

특허청구의 범위

청구항 1.

서열목록 1에 기재된 B1 영역(element)에 중아황산염(bisulfite)을 처리하는 1 단계, MSP(methylation specific PCR)을 수행하는 2 단계 및 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하는 3 단계 공정을 포함하는 DNA 메틸화(methylation) 측정 방법.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

항암제를 처리한 실험군 및 처리하지 않은 대조군의 B1 영역(element)를 분리하는 1 단계, B1 영역(element)에 중아황산염(bisulfite)을 처리하는 2 단계, MSP(methylation specific PCR)을 수행하는 3 단계 및 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하는 4 단계 공정을 포함하는 항암제의 항암활성 측정 방법.

청구항 4.

삭제

청구항 5.

제 3항에 있어서, 상기 항암제는 5-아자시티딘(5-Azacytidine), 5-데옥시-아자시티딘(5-deoxy-Azacytidine), 트리코스타틴 A(trichostatin A ; TSA), 데프시펩티드(depsipeptide), 발프로익산(valproic acid), 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil)인 기존 항암제임을 특징으로 하는 측정 방법.

청구항 6.

제 3항에 있어서, 상기 항암제는 신규 항암 후보물질임을 특징으로 하는 측정 방법.

청구항 7.

i)서열목록 1에 기재된 B1 영역, ii)메틸화되지 않은 CpG 섬의 시토신(C)을 티민(T)으로 전환시키는 중아황산염(bisulfite), iii)목적 DNA를 생성할 수 있는 프라이머(primer), iv)내열성 폴리머라제인 태그 폴리머라제(Taq polymerase), v)dNTPs(사전 혼합형 또는 분리 공급형)를 포함함을 특징으로 하는 DNA 메틸화 측정용 키트.

청구항 8.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 B1 서열(B1 element)을 이용한 DNA 메틸화(methylation) 정도를 측정하는 방법 및 이를 이용한 항암제의 항암활성 측정법이다.

현재는 게놈 프로젝트가 거의 마무리 되었고 그 뒤를 이어 프로테오믹스 프로젝트가 시행되는 이른바, 포스트 게놈 시대이다. 최근 이러한 프로젝트를 통해 얻은 정보를 의학에 적용하거나 신약개발에 활용하려는 시도가 많고 후생유전학(Epigenetics)을 이용한 연구 및 응용이 활발하다.

DNA 메틸화(methylation)란 CpG 영역(site)의 시토신(cytosine)이 메틸화되어 5-메틸시토신(5-methylcytosine)이 되는 것을 의미한다. 게놈의 염기서열에서 시토신(C)과 구아닌(G)이 나란히 존재하는 것을 CpG 라고 하는데 이 배열에서 시토신이 메틸화되는 경향이 있다. 인간게놈의 경우, 전체 시토신 중 3-4%는 메틸화되어 있으며 CpG의 메틸화 정도와 패턴은 포유동물의 종 및 조직에 따라 매우 특이적인 양상을 보인다. 포유동물의 염기서열에는 CpG가 밀집되어 있는 CpG 섬(island)이라는 부위가 존재하는데 이 CpG 섬은 유전자의 전사과정을 조절하는 프로모터 부근에 위치하여 유전자의 발현을 조절한다. 즉, CpG 섬이 메틸화되면 이 부위에서 메틸기 결합 단백질들이 유도되고 이들은 다시 히스톤 탈아세틸효소 등과 결합하여 복합체를 형성하여 전사인자의 인식을 방해함으로써 유전자의 발현을 억제한다. 부모에게서 물려받은 한 쌍의 유전자 중에서 어느 하나만 발현되어 두 유전자가 모두 발현될 경우 발생하는 유전 이상을 방지하는 현상을 유전체 각인(genomic imprinting)이라고 하는데 이러한 각인 현상이 가능한 이유도 수정란의 발생단계에서 해당 유전자의 CpG 섬이 선택적으로 메틸화되어 한쪽 유전자의 발현을 억제하기 때문이다. 또한, CpG의 메틸화는 외부에서 유입되는 트랜스포손과 같은 이동성 유전자들의 발현을 억제하는 방어기작으로 작용하기도 하고 암 발생과도 밀접한 관련성을 가진다. 암억제유전자의 프로모터 영역이 메틸화되면 이 유전자의 발현이 억제되어 암이 유발되는 것이다. 따라서 메틸화된 DNA의 탐색 기술은 암과 관련된 연구 등에 적용되고 있으며 이를 항암치료를 위한 표적 유전자로 활용하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다. 또한, DNA 메틸화는 획득형질의 유전에 의한 진화론의 핵심기작으로 알려져 있다. 임의적인 유전자 돌연변이에 기초한 다윈의 진화론으로 설명하기 어려운 빠른 환경적응력을 뒷받침하는 획득형질의 유전현상은 아직 정확한 경로는 밝혀지지 않았지만 DNA 메틸화에 의한 크로마틴(chromatin)의 구조적인 변화에서 기인하는 것으로 알려져 있다 (Jablonka E, et al., *J. Theor. Biol.*, **139**(1), pp69-83, 1989). 포유류의 경우, CpG 섬은 40% 이상이 반복서열(repetitive elements)에 존재하고 있다(Szyf, M., 2003. *Drug Resist Updat.*, **6**, pp341-345, 2003).

