



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년08월22일
 (11) 등록번호 10-1649591
 (24) 등록일자 2016년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0195946
 (22) 출원일자 2014년12월31일
 심사청구일자 2014년12월31일
 (65) 공개번호 10-2016-0083623
 (43) 공개일자 2016년07월12일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR101244436 B1
 KR1020100035404 A
 US20030119043 A1
 KR101208051 B1

(73) 특허권자
 원광대학교산학협력단
 전라북도 익산시 익산대로 460 (신동)
 광주과학기술원
 광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동)
 (72) 발명자
 박도심
 전라북도 익산시 무왕로 895 원광대학병원 진단검사의학과
 전창덕
 광주광역시 북구 첨단과기로 261 오룡동 광주과학기술원
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 이원희

전체 청구항 수 : 총 10 항

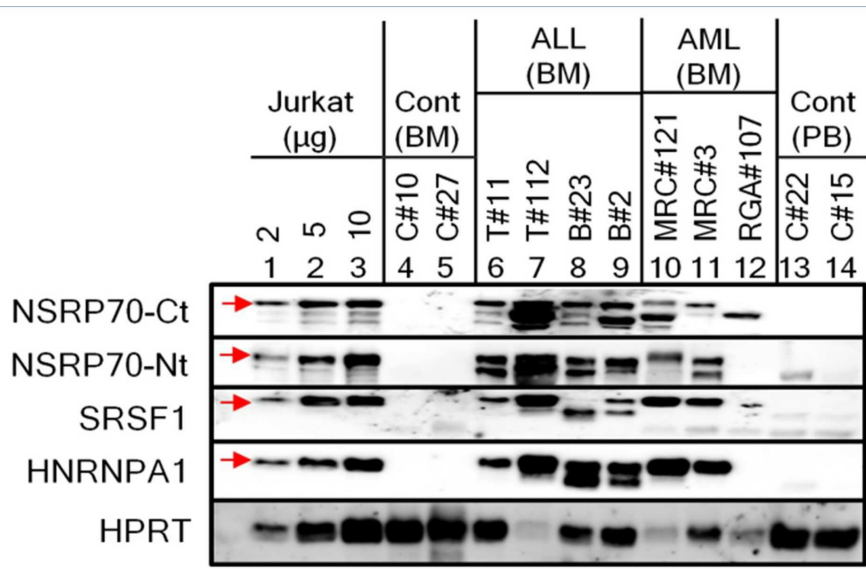
심사관 : 기광용

(54) 발명의 명칭 **신규 급성백혈병의 진단용 마커**

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 바이오마커를 이용한 급성 백혈병의 진단 키트에 관한 것으로, 구체적으로 급성백혈병환자 그룹의 골수에서 NSRP70의 단백질 농도가 현저히 높게 나타나고 항암치료후에는 다시 그 발현량이 줄어드는 것을 확인함으로써, 상기 NSRP70 단백질을 급성백혈병의 진단 및 치료제 스크리닝에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박무림

전라북도 익산시 무왕로 21길 64 리젠시빌 아파트
501동 406호

김학렬

전라북도 익산시 고봉로34길 5-2 104동 1002호 (영등동, 우남샘물타운아파트)

최단비

전라북도 익산시 인북로9길 19 101동 905호 (남중동, 신일아파트)

윤권하

전라북도 익산시 무왕로 895 원광대학병원 영상의학과

박래길

전라북도 익산시 뒤란길 55

채수천

전라북도 익산시 익산대로 460 원광대학교 의과대학 병리학교실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012R1A1A2021866

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 T립프구의 활성화 분화에 미치는 신규 alternative splicing factor인 NSrp70의 기능 규명

기여율 25/100

주관기관 원광대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012R1A1A2041914

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 암복결핵 발병 차단을 위한 항결핵 면역기전 규명: 면역시냅스 및 관련단백의 질환제어 및 바이오마커로서의 유용성

기여율 25/100

주관기관 원광대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110030130

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신도연구센터 지원사업 기초의과학분야(MRC)

연구과제명 MRC-대사기능제어 연구센터

기여율 25/100

주관기관 원광대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.07 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C0110

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건사업진흥원

연구사업명 질환극복 기술개발사업

연구과제명 X선 영상응용 폐질환 진단기술개발

기여율 25/100

주관기관 원광대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2017.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

NSRP70(nuclear speckle-related protein 70)의 단백질 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 급성백혈병(acute leukemia, AL) 진단 키트.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 NSRP70 단백질 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 NSRP70 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 급성백혈병(acute leukemia, AL) 진단 키트.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 급성 백혈병은 급성골수성백혈병(acute myeloid leukemia, AML) 또는 급성림프구성백혈병(acute lymphoblastic leukemia, ALL)인 것을 특징으로 하는 급성백혈병(acute leukemia, AL) 진단 키트.

청구항 4

- 1) 생물학적 시료로부터 NSRP70(nuclear speckle-related protein 70)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 NSRP70의 발현 수준이 정상 대조군에 비해 증가한 경우, 급성백혈병(acute leukemia, AL)에 걸릴 위험이 높거나 급성백혈병에 걸린 개체로 판정하는 단계를 포함하는, 급성백혈병 진단의 정보를 제공하기 위한 NSRP70의 단백질 발현 수준의 측정방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 단계 1)의 생물학적 시료는 골수, 혈청, 혈장 및 혈액으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 NSRP70의 단백질 발현 수준의 측정방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 단계 1)의 NSRP70 단백질 발현 수준 측정은 NSRP70 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것을 특징으로 하는 NSRP70의 단백질 발현 수준의 측정방법.

청구항 7

- 1) 급성백혈병 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 세포주에서 NSRP70 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 NSRP70의 단백질 발현 수준을 무처리 대조군에 비해 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 급성백혈병 치료제 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 단계 2)에서 NSRP70의 단백질 발현 수준 측정은 면역형광법, 질량분석법, 단백질 칩, 웨스턴 블롯 및 ELISA로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 급성백혈병 치료제 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 9

최고분자량 NSRP70(hi-nuclear speckle-related protein 70)의 단백질 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 급성골수성백혈병(acute leukemia, AL)의 예후 모니터링 키트.

청구항 10

- 1) 생물학적 시료로부터 최고분자량 NSRP70(hi-NSRP70)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 최고분자량 NSRP70의 발현 수준에 따라, 급성골수성백혈병의 예후를 모니터링하는 단계를 포함하는, 급성골수성백혈병의 예후를 모니터링하기 위한 최고분자량 NSRP70의 단백질 발현 수준의 측정방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오마커를 이용한 급성백혈병의 진단 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] pre-mRNA의 선택적 스플라이싱(alternative splicing)은 단백질의 다양성을

[0003] 관련되어 있는 주요한 전사후 조절 기전이다. 상기 스플라이싱을 매개하는 전사 인자(splicing factor, SF)와 종양 질환의 상호 관계는 다양한 연구를 통해 규명되어 왔다(Venables JP, Cancer Res, 2004;64:7647-54).

[0004] SF 유전자의 돌연변이는 백혈병 발생(leukemogenesis)의 신규한 경로로 생각되고 있다(Maciejewski JP et al., Br J Haematol, 2012;158:165-73). 그러나 SF 유전자의 돌연변이 발생빈도는 급성백혈병(acute leukemia,AL)에서 상대적으로 낮음(약 6%)에도 불구하고, 비정상적인 스플라이싱 변이산물이 고빈도로 (예:CD13 >64%, 계놈 전체 ~29%) 관찰된다는 연구결과(Adamia S et al., Clin Cancer Res, 2014;20:1135-45; Yokota A et al., Hematol Oncol 1998;16:131-41)는 비정상적인 스플라이싱 변이산물이 SF 유전자 자체의 돌연변이와는 다른 기전에 의해 생성될 수 있음을 시사한다.

