용되는 단백질 발현량의 검출 방법이다.

[0084] 즉, 상기 실시예 1에 기재된 SWATH-MS 방법으로 검출된 274개의 단백질들의 종류와 이들의 알츠하이머성 치매 환자 및 정상 대조군에서의 비교한 통계 처리 결과를 하기 표 2에 나타내었다(굵은 글씨로 표시된 p-값은 독립 표본 t 검정 상에서 Benjamini-Hochberg false discovery rate(FDR)의 임계값 0.05의 미만 값을 표시함, 약어에 대한 설명: FC (log2), 대조군 vs 알츠하이머성 치매 환자의 AUC의 log2 배수 변화).

[0085] SWATH-MS 분석의 스펙트럼상의 각 단백질에 해당되는 피크를 형성하는 면적값(AUC)들을 알츠하이머성 치매 환자 42명과 정상 대조군 39명 간의 비교를 수행한 결과, 하기 표 3 내지 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 274개의 단백질들 중에서 25개의 단백질들이 독립 표본 t-검정을 통해서 p-값이 0.05 미만으로 측정되어, 유의적임을 확인하였다.

표 3

UniProt ID	단백질	p-값	FC (log2)		Rank in significance	FDR
			평균	표준편차		
O15240	Neurosecretory protein VGF	0.0001	-0.43	0.44	1	< 0.05
P31946	14-3-3 protein beta/alpha	0.0008	0.31	0.75	2	< 0.05
P10645	Chromogranin-A	0.0018	-0.55	0.65	3	< 0.05
P05060	Secretogranin-1	0.0021	-0.28	0.47	4	< 0.05
Q14982	Opioid-binding protein/cell adhesion molecule	0.0027	-0.51	0.81	5	< 0.05
		0.0043	-0.39	0.64	6	> 0.05
		0.0043	-1.87	1.35	7	> 0.05
		0.0074	-0.27	0.44	8	> 0.05
		0.0107	0.15	0.37	9	> 0.05
		0.0116	-0.39	0.75	10	> 0.05
		0.0139	-0.24	0.41	11	> 0.05
		0.0162	-0.21	0.42	12	> 0.05
		0.0185	-0.33	0.62	13	> 0.05
		0.0196	-0.26	0.51	14	> 0.05
		0.0235	-0.35	0.63	15	> 0.05
		0.0248	0.13	1	16	> 0.05
		0.0252	-0.38	0.64	17	> 0.05
		0.0252	-0.24	0.49	18	> 0.05
		0.0265	-0.23	0.47	19	> 0.05
		0.0267	-0.2	0.44	20	> 0.05
		0.0267	-0.26	0.51	21	> 0.05
		0.0326	-0.26	0.62	22	> 0.05
		0.0326	-0.25	0.45	23	> 0.05
		0.0417	-0.23	0.41	24	> 0.05
		0.0431	0.13	0.48	25	> 0.05
		0.0501	0.08	0.6	26	> 0.05
		0.0526	0.12	0.61	27	> 0.05
		0.0541	-0.27	0.71	28	> 0.05
		0.0593	-0.24	0.43	29	> 0.05
		0.06	0.1	0.51	30	> 0.05
		0.0662	-0.29	0.61	31	> 0.05
		0.0711	0.12	0.71	32	> 0.05

[0086]

표 4

		0.0731	-0.16	0.34	33	> 0.05
		0.0751	-0.4	0.52	34	> 0.05
		0.078	0.07	0.7	35	> 0.05
		0.08	-0.32	0.7	36	> 0.05
		0.0944	-0.33	0.69	37	> 0.05
		0.0945	0.09	0.51	38	> 0.05
		0.1018	0.08	0.48	39	> 0.05
		0.102	-0.21	0.44	40	> 0.05
		0.1034	-0.25	0.52	41	> 0.05
		0.1039	-0.18	0.44	42	> 0.05
		0.1042	-0.16	1.4	43	> 0.05
		0.1064	-0.23	0.56	44	> 0.05
		0.1073	0.1	0.48	45	> 0.05
		0.1079	-0.22	0.59	46	> 0.05
		0.1122	0.1	0.6	47	> 0.05
		0.1178	-0.49	0.9	48	> 0.05
		0.1196	-0.29	0.65	49	> 0.05
		0.1218	-0.2	0.46	50	> 0.05
		0.1223	-0.16	0.42	51	> 0.05
		0.1282	0.05	0.59	52	> 0.05
		0.1283	-0.17	0.44	53	> 0.05
		0.1298	0.06	0.65	54	> 0.05
		0.1307	-0.18	0.43	55	> 0.05
		0.1332	0.07	0.58	56	> 0.05
		0.1421	-0.52	0.97	57	> 0.05
		0.1425	-0.58	1.06	58	> 0.05
		0.1428	-0.25	0.62	59	> 0.05
		0.1492	0.06	0.39	60	> 0.05
		0.1492	0.05	0.47	61	> 0.05
		0.1524	0.06	0.38	62	> 0.05
		0.1526	-0.29	0.63	63	> 0.05
		0.153	0.05	0.66	64	> 0.05
		0.1548	-0.36	0.79	65	> 0.05
		0.1553	-0.13	1.24	66	> 0.05
		0.1618	-0.43	0.87	67	> 0.05
		0.1702	0.06	0.47	68	> 0.05
		0.1736	0.06	0.54	69	> 0.05
		0.174	-0.23	0.64	70	> 0.05

[0087]

표 5

		0.174	-0.02	0.87	71	> 0.05
		0.1777	0.05	0.63	72	> 0.05
		0.1784	0.05	0.54	73	> 0.05
		0.1804	-0.17	0.43	74	> 0.05
		0.1811	0.05	0.55	75	> 0.05
		0.1861	-0.33	0.75	76	> 0.05
		0.1877	-0.18	0.47	77	> 0.05
		0.1895	-0.23	0.55	78	> 0.05
		0.1902	-0.07	1	79	> 0.05
		0.1956	0.04	0.54	80	> 0.05
		0.1982	-0.5	0.85	81	> 0.05
		0.2022	0.05	0.43	82	> 0.05
		0.2025	-0.51	0.88	83	> 0.05
		0.2032	0.04	0.49	84	> 0.05
		0.206	0.04	0.53	85	> 0.05
		0.213	-0.25	0.75	86	> 0.05
		0.2135	0.05	0.38	87	> 0.05
		0.2149	0.02	0.64	88	> 0.05
		0.2158	-0.34	0.95	89	> 0.05
		0.2202	-0.22	0.56	90	> 0.05
		0.2205	-0.22	0.59	91	> 0.05
		0.2253	-0.01	0.79	92	> 0.05
		0.2263	0.05	0.42	93	> 0.05
		0.2283	0.03	0.5	94	> 0.05
		0.2314	-0.26	0.82	95	> 0.05
		0.2327	0.01	0.61	96	> 0.05
		0.233	0.03	0.54	97	> 0.05
		0.2418	-0.4	0.82	98	> 0.05
		0.2431	-0.16	0.41	99	> 0.05
		0.2477	0.02	0.55	100	> 0.05
		0.2495	0.03	0.49	101	> 0.05
		0.2503	-0.13	0.4	102	> 0.05
		0.2519	-0.06	0.96	103	> 0.05
		0.252	0.04	0.43	104	> 0.05
		0.2557	0.04	0.45	105	> 0.05
		0.2577	0.03	0.53	106	> 0.05
		0.2589	0.01	0.67	107	> 0.05
		0.2602	0	0.71	108	> 0.05

