



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2018-0033454  
(43) 공개일자 2018년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6869 (2018.01) C12P 19/34 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6869 (2013.01)  
C12P 19/34 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-7035288  
(22) 출원일자(국제) 2016년05월12일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2017년12월07일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/032029  
(87) 국제공개번호 WO 2016/183289  
국제공개일자 2016년11월17일  
(30) 우선권주장  
62/160,390 2015년05월12일 미국(US)

(71) 출원인  
웨이크 포리스트 유니버시티 헬스 사이언시즈  
미국 27157 노스캐롤라이나 윈스턴-사렘 메디칼  
센터 블러바드  
(72) 발명자  
홀 아담 알  
미국 27101 노스 캐롤라이나주 윈스턴-세일럼 스  
위트 120 노스 패터슨 애비뉴 575  
(74) 대리인  
양영준, 김윤기

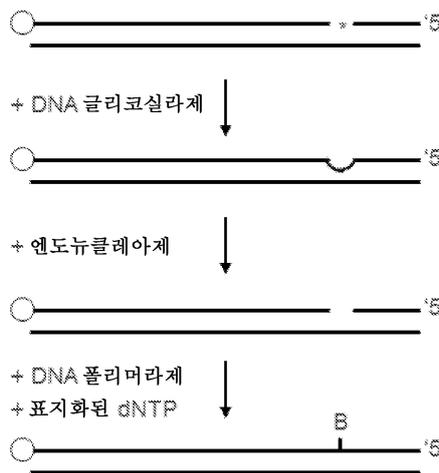
전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 유전자 변형의 확인

**(57) 요약**

DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오타이드 염기를 표적 변형된 염기를 절제하는 특이적 DNA 글리코실라제를 사용하여 검출하는 방법이 기재된다. 이어서, DNA 분자는 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성 및 가닥 치환 활성이 결합된 DNA 폴리머라제를 사용하여 표지화된다. 방법은 후성적 변화 및 DNA 손상을 검출하는데 사용될 수 있다. 질환 또는 병태를 진단하고, 질환 또는 병태의 위험을 결정하고, 적절한 치료를 확인하고, 치료의 유효성을 모니터링하고, 변형된 염기의 검출에 기반하여 대상체에서의 치료의 부작용을 모니터링하는 방법이 제공된다. DNA를 함유하는 생물학적 샘플의 환경 노출, 또는 환경 노출 시간을 결정하는 방법이 또한 제공된다. 기재된 방법을 수행하기 위한 키트, 시스템 및 장치가 또한 제공된다.

**대표도 - 도1**



(52) CPC특허분류

*C12Q 2521/301* (2013.01)

*C12Q 2521/531* (2013.01)

*C12Q 2537/164* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 단계를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하는 방법:

(a) 단편화된 DNA를 포함하는 DNA 샘플을 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션 하여, 단편화된 DNA 내의 변형된 뉴클레오티드의 부위에서 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하는 단계;

(b) 단계 (a)의 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 AP 부위에 대항하는 뉴클레오티드에 상보적인 표지화된 뉴클레오티드로 처리하며, 이에 의해 표지화된 뉴클레오티드를 단편화된 DNA 내의 AP 부위에 혼입시키는 단계;

(c) 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 분리하는 단계; 및

(d) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하거나, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하거나, 또는 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 및 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하고 양을 정량화하는 것을 둘 다 하는 단계.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, DNA 샘플이 게놈 DNA, 미토콘드리아 DNA 또는 그의 조합인 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, DNA 샘플이 약 50-250개의 염기 쌍 길이의 DNA 단편을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 메틸시토신 (mC), 히드록시메틸시토신 (hmC), 카르복시시토신 (caC), 포르밀시토신 (fC), 8-옥소-7,8-디히드로구아닌 (8-oxoG), 우라실, 메틸아데닌 (mA), 8-옥소아데닌, O6-메틸구아닌, 1-메틸아데닌, O4-메틸티민, 5-히드록시시토신, 5-히드록시우라실, 5-히드록시메틸우라실 또는 티민 이량체 중 적어도 하나인 방법.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 표 1에 열거된 것들 중 적어도 하나인 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, DNA 글리코실라제가 표 1에 열거된 것들 중 적어도 하나인 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)를 수행하기 전에 단계 (a)의 단편화된 DNA를 AP 엔도뉴클레아제와 함께 인큐베이션하는 것을 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, DNA 폴리머라제가 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성 또는 가닥 치환 활성을 갖지 않는 것인 방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, DNA 폴리머라제가 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여된, 돌연변이된 T4 DNA 폴리머라제일 수 있는 것인 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에 사용된 DNA 폴리머라제의 양이 약 10 U/pmol 내지 약 30 U/pmol 총 DNA일 수 있는 것인 방법.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 표지화된 뉴클레오티드가 비오틴-표지화된 뉴클레오티드인 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 표지화된 뉴클레오티드가 비오틴-표지화된 뉴클레오티드인 경우에, 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 분리하는 것이 단편화된 DNA를 고체 지지체에 부착된 스트랩 타비딘과 접촉시키고, 그에 결합되지 않은 단편화된 DNA를 제거하는 것을 포함하는 것인 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하는 단계를 포함하고, 표지화된 뉴클레오티드의 양을 기지의 양의 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 참조 샘플 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양과 비교하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하는 것이 분리된 단편화된 DNA를 서열분석하는 것을 포함하는 것인 방법.

**청구항 15**

하기 단계를 포함하는, 후성적 변형 또는 어떤 유형의 DNA 손상과 연관된 것으로 공지된 질환 또는 병태를 갖는 대상체를 진단하는 방법:

- (a) 대상체로부터의 DNA 샘플을 제공하는 단계;
- (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
- (c) 제1항의 방법에 따라 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나를 확인하는 단계;
- (d) 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치 또는 양과 비교하여 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양에서의 차이를 결정하는 단계; 및
- (e) 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치 또는 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양에서의 차이가 있으면, 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다는 것을 나타내는 단계.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양이 증가되면, 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다는 것을 나타내는 것을 포함하는 방법.

**청구항 17**

제15항에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양이 감소되면, 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다는 것을 나타내는 것을 포함하는 방법.

**청구항 18**

제15항에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치와 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치의 변화가 있으면, 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다는 것을 나

타내는 것을 포함하는 방법.

**청구항 19**

하기 단계를 포함하는, 후성적 변형 또는 어떤 유형의 DNA 손상과 연관된 것으로 공지된 질환 또는 병태가 발생할 위험이 있는 대상체를 확인하는 방법:

- (a) 대상체로부터의 DNA 샘플을 제공하는 단계;
- (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
- (c) 제1항의 방법에 따라 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나를 확인하는 단계;
- (d) 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치 또는 양과 비교하여 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나에서의 차이를 결정하는 단계; 및
- (e) 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치, 양 또는 이들 둘 다와 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나에서의 차이가 있으면, 대상체가 질환 또는 병태가 발생할 위험이 있다는 것을 나타내는 단계.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양이 증가되면, 대상체가 질환 또는 병태가 발생할 위험이 있다는 것을 나타내는 것을 포함하는 방법.

**청구항 21**

제19항에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양이 감소되면, 대상체가 질환 또는 병태가 발생할 위험이 있다는 것을 나타내는 것을 포함하는 방법.

**청구항 22**

제19항에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치와 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치의 변화가 있으면, 대상체가 질환 또는 병태가 발생할 위험이 있다는 것을 나타내는 것을 포함하는 방법.

**청구항 23**

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 질환 또는 병태가 발생할 유전적 위험을 갖는 것인 방법.

**청구항 24**

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 질환 또는 병태가 발생할 환경적 위험을 갖는 것인 방법.

**청구항 25**

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치 또는 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양에서의 차이가 없으면, 대상체를 모니터링하기 위해 향후 시점에 수행되는 방법.

**청구항 26**

하기 단계를 포함하는, 대상체의 질환 또는 병태에 대한 치료에 반응할 가능성을 결정하는 방법:

- (a) 대상체로부터의 DNA 샘플을 제공하는 단계;
- (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;

(c) 제1항의 방법에 따라 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나를 확인하는 단계;

(d) 질환 또는 병태를 가지며 치료에 대해 반응하는 것으로 공지된 대상체의 참조 집단으로부터의 샘플 내의 변형된 염기의 위치 또는 양 중 적어도 하나와 비교하여 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양에서의 차이를 결정하는 단계; 및

(e) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 참조 집단으로부터의 샘플 내의 변형된 염기의 위치, 양 또는 이들 둘 다와 유사하면, 대상체가 치료에 반응할 가능성이 더 크다는 것을 나타내거나, 또는 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 참조 집단으로부터의 샘플 내의 변형된 염기의 위치, 양 또는 이들 둘 다와 유사하지 않으면, 대상체가 치료에 반응할 가능성이 더 작다는 것을 나타내는 단계.

### 청구항 27

하기 단계를 포함하는, 치료에 대한 대상체의 반응성을 평가하는 방법:

(a) 치료를 받고 있는 대상체로부터의 DNA 샘플을 제공하는 단계;

(b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;

(c) 제1항의 방법에 따라 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나를 확인하는 단계;

(d) (i) 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 또는 (ii) 질환 또는 병태를 갖는 1명 이상의 대상체로부터의 하나 이상의 샘플 중 적어도 하나 내의 변형된 염기의 위치 또는 양과 비교하여 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나에서의 차이를 결정하는 단계; 및

(e) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치, 양 또는 이들 둘 다와 유사하면, 대상체가 치료에 반응하고 있다는 것을 나타내거나, 또는 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 질환 또는 병태를 갖는 1명 이상의 대상체로부터의 하나 이상의 샘플 내의 변형된 염기의 위치, 양 또는 이들 둘 다와 유사하면, 대상체가 치료에 반응하고 있지 않다는 것을 나타내는 단계.

### 청구항 28

제27항에 있어서, 시간 경과에 따른 대상체의 치료에 대한 반응성을 모니터링하기 위해 하나 이상의 향후 시점에 수행되는 방법.

### 청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 대상체가 치료를 받기 이전에 대상체로부터 수득된 DNA 샘플에 대해 단계 (b) 및 (c)를 수행하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 30

제29항에 있어서, 질환 또는 병태를 갖는 1명 이상의 대상체로부터의 하나 이상의 샘플이 치료를 받기 이전에 대상체로부터 수득된 DNA 샘플인 방법.

### 청구항 31

하기 단계를 포함하는, 치료와 연관된 DNA 손상의 축적에 대해 대상체를 모니터링하는 방법:

(a) 치료의 투여 이전에 대상체로부터의 제1 DNA 샘플을 제공하는 단계;

(b) 제1 DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;

(c) 제1항의 방법에 따라 제1 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나를 확인하는 단계;

(d) 치료의 투여 후에 대상체로부터의 제2 DNA 샘플을 제공하는 단계;

- (e) 제2 DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
- (f) 제1항의 방법에 따라 제2 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하는 단계;
- (g) 제2 DNA 샘플과 비교하여 제1 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나에서의 차이를 결정하는 단계; 및
- (h) 제2 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 제1 DNA 샘플과 비교하여 증가되었으면, 대상체가 DNA 손상을 축적하였다는 것을 나타내거나, 또는 제2 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 제1 DNA 샘플과 유사하면, 대상체가 DNA 손상을 축적하지 않았다는 것을 나타내는 단계.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 대상체에서의 DNA 손상의 축적을 모니터링하기 위해 단계 (d) 내지 (h)가 향후 시점에 수행되는 것인 방법.

**청구항 33**

제31항 또는 제32항에 있어서, 치료가 방사선 요법 또는 화학요법 중 적어도 하나인 방법.

**청구항 34**

하기 단계를 포함하는, 대상체에 대한 유전자 프로파일을 개발하는 방법:

- (a) 대상체로부터의 DNA 샘플을 제공하는 단계;
- (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
- (c) 단편화된 DNA를 포함하는 DNA 샘플을 복수의 변형된 뉴클레오티드를 절제하며, 각각 상이한 종류의 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 복수의 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션하여, 단편화된 DNA 내의 변형된 뉴클레오티드의 부위에서 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하는 단계;
- (d) 단계 (c)의 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 AP 부위에 대항하는 뉴클레오티드에 상보적이며, 각 종류가 상이한 종류의 표지를 갖는 표지화된 뉴클레오티드로 처리하며, 이에 의해 표지화된 뉴클레오티드를 단편화된 DNA 내의 AP 부위에 혼입시키는 단계;
- (e) 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 분리하는 단계; 및
- (f) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하거나, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하거나, 또는 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 및 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하고 양을 정량화하는 것을 둘 다 하며, 이에 의해 대상체에 대한 유전자 프로파일을 생성하는 단계.

**청구항 35**

제34항에 있어서, DNA 샘플이 단계 (c)에서 한 번에 하나의 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션되는 것인 방법.

**청구항 36**

제34항에 있어서, DNA 샘플이 단계 (c)에서 다중 부분으로 분할되고, 각각의 부분이 상이한 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션되는 것인 방법.

**청구항 37**

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 향후 시점에 대상체로부터의 DNA 샘플에 대해 방법을 수행하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 38**

하기 단계를 포함하는, DNA를 함유하는 생물학적 샘플의 환경 노출 시간을 결정하는 방법:

- (a) 환경 조건에 노출된 DNA 샘플을 제공하는 단계;
- (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
- (c) 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 AP 부위에 대항하는 뉴클레오티드에 상보적인 표지화된 뉴클레오티드로 처리하며, 이에 의해 표지화된 뉴클레오티드를 단편화된 DNA 내의 AP 부위에 혼입시키는 단계;
- (d) 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하는 단계; 및
- (e) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하거나, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하거나, 또는 이들 둘 다를 하는 단계; 및
- (f) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치, 양 또는 이들 둘 다를 환경 조건에 노출되었으며, 각각 상이한 길이의 시간 동안 환경 조건에 노출된 복수의 참조 샘플과 비교하며, 여기서 DNA 샘플의 환경 노출 시간은 DNA 샘플과 비교 시 변형된 뉴클레오티드의 가장 유사한 위치, 양 또는 이들 둘 다를 갖는 참조 샘플에 의해 결정되는 것인 단계.

**청구항 39**

하기를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 검출을 위한 키트:

DNA 글리코실라제, AP 엔도뉴클레아제, 교정 및 가닥 치환 활성이 결여된 DNA 폴리머라제 또는 DNA 리가제 중 적어도 하나로부터 선택된 효소; 및

적어도 1종의 종류의 표지화된 뉴클레오티드.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 효소를 위한 완충제, 적어도 1종의 종류의 비표지화된 뉴클레오티드, 또는 기지의 양 또는 위치 패턴의 표지화된 뉴클레오티드를 포함하는 대조 DNA 올리고뉴클레오티드 중 하나 이상을 추가로 포함하는 키트.

**청구항 41**

각각 기지의 양의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 복수의 올리고뉴클레오티드.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 부분이 기지의 양의 제2 종류의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 혼합물.

**청구항 43**

제41항 또는 제42항에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 혼합물이 약 50-250개의 염기 쌍 길이의 DNA 단편을 포함하는 것인 혼합물.

**청구항 44**

하기를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 검출을 위한 샘플 장치:

고체 표면;

제1 고체 표면과 접촉 상태의 제2 고체 표면;

유입구; 및

유입구에 연결되며, (i) 염기 절제 반응, (ii) DNA 표지화 반응, (iii) 표지화된 DNA의 단리, 또는 (iv) 적어도 하나의 DNA 검출, 정량화 또는 서열분석 중 적어도 하나를 수행하도록 구성된 적어도 하나의 챔버.

**청구항 45**

하기를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 검출을 위한 분석 장치:

제44항에 따른 하나 이상의 샘플 장치를 수용하도록 구성된 리셉터클;

사용자 입력 장치; 및

메모리 및 프로세서를 포함하며, 상기 메모리는 상기 프로세서가 (i) 염기 절제 반응, (ii) DNA 표지화 반응, (iii) 표지화된 DNA의 단리, 또는 (iv) 적어도 하나의 DNA 검출, 정량화 또는 서열분석 중 적어도 하나를 수행하는 하나 이상의 기능을 실행하게 하도록 구성된 소프트웨어 명령을 포함하는 것인 컴퓨팅 장치.

## 발명의 설명

## 기술 분야

## 배경 기술

- [0001] 메틸화 및 다양한 형태의 DNA 손상의 산물은 다양한 중요한 생물학적 과정에 연루되어 왔다. 메틸화 패턴에서의 변화 및 손상된 DNA의 출현은 종종 다양한 질환 상태에 대해 관찰되는 가장 빠른 사건 중 하나이다.
- [0002] 후성적 변형은 정상적인 발생을 위해 필수적이다. 예를 들어, 가장 광범위하게 연구된 후성적 변형인, 메틸시토신은 게놈 각인, X-염색체 불활성화, 반복 요소의 억제 및 발암을 포함한, 다수의 핵심 과정과 연관되어 있다. 예를 들어, 시토신의 5 위치에서의 DNA 메틸화는 유전자 발현을 감소시키는 특정한 효과를 가지며, 검사된 모든 척추동물에서 발견된 바 있다. 많은 질환 과정, 예컨대 암에서, 유전자 프로모터 CpG 섬은 비정상적인 과메틸화를 획득하고, 이는 세포 분열 후 딸세포에 의해 유전될 수 있는 전사 침묵을 유발한다. 또한, DNA 메틸화의 변경은 암 발생의 중요한 구성요소로서 인식된 바 있다. 저메틸화는 일반적으로 보다 조기에 발생하며, 염색체 불안정성 및 각인의 상실과 연관되는 반면, 과메틸화는 프로모터와 연관되며, 유전자 (종양유전자 억제자) 침묵에 부차적으로 발생할 수 있다. 추가적으로, 히드록시메틸시토신이 또한 발생에서부터 노화에 이르는 유전자 발현에 있어서 잠재적인 조절 역할을 또한 갖는 중요한 후성적 변형으로서 알려진 바 있다. 다양한 암에 의해 히드록시메틸시토신 함량이, 심지어 조기-단계 병변에서도, 건강한 조직에 비해 악성에서 일관되게 유의하게 감소된 것으로 제시된 바 있다.
- [0003] DNA는 내인성 및 외인성 기원 둘 다로부터의 끊임없는 스트레스 하에 있다. 염기는 제한된 화학적 안정성을 나타내며, 산화, 알킬화, 방사선 손상 및 가수분해를 포함한, 상이한 유형의 손상을 통한 화학적 변형에 취약하다. DNA 염기에 대한 손상은 그의 염기-쌍형성 특성에 영향을 미칠 수 있고, 따라서, 돌연변이유발성일 수 있다. 이들 유형의 DNA 손상으로부터 유발되는 DNA 염기 변형은 광범위하며, 생리학적 상태 및 질환 표현형에 영향을 미치는 중요한 역할을 한다. 예는 7,8-디히드로-8-옥소구아닌 (8-oxoG) (산화성 손상), 8-옥소아데닌 (산화성 손상; 노화, 알츠하이머병, 파킨슨병), 1-메틸아데닌, O6-메틸구아닌 (알킬화; 신경교종 및 결장직장 암종), 벤조[a]피렌 디올 에폭시드 (BPDE), 피리미딘 이량체 (부가물 형성; 흡연, 산업적 화학물질 노출, UV 광 노출; 폐암 및 피부암) 및 5-히드록시시토신, 5-히드록시우라실, 5-히드록시메틸우라실 및 티민 글리콜 (이온화 방사선 손상; 만성 염증성 질환, 전립선암, 유방암 및 결장직장암)을 포함한다. 예를 들어, 8-oxoG는 DNA 산화의 빈번한 생성물이다. 8-oxoG는 아데닌과 염기-쌍형성하여, G·C에서 T·A로의 전좌 돌연변이를 초래하는 경향이 있다. 또 다른 예는 각각 구아닌과 잘못 쌍형성된 우라실 및 티민을 초래하는 시토신의 가수분해성 탈아미노화 및 5-메틸시토신 (5-meC)이며, 복구되지 않으면 C·G에서 T·A로의 전이 돌연변이를 유발한다. 또 다른 예에서, 알킬화는 6-meG, N7-메틸구아닌 (7-meG) 또는 N3-메틸아데닌 (3-meA)을 포함하는 다양한 DNA 염기 병변을 생성할 수 있다. 6-meG는 티민과 쌍형성하는 그의 특성에 의해 돌연변이전구성인 반면, 7-meG 및 3-meA는 복제 DNA 폴리머라제를 차단하고, 따라서 세포독성이다. 이들 및 많은 다른 형태의 DNA 염기 손상은 세포에서 매일 다수회 발생하고, 단지 특수화된 DNA 복구 시스템의 연속적 작용만이 유전자 정보의 급속한 소멸을 방지할 수 있다. 핵 DNA에 대한 손상 이외에도, 미토콘드리아 DNA가 또한 유의한 산화성 손상, 뿐만 아니라 알킬화, 가수분해 및 부가물로부터의 손상을 경험한다. 예를 들어, 산화성 손상은, 주로 미토콘드리아가 반응성 산소 종 (ROS)의 주요 세포 공급원이기 때문에, 미토콘드리아 DNA에서의 가장 보편적인 유형의 손상이다. 또한, 미토콘드리아는, DNA를 비효소적으로 메틸화할 수 있는 S-아데노실메티오닌의 세포 풀의 대략 30%를 수용한다. 또한, 특정 작용제, 예컨대 에스트로겐, 담배 연기 및 특정 화학물질에 대한 노출이 미토콘드리아 DNA의 우선적 손상으로 이어진다.

- [0004] DNA 복구는 세포가 그의 게놈을 코딩하는 DNA 분자에 대한 손상을 확인하고 수정하는 과정의 집합이다. 정상적인 대사 활성 및 환경 요인이 둘 다 DNA 손상을 유발할 수 있다. 이들 손상된 부위 중 다수는 DNA 분자에 대한 구조적 손상을 유발하며, 영향을 받은 유전자 서열로부터의 발현을 변경 또는 제거할 수 있다. 다른 병변은 세포의 게놈에서 잠재적으로 유해한 돌연변이를 유도하며, 이는 그의 딸세포의 생존에 영향을 미치거나, 또는 질환 상태의 진행을 촉진하는 조절 이상을 유발할 수 있다. 따라서, DNA 복구 과정은 DNA 구조 내의 손상에 반응하므로, 이는 끊임없이 활성이다.
- [0005] DNA 손상 및 후성적 변형이 질환 상태의 가장 빠른 지표일 수 있으므로, 후성적 변형 및 DNA 손상 패턴의 검출은 질환의 조기 검출 및 중재에 유용할 수 있다. 그러나, 검출 방법이 제한을 갖는다. 예를 들어, 메틸화 상태와 관련하여, 분광광도측정법이 표적 DNA에서의 변형의 전반적 함량을 나타내는데 사용될 수 있지만, 제한된 특이성을 갖는다. 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 및 질량 분광측정법이 또한 종종 사용되지만, 비용이 많이 들고, 상당량의 물질을 필요로 하며, DNA를 구성성분 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드로 환원시키고, 따라서 하류 분석을 위한 서열 정보를 파괴한다. 모노클로날 항체를 사용하는 면역침전 (IP)은 표적 변형을 갖는 DNA를 풍부화시킬 수 있으나, 특이성에 의한 제한이 확인된 바 있다. 제한 소화 프로파일링은 변형-감수성 제한 엔도뉴클레아제로 처리된 DNA의 단편 분석을 이용하지만, 다량의 물질을 필요로 하고, 공지된 감수성을 갖는 제한 부위를 특색으로 하는 서열로 제한된다. 비술과이트 서열분석은 DNA 메틸화의 검출을 위한 "황금-표준" 기술로 간주되지만, 중요한 제한이 있다. 첫째로, 화학적 전환 과정이 DNA에 대한 광범위한 비-특이적 손상을 유발하고, 따라서 접근법은 다량의 출발 물질을 필요로 한다. 두번째로, 방법이 비싸고, 다중 서열분석 전개를 필요로 하여 시간 소모적일 수 있다. 마지막으로, 및 중요하게는, 이는 일반적으로 단지 메틸시토신 (mC) 변형에만 적용가능하다. 제한된 수의 추가의 변형 유형 (메틸시토신 (mC) 및 히드록시메틸시토신 (hmC))이 표적화 되도록 하는 변경이 개발 또는 시사된 바 있지만, 이들은 저수율이고, 여전히 상기 열거된 다른 제한을 공유한다. 이들은 또한 다른 변형에 용이하게 적용가능하지 않으며, 꽤 복잡하다.

**발명의 내용**

- [0006] 본 발명의 측면은 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 후성적 변화 및 DNA 손상의 검출을 포괄한다. 다양한 후성적 변형 및 DNA 손상을, 변형된 유전자 서열의 풍부화, 검출 및 분석을 위해 후속적으로 사용될 수 있는 표지화된 뉴클레오티드로 특이적으로 표지화하는 신규한 모듈식 전략이 개시된다.
- [0007] 한 측면에서, 하기 단계를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하는 방법이 제공된다: (a) 단편화된 DNA를 포함하는 DNA 샘플을 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션하여, 단편화된 DNA 내의 변형된 뉴클레오티드의 부위에서 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하는 단계; (b) 단계 (a)의 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 AP 부위에 대항하는 뉴클레오티드에 상보적인 표지화된 뉴클레오티드로 처리하며, 이에 의해 표지화된 뉴클레오티드를 단편화된 DNA 내의 AP 부위에 혼입시키는 단계; (c) 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하는 단계; 및 (d) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하거나, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하거나, 또는 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 및 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하고 양을 정량화하는 것을 둘 다 하는 단계.
- [0008] 한 측면에서, 의학적 치료를 대상체에게 제공하는데 유용한 방법이 제공된다. 예를 들어, 방법은 후성적 변형 또는 어떤 유형의 DNA 손상과 연관된 것으로 공지된 질환을 갖는 대상체를 진단하는데 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 방법은 질환에 대한 특정한 치료에 반응할 가능성이 더 크거나 또는 더 작은 대상체를 확인하는데 사용될 수 있다. 또 다른 측면에서, 대상체에 대한 적절한 치료를 결정하는 방법이 제공된다. 또 다른 예에서, 방법은 부작용을 최소화하기 위해 대상체에 대한 치료의 효과를 모니터링하는데 사용될 수 있다.
- [0009] 또 다른 측면에서, 하기 단계를 포함하는, 대상체에 대한 유전자 프로파일을 개발하는 방법이 제공된다: (a) 대상체로부터의 DNA 샘플을 제공하는 단계; (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계; (c) 단편화된 DNA를 포함하는 DNA 샘플을 복수의 변형된 뉴클레오티드를 절제하며, 각각 상이한 종류의 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 복수의 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션하여, 단편화된 DNA 내의 변형된 뉴클레오티드의 부위에서 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하는 단계; (d) 단계 (c)의 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 AP 부위에 대항하는 뉴클레오티드에 상보적이며, 각 종류가 상이한 종류의 표지를 갖는 표지화된 뉴클레오티드로 처리하며, 이에 의해 표지화된 뉴클레오티드를 단편화된 DNA 내의 AP 부위에 혼입시키는 단계; (e) 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하는 단계; 및 (f) DNA 샘플 내의 변형된 뉴

클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하거나, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하거나, 또는 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 및 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하고 양을 정량화하는 것을 둘 다 하며, 이에 의해 대상체에 대한 유전자 프로파일을 생성하는 단계.

