(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0087550
(43) 공개일자 2024년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6806 (2018.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01) *C12Q 1/6869* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6806 (2018.05)
C12N 15/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0160974
(22) 출원일자 2023년11월20일
심사청구일자 2023년11월20일
(30) 우선권주장
1020220156416 2022년11월21일 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)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

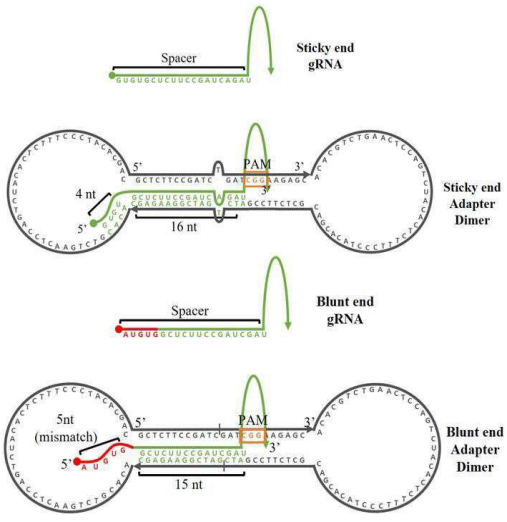
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **Ｃａｓ９ 단백질을 이용한 고효율 어댑터 연결 반응에서 어댑터 이합체의 제거 방법**

(57) 요 약

본 발명은 Cas9 단백질을 이용한 고효율 어댑터 연결 반응에서 어댑터 이합체의 제거 방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 스페이서(spacer) 서열을 포함하는 NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 gRNA(guide RNA), 상기 gRNA 및 Cas9 단백질로 구성되는 NGS 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체, 상기 RNP 복합체를 이용한 어댑터 이합체 제거방법 및 NGS 라이브러리 제조과정에서 어댑터 연결반응을, 표적 DNA와 어댑터를 1:20~1:100의 몰비로 사용하고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 8~10%의 농도로 첨가하여 반응하는 것을 특징으로 하는 고효율 어댑터 연결방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 9/22 (2013.01)
C12Q 1/6869 (2018.05)
C12Q 2521/301 (2013.01)
C12Q 2525/107 (2013.01)
C12Q 2525/185 (2019.08)
C12Q 2525/191 (2013.01)
C12Q 2525/301 (2013.01)
C12Q 2535/122 (2019.08)

(72) 발명자
조은영
서울특별시 동작구 여의대방로44길 9 (대방동, 성원아파트)
정화연
서울특별시 노원구 화랑로51길 78 (공릉동, 비선아파트)
이희경
인천광역시 부평구 부흥로 246 (부평동, 동아아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711168711
과제번호 2022M3A9B608267012
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 하이브리드 인공지능기반 바이오회로 시험 및 최적화 기술개발
기 여 율 3/10
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 시스템 개발
기 여 율 5/10
과제수행기관명 압티지엠제이주식회사
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
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
기 여 율 2/10
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 스페이서(spacer) 서열을 포함하는,

NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 gRNA(guide RNA).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열번호 1의 스페이서 서열을 포함하는 gRNA(guide RNA)는 점착 말단 연결(sticky end ligation)의 어댑터 이합체에 상보적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 gRNA(guide RNA).

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 서열번호 3의 스페이서 서열을 포함하는 gRNA(guide RNA)는 평활 말단 연결(blunt end ligation)의 어댑터 이합체에 상보적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 gRNA(guide RNA).

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 어댑터 이합체 절단용 gRNA는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 gRNA(guide RNA).

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 어댑터 이합체 절단용 gRNA는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 gRNA(guide RNA).

청구항 6

제1항의 gRNA(guide RNA) 및 Cas9 단백질로 구성되는, NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체.

청구항 7

제6항의 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 이용하여 NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체를 절단하여 제거하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 어댑터 이합체는 NGS 라이브러리 제조 과정 시, 표적 DNA에 대한 어댑터의 고효율 연결반응 시 생성되는 것을 특징으로 하는, 어댑터 이합체를 절단하여 제거하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 고효율 연결반응은 표적 DNA와 어댑터를 1:20~1:100의 몰비로 사용하고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 8~10%의 농도로 첨가하여 반응하는 것을 특징으로 하는, 어댑터 이합체를 절단하여 제거하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 고효율 연결반응은 표적 DNA와 어댑터를 1:50의 몰비로 사용하고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 10%의 농도로 첨가하여 반응하는 것을 특징으로 하는, 어댑터 이합체를 절단하여 제거하는 방법.

청구항 11

NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 어댑터 연결반응을, 표적 DNA와 어댑터를 1:20~1:100의 몰비로 사용하고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 8~10%의 농도로 첨가하여 반응하는 것을 특징으로 하는, 고효율 어댑터 연결방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

어댑터 연결반응 후, 제1항의 gRNA(guide RNA) 및 Cas9 단백질로 구성되는 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 처리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 고효율 어댑터 연결방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Cas9 단백질을 이용한 고효율 어댑터 연결 반응에서 어댑터 이합체의 제거 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] NGS(Next-Generation Sequencing)는 유전체 염기서열 분석법으로 분석하고자 하는 DNA를 분절화(Fragmentation)하여 병렬로 동시에 읽어내는 특징을 가지며 따라서 매우 빠른 분석이 가능한 방법이다.

[0003] NGS는 샘플 준비, 라이브러리 제작, 클러스터(Cluster) 제작, 시퀀싱, 결과 분석의 순서로 진행되는데, 그 중 라이브러리 제작 과정에는 DNA 파편에 대한 말단 수리(End repair) 과정을 거친 뒤에 증폭을 위한 프라이머(Primer) 결합 서열 등 다양한 기능적 서열을 갖는 어댑터(Adapter)를 DNA 파편에 연결하는 과정이 포함된다. 일반적으로 DNA 파편에 아데닌(Adenine)을 연결하는 A-테일링(A-tailing) 과정을 진행하고 티민(Thymine)이 말단에 돌출되어 있는 어댑터를 연결하는 점착 말단 연결(Sticky-end ligation) 과정을 진행한다. 이후, 분석 목적에 따라 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, 이하 PCR)을 통한 증폭 및 증폭 생성물만을 얻어내기 위해 자성 비드 (Magnetic bead) 등을 통한 정제 과정을 거치게 된다.

