



등록특허 10-2421185



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월14일  
(11) 등록번호 10-2421185  
(24) 등록일자 2022년07월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/10* (2017.01) *C12Q 1/68* (2018.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/1006* (2013.01)  
*C12Q 1/6806* (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2017-7003611
- (22) 출원일자(국제) 2015년07월09일  
심사청구일자 2020년07월07일
- (85) 번역문제출일자 2017년02월09일
- (65) 공개번호 10-2017-0028432
- (43) 공개일자 2017년03월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/039760
- (87) 국제공개번호 WO 2016/007755  
국제공개일자 2016년01월14일

(30) 우선권주장  
62/022,538 2014년07월09일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문현

US05808041 A\*  
US20140093880 A1\*  
WO2014036391 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

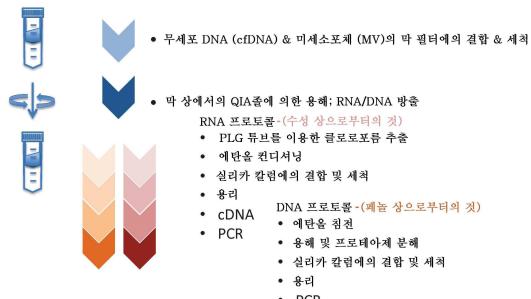
전체 청구항 수 : 총 22 항

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 생물학적 샘플로부터 미세소포체를 단리시키고 핵산을 추출하는 방법

**(57) 요약**

본 발명은 미세소포체로부터 무세포 DNA, 및/또는 무세포 RNA 및 적어도 RNA를 포함하는 핵산을 단리시키는 것을 포함하여, 생물학적 샘플로부터 핵산을 단리시키는 것, 및 미세소포체로부터 및/또는 생물학적 샘플로부터 핵산을 추출하는 것을 위한 신규한 방법 및 키트를 제공한다.

**대 표 도**

(72) 발명자

라마찬드란, 아파르나

미국 08830 뉴저지주 이셀린 우드브릿지 커먼스  
1806

얀, 하오행

미국 10706 뉴욕주 해스팅스 온 헤드슨 아파트먼트  
3에이 메이플 에비뉴 55

버그호프, 에밀리

미국 02139 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 3 메모  
리얼 드라이브 840

웨이, 타이-펜

미국 02139 메사추세츠주 캠브릿지 스위트 3 메모  
리얼 드라이브 840

노어홀름, 미켈

독일 82131 가우팅 프라이징스트라쎄 21

(30) 우선권주장

62/079,763 2014년11월14일 미국(US)

62/166,890 2015년05월27일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (a) 포획 표면 상에 또는 포획 표면 내에 생물학적 샘플로부터의 무세포 DNA 및 미세소포체를 유지시키는 데 충분한 조건하에서 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시키는 단계이며, 여기서 포획 표면은 4급 암모늄  $R-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 으로 관능화된 음이온 교환체인 하나 이상의 막, 또는 양으로 하전되고 4급 암모늄  $R-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 으로 관능화된 하나 이상의 막을 포함하는 것인 단계;
- (b) 무세포 DNA 및 미세소포체가 포획 표면 상에 또는 포획 표면 내에 있는 동안 포획 표면을 페놀계 용해 시약과 접촉시켜 샘플로부터 DNA 및 RNA를 방출시키고 균질물을 제조하는 단계; 및
- (c) 균질물로부터 DNA, RNA, 또는 DNA 및 RNA 둘 모두를 추출하는 단계  
를 포함하는, 생물학적 샘플로부터 DNA 및 RNA를 추출하는 방법.

#### 청구항 2

- (a) 포획 표면 상에 또는 포획 표면 내에 생물학적 샘플로부터의 무세포 DNA 및 미세소포체를 유지시키는 데 충분한 조건하에서 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시키는 단계이며, 여기서 포획 표면은 4급 암모늄  $R-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 으로 관능화된 음이온 교환체인 하나 이상의 막, 또는 양으로 하전되고 4급 암모늄  $R-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 으로 관능화된 하나 이상의 막을 포함하는 것인 단계;
- (b) 무세포 DNA 및 미세소포체가 포획 표면 상에 또는 포획 표면 내에 있는 동안 포획 표면을 구아니디늄 티오시아네이트계 용해 시약과 접촉시켜 샘플로부터 DNA 및 RNA를 방출시키고 균질물을 제조하는 단계; 및
- (c) 균질물로부터 DNA, RNA, 또는 DNA 및 RNA 둘 모두를 추출하는 단계  
를 포함하는, 생물학적 샘플로부터 DNA 및 RNA를 추출하는 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 막이 양으로 하전된 것인 방법.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 막이 4급 암모늄  $R-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 으로 관능화된 음이온 교환체인 방법.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 막이 양으로 하전되고 4급 암모늄  $R-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 으로 관능화된 것인 방법.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 막의 세공 크기가 적어도  $3 \mu\text{m}$ 인 방법.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 포획 표면이 3개의 막을 포함하고, 여기서 상기 3개의 막은 서로 직접 인접해 있는 것인 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 3개의 막이 서로 동일한 것인 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 각 막이 양으로 하전된 것인 방법.

**청구항 10**

제8항에 있어서, 각 막이 4급 암모늄  $R-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 으로 관능화된 음이온 교환체인 방법.

**청구항 11**

제8항에 있어서, 각 막이 양으로 하전되고 4급 암모늄  $R-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 으로 관능화된 것인 방법.

**청구항 12**

제1항 또는 제2항에 있어서, 생물학적 샘플이 혈장 또는 혈청인 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 생물학적 샘플이 0.2 내지 4 mL인 방법.

**청구항 14**

제1항 또는 제2항에 있어서, 생물학적 샘플이 소변, 뇌척수액 또는 세포 배양물 상청액인 방법.

**청구항 15**

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (a)가 생물학적 샘플을 여과함으로써 생물학적 샘플을 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 여과를 0.8  $\mu\text{m}$  필터를 사용하여 수행하는 것인 방법.

**청구항 17**

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (a)가 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시킨 후, 원심분리 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 18**

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (a)가 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시킨 후, 포획 표면을 세척하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 단계 (b)가 포획 표면을 폐놀계 용해 시약과 접촉시킨 후, 원심분리 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 20**

제2항에 있어서, 단계 (b)가 포획 표면을 구아니디늄 티오시아네이트계 용해 시약과 접촉시킨 후, 원심분리 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 21**

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (c)가 클로로포름을 균질물에 첨가하기 이전에 대조군을 균질물에 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 22**

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (d) 단계 (c)로부터의 추출물의 에탄올 컨디셔닝 단계; 단계 (e) 에탄올 컨디

셔닝된 추출물을 실리카 칼럼에 결합시키는 단계; 및 단계 (f) 실리카 칼럼으로부터 추출물을 용리시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2014년 7월 9일 출원된 미국 가출원 번호 62/022,538, 2014년 11월 14일 출원된 미국 가출원 번호 62/079,763, 및 2015년 5월 27일 출원된 미국 가출원 번호 62/166,890의 우선권 및 이익을 주장하고, 상기 각 출원의 내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] 본 발명의 기술분야

[0004] 본 발명은 미세소포체로부터 무세포 DNA, 및/또는 무세포 RNA 및 적어도 RNA를 포함하는 핵산을 단리시키는 것

을 포함하여, 생물학적 샘플로부터 핵산을 단리시키는 것, 미세소포체로부터 및/또는 생물학적 샘플로부터 핵산을 추출하는 것을 위한 신규한 방법 및 키트를 제공한다.

## 배경 기술

[0005] 세포에 의해 방출된 막 소포체는 총칭하여 미세소포체로서 지칭된다. 다양한 세포 공급원으로부터의 미세소포체는 단백질 및 지질 함량에 대하여 광범위하게 연구되어 왔다. 최근, 미세소포체는 게놈 DNA, cDNA, 미토콘드리아 DNA, 마이크로RNA (miRNA), 및 메신저 RNA (mRNA)를 비롯한, DNA 및 RNA 둘 모두를 함유한다는 것 또한 밝혀졌다.

[0006] 세포에 의해 방출된 미세소포체에 함유되어 있는 유전자 및 프로테옴 정보에 기인하여, 현 연구는 예를 들어, 질환 상태 또는 질환에 대한 소질과 같이, 상기 세포의 상태에 대한 추가의 통찰을 얻기 위하여 미세소포체를 사용하는 것을 대상으로 하고 있다. 추가로, 현 연구는 또한 세포의 상태에 대해 추가로 통찰하기 위하여 무세포 DNA를 사용하는 것을 대상으로 하고 있다.

[0007] 따라서, 의학적 상태 및 질환의 정확한 진단을 위한 생물학적 샘플로부터의 무세포 DNA의 단리 및 미세소포체의 단리 방법, 및 고품질 핵산의 추출 방법이 요구되고 있다.

## 발명의 내용

[0008] 본 발명은 DNA, RNA 및 cfDNA, 및/또는 미세소포체를 표면에 포획시킨 후, 이어서, 미세소포체를 용해시켜 그 안에 함유되어 있는 핵산, 특히, RNA를 방출시키고, DNA, 및/또는 cfDNA 및 적어도 RNA를 포함하는 핵산을 포획 표면으로부터 용리시킴으로써, 무세포 DNA ("cfDNA", 이는 또한 순환 DNA로도 알려져 있다)를 단리시키는 방법, 및/또는 샘플로부터의 미세소포체로부터 cfDNA 및 적어도 RNA를 포함하는 핵산을 조합적으로 단리시키는 방법을 제공한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 미세소포체 분획이 또한 DNA를 포함한다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 미세소포체 분획을 용해시키면, RNA 및 DNA 둘 모두가 방출된다. 추가로, 단리된 DNA는 뉴클레오솜 및 다른 무세포 DNA 공급원을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다양한 공급원들 중 임의의 것으로부터의 것일 수 있다.

[0009] 샘플로부터 핵산을, 예컨대, cfDNA, 및/또는 DNA 및 적어도 RNA를 포함하는 핵산을 샘플의 미세소포체 분획으로부터 단리 및 추출하는 데 사용된 종래 방법은 초원심분리, 예컨대, 1-3 hr 동안 10,000 x g 초과로 회전시키는 초원심분리 사용 후, 상청액을 제거하고, 펠릿을 세척하고, 펠릿을 용해시키고, 칼럼 상에서 핵산, 예컨대, DNA, 및/또는 RNA 및 cfDNA를 정제하는 것에 의존한다. 이러한 종래 방법은 예컨대, 속도가 느리고, 장황하고, 배치마다 가변적일 수 있으며, 규모 확장에 적합하지 않을 수 있다는 것과 같은 여러 단점이 있는 것으로 입증되었다. 본원에서 제공되는 단리 및 추출을 위한 방법 및 키트는 이러한 단점들을 극복하며, 속도가 빠르고, 강건하며, 큰 부피로 쉽게 확장가능한, 단리 및 추출을 위한 회전 기반 칼럼을 제공한다.

[0010] 본 방법 및 키트는 본원에서 "EX052"로 지칭되는 하기의 일반 방법을 사용하여 샘플로부터 핵산, 예컨대, DNA, 및/또는 cfDNA 및 적어도 RNA를 포함하는 핵산을 단리시키고, 추출한다. 먼저, 샘플 중 핵산, 예컨대, DNA, 및/또는 cfDNA 및 미세소포체 분획을 포획 표면, 예컨대, 막 필터에 결합시키고, 포획 표면을 세척한다. 이어서, 시약을 사용하여 막 상에서의 용해 및 핵산, 예컨대, DNA, 및/또는 RNA의 방출을 수행한다. 이어서, PLG튜브를 이용하여 클로로포름 추출을 수행한 후, 에탄올 컨디셔닝을 수행한다. 이어서, 핵산, 예컨대, DNA, 및/또는 cfDNA 및 적어도 RNA를 실리카 칼럼에 결합시키고, 세척하고, 용리시킨다.

[0011] EX052 방법 및 키트에서 사용되는 막은 큰 세공이 있고, 양으로 하전된다. 일부 실시양태에서, EX052 방법 및 키트에서는 1개 초과의 막이 사용되고, 예를 들어, 2개 이상의 막이 사용된다. 일부 실시양태에서, 3개의 막이 사용된다. EX052 방법 및 키트에서 사용되는 막의 개수는 한 번에 분석될 수 있는 샘플의 전체 부피와 상관관계가 있다. 일부 실시양태에서, EX052 방법 및 키트에서 사용되는 막의 각 층에 대하여 약 1 ml의 샘플이 처리된다.

[0012] 일부 실시양태에서, 막은 양으로 하전된 막이다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 음이온 교환체이다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 4급 아민을 포함하는 음이온 교환체이다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 양으로 하전된 막인 Q 막이고, 4급 아민을 포함하는 음이온 교환체이다. 예를 들어, Q 막은 4급 암모늄, R-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>으로 관능화된 것이다. 일부 실시양태에서, 막의 세공 크기는 적어도 3 μm이다.

[0013] 미세소포체 분획을 비롯한 샘플 정제는 이온 교환 기술을 사용하여 수행한다. 일부 실시양태에서, 이온 교환

기술은 본원에서 제공되는 실험 실시예에 제시된 것으로부터 선택되는 기술이다.

[0014] 일부 실시양태에서, 막 상에서의 용해를 위해 사용되는 작용제는 폐놀계 시약이다. 일부 실시양태에서, 용해 시약은 구아니디늄계 시약이다. 일부 실시양태에서, 용해 시약은 고염 기반 완충제이다. 일부 실시양태에서, 용해 시약은 QIA졸(QIAzol)이다. 일부 실시양태에서, 용해 시약은 폐놀계 용해 시약, 예컨대, QIA졸이고, 이는 약 700  $\mu\text{l}$ 의 부피로 사용된다.

[0015] 한 측면에서, 생물학적 샘플로부터 핵산을 추출하기 위한 방법은 (a) 생물학적 샘플을 제공하는 단계; (b) 포획 표면 상에 또는 포획 표면 내에 미세소포체 분획을 유지시키는 데 충분한 조건하에서 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시키는 단계; (c) 미세소포체가 포획 표면 상에 또는 포획 표면 내에 있는 동안 미세소포체 분획을 용해시키는 단계; 및 (d) 미세소포체 분획으로부터 핵산을 추출하는 단계를 포함한다. 대안적으로, 생물학적 샘플로부터 핵산을 추출하는 방법은 단계 (b) 이후에 포획 표면으로부터 미세소포체 분획을 용리시키는 단계, 용리된 미세소포체 분획을 수집하는 단계, 및 용리된 미세소포체 분획으로부터 핵산을 추출하는 단계를 추가로 포함한다. 임의적으로, 용리된 미세소포체 분획을 회전형 농축기에 의해 농축시켜 농축된 미세소포체 분획을 수득할 수 있고, 이어서, 상기 농축된 미세소포체 분획으로부터 핵산을 추출한다.

[0016] 또 다른 측면에서, 생물학적 샘플로부터 핵산을 추출하는 방법은 (a) 생물학적 샘플을 제공하는 단계; (b) 포획 표면 상에 또는 포획 표면 내에 미세소포체 분획을 유지시키는 데 충분한 조건하에서 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시키는 단계; 및 (c) 미세소포체가 포획 표면 상에 또는 포획 표면 내에 있는 동안 미세소포체 분획을 용리시키는 단계를 포함한다. 이어서, 추가 분석을 위해 용리된 미세소포체 분획을 처리할 수 있다. 임의적으로, 용리된 미세소포체 분획을 회전형 농축기에 의해 농축시켜 농축된 미세소포체 분획을 수득할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이어서, 상기 농축된 미세소포체 분획으로부터 핵산을 추출한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 포획 표면은 막이다. 한 측면에서, 막은 재생 셀룰로스를 포함한다. 예를 들어, 막의 세공 크기는 1  $\mu\text{m}$  이상, 예컨대, 예를 들어, 2-5  $\mu\text{m}$  범위이다. 일부 실시양태에서, 막의 세공 크기는 3-5  $\mu\text{m}$  범위이다. 일부 실시양태에서, 막은 폴리에테르솔fon (PES)을 포함한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 막은 하전된 것이다. 일부 실시양태에서, 막은 양으로 하전된 것이다. 일부 실시양태에서, 막은 음으로 하전된 것이다.

[0019] 일부 측면에서, 막은 관능화된 것이다. 예를 들어, 막은 4급 암모늄  $\text{R}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 으로 관능화된 것이다.

[0020] 한 실시양태에서, 포획 표면은 1개 초파의 막을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 적어도 2개의 막을 포함하며, 여기서 각 막은 나머지 다른 막(들) 옆에 인접하게 존재한다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 적어도 3개의 막을 포함하며, 여기서 3개의 막은 각각 서로 바로 옆에 인접해 있다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 적어도 4개의 막을 포함하며, 여기서 각각의 4개의 막은 각각 서로 바로 옆에 인접해 있다.

[0021] 일부 실시양태에서, 포획 표면은 비드이다. 예를 들어, 비드는 자성인 것이다. 대안적으로, 비드는 비-자성인 것이다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 비드는 친화성 리간드로 관능화된 것이다.

[0022] 일부 실시양태에서, 포획 표면은 중합체(들)의 슬러리이다. 일부 실시양태에서, 중합체(들)의 슬러리는 비드로 형상화된다.

[0023] 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈장이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈청이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 소변이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 뇌척수액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 배양물 상청액이다.

[0024] 일부 측면에서, 본원에 기술된 방법은 생물학적 샘플을 로딩 완충제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 로딩 완충제 범위는 pH 4-8이다. 한 측면에서, 로딩 완충제는 중성 pH를 가진다.

[0025] 본원에 기술된 방법은 미세소포체로부터 핵산을 추출하는 것을 제공한다. 바람직하게는, 추출되는 핵산은 DNA, 및/또는 RNA 및 RNA이다. 추출되는 RNA로는 메신저 RNA, 리보솜 RNA, 운반 RNA, 또는 소형 RNA, 예컨대, 마이크로RNA, 또는 그의 임의 조합을 포함할 수 있다.

[0026] 다양한 핵산 서열분석 기술을 사용하여 핵산, 예컨대, 생물학적 샘플로부터의 미세소포체 분획으로부터 추출된 무세포 DNA 및/또는 RNA를 검출 및 분석한다. 진단 목적으로 핵산, 예컨대, 미세소포체로부터 추출된 무세포 DNA 및/또는 핵산을 분석하는 것은 미세소포체를 쉽게 수집할 수 있는 비-침습성 성질에 기인하여 광범위한 영향을 미친다. 침습성 조직 생검 대신 미세소포체 분석을 사용하는 것은 환자 안녕 상태에 긍정적인 영향을 미

칠 것이고, 종적 질환 모니터링을 수행할 수 있는 능력을 개선시킬 수 있을 것이며, 심지어 (예컨대, 난소암 또는 뇌암 환자에서와 같이) 조직 세포에 쉽게 접근가능하지 않을 때에도 발현 프로파일을 수득할 수 있는 능력을 개선시킬 수 있을 것이다.

[0027] 일부 실시양태에서, 본 발명은 저빈도 서열 변이체를 검출하는, 예를 들어, 차세대 서열분석 (NGS) 검정법을 비롯한, 핵산 서열분석 기술을 위한 공정 중 제어를 제공하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 이러한 제어는 기술적으로 많은 이점을 제공한다.

[0028] 생물학적 샘플은 체액이다. 체액은 대상체 신체 중 어느 부위에서든, 바람직하게는, 말초 위치로부터 단리된 유체일 수 있고, 이는 예를 들어, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 가래, 척수액, 뇌척수액, 흉수, 유두 흡입물, 림프액, 기도, 장관, 및 비뇨생식관의 유체, 누액, 타액, 모유, 림프계로부터의 유체, 정액, 뇌척수액, 기관계내 유체, 복수, 종양 낭액, 양수 및 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 체액은 소변, 혈액, 혈청, 또는 뇌척수액이다.

[0029] 상기 방법들 중 임의의 것에서, 핵산은 DNA, 및/또는 RNA이다. RNA의 예로는 메신저 RNA, 운반 RNA, 리보솜 RNA, 소형 RNA ( $\text{b}\text{i}$ -단백질-코딩 RNA,  $\text{b}\text{i}$ -메신저 RNA), 마이크로RNA, piRNA, exRNA, snRNA 및 snoRNA를 포함한다.

[0030] 상기 방법들 중 임의의 것에서, 핵산은 샘플로부터 단리되거나, 또는 다르게는 샘플로부터 유래된 것으로, 샘플의 미세소포체 분획으로부터 단리된 RNA를 포함한다.

[0031] 상기 방법들 중 임의의 것에서, 핵산은 본원에서 순환 핵산으로도 또한 지칭되는 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 DNA 또는 RNA이다.

[0032] 이제, 본 발명의 다양한 측면 및 실시양태를 상세하게 기술할 것이다. 본 발명의 범주로부터 벗어남 없이 세부사항이 변형될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 추가로, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 형태의 용어는 복수를 포함하여야 하고, 복수 형태의 용어는 단수를 포함하여야 한다.

[0033] 확인되는 모든 특허, 특히 출원, 및 공개문헌은 예를 들어, 상기 공개문헌에 기술된 방법은 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다는 것을 기술 및 개시하기 위한 목적으로 본원에서 참조로 명백하게 포함된다. 이를 공개문헌은 오직 본 출원의 출원일 이전의 그의 개시내용에 대해서만 제공된다. 이와 관련하여 어떤 것도 본 발명자들이 선행 발명에 의해 또는 임의의 다른 이유에서 상기 개시내용을 앞서는 자격을 갖지 않음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 날짜에 관한 모든 언급 내용 또는 상기 문헌들의 내용에 관하여 나타낸 것은 본 출원인이 이용가능한 정보에 기초하는 것이며, 날짜 또는 상기 문헌의 내용의 정확성에 관하여 인정하는 것으로 여겨지는 것은 아니다.

### 도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 미세소포체 분획을 단리시키고, 미세소포체 핵산을 방출시키고, 별개의 두 프로토콜을 사용하여 RNA 및 DNA를 추출하는, RNA 및 DNA 단리 프로토콜의 한 실시양태를 설명하는 개략도이다.

도 2는 미세소포체 분획을 단리시키고, 미세소포체 핵산을 방출시키고, 단일 프로토콜을 사용하여 RNA 및 DNA를 추출하는, RNA 및 DNA 단리 프로토콜의 또 다른 실시양태를 설명하는 개략도이다.

도 3은 야생형 BRAF RNA 및 DNA의 검출에 의해 입증되는 바와 같은, 단일 추출에서 미세소포체 RNA 및 DNA를 단리시키기 위한 상 분리에 대한 클로로포름 농도의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 4는 GAPDH RNA 및 DNA의 검출에 의해 입증되는 바와 같은, 단일 추출에서 미세소포체 RNA 및 DNA를 단리시키기 위한 상 분리에 대한 클로로포름 농도의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 5는 상 분리에서의 pH 조정이 DNA 추출 및 검출에 영향을 미친다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 6은 뇌척수액 (CSF) 샘플 부피 적정의 미세소포체 RNA 추출 및 검출에 대한 효과를 보여주는 그래프이다.

도 7은 초원심분리 및 EX060 단리 방법으로부터의 미세소포체 RNA 표적의 검출 비교를 보여주는 그래프이다.

도 8은 상이한 환자의 CSF 샘플에 대한 초원심분리 및 EX060 단리 방법으로부터의 미세소포체 RNA 표적의 검출 비교를 보여주는 그래프이다. 환자 샘플은 환자 ID로 명시되어 있다. 다양한 샘플 부피를 사용하였다. (\*) 표시는 사후 샘플임을 나타낸다.

도 9는 CSF 샘플 부피 (0.25 ml, 0.5 ml, 1.0 ml 및 2.0 ml)가 상이한 미세소포체 RNA 단리 및 추출 방법에 미치는 효과를 보여주는 그래프이다. UC (초원심분리), uCSC (소변 여과 방법), 및 EX060.

도 10은 소변 순환 줄기 세포 (uCSC) 방법과 비교하여, EX070 프로토콜을 사용하여 2개의 상이한 소변 샘플로부터의 추출로부터 얻은 RNA 프로파일을 도시한 바이오어날라이저 플롯 시리즈이다.

도 11은 소변CSC 방법과 비교하여, EX070에 의한 단리 및 추출 이후의 RNA 검출 사이의 상관관계를 보여주는 그래프이다.

도 12는 EX070 또는 uCSC 방법에 의한 단리 및 추출 이후의 상이한 RNA 표적 검출을 보여주는 2개의 그래프이다. RNA를 단리된 미세소포체 분획 (EX070 또는 uCSC), 및 단리 후 통과액 또는 상청액 분획 (EX070 통과액 또는 uCSC 통과액)으로부터 추출하고, 분석하였다. (A) mRNA 표적; (B) miRNA 표적.

도 13-223은 본원에서 상업적으로 입수 가능한 CNA 키트로서 지칭되는 상업적으로 입수 가능한 순환 혼산 단리 키트와의 비교와 함께, EX052 DNA 및 RNA 단리 및 추출 방법의 감도 및 특이성을 도시한 그래프 및 도해 시리즈다.

도 13은 PLG 투브를 사용한 및 사용하지 않은 DNA 추출을 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 14, 15, 16, 및 17은 초기 DNA/RNA 단리 방법 (EX052.1) 및 상업적으로 입수 가능한 키트를 이용한 PLG 투브를 사용한 및 사용하지 않은 DNA 추출을 도시한 그래프 시리즈다.

도 18 및 19는 본 개시내용의 방법 대 상업적으로 입수 가능한 순환 혼산 추출 키트를 사용한 DNA 추출을 도시한 그래프 시리즈다.

도 20은 클로로포름 적정이 폐놀 상의 RNA 및 DNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프이다.

도 21은 클로로포름 적정이 PLG 투브에서의 폐놀 상의 RNA 단리 및 DNA 단리에 미치는 효과를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 22, 23, 24, 25, 및 26은 클로로포름 적정이 RNA 단리 (도 22), RNA 및 DNA 단리 (도 23, 24), 및 DNA 단리 (도 25, 26)에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈다.

도 27은 RN이지(RNeasy) 프로토콜 (PLG 투브를 사용하지 않음) 및 클로로포름 적정을 사용한 DNA 단리를 도시한 그래프이다.

도 28은 PLG 투브는 사용하지 않고 클로로포름 적정은 사용한 DNA 단리를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 29, 30, 및 31은 RN이지 프로토콜 (PLG 투브를 사용하지 않음) 및 클로로포름 적정을 사용한 DNA 단리를 도시한 그래프 시리즈다.

도 32는 조정된 클로로포름 첨가가 DNA 및 RNA를 공동으로 단리시킨다는 것을 도시한 그래프이다.

도 33은 PLG 투브는 사용하지 않고 클로로포름 적정은 사용한 DNA 단리를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 및 44는 RN이지 프로토콜 (PLG 투브를 사용하지 않음) 및 클로로포름 적정을 사용한 DNA 단리를 도시한 그래프 시리즈다.

도 45는 상 분리에서의 pH 변화가 DNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프이다.

도 46은 pH 적정을 이용한 수성 상으로부터의 DNA 단리를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 47은 pH 컨디셔닝 용액을 제조하는 방법을 나타낸 개략적 대표도이다.

도 48은 단리된 RNA 및 DNA에 대한 Nala 증폭 곡선을 도시한 그래프이다.

도 49, 50, 51, 52, 53, 및 54는 pH 적정이 수성 상으로부터의 DNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈다.

도 55는 클로로포름 첨가가 수성 상의 DNA 함량을 결정하는 데 있어서 지배적인 인자라는 것을 도시한 그래프이다.

도 56은 RNA 신호가 DNA 단리를 첨가를 통해 영향을 받지 않는다는 것을 도시한 그래프이다.

도 57은 클로로포름 적정을 사용하고 pH 용액을 첨가하거나 또는 첨가하지 않은, 수성 상으로부터의 DNA 단리를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 58은 pH 컨디셔닝 용액을 제조하는 방법을 나타낸 개략적 대표도이다.

도 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 및 68은 pH 용액을 첨가하거나 또는 첨가하지 않은 클로로포름 적정이 수성 상으로부터의 DNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 69는 4°C 또는 실온 퀴아졸(Qiazol) 회전 단계가 상업적으로 입수 가능한 키트를 사용하한 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프이다.

도 70은 4°C 또는 실온 퀴아졸 회전 단계가 본 개시내용의 방법에 미치는 효과를 도시한 그래프이다.

도 71 및 72는 4°C 또는 실온 퀴아졸 회전 단계와 함께 상업적으로 입수 가능한 키트를 사용한 RNA 단리를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도 및 상기 연구의 개요이다.

도 73, 74, 및 75는 4°C 또는 실온 퀴아졸 회전 단계가 상업적으로 입수 가능한 키트에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 76 및 77은 4°C 또는 실온 퀴아졸 회전 단계와 함께 EX052 방법을 사용한 RNA 단리를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도 및 상기 연구의 개요이다.

도 78 및 79는 4°C 또는 실온 퀴아졸 회전 단계가 본 개시내용의 방법에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 81은 1.5x 내지 2.6x의 다양한 에탄올 부피가 미치는 효과를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 81 및 82는 1.5x 내지 2.6x의 다양한 에탄올 부피가 DNA 및 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 83은 결합 단계 이전의 실온에서의 ProtK 분해의 결과를 도시한 그래프이다.

도 84는 결합 단계 이전의 실온에서의 ProtK 분해를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 85 및 86은 결합 단계 이전의 실온에서의 ProtK 분해의 결과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 87은 로딩 용량이 혈장 8 mL를 초과한다는 것을 도시한 그래프이다.

도 88은 통과액이 최대 8 mL 혈장까지는 관류점을 갖지 않는다는 것을 도시한 그래프이다.

도 89는 엑소좀 및 뉴클레오솜에 대한 상이한 결합능을 도시한 그래프이다.

도 90은 로딩 용량을 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 91은 엑소좀 및 뉴클레오솜에 대한 상이한 결합능을 도시한 그래프이다.

도 92 및 93은 로딩 용량이 혈장 8 mL를 초과한다는 것을 도시한 그래프 시리즈이다.

도 94는 통과액이 최대 8 mL 혈장까지는 관류점을 갖지 않는다는 것을 도시한 그래프이다.

도 95, 96, 및 97은 혈장의 로딩 부피를 달리하였을 때, 그것이 DNA 및 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 98은 통과액이 최대 8 mL 혈장까지는 관류점을 갖지 않는다는 것을 도시한 그래프이다.

도 99 및 100은 혈장의 로딩 부피를 달리하였을 때, 그것이 DNA 및 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 101, 102, 103, 104, 105, 및 106은 엑소좀 및 뉴클레오솜에 대한 상이한 결합능을 도시한 그래프 시리즈이다.

다.

도 107 및 108은 본 개시내용의 방법 및 상업적으로 입수가능한 키트를 포함하여 상이한 단리 기술을 사용한, 무세포 DNA (cfDNA) 단리를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 109는 본 개시내용의 방법을 사용한 cfDNA 단리와 상업적으로 입수가능한 키트를 사용한 것을 비교하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 110 및 111은 본 개시내용의 방법 및 상업적으로 입수가능한 키트를 포함하여 상이한 단리 기술을 사용한, cfDNA 단리를 비교하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도 및 상기 연구의 개요이다.

도 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 및 123은 본 개시내용의 방법 및 상업적으로 입수가능한 키트를 포함하여 상이한 단리 기술을 사용한, cfDNA 단리를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 124, 125, 126, 127, 및 128은 본 개시내용의 방법 및 상업적으로 입수가능한 키트를 포함하여 상이한 단리 기술을 사용한, cfDNA 카페수 비교를 도시한 그래프 시리즈 및 표이다.

도 129, 130, 및 131은 단리된 DNA 및 RNA의 하류 분석을 위한 올프렙 마이크로(AllPrep Micro) 키트의 사용을 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도 및 상기 연구의 개요이다.

도 132, 133, 134, 135, 및 136은 단리된 DNA 및 RNA의 하류 분석을 위한 올프렙 마이크로 키트의 사용을 도시한 그래프 시리즈이다.

도 137 및 138은 본 개시내용의 방법 및 상업적으로 입수가능한 키트를 포함하여 상이한 단리 기술을 사용한, 무세포 DNA (cfDNA) 단리를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 139는 본 개시내용의 방법 및 상업적으로 입수가능한 키트를 사용하여 단리된 cfDNA를 비교하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 140, 141, 142, 143, 144, 145, 및 146은 본 개시내용의 방법 및 상업적으로 입수가능한 키트를 포함하여 상이한 단리 기술을 사용한, 무세포 DNA (cfDNA) 단리를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 147, 148, 및 149는 본 개시내용의 방법 및 상업적으로 입수가능한 키트를 사용하여 단리된 cfDNA를 비교하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 및 170은 본 개시내용의 방법 및 상업적으로 입수가능한 키트를 포함하여 상이한 단리 기술을 사용한, 무세포 DNA (cfDNA) 단리를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 171은 본 개시내용의 방법이 일관되게 상업적으로 입수가능한 cNA 키트를 능가한다는 것을 도시한 그래프 시리즈이다.

도 172, 173, 및 174는 본 개시내용의 방법 및 상업적으로 입수가능한 키트를 사용하여 단리된 cfDNA를 비교하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 및 196은 본 개시내용의 방법 및 상업적으로 입수가능한 키트를 포함하여 상이한 단리 기술을 사용한, 무세포 DNA (cfDNA) 단리를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 197은 다중 별개의 퀴아졸 용리 단계가 DNA 및 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프이다.

도 198은 다중 퀴아졸 용리 단계를 사용한 DNA 및 RNA 단리를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 199, 200, 201, 및 202는 다중 별개의 퀴아졸 용리 단계가 DNA 및 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 203은 다중 퀴아졸 용리 단계를 사용한 DNA 및 RNA 단리를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 204, 205, 및 206은 다중 별개의 퀴아졸 용리 단계가 DNA 및 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 207은 에탄올 침전과 함께 이중 RN이지 로딩 단계가 DNA 및 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프이다.

도 208 및 209는 에탄올 침전과 함께 이중 RN이지 로딩 단계를 사용한 DNA 및 RNA 단리를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도 및 상기 연구의 개요이다.

도 210 및 211은 에탄올 침전과 함께 이중 RN이지 로딩 단계가 DNA 및 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 212는 상이한 하류 칼럼이 DNA 및 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프이다.

도 213은 상이한 하류 칼럼을 사용한 DNA 및 RNA 단리를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 214, 215, 216, 및 217은 상이한 하류 칼럼이 DNA 및 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 219는 다중 RN이지 용리 단계를 사용한 DNA 및 RNA 단리를 평가하도록 디자인된 연구를 나타낸 개략적 대표도이다.

도 220, 221, 222, 및 223은 다중 RN이지 용리 단계가 DNA 및 RNA 단리에 미치는 효과를 도시한 그래프 시리즈이다.

도 224는 혈장 중 핵산의 크기 분포를 도시한 그래프 시리즈이다. 1 mL 혈장으로부터의 완전한 핵산 단리물에 대해 RNase A 분해 ("cfDNA"), DNase I 분해 ("엑소RNA"), 또는 모의 처리 ("EX052")를 수행하였다. 반응 클린업 후, 바이오아날라이저 피코 6000(Bioanalyzer Pico 6000) 검정에 의해 단리물 중에 존재하는 핵산의 크기 분포를 측정하였다.

도 225는 2 mL의 혈액 혈장으로부터의 핵산의 순차적 단리를 도시한 그래프이다. 정상적인 건강한 공여자로부터의 혈액 혈장을 EX052 칼럼을 통해 통과시키고, 상업적으로 입수 가능한 엑소RN이지 키트 (RNA) 또는 상업적으로 입수 가능한 순환 핵산 키트 (DNA)를 사용하여 통과액에 남아있는 물질을 단리시켰다. 엘타 CT의 함수로서 BRAF, KRAS 및 18S 유전자에 대한 (RT)-qPCR을 사용하여 전체 수율을 EX052 (RNA+DNA)와 비교한다. 오차 막대는 3회 반복 단리를 나타낸다.

도 226은 엑소RNA 및 ciDNA 둘 모두가 실질적으로 혈액 혈장으로부터의 수거된 전체 핵산에 기여한다는 것을 도시한 그래프 시리즈이다. 역전사 단계를 수행하거나 (RNA+DNA) 또는 수행하지 않고 (DNA), 상업적으로 입수 가능한 엑소RN이지 키트 (RNA) 또는 EX052 단리를 사용하여 건강한 공여자로부터 1 mL 혈장을 단리시켰다. RT-qPCR에 의한 절대 정량화는 박스플롯으로 제시되어 있고, 이는 혈장 1 mL당 중앙 카피수를 나타내며, 개별 공여자는 형상으로 플로팅되어 있다.

도 227 및 228은 전체 순환 핵산을 포획할 수 있는 본원에서 제공되는 EX052 방법의 능력을 도시한 그래프 시리즈이다. EX052 방법을 상업적으로 입수 가능한 순환 핵산 DNA 단리 키트와 비교하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035]

본 발명은 DNA 및 미세소포체를 표면에 포획시킨 후, 이어서, 미세소포체를 용해시켜 그 안에 함유되어 있는 핵산, 특히, RNA를 방출시키고, DNA, 및/또는 DNA 및 적어도 RNA를 포함하는 핵산을 포획 표면으로부터 용리시킴으로써, 무세포 DNA (cfDNA) 및/또는 cfDNA 및 적어도 RNA를 포함하는 핵산을 단리시키는 방법을 제공한다. 미세소포체는 세포 밖으로 진핵 세포에 의해 방출되거나, 혈장 막으로부터 출아된다. 이들 막 소포체는 직경이 약 10 nm 내지 약 5,000 nm 범위로 크기가 불균일하다. 직경이 < 0.8 μm인, 세포에 의해 방출된 모든 막 소포체는 본원에서 총칭하여 "미세소포체"로 지칭된다. 이들 미세소포체로는 미세소포체, 미세소포체-유사 입자, 프로스타솜, 텍소좀, 텍소좀, 엑토좀, 온코좀, 아폽토시스 소체, 레트로바이러스-유사 입자, 및 인간 내인성 레트로바이러스 (HERV) 입자를 포함한다. 관련 기술분야에서는 세포내 다소포체의 엑소시토시스에 의해 방출되는 소형 미세소포체 (직경이 대략 10 내지 1,000 nm, 및 더욱 빈번하게는 30 내지 200 nm)가 "미세소포체"로서 지칭된다.

[0036]

미세소포체로부터 DNA, 및/또는 DNA 및 적어도 RNA를 포함하는 핵산을 단리시키는 현행 방법은 초원심분리, 한외여과, 예컨대, 100 kD 필터를 이용하는 것, 중합체 침전 기술, 및/또는 크기에 기초한 여과를 포함한다. 그러나, 진단 목적을 비롯한, 다양한 적용에서 사용하기 위해 미세소포체를 단리시키고, 임의적으로, 그 안에 함

유되어 있는 핵산, 바람직하게는, RNA를 추출하는 데 있어 효율적이고, 효과적인 대안 방법이 요구되고 있다.

[0037]

EX052 DNA, 및/또는 DNA 및 RNA 단리 방법 및/또는 키트로 지칭되는, 본원에서 제공되는 단리 및 추출 방법 및/또는 키트는 무세포 DNA 및/또는 미세소포체에 결합하는 친화성 막을 사용하는 회전-칼럼 기반 정제 공정을 이용한다. 본 개시내용의 방법 및 키트를 통해 단일 칼럼 상에서 0.2 mL부터 최대 4 mL까지의 부피를 사용하여 다수의 임상 샘플을 동시에 전개시킬 수 있는 능력을 갖게 된다. EX052 방법을 사용하여 단리된 무세포 DNA는 고도로 순수하다. 단리된 RNA는 고도로 순수하며, 용해될 때까지 소포체 막에 의해 보호되고, 무손상 소포체는 EX052 막으로부터 용리될 수 있다. EX052 막 방법은 혈장 유입물로부터 실질적으로 모든 무세포 DNA를 고갈시킬 수 있고, 상업적으로 입수 가능한 순환 DNA 단리 키트와 비교하였을 때, DNA 수율은 동일하거나, 또는 그보다 더 우수하다. EX052 방법은 혈장 유입물로부터 실질적으로 모든 mRNA를 고갈시킬 수 있고, 초원심분리 또는 직접 용해와 비교하였을 때, mRNA/miRNA 수율은 동일하거나, 또는 그보다 더 우수하다. 상업적으로 입수 가능한 키트 및/또는 종래 단리 방법과 달리, EX052 방법 및/또는 키트는 miRNA의 미세소포체 결합 분획을 강화시키고, 이는 다양한 유입 물질로 쉽게 규모 확장될 수 있다. 이러한 규모 확장이 가능한 능력을 통해서 흥미롭지만, 존재량이 낮은 전사체에 대한 연구가 이루어질 수 있다. 시판되는 다른 상업적으로 입수 가능한 제품과 비교하였을 때, 본 개시내용의 방법 및 키트는 본원에서 제공되는 실시예에 의해 입증되는 특유한 능력을 제공한다.

[0038]

EX052 방법 및 키트는 하기 일반 방법을 사용하여 생물학적 샘플로부터 핵산, 예컨대, DNA, 및/또는 DNA 및 적어도 RNA를 포함하는 핵산을 단리 및 추출한다. 먼저, cfDNA 및 미세소포체 분획을 포함하는 샘플을 막 필터에 결합시키고, 필터를 세척한다. 이어서, 폐놀계 시약을 사용하여 막 상에서의 용해 및 핵산, 예컨대, DNA, 및/또는 DNA 및 RNA의 방출을 수행한다. 이어서, PLG 튜브를 사용하여 클로로포름 추출을 수행한 후, 이어서 에탄올 컨디셔닝을 수행한다. 이어서, 핵산, 예컨대, DNA, 및/또는 DNA 및 RNA를 실리카 칼럼에 결합시키고, 세척한 후, 용리시킨다. 이어서, 예를 들어, 다양한 하류 검정법들 중 임의의 것을 사용하여 추출된 핵산, 예컨대, DNA, 및/또는 DNA 및 RNA를 추가로 분석할 수 있다.

[0039]

일부 실시양태에서, 본 방법은 하기 단계를 포함한다. 필터를 회전 칼럼에 포함시킨다. 용해 시약을 첨가하기 전, 샘플을 회전 칼럼 중의 막 필터에 결합시킨 후, 회전 칼럼을 대략 500 x g로 1 min 동안 회전시킨다. 이어서, 통과액을 폐기하고, 완충제를 회전 칼럼에 첨가하고, 회전 칼럼을 다시 대략 5,000 x g로 5 min 동안 회전시켜 칼럼으로부터 잔류 부피를 제거한다. 2차 회전 후, 통과액을 폐기한다. 이어서, 회전 칼럼을 폐놀계 용해 시약과 접촉시키고, 대략 5,000 x g로 5 min 동안 회전시켜 용해된 미세소포체 및 포획된 cfDNA를 함유하는 균질물을 수집한다. 일부 실시양태에서, 용해 완충제는 폐놀계 용해 완충제이다. 예를 들어, 용해 완충제는 QIA졸® 용해 시약 (퀴아젠(Qiagen))이다. 이어서, 균질물에 대해 핵산 단리 및 추출을 수행한다. 일부 실시양태에서, RNA 단리 효율을 위한 대조군, 예컨대, 예를 들어, Q-베타 또는 본원에 기술된 임의의 다른 대조군은 핵산 단리 및 추출 이전에 균질물에 스파이크-인(spiked-in)한다.

[0040]

일부 실시양태에서, 하기 단계에 따라 핵산을 단리시킨다. 용해 시약을 첨가한 후, 이어서 클로로포름을 균질물에 첨가하고, 용액을 단기간 동안 왕성하게 혼합한다. 일부 실시양태에서, 350  $\mu$ L 클로로포름을 균질물에 첨가한다. 이어서, 용액을 4°C에서 12,000 x g로 5 min 동안 원심분리한다. 이어서, 상부 수성 상을 새 수집 튜브로 옮기고, 2 부피의 100% 에탄올을 상부 수성 상에 첨가하고, 용액을 혼합한다. 이어서, 관련 기술분야에 알려져 있는 다양한 핵산 단리 및/또는 추출 방법 중 임의의 것을 사용하여 용액을 처리할 수 있다.

[0041]

이어서, 다양한 하류 검정법 중 임의의 것을 사용하여 단리된 핵산, 예컨대, DNA, 및/또는 DNA 및 RNA에 대해 추가 분석을 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA 및 RNA의 조합형 검출을 사용하여 실행 가능한 돌연변이에 대한 감도를 증가시킬 수 있다. 순환 핵산 중 검출 가능한 돌연변이의 잠재적인 공급원은 다수 존재한다. 예를 들어, 살아있는 종양 세포는 샘플의 미세소포체 분획으로부터 단리된 RNA 및 DNA에 대한 잠재적인 공급원이고, 죽은 종양 세포는 무세포 DNA 공급원, 예컨대, 예를 들어, 아프토시스 소포체 DNA 및 괴사성 종양 세포로부터의 무세포 DNA에 대한 잠재적인 공급원이다. 돌연변이화된 핵산은 순환 중에 비교적 저빈도로 존재하므로, 검출 감도를 최대화시키는 것이 매우 중요하다. DNA 및 RNA의 조합형 단리는 질환 진행 및 요법에 대한 환자 반응을 평가할 수 있는 종합적인 임상 정보를 전달한다. 그러나, 본원에서 제공되는 방법 및 키트와 달리, 순환 핵산을 검출하는 상업적으로 입수 가능한 키트는 단지 혈장으로부터, 즉, 죽은 세포로부터 cfDNA를 단리시키는 것만을 할 수 있다. 도 227-228에 제시되어 있는 바와 같이, EX052는 모든 cfDNA를 포획하였고, EX052는 cfDNA 단독 대비 엑소RNA 및 cfDNA를 조합한 유의적으로 더 많은 카페를 검출하였다. 더 많은 카페의 돌연변이 또는 다른 바이오마커가 돌연변이 및 다른 바이오마커를 확인하는 데 있어서 감도 및 정확도를 증강시킨다는 것을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이해할 것이다.

- [0042] 본원에서 사용되는 바와 같이, "핵산"이라는 용어는 DNA 및 RNA를 지칭한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥 일 수 있다. 일부 경우에서, 핵산은 DNA이다. 일부 경우에서, 핵산은 RNA이다. RNA는 메신저 RNA, 운반 RNA, 리보솜 RNA, 비-코딩 RNA, 마이크로RNA, 및 HERV 요소를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본원에서 사용되는 바와 같이, "생물학적 샘플"이라는 용어는 생물학적 물질, 예컨대, DNA, RNA 및 단백질을 함유하는 샘플을 의미한다.
- [0044] 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 적합하게는 대상체로부터의 체액을 포함할 수 있다. 체액은 대상체 신체 중 어느 부위에서든, 예컨대, 예를 들어, 말초 위치로부터 단리된 유체일 수 있고, 이는 예를 들어, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 가래, 척수액, 뇌척수액, 흉수, 유두 흡입물, 림프액, 기도, 장관, 및 비뇨생식관의 유체, 누액, 타액, 모유, 림프계로부터의 유체, 정액, 기관계내 유체, 복수, 종양 낭액, 양수 및 세포 배양물 상청액, 및 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 생물학적 샘플은 또한 대변 또는 맹장 샘플, 또는 그로부터 단리된 상청액을 포함할 수 있다.
- [0045] 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 적합하게는 세포 배양물 상청액을 포함할 수 있다.
- [0046] 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 적합하게는 대상체로부터의 조직 샘플을 포함할 수 있다. 조직 샘플은 대상체 신체 중 어느 부위에서든 그로부터 단리될 수 있다.
- [0047] 체액의 적합한 샘플 부피는 예를 들어, 약 0.1 ml 내지 약 30 ml 유체 범위이다. 유체 부피는 몇몇 인자, 예컨대, 사용되는 유체 유형에 의존할 수 있다. 예를 들어, 혈청 샘플의 부피는 약 0.1 ml 내지 약 4 ml, 바람직하게는, 약 0.2 ml 내지 4 ml일 수 있다. 혈장 샘플의 부피는 약 0.1 ml 내지 약 4 ml, 바람직하게 0.5 ml 내지 4 ml일 수 있다. 소변 샘플의 부피는 약 10 ml 내지 약 30 ml, 바람직하게 약 20 ml일 수 있다.
- [0048] 본원에서 제공되는 실시예는 혈장 샘플을 사용하였지만, 상기 방법이 다양한 생물학적 샘플에 적용될 수 있다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다.
- [0049] 본 개시내용의 방법 및 키트는 인간 대상체로부터 유래된 샘플과 함께 사용하는 데 적합하다. 본 개시내용의 방법 및 키트는 인간 대상체로부터 유래된 샘플과 함께 사용하는 데 적합하다. 추가로, 본 개시내용의 방법 및 키트는 또한 인간 대상체로부터 유래된 샘플과 함께 사용하는 데 적합하다. 본 개시내용의 방법 및 키트는 비-인간 대상체, 예컨대, 예를 들어, 설치류, 비-인간 영장류, 반려 동물 (예컨대, 고양이, 개, 말), 및/또는 농장 동물 (예컨대, 닭)로부터 유래된 샘플과 함께 사용하는 데 적합하다.
- [0050] "대상체"라는 용어는 핵산을 함유하는 입자를 갖는 것으로 나타난, 또는 그러한 것으로 예상되는 모든 동물을 포함하는 것으로 한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 포유동물, 인간 또는 비-인간 영장류, 개, 고양이, 말, 소, 다른 농장 동물, 또는 설치류 (예컨대, 마우스, 래트, 기니 피그 등)이다. 인간 대상체는 관찰가능한 이상, 예컨대, 질환을 앓지 않는 정상적인 인간일 수 있다. 인간 대상체는 관찰가능한 이상, 예컨대, 질환을 앓는 인간일 수 있다. 관찰가능한 이상은 인간 본인에 의해, 또는 의사에 의해 관찰될 수 있다. "대상체," "환자," 및 "개체"라는 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0051] 본원에서 제공되는 실험 실시예는 포획 표면으로서 막을 사용하지만, 포획 표면의 포맷, 예컨대, 비드 또는 필터 (이는 또한 본원에서 막으로 지칭된다)가 생물학적 샘플로부터 미세소포체를 효율적으로 포획할 수 있는, 본원에서 제공되는 방법의 능력에 영향을 미치지 않는다는 것을 이해하여야 한다.
- [0052] 본원에서 제공되는 실험 실시예는 추출 단계 동안 클로로포름을 사용하지만, 핵산 추출 동안 클로로포름과 동일한 과제를 수행할 수 있는 임의의 화학물질이 본원에서 제공되는 방법에서 사용될 수 있다는 것을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이해할 것이다. 비-제한적인 예로서, 추출 단계에서 사용하기에 적합한 화학물질로는 디클로로메탄, 틀루엔, 헥산, MTBE, 및 에틸 아세테이트 (EtOAc)를 포함한다.
- [0053] 매우 다양한 표면이 본원에서 제공되는 방법에 따라 미세소포체를 포획할 수 있지만, 모든 표면이 미세소포체를 포획할 수 있는 것은 아니다 (일부 표면은 어느 것도 포획하지 못한다).
- [0054] 본 개시내용은 또한 1회용 플라스틱 부품 및 원심분리기 장치를 사용하여 생물학적 또는 임상 샘플로부터 미세소포체를 단리 및 농축시키기 위한 장치를 기술한다. 예를 들어, 본 장치는 포획 표면 (즉, 막 필터)을 포함하는 칼럼, 외부 프릿과 내부 튜브 사이에 포획 표면을 고정시키는 홀더, 및 수집 튜브를 포함한다. 외부 프릿은 액체가 통과할 수 있도록 허용하는 큰 그물 구조를 포함하고, 이는 바람직하게는 칼럼 한쪽 단부에 위치한다. 내부 튜브는 포획 표면을 제 위치에 고정시키고, 바람직하게는 약간 원추형인 형상을 가진다. 수집 튜브는 상업적으로 입수가능한, 즉, 50 ml 팔콘(Falcon) 튜브일 수 있다. 칼럼은 바람직하게는 회전시키는 데 적합한 것

이며, 즉, 그 크기는 표준 원심분리기 및 마이크로-원심분리기 장치와 호환성을 띤다.

[0055] 포획 표면이 막인 실시양태에서, 생물학적 샘플로부터 미세소포체 분획을 단리시키기 위한 장치는 적어도 1개의 막을 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 막을 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 3개의 막을 포함한다. 장치가 1개 초과의 막을 포함하는 실시양태에서, 막은 모두 칼럼 한쪽 단부에서 서로 직접적으로 인접해 있다. 장치가 1개 초과의 막을 포함하는 실시양태에서, 막은 모두 서로 동일한 것이며, 즉, 동일하게 하전된 것이고/거나, 같은 작용기를 가진다.

[0056] 미세소포체보다 작은 세공 크기를 통해 여과함으로써 수행되는 포획은 본원에서 제공되는 방법에 의한 포획의 주요 메커니즘이 아니라는 것에 주의하여야 한다. 그러나, mRNA가 20 nm 필터 상에 달라붙어 회수될 수 없고, 그에 반해, 마이크로RNA는 쉽게 용리될 수 있기 때문에, 그리고, 예컨대, 필터 세공 크기가 이용가능한 표면 포획 면적에서 중요한 파라미터이기 때문에, 그럼에도 불구하고, 필터의 세공 크기는 매우 중요하다.

[0057] 본원에서 제공되는 방법은 다양한 포획 표면 중 임의의 것을 사용한다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 막이며, 이는 또한 본원에서 필터 또는 막 필터로 지칭된다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 상업적으로 입수 가능한 막이다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 하전된 상업적으로 입수 가능한 막이다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 중성이다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 팔 코포레이션(PALL Corporation)으로부터의 무스탕® 이온 교환 막(Mustang® Ion Exchange Membrane); 사르토리우스 아게(Sartorius AG)로부터의 비바퓨어(Vivapure)® Q 막; 사르토바인드(Sartobind) Q, 또는 비바퓨어® Q 맥시 H(Vivapure® Q Maxi H); 사르토리우스 아게로부터의 사르토바인드® D, 사르토리우스 아게로부터의 사르토바인드 (S), 사르토리우스 아게로부터의 사르토바인드® Q, 사르토리우스 아게로부터의 사르토바인드® IDA, 사르토리우스 아게로부터의 사르토바인드® 알데히드(Sartobind® Aldehyde), 시그마(Sigma)로부터의 와트맨(Whatman)® DE81, EMD 밀리포어(EMD Millipore)로부터의 패스트 트랩 바이러스 퓨리피케이션(Fast Trap Virus 정제) 칼럼; 씨모 사이언티픽(Thermo Scientific)\* 피어스 스트롱 양이온 및 음이온 교환 회전 칼럼(Pierce Strong Cation and Anion Exchange Spin Columns)으로부터 선택된다.

[0058] 포획 표면이 하전된 것인 실시양태에서, 포획 표면은 0.65  $\mu\text{m}$  양으로 하전된 Q PES 진공 여과 (밀리포어(Millipore)), 3-5  $\mu\text{m}$  양으로 하전된 Q RC 회전 칼럼 여과 (사르토리우스), 0.8  $\mu\text{m}$  양으로 하전된 Q PES 홈메이드 회전 칼럼 여과 (팔(Pall)), 0.8  $\mu\text{m}$  양으로 하전된 Q PES 시린지 여과 (팔), 0.8  $\mu\text{m}$  음으로 하전된 S PES 홈메이드 회전 칼럼 여과 (팔), 0.8  $\mu\text{m}$  음으로 하전된 S PES 시린지 여과 (팔), 및 50 nm 음으로 하전된 나일론 시린지 여과 (스테르리테크(Sterlitech))로 이루어진 군으로부터 선택되는 하전된 필터일 수 있다. 본 실시양태에서는 퀴아졸/RNA를 필터 밖으로 제거하는 것이 더 어렵기 때문에, 하전된 필터는 시린지 여과 장치에는 하우징되지 않는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 하전된 필터는 칼럼의 한쪽 단부에 하우징된다.

[0059] 포획 표면이 막인 실시양태에서, 막은 다양한 적합한 물질로부터 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 막은 폴리에테르슬론(PES) (예컨대, 밀리포어 또는 팔 코포레이션으로부터의 것)이다. 일부 실시양태에서, 막은 재생된 셀룰로스(RC) (예컨대, 사르토리우스 또는 피어스(Pierce)로부터의 것)이다.

[0060] 일부 실시양태에서, 포획 표면은 양으로 하전된 막이다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 양으로 하전된 막인 Q 막이고, 4급 아민을 포함하는 음이온 교환체이다. 예를 들어, Q 막은 4급 암모늄,  $\text{R}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 으로 관능화된다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 음으로 하전된 막이다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 음으로 하전된 막인 S 막이고, 술폰산 기를 포함하는 양이온 교환체이다. 예를 들어, S 막은 술폰산,  $\text{R}-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ 으로 관능화된다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 디에틸아민 기,  $\text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ 를 포함하는 약한 염기성 음이온 교환체인, D 막이다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 금속 칼레이트 막이다. 예를 들어, 막은 아미노디아세트산 $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ 로 관능화된 IDA 막이다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 알데히드 기,  $-\text{CHO}$ 로 관능화된 미세다공성 막이다. 다른 실시양태에서, 막은 디에틸아미노에틸(DEAE) 셀룰로스를 포함하는, 약한 염기성 음이온 교환체이다. 모든 하전된 막이 본원에서 제공되는 방법에서 사용하는 데 적합한 것은 아니며, 예컨대, 사르토리우스 비바퓨어 S 막 회전 칼럼을 사용하여 단리된 RNA는 RT-qPCR 억제를 보였고, 따라서, PCR 관련 하류 검정법에서는 부적합하였다.

[0061] 포획 표면이 하전된 것인 실시양태에서, 미세소포체는 양으로 하전된 필터를 이용하여 단리시킬 수 있다.

[0062] 포획 표면이 하전된 것인 실시양태에서, 미세소포체 포획 동안 pH는  $\text{pH} \leq 7$ 이다. 일부 실시양태에서, pH는 4

초과 내지 8 이하이다.

- [0063] 포획 표면이 양으로 하전된 Q 필터인 실시양태에서, 완충제 시스템은 250 mM 비스 트리스 프로판(Bis Tris Propane), pH 6.5-7.0을 포함하는 세척 완충제를 포함한다. 포획 표면이 양으로 하전된 Q 필터인 실시양태에서, 용해 완충제는 퀴아졸이다. 포획 표면이 양으로 하전된 Q 필터인 실시양태에서, 용해 완충제는 1 부피로 존재한다. 포획 표면이 양으로 하전된 Q 필터인 실시양태에서, 용해 완충제는 1 초과의 부피로 존재한다.
- [0064] 막 물질에 따라, 막의 세공 크기는 3  $\mu\text{m}$  내지 20 nm 범위이다.
- [0065] 포획 표면의 표면 전하는 양성, 음성 또는 중성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 포획 표면은 양으로 하전된 비드 또는 비드들이다.
- [0066] 본원에서 제공되는 방법은 용해 시약을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막 상에서의 용해를 위해 사용되는 시약은 폐놀계 시약이다. 일부 실시양태에서, 용해 시약은 구아니디늄계 시약이다. 일부 실시양태에서, 용해 시약은 고염 기반 완충제이다. 일부 실시양태에서, 용해 시약은 QIA졸이다.
- [0067] 본원에서 제공되는 방법은 로딩 및 세척 완충제를 비롯한, 다양한 완충제를 포함한다. 로딩 및 세척 완충제는 이온 강도가 높거나, 또는 낮은 것일 수 있다. 염 농도, 예컨대, NaCl 농도는 0 내지 2.4 M일 수 있다. 완충제는 다양한 성분들을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 완충제는 하기 성분들 중 하나 이상의 것을 포함한다: 트리스, 비스-트리스, 비스-트리스-프로판, 이미다졸, 시트레이트, 메틸 말론산, 아세트산, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민 (TEA) 및 인산나트륨. 본원에서 제공되는 방법에서, 로딩 및 세척 완충제의 pH는 중요하다. 로딩 이전에 혈장 샘플이 pH ≤ 5.5로 설정된 경우에는 필터가 막히는 경향이 있고 (혈장은 칼럼을 통해 전혀 회전하지 못할 것이다), 더 높은 pH에서는 미세소포체가 불안정하기 때문에, 미세소포체 RNA 회수가 더 낮다. 중성 pH에서, 미세소포체로부터의 RNA 회수가 최적이다. 일부 실시양태에서, 사용되는 완충제는 1X 농도, 2X 농도, 3X 농도, 또는 4X 농도이다. 예를 들어, 로딩 또는 결합 완충제는 2X 농도인 반면, 세척 완충제는 1X 농도이다.
- [0068] 일부 실시양태에서, 본 방법은 예를 들어, 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시킨 후, 1회 이상의 세척 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 계면활성제를 세척 완충제에 첨가하여 비-특이적 결합 (즉, 오염 물질, 세포 데브리스, 및 순환 단백질 복합체 또는 핵산)을 제거함으로써 더욱 순수한 미세소포체 분획을 수득한다. 사용하기에 적합한 계면활성제로는 소듐 도데실 솔레이트 (SDS), 트윈(Tween)-20, 트윈-80, 트리톤(Triton) X-100, 노니데트(Nonidet) P-40 (NP-40), Brij-35, Brij-58, 옥틸 글루코시드, 옥틸 티오글루코시드, CHAPS 또는 CHAPSO를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0069] 일부 실시양태에서, 포획 표면, 예컨대, 막은 원심분리에 사용되는 장치; 예컨대, 회전 칼럼, 또는 진공 시스템을 위한 장치, 예컨대, 진공 필터 홀더, 또는 압력을 이용한 여과를 위한 장치, 예컨대, 시린지 필터 내에 하우징된다. 바람직한 실시양태에서, 포획 표면은 회전 칼럼 또는 진공 시스템 내에 하우징된다.
- [0070] 핵산을 추출하기 전에 생물학적 샘플로부터 미세소포체를 단리시키는 것이 하기 이유로 이롭다: 1) 미세소포체으로부터 핵산을 추출하는 것은 유체 샘플 내의 다른 미세소포체로부터 질환 또는 종양-특이적 미세소포체를 단리시킴으로써 수득된 질환 또는 종양-특이적 핵산을 선택적으로 분석할 수 있는 기회를 제공하고; 2) 핵산을 함유하는 미세소포체는, 먼저 미세소포체를 단리시키지 않고 유체 샘플로부터 직접 핵산을 추출함으로써 수득된 수율/완전성과 비교하였을 때, 더 높은 완전성으로 핵산 종을 유의적으로 더 높은 수율로 생성하고; 3) 예컨대, 저수준으로 발현되는 핵산을 검출할 수 있는 확장성, 감도는 본원에 기술된 방법을 사용하여 더 큰 부피의 샘플로부터 미세소포체를 농축시킴으로써 증가될 수 있고; 4) 자연적으로 생물학적 샘플 내에서 발견되는 단백질, 지질, 세포 데브리스, 세포 및 다른 잠재적 오염 물질 및 PCR 억제제가 핵산 추출 단계 이전에 배제된다는 점에서 추출된 핵산은 더욱 순수하거나, 품질/완전성이 더 높고; 5) 단리된 미세소포체 분획의 부피가 출발 샘플 부피의 것보다 더 작을 수 있고, 이로써, 작은 부피의 칼럼 필터를 사용하여 상기 분획 또는 펠릿으로부터 핵산을 추출할 수 있으므로, 핵산 추출 방법에서 더 많은 선택 사항이 사용될 수 있다.
- [0071] 생물학적 샘플로부터 미세소포체를 단리시키는 여러 방법이 관련 기술분야에 기술되어 왔다. 예를 들어, 분별 원심분리 방법은 라포소(Raposo) 등의 논문 (Raposo et al., 1996), 스콕(Skog) 등의 논문 (Skog et al., 2008) 및 닐슨(Nilsson) 등의 논문 (Nilsson et al., 2009)에 기술되어 있다. 이온 교환 및/또는 젤 투과 크로마토그래피 방법은 미국 특허 번호 6,899,863 및 6,812,023에 기술되어 있다. 수크로스 밀도 구배 또는 세포 소기관 전기영동 방법은 미국 특허 번호 7,198,923에 기술되어 있다. 자성 활성화 세포 분류 방법 (MACS)은 테

일러(Taylor) 및 게르셀 테일러(Taylor)의 논문 (Taylor and Gercel-Taylor, 2008)에 기술되어 있다. 나노막 한외여과 농축 방법은 체루반키(Cheruvanki) 등의 논문 (Cheruvanki et al., 2007)에 기술되어 있다. 퍼콜(Percoll) 구배 단리 방법은 미란다(Miranda) 등의 공개 문현 (Miranda et al., 2010)에 기술되어 있다. 추가로, 미세소포체는 미세유체 장치에 의해 대상체의 체액으로부터 확인 및 단리될 수 있다 (Chen et al., 2010). 핵산 바이오마커의 연구 및 개발 뿐만 아니라, 그의 상업적 적용에서, 일관되고, 신뢰가능하며, 실용적인 방식으로 생물학적 샘플로부터 고품질 핵산을 추출하는 것이 바람직할 수 있다.

[0072] 그러므로, 본 발명의 목적은 생물학적 샘플, 예컨대, 체액으로부터 핵산 함유 입자를 빠르고 쉽게 단리시키고, 단리된 입자로부터 고품질 핵산을 추출하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 방법은 실험실 또는 임상 환경에서, 또는 현장에서 사용하기 위한 콤팩트 장치 또는 계기로 적합화 및 도입하는 데 적합할 수 있다.

[0073] 일부 실시양태에서, 샘플은 생물학적 샘플로부터 핵산, 예컨대, DNA, 및/또는 RNA를 단리 및 추출하기 이전에 미리 처리되지 않는다.

[0074] 일부 실시양태에서, 단리 이전에 샘플에 대해 사전 처리 단계를 수행하고, 미세소포체의 정제 또는 강화를 수행하여 생물학적 샘플 중에 존재하는 원치않는 큰 입자, 세포 및/또는 세포 데브리스 및 다른 오염 물질을 제거한다. 1회 이상의 원심분리 단계 (예컨대, 분별 원심분리) 또는 1회 이상의 여과 단계 (예컨대, 한외여과), 또는 그의 조합을 통해 사전 처리 단계를 달성할 수 있다. 1회 초과의 원심분리 사전 처리 단계를 수행할 경우, 생물학적 샘플을 먼저 더 낮은 저속도로 원심분리시킨 후, 더 높은 고속도로 원심분리시킬 수 있다. 원하는 경우, 추가로 적합한 원심분리 사전 처리 단계를 수행할 수 있다. 1회 이상의 원심분리 사전 처리 단계에 대한 대안으로 또는 그에 대한 추가 방식으로, 생물학적 샘플을 여과할 수 있다. 예를 들어, 생물학적 샘플을 먼저 20,000 g로 1시간 동안 원심분리시켜 원치않는 큰 입자를 제거할 수 있고; 이어서, 예를 들어, 0.8  $\mu\text{m}$  필터를 통해 샘플을 여과할 수 있다.

[0075] 일부 실시양태에서, 샘플을 미리 여과하여 0.8  $\mu\text{m}$ 를 초과하는 입자를 배제시킨다. 일부 실시양태에서, 샘플은 첨가제, 예컨대, EDTA, 소듐 시트레이트, 및/또는 시트레이트-포스페이트-텍스트로스를 포함한다. 헤파린은 RT-qPCR 및 다른 핵산 분석에 부정적인 영향을 미칠 수 있기 때문에, 샘플은 헤파린을 함유하지 않는 것이 바람직하다. 일부 실시양태에서, 정제 및/또는 핵산 단리 및/또는 추출 이전에 샘플을 완충제와 함께 혼합한다. 일부 실시양태에서, 완충제는 XBP 완충제이다.

[0076] 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시키기 이전 또는 그 이후에 1회 이상의 원심분리 단계를 수행하여 미세소포체를 분리하고, 생물학적 분획으로부터 단리된 미세소포체를 농축시킨다. 예를 들어, 샘플을 4°C에서 1시간 동안 20,000 g로 원심분리한다. 원치않는 큰 입자, 세포 및/또는 세포 데브리스를 제거하기 위해, 샘플을 약 100–500 g, 바람직하게는, 약 250–300 g의 저속도로 원심분리시킬 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 샘플을 더 높은 고속도로 원심분리시킬 수 있다. 적합한 원심분리 속도는 최대 약 200,000 g; 예를 들어, 약 2,000 g 내지 약 200,000 g 미만이다. 약 15,000 g 초과 내지 약 200,000 g 미만, 또는 약 15,000 g 초과 내지 약 100,000 g 미만, 또는 약 15,000 g 초과 내지 약 50,000 g 미만인 속도가 바람직하다. 약 18,000 g 내지 약 40,000 g 또는 약 30,000 g; 및 약 18,000 g 내지 약 25,000 g인 속도가 더욱 바람직하다. 약 20,000 g인 원심분리 속도가 특히 바람직하다. 일반적으로, 적합한 원심분리 시간은 약 5분 내지 약 2시간, 예를 들어, 약 10분 내지 약 1.5시간, 또는 더욱 바람직하게는, 약 15분 내지 약 1시간이다. 약 0.5시간인 시간이 바람직할 수 있다. 때로는 생물학적 샘플을 약 0.5시간 동안 약 20,000 g로 원심분리시키는 것이 바람직하다. 그러나, 상기 속도 및 시간은 임의 조합으로 적합하게 사용될 수 있다 (예컨대, 약 10분 내지 약 1.5시간 동안, 또는 약 15분 내지 약 1시간 동안, 또는 약 0.5시간 동안 약 18,000 g 내지 약 25,000 g, 또는 약 30,000 g 내지 약 40,000 g 등). 원심분리 단계 또는 단계들은 주변 온도 미만인 온도, 예를 들어, 약 0–10°C, 바람직하게 약 1–5 °C, 예컨대, 약 3 °C 또는 약 4°C에서 수행될 수 있다.

[0077] 일부 실시양태에서, 1회 이상의 여과 단계는 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시키기 이전 또는 그 이후에 수행된다. 크기가 약 0.1 내지 약 1.0  $\mu\text{m}$  범위인, 바람직하게는, 약 0.8  $\mu\text{m}$  또는 0.22  $\mu\text{m}$ 인 필터가 사용될 수 있다. 여과는 또한 세공성을 감소시켜가면서 필터를 사용하여 연속 여과를 통해 수행될 수 있다.

[0078] 일부 실시양태에서, 크로마토그래피 단계 동안, 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시키기 이전 또는 그 이후에 처리하고자 하는 샘플의 부피를 감소시키기 위해 1회 이상의 농축 단계를 수행한다. 고속도로, 예컨대, 10,000 내지 100,000 g로 샘플을 원심분리하여 농축시켜 미세소포체를 침강시킬 수 있다. 이는 연속 분별 원심분리로 이루어질 수 있다. 수득된 펠릿 중의 미세소포체는 후속 공정 단계에 적합한 완충제 중에서 더 작은 부피로 재구성될 수 있다. 농축 단계는 또한 한외여과에 의해 수행될 수 있다. 실제로, 상기 한외여과는 생물학적 샘플

을 농축시킬 뿐만 아니라, 미세소포체 분획의 추가 정제를 수행한다. 또 다른 실시양태에서, 여과는 한외여과, 바람직하게는, 접선 한외여과이다. 접선 한외여과는 결정된 컷 오프 역치의 막에 의해 분리된, 두 구획(여액 및 보유액) 사이의 용액을 농축시키고, 분획화하는 것으로 이루어진다. 분리는 보유액 구획에 유체를 가하고, 상기 구획과 여액 구획 사이에 막통과 압력을 가함으로써 수행된다. 한외여과를 수행하는 데에는 다양한 시스템, 예컨대, 나선 막(밀리포어, 아미콘(Amicon)), 평평한 막 또는 중공사(아미콘, 밀리포어, 사르토리우스, 팔, GF, 세프라코르(Spracor))가 사용될 수 있다. 본 발명의 범주 내에서, 컷 오프 역치가 1,000 kDa 미만, 바람직하게는, 100 kDa 내지 1,000 kDa, 또는 더욱더 바람직하게는, 100 kDa 내지 600 kDa인 막을 사용하는 것이 이롭다.

[0079] 일부 실시양태에서, 1회 이상의 크기 배제 크로마토그래피 단계 또는 겔 투과 크로마토그래피 단계는 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시키기 이전 또는 그 이후에 수행된다. 겔 투과 크로마토그래피 단계를 수행하기 위해, 실리카, 아크릴아미드, 아가로스, 데스트론, 에틸렌 글리콜-메타크릴레이트 공중합체 또는 그의 혼합물, 예컨대, 아가로스-데스트론 혼합물로부터 선택되는 지지체가 바람직하게 사용된다. 예를 들어, 상기 지지체로는 슈퍼덱스(SUPERDEX)® 200HR (파마시아(Pharmacia)), TSK G6000 (토소하스(TosoHaas)) 또는 세파크릴(SEPHACRYL)® S (파마시아)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0080] 일부 실시양태에서, 1회 이상의 친화성 크로마토그래피 단계는 생물학적 샘플을 포획 표면과 접촉시키기 이전 또는 그 이후에 수행된다. 일부 미세소포체는 특정 표면 분자를 특징으로 할 수 있다. 미세소포체는 세포 혈장 막의 출아로부터 형성되기 때문에, 이러한 미세소포체는 대개 그의 기원이 되는 세포 상에서 발견되는 것과 동일한 표면 분자들 다수를 공유한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "표면 분자"는 총칭하여 미세소포체의 표면 상에서, 또는 그의 막에서, 또는 막 상에서 발견되는 항원, 단백질, 지질, 탄수화물, 및 마커를 지칭한다. 이를 표면 분자는 예를 들어, 수용체, 종양 연관 항원, 막 단백질 변형물(예컨대, 글리코실화된 구조체)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 종양 세포로부터 출아된 미세소포체는 대개 그의 세포 표면 상에 종양 연관 항원을 제시한다. 따라서, 특정 공여자 세포 유형으로부터 특정 미세소포체 집단을 단리, 확인, 및/또는 강화시키는데 친화성 크로마토그래피 또는 친화성 배제 크로마토그래피 또한 본원에서 제공되는 방법과 함께 조합하여 사용될 수 있다 ([Al-Nedawi et al., 2008]; [Taylor and Gercel-Taylor, 2008]). 예를 들어, 종양(악성 또는 비-악성) 미세소포체는 종양 연관 표면 항원을 보유하며, 상기의 특이적 종양 연관 표면 항원을 통해 검출, 단리 및/또는 강화될 수 있다. 한 예에서, 표면 항원은 혈액학적 세포 기원의 것이 아닌, 폐, 결장직장, 유방, 전립선, 두부경부, 및 간 기원의 암종으로부터의 미세소포체에 특이적인 상피 세포 부착 분자(EpCAM)이다 ([Balzar et al., 1999]; [Went et al., 2004]). 추가로, 종양-특이적 미세소포체는 또한 특정 표면 마커, CD80 및 CD86의 부족을 특징으로 할 수 있다. 이러한 경우, 상기 마커를 포함하는 미세소포체는 예컨대, 친화성 배제 크로마토그래피에 의해 종양 특이적 마커의 추가 분석에 대하여 배제될 수 있다. 예를 들어, 상이한 지지체, 수지, 비드, 항체, 암타마, 암타마 유사체, 분자 각인 중합체, 또는 미세소포체 상의 원하는 표면 분자를 특이적으로 표적화하는, 관련 기술분야에 공지된 다른 분자를 사용하여 친화성 크로마토그래피를 수행할 수 있다.

[0081] 임의적으로, 대조군 입자는 미세소포체 단리 또는 핵산 추출 이전에 샘플에 첨가될 수 있고, 이는 미세소포체 정제 및/또는 핵산 추출의 효율 또는 품질을 평가하기 위한 내부 대조군으로서의 역할을 할 수 있다. 본원에 기술된 방법은 효율적인 단리 및 미세소포체 분획과 함께 대조군 입자를 제공한다. 이를 대조군 입자는 Q-베타 박테리오파지, 바이러스 입자, 또는 자연적으로 발생될 수 있는, 또는 재조합 DNA 기술에 의해 조작될 수 있는 대조군 핵산(예컨대, 적어도 1개의 대조군 표적 유전자)을 포함하는 임의의 다른 입자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대조군 입자의 정량은 샘플에 첨가하기 이전에 공지된다. 대조군 표적 유전자는 실시간 PCR 분석을 사용하여 정량화될 수 있다. 대조군 표적 유전자의 정량화를 사용하여 미세소포체 정제 또는 핵산 추출 공정의 효율 또는 품질을 측정할 수 있다.

[0082] 바람직하게는, 대조군 입자는 Q-베타 박테리오파지이며, 이는 본원에서 "Q-베타 입자"로 지칭된다. 본원에 기술된 방법에서 사용되는 Q-베타 입자는 자연적으로 발생된 바이러스 입자일 수 있거나, 또는 바이러스 입자 중 적어도 하나의 성분(예컨대, 게놈 또는 외피 단백질의 일부)은 관련 기술분야에 공지된 재조합 DNA 또는 분자 생물학 기술에 의해 합성된 것인, 재조합 또는 조작된 바이러스일 수 있다. Q-베타는 4개의 바이러스 단백질: 외피 단백질, 성숙 단백질, 용해 단백질 및 RNA 리풀리카제를 코딩하는 3개의 유전자로 이루어진 선형, 단일 가닥 RNA 게놈을 특징으로 하는, 레비비리다에(leviviridae) 과의 구성원이다. 그의 크기가 평균 미세소포체와 유사하기 때문에, Q-베타는 본원에 기술된 바와 같이, 미세소포체를 단리시키는 데 사용된 것과 동일한 정제 방법을 사용하여 생물학적 샘플로부터 쉽게 정제될 수 있다. 추가로, Q-베타 바이러스 단일 가닥 유전자 구조의

낮은 복잡성은 그를 증폭 기반 핵산 검정법에서 대조군으로서 사용하는 데 이롭다. Q-베타 입자는 샘플 중 Q-베타 입자의 양을 정량화하기 위해 검출 또는 측정하고자 하는 대조군 표적 유전자 또는 대조군 표적 서열을 함유한다. 예를 들어, 대조군 표적 유전자는 Q-베타 외피 단백질 유전자이다. Q-베타 입자를 생물학적 샘플에 첨가한 후, 본원에 기술된 추출 방법을 사용하여 생물학적 샘플로부터의 핵산과 함께 Q-베타 입자로부터의 핵산을 추출한다. Q-베타 대조군 표적 유전자의 검출은 예를 들어, 관심 바이오마커(들)와 함께 동시에 RT-PCR 분석에 의해 측정될 수 있다. 10배 희석률로 적어도 2, 3, 또는 4개의 공지된 농도의 대조군 표적 유전자의 표준 곡선을 사용하여 카피수를 측정할 수 있다. 검출되는 카피수 및 첨가되는 Q-베타 입자의 정량을 비교하여 단리 및/또는 추출 공정의 품질을 측정할 수 있다.

[0083] 바람직한 실시양태에서, Q-베타 입자를 핵산 추출 이전에 소변 샘플에 첨가한다. 예를 들어, Q-베타 입자를 한 외여과 이전 및/또는 사전-여과 단계 이후에 소변 샘플에 첨가한다.

[0084] 일부 실시양태에서, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 1,000 또는 5,000개의 Q-베타 입자 카피를 체액 샘플에 첨가한다. 바람직한 실시양태에서, 100개의 Q-베타 입자 카피를 체액 샘플에 첨가한다. Q-베타 입자의 카피수는 표적 세포를 감염시킬 수 있는 Q-베타 박테리오파지의 능력에 기초하여 계산될 수 있다. 따라서, Q-베타 입자의 카피수는 Q-베타 박테리오파지의 콜로니 형성 단위와 상관관계가 있다.

#### 핵산 추출

[0085] 본 발명은 미세소포체의 개선된 단리, 정제, 또는 강화를 위해 포획 표면을 사용하는 것에 관한 것이다. 본원에 개시된 방법은 상기 미세소포체로부터 고품질 핵산을 추출하기 위해 고도로 강화된 미세소포체 분획을 제공한다. 본원에 기술된 방법에 의해 수득된 핵산 추출물은 고품질 핵산 추출물이 요구되거나, 또는 바람직한 다양한 적용에, 예컨대, 질환 또는 의학적 상태의 진단, 예후, 또는 모니터링에서 사용하는 데 유용할 수 있다.

[0086] 미세소포체 내의 핵산이 바이오마커로서의 역할을 한다는 것이 최근 연구를 통해 밝혀졌다. 다른 것 중에서도 특히 예를 들어, WO 2009/100029에는 의학적 진단, 예후 및 요법 평가를 위한 GBM 환자 혈청 중 미세소포체로부터 추출된 핵산의 용도가 기술되어 있다. WO 2009/100029에는 또한 같은 목적의 인간 소변 중 미세소포체로부터 추출된 핵산의 용도가 기술되어 있다. 미세소포체로부터 추출된 핵산의 사용은 생검의 필요성을 잠재적으로 회피하는 것으로 간주되며, 이는 미세소포체 생물학적 성질의 방대한 진단학적 잠재능을 강조한다 (Skog et al., 2008).

[0087] 단리된 미세소포체의 품질 또는 순도가 추출된 미세소포체 핵산의 품질에 직접적으로 영향을 미칠 수 있고, 이어서, 이는 질환 진단, 예후, 및/또는 모니터링을 위한 바이오마커 검정법의 효율 및 감도에 직접적으로 영향을 미친다. 임상 분야에서 정확하고, 고감도인 진단 시험의 중요성을 고려하면, 생물학적 샘플로부터 고도로 강화된 미세소포체 분획을 단리시키는 방법이 요구된다. 이러한 요구를 처리하기 위해, 본 발명은 생물학적 샘플로부터 고품질 핵산을 추출하기 위해 생물학적 샘플로부터 미세소포체를 단리시키는 방법을 제공한다. 본원에 제시된 바와 같이, 고도로 강화된 미세소포체 분획은 본원에 기술된 방법에 의해 생물학적 샘플로부터 단리되고, 여기서 고품질 핵산은 이어서 고도로 강화된 미세소포체 분획으로부터 추출된다. 이러한 고품질의 추출된 핵산은 질환 또는 다른 의학적 상태의 진단, 예후, 및/또는 모니터링을 지원하기 위해 바이오마커의 존재 또는 부재를 측정 또는 평가하는 데 유용하다.

[0088] 본원에서 사용되는 바와 같이, 핵산 추출과 관련하여 "고품질"이라는 용어는 18S 및 28S rRNA를 바람직하게는, 대략 1:1 내지 대략 1:2; 및 더욱 바람직하게는, 대략 1:2의 비율로 검출할 수 있는 추출을 의미한다. 본원에 기술된 방법에 의해 수득되는 고품질 핵산 추출은 또한 RNA 완전성 수가 저단백질 생물학적 샘플 (예컨대, 소변)인 경우, 5 이상, 또는 고단백질 생물학적 샘플 (예컨대, 혈청)인 경우, 3 이상, 및 핵산 수율이 20 ml 저단백질 생물학적 샘플 또는 1 ml 고단백질 생물학적 샘플로부터 50 pg/ml 초파인 것이 이상적이다.

[0089] RNA 분해가 예컨대, 유전자 발현 및 mRNA 분석에서 뿐만 아니라, 비-코딩 RNA, 예컨대, 소형 RNA 및 마이크로 RNA의 분석에서 추출된 RNA의 하류 평가에 악영향을 주므로, 이에 고품질 RNA 추출은 바람직할 수 있다. 본원에 기술된 새로운 방법을 통해서 생물학적 샘플로부터 단리된 미세소포체로부터 고품질 핵산을 추출할 수 있고, 이로써 미세소포체 내의 핵산에 대한 정확한 분석을 수행할 수 있다.

[0090] 생물학적 샘플로부터 미세소포체를 단리시킨 후, 핵산을 단리된, 또는 강화된 미세소포체 분획으로부터 추출할 수 있다. 이를 달성하기 위해, 일부 실시양태에서, 미세소포체를 먼저 용해시킬 수 있다. 미세소포체의 용해 및 핵산의 추출은 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법을 이용하여 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 추출은 관련 기술분야에 공지된 표준 방법 및 기술에 따라 페놀:클로로포름을 이용하여 달성될 수 있다. 상기

방법은 또한 미세소포체 내에 함유되어 있는 핵산은 포획하는 데 핵산-결합 칼럼을 이용할 수 있다. 일단 결합하고 나면, 이어서, 핵산을, 핵산과 결합 칼럼 사이의 상호작용을 파괴시키는 데 적합한 용액 또는 완충제를 이용하여 용리시킴으로써 핵산을 성공적으로 용리시킬 수 있다.

[0092] 일부 실시양태에서, 핵산 추출 방법은 또한 생물학적 샘플로부터 고품질 핵산 추출을 막는 유해 인자를 제거 또는 경감시키는 단계를 포함한다. 상기 유해 인자는, 상이한 생물학적 샘플이 다양한 종의 유해 인자를 함유할 수 있다는 점에서 불균질한 것이다. 일부 생물학적 샘플에서, 인자, 예컨대, 과도한 DNA는 상기 샘플로부터의 핵산 추출의 품질에 영향을 줄 수 있다. 다른 샘플에서, 인자, 예컨대, 과도한 내인성 RNase는 상기 샘플로부터의 핵산 추출의 품질에 영향을 줄 수 있다. 이러한 유해 인자를 제거하는 데 많은 작용제 및 방법이 사용될 수 있다. 이러한 방법 및 작용제는 총칭하여 본원에서 "추출 강화 작업"으로 지칭된다. 일부 경우에서, 추출 강화 작업은 핵산 추출 강화제를 생물학적 샘플에 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 유해 인자, 예컨대, 내인성 RNase를 제거하기 위해, 본원에서 정의하는 바와 같은 상기 추출 강화제로는 RNase 억제제, 예컨대, 슈퍼아제-인(Superase-In) (암비온 인크.(Ambion Inc.)로부터 상업적으로 입수가능) 또는 RNase인플러스(RNaseINplus) (프로메가 코포레이션(Promega Corp.)으로부터 상업적으로 입수가능), 또는 유사한 방식으로 작용하는 다른 작용제; (RNase 억제제로서 작용할 수 있는) 프로테아제; DNase; 환원제; 데코이 기질, 예컨대, 합성 RNA 및/또는 캐리어 RNA; RNase에 결합할 수 있는 가용성 수용체; 소형 간섭 RNA (siRNA); RNA 결합 분자, 예컨대, 항-RNA 항체, 염기성 단백질 또는 샤프론 단백질; RNase 변성 물질, 예컨대, 고 오스몰 농도 용액, 계면활성제, 또는 그의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0093] 예를 들어, 추출 강화 작업은 핵산 추출 이전에 RNase 억제제를 생물학적 샘플에, 및/또는 단리된 미세소포체 분획에 첨가하는 것을 포함할 수 있고; 바람직하게는, RNase 억제제 농도는 1  $\mu\text{l}$  이상인 부피의 샘플에 대해 0.027 AU (1X) 초과; 대안적으로, 1  $\mu\text{l}$  이상인 샘플에 대해 0.135 AU (5X) 이상; 대안적으로, 1  $\mu\text{l}$  이상인 샘플에 대해 0.27 AU (10X) 이상; 대안적으로, 1  $\mu\text{l}$  이상인 샘플에 대해 0.675 AU (25X) 이상; 및 대안적으로, 1  $\mu\text{l}$  이상인 샘플에 대해 1.35 AU (50X) 이상이고; 여기서, 1X 농도는, 1  $\mu\text{l}$  이상의 체액으로부터 단리된 미세소포체를 처리하는 데 0.027 AU 이상의 RNase 억제제가 사용되는 효소 조건을 의미하고, 5X 농도는, 1  $\mu\text{l}$  이상의 체액으로부터 단리된 미세소포체를 처리하는 데 0.135 AU 이상의 RNase 억제제가 사용되는 효소 조건을 의미하고, 10X 프로테아제 농도는 1  $\mu\text{l}$  이상의 체액으로부터 단리된 입자를 처리하는 데 0.27 AU 이상의 RNase 억제제가 사용되는 효소 조건을 의미하고, 25X 농도는 1  $\mu\text{l}$  이상의 체액으로부터 단리된 미세소포체를 처리하는 데 0.675 AU 이상의 RNase 억제제가 사용되는 효소 조건을 의미하고, 50X 프로테아제 농도는 1  $\mu\text{l}$  이상의 체액으로부터 단리된 입자를 처리하는 데 1.35 AU 이상의 RNase 억제제가 사용되는 효소 조건을 의미한다. 바람직하게는, RNase 억제제는 프로테아제이며, 이 경우, 1 AU는 분당 1  $\mu\text{mol}$  티로신에 상응하는 폴린-양성 아미노산 및 웹티드를 유리시키는 프로테아제 활성이다.

[0094] 상기 강화제는 다양한 방식으로, 예컨대, RNase 활성을 억제시킴으로써 (예컨대, RNase 억제제), 단백질의 편재적 분해를 통해 (예컨대, 프로테아제), 또는 RNA에 결합하여 그를 보호하는 샤프론 단백질을 통해 (예컨대, RNA-결합 단백질) 그의 기능을 발휘할 수 있다. 모든 경우에서, 상기 추출 강화제는 생물학적 샘플 중에 존재하는, 또는 다르게는, 단리된 입자로부터 핵산의 고품질 추출을 방해 또는 간섭할 수 있는 단리된 입자와 회합된 유해 인자 중 일부 또는 그들 모두를 제거 또는 적어도 경감시킨다.

[0095] 일부 실시양태에서, 추출된 18S 및 28S rRNA의 정량화는 핵산 추출의 품질을 결정하는 데 사용될 수 있다.

#### 핵산 바이오마커의 검출

[0097] 일부 실시양태에서, 추출된 핵산은 DNA, 및/또는 DNA 및 RNA를 포함한다. 추출된 핵산이 DNA 및 RNA를 포함하는 실시양태에서, RNA는 바람직하게는 추가 증폭 이전에 상보성 DNA (cDNA)로 역전사된다. 상기 역전사는 단독으로 또는 증폭 단계와 함께 조합하여 수행될 수 있다. 역전사와 증폭 단계를 조합하는 방법의 한 예로는 역전사 중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)이 있으며, 이는 추가로 정량적인 것, 예컨대, 미국 특허 번호 5,639,606 (이 특허는 상기 교시를 위해 본원에서 참조로 포함된다)에 기술된 바와 같은 정량적 RT-PCR로 변형될 수 있다. 상기 방법의 또 다른 예는 별개의 두 단계: 역전사하여 RNA를 cDNA로 전환시키는 제1 단계 및 정량적 PCR을 이용하여 cDNA의 양을 정량화하는 제2 단계를 포함한다. 하기 실시예에서 입증되는 바와 같이, 본원에 개시된 방법을 사용하여 핵산-함유 입자로부터 추출된 RNA는 리보솜 18S 및 28S rRNA, 마이크로RNA, 운반 RNA, 질환 또는 의학적 상태와 연관된 전사체, 및 의학적 상태의 진단, 예후, 및 모니터링에 중요한 바이오마커를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 많은 종의 전사체를 포함한다.

[0098] 예를 들어, RT-PCR 분석은 각 반응에 대한 Ct (사이클 역치)를 측정한다. RT-PCR에서, 양성 반응은 형광 신호

의 축적에 의해 검출된다. Ct 값은 형광 신호가 역치를 넘는 데 (즉, 배경 수준을 초과하는 데) 필요한 사이클 횟수로서 정의된다. Ct 수준은 샘플 중 표적 핵산, 또는 대조군 핵산의 양에 반비례한다 (즉, Ct 수준이 낮을 수록, 샘플 중 대조군 핵산의 양은 더 많은 것이다).

[0099] 또 다른 실시양태에서, 대조군 핵산의 카피수는 RT-PCR을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술 중 임의의 것을 사용하여 측정될 수 있다. 대조군 핵산의 카피수는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여, 예컨대, 보정, 또는 표준 곡선을 작성 및 사용함으로써 결정될 수 있다.

[0100] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 바이오마커는 하나의 유전적 이상 또는 그의 집합일 수 있고, 이는 본원에서 핵산-함유 입자 내의 핵산 양 뿐만 아니라, 핵산 변이체를 나타내는 데 사용된다. 구체적으로, 유전자 이상으로는 비제한적으로, 한 유전자 (예컨대, 한 온코진) 또는 유전자 패널의 과다발현, 한 유전자 (예컨대, 한 종양 억제 유전자, 예컨대, p53 또는 RB) 또는 유전자 패널의 과소발현, 한 유전자 또는 또는 유전자 패널의 슬라이스 변이체의 선택적 생산, 유전자 카피수 변이체 (CNV) (예컨대, DNA 배가 분) (Hahn, 1993), 핵산 변형 (예컨대, 메틸화, 아세틸화 및 인산화), 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP), 염색체 재배열 (예컨대, 역전, 결실 및 중복), 및 한 유전자 또는 또는 유전자 패널의 돌연변이 (삽입, 결실, 중복, 미스센스, 넌센스, 동의 코돈 (synonymous) 또는 임의의 다른 뉴클레오티드 변이)를 포함하고, 여기서 많은 경우에서, 돌연변이는 최종적으로는 유전자 생성물의 활성 및 기능에 영향을 미치거나, 선택적 전사 스플라이스 변이체 및/또는 유전자 발현 수준의 변화를 유도하거나, 또는 상기 중 임의의 것의 조합 중 임의의 것을 일으킨다.

[0101] 단리된 입자 중에 존재하는 핵산의 분석은 정량적 및/또는 정성적 분석이다. 정량적 분석인 경우, 단리된 입자 내의 특정의 관심 핵산의 상대량 또는 절대량 (발현 수준)을 (하기 기술되는) 관련 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 측정한다. 정성적 분석인 경우, 단리된 미세소포체 내의 특정의 관심 핵산의 종이 야생형인지 또는 변이체인지를 관련 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 확인한다.