기존에 알려진 메틸화된 DNA의 탐색 기술로는 DNA 메틸화(methylation) 과정에 영향을 주는 DNMT1(DNA methyltransferase 1), S-아데노실-메티오닌(S-adenosyl-methionine), 호모시스테인(homocysteine) 등을 이용한 탐색 기술이 있으나 이러한 방법들은 질병 또는 증상에 따라 메틸화에 관여하는 특정 유전자의 시퀀스를 각각 따로 이용해야 하는 단점이 있다. 최근에는 특정 유전자의 프로모터를 이용하여 CpG 섬의 메틸화 정도를 측정하는 방법이 개발된 바 있으나 이는 특정 유전자가 관여하는 상황에 대해서만 메틸화를 분석할 수 있다(Christman, J.K., *Oncogene*, **21**, pp5483-5495, 2002). 이에 따라, 메틸화에 관여하는 특정 유전자를 필요로 하지 않고 보편적으로 이용될 수 있는 방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

본 발명자들은 마우스의 B1 서열(element)을 이용하여 MSP(methylation specific PCR)와 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하여 특정 유전자의 메틸화 정도에 대한 정보를 필요로 하지 않고 게놈의 메틸화 정도를 보다 빠르고 정확하게 측정할 수 있는 DNA 메틸화(methylation) 측정방법을 개발하고 이를 이용하여 항암제의 항암활성 측정법을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 B1 서열(B1 element)을 이용한 DNA 메틸화(methylation) 측정 방법 및 이를 이용한 항암제의 항암활성 측정법을 제공함으로써, 항암제의 효능 검증, 항암치료의 경과진단, 항암치료를 위한 표적 유전자의 검색 및 유전자의 발현조절과 관련된 다양한 질환의 치료법을 개발하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1에 기재된 B1 영역(element)을 이용한 DNA 메틸화(methylation) 측정방법을 제공한다.

본 발명의 DNA 메틸화 측정방법은 B1 영역(element)에 중아황산염(bisulfite)을 처리하는 1 단계; MSP(methylation specific PCR)을 수행하는 2 단계 및 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하는 3 단계 공정을 포함함을 특징으로 한다.

또한, 본 발명은 서열목록 1에 기재된 B1 영역(element)을 이용하여 DNA 메틸화(methylation) 정도를 측정함을 특징으로 하는 항암제의 항암활성 측정방법을 제공한다.

본 발명의 항암활성 측정방법은 항암제를 처리한 실험군 및 처리하지 않은 대조군의 B1 영역(element)을 분리하는 1 단계; B1 영역(element)에 중아황산염(bisulfite)을 처리하는 2 단계; MSP(methylation specific PCR)을 수행하는 3 단계 및 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하는 4 단계 공정을 포함함을 특징으로 한다.

또한, 본 발명은 MSP 및 파이로시퀀싱 과정을 수행하기 위한 구성요소를 포함하는 DNA 메틸화 측정용 키트를 제공한다.

상기 키트는 i)서열목록 1에 기재된 B1 영역, ii)메틸화되지 않은 CpG 섬의 시토신(C)을 티민(T)으로 전환시키는 중아황산염(bisulfite), iii)목적 DNA를 생성할 수 있는 프라이머(primer), iv)내열성 폴리머라제인 태그 폴리머라제(Taq polymerase), v)dNTPs(사전 혼합형 또는 분리 공급형)를 포함한다.

