

<https://doi.org/10.1002/smt.202100938>

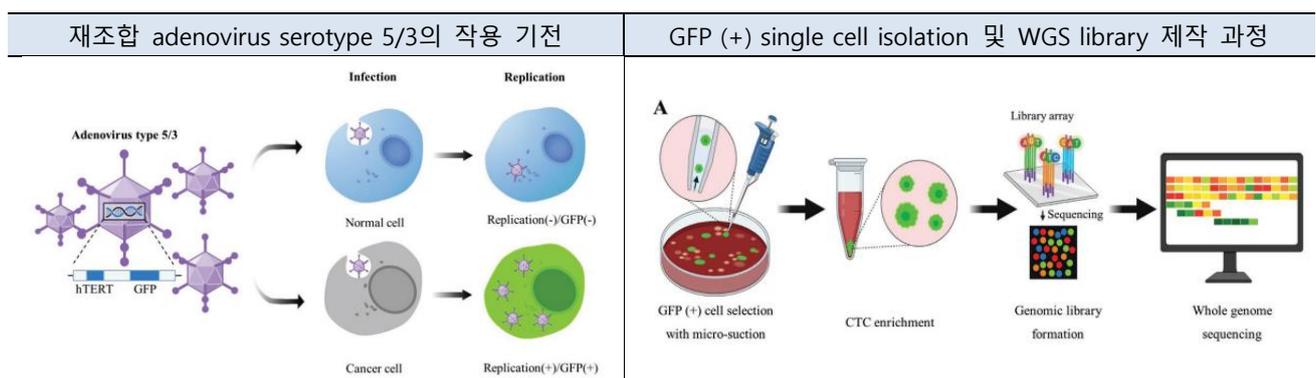
Isolation and Genomic Analysis of Single Circulating Tumor Cell Using Human Telomerase Reverse Transcriptase and Desmoglein-2

Jae Won Song, Jungyo Suh, Seok Won Lee, Jung Ki Yoo, Uijeong Lee, Jang Hee Han, Cheol Kwak, Minyong Kang, Yi Rang Kim, Chang Wook Jeong, Jin Woo Choi

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

Abstract 미리보기

순환계의 상피세포는 tumor로부터 기원하는 것으로 알려져 있기 때문에, epithelial cell adhesion molecule 은 circulating tumor cell (CTC) 분리를 위한 표준 마커로 사용되어져 왔다. 그러나, 대부분의 암세포는 혈관 내로 침투하는 과정에서 epithelial-mesenchymal transition (EMT)를 거치게 되면서 사라지는 것으로 보인다. 따라서, CTC의 임상적 중요성을 더 심층적으로 이해하기 위해서는 CTC를 검출할 수 있는 보다 진보한 기술이 필요하게 되었다. 형광 monitor gene을 발현하는 바이러스를 암세포에 특이적으로 감염, 복제시키는 것은 CTC를 효과적으로 검출하는 방법으로 활용될 수 있다. 본 논문의 저자들은 대부분의 암세포에서 발현하는 것으로 알려진 desmoglein-2에 결합하는 adenovirus를 설계했으며, 암세포에 특이적인 human telomerase reverse transcriptase promoter를 활용해 viral E1 region을 조절하기 위해 삽입하였다. 이 adenovirus는 수술 전/후의 renal cell carcinoma (RCC)와 prostate cancer (PC) 환자의 CTC 수를 비교하는 데 활용하였다. 분리한 2~3개의 CTC는 whole genome sequencing (WGS)에 적합하였으며, 게놈 분석을 통해 primary tumor와 CTC 사이의 변이 차이를 증명하였다. 이를 종합해보면, 본 논문에서 제시하는 방법은 빠르고 재현성 있게 CTC를 분리할 수 있으며, enriched genome sequencing을 통해 암 환자의 현장 진료 시스템 및 예후를 결정하는 데 사용될 수 있을 것으로 기대된다.



