

기관고유연구사업 결과보고서

편집순서 1 : 결표지 (앞면)

(과제번호 : 0510560)

국립암센터 Genomics Core Laboratory의 운영
(Genomics core facility for translational cancer research)

과제책임자 : 이 연 수

국 립 암 셴 터

↑
5cm

↓

국립암
센터
Genomi
cs Core
Laborat
ory의
운영

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구
사업 결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시
국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야
합니다.

(14 pont, 고딕체)

↑
6cm ↓

국
립
암
센
터

↑
3cm

↓

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “국립암센터 Genomics Core Laboratory의 운영” 과제의 결과보고서로 제출합니다.

2007. 12 . 28

국 립 암 센터

과 제 책 임 자 : 이 연 수

연 구 원 : 홍 성 혜

” : 김 숙 영

” : 홍 승 현

” : 황 정 아

” : 앨 빈 천

” : 강 호 정

” : 김 일 진

” : 장 상 근

목 차

< 요약 문 >

(한글)

(영문)

1. 연구사업의 최종목표
2. 연구사업의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

< 요약 문 >

연구분야(코드)		과제번호		0510560	
과제명		국립암센터 Genomics Core Laboratory의 운영			
연구기간/연구비 (천원)		합계	2005년 10월 01일 ~ 2007년12월31일	530,000	
		1차년도	2005년 10월 01일 ~ 2005년12월31일	80,000	
		2차년도	2006년 01월 01일 ~ 2006년12월31일	150,000	
		3차년도	2007년 01월 01일 ~ 2007년12월31일	300,000	
과제책임자		성명	이연수	주민등록번호	
		전화번호	031-920-2588	전자우편	yslee2@ncc.re.kr
색인단어	국문	지노믹스, 단일염기다형성, 마이크로어레이, 핵산분리정제, 염기서열분석, 에피제노믹스			
	영문	Genomics, SNP, Microarray, Nucleic Acid Purification, Sequencing, Epigenomics			
<p>◆ 연구목표</p> <p><최종목표></p> <ul style="list-style-type: none"> - High-throughput genomics service를 제공함으로써 국립암센터 연구진들이 SNP 연구를 수행하는데 있어 실험적 측면에서 도움을 주고, 시간 및 연구비 절감에 기여하기 위함. - 암센터 내에서 유전체연구를 통한 암연구를 활성화시켜 향후 이행성연구(translational research)의 기반 기술을 확보 <p><당해년도 목표></p> <ul style="list-style-type: none"> -System set up (각종 기기의 set up 및 technician training) -Test run 및 Data의 quality 확보 (high call rate, low error rate) -분석 장비 사용 매뉴얼 및 표준화 (Process standardization) -System을 활용한 서비스 및 연구 진행 <ul style="list-style-type: none"> - 각종 시료로부터 핵산 분리, 정제 (Automatic DNA extraction) - 염기서열 자동분석 (Automatic Sequencing) - 단일염기다형성 분석 (SNP analysis): genome wide & target gene - 유전자 발현 양상 분석 (Gene Expression profiling): small to large scale 					
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p>1. 기본 업무</p> <p>암센터 내의 연구 수요에 따라, 핵산 분리 정제, 염기서열분석, 단일염기다형성분석 및 유전자발현양상분석의 실험 지원. 프로젝트 수행을 위한 연구 자문</p> <p>2. 인력 운영</p> <p>Core의 핵심 기술을 보유한 정규직 연구원을 중심으로 하고, 연구비 중 일부를 외부인건비로 책정하여 과제연구원을 채용하여 운용</p>					

3. 연구비 및 검사 비용의 운영
 외부인건비, 직접경비 등은 과제연구비를 통해 지원. 실험 지원에 필요한 재료비의 비용은 사용자부담을 원칙으로 함 (주요 재료를 사용자가 구매)

4. 연구 성과
 Core Lab.의 연구 성과는 연간 수행된 기본 업무의 건수를 정리하여 연구 성과물로 제시.

5. Core Lab. 활성화 및 발전을 위한 노력
 Core Lab.운영 및 담당 업무를 국립암센터 연구자들에게 홍보, 과제연구원들의 숙련화를 위한 교육, 유전체연구방법과 관련된 최신 기술 도입 및 개선

◆ 연구성과

<정량적 성과>

지원 내용	2005년	2006년	2007년
핵산분리정제	-	-	9
SNP 분석	1	2	14
Microarray 분석	-	4	6
Sequencing	-	-	91
계	1	6	120

* 2005년은 3개월의 연구기간 동안 초기 system set up에 치중했으며 2006년에는 Microarray 분석 관련 연구원 training이 주로 이루어졌음.

<정성적 성과>

- Core Lab의 기기 안정화 및 연구원 training을 통한 1차 set up 완료, 본격적인 연구 지원 수행
- Core Lab 운영 및 담당 업무, 연구 지원 양식 등을 국립암센터 연구자들에게 홍보 (그룹웨어의 core게시판 및 커뮤니티 등의 홍보 system 신설)
- 국립암센터 연구진들에게 Genomics 분석 지원을 제공함으로써, 연구자들에게 보다 다양한 연구 기회 제공
- 집중적인 연구시설을 이용하여 SNP 및 유전자 발현을 분석함으로써 각 연구진들이 개별적으로 연구하는데 소요되는 시간과 경비를 절감

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)	성 명	이연수, 김숙영, 홍성혜, 홍승현, 황정아, 엘빈천, 강효정, 김일진, 장상근
	주민등록번호	

