(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월23일
(11) 등록번호 10-2159008
(24) 등록일자 2020년09월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6855 (2018.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6855 (2018.05)
C12N 15/1093 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0129979
(22) 출원일자 2019년10월18일
심사청구일자 2019년10월18일
(56) 선행기술조사문헌
US20120083017 A1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정철희
서울특별시 성북구 돌곶이로8길 22, 107동 1001호 (석관동, 래미안아트리치)
김서영
인천광역시 서구 승학로197번길 20-4, B동 201호 (심곡동, 선영홈타운)
신준이
서울특별시 강북구 솔샘로 159, 102동 701호 (미아동, 벽산라이브파크)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

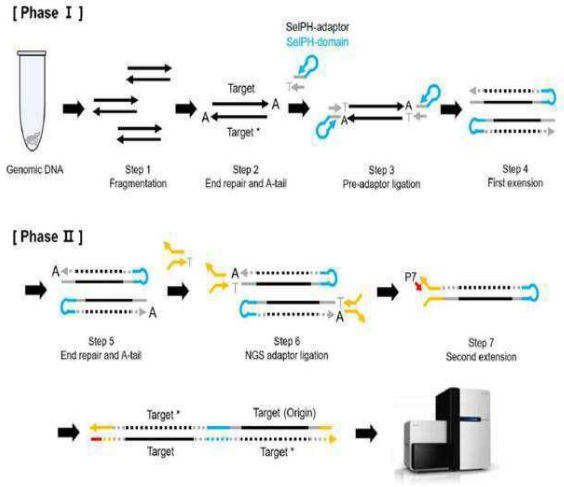
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **자가 증폭이 가능한 헤어핀 구조의 NGS 라이브러리 제작용 어댑터 및 이를 이용한 NGS 라이브러리 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 자가 증폭이 가능한 헤어핀 구조의 NGS 라이브러리 제작용 어댑터 및 이를 이용한 NGS 라이브러리 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고 헤어핀 구조를 갖는 긴 단일 가닥의 제1 올리고뉴클레오티드; 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 짧은 단일 가닥의 제2 올리고뉴클레오티드;를 포함하는, 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터, 상기 어댑터를 이용한 NGS 라이브러리 제작방법 및 상기 어댑터를 포함하는 NGS 라이브러리 제조용 키트에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2018.05)
C12Q 2525/191 (2013.01)
C12Q 2525/301 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
WO2017202389 A1
JP2018530536 A
JP2019526267 A
Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, No. 5 2169-2176

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019022307
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구자지원-신진연구
연구과제명	암세포로부터 유래된 이질성 미량 핵산의 자가 증폭 기반 초정밀 진단 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 4의 염기서열로 이루어지고 헤어핀 구조를 갖는 긴 단일 가닥의 제1 올리고뉴클레오티드; 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 짧은 단일 가닥의 제2 올리고뉴클레오티드;를 포함하는,

자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 올리고뉴클레오티드는 중합효소가 결합할 수 있고, 연장반응(extension) 중에도 헤어핀 구조가 유지되는 것을 특징으로 하는, 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제2 올리고뉴클레오티드는 상기 제1 올리고뉴클레오티드의 3' 말단과 라이게이션 되지 않도록 서열번호 5로 이루어진 염기서열의 5' 말단이 인산화 되어 있지 않은 것을 특징으로 하는, 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터.

청구항 4

(1) 분석 대상 게놈 DNA를 절편화(fragmentation)화는 단계;

(2) 절편화된 분석 대상 게놈 DNA의 말단에 제1항의 어댑터를 라이게이션하는 단계;

(3) 상기 (2) 단계에서 제1항의 어댑터를 라이게이션 한 반응액에 중합효소를 첨가하고 연장 반응을 수행하여 1차 반응산물을 수득하는 단계;

(4) 상기 1차 반응산물에 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션하는 단계;

(5) 상기 (4) 단계에서 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션 한 반응액에 중합효소를 첨가하고 연장 반응을 수행하여 2차 반응산물을 수득하는 단계; 및

(6) 상기 2차 반응산물을 정제하는 단계를 포함하는,

NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 (2) 단계에서 절편화된 분석 대상 게놈 DNA 및 제1항의 어댑터는 상기 분석 대상 게놈 DNA 대 제1항의 어댑터를 1:15~1:25의 몰비로 혼합하여 사용하는 것을 특징으로 하는, NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 (2) 단계에서 제1항의 어댑터를 라이게이션 하기 전 및 상기 (4) 단계에서 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션 하기 전에, DNA의 말단 수선(end repair) 후 3' 말단에 아데노신을 접합(A-tail)하는 단계를 추가로 더

포함하는 것을 특징으로 하는, NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 (4) 단계의 1차 반응산물은 제1항의 어댑터 염기서열을 포함하여 연장 반응된 헤어핀 구조를 갖는 증폭산물인 것을 특징으로 하는, NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 (5) 단계에서 상기 2차 반응산물은 연장 반응으로 증폭되어 선형의 이중 DNA(duplex DNA) 형태인 것을 특징으로 하는, NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작방법.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 (3) 단계의 연장 반응 및 (5) 단계의 연장 반응은 각각 1회씩 수행하는 것을 특징으로 하는, NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작방법.

청구항 10

제1항의 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터를 포함하는, DNA 라이브러리 제조용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자가 증폭이 가능한 헤어핀 구조의 NGS 라이브러리 제작용 어댑터 및 이를 이용한 NGS 라이브러리 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 차세대 염기서열 분석법(NGS:Next-generation sequencing)은 대규모 병렬형 염기서열 분석 기술로 유전체의 염기서열을 고속으로 분석하는 기술을 통칭한다. 이러한 NGS 기술은 암의 치료 및 연구부터 산전진단, 약물내성, 전염병 및 법의학 등 여러 분야에서 응용되고 있다.

[0003] 한편, NGS의 기술적 진보에도 불구하고 분석 시 발생하는 오류율은 0.1~1%로 상당히 높은 수치이다. 오류의 원인 중 큰 부분을 차지하는 것은 시료 준비 과정인데, 그 중에서도 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction: PCR)이다. DNA Polymerase의 본질적인 돌연변이 오류율과 주형 DNA의 어느 특정부분만 편향적으로 증폭하는 경향에 의해 올바른 분석이 되지 않기도 한다. 또한, PCR의 첫번째 증폭 단계에서 초기 주형 DNA의 증폭 오류로 인한 Jackpot 에러 발생 시에는 오류 교정 자체를 할 수 없다. 이외에도 PCR misincorporation, Chimeric PCR products, Template switching 및 Hairpin 구조 형성의 결과로도 시료 준비 과정에서 상당한 오류가 발생할 수 있는 문제점이 있다.

[0004] 또한 이질성을 보이는 시료의 경우, 예컨대 종양의 이질성은 각 종양 세포마다 같은 유전자 내에 다른 돌연변이를 가지고 있을 수 있어, 실제 NGS로 분석을 했을 때 관찰되는 돌연변이가 NGS 자체의 오류에 의한 것인지 실제 돌연변이에 의한 것인지 구별하기 어려운 문제가 있다. 뿐만 아니라 다수의 체성 돌연변이의 경우는 그 양이 적거나 극히 낮은 빈도로 나타내는 특성을 갖기 때문에 이들을 완벽하게 식별하는 것이 어렵다.

[0005] 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위한 기술들이 개발되고 있는데, 최근 몇 년 동안 바코드 기반 혹은 UMI(Unique molecular identifier) 기반의 오류 수정(error correction) 전략이 개발되었는데, 이 전략은 DNA 조각에 길이가 8~14bp 정도의 임의의 염기서열로 이루어진 바코드를 부착하는 방법으로 어댑터를 통해 직접 부착하거나 프라이머를 통해 PCR 하여 DNA 조각에 적용시킨 후, 개별 파편들을 추적하여 시퀀싱하는 방법이다. 그러나 이러한 방법은 시료 당 요구되는 시퀀싱 양을 상당히 증가시키며 증폭과정을 필요로 하기 때문에 편향적인

증폭이나 잡음 발생의 문제가 여전히 발생할 수 있다.

[0006] 다른 방법으로는 Duplex-Sequencing(DupSeq) 방법이 있는데, 원본 DNA 조각에서 이중 가닥 각각의 말단에 서로 다른 UMI를 부착하여 독립적으로 시퀀싱하는 방법으로 오류를 줄이는 기술이다. 두 가닥이 서로 상보적이기 때문에 진정한 변이는 Read Family 내에서 두 가닥의 같은 위치에서 발견되며, 만일 둘 중 한가닥에서는 검출되지만 다른 가닥에서는 검출되지 않는다면 이것은 손상된 DNA 이거나 PCR 또는 시퀀싱 오류라고 판단할 수 있다. 그러나 이 방법은 보통의 NGS 방법과 비교하여 샘플 당 필요한 리드(read)수가 100배 정도 증가하여 많은 비용이 들고 바코드의 존재로 PCR 증폭편향 및 워크플로워(workflow)의 복잡성이 증가한다는 문제점이 있다.

[0007] 또 다른 방법으로는 Circle-Sequencing(Circle-Seq) 방법이 있는데, RCA(rolling circle amplification)처럼 매우 짧은 단일 가닥 DNA를 원형 DNA화하여 원형의 상태로 증폭하여 원본조각과 동일한 여러 개의 증폭물을 선형(linear)으로 만들어 내는 방법으로, 이 방법은 복제율을 균일하게 유지할 수 있어 비용 측면에서 효율이 좋다. 그러나 RCA는 길이의 제한이 있고 심각한 편향적인 증폭을 유발하며 희귀변이(rare variants) 검출에는 한계가 있다.

[0008] 최근에는 O2n-Seq 방법이 개발되어 사용되고 있는데, O2n-Seq 방법은 바코드와 RCA 방법의 장점을 합쳐 보완된 기술로서, O2n-Seq 의 라이브러리는 하나의 원본 조각에 copies가 한 쌍의 paired end 형태로 존재하여 하나의 리드 패밀리(read family)를 형성하므로 시퀀싱 에러를 줄이는 기술이다. 그러나 O2n-Seq 방법은 circular DNA를 만드는 효율이 낮고 circular DNA를 만들기 위해 분석하고자 하는 DNA 조각의 길이에 제한이 있어 긴 단편에는 적용하기 어려운 문제점이 있을 뿐만 아니라 nick 부위는 불완전한 절단의 결과로 인공산물을 생성할 수 있는 문제점이 있으며 단일가닥 DNA의 생화학적인 손상을 만들 수 있기 때문에 end-repair 및 A-tail 과정에서 폴리머라제의 수행효율이 떨어지게 되고 이는 어댑터가 제대로 부착하지 못하는 요인으로 작용하여 라이브러리 구축의 문제로도 이어질 수 있다. 또한 우라실(uracil) 염기를 제거할 때 사용되는 user enzyme의 uracil-DNA glycoslase(UDG)는 염기를 방출시키는 역할을 하는데 이때 증폭에 반하는 abasic 부위가 생성될 수 있는 등의 문제점이 있다.

[0009] 그러므로 이러한 차세대염기서열분석 방법에서 발생할 수 있는 문제점을 개선 및 해결할 수 있는 새로운 분석방법의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-1651817

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에 본 발명자들은 차세대염기서열분석에서 DNA 증폭과정에서 발생하는 오류를 최소화할 수 있는 방법을 연구한 결과, 헤어핀 구조를 가지며 자가 증폭, 즉 셀프-프라이밍과 리플리케이팅(self-priming and replicating)이 가능한 어댑터(SelPH:Self-priming and replicating hairpin adaptor)를 제조하였고, 원본 핵산 시료에 상기 본 발명의 어댑터(SelPH-adaptor)를 부착하여 1번 증폭 후 염기서열분석법으로 라이브러리 제작이 가능함을 확인하였으며, 이때 원본 핵산 시료를 구성하던 단일 가닥들 각각은 최종적으로 이중 (Duplicate)의 형태의 DNA로 만들어진다는 것을 확인하였다. 또한 본 발명의 자가 증폭이 가능한 어댑터를 사용할 경우, 1번씩 총 2회만의 증폭만 진행하면 되기에 기존 수차례의 증폭과정으로 야기되는 문제점인 jackpot 에러나 편향적인 증폭에 따른 오류를 최소화할 수 있고, DNA 조각의 길이 제한이 없으며 원형 DNA를 만드는 셀프-라이게이션 과정 없이도 한 쌍의 Paired end를 만들 수 있어 워크플로우(workflow)가 단순하고 효율적일 뿐만 아니라 Nick 및 user enzyme의 사용이 없어 핵산시료의 손상으로 인해 발생할 수 있는 오류 및 인공산물을 염려할 필요가 없는 바, 기존 방법의 라이브러리 제작보다 오류율을 줄일 수 있고, 효율을 높일 수 있으며 낮은 빈도로 존재하는 돌연변이 서열을 보다 정확하게 검출할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터를 이용한 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터를 포함하는 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제조용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 그러므로 본 발명은 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고 헤어핀 구조를 갖는 긴 단일 가닥의 제1 올리고뉴클레오티드; 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 짧은 단일 가닥의 제2 올리고뉴클레오티드;를 포함하는, 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터를 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 제1 올리고뉴클레오티드는 중합효소가 결합할 수 있고, 연장반응(extension) 중에도 헤어핀 구조가 유지될 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 제2 올리고뉴클레오티드는 상기 제1 올리고뉴클레오티드의 3' 말단과 라이게이션 되지 않도록 서열번호 5로 이루어진 염기서열의 5' 말단이 인산화 되어 있지 않은 것일 수 있다.

