



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0051674
(43) 공개일자 2020년05월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/686 (2018.01) C12Q 1/6813 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/686 (2018.05)
C12Q 1/6813 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2020-7009262(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2007년05월03일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2019-7012577
원출원일자(국제) 2007년05월03일
심사청구일자 2019년05월24일
- (85) 번역문제출일자 2020년03월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2007/001627
- (87) 국제공개번호 WO 2007/132167
국제공개일자 2007년11월22일
- (30) 우선권주장
60/797,456 2006년05월03일 미국(US)
11/784,499 2007년04월06일 미국(US)

- (71) 출원인
더 차이나이즈 유니버시티 오브 홍콩
중국 홍콩 엔. 티. 새턴 더 차이나이즈 유니버시티
오브 홍콩
- (72) 발명자
로 유크 밍 테니스
중국 홍콩 사르 코우룬 호만틴 킹 탁 스트리트 7
4/에프
치우 로사 와이 켄
중국 뉴 테리토리즈 타이 포 형 램 드라이브 1 콘
스텔레이션 코브블록 1 플랫폼 1에이
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

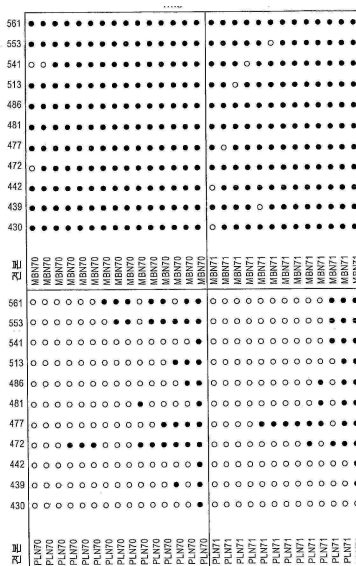
전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 산전 진단 및 모니터링을 위한 신규 태아 마커

(57) 요약

본 발명은 일부 임신 관련 질환을 산전 진단 및 모니터링하기 위한 새로운 태아 마커의 용도를 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 태아의 21번 염색체에 위치한 일부 CpG 섬(CpG island)이 모체의 21번 염색체 상에 위치한 상응하는 CpG 섬과는 상이한 메틸화 프로파일을 나타낸다는 발견에 근거한다. 본 발명은 또한 관련된 질환을 진단하고 모니터링하기 위한 키트를 제공한다.

대표도 - 도1aa



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6827 (2018.05)

C12Q 1/6883 (2018.05)

G01N 33/50 (2013.01)

C12Q 2523/125 (2013.01)

C12Q 2600/154 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

(72) 발명자

침 스티븐 시우 칭

중국 홍콩 사르 퀴리 베이 콘힐 블록 에이 20/에프
플랫 2011

딩 청밍

중국 홍콩 사르 뉴 테리토리즈 샹틴 더 차이나이즈
유니버시티 오브 홍콩 유니버시티 레지던스 11 플랫
6비

진 쟝난

중국 홍콩 사르 뉴 테리토리즈 샹틴 더 차이나이즈
유니버시티 오브 홍콩 유니버시티 레지던스 11 플랫
6비

리 트레이시 유엔 한

중국 홍콩 사르 츠엔 완 벨비디어 가든 페이즈 3
블록 1 플랫 4지

룬 피오나 미우 편

중국 홍콩 사르 뉴 테리토리즈 콰이 칭 라이 킹 에
스테이트 앳 킹하우스 룸 1116

명세서

청구범위

청구항 1

태아를 임신한 여성에서 임신 관련 질환을 검출하거나 모니터링하는 방법으로서,

(a) 상기 여성으로부터 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 생물학적 시료를 얻는 단계;

(b) 시료 중의 CpG-함유 게놈 서열의 메틸화 상태를 측정하는 단계로서, 태아 유래의 게놈 서열과 여성 유래의 게놈 서열이 서로 다르게 메틸화되어 이에 의해 시료 중에서 여성 유래의 게놈 서열과 태아 유래의 게놈 서열이 구별되고, 상기 게놈 서열은 길이가 15개 뉴클레오타이드 이상이고, 하나 이상의 사이토신을 포함하며, 21번 염색체 상의 영역 내에 있고, 상기 영역은 (1) CGI137, 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌, 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계;

(c) 태아 유래 게놈 서열의 수준을 측정하는 단계; 및

(d) 태아 유래 게놈 서열의 수준을 표준 대조물과 비교하는 단계로서, 표준 대조물로부터의 증가 또는 감소가 임신 관련 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 여성 유래 게놈 서열은 메틸화되어 있고, 태아 유래 게놈 서열은 메틸화되어 있지 않은 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 여성 유래 게놈 서열은 메틸화되어 있지 않고, 태아 유래 게놈 서열은 메틸화되어 있는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 단계 (b)는 메틸화된 DNA와 메틸화되지 않은 DNA를 서로 다르게 변형시키는 시약으로 시료를 처리하여 수행하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 시약은 바이설과이트를 포함하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 시약은 메틸화된 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함하는 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 시약은 메틸화되지 않은 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 단계 (b)는 메틸화-특이적 PCR에 의해 수행하는 방법.

청구항 9

태아를 임신한 여성에서 임신 관련 질환을 검출하거나 모니터링하는 방법으로서,

(a) 상기 여성으로부터의 생물학적 시료 중의 DNA를 얻는 단계로서, 상기 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계;

(b) 단계 (a)로부터의 DNA를 바이셀과이트로 처리하는 단계; 및

(c) 단계 (b)로부터의 DNA 및 2개의 프라이머를 이용한 증폭 반응을 수행하여 CpG-함유 게놈 서열을 증폭시키는 단계로서, 상기 게놈 서열은 길이가 15개 뉴클레오타이드 이상이고, 하나 이상의 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 내에 있고, 상기 영역은 (1) CGI137, 포스포다이에스테라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌, 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되고, 2개의 프라이머중 하나 이상은 태아 유래 게놈 서열에 다르게 결합하는 단계; 및

(d) 단계 (c)로부터의 게놈 서열의 증폭된 부분의 수준을 표준 대조물과 비교하는 단계로서, 표준 대조물로부터의 증가 또는 감소가 임신 관련 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 증폭 반응은 중합효소 연쇄 반응(PCR)인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 증폭 반응은 메틸화-특이적 PCR인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 증폭 반응은 핵산 서열 기반 증폭인 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 증폭 반응은 가닥 치환 반응인 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 증폭 반응은 분지형(branched) DNA 증폭 반응인 방법.

청구항 15

제1항 또는 제9항에 있어서, 임신 관련 질환은 자간전증인 방법.

청구항 16

제1항 또는 제9항에 있어서, 임신 관련 질환은 조기 진통인 방법.

청구항 17

제1항 또는 제9항에 있어서, 임신 관련 질환은 임신 오조증인 방법.

청구항 18

제1항 또는 제9항에 있어서, 임신 관련 질환은 자궁외 임신인 방법.

청구항 19

제1항 또는 제9항에 있어서, 임신 관련 질환은 염색체 이수성인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 임신 관련 질환은 21번 삼염색체증인 방법.

청구항 21

제1항 또는 제9항에 있어서, 임신 관련 질환은 자궁내 성장 지연인 방법.

청구항 22

임신 관련 질환을 검출하고 모니터링하는 방법으로서,

(a) 여성으로부터의 생물학적 시료 중의 DNA를 얻는 단계로서, 상기 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계;

(b) 단계 (a)로부터의 DNA를, 메틸화된 DNA와 메틸화되지 않은 DNA를 서로 다르게 변형시키는 시약으로 처리하는 단계;

(c) 단계 (b)로부터의 CpG-함유 게놈 서열의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 단계로서, 상기 게놈 서열은 길이가 15개 뉴클레오타이드 이상이고, 하나 이상의 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 내에 있고, 상기 영역은 (1) CGI137, 포스포다이에스테라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌, 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및

(d) 단계 (c)로부터의 뉴클레오타이드 서열의 프로파일을 표준 대조물과 비교하는 단계로서, 표준 대조물로부터의 프로파일 변화가 임신 관련 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 시약은 바이실과이트를 포함하는 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 시약은 메틸화된 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함하는 방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 시약은 메틸화되지 않은 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함하는 방법.

청구항 26

제22항에 있어서, 단계 (b)로부터의 DNA 및 2개의 프라이머를 이용하여 게놈 서열을 증폭시키는 증폭 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 증폭 단계는 PCR에 의해 수행하는 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 증폭 단계는 메틸화-특이적 PCR에 의해 수행하는 방법.

청구항 29

제22항에 있어서, 단계 (c)는 질량 분광학에 의해 수행하는 방법.

청구항 30

제22항에 있어서, 단계 (c)는 프라이머 연장에 의해 수행하는 방법.

청구항 31

제22항에 있어서, 단계 (c)는 폴리뉴클레오타이드 하이브리드화에 의해 수행하는 방법.

청구항 32

제22항에 있어서, 단계 (c)는 실시간 PCR에 의해 수행하는 방법.

청구항 33

제22항에 있어서, 단계 (c)는 전기영동에 의해 수행하는 방법.

청구항 34

임신한 여성의 태아에서 21번 삼염색체증을 검출하는 방법으로서,

(a) 상기 여성으로부터 생물학적 시료를 얻는 단계로서, 상기 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계;

(b) 단계 (a)으로부터의 시료를, 메틸화된 DNA와 메틸화되지 않은 DNA를 다르게 변형시키는 시약으로 처리하는 단계;

(c) CpG-함유 게놈 서열의 대립인자를 분석하는 단계로서, 상기 게놈 서열은 길이가 15개 뉴클레오타이드 이상이고, 하나 이상의 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 내에 있고, 상기 영역은 (1) CGI137, 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및

(d) 대립인자의 비를 측정하는 단계로서, 21번 삼염색체증이 없는 태아를 임신한 여성의 대립인자의 비로부터의 편차가 태아의 21번 삼염색체증을 나타내는 것인 단계를 포함하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 시약은 바이실파이트를 포함하는 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 시약은 메틸화된 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함하는 방법.

청구항 37

제34항에 있어서, 시약은 메틸화되지 않은 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함하는 방법.

청구항 38

제34항에 있어서, 단계 (b) 후에 메틸화되거나 메틸화되지 않은 게놈 서열을 증폭시키기 위한 증폭 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 증폭 단계는 PCR에 의해 수행하는 방법

청구항 40

제38항에 있어서, 증폭 단계는 메틸화-특이적 PCR에 의해 수행하는 방법

청구항 41

제34항에 있어서, 단계 (c)는 질량 분광학에 의해 수행하는 방법

청구항 42

제34항에 있어서, 단계 (c)는 프라이머 연장 분석법에 의해 수행하는 방법

청구항 43

제34항에 있어서, 단계 (c)는 실시간 PCR에 의해 수행하는 방법

청구항 44

제34항에 있어서, 단계 (c)는 폴리뉴클레오타이드 하이브리드화에 의해 수행하는 방법

청구항 45

제34항에 있어서, 단계 (c)는 전기영동에 의해 수행하는 방법

청구항 46

제34항에 있어서, 태아 유래 게놈 서열의 2개의 서로 다른 대립인자는 단일 뉴클레오타이드 다형성, 삽입-결실 다형성, 또는 단순 탠덤(tandem) 반복 다형성을 포함하는 방법.

