



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0052964
(43) 공개일자 2025년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6827 (2018.01) C12Q 1/6855 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6827 (2018.05)
C12Q 1/6855 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2024-0134708
(22) 출원일자 2024년10월04일
심사청구일자 2024년10월04일
(30) 우선권주장
1020230135160 2023년10월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정철희
서울특별시 성북구 돌곶이로8길 22 (석관동, 래미안아트리치)
김한아
서울특별시 광진구 구의강변로 11 (자양동, 자양한양아파트)
이희경
인천광역시 부평구 부흥로 246 (부평동, 동아아파트)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹

전체 청구항 수 : 총 9 항

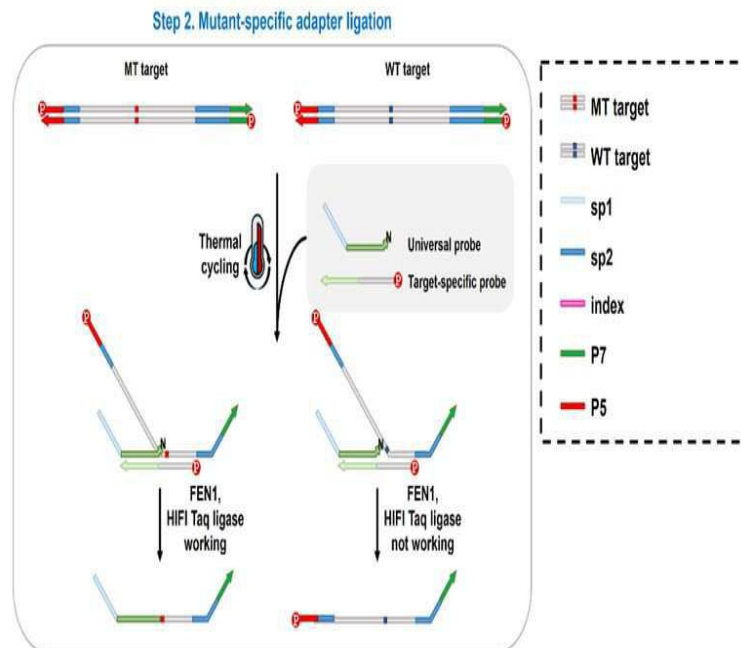
(54) 발명의 명칭 높은 처리량의 돌연변이 특이적 아답터 리게이션 방법

(57) 요약

본 발명은 높은 처리량의 돌연변이 특이적 아답터 리게이션 방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 돌연변이 염기(base)를 갖는 타겟 DNA에 상보적으로 결합하는 프로브로서, 상기 프로브는 타겟 DNA의 염기서열에 상보적인 염기서열을 포함하되, 상기 돌연변이 염기를 기준 0 위치로 하여 상기 돌연변이 염기로부터 2번째 떨어진 위치의

(뒷면에 계속)

대표도 - 도8



염기를 인공적인 미스매치 염기로 치환시킨 것을 특징으로 하는 프로브; 상기 프로브를 포함하는 NGS(Next Generation Sequencing) 분석을 위한 돌연변이 타겟 DNA 캡처용 조성물; 상기 프로브 및 유니버설 프로브를 타겟 DNA와 혼성화시킨 후, FEN1(flap endonuclease 1) 및 HIFI 리게이스를 처리하여 반응시키는 단계를 포함하는 돌연변이 DNA 특이적 어답터 리게이션(adapter ligation) 방법; 및 상기 프로브 및 유니버설 프로브를 타겟 DNA와 혼성화시킨 후, FEN1 및 HIFI 리게이스를 처리하여 어답터 리게이션시킨 다음, 유니버설 프라이머를 이용한 PCR 증폭반응을 수행하는 단계를 포함하는 돌연변이 타겟 DNA의 풍부화 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6876 (2018.05)
C12Q 2521/301 (2013.01)
C12Q 2521/501 (2013.01)
C12Q 2531/107 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711168711
과제번호	2022M3A9B608267012
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	하이브리드 인공지능기반 바이오회로 시험 및 최적화 기술개발
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415187028
과제번호	20009356
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술기획평가원
연구사업명	바이오산업기술개발
연구과제명	디지털 PCR 대체 nest PCR 기반 기술 개발 및 저가형 현장형 위해요소 분자진단 시

스텝 개발

과제수행기관명	압티지엠제이주식회사
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180905
과제번호	2021R1C1C1004147
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	정확한 단일염기변이 구분 프로브를 이용한 살아있는 세포 식별 및 분리 기술 개발
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

돌연변이 염기(base)를 갖는 타겟 DNA에 상보적으로 결합하는 프로브로서, 상기 프로브는 타겟 DNA의 염기서열에 상보적인 염기서열을 포함하되, 상기 돌연변이 염기를 기준 0 위치로 하여 상기 돌연변이 염기로부터 2번째 떨어진 위치의 염기를 인공적인 미스매치 염기로 치환시킨 것을 특징으로 하는, 프로브.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미스매치 염기는 타겟 DNA에 존재하는 돌연변이 염기를 0 위치로 하여 하류 쪽으로(검출 타겟 DNA 염기서열의 5' 에서 3' 방향으로) 2번째 떨어진 위치의 염기에 대한 미스매치 염기인 것을 특징으로 하는, 프로브.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 프로브는 타겟 DNA와 결합하기 위한 타겟 DNA에 상보적인 염기서열 영역; 및 유니버설 프로브와 결합할 수 있도록 유니버설 프로브 염기서열에 대한 상보적인 염기서열 영역;을 포함하는 것을 특징으로 하는, 프로브.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 프로브는 인공적인 미스매치 염기의 도입으로 FEN1(flap endonuclease 1)의 구조 식별 능력이 향상된 것을 특징으로 하는, 프로브.

청구항 5

제1항에 있어서,

돌연변이 염기를 갖는 타겟 DNA는 cfDNA(cell free DNA)인 것을 특징으로 하는, 프로브.

청구항 6

제1항의 프로브를 포함하는, NGS(Next Generation Sequencing) 분석을 위한 돌연변이 타겟 DNA 캡처용 조성물.

청구항 7

제1항의 프로브 및 유니버설 프로브를 타겟 DNA와 혼성화시킨 후, FEN1(flap endonuclease 1) 및 HIFI 리게이스를 처리하여 반응시키는 단계를 포함하는,

돌연변이 DNA 특이적 어답터 리게이션(adapter ligation) 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 방법은 돌연변이 위치의 염기에 특이적으로 5' 어답터가 연결되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항의 프로브 및 유니버설 프로브를 타겟 DNA와 혼성화시킨 후, FEN1(flap endonuclease 1) 및 HIFI 리게이스를 처리하여 어답터 리게이션시킨 다음, 유니버설 프라이머를 이용한 PCR 증폭반응을 수행하는 단계를 포함하는,

돌연변이 타겟 DNA의 풍부화 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 높은 처리량의 돌연변이 특이적 아답터 리게이션 방법에 관한 것으로, 낮은 유전자 빈도를 갖는 돌연변이를 탐지하기 위한 돌연변이 풍부화(Mutation enrichment) 방법으로서 두 종류의 효소, 플랩 엔도뉴클레아제(이하 FEN1)와 HIFI 리게이스를 활용하는 것으로, 이종의 효소 작용과 더불어 인공적인 미스매치가 포함된 프로브를 사용하여 낮은 빈도의 돌연변이를 단일 뉴클레오타이드 수준에서 더욱 민감하게 탐지할 수 있고 온도 순환을 통해 충분한 반응 효율을 확보한 새로운 돌연변이 풍부화 기법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 액체 생검은 환자의 혈액 및 소변과 같은 체액 샘플을 이용하여 암을 진단하거나 항암 치료 이후의 예후를 관찰하는 기술을 일컫는다. 액체 생검은 전통적인 방식의 조직 생검과 비교하여 비침습적이고 비용 및 시간적인 측면에서 경제적이므로 환자의 부담을 줄여준다. 또한 액체 생검은 중앙 조직의 불균질성을 커버할 수 있다는 장점이 있다. 액체 생검은 일반적으로 환자의 혈장에 존재하는 세포 유리 DNA (Cell free DNA, 이하 cfDNA)를 타겟으로 삼는데 cfDNA 중 순환 종양 DNA (Circulating tumor DNA)는 극소수에 불과하며 50 - 200 염기쌍 정도의 짧은 길이로 인해 15분에서 수 시간에 이르는 반감기로 인해 분석에 어려움이 있다. 이러한 cfDNA는 환자의 혈장 샘플로부터 얻을 수 있는 양이 ml당 10 ng 혹은 3,000 게놈 카피 이하로 상당히 낮고 0.01 - 5 %의 대립 유전자 빈도(Variant allele frequency, 이하 VAF)를 가지므로 분석 방법이 제한적이다. 대표적인 분석 방법으로는 차세대 염기 서열 분석 (Next generation sequencing, 이하 NGS), 디지털중합효소연쇄반응 (Droplet digital PCR, 이하 ddPCR)이 있다.
- [0003] NGS는 핵산 가닥을 각각 분석하는 방식으로 염기 서열을 빠르고 저렴하게 읽어낼 수 있는 기술이다. NGS는 높은 민감도를 가지며 낮은 VAF를 가지는 샘플도 탐지가 가능하지만 높은 시퀀싱 깊이를 요구하고 이는 비용의 증가로 이어지게 된다. ddPCR은 PCR 반응을 미세방울 (Droplet)로 쪼개어 증폭시키고 각 방울의 신호를 계수하는 시스템이다. ddPCR 또한 원리상으로는 낮은 VAF까지도 탐지가 가능하지만 대다수의 상업적인 시스템에서는 검출한계가 제한적이며 멀티플렉싱이 불가능하다는 단점이 있다. 그 외에 정량 실시간 PCR (Quantitative real-time PCR), 생가 시퀀싱 (Sanger sequencing), 고해상도 용융 분석 (High resolution melting analysis)과 같은 다양한 핵산 분석 기술이 있지만 낮은 VAF의 샘플은 위양성으로부터 비롯된 오차와 실제 신호를 구별이 불가능하다.
- [0004] 따라서 이러한 문제점을 개선할 수 있는 새로운 분석 기술의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2017-0136555