논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

PicoPLEX® Gold Single Cell DNA-seq Kit (Code R300669)

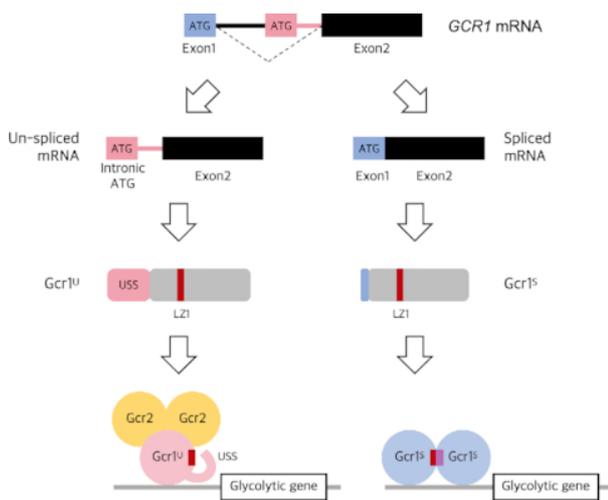
- Whole Genome Amplification (WGA)의 golden standard인 PicoPLEX® 기술 도입
- Single cell ~ 최대 5개 세포에서 심층적으로 전장 유전체 분석하는 경우에 적합
- WGA와 동시에 Illumina® 분석용 DNA-seq library를 제작하므로 시간 및 비용 절약
 - Library 총 제작 시간 3시간 이내, hands on time 30분
- CNV, SNV, aneuploidy (염색체 이수성)을 매우 높은 민감도와 재현성으로 정확하게 분석 가능.

Differential activation mechanisms of two isoforms of Gcr1 transcription factor generated from spliced and un-spliced transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*

Seungwoo Cha, Chang Pyo Hong, Hyun Ah Kang, Ji-Sook Hahn

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

Abstract 미리보기



Gcr1은 *Saccharomyces cerevisiae*의 glycolytic 유전자에 중요하게 관여하는 전사 인자로서, 최근 un-spliced transcript 유래의 Gcr1^U와 spliced transcript 유래의 Gcr1^S, 두 개의 isoform이 존재하는 것이 밝혀졌다. 본 연구에서는 CRISPR/Cas9를 이용해 Gcr1^U 또는 Gcr1^S만을 발현하는 균주를 제작하고, isoform에 따라 보이는 activation mechanism의 차이를 설명한다. Gcr1^U monomer는 Gcr2 homodimer와 활성 복합체를 형성하는 반면, Gcr1^S는 Gcr2가 존재하지 않을 때 homodimer 형태로 작용한다. 55개의 잔기로 구성된 USS domain은 Gcr1^U의 N-terminus에만 존재하며, Gcr1^U 뿐 아니라 Gcr1^S의 dimerization까지 억제한다.

Gcr1^S monomer는 에탄올 활용에 필요한 mitochondrial aldehyde dehydrogenase를 인코딩하는 *ALD4* 유전자 과발현에 의해 회복할 수 있는 *ALD4* promoter에 직접 결합하여, 발효에서 호흡으로 대사가 전환하는 것을 억제한다. Gcr1^U와 Gcr1^S는 유사한 유전자 조절에 관여하지만 성장기에 따라 차등한 활성을 보이며, 이는 isoform이 환경 조건에 따른 별도의 활성화 기전을 통해 다른 역할을 하고 있음을 보여준다.

Takara 제품을 이용한 method 미리보기

ChIP-seq을 위해 triplicate로 배양된 세포를 각각 회수하여 sonication한 후, 총 3 mL 샘플을 준비했다. 두 세트의 샘플 600 μ L는 각 protein tag에 따른 항체와 beads를 함께 incubation한 후 reverse crosslinking 하였으며, 이 후 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)를 처리하고, -80 °C에서 에탄올과 glycogen으로 침전시켰다. 건조된 pellet은 물로 용해하여 높은 DNA 농도를 위해 모아서 분석하였다.

Gcr1^U와 Gcr1^S의 ChIP DNA fragment (1-5 ng)의 sequencing library는 Takara의 [ThruPLEX® DNA-Seq Kit](#)로 제작하였으며, 제조사의 프로토콜에 따라 실험을 진행하였다. 간략하게, DNA fragment의 end-repair 과정 후 3' A-tailing, adapter ligation를 진행하고, 15 cycle의 PCR을 통해 DNA를 증폭한 후 정제하였다. 제작된 library는 Illumina®의 HiSeq2500 기기를 사용해 single-end sequencing, 50 cycle로 분석하였다.

