

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 3월 9일 (09.03.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/039286 A1

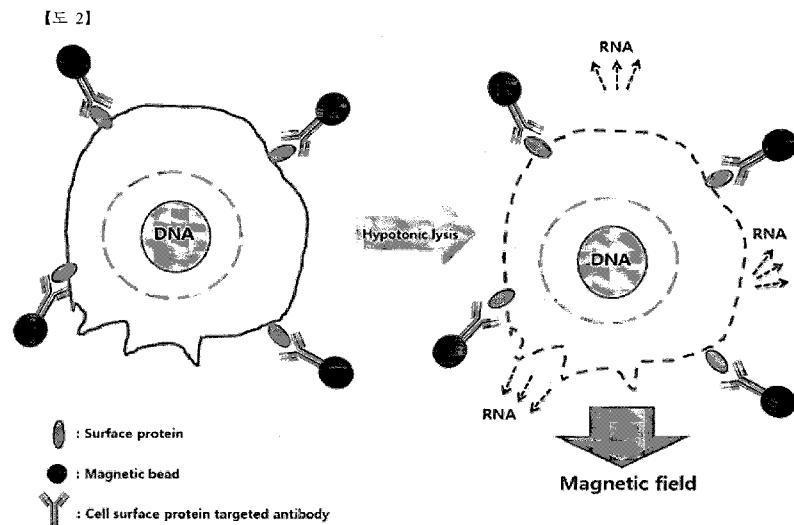
- (51) 국제특허분류: *C12N 15/10* (2006.01) *G01N 35/00* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/009660
- (22) 국제출원일: 2016년 8월 30일 (30.08.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2015-0123496 2015년 9월 1일 (01.09.2015) KR
- (71) 출원인: 삼성전자 주식회사 (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) [KR/KR]; 16677 경기도 수원시 영통구 삼성로 129, Gyeonggi-do (KR). 사회복지법인 삼성생명 공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로 55길 48, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 한정연 (HAN, Kyung Yeon); 05678 서울시 송파구 송이로 12길 11, 102동 802호, Seoul (KR). 박동현 (PARK, Dong Hyun); 24447 강원도 춘천시 영서로 2169, 104동 164호, Gangwon-do (KR). 박웅양 (PARK, Woongyang); 06519 서울시 서초구 신반포로 33길 66, 102동 207호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 팬코리아특허법인 (PANKOREA PATENT AND LAW FIRM); 06234 서울시 강남구 논현로 85길 70, 13F, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, 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:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING NUCLEIC ACID

(54) 발명의 명칭: 핵산 분리 방법



(57) Abstract: A method for effectively isolating DNA and RNA from a single cell sample is provided. DNA and RNA can be isolated from a single cell sample by the isolation method, and thus genome information and transcriptome information can be simultaneously collected and/or analyzed.

(57) 요약서: 단일 세포 시료에서 DNA와 RNA를 효과적으로 분리하는 방법이 제공된다. 상기 분리 방법에 의하여, 하나의 세포 시료로부터 DNA와 RNA의 분리가 가능하여, 유전체 (genome) 정보와 트랜스크립톰 (transcriptome) 정보를 동시에 수집 및/또는 분석할 수 있다.



WO 2017/039286 A1

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

핵산 분리 방법

5 【기술분야】

세포 시료에서 DNA와 RNA를 효과적으로 분리하는 방법이 제공된다. 상기 분리 방법에 의하여, 하나의 세포 시료로부터 DNA와 RNA의 분리가 가능하며, 유전체 (genome) 정보와 트랜스크립톰 (transcriptome) 정보를 동시에 수집 및/또는 분석할 수 있다.

10

【배경 기술】

최근, 질병의 진단, 치료 전략 수립, 치료 모니터링 등의 분야에서, 유전체 (genome) 또는 DNA, 트랜스크립톰 (transcriptome) 또는 RNA 등의 유전 정보의 분석 및 해석에 대한 연구의 중요성이 증진되고 있다.

15

이러한 유전 정보의 분석을 위하여, 시료로부터 DNA, RNA 등의 핵산을 효율적으로 분리하는 것이 중요하다.

이와 관련하여, 미국특허 제US5777098호는 세포 내 DNA를 분리/정제하기 위한 방법을 제공하지만, RNA의 분리 및 분석에 대해서는 기재하지 않아서, 또 다른 시료에서의 RNA의 분리 및 정제를 위한 처리

20

과정을 별도로 수행하여야 하는 번거로움이 있다. 따라서, 보다 간편하면서 효율적으로 DNA, RNA 등의 핵산을 분리하는 방법의 개발이 요구된다.

【발명의 내용】

25

【해결하려는 과제】

본 발명의 일 예는 하나의 세포 (single cell)로부터 DNA와 RNA를 동시에 분리하는 핵산 분리 방법을 제공한다.

보다 구체적으로, 상기 핵산 분리 방법은

(1) 목적 세포가 포함된 세포 시료(예컨대, 하나의 목적 세포가 포함된 세포 시료)를 준비하는 단계;

30

(2) 상기 목적 세포의 세포막 표면에 존재하는 단백질에 결합하는 표적 물질이 부착된 비드를 상기 세포 시료에 처리하여 목적 세포의 세포막에 비드를 결합시키는 단계;

5 (3) 상기 세포 시료에 저장성 용액을 처리하여 세포막을 용해시켜 세포 용해물을 얻는 단계;

(4) 상기 얻어진 세포 용해물의 액상부와 고형부를 얻는 단계;

(5) 상기 단계 (4)에서 얻어진 액상부로부터 RNA를 분리하는 단계; 및

(6) 상기 단계 (4)에서 얻어진 고형부로부터 DNA를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

10

【과제의 해결 수단】

세포 시료로부터 DNA와 RNA를 동시에 분리하는 방법이 제공된다.

본 명세서에서, 세포 시료 내의 목적 세포의 세포 표면 (세포막의 외부 노출 부분)에 위치하는 단백질과 결합하는 표적 물질 (예컨대, 항체, 폴리펩타이드, 압타머 등)가 표면에 부착(접합)된 비드를 이용하여 비드를 목적 세포의 세포막에 결합시키고, 저장성 용액을 이용하여 세포를 용해시키면, 용해된 표적 세포의 세포막은 비드에 결합된 상태로 세포 용해물에 존재하고, 세포질에 존재하던 RNA는 세포에서 유리(용출)된 상태 세포 용해물에 존재하게 된다. 이 때, 저장성 용액의 농도를 조절하면 세포막만 용해되고 핵막은 유지되어, 세포 용해물 내에 완전한 상태의 핵이 존재하게 되며, 유지된 핵막은 액틴 등의 마이크로필라멘트, 튜블린 등의 마이크로튜블 등과 같은 세포골격성분 (cytoskeleton)에 의하여 세포막과 연결되어 있으므로, 세포막에 결합된 비드에 용해되지 않은 온전한 상태의 핵이 함께 포획된다. 상기 세포 용해물을 원심분리하면 세포로부터 유리(용출)된 RNA가 포함된 상층액과 비드에 결합된 세포막과 핵이 포함된 침전물이 얻어진다. 상기 얻어진 상층액으로부터 RNA를 분리할 수 있으며, 상기 얻어진 침전물로부터 핵에 존재하는 DNA를 분리할 수 있다. 본 발명은, 상기와 같은 연구를 통하여 완성된 것으로, 동일한 세포 시료로부터 DNA와 RNA를 동시에 분리하는 핵산 분리 방법을 제공한다.

30 상기 핵산 분리 방법은

(1) 목적 세포가 포함된 세포 시료를 준비하는 단계;

(2) 상기 목적 세포의 세포막 표면에 존재하는 단백질에 결합하는 표적 물질이 부착된 비드를 상기 세포 시료에 처리하여 목적 세포의 세포막에 비드를 결합시키는 단계;

5 (3) 상기 비드와 결합한 목적 세포에 저장성 용액을 처리하여 세포막을 용해시켜 세포 용해물을 얻는 단계;

(4) 상기 얻어진 세포 용해물의 액상부와 고형부를 얻는 단계;

(5) 상기 단계 (4)에서 얻어진 액상부로부터 RNA를 분리 및/또는 분석하는 단계; 및

10 (6) 상기 단계 (4)에서 얻어진 고형부로부터 DNA를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

상기 세포 시료가 다수의 세포를 포함하는 벌크 시료 (bulk sample)인 경우, 하나의 목적 세포를 추출(sampling)하는 단일 세포 샘플링 (single cell sampling)단계가 필요하다. 따라서, 상기 세포 시료가 다수의 세포를 포함하는

15 벌크 시료 (bulk sample)인 경우, 상기 핵산 분리 방법은, 상기 단계 (2) 및 단계 (3) 사이에, 단계 (2-1) 상기 반응물로부터 비드에 결합된 하나의 목적 세포를 추출하는 단일 세포 추출 (single cell sampling) 단계를 추가로 포함할 수 있다.

상기 단계 (2-1) 단일 세포 추출 단계는 비드에 결합된 하나의 목적 세포를 분리하여 반응 용기 (예컨대, 튜브, 웰 플레이트 등)에 분주하는 단계를 포함할
20 수 있다. 일 예에서, 상기 하나의 목적 세포의 분리는, 예컨대, FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) 방법에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 통상적인 세포 분리 방법에 의하여 수행될 수 있다.

상기 단계 (1)에서, 목적 세포는 핵산 정보의 분리 및/또는 분석이 필요한 세포를 의미한다. 상기 세포 시료는 생체에서 분리된 세포를 포함하는

25 것으로, 상기 목적 세포만을 포함하거나, 목적 세포 이외에 다양한 종류를 함께 포함하거나, 상기 세포를 PBS 등의 버퍼 또는 배지와 함께 포함하는 것일 수 있다. 상기 목적 세포는 고유의 표면 마커 (예컨대, EpCAM 등)가 알려져

있어서 상기 마커 결합 분자(표적 물질)가 표면 부착된 비드와 결합이 가능한 모두 세포일 수 일 수 있다. 상기 목적 세포 및/또는 상기 세포 시료에 포함된

30 세포는 모든 진핵 세포들 중에서 선택될 수 있으며, 예컨대, 동물 세포, 식물

세포, 세균, 진균 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 세포는 동물, 식물, 세균, 진균 등으로부터 유래된 세포 및/또는 상기 세포의 배양물일 수 있다. 상기 세포는 체세포, 생식세포, 배아줄기세포, 성체줄기세포, 만능유도줄기세포, 중간엽줄기세포 등의 줄기세포, 유전자 조작 세포 등 모든

5 유형의 세포 또는 세포주일 수 있다. 상기 세포는 정상 세포 및/또는 종양 세포/암세포 (조직 또는 혈액 중 암세포, 복강 내 암세포 등), 염증세포, 염색체 이상 세포 등의 이상 세포 등일 수 있다. 상기 세포 시료는 환자로부터 얻어진(분리된) 세포, 세포주, 또는 이의 배양물일 수 있으며, 상기 환자는 인간을 포함한 포유류일 수 있다.

10 세포 시료에 다양한 종류 또는 여러 개의 세포가 포함된 경우 (large population), 구축된 유전체 및 트랜스크립톰 정보 및 이를 바탕으로 진행된 통상적 시퀀싱은 개별 세포의 동력학(dynamics)적 특성과 세포 별 이질성(heterogeneity)을 대변하지 못할 수 있다. 또한, 이 경우, DNA와 RNA가 여러 개의 세포로부터 유래하는 DNA 혼합물 및 RNA 혼합물 형태로

15 얻어지므로, 이들의 유래 세포별로 DNA와 RNA를 matching하는 것이 매우 곤란하다. Bulk signal에 가려진 유전체 및/또는 트랜스크립톰의 변이의 정확한 분석 및 개개의 목적 세포로부터 유래하는 유전체 (DNA)와 트랜스크립톰(RNAs)의 정확한 matching을 위하여, 단일 세포 (single cell) 수준에서 분석하는 것이 유리할 수 있다.

20 따라서, 일 예에서, 상기 목적 세포는 하나의 세포일 수 있고, 상기 세포 시료는 하나의 목적 세포만을 포함하는 단일 세포 (single cell) 시료일 수 있다. 상기 세포 시료가 다수의 세포를 포함하는 경우, 앞서 설명한 바와 같이, 단계 (2-1) 단일 세포 추출 단계를 추가로 수행할 수 있다.

그러나, 단일 세포 시료에는 RNA가 극미량 존재하여 샘플 수득, reverse

25 transcription 및 cDNA 합성 단계에 어려움이 있다. 이러한 실험적 난관은 biological variation 의 정확한 분석을 어렵게 만든다.

본 발명에서 제공되는 핵산 분석 방법은, 단일 세포에서 얻어진 sub-pg 수준의 RNA를 손실 없이 효과적으로 추출하여 전체 트랜스크립톰 분석 (whole transcriptome analysis) 에 활용 가능한 cDNA library를 제공할 수 있어서, 개별

30 세포의 동력학적 특성과 세포 별 이질성을 대변하면서 동시에 적은 양의

RNA로도 정확한 분석이 가능하다는 이점이 있다. 또한, RNA 추출 시 별도의 표지(tagging) 및/또는 전처리 없이 isolation 가능하다는 이점이 있다.

상기 단계 (2)에서, 상기 비드는, 고체 재질이면 특별한 제한이 없으며, 자성 비드, 실리카 비드, 고분자 비드 (예컨대, 폴리스티렌 비드 등), 유리 비드, 셀룰로오스 비드, 퀀텀닷(Q-dot), 금속 비드 (예컨대, 은(Au), 금(Ag), 구리(Cu), 등), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 예컨대, 상기 비드는 자성 비드일 수 있다. 자성 비드는 자성 입자와 상기 자성 입자의 외부 표면을 실리카, 금속, 고분자 등으로 코팅한 코어/셸 구조의 구조체로서, 이 경우 세포 시료와의 반응 후 자석을 이용하여 미반응 세포를 용이하게 제거할 수 있고, 이후 단계에서 세포 용해 후 원심분리 과정 없이 자석을 사용하여 액상부와 고상부를 용이하게 분리시킬 수 있다는 이점이 있다. 또한, 자성 비드는 단일 세포 표적시에 마이크로그램 수준의 극미량의 시료로부터도 손실 없이 수득물을 손쉽게 분리할 수 있다는 이점이 있다.

