



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0110902  
(43) 공개일자 2016년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/10 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/1013 (2013.01)  
C12N 15/1003 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2016-0029622  
(22) 출원일자 2016년03월11일  
심사청구일자 2016년03월11일  
(30) 우선권주장  
1020150034686 2015년03월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
재단법인 아산사회복지재단  
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)  
울산대학교 산학협력단  
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)  
(72) 발명자  
이정신  
서울특별시 강남구 언주로 406 35동 306호 (역삼동, 개나리아파트)  
최은경  
서울특별시 송파구 올림픽로35길 93 더스타리버 아파트 102동 2504호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
손민

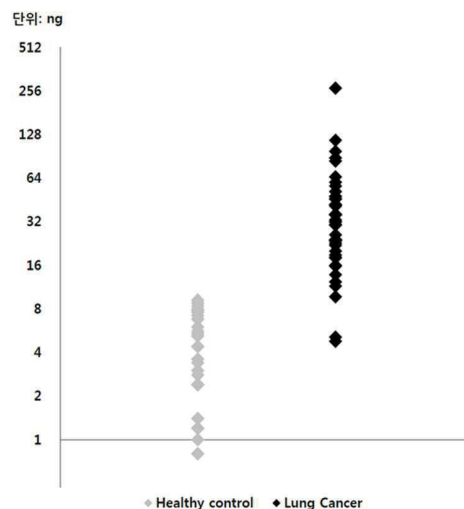
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 순환 유리 핵산의 분리 방법

### (57) 요약

본 발명은 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid)을 포함하는 시료로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 방법, 순환 유리 핵산 분리 키트 및 순환 유리 핵산 분리를 위한 용해 완충액에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12Q 1/6806** (2013.01)

(72) 발명자

**장세진**

경기도 성남시 분당구 야탑로 124 605동 704호 (야탑동, 탑마을백산아파트)

**천성민**

서울특별시 강동구 상암로 11 107동 1606호 (암사동, 선사현대아파트)

**김태임**

서울특별시 송파구 송이로 88, 대림아파트 2동 1008호

**이지영**

서울특별시 관악구 서원 4길 6, 205호

**김유진**

서울특별시 강동구 아리수로 74 다동 101호 (암사동, 현대타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711015882

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 동북아RND허브기반구축

연구과제명 아산-다나파버 암 유전체 연구 센터

기 여 율 1/2

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2011.07.01 ~ 2017.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015056895

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 순환 유리 핵산의 고효율 추출법 개발

기 여 율 1/2

주관기관 서울아산병원

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (a) 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid)을 포함하는 분리된 시료에 염 및 PEG(polyethylene glycol)를 포함하는 용액 및 자성 비드를 첨가하는 단계; 및
- (b) 상기 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 획득하고, 이로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 단계를 포함하는, 순환 유리 핵산을 포함하는 시료로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료는 혈장 또는 혈청을 용해 완충액(lysis buffer)으로 용해시켜 제조된 것인, 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 용해 완충액은 카오토로픽 염 chaotropic salt), 킬레이트제(chelating agent), 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant) 및 Tris-Cl을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 4

제2항에 있어서,

상기 용해 완충액은 2 내지 6M 카오토로픽염; 1 내지 50mM 킬레이트제; 0.1 내지 5% (w/v) 비이온성 계면활성제; 및 10 내지 100mM Tris-Cl을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용해 완충액의 pH는 pH 7.0 내지 8.5인 것인, 방법.

#### 청구항 6

제3항에 있어서,

상기 카오토로픽 염은, 구아니디늄(guanidinium) 염, 리튬(lithium) 염, 마그네슘 염, SDS(Sodium dodecyl sulfate), 티오우레아(thiourea), 우레아(urea), 부탄올 및 에탄올로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 구아니디늄 염은 구아니디늄 클로라이드인, 방법.

#### 청구항 8

제3항에 있어서, 상기 킬레이트제(chelating agent)는 DTPA(diethylenetriaminepentaacetic acid), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), EGTA(ethylene glycol tetraacetic acid), 및 NTA(N,N-bis(carboxymethyl)glycine)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.

#### 청구항 9

제3항에 있어서,

상기 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant)는 트리톤(triton) X-100인 것인, 방법.

#### 청구항 10

제2항에 있어서, 상기 용해 완충액은 구아니디늄 클로라이드, EDTA, 트리톤 X-100 및 Tris-Cl을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 상기 염 및 PEG를 포함하는 용액은 염화나트륨 및 PEG를 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 상기 PEG(polyethylene glycol)는 평균 분자량이 6,000 내지 10,000Da인 PEG인 것인, 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 상기 염 및 PEG를 포함하는 용액은 1 내지 4M 염 및 10 내지 60%(w/v)의 PEG를 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 14

제2항에 있어서, 용해 완충액과 함께 단백질을 분해효소를 혈장 또는 혈청에 첨가하는 것을 포함하는 것인, 방법.

#### 청구항 15

제1항에 있어서, (b) 단계는 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 세척한 후, 자성 비드를 획득하고, 이로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 것인, 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 세척은 50 내지 95%(v/v) 에탄올 용액을 사용하여 수행되는 것인, 방법.

#### 청구항 17

제2항에 있어서, 상기 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료는

분리된 혈액 시료에서 혈장을 분리하기 위해 제1 원심분리하는 단계; 및

제1 원심분리된 시료에서 혈장을 분리하고, 분리된 혈장을 제2 원심분리하는 단계를 포함하는 방법으로 수득된 것인, 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 제1 원심분리는 1,900 내지 2,000 x g의 조건에서 원심분리하고, 제2 원심분리는 12,000 내지 18,000 x g의 조건에서 원심분리하는 것인, 방법.

#### 청구항 19

용해 완충액(lysis buffer); 염 및 PEG(polyethylene glycol)를 포함하는 용액; 및 자성 비드를 포함하는, 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid) 분리 키트.

#### 청구항 20

제19항에 있어서,

상기 용해 완충액은 카오토로픽 염(chaotropic salt), 킬레이트제(chelating agent), 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant) 및 Tris-Cl을 포함하는 것인, 키트.

#### 청구항 21

제19항에 있어서,

상기 용해 완충액은 2 내지 6M 카오토로픽염; 1 내지 50mM 킬레이트제; 0.1 내지 5% (w/v)비이온성 계면활성제; 및 10 내지 100mM Tris-Cl을 포함하는 것인, 키트.

#### 청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용해 완충액의 pH는 pH 7.0 내지 8.5인 것인, 키트.

#### 청구항 23

제20항에 있어서,

상기 카오토로픽 염은, 구아니디늄(guanidinium) 염, 리튬(lithium) 염, 마그네슘 염, SDS(Sodium dodecyl sulfate), 티오우레아(thiourea), 우레아(urea), 부탄올 및 에탄올로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 키트.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 상기 구아니디늄 염은 구아니디늄 클로라이드인, 키트.

#### 청구항 25

제20항에 있어서,

상기 킬레이트제(chelating agent)는 DTPA(diethylenetriaminepentaacetic acid), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), EGTA(ethylene glycol tetraacetic acid), 및 NTA(N,N-

bis(carboxymethyl)glycine)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 키트.

#### 청구항 26

제20항에 있어서,

상기 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant)는 트리톤(triton) X-100인 것인, 키트.

#### 청구항 27

제19항에 있어서, 상기 용해 완충액은 구아니딘염 클로라이드, EDTA, 트리톤 X-100 및 Tris-Cl을 포함하는 것인, 키트.

#### 청구항 28

제19항에 있어서, 상기 염 및 PEG(polyethylene glycol)를 포함하는 용액은 염화나트륨 및 PEG를 포함하는 것인, 키트.

#### 청구항 29

제19항 또는 제28항에 있어서, 상기 PEG(polyethylene glycol)는 평균 분자량이 6,000 내지 10,000 Da인 PEG인 것인, 키트.

#### 청구항 30

제19항 또는 제28항에 있어서, 상기 염 및 PEG를 포함하는 용액은 1 내지 4M 염 및 10 내지 60%(w/v)의 PEG를 포함하는 것인, 키트.

#### 청구항 31

제19항에 있어서, 상기 키트는 추가로 자성비드 세척 완충액, 자성비드 분리 기구, 또는 둘 다를 추가로 포함하는 것인, 키트.

#### 청구항 32

제31항에 있어서, 상기 자성비드 세척 완충액은 50 내지 95%(v/v) 에탄올 용액인 것인, 키트.

#### 청구항 33

카오트로픽 염 chaotropic salt), 킬레이트제(chelating agent), 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant) 및 Tris-Cl을 포함하는, 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid) 분리를 위한 용해 완충액.

### 발명의 설명

### 기술 분야

본 발명은 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid)을 포함하는 시료로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 방법, 순환 유리 핵산 분리 키트 및 순환 유리 핵산 분리를 위한 용해 완충액에 관한 것이다.

[0001]

## 배경 기술

[0003] 혈액에 존재하는 암 특이적 세포 외 DNA 단편 및 mRNA, 또는 모체혈(maternal blood)에 존재하는 태아의 핵산(fetal nucleic acid)과 같은 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid, cfNA)이 혈청 또는 혈장 내에 1000bp 이하의 DNA, 또는 100nt 이하의 RNA 형태로 존재하는 것이 알려져 있다. 특히, 암의 발달 과정 중 암의 괴사 혹은 사멸된 세포에 의해 유리된 핵산이 혈장 내에 존재하는 것이 알려져 있다. Kamat *et al* (Cancer Biol Ther. 2006 Oct;5(10):1369-74.)은 누드 마우스에 암세포를 주입하고 이후 cfDNA의 양을 측정하였을 때, cfDNA의 양이 암의 크기를 잘 반영하고, 이후의 치료에 대한 반응도 잘 반영한다고 보고한 바 있다. 이렇듯 cfDNA는 다양한 위치의 암에서 다양하게 유리되어 암의 발달, 진행 및 전이된 암의 특성을 나타내는 것으로 알려져 있어, 이를 암의 연구 및 진단에 이용하고자 순환 유리 핵산의 효과적인 분리에 대한 필요성이 강조되고 있다.

[0005] 순환 유리 핵산의 분리 방법으로, 컬럼을 이용하여 순환 유리 핵산을 분리하는 키트 및 방법 등이 알려져 있다(QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit). 그러나, 기존에 알려진 방법에 비하여 개선된 순환 유리 핵산의 분리 키트 및 방법의 개발이 여전히 요구된다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 순환 유리 핵산을 효과적으로 수득할 수 있는 키트 및 방법의 개발을 위하여 예의 노력한 결과, 순환 유리 핵산을 포함하는 시료를 용해시키고, 여기에 염 및 PEG를 포함하는 용액과 자성 비드를 첨가하여 순환 유리 핵산이 결합된 자성 비드로부터 순환 유리 핵산을 획득하는 방법을 개발하였다. 상기 개발된 방법을 사용하여 순환 유리 핵산을 포함하는 시료에서 순환 유리 핵산을 효과적으로 분리할 수 있음을 확인하였고, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid)을 포함하는 시료로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 용해 완충액(lysis buffer); 염 및 PEG를 포함하는 용액; 및 자성 비드를 포함하는, 순환 유리 핵산 분리 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 카오트로픽 염(chaotropic salt), 킬레이트제(chelating agent), 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant) 및 Tris-Cl을 포함하는, 순환 유리 핵산 분리를 위한 용해 완충액을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0013] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 구체적인 하나의 양태는

[0014] (a) 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료에 염 및 PEG(polyethylene glycol)를 포함하는 용액 및 자성 비드를 첨가하는 단계; 및

[0015] (b) 상기 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 획득하고, 이로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 단계를 포함하는, 순환 유리 핵산을 포함하는 시료로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 방법이다. 상기 핵산을 분리하는 방법은 PREP으로도 불릴 수 있다.

[0017] 본 발명에서 용어, "순환 유리 핵산(circulating cell-free nucleic acid)"은 혈액에서 순환하며 존재하는 DNA를 말한다. 상기 순환 유리 핵산은 구체적으로 순환 유리 DNA(circulating cell-free DNA, cfDNA), 순환 유리

RNA 등을 포함하며, 구체적으로는 순환 유리 DNA일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 순환 유리 핵산은 일반적으로 혈장 또는 혈청에 1000bp 이하(DNA), 100nt 이하(RNA)의 길이를 나타내나, 이에 제한되지 않는다. 상기 순환 유리 핵산은 혈액 내에 소량으로 존재하여 이를 높은 수율로 획득하는 방법의 개발이 요구되어 왔다.

