

더 간단하게, 더 확실하게 NGS 분석하고 싶은 분은 주목하세요

## NGS Application Book

### Low Input DNA Library Preparation (For All Purpose)

#### SMARTer<sup>®</sup> ThruPLEX<sup>®</sup> DNA-Seq Kit (Code R400674)

#### High Performance

- 극소량의 DNA 분석 : 50 pg ~ 50 ng DNA input
- 다양한 샘플 적용 가능 : gDNA, cfDNA, ctDNA, ChIP DNA, FFPE DNA, cDNA
- **Compatible with major target enrichment platform** (Agilent SureSelect<sup>®</sup>, Roche Nimblegene<sup>®</sup> 외)

#### Fast & Easy Protocol

- **15분 Hands-on-time** : 15분 작업 시간, 총 2시간이면 Illumina<sup>®</sup> NGS Library 제작 완료
- **3 Step in single tube (single-well)** : 튜브 이동 없이 하나의 튜브에서 3번의 실험스텝
- **No intermediate purification** : Beads purification 과정을 줄여 쉽고 간편하게

### ★ 적용사례 목차 ★

	Applications	적용 사례	데이터 제공
1	ChIP-Seq	소량의 세포 (10,000개의 세포)로부터 ChIP-seq 분석 기법 확립	Prof. Shirahige Katsuhiko (University of Tokyo)
2	ChIP-Seq	발톱개구리 초기 배아에서 발현하는 발생 제어 인자에 대한 ChIP-Seq 분석 방법의 확립	이화학연구소 (RIKEN)
3	ChIP-Seq (CUT&RUN-seq)	Customer spotlight: profiling transcription factors with CUT&RUN sequencing	University of Pennsylvania
4	Cell-free DNA	SMARTer <sup>®</sup> ThruPLEX <sup>®</sup> Tag-Seq Kit을 이용하여 Cell-free DNA로부터 Low frequency variants 검출과 분석	다카라바이오
5	Cell-free DNA	SMARTer <sup>®</sup> ThruPLEX <sup>®</sup> DNA-Seq Kit을 이용한 Plasma cell-free DNA (cfDNA) 서열 분석	The University of Tsukuba
6	Metagenome	SMARTer <sup>®</sup> ThruPLEX <sup>®</sup> DNA-Seq Kit을 이용하여 미량의 검체로부터 정확한 미생물 해석	다카라바이오
7	DMS-Seq	SMARTer <sup>®</sup> ThruPLEX <sup>®</sup> DNA-Seq Kit을 이용하여 출아효모의 DMS-Seq 분석 기법	이화학연구소(RIKEN), 마이크로바이옴 연구팀

## Application – 1

### 소량의 세포 (10,000개의 세포)로부터 ChIP-seq 분석 기법 확립

- 데이터 제공: Prof. Shirahige Katsuhiko

(The Institute for Quantitative Biosciences (IQB), The University of Tokyo)

#### ◆ Introduction

크로마틴면역침강법 (ChIP; chromatin immuno precipitation)은 목적 단백질이 결합되어 있는 염색체 영역을 면역침강법으로 농축 (enrichment)하는 기술이다. Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-seq)은 농축한 영역을 Next Generation Sequencing (NGS)으로 분석하는 방법으로, 에피제네틱스 연구를 위한 필수적인 기술이다. ChIP-seq은 사용하는 세포의 수가 적고 ChIP으로부터 회수되는 DNA의 양이 매우 적어, 미량의 ChIP DNA 분석법을 확립하는 것은 매우 중요한 과제이다. 이에 따라, 본 연구자는 크로마틴 단편화 (Chromatin fragmentation)의 최적화 및 다카라바이오의 SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit을 이용하여, 미량의 ChIP DNA-seq 분석 기법을 확립하였다.

#### ◆ 사용제품 : SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit (Takara)

#### ◆ Workflow



### ◆ NGS Mapping 결과

1x10<sup>4</sup>개 또는 2.5x10<sup>5</sup>개의 망막색소상피세포 (RPE)에서 H3K4me3 항체를 이용해 ChIP DNA 샘플을 얻었다. 면역 침강하지 않은 세포를 "Input" 샘플로 표기하였다. ChIP DNA 샘플의 전량을 이용해 SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit로 NGS Library를 제작하여 염기서열을 분석하였다. 1x10<sup>4</sup>개의 적은 세포 샘플에서 duplicate rate가 9.1%로 확인되었고 2.5x10<sup>5</sup> 개 세포 샘플의 실험 결과와 유사하였다.

샘플	Total reads	Mapped reads	Unmapped reads	PCR Bias (duplicate)
Input	31,400,938	26,696,740 (78.7%)	3,087,220 (9.8%)	3,616,978 (11.5%)
1x10 <sup>4</sup> 세포 (H3K4me3)	30,823,404	21,336,878 (69.2%)	6,697,451 (21.7%)	2,789,075 (9.1%)
2.5x10 <sup>5</sup> 세포 (H3K4me3)	45,738,702	37,730,704 (82.5%)	4,018,338 (8.8%)	3,989,660 (8.7%)

### ◆ Peak 검출결과

1x10<sup>4</sup> 세포로부터 얻은 H3K4me3의 peak profile은 2.5x10<sup>5</sup> 세포의 결과와 유사함을 확인하였다.



### ◆ 제품 사용을 검토 중인 분께 사용자의 한마디

SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit을 이용하면 소량의 DNA로도 ChIP-seq 분석을 할 수 있습니다. 물론, 샘플량이 소량인지 아닌지를 확인하는 것이 어려운 분에게도 매우 추천합니다. 간편하고 효율적으로 ChIP DNA의 NGS Library를 제작할 수 있기 때문에, 처음 실험하는 분께도 매우 추천할 만한 제품입니다. (Prof. Shirahige Katsuhiko, The University of Tokyo)

### 발톱개구리 초기 배아에서 발현하는 발생 제어 인자에 대한 ChIP-Seq 분석 방법의 확립

- 데이터제공: 이화학연구소 (RIKEN)

#### ◆ Introduction

ChIP-Seq은 염색질 면역침강 (ChIP)을 이용하여 목적 단백질이 결합되어 있는 염색체 영역을 농축한 뒤, 차세대 시퀀싱 (Next Generation Sequencing)으로 서열을 분석하는 기법이다. 동물의 발생 과정에서 세포의 운명을 결정하는 전사인자 단백질과 DNA의 상호작용이 세포 발생을 어떻게 제어하는지 규명하는 데 있어, 동물 배아를 이용한 ChIP-Seq 분석은 매우 중요하다. 하지만 동물 배아의 일부 세포에서만 발현되는 발생조절인자 (전사인자)에 대하여 ChIP-Seq 분석을 진행하는 경우, 적은 양의 세포에서 농축된 극소량의 ChIP DNA를 이용하여 NGS 분석을 진행해야 한다. 본 연구실에서 이용한 발톱개구리 (*Xenopus* sp.)는 한꺼번에 배아를 획득 가능하며, 초기 발생 유전자의 발현 제어를 분석하는데 적합한 모델로써 본 연구에서는 소량의 발톱개구리 배아에서 농축한 미량의 ChIP DNA를 SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit을 이용하여 ChIP-Seq 분석을 진행하였다.