상기 비드의 크기는, 특별한 제한은 없지만, 비드의 직경이 너무 작으면 비드 응집 (bead aggregation) 단계 없이 분리하기가 곤란하고, 너무 크면 세포-비드 접합 반응 시에 세포에 손상을 줄 수 있으므로, 적절한 크기로 조절되는 것이 유리하다. 예컨대, 상기 비드는, 효율적인 세포막 단백질 부착 및 분리를 위하여, 평균 직경이 1 μ m 내지 20 μ m, 1 μ m 내지 15 μ m, 1 μ m 내지 10 μ m, 5 μ m 내지 20 μ m, 5 μ m 내지 15 μ m, 5 μ m 내지 10 μ m, 10 μ m 내지 20 μ m, 또는 10 μ m 내지 15 μ m 일 수 있다. 또한, 상기 비드는 2 가지 이상의 크기를 갖는 비드가 혼합된 것일 수 있다. 즉, 상기 비드는 동일한 크기의 것이거나, 서로 상이한 크기를 갖는 비드의 혼합물일 수 있다.

상기 비드 표면에 부착된 표적 물질은 목적 세포의 세포막에 존재하는 단백질에 특이적으로 결합 가능한 항체, 항체의 항원 결합 단편, DARPin 등의 단백질 스캐폴드, 압타머, 소분자 화합물 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 표적 물질은 목적 세포의 종류에 따라서 적절히 선택될 수 있다.

상기 목적 세포의 세포막에 존재하는 단백질은, 예컨대, 상기 목적세포에 특이적으로, 세포막의 외부 (세포 밖) 표면에 전부 또는 일부 노출된 모든 단백질일 수 있으며, 예컨대 각종 수용체, 세포막통과 당단백질

(transmembrane glycoprotein; 예컨대, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 수용체는 수용체 티로신 키나아제 단백질일 수 있으며, 예컨대, 각종 성장 인자 (예컨대, EGF(Epidermal growth factor), PDGF(Platelet-derived growth factor), FGF(fibroblast growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor) 등)의 수용체로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 수용체는 예컨대, EGFR(Epidermal growth factor receptor), HER2, HER3 등을 포함하는 ErbB 패밀리를 포함하는 HGF 수용체(hepatocyte growth factor receptor; HGFR), Trk 수용체(tropomyosin-receptor-kinase receptor), Eph 수용체(Ephrin receptor), AXL 수용체, LTK 수용체 (Leukocyte receptor tyrosine kinase), TIE 수용체, ROR 수용체(receptor tyrosine kinase-like orphan receptor), DDR 수용체 (Discoidin domain receptor), RET 수용체, KLG 수용체, RYK 수용체 (related to receptor tyrosine kinase receptor), MuSK 수용체 (Muscle-Specific Kinase receptor) 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 일 예에서 목적 세포의 세포막에 존재하는 단백질은 종양세포/암세포 표면 특이적 마커 단백질일 수 있다.

상기 항체는 목적 세포의 세포막에 존재하는 단백질을 항원으로 인식하는 모든 서브타입 (IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), 또는 IgM)의 항체일 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 상기 항원, 즉 목적 세포의 세포막에 존재하는 단백질에 특이적으로 결합하는 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 의미하는 것으로, 항체의 중쇄 CDR (complementarity determining region), 경쇄 CDR, 중쇄 가변 부위, 경쇄 가변 부위 또는 이들의 조합 (예컨대, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂)을 의미하는 것이다.

상기 단백질 스캐폴드는 단백질과 유사한 구조를 갖거나 특정 단백질 또는 특정 세포에 특이적으로 결합(및/또는 인식)하는 특성을 갖는 단백질 구조체로서, 예컨대, DARPin, 에피바디(Affibody), 라소(Lasso), 사이클로타이드(Cyclotide), 노틴(Knottin), Avimer, 쿠니츠 도메인(Kunitz Domain), 안티칼린(Anticalin), 아드넥틴(Adnectin), 프로넥틴(Pronectin), 피노머(Fynomer), 나노피틴(Nanofitin), 에필린(Affilin) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일

수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다

상기 표적 물질은 상기 비드 표면에 이온 결합, 공유 결합, 흡착 등의 비공유 결합, 리간드-수용체 결합 등을 통해 부착될 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 비드는 그 표면 자체가 상기 표적 물질과 결합 가능한 것이거나, 그
5 표면이 상기 표적 물질과 결합 가능한 관능기가 코팅 (표면 개질)되어 있는 것일 수 있다.

상기 비드 표면에 코팅될 수 있는 관능기는, 예컨대, 아민 커플링 (NH₂ coupling) 가능한 아민계 화합물, 티올 커플링 (SH coupling) 가능한 티올계 화합물, 카르복실 커플링 (COO coupling) 가능한 카르복실계 화합물, 단백질
10 G, 단백질 A 등의 항체 결합 단백질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정하지 않고, 표적 물질의 종류에 따라서 적절히 선택될 수 있다. 예컨대, 상기 관능기는 말레이미드(maleimide) 계열 화합물, 피리딜디티오(pyridyldithio) 계열 화합물, N-하이드록시숙신이미드(hydroxysuccinimide) 계열 화합물, 알데하이드, 단백질 G,
15 단백질 A 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

다른 예에서, 상기 표적 물질은 스트렙트아비딘-바이오틴 결합과 같은 리간드-수용체 결합에 의하여 비드 표면에 결합될 수 있다. 즉, 리간드와 수용체 중 하나는 비드 표면에 부착시키고, 다른 하나는 표적 물질에 부착시켜,
20 리간드-수용체 결합에 의하여 표적물질을 비드 표면에 부착시킬 수 있다. 예컨대, 통상적인 방법으로, 비드 표면에 스트렙트아비딘을 부착시키고, 표적 물질에 바이오틴을 결합시켜, 이들을 반응시키면, 비드 표면의 스트렙트아비딘과 표적 물질에 부착된 바이오틴 간 상호작용에 의하여, 표적 물질이 비드 표면에 부착된다.

상기 단계 (2)의 표적 물질이 부착된 비드는 제조하여 사용하거나 시판되는 제품을 입수하여 사용할 수 있다. 제조하여 사용하는 경우, 상기
25 단계 (2) 이전에 비드 표면에 표적 물질을 부착시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 비드 표면에 표적 물질을 부착시키는 단계는 비드에 표적 물질을 적용(첨가 또는 접촉)하고, 0 내지 35℃ 또는 10 내지 30℃, 예컨대
30 상온에서, 비드 표면에 표적물질이 결합하기에 충분한 시간, 예컨대, 0.5 내지

24시간, 0.5 내지 12시간, 0.5 내지 6시간, 1 내지 24시간, 1 내지 12 시간, 또는 1 내지 5시간 동안 반응시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 비드와 표적 물질 종류 등을 고려하여 적절히 조절할 수 있다. 상기 비드 표면에 부착하기 위하여 적용되는 표적 물질의 양은 사용되는 비드 및/또는 표적 물질의 종류에
 5 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 비드 표면에 결합 가능한 최대 용량 (즉, 포화 용량) (예컨대, 표적 물질로서 항체를 사용하는 경우 비드 표면에 결합 가능한 항체량 titration을 통하여 얻어진 비드 표면에 결합 가능한 최대 용량 (포화 용량)) 또는 이를 초과하는 과용량을 반응시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

10 상기 단계 (2)의 비드를 상기 세포 시료에 처리하는 과정은 세포 시료에 표적 물질이 부착된 비드를 첨가함으로써 수행될 수 있다. 이 때 첨가되는 비드의 개수가 너무 많으면 후단 분자 분석 단계에 방해줄 수 있으며 너무 적으면 세포 부착이 효과적으로 일어나지 않으므로, 첨가되는 비드 개수는 적절한 범위로 조절될 수 있다. 예컨대, 첨가되는 비드의 개수는 세포 시료
 15 내의 세포 개수의 1 내지 100배, 1 내지 50배, 1 내지 20배, 1 내지 15배, 5 내지 100배, 5 내지 50배, 5 내지 20배, 5 내지 15배, 7 내지 100배, 7 내지 50배, 7 내지 20배, 또는 7 내지 15배로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 목적 세포의 종류, 비드 표면에 부착된 표적 물질의 종류 등을 고려하여 적절히 조절할 수 있다.

20 비드 표면의 표적 물질이 목적 세포의 표면 단백질에 결합하도록 하기 위하여, 상기 단계 (2)에서 세포 시료에 비드를 처리한 후, 0 내지 35℃ 또는 10 내지 30℃, 예컨대 상온에서, 1 내지 60분, 5 내지 30분, 또는 10 내지 20분 동안 반응시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 목적 세포의 종류, 비드 표면에 부착된 표적 물질의 종류 등을 고려하여 적절히 조절할 수 있다.

25 자성 비드를 사용하는 경우, 상기 단계 (2) 이후에 (예컨대, 단계 (2)와 단계 (3) 사이에) 자석 등의 자기장 발생체를 적용하고 반응물을 세척하여 미반응(미결합) 세포를 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

 상기 단계 (3)에 있어서, 저장성 용액은 버퍼 수용액, 또는 계면활성제가 물 또는 버퍼 수용액에 용해된 계면활성제 용액일 수 있다. 상기 저장성
 30 용액은 DNA/RNA 분리 효율에 따라 그 조성을 적절하게 조절할 수 있다.

상기 버퍼는 생체 적합한 모든 버퍼 중에서 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않지만, 생체 적합성을 고려하여 pH 7.2 내지 7.6, 예컨대, pH 7.4인 것을 사용할 수 있다. 예컨대, 상기 버퍼는 포스페이트 버퍼 살린 (PBS), Hank's balanced saline solution (HBSS) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예컨대, PBS일 수 있다.

상기 계면활성제는 양이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 양성 계면활성제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 양이온성 계면활성제는 도데실 트리메틸 암모늄 브로마이드, 도데실 트리메틸 암모늄 클로라이드, 세틸트리메틸암모늄 브로마이드 등을 포함할 수 있고, 상기 음이온성 계면활성제는 도데실 황산 나트륨(SDS), 콜산 나트륨, 도데실 콜산 나트륨, N-라우로일사르코신 나트륨 등을 포함할 수 있으며, 상기 비이온성 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 옥틸페닐에테르 (예컨대, Triton X-100 등), 폴리소르베이트 (예컨대, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(Tween20), 폴리옥시에틸렌소르비탄모노올레이트(Tween80) 등), n-옥틸-β-D-글루코사이드, n-옥틸-β-D-글루코피라노시드, n-옥틸 티오-β-D-티오 글루코피라노시드, 옥틸 페닐-에톡시 에탄올(예컨대, 노니젯트P-40 (NP40) 등), 폴리에틸렌-라우릴 에스테르(예컨대, Brij35 등), 폴리에틸렌-글리콜 헥사데실-에스테르(예컨대, Brij58 등) 등을 포함할 수 있고, 상기 양성 계면활성제는 3-[(3-코라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판술포네이트 (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; CHAPS), 포스파티딜에탄올아민 등을 포함할 수 있다. 구체예에서, 핵산에 미치는 영향을 고려하여, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 옥틸페닐에테르 (예컨대, Triton X-100 등), 폴리소르베이트 (예컨대, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(Tween20), 폴리옥시에틸렌소르비탄모노올레이트(Tween80) 등), 3-[(3-코라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판술포네이트 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

상기 단계 (3)에서 얻어지는 세포 용해물은 세포막은 용해(파괴)되었지만 핵막은 유지되어 핵이 온전한 상태로 존재하는 것을

특징으로 한다. 상기 단계 (3)에서 사용된 저장성 용액의 농도가 너무 높으면 세포막의 용해가 일어나지 않으며, 너무 낮으면 세포막뿐 아니라 핵막도 용해된다. 따라서, 상기 저장성 용액은 세포막은 용해시키면서 핵막은 유지시키는 범위의 농도를 갖는 것을 특징으로 한다. 이를 위하여, 상기 버퍼 수용액 중의 물과 버퍼의 혼합비(물 부피:버퍼 부피; 총 100으로 함)는 부피 기준으로 95:5 내지 60:40, 95:5 내지 70:30, 95:5 내지 75:25, 95:5 내지 78:22, 95:5 내지 80:20, 90:10 내지 60:40, 90:10 내지 70:30, 90:10 내지 75:25, 90:10 내지 78:22, 90:10 내지 80:20, 85:15 내지 60:40, 85:15 내지 70:30, 85:15 내지 75:25, 85:15 내지 78:22, 85:15 내지 80:20, 82:18 내지 60:40, 82:18 내지 70:30, 82:18 내지 75:25, 또는 82:18 내지 78:22 일 수 있다. 구체예에서, 상기 버퍼 수용액은 물과 PBS가 부피비(물 부피:버퍼 부피; 총 100으로 함)로 95:5 내지 60:40, 95:5 내지 70:30, 95:5 내지 75:25, 95:5 내지 78:22, 95:5 내지 80:20, 90:10 내지 60:40, 90:10 내지 70:30, 90:10 내지 75:25, 90:10 내지 78:22, 90:10 내지 80:20, 85:15 내지 60:40, 85:15 내지 70:30, 85:15 내지 75:25, 85:15 내지 78:22, 85:15 내지 80:20, 82:18 내지 60:40, 82:18 내지 70:30, 82:18 내지 75:25, 또는 82:18 내지 78:22의 비율로 혼합된 PBS 수용액일 수 있다. 또한, 상기 계면활성제의 물 또는 버퍼 수용액에 대한 농도 (즉, 물 또는 버퍼 수용액의 부피를 100으로 하였을 때의 함유된 계면활성제의 부피)는 0.01 내지 10%(v/v), 0.01 내지 5%(v/v), 0.01 내지 1%(v/v), 0.01 내지 0.5%(v/v), 0.01 내지 0.3%(v/v), 0.05 내지 10%(v/v), 0.05 내지 5%(v/v), 0.05 내지 1%(v/v), 0.05 내지 0.5%(v/v), 0.05 내지 0.3%(v/v), 0.08 내지 10%(v/v), 0.08 내지 5%(v/v), 0.08 내지 1%(v/v), 0.08 내지 0.5%(v/v), 또는 0.08 내지 0.3%(v/v)일 수 있다. 또한, 용매로서 사용되는 버퍼 수용액 내의 물과 버퍼의 혼합비 (물 부피:버퍼 부피)는 부피 기준으로 95:5 내지 60:40, 95:5 내지 70:30, 95:5 내지 75:25, 95:5 내지 78:22, 95:5 내지 80:20, 90:10 내지 60:40, 90:10 내지 70:30, 90:10 내지 75:25, 90:10 내지 78:22, 90:10 내지 80:20, 85:15 내지 60:40, 85:15 내지 70:30, 85:15 내지 75:25, 85:15 내지 78:22, 85:15 내지 80:20, 82:18 내지 60:40, 82:18 내지 70:30, 82:18 내지 75:25, 또는 82:18 내지 78:22일 수 있다. 일 예에서, 세포막 용해에 의하여 용출된 RNA의 분해를 방지하기 위하여, 상기 저장성 용액 처리 전, 후, 또는 동시에, RNA 분해효소 저해제(RNase inhibitor)를 추가로 처리할 수 있다.

