



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0001712
(43) 공개일자 2018년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) G06F 19/26 (2011.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2013.01)
G06F 19/26 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0080291
(22) 출원일자 2016년06월27일
심사청구일자 2016년06월27일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
조규봉
경기도 고양시 일산서구 후곡로 36 404동 703호
(일산동, 후곡마을4단지아파트)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

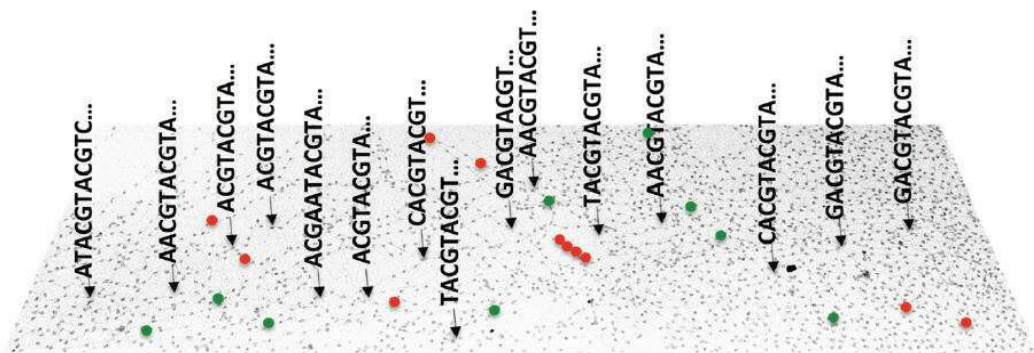
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 DNA 및 염색사의 이미지 서열 맵핑 방법

(57) 요약

본 발명은 염색사의 이미지 서열 맵핑 방법을 제공한다. 본 발명은 염색사 이미지 서열 맵핑 기법을 사용하면 어떤 유전자가 특정 시간대에 특정 조직에서 활성 혹은 비활성이 되는지와 같은 핵심적인 생물학적 통찰을 제시할 수 있다. 또한, 단일 염색사 섬유 내 유전자 발현의 시스-조절 제어를 정확하게 분석하여 후생유전학 연구에 새로운 분석법을 제시한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12Q 2563/131 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A2A04003870
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 (재)한국연구재단
 연구사업명 이공분야 기초연구사업
 연구과제명 단일분자 DNA를 이용한 초민감 DNA 손상검출 바이오센서
 기 여 율 1/2
 주관기관 서강대학교 산학협력단
 연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A6A1A03012845
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중점연구소 지원사업 (이공분야)
 연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 서강대학교 산학협력단
 연구기간 2016.05.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 염색사의 서열 맵핑 방법:

- (a) 세포로부터 DNA 또는 염색사(chromatin)를 분리하여 기관 상에 고정시키는 단계;
- (b) 상기 DNA 또는 염색사를 표지(labeling)하는 단계;
- (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 분절화(fragmentation)하여 DNA 분절을 제조하는 단계;
- (d) 상기 DNA 분절을 시퀀싱(sequencing)하는 단계; 및
- (e) 상기 단계(d)의 시퀀싱 데이터를 염색사 이미지 상에 맵핑(mapping)하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 염색사는 하이드로겔(hydrogel) 내 포매되는(embeded) 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 하이드로겔은 1-1000 nm의 다공(pore)을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a) 및 (b) 사이에 염색사 분해 효소를 처리하는 단계 (a')을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 (i) 항체를 처리하는 단계 및 (ii) 후생적 마커(epigenetic marker)를 처리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 단계 (ii)의 후생적 마커는 메틸화 ($-CH_3$), 아세틸화($-COCH_3$), 인산화($-PO_4^-$), 유비퀴틴화, 수모일화(SUMOylation), ADP-리보실화, 탈아미노화 및 프롤린 이성질화로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 제한효소(restriction enzyme)를 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 DNA 분절은 1 내지 100 kbp(kilo base pair)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (e)의 염색사 이미지는 단계 (c)의 결과물의 이미지인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 DNA 및 염색사의 이미지 서열 맵핑 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 분자의 가시화는 단분자 과학이라는 영역을 열었는데, 이는 분자의 모양과 움직임에 대한 직접적인 실험적 근거를 주어 화학과 물리학의 경계를 허물었다. 과학의 가시화는 William E. Moerner, Eric Betzig 및 Stefan W. Hell이 초해상 현미경이라 불리는 광학 현미경으로 나노 범위까지 관찰이 가능하게 하여 2014년에 노벨 화학상을 수상함에 따라 그 중요성이 더욱 강조되었다.