[0005] Serine/arginine-rich (SR) SF1 (SRSF1)은 원종양형성 유전자특성을 가지는 전형적 SR(세린아르기닌)단백질로써, CD44와 FAS 단백질의 스플라이싱을 조절하는 것으로 알려져 있다(Galiana-Arnoux D et al., J Biol Chem, 2003;278:32943-53; Clery A et al., Proc Natl Acad Sci U S A2013;110:E2802-11). CD44 와 FAS 단백질의 비정상적인 스플라이싱 산물은 종양세포 사멸을 억제하며 종양의 진행을 유도한다.

[0006] Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRNPA1)은 가장 풍부한 HNRNP들 중 하나으로써, SRSF1의 특정한 엑손에 대한 선택적 스플라이싱에 있어 대표적인 길항작용 조절자로서 보고되었다(예, HNRNPA1은 FAS 유전자의 스플라이싱에 있어서 6번 엑손을 포함하는, SRSF1는 이를 제외한 mRNA를 형성한다). 현재까지HNRNPA1은 유방암, 폐암, 교아세포종과 같은 고형성 종양에서 발현이 증가되어 있음이 알려져 있다(Jean-Philippe J et al.,Int J Mol Sci 2013;14:18999-9024; David CJ et al., Nature2010;463:364-8).

[0007] Nuclear speckle-related protein 70 (NSRP70)은 SR-관련단백질(전형적인 SR 단백질과 달리 RNA 결합 도메인이 없거나 다른 RNA 결합 도메인을 가진다.)로써 SRSF1과 상호작용하며, NSRP70 또한 CD44와 FAS의 스플라이싱을 조절한다. 특히, CD44 엑손 v5의 선택적 스플라이싱에 있어 NSRP70 와 HNRNPA1 반대의 작용을 한다. 현재까지,

특정질환에서 NSRP70 단백질 발현양이 변화하였다는 확립된 보고는 없다.

[0008] 특정 질환에서 비정상적인 발현양상을 보이는 유전자를 동정하는 것은 각각의 질환에 대한 보다 정확하고 정밀한 진단과 새로운 치료 표적의 개발을 가능하게 한다. 본 발명자들은 특히 급성 백혈병에 있어 상기 유전자의 발현 수준을 조사한 결과, 그 단백질 발현 수준이 증가되어 있음을 확인하여 급성 백혈병 진단용 마커 및 진단 방법에 유용하게 이용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 NSRP70(nuclear speckle-related protein 70)의 단백질 발현수준을 측정하는 체제를 포함하는 급성 백혈병(acute leukemia, AL) 진단 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 NSRP70(nuclear speckle-related protein 70)의 단백질 발현수준을 측정하는 체제를 포함하는 급성 백혈병(acute leukemia, AL) 진단 키트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 1) 생물학적 시료로부터 NSRP70(nuclear speckle-related protein 70)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및 2) 상기 단계 1)의 NSRP70의 발현 수준이 정상 대조군에 비해 증가한 경우, 급성 백혈병(acute leukemia, AL)에 걸릴 위험이 높거나 급성 백혈병에 걸린 개체로 판정하는 단계를 포함하는, 급성 백혈병 진단의 정보를 제공하기 위한 NSRP70의 단백질 발현 수준의 측정방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 1) 급성백혈병 세포주에 피검물질을 처리하는 단계; 2) 상기 단계 1)의 세포주에서 NSRP70 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 3) 상기 단계 2)의 NSRP70의 단백질 발현 수준을 무처리 대조군에 비해 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 급성 백혈병 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 최고분자량 NSRP70(hi-nuclear speckle-related protein 70)의 단백질 발현수준을 측정하는 체제를 포함하는 급성골수성백혈병(acute leukemia, AL)의 예후 모니터링 키트를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 1) 생물학적 시료로부터 최고분자량 NSRP70(hi-NSRP70)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0015] 2) 상기 단계 1)의 최고분자량 NSRP70의 발현 수준에 따라, 급성골수성백혈병의 예후를 모니터링하는 단계를 포함하는, 급성골수성백혈병의 예후를 모니터링하기 위한 최고분자량 NSRP70의 단백질 발현 수준의 측정방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 급성 백혈병에 걸린 환자의 골수에서 NSRP70의 단백질 발현이 증가해 있는 것을 확인하고 이에 대한 급성 백혈병 진단용 바이오마커를 제공함으로써, 향후 급성백혈병을 신속하게 진단, 이를 토대로 치료할 기반을 제공하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 항암 치료 후 완전관해 상태에서 NSRP70 단백질의 발현이 사라지는 것을 확인함으로써, 급성 백혈병의 치료제 스크리닝 방법에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017]

도 1은 급성백혈병환자그룹 및 대조군의 골수(BM, bone marrow) 및 말초혈(PB, peripheral blood)로부터 유래한 단핵구에서 SF 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 조사한 도이다.

도 2는 상기 도 1의 분석 결과로부터 HPRT의 발현량을 기준으로 하여 각 SF 단백질의 상대적 발현량을 도식화하여 나타낸 도이다;

막대는 상대적 단백질 발현량의 중앙값을 의미하며, 25백분위수 및 75백분위수 값은 검정색의 굵은 가로선으로 나타내었다. 청색 점선은 급성백혈병그룹과 대조군을 가장 잘 구별하는 값(cut-off)을 의미하며, 해당 단백질 발현값이 cut-off 값보다 더 높은 경우 비정상 SFP(Abe-SFP, aberrant splicing factor)로 정의한다. * $p < 0.001$, 대조군(control)과 급성백혈병(AL)비교; $p < 0.01$, 대조말초혈(PB)과 급성림프구성백혈병(ALL) 비교; $p < 0.001$, 대조골수(BM)와 급성림프구성백혈병 비교; $p < 0.05$, 대조말초혈과 급성골수구성백혈병(AML) 비교; $p < 0.01$, 대조말초혈과 대조골수 비교; $p < 0.05$, 대조골수와 급성골수성백혈병 비교; # $p < 0.01$, 급성림프구성백혈병과 급성골수성백혈병 비교.

도 3은 급성백혈병세포주에서 SF 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 조사한 도이다.

도 4는 급성백혈병환자 및 대조군의 세포, 및 급성백혈병세포주에서 SF 단백질 발현을 면역형광분석방법으로 조사한 도이다;

각 패널의 아래쪽 사진은 위쪽 사진과 DAPI(4,6 diamidino-2-phenylindole)로 세포핵을 염색한 것을 결합한 것이다. NSRP70은 2종의 항체로 면역형광염색 (anti-NSRP70-Ct 와 anti-NSRP70-Nt) 분석을 수행하였다.

도 5는 상기 도 4의 결과로부터 상대적 SF 발현량을 도식화하여 나타낸 도이다;

막대는 각 그룹의 중앙값을, 굵은 검정 가로선은 25백분위수와 75백분위수를 나타낸다. * $p < 0.01$, 대조군 [8종의 골수단핵구 (BMDCs) 와 11종의 말초혈 (PB) 단핵구]과 림프모세포세포주 (LCL) 비교; † $p < 0.01$, 대조군과 급성백혈병 (AL) 세포주 (HL60, THP-1, K562, and Jurkat)와 비교; ‡ $p < 0.01$, 대조군과 비정상 SFPs (Abe-SFPs)를 가진 급성백혈병 환자. 검정점선 부위의 ns 는 모든 그룹들이 유의하게 다르지 않음을 의미한다.