상기 RNA 분해효소 저해제의 종류는 특별한 제한이 없고, 통상적으로 사용되는 모든 유형의 RNA 분해효소 (예컨대, RNA 분해효소 A, B, C 등)에 대한 저해제들 중에서 적절하게 선택하여 사용할 수 있다. 상기 RNA 분해효소 저해제를 저장성 용액 내에 포함시켜 함께 처리하는 경우, 상기 저장성 용액

5 내의 RNA 분해효소 저해제의 함량은 0 내지 10%(v/v), 0 내지 5%(v/v), 0 내지 2%(v/v), 0.1 내지 10%(v/v), 0.1 내지 5%(v/v), 또는 0.1 내지 2%(v/v)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니고, RNA 분해효소 저해제 종류에 따라서 적절하게 조정할 수 있다. 또한, 상기 저장성 용액의 사용량은 세포 용액 1 μ l 기준으로

10 5 내지 20 μ l, 5 내지 15 μ l, 5 내지 10 μ l, 8 내지 20 μ l, 8 내지 15 μ l, 또는 8 내지 10 μ l, 예컨대, 세포 용액:저장성 용액 비율을 부피 기준으로 1:9로 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 세포 용액은 비드가 결합된 하나의 목적 세포가 포함된 계면 활성제 용액으로서, 상기 계면활성제는 앞서 설명한 바와 같다.

상기 단계 (3)에서, 세포 용해가 적절히 이루어지도록 하기 위하여, 상기

15 단계 (3)에서 세포 시료에 저장성 용액을 처리한 후, 0 내지 35 $^{\circ}$ C 또는 10 내지 30 $^{\circ}$ C, 예컨대 상온에서, 1 내지 60분, 3 내지 30분, 또는 5 내지 20분 동안 반응시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 목적 세포의 종류, 사용된 저장성 용액의 종류 및/또는 농도 등을 고려하여 적절히 조절할 수 있다.

상기 단계 (3)의 세포 용해 과정을 도 1에 모식적으로 나타내었다. 도

20 1은 저장성 용액 처리에 의하여 세포막만 선택적으로 파쇄되는 것을 모식적으로 보여준다. 세포막과 달리 핵기공(nuclear pore)을 갖는 핵막의 구조적 차이점에 의하여 저장성 용액의 침습시 세포막은 파쇄되어 용출된 RNA가 용액 상태로 존재하고, 핵막은 유지되어 온전한 상태의 핵이 존재하는 세포 침전물에 DNA가 존재하므로, 하나의 세포시료로부터 RNA와 DNA를

25 독립적으로 얻을 수 있다.

상기 단계 (4)의 세포 용해물의 액상부와 고형부를 얻는 단계는 용해된 세포의 세포질 성분이 포함된 액상부와 비드에 부착(포획)된 세포막 성분 및 세포골격성분에 의하여 세포막 성분과 연결된 핵막이 유지된 온전한 상태의 핵이 포함된 고형부를 분리하는 단계로, 상기 액상부에는 세포로부터 용출된

30 RNA가, 상기 고형부에는 핵 내에 존재하는 DNA가 포함되어 있다.

상기 단계 (4)의 세포 용해물의 액상부와 고형부를 얻는 단계는 상기 단계 (3)에서 얻어진 세포 용해물을 원심분리에 의하여 상층액 (액상부)과 침전물(고형부)을 분리함으로써 수행할 수 있다. 다른 예에서, 자성 비드가 사용된 경우, 상기 단계 (4)의 세포 용해물의 액상부와 고형부를 얻는 단계는 단계 (3)에서 얻어진 세포 용해물에 자기장을 형성하여 수행될 수 있다. 예컨대, 자성 비드가 사용된 경우, 상기 단계 (4)의 세포 용해물의 액상부와 고형부를 얻는 단계는 단계 (3)에서 얻어진 세포 용해물 또는 상기 세포 용해물을 포함하는 용기에 자석 등의 자기장 형성체를 적용하여 자성 비드에 의하여 포획된 세포막 및 핵을 고정화시켜 고형부(DNA 포함)가 형성되고, 자기장으로부터 자유로운 액상부(RNA 포함)가 형성된다.

본 발명에서, 상기 단계 (4)의 세포 용해물의 액상부와 고형부를 얻는 단계는 고형부를 거를 수 있는 기공 크기를 갖는 필터 사용하는 단계를 포함하지 않을 수 있다.

상기 (5) 액상부로부터 RNA를 분리하는 단계 및 (6) 고형부로부터 DNA를 분리하는 단계는 동시 또는 순서에 상관없이 순차적으로 수행될 수 있다.

상기 단계 (5)의 액상부로부터 RNA를 분리하는 단계는, 단계 (4)가 원심분리에 의하여 수행되는 경우 상층액으로부터 RNA를 분리함으로써 수행되고, 단계 (4)가 자기장 형성체에 의하여 수행되는 경우 자기장 형성체에 고정되지 않은 액상부로부터 RNA를 분리함으로써 수행될 수 있다.

앞서 설명한 바와 같이, 본 발명에서는 비드의 표적 물질이 목적 세포의 세포막을 표적하므로, 기존의 oligo dT가 결합된 비드를 이용하여 mRNA를 표적하던 것과 달리, mRNA 이외에 세포에 존재하는 모든 RNA가 분리 가능하다. 따라서, 상기 분리된 RNA는 mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, 기타 non-coding RNA 등으로 이루어진 모든 RNA 종류 중 하나 이상일 수 있으며, 일 예에서, 이들 모두를 포함하는 트랜스크립토姆 (transcriptome)일 수 있다.

상기 분리된 RNA는 모든 통상적인 수단 및/또는 방법을 통하여 정량 및/또는 정성 분석 가능하다. 따라서, 상기 단계 (5)의 액상부로부터 RNA를 분리하는 단계 이후에, 분리된 RNA의 정량 및/또는 정성 분석 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 RNA 분석은, 통상적인 방법에 의하여, RNA의

역전사에 의하여 cDNA를 제조하는 단계 및 상기 얻어진 cDNA를 증폭하는 단계에 의하여 수행될 수 있다. 상기 cDNA를 증폭하는 단계는 중합효소 연쇄반응(PCR; 예컨대 quantitative polymerase chain reaction (qPCR), Real-time PCR 등), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification), Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭, 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법에 의하여 수행될 수 있다. 다른 예에서, 상기 RNA 분석은 northern blot hybridization, dot 또는 slot blot hybridization, RNase protection assay 등의 통상적인 RNA 분석 방법에 의하여 수행될 수 있다.

상기 단계 (6)의 고품부로부터 DNA를 분리하는 단계는 단계 (4)가 원심분리에 의하여 수행되는 경우 침전물로부터 DNA를 분리함으로써 수행되고, 단계 (4)가 자기장 형성체에 의하여 수행되는 경우 자기장 형성체에 의하여 고정된 고품부로부터 DNA를 분리함으로써 수행될 수 있다. 상기 DNA 분리 단계는 핵막을 용해시키는 단계 및 용출된 DNA를 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 핵막을 용해시키는 단계는 통상적인 방법, 예컨대, 알칼라인 용해(alkaline lysis), 계면활성제 용해(detergent based lysis) 등의 화학적 용해, 초음파 처리(sonication), 기계적 파쇄(mechanical disruption), 쇠균(homogenization), 동결/해동 반복(freeze/thaw cycle) 등의 물리적 용해 등의 방법을 통하여 수행될 수 있다. 알칼라인 용해의 경우, Tris-EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid), sodium hydroxide/sodium dodecyl sulfate (NaOH/SDS) 등으로 이루어진 군에서 선택된 알칼라인 용액을 사용할 수 있으며, 임의로 dithiothreitol (DTT), proteinase K 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 추가제를 첨가하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 통상적으로 핵막 용해에 사용되는 모든 알칼라인 용액 및 반응 조건을 적절히 적용할 수 있다. 상기 용출된 DNA를 분리하는 단계는, 상기 핵막 용해 단계 이후에, 핵막 용해 단계가 수행된 반응물을 원심 분리하여 얻어진 상층액을 분리하거나, 자성 비드가 사용된 경우, 자기장 형성체(예컨대, 자석 등)에 의하여 자기장을 형성시켜(예컨대, 약 0.5 내지 약 3 분, 또는 약 0.5 내지 2 분 동안), 자성 비드를 통하여 핵막을 포획하여 제거하거나 용액부를 분리함으로써 수행될 수 있다.

이와 같은 RNA 및 DNA 분리 과정을 도 2에 모식적으로 나타내었다. 도 2는 세포막 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 접합시킨 자성 비드와 세포를 결합시킨 후, 저장성 용액을 이용하여 세포막을 선택적으로 파쇄시키고, 자기장을 걸어 세포 용해물에 접합된 자성 비드를 당겨, 5 세포로부터 용출되어 용액 속에 존재하는 RNA를 분리함으로써 RNA를 분리하고, 세포 용해물로부터 DNA를 추출(분리)하는 과정을 모식적으로 보여준다.

상기 핵막을 용해시키는 단계 이후, 또는 상기 용출된 DNA를 분리하는 단계 이후에, 비드를 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 자성 비드를 10 사용하는 경우, 자석 등의 자기장 형성체를 이용하여 제거할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 분리된 DNA는 모든 통상적인 수단 및/또는 방법을 통하여 정량 및/또는 정성 분석 가능하다. 따라서, 상기 단계 (6)의 고형부로부터 DNA를 분리하는 단계 이후에, 분리된 DNA의 정량 및/또는 정성 분석 단계를 추가로 15 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 DNA 분리는, 통상적인 방법에 의하여 증폭하는 단계에 의하여 수행될 수 있다. 상기 DNA 증폭하는 단계는 증합효소 연쇄반응(PCR; 예컨대 quantitative polymerase chain reaction (qPCR), Real-time PCR 등), multiple displacement amplification (MDA), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 20 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification), Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭, 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법에 의하여 수행될 수 있다.

종래의 기술은 pooled-sample 로 부터 DNA/RNA 분석용 샘플을 25 독립적으로 준비하여 분석하거나, 개별 단일 세포로부터 DNA/RNA 를 독립적으로 분석하여야 하는 문제점을 안고 있다. 본 발명의 일 예는 단일 세포의 세포막을 선택적으로 파쇄하여 RNA를 추출한 후, 부분 파쇄된 세포를 자성 비드를 이용하여 분리, DNA를 추출할 수 있는 기술을 제공함으로써, 하나의 세포 시료로부터 유전체와 트랜스크립토를 동시에 분리, 분석 및/또는 30 비교 할 수 있다는 이점을 갖는다.

【발명의 효과】

전체 트랜스크립톰 분석 (whole transcriptome analysis)를 통해 단일 세포의 RNA expression 정보를 구축하며 개별 세포 정보를 바탕으로 세포 군집
5 내의 발현 양상 분포를 분석할 수 있다. 단일 세포의 전체 유전체 증폭 (whole genome amplification)을 통해 세포 개별 CNV (copy number variation) 등을 분석하는 데 이용 가능한 정보를 제공할 수 있다. 또한 유전체와 트랜스크립톰을 동시에 분석하여 integrative SNV/InDel analysis에 활용할 수 있다.

또한, 본 발명은 단일 세포에서 얻어진 sub-pg 수준의 RNA를 손실 없이
10 효과적으로 추출하여 전체 트랜스크립톰 분석 (whole transcriptome analysis)에 활용 가능한 cDNA library를 제공한다. RNA 추출 시 별도의 tagging이나 전처리 없이 isolation 가능하다. RNA 추출 후, 자성 비드를 이용하여 magnetic separation 방법을 통해 RNA-free DNA를 손쉽게 수득할 수 있다.

15 【도면의 간단한 설명】

도 1은 저장성 용혈법(Hypotonic lysis)을 이용한 세포막의 선택적 파쇄를 보여주는 모식도이다.

도 2는 RNA 및 DNA의 선택적 분리 과정을 보여주는 모식도이다.

도 3은 세포질 염색 (CellTracker, green) 및 핵 염색 (DAPI, blue)된
20 세포에 등장성 용액 (PBS; pH 7.4) 및 저장성 용액 (1/5 PBS) 처리 후 얻어진 형광 이미지로서, 저장성 용액에 의하여 세포막이 선택적으로 파쇄됨을 보여준다.

도 4는 실시예 1의 방법에 따라서 분리된 DNA의 정량 결과를 whole cell lysate에서 얻어진 결과와 비교한 그래프이다.

25 도 5는 실시예 1의 방법에 따라서 분리된 RNA의 정량 결과를 whole cell lysate에서 얻어진 결과와 비교한 그래프이다.

도 6는 실시예 1의 방법에 따라서 분리된 RNA의 회수율을 whole cell lysate에서 얻어진 결과와 비교한 그래프이다.

30 도 7는 실시예 1의 방법에 따라서 분리된 DNA의 회수율을 whole cell lysate에서 얻어진 결과와 비교한 그래프이다.

