



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0113894
(43) 공개일자 2018년10월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6869 (2018.01) C40B 40/06 (2006.01)
C40B 50/06 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1093 (2013.01)
C12N 15/1003 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0145331
(22) 출원일자 2017년11월02일
심사청구일자 2017년11월02일
(30) 우선권주장
1020160146642 2016년11월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
장세진
경기도 성남시 분당구 야탑로 124, 605동 704호
(야탑동, 탑마을벽산아파트)
천성민
서울특별시 송파구 올림픽로35길 104, 3동 1207호
(신천동, 장미아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 20 항

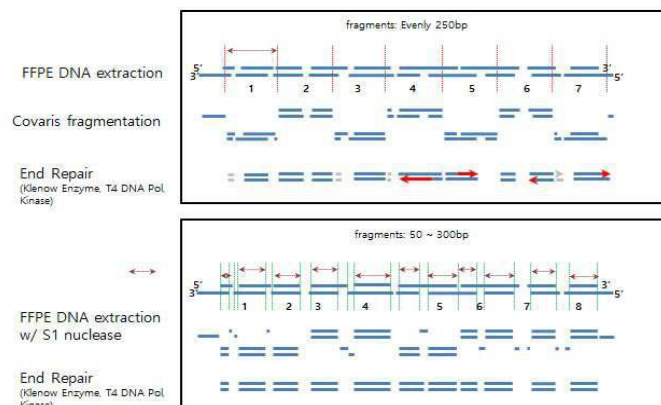
(54) 발명의 명칭 엔도뉴클레이즈를 이용한 FFPE 조직 유래 DNA 라이브러리 제작 방법

(57) 요약

본 발명은 엔도뉴클레이즈를 이용한 FFPE 조직 유래 DNA 라이브러리 제작 방법에 관한 것으로서, 일반적인 임상 시료는 절대 다수가 FFPE 조직이며, 오래된 FFPE 조직의 경우, DNA 라이브러리 제작에 실패하게 되는 경우가 빈번하여 NGS 분석에 어려움을 겪게 되는데, 이를 극복할 방안이 절실히 필요한 실정이다. S1 뉴클레이즈는 단일-가닥(single-stranded) DNA만을 특이적으로 잘라내는 효소인데, 거의 모든 FFPE의 경우, dsDNA 곳곳에 닉(nick)이 존재하며, 이 부분이 S1 뉴클레이즈의 표적(target)이 될 수 있다. FFPE 조직에서 gDNA를 추출하는 과정 중, 용출(elution) 과정에서 S1 뉴클레이즈를 적절한 조건에서 처리하고 용출하면, DNA 추출과 동시에, DNA 라이브러리 제작에 적당한 크기의 DNA로 단편화된 DNA를 얻을 수 있으므로, Covaris 단편화 과정을 생략할 수 있어, 비용 및 시간을 감소할 수 있다.

대표도 - 도3

Covaris vs. S1 nuclease: bad quality DNA-2



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6806 (2018.05)

C12Q 1/6869 (2018.05)

C40B 40/06 (2013.01)

C40B 50/06 (2013.01)

(72) 발명자

성창욱

경기도 용인시 기흥구 죽현로 12, 308동 1702호 (보정동, 죽현마을 동원로얄듀크)

김유진

서울특별시 강동구 고덕로20다길 18-3, 2층 (암사동)

이지영

서울특별시 관악구 서원4길 6, 205호 (신림동, 하나빌)

전혜준

서울특별시 강동구 구천면로 192, 천호역 한강 푸르지오시티 2214호 (천호동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711029082

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해외우수기관유치사업

연구과제명 아산-다나파버 암 유전체 연구 센터(3)

기 여 율 40/100

주관기관 울산대학교

연구기간 2015.07.01 ~ 2016.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711058033

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 혈중 순환 종양 DNA 기반 종양 유전체 및 후성유전체 변이 초고감도 분석 기술 개발

기 여 율 40/100

주관기관 서울아산병원

연구기간 2017.06.30 ~ 2018.03.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345242023

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원

연구과제명 순환 유리 핵산의 고효율 추출법 개발

기 여 율 20/100

주관기관 서울아산병원

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

엔도뉴클레이즈(endonuclease)를 유효성분으로 포함하는 포르말린-고정, 파라핀-포매(formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE) 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리(library) 제작용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 엔도뉴클레이즈는 FFPE 조직 유래 단일가닥구조 DNA인 닉(nick)을 타겟으로 절단하는 것을 특징으로 하는 FFPE 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리 제작용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 엔도뉴클레이즈는 S1 뉴클레이즈, P1 뉴클레이즈, 녹두 뉴클레이즈(mung bean nuclease) 및 BAL-31 뉴클레이즈로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 엔도뉴클레이즈인 것을 특징으로 하는 FFPE 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리 제작용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리는 차세대 유전체 해독기술(Next generation sequencing, NGS) 분석을 위한 것임을 특징으로 하는 FFPE 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리 제작용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리 제작용 키트.

청구항 6

엔도뉴클레이즈를 유효성분으로 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 용출(elution)용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 엔도뉴클레이즈는 S1 뉴클레이즈, P1 뉴클레이즈, 녹두 뉴클레이즈(mung bean nuclease) 및 BAL-31 뉴클레이즈로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 엔도뉴클레이즈인 것을 특징으로 하는 FFPE 조직 유래 DNA의 용출용 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항의 조성물을 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 용출용 키트.

청구항 9

FFPE 조직 유래 DNA 라이브러리 제작 방법에 있어,

FFPE 조직 절편 용해물에 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계; 및

상기 반응물로부터 DNA를 용출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 복잡도(complexity)가 향상된 DNA 라이브러리의 제작 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 FFPE 조직 절편 용해물은 FFPE 조직 절편으로부터 단백질을 분해시켜 제거한 것을 특징으로 하는 복잡도가 향상된 DNA 라이브러리의 제작 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 반응물로부터 DNA를 용출하는 단계는 DNA의 양 말단을 평활화(end repair)시키는 단계 및

상기 평활화된 DNA를 라이게이션(ligation)시키는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 복잡도가 향상된 DNA 라이브러리의 제작 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계는 상기 엔도뉴클레이즈를 1 내지 100 유닛(unit) 처리하는 것을 특징으로 하는 복잡도가 향상된 DNA 라이브러리의 제작 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계는 상기 엔도뉴클레이즈를 37℃에서 1 내지 60분 동안 처리하는 것을 특징으로 하는 복잡도가 향상된 DNA 라이브러리의 제작 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 엔도뉴클레이즈는 S1 뉴클레이즈, P1 뉴클레이즈, 녹두 뉴클레이즈(mung bean nuclease) 및 BAL-31 뉴클레이즈로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 엔도뉴클레이즈인 것을 특징으로 하는 복잡도가 향상된 DNA 라이브러리의 제작 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 DNA 라이브러리는 NGS 분석을 위한 것임을 특징으로 하는 DNA 라이브러리 제작 방법.

청구항 16

FFPE 조직 절편 용해물에 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계; 및

상기 반응물로부터 DNA를 용출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 FFPE 조직 유래 DNA 용출 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 FFPE 조직 절편 용해물은 FFPE 조직 절편으로부터 단백질을 분해시켜 제거한 것을 특징으로 하는 FFPE 조직 유래 DNA 용출 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계는 상기 엔도뉴클레이즈를 1 내지 100 유닛(unit) 처리하는 것을 특징으로 하는 FFPE 조직 유래 DNA 용출 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계는 상기 엔도뉴클레이즈를 37℃에서 1 내지 60분 동안 처리하는 것을 특징으로 하는 FFPE 조직 유래 DNA 용출 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 상기 엔도뉴클레이즈는 S1 뉴클레이즈, P1 뉴클레이즈, 녹두 뉴클레이즈(mung bean nuclease) 및 BAL-31 뉴클레이즈로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 엔도뉴클레이즈인 것을 특징으로 하는 FFPE 조직 유래 DNA 용출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 엔도뉴클레이즈(endonuclease)를 이용한 포르말린-고정, 파라핀-포매(formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE) 조직 유래 DNA 라이브러리(library) 제작 방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근, 의료 분야에서는 분자생물학적 기술이 다양하게 이용되고 있다. 특히, 분자 병리학적 측면에서 이러한 기술들은 형태학적 수준에서부터 유전자 수준까지 병리학적 진단을 가능하게 하며, 또한 상기 형태학적 수준 및

유전자 수준으로부터 특정 질병의 유전적 특징을 밝힐 수 있다. 이러한 진단 과정을 위해 병원에서는 FFPE 형태로 조직을 수거하게 되는데, 상기 FFPE 조직을 통해 다양한 임상적 상태와 관련된 유전적 정보를 분석 및 진단할 수 있다.