[0102] 본 발명은 또한 (i) 대상체의 진단을 지원하기 위한, (ii) 대상체에서 질환 또는 다른 의학적 상태의 진행 또는 재발을 모니터링하기 위한, 또는 (iii) 질환 또는 다른 의학적 상태를 앓고 있거나, 또는 그에 대한 치료가 고려되는 대상체에 대한 치료 효능 평가를 지원하기 위한 것으로서, 본 방법으로부터 수득된 핵산 추출물 중의 하나 이상의 바이오마커의 존재 또는 부재를 측정하고, 하나 이상의 바이오마커가 각각 질환 또는 다른 질환의 진단, 진행 또는 재발, 또는 치료 효능과 연관이 있는 것인, 고품질 핵산 추출을 위해 생물학적 샘플로부터 미세소포체를 단리시키는 새로운 방법의 다양한 용도를 포함한다.

#### 생물학적 샘플로부터 미세소포체를 단리시키기 위한 키트

[0104] 본 발명의 한 측면은 추가로 본원에 개시된 본 방법에서 사용하기 위한 키트에 관한 것이다. 키트는 생물학적 샘플 중에 이 또한 존재하는 원치않는 입자, 데브리스 및 소형 분자로부터, 생물학적 샘플로부터의 미세소포체를 분리시키는 데 충분한 포획 표면 장치를 포함한다. 본 발명은 또한 임의적으로 단리, 및 임의적인 후속 핵산 추출 공정에서의 상기 시약 사용에 관한 설명서를 포함한다.

#### **실시예**

[0106] 본원에서 제공되는 실시예는 원심분리 및/또는 여과 목적으로 사용되는 다양한 막 및 장치를 사용하지만, 이들 방법은 미세소포체를 효율적으로 포획할 수 있고, 그 안에 함유되어 있는 핵산, 특히, RNA를 방출시킬 수 있도록 하는 임의의 포획 표면 및/또는 하우징 장치와 함께 사용될 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

#### **실시예 1: DNA의 EX052 단리 뿐만 아니라, RNA 및 DNA의 공동 단리**

[0108] 본 실시예는 혈장 샘플로부터 모든 DNA를 단리시킬 수 있는 EX052 방법의 능력을 입증한다. 본원에서 제시하는 도면 중 일부에서는 전구체 방법을 본원에서 EX052로 지칭되는 단리 방법과 식별하기 위해 다양한 용어가 사용되었다는 것에 주의하여야 한다. 예를 들어, 일부 도면은 예컨대, 구형 EX052, EX052.1, 및 그의 파생어와 같은 용어를 포함한다. 상기의 초기 버전은 비교로서 및 본 개시내용의 EX052 방법을 사용하여 달성되는 우수한 단리를 입증하기 위해 단독으로 제공된다. EX052.2라는 용어의 사용은 RNA 및 DNA 추출이 단일 튜브에서 수행되는 EX052 방법이다.

[0109] 혈장 샘플로부터 모든 DNA를 단리시키는 데 EX052 칼럼 또한 사용될 수 있다. RNA 이외에도 DNA 단리를 위해 EX052 칼럼을 사용하는 2가지 방법이 도 1 및 도 2에 도시되어 있다. 구체적으로 두 공정 사이의 차이는 용이한 사용, 프로토콜의 간소화, 및 재현성 증가를 위해 EX052에서는 RNA 및 DNA 추출이 하나의 튜브로 조합되어 있다는 점이다. 도 3은 EX050 RNA + DNA (EX052)에서 1.5 Ct를 획득하였다는 것을 보여주는 것이다. EX050은

생물학적 샘플, 예컨대, 예를 들어, 혈장 중 미세소포체로부터 RNA를 단리시키는 방법이다. 이 방법은 PCT 공보 번호 WO2014/107571에 기술되어 있다. 도 4는 상 분리 동안 클로로포름 양 증가를 통해 DNA가 다시 수성 상으로 첨가되고, 이로써, DNA는 일반 EX050 방법으로 공동 단리된다는 것을 보여주는 것이다. 도 5에 제시된 바와 같이, 상 분리 동안의 pH 수준에 대한 추가의 최적화로부터 또한 DNA가 프렙에 첨가된다.

[0110] 따라서, 본 개시내용의 방법은 혈장 샘플로부터 모든 DNA를 단리시키는 데 사용될 수 있다. 상 분리 후, QIA졸 용해물 하부의 소수성 상으로부터 DNA를 회수한다. 본 개시내용의 방법 (예컨대, 2개의 퓨브 또는 EX052에서와 같이 단일 퓨브)은 같은 샘플 부피에 대하여 RNA 및 DNA를 유사한 수준으로 분리하고, RNA 및 DNA는 서로 분리 될 수 있다. 본 개시내용의 방법은 상업적으로 입수가능한 단리 키트, 예컨대, 퀴아젠과 동일하거나, 또는 그 보다 더 많은 mRNA 및 휠씬 더 많은 miRNA를 포획한다.

[0111] EX052는 또한 RNA 및 DNA를 공동으로 정제하는 데 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, EX052는 달리 명시되지 않는 한, 하기 프로토콜을 나타낸다.

[0112] 샘플 제조: EX052 방법을 사용함으로써 0.2 - 4 mL의 혈장 또는 혈청을 이용하여 엑소좀 및 다른 미세소포체로부터 RNA 및 DNA를 단리시킬 수 있다. 오직 미리 여과된 혈장 또는 혈청을 사용함으로써 0.8 μm보다 큰 입자를 배제하는 것이 권장된다. 적합한 혈장 퓨브의 목록은 첨가제 EDTA, 소듐 시트레이트, 및 시트레이트-포스페이트-텍스트로스를 포함하는 혈장을 포함한다. 헤파린을 함유하는 혈장은 RT-qPCR을 억제시킬 수 있다. 단독의, 또는 결합 완충제로 회석된 샘플을 EX052 회전 칼럼 상에 로딩하고, 1 min 동안 500 x g로 회전시킨다. 통과액을 폐기하고, 칼럼을 다시 같은 수집 퓨브 안에 배치한다. 이어서, 세척 완충제를 첨가하고, EX052 칼럼을 5 min 동안 5,000 x g로 회전시켜 칼럼으로부터 잔류 부피를 제거한다. 주의: 원심분리 후, EX052 회전 칼럼을 수집 퓨브로부터 제거함으로써 칼럼은 통과액과 접촉하지 않는다. 이어서, 회전 칼럼을 새 수집 퓨브로 옮기고, 700 μl 퀴아졸을 막에 첨가한다. 이어서, 회전 칼럼을 5 min 동안 5,000 x g로 회전시켜 용해된 엑소좀을 함유하는 균질물을 수집한다. 이어서, 균질물을 PLG 퓨브로 옮긴다.

[0113] 이어서, 350 μl 클로로포름을 균질물을 함유하는 퓨브에 첨가하고, 15 s 동안 왕성하게 진탕시킨다. 이어서, 균질물을 함유하는 퓨브를 실온에서 2-3 min 동안 보존한 후, 4°C에서 5 min 동안 12,000 x g로 원심분리시킨다. 원심분리 후, 다음 원심분리 단계를 위해 같은 원심분리기가 사용될 경우, 원심분리기를 실온 (15-25°C)까지 가열한다.

[0114] 상부의 수성 상을 새 수집 퓨브로 옮겨 놓음으로써 임의의 상간 물질의 이동을 막는다. 이어서, 2 부피의 100% 에탄올을 첨가하고, 원심분리기를 사용하지 않고, 수회에 걸쳐 위아래로 피펫팅함으로써 완전하게 혼합한다. 이어서, 형성될 수 있는 임의의 침전물을 포함하는 700 μl의 샘플을 2 ml 수집 퓨브 (카탈로그 번호 1026497) 중 RN이지 민일루트(RNeasy MinElute) 회전 칼럼으로 피펫팅한 후, 실온 (15-25°C)에서 15 s 동안 ≥8000 x g ( $\geq 10,000$  rpm)로 원심분리한다. 통과액을 폐기한다. 남은 샘플을 사용하여 상기 단계를 반복하고, 통과액을 폐기한다.

[0115] EX052는 생물학적 샘플로부터 DNA를 단리 및 검출하는 데 유용하다. 소포체 RNA는 예컨대, 이환된 조직 중의 살아있는 세포로부터 유래되는 것으로 여겨진다. 무세포 DNA (cfDNA)는 질환 조직 중의 죽은 세포, 예컨대, 고사성 세포로부터 유래되는 것으로 여겨진다. 따라서, cfDNA는 치료학적 반응의 지표로서 유용한 반면, RNA는 증가하고 있는 내성 돌연변이의 지표이다.

[0116] EX052는 충분한 양의 핵산에 대하여 적용될 수 있는 충분하게 고감도인 방법을 제공하므로, 이에 EX052는 혈액 중 희귀 돌연변이를 검출하는 데 유용하다. 생체유체 중 실제 DNA 및 RNA 분자의 양은 매우 제한되어 있으며, EX052는 효과적인 하류 처리 및/또는 분석에 충분할 정도로 소량인 부피로 돌연변이를 검출하는 것과 관련된 혈액 중의 모든 분자를 추출하는 단리 방법을 제공한다.

[0117] 도 13 - 223 (오직 본 실시예에서만 "도면"으로 지칭된다)은 EX052 방법의 특이성 및 감도를 입증한다.

[0118] 본 연구에서는 EX050/52 칼럼이 혈장 중의 모든 DNA에 결합하지만, 단리 방법이 매우 가변적이기 때문에, DNA를 폐울 상으로부터 제거하는 방법을 통해서는 민족스러운 결과를 얻지 못하는 것으로 밝혀졌다. 본원에서 제공되는 방법을 통해 EX050/52 칼럼의 막으로부터 DNA를 재현가능한 방식으로 및 효율적으로 단리 및/또는 추출할 수 있다.

[0119] PLG 퓨브를 이용하여 수행된 Exo52 단리의 3회 반복 실험 중 2회의 실험에서 상업적으로 입수가능한 cfDNA 키트와 거의 동일한 CT 값을 보인다. PLG 퓨브를 이용하지 않은 EX052 단리의 3회 반복 실험 중 1회의 실험에서 cfDNA 키트와 거의 동일한 CT 값을 보인다. 고갈된 혈장 (2x 결합 완충제를 사용하지 않은 혈장의 Exo50 통과

액)은 많은 DNA를 함유하지 못한다 (일반 단리와 18S ~ 9CT의 차이가 난다). 거의 모든 DNA가 Exo50 칼럼에 결합하였다.

[0120] 도면에 제시된 바와 같이, EX052 방법에 클로로포름을 첨가함으로써 RNA 및 DNA 둘 모두를 공동으로 단리시킬 수 있었으며, 클로로포름 첨가가 RNA 검출 또는 단리에 해를 끼치지는 않았다.

[0121] RNA 단리와 관련하여, RNA 특이적 검정법을 사용할 경우, 더 많은 클로로포름을 첨가하는 것이 RNA 단리에는 영향을 미치지 않는 것으로 측정되었다. DNA가 수성 상에 존재하기 때문에, 더 많은 클로로포름을 첨가할 때, DNA 특이적 검정법을 통해 더 낮은 CT를 얻게 될 것이다.

[0122] DNA 단리와 관련하여, 더 많은 클로로포름을 첨가함에 따라, DNA 검출 검정법에 대한 CT는 수성 상 단리에서는 증가하였고, EX052 폐놀 상 DNA 단리에서는 감소하였다.

[0123] 폐놀 상으로부터의 EX050 단리를 통해 그 결과로 가장 낮은 CT 값 (= 가장 높은 DNA 수율)을 얻었다. 90  $\mu\text{l}$  클로로포름을 통해 폐놀 상으로부터 최상의 DNA 수율을 얻었다.

[0124] PLG 튜브를 사용하지 않은 경우에 또한, DNA 오염이 관찰되지 않은 클로로포름 비는 대략 0.13x이었다.

[0125] 도면에 제시된 바와 같이, 350  $\mu\text{l}$ 의 클로로포름은 PC 추출 동안 EX052 칼럼으로부터의 모든 DNA를 수성 상에 첨가하는 데 충분하였다. 클로로포름 양이 많을수록 RNA 단리를 간섭할 수 있다.

[0126] 도면에 제시된 바와 같이, 더 많은 클로로포름을 첨가함에 따라 수성 상에서 DNA 수율은 증가한 반면, 폐놀 상 (EX052 DNA 단리)에서 DNA 수율은 감소하였다. 폐놀 상으로부터의 EX052 DNA 단리와 비교하였을 때, 수성 상으로부터의 DNA 단리가 더 많은 DNA를 수득한다. PLG 튜브를 사용하기 않고 전체 상을 제거하기는 어렵기 때문에, 상부 상을 제거한 후 폐놀 상에 또는 남은 수성 상 중에 여전히 그대로 존재하는 DNA는 거의 없는 것으로 나타났다. DNA 수율은 RT 반응물 (최종 20  $\mu\text{l}$  RT 믹스 중 10  $\mu\text{l}$  EX050 용리액) 및 1:2 희석된 EX050 용리액에서와 유사하다. DNA는 역전사 믹스와 반응하지 않는 것으로 보였다.

[0127] RNA 단독 GAPDH 검정법이 클로로포름 첨가 증가에 의해 영향을 받는지 여부를 알아보기 위해 RNA 단독 GAPDH 검정법을 사용하여 연구를 반복 실시하였다. RNA는 클로로포름 첨가 증가에 의해 영향을 받지 않았다. 또한, GAPDH\_RNA\_DNA 검정법을 사용하여 연구를 실시하였으며, 그 결과, DNA에 의한 RNA 신호 대체는 나타나지 않았다 (~2CT 차이).

[0128] BRAF 검정법 결과, 수성 상 중에 존재하는 DNA를 포함함으로써 EX050 RNA 분획 중의 신호는 2x 증가를 보였다. RNA 카페와 비교하였을 때, 첨가된 카페가 미소하였기 때문에, GAPDH 검정법은 EX050 RNA 분획 중에서 DNA의 뚜렷한 상가 효과를 보이지 않았다. RNA 및 DNA 카페 사이의 이러한 뚜렷한 차이와 관련하여, RNA 신호의 대체는 전혀 관찰할 수 없다.

[0129] 상 분리에서 pH 변화의 효과가 존재할 경우, 그 효과를 측정하는 연구를 실시하였다. pH 조정은 DNA를 수성 상에 첨가하기 위한 대안적 도구를 제공한다. 매우 높은 pH는 RNA 단리를 방해하는 것으로 밝혀졌다.

[0130] 높은 pH는 BA에 문제를 일으키는 것으로 보인다. 예를 들어, 10 N NaOH 샘플로부터의 BA 프로필은 가장 높은 DNA 피크를 보였지만, FU는 매우 낮았다 ([FU]=40과 비교하였을 때, [FU]=2). 높은 pH는 RT 반응에 문제를 일으키는 것으로 보인다. 수성 상 pH를 증가시킨 결과, Exo50 DNA 단리에서 CT 값은 감소하였고, 반면에 EX052 DNA 단리를 통해서는 더 높은 값을 얻었지만, 클로로포름 적정과 비교하였을 때, 폐놀 상에 더 높은 DNA 양이 그대로 남아있었다.

[0131] pH를 감소시켰을 때, EX052 폐놀 상으로부터 DNA를 제거할 수 있고, 수성 상 중에서 강화시킬 수 있었다. RT에서 DNA는 손상되지 않았다. 가장 높은 pH에서 RNA는 손상되었다. BA는 3개의 가장 높은 pH 단계에서 영향을 받았다.

[0132] 도면에 제시된 바와 같이, 클로로포름 첨가가 수성 상의 DNA 함량을 결정하는 데 있어서 지배적인 인자였다. 높은 pH의 양성 효과는 오직 낮은 클로로포름 수준에서만 관찰되었다. RNA 신호는 DNA의 수성 상으로의 첨가에 의해서는 영향을 받지 않았다.

[0133] 도면에 제시된 바와 같이, pH 용액이 DNA 카페수에 미치는 상가 효과는 없었고, 또한, 수성 상으로 DNA를 가져오는 데에는 필요한 클로로포름 양에 있어서 어떤 변화도 필요없었다. 심지어 pH 용액 없이 처리된 샘플과 비교하였을 때, 샘플은 더 낮은 카페수를 얻었다. 90  $\mu\text{l}$ 를 이용하여 처리된 샘플만이 오직 더 높은 카페수를 얻었다. pH 용액 및 더 높은 클로로포름 양이 RNA 단리 (mRNA)에 영향을 주지는 않았다. 전체 적정 동안, pH 용액

액을 이용하여 처리된 샘플은 pH 용액을 이용하지 않고 처리된 샘플과 비교하여 약간 더 낮은 카피수를 얻었다 (단, 90  $\mu\text{l}$  클로로포름 샘플 제외).

[0134] 도면에 제시된 바와 같이, 실온에서의 QIA출 회전은 수성 상 중 DNA 물질의 비율(%)을 증가시켰다. 이는 EX052 방법에서 더 많은 양의 클로로포름을 사용하였을 때에는 그려하지 않았다.

[0135] 퀴아출 원심분리 단계는 수성 상에서 뿐만 아니라, PLG 튜브를 사용하지 않는 샘플에서도 DNA 오염을 유발하였다. 실온에서 원심분리 단계를 수행한 PLG 튜브 샘플은 또한 약간 더 많은 DNA를 보였지만, 카피수는 LQ=32 카피수 미만이었다. 원심분리 단계를 위한 온도가 mRNA 및 miRNA 단리에 영향을 주지는 않았다.

[0136] 실온에서의 퀴아출 회전이 일반 EX052 DNA 단리에 DNA를 첨가하지 않았다. 회전 온도로 지정되는 CT 값에 있어서 어떤 차이도 없었다. 원심분리 단계를 위한 온도가 mRNA 및 miRNA 단리에 영향을 주지는 않았다.

[0137] 도면에 제시된 바와 같이, EX052로부터의 DNA의 RN이지 회전 칼럼에의 결합 및 용리는 1.5x 부피 내지 2.6x 부피 범위에서 에탄올 농도에 의존하지 않았다.

[0138] 도면에 제시된 바와 같이, EX052의 성능은 더 높은 고농도의 에탄올을 사용하였을 때에는 증가하지 않았다. 3 개의 검정법 모두의 CT 값은 전체 에탄올 적정 동안 일정하게 유지되었다. RNA 단리의 사전-컨디셔닝 단계에서 에탄올 농도가 cfDNA의 회수에 영향을 주지 않았다.

[0139] 도면에 제시된 바와 같이, 혈장 샘플의 프로테이나제 K (ProtK) 분해는 구체적으로 RNA로부터의 신호를 손실시켰지만, ProtK 처리는, 모든 샘플에 대해 같은 CT를 수득하였는 바, DNA 수율에는 어떤 영향도 주지 않았다.

[0140] 도면에 제시된 바와 같이, DNA 수율이 여전히 선형으로 증가하였고, 통과액 중에 검출가능한 DNA는 존재하지 않았는 바, EX052의 DNA 로딩 용량이 8 mL 혈장에 도달하지 못했다. 이는 4 mL에 도달하는, 소포체의 선형 로딩 용량과는 대조를 이룬다. 통과액 (FT)에서는 어떤 cfDNA도 검출되지 않았지만, RNA는 2 mL로부터 축적되는 것으로 보였다. RNA가 아닌 DNA의 경우, 샘플 결과는 선형이다. RNA는 DNA와는 상이한 포화점을 가진다. 본 방법에 PLG 튜브를 첨가하였을 때, 수율은 약간 증가한 것으로 나타났다. 상업적으로 입수가능한 CNA 키트와 비교하였을 때, EX052 방법은 RNA 카피를 첨가하였다.

[0141] 일부 실시양태에서, 본 방법은 오직 구아니디늄계 티오시아네이트에만 기초한 추출 완충제를 사용하여 EX052 칼럼으로부터 RNA 및 DNA를 추출한다.

[0142] 도면에 RNA 단리에 대해 제시된 바와 같이, RLT+ 높은 DTT 56°C를 이용하여 수행된 2회의 반복 실험 중 1회에서 예상된 CT 값을 얻었다. 반복 실험 사이의 편차는 로딩 혼합물 첨가 후, RN이지 막이 막힘에 따라 유발된 것일 수 있다. BA 프로파일은 RLT+ 높은 DTT 56°C의 경우, 칼럼 데이터 점 상에 그대로 남아있는 것의 경우, 매우 낮은 RNA 농도를 보였지만, 오직 단 1회의 RNA 단리만이 예상된 CT 값을 얻었다.

[0143] DNA 단리에 대해 도면에 제시된 바와 같이, 올프렙 DNA 칼럼을 통해 DNA 검출 검정법에 대하여 매우 높은 카피 수를 얻었다. 또한, 칼럼 데이터 점 상에 그대로 남아있는 것은 매우 높은 CT 값을 보였다. DNA는 올프렙 DNA 회전 칼럼에 의해 높은 컷 오프 (15-30 kb)에 의해 유발된 손실을 보였다. cfDNA의 크기는 전형적으로 35 bp - 10 kb 범위이다.

[0144] 본 도면은 또한 다양한 DNA 또는 DNA/RNA 단리 방법을 사용하여 마이크로RNA를 단리시키는 것을 보여준다. EX052는 상업적으로 입수가능한 CNA 키트보다 더 많은 mRNA 및 휠센 더 많은 miRNA를 단리시켰고, EX052 및 CNA 키트는 동일한 양의 DNA를 단리시켰다. EX052 방법은 혈장으로부터 모든 DNA를 단리시키는 것으로 보였다.

[0145] 도면에 제시된 바와 같이, EX052는 일관되게 상업적으로 입수가능한 순환 핵산 (CNA) 키트를 능가한다. EX052는 3개의 상이한 혈장 풀, 상이한 CNA 시약 로트, 상이한 오퍼레이터 및 상이한 샘플 공급원에서 CNA 키트보다 더 우수한 수율을 보인다.

[0146] EX052 방법을 사용하여 흑색종 코호트로부터의 샘플 중 cfDNA를 분석하였다. EX052 방법을 이용하여 수득된 결과는 상업적으로 입수가능한 CNA 키트를 이용하여 수득된 결과와 비교하였다. CNA 키트의 검정내 편차 (같은 혈장 샘플의 상이한 시점에서의 단리에 기초한 것)는 EX052 방법을 사용하였을 때 수득된 것보다 더 높았다. 도면에 제시된 바와 같이, EX052 방법의 성능은 상업적으로 입수가능한 키트를 사용하여 수득된 것과 같거나, 또는 그보다 우수하다.

[0147] 도면에 제시된 바와 같이, 350  $\mu\text{l}$  클로로포름을 이용하여 상 분리를 수행한 후, 유기상에는 대략 15% DNA가 남아있었다. 이중 추출을 통해 DNA 수율은 약 15% 점만큼 증가되었다. 90  $\mu\text{l}$  클로로포름 (RNA)을 이용하여 상

분리를 수행한 후, 추가의 260  $\mu\text{l}$  (합계: 350  $\mu\text{l}$  클로로포름)를 이용하여 2차 추출을 수행하였을 때에는 오직, 일반 EX052 DNA 추출과 비교하였을 때, 약 50% DNA 수율을 얻었다. 같은 칼럼 상에서의 컨디셔닝된 EX052 물질의 재로딩이 수율을 개선시키지는 못했다.

**[0148] 실시예 2. 암 혈장으로부터의 엑소좀 RNA 및 무세포 DNA에 대한 1 단계 단리 플랫폼 개발**

암 환자의 혈류 중 순환 핵산은, 조직 생검을 필요로 하지 않으면서, 환자의 질환 상태 및 치료 옵션에 대한 정보를 수득할 수 있는 잠재능을 가지고 있기 때문에, 의료 연구에 있어 큰 관심을 받는다. 돌연변이 분석을 위해 생체유체 사용을 추구하는 임의의 진단 시험은 순환 중 종양 유래 돌연변이의 포획을 최대화시킬 수 있는 플랫폼을 필요로 한다. 혈액 혈장은 적어도 2개의 무세포 핵산 공급원: 아폽토시스 또는 고사 세포로부터 생성된 순환 무세포 DNA (cfDNA), 및 소체에서 세포에 의해 활발하게 분비되는, 엑소좀 (엑소RNA)을 포함하는 세포외 소포체에 포함되어 있는 RNA를 함유한다. 생체유체 중의 핵산의 총량은 매우 제한되어 있고, 돌연변이는 RNA 및 DNA 둘 모두에 반영되는 바와 같이, RT-qPCR에 의한 효과적인 하류 처리 및 NGS에 의한 표적화된 재서열분석에 충분할 정도로 소량인 부피로 혈액 혈장 샘플로부터 엑소RNA 및 cfDNA 모두를 공동으로 단리시키는 방법이 고안되었다.

도 224-226은 하기: (i) 혈액 혈장은 무세포 DNA 이외에도 무세포 RNA를 함유하고; (ii) EX052는 부피가 큰 생체유체로부터 모든 엑소RNA 및 cfDNA 모두를 공동으로 단리시키는 신속하고, 재현가능하며, 편리한 방법이고; (iii) 엑소RNA 및 cfDNA 둘 모두를 사용하는 것이 qPCR 및 NGS에 의한 희귀 돌연변이체 검출에 이용가능한 분자를 배가시킨다는 것을 입증하는, 본원에 제시된 연구를 보여주는 것이다.

도 227 및 228은 전체 순환 핵산을 포획할 수 있는 본원에서 제공되는 EX052 방법의 능력을 도시한 그래프 시리즈이다. EX052 방법을 상업적으로 입수 가능한 순환 핵산 DNA 단리 키트와 비교하였다. 도 227-228에 제시되어 있는 바와 같이, EX052는 모든 cfDNA를 포획하였고, EX052는 cfDNA 단독 대비 엑소RNA 및 cfDNA를 조합한 유의적으로 더 많은 카페를 검출하였다. 도 228은 또한 환자가 오직 cfDNA 분석에만 기초하였을 때에는 바이오마커에 대해 음성인 것으로 확인되었지만, 조합된 DNA 및 RNA 분석을 사용한 경우에 상기 환자는 바이오마커에 대하여 양성인 것으로 확인되었다는 것을 입증한다. 더 많은 카페의 돌연변이 또는 다른 바이오마커가 돌연변이 및 다른 바이오마커를 확인하는 데 있어서 감도 및 정확도를 증강시킨다는 것을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이해할 것이다.

**[0152] 다른 실시양태**

본 발명은 그의 상세한 설명과 함께 연계하여 기술되었지만, 하기 기술 내용은 본 발명의 범주를 제한하는 것이 아니라, 그를 예시하기 위한 의도로 제시된 것이며, 본 발명의 범주는 첨부된 특허청구범위의 범주에 의해 정의된다. 다른 측면, 이점, 및 변형도 하기 범주 내에 포함된다.

## 도면

## 도면1

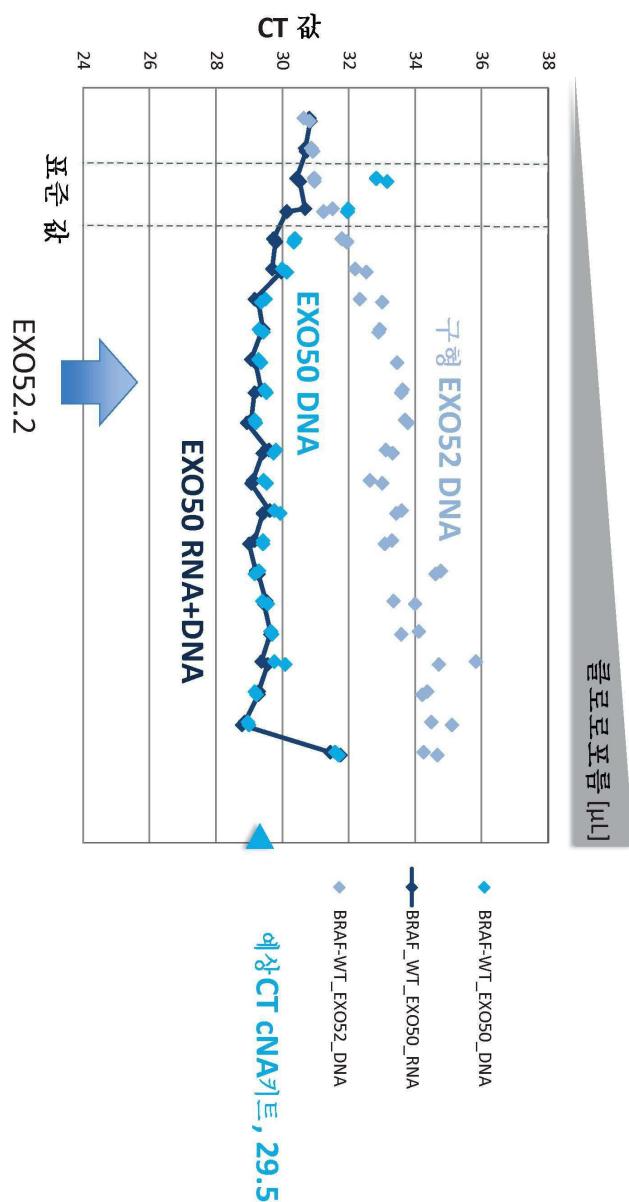


- 푸세포 DNA (cfDNA) & 미세소포체 (MV)의 막 필터에의 결합 & 세척
- 막 상에서의 QIA졸에 의한 용해; RNA/DNA 방출 RNA 프로토콜-(수성 상으로부터의 것)
- PLG 튜브를 이용한 클로로포름 추출
- 에탄올 칸디셔닝
- 실리카 칼럼에의 결합 및 세척
- 용리
- cDNA DNA 프로토콜 -(폐늘 상으로부터의 것)
- PCR • 에탄올 침전
  - 용체 및 프로테아제 분체
  - 실리카 칼럼에의 결합 및 세척
  - 용리
- PCR

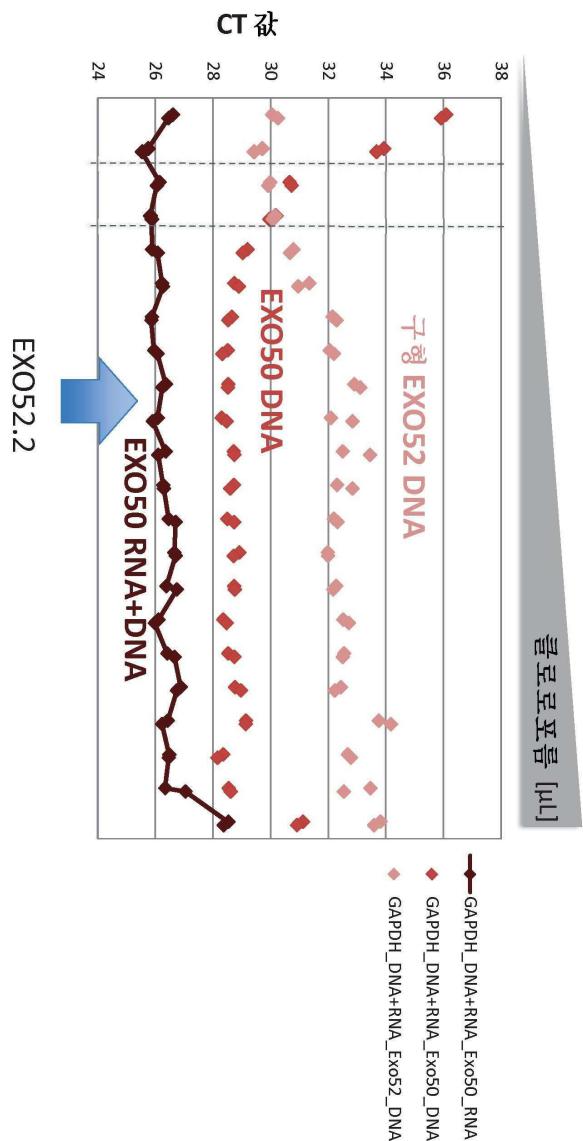
도면2



도면3

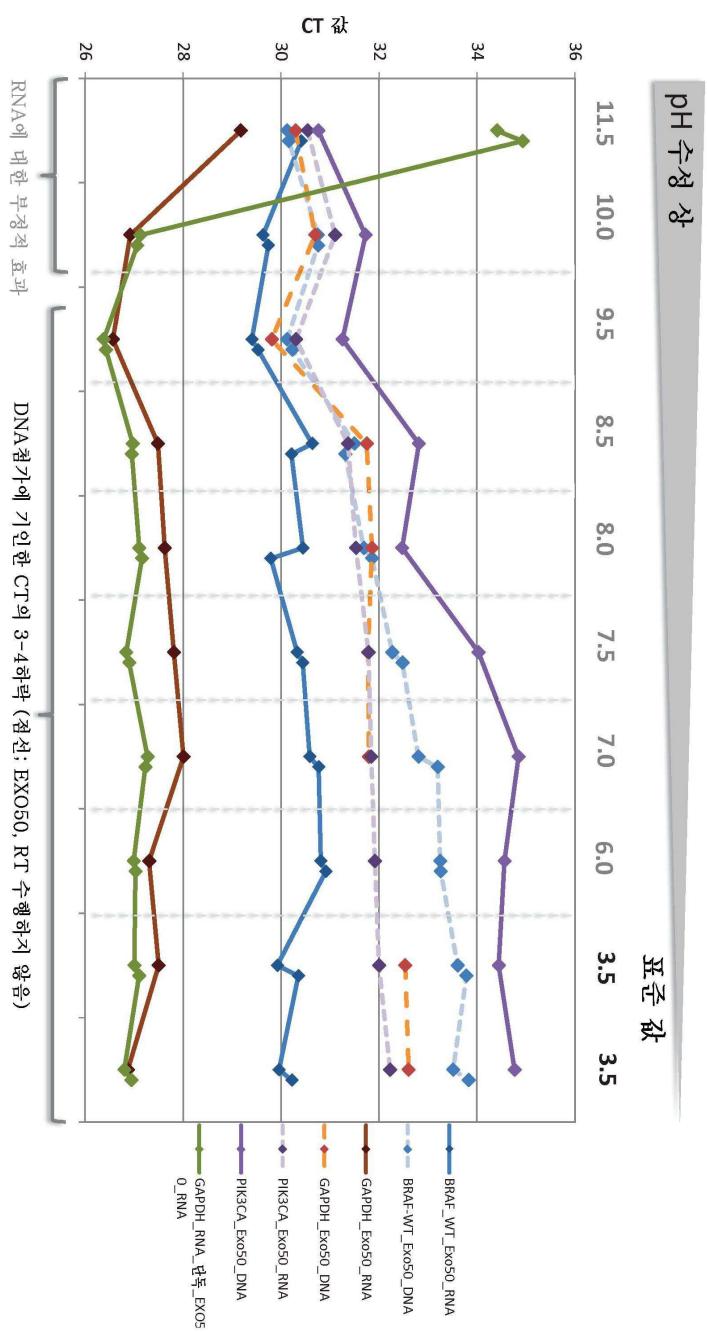


도면4

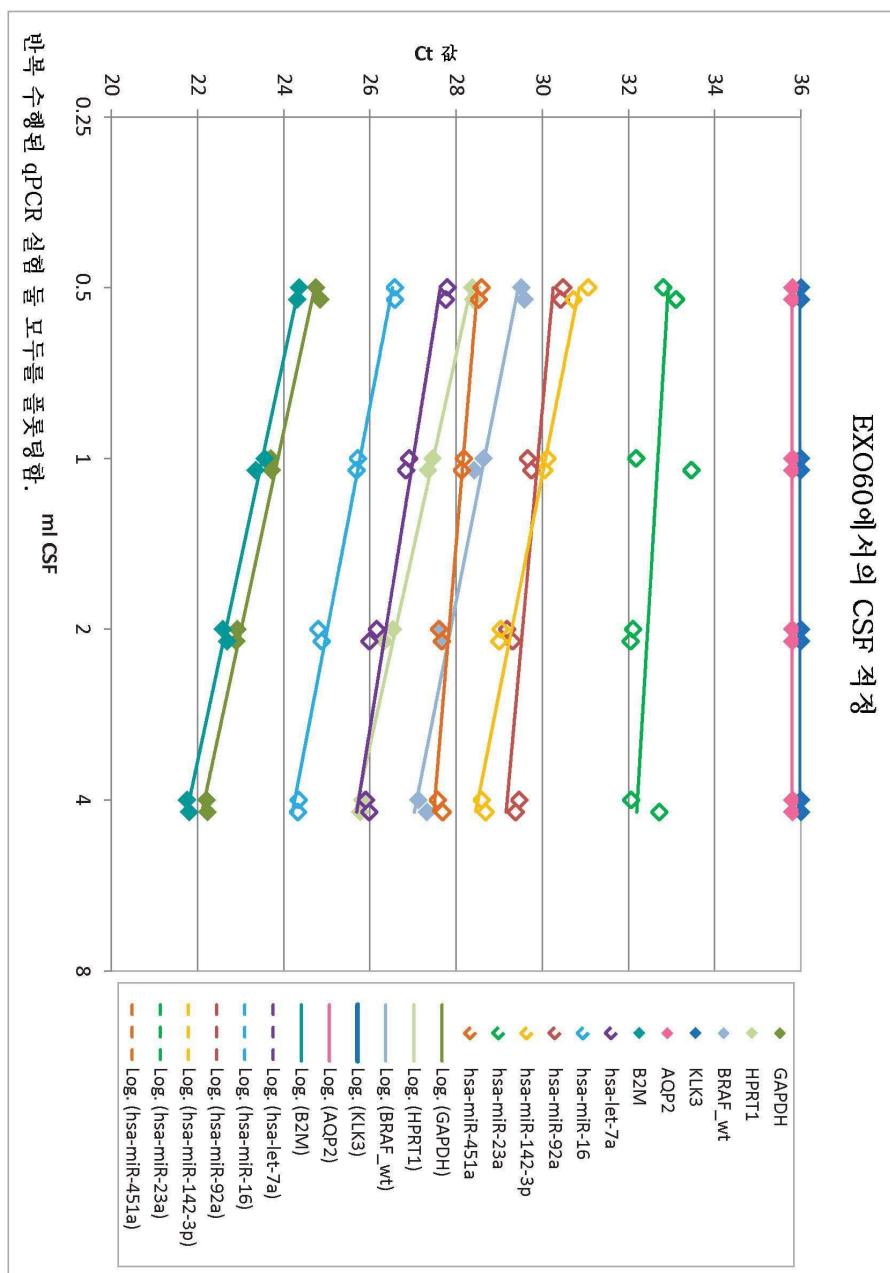


도면5

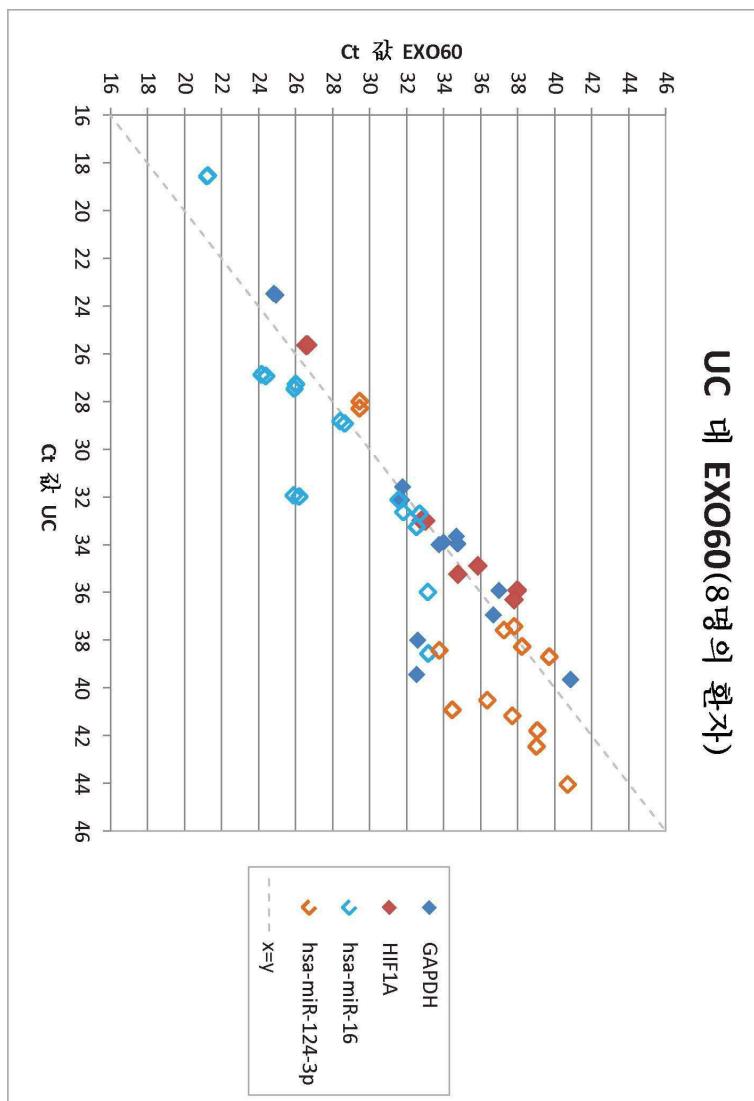
상 분리에서 pH를 조정하여 DNA를 EXO52.5 뜨거워 절가



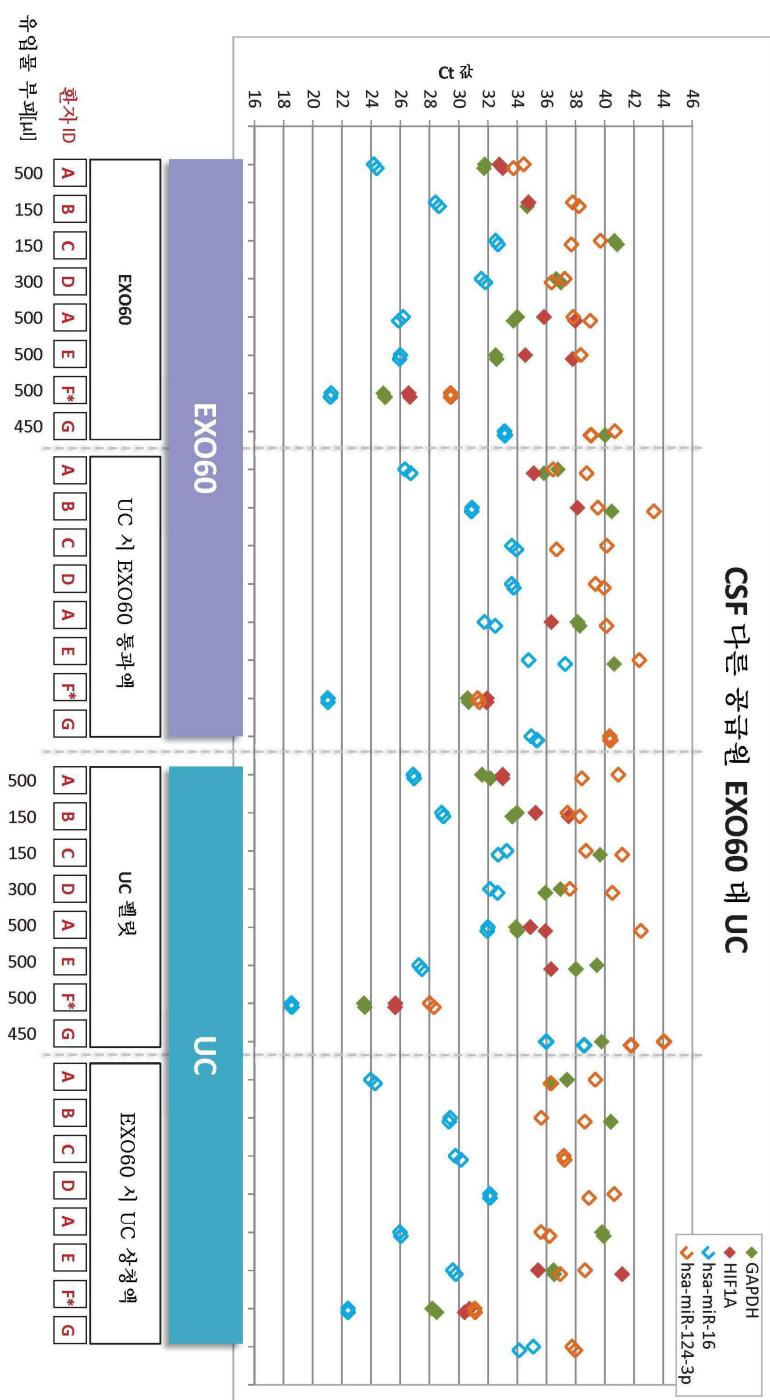
도면6



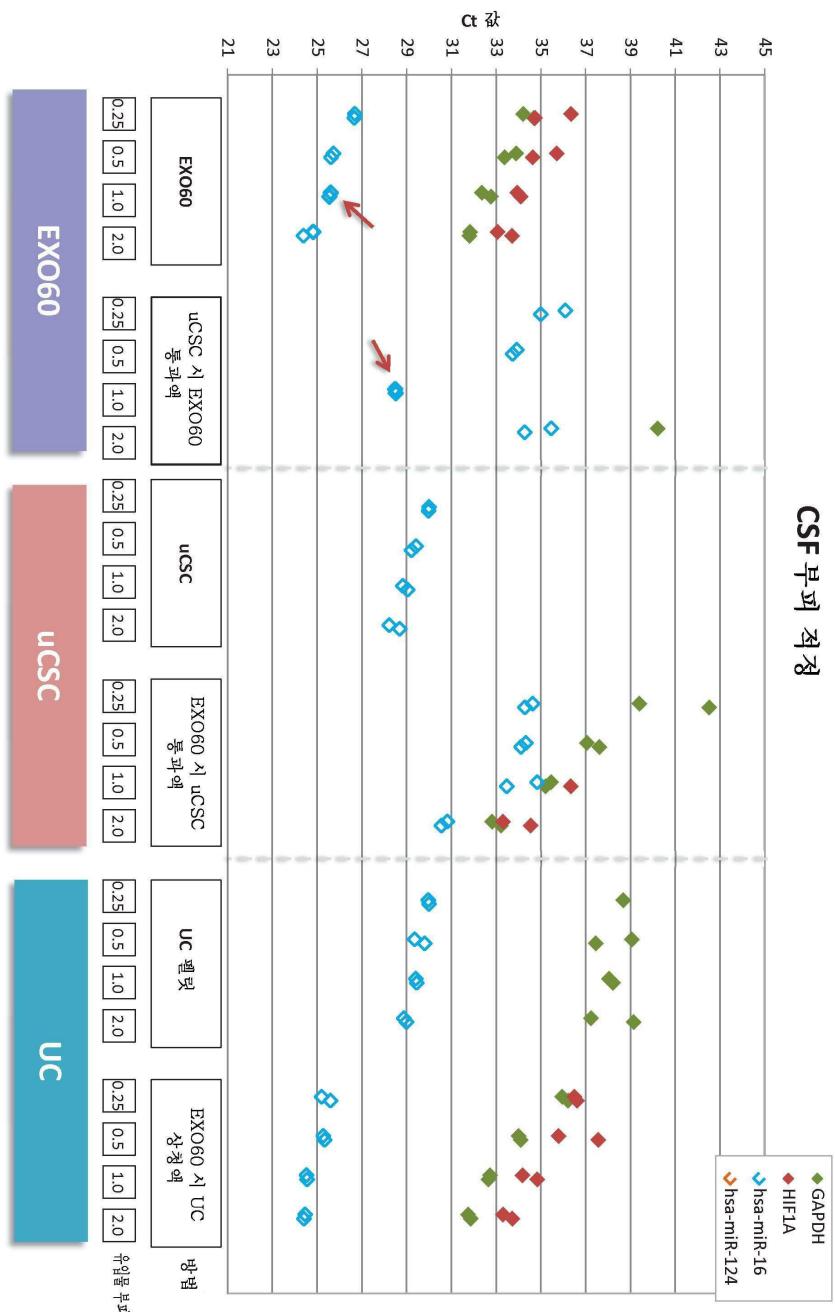
도면7



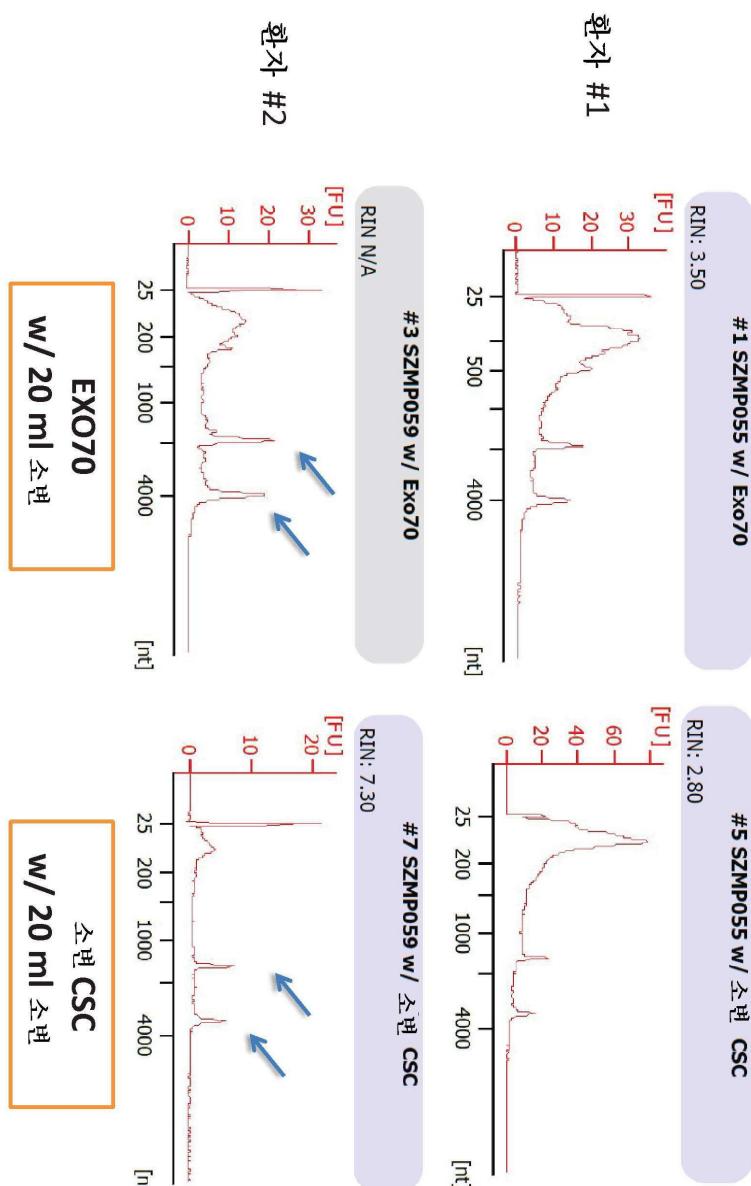
도면8



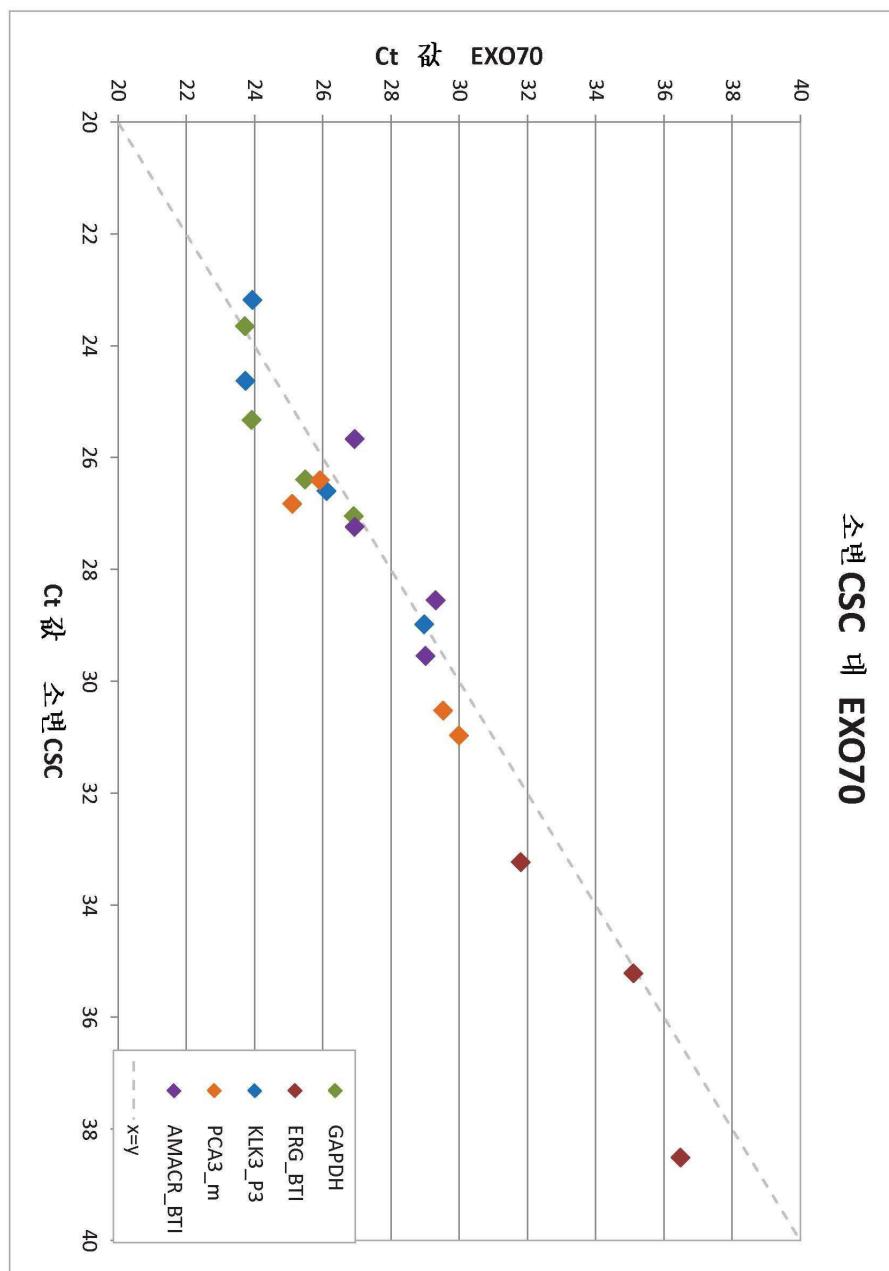
도면9



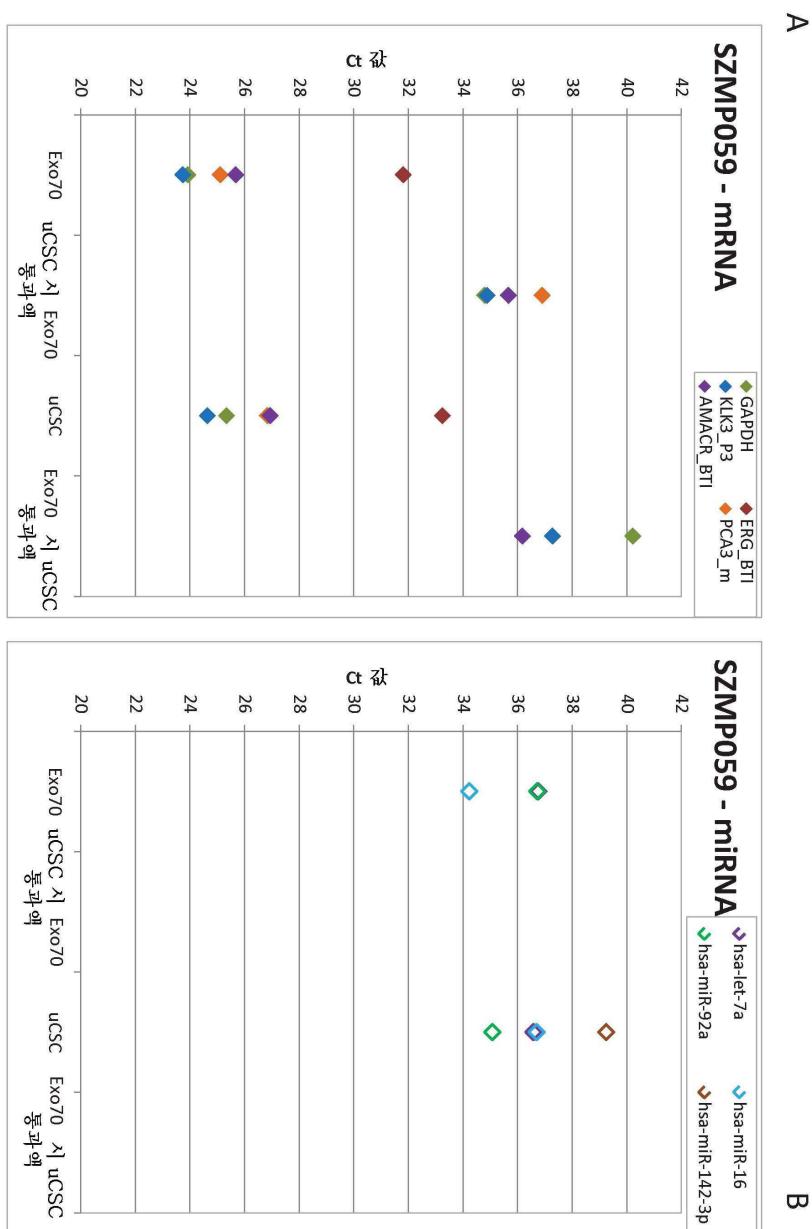
도면10



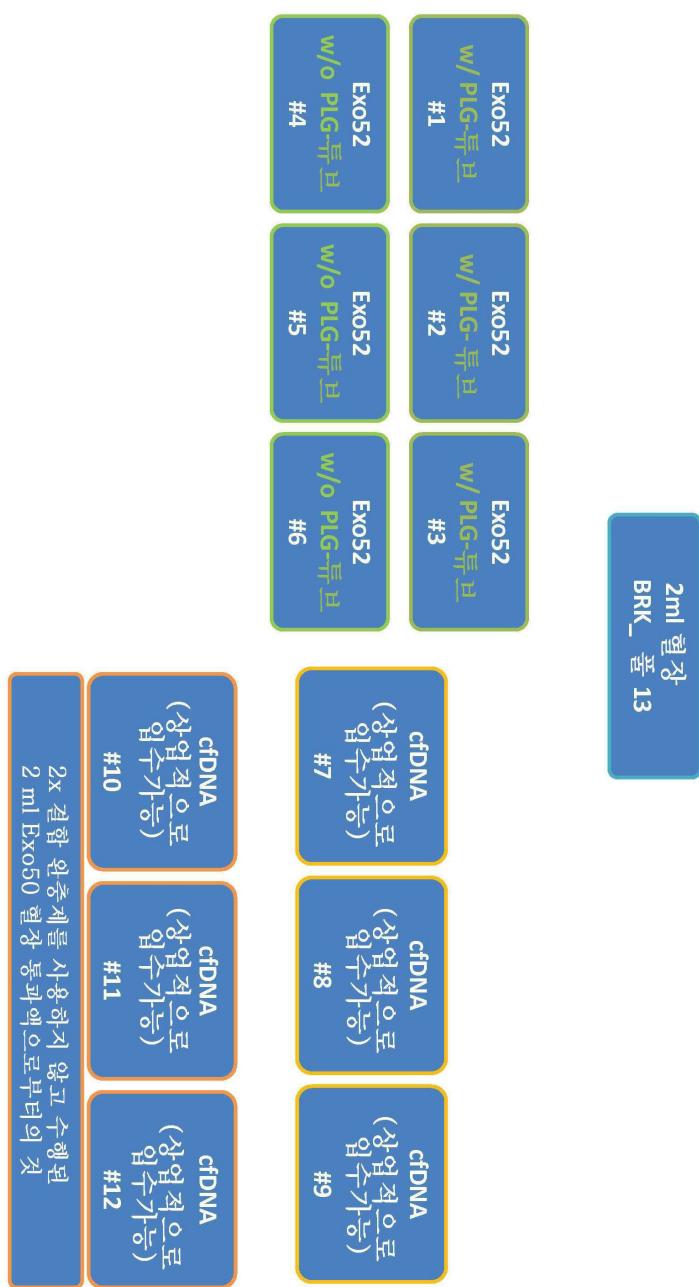
도면11



도면12

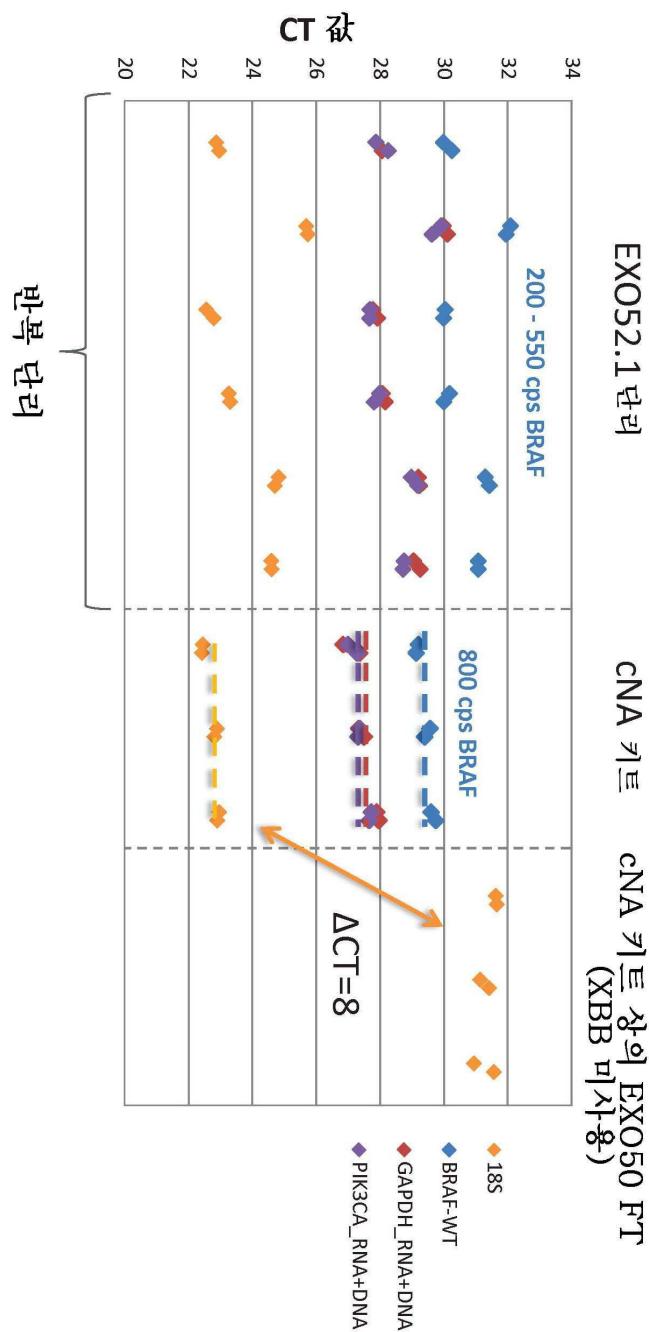


## 도면 13



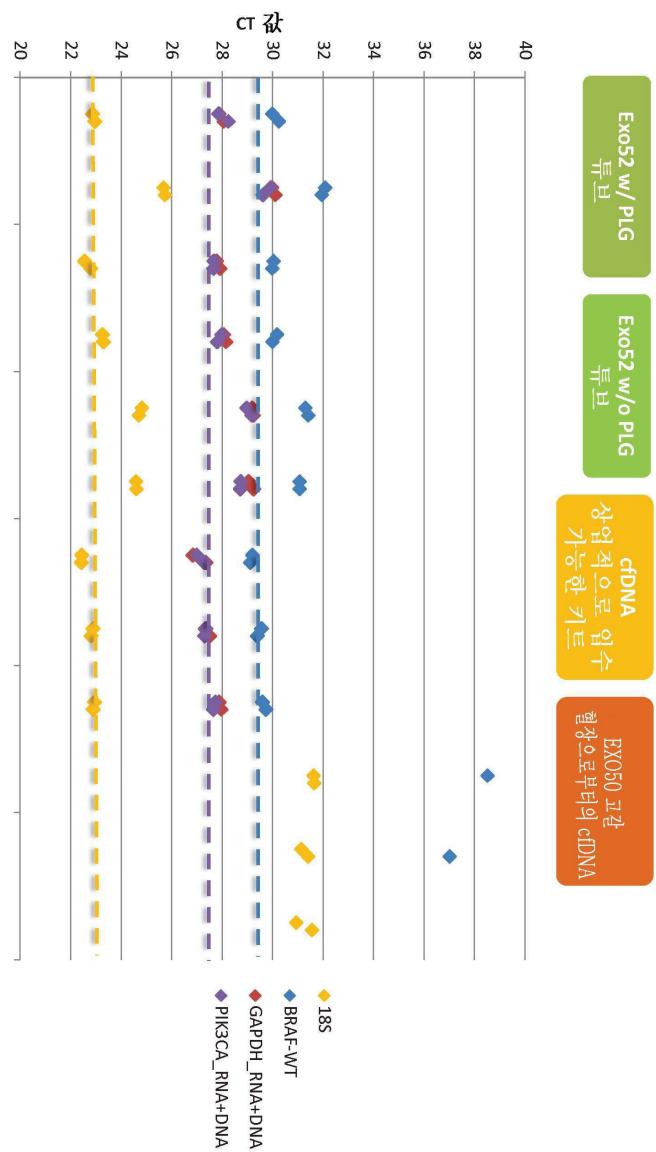
Exo52 프로토콜 최적화 : PLG 튜브를 사용한 및 사용하지 않은 DNA 추출

도면14

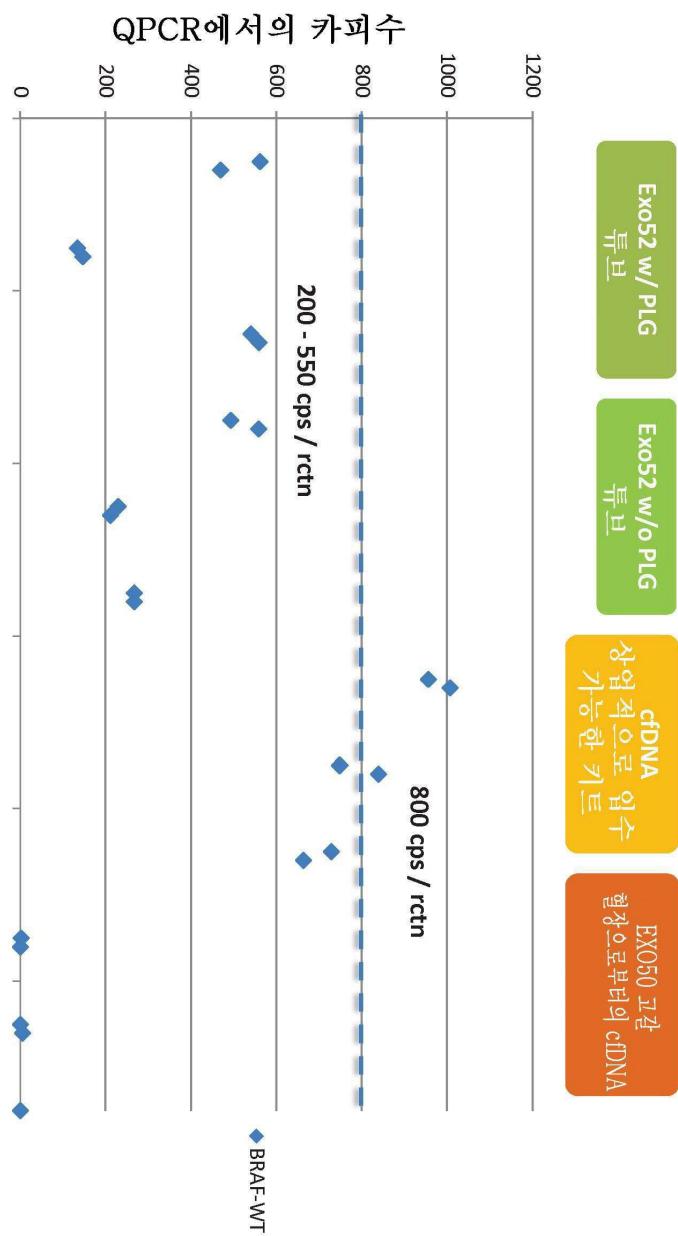


## 도면15

Exo52 프로토콜 최적화: PLG 투보를 사용한 및 사용하지 않은 DNA 추출

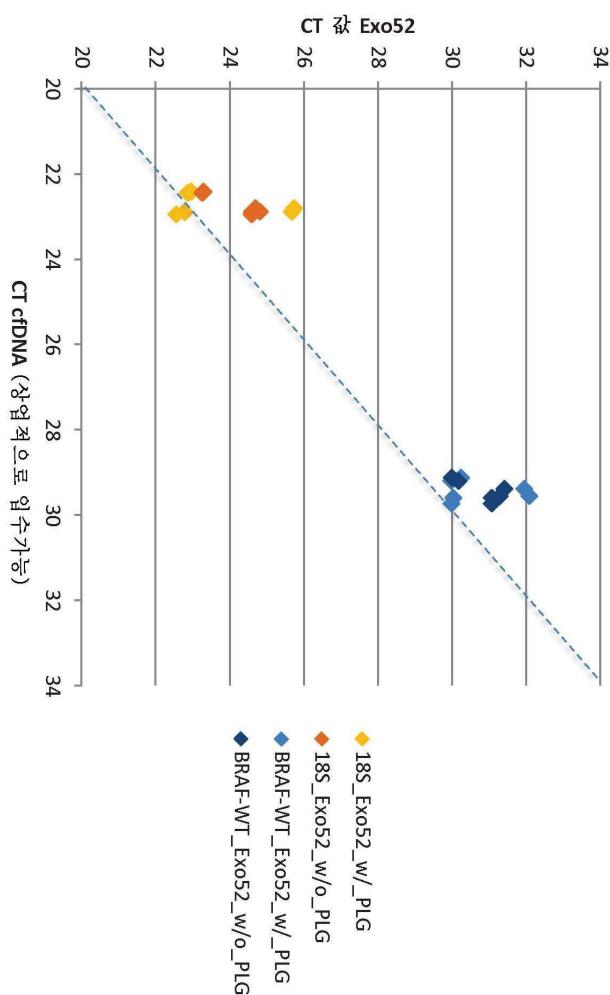


## 도면 16

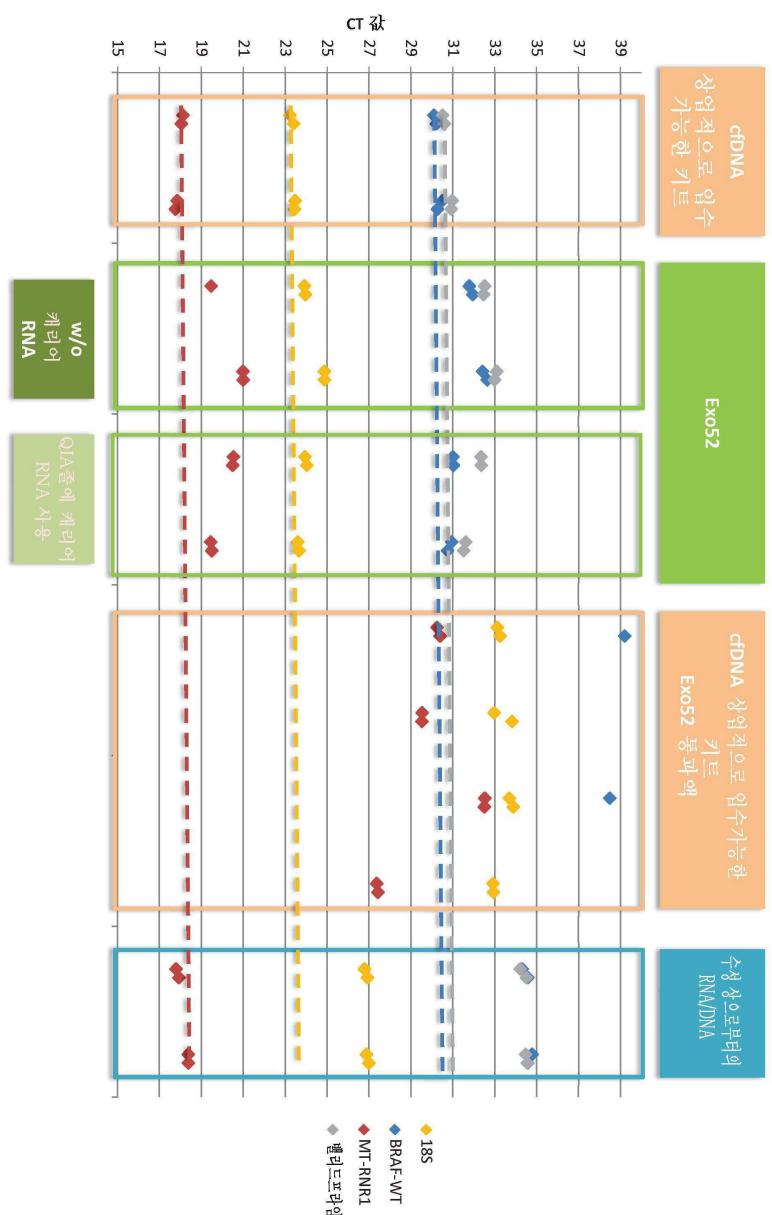


## 도면 17

Exo52 프로토콜 조작: PLG 투보를 사용한 및 사용하지 않은 DNA 추출



## 도면18



## 도면19

## EXO52(ExDx) 대 circNA 키트 – 절대 량

$2^{-\Delta CT}$  및 렐리드프로토임 검정법을 이용하여 DNA 오염 카페 계산  
gDNA 표준물: 0.01 ng DNA당 4개의 카페 → 본 발행자들은 QPCR에서 10 ng = 4000개의 카페 gDNA 표준물을 사용하였다.  
BRAF-WT 검정법은 10 ng 중 약 3500개의 카페인 유사값을 계산한다.



cfdNA  
상업적으로  
입수 가능한 키트

Exo52

cfdNA 상업적으로  
입수 가능한 키트  
Exo52 통과액

수성 상으로부터의  
RNA/DNA

4000 개의 카페

100

1000

900

800

700

600

500

400

300

200

100

0

QPCR에서의 카페수

100

1000

900

800

700

600

500

400

300

0

QPCR에서의 카페수

w/o  
캐리어  
RNA

QIAzol에  
캐리어  
RNA 사용

◆ BRAF-WT  
◆ 렐리드프로토임

300 cps / rctn

500 cps / rctn

900 cps / rctn

0

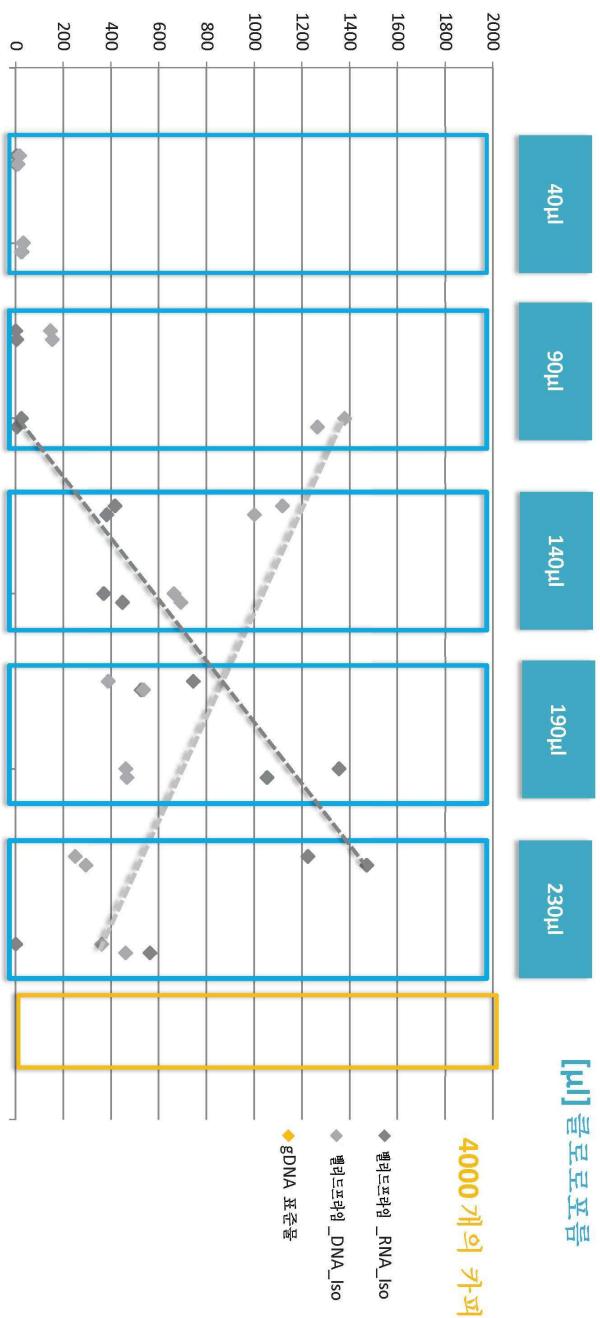
50 cps / rctn

0 cps / rctn

도면20

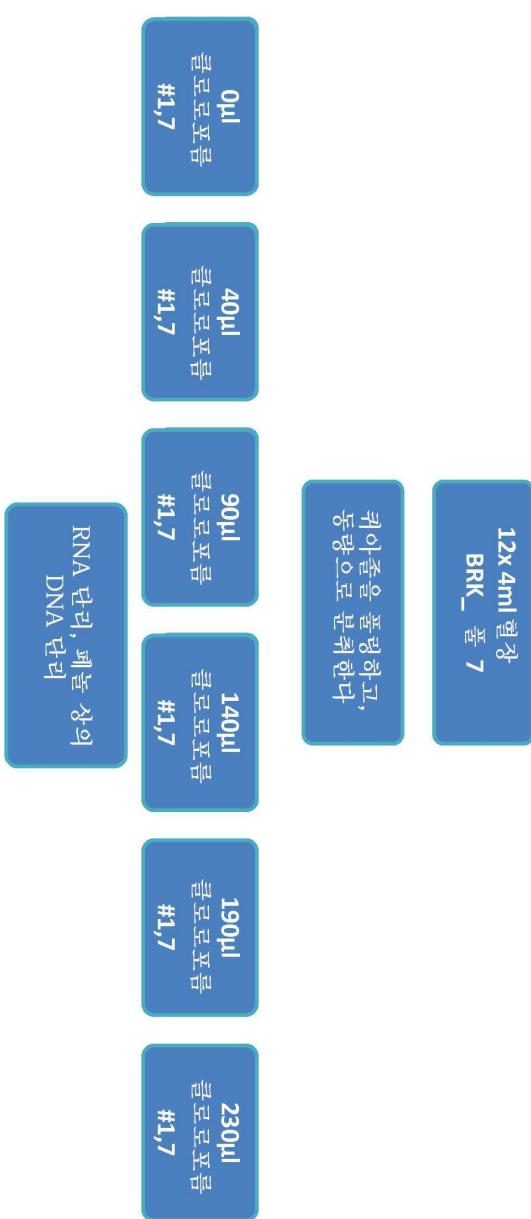
### Ad3 클로로포름 적정:RNA 단리 + 페놀 상의 DNA 단리 (PLG 튜브) 줌 인

$2^{-\Delta CT}$  및 블리드프리임 검정법을 이용하여 DNA 오염 카페 계산  
gDNA 표준물: 0.01 ng DNA 당 4개의 카페  $\rightarrow$  본 팔레트들은 QPCR에서 10 ng = 4000개의 카페 gDNA 표준물을 사용하였다.  
BRAF-WT 검정법은 10 ng 중 약 3500개의 카페인 유사값을 계산한다.



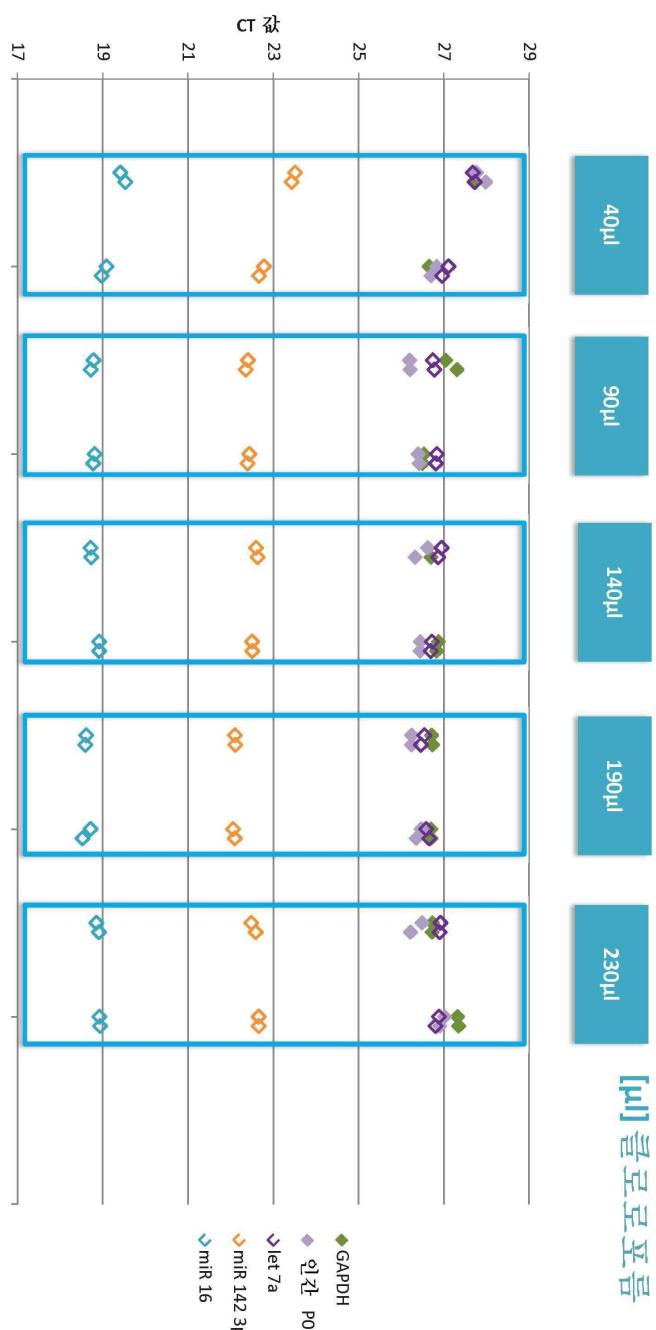
## 도면21

Ad3 클로로포름 석정: RNA 단리 + 폐플 상의 DNA 단리 (PLG 투브)



- 펄터: 흠메 이드 3종
- 완충제
  - 로딩 완충제: 2x 완충제 100 mM 포스페이트 완충제 370 mM NaCl pH 6.5
  - 세척 완충제: 1x 완충제 50 mM 포스페이트 완충제 185 mM NaCl pH 6.5
- 클로로포름 폐플 상으로부터의 DNA 단리

도면22

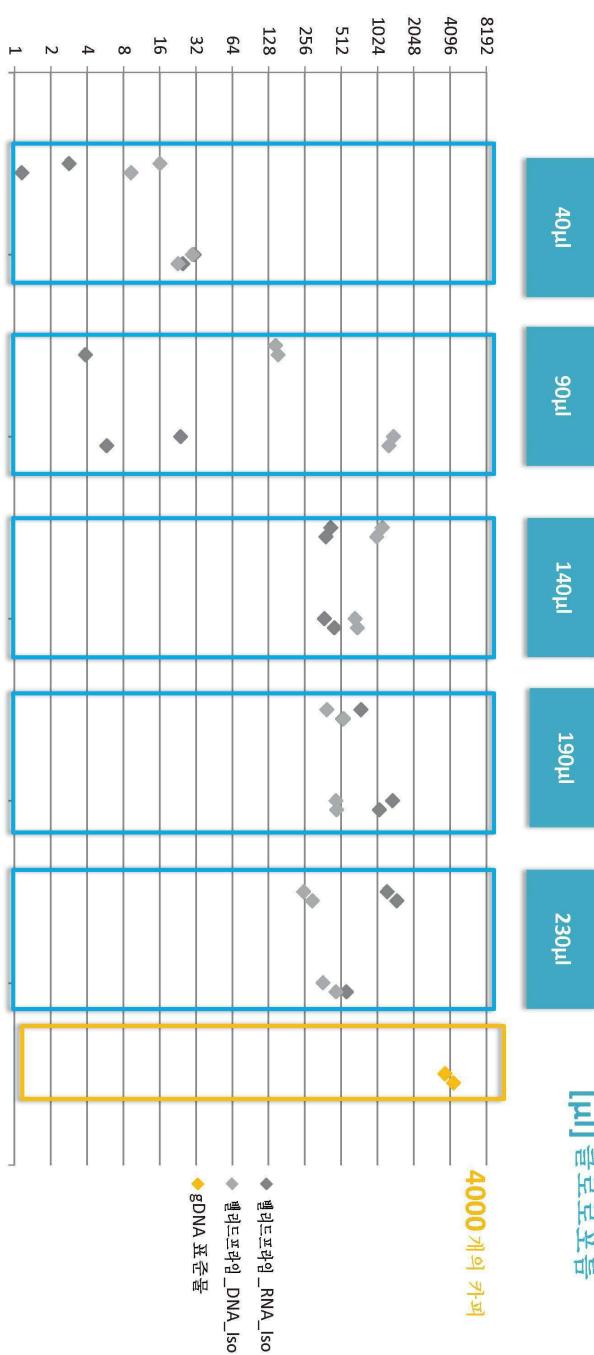


### Ad3 클로로포름 적정: RNA 단리

## 도면23

## Ad3 클로로포름 적정: RNA 단리+폐놀 상의 RNA 단리 (PLG 투보)

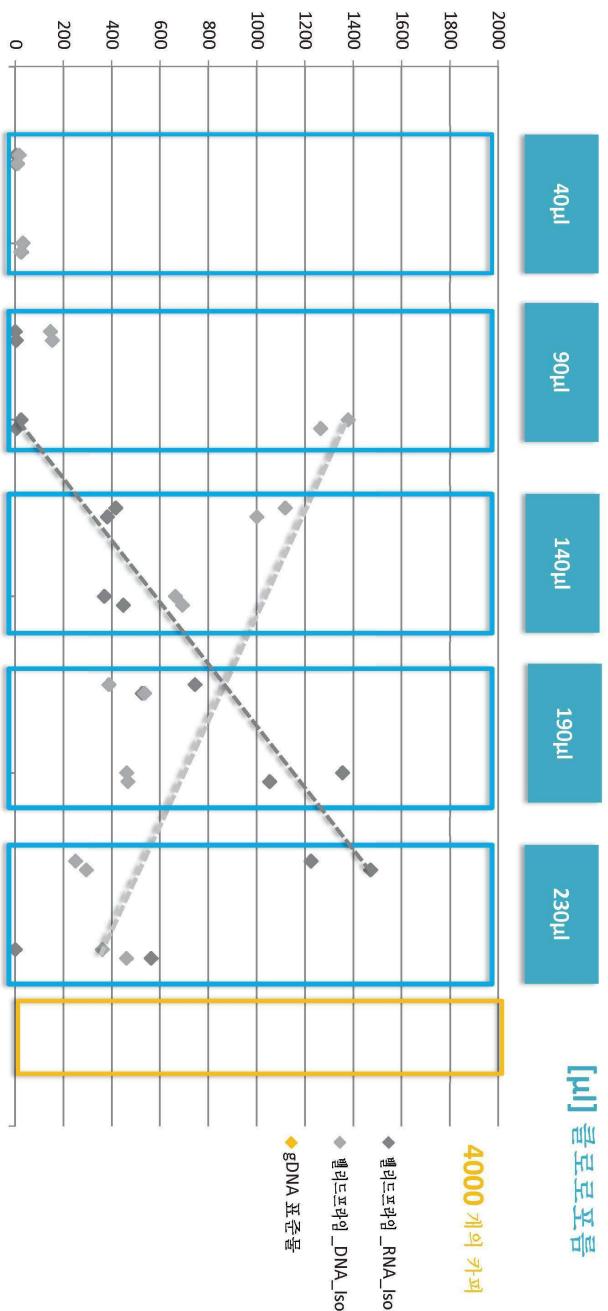
$2^{-\Delta CT}$  및 뱀리드프리임 검정법을 이용하여 DNA 오염 카피 계산  
gDNA 표준물: 0.01 ng DNA당 4개의 카피 → 본 발명자들은 QPCR에서 10 ng = 4000개의 카피 gDNA 표준물을 사용하였다.  
BRAF\_WT 검정법은 10 ng 중 약 3500개의 카피인 유사값을 계산하였다.



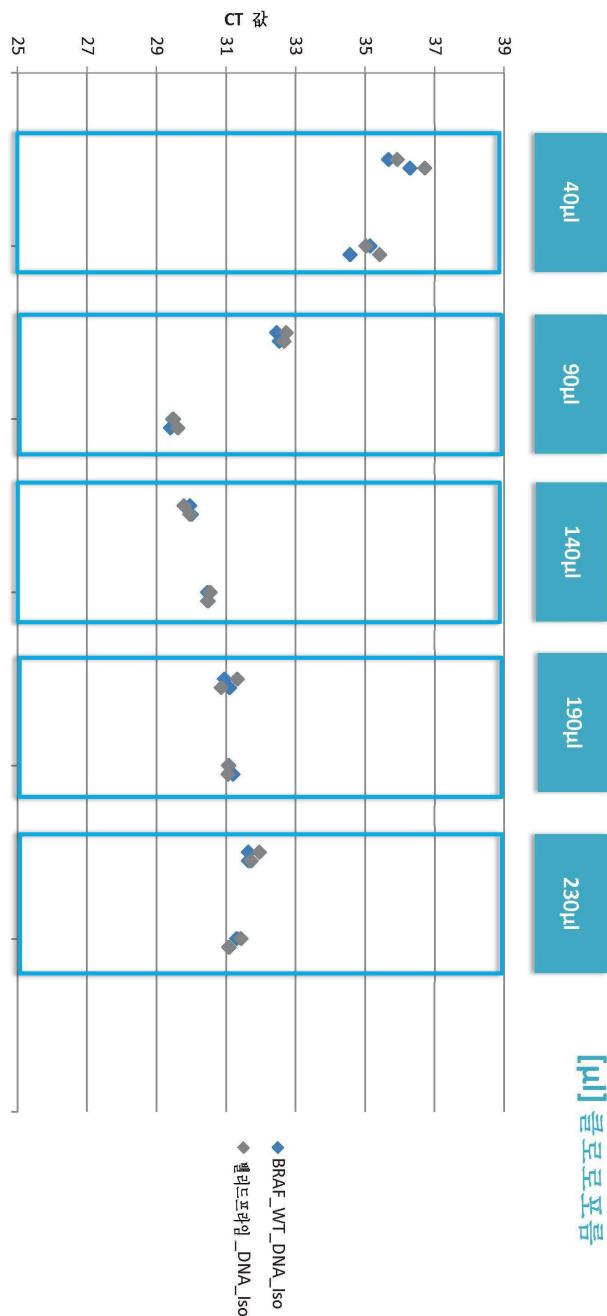
도면24

### Ad3 클로로포름 적정: RNA 단리+폐墟 상의 RNA 단리 (PLG 투보) 줌 인

$2^{-\Delta CT}$  및 벨리드프라이 검정법을 이용하여 DNA 오염 카피 계산  
gDNA 표준물: 0.01 ng DNA 당 4개의 카피 → 본 발명자들은 QPCR에서 10 ng = 4000개의 카피 gDNA 표준물을 사용하였다.  
BRAF\_WT 검정법은 10 ng 중 약 3500개의 카피인 유사값을 계수한다.