청구항 47

태아를 임신한 여성에서 임신 관련 질환을 검출하거나 모니터링하는 방법으로서,

- (a) 상기 여성으로부터 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 생물학적 시료를 얻는 단계;
- (b) 시료 중의 CpG-함유 게놈 서열의 수준을 측정하는 단계로서, 상기 게놈 서열은 길이가 15개 뉴클레오타이드 이상이고, 하나 이상의 메틸화되지 않은 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 내에 있고, 상기 영역은 (1) CGI137, 포스포다이에스테라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2), 및 Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스)으로 구성된 군에서 선택된 유전자좌 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및
- (c) 게놈 서열의 수준을 표준 대조물과 비교하는 단계로서, 표준 대조물로부터의 증가 또는 감소가 임신 관련 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함하는 방법.

청구항 48

태아를 임신한 여성의 임신 관련 질환을 검출하거나 모니터링하는 방법으로서,

- (a) 상기 여성으로부터 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 생물학적 시료를 얻는 단계;
- (b) 시료 중의 CpG-함유 게놈 서열의 수준을 측정하는 단계로서, 상기 게놈 서열은 길이가 15개 뉴클레오타이드 이상이고, 하나 이상의 메틸화된 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 내에 있고, 상기 영역은 (1) CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및
- (c) 게놈 서열의 수준을 표준 대조물과 비교하는 단계로서, 표준 대조물로부터의 증가 또는 감소가 임신 관련 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함하는 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 단계 (b)는 혈액 시료 중에 존재하는 DNA를, 메틸화된 사이토신과 메틸화되지 않은 사이토신을 서로 다르게 변형시키는 시약으로 처리하는 것을 포함하는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 시약은 바이설파이트를 포함하는 방법.

청구항 51

제49항에 있어서, 시약은 메틸화된 사이토신을 포함하는 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함하는 방법.

청구항 52

제49항에 있어서, 시약은 메틸화되지 않은 사이토신을 포함하는 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함하는 방법.

청구항 53

제47항 또는 제48항에 있어서, 단계 (b)는 증폭 반응을 포함하는 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 증폭 반응은 중합효소 연쇄 반응(PCR)인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, PCR은 메틸화-특이적 PCR인 방법.

청구항 56

제53항에 있어서, 증폭 반응은 핵산 서열 기반 증폭인 방법.

청구항 57

제53항에 있어서, 증폭 반응은 가닥 치환 반응인 방법.

청구항 58

제53항에 있어서, 증폭 반응은 분지된 DNA 증폭 반응인 방법.

청구항 59

제47항 또는 제48항에 있어서, 게놈 DNA 서열의 수준은 전기영동에 의해 측정하는 방법.

청구항 60

제47항 또는 제48항에 있어서, 게놈 DNA 서열의 수준은 폴리뉴클레오타이드 하이브리드화에 의해 측정하는 방법.

청구항 61

제47항 또는 제48항에 있어서, 임신 관련 질환은 자간전증인 방법.

청구항 62

제47항 또는 제48항에 있어서, 임신 관련 질환은 조기 진통인 방법.

청구항 63

제47항 또는 제48항에 있어서, 임신 관련 질환은 임신 오조증인 방법.

청구항 64

제47항 또는 제48항에 있어서, 임신 관련 질환은 자궁외 임신인 방법.

청구항 65

제47항 또는 제48항에 있어서, 임신 관련 질환은 21번 삼염색체증인 방법.

청구항 66

제47항 또는 제48항에 있어서, 임신 관련 질환은 자궁내 성장 지연인 방법.

청구항 67

제1항, 제9항, 제22항, 제34항, 제47항 또는 제48항중 어느 한 항에 있어서, 게놈 서열은 CpG 섬인 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 대한 상호참조

[0001]

[0002] 본 발명은 2006년 5월 3일자로 출원되고 그 내용 전체가 본원에 참고로 인용되어 있는 미국 가출원 제 60/797,456호를 우선권 주장한다.

배경 기술

[0003] 임신 또는 분만 동안의 잠재적인 합병증 및 태아의 유전적 결함을 포함하는 임신과 연관된 질환이 초기에 검출될 경우 산모와 태아 둘 모두의 안전에 필요한 초기의 의학적 개입이 가능해지기 때문에, 임신 관련 질환의 초기 검출은 매우 중요하다. 용모막 용모 샘플링(VCS: chorionic villus sampling) 또는 양수 천자와 같은 과정을 통해 태아로부터 단리된 세포를 이용하여 산전 진단이 정규적으로 수행되어 왔다. 그러나, 이러한 종래의 방법은 침습적이고, 가장 조심스럽게 행한다하더라도 엄마와 태아 둘 모두에서 상당한 위험이 존재한다(문헌[Tabor et al, Lancet 1:1287-1293, 1986] 참조).

[0004] 이러한 침습적인 접근법에 대한 대안으로서, 여러 유형의 태아 세포가 모체 순환계에서 발견될 수 있고(문헌 [Johansen et al, Prenat. Diagn. 15:921-931, 1995] 참조), 보다 중요하게는, 순환하는 세포가 없는 태아 DNA가 모체의 혈장 및 혈청에서 검출될 수 있다(문헌[Lo et al., Lancet 350:485-487, 1997])는 발견에 따라 예를 들면 태아 이상을 검출하기 위한 산전 스크리닝법이 개발되어 왔다. 태아 세포를 단리하고 풍부하게 하기 위해 여러 단계들을 필요로 하는 다른 방법과는 달리, 모체의 혈액 중의 태아 DNA의 양은 혈장 또는 혈청을 복잡하게 처리하지 않고도 유전자 분석하기에 충분한 것으로 보인다. 중합효소 연쇄 반응(PCR: polymerase chain reaction)에 근거한 기법을 이용하여 모체 혈장 또는 혈청중의 태아 DNA를 검출함으로써 태아 레수스(rhesus) D(RhD) 유전자형 검사(문헌[Lo et al, N. Engl. J. Med. 339:1734-1738, 1998] 참조), 태아 성별 검사(문헌 [Costa et al, N. Engl. J. Med. 346:1502, 2002] 참조), 및 여러 태아 질환의 진단(문헌[Amicucci et al, Clin. Chem. 46:301-302, 2000]; [Saito et al, Lancet 356:1170, 2000]; 및 [Chiu et al, Lancet 360:998-1000, 2002])이 달성되어 왔다.

[0005] 또한, 모체 혈장/혈청 중의 태아 DNA의 양적인 이상은 자간전증(문헌[Lo et al, Clin. Chem. 45:184-188, 1999] 및 [Zhong et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 184:414-419, 2001]), 태아 21번 삼염색체증 (문헌[Lo et al, Clin. Chem. 45:1747-1751, 1999] 및 [Zhong et al., Prenat. Diagn. 20:795-798, 2000]) 및 임신 오조증 (문헌[Sekizawa et al, Clin. Chem. 47:2164-2165, 2001])에서 보고되어 왔다. 산전 유전자 분석을 위한 모체 혈액 중의 태아 핵산 검출은 또한 미국 특허 제6,258,540호에 개시되어 있다.

[0006] 모체 혈액에 존재하는 태아 RNA 또한 임신 관련 질환에 대한 진단 수단으로 확립되어 왔다. 예를 들면 미국 특허 출원 제09/876,005호는 모체 혈액 중의 태아 RNA의 검출에 근거한 비-침습적 기법을 개시하고 있고; 미국 특허 출원 제10/759,783호는 모체 혈액에 존재하는 일정한 mRNA 종(예를 들면 hCG-β, hCRH, hPH, KISSI, TPF12 및 PLAC1)의 양이 임신과 연관된 질환, 예를 들면 자간전증, 태아 염색체 이수성 및 조기 진통을 진단하고, 모니터링하고, 예측하기 위한 마커로서 사용될 수 있음을 추가로 개시하고 있다.

[0007] 비록 DNA의 안정성이 태아 DNA에 근거한 진단에 이점을 제공하지만, 이 접근법에는 다음과 같은 한가지 주요한 제한이 존재한다: 태아와 모체 DNA 둘 모두 임신한 여성의 혈액의 무세포 부분, 예를 들면 혈청 또는 혈장에 존재한다. 따라서, 정확한 진단을 보충하기 위해서는 모체의 DNA로부터 태아의 DNA를 구별해야 할 필요가 있다. 태아와 모체의 DNA가 서로 다른 메틸화 프로파일에 의해 구별될 수 있다는 것이 제20030044388호로 공개된 미국 특허 출원 제09/944,951호에 처음 개시되었다. 미국 특허 출원 공개 공보 제20030211522호(Landes et al.)는 또한 서로 다른 메틸화 마커가 산전 진단을 위해 사용될 수 있음을 제안하였다. 본 명세서에서는, 21번 염색체에 위치한 다수의 인간 게놈 DNA 서열이 태아 또는 성인(예를 들면 임신한 여성)으로부터 기원한 게놈 DNA에서 서로 다르게 메틸화되는 영역을 함유하고 있는 유전자좌로서 처음 확인되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 제 1 측면에서는, 태아를 임신한 여성에게서 임신과 연관된 질환을 검출하거나 모니터링하기 위한 방법을 제공한다. 이 방법은 (a) 여성으로부터 생물학적 시료를 획득하고, 여기서 생물학적 시료가 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계; (b) 시료 중의 CpG-함유 게놈 서열의 메틸화 상태를 측정하며, 여기서 태아에서 나온 게놈 서열과 여성에서 나온 게놈 서열이 서로 다르게 메틸화되어 이에 의해 시료 중의 여성에서 나온 게놈 서열과 시료 중의 태아에서 나온 게놈 서열을 구별하고, 게놈 서열의 길이가 15뉴클레오타이드 이상이고 하나 이상의 사이트신을 포함하고 21번 염색체 상의 영역 내에 있고, 여기서 상기 영역이 (1) CGI137, 포스포다이에

스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스(caenorhabditis elegans)), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제 (HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌, 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; (c) 태아에서 나온 게놈 서열의 수준을 측정하는 단계; (d) 태아에서 나온 게놈 서열의 수준을 표준 대조물과 비교하고, 여기서, 표준 대조물의 증가 또는 감소가 임신과 연관된 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함한다.

[0009] 일부 양태에서, 여성에서 나온 게놈 서열은 메틸화되어 있고, 태아에서 나온 게놈 서열은 메틸화되어 있지 않다. 다른 양태에서는 여성에서 나온 게놈 서열은 메틸화되어 있지 않고, 태아에서 나온 게놈 서열은 메틸화되어 있다.

[0010] 일부 양태에서, 단계 (b)는 시료를 메틸화된 DNA와 메틸화되지 않은 DNA를 서로 다르게 변형시키는 시약으로 처리하여 수행된다. 예를 들면, 시약은 바이실과이트를 포함할 수 있거나; 또는 시약은 메틸화된 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있거나; 또는 시약은 메틸화되지 않은 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 단계 (b)는 메틸화-특이적 PCR에 의해 수행된다.

[0011] 본 발명의 제 2 측면에서, 태아를 임신한 여성에서 임신과 연관된 질환을 검출하거나 모니터링하기 위한 방법이 제공된다. 이 방법은 (a) 여성에서 나온 생물학적 시료 중의 DNA를 수득하고, 여기서 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계, (b) 단계 (a)에서 나온 DNA를 바이실과이트로 처리하는 단계; 및 (c) 단계 (b)에서 나온 DNA 및 2개의 프라이머를 이용한 증폭 반응을 수행하여 CpG-함유 게놈 서열을 증폭시키고, 여기서 게놈 서열은 길이가 15개 이상의 뉴클레오타이드이고, 하나 이상의 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 이내에 있고, 상기 영역이 (1) CGI137, 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌, 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되고, 여기서 2개의 프라이머중 하나 이상이 태아에서 나온 게놈 서열에 상이하게 결합하는 단계; 및 (d) 단계 (c)에서 나온 게놈 서열의 증폭된 부분의 수준을 표준 대조물과 비교하고, 여기서, 표준 대조물로부터의 증가 또는 감소가 임신과 연관된 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함한다.