[0004] 한편, 이러한 NGS를 통한 분석은 매우 낮은 비율로 존재하는 돌연변이가 일어난 DNA를 시퀀싱하여 질병의 진단에도 이용할 수 있는데, 이 경우 각 과정 모두에서 손실을 최대한 줄이는 것이 중요한데, 정확한 결과 도출을 위한 반응에 관여하는 반응물들의 손실 및 라이브러리 손실이 발생하는 문제가 있고, 또한 어댑터의 연결 과정에서 어댑터끼리의 연결로 인한 이합체(Adapter dimer) 형성으로 이후의 증폭 및 시퀀싱 과정에도 영향을 미쳐 정확한 분석결과를 얻지 못한다는 문제점이 있다.

[0005] 따라서 NGS가 갖는 이러한 문제점을 개선할 수 있는 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 NGS 반응 과정에서 어댑터 연결 과정에서의 반응 효율을 향상시킬 수 있는 고효율 어댑터 연결의 최적 반응조건을 확립하였고, 고효율 어댑터 연결에서 발생하는 어댑터 이합체를 Cas9 단백질을 이용하여 서열 특이적으로 절단함으로써 시퀀싱의 민감도와 정확도를 향상시킬 수 있는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-2159008

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 그러므로 본 발명의 목적은 서열번호 1 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 스페이서(spacer) 서열을 포함하는, NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 gRNA(guide RNA)를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명의 gRNA(guide RNA) 및 Cas9 단백질로 구성되는, NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 이용하여 NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체를 절단하여 제거하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 어댑터 연결반응을, 표적 DNA와 어댑터를 1:20~1:100의 몰비로 사용하고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 8~10%의 농도로 첨가하여 반응하는 것을 특징으로 하는, 고효율 어댑터 연결방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 따라서 본 발명은, 서열번호 1 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 스페이서(spacer) 서열을 포함하는, NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 gRNA(guide RNA)를 제공한다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 서열번호 1의 스페이서 서열을 포함하는 gRNA(guide RNA)는 점착 말단 연결(sticky end ligation)의 어댑터 이합체에 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 서열번호 3의 스페이서 서열을 포함하는 gRNA(guide RNA)는 평활 말단 연결(blunt end ligation)의 어댑터 이합체에 상보적으로 결합하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 어댑터 이합체 절단용 gRNA는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 어댑터 이합체 절단용 gRNA는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0017] 또한 본 발명은 본 발명의 gRNA(guide RNA) 및 Cas9 단백질로 구성되는, NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 본 발명의 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 이용하여 NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체를 절단하여 제거하는 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 어댑터 이합체는 NGS 라이브러리 제조 과정 시, 표적 DNA에 대한 어댑터의 고효율 연결반응 시 생성되는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 고효율 연결반응은 표적 DNA와 어댑터를 1:20~1:100의 몰비로 사용하고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 8~10%의 농도로 첨가하여 반응하는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 고효율 연결반응은 표적 DNA와 어댑터를 1:50의 몰비로 사용하고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 10%의 농도로 첨가하여 반응하는 것일 수 있다.

[0022] 나아가 본 발명은 NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 어댑터 연결반응을, 표적 DNA와 어댑터를 1:20~1:100의 몰비로 사용하고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 8~10%의 농도로 첨가하여 반

응하는 것을 특징으로 하는, 고효율 어댑터 연결방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 어댑터 연결반응 후, 상기 본 발명의 gRNA(guide RNA) 및 Cas9 단백질로 구성되는 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 처리하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명은 종래 NGS 라이브러리 제작 과정에서 어댑터 연결 반응 시 형성되는 어댑터 이합체를 효과적으로 제거할 수 있는 기술을 제공하는 것으로, 어댑터 이합체의 염기서열을 토대로 어댑터 이합체에만 특이적으로 결합할 수 있는 Cas9의 gRNA 스페이서 서열을 디자인하였고, 본 발명에서 개발한 gRNA 및 Cas9을 포함하는 RNP 복합체를 이용할 경우, 표적 DNA에 어댑터 연결을 진행한 시료로부터 어댑터 이합체만을 특이적으로 절단하여 제거할 수 있는 효과가 있어, 이후 진행되는 NGS 분석에서 정제, 증폭 및 시퀀싱에서 원하는 표적 DNA의 서열만을 민감하게 얻어낼 수 있는 효과가 있다. 따라서 본 발명에서 제공하는 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체는 라이브러리의 손실을 최소화함과 동시에 시퀀싱의 정확도와 민감도를 향상시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에 따른 어댑터 이합체 절단을 위한 gRNA 디자인을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에서 표적 DNA에 대한 고효율 어댑터 연결 반응 조건 확립을 위해, 표적 DNA와 어댑터의 혼합 몰비를 각기 달리하여 수행한 어댑터 연결반응 결과를 확인한 것이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에서 표적 DNA에 대한 고효율 어댑터 연결 반응 조건 확립을 위해, PEG-6000의 사용농도에 따른 어댑터 연결반응 결과를 확인한 것이다.

도 4는 본 발명에서 확립한 고효율 어댑터 연결반응 조건에 있어서, 본 발명의 gRNA를 포함하는 Cas9 RNP를 처리한 군과 처리하지 않은 군을 대상으로 어댑터 이합체의 전달 효과를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 gRNA를 포함하는 Cas9 RNP를 이용한 어댑터 이합체 절단(제거) 방법을 NGS 라이브러리 제작에 적용하여 어댑터 이합체 절단 효과가 발생하는지를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 Cas9 단백질을 이용한 고효율 어댑터 연결 반응에서 어댑터 이합체의 제거 방법을 제공함에 특징이 있다.

[0027] 차세대염기서열분석인 NGS(Next-Generation Sequencing) 분석은 DNA 가닥을 하나씩 분석하는 방법으로 기존의 직접 염기서열 분석에 비해 매우 빠르고 저렴하게 염기서열 분석이 가능한 장점이 있다.