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

Project Summary

Title of Project	Genomics core facility for translational cancer research
Key Words	Genomics, SNP, Microarray, Nucleic Acid Purification, Sequencing, Epigenomics
Project Leader	Yeon-Su Lee
Associated Company	
<p>Comprehensive support for studies of Polymorphism, genetic mutation and gene expression</p> <p>With remarkable advances in genomic technologies, the National Cancer Center established the Genomics Core Facility to investigate the contribution of genetic variation, gene expression and other molecular genetic changes of the human genome to cancer susceptibility and outcomes. Supporting and working in concert with clinicians, epidemiologists, biostatisticians and basic research scientists in the intramural research program, the Genomics Core Facility has developed the capacity to conduct genome-wide association studies and candidate gene approaches to identify the heritable determinants of various forms of cancer.</p> <p>Mission: Genome technology is a high through-put experimental technology, which provides rapid and quantitative information about genomic status in human. The mission of the Genomics Core encompasses two related programs. First, basic research support is provided to members of the NCC and, on a limited basis, to investigators who performed institutional collaboration with the NCC.</p> <p>Expertise:</p> <p>The Genomics Core provides nucleic acid purification from various tissues and cell cultures, SNP analysis for targeted genes, genome wide expression analysis and sequencing. Automated high through-put experiments and data analysis are available in either eppendorf tube, 96 well and/or 384 well format. Software for sequencing analysis and polymorphism are also available.</p> <p>Established Technologies and systems:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Customized (target Gene) SNP validation: MassARRAY system(Sequenom, USA) - High through-put Sequencing: ABI3730 system(Applied Biosystems, USA) - Automatic DNA extraction: M48 system (Qiagen, Germany) 	

※ 연구사업의 목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

편집순서 6 : 연구사업결과

1. 연구사업의 최종목표

현재까지 여러 종류의 SNP 분석 방법이 개발되고 응용되어 새로운 SNP 발굴에 사용될 뿐 아니라 대량의 환자 샘플에서 특정 부위의 SNP를 검사하는데 널리 이용되고 있다. 전통적으로 많이 사용되는 방법으로는 자동염기서열 분석법, RFLP, SSCP, DGGE 등이 있으나 이러한 방법들은 민감도가 낮고, 대량의 샘플에 적용하는데 적합하지 않다. 최근에는 대용량 분석 기술 (high-throughput technology)의 발달로 한 번에 수백 개의 샘플을 대상으로 SNP 분석이 이루어지는 TaqMan assay, SNaPshot assay, MALDI-TOF를 이용한 assay 등과 유전체에 널리 퍼져있는 수십만 개의 SNP를 대상으로 한 번에 분석이 가능한 Bead array, SNP 분석용 microarray 등이 개발되어 널리 사용되고 있다. 이러한 대용량 분석 기술은 많은 장점을 가진 반면 고가의 장비와 숙련된 사용자가 요구되므로 SNP 연구를 수행하고자 하는 연구자들이 쉽게 접근할 수 없는 단점이 있다. 그러나 전통적인 방법으로 대량의 샘플을 대상으로 SNP 연구를 수행하는 경우, 환자의 혈액 샘플로부터 DNA를 추출해서 SNP를 분석하는데 까지 많은 노동력, 시간, 비용이 소모됨을 고려할 때 대용량 분석 기술을 두루 갖추고 전문화된 SNP 분석 서비스를 제공하는 자체적인 Genomics (SNP) Core Laboratory의 운영이 요구된다.

Genomics (SNP) Core Laboratory 운영의 최종 목표는 high-throughput genomics service를 제공함으로써 국립암센터 연구진들이 SNP 연구를 수행하는데 있어 실험적 측면에서 도움을 주고, SNP 연구 수행에 소모되는 시간 및 연구비 절감에 기여하고자 하는 것이다.

- High-throughput genomics service를 제공함으로써 국립암센터 연구진들이 SNP 연구를 수행하는데 있어 실험적 측면에서 도움을 주고, 시간 및 연구비 절감에 기여하기 위함.

- 암센터 내에서 유전체연구를 통한 암연구를 활성화시켜 향후 이행성연구(translational research)의 기반 기술을 확보

2. 연구사업의 내용 및 결과

2.1 1차년도 (2005년)

- SNP 검사 의뢰 내용 (1건)

1) 의뢰자 : 국립암센터 폐암연구과 한지연

2) 연구 과제명

: 폐암환자에서 약물유전체 분석을 통한 항암화학요법 감수성 예측 연구

3) 연구 대상 (샘플수) : 폐암 환자군 총 344명

4) 연구 대상 수집 경로 : 환자 혈액 샘플

5) DNA 추출 여부, 방법 및 정량 유무 :

- 의뢰자가 미리 DNA 추출 후 검사 의뢰
- DNA 추출 시약 : QIAamp DNA blood mini kit
- 정량 유무 : 의뢰자가 정량 후 의뢰 (농도: 100ng/ul)

6) 연구 대상 유전자 : ABCB1, ABCB2

7) 연구 대상 SNP 수 : 5개의 SNP site 검사 의뢰

8) 염기 서열 정보 : 의뢰자가 사전에 공지 해줌

- SNP 검사 의뢰 수행 내용 및 결과

총 344명의 샘플을 대상으로 5개의 SNP site에 대해 SNP genotyping을 다음과 같이 수행 함.

1) 검사 방법 : TaqMan assay (3개의 SNP site 진행), sequencing (2개의 SNP site 진행)

2) 검사 결과 : 일부 샘플 상의 문제로 검사가 되지 않는 6-9 샘플을 제외한 모든 샘플의 5개 SNP site의 genotyping을 완료 함.

3) 검사 결과 통보 : 각 SNP site 마다 의뢰한 샘플의 genotype을 입력한 파일 제작 및 논문 작성 시 필요한 genotyping method 부분을 작성하여 의뢰자에게 전달함.

4) 검사 비용 처리 : 검사 인력은 Core Lab. 자체 과제 연구원을 활용하여 인건비 및 Core Lab. 기본 운영에 소모되는 비용을 제외한 검사에 직접 소모되는 시약 비용은 의뢰자 에게 전달하여 처리 하도록 함.