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명은 B1 영역(element)에 중아황산염(bisulfite)을 처리하는 1 단계; MSP(methylation specific PCR)를 수행하는 2 단계 및 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하는 3단계 공정을 포함하는 DNA 메틸화(methylation) 측정 방법을 제공한다.

DNA 메틸화(methylation)란 CpG 영역의 시토신(C)이 메틸화되어 5-메틸시토신이 되는 것을 의미한다. 게놈의 염기서열에서 시토신(C)과 구아닌(G)이 나란히 존재하는 CpG 배열에서 시토신(C)이 메틸화되는 경향이 있다. Alu 서열(Alu element)에 중아황산염(bisulfite)을 처리하면 Alu 서열의 시토신(C)은 모두 티민(T)으로 전환되는데 이 때, 메틸화된 CpG의 시토신(C)은 티민(T)으로 변하지 않는다. 이를 마우스의 B1 서열(B1 element)에 응용하여 B1 서열에 중아황산염을 처리하면 게놈 전체 3만개 이상의 CpG 섬의 메틸화된 시토신(C) 이외의 시토신은 모두 티민(T)으로 전환된다.

B1 서열(B1 element)은 마우스의 게놈에서 발견되는 가장 보편적인 SINE으로 3만 카피(copies) 정도 존재하며 Alu이라는 제한효소에 의해 인식되는 특이 염기서열을 가지고 있어 Alu 패밀리(family)에 속한다. SINE(short interspersednucleotide element)는 3백개 정도의 염기로 구성된 반복서열(repetitive element)로, LINE(long interspersed elements)와 함께 레트로트랜스포존(retrotransposon)의 하나로 알려져 있다. 일반적으로 반복서열은 AT 염기가 풍부하고 CG 염기는 적는데 이 SINE은 CG 염기가 풍부하며 보통 포유동물 종 사이에는 50-60% 정도, 그리고 단일 종 내에서는 80% 정도의 유사성을 갖는다. SINE는 게놈 내에서 여기저기로 옮겨 다닐 수 있기 때문에 유전물질의 운반 수단으로 알려져 있다. 이들의 생체 내 역할은 정확하게 밝혀지지 않았지만 생명체 내에서 새로운 유전자를 만드는 수단으로서의 기능을 수행할 것으로 추정된다.

상기 B1 영역(element)에 중아황산염(bisulfite)을 처리하는 1 단계에서 중아황산염은 시토신(C)을 티민(T)으로 바꾸는 역할을 한다.

상기 MSP(methylation specific PCR)를 수행하는 2 단계에서 MSP(methylation specific PCR)은 프로모터의 메틸화(promotor methylation) 유무를 검사하기 위해서 사용되는 특수 PCR(Polymerase Chain Reaction)이다. 인위적으로 gDNA 를 메틸화된 상태를 만든 후에 메틸화가 되었을 경우와 아닌 경우의 프라이머(primer)를 준비해서 PCR을 수행하고 전기영동을 통해 나타난 밴드(band)를 통해 메틸화의 유무 및 대략적인 비율을 확인할 수 있다.

상기 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하는 3 단계에서 파이로시퀀싱은 DNA 시퀀싱(sequencing)에 이용되기도 하는 SNP 분석방법으로 DNA가 합성되는 동안 방출되는 무기인산(inorganic pyrophosphate ; PPi)의 빛(light)을 검출하는 방법이다. 중합반응(Polymerization) 시 4 개의 dNTPs(deoxynucleotide triphosphates)를 한번에 하나씩 순차적으로 넣어서 반응시키면 중합되는 dNTP에 붙어 있는 무기인산(PPi)은 효소반응으로 빛을 방출한다. 방출된 빛은 순차적으로 들어간 각각의 dNTP의 반응순서대로 신호 피크(signal peak)를 나타내고 그 신호 피크는 각각의 dNTP가 반응한 수에 비례하여 높아지고 낮아지는 경향(pattern)을 나타낸다.

또한, 본 발명은 항암제를 처리한 실험군 및 처리하지 않은 대조군의 B1 영역(element)을 분리하는 1 단계; B1 영역(element)에 중아황산염(bisulfite)을 처리하는 2 단계; MSP(methylation specific PCR)을 수행하는 3 단계 및 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하는 4 단계 공정을 포함하는 기존 항암제 또는 항암제 후보물질의 항암활성을 측정 또는 검증하는 방법을 제공한다.