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에 본 발명자들은 기존 NGS의 단점인 높은 시퀀싱 깊이로부터 비롯된 비용 부담과 그 외 핵산 분석 기술의 단점인 낮은 민감도를 해결하며, 동시에 다양한 돌연변이 위치의 검출할 수 있는 새로운 기술을 개발하던 중, HTML (High Throughput Mutant-specific Ligation)으로 명명되는 새로운 방법을 고안하였으며, HTML의 필수 요소인 인공적인 미스매치가 포함된 프로브가 DNA 템플릿과 구조를 형성하고, FEN1과 HIFI 리게이스가 잇달아 작용하여 돌연변이 위치의 염기에 특이적으로 5' 어답터 (Adapter)를 이어줌으로써, 각각의 돌연변이 위치의 염기에 따라 생성된 리게이트 (Ligate)가 유니버설 프라이머 (Universal primer)를 사용하는 PCR 과정에 따라 증폭되고 최종적으로 야생형 (Wildtype)과 돌연변이 (Mutant)가 섞인 혼합물에서 돌연변이만을 선택적으로 풍부화시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명의 방법을 사용할 경우, 표적 증폭물을 단일 뉴클레오타이드 레벨의 특이성으로 구별해낼 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은, 돌연변이 염기(base)를 갖는 타겟 DNA에 상보적으로 결합하는 프로브로서, 상기 프로브는 타겟 DNA의 염기서열에 상보적인 염기서열을 포함하되, 상기 돌연변이 염기를 기준 0 위치로 하여 상기 돌연변이 염기로부터 2번째 떨어진 위치의 염기를 인공적인 미스매치 염기로 치환시킨 것을 특징으로 하는, 프로브를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명의 프로브를 포함하는, NGS(Next Generation Sequencing) 분석을 위한 돌연변이 타겟 DNA 캡처용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 본 발명의 프로브 및 유니버설 프로브를 타겟 DNA와 혼성화시킨 후, FEN1(flapp endonuclease 1) 및 HIFI 리게이스를 처리하여 반응시키는 단계를 포함하는, 돌연변이 DNA 특이적 어답터 리게이션(adapter ligation) 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 본 발명의 프로브 및 유니버설 프로브를 타겟 DNA와 혼성화시킨 후, FEN1(flapp endonuclease 1) 및 HIFI 리게이스를 처리하여 어답터 리게이션시킨 다음, 유니버설 프라이머를 이용한 PCR 증폭반응을 수행하는 단계를 포함하는, 돌연변이 타겟 DNA의 풍부화 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 따라서 본 발명은 돌연변이 염기(base)를 갖는 타겟 DNA에 상보적으로 결합하는 프로브로서, 상기 프로브는 타겟 DNA의 염기서열에 상보적인 염기서열을 포함하되, 상기 돌연변이 염기를 기준 0 위치로 하여 상기 돌연변이 염기 위치로부터 2번째 떨어진 위치의 염기를 인공적인 미스매치 염기로 치환시킨 것을 특징으로 하는, 프로브를 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미스매치 염기는 타겟 DNA에 존재하는 돌연변이 염기 위치를 기준으로(0 위치) 하류 쪽으로(검출 타겟 DNA 염기서열의 5' 에서 3' 방향으로) 2번째 떨어진 위치의 염기에 대한 미스매치 염기일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로브는 타겟 DNA와 결합하기 위한 타겟 DNA에 상보적인 염기서열 영역; 및 유니버설 프로브와 결합할 수 있도록 유니버설 프로브 염기서열에 대한 상보적인 염기서열 영역;을 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로브는 인공적인 미스매치 염기의 도입으로 FEN1(flapp endonuclease 1)의 구조 식별 능력이 향상될 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 돌연변이 염기를 갖는 타겟 DNA는 cfDNA(cell free DNA)일 수 있다.

[0016] 또한 본 발명은 본 발명의 프로브를 포함하는, NGS(Next Generation Sequencing) 분석을 위한 돌연변이 타겟 DNA 캡처용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 본 발명의 프로브 및 유니버설 프로브를 타겟 DNA와 혼성화시킨 후, FEN1(flapp endonuclease 1) 및 HIFI 리게이스를 처리하여 반응시키는 단계를 포함하는, 돌연변이 DNA 특이적 어답터 리게이션(adapter ligation) 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법은 돌연변이 위치의 염기에 특이적으로 5' 어답터가 연결되는 것일 수 있다.

[0019] 나아가 본 발명은 본 발명의 프로브 및 유니버설 프로브를 타겟 DNA와 혼성화시킨 후, FEN1(flapp endonuclease 1) 및 HIFI 리게이스를 처리하여 어답터 리게이션시킨 다음, 유니버설 프라이머를 이용한 PCR 증폭반응을 수행하는 단계를 포함하는, 돌연변이 타겟 DNA의 풍부화 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 기존 핵산 분석 기술들의 문제점인 낮은 민감도 혹은 높은 비용으로 인한 낮은 VAF를 가지는 샘플들의 분석 어려움을 개선할 수 있는 기술로서, FEN1과 HIFI 리게이스 및 2 종류의 프로브를 사용하여 돌연변이 염기(분자)에만 특이적으로 어답터를 리게이션 시키며, 어답터 리게이션 후, 유니버설 프라이머를 사용하는 PCR 과정을 통해 성공적으로 돌연변이를 풍부화시켜, 검출하고자 하는 돌연변이를 용이하게 검출할 수 있는 효과를 갖는다. 또한 본 발명의 기술은 다양한 돌연변이 위치에 동시에 적용할 수 있고, 간단한 프로브 디자인으로 프로브의 디자인 복잡성을 해결할 수 있으며, 나아가 본 발명은 액체생검을 기반으로 하는 암과 같은 질환의 진단

및 위양성 위험을 낮춘 돌연변이 검출 방법에도 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 일반적인 액체생검의 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 돌연변이 풍부화 방법을 적용하여 cfDNA를 분석하는 과정을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에서 2가지 다른 조성의 버퍼 조건에서 어답터 리게이션의 효능을 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에서 미스매치가 없는 한 종류의 U 프로브와 3' 서열에 N 서열을 갖는 U 프로브를 사용하였을 때, 온도 사이클링을 통한 효율 증가 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에서 3가지 다른 반응 온도에서 어답터 리게이션의 효능을 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에서 KRAS G12V 돌연변이를 포함하는 템플릿을 대상으로 본 발명의 어답터 리게이션 방법에 의한 돌연변이의 성공적인 증폭 결과를 확인한 것을 나타낸 것이다.

도 7은 3' 어답터 리게이션 과정을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 돌연변이 특이적 5' 어답터 리게이션 과정을 나타낸 것이다.

도 9는 TS 프로브의 인공적인 미스매치 위치 선정을 위한 디자인을 나타낸 것이고, 도 10은 도 9의 TS 프로브를 이용한 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 PCR 증폭 과정을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은 야생형과 돌연변이가 섞인 혼합물에서 돌연변이만을 선택적으로 풍부화시키기 위하여 FEN1과 HIFI 리게이스(ligase)의 연속적인 작용이 가능한 새로운 프로브 세트를 제작하였고, 또한 NGS 분석에 적용하기 위한 세 단계, 즉 전처리 단계, 돌연변이 풍부화 단계 및 PCR로 이루어진 라이브러리 제작 단계를 개발하였다.