[0012] 일부 양태에서, 증폭 반응은 중합효소 연쇄 반응(PCR), 예를 들면 메틸화-특이적 PCR이다. 다른 양태에서, 증폭 반응은 핵산 서열에 근거한 증폭, 가닥 치환 반응, 또는 분지된 DNA 증폭 반응이다.

[0013] 본 발명의 제 1 측면에 개시된 방법뿐 아니라, 이 방법은 자간전증, 조기 진통, 임신 오조증, 자궁외 임신, 염색체 이수성(예를 들면 삼염색체증) 및 자궁내 성장 지연과 같은 질환을 검출하거나 모니터링하는데 적합하다.

[0014] 본 발명의 제 3 측면에서는 임신과 연관된 질환을 검출하고 모니터링하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 (a) 여성에서 나온 생물학적 시료 중의 DNA를 수득하고, 여기서, 시료가 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계; 단계 (a)에서 나온 DNA를 메틸화된 DNA와 메틸화되지 않은 DNA를 다르게 변형시키는 시약으로 처리하는 단계; (c) 단계 (b)에서 나온 CpG-함유 게놈 서열의 뉴클레오타이드 서열을 측정하고, 여기서 게놈 서열은 길이가 15개 이상의 뉴클레오타이드이고, 하나 이상의 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 이내에 있고, 상기 영역이 (1) CGI137, 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제 (HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌, 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및 (d) 단계 (c)에서 나온 뉴클레오타이드 서열의 프로파일을 표준 대조물과 비교하고, 여기서, 표준 대조물의 프로파일로부터 변화된 경우 임신과 연관된 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함한다.

[0015] 일부 양태에서, 시약은 바이실과이트를 포함하거나; 또는 시약은 메틸화된 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있거나; 또는 시약은 메틸화되지 않은 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있다.

[0016] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 단계 (b)에서 나온 DNA 및 2개의 프라이머를 이용하여 게놈 서열을 증폭시키는 증폭 단계를 추가로 포함한다. 예를 들면, 증폭 단계는 PCR, 예를 들면 메틸화-특이적 PCR에 의해 수행될 수

있다. 일부 양태에서, 단계 (c)는 질량 분광학에 의해 수행된다. 다른 양태에서, 단계 (c)는 프라이머 연장에 의해 수행된다. 단계 (c)를 수행하기 위한 다른 가능한 수단은 폴리뉴클레오타이드 하이브리드화, 실시간 PCR 및 전기영동을 포함한다.

- [0017] 본 발명의 제 4 측면에서는 임신한 여성의 태아의 21번 삼염색체증을 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (a) 여성으로부터 생물학적 시료를 획득하고, 여기서, 시료가 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계; (b) 단계 (a)에서 나온 DNA를 메틸화된 DNA와 메틸화되지 않은 DNA를 다르게 변형시키는 시약으로 처리하는 단계; (c) CpG-함유 게놈 서열의 대립인자를 분석하고, 여기서 게놈 서열은 길이가 15개 이상의 뉴클레오타이드이고, 하나 이상의 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 이내에 있고, 상기 영역이 (1) CGI137, 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및 (d) 대립인자의 비를 측정하고, 여기서 21번 삼염색체증을 갖지 않는 태아를 갖는 여성의 대립인자의 비로부터 벗어나는 것이 태아의 21번 삼염색체증을 나타내는 것인 단계를 포함한다.
- [0018] 일부 양태에서, 시약은 바이실과이트를 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 시약은 메틸화된 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있다. 또다른 양태에서 시약은 메틸화되지 않은 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있다.
- [0019] 일부 양태에서, 상기 방법은 메틸화되거나 메틸화되지 않은 게놈 서열을 증폭시키기 위해 단계 (b) 후에 증폭 단계를 추가로 포함한다. 증폭 단계는 PCR, 예를 들면 메틸화-특이적 PCR에 의해 수행될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 방법의 단계 (c)를 수행하는 데는 다양한 방법이 있다. 예를 들면, 단계는 질량 분광계, 프라이머 연장 분석, 실시간 PCR, 폴리뉴클레오타이드 하이브리드화 또는 전기영동에 의해 수행될 수 있다.
- [0021] 이 방법의 일부 양태에서, 태아에서 나온 21번 염색체 상의 게놈 서열의 2개의 서로 다른 대립인자는 단일 뉴클레오타이드 다형성, 삽입-결실 다형성, 또는 단순 탠덤(tandem) 반복 다형성을 포함한다.
- [0022] 본 발명의 제 5 측면에서는 태아를 임신한 여성에서 임신과 연관된 질환을 검출하거나 모니터링하기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 (a) 여성으로부터 생물학적 시료를 획득하고, 여기서, 시료가 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계; (b) 시료 중의 CpG-함유 게놈 서열의 수준을 측정하고, 여기서 게놈 서열은 길이가 15개 이상의 뉴클레오타이드이고, 하나 이상의 메틸화되지 않은 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 이내에 있고, 상기 영역이 (1) CGI137, 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2) 및 Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스)으로 구성된 군에서 선택된 유전자좌 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및 (c) 게놈 서열의 수준을 표준 대조물과 비교하고, 여기서 표준 대조물로부터의 증가 또는 감소가 임신과 연관된 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함한다.
- [0023] 일부 양태에서, 단계 (b)는 혈액 시료 중에 존재하는 DNA를 메틸화된 사이토신과 메틸화되지 않은 사이토신을 다르게 변형시키는 시약으로 처리함을 포함한다. 이 시약은 바이실과이트를 포함할 수 있거나, 또는 메틸화된 사이토신을 포함하는 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있거나, 또는 메틸화되지 않은 사이토신을 포함하는 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있다.
- [0024] 일부 양태에서, 단계 (b)는 증폭 반응, 예를 들면 중합효소 연쇄 반응(PCR), 특히 메틸화-특이적 PCR을 포함한다. 증폭 반응은 또한 핵산 서열에 근거한 증폭, 가닥 치환 반응, 분지된 DNA 증폭 반응일 수 있다. 일부 양태에서, 게놈 DNA 서열의 수준은 전기영동 또는 폴리뉴클레오타이드 하이브리드화에 의해 측정된다.
- [0025] 본 발명의 방법은 자간전증, 조기 진통, 임신 오조증, 자궁의 임신, 21번 삼염색체증 및 자궁내 성장 지연을 포함하는 다수의 임신과 연관된 질환을 검출하거나 모니터링하는데 적합하다.
- [0026] 본 발명의 제 6 측면에서, 태아를 임신한 여성의 임신과 연관된 질환을 검출하거나 모니터링하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 (a) 여성으로부터 생물학적 시료를 획득하고, 여기서, 시료가 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계; (b) 시료 중의 CpG-함유 게놈 서열의 수준을 측정하고, 여기서 게놈 서열은 길이가 15개 이상의 뉴클레오타이드이고, 하나 이상의 메틸화된 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 이내에 있고, 상기 영역이 (1) CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌 및 (2) 상기 유전자

좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및 (c) 게놈 서열의 수준을 표준 대조물과 비교하고, 여기서 표준 대조물로부터의 증가 또는 감소가 임신과 연관된 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함한다.

- [0027] 일부 양태에서, 단계 (b)는 혈액 시료 중에 존재하는 DNA를 메틸화된 사이토신과 메틸화되지 않은 사이토신을 다르게 변형시키는 시약으로 처리함을 포함한다. 이 시약은 바이실과이트를 포함할 수 있거나, 또는 메틸화된 사이토신을 포함하는 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있거나, 또는 메틸화되지 않은 사이토신을 포함하는 DNA를 우선적으로 분해하는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있다.
- [0028] 일부 양태에서, 단계 (b)는 증폭 반응, 예를 들면 중합효소 연쇄 반응(PCR), 특히 메틸화-특이적 PCR을 포함한다. 증폭 반응은 또한 핵산 서열에 근거한 증폭, 가닥 치환 반응, 분지된 DNA 증폭 반응일 수 있다. 일부 양태에서, 게놈 DNA 서열의 수준은 전기영동 또는 폴리뉴클레오타이드 하이브리드화에 의해 측정된다.
- [0029] 상기 방법은 자간진증, 조기 진통, 임신 오조증, 자궁외 임신, 21번 삼염색체증 및 자궁내 성장 지연을 포함하는 다수의 임신과 연관된 질환을 검출하거나 모니터링하는데 적합하다.
- [0030] 상기 언급된 모든 측면 내의 본 발명의 실시에서, CpG 섬은 일부 경우에는 CpG-함유 게놈 서열로서 이용될 수 있는 반면, 다른 경우에는 CpG-함유 게놈 서열이 CpG 섬이 아닐 수 있다.
- [0031] 본 발명의 방법은, 모든 측면에서, 여성에게 수행되는 임의의 단계없이 수행될 수 있다. 이들 양태에서, 본 발명의 방법은 여성으로부터 생물학적 시료를 수득하는 단계를 생략하고, 시료에서 수행되는 처음 언급된 단계로 시작된다. 본 명세서의 모든 다른 개시 내용은, 그 내용이 명확하게 달리 요구하는 경우를 제외하고는, 이들 양태에 똑같이 적용된다.
- [0032] 따라서, 이 양태의 제 1 측면의 방법은 (a) (생략됨); (b) 여성에서 나온 생물학적 시료 중의 CpG-함유 게놈 서열의 메틸화 상태를 측정하며, 여기서 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액이고, 태아에서 나온 게놈 서열과 여성에서 나온 게놈 서열이 서로 다르게 메틸화되어 이에 의해 시료 중의 여성에서 나온 게놈 서열과 시료 중의 태아에서 나온 게놈 서열이 구별되고, 게놈 서열의 길이가 15뉴클레오타이드 이상이고 하나 이상의 사이토신을 포함하고 21번 염색체 상의 영역 내에 있고, 여기서 상기 영역이 (1) CGI137, 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌, 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; (c) 태아에서 나온 게놈 서열의 수준을 측정하는 단계; 및 (d) 태아에서 나온 게놈 서열의 수준을 표준 대조물과 비교하고, 여기서, 표준 대조물의 증가 또는 감소가 임신과 연관된 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함하는, 태아를 임신한 여성에서 임신과 연관된 질환을 검출하거나 모니터링하는 방법이 된다.
- [0033] 유사하게, 이 양태의 제 2 측면의 방법은 (a) (생략됨); (b) 여성에서 나온 생물학적 시료의 DNA를 바이실과이트로 처리하고, 여기서 생물학적 시료가 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계; 및 (c) 단계 (b)에서 나온 DNA 및 2개의 프라이머를 이용한 증폭 반응을 수행하여 CpG-함유 게놈 서열을 증폭시키고, 여기서 게놈 서열은 길이가 15개 이상의 뉴클레오타이드이고, 하나 이상의 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 이내에 있고, 상기 영역이 (1) CGI137, 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌, 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되고, 여기서 2개의 프라이머중 하나 이상이 태아의 게놈 서열에 상이하게 결합하는 단계; 및 (d) 단계 (c)에서 나온 게놈 서열의 증폭된 부분의 수준을 표준 대조물과 비교하고, 여기서, 표준 대조물로부터의 증가 또는 감소가 임신과 연관된 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함하는, 태아를 임신한 여성에서 임신과 연관된 질환을 검출하거나 모니터링하는 방법이 된다.
- [0034] 유사하게, 이 양태의 제 3 측면의 방법은 (a) (생략됨); (b) 여성에서 나온 생물학적 시료의 DNA를, 메틸화된 DNA와 메틸화되지 않은 DNA를 다르게 변형시키는 시약으로 처리하고, 여기서 생물학적 시료가 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계; (c) 단계 (b)에서 나온 CpG-함유 게놈 서열의 뉴클레오타이드 서열을 측정하고, 여기서 게놈 서열은 길이가 15개 이상의 뉴클레오타이드이고, 하나 이상의 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 이내에 있고, 상기 영역이 (1) CGI137, 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파

타제 1, 조절 (억제제) 서브유니트 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌, 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및 (d) 단계 (c)에서 나온 뉴클레오타이드의 프로파일을 표준 대조물과 비교하고, 여기서, 표준 대조물에서 나온 프로파일의 변화가 임신과 연관된 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함하는, 임신과 연관된 질환을 검출하거나 모니터링하는 방법이 된다.