상기 항암제는 5-아자시티딘(5-Azacytidine), 5-데옥시-아자시티딘(5-deoxy-Azacytidine), 트리코스타틴 A(trichostatin A ; TSA), 데프시펩티드(depsipeptide), 발프로익산(valproic acid), 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil) 등의 후생유전학 관련 기존 항암제 및 신규 항암 후보물질을 포함한다.

상기 항암제를 처리한 실험군 및 처리하지 않은 대조군의 B1 영역을 분리하는 1 단계에서 B1 영역은 마우스(mouse)의 DNA를 주형(template)으로 B1 영역의 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR를 수행하여 증폭 및 스크리닝(screening)한다. DNA는 살아있는 마우스에 항암제를 처리하는 생체 내(in vivo) 조작을 거친 마우스의 고환, 신장, 심장, 간, 폐, 뇌 등의 조직, 발톱 및 혈액 또는 마우스에서 분리한 세포에 항암제를 처리하는 생체 외(in vitro) 조작을 거친 세포를 이용하여 통상적인 DNA 준비법(preparation)을 수행함으로써 분리한다.

후속단계인 B1 영역(element)에 중아황산염(bisulfite)을 처리하는 2 단계, MSP(methylation specific PCR)을 수행하는 3 단계 및 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하는 4 단계는 상기 메틸화 측정법에서의 1단계, 2단계 및 3단계와 동일한 과정을 수행할 수도 있으며 당업계에 잘 알려진 기존 방법 및 기술을 변형 또는 개량함으로써 수행가능하다.

또한, 본 발명은 MSP 및 파이로시퀀싱 과정을 수행하기 위한 구성요소를 포함하는 DNA 메틸화 측정용 키트를 제공한다.

상기 키트는 i)서열목록 1에 기재된 B1 영역, ii)메틸화되지 않은 CpG 섬의 시토신(C)을 티민(T)으로 전환시키는 중아황산염(bisulfite), iii)목적 DNA를 생성할 수 있는 프라이머(primer), iv)내열성 폴리머라제인 태그 폴리머라제(Taq polymerase), v)dNTPs(사전 혼합형 또는 분리 공급형)를 필수적으로 포함하고 총부피를 조절하기 위한 물 등 기타 필요시약을 포함할 수 있다.

따라서, 본 발명은 상기와 같이 B1 영역의 메틸화 정도를 측정 및 분석하는 방법 및 키트를 제공함으로써 암세포의 발견, 사멸 및 증식과 같은 암세포의 치료 진행 정도를 간접 및 직접적으로 진단하는 것이 가능하게 하고 이는 임상 실험에도 이용될 수 있어 산업적으로 유용하게 이용될 수 있다.

본 발명은 다음의 실시예 및 실험예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이에 의해 제한되지는 않는다.

참고예 1. 조직으로부터 DNA 분리

(주) 샘타코(Samtako ; Osan, Gyunggi-Do, Korea)에서 구입한 8주된 수컷 ICR 마우스에서 고환을 떼어낸 후, 30mg씩 나누어서 액체질소에서 급속 냉동시킨 다음 막자로 잘게 부수고 다시 분쇄기를 이용하여 입자가 보이지 않을 정도로 간 후, 키트(PUREGENETM Cell and Tissue kit. ; Gentra, Minneapolis, USA)를 사용하여 gDNA 를 추출하였다.

참고예 2. 세포로부터 DNA 분리

마우스의 상피세포인 NIH3T3를 5%의 이산화탄소, 37℃의 배양온도로 10% FBS, 1% 항생제를 포함한 DMEM 배지(100 파이 컬처디쉬)에서 2일에 한번씩 계대배양하여 세포밀도가 약 50%에 도달했을 때, 배지를 버리고 PBS로 세척한 다음, 트립신(trypsin)으로 부착된 세포를 떼어내어 세포를 수확(harvest)하여 키트(PUREGENETM Cell and Tissue kit. ; Gentra, Minneapolis, USA)를 사용하여 gDNA 를 추출하였다.