도 8은 MCF7 bulk sample RNA, whole cell RNA, 및 fractionated RNA의 서열간 상관성 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

도 9는 fractionated RNA의 RNA 시퀀싱 결과(detected gene number)를 보여주는 그래프이다.

5 도 10은 실시예 1의 방법에 따라서 분리된 DNA 분획에 대한 전장 유전체 시퀀싱 결과를 bulk sample 및 whole cell lysate에서 얻어진 결과와 비교하여 보여주는 그래프이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

10 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 세포 시료로부터 DNA 및 RNA의 분리

15 1.1. 항체 부착된 자성 비드 제작

목적 세포로서 유방암 세포의 일종인 MCF-7 세포 (ATCC; Manassas, VA, ATCC® HTB-22™)를 준비하였다. 자성 비드로서 직경이 2.8 μ m이며, protein G가 부착된 Dynabeads®(Life Technologies, 10003D)을 준비하였다. 상기 MCF-7 세포의 세포막 성분의 포획을 위하여, MCF-7 세포의 세포막 단백질 중 하나인
20 EpCAM와 결합 가능한 Anti-EpCAM 항체 (HEA125 clon; Novus, NB100-65094)를 준비하였다.

상기 준비된 자성 비드를 0.1%(w/v) BSA (bovine serum albumin)를 포함하는 PBS (pH7.4)와 혼합하여 자성 비드 용액을 제조하였다. 상기 준비된 자성 비드 용액 100 μ l과 Anti-EpCAM 항체 원액 700 μ l를 혼합하고 4℃에서
25 overnight 반응시킨 후, 자석을 이용하여 자성 비드를 1분 동안 모으고, 상층액을 제거하여, 미반응물을 제거하였다. 여기에 washing buffer (2mM EDTA가 포함된 0.1% BSA를 포함하는 PBS, pH7.4) 200 μ l를 첨가하여, 세척하는 단계를 3회 반복하였다. 얻어진 반응물에 완충액 (0.1% BSA를 포함하는 PBS, pH7.4) 100 μ l를 첨가하여 표면에 Anti-EpCAM 항체가 부착된 자성 비드 용액을
30 제조하였다.

1.2.1. 목적 세포와 항체 결합된 자성 비드의 결합

상기 준비된 MCF-7 세포가 약 5×10^3 개 포함된 100 μ l PBS 용액(pH7.4)을 튜브에 넣고, 여기에 상기 실시예 1.1에서 준비된 항체가 부착된 자성 비드 용액을 자성 비드를 약 5×10^4 개 포함하는 양으로 첨가하였다. 상온에서 약 10 내지 20분 동안 교반하면서 반응시켜, 항체 부착된 자성 비드와 세포를 결합시켰다. 세포와 자성 비드가 포함된 튜브를 자석에 1분간 위치시킨 후, 상층액을 제거하여, 미결합 세포를 제거하였다. 예기에 완충액 (PBS, pH7.4) 100 μ l 를 첨가하여, 자성 비드와 결합된 세포 용액을 제조하였다.

1.2.2. Single cell 계수 및 재확인

완충액 (PBS, pH7.4)을 이용하여 상기 준비된 비드가 결합된 MCF-7 세포를 single cell/1 μ l 의 농도로 희석하였다. 희석된 세포 용액 1 μ l 를 96 well plate 5개 well 에 피펫팅하였다. 현미경을 이용하여 각 well 에 하나의 세포 (single cell)가 dispensing 되었는지 확인하였다. Single cell/1 μ l 수준의 농도가 확인된 용액 (master solution)으로부터 1 μ l 의 용액을 피펫팅하여 10개의 well 에 dispensing 하고, 각 well 에 하나의 세포가 존재하는지 현미경으로 재확인하였다.

1.3. 저장성 용액에 의한 세포막 파쇄

상기 실시예 1.2.2 에서 준비된 자성 비드가 결합된 세포 (single cell)에 저장성 용액을 첨가하여 세포를 파쇄하였다.

구체적으로, 상기 저장성 용액은 Triton X-100이 물(증류수)과 PBS (pH 7.4)이 4:1 (v:v)로 함유된 버퍼 수용액에 0.1%(v/v)의 농도로 용해된 용액에 RNase inhibitor (Clon Tech, 070814)를 상기 용액에 대하여 1%(v/v)의 양으로 첨가하여 제조하였다. 상기 실시예 1.2.2에서 준비된 자성 비드가 결합된 세포 용액 1 μ l (1 개 세포가 포함된 PBS 용액)에 상기 제조된 저장성 용액 9 μ l를 첨가하고, 상온에서 10분간 반응시켜, 세포막이 파쇄된 세포 용해물을 얻었다.

1.4. RNA 및 DNA 추출

상기 실시예 1.3 에서 얻어진 세포 용해물이 포함된 반응용기에 자석을 위치시켜 DNA 가 포함된 세포 용해물을 자석으로 당기면서, 용출된 RNA 가 포함된 용액을 피펫을 이용하여 분리하여, RNA 를 추출하였다.

또한, Alkaline lysis 법을 이용하여 핵막 파쇄 후 DNA 를 용출하였다.

- 5 구체적으로, 상기 RNA 가 포함된 용액을 분리하고 남은 세포 용해물에 PBS(pH7.4) 4 μ l 를 첨가하였다. 알칼라인 lysis buffer (1M DTT 3 μ l, Buffer DLB 33 μ l; Qiagen, 150343)를 3 μ l 의 양으로 첨가하고 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후, stop solution 3 μ l 를 첨가하여 반응을 종료하여, 핵막을 파쇄하였다. 비드를 제거하는 과정에서의 DNA 손실을 방지하기 위하여, 비드가 붙은 상태로 전체 유전체 DNA 분석을 수행하였다.

실시예 2: 저장성 용액에 의한 세포막의 선택적 파쇄 확인

- 저장성 용액을 사용하는 저장액 용혈법 (Hypotonic lysis)에 의하여 핵막은 유지되면서 세포막만 선택적으로 파쇄됨을 확인하기 위하여, 다음 시험을 수행하였다.

- MCF-7 세포의 세포질과 핵을 각각 CellTracker™ green CMFDA (Life Technologies; 세포질)과 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue; 핵)을 염색하였다. 그 후, 세포 용액 100 μ l (세포 약 5×10^4 개 포함)에 등장성 용액 (PBS; pH 7.4) 및 저장성 용액 (PBS(pH 7.4):물=1:5(v:v) 비율의 lysis 를 위해)을 20 500 μ l 의 양으로 첨가하고, 상온에서 10분간 반응시켰다.

- 상기와 같이 반응된 세포를 형광현미경 (Olympus, IX81-XDC)을 사용하여 관찰하여 얻어진 형광 이미지를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 확인되는 바와 같이, 등장성 용액(PBS)을 처리한 경우에 세포질(green)과 핵(blue)이 온전하게 보존되어 있는 반면, 저장성 용액 (1/5 PBS)을 처리한 25 경우에는 핵(blue)이 온전하게 보존되어 있으나, 세포질(green)은 용해되어 용액 내에 분산되어 있음을 알 수 있다.

실시예 3: RNA 및 DNA 의 정량 분석

상기 실시예 1에 기재된 핵산 분리 방법을 MCF7 세포 10개에 적용하여 DNA 와 RNA 를 분리하였다. 이와 같이 분리된 DNA 및 RNA 을 정량하여, whole cell lysate (Intact cell)에 포함된 DNA 및 RNA 와 비교하였다.

DNA 의 정량은 line 1 locus 를 타겟으로 하여 quantitative real-time PCR(qRT-PCR); Light Cycler 480 II (Roche))을 진행하여 수행되었고, 얻어진 Cp 값을 이용하여 DNA 양을 상대적으로 나타내었다. 상기 qRT-PCR 에 사용된 프라이머와 PCR 조건은 다음과 같다:

1) 프라이머,

hLINE1 Forward: TCA CTC AAA GCC GCT CAA CTA C (서열번호 1)

10 hLINE1 Reverse: TCT GCC TTC ATT TCG TTA TGT ACC (서열번호 2)

2) PCR 조건

Components: SYBR Green master mix (Exiqon, 203400) 10 μ l, isolated DNA diluted 1:2 with 1x TE Buffer, pH 8.0, 5 μ l, 10uM forward and reverse primer 각 0.2 μ l, Nuclease-free water 4.6 μ l,

15 Reaction condition: Holding Enzyme activation 95 $^{\circ}$ C 10 min, Cycling (40 cycles) Denature 95 $^{\circ}$ C 10 sec, Anneal/extend 60 $^{\circ}$ C 1 min.

RNA 는 GAPDH 를 타겟으로 cDNA library 를 제작한 후, TaqMan assay 를 진행하여 얻어진 Cp 값을 이용하여 정량하였다. 구체적으로, cDNA library 제작은 Single Cell-to-CT™ Kit (Life Technologies, 4458237)의 reagent 를 이용하여 20 진행하였다. RNA 가 포함된 solution 10 μ l 에 DNase I 1 μ l 첨가 후, reverse transcription 을 시행하였다 (Components: Single Cell VILO™ RT Mix 3.0 μ l, Single Cell SuperScript® RT 1.5 μ l; reaction condition: 25 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 85 $^{\circ}$ C 5min).

상기와 같이 합성된 cDNA 를 다음의 조건으로 pre-amplification 하였다: 25 components: Single Cell PreAmp Mix 5 μ l, 0.2x pooled TaqMan® Gene Expression Assays 6 μ l) Total PreAmp reaction mix 11 μ l; reaction condition: Holding Enzyme activation 95 $^{\circ}$ C 10 min, Cycling (14 cycles) Denature 95 $^{\circ}$ C 15 sec, Anneal/extend 60 $^{\circ}$ C 4min, Holding Enzyme Deactivation 99 $^{\circ}$ C 10 min)

TaqMan assay 는 Light Cycler 480 II(Roche)를 사용하여 수행하였다:

30 프라이머: Hs03929097_g1(Life Technologies),

반응조건:

Components: 2x TaqMan® Gene Expression Master Mix 10µl, Preamplified product diluted 1:20 with 1x TE Buffer, pH 8.0, 4µl, 20x TaqMan® Gene Expression Assay 1µl, Nuclease-free water 5µl,

5 Reaction condition: Holding UDG incubation 50°C 2min, Holding Enzyme activation 95°C 10 min, Cycling (40 cycles) Denature 95°C 5 sec, Anneal/extend 60°C 1 min

Cp 값 측정: Light Cycler 480 II(Roche).

Cp (Crossing point)값은 실시간 PCR 반응에서 검출 가능한 형광 신호가
10 나타나는 사이클 수를 말한다. 즉 초기 DNA 농도가 높을수록 낮은 Cp 값에서 형광 신호 검출이 가능하고, 초기 DNA 농도가 낮을수록 Cp 값이 높아야 형광 신호 검출이 가능하다. 즉, Cp 값 비교를 통하여 DNA 의 정량이 가능하다.

비교를 위하여, whole cell lysate (Intact cell)에 포함된 DNA 및 RNA 를
상기한 방법으로 정량(real-time PCR)하였다 (동일한 개수의 세포가 투입되었을
15 때 유사한 수준의 DNA/RNA 가 존재한다는 전제하에 반응 전 정량 과정 없이 진행함).

상기 DNA 및 RNA 정량은 각각 2개의 well 에서 진행되었으며, 얻어진
Cp 값을 아래의 표 1 (DNA 정량 결과) 및 표 2 (RNA 정량 결과)에 나타내었고,
이 중에서 10개 세포 분석에서 얻어진 값을 도 4 (DNA 정량 결과) 및 도
20 5(RNA 정량 결과)에 나타내었다.

【표 1】

Line 1 qRT-PCR

Line 1	10 cell	
Intact cells	1	2
	23.9	23.17
	23.01	22.66
Isolated DNA	1	2
	22.54	22.05
	22.32	22.05

Data: Cp value

【표 2】

- GAPDH gene expression TaqMan assay

GAPDH	10 cells	
Intact cells	1	2
	16.26	16.25
	16.16	16.23
Isolated RNA	1	2
	16.26	16.15
	16.32	16.01

Data: Cp value

상기 표 1과 2 및 도 4와 5에 나타난 바와 같이, 분리된 DNA 및 RNA의 상대적 양이 whole cell lysate와 유사한 수준인 것을 알 수 있으며, 이는 DNA와 RNA가 손실 없이 추출(분리)되었음을 확인시켜주는 것이며, 또한, 10개의 세포에서의 결과가 유사하게 얻어진 것에 의하여, 실시예 1에 따른 분리 방법은 세포 수가 적은 경우에도 효과적으로 적용 가능함을 보여준다.

실시예 4: RNA 및 DNA의 회수율 시험 (DNA/RNA recovery rate validation)

4.1. RNA 회수율 시험

10개 MCF7 세포로부터 추출한 RNA (Intact cells; 실시예 1에서 자석을 이용하여 비드에 부착된 세포막 부분을 분리하는 단계를 생략한 방법으로 RNA 회수 후, cDNA를 합성), 실시예 1의 핵산 분리 방법을 이용하여 10개 MCF7 세포로부터 DNA가 포함된 세포막 부분을 분리한 RNA fraction (Isolated RNA), 실시예 1의 핵산 분리 방법을 이용하여 10개 MCF7 세포로부터 RNA 분리 중에 자성 비드에 흡착되어 DNA fraction으로 손실된 RNA (Residual RNA; RNA가 포함된 상층액을 제거한 후, 비드에 흡착된 RNA를 분석하기 위해 비드와 세포막이 결합된 고형부에 lysis solution 10 μ l를 추가 투입한 후 cDNA 합성 과정을 진행) 등 3종의 RNA sample을 GAPDH를 타겟으로 cDNA library를 제작하여 TaqMan assay를 수행하여 정량적으로 분석하였다

(프라이머:

Taqman gene expression analysis (Life Technologies, Hs03929097_g1),

반응조건:

Components: 2x TaqMan® Gene Expression Master Mix 10µl, Preamplified product diluted 1:20 with 1x TE Buffer, pH 8.0, 4µl, 20x TaqMan® Gene Expression Assay 1µl, Nuclease-free water 5µl,

Reaction condition: Holding UDG incubation 50°C 2min, Holding Enzyme activation 95°C 10 min, Cycling (40 cycles) Denature 95°C 5 sec, Anneal/extend 60°C 1 min,

Cp 값: Light Cycler 480 II(Roche)으로 측정.