[0003] 차세대 유전체 해독기술(Next generation sequencing, NGS) 분석을 위해서는 시료에서 게놈 DNA(genomic DNA; gDNA)를 추출하고, 추출된 게놈 DNA를 150~250bp 정도의 크기로 단편화한 후, 해당 크기의 DNA를 선별 추출하여 여러 효소를 이용한 평활화(end repair)를 거쳐 DNA 라이브러리(library)를 제작하여야 한다. 일반적인 상태(quality)의 gDNA를 사용할 경우, 상기 과정을 거쳐 DNA 라이브러리를 제작할 수 있으나, 오래되어 분해(degradation)가 많이 진행된 DNA의 경우에는 DNA 라이브러리 제작에 실패하게 되는 경우가 빈번하다. DNA 단편화의 경우, 일반적으로는 Covaris라는 장비를 이용한, 일종의 sonication 방법으로 진행하게 된다. 이는 출력과 반응시간 등을 조정하여, 최종 단편화된 DNA의 크기를 조절하는데, 이 때, DNA 상에서 단편화가 발생하는 위치는 무작위적(random)으로 나타나기 때문에, 오래된 시료에서 추출한, 이미 분해가 심하게 진행된 gDNA의 경우, 더 잘게 조각난 형태로 단편화되어, DNA 라이브러리 제작이 실패하게 된다.

[0004] 엔도뉴클레이즈(endonuclease)는 폴리뉴클레오티드사슬의 내부에서 3',5'-인산디에스테르 결합을 절단하여 올리고리보뉴클레오티드를 생산하는 효소의 총칭하는 것으로서, DNA와 RNA의 구별 없이 사슬 내부를 절단하는 것이 일반적이다. 엔도뉴클레이즈의 한 종류인 S1 뉴클레이즈(S1 nuclease)는 이중나선구조 DNA 중 한 가닥만 연결되어 부위를 표적으로 하는 효소로써, 두 조각의 단편화된 이중나선구조 DNA를 생성하거나, 단일가닥구조의 DNA를 분쇄시켜 제거한다. 분자생물학 분야에서 S1 뉴클레이즈는 평활화 말단(blunt end)을 제작하기 위해, DNA 분자로부터 단일가닥 말단을 제거하거나, 이중 가닥 cDNA의 합성 중 발생하는 열린 헤어핀 루프(hairpin loops)를 제거하는 데 일반적으로 사용된다.

[0005] 일반적인 임상시료는 절대 다수가 FFPE 조직이며, 오래된 FFPE 조직의 경우, 상기한 문제로 인해 NGS 분석이 어려워, 이를 극복할 방안이 절실히 필요한 실정이다. 이에 본 발명자들은 거의 모든 FFPE의 경우, dsDNA 곳곳에 닉(nick)이 존재하며, 이 부분이 S1 뉴클레이즈의 표적(target)이 될 수 있음을 확인하고, S1 뉴클레이즈를 이용하여 NGS library 제작 효율을 크게 증가시킬 수 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 중국공개특허 제102485979호 (2012.06.06 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 엔도뉴클레이즈를 유효성분으로 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리 제작용 조성물 및 이를 이용한 FFPE 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리 제작 방법을 제공하는데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 엔도뉴클레이즈를 유효성분으로 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 용출용 조성물, 및 이를 이용한 FFPE 조직 유래 DNA의 용출 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엔도뉴클레이즈를 유효성분으로 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리 제작용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리 제작용 키트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 엔도뉴클레이즈를 유효성분으로 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 용출용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 용출용 키트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 FFPE 조직 유래 DNA 라이브러리 제작 방법에 있어, FFPE 조직 절편 용해물에 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계; 및 상기 반응물로부터 DNA를 용출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 복잡도(complexity)가 향상된 DNA 라이브러리의 제작 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 FFPE 조직 절편 용해물에 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계; 및 상기 반응물로부터 DNA를 용출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 FFPE 조직 유래 DNA 용출 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 엔도뉴클레이즈를 이용한 FFPE 조직 유래 DNA 라이브러리 제작 방법에 관한 것으로서, 일반적인 임상 시료는 절대 다수가 FFPE 조직이며, 오래된 FFPE 조직의 경우, DNA 라이브러리 제작에 실패하게 되는 경우가 빈번하여 NGS 분석에 어려움을 겪게 되는데, 이를 극복할 방안이 절실히 필요한 실정이다. S1 뉴클레이즈는 단일가닥(single-stranded) DNA만을 특이적으로 잘라내는 효소인데, 거의 모든 FFPE의 경우, dsDNA 곳곳에 닉(nick)이 존재하며, 이 부분이 S1 뉴클레이즈의 표적(target)이 될 수 있다. FFPE 조직에서 gDNA를 추출하는 과정 중, 용출(elution) 과정에서 S1 뉴클레이즈를 적절한 조건에서 처리하고 용출하면, DNA 추출과 동시에, DNA 라이브러리 제작에 적당한 크기의 DNA로 단편화된 DNA를 얻을 수 있으므로, Covaris 단편화 과정을 생략할 수 있어, 비용 및 시간을 감소할 수 있다. 또한, 추가 단편화 없이 바로 평활화(end-repair)를 진행할 수 있어, 너무 작게 조각나 라이게이션 삽입물(ligation insert)로 사용되지 못하게 됨을 억제할 수 있어, 제작된 라이브러리의 복잡도(complexity)를 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 좋은 상태의 DNA를 사용하여, DNA 단편화에 일반적으로 이용되는 Covaris 방법과, 본 발명의 S1 뉴클레이즈를 이용한 DNA 단편화 과정을 나타낸다.

도 2는 중간 상태의 DNA를 사용하여, DNA 단편화에 일반적으로 이용되는 Covaris 방법과, 본 발명의 S1 뉴클레이즈를 이용한 DNA 단편화 과정을 나타낸다.

도 3은 나쁜 상태의 DNA를 사용하여, DNA 단편화에 일반적으로 이용되는 Covaris 방법과, 본 발명의 S1 뉴클레이즈를 이용한 DNA 단편화 과정을 나타낸다.

도 4는 환자 FFPE 조직을 이용하여, S1 뉴클레이즈 처리 후 DNA 크기 변화 및 DNA 라이브러리 제작 결과를 나타낸다(#192).

도 5는 환자 FFPE 조직을 이용하여, S1 뉴클레이즈 처리 후 DNA 크기 변화 및 DNA 라이브러리 제작 결과를 나타낸다(#27).

도 6은 환자 FFPE 조직을 이용하여, S1 뉴클레이즈 처리 후 DNA 크기 변화 및 DNA 라이브러리 제작 결과를 나타낸다(#51).

도 7은 환자 FFPE 조직을 이용하여, S1 뉴클레이즈 처리 후 DNA 크기 변화 및 DNA 라이브러리 제작 결과를 나타낸다(#62).

도 8은 환자 FFPE 조직을 이용하여, S1 뉴클레이즈 처리 후 DNA 크기 변화 및 DNA 라이브러리 제작 결과를 나타낸다(#219).

도 9는 Covaris 방법으로 제작한 라이브러리와 S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 제작한 라이브러리를 이용하여 얻은 돌연변이 검출 비교 결과이다.

도 10은 좋은 상태의 FFPE 조직을 이용하여 라이브러리를 제작한 결과를 나타낸다.

도 11은 고정하지 않은 신선한 세포를, S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 DNA를 추출하고, 이를 이용해 라이브러리를 제작한 결과를 나타낸다.

도 12는 다양한 시간 (6, 12, 24, 48hr)으로 포르말데히드 고정을 한 A549 세포 블록(cell block)에서, Covaris 방법 및 S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 gDNA를 추출한 후, Bioanalyzer와 1.5% 아가로스 겔에서 추출된 DNA의 패턴을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 엔도뉴클레이즈를 유효성분으로 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리 제작용 조성물을 제공한다. 상세하게는, 상기 엔도뉴클레이즈는 FFPE 조직 유래 단일가닥구조 DNA인 닉(nick)을 타겟으로 절단할 수 있다.