일반적으로, NGS 전처리 과정은 샘플 DNA 또는 RNA가 NGS 장비에서 인식하여 염기서열 분석을 할 수 있도록 가공하는 과정을 말하며, NGS 장비가 인식하기 위해서는 보통 샘플 DNA 혹은 RNA를 적당한 크기로 자른 후, 양 끝에 특정한 염기서열을 가진 어답터(adapter) 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)를 붙여준다. 이렇게 만들어진 산물을 라이브러리(library)라고 부른다.

또한 라이브러리 제작을 위해, 샘플로부터 추출한 핵산은 nuclease, fragmentase, transposase 등의 효소를 적절한 조건에 처리를 하여 원하는 크기의 핵산 분절(fragment)화 시킨다.

그런 다음, 말단수리(end repair), 3' 말단 아데닌 추가, 어답터 부착 및 PCR 증폭을 통한 라이브러리 증폭을 수행한다.

말단수리는 분절화가 끝난 핵산은 말단 부위가 완전히 이중나선(duplex) 구조로 되어 있지 않는 경우가 많다. 이러한 불완전한 말단을 DNA 중합효소 등을 이용하여 절단해 내거나 상보적인 염기로 채워 끝까지 완전히 이중나선 구조가 되도록 만들어 준다. 이때 5' -말단에 인산기를 추가로 붙여 준다.

또한, 3' 말단에는 아데닌을 추가하는데, 말단 수리된 DNA의 3' -말단에는 효소를 이용하여 아데닌(adenine) 염기를 추가하여 주면 아데닌이 튀어나와 걸쳐있는(overhang) 형태를 가지게 된다. 이러한 산물은 티민(thymine)이 걸쳐있는 어답터(adapter) 올리고뉴클레오타이드와 상보적으로 용이하게 결합한다.

어답터(Adapter)란 NGS 장비가 인식할 수 있는 고유한 염기서열을 가진 올리고뉴클레오타이드로서, DNA에 어답터를 붙여 주는 작업은 리게이스(ligase) 효소를 이용한다. 어답터는 보통 Y자 형태(forked) 혹은 U자 형태(hairpin)로 되어 있고 3' -말단에는 티민이 붙어 있어 A-말단 작업이 끝난 산물에 리게이스 효소에 의해 쉽게 붙을 수 있도록 고안된다. 어답터에는 샘플을 구별할 수 있는 고유한 염기서열이 있으며 이것을 인덱스(index) 혹은 바코드(barcode)라 부른다. 샘플 인덱스는 보통 수 개~수십 개 정도 되는 염기서열로 되어 있고 각 장비에서는 약속된 인덱스 염기서열을 판독한 후 해당 라이브러리 DNA가 어느 샘플에서 유래되었는지 분류할 수 있게 한다.

- [0029] 다음으로, PCR 과정을 통해 라이브러리를 증폭한다.
- [0030] 한편, 본 발명자들은 낮은 유전자 빈도를 갖는 돌연변이를 높은 효율로 정확하게 검출하기 위하여 새로운 돌연변이 풍부화(mutatin enrichment) 방법을 개발하였다.
- [0031] 본 발명에 따른 방법은, 돌연변이 풍부화 과정을 수행하기 전에 일련의 전처리 과정을 수행한다.
- [0032] 첫째로, 템플릿의 5' 말단을 인산화시키고, 3' 말단을 수산화시키는 엔드 리페어 과정을 수행한다. 둘째로, 두 가닥 말단 어답터 리게이션(Blunt end adapter ligation) 과정을 수행한다. 이 때 사용하는 어답터는 3' 말단이 인산화되어 있어 어답터 다이머(Adapter dimer)를 형성하지 않으므로 이후 진행할 NGS 분석과정에 있어서 어답터 다이머 문제를 일으키지 않는다. 결과적으로 템플릿의 3' 부분에만 어답터 서열이 연결된 생산물이만 들어진다(도 7 참조).
- [0033] 다음으로, FEN1과 HIFI 리게이스를 이용한 돌연변이 풍부화 과정을 수행한다. 두 종류의 프로브가 템플릿과 결합하여 FEN1의 기질(Substrate)인 이중 플랩구조를 형성한다(도 8 참조). 두 종류의 프로브 중 하나는 돌연변이 위치에 특이적인 타겟 특이적 프로브(Target specific probe, 이하 TS 프로브)이며, 다른 하나는 돌연변이 위치에 관계없이 사용 가능한 유니버설 프로브(Universal probe, 이하 U 프로브)를 사용한다.
- [0034] TS 프로브는 두 부분으로 나눌 수 있다. 한 부분은 U 프로브와 결합을 형성하기 위해 서로 상보적인 서열을 가지며 돌연변이 위치와 상관없이 통일된 서열을 가진다. 또 다른 부분은 템플릿과 상보적으로 각각의 돌연변이 위치에 특이적인 서열을 갖는다. 본 발명은 돌연변이 위치 특이적인 부분에 인공적인 미스매치 염기를 추가하여 야생형 또는 돌연변이에 따른 DNA 복합체 구조 변화를 FEN1 효소가 더욱 잘 인식할 수 있도록 하였다(도 9 참조).
- [0035] 또한 본 발명자들은 이러한 인공적인 미스매치의 위치 최적화 분석을 수행하였고, 돌연변이 위치(0 위치)로부터 하류 영역으로 2번째 뉴클레오타이드 떨어진 곳을 최종적인 미스매치 위치로 선정하였다(도 10). FEN1이 5' 플랩을 잘라준 이후에는 HIFI 리게이스가 연속적으로 작용하여 U 프로브를 템플릿 5' 말단부에 이어준다. U 프로브는 차후 NGS 분석 과정에서 이용되는 어답터 서열을 가지고 있다. 3' 말단부에는 N (N = A, T, G, C) 서열을 추가하여 돌연변이 위치에 상관없이 이용할 수 있다.
- [0036] 마지막으로 어답터 서열에 상보적인 유니버설 프라이머를 사용한 PCR을 수행한다(도 11 참조).
- [0037] 또한, 특이도를 높이기 위해 PCR 증폭 과정 이전에 람다 뉴클레아제(Lambda nuclease) 처리 과정을 거친다. 효소 작용에 따라 5' 인산화 변형이 가해진 야생형 분자와 프로브들은 분해되고 돌연변이 분자만 남게 된다. 결과적으로 양쪽에 어답터 서열을 가지고 있는 돌연변이 분자만이 PCR 과정에 의해 증폭되고 돌연변이 풍부화가 이루어진다.
- [0038] 그러므로 본 발명은 돌연변이 염기(base)를 갖는 타겟 DNA에 상보적으로 결합하는 프로브로서, 상기 프로브는 타겟 DNA의 염기서열에 상보적인 염기서열을 포함하되, 상기 돌연변이 염기 위치로부터 2번째 떨어진 위치의 염기를 인공적인 미스매치 염기로 치환시킨 것을 특징으로 하는, 프로브를 제공할 수 있다.
- [0039] 여기서 상기 미스매치 염기는 타겟 DNA에 존재하는 돌연변이 염기 위치를 기준으로(0 위치) 하류 쪽으로(검출 타겟 DNA 염기서열의 5' 에서 3' 방향으로) 2번째 떨어진 위치의 염기에 대한 미스매치 염기를 말한다. 보다 구체적으로 타겟 DNA에 존재하는 돌연변이 염기의 위치를 기준 0 위치로 하여 하류 쪽으로 2번째 떨어진 위치의 염기에 대하여 비상보적인(미스매치 염기) 염기를 말한다.
- [0040] 본 발명에서 제공하는 상기 프로브는 타겟 특이적 프로브에 해당되는 것으로, 타겟 DNA와 결합하기 위한 타겟 DNA에 상보적인 염기서열 영역; 및 유니버설 프로브와 결합할 수 있도록 유니버설 프로브 염기서열에 대한 상보적인 염기서열 영역;을 포함하며, 여기서 상기 타겟 DNA에 상보적인 염기서열에는 타겟 DNA에 존재하는 돌연변이 염기를 기준 0 위치로 하여 하류 쪽으로 2번째 떨어진 염기가 미스매치된 염기로 치환되어 있다.
- [0041] 또한, 본 발명의 프로브는 이러한 인공적인 미스매치 염기의 도입으로 FEN1(flap endonuclease 1)의 구조 식별 능력을 향상시킬 수 있다. FEN1은 이중 플랩 구조의 중앙에 위치한 미스매치 갭의 크기에 따라 활성이 변하는 특성을 갖는다.
- [0042] 먼저, DNA 가닥들이 서로 완전히 상보적일 경우를 살펴보자. 이때는 이중 플랩 구조의 중앙에 미스매치 갭이 형성되지 않으며, FEN1은 본래의 활성을 유지하여 5' 플랩을 정확하게 절단한다.
- [0043] 그러나 돌연변이 위치에서 염기 서열이 달라지면 상황이 달라진다. 이 경우 2 염기(nt)의 미스매치 갭이 형성되

어 FEN1의 활성이 저해된다.

