



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월08일
(11) 등록번호 10-2107841
(24) 등록일자 2020년04월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6876 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6876 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2018-0133841
- (22) 출원일자 2018년11월02일
심사청구일자 2018년11월02일
- (56) 선행기술조사문헌
US20120142543 A1*
KR101840002 B1
KR101840003 B1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)
서울대학교병원
서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)
- (72) 발명자
이지은
서울특별시 성북구 화랑로14길 5(하월곡동)
천동희
서울특별시 성북구 화랑로14길 5(하월곡동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 9 항

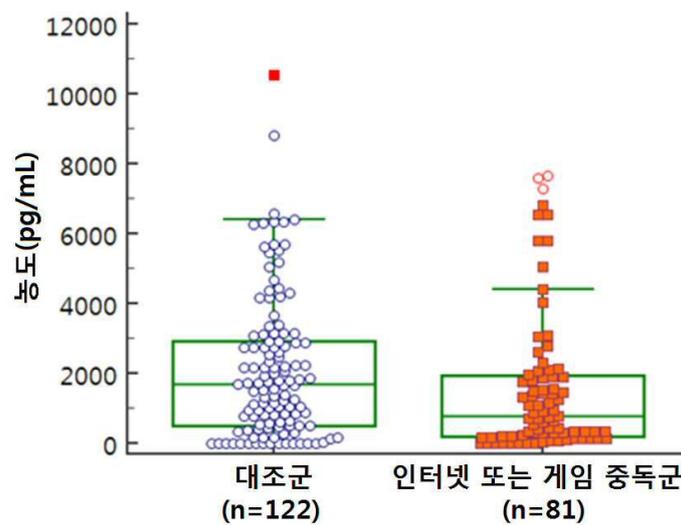
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **행위 중독의 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용한 행위 중독의 진단을 위한 코카인 및 암페타민 조절성 전사 단백질의 검출 방법**

(57) 요약

일 양상에 따른 행위 중독 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 행위 중독의 진단을 위해 코카인 및 암페타민 조절성 전사체 단백질(Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein: CART)을 검출하는 방법을 제공한다. 이에 따르면, 행위 중독, 예를 들어 인터넷 중독 또는 게임 중독을 간편하고, 높은 정확도 및 특이도로 진단하는데 이용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/30 (2013.01)

(72) 발명자

김대진

서울특별시 서초구 서초중앙로 188, A동 1702호 (서초동, 아크로비스타)

전지원

경기도 성남시 분당구 이매로123번길 12, 101동 201호(이매동, 이매포스파크)

최정석

서울특별시 동작구 보라매로5길, 보라매병원 정신건강의학과(신대방동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711076362

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발

연구과제명 혈액시료기반 인터넷·게임 중독 특이적인 단백질/신경전달 물질 바이오마커 발굴

기여율 75/100

주관기관 한국과학기술연구원

연구기간 2015.10.01 ~ 2019.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018076019

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 뇌영상기법을 통한 인터넷·게임 중독의 구조적/기능적 뇌 변화 규명

기여율 15/100

주관기관 가톨릭대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2019.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711094407

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 인터넷게임중독의 뇌 생체신호 지표 발굴 연구

기여율 10/100

주관기관 서울특별시 보라매병원

연구기간 2014.10.01 ~ 2019.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

생물학적 시료 중 코카인 및 암페타민 조절성 전사체 단백질(Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein: CART) 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 행위 중독 진단용 조성물로서, 상기 발현 수준은 정상 대조군에서 CART의 발현 수준에 비해 감소한 것이고, 상기 행위 중독은 인터넷 중독 및 게임 중독으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 CART 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 CART 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 동일하거나 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산인 것인 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 항체는 폴리클론 항체 또는 모노클론 항체인 것인 조성물.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 핵산은 프라이머 또는 프로브인 것인 조성물.

청구항 6

생물학적 시료 중 CART 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 행위 중독 진단용 키트로서, 상기 발현 수준은 정상 대조군에서 CART의 발현 수준에 비해 감소한 것이고, 상기 행위 중독은 인터넷 중독 및 게임 중독으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 키트.