상기 정량 과정은 3 번씩 수행되었으며, 얻어진 Cp 값을 도 6에 나타내고, Cp 평균값을 아래의 표 3에 나타내었다.

10 【표 3】

- GAPDH gene expression TaqMan assay

	Intact cells	Isolated RNA	Residual RNA
Average Cp	17.17	17.81	20.52

Data: Cp value

상기 표 3 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 실시예 1에 따라 분리한 isolated RNA 는 intact cell RNA (whole cell 유래의 RNA)와 유사한 수준의 Cp 값을 보였다. 반면, isolated RNA 와 residual RNA 의 평균 Cp 값의 차이 (ΔCp)는 2.71로, 두 값의 RNA 량 fold change 가 Isolated RNA:residual RNA= $2^{2.71}:1=6.54:1$ 의 비율을 보이며, 따라서, residual RNA 대비 isolated RNA 의 양은 전체의 약 86%를 차지하고, isolated RNA 대비 Residual RNA 의 양은 전체의 약 14%를 차지하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 실시예 1에 따른 핵산 분리법을 통하여 적은 수의 세포로부터 효과적으로 RNA 를 추출할 수 있음을 보여주는 것이며, 이러한 실시예 1의 기술의 단일 세포에의 적용 가능성을 보여주는 것이라 할 수 있다.

4.2. DNA 회수율 시험

25 MCF7 10개 세포로부터 추출한 DNA (Intact cells; n=3; 실시예 1에서 자석을 이용하여 비드에 부착된 세포막 부분을 분리하는 단계를 생략한 방법으로 lysis 를 실시한 후 DNA 를 회수), 실시예 1의 핵산 분리 방법을 이용하여 MCF7 10개 세포로부터 RNA 를 분리한 DNA fraction (Isolated DNA;

n=3), 실시예 1의 핵산 분리 방법을 이용하여 MCF7 10개 세포로부터 RNA 를 분리 시 손실된 DNA (Residual DNA; n=3; 세포막 용해 과정에서 핵막의 부분적 파쇄로 인해 RNA fraction 이 포함된 액상부로 방출된 DNA 를 확인하기 위한 것으로, 자성비드에 결합하여 세포막과 함께 자석에 결합되지 못하고 액상부 (lysis buffer)에 함유되어 손실된 DNA 를 real time PCR 을 통해 정량) 등 3종의 DNA sample 을 qRT-PCR 을 이용하여 정량적으로 분석하였다.

DNA 는 line 1 locus 를 타겟으로 하여 real-time PCR 진행하였고, Cp 값을 이용하여 DNA 양을 상대 비교하였다 (실시예 3 참조).

상기 정량 과정은 모든 샘플에 대하여 각 2번씩 수행되었으며, 얻어진 모든 샘플의 Cp 값의 평균을 도 7에 나타내고 (NTC 는 DNA 샘플 대신 DW 를 첨가한 negative control 의 Cp 값임), 각 DNA (Intact cell, Isolated DNA, Residual DAN) 당의 Cp 평균값을 아래의 표 4에 나타내었다.

【표 4】

- Line 1 qRT-PCR

	Intact cells	Isolated DNA	Residual DNA
Average Cp	21.46	21.56	28.82

Data: Cp value

상기 표 4 및 도 7에 나타낸 바와 같이, 실시예 1에 따라 분리한 isolated DNA 와 residual DNA 의 평균 C 값의 차이 ΔC_p 는 7.26의 값을 나타내며, 두 값의 DNA 량 fold change (Isolated DNA: residual DNA) 는 $2^{7.26}$:1=153.5:1의 비율을 보이므로, residual DNA 대비 isolated DNA 의 양은 전체의 약 99%를 차지하며, isolated DNA 대비 Residual DNA 의 양은 전체의 약 1% 수준을 보인다. 이러한 결과는 실시예 1에 따른 핵산 분리법을 통하여 적은 수의 세포로부터 효과적으로 DNA 를 추출할 수 있음을 확인하였으며, 이러한 실시예 1의 기술의 단일 세포에의 적용 가능성을 보여주는 것이라 할 수 있다.

실시예 5: 서열 상관성 분석 (sequence correlation analysis)

MCF7 bulk sample (MCF7_B) (1×10^6 cell 이상 사용; 상기 세포에서 수득된 cDNA 중 1ng 이 RNA-sequencing 에 사용함)의 RNA 서열, MCF7 단독 세포(single cell)의 whole cell 의 RNA 서열, 및 MCF7 단독 세포로부터 실시예

1의 핵산 분리 방법을 이용하여 분리된 RNA (fractionated 또는 isolated RNA; 실시예 1의 핵산 분리 방법에 의하여 분리된 RNA)의 서열 간의 상관성 분석(correlation analysis)을 수행하였다.

구체적으로, MCF7 bulk sample 1종, whole RNA sample 10종, fractionated RNA sample 10종을 분석 대상으로 하였으며, Whole/fractionated sample 유전자 발현 수준(gene expression level)의 평균값을 구하였다. 상기 유전자 발현 수준은 앞서 실시예 3에서 설명한 바와 같은 RNA 정량 분석 방법에 의하여 수행하였다.

상기 얻어진 유전자 발현 양상(gene expression profile)의 상관 관계 결과를 도 8의 (a) 내지 (c)에 나타내었다. 도 8의 (a) 내지 (c)에서, MCF7 bulk sample로부터 얻은 결과값 (gene expression level) ("Bulk cells"로 표시) vs. whole RNA sample 들로부터 얻은 gene expression level 의 평균값 ("Single cell WR"로 표시), MCF7 bulk sample로부터 얻은 결과값 vs. fractionated RNA sample 들로부터 얻은 gene expression level 평균값 ("Single cell FR"로 표시), whole RNA sample 들로부터 얻은 평균값 vs. fractionated RNA sample 들로부터 얻은 평균값을 각각 scattered plot 으로 도식화하여 샘플간 expression level 의 상관 관계를 나타내었다. 여기서 r 은 correlation coefficient 는 상관 계수(correlation coefficient)를 나타낸다 (상관 계수는 서열 데이터 유사성 및/또는 상관성 정도를 나타냄). 각 그래프의 x 축과 y 축의 수치는 유전자 발현 수준(expression level), 즉 RNA 수준을 나타낸다.

도 8 의 (d) 및 (e)는 single cell fraction/single cell whole 각각의 모집단에서 cell-to-cell correlation coefficient 를 나타낸 그래프로써, y 축의 Frequency 는 해당 correlation coefficient 값을 갖는 pair 의 숫자를 의미한다. FR (single cell fraction) 및 WR (single cell whole)의 ~10여개 세포간 RNA expression correlation 을 분석하였고, 각각의 평균 correlation coefficient 가 각각 $r=0.61$ (single cell FR), $r=0.57$ (single cell WR)인 것으로 나타나, 이들 간 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다.

도 8에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 핵산 분리 방법에 의하여 분리된 RNA 의 분석 결과가 whole cell 유래의 RNA 를 분석하는 기존 방법과 동등 이상의 분리 효율성을 갖는다.

또한, 상기 얻어진 MCF7 단독 세포 유래 Whole cell 및 MCF7 단독 세포로부터 실시예 1의 핵산 분리 방법을 이용하여 분리된 RNA 샘플(fractionated RNA sample)의 RNA 시퀀싱 결과로서 detected gene number 를 도 9에 나타내었다. 도 9에서 detected gene 은 sequencing 결과 detection 된 gene 의 개수, unmapped 은 reference sequence 에 mapping 되지 않는 gene 개수, mapped 는 reference sequence 에 mapping 되는 gene 개수를 나타낸다 (human genome reference: hg19 (UCSC genome browser); 분석 방법: reference 인 hg19 sequence 와 sequencing 완료 된 sample 의 sequence read 를 mapping 하여 전체 read count 중 reference 에 mapping 또는 unmapping 된 read 의 수를 산출함).

도 9에 보여지는 바와 같이, MCF7 단독 세포 유래 Whole cell 및 fractionated RNA sample 의 detected gene number 가 서로 큰 차이를 보이지 않았다. 이를 근거로 본 발명의 분석 방법이 전통적인 방법 (DNA/RNA 를 분리하지 않고 RNA 를 독립적으로 분석하는 방법) 대비 동등한 수준을 보임을 알 수 있다.

실시예 6: 전장 유전체 시퀀싱 (whole genome sequencing; WGS)

MCF7 세포를 이용하여 상기 실시예 1의 핵산 분리 방법의 단일 세포 전장 유전체 증폭에 대한 성능 평가를 수행하였다. MCF7 bulk sample (1×10^6 cell 이상 사용; 상기 세포에서 수득된 gDNA 에 대하여 WGS 수행), 상기 실시예 1의 방법으로 MCF7 단일세포로부터 얻은 DNA 분획물, 및 MCF7 단일세포의 전세포 용해물로부터 얻은 유전체 DNA (gDNA)에 대하여 전장 유전체 시퀀싱 (Whole genome sequencing; WGS)를 수행하여 Genome wide copy number variations 을 측정하였다.

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit (Illumina, USA) 를 이용하여 whole genome sequencing 을 위한 DNA library 를 준비하고, Illumina HiSeq 2500을 이용하여 100bp paired-end mode 로 분석을 진행하였다. Read depth 는 0.1x 내지 0.7x 로 진행하였고, BWA aligner (bio-bwa.sourceforge.net)를 사용하여 모든 sequencing read 를 Hg 19 reference genome 에 align 하였다.

상기 얻어진 결과를 도 10에 나타내었다. 도 10에서, Y 축의 -CN 는 Copy number 를 나타내고, Bulk 는 MCF7 bulk sample 의 WGS 결과 (copy number)이고, FD 는 실시예 1의 핵산 분리 방법에 의하여 MCF7 단일세포로부터

얻은 DNA 분획물의 copy number 이고, WD 는 MCF7 단일세포의 전세포 용해물로부터 얻은 gDNA 이 copy number 를 나타낸다. 각 그래프의 X 축의 수치는 bin 으로 chromosome region 을 의미한다. 도 10에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 핵산 분리 방법에 의하여 MCF7 단일세포로부터 얻은 DNA
5 분획물로부터 얻어진 copy number 양상이 MCF7 단일세포의 전세포 용해물로부터 얻은 gDNA 및 MCF7 bulk sample 로부터 얻어진 copy number 양상과 큰 차이가 없음을 확인할 수 있다. 이러한 결과는, 실시예 1에 예시된 핵산 분리 방법에 의하여 단일 세포로부터 분리된 핵산에 대해서도 bulk sample 또는 전세포에서와 유사한 수준의 핵산 분석 결과를 얻을 수 있음을 의미한다.

10

【청구범위】

【청구항 1】

- (1) 목적 세포가 포함된 세포 시료를 준비하는 단계;
- (2) 상기 목적 세포의 세포막 표면에 존재하는 단백질에 결합하는 표적
5 물질이 부착된 비드를 상기 세포 시료에 처리하여 목적 세포의 세포막에
비드를 결합시키는 단계;
- (3) 상기 세포 시료에 저장성 용액을 처리하여 세포막을 용해시켜 세포
용해물을 얻는 단계;
- (4) 상기 얻어진 세포 용해물의 액상부와 고형부를 얻는 단계;
- 10 (5) 상기 단계 (4)에서 얻어진 액상부로부터 RNA를 분리하는 단계; 및
- (6) 상기 단계 (4)에서 얻어진 고형부로부터 DNA를 분리하는 단계
를 포함하는, 하나의 세포로부터의 핵산 분리 방법.

【청구항 2】

- 제1항에 있어서, 상기 비드는 자성 비드, 실리카 비드, 고분자 비드,
15 유리 비드, 셀룰로오스 비드, 퀀텀닷(Q-dot), 및 금속 비드로 이루어진 군에서
선택된 것인, 핵산 분리 방법.

【청구항 3】

- 제1항에 있어서, 상기 표적 물질은 상기 목적 세포의 세포막 표면에
존재하는 단백질에 결합하는 항체, 항체의 항원 결합 단편, DARPin 등의
20 단백질 스캐폴드, 및 압타머로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 핵산 분리
방법.

【청구항 4】

- 제1항에 있어서, 상기 표적 물질은 상기 비드의 표면에 리간드-수용체
결합, 이온 결합, 공유 결합, 또는 흡착에 의하여 결합된 것인, 핵산 분리 방법.

25 【청구항 5】

- 제1항에 있어서, 상기 단계 (3)의 저장성 용액은 a) 버퍼 수용액, 또는 b)
계면활성제가 물 또는 버퍼 수용액에 용해된 계면활성제 용액인, 핵산 분리
방법.

【청구항 6】

- 30 제5항에 있어서, 상기 a) 버퍼 수용액 및 b)의 용매로 사용된 버퍼

수용액은 포스페이트 버퍼 살린 (PBS), Hank's balanced saline solution (HBSS), 또는 이의 혼합물이 물에 부피비로 90:10 내지 70:30 (물 부피:버퍼 부피)의 비율로 용해된 것인, 핵산 분리 방법.

【청구항 7】

5 제6항에 있어서, 상기 a) 버퍼 수용액 및 b)의 용매로 사용된 버퍼 수용액은 포스페이트 버퍼 살린 (PBS), Hank's balanced saline solution (HBSS), 또는 이의 혼합물이 물에 부피비로 85:15 내지 75:25 (물 부피:버퍼 부피)의 비율로 용해된 것인, 핵산 분리 방법.

【청구항 8】

10 제6항에 있어서, 상기 a) 버퍼 수용액 및 b)의 용매로 사용된 버퍼 수용액은 포스페이트 버퍼 살린 (PBS), Hank's balanced saline solution (HBSS), 또는 이의 혼합물이 물에 부피비로 82:18 내지 78:22 (물 부피:버퍼 부피)의 비율로 용해된 것인, 핵산 분리 방법.

【청구항 9】

15 제5항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 옥틸페닐에테르, 폴리소르베이트, 및 3-[(3-코라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판술포네이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 핵산 분리 방법.