#### ◆ 사용제품 : [SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit \(Code 400674\)](#)

#### ◆ Workflow

- ① **배아 고정:** 발톱개구리의 낭배 (gastrula) 약 250개를 1% 포르말린으로 고정 후, -80°C에서 냉동 보존
- ② **세포 용해와 핵 농축:**  
계면활성제가 포함된 Lysis Buffer로 배아를 균질화 (homogenize) 후, 핵 농축
- ③ **Chromatin fragmentation:**  
초음파세포파쇄장치 Picoruptor (Diagenode)를 이용하여 크로마틴 단편화
- ④ **면역침강 (Immuno-precipitation):**  
Anti-Otx2 항체를 미리 결합시킨 Protein A Magnetic Beads와 상기의 단편화된 크로마틴을 혼합하고 4°C에서 overnight 교반 후 RIPA Buffer로 washing
- ⑤ **Cross-link reversal:**  
1% SDS를 포함한 용출 buffer에서 65°C, overnight incubation 후, cross-link reversal beads 하에서 RNase A 및 Proteinase K를 처리하여 cross-link reversal
- ⑥ **DNA 정제 (DNA Purification):** MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)으로 ChIP DNA 정제
- ⑦ **ChIP DNA Quality Control (QC):**  
형광광도계 (Qubit dsDNA HS Kit)을 이용하여 ChIP DNA 정량하고, qPCR로 게놈영역 농축 확인

⑧ **NGS Library Preparation:**

SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit을 이용하여 10 μl의 CHIP DNA로부터 NGS Library Preparation

⑨ **Sequencing:** Illumina® NestSeq550, 75 bp paired-end

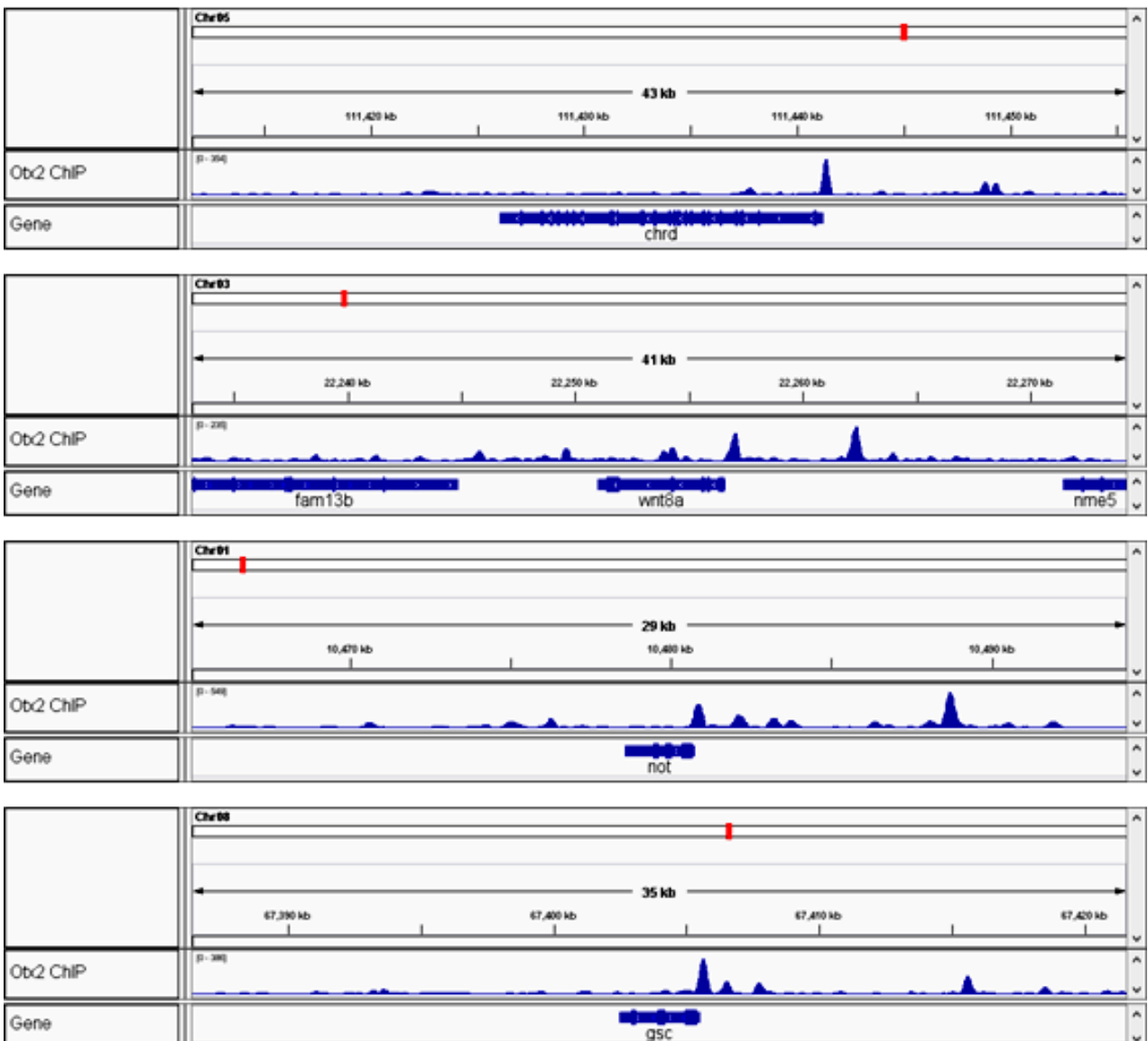
⑩ **Data analysis:** BWA 소프트웨어를 이용하여 발톱개구리 게놈 (v9)에 mapping, IGV visualization

◆ **NGS Mapping 결과**

샘플	Total reads	Mapped reads (%)
Input	74,426,066	70,219,181 (94.35%)
Otx2 ChIP	82,794,598	75,710,767 (91.44%)

◆ **Otx2 ChIP-seq 결과**

250개의 발톱개구리 배아로부터 획득한 1 ng 정도의 ChIP DNA에서 충분한 양의 NGS Library를 제작하여 분석할 수 있었다 (PCR Cycle = 12). 또한 Mapping data에서 약 2,000개의 발톱개구리 배아로부터 수행한 ChIP-Seq 분석 결과와 동일함을 알 수 있다 (Yasuoka *et al.*, *Nature Communications* 2014 5 : 4322)



#### ◆ 향후 계획

SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit를 이용하면 극소량의 DNA에서 NGS Library 제작이 가능하기 때문에 동일한 전사인자에 대해 반복적인 ChIP-Seq 분석을 시행하여, 전사인자가 어느 정도의 차이 (variation)을 가지고 결합하는지에 대해 향후 규명할 예정이다 ([http://constrained-evo.org/proposed\\_projects.html](http://constrained-evo.org/proposed_projects.html)). 표적으로 하는 전사인자와 사용하는 항체에 따라 다를 수 있지만, 본 제품을 이용하면 ChIP에 필요한 배아의 수를 50 ~ 100개 정도로 줄일 수 있어, 보다 효율적으로 연구를 진행할 수 있을 것으로 기대된다.