청구항 7

행위 중독이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CART 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군의 CART 발현 수준과 비교하는 단계; 및 상기 측정된 발현 수준이 상기 정상 대조군에서 CART의 발현 수준에 비해 감소한 것을 검출하는 단계를 포함하는 행위 중독의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해 생물학적 시료로부터 CART를 검출하는 방법으로서, 상기 행위 중독은 인터넷 중독 및 게임 중독으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 점막액, 양수, 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 측정하는 단계는 상기 생물학적 시료와, CART 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는

항체를 인큐베이션시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 측정하는 단계는 전기영동, 면역블로팅, 효소 결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), 단백질 칩, 면역침강, 마이크로어레이, 노던(Northern) 블로팅, 폴리머라제 증폭 반응(polymerase chain reaction: PCR), 또는 이들의 조합으로 수행되는 것인 방법.

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 행위 중독의 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용한 행위 중독의 진단을 위한 바이오마커의 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 행위 중독(behavioral addiction)은 도박 중독, 성 중독, 병리적 인터넷 사용 등과 같이 어떠한 행위, 과정, 활동에 관한 중독에 관한 것으로, 뇌 회로가 관여하고, 내성과 금단이 발생할 수 있으며, 충동성이 발달 초기 단계에 중요하게 작용하고 강박성이 행동 유지에 핵심적으로 관여한다. 현대 사회에서는 알코올 중독이나 마약 중독과 같이 인터넷 중독, 게임 중독, 및 강박적 중독 등이 두드러지게 나타나고 있다.

[0003] 정신 의학적 증상 예를 들어, 자폐, 파킨슨병, 치매, 주의력 결핍 과잉 행동 장애, 알코올 중독, 마약 중독, 및 강박 신경 장애 등에 대한 바이오마커들이 알려져 있다(미국 공개 공보 2005/0084880 A1(2005.04.21), 대한민국 등록공고 10-1157526(2016.06.27) 등). 그러나, 행위 중독, 특히 인터넷 중독 또는 게임 중독을 진단하기 위해 자기 공명 영상(magnetic resonance imaging: MRI)을 통한 뇌 영상 확인이나 설문조사를 통한 자가 진단 방법이 주로 이용될 뿐, 진단을 위해 효과적인 바이오마커가 아직 없다.

[0004] 따라서, 비용이 비싸고 번거로운 뇌 영상 진단이나 주관적 판단을 기반으로 하는 자가 설문조사 방법이 아니라, 행위 중독을 간편하고 비용이 저렴하게 진단할 수 있고, 진단의 정확도 및 특이도가 높은 바이오마커를 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 행위 중독 진단용 조성물을 제공한다.

[0006] 행위 중독 진단용 키트를 제공한다.

[0007] 행위 중독의 진단을 위해 바이오마커를 검출하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 코카인 및 암페타민 조절성 전사체 단백질(Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein: CART) 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 행위 중독 진단용 조성물을 제공한다.

[0009] 용어 "행위 중독(behavioral addiction)"은 어떠한 행위, 과정 또는 활동에 관한 중독을 말한다. 행위 중독은 내성과 금단이 발생할 수 있다. 상기 행위 중독은 인터넷 중독, 스마트폰 중독, 게임 중독, 도박 중독, 종교 중독, 성 중독, 쇼핑 중독, 운동 중독, 및 일 중독으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 인터넷 중독은 병리적 또는 강박적인 인터넷 사용으로 인하여, 신체적, 정신적, 또는 사회적 생활에 지장을 받은 중독 상태에 이르는 것을 말한다. 상기 게임 중독은 병리적 또는 강박적으로 게임에의 몰입으로 인하여, 신체적, 정신적, 또는 사회적 생활에 지장을 받은 중독 상태에 이르는 것을 말한다. 상기 인터넷 또는 게임은 컴퓨터, 휴대전화, 스마트폰, 및 TV 등의 모든 매체에 의한 사용을 포함한다.