[0004] 구조 규명에 덧붙여, 화학적 이미지 맵핑 또한 분자의 가시화에 핵심적인 화학적 분석법이다. 이는 공간적 연관성에 대한 수많은 분광학적 분석법으로 얻은 이미지에서 분자들과 작용기들의 분산도를 표현할 수 있다. 스펙트럼분석을 통해 특정 파장에서 이미지를 고르는 것은 화학적 이미지 맵을 만들어 특정 분자들의 분포를 보여줄 수 있다. 화학적 이미지 맵핑은 화학적인 정보를 주는 이미지 내에서 분자간 분포를 직관적으로 나타내주는 점에 있어 특징적이다. 발명자는 미세유동적 장치내에서 관리한 신경세포로부터 분비된 신경 펩티드를 시각화하기 위하여 MALDI-TOF MS 이미징 기법을 적용하는 방법을 개발하였다.¹ 하지만, 그 후 유전자 분석 기법의 개발은 나노 및 미세유동적 장치를 이용하는 방향으로 발전하였다.² 유전자 분석 중, 형광현미경과 전자 현미경 상에서 복잡한 염색사 혹은 거대한 유전적 DNA 가 종종 관찰되었다.

[0005] 염색사는 DNA, 히스톤, 여러 단백질로 구성된 뉴클레오솜이 길게 연결된 형태이다. 화학적 변이가 DNA 염기내 혹은 히스톤 단백질에서 일어날 수 있다는 점은 유전자의 활성도와 무관하게 유전자의 위치를 나타내는 중요한 지표로 이용될 수 있다. 이러한 화학적 개조는 DNA 서열을 넘어 유전되는 정보라는 의미로 후성유전체학이라 명명되었고, 생물학에서 많은 중요한 현상을 설명하였다. 예를 들어, 뇌, 간, 그리고 피부는 각각 다른 모양과 기능을 지녔지만 그들의 DNA 서열은 동일하여 후성유전체학으로 설명된다. 또 다른 예로 아이는 동일한 DNA 서열을 유지하면서 어른으로 성장하는데, 이 또한 후성유전체학의 예이다. 흥미롭게도, 후성유전체적 형태는 음식, 스트레스 등 환경적 요소에 의해 달라질 수 있다. 후성유전체학은 1999년에 DNA 미세배열법을 처음으로 이용하게 되기 전까지는 천천히 발전하였다.³ 그 이후로, DNA 칩에의 염색사 면역침전법(ChIP-chip)은 후성유전체학을 광범위-유전자 연관 학문(Genome-wide Association Study)으로 혁신적 탈바꿈을 이룩하였다. 더 나아가서, 인간 유전자 연구(Human Genome Project)가 2003년에 완성되고 차세대 DNA 서열분석법(Next-generation DNA Sequencing)이 2005년에 개발된 결과, 염색사 면역침전 서열분석법(ChIP-seq) 및 인간 유전체 맵핑을 위한 다양한 분석기법에 힘입어 후성유전체학의 발전은 가속화되었다.

[0006] 염색사는 DNA, 히스톤 및 여러 단백질로 구성된 뉴클레오솜이 길게 연결된 형태이다. 염색사에 대한 후성유전체의 화학적 변형은 생물학적으로 중요한데, 이는 염색사가 DNA를 보호하고, 세포 분열 및 유전자 발현을 조절하기 때문이다. 더 흥미롭게도, 염색사는 아이에서 어른, 성장과 노화, 여러 질병 및 조직 특이적 분화에 대한 분자적 지표로서의 기능도 한다. 따라서, 후성유전체를 총체적으로 분석하는 것은 생명 과학에 있어 핵심적이다. 현재, 염색사 면역침전 서열분석법(ChIP-seq)과 관련 분석법들은 후성유전체 분석에 있어 근본적인 분석 방법으로 이용되고 있다. 하지만, 현재의 ChIP-seq 방법은 짧은 DNA 서열 길이에서 기인한 두 가지 중대한 난관에 봉착해 있는데, 이는 1) 반수체분석법과 2) 반복적인 DNA 서열이다. 본 문제점에 대한 해결책으로, 발명자는 염색사 점유를 이미지화 할 수 있는 가시적인 후성유전체적 지표를 이용하여 DNA 서열을 분석할 수 있는

염색사 이미지 서열 분석법을 제안한다.