[0035] 유사하게, 이 양태의 제 4 측면의 방법은 (a) (생략됨); (b) 여성에서 나온 생물학적 시료를, 메틸화된 DNA와 메틸화되지 않은 DNA를 다르게 변형시키는 시약으로 처리하고, 여기서, 시료가 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액인 단계; (c) CpG-함유 게놈 서열의 대립인자를 분석하고, 여기서 게놈 서열은 길이가 15개 이상의 뉴클레오타이드이고, 하나 이상의 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 이내에 있고, 상기 영역이 (1) CGI137, 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유니트 2 슈도진 2(PPP1R2P2), Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스), CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및 (d) 대립인자의 비를 측정하고, 여기서 21번 삼염색체증을 갖지 않는 태아를 갖는 여성의 대립인자의 비로부터의 이탈이 태아의 21번 삼염색체증을 나타내는 단계를 포함하는, 임신한 여성의 태아의 21번 삼염색체증을 검출하거나 모니터링하는 방법이 된다.

[0036] 유사하게, 이 양태에서 제 5 측면의 방법은 (a) (생략됨); (b) 여성에서 나온 생물학적 시료 중의 CpG-함유 게놈 서열의 수준을 측정하고, 여기서, 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액이고, 여기서 게놈 서열은 길이가 15개 이상의 뉴클레오타이드이고, 하나 이상의 메틸화되지 않은 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 이내에 있고, 상기 영역이 (1) CGI137, 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A), 호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유니트 2 슈도진 2(PPP1R2P2) 및 Fem1A와의 유사성(카에노하브디티스 엘레간스)으로 구성된 군에서 선택된 유전자좌 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및 (c) 게놈 서열의 수준을 표준 대조물과 비교하고, 여기서 표준 대조물로부터의 증가 또는 감소가 임신과 연관된 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함하는, 태아를 임신한 여성에서 임신과 연관된 질환을 검출하거나 모니터링하는 방법이 된다.

[0037] 유사하게, 이 양태의 제 6 측면의 방법은 (a) (생략됨); (b) 여성에서 나온 생물학적 시료 중의 CpG-함유 게놈 서열의 수준을 측정하고, 여기서, 시료가 전혈, 혈청, 혈장, 뇨 또는 타액이고, 게놈 서열은 길이가 15개 이상의 뉴클레오타이드이고, 하나 이상의 메틸화된 사이토신을 포함하고, 21번 염색체 상의 영역 이내에 있고, 상기 영역이 (1) CGI009, 카보닐 리덕타제 1(CBR1), 다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM), 21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29), 홀로카복실라제 신테타제(HLCS) 및 CGI132로 구성된 군에서 선택된 유전자좌 및 (2) 상기 유전자좌의 상류 및/또는 하류 10 kb 이하의 DNA 서열로 구성되는 단계; 및 (c) 게놈 서열의 수준을 표준 대조물과 비교하고, 여기서 표준 대조물로부터의 증가 또는 감소가 임신과 연관된 질환의 존재 또는 진행을 나타내는 단계를 포함하는, 태아를 임신한 여성에서 임신과 연관된 질환을 검출하거나 모니터링하는 방법이 된다.

과제의 해결 수단

[0038] 정의

[0039] 본원에서 사용되는 용어 "임신과 연관된 질환"은 임신한 여성, 임신한 여성의 태아 또는 여성과 태아 둘 모두에 영향을 미칠 수 있는 임의의 상태 또는 질병을 의미한다. 이런 상태 또는 질병은 제한된 기간 동안, 예를 들면 임신 또는 분만 동안 그 증후가 나타날 수 있거나, 출생 후 태아의 전 생애에 걸쳐 지속될 수 있다. 임신과 연관된 질환의 일부 예는 자궁외 임신, 자간전증, 조기 진통 및 태아 염색체 이상, 예를 들면 21번 삼염색체증을 포함한다.

[0040] 본원에서 사용되는 "CpG-함유 게놈 서열"은 인간의 태아 또는 임신한 여성과 같은 개인의 게놈에서 한정된 위치의 DNA 서열의 분획을 나타낸다. 전형적으로 "CpG-함유 게놈 서열"은 그 길이가 15개 뉴클레오타이드 이상이고, 하나 이상의 사이토신을 함유한다. 바람직하게는 이는 길이가 30, 50, 80, 100, 150, 200, 250 또는 300개 뉴클레오타이드 이상이고, 2, 5, 10, 15, 20, 25 또는 30개 이상의 사이토신을 함유한다. 주어진 위치, 예를 들면 21번 염색체 상의 주어진 유전자좌 부근에 중심을 갖는 영역 이내의 임의의 하나의 "CpG-함유 게놈 서열"(예를 들면 CpG 섬 CGI137, PDE9A, CGI009 등)의 경우, 개인마다 뉴클레오타이드 서열 변이가 존재할 수 있고, 심지어 동일한 사람에게서도 대립인자 변이가 존재할 수 있다. 전형적으로 한정된 유전자좌 부근에 중심을 갖는 이런

영역(예를 들면 CpG 섬)은 유전자좌 및 상류 및/또는 하류 서열을 함유한다. 상류 또는 하류 서열(각각 유전자좌의 5' 또는 3' 경계로부터 계산한다) 각각은 10kb 정도로 길 수 있고, 다른 경우 5kb, 2kb, 1kb, 500bp, 200bp 또는 100bp 정도로 길 수도 있다. 또한, "CpG-함유 게놈 서열"은 단백질 생산을 위해 전사되거나 전사되지 않는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 뉴클레오타이드 서열은 단백질-코딩 서열, 비-단백질 코딩 서열(예를 들면 전사 프로모터) 또는 이의 조합일 수 있다.

[0041] 본원에서 "CpG 섬"은 최소한의 길이, 최소한의 GC 함량 및 최소한의 관찰된 CpG 빈도/예측된 CpG 빈도(OCF/ECF: observed CpG frequency/expected CpG frequency)를 갖는, 게놈에서 발견되는 DNA 서열의 분획을 개시한다. 문헌[Yamada et al., Genome Research 14:247-266, 2004]은 CpG 섬을 측정하기 위한 표준물 세트를 개시하고 있다: 이는 길이가 400개 뉴클레오타이드 이상이어야만 하고 50% 보다 큰 GC 함량 및 0.6 보다 큰 OCF/ECF 비를 갖는다. 다른 곳(문헌[Takai et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:3740-3745, 2002]에서는 길이가 200개 뉴클레오타이드 이상이어야만 하고 50% 보다 큰 GC 함량 및 0.6 보다 큰 OCF/ECF 비를 갖는 서열로서 CpG 섬을 덜 엄격하게 정의하고 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 21번 염색체 상의 "CpG 섬"이라는 개념은, 100, 200 또는 300개 뉴클레오타이드의 윈도우 크기 및 스크리닝 방법에서 1, 2 또는 3개의 뉴클레오타이드의 쉬프트 또는 단계 크기를 이용할 경우 수득되는 결과를 포함하여, 상기 언급된 기준에 근거하여 염색체를 스캔하기 위해 고안된 현재 이용가능한 컴퓨터 프로그램중 임의의 것에 의해 제공되는 CpG 섬 프로파일에 부합하는 것이다. 본 명세서에서 명명된 개별적인 CpG 섬은 본 명세서의 표 1에 개시된 바와 같이 그들의 상응하는 유전자 콘티그(contig) 수납 번호, 진뱅크(GenBank)에서의 버전과 영역, UCSC 게놈 브라우저(genome.ucsc.edu)의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 21번 염색체에 대한 염색체 위치, 및 주어진 조건 하에서 PCR 프라이머에 의해 증폭될 수 있는 능력에 의해 추가로 한정된다.

[0042] 본원에서 사용되는 용어 "후생학적 상태(epigenetic state 또는 epigenetic status)"는 1차 뉴클레오타이드 서열이 아닌 핵산(예를 들면 DNA 또는 RNA)의 분자 수준에서의 임의의 구조적 특징을 의미한다. 예를 들면 게놈 DNA의 후생학적 상태는 예를 들면 그의 메틸화 패턴 또는 세포 단백질과의 결합에 의해 영향을 받거나 결정되는 이의 2차 또는 3차 구조를 포함할 수 있다.

[0043] 본원에서 게놈 서열의 메틸화 상태를 개시하기 위해 사용되는 경우 용어 "메틸화 프로파일" 또는 "메틸화 상태"는 메틸화와 관련된 특정한 유전자좌에서 DNA 분획의 특성을 의미한다. 이런 특성은 이 DNA 서열 내부의 임의의 사이토신(C) 잔기의 메틸화 여부, 메틸화된 C 잔기의 위치, 임의의 특정한 죽 이어진 잔기에서 메틸화된 C의 %, 및 예를 들면 대립인자의 기원의 차이로 인한 메틸화에서의 대립인자 차이를 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다. 용어 "메틸화 프로파일" 또는 "메틸화 상태"는 또한 생물학적 시료의 임의의 특정한 죽 이어진 잔기에서 메틸화된 C 또는 메틸화되지 않은 C의 상대적 또는 절대적 농도를 의미한다.

[0044] 본원에서 사용되는 용어 "단일 뉴클레오타이드 다형성" 또는 "SNP"는 동일한 게놈 서열의 서로 다른 대립인자 내부의 하나의 뉴클레오타이드 잔기에 존재하는 폴리뉴클레오타이드 서열 변이를 의미한다. 이 변이는, 게놈 서열이 단백질 생산동안 전사된다면, 게놈 서열의 코딩 영역 또는 비-코딩 영역(즉, 프로모터 영역) 내부에서 일어날 수 있다. 하나 이상의 SNP의 검출은 단일 게놈 서열의 서로 다른 대립인자의 차별화를 가능하게 한다.

[0045] 본원에서 사용되는 용어 "혈액"은 임신한 여성 또는 임신 가능성을 시험하고 있는 여성에서 나온 혈액 시료 또는 준비물을 의미한다. 이 용어는 전혈 또는 혈액의 임의의 분획, 예를 들면 종래 정의된 바와 같은 혈청 및 혈장을 포함한다.

[0046] 본원에서 사용되는 용어 "바이설파이트"는 메틸화된 사이토신을 화학적으로 개질시키지 않고 사이토신(C)을 우라실(U)로 전환시킬 수 있어서 DNA의 메틸화 상태에 근거하여 DNA 서열을 서로 다르게 변형시키는데 이용될 수 있는 모든 유형의 바이설파이트, 예를 들면 나트륨 바이설파이트를 포함한다.