- [0044] 여기에 추가로 프로브 서열에 인공적인 미스매치를 삽입하면, 돌연변이 위치의 미스매치와 인공적인 미스매치가 겹쳐져 4 염기의 미스매치 갭이 형성된다. 이는 FEN1의 활성을 더욱 크게 저해하는 결과를 낳는다.
- [0045] 반대로, 돌연변이 위치의 염기 서열이 상보적이라 미스매치가 형성되지 않는 경우에는 인공적인 미스매치가 이중 플랩 구조의 중앙으로부터 4 염기 떨어져 있어 단독으로는 중앙에 미스매치 갭을 형성하지 못한다.
- [0046] 결론적으로, 돌연변이 위치에 미스매치가 형성될 때만 인공적인 미스매치와 중첩되도록 설계함으로써 미스매치 갭의 크기 차이를 더욱 크게 만들었다. 이를 통해 FEN1의 구조 식별 능력을 효과적으로 향상시킬 수 있었다.
- [0047] 본 발명의 프로브를 이용한 검출 타겟 DNA는 낮은 유전자 빈도를 갖는 돌연변이로서 cfDNA(cell free DNA)일 수 있고, 상기 cfDNA(cell free DNA)는 바람직하게는 질병 발병 시 발생하는 핵산 단편일 수 있다.
- [0048] 또한 본 발명은 본 발명의 프로브를 포함하는, NGS(Next Generation Sequencing) 분석을 위한 돌연변이 타겟 DNA 캡처용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0049] 또한 본 발명은 본 발명의 프로브 및 유니버설 프로브를 타겟 DNA와 혼성화시킨 후, FEN1(flap endonuclease 1) 및 HIFI 리게이스를 처리하여 반응시키는 단계를 포함하는, 돌연변이 DNA 특이적 어답터 리게이션(adapter ligation) 방법을 제공할 수 있다.
- [0050] 상기 방법은 돌연변이 위치의 염기에 특이적으로 5' 어답터가 연결되는 특징이 있다.
- [0051] 나아가 본 발명은 본 발명의 프로브 및 유니버설 프로브를 타겟 DNA와 혼성화시킨 후, FEN1(flap endonuclease 1) 및 HIFI 리게이스를 처리하여 어답터 리게이션시킨 다음, 유니버설 프라이머를 이용한 PCR 증폭반응을 수행하는 단계를 포함하는, 돌연변이 타겟 DNA의 풍부화 방법을 제공할 수 있다.
- [0052] 이처럼 본 발명은 기존 핵산 분석 기술들의 문제점인 낮은 민감도 또는 높은 비용으로 인한 낮은 VAF를 가지는 샘플의 분석 어려움을 개선할 수 있으며, FEN1 및 HIFI 리게이스와 2 종류의 프로브를 사용하여 돌연변이 분자에만 특이적으로 어답터를 리게이션할 수 있다. 또한 어답터 리게이션 이후 유니버설 프라이머를 사용하는 PCR 과정을 수행하여 효율적이고 성공적인 돌연변이 풍부화를 이루어냈다.
- [0053] 이러한 본 발명의 방법은 액체생검을 기반으로 하는 질병진단에 유용하게 사용할 수 있을 뿐만 아니라 위양성 위험을 낮춘 돌연변이 검출에도 유용하게 활용할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 이해를 돕기 위해 하기 실시 예를 제시한다. 그러나 이는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시 예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

프로브 디자인

1) 인공적인 미스매치 위치 최적화 실험

인공적인 미스매치 위치를 최적화하고자, 하기 표 1의 4가지 서열의 TS 프로브를 가지고 FEN1을 사용하였을 때 단일 뉴클레오타이드 구별 능력을 분석하였다.

표 1

이름	서열 (5' - 3')	길이 (nt)	서열 번호
TS probe 2	GGCACTCTTGCTACGCCAACAATGCGCGACATTCGGAAG	40	1
TS probe 2(3)	GGCACTCTTGCTACGCCGACAATGCGCGACATTCGGAAG	40	2
TS probe 2(4)	GGCACTCTTGCTACGCTAACAATGCGCGACATTCGGAAG	40	3
TS probe 2(5)	GGCACTCTTGCTACGTCACAATGCGCGACATTCGGAAG	40	4

- [0062] 미스매치 위치는 굵은 빨간색으로 표시하였다.
- [0063] 돌연변이 염기에 대한 상보적인 TS probe의 염기는 굵은 파란색으로 표시하였다.
- [0064] TS 프로브에 인공적인 미스매치를 다양한 위치에 삽입하여, 이들이 형성하는 이중 플랩 구조와 FEN1 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하였다.
- [0065] 각 TS 프로브를 사용하여 형성된 이중 플랩 구조는 도 9에 나타나 있다. TS probe 2는 인공적인 미스매치를 삽입하지 않은 프로브로서, 야생형 타겟 DNA와 구조를 이루면 1 nt의 갭을 형성한다. 반면에 TS probe 2(3), TS probe 2(4), TS probe 2(5)는 돌연변이 위치를 기준 0위치로 하여, 상기 돌연변이 위치로부터 각각 1번째, 2번째, 3번째 서열에 인공적인 미스매치를 추가하였다. 이들 프로브는 야생형 타겟과 결합하여 각각 3, 4, 5 nt의 갭을 형성한다. 일반적으로 미스매치 갭이 형성되면 반응 효율이 저하되는 것으로 알려져 있다.
- [0066] 이러한 TS 프로브들을 활용하여 FEN1의 활성에 어떤 영향을 미치는지 확인하는 실험을 진행하였다. 실험 결과에서 반응물인 잘리지 않은 타겟 DNA는 파란색 박스로 표시하였다. 특히 TS probe 2(4)를 사용한 경우, 다른 프로브들과 비교했을 때 타겟 DNA가 상당량 잘리지 않은 채로 남아 있는 것을 확인할 수 있었다(도 10). 이는 4 nt의 미스매치 갭이 FEN1의 활성을 크게 저해하여 효소가 효과적으로 작용하지 못했기 때문이다.
- [0067] 따라서 돌연변이 위치로부터 하류영역으로 2번째 (검출 타겟 DNA 염기서열의 5' 에서 3' 방향으로) 염기를 최종적인 미스매치 위치로 선정하였다.

[0069] 2) 타겟 특이적 프로브 디자인; TS(target specific) 프로브

[0070] 인공적인 미스매치 위치는 앞선 실험을 통해 최적화하였다. 돌연변이 위치로부터 하류영역으로 2번째 (검출 타겟 DNA 염기서열의 5' 에서 3' 방향으로) 염기에 인공적인 미스매치를 추가하였다. U 프로브(universal probe)와 결합하는 영역은 차후 cfDNA 샘플에 적용하였을 때의 의도치 않은 구조 생성을 억제하기 위해 박테리아 16s rRNA 유전자 서열을 참고하였다. 또한, 람다 엑소뉴클레아제 (Lambda exonuclease) 처리 과정에서 분해될 수 있도록 5' 말단에 인산화 변형을 가하였다. PCR 증폭 과정에서 비특이적 산물 생성을 억제하기 위해 3' 말단에는 디데옥시 뉴클레오타이드 (Dideoxy nucleotide) 변형을 가하였다.

표 2

TS 프로브 서열

이름	서열 (5' - 3')	길이 (nt)	서열 번호
KRAS G12V TS probe	/5Phos/GGCACTCTTGCCTACGCGAAC AATGCGCGACATTCCGAAGAAAA/3ddC/	45	5
EGFR L858R TS probe	/5Phos/CCCAGCAGTTTGGCCG AATGCGCGACATTCCGAAGAAAA/3ddC/	41	6
EGFR T790M TS probe	/5Phos/AGCCGAAGGCATGAGCTCAT AATGCGCGACATTCCGAAGAAAA/3ddC/	46	7
KRAS G12D TS probe	/5Phos/GGCACTCTTGCCTACGCGATC AATGCGCGACATTCCGAAGAAAA/3ddC/	45	8
NRAS Q61K TS probe	/5Phos/ATTGGTCTCTCATGGCACTGTACTCTTCCTT AATGCGCGACATTCCGAAGAAAA/3ddC/	56	9
NRAS A59T TS probe	/5Phos/CATGGCACTGTACTCTTCTTGTCCGTT AATGCGCGACATTCCGAAGAAAA/3ddC/	52	10
PIK3CA E545K TS probe	/5Phos/CCTGTGACTCCATAGAAATCTTCTCCTGTTA AATGCGCGACATTCCGAAGAAAA/3ddC/	58	11

[0071]

[0072] 미스매치 위치는 굵은 빨간색으로 표시하였다.

[0073] 돌연변이 염기에 대한 상보적인 TS probe의 염기는 굵은 파란색으로 표시하였다.