[0010] 또 다른 측면에서, 하기 단계를 포함하는, DNA를 함유하는 생물학적 샘플의 환경 노출 시간을 결정하는 방법이 제공된다: (a) 환경 조건에 노출된 DNA 샘플을 제공하는 단계; (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계; (c) 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 AP 부위에 대항하는 뉴클레오티드에 상보적인 표지화된 뉴클레오티드로 처리하며, 이에 의해 표지화된 뉴클레오티드를 단편화된 DNA 내의 AP 부위에 혼입시키는 단계; (d) 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하는 단계; 및 (e) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하거나, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하거나, 또는 이들 둘 다를 하는 단계; 및 (f) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치, 양 또는 이들 둘 다를 환경 조건에 노출되었으며, 각각 상이한 길이의 시간 동안 환경 조건에 노출된 복수의 참조 샘플과 비교하며, 여기서 DNA 샘플의 환경 노출 시간은 DNA 샘플과 비교 시 변형된 뉴클레오티드의 가장 유사한 위치, 양 또는 이들 둘 다를 갖는 참조 샘플에 의해 결정되는 것인 단계.

[0011] 시스템, 장치, 키트 및 조성물이 또한 기재된다.

[0012] 한 측면에서, DNA 글리코실라제, AP 엔도뉴클레아제, 교정 및 가닥 치환 활성이 결여된 DNA 폴리머라제 또는 DNA 리가제 중 적어도 하나로부터 선택된 효소; 및 적어도 1종의 종류의 표지화된 뉴클레오티드를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 검출을 위한 키트가 제공된다.

[0013] 또 다른 측면에서, 각각 기지의 양의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 복수의 올리고뉴클레오티드가 제공된다.

[0014] 또 다른 측면에서, 고체 표면; 제1 고체 표면과 접촉 상태의 제2 고체 표면; 유입구; 및 유입구에 연결되며, (i) 염기 절제 반응, (ii) DNA 표지화 반응, (iii) 표지화된 DNA의 단리, 또는 (iv) 적어도 하나의 DNA 검출, 정량화 또는 서열분석 중 적어도 하나를 수행하도록 구성된 적어도 하나의 챔버를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 검출을 위한 샘플 장치가 제공된다.

[0015] 또 다른 측면에서, 청구범위 제44항에 따른 하나 이상의 샘플 장치를 수용하도록 구성된 리셉터클; 사용자 입력 장치; 및 메모리 및 프로세서를 포함하며, 상기 메모리는 상기 프로세서가 (i) 염기 절제 반응, (ii) DNA 표지화 반응, (iii) 표지화된 DNA의 단리, 또는 (iv) 적어도 하나의 DNA 검출, 정량화 또는 서열분석 중 적어도 하나를 수행하는 하나 이상의 기능을 실행하게 하도록 구성된 소프트웨어 명령을 포함하는 것인 컴퓨팅 장치를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 검출을 위한 분석 장치가 제공된다.

[0016] 상기 기재된 특색, 및 본 발명의 많은 다른 특색 및 수반되는 이점은, 첨부 도면과 함께 고려될 때, 하기 상세한 설명을 참조함으로써 명백해지고 추가로 이해될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 개시내용의 측면에 따라, 관심대상의 변형된 염기를 함유하는 DNA 분자를 표지화하는 단계를 제시하는 개략도를 도시한다. DNA 분자에 존재하는 변형된 염기 (\*)는 특이적 DNA 글리코실라제로 절제되고, 임의로 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP) 엔도뉴클레아제로 DNA 분자의 가닥 내에 갭을 생성한다. 이어서, DNA 분자는 DNA 폴리머라제 및 갭에 대항하는 DNA 가닥 내의 염기에 상보적인 표지화된 뉴클레오티드와 함께 인큐베이션되어, 변형된 염기의 원래 위치에서의 표지 (B)의 혼입을 유발한다.

도 2는 본 개시내용의 측면에 따라, 비오티닐화된 dUTP (bio dUTP)가 야생형 또는 돌연변이체 T4 DNA 폴리머라제 중 어느 하나를 사용하여 혼입되어 있는 표지화된 DNA 분자의 서열분석용 겔 분석의 영상을 도시한다. 우라실 DNA 글리코실라제 (UDG)를 사용하여 40개 염기 쌍의 dsDNA 표적의 하나의 가닥으로부터 우라실 염기를 절제하고, 이어서 표적을 엔도뉴클레아제 IV (END IV)로 처리하여, 2개 단편 - 5' 33개 뉴클레오티드 단편 및 6개 뉴클레오티드 3' 단편 사이의 단일 염기 쌍 갭을 생성하였다. 33개 뉴클레오티드 단편이 각각의 겔 영상의 좌측 레인에 제시되어 있다. 이어서, dsDNA 표적을 비오티닐화된 dUTP (bio dUTP), 및 야생형 T4 DNA 폴리머라제 (WT T4 pol) 또는 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여된 돌연변이된 T4 DNA 폴리머라제 (T4 pol exo<sup>-</sup>) 중 어느 하나로 처리하였다. 각각의 겔의 우측 레인은 생성된 혼입 생성물을 제시한다.

도 3은 비오틴화된 dUTP가 1 유닛/nmol DNA 내지 1 유닛/pmol DNA 범위의 다양한 농도의 T4 pol<sup>-</sup> exo<sup>-</sup>를 사용하여 혼입되어 있는 표지화된 DNA 분자의 서열분석용 겔 분석의 영상을 도시한다. 검정 포맷은 일반적으로 도 2에 대해 상기 기재된 바와 같았다. 레인 1은 전장 40개 뉴클레오티드 주형 가닥의 이동 위치를 제시하고, 레인 2는 우라실의 절제에 의해 생성된 33개 뉴클레오티드 단편의 이동 위치를 제시한다. 별표는 33개 뉴클레오티드 가닥에 혼입된 하나의 비오틴화된 dUTP를 갖는 34개 뉴클레오티드 단편의 위치를 제시한다. T4 pol<sup>-</sup> exo<sup>-</sup>의 회색 배율은 겔 영상의 상단에 레인 3-13에 대해 제시되어 있다.

도 4a는 본 개시내용의 측면에 따라, 상이한 DNA 글리코실라제를 사용한 DNA 구축물 내의 우라실, 옥소구아닌 및 T:G 미스매치의 특이적 절단 및 표지화를 제시하는 변성화 겔을 도시한다. 각각의 겔에서 제1 레인은 무순상 40 nt DNA 분자이다. 제2 레인은 글리코실라제 및 엔도뉴클레아제 쌍 (우라실: UDG 및 Endo VI; 옥소구아닌: hOOG1 및 Endo IV; T:G 미스매치: TDG 및 Endo IV)에 의한 표적 염기의 절제 후의 보다 빠르게 이동하는 절단 생성물을 제시한다. 제3 레인은 보다 느리게 이동하는 DNA 분자 (\*로 표시된 이동 위치)로서, 무염기성 부위에서의 비오틴화된 염기의 혼입을 제시한다.

도 4b는 본 개시내용의 측면에 따라, 단일 oxoG 변형을 갖는 40 nt DNA 구축물과 관련하여 우라실 DNA 글리코실라제 (UDG), 인간 옥소구아닌 글리코실라제 (hOGG1) 및 티민 DNA 글리코실라제 (TDG)의 절제 특이성을 예시하는 변성화 겔을 도시한다. 변형이 절제된 가닥은 보다 빠른 속도로 이동한다.

도 4c는 본 개시내용의 측면에 따라, DNA 글리코실라제 UDG, TDG 및 hOGG1의 특이성을 제시하는 변성화 겔을 도시한다. 효소를 각각 Endo IV, 및 DNA 글리코실라제가 절제하는 것으로 공지된 것과는 상이한 단일 DNA 변형을 함유하는 40 nt DNA 분자와 함께 공동-인큐베이션하였다. 구체적으로, 우라실-함유 DNA 구축물은 hOGG1 또는 TDG (각각 oxoG 및 T:G 미스매치에 대해 특이적임)와 함께 인큐베이션하였고; oxoG-함유 DNA 구축물은 UDG 또는 TDG (각각 우라실 및 T:G 미스매치에 대해 특이적임)와 함께 인큐베이션하였으며; T:G 미스매치-함유 DNA 구축물은 UDG 또는 hOGG1 (각각 우라실 및 oxoG에 대해 특이적임)과 함께 인큐베이션하였다.

도 5는 튜브에서 수행된 절제 및 표지화 반응 (원 포트 반응)의 변성화 겔 분석을 도시한다. 좌측 레인은 우라실을 함유하는 출발 DNA 구축물을 제시한다. 중앙 레인은 절제 단계 후 및 반응 튜브에 DNA 폴리머라제를 첨가하기 이전의 반응 혼합물로부터 취한 분취물에서 평가된 DNA 생성물을 제시한다. 우측 레인은 DNA 폴리머라제를 첨가하고 그와 함께 인큐베이션한 후에 생성된 최종 표지화된 생성물을 제시한다. 표지화된 생성물의 위치는 \*로 표시된다.

도 6a는 본 개시내용의 측면에 따라, 티민 DNA 글리코실라제 (TDG)를 사용하는 다양한 변형된 DNA 염기의 검출 경로를 제시하는 개략도를 도시한다. 경로 (1)에서, 변형된 염기를 함유하는 DNA 샘플은 TDG로 처리한 다음, 비오틴화된 (bio) dCTP (삼각형)로 표지화하여 카르복시시토신 (caC) 및 포르밀시토신 (fC) (백색 원형)의 위치를 검출한다. 경로 (2)에서, DNA 샘플은 TDG로 처리한 다음, 비표지화된 뉴클레오티드를 사용하여 갭-충전하고, 이어서 TET 효소로 처리하여 메틸시토신 (mC, 흑색 원형) 및 히드록시메틸시토신 (hmC, 정사각형)을 caC/fC (백색 원형)로 탈메틸화한 다음에, TDG에 의해 caC/fC를 절제하고, 이어서 bio dCTP로 표지화하여 mC 및 hmC의 위치를 검출한다. 경로 (3)에서, DNA 샘플은 TDG로 처리한 다음, 비표지화된 뉴클레오티드를 사용하여 갭-충전하고, 이어서 β-글루코실트랜스퍼라제로 처리하여 글루코스 모이어티를 hmC에 선택적으로 부착한 다음에, TET 효소로 처리하여 mC를 caC/fC로 탈메틸하고, 이어서 TDG에 의해 caC/fC를 절제한 다음에, bio dCTP로 표지화하여 mC 및 hmC의 위치를 서로에 대해 구별한다.

도 6b는 본 개시내용의 측면에 따라, 티민 DNA 글리코실라제 (TDG) 및 우라실 DNA 글리코실라제 (UDG)를 사용하는 다양한 변형된 DNA 염기의 검출 경로를 제시하는 개략도를 도시한다. KRuO<sub>4</sub>를 사용하여 hmC를 caC/fC로 산화시킬 수 있고, 이는 이어서 TDG에 의해 절단되며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 hmC의 부위를 표지화된 dCTP (예를 들어, 비오틴화된 dCTP)로 표지화할 수 있다. 도 6a에 제시된 것과 유사한 접근법인, β-글루코실트랜스퍼라제로 처리는 글루코스 모이어티를 hmC에 선택적으로 부착하며, 이에 의해 그를 산화로부터 차단할 수 있다. APOBEC3a (또는, 대안적으로, 비술파이트)가 mC를 우라실로 전환시킬 수 있고, 이어서 이를 UDG에 의해 절단하고, 표지화된 dCTP (예를 들어, 비오틴화된 dCTP)로 표지화할 수 있다.

도 7은 본 개시내용의 측면에 따라, 본원에 기재된 방법을 수행하는데 유용한 샘플 장치를 도시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0018] DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 후성적 변화 및 DNA 손상을 검출하는 방법이 본원에 기재된다.
- [0019] I. 변형된 DNA 염기를 검출하는 방법
- [0020] 한 측면에서, DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하는 방법이 제공된다. 방법의 예시적인 개략적 개관이 도 1에 제공된다. 방법은 DNA 샘플을 수득하고, DNA를 단편화하는 것을 포함할 수 있다. 이어서, 방법은 단편화된 DNA를 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 DNA 글리코실라제로 처리하여, 단편화된 DNA 내에 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하는 것을 수반할 수 있다. 이어서, 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 절제된 변형된 뉴클레오티드에 상응하는 표지화된 뉴클레오티드로 처리하여, 표지화된 뉴클레오티드를 AP 부위에 혼입시킬 수 있다. 이어서, 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리할 수 있고, 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 결정하여 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 확인할 수 있다. 일부 경우에, 검출 단계는 대안적으로 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하는 것을 수반하고, 방법은 표지화된 뉴클레오티드의 양을 기지의 양의 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 참조 샘플 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양과 비교하는 것을 추가로 포함한다.
- [0021] 한 측면에서, 의료 관리를 대상체에게 제공하는데 유용한 방법이 제공된다. 예를 들어, 방법은 후성적 변형 또는 어떤 유형의 DNA 손상과 연관된 것으로 공지된 질환 또는 병태를 갖는 대상체를 진단하는데 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 후성적 변형은, 기저 유전자 서열을 변경하지 않으면서, 그의 기능 및/또는 조절에 대한 변화를 유발하는 DNA의 공유 변형을 지칭한다. 후성적 변화는 기저 DNA 서열에 대한 변화를 수반하지 않는 유전자 발현에서의 유전가능한 변화; 유전자형에서의 변화 없이 표현형에서의 변화이다. 또 다른 예에서, 방법은 대상체가 질환 또는 병태에 대한 특정한 치료에 반응할 가능성이 더 큰지 또는 더 작은지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 방법은 치료의 유효성/효능; 즉 치료에 대한 대상체의 반응성을 평가하는데 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 방법은 부작용을 최소화하기 위해 대상체에 대한 치료의 효과를 모니터링하는데 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 방법은 대상체에 대한 유전자 프로파일을 개발하는 것을 포함할 수 있다.
- [0022] 한 경우에, 대상체에서 질환 또는 병태를 진단 또는 검출하는 방법이 제공된다. 방법은 대상체로부터의 DNA 샘플을 수득하고, DNA를 단편화하고, 단편화된 DNA를 질환과 연관된 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 DNA 글리코실라제로 처리하여, 단편화된 DNA 내에 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하고, 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 AP 부위에 대항하는 염기에 상보적인 (예를 들어, 절제된 변형된 뉴클레오티드에 상응하는) 표지화된 뉴클레오티드로 처리하여, 표지화된 뉴클레오티드를 AP 부위에 혼입시키고, 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하고, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 검출 단계는 대안적으로 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하는 것을 수반하고, 방법은 표지화된 뉴클레오티드의 양을 기지의 양의 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 참조 샘플 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양과 비교하는 것을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다면, 후성적 변형은 건강한 대상체와 비교 시 증가하거나, 감소하거나 또는 패턴이 변화할 수 있다. 특정 경우에, 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다면, 대상체는 건강한 대상체에 비해 증가된 양의 DNA 손상을 가질 수 있다.
- [0023] 또 다른 경우에, 질환 또는 병태가 발병할 위험이 있는 대상체를 확인하는 방법이 제공된다. 방법은 대상체로부터의 DNA 샘플을 수득하고, DNA를 단편화하고, 단편화된 DNA를 질환과 연관된 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 DNA 글리코실라제로 처리하여, 단편화된 DNA 내에 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하고, 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 절제된 변형된 뉴클레오티드에 상응하는 표지화된 뉴클레오티드로 처리하여, 표지화된 뉴클레오티드를 AP 부위에 혼입시키고, 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하고, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 검출 단계는 대안적으로 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하는 것을 수반하고, 방법은 표지화된 뉴클레오티드의 양을 기지의 양의 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 참조 샘플 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양과 비교하는 것을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 대상체의 DNA를 질환과 연관된 변형된 뉴클레오티드에 대해 1회 초과 평가할 수 있다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드가 대상체의 DNA 내에 축적되는지 여부를 결정하기 위해 대상체를 시간 경과에 따라 모니터링할 수 있다. 일부 경우에, 대상체가 질환 또는 병태를 가질 위험이 있다면, 후성적 변형은 건강한 대상체와 비교 시 증가하거나, 감소하거나 또는 패턴이 변화할 수 있다. 특정 경우에, 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다면, 대상체는 건강한 대상체에 비해 증가된 양의 DNA 손상을 가질 수 있다. 일부 경우에, 대상체는 질환 또는 병태가

발병할 유전적 위험을 갖는다. 일부 경우에, 대상체는 질환 또는 병태가 발병할 환경적 위험을 갖는다.

[0024]

또 다른 경우에, 대상체에 대한 적절한 치료를 결정하는 방법이 제공된다. 방법은 대상체로부터의 DNA 샘플을 수득하고, DNA를 단편화하고, 단편화된 DNA를 치료에 대한 반응성 또는 반응성의 결여와 연관된 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 DNA 글리코실라제로 처리하여, 단편화된 DNA 내에 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하고, 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 절제된 변형된 뉴클레오티드에 상응하는 표지화된 뉴클레오티드로 처리하여, 표지화된 뉴클레오티드를 AP 부위에 혼입시키고, 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하고, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 검출 단계는 대안적으로 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하는 것을 수반하고, 방법은 표지화된 뉴클레오티드의 양을 기지의 양의 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 참조 샘플 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양과 비교하는 것을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 다중 치료는 질환 또는 병태, 하위유형의 질환 또는 병태의 치료에 이용가능하다. 일부 경우에, 대상체로부터의 DNA 샘플에서 검출된 DNA 변형의 유형, 양 및/또는 패턴은 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다는 것을, 또는 특정한 치료에 반응할 가능성이 더 큰 특정한 하위유형의 질환 또는 병태를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0025]

또 다른 경우에, 치료에 대한 대상체의 반응을 모니터링하는 방법이 제공된다. 방법은 대상체로부터의 DNA 샘플을 수득하고, DNA를 단편화하고, 단편화된 DNA를 치료에 대한 반응성 (질환 상태의 결여) 또는 반응성의 결여 (질환 상태)와 연관된 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 DNA 글리코실라제로 처리하여, 단편화된 DNA 내에 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하고, 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 절제된 변형된 뉴클레오티드에 상응하는 표지화된 뉴클레오티드로 처리하여, 표지화된 뉴클레오티드를 AP 부위에 혼입시키고, 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하고, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 검출 단계는 대안적으로 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하는 것을 수반하고, 방법은 표지화된 뉴클레오티드의 양을 기지의 양의 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 참조 샘플 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양과 비교하는 것을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 대상체의 DNA를 질환과 연관된 변형된 뉴클레오티드에 대해 1회 초과 평가할 수 있다. 예를 들어, 대상체를 대상체의 DNA 내의 변형된 뉴클레오티드의 퍼센트 또는 DNA 내의 변형된 뉴클레오티드의 패턴이 치료에 반응하여 변화하는지 여부를 결정하기 위해 시간 경과에 따라 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 대상체가 치료를 받을 때 변형된 뉴클레오티드의 양 또는 그의 패턴 또는 이들 둘 다가 시간 경과에 따라 변화하지 않는다면, 대상체는 치료에 반응하지 않는 것일 수 있다. 대안적으로, 대상체가 치료를 받을 때 변형된 뉴클레오티드의 양 또는 그의 패턴 또는 이들 둘 다가 시간 경과에 따라 변화한다면, 대상체는 치료에 반응하는 것일 수 있다. 한 예에서, 대상체가 치료를 받고 있는 동안에 DNA 손상의 양이 감소한다면, 대상체는 치료에 반응하는 것일 수 있다.

[0026]

한 경우에, 질환 또는 병태에 대한 치료와 연관된 부작용에 대해 대상체를 모니터링하는 방법이 제공된다. 방법은 대상체로부터의 DNA 샘플을 수득하고, DNA를 단편화하고, 단편화된 DNA를 질환에 대한 치료와 연관된 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 DNA 글리코실라제로 처리하여, 단편화된 DNA 내에 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하고, 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 절제된 변형된 뉴클레오티드에 상응하는 표지화된 뉴클레오티드로 처리하여, 표지화된 뉴클레오티드를 AP 부위에 혼입시키고, 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하고, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 검출 단계는 대안적으로 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하는 것을 수반하고, 방법은 표지화된 뉴클레오티드의 양을 기지의 양의 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 참조 샘플 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양과 비교하는 것을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 대상체의 DNA를 질환과 연관된 변형된 뉴클레오티드에 대해 1회 초과 평가할 수 있다. 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드가 대상체의 DNA 내에 축적되는지 여부를 결정하기 위해 대상체를 시간 경과에 따라 모니터링할 수 있다. 일부 경우에, 질환에 대한 치료와 연관된 변형된 뉴클레오티드는 치료의 결과로서 대상체의 DNA 내에 축적되는 DNA 손상이다. 일부 경우에, 방법은 변형된 뉴클레오티드의 양이 역치에 가깝거나 또는 그 초과이거나, 또는 치료에 대한 부정적 부작용과 연관된 패턴 또는 프로파일을 갖는다는 것을 나타내고, 또한 일부 경우에, 대상체가 치료를 계속 받아서는 안되고/거나 대체 치료를 받아야 한다는 것을 나타내는 것을 추가로 포함한다. 다른 경우에, 방법은 변형된 뉴클레오티드의 양이 역치 미만이거나, 또는 치료에 대한 부정적 부작용과 연관되지 않은 패턴 또는 프로파일을 갖는다는 것을 나타내고, 또한 일부 경우에, 대상체가 치료를 계속 받을 수 있다는 것을 나타내는 것을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 치료는 방사선 요법 또는

화학요법일 수 있다.

[0027] 대상체에 대한 적절한 치료를 결정하고, 치료에 대한 대상체의 반응을 모니터링하고, 질환 또는 병태에 대한 치료와 연관된 부작용에 대해 대상체를 모니터링하는 것과 관련된 상기 방법에 대해, 다양한 유형의 치료가 고려된다. 일부 경우에, 치료는 제약 약물일 수 있다. 제약 약물의 예는 특히 콜린에스테라제 억제제 (ChEI), N-메틸-D-아스파르테이트 (NMDA) 수용체 길항제, 카르비도파/레보도파 및 관련 화합물, 도파민 효능제, 항콜린제, MAO-B 억제제, COMT 억제제, 항염증 화합물 (예컨대 스테로이드, 코르티코스테로이드, 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID)), 면역억제 약물, 생물제제 (예컨대 모노클로날 항체, 인슐린, 인터페론, 에리트로포이에틴, G-CSF), 진통제, 질환-조절 항류마티스 약물 (생물학적 반응 조절제 포함), 항응고제, 항혈소판 화합물, 안지오텐신-전환 효소 (ACE) 억제제, 안지오텐신 II 수용체 억제제, 베타 차단제, 조합된 알파 및 베타 차단제, 칼슘 채널 차단제, 디기탈리스 제제, 이노제, 혈관확장제, 비타민, 막-관통 항산화제, 피루베이트, 항바이러스 화합물, 항박테리아 화합물 및 항진균 화합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 치료는 대상체의 식이, 신체 활동량, 신체 활동 유형 또는 그의 조합 중 임의의 것을 변경하는 것을 포함할 수 있다.

[0028] 또 다른 경우에, 대상체에 대한 유전자 프로파일을 개발하는 방법이 제공된다. 방법은 대상체로부터의 DNA 샘플을 수득하고, DNA를 단편화하고, 단편화된 DNA를 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 복수의 DNA 글리코실라제로 처리하여, 단편화된 DNA 내에 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하고, 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 절제된 변형된 뉴클레오티드에 상응하는 표지화된 뉴클레오티드로 처리하여, 표지화된 뉴클레오티드를 AP 부위에 혼입시키고, 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 분리하고, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하여, 대상체에 대한 유전자 프로파일을 결정하는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 검출 단계는 대안적으로 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하는 것을 수반하고, 방법은 표지화된 뉴클레오티드의 양을 기지의 양의 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 참조 샘플 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양과 비교하는 것을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 단편화된 DNA를 복수의 DNA 글리코실라제로 순차적으로 처리한다. 일부 경우에, 단편화된 DNA를 개별 용기에 분취하고, 복수의 DNA 글리코실라제로 병렬 처리한다. 일부 경우에, 미지의 기원의 DNA 샘플이 대상체의 것인지 여부를 결정하기 위해, 대상체에 대한 유전자 프로파일을 미지의 기원의 DNA 샘플과 비교할 수 있다. 일부 경우에, 대상체에 대한 1개 초과 유전자 프로파일을 다중 시점에 걸쳐 개발할 수 있다. 대상체의 질환 상태 또는 병태의 발병 여부를 결정하기 위해, 대상체에 대한 유전자 프로파일을 매시점 비교할 수 있다 (의료 관리를 제공하는 방법과 관련하여 상기 기재된 바와 같음).