2.2 2차년도 (2006년)

- SNP 검사 서비스 2건, Microarray 실험 및 분석 서비스 4건 총 6건 수행

(1) SNP 검사 의뢰 내용 (2건)

1) SNP 검사 I

1] 의뢰자 : 국립암센터 대장암연구과 정승용

2] 연구 과제명

: 인체고형암의 유전체 분석

3] 연구 대상 (샘플수) : 대장암 환자군 436명, 정상 대조군 568명 총 1004명

4] 연구 대상 수집 경로 : 환자 혈액 샘플 및 수술 정상 조직 추출 DNA

5] DNA 추출 여부, 방법 및 정량 유무 :

- 의뢰자가 미리 DNA 추출 후 검사 의뢰
- DNA 추출 시약 : QIAamp DNA blood mini kit, Trizol reagent

- 정량 유무 : 의뢰자가 정량 후 의뢰 (농도: 50ng/ul)

6] 연구 대상 유전자 : GSTT2

7] 연구 대상 SNP 수 : 4개의 SNP site 검사 의뢰

(-537G>A, -277T>C, -129T>C, -158G>A)

8] 염기 서열 정보 : 의뢰자가 사전에 공지 해줌

2) SNP 검사 II

1] 의뢰자 : 국립암센터 대장암연구과 정승용

2] 연구 과제명

: 인체고형암의 유전체 분석

3] 연구 대상 (샘플수) : 대장암 환자군 462명, 정상 대조군 245명 총 707명

4] 연구 대상 수집 경로 : 환자 혈액 샘플 및 수술 정상 조직 추출 DNA

5] DNA 추출 여부, 방법 및 정량 유무 :

- 의뢰자가 미리 DNA 추출 후 검사 의뢰

- DNA 추출 시약 : Trizol reagent, QIAamp DNA blood mini kit

- 정량 유무 : 의뢰자가 정량 후 의뢰 (농도: 50ng/ul)

6] 연구 대상 유전자 : CHFR

7] 연구 대상 SNP 수 : 6개의 SNP site 검사 의뢰

(413C>T, 1582T>C, 1615G>A, 685G>A, 762A>C, 1367C>T)

8] 염기 서열 정보 : 의뢰자가 사전에 공지 해줌

(2) Microarray 실험 및 분석 서비스 의뢰 내용 (4건)

1) Microarray 실험 및 분석 서비스 I

1] 의뢰자 : 국립암센터 유방내분비암연구과 이은숙

2] 연구 과제명

: 유방암 환자에서 화학요법과 내분비요법에 대한 반응 및 예후를 예측할 수 있는 선택지표 개발

3] 연구 대상 (샘플수) : 유방암 환자 총 53례

4] 연구 대상 수집 경로 : 유방암 환자의 biopsy 샘플

5] RNA 추출 여부, 방법 및 정량 유무 :

- 의뢰자가 미리 RNA 추출 후 실험 의뢰

- RNA 추출 시약 : Trizol reagent

- 정량 유무 : 의뢰자가 정량 후 의뢰 (10ug/ul 이상)

6] 실험 Microarray : Affymetrix GeneChip U133A 2.0

7] 분석 방법 :Affymetrix GCOS software, GeneCluster2, Eisen software (Cluster, Treeview)

2) Microarray 실험 및 분석 서비스 II

1] 의뢰자 : 국립암센터 폐암연구과 이진수

2] 연구 과제명

: A case-control study of the relationship of passive smoking with cancer in Korea (II)

3] 연구 대상 (샘플수) : 암세포주 총 6례

4] 연구 대상 수집 경로 : 암세포주 culture 후 RNA 추출하여 의뢰

5] RNA 추출 여부, 방법 및 정량 유무 :

- 의뢰자가 미리 RNA 추출 후 실험 의뢰

- RNA 추출 시약 : Trizol reagent, RNeasy column (Qiagen)

- 정량 유무 : 의뢰자가 정량 후 의뢰 (약 50ug/ul)

6] 실험 Microarray : Affymetrix GeneChip U133A 2.0

7] 분석 방법 :Affymetrix GCOS software, Eisen software (Cluster, Treeview), MS Excel

3) Microarray 실험 및 분석 서비스 III

1] 의뢰자 : 국립암센터 자궁암연구과 강석범

2] 연구 과제명

: 난소암 항암화학요법 치료반응 예측 유전자적 지표 개발

3] 연구 대상 (샘플수) : 암세포주 총 4례

4] 연구 대상 수집 경로 : 암세포주 culture 후 RNA 추출하여 의뢰

5] RNA 추출 여부, 방법 및 정량 유무 :

- 의뢰자가 미리 RNA 추출 후 실험 의뢰

- RNA 추출 시약 : Trizol reagent

- 정량 유무 : 의뢰자가 정량 후 의뢰 (30-60ug/ul)

6] 실험 Microarray : Affymetrix GeneChip U133A 2.0

7] 분석 방법 :Affymetrix GCOS software, Eisen software (Cluster, Treeview), MS Excel

4) Microarray 실험 및 분석 서비스 IV

1] 의뢰자 : 국립암센터 소아암연구과 김용연

2] 연구 대상 (샘플수) : 암세포주 총 3례

3] 연구 대상 수집 경로 : 암세포주 culture 후 RNA 추출하여 의뢰

4] RNA 추출 여부, 방법 및 정량 유무 :

- 의뢰자가 미리 RNA 추출 후 실험 의뢰

- RNA 추출 시약 : Trizol reagent

- 정량 유무 : 의뢰자가 정량 후 의뢰 (100 ug/ul 이상)

5] 실험 Microarray : Affymetrix GeneChip U133A 2.0

6] 분석 방법 :Affymetrix GCOS software, Eisen software (Cluster, Treeview), MS Excel

- SNP 검사 의뢰 수행 내용 및 결과

1) 검사 방법 : TaqMan assay, Sequencing

2) 검사 결과 : 일부 샘플 상의 문제로 검사가 되지 않는 샘플을 제외한 모든 샘플의 SNP site의 genotyping을 완료 함.

3) 검사 결과 통보 : 각 SNP site 마다 의뢰한 샘플의 genotype을 입력한 파일 제작 및 논문 작성 시 필요한 genotyping method 부분을 작성하여 의뢰자에게 전달함.

4) 검사 비용 처리 : 검사 인력은 Core Lab. 자체 과제 연구원을 활용하여 인건비 및 Core Lab. 기본 운영에 소모되는 비용을 제외한 검사에 직접 소모되는 시약 비용은 의뢰자에게 전달하여 처리 하도록 함.

- Microarray 실험 및 분석 서비스 의뢰 수행 내용 및 결과

1) 실험 방법 : Affymetrix GeneChip U133A 2.0 실험 프로토콜 사용

2) 실험 및 분석 결과 : 일부 biopsy 샘플의 경우 RNA degradation 문제로 인하여 실험이 불가하였고 실험에 필요한 최소 농도에 못 미치는 샘플은 실험에서 제외함.