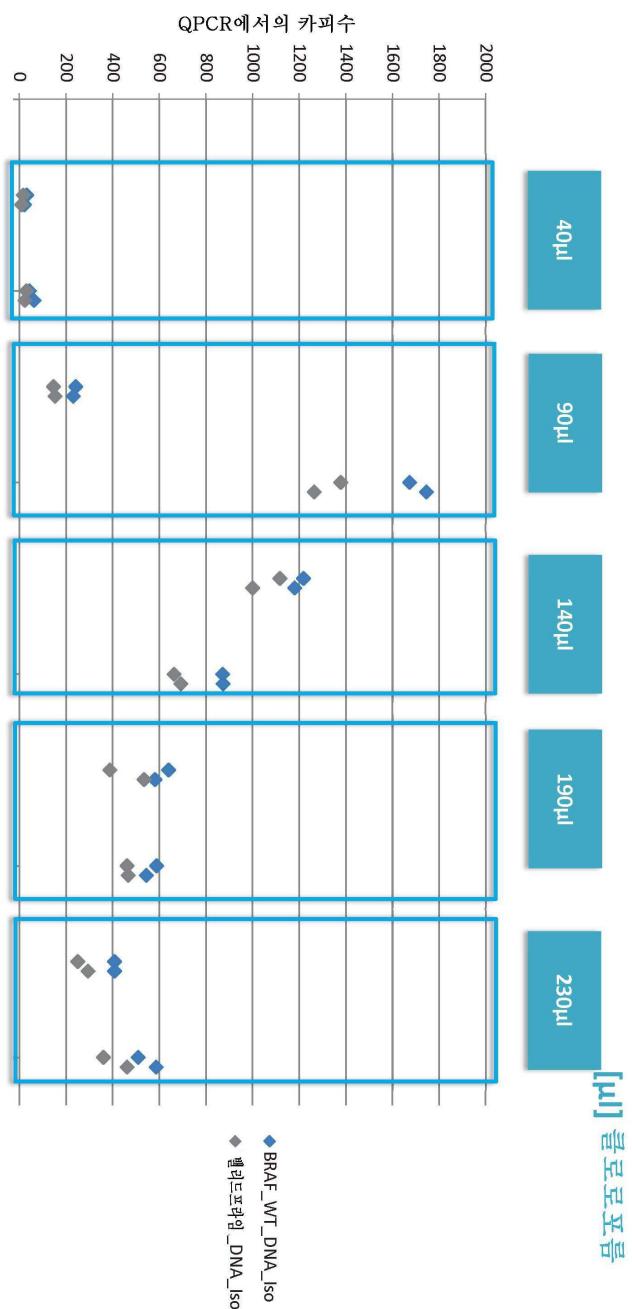


도면25



Ad3을로로포름 적정: 폐늘 상의 DNA 단위 (PLG 투보)

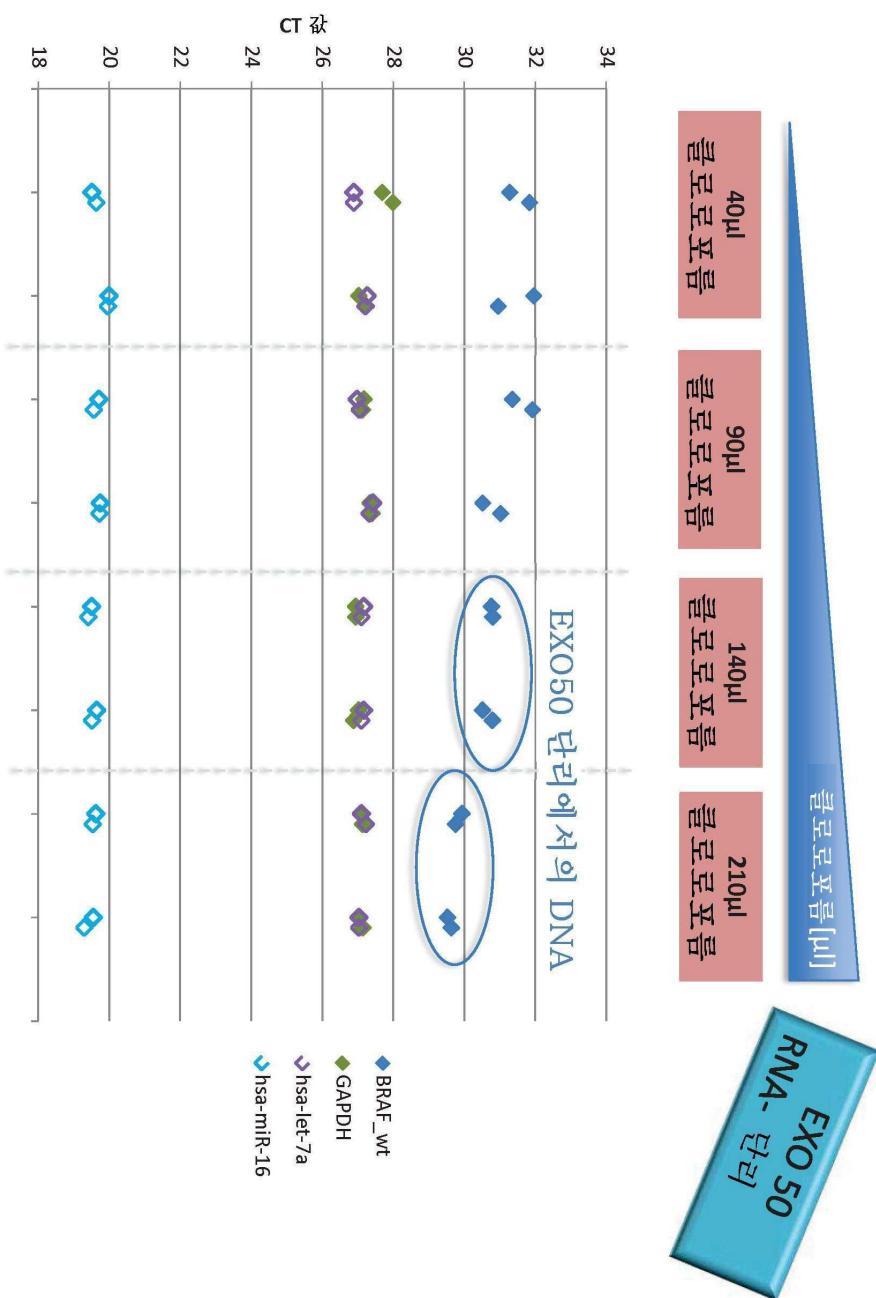
## 도면26



Ad3 클로로포름 적정: 폐널 상의 DNA 단리 (PLG 투보)

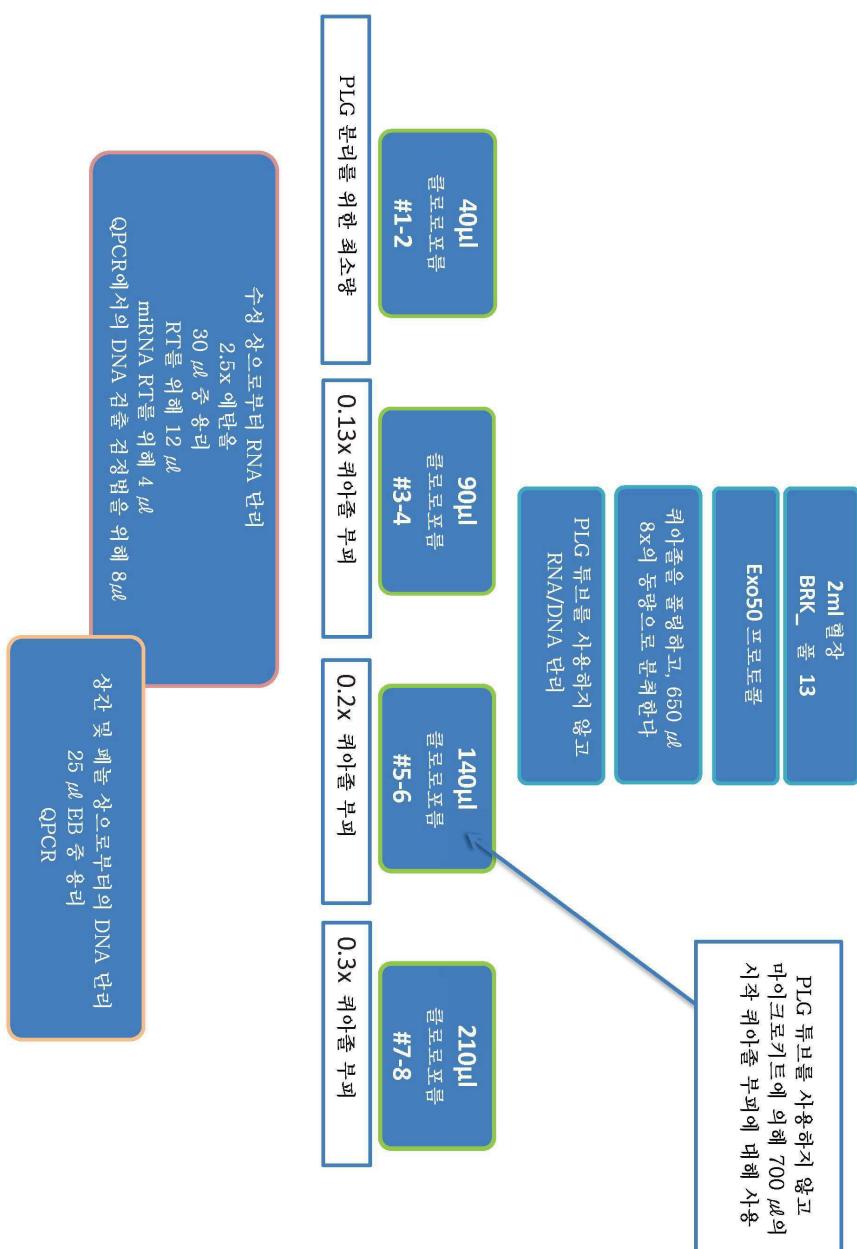
도면27

RN<sub>O</sub>] 지 프로토콜 (PLG 특별 미사용) 및 클로로포름 적정을  
사용한 DNA 단리



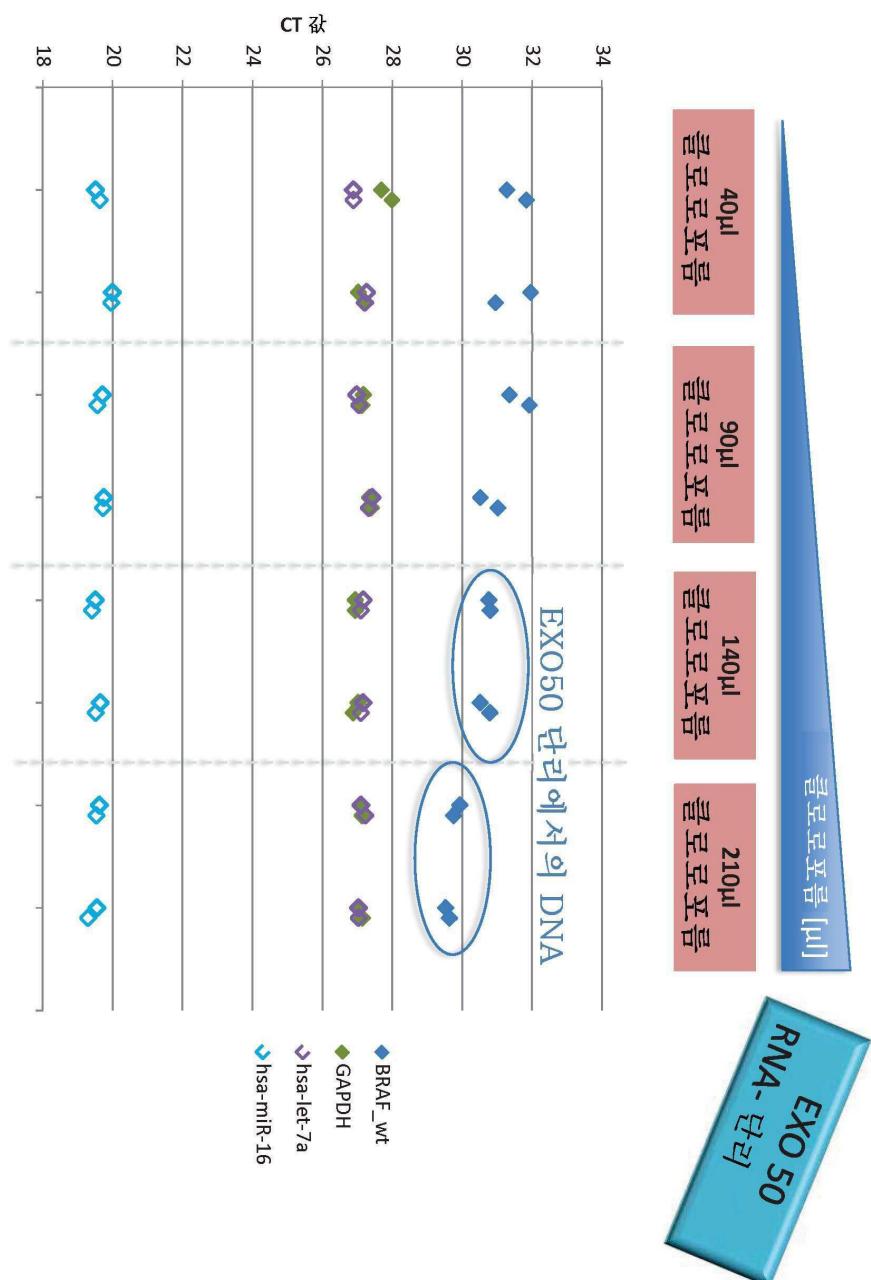
## 도면28

RN[이] 프로토콜 (PLG 투보 미사용) 및 클로로포름 적정을 사용한 DNA 단리



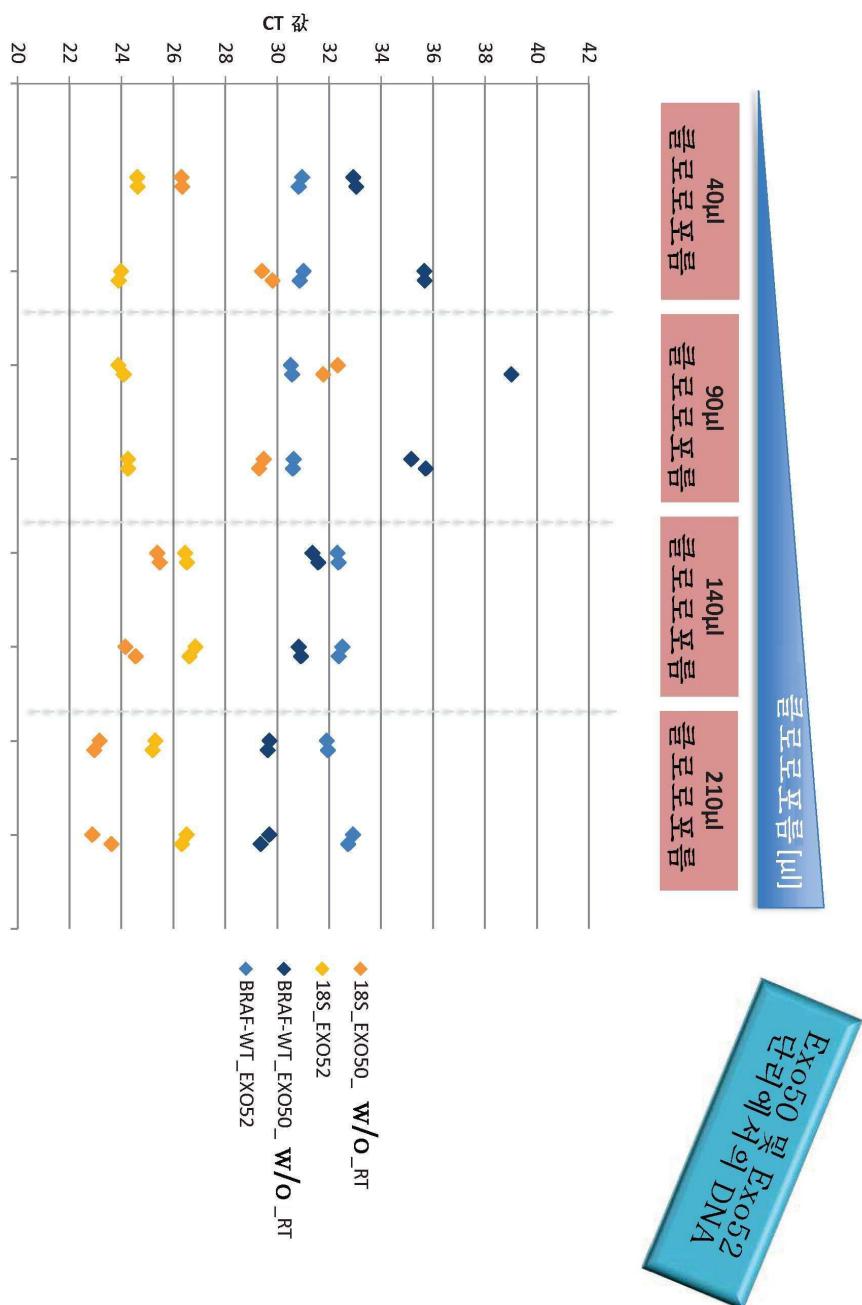
도면29

RN이지 프로토콜 (PLG 투브 미사용) 및 클로로포름 적정을 사용한 DNA 단리

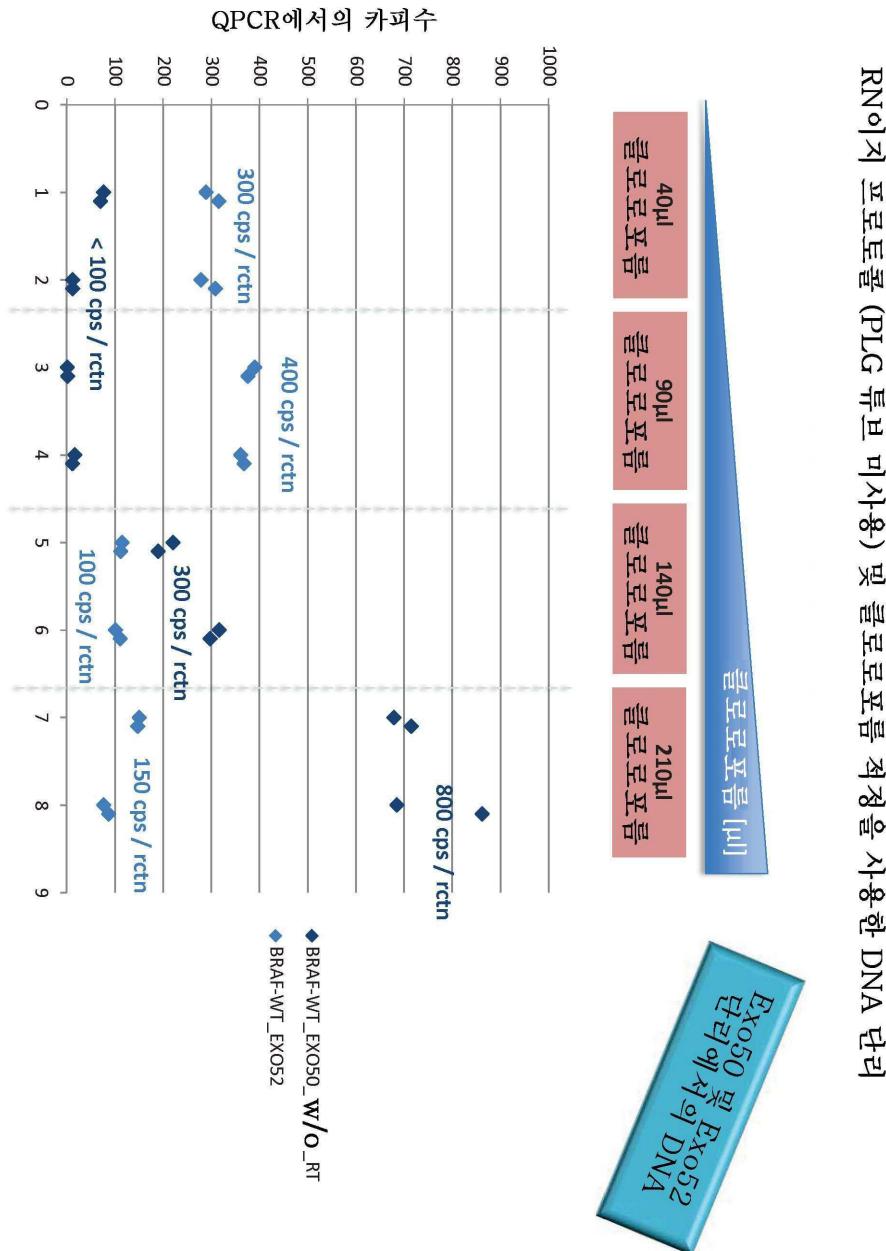


도면30

### RN이지 프로토콜 (PLG 투브 미사용) 및 클로로포름 적정을 사용한 DNA 단리

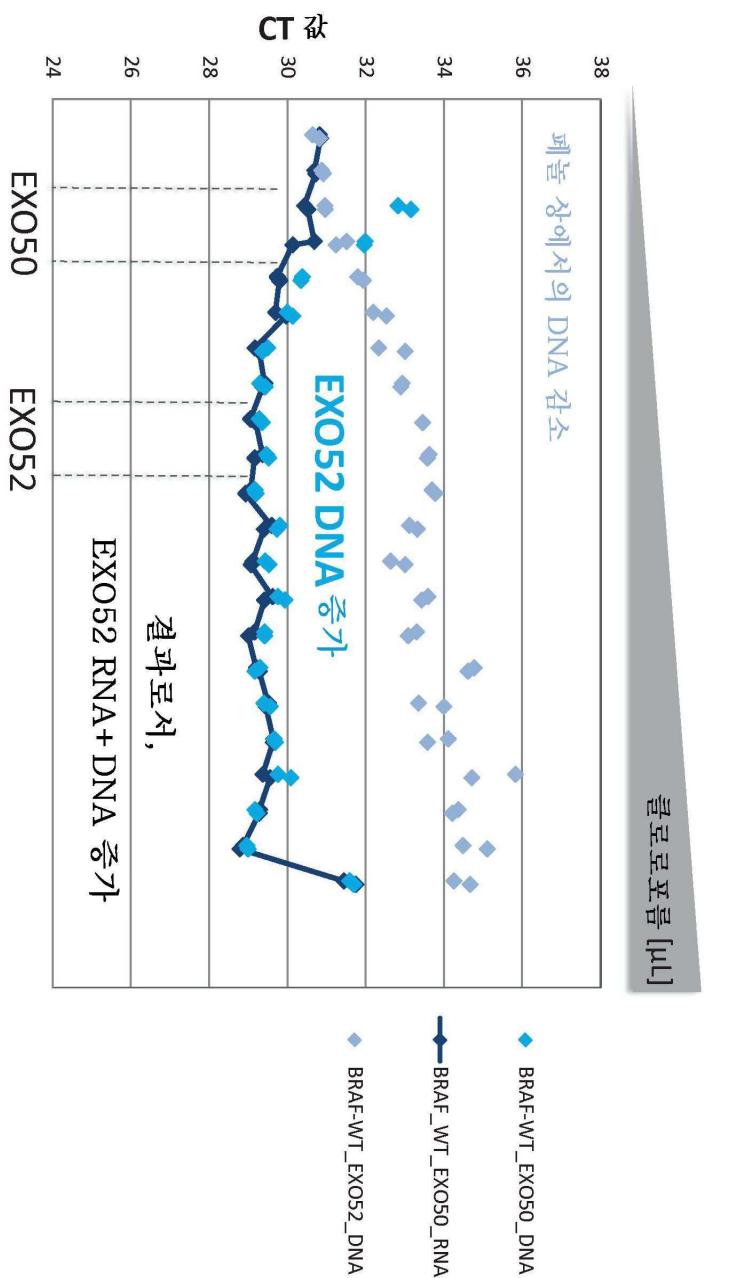


## 도면31



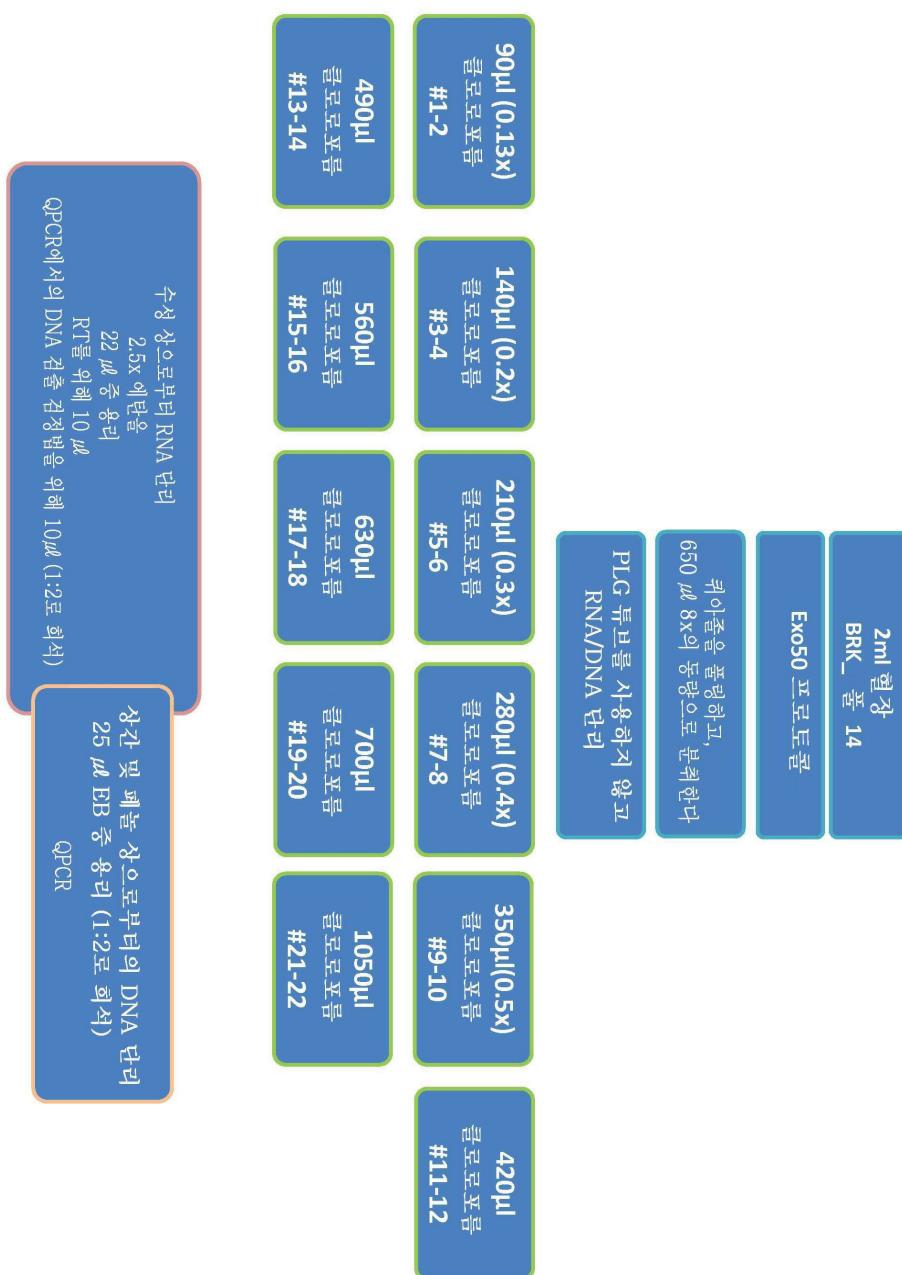
RN이자 프로토콜 (PLG 투브 미사용) 및 클로로포름 적정을 사용한 DNA 단위

도면32



## 도면33

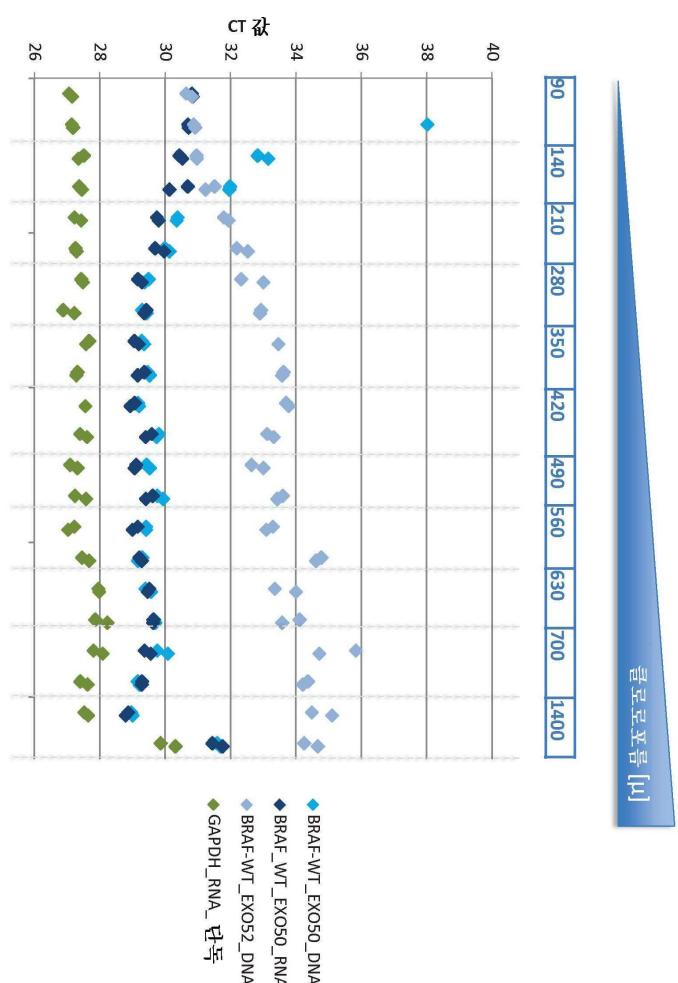
RN이지 프로토콜 (PLG 투브 미사용) 및 클로로포름 쟝정을 사용한 DNA 단리



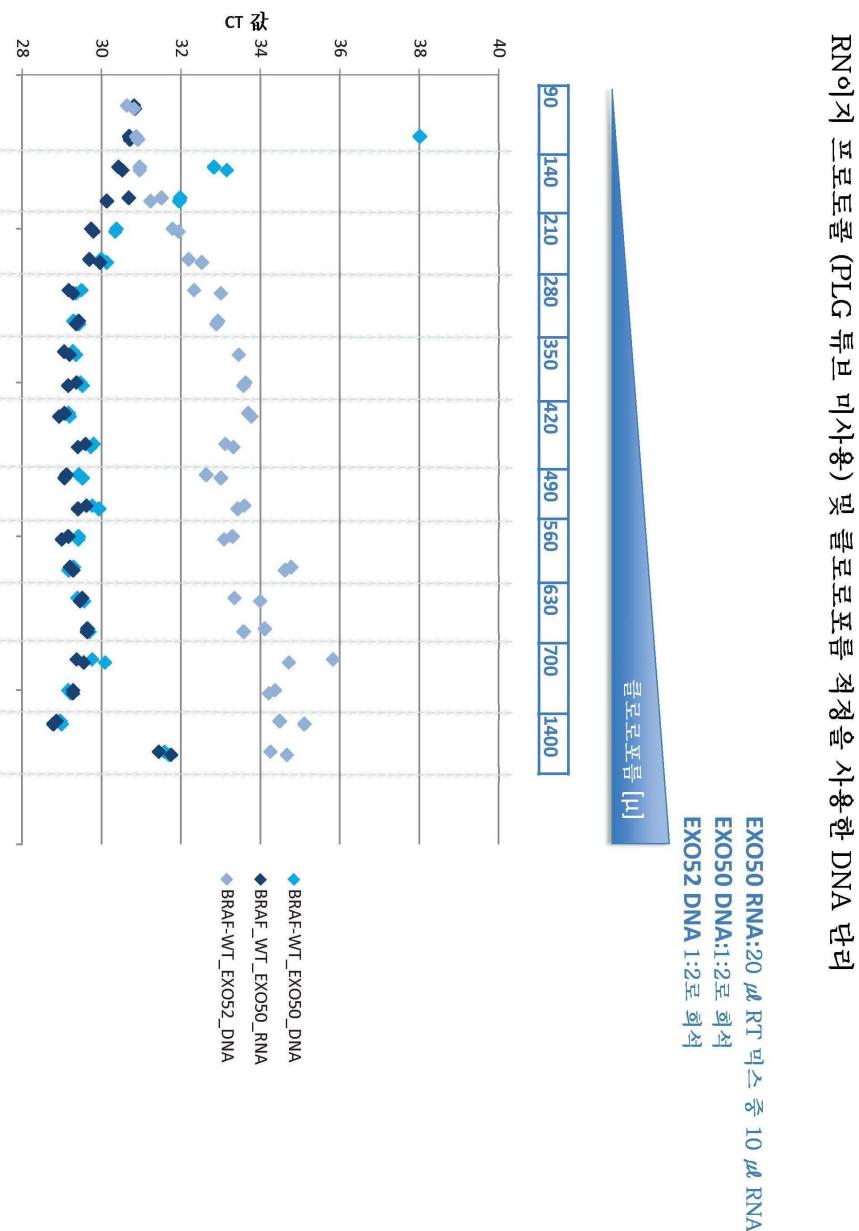
도면34

## RNA[자] 프로토콜 (PLG 투보 미사용) 및 클로로포름 적정을 사용한 DNA 단리

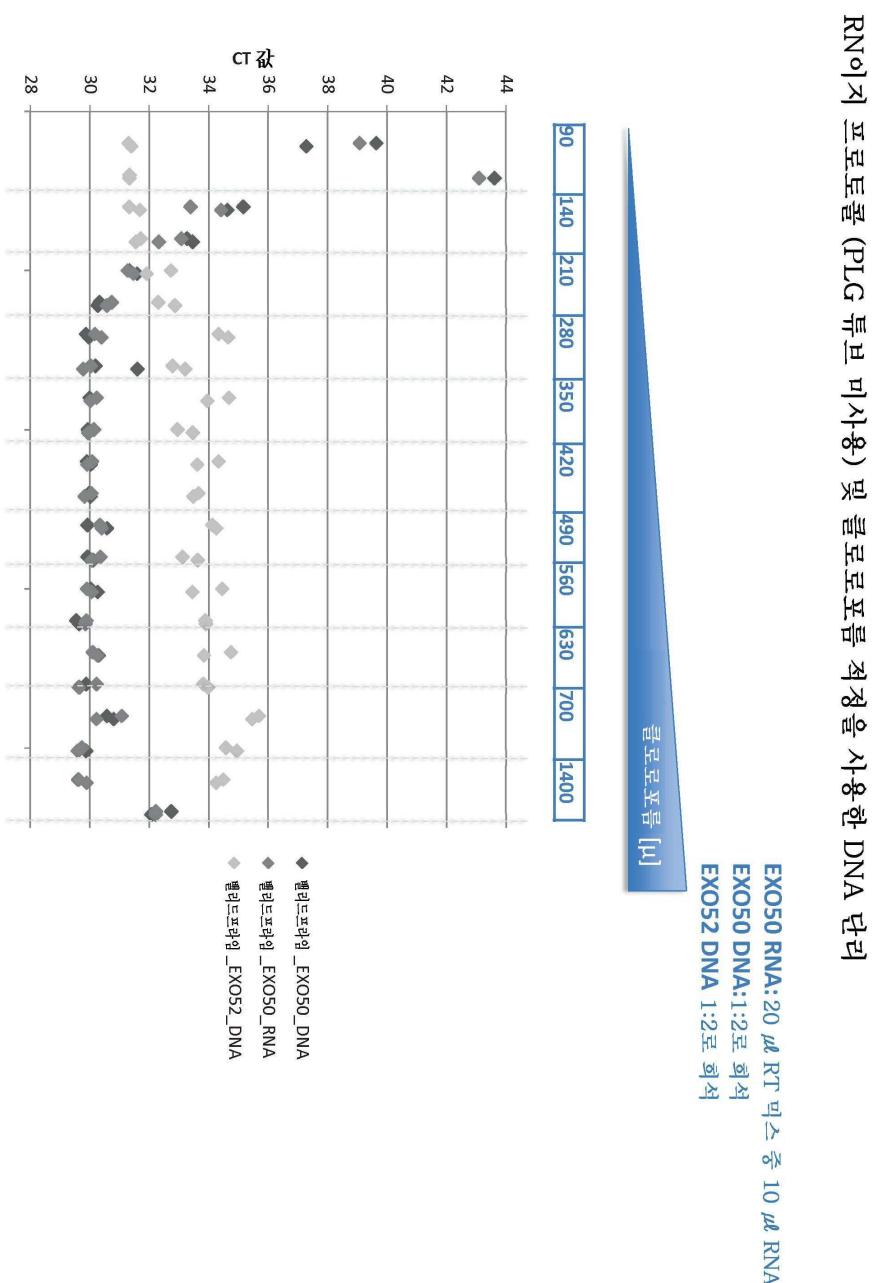
EXO50 RNA: 20  $\mu$ l RT 믹스 중 10  $\mu$ l RNA  
 EXO50 DNA: 1:2로 회색  
 EXO52 DNA 1:2로 회색



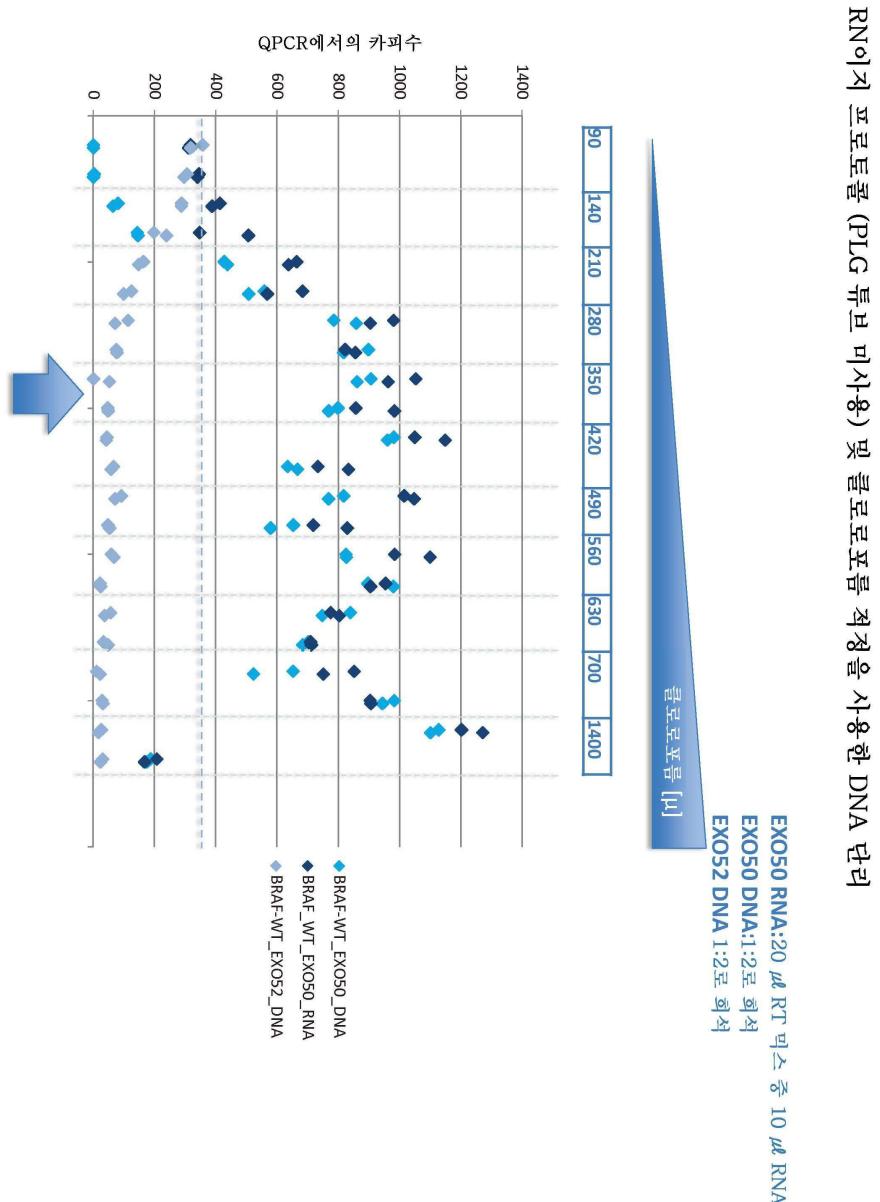
## 도면35



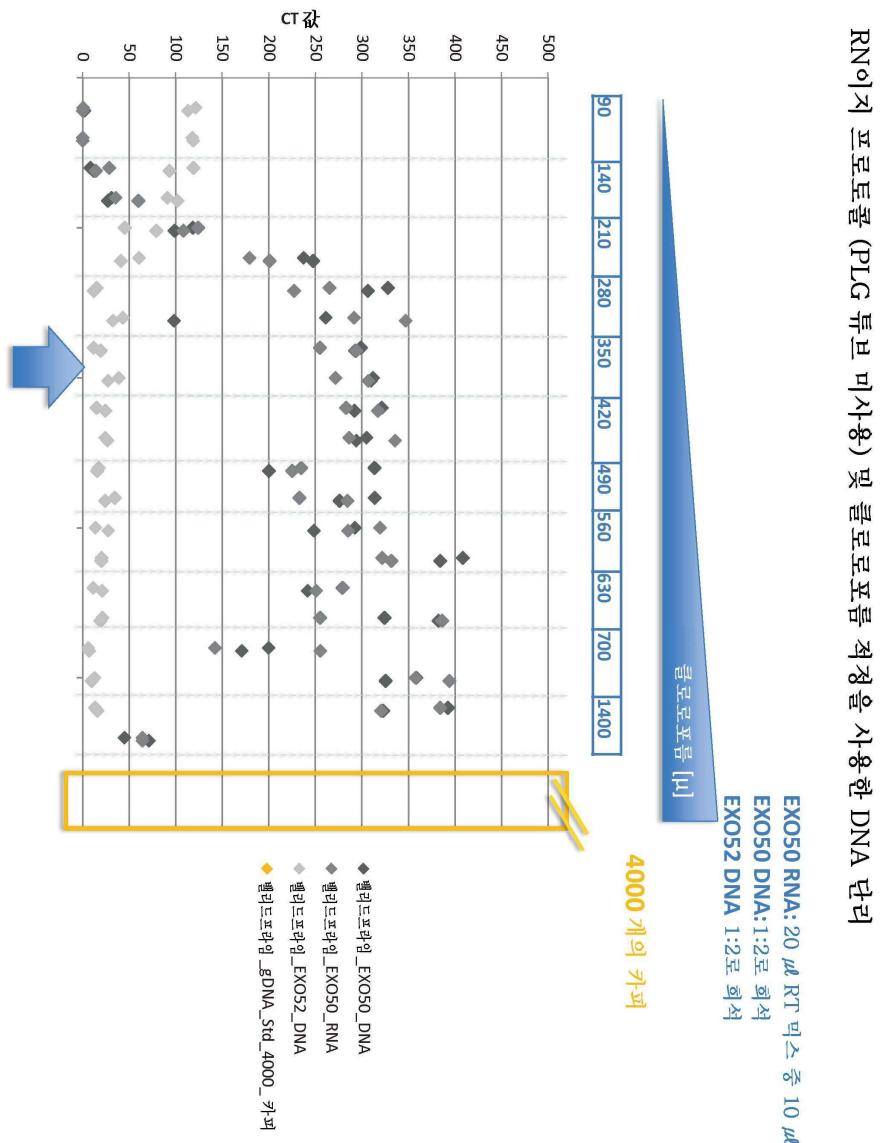
도면36



## 도면37



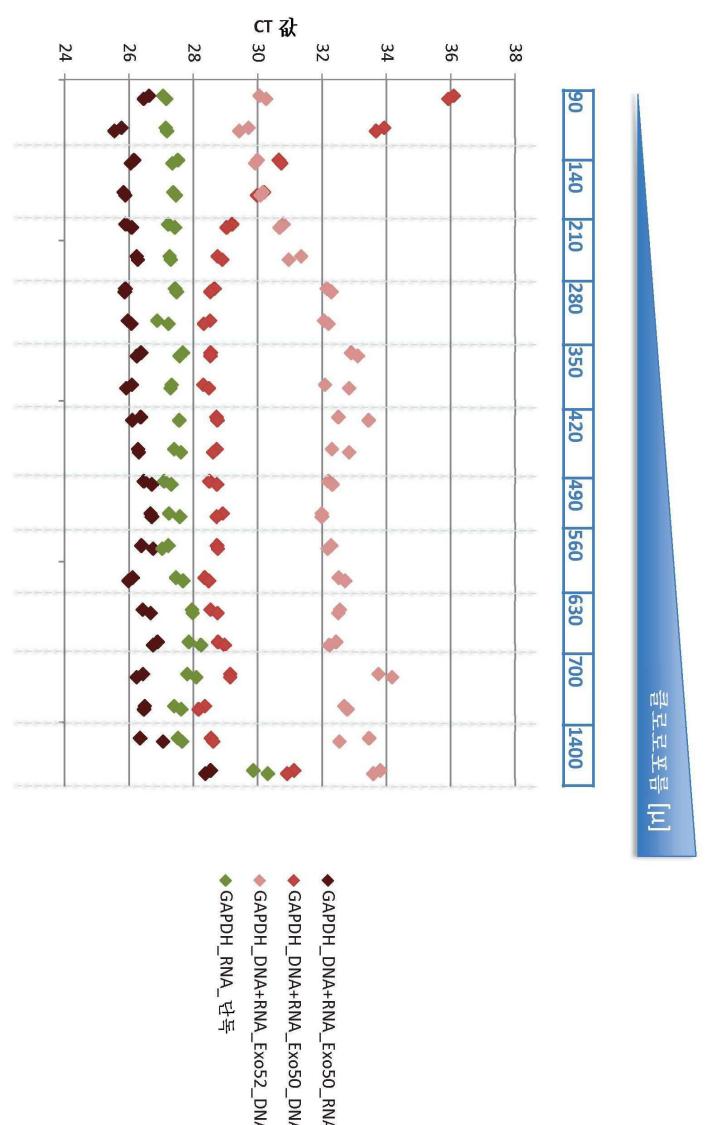
## 도면38



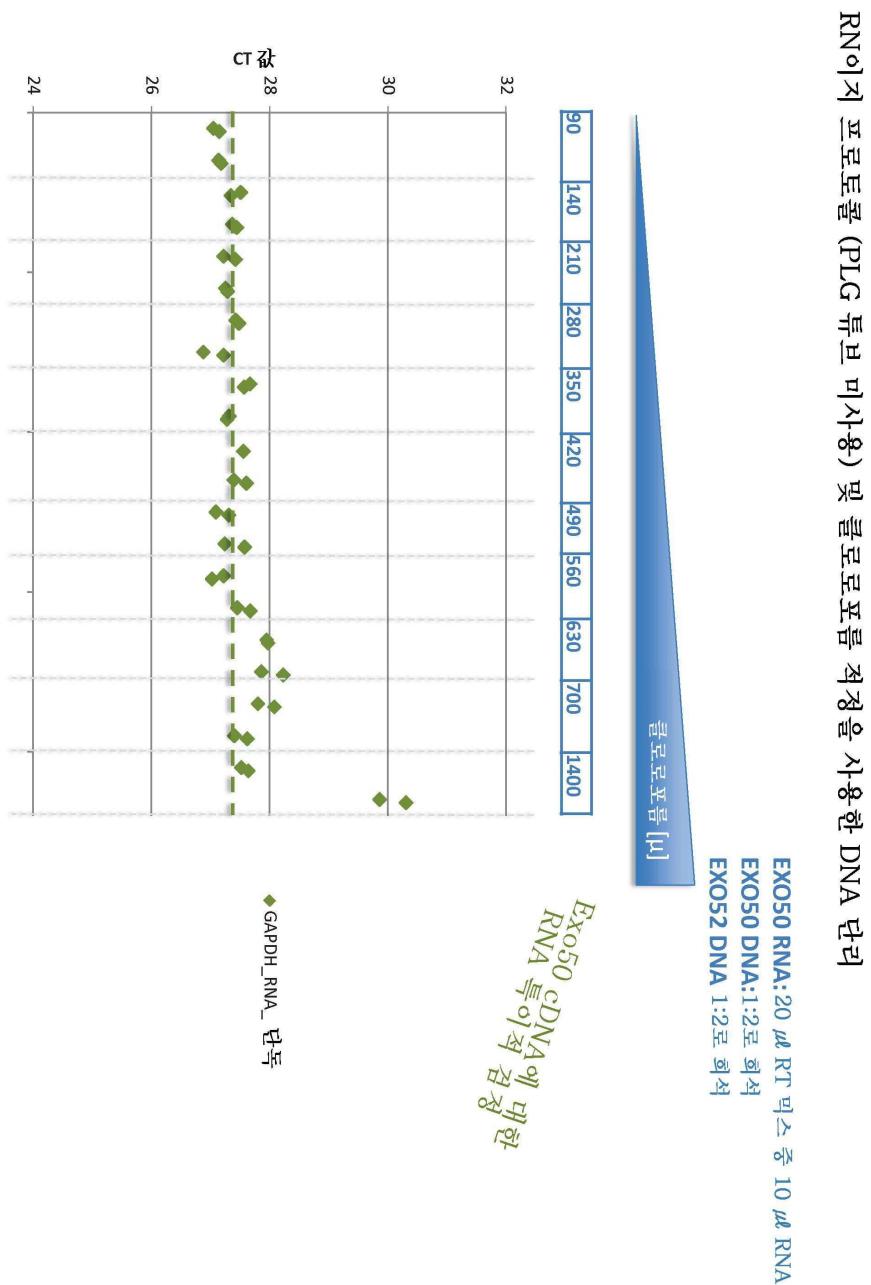
## 도면39

RN이지 프로토콜 (PLG 투브 미사용) 및 클로로포름 적정을 사용한 DNA 단위

EX050 RNA: 20  $\mu$ l RT 믹스 중 10  $\mu$ l RNA  
 EX050 DNA: 1:2로 회색  
 EX052 DNA 1:2로 회색



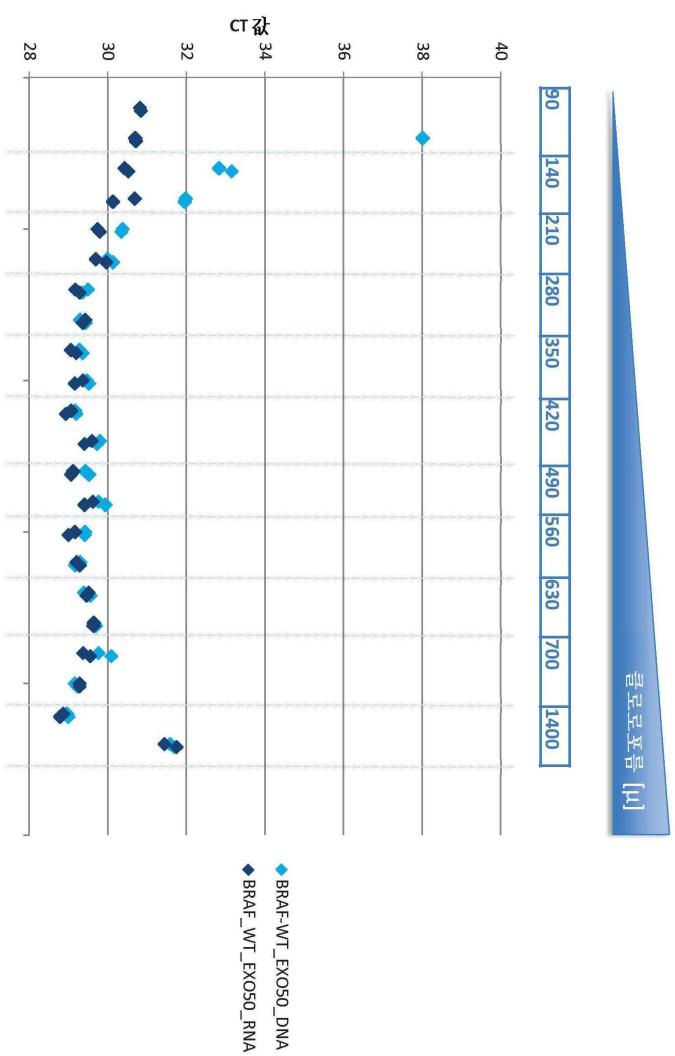
## 도면40



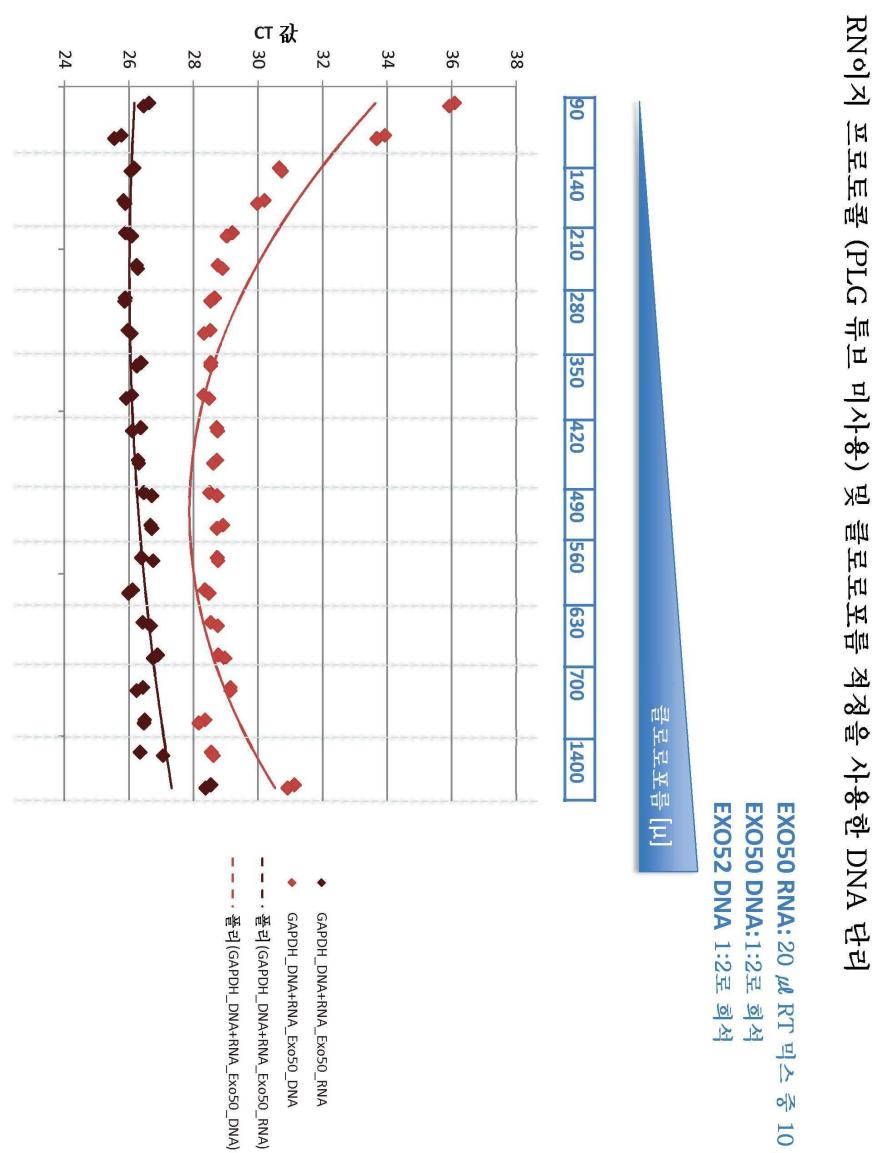
도면41

RN<sub>A</sub> 및 프로토콜 (PLG 유보 미사용) 및 클로로포름 적정을 사용한 DNA 단위

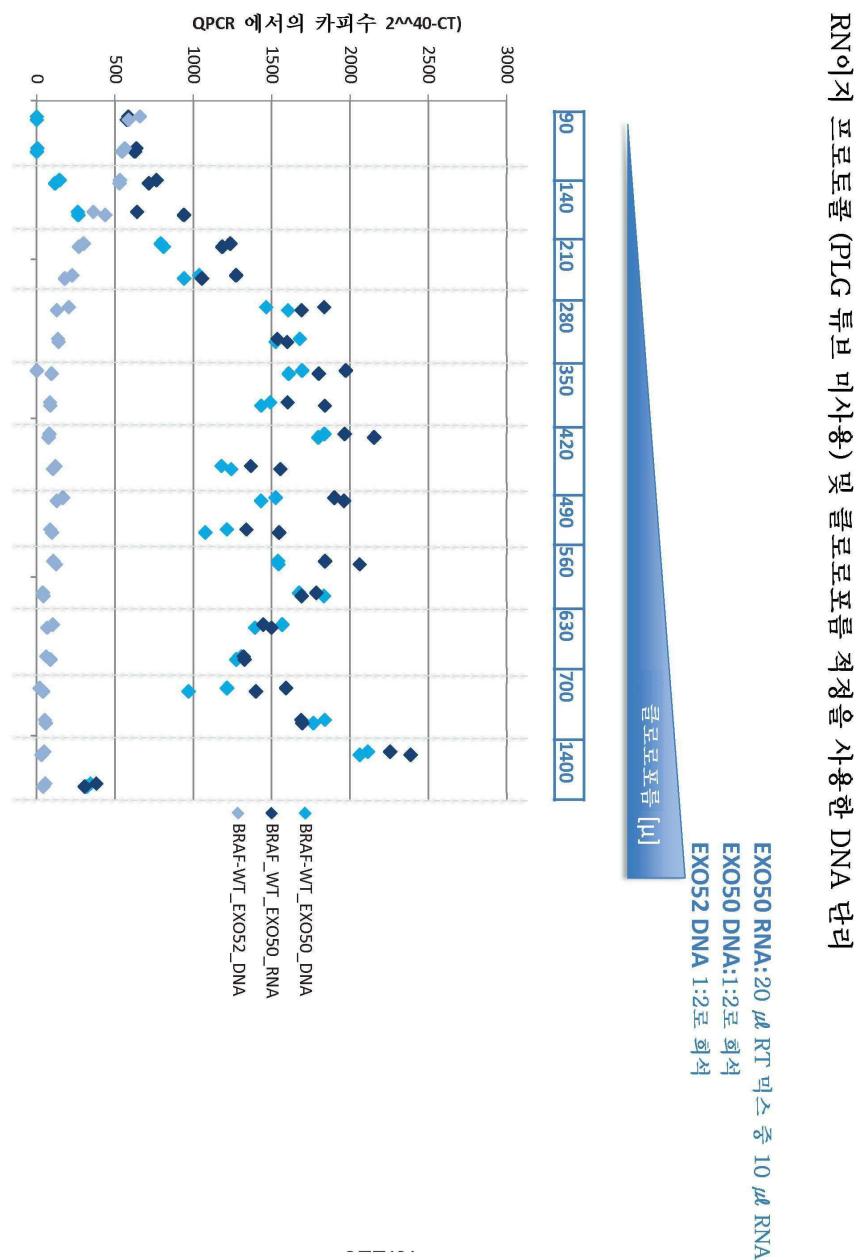
EX050 RNA: 20  $\mu$ l RT 믹스 중 10  $\mu$ l RNA  
 EX050 DNA: 1:2로 회색  
 EX052 DNA 1:2로 회색



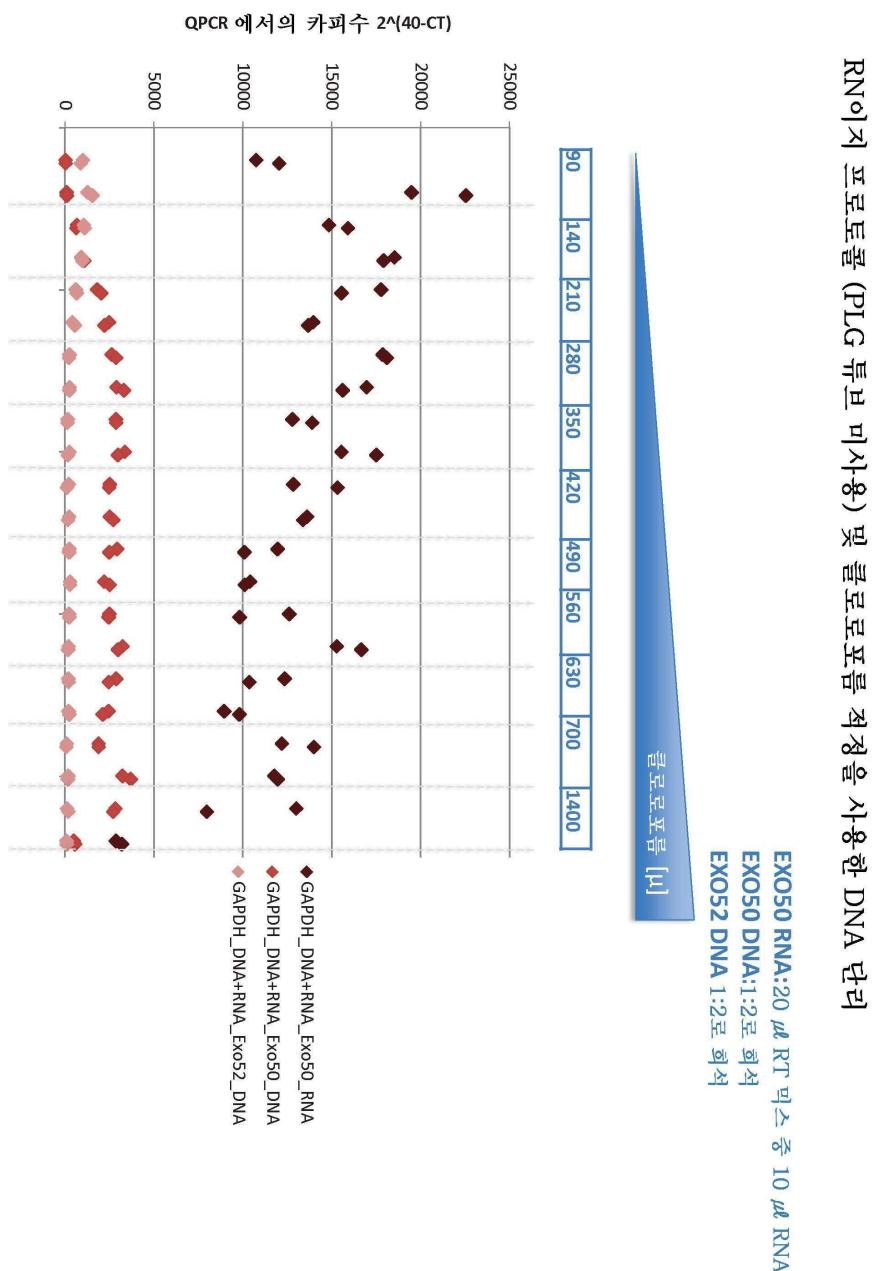
도면42



## 도면43

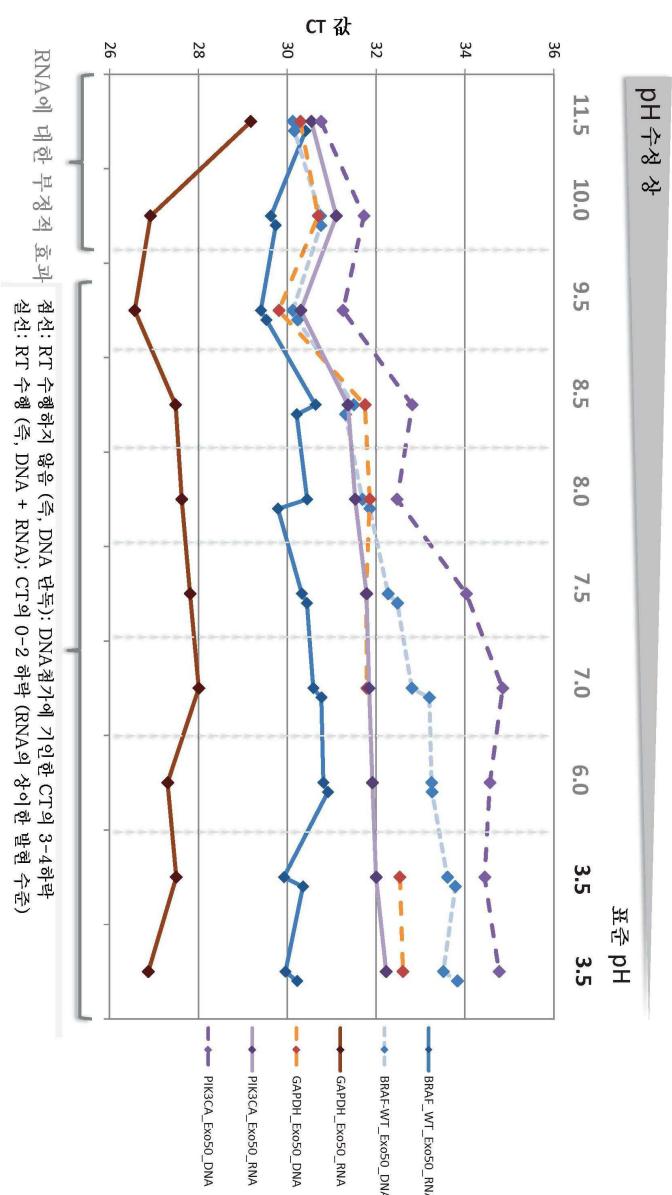


## 도면44



## 도면45

**EXO52.2: 상 분리에서의 pH 변화**  
**상 분리에서 pH를 조정하여 DNA를 EXO52.2 프레에 점가한다**



RNA에 대한 부정적 효과  
 첨성: RT 수행하지 않음 (즉, DNA 런독): DNA첨가에 기인한 CT의 3-4회락  
 실선: RT 수행 (즉, DNA + RNA): CT의 0-2회락 (RNA의 상이한 발현 수준)

## 도면46

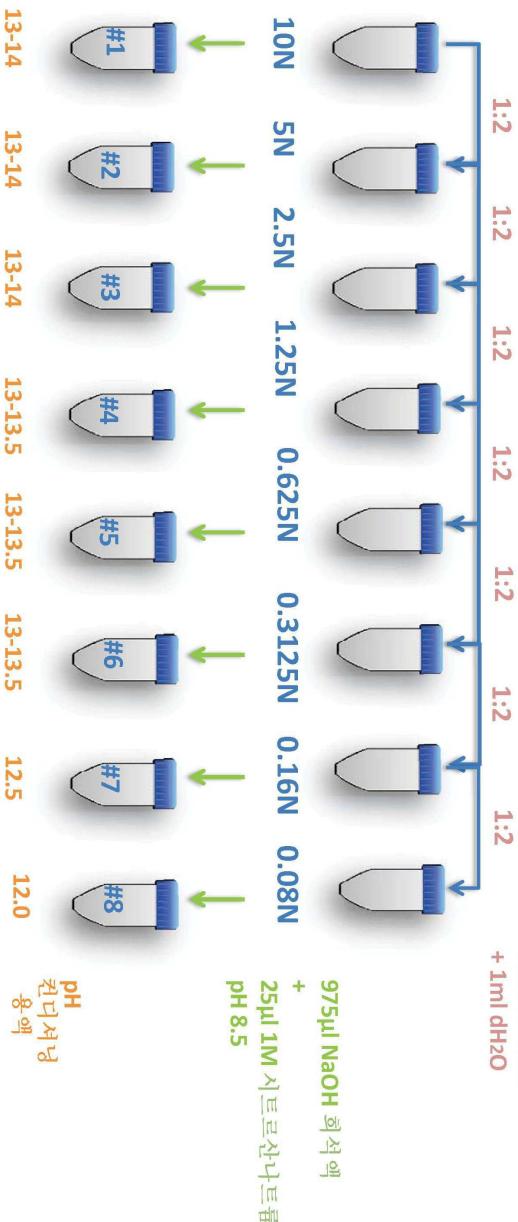
## 수성 상으로부터의 DNA 단리: pH 조정

2ml 월장 BRK- 풀 14	Exo50 프로토콜	케이줄을 풀링하고, $700 \mu\text{l}$ 10x의 동량으로 분취한다	PLG 투브를 사용하지 않고 RNA/DNA 단리	140 $\mu\text{l}$ 클로로포름 사용
140 $\mu\text{l}$ 10N NaOH	140 $\mu\text{l}$ 5N NaOH	140 $\mu\text{l}$ 2.5N NaOH	140 $\mu\text{l}$ 1.25N NaOH	140 $\mu\text{l}$ 0.625N NaOH
140 $\mu\text{l}$ 0.3125N NaOH	140 $\mu\text{l}$ 0.16N NaOH	140 $\mu\text{l}$ 0.08N NaOH	140 $\mu\text{l}$ 25mM 시트로산나트륨 - 윤증제	140 $\mu\text{l}$ dH <sub>2</sub> O
수성 상으로부터 RNA 단리 2.5x 에탄올 22 $\mu\text{l}$ 중용리 RT를 위해 10 $\mu\text{l}$ QPCR에서의 DNA 검출 감정법을 위해 10 $\mu\text{l}$ (1:2로 회석)	상간 및 폐ぬ 상으로부터의 DNA 단리 25 $\mu\text{l}$ ATE 중용리 (1:2로 회석)			

## pH 컨디셔닝 용액 제조

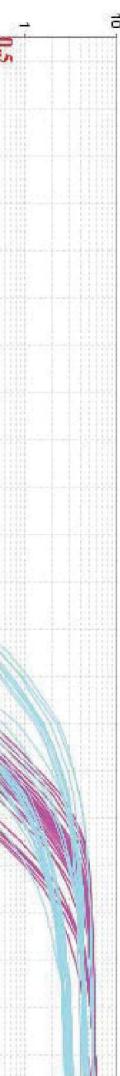
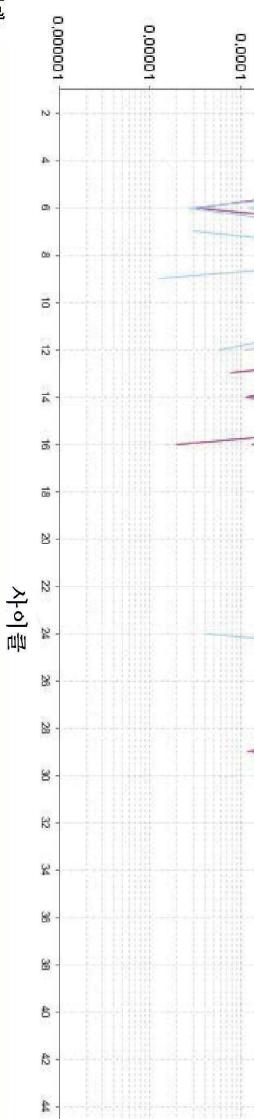
### 10N (10mol/l) 수산화나트륨

1ml xN NaOH  
+ 1ml dH<sub>2</sub>O



## Nala 증폭 곡선

증폭 플롯

 $\Delta Rn$ 

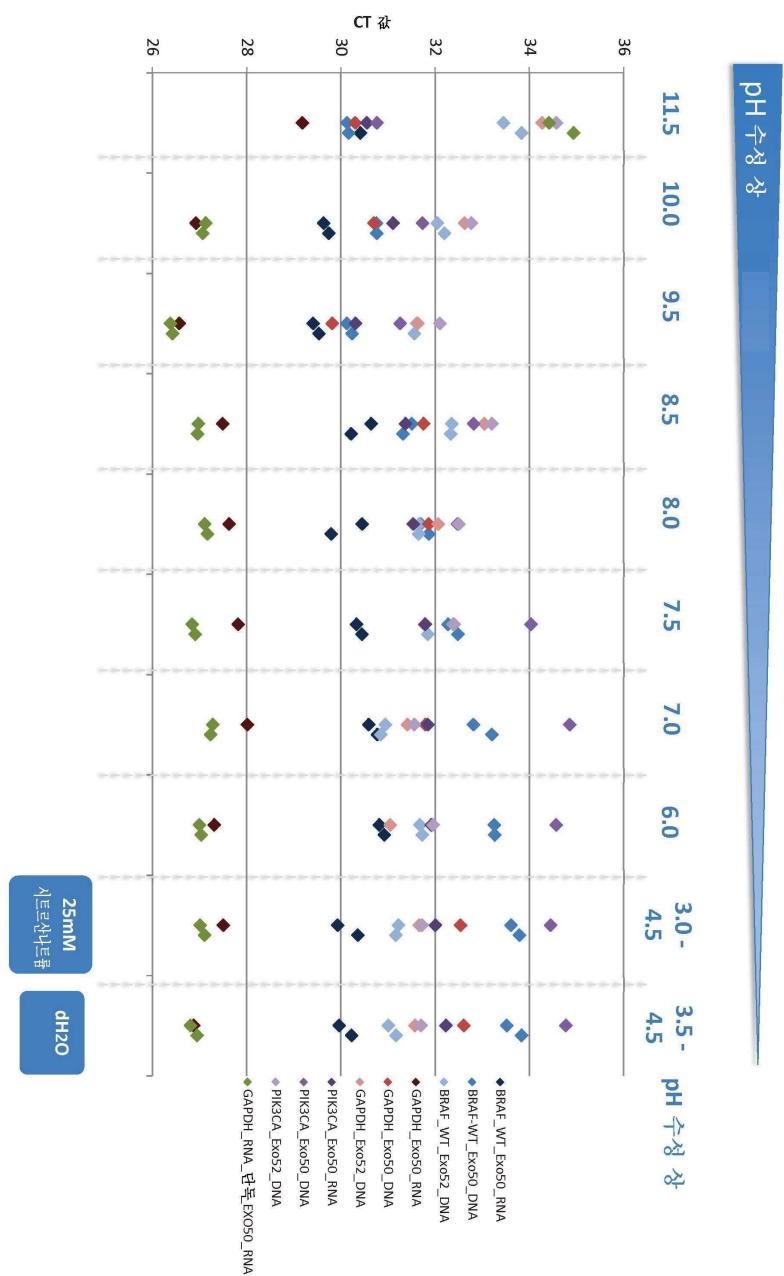
사이클

→ 억지 0.5

도면48

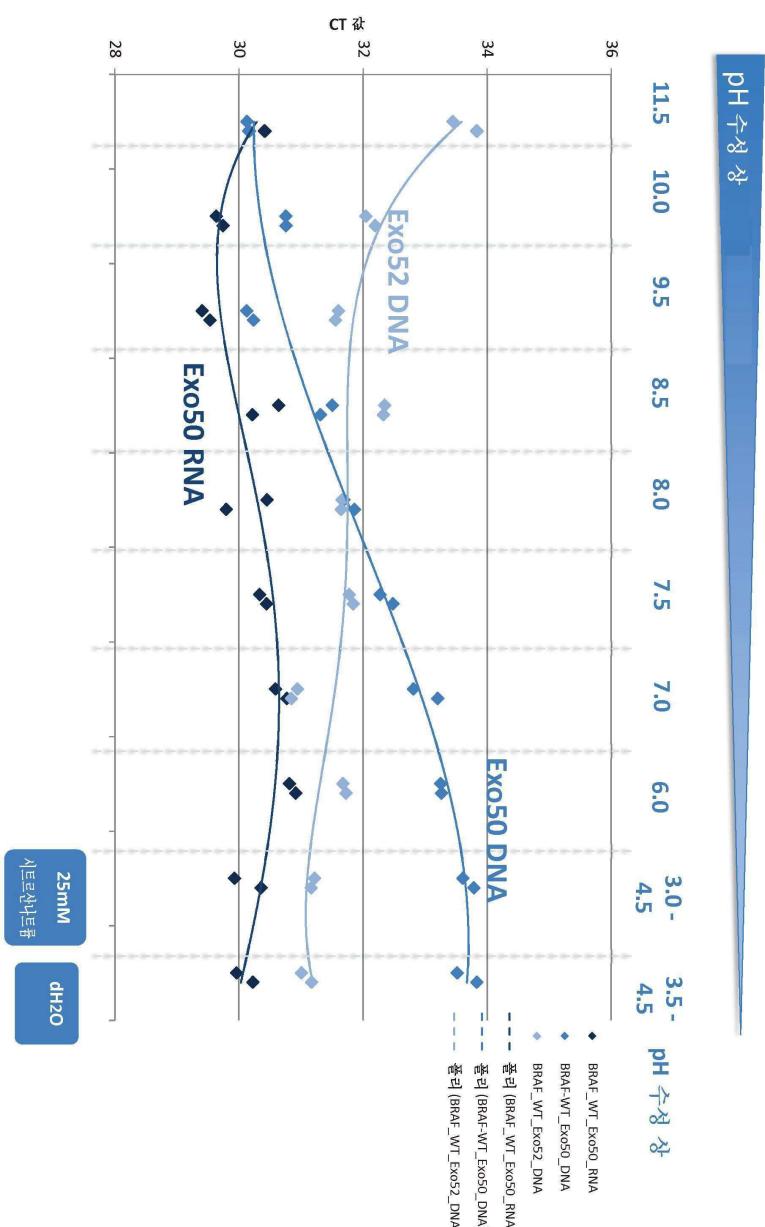
도면49

### 수성상으로부터의 DNA 단위: pH 적정



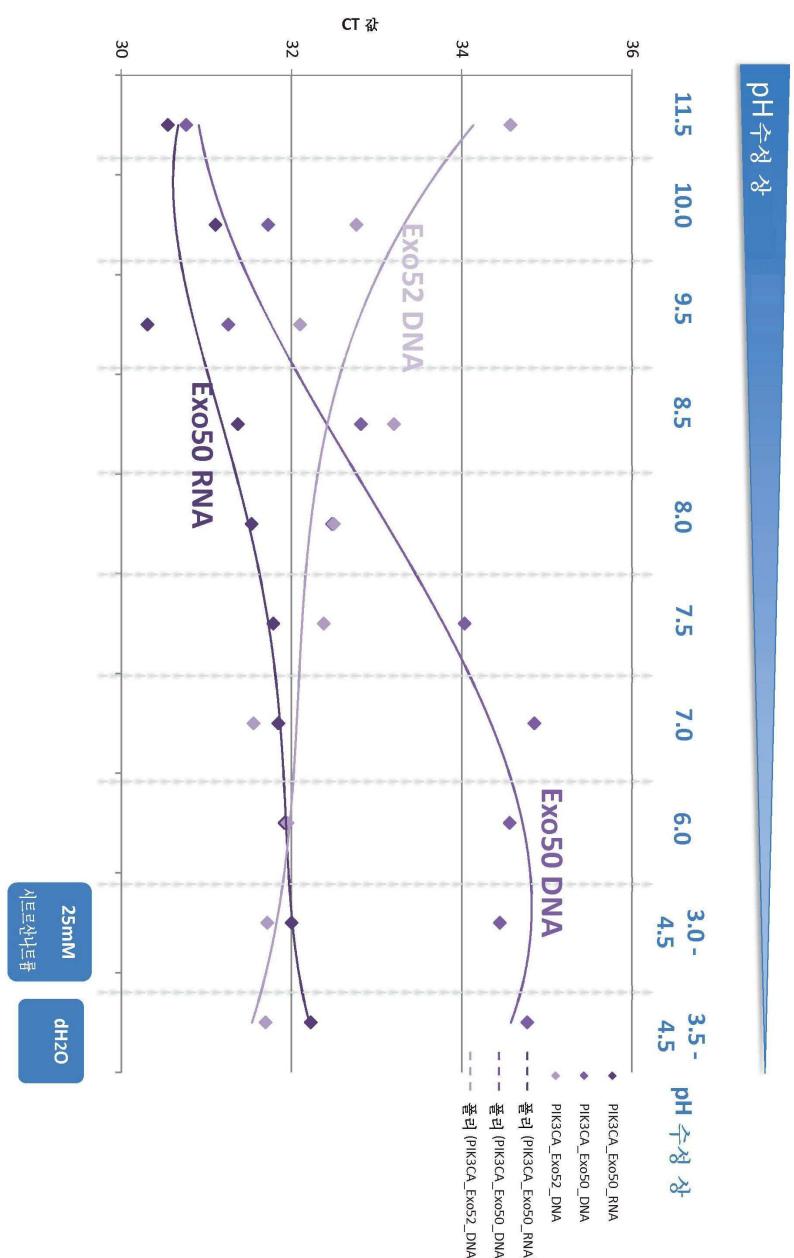
도면50

### 수성 상으로부터의 DNA 단위: pH 적정



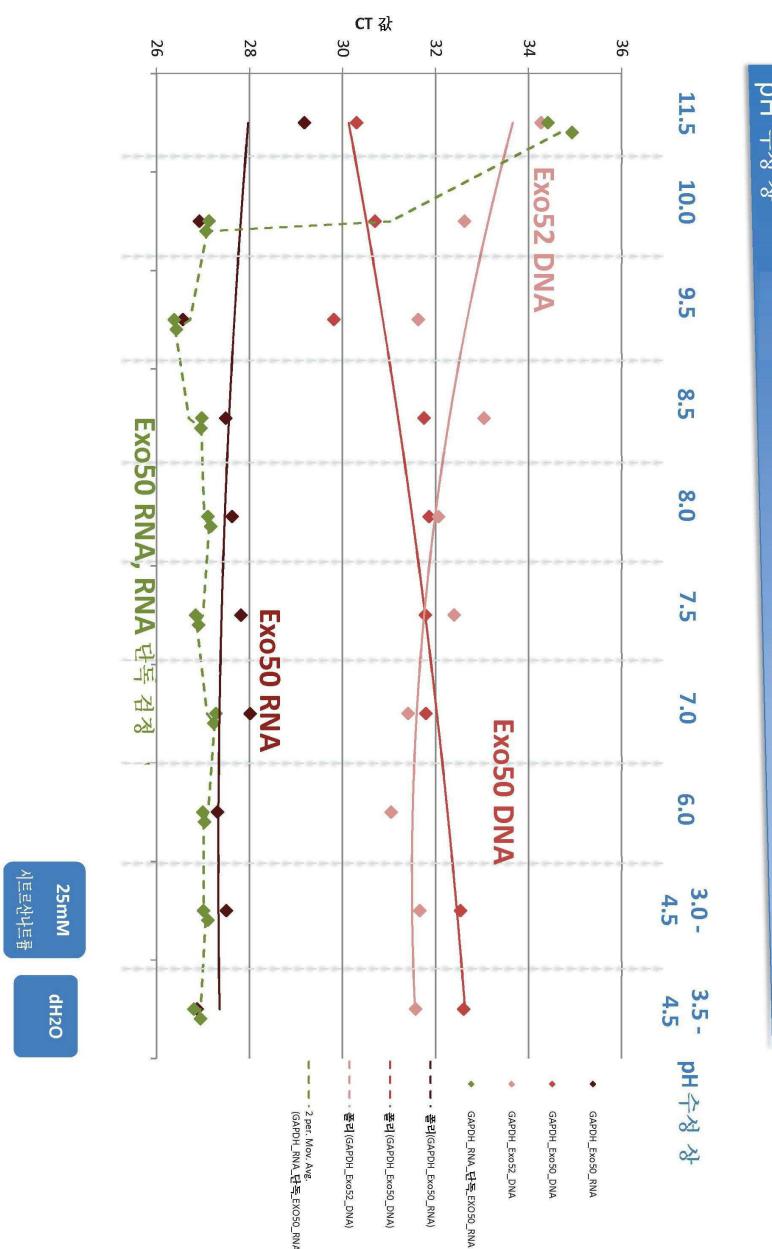
도면51

## 수성 상으로부터의 DNA 판리: pH 적정



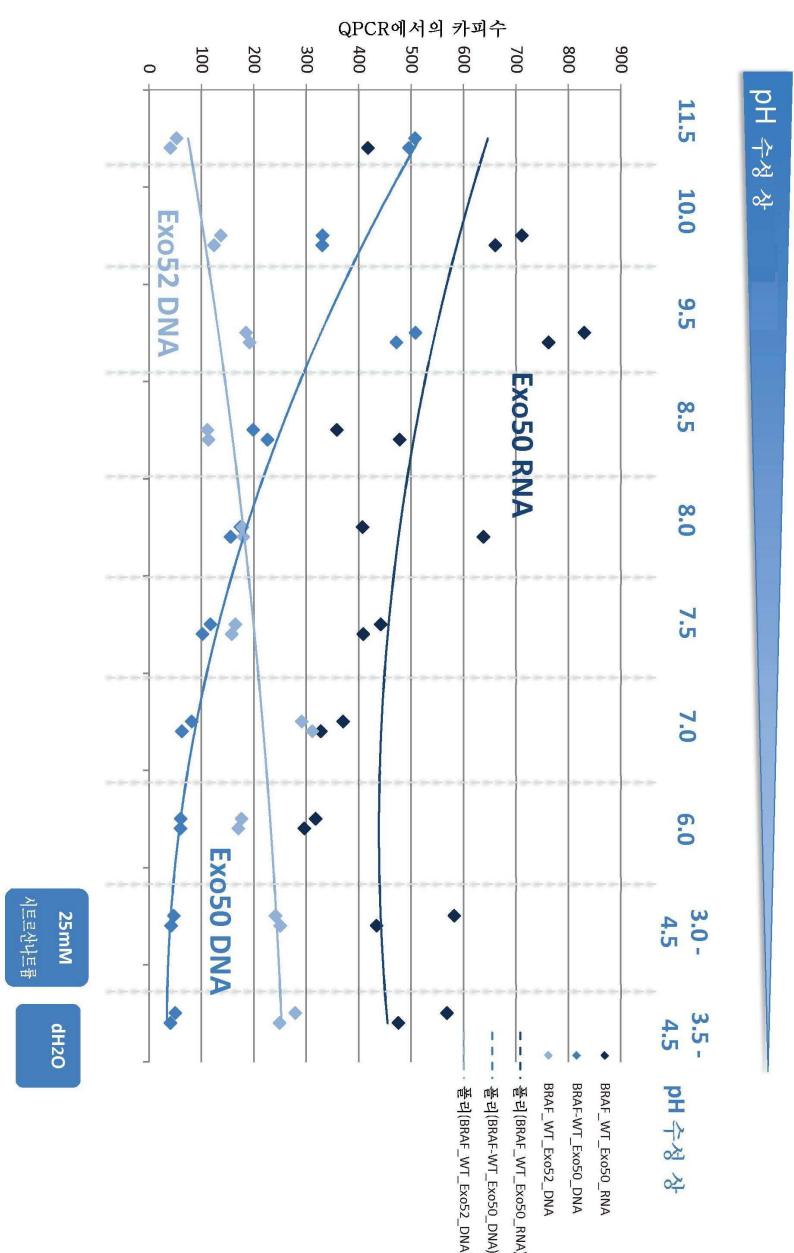
도면52

### 수성 상으로부터의 DNA 단리: pH 적정

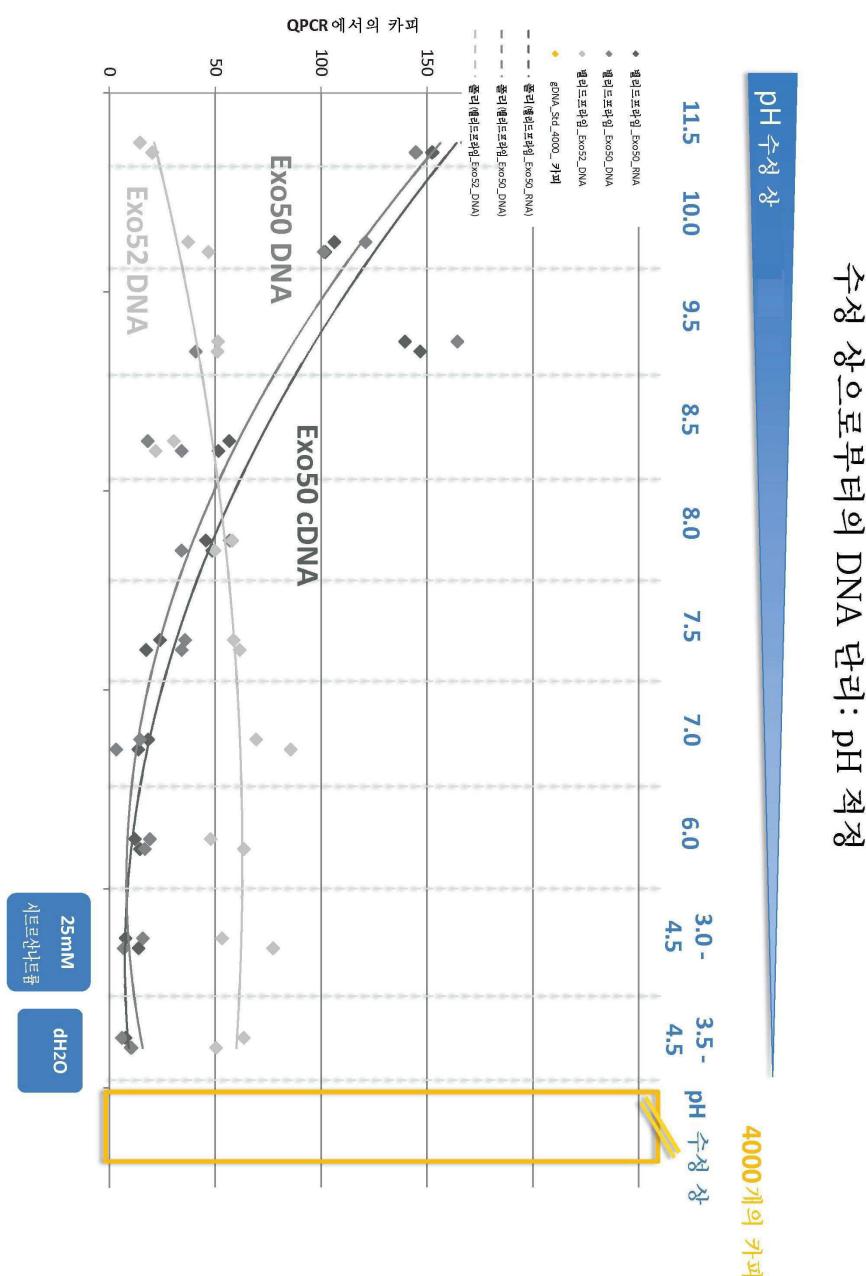


도면53

### 수성 상으로부터의 DNA 단리: pH 적정

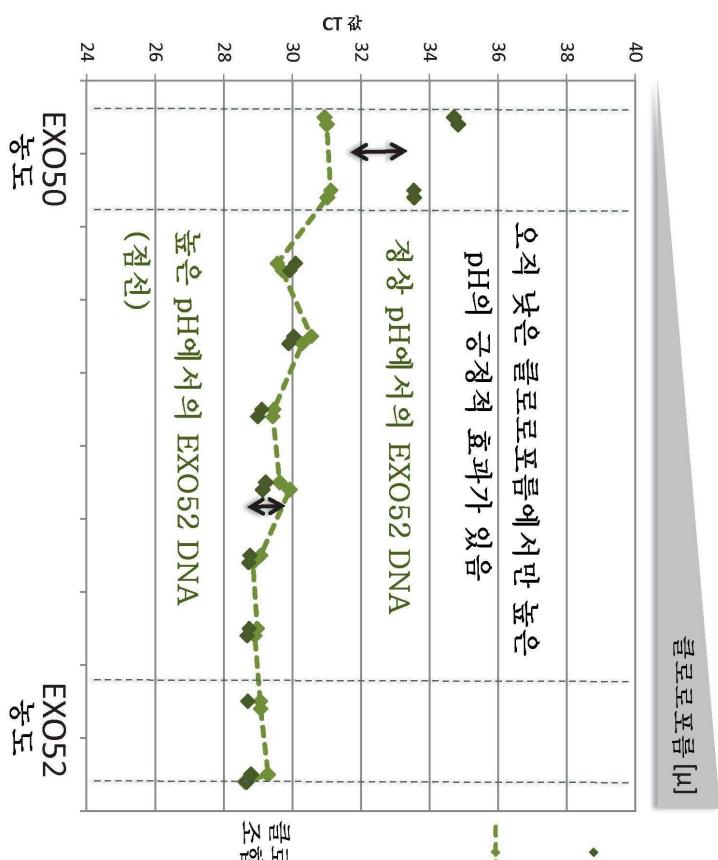


도면54



도면55

클로로포름 첨가가 수성 상의 DNA 함량을 결정하는 데 있어서 지배적인 인자이다



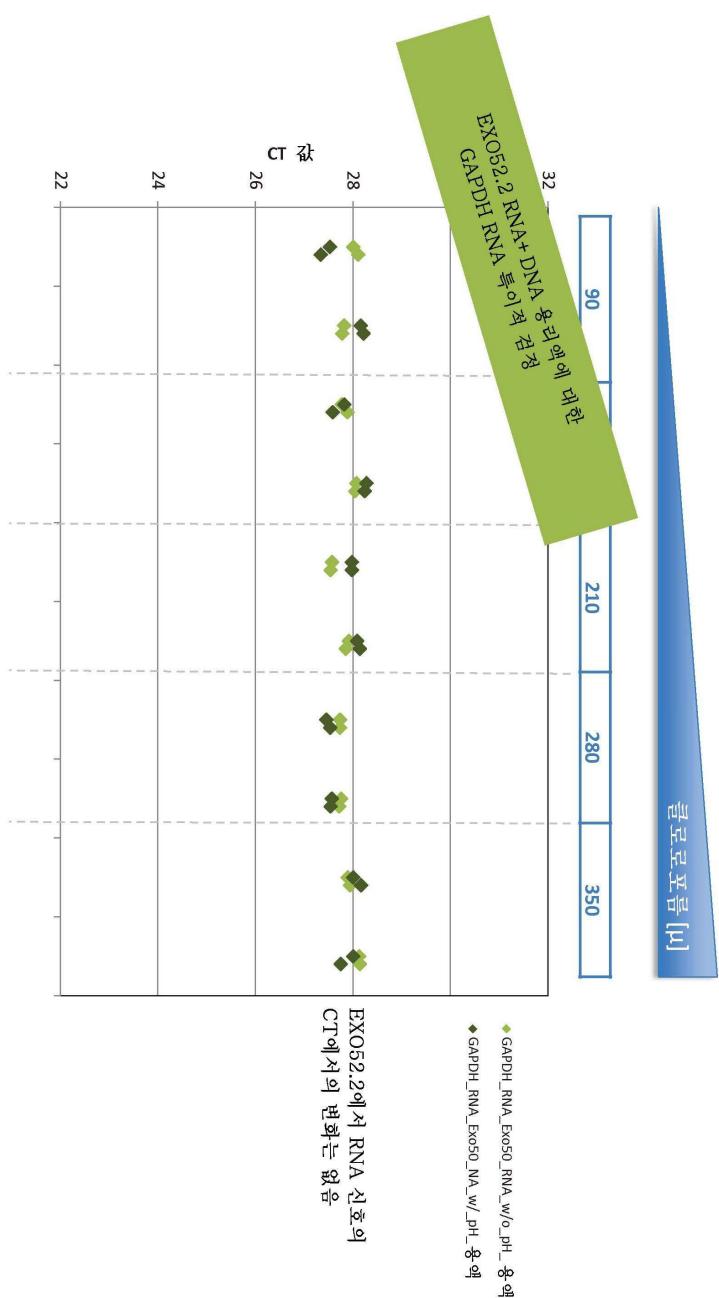
클로로포름 첨가와의  
조합-효과는  
없음

정상 pH에서의 EXO52 DNA

pH의 궁정적 효과가 있음

오직 낮은 클로로포름에서만 낮은

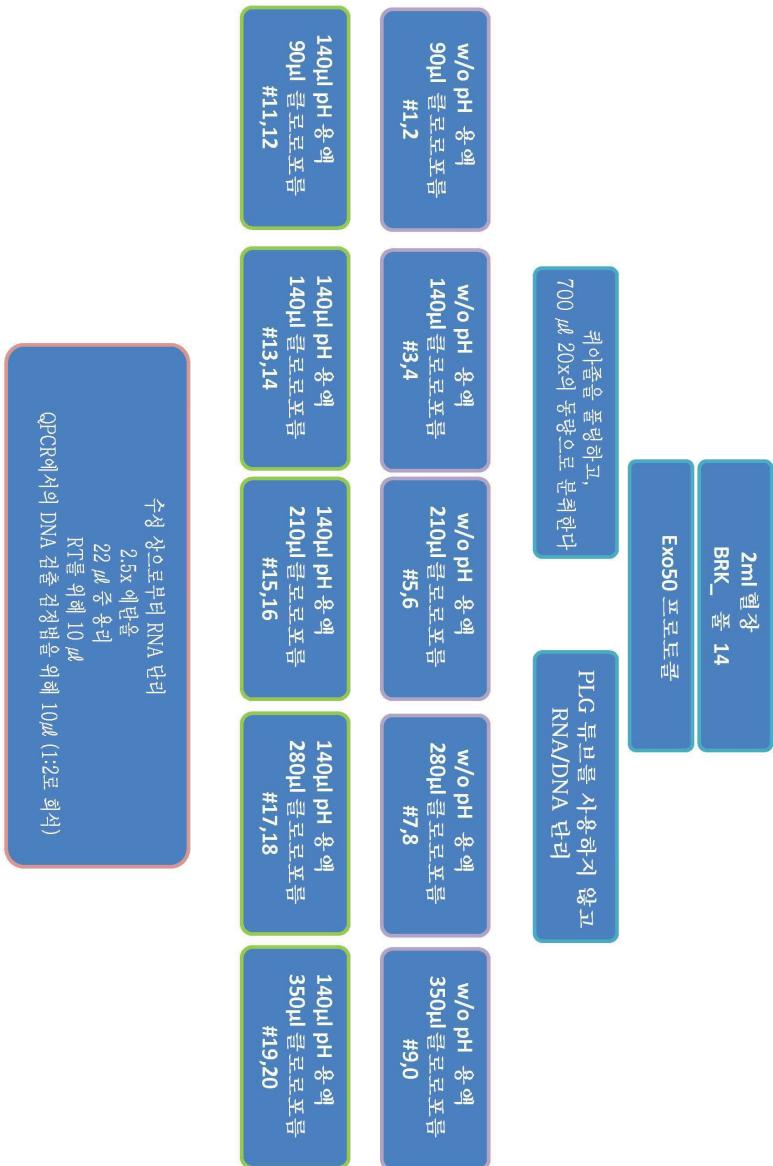
## 도면56



RNA 신호는 DNA 첨가를 통해 영향을 받지 않는다.