- [0018] 바람직하게는, 상기 DNA 라이브러리는 차세대 유전체 해독기술(Next generation sequencing, NGS) 분석을 위한 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에서 용어, "포르말린-고정, 파라핀-포매(formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE)"는 동물로부터 분리된 조직을 보관 또는 저장하기 위한 하나의 방법으로, 조직을 고정하고 고정된 조직을 왁스에 포매시킨 것을 의미한다. 이에 제한되는 것은 아니나 FFPE 조직을 제조하기 위한 구체적인 과정은 다음과 같을 수 있다.
- [0020] 먼저, 절개 또는 생검에 의해 동물 시편으로부터 조직을 분리한다. 그 다음, 상기 조직을 잘라 절편을 제조하고, 이를 부패 또는 분해로부터 방지하고 조직학적, 병리학적 또는 세포학적 연구를 위해 현미경하에서 이것을 명확하게 검사하기 위해 고정한다. 고정은 조직을 현미경하에서 염색 및 조망하기 위한 목적으로 부동화시키고, 치사시키고, 보존시키는 공정이다. 공정 후 가공은 조직이 염색 시약을 투과하도록 만들고 거대분자를 가교시켜, 이들이 위치에 안정화되고 간히게 한다. 예를 들어, 보우인(Bouine) 용액, 포르말린 또는 액체 질소와 같은, 많은 고정액이 본 목적을 위해 사용된다. 그 다음 상기 고정된 조직을 왁스에 포매시켜, 얇은 섹션으로 절단하고 헤마톡실린 및 에오신 염색으로 염색될 수 있게 한다. 이후, 마이크로톰(microtoming)은 현미경하에서 항체로의 염색을 연구하기 위해 미세한 섹션을 절단함으로써 실시된다.
- [0021] 한편, 본 발명의 FFPE 조직 유래 DNA의 단편화에 이용되기 위한 FFPE 조직은 최근에 제조된 것뿐만 아니라 10년 이상 장기간 보관된 FFPE 조직 역시 적용 가능하다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "엔도뉴클레이즈(endonuclease)"는 폴리뉴클레오티드사슬의 내부에서 3', 5'-인산디에스테르 결합을 절단하여 올리고리보뉴클레오티드를 생산하는 효소의 총칭하는 것으로서, DNA와 RNA의 구별 없이 사슬 내부를 절단하는 것이 일반적이다.
- [0023] 한편, 본 발명에서는 모든 엔도뉴클레이즈가 적용될 수 있으며, 바람직하게는 S1 뉴클레이즈, P1 뉴클레이즈, 녹두 뉴클레이즈(mung bean nuclease) 또는 BAL-31 뉴클레이즈가 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "S1 뉴클레이즈(S1 nuclease)"는 단일-가닥(single-stranded) DNA만을 특이적으로 잘라내는 효소인데, 거의 모든 FFPE의 경우, dsDNA 곳곳에 Nick(nick)이 존재하며, 이 부분이 S1 뉴클레이즈의 표적(target)이 될 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리 제작용 키트를 제공한다.
- [0026] 한편, 상기 키트는 FFPE 조직 유래 DNA의 DNA 라이브러리 제작에 일반적으로 사용되는 다른 기구, 용액 등을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 또한, 본 발명은 엔도뉴클레이즈를 유효성분으로 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 용출(elution)용 조성물을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 FFPE 조직 유래 DNA의 용출용 키트를 제공한다.
- [0029] 한편, 상기 키트는 FFPE 조직 유래 DNA의 용출에 일반적으로 사용되는 다른 기구, 용액 등을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 또한, 본 발명은 FFPE 조직 유래 DNA 라이브러리 제작 방법에 있어, FFPE 조직 절편 용해물에 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계; 및 상기 반응물로부터 DNA를 용출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 복잡도(complexity)가 향상된 DNA 라이브러리의 제작 방법을 제공한다.
- [0031] 상세하게는, 상기 FFPE 조직 절편 용해물은 FFPE 조직 절편으로부터 단백질을 분해시켜 제거한 것일 수 있으며, 상기 반응물로부터 DNA를 용출하는 단계는 DNA의 양 말단을 평활화(end repair)시키는 단계 및 상기 평활화된 DNA를 라이게이션(ligation)시키는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0032] 바람직하게는, 상기 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계는 상기 엔도뉴클레이즈를 1 내지 100 유닛(unit) 처리할 수 있고, 37℃에서 1 내지 60분 동안 처리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 바람직하게는, 상기 DNA 라이브러리는 NGS 분석을 위한 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 또한, 본 발명은 FFPE 조직 절편 용해물에 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계; 및 상기 반응물로부터 DNA를 용출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 FFPE 조직 유래 DNA 용출 방법을 제공한다.

- [0035] 상세하게는, 상기 FFPE 조직 절편 용해물은 FFPE 조직 절편으로부터 단백질을 분해시켜 제거한 것일 수 있다.
- [0036] 바람직하게는, 상기 엔도뉴클레이즈를 처리하여 반응시키는 단계는 상기 엔도뉴클레이즈를 1 내지 100 유닛(unit) 처리할 수 있고, 37℃에서 1 내지 60분 동안 처리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 한편, 본 발명의 상기 DNA 라이브러리의 제작 방법 또는 DNA 용출 방법에서는 모든 엔도뉴클레이즈가 적용될 수 있으며, 바람직하게는 S1 뉴클레이즈, P1 뉴클레이즈, 녹두 뉴클레이즈(mung bean nuclease) 또는 BAL-31 뉴클레이즈가 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.
- [0039] **<실시예 1> 여러 상태의 FFPE 유래 DNA를 이용한 단편화 비교**
- [0040] 좋은 상태의 DNA, 중간 상태의 DNA 및 나쁜 상태의 DNA를 사용하여, DNA 단편화에 일반적으로 이용되는 Covaris 방법과, 본 발명의 S1 뉴클레이즈를 이용한 DNA 단편화 방법을 비교하였다(도 1 내지 도 3).
- [0041] Covaris 방법은 다음과 같은 과정으로 이루어진다. 시료에서 gDNA를 추출하고, 추출된 gDNA를 150~250bp 정도의 크기로 단편화한 후, 해당 크기의 DNA를 선별 추출하여 여러 효소를 이용한 평활화(end repair)를 거친다. 그 후, 3' 말단에 A-tailing 하고, 어댑터 서열(adapter sequences)을 이용한 라이게이션(ligation)을 수행한다.
- [0042] 일반적인 상태의 gDNA를 사용할 경우, 상기 과정을 거쳐 DNA 라이브러리를 제작할 수 있으나, 오래되어 분해(degradation)가 많이 진행된 DNA의 경우에는 DNA 라이브러리 제작에 실패하게 되는 경우가 빈번하다. 오래된 시료에서 추출한, 이미 분해가 심하게 진행된 gDNA의 경우, 더 잘게 조각난 형태로 단편화되어, DNA 라이브러리 제작이 실패하게 되는 것이다.
- [0043] 특히, 제작된 지 오래된 FFPE 조직의 경우, 이미 DNA 단편화가 많이 진행되어 있으며, Covaris를 이용한 무작위적인 단편화를 다시 진행하면, 너무 작은 조각으로 분쇄되는 영역이 발생하게 된다. 이 부분은 라이브러리 제작 후 크기 선별(라이브러리 크기 150bp 이상만 선별) 과정에서 제거되어, 결국은 gDNA 전체 정보를 잃어버리는 결과가 발생하게 되므로, 제작된 라이브러리의 복잡도(complexity)이 낮아지게 된다.
- [0044] 이에 반해, 본 발명의 S1 뉴클레이즈를 이용하여 추출된 gDNA의 경우, 훨씬 많은 부위가 보존되어 라이브러리의 복잡도(complexity)이 높아지게 된다.
- [0045] **<실시예 2> S1 뉴클레이즈 처리 후 DNA 크기 변화 확인**
- [0046] 실제로 S1 뉴클레이즈 처리 후, DNA의 크기가 어떻게 변하는지를 확인하기 위해 5명 환자에 대한 FFPE 조직을 이용하여, 두 방법으로 DNA를 추출하여 BioAnalyzer를 이용하여 추출된 DNA의 크기를 확인하였다.
- [0047] Covaris를 이용한 일반적인 방법으로 DNA를 추출한 경우, 예상대로 150bp~10kb 까지 넓게 퍼져있는 형태(smearing pattern)의 gDNA를 확인할 수 있었다.
- [0048] 반면, 용출 과정에서 S1 뉴클레이즈를 처리한 경우(20 unit, 10min), 예상대로, DNA의 크기가 넓게 퍼져 있지 않고, 특정 크기를 주된 형태로 하는 단편화가 일어나 있음을 확인하였다. 또한, 그 크기가 DNA 라이브러리 제작을 위해 요구되는, 150~250bp 영역에 존재하는 것을 확인하였다. 이를 통해, FFPE 조직에서 gDNA 추출 시 S1 뉴클레이즈를 처리하면, 150~250bp 크기의 적당한 형태의 DNA를 추출할 수 있음을 확인하였다.
- [0049] 구체적으로, #192 시료의 경우, 상기 두 방법 모두 DNA 라이브러리 제작이 잘 이루어졌으며, Covaris 방법에서 약간 더 큰 DNA 라이브러리가 제작되었다(도 4).
- [0050] #27 시료의 경우, Covaris 방법으로 단편화한 후 선별 추출된 DNA의 양이 너무 작아, 다음 단계로 진행되지 못해 DNA 라이브러리 제작에 실패하였으나, S1 뉴클레이즈 처리 방법으로는 DNA 라이브러리 제작 성공하였다(도 5).
- [0051] #51 및 #62 시료의 경우, 상기 두 방법 모두 DNA 라이브러리 제작에 성공하였다(도 6 및 도 7).
- [0052] #217 시료의 경우, Covaris 방법으로 제작된 DNA 라이브러리 형태에 문제가 있어, NGS 분석에 사용이 불가하였으나, S1 뉴클레이즈 처리 방법으로는 DNA 라이브러리 제작 성공하였다(도 8).

[0053] <실시예 3> S1 뉴클레이즈 처리 조건 최적화

[0054] S1 뉴클레이즈의 사용량 및 반응시간과 같은 S1 뉴클레이즈 처리 조건을 다양하게 비교하여 최적의 조건을 확립하였다. S1 뉴클레이즈 처리 조건은 표 1과 같다.