[0029] 의료 관리를 제공하는 것과 관련된 상기 기재된 방법에 대해, 대상체는 다양한 질환 및 병태 중 하나 이상을 가질 수 있다. 일부 경우에, 질환 또는 병태는 암일 수 있다. 예를 들어, 암은 신경교종, 결장직장암, 폐암, 피부암, 전립선암 또는 유방암일 수 있다. 일부 경우에, 질환 또는 병태는 신경변성 질환일 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 신경변성 질환은 알츠하이머병 또는 파킨슨병일 수 있다. 일부 경우에, 질환 또는 병태는 만성 염증성 질환일 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 만성 염증성 질환은 전신 홍반성 루푸스 (SLE) 또는 류마티스 관절염 (RA)일 수 있다. 일부 경우에, 질환 또는 병태는 대사 질환일 수 있다. 예를 들어, 대사 질환은 당뇨병 또는 비만일 수 있다. 일부 경우에, 질환 또는 병태는 심혈관 질환일 수 있다. 예를 들어, 심혈관 질환은 아테롬성동맥경화증 또는 동맥경화증일 수 있다. 일부 경우에, 질환 또는 병태는 감염성 질환일 수 있다. 예를 들어, 감염성 질환은 박테리아 감염, 바이러스 감염 또는 진균 감염일 수 있다. 일부 경우에, 질환 또는 병태는 미토콘드리아 질환일 수 있다. 예를 들어, 미토콘드리아 질환은 미토콘드리아 근병증; 당뇨병 및 난청 (DAD); 레베르 유전성 시신경병증 (LHON); 라이 증후군; 신경병증, 운동실조, 색소성 망막염, 및 안검하수증 (NARP), 근신경원성 위장 뇌병증 (MNGIE); 불균일 적색 근섬유 근간대성 간질 (MERRF); 미토콘드리아 근병증, 뇌근병증, 락트산 산증, 졸중-유사 증상 (MELAS); 또는 미토콘드리아 DNA 고갈일 수 있다. 일부 경우에, 질환 또는 병태는 환경적 (외인성) 작용제에 대한 노출로부터 발생하는 것이다. 환경적 작용제의 예는 담배 연기, 오염, 방사선 (UV, X선, 이온화, 핵 등), 독성 화학물질 또는 화합물 예컨대, 살충제, 독성 금속, 화학적 분산제, 산업적 화학물질, 오일 및 가스 생성물 및 유출물, 화학요법제, 및 생물독소 (진균, 미생물, 식물, 동물, 짧은 미코톡신, 짧은 식물독소), 뿐만 아니라 박테리아, 바이러스 및 진균을 포함한 생물학적 유기체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 질환 또는 병태는 내인성 작용제로부터 발생하는 것이다. 내인성 작용제의 예는 DNA를 비효소적으로 메틸화할 수 있는 S-아데노실메티오닌, 및 에스트로겐을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 후성적 변형 또는 DNA 손상과 연관된 다른 질환 및 병태가 또한 본원에 제공된 방법과 관련하여 고려된다.

[0030] 또 다른 경우에, DNA를 함유하는 생물학적 샘플의 환경 노출 시간을 결정하는 방법이 제공된다. 참조 샘플은

DNA에 대한 변형을 유발하는 환경 조건에 노출된 생물학적 샘플이다. 방법은 생물학적 샘플로부터의 DNA를 수득하고, DNA를 단편화하고, 단편화된 DNA를 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 DNA 글리코실라제로 처리하여, 단편화된 DNA 내에 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하고, 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 절제된 변형된 뉴클레오티드에 상응하는 표지화된 뉴클레오티드로 처리하여, 표지화된 뉴클레오티드를 AP 부위에 혼입시키고, 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하고, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하여, 생물학적 샘플에 대한 DNA 변형 프로파일을 결정하는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 검출 단계는 대안적으로 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하는 것을 수반하고, 방법은 표지화된 뉴클레오티드의 양을 기지의 양의 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 참조 샘플 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양과 비교하는 것을 추가로 포함한다. 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양은 DNA 샘플의 환경 노출 시간을 결정하기 위해 DNA에 대한 변형을 유발하는 환경 조건에 노출되었으며, 각각 상이한 시간 기간 동안 노출된 복수의 참조 샘플과 비교할 수 있다. DNA 샘플의 참조 샘플(들)과의 비교는 참조 샘플(들)과 비교한, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양, 그의 패턴 또는 이들 둘 다에 기반하여 생물학적 샘플의 환경 노출 시간을 확인할 수 있다. 일부 경우에, 환경 조건은 실외인 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 환경 조건은 특정한 외부 환경 (예컨대, 예를 들어, 물 중, 지중에 매립된 것 등)이다. 일부 경우에, 환경 조건은 산화제, 알킬화제, 산업적 화학물질, 담배 연기, 오염, 방사선 (UV, X선, 이온화, 핵 등), 독성 화학물질 또는 화합물 예컨대, 살충제, 독성 금속, 화학적 분산제, 오일 및 가스 생성물 및 유출물, 화학요법제, 및 생물독소 (진균, 미생물, 식물, 동물, 짧은 미코톡신, 짧은 식물독소), 뿐만 아니라 박테리아, 바이러스 및 진균을 포함한 생물학적 유기체에 대한 노출일 수 있다. 일부 경우에, 생물학적 샘플은 살아있는 대상체로부터 수득될 수 있다. 일부 경우에, 생물학적 샘플은 사망한 대상체로부터 수득될 수 있다.

[0031] 일부 경우에, DNA 샘플은 생물학적 샘플로부터 수득된, 게놈 DNA, 미토콘드리아 DNA, 또는 게놈 및 미토콘드리아 DNA 둘 다이다.

[0032] 상기 기재된 방법 각각에 대해, 일부 경우에, 변형된 뉴클레오티드는 메틸시토신 (mC), 히드록시메틸시토신 (hmC), 카르복시시토신 (caC), 포르밀시토신 (fC), 8-옥소-7,8-디히드로구아닌 (oxoG), 우라실, 메틸아데닌 (mA) 또는 8-옥소아데닌, 06-메틸구아닌, 1-메틸아데닌, 04-메틸티민, 5-히드록시시토신, 5-히드록시우라실, 5-히드록시메틸우라실, 또는 티민 이량체 중 적어도 하나일 수 있다. 일부 경우에, 이들 유형의 변형된 뉴클레오티드의 복수의 임의의 조합이 검출될 수 있다.

[0033] 또한, 일부 경우에, DNA 글리코실라제는 표 1에 열거된 효소 중 하나일 수 있다. 일부 경우에, DNA 폴리머라제는 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성 또는 가닥 치환 활성을 갖지 않는다. 한 예에서, DNA 폴리머라제는 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여된, 돌연변이된 T4 DNA 폴리머라제일 수 있다. 일부 경우에, 표지화된 뉴클레오티드는 비오틴-표지화된 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 경우에, 방법은 단편화된 DNA를 DNA 글리코실라제로 처리한 후에, 단편화된 DNA를 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP) 엔도뉴클레아제와 함께 인큐베이션하는 것을 추가로 포함한다. 일부 경우에, AP 엔도뉴클레아제는 엔도뉴클레아제 IV일 수 있다. 일부 경우에, 방법은 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단편화된 DNA에 존재하는 Nick을 폐쇄하는 DNA 리가제와 함께 인큐베이션하는 것을 추가로 포함한다. 예시적인 DNA 리가제는 T4 DNA 리가제 및 이. 콜라이 DNA 리가제를 포함한다. 일부 경우에, 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하는 것은 단편화된 DNA를 고체 지지체에 부착된 스트렙타비딘과 접촉시키고 그에 결합되지 않은 단편화된 DNA를 제거하는 것을 수반할 수 있다. 일부 경우에, 검출 단계는 단리된 단편화된 DNA를 서열분석하는 것을 수반할 수 있다.

[0034] 상기 기재된 방법에 관한 추가의 세부사항이 하기에 제공된다.

[0035] 샘플 제조

[0036] 한 측면에서, 생물학적 샘플로부터의 DNA가 수득되거나 또는 제공된다. 생물학적 샘플로부터 수득되거나 또는 제공된 DNA는 게놈 DNA, 미토콘드리아 DNA, 또는 게놈 및 미토콘드리아 DNA 둘 다일 수 있다. 일부 경우에, 게놈 DNA 및 미토콘드리아 DNA는 동일한 생물학적 샘플 또는 공급원으로부터 개별적으로 수득될 수 있다. 많은 상이한 방법 및 기술이 게놈 DNA 및 미토콘드리아 DNA의 단리에 이용가능하다. 일반적으로, 이러한 방법은 출발 물질의 파괴 및 용해, 이어서 단백질 및 다른 오염물의 제거 및 최종적으로 DNA의 회수를 수반한다. 단백질의 제거는, 예를 들어, 프로테이나제 K에 의한 소화, 이어서 염석, 유기 추출, 구배 분리 또는 고체-상 지지체에 대한 DNA의 결합 (음이온-교환 또는 실리카 기술)에 의해 달성될 수 있다. 미토콘드리아 DNA는 유사하게 미토콘드리아의 초기 단리 후에 단리될 수 있다. DNA는 에탄올 또는 이소프로판올을 사용한 침전에 의해 회수될

수 있다. 핵 또는 미토콘드리아 DNA의 단리에 이용가능한 상업용 키트가 또한 있다. 방법의 선택은, 예를 들어, 샘플의 양, DNA의 요구되는 양 및 분자량, 하류 적용을 위해 요구되는 순도, 및 시간 및 비용을 포함한 많은 인자에 좌우된다.

[0037] 일부 경우에, 단리된 DNA는 복수의 보다 짧은 이중 가닥 DNA 조각으로 단편화된다. 일반적으로, DNA의 단편화는 물리적으로 또는 효소적으로 수행될 수 있다.

[0038] 예를 들어, 물리적 단편화는 음향 전단, 초음파처리, 마이크로웨이브 조사 또는 유체역학적 전단에 의해 수행될 수 있다. 음향 전단 및 초음파처리는 DNA의 전단에 사용되는 주요 물리적 방법이다. 예를 들어, 코바리스 (Covaris)® 기기 (매사추세츠주 워번)는 DNA를 100 bp - 5 kb로 파단시키기 위한 음향 장치이다. 코바리스는 또한 메이트-페어(Mate-Pair) 라이브러리를 위해 샘플을 6-20 kb로 프로세싱할 튜브 (지튜브(gTube))를 제작한다. 또 다른 예는 염색질, DNA를 전단하고 조직을 파괴하기 위해 이용되는 초음파처리 장치인, 바이오rupter (Bioruptor)® (뉴저지주 덴빌)이다. 적은 용량의 DNA는 150 bp - 1 kb의 길이로 전단될 수 있다. 디지랩 (Digilab) (매사추세츠주 말보로)으로부터의 히드로셰어(Hydroshear)®는 또 다른 예이며, DNA를 전단하기 위해 유체역학력을 이용한다. 라이프 테크놀로지스 (뉴욕주 그랜드 아일랜드)에 의해 제조된 것들과 같은 네블라이저는 또한 압축 공기를 사용하여 액체를 원자화하여, DNA를 수초 내에 100 bp - 3 kb 단편으로 전단하는데 사용될 수 있다. 연무화는 샘플의 손실을 유발할 수 있기 때문에, 일부 경우에, 제한된 양의 샘플을 위해서는 바람직한 단편화 방법이 아닐 수 있다. 초음파처리 및 음향 전단은 샘플로부터의 DNA의 전체 양이 보다 효율적으로 유지될 수 있기 때문에, 보다 적은 샘플 용량을 위한 보다 우수한 단편화 방법일 수 있다. 공지 또는 개발된 다른 물리적 단편화 장치 및 방법이 또한 사용될 수 있다.

[0039] 다양한 효소적 방법이 또한 DNA를 단편화하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, DNA는 DNase I, 또는 말토스 결합 단백질 (MBP)-T7 Endo I 및 비-특이적 뉴클레아제 예컨대 비브리오 볼니피쿠스(*Vibrio vulnificus*) 뉴클레아제 (Vvn)의 조합으로 처리될 수 있다. 비-특이적 뉴클레아제 및 T7 Endo의 조합은 상승작용적으로 작용하여 비-특이적 Nick 및 카운터 Nick을 생성하면서, Nick 부위로부터 8개 이하의 뉴클레오티드를 해리하는 단편을 생성한다. 또 다른 예에서, DNA는 NEB넥스트(NEBNext)® dsDNA 프래그멘타제(Fragmentase)® (NEB, 매사추세츠주 입스위치)로 처리될 수 있다. NEB넥스트® dsDNA 프래그멘타제는 시간-의존성 방식으로 dsDNA 파단물을 생성하여, 반응 시간에 따라 50-1,000 bp DNA 단편을 산출한다. NEB넥스트 dsDNA 프래그멘타제는 2종의 효소를 함유하는데, 하나는 무작위로 dsDNA 상에 Nick을 생성하며, 다른 하나는 Nick된 부위를 인식하고, Nick으로부터 대향하는 DNA 가닥을 절단하여 dsDNA 파단물을 생성한다. 생성된 DNA 단편은 짧은 오버행, 5'-포스페이트 및 3'-히드록실기를 함유한다. 또 다른 예는 넥스테라(Nextera)® 태그멘테이션(Tagmentation)® 기술 (일루미나(Illumina), 캘리포니아주 샌디에고)이다. 태그멘테이션® 기술은 동시에 단편화하고 어댑터를 dsDNA 상에 삽입하는 트랜스포사제를 사용한다. 트랜스포솜은 유리 DNA 단부를 가지며 '절단 및 페이스트화' 반응으로 DNA 내로 무작위로 삽입된다. DNA 단부가 유리 상태이기 때문에, 이는 효과적으로 DNA를 단편화하면서 어댑터 서열을 부가한다. 이러한 방법은 어댑터 서열이 샘플의 후속적 확인, 단리 또는 조작을 위해 유용할 수 있는 경우에 유용할 수 있다.

[0040] 일부 경우에, DNA 샘플은 특정한 크기 범위로 단편화된다. 예를 들어, DNA 샘플은 약 25-100 bp, 약 25-150 bp, 약 50-200 bp, 약 25-200 bp, 약 50-250 bp, 약 25-250 bp, 약 50-300 bp, 약 25-300 bp, 약 50-500 bp, 약 25-500 bp, 약 150-250 bp, 약 100-500 bp, 약 200-800 bp, 약 500-1300 bp, 약 750-2500 bp, 약 1000-2800 bp, 약 500-3000 bp, 약 800-5000 bp의 범위, 또는 이들 범위 내의 임의의 다른 크기 범위의 단편으로 단편화될 수 있다. 예를 들어, DNA 샘플은 25-100 bp, 25-150 bp, 50-200 bp, 25-200 bp, 50-250 bp, 25-250 bp, 50-300 bp, 25-300 bp, 50-500 bp, 25-500 bp, 150-250 bp, 100-500 bp, 200-800 bp, 500-1300 bp, 750-2500 bp, 1000-2800 bp, 500-3000 bp, 800-5000 bp의 범위, 또는 이들 범위 내의 임의의 다른 크기 범위의 단편으로 단편화될 수 있다. 예를 들어, DNA 샘플은 약 50-250 bp의 단편으로 단편화될 수 있다. 한 예에서, DNA 샘플은 50-250 bp의 단편으로 단편화될 수 있다. 일부 경우에, 단편은 약 25 bp만큼 더 크거나 또는 더 작을 수 있다. 예를 들어, 단편은 25 bp만큼 더 크거나 또는 더 작을 수 있다. 일부 경우에, 상대적으로 짧은 DNA 단편은 단편 사이의 서열 중첩을 최소화함으로써 분석을 용이하게 할 수 있다.

[0041] 특정 경우에, DNA 단편은 Nick 또는 갭 없이 평할 단부 DNA 단편을 생성하도록 처리된다. 이는, 예를 들어, 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 정규 뉴클레오티드와 함께 인큐베이션함으로써 수행될 수 있다. 다수의 DNA 폴리머라제가 DNA 오버행을 제거할 것이고/거나 프라이밍에 이용가능한 3' 히드록실기가 있는 경우에는 누락 염기를 충전하는데 사용될 수 있다. 이러한 반응을 위한 폴리머라제는 T4 DNA 폴리머라제 (가닥 치환 활성 없음), DNA 폴리머라제 I, DNA 폴리머라제 I의 클레나우 단편 (클레나우 단편), 클레나우 엑소 마이너스 폴리머라제, *Taq* DNA 폴리머라제, *Tfi* DNA 폴리머라제, *Tth* DNA 폴리머라제, *Tli* DNA 폴리머라제, 및 *Pfu* DNA 폴리머라제를 포

함한다. 각각의 이들 폴리머라제는 3' 오버행을 증진하는데 사용될 수 있는 반면, DNA 폴리머라제 I, 클레나우 단편, T4 DNA 폴리머라제, *Tli* DNA 폴리머라제, 및 *Pfu* DNA 폴리머라제는 또한 5' 오버행을 증진하고 3' 오버행을 제거할 수 있다. 일부 경우에, 예를 들어 T4 DNA 폴리머라제 (가닥 치환 활성 없음), *Pfu* DNA 폴리머라제, *Tli* DNA 폴리머라제, 및 DNA 폴리머라제 I의 클레나우 단편을 포함한 특정 폴리머라제는 평활 말단을 생성하는데 바람직할 수 있다. 일부 경우에, 예를 들어 T4 DNA 폴리머라제 및 인간 DNA 폴리머라제  $\beta$ 를 포함한 특정 폴리머라제는 내부 겹을 증진하는데 바람직할 수 있다. 일부 경우에, 하나 초과 DNA 폴리머라제가 뉴클레오티드를 DNA 단편에 혼입시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, *Taq* DNA 폴리머라제 및 T4 DNA 폴리머라제는 닉 또는 겹 없이 평활 단부 DNA 단편을 생성하는데 사용될 수 있다.

[0042] 일부 경우에, DNA 단편은 DNA 단편의 포스페이트 백본 내의 닉을 효소적으로 폐쇄하기 위해 추가로 리가제와 함께 인큐베이션될 수 있다. 리가제는 듀플렉스 DNA 또는 RNA 내의 병렬배치된 5' 포스페이트와 3' 히드록실 말단 사이의 포스포디에스테르 결합의 형성을 촉매한다. 효소는 평활 단부 및 응집성 단부 말단을 연결할 뿐만 아니라 듀플렉스 DNA 내의 단일 가닥화 닉을 복구한다. 예시적인 리가제는 클로닝을 위해 가장 빈번하게 사용되는 효소인, T4 리가제이다. 사용될 수 있는 또 다른 리가제는 응집성 이중-가닥 DNA 단부를 우선적으로 연결하지만, 또한 피콜 또는 폴리에틸렌 글리콜의 존재 하에서는 평활 단부 DNA에 대해서도 활성인 이. 콜라이 DNA 리가제이다. 사용될 수 있는 또 다른 리가제는 미토콘드리아에서 기능하는 것으로 공지된 DNA 리가제 III  $\alpha$ 이다.

[0043] 일부 경우에, DNA 단편은 5' 또는 3' 단부 상에 혼입된 샘플 식별자 서열을 갖도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 이는 다중 샘플을 병렬로 하나의 반응으로 분석하고 그 후에 최종 표지화된 DNA 샘플을 분석하는 것을 가능하게 할 것이다. 예를 들어, 표지화된 DNA 샘플이 서열분석에 의해 분석되는 경우에, 서열 식별자는 동시에 다중 샘플의 차세대 서열분석을 가능하게 할 것이다.

[0044] 일부 경우에, DNA 단편은 본원에 기재된 방법 동안 DNA 단편의 단리 또는 분석을 보조하기 위해 5' 또는 3' 단부 상에 혼입된 서열 또는 그에 부착된 모이어티를 갖도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 플루오레세인 아미다이트 (FAM) 표지는 DNA 분자의 어느 쪽이든 단부 상에 혼입될 수 있으며, 이는, 예를 들어, 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이 형광을 검출함으로써 표지화된 DNA 생성물을 평가하는데 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 또 다른 모이어티는 비오틴이며, 이는 스트렙타비딘 (이는 DNA 분자의 단리를 용이하게 하기 위해 고체 지지체에 부착될 수 있음)과의 강력한 상호작용을 통해 검출 또는 단리를 위해 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 각각의 DNA 분자에 혼입된 서열은 고체 지지체에 부착된 상보적 서열과의 혼성화를 통해 그들을 단리하는데 사용될 수 있다. 이들 목적을 위해 유용한 다른 모이어티는 기재된 방법을 수행하는데 사용된 조건에서 DNA 분자에 대한 부착의 용이성 및 안정성에 기반하여 선택될 수 있다. 일부 경우에, 서열 또는 모이어티는 방법의 표지화 단계 전보다는, 그 후에 표지화된 DNA 단편에 부착될 수 있다.

[0045] 변형된 뉴클레오시드의 글리코실라제 절제

[0046] 한 측면에서, 방법은 DNA 샘플을 변형된 염기를 절제하는 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션하는 것을 포함한다. 많은 DNA 글리코실라제가 서열 미스매치 및 넓은 범위의 후성적 변형을 포함한, 광범위한 특이적 DNA 손상 요소를 표적화하는 것으로 확인된 바 있다. 기재된 방법에 의해 검출가능한 예시적인 유전자 변형은 메틸시토신 (mC), 히드록시메틸시토신 (hmC), 카르복시시토신 (caC), 포르밀시토신 (fC), 8-옥소-7,8-디히드로구아닌 (oxoG), 우라실, 메틸아데닌 (mA) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 기재된 방법의 모듈식 측면은, 효소 선택을 통해, 많은 상이한 특정한 변형된 뉴클레오시드 염기가 독립적으로 표적화될 수 있다는 것이다.

[0047] DNA 글리코실라제는 2종의 주요 클래스가 있다: 단일기능적 및 이중기능적. 단일기능적 글리코실라제는 단지 글리코실라제 활성만을 갖는 반면, 이중기능적 글리코실라제는 또한 이들이 염기 병변에서 DNA의 포스포디에스테르 결합을 절단하도록 하는 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP) 리아제 활성을 보유하여, AP 엔도뉴클레아제를 필요로 하지 않으면서 단일-가닥 과단물을 형성한다. AP-리아제 활성은 AP 부위에 대해 3' 및 5'를 절단하여, 5' 포스페이트 및 3' 포스페이트를 남긴다.  $\beta$ -리아제 활성 (AP 부위의  $\beta$ -제거)은 AP 엔도뉴클레아제 절단 생성물과는 상이한, 5' 포스페이트에 인접한 3'  $\alpha$ ,  $\beta$ -불포화 알데히드를 산출한다.  $\beta$ -리아제 활성을 갖는 효소는 타입/클래스 I AP 엔도뉴클레아제라 지칭된다. 일부 글리코실라제-리아제는 또한  $\delta$ -리아제 활성 ( $\delta$ -제거를 수행할 수 있음)을 가지며, 이는 3' 알데히드를 3' 포스페이트로 전환시킨다.  $\beta$ -리아제 및  $\delta$ -리아제 활성을 갖는 효소는 타입/클래스 II AP 엔도뉴클레아제라 지칭된다. 예를 들어, 이. 콜라이 엔도뉴클레아제 III (Endo III) 및 엔도뉴클레아제 VIII (Endo VIII)은 이중-가닥 DNA로부터 손상된 피리미딘을 절제하고, N-글리코실라제 및 AP-리아제 활성을 둘 다 갖는 이중기능적 글리코실라제이다. Endo III 및 VIII에 의해 인식

되고 제거되는, 손상된 염기는 우라실, 5, 6- 디히드록시티민, 티민 글리콜, 5-히드록시-5-메틸히단토인, 우라실 글리콜, 6-히드록시-5, 6-디히드로티민, 및 메틸타르트르닐우라실을 포함한다. Endo VIII 및 Endo III은 유사하지만, Endo VIII은 β 및 δ 리아제 활성을 갖는 반면, Endo III은 β 리아제 활성을 갖는다. 일부 효소는 DNA 글리코실라제 및 AP 엔도뉴클레아제 둘 다이고; 한 예는 Endo IV이다.

[0048] 기재된 방법에 유용한 예시적인 DNA 글리코실라제가 표 1에 열거된다. 일부 경우에, 표 1에 열거된 DNA 글리코실라제 중 하나 이상이 샘플 DNA로부터 변형된 염기를 절제하기 위해 기재된 방법에 사용될 수 있다. 일부 경우에, 표 1에 열거된 DNA 글리코실라제는 DNA 글리코실라제에 대한 기질로서 표 1에 열거된 변형된 염기 중 하나 이상을 절제하는데 사용될 수 있다. 선택 DNA 글리코실라제는 본 개시내용에서 특이적으로 확인되지만, 임의의 DNA 글리코실라제가 기재된 방법의 절제 단계를 수행하는데 사용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0049] 표 1. DNA 글리코실라제.

염기 병변/변형의 유형	명칭	생리학적 기질	Fxn
ss 또는 ds DNA에서의 우라실	우라실-N 글리코실라제 1 (UNG1/UDG1)*	U, 5-FU, ss 및 ds DNA	M
	단일-가닥-특이적 단일기능적 DNA 글리코실라제 I	U, 5-hmU, 5-FU, ss 및 ds DNA	M
미스매치에서의 피리미딘 유도체	메틸-결합 도메인 글리코실라제 4 (MBD4)	T, U, 5-FU, εC, G 대향, dsDNA	M
	티민 DNA 글리코실라제 (TDG)	T, U, 5-FU, εC, 5-hmU, 5-fC, 5-caC; G 대향, dsDNA	M
산화성 염기 손상	8-oxoG DNA 글리코실라제 I (OGG1)*	8-oxoG, FaPy, C 대향, dsDNA	B
	MutY 상동체 DNA 글리코실라제 (MYH/MUTYH)*	8-oxoG 대향 A, C 또는 G, G 대향 2-hA, ds DNA	M
알킬화된 퓨린	메틸퓨린 글리코실라제 (MPG)	3-meA, 7-meG, 3-meG, 하이포크산틴, εA, ss 및 ds DNA	M
산화된, 고리-단편화된 또는 -포화된 피리미딘	엔도뉴클레아제 III-유사 글리코실라제 1 (NTHL1)*	Tg, FaPyG, 5-hC, 5-hU, dsDNA	B
	엔도뉴클레아제 VIII-유사 글리코실라제 1 (NEIL1)*	Tg, FaPyG, FaPyA, 8-oxoG, 5-hU, 5-hC, ss 및 ds DNA	B
	엔도뉴클레아제 VIII-유사 글리코실라제 2 (NEIL2)*	NTHL1 및 NEIL1과 동일	B
	엔도뉴클레아제 VIII-유사 글리코실라제 3 (NEIL3)	FaPyG, FaPyA, ssDNA 우선	B
시스-syn-시클로부탄 피리미딘 이량체 (예를 들어, UV 조사에 의해 유발됨)	T4 피리미딘 이량체 글리코실라제 (T4 PDG) / T4 엔도뉴클레아제 V	시스-syn-시클로부탄 피리미딘 이량체	B
미스매치에서의 피리미딘 유도체	Mug-DNA 글리코실라제 (MUG)	U, T, εC, 구아닌 대향	M

[0050]

dsDNA로부터의 손상된 퓨린	FaPy-DNA 글리코실라제	7, 8-디히드로-8-옥소구아닌 (8-옥소구아닌), 8-옥소아데닌, fapy-구아닌, 메틸-fapy-구아닌, fapy-아데닌, 아플라톡신 B1-fapy-구아닌, 5-히드록시-시토신 및 5-히드록시-우라실	B
알킬화된 퓨린	3-메틸아데닌 DNA 글리코실라제 I (TagA)	3-mA, 3-ethA	M
알킬화된 퓨린	3-메틸아데닌 DNA 글리코실라제 II (AlkA)	3-m-퓨린, 7-m-퓨린, 3-eth-퓨린, 7-eth-퓨린, εA, O <sup>2</sup> -m-피리미딘	M
ssDNA 및 dsDNA에서의 우라실	SMUG DNA 글리코실라제 (SMUG)	U, 5-hmU	M
손상된 피리미딘	엔도뉴클레아제 III	우레아, 5, 6- 디히드록시티민, 티민 글리콜, 5-히드록시-5-메틸히단토인, 우라실 글리콜, 6-히드록시-5, 6-디히드로티민 및 메틸타르트르닐우레아	B
손상된 피리미딘	엔도뉴클레아제 VIII	우레아, 5, 6- 디히드록시티민, 티민 글리콜, 5-히드록시-5-메틸히단토인, 우라실 글리콜, 6-히드록시-5, 6-디히드로티민, 메틸타르트르닐우레아	B
범례: U, 우라실; A, 아데닌; T, 티민; C, 시토신; G, 구아닌; ss, 단일 가닥; ds, 이중 가닥; 5-h, 5-히드록시; 5-hm, 5-히드록시메틸; 5-FU, 5-플루오르우라실; ε, 에테노; 5-fC, 5-포르밀시토신; 5-caC, 5-카복실시토신; 8-oxoG, 8-옥소-7,8-디히드로구아닌; Tg, 티민 글리콜; FaPy, 2,6-디아미노-4-히드록시-5-N-메틸포르미아미도피리미딘; m 또는 me, 메틸; h, 히드록실; eth, 에틸; Fxn, 기능성; M, 단일기능적; B, 이중기능적; * 또한 미토콘드리아에서도 발견됨			

[0051]

[0052]

일부 경우에, AP 부위가 DNA 글리코실라제에 의해 생성되면, DNA 샘플은 이어서 절제된 염기의 위치 근처에서 AP 엔도뉴클레아제로 처리되어 3' 히드록실 기 및 5' 데옥시리보스 5'-포스페이트를 생성할 수 있다. 예를 들어, 변형된 염기를 절제하는데 사용된 DNA 글리코실라제가 단일기능성인 경우에, DNA 샘플을 AP 엔도뉴클레아제로 처리함으로써 포스포디에스테르 백본이 절단될 수 있다.