3) 유니버설 프로브 디자인: U(Universal) 프로브

TS 프로브와 결합하는 영역은 차후 cfDNA 샘플에 적용하였을 때의 의도치 않은 구조 생성을 억제하기 위해 박테리아 16s rRNA 유전자 서열을 참고하였다. 템플릿과 열결되는 부분은 NGS 시퀀싱 프라이머 서열을 참고하였고 이후 유니버설 프라이머를 사용한 PCR에 이용될 수 있게 하였으며, 하기 표 2의 서열로 구성되는 유니버설 프로브를 디자인하였다.

표 3

U 프로브 서열

이름	서열 (5' - 3')	길이 (nt)	서열 번호
Universal probe A	AATGATACGGGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCTACACGAAGC TCTTCGATCTGTTCTTCGGAATGTCGCGCATTA	81	12
Universal probe T	AATGATACGGGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCTACACGAAGC TCTTCGATCTGTTCTTCGGAATGTCGCGCATTT	81	13
Universal probe G	AATGATACGGGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCTACACGAAGC TCTTCGATCTGTTCTTCGGAATGTCGCGCATTG	81	14
Universal probe C	AATGATACGGGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCTACACGAAGC TCTTCGATCTGTTCTTCGGAATGTCGCGCATTC	81	15

4) 3' 차단 어답터(blocked adapter) 디자인

기본적인 어답터 서열은 NGS Y 모양 어답터 (Y shape adapter)를 참고하였다. 어답터 리게이션 과정에서 어답터 다이머 생성을 억제하기 위해 한 가닥은 3' 인산화 변형을 가하였고, 반대쪽 가닥은 리게이스를 사용하여 템플릿과 연결될 수 있도록 5' 에는 인산화 변형을 가하였다. 어답터 서열은 하기 표 3에 나타낸 바와 같다.

표 4

어답터 서열

이름	서열 (5' - 3')	길이 (nt)	서열 번호
3' blocked Adapter-a	/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATC ACGATCTCGTATGCGGTCTTCTGCTTG/3ddC/	63	16
3' blocked Adapter-b	GCTCTTCGATCT/3Phos/	13	17

<실시예 2>

반응의 최적조건 확립

1) 버퍼 (Buffer) 테스트

하기 표 5의 2가지 조성의 버퍼에서 FEN1, HIFI 리게이스를 연달아 사용하였을 때 단일 뉴클레오타이드 구별 능력을 분석하였다.

표 5

버퍼 조성

이름	조성
ThermoPol® Buffer (NAD ⁺ 1mM added)	20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mM KCl, 2 mM MgSO ₄ , 0.1% Triton® X-100, pH 8.8 @ 25 °C (+ NAD ⁺ 1 mM added)
HiFi Taq DNA Ligase Buffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 1 mM NAD, 0.1% Triton® X-100, (pH 8.5 @ 25 °C)

[0087]

[0088]

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, HiFi Taq DNA Ligase 버퍼를 사용한 군이 단일 뉴클레오타이드 구별능력이 더 우수한 것으로 나타났다.

[0089]

HiFi Taq DNA Ligase 버퍼는 HiFi Taq DNA ligase의 단일 뉴클레오타이드 구별 능력을 최대화할 수 있는 버퍼이다. 즉 Thermopol 버퍼와 비교했을 때, 이중 효소 작용을 통한 단일 뉴클레오타이드 구별의 두 번째 단계인 HiFi Taq DNA Ligase의 구별 능력이 향상되어 전체적인 구별 능력이 더욱 우수하게 나타났다.

[0090]

따라서 버퍼는 HiFi Taq DNA Ligase 버퍼를 사용하는 것이 적절함을 알 수 있었다.

[0092]

2) 온도 사이클링을 통한 효율 증가 확인

[0093]

본 발명은 다양한 돌연변이 타겟에 적용하는 것을 목적으로 한다. 이를 위해 타겟 DNA의 돌연변이 위치 서열에 영향을 받는 U 프로브의 3' 말단 서열에 다양성을 주었다.

[0094]

그러나 3' 말단에 N (N = A, T, G, C) 서열을 갖는 U 프로브를 사용할 경우, 부적합한 쌍이 구조를 형성하면 반응이 원활하게 진행되지 않을 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 부적합한 구조가 형성되었을 때 온도 사이클링을 적용하여 구조를 재형성할 수 있게 하였다.

[0095]

3' 말단에 N (N = A, T, G, C) 서열을 갖는 U 프로브를 사용할 때 온도 사이클링을 통해 효율을 증가시킬 수 있는지를 확인하기 위해 실험을 진행했다. 그 결과, 한 종류의 U 프로브를 사용한 경우에는 사이클링 없이도 충분한 효율을 보였다. 하지만 3' 말단에 N (N = A, T, G, C) 서열을 갖는 U 프로브를 사용한 경우에는 온도 사이클링을 적용했을 때 효율이 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 4 참조).

[0096]

따라서 다양한 3' 말단 서열을 가진 U 프로브를 사용할 때는 온도 사이클링을 적용하는 것이 효율 향상에 유리함을 알 수 있다.

[0098]

3) 반응 온도 최적화

[0099]

총 3가지의 반응 온도에서(60℃, 64℃, 68℃) 어답터 리게이션의 반응효율 및 뉴클레오타이드 레벨의 특이성을 확인하는 실험을 진행하였다.

[0101]

그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 반응 온도가 낮아질수록 효율은 증가하는 반면 특이성은 낮아지는 것으로 나타났고, 반응온도가 높아질 때에는 효율은 낮아지고 특이성은 높아지는 것을 확인하였다.

[0102]

본 발명의 목적은 저빈도로 존재하는 돌연변이를 민감하게 검출하는 것인 만큼 효율이 특이성보다 우선되어야 한다. 또한 60℃ 반응 조건에서도 야생형과 돌연변이 타겟 DNA를 구별하기에 충분한 특이성이 유지되었다.

[0103]

60℃, 64℃, 68℃의 3가지 반응 온도 중에, 최종적으로 60℃를 반응 온도로 선정하는 것이 가장 적절한 것을 확인하였다.

[0105] 나아가 최종 온도 사이클링 조건, 프로브 농도, 효소 양 또한 최적화를 진행하였으며, 그 결과, 20 μ L 반응 기준, U 프로브 각 300 nM, TS 프로브 200 nM, FEN1 12 U, HIFI 리게이스 0.4 μ L를 최적의 반응 조건으로 선정하였다. 온도 사이클링 조건은 하기 표 5에 나타내었다.

표 6

온도 사이클링 조건

Step	Temperature	Time (mm:ss)	Cycle
Denaturation	95 °C	5:00	30X
Denaturation	95 °C	00:05	
Enzyme work	60 °C	1:00	
	4 °C	∞	

[0108] <실시예 3>

[0109] 최종 성능 확인

[0110] 나아가 본 발명자들은 본 발명에서 디자인한 인공적인 미스매치가 포함된 프로브에 대하여 타겟 돌연변이를 높은 민감도로 검출할 수 있는지에 대한 분석을 수행하였다. 즉, 본 발명의 HTML 기술 성능 평가를 위하여, KRAS G12V 돌연변이를 포함한 단일 가닥 합성 올리고뉴클레오타이드 템플릿으로 사용하였다. 돌연변이 DNA는 다양한 VAF (100%에서 0.1%까지)로 야생형 DNA에 첨가되었으며, 각 VAF에 대해 10^6 개의 템플릿을 사용하였다. 샘플은 FEN1/HIFI Taq DNA 리게이스를 이용한 반응과 PCR 증폭을 포함하는 HTML 과정을 수행하였고, 최종 산물은 Sanger 염기서열 분석을 통해 분석하였으며, 분석은 코스모진텍 (한국)에서 수행하였다.

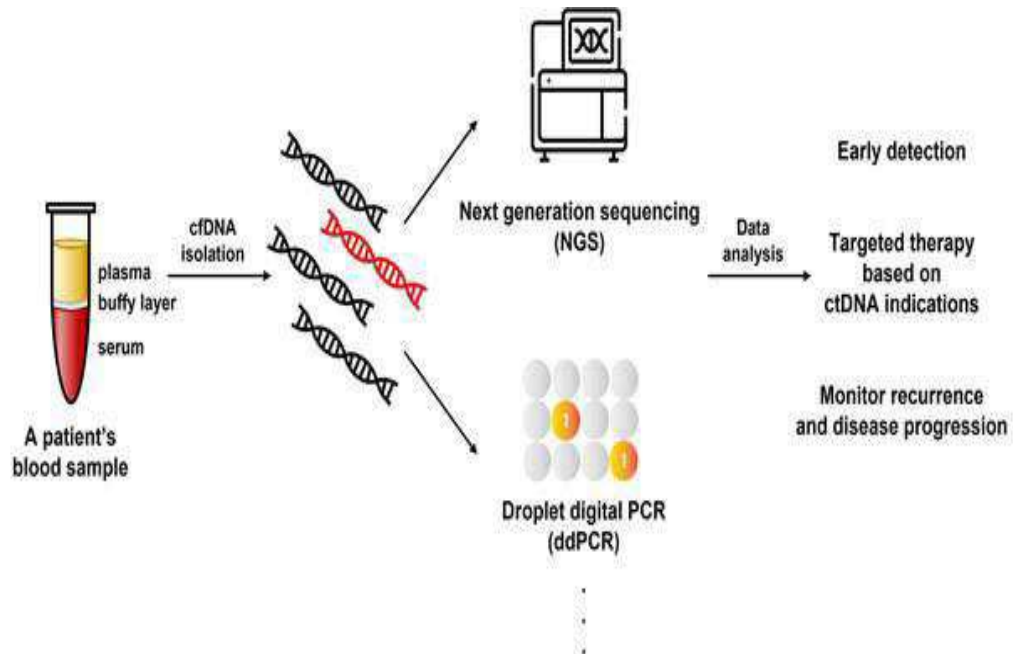
[0112] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 임상 샘플에서의 VAF cut-off로 알려진 0.1%에서도 타겟 돌연변이 염기에 대해 성공적인 증폭 성능을 확인할 수 있었다.