도 6은 급성백혈병환자그룹 및 대조군의 단핵구 및 급성백혈병세포주에서 SF 유전자들의 mRNA 발현량을 조사하여 도식화하여 나타낸 도이다;

도 7은 급성백혈병 환자 유래 골수단핵구, 림프모세포에서 SF 단백질들의 탈인산화여부 및 이로 인한 단백질 발현량을 나타낸 도이다.

도 8은 항암치료 전후 급성백혈병환자 유래 세포에서 SF 단백질의 발현 변화를 나타낸 도이다;

ND(newly diagnosed), CR(completely remitted).

도 9는 급성백혈병환자그룹에서 질환의 예후 정도에 따른 비정상 최고분자량-SF 단백질(Abe-hi-SFP, aberrant splicing factor protein)의 빈도를 나타낸 도이다;

Fav(경증, favorable), Int(중등도, intermediate), Adv(악성, adverse)

ns(not significant).

도 10은 급성백혈병환자그룹에서 질환의 예후 정도에 따른 비정상 총-SF 단백질의 빈도(Abe-sum-SFP, aberrant splicing factor protein)의 빈도를 나타낸 도이다.

Fav(경증, favorable), Int(중등도, intermediate), Adv(악성, adverse)

ns(not significant).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019]

본 발명은 NSRP70(nuclear speckle-related protein 70)의 단백질 발현수준을 측정하는 체제를 포함하는 급성

백혈병(acute leukemia, AL) 진단 키트를 제공한다.

- [0020] 상기 NSRP70 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 키트는 ELISA(Enzyme-linked immnosorbent assay) 키트, 샌드위치 ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid)키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring)키트 등이 있으며, 이에 한정되지 않고, 단백질에 결합하는 방식을 이용한다면 당업자에게 알려진 모든 공지의 방법을 통해 이루어질 수 있다.
- [0021] 상기 키트는 NSRP70 표준 항원을 포함하는 양성 대조군과 상기 항원이 주입되지 않은 동물의 항혈청을 포함하는 음성 대조군을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0022] 상기 NSRP70 단백질 발현 수준을 측정하는 체제는 상기 NSRP70 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 항체는 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체를 모두 이용가능하다. 또한 상기 키트는 추가로 상기 NSRP70 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체에 특이적으로 결합하는 검출체를 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 급성 백혈병은 급성골수성백혈병(acute myeloid leukemia, AML) 또는 급성림프구성백혈병(acute lymphoblastic leukemia, ALL)일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 백혈병(leukemia)은 백혈구가 종양성으로 증식하는 질환을 총칭하는데, 급성 백혈병은 비교적 초기단계의 조혈 과정에서 분화를 시작하는 골수계 모세포의 변이로 유발되며 병의 임상 경과가 빨라 신속한 진단 및 치료가 필수적이다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 급성백혈병 환자의 경우 웨스턴 블롯 및 면역형광염색분석에서 대조군에 비해 NSRP70 단백질의 발현량이 증가해 있고(도 1 내지 도 5), 그 단백질의 발현량의 증가는 mRNA 수준이 아닌 인산화가 관련됨을 확인할 수 있었다(도 6 내지 도 7).
- [0026] 따라서, NSRP70 단백질의 발현을 측정하는 체제를 급성백혈병의 진단용 키트에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은
- [0028] 1) 생물학적 시료로부터 NSRP70(nuclear speckle-related protein 70)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0029] 2) 상기 단계 1)의 NSRP70의 발현 수준이 정상 대조군에 비해 증가한 경우, 급성 백혈병(acute leukemia, AL)에 걸릴 위험이 높거나 급성 백혈병에 걸린 개체로 판정하는 단계를 포함하는, 급성 백혈병 진단의 정보를 제공하기 위한 NSRP70의 단백질 발현 수준의 측정방법을 제공한다.
- [0030] 상기 단계 1)의 생물학적 시료는 골수, 혈청, 혈장 및 혈액으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 상기 단계 1)의 NSRP70 단백질 발현 수준 측정은 NSRP70 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 항체는 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체를 모두 이용가능하다.
- [0032] 상기 단계 1)의 NSRP70의 단백질 발현 수준 측정은 면역형광법, 질량분석법, 단백질 칩, 웨스턴 블랏 및 ELISA로 구성된 군으로부터 선택되는 방법일 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 모든 단백질 발현 수준 측정 방법일 수 있다.
- [0033] 상기 급성 백혈병은 급성골수성백혈병(acute myeloid leukemia, AML) 또는 급성림프구성백혈병(acute lymphoblastic leukemia, ALL)일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0034] 본 발명자들은 급성 백혈병 환자의 경우 대조군에 비해 NSRP70 단백질의 발현량이 증가해 있는 것을 확인함으로써, NSRP70 단백질의 발현을 측정하는 방법을 급성 백혈병의 진단에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은

- [0036] 1) 급성백혈병 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0037] 2) 상기 단계 1)의 세포주에서 NSRP70 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0038] 3) 상기 단계 2)의 NSRP70의 단백질 발현 수준을 무처리 대조군에 비해 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 급성 백혈병 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0039] 상기 단계 2)에서 NSRP70의 단백질 발현 수준 측정은 면역형광법, 질량분석법, 단백질 칩, 웨스턴 블랏 및 ELISA로 구성된 군으로부터 선택되는 방법일 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 모든 단백질 발현 수준 측정 방법일 수 있다.
- [0040] 본 발명자들은 급성 백혈병 환자에서 항암 치료 후 완전관해 상태에서 증가해 있던 NSRP70 단백질의 발현이 사라지는 것을 확인함으로써, 이를 급성 백혈병의 치료제 스크리닝 방법에 유용하게 이용할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은 최고분자량 NSRP70(hi-nuclear speckle-related protein 70)의 단백질 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 급성골수성백혈병(acute leukemia, AL)의 예후 모니터링 키트 및 1) 생물학적 시료로부터 최고분자량 NSRP70(hi-NSRP70)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0042] 2) 상기 단계 1)의 최고분자량 NSRP70의 발현 수준에 따라, 급성골수성백혈병의 예후를 모니터링하는 단계를 포함하는, 급성골수성백혈병의 예후를 모니터링하기 위한 최고분자량 NSRP70의 단백질 발현 수준의 측정방법을 제공한다.
- [0043] 상기 최고분자량 NSRP70 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 키트는 ELISA(Enzyme-linked immnosorbent assay) 키트, 샌드위치 ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid)키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring)키트 등이 있으며, 이에 한정되지 않고, 단백질에 결합하는 방식을 이용한다면 당업자에게 알려진 모든 공지的方法을 통해 이루어질 수 있다.
- [0044] 상기 키트는 NSRP70 표준 항원을 포함하는 양성 대조군과 상기 항원이 주입되지 않은 동물의 항혈청을 포함하는 음성 대조군을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 최고분자량 NSRP70 단백질 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 최고분자량 NSRP70 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 항체는 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체를 모두 이용 가능하다. 또한 상기 키트는 추가로 상기 최고분자량 NSRP70 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체에 특이적으로 결합하는 검출체를 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 단계 2)에서 최고분자량 NSRP70의 단백질 발현 수준 측정은 면역형광법, 질량분석법, 단백질 칩, 웨스턴 블랏 및 ELISA로 구성된 군으로부터 선택되는 방법일 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 모든 단백질 발현 수준 측정 방법일 수 있다.
- [0047] 본 발명자들은 Abe-hi-NSRP70(비정상적-최고분자량-NSRP70)의 빈도가 급성골수성백혈병 예후 그룹간에 악성(adverse, 57%, 4/7), 중등도(intermediate, 17?21%, 4/24~5/24), 양호(favorable 6%, 1/17) 순서대로 높은 것을 확인함으로써, 최고분자량 NSRP70의 발현을 측정하는 제제를 급성골수성백혈병(acute leukemia, AL)의 예후 모니터링 키트에 및, 그 발현측정방법을 발현급성골수성백혈병의 예후 모니터링에 유용하게 이용할 수 있다.
- [0048] 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0049] 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0050] <실시예 1> 급성백혈병환자그룹과 대조군 그룹의 구성과 임상적 특성의 분석
- [0051] 급성백혈병 환자와 대조군 그룹간의 기본적인 임상적 특성을 확인하기 위하여, 71명의 급성백혈병 환자와 116명의 급성백혈병이 없는 (non-acute leukemic patient 또는 정상인) 성인으로부터 총 187검체 (골수천자흡입액 검체 116개와 말초혈 검체 40개)가 원광대학병원과 전남대학교 병원으로부터 획득되었다.
- [0052] 모든 급성백혈병환자의 검체의 초기 검체는 치료 전 초기 급성백혈병 진단 시 획득되었다. 이들 급성백혈병환자

