

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 5월 9일 (09.05.2019)



(10) 국제공개번호
WO 2019/088666 A2

(51) 국제특허분류:
미분류

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/013028

(22) 국제출원일: 2018년 10월 30일 (30.10.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0142509 2017년 10월 30일 (30.10.2017) KR

(71) 출원인: 한국표준과학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) [KR/KR]; 34113 대전시 유성구 가정로 267, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 양인철 (YANG, In Chul); 34113 대전시 유성구 가정로 267, Daejeon (KR). 권하정 (KWON, Ha Jeong); 34113 대전시 유성구 가정로 267, Daejeon (KR). 정지선 (JEONG, Ji Seon); 34113 대전시 유성구 가정로 267,

Daejeon (KR). 배영경 (BAE, Young Kyung); 34112 대전시 유성구 대덕대로649번길 5-25, Daejeon (KR).

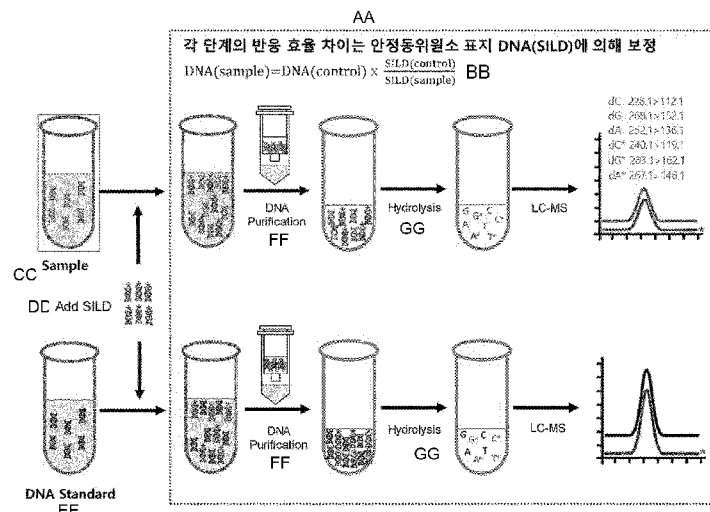
(74) 대리인: 장낙용 등 (JANG, Nak Yong et al.); 06235 서울시 강남구 테헤란로16길 14, 7층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: NUCLEIC ACID QUANTIFICATION METHOD USING STABLE ISOTOPE LABELLED NUCLEIC ACID AS INTERNAL STANDARD AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 안정동위원소 표지 핵산을 내부표준물질로 활용하는 핵산 정량 방법 및 이의 용도



AA ... Reaction efficiency differences in each step is normalized with
BB ... stable isotope labelled DNA (SILD)
CC ... Sample
DD ... Add SILD
EE ... DNA Standard
FF ... DNA Purification
GG ... Hydrolysis

(57) Abstract: Quantitative analysis of nucleic acids present in a sample or a complex medium requires a nucleic acid isolation or purification process. However, yields of nucleic acid isolation and purification greatly vary with purification principles, kits used, and characteristics of samples. Thus, effective normalization of nucleic acid isolation and purification yields is an indispensable condition for the accurate quantitative analysis of nucleic acids with reference to an original sample. The present invention relates to a method for quantitative analysis of nucleic acids present in a sample or complex medium without amplifying target nucleic acids.

LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

(57) 요약서: 시료 또는 복잡한 매질 내에 존재하는 핵산을 정량 분석하기 위해서는 핵산 추출 또는 정제 과정이 필요하다. 그러나 핵산 추출 및 정제의 수율(yield)은 정제 원리, 사용되는 키트 및 시료의 특성에 의해 변동성이 매우 크다. 따라서 핵산 추출 및 정제 수율의 효율적인 보정(normalization)은 원 시료를 기준으로 하는 정확한 핵산 정량 분석의 필수 조건이 된다. 본 발명은 표적 핵산의 증폭없이 시료 또는 복잡한 매질 내에 존재하는 핵산을 정량 분석하는 방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 안정동위원소 표지 핵산을 내부표준물질로 활용하는 핵산 정량 방법 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본원 발명은 정확도와 신뢰성을 높인 핵산(Nucleic acids; DNA 및 RNA)의 정량 분석방법으로서, 구체적으로 안정동위원소(stable isotope)로 표지된 핵산(stable isotope labelled nucleic acids(DNA or RNA); 이하 'SILD')를 내부표준물질(internal standard)로 활용하는 핵산 정량 분석방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 유전자 분석은 PCR과 시퀀싱(sequencing) 기술에 의해 특정 유전자를 증폭하고 그 염기서열을 분석하는 과정을 포함한다. 유전자 분석은 질병 진단, 돌연변이 검출, 병원성 박테리아와 바이러스의 검출과 같은 의학 분야; 유전자 변형 농산물의 검출, 식재료의 원산지 판별, 식재료에 오염된 미생물 검출과 같은 식품 및 위생 분야; 미생물 군집 분석, 생물체에 가해지는 독성 분석, 생물 다양성 보존과 같은 환경 분야; 친자 판별, 개인 식별, 범죄 용의자 식별과 같은 법의학적 분야에서 다양하게 활용되고 있다.
- [3] 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing; NGS) 기술의 개발로 수십, 수백 개의 다른 시료를 동시에 분석하거나 수천, 수만 유전자를 동시에 분석하는 고효율 유전체(genome) 분석까지 가능하다. NGS 기술은 전사체 분석에 의한 모든 유전자의 발현 양상 분석 및 대규모, 고정밀도의 미생물 군집 분석; 코호트 분석에 의한 집단 유전적 특성 및 질병 마커 발굴; 개인 유전체 분석에 의한 질병 예측 및 맞춤의학 등 여러 분야에서 매우 유용하게 활용되고 있다.
- [4] 최근 혈액 내 '순환 핵산 또는 자유 핵산(circulating cell free nucleic acid)'이 발견되었다. 후속 연구를 통해서 순환 핵산이 의학적으로 매우 중요하다는 것이 밝혀졌고, 이를 활용하기 위한 정밀 분석법의 필요성이 크게 대두되고 있다.
- [5] 정상 상태일 때 혈액 중 순환 핵산의 양은 20-100ng/이나, 유방암, 혈액암 등 암이 발병되는 경우에는 200-500ng/ml로 크게 증가되어 있는 현상이 발견되었다. 암 뿐만 아니라 심근 경색, 감염, 급성 염증, 과도한 운동 및 스트레스에서도 혈중 순환 핵산의 양이 변한다는 것이 보고되었다. 즉, 단순히 혈중 순환 핵산의 양을 측정하는 것만으로도 주요 질병을 조기에 진단할 수 있는 가능성이 열렸다. 이를 위해서는 무엇보다도, 혈중 순환 핵산에 대한 정확하고 신뢰성 있는 정량 분석이 필요하다.
- [6] 핵산 정량법으로는 UV 흡광법(UV spectrometry), 정량적 핵산 증폭법(qPCR), 디지털 핵산 증폭법(digital PCR) 및 형광 정량법 등이 많이 사용된다. 이들 정량법은 시료 또는 매질에 존재하는 다른 성분들에 의해 방해받기 때문에 정제 과정이 없이는 정확한 핵산의 정량을 분석할 수 없다. 그러나, 복잡한 매질