[0028] 이러한 NGS는 DNA를 일정한 조각(fragment)으로 분절화시키고 장비가 인식할 수 있는 특정 염기서열을 가진 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)를 붙여주는 라이브러리(library) 제작단계, 각 라이브러리 DNA 가닥의 염기서열을 장비에서 읽는 단계 및 장비에서 생성된 데이터를 가공하여 알고리즘으로 분석하는 단계로 구성된다.

[0029] 상기 과정에서 라이브러리 제조과정은 핵산 분절화(fragmentation), 말단수리(end-repair), 3′ -말단 아데닌 추가(A-tailing), 어댑터 연결(부착)(adapter ligation) 및 라이브러리 증폭(library amplification) 과정으로 수행되는데, 어댑터 연결 과정에서 형성되는 어댑터 이합체가 분석의 정확도 및 민감도를 떨어뜨리는 문제점이 되고 있다.

[0030] 이에 본 발명자들은 이러한 어댑터 이합체를 효과적으로 감소 또는 제거할 수 있는 방법을 연구하던 중, 어댑터 이합체에만 특이적으로 결합하여 이를 절단하여 제거할 수 있는 gRNA(guide RNA) 및 Cas9 단백질로 구성된 새로운 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 제조하였다.

[0031] 한편, CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas9 기술은 미생물의 적응면역 현상에서 기인한 유전자 편집 기술로, target DNA를 정밀하게 잘라낸 다음 자연적으로 DNA가 복구되도록 함으로써 보다 간단하고 효율적으로 유전자 조작을 가능하게 한다. 이 시스템은 gRNA(guide RNA)와 Cas9 nuclease 단백질로 구성되며, RNA 유전자 가위(RNA-guided engineered nucleases, RGENs) 기술이라고도 불린다.

[0032] Cas9 단백질은 가이드 RNA(guide RNA, 이하 gRNA)에 의해 유도되는 핵산중간분해효소(Endonuclease)로, gRNA의 20 뉴클레오타이드(Nucleotide) 길이를 갖는 스페이서(Spacer) 부위와 상보적인 표적 서열을 가짐과 동시에 NGG 서열의 PAM(Protospacer Adjacent Motif) 서열을 갖는 이중가닥 DNA에 결합하고 특정 부위에 DNA 이중 가닥 절

단(Double-strand break)를 유도한다. 이러한 서열 특이적 절단 기능을 가짐으로 인해 Cas9는 유전체 편집 등 매우 다양한 분야에 응용되고 있다.

[0033] 또한, gRNA는 타겟 서열에 상보적으로 결합하는 crRNA(spacer 영역)와 Cas9과 결합을 위한 tracrRNA로 구성된다. gRNA는 Cas9을 타겟 부위로 안내하는 역할을 하며, 타겟 DNA 서열과 상보적으로 결합한다. 타겟 DNA 서열의 3’ 말단에는 NGG 서열의 PAM(Protospacer adjacent motif) 서열이 있어야 한다. gRNA가 Cas9 nuclease와 복합체를 형성하고(RNP 형성), 타겟 서열에 특이적으로 결합하면 Cas9 nuclease는 PAM 서열을 인식하고 PAM의 3 bp 업스트림(upstream) 부분에 이중 가닥 손상(Double Strand Break, DSB)을 유도하여 DNA를 절단한다.

[0034] 상기 PAM 서열은 protospacer associated motif로써 CRISPR 시스템에서 핵산가수분해효소가 타겟 DNA를 인지하도록 도와주는 서열로서, PAM 서열은 NGG(N은 A, T, C 또는 G임)로 구성된다.

[0035] 이에 본 발명자들은 이러한 gRNA-Cas9 단백질을 이용하여 NGS 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체를 특이적으로 절단하여 제조할 수 있는 가이드 RNA을 특정 염기서열로 구성하여 디자인하였다.

[0036] 본 발명에서 고안한 NGS 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 gRNA(guide RNA)는, 서열번호 1 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 스페이서(spacer) 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 3의 gRNA의 스페이서 염기서열은 어댑터 이합체의 염기서열 구성을 보고 착안한 것으로, 어댑터 2개가 연결되었을 때 연결 부위를 기점으로 어댑터 양쪽을 모두 포함하는 서열로 Cas9 표적서열 및 gRNA 스페이서 서열을 약 20nt의 길이가 되도록 서열번호 1 또는 서열번호 3의 서열로 디자인하였다.

[0038] 이때 상기 서열번호 1의 스페이서 서열을 포함하는 gRNA(guide RNA)는 점착 말단 연결(sticky end ligation)의 어댑터 이합체에 상보적으로 결합하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 3의 스페이서 서열을 포함하는 gRNA(guide RNA)는 평활 말단 연결(blunt end ligation)의 어댑터 이합체에 상보적으로 결합할 수 있다.

[0039] 따라서 서열번호 1의 스페이서 서열을 포함하는 gRNA는 점착 말단의 연결을 갖는 어댑터 이합체의 제거에 사용될 수 있고, 서열번호 3의 스페이서 서열을 포함하는 gRNA는 평활 말단의 연결을 갖는 어댑터 이합체의 제거에 사용될 수 있다.

[0040] 보다 구체적으로 본 발명에 따른 상기 어댑터 이합체 절단용 gRNA의 전체 염기서열은 서열번호 2 또는 서열번호 4로 이루어진 것일 수 있다.

[0041] 또한 본 발명은 상기 본 발명에 따른 어댑터 이합체 절단용 gRNA(guide RNA) 및 Cas9 단백질로 구성되는, NGS 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 제공할 수 있다.

[0042] 상기 RNP(ribonucleoprotein) 복합체에서 어댑터 이합체 절단용 gRNA는 앞서 기술한 바와 같이, 서열번호 1 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 스페이서(spacer) 서열을 포함하는 gRNA(guide RNA)와 Cas9 단백질의 복합체이다.

[0043] 또한 본 발명은 본 발명의 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 이용하여 NGS(Next Generation Sequencing) 라이브러리 제조과정에서 발생하는 어댑터 이합체를 절단하여 제거하는 방법을 제공한다.