- [0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) K. Jo, M. L. Heien, L. B. Thompson, M. Zhong, R. G. Nuzzo and J. V. Sweedler, Lab on a Chip, 2007, 7, 1454-1460
- (비특허문헌 0002) J. Lee, Y. Kim, S. Lee and K. Jo, Electrophoresis, 2015, 36, 2057-2071.
- (비특허문헌 0003) Y. Blat and N. Kleckner, Cell, 1999, 98, 249-259.
- (비특허문헌 0004) A. L. Olins and D. E. Olins, Science, 1974, 183, 330-332.
- (비특허문헌 0005) T. D. Yager, C. T. McMurray and K. E. van Holde, Biochemistry, 1989, 28, 2271-2281.
- (비특허문헌 0006) J. J. Benitez, J. Topolancik, H. C. Tian, C. B. Wallin, D. R. Latulippe, K. Szeto, P. J. Murphy, B. R. Cipriany, S. L. Levy, P. D. Soloway and H. G. Craighead, Lab Chip, 2012, 12, 4848-4854.
- (비특허문헌 0007) A. Cerf, H. C. Tian and H. G. Craighead, ACS Nano, 2012, 6, 7928-7934.
- (비특허문헌 0008) C. Bustamante, G. Zuccheri, S. H. Leuba, G. L. Yang and B. Samori, Methods-a Companion to Methods in Enzymology, 1997, 12, 73-83.
- (비특허문헌 0009) P. Oudet, M. Gross-Bellard and P. Chambon, Cell, 1975, 4, 281-300.
- (비특허문헌 0010) J. Herschleb, G. Ananiev and D. C. Schwartz, Nature Protocols, 2007, 2, 677-684.
- (비특허문헌 0011) E. T. Dimalanta, A. Lim, R. Runnheim, C. Lamers, C. Churas, D. K. Forrest, J. J. de Pablo, M. D. Graham, S. N. Coppersmith, S. Goldstein and D. C. Schwartz, Anal Chem, 2004, 76, 5293-5301.
- (비특허문헌 0012) S. Lee, Y. Oh, J. Lee, S. Choe, S. Lim, H. S. Lee, K. Jo and D. C. Schwartz, Nucleic Acids Res, 2016, 44, e6.
- (비특허문헌 0013) K. Jo, D. M. Dhingra, T. Odijk, J. J. de Pablo, M. D. Graham, R. Runnheim, D. Forrest and D. C. Schwartz, Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104, 2673-2678.
- (비특허문헌 0014) J. Lee, Y. Kim, S. Lim and K. Jo, Analyst, 2016, 141, 847-852.
- (비특허문헌 0015) K. Jo, Y. L. Chen, J. J. de Pablo and D. C. Schwartz, Lab on a Chip, 2009, 9, 2348-2355.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 후성유전체(Epigenetics) 연구를 위한 종래의 ChIP-seq 방법이 갖는 한계를 개선하고자 노력하였다. 그 결과, 상기 ChIP-seq 방법의 반수체분석법 및 반복적 DNA 서열에 의한 한계를 개선할 수 있는 염색사 이미지 서열 맵핑 방법을 고안하였다. 상기 염색사 이미지 서열 맵핑은 염색사 이미지 상에 서열정보가 표기

되는 새로운 후성유전제적 분석 방법으로, 염색사 내의 유전자 발현을 일정하게 조절하면서 정확하게 분석할 수 있다.

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 염색사의 서열 맵핑 방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 염색사의 서열 맵핑 방법을 제공한다:

[0017] (a) 세포로부터 DNA 또는 염색사(chromatin)를 분리하여 기관 상에 고정시키는 단계;

[0018] (b) 상기 DNA 또는 염색사를 표지(labeling)하는 단계;

[0019] (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 분절화(fragmentation)하여 DNA 분절을 제조하는 단계;

[0020] (d) 상기 DNA 분절을 시퀀싱(sequencing)하는 단계; 및

[0021] (e) 상기 단계(d)의 시퀀싱 데이터를 염색사 이미지 상에 맵핑(mapping)하는 단계.

[0023] 본 발명자들은 후성유전체(Epigenetics) 연구를 위한 종래의 ChIP-seq 방법이 갖는 한계를 개선하고자 노력하였다. 그 결과, 상기 ChIP-seq 방법의 반수체분석법 및 반복적 DNA 서열에 의한 한계를 개선할 수 있는 염색사 이미지 서열 맵핑 방법을 고안하였다. 상기 염색사 이미지 서열 맵핑은 염색사 이미지 상에 서열정보가 표기되는 새로운 후성유전제적 분석 방법을 개발하였다.

[0025] 현대의 많은 후성유전체 분석 기법은 ChIP-seq를 기반으로 하나, 크게 두 가지 중대한 문제점이 있다: 1) 반수체문제 그리고 2) 반복된 DNA 서열에 의한 한계의 문제. 위 두 가지 중대한 문제를 해결하기 위해, 본 발명자는 염색사의 이미지 서열 맵핑 방법을 제안한다. 본 분석법의 목적은 염색체 섬유에 유전체적 양상을 설명하고 DNA 서열 맵핑을 함으로써 가시화하는 분석기법을 구축하는 것이다. 세포 핵에서 추출한 염색사를 퍼서 얇은 하이드로겔 층에 고정된 후, 후생적 마커를 형광물질로 표지한다. 이미징 후, DNA는 분절화되고 위치를 고정하는 보존제와 혼합되어 단분자 DNA 서열분석용 웰에 옮겨진다. 최종적으로, 서열들은 염색사 이미지 위해 맵핑된다. 중요한 점은, 그 이미지에서 하나의 염색사 섬유 골격은 반수체문제와 반복 서열 문제를 해결할 수 있을 것이라는 점이다.