[0047] 본원에서 사용되는 경우 메틸화되거나 메틸화되지 않은 DNA를 "서로 다르게 개질시키는" 시약은 공정에서 메틸화되고/되거나 메틸화되지 않은 DNA를 개질시켜 이 공정을 통해 메틸화된 DNA와 메틸화되지 않은 DNA로부터 구별가능한 생성물이 생성되어 DNA 메틸화 상태를 확인할 수 있게 하는 임의의 시약을 포함한다. 이런 공정은 화학적 반응(예를 들면 바이설파이트에 의한 C → U 전환) 및 효소적 처리(예를 들면 메틸화-의존적 엔도뉴클레아제)를 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다. 따라서, 메틸화된 DNA를 우선적으로 분해하는 효소는 DNA가 메틸화된 경우 훨씬 더 높은 효율로 DNA 분자를 분해할 수 있는 것이고, 반면 메틸화되지 않은 DNA를 우선적으로 분해하는 효소는 DNA가 메틸화되지 않았을 때 훨씬 더 높은 효율을 나타낸다.

[0048] 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 데옥시라이보핵산(DNA) 또는 라이보핵산(RNA), 및 단일 스트랜드 형

태 또는 이중 스트랜드 형태인 이의 중합체를 의미한다. 달리 특별하게 한정되지 않은 한, 상기 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 성질을 갖고 천연 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 지시되지 않는 한, 특정한 핵산 서열은 또한 명확하게 지시되는 서열 뿐만 아니라, 이의 보존적으로 개질된 변이체(예를 들면 디제너레이트(degenerate) 코돈 치환), 대립인자, 오르토로그(ortholog), 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP) 및 상보적 서열을 명확하게 포함한다. 특히, 디제너레이트 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 3번째 위치가 혼합된-염기 및/또는 테옥시노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다(문헌[Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991)]; [Ohtsuka et al, J. Biol Chem. 260:2605-2608 (1985)]; 및 [Rossolini et al, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)]). 용어 핵산은 유전자, cDNA 및 유전자에 의해 코딩되는 mRNA와 상호교환적으로 사용된다.

[0049] 용어 "유전자"는 폴리펩타이드 쇄를 생성하는데 포함되는 DNA 단편을 의미하고, 이는 유전자 생성물의 전사/번역에 관련된 코딩 영역 앞과 뒤의 영역(리더(leader) 및 트레일러(trailer)) 및 전사/번역의 조절 영역, 또한 개별적인 코딩 단편(엑손) 사이의 개입 서열(인트론)을 포함한다.

[0050] 본원에서, 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 천연 아미노산 중합체 및 비-천연 아미노산 중합체 뿐 아니라 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 아미노산의 인공 화학적 모방체인 아미노산 중합체에도 적용된다. 본원에서 사용되는 경우 상기 용어는 아미노산 잔기가 펩타이드 공유 결합에 의해 결합되어 있는 전장 단백질(즉, 항원)을 포함하는, 임의의 길이의 아미노산 쇄를 포함한다.

[0051] 용어 "아미노산"은 천연 및 합성 아미노산, 및 천연 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 포함한다. 천연 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩되는 것들, 및 나중에 개질되는 아미노산, 예를 들면 하이드록시프롤린, γ -카복시글루타메이트 및 O-포스포세린이다.

[0052] 아미노산은 본원에서 일반적으로 알려진 3문자 기호 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회에 의해 추천되는 1문자 기호로 언급될 수 있다. 유사하게 뉴클레오타이드도 이들의 일반적으로 허용되는 1문자 코드로 언급될 수 있다.

[0053] 본원에서 사용되는 "증가" 또는 "감소"는 확립된 표준 대조물과 비교하였을 때 양의 검출가능한 양(+)의 변화 또는 음(-)의 변화를 의미한다. 증가는 바람직하게는 대조물의 값의 10% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 보다 더 바람직하게는 2배, 보다 더 바람직하게는 5배 이상, 가장 바람직하게는 10배 이상의 양의 변화이다. 유사하게, 감소는 대조물의 바람직하게는 10% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 보다 더 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 음의 변화이다. 비교 기준으로부터의 양적 변화 또는 차이를 나타내는 다른 용어, 예를 들면 "초과" 또는 "미만"은 본원에서 상기 개시된 것과 같은 방식으로 사용된다.

[0054] 본원에서 사용되는 "폴리뉴클레오타이드 하이브리드화 방법"은 적절한 하이브리드화 조건 하에서 공지된 서열의 폴리뉴클레오타이드 프로브와 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍을 형성할 수 있는 능력에 근거하여 폴리뉴클레오타이드의 존재 및/또는 양을 검출하는 방법을 의미한다. 이런 하이브리드화 방법의 예는 써던 블롯팅(Southern blotting) 및 노던 블롯팅(Northern blotting)을 포함한다.

[0055] 본원에서 사용되는 "프라이머"는 증폭 방법, 예를 들면 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 사용하여 다양한 메틸화 상태인 특정한 게놈 서열, 예를 들면 21번 염색체 상의 CpG 섬 CGI137, PDE9A 또는 CGI009 내부에 위치하는 서열에 상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 근거하여 뉴클레오타이드 서열을 증폭시킬 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 폴리뉴클레오타이드 서열을 증폭하기 위한 PCR 프라이머중 하나 이상은 그 서열에 대해 서열-특이적이다.

[0056] 본원에서 사용되는 "표준 대조물"은 시험 시료 중에 존재하는 특정한 게놈 서열, 예를 들면 21번 염색체 상의 CpG 섬 CGI137, PDE9A 또는 CGI009 내부에 위치하는 서열의 양 또는 메틸화 상태를 비교하기 위해, 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 소정의 양 또는 메틸화 프로파일(이는 메틸화에 대해 여러 개의 서로 다르고 분리 가능한 특성을 포함할 수 있다)을 갖는 게놈 서열을 포함하는 시료를 의미한다. 표준 대조물로서 작용하는 시료는 정상 태아를 임신하고 있는 평균적이고 건강한 임산부(태아와 임산부 둘 모두 임의의 임신과 연관된 질환 또는 합병증이 전개될 위험이 없다)의 혈액 중에서 임신 동안 한정된 시기(예를 들면 임신 제1 삼분기)에 전형적인 대상 유전자의 평균 양 또는 메틸화 프로파일을 제공한다.

[0057] 임산부를 묘사하는데 사용되는 용어 "평균"은 여성이 하나 이상의 관련된 질환이 없다는, 예를 들면 염색체 이상이 있는 태아를 갖고 있다거나 임신과 연관된 질환(예를 들면 자궁외 임신, 자간전증 또는 조기 진통)이 없다

는 사실을 의미한다. 다른 내용에서 사용되는 경우, 용어 "평균"은 염색체가 정상인 태아를 임신하고 있고 임의의 임신과 연관된 질병 또는 질환이 없는 건강한 여성의 무작위 선택된 그룹을 대표하는 여성의 혈액에서 발견되는 모체 및 태아 기원 둘 모두의 특정한 게놈 서열의 일부 특성, 예를 들면 특정한 게놈 서열(예를 들면 21번 염색체 상의 CpG 섬 CGI137, PDE9A 또는 CGI009 내부에 위치하는 서열)의 메틸화 프로파일을 의미한다. 이 선택된 그룹은 이들 여성중의 대상 게놈 서열의 평균 양 또는 메틸화 프로파일이 건강한 태아를 임신한 건강한 여성의 일반적인 모집단에서의 상응하는 프로파일을 합당한 정확성으로 반영할 수 있도록 충분한 수의 여성을 포함하여야만 한다. 또한, 선택된 그룹의 여성은 일반적으로 혈액을 이용하여 임신과 연관된 질환이 있는지를 시험하고자 하는 여성과 유사한 잉태 시기를 가져야만 한다. 본 발명을 실시하기 위한 바람직한 잉태 시기는 스크리닝하고자 하는 질환에 따라 다양할 수 있다. 예를 들면 임신부는 바람직하게는 임신 중기 동안 자간전증 위험에 대해 스크리닝되는 반면, 태아 염색체 이수성은 가능한 한 임신 제1 삼분기에 스크리닝되고 진단되는 것이 바람직하다. 더욱이 시험에 바람직한 잉태 시기는 또한 시험 대상 유전자에 따라 다양할 것이다.

[0058] 본원에서 사용되는 용어 "자간전증"은 임신 동안 발생하는 질환을 의미하고, 이의 주 증후는 종종 단백뇨와 부종(팽윤)을 동반하는 다양한 형태의 고혈압이다. 종종 임신 독혈증으로도 불리는 자간전증은 발작이 동반하는 자간전증인 "자간"이라 불리는 보다 심각한 질환과 관련되어 있다. 이들 질환은, 비록 출산 직후나 임신 20주 이전에도 발병할 수 있긴 하지만, 일반적으로 임신 중반 이후(20주 이후)에 발병한다.

[0059] 본원에서 사용되는 용어 "조기 진통" 또는 "조숙 진통"은 진통이 약 40주의 총 잉태 기간보다 3주 이상 전에 시작되는 상태를 의미하고, 이는 치료되지 않을 경우 종종 조산을 야기한다.

[0060] 용어 "임신 오조증"은 임신동안, 특히 임신 제1 삼분기 동안의 극심하고 지속적인 메스꺼움과 구토를 의미한다. 메스꺼움과 구토는 탈수를 야기할 수 있고, 임신에 필요한 체중 증가를 방해한다.

[0061] "자궁외 임신"은 수정란이 자궁 외부에 착상된 이상 임신을 의미한다. 자궁외 임신의 대부분의 경우 수정란이 나팔관에 착상하지만, 이 용어는 또한 수정란이 여성의 난소, 복부 또는 자궁 경관에 착상한 이상 임신을 포함한다.

[0062] 상세한 설명

[0063] **I. 서론**

[0064] 모체 혈장 중의 태아 DNA의 존재는 1997년에 처음 보고되었고, 단순히 모체 혈액 시료의 분석을 통해 비-침습적인 산전 진단 가능성이 제안되었다(문헌[Lo et al, Lancet 350:485-487, 1997]). 이제까지, 다수의 유망한 임상 적용법이 개발되어 왔다. 특히 모체 혈장중의 태아 DNA 농도의 양적 이상은 자간전증, 조기 진통, 분만전 출혈, 침습적 태반 형성, 태아 다운 증후군 및 다른 태아 염색체 이수성과 관련된 것으로 발견되었다. 따라서, 모체 혈장 중의 태아 DNA 분석이 태아와 임신부의 복지를 모니터링하기 위한 유망한 마커로 제안되어왔다.

[0065] 그러나, 모체 혈장에서 태아 DNA는 바탕값 모체 DNA와 공존한다. 따라서, 대부분의 보고된 용도에서는 Y 염색체 서열의 검출에 의존하였는데, 이들 서열이 모체 DNA와 가장 편리하게 구별될 수 있기 때문이었다. 이런 접근법은 현존하는 분석법의 적용가능성을 모든 임신의 단지 50%, 즉 남자 아이를 임신한 경우만으로 제한한다. 따라서, 모체 혈장 검출을 위한 성별과 무관한 태아 DNA 마커의 개발이 매우 요구되고 있다.