## 도면57

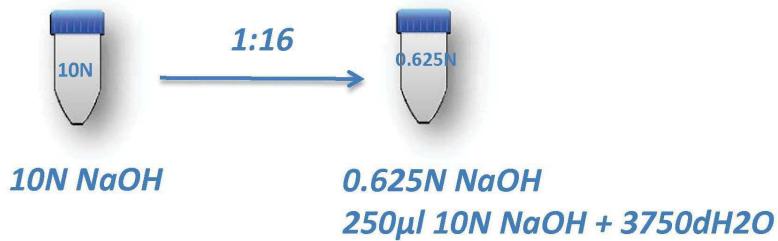
수성 상으로부터의 DNA 단리: pH 용액을 첨가한 및 첨가하지 않은 클로로포름 적정



## 도면58

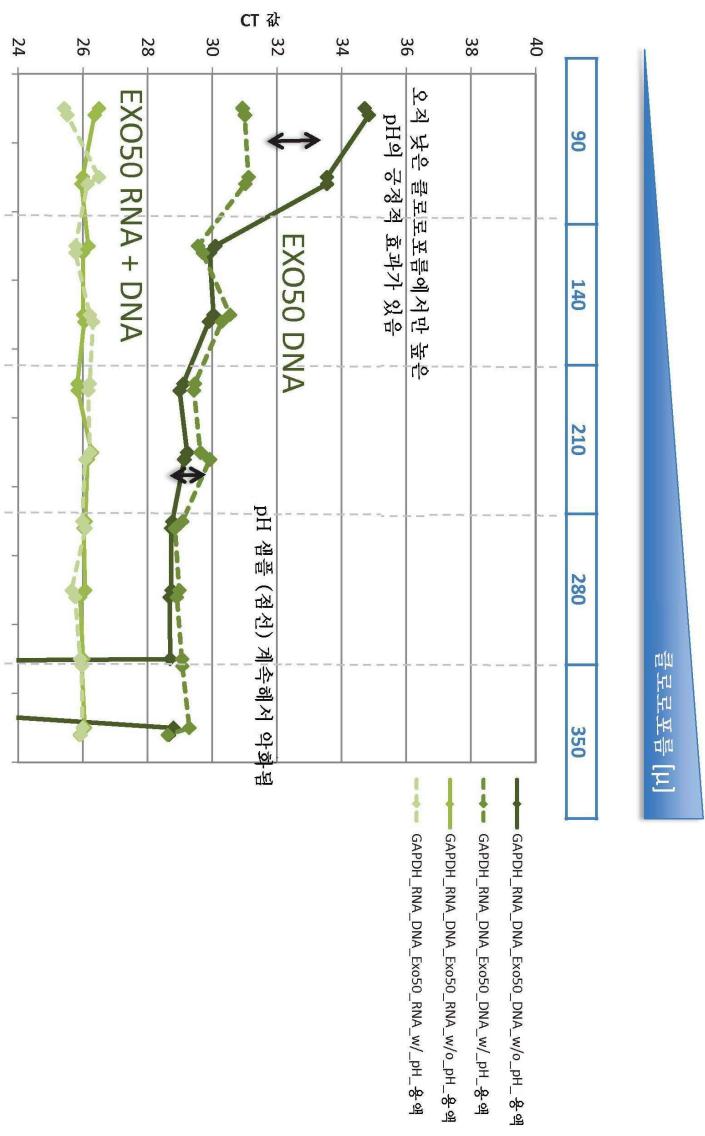
## pH 컨디셔닝 용액 제조

10N (10mol/l) 수산화나트륨  
1M 시트르산나트륨 pH 8.5 (자가 제조)



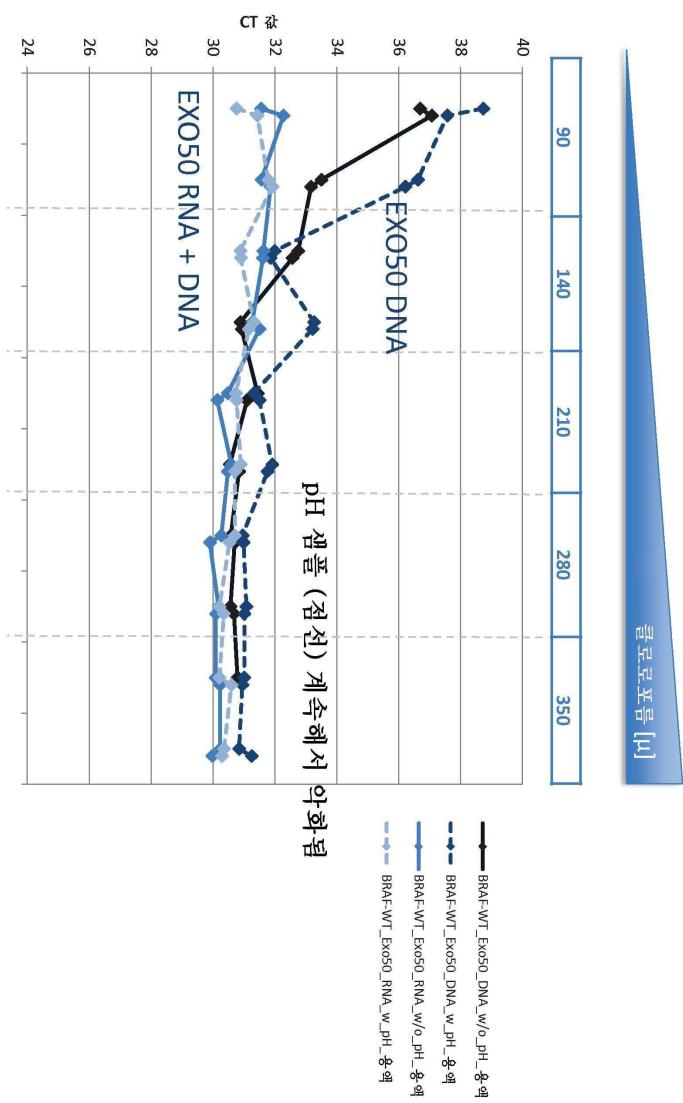
도면59

수성 상으로부터의 DNA 단위: pH 용액을 첨가한 및 첨가하지 않은 클로로포름 적정

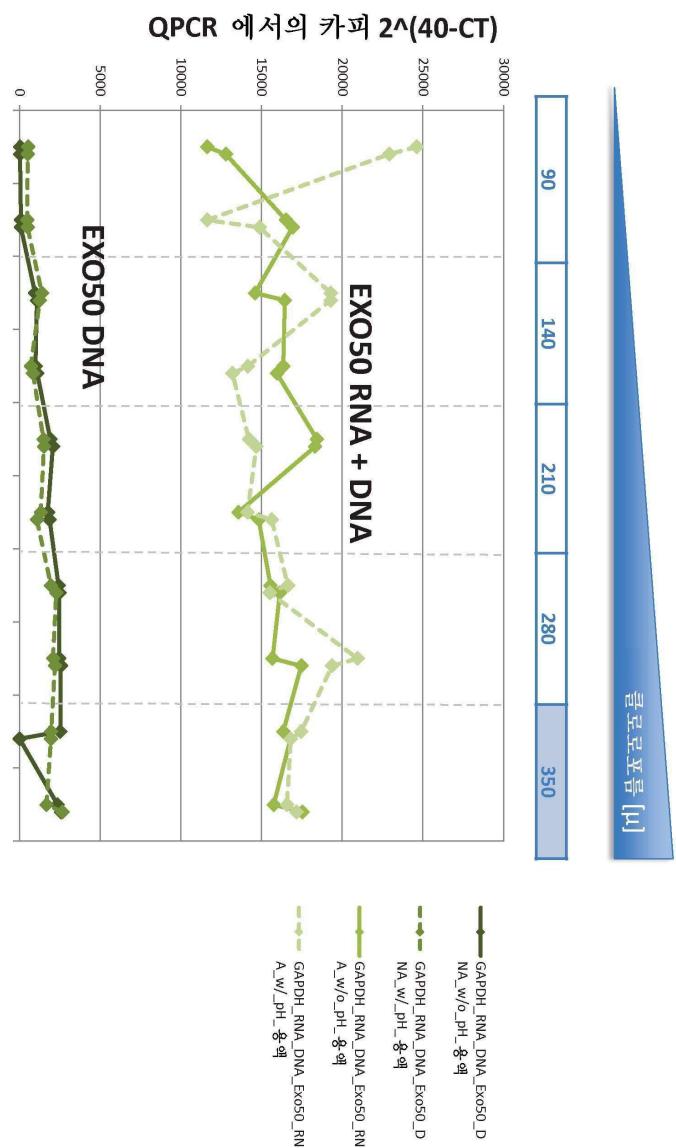


도면 60

수성 상으로부터의 DNA 단위: pH 용액을 첨가한 뒤 첨가하지 않은 클로로포름 처리



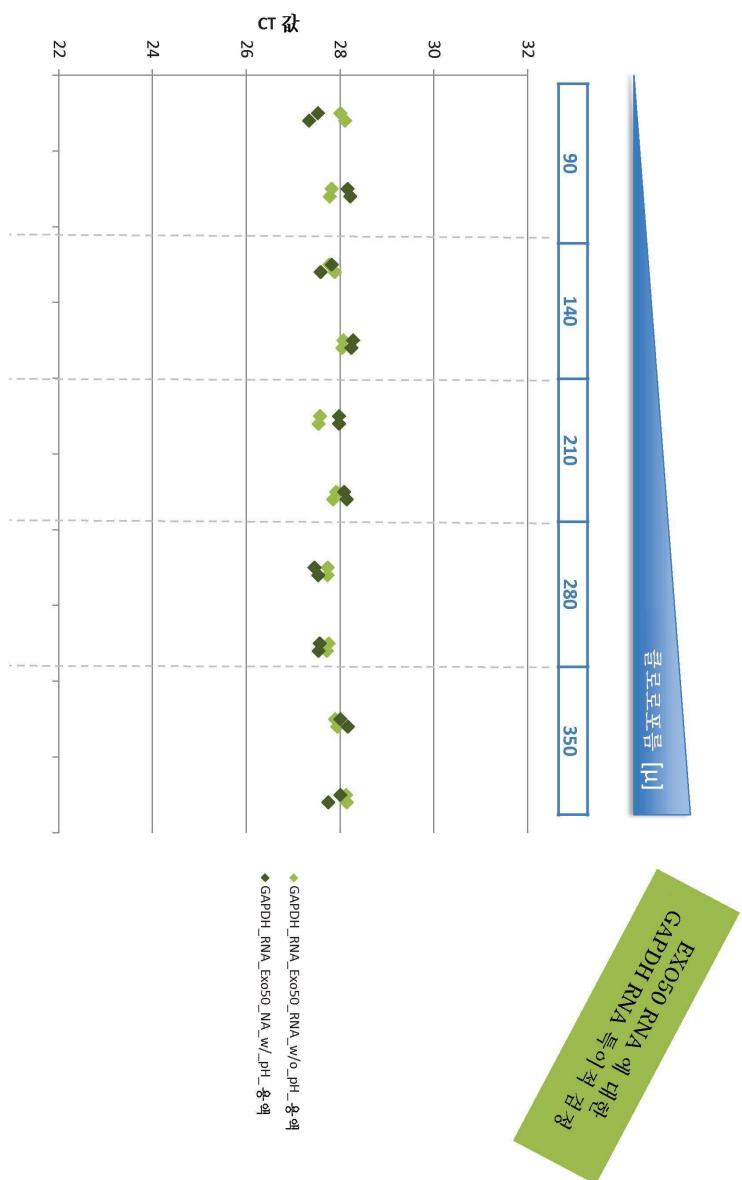
## 도면61



수성 상으로부터의 DNA 단위: pH 용액을 첨가한 및 첨가하지 않은 클로로포름 처리

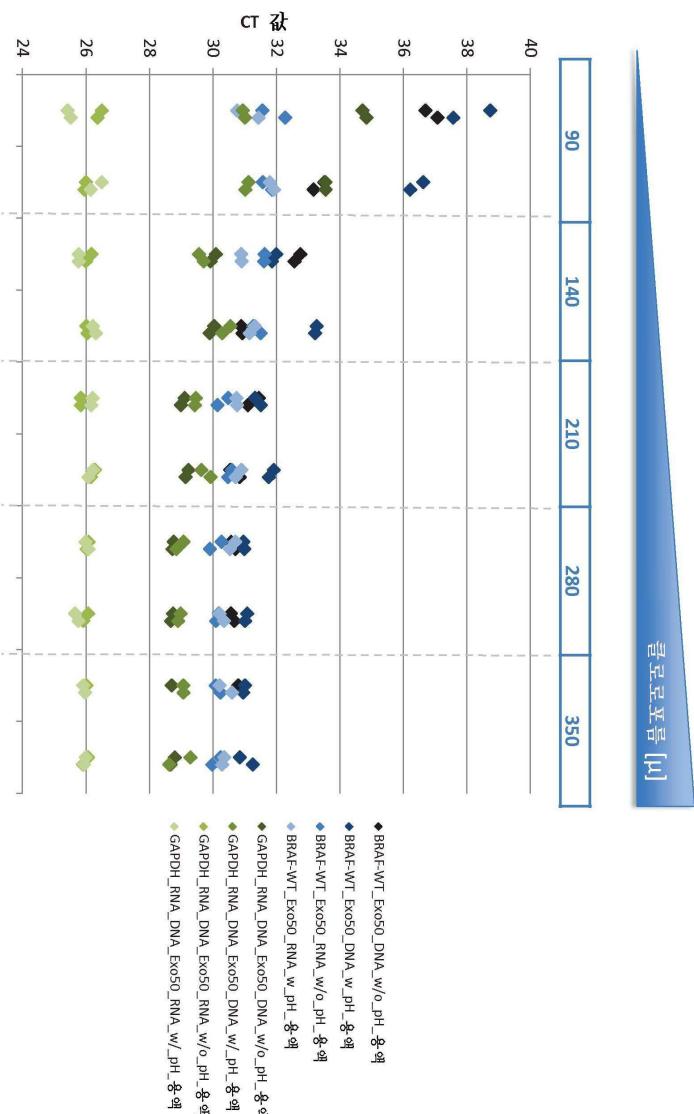
## 도면62

추성 죽으로부터의 DNA 단리: pH 용액을 첨가한 및 첨가하지 않은 클로로포름 적정



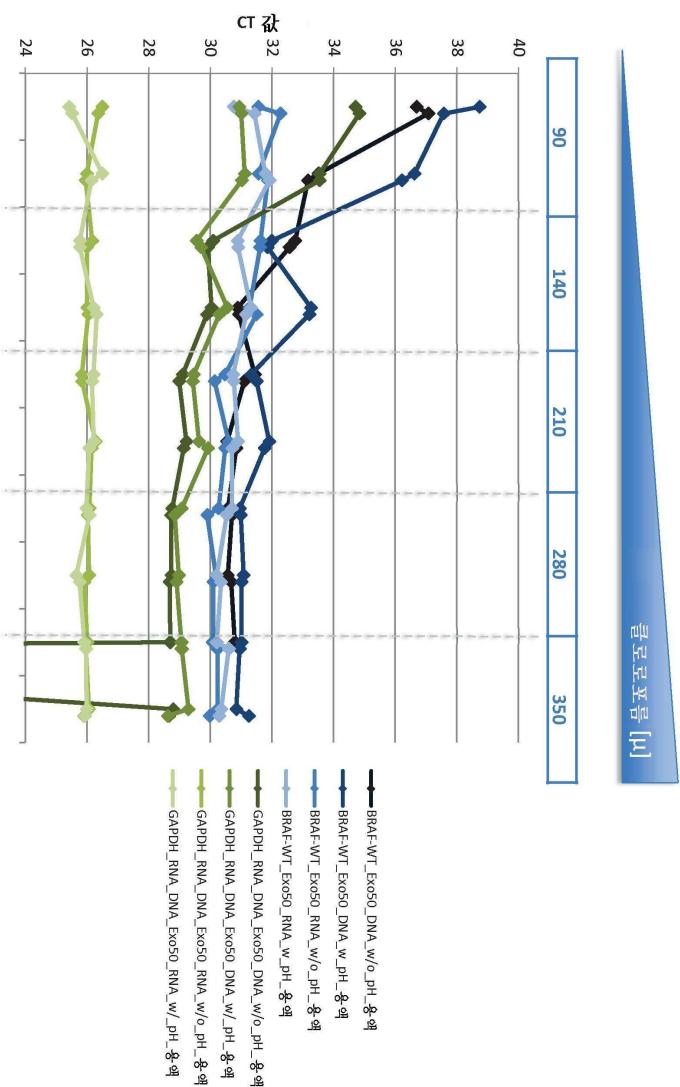
도면63

추성 상으로부터의 DNA 단리: pH 용액을 첨가한 및 첨가하지 않은 클로로포름 처리



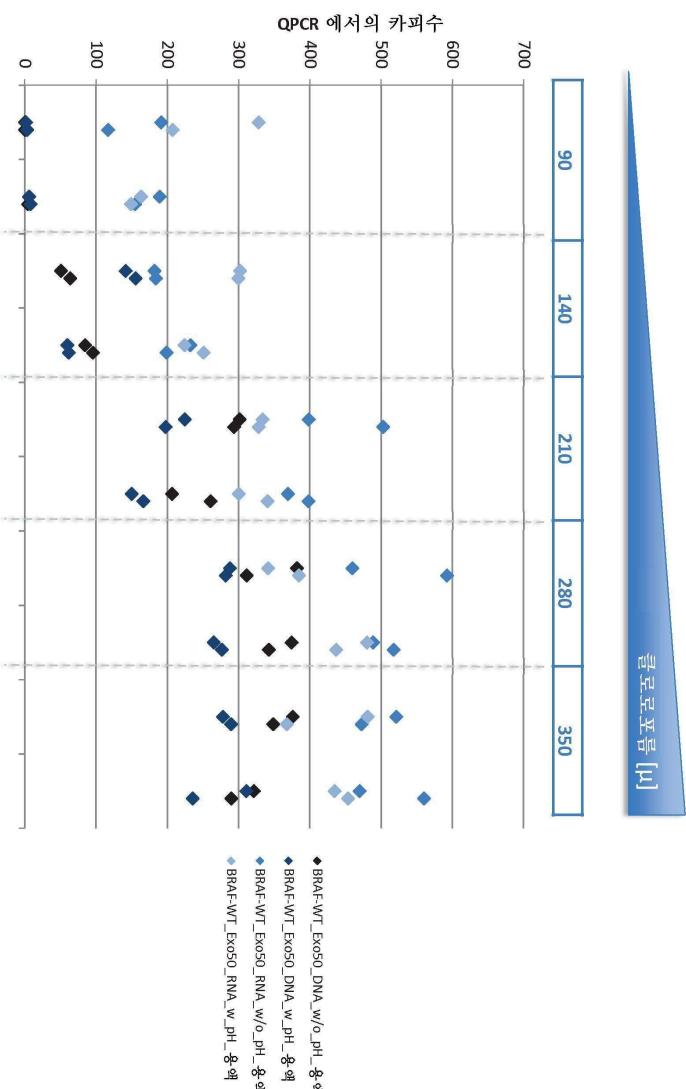
도면64

수성 상으로부터의 DNA 단위: pH 용액을 첨가한 및 첨가하지 않은 클로로포름 처리



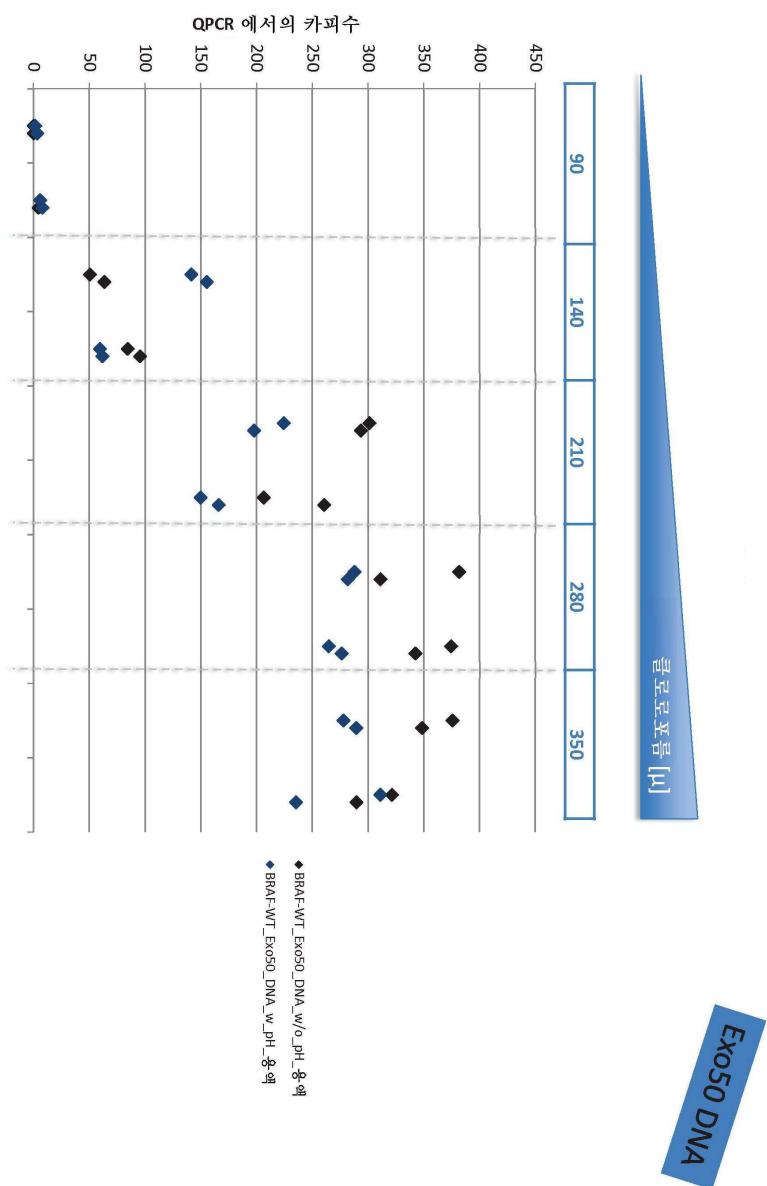
## 도면65

수성 상으로부터의 DNA 단리: pH 용액을 첨가한 및 첨가하지 않은 클로로포름 적정



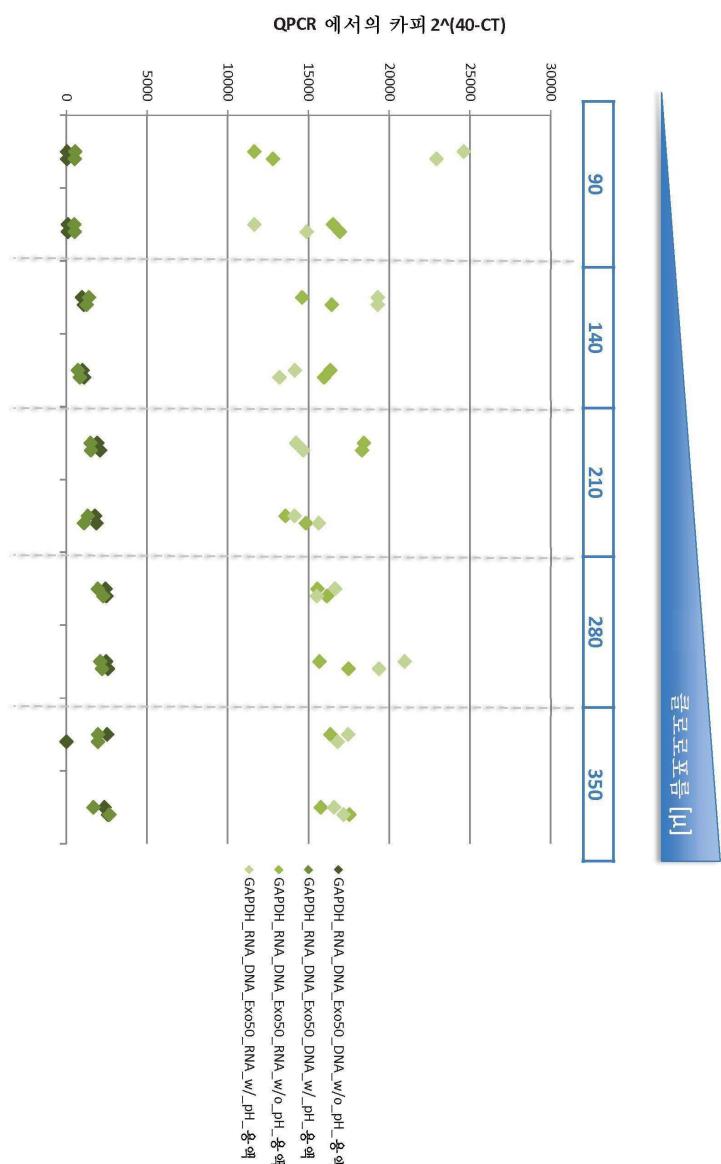
도면66

수성 상으로부터의 DNA 단리: pH 용액을 첨가한 및 첨가하지 않은 클로로포름 적정



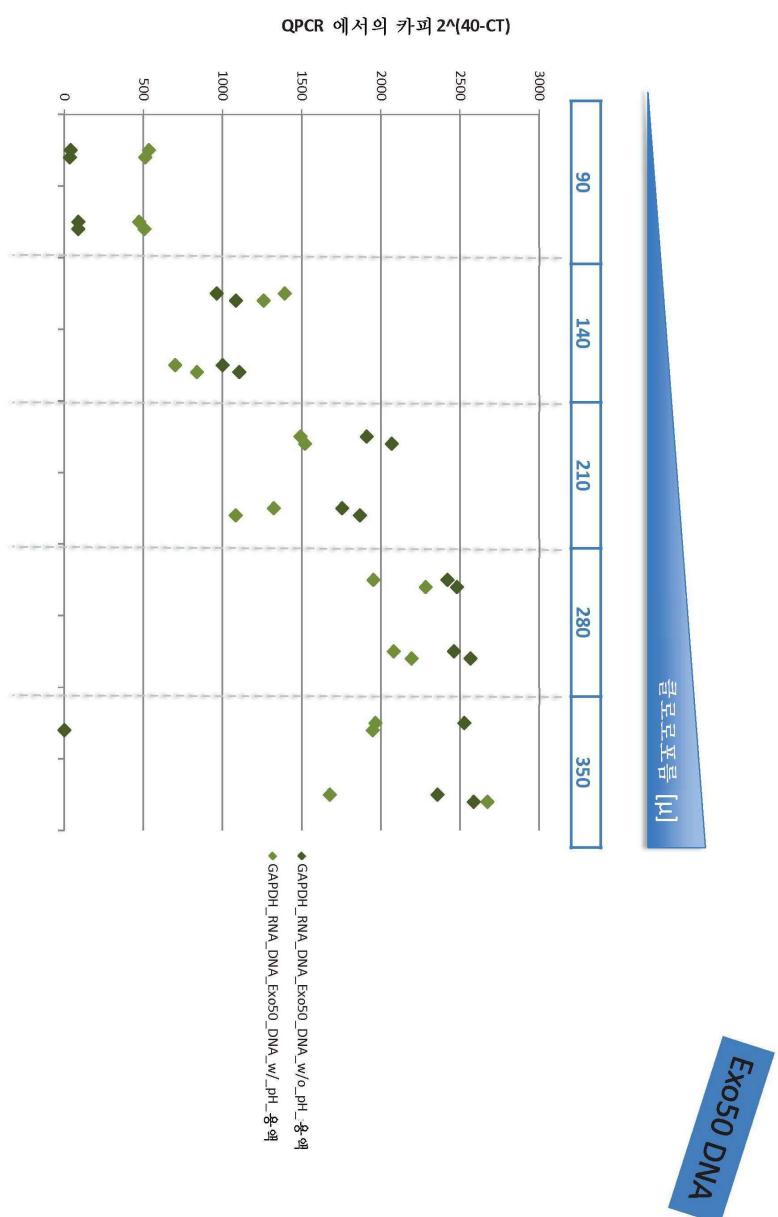
도면67

수성 상으로부터의 DNA 단리: pH 용액을 증가한 및 증가하지 않은 클로로포름 적정



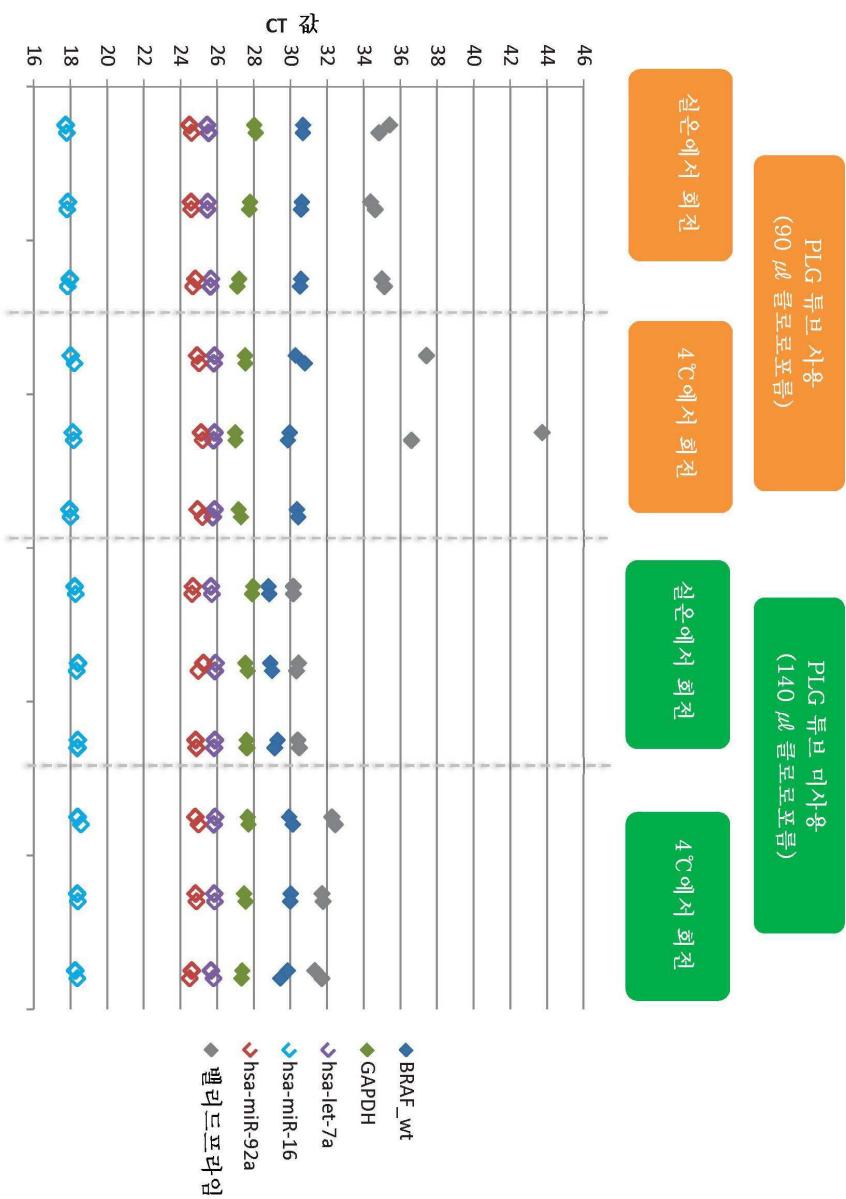
## 도면68

추첨 상으로부터의 DNA 단위: pH 옹액을 첨가한 및 첨가하지 않은 클로로포름 처리



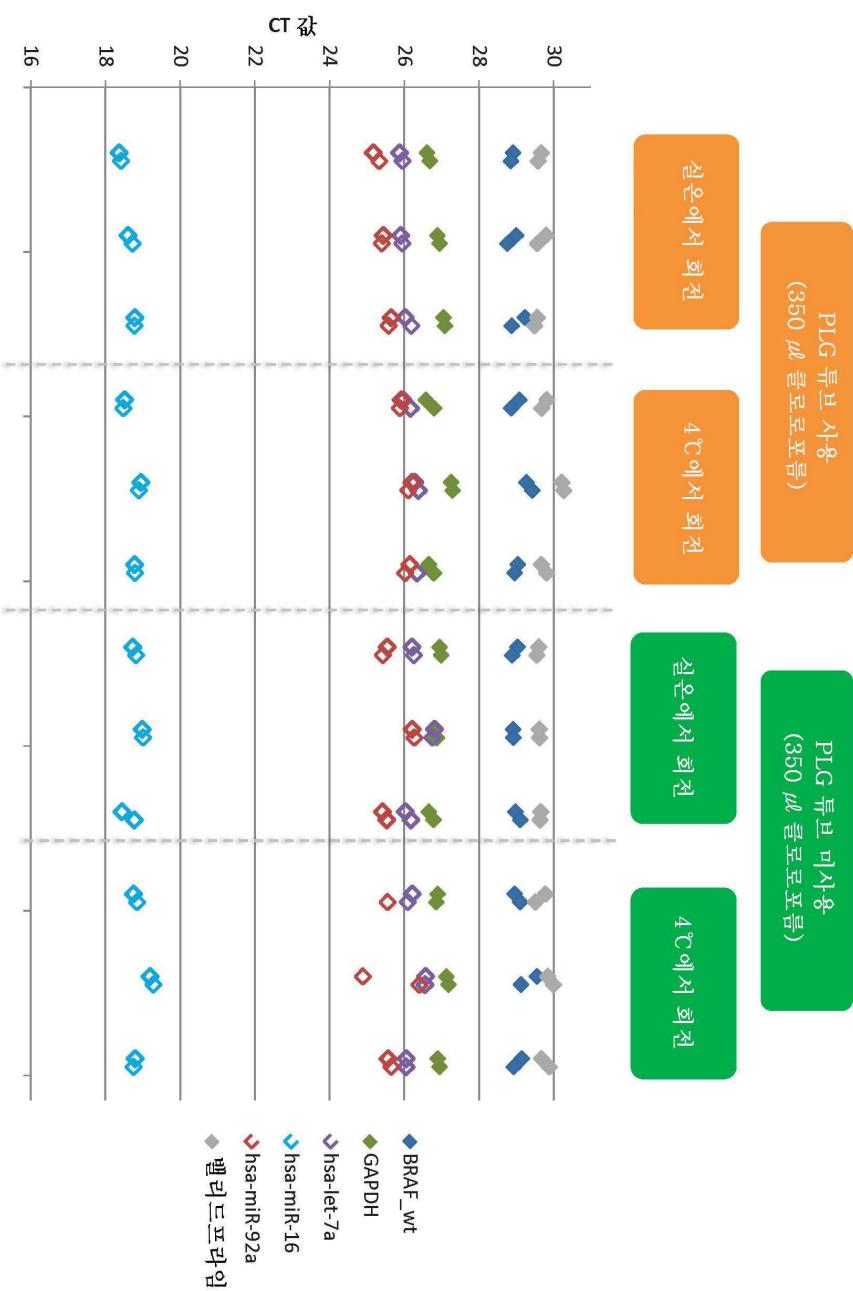
도면69

상업적으로 입수 가능한 RNA 단리: 캐이즐 회전 단계를 위한 4°C 대 실온

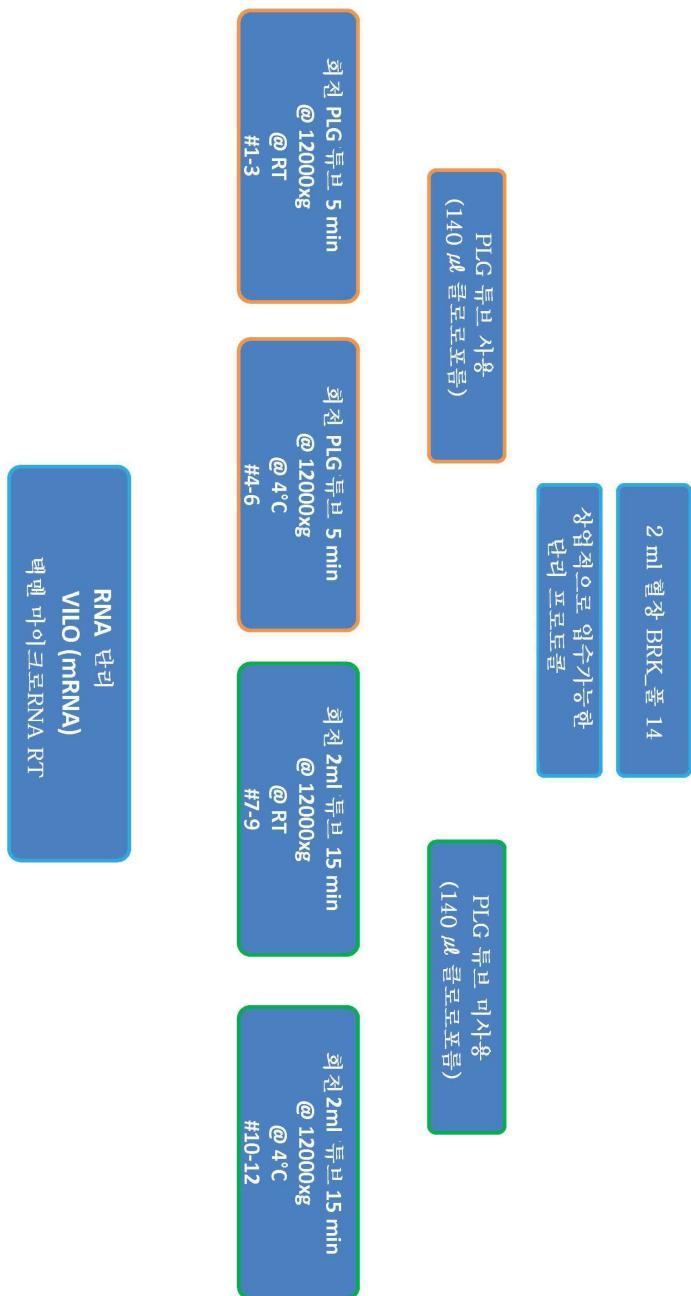


도면70

## EX0502.2 DNA 단리: 케아졸 회전 단계를 위한 4°C 대 실온



## 도면71

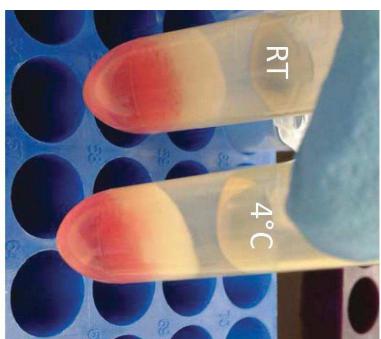
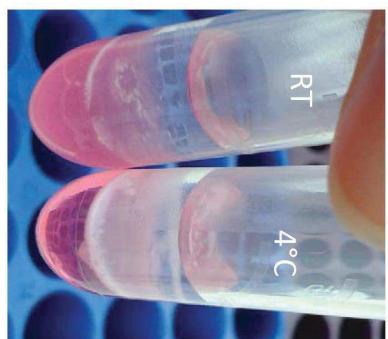


상업적으로 임수기 가능한 RNA 단리: 케아졸 회전 단계를 위한 4°C 대 실온

도면72

## 수성 상 측정: 액소 RN이지 v1(2.0x 에탄올)

샘플	PLG 투브	수성 상 [㎕]	RNA 단리를 위한
			100% 에탄올의 부피
1	사용	450	900
2	사용	450	900
3	사용	450	900
4	사용	450	900
5	사용	450	900
6	사용	450	900
7	미사용	350	700
8	미사용	400	800
9	미사용	350	700
10	미사용	350	700
11	미사용	350	700
12	미사용	350	700

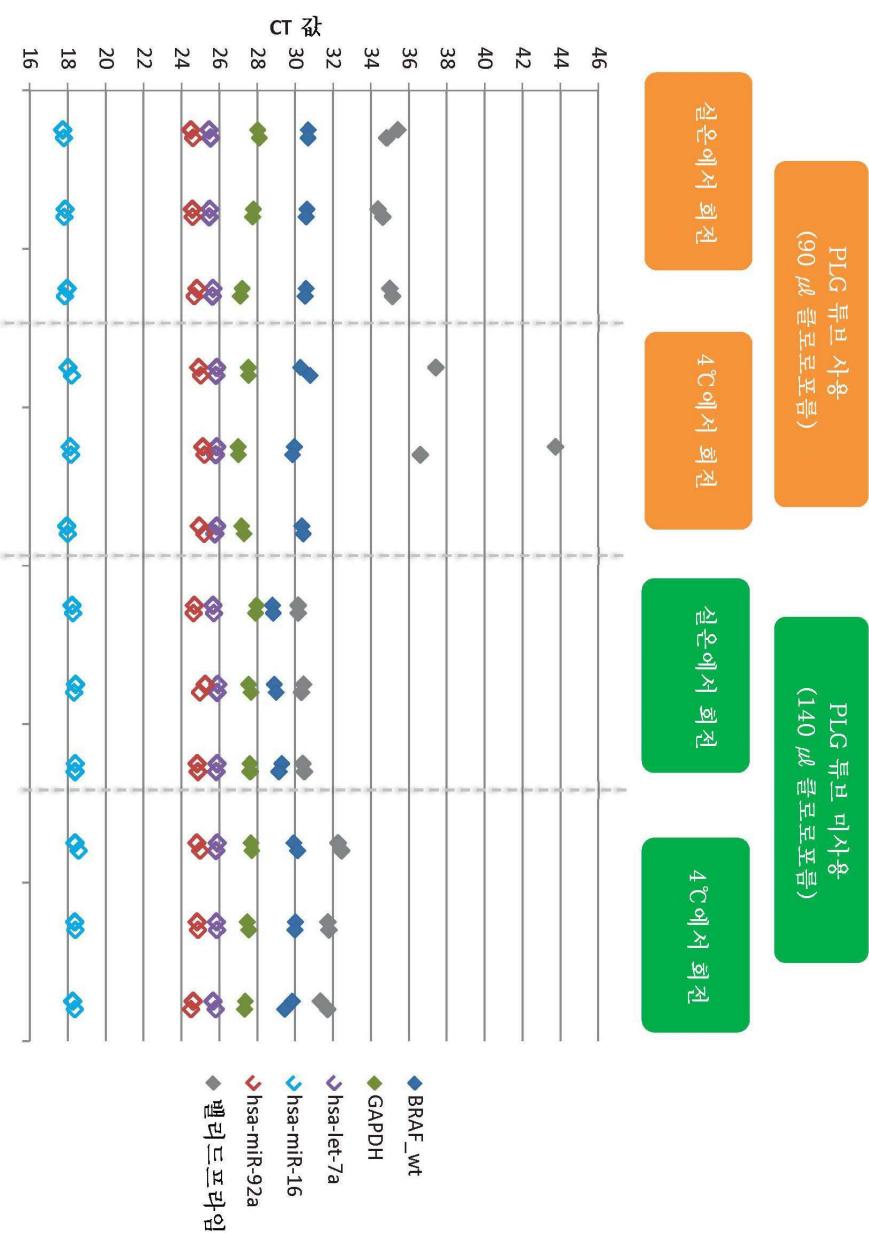


RT 또는 4°C 화전 온도를 사용한  
상 분리 (PLG 투브)에서는 차이가 없음

4°C 샘플보다 RT 샘플에는 상간 물질  
(황색 고리)이 더 적게 존재하고,  
폐늘 상은 더욱 혼탁함

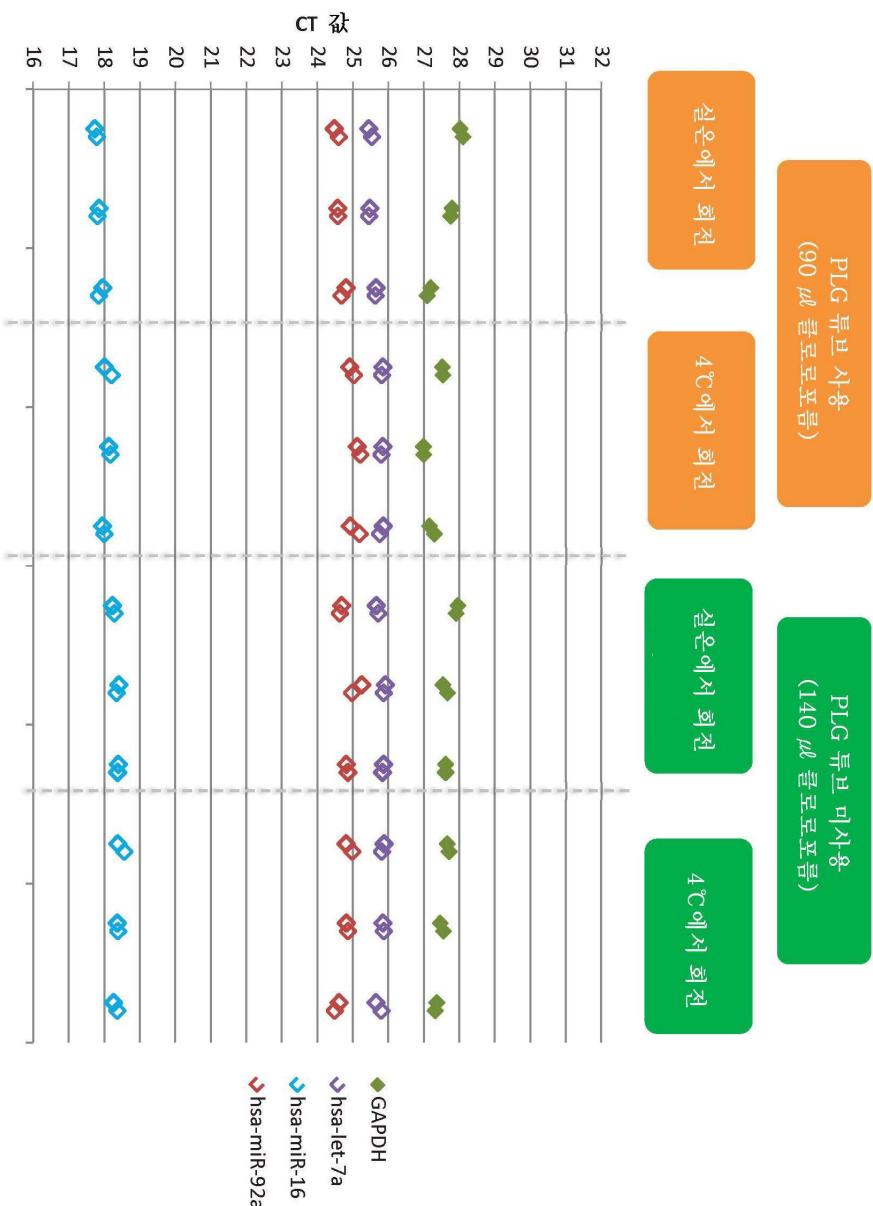
## 도면73

상업적으로 입수가능한 RNA 단리: 케이줄 회전 단계를 위한 4°C 대 실온



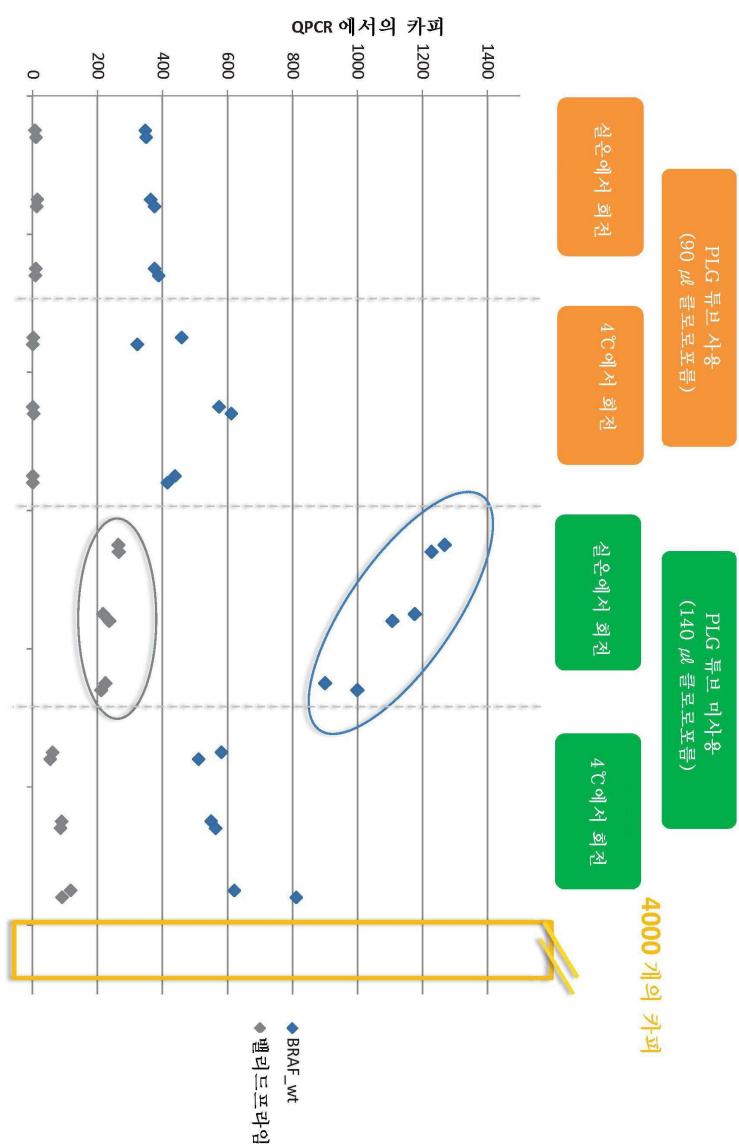
도면74

### 상업적으로 입수가능한 RNA 단리: 퀴아졸 회전 단계를 위한 4°C 대 실온



## 도면75

성업적으로 입수가능한 RNA 단위: 쿼아졸 회전 단계를 위한 4°C 대 실온



## 도면76

EX0502.2 DNA 단리: 캐이즐 휘진 단계를 위한 4°C 대 실온

2ml 헬장  
BRK- 풀 14

EX052.2  
DNA 단리

PLG 투브 사용  
(350 µl 클로로포름)

휘진 PLG 투브 5 min  
@ 12000xg  
@ RT  
#1-3

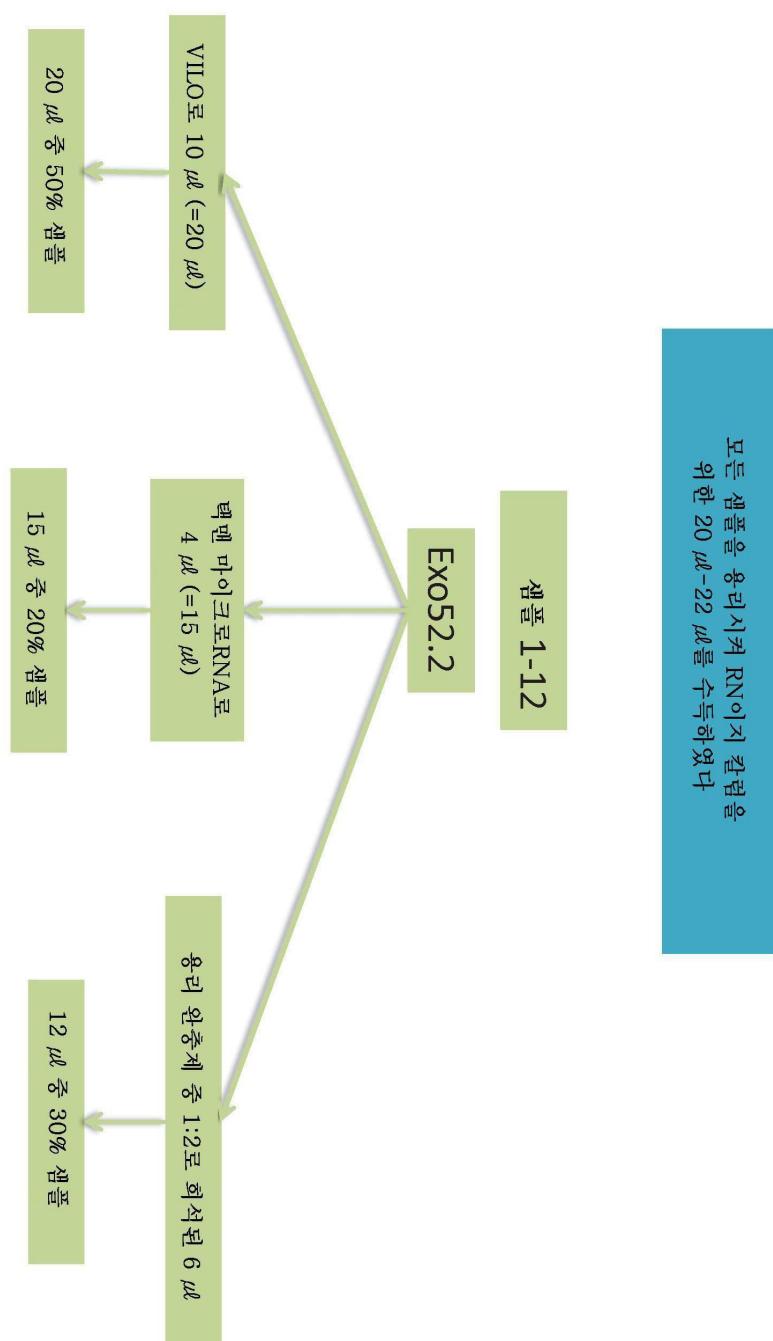
휘진 PLG 투브 5 min  
@ 12000xg  
@ 4°C  
#4-6

휘진 2ml 투브 15 min  
@ 12000xg  
@ RT  
#7-9

휘진 2ml 투브 15 min  
@ 12000xg  
@ 4°C  
#10-12

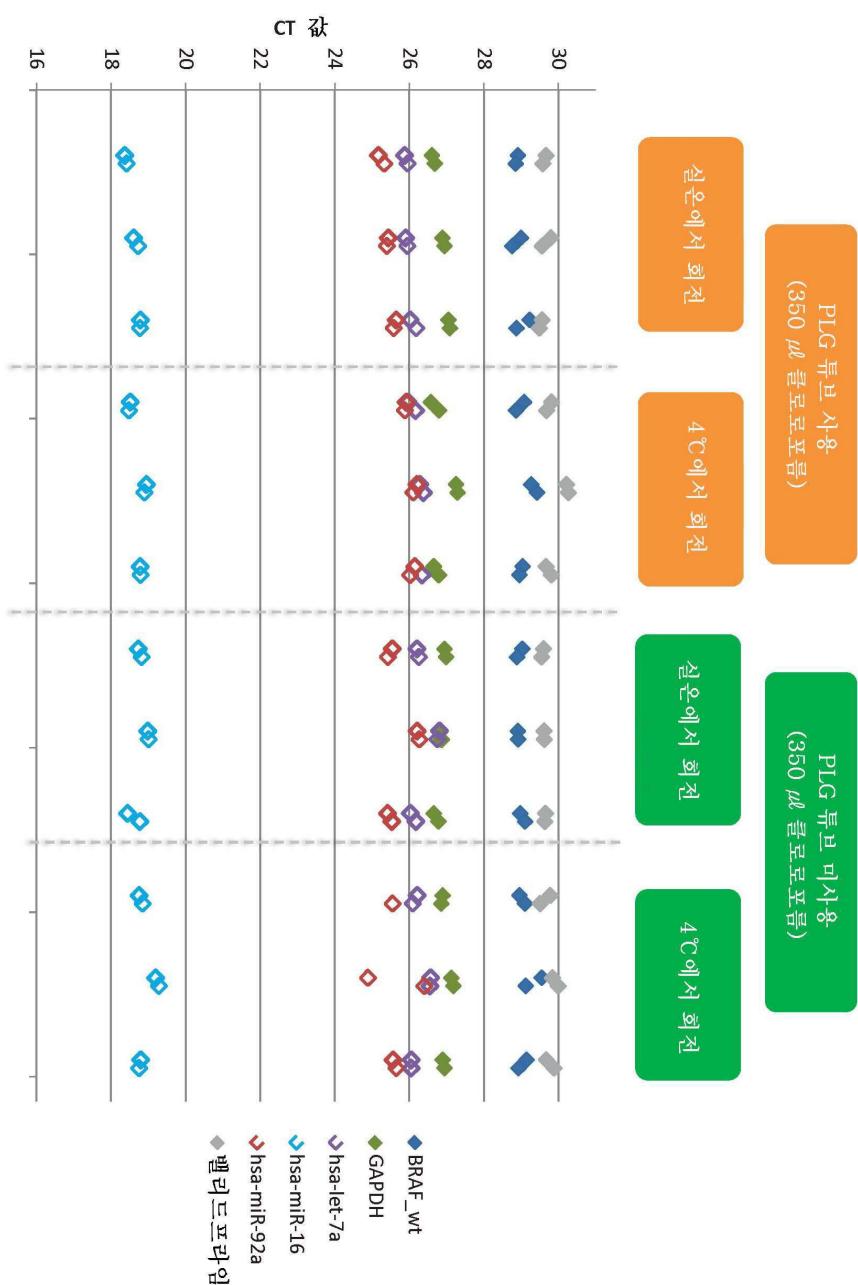
20 µl 중 용리  
VIVO RT 반응으로 10 µl  
택렌 디아이크로RNA RT로 4 µl  
용리 완충제 중 1:2 회석액 6 µl

도면77



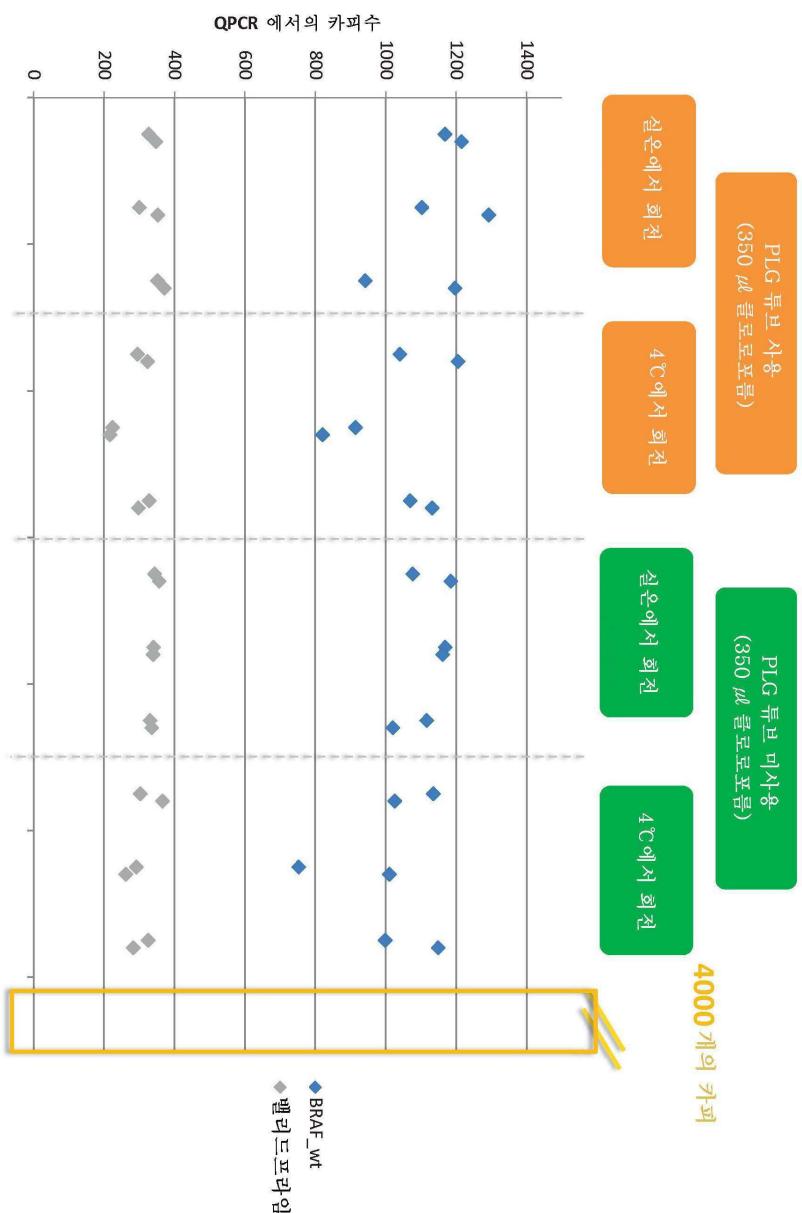
도면78

## EXO502.2 DNA 단리: 캐이줄 회전 단계를 위한 4°C 대 실온

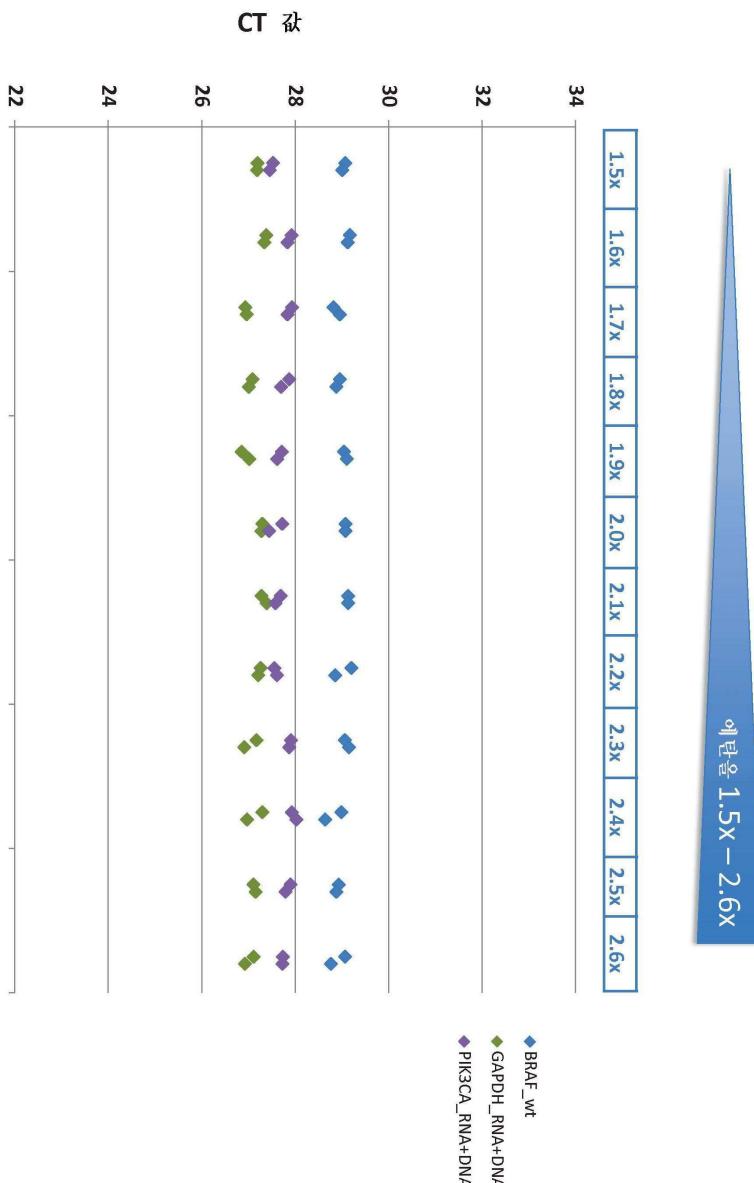


도면79

## EXO502.2 DNA 단리: 츄아졸 회전 단계를 위한 4°C 대 실온



## 도면80



## 도면81

## Exo52.2 : 상이한 에탄올 부피 1.5x – 2.6x

2ml 혼장  
BRK\_ 풀 18

자각 13x EXO52.2 단위

수성 성을 풀어서하고,  
동량 (450  $\mu$ l)으로 분할한다

**1.5x**  
에탄올  
**#1**

**1.6x**  
에탄올  
**#2**

**1.7x**  
에탄올  
**#3**

**1.8x**  
에탄올  
**#4**

**1.9x**  
에탄올  
**#5**

**2.0x**  
에탄올  
**#6**

**2.1x**  
에탄올  
**#7**

**2.2x**  
에탄올  
**#8**

**2.3x**  
에탄올  
**#9**

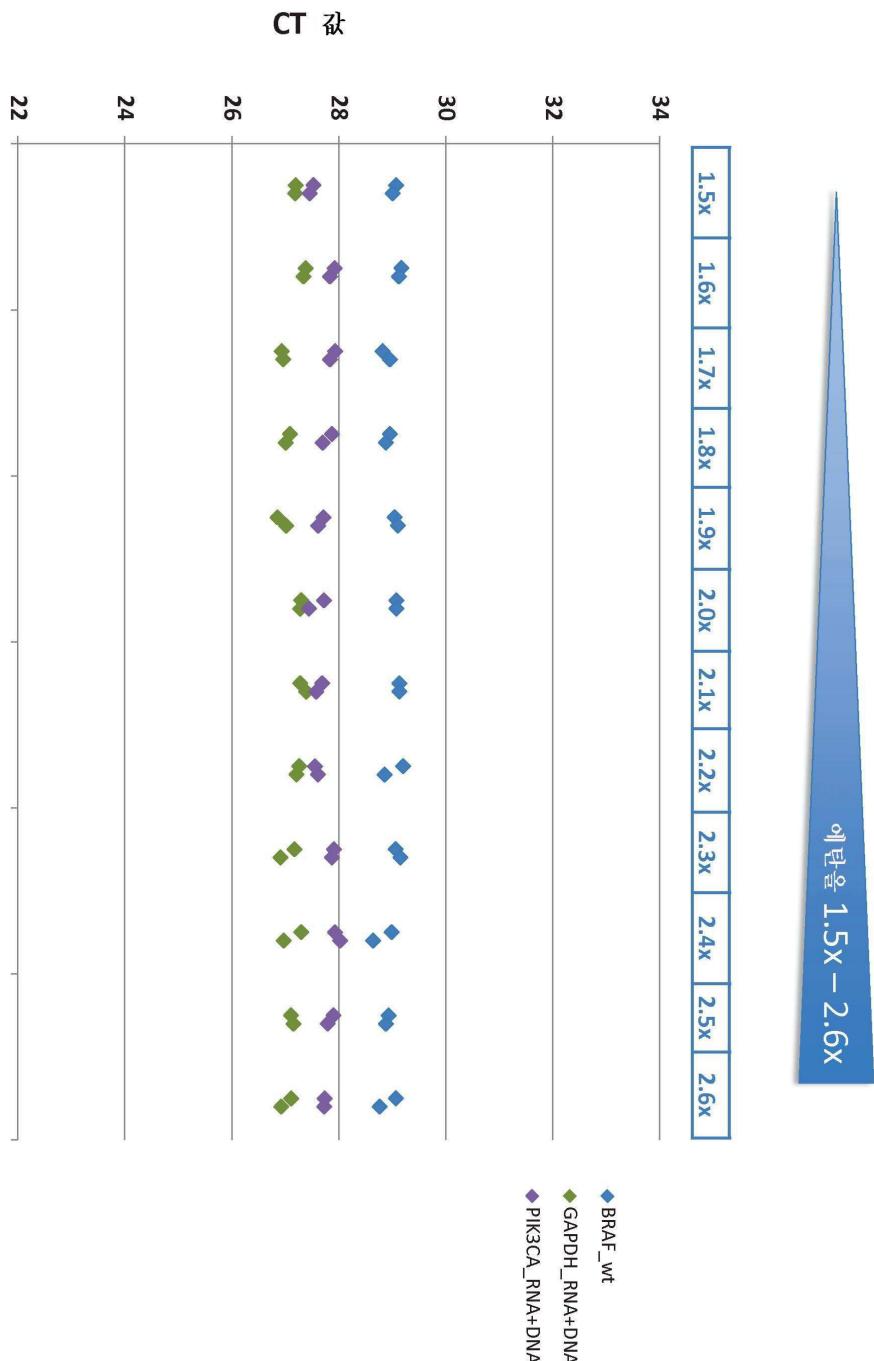
**2.4x**  
에탄올  
**#10**

**2.5x**  
에탄올  
**#11**

**2.6x**  
에탄올  
**#12**

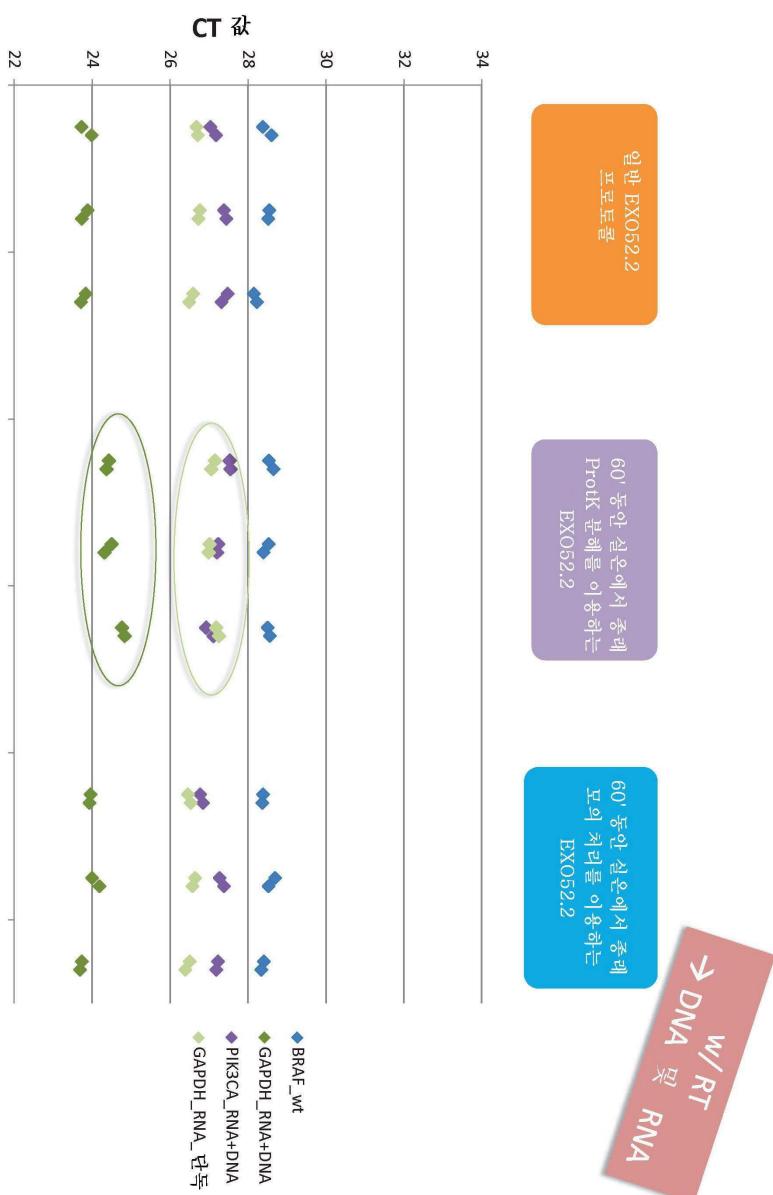
22  $\mu$ l의 뉴클레아리제 무향유 물  
중에서 용라시카고 1:2로  
회식한다

도면82



## 도면 83

Exo52.2: EXO52.2 결합 단계 이전에 실온에서 ProtK 분해



RNA 단독 검정법 및 GAPDH DNA + RNA 검정법의 성능은 ProtK 처리 샘플 사용 시 악화된다.

도면84

Exo52.2: EXO52.2 결합 단계 이전에 실온에서 ProtK 분해

2ml 월장  
BRK\_ 풀 18

일반 EXO52.2  
프로토콜  
#1-3

60' 동안 실온에서 중대  
ProtK 분해를 이용하는  
EXO52.2  
#4-6

200μl 프로테아제 K  
(cNA카트)

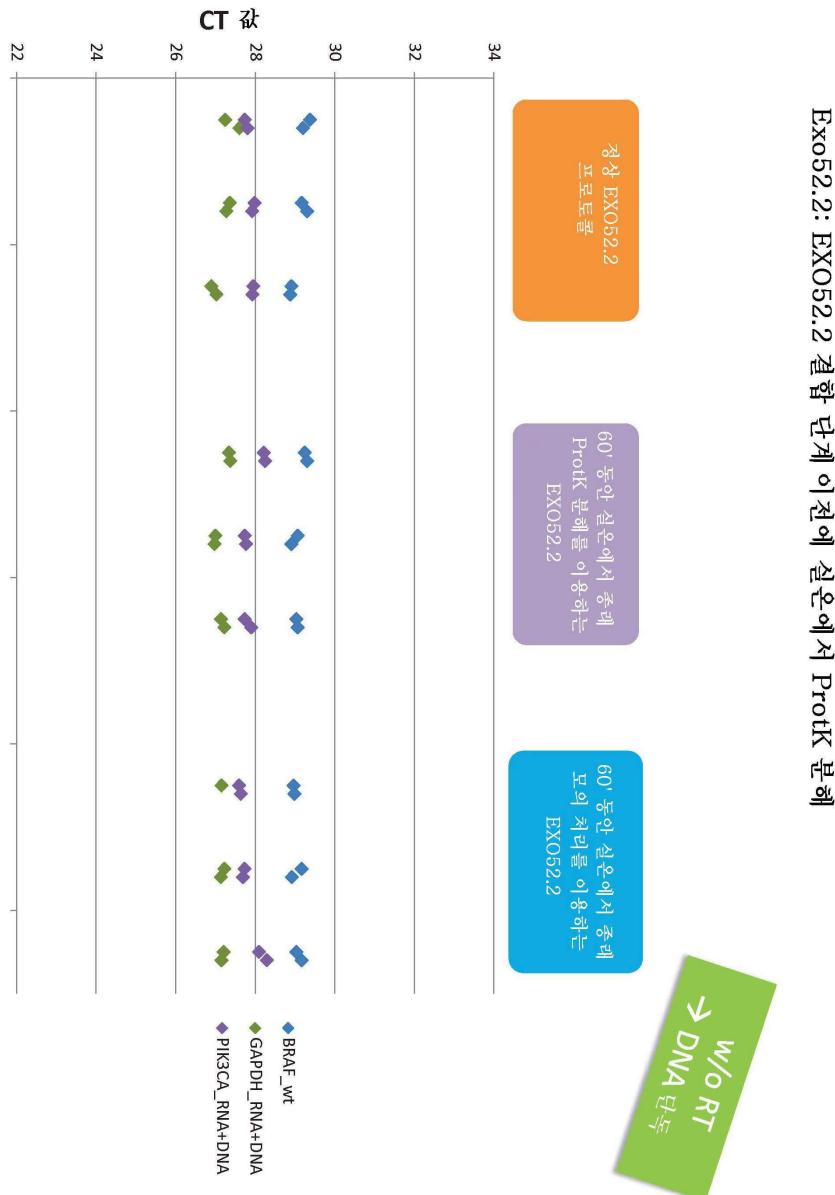
60' 동안 실온에서 중대  
모의 치리를 이용하는  
EXO52.2  
#4-6

200μl 1xPBS

22 μl의 뉴클레아제 무형유  
물 중에서 샘플을 용리시킨다

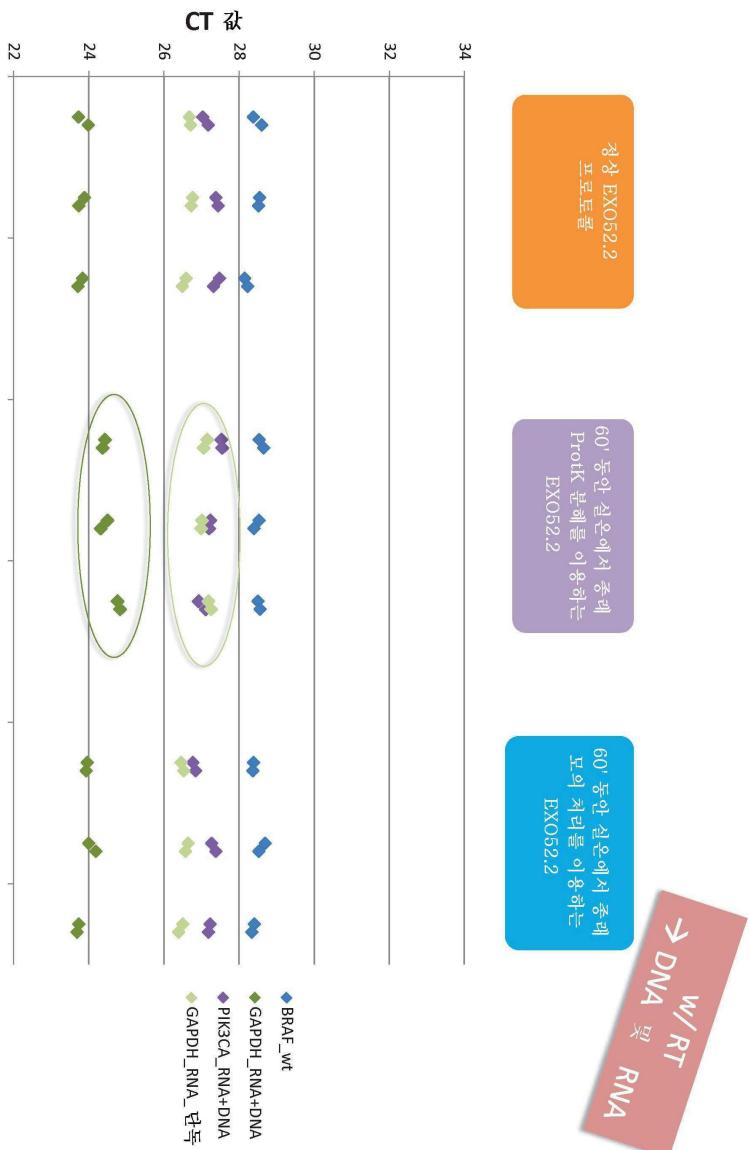
RT(VLLO)를 위해 10 μl를 사용한다  
용리 완충제를 사용하여 남은 10 μl를 1:2로 회색시킨다

도면85



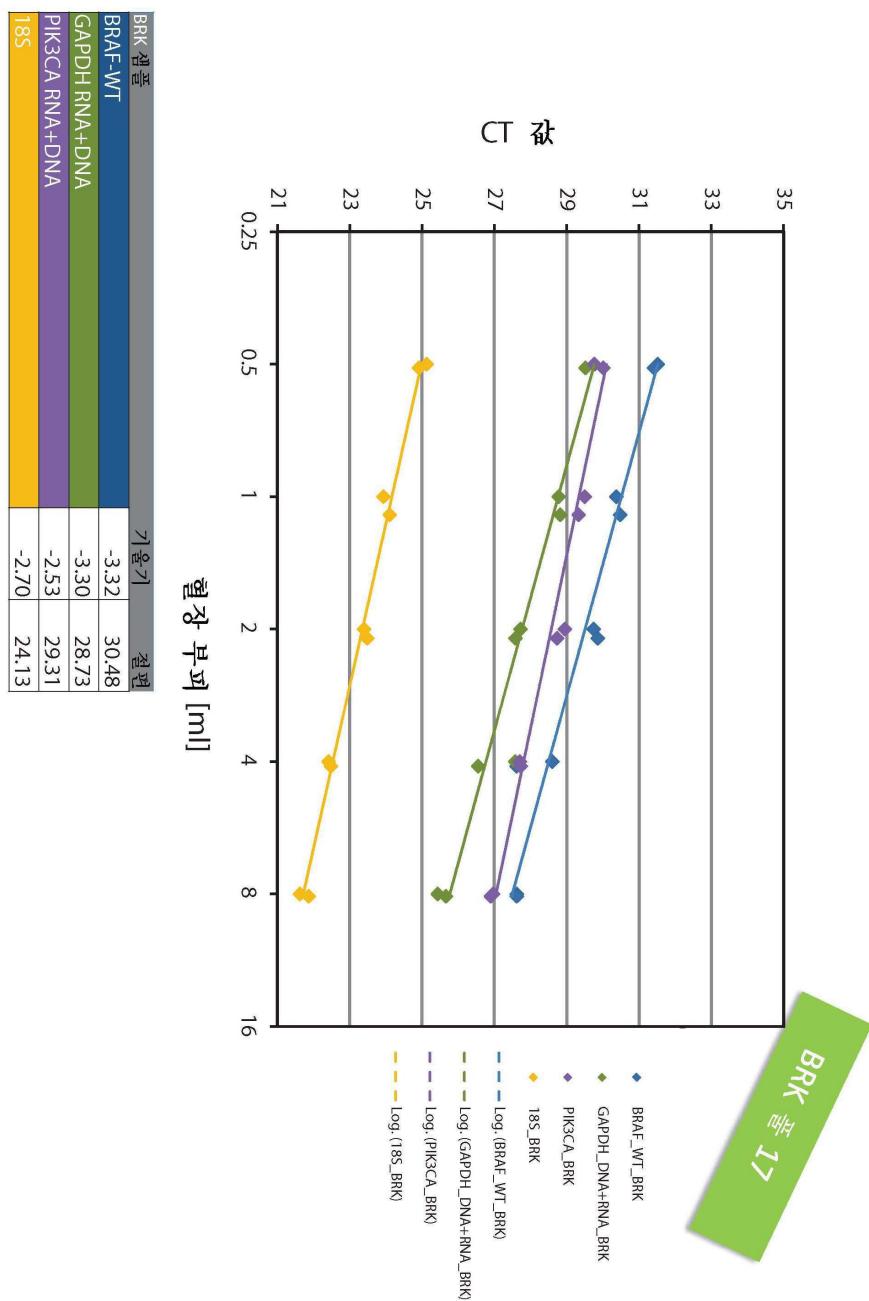
도면86

## Exo52.2: EXO52.2 결합 단계 이전에 실온에서 ProtK 분해

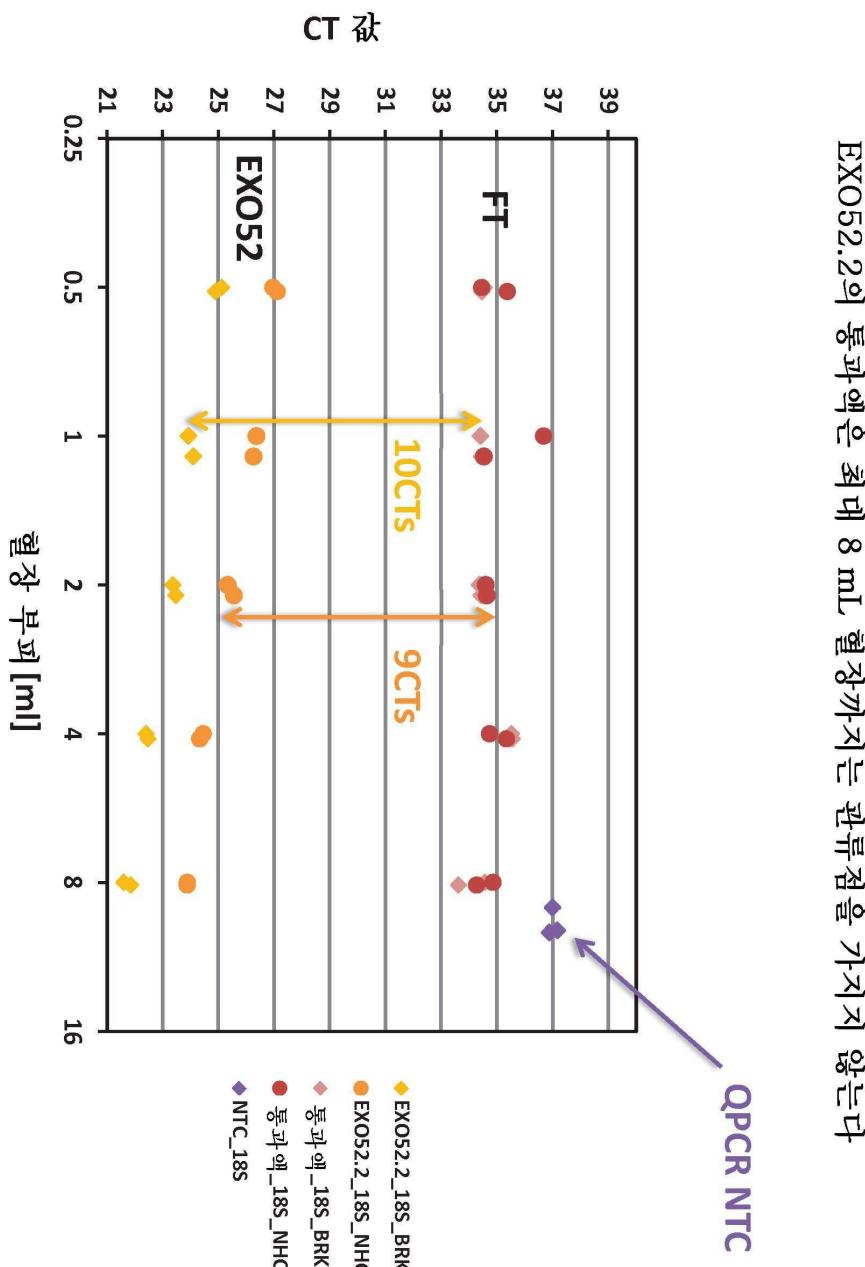


RNA 단독 검정법 및 GAPDH DNA + RNA 검정법의 성능은 ProtK 처리 샘플 사용 시 악화된다

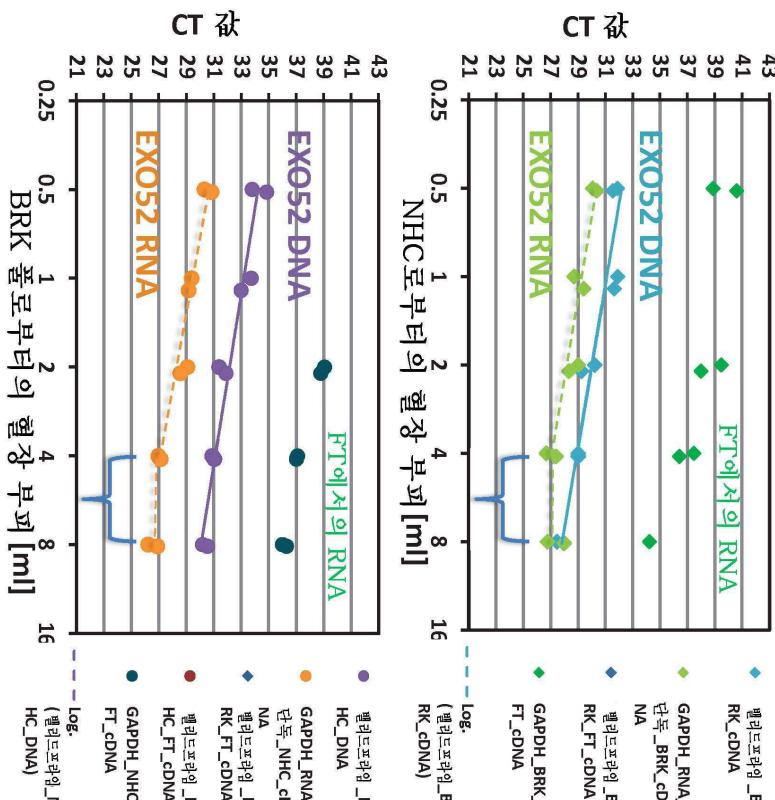
도면 87



도면88



## 도면89



실습

(1) EXO52 샘플 및 (2) CNA 키트를 이용하여 단리된 통과액 cDNA

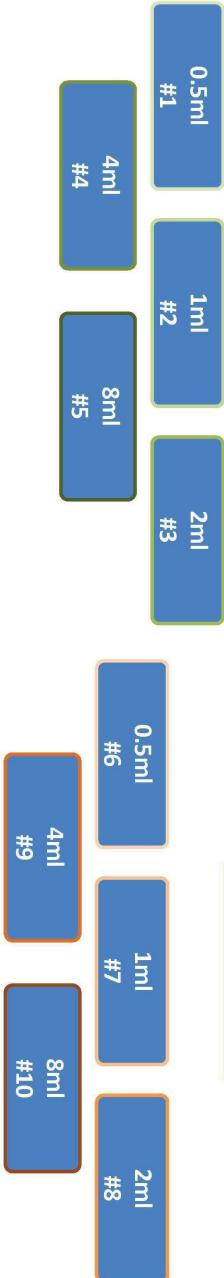
결과

RNA 4 mL에 이[로]기까지 선풍

FT 중 cfDNA 없음  
FT에서의 RNA는 2 ml로부터 계속 진행

도면90

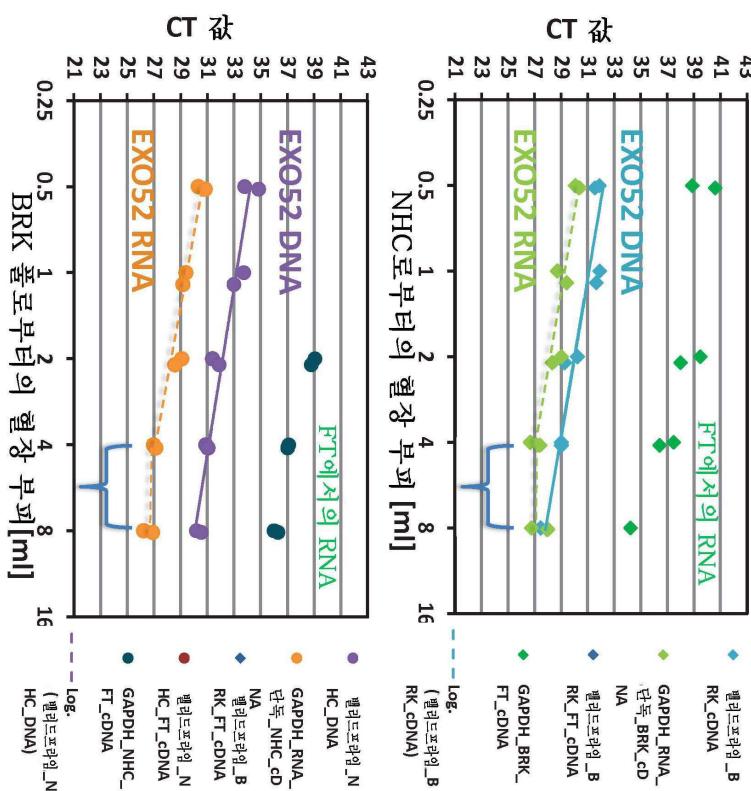
## EX052.2-로딩 용량

BRK\_ 풀 17  
월장MUC014 (NHCO4)  
월장

## EX052.2 실행

circ NA 카트를 통해 통과액으로부터  
남은 DNA를 단리VIVO RT를 위해 10 μl 사용(샘플#1-12)  
80°C에서 통과액의 RNA 저장  
남은 10 μl를 1:2로 회색(10 μl DNA + 10 μl 용리 용액)