[0018] 또한 본 발명은, (1) 분석 대상 게놈 DNA를 절편화(fragmentation)화는 단계; (2) 절편화된 분석 대상 게놈 DNA의 말단에 본 발명의 어댑터를 라이게이션하는 단계; (3) 상기 (2) 단계에서 본 발명의 어댑터를 라이게이션 한 반응액에 중합효소를 첨가하고 연장 반응을 수행하여 1차 반응산물을 수득하는 단계; (4) 상기 1차 반응산물에 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션하는 단계; (5) 상기 (4) 단계에서 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션 한 반응액에 중합효소를 첨가하고 연장 반응을 수행하여 2차 반응산물을 수득하는 단계; 및 (6) 상기 2차 반응산물을 정제하는 단계를 포함하는, NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (2) 단계에서 절편화된 분석 대상 게놈 DNA 및 제1항의 어댑터는 상기 분석 대상 게놈 DNA 대 제1항의 어댑터를 1:15~1:25의 몰비로 혼합하여 사용하는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (2) 단계에서 제1항의 어댑터를 라이게이션 하기 전 및 상기 (4) 단계에서 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션 하기 전에, DNA의 말단 수선(end repair) 후 3' 말단에 아데노신을 접합(A-tail)하는 단계를 추가로 더 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (4) 단계의 1차 반응산물은 제1항의 어댑터 염기서열을 포함하여 연장 반응된 헤어핀 구조를 갖는 증폭산물일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (5) 단계에서 상기 2차 반응산물은 연장 반응으로 증폭되어 선형의 이중 DNA(duplex DNA) 형태일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (3) 단계의 연장 반응 및 (5) 단계의 연장 반응은 각각 1회씩 수행하는 것일 수 있다.

[0024] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터를 포함하는, DNA 라이브러리 제조용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 자가 증폭이 가능한 헤어핀 구조를 갖는 NGS 라이브러리 제조용 어댑터는 증폭반응의 횟수를 최소화할 수 있어 기존 수차례의 증폭과정으로 야기되는 jackpot 에러나 편향적인 증폭에 따른 오류를 최소화할 수 있고, DNA 조각의 길이 제한이 없으며 워크플로우(workflow)가 단순하고 효율적일 뿐만 아니라, 별도의 Nick 및 user enzyme의 사용이 없어 핵산시료의 손상으로 인해 발생할 수 있는 오류 및 인공산물을 염려할 필요가 없다. 따라서 본 발명의 자가 증폭이 가능한 어댑터를 사용하여 NGS용 라이브러리를 제조할 경우, 기존 방법의 라이브러리 제작보다 오류율을 줄이면서 효율을 높일 수 있고, 낮은 빈도로 존재하는 돌연변이 서열도 보다 정확하게 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명에 따른 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 어댑터를 이용한 차세대염기서열분석 방법인 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 시퀀싱(SelPH-seq) 분석과정을 모식도로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 어댑터(2a)를 나타낸 것이고, 본 발명의 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 어댑터를 이용한 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅을 확인한 결과를 나타낸 것이다(2b).

도3은 본 발명의 일실시예에서 EGFR 유전자의 엑손 21번째로부터 추출한 91bp 크기를 갖는 인공 인서트 DNA를 PAGE로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에서 BRCA1 유전자의 1041 position을 타겟으로 285bp 크기를 는 인공 인서트 DNA를 수득하기 위해 어닐링 온도 차이에 따른 PCR 산물을 PAGE로 확인한 결과로서, 레인1: 54℃, 레인2: 57℃, 레인3은 60℃에서 수행한 PCR 산물을 나타낸 것이다.

도 5는 285bp 인서트 DNA 제작 과정 및 PAGE 결과를 나타낸 것으로, 5a는 네스티드 PCR 산물(PAGE)이고, 5b는 네스티드 PCR 산물에 대한 1.5% 아가로스 겔 전기영동 사진이며, 5c는 겔 추출 산물에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 91bp 인서트 DNA를 대상으로 다양한 라이게이션 시약들을 이용한 라이게이션 산물에 대한 PAGE 결과로서, 6a에서 레인1: NEXTFlex Rapid DNA Sequencing Bundle(Bioo Scientific), 레인2: KAPA HyperPlus 키트(KAPA Biosystems), 레인3: Illumina용 NEBNext Ultra II FS DNA library Prep Kit(NEB), 레인4: 블런트/TA Ligase Master Mix(NEB), M2: 50bp DNA ladder를 나타낸 것이고, 6b는 SelPH-adaptor 라이게이션 산물 생성에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

도 7은 91bp 및 285bp의 인서트 DNA를 대상으로 라이게이션 시간에 따른 라이게이션 산물의 결과를 PAGE로 나타낸 것으로, 7a의 레인1: 60분간 라이게이션 한 91bp 인서트 DNA, 레인2: 18시간 라이게이션 한 91bp 인서트 DNA이며, 7b의 레인1: 285bp의 인서트 DNA, 레인2: 1시간 라이게이션 한 285bp의 인서트 DNA를 나타낸 것이다.

도 8은 DNA 폴리머라제에 따른 91bp 인서트 DNA의 연장반응 산물을 나타낸 것으로, 8a에서 레인1: SelPH-어댑터 라이게이션 산물, 레인2: Q5 DNA 폴리머라제 어닐링 온도 78℃에서 수행한 산물, 레인3: Q5 DNA 폴리머라제 어닐링 온도 65℃에서 수행한 산물, 레인4: Phi29 DNA 폴리머라제, 레인5: Bst 2.0 DNA 폴리머라제, M2: 50bp DNA ladder를 나타낸 것이고, 8b는 1차 연장반응의 결과를 모식도로 나타낸 것이다.

도 9는 91bp 인서트 DNA를 대상으로 본 발명의 SelPH-어댑터를 이용하여 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 시퀀싱(SelPH-seq)의 전과정을 수행한 산물을 나타낸 것으로, 레인1: SelPH-어댑터와 91bp 인서트 DNA, 레인2: SelPH-어댑터 라이게이션 산물, 레인3: 1차 연장반응산물, 레인4: NGS 어댑터 라이게이션 산물, 레인5: 2차 연장반응산물을 나타낸 것이다.

도 10은 285bp 인서트 DNA를 대상으로 본 발명의 SelPH-어댑터를 이용하여 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 시퀀싱(SelPH-seq)의 전과정을 수행한 산물을 나타낸 것으로, 레인1: 285bp 인서트 DNA, 레인2: SelPH-어댑터 라이게이션 산물, 레인3: 1차 연장반응산물, 레인4: NGS 어댑터 라이게이션 산물, 레인5: 2차 연장반응산물을 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명에 따른 SelPH-어댑터를 이용하여 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 시퀀싱(SelPH-seq) 과정에서 이차 라이게이션 반응 과정 및 생성 산물에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

도 12는 효모 게놈(yeast genome)을 대상으로 본 발명의 SelPH-어댑터를 이용하여 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 시퀀싱(SelPH-seq) 분석 산물에 대한 PAGE 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 차세대염기서열분석(NGS; Next generation sequencing) 과정에서 증폭과정에 의해 발생하는 오류를 최소화할 수 있고 최소한의 증폭만으로도 정확도가 높은 차세대염기서열 분석용 라이브러리를 제조할 수 있는 새로운 어댑터를 개발한 점에 특징이 있다.

[0028] 차세대염기서열분석 기술은 기존의 방법과 달리 대용량의 데이터를 빠른 시간에 생산할 수 있어, 유전체 해독에 필요한 시간과 비용을 획기적으로 절감시킨 기술이다. 차세대염기서열분석 기술은 시간이 지남에 따라 시퀀싱 플랫폼의 기술이 발전하고 분석 가격은 저렴해 지고 있으며, 유전질환, 희귀질환, 암 등을 차세대염기서열분석

기술을 이용하여 질병의 원인 유전자를 찾는데 성공하고 있다. 현재 가장 많이 이용되고 있는 일루미나(illumina)사의 차세대염기서열분석법은 검체로부터 DNA를 추출한 후, 기계적으로 절편화(fragmentation)한 후, 특정 크기를 갖는 라이브러리를 제작하여 시퀀싱에 사용한다. 대용량 시퀀싱 장비를 사용하여 한 개의 염기단위로 4가지 종류의 상보적 뉴클레오티드 결합 및 분리 반응을 반복하면서 최기 시퀀싱 데이터를 생산하게 되고, 이후 초기 데이터의 가공(trimming), 매핑(mapping), 유전체 변이의 동정 및 변이 정보의 해석 등 생물정보학을 이용한 분석 단계를 수행하여 이루어진다.

[0029] 이러한 차세대염기서열분석법은 질병 및 다양한 생물학적 형태에 영향을 미치거나 가능성이 높은 유전체 변이를 발굴하여 새로운 질병 치료제의 개발을 통한 새로운 부가가치의 창출에도 기여하고 있다.

[0030] 한편, 앞서 종래기술에서도 언급한 바와 같이, 차세대염기서열분석법에서 라이브러리의 제작은 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction: PCR)을 통한 라이브러리의 시료 준비 과정이 매우 중요한데, 이 과정에서 현재 개발된 기술들은 높은 오류율을 보이고 있다는 문제점이 있다.

[0031] 또한 일반적인 라이브러리의 제작은 시료의 무작위적인 DNA 또는 cDNA 조각에서 5’ 에서 3’ 방향의 어댑터를 접합(ligation)하여 서열 분석에 필요한 라이브러리를 준비하는데, 이 과정에서 편향적인 증폭이나 잡음 발생의 문제가 있고, 많은 비용이 들 뿐만 아니라 바코드 사용 시, 바코드의 존재로 PCR 증폭편향 및 워크플로워(workflow)의 복잡성이 증가하는 문제점이 있고, 희귀변이의 검출이 어렵다는 등 많은 문제점이 존재한다.

[0032] 이에 본 발명에서는 증폭반응에 따른 오류를 최소화할 수 있고, 최소한의 증폭반응만으로도 정확도가 높으며, DNA 절편(조각)의 길이 제한이 없고, DNA 손상 염려도 없으며 낮은 빈도의 돌연변이 서열도 정확하게 검출할 수 있는 NGS 라이브러리를 제조용 어댑터를 개발하였다.

[0033] 따라서 본 발명은, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고 헤어핀 구조를 갖는 긴 단일 가닥의 제1 올리고뉴클레오티드; 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 짧은 단일 가닥의 제2 올리고뉴클레오티드;를 포함하는, 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터를 제공한다는 점에 특징이 있다.

[0034] 상기 본 발명의 어댑터는 긴 단일 가닥의 제1 올리고뉴클레오티드 및 짧은 단일 가닥의 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하고 있으며, 여기서 상기 제1 올리고뉴클레오티드는 중합효소가 결합할 수 있고, 연장반응(extension) 중에도 헤어핀 구조가 유지될 수 있는 특징이 있는데, 이는 상기 제1 올리고뉴클레오티드가 SelPH-도메인(self-priming and replicating hairpin-domain), 즉 자가 증폭 염기서열을 포함하고 있기 때문이다. 상기 본 발명에 따른 SelPH-도메인에 해당하는 염기서열은 서열번호 4의 염기서열에서 17번째 염기서열부터 28번째의 염기서열(GCGA CGAC ATCT) 및 33번째 염기서열부터 44번째의 염기서열(AGAT GTCG TCGC)에 해당한다. 상기 SelPH-도메인의 염기서열은 서열번호 4의 17번째 염기서열부터 28번째의 염기서열과 33번째 염기부터 44번째의 염기서열이 서로 상보적인 염기서열로 이루어져 있다.

[0035] 또한 상기 제1 올리고뉴클레오티드의 5’ 말단은 인산화되어 있다.

[0036] 상기 제2 올리고뉴클레오티드는 상기 제1 올리고뉴클레오티드의 3’ 말단과 라이게이션 되지 않도록 5’ 말단이 인산화 되어 있지 않으며, 구체적으로 서열번호 5의 염기서열로 이루어져 있다.

[0037] 본 발명에 따른 상기 NGS 라이브러리 제작용 어댑터는 자가 증폭, 즉, 셀프-프라이밍 및 리플리케이팅(self-priming and replicating)이 가능하며 헤어핀 구조를 갖는 특성이 있는데, 여기서 상기 자가 증폭(self-priming and replicating)이란, 중합효소가 상기 본 발명의 어댑터 염기서열에 결합하면, 중합효소에 의해 상기 어댑터의 염기서열이 증폭되어지는 것을 의미한다. 즉, 본 발명의 NGS 라이브러리 제작용 어댑터는 상보적인 염기서열로 헤어핀 구조를 이루고 있으며, 상기 중합효소가 어댑터에 결합 후 상보적 염기서열에 해당하는 부위부터 증폭이 시작되어 접합되어있는 DNA까지 증폭된다. 일반적인 방법으로는 중합효소연쇄반응(Polymerase chanin reaction; PCR)의 어닐링(Annealing) 단계에서 특정 염기서열을 갖는 프라이머의 조건 하에 프라이머가 주형가닥 DNA에 먼저 결합하여야만 중합효소의 연장반응이 진행될 수 있는데, 본 발명의 어댑터에 의한 셀프-프라이밍 및 리플리케이팅은 상보적 염기서열을 갖는 헤어핀 구조로 인해 별도의 프라이머 및 주형가닥 DNA와 프라이머 간의 결합 과정 없이도 중합효소에 의한 연장반응이 가능하다는 특징이 있다. 즉, 본 발명의 어댑터가 가지고 있는 헤어핀 구조 자체가 프라이머 역할을 수행할 수 있다.