중의 핵산에 대해서 정확도와 신뢰성이 높은 정량 분석법은 아직까지 제시되지 않았다.

- [7] 특허문헌 1은 핵산의 정량 방법에 관한 것으로서, 샘플 중의 피분석물인 핵산과 구별될 수 있고 이 핵산과 동시 증폭될 수 있는 여러 핵산 작제물들의 상이한 각각의 양을 샘플에 첨가하는 단계; 상기 피분석물인 핵산 및 핵산 작제물과 반응할 수 있는 증폭 시약을 사용하여 상기 샘플을 핵산 증폭 절차로 처리하는 단계; 상기 상대적인 양들로부터 피분석물인 핵산의 양을 계산하는 단계로 구성된다. 각각의 핵산 작제물은 상이하며; 핵산 작제물들은 서로 구별될 수 있고 피분석물인 핵산과도 구별될 수 있다. 핵산 작제물은 동일한 증폭 시약으로 반응할 수 있다는 점에서 핵산 작제물, 및 피분석물인 핵산과 유사하다.
- [8] 그러나 상기와 같은 방법은 검량곡선의 작성에 사용되는 여러 핵산 작제물이 분석하는 핵산에 따라서 계속 달라질 수 있고, 핵산 작제물이 피분석물과 동일한 속도로 증폭이 되어야 하는 전제가 있다는 점에서 신뢰성 있는 정량 분석방법이라고 볼 수 없다.
- [9] 특허문헌 2는 샘플 내의 표적 핵산의 특성 수준을 계산할 수 있는 캘리브레이션 곡선을 생성하기 위한 보편적 기준 핵산의 사용에 관한 것이다. 특허문헌 2는 공지된 양의 형광단으로 표지된 보편적 기준 핵산을 도입하여 정량하는 방법에 관한 것이다. 이 또한 특허문헌 1과 같이 검량곡선에 사용되는 핵산 또한 동일한 속도로 증폭이 되어야 하는 전제가 있다는 점에서 오류가 기본적으로 내재되었다.
- [10] 이와 같이 표적 핵산의 증폭 없이 핵산을 정밀하게 정량할 수 있는 방법은 현재까지 제시되지 않았다.
- [11] (선행기술문헌)
- [12] 대한민국 등록특허공보 제10-0312800호
- [13] 대한민국 공개특허공보 제10-2017-0083053호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 시료 또는 복잡한 매질 내에 존재하는 핵산을 정량 분석하기 위해서는 핵산 추출 또는 정제 과정이 필요하다. 그러나 핵산 추출 및 정제의 수율(yield)은 정제 원리, 사용되는 키트 및 시료의 특성에 의해 변동성이 매우 크다. 따라서 핵산 추출 및 정제 수율의 효율적인 보정(normalization)은 원 시료를 기준으로 하는 정확한 핵산 정량 분석의 필수 조건이 된다. 본 발명은 표적 핵산의 증폭 없이 시료 또는 복잡한 매질 내에 존재하는 핵산을 정량 분석하는 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [15] 본 발명은 시료 중의 핵산(Nucleic acids; DNA 및 RNA) 정량 분석의 정확도와 신뢰성을 높이기 위한 방법으로서 SILD를 내부표준물질 (internal standard)로

활용하는 핵산 정량 분석방법에 관한 것이다.

- [16] 시료 또는 복잡한 매질 내에 존재하는 핵산을 정확히 정량 분석하기 위해서는 핵산 추출 또는 정제 과정이 필요하다. 그러나 핵산 추출 및 정제의 수율(yield)은 정제 원리, 사용되는 키트 및 시료의 특성에 의해 변동성이 매우 크다. 따라서 핵산 추출 및 정제 수율의 효율적인 보정(normalization)은 원 시료를 기준으로 하는 정확한 핵산 정량 분석의 필수 조건이 된다.

- [17] 본 발명은 핵산 정제 및 전처리 과정에서의 수율을 보정하기 위해 SILD를 내부표준물질로 이용하는 방법에 관한 것이다.