[0113] 이를 통해 본 발명자들은 본 발명에 따른 인공적인 미스매치가 포함된 프로브를 이용할 경우, 돌연변이 특이적 어답터 리게이션을 효과적으로 수행할 수 있어, 검출하고자 하는 돌연변이 타겟을 성공적으로 증폭 및 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

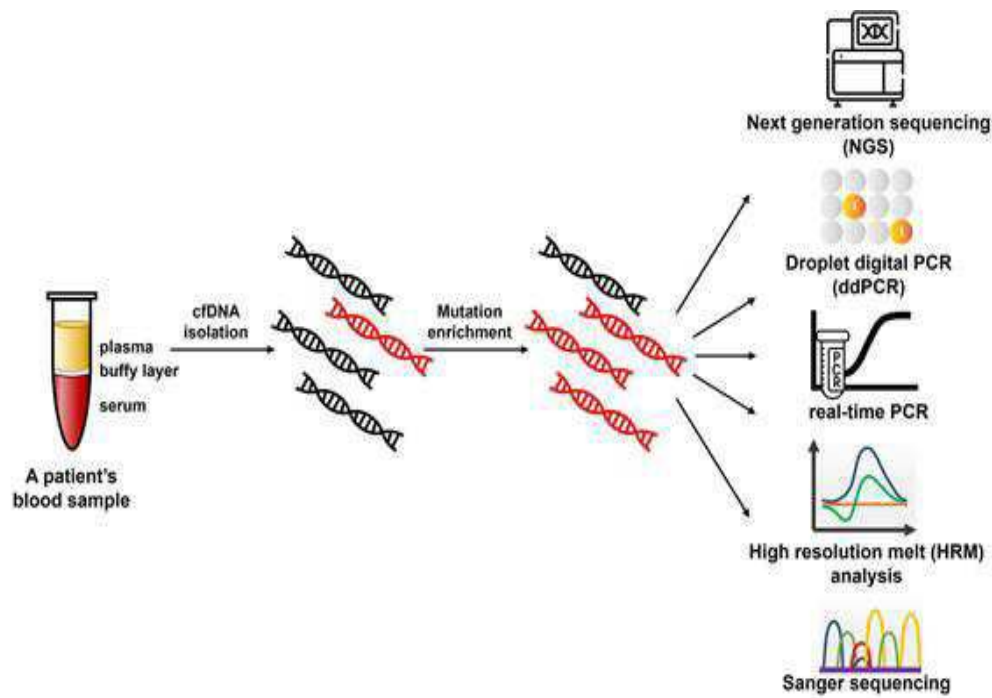
[0115] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1

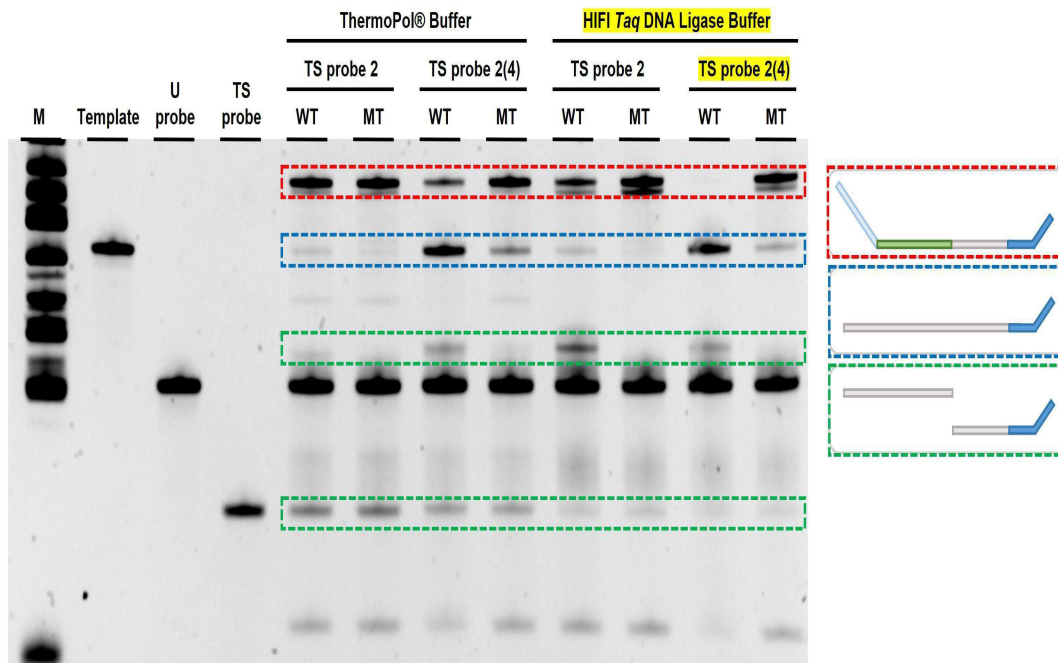


도면2



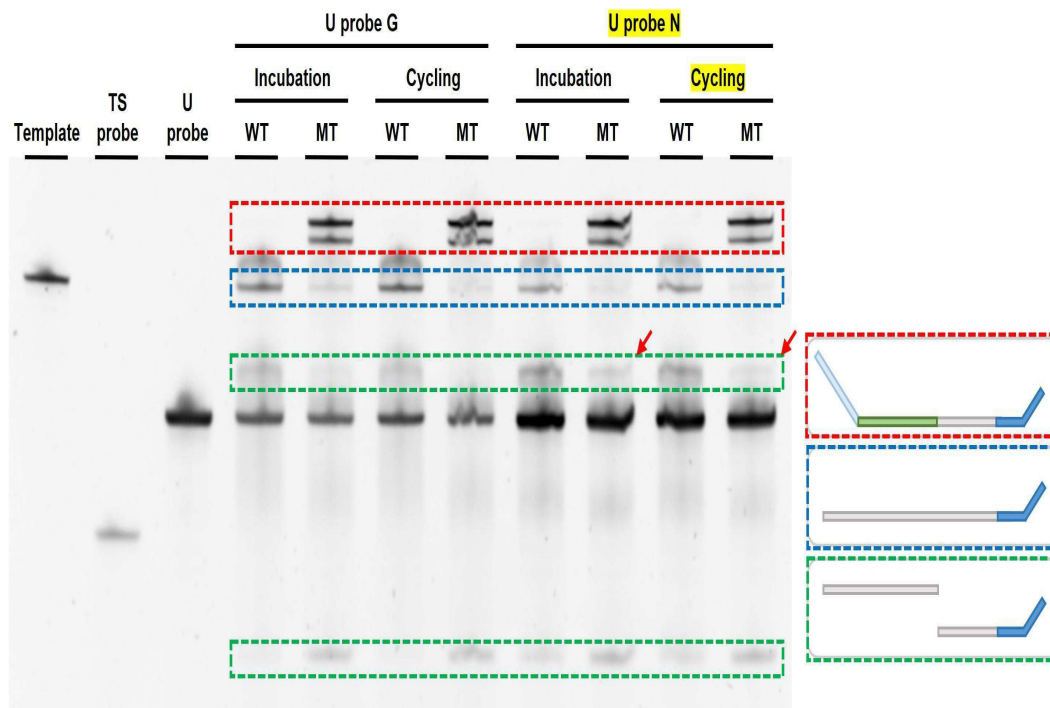
도면3

10% Denaturing PAGE (SYBR gold, 250 V 2 hr)