[0038] 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명의 어댑터에 대한 자가 증폭능을 확인하기 위해, Q5 DNA 폴리머라제를 이용하여 어댑터의 자가 증폭능 여부 및 최적의 조건을 확인하기 위한 분석하였는데, 이를 위해 어댑터를 구성하는 2개의 올리고뉴클레오티드 중, 긴 단일 가닥의 올리고뉴클레오티드의 길이를 각기 달리하여 제작한 후(표 6 참

조), 연장 반응(증폭 반응)에 따른 자가 증폭 정도를 분석하였다.

[0039] 그 결과, 긴 단일 가닥의 올리고뉴클레오티드에서 헤어핀 스템(hairpin stem) 부분이 12bp의 염기로 구성된 SelPH-도메인(self priming hairpin-domain), 즉 자가 증폭 염기서열을 갖는 어댑터가 헤어핀 스템 길이가 8bp 및 10bp를 갖는 어댑터에 비해 더 안정성이 높고 자가 증폭이 우수한 것을 확인할 수 있었고, 이를 통해 본 발명의 어댑터는 단일 가닥의 올리고뉴클레오티드에서 자가 증폭이 된다는 것으로 확인하였다.

[0040] 따라서 SelPH-도메인을 포함하는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 긴 단일 가닥의 제1 올리고뉴클레오티드는 중합효소가 잘 결합할 수 있고 연장 반응 과정에도 헤어핀 구조를 잘 형성 및 유지할 수 있는 특징을 갖는다.

[0041] 또한 본 발명의 상기 긴 단일 가닥의 제1 올리고뉴클레오티드는 hybridization stem 끝부분과 SelPH-도메인 시작부분 사이에 아데닌 4개를 포함하고 있도록 하여 어댑터 라이게이션 과정 중, SelPH-도메인의 3' 부분과 짧은 단일 가닥의 제2 올리고뉴클레오티드의 5' 부분이 라이게이션 되지 않도록 하였다(도 2 참조).

[0042] 나아가 본 발명은 본 발명의 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터를 이용한 NGS 라이브러리 제작방법을 제공할 수 있다.

[0043] 상기 본 발명의 NGS 라이브러리 제작방법은, 크게 본 발명에 따른 NGS라이브러리 제작용 어댑터를 분석 대상 게놈 DNA에 라이게이션하고 연장 반응시키는 제1 단계(phase I); 및 제1 연장 반응 산물에 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션하고 연장 반응시키는 제2 단계(phase II)를 통해 수행된다.

[0044] 바람직하게 상기 본 발명의 NGS 라이브러리 제작방법은, (1) 분석 대상 게놈 DNA를 절편화(fragmentation)화는 단계; (2) 절편화된 분석 대상 게놈 DNA의 말단에 본 발명의 어댑터를 라이게이션하는 단계;(3) 상기 (2) 단계에서 본 발명의 어댑터를 라이게이션 한 반응액에 중합효소를 첨가하고 연장 반응을 수행하여 1차 반응산물을 수득하는 단계;(4) 상기 1차 반응산물에 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션하는 단계; (5) 상기 (4) 단계에서 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션 한 반응액에 중합효소를 첨가하고 연장 반응을 수행하여 2차 반응산물을 수득하는 단계; 및 (6) 상기 2차 반응산물을 정제하는 단계를 포함한다.

[0045] 여기서 상기 제1 단계는 상기 (1) 내지 (3) 단계까지를 의미하며, 제2 단계는 상기 (4) 내지 (6) 단계를 의미한다.

[0046] 각 단계별 과정을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0047] 먼저, (1) 분석 대상 게놈 DNA를 절편화(fragmentation)한다.

[0048] 여기서 상기 분석 대상의 DNA는 인간을 포함하는 모든 포유동물, 식물, 미생물 및 진균 등 분석하고자 하는 모든 생물 유래의 게놈 DNA를 포함할 수 있으며, 상기 DNA는 당업계에 공지된 통상적인 방법을 통해 수득 및 절편화할 수 있다.

[0049] 이후, (2) 절편화된 분석 대상 게놈 DNA의 말단에 본 발명의 어댑터를 라이게이션한다.

[0050] 여기서 상기 절편화된 분석 대상 게놈 DNA 및 본 발명의 어댑터는 1:15~1:25의 혼합비로 혼합하여 라이게이션을 수행할 수 있다.

[0051] 차세대염기서열분석을 위한 라이브러리의 제조 과정에서 타겟 DNA에 어댑터의 접합(라이게이션) 및 연장 반응이 매우 중요한데, 본 발명에서는 라이게이션 및 연장 반응의 최적화를 위한 DNA 및 본 발명의 어댑터 처리양의 조건을 확인하기 위한 실험을 진행하였고, 그 결과, 분석 대상 게놈 DNA 대 본 발명의 어댑터를 1:15~1:25의 비율로 사용하는 것이 적합함을 확인하였고, 1:20의 비율로 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0052] 만일 상기 비율을 벗어난 양으로 처리하여 반응시키면, 라이게이션 및 연장 반응의 효율이 미비하여 목적하는 효과를 도출할 수 없다.

[0053] 또한, 라이게이션의 반응 시간에 대한 최적 조건을 확인하기 위한 실험을 수행하였는데, 라이게이션 시간을 각각 15분, 60분 및 18시간으로 실험한 결과, 15분이 가장 적합한 것으로 나타났다.

[0054] 또한 상기 절편화된 분석 대상 게놈 DNA의 말단에 본 발명의 어댑터를 라이게이션 하기 전에는 상기 DNA의 말단 수선(end repair) 후 3' 말단에 아데노신을 접합(A-tail)하는 단계, 즉 End repair 및 A-tail 단계를 먼저 수행할 수 있다.

[0055] 본 발명의 어댑터의 라이게이션이 완료되면, 다음으로 (3) 상기 (2) 단계에서 본 발명의 어댑터를 라이게이션

한 반응액에 중합효소를 첨가하고 연장 반응을 수행하여 1차 반응 산물을 수득한다.

[0056] 상기 중합효소는 핵산의 증폭을 위해 사용되는 당업계의 중합효소라면 모두 사용 가능하며, 이에 제한되지는 않으나, Q5 DNA 폴리머라제, Phi29 DNA 폴리머라제 또는 Bst 2.0 DNA 폴리머라제를 사용할 수 있다.

[0057] 또한 본 발명에서는 상기 (3) 단계에서의 연장 반응은 1회의 반응(1 cycle)만 수행하며, 상기 1차 반응산물은 본 발명의 어댑터 염기서열을 포함하여 연장 반응된 헤어핀 구조를 갖는 증폭산물이다.

[0058] 즉, 절편화된 분석 대상의 핵산시료에 라이게이즈 효소를 이용하여 본 발명의 어댑터를 부착시키고, 중합효소를 첨가하면 본 발명의 어댑터에 포함된 자가 증폭 염기서열(SelPH-도메인)로 인해 3' 부터 혼성화된 어댑터의 스템(stem) 부분을 지나 5' 쪽으로 연장반응에 의해 복제가 되며, 그 결과, 분석 대상의 핵산시료의 단일 가닥이 각각 분리되어 긴 헤어핀 모양의 1차 반응산물이 생성된다(도 1의 phase I 참조).

[0059] 이렇게 제 1 단계의 과정이 완료되면, 제 2단계가 진행되는데, (4) 상기 1차 반응산물에 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션하는 단계를 수행한다.

[0060] 이때 상기 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션 하기 전, NGS용 유니버셜 어댑터 부착을 위해 상기 1차 반응산물의 DNA는 말단 수선(end repair) 및 3' 말단에 아데노신을 접합(A-tail)하는 단계, 즉 End repair 및 A-tail 단계를 먼저 수행할 수 있다.

[0061] 상기 NGS용 유니버셜 어댑터는 당업계에 공지된 NGS용 어댑터라면 모두 사용 가능하며, 본 발명의 일실시예에서는 Bioo Scientific사의 NEXTFlex DNA 바코드 어댑터를 사용하였다.

[0062] 상기 라이게이션은 당업계에 공지된 라이게이즈 효소라면 모두 사용 가능한다.

[0063] 상기 1차 반응산물에 NGS용 유니버셜 어댑터의 라이게이션이 완료되면, 다음으로 (5) 단계로 상기 NGS용 유니버셜 어댑터를 라이게이션 한 반응액에 중합효소를 첨가하고 연장 반응을 수행하여 2차 반응산물을 수득한다.

[0064] 이때 상기 중합효소는 상기 중합효소는 핵산의 증폭을 위해 사용되는 당업계의 중합효소라면 모두 사용 가능하며, 이에 제한되지는 않으나, Q5 DNA 폴리머라제, Phi29 DNA 폴리머라제 또는 Bst 2.0 DNA 폴리머라제를 사용할 수 있으며, 상기 2차 반응산물을 얻기 위한 상기 연장 반응은 1회의 반응(1 cycle)만 수행한다.

[0065] 또한, 상기 2차 반응산물을 얻기 위한 상기 연장 반응에는 플로우셀 부착을 위한 프라이머(예컨대, P7 프라이머)를 중합효소와 함께 사용할 수 있으며, 상기 2차 반응산물은 긴 헤어핀 구조를 갖는 1차 반응산물이 복제되면서 선형의 이중 DNA(duplex DNA) 형태를 갖는 산물이 된다.

[0066] 본 발명의 일실시예에서는 2차 반응산물의 양쪽 말단에 P5 및 P7을 갖는 이중 형태의 DNA로 복제되면서 증폭되었다.

[0067] 상기 방법으로 증폭된 2차 반응산물은 정제 단계를 수행할 수 있는데, 증폭 산물의 정제방법은 당업계에 알려진 일반적인 방법이면 모두 사용가능하며, 이에 제한되지는 않으나, 겔 필트레이션, 컬럼 이용 방법 또는 전자기장을 이용한 방법 등을 사용할 수 있다.

[0068] 본 발명에서 상기 "연장 반응"은 분석 대상의 핵산 시료를 증폭하는 반응을 의미한다. 핵산 시료의 증폭을 위한 반응은 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 복구 연쇄반응(repair chain reaction), 전사-중재 증폭(TMA), 자가 유지 염기서열 복제, 임의적 프라이밍 및 리플리케이팅 중합효소 연쇄반응, 핵산 염기서열 기반 증폭, 가닥 치환 증폭 및 고리-중재 항온성 증폭 방법을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0069] 나아가 본 발명은 본 발명의 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 헤어핀 구조의 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터를 포함하는, DNA 라이브러리 제조용 키트를 제공할 수 있다.

[0070] 본 발명에 따른 상기 키트는 버퍼, DNA 중합효소 및 타겟 증폭 PCR 반응을 실시하는데 필요한 시약을 선택적으로 포함할 수 있으며, 다양한 폴리뉴클레오티드 분자, 역전사효소, 다양한 버퍼 및 시약 등을 포함할 수 있다.

[0071] 이상, 본 발명에서 고안한 NGS(Next generation sequencing) 라이브러리 제작용 어댑터는 헤어핀 구조를 가지며 자가 증폭(self-priming and replicating)이 가능한 어댑터로서 분석대상 핵산시료에 본 발명의 어댑터(SelPH-adaptor)를 부착하여 1번의 증폭을 수행하고, 이후 공지된 염기서열분석법을 수행하여 매우 빠르고 정확하게 라이브러리를 제작할 수 있다.

[0072] 또한, 본 발명의 자가 증폭이 가능한 어댑터를 사용할 경우, 1번씩 총 2회만의 증폭(즉, 본 발명의 어댑터 부착

후 연장반응에 따른 증폭(phase I의 증폭) 및 일반적인 NGS 어댑터 부착 후 연장반응에 따른 증폭(phase II의 증폭))만 진행하면 되므로, 기존 수차례의 증폭과정으로 야기되는 jackpot 에러나 편향적인 증폭에 따른 오류를 최소화할 수 있다.

[0073] 또한, 본 발명의 자가 증폭이 가능한 어댑터를 사용할 경우, DNA 조각의 길이 제한이 없으며 원형 DNA를 만드는 셀프-라이게이션 과정 없이도 한 쌍의 Paired end 형태의 산물을 만들 수 있어 워크플로우(workflow)가 단순하고 효율적일 뿐만 아니라, 별도의 Nick 및 user enzyme의 사용이 없어 핵산시료의 손상으로 인해 발생할 수 있는 오류 및 인공산물을 염려할 필요가 없다.

[0074] 그러므로 본 발명의 자가 증폭이 가능한 어댑터를 사용하여 NGS용 라이브러리를 제조할 경우, 기존 방법의 라이브러리 제작보다 오류율을 줄이면서 효율을 높일 수 있고, 낮은 빈도로 존재하는 돌연변이 서열을 보다 정확하게 검출할 수 있다.

[0075] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0077] **<준비예>**

[0078] 시약

[0079] 모든 올리고뉴클레오티드는 IDT(Integrated DNA Technology)에서 구입하여 사용하였고, 동결건조된 올리고뉴클레오티드는 0.1M TE 버퍼로 희석 후, 믹싱블럭(MB102: Bioer)에서 50℃의 온도로 1시간 동안 반응시켰다. Post-ligation cleanup 과 Post-amplification cleanup은 프로메가사의 ProNex Size-selective 정제 시스템을 사용하였다. 5X Q5 반응버퍼, 5X High-fidelity DNA 폴리머라제, Bst 2.0 DNA 폴리머라제, 10X Isothermal 증폭 버퍼, 각각의 10mM dNTPs, 효모 게놈(yeast genome) 라이브러리 준비 시 사용한 일루미나용 NEBNext Ultra II FS DNA 라이브러리 프랩키트는 NEB(New england biolabs) 제품을 사용하였다. 91bp 및 285bp 인서트 DNA 실험에서는 Bio Scientific 사의 NEXTflex Rapid DNA sequencing bundle을 사용하였다.