- [18] 핵산 추출 및 정제의 수율을 간접적으로 보정하기 위해 많이 활용되는 방법은 미리 알고 있는 양의 특정 유전자를 시료에 내부표준물질로 첨가한 후 추출 및 정제 후 이 유전자의 양을 다시 측정함으로써 추출 및 정제의 수율을 계산하는 방법이 쓰이기도 한다. 그러나 이 방법은 정제 대상 핵산의 크기가 다양한 상태에서 내부표준물질로 넣어주는 핵산은 단일 크기를 가지게 되는데 핵산 추출 효율은 핵산의 크기에 따라서도 큰 영향을 받기 때문에 전체적인 추출 효율의 보정에 활용하기 어렵다는 단점이 있다. 또한 이러한 크기 문제를 해결하기 위해 크기 분포 등이 동일하고 미리 양을 알고 있는 핵산을 외부표준물질로 활용하여 이에 대한 별도의 추출 및 정제 반응 그리고 정량분석을 함으로써 사용된 키트, 실험자 등에 따른 수율을 예측하는 방법도 있다. 그러나 이 방법은 근본적으로 핵산 정제의 수율이 개별 반응 용기마다 다를 수 있다는 점, 시료의 매질 형태에 따라서도 달라진다는 점 때문에 완벽한 효율 보정 방법이라고 하기는 힘들다. 따라서 기존 방법들의 이러한 단점을 극복하기 위해 내부표준물질로 사용되면서도 핵산 전체의 정제 효율을 보정하는 방법을 발명하여 본 발명에 이르게 되었다.

- [19] 본 발명은 핵산 추출 및 정제의 수율을 보정하는 방법으로서 SILD를 내부표준물질로 활용한다. SILD는 분석대상인 보통의 핵산과 화학적, 생물학적 특성은 동일하지만 안정동위원소(^{13}C , ^{15}N)에 의해 분자량은 차이가 나게 된다. 그리고 이러한 분자량 차이는 최종 분석 기기인 질량분석기에서 서로 다른 전하-대-질량비(m/z)로서 검출 및 정량이 가능하다. 즉, 각 시료에서 산출된 정상 핵산의 양과 내부표준물질 핵산의 양을 동시에 그리고 구분해서 정량할 수 있다. 그리고 시료에서 산출된 내부표준물질의 특성은 분석대상 핵산의 추출, 정제, 효소 반응, 질량분석의 효율과 동일하기 때문에 내부표준물질의 신호값은 동일 반응에 대해 분석대상 물질이 갖는 반응 효율의 척도가 된다.

- [20] 만약 내부표준물질로 첨가한 핵산의 양을 미리 알고 있거나 핵산 정량의 표준물질에 동일한 양의 내부표준물질을 첨가했다면 이러한 분석법은 통칭 동위원소희석 질량분석법(isotope dilution mass spectrometry)라고 하는데 이는 분석화학 분야에서 물질 정량분석법으로 사용되는 방법이다. 그러나 동위원소희석 질량분석법은 분석대상물질에 대해 동위원소로 치환된 내부표준물질의 준비가 반드시 필요하다. 분석화학 분야에서 주로 대상으로

하는 물질들은 분자량이 작고 구조가 단순하기 때문에 동위원소로 치환된 내부표준물질의 준비가 비교적 쉽고 상업용 시약 회사에서도 구입을 할 수가 있다. 그러나 핵산의 경우에는 분자량이 매우 크고(유전체 핵산의 경우 보통 10kb의 길이, 분자량 7MDa 이상, 혈액 내 순환 핵산의 경우 길이 150bp, 분자량 100 kDa 정도) 구조가 복잡하기 때문에 동위원소 희석 내부표준물질의 준비가 쉽지 않다. 이러한 어려움에도 불구하고 대장균을 무기 원소만으로 구성된 최소 배지와 동위원소로 치환된 질소원(ammonium sulfate) 및 탄소원(glycerol)을 추가한 배지에서 배양함으로써 핵산 전체를 안정동위원소로 표지하는 방법이 개발된 바 있다. 본 발명에서는 이러한 기술에 착안하여 안정동위원소로 표지된 대장균 유전체 핵산을 생산하였고 이 핵산을 매질 내 핵산 분석의 내부표준물질로 활용하였다.

- [21] 내부표준물질로 사용되는 SILD는 분석 시작 시점에서 분석대상 시료와 비교대상 시료(대조군 또는 표준물질)에 동일량을 첨가해 준다. ^{13}C , ^{15}N 등 안정동위원소로 치환된 SILD는 원래 시료에 들어있는 분석대상 핵산과 화학적으로 동일한 특성을 갖기 때문에 핵산의 추출 및 정제 과정 뿐만 아니라 그 후의 효소 반응, 질량분석 과정 등에서도 원칙적으로 동일한 효율을 갖게 된다. 그리고 최종 분석 단계인 질량분석 결과에서는 안정동위원소 치환에 의해 전하-대-질량(m/z) 값이 다르게 검출이 되므로 첨가해준 내부표준물질 핵산의 신호값은 따로 분리를 할 수 있다.
- [22] 상기 질량분석 과정은 액체 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)를 사용한다.
- [23] 한편 분석 시작 시점에서 SILD를 분석대상 시료와 비교대상 시료(대조군 또는 표준물질) 시료에 동일량을 첨가했기 때문에 각각 시료에서 나오는 내부표준물질의 기기 신호값(질량분석기에서의 피크 면적)은 각 시료에서의 정제, 효소 반응, 질량분석 효율의 객관적인 척도가 된다.
- [24] 본 발명은 1) ^{13}C 및/또는 ^{15}N 의 SILD를 준비하는 단계; 2) 상기 치환된 핵산(SILD)을 분석대상 시료 및 대조군 시료에 내부표준물질로서 각각 동일량 첨가하는 단계; 3) 상기 분석대상 시료 및 상기 대조군 시료로부터 핵산을 얻는 단계; 4) 상기 3) 단계에서 얻은 핵산을 단일 뉴클레오타이드 수준으로 가수분해하는 단계; 5) 질량분석에서 상기 4) 단계에서 얻은 뉴클레오타이드로부터 정상 뉴클레오타이드와 치환된 핵산(SILD) 유래 뉴클레오타이드 검출값을 얻는 단계; 6) 상기 치환된 핵산(SILD) 유래 뉴클레오타이드 검출값이 분석대상 시료와 대조군 시료에서 같아야 하는 특성을 이용해 분석대상 시료 핵산의 양을 보정하는 단계;를 포함하는 핵산의 정량 분석방법이다.
- [25] 여기서 핵산은 DNA 또는 RNA이며, 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 소변, 타액, 땀, 우유, 동물 추출액, 식물 추출액, 세포 추출액, 세포 배양액, 식수, 상수, 하수, 강물, 바닷물 중 적어도 하나 이상이다.
- [26] ^{13}C 및/또는 ^{15}N 의 SILD는 대장균, 사람, 생쥐, 효모, 식물, 초파리, 예쁜꼬마선충

중에서 하나로부터 유래한 것이며, 바람직하게는 대장균으로부터 유래된 것이다.