[0044] 본 발명의 일실시예에서는 NGS 라이브러리 제조 과정에서 어댑터 연결 반응 후, 본 발명의 어댑터 이합체 절단용 RNP 복합체를 처리한 군과 처리하지 않은 군을 대상으로, 반응물 내에 존재하는 어댑터 이합체를 분석한 결과, 본 발명의 RNP 복합체를 처리한 군은 어댑터 이합체가 대부분 절단되어 거의 확인되지 않는 것으로 나타난 반면, 본 발명의 RNP를 처리하지 않은 군은 어댑터 이합체가 상당수 형성되어 있는 것으로 나타났다.

[0045] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명에서 디자인한 어댑터 이합체 절단용 gRNA 및 Cas9의 이합체 절단용 RNP 복합체를 이용할 경우, NGS 라이브러리 제조 과정에서 발생하는 어댑터 이합체를 효과적으로 제거할 수 있음을 알 수 있었다.

[0046] 나아가 본 발명은 NGS 라이브러리 제조 과정에서 어댑터 연결반응의 효율을 향상시킬 수 있는 고효율 어댑터 연결방법을 제공할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 제공하는 고효율 어댑터 연결방법은 표적 DNA와 어댑터를 1:20~1:100의 몰비로 사용하고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 8~10%의 농도로 첨가하여 연결반응을 수행한다는 점에 특징이 있다.

[0048] 본 발명의 일실시예에서는, NGS 라이브러리 제조에 있어서 어댑터 연결반응을 효율을 향상시킬 수 있는 최적의 반응조건을 규명하기 위한 실험을 수행하였다. 그 결과, 표적 DNA와 어댑터를 다양한 혼합비로 반응에 사용하였고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 다양한 농도로 반응에 사용하였는데, 그 결과, 표적 DNA와 어댑터를 1:20~1:100의 몰비로 사용하고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 8~10%의 농도로 사용할 경우, 어댑터 연결반응 효율이 우수한 것으로 나타났다.

[0049] 특히 표적 DNA와 어댑터를 1:50의 몰비로 사용하고, PEG-6000(Polyethylene glycol-6000)을 10%의 농도로 첨가하여 반응한 경우, 표적 DNA의 한 쪽에만 어댑터가 연결된 중간체 반응산물 및 반응이 일어나지 않은 표적 DNA가 거의 존재하지 않고, 대부분 모두 표적 DNA의 양쪽에 어댑터가 연결된 것을 확인할 수 있었다.

[0050] 따라서 본 발명에서는 고효율의 어댑터 연결반응 조건을 확립하였다.

[0051] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에서는 본 발명에서 확립한 고효율 어댑터 연결반응 시, 어댑터 이합체가 생성되는 문제점이 여전히 존재하고 있는 것으로 나타나, 어댑터 연결반응 후, 본 발명의 gRNA(guide RNA) 및 Cas9 단백질로 구성되는 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 처리한 결과, 어댑터 이합체가 대부분 절단되어 제거되는 것을 확인할 수 있었다.

[0052] 이러한 결과를 통해 본 발명에서 확립한 고효율 어댑터 연결 반응을 수행하고 이후 본 발명의 어댑터 이합체 절단용 RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 처리하는 과정을 수행할 경우, 정확도 및 민감도가 우수한 NGS 분석이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

[0054] 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.

[0056] **<실시예 1>**

[0057] **어댑터 이합체 제거용 gRNA 스페이서 디자인**

[0058] 본 발명자들은 NGS 반응의 라이브러리 제조 과정에서 발생하는 어댑터 이합체를 효과적으로 제거할 수 있는 방법으로, Cas9 단백질을 이용할 수 있는 방법을 고안하였고, 다음과 같이 Cas9 단백질이 어댑터 이합체에만 작용하여 절단할 수 있는 gRNA의 스페이서(space) 영역의 특정 염기서열을 디자인하였다.

[0059] gRNA와 결합한 Cas9 단백질은 어댑터 이합체에만 작용하여 절단 기능을 수행하여야 한다. 어댑터 단량체(Monomer)에도 Cas9 RNP가 작용하게 되면 결과적으로 어댑터 단량체가 양쪽에 하나씩 연결된, 어댑터 연결의 목표 산물도 Cas9에 의해 절단되는 문제가 발생할 수 있기 때문이다. 따라서 어댑터 이합체가 형성되었을 때만 만들어지는, 즉 어댑터 두 개가 연결되었을 때 연결 부위를 기점으로 양쪽을 모두 포함하는 서열로 Cas9의 표적 서열 및 gRNA 스페이서 서열을 길이 20nt가 되도록 선정하였다. 그와 동시에 적절한 위치에 PAM 서열인 NGG 서열이 있도록 디자인하였다(도 1 참조). 어댑터 서열 및 본 발명에서 디자인한 어댑터 이합체 제거용 gRNA의 스페이서 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0060] 어댑터 서열 및 본 발명에서 디자인한 어댑터 이합체 제거용 gRNA의 스페이서 서열 및 gRNA 서열

이름	서열 (5’ → 3’)
Adapter	/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCUACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
gRNA spacer	G*U*GUGCUCUUCCGAUCAGAU [서열번호 1]
gRNA (cr RNA)	G*U*GUGCUCUUCCGAUCAGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU*U [서열번호 2]
gRNA spacer	A*U*GUGGCUCUUCCGAUCGAU [서열번호 3]
gRNA (cr RNA)	A*U*GUGGCUCUUCCGAUCGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU*U [서열번호 4]

[0062] 상기 표 1에서 밑줄은 2 '-O-메틸 유사체(2'-O-methyl analog)를 표시한 것이고, *는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 간 결합(phosphorothioate internucleotide linkage)을 나타낸 것이다.

[0064] **<실시예 2>**

[0065] **고효율 어댑터 연결반응의 조건 확립 및 본 발명의 gRNA와 Cas9을 이용한 어댑터 이합체 절단 효과 확인**

[0067] <2-1> 고효율 어댑터 연결반응의 최적 조건 확립

[0068] 본 발명자들은 NGS 라이브러리 제조 과정에서, 어댑터 연결반응의 효율을 향상시킬 수 있는 반응 조건을 확립하기 위한 실험을 수행하였다.