[0081] **<실험방법>**

[0082] ① Self-priming 및 replicating 확인

[0083] NCBI에서 EGFR 유전자의 엑손 21번의 시퀀싱을 확인 후, 6번째 염기부터 46번째의 염기까지 40개의 염기를 갖는 올리고뉴클레오티드에 Self-priming 및 replicating을 위한 헤어핀 모양의 어댑터 3종류의 시퀀스를 각각 3' 에 추가하여 하기 표 1과 같이 제작하였다. 올리고뉴클레오티드는 1M TE 버퍼를 사용하여 100uM 농도로 희석하여 배양하였다. 5X Q5 반응버퍼 5㎕, 10mM dNTPs 각각은 0.5㎕, Q5 DNA 폴리머라제는 0.25㎕, 각각의 올리고뉴클레오티드는 증류수를 사용하여 20㎛M로 희석 후 1㎕로 첨가하여 총 부피가 25㎕가 되도록 하였다. 98℃에서 10초, 65℃까지 서서히 온도를 낮추고 30초 반응 수행 후, 72℃에서 10분 동안 진행하였다.

표 1

Self-priming and replicating 확인용 어댑터 시퀀스

[0084]

이름	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	
8 bp adaptor	GAACT ACTTG GAGGA CCGTC GCTTG GTGCA CCGCG ACCTG CGAC ATCT AAAA AGAT GTCG	서열번호:1
10 bp adaptor	GAACT ACTTG GAGGA CCGTC GCTTG GTGCA CCGCG ACCTG GC ACAC ATCT AAAA AGAT GTGT GC	서열번호:2
12 bp adaptor	GAACT ACTTG GAGGA CCGTC GCTTG GTGCA CCGCG ACCTG GCGA CGAC ATCT AAAA AGAT GTCG TCGC	서열번호:3

[0086] ② SelPH-adaptor 제작

[0087] SelPH-adaptor를 구성하는 긴 단일가닥, 짧은 단일 가닥의 하기 표 2의 올리고뉴클레오티드를 100㎛M 농도로 각

각 0.1M TE 버퍼로 반응시킨 후, 각각을 2X PBS를 이용하여 최종농도 30μM의 총 부피 100 μl이 되도록 맞췄다. 이후 Thermocycler를 이용하여 95℃에서 20℃까지 온도를 서서히 낮춰 어닐링시켰다.

표 2

SelPH-adaptor 시퀀스

이름	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	
SelPH-adaptor long strand	/5Phos/ GGAT AAGG GAGC AAAA GCGA CGAC ATCT AAAA AGAT GTCG TCGC	서열번호:4
SelPH-adaptor short strand	GCTC CCTT ATCC T	서열번호:5

[0088]

[0089] ③ SelPH-시퀀싱 진행

[0090] SelPH-시퀀싱은 91bp 및 285bp 크기로 제작한 인서트(insert) DNA를 사용하여 수행하였다.

[0092] (i) 91bp 인서트 DNA 실험

[0094] 91bp 인서트 DNA 제작

[0095] 하기 표 3의 91bp 인서트 DNA를 구성하는 단일가닥의 올리고뉴클레오티드들은 각각 1M TE 버퍼를 사용하여 20μM이 되도록 희석하였고, 올리고뉴클레오티드 각각이 최종농도 1 μM이 되도록 1X PBS 버퍼로 맞춰 총 부피 100 μl가 되도록 한 후, SimpliAmp Thermal Cycler(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 95℃에서 20℃까지 온도를 서서히 낮춰 어닐링시켰다.

표 3

91 bp 인서트 DNA 서열

이름	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	
91 bp single strand 1	/5Phos/GGCAT GAACT ACTTG GAGGA CCGTC GCTTG GTGCA CCGCG ACCTG GCAGC CAGGA ACGTA CTGGT GAAAA CACCG CAGCA TGTCA AGATC A	서열번호:6
91 bp single strand 2	/5Phos/GATCT TGACA TGCTG CGGTG TTTTC ACCAG TACGT TCCTG GCTGC CAGGT CGCGG TGCAC CAAGC GACGG TCCTC CAAGT AGTTC ATGCC A	서열번호:7

[0096]

[0097] 1차 라이게이션(SelPH-어댑터)

[0098] SelPH-어댑터의 부착은 1uM 91bp 인서트 DNA 18μl, NEXTFlex End-Repair & Adenylation 버퍼 믹스 15μl, 25uM의 SelPH-어댑터 0.5μl 조건으로 제조사의 프로토콜대로 라이게이션을 수행하였다.

[0099]

[0100] POST-ligation Cleanup

[0101] ProNex Chemistry 시약을 SelPH-어댑터 라이게이션 시료 부피의 3배로 첨가하고 제조사의 실험방법에 따라 수행하였고, 용출버퍼 40㎕를 첨가하고 10분 동안 용출시간을 주었다.

[0103] 1차 연장반응(First extension)

[0104] 10X Isothermal 증폭 버퍼 2㎕, 10mM dNTPs 각각 0.5㎕, Bst 2.0 DNA 폴리머라제 0.5㎕, 용출된 시료 10㎕를 혼합하고 증류수로 총 부피 20㎕가 되도록 한 후, 65℃에서 10분 간 반응시키고, Bst DNA 폴리머라제를 첨가한

후, 65℃에서 5분간 반응시켰다.

[0106] Post-amplification Cleanup

[0107] ProNex Chemistry 시약을 SelPH-어댑터 라이게이션 시료 부피의 3배로 첨가하고 제조사에 따라 실험을 수행하였으며, 용출버퍼 20㎕를 넣고 10분 용출시간을 주었다.

[0109] End repair 및 A-tail

[0110] 용출한 시료에 NEXTFlex End-Repair 및 Adenylation 버퍼 믹스 15㎕, NEXTFlex End-Repair 및 Adenylation Enzyme 믹스 3㎕를 첨가하고 제조사의 지시에 따라 수행하였다.

[0112] 2차 라이게이션(NGS-어댑터)

[0113] NGS-어댑터는 Bioo Scientific사의 NEXTFlex Rapid DNA Sequencing Bundle에 포함된 것을 사용하였고, A-Tailing까지 마친 시료에 25μM NGS-어댑터 2.5㎕를 첨가하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다.

[0115] Post-ligation Cleanup

[0116] ProNex Chemistry 시약을 NGS-어댑터 라이게이션까지 마친 시료 부피의 2배로 첨가하여 제조사의 지침사항에 따라 수행하였으며, 용출버퍼 40㎕를 넣고 10분 동안 용출시간을 주었다.

[0117]

[0118] 2차 연장반응(Second extension)

[0119] 10X Isothermal 증폭 버퍼 4㎕, 10mM dNTPs 각각 1㎕, Bst 2.0 DNA 폴리머라제 0.5㎕, 용출된 시료 30㎕를 혼합하고 증류수로 총 부피 40㎕가 되도록 하였다. 여기에 Bioo Scientific에서 제공하는 올리고뉴클레오티드 시퀀스대로 표 4의 PCR 프라이머를 2.5㎕ 첨가하고 65℃에서 10분간 반응시킨 다음, Bst DNA 폴리머라제를 넣은 후 65℃에서 5분간 반응시켰다.

표 4

일루미나 P7 프라이머

[0120]

이름	Oligonucleotide sequence (5' to 3')
NEXTflex PCR Primer 2	CAAGC AGAAG ACGGC ATACG AGAT

[0121] Post-amplification Cleanup

[0122] ProNex Chemistry 시약을 2차 연장반응을 마친 시료 부피의 1.3배로 첨가하고 제조사에 따라 실험을 수행하였으며, 용출버퍼 30㎕를 넣고 10분 동안 용출시간을 주었다.

[0124] (ii) 285bp 인서트 DNA 실험

[0126] 285bp 인서트 DNA 제작

[0127] BRCA1 유전자의 1041 position을 목표로 285bp의 길이가 나오는 DNA 절편을 얻기 위해 하기 표 5의 프라이머를 제작하였다.

표 5

BRCA1 gene position 1041 primer(285bp)

[0128]

이름	Oligonucleotide sequence (5' to 3')
Forward primer	/5Phos/CTGAA TTCTG TAATA AAAGC
Reverse primer	/5Phos/CATCA GAACC TAACA GTTCA

[0129] 인간 게놈 DNA 20ng, 5X Q5 반응버퍼 5㎕, 10mM dNTPs 각각 0.5㎕, 10uM 정방향 프라이머와 역방향 프라이머는 최종농도가 0.5uM이 되도록 하였고, Q5 High-fidelity DNA 폴리머라제는 0.25㎕ 첨가한 다음, 98℃에서 30초 동안 초기 변성시키고, PCR시 어닐링 온도를 각각 54℃, 57℃, 60℃로 하였으며, 연장반응 온도는 72℃로 하여 35회(변성 10초, 어닐링 30초, 연장 30초)반복 후, 72℃에서 2분간 최종 연장반응 시켰다. PAGE 사진 상에서 여러 개의 희미한 밴드가 확인되어 동일한 시료에 동일 조건으로 Nested PCR 실시 후, 다시 전기영동을 수행하였다. 그 결과 단독 밴드를 확인하였고 시료를 1.5% 아가로즈 겔에서 전기영동 한 후, Monarch Gel Extraction 키트(NEB사)를 이용하여 285bp 인서트 DNA를 제작하였다. 이후 다시 시료를 PAGE 수행하여 젤에서 단독 밴드를 확인한 다음, 나노드랍(DeNOVIX)를 이용하여 농도를 측정하였다.

[0130]

[0131] End repair 및 A-tail

[0132] 285bp 인서트 DNA 400ng을 사용하여 제조사에 지침에 따라 반응을 수행하였고 이후 과정은 상기 91bp 인서트 DNA를 사용한 방법과 동일한 방법으로 다음의 실험들을 수행하였다.

[0134] (iii) 라이게이션 조건의 최적화

[0135] 인서트 DNA 91bp 및 285bp를 모두 사용하였고, 이들 각각을 1X PBS 버퍼에 1uM의 농도로 어닐링 한 것을 추가 희석 없이 사용하였다. 모든 라이게이션 후에는 ProNex Size-selective 정제 시스템을 사용하여 정제 후 PAGE로 확인하였다.

[0137] NGS 라이브러리 준비용 시약 4종 비교

[0138] 시판되고 있는 NGS 라이브러리 준비용 시약 4가지를 사용하여 실험하였으며, 상품별 실험방법이 상이하여 실험들은 각 제조사의 지침사항에 따라 수행하되 91bp 인서트 DNA와 SelPH-어댑터를 사용하였고 비율은 1:20으로 고정하여 수행하였다. ProNex Size-selective 정제 시스템을 사용하여 정제 시, ProNex Chemistry 시약과 시료의 부피 비율은 동일하게 3x로 진행하였고 용출 시간은 10분으로 하였다.

[0140] ㉠ NEXTFlex Rapid DNA Sequencing Bundle(Bioo Scientific)

[0141] 91bp 인서트 DNA 3㎕, 25uM SelPH-어댑터 2.5㎕, EXTFlex End-Repair 및 Adenylation 버퍼 믹스 15㎕, NEXTFlex ligase enzyme 믹스 47.5㎕를 첨가하고 증류수를 첨가하여 총 부피가 100㎕가 되도록 하였다. 반응 시간 등의 실험조건은 제조사의 지침에 따라 수행하였고, 정제 시 용출 부피는 40㎕가 되도록 하였다.

[0143] ㉡ KAPA HyperPlus 키트(KAPA Biosystems)

[0144] 91bp 인서트 DNA 3.5㎕, 15uM SelPH-어댑터 5㎕, 10X KAPA Frag 버퍼 5㎕, End-Repair 및 A-Tailing 버퍼 7㎕, 라이게이션 버퍼 30㎕, DNA 라이게이즈 10㎕를 첨가하고 증류수를 첨가하여 총 부피가 110㎕가 되도록 하였다. 반응 시간 등의 실험조건은 제조사의 지침에 따라 수행하였고, 정제 시 용출 부피는 40㎕가 되도록 하였다.

[0146] ㉢ Illumina용 NEBNext Ultra II FS DNA library Prep Kit(NEB)

[0147] 91bp 인서트 DNA 5㎕, 15uM SelPH-어댑터 2.5㎕, NEBNext Ultra II FS 반응버퍼 7㎕, NEBNext Ultra II 라이게이션 마스터 믹스 30㎕, NEBNext 라이게이션 인핸서 1㎕를 첨가하고 증류수를 첨가하여 총 부피 68.5㎕가 되도록 하였다. 반응 시간 등의 실험조건은 제조사의 지침에 따라 수행하였고, 정제 시 용출 부피는 30㎕가 되도록 하였다.

[0149] ㉣ 블런트/TA Ligase Master Mix(NEB)

[0150] 91bp 인서트 DNA 1㎕, 30uM SelPH-어댑터 3㎕, 블런트/TA Ligase Master Mix 10㎕를 첨가하고 증류수로 총 부피가 20㎕이 되도록 하였다. 반응 시간 등의 실험조건은 제조사의 지침에 따라 수행하였고, 정제 시 용출 부피는 15㎕가 되도록 하였다.