[0053]

상기 논의된 바와 같이, 타입/클래스 I AP 엔도뉴클레아제 (AP 리아제)는 AP 부위의 3' 측에서 β-제거를 촉매하는 반면, 타입/클래스 II 효소는 AP 부위의 5' 측에서 가수분해를 촉매하여 3'-히드록실 말단을 남긴다. 타입 II 효소는 이. 콜라이 Endo III, Endo IV, 및 Endo VIII, 사카로미세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) Apn1, 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) Rrp1, 카에노랍디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*) CeAPN1, 및 주요 포유동물 AP 엔도뉴클레아제, 다양하게 지정된 APE1 (또한 Ape, APE1, Hap1, Apex, REF1, 및 섬유모세포 AP 엔도뉴클레아제 II로서 공지됨)을 포함한다. 이들 타입 II 효소 중 몇몇은 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성을 보유하나, 모두가 3'-포스포디에스테라제 활성을 보유하고, DNA의 3' 단부로부터 3' -포스포글리콜레이트 (PG), 포스포글리코알데히드, 포스페이트 및/또는 말단 AP 부위를 제거하는 것으로 제시된 바 있다. 일부 경우에, 기재된 방법에 사용되는 AP 엔도뉴클레아제는 또한 AP 부위에 남아 있는 3' 포스페이트를 절제하는 3' 포스포디에스테라제 활성을 가질 수 있다.

[0054]

일부 경우에, 절제 단계는 DNA 내의 다양한 산화성 손상에 작용할 수 있는 Endo IV를 사용하여 수행된다. Endo IV는 dsDNA 분자 내의 무손상 AP 부위를 가수분해할 수 있는 아퓨린산/아피리미딘산 (AP) 엔도뉴클레아제이다. AP 부위는 병변에 대해 5'인 제1 포스포디에스테르 결합에서 절단되어, 3' 말단에서의 히드록실 기 및 5' 말단에서의 데옥시리보스 5'-포스페이트를 남긴다. 효소는 또한 3'-디에스테라제 활성을 가지며, DNA의 3' 단부로부터 포스포글리코알데히드, 무손상 데옥시리보스 5-포스페이트, 및 포스페이트를 방출할 수 있다. 일부 경우에, 예를 들어 Apn1, CeAPN1 또는 Rrp1을 포함한, Endo IV의 상동체가 기재된 방법에 사용될 수 있다. 일부 경우에, AP 엔도뉴클레아제는 APE1이다. 예를 들어, APE1은 핵 또는 미토콘드리아 DNA를 분석할 때 사용될 수 있다.

[0055] 일부 경우에, DNA 글리코실라제는 변형된 염기 또는 부정확한 염기를 절제한 후에, DNA 분자에 결합된 상태로 유지될 수 있다. 이러한 경우에, 그에 결합된 DNA 글리코실라제를 갖는 DNA 분자는 DNA 글리코실라제를 DNA 분자로부터 방출시키는 시약과 함께 인큐베이션될 수 있다. DNA 글리코실라제가 방출되면, 무염기성 부위를 함유하는 DNA 분자는 본 개시내용에서 하기 및 다른 곳에 기재된 바와 같이 표지화될 수 있다. 예를 들어, 티민 DNA 글리코실라제 (TDG)는 불량한 촉매 효율 (효소 턴오버)를 갖는다. 일부 경우에, TDG가 기재된 방법에서 DNA 글리코실라제로서 사용될 때, 절제 반응의 DNA 생성물 (즉, 무염기성 부위를 갖는 DNA 분자)은 결합된 TDG를 제거하기 위해 추가로 처리될 수 있다. 한 예에서, DNA 생성물은 TDG를 분해하기 위해 프로테아나제 K와 함께 인큐베이션될 수 있으며, 이에 의해 그를 방출한다. 또 다른 예에서, DNA-TDG 혼합물은, 경쟁적으로 글리코실라제의 DNA 결합 도메인에 결합하는 SUMO1과 함께 공동-인큐베이션되며, 이에 의해 DNA 분자로부터의 그의 해리를 유발할 수 있다.

[0056] 일부 경우에, 방법은 표 1에 열거된 임의의 변형된 염기를 검출하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 하기 변형된 염기 중 하나 이상이 본원에 기재된 방법을 사용하여 검출될 수 있다: 5-플루오르우라실 (5-FU); 5-히드록시메틸-플루오르우라실 (5-hmU); 5-포르밀시토신 (5-fC); 5-카르복실시토신 (5-caC); 8-옥소-7,8-디히드로구아닌 (8-oxoG); 2,6-디아미노-4-히드록시-5-N-메틸포름아미도피리미딘 (FaPy); 2-히드록시-아데닌 (2-hA); 7-메틸-구아닌 (7-meG); 3-메틸-구아닌 (3-meG); 하이포크산틴; 티민 글리콜 (Tg); 우라실 글리콜 (Ug); 5-히드록시-시토신 (5-hC); 5-히드록시-우라실 (5-hU); 시스-syn-시클로부탄 피리미딘 이량체; 8-옥소아데닌 (8-oxoA); fapy-구아닌 (FaPyG); 메틸-fapy-구아닌 (mFaPyG); fapy-아데닌 (FaPyA); 아플라톡신 B1-fapy-구아닌 (AFB1-FaPyG); 5-히드록시-시토신 (5-hC); 5-히드록시-우라실 (5-hU); 3-메틸-아데닌 (3-mA); 3-에틸-아데닌 (3-ethA); 3-메틸-퓨린; 7- 메틸-퓨린; 3-에틸-퓨린; 7-에틸-퓨린; 에테노-아데닌 ( $\epsilon$  A); 에테노-시토신 ( $\epsilon$  C); O2-메틸-피리미딘; 우레아; 5, 6- 디히드록시티민; 5-히드록시-5-메틸히단토인; 및 6-히드록시-5, 6-디히드로티민; 메틸타르트르닐우레아; 메틸시토신 (mC); 및 히드록시메틸시토신 (hmC). 한 예에서, 본원에 기재된 방법은 8-옥소-7,8-디히드로구아닌 (8-oxoG)을 검출하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 방법은 5-포르밀시토신 (5-fC); 5-카르복실시토신 (5-caC), 메틸시토신 (mC) 및 히드록시메틸시토신 (hmC) 중 하나 이상을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0057] 한 예에서, 방법은, 예를 들어, 도 4a에 제시된 바와 같이 DNA 샘플 내의 임의의 우라실 뉴클레오티드, 옥소구아닌 (oxoG) 뉴클레오티드 또는 T:G 미스매치를 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 표적 DNA는 oxoG를 절제하고 폴리머라제 활성화에 대해 적합한 Nick을 유도하기 위해 oxoG DNA 글리코실라제 (hOGG1) 및 엔도뉴클레아제 IV (EndoIV)의 조합과 함께 인큐베이션될 수 있다. 예를 들어, 표적 DNA는 우라실을 절제하고 폴리머라제 활성화에 대해 적합한 Nick을 유도하기 위해 우라실 DNA 글리코실라제 및 엔도뉴클레아제 IV (EndoIV)의 조합과 함께 인큐베이션될 수 있다. 예를 들어, 표적 DNA는 T:G 미스매치를 절제하기 위해 티민 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션되고, 이어서 결합된 TDG를 분해하기 위해 프로테아나제 K와 함께 인큐베이션되며, 최종적으로 폴리머라제 활성화에 대해 적합한 Nick을 유도하기 위해 엔도뉴클레아제 IV (EndoIV)와 함께 인큐베이션될 수 있다. 각각의 예에서, DNA 글리코실라제는 선택적으로 개별 표적 뉴클레오티드를 표적화하고, 이들을 DNA의 포스페이트 백본으로부터 절제하여, 아퓨린산 또는 아피리미딘산 (AP) 부위를 남길 것이다. 후속적으로, 이중기능적 글리코실라제의 경우에, 효소의 리아제 활성이 AP 부위에 대해 3'를 절단하여, 5' 포스페이트 및 3'-포스포- $\alpha$ ,  $\beta$ -불포화 알데히드를 생성할 것이다. EndoIV와의 공동-인큐베이션은 AP 부위에 대해 5' 절단 및 3' 말단의 히드록실화를 유발하여, 폴리머라제 활성을 위한 기질로서 작용하는 하나의 뉴클레오티드 갭을 남길 것이다. 단일 기능적 글리코실라제의 경우에, 나머지 포스페이트가 AP 부위에 대해 5'에 남아 있을 것이다. 이는 후속적 폴리머라제 활성화에 영향을 미치지 않는다. 본 개시내용의 다음 섹션에서 추가로 논의된 바와 같이, DNA는 비오틴-표지화된 dNTP (여기서, N은 표적에서의 정확한 정규 염기의 정체를 매칭함) 및 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성 및 가닥 치환 활성이 결여된 T4 폴리머라제로 처리될 수 있다. 이러한 폴리머라제의 갭-충전 능력은 주위 서열에 상관 없이, 각각의 갭 부위에 혼입되는 단지 단일의 비오틴화된 뉴클레오티드를 유발한다. 생성된 DNA 단편은 그의 원래 서열을 유지하지만, 각각의 원래의 표적 변형된 염기 또는 미스매치의 위치에서 각각 단일 비오틴 모이어티를 갖는다. 이들 예에서, UDG 및 TDG는 둘 다 단일기능적 글리코실라제인 반면, hOGG1은 이중기능적이고, 따라서 DNA 글리코실라제의 클래스 둘 다에 대한 방법의 적용성을 입증한다. 또한, DNA 글리코실라제의 사용은 표적 염기 절제, 및 따라서 표지화의 높은 특이성을 유발한다. 일부 경우에, 주어진 DNA 글리코실라제는 그의 표적 염기를 특이적으로 절제할 것이나, 다른 DNA 글리코실라제는 그러지 않을 것이다. 예를 들어, 도 4b에 제시된 바와 같이, UDG는 표적 DNA 분자로부터 oxoG를 특이적으로 절제하지만 hOGG1 및 TDG는 그렇지 않다. 또 다른 예에서, 도 4c에 제시된 바와 같이, UDG는 oxoG 또는 T:G 미스매치를 절제하지 않고, TDG는 oxoG 또는 우라실을 절제하지 않고, hOGG1은 우라실 또는 T:G 미스매치를 절제하지 않는다.

[0058] DNA 샘플은 방법의 절제 단계에 사용된 효소 및 다른 시약으로부터 단리 또는 정제될 수 있다. 칼럼 크로마토 그래피, 에탄올 침전과 함께 페놀-클로로포름 처리, 염화세슘 밀도 구배, 음이온 교환 여과, 및 실리카 흡착을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 방법이 DNA 샘플을 단리하는데 사용될 수 있다. 단리 후에, DNA 샘플은 저장을 위해 또는 하기 기재된 방법의 표지화 단계에 사용하기 위해 완충제 중에 현탁될 수 있다.

[0059] 절제 위치에서의 표적 DNA의 표지화

[0060] 한 측면에서, 기재된 방법은 표지화된 뉴클레오타이드 염기를 변형된 염기가 처음에 위치하였던 위치에서 DNA 샘플에 혼입시키기 위해, 변형된 염기가 절제된 DNA 단편을 DNA 폴리머라제 및 하나 이상의 표지화된 뉴클레오타이드와 함께 인큐베이션하는 단계를 수반한다. 일부 경우에, DNA 폴리머라제는 갭 충전 활성을 가지며, 3'→5' 엑소뉴클레아제 또는 가닥 치환 활성을 갖지 않는다. 예시적인 DNA 폴리머라제는 3'→5' 엑소뉴클레아제 (교정) 활성이 결여된, 돌연변이된 T4 DNA 폴리머라제 (예를 들어, 루시젠(Lucigen)에 의해 판매되는 바와 같은 T4 pol exo<sup>-</sup>), Tae Pol A, Sce Pol I, T2 pol, ASFV pol X, 인간 Pol 람다, 인간 Pol 뮤, 인간 Pol 베타, 인간 Pol 알파, 및 Sce Pol 알파를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, T4 pol exo<sup>-</sup>는 표지화된 변형된 염기의 절제에 의해 표적 DNA에 생성된 갭에 표지화된 뉴클레오타이드를 혼입시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 도 2에 제시된 바와 같이, T4 pol exo<sup>-</sup>를 이용한 표적 DNA의 표지화는, 표지화된 뉴클레오타이드가 변형된 염기가 특이적으로 절제된 위치에서 표적 DNA에 혼입된 목적하는 반응 생성물을 주로 생성한다. 일부 경우에, 갭 충전 활성을 가지며 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성 또는 가닥 치환 활성을 갖지 않는 DNA 폴리머라제의 사용은 도 2에 제시된 바와 같이, 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제의 사용과 비교 시 목적하는 표지화된 생성물의 증가된 수율을 제공한다. 임의의 특정한 이론에 얽매는 것은 아니지만, 표지화 반응이 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하여 수행되는 경우에는, 표지화 반응이 표지화된 뉴클레오타이드의 단지 하나의 유형만을 포함하기 때문에, 3'→5' 방향으로의 분해는 폴리머라제가 (i) 표적으로부터의 염기 5'에서 영구적으로 중지되어, 어떠한 표지 혼입도 유발하지 않거나, 또는 (ii) 표지화된 변형된 염기로부터의 부위 5'에서 표지화된 뉴클레오타이드를 혼입시켜, 갭을 남겨두고 변형된 염기의 위치를 잘못 확인하도록 할 수 있다. 일부 경우에, 목적하는 표지화된 생성물의 수율은 표지화 반응에서 표적 DNA의 총량의 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 거의 100%이다. 예를 들어, 목적하는 표지화된 생성물의 수율은 표지화 반응에서 표적 DNA의 총량의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 거의 100%일 수 있다. 한 예에서, 목적하는 표지화된 생성물의 수율은 적어도 80%일 수 있다. 한 예에서, 목적하는 표지화된 생성물의 수율은 적어도 85%일 수 있다. 또 다른 예에서, 목적하는 표지화된 생성물의 수율은 적어도 90%일 수 있다. 또 다른 예에서, 목적하는 표지화된 생성물의 수율은 적어도 95%일 수 있다. 또 다른 예에서, 목적하는 표지화된 생성물의 수율은, 절제 및 표지화 반응이 표지화 반응 전의 절제 반응 중간체 생성물의 정제 없이 단일 반응 용기에서 수행될 때 적어도 90%일 수 있다. 또 다른 예에서, 목적하는 표지화된 생성물의 수율은 절제 및 표지화 반응이 표지화 반응 전의 절제 반응 중간체 생성물의 정제 없이 단일 반응 용기에서 실행될 때 적어도 95%일 수 있다. 일부 경우에, 교정 활성이 결여된 DNA 폴리머라제의 사용은 어떠한 표지화된 뉴클레오타이드도 혼입되지 않거나 또는 과잉의 표지화된 뉴클레오타이드가 허위 위치에서 혼입된 DNA 분자를 생성한다.

[0061] 일부 경우에, 방법의 표지화 단계에 사용된 DNA 폴리머라제의 양은 제한되며, 이에 의해 목적하는 생성물의 감소된 수율 및 목적하지 않는 생성물의 생성을 회피할 수 있다. 일부 경우에, 표지화 반응에 사용된 DNA 폴리머라제의 양은 표지화 반응에서의 약 10 U/pmol 내지 약 30 U/pmol 총 DNA일 수 있다. 예를 들어, 표지화 반응에서의 DNA 폴리머라제의 양은 약 10 U/pmol 총 DNA, 약 15 U/pmol 총 DNA, 약 20 U/pmol 총 DNA, 약 25 U/pmol 총 DNA, 약 30 U/pmol 총 DNA, 약 35 U/pmol 총 DNA, 또는 이들 양의 2-3 U/pmol 이내의 양일 수 있다. 일부 경우에, 표지화 반응에서의 DNA 폴리머라제의 양은 10 U/pmol 총 DNA, 15 U/pmol 총 DNA, 20 U/pmol 총 DNA, 25 U/pmol 총 DNA, 30 U/pmol 총 DNA, 35 U/pmol 총 DNA, 또는 이들 양의 2-3 U/pmol 이내의 양일 수 있다. 한 예에서, 표지화 반응에서의 DNA 폴리머라제의 양은 약 20 U/pmol 총 DNA이다. 일부 경우에, 표지화 반응에서의 DNA 폴리머라제의 양은 20 U/pmol 총 DNA일 수 있다. 일부 경우에, 50 U/pmol 이상의 DNA 폴리머라제 농도를 사용하여 수행된 표지화 반응은 도 3에 제시된 바와 같이, 표적 DNA 내에 하나 이상의 비-상보적 표지화된 뉴클레오타이드를 갖는 생성물, 어떠한 표지화된 뉴클레오타이드도 혼입되지 않은 생성물 또는 이들 둘 다를 포함한, 다양한 표지화된 생성물을 산출할 수 있다. 일부 경우에, 10 U/pmol 미만의 DNA 폴리머라제를 사용하여 수행된 표지화 반응은 단일 표지화된 뉴클레오타이드가 절제된 염기의 위치에서 혼입된 목적하는 표지화된 생성물의 감소된 수율을 유발할 수 있다. 일부 경우에, 방법의 표지화 단계에서의 목적하는 표지화된 생성물의

수율은 처리된 표적 DNA의 총량의 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 거의 100%이다. 예를 들어, 표지화 반응에서의 목적하는 표지화된 생성물의 수율은 처리된 표적 DNA의 총량의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 거의 100%일 수 있다. 예를 들어, 목적하는 표지화된 생성물의 수율은 적어도 80%일 수 있다. 일부 경우에, 1 유닛 (U)은 특정 양의 효소적 활성을 발생시키는 효소의 양, 즉, 분당 1 마이크로 몰의 기질의 전환을 촉매하는 양으로서 정의된다. 예를 들어, T4 DNA 폴리머라제의 경우에, 1 유닛은 30분 동안 37°C에서 50 mM 글리신-NaOH (pH 8.8), 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 6.5 μM EDTA, 10 mM 2-메르캅토에탄올, 0.165 mg/ml BSA, 1.6 mg/ml DNase I-닉킹된 연어 고환 DNA, 0.33 mM dCTP, 0.33 mM dATP, 0.33 mM dGTP, 0.33 mM dTTP, 76 nM [<sup>3</sup>H]dTTP, 및 0.1 ml의 효소와 같은 조건 하에 30분 내에 37°C에서 주형·프라이머로서 DNase I-닉킹된 DNA를 사용하여 산-침전가능한 물질 내로 10 nmol의 총 데옥시리보뉴클레오티드를 혼입시킬 수 있다.

[0062] 다양한 표지가 방법의 표지화 단계에 사용하기 위해 뉴클레오티드에 부착되거나 또는 접합될 수 있다. 일부 경우에, 표지는 표지화된 DNA 생성물의 목적하는 분석 방법에 기반하여 선택된다. 일부 경우에, 표지는 비오틴일 수 있다. 따라서, 방법의 표지화 단계는 비오틴닐화된 뉴클레오티드를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 실시예 1-3에 기재되고 도 1-4에 제시된 바와 같이, 비오틴닐화된 dUTP는 티민 (또는 그의 변형된 형태)이 DNA 샘플로부터 절제된 것인 표지화 반응에 사용될 수 있다. 다양한 고체 지지체에 부착될 수 있는 스트렙타비딘과의 강력한 상호작용을 통해, 비오틴 표지는 표지화된 DNA 분자를 특이적으로 단리하는데 사용될 수 있다.

[0063] 방법의 표지화 단계에 사용될 수 있었던 다른 예시적인 표지는 각각 다양한 항-디곡시게닌 항체 및 항-플루오레세인 항체에 의해 높은 친화성 및 특이성으로 결합되며, 비오틴 및 스트렙타비딘에 대해 상기 기재된 것과 유사한 방식으로 사용될 수 있는 디곡시게닌 및/또는 플루오레세인이다.

[0064] 방법의 표지화 단계에 사용될 수 있었던 또 다른 예시적인 표지는 클릭 화학 개념 내에서 가장 대중적인 반응 중 하나인, 아지드-알킨 휘스켄 고리화첨가 반응에 기반한 것이다. 이러한 클릭 화학 반응은 실온에서 구리 (Cu) 촉매를 사용하여 아지드와 말단 또는 내부 알킨 사이의 1,3-쌍극자 고리화첨가를 유발함으로써 1,2,3-트리아졸을 제공한다. Cu(I) 종은 미리 형성된 착물로서 도입될 수 있거나, 또는 달리 다양한 방식 중 하나에 의해 반응 포트 자체에서 생성된다. 일부 경우에, 그에 부착된 아지드 화학적 기를 갖는 뉴클레오티드가 반응의 표지화 단계에 사용될 수 있다. 표지화 단계 후에, 클릭 화학은 단리 및 정제를 위해 고리화첨가를 통해 알킨-표지화된 분석물 또는 기질과의 공유 결합을 형성하도록 수행될 수 있다. 이들 경우에, 기질 또는 분석물은 표지화된 DNA가 공유 연결되고 단리될 수 있는 고체 지지체, 예컨대 칼럼 또는 알킨 비드일 것이다. 연결은 후속적으로 절단되어 표지화된 DNA를 방출할 것이다.

[0065] 방법의 표지화 단계에 사용될 수 있었던 또 다른 예시적인 표지는 아민-반응성 화학적 기 예컨대, 예를 들어, NHS 에스테르 (N-히드록시숙신이미드 에스테르) 및 이미도에스테르이다. NHS 에스테르는 카르복실레이트 분자의 카르보디이미드-활성화에 의해 형성된 반응성 기이다. NHS 에스테르-활성화된 가교제 및 표지화 화합물은 생리적 내지 약알칼리성 조건 (pH 7.2 내지 9) 하에 1급 아민과 반응하여 안정한 아미드 결합을 산출하고 N-히드록시숙신이미드 (NHS)를 방출한다. 이미도에스테르 가교제는 1급 아민과 반응하여 아미딘 결합을 형성한다. 이미도에스테르 가교제는 알칼리성 pH에서 아민과 급속하게 반응하지만 짧은 반감기를 갖는다. 이러한 방식으로, 공유 결합이 후속적 단리 및 정제를 위한 분석물 또는 기질 상의 아민 기와 선택적으로 형성될 수 있다. 이들 경우에, 가교제는 표지화된 DNA가 공유 연결되고 단리될 수 있는 고체 지지체, 예컨대 칼럼 또는 알킨 비드에 부착될 수 있다. 연결은 후속적으로 절단되어 표지화된 DNA를 방출할 수 있다.

[0066] 방법의 표지화 단계에 사용될 수 있었던 또 다른 예시적인 표지는 디티올 링커 예컨대 디티올 포스포르아미다이트 (DTPA)이다. DTPA는 DNA 분자의 임의의 위치에 삽입될 수 있다. 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP) 또는 디티오트레이톨 (DTT)로의 환원 후에, 각각의 삽입은 리간드 또는 표면과의 커플링을 위한 2개의 티올 (SH) 관능기를 생성한다. 디티올 변형은 DNA 단편을 리간드 또는 고체 표면, 예컨대, 예를 들어, 금에 커플링하는데 사용될 수 있다. 이는 또한 DNA 단편을 말레이미드, 할로젠, 아이오도아세트아미드, 피리딜디술피드 또는 단백질, 예컨대 양고추냉이 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제에 연결하는데 사용될 수 있다. 이어서, DTPA는 비오틴/스트렙타비딘, 디곡시게닌 및 플루오레세인에 대해 상기 기재된 것과 유사한 방식으로 사용될 수 있다.

[0067] 일부 경우에, 표지화가 수행된 후에, DNA 단편은 포스포디에스테르 백본 내의 임의의 틈을 실링하기 위해 DNA 리가제로 처리될 수 있다. 이는, 일부 경우에, 전단 파단의 경향이 더 적고, 증폭 및 분석에 사용된 다른 효소적 과정에 대한 적용성이 더 클 수 있는 근접 분자를 생성할 것이다.