[0088]

표 6

		0.2643	-0.14	0.43	109	> 0.05
		0.2658	0.03	0.58	110	> 0.05
		0.2699	-0.19	0.58	111	> 0.05
		0.2701	0	0.63	112	> 0.05
		0.2719	0.05	0.52	113	> 0.05
		0.2747	0.04	0.32	114	> 0.05
		0.2774	-0.19	0.56	115	> 0.05
		0.2856	0	0.64	116	> 0.05
		0.2878	-0.16	0.51	117	> 0.05
		0.2919	-0.2	0.56	118	> 0.05
		0.2921	-0.26	0.83	119	> 0.05
		0.2935	-0.15	0.42	120	> 0.05
		0.2977	-0.15	0.46	121	> 0.05
		0.2994	-0.09	0.96	122	> 0.05
		0.2995	-0.22	0.6	123	> 0.05
		0.2999	0.02	0.53	124	> 0.05
		0.3004	0	0.59	125	> 0.05
		0.3008	-0.06	0.88	126	> 0.05
		0.314	0.02	0.49	127	> 0.05
		0.3166	0.02	0.32	128	> 0.05
		0.3173	0.01	0.51	129	> 0.05
		0.3178	-0.07	0.87	130	> 0.05
		0.3207	-0.16	0.56	131	> 0.05
		0.3316	-0.3	0.76	132	> 0.05
		0.3347	-0.03	0.77	133	> 0.05
		0.3363	-0.07	0.84	134	> 0.05
		0.3367	0.01	0.58	135	> 0.05
		0.3368	0	0.58	136	> 0.05
		0.3409	-0.07	0.87	137	> 0.05
		0.3454	-0.16	0.51	138	> 0.05
		0.3482	-0.12	0.41	139	> 0.05
		0.3497	-0.16	0.54	140	> 0.05
		0.3518	-0.06	0.86	141	> 0.05
		0.3523	-0.08	0.31	142	> 0.05
		0.3581	-0.02	0.64	143	> 0.05
		0.3606	-0.09	0.34	144	> 0.05
		0.3739	-0.01	0.6	145	> 0.05
		0.3784	-0.06	0.76	146	> 0.05

[0089]

표 7

		0.3828	-0.2	0.64	147	> 0.05
		0.3861	0.02	0.36	148	> 0.05
		0.392	-0.19	0.62	149	> 0.05
		0.3968	-0.01	0.57	150	> 0.05
		0.4016	0.01	0.47	151	> 0.05
		0.4031	0.01	0.47	152	> 0.05
		0.404	-0.03	0.63	153	> 0.05
		0.4193	0	0.54	154	> 0.05
		0.4195	-0.01	0.56	155	> 0.05
		0.4198	-0.04	0.67	156	> 0.05
		0.42	-0.4	0.85	157	> 0.05
		0.423	-0.51	1.06	158	> 0.05
		0.4371	-0.18	0.56	159	> 0.05
		0.4377	-0.13	0.49	160	> 0.05
		0.4415	-0.42	0.9	161	> 0.05
		0.4442	-0.45	0.98	162	> 0.05
		0.4469	-0.03	0.62	163	> 0.05
		0.4478	-0.06	0.71	164	> 0.05
		0.4492	-0.1	0.39	165	> 0.05
		0.4496	-0.06	0.72	166	> 0.05
		0.4499	-0.11	0.41	167	> 0.05
		0.4522	-0.02	0.65	168	> 0.05
		0.4603	-0.29	0.82	169	> 0.05
		0.4662	-0.05	0.66	170	> 0.05
		0.4771	-0.18	1	171	> 0.05
		0.4785	-0.13	0.48	172	> 0.05
		0.4786	0	0.44	173	> 0.05
		0.4869	0	0.39	174	> 0.05
		0.4905	-0.31	0.97	175	> 0.05
		0.4921	-0.39	0.97	176	> 0.05
		0.4938	0	0.42	177	> 0.05
		0.4947	-0.03	0.61	178	> 0.05
		0.4961	-0.03	0.61	179	> 0.05
		0.5002	-0.1	0.4	180	> 0.05
		0.5009	-0.17	0.53	181	> 0.05
		0.505	-0.04	0.68	182	> 0.05
		0.5126	-0.02	0.53	183	> 0.05
		0.5145	-0.23	0.73	184	> 0.05

[0090]

표 8

		0.5179	-0.24	0.73	185	> 0.05
		0.5199	-0.01	0.49	186	> 0.05
		0.5235	-0.1	0.4	187	> 0.05
		0.5283	-0.01	0.43	188	> 0.05
		0.5293	-0.18	0.69	189	> 0.05
		0.539	-0.01	0.43	190	> 0.05
		0.5535	-0.04	0.57	191	> 0.05
		0.5625	-0.21	0.74	192	> 0.05
		0.5654	-0.07	0.66	193	> 0.05
		0.58	-0.01	0.43	194	> 0.05
		0.5845	-0.04	0.54	195	> 0.05
		0.5895	-0.03	0.52	196	> 0.05
		0.596	-0.01	0.41	197	> 0.05
		0.5967	-0.05	0.58	198	> 0.05
		0.6027	-0.1	0.45	199	> 0.05
		0.6086	-0.17	0.61	200	> 0.05
		0.609	-0.02	0.5	201	> 0.05
		0.6111	-0.12	0.5	202	> 0.05
		0.6165	-0.19	0.66	203	> 0.05
		0.6228	-0.14	0.58	204	> 0.05
		0.6376	-0.01	0.46	205	> 0.05
		0.6402	-0.11	0.49	206	> 0.05
		0.6442	-0.09	0.74	207	> 0.05
		0.6456	-0.03	0.45	208	> 0.05
		0.6474	0	0.33	209	> 0.05
		0.6594	-0.16	0.6	210	> 0.05
		0.6599	-0.18	1.04	211	> 0.05
		0.6624	-0.05	0.57	212	> 0.05
		0.6794	-0.04	0.48	213	> 0.05
		0.6818	-0.48	1.17	214	> 0.05
		0.6935	-0.49	1.46	215	> 0.05
		0.6981	-0.08	0.63	216	> 0.05
		0.6987	-0.13	0.59	217	> 0.05
		0.6987	-0.06	0.55	218	> 0.05
		0.7075	-0.12	0.83	219	> 0.05
		0.7077	-0.09	0.66	220	> 0.05
		0.7085	-0.02	0.39	221	> 0.05
		0.7244	-0.07	0.39	222	> 0.05

[0091]