[27] 시료로부터 핵산을 얻는 단계는 추출 및 정제일 수 있다.

[28] 핵산을 단일 뉴클레오시드 수준으로 가수분해하는 방법은 효소 반응, 산(acid) 처리, 열(heat) 처리, 방사선 처리, 초음파 처리 중 적어도 하나 이상이다. 특히 가수분해는 전체 핵산의 99.5% 이상(중량 기준)이 단일 뉴클레오시드로 가수분해된다.

[29] 상기 보정하는 단계는 하기 식에 의해서 계산된다.

[30]
$$\text{핵산(분석대상)} = \text{핵산검출값(분석대상)} \times \frac{\text{핵산(대조군)}}{\text{핵산검출값(대조군)}} \times \frac{\text{SILD검출값(대조군)}}{\text{SILD검출값(분석대상)}}$$

[31] 여기서 핵산(분석대상)은 분석대상 시료의 핵산의 양, 핵산검출값(분석대상)은 분석대상 시료의 핵산의 질량분석에서의 검출값, 핵산(대조군)은 대조군 시료의 핵산의 양, 핵산검출값(대조군)은 대조군 시료의 핵산의 질량분석에서의 검출값, SILD검출값(대조군)은 대조군 시료의 치환된 핵산(SILD)의 질량분석에서의 검출값, SILD검출값(분석대상)은 분석대상 시료의 치환된 핵산(SILD)의 질량분석에서의 검출값을 말한다.

발명의 효과

[32] 본 발명의 효과는 SILD를 내부표준물질로 활용함으로써 매질 내에 있는 핵산의 추출 및 정제 과정에서 발생하는 수율의 차이를 보정할 수 있게 해 주는 것이다. 또한 첨가된 내부표준물질은 정제 후의 효소 반응 및 질량분석의 효율도 보정한다. 예를 들어서, 일부 불순물이 남아 있을 경우 효소 반응이나 질량분석의 이온화 효율이 달라질 수 있는데 이런 효과를 내부표준물질 또한 동일하게 받기 때문에 내부표준물질의 신호값 비를 이용해서 분석대상물질이 받은 방해 효과를 보정할 수 있게 된다. 종합적으로 SILD를 내부표준물질로의 사용은 매질 시료의 핵산을 정량분석하기 위해 수행되는 모든 절차 및 반응의 효율을 보정함으로써 매질 핵산 정량분석의 정확도를 개선할 수 있게 한다.

도면의 간단한 설명

[33] 도 1은 SILD를 내부표준물질로 활용하여 매질 내 핵산을 정량하는 과정에 대한 모식도이다. '*'는 안정동위원소 표지된 물질을 의미한다.

[34] 도 2는 SILD를 내부표준물질로 활용하기 위해 생산된 대장균 유전체 DNA의 질량분석 결과이다.

[35] 도 3은 SILD를 내부표준물질로 활용해서 DNA 추출 및 정제 효율을 보정한 결과를 보여주는 그림이다.

[36] 도 4는 SILD를 내부표준물질로 활용하여 인간 혈청 중의 자유 핵산(cell free DNA)의 양을 측정한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

[37] 본 발명은 1) SILD를 내부표준물질로서 분석대상 시료 및 비교대상

시료(대조군 또는 표준물질) 시료에 동일량 첨가하는 단계, 2) 각 시료로부터 핵산을 추출하거나 정제하는 단계, 3) 정제된 핵산을 효소반응을 통해 단일 뉴클레오타이드(nucleoside) 수준으로 가수분해하는 단계, 4) 액체 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS)을 통해 각 뉴클레오타이드 및 안정동위원소 치환된 뉴클레오타이드를 분리, 검출, 정량하는 단계, 5) 내부표준물질의 신호값을 이용해 전체 단계의 효율 차이를 보정하고 분석대상 시료 내에 있던 핵산의 양을 정량적으로 산출하는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 매질 내 핵산 정량법이다.

- [38] 도 1은 SILD를 내부표준물질로 활용하여 매질 내 핵산을 정량하는 과정에 대한 모식도이다. SILD를 분석대상 시료와 비교대상 시료(또는 표준물질 시료)에 동일량을 첨가한 후 두 시료를 추출 및 정제, 효소반응에 의한 가수분해, 질량분석을 차례대로 수행한다. 최종적으로 질량분석 결과에서 동일량을 넣어준 SILD의 신호값은 두 시료에 대한 전체 반응 효율 및 수율의 척도가 되고 그림에 기술한 공식, 정확히는 아래에 기재된 식에 의해 매질 내 핵산의 절대량 또는 상대량을 계산할 수 있다.

$$[39] \quad \text{핵산(분석대상)} = \text{핵산검출값(분석대상)} \times \frac{\text{핵산(대조군)}}{\text{핵산검출값(대조군)}} \times \frac{\text{SILD검출값(대조군)}}{\text{SILD검출값(분석대상)}}$$

- [40] 여기서 핵산(분석대상)은 분석대상 시료의 핵산의 양, 핵산검출값(분석대상)은 분석대상 시료의 핵산의 질량분석에서의 검출값, 핵산(대조군)은 대조군 시료의 핵산의 양, 핵산검출값(대조군)은 대조군 시료의 핵산의 질량분석에서의 검출값, SILD검출값(대조군)은 대조군 시료의 치환된 핵산(SILD)의 질량분석에서의 검출값, SILD검출값(분석대상)은 분석대상 시료의 치환된 핵산(SILD)의 질량분석에서의 검출값을 말한다.

- [41] 본 발명을 실시하기 위해서는 SILD를 생산하는 것이 우선적으로 필요하다.