[0010] 코카인 및 암페타민 조절성 전사체 단백질(Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein: CART)는

신경펩티드 단백질로서, 보상(reward), 식이(feeding) 또는 스트레스에 기능을 갖는 단백질이다. CART는 CART(1-39) 및 CART(42-89)의 두개의 사슬로 절단될 수 있다. CART는 동물에서 코카인 및 암페타민과 유사한 행동을 일으키는 신경펩티드일 수 있다. CART는 식욕감퇴 펩티드이고 중추신경계 및 말초신경계 모두, 특히 시상하부에서 광범위하게 발현될 수 있다. CART는 렙틴(leptin)에 의해 발현 수준이 증가할 수 있다. CART는 사람에서 Uniprot 번호 Q16568의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 마우스에서 Uniprot 번호 P56388의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [0011] 상기 단편(fragment)은 CART의 일부로서, 면역원성 폴리펩티드일 수 있다.
- [0012] 상기 제제는 CART 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 상기 항체는 폴리클론 항체 또는 모노클론 항체일 수 있다. 용어 "항체(antibody)"는 용어 "면역글로불린(immunoglobulin)"과 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 항체는 폴리클론 항체 또는 모노클론 항체일 수 있다. 상기 항체는 전장 항체일 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 항원 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드를 말한다. 상기 항원 결합 단편은 단일-도메인 항체(single-domain antibody), Fab, Fab', scFv, 디아바디, 나노바디, 미니바디, 테트라바디, 트리아바디, V_H 도메인, 또는 V_L 도메인일 수 있다. 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 고체 지지체에 부착된 것일 수 있다. 상기 고체 지지체는 예를 들어, 금속 칩, 플레이트, 또는 웰(well)의 표면이다. 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 항-CART 항체 또는 항원 결합 단편일 수 있다.
- [0013] 상기 제제는 CART 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 동일하거나 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산일 수 있다. 상기 핵산은 프라이머 또는 프로브일 수 있다. 상기 프라이머 또는 프로브는 그의 말단 또는 내부에 형광 물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 또는 방사성 동위원소 등으로 표지된 것일 수 있다.
- [0014] 다른 양상은 CART 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 행위 중독 진단용 키트를 제공한다.
- [0015] 상기 키트는 행위 중독 진단에 필요한 시료를 더 포함할 수 있다. 상기 키트는 고체 지지체, 항체 또는 항원 결합 단편의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적합한 완충용액, 발색 효소, 형광물질로 표지된 2차 항체, 또는 발색 기질을 포함할 수 있다. 상기 키트는 핵산 검출을 위하여, 중합효소, 완충제, 핵산, 조효소, 형광물질, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 중합 효소는 예를 들어 Taq 중합효소이다.
- [0016] 다른 양상은 행위 중독이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CART 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 행위 중독의 진단을 위해 CART를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0017] 상기 방법은 행위 중독이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CART 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0018] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 행위 중독을 앓고 있거나 행위 중독에 걸린 것으로 의심되는 개체일 수 있다.
- [0019] 상기 생물학적 시료는 상기 개체로부터 수득된 시료를 말한다. 상기 생물학적 시료는 예를 들면 혈액, 혈장, 혈청, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 점막액, 양수, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0020] 상기 측정하는 단계는 상기 생물학적 시료와, CART 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 인큐베이션시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 측정하는 단계는 전기영동, 면역블로팅, 효소 결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), 단백질 칩, 면역침강, 마이크로어레이, 노던 블로팅(Northern blotting), 폴리머라제 증폭 반응(polymerase chain reaction: PCR), 또는 이들의 조합으로 수행될 수 있다. 상기 전기영동은 SDS-PAGE, 등전점 전기영동, 2차원 전기영동, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 PCR은 실시간 PCR 또는 역전사 PCR일 수 있다.
- [0022] 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계를 포함한다.
- [0023] 상기 정상 대조군은 행위 중독에 걸리지 않은 군으로서 음성 대조군을 의미한다.
- [0024] 상기 방법은 측정된 CART 또는 이의 단편의 발현 수준이 정상 대조군의 단백질 발현 수준 보다 감소한 경우, 상기 개체는 행위 중독에 걸리거나 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 행위 중독, 예를 들어 인터넷 중독 또는 게임 중독으로 진단된 개체에 심리사회적 치료 또는 약물 치료를 수행할 수 있다. 상기 약물은 예를 들어, 날트렉손(naltrexone), 디숄피람(disulfiram), 메타돈(methadone), 클로르디아제폭사이