표 9

		0.7367	-0.08	0.61	223	> 0.05
		0.7447	-0.1	0.47	224	> 0.05
		0.7451	-0.06	0.33	225	> 0.05
		0.7556	-0.12	0.74	226	> 0.05
		0.7663	-0.02	0.34	227	> 0.05
		0.7688	-0.1	0.68	228	> 0.05
		0.775	-0.21	1.04	229	> 0.05
		0.7803	-0.06	0.54	230	> 0.05
		0.7835	-0.05	0.54	231	> 0.05
		0.7845	-0.09	0.48	232	> 0.05
		0.7959	-0.24	0.87	233	> 0.05
		0.8047	-0.09	0.6	234	> 0.05
		0.8135	-0.12	0.55	235	> 0.05
		0.8142	-0.04	0.42	236	> 0.05
		0.8182	-0.08	0.6	237	> 0.05
		0.8192	-0.02	0.35	238	> 0.05
		0.8238	-0.04	0.41	239	> 0.05
		0.833	-0.33	1.18	240	> 0.05
		0.8406	-0.09	0.54	241	> 0.05
		0.8417	-0.12	0.58	242	> 0.05
		0.848	-0.09	0.59	243	> 0.05
		0.8523	-0.17	0.84	244	> 0.05
		0.8569	-0.1	0.61	245	> 0.05
		0.8615	-0.03	0.37	246	> 0.05
		0.8627	-0.08	0.46	247	> 0.05
		0.874	-0.04	0.42	248	> 0.05
		0.888	-0.22	0.93	249	> 0.05
		0.8884	-0.14	0.67	250	> 0.05
		0.8897	-0.06	0.39	251	> 0.05
		0.8926	-0.12	0.55	252	> 0.05
		0.8957	-0.04	0.31	253	> 0.05
		0.8995	-0.06	0.42	254	> 0.05
		0.9037	-0.07	0.43	255	> 0.05
		0.9097	-0.14	0.71	256	> 0.05
		0.9151	-0.04	0.36	257	> 0.05
		0.9179	-0.23	0.9	258	> 0.05
		0.918	-0.18	0.79	259	> 0.05
		0.9308	-0.1	0.53	260	> 0.05

[0092]

표 10

		0.9312	-0.16	0.75	261	> 0.05
		0.9315	-0.69	1.29	262	> 0.05
		0.9401	-0.06	0.4	263	> 0.05
		0.9401	-0.02	0.26	264	> 0.05
		0.9427	-0.06	0.46	265	> 0.05
		0.9572	-0.03	0.31	266	> 0.05
		0.9576	-0.2	0.78	267	> 0.05
		0.958	-0.15	0.66	268	> 0.05
		0.96	-0.04	0.36	269	> 0.05
		0.9654	-0.05	0.41	270	> 0.05
		0.9664	-0.17	0.76	271	> 0.05
		0.9664	-0.04	0.42	272	> 0.05
		0.9709	-0.11	0.59	273	> 0.05
		0.9968	-0.11	0.57	274	> 0.05

[0093]

[0095]

다만, 274개 단백질들의 검체에 대한 동시 비교이므로, 반복 비교에 따른 통계적 오류를 줄이기 위해 통계기법인 'Benjamini-Hochberg false discovery rate(FDR)'을 활용하여 p-값을 재평가하였다. 즉, 'FDR < 0.05'인 경우만을 최종적으로 유의적인 차이로 선별하였다. 이를 통해, 최종적으로 신경분비단백질 VGF(VGF), 14-3-3 단백질 β/α (YWHAB), 크로모그라닌-A(Chromogranin-A, CHGA), 시크리토그라닌-1(Secretogranin-1, CHGB), 오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자(Opioid-binding protein/cell adhesion molecule, OPCML)를 포함한, 총 5개의 단백질을 선별하였다. 알츠하이머성 치매 환자에서 유의적으로 발현 차이를 보인, 상기 5종의 단백질의 종류 및 이의 통계적 수치를 하기 표 11에 나타내었다(AD, 알츠하이머성 치매; AUC, 곡선 하면적; FC (log2), 대조군 vs 알츠하이머성 치매 환자의 AUC의 log2 배수 변화).

표 11

[0096]

UniProt ID	단백질	유전자	AUC		p-값	FC (log2)
			대조군	AD		
015240	Neurosecretory protein VGF	VGF	23478.5 ± 6236.6	18243.9 ± 5387.3	0.0001**	-0.4 ± 0.4
P31946	14-3-3 protein β/α	YWHAB	960.2 ± 376.7	1331.4 ± 561.2	0.0008**	0.3 ± 0.7
P10645	Chromogranin-A	CHGA	7950.8 ± 3236.5	5909.1 ± 2302.6	0.0018**	-0.6 ± 0.6
P05060	Secretogranin-1	CHGB	46505.7 ± 9216.4	39804.8 ± 9753.9	0.0021**	-0.3 ± 0.5
Q14982	Opioid-binding protein/cell adhesion molecule	OPCML	7684.5 ± 2262.7	6039.4 ± 2498.3	0.0027**	-0.5 ± 0.8

[0097]

\*\* FDR < 0.05

[0099]

상기 선별된 5종의 단백질의 개별적인 알츠하이머성 치매 진단의 유용성을 확인하기 위해, ROC 커브 분석을 수행하였다. 그 결과, 하기 표 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, AUC 값이 0.7 내외로 측정되어 상기 5종의 단백질은 개별적으로도 알츠하이머성 치매 진단에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

표 12

[0100]

	AUC	95% CI	p-값	Youden index <i>J</i>	Sen (%)	Spe (%)
Neurosecretory protein VGF (VGF)	0.752	0.642 - 0.861	< 0.001	0.51	82	69

14-3-3 protein $\beta/\alpha$ (YWHAB)	0.707	0.590 - 0.824	0.001	0.44	64	79
Chromogranin-A (CHGA)	0.678	0.559 - 0.796	0.006	0.37	56	81
Secretogranin-1 (CHGB)	0.705	0.590 - 0.819	0.002	0.39	79	60
Opioid-binding protein/cell adhesion molecule (OPCML)	0.698	0.583 - 0.814	0.002	0.39	79	60

[0102] <실시예 3> 알츠하이머성 치매 진단을 위한 최적의 단백질 조합 및 이의 유용성 확인

[0104] 실시예 3-1: 알츠하이머성 치매 진단을 위한 최적의 단백질 조합(YWHAB, CHGA, CHGB)의 선별

[0105] 알츠하이머성 치매를 진단함에 있어서, 상기 실시예 2에서 선별한 5종의 단백질의 조합이 개별적인 단백질 보다 더 유용한지 확인하기 위해, 역행 단계적인 선별 방법(Backward stepwise selection)을 이용한 로지스틱 회귀분석(Logistic regression)을 수행하였다.

[0106] 그 결과, 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기와 같은 과정에서 신경분비 단백질 VGF 및 오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자(OPCML)은 어떤 조합을 구성하더라도, 모든 경우에서 유의확률(p-값)이 0.05 수준을 넘게 나오므로, 상기 2종의 단백질을 제외한, 14-3-3 단백질  $\beta/\alpha$  (YWHAB), 크로모그라닌-A(CHGA), 시크리토그라닌-1(CHGB)를 포함한 3종의 단백질의 조합이 가장 유의적인 유의확률을 나타내어, 상기 3종의 단백질의 조합을 알츠하이머성 치매 진단을 위한 최적의 단백질 조합으로 선별하였다.

[0108] 실시예 3-2: 선별된 3종의 단백질(YWHAB, CHGA, CHGB)의 알츠하이머성 치매 진단의 유용성 확인

[0109] 상기 선별된 3종의 단백질의 동시 측정을 통한 알츠하이머성 치매 진단을 설명하는 회귀방정식을 구하였다. 회귀계수 및 회귀 상수값을 얻어, 최종적으로 " $3.761 + 0.04 \times \text{YWHAB} - 0.0005 \times \text{CHGA} - 0.001 \times \text{CHGB}$ "의 회귀방정식을 얻었다. 3종의 단백질의 발현량을 모두 포함하는 상기 회귀 방정식으로, 모든 검체에서 방정식 값을 얻은 후, 그 값으로 알츠하이머성 치매 진단을 위한 ROC 분석을 실시하였다. 그 결과, 하기 표 13에서 확인할 수 있는 바와 같이, 0.904의 높은 AUC 값을 나타내었다. 또한, ROC 그래프의 좌표 분석을 통하여, 진단을 위한 컷-오프 값을 'Youden index J' 값을 가장 높게 만드는 좌표점으로 구하였다. 이를 기준으로 하는 경우, 회귀 방정식 값은 민감도(Sen) 88%, 특이도(Spe) 82% 수준으로 알츠하이머성 치매 진단을 가능하게 함을 나타낸다.