[0152] 라이게이션 시간

[0153] 91bp 및 285bp 크기의 인서트 DNA와 NEXTFlex Rapid DNA Sequencing Bundle(Bioo Scientific)의 라이게이션 시약을 사용하였으며, 반응시간의 차이를 두고 제조사의 지침사항에 따라 실험을 수행하였다. 91bp 인서트 DNA의 경우, 라이게이션 시간을 기존 15분에서 60분과 18시간으로 각각 늘렸고, 285bp의 경우 60분으로 늘려주었다.

ProNex Size-selective 정제 시스템을 이용하여 정제하였고, 정제 시 ProNex Chemistry시약과 시료의 부피 비율은 동일하게 3x로 하였으며, 용출시간은 10분, 용출 부피는 40 ㎕로 하였다.

[0155] (iv) 연장 조건의 최적화

[0156] 91bp 인서트 DNA 1ug과 25uM SelPH-어댑터 2.5㎕로 라이게이션 후, 정제까지 마친 시료를 사용하였다.

[0157]

[0158] Q5 DNA 폴리머라제

[0159] SelPH-어댑터 라이게이션 시료 8㎕, 5X Q5 반응버퍼 5㎕, 10mM dNTPs 각각 0.5㎕, Q5 DNA 폴리머라제 0.25㎕를 첨가하고 증류수를 이용하여 총 부피가 25㎕가 되도록 2개의 시료를 각각 준비하였다. 98℃에서 30초 동안 초기 변성시키고 PCR 시 어닐링 온도를 각각 78℃, 65℃로 하고, 연장 온도를 72℃로 하여 1회(변성 10초, 어닐링 15초, 연장 30초)진행 후, 72℃에서 5분 간 최종 연장반응 시켰다.

[0161] Phi29 DNA 폴리머라제

[0162] SelPH-어댑터 라이게이션 시료 8㎕, 10X Phi29 DNA 폴리머라제 반응버퍼 2㎕, 10mM dNTPs 각각 0.5㎕, 100X BSA 0.2㎕, Phi29 DNA 폴리머라제 0.2㎕를 첨가하고 증류수로 총 부피가 20㎕가 되도록 하였다. 이후 30℃에서 5분 반응 후, Phi29 DNA 폴리머라제를 첨가한 뒤 30℃에서 10분간 반응시키고 65℃에서 10분간 불활성화시킨 다음, 20℃까지 서서히 온도를 낮춰주었다.

[0164] Bst 2.0 DNA 폴리머라제

[0165] SelPH-어댑터 라이게이션 시료 8㎕, 10X Isothermal amplification 버퍼 2㎕, 10mM dNTPs 각각 0.5㎕, Bst 2.0 DNA 폴리머라제 0.5㎕를 첨가하고, 증류수를 이용하여 총 부피가 20㎕가 되도록 하였다. 이후 65℃에서 10분 반응 후, Bst 2.0DNA 폴리머라제를 첨가한 뒤 65℃에서 10분간 반응시키고 80℃에서 20분간 불활성화시킨 다음, 20℃까지 서서히 온도를 낮춰주었다.

[0167] ④ SelPH-seq를 이용한 효모 게놈 라이브러리 제작

[0168] 약 12Mb의 yeast인 사카로마이세스 세레비지애(By4741)의 게놈 DNA를 사용하였고 농도는 446.745ng/㎕였다. 일루미나용 NEBNext Ultra II FS DNA 라이브러리 프랩 키트(NEB사)를 이용하여 제조사의 지침사항에 따라 수행하였다.

[0170] DNA 절편화, End repair 및 A-Tail

[0171] 효모 게놈 DNA 0.5㎕, NEBNext Ultra II FS 반응버퍼 7㎕, NEBNext Ultra II FS enzyme 믹스 2㎕를 혼합하고 증류수를 이용하여 총 부피가 35㎕가 되도록 하였다. 이후 37℃에서 40분 동안 반응을 하였고 이후의 실험은 제조사의 지침사항에 따라 진행하였다.

[0172]

[0173] 1차 라이게이션(SelPH-어댑터)

[0174] 15uM 농도의 SelPH-어댑터 2.5㎕, NEBNext Ultra II 라이게이션 마스터 믹스 및 NEBNext 라이게이션 인핸서를 반응 혼합물에 첨가하고 잘 섞은 후 제조사의 지침사항에 따라 진행하였다.

[0176] Post Ligation Cleanup

[0177] ProNex Chemistry 시약을 SelPH-어댑터 라이게이션 시료 부피의 2배로 첨가하고 제조사의 지침사항에 따라 실험을 진행하였고, 용출버퍼 30 ㎕를 넣고 10분 간 용출 시간을 주었다.

[0178]

[0179] 1차 연장반응

[0180] 10X Isothermal amplification 버퍼 4㎕, 10mM dNTPs 각각 1㎕, Bst 2.0 DNA 폴리머라제 0.5㎕, 용출된 시료 30㎕를 첨가하고 증류수를 이용하여 총 부피가 40㎕가 되도록 하였다. 이후 60℃에서 10분간 반응시키고, Bst 2.0 DNA 폴리머라제를 첨가한 후, 65℃에서 5분간 반응시켰다.

[0182] Post-amplification Cleanup

[0183] ProNex Chemistry 시약을 일차 연장 시료 부피의 2배로 첨가하고 제조사의 지침사항에 따라 반응을 수행하였다. 이때 용출버퍼 40㎕를 첨가하고 10분간 용출 시간을 주었다.

[0185] End repair 및 A-Tail

[0186] 일루미나용 NEBNext Ultra II FS DNA 라이브러리 프랩 키트는 절편화(fragmentation)과 End-repair 및 A-Tail이 함께 진행되는 효소 혼합물로서 NEBNext Ultra End-repair/dA-Tailing 모듈(NEB사)을 사용하여 수행하였다. 용출된 시료 40㎕에 10X End repair 반응버퍼 6.5㎕, End 프랩 믹스 3㎕를 첨가한 후, 총 부피가 65㎕가 되도록 증류수로 맞췄고 제조사의 지침사항에 따라 실험을 수행하였다.

[0188] 2차 라이게이션(NGS 어댑터)

[0189] NGS 어댑터는 Bioo Scientific사의 NEXTFlex Rapid DNA Sequencing Bundle이 포함된 것을 사용하였고, A-Tailing까지 마친 시료에 25uM NGS 어댑터 2.5㎕을 첨가한 후, 제조사의 지침사항에 따라 반응을 수행하였다.

[0190]

[0191] Post-ligation Cleanup

[0192] ProNex Chemistry 시약을 NGS 어댑터 라이게이션을 마친 시료 부피의 2배로 첨가하고 제조사의 지침사항에 따라 반응을 수행하였으며, 용출버퍼로 30㎕를 첨가하고 용출 시간을 10분 주었다.

[0194] 2차 연장반응

[0195] 10X Isothermal amplification 버퍼 4㎕, 10mM dNTPs 각각 1㎕, Bst 2.0 DNA 폴리머라제 0.5㎕, 용출된 시료 30㎕를 첨가하고 증류수를 이용하여 총 부피가 40㎕가 되도록 하였다. 여기에 Bioo Scientific에서 제공하는 올리고뉴클레오티드 시퀀스대로 PCR 프라이머 2(일루미나 P7 프라이머의 역할 수행)를 2.5㎕ 첨가하고 65℃에서 10분간 반응시킨 다음, Bst 2.0 DNA 폴리머라제를 첨가한 후, 65℃에서 5분간 반응시켰다.

[0197] Post-amplification Cleanup

[0198] ProNex Chemistry 시약을 2차 연장 반응까지 마친 시료 부피의 1.3배로 첨가하고 제조사의 지침사항에 따라 반응을 수행하였으며, 용출버퍼로 30㎕를 첨가하고 용출 시간을 10분 주었다.

[0200] ⑤ 겔 전기영동

[0201] PAGE(Polyacrylamide gel electrophoresis)는 각 시료에 Novex TBE-Sample 버퍼(5x) 2㎕를 첨가하고 잘 혼합하였고, 인비트로젠사의 10% TBE 겔에 10㎕ 분지하여 200V에서 35분 동안 전기 영동하였다. 전기영동을 마친 겔은 잘 분리하여 증류수 100ml에 SYBR Gold Nucleic acid gel stain 5㎕를 희석 후, 믹싱블럭에서 15분동안 반응시켰다. 아가로스 겔 전기영동은 1X TBE 버퍼로 1.5%와 2%의 아가로스 겔을 만들었고, 6X Purple 로딩 다이 2㎕에 시료 10㎕를 첨가하여 혼합한 후, 10㎕를 로딩하여 100V에서 50분 동안 전기영동하였다.

[0203] **<참고예>**

[0204] **본 발명의 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 어댑터를 이용한 NGS 라이브러리 제작 방법에 대한 전반적인 실험 방법**

[0205] 먼저 본 발명에서 고안한 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 어댑터(SelPH-adaptor)를 이용하여 NGS 라이브러리를 제작하는 전반적인 실험 과정을 설명하면 다음과 같다(도 1 참조).

[0206] 본 발명에 따른 NGS 라이브러리 제작 방법은 크게 본 발명에서 고안한 SelPH-adaptor를 부착하는 Phase I 단계와 시퀀싱을 위해 NGS용 adaptor를 부착하는 Phase II로 구성된다.

[0207] Phase I 단계는 시퀀싱을 수행할 리드(read) 길이를 생각하여 게놈 DNA(gDNA)를 작게 조각낸 후(도 1의 step 1), SelPH-adaptor의 부착을 위해 End-repair(말단 수선) 및 A-tailing(A-테일링)을 수행한다(도 1의 step 2). 이후, 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 도메인(SelPH domain)이 있는 SelPH-adaptor를 A-tail까지 마친 DNA 조각에 부착시킨다(도 1의 step 3). 이후 DNA 폴리머라제를 이용하여 SelPH domain의 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅으로 3' 부터 Hybridization stem을 지난 5' 쪽으로 연장반응이 시작된다. 그 결과 DNA 조각의 센스 DNA(Target)와 안티센스 DNA(Target*)는 각각 분리되어 긴 헤어핀 스템(stem) 모양을 형성하게 된다(도 1의 step 4).

[0208] 다음으로 Phase II 단계를 수행하는데, Phase I 단계에서 제조된 긴 헤어핀 스템(stem) 모양을 갖는 DNA에 NGS

adaptor 부착을 위한 End-repair(말단 수선) 및 A-tailing(A-테일링)을 수행한다(도 1의 step 5). 이후 NGS adaptor를 부착하고, P7 프라이머와 가닥변위(strand displacement) 기능이 있는 DNA 폴리머라제를 이용하여 연장 반응을 수행하여(도 1의 step 7), 긴 헤어핀 스템 모양을 갖던 DNA가 폴리머라제에 의해 복제되면서 펼쳐진 형태를 가지게 되며 결국 양쪽 말단에 P5 및 P7을 갖는 이중 DNA를 형성하게 된다.

[0210] **<실시예 1>**

[0211] **본 발명의 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 어댑터를 이용한 NGS 분석**

[0212] <1-1> 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 어댑터(SelPH-adaptor)의 제조와 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 확인

[0213] 본 발명자들은 SelPH-adaptor의 제조를 위해 SelPH-domain을 포함하는 긴 단일가닥의 올리고뉴클레오티드와 라이게이션을 위해 필요한 hybridization stem을 구성하는 짧은 단일가닥의 올리고뉴클레오티드를 하기 표 6과 같이 디자인하였다. 먼저 짧은 단일가닥은 3' 말단에 T-tail 하여 어댑터 라이게이션에 의해 A-tail과 결합할 수 있도록 하였고, 5' 는 긴 단일가닥의 3' 과 라이게이션 되는 것을 예방하기 위해 인산화시키지 않았다. 긴 단일가닥의 SelPH-domain은 DNA 폴리머라제가 잘 결합할 수 있는 구조이어야 하고 연장반응을 수행하는 온도(65℃)에서 헤어핀 구조를 잘 형성 및 유지하여 자가-증폭(self-priming and replicating)이 가능해야 한다. 이에 본 발명자들은 이러한 최적 조건을 갖는 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 어댑터를 제조하기 위해, 40개 염기를 갖는 단일 가닥의 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 헤어핀 stem 길이가 각각 8bp, 10bp, 12bp인 SelPH-domain 후보 염기서열을 추가하였다(도 2a 참조). 이후 Q5 DNA 폴리머라제를 이용하여 연장이 된 것을 확인함으로써 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅(자가 증폭)이 가능함을 확인하였다. 한편, 각기 다른 길이의 헤어핀 stem 중에서 안정성은 12bp가 가장 우수한 것으로 나타나, 본 발명의 SelPH-adaptor 제조에는 12bp를 사용하기로 하였다(도 2b 참조). 또한, hybridization stem 끝부분과 SelPH-domain의 시작 부분 사이에는 아데닌(A) 4개를 추가하여 어댑터 라이게이션 과정 중에 SelPH-domain의 3' 부분과 짧은 단일가닥의 5' 이 라이게이션 되지 않도록 하였다.

표 6

[0214]

셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 확인용 프라이머	염기서열(5'->3')
SelPH-adaptor(긴 단일가닥; 8bp의 SelPH-domain 함유)	GAACT ACTTG GAGGA CCGTC GCTTG GTGCA CCGCG ACCTG CGAC ATCT AAAA AGAT GTCG
SelPH-adaptor(긴 단일가닥; 10bp의 SelPH-domain 함유)	GAACT ACTTG GAGGA CCGTC GCTTG GTGCA CCGCG ACCTG GC ACAC ATCT AAAA AGAT GTGT GC
SelPH-adaptor(긴 단일가닥; 12bp의 SelPH-domain 함유)	GAACT ACTTG GAGGA CCGTC GCTTG GTGCA CCGCG ACCTG GCGA CGAC ATCT AAAA AGAT GTCG TCGC
SelPH-adaptor(짧은 단일가닥)	GCTC CCTT ATCCT (굵은표기 "T"는 T-tail된 것)

[0215] 상기 표 6에서 파란색의 염기서열 표시는 도 2a에서 파란색으로 표시된 염기서열에 해당한다.