표 1

Condition	S1 Unit	Incubation @ 37°C
A	20 units	10 min
B	20 units	30 min
C	10 units	10 min
D	10 units	2 min
E	2 units	10 min
F	2 units	2 min

[0055]

[0056] 그 결과, 조건별로 약간의 차이를 보이는 library가 제작됨을 확인되었다.

[0057] 라이브러리 크기(Library size)는 S1 뉴클레이즈의 농도가 높거나 반응시간이 길수록 라이브러리의 크기가 작아지는 경향이 보였다.

[0058] 라이브러리 양(Library amount)은 S1 뉴클레이즈의 농도가 높거나 반응시간이 길수록 제작된 라이브러리의 양이 많아지는 경향이 보였다.

[0059] S1 뉴클레이즈의 활성 사이트가 FFPE DNA에 존재하며, 이로 인해 단편화되는 것을 증명하였다.

[0060] 제작된 라이브러리의 양이 많아졌다는 것은, 어댑터(adapter)와 라이게이션(ligation) 될 수 있는, S1에 의해 단편화되어 생성된 DNA인 삽입체(insert)의 몰(mole) 수가 증가했음을 의미한다. 즉, 제작된 라이브러리의 복잡도(complexity)이 증가함을 의미한다. 따라서, 제작된 라이브러리의 복잡도를 높이기 위해서는, protocol B (20 unit, 30 min)가 최적 조건으로 판단되었다. 다만, 이는 비교된 조건 중 최적이었으며, protocol B가 최종적인 최적 조건으로 한정됨은 아니며, 추가적인 비교분석을 통해 보다 효율적인 최적 조건은 변경될 수 있다.

[0061] <실시예 4> capture sequencing

[0062] S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 제작한 라이브러리를, targeted NGS를 진행하여 돌연변이(mutation) 분석하는데 문제가 없는지를 실제로 확인하였다.

[0063] 1. Capture panel: Tier2 panel (200 여 개 유전자를 표적으로 하는 cancer panel) 사용

[0064] 2. Library pooling

[0065] (1) 각자 다른 index로 barcoding된 8개의 라이브러리들을 pooling 하여 capture 진행.

[0066] (2) 앞서 서로 다른 S1 뉴클레이즈 반응 조건에 따른 라이브러리 비교 실험에 사용된, 5 DNA에 대한 8개 라이브러리들은 다음과 같다(표 2).

[0067] i) protocol B로 제작한 5 개의 라이브러리들

[0068] ii) protocol A로 제작한 3 개의 라이브러리들

[0069] (3) 각 라이브러리의 크기에 따라, 56~80ng을 pooling.

표 2

No	#	병리번호	환자번호	Protocol	S1	Incub Time	OP_ID	Qubit	Library	total, ng	From 150 to 500 (pg/ul) - d ilution (bi oanalyser)	From 150 to 500 (ng/ul) bi oanalyser	Average size(bp)	peak	Library for cap turing (ng)
								Con. (ng /ul)							
1	192	105-091623_A1	27335989A	20U	10 min	16R209_0001_27335989		9.0	270.6	1399.41	12.62	289	263	65	
1	192	105-091623_A1	27335989B	20U	30 min	16R214_0002_27335989		16.8	504.0	1889.22	31.74	281	256	56	
2	27	025-50906_B4	28042413A	20U	30 min	16R219_0004_28042413		4.6	138.6	2173.95	10.04	242	238	80	
3	51	085-62322_B3	32247565A	20U	10 min	16R211_0005_32247565		6.8	203.4	1008.07	6.83	240	241	80	
3	51	085-62322_B3	32247565B	20U	30 min	16R224_0006_32247565		4.0	120.0	2402.42	9.61	248	242	80	
4	62	095-60473_2	37176699A	20U	30 min	16R229_0008_37176699		25.6	768.0	1770.5	45.32	277	257	56	
5	219	085-58509_A4	20611846A	20U	10 min	16R213_0025_20611846		3.9	117.0	857.21	3.34	276	249	80	
5	219	085-58509_A4	20611846B	20U	30 min	16R234_0009_20611846		6.4	192.0	1471.94	9.42	238	236	80	

[0070]

[0071]

상기와 같은 조건의 라이브러리들을 서열분석(Sequencing) 후, QC metrics의 수치를 이용하여, protocol A 및 protocol B로 제작한 라이브러리 간의 분석 결과를 비교하고, 작은 크기의 라이브러리 결과를 확인하였다(표 3).

표 3

Sample ID	lane	% Pool Representation	% Expected Representation				
16R209_27335989T	1	6.5	12.5				
16R214_27335989T	1	10.9	12.5				
16R219_28042413T	1	16.5	12.5				
16R211_32247565T	1	9.8	12.5				
16R224_32247565T	1	20.3	12.5				
16R229_37176699T	1	11.6	12.5				
16R213_20611846T	1	8.8	12.5				
16R234_20611846T	1	12.2	12.5				
NNNNNN	1	3.1	0				
unused	1	0.3	0				
Sample ID	Number of Total Reads	% PF Reads	% Selected Bases	Mean Target Coverage	% Target Not Covered	% Targets Bases Covered 30X	% Duplication
16R209_0001_27335989T	4146704	87.9	52	61.543011	1.2	82.6	44.3
16R214_0002_27335989T	6950550	87.8	62.8	179.57019	1	96.1	21.2
16R219_0004_28042413T	10536642	86.3	41.3	146.86531	0.9	97.4	40.7
16R211_0005_32247565T	6259226	86.5	48.7	102.68804	0.9	96.3	39
16R224_0006_32247565T	12911684	86.3	43	178.54504	0.9	98.3	41.9
16R229_0008_37176699T	7386386	87.1	62	215.59911	0.9	97.5	17.8
16R213_0025_20611846T	5573858	85.9	46.5	57.878794	0.9	90	53.7
16R234_0009_20611846T	7794250	85.7	47.3	129.84997	1	95.9	33.6

[0072]

[0073]

protocol B를 이용하여 만든 라이브러리에서, 크기가 더 작음에도 불구하고, protocol A 라이브러리 보다 훨씬 높은 depth를 보여 주었고, 비교한 3명의 환자에서 모두 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

[0074]

실시에 3에서 기술한 것처럼, protocol B로 제작한 라이브러리의 복잡도가 높았는데, 이로 인해 protocol A 방법의 라이브러리보다 protocol B 방법의 라이브러리에서, duplication rate가 더 낮은 것으로 증명되었다.

[0075]

또한, protocol A 대비 더 작은 크기이기 때문에, 같은 양을 이용하여도, 몰수가 더 높을 것이기 때문에, protocol A 방법의 라이브러리보다 protocol B 방법의 라이브러리에서, total read 수가 더 높은 것으로 증명되었다.

[0076]

한편, S1 뉴클레오타이드로 만든 작은 크기의 라이브러리도, 서열분석에 문제 없는 수준의 수치를 얻을 수 있었다.

[0077]

가장 작은 크기인 236bp (16R234_0009_20611846), 238bp의 라이브러리 (16R219_0004_28042413)에서, 다음의 QC metrics 수치 확보할 수 있었다.

[0078]

- Duplication rate: 33.6%, 40.7%

[0079]

- On target rate (% of selected bases): 47.3%, 41.3%

[0080]

- >30x rate: 95.9%, 97.4%

- [0081] - Mean target coverage: 129.8x, 146.8x
- [0082] 물론, 크기가 더 큰 라이브러리 (보다 좋은 상태를 가진 DNA에서 생성된 library: 16R214_0002_2733598, 16R229_0008_37176699) 보다는 낮은 수치였다.
- [0083] - Duplication rate: 21.2%, 17.8%
- [0084] - On target rate (% of selected bases): 62.8%, 62%
- [0085] - >30x rate: 97.4%, 97.5%
- [0086] - Mean target coverage: 179.5x, 215.6x
- [0087] 하지만, covaris 방법으로는 라이브러리 제작에 실패해서, 서열 분석 자체를 할 수 없었던 점이나, 유전변이 분석에 큰 무리가 없는 수준의 Mean coverage 100x 이상인 점을 상기할 때, S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 제작된 작은 크기의 라이브러리도 NGS 분석에 충분히 활용 가능함을 확인할 수 있었다.
- [0088] <실시예 5> Somatic variants 비교
- [0089] 상기 QC metrics 상으로는 분석 가능한 수치지만, 실제로 해당 분석 결과를 가지고 정확한 유전변이를 검출할 수 있는지를 확인하였다.
- [0090] 이에 실험에 사용된 5 검체에 대한 somatic variants 일치도를 비교하였다.
- [0091] OncoMap_V4 panel은 MassArray system을 이용하여, 100bp 정도의 짧은 PCR 산물을 증폭하고, 특정 핫 스팟 돌연변이(hot spot mutation)를 확인할 수 있는 방법으로서, OncoMap_V4 panel로 확인할 수 있는 돌연변이는 41 개 유전자에서 473개의 핫 스팟 돌연변이를 확인하였다. 5 검체 중, 3 검체에서 EGFR과 MLH1 유전자의 핫 스팟 돌연변이가 확인되었으며, 2 검체에서는 검출되지 않았다(표 4).
- [0092] 결과적으로, 5 검체에 대해 OncoMap_v4로 확인한 돌연변이 결과와, 정확하게 일치하는 유전변이를 확인할 수 있었다.