표 13

	AUC	95% CI	p-값	Youden index J	Sen (%)	Spe (%)
회귀방정식(Regression Equation)	0.904	0.84 - 0.967	< 0.001	0.70	88	82

[0112] 즉, 상기와 같은 결과 및 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 3종의 단백질의 조합이 개별적인 단백질에서 보다 훨씬 높은 ROC 커브 및 회귀방정식 값을 나타내므로, 개별적인 단백질의 측정에 비해, 3종의 단백질(YWHAB, CHGA, CHGB) 발현량의 동시 측정을 통해, 알츠하이머성 치매를 높은 정확도 및 민감도로 진단하는 것이 가능함을 확인할 수 있다.

[0114] 이상의 내용을 종합하면, 본 발명에서는 정상 대조군과 비교하여 알츠하이머성 치매 환자에서 공통적으로 검출되는 274종의 단백질들 중에서도, 5종의 단백질들(VGF, YWHAB, CHGA, CHGB, OPCML)이 유의적으로 차이가 있는 발현량을 나타냄을 확인하였다. 더욱이, 상기 5종의 개별적인 단백질들에 비해, 3종의 단백질의 조합(YWHAB, CHGA, CHGB)이 알츠하이머성 치매 진단의 유용성에 있어서 월등히 높은 민감도 및 특이도를 나타냄을 확인하였다. 이를 통해, 3종의 단백질 발현량의 동시 측정을 통해, 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후 예측에 유용한 정보를 획득할 수 있음을 확인하였다.

[0116] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 또

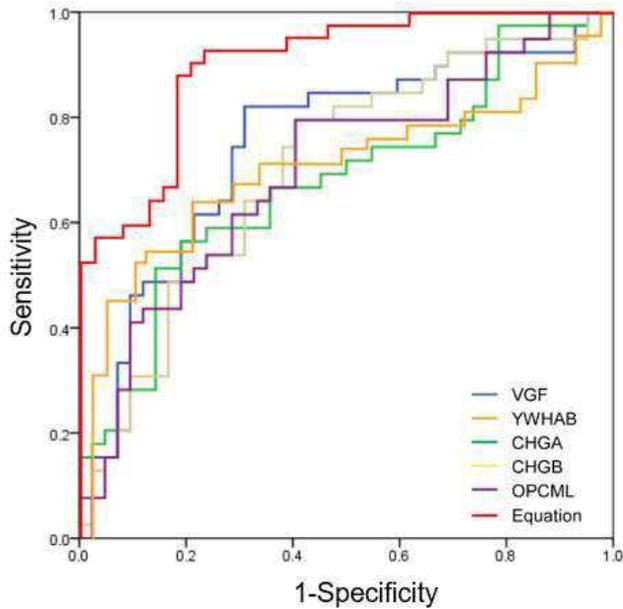
든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

변수	로그-우도	-2 로그 우도에서 변경	자유도	변화량의 유의확률
1 단계 VGF	-31.570	.742	1	.389
변_1433B	-47.712	33.025	1	.000
CMGA	-34.019	5.640	1	.018
SCG1	-32.052	1.705	1	.192
OPCM	-31.383	.367	1	.545
2 단계 VGF	-31.725	.686	1	.408
변_1433B	-48.063	33.361	1	.000
CMGA	-34.315	5.865	1	.015
SCG1	-33.079	3.393	1	.065
3 단계 변_1433B	-49.253	35.055	1	.000
CMGA	-38.282	13.114	1	.000
SCG1	-36.093	8.734	1	.003

도면2



서열 목록

- <110> AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> Alzheimer's disease diagnostic fluid biomarker including the combination of four proteins
- <130> KPA181172-KR
- <160> 15
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 6748

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

tccttccgtc gtcaggaga gtggagccaa tgcgtgcctt ggaggactgc tctgagccct      60
gtgcagattg gtgctgatga ttcttaccag ttgtgtgcaa gaaaagaaat cagagacgct      120
gcctgcctgc tcccatctct cgcgcgctct ctctctcttc tgcctctctcc ctccctttgc      180

aaacattgga tttaaactcg ctcaagaattc agcacagagg aaggcagcag cggtagcagc      240
agcagaagca gtagcaagcc cggcagctga gagcacccga gcgtcgagat gtacccatcct      300
gcctactggg tcgtcttctc ggcgacaact gcctgtctct tcatcccagg tgtacatag      360
atgaccgggt aaccgggtg gcctggctaa accgcagcac catcctctac gctgggaatg      420
acaagtggtc catagacct cgtgtgatca tcttggtaaa tacaccaacc cagtacagca      480
tcatgatcca aaatgtggat gtgtatgacg aaggtccgta cacctgctct gtgcagacag      540
acaatcatcc caaaacgtcc cgggttcacc taatagtca agttcctcct cagatcatga      600

atatctctc agacatcact gtgaatgagg gaagcagtgt gacctgctg tgtcttgcta      660
ttggcagacc agagccaact gtgacatgga gacacctgtc agtcaaggaa gcccagggt      720
ttgtaagtga ggatgagfac ctggagatct ctgacatcaa gcgagaccag tccggggagt      780
acgaatgcag cgcgttgaac gatgtcgctg cgcccgatgt gcggaaagta aaaatcactg      840
taaactatcc tcctatata tcaaaagcca agaacactgg tgtttcagtc ggtcagaagg      900
gcatcctgag ctgtgaagcc tctgcagtcc ccatggetga attccagtgg ttcaaggaag      960
aaaccagggt agccactggt ctggatggaa tgaggattga aaacaaaggc cgcattcca      1020

ctctgacttt cttcaatgtt tcagaaaagg attatgggaa ctatacttgt gtggccacga      1080
acaagcttgg gaacaccaat gccagcatca cattgtatgg gcctggagca gtcattgatg      1140
gtgtaaacct ggctccaga gcaactgctt gtctctggct atcagggacc ctcttagccc      1200
acttcttcat caagtttga taagaaatcc taggtctctt gagcaacgcc tgccttctca      1260
tatacagac tttaatctac actgcggaga gcaaaccagc ttgggcttct ttttgtttt      1320
ttctgttatt ctgatttgt tttcttttg tttttgtta tttgtttgtt tgcttttatt      1380
tccagcttga atgagtgggg ttggggcggg ggtgggcagg gttctaccac gtgtaggata      1440