분석은 위에 언급한 software를 기본으로 분석하였음. 실험 디자인에 따라 실험군과 대조군 사이에서 overexpression 되었거나 downregulation 된 유전자들을 fold-change 및 Wilcoxon rank test와 같은 분석 기준을 적용하여 선별하여 리스트를 만들고, 필요한 경우 Hierarchical clustering 결과와 class prediction 및 marker selection에 필요한 알고리즘을 적용하여 유전자들의 발현 양상 및 반응군 예측 인자를 선별하여 training set과 test set을 적용하여 예측 결과를 실제 임상 결과와 비교함.

3) 검사 결과 통보 : Microarray 실험 및 분석이 완료된 경우, Report 파일을 작성하여 의뢰자에서 전

체적인 실험 과정에 대한 정보를 제공하고 유전자 선별 작업이 필요한 경우 분석 방법을 적용하여 선별된 유전자들을 엑셀 파일에 정리하여 의뢰자에게 결과를 전달 함.

4) 검사 비용 처리 : 검사 인력은 Core Lab. 자체 과제 연구원을 활용하여 인건비 및 Core Lab. 기본 운영에 소모되는 비용을 제외한 검사에 직접 소모되는 시약 비용은 의뢰자에게 전달하여 처리 하도록 함. 특히 Microarray 실험의 경우 test 실험이 요구 되어 이에 대한 비용은 Cora Lab. 재료비로 진행하였으며, 샘플에 문제가 없고 실험자의 실험 숙련도에 영향을 받아 실험이 잘 되지 않은 일부 실험의 경우 microarray 비용을 Core lab. 재료비로 진행하였음.

2.3 3차년도 (2007년)

- System set up 및 training 수행

- Customized (target Gene) SNP validation 시스템 및 기술 확보: 단일염기다형성분석(SNP) 지원을 위한 MassARRAY system 도입. set up 및 연구원 training 완료. 실험 지원 본격 착수

- High through-put Sequencing system 도입 (Applied Biosystems사 ABI3730), set up 및 연구원 training 완료. 다양한 염기서열분석 지원 착수

- Automatic DNA extraction system 도입 (Qiagen사 M48), set up 및 연구원 training 완료. 다양한 sample로부터 DNA 분리 정제 지원 착수

- 실험 지원 및 프로젝트 자문을 통한 연구 지원 수행

- 단일염기다형성분석(SNP) 지원 14건, 유전체발현분석(Microarray) 실험 및 분석 지원 6건, 염기서열분석(Sequencing) 지원 91건, 핵산분리 및 정제 (DNA extraction) 지원 9건, 총 120건 수행

(1) 단일염기다형성분석 (SNP) 지원 세부 내용

1) 실험 방법 : Sequenom iPLEX genotyping 프로토콜 사용

DNA 추출은 어느 방법으로 수행해도 무관하며, QC 결과 UV 측정치 (260/280nm)가 최소 1.7 이상 되고 농도가 10ng/ul 이상인 것만을 실험에 사용. 표적 DNA의 증폭을 위해서, 분석하고자 하는 단일염기다형이 포함된 일정한 DNA 영역인 표적 DNA를 PCR을 이용하여 증폭하였다. PCR 방법은 통상적인 방법으로 진행하였으며, 그 조건은 다음과 같았다.

PCR 반응액	Volume (1rxn)
물(HPLC 급)	2.075 μ l
PCR 10x 버퍼 (15 mM MgCl ₂ , 25 mM MgCl ₂ 함유)	0.625 μ l
dNTP 믹스(GIBCO)(25 mM/각)	0.1 μ l
Taq pol(HotStar)(5U/ μ l)	0.2 μ l

전위/후위 프라이머 믹스 (1 μ M/각)	1.00 μ l
DNA	1.00 μ l
총 반응 부피	5.00 μ l

각각의 프라이머는 dbSNP에서 선별한 SNP들의 앞, 뒤 200bp의 염기서열로부터 SpectroDESIGNER 프로그램을 사용하여 제작했다. PCR 반응은, 94 °C에서 15분 동안 유지하고, 94 °C에서 20초, 56 °C에서 30초, 72 °C에서 1분을 45회 반복하고, 72 °C에서 3분 동안 유지한 후, 4 °C에 보관하였다. 그 결과, 80~120 뉴클레오티드 이하의 길이를 가진 표적 DNA 단편을 얻었다. 이 PCR 산물로부터 결합되지 않는 dNTP를 제거하기 위해서 DW 1.53 μ l, iPLEX 버퍼(10X) 0.17 μ l, SAP (shrimp alkaline phosphatase)(1.7U/ μ l) 0.30 μ l를 1.5 ml 튜브에 넣고 혼합한 다음 37 °C에서 40분, 85 °C에서 5분 동안 SAP reaction을 수행하였다. 증폭된 표적 DNA 중의 단일염기 다형의 분석을 위해 표적 DNA 단편 중의 단일염기 다형 바로 전까지의 염기에 상보적인 프라이머(extension primer)를 제작한다. 이 프라이머를 사용하여 iPLEX reaction을 수행한다. 이 실험의 원리를 앞에서 증폭된 표적 DNA 단편에 혼성화시키고, DNA 중합 반응을 일으키는데 이 때, 반응액 중에는 ddNTP만이 들어있어 대상 단일염기 다형 대립인자의 대립인자 염기 (예를 들면, A 대립인자)에 상보적인 염기가 첨가된 후 반응이 멈추게 되며 그 결과, 표적 DNA 단편에 대립인자에 상보적인 염기(예를 들면, T) 하나만이 첨가된 산물이 얻어진다. 반면, 표적 DNA 단편에 다른 대립인자 (예를 들면, G 대립인자)가 존재하는 경우에는, 이 대립인자에 상보적인 염기(예를 들면, C)가 연장된 산물을 얻게 된다. 이렇게 얻어진 연장된 산물의 질량을 질량 분석을 통하여 결정함으로써, 표적 DNA에 존재하는 대립인자의 종류를 결정할 수 있다. iPLEX 반응의 반응액은 다음과 같았다.