[0018] 본 발명에서는, 순환 유리 핵산을 포함하는 시료를 자성 비드; 및 염 및 PEG를 포함하는 용액과 반응시키고, 자성 비드에 결합된 순환 유리 핵산을 분리하는 방법을 개발하였다. 자성 비드와 순환 유리 핵산을 반응시킴에 있어서, 염 및 PEG를 포함하는 용액을 모두 포함하는 용액을 사용하는 경우, 자성 비드가 순환 유리 핵산을 보다 효과적으로 포획할 수 있어, 고수율로 순환 유리 핵산을 수득할 수 있음을 확인하였다. 나아가, 본 발명에서는 상기 방법에 있어 용해 완충액 및 혈장 제조 역시 최적화하여 재현성있게 순환 유리 핵산을 효과적으로 분리할 수 있는 기술을 개발하였다.

[0020] 이하 본 발명의 단계 및 각 구성을 보다 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명의 방법에서 (a) 단계는 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료에 염 및 PEG를 포함하는 용액, 및 자성 비드를 첨가하여 순환 유리 핵산이 자성 비드에 결합하도록 하는 단계이다.

[0024] 본 발명에서, 상기 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료는 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료라면 그 종류는 특별히 제한되지 않으나, 혈장 또는 혈청일 수 있다. 구체적으로, 순환 유리 핵산의 분석 또는 수득이 필요한 개체로부터 분리된 혈장 또는 혈청, 보다 구체적으로는 혈장일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 상기 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 시료는 혈장 또는 혈청을 용해 완충액(lysis buffer)으로 용해시켜 제조한 것일 수 있다.

[0027] 이에 따라 본 발명의 방법은 순환 유리 핵산을 포함하는 분리된 혈장 또는 혈청 시료에 용해 완충액을 첨가하는 제1 단계; 상기 제1 단계에서 용해된, 순환 유리 핵산을 포함하는 상기 시료에 염 및 PEG를 포함하는 용액 및 자성 비드를 첨가하는 제2 단계; 및 상기 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 획득하고, 이로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 제3 단계를 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0029] 혈장 또는 혈청의 용해를 위해 사용되는 상기 용해 완충액은 구체적으로, 카오트로픽 염 chaotropic salt), 킬레이트제(chelating agent), 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant) 및 Tris-Cl을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 상기 조성을 가진 용해 완충액을 사용하는 경우, 킬레이트제인 EDTA, 카오트로픽염인 SDS, 및 Tris-Cl로 구성된 용해 완충액을 비롯한 다른 완충액을 사용한 경우에 비하여, 자성 비드의 분리가 용이하거나/하며 수율이 높음을 확인하였다.

[0032] 본 발명에서 카오트로픽 염은, 물 분자 간의 수소 결합을 방해할 수 있는 물질을 포함한다 또한, 상기 카오트로픽 염은 단백질의 구조 변화를 야기하여 상기 단백질과 DNA 간의 결합력을 약화시키고, 이에 따라 DNA를 순수하게 분리하는 정도를 높이는 역할을 수행할 수 있다.

[0033] 상기 카오트로픽 염의 예로서, 구아니디늄(guanidinium) 염, 리튬(lithium) 염, 마그네슘 염, SDS(Sodium dodecyl sulfate), 티오우레아(thiourea), 우레아(urea), 부탄올 또는 에탄올을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 상기 구아니디늄 염의 예로는, 구아니디늄 클로라이드를 들 수 있으며, 상기 리튬 염의 예로는 리튬 퍼클로레이트(lithium perchlorate), 리튬 아세테이트(lithium acetate)를, 마그네슘 염의 예로는 마그네슘 클로라이드를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 구아니디늄 클로라이드를 카오트로픽 염으로서 사용하였다.

- [0036] 본 발명에서, 킬레이트 제는  $Mg^{2+}$  및  $Ca^{2+}$ 와 같은 이가 양이온을 격리시키기 위하여 사용될 수 있으며, 이에 따라 DNA를 이를 분해하는 효소들로부터 보호할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 상기 킬레이트 제의 예로는, DTPA(diethylenetriaminepentaacetic acid), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), EGTA(ethylene glycol tetraacetic acid), 및 NTA(N,N-bis(carboxymethyl)glycine)로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 EDTA를 킬레이트제로 사용하였다.
- [0038] 상기 EDTA는 EDTA 화합물(예,  $K_2EDTA$ ,  $K_3EDTA$ , 또는  $Na_2EDTA$ )중 EDTA 부분을 나타내는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 본 발명에서, 비이온성 계면활성제(nonionic surfactant)는 한 분자 내에 친수성과 소수성 부분을 함께 가지고 있는 물질로서, 해리 시 비이온성인 특성을 나타내는 물질이다.
- [0041] 본 발명에서 사용될 수 있는 상기 비이온성 계면활성제의 예로는, 트리톤(triton) X-100을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 상기 용해 완충액은 2 내지 6M 카오트로픽염; 1 내지 50mM 킬레이트제; 0.1 내지 5% (w/v) 비이온성 계면활성제; 또는/및 10 내지 100mM Tris-Cl을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 여기서, 상기 용해 완충액의 pH는 pH 7.0 내지 8.5일 수 있다.
- [0045] 보다 구체적으로, 상기 용해 완충액은 구아니디늄 클로라이드, EDTA, 트리톤 X-100 및 Tris-Cl을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 또한, 상기 용해 완충액으로 혈장 또는 혈청 시료를 용해시킬 때, 단백질분해효소를 함께 첨가할 수 있다.
- [0048] 상기 단백질분해효소는 핵산 분리에 통상적으로 사용되는 다양한 단백질분해효소가 사용될 수 있으나, 그 예로 단백질분해효소 K(proteinase K)를 사용할 수 있다.
- [0050] 한편, 상기 분리된 혈장 시료는 분리된 혈액 시료에서 혈장을 분리하기 위해 제1 원심분리하는 단계; 및 제1 원심분리된 시료에서 혈장을 분리하고, 분리된 혈장을 제2 원심분리하는 단계를 포함하는 방법으로 수득된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] \*본 발명에서는, 혈액 시료에서 혈장 시료를 제조하는 경우에 있어서 저속도에서 1차 원심분리를 수행하고, 이후 고속에서 2차 원심분리를 수행하는 경우, 백혈구(WBC) 등에서 유래된 DNA의 오염 없이 cfDNA를 보다 순수하게 분리할 수 있음을 확인하였다.
- [0053] 구체적으로, 상기 제1 원심분리는 1900 내지 2000 x g의 조건에서 원심분리하고, 제2 원심분리는 12000 내지 18000 x g의 조건에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 기술한 원심분리는 4 °C 내외의 온도 조건에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 본 발명에서, 상기 자성 비드와 염 및 PEG를 포함하는 용액을 상기 시료에 첨가하는 것은 순차적으로, 또는 동시에 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 순차적으로 수행하는 경우, 자성 비드의 첨가 후 상기 용액을 첨가하거나, 상기 용액을 첨가한 다음, 자성 비드를 첨가하는 방식 모두 수행될 수 있다.

- [0058] 본 발명에서, 상기 자성 비드와 함께 첨가되는 염 및 PEG를 포함하는 용액은 특별히 이에 제한되지는 않으나, 100bp 혹은 100nt 이하의 작은 핵산 단편을 포획하는 것에 도움을 줄 수 있다.
- [0060] 상기 염 및 PEG(polyethylene glycol)를 포함하는 용액에서 상기 염은 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 그 예로 염화나트륨일 수 있다.
- [0061] 상기 용액의 PEG는 평균 분자량이 6,000 내지 10,000 Da인 PEG일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 보다 구체적으로, 상기 염 및 PEG를 포함하는 용액은 1 내지 4M 염 및 10 내지 60 %(w/v)의 PEG를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 본 발명에서 자성 비드는, 자기장에 반응하는 입자 또는 비드를 말한다. 일반적으로, 자성 비드는 자기장을 가지지 않으나, 자기장에 노출되는 자기 쌍극자를 형성하는 물질을 말한다. 예컨대, 자기장 하에서 자화될 수 있으나, 자기장의 부재 하에서는 스스로는 자성을 가지지 않는 물질을 말한다. 본 발명에서 사용되는 자성은 상자성(paramagnetic) 또는 초상자성(superparamagnetic) 물질을 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 본 발명의 목적상 상기 자성 비드는 핵산에 결합하는 성질을 가지는 비드임이 바람직하고, 그 예로 핵산에 결합하는 관능기, 예컨대 -COOH기를 가지는 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 본 발명에서 상기 (b) 단계는 상기 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 획득하고, 이로부터 순환 유리 핵산을 분리하는 단계이다.
- [0069] 구체적으로, 상기 (b) 단계는 상기 (a) 단계에서 첨가된 자성 비드에 부착되어 있는 순환 유리 핵산을 자성 비드로부터 분리하는 단계이다.
- [0071] 상기 자성 비드가 첨가된 시료에서 자성 비드를 획득하기 전, 자성 비드를 세척하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0072] 이때, 상기 자성 비드의 세척은 50 내지 95%(v/v) 에탄올 용액, 구체적으로는 80 내지 90 %(v/v) 에탄올 용액을 사용하여 수행되는 것일 수 있다.
- [0073] 이와 같은 세척 과정은 자성 비드를 자성 스탠드 하에 두어, 자성 비드를 모은 다음, 상층액을 제거하고, 여기에 세척 완충액을 첨가하여 세척하는 방식으로 수행할 수 있다. 또한, 이러한 세척 단계는 1회 이상 수행할 수 있다.
- [0075] \*이와 같은 세척 과정을 선택적으로 수행한 다음, 자성 비드를 분리하고, 분리된 자성 비드에 용출 완충액(elution buffer)을 첨가하는 등의 방식으로 자성 비드로부터 순환 유리 핵산을 분리할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 구체적인 다른 양태는, 용해 완충액; 염 및 PEG를 포함하는 용액; 및 자성 비드를 포함하는, 순환 유리 핵산 분리 키트이다.
- [0078] 용해 완충액, 염 및 PEG를 포함하는 용액, 및 자성 비드에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0079] 본 발명의 순환 유리 핵산 분리 키트는 그 유래에 제한되지 않고 cfDNA를 분리할 수 있으므로, 암 환자 또는 산모에서 cfDNA를 추출할 수 있다. 따라서, 암 환자의 혈액에서 추출한 cfDNA를 이용하여 해당 암 환자 특이적인 유전변이를 진단할 수 있다. 또한, 산모의 혈장 내에는 태아로부터 유래된 cfDNA가 다량 존재하므로, 산모 혈액에서 추출한 cfDNA를 이용하여, 태아의 비침습적 산전 진단에 활용할 수 있다. 즉, 본 발명의 순환 유리 핵산 분리 키트는 암 진단용 또는 산전 진단용 등으로 사용될 수 있으며, cfDNA를 활용할 수 있는 분야라면 그 용도

에 특별히 제한되지 않는다.

[0080] 또한, 상기 키트는 핵산 분리에 일반적으로 사용되는 다른 기구, 용액 등을 추가로 포함할 수 있으며, 순환 유리 핵산 분리를 위한 지시서 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0081] 또한, 상기 키트는 추가로 자성비드 세척 완충액, 및 자성비드 분리 기구(예, 자성 스탠드(magnetic stand))를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0083] 본 발명의 구체적인 다른 양태는, 카오트로픽 염, 킬레이트제, 비이온성 계면활성제 및 Tris-Cl을 포함하는, 순환 유리 핵산 분리를 위한 용해 완충액이다.

[0084] 카오트로픽 염, 킬레이트제, 비이온성 계면활성제, 순환 유리 핵산 및 용해 완충액에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

### 발명의 효과

[0086] 본 발명의 순환 유리 핵산 분리 키트 및 방법에 따르면 순환 유리 핵산 분리를 포함하는 시료, 특히 혈장 또는 혈청 시료에서 순환 유리 핵산을 단기간 내에 고수율로 수득할 수 있는 효과를 가진다.