[0216]

[0217] <1-2> 다양한 길이를 갖는 인공 DNA의 준비

[0218] 상기 <1-1>에서 제작한 본 발명의 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅헤어핀 어댑터(SelPH-adaptor)를 이중 가닥 DNA에 부착 시에도 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅이 되는 것을 확인하기 위해 NGS 분석을 위한 다양한 길이를 갖는 인공 DNA를 준비하였다.

[0220] 91bp 인공 DNA 준비

[0221] 작은 크기의 인서트 DNA로서 91bp의 크기를 갖는 인공 DNA를 준비하기 위해, NCBI에서 EGFR 유전자의 엑손 21번의 시퀀스를 확인 후, 첫 번째 염기부터 90번째의 염기까지 90개 염기를 갖는 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 아데닌을 추가하여 총 91개 염기 길이의 단일가닥 DNA를 서로 상보적으로 합성하였고, 이들 각각의 단일 가닥을 95℃에서부터 20℃까지 서서히 낮춰주면서 어닐링 시켜 이중 가닥의 91bp 인공 DNA를 준비하였다(도 3 참조).

[0222]

[0223] 285bp 인공 DNA 준비

[0224] 다음으로 91bp에 비해 상대적으로 길이가 긴 인서트 DNA의 준비를 위해 BRCA1 유전자의 1041 position을 목표로 285bp의 크기를 갖는 DNA 절편을 준비하였고, 주형 DNA를 대상으로 각기 다른 온도(54℃, 57℃ 및 60℃)에서 PCR을 수행 후, PAGE 겔을 통해 PCR 단편을 확인하였으며(도 4 참조), 이때 285bp 크기의 단일 밴드를 얻기 위해 네스티드 PCR을 수행하였고, 그 결과, 285bp 크기의 밴드만 존재하는 것을 PAGE 겔을 통해 확인하였으며(도 5 참조), 285bp의 염기서열은 서열번호 8에 나타내었다.

[0226] <1-3> 라이게이션 조건 확립

[0227] 본 발명의 NGS 제조 과정은 앞서 기술한 바와 같이, 본 발명의 어댑터의 결합 및 연장반응이 수행되는 Phase I 및 NGS 어댑터의 결합 및 연장반응이 수행되는 Phase II 단계로 진행된다. Phase I 단계는 본 발명의 SelPH-adaptor와 DNA 조각의 라이게이션이 이루어져야만 SelPH domain의 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅으로 연장반응이 진행된다. 또한 Phase I에서 연장 반응이 진행되어야만 Phase II에서 NGS 어댑터와의 라이게이션(접합)이 가능해진다. 이에 본 발명자들은 먼저 91bp 및 285bp의 인서트 DNA를 사용하여 본 발명의 SelPH-adaptor와 라이게이션 및 연장반응을 위한 최적의 조건을 확인하였다.

[0229] 라이게이션 조건의 확립을 위해, NEXTFlex Rapid DNA Sequencing Bundle(Bioo Scientific), KAPA HyperPlus 키트(KAPA Biosystems), Illumina용 NEBNext Ultra II FS DNA library Prep Kit(NEB) 및 블런트/TA Ligase Master Mix(NEB)의 4가지를 선택하여 라이게이션 반응을 수행하였으며, 이때 본 발명의 인서트 DNA : SelPH-adaptor의 혼합비율은 1:20으로 고정하여 수행하였다.

[0230] 그 결과, 91bp의 인서트 DNA를 대상으로 분석한 결과에 의하면, 도 6a의 가장 하단에 보이는 희미한 밴드는 SelPH-adaptor로 이중 가닥을 형성하는 부분은 총 24bp이지만 헤어핀 구조를 가지며 부분적으로 단일 가닥 형태로 존재하는 것이 있음을 감안하면 전기영동 시 움직임에 조금씩의 차이가 있을 수 있음을 예상할 수 있으며, 라이게이션 된 SelPH-adaptor의 밴드 사이즈는 28bp로 계산하였다.

[0231] 도 6a의 결과에서 가운데 밀집된 밴드 중 아래쪽에 존재하는 91bp에 위치하는 밴드는 양쪽 말단에 SelPH-adaptor가 하나도 라이게이션 되지 않은 인서트 DNA이며, 가운데 위치한 밴드는 한쪽에만 어댑터가 라이게이션 되어 119bp의 크기를 보임을 알 수 있으며, 양쪽 말단에 모두 어댑터가 라이게이션 된 것은 147bp의 크기를 갖는 밴드임을 알 수 있었다. 또한, 상기 4개의 제품 중에서 인공 인서트 DNA를 사용할 경우, Bioo Scientific사 제품을 사용하고, 절편화(Fragmentation)가 필요한 경우에는 NEB 사의 제품을 사용하는 것이 좋다는 것을 확인하였다.

[0233] 또한, 양쪽 다 SelPH-adaptor가 라이게이션 될 수 있는 조건을 찾고자 어댑터와 인서트 DNA의 농도를 1:20으로 고정하고 시간을 달리하여 라이게이션을 수행하였는데, 그 결과, 라이게이션 시간을 기존 15분에서 60분 및 18시간으로 각각 늘렸으나 밴드양상을 유사한 것으로 나타났고(도 7a 참조), 285bp 인서트 DNA로 60분 라이게이션을 수행하였으나, 91bp의 인서트 DNA와 비슷한 양상을 보였다(도 7b 참조). 한편, 양쪽 다 라이게이션 되거나 또는 한쪽만 라이게이션이 되더라도 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅(자가-복제)는 모두 가능하기에, 라이게이션 시간은 15분 동안 수행하는 것이 효율적임을 확인하였다. 따라서 phase I 및 II에서 라이게이션 시간은 15분 간 수행하였다.

[0235] <1-4> 연장반응 조건 확립

[0236] 다음으로 SelPH-adaptor가 라이게이션된 후, 연장반응이 되는 조건을 확립하기 위해, Q5 DNA 폴리머라제, 가닥 변위 기능을 있는 Phi29 DNA 폴리머라제 및 Bst 2.0 DNA 폴리머라제를 각각 사용하여 연장반응 결과를 분석하였다. 이때 Q5 DNA 폴리머라제는 98℃ 변성 과정이 필요한데, SelPH domain의 헤어핀 스템의 멜팅 온도가 78℃의 고온으로 올렸다가 낮추는 과정에서 헤어핀 구조가 제대로 형성되지 않게되면 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅이 되지 않을 수 있으므로, Q5 DNA 폴리머라제를 사용한 실험에서는 변성 과정 후, 헤어핀 스템의 멜팅 온도인 78℃와 어닐링 온도인 65℃까지 온도를 매우 천천히 낮춰 헤어핀 구조를 잘 형성할 수 있도록 하였다.

[0237] 연장반응을 수행하게 되면, 91bp의 인서트 DNA에 대해 SelPH-adaptor가 라이게이션된 밴드로부터 연장반응이 된다면 양쪽 모두 붙어있는 인서트 DNA의 경우 135bp 크기의 이중가닥 DNA 2개가 나오고, 한쪽만 붙어있는 인서트 DNA의 경우 123bp크기의 이중가닥 DNA 1개와 103bp의 단일가닥 1개가 나오며, 기존 라이게이션이 되지 않은 91bp의 인서트 DNA까지 총 4개의 밴드가 나타날 수 있다(도 8 참조).

[0238] 연장반응에 따른 분석 결과, Q5 DNA 폴리머라제를 사용한 경우, 135bp 및 123bp의 밴드가 잘 보이지만 상단부에 기타의 밴드가 많이 존재하는 것으로 나타났고, Phi29 DNA 폴리머라제를 사용한 경우에는 대조군으로 사용한 SelPH-adaptor 라이게이션 시료와 비슷한 패턴을 보여 연장반응이 잘 진행되지 않았음을 알 수 있었으며, Bst 2.0 DNA 폴리머라제를 사용한 경우, 135bp 및 123bp의 밴드가 잘 보였고, 상단부에 다른 크기를 갖는 밴드들이 존재하지 않는 것으로 나타나, 본 발명의 연장 반응에서는 Bst 2.0 DNA 폴리머라제를 사용하는 것이 가장 적합하다는 것을 알 수 있었다(도 8a 참조).

[0240] <1-5> 본 발명의 SelPH-adaptor를 이용한 Phase I 및 Phase II 과정 수행

[0241] 앞서 실시예를 통해 본 발명의 SelPH-adaptor를 이용할 경우, 라이게이션 및 연장반응을 위한 최적의 조건 하에서 91bp 및 285bp 인서트 DNA를 대상으로 Phase I 및 Phase II 과정을 수행하여 NGS 분석을 수행하였다.

[0242] 91bp 및 285bp 인서트 DNA 각각에 대하여 본 발명의 SelPH-adaptor와 인서트 DNA를 1:20의 비율(몰농도 비율)로 혼합하고 NEXTFlex Rapid DNA Sequencing Bundle(Bioo Scientific) 제품을 사용하여 15분 동안 라이게이션을 수행하였다. 이후 Bst 2.0 DNA 폴리머라제를 이용하여 연장반응을 수행하여 Phase I 단계를 완료하였다. 이후 Phase I 단계까지 수행한 시료에 End-repair 및 A-Tail 후, Bioo Scientific 사의 NGS 어댑터인 NEXTFlex DNA 바코드 어댑터를 라이게이션하였다.

[0243] 이때 상기 NGS 어댑터는 P5와 T-tail된 58개 염기의 단일가닥, P7’와 index를 포함한 63개 염기의 단일 가닥 DNA 들이 12bp 길이로 hybridization된 Y자 모양을 갖는 어댑터이다. 91bp의 인서트 DNA를 사용한 경우, 1차 연장 시 135bp, 123bp, 103bp, 91bp의 4가지 밴드가 나올 수 있는데, 여기서 NGS 어댑터를 대략 60bp크기라고 계산하면, 195bp, 183bp, 163bp, 152bp의 순서대로 결과가 나오며 라이게이션 되지 않은 인서트 DNA도 함께 존재할 수 있다.

[0245] 실제 분석 결과를 보면, 도 9의 레인 4를 보면 60bp 부근에서 2개의 밴드가 관찰되어지는데, 이는 NGS 어댑터가 전기영동 과정에서 분리되어 단일가닥으로 나타난 것이며, 레인 3은 1차 연장반응 산물로서 두꺼운 밴드 2개가 존재하는데 이것들은 NGS 어댑터가 라이게이션 되지 않아 잔존한 1차 연장의 증폭산물로 판단되며 최상단의 진한 밴드가 NGS 어댑터가 제대로 라이게이션된 인서트 DNA임을 알 수 있다. 레인 5번은 NGS 어댑터의 라이게이션 후, 2차 연장반응 산물을 나타낸 것으로 진한 2개의 밴드는 SelPH-adaptor 부착 후, 연장반응된 Phase I의 산물들이 NGS adaptor와 라이게이션된 후, P7 프라이머와 Bst 2.0 DNA 폴리머라제에 의해 연장반응으로 나온 산물로서 크기도 약 두배 정도 늘어난 389bp, 365bp로 나타났다.

[0246] 또한, 285bp 인서트 DNA를 사용한 경우도 1차 연장 반응시, 329bp, 317bp, 297bp, 285bp 의 4가지 밴드가 나오는데 NGS adaptor를 약 60bp로 계산하면, 389bp, 377bp, 357bp, 345bp 순서로 나오게 된다. 285bp 인서트 DNA를 대상으로 Phase I 및 II 과정을 수행한 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이 예상된 크기의 증폭 산물을 확인할 수 있었다.

[0248] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 SelPH-adaptor를 사용한 시퀀싱 분석은 잘 작동될 수 있다는 것을 알 수 있었고, 이를 이용하여 NGS 라이브러리의 제작이 가능할 수 있음을 알 수 있었다.

[0249]

[0250] **<실시예 2>**

[0251] **효모 게놈(Yeast genome)을 대상으로 본 발명의 셀프 프라이밍 및 리플리케이팅 헤어핀 어댑터를 이용한 NGS 분석**

[0252] 실시예 1을 통해 인공적으로 제작한 인서트 DNA에 대해 본 발명의 SelPH-adaptor를 이용한 NGS 분석이 잘 이루어짐을 확인함에 따라 본 발명자들은 실제의 게놈 DNA에서도 본 발명의 어댑터가 잘 작동하는지 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0254] <2-1> 라이브러리 준비

[0255] 약 12Mb의 크기를 갖는 효모 게놈인 사카로마이세스 세레비지애(By4741)을 단편화하기 위해 일루미나용 NEXTFlex Ultra II FS DNA 라이브러리 프랩 키트(NEB사)를 사용하였고, 효모 게놈의 인서트 DNA의 크기는 100~150bp로 정하였다.

[0257] <2-2> 라이브러리 제조 확인

[0258] <2-1>에서 준비한 효모 게놈의 인서트 DNA를 대상으로 상기 실시예 1의 <1-5>와 동일한 조건으로 Phase I 및 II의 반응을 수행하여 반응산물을 확인하였다.