[0066] 태아 DNA와 모체 DNA는 메틸화 상태에서의 차이에 의해 구별가능하다는 점이 이전에 입증되었다(미국 특허 출원 공개 공보 제20030044388호). 메틸화는 후생학적 현상이고, 이는 DNA 서열의 변화를 포함하지 않고 표현형이 변화되는 과정을 의미한다. 게놈 임프린팅(차별적인 메틸화, 및 따라서 특별한 대립 유전자의 어머니 기원과 연관된 단일 유전자의 2개의 대립 유전자의 차별적인 발현)을 나타내는 유전자좌인 H19에서 부계 유전되는 대립 유전자와 모계 유전되는 대립 유전자 사이의 DNA 메틸화 상태의 차이를 활용함으로써, 본원 발명자 중 한 명(Y.M.D. Lo) 및 그의 그룹은 모체 혈장으로부터 태아 유래된 모계 유전된 DNA 서열을 검출하기 위해 후생학적 마커를 이용하는 실행가능성을 처음으로 입증하였다(문헌[Poon et al, Clin. Chem. 48:35-41, 2002]). 또한 비-침습성 산전 진단을 위해 후생학적 마커를 이용할 것이 제안되었다(미국 특허 출원 공개 공보 제20030211522호(Landes et al.)).

[0067] 본 발명자들은 태반-유래된 RNA가 모체 혈장에서 검출될 수 있음을 최근에 입증하였다(문헌[Ng et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:4748-4753, 2003]). 한편, 정상적인 개인의 혈장 DNA는 주로 조혈 세포에서 유래되는 것으로 제시되었다(문헌[Lui et al, Clin. Chem. 48:421-427, 2002]). 따라서, 모체 DNA의 주된 근원은 말초 혈액 세포에서 유래되는 반면, 태반이 모체 혈장으로 방출되는 태아 DNA의 가능한 근원이라는 가설이 세워졌다. 따라서, 모체 혈장에서 검출하기 위한 일반적인 태아-특이적 DNA 마커를 개발하기 위한 한가지 전략은 태반

과 모체 말초 혈액 세포 사이에서 서로 다르게 메틸화되는 유전자를 확인하는 것이다.

[0068] 본 발명자는 21번 염색체 상의 특정한 게놈 유전자좌에 위치하는 다수의 게놈 서열이 태아에서 나온(예를 들면 태반에서 나온) 태아 DNA와 엄마의 말초 혈액 세포에서 나온 모체 DNA 사이에서 서로 다르게 메틸화됨을 처음으로 입증하였다. 따라서, 이 발견은 태아 게놈 DNA와 모체 게놈 DNA를 식별하기 위한 새로운 접근법, 및 비-침습 산전 진단을 위한 새로운 방법을 제공한다.

[0069] **II. 일반적 방법론**

[0070] 본 발명을 실시하는 것은 분자 생물학 분야에서 일상적인 기법을 이용한다. 본 발명에서 이용되는 일반적인 방법을 개시하고 있는 기본 교재에는 문헌[Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd ed. 2001)]; [Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990)]; 및 [Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al, eds., 1994)]이 포함된다.

[0071] 핵산의 경우 크기는 킬로베이스(kb) 또는 염기 쌍(bp)중 하나로 표시된다. 이들은 아가로즈 또는 아크릴아미드 겔 전기영동, 서열 분석된 핵산 또는 공개된 DNA 서열에서 유래된 추정치이다. 단백질의 경우, 크기는 킬로달톤(kDa) 또는 아미노산 잔기 수로 표시된다. 단백질 크기는 겔 전기영동, 서열 분석된 단백질, 유도된 아미노산 서열 또는 공개된 단백질 서열로부터 추정된다.

[0072] 상업적으로 이용가능하지 않은 올리고뉴클레오타이드는 예를 들면 문헌[Van Devanter et. al, *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168 (1984)]에 개시된 바와 같이 자동화된 합성기를 이용하여 문헌[Beaucage & Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862 (1981)]에 처음으로 개시된 고품 상 포스포르아미다이트 트라이에스터 방법에 따라 화학적으로 합성될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 정제는 임의의 당 분야에서 인정되는 전략, 예를 들면 문헌[Pearson & Reanier, *J. Chrom.* 255: 137-149 (1983)]에 개시된 바와 같은 천연 아크릴아미드 겔 전기영동 또는 음이온-교환 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 수행된다.

[0073] 본 발명의 게놈 서열, 예를 들면 CGI137, PDE9A 및 CGI009와 같이 21번 염색체 상의 CpG 섬 이내에 위치한 것들, 및 합성 올리고뉴클레오타이드의 폴리뉴클레오타이드 서열은 예를 들면 문헌[Wallace et al, *Gene* 16: 21-26 (1981)]의 이중 스트랜드 주형의 서열을 분석하기 위한 쇠 종결 방법을 이용하여 확인될 수 있다.

[0074] **III. 혈액 시료의 획득 및 DNA 추출**

[0075] 본 발명은 임신과 연관된 증후 또는 질환의 존재를 검출하고/하거나 이들 증후 또는 질환의 진행을 모니터링하기 위해서 비-침습적인 수단으로 모체 혈액에서 발견되는 태아 DNA의 후생학적 상태를 분석하는 것에 관한 것이다. 따라서, 본 발명을 실시하는 첫번째 단계는 임신한 여성으로부터 혈액 시료를 취득하고 이 시료로부터 DNA를 추출하는 것이다.

[0076] A. 혈액 시료의 획득

[0077] 본 발명의 방법을 이용한 시험에 적합한 잉태 시기의 임신한 여성으로부터 혈액 시료를 취득한다. 적합한 잉태 시기는 하기 개시된 바와 같이 시험되는 질환에 따라 다양할 수 있다. 여성으로부터의 혈액 수집은 병원이나 클리닉이 일반적으로 따르는 표준 프로토콜에 따라 수행된다. 적절한 양, 예를 들면 전형적으로 5 내지 50ml의 말초 혈액을 수집하고, 추가로 처리하기 전에 표준 과정에 따라 저장될 수 있다.

[0078] B. 혈액 시료의 준비

[0079] 본 발명에 따라 모체 혈액에서 발견되는 태아 DNA의 분석은 예를 들면 전혈, 혈청 또는 혈장을 이용하여 수행될 수 있다. 모체 혈액에서 나온 혈청 또는 혈장을 준비하는 방법은 당 분야의 숙련자들에게는 잘 알려져 있다. 예를 들면 혈액 응고를 방지하기 위해 임신한 여성의 혈액을 EDTA를 함유하는 시험관 또는 특수한 상업적 제품, 예를 들면 바큐테이너(Vacutainer) SST(Becton Dickinson, 뉴저지주 프랑클린 레이크스)에 둘 수 있고, 그런 다음 원심분리를 통해 전혈로부터 혈장을 취득할 수 있다. 한편, 혈액 응고 후 원심분리하거나 하지 않고 혈청을 취득할 수 있다. 원심분리를 사용하는 경우, 이는 전형적으로(배타적은 아니지만) 적절한 속도, 예를 들면 1500 내지 3000g에서 수행된다. 혈장 또는 혈청은 DNA를 추출하기 위해 신선한 시험관으로 이동되기 전에 추가의 원심분리 단계를 거칠 수 있다.

[0080] 전혈의 무세포 부분에 추가하여, DNA는 연막 부분이 풍부한 세포 분획으로부터 회수될 수 있고, 이는 여성에서 나온 전혈 시료를 원심분리하고 혈장을 제거한 후 취득될 수 있다.

[0081] C. DNA 추출

[0082] 혈액을 포함한 생물학적 시료로부터 DNA를 추출하는 다수의 공지된 방법이 있다. DNA 준비의 일반적인 방법(예를 들면 문헌[Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d ed., 2001]에 개시된 방법)을 따를 수도 있고; 또한 다양한 상업적으로 이용가능한 시약 또는 키트, 예를 들면 퀴아엠프(QiaAmp) DNA 미니 키트 또는 퀴아엠프 DNA 혈액 미니 키트(Qiagen, 독일 힐텐), 제노믹프렙(GenomicPrep, 상표명) 혈액 DNA 단리 키트(Promega, 위스콘신주 매디슨) 및 GFX(상표명) 게놈 혈액 DNA 정제 키트(Amersham, 뉴저지주 피스카타웨이)를 이용하여 임신한 여성에서 나온 혈액 시료로부터 DNA를 수득할 수 있다. 이들 방법중 하나 이상의 조합을 이용할 수 있다.

[0083] **IV. DNA의 메틸화-특이적 화학적 개질**

[0084] 임신한 여성의 혈액 시료로부터 추출할 경우, 메틸화 차별적 방식으로 DNA를 화학적 개질시킬 수 있는(즉, 처리 후에 메틸화된 사이토신(C) 잔기와 메틸화되지 않은 C 잔기로부터 서로 상이하고 식별가능한 화학적 구조가 생성되는) 시약으로 DNA를 처리한다. 전형적으로, 이런 시약은 DNA 분자의 메틸화되지 않은 C 잔기와 반응하여 각각의 메틸화되지 않은 C 잔기를 U 잔기로 전환시키는 반면, 메틸화된 C 잔기는 변화시키지 않고 남겨둔다. 이러한 C → U 전환은 핵산의 1차 서열의 변화에 근거하여 메틸화 상태를 검출하고 비교하는 것을 가능하게 한다. 이 목적에 적합한 예시적인 시약은 바이설파이트, 예를 들면 나트륨 바이설파이트이다. DNA의 화학적 개질에 바이설파이트를 이용하는 방법은 당 분야에 잘 공지되어 있고(예를 들면 문헌[Herman et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:9821-9826, 1996]참조), 본원에서는 상세히 논의되지 않을 것이다.

[0085] 당 분야의 숙련자들은 본원에서 거론되지 않았지만 메틸화된 DNA와 메틸화되지 않은 DNA를 서로 다르게 화학적으로(또는 임의의 다른 기작을 통해) 개질시키는 동일한 성질을 가진 임의의 다른 시약을 본 발명을 실시하는데 사용할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들면 DNA의 메틸화-특이적 개질은 메틸화-민감성 제한 효소에 의해 달성될 수 있고, 이러한 제한 효소의 일부는 전형적으로 메틸화되지 않은 DNA 단편을 분해하지만 메틸화된 DNA 단편은 분해하지 않는 반면, 다른 것들은(예를 들면 메틸화-의존적 엔도뉴클레아제 McrBC) 메틸화된 사이토신을 함유하는 DNA는 분해하지만 메틸화되지 않은 DNA는 분해하지 않는다. 또한, 화학적 개질과 제한 효소 처리의 조합, 예를 들면 조합된 바이설파이트 제한 효소 분석(COBRA)을 본 발명의 실시예에 이용할 수 있다.

[0086] **V. 폴리뉴클레오타이드 서열 증폭 및 결정**

[0087] 메틸화-차별적 방식으로 DNA를 화학적 개질시킨 후, 태아 DNA에서 나온 본 발명의 게놈 서열중 하나 이상(예를 들면 21번 염색체 상의 CpG섬, 예를 들면 CGI137, PDE9A 및 CGI009 이내에 위치한 것들)이 모체 DNA에서 나온 이들의 대응물과 식별될 수 있고, 태아 게놈 서열 메틸화 프로파일이 측정되고 표준 대조물과 비교될 수 있도록, 처리된 DNA를 서열에 근거하여 분석한다. 또한, 일단 태아 기원의 한가지 특정한 게놈 서열이 모체 대응물에 비해 과메틸화되었거나 저메틸화된 것으로 측정되면, 이 태아 게놈 서열의 양을 이의 특이적 메틸화 상태에 근거하여 측정할 수 있다. 후속적으로, 이 양을 표준 대조물 값과 비교하여 임의의 임신과 연관된 질환의 가능성에 대한 지표로 삼을 수 있다.

[0088] **A. 뉴클레오타이드 서열의 증폭**

[0089] 증폭 반응은 메틸화 특이적 개질 후의 게놈 서열을 서열 분석하기 전의 선택 사항이다. 본 발명의 일부 양태에서는, 한가지 특정한 근원, 예를 들면 태반에서 나오거나 태아의 다른 조직에서 나온 게놈 서열만이 검출되고 분석될 수 있도록, 특정한 메틸화 패턴을 갖는 21번 염색체 상의 CpG-함유 게놈 서열이 우선적으로 증폭되도록 증폭이 수행된다.