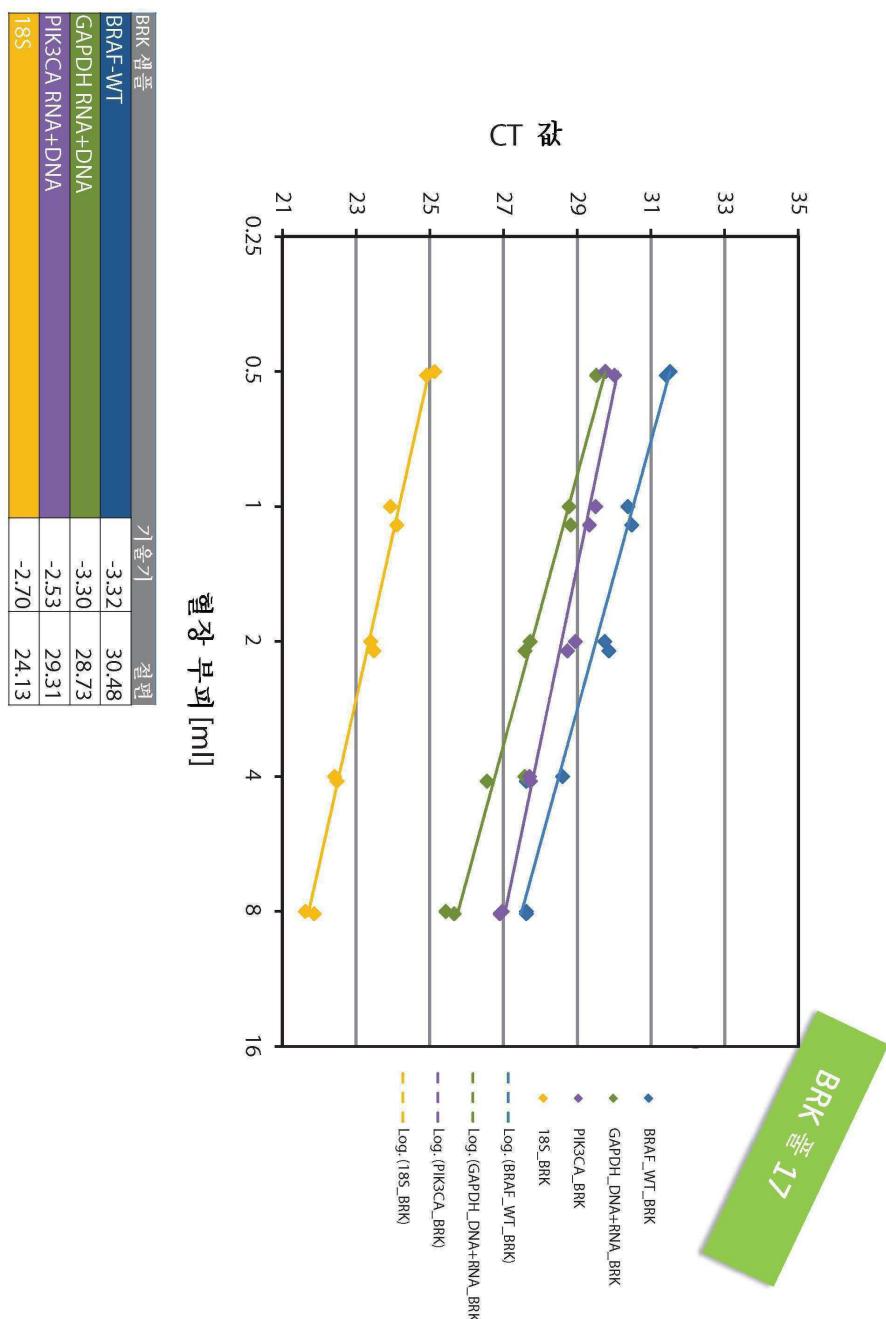
## 엑소줌 및 뉴클레오솜에 대한 상이한 EXO52 결합능



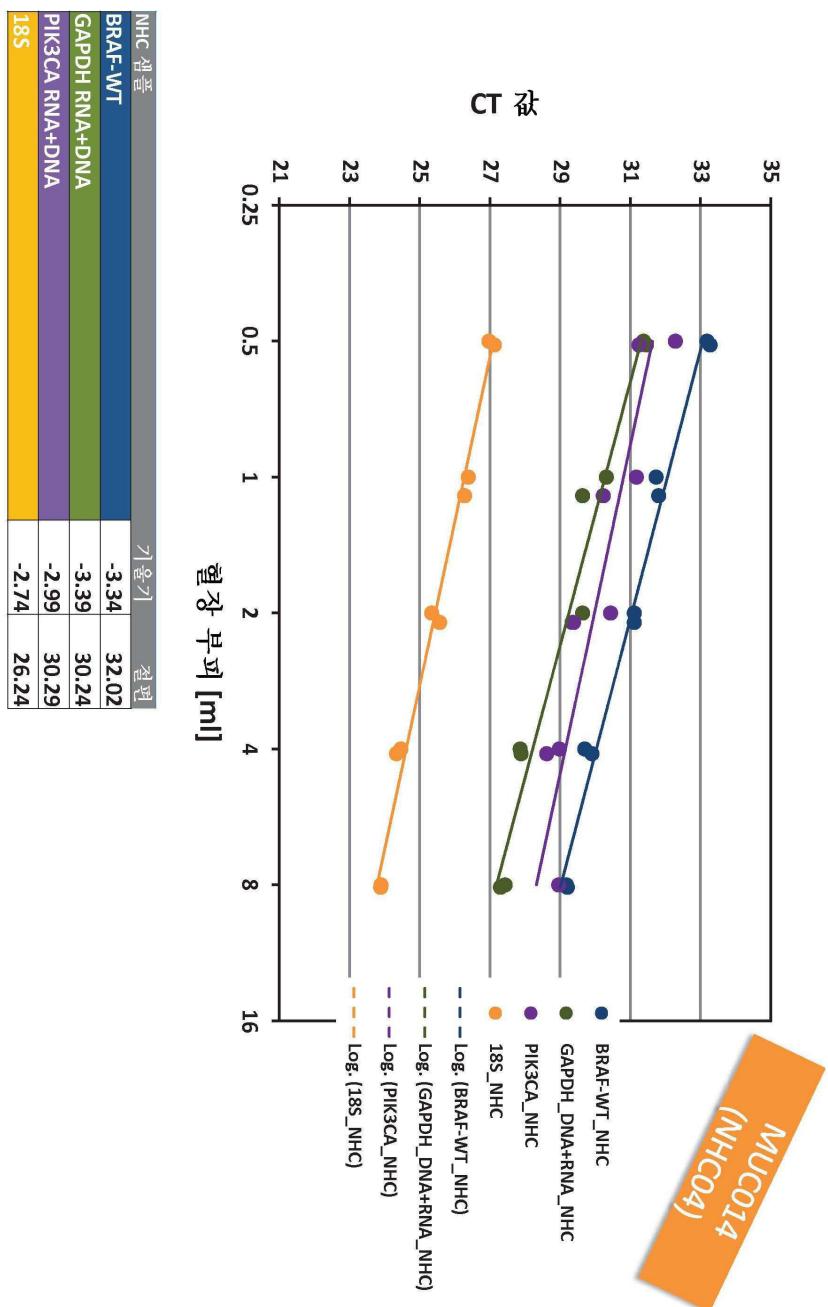
- 116 -

## 도면92

EX052.2 - 로딩 용량이 혈장 8 mL를 초과한다

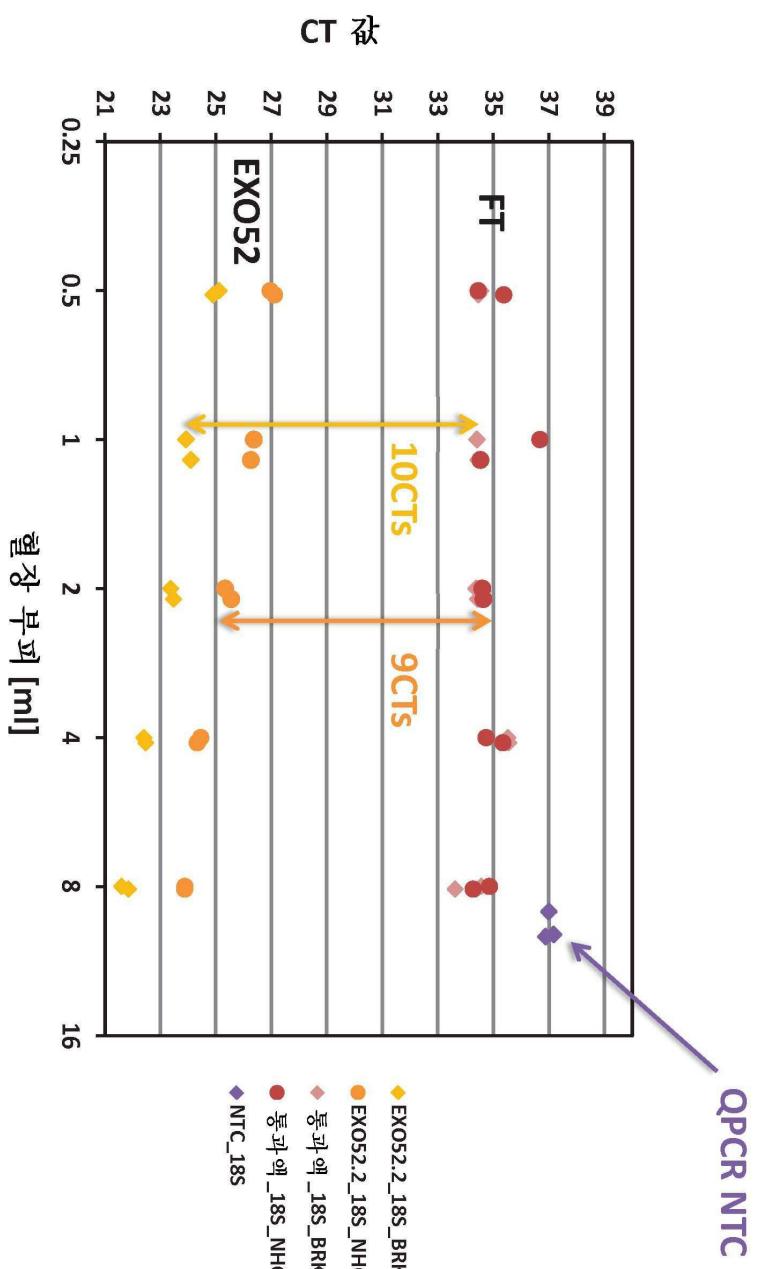


## 도면93



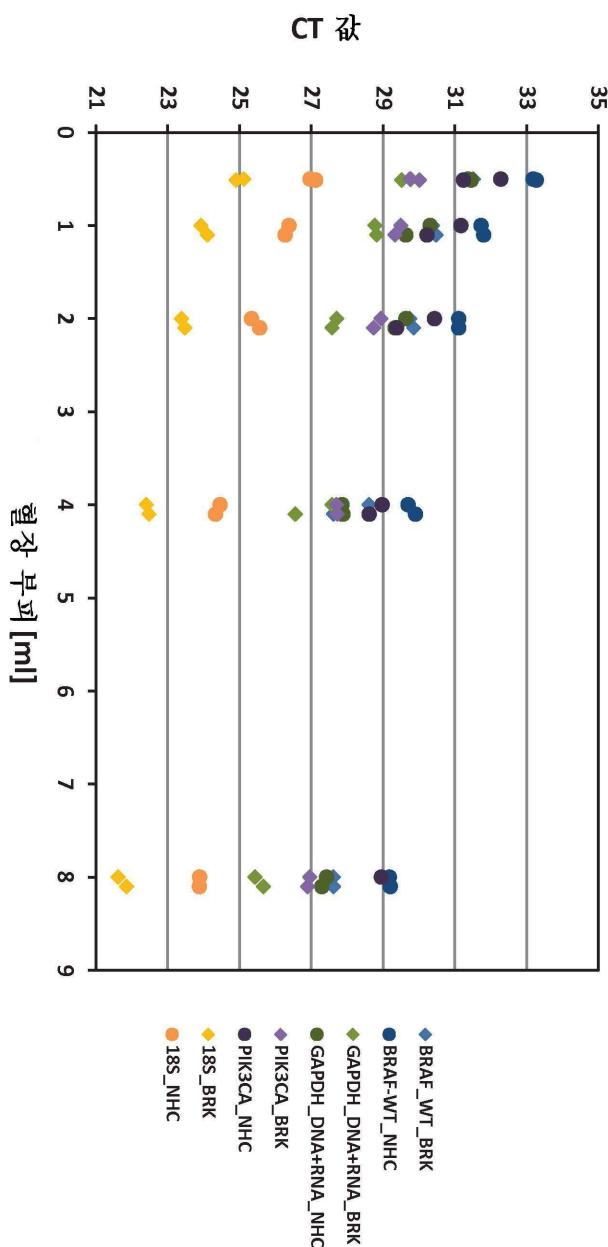
도면94

EXO52.2의 통과액은 최대 8 mL 월장까지는 관류점을 가지지 않는다



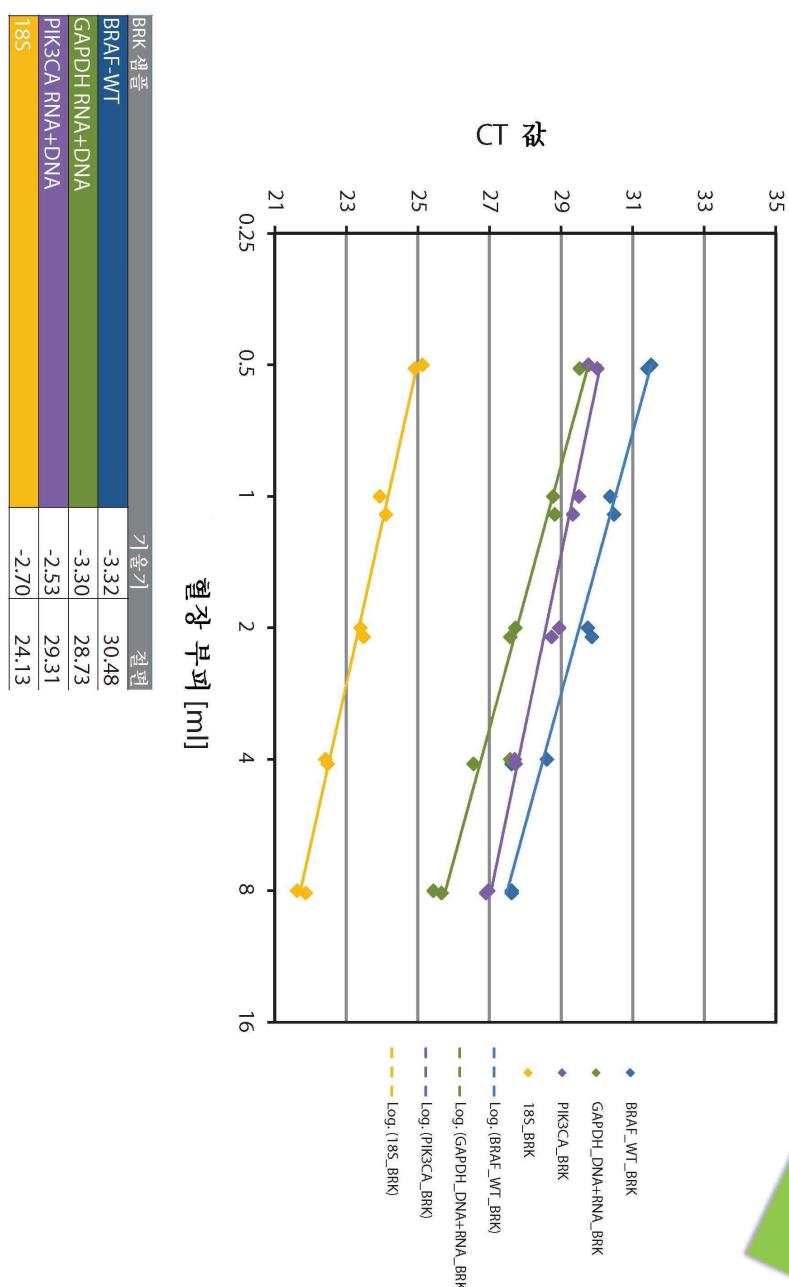
도면95

## EX052.2 – 로딩 용량



도면96

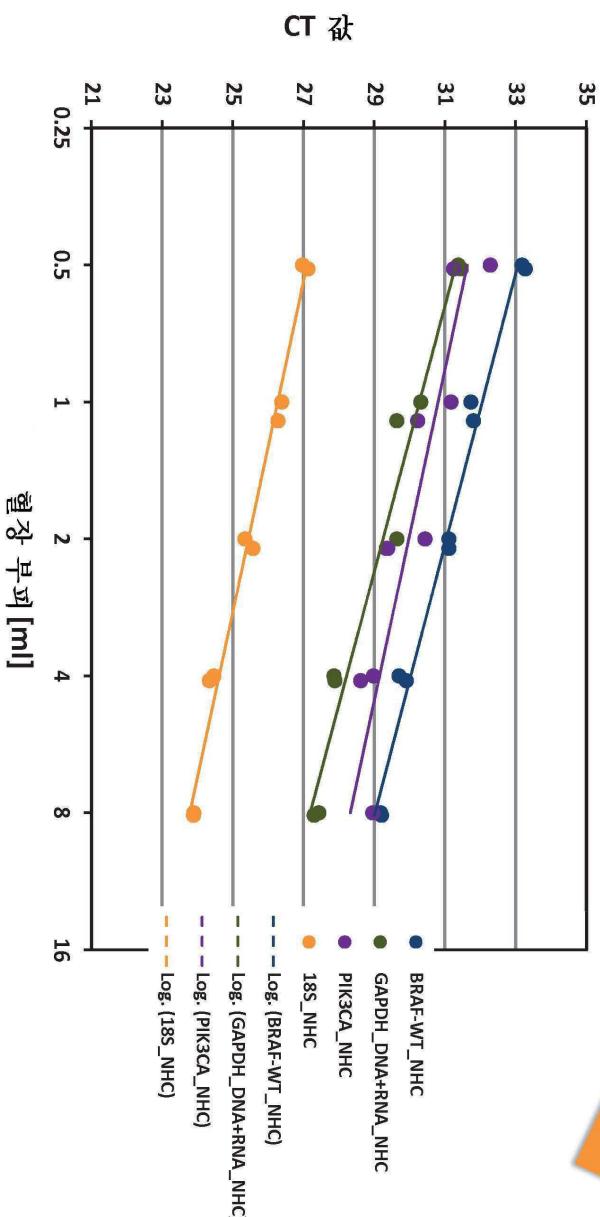
## EX052.2 – 코딩 용량

BRK  
을 17

도면97

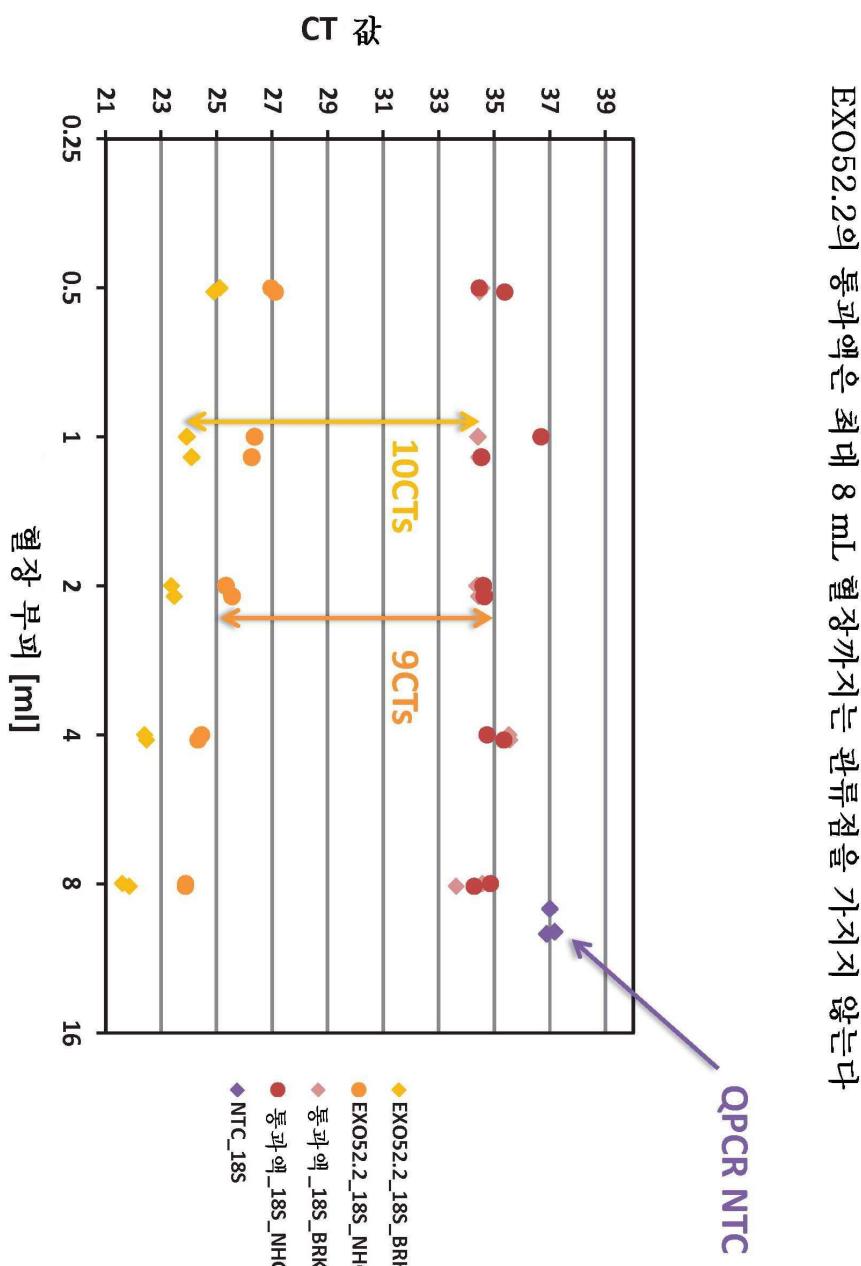
## EX052.2 – 로딩 용량

*MUC014  
(NHC04)*

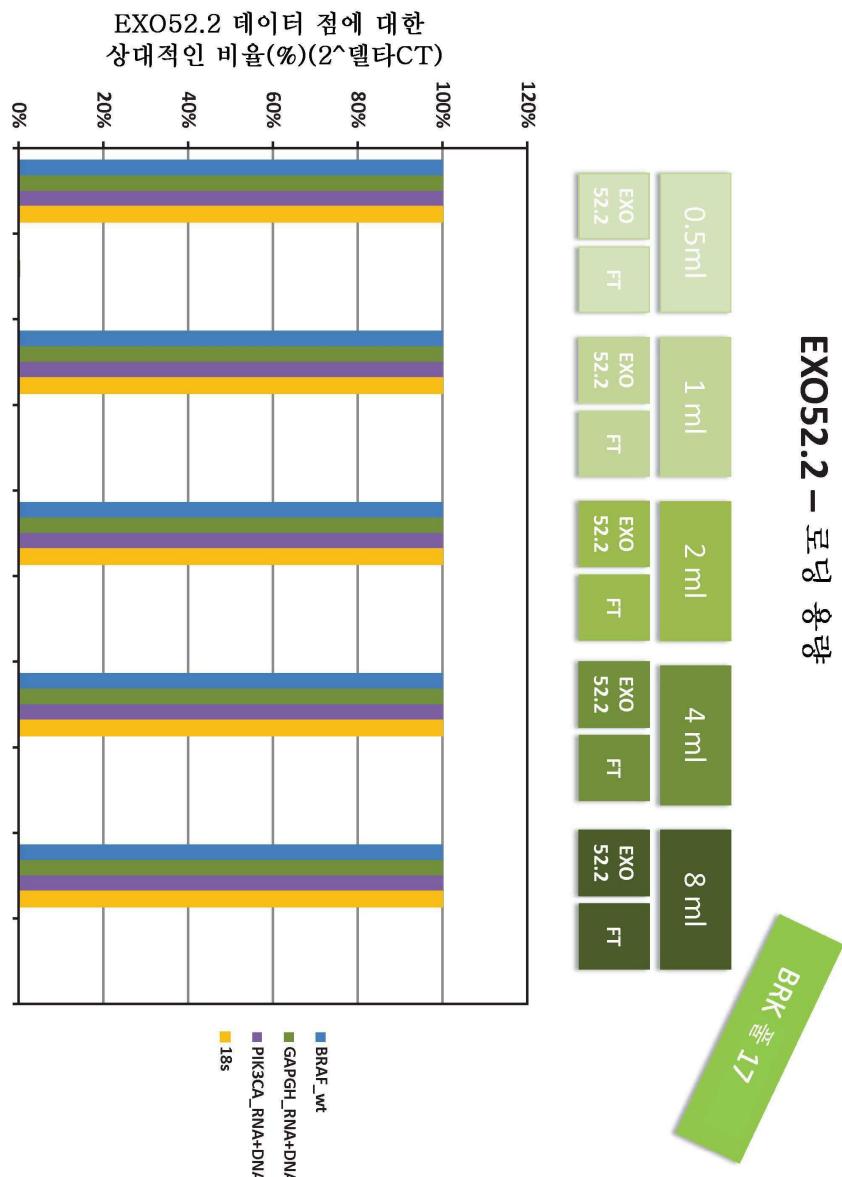


NHC 샘플	기울기	절편
BRAF-WT	-3.34	32.02
GAPDH RNA+DNA	-3.39	30.24
PIK3CA RNA+DNA	-2.99	30.29
18S	-2.74	26.24

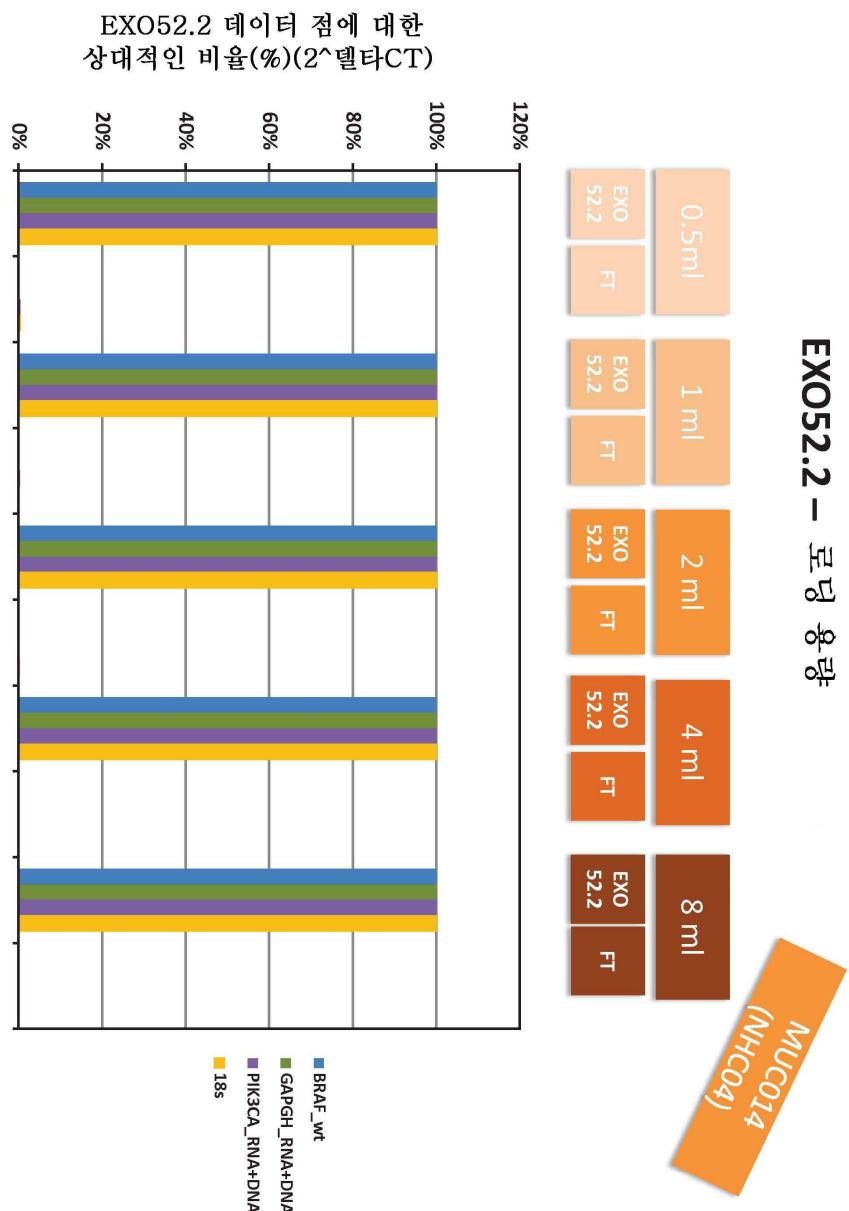
도면98



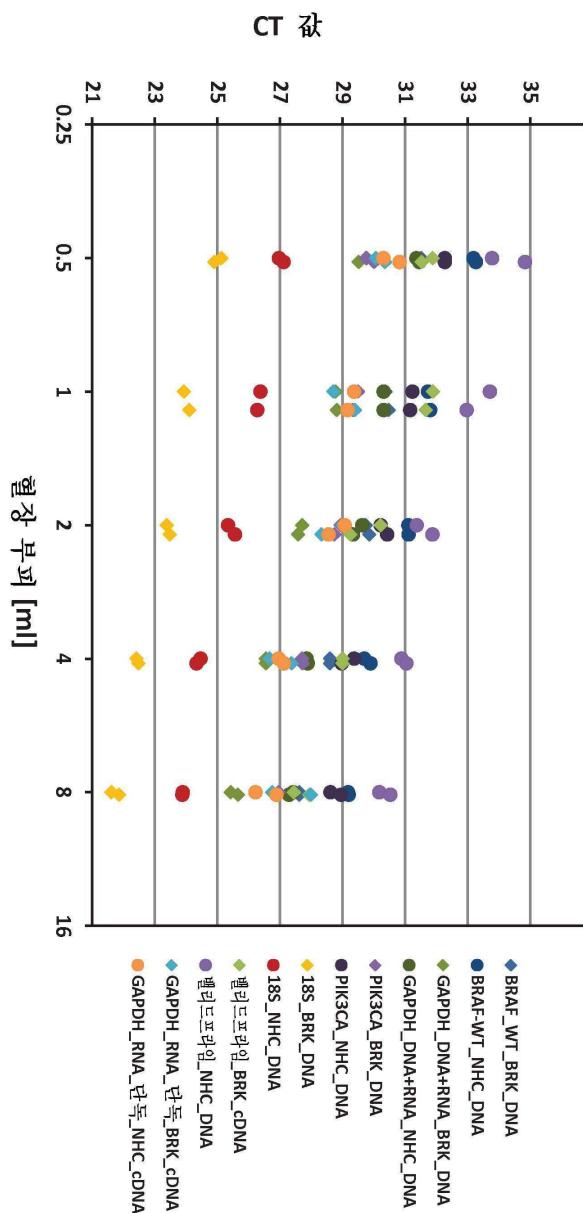
도면99



## 도면100



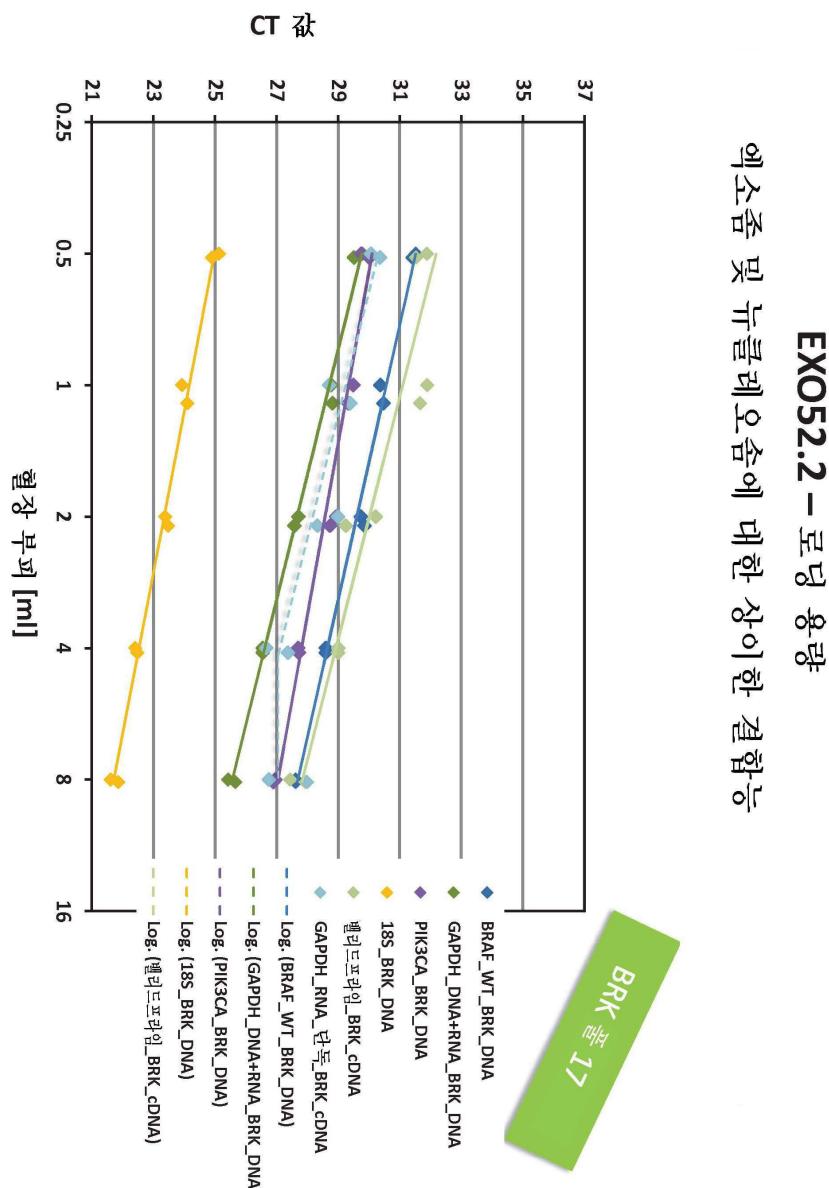
도면101



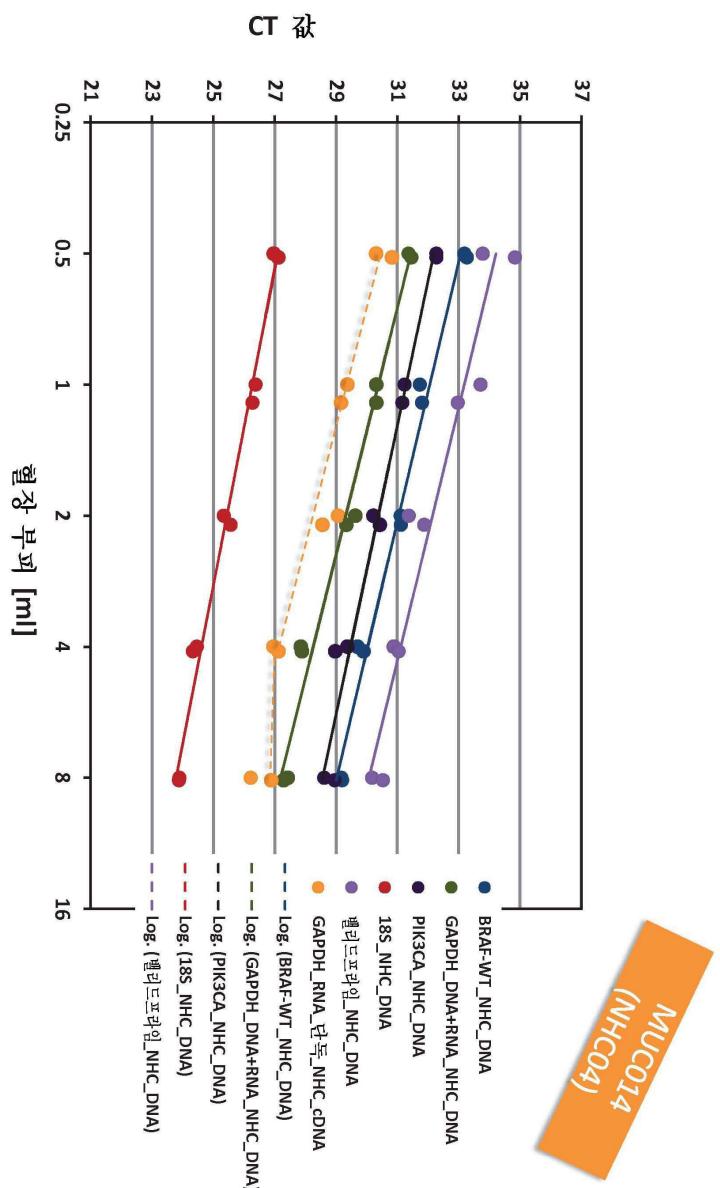
## EX052.2 – 로딩 용량

엑소좀 및 뉴클레오솜에 대한 상이한 결합<sup>6</sup>

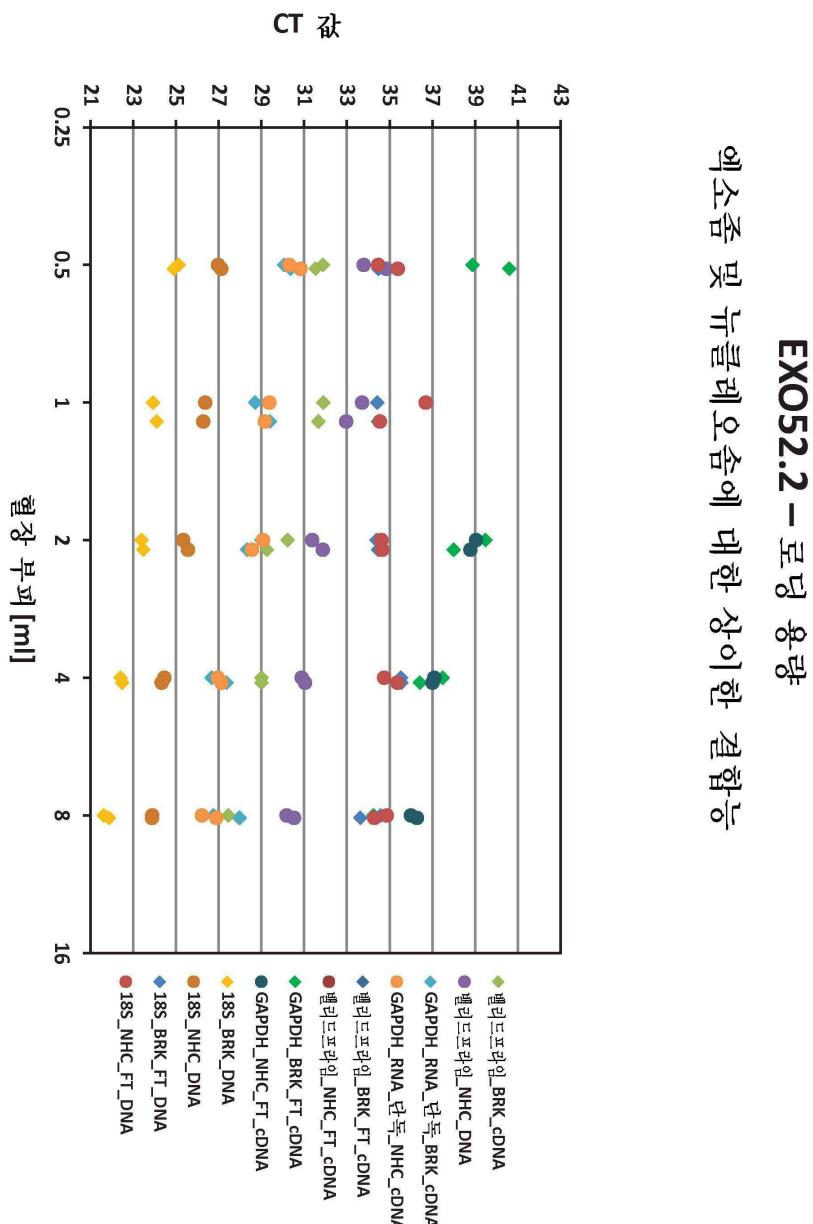
도면102



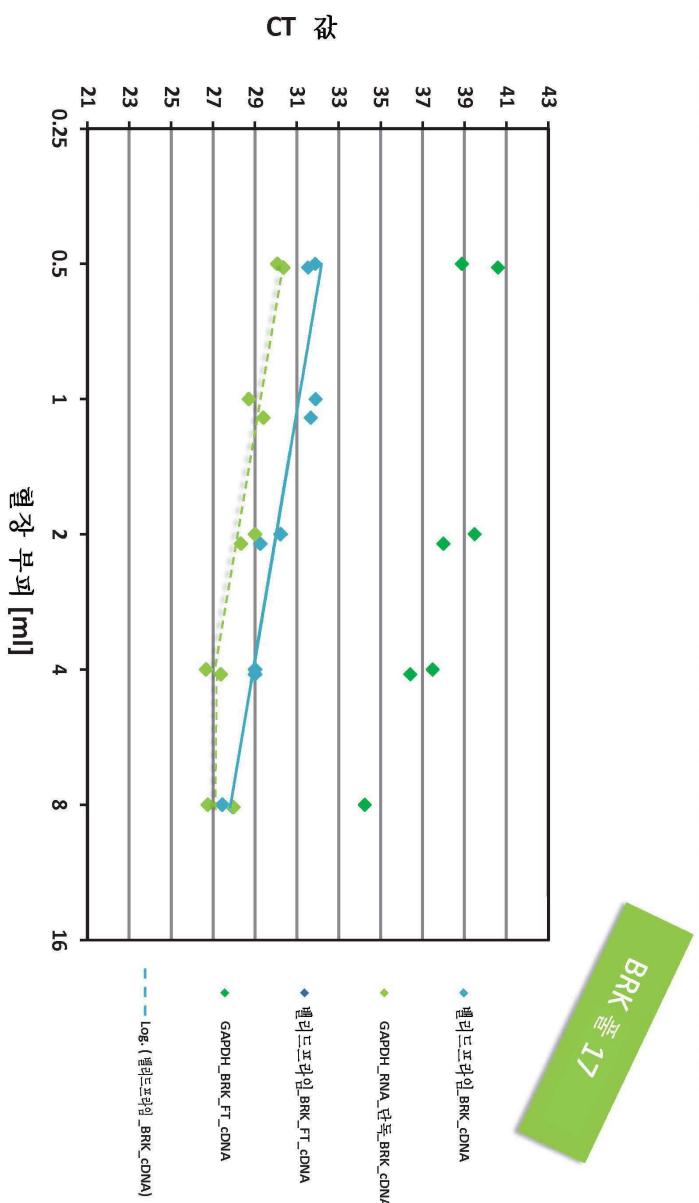
도면103



도면104

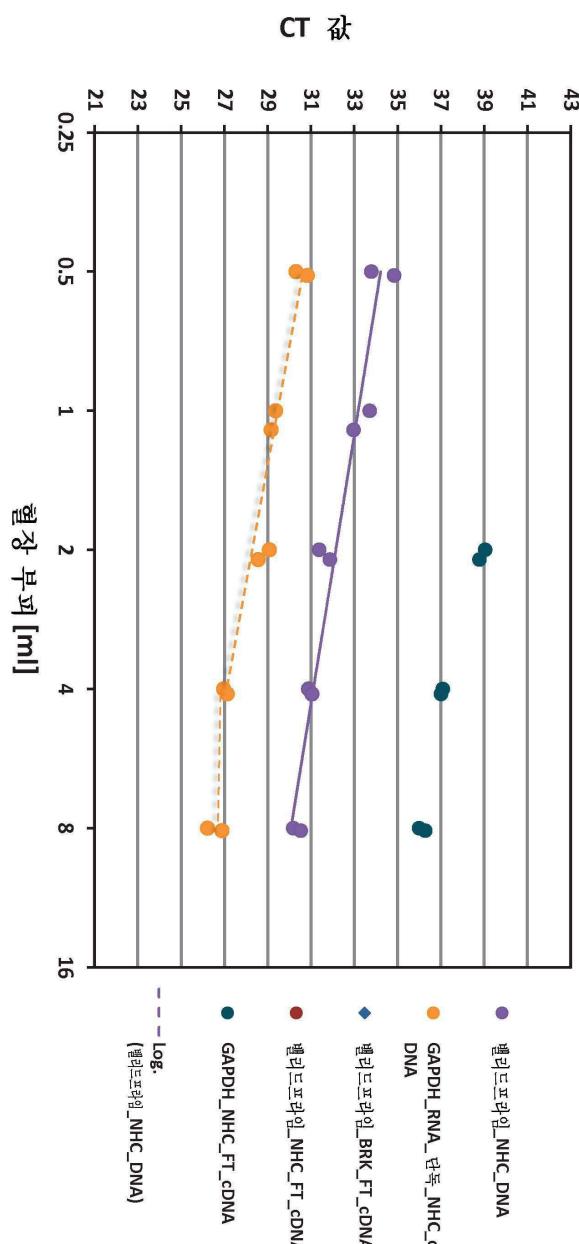


도면105



$\text{BRK}_{\frac{\text{단백질}}{\text{cDNA}}}$

## 도면106



## EXO52.2 – 로딩 용량

엑소솜 및 뉴클레오솜에 대한 상이한 결합

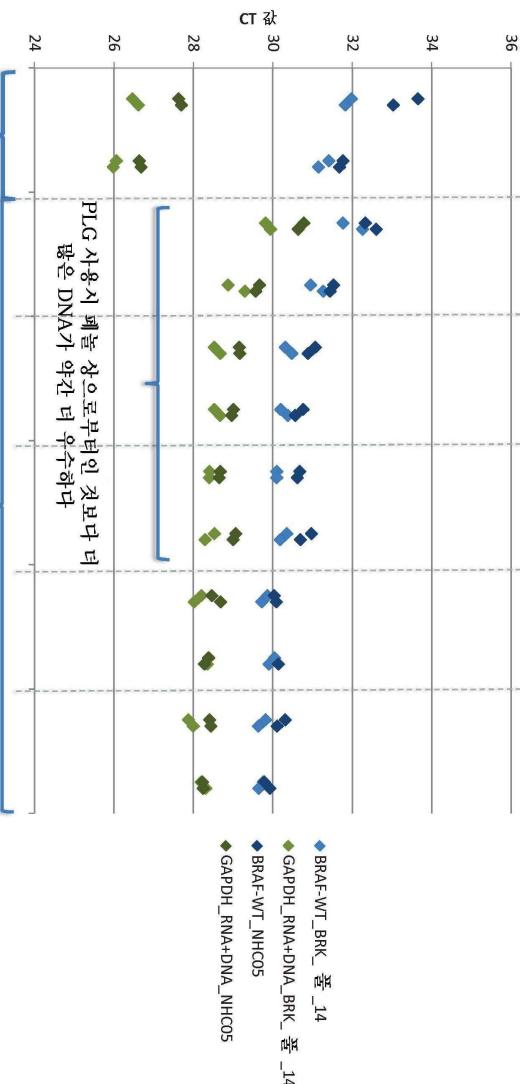
도면107

### 상이한 단리 기술을 이용한 cfDNA 단리

상업적으로 입수가능한 카트1-상업적으로 입수가능한 카트2-Exo52.1-

#### Exo52.2(cfDNA+RNA)

Exo50 DNA n.a.

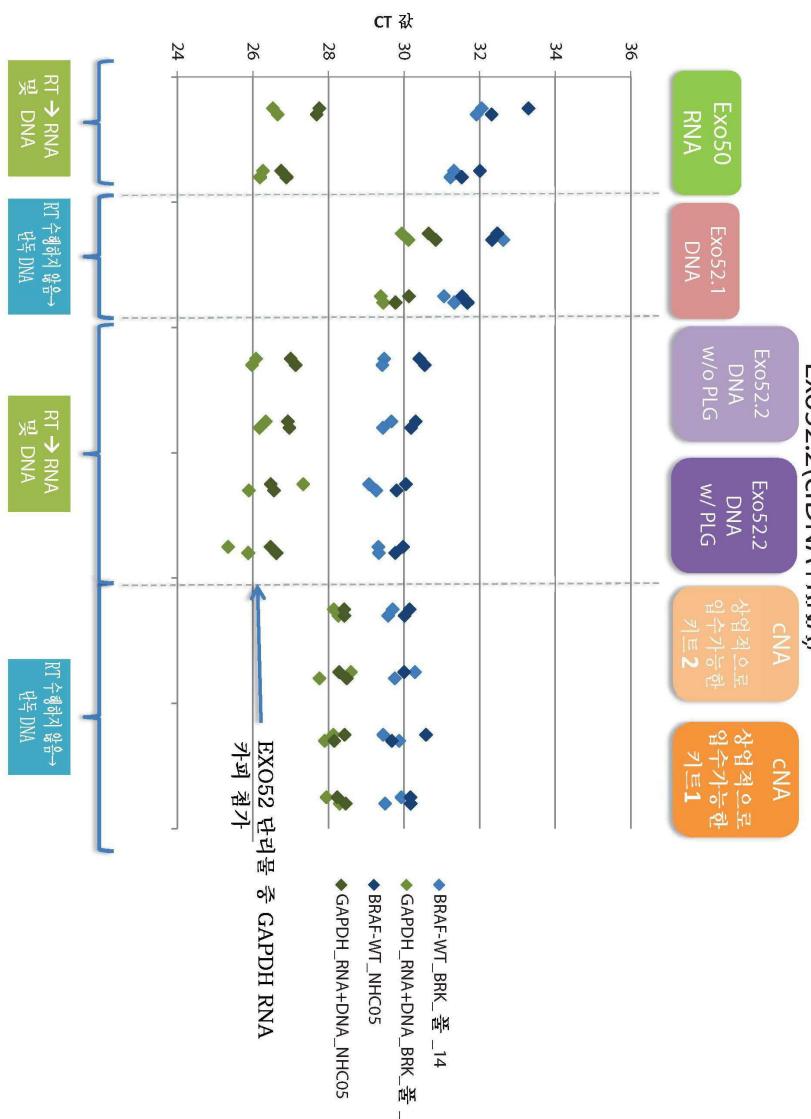


20 μl RT  
RT-에서 10 μl

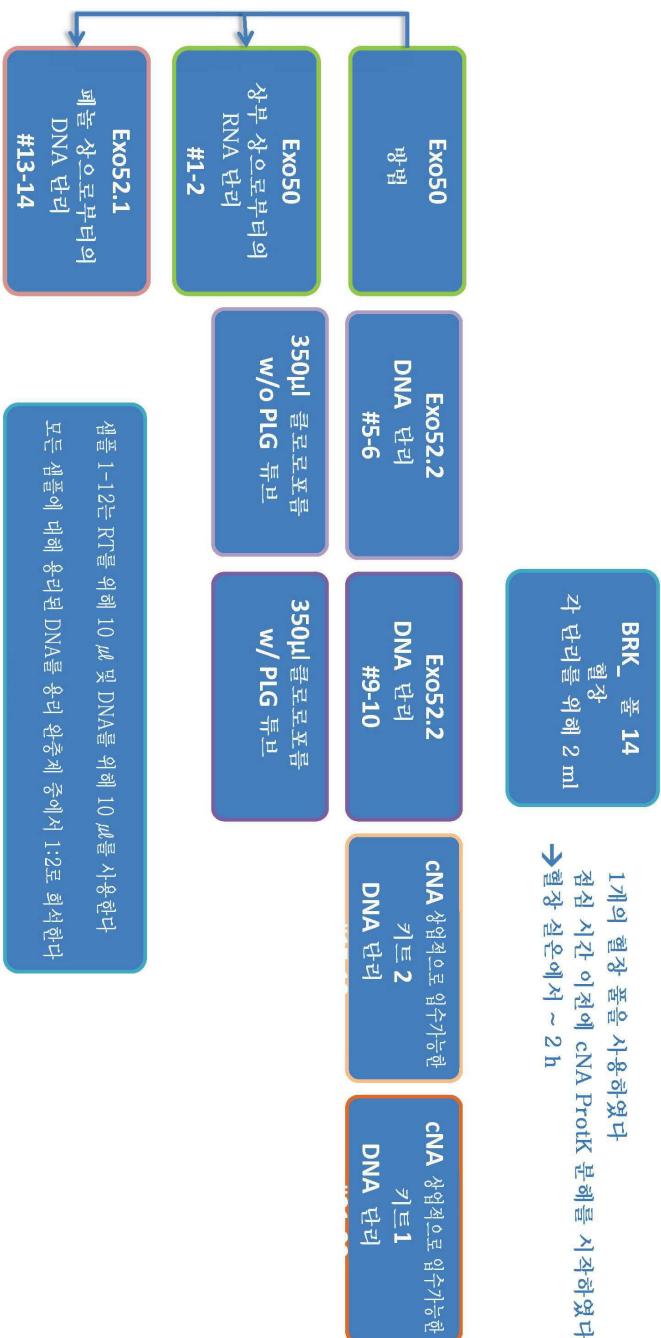
DNA를 용리 원증체 중 1:2로 회식

## 도면108

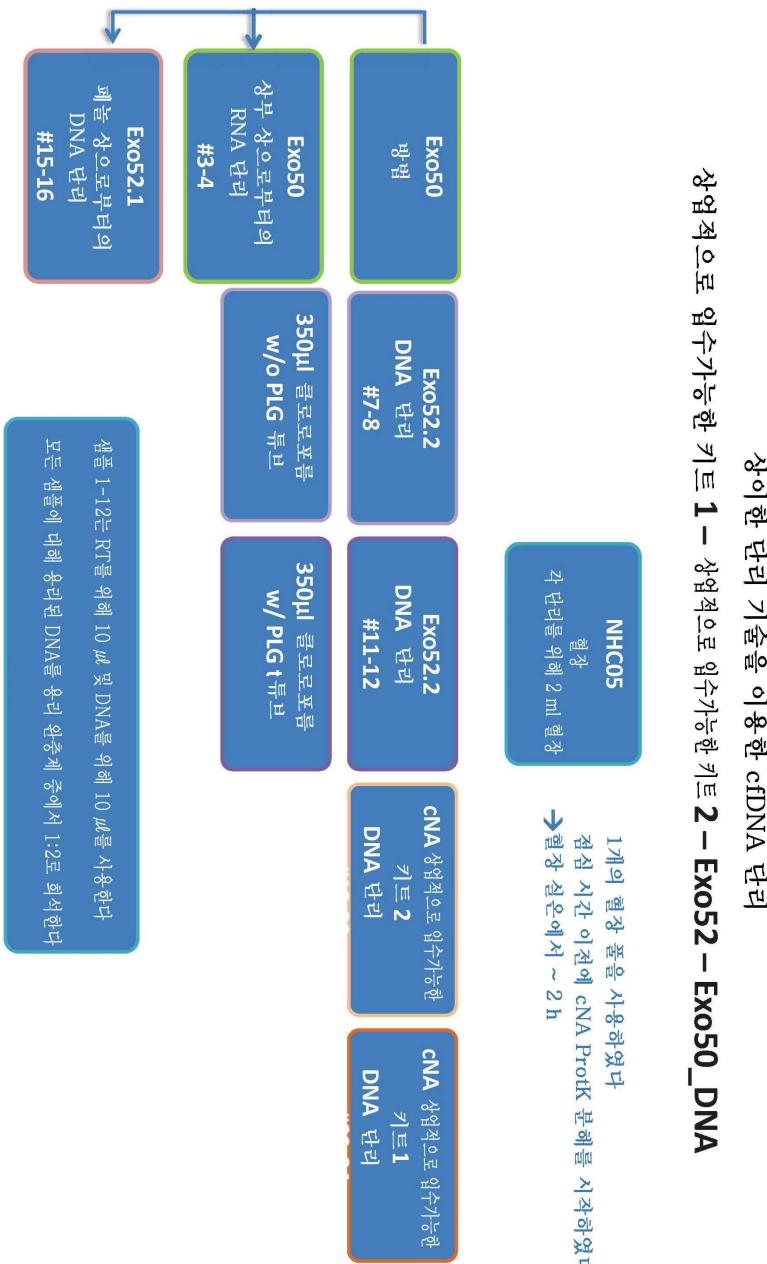
장이한 단리 기술을 이용한 cfDNA 단리  
상업적으로 임수 가능한 키트 1 – 상업적으로 임수 가능한 키트 2 – Exo52.1 –  
Exo52.2(cfDNA+RNA)



## 도면 109

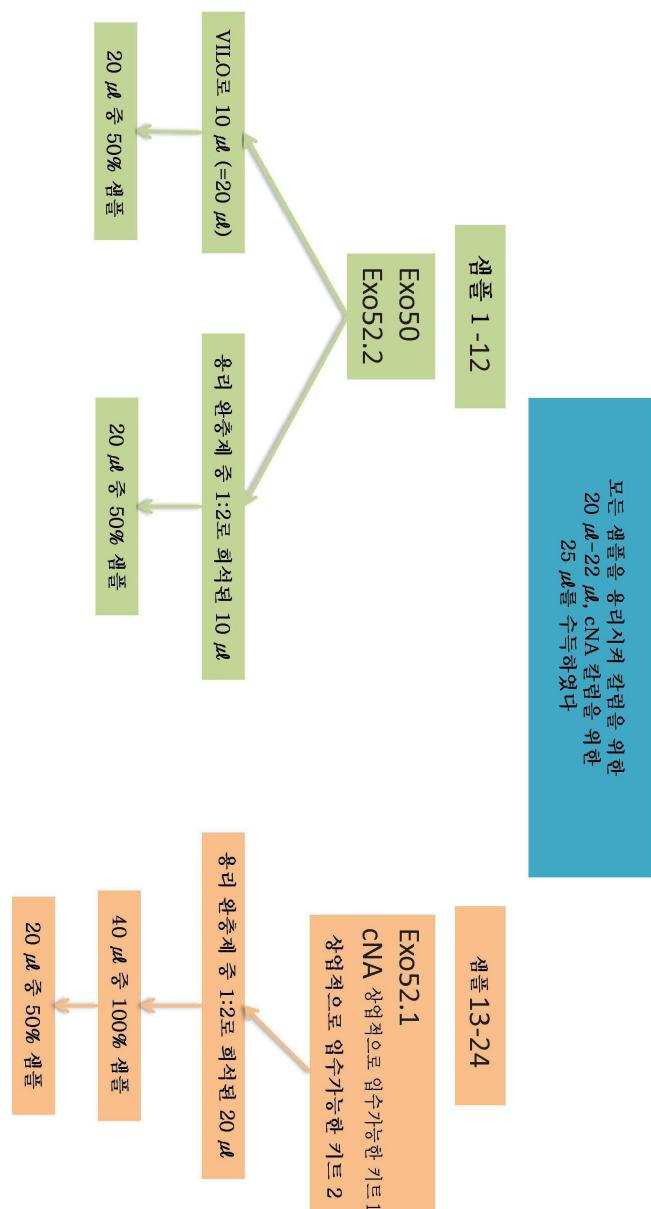


## 도면110



## 상업적으로 업수가능한 카트 1 – 상업적으로 업수가능한 카트 2 – Exo52 – Exo50\_DNA

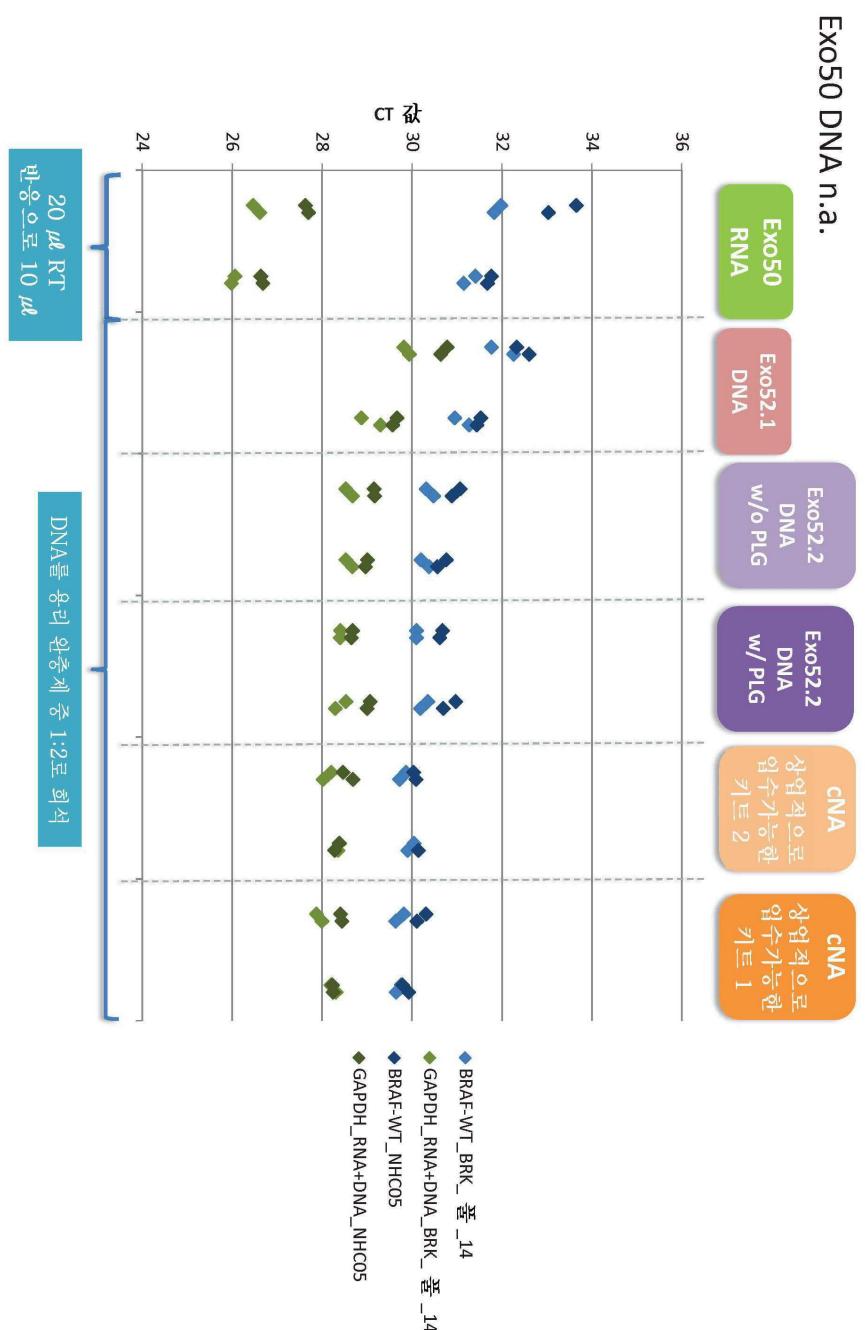
도면111



회석 개요

## 도면112

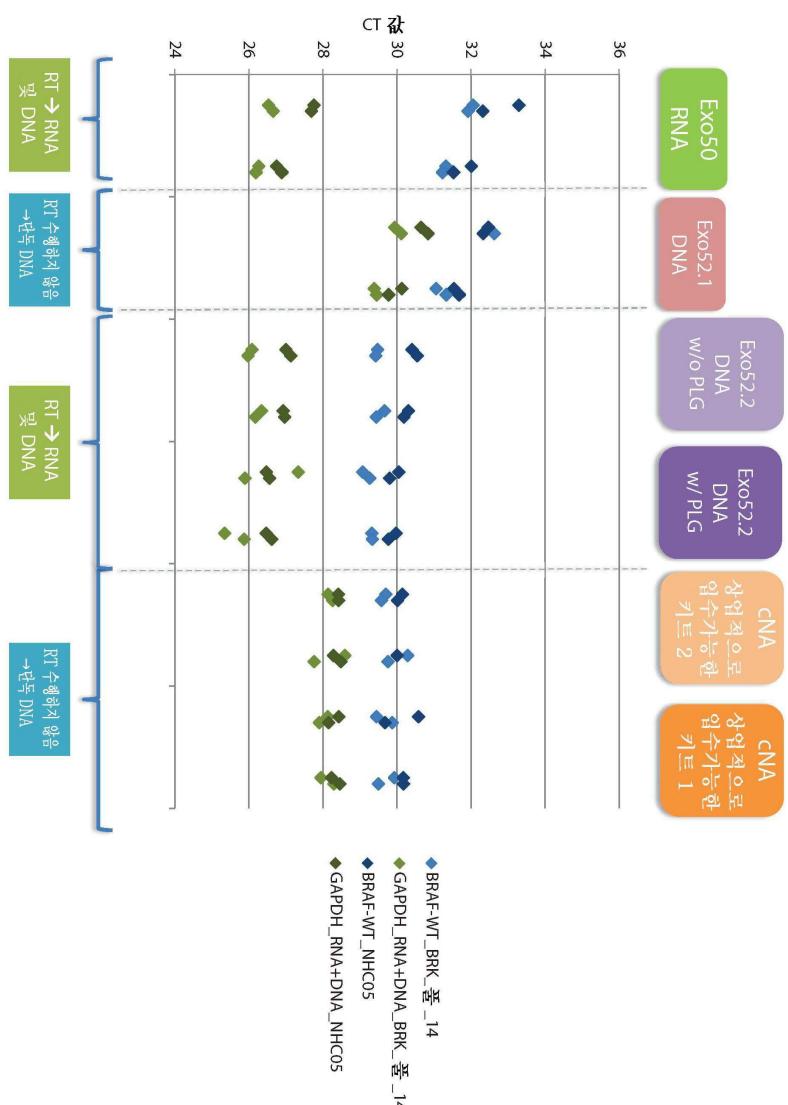
상업적으로 입수 가능한 키트 1 – 상업적으로 입수 가능한 키트 2 – Exo52.1 – Exo52.2(cfDNA+RNA)



## 도면113

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

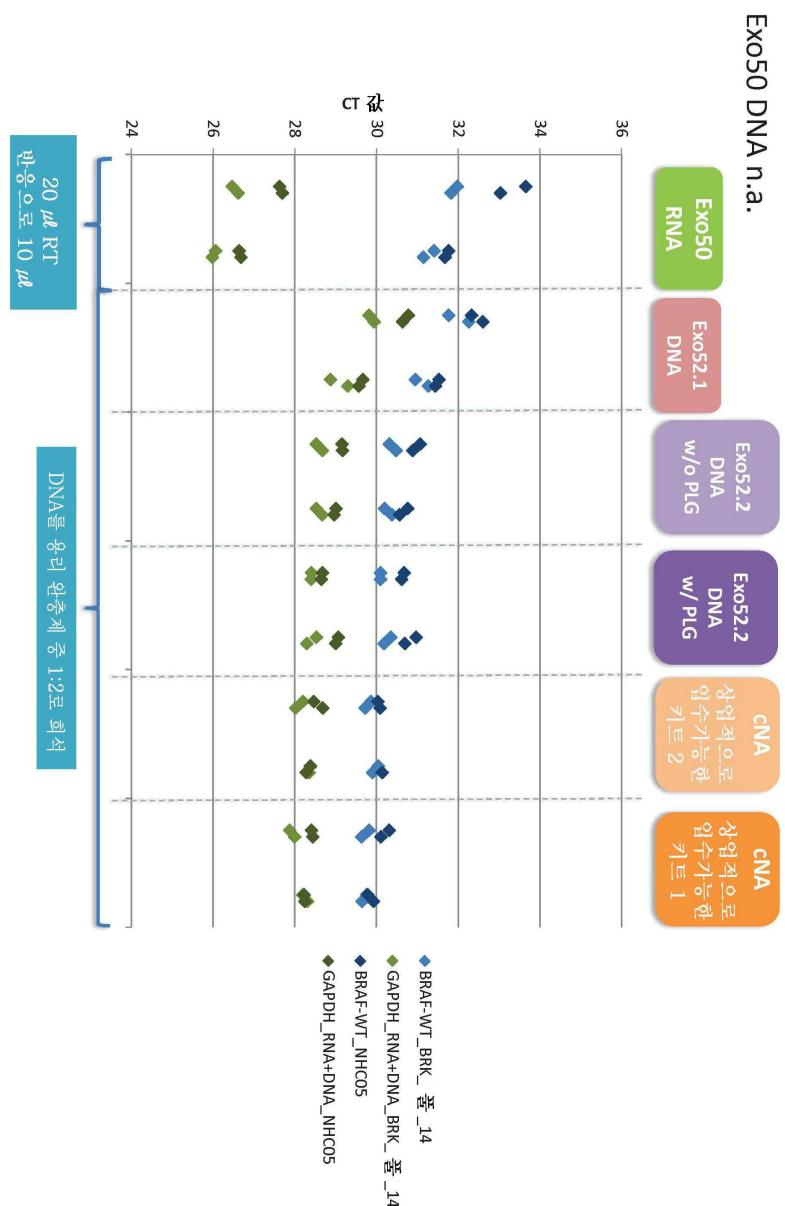
상업적으로 업수가능한 카트1 – 상업적으로 업수가능한 카트2 – Exo52.1 – Exo52.2(cfDNA+RNA)



## 도면114

상이한 단리 기술을 이용한 cfDNA 단리

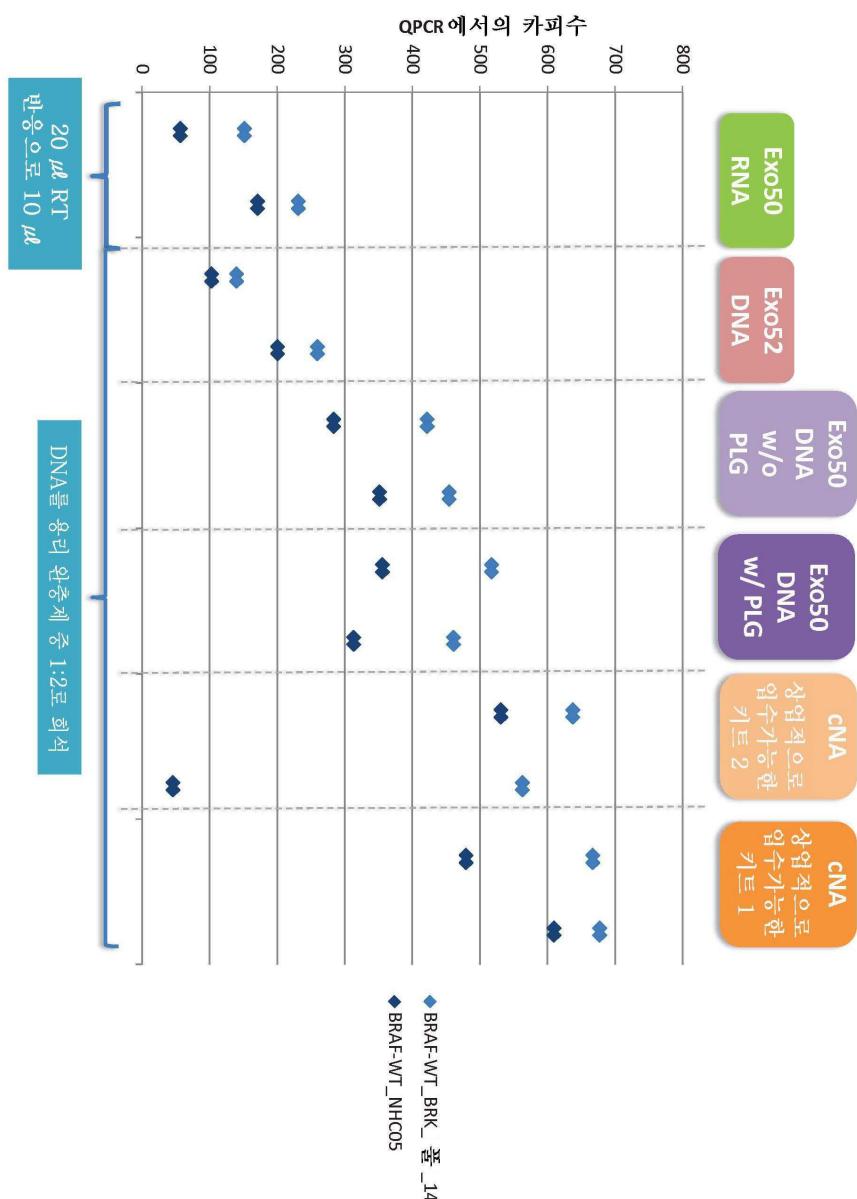
상업적으로 입수 가능한 키트 1 – Exo52.1 – Exo52.2(cfDNA+RNA)



## 도면 115

상이한 단리 기술을 이용한 cfDNA 단리

## 상업적으로 입수 가능한 키트 1 – 상업적으로 입수 가능한 키트 2 – Exo52.1 – Exo52.2(cfDNA+RNA)



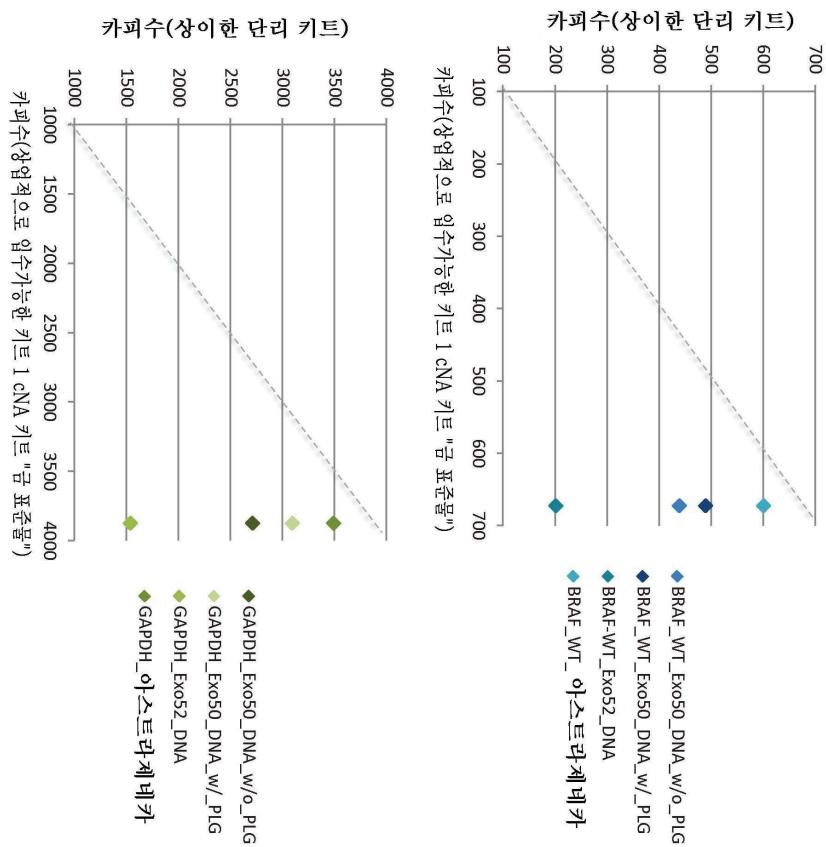
## 도면116

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

상업적으로 업수기능한 키트 1 – 상업적으로 업수기능한 키트 2 – Exo52.1 – Exo52.2(cfDNA+RNA)



## 도면 117

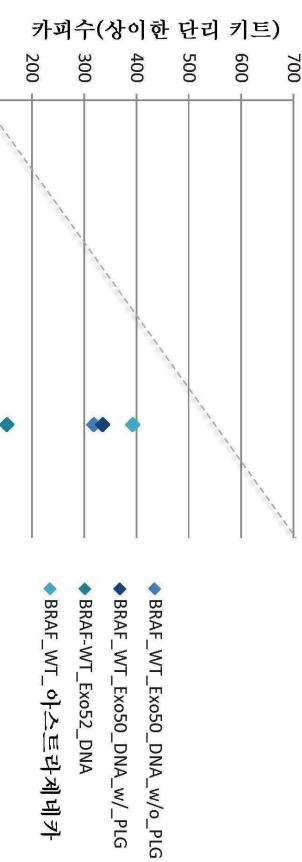


모든 샘플 w/o  
RT → 단독 DNA

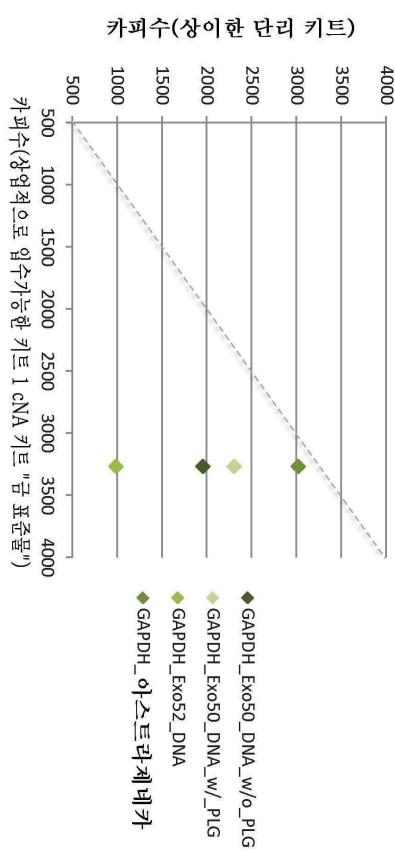
**BRK 풀 14**

## 도면118

## 금 표준물과 비교



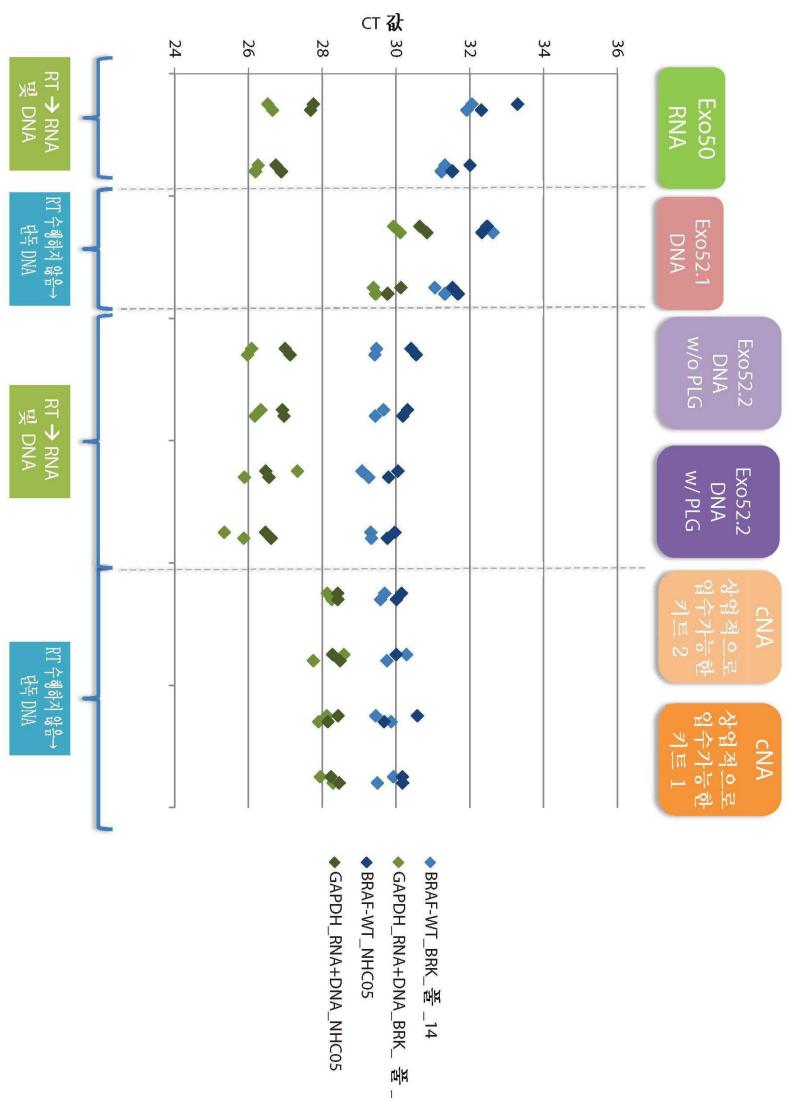
NHC05  
모든 샘플 w/o  
RT → 단독 DNA



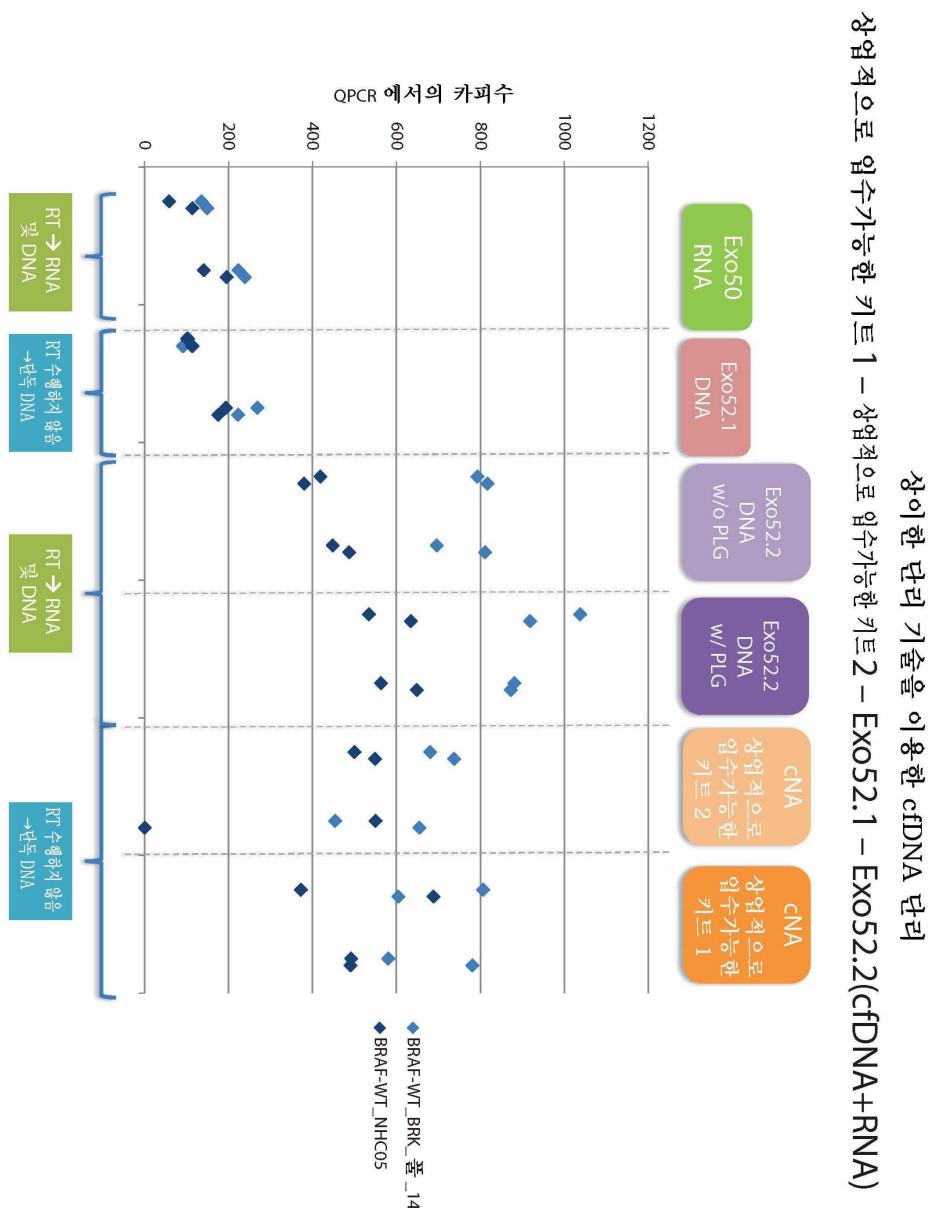
## 도면119

## 상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 관리

상업적으로 암추가능한 카트 1 – 상업적으로 암추가능한 카트 2 – Exo52.1 – Exo52.2(cfDNA+RNA)



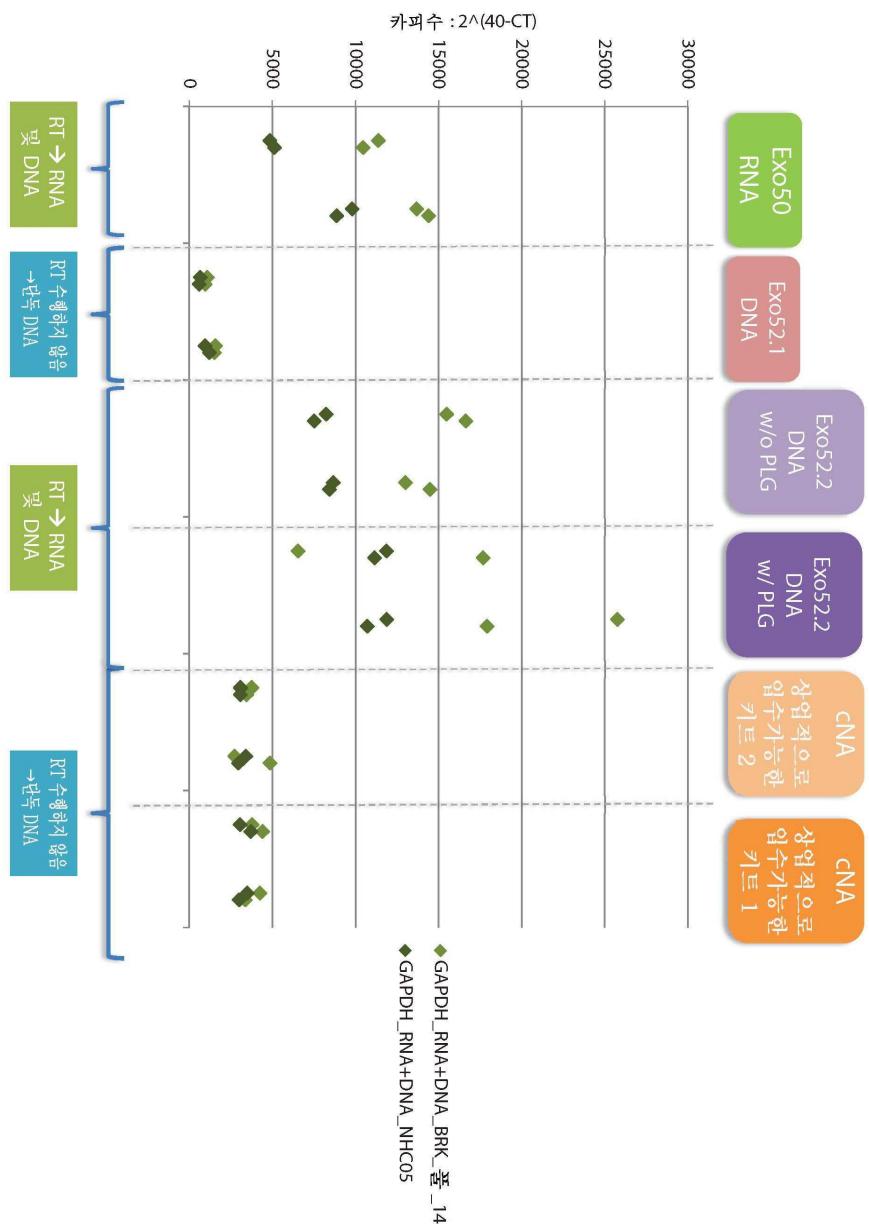
도면 120



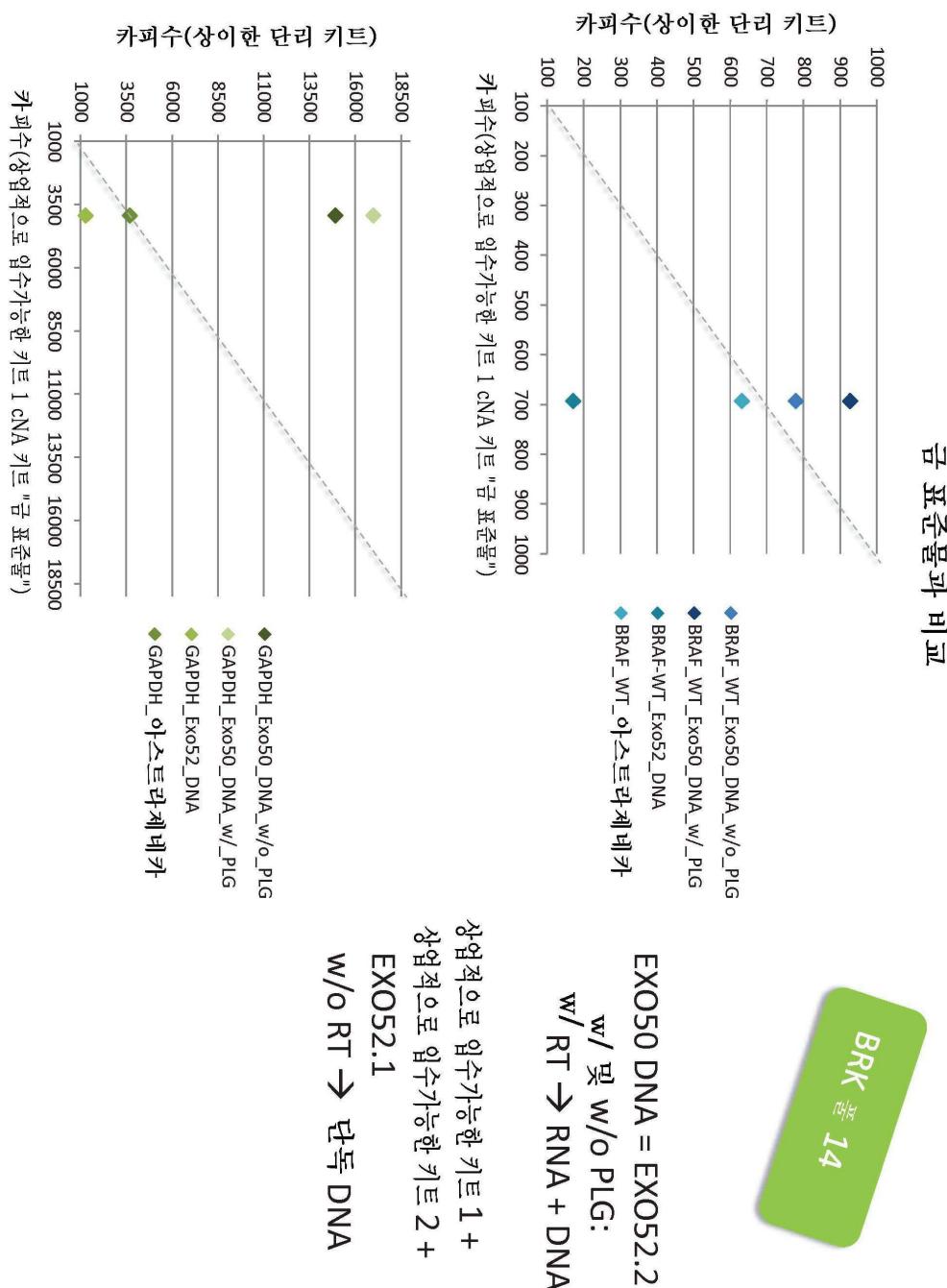
## 도면 121

## 상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 관리

상업적으로 입수기능한 키트 1 – 상업적으로 입수기능한 키트 2 – Exo52.1 – Exo52.2(cfDNA+RNA)



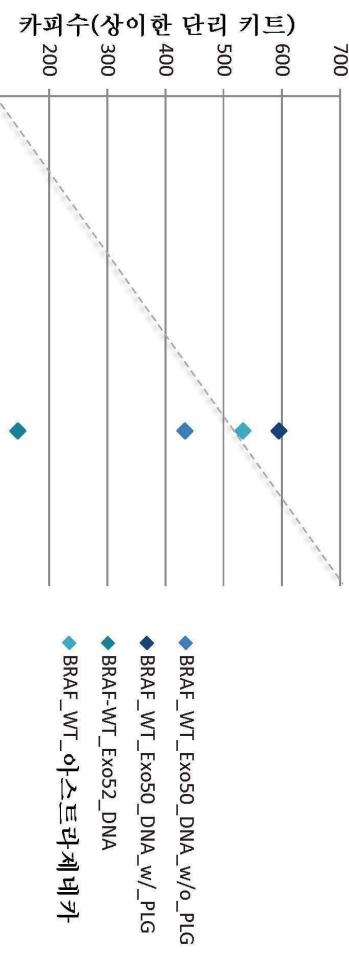
## 도면122



## 도면123

## 금 표준물과 비교

NHC05

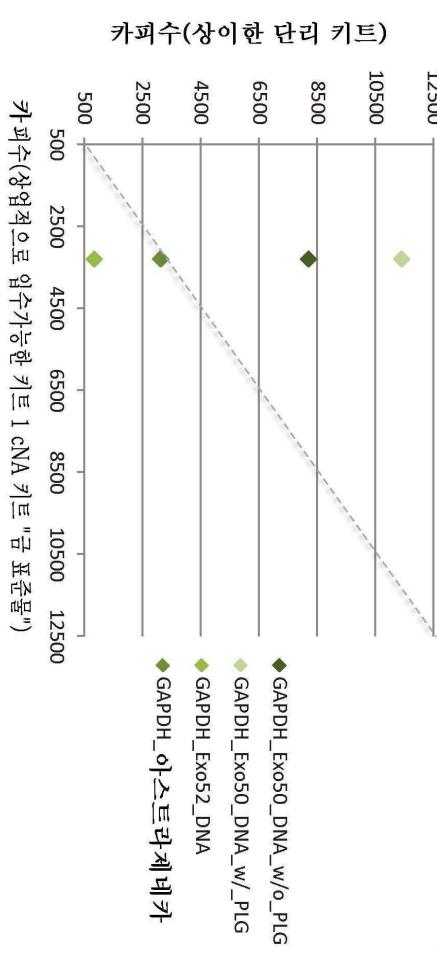


카페수(상업적으로 입수 가능한 카트 1 cDNA 카트 "금 표준물")

EXO50 DNA = EXO52.2  
w/ 및 w/o PLG:  
w/ RT → RNA + DNA

상업적으로 입수 가능한 카트 1 +  
상업적으로 입수 가능한 카트 2 +  
EXO52.1

w/o RT → 단독 DNA



카페수(상업적으로 입수 가능한 카트 1 cDNA 카트 "금 표준물")

## 도면124

## 결과: 상이한 카트 내의 cfDNA 카프수의 비교

QPCR에 서의 카프수	BRAF-WT		GAPDH RNA+DNA	
	최소	최대	최소	최대
큐아셀 QIAamp 순화 혼산 카트 *	500	700	3000	4000
아스트라제네카 *	400	700	3000	3500
EXO50 DNA 단리(PLG 미사용) *	350	450	2000	2500
EXO50 DNA 단리(PLG 사용) *	350	500	2500	3000
Exo52 DNA 단리 *	150	200	1000	1500