- [0068] 일부 경우에, 주어진 샘플로부터의 DNA 단편은 개별 부분으로 분할되며, 각각의 부분은 개별적으로 분석될 수 있다. 일부 경우에, 각각의 부분은 상이한 종류의 DNA 글리코실라제를 사용하여 분석될 수 있다. 일부 경우에, 적어도 일부 부분은 하기에 추가로 논의된 바와 같이 하나 이상의 변형 효소로 처리된 다음에, DNA 글리코실라제로 처리될 수 있다.
- [0069] 일부 경우에, 효소의 순차적 첨가는 글리코실라제, 엔도뉴클레아제 및 폴리머라제의 활성을 위해 적합한 완충제를 함유하는 단일 반응 포트에서 수행될 수 있다. 각각의 단계를 단일 반응 용기에서 수행하는 것은 각 단계 사이에 DNA 정제의 필요성을 제거함으로써 분석될 DNA 물질의 손실을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 도 5에 제시된 바와 같이, UDG, Endo IV 및 T4 DNA pol exo<sup>-</sup>는 DNA 분자로부터 우라실을 특이적으로 절제하고, 무염기성 부위에 표지화된 dUTP를 혼입시키는데 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, hOGG1, Endo IV 및 T4 DNA pol exo<sup>-</sup>는 DNA 분자로부터 oxoG를 특이적으로 절제하고, 무염기성 부위에 표지화된 dGTP를 혼입시키는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 실시예 4에 기재된 바와 같이, 단일 반응 용기에서 수행된 절제 및 표지화 반응의 효율은 절제 및 표지화 반응을 개별적으로 수행하는 효율보다 더 클 수 있다. 또 다른 예에서, 목적하는 표지화된 생성물의 수율은 절제 및 표지화 반응이 표지화 반응 전의 절제 반응 중간체 생성물의 정제 없이 단일 반응 용기에서 수행될 때 적어도 90%일 수 있다. 또 다른 예에서, 목적하는 표지화된 생성물의 수율은 절제 및 표지화 반응이 표지화 반응 전의 절제 반응 중간체 생성물의 정제 없이 단일 반응 용기에서 수행될 때 적어도 95%일 수 있다.
- [0070] 글리코실라제 표지화의 변경
- [0071] 일부 경우에, 하나의 DNA 글리코실라제가 사용되어, 상이한 종류의 변형된 염기의 절제 및 표지화를 용이하게 할 수 있다. 일부 경우에, 방법은 주어진 DNA 글리코실라제에 의한 절제에 영향을 미치는, DNA 단편의 염기에 대한 변형을 촉매하는 하나 이상의 효소로 DNA 단편이 처리되는 추가의 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 변형 효소를 이용한 DNA 단편의 변형은, 전형적으로 인식하고 절제할 DNA 글리코실라제에 의해 더 이상 인식되지 않고 절제되지 않도록 염기를 변경할 수 있다. 일부 경우에, 변형 효소를 이용한 DNA의 변형은, 전형적으로 인식하지 못하고 절제하지 않을 DNA 글리코실라제에 의해 인식되고 절제되도록 염기를 변경할 수 있다.
- [0072] 한 예에서, 실시예 5에 기재되고 도 6a에 제시된 바와 같이, 티민 DNA 글리코실라제 (TDG)는 그의 공지된 표적 인 카르복시시토신 (caC) 및 포르밀시토신 (fC) 을 절제하는데 사용될 수 있고, DNA 샘플 내의 염기를 변형시키는 추가의 단계로, 특이적으로 인식하지 않는 변형된 염기인 메틸시토신 (mC) 및 히드록시메틸시토신 (hmC)을 확인하는데 사용될 수 있다. 한 예에서, caC 또는 fC 변형된 염기를 갖는 DNA 내의 위치를 표지화하기 위해, 도 6a의 경로 (1)로 제시된 바와 같이, TDG가 이들 변형된 염기의 위치에서 AP 부위를 생성하는 DNA 글리코실라제로서 사용될 수 있고, 이어서 표지화된 dTTP 또는 dUTP가 혼입되어 이들 위치를 표지화할 수 있다. 또 다른 예에서, mC 및 hmC 변형된 염기의 위치를 표지화하고 검출하기 위해, 도 6a의 경로 (2)에 제시된 바와 같이, TDG 및 변형 효소 TET를 사용하는 다중 단계가 사용될 수 있다. 예를 들어, TDG는 DNA에 존재하는 임의의 기존의 caC 및 fC 변형된 염기를 절제하는데 사용될 수 있고, 생성된 AP 부위는 정규 (비표지화된) dTTP 또는 dUTP 로 충전될 수 있다. 이어서, DNA는 mC 및 hmC 변형된 염기를 caC 및 fC로 탈메틸화하고 전환시키기 위해 TET 효소로 처리될 수 있다. 이어서, DNA는 TDG로 다시 처리될 수 있고, 이는 전환된 염기의 위치에서 AP 부위를 생성할 것이고, 이어서 이들 부위는 표지화된 dTTP 또는 dUTP로 표지화될 수 있다. 또 다른 예에서, mC 및 hmC 를 구별하기 위해, DNA 샘플의 부분은 경로 (2)에 기재된 바와 같이 프로세싱될 수 있고, 또 다른 부분은 도 6a의 경로 (3)에 제시된 바와 같이 병렬 프로세싱되어 mC 부위를 확인할 수 있다. mC 부위를 확인하는데 사용되는 부분은 DNA에 존재하는 임의의 기존의 caC 및 fC 변형된 염기를 절제하기 위해 TDG로 처리될 수 있고, 생성된 AP 부위는 정규 (비표지화된) dTTP 또는 dUTP로 충전될 수 있다. 이어서, DNA는 DNA에 존재하는 hmC에 글루코스 모이어티를 선택적으로 부착하기 위해  $\beta$ -글루코실트랜스퍼라제로 처리된 다음에, 단지 mC를 caC/fC로 전환시키기 위해 TET 효소로 처리될 수 있다. 이어서, DNA는 전환된 caC/fC 부위 (이전에 mC 부위)를 절제하기 위해 TDG로 다시 처리될 수 있고, 이어서 표지화된 dTTP 또는 dUTP로 표지화될 수 있다. 경로 (2) 및 경로 (3)에 따라 프로세싱된 DNA 샘플의 부분의 비교는 DNA 샘플에 존재하는 hmC 부위를 확인할 것이다.
- [0073] 변형된 염기의 선택적 절제를 변경하는 다른 유사한 방법이 가능하다. 예를 들어, 도 6b에 제시된 바와 같이, 동일한 염기를 검출하기 위해 티민 DNA 글리코실라제 (TDG) 및 우라실 DNA 글리코실라제 (UDG)를 사용하는 유사한 방법이 수행될 수 있다. fC/caC를 검출하기 위한 경로 (1)은 상기 기재된 것과 동일하다. 경로 (2)에서 hmC를 특이적으로 표지화하고 검출하기 위해, KRuO<sub>4</sub>를 사용하여 hmC를 caC/fC로 산화시킬 수 있고, 이어서 이들은 TDG에 의해 절단되며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 hmC의 부위를 표지화된 dCTP (예를 들어, 비오틴일화된 dCTP)로 표지화할 수 있다. 경로 (3)에서, 도 6a에 제시된 것과 유사한 접근법을 사용하여 mC를 특이적으로 검

출할 수 있다.  $\beta$ -글루코실트랜스퍼라제를 사용하여 글루코스 모이어티를 선택적으로 hmC에 부착하며, 이에 의해 이를 산화로부터 차단할 수 있다. APOBEC3a 또는 비술파이트는 mC를 우라실로 전환시킬 수 있으며, 이는 이어서 UDG에 의해 절단되고 표지화된 dCTP (예를 들어, 비오틴화된 dCTP)로 표지화될 수 있다.

[0074] 또 다른 예에서, 방법의 염기 절제 단계는 하나 이상의 변형된 염기 (모두 동일한 종류이거나 또는 1종 초과)의 종류를 함유하는 비표지화된 경쟁자 올리고뉴클레오티드의 존재 하에 수행될 수 있다. 예를 들어, 이러한 올리고뉴클레오티드는 특정한 DNA 글리코실라제가 1종 초과)의 유형의 변형된 염기를 절제하는 능력을 갖는 경우에 (즉, 1종 초과)의 유형의 변형된 염기에 대해 특이성을 가진) 유용할 수 있다. 비표지화된 경쟁자 올리고뉴클레오티드는 단편화된 DNA 및 DNA 글리코실라제와 조합될 수 있고, 비표지화된 경쟁자 올리고뉴클레오티드는 DNA 글리코실라제에 의해 인식되는 제1 유형의 변형된 염기를 함유할 수 있다. 일부 경우에, 비표지화된 경쟁자 올리고뉴클레오티드의 존재는 제1 유형의 변형된 염기에 대한 DNA 글리코실라제의 친화성을 우선적으로 감소시키며, 단편화된 게놈 DNA에 존재하는 제2 유형의 변형된 염기에 대한 DNA 글리코실라제의 친화성을 증가시킬 수 있다.

[0075] 일부 경우에, 상이한 변형된 염기를 구별하여 표지화하기 위해 DNA 샘플을 순차적 방식으로 하나 초과)의 DNA 글리코실라제로 처리하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 방법은 제1 변형된 염기에 대한 특이성을 갖는 제1 DNA 글리코실라제로의 제1 절제 단계, 및 제1 표지화된 뉴클레오티드가 DNA 단편에 혼입되는 제1 표지화 단계를 포함할 수 있다. 방법은 또한 제2 변형된 염기에 대한 특이성을 갖는 제2 DNA 글리코실라제로의 제2 절제 단계, 및 제2 표지화된 뉴클레오티드가 DNA 단편에 혼입되는 제2 표지화 단계를 포함할 수 있다. 제1 및 제2 표지화된 뉴클레오티드에 부착된 표지는 상이한 표지일 수 있다. 방법은 상이한 특이성을 갖는 DNA 글리코실라제로의 추가의 절제 단계, 및 제1 및 제2 표지화된 뉴클레오티드와는 상이한 표지를 갖는 표지화된 뉴클레오티드로의 표지화 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 절제 및 표지화의 순차적 라운드는 단일 DNA 샘플 내의 다중 유형의 변형된 염기의 검출을 가능하게 할 수 있다. 일부 경우에, DNA 샘플은 복수의 부분으로 분할되고, 각각에 대해 절제 단계가 상이한 DNA 글리코실라제로 병렬 수행될 수 있다. 일부 경우에, 각각의 개별 부분을 위한 표지화된 뉴클레오티드에 동일한 표지가 사용될 수 있으며, 여기서 샘플의 각 부분에서의 표지화된 DNA 분자는 개별적으로 검출되고 분석될 것이다. 일부 경우에, 부분이 조합되고 동시에 분석될 수 있도록 각 부분을 위해 상이한 표지를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0076] 표지화된 DNA의 풍부화

[0077] 일부 경우에, 표지화된 DNA 단편은 표지 검출 전에 총 DNA 샘플로부터 단리되거나 또는 풍부화될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, DNA 단편에 혼입된 표지가 사용될 수 있다. 예를 들어, 스트렙타비딘은 비오틴으로 표지화된 DNA를 단리하는데 사용될 수 있고, 항체는 디콕시게닌 또는 플루오레세인으로 표지화된 DNA를 단리하는데 사용될 수 있으며, 금은, 예를 들어, DTPA로 표지화된 DNA를 단리하는데 사용될 수 있다. 아지드 변형된 분자는 알킨-아가로스 수지 칼럼을 사용하여 단리될 수 있고, 아민 화학은 유리 비드로 이러한 분자를 풍부화하는데 사용될 수 있다.

[0078] 풍부화 단계는 단순하게 하기 위해 비오틴 표지화된 DNA와 관련하여 기재될 것이다. 그러나, 방법의 표지화 단계에 사용된 표지의 유형에 기반하여 유사한 방법이 용이하게 분명하다. 한 예에서, DNA 단편은 비오틴화된 뉴클레오티드로 표지화될 수 있다. 방법의 표지화 단계 후에, 표지화된 염기를 함유하는 (변형된 염기가 출발 DNA 샘플에 존재했던 위치에서) 단편이 친화성 포획되도록, DNA 단편은 스트렙타비딘 자기 비드와 함께 인큐베이션될 수 있다. 이어서 자장을 사용하여 비드는 잡아당기는 반면, 용액 내의 비표지화된 DNA 단편은 세척될 수 있다. 이어서, 표지화된 DNA 단편은 승온에서 95% 포름아미드 및 10 mM EDTA (pH 8.2)로의 처리를 사용하여 스트렙타비딘 비드로부터 절단되고, 자장 하에 상청액을 가만히 따라냄으로써 단리될 수 있다.

[0079] 일부 경우에, 표지는 풍부화된 DNA 단편으로부터 제거된다. 예를 들어, 표지는 표지화를 위해 사용된 뉴클레오티드에 제거가능하게 부착될 수 있으므로, 표적 DNA로의 혼입 후에, 이는 표지화된 표적 DNA에 혼입된 염기에 제거가능하게 부착된다. 한 예에서, 표지는 광절단가능한 링커를 통해 뉴클레오티드 (염기)에 부착될 수 있다. 이어서, 염기는 광 노출 (예컨대 레이저에 의해 제공됨)에 의해 제거되어 표지를 방출할 수 있다. 또 다른 예에서, 표지는 화학적으로 절단가능한 링커를 통해 부착될 수 있다. 예를 들어, 화학적으로 절단가능한 링커는 산, 염기, 산화, 환원, 열, 광, 금속 이온 촉매작용, 치환 또는 제거 화학에 의해 절단가능한 모이어티일 수 있다.

[0080] 표지화된 DNA의 분석

- [0081] 일부 경우에, 표적 변형이 상기 기재된 바와 같이 표지화되면, 이들은 미국 특허 출원 번호 2013/0196323, 2013/0203050 및 2014/0319339에 기재된 바와 같은 심층 서열분석, 차세대 서열분석 및 나노포어 기술을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 수많은 확립 및 신생 기술을 통해 평가될 수 있으며, 이들 출원은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 예를 들어, 분석 방법은 확인을 위해 선택된 표지에 기반할 수 있다. 일부 방법은 다른 것들보다 더 정량적이다. 한 예에서, 서열분석용 분석을 사용하여 표지화된 DNA 분자를 분석할 수 있다. 단리된 표지화된 DNA는 무작위 육량체를 사용하여 증폭될 수 있고, 서열분석되며, 모든 포획된 서열을 확인하고 상대 존재비를 정할 수 있도록 서열이 참조 라이브러리와 비교될 수 있다. 또 다른 예에서, 나노포어를 사용하여 표지화된 DNA 분자를 분석할 수 있다. 짧은 길이 ( $\geq 500$  bp)의 표지화된 DNA 서열은 나노미터-규모 개구를 통해 선택적으로 전위되어, 증폭 없이 표지화된 DNA를 직접적으로 정량화하는데 사용될 수 있는 측정된 트랜스-포어 이온 전류에서의 특징적인 변동을 유발할 수 있다.
- [0082] 일부 경우에, 하나 이상의 변형된 염기 (동일한 종류 또는 상이한 종류)를 함유하는 대조 DNA 올리고뉴클레오티드를 사용하여 단리된 표지화된 DNA 내의 변형된 염기의 양을 정량화할 수 있다. 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 기지의 농도를 가지며, DNA 분자 또는 농도당 기지의 양의 변형된 염기를 가질 수 있다. 일부 경우에, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 단리된 표지 DNA 단편과 유사한 크기를 가질 수 있다. 일부 경우에, 기재된 염기 절제 및 표지화 반응은 단리된 표지화된 DNA 및 대조 DNA 올리고뉴클레오티드에 대해 병렬 수행될 수 있다. 대조 DNA 올리고뉴클레오티드의 표지화 양의 분석은 단리된 표지화된 DNA에 혼입된 표지의 양, 및 따라서 단리된 표지화된 DNA 내의 특정한 변형된 염기의 양을 정량화하는데 사용될 수 있다. 한 예에서, 복수의 양의 대조 DNA 올리고뉴클레오티드에 혼입된 표지화에 기반하여 표준 곡선을 생성할 수 있고, 단리된 표지화된 DNA에 혼입된 표지화의 양을 표준 곡선과 비교하여 단리된 표지화된 DNA에 존재하는 변형된 염기의 양을 결정할 수 있다. 일부 경우에, 분석은 복수의 대조 DNA 올리고뉴클레오티드를 단리된 표지화된 DNA와 비교하여 수행될 수 있으며, 각각의 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 기지의 양의 상이한 변형된 염기를 갖는다. 또 다른 예에서, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 정량화를 위해 기지의 양으로 단리된 표지화된 DNA와 조합될 수 있다 (스파이크 인).
- [0083] 비제한적 실시양태는 하기를 포함한다:
- [0084] 실시양태 1. 하기 단계를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하는 방법:
- [0085] (a) 단편화된 DNA를 포함하는 DNA 샘플을 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션하여, 단편화된 DNA 내의 변형된 뉴클레오티드의 부위에서 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하는 단계;
- [0086] (b) 단계 (a)의 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 AP 부위에 대항하는 뉴클레오티드에 상보적인 표지화된 뉴클레오티드로 처리하며, 이에 의해 표지화된 뉴클레오티드를 단편화된 DNA 내의 AP 부위에 혼입시키는 단계;
- [0087] (c) 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하는 단계; 및
- [0088] (d) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하거나, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하거나, 또는 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 및 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하고 양을 정량화하는 것을 둘 다 하는 단계.
- [0089] 실시양태 2. 실시양태 1에 있어서, DNA 샘플이 게놈 DNA, 미토콘드리아 DNA 또는 그의 조합인 방법.
- [0090] 실시양태 3. 실시양태 1 또는 2에 있어서, DNA 샘플이 약 50-250개의 염기 쌍 길이의 DNA 단편을 포함하는 것인 방법.
- [0091] 실시양태 4. 실시양태 1 내지 3 중 어느 한 실시양태에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 메틸시토신 (mC), 히드록시메틸시토신 (hmC), 카르복시시토신 (caC), 포르밀시토신 (fC), 8-옥소-7,8-디히드로구아닌 (8-oxoG), 우라실, 메틸아데닌 (mA), 8-옥소아데닌, O6-메틸구아닌, 1-메틸아데닌, O4-메틸티민, 5-히드록시시토신, 5-히드록시우라실, 5-히드록시메틸우라실 또는 티민 이량체 중 적어도 하나인 방법.
- [0092] 실시양태 5. 상기 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 변형된 뉴클레오티드가 표 1에 열거된 것들 중 적어도 하나인 방법.
- [0093] 실시양태 6. 실시양태 1 내지 5 중 어느 한 실시양태에 있어서, DNA 글리코실라제가 표 1에 열거된 것들 중 적어도 하나인 방법.

- [0094] 실시양태 7. 실시양태 1 내지 6 중 어느 한 실시양태에 있어서, 단계 (b)를 수행하기 전에 단계 (a)의 단편화된 DNA를 AP 엔도뉴클레아제와 함께 인큐베이션하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0095] 실시양태 8. 실시양태 1 내지 7 중 어느 한 실시양태에 있어서, DNA 폴리머라제가 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성 또는 가닥 치환 활성을 갖지 않는 것인 방법.
- [0096] 실시양태 9. 실시양태 1 내지 8 중 어느 한 실시양태에 있어서, DNA 폴리머라제가 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여된, 돌연변이된 T4 DNA 폴리머라제일 수 있는 것인 방법.
- [0097] 실시양태 10. 실시양태 1 내지 9 중 어느 한 실시양태에 있어서, 단계 (b)에 사용된 DNA 폴리머라제의 양이 약 10 U/pmol 내지 약 30 U/pmol 총 DNA일 수 있는 것인 방법.
- [0098] 실시양태 11. 실시양태 1 내지 10 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표지화된 뉴클레오티드가 비오틴-표지화된 뉴클레오티드인 방법.
- [0099] 실시양태 12. 실시양태 1 내지 11 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표지화된 뉴클레오티드가 비오틴-표지화된 뉴클레오티드인 경우에, 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하는 것이 단편화된 DNA를 고체 지지체에 부착된 스트랩타비딘과 접촉시키고, 그에 결합되지 않은 단편화된 DNA를 제거하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0100] 실시양태 13. 실시양태 1 내지 12 중 어느 한 실시양태에 있어서, 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하며, 표지화된 뉴클레오티드의 양을 기지의 양의 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 참조 샘플 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양과 비교하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0101] 실시양태 14. 실시양태 1 내지 13 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하는 것이 단리된 단편화된 DNA를 서열분석하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0102] 실시양태 15. 하기 단계를 포함하는, 후성적 변형 또는 어떤 유형의 DNA 손상과 연관된 것으로 공지된 질환 또는 병태를 갖는 대상체를 진단하는 방법:
  - [0103] (a) 대상체로부터의 DNA 샘플을 제공하는 단계;
  - [0104] (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
  - [0105] (c) 실시양태 1의 방법에 따라 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나를 확인하는 단계;
  - [0106] (d) 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치 또는 양과 비교하여 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양에서의 차이를 결정하는 단계; 및
  - [0107] (e) 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치 또는 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양에서의 차이가 있으면, 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다는 것을 나타내는 단계.
- [0108] 실시양태 16. 실시양태 15에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양이 증가되면, 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다는 것을 나타내는 것을 포함하는 방법.
- [0109] 실시양태 17. 실시양태 15에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양이 감소되면, 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다는 것을 나타내는 것을 포함하는 방법.
- [0110] 실시양태 18. 실시양태 15에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치와 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치의 변화가 있으면, 대상체가 질환 또는 병태를 갖는다는 것을 나타내는 것을 포함하는 방법.
- [0111] 실시양태 19. 하기 단계를 포함하는, 후성적 변형 또는 어떤 유형의 DNA 손상과 연관된 것으로 공지된 질환 또는 병태가 발병할 위험이 있는 대상체를 확인하는 방법:
  - [0112] (a) 대상체로부터의 DNA 샘플을 제공하는 단계;

- [0113] (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
- [0114] (c) 실시양태 1의 방법에 따라 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나를 확인하는 단계;
- [0115] (d) 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치 또는 양과 비교하여 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나에서의 차이를 결정하는 단계; 및
- [0116] (e) 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치, 양 또는 이들 둘 다와 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나에서의 차이가 있으면, 대상체가 질환 또는 병태가 발병할 위험이 있다는 것을 나타내는 단계.
- [0117] 실시양태 20. 실시양태 19에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양이 증가되면, 대상체가 질환 또는 병태가 발병할 위험이 있다는 것을 나타내는 것을 포함하는 방법.
- [0118] 실시양태 21. 실시양태 19에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양이 감소되면, 대상체가 질환 또는 병태가 발병할 위험이 있다는 것을 나타내는 것을 포함하는 방법.
- [0119] 실시양태 22. 실시양태 19에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치와 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치의 변화가 있으면, 대상체가 질환 또는 병태가 발병할 위험이 있다는 것을 나타내는 것을 포함하는 방법.
- [0120] 실시양태 23. 실시양태 19 내지 22 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 질환 또는 병태가 발병할 유전적 위험을 갖는 것인 방법.
- [0121] 실시양태 24. 실시양태 19 내지 22 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 질환 또는 병태가 발병할 환경적 위험을 갖는 것인 방법.
- [0122] 실시양태 25. 실시양태 19 내지 24 중 어느 한 실시양태에 있어서, 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치 또는 양과 비교 시 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양에서의 차이가 없으면, 대상체를 모니터링하기 위해 향후 시점에 수행되는 방법.
- [0123] 실시양태 26. 하기 단계를 포함하는, 대상체의 질환 또는 병태에 대한 치료에 반응할 가능성을 결정하는 방법:
- [0124] (a) 대상체로부터의 DNA 샘플을 제공하는 단계;
- [0125] (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
- [0126] (c) 실시양태 1의 방법에 따라 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나를 확인하는 단계;
- [0127] (d) 질환 또는 병태를 가지며 치료에 대해 반응하는 것으로 공지된 대상체의 참조 집단으로부터의 샘플 내의 변형된 염기의 위치 또는 양 중 적어도 하나와 비교하여 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양에서의 차이를 결정하는 단계; 및
- [0128] (e) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 참조 집단으로부터의 샘플 내의 변형된 염기의 위치, 양 또는 이들 둘 다와 유사하면, 대상체가 치료에 반응할 가능성이 더 크다는 것을 나타내거나, 또는 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 참조 집단으로부터의 샘플 내의 변형된 염기의 위치, 양 또는 이들 둘 다와 유사하지 않으면, 대상체가 치료에 반응할 가능성이 더 작다는 것을 나타내는 단계.
- [0129] 실시양태 27. 하기 단계를 포함하는, 치료에 대한 대상체의 반응성을 평가하는 방법:
- [0130] (a) 치료를 받고 있는 대상체로부터의 DNA 샘플을 제공하는 단계;
- [0131] (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
- [0132] (c) 실시양태 1의 방법에 따라 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나를 확인하는 단계;