[0090] 다양한 폴리뉴클레오타이드 증폭 방법이 잘 확립되어 있고 종종 연구에 사용된다. 예를 들면 폴리뉴클레오타이드 서열 증폭을 위한 중합효소 연쇄 반응(PCR)의 일반적인 방법은 당 분야에 잘 공지되어 있고, 따라서 본원에서는 상세하게 기술하지 않는다. PCR 방법의 개론, 프로토콜 및 프라이머 디자인 원칙에 대해서는 예를 들면 문헌[Innis, et al, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N. Y., 1990]을 참고할 수 있다. PCR 시약 및 프로토콜은 또한 로슈 몰레큘라 시스템스(Roche Molecular Systems)와 같은 상업적인 판매자로부터 입수할 수 있다.

[0091] PCR은 대부분 열에 안정적인 효소를 이용한 자동화된 공정으로서 일반적으로 수행된다. 이 공정에서, 반응 혼합물의 온도는 자동적으로 변성 영역, 프라이머 어닐링(annealing) 영역 및 연장 반응 영역을 통해 순환된다. 이 목적에 특이적으로 개조된 기계가 상업적으로 입수가 가능하다.

[0092] 목표 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들면 태아와 모체 서열이 서로 다르게 메틸화되는 21번 염색체 상의 CpG-함

유 게놈 서열)의 PCR 증폭이 전형적으로 본 발명의 실시예에 이용되지만, 당 분야의 숙련자들은 모체 혈액 시료 중에서 발견되는 게놈 서열의 증폭이 임의의 공지된 방법, 예를 들면 리가제 연쇄 반응(LCR: ligase chain reaction), 전사-매개 증폭 및 자가-지지된 서열 복제 또는 핵산 서열-계 증폭(NASBA: nucleic acid sequence-based amplification)에 의해 수행될 수 있고, 이들 각각이 충분한 증폭을 제공한다는 것을 인식할 것이다. 보다 최근에 개발된 분지된-DNA 기법을 또한 이용하여 본 발명의 특정 게놈 서열의 존재(이는 특정한 메틸화 패턴을 나타낸다)를 정성적으로 입증하거나, 모체 혈액 중의 이 특정한 게놈 서열의 양을 정량적으로 측정할 수 있다. 임상 시료 중의 핵산 서열의 직접적 정량화를 위한 분지된-DNA 신호 증폭에 대한 개론은 예를 들면 문헌 [Nolte, Adv. Clin. Chem. 33:201-235, 1998]을 참고할 수 있다.

[0093] **B. 폴리뉴클레오타이드 서열의 측정**

[0094] 폴리뉴클레오타이드 서열 측정 기법 또한 잘 확립되어 있으며 관련 조사 분야에서 널리 실시되고 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 서열 분석을 위한 기본 원리 및 일반적인 기법은 다양한 연구 보고서 및 분자생물학과 재조합 유전자학에 대한 전문 서적, 예를 들면 문헌[Wallace et al, Gene 16: 21-26 (1981)], [Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d ed., 2001], [Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al, eds., 1994)]에 개시되어 있다. 연구 실험실에서 수동 또는 자동으로 일상적으로 수행되는 DNA 서열 분석 방법을 본 발명의 실시예에 이용할 수 있다. 본 발명을 실시하기 위해 폴리뉴클레오타이드 서열에서의 변화(예를 들면 C → U)를 검출하기에 적합한 추가의 수단은 질량 분광학, 프라이머 연장, 폴리뉴클레오타이드 하이브리드화, 실시간 PCR 및 전기영동을 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다.

[0095] **VI. 표준 대조물 확립**

[0096] 본 발명을 실시하기 위한 표준 대조물을 확립하기 위해, 건강한 태아를 임신하고 있는 건강한 임신한 여성의 그룹을 먼저 선택하였다. 이들 여성은 유사한 잉태 시기이고, 이러한 잉태 시기는 본 발명의 방법을 이용하여 자간전증, 태아 염색체 이수성 및 조기 진통과 같은 질환을 스크리닝하기에 적절한 임신 기간 이내에 있다. 유사하게, 표준 대조물은 건강한 임신하지 않은 여성의 그룹에서 나온 시료를 이용하여 확립된다.

[0097] 선택된 임신한 여성과 이들이 임신하고 있는 태아의 건강 상태는 여성의 혈압 모니터링, 진통 개시 기록 및 CVS 및 양수 천자를 이용한 태아의 유전자 분석을 수행하는 것을 포함하지만, 이로 제한되지 않는, 잘 확립된 일상적인 방법에 의해 확인된다.

[0098] 또한, 건강한 태아를 임신하고 있는 건강한 임신한 여성의 선택된 그룹은, 이 군에서 수득된 모체 혈액 중의 태아에서 기원한 본 발명의 게놈 서열의 평균적인 양 또는 이 그룹에서 수득된 모체 혈액 중의 태아 게놈 서열의 메틸화 프로파일이 건강한 태아를 임신하고 있는 건강한 여성의 일반적인 모집단 중에서 정상적이거나 평균적인 양 또는 메틸화 프로파일을 나타내는 것으로 합리적으로 간주될 수 있도록, 합리적인 크기이어야만 한다. 바람직하게는 선택된 그룹은 10명 이상의 여성을 포함한다.

[0099] 태아 게놈 서열 메틸화 프로파일에 대한 표준 대조물은 이 특정한 게놈 서열의 메틸화 상태의 여러 상이하고 분리가능한 측면을 반영할 수 있다. 예를 들면, 메틸화 프로파일의 한 측면은 임의의 주어진 C 잔기의 메틸화 여부이고; 다른 측면은 특정한 게놈 서열 내부의 메틸화된 C 염기의 수이고; 프로파일의 추가의 측면은 임의의 주어진 위치에서 메틸화된 C의 %이다. 메틸화 프로파일의 추가 측면은 메틸화에서의 대립 유전자 차이, 차별적으로 메틸화된 대립 유전자의 비 등을 포함할 수 있지만, 이로 한정되지 않는다. 태아 게놈 서열 메틸화 프로파일은 또한 조직 유형, 예를 들면 태반 또는 다른 태아 조직에 따라 다양할 수 있다. 따라서, 시험에 이용되는 서로 다른 태아 조직에 대해 별개의 표준 대조물이 확립될 수 있다.

[0100] 일단 선택된 건강한 대조군의 여성 각각에서 발견되는 개별적인 값에 근거하여 모체 혈액중에 존재하는 특정한 태아 게놈 서열에 대해 평균 수준 또는 메틸화 프로파일이 확립되면, 이 평균, 중간 또는 대표적인 값 또는 프로파일이 표준 대조물로 간주된다. 따라서 유사한 양의 태아 게놈 서열 또는 유사한 메틸화 프로파일의 태아 게놈 서열을 함유하는 임의의 혈액 시료가 표준 대조물로서 이용될 수 있다. 또한, 평균 또는 중간 또는 대표적인 양의 게놈 DNA 서열, 또는 평균 또는 중간 또는 대표적인 메틸화 프로파일을 갖는 게놈 DNA 서열을 함유하는 용액이 또한 인공적으로 조합되어 표준 대조물로서 사용될 수 있다. 또한, 서로 다른 측면의 메틸화 프로파일을 갖는 태아 기원의 게놈 서열에 대해 별개의 표준 대조물이 확립될 수 있다.

발명의 효과

[0101] 본 발명은 일부 임신 관련 질환을 산전 진단 및 모니터링하기 위한 새로운 태아 마커의 용도를 제공한다. 보다

구체적으로, 본 발명은 태아의 21번 염색체에 위치한 일부 CpG 섬(CpG island)이 모체의 21번 염색체 상에 위치한 상응하는 CpG 섬과는 상이한 메틸화 프로파일을 나타낸다는 발견에 근거한다. 본 발명은 또한 관련된 질환을 진단하고 모니터링하기 위한 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0102]

도 1a(도 1aa 내지 1ac로 나누어 도시함) 및 도 1b(도 1ba 내지 도 1bc로 나누어 도시함)는 CGI137의 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석을 도시하는 도면으로, 도 1a는 쌍을 이룬 태반 조직과 모체 혈액 세포 중의 영역 A이고, 도 1b는 영역 B이다. 개별적인 CpG 부위는 첫번째 열을 가로질러 번호 매겨져 있고, 핵산 위치는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(Human May 2004)(hg17) 어셈블리의 chr21:46,249,636(+1)에 대해 정의되어 있다. 각각의 후속적인 열은 클로닝에 의해 단리된 단일 DNA 분자 중에서 CpG 부위를 가로지른 메틸화 상태를 나타낸다. 채워진 원과 채워지지 않은 원은 각각 메틸화된 CpG 부위와 메틸화되지 않은 CpG 부위를 나타낸다. 태반 조직 시료에서 얻은 클론은 접두사 "PLN"으로 라벨링되고, 모체 혈액 세포에서 얻은 클론은 접두사 "MBL"로 라벨링된다. 동일한 임신부에게서 나온 태반과 모체 혈액 세포는 "PLN" 또는 "MBN" 후에 동일한 시료 번호로 확인된다.

도 2a와 2b는 CGI137 내의 연구된 CpG 부위 각각에 대한 태반 및 모체 혈액 세포 시료에 대한 모든 서열 분석된 클론중 메틸화 지수의 상자형 그래프를 도시하고 있고, 도 2a는 영역 A이고, 도 2b는 영역 B이다. x-축을 가로질러, 개별적인 CpG 부위가 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:46,249,636(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치를 이용하여 표기되어 있다.

도 3a 내지 3e는 영역 A(도 3a 및 3b), 영역 B(도 3c 및 3d) 및 영역 C(도 3e)에 대한 임신 제3 삼분기와 임신 제1 삼분기 중에서 *PDE9A* 내부의 연구된 CpG 부위 각각에 대한 태반 및 모체 혈액 세포 시료에 대해 서열 분석된 모든 클론중의 메틸화 지수의 상자형 그래프를 도시하고 있다. 도 3a와 3b의 경우, x-축을 가로질러, 개별적인 CpG 부위가 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:46,978,424(+1)의 역방향 스트랜드(reverse strand)에 대한 뉴클레오타이드 위치를 이용하여 표기되어 있고, 도 3c와 3d의 경우, chr21:46,978,718(+1)의 정방향 스트랜드(forward strand)에 대해 정의되어 있고, 도 3e의 경우, chr21:46,978,005(+1)의 정방향 스트랜드에 대해 표기되어 있다.

도 4는 임신 제3 삼분기(도 4a) 및 임신 제1 삼분기(도 4b)에서 *PPP1R2P2*의 영역 A 이내, 그리고 임신 제3 삼분기 중의 *PPP1R2P2*의 영역 B 이내(도 4c)의 연구된 CpG 부위 각각에 대한 태반과 모체 혈액 세포 시료에 대해 서열 분석된 모든 클론 모두의 메틸화 지수의 상자형 그래프를 도시하고 있다. x-축을 가로질러 개별적인 CpG 부위가 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:36,180,493(+1)에 대한 상대적인 뉴클레오타이드 위치로 표기되어 있다.

도 5는 *Fem1A*에 대한 유사성(씨. 엘레간스) 영역 A(도 5a) 및 영역 B(도 5b)이내의 연구된 CpG 부위 각각에 대한 태반 및 모체 혈액 세포 시료에 대해 서열 분석된 모든 클론의 메틸화 지수의 상자형 그래프를 도시하고 있다. x-축을 가로질러, 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:14,056,070(+1)에 대한 상대적인 뉴클레오타이드 위치로 표기되어 있다.