[0027] 본 명세서에서 용어 “염색사의 이미지 서열 맵핑”(또는 염색사의 서열 맵핑)은 염색체의 이미지(예컨대, 염색사의 “beads on a string” 및 분절화 형태) 상에 후생적 마커를 표지하고 각 DNA 분절에 상응하는 서열 데이터를 지도화하는 DNA 분석 방법이다.

[0029] 본 발명의 염색사의 서열 맵핑 방법을 단계별로 설명한다.

[0031] 단계 (a): 염색사의 분리 및 고정

[0032] 먼저, 세포로부터 염색사를 분리한다.

[0033] 우선, 세포로부터 핵을 분리한 후에 염색사를 분리할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 미세분리(microdissection) 기술을 실시하여 핵을 분리한다.

[0035] 본 명세서에서 용어 “미세분리”는 평면 시료(예컨대, 세포 또는 조직 절편)로부터 정교하게 포커싱된 레이저 빔을 이용하여 작은 조각(dissected specimen)을 절개하는 의학 및 미생물학 분야의 한 방법이다. 레이저 미

세분리는 시료에 직접적으로 조사되는 조명빔(illumination beam)을 포함하는 현미경 및 시료를 이미지화하는 이미징 빔 경로를 갖는다.

- [0036] 상기 미세분리 기술을 이용하여 세포 내 핵을 분리한다.
- [0037] 상기 염색사의 분리는 당업계에 공지된 방법에 의해 실시할 수 있다. 예컨대, 염색사 추출 키트를 이용하여 염색사를 분리할 수 있다.
- [0039] 다음, 상기 세포 또는 세포로부터 분리한 핵으로부터 염색사를 분리하여 기관 상에 고정시킨다.
- [0040] 상기 염색사는 가능한 펼친 형태로 기관 상에 고정된다.
- [0041] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 염색사는 핵산 분해 효소 처리하여 염색사를 펼친다.
- [0042] 상기 효소는 리보뉴클레아제(ribonuclease), 프로테아제(protease) 및 디옥시리보뉴클레아제(deoxyribonuclease)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소이다.
- [0043] 상기 염색사를 기관 상에 고정한다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 염색사는 하이드로겔(hydrogel) 내 포매(embedded)된 형태로 기관 상에 고정된다.
- [0045] 상기 염색사는 얇은 하이드로겔 층 내에 포매된다. 상기 하이드로겔은 아가로오스(agarose), 폴라아크릴아마이드(polyacrylamide), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 알지네이트(alginate), 폴리하이드록시에틸 메타크릴레이트(polyhydroxyethylmethacrylate), 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 고분자를 구성으로 하며, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 하이드로겔은 1-1000 nm의 다공(pore)을 갖는다.
- [0047] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 하이드로겔은 1-800 nm, 1-600 nm, 1-400 nm 또는 1-200 nm의 다공을 갖는다.
- [0048] 상기 하이드로겔 내 포매된 염색사를 이미지화한다.
- [0050] 단계 (b): 염색사의 표지
- [0051] 다음, 상기 DNA 또는 염색사를 표지한다.
- [0052] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 (i) 형광 표지된 항체를 처리하는 단계 및 (ii) 상기 후생적 마커를 처리하는 단계를 포함한다.
- [0053] 상기 후생적 마커는 메틸화 (-CH₃), 아세틸화(-COCH₃), 인산화(-PO₄⁻), 유비퀴틴화, 수모일화(SUMOylation), ADP-리보실화, 탈아미노화 및 프롤린 이성질화로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커이나, 이에 한정되지 않는다.
- [0054] 상기 후생적 마커 뿐 아니라, 염색사의 분석에 필요한 염색사 구성요소(예컨대, DNA, DNA 백본 등)도 항체, 염료 등을 이용하여 표지한다.
- [0056] 단계 (c): 분절화
- [0057] 다음, 상기 염색사를 분절화(fragmentation)하여 DNA 분절을 제조한다.
- [0058] 본 명세서에서 용어 “분절화”는 기계적 또는 효소적 분해 등의 방법에 의해 염색사의 지노믹(genomic) DNA를 작은 DNA 분절(예컨대, 20-200 kb)로 절단하는 것을 의미한다.
- [0059] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 분절화는 제한효소(restriction enzyme)를 이용하여 실시한다.
- [0060] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 제한효소는 Not I, Sma I, Asc I, Pac I, Fse I, Mlu I, Nru I, Pme I,

Spe I 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제한효소이나, 이에 한정되지 않는다.