실험예 1. DNA 메틸화 측정

실험예 1-1. 중아황산염이 처리된 B1 서열의 준비 단계

참고예 1에서 준비한 gDNA에 키트(CpGenomeTM DNA modification kit. ; CHEMICON, Temecula, USA)를 이용하여 중아황산염(Bisulfite ; Sigma)을 처리한 후, 바이오니어(bioneer)사를 통해 제작한 프라이머(primer)로 당업계에서 통상적으로 이용되는 PCR(polymerase Chain reaction) 방법을 이용하여 참고예 1의 B1 서열을 증폭하였다. 이 때, 변성

(Denature) 과정은 약 95°C의 온도에서 2분, 아닐링(annealing) 과정은 약 56°C의 온도에서 90초, 신장(extention) 과정은 약 72°C의 온도에서 2분 동안 실시하고 이 과정을 40회 반복하였다. PCR 생산물(product)의 총부피는 25ul 로 하였으며 사용한 폴리머라아제(polymerase)는 AmpliTaq GoldTM(Applied Biosystem, Roche)을 이용하였다.

본 실험에 사용한 정방향 프라이머(forward primer)는 하기와 같다.

5'-GGTGGTGGTGGTGGTTGAGATAG-3'

사용한 역방향 프라이머(reverse primer)는 하기와 같다.

5'-AATAACACACACCTTTAATCCCAACACT-3'

실험예 1-2. MSP (Methylation specific PCR) 의 수행 단계

참고문헌(Yang A.S. et al, *Nucleic Acids Res.*, 32, p e38, 2004)에 기재된 MSP (Methylation specific PCR) 법을 변형하여 메틸화를 측정하였다.

바이오니어(bioneer)를 통해 제작한 프라이머(primer)로 당업계에서 통상적으로 이용되는 PCR(polymerase Chain reaction) 방법을 이용하여 B1 서열을 증폭하였다. 이 때, 변성(Denature) 과정은 약 94°C의 온도에서 1분, 아닐링(annealing) 과정은 약 53°C의 온도에서 1분, 신장(extention) 과정은 약 72°C의 온도에서 1분 동안 실시하고 이 과정을 30회 반복하였다. PCR 생산물(product)의 총부피는 25ul 로 하였으며 사용한 폴리머라아제(polymerase)는 AmpliTaq GoldTM(Applied Biosystem, Roche)를 이용하였다.

비메틸화 정방향 프라이머(unmethyl forward primer)는 하기와 같다.

5'-TAACCTCAAACCTCAAAAATCCACC-3'

비메틸화 역방향 프라이머(unmethyl reverse primer)는 하기와 같다.

5'-GTTGGGTGTAGTGGTATATATTTTTAATTTTA-3'

메틸화 정방향 프라이머(methyl forward primer)는 하기와 같다.

5'-CTCGAACTCAAAAATCCGCC-3'

메틸화 역방향 프라이머(methyl reverse primer)는 하기와 같다.

5'-GTCGGGCGTAGTGGTATATATTTTT-3'

보다 체계적으로 메틸화 정도를 확인하기 위해 B1 영역의 특정 CpG를 CpG-1, CpG-2로 지정하여 실험을 수행하였다(도 1 참조). B1 영역의 CpG-1 부분의 시퀀싱 프라이머(Sequencing primer)는 하기와 같다.

5'-TGGTGGTGGTTGAGA-3'

B1 영역의 CpG-2 부분의 시퀀싱 프라이머(Sequencing primer)는 하기와 같다.

5'-TTTGTAGATTAGGTTGGTTT-3'

상기 실험을 수행한 결과, 메틸화된 B1 서열 및 메틸화되지 않은 B1 서열이 모두 존재함을 확인할 수 있었다(도 2 참조).

실험예 1-3. 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)법의 수행 단계

PSQ 96MA 시스템(Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden)을 이용하여 자동적으로 시퀀싱(sequencing)을 하여 메틸화 백분율을 측정하였다.

본 발명에서 사용한 메틸화 백분율은 하기 수학적 식 1과 같이 계산되었다.

수학적 식 1

$$\text{메틸화 백분율} = \text{cytosine(C)} / (\text{cytosine (C)} + \text{thymine (T)}) \times 100$$

상기 실험을 수행한 결과, B1 영역의 CpG-1 부분의 메틸화 백분율은 8.4%(도 3a 참조), B1 영역의 CpG-2 부분의 메틸화 백분율은 9.2%(도 3b 참조)로 나타났다.

실험예 2. 5-아자시티딘의 항암활성 측정

상기 참고예 2와 같이 배양한 마우스 상피세포 NIH3T3 에 5-아자시티딘(5-Azacytidine)을 5ng, 7.5ng, 15ng, 30ng, 50ng 의 농도로 처리하고 24시간 동안 방치한 후, gDNA를 분리하고 실험예 1-1 내지 1-3과 같은 방법으로 MSP (Methylation specific PCR) 및 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 동일하게 수행하였다.