표 4

S1 protocol	QC_ID	Library size (bp)	Patient_ID	Sample ID	surgicalno_sub	Patients #	Primary (1), recur (2)	Organs	OncoMap_V4 결과	김주현,선생님,LAB결과(PGM) 결과	S1_treated_DNA_tier2 분석결과
A	16R209_273359897	269	27335989	192105-091623_A1		65		2.lung	EGFR_L858R, EGFR_T790M,	not_tested	EGFR_L858R (10%), EGFR_T790M(21%)
B	16R214_273359897	256	27335989	192105-091623_A1		65		2.lung	EGFR_L858R, EGFR_T790M,	not_tested	EGFR_L858R (13%), EGFR_T790M(15%)
B	16R219_280424137	238	28042413	27025-50906_B4		24		1.Primary	EGFR_L747_P753>S	too_low_depth (average_depth, 4)	EGFR_L747_P753delinsS (45%)
A	16R211_322475657	241	32247565	51085-62322_B3		49		2.lung	Nd	too_low_depth (average_depth, 9)	Nd
B	16R224_322475657	242	32247565	51085-62322_B3		49		2.lung	Nd	too_low_depth (average_depth, 9)	Nd
B	16R229_371766997	257	33373955	62095-60473_2		59		2.brain	Nd	not_tested	Nd
A	16R213_206118467	240	20611846	219085-58909_A4		88		1.Primary	MLH1_V384D, EGFR_L858R,	not_tested	MLH1_V384D (34%), EGFR_L858R (48%)
B	16R234_206118467	236	20611846	219085-58909_A4		88		1.Primary	MLH1_V384D, EGFR_L858R,	not_tested	MLH1_V384D (52%), EGFR_L858R (22%)

- [0093]
- [0094] <실시예 6> 라이브러리 품질 비교(covaris vs S1 뉴클레이즈 처리)
- [0095] 이미 결과를 가지고 있는, 환자 샘플의 FFPE 조직의 동일 검체를 이용하여, Covaris 방법으로 제작한 라이브러리와 S1 뉴클레이즈 처리 방법(protocol B 방법)으로 제작한 라이브러리를 pooling 하여, 동시에 capturing하고 NGS 분석하여, 그 결과 값을 직접 비교하였다. 4명의 검체에 대해, 각각 라이브러리를 만들고, Pooling하였으며, Tier2 panel을 이용하여 capturing 진행한 후, MiSeq v3 kit를 이용하여 서열분석을 진행하였다.
- [0096] QC Metrics를 비교하여, 결과 값을 확인한 결과, Covaris 단편화 방법 대비, S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 제작한 라이브러리의 결과 값이 우수함을 확인하였다(표 5).
- [0097] - Number of total reads: Capture시, 동일한 라이브러리 양을 이용했지만, 대부분의 시료에서 S1 뉴클레이즈 처리 방법의 경우에 훨씬 더 높은 sequencing reads를 보여주고 있다.

- [0098] - Mean target coverage: 모든 시료에서 S1 뉴클레이즈 처리 방법의 경우 훨씬 더 높은 수치를 보여주고 있다.
- [0099] - % target >30x: 모든 시료에서 S1 뉴클레이즈 처리 방법의 경우 훨씬 더 높은 수치를 보여주고 있다.
- [0100] - % duplication: 모든 시료에서 S1 뉴클레이즈 처리 방법의 경우 더 낮은 수치를 보여주고 있다. 이는, 제작된 DNA 라이브러리의 복잡도가 더 높음을 의미한다.

표 5

Patient #	Surgical #	OP_ID	Library			Capture Amount (ng)	Loading		QC Metrics						
			Prep 방법	Amount (ng)	Peak size (bp)		Con. (pM)	Cluster density	Number of Total Reads	% PF Reads	% Selected Bases	Mean Target Coverage	% Targets Covered	% Targets Covered 30X	% Duplication
44271578	12S 92016_A5	15R102_0001_44271578T	Covaris	450.0	274	50	15	1355	5496564	89.7	49.2	115	0.9	92.9	11
41467820	11S 50993_D1	15R144_0005_41467820T		399.0	284	50			4665242	90.3	51.6	95	0.9	88.3	11.7
32933486	08S 39202_1	15R128_0007_32933486T		128.4	248	70			7361098	89.2	41.8	113	0.8	93	25.3
38912735	09S 88904	15R131_0010_38912735T		169.2	253	70			9559316	89.3	38.8	148	0.7	97.1	25.2
44271578	12S 92016_A5	16R345_0013_44271578T	S1 protocol B	546.0	259	50			7051726	89.7	46.6	150	0.6	95	8.9
41467820	11S 50993_D1	16R348_0014_41467820T		600.0	261	50			8044426	89	46.4	177	0.9	96.4	10.1
32933486	08S 39202_1	16R347_0015_32933486T		267.0	250	70			9346052	88.7	42.7	181	0.5	95.9	15.3
38912735	09S 88904	16R348_0016_38912735T		159.0	241	70			9472126	86.8	38.3	172	0.8	97.5	17.3

- [0101]
- [0102] 또한, 각각의 방법으로 제작된 라이브러리를 이용해 얻은, 돌연변이 결과가 일치하는지를 확인하였다(도 9 및 표 6) .
- [0103] 양 방법에서 동시에 검출된 돌연변이의 경우, depth (total depth 및 variant allele depth)가 모두 30x 이상이었다. Variant allele fraction도 30% 이상으로 충분히 높았다. S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 제작한 라이브러리에서 얻은 돌연변이에서 더 높은 depth가 확보되었다. 이는 결과 값의 신뢰도 상승을 의미한다.
- [0104] 각 방법에서만 검출된 돌연변이의 경우, Depth의 경우, total depth에서는 S1이 더 높고, variant allele depth에서는 2~4x 수준으로 비슷하였다. Variant allele fraction의 경우 6~13% 수준으로 비슷하였다. NGS data를 이용한 single nucleotide variation 분석을 위해 사용하는 mutect algorithm의 경우, 보통 5x 미만의 variant allele depth를 가지는 경우는 위양성(false positive)일 가능성이 높다.

표 6

두 library에서 모두 확인된 variants의 평균수치						
Sample	Total depth		Variant allele depth		Variant allele %	
	Covar is	S1	Covar is	S1	Covar is	S1
44271578	82	87	30	30	36	33
41467820	92	129	55	71	56	52
32933486	93	147	37	60	40	43
38912735	84	80	41	39	48	48

각 library에서만 확인된 variants의 평균수치						
Sample	Total depth		Variant allele depth		Variant allele %	
	Covar is	S1	Covar is	S1	Covar is	S1
44271578	49	39	3	2	6	6
41467820	0	26	0	2	0	9
32933486	35	61	2	4	6	7
38912735	22	39	2	3	13	7

[0105]

[0106] Variant allele depth 5x를 기준으로, covaris 방법과 S1 뉴클레이즈 처리 방법에서 각각 몇 개의 variants가 검출되는지 확인하였다. Variant allele depth 5x 이상은, 진양성(true positive)으로 판단하였는데, S1 뉴클레이즈 처리 방법에서는 2개의 variants를 추가로 검출하였다. Variant allele depth 5x 미만은, 위양성(false positive)으로 판단하였는데, Covaris 방법에서 3개의 variants를 추가로 검출하였다(표 7).

[0107] 즉, S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 생성한 라이브러리를 이용할 경우, 더 높은 신뢰도를 가진 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

표 7

Depth 5X 기준 variant allele 개수				
Sample	5X 이상		5X 미만	
	Covar is	S1	Covar is	S1
44271578	3	3	4	3
41467820	8	8	0	2
32933486	6	8	13	9
38912735	5	5	5	5

[0108]

[0109] <실시예 7> 나쁜 상태의 FFPE 조직을 이용한 라이브러리 제조

[0110] Covaris 방법으로 라이브러리 제작에 실패한 89개의 검체를 이용하여, S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 라이브러리를 제작한 결과, 66.3%의 검체를 NGS 서열분석에 들어갈 만한 수준의 라이브러리 제작에 성공하였다(표 8).