### 도면의 간단한 설명

[0088] 도 1은, 정상인 및 폐암 환자의 혈장 200  $\mu$ l로부터 수득한 cfDNA의 양을 그래프로 나타낸 것이다. 여기서, 회색 마름모는 정상인로부터 분리한 혈장에 대한 실험 결과를, 검은색 마름모는 폐암 환자로부터 분리한 혈장에 대한 실험 결과를 나타낸다. y 축은 cfDNA의 양(ng)을 나타낸다.

도 2는, 폐암 환자로부터 분리한 혈장을 사용하여 cfDNA Prep을 2번 수행한 후, 재현성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3a 및 b는, 본 발명의 방법에 따라 난소암 환자의 혈장에서 분리한 cfDNA의 패턴을 Bioanalyzer로 분석한 결과를 나타낸 것이다. 혈장 cfDNA는 뉴클레오솜 단위로 단편화되어 있는 것으로 알려져 있는데, 본 발명의 방법에 따라 수득한 cfDNA의 크기가 뉴클레오솜 단위인 대략 180bp 로 단편화 되어 있는 결과를 나타내어, 본 발명의 방법이 cfDNA 분리에 적합함을 시사하였다.

도 4는, 본 발명의 방법에 따라 분리한 cfDNA를 주형으로 사용하여 ~100BP와 237BP 크기의 PCR 산물이 증폭되는지 여부를 확인한 결과이다. 도 4에 나타난 바와 같이, 상기 PCR 산물이 잘 증폭되어, 본 발명의 방법에 따라 정제된 cfDNA가 DNA 중합효소의 효소 반응에 영향을 주지 않는, 높은 순도를 가지고 있음을 나타내었다.

도 5a는, 1 단계 원심분리 방법 및 2 단계 원심분리 방법으로 정상인의 혈액으로부터 혈장을 분리한 다음, cfDNA PREP을 수행하여 수득된 DNA 양을 확인한 결과를 각각 나타낸 것이다. x 축은 각 혈장 시료의 번호를, y 축은 cfDNA 양(단위: ng)을 나타낸다.

도 5b는, 1 단계 원심분리 방법 및 2 단계 원심분리 방법으로 정상인의 혈액으로부터 혈장을 분리한 다음, cfDNA PREP을 수행한 다음, 분리한 cfDNA를 Bioanalyzer로 분석한 결과를 나타낸다.

도 6은, 본 발명에 따른 방법(CCGD\_cfDNA로 명명)과 Qiagen Kit를 각각 사용하여 cfDNA를 분리한 결과를 나타내는 도이다. 막대 그래프 위에 표시된 숫자는 DNA 양(단위: ng)을 나타낸다.

도 7은, 비교 완충액 1(카오트로픽 염, 킬레이트 제 및 Tris-Cl을 포함) 및 본 발명에 따른 실시 완충액을 사용하여 cfDNA PREP을 수행한 결과를 나타낸 도이다. 막대 그래프 위에 표시된 숫자는 DNA 양(단위: ng)을 나타낸다.

도 8은, 비교 완충액 2(킬레이트 제, 비이온성 계면활성제 및 Tris-Cl을 포함) 및 본 발명에 따른 실시 완충액을 사용하여 cfDNA PREP을 수행한 결과를 나타낸 도이다. 막대 그래프 위에 표시된 숫자는 DNA 양(단위: ng)을 나타낸다.

도 9는 10 명의 산모로부터 분리된 혈장에서 본 발명에 따른 방법(CCGD\_cfDNA로 명명)과 Qiagen Kit를 각각 사

용하여 분리한 cfDNA의 수율을 Picogreen 정량법 (PG) 및 RQ-PCR 정량법을 이용하여 확인한 결과를 나타낸다.

도 10은 Picogreen 정량값 (PG) 및 RQ-PCR 정량값의 상관 계수를 분석한 결과를 나타낸다.

도 11은 10 명의 산모로부터 분리된 혈장에서 본 발명에 따른 방법(CCGD\_cfDNA로 명명)과 Qiagen Kit를 각각 사용하여 분리한 cfDNA의 품질을 나타낸다.

도 12는 산모로부터 분리된 혈장에서 본 발명에 따른 방법(CCGD\_cfDNA로 명명)과 Qiagen Kit를 각각 사용하여 분리한 cfDNA의 순도를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되지는 않는다.

#### [0091] 실시예 1: 혈장 시료의 제조

[0093] 신선한 혈액 시료를 4 °C에서 1,900 x g로 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 그 다음, 분리된 혈장을 다시 4 °C에서 16,000 x g로 10분간 원심분리하고, 상층액을 분리하였다. 그 다음, 이렇게 수득한 혈장 시료는 DNA 분리 전에 -20°C에서 저장하였다. 특별히 기술된 경우를 제외하고는 하기 실시예에서는 상기 방법을 이용하여 제조된 혈장을 사용하였다.

#### [0095] 실시예 2: cfDNA의 분리

[0097] 동결된 혈장 시료는 DNA 분리 전에 녹인 후, 튜브에 혈장 시료 200 $\mu$ l를 담았다. 그 다음, 상기 시료 튜브에 혈장 용해 완충액(5.5M 구아니딘 HCl, 50mM Tris-Cl, pH 8.0, 20mM EDTA, pH 8.0, 1.3% Triton X-100) 400 $\mu$ l 및 단백질 분해효소 K(proteinase K) 10 $\mu$ l를 첨가하고, 이를 혼합하였다.

[0098] 그 다음, 상기 튜브에 자성 비드(AMPure XP, Backman Coulter 사) 100 $\mu$ l 및 용액 A(2.5M NaCl, 20% PEG-8000) 1100 $\mu$ l를 각 튜브에 첨가하고, 이를 혼합하였다. 그 다음, 자성 스탠드(magnetic stand)에서 상기 튜브를 인큐베이션하고, 상기 튜브의 상층액을 제거하였다.

[0099] 그 다음, 세척 완충액(85% EtOH) 1mL를 첨가하고 반응시킨 후, 자성 스탠드 위에서 에탄올 상층액을 제거하였고, 상기 세척 과정을 수회 반복하였다.

[0100] 그 다음, 비드를 건조시켰고, 자성 스탠드에서 반응 튜브를 빼어낸 다음, 용출 완충액(순수 분리된 3차 증류수 또는 10 mM TE 완충액)을 첨가하였다. 그 다음, 자성 스탠드 위에서 반응 튜브를 둔 다음, 용출액을 분리하여, cfDNA 시료를 수득하였다.

#### [0102] 실시예 3: 정상인 및 폐암 환자의 혈장으로부터의 cfDNA 시료 수득

[0104] 상기 실시예 2의 cfDNA 분리 방법을 이용하여 정상인과 환자 간의 cfDNA 추출 양을 비교하는 실험을 진행하였다.

[0105] 구체적으로, 정상 개체의 시료 31개, 폐암 환자 시료 49개에서 얻은 혈장을 각각 200 $\mu$ l 이용하여 cfDNA를 분리하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 상기 시료는 서울 아산병원 BRC (Bio Resource Center)에서 분양 받았다.

[0106] 그 결과, 정상 개체와 폐암 환자에서 얻은 cfDNA의 양을 비교하였을 때, 폐암 환자에서 훨씬 많은 cfDNA를 얻을 수 있었고, 이는 당업계에 공지된 내용으로부터 예상된 사실이었다. 특히, 정상 개체의 200 $\mu$ l 혈장 시료에서 수득된 cfDNA의 양은 중간 값이 4.4ng (최대값: 9.2ng, 최소값: 0.8ng)이었고, 폐암 환자의 200 $\mu$ l 혈장 시료에서

수득된 cfDNA의 양은 중간 값이 32.0ng (최대값: 268.0 ng, 최소값: 4.78 ng)을 나타내어, 200 $\mu$ l 혈장 시료에서도 효과적으로 cfDNA를 분리할 수 있음을 확인하였다.

**[0108] 실시예 4: 실시예 2의 cfDNA PREP 방법의 재현가능성 확인**

[0110] 상기 실시예 2의 cfDNA 분리 방법의 재현성을 조사하였다.

[0111] 구체적으로, 폐암 환자 시료 49개에서 얻은 혈장을 각각 200 $\mu$ l 이용하여 두 번의 실험을 반복 수행한 후, 각각의 실험에서 얻은 cfDNA의 양을 비교하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0113] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 두 값 간의 상관 관계가 1에 가까울 정도로 재현성이 우수한 결과를 나타내었다.

**[0115] 실시예 5: 실시예 2의 cfDNA PREP 방법으로 수득한 시료의 cfDNA 패턴 분석**

[0117] 실시예 2의 cfDNA PREP 방법을 이용하여 PREP한 cfDNA의 특성을 BioAnalyzer를 이용하여 분석하였다

[0118] 먼저, 폐암 환자의 혈장 시료로부터 PREP한 cfDNA의 크기를 확인하여 도 3a 및 b에 그 결과를 나타내었다.

[0119] 크기를 확인한 결과, 세포사멸(Apoptosis)에 의해 생성되는 cfDNA의 특성으로 잘 알려진, DNA Ladder 크기 형태의 패턴으로 나타남을 확인할 수 있었다.

[0120] 또한, cfDNA는 뉴클레오솜(nucleosome) 단위로 잘려져 있기 때문에, 대략 180bp 정도의 크기가 최소 단위이며, 2, 3, 4 뉴클레오솜 단위 크기인 180\*2, 180\*3, 180\*4bp 크기 형태도 보였다(도 3b).

[0121] 하지만, 기대보다 큰 크기의 DNA도 보였는데, 이는 혈액에서 혈장을 제조하는 경우에 DNA가 완전히 제거되지 않았거나, 용혈된 백혈구(WBC)에서 나온 gDNA가 함께 추출되어 나온 것이었다. 이는, 오래 전에 준비되어 보관되었던 폐암환자의 혈장을 이용하여 실험을 진행하였기 때문으로 여겨지며, 신선한 혈액을 이용하여, 실시예 1과 같이 2 단계 원심분리 법으로 혈장을 준비하면 해결될 수 있음을 확인하였다.

**[0123] 실시예 6: 실시예 2의 cfDNA PREP 방법으로 수득한 cfDNA의 품질 분석**

[0125] 또한, 실시예 2의 cfDNA PREP 방법을 이용하여 PREP한 cfDNA의 품질(quality)을 확인하기 위하여, 100bp 및 237bp 크기의 생성 산물을 증폭할 수 있는 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. 이때, 주형 DNA로는 폐암 환자의 시료로부터 분리한 1 내지 5번의 cfDNA 시료와 2개의 대조군 gDNA(Beas2B, H1975 세포주에서 PREP한 게놈 DNA)를 사용하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다 (도 4에서, cfDNA 시료는 1 내지 5로 표시함).

[0127] PCR 수행 조건은 하기와 같았다.

[0128] 구체적으로, 순수분리한 cfDNA 2  $\mu$ l, 표 1에 표기된 프라이머쌍 (rs1952996 프라이머쌍 또는 RASSF1A 프라이머쌍 (각 프라이머쌍의 농도는 해당 F와 R 모두 각각 5  $\mu$ M) 1  $\mu$ l, dNTP mix (2.5 mM) 1  $\mu$ l, Qiagen 사의 HotStar Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) 0.1  $\mu$ l, 10x PCR buffer 1  $\mu$ l, 최종 10  $\mu$ l가 되도록 3차 증류수를 첨가한 다음, 94  $^{\circ}$ C에서 15분 반응시켜 HotStarTaq polymerase를 활성화한 후, [94  $^{\circ}$ C(20초)/60  $^{\circ}$ C(30초)/72  $^{\circ}$ C(30초)] 반응을 35회 반복한 후, 72  $^{\circ}$ C에서 3분 반응시켜 증폭반응 종료하였다.

[0129] 사용한 프라이머 정보는 하기와 같다.