【청구항 10】

20 제5항에 있어서, 상기 계면활성제 용액 내의 계면활성제의 농도는 물 또는 버퍼 수용액의 부피에 대하여 0.05 내지 0.5 %(v/v)인, 핵산 분리 방법.

【청구항 11】

제10항에 있어서, 상기 계면활성제 용액 내의 계면활성제의 농도는 물 또는 버퍼 수용액의 부피에 대하여 0.1 내지 0.3%(v/v)인, 핵산 분리 방법.

【청구항 12】

25 제1항에 있어서, 상기 단계 (4)의 세포 용해물의 액상부와 고형부를 얻는 단계는 상기 단계 3에서 얻어진 세포 용해물에 원심분리를 수행하거나, 자기장을 형성하여 수행되는 것인, 핵산 분리 방법.

【청구항 13】

30 제1항에 있어서, 상기 비드는 자성 비드이고, 상기 단계 (4)의 세포 용해물의 액상부와 고형부를 얻는 단계는 상기 단계 3에서 얻어진 세포

용해물에 자기장을 형성하여 수행되는 것인, 핵산 분리 방법.

【청구항 14】

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 시료는 단일 세포를 포함하는 시료(single cell sample)인, 핵산 분리 방법.

5 【청구항 15】

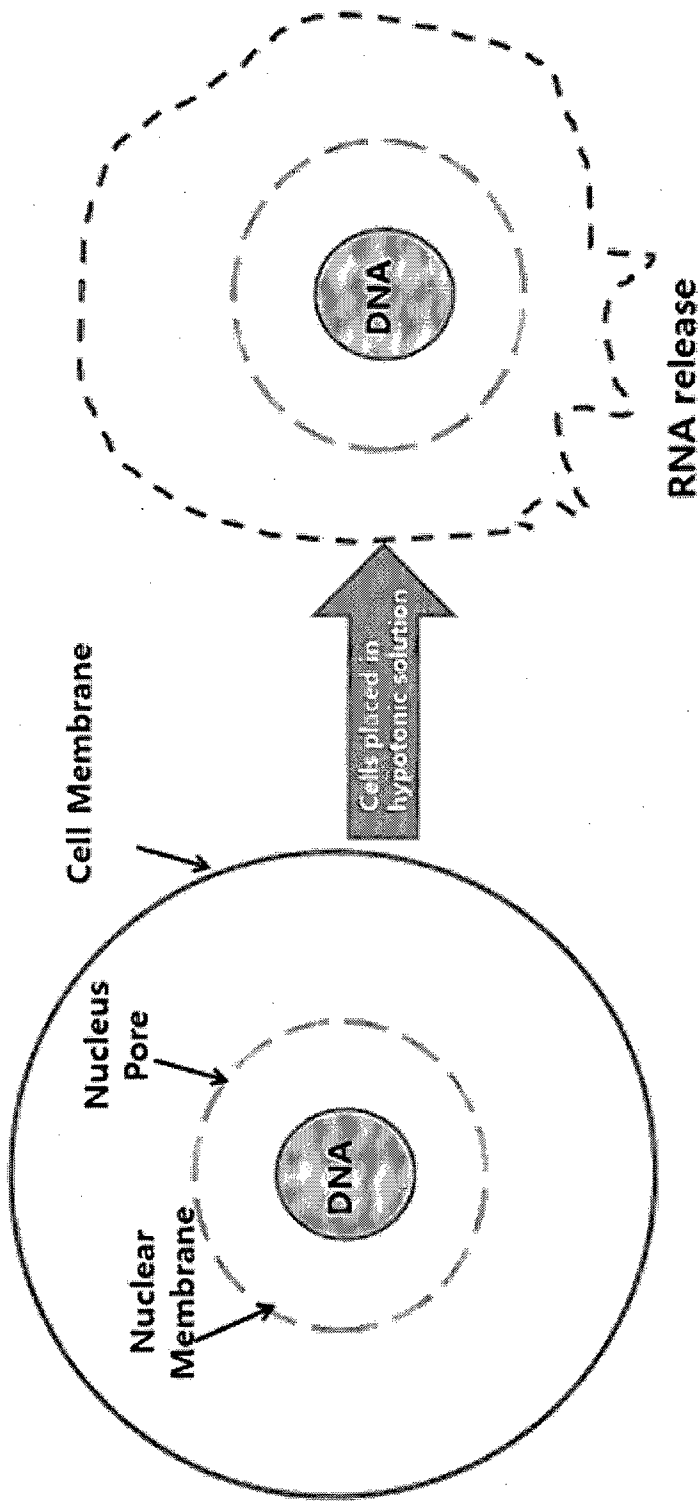
제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (5)의 DNA와 단계 (6)의 RNA는 동일한 세포 시료로부터 분리되는 것을 특징으로 하는, 핵산 분리 방법.

【청구항 16】

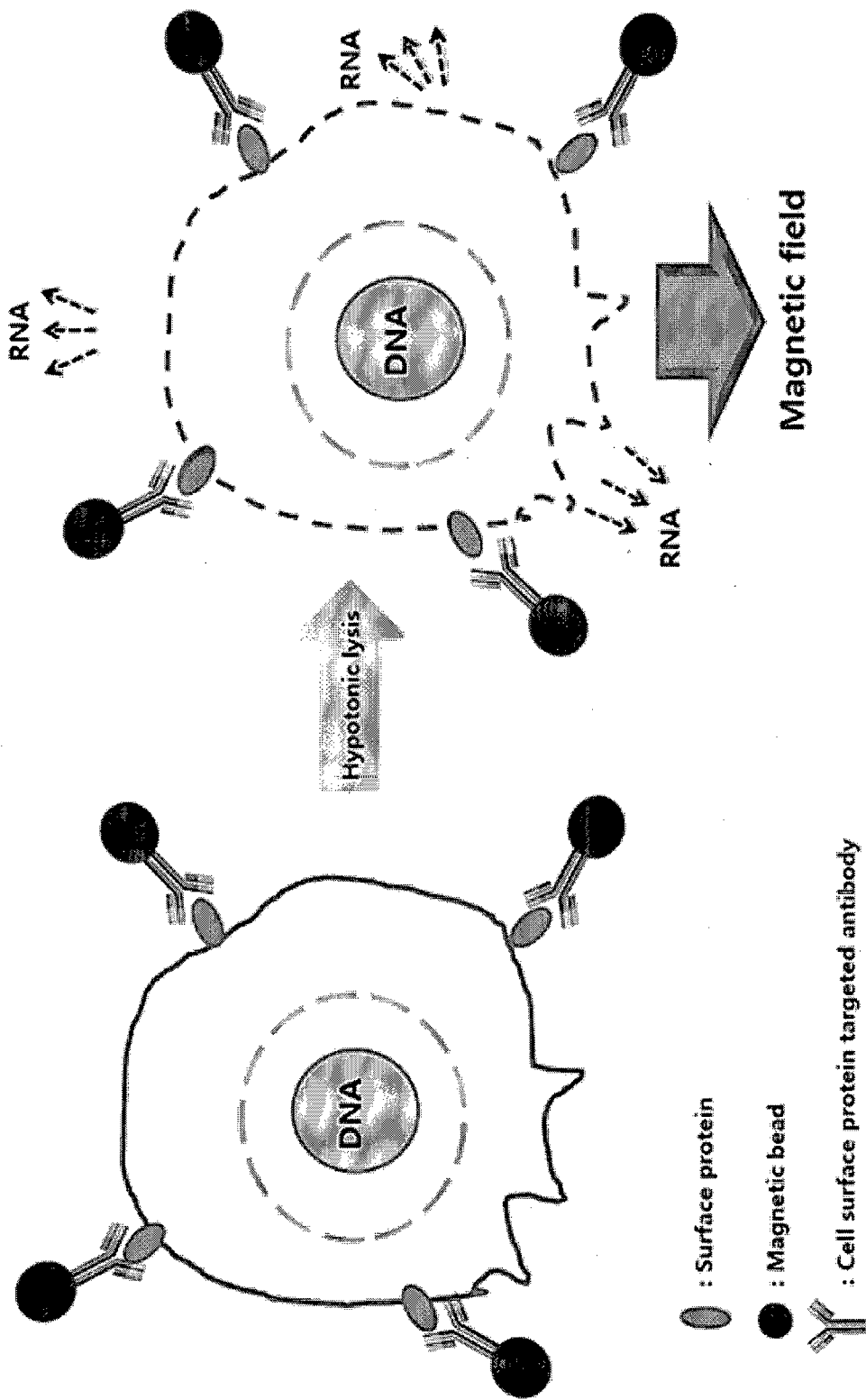
10 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (4)는 필터를 사용하는 단계를 포함하지 않는 것인, 핵산 분리 방법.