들은 급성백혈병 외에 다른 혈액질환이나 증양이 없었고, 이에 대한 치료를 받은 병력이 없었다. 비백혈병 검체 (116개)는 비중양성 질환, 골수침범이 없는 림프선종, 급성백혈병이 아닌 골수성 신생물 환자 및 특이질환이 없는 건강한 성인의 말초혈에서 얻어졌으며, 이전의 2주간 특정 증상이나 약물치료 병력이 없었다. 모든 참여자는 헬싱키 선언에 따라 기록된 연구정보를 얻었고, 관련 연구내용은 기관윤리위원회의 심의를 거쳐 승인되었다.

[0053] 표 1의 결과로부터 대조군으로 사용된 급성백혈병이 아닌 모든 검체는 급성백혈병 환자와 달리 말초혈과 골수천자액에서 모세포(blast) 수가 5% 미만이었으며, 건강인과 유사한 정상적인 총혈액세포수와 백혈구 감별수를 가지고 있음을 확인하였다.

표 1

[0054]

		AL, (n = 71)			control
Total (n =187)			AML (n = 48)	ALL (n = 23)	(n = 116)
검체 (n)		골수(71)	골수 (48)	골수 (23)	골수(76) ^a , 말초혈(40)
	나이, 중양값(range), 년	54 (1984)	54 (1984)	61 (1975)	53 (1985)
	성별, 남자(%)	34 (48)	24 (50)	10 (43)	59 (51)
	모세포 % (말초 혈), 중양값 (범위)	60 (099)	42 (094)	81 (299)	0 (05)
	모세포 % (골수), 중양값 (범위)	80 (2199)	76 (2198)	90 (3599)	1 (05) ^a
	CD34 ⁺ 세포%세포 (골수), 중양값 (범위)	52 (099)	15 (099)	82 (099)	NA
	혈색소, g/L (범 위)	87 (35149)	87 (35149)	87 (51143)	127 (61170)
	백혈구 10 ³ /(범 위)	22 (0.8173)	15 (0.8113)	44 (6.3173)	6 (0.2316)
	혈소판10 ³ /(범위)	51 (5511)	51 (5511)	53 (10303)	199 (12182)

[0055] AL, 급성백혈병; AML, 급성골수성백혈병; ALL, 급성림프구성백혈병

[0056] a: 76명의 급성백혈병이 아닌 환자에서만 실시하였으며 이들은 구성은 다음과 같다: (1) 급성백혈병이외의 골수 신생물들, n = 27 (만성골수성 백혈병, n = 13; 본태성혈소판증가증, n = 7; 본태성골수섬유화증, n = 1; 만성 골수-단핵구성 백혈병, n = 1; 골수이형성증후군, n = 2; 의미없는 단클론감마글로빈병증, n = 3); (2) 치료된 - or 비골수성 종양, n = 27 (완전 또는 부분 관해된 골수증식성 질환, n = 9; 골수침범이 없는 림프종, n = 18) (3) 비중양성 질환, n = 22 (1차/2차 혈소판감소증, n = 12; 반응성 호산구증가증, n = 4; 재생불량성빈혈, n = 3; 기타, n = 3).

[0057] <실시에 2> 급성백혈병 환자 그룹의 WHO 분류에 따른 급성백혈병의 아형과 이들의 유전자형 및 FAB 아형

[0058] 급성백혈병 그룹은 추가적으로 WHO 분류에 따라 진단하였다.

[0059] 본 연구에서 포함하지 않은 CEBPA(CCAAT/enhancer binding protein α) 유전자를 제외한 AML의 예후 유전 집단 (prognostic genetic group)은 European LeukemiaNet standardized reporting system에 따라 분류하였다. Acute promyelocyte leukemia (급성전골수성 백혈병)은 양성예후유전집단으로 분류하였다. ALL의 예후 유전 집

단은 t(9;22), t(4;11), t(8;14), 복합 핵형 (≥5 비정상들), or 낮은 저이배수체/근접삼배수체에 가까운 염색체 수적이상은 adverse군 (악성예후군)으로 이 외의 악성예후군으로 분류되지 않은 다른 세포유전학적 이상, 정상핵형 및 기타 악성예후군으로 분류되지 않은 세포유전학적 인상은 intermediate (중등도 예후군)으로 분류되었다. ALL의 favorable 군(양호 예후군)은 본 연구에 포함하지 않았다(표 2).

표 2

WHO 범주 (n = 71)	세포 유전학적 이상 n (%)	예후의 유전 그룹 ^a (n)	세포유전학적 및 분자유전학적 기술편 ^b [n]	FAB (n)
반복유전적 이상 관련 급성골수성백혈병 [AML with RGA (n = 17)]	16 (94)	Fav (17)	t(8;21) [5]; t(15;17) [10]; inv(16) [1]; <i>NPM1</i> [1]	M2 (6); M3 (10); M4 (1)
골수이형성 관련 급성골수성백혈병 [AML with MRC (n = 10)]	7 (70)	Adv (6); Int (4)	complex [6]; other [4]	M1 (3); M2 (2); M6 (1); RAEB-t (4)
이외 세포유전 특이 변이 없는 급성골수성 백혈병 AML, NOS (n = 21)	8 (38)	Adv(1); Int (20)	t(6;11) [1]; <i>FLT3</i> [2]; other [18]	M1 (3); M2 (11); M4 (4); M5 (1); M6 (1); undetermined (1)
B ALL, NOS (n = 6)	4 (67)	Int (6)	other [6]	L1 (1); L2 (5)
B ALL with RGA (n = 8)	8 (100)	Adv (7); Int (1)	t(9;22) [7]; t(1;19) [1]	L2 (8)
T ALL (n = 9)	5 (56)	Adv (1); Int (8)	t(9;11) [1]; complex [1]; ; other [7]	L1 (1); L2 (8)

[0060]

[0061]

<실시예 3> 급성백혈병환자그룹과 대조군 그룹에서 웨스턴 블롯을 이용한 SF 단백질 발현 확인

[0062]

급성백혈병 진단용 바이오마커를 발굴하기 위해, 급성백혈병환자그룹과 대조군 그룹의 시료로부터 웨스턴 블롯으로 NSRP70 단백질의 발현정도를 조사하였다.