표 1

| Primer 이름   | 염기서열(5'→3')          | 서열번호 | 증폭산물 크기 (bp) |
|-------------|----------------------|------|--------------|
| rs1952966-F | GGCTCTGGTTACAACAGCTT | 1    | 100          |
| rs1952966-R | AGAAGTTTGCTTGGCTGAAG | 2    |              |
| RASSF1A-F   | GTGGGGACCCTCTTCCTCTA | 3    | 237          |
| RASSF1A-R   | GGAAGGAGCTGAGGAGAGC  | 4    |              |

그 결과, 사용한 모든 cfDNA에서 PCR 산물 증폭이 잘 되었음을 확인하였다. 즉, PREP한 cfDNA의 품질에 문제가 없음을 확인하였다.

실시예 7: 혈장 제조 과정의 최적화

본 발명의 cfDNA PREP 방법에 사용되는 혈장의 제조 과정을 하기와 같이 최적화하였다.

구체적으로, cfDNA PREP 시, 2 단계 원심분리를 수행하여 혈장을 준비하는 경우의 효과를 1 단계 원심분리를 수행한 경우의 효과와 서로 비교하였다. 이를 위하여 정상 개체로부터 얻은 신선한 혈액을 이용하였다. 1 단계 원심분리 방법은 개체로부터 얻은 신선한 혈액을 1,900 x g 및 4 °C에서 10분간 원심분리하여 혈장 시료를 수득하는 방법이고, 2 단계 원심분리 방법은 개체로부터 얻은 신선한 혈액을 1,900 x g 및 4 °C에서 10분간 원심분리한 다음에 16,000 x g 및 4 °C에서 10분간 원심분리하여 혈장 시료를 수득하는 방법이다.

상기 1 단계 원심분리 방법 및 2 단계 원심분리 방법을 사용하여 수득한 혈장 시료를 실시예 2의 방법으로 cfDNA를 분리하고, 그 양과 특성을 비교하였다. 상기 결과를 도 5a, 표 2 및 5b에 각각 나타내었다.

도 5a 및 하기 표 2에 나타난 바와 같이 2 단계 원심분리 방법을 사용하여 획득한 혈장에서 분리한 cfDNA의 양이, 1 단계 원심분리 방법을 사용하여 획득한 혈장에서 분리한 cfDNA 양의 1/3 정도를 나타내었다. 1 단계 원심분리 방법의 경우, 추출된 cfDNA의 양에 편차가 크고 예상보다 양이 많았다.

표 2

| Healthy plasma | 1 step method<br>(1,900g, 4 °C, 10min),<br>total ng | 2 step method<br>(1,900g, 4 °C, 10min →<br>16,000g, 4 °C, 10min),<br>total ng | Ratio between 1<br>step / 2 step |
|----------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1              | 17.05                                               | 6.26                                                                          | 2.72                             |
| 2              | 7.11                                                | 2.91                                                                          | 2.45                             |
| 3              | 10.76                                               | 2.75                                                                          | 3.92                             |
| 4              | 10.64                                               | 6.26                                                                          | 1.70                             |
| 5              | 16.98                                               | 5.26                                                                          | 3.23                             |
| 6              | 21.76                                               | 2.95                                                                          | 7.36                             |
| 7              | 31.87                                               | 4.52                                                                          | 7.06                             |
| 8              | 9.66                                                | 3.68                                                                          | 2.63                             |

또한, 도 5b에 나타난 바와 같이, 2 단계 원심분리 방법 및 1 단계 원심분리 방법을 이용하여 제조한 혈장으로부터 수득한 cfDNA의 특성을 분석한 결과, 2 단계 원심분리 방법으로 획득된 DNA의 경우, 전형적인 cfDNA 특징인 180bp 정도의 최소 뉴클레옴 단위 크기를 나타냄을 확인할 수 있었다. 반면, 1 단계 원심분리 방법으로 추출된 DNA의 경우, 게노믹 DNA (gDNA)가 섞인 형태의 패턴을 나타내었다. 즉, BioAnalyzer 로딩 시, 상위 마커 (upper marker) 보다 큰 intact gDNA 및 일부 단편화(fragmentation)되어 smear 패턴으로 보이는 gDNA를 나타내었다.

[0142] 실시예 8: 실시예 2의 cfDNA PREP 법과 상용화된 키트 간의 비교

[0144] 본 발명에 따른 cfDNA PREP 법의 효과를 기존 상용화된 키트와 비교하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0145] 구체적으로, 현재 cfDNA PREP에 가장 많이 이용되고 있는 Qiagen circulating tumor DNA prep 키트와 성능을 비교하였다. 이를 위하여, 실제 난소암 환자의 혈장을 이용하여 실험을 진행하였고, 그 결과를 하기 표 3 및 도 6에 나타내었다. 도 6에서 본 발명에 따른 cfDNA PREP(실시예 2)의 방법을 'CCGD\_cfDNA'로 표시하였다. 상기 혈장은 서울 아산병원 BRC에서 분양 받았다.

[0147] 그 결과, 하기 표 3 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 각 방법을 사용하여 cfDNA를 분리한 결과, 본 발명의 방법을 이용하는 경우에 Qiagen Kit를 사용한 경우에 비하여 4 내지 5배 가량 높은 양의 cfDNA를 수득할 수 있음을 확인하였다.

표 3

[0148]

| 샘플번호                                  | Qiagen Kit          |            | CCGD_cfDNA          |            |
|---------------------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
|                                       | 농도<br>(ng/ $\mu$ l) | 수득한 양 (ng) | 농도<br>(ng/ $\mu$ l) | 수득한 양 (ng) |
| 2395                                  | 0.02                | 0.8        | 0.20                | 4.0        |
| 2397                                  | 0.03                | 1.5        | 0.22                | 4.5        |
| 2672                                  | 0.01                | 1.0        | 0.20                | 3.9        |
| 2722                                  | 0.02                | 1.3        | 0.33                | 6.7        |
| 2772                                  | 0.02                | 1.5        | 0.37                | 7.5        |
| 2799                                  | 0.02                | 1.5        | 0.22                | 4.3        |
| 2834                                  | 0.23                | 2.3        | 0.26                | 5.1        |
| 3030                                  | 0.08                | 0.9        | 0.28                | 5.5        |
| 3051                                  | 0.05                | 0.6        | 0.17                | 3.4        |
| 3052                                  | 0.13                | 1.4        | 0.38                | 7.6        |
| * 2차 원심 분리 후 수득한 200 $\mu$ l의 혈장을 사용함 |                     |            |                     |            |

[0149] 실시예 9: 완충액의 종류에 따른 효과 비교

[0151] 본 발명의 cfDNA PREP 방법에 효과적으로 사용될 수 있는 용해 완충액의 최적 조건을 하기와 같이 규명하였다.

[0153] 먼저, 카오트로픽 염, 킬레이트 제 및 Tris-Cl을 포함하는 완충액(비교 완충액 1)과 카오트로픽 염, 킬레이트 제, 비이온성 계면활성제, 및 Tris-Cl을 포함하는 완충액(실시 완충액)을 각각 사용하여 실시예 2의 방법으로 cfDNA를 분리하였다. 이때, 난소암 환자의 혈장을 이용하여 실험을 진행하였고, 실시예 1과 같이 2번의 원심분리를 거친 시료를 사용하였다.

[0155] 사용한 비교 완충액 1 및 실시 완충액의 구체적인 조성은 하기와 같았다.

표 4

[0156]

| 비교 완충액 1                                                | 실시 완충액                                                                               |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 10mM Tris-Cl (pH 8.0)<br>0.1mM EDTA(pH 8.0)<br>0.5% SDS | 5.5M Guanidine-HCl<br>50mM Tris-Cl(pH 8.0)<br>20mM EDTA(pH 8.0)<br>1.3% Triton X-100 |

[0157] 그 결과, 하기 표 5 및 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시 완충액을 사용하는 경우, 비교 완충액 1을 사용하는 경우에 비하여 훨씬 더 많은 양의 cfDNA를 얻을 수 있음을 확인하였다.

표 5

[0158]

| 샘플 번호                                 | 비교 완충액 1            |            | 실시 완충액              |            |
|---------------------------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
|                                       | 농도<br>(ng/ $\mu$ l) | 수득한 양 (ng) | 농도<br>(ng/ $\mu$ l) | 수득한 양 (ng) |
| 2395                                  | 0.08                | 1.6        | 0.20                | 4.0        |
| 2397                                  | 0.08                | 1.6        | 0.22                | 4.5        |
| 2672                                  | 0.12                | 2.5        | 0.20                | 3.9        |
| 2722                                  | 0.08                | 1.6        | 0.33                | 6.7        |
| 2772                                  | 0.11                | 2.1        | 0.37                | 7.5        |
| 2799                                  | 0.11                | 2.2        | 0.22                | 4.3        |
| 2834                                  | 0.10                | 2.0        | 0.26                | 5.1        |
| 3030                                  | 0.07                | 1.4        | 0.28                | 5.5        |
| 3051                                  | 0.07                | 1.3        | 0.17                | 3.4        |
| 3052                                  | 0.14                | 2.8        | 0.38                | 7.6        |
| * 2차 원심 분리 후 수득한 200 $\mu$ l의 혈장을 사용함 |                     |            |                     |            |

[0159] 또한, 용해 완충액의 카오트로픽 염의 포함 유무에 따른 cfDNA PREP 효과를 비교하였다. 구체적으로 하기 [표 6]의 조성을 가지는 본 발명에 따른 실시 완충액 및 비교 완충액 2를 각각 사용하여 실시예 2의 방법으로 DNA를 분리하였다. 이 때, 2명의 정상인 개체로부터 얻은 혈장에 200ng의 Highly degraded gDNA를 첨가하여 진행하여, 용해 완충액의 조건에 따른 DNA 획득물을 서로 비교하였다. 그 결과를 하기 표 7 및 도 8에 나타내었다.

표 6

[0160]

|                 | 실시 완충액 | 비교 완충액 2 |
|-----------------|--------|----------|
| Guanidine-HCl   | 5.5M   | -        |
| Tris-Cl (pH8.0) | 50mM   | 66.7mM   |
| EDTA (pH8.0)    | 20mM   | 26.7mM   |
| Triton X-100    | 1.30%  | 1.74%    |

표 7

[0161]

|                   | 샘플번호                        | 실시 완충액 | 비교 완충액 2 |
|-------------------|-----------------------------|--------|----------|
| Healthy control-1 | Applied gDNA(ng)            | 200    | 200      |
|                   | Total recovered amount (ng) | 32.5   | 24.7     |
|                   | Recovery ratio(%)           | 16.2   | 12.4     |
| Healthy control-2 | Applied FFPE gDNA(ng)       | 200    | 200      |
|                   | Total recovered amount (ng) | 48.8   | 19.4     |
|                   | Recovery ratio(%)           | 24.4   | 9.7      |

[0162] 그 결과, 두 명의 정상 개체의 혈장을 이용한 결과 모두에서, 본원발명에 따른 실시 완충액을 이용한 경우, 가장 높은 회수율을 나타내었다.

[0164] 실시예 10: 산모의 혈장으로부터 cfDNA의 분리

[0166] 본 발명의 cfDNA prep 방법은 폐암 환자뿐만 아니라, 정상 개체에서도 cfDNA를 수득할 수 있다. 즉, 개체의 상태에 제한 없이 분리된 혈장으로부터 cfDNA를 수득할 수 있다. 이에, 본 발명의 cfDNA prep 방법의 특성을 더욱 분석하기 위하여 이하의 실시예에서는 산모로부터 cfDNA를 분리하여 분석을 수행하였다. 나아가, 상기 실시예 2에서는 200  $\mu$ l의 혈장 시료를 사용하였으나, 본 발명의 cfDNA prep 방법을 더 큰 부피의 시료에 적용하기 위해 분리 조건을 하기와 같이 적절히 변경하였다 (표 8).