#### ◆ 제품 사용을 검토 중인 분께 사용자의 한마디

SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit는 형광 광도계에서도 측정이 불가능할 정도로 극소량인 DNA에서 NGS Library 제작이 가능하므로, 아주 적은 양의 세포에 대해 ChIP-Seq 분석을 실시할 경우 추천합니다. 또한 실험의 과정이 매우 간편하고 제품 내의 각 구성품들도 각기 다른 라벨로 구분이 되어 있어 매우 쉽게 NGS Library를 제작할 수 있으므로, NGS Library 제작에 익숙하지 않은 사람에게도 매우 적합합니다.

**Customer spotlight:**  
**profiling transcription factors with CUT&RUN sequencing**

- 데이터제공: The lab of Shelley Berger, the University of Pennsylvania

펜실베이니아 대학의 Ph.D Karl Glastad가 NGS Library 제작을 위하여 다카라바이오의 **ThruPLEX® Chemistry**를 CUT&RUN 기법에 접목한 내용을 소개합니다.

◆ **ChIP-seq의 한계 극복**

DNA 결합 단백질 (DNA-binding protein)은 세포 내에서 필수적이고 다양한 역할을 수행하고 있으며, 이에 대한 근본적인 메커니즘을 이해하고자 하는 연구자들에게 매우 중요한 실험 자원으로 여겨지고 있다. 일반적으로 DNA 결합 단백질의 상호작용을 분석하고 단백질 결합부위의 유전자를 규명하기 위하여 ChIP-seq을 이용한다. ChIP-seq은 차세대염기서열분석법 (NGS)과 크로마틴면역침강법 (chromatin immunoprecipitation; ChIP)을 결합한 방법이다. 하지만, ChIP-seq은 샘플양과 분석 타겟의 유형에 따라 한계점을 가지고 있다.

이에 반해, CUT&RUN sequencing (Cleavage Under Targets and Release Using Nuclease)은 ChIP-seq의 한계점을 극복하여 연구자들이 더 많은 수의 genome sequence를 더 쉽게 분석할 수 있도록 개선한 분석 기법이다. 다카라바이오는 펜실베이니아 대학의 [Shelley Berger 연구소에서](#) 개미의 역할분담 (ant castes)의 후성유전학을 연구하는 박사 후 연구원, Karl Glastad와 함께 본 기술에 대하여 토론하였다.



Karl Glastad, PhD

◆ **현재 당신의 중점 연구는 무엇입니까?**

우리는 개미의 역할분담 (카스트; caste)을 결정하는 분자에 대한 연구를 진행하고 있습니다. 구체적으로, 매우 밀접한 연관이 있는 각각의 개미가 매우 다른 환경적 자극 하에서 어떻게 완전히 다른 유형의 표현형을 발현하는 지에 대해 관심이 있습니다. 우리 연구의 주요 초점 중 하나는 '개미 서식지 내에서 역할분담 (카스트) 간의 극단적인 수명 차이 연구'입니다. 예를 들어, 하나의 개미 개체는 1년 이내로 생존하는 반면 그 개체의 누이는 10년 – 20년을 생존합니다. 이러한 개미 역할분담 간의 수명 차이의 주요 원인은 크로마틴 변이 (differential chromatin modification)와 전사인자의 결합 (transcription factor binding; TF binding)의 차이에서 기인합니다.

◆ CUT&RUN 기법은 연구에 어떻게 적용되니까? 기존의 기술 대비하여 좋은 점은 무엇입니까?

각 개미 개체 조직의 세포의 양 (15 – 150,000 cells)은 매우 적기 때문에 cross-linking ChIP-seq (X-ChIP)과 같은 기존의 방법으로 분석하는 것은 엄두를 내지 못 합니다. 반면, Native ChIP은 이러한 샘플에서 히스톤 변형을 분석하는 데 상당히 효과적이지만, 전사인자 (transcription factor; TF)와 같은 비히스톤 크로마틴 결합 단백질 (non-histone chromatin-binding proteins)을 분석할 수는 없습니다. 우리는 CUT&RUN 기법을 이용하여 기존의 X-ChIP으로는 분석이 불가능했던 전사인자 (TF)를 프로파일링 할 수 있게 되었습니다. 게다가, 개미에서 X-ChIP으로는 확인이 불가능했던 포유류 단백질의 보존영역 (conserved region)에 대해 생성된 몇 가지의 항체가 CUT&RUN에서는 적용이 가능함을 확인하였습니다. 따라서, 우리는 CUT&RUN 기법을 이용하여 개미 뇌의 여러 종류의 전사인자 (TF)를 확인할 수 있었을 뿐만 아니라, 포유류 항원/단백질에 대해 생성된 항체를 이용하여 대상 분자의 레퍼토리를 확대분석 할 수 있게 되었습니다.

◆ CUT&RUN의 원리에 대해 설명해 주시겠습니까?

기존의 ChIP 기법이 sonication 또는 핵산분해효소 활성 (nuclease activity)을 이용하여 게놈을 조각낸 후 목적단백질에 결합된 유전자좌위 (loci)를 침강시키는 것과는 달리, CUT&RUN 기법은 손상되지 않은 온전한 세포 (intact cell) 또는 핵 (nuclei) 내에서 항체를 *in situ* binding 시킨 후, 목적 단백질과 결합된 DNA를 절단합니다. CUT&RUN은 Protein A-MNase fusion protein을 이용하는데, 이는 목적 단백질과 결합된 DNA만 특이적으로 절단하므로 면역침강법 (immunoprecipitation)과 같은 기존의 분석 방법에서 흔히 발생할 수 있는 background를 크게 감소시킬 수 있습니다. 또한, CUT&RUN은 면역형광법(IF)과 같이 손상되지 않은 세포 또는 핵에서 실험을 진행하기 때문에 기존의 ChIP에서 적용할 수 없었던 항체도 효과적으로 적용 가능합니다.