드(chlordiazepoxide), 아캄프로세이트(acamprosate), 부프로피온(bupropion), 바레니클린(varenicline), 부르페노르핀(buprenorphine), 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0025] 일 양상에 따라 CART를 검출하여 행위 중독의 진단에 필요한 정보를 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0026] 일 양상에 따른 행위 중독 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 행위 중독의 진단을 위해 코카인 및 암페타민 조절성 전사체 단백질(Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein: CART)을 검출하는 방법에 따르면, 행위 중독, 예를 들어 인터넷 중독 또는 게임 중독을 간편하고, 높은 정확도 및 특이도로 진단하는데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 감손된 혈청 시료에 대해 고성능 액체 크로마토그래피를 수행한 결과를 나타내는 그래프이다(x 축: 시간(분), y 축: 질량 흡광도 단위(milli Absorbance Unit: mAU)).

도 2a는 정상 대조군의 혈청 시료에서 감손 전후 SDS-PAGE 겔 이미지이고, 도 2b는 인터넷 또는 게임 중독군의 혈청 시료에서 감손 전후 SDS-PAGE 겔 이미지이다(좌: 감손 전, 우: 감손 후, M: 크기 마커(kDa), 1 내지 4: 레인 1 내지 4).

도 3a는 493 종의 단백질에 대해 항체 어레이를 수행하여 수득된 이미지이고, 도 3b는 CART의 항체 어레이 스팟의 상대적 강도를 나타내는 그래프이다.

도 4는 정상 대조군과 인터넷 또는 게임 중독군에서 혈액 중 CART의 농도(pg/mL)를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 실시예 1. 인터넷 또는 게임 중독군의 혈청 단백질 중 차등 발현된 단백질의 확인

[0030] 1. 인터넷 또는 게임 중독군의 시료의 준비

[0031] 가톨릭 대학교 서울성모병원으로부터 인터넷 또는 게임 중독 환자(n=4)의 혈청 시료를 수집하였다. 음성 대조군으로서 인터넷 또는 게임 중독으로 진단되지 않은 정상인(n=4)의 혈청 시료를 수득하였다.

[0032] 혈청 시료의 단백질 분해 또는 변형을 막기 위해, 혈청을 수득한 직후에 수득된 혈청에 단백질 분해효소 저해제로서 cOmplete, Mini EDTA-free 프로테아제 저해제 콕테일(Roche) 및 포스파타아제 저해제로서 PhosSTOP(Roche)을 첨가하였다. 상기 저해제는 제조사의 프로토콜에 따라 1개의 정제를 200 μ l의 인산완충식염수(phosphate buffered saline: PBS)에 녹여 50 X로 만든 후, 각 시료에 저해제의 최종 농도 1.5 X가 되도록 첨가하였다. 저해제를 첨가한 혈청 시료를 정량하고, 실험에 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

[0033] 2. 혈청 시료의 감손(depletion)

[0034] 알부민이나 면역글로불린 G와 같이 혈청에 다량 존재한 단백질을 제거하기 위해, 수득된 혈청 시료를 감손하였다.

[0035] 구체적으로, 1.에서 수득된 혈청 시료를 각각 정량 최소량인 54.8 μ g/ μ l의 농도로 준비하고, 동일한 조건에서 실험을 수행하였다. 준비된 혈청 시료를 제조사에서 제공하는 완충액으로 6배 희석하고, 희석된 시료를 0.22 μ m 스펀 필터에 여과하였다. 여과된 시료를 Multiple Affinity Removal System(MARS) 14 컬럼(Agilent)에 주입하고, Agilent 1100 HPLC 시스템을 사용하여 시료를 감손하였다. 14종의 다량 존재하는 단백질(알부민, 면역글로불린 G, 알파-1-항트립신, 면역글로불린 A, 트랜스페린, 합토클로빈, 피브리노겐, 알파-2-마크로글로불린, 알파-1-산성당단백질, 면역글로불린 M, 아포지질단백질 A-I, 아포지질단백질 A-II, 보체 단백질 C3, 및 트랜스타이레틴)이 제거된 여과물을 각각 수집하였다. MARS 14 컬럼에 의해서 감손되어 나오는 여과물에 대한 흡광도를 실시간으로 측정된 결과를 도 1에 나타내었다(---: 여과물의 수집이 시작되는 시점을 나타냄. ---: 여과물의 수집이 끝나는 시점을 나타냄).