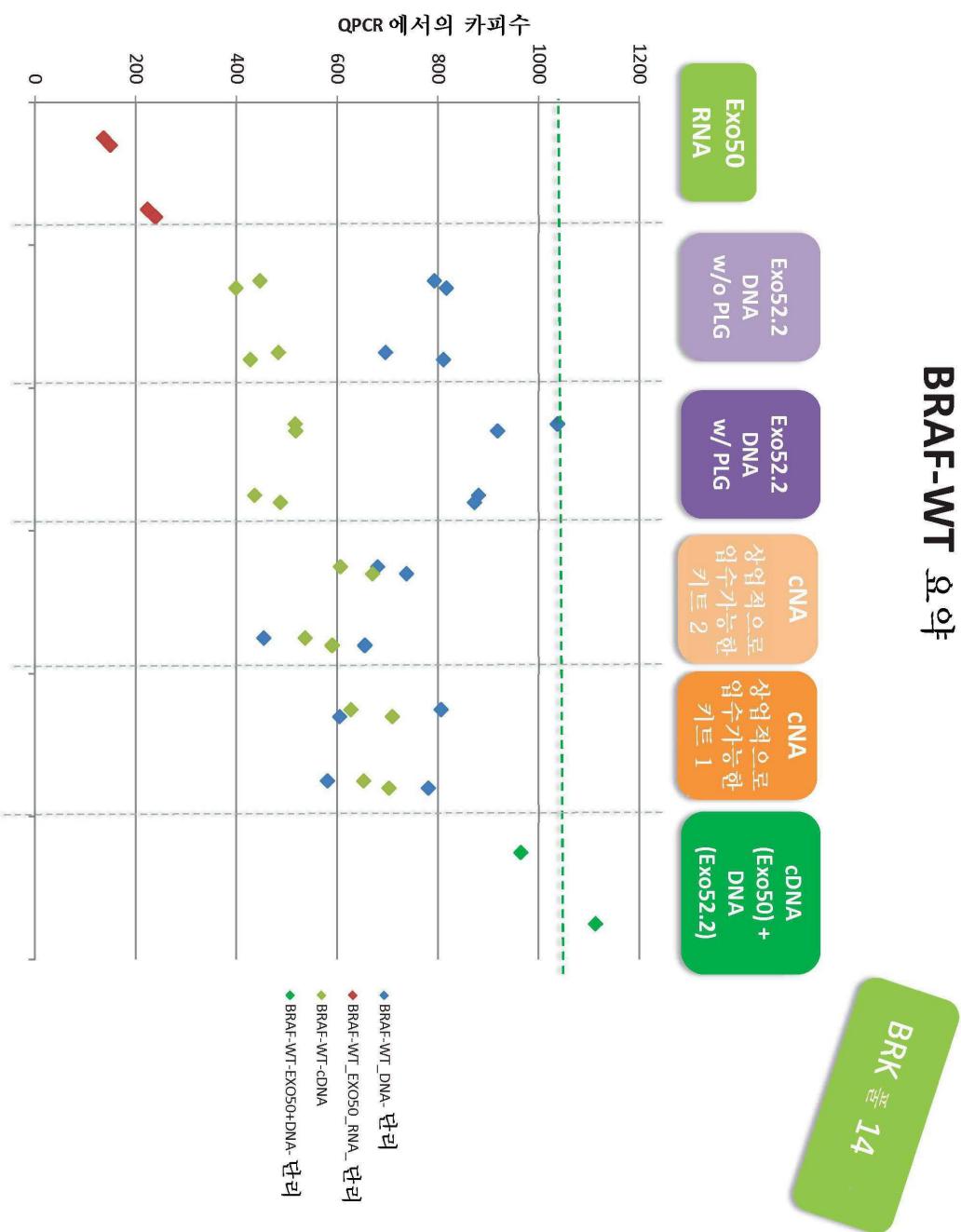
QPCR에 서의 카프수	BRAF-WT		GAPDH RNA+DNA	
	최소	최대	최소	최대
큐아셀 QIAamp 순화 혼산 카트 *	500	800	3000	4000
아스트라제네카 *	500	750	3000	4000
EXO50 DNA 단리(PLG 미사용) (Exo52.2) **	400	800	7500	16500
EXO50 DNA 단리(PLG 사용) (Exo52.2) **	500	900	10000	17000
EXO52.1 DNA 단리 *	100	250	700	1000
EXO50 RNA 단리 **	100	250	10000	15000

\* RT 단계를 수행하지 않는 경우, 샘플 → 단독 DNA

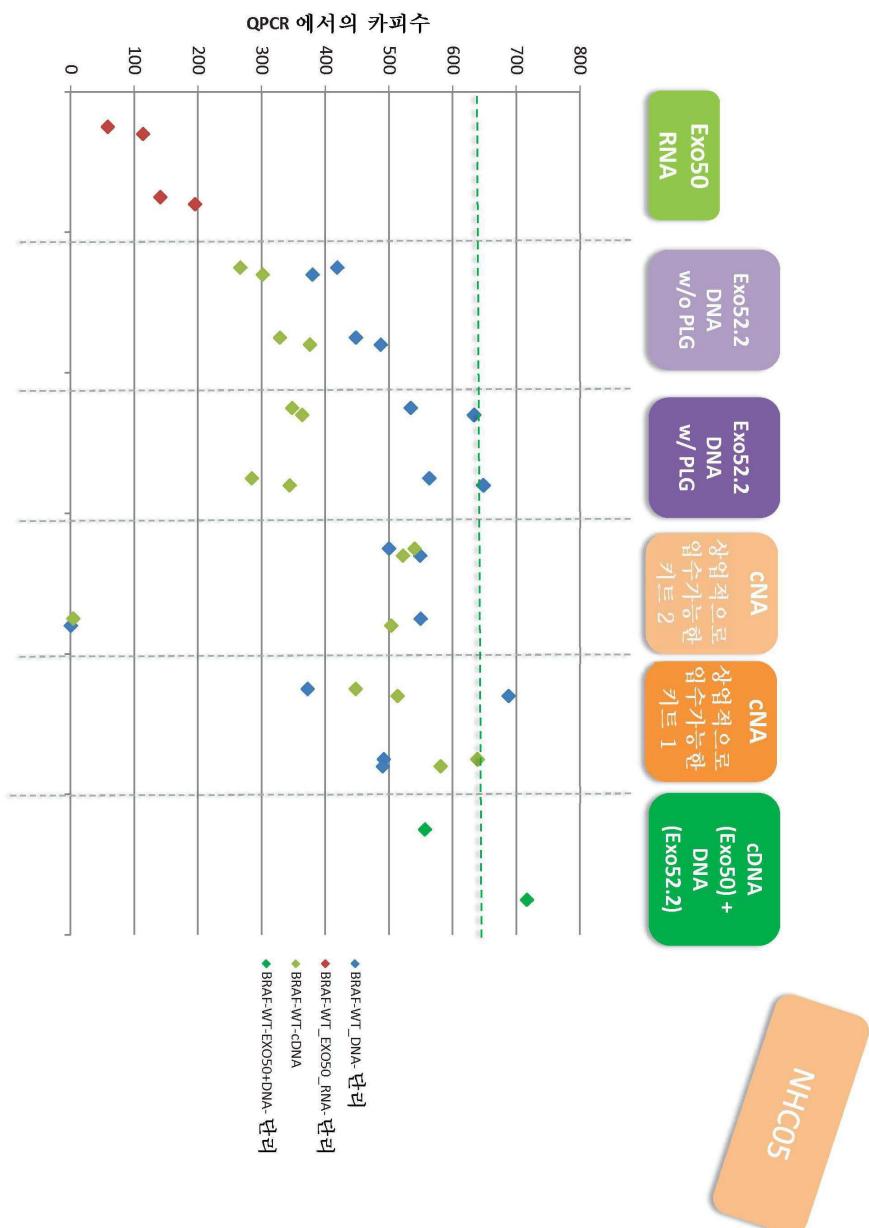
\*\* RT 단계를 수행하는 경우, 샘플 → 전사체 RNA 및 DNA 포함

## 도면 125

## BRAF-WT 요약

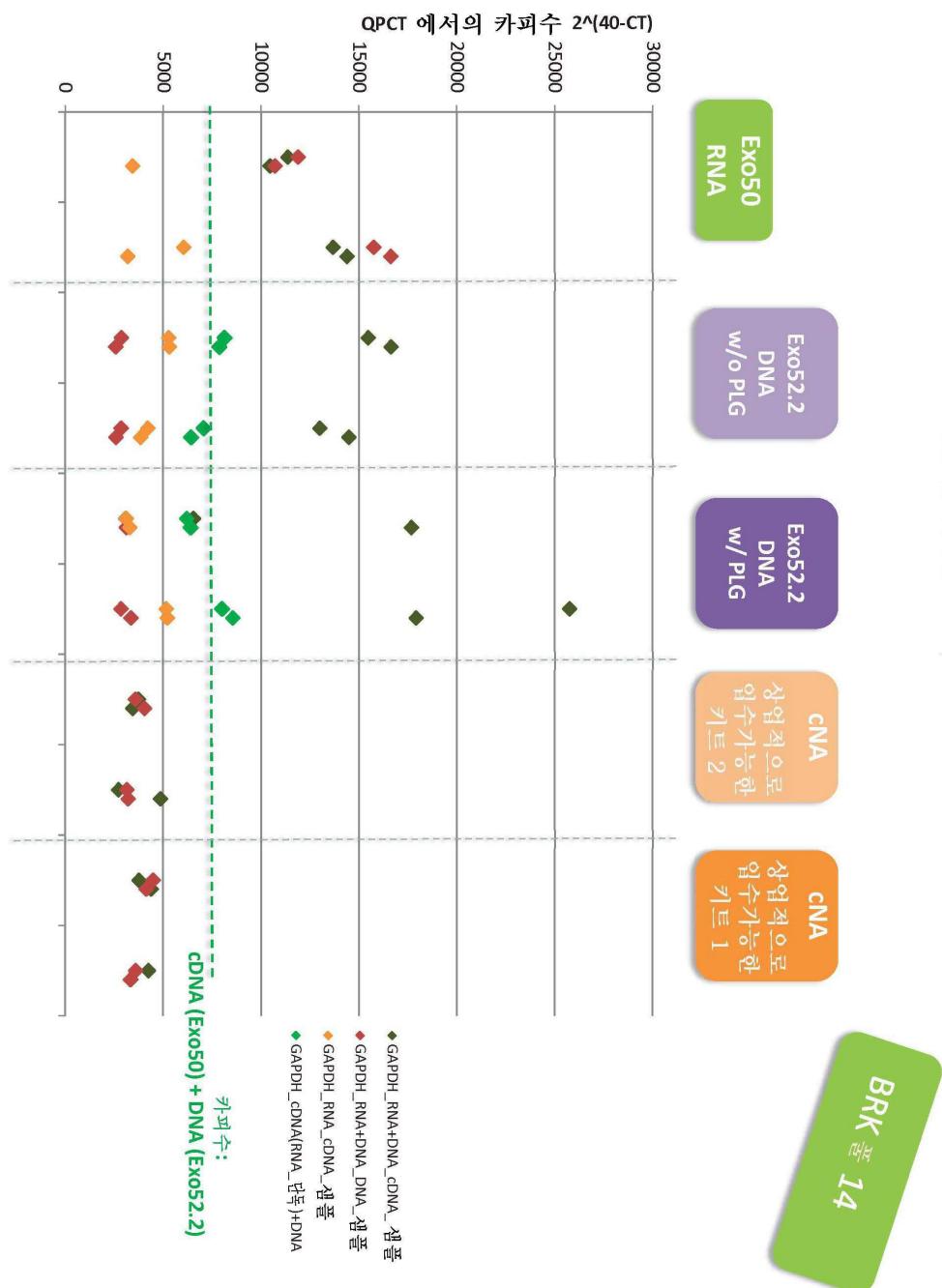


## 도면126

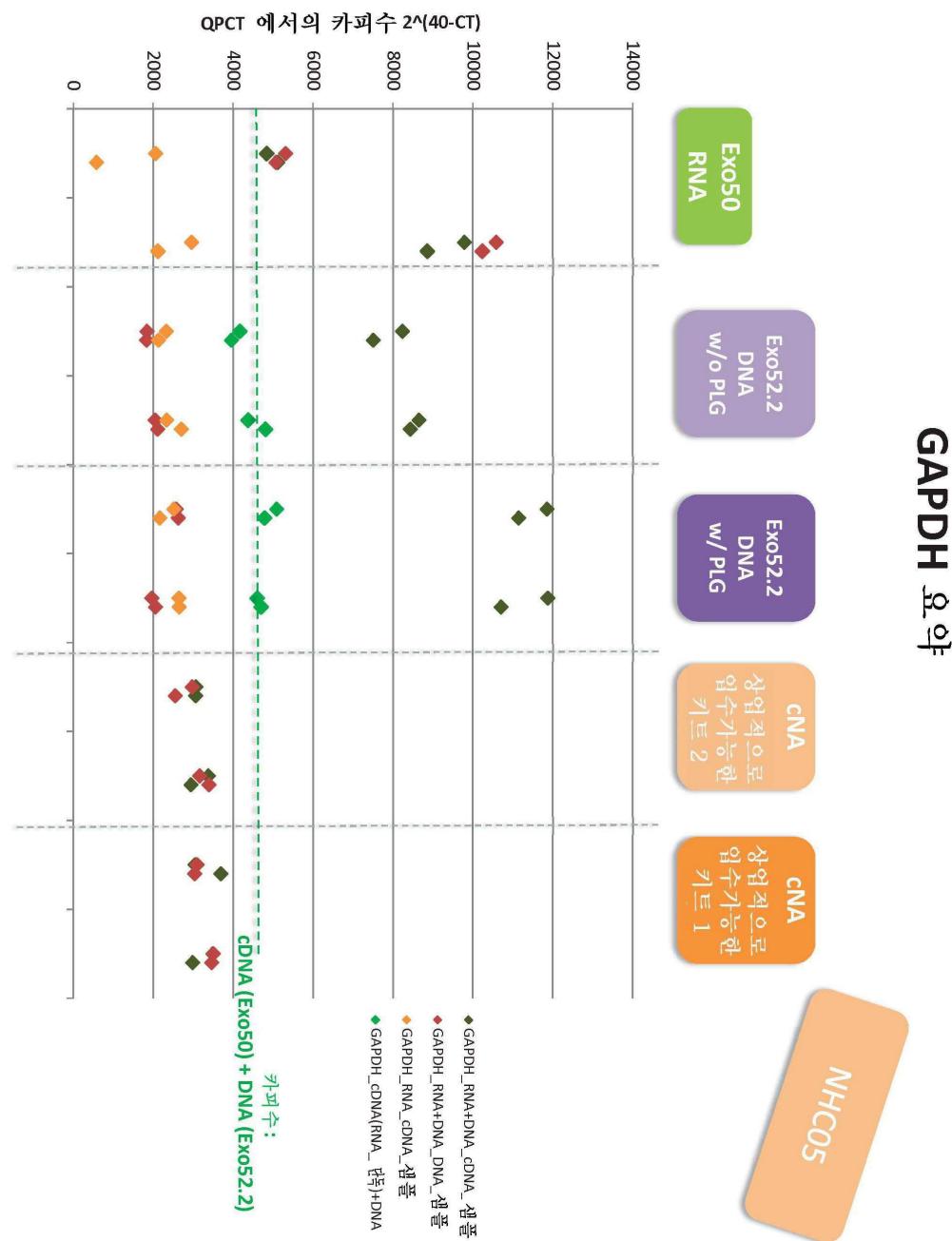


도면127

## GAPDH 요약

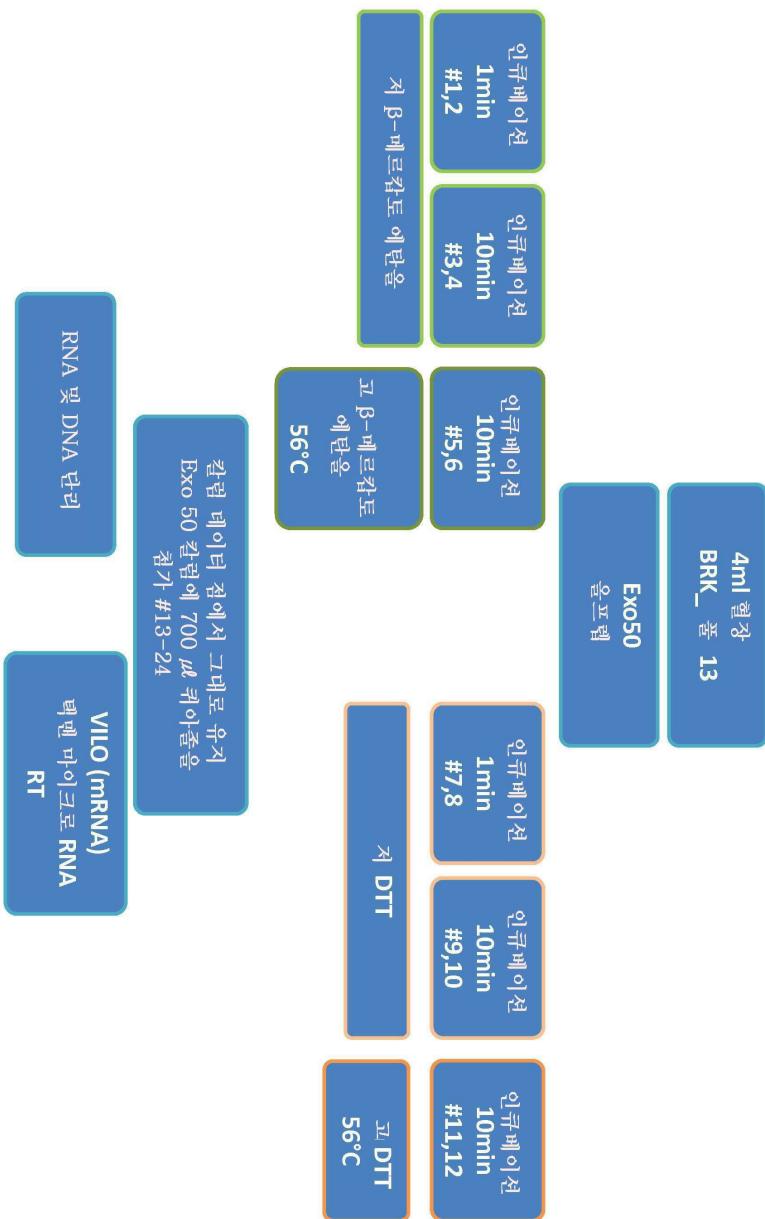


## 도면128



## 도면 129

Exo50: 하류 분석을 위한 옵트렉 DNA/RNA 마이크로 카트



도면130

주석:

캐리어 RNA: 상업적으로 입수 가능한 카트로부터의 폴리A 0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l = 200ng/ $\mu$ l → 4 ng/ $\mu$ l(1:50)으로 희석하고, 샘플당 5  $\mu$ l씩 사용

$\beta$ -메르캅토에탄올 14.3 M

저농도: RLT 완충제 1 ml당 10  $\mu$ l → 143M

고농도: RLT 완충제 1 ml당 50  $\mu$ l → 715M

DTT 1M

카트 권장 사항: RLT 완충제 1 ml당 2 M DTT 20  $\mu$ l

→ RLT 완충제 1 ml당 1 M DTT 40  $\mu$ l(=저농도) → 40M

→ RLT 완충제 1 ml당 1 M DTT 200  $\mu$ l(=고농도) → 200M

## 도면 131

결합 단계 동안 RNA이자 미니 일루트 칼럼 막힘; 추가 단계 또한 영향을 받는다.

상세 사항	올프렐 DNA 회전 칼럼	RNA이자 회전 칼럼	민일루트
최대 결합능	100 μg DNA*	45 μg RNA	
최대 로딩 부피	700 μl	700 μl	
해산 크기 분포	15~30 kb 의 DNA†	RNA > 200 kb의 RNA‡	
최소 용량 부피	30 μl → 25μl	10 μl → 20μl	
출발 물질의 최대 양			
■ 동물 및 인간 세포	5 × 10 <sup>5</sup> 개의 세포	올프렐 DNA 회전 칼럼으로부터의 전체 통과액	
■ 동물 및 인간 조직	5 mg	올프렐 DNA 회전 칼럼으로부터의 전체 통과액	

도면132

### Exo50: 헤리어 밴드를 위한 옥스포럼 DNA/RNA 마이크로 카트



- ◆ BRAF\_WT\_β\_메르캅토에 렌즈
- ◆ BRAF\_WT\_DTT
- ◆ BRAF\_WT\_β\_메르캅토\_칼럼 상에 그대로 남아있음
- ◆ BRAF\_WT\_DTT\_칼럼 상에 그대로 남아있음
- ◆ GAPDH\_베타\_메르캅토
- ◆ GAPDH\_DTT
- ◆ GAPDH\_3\_메르캅토\_칼럼 상에 그대로 남아있음
- ◆ GAPDH\_DTT\_칼럼 상에 그대로 남아있음
- ▼ let-7a\_베타\_메르캅토
- ▼ let-7a\_DTT
- ▼ let-7a\_베타\_메르캅토\_칼럼 상에 그대로 남아있음
- ▼ let-7a\_DTT\_칼럼 상에 그대로 남아있음
- ▼ miR-16\_베타\_메르캅토
- ▼ miR-16\_DTT
- ▼ miR-16\_베타\_메르캅토\_칼럼 상에 그대로 남아있음
- ▼ miR-16\_DTT\_칼럼 상에 그대로 남아있음

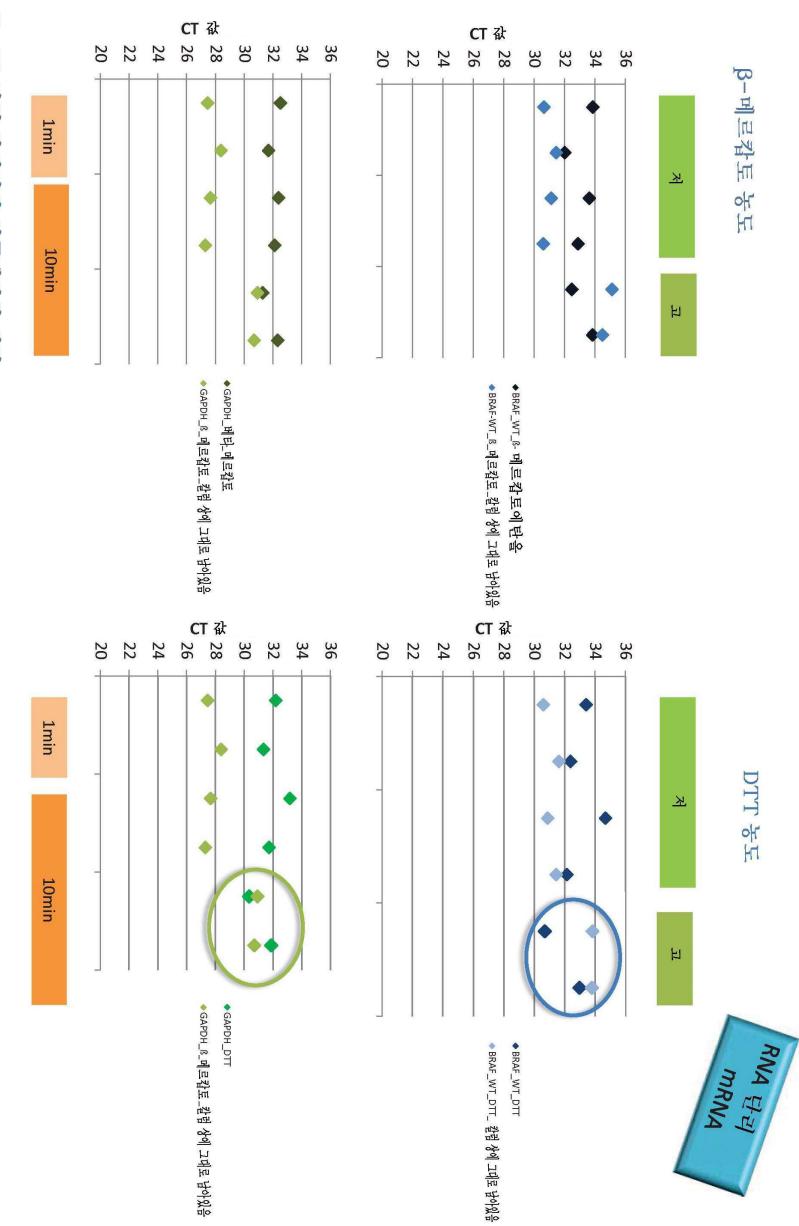
Exo50 칼럼 상에 서의 인큐베이션 시간

1min

10min

## 도면133

## Exo50: 허류 방법을 위한 올프램 DNA/RNA 마이크로 카트



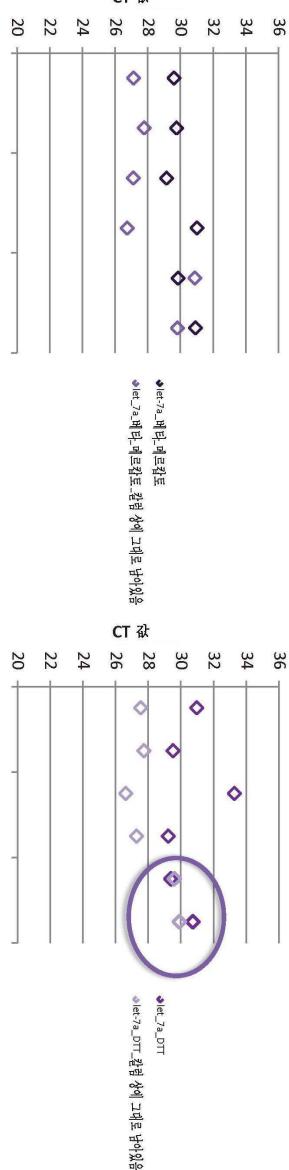
Exo50 칼럼 상에 서의 일류 베이션 시간

## 도면 134

## Exo50: 헤리 방법을 위한 올프렉 DNA/RNA 마이크로 카트



DTT 농도



도면 135

Exo50: 하류 냉법을 위한 올프렙 DNA/RNA 마이크로 카트

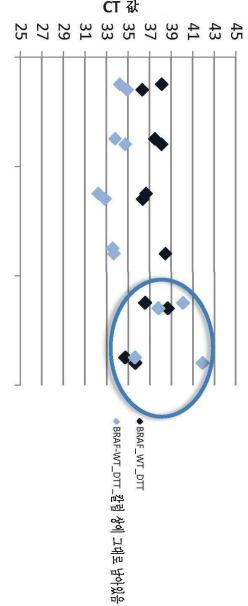
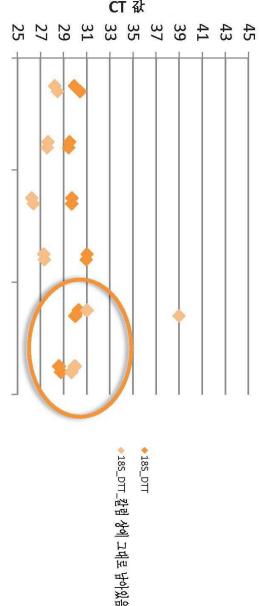
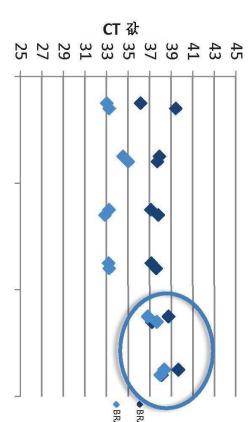
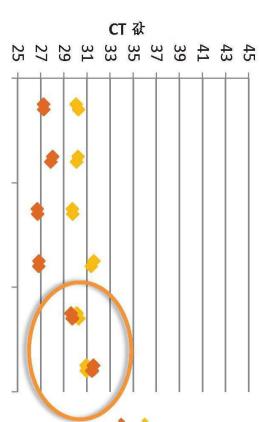
 $\beta$ -메르캅토-DTT 혼도

## 도면 136

Exo50 칼럼 상에서의 인큐메이션 시간

1min

10min



DNA 단위

## Exo50: 헤류 방법을 위한 올프레임 DNA/RNA 마이크로 카트

도면137

상이한 단리를 이용한 cfDNA 단리

상업적으로 입수 가능한 카트 1 circNA – cirmiNA – Exo52.2 구형 –

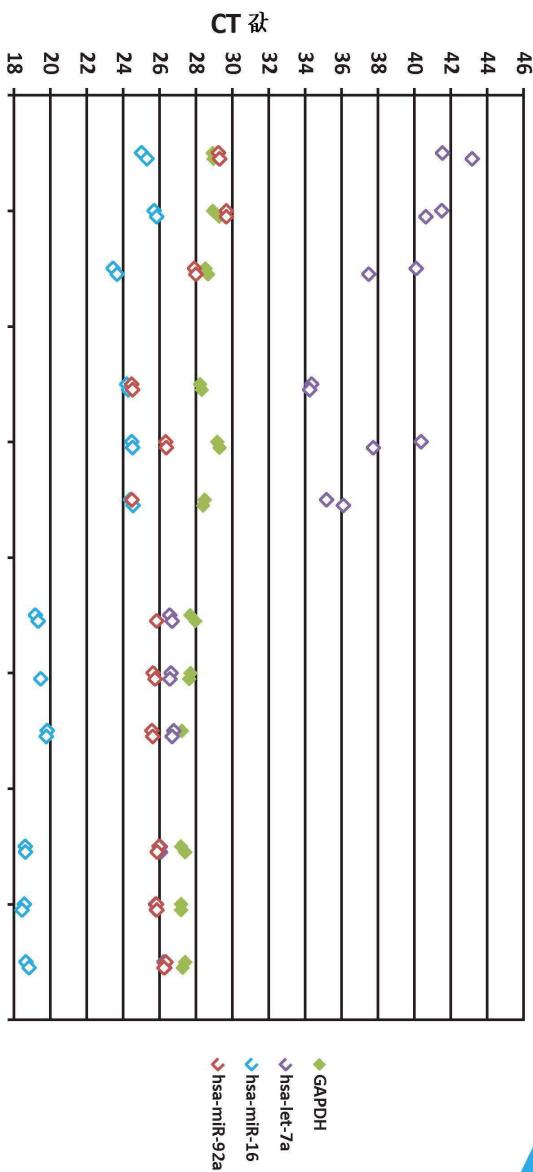
**Exo52.2** 신형

Circ miNA

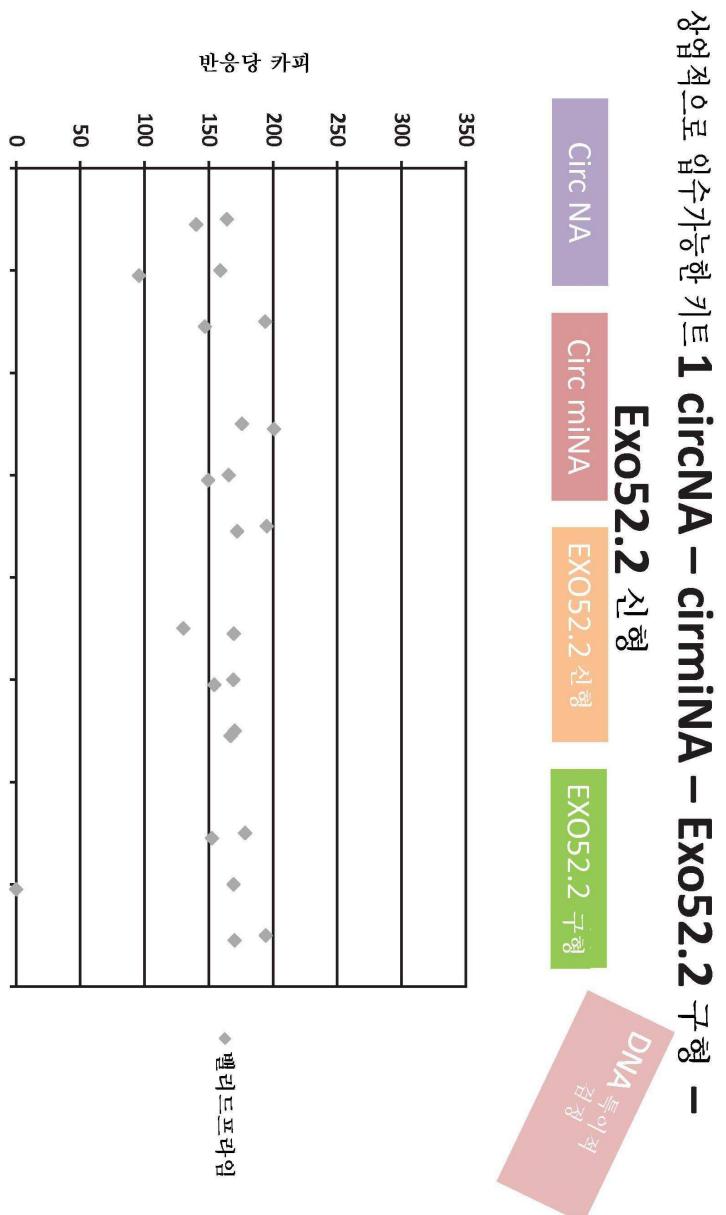
EXO52.2 신형

EXO52.2 구형

**RNA**  
검증이족



도면138



도면139

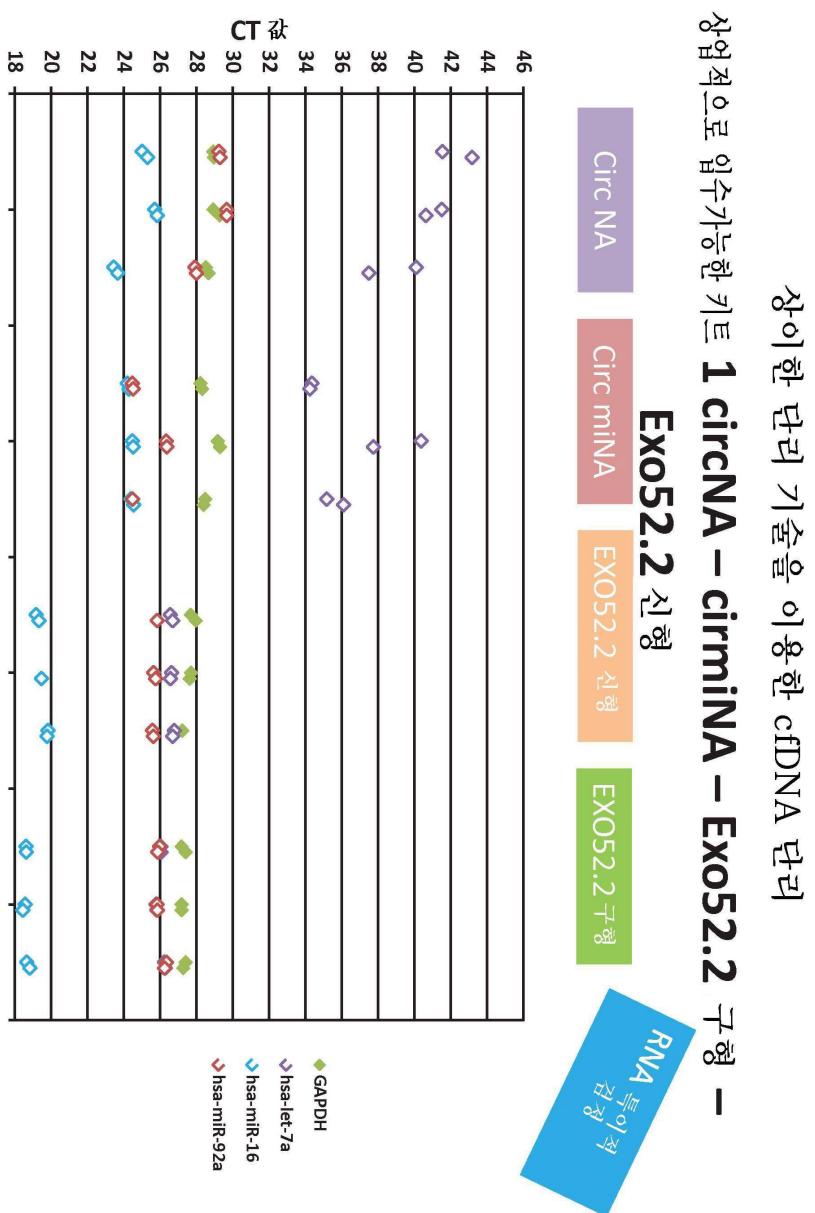
상이한 단리 기술을 이용한 cfDNA 단리

상업적으로 암수가능한 카트 1 circNA – cirmiNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

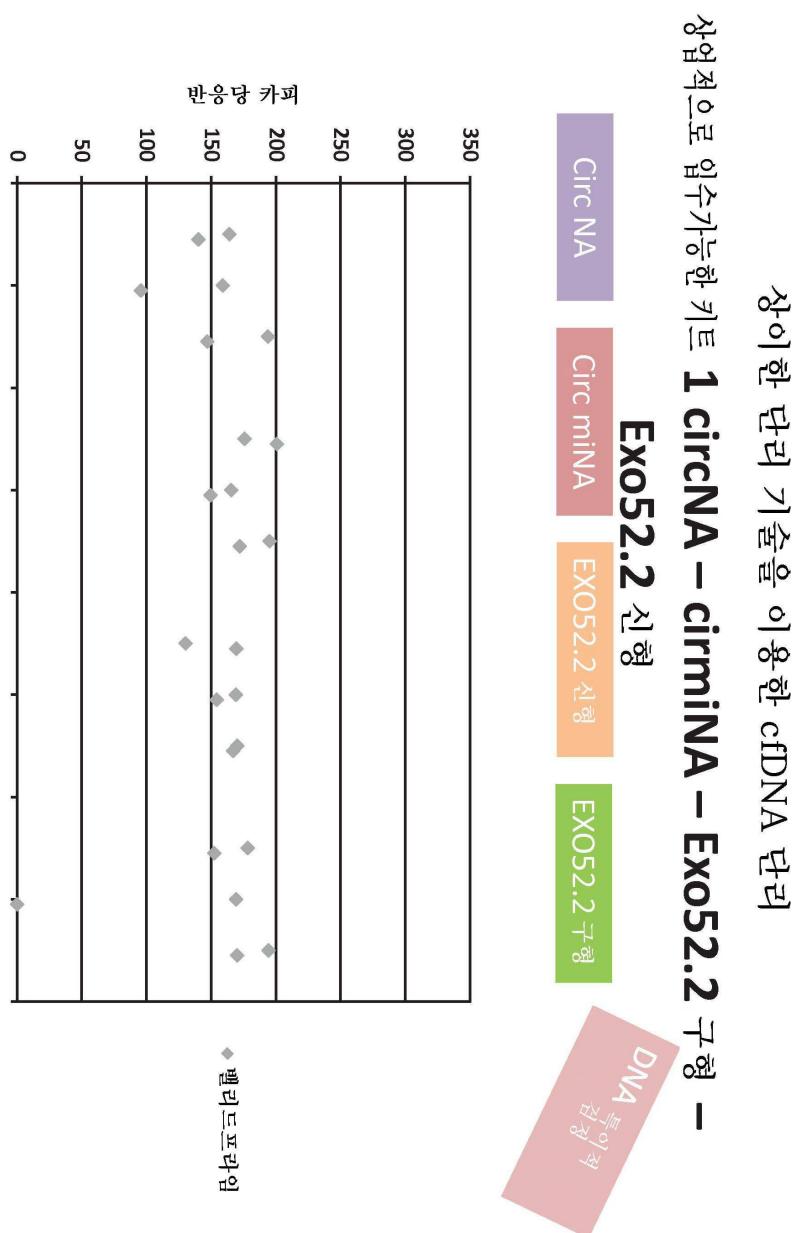


- 20 μl의 뉴클레이세 무함유 물 중에서 Exo52.2 샘플(#7-12)을 용리시킨다
- 23 μl의 AVE 완충제 중에서 cNA 샘플(#1-6)을 용리시킨다
- VIVO RT 반응을 위해 12 μl 사용 (20 μl VIVO 반응물 중 12 μl)
- LTI miRNA RT 반응을 위해 4 μl 사용 (15 μl LTI 반응물 중 4 μl)

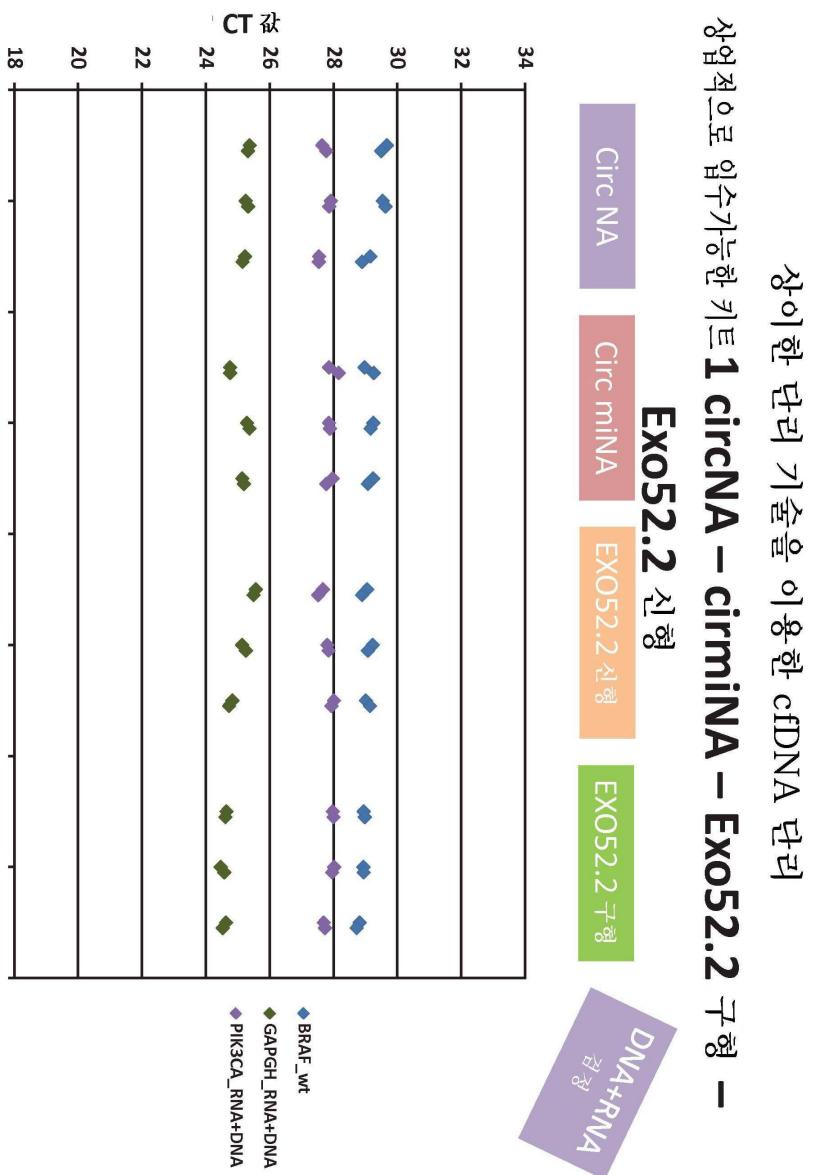
도면140



도면141

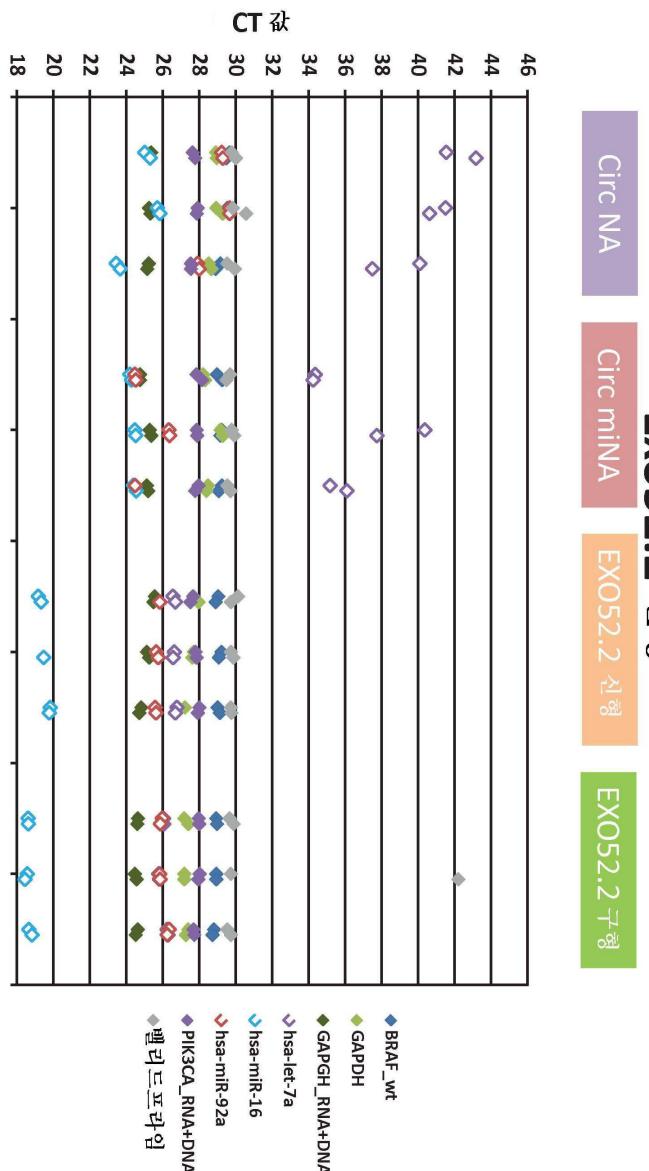


도면142

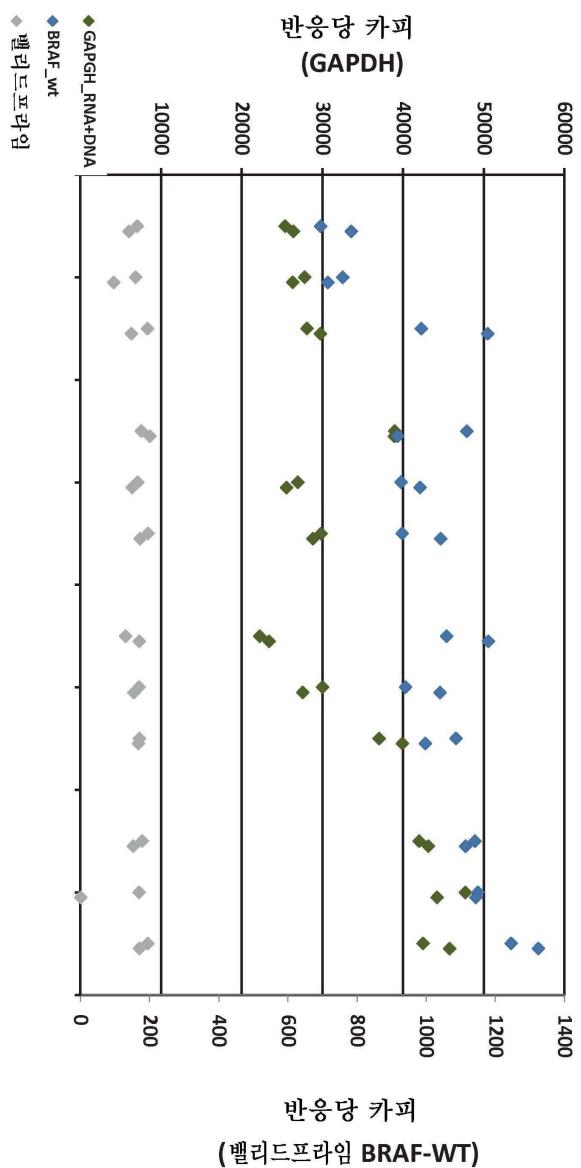


도면143

상업적으로 암수가능한 카트 1 circNA – cirmiNA – Exo52.2 –  
**Exo52.2 신형**



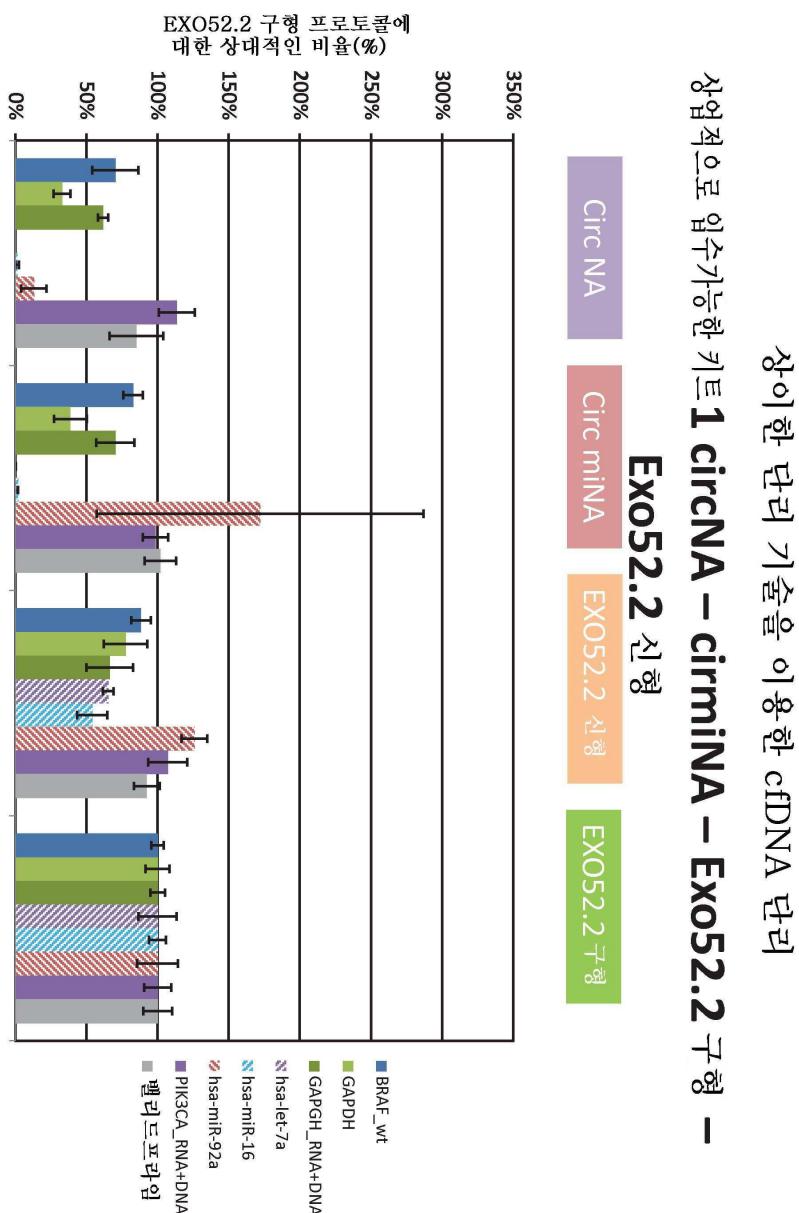
## 도면144



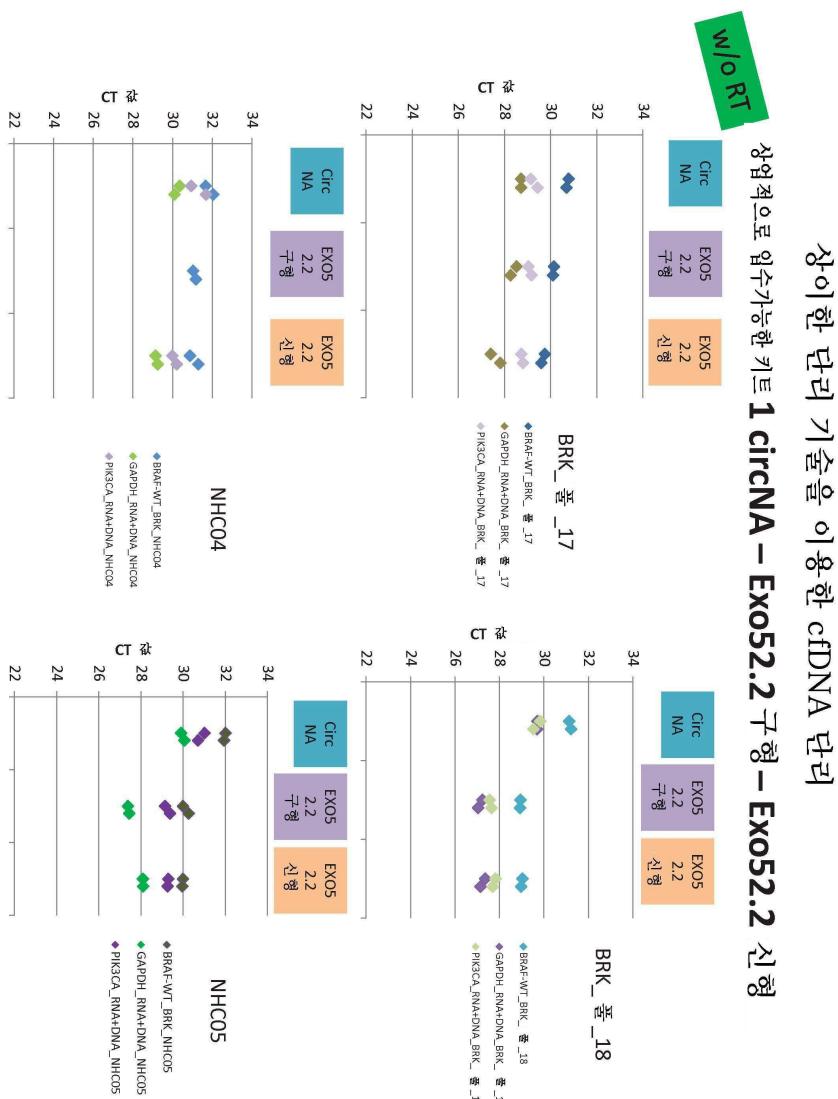
상업적으로 입수 가능한 카트 1 circRNA – cirmiNA – Exo52.2 구형 –  
Exo52.2 신형

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

도면145



### 도면 146



## 도면147

상이한 단리 기술을 이용한 cfDNA 단리  
상업적으로 업수기능한 카트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

상이한 단리 기술을 이용한 cfDNA 단리

각 단리를 위해 2 ml

29.04.2014 29.04.2014

29.04.2014 29.04.2014

29.04.2014 29.04.2014

NHC04 BRK Pool17 #1 #3

NHC04 BRK 풀17 #5 #7

Exo52.2  
구형  
프로토콜  
(350 μl  
클로로포름을  
이용하는  
Exo50 v4  
프로토콜)  
#1,3

NHC04 BRK 풀17 #9 #11

Circ NA  
cNA 프로토콜 폐이지  
22ff

#5,7

#9,11

신형 프로토콜  
(Exo52.2 v4)

22 μl의 뉴클레아이제 무함유 물 중에서 Exo52.2 샘플(#1,3,9,11)을 용리시킨다

25 μl의 AVE 완충제 중에서 cNA 샘플(#5,7)을 용리시킨다

VIVO RT 반응을 위해 10 μl 사용 (20 μl VIVO 반응물 중 10 μl)  
남은 10 μl를 1:2로 회식시킨다(10 μl DNA + 10 μl 용리 완충제)

## 도면148

상이한 단리 기술을 이용한 cfDNA 단리

**상업적으로 암수가능한 키트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형**

각 단리를 위해 2 ml

30.04.2014 30.04.2014

NHC05 #2	BRK 풀 18 #4
-------------	-------------------

30.04.2014 30.04.2014

NHC05 #6	BRK 풀 18 #8
-------------	-------------------

30.04.2014 30.04.2014

NHC05 #10	BRK 풀 18 #12
--------------	--------------------

각 프로토콜에 대하여  
신선한 혈장  
분류를 사용

**Exo52.2**

(350  $\mu$  클로로포름을  
이용하는  
Exo50 v4  
프로토콜)

#2,4

**Circ NA**

cNA  
프로토콜  
폐이지  
22ff

#6,8

**Exo52.2**

신형  
프로토콜  
(Exo52.2 v4)

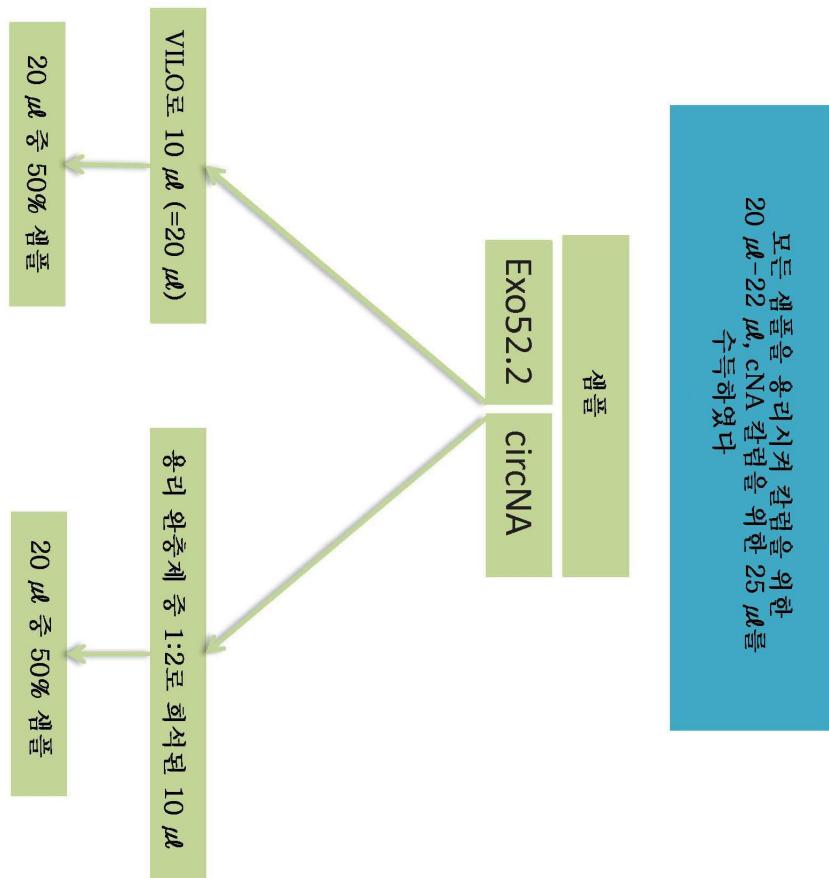
# 10,12

22  $\mu$ 의 뉴클레아제 무함유 물 중에서 Exo52.2 실클(4,10,12)를 용라시킨다

25  $\mu$ 의 AVE 원종재 중에서 cNA 샘플(#6,8)을 용라시킨다

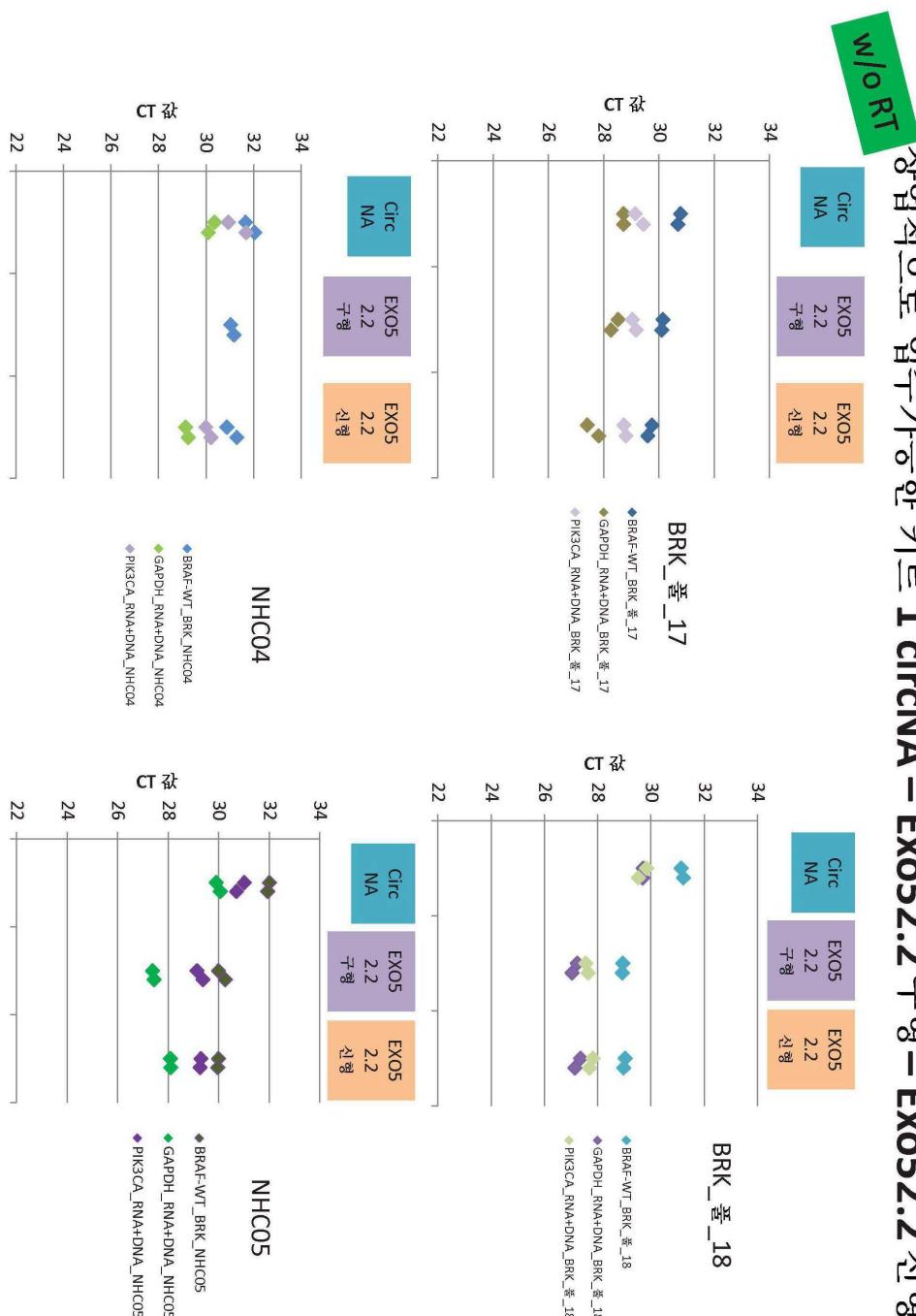
VIVO RT 반응을 위해 10  $\mu$  시약 (20  $\mu$  VIVO 반응을 중 10  $\mu$ )  
남은 10  $\mu$ 를 1:2로 회석시킨다(10  $\mu$  DNA + 10  $\mu$  용리 원종재)

도면 149



도면150

## 상업적으로 암주가능한 키트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형



도면151

### 장이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

#### 상업적으로 입수 가능한 키트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

W / RT



34

32

30

28

26

24

22

34

32

30

28

26

24

22

BRK\_全景\_18

34

32

30

28

26

24

22

34

32

30

28

26

24

22

NHC04

34

32

30

28

26

24

22

NHC05

34

32

30

28

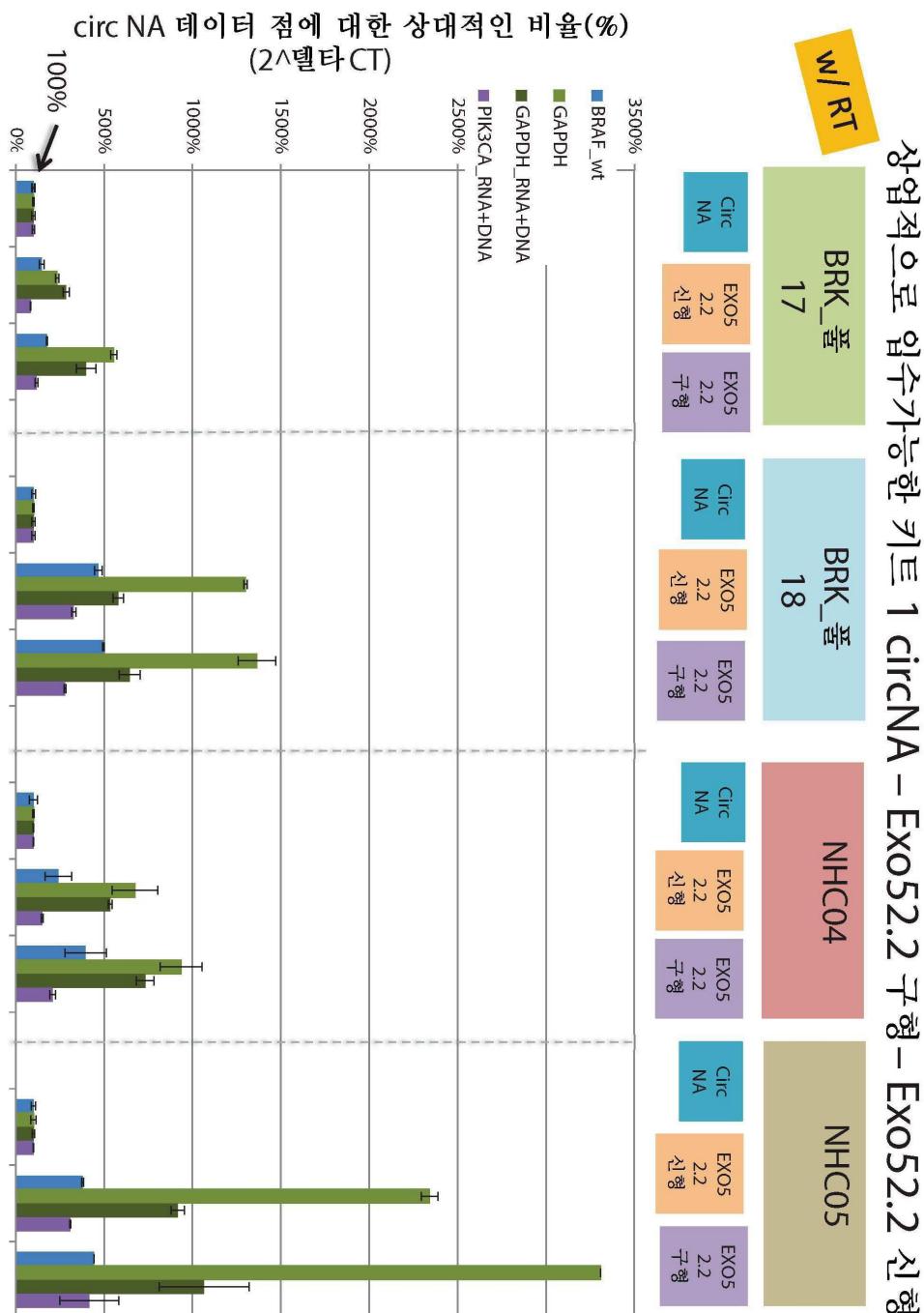
26

24

22

도면152

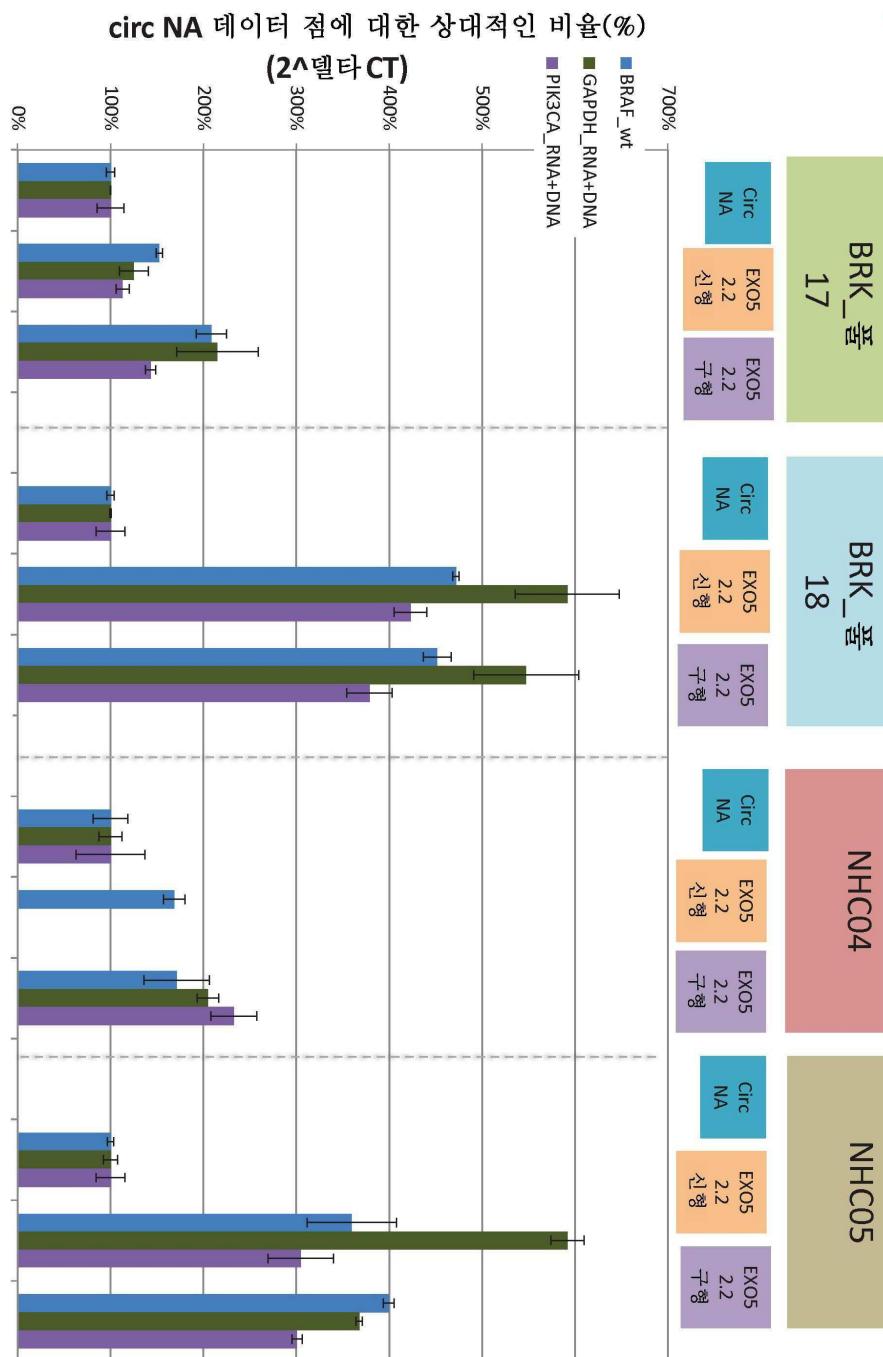
### 상업적으로 입수 가능한 키트 1 circNA – Exo5.2.2 구형 – Exo5.2.2 신형



도면153

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

w/o RT 상업적으로 입증가능한 카트 1 circNA – EXO52.2 구형 – EXO52.2 신형

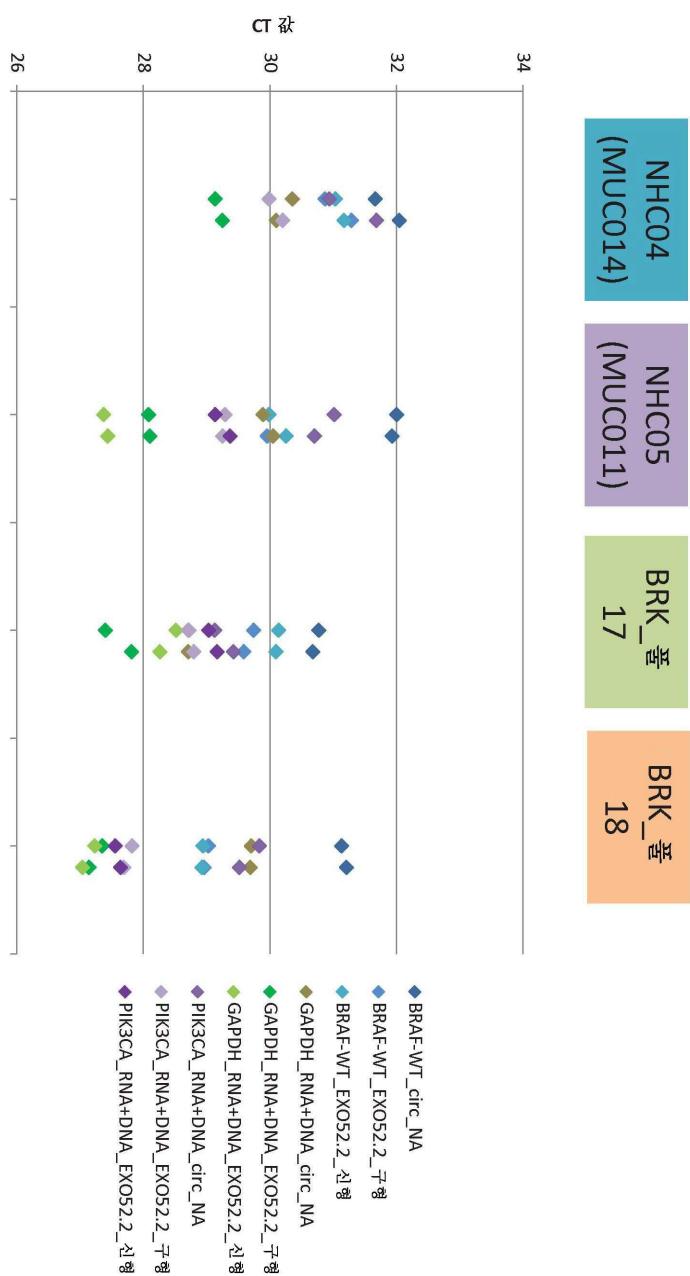


도면154

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

상업적으로 입수 가능한 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

w/o RT

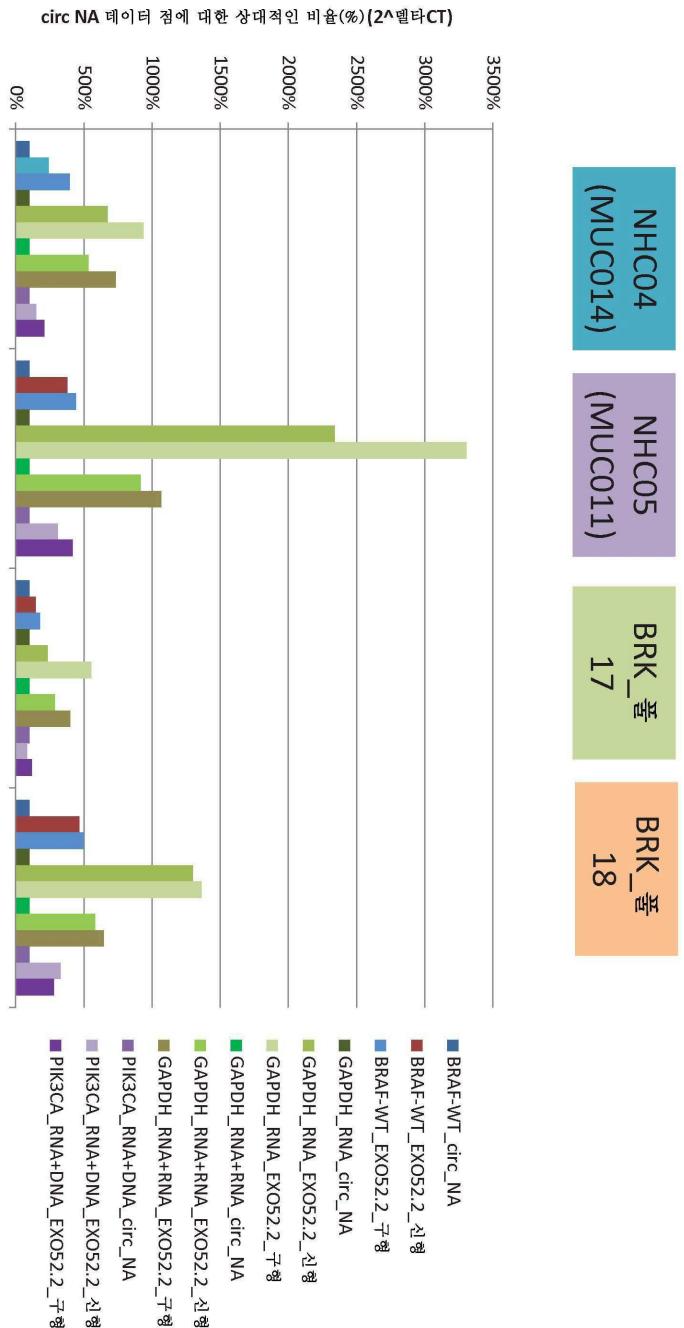


도면155

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

### 상업적으로 업수 가능한 키트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

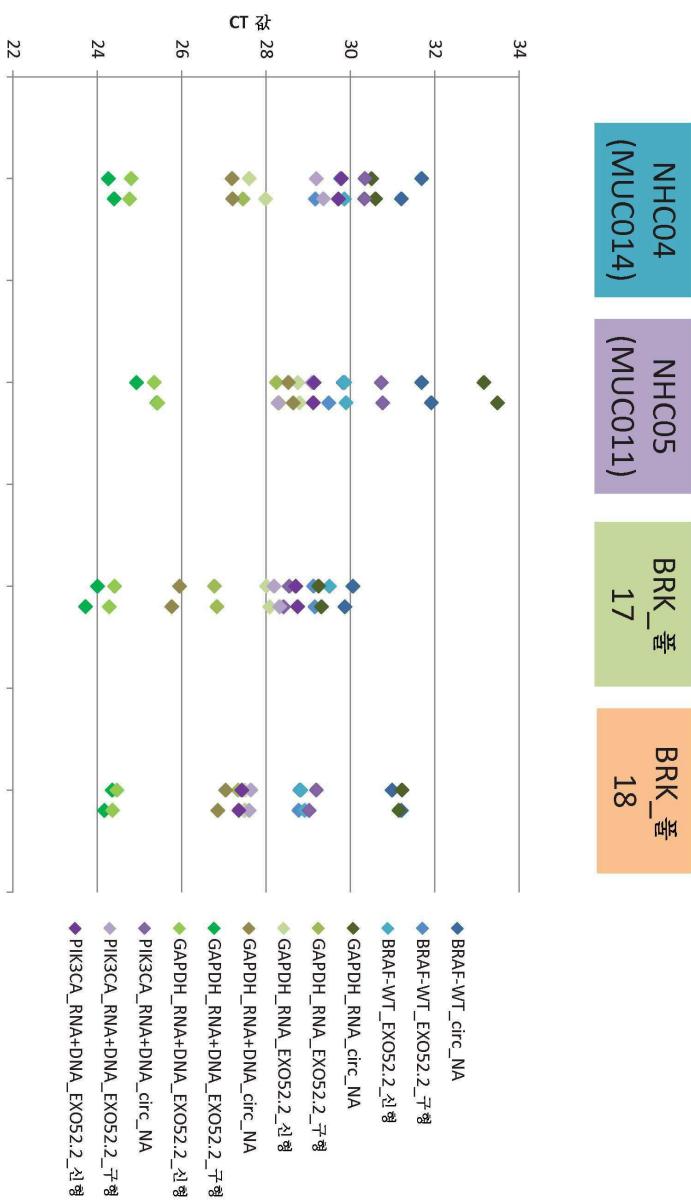
w/o RT



도면156

상이한 단리 기술을 이용한 cfDNA 단리

산업적으로 일주가능한 카트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

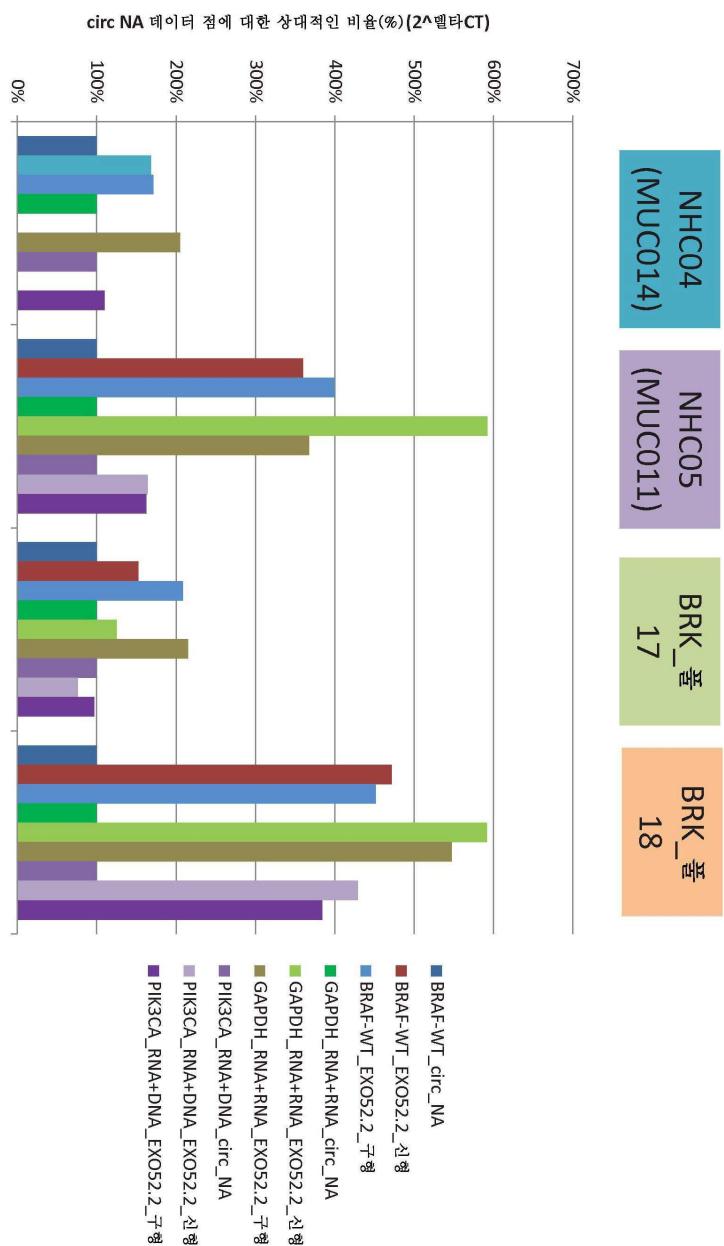
W/  
RT

도면157

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

### 상업적으로 암수 가능 한 키트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

W/  
RT



도면158

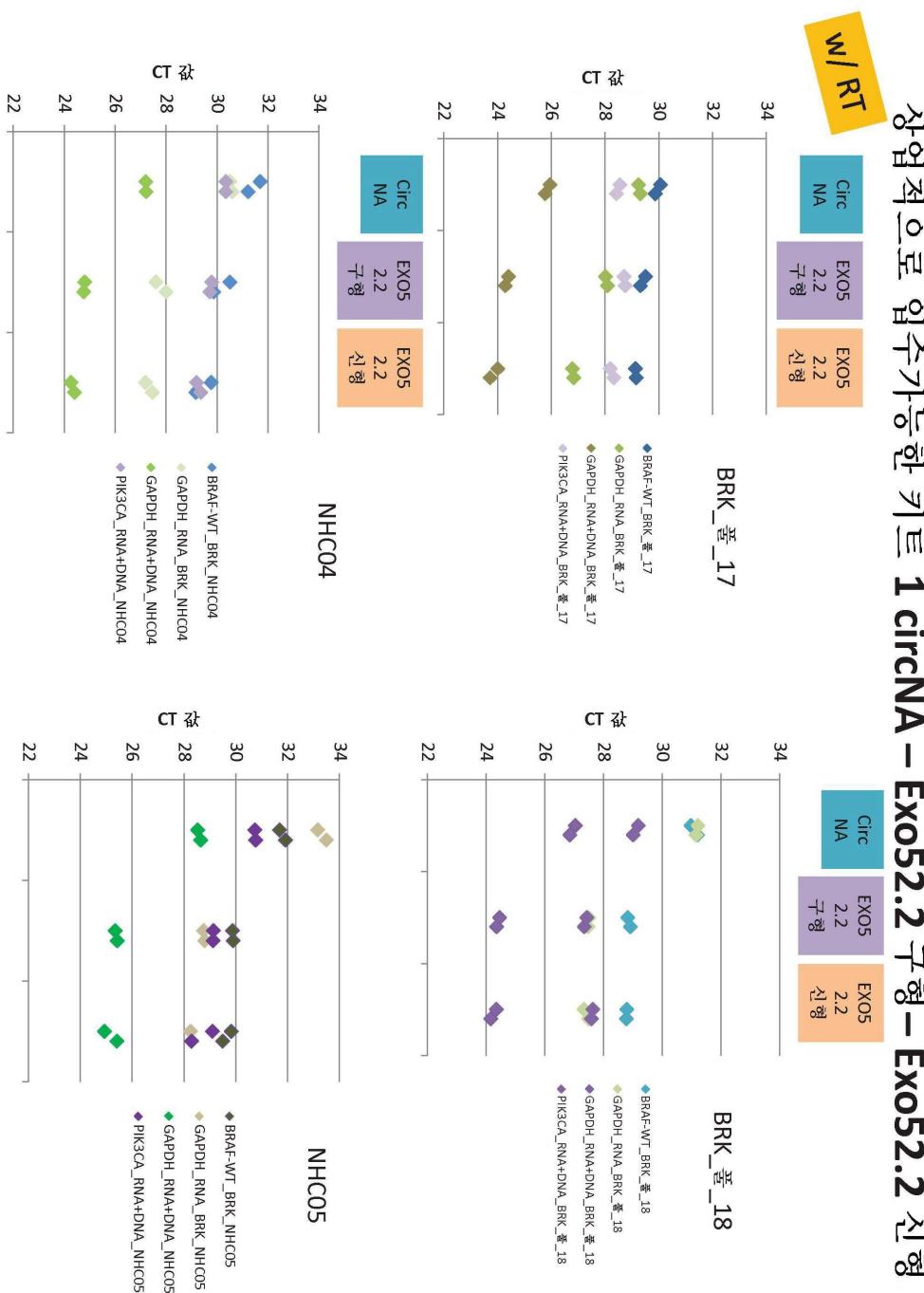
상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

### 상업적으로 암수 가능 한 키트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형



도면159

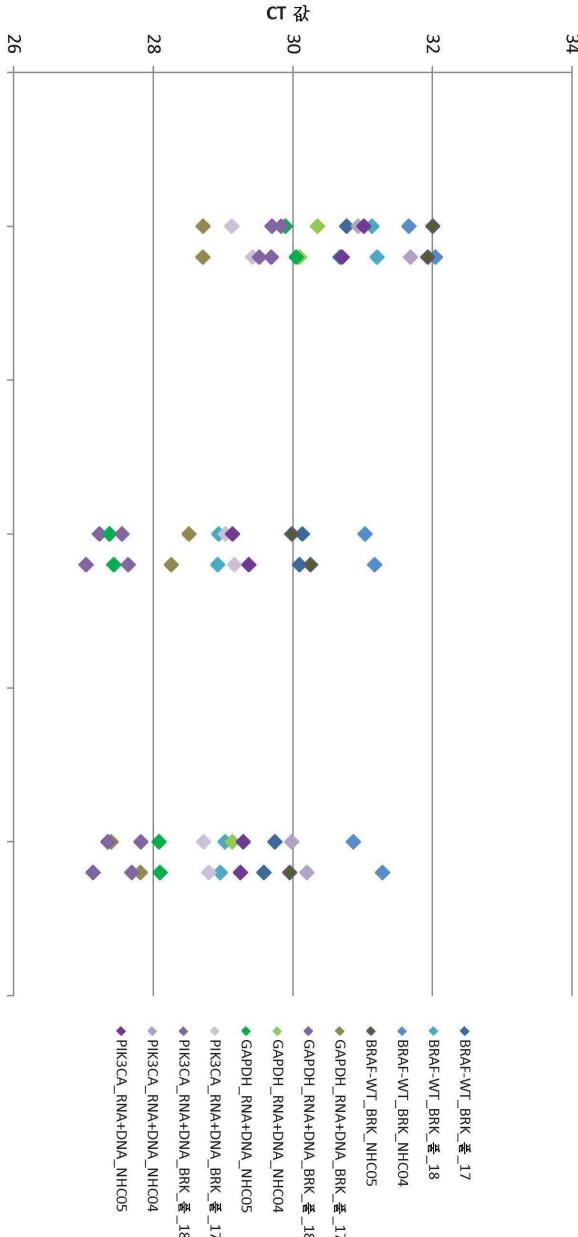
### 상업적으로 입수 가능한 키트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형



도면 160

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

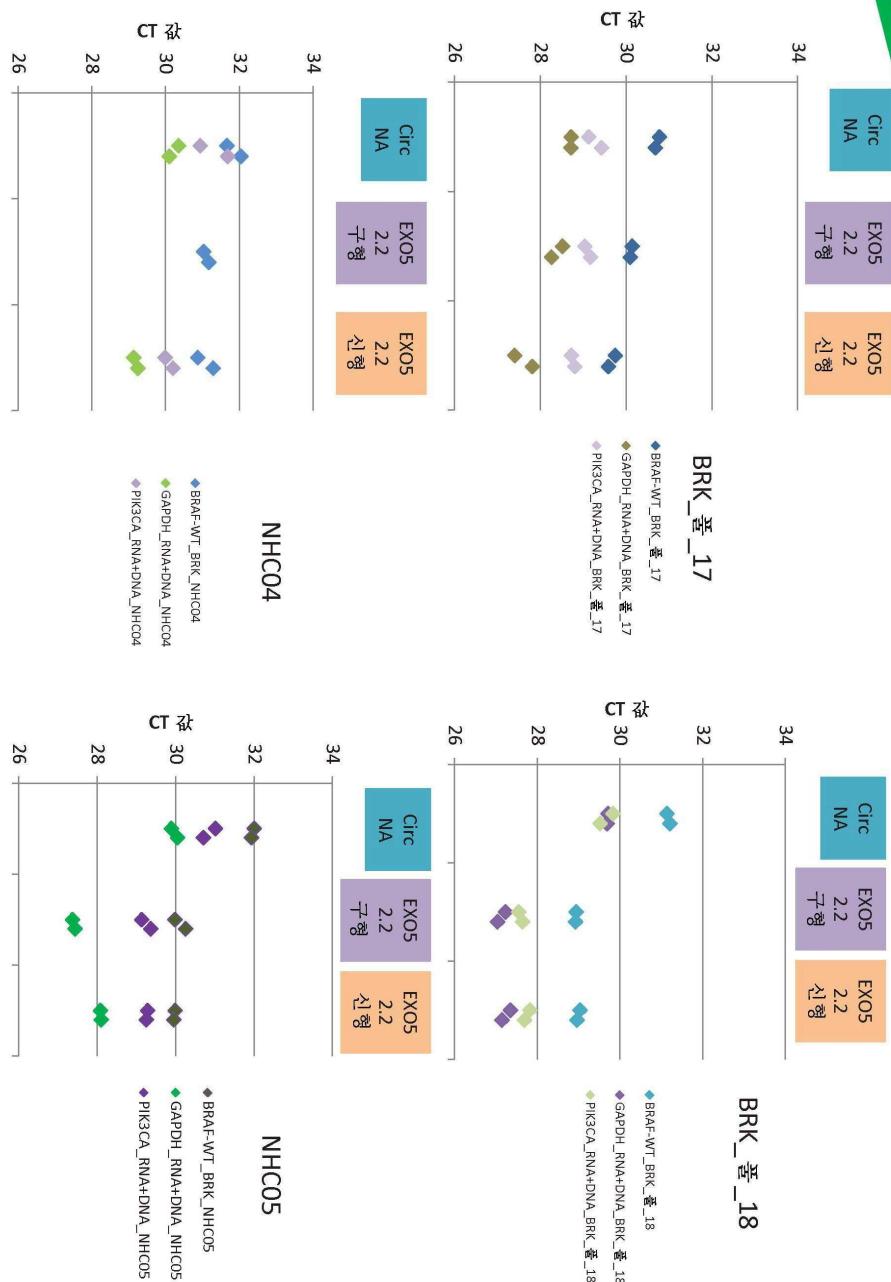
상업적으로 암주가능한 키트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형



도면161

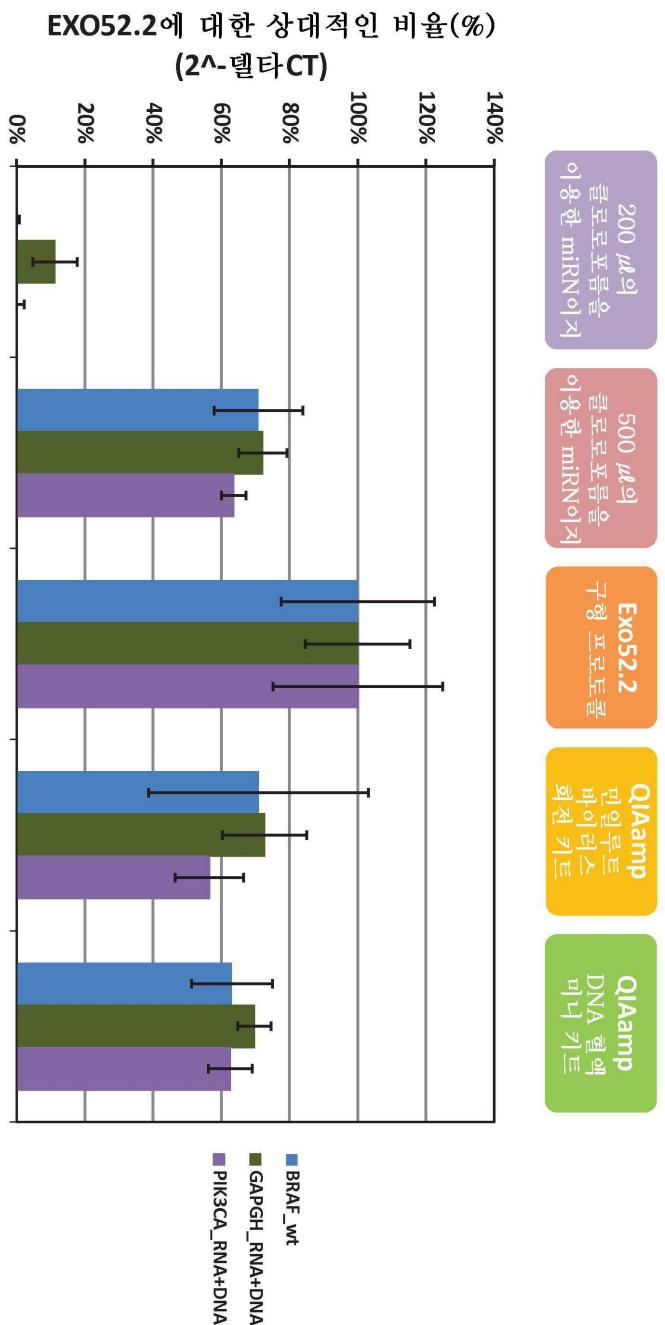
## 상업적으로 입수 가능한 키트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