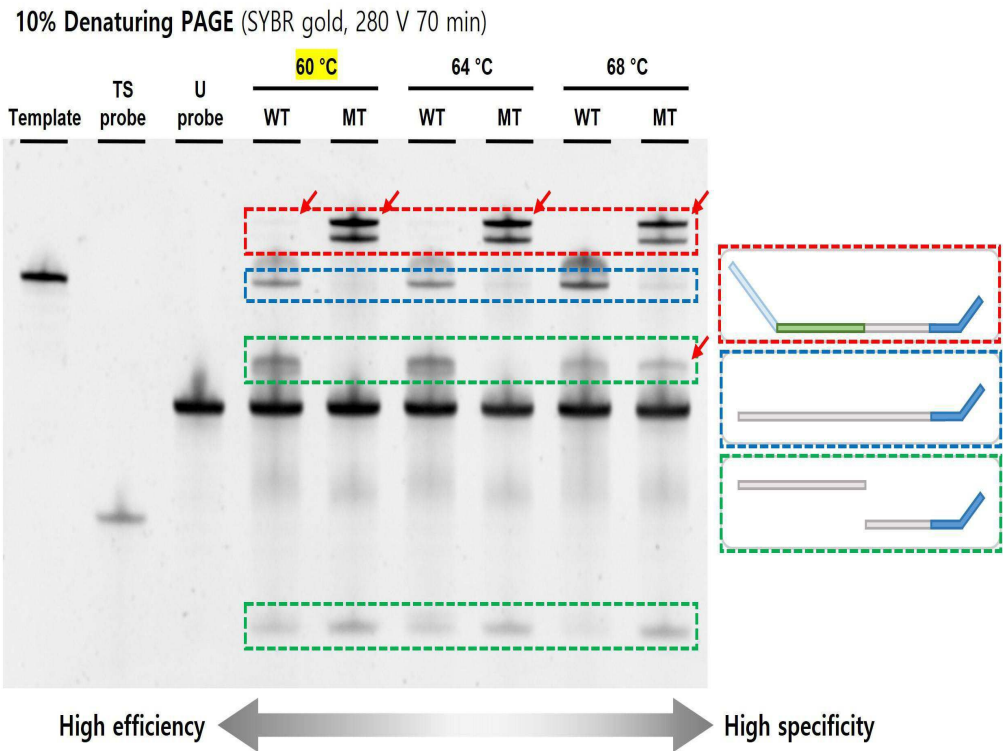


도면4

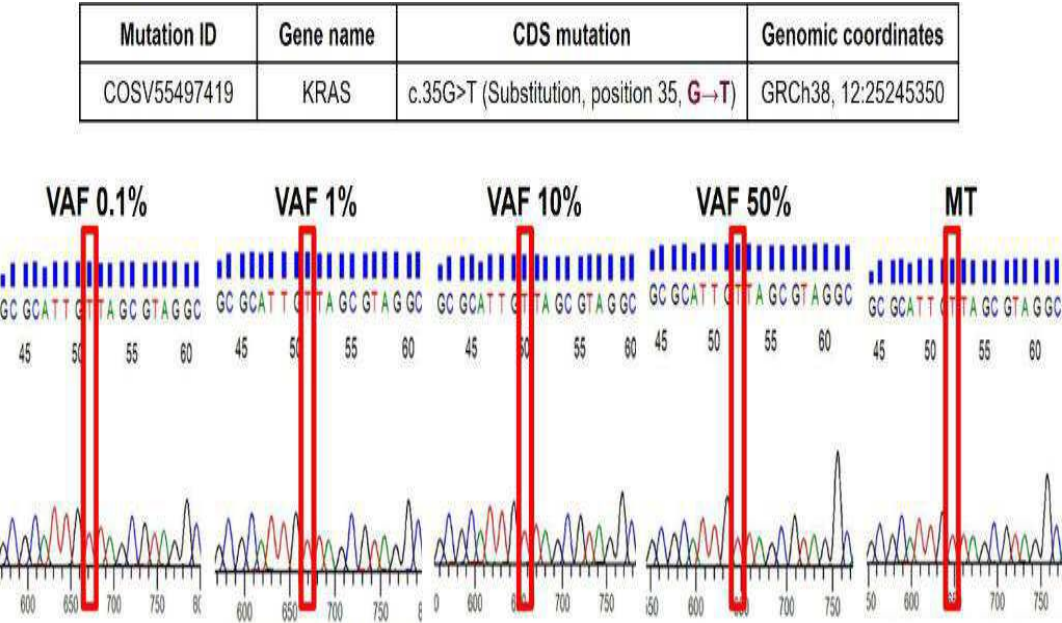
10% Denaturing PAGE (SYBR gold, 280 V 70 min)