표 8

	Good	Moderate	Bad	Fail
기준	- 양: 80ng 이상 - 크기: 230bp 이상 - Library에 단일 peak만 보이는 경우	- 양: 50ng 이상 - 크기: 190bp 이상 - Library에 두 개의 peak이 보이는 경우	- 크기: 200bp 미만 - 양: 80ng 이상 - Library에 두 개의 peak과 함께 adapter dimer가 함께 보이는 경우	제대로 된 peak이 보이지 않거나, 양이 20ng 미만의 경우
개수	25	34	19	11

Library prep 성공 (66.3%)
Library prep 실패 (33.7%)

[0111]

[0112] <실시예 8> 좋은 상태의 FFPE 조직을 이용한 라이브러리 제조

[0113] 신선한 FFPE 조직도 S1 뉴클레이즈 처리하여 NGS용 단편화된 DNA를 얻을 수 있는지 확인하였다. 오래된 FFPE 조직의 경우, S1 뉴클레이즈가 작용할 수 있는 표적인 Nick(nick)이 존재하여, 단편화할 수 있지만, 최근에 FFPE로 만들어진 신선한 FFPE 조직의 경우, 이러한 Nick이 존재하는지 알 수 없으므로, 이를 확인하기 위해 3일 전에 제작된 FFPE 2개를 이용하여, S1 뉴클레이즈를 사용하지 않은 일반적인 방법의 gDNA 추출방법 및 S1 뉴클레이즈를 사용한 gDNA 추출방법으로 각각 DNA 라이브러리를 제작하였다(표 9).

표 9

No	병리번호	조건	Nanodrop			Qubit	ND/QB
			Con. (ng/ul)	260/280	260/230	Con. (ng/ul)	
1	16S 68577 A5	1.5X	110.1	1.91	1.82	13.6	8.10
2	16S 68784 A1		387.3	1.97	2.07	54.8	7.07
3	16S 68577 A5	S1 Prep (1.5X Prep(S1 Nuclease 20U/ul)+37°C, 30min +lysis buffer 100ul+1.5X prep(PEG 225ul)	103	1.85	1.65	15.8	6.52
4	16S 68784 A1		218.4	1.91	1.82	39	5.60

[0114]

[0115] 추출된 gDNA 및 DNA 라이브러리를 BioAnalyzer를 이용하여, 크기를 확인하였다. 예상대로, 일반적인 방법으로 추출한 gDNA는 10kb 이상의 크기를 가지고 있었다. 이에 비해, S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 추출한 gDNA는, 200bp 근처로 분쇄되어 있는 것이 확인하였다(도 10).

[0116] 해당 gDNA를 이용하여 라이브러리를 제작하고, 그 크기를 확인한 결과, 270~280bp의 적당한 크기의 라이브러리가 충분한 양으로 제작되었음을 확인하였다. 이는, 제작된 지 3일 된 신선한 FFPE 조직을 이용하여도, S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 NGS 라이브러리 제작용 DNA 추출에 성공하였다. 즉, 이는 모든 FFPE 조직을 S1 뉴클레이즈 처리 방법을 통해서, NGS 용 라이브러리를 만들 수 있는 적절한 크기로 분쇄된 DNA를 추출할 수 있음을 의미한다.

[0117] 신선한 FFPE 조직에도, S1 뉴클레이즈의 활성 사이트인 Nick(nick)이 있음을 확인하였으므로, 포름알데히드(formaldehyde)로 고정(fixation)하는 과정에서 Nick(nick)이 생성됨을 알 수 있었다. 이를 확인하기 위해, 고정하지 않은 신선한 세포를, S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 DNA를 추출하고, 이를 이용해 라이브러리를 제작하였다(도 11). 예상대로, gDNA의 크기가 10kb 근처에서 나타나고 있으며, 이는, S1 뉴클레이즈에 의한 DNA 단편화가 일어나지 않았음을 의미한다. 상기 gDNA를 이용하여 라이브러리 제작 시, 1.5kb 이상의 큰 라이브러리가 만들어

졌음을 확인할 수 있었다.

- [0118] 이는, 신선한 FFPE에서 S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 추출한 gDNA와는 완전히 다른 결과이다. 즉, S1 뉴클레이즈가 작용할 수 있는 활성 사이트인 닉(nick)이, 신선한 FFPE DNA에는 있지만, 세포주 DNA에는 없다는 것을 나타낸다. FFPE로 제작된 지 3일 된 신선한 FFPE에도, 평균 200bp 정도를 간격으로 닉(nick)이 존재함을 확인하였다.
- [0119] 결론적으로, FFPE 조직에서 DNA 추출 과정에, S1 뉴클레이즈를 처리하면, NGS 라이브러리 제작에 반드시 필요한 단편화 과정 없이 적당한 크기로 단편화된 gDNA를 얻을 수 있었다. 이는 NGS 라이브러리 제작에 있어 첫 번째 단계를 건너뛸 수 있어, 시간과 비용 측면에서 상당한 감소효과가 있다. 이렇게 얻은 단편화 DNA를 이용하여, 라이브러리를 제작할 경우, 단편화를 위해 일반적으로 사용하는 covaris 방법 대비 훨씬 높은 라이브러리 제작 성공률을 보였다.
- [0120] 또한, covaris 방법 대비, S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 제작된 라이브러리를 이용할 경우, 훨씬 높은 depth를 얻을 수 있었다. 아주 오래된 FFPE 조직에서도 상당히 높은 성공률로 NGS 용 라이브러리를 제작할 수 있었으며, 아주 신선한 FFPE 조직에서도 동일한 방법으로 라이브러리를 제작할 수 있으며, 모든 FFPE 조직의 NGS용 단편화 과정에, S1 방법이 표준이 될 수 있음을 밝혀냈다.
- [0121] <실시예 9> FFPE 조직의 DNA 상에 발생한 닉(nick)이 S1 뉴클레이즈의 표적인지 여부 확인
- [0122] FFPE 조직의 DNA 상에 존재하는 닉(nick)은 FFPE 조직으로 제작을 위한 포르말데히드 고정(formaldehyde fixation) 과정에서 발생하는데, S1 뉴클레이즈는 상기 닉(nick)을 타겟으로 하여 반응한다.
- [0123] 정말로 FFPE 조직 DNA의 닉(nick)이 포르말데히드 고정 과정에서 발생하는지를 확인하기 위해,
- [0124] 1. 배양한 세포(A549)를 이용하여, FFPE 세포조직을 만들었고,
- [0125] 2. 포르말데히드 고정 시간을 3/6/12/24/48시간으로 다양하게 한 후, 이를 파라핀에 포매하여 세포 블록(cell block)을 제작한 후,
- [0126] 3. Covaris와 S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 각기 DNA 라이브러리를 제작하여, 생산된 라이브러리의 양과 크기를 확인하였고,
- [0127] 4. NGS 서열분석을 수행하여, 생산된 데이터의 질을 비교하였다.
- [0128] 그 결과, 포르말데히드 고정 시간이 길어질수록, S1 뉴클레이즈 처리 시 단편화되는 DNA의 크기가 줄어들었다. 이는 포르말데히드 고정 시간이 길어질수록, S1 뉴클레이즈의 활성사이트인 닉(nick)이 더 많이 생성됨을 의미한다(도 12).
- [0129] 또한, Covaris 방법 및 S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 추출한 4개의 셀 블록 DNA를 Library prep하여, 동량으로 동시에 AMCV2 panel을 이용하여 캡처(capture)하고, NGS 서열분석을 진행하여, 그 결과를 비교하였다(표 10).
- [0130] - SNV는 3x 이상, indel은 5x 이상일 때, 믿을 만한 variant로 사용하였다.
- [0131] - 26개의 variants가 8개의 모든 라이브러리에서 확인되었다.
- [0132] - Covaris 방법 및 S1 뉴클레이즈 처리 방법으로 제작한 각 4개씩의 라이브러리에서, 각각 1개씩 BRAF_V600E variant가 확인되었으나, allele fraction도 낮고 IGV 확인 결과 맵핑 품질(mapping quality)도 30 미만으로 낮았다.
- [0133] - Covaris 검체에서만 확인된 variants가 3개, S1 뉴클레이즈 처리 검체에서만 확인된 variants가 4개였으나, 이들 모두 depth가 2 또는 3으로, 위양성(false positive)일 것으로 판단되었다.
- [0134] 한편, QC metrics 비교 결과, 포르말데히드 고정 시간이 긴 DNA를 이용하여 제작한 라이브러리일수록, Covaris 방법은 라이브러리의 피크 크기 및 총량(amount)이 낮아졌고, mean depth가 떨어졌으며, duplication rate가 올라갔다. S1 방법의 경우, 라이브러리의 총량(amount)이 낮아지는 경향은 동일하나, covaris 방법보다 훨씬 많은 양이 생성되었다. 라이브러리의 피크 크기는 변화가 없었다. 오히려 mean depth가 올라갔는데, 이는 고정 시간이 짧은 DNA의 경우, S1의 활성 사이트인 닉(nick)이 적어서 발생하는 문제이고, duplication rate도 함께 올라가는 양상이지만, 그 정도가 covaris 대비해서는 아주 낮았다.