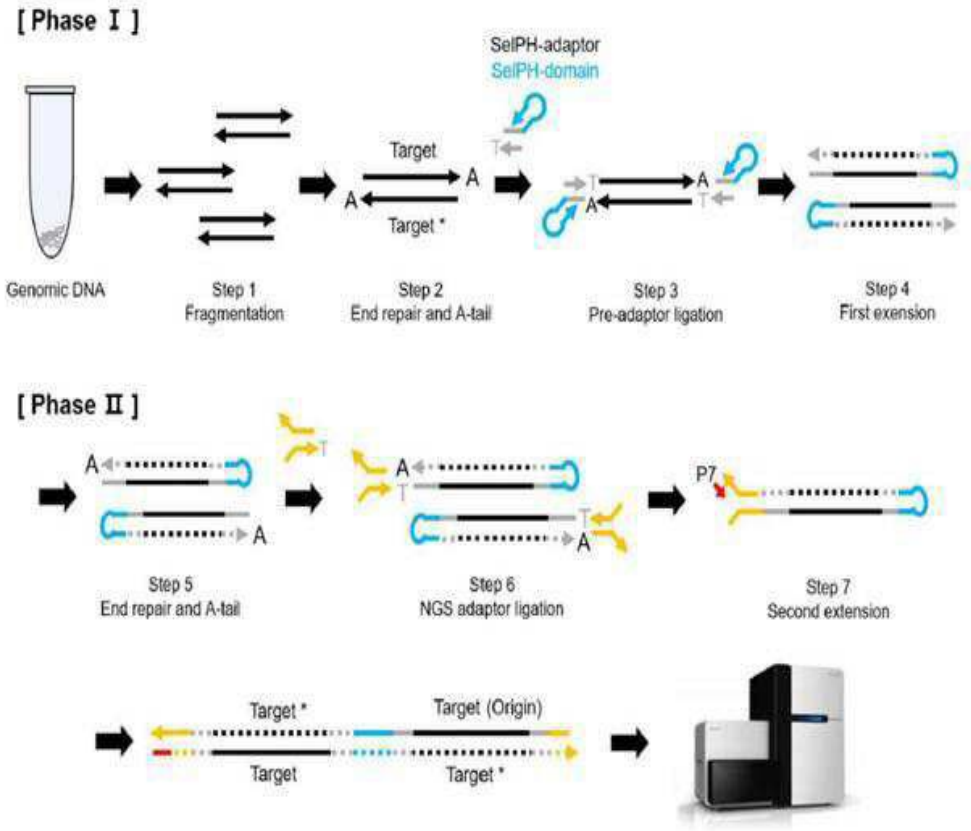
[0259] 그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 100~150bp의 인서트 DNA를 사용한 경우, Phase II의 연장반응까지 마친 경우 380~500bp의 목적하는 이중(duplicate)의 산물이 생성된 것을 확인할 수 있었다.

[0261] 이상의 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 SelPH-adaptor는SelPH domain의 자가 증폭(self-priming and replicating) 기능으로 1회의 연장반응을 수행하기 때문에 종래 수차례 요구되는 PCR에 의한 편향적인 증폭을 감소시킬 수 있으며, high fidelity의 DNA 폴리머라제를 사용하지 않아서 발생하는 오류 및 DNA 폴리머라제 자체의 오류율로 야기되는 오류도 본 발명의 SelPH-adaptor를 이용한 분석에서는 이중 형태의 산물(duplicate product)이 나오기 때문에 에러 수정이 가능한 효과가 있으며, DNA 손상으로 인해 발생할 수 있는 오류가 없을 뿐만 아니라 종래 Circular DNA 기반의 방법과 달리 DNA 조각의 길이 제한이 없어, 기존 방법 보다 낮은 오류율 및 높은 효율로 라이브러리의 제조가 가능하며 낮은 빈도로 존재하는 돌연변이 서열도 보다 정확하게 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

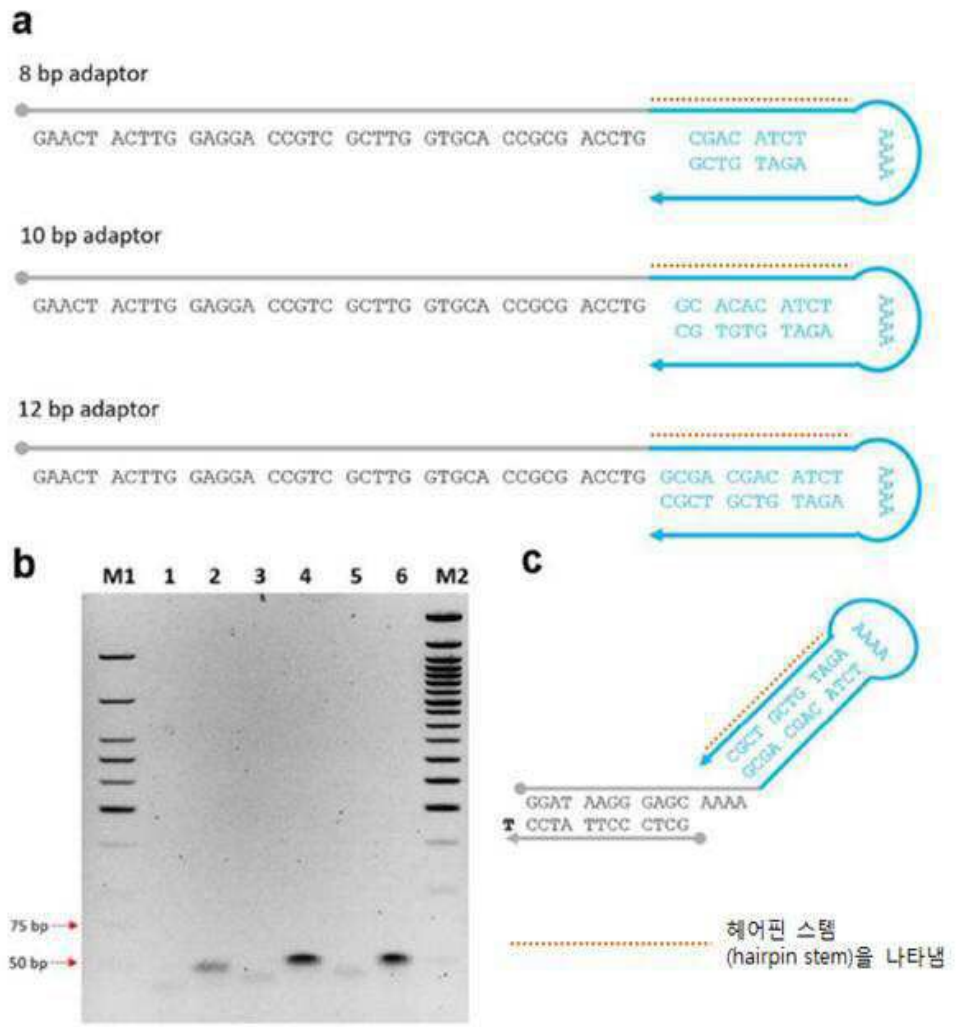
[0263] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

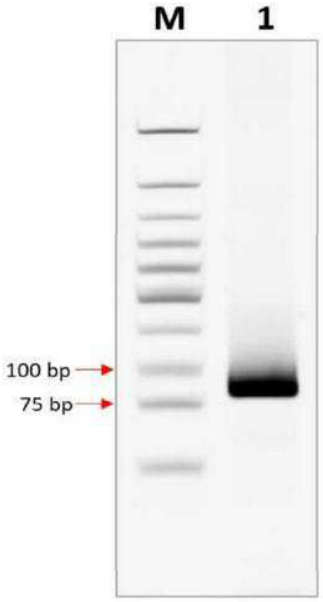
도면1



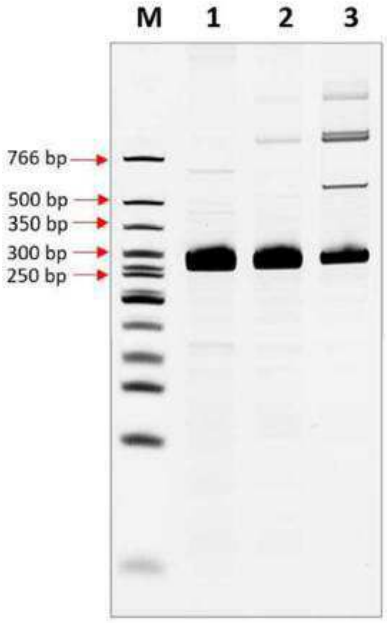
도면2


a
8 bp adaptor
GAACT ACTTG GAGGA CCGTC GCTTG GTGCA CCGCG ACCTG
CGAC ATCT
GCTG TAGA
AAAA
10 bp adaptor
GAACT ACTTG GAGGA CCGTC GCTTG GTGCA CCGCG ACCTG
GC ACAC ATCT
CG TGTG TAGA
AAAA
12 bp adaptor
GAACT ACTTG GAGGA CCGTC GCTTG GTGCA CCGCG ACCTG
GCGA CGAC ATCT
CGCT GCTG TAGA
AAAA
b
M1 1 2 3 4 5 6 M2
75 bp
50 bp
c
AAAA
CGCT GCTG TAGA
GCGA CGAC ATCT
GGAT AAGG GAGC AAAA
T CCTA TTCC CTCG
헤어핀 스템
(hairpin stem)을 나타냄