[42] 1. SILD의 생산 및 확인

- [43] SILD의 생산은 참고문헌(Appl Microbiol Biotechnol (2010) 88:771-779)에 기술된 방법에 따라 수행하였다. 간략하게 설명하면 필수 무기원소만으로 구성된 LMR 배지(176mM KH₂PO₄, 25mM NaOH, 10μl H₂SO₄, 12.6mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 10 microMole FeSO₄, 0.2 % Trace metal solution) 조성에서 ¹⁵N으로 치환된 (NH₄)₂SO₄를 사용하였고(Cambridge Isotope Laboratory) 탄소원으로서는 0.2%의 ¹³C로 치환된 글리세롤(glycerol)을 첨가한 배지를 사용하였다. 대장균은 표준 균주인 KCTC11을 사용하였다. 안정동위원소 배지에서 배양된 대장균으로부터의 유전체 DNA 추출은 Genelute Bacterial genomic DNA kit(Sigma-Aldrich)를 이용해서 수행하였다. 추출된 유전체 DNA가 안정동위원소로 잘 표지됐는지 확인하기 위해 DNA 약 500ng을 DNase I (Takara)과 Phosphodiesterase I (Affymetrix)을 이용해 뉴클레오타이드(dNMP) 수준으로 가수분해 하고 LC-Quadrupole-TOF(AB SCIEX 5600) 질량분석기를 통해 각 뉴클레오타이드를 검출하였다(도 2 참조).

[44] 도 2에서 볼 수 있듯이 일반 배지에서 배양한 대장균 DNA와 안정동위원소 배지에서 배양한 대장균 DNA는 dCMP와 TMP의 경우 분자량이 12가 차이గా 나고 dAMP와 dGMP는 15가 차이가 난다. 이러한 차이는 각 뉴클레오시드에 있는 탄소 및 질소가 모두 치환됐다고 가정했을 때 나오는 차이에 해당한다. 그리고 안정동위원소 배지에서 배양된 DNA에서는 분자량이 작은 정상 뉴클레오시드는 검출이 되지 않는다. 따라서 본 발명에서 실시한 방법에 의하면 대장균 DNA가 100%에 가까운 수준으로 안정동위원소로 표지되었다는 사실을 확인할 수 있었다.

[45] 2. 매질 DNA의 추출 및 정제 효율 보정 및 DNA 정량 분석

[46] 안정동위원소 표지된 대장균 DNA를 내부표준물질로 첨가했을 때 매질 DNA 추출 및 정제 효율을 제대로 보정하는지 확인하기 위해 대표적인 매질로서 단백질을 의약품 보관 용 버퍼(hGH buffer: 2.25 % Mannitol, 0.5 % Glycine, 0.15 % Sodium phosphate, 5 mg/mL Bovine serum albumin)를 선정하였다. hGH 버퍼에 분석대상 시료로서 100ng의 아는 양의 DNA를 첨가했고 내부표준물질로서 약 100ng에 해당하는 SILD를 첨가하였다. 동일량의 SILD를 정량의 표준물질로서 값을 미리 알고 있는 human placental DNA 및 dNMP 시료에도 첨가하였다. SILD가 첨가된 시료는 PCR purification kit (QPK, Qiagen), QiaAmp DNA Blood mini kit (QBD, Qiagen), Serum/plasma cell free DNA midi kit (Sigma, Sigma-Aldrich) 및 QiaAmp circulating nucleic acid kit (QC, Qiagen) 등 4종류의 서로 다른 키트를 이용해 추출 및 정제하였다(도 3). DNA는 DNase I (Takara)과 Phosphodiesterase I (Affymetrix)을 이용해 뉴클레오티드(dNMP) 수준으로 가수분해 하고 다시 Shrimp alkaline phosphatase(Takara)를 이용해서 뉴클레오시드(dN)으로 가수분해하였다. 가수분해 된 4종의 뉴클레오시드는 LC-Quadrupole-TOF (AB SCIEX 5600) 질량분석기를 통해 정량 분석하였다. 각 정제된 시료에서 산출된 정상 뉴클레오시드의 피크 면적과 SILD 유래 뉴클레오시드의 피크 면적을 기반으로 다음과 같은 공식에 적용하여 매질 내 DNA 양을 산출하였다. 하기 식은 분석대상 시료와 내부표준물질이 동일한 100ng이 적용되었을 경우에만 사용될 수 있다.

$$[47] \quad \text{DNA(시료)} = \text{DNA(표준물질)} \times \frac{\text{SILD(표준물질)}}{\text{SILD(시료)}}$$

[48] 키트 별 보정 전 및 보정 후의 핵산 정량 결과는 도 3에 비교돼 있다. SILD로 보정하지 않고 정량한 결과는 최초 기준값 대비 키트에 따라 20 - 70 % 수준의 정량값을 보여준다. 반면에 본 발명에서 제시하는 SILD로 정제 및 가수분해 반응을 보정한 결과에서는 기준값 대비 90 - 105 % 수준의 정량값을 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 매질 내 핵산 정량분석에 있어서 SILD 내부표준물질을 사용함으로써 정량의 정확도를 획기적으로 높일 수 있다는 사실을 의미한다. 이에 더해 SILD 내부표준물질을 사용하면 심지어는 핵산 정제 과정을 생략한

경우에도 매우 정확한 핵산 정량이 가능하다는 사실을 확인할 수 있었다.

- [49] 도 3에서 보듯이 보정하지 않은 경우의 뉴클레오타이드 피크 면적은 기준값의 약 50 % 수준으로서 효소에 의한 가수분해의 효율 및 질량분석의 이온화 효율이 정제된 핵산 대비 낮다는 것을 알 수 있다. 이렇게 낮아진 효율은 hGH버퍼에 포함돼 있는 방해 요인들이 정제에 의해 제거되지 않았기 때문으로 해석이 된다. 그러나 SILD를 이용하면 이처럼 낮은 가수분해 효율 및 이온화 효율까지도 보정을 해주기 때문에 최종 결과의 핵산 정량값은 기준값 대비 101.5%로서 매우 정확한 정량이 가능하였다. 이와 같은 관찰 결과를 바탕으로 SILD를 내부표준물질로 사용하면 매질 내 핵산 양을 추출 및 정제 키트 종류에 무관하게 그리고 더 나가서는 정제를 하지 않은 경우에도 매우 정확하게 핵산 양을 측정할 수 있다는 결론을 얻을 수 있다.