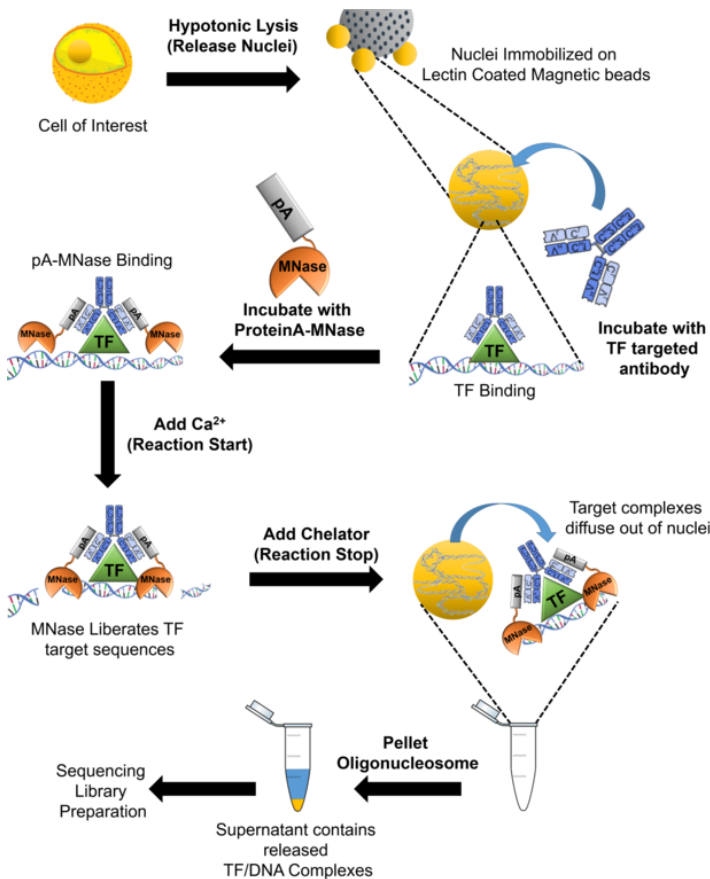


그림. CUT&RUN-sequencing workflow (Figure by Mannan369, used under CC BY-SA 4.0.)



◆ CUT&RUN이 가장 적합하게 사용될 수 있는 분야는 무엇입니까? 때로, ChIP-seq과 같은 기존의 방식이 더 나은 경우도 있습니까?

CUT&RUN은 샘플의 양이 매우 적은 경우, 또는 타겟 항체가 면역형광법 (IF)에서는 적용이 가능하지만 면역침전 (IP)에서는 적용이 불가능한 경우에 적합합니다. 또한, CUT&RUN은 표적특이적으로 절단하기 때문에 기존의 ChIP-seq보다 background가 훨씬 낮습니다. 하지만, CUT&RUN 기법은 아직 초기 개발 단계이므로 ChIP-seq이 제공하는 정보학적, 전산적인 자원의 이용이 어렵습니다. 예를 들어, CUT&RUN의 normalization control은 제한적이며, 서로 다른 조건 (특히, binding에 있어서 점진적인 차이가 있는 조건)을 비교하는 가장 좋은 방법에 대해서는 여전히 논의 중인 사안입니다. 하지만, 이러한 CUT&RUN의 한계점은 기술이 보급되면서 그리고, 정보학적, 전산학적인 자원이 증가함에 따라 해결될 수 있습니다.

◆ CUT&RUN으로 분석한 데이터를 보완하기 위해 어떤 다른 실험기법을 이용하십니까?

우리는 RNA-seq, smRNA-seq, hiChIP-seq을 이용하여 looping의 변화를 확인하고, ATAC-seq을 이용해 접근성에 대한 근본적인 변화를 확인하고 있습니다.

◆ 연구의 궁극적인 목적은 무엇입니까?

개미를 이용하여 인간의 수명을 늘리는 것입니다



SMARTer® ThruPLEX® Tag-seq Kit을 이용하여  
Cell-free DNA로부터 Low frequency variants 검출과 분석

- 데이터 제공: 다카라바이오

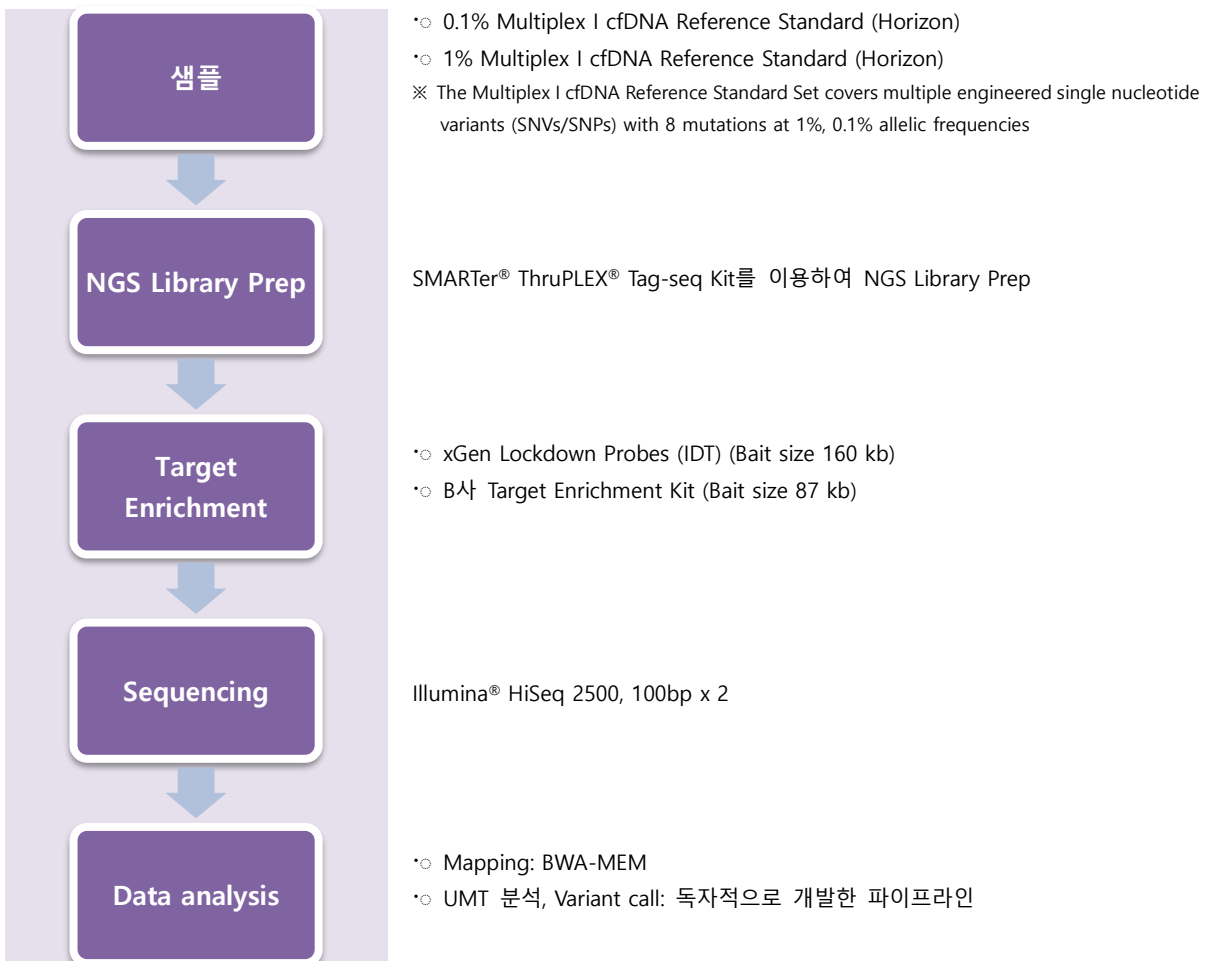
◆ Introduction

암 연구에서 Cell-free DNA의 저빈도 변이 (Low frequency variants)를 정확하게 검출하는 것은 매우 중요하다. 특히, 차세대 시퀀서를 이용하여 분석하는 경우 NGS Library Preparation 과정 중의 증폭 에러나 시퀀스 에러가 발생할 가능성이 있어 샘플 자체의 저빈도 변이와 구별하기 어려운 경우가 있다. SMARTer® ThruPLEX® Tag-seq Kit는 1,600만개의 Unique Molecular Tags (UMT)를 채용한 NGS Library Preparation Kit로써, UMT를 이용하여 false-positive variant calls를 줄일 수 있어 보다 저빈도로 존재하는 변이를 보다 정확하게 검출할 수 있다. 본 자료는 SMARTer® ThruPLEX® Tag-seq Kit을 이용하여 NGS Library를 제조한 후, Target enrichment에 xGen Lockdown Probes (IDT)와 B사의 제품을 이용하여 분석한 데이터이다.