실험예 1-2와 같은 방법으로 MSP(Methylation specific PCR)를 수행하여 5-아자시티딘(5-Azacytidine)의 농도가 증가함에 따라 메틸화 비율이 감소하는 패턴을 확인하였다(도 4 참조).

또한, 이러한 비율의 좀더 정확한 값을 알기 위하여 실험예 1-3과 같은 방법으로 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하여 메틸화 백분율(Methylation percentages)을 측정하였는데 5-아자시티딘(5-Azacytidine)을 처리하지 않은 세포와 50ng 을 처리한 세포를 비교해보면 5-아자시티딘(5-Azacytidine)을 처리한 세포가 현저하게 메틸화 백분율이 감소함을 확인할 수 있다(도 5 참조).

실험의 유효성 및 반복재현성을 검증하기 위해서 5ng, 7.5ng, 15ng, 30ng, 50ng으로 농도를 달리하여 5-아자시티딘(5-Azacytidine)을 처리한 실험을 각각 세 번 반복하여 평균값을 계산하였다.

상기 실험을 수행한 결과, 5-아자시티딘(5-Azacytidine)의 농도에 따라 DNA 메틸화 백분율이 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있다(도 6 참조). 또한, 5-아자시티딘(5-Azacytidine)을 처리하지 않은 세포의 메틸화 백분율과 비교해보면, 15ng 및 30ng 를 처리한 경우에는 메틸화 백분율이 50%이상이 감소함을 확인할 수 있다(도 7 참조). 이에 따라, 5-아자시티딘(5-Azacytidine)을 처리하면 암억제유전자의 메틸화가 저해되어 암 발생을 억제함은 물론, 동시에 본 메틸화 측정방법이 유효하고 확실함을 확인할 수 있다.

따라서 본 발명의 항암제의 항암활성 측정법은 항암제의 효능 검증을 간편하게 하여 항암제 개발에 유용하게 이용될 수 있고 항암치료의 경과를 정확하고 신속하게 진단하는 방법을 제공함을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

본 발명의 B1 서열(B1 element)을 이용한 DNA 메틸화(methylation) 측정 방법 및 이를 이용한 항암제의 항암활성 측정법은 항암제의 효능 검증을 간편하게 하여 항암제 개발에 유용하게 이용될 수 있고 항암치료의 경과를 정확하고 신속하게 진단하여 다양한 치료법의 적절한 활용을 가능하게 하며 항암치료를 위한 표적 유전자의 검색 및 유전자의 발현조절과 관련된 다양한 질환의 치료법의 개발을 용이하게 할 것이다. 또한, 아직 알려지지 않은 후천적으로 획득한 형질의 유전현상을 설명하는 기작을 밝혀내는 연구에 핵심적인 도구(tool)로 이용되어 생물의 진화 및 적응과 관련된 연구의 빠른 진척에 크게 기여할 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 B1 영역(B1 element) 내에서의 CpG-1, CpG-2 및 각종 프라이머(primer)를 나타내는 도이고,

도 2는 마우스(mouse) 조직의 B1 영역을 이용하여 MSP(methylation specific PCR)를 수행하여 메틸화 유무를 조사한 도이며,

도 3a는 마우스 조직의 B1 영역 중 CpG-1의 파이로시퀀싱(pyrosequencing) 결과를 나타낸 도이며,

도 3b는 마우스 조직의 B1 영역 중 CpG-2의 파이로시퀀싱(pyrosequencing) 결과를 나타낸 도이며,

도 4는 5-아자시티딘(5-Azacytidine)을 처리한 마우스 세포의 B1 영역을 이용하여 MSP(methylation specific PCR)를 수행하여 메틸화 유무를 조사한 도이며,