[0036] 3. 감손된 혈청 시료의 농축 및 정량

[0037] 3K centrifugal filter(Amicon Ultra, Millipore)를 400 μ l의 물(HPLC grade, J.T Baker)로 2회 및 400 μ l의 10 mM HEPES 완충액(pH8.0)으로 2회 가하여 준비하였다.

[0038] 2.에서 감손된 혈청 시료를 10 mM HEPES 완충액으로 5배 희석하였다. 희석된 시료를 준비된 필터에 가한 후 14000x g의 속도로 10 $^{\circ}$ C에서 약 10분 동안 원심분리하여 시료를 농축하였다. 그 후, 시료가 포함된 필터를 10 mM HEPES 완충액으로 5회 세척하고 새로운 튜브에 감손된 혈청 시료를 함유한 필터를 뒤집어서 끼운 후, 3000x g의 속도로 10 $^{\circ}$ C에서 약 5분 동안 원심분리하여 농축된 혈청 시료를 회수(recovery)하였다.

[0039] 농축된 시료는 비신크로니닉산(bicinchoninic acid: BCA) 분석법으로 정량하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후, 전기영동된 겔을 은(silver) 염색법으로 염색하였다. 염색된 겔의 이미지를 도 2a 및 도 2b에 나타내었다(도 2a: 정상 대조군의 혈청 시료에서 감손 전후 SDS-PAGE 겔 이미지, 도 2b: 인터넷 또는 게임 중독군의 혈청 시료에서 감손 전후 SDS-PAGE 겔 이미지).

[0040]

[0041] **4. 항체 어레이를 이용한 단백질 스크리닝**

[0042] 대조군과 인터넷 또는 게임 중독군 각각 4명의 혈청 시료를 단백질의 농도가 500 μ g/총 부피 1.5 ml가 되도록 풀링(pooling)하였다.

[0043] 풀링된 각각의 혈청 시료에 3.6 μ l의 비오틴화제(RayBiotech, Inc.)를 가하고 30분 동안 실온에서 인큐베이션한 후, 5 μ l의 반응 종결 용액(RayBiotech, Inc.)을 가하여 반응을 종결시켰다. 반응물을 크기 배제 컬럼(RayBiotech, Inc.)에 여과하여 시료에 남아 있는 비오틴을 제거하였다.

[0044] 항체 493 어레이(RayBiotech, Inc.)에 블로킹 완충액(RayBiotech, Inc.)을 가하고 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하여 항체 어레이를 준비하였다. 1.5 ml의 비오틴-표지된 시료에 블로킹 완충액을 가하여 총 부피 14 ml로 희석하였다. 준비된 어레이에 시료를 가하고 약 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0045] 그 후, 항체 어레이 키트에 포함된 세척 완충액으로 어레이를 세척하고, 어레이에 스트렙트아비딘-HRP 접합 용액(RayBiotech, Inc.)을 가하고 상온에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 다시 어레이를 세척하고, 제조자의 지시에 따라 어레이의 신호를 검출하였다.

[0046] 493 종의 단백질에 대한 항체 어레이 결과를 도 3a에 나타내었다. 도 3a에 나타난 바와 같이 정상 대조군과 인터넷 또는 게임 중독군의 시료에서 차등발현되는 단백질을 확인하였다. 인터넷 또는 게임 중독군에서 차등발현되는 단백질 중 코카인 및 암페타민 조절성 전사체 단백질(Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein: CART)을 바이오마커로 선정하였다. CART의 항체 어레이 이미지를 TotalLab 1D 분석 소프트웨어(Nonlinear Dynamics)를 사용하여 스팟의 상대적 강도(intensity)를 수치화하고, 대조군과 인터넷 또는 게임 중독군에서 단백질의 상대적 강도를 도 3b에 나타내었다.

[0047] 도 3b에 나타난 바와 같이, CART는 대조군에 비해 인터넷 또는 게임 중독군에서 유의하게 발현이 감소하였다.