[50] 3. 인간 혈청 중의 자유 DNA 정량 분석

- [51] 안정동위원소 표지된 대장균 DNA를 내부표준물질로 첨가했을 때 매질 DNA 추출 및 정제 효율을 제대로 보정하는지 확인하기 위해 인간 혈청 중의 자유 DNA를 정량 분석하였다. 혈청 중의 자유 DNA를 정제하기 전에 16개의 인간 혈청 시료 각 0.5ml에 약 50ng의 SILD를 첨가하였다. 또한 정량의 기준으로서 양을 미리 알고 있는 dNMP 표준물질 혼합물(4종 개별 뉴클레오타이드 각 20ng/ml 농도)에도 동일한 양의 SILD를 내부표준물질로 첨가하였다.
- [52] SILD가 첨가된 시료는 Circulating cell free DNA purification kit(Qiagen)을 이용해 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 앞에서 서술한 바와 동일하게 가수분해를 거쳐 LC-MS에서 정량 분석하였다. 그 결과는 도 4에 나타나 있다. 도 4에 나타난 측정값의 범위는 50 - 500ng/ml로서 일반적으로 DNA 추출 및 정제 효율을 보정하지 않은 실험에서 산출된 20 - 100ng/ml보다 상당히 높은 값의 분포를 보이고 있다. 이는 DNA 정제에 사용된 키트의 정제 효율이 약 40%라는 점을 고려하면 본 발명에서 사용한 측정법은 이 정제 효율을 완전하게 보정했기 때문에 약 두 배 정도의 높은 측정값을 얻은 것으로 판단된다. 이상의 결과를 통해 본 발명에서 제시하는 ‘안정동위원소 표지 DNA를 내부표준물질로 활용하는 매질 내 DNA 측정법’은 DNA의 정제 효율, 효소에 의한 가수분해 효율, LC-MS에서의 변동성을 한꺼번에 보정함으로써 정확한 정량을 가능하게 하는 방법임을 확인할 수 있다.

산업상 이용가능성

- [53] 본 발명은 SILD를 내부표준물질로 활용함으로써 매질 내에 있는 핵산의 추출 및 정제 과정에서 발생하는 수율의 차이를 보정할 수 있게 해 주는 것이다. 또한 첨가된 내부표준물질은 정제 후의 효소 반응 및 질량분석의 효율도 보정한다. 예를 들어서, 일부 불순물이 남아 있을 경우 효소 반응이나 질량분석의 이온화 효율이 달라질 수 있는데 이런 효과를 내부표준물질 또한 동일하게 받기 때문에 내부표준물질의 신호값 비를 이용해서 분석대상물질이 받은 방해 효과를

보정할 수 있게 된다. 종합적으로 SILD를 내부표준물질로의 사용은 매질 시료의 핵산을 정량분석하기 위해 수행되는 모든 절차 및 반응의 효율을 보정함으로써 매질 핵산 정량분석의 정확도를 개선할 수 있게 한다.

[54]

청구범위

- [청구항 1] 1) ^{13}C 및/또는 ^{15}N 의 안정동위원소로 치환된 핵산(SILD)을 준비하는 단계;
 2) 상기 치환된 핵산(SILD)을 분석대상 시료 및 대조군 시료에 내부표준물질로서 각각 동일량 첨가하는 단계;
 3) 상기 분석대상 시료 및 상기 대조군 시료로부터 핵산을 얻는 단계;
 4) 상기 3) 단계에서 얻은 핵산을 단일 뉴클레오시드 수준으로 가수분해하는 단계;
 5) 질량분석에서 상기 4) 단계에서 얻은 뉴클레오시드로부터 정상 뉴클레오시드와 치환된 핵산(SILD) 유래 뉴클레오시드 검출값을 얻는 단계;
 6) 상기 치환된 핵산(SILD) 유래 뉴클레오시드 검출값이 분석대상 시료와 대조군 시료에서 같아야 하는 특성을 이용해 분석대상 시료 핵산의 양을 보정하는 단계;
 를 포함하는 핵산의 정량 분석방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 핵산은 DNA 또는 RNA이며,
 상기 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 소변, 타액, 땀, 우유, 동물 추출액, 식물 추출액, 세포 추출액, 세포 배양액, 식수, 상수, 하수, 강물, 바닷물 중 적어도 하나 이상인 핵산의 정량 분석방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
 상기 핵산은 DNA이며, 상기 시료는 혈청인 핵산의 정량 분석방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
 상기 치환된 핵산(SILD)이 대장균, 사람, 생쥐, 효모, 식물, 초파리, 예쁜꼬마선충 중에서 하나로부터 유래한 것인 핵산의 정량 분석방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
 상기 치환된 핵산(SILD)이 대장균으로부터 유래한 것인 핵산의 정량 분석방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
 상기 얻는 단계는 추출 및 정제인 핵산의 정량 분석방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
 상기 가수분해는 효소 반응, 산(acid) 처리, 열(heat) 처리, 방사선 처리, 초음파 처리 중 적어도 하나 이상인 핵산의 정량 분석방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
 상기 단일 뉴클레오시드 수준은 전체 핵산의 99.5% 이상(중량 기준)이 단일 뉴클레오시드로 가수분해되는 것인 핵산의 정량 분석방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
 상기 보정하는 단계는 하기 식에 의해서 계산되는 것인 핵산의 정량