[0069] 종래 NGS 라이브러리 제조에 있어서 어댑터 연결의 효율이 낮아 어댑터 이합체가 생성되는 문제점이 있었다. 이에 본 발명자들은 어댑터 연결반응에 사용되는 어댑터들이 최대한 모두 반응에 참여하여 어댑터 이합체의 형성을 감소시키고 동시에 연결 반응의 효율을 증가시킬 수 있는 조건을 찾기 위하여, 어댑터를 연결시킬 표적 DNA로, 인간 게놈 DNA(Human genomic DNA)로부터 KRAS 유전자의 일부를 PCR로 증폭한 149 뉴클레오타이드의 길이를 갖는 DNA 파편을 이용하였고, 프라이머는 IDT로부터 구매한 것을 사용하였는데, PCR 프라이머 서열과 증폭 산물로 생성되는 표적 DNA의 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

[0070] 연결반응은 A-테일링이 완료된 표적 DNA, 어댑터, PEG-6000, 1X Ultra II Ligation module(NEB), 증류수를 혼합하여 20℃에서 15분간 동안 수행하였으며, 최적의 연결반응을 위한 조건 확립을 위해 표적 DNA 주형과 어댑터의 첨가량을 각각 다른 몰비(표적 DNA 주형:어댑터=1:3.75, 1:20, 1:50, 1:100)를 사용하였고, PEG-6000 첨가 농도를 각기 달리 첨가하여 수행하였다.

표 2

[0071] 프라이머 및 표적 DNA 서열

이름	서열 (5' → 3')	Tm value(℃)
KRAS_FP	/5Phos/TTGTGGTAGTTGGAGCTGGT	61.3
KRAS_RP	/5Phos/CTGTATCAAAGAATGGTCCTGCAC	61.6
KRAS target	/5Phos/TTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTTAATATGCATATTACTGGTGCAGGACCATTCTTTGATACAG	-

[0073] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 반응 결과물은 7.5% Native PAGE로 확인하였는데, 어댑터 연결 반응이 일어나지 않은 표적 DNA는 초록색 박스로 표시하였고, 표적 DNA 한 쪽에만 어댑터가 결합한 중간체는 보라색 박스로 표시하였고, 표적 DNA 양쪽에 어댑터가 결합한 최종 생성물은 빨간색 박스로 표시하였다. 또한, 어댑터 이합체는 파란색 박스로 표시하였다.

[0074] 표적 DNA와 어댑터의 혼합비를 달리하여 분석한 결과, 어댑터 비율이 증가할수록 연결 반응의 효율이 증가하는 것으로 나타났고, 어댑터 이합체의 형성도 어댑터 비율 증가에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 본 발명의 실험에 의하면, 표적 DNA와 어댑터의 비율이 1:50인 경우, 어댑터 이합체의 형성이 작고 표적 DNA의 양쪽에 모두 어댑터가 연결된 양이 가장 많은 것을 확인함에 따라 상기 첨가 비율로 반응시키는 것이 가장 효과적으로 어댑터 연결반응이 이루어진다는 것을 알 수 있었다.

[0075] 또한, PEG-6000의 첨가량을 달리하여 어댑터 연결 반응을 수행하였다. PEG-6000의 사용에 따라 어댑터 연결반응에 밀도를 증진시키는 효과를 유도하여 어댑터 연결 효율을 상승시킬 수 있으나, 사용하는 T4 라이게이즈(T4 ligase)의 정확도가 제한되므로 어댑터 연결 반응의 효율이 상승함에 따라 불가피하게 어댑터 이합체가 생성되는 문제점이 있다.

[0076] 도 3의 결과에 의하면, PEG-6000 농도를 0%에서 10%로 점차적으로 증가시킴에 따라 어댑터 이합체 양도 증가되는 것으로 나타났다. 한편, 10%의 PEG-6000 첨가군이 다른 실험군에 비해 표적 DNA의 양쪽에 모두 어댑터가 연결된 형태의 반응 산물이 가장 많은 것으로 나타나, 고효율 어댑터 연결반응은 10%의 PEG-6000 조건에서 수행하는 것이 가장 효과적임을 알 수 있었다. 나아가 10%를 초과한 농도로 PEG-6000을 처리한 군들에서는 10%의 PEG-6000 첨가군과 거의 유사한 수준의 어댑터 연결 효과가 확인되어 10% 농도를 초과하여 PEG-6000을 사용하는 것이 경제적이지 못하다는 것을 확인하였다.

[0078] <2-2> 고효율 어댑터 연결반응 조건에서 본 발명의 gRNA와 Cas9을 이용한 어댑터 이합체 절단 활성 분석

[0079] 상기 실시예 <2-1>의 실험을 통해 어댑터 연결을 위한 최적의 반응조건이 표적 DNA와 어댑터의 몰비율을 1:50으로 하고, 10%의 PEG-6000을 이용하는 것임을 확인하였다. 한편, 상기 최적의 연결반응 조건의 경우 어댑터 이합체가 생성되는 것을 확인함에 따라, 상기 연결반응 조건에서 본 발명에서 디자인한 gRNA와 Cas9을 이용할 경우, 형성된 어댑터 이합체를 효과적으로 절단(제거)할 수 있는지를 확인하였다. 이를 위해 다음과 같이 실험을 수행하였다.

[0080] 먼저 8 μM의 SpCas9 단백질, 8 μM의 본 발명의 gRNA, 1X NEB buffer r2.1(NEB) 및 증류수를 혼합하고 상온에서 10분간 놔두어 RNP 복합체가 형성되도록 하였다. 이후 상기 실시예 <2-1>의 연결 반응을 진행했던 샘플에 40 피코몰의 Cas9 RNP, 1X NEBuffer 2.1(NEB) 및 증류수를 첨가하고 37℃에서 60분간 반응을 진행하였다. 반응 후에는 4 μL의 Proteinase K, 4 μL의 RNase A를 처리하여 Cas9 RNP가 분해되도록 하였으며, 대조군으로는 Cas9 반응을 진행하지 않은 것을 사용하였다.