◆ 사용제품

**SMARTer® ThruPLEX® Tag-seq Kit (Takara)**

◆ Workflow



◆ 변이 유전자 검출 결과

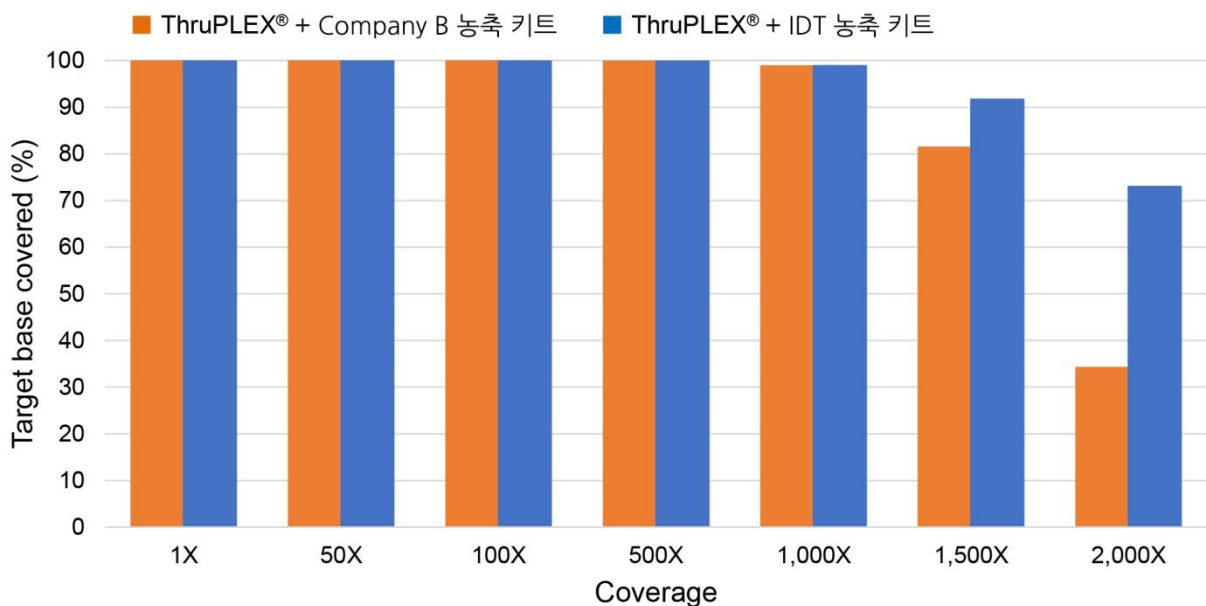
타겟 농축 키트	ThruPLEX + IDT 농축 키트						ThruPLEX + Company B 농축 키트					
샘플정보	1.0% Multiplex I cfDNA			0.1% Multiplex I cfDNA			1.0% Multiplex I cfDNA			0.1% Multiplex I cfDNA		
Mapping software	BWA-MEM											
변이검출 소프트웨어	독자 개발 파이프라인											
Variant	REF	ALT	AF	REF	ALT	AF	REF	ALT	AF	REF	ALT	AF
EGFR (L858R)	2,192	20	0.91%	1,977	2	0.10%	1,499	18		1,679	3	0.18%
EGFR (ΔE746-A750)	1,966	9	0.46%	1,869	0	0.00%	1,471	5	0.34%	1,536	3	0.20%
EGFR (T790M)	2,163	30	1.39%	2,160	3	0.14%	1,573	14	0.89%	1,524	0	0.00%
EGFR (V769-D770Ins)	1,997	9	0.45%	2092	0	0.00%	739	3	0.41%	739	0	0.00%
KRAS (G12D)	1,320	19	1.44%	1,179	2	0.17%	1,135	7	0.62%	1,099	1	0.09%
NRAS (Q61K)	4,093	40	0.98%	3,505	2	0.06%	1,826	15	0.82%	1,861	0	0.00%
NRAS (A59T)	4,158	42	1.01%	3,594	8	0.22%	1,835	30	1.63%	1,847	5	0.27%
PIK3CA (E545K)	1,309	15	1.15%	1112	1	0.09%	1,172	5	0.43%	987	2	0.20%
변이검출 수 (검출감도)	8 (100%)			6 (75%)			8 (100%)			5 (62.5%)		

REF: Reference 배열과 같은 염기를 가지는 리드 수  
 ALT: 변이배열과 같은 염기를 가지는 리드 수  
 AF: 변이빈도 (전체 리드 수 중 ALT 리드의 비율)

SMARTer® ThruPLEX® Tag-seq Kit과 두 종류의 Target Enrichment Kit을 이용하여 변이유전자를 검출한 결과, 1% Multiplex I cfDNA는 두 실험군에서 모두 8종의 변이 유전자를 검출할 수 있었다. 한편, 0.1% Multiplex I cfDNA에서는 IDT 제품을 이용한 경우에 6종, B 회사를 이용한 경우에 5종의 변이 유전자를 검출할 수 있었다. 따라서, Unique Molecular Tags를 탑재한 SMARTer® ThruPLEX® Tag-seq Kit과 IDT Target Enrichment를 조합하면 보다 낮은 allele frequency를 정확하게 검출할 수 있다.

◆ 타겟 영역의 Coverage 비교

※ IDT, B회사의 제품에서 공통되는 타겟유전자 (30 kb) 데이터만 비교



SMARTer® ThruPLEX® Tag-seq Kit와 IDT Target Enrichment Kit을 조합한 경우, 보다 높은 coverage rate를 보였으며, low frequency variant 검출에 두 제품의 조합이 적합함을 알 수 있었다.

## SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit을 이용한

### Plasma cell-free DNA (cfDNA) 서열 분석

- 데이터 제공: Laboratory of sports medicine, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

#### ◆ Introduction

Cell-free DNA (cfDNA)는 태아의 유전자 진단 또는 종양 유래의 DNA를 모니터링하기 위한 시료로써 사용되고 있지만, cfDNA 자체의 질적 · 양적 변화를 포괄적으로 분석한 자료는 많지 않다. 본 연구실에서는 정상인의 Plasma cfDNA (혈장 cfDNA)가 특정 실험 처치 전·후에 질적 · 양적으로 어떻게 변화하는지 NGS를 통해 포괄적으로 분석하고자 하였다.