- [0133] (d) (i) 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 또는 (ii) 질환 또는 병태를 갖는 1명 이상의 대상체로부터의 하나 이상의 샘플 중 적어도 하나 내의 변형된 염기의 위치 또는 양과 비교하여 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나에서의 차이를 결정하는 단계; 및
- [0134] (e) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 1명 이상의 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 참조 샘플 내의 변형된 염기의 위치, 양 또는 이들 둘 다와 유사하면, 대상체가 치료에 반응하고 있다는 것을 나타내거나, 또는 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 질환 또는 병태를 갖는 1명 이상의 대상체로부터의 하나 이상의 샘플 내의 변형된 염기의 위치, 양 또는 이들 둘 다와 유사하면, 대상체가 치료에 반응하고 있지 않다는 것을 나타내는 단계.
- [0135] 실시양태 28. 실시양태 27에 있어서, 시간 경과에 따른 대상체의 치료에 대한 반응성을 모니터링하기 위해 하나 이상의 향후 시점에 수행되는 방법.
- [0136] 실시양태 29. 실시양태 27 또는 28에 있어서, 대상체가 치료를 받기 이전에 대상체로부터 취득된 DNA 샘플에 대해 단계 (b) 및 (c)를 수행하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0137] 실시양태 30. 실시양태 29에 있어서, 질환 또는 병태를 갖는 1명 이상의 대상체로부터의 하나 이상의 샘플이 치료를 받기 이전에 대상체로부터 취득된 DNA 샘플인 방법.
- [0138] 실시양태 31. 하기 단계를 포함하는, 치료와 연관된 DNA 손상의 측정에 대해 대상체를 모니터링하는 방법:
  - [0139] (a) 치료의 투여 이전에 대상체로부터의 제1 DNA 샘플을 제공하는 단계;
  - [0140] (b) 제1 DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
  - [0141] (c) 실시양태 1의 방법에 따라 제1 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나를 확인하는 단계;
  - [0142] (d) 치료의 투여 후에 대상체로부터의 제2 DNA 샘플을 제공하는 단계;
  - [0143] (e) 제2 DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
  - [0144] (f) 실시양태 1의 방법에 따라 제2 DNA 샘플 내의 변형된 DNA 염기를 검출하는 단계;
  - [0145] (g) 제2 DNA 샘플과 비교하여 제1 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나에서의 차이를 결정하는 단계; 및
  - [0146] (h) 제2 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 제1 DNA 샘플과 비교하여 증가되었으면, 대상체가 DNA 손상을 축적하였다는 것을 나타내거나, 또는 제2 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 또는 양 중 적어도 하나가 제1 DNA 샘플과 유사하면, 대상체가 DNA 손상을 축적하지 않았다는 것을 나타내는 단계.
- [0147] 실시양태 32. 실시양태 31에 있어서, 대상체에서의 DNA 손상의 측정을 모니터링하기 위해 단계 (d) 내지 (h)가 향후 시점에 수행되는 것인 방법.
- [0148] 실시양태 33. 실시양태 31 또는 32에 있어서, 치료가 방사선 요법 또는 화학요법 중 적어도 하나인 방법.
- [0149] 실시양태 34. 하기 단계를 포함하는, 대상체에 대한 유전자 프로파일을 개발하는 방법:
  - [0150] (a) 대상체로부터의 DNA 샘플을 제공하는 단계;
  - [0151] (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
  - [0152] (c) 단편화된 DNA를 포함하는 DNA 샘플을 복수의 변형된 뉴클레오티드를 절제하며, 각각 상이한 종류의 변형된 뉴클레오티드를 절제하는 복수의 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션하여, 단편화된 DNA 내의 변형된 뉴클레오티드의 부위에서 아퓨린산 또는 아피리미딘산 부위 (AP 부위)를 형성하는 단계;
  - [0153] (d) 단계 (c)의 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 AP 부위에 대항하는 뉴클레오티드에 상보적이며, 각 종류가 상이한 종류의 표지를 갖는 표지화된 뉴클레오티드로 처리하며, 이에 의해 표지화된 뉴클레오티드를 단편화된 DNA 내의 AP 부위에 혼입시키는 단계;
  - [0154] (e) 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 분리하는 단계; 및

- [0155] (f) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하거나, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하거나, 또는 DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치 및 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하고 양을 정량화하는 것을 둘 다 하며, 이에 의해 대상체에 대한 유전자 프로파일을 생성하는 단계.
- [0156] 실시양태 35. 실시양태 34에 있어서, DNA 샘플이 단계 (c)에서 한 번에 하나의 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션되는 것인 방법.
- [0157] 실시양태 36. 실시양태 34에 있어서, DNA 샘플이 단계 (c)에서 다중 부분으로 분할되고, 각각의 부분이 상이한 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션되는 것인 방법.
- [0158] 실시양태 37. 실시양태 34 내지 36 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 향후 시점에 대상체로부터의 DNA 샘플에 대해 방법을 수행하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0159] 실시양태 38. 하기 단계를 포함하는, DNA를 함유하는 생물학적 샘플의 환경 노출 시간을 결정하는 방법:
- [0160] (a) 환경 조건에 노출된 DNA 샘플을 제공하는 단계;
- [0161] (b) DNA 샘플 내의 DNA를 단편화하여, 단편화된 DNA를 생성하는 단계;
- [0162] (c) 단편화된 DNA를 DNA 폴리머라제 및 AP 부위에 대항하는 뉴클레오티드에 상보적인 표지화된 뉴클레오티드로 처리하며, 이에 의해 표지화된 뉴클레오티드를 단편화된 DNA 내의 AP 부위에 혼입시키는 단계;
- [0163] (d) 표지화된 뉴클레오티드를 함유하는 단편화된 DNA를 단리하는 단계; 및
- [0164] (e) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치를 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 위치를 검출하거나, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 양을 결정하기 위해 단편화된 DNA 내의 표지화된 뉴클레오티드의 양을 정량화하거나, 또는 이들 둘 다를 하는 단계; 및
- [0165] (f) DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 위치, 양 또는 이들 둘 다를 환경 조건에 노출되었으며, 각각 상이한 길이의 시간 동안 환경 조건에 노출된 복수의 참조 샘플과 비교하며, 여기서 DNA 샘플의 환경 노출 시간은 DNA 샘플과 비교 시 변형된 뉴클레오티드의 가장 유사한 위치, 양 또는 이들 둘 다를 갖는 참조 샘플에 의해 결정되는 것인 단계.
- [0166] II. 키트
- [0167] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 방법을 수행하기 위한 시약을 포함하는 키트가 제공된다. 다양한 효소가 키트에 포함될 수 있다. 일부 경우에, 키트는 하나 이상의 DNA 글리코실라제를 포함한다. 각각의 DNA 글리코실라제는 하나 이상의 상이한 종류의 변형된 염기 또는 1종 이상의 유형의 염기 변형에 대한 특이성을 가질 수 있다. 일부 경우에, 키트는 또한 AP 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 경우에, 키트는 또한 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성 및 가닥 치환 활성이 결여된 DNA 폴리머라제를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 키트는 또한 DNA 리가제를 포함할 수 있다.
- [0168] 일부 경우에, 키트는 하나 이상의 표지화된 뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있거나, 또는 대안적으로, 표지 및 뉴클레오티드에 표지를 첨가하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 키트에 포함된 표지화된 뉴클레오티드는 표지화된 dATP, dUTP, dTTP, dCTP, dGTP 및 그의 유용한 변형물을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 단지 절제될 변형된 염기에 대항하는 혼입 염기에 상보적인 표지화된 뉴클레오티드만이 키트에 포함될 수 있으며; 즉 키트는 특정한 변형된 염기의 검출을 위해 설계될 수 있다. 일부 경우에, 키트는 또한 하나 이상의 정규 (비표지화된) 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0169] 일부 경우에, 키트는 주어진 DNA 글리코실라제를 사용하여 검출될 수 있는 변형된 염기의 유형을 변경하는데 유용한 효소 및 시약을 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는, 전형적으로 인식하고 절제할 DNA 글리코실라제에 의해 더 이상 인식되지 않고 절제되지 않도록 염기를 변경하는 변형 효소를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 키트는, 전형적으로 인식하지 못하고 절제하지 않을 DNA 글리코실라제에 의해 인식되고 절제되도록 염기를 변경하는 변형 효소를 포함할 수 있다. 한 예에서, 티민 DNA 글리코실라제 (TDG)와 함께 사용하기에 유용할 수 있는 효소 및 시약은 TET 효소, β-글루코실트랜스퍼라제 및 글루코스 또는 그의 일부 조합을 포함한다.
- [0170] 일부 경우에, 키트는 방법의 절제 또는 표지화 단계를 수행하기 위한 하나 이상의 완충제 및/또는 반응 성분을

포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 하나 이상의 DNA 글리코실라제 완충제, 리가제 완충제, DNA 폴리머라제 완충제 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 키트는 또한 시약 예컨대 염, 양이온 또는 디터전트를 포함할 수 있다.

[0171] 일부 경우에, 키트는 DNA 샘플의 단편화를 위한 시약 및 지침서를 포함한다. 예를 들어, 키트는 DNA를 단편화하기 위한 하나 이상의 효소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 DNase I, 말토스 결합 단백질-T7 Endo I 및 비특이적 뉴클레아제 예컨대 비브리오 불니피쿠스 뉴클레아제 (Vvn), 또는 NEB넥스트® dsDNA 프래그멘타제® 중 임의의 것을 포함할 수 있다.

[0172] 일부 경우에, 키트는 하나 이상의 변형된 염기 (예를 들어, 상이한 유형의 변형된 염기, 상이한 염기 변형 또는 이들 둘 다)를 함유하는 대조 DNA 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있다. 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 기지의 농도로 제공되며, DNA 분자 또는 농도당 기지의 양의 변형된 염기를 가질 수 있다. 일부 경우에, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드의 크기는 특정한 크기 범위에 있을 수 있다. 일부 경우에, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 약 25-100 bp, 약 25-150 bp, 약 50-200 bp, 약 25-200 bp, 약 50-250 bp, 약 25-250 bp, 약 50-300 bp, 약 25-300 bp, 약 50-500 bp, 약 25-500 bp, 약 150-250 bp, 약 100-500 bp, 약 200-800 bp, 약 500-1300 bp, 약 750-2500 bp, 약 1000-2800 bp, 약 500-3000 bp, 약 800-5000 bp의 범위에 있을 수 있다. 예를 들어, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 25-100 bp, 25-150 bp, 50-200 bp, 25-200 bp, 50-250 bp, 25-250 bp, 50-300 bp, 25-300 bp, 50-500 bp, 25-500 bp, 150-250 bp, 100-500 bp, 200-800 bp, 500-1300 bp, 750-2500 bp, 1000-2800 bp, 500-3000 bp, 800-5000 bp의 범위에 있을 수 있다. 예를 들어, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 약 50-250 bp일 수 있다. 한 예에서, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드의 크기는 50-250 bp의 범위에 있을 수 있다. 일부 경우에, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 임의의 언급된 범위보다 약 25 bp만큼 더 크거나 또는 더 작을 수 있다. 일부 경우에, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 키트를 사용하여 분석될 DNA 분자와 동일한 대략적인 크기 범위에 있을 수 있다. 일부 경우에, 기재된 염기 절제 및 표지화 반응은 DNA 샘플 및 대조 DNA 올리고뉴클레오티드에 대해 병렬 수행될 수 있다. 대조 DNA 올리고뉴클레오티드의 표지화 양의 분석은 DNA 샘플에 혼입된 표지의 양, 및 따라서 샘플 내의 특정한 변형된 염기의 양을 정량화하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 복수의 양의 대조 DNA 올리고뉴클레오티드에 혼입된 표지화에 기반하여 표준 곡선을 생성할 수 있고, DNA 샘플에 혼입된 표지화의 양을 표준 곡선과 비교하여 DNA 샘플에 존재하는 변형된 염기의 양을 결정할 수 있다. 또 다른 예에서, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 정량화를 위해 기지의 양으로 단리된 표지화된 DNA와 조합될 수 있다 (스파이크 인). 일부 경우에, 키트는 대조 DNA 올리고뉴클레오티드의 복수의 분취물을 포함할 수 있으며, 각각의 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 기지의 양의 상이한 변형된 염기를 갖는다.

[0173] 일부 경우에, 키트는 지침서를 추가로 포함할 수 있다. 지침서는 기재된 방법의 DNA 단리 단계, DNA 단편화 단계, 절제 단계, 기재된 방법의 표지화 단계, 또는 기재된 방법의 표지화된 DNA 단리 단계 중 하나 이상을 수행하는 방법을 명시할 수 있다. DNA 샘플에 혼입된 표지의 양을 정량화하기 위해 대조 DNA 올리고뉴클레오티드를 사용하는 방법을 기재하는 지침서가 키트에 포함될 수 있다.

[0174] 비제한적 실시양태는 하기를 포함한다:

[0175] 실시양태 39. 하기를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 검출을 위한 키트: DNA 글리코실라제, AP 엔도뉴클레아제, 교정 및 가닥 치환 활성이 결여된 DNA 폴리머라제 또는 DNA 리가제 중 적어도 하나로부터 선택된 효소; 및 적어도 1종의 종류의 표지화된 뉴클레오티드.

[0176] 실시양태 40. 실시양태 39에 있어서, 효소를 위한 완충제, 적어도 1종의 종류의 비표지화된 뉴클레오티드, 또는 기지의 양 또는 위치 패턴의 표지화된 뉴클레오티드를 포함하는 대조 DNA 올리고뉴클레오티드 중 하나 이상을 추가로 포함하는 키트.

[0177] III. 조성물

[0178] 또 다른 측면에서, 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는 DNA 올리고뉴클레오티드가 제공된다. 일부 경우에, DNA 올리고뉴클레오티드는 변형된 염기를 함유한다. 일부 경우에, DNA 올리고뉴클레오티드는 동일한 종류의 다중 변형된 염기를 함유한다. 일부 경우에, DNA 올리고뉴클레오티드는 적어도 2종의 상이한 유형의 변형된 염기 (예를 들어, 상이한 염기 또는 상이한 염기 변형)를 함유한다. 일부 경우에, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드의 크기는 특정한 크기 범위에 있을 수 있다. 예를 들어, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 약 25-100 bp, 약 25-150 bp, 약 50-200 bp, 약 25-200 bp, 약 50-250 bp, 약 25-250 bp, 약 50-300 bp, 약 25-300 bp, 약 50-500 bp, 약 25-500 bp, 약 150-250 bp, 약 100-500 bp, 약 200-800 bp, 약 500-1300 bp, 약 750-2500 bp, 약

1000-2800 bp, 약 500-3000 bp, 약 800-5000 bp의 범위, 또는 약 25 bp 내지 5000 bp 사이의 다른 크기 범위에 있을 수 있다. 예를 들어, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 25-100 bp, 25-150 bp, 50-200 bp, 25-200 bp, 50-250 bp, 25-250 bp, 50-300 bp, 25-300 bp, 50-500 bp, 25-500 bp, 150-250 bp, 100-500 bp, 200-800 bp, 500-1300 bp, 750-2500 bp, 1000-2800 bp, 500-3000 bp, 800-5000 bp의 범위, 또는 25 bp 내지 5000 bp 사이의 다른 크기 범위에 있을 수 있다. 예를 들어, DNA 올리고뉴클레오티드는 약 50-250 bp일 수 있다. 한 예에서, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드의 크기는 50-250 bp의 범위에 있을 수 있다. 일부 경우에, DNA 올리고뉴클레오티드는 임의의 언급된 범위보다 약 25 bp만큼 더 크거나 또는 더 작을 수 있다. 일부 경우에, DNA 올리고뉴클레오티드는 기재된 방법에서 DNA 단편에 혼입된 표지화된 뉴클레오티드의 양을 분석하는데 사용하기 위한 대조 시약으로서 유용할 수 있다. 일부 경우에, DNA 올리고뉴클레오티드는 본원에 기재된 키트에 대조 DNA 올리고뉴클레오티드로서 포함될 수 있다. 일부 경우에, DNA 올리고뉴클레오티드는 DNA 샘플 내의 변형된 염기의 정량화를 용이하게 하기 위해 대조 올리고뉴클레오티드로서 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 일부 경우에, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 기재된 키트를 사용하여 분석될 DNA 분자와 동일한 대략적인 크기 범위에 있을 수 있다. 일부 경우에, 기재된 염기 절제 및 표지화 반응은 DNA 샘플 및 대조 DNA 올리고뉴클레오티드에 대해 병렬 수행될 수 있다. 대조 DNA 올리고뉴클레오티드의 표지화 양의 분석은 DNA 샘플에 혼입된 표지의 양, 및 따라서 샘플 내의 특정한 변형된 염기의 양을 정량화하는데 사용될 수 있다. 한 예에서, 복수의 양의 대조 DNA 올리고뉴클레오티드에 혼입된 표지화에 기반하여 표준 곡선을 생성할 수 있고, DNA 샘플에 혼입된 표지화의 양을 표준 곡선과 비교하여 DNA 샘플에 존재하는 변형된 염기의 양을 결정할 수 있다. 또 다른 예에서, 대조 DNA 올리고뉴클레오티드는 정량화를 위해 기지의 양으로 단리된 표지화된 DNA와 조합될 수 있다 (스파이크 인).

- [0179] 비제한적 실시양태는 하기를 포함한다:
- [0180] 실시양태 41. 각각 기지의 양의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 복수의 올리고뉴클레오티드.
- [0181] 실시양태 42. 실시양태 41에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 부분이 기지의 양의 제2 종류의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 혼합물.
- [0182] 실시양태 43. 실시양태 41 또는 42에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 혼합물이 약 50-250개의 염기 쌍 길이의 DNA 단편을 포함하는 것인 혼합물.
- [0183] IV. 시스템 및 장치
- [0184] 또 다른 측면에서, 상기 기재된 방법을 수행하기 위한 장치 및 시스템이 제공된다.
- [0185] 장치
- [0186] 본 개시내용의 시스템은 변형된 염기에 대한 DNA 샘플의 자동화 분석을 위한 장치를 포함할 수 있다.
- [0187] 한 측면에서, 변형된 염기에 대한 DNA 샘플의 자동화 분석을 위한 분석 장치가 제공된다. 또 다른 측면에서, DNA 샘플의 분석을 위한 DNA 샘플을 수용하도록 구성된 샘플 장치가 제공된다. 한 예에서, 샘플 장치는 마이크로유체 샘플 장치일 수 있다. 예를 들어, 샘플 장치는 랩온어칩(lab-on-a chip) 마이크로유체 장치일 수 있다. 일부 경우에, 분석 장치는 하나 이상의 샘플 장치를 수용하도록 구성된다.
- [0188] 일부 경우에, 분석 장치는 하기 기재된 바와 같이, 하나 이상의 샘플 장치를 수용하기 위한 리셉터클을 포함할 수 있다.
- [0189] 일부 경우에, 분석 장치는 디스플레이를 포함할 수 있다. 디스플레이는 하나 이상의 그래픽 객체를 출력하도록 구성될 수 있다. 일부 경우에, 디스플레이는 터치-스크린 디스플레이를 포함할 수 있다. 터치-스크린 디스플레이는 터치-스크린 디스플레이와의 사용자 대화를 감지하고, 하나 이상의 연관된 센서 신호를 프로세서 (예를 들어, 분석 장치 내부)로 전송하도록 구성될 수 있다. 센서 신호는 사용자 대화와 연관된 데이터, 예컨대 사용자 대화의 위치, 방향 및/또는 압력을 포함할 수 있다.
- [0190] 분석 장치는 추가적으로 또는 대안적으로 사용자 입력 장치를 포함할 수 있다. 사용자 입력 장치는 터치-스크린 디스플레이; 터치 패드; 키패드; 하나 이상의 버튼, 노브 또는 스위치; 또는 임의의 이러한 사용자 입력 장치의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 사용자 입력 장치는 사용자 입력을 수신하고, 연관된 센서 신호를 프로세서로 전송하도록 구성될 수 있다.
- [0191] 일부 경우에, 분석 장치는 컴퓨팅 장치를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 컴퓨팅 장치는 메모리 및 프로세서를 포함할 수 있다. 메모리는 임의의 적합한, 유형의 (및 비-일과성) 컴퓨터-관독가능 매체 예컨대 RAM,

ROM, EEPROM 등을 포함할 수 있으며, 분석 장치의 운영을 구성하는 프로그램 구성요소를 구현할 수 있다. 일부 경우에, 메모리는 프로세서가 하나 이상의 기능을 실행하게 하도록 구성된 소프트웨어 명령을 포함할 수 있다. 예를 들어, 소프트웨어 명령은 프로세서가 특정한 시점에 분석 장치 내에 위치하는 샘플 장치의 하나 이상의 챔버 또는 구획으로의 시약의 주입을 조정하게 하도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 소프트웨어 명령은 분석 장치 내에 함유된 하나 이상의 샘플 장치에 시약의 시간 설정된 및/또는 순차적인 첨가를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 소프트웨어 명령은 분석 장치 내에 함유된 하나 이상의 샘플 장치에 대한 시간 설정된 및/또는 순차적인 물리적, 기계적 또는 전기화학적 조정을 유발할 수 있다. 일부 경우에, 메모리는 본 개시내용 전반에 걸쳐 기재된 임의의 방법을 수행하도록 구성된 소프트웨어 명령을 포함할 수 있다.

[0192] 일부 경우에, 분석 장치는 네트워크 인터페이스를 포함할 수 있다. 네트워크 인터페이스는 네트워크 연결을 용이하게 하거나 또는 달리 장치 사이의 통신을 용이하게 하는 임의의 구성요소를 포함할 수 있다. 예는 유선 인터페이스 예컨대 이더넷, USB, IEEE 1394, 및/또는 무선 인터페이스 예컨대 IEEE 802.11, 블루투스, 근거리 통신 (NFC) 인터페이스, RFID 인터페이스, 또는 휴대 전화 네트워크에 접속하기 위한 라디오 인터페이스 (예를 들어, CDMA, GSM, UMTS 또는 다른 이동 통신 네트워크에 접속하기 위한 트랜스미터/안테나)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 분석 장치는 원격 장치에 DNA 샘플에 대한 정보를 수신 또는 전송하기 위해 네트워크 인터페이스를 사용할 수 있다.

[0193] 일부 경우에, 분석 장치는 기재된 방법의 하나 이상의 단계가 수행되는 샘플 장치를 수용하도록 구성된다.

[0194] 한 측면에서, 기재된 방법의 하나 이상의 단계가 수행될 수 있는 샘플 장치가 제공된다. 예시적인 샘플 장치도 7에 제시되어 있으며, 이는 제1 고체 표면, 제1 고체 표면과 접촉 상태의 제2 고체 표면, 유입구, 제1 챔버, 제2 챔버, 제3 챔버, 유출구, 완충제 구획, 유출구, 및 다양한 구성요소를 서로 연결하는 복수의 채널을 포함한다. 샘플 장치는 샘플 DNA가 도입되는 유입구를 가질 수 있다.

[0195] 일부 경우에, 샘플 장치는 제1 고체 표면, 및 제1 고체 표면과 접촉 상태의 제2 고체 표면을 포함한다. 제1 및 제2 고체 표면은 다양한 기하학적 형상 예컨대, 예를 들어, 정사각형 형상, 직사각형 형상, 원형 형상, 타원형 형상, 삼각형 형상 또는 일부 다른 형상을 가질 수 있다. 일부 경우에, 고체 기관의 형상은 다양할 수 있다. 예를 들어, 고체 표면의 한 부분은 직사각형일 수 있고, 또 다른 부분은 상이한 형상을 가질 수 있다. 샘플 장치는 서로 동일한 형상 또는 상이한 형상인, 제1 및 제2 고체 기관을 포함할 수 있다. 고체 기관의 치수는 샘플 장치의 목적하는 전체 구성에 의해 결정될 수 있다. 일부 경우에, 제1 및 제2 고체 표면은 실질적으로 동일한 치수를 가질 수 있다.

[0196] 일부 경우에, 유입구는 제1 고체 표면, 제2 고체 표면, 또는 제1 및 제2 고체 표면 사이의 접합부에 형성된다. 샘플 장치는 복수의 챔버 및 채널을 추가로 포함할 수 있다. 샘플 장치는 기재된 방법의 단계를 수행하기 위한 1종 이상의 시약을 함유하는 복수의 챔버를 가질 수 있다. 챔버 및 채널은 모두 제1 고체 표면 또는 제2 고체 표면에 형성될 수 있거나, 또는 일부 챔버 및 채널은 제1 고체 표면에 형성될 수 있고, 다른 챔버 및 채널은 제2 고체 표면에 형성될 수 있다.

[0197] 한 예에서, 제1 챔버(1)는 동결건조된 DNA 글리코실라제를 함유할 수 있다. DNA 샘플은 제1 채널을 통해 유입구로부터 제1 챔버로 이동하고, 그 챔버에서 인큐베이션되어 DNA 글리코실라제가 관심대상의 변형된 뉴클레오티드를 절제하도록 할 수 있다. 챔버(1)는 AP 엔도뉴클레아제를 추가로 함유할 수 있다. 대안적으로, 샘플 장치는 동결건조된 AP 엔도뉴클레아제를 함유하는 개별 챔버 (제시되지 않음)를 포함할 수 있다. DNA 샘플은 측면 채널을 통해 제1 챔버로부터 AP 엔도뉴클레아제 챔버로 이동하고, 그 챔버에서 인큐베이션되어 엔도뉴클레아제가 DNA 샘플 내의 AP 부위의 위치에서 겹을 생성하도록 할 수 있다.

[0198] 일부 경우에, 샘플 장치는 DNA 샘플에 대한 친화성 성분을 함유하는 제2 챔버(2)를 추가로 포함할 수 있다. DNA 샘플은 제2 채널을 통해 제1 챔버 또는 AP 엔도뉴클레아제 챔버로부터 제2 챔버로 이동할 수 있다. 제2 챔버는 DNA 샘플이 결합하는 친화성 성분, 예컨대 실리카 비드 또는 이온 교환 비드를 함유할 수 있다. 샘플 장치는 또한 제2 챔버를 세척 완충제 구획 및/또는 용리 완충제 구획에 연결하는 채널을 포함할 수 있다. 친화성 성분에 결합된 DNA 샘플은 세척 완충제 구획으로부터 제2 챔버에 도입된 세척 완충제에 의해 세척되며, 용리 완충제 구획으로부터 제2 챔버에 도입된 용리 완충제에 의해 친화성 성분으로부터 용리될 수 있다. 일부 경우에, 세척 완충제 구획 및/또는 용리 완충제 구획을 제2 챔버에 연결하는 채널은 제2 챔버로의 완충제의 제어된 도입을 가능하게 하는 밸브 (회색 X 표시 정사각형)를 가질 수 있다.

[0199] 일부 경우에, 용리된 DNA 샘플은 제3 채널을 통해 제2 챔버로부터 제3 챔버로 이동할 수 있다. 제3 채널은 동

결건조된 DNA 폴리머라제 및 표지화된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 일부 경우에, DNA 샘플은 제3 챔버에서 유지되어, DNA 샘플에 존재하는 갭으로 표지 뉴클레오티드의 혼입을 가능하게 한다. 일부 경우에, 표지화된 DNA 샘플은 이어서 유출구를 통해 샘플 장치로부터 배출될 수 있다.