[0048] **5. 효소-결합 면역흡착 분석법을 이용한 차등발현의 검증**

[0049] 4.에서 바이오마커 후보로 선정된 CART의 발현 양상을 검증하였다. 검증을 위해, 가톨릭 대학교 서울성모병원과 보라매병원에서 제공한 대조군 122명, 인터넷 또는 게임 중독군 81명의 시료를 사용하여 실험을 진행하였다.

[0050] 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline: PBS)를 사용하여 1:10의 비율로 희석된 대조군과, 인터넷 또는 게임 중독군 환자의 혈청 시료와, 100 μ l의 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.25 pg/ml, 또는 0 pg/ml의 농도로 준비된 CART(Elabscience Biotechnology Inc.)를 준비하고, 96 웰 ELISA 플레이트(Elabscience Biotechnology Inc.)에 로딩하였다. ELISA 플레이트를 약 37 $^{\circ}$ C에서 약 1시간 30분 동안 인큐베이션하였다. 반응 후 남아있는 시료와 스탠다드를 제거하였다. 1:100의 비율로 희석된 100 μ l의 비오틴화 검출 항체(Elabscience Biotechnology Inc.)를 ELISA 플레이트에 가하고, 약 37 $^{\circ}$ C에서 약 1시간 동안 인큐베이션하였다. 반응 후 남아있는 용액을 제거하고, 25X로 농축된 세척 완충액을 1X로 희석시켜 각 웰당 300 μ l씩 가하고, 3회 세척하였다. 그 후, 1:100의 비율로 희석된 100 μ l의 HRP 부착 용액(Elabscience Biotechnology Inc.)을 각 웰에 가하고 약 37 $^{\circ}$ C에서 약 30분간 인큐베이션하였다. 반응 후 남아있는 시료와 스탠다드를 제거하고, 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 90 μ l의 기질 용액(Elabscience Biotechnology Inc.)을 각 웰에 가하고, ELISA 플레이트를 약 37 $^{\circ}$ C에서 약 10분 내지 20 분간 빛을 차단한 상태에서 인큐베이션하였다. 시료와 스탠다드의 색이 파란색으로 바뀌면 50 μ l의 종결 용액(Elabscience Biotechnology Inc.)을 ELISA 플레

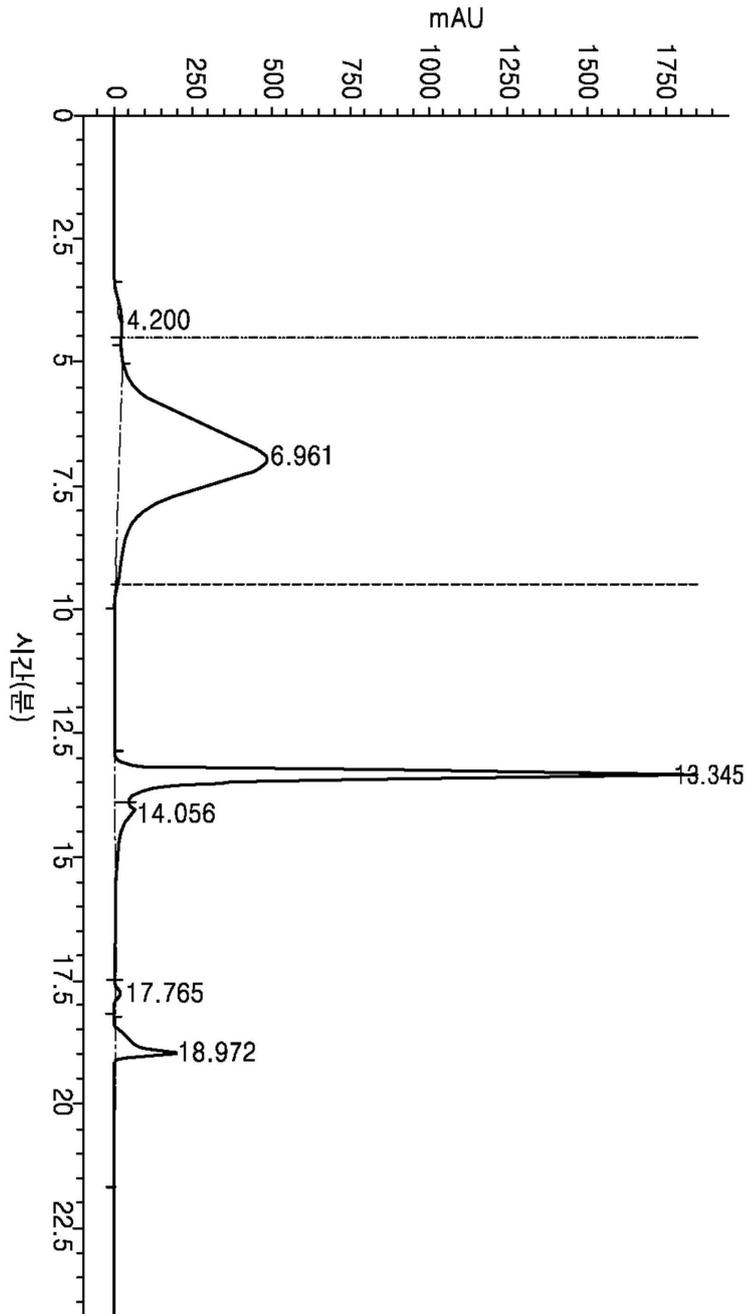
이트에 가하고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0051] 측정된 흡광도로부터 시료의 농도를 계산하였다. 만-휘트니(Mann-Whitney) U-검정법으로 분석한 결과를 도 4에 나타내었다($p = 0.0119$).