[0082] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 어댑터 연결반응에서 발생하는 어댑터 이합체들이 본 발명의 gRNA를 포함하는 Cas9 RNP을 처리한 경우, 어댑터 이합체가 효과적으로 절단되어 제거됨을 확인할 수 있었다. 반면, 본 발명의 gRNA를 포함하는 Cas9 RNP을 처리하지 않은 군은 어댑터 이합체가 형성된 채로 반응 생성물에 존재하고 있음을 확인하였다.

[0083] 이러한 결과를 통해, 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 어댑터 서열에 특이적으로 결합할 수 있는 특정 서열로 구성된 gRNA 스페이서 서열을 포함하는 gRNA와 Cas9을 이용한 Cas9 RNP 복합체를 이용할 경우, NGS 라이브러리 제조에 문제가 되고 있는 어댑터 이합체를 특이적으로 절단 및 제거할 수 있음을 알 수 있었다.

[0084] **<실시예 3>**

[0085] **NGS 라이브러리 제조에 있어서 본 발명에 따른 gRNA 및 Cas9을 이용한 어댑터 이합체 제거방법의 적용 확인**

[0086] 나아가 본 발명자들은 본 발명에서 디자인한 어댑터 이합체 절단을 위한 gRNA 및 Cas9을 이용한 어댑터 이합체 제거기술이 NGS 라이브러리 제조에 실제적으로 잘 적용되어 작동되는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0087] 이를 위해, 40 ng의 표적 DNA를 0.1X TE buffer 50 uL에 희석한 후 1X Ultra II End prep module(NEB)을 혼합하여 엔드 리페어(End-repair) 및 A-테일링(A-tailing) 반응을 진행하였다. 어댑터 연결 반응을 진행하기 직전, 어댑터는 95° C에서 5분간 처리한 후 0.1° C/s의 속도로 25° C까지 램핑 다운 (Ramping down)하여 25° C에서의 15분 반응을 통해 헤어핀 구조를 형성하도록 하였고, 이후 상기 본 발명에서 확립한 최적의 고효율 어댑터 연결반응 조건으로 어댑터 연결반응을 수행하였다. 어댑터 연결 반응이 완료된 샘플에 USER 효소(NEB)를 각 3 uL씩 처리하였고 37° C에서 15분간 반응을 진행하였다. 이후 Monarch DNA Cleanup kit (NEB)를 사용하여 정제과정을 거친 이후, 상기 실시예 <2-2>의 본 발명의 gRNA와 Cas9을 이용한 어댑터 이합체 절단 반응을 진행하였다. 어댑터 이합체 절단 반응이 완료된 샘플은 0.9X SPRIselect bead (Beckman)로 정제하였으며 Ultra II Q5 master mix (NEB), NEBNext Multiplex Oligos for Illumina(96 Unique Dual Index Primer Pairs) (NEB)를 이용하여 6 사이클의 PCR 증폭 과정을 진행했다. 최종적으로 0.9X SPRIselect bead (Beckman)를 사용하여 정제한 후 dsDNA high sensitivity assay (DeNovix)를 이용해 최종 샘플 농도를 측정하였고, Native PAGE 7.5% 전기영동을 통해 확인하였다. 또한, 대조군(Ct)으로는 상업 키트(NEB Next Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina, NEB)를 이용한 군을 사용하였다.

[0089] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 상업 키트를 사용한 대조군의 경우, 표적 DNA의 한 쪽에만 어댑터가 연결

된 중간체 반응산물 및 반응이 일어나지 않은 표적 DNA가 그대로 존재하는 것을 확인하였다. 이러한 산물이 존재하는 경우, NGS 분석에 적합하지 않다. 또한, 본 발명의 gRNA 및 Cas9 단백질을 처리하지 않은 군에서는 최적의 연결반응 조건에서 반응을 수행하였기에 높은 어댑터 연결효율을 보였으나, 최종 NGS 라이브러리 샘플 상에서도 어댑터 이합체 밴드가 확인되었다. 어댑터 이합체는 추후 NGS 분석 과정에서 방해물로 작용할 수 있어 해당 실험군 역시 NGS 분석에 적합하지 않다는 것을 알 수 있었다.

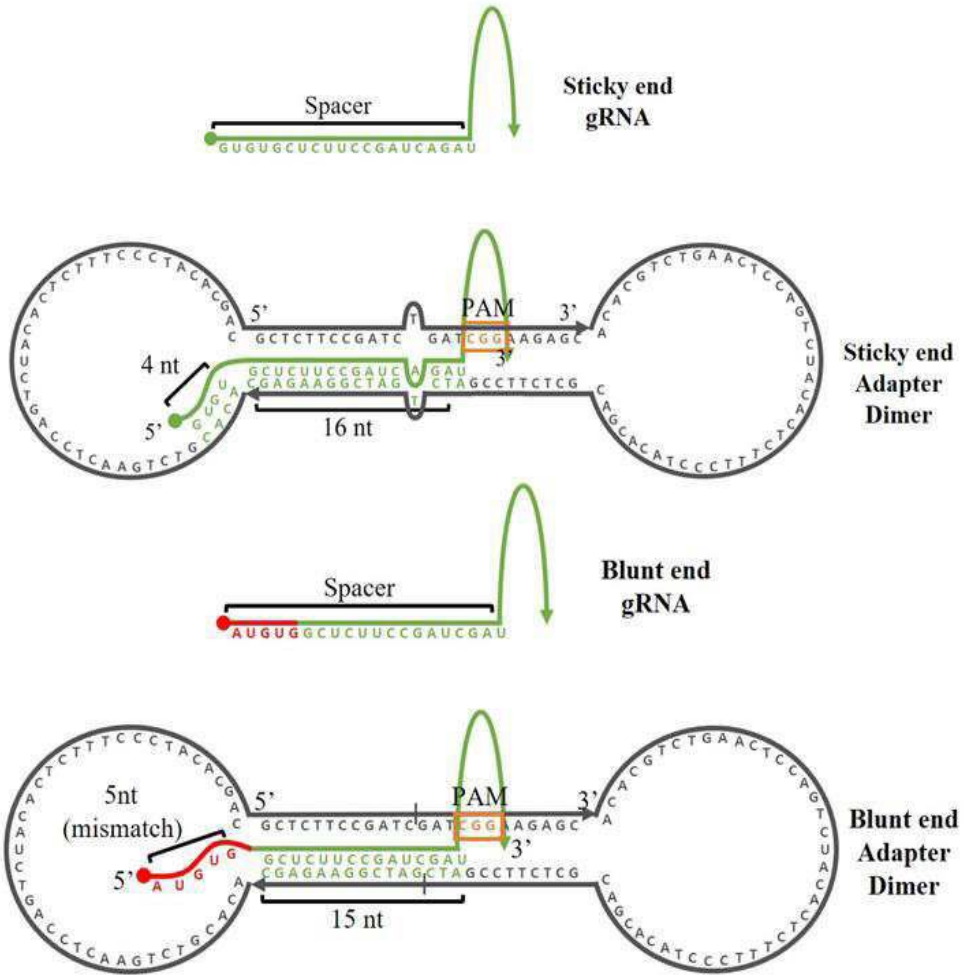
[0090] 반면, 본 발명의 gRNA 및 Cas9 단백질을 처리한 군의 경우, 높은 어댑터 연결 반응의 효율이 유지되면서(표적 DNA의 양쪽에 모두 어댑터가 연결된 산물이 다량 형성됨), 동시에 어댑터 이합체는 완전히 절단되어 제거되고 반응이 일어나지 않은 표적 DNA도 거의 없는 것을 확인할 수 있었다.