iPLEX 반응액	Volume (1rxn)
물(나노급 순수)	0.7395 μ l
iPLEX 연장 믹스 (2.25 mM ddNTPs를 포함하는 10x버퍼)	0.200 μ l
Extension 프라이머 (각 100 μ M)	0.94 μ l
iPLEX Termination mix	0.100 μ l
iPELX enzyme	0.0205 μ l
총부피	2.00 μ l

iPLEX 반응을 위해서 위의 mix를 94 °C에서 30초 동안 유지한 다음, 먼저 94 °C에서 5초, 52 °C에서 5초와 80 °C에서 5초를 5번 반복, 이 3단계를 40회 반복 한 다음, 72°C에서 3분 유비 후 4 °C에 보관하였다. 이렇게 얻어진 균질적 연장 반응 산물을 레진(SpectroCLEAN)을 사용하여 정제하였다. 마지막으로 연장 반응산물을 질량 분석 방법 중 MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization-Time of Flight)를 이용하여 다형성 부위의 서열을 분석하였다. MALDI-TOF는 분석하고자 하는 물질이 레이저 빔을 받으면, 이온화된 매트릭스(matrix)와 함께 비행하여 진공상태에서 반대편에 있는 검출기까지 날아가는 데 걸린 시간을 계산하여 질량을 분석해내는 원리에 의하여 작동한다. 질량이 작은 물질은 검출기에 빨리 도달하게 되는데, 이렇게 얻어지는 질량의 차이와 이미 알고 있는 단일염기 다형의 서열을 근거로 하여 표적 DNA의 단일염기 다형의 서열을 결정할 수 있는 것이다

2) 실험 및 분석 결과 : 10ng/reaction의 DNA를 sample로 사용하여 최대 12plex까지 multiplex를 수행하여 최단시간에 최대 결과를 낼 수 있도록 하며, 384well plate에, negative control과 intra plate replication을 적정수 넣어 실험 및 Data의 quality control이 가능하도록 했다.

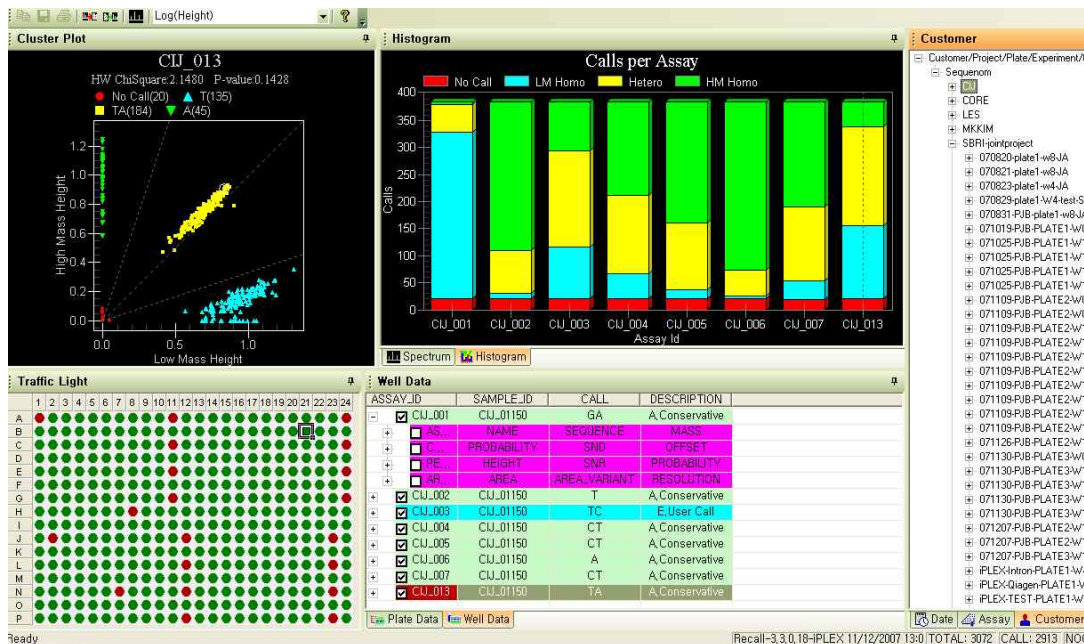
표1. 384 well plate design for iPLEX의 예

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	PCR	PCR	29	45	61	77	93	109	125	141	NC	R6	171	187	203	219	235	251	267	283	299	315	R11	NC
B	DW	DW	30	46	62	78	94	110	126	142	157	164	172	188	204	220	236	252	268	284	300	316	331	338
C	1	15	31	47	63	79	95	111	127	143	NC	R7	173	189	205	221	237	253	269	285	301	317	R12	NC
D	2	16	32	48	64	80	96	112	128	144	158	165	174	190	206	222	238	254	270	286	302	318	332	339
E	3	17	33	49	65	81	97	113	129	145	NC	R8	175	191	207	223	239	255	271	287	303	319	R13	NC
F	4	18	34	50	66	82	98	114	130	146	159	166	176	192	208	224	240	256	272	288	304	320	333	340
G	5	19	35	51	67	83	99	115	131	147	NC	R9	177	193	209	225	241	257	273	289	305	321	R14	NC
H	6	20	36	52	68	84	100	116	132	148	R1	167	178	194	210	226	242	258	274	290	306	322	334	R16
I	7	21	37	53	69	85	101	117	133	149	160	R10	179	195	211	227	243	259	275	291	307	323	R15	341
J	8	22	38	54	70	86	102	118	134	150	R2	NC	180	196	212	228	244	260	276	292	308	324	NC	R17
K	9	23	39	55	71	87	103	119	135	151	161	168	181	197	213	229	245	261	277	293	309	325	335	342
L	10	24	40	56	72	88	104	120	136	152	R3	NC	182	198	214	230	246	262	278	294	310	326	NC	R18
M	11	25	41	57	73	89	105	121	137	153	162	169	183	199	215	231	247	263	279	295	311	327	336	343
N	12	26	42	58	74	90	106	122	138	154	R4	NC	184	200	216	232	248	264	280	296	312	328	NC	R19
O	13	27	43	59	75	91	107	123	139	155	163	170	185	201	217	233	249	265	281	297	313	329	337	344
P	14	28	44	60	76	92	108	124	140	156	R5	NC	186	202	218	234	250	266	282	298	314	330	NC	R20

3) 검사 결과 통보 : 실험 및 분석이 완료된 후, MassARRAY Typer software의 분석 방법을 적용하여 각 sample 별 genotype을 정리하여 genotype panel을 excel file 형식으로 정리하여 report 한다.