- [0200] 다른 경우에, 샘플 장치는 정제 채널 (제시되지 않음)을 통해 제3 챔버에 연결된 정제 챔버 (제시되지 않음)를 추가로 포함할 수 있다. 정제 챔버는 제2 챔버와 유사하게 구성될 수 있다. 정제 챔버는 표지화된 DNA 샘플이 결합하는 친화성 성분을 함유할 수 있고, 측면 채널을 통해 세척 완충제 구획 및/또는 용리 완충제 구획에 연결될 수 있다. 친화성 성분에 결합된 DNA 샘플은 세척 완충제 구획으로부터 제2 챔버에 도입된 세척 완충제에 의해 세척되며, 용리 완충제 구획으로부터 제2 챔버에 도입된 용리 완충제에 의해 친화성 성분으로부터 용리될 수 있다. 일부 경우에, 세척 완충제 구획 및/또는 용리 완충제 구획을 제2 챔버에 연결하는 채널은 제2 챔버로의 완충제의 제어된 도입을 가능하게 하는 밸브 (회색 X 표시 정사각형)를 가질 수 있다. 예를 들어, 표지가 비오틴인 경우에, 정제 채널은 스트렙타비딘-코팅 비드를 함유할 수 있고, 용리 완충제는 스트렙타비딘-코팅 비드로부터 비오틴-표지화된 DNA 샘플의 용리를 촉진하도록 제형화될 수 있다. 일부 경우에, 표지화된 DNA 샘플은 이어서 유출구를 통해 샘플 장치로부터 배출될 수 있다.
- [0201] 일부 경우에, 샘플 장치는 검출 채널 (제시되지 않음)을 통해 제3 챔버 (또는 이전 단락에서 언급된 정제 챔버)에 연결된 검출 챔버 (제시되지 않음)를 추가로 포함할 수 있다. 검출 챔버는 DNA 샘플에 혼입된 표지의 검출을 위한 시약을 함유하도록 구성될 수 있다. 검출 챔버는 DNA 샘플 내에 혼입된 하나 이상의 표지의 양의 정량화를 가능하게 하도록 구성될 수 있다.
- [0202] 일부 경우에, 샘플 장치는 다른 효소적 반응이 발생할 수 있는 챔버를 포함하는 다른 구성을 가질 수 있다. 예를 들어, 샘플 장치는 상이한 DNA 글리코실라제를 각각 함유하는 복수의 챔버를 포함할 수 있다. 샘플 장치는 샘플을 개별 부분으로 분할할 수 있거나, 또는 동시에 DNA 샘플을 복수의 DNA 글리코실라제와 함께 인큐베이션하는 것을 가능하게 하기 위해, 복수의 유입구를 가질 수 있다. 또 다른 예에서, 샘플 장치는 DNA 샘플이 하나의 챔버로부터 또 다른 챔버로 순차적으로 이동하도록 샘플 장치 내에 배열된, 상이한 DNA 글리코실라제를 각각 함유하는 복수의 챔버를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 샘플이 다음 챔버로 이동하기 전에 선행 챔버로부터의 DNA 샘플의 세척 및 시약의 제거를 가능하게 하는, 추가의 친화성 챔버, 세척 완충제 구획 및 용리 완충제 구성 요소가 포함된다. 또 다른 예에서, 샘플 장치는 상기 기재된 바와 같이 DNA 글리코실라제에 의해 검출되는 변형된 염기를 변형시키기 위한 효소 및 시약을 함유하는 챔버를 함유할 수 있다. 일부 경우에, 샘플 장치의 다양한 챔버 및 구획은 채널을 통해 연결된다. 일부 경우에, 채널은 하나의 챔버 또는 구획 내의 유체의 또 다른 챔버 또는 구획으로의 접근을 제어하는 밸브를 함유한다.
- [0203] 일부 경우에, 샘플 장치는 샘플 장치의 식별을 용이하게 하는 식별 구성요소를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 식별 구성요소는 샘플 장치 내에 함유된 DNA 샘플에 대한 정보를 포함할 수 있다. 예를 들어, 식별 구성요소는 DNA 샘플과 연관될 수 있는 고유한 일련 번호일 수 있다. 또 다른 예에서, 식별 구성요소는 사용자가 DNA 샘플 또는 그에 대해 수행될 방법에 대한 정보를 기록할 수 있는 샘플 장치 상의 위치이다. 또 다른 예에서, 식별 구성요소는 정보 예컨대, 비제한적으로, DNA 샘플 공급원의 정체, DNA 샘플에 대한 다른 정보 및 DNA 샘플에 대해 수행될 방법이 저장될 수 있는 메모리 구성요소 또는 메모리 장치일 수 있다.
- [0204] 일부 경우에, 기재된 샘플 장치는 다양한 물질로부터 제조될 수 있다. 일반적으로, 물질은 핵산에 대해 비-반응성이며, 핵산, 단백질, 뉴클레오티드, 또는 표지화된 뉴클레오티드를 위해 사용된 표지와 실질적으로 결합하지 않는다. 예시적인 물질은 폴리에틸렌 글리콜, POP-6™ 중합체 (라이프 테크놀로지스, 인크.(Life Technologies, Inc.)) 또는 다른 차단 층으로 관능화 (코팅)된 폴리프로필렌, 실리콘화 폴리프로필렌 및 유리 및 폴리디메틸실록산을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0205] 비제한적 실시양태는 하기를 포함한다:
- [0206] 실시양태 44. 하기를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 검출을 위한 샘플 장치:
- [0207] 고체 표면;
- [0208] 제1 고체 표면과 접촉 상태의 제2 고체 표면;
- [0209] 유입구; 및
- [0210] 유입구에 연결되며, (i) 염기 절제 반응, (ii) DNA 표지화 반응, (iii) 표지화된 DNA의 단리, 또는 (iv) 적어도 하나의 DNA 검출, 정량화 또는 서열분석 중 적어도 하나를 수행하도록 구성된 적어도 하나의 챔버.

- [0211] 시스템
- [0212] 한 측면에서, DNA 샘플 내의 변형된 염기의 존재를 평가하는데 유용한 시스템이 제공된다. 시스템은 다양한 구성요소를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "구성요소"는 광범위하게 정의되며, 열거된 방법을 수행하기에 적합한 임의의 적합한 장치 또는 장치의 집합을 포함한다. 구성요소가 임의의 특정한 방식으로 서로에 대해 일체형으로 연결 또는 위치될 필요는 없다. 실시양태는 서로에 대한 구성요소의 임의의 적합한 배열을 포함한다. 예를 들어, 구성요소는 동일한 공간에 있을 필요는 없다. 그러나 일부 경우에, 구성요소는 일체형 유닛으로 서로 연결된다. 일부 경우에, 동일한 구성요소는 다중 기능을 수행할 수 있다.
- [0213] 시스템은 본원에 기재된 바와 같은 분석 장치를 포함할 수 있다. 시스템은 시스템의 다양한 구성요소가 분석 장치로부터의 정보를 전송 또는 수신하도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 시스템은 분석 장치로부터의 정보를, 사용자 입력 장치 예컨대, 예를 들어, 터치-스크린 디스플레이로부터 수신된 대로 수신하도록 구성될 수 있다. 시스템은, 예컨대 프로세서를 통해, 분석 장치, 예컨대, 예를 들어, 사용자 입력 장치로부터 전송된 하나 이상의 연관된 센서 신호를 수신하도록 구성될 수 있다. 시스템은 분석 장치의 프로세서가 시스템의 다른 구성요소로부터의 정보를 전송 및/또는 수신하도록 구성될 수 있다.
- [0214] 시스템은 또한 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 샘플 장치를 포함할 수 있다. 시스템은 시스템이 하나의 샘플 장치를 또 다른 것과 구별할 수 있도록 하기 위해, 샘플 장치의 하나 이상의 식별 구성요소를 감지하도록 구성될 수 있다.
- [0215] 시스템은 하나 이상의 컴퓨팅 장치를 포함할 수 있다. 컴퓨팅 장치의 전형적인 예는 범용 컴퓨터, 프린터, 프로그래밍된 마이크로프로세서, 마이크로컨트롤러, 주변 집적 회로 소자, 및 본 기술의 방법을 구성하는 단계를 구현할 수 있는 다른 장치 또는 장치의 배열을 포함한다.
- [0216] 컴퓨팅 장치는 메모리를 포함한다. 메모리는 임의의 접근 메모리 (RAM) 및 읽기 전용 메모리 (ROM), 뿐만 아니라 이동식 매체 장치, 메모리 카드, 플래시 카드 등을 포함할 수 있다. 컴퓨팅 장치는 저장 장치를 추가로 포함할 수 있다. 컴퓨팅 장치는 또한 프로세서를 포함한다. 프로세서는 입력 데이터를 프로세싱하기 위해, 하나 이상의 저장 소자 (예를 들어, 메모리 또는 저장 장치)에 저장된 일련의 명령을 실행한다. 일부 실시양태에서, 컴퓨팅 장치는 단일 프로세서를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 컴퓨팅 장치는 2개 이상의 프로세서를 포함한다. 저장 소자는 또한 목적하는 경우에 데이터 또는 다른 정보를 보유할 수 있다. 저장 소자는 프로세싱 기계에 존재하는 정보 발생원 또는 물리 메모리 소자의 형태일 수 있다.
- [0217] 컴퓨팅 장치는 전형적으로 그 컴퓨팅 장치의 전반적 관리 및 운영에 대한 실행가능한 프로그램 명령을 제공하는 운영 시스템을 포함할 것이며, 전형적으로 명령을 저장하는 컴퓨터-관독가능 저장 매체 (예를 들어, 하드 디스크, 임의의 접근 메모리, 읽기 전용 메모리 등)를 포함할 것이고, 이는 프로세서에 의해 실행될 때, 컴퓨팅 장치가 그의 의도된 기능을 수행하도록 한다. 컴퓨팅 장치의 운영 시스템 및 전반적 기능을 위한 적합한 구현은 공지되어 있거나 또는 상업적으로 입수가 가능하고, 특히 본원의 개시내용을 고려하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 구현된다.
- [0218] 프로세서는 통신 버스에 연결된다. 통신 버스는 하나 이상의 다른 구성요소, 예를 들어 프로세서, 입력 장치 (예를 들어, 마우스, 키보드, 컨트롤러, 터치 스크린 또는 키패드) 및 출력 장치 (예를 들어, 디스플레이, 프린터 또는 스피커)에 연결될 수 있다. 통신 버스는 또한 분석 장치에 연결될 수 있다.
- [0219] 컴퓨팅 장치는 또한 네트워크 구성요소를 포함할 수 있다. 네트워크 구성요소는 컴퓨팅 장치가 I/O 인터페이스를 통해 하나 이상의 네트워크 및/또는 다른 데이터베이스 (예를 들어, 데이터베이스)에 연결되도록 한다. 네트워크 구성요소는 네트워크 인터페이스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 네트워크 인터페이스는 유선 또는 무선 통신 링크를 통해 통신하도록 구성된다.
- [0220] 컴퓨팅 장치는 또한 컴퓨터-관독가능 저장 매체 관독기를 포함한다. 컴퓨터-관독가능 저장 매체 관독기는 컴퓨터-관독가능 정보를 일시적으로 및/또는 보다 영구적으로 함유, 저장, 전송 및 검색하기 위한 저장 매체 뿐만 아니라, 원격, 로컬, 고정식 및/또는 이동식 저장 장치를 나타내는 컴퓨터-관독가능 저장 매체와 연결되거나 또는 그를 수용하도록 구성될 수 있다. 시스템 및 다양한 장치는 또한 전형적으로 운영 시스템 및 어플리케이션 프로그램, 예컨대 클라이언트 어플리케이션 또는 웹 브라우저를 포함한, 적어도 하나의 작업 메모리 장치 내에 위치하는 다수의 소프트웨어 어플리케이션, 모듈, 서비스 또는 다른 소자를 포함할 것이다. 대안적 실시양태가 상기 기재된 것의 수많은 변형을 가질 수 있다는 것을 인지하여야 한다. 코드 또는 코드의 부분을 함유하기 위한 저장 매체 및 컴퓨터 관독가능 매체는 관련 기술분야에서 공지되었거나 또는 사용되는 임의의 적절한 매체를

포함할 수 있다.

- [0221] 일부 실시양태에서, 시스템은 하나 이상의 어플리케이션을 실행할 수 있다. 하나 이상의 어플리케이션은 상기 기재된 바와 같은, 임의의 수의 컴퓨팅 장치 상에서 실행될 수 있다. 예를 들어, 시스템은 분석 장치를 위한 프로토콜을 활성화하도록 구성된 어플리케이션을 실행할 수 있다. 이러한 프로토콜은 시약의 시간 설정된, 순차적 첨가, 또는 분석 장치 내에 함유된 하나 이상의 샘플 장치에 대한 조정을 포함할 수 있다. 시스템은 또한 데이터베이스에 정의하도록 구성된 어플리케이션을 실행할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시스템은 시험 결과 보고를 전송할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시스템은 시험 보고를 컴퓨팅 장치로 전송할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시스템은 시험 결과 보고를 1명 이상의 수신자에게 전송할 수 있다. 일부 실시양태에서, 수신자는 대상체 또는 건강관리 제공자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 시스템은 이메일 (예를 들어, 대상체의 건강관리 제공자와 연계된 이메일 계정), SMS 또는 문자 메시지를 통해 시험 결과 보고를 전송할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시스템은 시험 결과 보고를 데이터베이스에 저장할 수 있다. 추가로, 시스템은 컴퓨팅 장치에 전자 통지를 제공할 수 있다. 컴퓨팅 장치는 대상체와 연계될 수 있는, 건강관리 제공자와 연계될 수 있다. 일부 실시양태에서, 전자 통지는 이메일, 문자 메시지 또는 푸시 통지를 포함할 수 있다. 전자 통지는 시험 보고가, 예를 들어, 데이터베이스로부터의 다운로드를 위해 이용가능하다는 것을 나타낼 수 있다.
- [0222] 비제한적 실시양태는 하기를 포함한다:
- [0223] 실시양태 45. 하기를 포함하는, DNA 샘플 내의 변형된 뉴클레오티드의 검출을 위한 분석 장치:
- [0224] 실시양태 44에 따른 하나 이상의 샘플 장치를 수용하도록 구성된 리셉터클; 및
- [0225] 사용자 입력 장치; 및
- [0226] 메모리 및 프로세서를 포함하며, 상기 메모리는 상기 프로세서가 (i) 염기 절제 반응, (ii) DNA 표지화 반응, (iii) 표지화된 DNA의 단리, 또는 (iv) 적어도 하나의 DNA 검출, 정량화 또는 서열분석 중 적어도 하나를 수행하는 하나 이상의 기능을 실행하게 하도록 구성된 소프트웨어 명령을 포함하는 것인 컴퓨팅 장치.
- [0227] 실시예
- [0228] 하기 실시예는 청구된 발명을 제한하기 위해서가 아니라, 예시하기 위해 제공된다.
- [0229] 실시예 1
- [0230] 유전자 서열에서 메틸화 또는 손상된 뉴클레오티드 염기를 표지화하는데 유용한 DNA 폴리머라제 특성을 확인하는 연구를 수행하였다. 표지화 반응이 3'→5' 교정 엑소뉴클레아제 활성이 결여된 DNA 폴리머라제를 사용함으로써 개선될 수 있는지 여부가 특정한 관심대상이었다. 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성이 혼입된 표지화된 염기의 절제를 유발할 수 있으며, 이는 표지화 반응의 효율을 감소시킬 것이라고 가설화하였다. 이러한 엑소뉴클레아제 활성은 또한 절제된 염기로부터 5' 방향으로 추가의 뉴클레오티드 염기의 절제를 유발할 수 있었다. 폴리머라제가 단지 하나의 (비오틴-접합된) 뉴클레오티드와 함께 공급되기 때문에, 이는 폴리머라제가 (i) 표적으로부터의 염기 5'에서 영구적으로 증지되어, 어떠한 표지 혼입도 유발하지 않거나, 또는 (ii) 표지화된 변형된 염기로부터의 부위 5'에서 표지화된 뉴클레오티드를 혼입시켜, 갭을 남겨두고 변형된 염기의 위치를 잘못 확인하도록 할 가능성이 가장 크다. 그러므로, 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여된 DNA 폴리머라제를 사용하는 것이 표지화 반응의 효율을 증가시키는 것으로 제안되었다. 이 가설을 시험하기 위해, 야생형 T4 DNA 폴리머라제 (WT T4 pol; 뉴잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))와 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여된, 돌연변이된 T4 DNA 폴리머라제 (T4 pol exo<sup>-</sup>; 루시젠, 1 U/20 pmol DNA)를 비교하는 실험을 수행하였다.
- [0231] 40개 염기 쌍의 상보적 DNA 분자 2개를 인티그레이티드 DNA 테크놀로지(Integrated DNA Technologies)에 주문하였고, 이들을 1:1 비로 함께 혼합하고, 95°C로 가열하고, ~ 1시간에 걸쳐 서서히 냉각시킴으로써 함께 어닐링하여, 도 1에 개략적으로 제시된 바와 같은 이중-가닥 DNA 구축물을 형성하였다. DNA 구축물의 하나의 가닥은 염기 위치 34에서 3' 플루오레세인 아마다이트 (FAM) 표지 및 우라실을 함유하였다. 다른 우라실 염기는 구축물에 존재하지 않았다.
- [0232] 제1 단계에서, DNA 구축물 ~4 µg을 50 mM 트리스-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 및 1 mM DTT를 함유하는 완충제 (총 용량 = 50 µL) 중에서 우라실 DNA 글리코실라제 (뉴잉글랜드 바이오랩스, 1 U/400 ng DNA) 및 엔도뉴클레아제 IV (뉴잉글랜드 바이오랩스, 1 U/200 ng DNA)와 함께 37°C에서 1시간 동안 공동-인큐베이션하였다. 글리코실라제는 구축물로부터 우라실 염기를 절단함으로써 무염기성 부위를 생성하였고, 엔도뉴클레아제는 상기

부위에 대해 3'와 5' 둘 다를 절단하여, 전장 40개 염기 쌍의 상보 가닥 (각각의 영상에서 레인 1)에 어닐링된 33개 염기 쌍 가닥 및 6개 염기 쌍 단편을 생성하였다. 생성된 DNA를 상업용 키트 (퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 정제하였다.

[0233] 제2 단계에서, 정제된 DNA 구축물을 10 mM 트리스-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl 및 1 mM DTT를 함유하는 완충제 중에서 비오틴화된 dUTP (라이프 테크놀로지스, 15 pmol) 및 T4 pol<sup>-</sup> 또는 WT T4 pol (20 U/pmol DNA) 중 어느 하나로 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. 이 단계에서, DNA 폴리머라제는 상보적 가닥 내의 아데닌 염기에 대항하는 FAM-표지화된 가닥으로 비오틴화된 dUTP를 혼입시킬 것이다.

[0234] 최종 반응 생성물을 변성화 서열분석 겔에서 전개시키고 (16% 겔 매트릭스, 0.09% APS, 0.06% TEMED, 3X TBE 중에서 전개), 520 nm에서 영상화하여 FAM 방출을 검출하였다. 예시적인 겔 영상이 도 2에 제시되어 있다. 단지 3' FAM 표지를 함유하는 생성물만이 검출가능하였다. 각각의 레인은 대략 40 ng의 총 DNA를 함유하였다.

[0235] 각각의 겔 영상의 좌측 레인은 상기 기재된 제1 단계 후의 중간체 반응 생성물을 제시한다. 겔은 둘 다 33개 뉴클레오티드 FAM-표지화된 분자를 제시한다. 각각의 겔 영상의 우측 레인은 상기 기재된 제2 단계 후의 최종 반응 생성물을 제시한다.

[0236] WT T4 pol을 사용한 반응은 단일 비오틴화된 dUTP가 절제된 우라실 염기의 위치에서 혼입된 목적하는 34개 뉴클레오티드 생성물을 생성할 뿐만 아니라, 또한 WT T4 pol의 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성에 의해 FAM-표지화된 가닥으로부터 뉴클레오티드가 절단되어 발생하는 여러 분해 생성물을 생성한다. 어떠한 특정한 이론에 얽매이지는 않지만, 원치 않는 이들 표지화된 생성물은 상보적 가닥의 아데닌 염기의 위치에서의 중지된 연장 및 비오틴화된 우라실의 오토허입을 둘 다 포함하는 것으로 제안된다. 그 결과, 목적하는 34개 뉴클레오티드 밴드의 총 수율이 최대라 해도 총 DNA의 20-25%였다.

[0237] 대조적으로, T4 pol<sup>-</sup>를 사용한 반응은 단일 비오틴화된 dUTP가 절제된 우라실 염기의 위치에서 혼입된 목적하는 34개 뉴클레오티드 생성물을 주로, 약 89%의 총 수율로 생성하였다.

[0238] 이 연구로부터의 결론은 표지화 반응의 효율 및 정확도가 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여된 DNA 폴리머라제를 사용함으로써 실질적으로 증가되었다는 것이다.

[0239] 실시예 2

[0240] 유전자 서열에서 메틸화 또는 손상된 뉴클레오티드 염기를 표지화하는데 유용한 DNA 폴리머라제 농도를 확인하는 연구를 수행하였다. 표지화 반응이 DNA 폴리머라제의 이용가능성을 제한함으로써 개선될 수 있는지 여부가 특정한 관심대상이었다. 이는, 과잉의 폴리머라제 농도는 상승된 오토허입, 주형이 없는 혼입, 및 활성을 낮출 수 있는 간섭을 포함한 허위 효과를 가질 수 있는 반면, 너무 제한된 이용가능성은 저수율 (즉, 많은 비표지화된 DNA)을 유발할 수 있기 때문이다. 이 가설을 시험하기 위해, 다양한 DNA 폴리머라제 농도를 평가하는 적정 실험을 수행하였다.

[0241] 실시예 1에 기재된 것과 동일한 DNA 구축물을 이 연구에서 사용하였다. 우라실 염기의 절제도 또한 DNA 구축물 총 약 50 μg에 대해 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행하였다. 생성 물질을 상업용 키트 (퀴아젠)를 사용하여 정제하고, pH 8.5의 10 mM 트리스-HCl에 현탁시키고, DNA 구축물 대략 2 μg을 함유하는 13개의 분취물로 나누었다. 각각의 분취물은 15 pmol 비오틴화된 dUTP (라이프 테크놀로지스) 및 하기 표 2에 기재된 바와 같은 다양한 농도의 T4 pol<sup>-</sup> (루시젠)를 수용하였다. 반응 조건은 10 mM 트리스-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl 및 1 mM DTT를 함유하는 완충제 중에 37°C에서의 1시간이었다.

[0242] 표 2. 표지화 반응에서의 DNA 폴리머라제 적정.

레인	DNA pol / DNA 구축물 (U/mol)	DNA pol 희석	DNA pol (mU)
1	--	--	--
2	--	--	--
3	1 U/nmol	1X	78.5
4	500 U/pmol	1/2	39.2
5	250 U/pmol	1/4	19.6
6	125 U/pmol	1/8	9.8
7	66.7 U/pmol	1/15	5.2
8	50 U/pmol	1/20	3.9
9	33.3 U/pmol	1/30	2.6
10	20 U/pmol	1/50	1.6
11	10 U/pmol	1/100	0.78
12	5 U/pmol	1/200	0.39
13	1 U/pmol	1/500	0.16

[0243]

[0244] 변성화 서열분석 겔 (16% 겔 매트릭스, 0.09% APS, 0.06% TEMED, 3:1 1xTBE 중에서 전개)에서 FAM 표지화된 DNA에 대해 영상화하여 분석을 수행하였다. 예시적인 겔 영상이 도 3에 제시되어 있다. 각각의 레인은 20 ng의 총 DNA를 함유하였다. 레인 1은 전장 40개 뉴클레오티드의 FAM-표지화된 가닥의 이동 패턴을 제시하고; 레인 2는 우라실 절제 단계 후의 중간체 33개 뉴클레오티드의 FAM-표지화된 가닥의 이동 패턴을 제시한다.

[0245] 높은 DNA 폴리머라제 농도를 사용하여 수행된 반응은 과잉 혼입-즉, 보다 높은/큰 밴드에 의해 반영되는 바와 같이 FAM-표지화된 가닥으로의 하나 이상의 비-상보적 비오티닐화-dUTP의 혼입- 및 누락된 물질-즉, 보다 낮은/작은 밴드에 의해 반영되는 바와 같이 임의의 비오티닐화-dUTP의 첨가에 의해 연장되지 않은 FAM-표지화된 가닥을 포함한, 다양한 활성을 산출하였다. 매우 낮은 농도의 DNA 폴리머라제를 사용하여 수행된 반응은 단일 비오티닐화된 dUTP가 절제된 우라실 염기의 위치에서 혼입된 목적하는 34개 뉴클레오티드 생성물의 수율에서의 유의한 감소를 유발하였다. 최소량의 원치 않는 생성물과 함께, 목적 생성물의 최대 수율은 총 DNA 중에서 약 89%의 목적 생성물이었다. 이는 약 20 U/ pmol DNA의 DNA 폴리머라제 농도로 관찰되었다.

[0246] 이 연구로부터의 결론은 표지화 반응의 효율 및 정확도가 약 10-30 U/pmol 범위의 DNA 폴리머라제의 제한된 양을 사용함으로써 실질적으로 증가되었다는 것이다.

[0247] 실시예 3

[0248] 실시예 1 및 2에서 작업한 조건을 사용하여, 본 개시내용의 검출 방법을 우라실, 옥소구아닌 및 T:G 미스매치를 특이적으로 절제하고 표지화는데 사용하였다. 3종의 DNA 구축물을 제조하며, 각각의 구축물은 단일 우라실, 옥소구아닌 또는 T:G 미스매치를 함유하였다. 도 4a는 각각의 DNA 구축물의 이동 패턴 (각각의 겔의 좌측 레인)을 제시한다. 글리코실라제 및 엔도뉴클레아제 쌍은 하기와 같았다: (1) 우라실: UDG 및 Endo VI; (2) 옥소구아닌: hOGG1 및 Endo IV; 및 (3) T:G 미스매치: TDG 및 Endo IV. 모든 샘플을 먼저 글리코실라제 및 엔도뉴클레아제로 처리한 다음, 폴리머라제 단계 전에 칼럼 여과에 의해 정제하였다. TDG 반응 생성물을 TDG 인큐베이션 후에 프로테아제 K로 처리하고, UDG 및 hOGG1과 관련하여서는 추가의 정제 단계를 필요로 하면서, 후속적 엔도뉴클레아제 및 폴리머라제 단계 전에 칼럼 여과에 의해 정제하였다. DNA 구축물의 각각의 글리코실라제 / 엔도뉴클레아제 쌍과의 공동-인큐베이션은 표적 염기의 절단 및 무염기성 부위의 생성을 유발하였다. 짧아진 생성물이 도 4a (각각의 겔의 중앙 레인)에 제시되어 있다. 비오티닐화된 dUTP, dGTP 및 dCTP를 상기 기재된 바와 같은 DNA 폴리머라제를 사용하여 무염기성 부위에 혼입시켜, 각각의 DNA 분자로의 표지화된 염기의 혼입을 유발하였다 (도 4a에서 각각의 겔의 우측 레인). UDG 및 TDG는 둘 다 단일기능적 글리코실라제이고, hOGG1은 이중기능적 글리코실라제이므로, 이 실험은 모든 클래스의 DNA 글리코실라제에 대한 기재된 방법의 적용성을 입증하였다.