[0092] 이상의 결과를 통해, 본 발명자들은 본 발명에서 규명한 고효율 어댑터 연결반응 조건을 수행할 경우, 매우 효과적으로 표적 DNA의 양쪽에 모두 어댑터가 연결된 산물을 형성시킬 수 있음을 알 수 있었고, 또한 본 발명에서 고안한 특정 스페이서 서열을 갖는 gRNA 및 Cas9을 이용할 경우, 어댑터 연결반응에서 발생하는 어댑터 이합체를 효과적으로 제거할 수 있어 보다 정확하고 효과적인 NGS 분석 결과를 얻는데 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

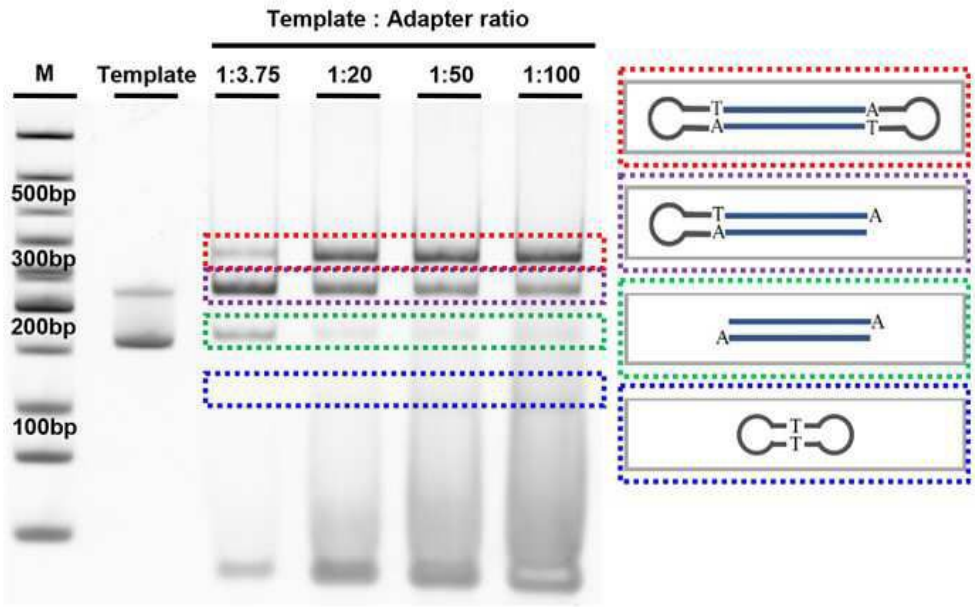
[0094] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