이 때 Typer에서 나온 data를 바탕으로 하여, contamination 및 miss-call에 대한 QC를 실시하고 cut-off 이하의 불량일 경우 data를 discard하고 재 실험을 수행한다.

도1. 결과 분석 software인 MassARRAY Typer의 실시 예



4) 지원 세부 내역

소속	PI	Sample	Target
발암원연구과	김미경	Cervix 환자 316명	MTHFR유전자의 24개 SNP
발암원연구과	김미경	Cervix 환자 316명	MTR유전자의 3개 SNP
발암원연구과	김미경	Cervix 환자 316명	MTRR유전자의 9개 SNP
발암원연구과	김미경	Cervix 환자 316명	SOD2유전자의2개 SNP
발암원연구과	김미경	Cervix 환자 316명	CAT유전자의1개 SNP
발암원연구과	김미경	Breast 환자 316명	MTHFR유전자의 24개 SNP
발암원연구과	김미경	Breast 환자 316명	MTR유전자의 3개 SNP
발암원연구과	김미경	Breast 환자 316명	MTRR유전자의 9개 SNP
발암원연구과	김미경	Breast 환자 316명	SOD2유전자의2개 SNP
발암원연구과	김미경	Breast 환자 316명	CAT유전자의1개 SNP
위암연구과	최일주	위암환자 790명	Interleukin 관련 유전자의 9개 SNP
위암연구과	최일주	정상인 158명	Interleukin 관련 유전자의 9개 SNP
위암연구과	최일주	위암환자 790명	TNF-a, TLR, CD 유전자의 6개 SNP
위암연구과	최일주	정상인 158명	TNF-a, TLR, CD 유전자의 6개 SNP

(2) 유전체발현분석 (Microarray) 실험 및 분석 지원 세부 내용

1) 실험 방법 : Affymetrix GeneChip U133A 2.0 plus 실험 프로토콜 사용

2) 실험 및 분석 결과 : 일부 샘플의 경우 RNA degradation 문제로 실험에 필요한 최소 농도에 못 미치는 샘플은 실험에서 제외함.

3) 검사 결과 통보 : Microarray 실험 및 분석이 완료된 후, 분석 방법을 적용하여 선별된 유전자들을 엑셀 파일에 정리하여 의뢰자에게 결과를 전달 함. 실험 디자인에 따라 실험군과 대조군 사이에서 overexpression 되었거나 downregulation 된 유전자들을 fold-change 및 Wilcoxon rank test와 같은 분석 기준을 적용하여 선별하여 리스트를 만들고, 필요한 경우 Hierarchical clustering 결과와 class prediction 및 marker selection에 필요한 알고리즘을 적용하여 유전자들의 발현 양상 및 반응군 예측 인자를 선별하여 training set과 test set을 적용하여 예측 결과를 실제 임상 결과와 비교함.

4) 지원 세부 내역

소속	PI	Sample	Nr.
간담체암연구과	박중원	Cell line (Hypoxia)	8개
간담체암연구과	박중원	Cell line (Hypoxia)	2개
폐암연구과	윤경아	Plasma RNA	6개

폐암연구과	윤경아	Plasma RNA	16개
대장암연구과	유병철	Cell line (Drug)	4개
위암연구과	전경희	Cell line (Drug)	2개

(3) 염기서열분석 (Sequencing) 지원 세부 내용

1) 실험 방법 : Applied Biosystems의 Big Dye Termination reaction v.3.1 실험 프로토콜을 사용했으며 Cyclic Sequencing reaction의 조성은 다음과 같음

DNA template	3ul
10uM Primer 1	0.3ul
Big-Dye	0.1ul
10X Buffer	0.3ul
D.W.	2.3ul

total	6ul

2) 실험 및 분석 결과 : 지원 내용은, A. Sequencing Run (의뢰자가 Sequencing reaction 수행 후 정제를 마치고 denaturation까지 끝낸 후 의뢰하여 기기에 run 하는 것부터 지원), B. Cycling Sequencing (의뢰자가 Sequencing을 위한 template와 primer를 준비하여 의뢰하면 Sequencing reaction부터 지원), C. Custom PCR (의뢰자가 template DNA와 primer를 준비하여 의뢰하면 target amplification을 위한 PCR 및 Sequencing reaction, 기기에 run하는 것 까지 지원) 세 가지 type으로 구별하여 지원

3) 검사 결과 통보 : 분석 결과는 아래의 그림과 같이 trace file인 .ab1과 text file인 .txt 파일 모두를 전자파일 형태로 전달

도2. Sequencing 분석 결과로 나오는 염기서열 정보의 실시 예



4) 지원 세부 내역

소속	PI	지원건수	전체 실험 수
간담체암연구과	박중원	5건	508개
기능유전체연구과	고성호	12건	150개
기능유전체연구과	김경태	12건	446개
방사선 의학과	김상수	3건	19개
분자영상치료연구과	김윤희	1건	65개
암실험자원연구과	이호	1건	5개
폐암연구과	윤경실	3건	32개
폐암연구과	윤경아	48건	2708개
혈액암연구과	공선영	6건	28개

(4) 핵산분리 및 정제 (DNA extraction) 지원 세부 내용

- 1) 실험 방법 : Qiagen사의 M48 실험 프로토콜 사용 (sample의 종류에 따라 Buffy 및 Whole blood, Tissue, parafin block 등 다양한 프로토콜 적용)
- 2) 실험 및 분석 결과 : 실험자의 특별한 주문이 있지 않은 경우 sample로부터 1회 분리 정제를 원칙으로 하여, 핵산 분리 정제 후 Nanodrop을 이용한 정량 측정 및 quality control 수행
- 3) 검사 결과 통보 : Eppendorf tube에 열린 핵산과 핵산의 농도, 총량 및 Quality 정보를 excel 파일 형식으로 전달 (아래 표의 형식)