표 10

Cell line	OP_ID	Library			Capture Amount (ng)	Loading		QC Metrics						
		Prep 방법	Amount (ng)	Peak size (bp)		Con. (pM)	Cluster density	Number of Total Reads	% PF Reads	% Selected Bases	Mean Target Coverage	% Target Not Covered	% Targets Based on 30X Coverage	% Duplication
A549	16R546_0003_A549 006T	Covaris	585.0	280	70	12	1468	8157594	85	48.9	136.7	1	96.1	12.3
A549	16R547_0004_A549 012T		552.0	280	70			8212636	86.7	49.2	134.4	0.9	96.3	14.9
A549	16R548_0005_A549 024T		447.0	280	70			7809826	86.9	48.2	114.2	0.8	95.6	18.2
A549	16R549_0006_A549 048T		199.8	272	70			9277450	86.5	47.3	98.6	1	96.8	28
A549	16R552_0009_A549 S06T	S1, protocol B	762.0	264	70			7402026	86.7	48.7	124.5	1.1	90.4	10
A549	16R553_0010_A549 S12T		720.0	264	70			7408662	86.7	51.3	130.8	1	92	11.1
A549	16R554_0011_A549 S24T		576.0	259	70			7596838	85.8	48	123.1	1	91.7	11.6
A549	16R555_0012_A549 S48T		432.0	264	70			9427018	86.2	49.5	156.3	0.9	96.1	14.4

[0135]

[0136]

상기의 결과를 정리하면 다음과 같다.

[0137]

1. 포름알데히드 고정 시간이 길어질수록, S1 효소 처리 시 단편화되는 DNA의 크기가 줄어들었다.

[0138]

2. Covaris 방법의 경우, 고정 시간이 증가함에 따라, 생산되는 라이브러리의 양과 질이 현저히 나빠졌으며, 이로 인해 서열분석 데이터의 양도 줄어들었다.

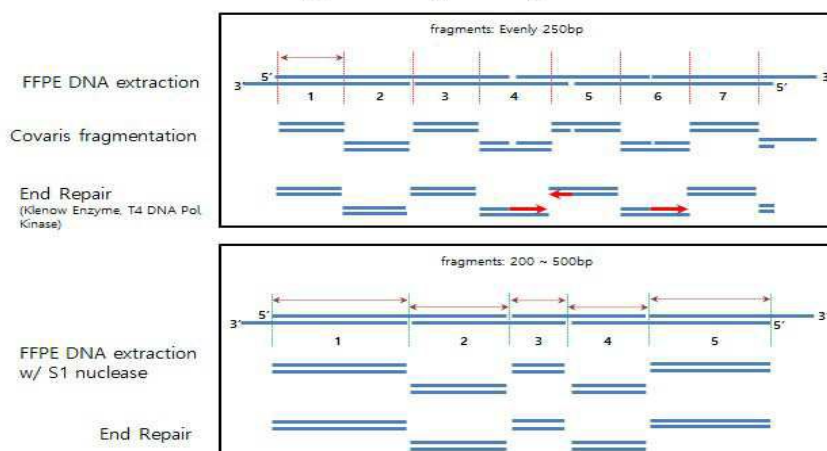
[0139]

3. S1 뉴클레이즈 방법의 경우, 고정 시간이 증가함에 따라, 생산되는 라이브러리의 양이 오히려 증가하였고, 질에는 큰 차이가 없었으며, 서열분석 데이터의 양에 큰 차이가 없었다.

도면

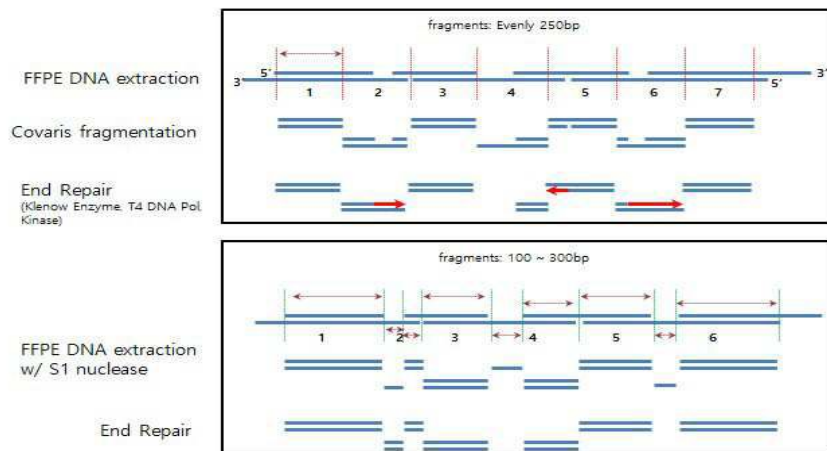
도면1

Covaris vs. S1 nuclease: good quality DNA



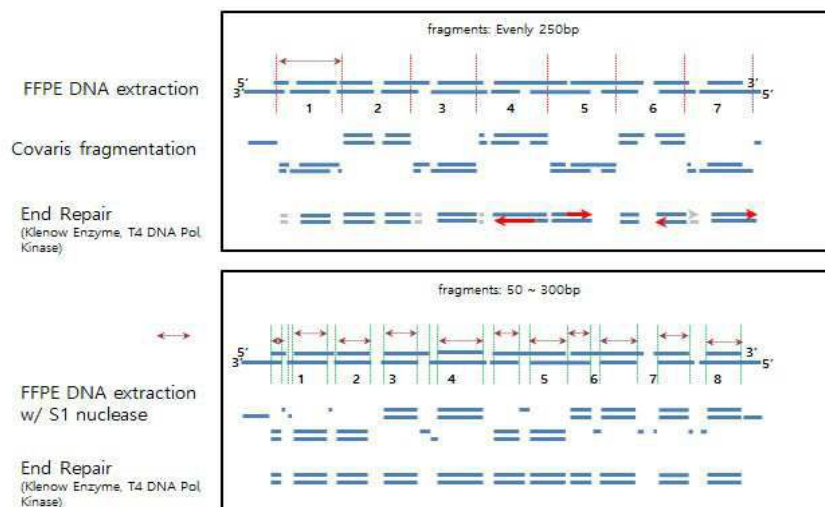
도면2

Covaris vs. S1 nuclease: moderate quality DNA-1



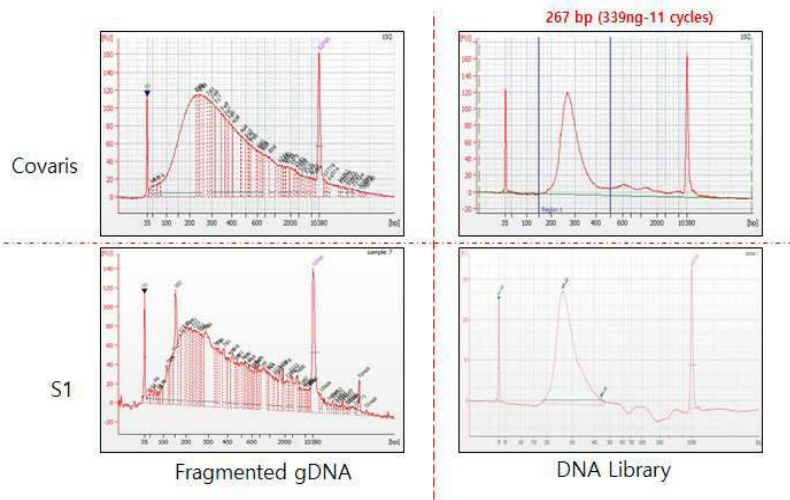
도면3

Covaris vs. S1 nuclease: bad quality DNA-2



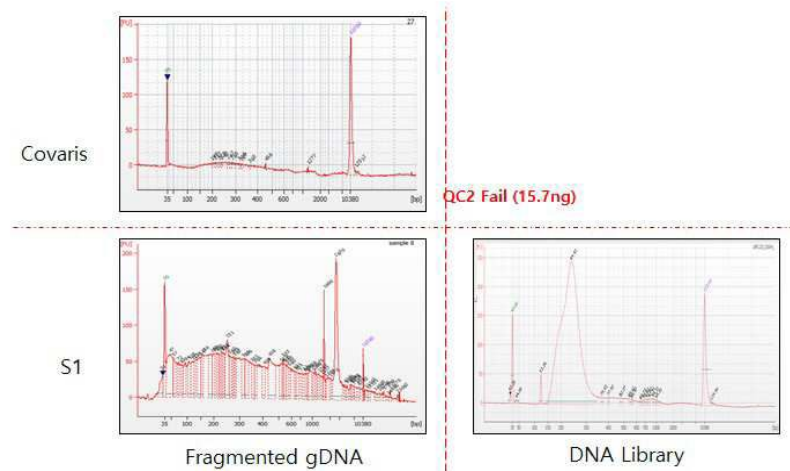
도면4

10S-091623_A1 (#192)