[0061] 상기 제한효소를 이용하여 절단된 DNA 분절은 시퀀싱에 적합한 크기를 갖는다.

[0062] 본 발명에 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 분절은 1 내지 100 kbp(kilo base pair)의 크기를 갖는다.

[0064] 단계 (d): 시퀀싱

[0065] 다음, 상기 DNA 분절을 시퀀싱한다.

[0066] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 시퀀싱은 차세대 염기서열(Next Generation Sequencing) 분석을 실시한다.

[0067] 본 명세서에서, 용어 “차세대 염기서열 분석”은 대량의 병렬 데이터 생산이 가능한 시퀀서(sequencer)를 이용한 시퀀싱으로, DNA 서열을 증폭하고 형광 표식 등을 카메라로 찍어 이미지를 처리하는 과정을 거쳐 염기를 읽는 기술이다.

[0068] 상기 시퀀싱은 차세대 염기서열 분석 뿐만 아니라, 차차세대 염기서열 분석(3rd Generation Sequencer; DNA를 증폭하지 않고 DNA 단일분자 그대로 시퀀싱하는 기술), 반도체 시퀀서(Semiconductor Sequencer; 반도체 칩의 작은 구멍에 각각 DNA 합성이 일어나면서 나타나는 pH 변화를 직접 반도체에서 신호로 잡아내어 수행하는 기술), 나노포어(Nanopore; 나노미터의 극소의 구멍을 DNA 분자가 통과하면서 네 종류의 염기마다 다른 세기의 전류가 흐르게 하여 염기를 읽는 기술) 등이 이용 가능하다.

[0070] 단계 (e): 맵핑

[0071] 상기 단계(d)의 시퀀싱 데이터를 염색사 이미지 상에 맵핑한다.

[0072] 본 명세서에서 용어 “맵핑”은 유전자 사이의 거리 및 유전좌위를 확인하는 과정을 의미한다. 즉, 상기 시퀀싱 데이터를 상기 단계 (b)의 염색사 이미지 상에 표지한다.

[0073] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 염색사 이미지는 단계 (c)의 결과물의 이미지이다.

[0074] 상기 단계 (c)의 DNA 분절의 이미지 상에 상기 DNA 분절에 상응하는 시퀀싱 데이터를 맵핑한다.

발명의 효과

[0076] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0077] (a) 본 발명은 염색사의 이미지 서열 맵핑 방법을 제공한다.

[0078] (b) 본 발명은 염색사 이미지 서열 맵핑 기법을 사용하면 어떤 유전자가 특정 시간대에 특정 조직에서 활성 혹은 비활성이 되는지와 같은 핵심적인 생물학적 통찰을 제시할 수 있다.

[0079] (c) 본 발명은 단일 염색사 섬유 내 유전자 발현의 시스-조절 제어를 정확하게 분석하여 후생유전학 연구에 새로운 분석법을 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0081] 도 1은 세포 내 핵을 레이저 미세분리기를 이용하여 절단한 후 크로마틴 제조 챔버로 이동시키는 단계를 도식화하여 나타낸다.

도 2는 핵으로부터 분리한 염색사를 펄서 하이드로젤에 고정화하는 단계를 도식화하여 나타낸다.

도 3은 제한효소로 절단한 후에 전기영동으로 잘라진 조각 DNA를 옮겨서 다른 표면으로 옮기고 그 표면을 서열 분석장비로 가져가서 분석하는 방법을 도식화하여 나타낸다.

도 4는 PacBio SMRT 시퀀싱(SEQUEL)을 이용한 단일 분자 DNA 시퀀싱을 도식화하여 나타낸다.