atcattcatt ggtgtgtcca aaaatggggt ctgctcctgc taccttgacc ctccctttc      1500
ctctgcttct ctctcatca tcattcccaa caacatctc tgccacacac aacaaaacgt      1560
aagtttcatt tgggcaaaaa ttgacccca caataaacac cctgaagaca caacttgact      1620
tataacatag tgcacagcaa gagctacatc caagtgcctt attatctgtg attatttct      1680

```

taatgacaat gtacatatgc ccccatccat gttattatt atctaattcc attagggttc 1740  
 acgtcttttc tttctgggac actatcctac tatatccata tctatagatt tcaatataga 1800  
 tgattgtgcc atcttctgta gccctccgc tctactcatt ccttccacca tctgcagaga 1860  
  
 tttgaagttt ggggctatgc atgaaacca aactaaatt ttgcaagtca agtaacaaa 1920  
 aaagggggag gcattttgaa gatagaacct ctattttaaa aagagaagtt caactcataa 1980  
 acgtgattga taggtggctg atttatttag gttttgtcaa gctatctatc aaagtaatgg 2040  
 tacagttacc catctactca aatatctgat ttatctcacc atccaattat ctaccacct 2100  
 gtcttctctc ctagcaatct atttactgtt tatcaatcta tcaatgtaat tgtctaacac 2160  
 tcctttctat tcctcccta ctactcacta tcaattcacc cccatagaa tctctaacca 2220  
 tattgtatct ctcccactgt attcatttat acaccatcag cagacattgg catcttcaaa 2280  
  
 attatctttc aacttctgtg aaagccaacg atctcacagg ttaacaaaat acaaaagcaa 2340  
 tacctgtgtg tgggactct ttaaatctg gtatcctatc cacccaaggg agacactaac 2400  
 agataggcca aagtagcaag ctaatgatca gtcactcact attcccagaa gagcctgtgt 2460  
 tttctaaaac acttcttgg gaagcagatc agcctagaaa agttttgatt agcactgtgg 2520  
 ttttctttt gcacttgaag gacaaagggt ccagccttta tgcttctctc aacccttcaa 2580  
 gaaagtacat gtcaggaacc tatggctggc tttccttagc agcaagaact tgagagaaaa 2640  
 acacatctgt ctctgcaatg caaagtgaag agtccaccg cctgagtggg atgacttcag 2700  
  
 ctagagtctc ctttctgctc cagttctggt ttaatctgtt tgaaaactat ccagtaaaaa 2760  
 gctgatggag gccaattaca tggcgggtgt attgacaact ctggtatttg tttcaggaag 2820  
 ctcttctaag ctgagggcac ttgagcaact gacttaattt tcaagcactt gattaacaca 2880  
 aactgcaaa cagaaggagg aaagtgtcag tgacacagtt tcctctgatg cagctgcttc 2940  
 tccaatggct ttggggaaga acttcaccag ctcttcaggt tcaaagcaga cccagcatac 3000  
 aaacaagagc tgagccacct ttgctgtctt gtctcctggg acgagaagga ctcatccagc 3060  
 aaagttgcct gggattcaaa ataaaggcat tgcagaccgc acaggtgtgc tgcagggact 3120  
  
 gatccacaga gaggatgaga atgcagcatc aatcgagac ctgccctgcc tcagttggaa 3180  
 aacctttca gccctcagt ctaaaaaata aaaaatatga gcaccattga attctgtgcc 3240  
 cttaatgctt aactggtctt ctctctctgg tatcagtgte ctctttgttt ttgtccatca 3300  
 aggcatatga gtgtgacctc tgccatgggg aaacacacac agagatatct atacatata 3360  
 acatacatac aaacataggc tatcttgcca cactaaatgc taagcactgt cttaaaggt 3420  
 agagctgggtg tgagtgaat taatgttaca tttccagct gtaaacagac atctgcattt 3480

cctagtgagc tgccaggagc cagattcggg aaccgtaact gatgtgccag gaatggtgca 3540

ttgattccca gttccaggga tgatcatgag caggcgcaaa atcagaatta aaggtcgcac 3600

atagacgttt cagatctgtc accaccttca gcatctggag ttgagttggt gtcagatagt 3660

glatgagaat taaatgtgtc atctgagcat gctactgatg ataaatttgt tactttggag 3720

ttgaataaat gtgaaggctg tgaagagtgg acagtcttgg agaacacagt gcttgaatg 3780

gacaagctgg acctattcct cactccaaga ctgtttctac aggaaagggt ccatgctcct 3840

ttggccaaga tcatcagaac ctctcaacc aacaaggctg gcttcagggc cactatggaa 3900

ccctgctgtt ccccttcca aaggatacta agatgccct ctggtgggta cctatcccag 3960

ccacgtttca gagggagaga aatgctacag ttgatcctca tctgtctggg gtaaagacaa 4020

caaagtaaat acaaccaag gcaactgggg tactcactgg gagtgaaaat gacttcttca 4080

caacagacat atttctgctt ctgtgttttt gtgtttcttt ggtggggatg gcttcatggg 4140

agagtggctg tcacccatca ttttgaagca tatagaacaa caaatgctta cacaagacaa 4200

tatccacact tttccaactt cacacacgga gagtacatgg agaatgccta caggctagat 4260

ttgttcaggg tgccagtagt gggcatgggg tgggggcaag gcaggacaaa acatacaagt 4320

ctgagcaagt acatctcttg caggttttcc acatgaaaag gaagccaaat aagtcctgtt 4380

aggagattag gtgagaggaa ttagcaatgt agggactctg aaacccttcc ctttcccaaa 4440

acagagtcca tatgcacttc caccaaagta atgccaatga aagtgtctgt gtttaaggctg 4500

cagccaagct tgttttcag tagtttaatg tcaagtgcct gatacagtcg actgcaagtc 4560

taaacaagca tgtttagttt ttctcattct tgccttaatt caggaggagg gagatgtaga 4620

gaagtggttg tgaaaacatg tacaggcttt atgcagagca ctgcatgg ctgttctgct 4680

gcaactgtgc tccacgaaac agaagaaaag glaaggtgtt gtgtcacaaa gaggccccag 4740

tctctttctt cttacatcca tgctctttac tagatgatac atttacagat tgggcagttt 4800

gttctcaaaa cctgggtgag aagactattc ctggactcta gcaacttcaa aactgaggct 4860

gggtttcaga atctttttct gcatcaattc agtcaatttg ctttcaacaa agagaagtca 4920

gcaagtcca tttatgctga aagaactatt ccatgagaaa agcagagAAC cccaaagtgg 4980

gcaggcaacc ccgacgagag cttatccctg tggcggcatc aggagtggct gtacattgaa 5040

ttttcaagtg ctggttggct gtcgccagcc catggttagga ggggaggaat ggcttaagat 5100

gaggttaagat ctggttgggg ggcactttc ctcaattcca tactgacttt gatcttgaga 5160

aagaaaaact ggctatgcat tacctaaaac cagtccaaaa tgaacagac caacacacac 5220

acaaaagcaa attgtcaatc cctttggaat taagggaagc agcataaggt ttttctttt 5280  
 ggaaaaaatg catttatttt ctttttctcc aacagcaaga atcttttgtt ttcattttgc 5340  
 acgtgacctt atcttggaat ctcttatacc caattgcctc ccctcctatt attcagagct 5400  
 tcctgtctt ttiacttgaa gacaaataag ttgagcact tgagtaaac ttcacaggtg 5460  
 tgtaagtagg aaggcaacat tttcaaaaag agaccatag atgagaacgc ctaatgatca 5520  
 ccacatgcaa acaaacaaaa ctgccagtct catttccac atttcttact taagagaaga 5580  
 gaagtaaatg aaaggaagaa gaaatagatt tgaattaaa gatgtggcaa aaaagatagg 5640

gctgagccag ttcaatttag ccttcaggtg cagaatactt agagtccaaa gaaatgtgga 5700  