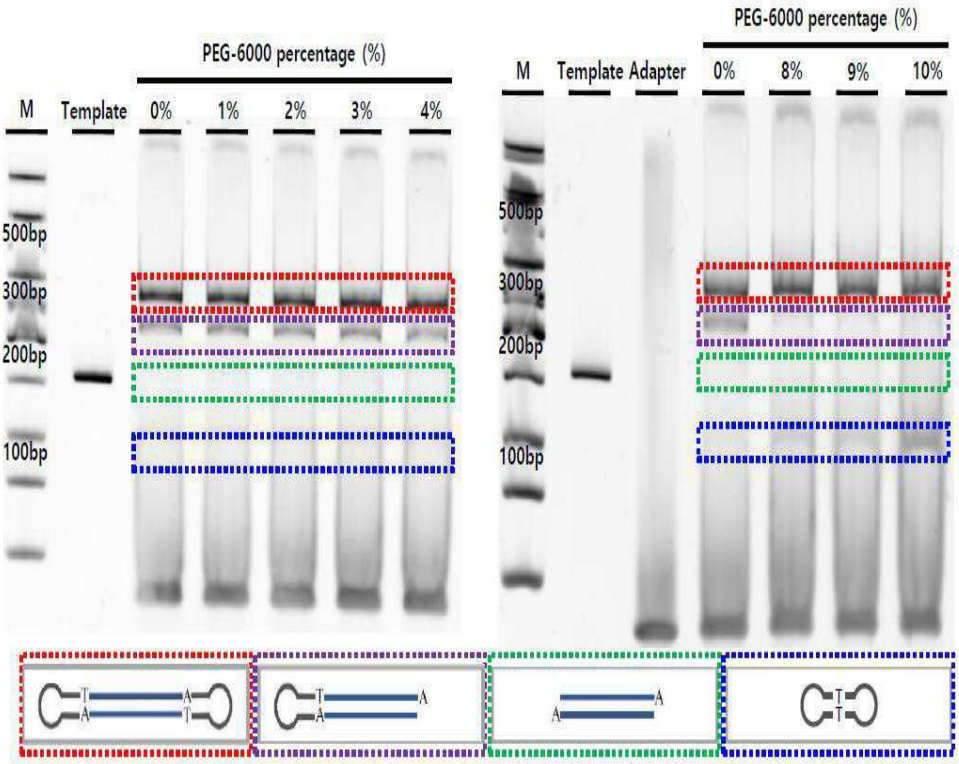
도면1


Spacer
GUGUGCUCUUCCGAUCAGAU
Sticky end
gRNA
5'
PAM
3'
4 nt
5'
16 nt
Sticky end
Adapter
Dimer
Spacer
AUGUGGCUCUUCCGAUCGAU
Blunt end
gRNA
5nt
(mismatch)
5'
PAM
3'
15 nt
Blunt end
Adapter
Dimer

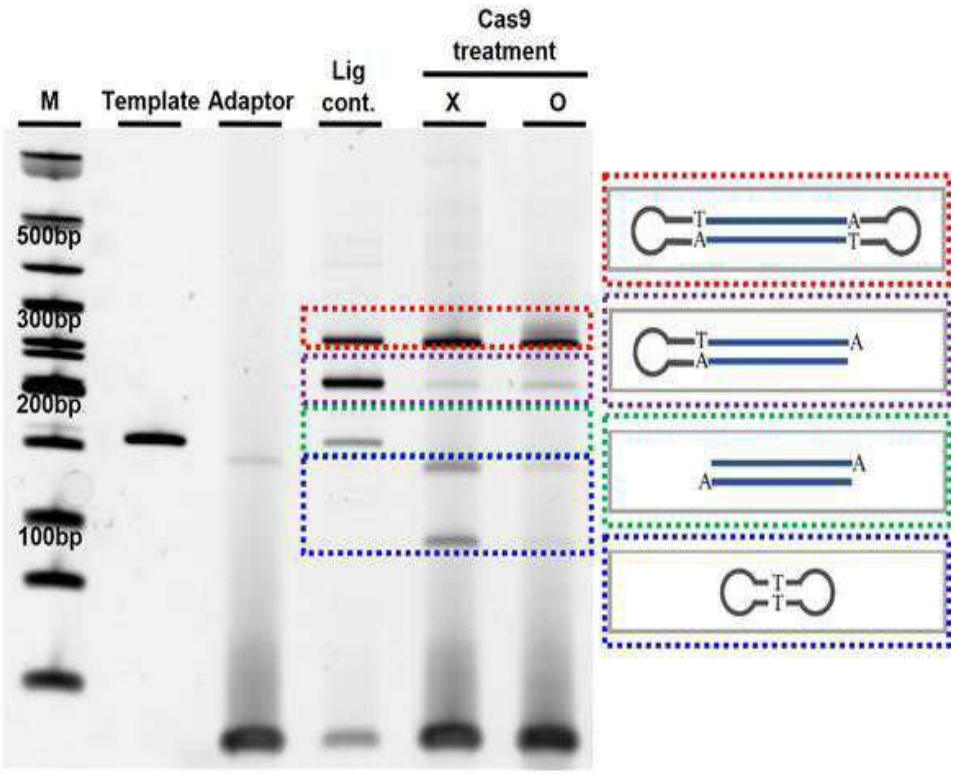
도면2


Template : Adapter ratio
M
Template
1:3.75
1:20
1:50
1:100
500bp
300bp
200bp
100bp

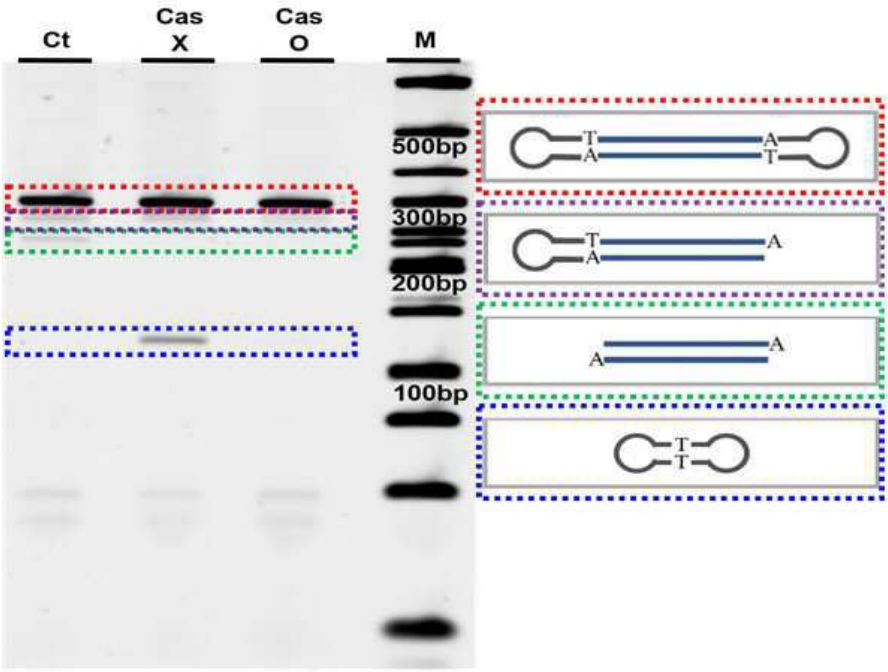
도면3


PEG-6000 percentage (%)
M
Template
0%
1%
2%
3%
4%
500bp
300bp
200bp
100bp
PEG-6000 percentage (%)
M
Template
Adapter
0%
8%
9%
10%
500bp
300bp
200bp
100bp

도면4


Cas9
treatment
M
Template
Adaptor
Lig
cont.
X
O
500bp
300bp
200bp
100bp

도면5


Ct
Cas
X
Cas
O
M
500bp
300bp
200bp
100bp

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.