Laboratory of sports medicine, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

연구실 홈페이지: <http://tsukuba-laboratorymedicine.com/>

#### ◆ 사용제품

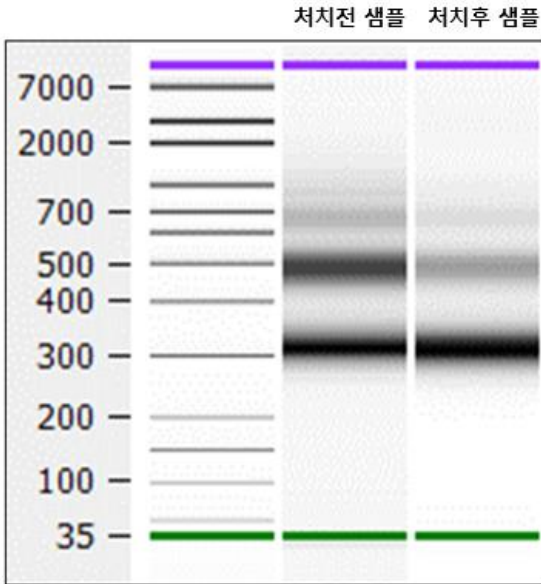
**SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit (Code 400674)**

#### ◆ Workflow

- ① 실험 처치 전 · 후의 정상인 혈액을 EDTA Tube에 채혈하여 원심분리로 혈장 (Plasma) 분리
- ② 2 ml의 혈장에서 NucleoSnap DNA Plasma (Macherey Nagel)을 이용하여 cfDNA 추출
- ③ SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit을 이용하여 10 ng ~ 30 ng의 cfDNA로부터 NGS Library 제작
- ④ Agilent Bioanalyzer를 이용하여 NGS Library의 농도 측정
- ⑤ Illumina® NextSeq500을 이용하여 시퀀싱
- ⑥ Bowtie 소프트웨어를 이용하여 mapping

◆ SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit을 이용한 cfDNA NGS Library 제작 결과

SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit을 이용하여 실험 처치 전 · 후의 10 ng ~ 30 ng의 cfDNA로부터 Illumina® NGS Library를 제작하고, Agilent Bioanalyzer로 NGS Library의 크기와 농도를 확인하였다. 처치 전 샘플과 후 샘플에서 모두 300 bp 부근의 밴드가 검출된 것으로 보아 Illumina® NGS Library가 적절히 제작되었음을 확인할 수 있었다 (NGS Library 제작 전 cfDNA의 사이즈: 약 160 bp, ThruPLEX adapter 사이즈: 약 140 bp)



◆ NGS Mapping 결과

실험 처치 전과 비교하여 처치 후의 cfDNA에서 게놈 상의 특정 위치에 많은 수의 read가 매핑되었으며, 특히 약 250배의 count reads 차이가 있는 위치를 식별할 수 있었다. 이는 혈장 cfDNA가 생체에 가해지는 특정 스트레스에 의해 질적 · 양적 변화를 일으킬 수 있음을 나타낸다.



A: Coverage B: Mapping reads

◆ 향후 계획

본 제품을 이용하여 인간이나 동물에 대해 다양한 조건 하에서 cfDNA의 염기서열, 특성 및 메커니즘을 추가로 분석하고자 한다.

◆ 제품 사용을 검토 중인 분께 사용자의 한마디

본 제품은 매우 쉬운 실험순서에 따라 간편하게 NGS Library를 제작할 수 있습니다. 처음 NGS Library를 제작하였지만, 본 제품을 이용하여 한번에 손쉽게 성공할 수 있었으며, NGS 데이터 분석 퀄리티 또한 우수합니다.

## Application – 6

### SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit 을 이용하여 미량의 검체로부터 정확한 미생물 해석 (Metagenome 분석)

- 데이터 제공: 다카라바이오

#### ◆ Introduction

최근 인체의 건강 및 질병 발병과 장내 미생물 균총의 높은 연관성이 밝혀졌으며, 염기서열 분석 비용의 감소와 기술이 향상됨에 따라, 보다 정확하고 광범위한 장내미생물 균총 분석을 기대할 수 있게 되었다. 장내 미생물 균총 분석을 위해 사용되는 핵산은 시료 채취 부위 또는 핵산 추출 방법 등에 따라 핵산의 양에 큰 차이를 보이며, 경우에 따라서는 매우 적은 양의 검체를 분석해야 하는 경우도 있기 때문에 미량 검체로부터 미생물 균총을 분석하기 위한 프로토콜의 개발이 요구되고 있다. 미량의 샘플로부터 미생물 균총을 분석하기 위하여, SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit로 다양한 양의 분변샘플, 20 Strain Even Mix Genomic Material로부터 NGS Library를 제작하고 분석을 실시하였다.

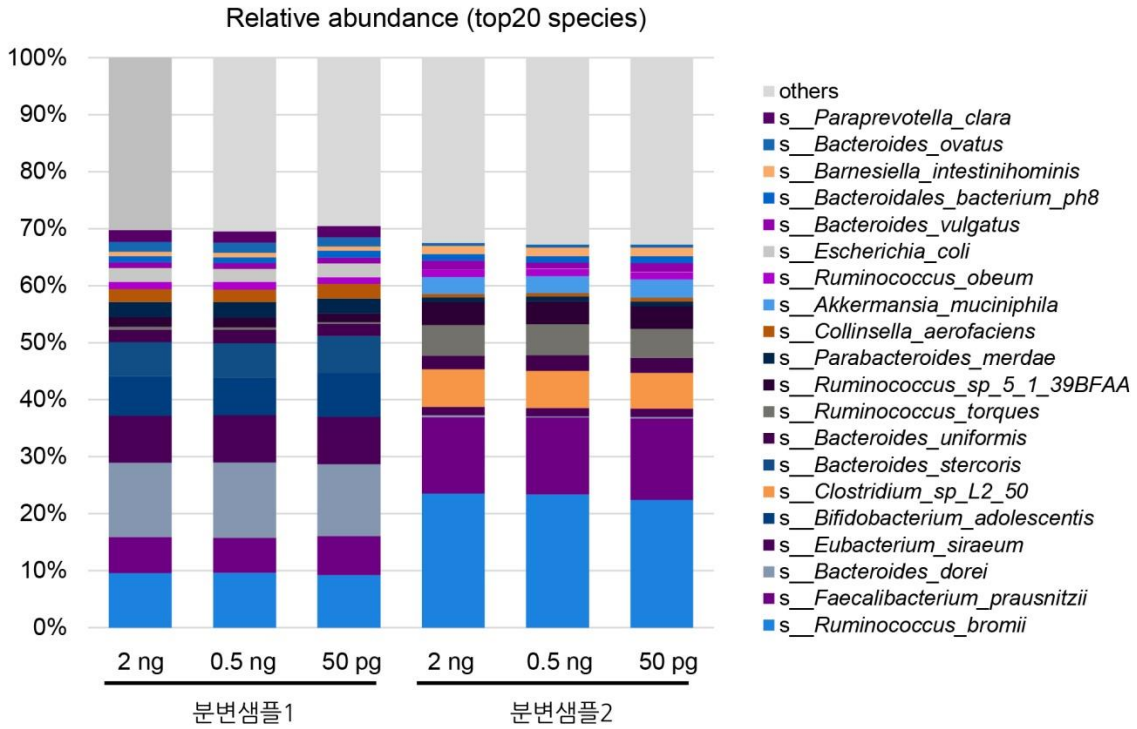
#### ◆ 사용제품

[SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit \(Takara\)](#)