Sample ID	ng/ul	260/280	Elution Vol.(ul)	Total amount (ug/ul)
10001	97.25	1.89	100	9.725
10002	97.61	1.88	100	9.761
10003	43.68	1.85	100	4.368
10004	19.24	2.26	100	1.924
10005	35.13	1.86	100	3.513
10006	31.59	1.82	100	3.159
10007	42.72	1.85	100	4.272
10008	31.60	1.90	100	3.16
10009	67.44	1.89	100	6.744
10010	40.91	1.94	100	4.091

4) 지원 세부 내역

소속	PI	Sample	Nr.
위암연구과	최일주	Buffy coat	302개
위암연구과	최일주	Buffy coat	304개
위암연구과	최일주	Buffy coat	357개
기능유전체연구과	김경태	Cell line	6개

발암원연구과	김미경	Paraffin block	302개
발암원연구과	김미경	Paraffin block	77개
발암원연구과	김미경	Paraffin block	106개
위암연구과	최일주	Buffy coat	277개
유방암연구과	이은숙	Whole blood	166개

3. 연구결과 고찰 및 결론

본 과제에서는 암 연구와 관련하여 많이 활용되고 있는 genomics 기술을 활용하여 암센터 내의 연구자들을 지원하는 업무를 수행했으며, 특히 일반 분자유전학연구에서 가장 많이 쓰이고 있는 염기서열분석 기술을 비롯하여, 유전자 발현의 차이를 분석하는 Gene expression analysis using Microarray 기술, Genome wide SNP analysis 기술 등을 활용하여 연구를 지원했다. 이중 SNP 분석 기술은 암의 발병 및 예후를 예측하고 약물 감수성 또는 치료 효과에 대한 개인간의 차이를 나타내 주는 마커를 발굴하기 위해 많이 쓰이고 있으며, 유전자 발현 분석 기술은 특정 암과 관련된 유전자 또는 기전 발견 및 암의 조기 진단을 위한 방법 개발을 위해 많이 쓰이고 있다.

이러한 기술을 활용한 연구 결과는 해외의 경우에는 점차 실제 임상에 영향을 줄 수 있는 형태로 나타나고 있어, 유방암, 폐암, 간암, 전립선암 등 주요 암에서 관련 신규 유전자들이 계속 보고되고 있으며 (Weir BA, et al., 2007 Nature; Easton DF et al., 2007 Nature; Min AJ, et al., 2005 Nature) 특히 Polymorphism에 대한 연구가 활발하여 SNP에 대한 대규모 연구 결과들이 최근 Nature 및 Science 등에 활발하게 나오고 있다. 암 연구에 대한 유전체 기술의 적용은 이미 거스를 수 없는 대세로, 미국의 경우 이미 1990년대부터 시작한 CGAP (Cancer Genome Anatomy Project)에 이어 SNP500 Cancer 프로젝트와 같이 암과 관련된 대규모 유전체 연구가 진행되고 있다. 특히 미국암연구소(National Cancer Institute)의 Division of Cancer Epidemiology and Genetics에는 Core Genotyping Facility (CGF)가 운영되고 있어서 Sample Handling, Whole Genome Amplification, Pre-Genotyping QA/QC, Uniplex Genotyping, Multiplex Genotyping, Whole Genome Association, Post-Genotyping QA/QC, Informatics analytics 등의 연구 지원을 제공하고 있다.

본 과제는 2005년 후반기에 SNP core lab을 착수할 때 예상으로 SNP관련 연구가 주를 이룰 것으로 생각되어 명칭을 SNP core lab으로 시작하였으나 Large scale SNP 연구를 위한 기반 시설 및 예산의 부족으로 실제 연구는 제한적으로 이루어졌고, 연구비 활용이 상대적으로 쉬웠던 Gene expression analysis 관련 실험이 더 많이 이루어져 이 부분에 대한 지원이 활발했다. 그러나 2007년부터 Genomics Core Facility로 전환하여 연구자의 needs에 기반한 적극적인 지원이 이루어진 결과 Sample 수가 수백에서 천 개 이상이 되는 규모의 target gene based SNP study가 수행되었으며, Sequencing 등 다른 분야의 지원도 활발히 이루어져 국립암센터 내부에서도 암연구에 유전체 기법을 도입하는 연구자들이 점차 증가했다. 그러나 Genomics Core의 활용도는 아직까지 만족할 만한 수준은 아니며, Cancer Genome 연구도 초창기

라고 볼 수 있어 보다 활발한 연구 지원과 암유전체연구가 필요하다. 2007년 초반에 비해 후반기로 가면 서 보다 많은 PI들이 Genomics Core를 활용하게 되고 협력연구 및 연구자문을 요청하고 있기 때문에 향후 암유전체 관련 연구의 큰 진전이 있을 것으로 보인다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분)	저널명(IF.)	Vol(No)Page	구분	과제 관련성

※저자구분 : 교신, 제1, 공동

※구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

※과제관련성 : 상(Acknowledgement 가 있는 경우), 중, 하

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역	과제 관련성
Cyclooxygenase-2 Inhibitor Induced Different Response of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway Depending on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line	Ji Hoon Kim, Joong-Won Park, Joo Hyun Shim, Jung Ahn Lee, Jin Oh Kim, Sun-young Kong, Yeon-Su Lee and Chang-Min Kim	미국 간질환 연구학회(AASLD, American Association for the Study of Liver Diseases)	미국, 보스턴 (2007)	상

※지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분	특허명	출원인	출원국	출원번호

※구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저 서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