[0063]

시료로부터 NSRP70 단백질의 발현 정도를 측정하기 위해 급성백혈병환자그룹의 골수 및 급성백혈병이 없는 (non-acute leukemic patient 또는 정상인) 성인대조군의 골수 및 말초혈로부터 단백질을 추출하였다. 구체적으로 모든 골수와 말초혈에서 유래된 단핵구는 피콜(Ficoll)용액으로 원심분리를 이용하여 분리하여 동결액(10% dimethyl sulfoxide, DMSO)을 이용하여 액체질소에 동결한 후 NSRP70을 포함한 SF단백질과 유전자 분석에 사용되었다. 백혈병세포주들은 American Type Culture Collection (K562, HEL 92.1.7, and Kasumi-1)과 CLS Cell Line Service (NB4) 및 한국세포주은행(Jurkat, HL60, THP-1, and Molt-4)에서 각각 구입하였다. 모든 구입한 백혈병세포주들은 8회 이내의 계대배양 후 사용하였다.

[0064]

단백질분리를 위해 RIPA 버퍼 (Rockland, cat. MB-030-0050) 50 µL에 인산완충식염수(phosphate buffered saline)로 세척한 10⁷개의 단핵구를 넣어 40분간 용해 후 원심분리하여(14000 RPM, 15분) 상층액을 얻었다. 추출된 단백질 (90-200 µg) 중 일부(10 µg)를 Jurkat 세포주 단백질(2-5 µg 및 10 µg)과 동시에 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동(120 V, 90분) 후, PVDF(polyvinylidene difluoride: Millipore, Billerica, MA, USA) 막으로 단백질을 이동시켰다. PVDF 막은 5% 탈지분유를 포함한 트리스완충식염수(1x TBST, tris buffered saline + 0.05% tween 20:AMRESCO J640-4L, Sigma-Aldrich Cat P1379)를 이용해 실온에서 1시간 블라킹(blocking)한 후, 3% 탈지분유를 함유한 TBST에서 다음의 1차 항체를 (모든 1차 항체 비율 1:1000으로 혼합, 2시간, 실온) 처리하였다. 2종의 anti-NSRP70 (Sigma-Aldrich: 2종 항체 중 C-말단에 가까운 항원결정기 (epitope)를 인식하는 항체로 검출된 단백질은 NSRP70-Ct로 표기, N-말단에 보다 가까운 항원결정기를 인식하는 항체로 검출된 단백질은 NSRP70-Nt로 표기), anti-SRSF1 (Invitrogen), anti-HNRNP1 및 anti-HPRT(Santa Cruz Biotechnology). 상기 막에 결합한 일차 항체(primary antibody)에 HRP가 접합된 이차 항체를 상온에서 30분 동안 반응시킨 후, 이를 Pierce ECL Western Blotting Substrate(Thermo Scientific, Waltham, MA, US

A)를 첨가하고 화학발광이미지분석장치(Chemi Documentation Imaging System, Cell Biosciences)를 이용하여 확인하였다.

[0065] 그 결과, NSRP70-Nt, NSRP70-Ct, SRSF1 및 HNRNPA1 단백질의 발현량은 대조군에 비해 급성백혈병환자그룹에서 증가해 있음을 확인할 수 있었다(도 1).

[0066] 또한 검출된 각 단백질은 예상 분자량의 매우 근접한 영역에서 여러 개의 밴드를 보였으므로 분자량이 가장 높은 것을 hi-SFP (hi-splicing factor protein: 붉은 화살표, 도1 참조, NSRP70: 73~75 kD, HNRNPA1: 34kD, SRSF1: 33kD)로, sum-SFP는 hi-SFP와 나머지 밴드의 합으로 정의하고. 하우스키핑유전자인 HPRT의 발현량을 이용하여 상대적인 발현량을 조사한 결과, NSRP70-Nt, NSRP70-Ct, SRSF1 및 HNRNPA1의 모든 단백질에 있어서 hi-SFP, sum-SFP는 급성림프구성백혈병 환자그룹에서 대조군에 비해 유의성 있게 높게 나타났으며, NSRP70-Nt 단백질의 경우 급성골수성백혈병환자그룹에서도 또한 유의성 있게 높은 것을 확인할 수 있었다(도 2).

[0067] <실시예 4> 급성백혈병세포주에서 웨스턴 블롯을 이용한 SF 단백질 발현 확인

[0068] 급성백혈병환자그룹의 골수에서의 SF 단백질들의 발현 증가가 급성백혈병세포주에서도 관찰되는지 확인하고자 하였다.

[0069] 상기 실시예3에 기재된 방법과 동일하게 수행한 결과, 다양한 급성백혈병세포주에서 또한 SF 단백질들의 발현량이 증가해 있음을 확인할 수 있었다(도 3).

[0070] <실시예 5> 급성백혈병환자 및 대조군에서 형광면역염색을 이용한 SF 단백질 발현 확인

[0071] SF 단백질에 대해 세포내 위치와 발현양상을 비교하기 위해 급성백혈병환자 및 대조군의 세포, 및 급성백혈병세포주에 대해 형광면역염색을 수행하였다.

[0072] 환자 및 대조군의 단핵구 또는 세포주를 커버글라스 상에서, 4% paraformaldehyde를 포함한 PBS에 15분간 고정 한 후, 세포내 침투액(0.1% Triton X-100를 포함한 PBS)으로 30분간 처리하였다. 5% BSA(bovine serum albumin)으로 1시간 블라킹 한 후 PBS로 세척하고 1차 항체(1:250)를 1시간동안 상온에서 처리하였다. 이후 형광이 결합된 2차항체를 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 30분간 반응시킨 후 상대적 형광강도를 ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)로 분석하였다. 핵은 4,6 diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probe)으로 대조염색하였다. 상대적 형광강도는 DAPI-염색영역으로 나누고, 매 실험(batch test)마다 Jurkat세포주의 형광강도에 따라 보정하였다 (Jurkat 세포주의 값은 10으로 설정함). DAPI-염색영역이 있으나 각 단백질에 해당하는 형광이 검출되지 않는 경우, 0.1로 값을 설정하여 계산하였다.

[0073] 그 결과, 면역형광염색상 NSRP70은 세포질/세포전체 내에서 진하게 고루퍼진 과립상으로 또는 간기 세포내에서 반점들(speckles) 또는 핵소체 (nucleoli) 모양으로 발현되었다. 세포 1개당 두드러진 핵소체의 수는 급성백혈병세포주(Jurkat)나 급성백혈병 환자유래 단핵구에서 더 많이 관찰되었다. SRSF1과 HNRNPA1은 핵내에서 반점 (speckles) 모양으로 발현되었다(도 4). 또한, 그 상대적 형광강도 분석 결과, NSRP70, SRSF1 및 HNRNPA1 상대적 형광강도의 중앙값은 백혈병세포주(ALCL)나 급성백혈병 환자에서 대조군보다 더 높은 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0074] <실시예 6> 급성백혈병환자 및 대조군에서 SF 유전자의 mRNA발현 확인

[0075] 상기에서 살펴 본 SF 단백질들의 양적 증가가 mRNA의 양적 증가로 인한 것인지를 확인하기 위하여 mRNA 발현량을 조사하였다.