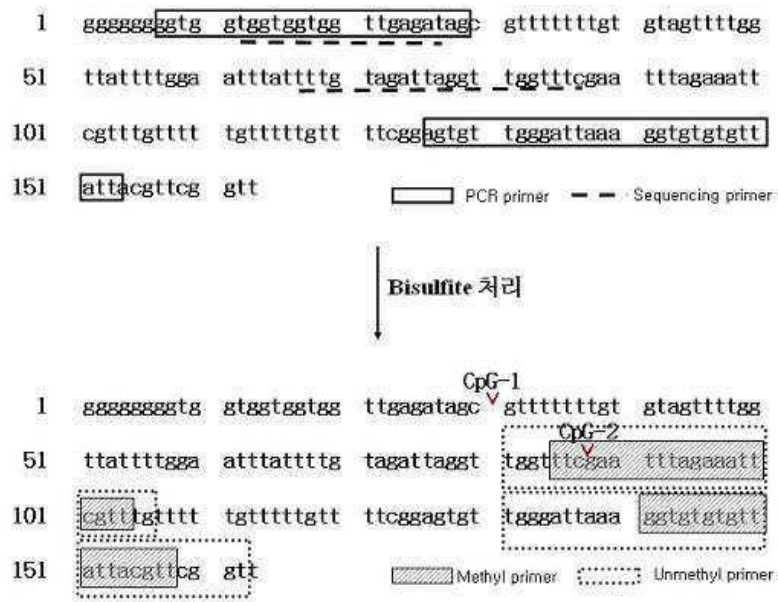
도 5는 5-아자시티딘을 처리한 마우스 세포의 B1 영역의 파이로시퀀싱(pyrosequencing) 결과를 나타낸 도이며,

도 6은 5-아자시티딘의 농도에 따른 DNA 메틸화 백분율을 나타낸 도이며,

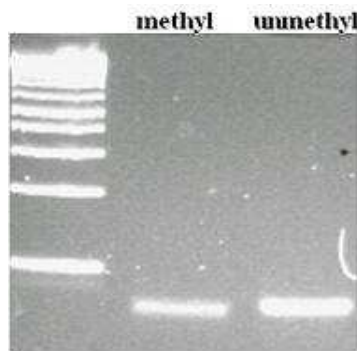
도 7은 5-아자시티딘을 처리하지 않은 세포와 처리한 세포의 메틸화 백분율을 비교한 도이다.