 gtggacttaa ttagatgcag ttgtctttat cctgaaagta gtgagctaag cctaatttcc 5760  
 agcattttga aagagattcc tttttgtttc tttccatggt gccctcttta aggcacagag 5820  
 ttgtccaca ccaactgggtg gagaagaaa gattgcgaac cctcgacat ccttttgagg 5880  
 ctacattcta tgitatttgg cagatttata aagctatcag taataacaat gctatgtact 5940  
 gcaagctgcc ctgtgttag ttaaaggag catttttaac cgttcgaaa ttttcgtgac 6000  
 atgtcaagtg cagtgtgag gactgtgtgg gtgaacgaaa atgtgtctgt caagttcaga 6060

gtcctttaga tttaaaaaaa aattatgact tatcaatggt gccgttatag ctgtgcaga 6120  
 caatgggtgt gccattctc acaattatcc ttcaaaaaaa atctatgttc aaatgcttta 6180  
 aaaatttate acacgatata agagtatgac ttgtcagcc ttctagagtt cttttttct 6240  
 tttattttct ttcgtatttt ttcttcaaa aatcaatga agacttgatt tctgtcaata 6300  
 attgtatcaa gggatgaat actacctgaa tttgtgcat gttacattgt agttgtaacc 6360  
 ttttctaatt caggatgaat acgagatggt tgtgatttg caggtacca ataaagtctg 6420  
 agaaatttgt aacttttggg gggctgttta ttaggacatc tcattgatat ccaggacggg 6480

aaaaatatga agcgagctct gcttctccca tatgtgcggt tttggccctg gagagtagat 6540  
 gcactcagaa agcctggagc tgcaccccc acctctctct ctccctctt ctctctctcg 6600  
 cacacactgt agaaagcagc cttagcactg tccgtatgac atttgtatat caaagatcta 6660  
 tgctgtttac aaacaatata aatgtagct gcagcctcaa agtctaaatt gttgttgggt 6720  
 gtaggcgaaa acgaaagcag aagagaag 6748

- <210> 2
- <211> 3231
- <212> RNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

gcgcccctcc cgtggggccg tggcaacccc gtgcctcgct tgccaatga gaacacggtt 60

tggggcgggg cgcgccagg accggagcgg aagtggcgat cggagcggaa gtggagctac 120

cgccaccgcc gccgcccatt ccggagccgg ggtagtcgcc gccgcccgcg ccgctgcagc 180

cactgcaggc accgctgccg ccgctgagt agtgggctta ggaaggaaga ggtcatctcg 240

ctcggagctt cgctcggaag ggtctttgtt cctgcagcc ctcccacggc agagtctcca 300

gagatttggg ccctacaaa aagtgcattt tgcccattcg gctgtggata gagaagcagg 360

aagagcactg gacttggagt caggaatga caatggataa aagtgagctg gtacagaaag 420

ccaaactcgc tgagcaggct gagcgatatg atgatatggc tgcagccatg aaggcagtca 480

cagaacaggg gcatgaactc tccaacgaag agagaaatct gctctctgtt gcctacaaga 540

atgtgtagg cgcccgcgcg tcttctggc gtgtcatctc cagcattgag cagaaaacag 600

agaggaatga gaagaagcag cagatgggca aagagtaccg tgagaagata gaggcagaac 660

tgcaggacat ctgcaatgat gttctggagc tgttggacaa atatcttatt cccaatgcta 720

cacaaccaga aagtaagggt ttctacttga aaatgaaagg agattatctt aggtatcttt 780

ctgaagtggc atctggagac aacaaacaaa ccaactgtgc gaactcccag caggcttacc 840

aggaagcatt tgaattagt aagaagaaa tgcagcctac acaccaatt cgtcttggtc 900

tggcactaaa tttctcagtc ttttactatg agattctaaa ctctcctgaa aaggcctgta 960

gcctggcaaa aacggcattt gatgaagcaa ttgctgaatt ggatcgcctg aatgaagagt 1020

cttataaaga cagcactctg atcatgcagt tacttaggga caatctcact ctgtggacat 1080

cggaaaacca gggagacgaa ggagacgctg gggagggaga gaactaatgt ttctcgtgct 1140

ttgtgatctg ttcagtgtca ctctgtacc tcaacatata tcccttgtgc gataaaaaaa 1200

aaaaaaaaaa aaaaaagaga atcgtacgtc gactttcgat ttttcacagc ctgagcctag 1260

gaaaaatggt tcatgggata aacagctggt atttgtatct aaaactcaga ttggtcacat 1320

aaatgccacg gcattccgaa gttttgattt tgattaacat tgacaggatt actgtgtgtt 1380

taatttttta aaaactgaac actgtgatta tggggttttg taatttagca gaactcttac 1440

tggtagaaaa aatagacctg aattatgtgt aactttttgg aaggtttaat ctgatatcaa 1500

aataatcatt gaaatacaat tccattgtaa agttgtacag aaagttagag agattatatt 1560

gtgatgctgg aacttggagt gagacacaca tcatttggca tttgagttga atggtaattc 1620

acagtaatgc tgccgttgtt cgggacttaa agacacttga cctgtttggg ctgttgccac 1680

ttaaaagttc atgaccacaa atgtccacag tctcttctc tgaggaaact cgaatcctga 1740

aatggaatt ctttggca gataactggc ttatgacacc ttgaaaagt caagtctca 1800  
 tataacacac cacactgaac cccctttcct acagcaatat gttcactatg ttaccaattt 1860  
 gcaacttgtg cttcaatagt ggaatctact ttcattgtta acactgagct aaagaaaaa 1920  
 agccgtgtgt tttatgaatg accttatctg tttcctggat aataccttta agaataatgt 1980  
 cctgagtcag gcgtgggtgt gcgtgcatct agtccaact atttgggagg ctgaggcagg 2040  
 aggatcgctt gagcccagga gtttaagct gcagtgcct gtggttgcac ctgtgaataa 2100  
 ctgcactcca gcctgggcaa catagcgaga cctcatctcc aaaaaagaaa acaaaaaaca 2160  
  
 aaaaaaggaa tgatgttctg tagagatggc ctttacttg aggagtactc agttttcagg 2220  
 ttcttctag ctcggttctt ttaaattttg aaatctaac attctttccc accatccttt 2280  
 ttgactgttg accttggttt tctcttctaa gtttctgtcc ctctgcttcc ttacttttt 2340  
 tcctttttga attctatctt tatctgtctt ttgttcaact tttaatgcta tatatgggca 2400  
 ggggtgagag acattactga gcaccttggg gagcaagcct ggctttaag attggagaag 2460  
 agcttctggc accagaacct tgtcttctc cagtctcaa cacggtgttg ctcttcagtc 2520  
 ataccggaat ctgaatcaaa aaagtatttt taaatatcca tgatttctcc ctgtattgag 2580  
  
 gctagccctg atcatgcttt ttgtgcctgt caccaggtct cccaagtgca ctcattccagg 2640  
 tcagtgtca gatgtgttta aggagacct atattcaggg aagtgtcgtg aacactgcag 2700  
 tggggagaat tgagaatagt caggectatc agtctcacag aatcaccct ctaccttga 2760  
 tattccactt agctgtagag tccatctgtt tgtccatctg ctgaaatgag aaaagaaaa 2820  
 tttatgact gatthaaac aaacaaaaa aaaagaaaa aacaaaaaa aaaatccctc 2880  
 ctttctagct gaacaaaaa gtgcagttaa tacttggcgc ttgaaaatgc agtagtgaat 2940  
 gtggaaccaa gcctgtctgt atatctggta gctcttttct tgccttgttt tttcttacca 3000  
  
 gtattctgcc taacgtttgc ttctgtgatg gttatattgc ctagcaagca cacccgtggt 3060  
 tgtgaaaata gtatagcaa aaagaaaaat ccccggttat tgatgtacta gatttgtgta 3120  