도 5는 염색사 이미지 상에 시퀀싱 데이터가 맵핑된 결과를 도식화하여 나타낸다. 녹색 및 빨간색 점은 후생

적 마커를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0082] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0084] **실시예**
- [0085] **실험 설계 및 방안**
- [0086] *1단계: 조직의 세포 핵 분리*
- [0087] 첫 번째 단계는 생물학적 검체에서 세포 핵(nucleus)을 분리하는 것이다. 이 단계에서는, 도 1에서 볼 수 있듯이 세포 혹은 핵을 분리하기 위한 레이저 미세분리(micro-dissection) 및 분리해낸 입자를 옮기기 위한 광학 집게(optical tweezers)를 갖춘 현미경적 체계를 이용한다. 최근 Zeiss and Molecule Machines사는 레이저 광선 분절과 광학 집게를 갖춘 장치를 개발하였다. 도 1에서 확인할 수 있듯이, 상기 장치는 단세포 핵을 쉽게 잘라낸 후 광학집게를 이용하여 미세유동장치 내에서 염색사 준비 챔버로 옮길 수 있다. 미세유동 챔버에서 분리된 단세포 핵은 다음 단계에서 후성유전체적 분석에 이용될 수 있다.
- [0089] *2단계: 세포 핵으로부터 염색사 이미지*
- [0090] 분리된 핵을 염색사 준비 챔버로 옮긴 후, 염색사 분리를 위해 용해해야 한다. 하지만, 용해하기 전 역동적으로 부착되어 있는 DNA와 히스톤을 교차연결해야 한다. DNA 복제, 전사, 유전적 재조합, DNA 복구 등 여러 과정에서 염색사 구조는 열리고 닫힌다. 그러므로, 포름 알데히드 혹은 글루타알데히드와 같은 세포막을 통과하는 가교 인자들을 첨가하여 이 복잡한 염색사 구조를 고정하는 것이 중요하다(도 2).
- [0091] 크기가 큰 염색사는 염색사 파손을 줄이기 위해 조심스럽게 준비되어야 한다. 이 과정은 ChIP-seq와 전혀 다른데, 이는 염색사 분절을 기초로 하기 때문이다. 다량의 염색사를 얻기 위한 신속한 기법은 1974년 Science 지에 게재된 바와 같이 증류수에서 세포 핵막을 무너뜨리는 것이다.⁴ 그러나, 다음의 연구들은 낮거나 높은 이온 결합력을 조합하여 이온 결합 정도를 최적화하였다.⁵ 덧붙여, 염색사 분리를 위한 미세유동장치 관련 연구가 이루어지고 있다.^{6,7} 도 1에 나타난 바와 같이, 이 염색사 준비용 챔버는 세포 용해를 위해 고농도와 저농도 용액이 교환될 수 있도록 들어오고 나가는 채널들이 연결되어야 한다. 대안으로, 핵막을 무너뜨리기 위해 레이저 광선을 직접 조사하는 방법도 가치가 있다.
- [0092] 핵 용해 후, 염색사를 가능한 넓게 펼쳐야 한다. 이를 위해, 선행 연구를 참고로 염분 농도를 최적화하는 것이 필요하다.^{8,9} 덧붙여, RNA 분자들은 보통 염색사와 복합체를 형성하기 때문에 리보핵산가수분해효소(RNase)를 이용하여 뒤엉킨 염색사 복합체를 분해해야 한다. 또한, 염색사 내의 내부적 연결을 대략적으로 끊기 위해 단백질분해효소 혹은 DNA 분해효소가 이용될 수 있다. 그러나, DNA 혹은 유전체적 표지자에 극심한 손상을 주지 않기 위해 조건을 조심스럽게 최적화해야 한다. 그 때, 넓게 펼쳐진 염색사는 이미지 상에서 염색사의 위치를 정하기 위해 하이드로겔을 이용하여 고정되어야 한다. 더욱이, 하이드로겔에 포매함으로써 염색사를 기계적 힘으로부터 보호할 수 있고, 부수적인 생화학적 반응을 위한 효소와 소분자의 이동을 가능하게 한다. 또다른 고려사항은 본 겔 층을 최대한 얇게 만들어 점차적인 반응이 빠르게 일어나게 하는 것이다. 하이드로겔 성분으로는 아가로스(100 nm 구멍) 혹은 폴리아크릴아미드(10 nm 구멍) 겔이 이용될 수 있는데, 이는 크기가 큰 DNA를 분석할 때에 본 물질들이 사용되고 있기 때문이다.^{10,11} 그럼에도, 구멍 크기를 조절하거나 표면 특성을 개질함으로써 다른 하이드로겔 물질들도 이용될 수 있다. 염색사가 포매된 하이드로겔 위에, 유전체적 표지자를 부착시키기 위해 형광 염료가 연결된 항체가 첨가되어야 한다. 동시에, YOYO-1 dyes⁷ 혹은 형광단백질-DNA 부착 펩티드(FPDBP)¹²와 같은 DNA 표지 인자가 염색사 내 DNA 골격을 형광으로 염색하기 위해 첨가될 수 있다.
- [0093] 다음 단계는 DNA 서열분석을 위해 겔 내에서 작은 DNA 분절을 만드는 것이다. SMRT 서열분석을 위한 절차는