W/o RT



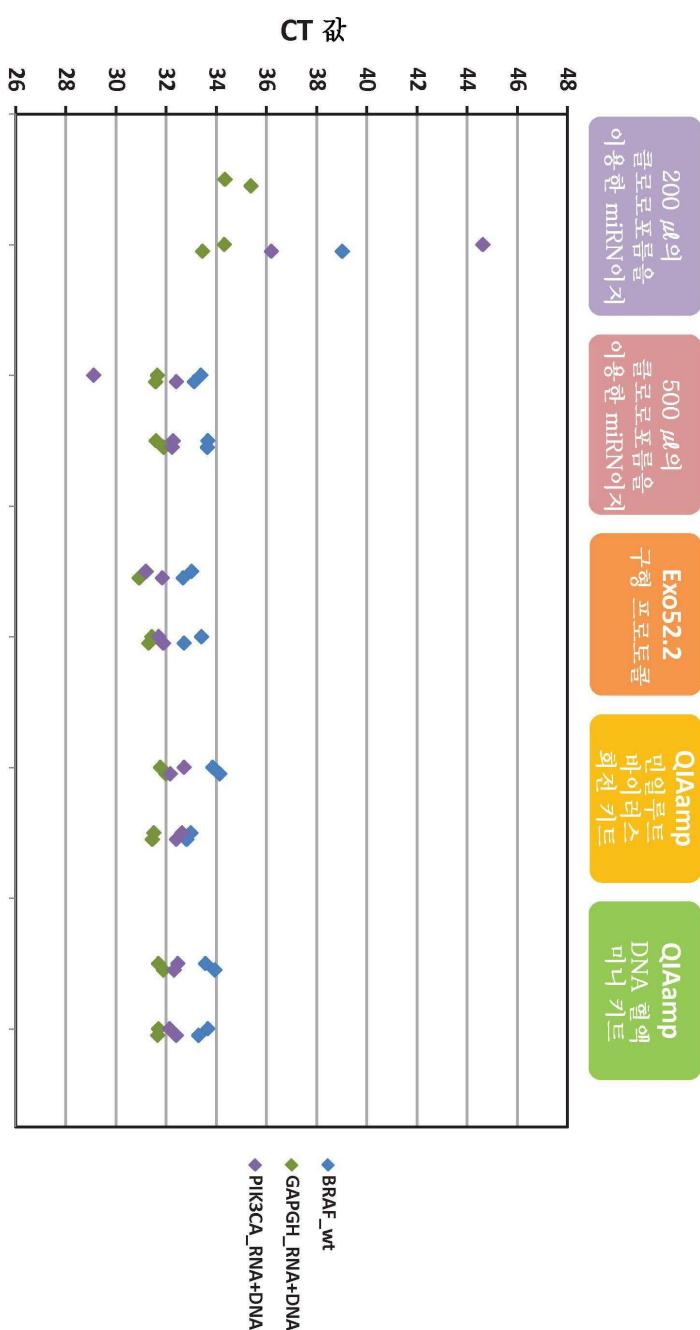
도면162

## 200 $\mu\text{l}$ 의 BRK 혈장에 대한 DNA 단위 방법 비교

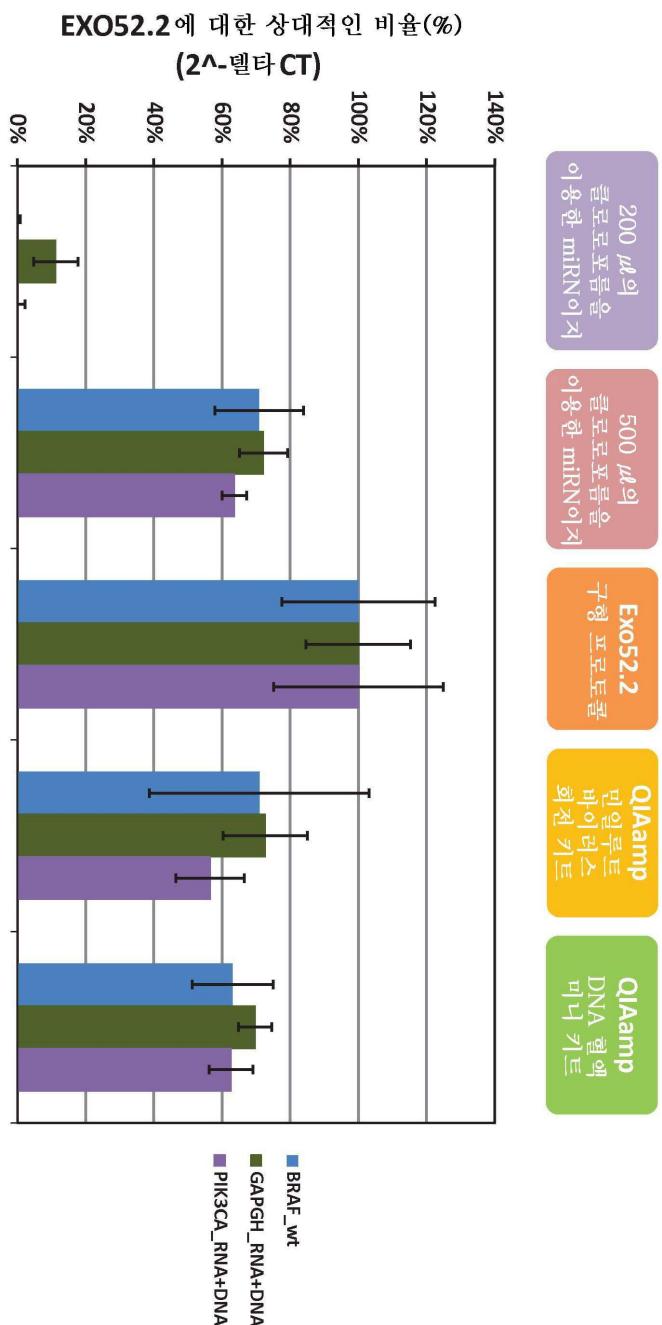


도면163

## 200 $\mu\text{l}$ 의 BRK 혈장에 대한 DNA 단리 방법 비교



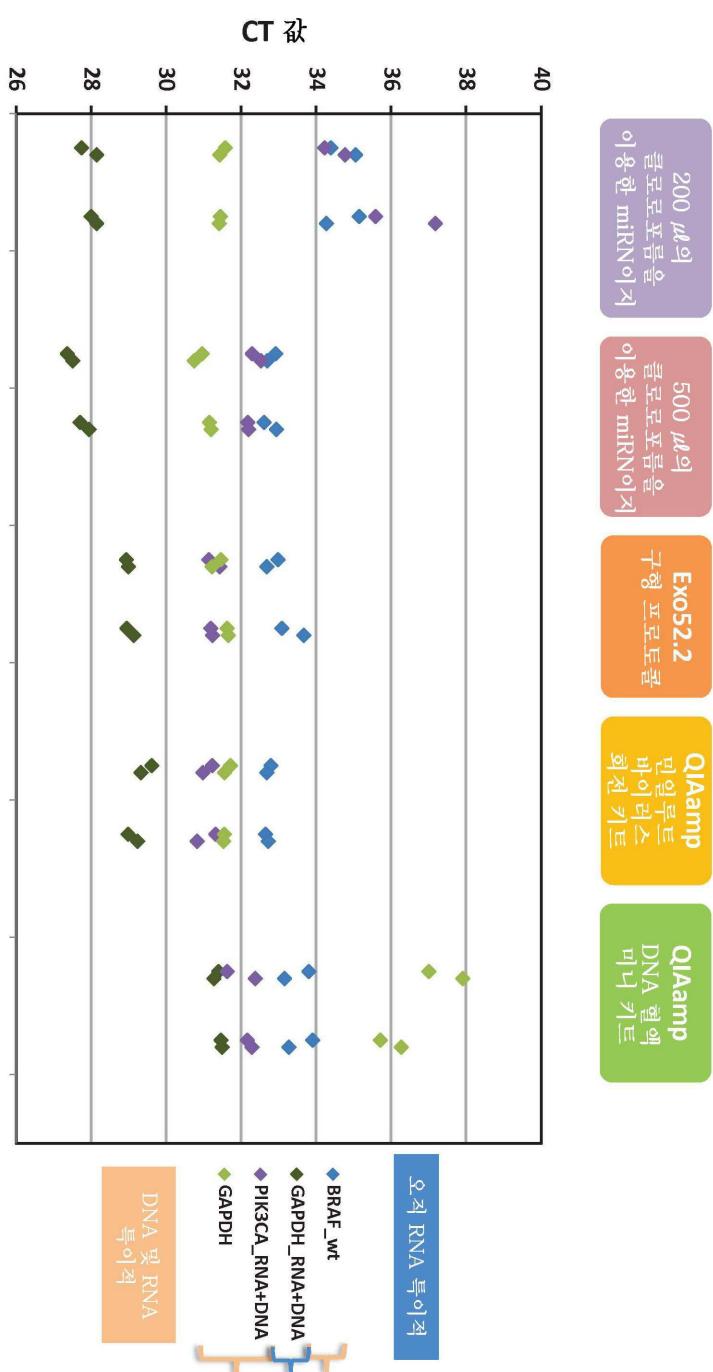
도면164



## 200 $\mu\text{l}$ 의 BRK 혈장에 대한 DNA 단리 방법 비교

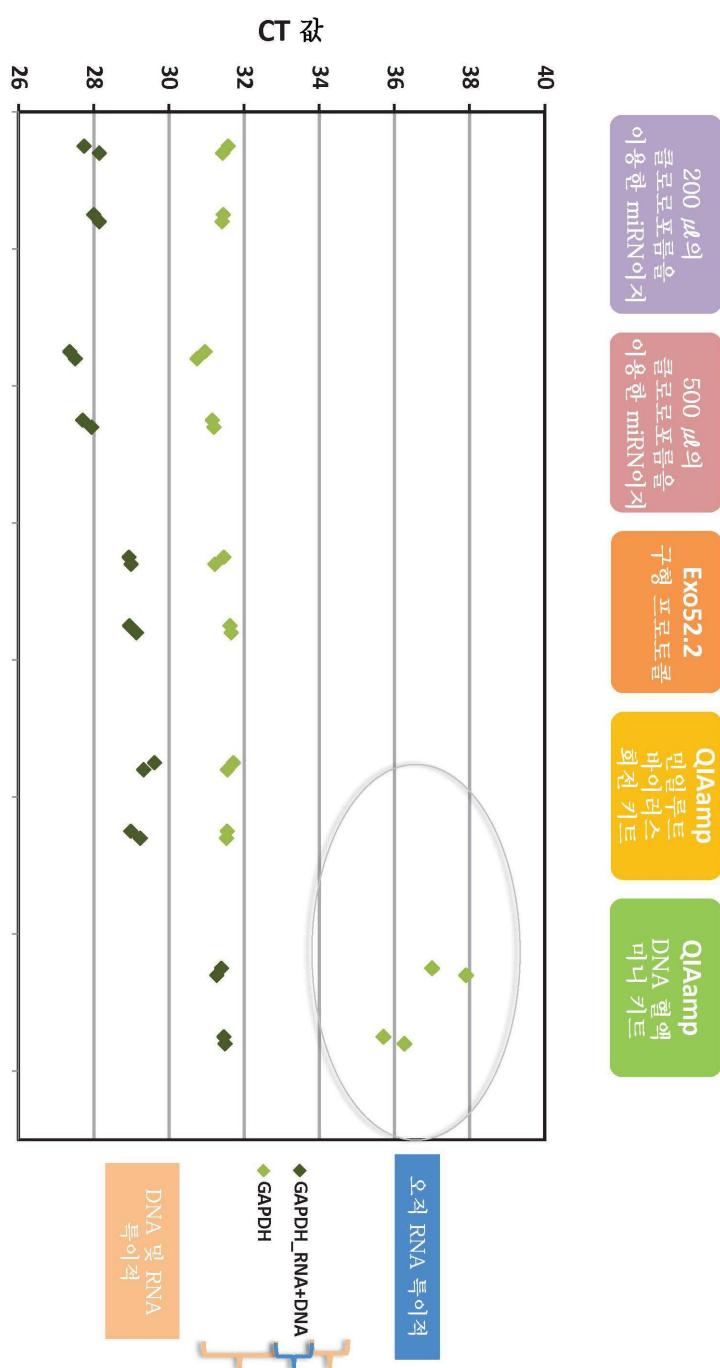
도면 165

## 200 $\mu$ l의 BRK 혈장에 대한 DNA/RNA 단위 방법 비교-RT 단계 수행



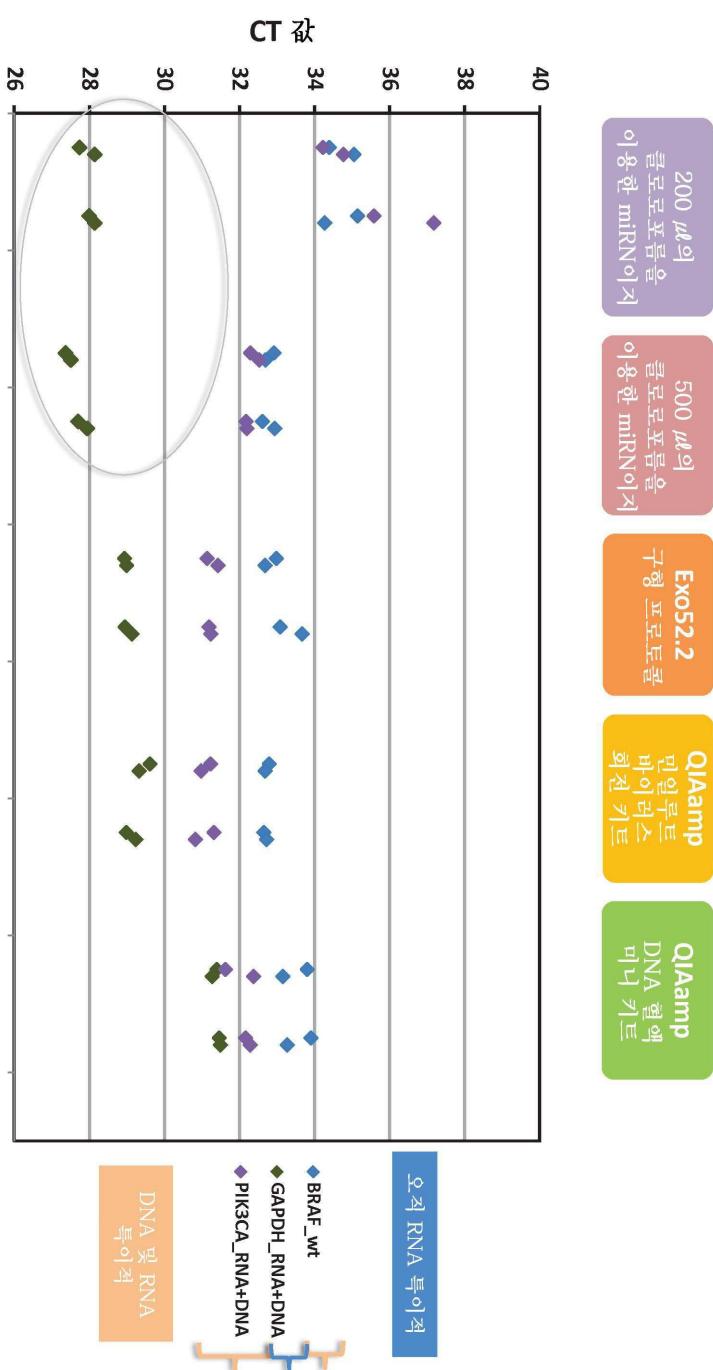
도면 166

## 200 $\mu\text{l}$ 의 BRK 혈장에 대한 DNA/RNA 단위 방법 비교-RT 단계 수행



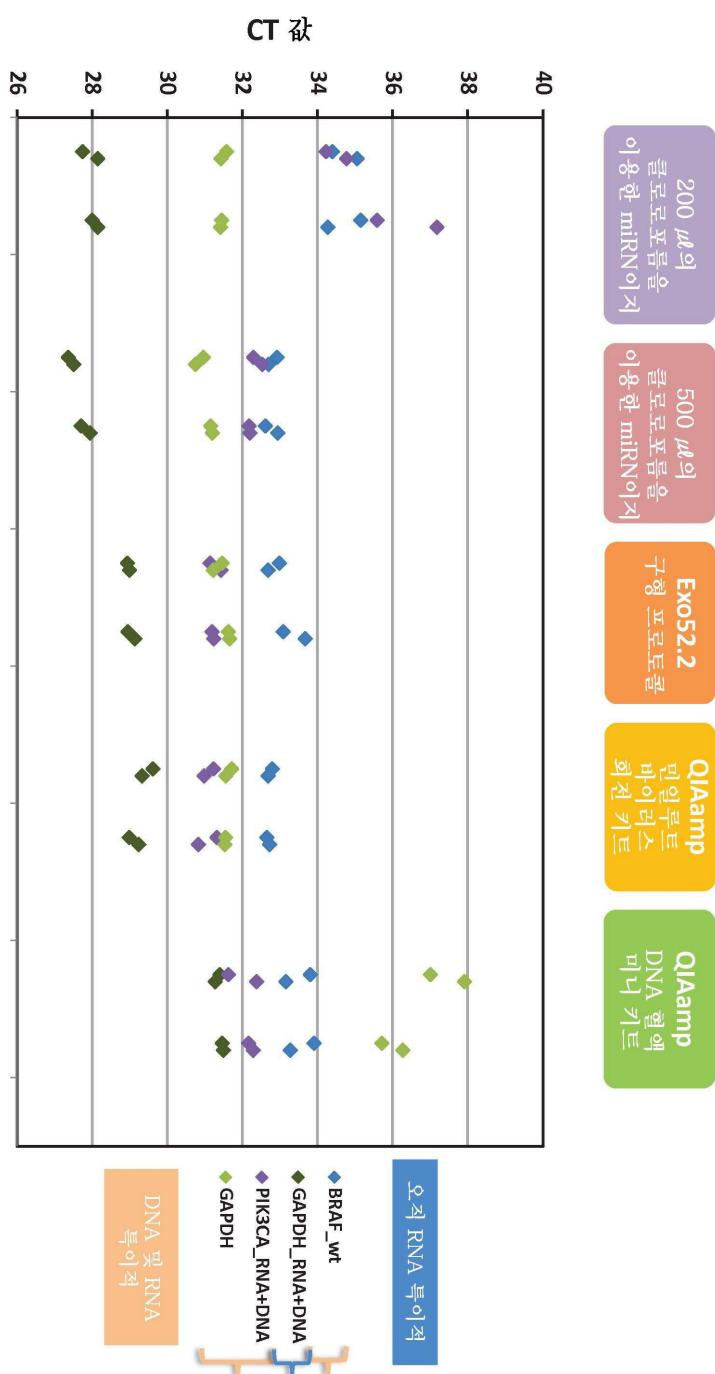
도면 167

## 200 $\mu$ l의 BRK 혈장에 대한 DNA/RNA 단백 방법 비교-RT 단계 수행

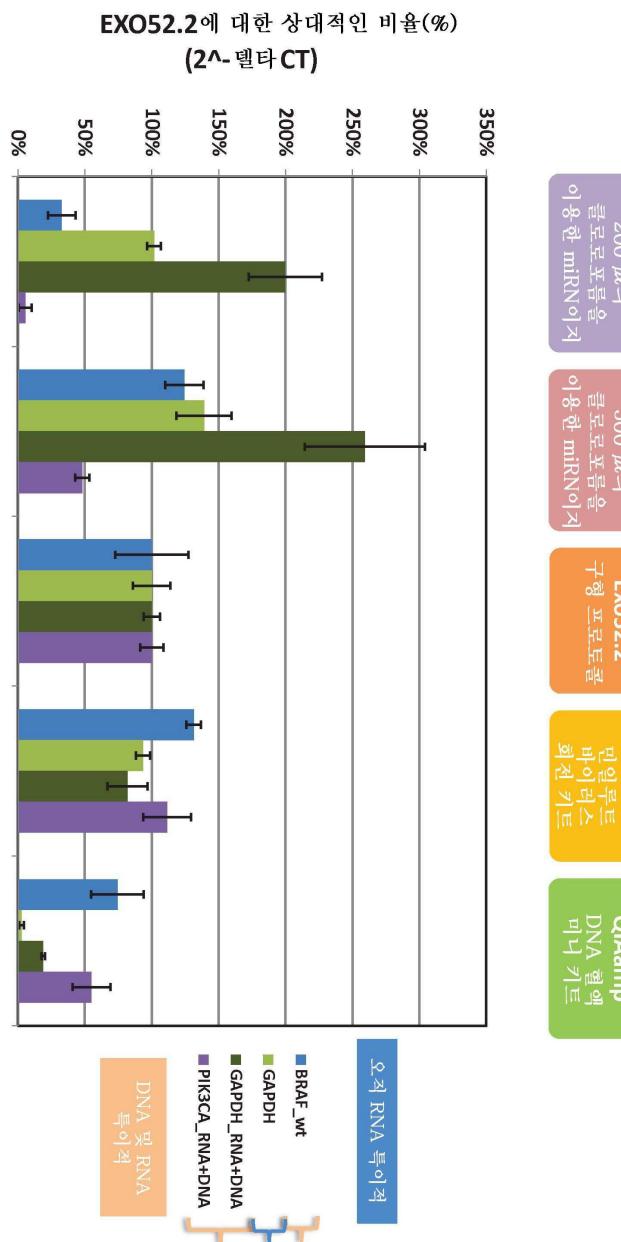


도면 168

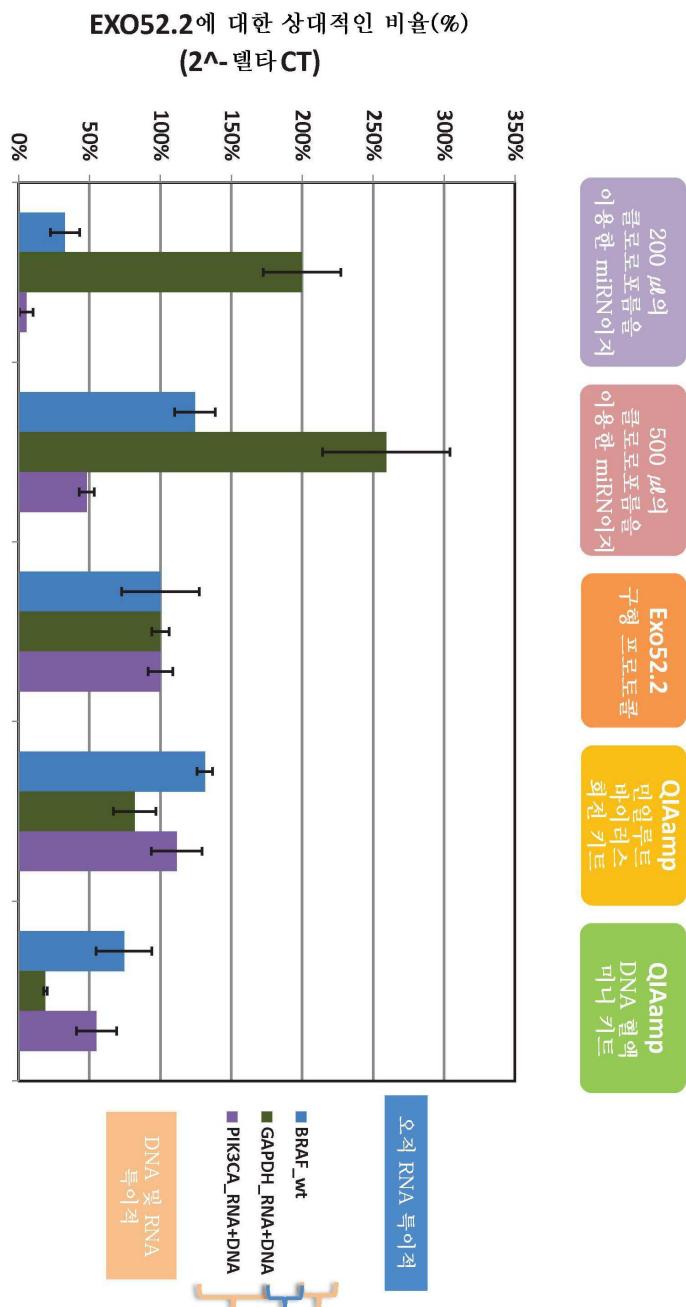
## 200 $\mu$ l의 BRK 혈장에 대한 DNA/RNA 단리 방법 비교-RT 단계 수행



## 도면 169

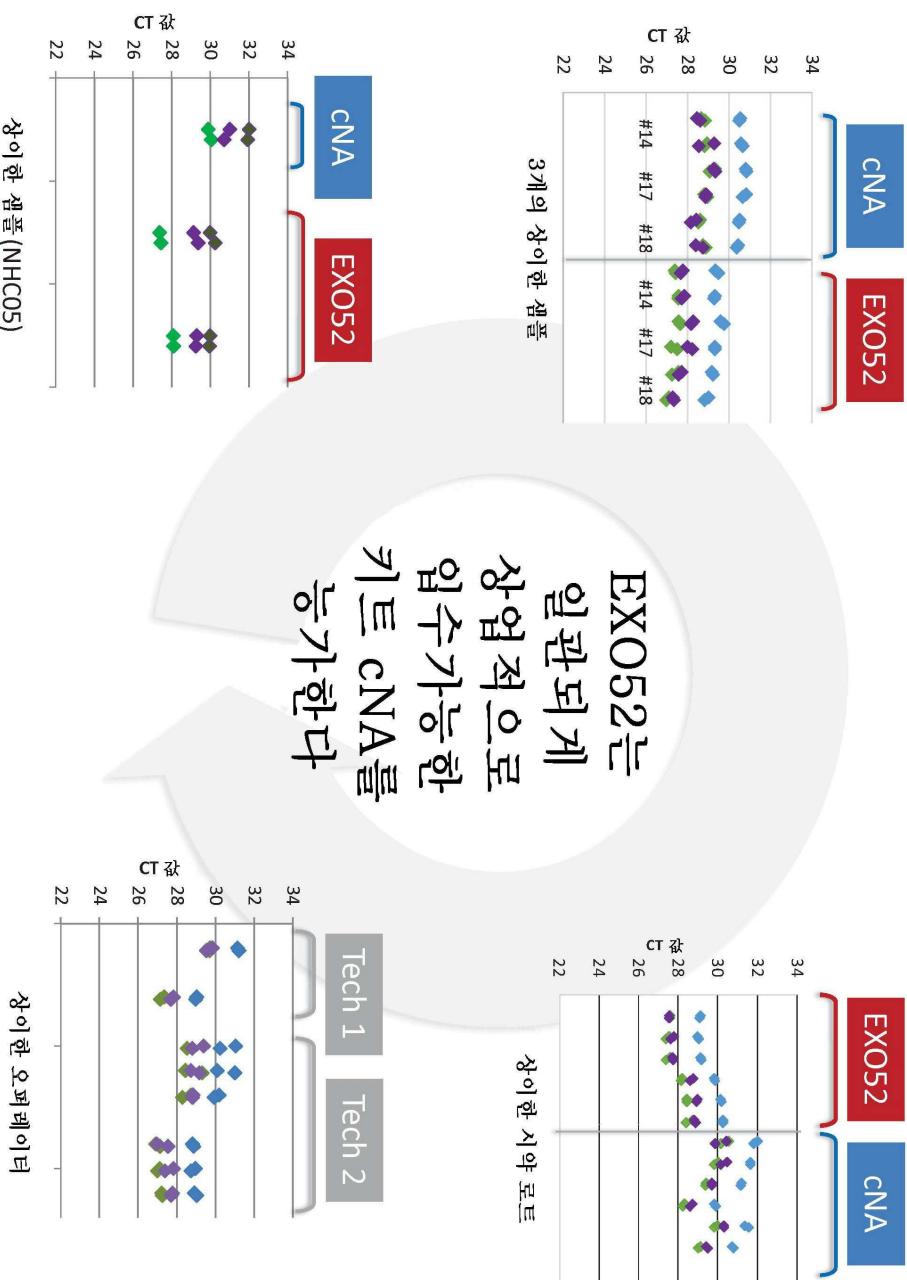
200  $\mu\text{l}$ 의 BRK 웰장에 대한 DNA/RNA 단위 방법 비교-RT 단계 수행

도면170



## 200 $\mu\text{l}$ 의 BRK 혈장에 대한 DNA/RNA 단리 방법 비교-RT 단계 수행

도면 171



상이한 단리 기술을 이용한 cfDNA 단리

**상업적으로 암수 가능 한 키트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형**

각 단리를 위해  
2 ml

29.04.2014 29.04.2014

29.04.2014 29.04.2014

29.04.2014 29.04.2014

NHC04  
#1BRK  
풀17  
#3NHC04  
#5BRK  
풀17  
#7NHC04  
#9BRK  
풀17  
#11

**Exo52.2**  
구형 프로토콜  
(350  $\mu$ l 클로로포름을  
이용하는  
Exo50 v4 프로토콜)

#1,3

**Circ NA**  
cNA 프로토콜 폐이자  
22ff

#5,7

**Exo52.2**  
신형 프로토콜  
(Exo52.2 v4)

#9,11

각 프로토콜에  
신선한 혈장에  
대하여  
분획물 사용

22  $\mu$ l의 뉴클레이어 무침-유 물 중에서 Exo52.2 샘플(#1,3,9,11)을 용리시킨다

25  $\mu$ l의 AVE 완충제 중에서 cNA 샘플(#5,7)을 용리시킨다

VIVO RT 반응을 위해 10  $\mu$ l 사용 (20  $\mu$ l VIVO 반응-물 중  
남은 10  $\mu$ l을 1:2로 희석시킨다(10  $\mu$ l DNA +  
10  $\mu$ l 용리 완충제))

도면172

도면173

상이한 단리 기술을 이용한 cfDNA 단리

상업적으로 암수 가능한 키트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

각 단리를 위해  
2 ml

30.04.2014 30.04.2014

NHC05  
#2

BRK  
풀18  
#4

30.04.2014 30.04.2014

NHC05  
#6

BRK  
풀18  
#8

각 프로토콜에 대하여  
신선한 혈장 분획을 사용

30.04.2014

NHC05  
#10

BRK  
풀18  
#12

30.04.2014

Exo52.2  
구형 프로토콜  
(350  $\mu$ l 클로도포를을  
이용하는  
Exo50 v4 프로토콜)/  
#2,4

Circ NA  
cNA 프로토콜 폐이자  
22ff

Exo52.2  
신형 프로토콜  
(Exo52.2 v4)

#6,8

#6,8

#10,12

22  $\mu$ l의 뉴클레이어에 무함유 풀 중에서 Exo52.2 샘플(#2,4,10,12)을 용리시킨다

25  $\mu$ l의 AVE 완충제 중에서 cNA 샘플(#6,8)을 용리시킨다

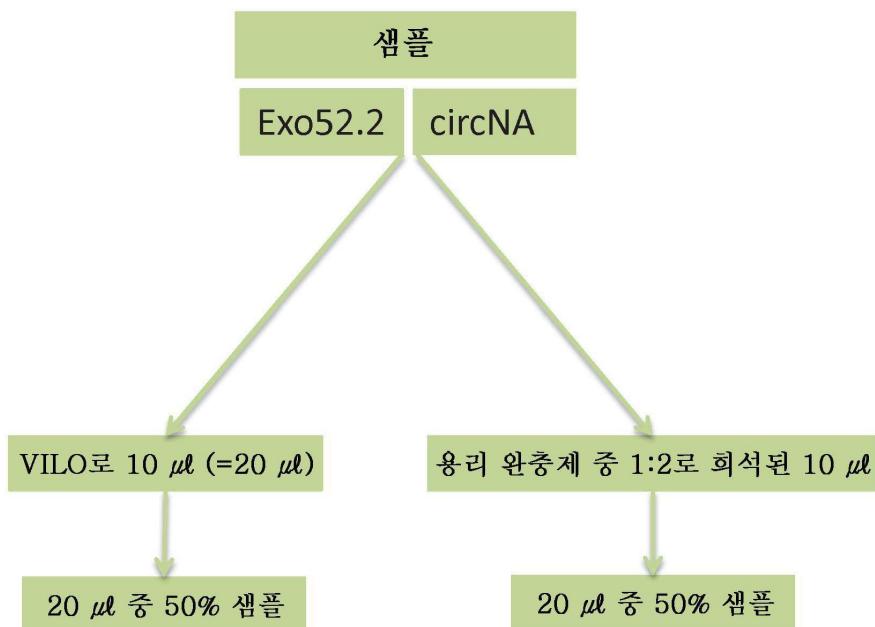
VIVO RT 반응을 위해 10  $\mu$ l 사용 (20  $\mu$ l VIVO RT 반응 풀 중  
10  $\mu$ l)

남은 10  $\mu$ l를 1:2로 회색지침(10  $\mu$ l DNA +  
10  $\mu$ l 용리 완충제)

도면174

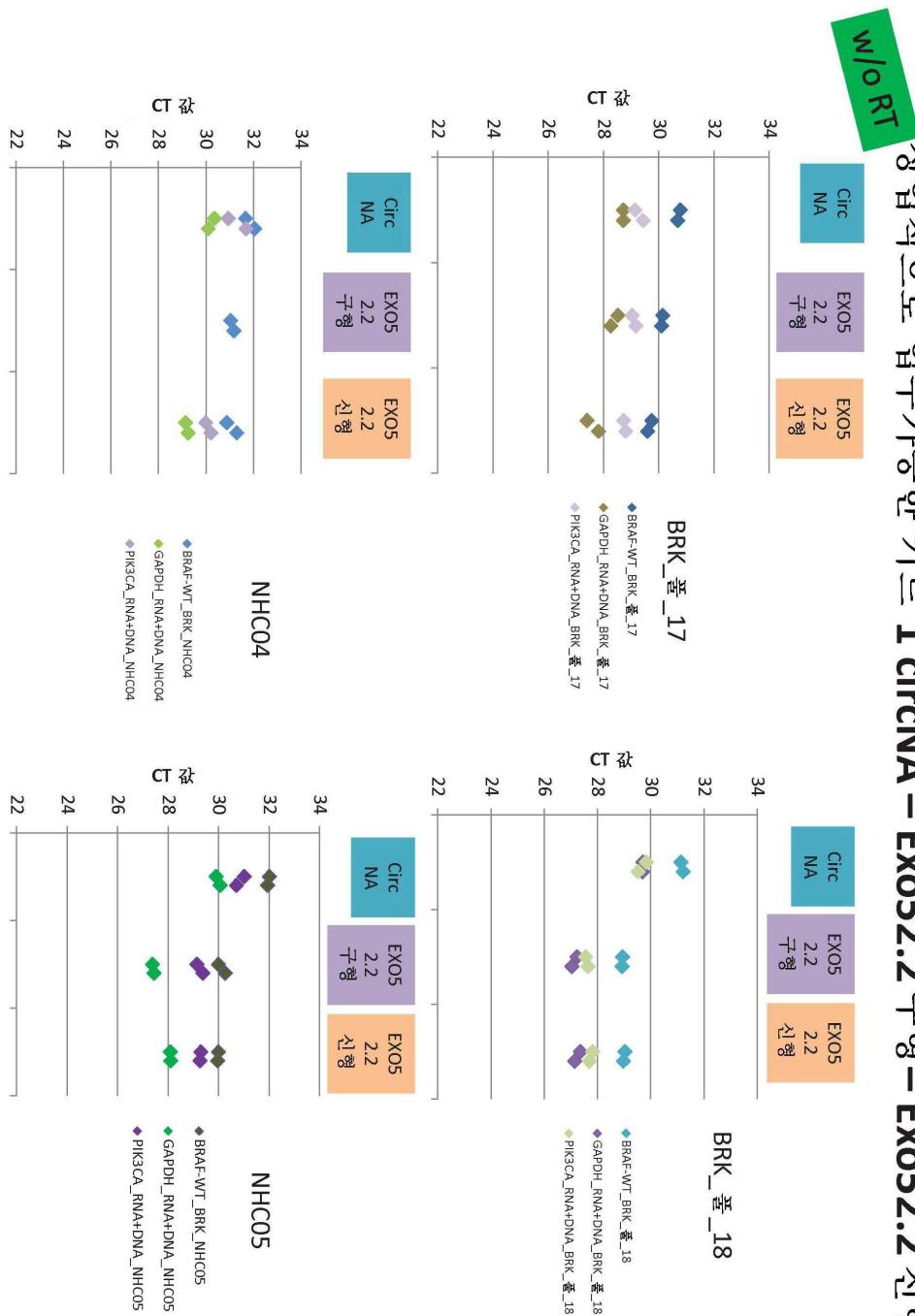
## 희석 개요

모든 샘플을 용리시켜  
RN이지 칼럼을 위한  $20 \mu\text{l}$ - $22 \mu\text{l}$ ,  
cNA 칼럼을 위한  $25 \mu\text{l}$ 를 수득하였다



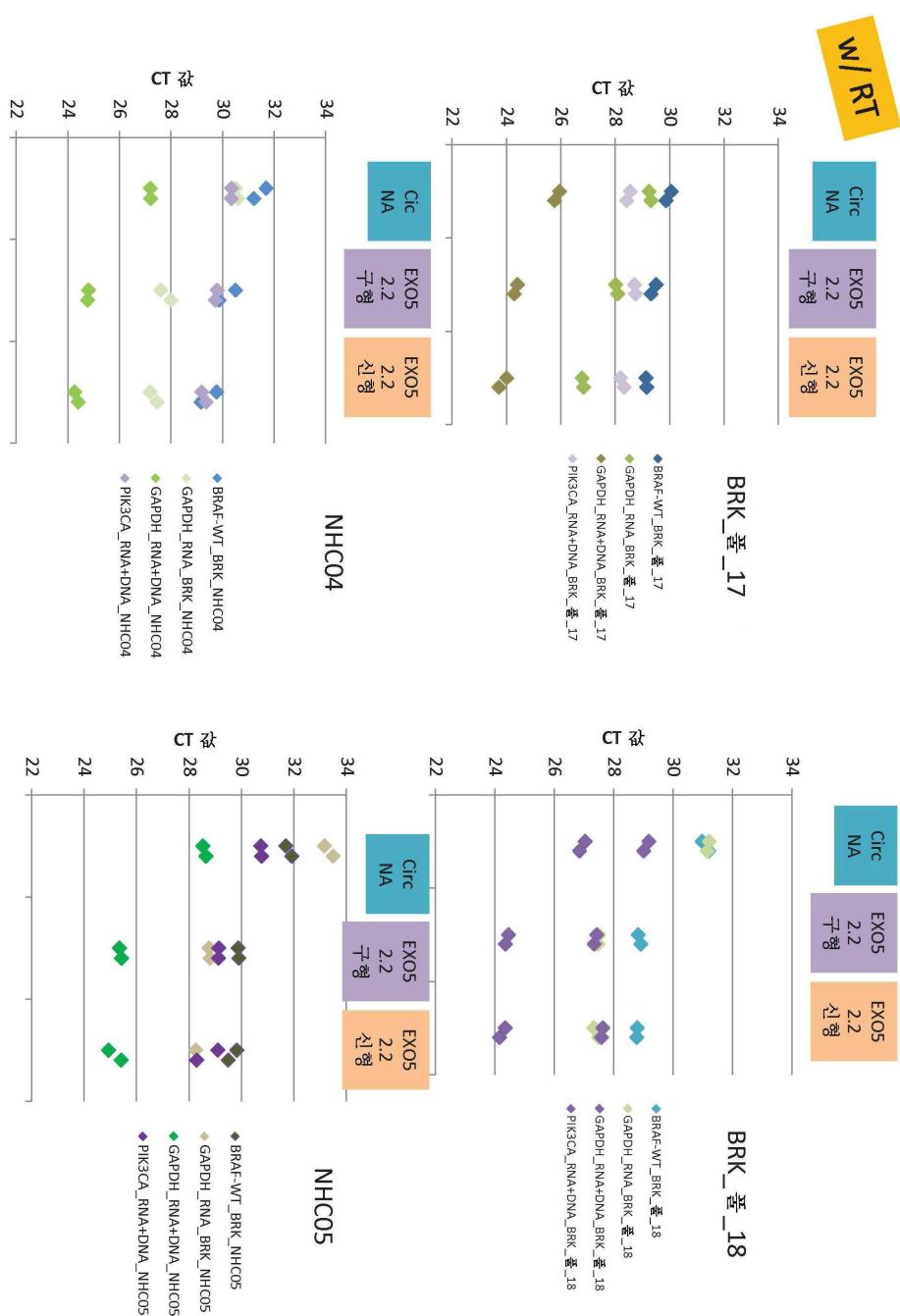
도면175

## 상업적으로 입수 가능한 카트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형



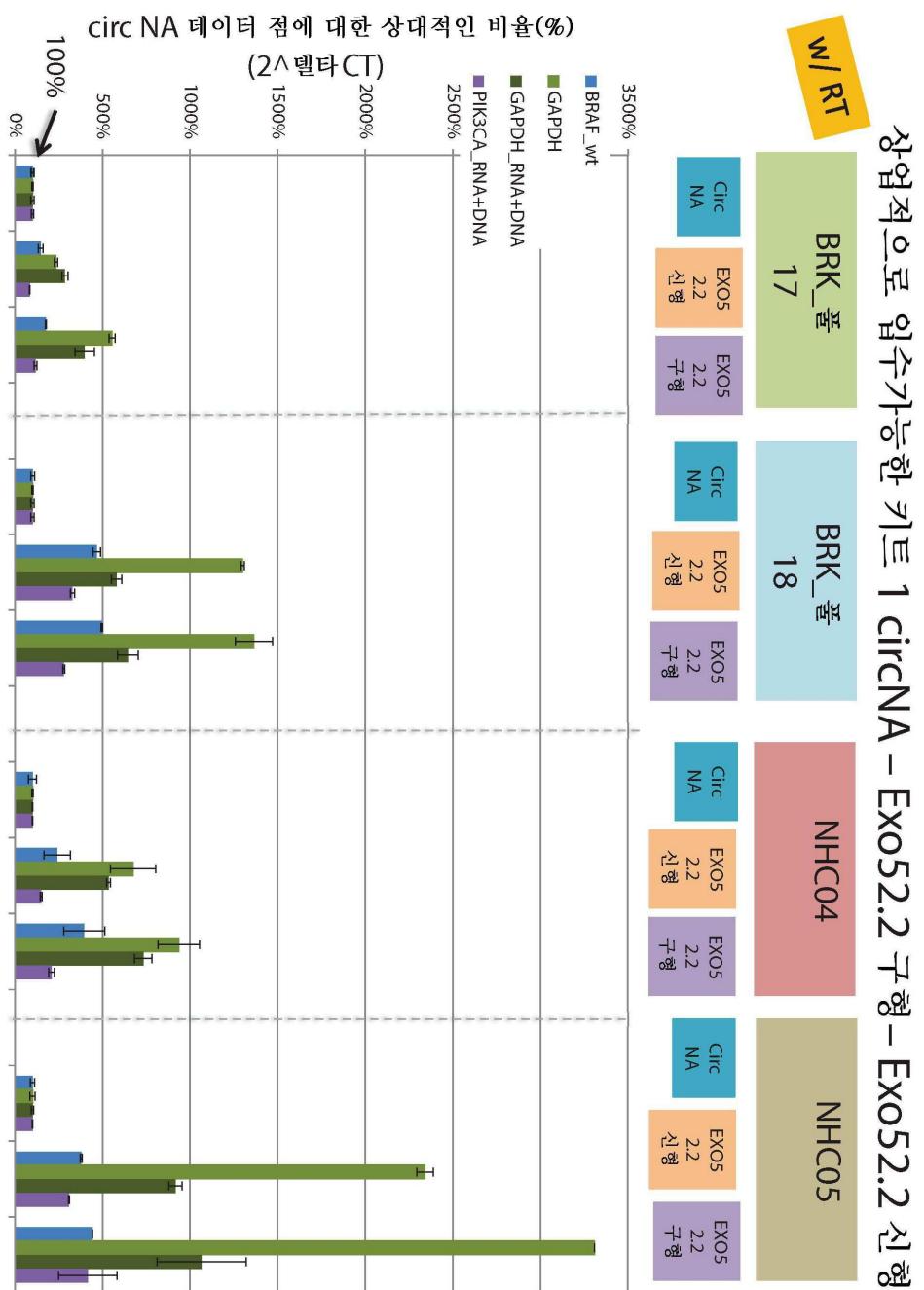
도면176

**상업적으로 입수 가능한 키트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형**



도면177

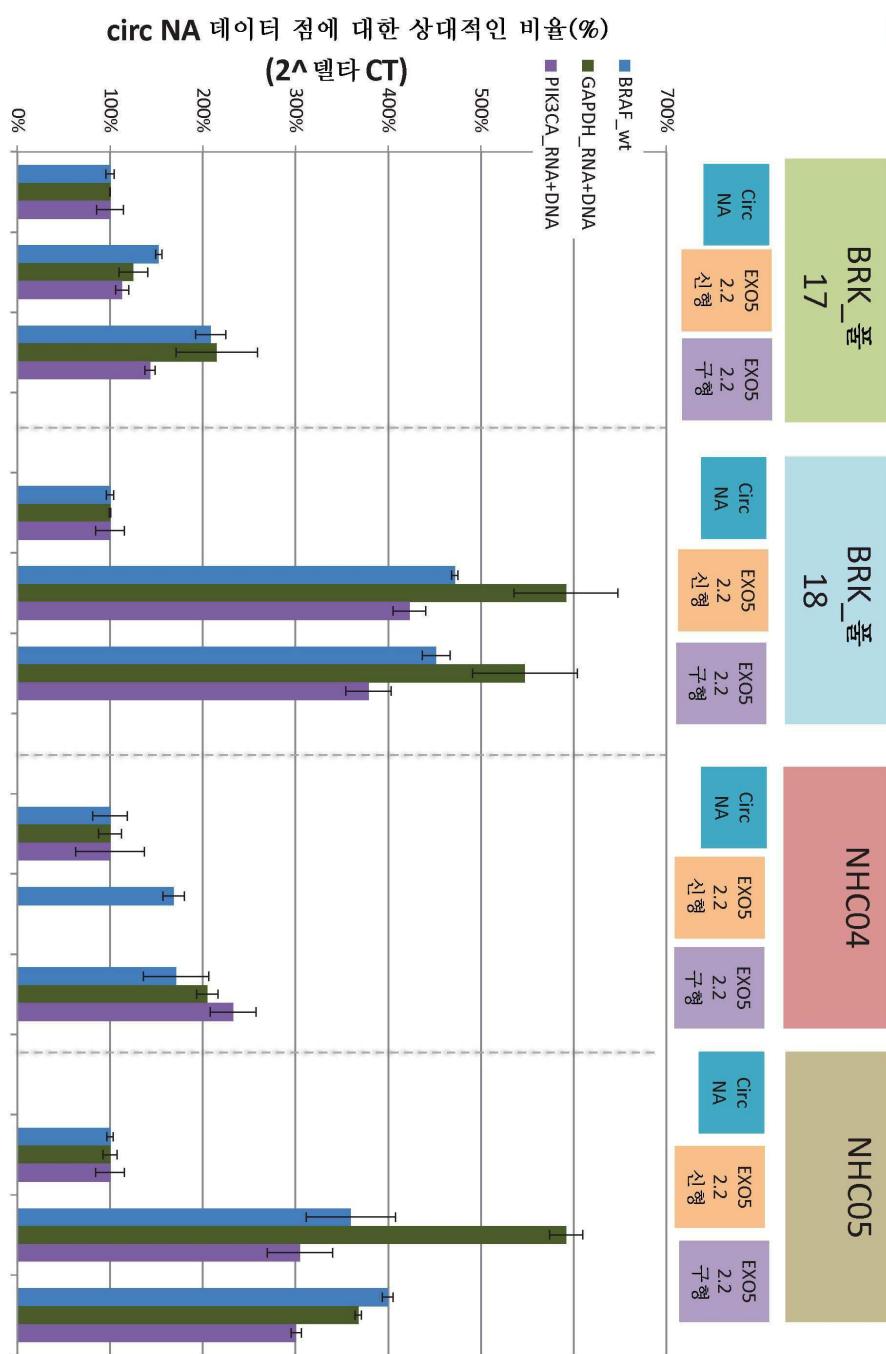
### 상업적으로 임수가능한 카트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형 상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위



도면178

w/o RT

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위  
상업적으로 입주가능한 키트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

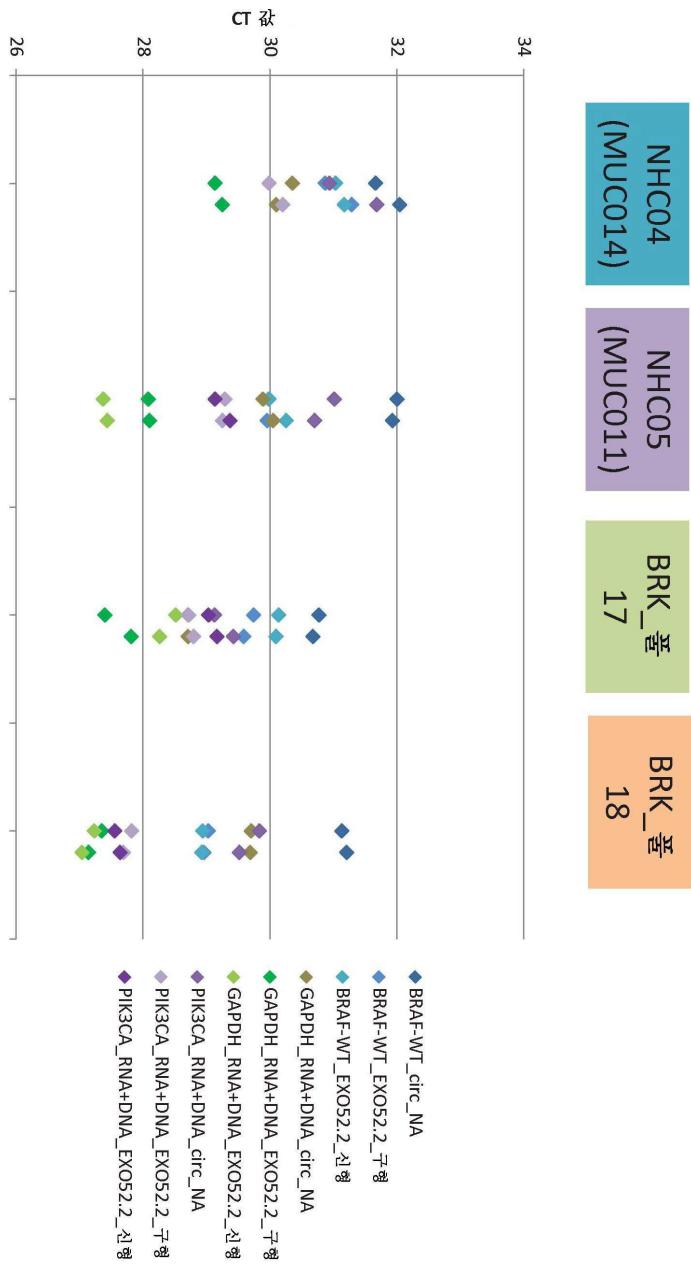


도면179

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

## 상업적으로 입수가능한 키트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

W/o RT

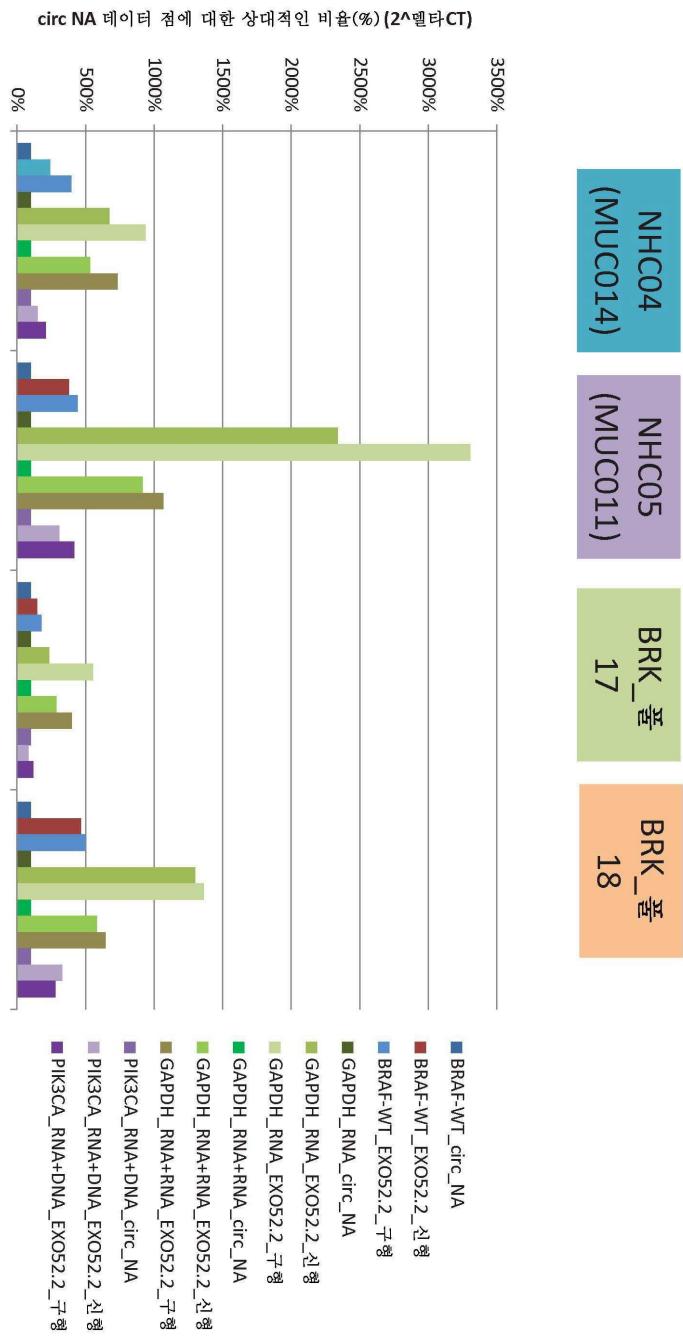


도면180

### 상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

작업적으로 업무가 편 키트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

w/o RT

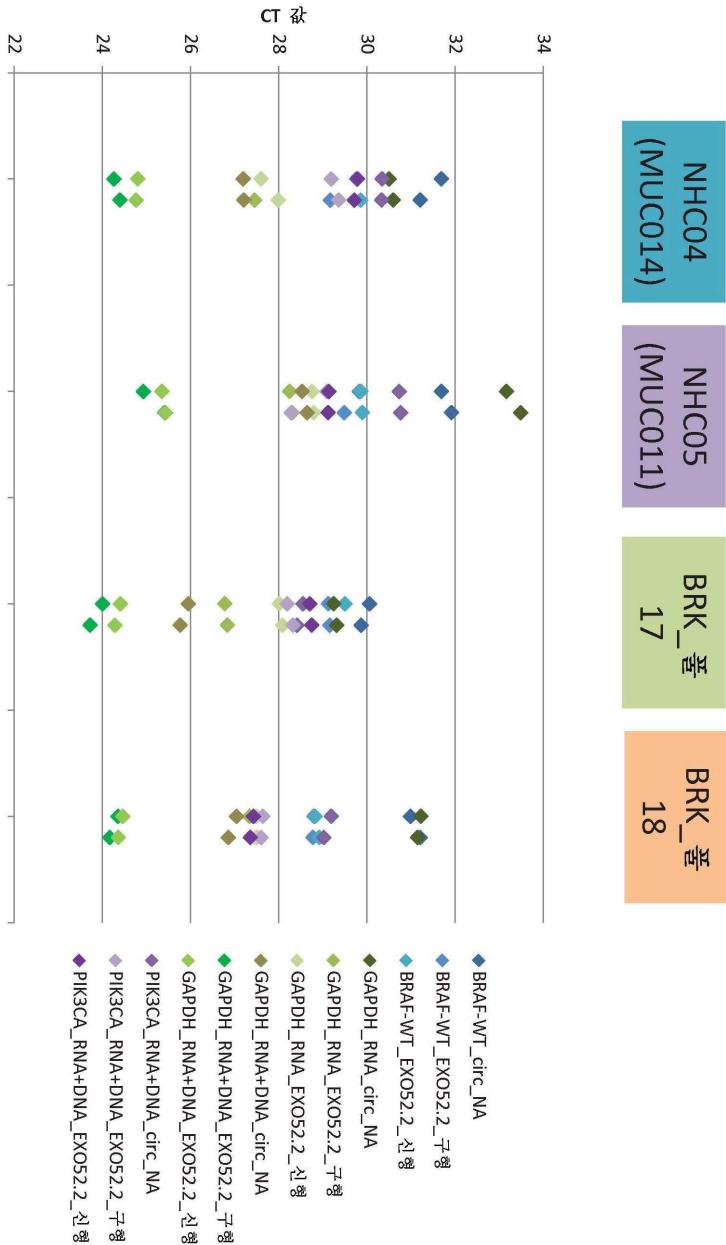


도면181

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

상역적으로 암수가능한 키트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

w/  
RT

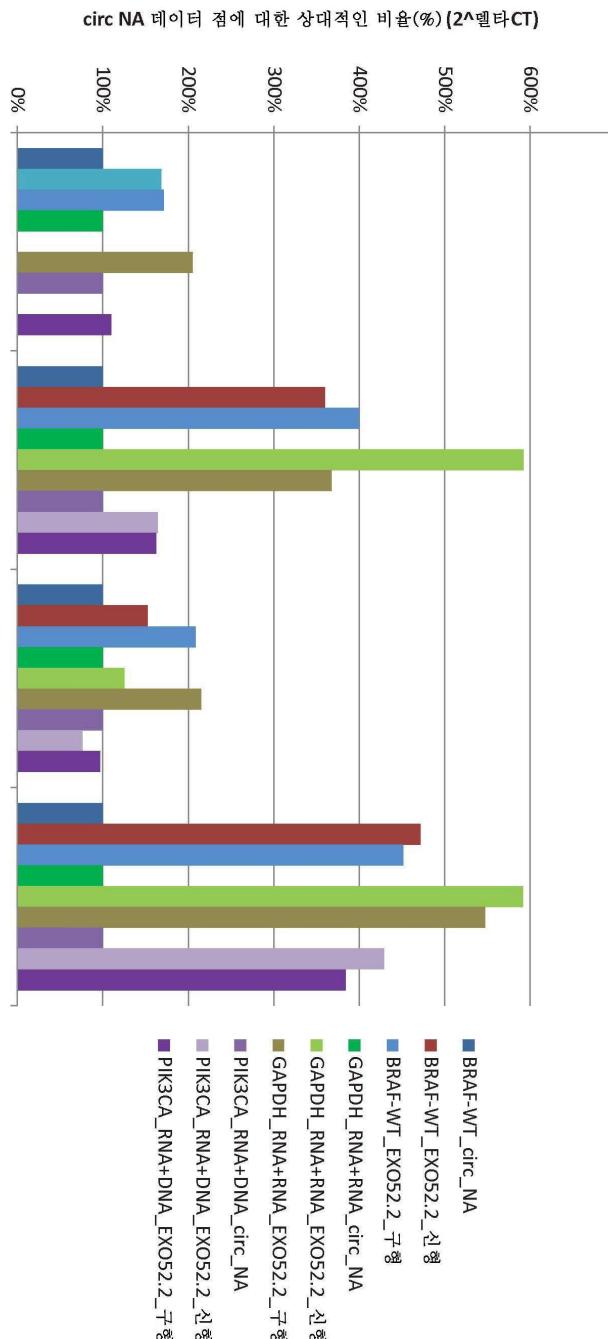


22

도면182

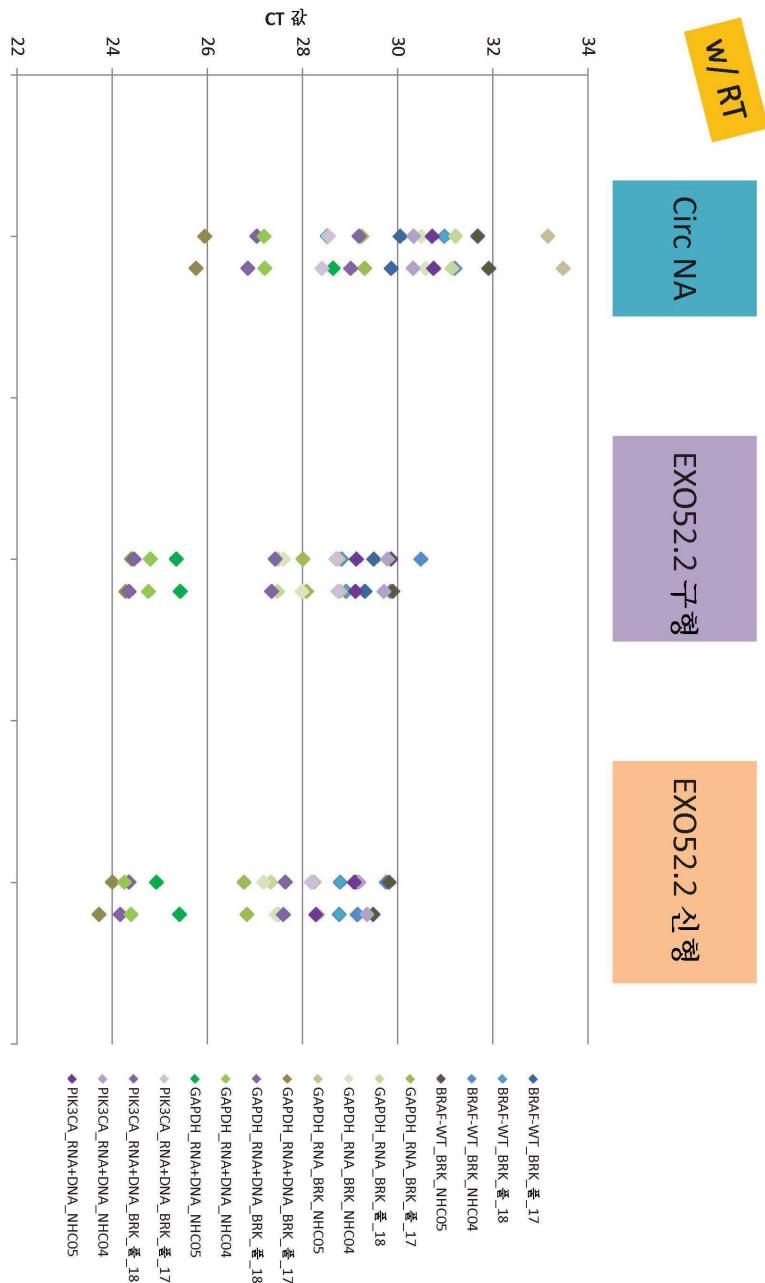
상업적으로 업수 가능한 키트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형  
W/ RT

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위



도면183

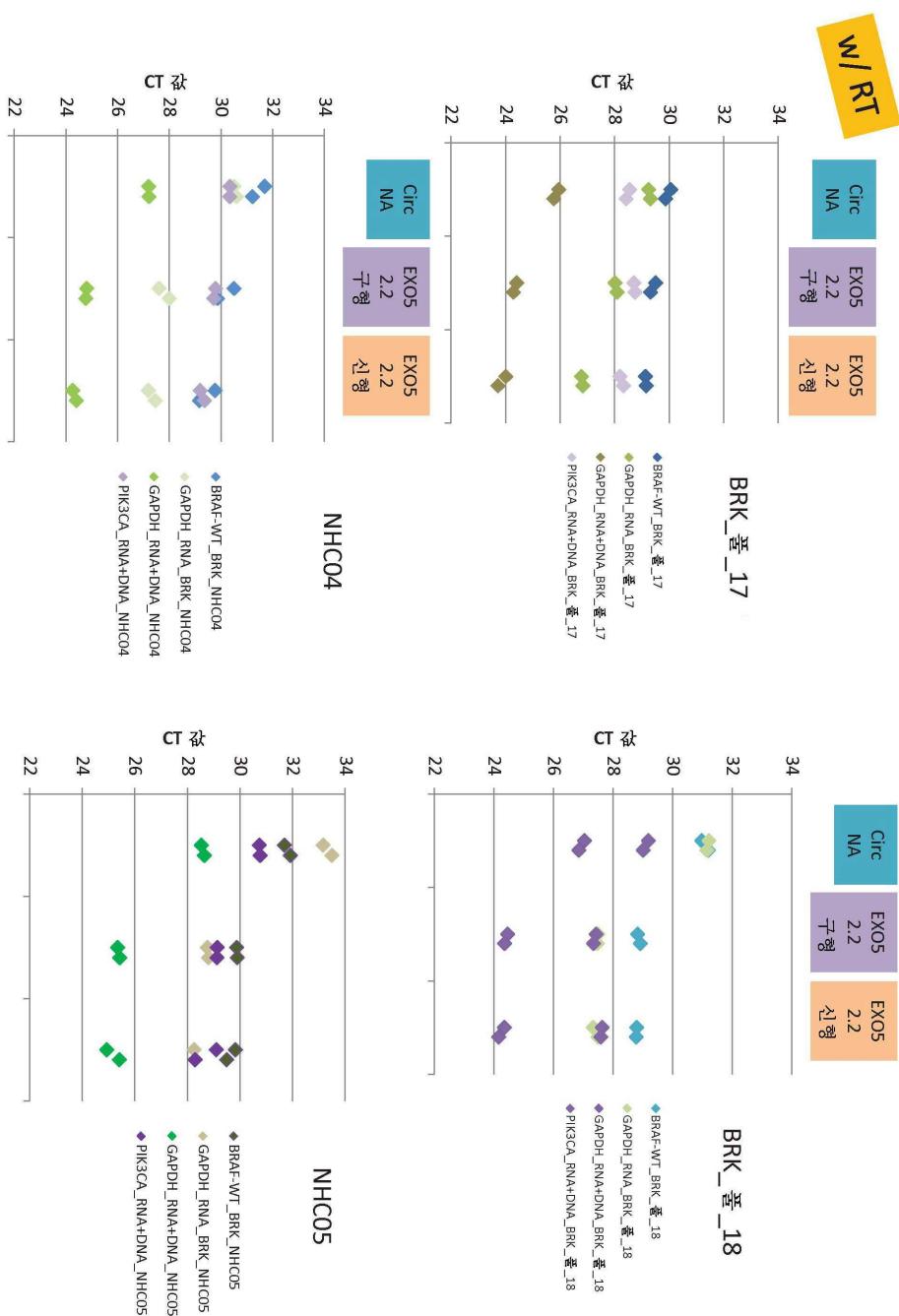
상업적으로 입증 가능한 키트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형



22

## 상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

### 상업적으로 업무가능한 키트 1 circRNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형

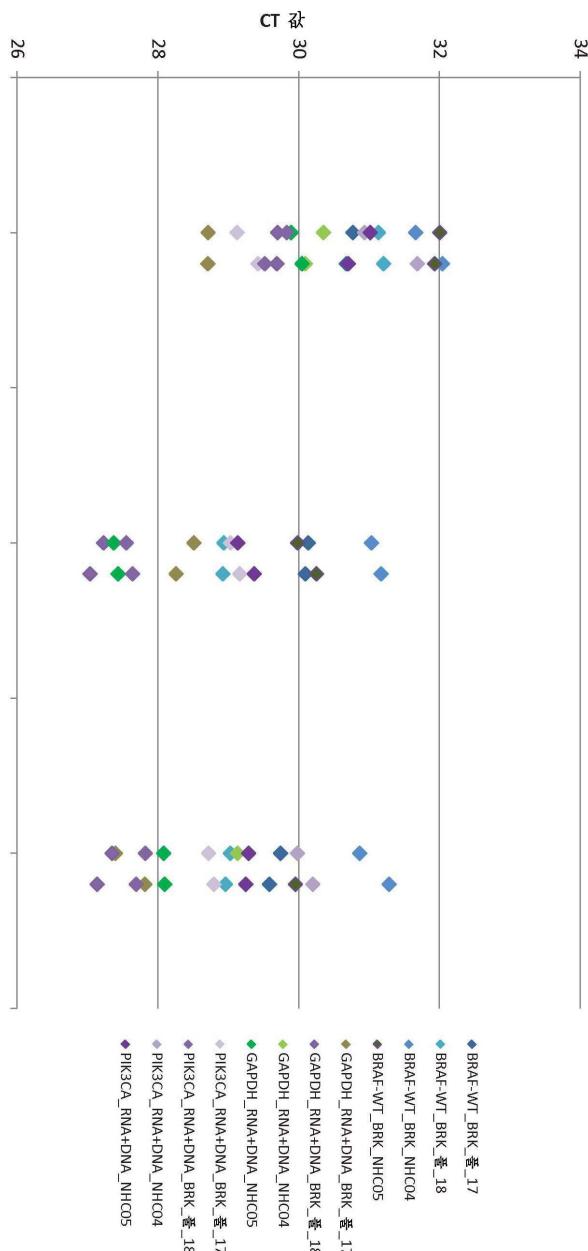


도면184

도면185

상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

### 상업적으로 입수 가능한 키트 1 circNA – Exo52.2 구형 – Exo52.2 신형



도면186

## 상이한 단위 기술을 이용한 cfDNA 단위

### 상업적으로 입수 가능한 카트 1 circRNA – EXO5 2.2 구형 – EXO5 2.2 신형

w/o RT



BRK\_17



32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

34

32

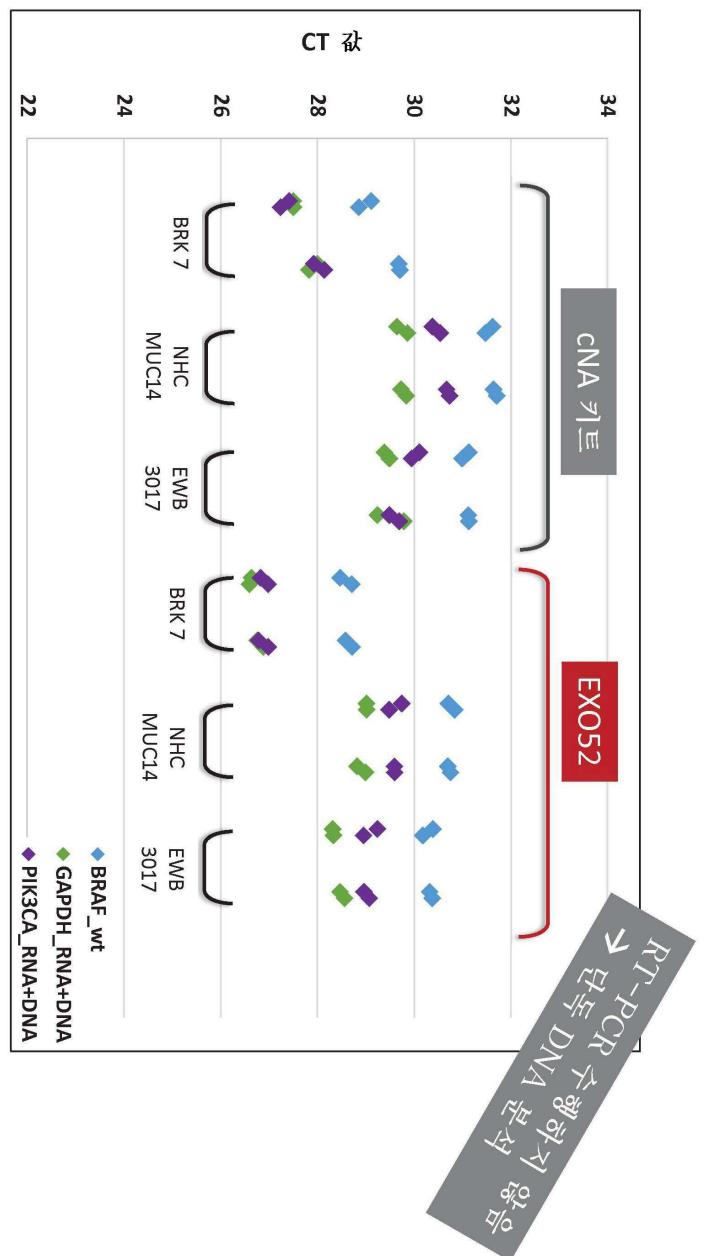
34

32

34

32

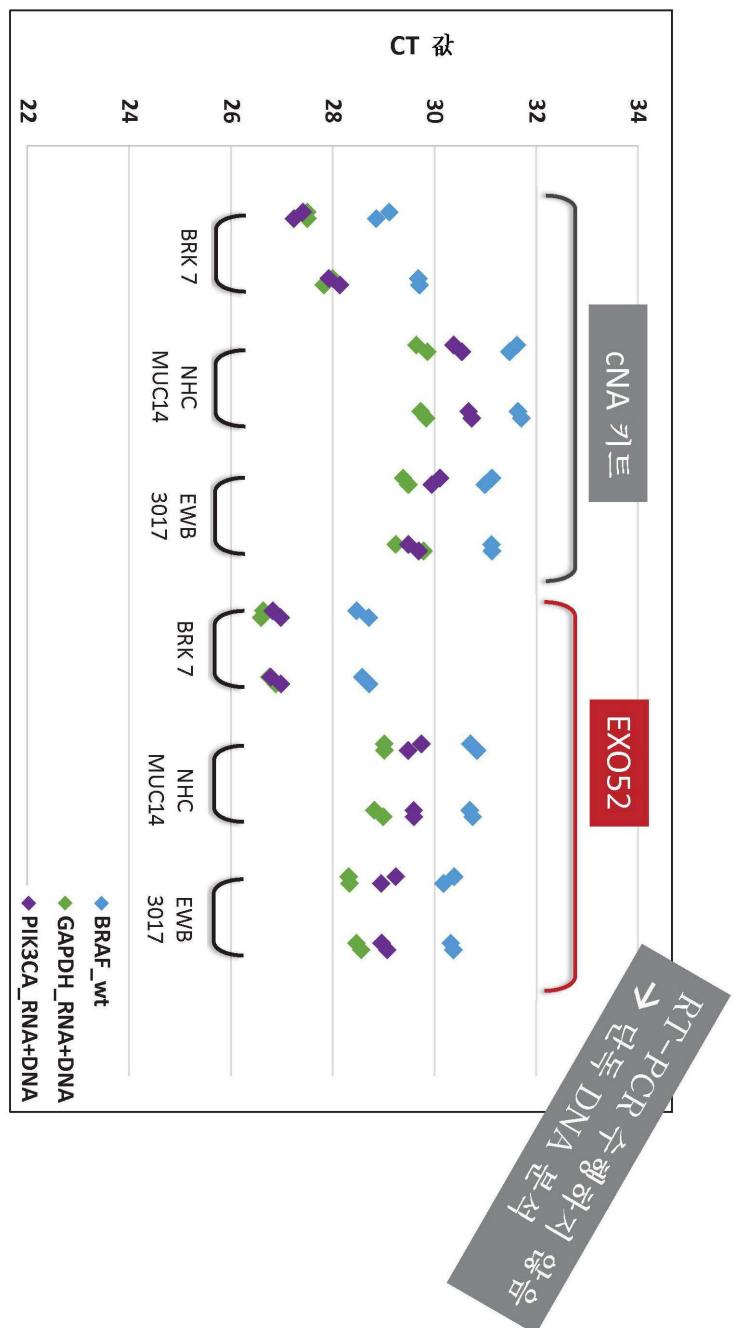
도면 187



### 3개의 혈장 풀에서의 EXO52/상업적으로 입주 가능한 카트 1 circRNA의 비교

도면188

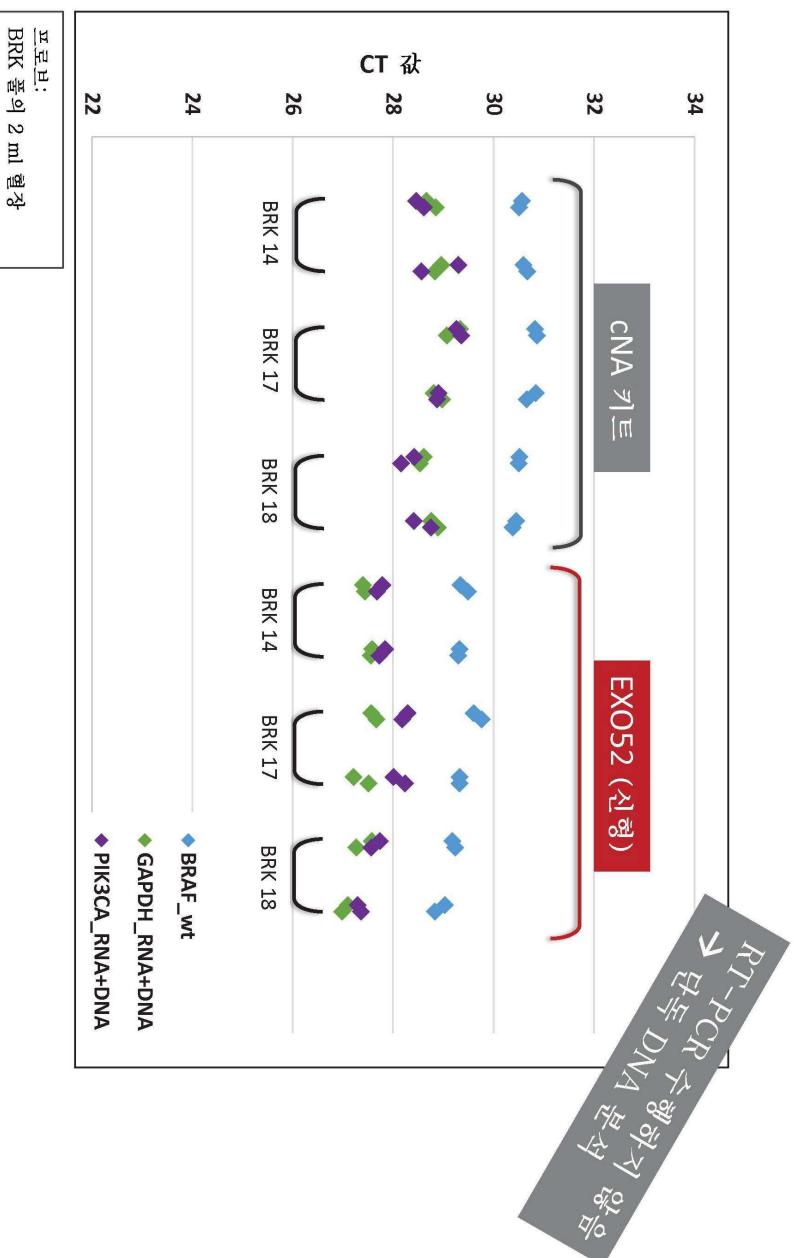
3개의 혈장 풀에서의 EX052/상업적으로  
입수 가능한 키트 1 circRNA의 비교



프로브:  
2ml 웰장

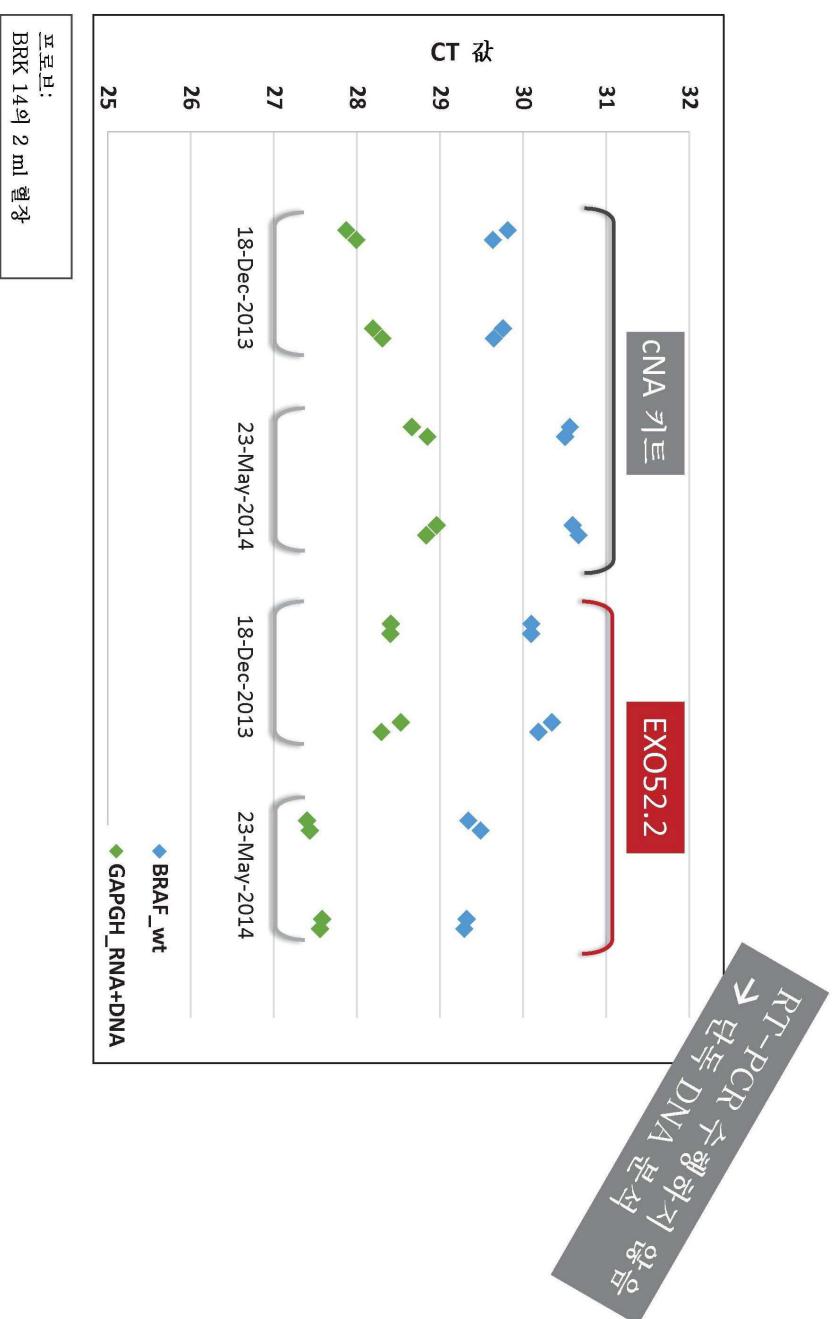
도면189

3개의 혈장 풀에서의 EXO52/상업적으로  
입수 가능한 키트 1 circRNA의 비교



도면190

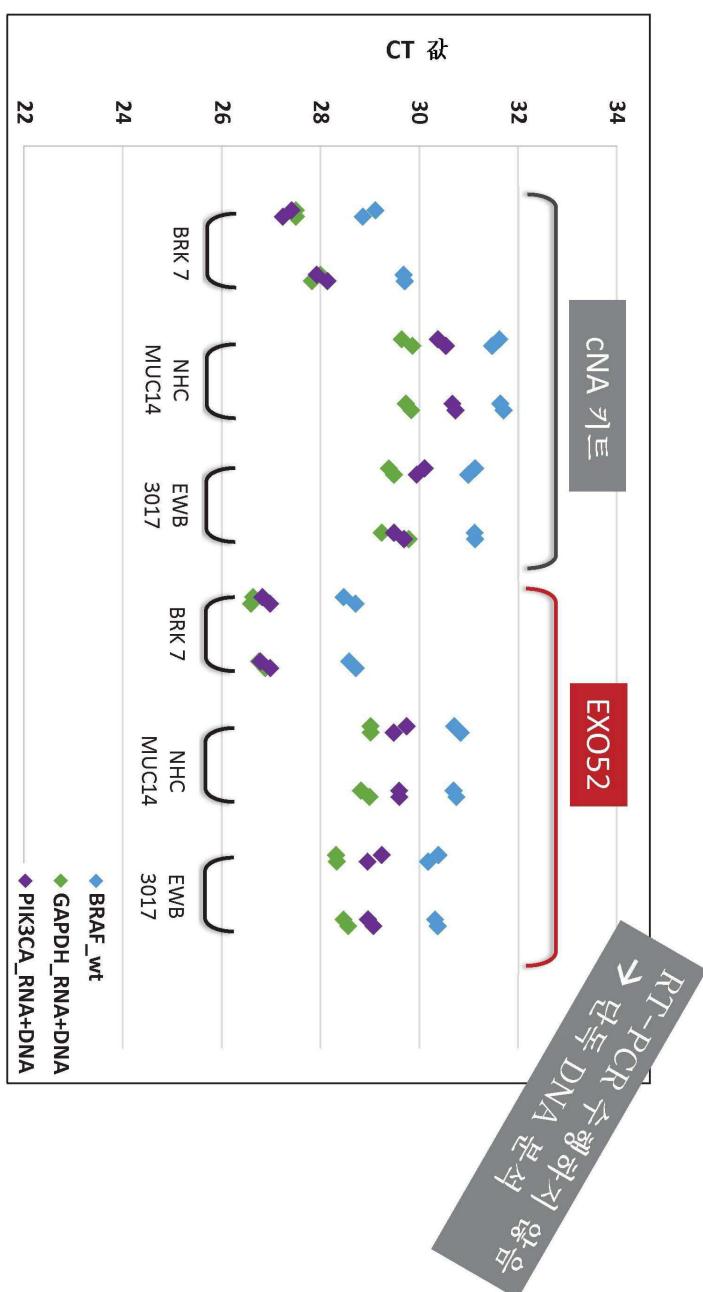
## EX052 및 상업적으로 입수 가능한 키트 1 circRNA 구형/신형 데이터 비교



도면191

프로브:  
2ml 혈장

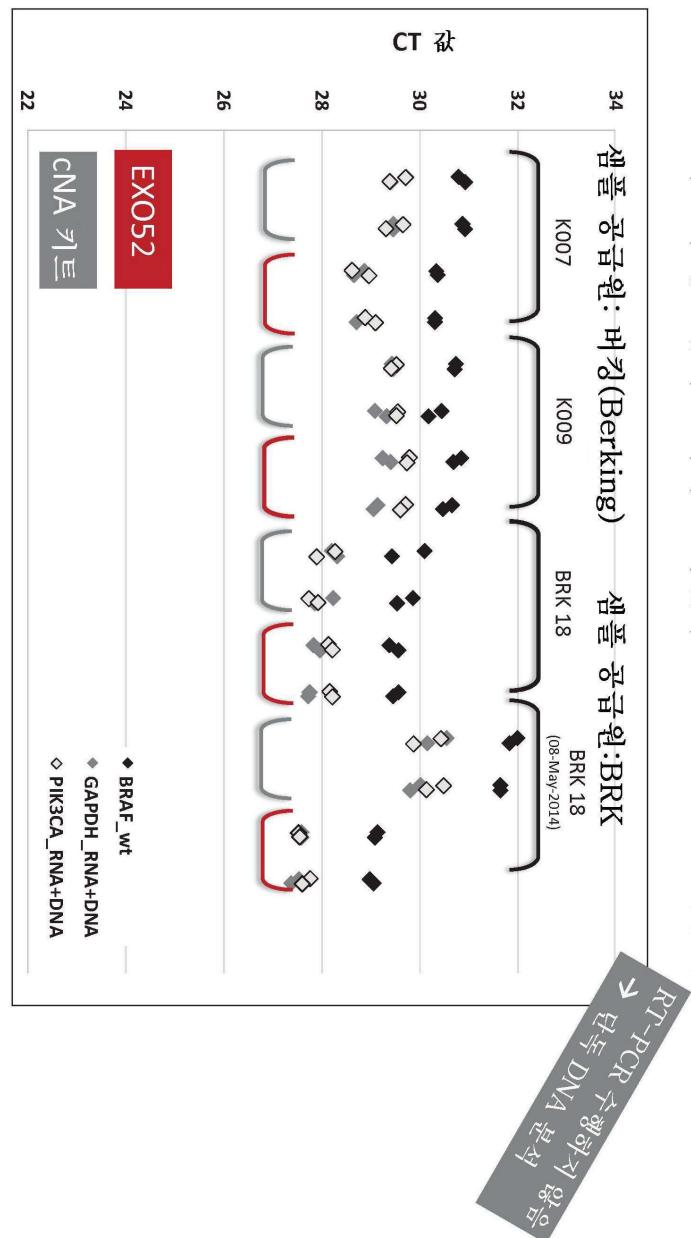
3개의 혈장 풀에서의 EXO52/상업적으로  
입수 가능한 카트 1 circRNA의 비교



도면192

EX052는 일관되게 CNA 카트와 동일하거나, 그보다 우수하다

... 그러나, 샘플 궁금증에 따라 편차가 있고, 단리 수혈일에 따라  
CNA 카트의 성능상의 편차가 존재한다!