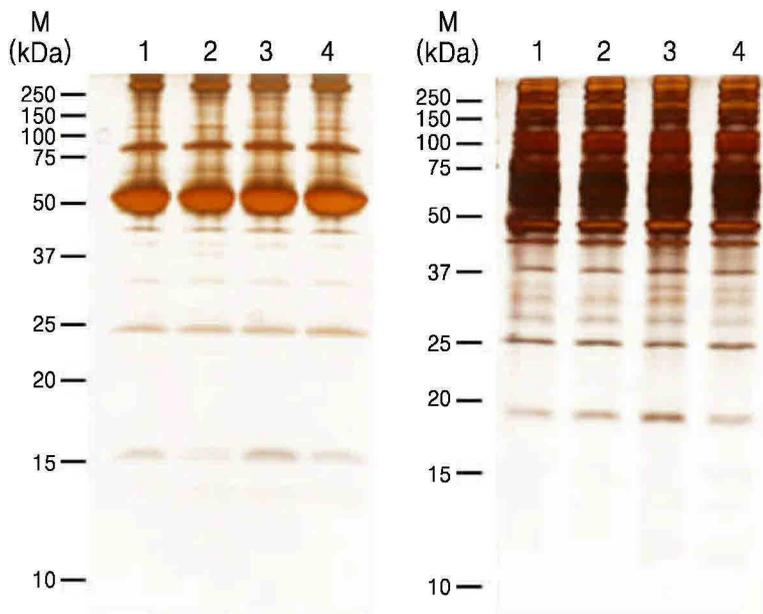
[0052] 도 4에 나타난 바와 같이, 인터넷 또는 게임 중독군은 정상 대조군에 비해 CART의 발현이 유의하게 감소함을 확인하였다. 따라서 CART가 인터넷 또는 게임 중독증에 대한 바이오마커로서 정확도가 우수함을 확인하였다.