[0076] 급성백혈병환자그룹 및 대조군의 단핵 세포 및 세포주로부터 miRNeasy Mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 total RNA를 분리 후, 500ng의 total RNA를 이용하여 cDNA를 합성(ReverTra Ace qPCR RT kit: Toyobo, Osaka, Japan)하였다. Real-Time PCR System (Applied Biosystems) 장비를 이용하여 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 상대적 mRNA 양은 StepOne software v.2.2.2를 이용하여 Jurkat cell의 정량값으로 (Jurkat cell 값은 10으로 정함) 보정하였고, 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[0077] NSRP70: 5'-ATAAAGAAGCATTTGTGACATCTG-3'(forward primer:서열번호 1) 및 5'-GGTGCCTATAAAATCCACTGAG-

3'(reverse primer:서열번호 2);

[0078] SRSF1: 5'- TGCCTACATCCGGGTTAAAG-3'(forward primer:서열번호 3) 및 5'- CTGCTGTGCTTCTGCTACG-3'(reverse primer:서열번호 4);

[0079] HNRNPA1: 5'-CCAGAGAAGATTCTCAAAGACC-3'(forward primer:서열번호 5) 및 5'-CTTCAGTGTCTTCTTTAATGCC-3'(reverse primer:서열번호 6);

[0080] HPRT: 5'-GTTTGTGTAGGATATGCCCTTG-3'(forward primer:서열번호 7) and 5'-CGATGTCAATAGGACTCCAGA-3'(reverse primer:서열번호 8).

[0081] 그 결과, 상기에서 살펴본 바와 같이 SF 단백질 발현이 증가한 것과 달리 mRNA 발현 수준에는 각 그룹간에 유의미한 차이가 없음을 확인할 수 있었다(도 6). 이는 급성백혈병환자그룹의 SF 단백질 발현 증가가 전사조절에 의한 것이 아닌 전사 후 조절기전(post-transcriptional regulation)에 의한 것임을 시사한다.

[0082] <실시예 7> 급성백혈병환자 유래 세포에서 SF 단백질의 탈인산화 확인

[0083] 상기 실시예로부터의 결과는 급성백혈병환자그룹에서의 SF 단백질의 발현 증가가 mRNA 수준이 아닌 단백질 수준에서의 조절에 의한 것임을 제시하므로, 단백질의 전사 후 조절과 관련하여 대표적인 인산화/탈인산화의 연관 여부를 조사하였다.

[0084] 급성백혈병 환자 유래 골수단핵구, 림프모세포에 각각 탈인산화를 유도하는 효소인 alkaline phosphatase(ALP; 80 U/mL; Promega, Madison, WI, USA) 처리 하거나 처리하지 않고 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 단백질을 추출한 후 SF 단백질들의 발현을 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

[0085] 그 결과, ALP를 처리한 경우, 전기영동상 이동성이 높아지고 단백질의 발현량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 급성백혈병환자에서 SF 단백질의 발현증가가 단백질의 인산화에 의한 안정성 증가 또는 그로 인한 분해억제 기전과 관련이 있음을 보여 준다(도 7).

[0086] <실시예 8> 항암치료 전후 급성백혈병환자 유래 세포에서 SF 단백질의 발현 변화 확인

[0087] NSRP70을 포함하는 SF 단백질들이 급성백혈병의 마커로써 진단적 유용성이 있는지를 항암치료 전후에 따른 상기 단백질들의 발현량 변화를 조사함으로써 추가적으로 조사하였다.

[0088] 5명의 급성백혈병 환자에서 치료전인 초기진단시와 항암치료 후 완전관해(completely remitted)상태에서 각각 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 세포로부터 단백질을 추출하여 SF 단백질들의 발현양상을 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

[0089] 그 결과, 대표적인 2명의 결과에서 완전관해 상태에서 SF 단백질들의 발현이 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(도 8). 이는 본원 발명의 SF 단백질이 급성백혈병의 진단마커 및 경과마커로써 유용함을 보여 준다.

[0090] <실시예 9> 급성백혈병의 예후유전그룹간 SF 단백질의 발현 비교

[0091] 급성백혈병환자그룹에서 그 증상의 예후 정도에 따라 SF 단백질의 발현 정도가 차이가 나는지, 이를 이용하여 질병의 예후 모니터링에 사용할 수 있는지를 조사하였다.

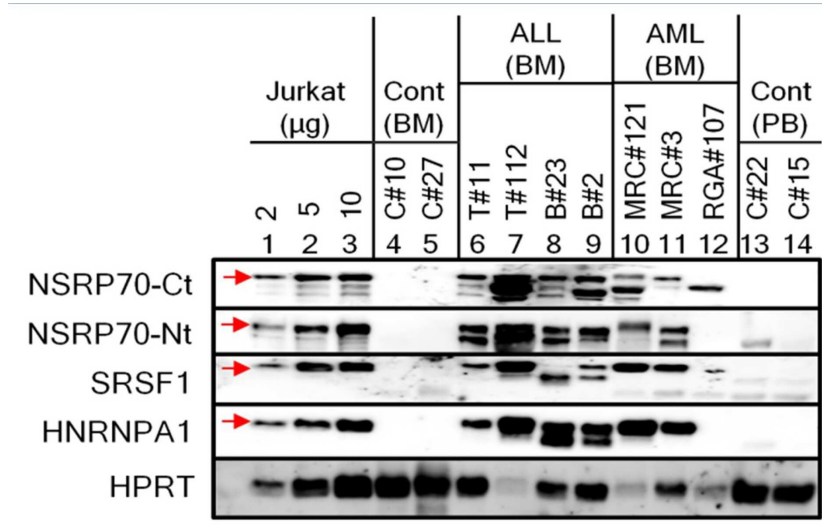
[0092] 급성백혈병환자그룹을 질환의 예후 정도에 따라 분류하고, 이들로부터 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 SF 단백질, 구체적으로 비정상 최고분자량-SF 단백질, 비정상 총-SF 단백질의 빈도를 각 유전그룹에서 확인하였다. 비정상 최고분자량-SF 단백질(Abe-hi-SFP, aberrant splicing factor protein)는, 웨스턴 블롯에서 여러 개의 밴드로 확인되는 SF 단백질들 중 최고분자량 SF 단백질의 발현량이 급성백혈병그룹과 대조군을 가장 잘 구별하는 단백질발현량(cut-off 값)보다 높은 경우로 정의된다. 유사하게 비정상 총-SF 단백질(Abe-sum-SFP, aberrant sum splicing factor protein)은 웨스턴 블롯에서 여러 개의 밴드로 확인되는 SF 단백질들의 전체합의 발현량이 급성백혈병그룹과 대조군을 가장 잘 구별하는 단백질발현량(cut-off 값)보다 높은 경우로 정의된다.

[0093] 그 결과, AML에서 Abe-hi-NSRP70(비정상적-최고분자량-NSRP70) 빈도는 악성예후 그룹간에 악성(adverse, 57%, 4/7), 중등도(intermediate, 17?21%, 4/24?5/24), 양호(favorable 6%, 1/17) 순서대로 높았다(p = 0.008).