표 8

|    | 혈장<br>(부피)  | 용해 완충액<br>(부피) | 단백질 분해효소 K | 용액 A                |              | 자성 비드       |
|----|-------------|----------------|------------|---------------------|--------------|-------------|
|    |             |                |            | 조성                  | 부피           |             |
| 기존 | 200 $\mu$ l | 400 $\mu$ l    | 20 $\mu$ l | 20 % PEG/2.5 M NaCl | 1000 $\mu$ l | 200 $\mu$ l |
| 변경 | 500 $\mu$ l | 1000 $\mu$ l   | 20 $\mu$ l | 40 % PEG/2.5 M NaCl | 1100 $\mu$ l | 400 $\mu$ l |

[0169] 구체적으로, 총 10 명의 산모로부터 채취한 신선한 혈액 시료를 4 °C에서 1,900 x g로 10 분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 그 다음, 분리된 혈장을 다시 4 °C에서 16,000 x g로 10 분간 원심분리하고, 상층액을 분리하였다. 그 다음, 분리된 혈장 500  $\mu$ l를 이용하여, 본 발명의 cfDNA prep 방법과 기존 상용화된 키트인 Qiagen circulating tumor DNA prep 키트와의 비교를 실시하였다.

[0171] 실시예 11: 실시예 10의 cfDNA PREP 법과 상용화된 키트 간의 수율 비교

[0173] 본 발명의 cfDNA prep 방법 (CCGD\_cfDNA) 및 Qiagen 키트로 분리된 cfDNA의 수율을 Picogreen 정량법 (PG) 및 RQ-PCR 정량법을 이용하여 비교하였다 (도 9).

[0174] 그 결과, 정량법에 관계 없이 본 발명의 cfDNA prep 방법은 Qiagen 키트를 이용한 경우와 비교하여 유사하거나 높은 수율로 나타나는 것을 확인하였다. 특히 산모 4 및 산모 6으로부터 분리된 샘플의 경우 2 배 이상의 수율이 확인되어, 본 발명의 cfDNA prep 방법이 Qiagen 키트에 비해 수율 면에서 매우 우수한 효과를 가지는 것을 확인하였다.

[0176] 한편, 각각의 정량법을 비교하였을 때, Qiagen 키트를 이용한 경우 PG 정량값과 RQ-PCR 정량값에서 큰 차이가 나는 것을 확인할 수 있었던 반면, 본 발명의 cfDNA prep 방법은 상기 두 정량법에서 큰 차이를 보이지 않았다. 이를 더욱 명확히 하기 위하여 PG 정량값과 RQ-PCR 정량값 간의 일치율을 확인하였다 (도 10).

[0177] 그 결과, Qiagen 키트를 이용한 경우, 상기 도 9에서도 확인한 것과 같이 농도가 높은 2 샘플을 제외하고는 모두 아주 낮은 농도로 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, PG 정량값과 RQ-PCR 정량값 간의 일치율에서 상관성 계수가, Qiagen 키트를 이용한 경우 0.9245, 본 발명의 cfDNA prep 방법의 경우 0.9676으로 나타나 본 발명의 cfDNA prep 방법이 더 높은 상관성 계수를 가지는 것을 확인하였다.

[0178] Qiagen 키트의 경우, 작은 조각으로 존재하는 cfDNA의 추출 효율을 높이기 위해 키트 안에 DNA 운반체로 tRNA를 이용하였기 때문에, 추출이 완료된 cfDNA에는 많은 양의 tRNA가 함께 존재하고 있다. 따라서, 이로 인해 Qiagen 키트를 이용해 cfDNA를 분리하는 경우 Picogreen을 이용한 정량값에서는 tRNA로 인한 과측정이 나타나며, 이로 인해 상기와 같은 낮은 상관성 계수가 나타난 것으로 파악된다. 즉, 10 ng 정도의 수율로 나타나는 8 개의 샘플은 많은 부분이 tRNA 오염에 의해 측정된 값으로 예상된다. 반면 본 발명의 경우 tRNA를 사용하지 않기 때문에 상기 두 종류의 정량법에서 높은 수준의 상관성 계수가 나타났다.

[0180] 실시예 12: 실시예 10의 cfDNA PREP 법과 상용화된 키트로 분리한 cfDNA의 품질 및 순도 비교

[0182] 10 명의 산모로부터 본 발명의 cfDNA prep 방법 및 Qiagen 키트를 이용해 추출된 cfDNA의 품질을 분석하기 위해, Bioanalyzer를 이용하여 추출된 cfDNA의 크기 분석을 수행하였다. 그 결과, 예상한 바와 같이 거의 모든 표본에서 cfDNA 크기 (~180 bp)로 보이는 피크 신호가 Qiagen 키트를 이용한 경우에 비해 본 발명의 cfDNA prep 을 이용한 경우 매우 높게 나타나는 것을 확인하였다 (도 11).

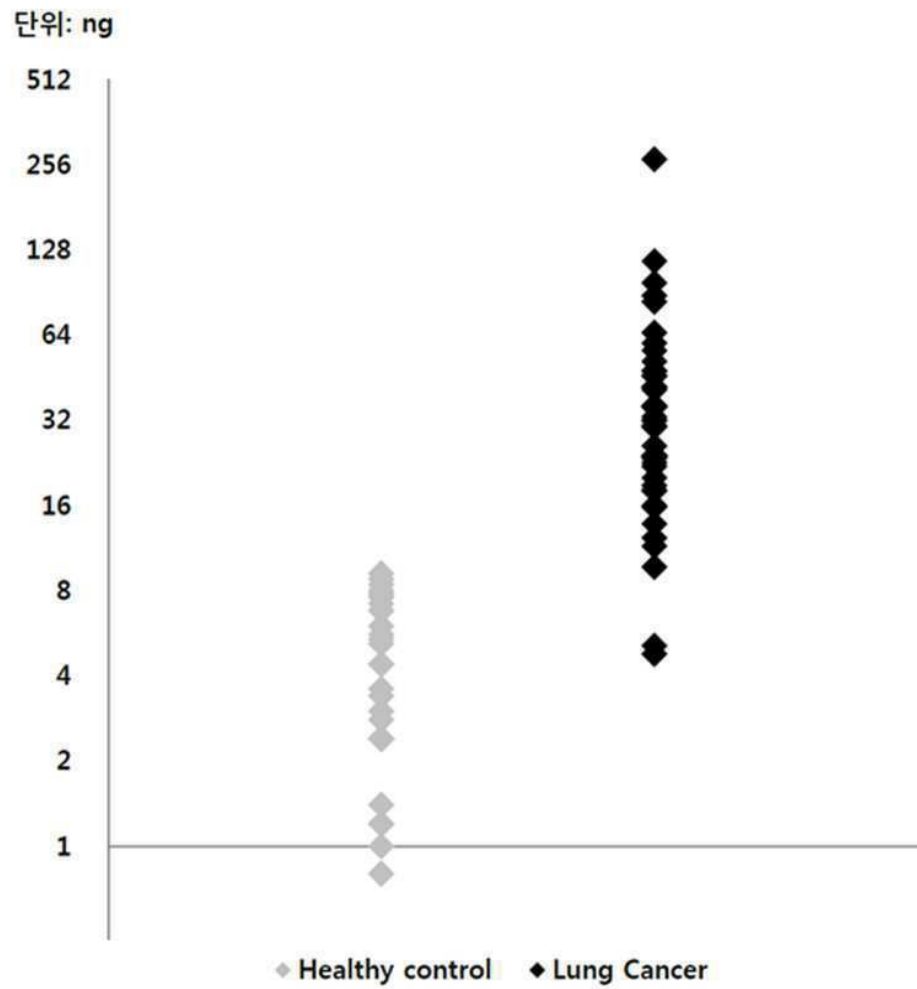
[0184] 다음으로, 상기 두 방법으로 추출된 cfDNA의 순도가 효소반응이 가능한 수준으로 우수한지를 확인하고자 하였다. 3 명의 산모 (산모 8, 산모 9 및 산모 10)로부터 추출된 cfDNA를 대상으로, 110 bp 크기를 가지는 amplicon을 증폭시키는 RQ-PCR 반응을 수행하였다. 동일 조건에서, 각 산모로부터 추출한 cfDNA의 양을 1, 2 및 4  $\mu$ l씩 증가시키면서 RQ-PCR을 수행하여 Ct 값을 확인한 후 이를 상대량 ( $1/2^{Ct}$ )으로 변환하여, 사용된 cfDNA의 양에 따른 RQ-PCR로 확인된 상대량의 비례 정도를 확인함으로써, 추출된 cfDNA의 순도를 재확인하였다.

[0185] 그 결과, 세 명의 산모로부터 추출한 cfDNA 모두, 사용된 cfDNA 양에 비례하여 상대량 (RQ-PCR 값,  $1/2^{Ct}$ )이 증가하는 것으로 확인되었으며, 두 값 사이의 일치율 상관성 계수가, Qiagen 키트를 이용한 경우 0.9574, 본 발명의 cfDNA prep 방법의 경우 0.9983으로 나타나 본 발명의 cfDNA prep 방법이 더 높은 상관성 계수를 가지는 것을 확인하였다 (도 12).

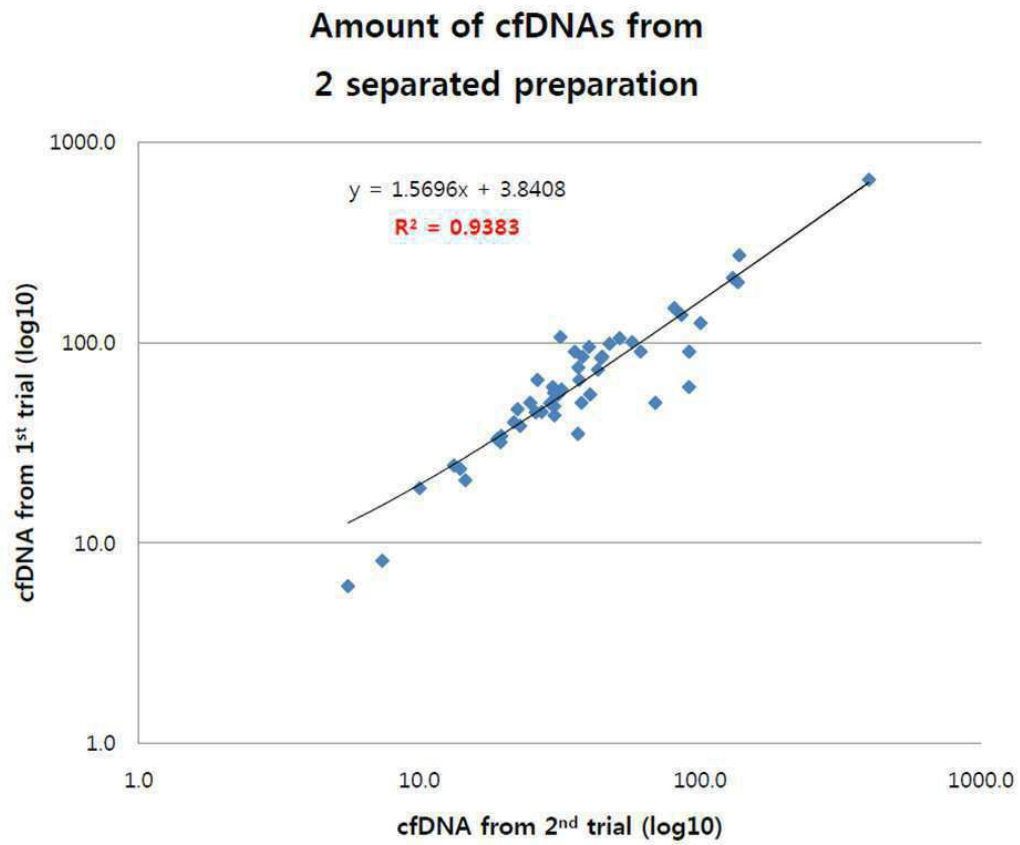
[0187] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