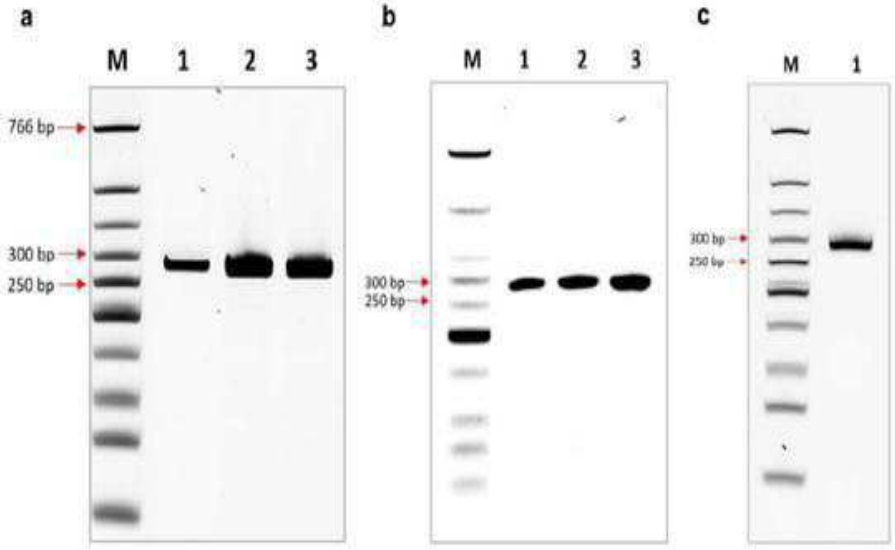
도면3


M
1
100 bp
75 bp

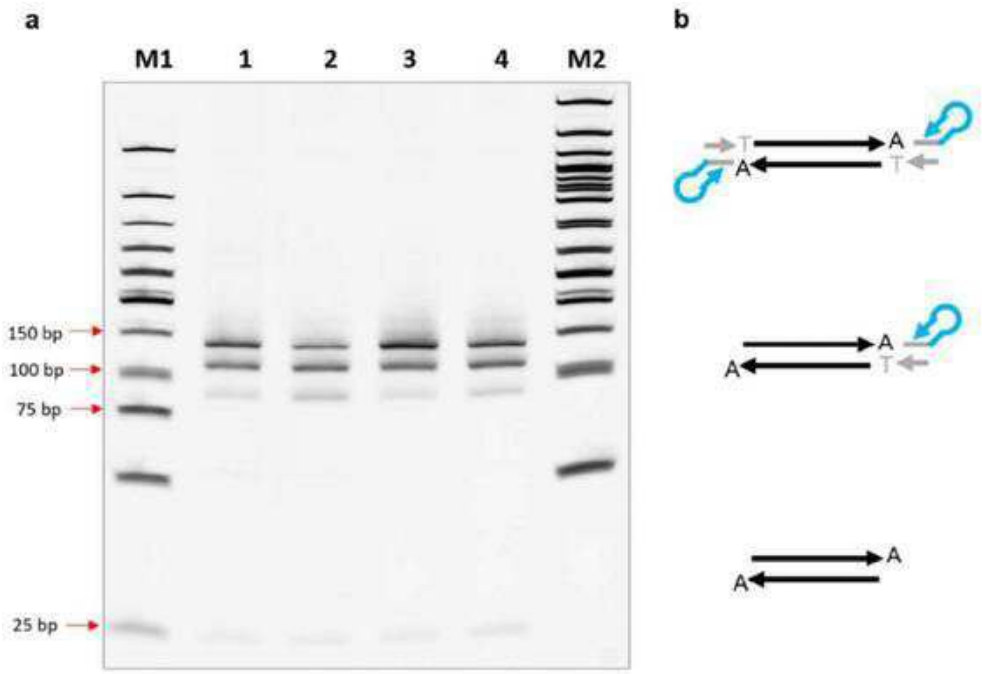
도면4


M
1
2
3
766 bp
500 bp
350 bp
300 bp
250 bp

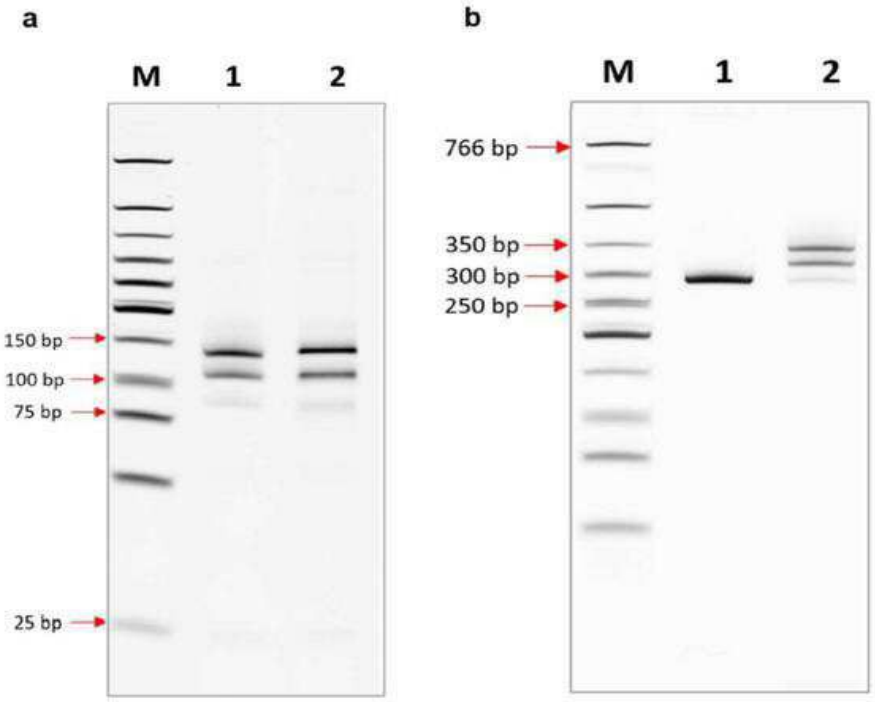
도면5


a
M
1
2
3
766 bp
300 bp
250 bp
b
M
1
2
3
300 bp
250 bp
c
M
1
300 bp
250 bp

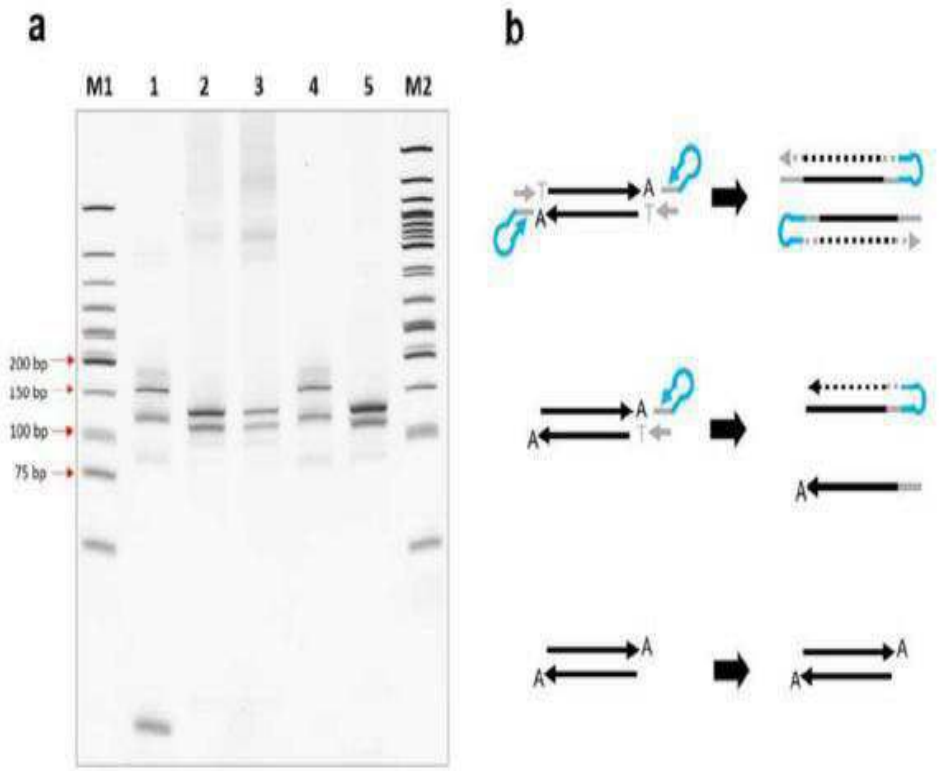
도면6


a
M1
1
2
3
4
M2
150 bp
100 bp
75 bp
25 bp
b
A
T
A
T
A
T
A
A
A
A

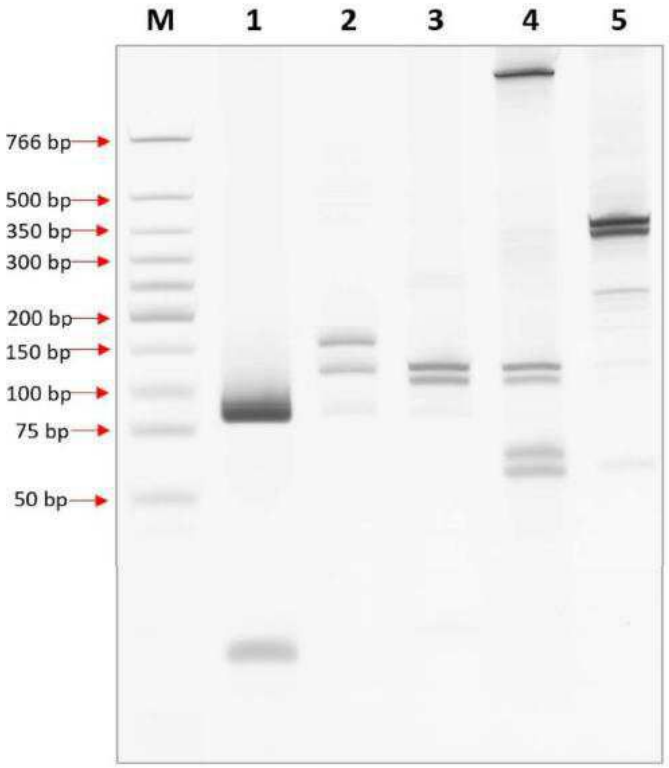
도면7


a
M
1
2
150 bp
100 bp
75 bp
25 bp
b
M
1
2
766 bp
350 bp
300 bp
250 bp

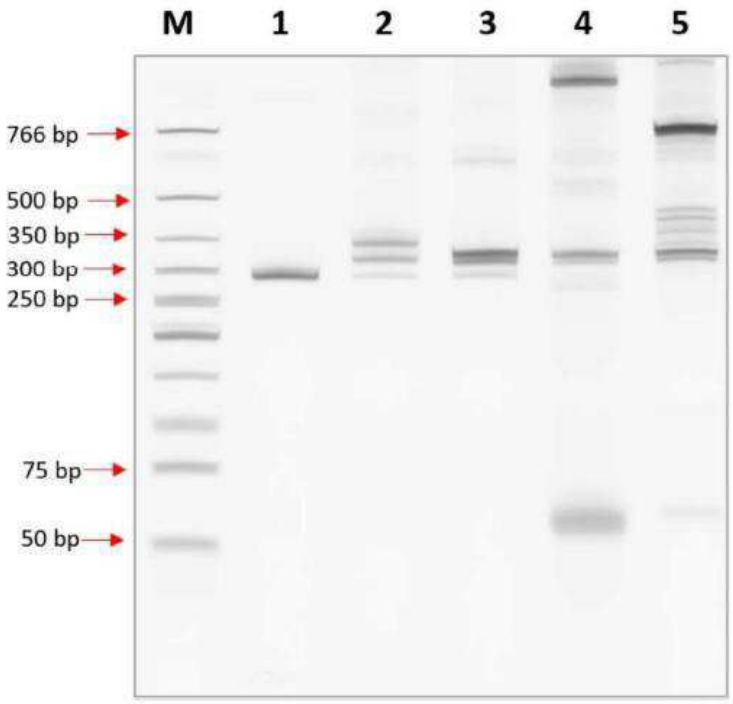
도면8


a
M1
1
2
3
4
5
M2
200 bp
150 bp
100 bp
75 bp
b
A
A
A
A
A
A

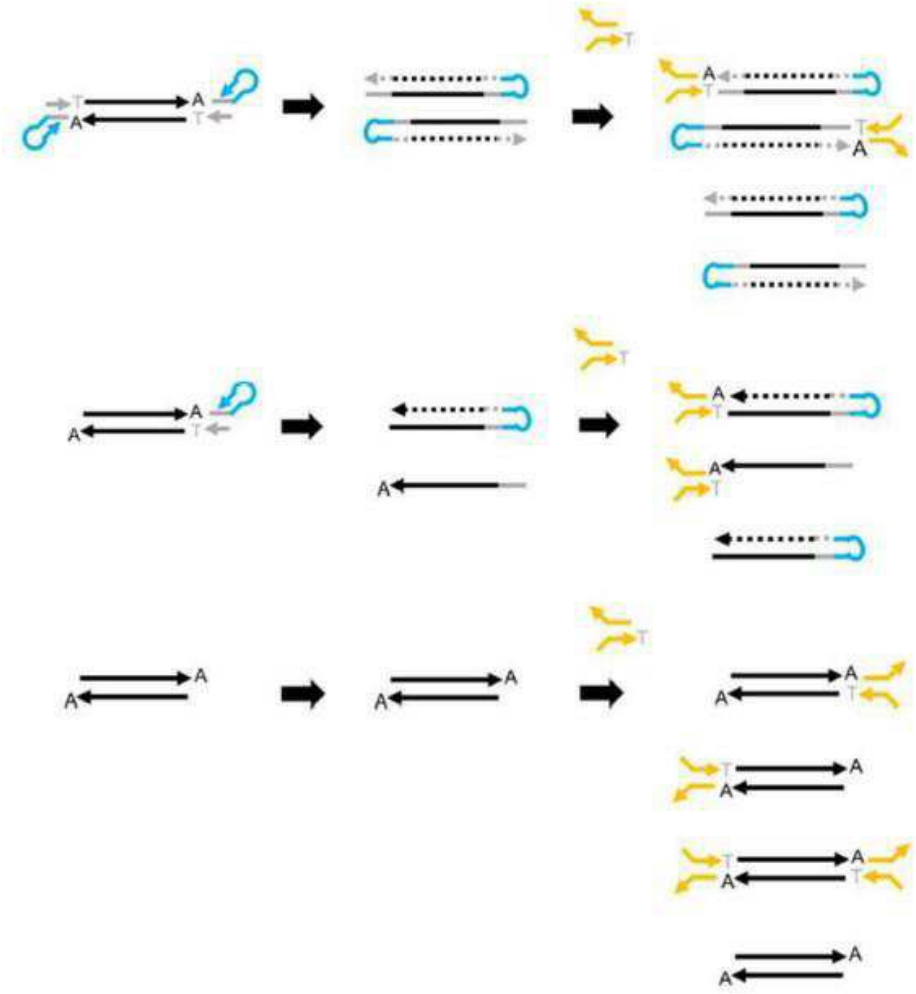
도면9


M
1
2
3
4
5
766 bp
500 bp
350 bp
300 bp
200 bp
150 bp
100 bp
75 bp
50 bp

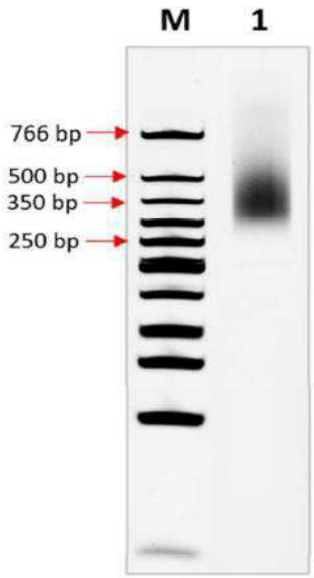
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Korea University

<120> Self-priming and replicating hairpin adaptor for NGS library preparation and method for making NGS library using the same

<130> NPDC80632

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8bp adaptor sequence

<400> 1

gaactacttg gaggaccgtc gcttggtgca ccgcgacctg cgacatctaa aaagatgtcg 60

60

<210> 2

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10bp adaptor sequence

<400> 2

gaactacttg gaggaccgtc gcttggtgca ccgcgacctg gcacacatct aaaaagatgt 60

cggc 64

<210> 3

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12bp adaptor sequence

<400> 3

gaactacttg gaggaccgtc gcttggtgca ccgcgacctg gcgacgacat ctaaaaagat 60

gtcgtcgc 68

<210> 4

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SelPH adaptor long strand sequence

<400> 4

ggataaggga gcaaaagcga cgacatctaa aaagatgtcg tcgc 44

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SelPH adaptor short strand sequence

<400> 5

gctcccttat cc 12

<210> 6

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> 91bp insert DNA sequence

<400> 6

ggcatgaact acttggagga ccgtcgcttg gtgcaccgcg acctggcagc caggaacgta 60

ctggtgaaaa caccgcagca tgtcaagatc a 91

<210> 7

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 91bp insert DNA sequence(complementary DNA of seq ID number 7)

<400> 7

gatcttgaca tgctgcggtg ttttcaccag tacgttcctg gctgccaggt cgcggtgcac 60

caagcgacgg tcctccaagt agttcatgcc a 91

<210> 8

<211> 285

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 285bp insert DNA sequence

<400> 8

ctgaattctg taataaaagc aaacagcctg gcttagcaag gagccaacat aacagatggg 60

ctggaagtaa ggaaacatgt aatgataggc ggactcccag cacagaaaaa aaggtagatc 120

tgaatgctga tcccctgtgt gagagaaaag aatggaataa gcagaaactg ccatgctcag 180

agaatcctag agatactgaa gatgttcctt ggataacact aaatagcagc attcagaaag 240

ttaatgagtg gttttccaga agtgatgaac tgttaggttc tgatg 285