도면

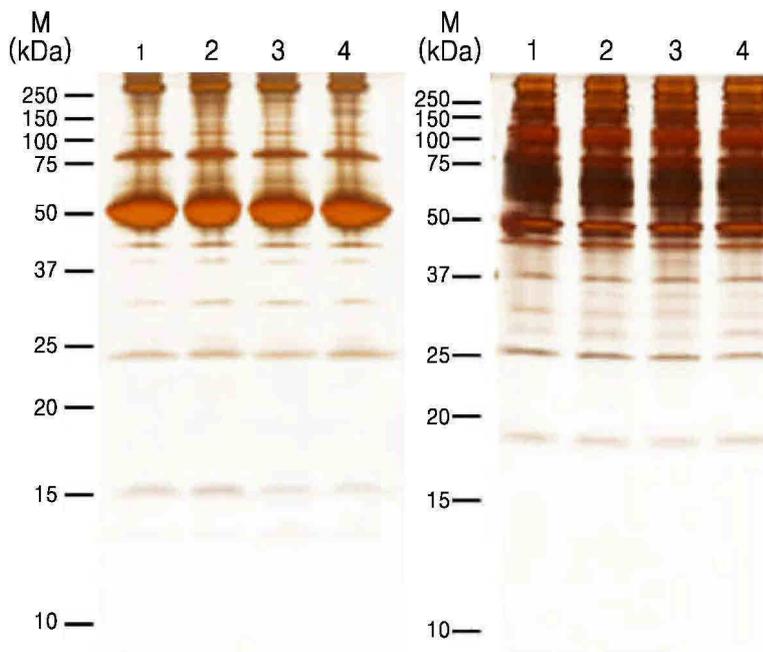
도면1



도면2a



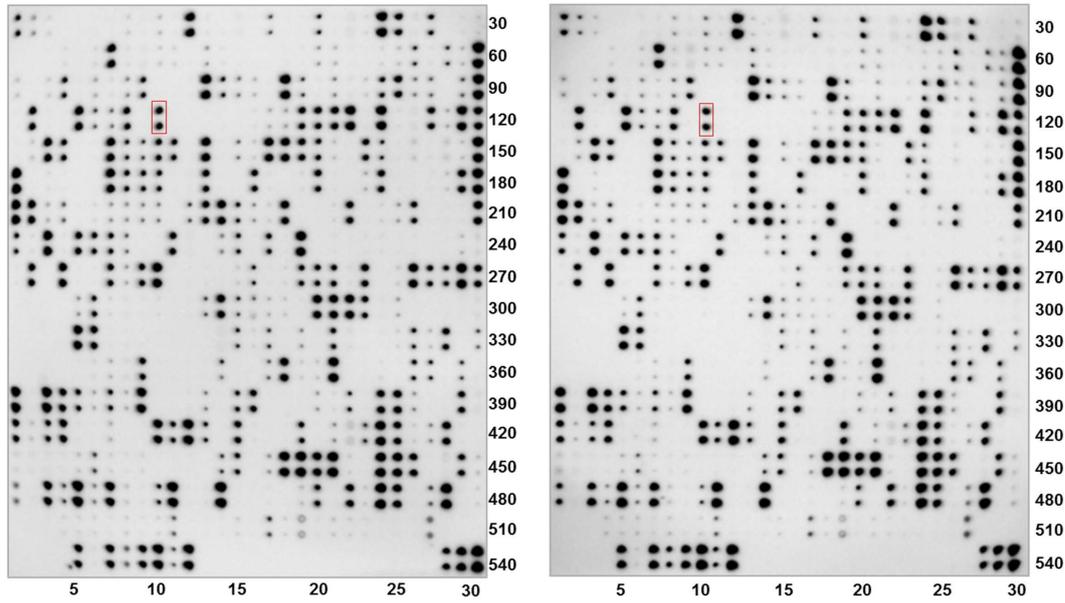
도면2b



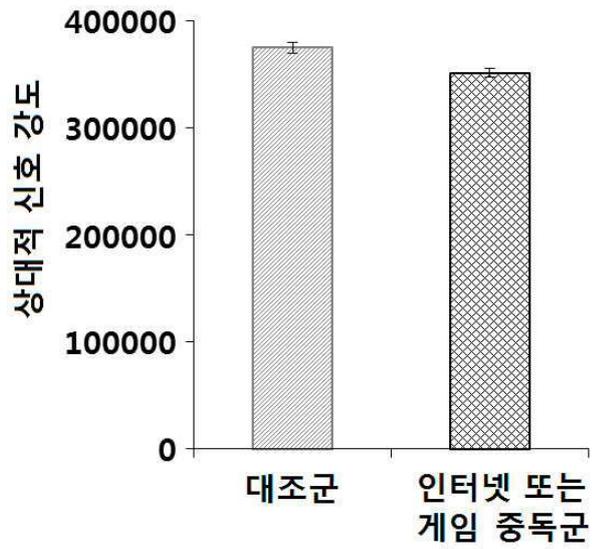
도면3a

<정상 대조군>

<인터넷 또는 게임 중독군>



도면3b



도면4