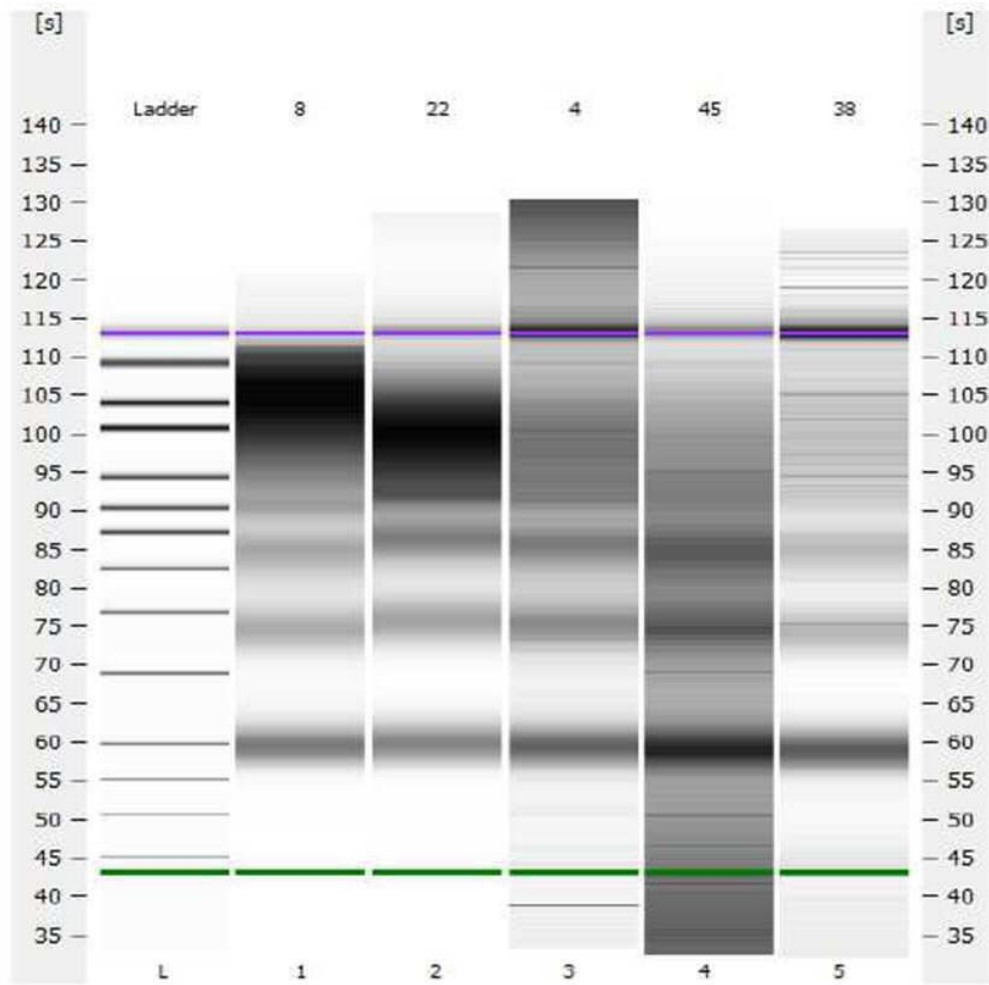
도면1



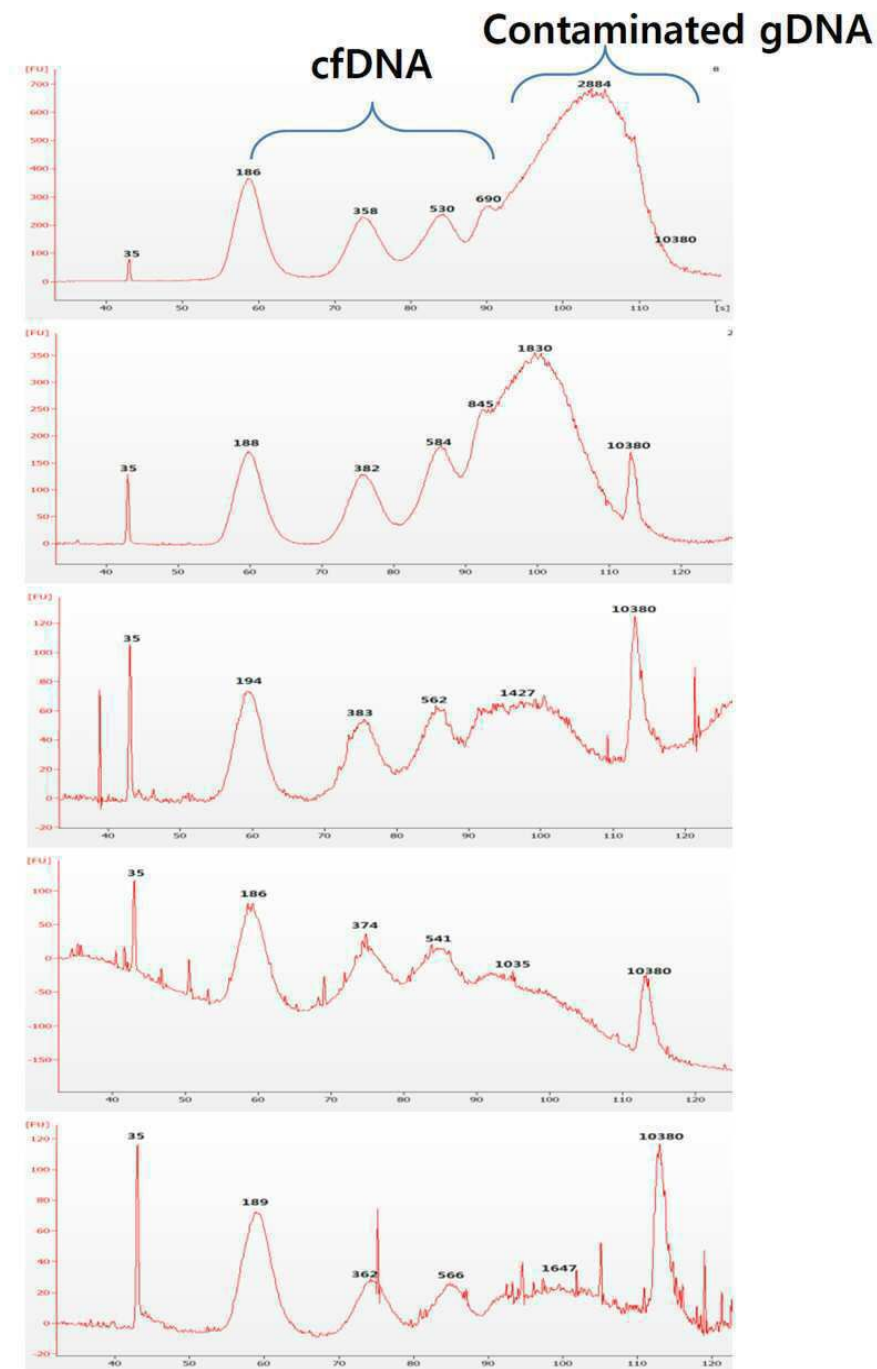
도면2



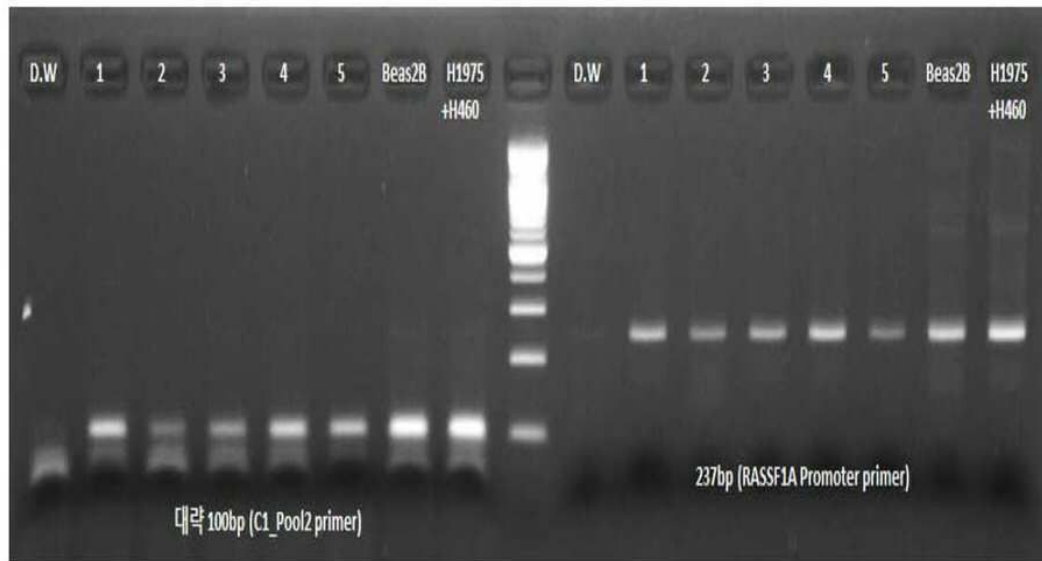
도면3a



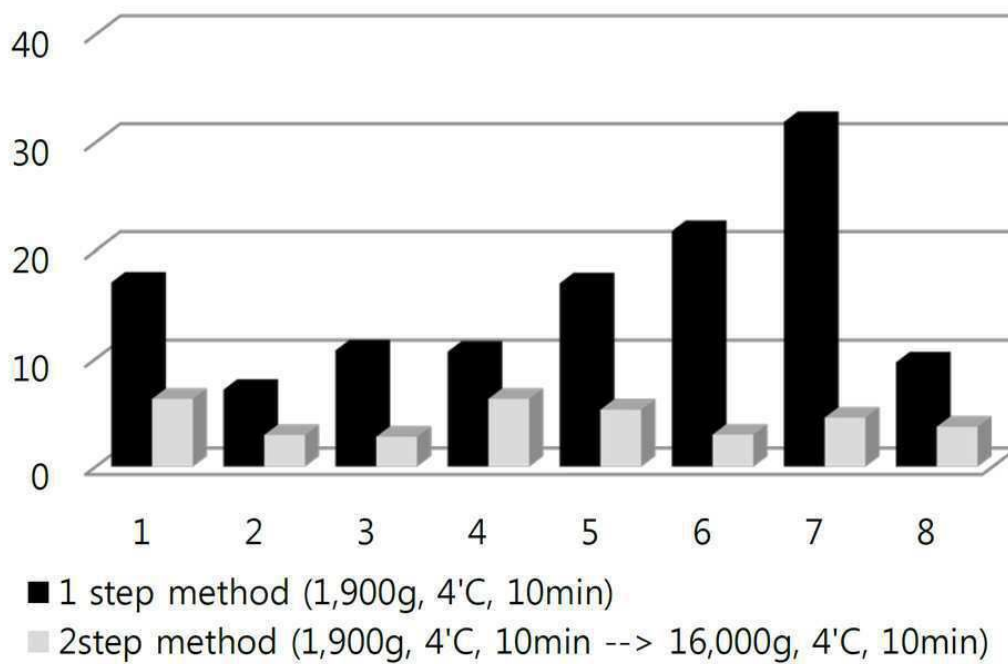
도면3b



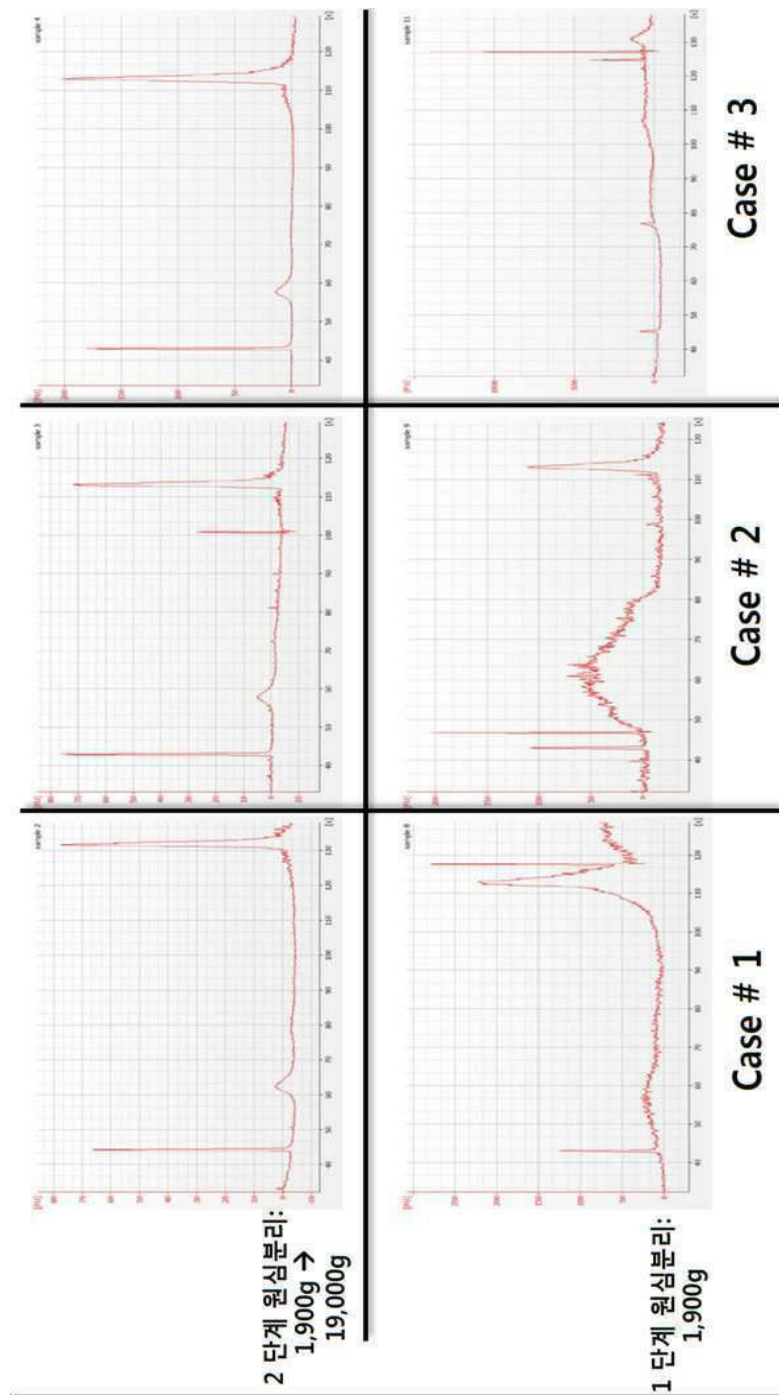
도면4



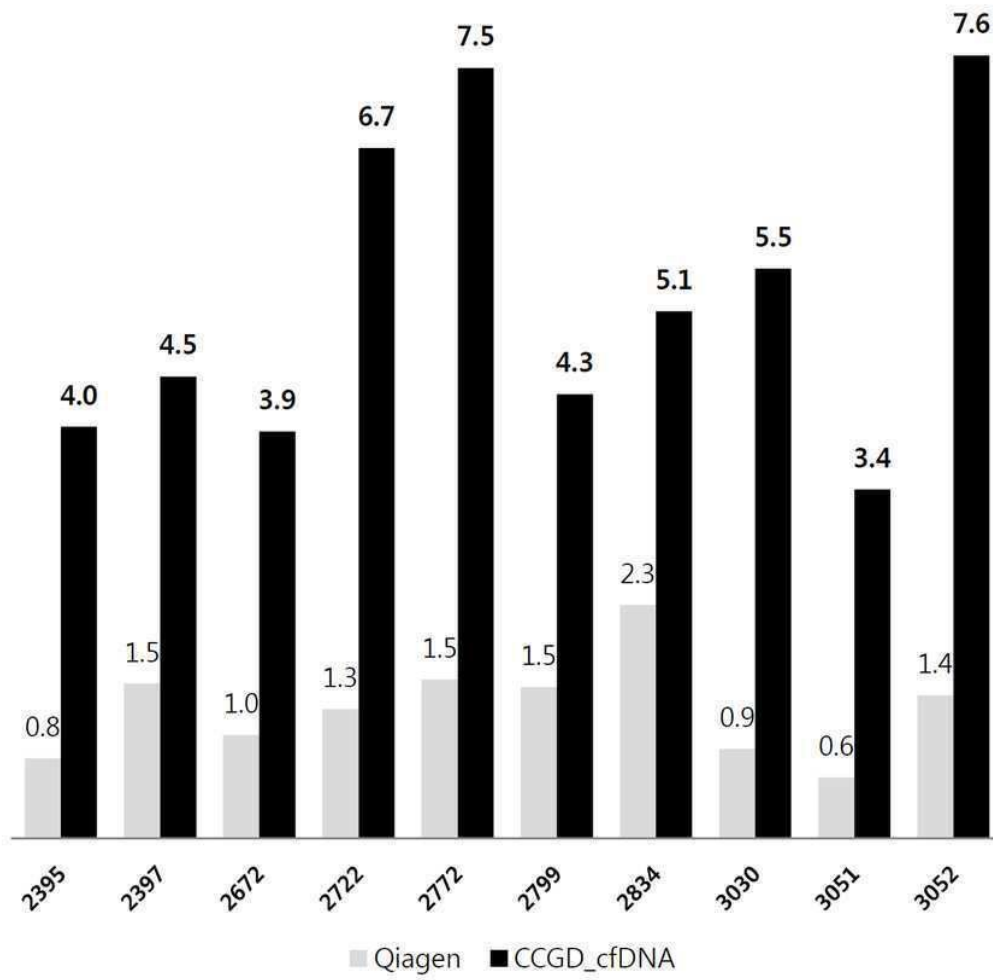
도면5a



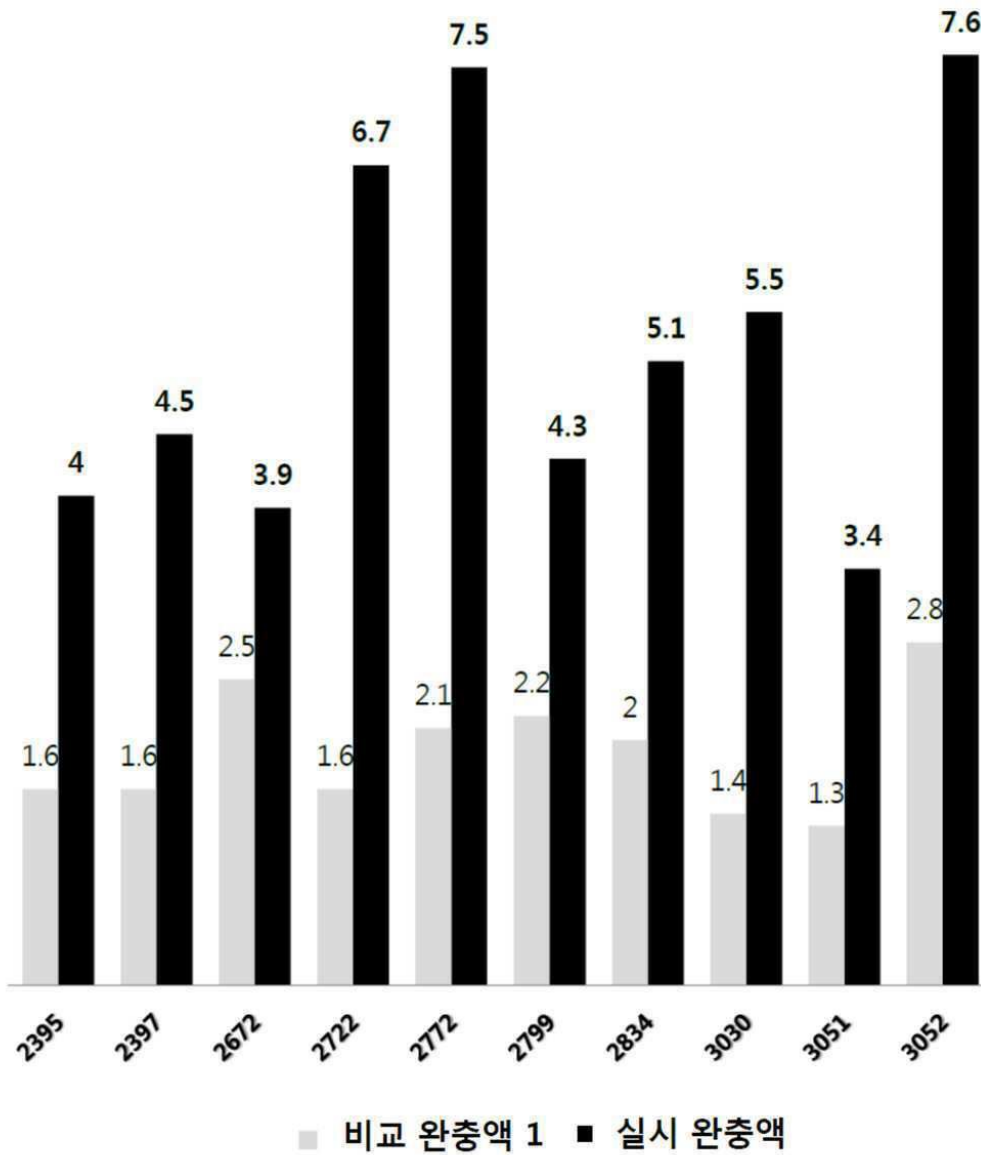
도면5b



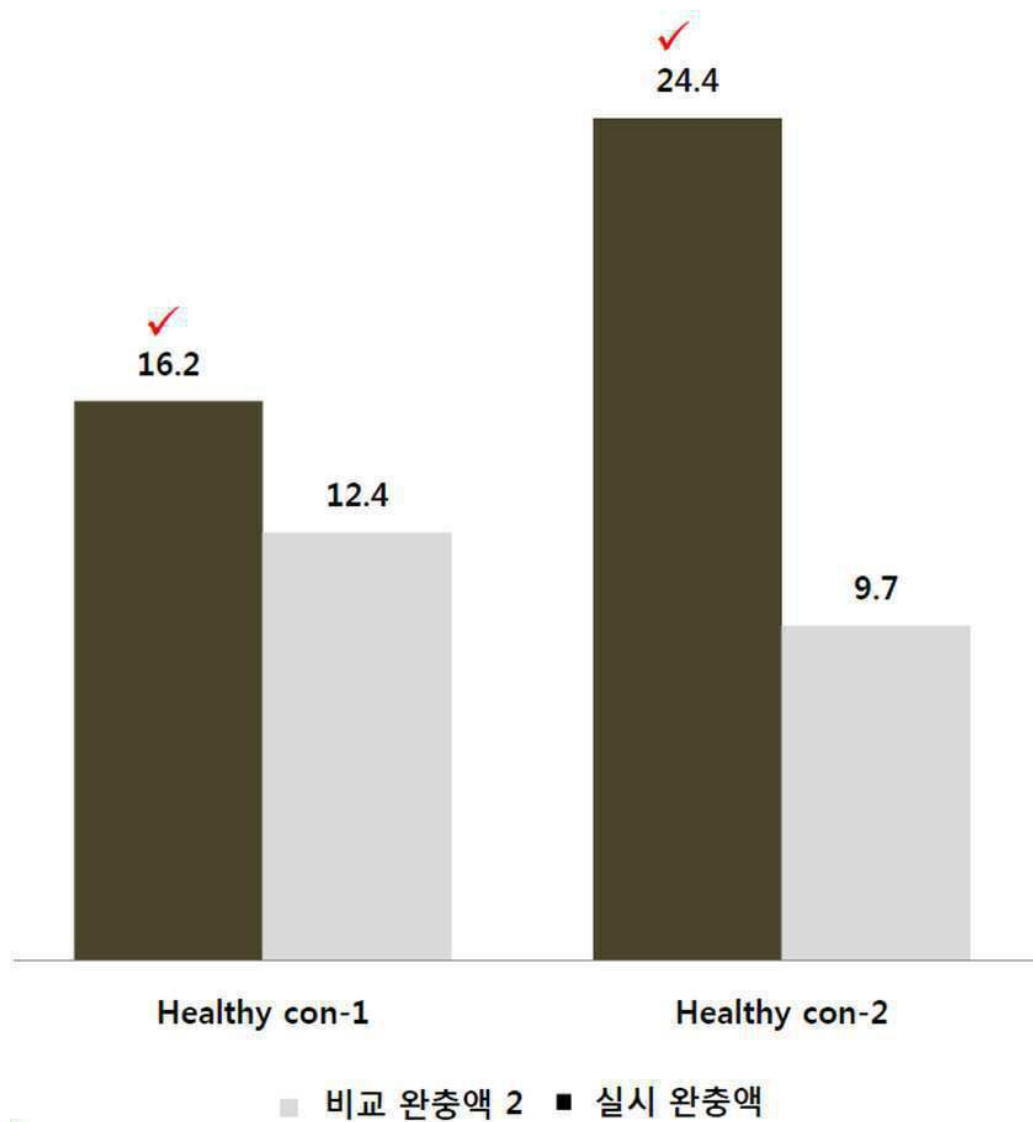
도면6



도면7



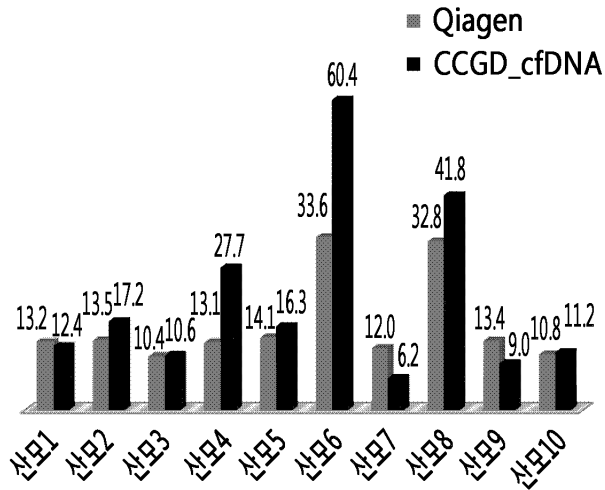
도면8



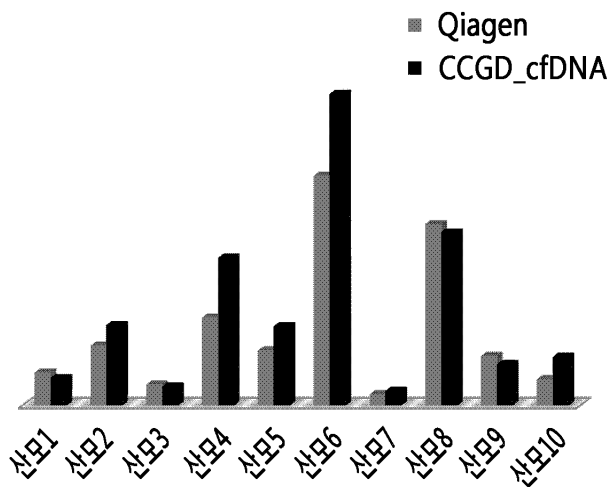
도면9

수율 비교 (PG, RQ-PCR)

0.5 ml 혈장의 cfDNA 양 (PG)

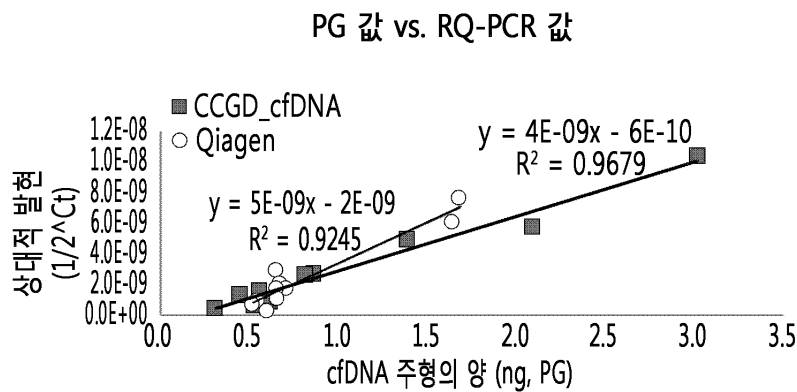
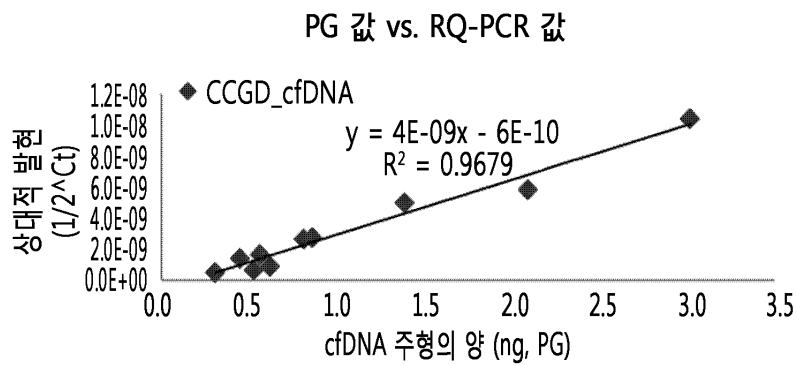
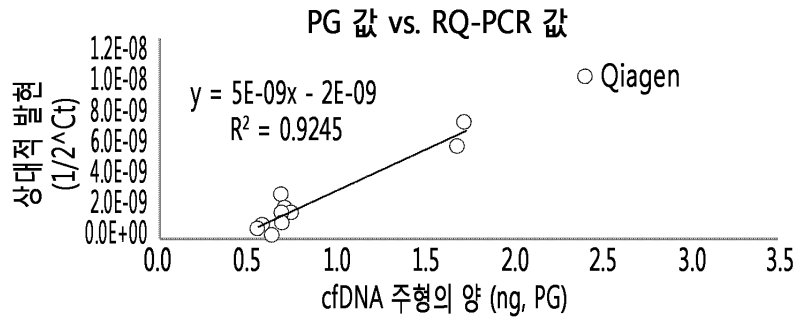


상대적 발현 ( $1/2^{Ct}$ )



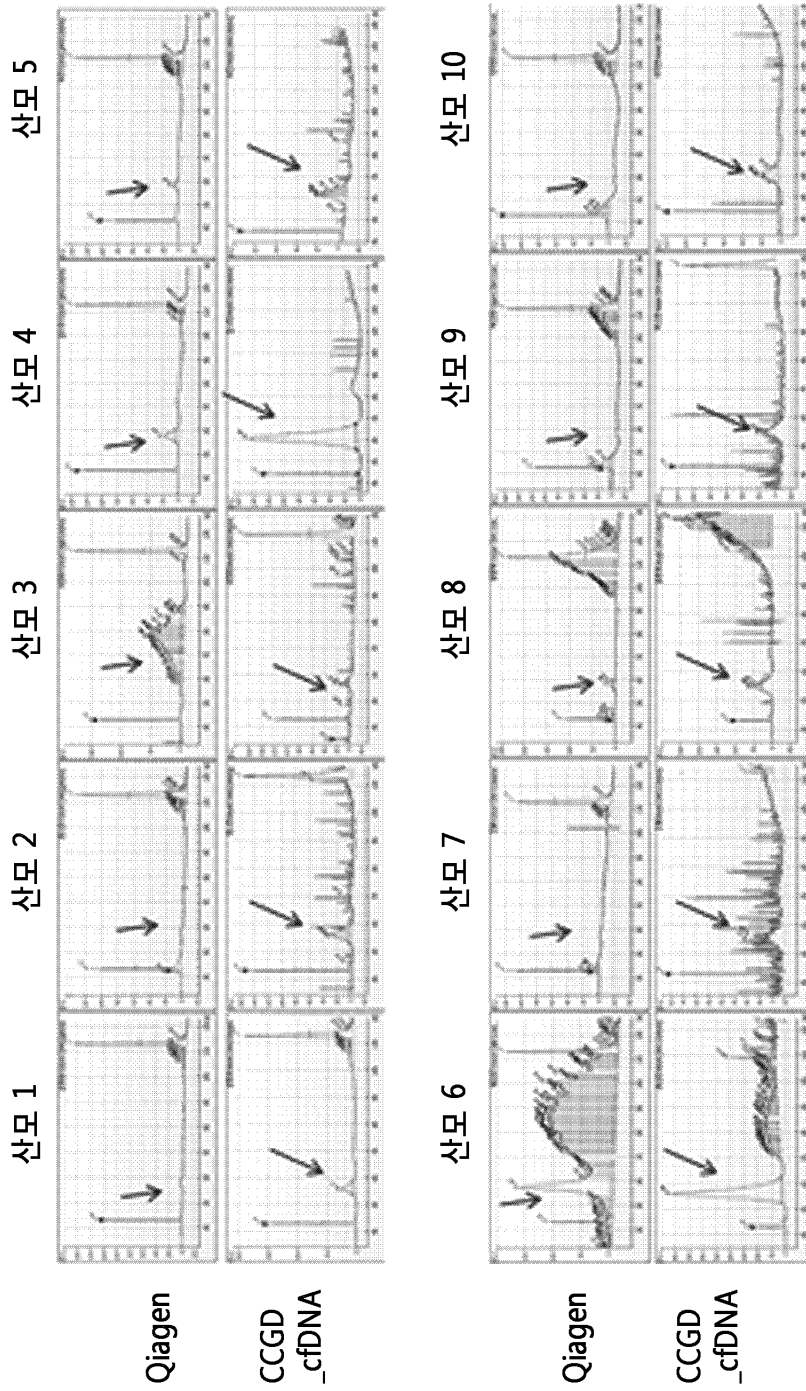
도면10