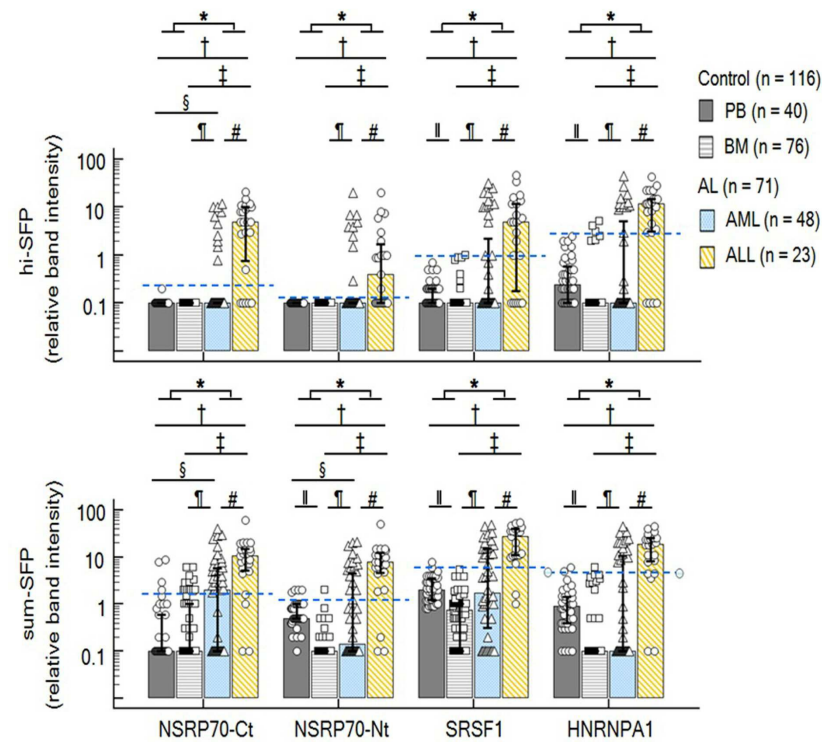
Abe-hi-NSRP70을 제외한 모든 Abe-hi-SFP는 예후유전 그룹간 유의미한 차이가 없었으며, ALL에서도 모든 Abe-hi-SFP는 예후유전그룹간 유의미한 차이가 관찰되지 않았다(도 9). Abe-sum-SFP는 예후 유전자그룹간에 AML과 ALL 모두에서 유의미한 차이가 관찰되지 않았다($p > 0.05$; 도 10).