 tgtcttttaa acagttctag tttcacctta cacagaataa tcaggaaaag tgtaaaaatt 3180  
 caaaagtga ataaaaatt tatcagttag ttgcctgtga aaaaaaaaa a 3231  
  
 <210> 3  
 <211> 2079  
 <212> RNA  
 <213> Homoeocarabus maender  
 <400> 3  
  
 gtcatttccg gggctggggg atataagcgg ggcgcgaggg cgctgctgct gccaccgctc 60

ctgccactgc agtgctcgag ccccgctgag gggagcttgc gggaggatcg accgacagac 120

ggacgcacgc cgaggcactg cgccccagc cccgcgccgg tgccaccgca gcccgacccc 180

ggcccgccagt ccagccgccc ctgcgccggt gcctaggtgc ccggccccac accgccagct 240

gctcggcgcc cgggtccgcc atgcgctccg ccgctgtcct ggctcttctg ctctgcgccg 300

ggcaagtcaac tgcgctccct gtgaacagcc ctatgaataa aggggatacc gaggtgatga 360

aatgcatcgt ttaggtcatc tccgacacac tttccaagcc cagccccatg cctgtcagcc 420

aggaatgttt ttagacactc cgaggagatg aacggatcct ttccattctg agacatcaga 480

atttactgaa ggagctccaa gacctcgtc tccaaggcgc caaggagagg gcacatcagc 540

agaagaaaca cagcggtttt gaagatgaac tctcagaggt tcttgagaac cagagcagcc 600

aggccgagct gaaagaggcg gtggaagagc catcatccaa ggatgttatg gagaaaagag 660

aggattccaa ggaggcagag aaaagtgggtg aagccacaga cggagccagg ccccaggccc 720

tcccggagcc catgcaggag tccaaggctg aggggaacaa tcaggcccct ggggaggaag 780

aggaggagga ggaggaggcc accaacacc accctccagc cagcctccc agccagaaat 840

accaggccc acaggccgag ggggacagtg agggcctctc tcagggtctg gtggacagag 900

agaaggcct gatlgcagag ccagggtggc aggcaaagag agaagaggag gaggaggagg 960

aggaggagc ttaggctgga gaggaggctg tccccagga agaaggcccc actgtagtgc 1020

tgaaccccca cccgagcctt ggctacaagg agatccgaa aggcgagagt cggtcggagg 1080

ctctgctgt ggatggagct gggaagcctg ggctgagga ggctcaggac cccgaaggga 1140

agggagaaca ggagcactcc cagcagaaag aggaggagga ggagatggca tgggtcccgc 1200

aaggcctctt ccgggtggg aagagcggag agctggagca ggaggaggag cggctctcca 1260

aggagtggga ggactccaaa cgctggagca agatggacca gctggccaag gagctgacgg 1320

ctgagaagcg gctggagggg caggaggagg aggaggacaa ccgggacagt tccatgaagc 1380

tctccttccg ggcccggcc tacggcttca gggccctgg gccgcagctg cgacaggct 1440

ggaggccatc ctcccggag gacagccttg aggcgggcct gccctccag gtccgaggct 1500

accccagga gaagaaagag gaggagggca gcgcaaaccg cagaccagag gaccaggagc 1560

tggagagcct gtcggcatt gaagcagagc tggagaaagt ggcccaccag ctgcaggcac 1620

tacggcgggg ctgagacacc ggctggcagg gctggcccca gggcaccctg tggcctggc 1680

tctgctgtcc ccttggcagg tcttggccag atggcccga tgctgcttcc ggtaggagg 1740

cagcctccag cctgccaag cccaggccac cctatcgecc cctacgcgc ttgtctccta 1800

ctcctgactc ctacctgccc tggaacatcc ttgacaggc agccccacaa ctttaaacat 1860  
 tgacgattcc ttctctgaac acaggcagct ttctagaagt ttccttctct ccatcctatc 1920  
 cactgggcac aactgcaata acttctgacc ttttgggtaa agctgagaac tcctgactgt 1980  
 aacatattct gtatgaactt tatctaaaga aaaataaatc tgttctgggc tctttctctt 2040  
 gaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 2079

<210> 4  
 <211> 2666  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

agaccctgca caccaggcga ctggactggc gtaaatttcc gccatttgc gtcgccgct 60

gggggtgctg ctctgtgacg tcagggtga gctagggggc gcccgctcct ggctgcccgc 120  
 tcctcccgc cctgcccgc ccgctgccc tttaaaagag cggggcctgc gccggccgcg 180  
 ccacaccgcg gggaccagga ggcacgctgg tttccgggg ccgctccatc gcgcttctct 240  
 cctgcccctc gcttctcgg tccagccgc atcttcttt ccgcacaggg gccgcccagc 300  
 gggccatgc agccaacgt gcttctcagc ctctgggag ccgtgggct ggcgctgtc 360  
 aattccatgc cagtggataa caggaaccac aatgaaggaa tggtagctcg ctgcatcatt 420  
 gaggtcctct caaatgcctt gtcgaagtcc agcgtccac ccatcacccc tgagtcccgc 480

caagtctga agacgagtag aaaagcgtc aaagacaaag agacaactga aatgaaaac 540  
 acaaagtttg aagtaagatt gttaaagac ccagctgatg cctcggagc ccacagctcc 600  
 tccagcaggg gagaggcagg agccccaggg gaggaggaca tccaaggccc aacaaaggca 660  
 gacacagaga aatgggcaga gggaggcggg cacagccgag agcgagcggg tgagccccag 720  
 tggagcctct atcctccga cagccaagtc tctgaagaag tgaagacag ccattctgag 780  
 aagagccaga gagagatga ggaggaggag gagggagaga actatcaaaa aggggagcga 840  
 ggggaagata gcagtgaaga gaaacacctt gaagagccag gagagacaca aaacgtttt 900

ctcaatgaaa gaaagcaggc ttcagctata aaaaaagagg agttagtggc cagatcggaa 960  
 acacatgctg ccgggcttc ttaggagaag acacatagcc gagagaagag tagccaggag 1020  
 agtggagagg agacagggag ccaggagaat cacccccagg agtctaaagg ccaaccccga 1080  
 agccaggaag aatctgagga aggtgaggaa gatgccacct ctgaggtgga caaacgacgc 1140  
 acgagccca gacaccacca cgggaggagc agccccgaca ggtcctctca aggaggaggt 1200  
 ctccctctg aggaaaaggg acaccccag gaggaatctg aggagtcaaa cgtcagcatg 1260

gccagtttag gggaaaagag ggaccacat tcaaccact acagggttc agaggaagaa 1320

ctggaatatg gagaagaaat aaagggttat ccaggcgtcc aggccctga ggacctggag 1380

tgggagcgt atagggcag aggaagtga gaatacagg ctccaagacc tcagagtga 1440

gagagtggg atgaggagga caagagaaac taccacagct tagagcttga taagatggca 1500

catggatatg gtgaagaaag tgaggaagag aggggccttg agccgggaaa gggacccat 1560

cacagaggca ggggagggga gccacgtgcc tattcatgt ctgacaccag agaagagaaa 1620

aggttcttgg gtgaaggaca ccacctgtc caagaaacc agatggaca ggcaaggagg 1680

catccacaag gtgcgtggaa agagctggac agaaattatc tcaactacgg tgaggaagga 1740

gccccaggga agtggcagca gcaggagac ctgcaggaca ctaagaaaa caggaggaa 1800

gctaggttc aagataaaca atatagctcc catcacacag ctgaaaagag gaagagatta 1860

ggggaactgt tcaaccata ctacacct ctccagtga agagcagcca ttttgaaga 1920

agagacaaca tgaatgaca tttctcgag ggtgaggagg aaaatgagct gacctgaac 1980

gagaagaatt tcttccaga atacaactat gactggtgg agaaaaagcc cttctctgag 2040