도 3에 설명되어 있다. 간략히, DNA 분절은 양끝이 원형 DNA에 연결되어 있는데, 이는 유전적으로 조작된 DNA 중합효소가 붙는 곳이기도 해서 바이오틴이 부착된 표면에 연결될 수 있다. 기존 방법과의 차이점으로는 DNA 분절의 XY-연계성을 유지하기 위해 모든 과정이 겔 층 내에서 이루어져야 한다는 점이다. 분절을 위해, 상대적으로 큰 DNA 분절을 만드는 *Not1* 및 *Swa1*과 같은 특이한 절단 효소(rare restriction enzyme)가 유용하다. 예를 들어, *Not1*은 GCGGCCGC를 인식하여 평균적으로 6만5천 염기쌍 길이의 분절을 만든다. 동전기적인 힘에 의해 조절되는 양극으로의 이동이 쉽기 때문에 긴 DNA 분절은 실험적으로 용이하다(도 3).

[0095] 3단계: DNA 서열분석 기법

[0096] 도 3은 하이드로겔에서 서열분석 장치로 DNA 분절을 옮기는 과정을 설명하고 있다. 전기영동으로 안에 갇혀있던 분자들이 아래 판으로 이동하게 되고 바닥에 붙게 된다. 이를 서열분석기로 옮겨서 시퀀싱한다. 도 3의 어댑터(adapter)는 시퀀싱을 위해서 이미 알고 있는 서열을 붙여주는 부분이다.

[0097] 동전기적으로 이동된 DNA 분절은 DNA 혼성 혹은 항원-항체 반응을 이용하여 기능적인 표면에 모일 수 있다. 그 때, 그 표면은 서열분석 웰 위에 놓일 수 있다. 기본적으로, 단분자 실시간(SMRT) 서열분석 장비로는 PacBio Sequel이 이용될 수 있다. 도 4와 같이, SMRT 서열분석 장치는 70 nm 너비와 100 nm 깊이의 웰(Zero Mode Waveguide; ZMW)로 이루어져 있는데, 바이오틴이 부착된 바닥에 연결된 아령모양 DNA 분절과 중합효소를 이용하여 초당 세 개의 뉴클레오타이드를 읽는 속도로 DNA 서열을 분석한다. 다행히도, 100 nm의 깊이는 매달려 있는 DNA 분절에 중합효소를 부착하기에 적절한 것으로 고려된다(64 kb=21 μ m).

[0098] 초기에는, 잘 확립된 상업적 기구의 사용이 더 이로울 수 있다. 그러나, SMRT 시퀀싱의 발상은 단순하고 간단하다. 원리증명 후에는 TIRF(Total Internal Reflection Fluorescence) 현미경 기반의 나노제작 장치를 이용한 고유의 시스템으로 점차 나아갈 것이다. 고유의 맞춤형 시스템은 많은 이점을 갖는다. 가장 중요한 이점은 도 4에서 확인할 수 있듯이, 이미지 해상도를 2 μ m 간격보다 작게 감소시킬 수 있는 것이다. 또한, 염색사 이미지 서열 맵핑을 최적화하여 단일 수행의 비용을 절감할 수 있다.

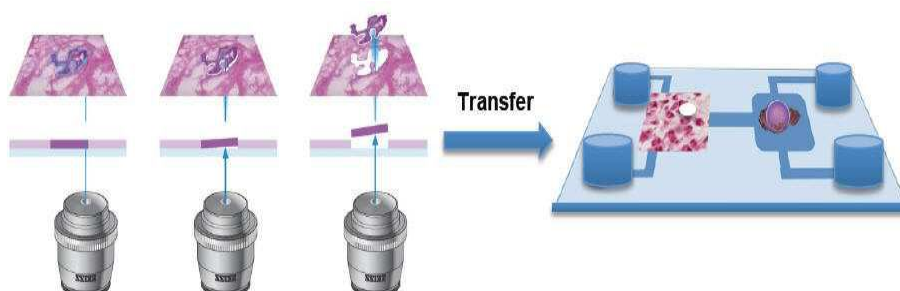
[0100] 4단계: 염색사 이미지 서열 맵핑

[0101] DNA 분절 시퀀싱을 수집한 후, 도 5와 같이, 이 시퀀싱 데이터를 염색사 이미지 상에 맵핑할 수 있다. 이 단계는 이미지 분석 관련 컴퓨터 프로그래밍이 요구된다. 본 연구진은 필기 이미지 분석 프로그램뿐 아니라 리눅스 API 및 ImageJ 기반의 C^{++} 를 이용한 이전 논문의 DNA 서열의 충분한 경험을 갖고 있다.¹³⁻¹⁵ 또한, 염색사 이미지 서열 맵핑과 개념상 유사한 질량분석 이미징에 비주얼 C# 프로그램을 이용하였다.¹ 이는 염색사 이미지 서열 맵핑을 위한 생물정보학 도구를 개발하는데 유용할 것이다.