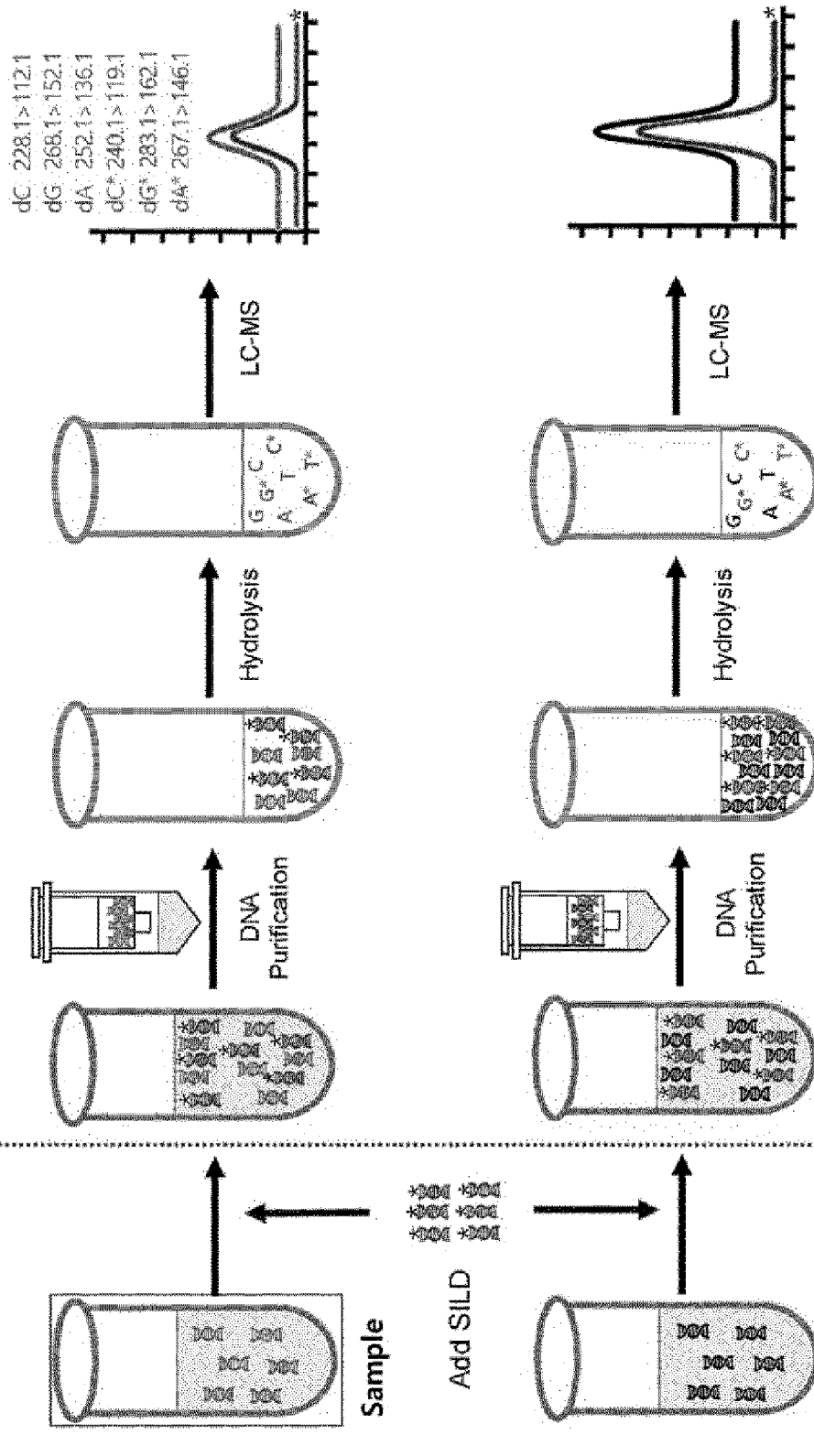
분석방법;

여기서 핵산(분석대상)은 분석대상 시료의 핵산의 양,
핵산검출값(분석대상)은 분석대상 시료의 핵산의 질량분석에서의
검출값, 핵산(대조군)은 대조군 시료의 핵산의 양, 핵산검출값(대조군)은
대조군 시료의 핵산의 질량분석에서의 검출값, SILD검출값(대조군)은
대조군 시료의 치환된 핵산(SILD)의 질량분석에서의 검출값,
SILD검출값(분석대상)은 분석대상 시료의 치환된 핵산(SILD)의
질량분석에서의 검출값을 말한다.