gatgtgaact gggggtatga gaagagaaac ctgccaggg tcccagct ggacctgaaa 2100

aggcaatatg acagggtggc ccaactggac cagctcctc actacaggaa gaagtcagct 2160

gagtttccag acttctatga ttctgaggag ccggtgagca cccaccagga ggcagaaaat 2220

gaaaaggaca gggctgacca gacagctctg acagaggacg agaaaaaga actcgaaaac 2280

ttggctgcaa tggatttga actacagaag atagctgaga aattcagcca aagggtctga 2340

ctgtcattgg agcgggtggc actgtaaga agcagccatc acatgatctg tttttacca 2400

cttactgaa agacaccatt tatctacca agggcagaaa gtagaactta ctattcatta 2460

aatgtttgac acaattggaa ttgtctttaa tttctgtcag aatgctattg aaaatgtgaa 2520

ttgcatgact tgtagcatat tcttttctgc aaaatagaca tattaacatg cttatgacaa 2580

tgactgtgct actgtctttg gaaaaatgtt tgtctcagtt ggaataata aaagattcac 2640

ctgagaccaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2666

<210> 5

<211> 2586

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ccagcgtgct gaagccggag cgagetagcc gccggagcc gcgccgacc agctgagccc 60

agcccacggg acgccagacc tgcacctgc ctctacccc ggccaccgt cggagccgag 120

gcggacgcgt cccgatcttc ccctgtcccc accctgcccc gacctctctc tccacctctc 180  
gcgtcgtgac accagctgtc tccggcagcc tcttggatcat gaaagccctc agattgtcgg 240

cttccgccct ctctgcctt ctgctgatca acgggttagg ggcagcacc cctggtcgcc 300  
ctgaggcgca gcctctctct ctcagctctg agcataaaga gccggtagcc ggggacgcag 360  
tgcccgggcc aaaggatggc agcgccccag aggtccgagg cgctcggaat tccgagccgc 420  
aggacgaggg agagcttttc cagggcgtgg atccccgggc gctggccgcg gtgctgctgc 480  
aggcactcga ccgtcccccc tccccccgg caccaagcgg ctcccagcag gggccggagg 540  
aagaagcagc tgaagctctg ctgaccgaga ccgtgcgcag ccagaccac agcctcccgg 600  
cgccggagag cccggagccc gcggctccgc ctgcctca gactccggag aatgggcccc 660

aggcgagcga tcctccgag gagctcgagg cgctagcgtc cctgctccag gaactcgag 720  
atctcagtc aagtagcgc aagcggcagc aggagacggc ggcagcagag acggaaacc 780  
gcacgcacac gctgaccga gtgaatctgg agagcccggg gccagagcgc gtatggcgcg 840  
cttctgggg agagtccag gcgcgtgtcc cggagcgcgc gccctgccg cccccggccc 900  
cctctcaatt ccagcgcgt atgcccgaca gcgggcccct tcccgaacc cacaagtteg 960  
gggaaggagt gtctcccc aaaacacacc taggcgaggc attggcacc ctgtccaagg 1020  
cgtaccaagg cgtggccgcc ccgttcccc aggcgcgccg gccggagagc gactcctgg 1080

gcggctccga ggcgggcgag cgccttctcc agcaaggct ggcgcaggtg gaggccgggc 1140  
ggcggcaggc ggaggccac cgccaggccg cggcgcagga agagcggctg gccgacctcg 1200  
cctcggacct gctgctccag tatttctgc agggcggggc ccggcagcgc ggcctcgggg 1260  
gtcggggct gcaggaggcg gcggaggagc gagagagtgc aagggaggag gaggaggcgg 1320  
agcaggagag acgcggcggg gaggagaggg tgggggaaga ggatgaggag gcggccgagg 1380  
cggaggcaga ggcggaggag gcggagaggg cgcggcagaa cgcgctcctg ttcgaggagg 1440  
aggaggacgg ggaagccggc gccgaggaca agcgtccca ggaggagacg ccgggccacc 1500

ggcgggaagga ggccgagggg acagaggagg gcggggagga ggaggacgac gaggagatgg 1560  
atccgcagac gatcgacagc ctatttgagc tctccacaa actccacctg ccagcggacg 1620  
acgtggtcag catcatcgag gaggtggagg agaagcggaa gcggaagaag aaccccctc 1680  
ccgagccctg gcccccccc cgtgccccc ccgccccac ccacgtccgc tccccgcagc 1740  
cccccccc cgccccct cccgcacgag acgagctgcc ggactggaac gaggtgctcc 1800  
cgccctggga tcgggaggag gacgaggtgt acccggcagg gccgtaccac cctttccca 1860

actacatccg gcccgggaca ctgcagccgc cctcggcctt gcgccgccgc cactaccacc 1920

acgccttgcc gccttcgccc cactatcccg gccgggaggc ccaggcgcgg cgcgcgcagg 1980

aggaggcggg ggcggaggag cgccggctgc aggagcagga ggagctggag aattacatcg 2040

agcacgtgct gctccggcgc ccgtgactgc cttcccggg cccgcccccg cgcgcccccg 2100

ccgcgcgcgc gcgccggcgc ccccctccgt gttgcccgct ccccctcggg gtttgcacgc 2160

gccccggccc tgccccttgg ccctgcccct gtccccgggc tgcgtcggga cctgccagac 2220

ccccctcccg ggtcctgagc ccgaactccc agagctcacc cgcgggtgac cgggggccag 2280

cccaggaggg cgggtggttt gtgcgagttc ccttgccaag cggggccccg gccccatcaa 2340

gtccctctgg ggacgtcccc gtcggaaacc ggaaaaagca gttccagtta attgtgtgaa 2400

gtgtgtctgt ctccagccct tcgggectcc cagagcccc tccagcctct ccaagtcgct 2460

gtgaattgac ccttctttc ctttctctgt tgtaaatacc cctcacggag gaaatagttt 2520

tgctaagaaa taaagtgac tattttatta ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2580

aaaaaa 2586

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OPCML primer(forward)

<400> 6

cctagtcct ctgagcaacg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OPCML primer(reverse)

<400> 7

ggtcaaggta gcaggagcag 20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> YWHAB primer(forward)

<400> 8  
 ggaaggaaga ggtcatctcg c 21  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <  
 212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> YWHAB primer(reverse)  
 <400> 9  
 tgcttctcta tccacagccg 20  
 <210> 10  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CHGA primer(forward)  
 <400> 10  
 cctgtgaaca gccctatg 18  
 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CHGA primer(reverse)  
 <400> 11  
 ggaaagtgtg tcggagat 18  
  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CHGB primer(forward)  
 <400> 12  
 caactggacc agctccttca c 21  
 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CHGB primer(reverse)

<400> 13

gcacagtcacat tgcataaagc atgt 24

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VGF primer(forward)

<400> 14

cctcttggtc atgaaagc 18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VGF primer(reverse)

<400> 15

ggctctttat gctcagag 18