도면

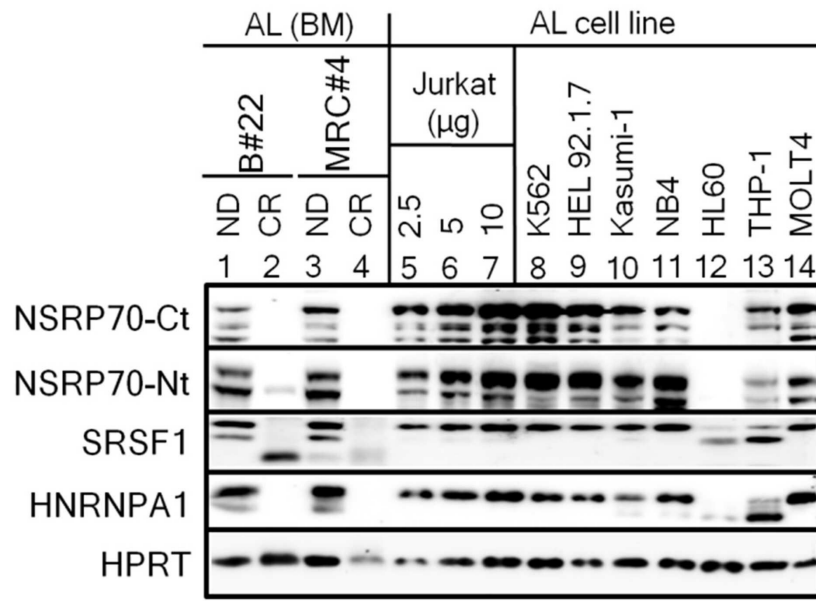
도면1



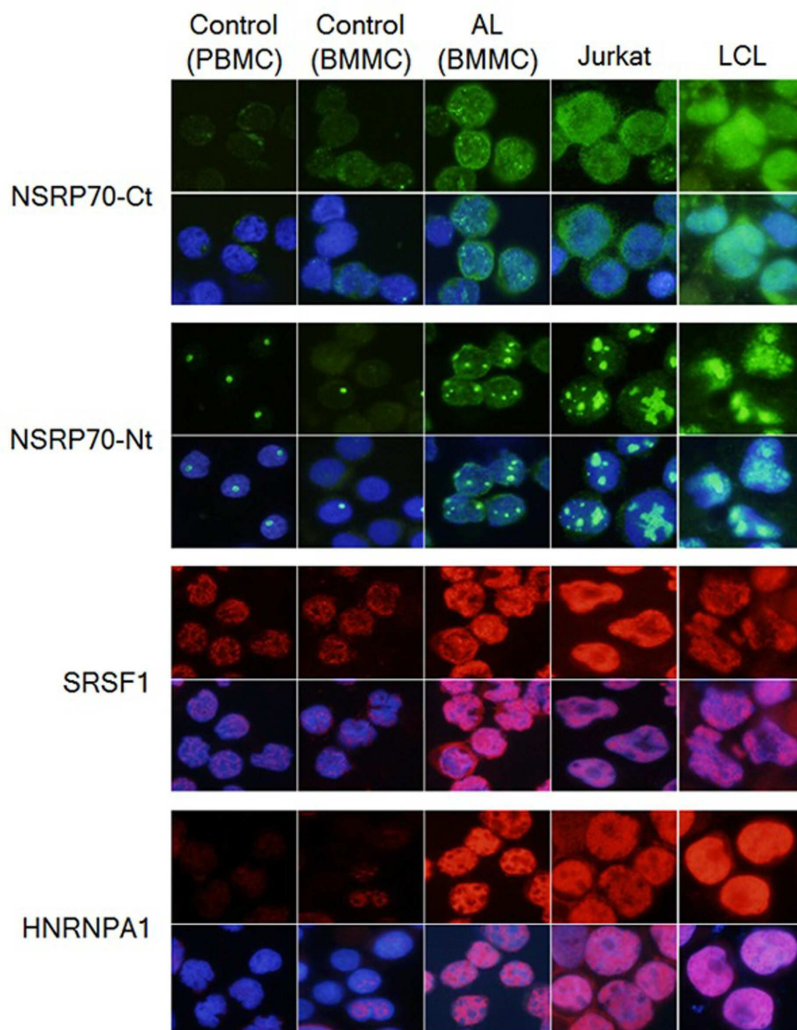
도면2



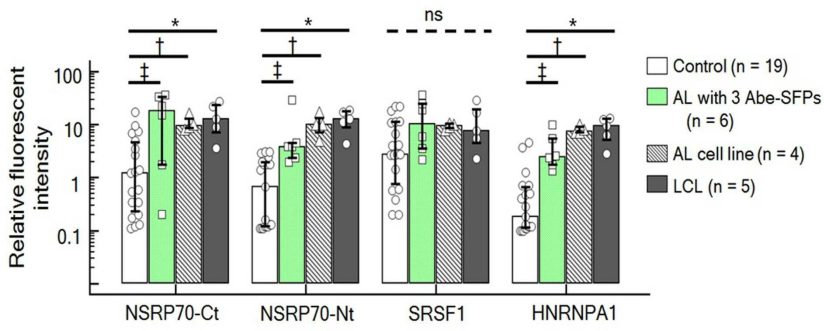
도면3



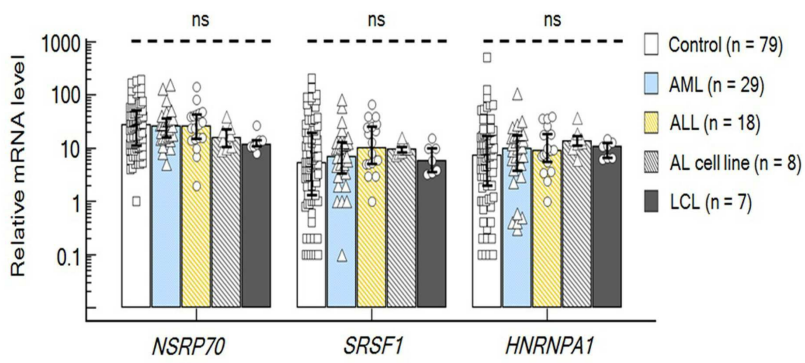
도면4



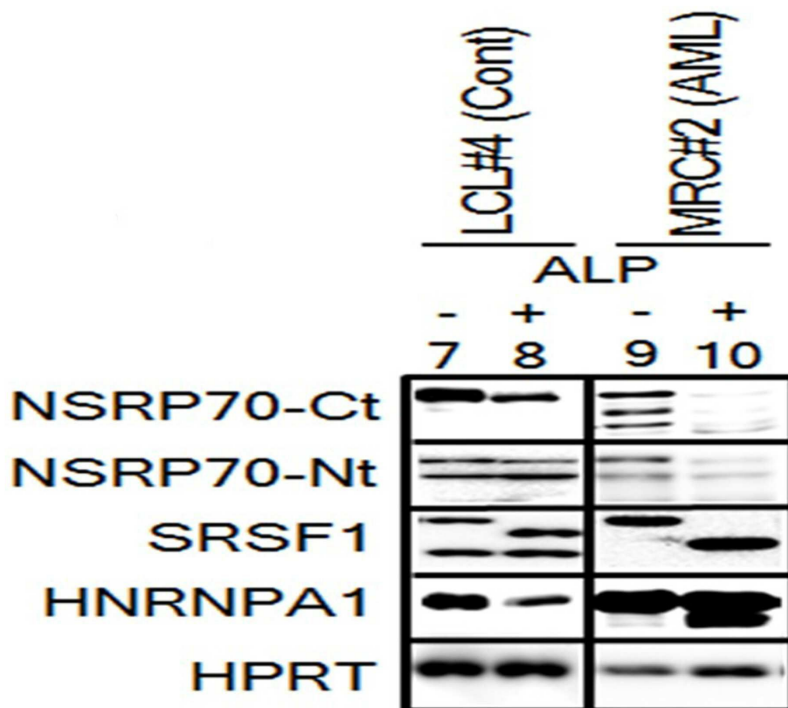
도면5



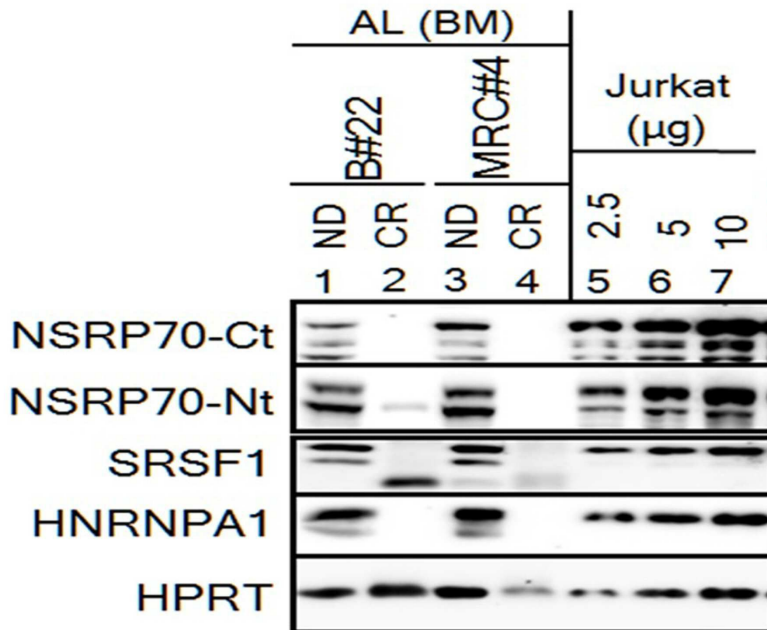
도면6



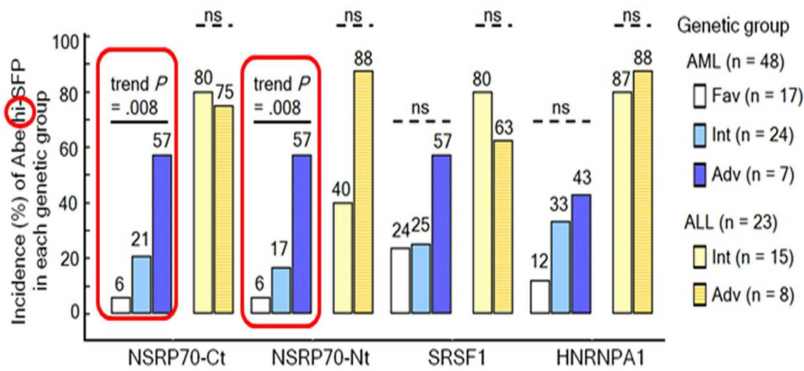
도면7



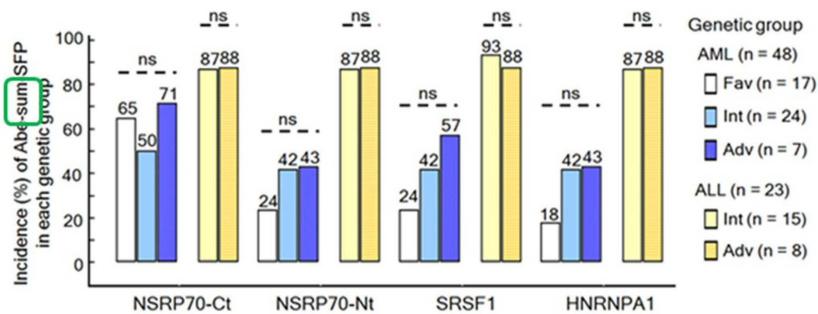
도면8



도면9



도면10



서열목록

<110> wonkwang university

gwangju institute of science and technology

<120> Novel biomarker for diagnosing acute leukemia
 <130> 14P-10-049
 <160> 8
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NSRP70 forward primer
 <400> 1
 ataaagaagc attgtgaca tctg 24
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NSRP70 reverse primer
 <400> 2
 ggtgcctata aaatccactg ag 22
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SRSF1 forward primer
 <400> 3
 tgctacatc cgggttaaag 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SRSF1 reverse primer
 <400> 4
 ctgctgttg tctgctacg 20
 <210> 5
 <211>

> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HNRNPA1 forward primer

<400> 5

ccagagaaga ttctcaaaga cc 22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HNRNPA1 reverse primer

<400> 6

cttcagtgtc ttctttaatg cc 22

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPRT1 forward primer

<400> 7

gtttgttgta ggatagccc ttg 23

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPRT1 reverse primer

<400> 8

cgatgtcaat aggactccag a 21