- 정량적 연구 성과

가. 연도별 지원 성과

연차	Sequencing	DNA extraction	SNP assay	Microarray	실험자문
2005년	-	-	의뢰 PI: 1 의뢰 건수: 1 전체 실험 수: 2,720 reaction	-	-
2006년	-	-	의뢰 PI: 1 의뢰 건수: 2 전체 실험 수: 8,258 reaction	의뢰 PI: 4 의뢰 건수: 4 전체 실험 수: 66 reaction	-
2007년	의뢰 PI: 8 의뢰 건수: 91 전체 실험 수: 3,961reaction	의뢰 PI: 3 의뢰 건수: 9 전체 실험 수: 1,874 reaction	의뢰 PI: 3 의뢰 건수: 14 전체 실험 수: 38,868 reaction	의뢰 PI: 4 의뢰 건수: 6 전체 실험 수: 38reaction	의뢰 PI: 5명

나. 2007년 지원 성과 (예산 절감 효과)

연구지원분야	지원 건수	전체 실험 수	실험 당 절감된 예산 (추정치)	예산절감 총액 (추정치)	비고
Microarray 분야 (유전체 발현 분석)	6	38	400,000	15,200,000	외부 업체에 맡길 경우에 대비한 추정치로 현재 국내 서비스를 제공하는 업체 가격과 비교
SNP 분야 (단일염기다형성 분석)	14	38,868	7,000	272,076,000	
Sequencing 분야 (염기서열분석)	91	3961	3,800	15,051,800	
DNA extraction 분야 (핵산분리정제)	9	1,874	5,600	10,494,400	이 분야의 서비스를 제공하는 업체는 현재 국내에 없기 때문에 재료를 대량 구매함에 따라 절감되는 비용만을 계산, 개별 연구자가 연구원을 채용하지 않는 것으로 인해 발생하는 인건비 절감은 계상하지 않음 (최소치는 최저가격 구매의 경우, 최대치는 리스트 가격 구매의 경우)
			총액	312,822,200	

- 정성적 연구 성과

- Core Lab의 기기 안정화 및 연구원 training을 통한 1차 set up 완료, 본격적인 연구 지원 수행

- Core Lab 운영 및 담당 업무, 연구 지원 양식 등을 국립암센터 연구자들에게 홍보 (그룹웨어의 core게시판 및 커뮤니티 등의 홍보 system 신설)
- 국립암센터 연구진들에게 Genomics 분석 지원을 제공함으로써, 연구자들에게 보다 다양한 연구 기회 제공
- 집중적인 연구시설을 이용하여 SNP 및 유전자 발현을 분석함으로써 각 연구진들이 개별적으로 연구하는데 소요되는 시간과 경비를 절감

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
High-throughput Genomics (SNP) 실험 서비스의 제공	1차년도	SNP 검사 서비스 시행 준비	검사 관련 시약, 연구 비품 준비	20	100
		과제연구원 채용 및 교육	과제연구원 1인, 보조원 1인 채용		
		Core Lab. 홍보	차기 년도 상반기 수행 계획		
	2차년도	SNP 검사 서비스 시행	총 1,711명의 10개 SNP 검사 완료	40	100
		Microarray 실험 서비스	Biopsy 샘플 53례, 암세포주 13례 실험 및 분석 완료		
	3차년도	기존 system 운영	- 정량화된 DNA 샘플을 대상으로 연구자가 지정하여 검사하고자 하는 SNP (single nucleotide polymorphism, 단일염기다형성) 관련 연구에 대해 실험 서비스 제공	100	100
Genome wide Experiment system set up & practical application		-System set up (각종 기기의 set up 및 technician training) -Test run 및 Data의 quality 확보 (high call rate, low error rate) -분석 장비 사용 매뉴얼 및 표준화 (Process standardization) -System을 활용한 서비스 및 연구 진행			

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
1. 각종 시료의 자동 처리 (Automatic Nucleic Acid extraction) system set up, 기술 확보 및 연구 지원	Qiagen사의 M48 자동 기기의 set up을 완료했으며 정상적으로 연구 지원 수행 중
	Applied Biosystems사의 ABI3730 기기의 set up

2. 염기서열 자동분석 (Automatic Sequencing) system set up, 기술 확보 및 연구 지원	을 완료했으며 정상적으로 연구 지원 수행 중
3. 고속핵산증폭 (High through-put PCR) system set up, 기술 확보 및 연구 지원	Applied Biosystems사의 ABI9600 PCR machine dual 384 block 기기의 set up을 완료했으며 정상적으로 연구 지원 수행 중
4. 단일염기다형성 분석 (SNP analysis) system set up, 기술 확보 및 연구 지원	Sequenom사의 MassARRAY system의 set up을 완료했으며 iPLEX 방식으로 SNP 분석을 진행하여 정상적으로 연구 지원 수행 중
5. 유전자 발현 양상 분석 (Gene Expression profiling) system set up, 기술 확보 및 연구 지원	Affymetrix사의 GeneChip system의 set up을 완료했으며 Human U133A 2.0 plus를 이용하여 유전자 발현 분석을 진행하여 정상적으로 연구 지원 수행 중

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년 후 예상 연구 성과

○ 연구종료 2년후까지 연구사업 결과로 발생할 것으로 예상되는 성과, 즉 학술지 게재, 산업재산권 등을 단계별로 다음의 양식에 의거하여 작성함. 학술지 게재는 게재 예상 학술지 명과 Impact Factor 등을 기재함
○ 연구사업의 내용이 논문이나 산업재산권과 연결되기 힘든 과제인 경우, 자유 형식으로 예상연구성과 및 활용정도를 기재하되 최대한 계량화할 것
예) DB 몇 건 구축완료, OOO 시스템 구축 및 OO사업 완료

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	3	SCI급, 총IF 30점
산업재산권 등록	3	한국 및 PCT, 신규 유전자 및 그의 활용
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

본 연구 과제를 통해 도출된 연구 결과는, 기존에 유사한 시설을 운영하는 선진국의 예를 통해 고려해 본다면, 약물개발, 암 진단 및 치료, 예후 예측 등 다양한 부분에 활용이 가능하고 또한 임

상 적용이 가능할 것으로 보여 부가가치가 매우 높게 산업화가 가능할 것임.

6. 참고문헌

- 보고서 작성시 인용된 모든 참고문헌을 열거

7. 첨부서류

- 본 연구사업의 성과로 논문, 저서, 산업재산권, 정책정책 기여 등이 있을 경우 관련 증빙자료를 첨부토록 함