도면

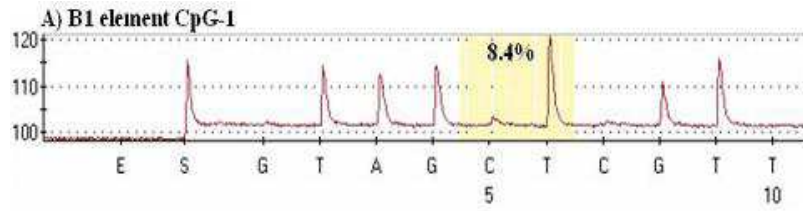
도면1



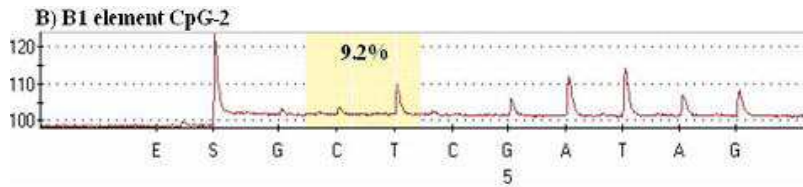
도면2



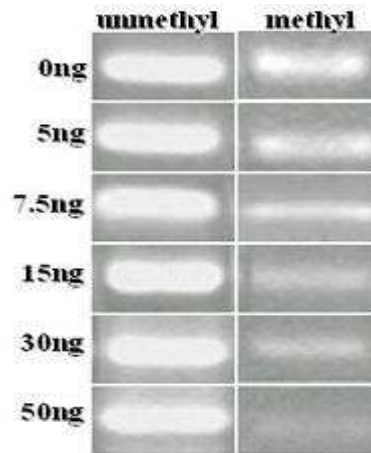
도면3a



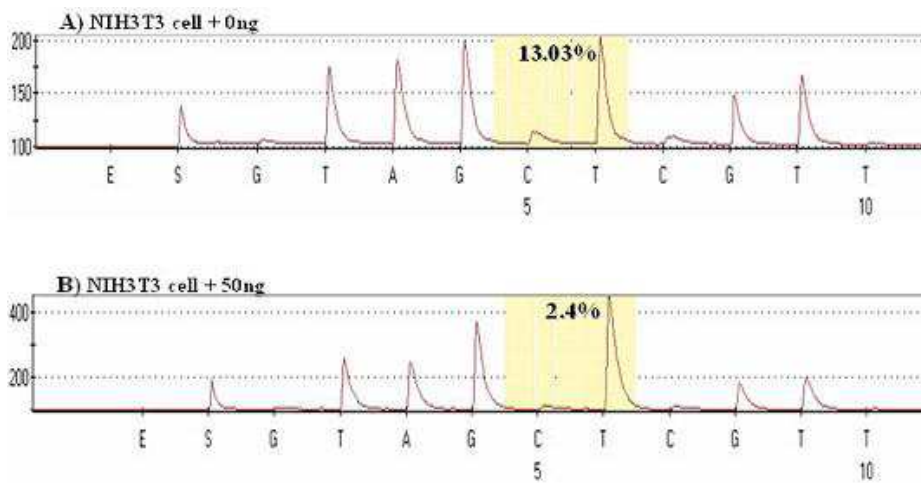
도면3b



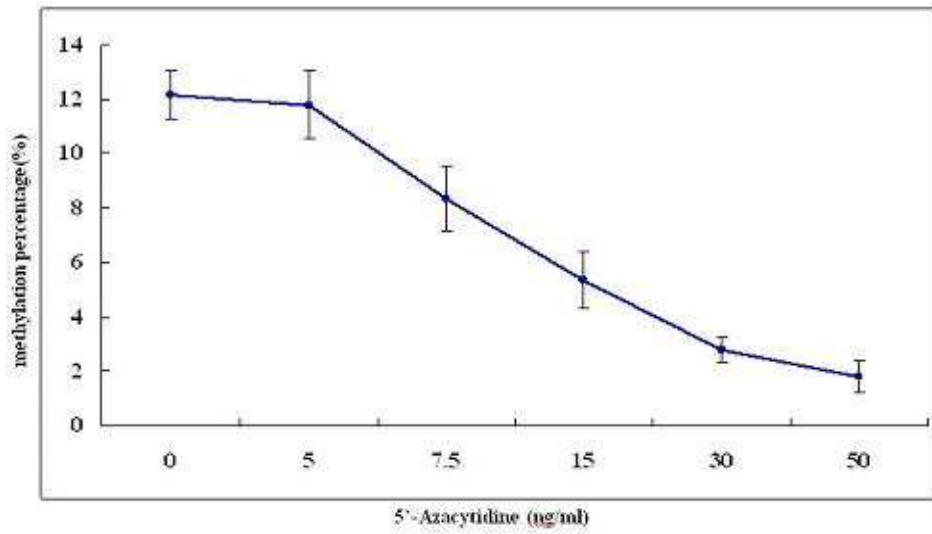
도면4



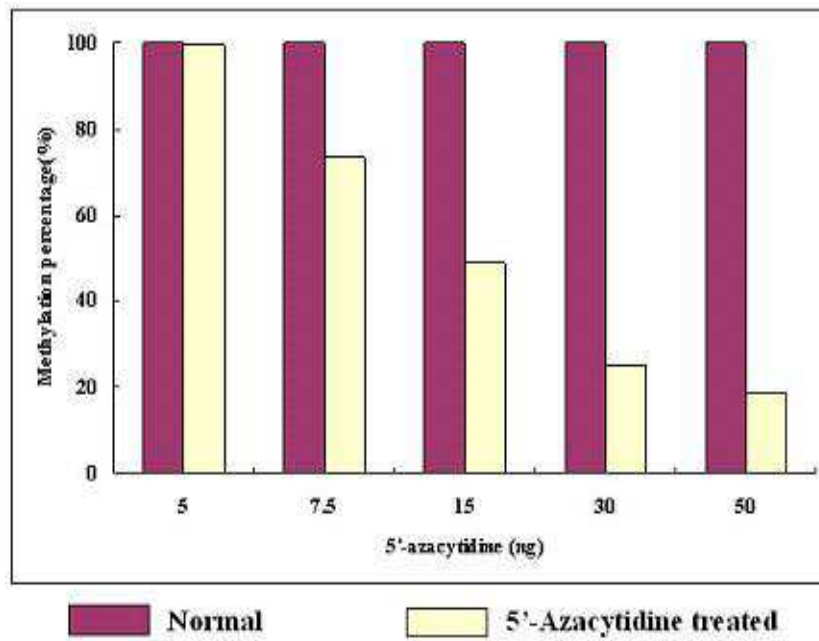
도면5



도면6



도면7



서열목록

서열목록 전자파일 첨부