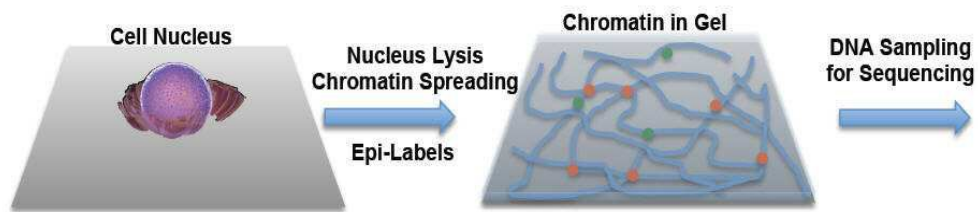
[0103] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

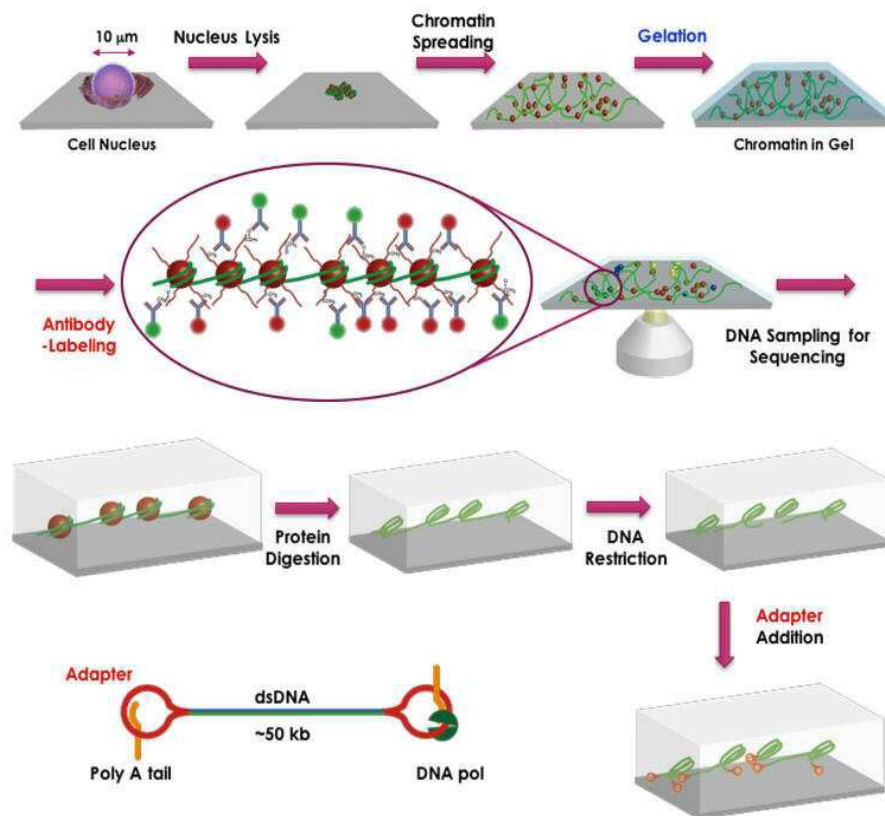
도면1



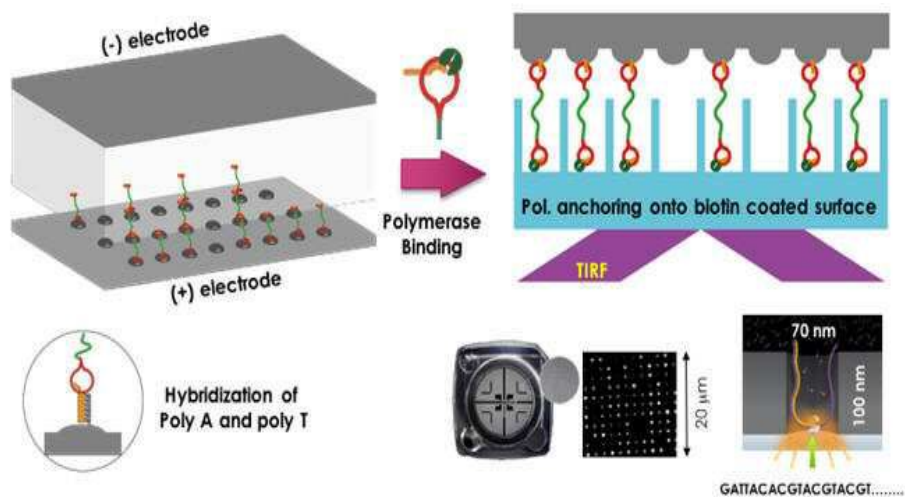
도면2



도면3



도면4



도면5