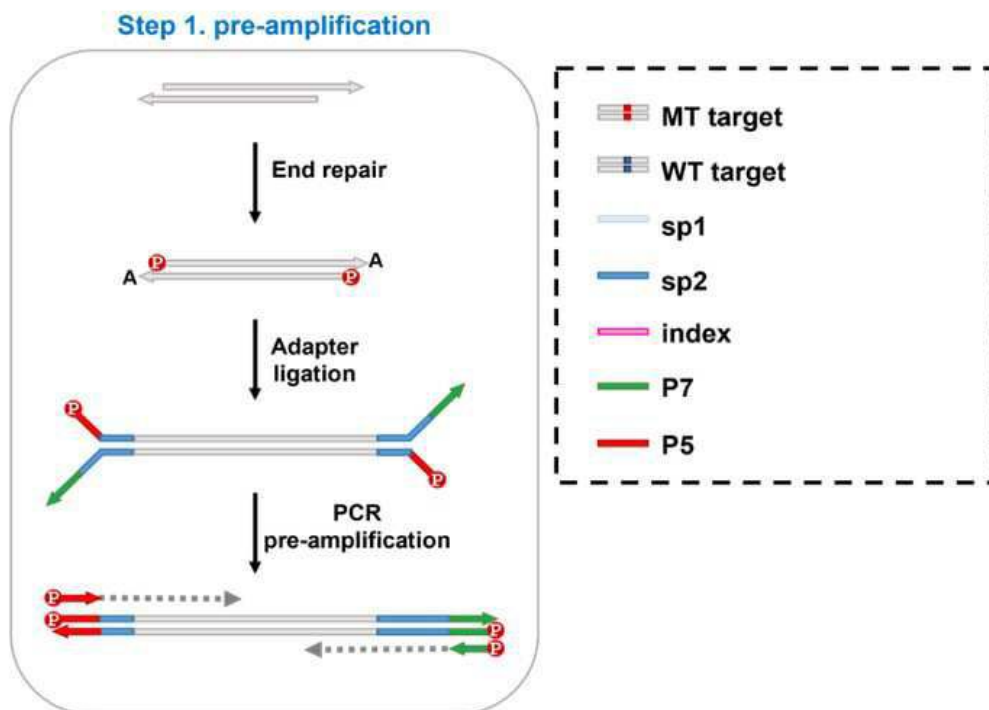
도면5



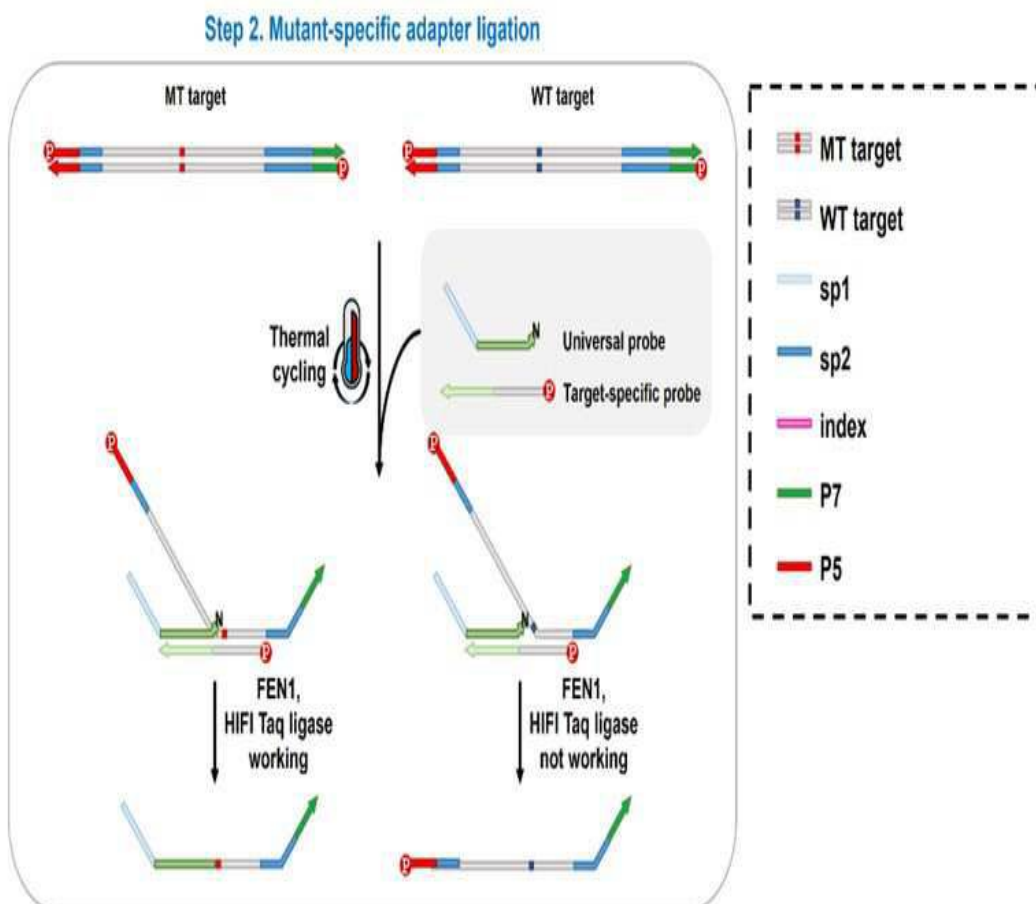
도면6



도면7

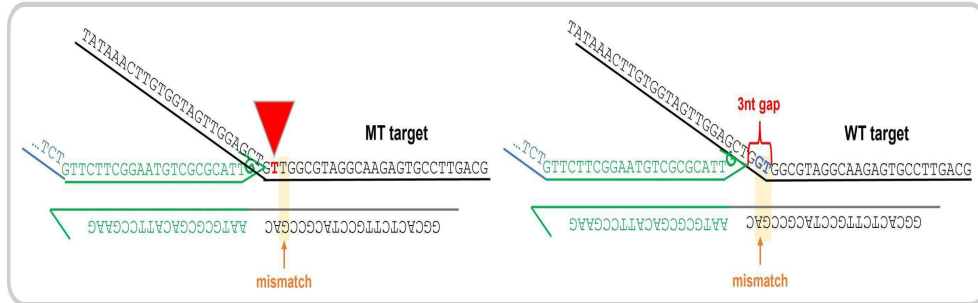


도면8

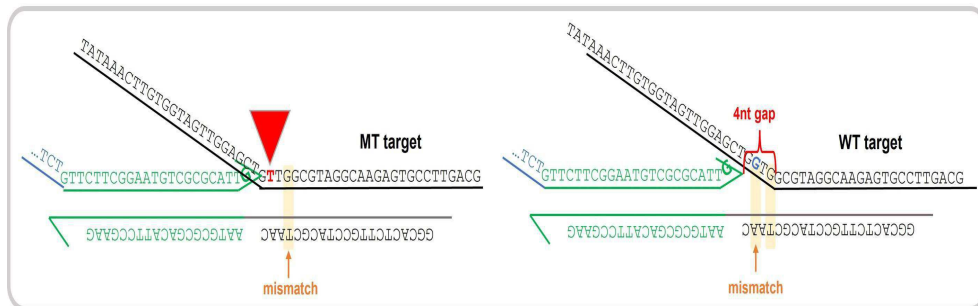


도면9

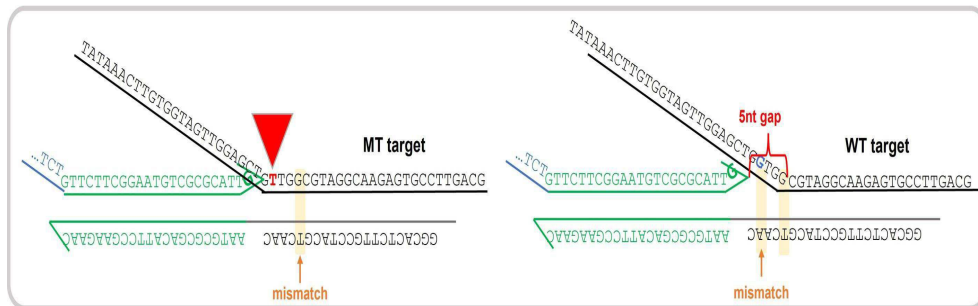
Target-specific probe 2(3)



Target-specific probe 2(4)

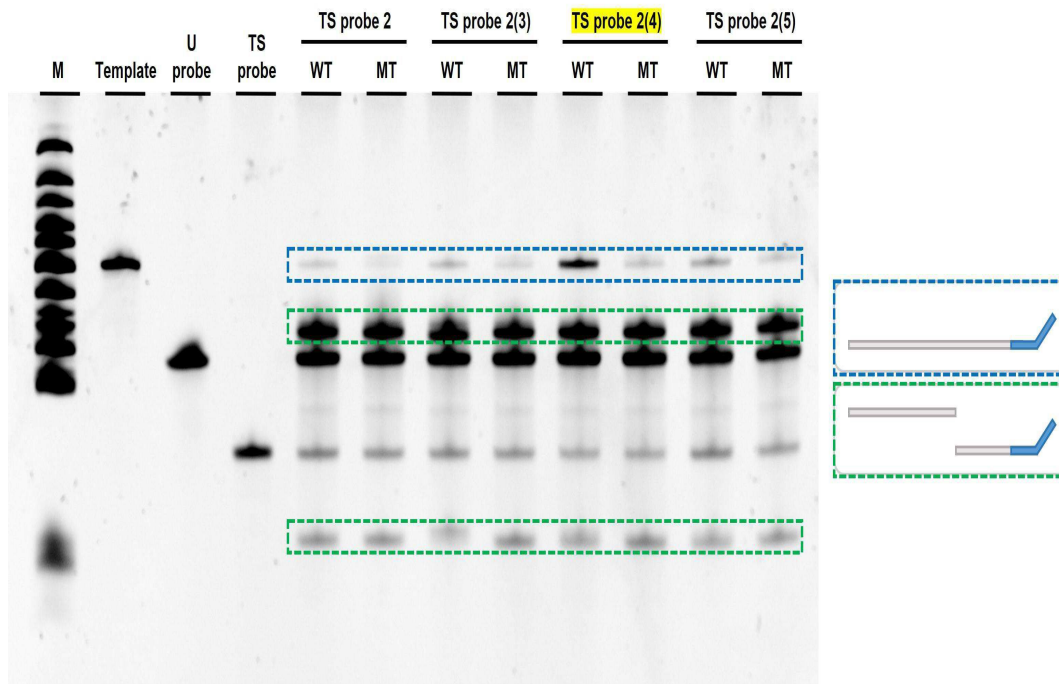


Target-specific probe 2(5)

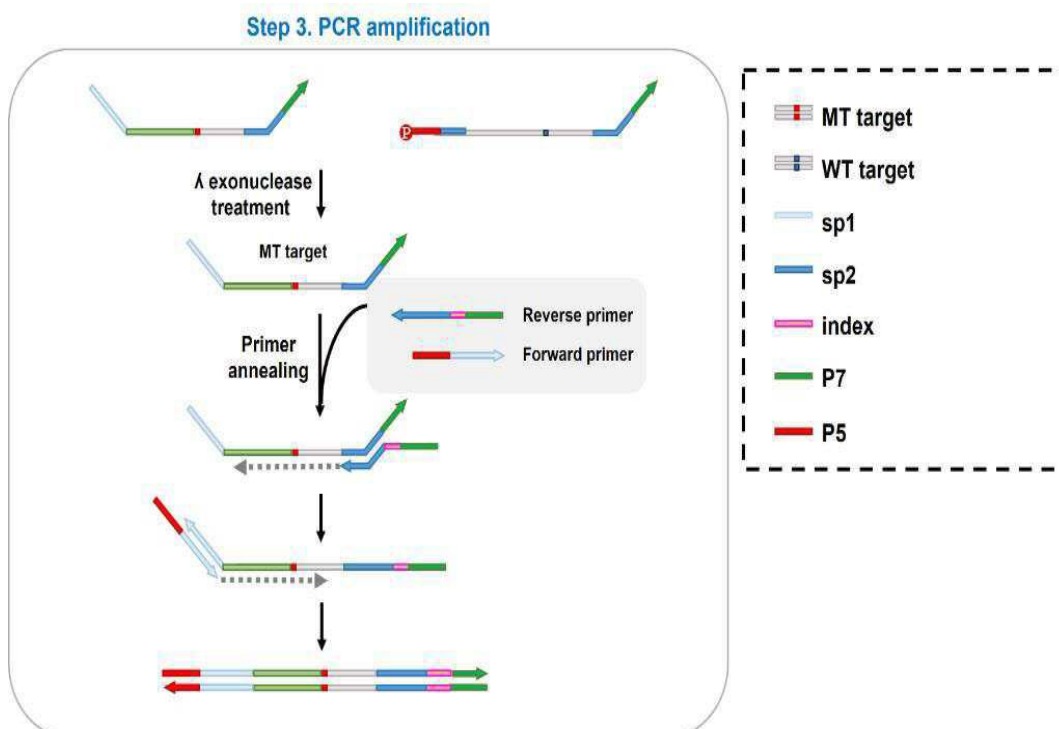


도면10

10% Denaturing PAGE (SYBR gold, 250 V 2 hr)



도면11



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.