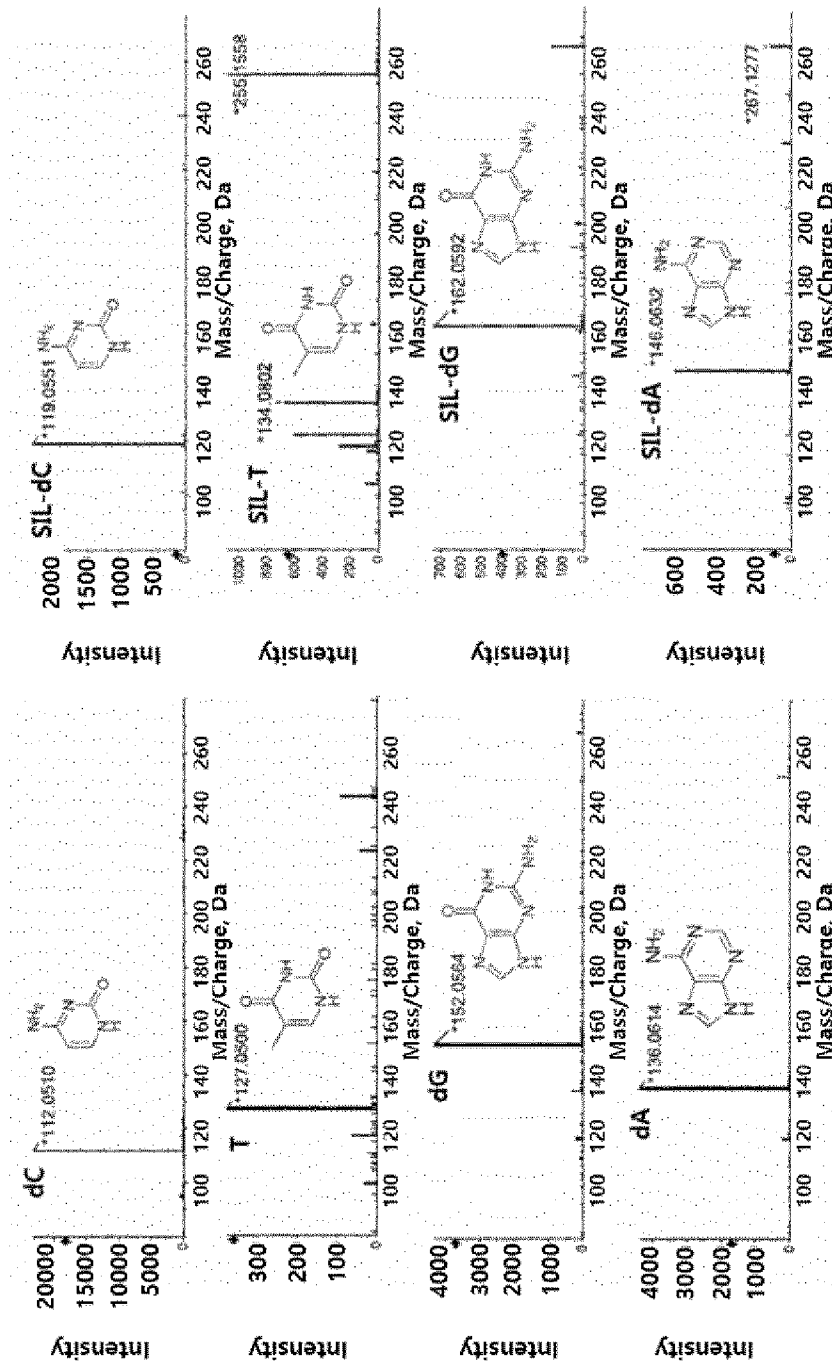
[도 1]

각 단계의 반응 효율 차이는 안정동위원소 표지 DNA(SILD)에 의해 보정

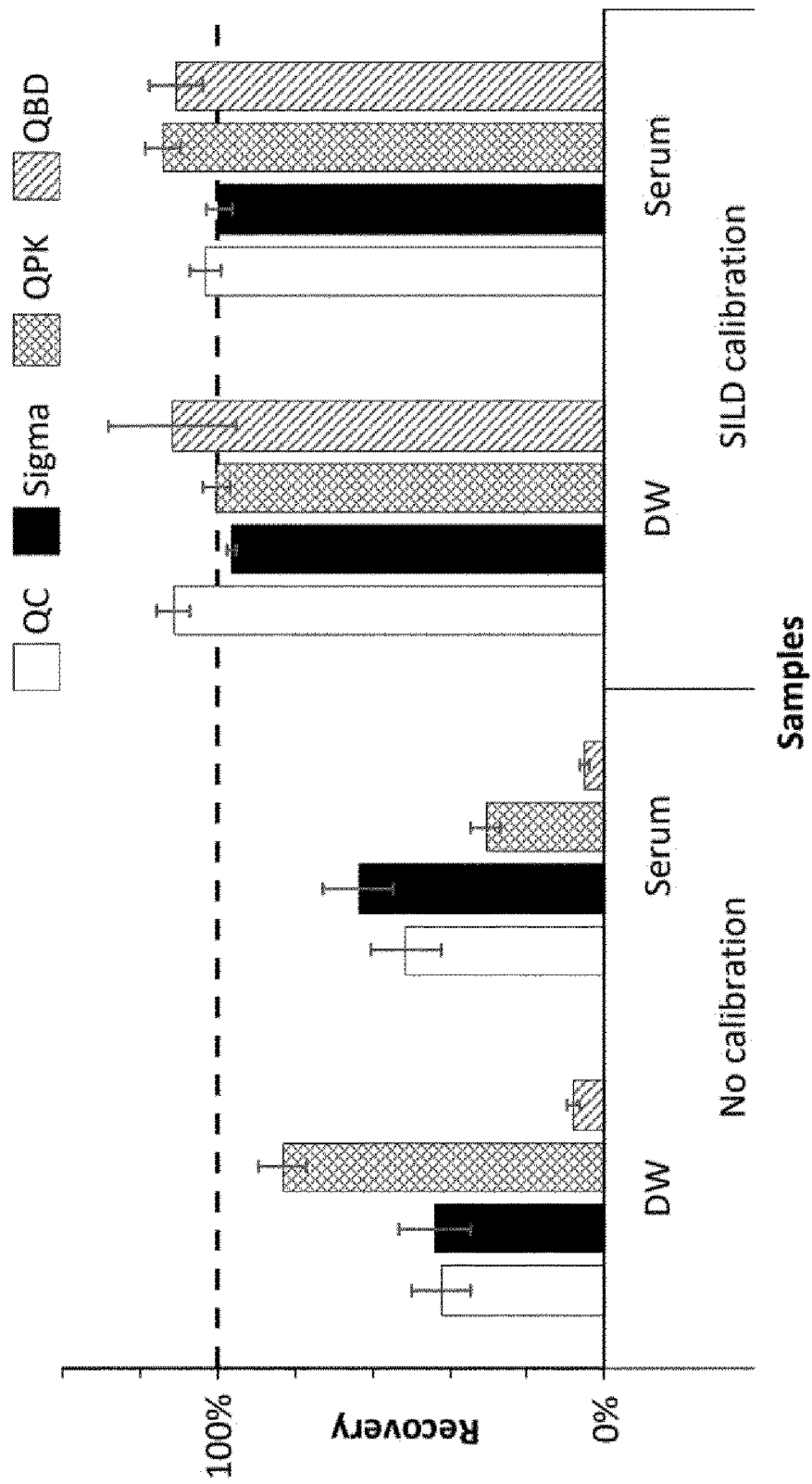
$$\text{DNA}(\text{sample}) = \text{DNA}(\text{control}) \times \frac{\text{SILD}(\text{control})}{\text{SILD}(\text{sample})}$$



[도2]



[도3]



[도4]