[0249] 표적 DNA 변형의 특이적 절단이 DNA 분자에서의 정확하고 신뢰할 수 있는 표지화를 보장하는데 있어서 중요하기 때문에, 여러 DNA 글리코실라제의 특이성을 평가하였다.

[0250] 하나의 실험에서, 단일 oxoG 변형을 함유하는 DNA 구축물을 제조하였다. 구축물을 UDG, hOGG1 및 TDG와 함께 병렬 인큐베이션하였다 (Endo IV와의 공동-인큐베이션). 도 4b에 제시된 바와 같이, 출발 DNA 구축물과 비교 시 그 반응 생성물에 대한 변경된 이동 패턴에 의해 반영되는 바와 같이 단지 hOGG1만이 DNA 구축물로부터 oxoG

를 절제할 수 있었다. 대조적으로, UDG 및 TDG를 이용한 절단 반응으로부터의 생성물은 출발 물질과 동일한 이동 패턴을 가지며, 이는 이들이 DNA 구축물로부터 oxoG를 비특이적으로 절제하지 않는다는 것을 제시한다.

[0251] 또 다른 실험에서, UDG, TDG 및 hOGG1이 이들의 공지된 특이성 이외에도, DNA 변형에 대해 어떠한 절단을 제시하는지를 결정하기 위해 이들을 평가하였다. UDG는 우라실 변형을 절제하는 것으로 공지되어 있고, TDG는 T:G 미스매치를 절제하는 것으로 공지되어 있으며, hOGG1은 oxoG 변형을 절제하는 것으로 공지되어 있다. 3종의 DNA 구축물을 제조하며: 하나는 단일 우라실 변형을 함유하고, 하나는 단일 oxoG 변형을 함유하며, 하나는 단일 T:G 미스매치를 함유하였다. 각각의 DNA 구축물의 분취물을 DNA 구축물에 존재하는 것과 상이한 유형의 변형에 대해 특이성을 갖는 2종의 DNA 글리코실라제와 함께 개별적으로 인큐베이션하였다. 구체적으로, 우라실 DNA 구축물은 hOGG1 또는 TDG와 함께 인큐베이션하였고; oxoG 구축물은 UDG 또는 TDG와 함께 인큐베이션하였으며; T:G 미스매치 구축물은 UDG 또는 hOGG1과 함께 인큐베이션하였다. 각 경우에, DNA 구축물은 DNA 글리코실라제 및 Endo IV와 함께 공동-인큐베이션하였다. TDG 반응을 위해서는, 프로테아제 K 처리를 수행하여 결합된 TDG를 분해하고, Endo IV 인큐베이션 전에 물질을 칼럼 여과에 의해 정제하였다. 도 4c에 제시된 바와 같이, DNA 글리코실라제 중 어느 것도 시험된 DNA 분자에 존재하는 변형을 절단하지 않았으며, 이는 글리코실라제의 그의 표적 변형에 대한 특이성을 입증하였다. 따라서, 주어진 DNA 글리코실라제는 특정한 DNA 변형을 특이적으로 절제하고 표지화하기 위해 기재된 방법에 사용될 수 있으며, 동일한 반응에서의 다른 유형의 변형의 잘못된 표지화는 최소한이거나 또는 존재하지 않아야 한다.

[0252] 실시예 4

[0253] 절제 및 표지화 반응의 유용성 및 효율을 또한 원-포트 설정에서 평가하였다. UDG 및 EndoIV를 pH 7.9의 50 mM NaCl, 10 mM 트리스-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT를 함유하는 완충제 중에서 단일 우라실 변형을 갖는 40 nt DNA 분자와 함께 공동-인큐베이션하였다. 절제 반응을 위한 인큐베이션 후에, 추후 분석을 위해 분취물을 취하였다. 이어서, T4 DNA pol exo<sup>-</sup> 및 비오틴화된 dUTP를 표지화 반응을 위해 첨가하였다. 40 nt DNA 분자, 중간-지점 샘플 및 최종 생성물을 변성화 겔에서 전개시켰다. 도 5에 제시된 바와 같이, 우라실은 중간-지점 샘플에서의 DNA의 더 빠른 이동 패턴에 의해 제시된 바와 같이 40 nt 분자로부터 효율적으로 절단되었고 (중앙 라인), 중요하게는, 비오틴화된 dUTP의 DNA 분자로의 혼입 또한 더 느린 이동 패턴에 의해 제시된 바와 같이 효율적이었다 (우측 라인; \*로 표시됨). 유사한 결과가 hOGG1, Endo IV 및 oxoG 변형을 함유하는 DNA 분자를 사용하여 얻어졌다. 수율은 단지 1시간의 전체 인큐베이션을 필요로 하면서 중간 정제 단계 없이, 단단계 공정에서보다 원-포트 반응 (~95%)에서 더 높았다.

[0254] 실시예 5

[0255] DNA 글리코실라제의 선택성을 맞추으로써 다중 DNA 변형을 표지화하는 예시 방법이 도 6a 및 도 6b에 제공되며 예시된다. 카르복시시토신 (caC) 및 포르밀시토신 (fC) (백색 원형), 메틸시토신 (mC, 흑색 원형), 및 히드록시메틸시토신 (hmC, 정사각형) 유전자 변형을 함유하는 DNA 샘플이 제시된다. 티민 DNA 글리코실라제 (TDG)는 caC 및 fC에 대해 선택성을 갖는다.

[0256] 도 6a에 제시된 바와 같이, TDG 글리코실라제는, 절제 단계 (실시예 1에 기재된 바와 같음)가 수행된 후, 표적 DNA가 변형을 도입하는 추가의 효소로 추가로 처리된다면, mC 및 hmC를 확인하는데 사용될 수 있다. 단순하게 하기 위해, 하기 논의는 표지화된 뉴클레오티드로서 비오틴화된 dCTP (삼각형)와 관련하여 이루어질 것이다. 그러나, 사용된 글리코실라제 및 관심 검출 방법에 따라 다른 표지화 방법 및 다른 뉴클레오티드가 사용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0257] 반응 경로 (1)은 표적 DNA 내의 caC/fC 변형의 확인을 위한 예시 방법을 제시한다. TDG 글리코실라제를 사용하여 caC/fC를 절제할 수 있고, 단지 caC/fC가 존재하였던 위치만을 표지화하기 위해 비오틴화된 dCTP를 사용하여 표지화 반응을 수행할 수 있다. 이 반응 경로는 표적 DNA 내의 caC/fC 변형의 확인을 가능하게 한다.

[0258] 반응 경로 (2)는 표적 DNA 내의 mC 및 hmC의 확인을 위한 예시 방법을 제시한다. 첫째로, TDG 글리코실라제를 사용하여 caC/fC를 절제할 수 있고, 정규 dCTP로 겔 충전을 수행할 수 있다. 이어서, TET 효소를 사용하여 mC 및 hmC 둘 다를 caC/fC로 탈메틸화하고 전환시킬 수 있다. 이어서, TDG 글리코실라제를 사용하여 caC/fC를 절제할 수 있고, mC 및 hmC가 표적 DNA에 존재하였던 위치에 혼입될 비오틴화된 dCTP를 사용하여 표지화 반응을 수행할 수 있다.

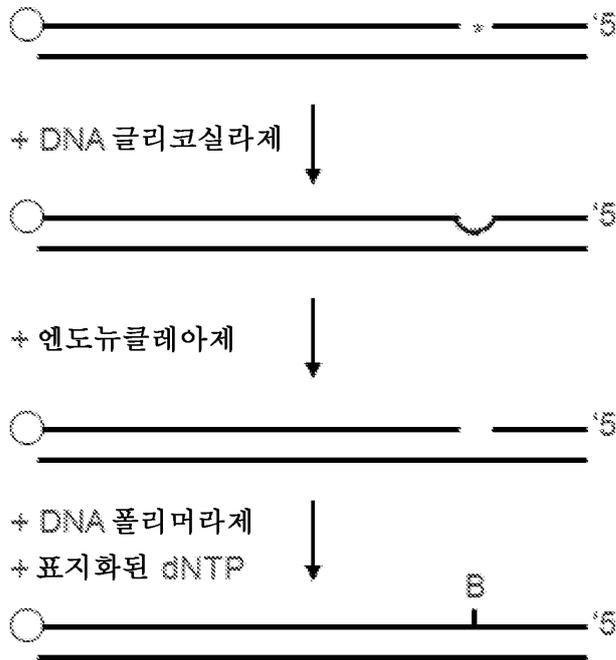
[0259] 반응 경로 (3)은 표적 DNA 내의 mC의 확인을 위한 예시 방법을 제시한다. TDG 글리코실라제를 사용하여 caC/fC

를 절제할 수 있고, 정규 dCTP로 갭 충전을 수행할 수 있다. 이어서,  $\beta$ -글루코실트랜스퍼라제를 사용하여 글루코스 모이더티를 hmC에 선택적으로 부착할 수 있다. 이어서, 표적 DNA의 TET 효소로의 처리는 단지 mC만을 caC/fC로 탈메틸화하고 전환시킬 것이다. mC가 표적 DNA에 존재하였던 위치로 혼입될, 비오틴화된 dCTP를 사용하여 표지화 반응을 수행할 수 있다. mc+hmC 표적 집단으로부터 mC 표적 집단을 제거하면 단지 hmC를 함유하는 표적 집단이 확인될 것이다.

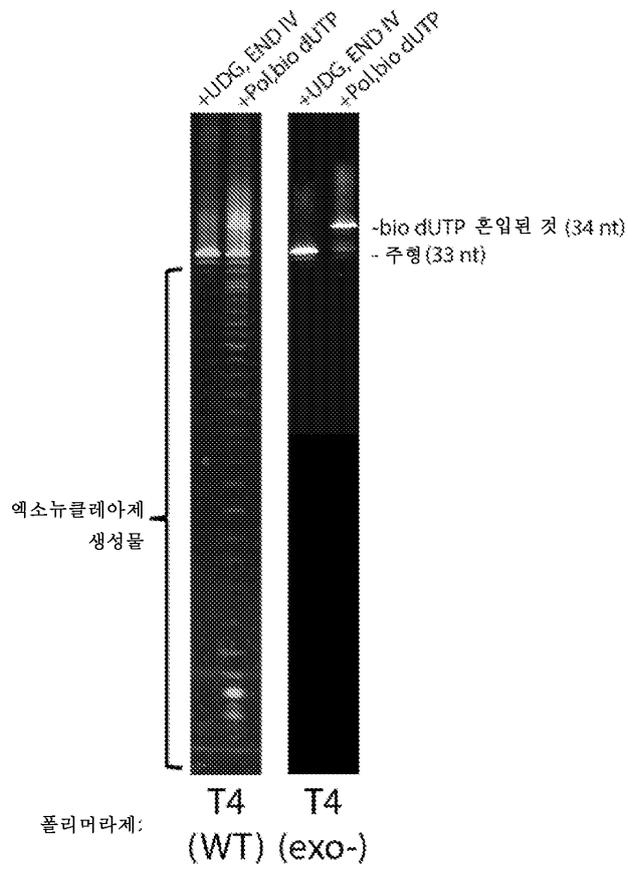
- [0260] 도 6b는 TDG 및 우라실 DNA 글리코실라제 (UDG)를 사용하여 DNA 샘플 내의 caC, fC, mC 및 hmC를 특이적으로 표지화하고 검출하는 또 다른 수단을 제시한다.
- [0261] 반응 경로 (1)은 상기 기재된 바와 같은 fC/caC를 검출하는 예시 방법을 제시한다.
- [0262] 반응 경로 (2)는 hmC를 검출하는 예시 방법을 제시한다. 첫째로, TDG 글리코실라제를 사용하여 caC/fC를 절제하고, 정규 dCTP로 갭 충전을 수행할 수 있다.  $KRuO_4$ 를 사용하여 hmC를 caC/fC로 산화시킬 수 있고, 이는 이어서 TDG에 의해 절단되며, 이에 의해 DNA 샘플 내의 hmC의 부위를 표지화된 dCTP (예를 들어, 비오틴화된 dCTP)로 표지화할 수 있다.
- [0263] 반응 경로 (3)은 mC를 검출하는 예시 방법을 제시한다. TDG 글리코실라제를 사용하여 caC/fC를 절제할 수 있고, 정규 dCTP로 갭 충전을 수행할 수 있다.  $\beta$ -글루코실트랜스퍼라제를 사용하여 글루코스 모이더티를 hmC에 선택적으로 부착하며, 이에 의해 그를 산화로부터 차단할 수 있다. 이어서, APOBEC3a 또는 비술파이트가 mC를 우라실로 전환시킬 수 있고, 이어서 이를 UDG에 의해 절단하고, 표지화된 dCTP (예를 들어, 비오틴화된 dCTP)로 표지화할 수 있다.
- [0264] 본 개시내용에서 논의된 모든 특허, 특허 공개, 특허 출원, 학술지 논문, 저서, 기술 참고문헌 등은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0265] 본 발명의 도면 및 설명은 본 발명의 명확한 이해를 위해 관련된 요소를 예시하도록 단순화된 것으로 이해되어야 한다. 도면은 예시적 목적을 위한 것이며, 구성 도면으로서 제시된 것이 아닌 것으로 인지되어야 한다. 생략된 세부사항 및 변형 또는 대안적 실시양태는 관련 기술분야의 통상의 기술자의 이해 범위 내에 있다.
- [0266] 본 발명의 특정 측면에서, 요소 또는 구조를 제공하기 위해 또는 주어진 기능 또는 기능들을 수행하기 위해, 단일 구성요소가 다중 구성요소에 의해 대체될 수 있으며, 다중 구성요소가 단일 구성요소에 의해 대체될 수 있는 것으로 인지될 수 있다. 이러한 치환이 본 발명의 특정 실시양태를 실시하는데 이용되지 않을 경우를 제외하면, 이러한 치환은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주된다.
- [0267] 본원에 제시된 실시예는 본 발명의 잠재적이고 특정한 구현을 예시하도록 의도된다. 실시예는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 주로 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 의도된 것으로 인지될 수 있다. 본 발명의 취지로부터 벗어나지 않으면서, 본원에 기재된 이들 다이어그램 또는 작업에 변경이 있을 수 있다. 예를 들어, 특정 경우에, 방법 단계 또는 작업이 상이한 순서로 수행 또는 실행될 수 있거나, 또는 작업이 추가, 삭제 또는 변형될 수 있다.
- [0268] 도면에 도시되거나 또는 상기 기재된 구성요소의 상이한 배열, 뿐만 아니라 제시 또는 기재되지 않은 구성요소 및 단계도 가능하다. 유사하게, 일부 특색 및 하위-조합이 유용하며, 다른 특색 및 하위-조합과 관계 없이 사용될 수 있다. 본 발명의 실시양태는 제한적 목적이 아닌, 예시적 목적을 위해 기재되었으며, 대안적 실시양태는 본 특허의 해석자에게 명백해질 것이다. 따라서, 본 발명은 상기 기재되었거나 또는 도면에 도시된 실시양태로 제한되지 않으며, 다양한 실시양태 및 변형이 본 개시내용의 범주로부터 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다.

도면

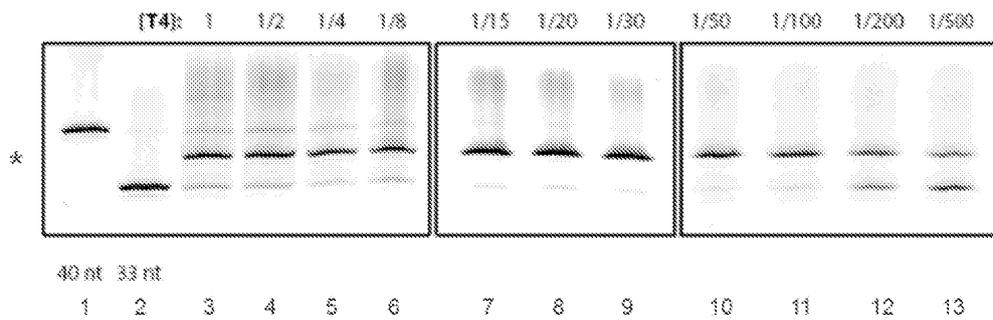
도면1



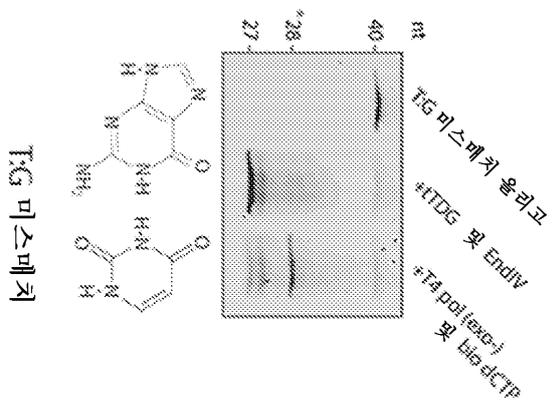
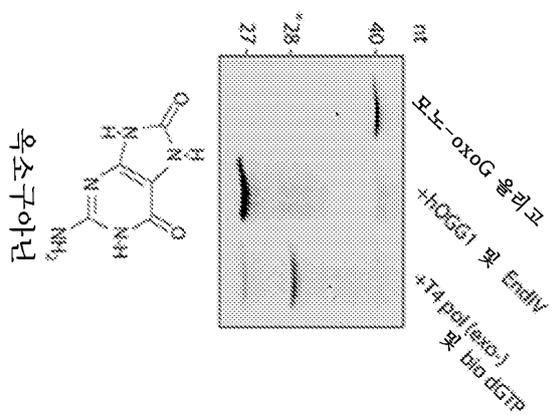
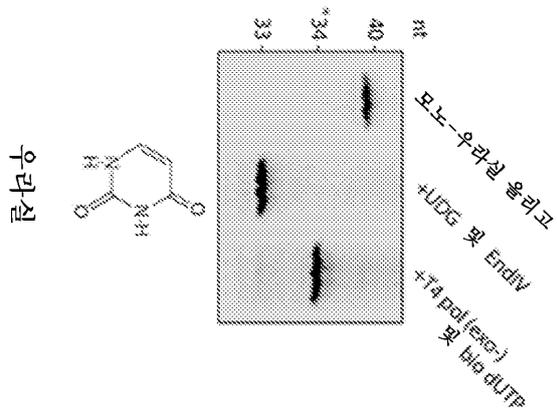
도면2



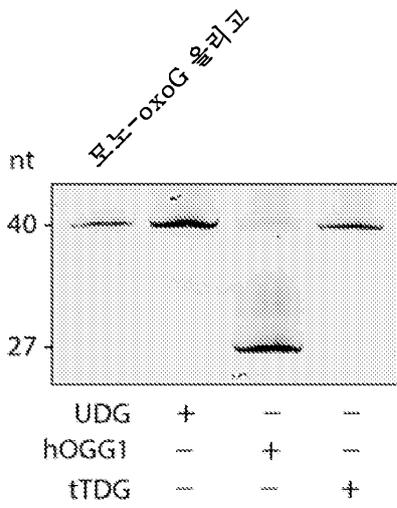
도면3



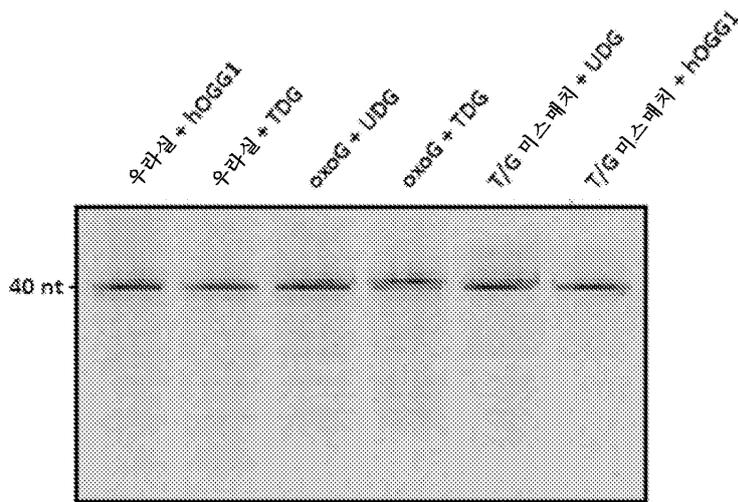
도면4a



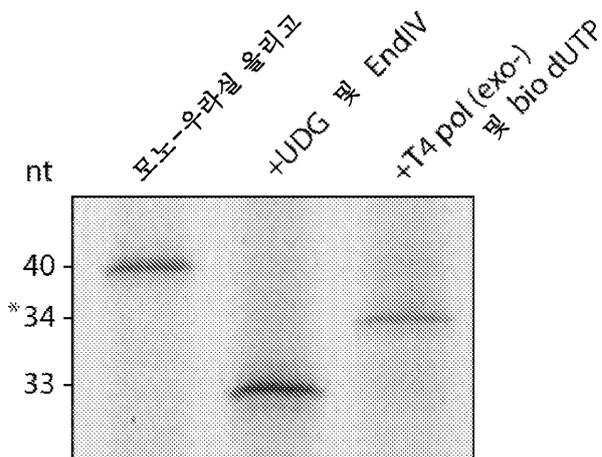
도면4b



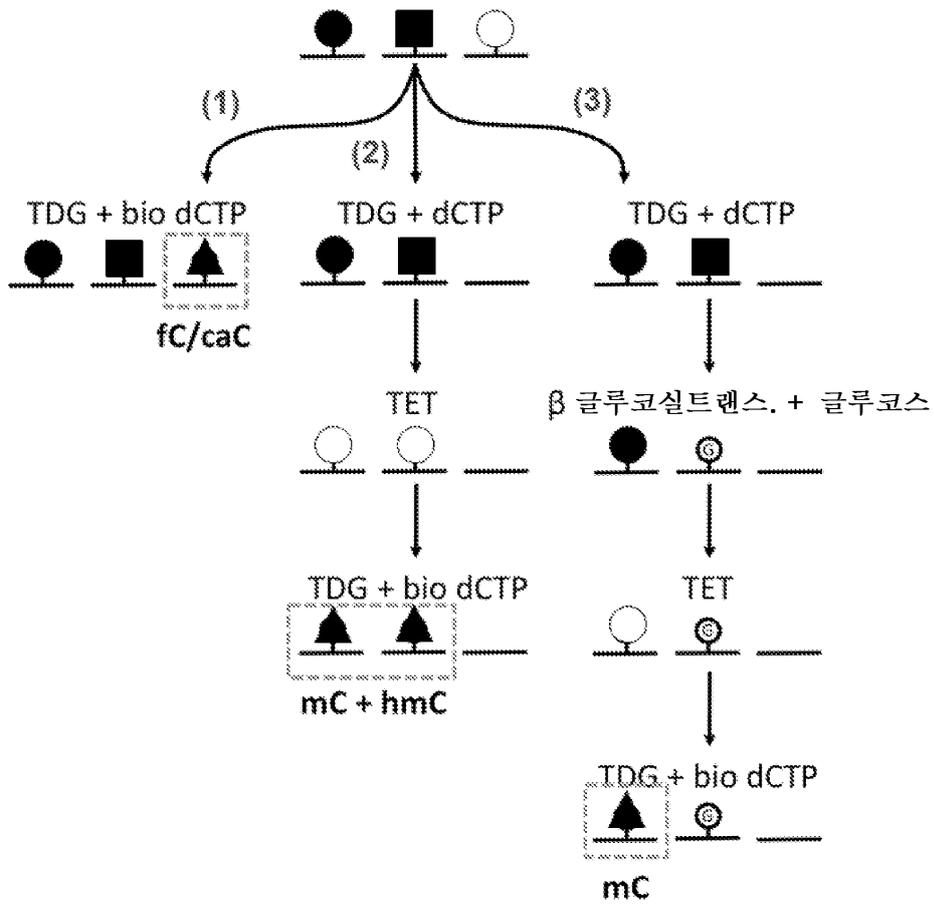
도면4c



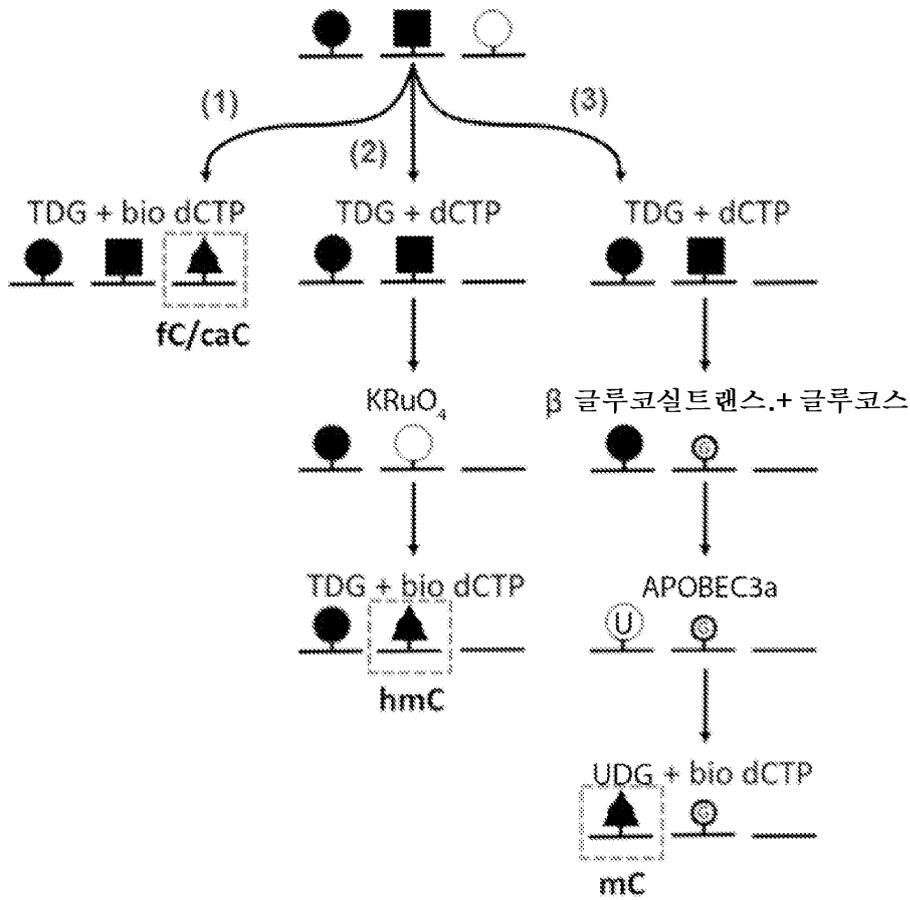
도면5



도면6a



도면6b



도면7