논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

[ThruPLEX® DNA-Seq Kit \(Code R400674\)](#)

- 50 pg ~ 50 ng DNA 샘플로부터 Illumina® 분석용 DNA-seq library를 제작
 - FFPE DNA, ChIP DNA 등 극소량 혹은 degradation 된 샘플에도 적용 가능
- Single tube 내 3-step으로 완료되는 매우 간편한 프로토콜
 - 동일 목적의 타사 제품들과 달리, 중간 정제과정이 없어 샘플 소실 및 오염 최소화
- ThruPLEX® 기술 도입으로, stem loop adapter를 이용해 background data 영향 최소화

Expanded clinical validation of Haploseek for comprehensive preimplantation genetic testing

David A. Zeevi, Daniel Backenroth, Elinor Hakam-Spector, Paul Renbaum, Tzvia Mann, Fouad Zahdeh, Reeval Segel, Sharon Zeligson, Talia Eldar-Geva, Ido Ben-Ami, Adi Ben-Yehuda, Shai Carmi & Gheona Altarescu

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

└ Abstract 미리보기

본 논문의 저자들은 이전에 착상 전 유전자 검사 (Preimplantation genetic testing, PGT)를 위한 Haploseek 분석법을 개발하였으나, 몇몇 주요한 기능이 누락되었으며 체계적으로 검증되지 못하였다. 따라서, 이 방식을 보다 확장하여, 배아의 조부모 DNA를 함께 분석하여, X 염색체 혹은 부모가 동일한 haplotype을 가지는 부위에서의 변이를 분석할 수 있도록 하였다. 모든 검체는 0.2X의 낮은 coverage를 이용해 시퀀싱하였으며, SNP (single-nucleotide polymorphism) microarray genotyping을 수행하여 부모와 조부모 혹은 형제와 비교하였다. 이렇게 확장된 Haploseek 방식을 이용하여, 본 논문에서는 각 배아에서 보이는 염색체 내 copy-number variants (CNVs) 뿐 아니라 관련 variant-flanking haplotype을 예측해냈다. 각각의 임상 샘플은 PCR을 기반으로 한 PGT 방식을 통해 예측한 haplotype을 검증하였고, CNV 예측은 기존에 상용화된 kit와 비교하여 검증하였다. 총 151개의 배아 생검에서 모두 Haploseek 를 통해 확인한 haplotype과 CNV가 임상 PGT 결과와 일치하였으며, 17개의 상염색체 우성, 5개의 상염색체 열성, 3개의 X 염색체 관련 단일 유전자 질환을 포함하였다. 또한 1개의 로버트슨 전좌 염색체 이상과 2개의 상호전위, 17개의 염색체 copy-number counting이 수행되었다. 이 결과는 Haploseek 방식이 임상적으로 정확성이 있으며, 임상 PGT 분석에서 사용되는 모든 적용성에 부합함을 증명한다.

└ Takara 제품을 이용한 method 미리보기

Single cell/blastomere/blastocyst DNA는 다카라바이오의 [PicoPLEX® WGA Kit](#) 제품을 이용해 WGA 되었다. 이후 증폭된 각 세포의 DNA는 Illumina®사의 Nextera XT library prep kit를 이용해 genome sequencing library로 제작되었다. 각 library는 normalization 및 pooling 과정을 거쳐, NextSeq 500 기기에서 1 X 75 single read 혹은 2 X 75 paired end를 이용해 0.2 - 0.4x의 coverage로 분석되었다.

└ 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

[PicoPLEX® WGA Kit \(Code R30050\)](#)

- PGS/PGD의 golden standard로 여겨지는 [PicoPLEX® 기술](#) 도입
- 1 ~ 10 human cells 혹은 15 ~ 50 pg of human DNA의 샘플에 적용 가능
- Single tube 내 3-step으로 완료되는 매우 간편한 프로토콜 - 샘플 오염 및 손실 최소화 과정
- DNA-seq library 제작, qPCR, array 등으로 최종 산물 분석 가능

[최신 버전] [PicoPLEX® Single Cell WGA Kit v3 \(Code R300718\)](#)

- High-fidelity 효소 도입으로, CNV는 물론 기존에는 분석이 어려웠던 SNV까지 검출 가능
- Single tube, 3-step의 프로토콜이 2.5시간 내 완료됨
- 1 ~ 10개의 세포 혹은 15 ~ 60 pg DNA로부터 2 µg 수준의 최종 산물로 증폭