샘플:  
2ml 혈장

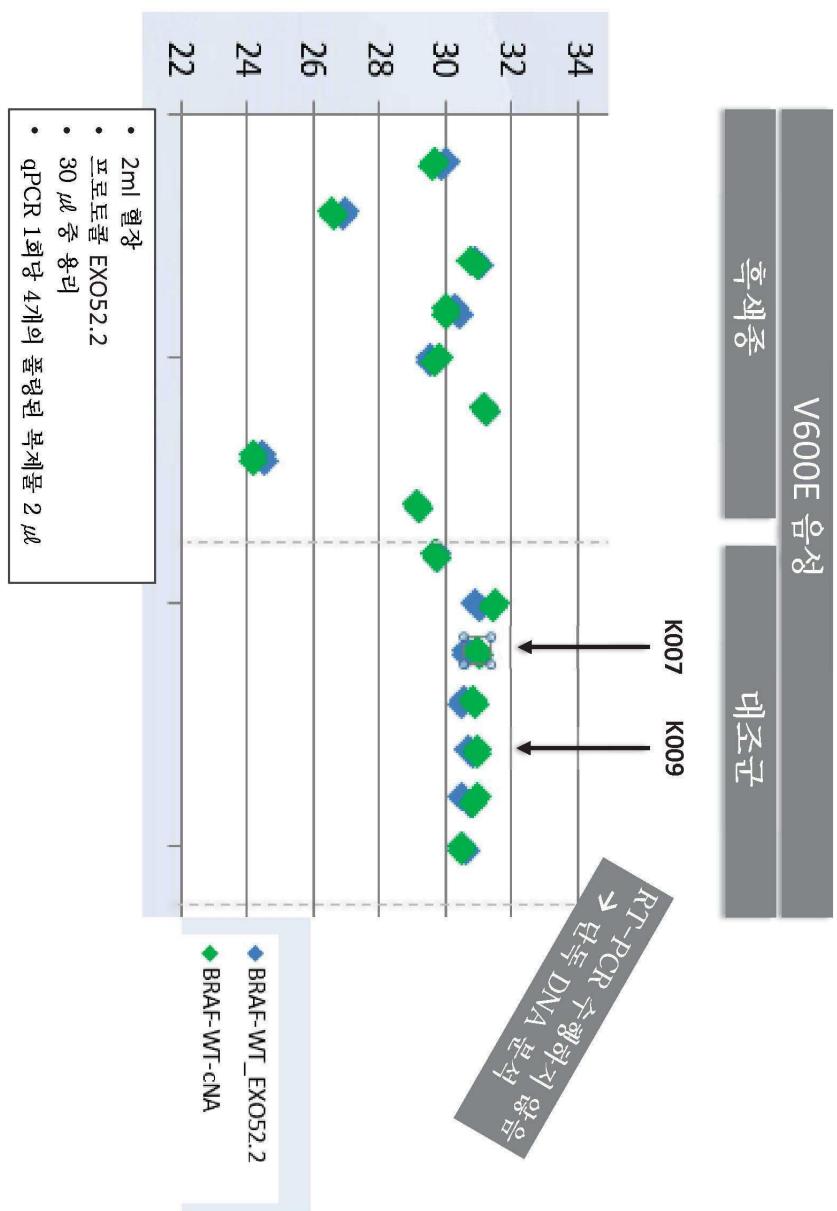
프로토콜:  
EX052.2 (EX050v6+350μl 클로로포름)

- 20 μl 층 용리
- qPCR 1회당 1 μl

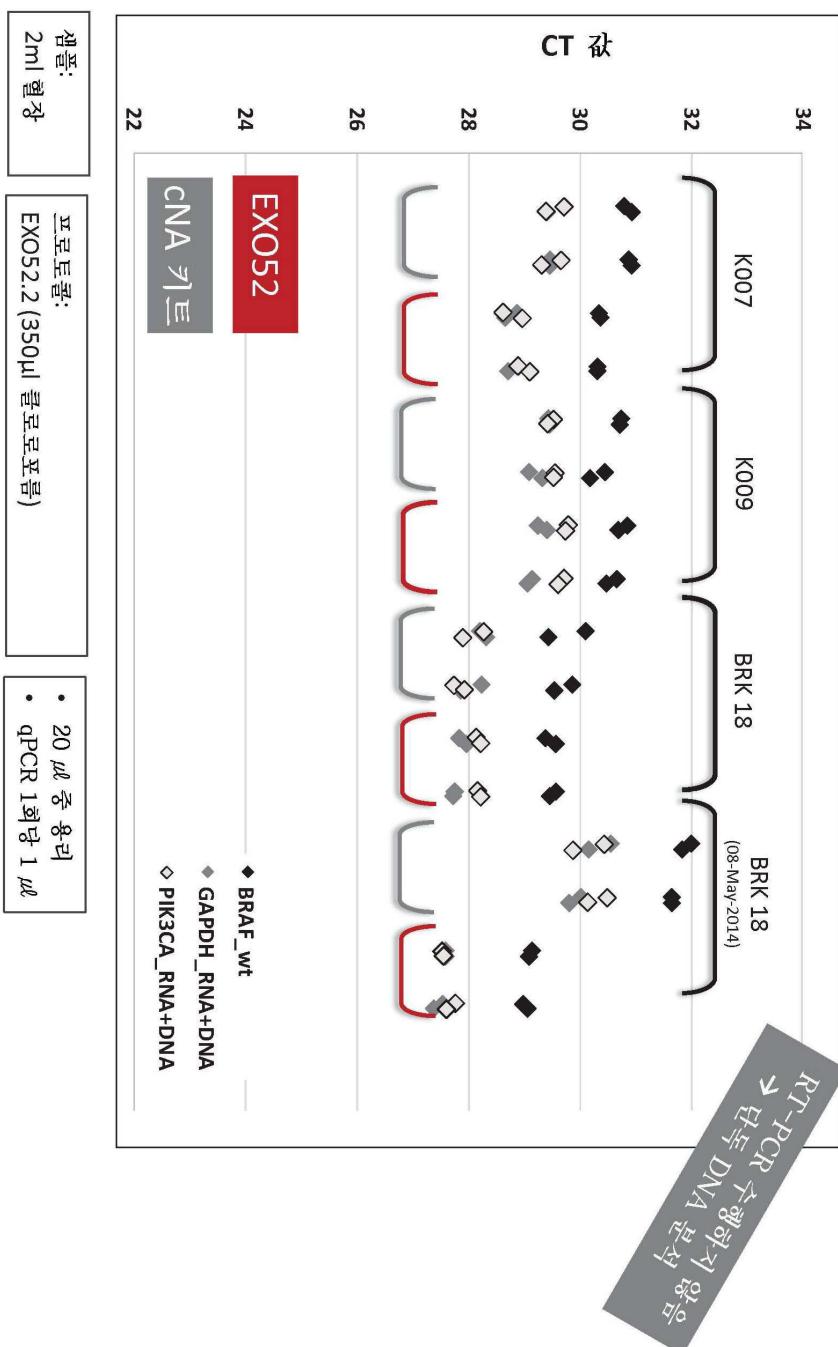
EX052  
cNA 카트  
22

도면193

### 코호트 샘플에 대한 원래의 BRAF-WT 검정

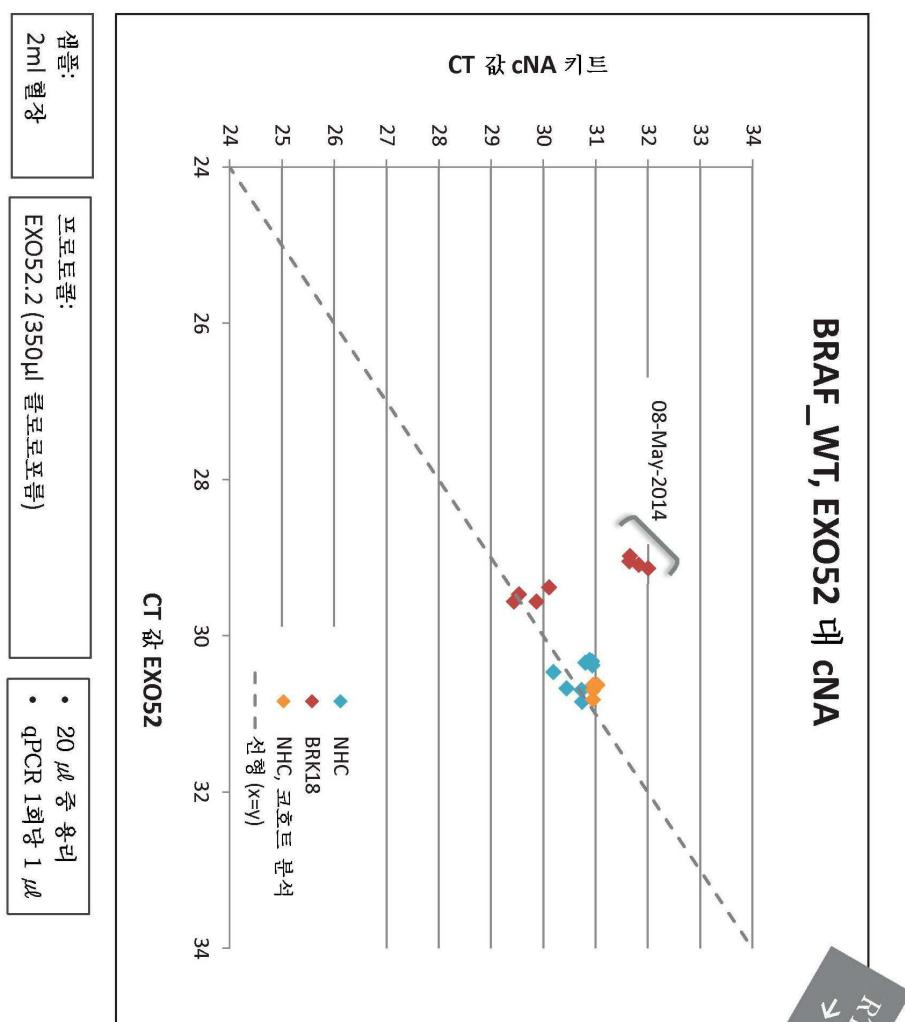


## 도면 194



도면 195

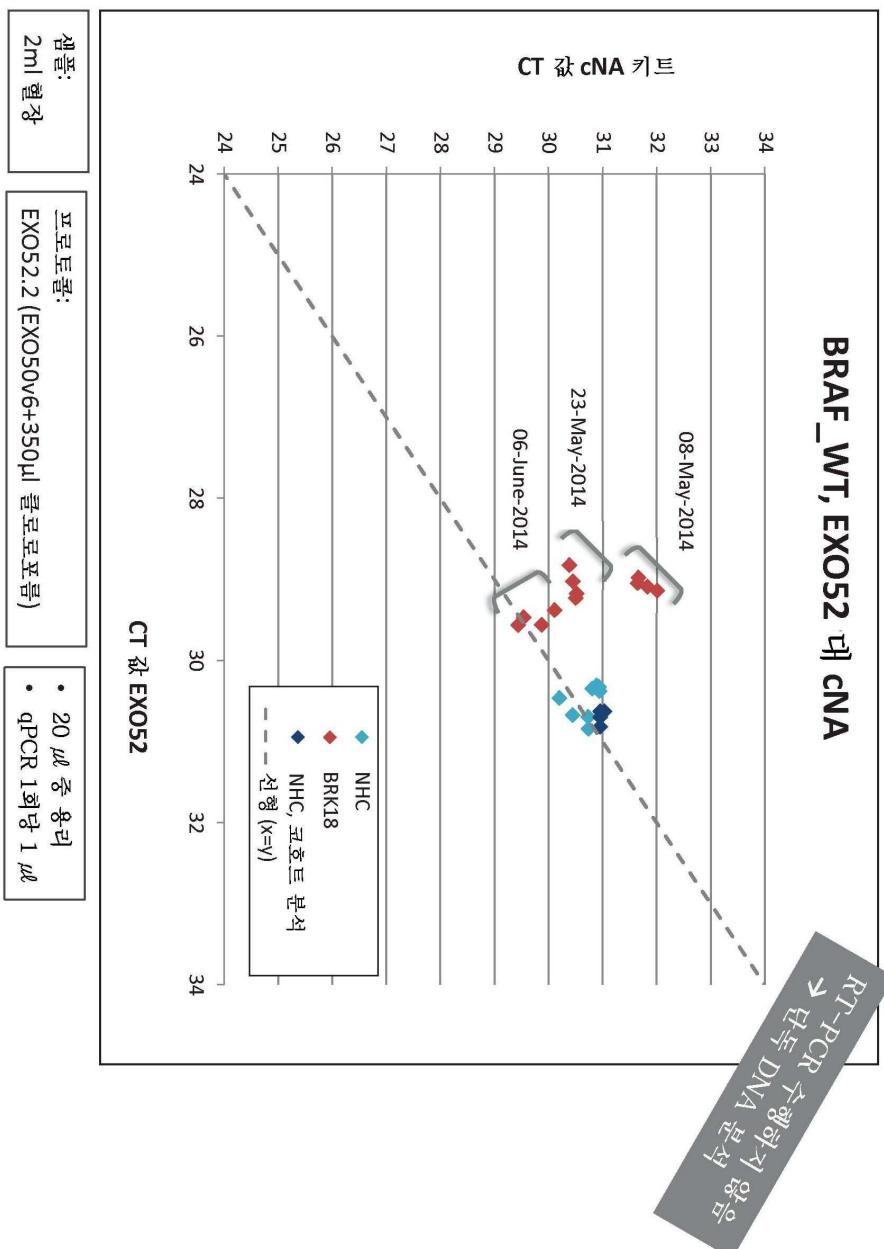
• 혈액 중 코호트 (정상적인 건강한 대조군)로부터 유래된 혈장에서의 EXO52  
/상업적으로 입수 가능한 카트 1 circRNA와 비교



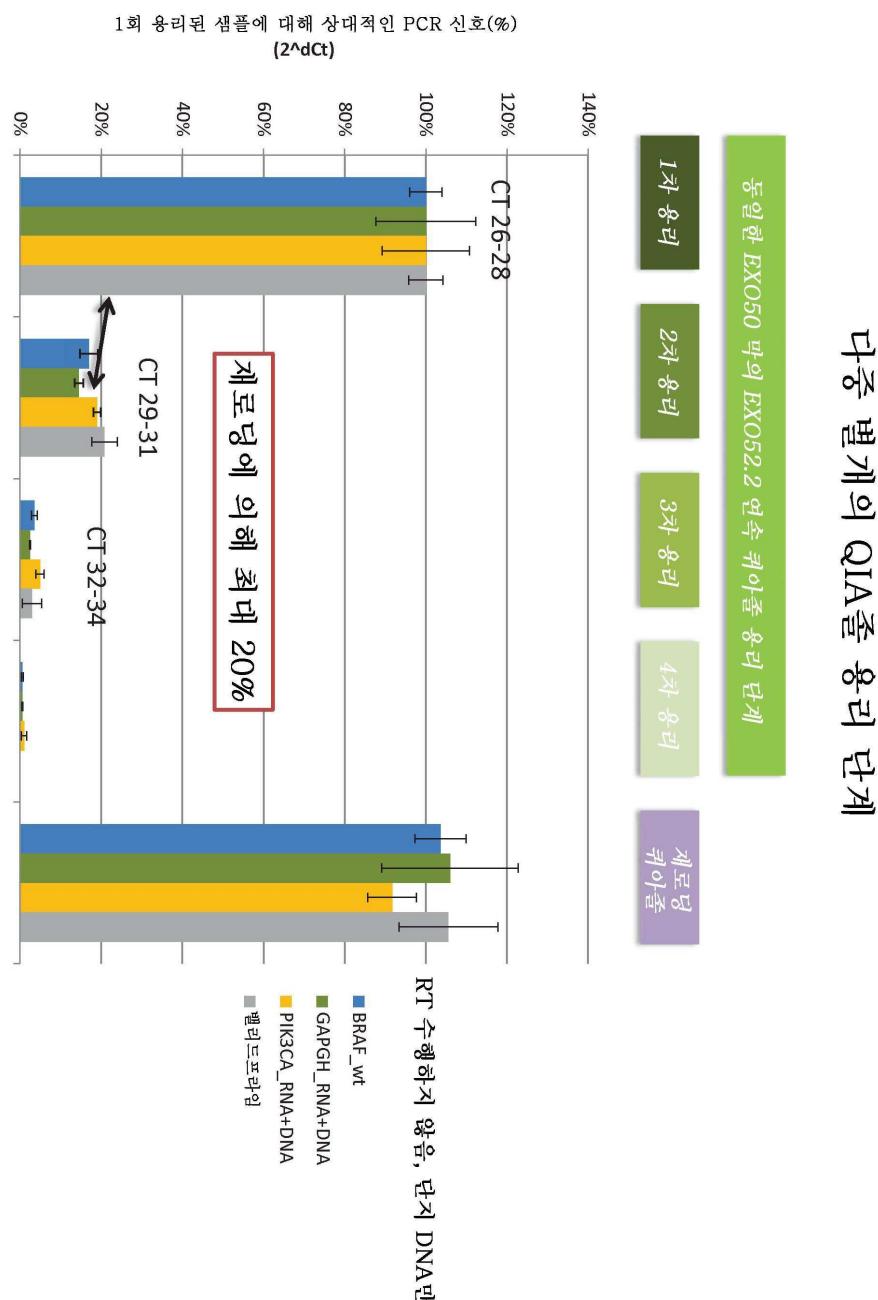
$R_{T-PCR}$  →  
단백질  
DNA 분석  
분석

흑색종 코호트 (정상적인 건강한 대조군)로부터 유래된 혈장에 서의 EXO52 /상업적으로 입수 가능한 카트 1 circRNA의 비교

도면196



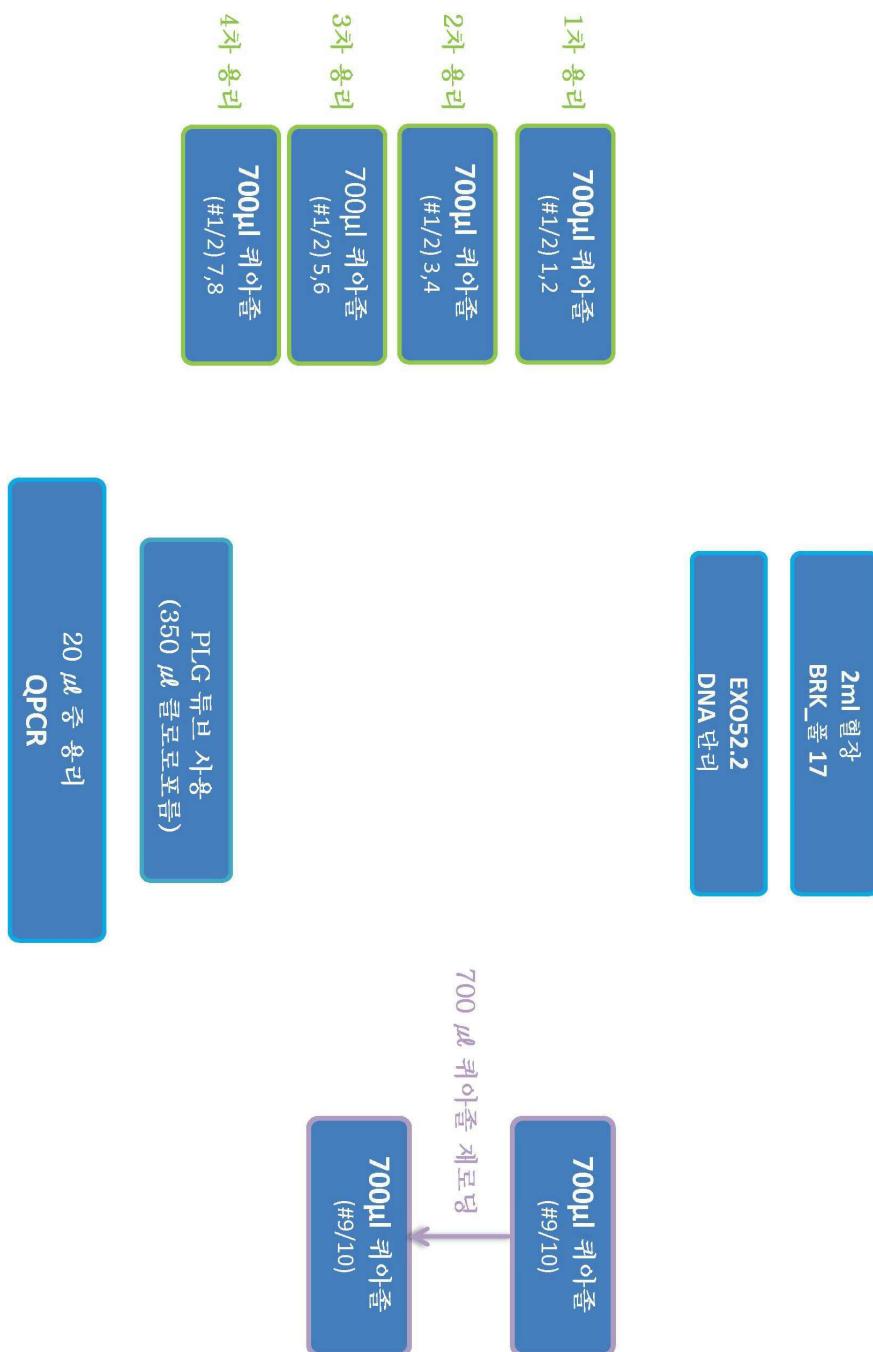
## 도면 197



## 다중 별개의 QIA줄 용리 단계

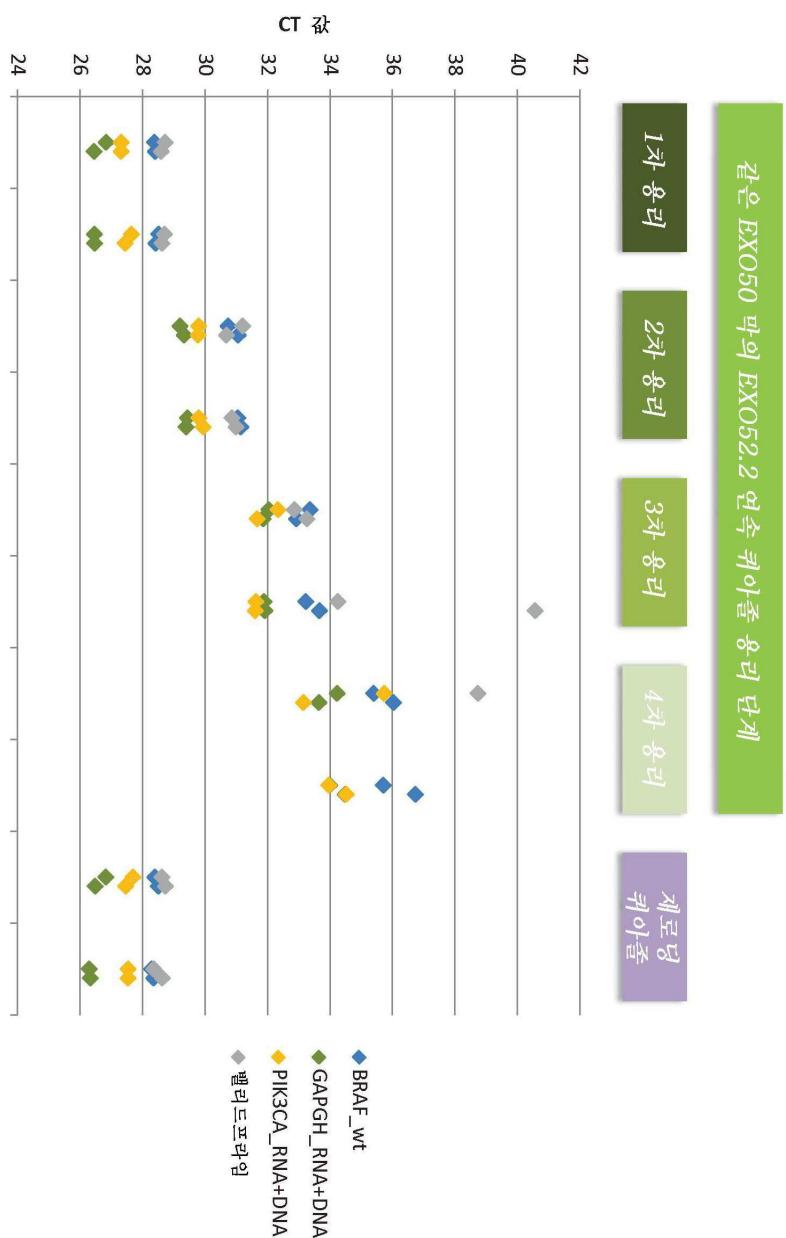
도면198

## EXO502.2 DNA-단리: 디중 케이줄 용리 단계



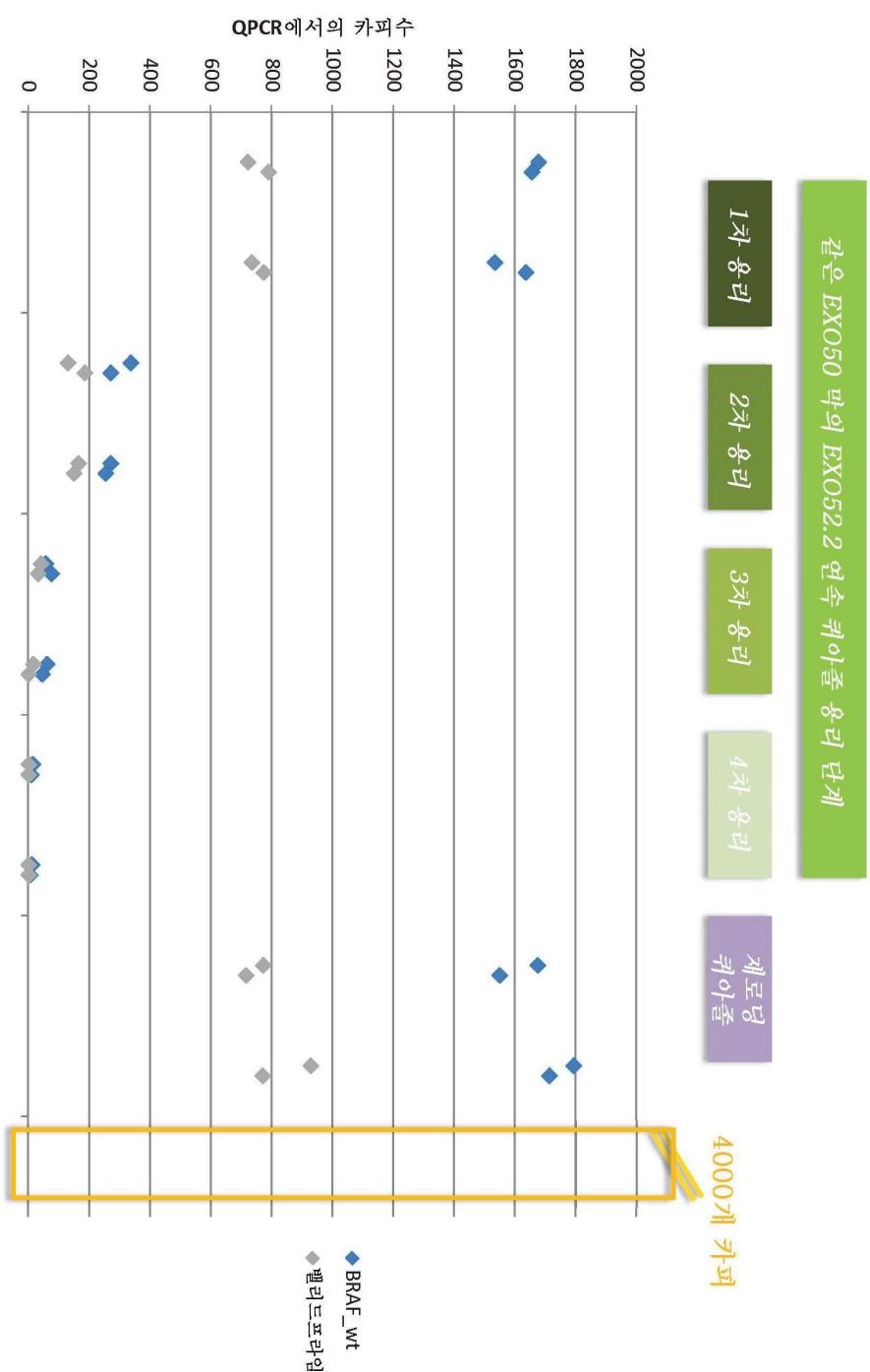
도면199

## EXO502.2 DNA-단위: 다중 퀴아졸 용리 단계



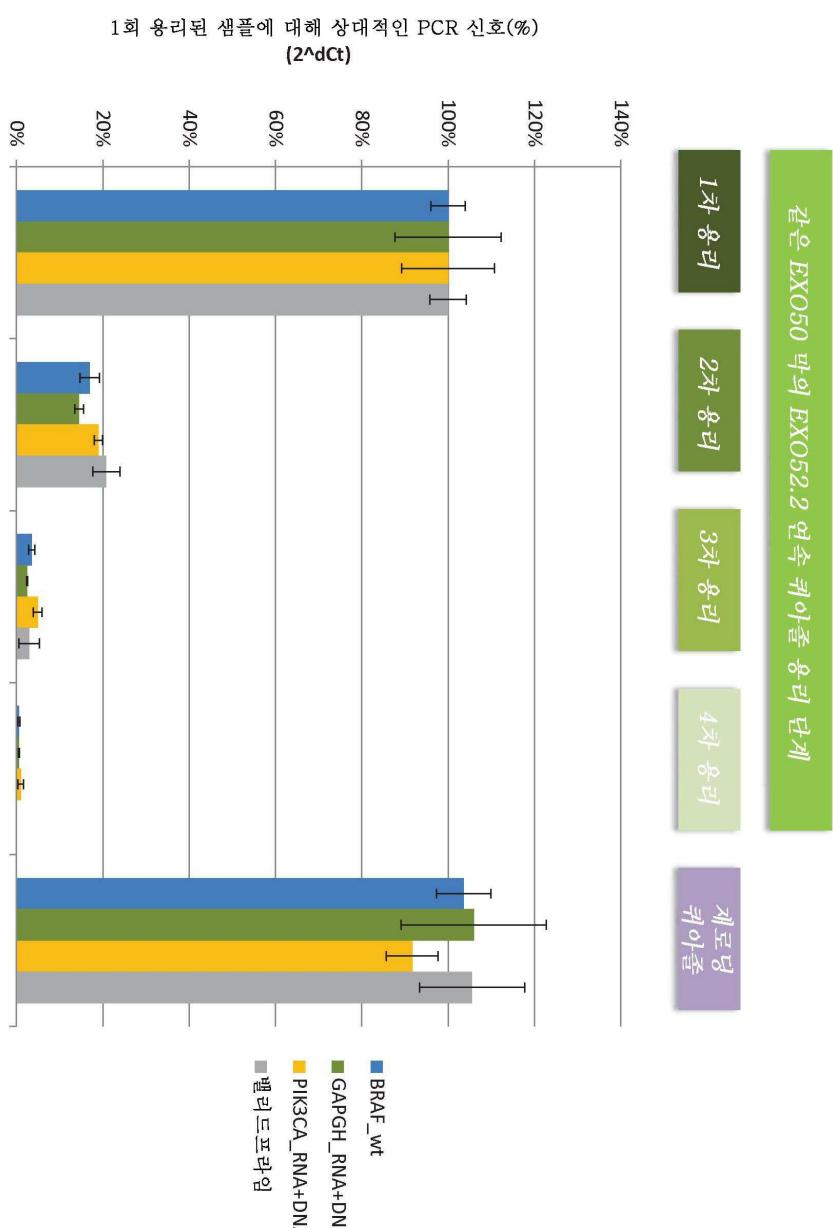
도면200

## EXO502.2 DNA-단위: 다중 케이줄 용리 단계



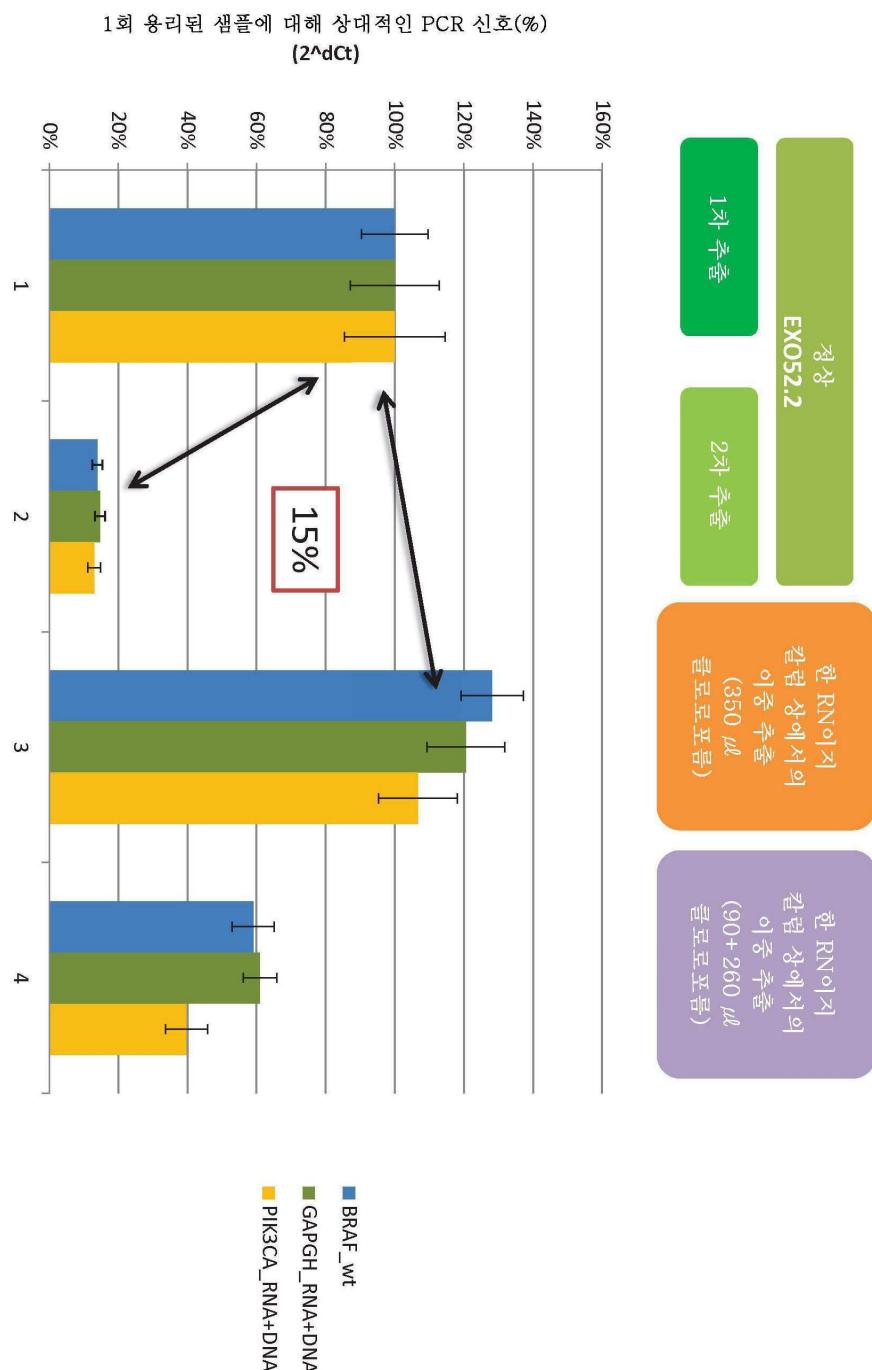
도면201

## EX0502.2 DNA-단리: 다중 케이즐 용리 단계



2개의 단리 복제물 모두의 평균 사용 및 표준 편차와 함께 오차 막대 사용

## 도면202



## EX0502.2 DNA-단위: 다중 쿼아졸 추출 단계

도면203

## EXO502.2 DNA-단위: 다중 퀴아졸 추출 단계



정상 단위 EXO52.2  
DNA 추출

2차 DNA 추출 단계를 위해 같은 퀴아졸 투브 사용

450  $\mu$ l EB 완충제 첨가 및 다시 상 분리를 수행

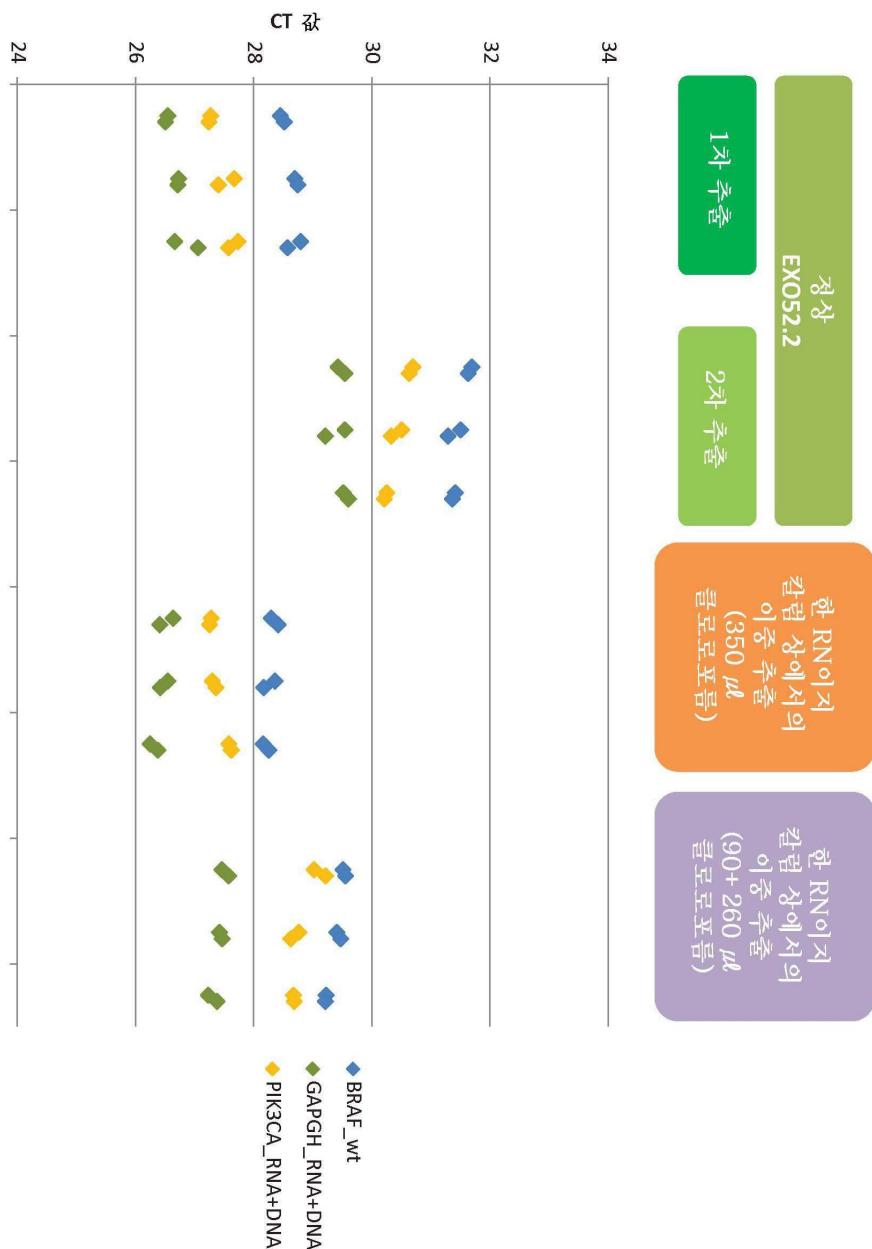
새 칼럼 상에 수성 상로딩  
#4-6



주식: 350  $\mu$ l 클로로포름/2.0x EtOH

도면204

## EX0502.2 DNA-단리: 다중 쿼아졸 추출 단계

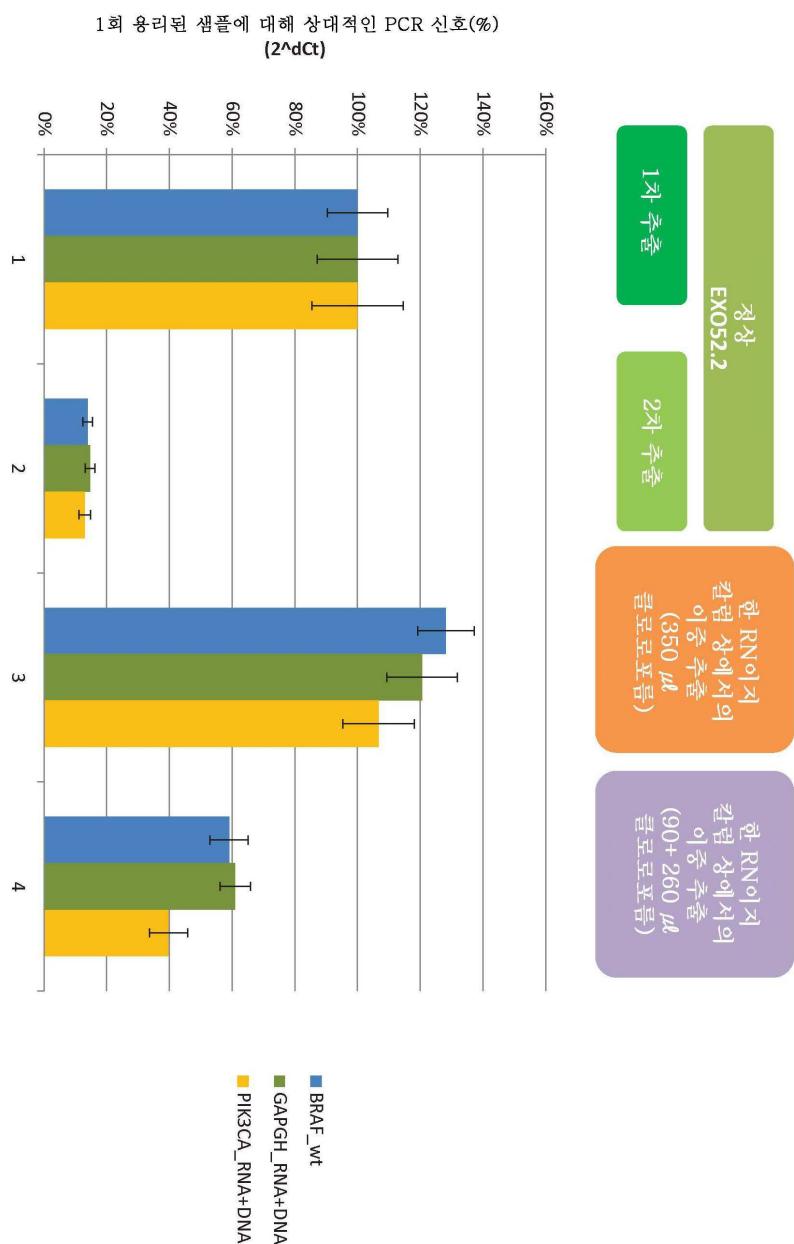


도면205

## EX0502.2 DNA-단위: 다중 퀴아졸 추출 단계



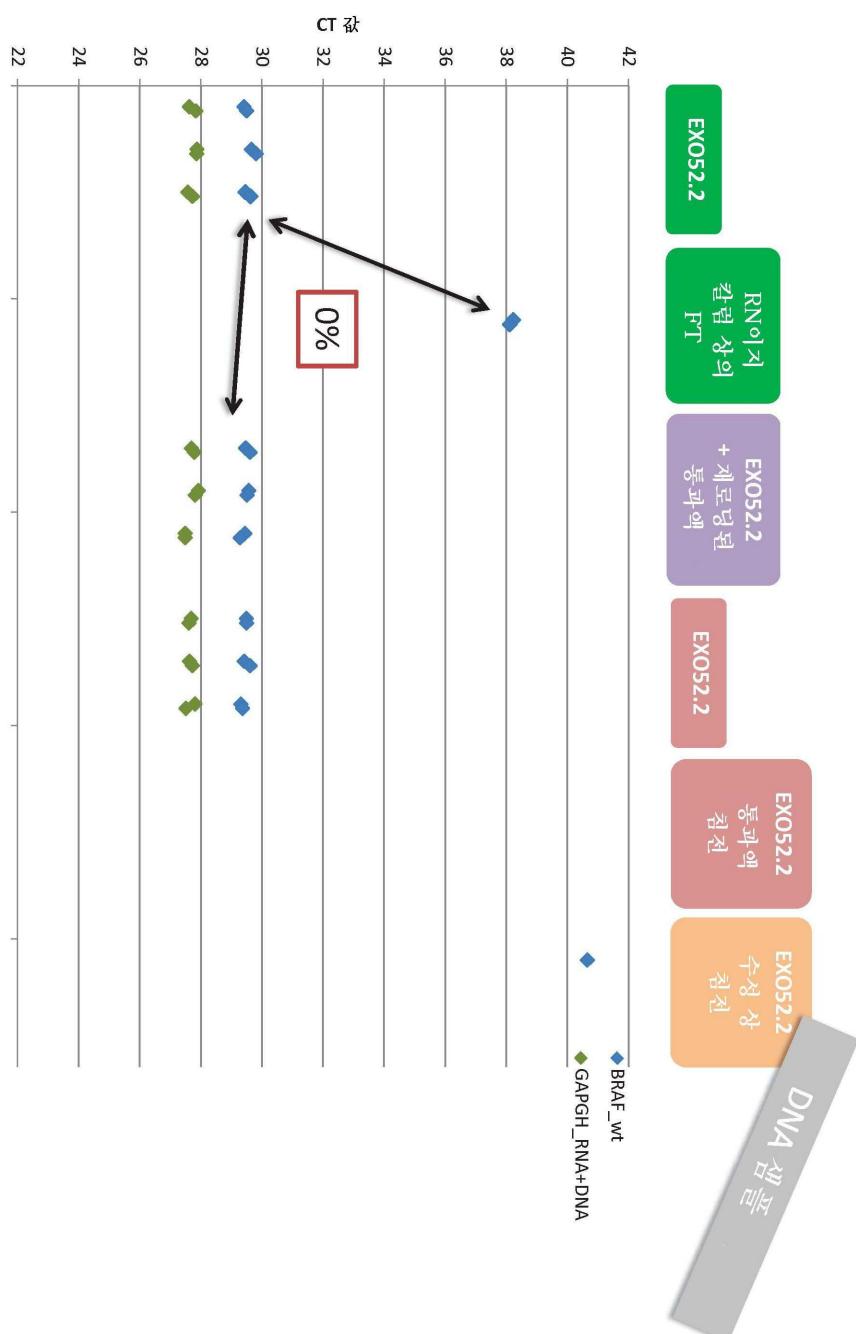
## 도면206



## EX0502.2 DNA-단위: 다중 쿼아졸 추출 단계

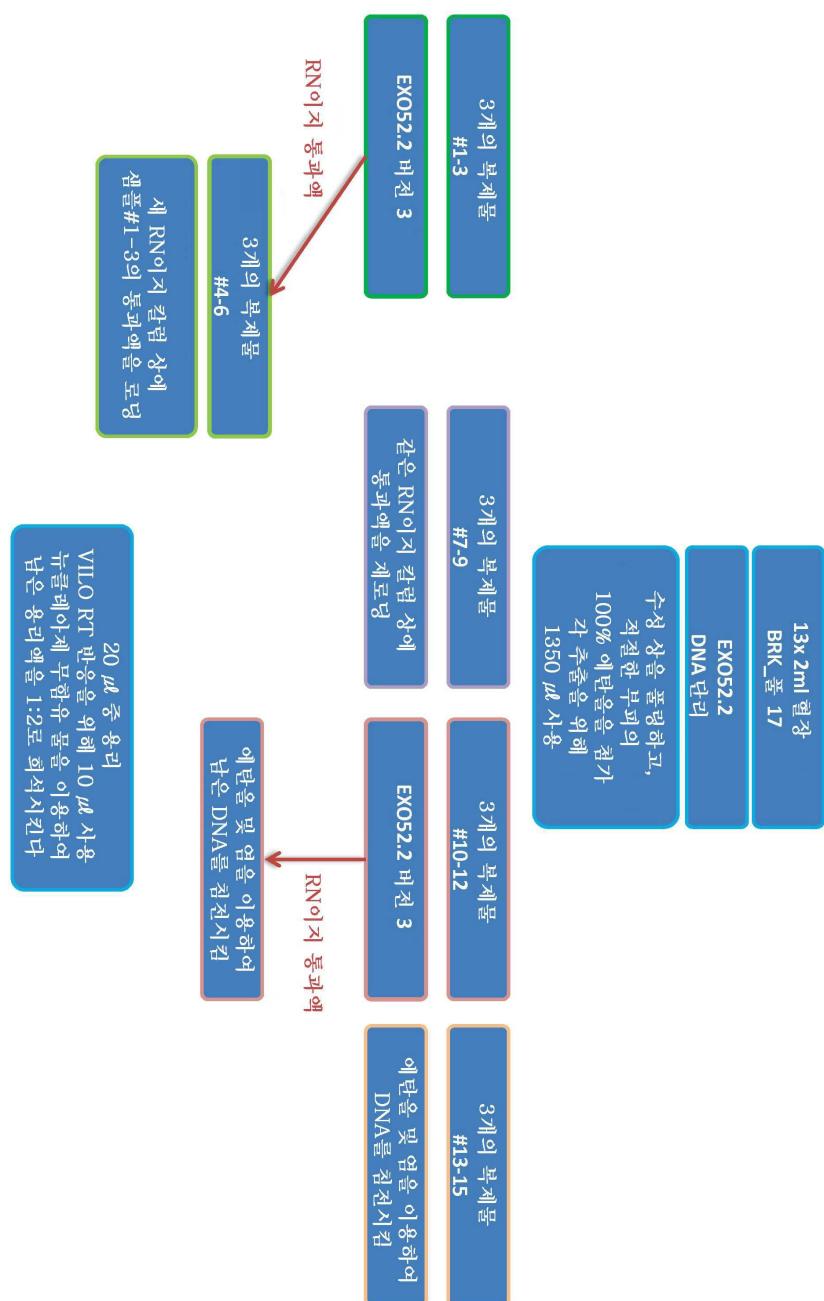
도면207

## EX052.2 DNA-단위: 이중 RN이지로딩 단계 - 예탄을 침전



도면208

## EX052.2 DNA-단리: 이중 RN이지 로딩 단계 - 에탄올 침전



주석: 350 μl 클로로포름/2.0x EtOH

도면209

## 프로토콜 예탄을 침전

**수성 상으로부터의 해산 예탄을 침전(EX052.2 방법):**

**시약:**

- **3M 소듐 아세테이트 pH 5.5**
- **100% 에탄올**
- **20 $\mu$ g/ $\mu$ l 글리코겐**

**프로토콜:**

1. 상부의 수성 상을 세 수집관으로 옮겨 놓는다. 임의의 성간 물질의 이동을 막는다. 2 부피의 100% 에탄올을 첨가하고, 수회에 걸쳐 위아래로 피펫팅함으로써 완전하게 혼합한다. 원심분리하지 않는다.
2. (RNA 및 DNA를 함유하는) 수성 상의 부피를 측정하고, 예탄올 1,350  $\mu$ l (450  $\mu$ l 수성 상 + 900  $\mu$ l 100% 에탄올)를 첨가한다.
3. (<sup>수성 상 부피 대비</sup>) 1/10 부피의 소듐 아세테이트 pH 5.2 첨가 → 45  $\mu$ l
4. 2.5 부피의 100% 에탄올까지 (450  $\mu$ l 수성 상 + 45  $\mu$ l 3 M 소듐 아세테이트) 첨가 → 1,237.5  $\mu$ l 100% 에탄올
- (이미 수성 상에 첨가된 900  $\mu$ l, 단계 1 참조) → 남은 100% 에탄올 (337.5  $\mu$ l) 첨가
5. 수회에 걸쳐 위아래로 피펫팅함으로써 완전하게 혼합한다. 원심분리하지 않는다.
6. 25 $\mu$ g 글리코겐 (1.25  $\mu$ g 글리코겐 20  $\mu$ g/ $\mu$ l)을 첨가한다.
7. 수회에 걸쳐 위아래로 피펫팅함으로써 완전하게 혼합한다. 원심분리하지 않는다.
8. 튜브를 밤새도록 -20°C 냉동기에 놓는다.
9. 다음 날 샘플을 해동시킨다.
10. 튜브를 수회에 걸쳐 도립시켜 완전하게 혼합한다.
11. 4°C에서 15 min 동안 최대 속도로 (16,000 xg)로 회전시킨다.
12. 혜산 펠렛을 파괴하지 않으면서, 상청액을 주의하여 제거한다.
13. 펠릿이 튜브 벽으로부터 제거된다면, 전속력으로 2 min 동안 다시 회전시킨다.
14. 1 ml 70% 에탄올을 첨가한다. 혼합하고, 단기간 회전시킨다. 상청 액을 주의하여 제거한다.
15. 펠릿이 튜브 벽으로부터 제거된다면, 전속력으로 2 min 동안 다시 회전시킨다.
16. 소형 피펫을 이용하여 남은 70% 에탄올을 제거한다.
17. 펠릿을 대기 건조시킨다
18. 20  $\mu$ l EB 중에 펠릿을 세현탁시킨다

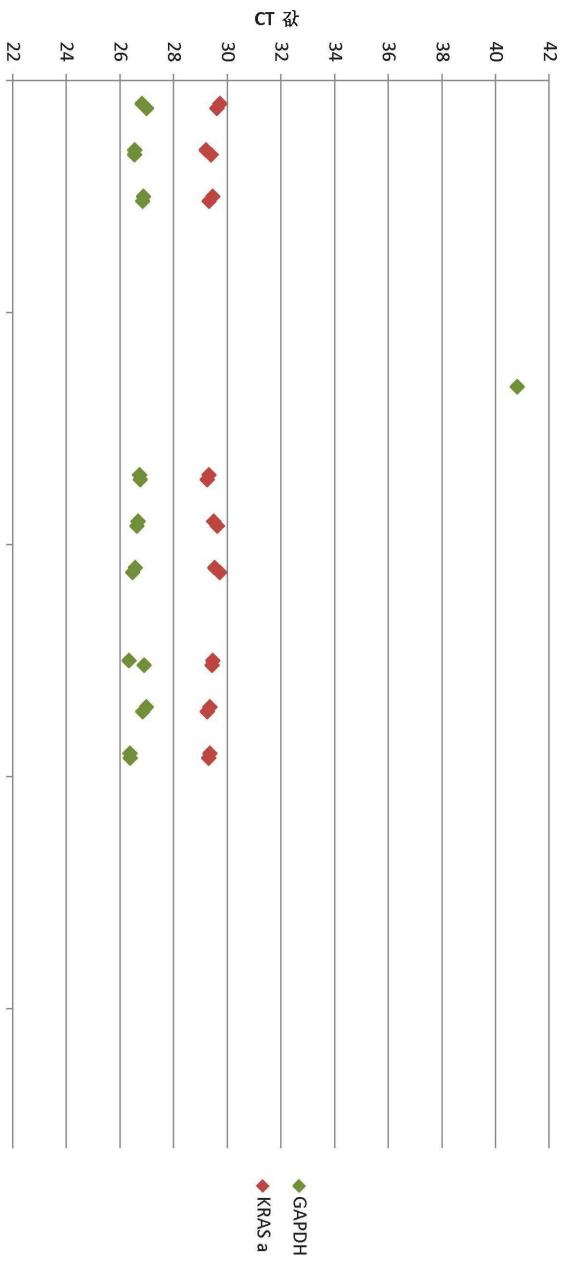
도면210

## EXO52.2 DNA-단백: 이중 RN이지 로딩 단계 – 에탄올 침전

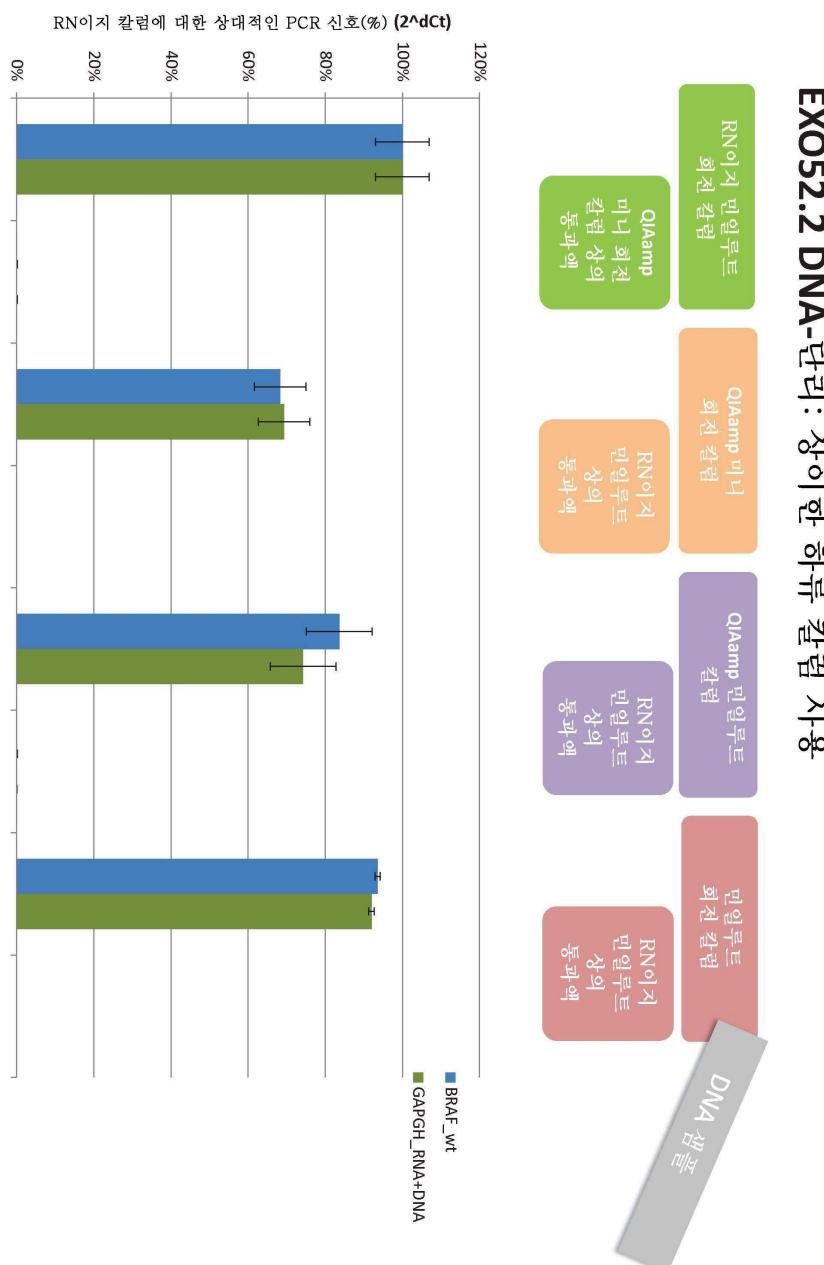


도면211

### EXO52.2 DNA-단위: 이중 RN이지 로딩 단계 - 예 탄을 침전

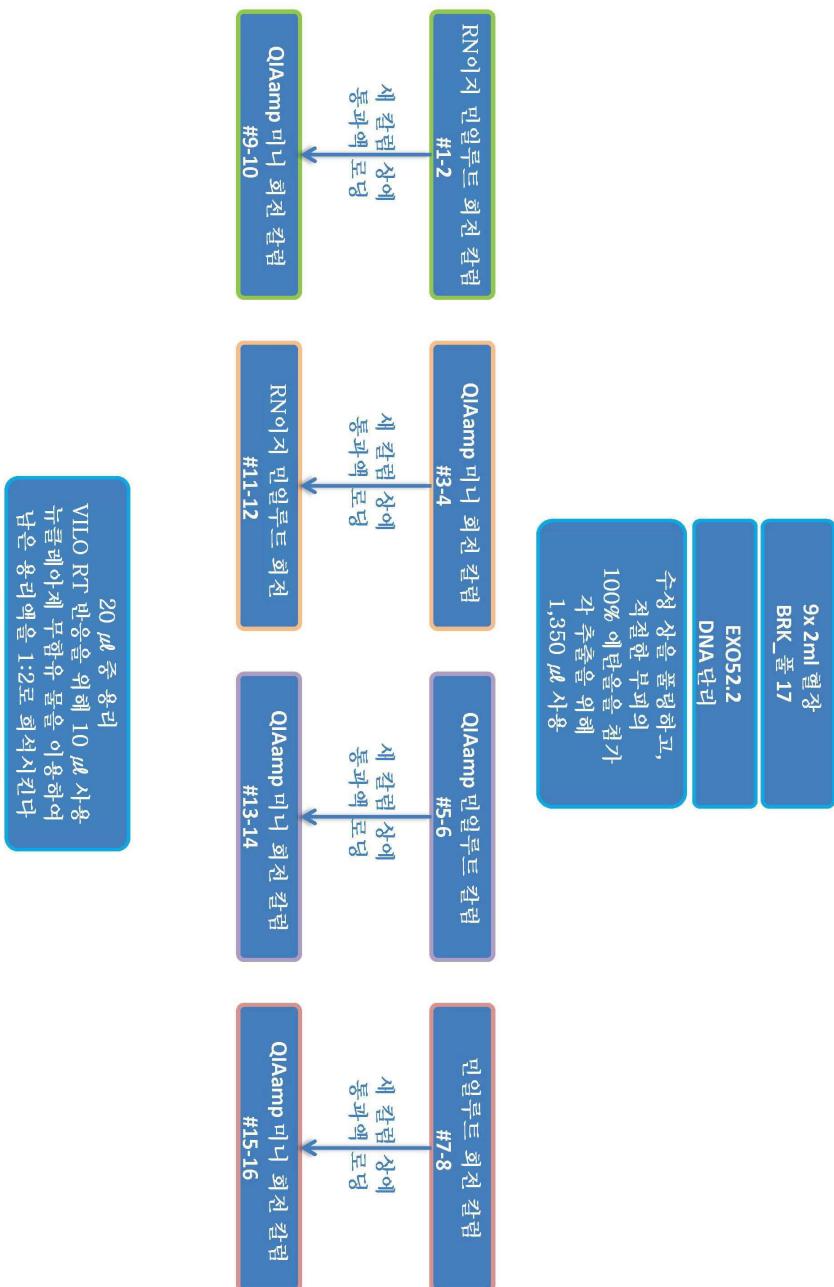


## 도면212



도면213

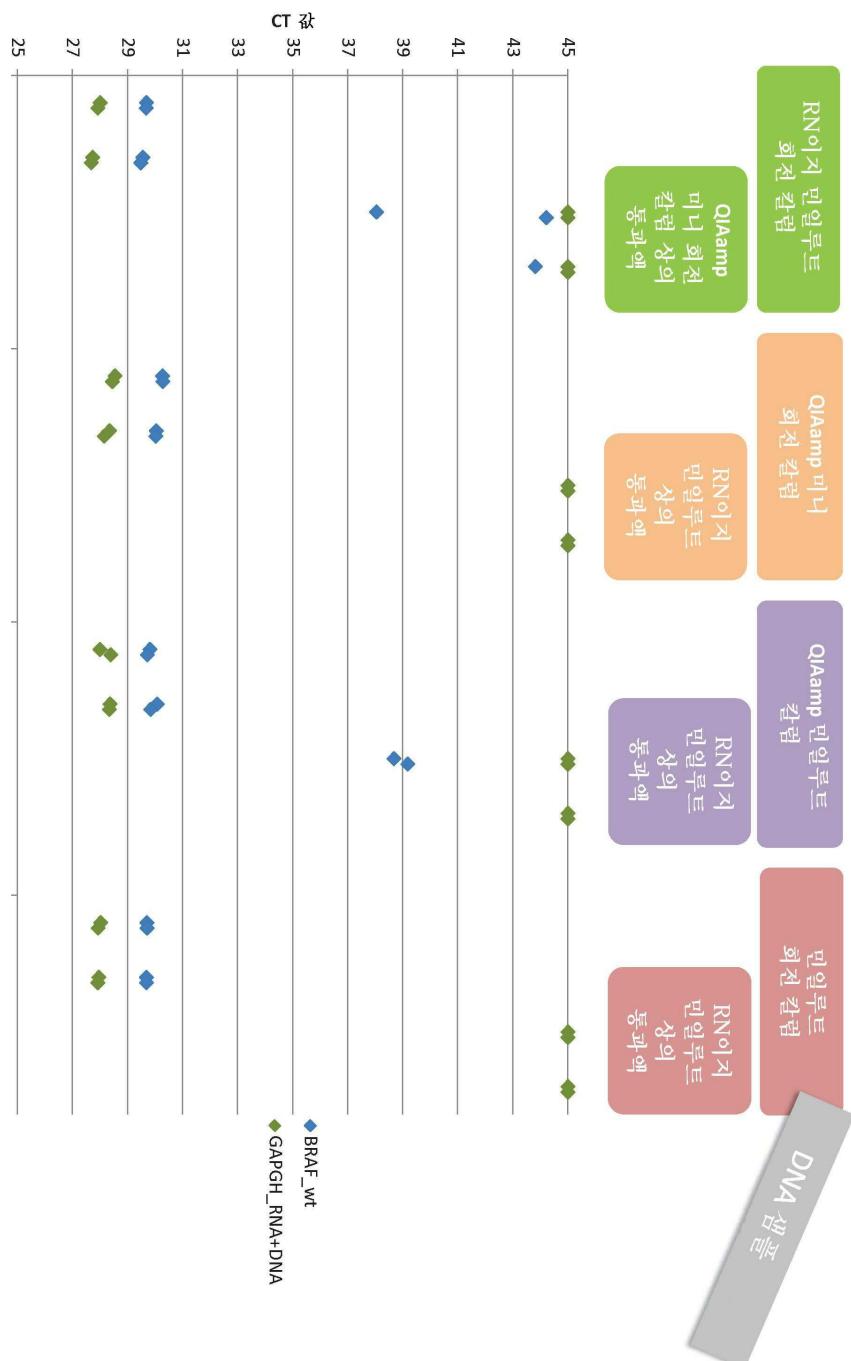
## EXO52.2 DNA-단리: 상이한 하류 칼럼 사용



주석: 350 μl 쿨로로포름/2.0x EtOH

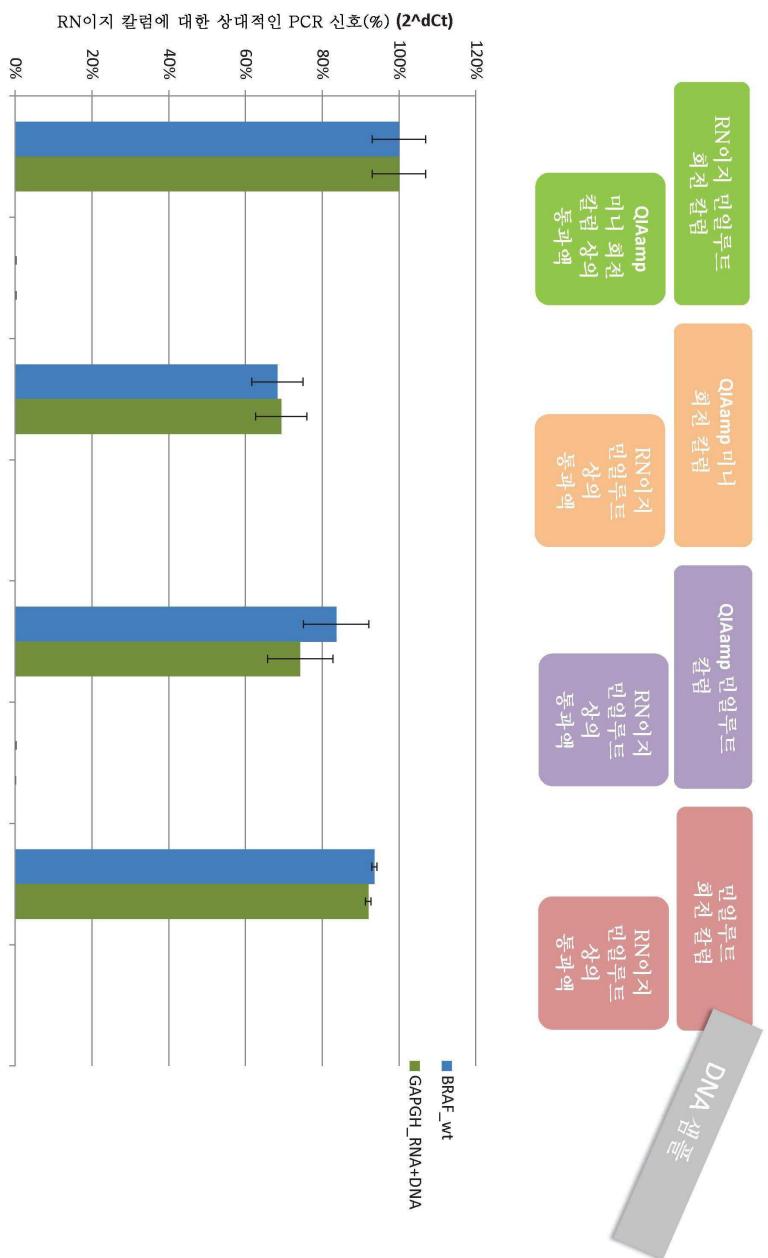
도면214

## EXO52.2 DNA-단위: 상이한 하류 칼럼 사용



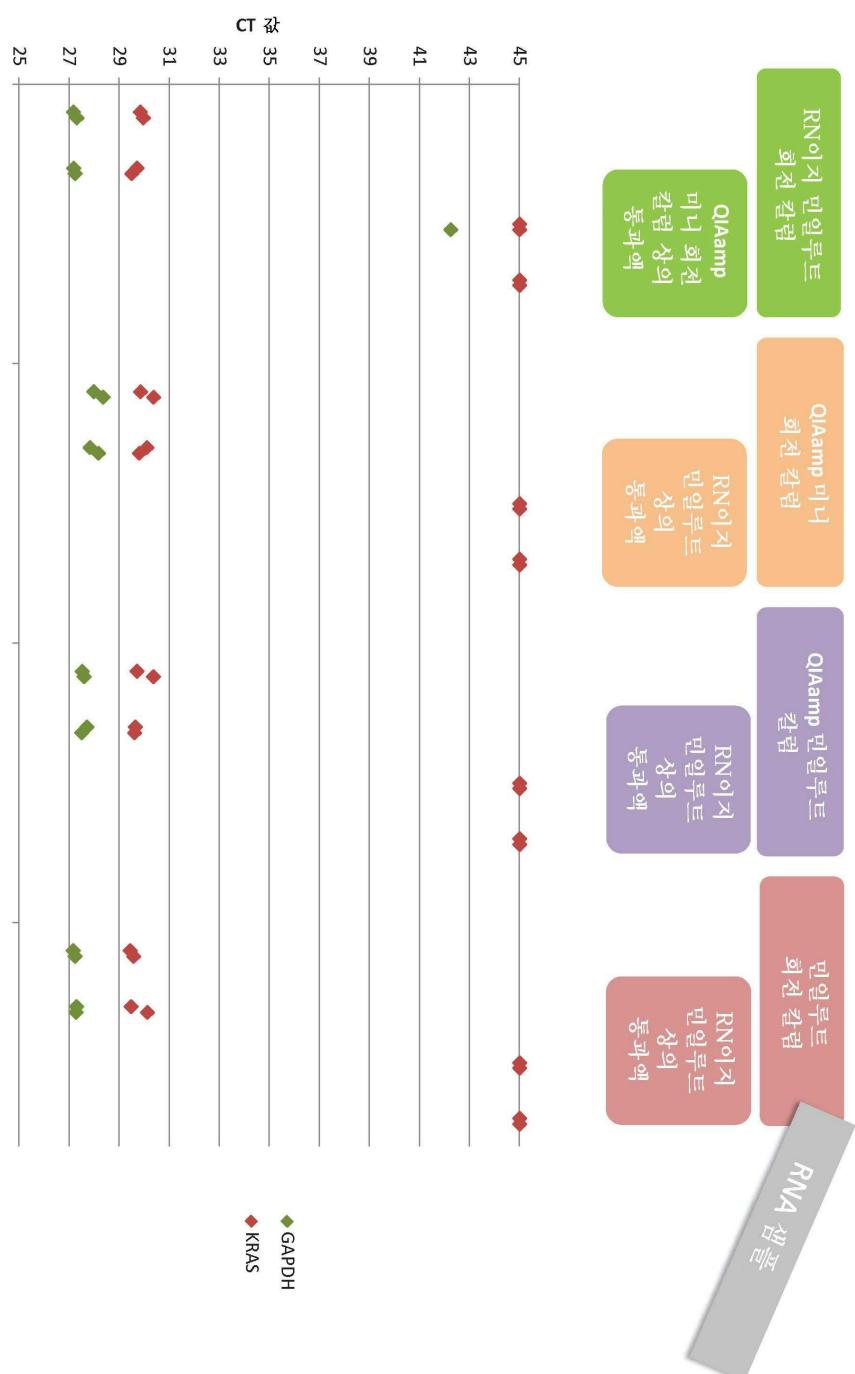
도면215

## EXO52.2 DNA-단리: 상이한 하류 칼럼 사용



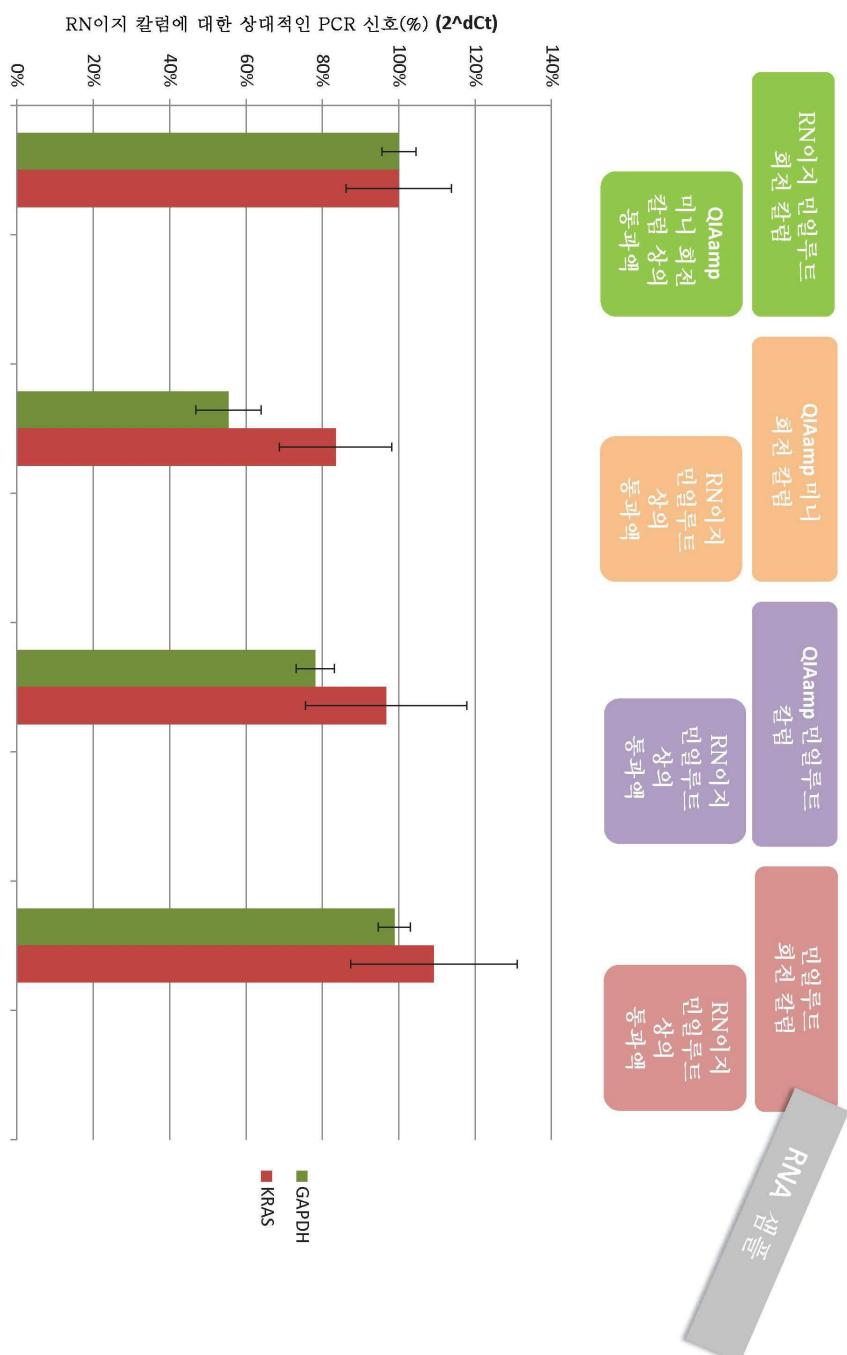
도면216

## EXO52.2 DNA-단위: 상이한 하류 칼럼 사용



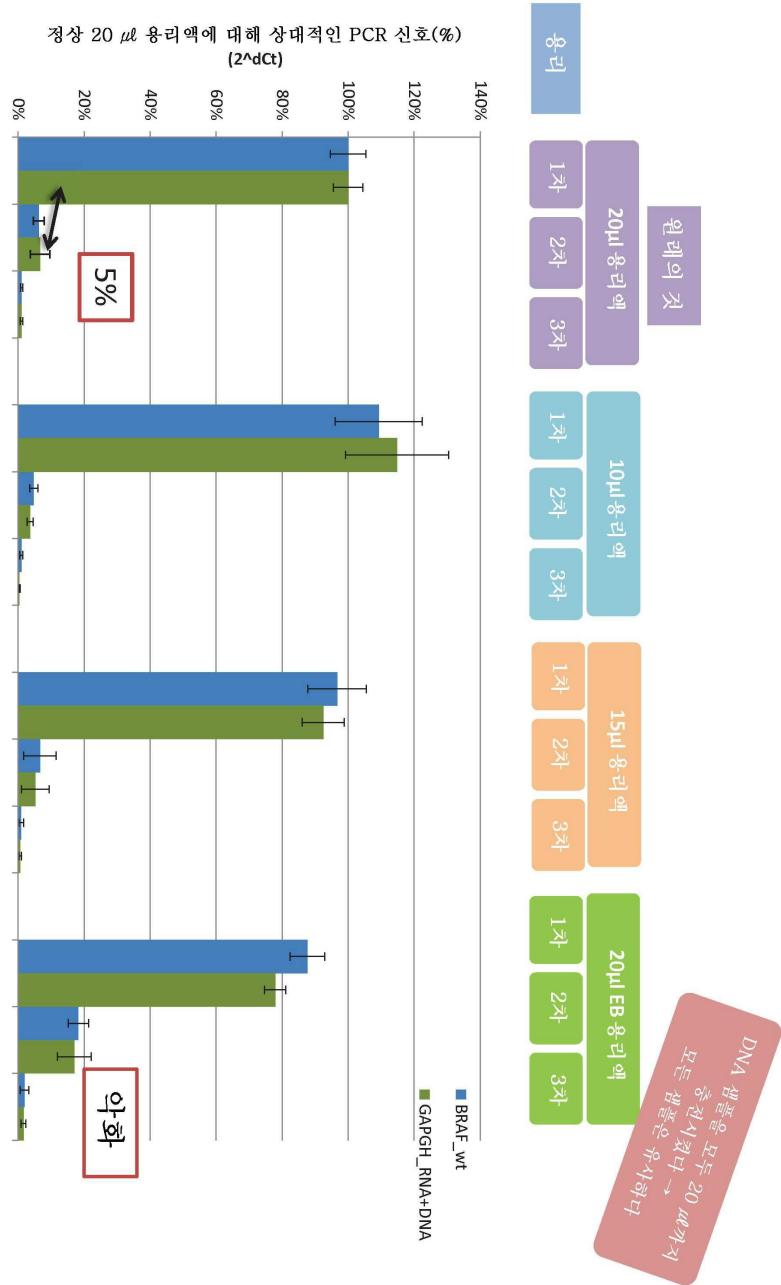
도면217

## EXO52.2 DNA-단리: 상이한 하류 칼럼 사용



## 도면218

## EX052.2 DNA-단위: 다중 RNA이지 용리 단계



도면219

## EX052.2 DNA-단리: 다중 RN이지 용리 단계

8x 2ml 헐장  
BRK\_풀 17

EX052.2  
DNA 단리

샘플 #1-2

1차-  
12  $\mu$ 의 뉴클레이어  
무협유 물로  
용리시킨다  
→ 10  $\mu$  용리액

샘플 #3-4

17  $\mu$ 의 뉴클레이어  
무협유 물로  
용리시킨다  
→ 15  $\mu$  용리액

샘플 #5-6

22  $\mu$ 의 뉴클레이어  
무협유 물로  
용리시킨다  
→ 20  $\mu$  용리액

샘플 #7-8

22  $\mu$ 의 EB  
완충제로 용리시킨다  
→ 20  $\mu$  용리액

2차-  
세 튜브 중에서  
12  $\mu$ 의 뉴클레이어  
무협유 물로  
용리시킨다  
→ 10  $\mu$  용리액

세 튜브 중에서  
17  $\mu$ 의 뉴클레이어  
무협유 물로  
용리시킨다  
→ 15  $\mu$  용리액

세 튜브 중에서  
22  $\mu$ 의 뉴클레이어  
무협유 물로  
용리시킨다  
→ 20  $\mu$  용리액

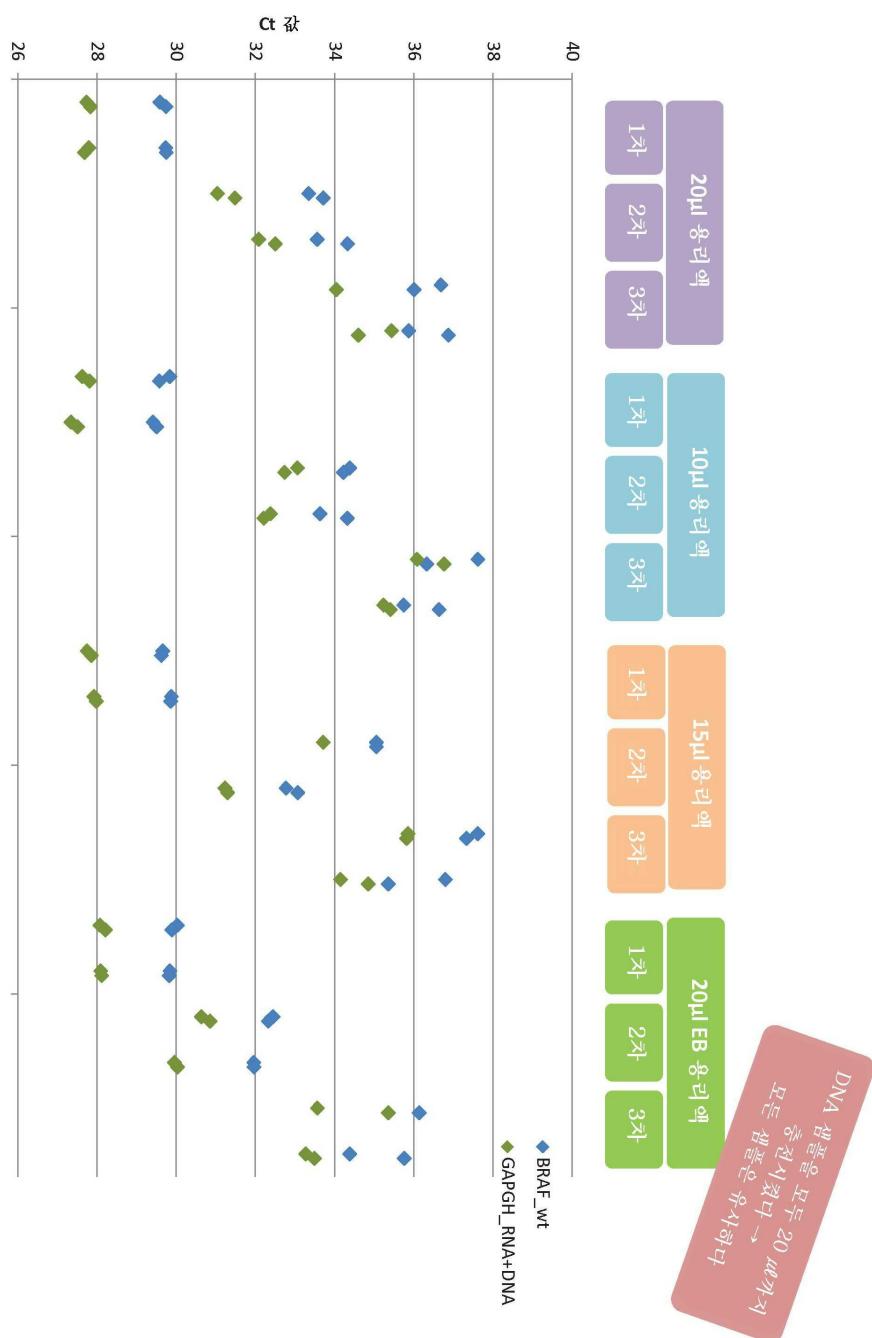
세 튜브 중에서  
22  $\mu$ 의 뉴클레이어  
무협유 물로  
용리시킨다  
→ 20  $\mu$  용리액

VIVO RT를 위해  
50% 용리액을 사용한다  
RT 반응에 따라  
남은 50%를 회색시킨다  
(최대 20  $\mu$ 까지 증발시킨다)

주석: 350  $\mu$  클로로포름/2.0x EtOH

도면220

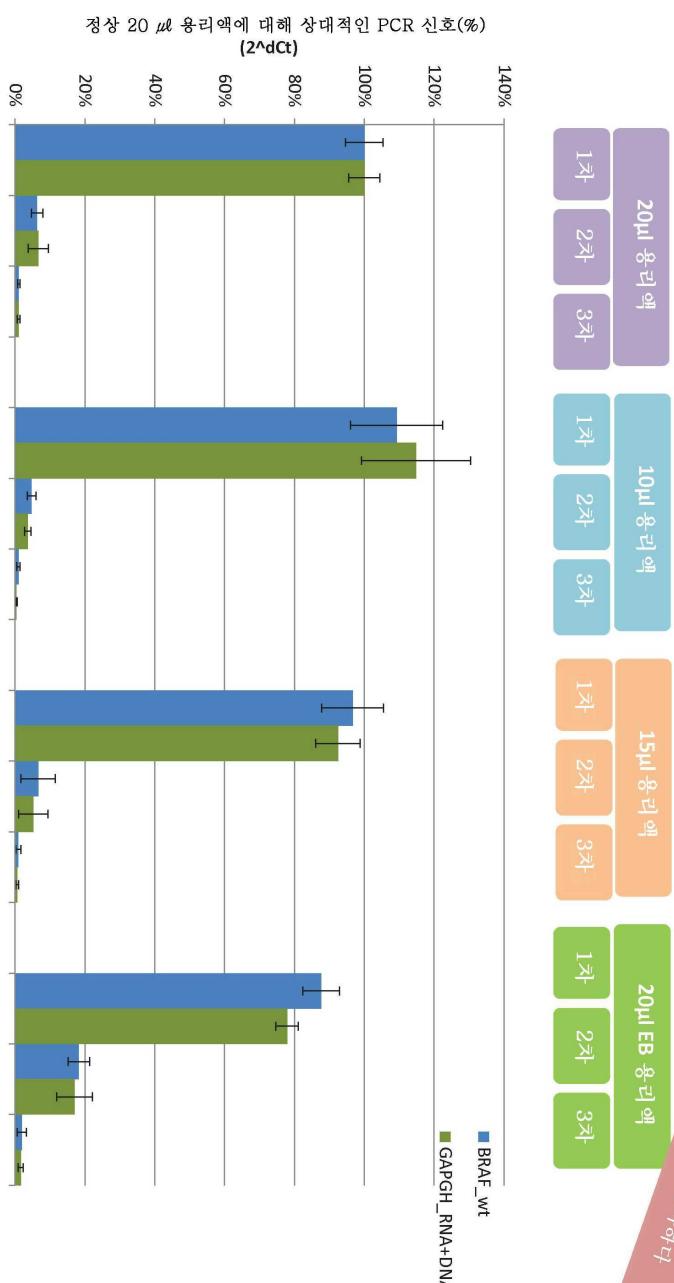
## EX052.2 DNA-단위: 다중 RN이지 용리 단계



## EX052.2 DNA-단리: 다중 RNA이지 용리 단계

2차-용리 단계에서 5% DNA

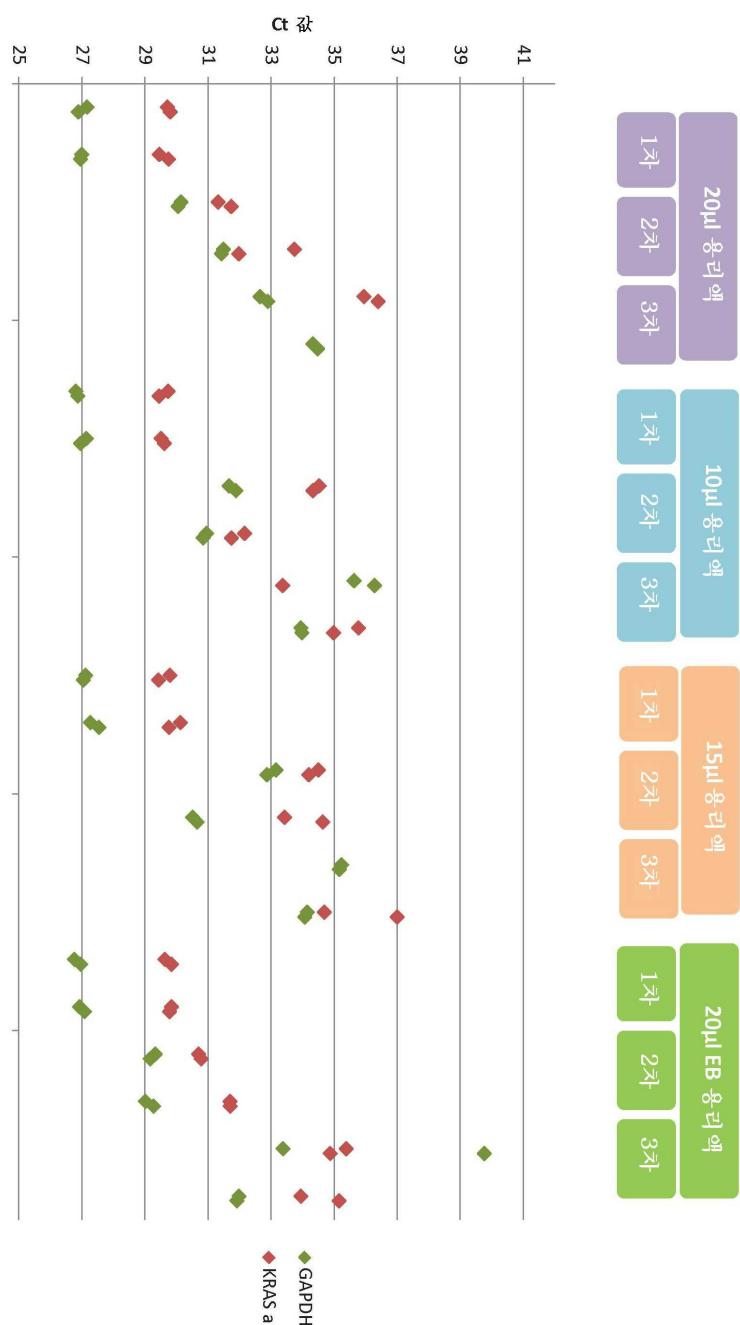
DNA  
샘플을  
증진시켰을  
모든  
샘플은  
20 μl 까지  
유지된다



도면221  
단리 복제를 모두의 평균 사용 및 표준 편차와 함께 오차-막대 사용

## EX052.2 DNA-단위: 다중 RN이지 용리 단계

도면222

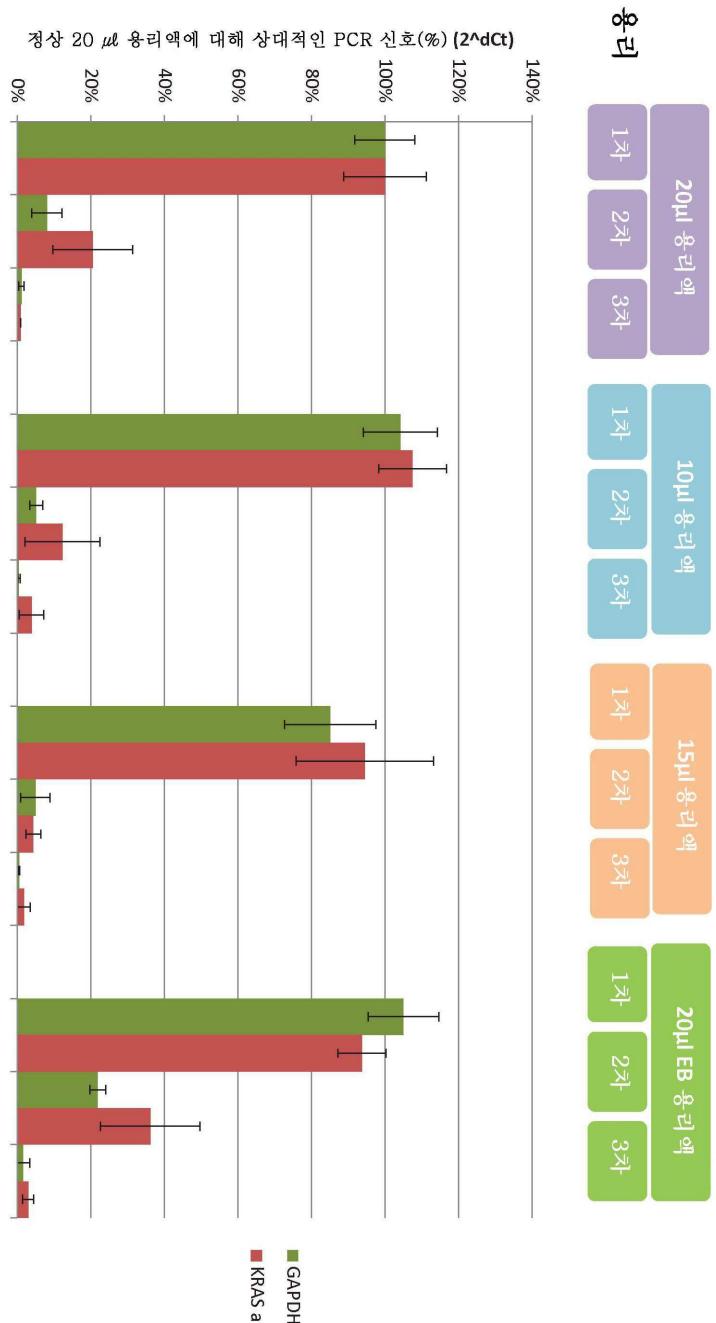


## 도면223

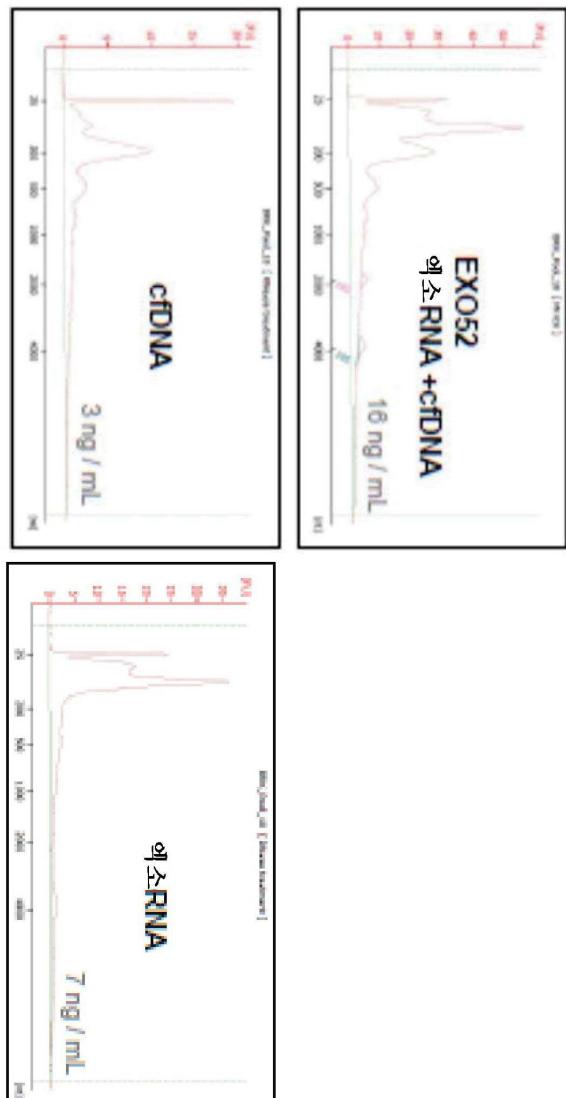
## EX052.2 DNA-단위: 다중 RN이지 용리 단계

## cDNA

## 원래의 것



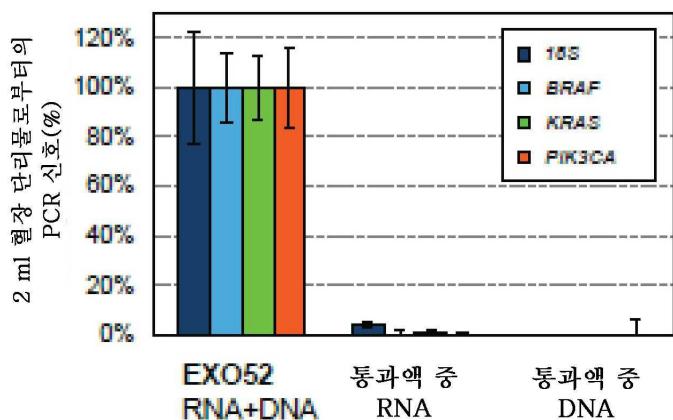
도면224



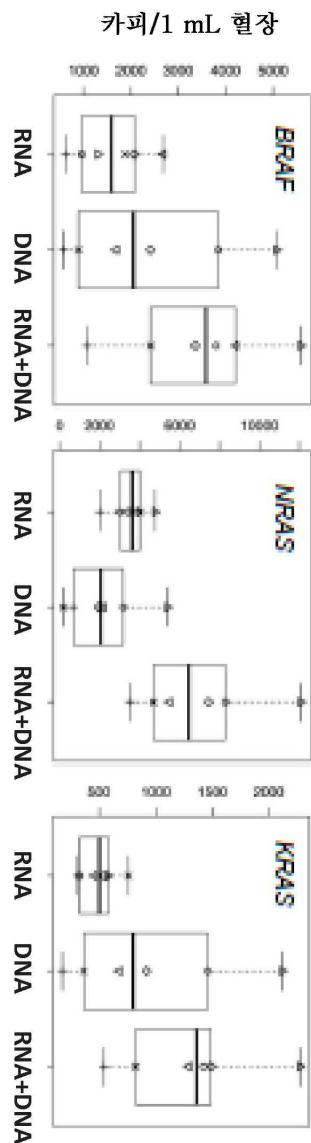
## 혈장 중 핵산의 크기 분포

**도면225**

EXO52 칼럼은 혈장 중 모든 mRNA 및 DNA에 결합한다



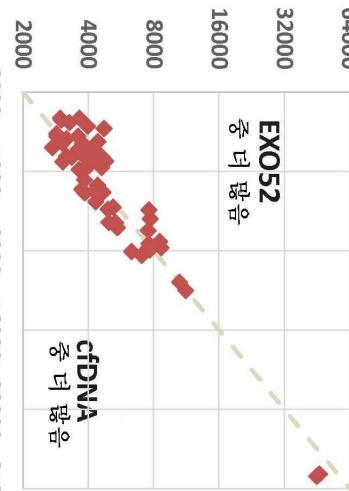
## 도면226



도면227

**EXO52 cfDNA**

단백



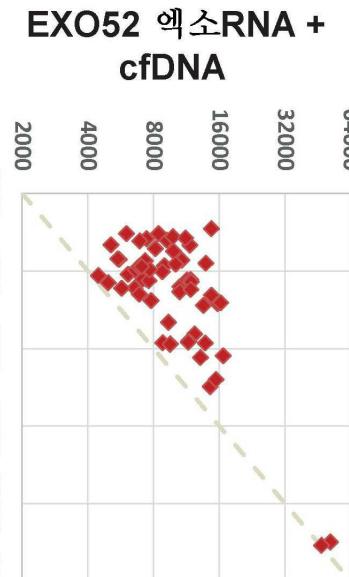
상업적으로 입수 가능한 키트를 사용한 cfDNA

EXO52는 cfDNA 단위 키트와  
동일한 양의 cfDNA를 추출한다**RT 수령(엑소RNA + cfDNA)**

BRAF 카페/mL

RT 수령(엑소RNA + cfDNA)

BRAF 카페/mL



상업적으로 입수 가능한 키트를 사용한 cfDNA

EXO52는 엑소RNA와 cfDNA를 조합함으로써  
더 높은 카페의 BRAF를 추출한다

도면228