#### ◆ Workflow



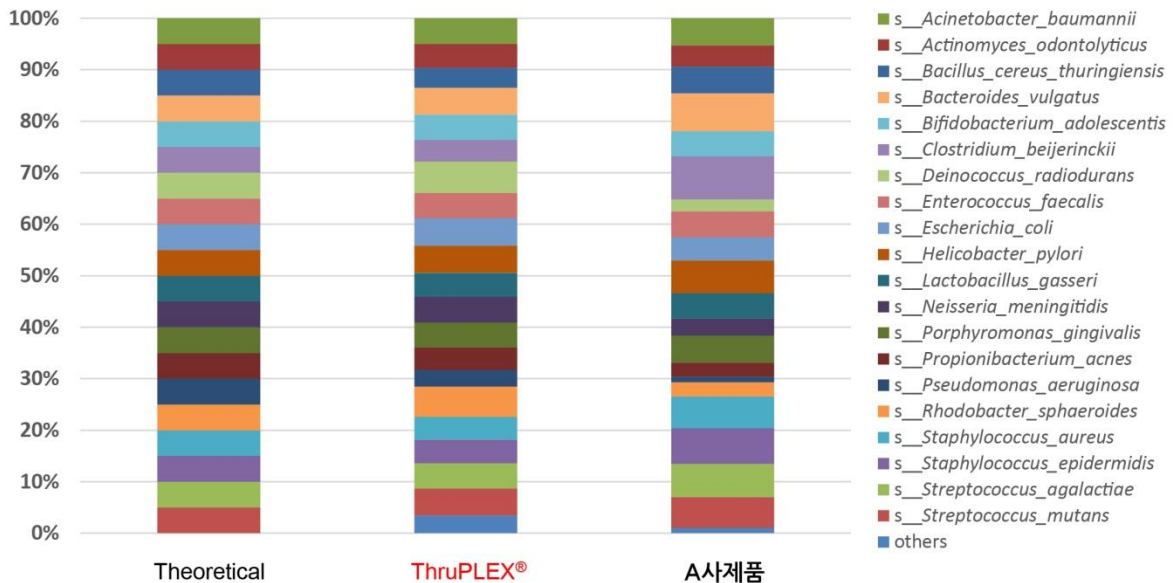
◆ 다양한 샘플양에 따른 미생물 균총 분석 결과 비교



다양한 양 (2 ng, 0.5 ng, 50 pg)의 분변샘플 1, 2를 SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit을 이용해 NGS 분석 후, 상위 20종 균주에 대하여 결과를 비교 분석하였다. 각 분변샘플에서 Input sample의 양과 관계없이 각 균주가 차지하고 있는 비율은 거의 유사하였으며, 이는 50 pg의 미량 샘플에서도 정확하게 미생물 균총을 분석할 수 있음을 나타낸다.

◆ SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit과 타사 제품의 미생물균총 분석 결과 비교

- Mock DNA (20 Strain Even Mix Genomic Material) 분석



20 균종 유래의 Genomic DNA가 동량 혼합된 Mock DNA (20 Strain Even Mix Genomic Material (ATCC, MSA-1002))를 이용하여 SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit과 A사 제품의 분석 결과를 비교하였다. SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit에서 얻은 균주 조성비가 Mock DNA (theoretical)와 상당히 일치하는

결과로 보아, A사 제품에 비해 보다 정확한 미생물 균총 분석이 가능함을 알 수 있었다.

## Application – 7

### SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit을 이용한 출아효모의 DMS-Seq 분석 기법

- 데이터 제공: 이화학연구소(RIKEN), 마이크로바이옴 연구팀

#### ◆ Introduction

Genome의 역할과 메커니즘을 포괄적으로 이해하기 위해서는 전사인자나 히스톤 등의 단백질이 DNA에 결합하는 위치를 규명해야 한다. 이러한 목적으로 이용되어 왔던 Genomic foot-printing 방식은 세포의 핵을 분리하고 DNA 분해효소를 처리해야만 했다. 이는 실험 조작이 어려울 뿐만 아니라 핵을 분리하는 과정에서 단백질과 DNA 상호작용이 변화되거나 또는 소실될 가능성이 있었다. 그리하여 본 연구실에서는 세포막 투과성 DNA 메틸화 시약인 디메틸황산 (dimethyl sulfate, DMS)를 이용하여 새로운 *in vivo* foot-printing 기법인 "DMS-Seq 기법"을 개발 중이다. DMS-Seq을 위한 프로토콜 정립을 위하여 SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit (Code 400674)를 이용하였다.

#### ◆ 사용제품

SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit (Code 400674)

#### ◆ Workflow (※)

- ① 출아효모 (Budding yeast)의 배양액을 회수하여 세포현탁액 ( $10^8 \sim 10^9$ ) 1 mL을 2 mL 튜브에 각각 분주
- ② 30  $\mu$ L의 DMS를 첨가 후, 실온에서 2 min incubation
- ③ 800  $\mu$ L의 *in vivo* STOP buffer를 첨가하여 반응을 중단시키고, washing buffer로 2회 washing
- ④ Zymolyase 처리 및 ProK/SDS를 처리하여 세포를 용해하고 phenol/chloroform 추출 및 에탄올 침전
- ⑤ RNase A 처리, phenol/chloroform 추출과 에탄올 침전
- ⑥ 12.5  $\mu$ L D.D.W를 첨가 후, 50 ng DMS 처리, DNA를 선별하여 Putrescine/APE1 처리
- ⑦ SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit (Code 400674)를 이용하여 NGS Library Preparation
- ⑧ Illumina® MiSeq, 75 bp paired-end sequencing
- ⑨ Bowtie2 소프트웨어를 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae* S288C(R64-1-1)에 mapping

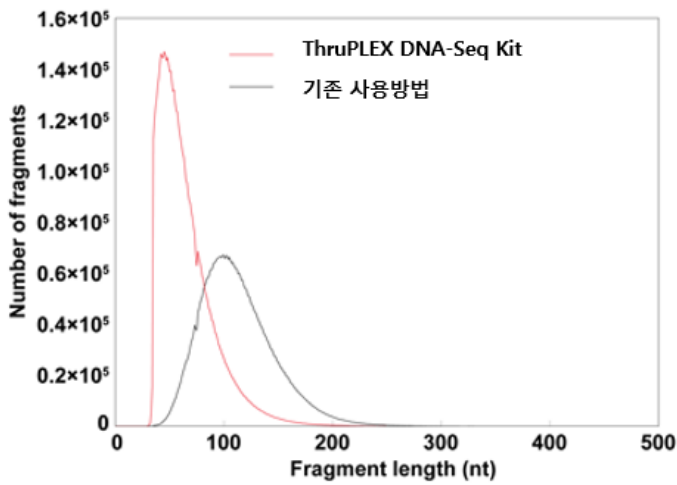
※ 실험방법에 대한 자세한 내용은 아래의 논문을 참조하세요.