Epigenetic alteration contributes to the transcriptional reprogramming in T-cell prolymphocytic leukemia

Shulan Tian, Henan Zhang, Pan Zhang, Michael Kalmbach, Jeong-Heon Lee, Tamas Ordog, Paul J. Hampel, Timothy G. Call, Thomas E. Witzig, Neil E. Kay, Eric W. Klee, Susan L. Slager, Huihuang Yan & Wei Ding

아래 내용은 다카라코리아에서 직접 번역한 내용으로, 해석하는 과정에서 원작자의 의도와 상이한 내용이 포함되어 있을 수 있습니다. 학술 정보를 목적으로 하는 경우 원문을 참고하여 주시기를 바랍니다.

└ Abstract 미리보기

T 세포 전림프구성 백혈병(T cell prolymphocytic leukemia, T-PLL)은 치명적인 임상 결과를 보이는 희귀 질환으로, 세포유전학적 분석, whole-exome / whole-genome sequencing을 통해 T-PLL이 inversion, translocation, CNV (copy number variation)을 비롯한 주요한 구조 변경을 나타내는 것이 확인되었다. 재발성 체세포 돌연변이는 염색질 조절인자를 코딩하는 유전자와 JAK-STAT 신호 전달 경로에서도 확인되었다. 대다수의 암에서 후성 유전학적 변화가 특징으로 나타나지만, T-PLL에서의 genome-wide epigenomic profiling에 대한 연구가 보고되지 않아, 이의 암 발생 과정에 대한 연구에 제한이 있었다. 따라서, 본 논문의 저자들은 T-PLL이 유발되는 데에 후성 유전학적인 매커니즘이 중요한 역할을 한다고 가정하였다. 이 가설을 체계적으로 확인하기 위해, 본 논문에서는 T-PLL 환자와 건강한 사람을 대상으로 진행한 H3K4me3와 H3K27ac의 ChIP-seq과 RNA-seq 데이터를 이용해 조절 영역에 대한 genome-wide map을 제작하였다. 이를 바탕으로 T-PLL에서 down-regulated된 유전자가 주로 방어 기작, 면역 체계 혹은 적응 면역 반응에 주로 관여하고 있는 반면, up-regulated된 유전자는 발달 과정 및 세포 운명을 결정하는데 주요한 역할을 하는 WNT 신호 전달 경로와 연관이 있다는 것을 발견하였다. 특히, 본 논문에서 분석한 바에 따르면, T-PLL에서 DNA 손상 반응과 T 세포 활성화에 관여하는 유전자, 종양 유전자의 후성 유전학적 조절과 관련된 면역 전사 인자와 결합하는 motif가 매우 상이한 피크를 보이면서 조절 환경에서 전체적인 변경을 보였다. 이를 종합하여 볼 때, 본 논문은 T-PLL의 후성 유전학적인 조절 장애와의 관련성을 증명하였다.

└ Takara 제품을 이용한 method 미리보기

H3K4me3는 주로 promoter에, H3K27ac는 active enhancer에 위치하며, 이 두개의 histone mark는 유전자 조절 영역을 mapping하는 데 널리 사용되고 있다. 따라서, 본 논문의 저자들은 anti-H3K27ac 항체와 anti-H3K4me3 항체를 이용해 ChIP을 수행하였다. 이후 5 ng의 ChIP DNA와 Takara의 [ThruPLEX® DNA-Seq Kit](#)를 이용해 ChIP-seq library를 제작하였다. ChIP enrichment는 real-time PCR을 이용해 검증하였으며, 제작된 library는 양 말단으로부터 51개 혹은 101개 염기로부터 HiSeq4000 플랫폼을 이용해 분석되었다.

└ 논문에서 사용된 Takara 관련 제품 알아보기

[ThruPLEX® DNA-Seq Kit \(Code R400674\)](#)

- DNA 양이 적어, 그간 NGS 분석이 어려웠던 ChIP DNA에 적용 가능
 - 적용 샘플: 50 pg ~ 50 ng의 double strand DNA
- Single tube 내 3-step으로 완료되는 매우 간편한 프로토콜 - 샘플 오염 및 손실 최소화 과정
- [\[적용\] ThruPLEX를 이용한 ChIP-seq](#)
- [\[논문\] ThruPLEX® for ChIP-Seq](#)