# PG 및 RQ-PCR 정량값의 상관성



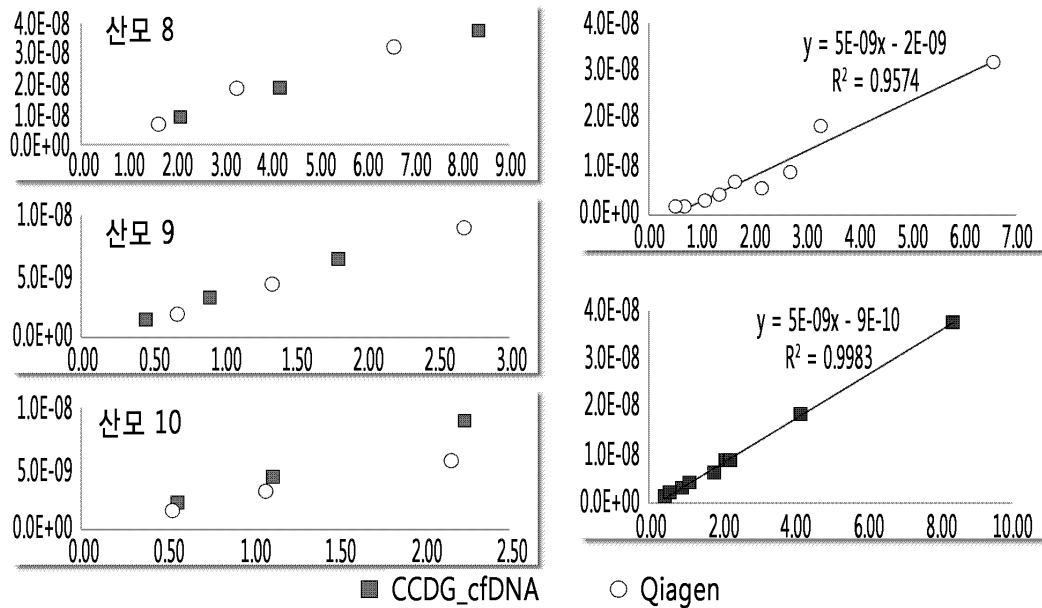
도면11

# 분리된 cfDNA의 정성분석



도면12

분리된 cfDNA의 순도



서열 목록

- <110> THE ASAN FOUNDATION
- University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> A method for isolating circulating cell-free nucleic acid
- <130> KPA141272-KR-P1
- <150> KR 10-2015-0034686
- <151> 2015-03-12
- <160> 4
- <170> KoPatent In
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> rs1952966-F
- <400> 1
- ggctctggtt acaacagctt
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

|                       |                     |    |
|-----------------------|---------------------|----|
| <220><223>            | rs1952966-R         |    |
| <400>                 | 2                   |    |
| agaagtttgc ttggctgaag |                     | 20 |
| <210>                 | 3                   |    |
| <211>                 | 20                  |    |
| <212>                 | DNA                 |    |
| <213>                 | Artificial Sequence |    |
| <220><223>            | RASSF1A-F           |    |
| <400>                 | 3                   |    |
| gtggggaccc tcttcctcta |                     | 20 |
| <210>                 | 4                   |    |
| <211>                 | 19                  |    |
| <212>                 | DNA                 |    |
| <213>                 | Artificial Sequence |    |
| <220><223>            | RASSF1A-R           |    |
| <400>                 | 4                   |    |
| ggaaggagct gaggagagc  |                     | 19 |