【도면】

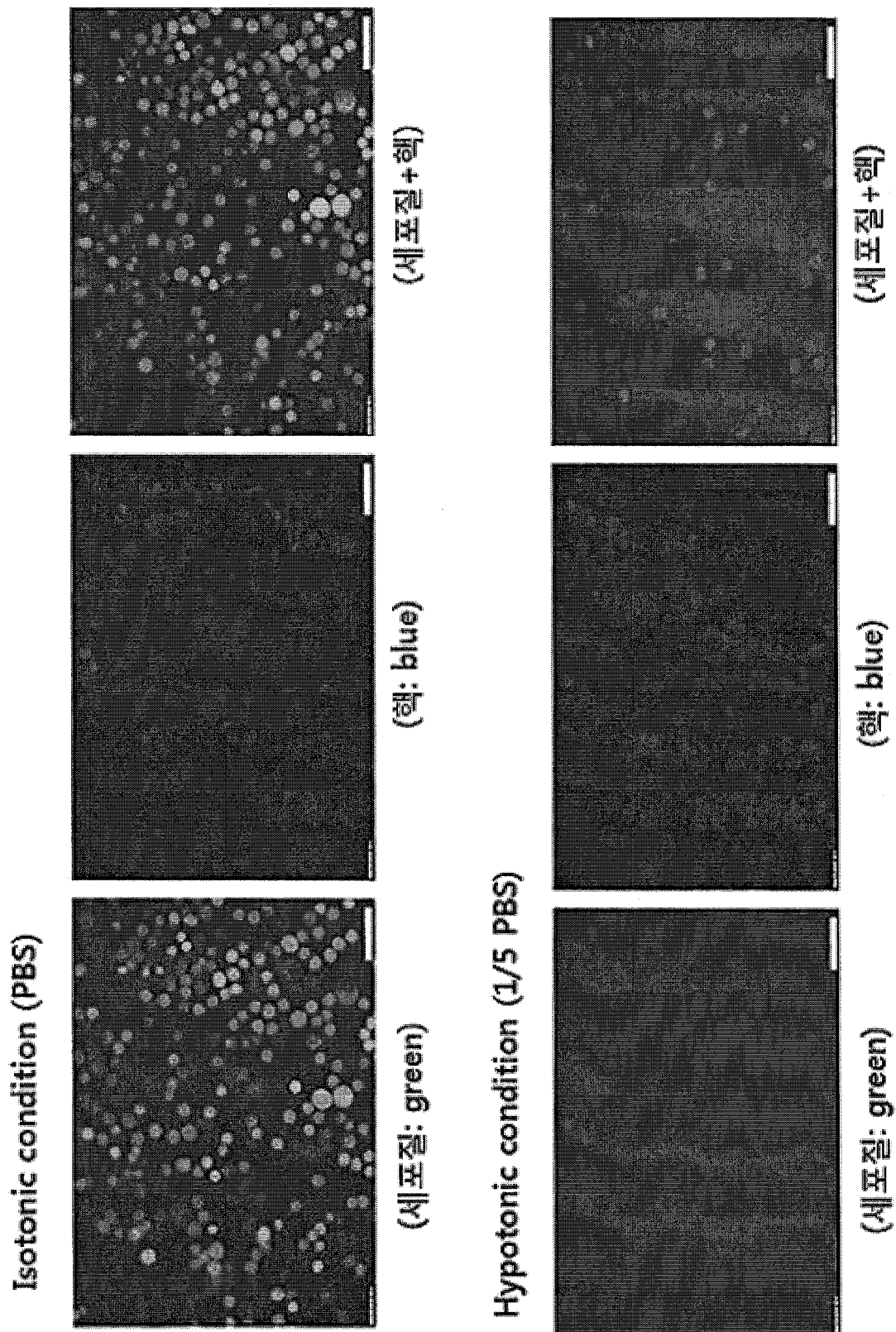
【도 1】



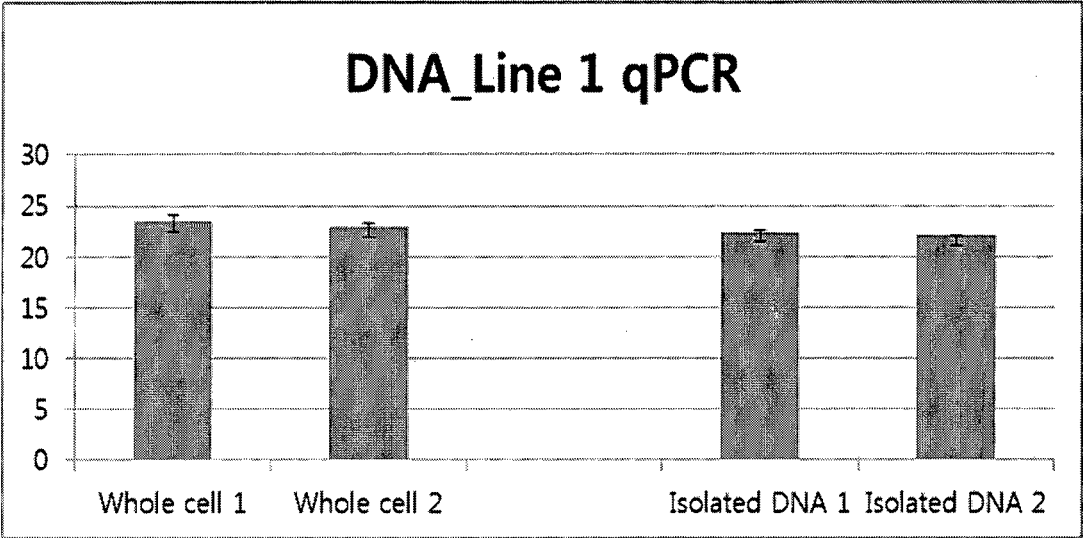
【도 2】



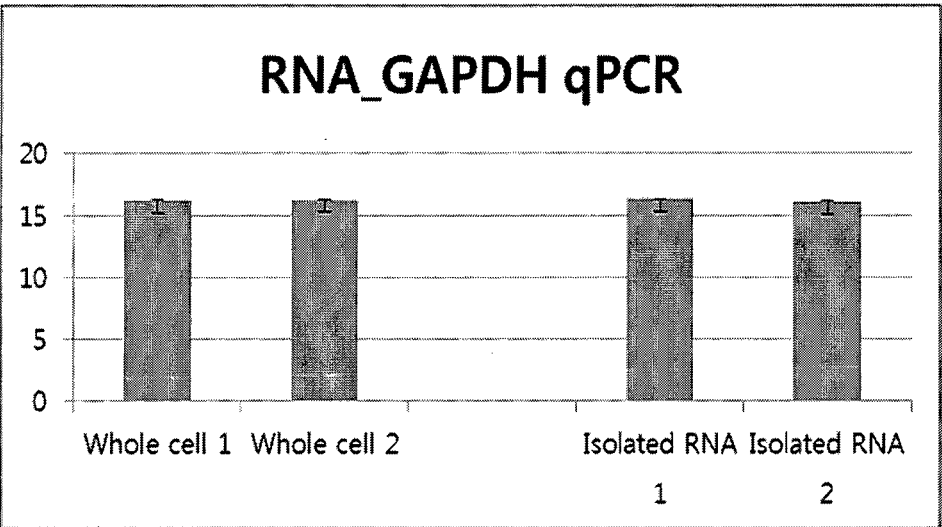
【도 3】



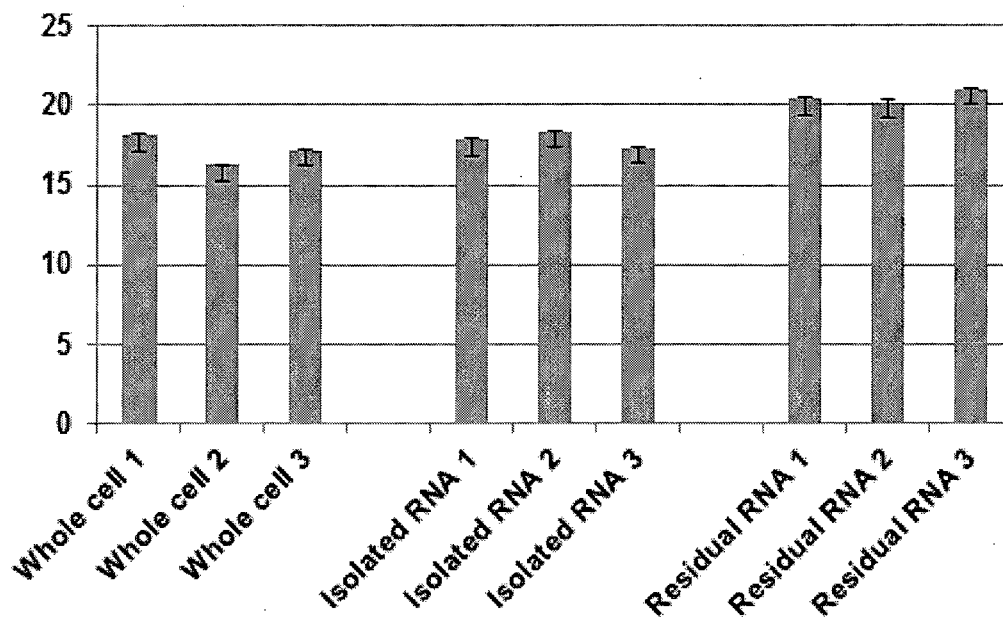
【도 4】



【도 5】

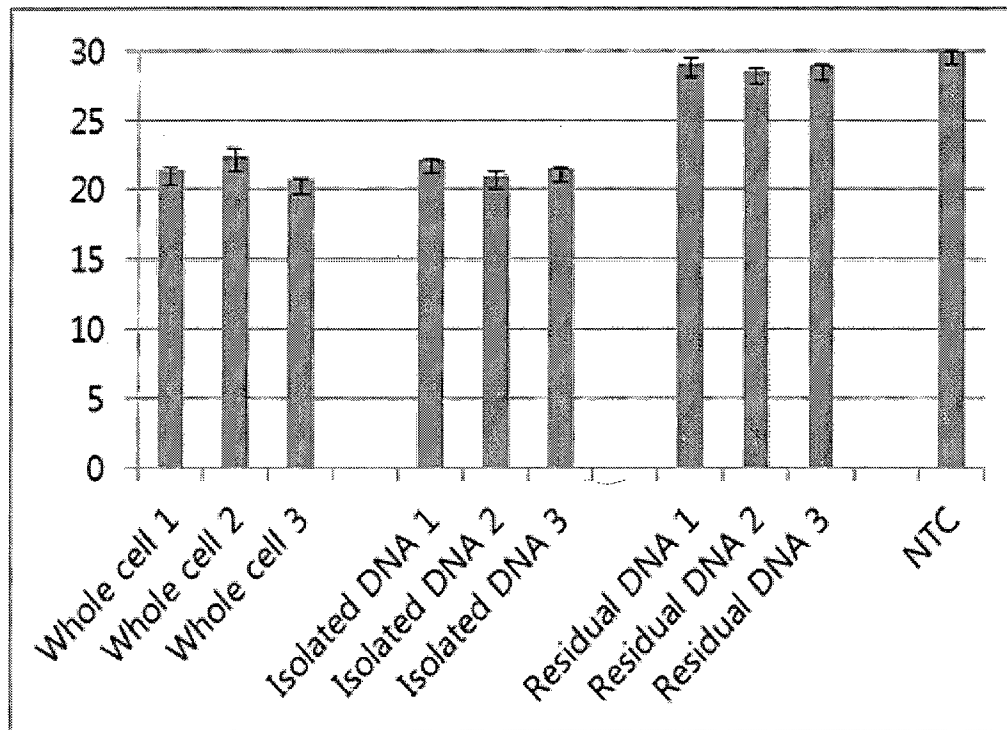


【도 6】



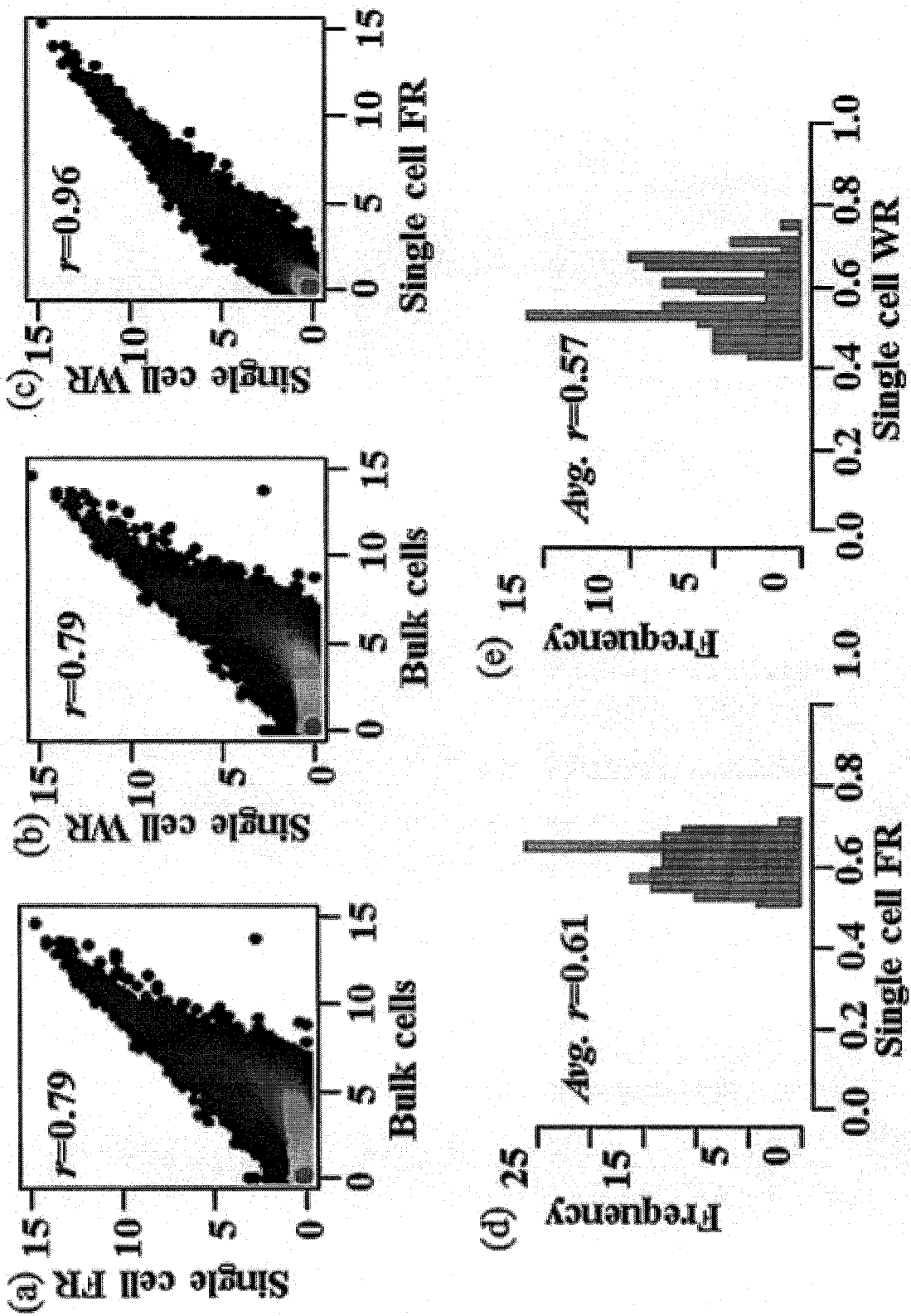
- GAPDH_qPCR quantification (10 MCF7 cells)
- Data: Cp value
- Isolated RNA/Residual RNA $\Delta C_p = 2.7$
→ RNA recovery rate >86%

【도 7】

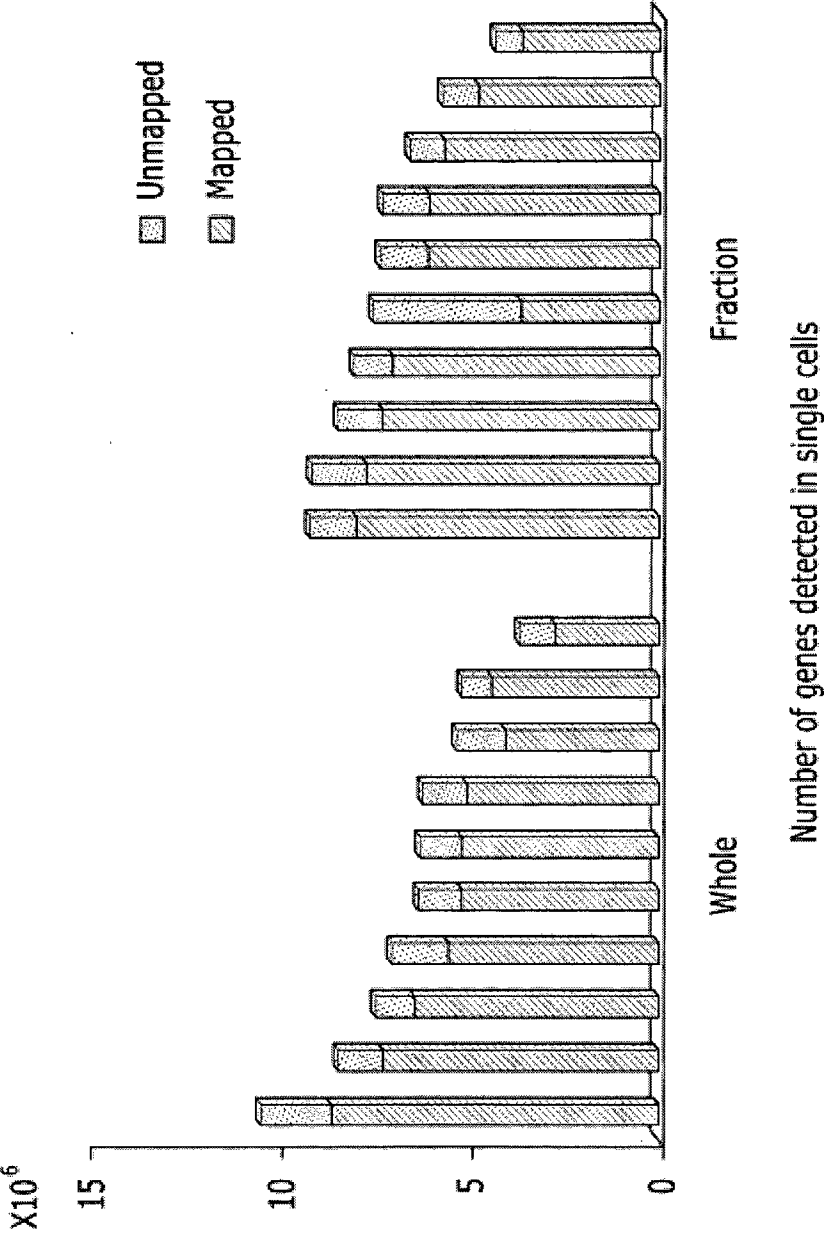


- Line1_qPCR quantification (10 MCF7 cells)
- Data: Cp value
- Isolated DNA/Residual DNA $\Delta C_p = 7.25$
 - DNA recovery rate > 95%