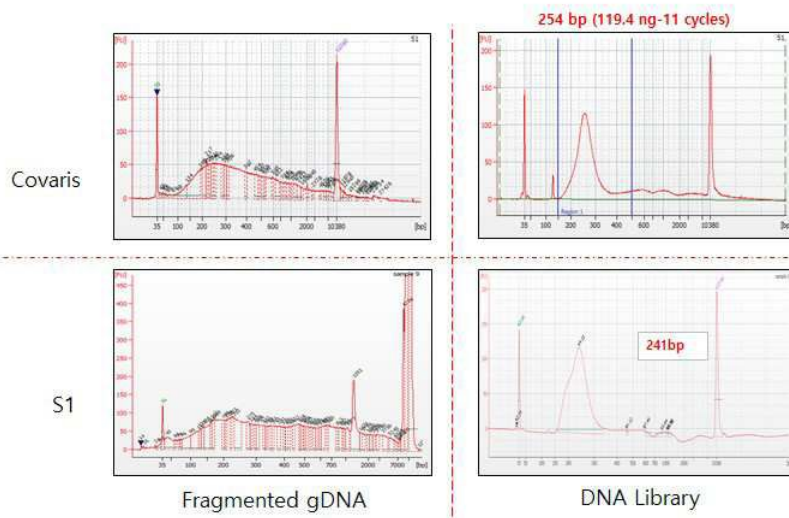
도면5

02S-50906_B4 (#27)



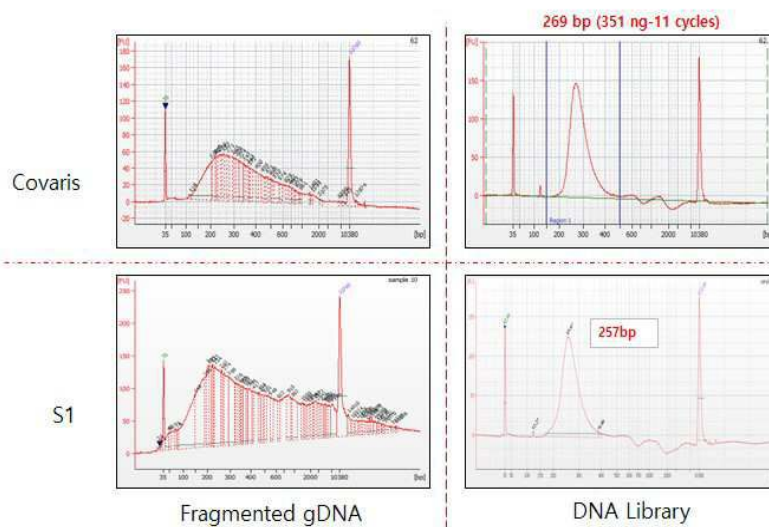
도면6

08S-62322_B3 (#51)



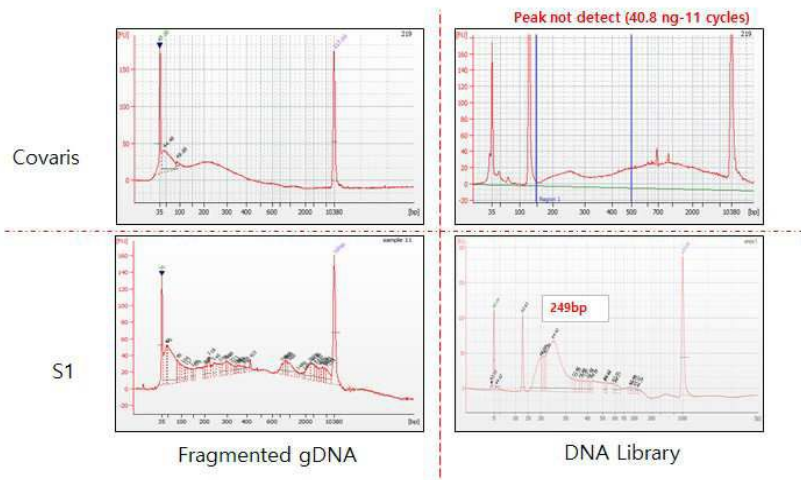
도면7

09S_60473_2 (#62)

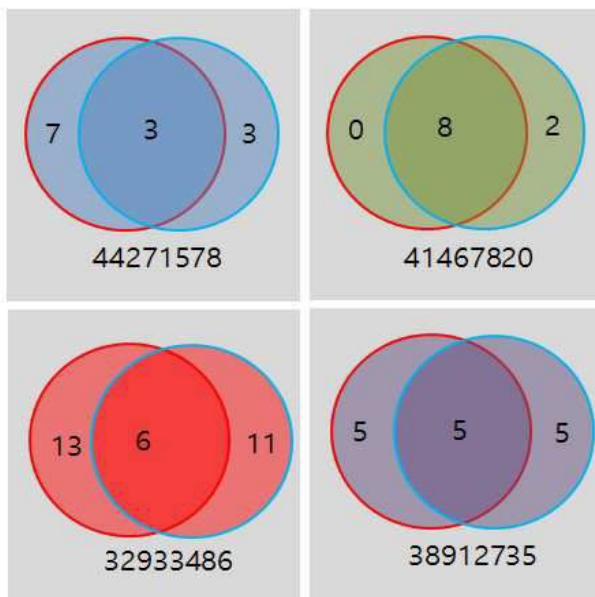


도면8

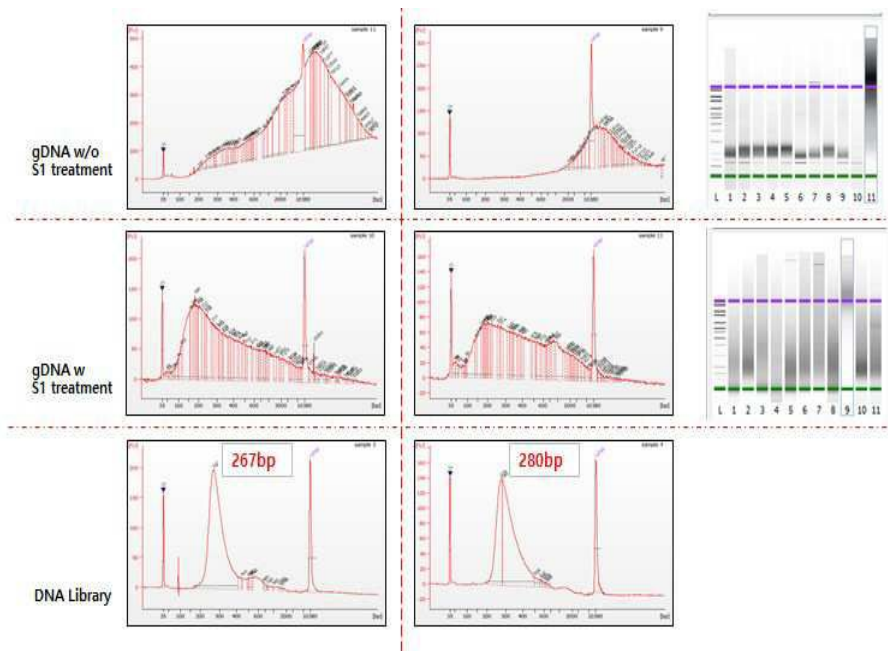
08S-58509_A4 (#219)



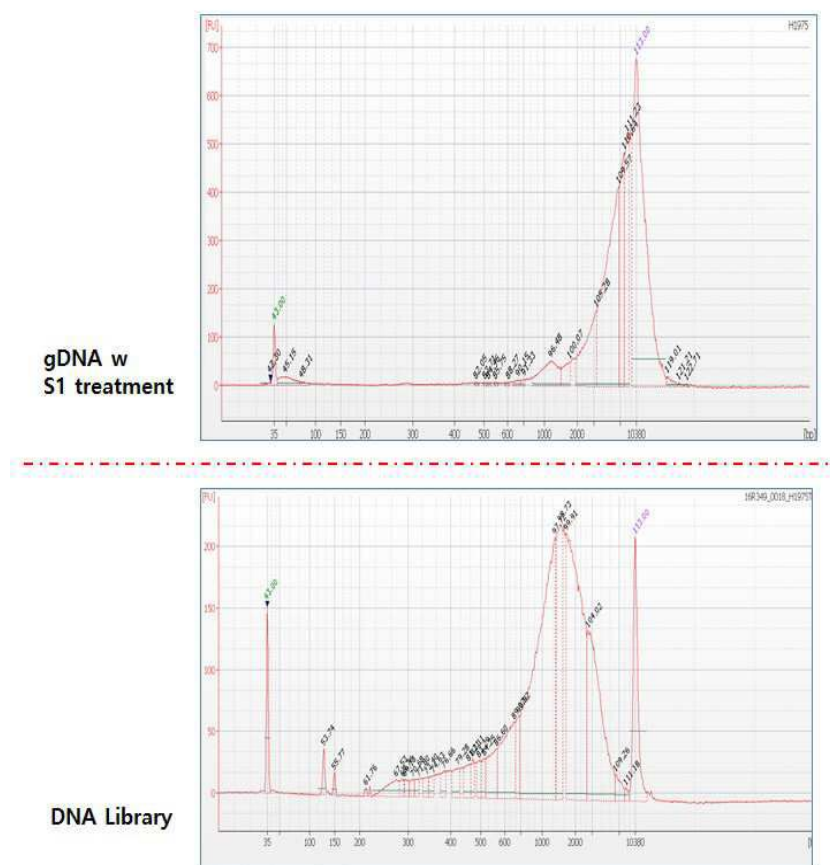
도면9



도면10



도면11



도면12