Umeyama, T. *et al.* DMS-Seq for *In Vivo* Genome-wide Mapping of Protein-DNA Interactions and Nucleosome Centers. *Cell Rep.* **22**, 289-300(2017)



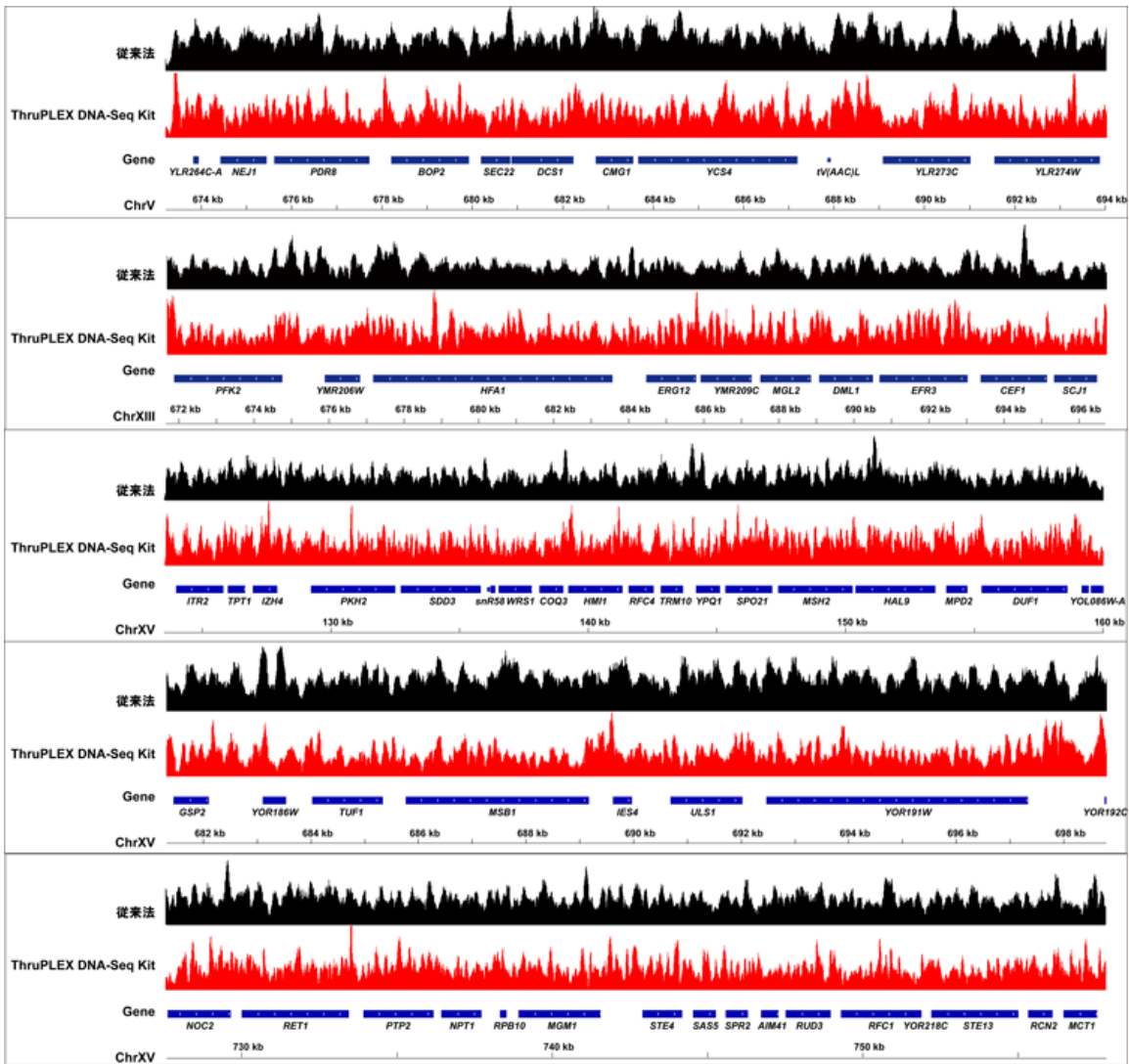
#### ◆ 기존의 분석 방법과 단편의 검출길이 비교

SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit을 이용함으로써 기존의 분석 방법으로는 NGS Library 제작이 불가능하였던 짧은 단편에 대한 NGS Library를 제작할 수 있었다.



#### ◆ Integrative Genomics Viewer (IGV)를 이용한 피크 검출

Mapping 결과, SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit을 이용하였을 때 기존 분석방법에서 검출이 되지 않았던 peak가 주기적으로 나타나는 영역을 확인할 수 있다.



◆ 실험결과에 따른 연구자의 코멘트

SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit을 이용함으로써 기존 방법으로는 분석이 불가능하였던 양이 적고 짧은 단편의 서열을 분석할 수 있어 보다 포괄적인 분석을 진행할 수 있었다.

◆ 제품 사용을 검토 중인 분께 사용자의 한마디

간편한 실험 방법으로 NGS Library를 제작할 수 있으며, 제품 내의 튜브도 식별이 용이하도록 분류되어 있어 NGS Library 제작에 익숙하지 않은 사람에게 추천합니다.

## SMARTer® ThruPLEX® 제품리스트

Pico-gram 수준의 DNA 샘플에 대응, 가장 범용성이 높은 제품 (for all purpose)

### SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit

제품명	Code	용량	Input 샘플양	샘플	적용실험
<a href="#">SMARTer® ThruPLEX® DNA-seq Kit</a>	R400674	24회	50 pg – 50 ng	gDNA	Whole Genome Seq Whole Exome Seq Targeted-Seq ChIP-Seq
	R400675	48회		FFPE DNA	
	R400676	96회		Cell-free DNA	
	R400677	480회		ChIP DNA PCR Amplicon	

1,600개 이상의 Unique Molecular Tag으로 Low frequency variant 분석

### SMARTer® ThruPLEX® Tag-seq Kit

제품명	Code	용량	Input 샘플양	샘플	적용실험
<a href="#">SMARTer® ThruPLEX® Tag-seq Kit</a>	R400584	12회	1 ~ 50 ng	gDNA	Targeted-Seq ChIP-Seq ctDNA-Seq
	R400585	48회		FFPE DNA	
	R400586	96회		Cell-free DNA ChIP DNA	

1ng의 Cell-free DNA 분석

### SMARTer® ThruPLEX® Plasma-seq Kit

제품명	Code	용량	Input 샘플양	샘플	적용실험
<a href="#">SMARTer® ThruPLEX® Plasma-seq Kit</a>	R400679	24회	1 ~ 30 ng	Cell-free DNA (Plasma, Liquid biopsy)	Whole Genome-Seq Whole Exome-Seq Targeted-Seq ctDNA-Seq
	R400680	48회			
	R400681	96회			
	R400682	480회			