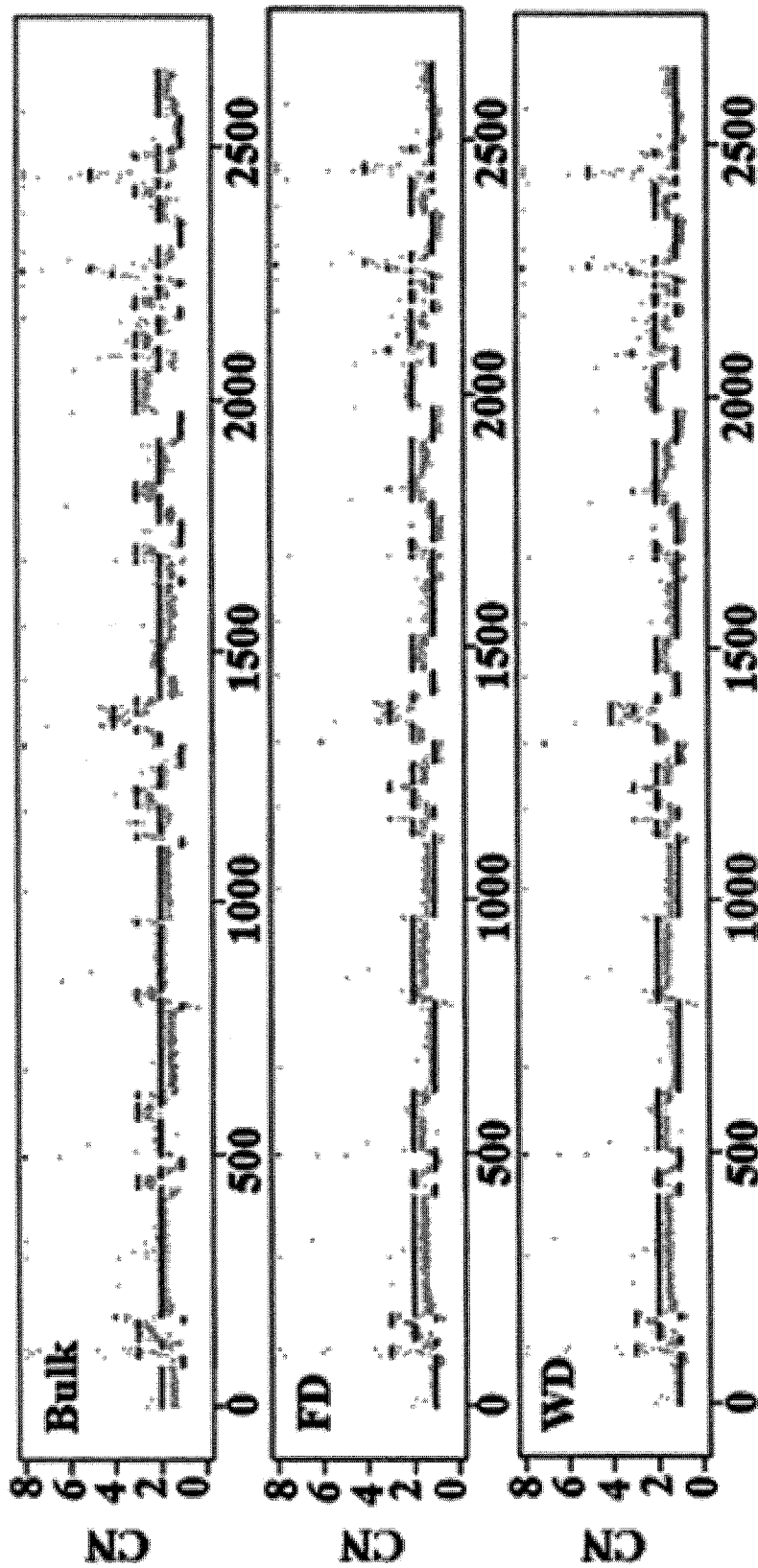
【도 8】



【도 9】



【도 10】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/009660**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/10(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 35/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/10; C07H 21/04; H01L 21/336; C07H 1/00; C07H 1/08; C12Q 1/68; G01N 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cell membrane, bead, hypotonic solution, DNA, RNA, separation of nucleic acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 8202693 B2 (GUO, Qi) 19 June 2012 See claims 1 and 5.	1-16
A	US 6342387 B1 (HAYASHIZAKI, Yoshihide et al.) 29 January 2002 See claims 1 and 6.	1-16
A	US 2005-0106576 A1 (AKHAVAN-TAFTI, Hashem et al.) 19 May 2005 See claims 1 and 6.	1-16
A	KR 10-2008-0027607 A (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) 28 March 2008 See claim 1.	1-16
A	KR 10-2001-0032806 A (DNA RESEARCH INSTRUMENTS LIMITED) 25 April 2001 See claims 1-7.	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 DECEMBER 2016 (19.12.2016)

Date of mailing of the international search report

19 DECEMBER 2016 (19.12.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/009660

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 8202693 B2	19/06/2012	US 2011-0124851 A1	26/05/2011
US 6342387 B1	29/01/2002	EP 1018549 A1	12/07/2000
		EP 1018549 A4	18/12/2002
		EP 1018549 B1	05/01/2005
		JP 11-092494 A	06/04/1999
		JP 4304348 B2	29/07/2009
		US 2002-0025572 A1	28/02/2002
		US 6969603 B2	29/11/2005
		WO 99-15645 A1	01/04/1999
US 2005-0106576 A1	19/05/2005	AU 2004-322309 A1	23/02/2006
		AU 2004-322310 A1	23/02/2006
		AU 2005-275484 A1	23/02/2006
		AU 2005-290297 A1	06/04/2006
		AU 2005-290300 A1	06/04/2006
		CN 101018870 A	15/08/2007
		CN 101018871 A	15/08/2007
		CN 101027411 A	29/08/2007
		CN 101076603 A	21/11/2007
		CN 101107365 A	16/01/2008
		EP 1781808 A1	09/05/2007
		EP 1781816 A1	09/05/2007
		EP 1789578 A2	30/05/2007
		EP 1799846 A2	27/06/2007
		EP 1799847 A2	27/06/2007
		JP 2008-506385 A	06/03/2008
		JP 2008-506386 A	06/03/2008
		JP 2008-506387 A	06/03/2008
		JP 2008-513007 A	01/05/2008
		JP 2008-513008 A	01/05/2008
		KR 10-2007-0057766 A	07/06/2007
		KR 10-2007-0057768 A	07/06/2007
		KR 10-2007-0058433 A	08/06/2007
		KR 10-2007-0062555 A	15/06/2007
		KR 10-2007-0062557 A	15/06/2007
		US 2005-0106577 A1	19/05/2005
		US 2005-0106589 A1	19/05/2005
		US 2005-0106602 A1	19/05/2005
		US 2005-0136477 A1	23/06/2005
		WO 2006-019387 A1	23/02/2006
		WO 2006-019388 A2	23/02/2006
		WO 2006-019388 A3	26/05/2006
		WO 2006-019568 A1	23/02/2006
		WO 2006-036243 A2	06/04/2006
		WO 2006-036243 A3	26/07/2007
		WO 2006-036246 A2	06/04/2006
		WO 2006-036246 A3	08/02/2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/009660

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0027607 A	28/03/2008	EP 1903338 A2	26/03/2008
		EP 1903338 A3	18/11/2009
		EP 1903338 B1	21/08/2013
		KR 10-0862660 B1	10/10/2008
		US 2008-0118972 A1	22/05/2008
		US 2010-0160585 A1	24/06/2010
		US 7718371 B2	18/05/2010
		US 7838036 B2	23/11/2010
KR 10-2001-0032806 A	25/04/2001	AU 1344799 A	28/06/1999
		CN 1230440 C	07/12/2005
		CN 1281462 A	24/01/2001
		CN 1781931 A	07/06/2006
		EP 1036082 A2	20/09/2000
		EP 1036082 B1	29/05/2002
		EP 1234832 A2	28/08/2002
		EP 1234832 A3	13/08/2003
		EP 1234832 B1	13/02/2008
		EP 1345952 A2	24/09/2003
		EP 1345952 B1	24/11/2004
		EP 1473299 A2	03/11/2004
		EP 1473299 A3	16/08/2006
		JP 2004-501054 A	15/01/2004
		JP 2004-521881 A	22/07/2004
		JP 2010-162037 A	29/07/2010
		JP 4868697 B2	01/02/2012
		KR 10-2005-0088164 A	01/09/2005
		US 2001-0018513 A1	30/08/2001
		US 2003-0008320 A1	09/01/2003
		US 2003-0054395 A1	20/03/2003
		US 2003-0130499 A1	10/07/2003
		US 2007-0231892 A1	04/10/2007
		US 2008-0305528 A1	11/12/2008
		US 2012-0196944 A1	02/08/2012
		US 2012-0197009 A1	02/08/2012
		US 2013-0338245 A1	19/12/2013
		US 6914137 B2	05/07/2005
		WO 02-048164 A3	17/10/2002
		WO 02-48164 A2	20/06/2002
		WO 99-29703 A2	17/06/1999
		WO 99-29703 A3	26/08/1999

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/10(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/10; C07H 21/04; H01L 21/336; C07H 1/00; C07H 1/08; C12Q 1/68; G01N 35/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 세포막, 비드, 저장성 용액, DNA, RNA, 핵산 분리

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 8202693 B2 (GUO, QI) 2012.06.19 청구항 1 및 5 참조.	1-16
A	US 6342387 B1 (HAYASHIZAKI, YOSHIHIDE 등) 2002.01.29 청구항 1 및 6 참조.	1-16
A	US 2005-0106576 A1 (AKHAVAN-TAFTI, HASHEM 등) 2005.05.19 청구항 1 및 6 참조.	1-16
A	KR 10-2008-0027607 A (삼성전자주식회사) 2008.03.28 청구항 1 참조.	1-16
A	KR 10-2001-0032806 A (디엔에이 리서치 인스트루먼트 리미티드) 2001.04.25 청구항 1-7 참조.	1-16

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 12월 19일 (19.12.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 12월 19일 (19.12.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



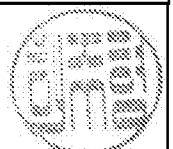
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 8202693 B2	2012/06/19	US 2011-0124851 A1	2011/05/26
US 6342387 B1	2002/01/29	EP 1018549 A1	2000/07/12
		EP 1018549 A4	2002/12/18
		EP 1018549 B1	2005/01/05
		JP 11-092494 A	1999/04/06
		JP 4304348 B2	2009/07/29
		US 2002-0025572 A1	2002/02/28
		US 6969603 B2	2005/11/29
		WO 99-15645 A1	1999/04/01
US 2005-0106576 A1	2005/05/19	AU 2004-322309 A1	2006/02/23
		AU 2004-322310 A1	2006/02/23
		AU 2005-275484 A1	2006/02/23
		AU 2005-290297 A1	2006/04/06
		AU 2005-290300 A1	2006/04/06
		CN 101018870 A	2007/08/15
		CN 101018871 A	2007/08/15
		CN 101027411 A	2007/08/29
		CN 101076603 A	2007/11/21
		CN 101107365 A	2008/01/16
		EP 1781808 A1	2007/05/09
		EP 1781816 A1	2007/05/09
		EP 1789578 A2	2007/05/30
		EP 1799846 A2	2007/06/27
		EP 1799847 A2	2007/06/27
		JP 2008-506385 A	2008/03/06
		JP 2008-506386 A	2008/03/06
		JP 2008-506387 A	2008/03/06
		JP 2008-513007 A	2008/05/01
		JP 2008-513008 A	2008/05/01
		KR 10-2007-0057766 A	2007/06/07
		KR 10-2007-0057768 A	2007/06/07
		KR 10-2007-0058433 A	2007/06/08
		KR 10-2007-0062555 A	2007/06/15
		KR 10-2007-0062557 A	2007/06/15
		US 2005-0106577 A1	2005/05/19
		US 2005-0106589 A1	2005/05/19
		US 2005-0106602 A1	2005/05/19
		US 2005-0136477 A1	2005/06/23
		WO 2006-019387 A1	2006/02/23
		WO 2006-019388 A2	2006/02/23
		WO 2006-019388 A3	2006/05/26
		WO 2006-019568 A1	2006/02/23
		WO 2006-036243 A2	2006/04/06
		WO 2006-036243 A3	2007/07/26
		WO 2006-036246 A2	2006/04/06
		WO 2006-036246 A3	2007/02/08

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0027607 A	2008/03/28	EP 1903338 A2	2008/03/26
		EP 1903338 A3	2009/11/18
		EP 1903338 B1	2013/08/21
		KR 10-0862660 B1	2008/10/10
		US 2008-0118972 A1	2008/05/22
		US 2010-0160585 A1	2010/06/24
		US 7718371 B2	2010/05/18
		US 7838036 B2	2010/11/23
KR 10-2001-0032806 A	2001/04/25	AU 1344799 A	1999/06/28
		CN 1230440 C	2005/12/07
		CN 1281462 A	2001/01/24
		CN 1781931 A	2006/06/07
		EP 1036082 A2	2000/09/20
		EP 1036082 B1	2002/05/29
		EP 1234832 A2	2002/08/28
		EP 1234832 A3	2003/08/13
		EP 1234832 B1	2008/02/13
		EP 1345952 A2	2003/09/24
		EP 1345952 B1	2004/11/24
		EP 1473299 A2	2004/11/03
		EP 1473299 A3	2006/08/16
		JP 2004-501054 A	2004/01/15
		JP 2004-521881 A	2004/07/22
		JP 2010-162037 A	2010/07/29
		JP 4868697 B2	2012/02/01
		KR 10-2005-0088164 A	2005/09/01
		US 2001-0018513 A1	2001/08/30
		US 2003-0008320 A1	2003/01/09
		US 2003-0054395 A1	2003/03/20
		US 2003-0130499 A1	2003/07/10
		US 2007-0231892 A1	2007/10/04
		US 2008-0305528 A1	2008/12/11
		US 2012-0196944 A1	2012/08/02
		US 2012-0197009 A1	2012/08/02
		US 2013-0338245 A1	2013/12/19
		US 6914137 B2	2005/07/05
		WO 02-048164 A3	2002/10/17
		WO 02-48164 A2	2002/06/20
		WO 99-29703 A2	1999/06/17
		WO 99-29703 A3	1999/08/26