도 6은 CGI1009 내의 연구된 CpG 부위 각각에 대한 태반 및 모체 혈액 세포 시료에 대해 서열 분석된 모든 클론의 메틸화 지수의 상자형 그래프를 도시하고 있다. x-축을 가로질러, 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:25,855,701(+1)에 대한 상대적인 뉴클레오타이드 위치로 표기되어 있다.

도 7은 *카보닐 리덕타제 1* 내의 연구된 CpG 부위 각각에 대한 태반 및 모체 혈액 세포 시료에 대해 서열 분석된 모든 클론의 메틸화 지수의 상자형 그래프를 도시하고 있다. x-축을 가로질러, 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:36,363,538(+1)에 대한 상대적인 뉴클레오타이드 위치로 표기되어 있다.

도 8은 *다운 증후군 세포 유착 분자* 내의 연구된 CpG 부위 각각에 대한 태반 및 모체 혈액 세포 시료에 대해 서열 분석된 모든 클론의 메틸화 지수의 상자형 그래프를 도시하고 있다. x-축을 가로질러, 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:41,139,872(+1)에 대한 상대적인 뉴클레오타이드 위치로 표기되어 있다.

도 9는 *C21orf29* 내의 연구된 CpG 부위 각각에 대한 태반 및 모체 혈액 세포 시료에 대해 서열 분석된 모든 클

론의 메틸화 지수의 상자형 그래프를 도시하고 있다. x-축을 가로질러, 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:44,953,288(+1)에 대한 상대적인 뉴클레오타이드 위치로 표기되어 있다.

도 10은 쌍을 이룬 태반 조직과 모체 혈액 세포 중의 CGI111의 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석에 관한 것이다. 개별적인 CpG 부위는 첫번째 열을 가로질러 번호 매겨져 있고, 뉴클레오타이드 위치는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:44,699,072(+1)에 대해 정의되어 있다. 각각의 후속적인 열은 클로닝에 의해 단리된 단일 DNA 분자 중의 CpG 부위를 가로지른 메틸화 상태를 나타낸다. 채워진 원과 채워지지 않은 원은 각각 메틸화된 CpG 부위와 메틸화되지 않은 CpG 부위를 나타낸다. 태반 조직 시료에서 얻은 클론은 접두사 "PLN"으로 라벨링되고, 모체 혈액 세포에서 얻은 클론은 접두사 "MBL"로 라벨링된다. 동일한 임신부에게서 나온 태반과 모체 혈액 세포는 "PLN" 또는 "MBN" 후에 동일한 시료 번호로 확인된다.

도 11은 CGI121 내의 연구된 CpG 부위 각각에 대한 태반 및 모체 혈액 세포 시료에 대해 서열 분석된 모든 클론의 메틸화 지수의 상자형 그래프를 도시하고 있다. x-축을 가로질러, 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:45,262,112(+1)에 대한 상대적인 뉴클레오타이드 위치로 표기되어 있다.

도 12는 CGI137의 메틸화되지 않은 형태를 목표로 하는 동중 매스익스텐드(MassEXTEND) 분석을 나타내는 도면이다. 증폭된 영역을 가로지르는 뉴클레오타이드 서열이 도시되어 있다. 원래의 DNA 서열(서열 번호 1)이 바이설파이트-전환된 서열(서열 번호 2) 위에 정렬되어 있다. CpG 부위는 "++" 표시로 확인된다. CpG 부위는 추가로 번호가 매겨져 있고, 번호는 도 1a, 도 2a 및 표 2A의 번호와 상응한다. CpG 다이뉴클레오타이드의 일부가 아닌 사이토신 잔기는 ":" 표시로 확인된다. 묘사된 바이설파이트-전환된 서열은 모든 CpG 부위가 메틸화되었다는 가정에 근거한다. 정방향, 연장 및 역방향 프라이머(서열 번호 3 내지 5)를 위한 정렬이 바이설파이트-전환된 서열 아래에 도시되어 있다.

도 13은 CGI137의 메틸화되지 않은 형태를 목표로 하는 동중 매스익스텐드(MassEXTEND) 분석을 나타내는 도면이다. 순수한 태반 DNA, 모체 연막(buffy coat) DNA, 95:5(모체 연막 DNA:태반 DNA) 혼합물, 분만전 모체 혈장, 분만후 모체 혈장 및 주형이 없는 대조물(NTC: no template controls)이 도시되어 있다. 모든 질량 스펙트럼의 경우, x-축은 검출된 연장 생성물(날카로운 피크로 도시됨)의 분자량을 나타내고, y-축은 임의의 단위로 표시된 강도를 나타낸다. 메틸화되지 않은 분자의 예측 위치는 표시된 바와 같다.

도 14는 *홀로카복실라제 신테타제* 영역 A(도 14a), 영역 B1(도 14b) 및 영역 B2(도 14c)의 조합된 바이설파이트 제한효소 분석(COBRA: Combined Bisulfite Restriction Analysis) 분석을 나타내는 도면이다. 2개의 21번 삼염색체증 태반(T21 PLN), 2개의 임신 제1 삼분기 정상 태반(정상 PLN 임신 제1 삼분기), 2개의 임신 제3 삼분기 정상 태반(정상 PLN 임신 제3 삼분기), 및 2개의 임신 제1 삼분기 모체 혈액 세포(연막)를 분석하였다. PCR 생성물을 *Bst* I 효소과 함께(+) 또는 상기 효소 없이(-) 분해하였다. 더 작은 크기의 분해 생성물의 출현에 의해 DNA 메틸화를 검출하였다. 1kb 래더(ladder)(Invitrogen, 캘리포니아주 칼스배드)을 겔 전기영동에 이용하였다.

도 15는 CGI009의 COBRA 분석을 도시하는 도면이다. 2개의 21번 삼염색체증 태반(T21 PLN), 2개의 임신 제1 삼분기 정상 태반(정상 PLN 임신 제1 삼분기), 2개의 임신 제3 삼분기 정상 태반(정상 PLN 임신 제3 삼분기), 및 2개의 임신 제1 삼분기 모체 혈액 세포(연막)를 분석하였다. PCR 생성물을 *Bst* I 효소과 함께(+) 또는 상기 효소 없이(-) 분해하였다. 더 작은 크기의 분해 생성물의 출현에 의해 DNA 메틸화를 검출하였다. 1kb 래더(ladder)(Invitrogen, 캘리포니아주 칼스배드)를 겔 전기영동에 이용하였다.

도 16은 CGI132의 COBRA 분석을 도시하는 도면이다. 2개의 21번 삼염색체증 태반(T21 PLN), 2개의 임신 제1 삼분기 정상 태반(정상 PLN 임신 제1 삼분기), 2개의 임신 제3 삼분기 정상 태반(정상 PLN 임신 제3 삼분기), 및 2개의 임신 제1 삼분기 모체 혈액 세포(연막)를 분석하였다. PCR 생성물을 *Bst* I 효소과 함께(+) 또는 상기 효소 없이(-) 분해하였다. 더 작은 크기의 분해 생성물의 출현에 의해 DNA 메틸화를 검출하였다. 1kb 래더(ladder)(Invitrogen, 캘리포니아주 칼스배드)를 겔 전기영동에 이용하였다.

도 17은 태반 조직과 모체 혈액 세포 중의 *HLCS* B2 영역의 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석을 나타내는 도면이다. 개별적인 CpG 부위는 첫번째 열을 가로질러 번호 매겨져 있고, 뉴클레오타이드 위치는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:37,274,682 내지 37,275,036의 역방향 스트랜드에 대해 정의되어 있다. 각각의 후속적인 열은 클로닝에 의해 단리된 단일 DNA 분자 중의 CpG 부위를 가로지른 메틸화 상태를 나타낸다. 채워진 원과 채워지지 않은 원은 각각 메틸화된 CpG 부위와 메틸화되지 않은 CpG 부위를 나타낸다.

21번 삼염색체증, 정상 임신 제1 삼분기 및 정상 임신 제3 삼분기 태반 조직 시료에서 얻은 클론은 각각 접두사 "T21 PLN", "정상 PLN 임신 제1 삼분기" 및 "정상 PLN 임신 제3 삼분기"로 라벨링되고, 모체 혈액 세포에서 얻은 시료는 접두사 "연막"으로 라벨링된다. 서로 다른 임신부에게서 얻은 태반과 모체 혈액 세포는 접두사 후의 시료 번호로 확인된다.

도 18은 태반 조직과 모체 연막에서 나온 *HLCS* DNA의 정량화를 나타내는 도면이다. 메틸화 지수는 제한효소 후의 *HLCS* DNA 농도를 동일한 시료의 가짜 분해 대조군에서 측정된 총 농도로 나눈 값으로 정의된다. 태반 조직에서 나온 DNA를 "정상 PLN"로 라벨링하고, 모체 연막에서 나온 DNA를 "MBC"로 라벨링하였다.

도 19는 임신 제3 삼분기 모체 혈장 중의 태아-특이적 *HLCS* 검출을 나타내는 도면이다. *HLCS* 신호는 메틸화 민감 제한 효소 처리된 모체 혈장 시료(도 19a)와 제한 효소 처리되지 않은 모체 혈장 시료(도 19b)에서 검출된다. 분만 전 혈장 시료는 "전"으로 표지되고, 분만 후 혈장 시료는 "후"로 라벨링된다. 제한 효소 *Hpa* II 및 *Bst*U I을 분해 반응에 이용하였고, 그래프에서 "(+)"로 라벨링하였다. 효소 처리하지 않은 가짜 분해는 "(-)"로 라벨링되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0103] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 제공된 것이지만 제한하고자 하지 않는다. 당분야의 숙련자들은 본질적으로 동일하거나 유사한 결과를 획득하기 위해 변화되거나 개질될 수 있는 다양한 비-결정적 변수를 쉽게 인식할 것이다.

[0104] **실시예 1**

[0105] 본 출원인은 모체 혈액 중에 존재하는 태아-특이적 후생학적 마커를 확인하고자 한다. 이전의 자료는 모체 혈장 중의 태아 DNA 분자가 주로 태반으로부터 유래하지만(문헌[Chim et al, Proc Natl Acad Sci USA., 102: 14753-14758]; [Masuzaki et al, J Med Genet 41, 289-292, 2004]; [Flori et al, Hum Reprod 19, 723-724, 2004]), 모체 혈장 중의 바탕값 DNA는 모체 혈액 세포로부터 기원할 수 있음을 제안하였다(문헌[Lui et al, Clin Chem 48, 421-427, 2002]). 따라서, 태아의 후생학적 마커를 확인하기 위해서, 태반 조직과 모체 혈액 세포 2가지 조직 유형 사이의 서로 다른 메틸화를 입증하는 유전자좌를 확인할 목적으로 태반 조직과 모체 혈액 세포 둘 모두에서 유전자좌의 메틸화 프로파일을 평가하였다. 이런 마커는 산전 진단 및 임신과 연관된 질환의 모니터링에 사용될 수 있다.

[0106] **재료 및 방법**

[0107] **CpG-함유 게놈 서열의 확인**

[0108] DNA 메틸화는 CpG 다이뉴클레오타이드 중의 사이토신 잔기의 5번 탄소 위치에 메틸기가 추가됨을 의미한다. 21번 염색체 상의 이런 CpG 다이뉴클레오타이드의 클러스터는 UCSC 게놈 생체정보 사이트(genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway)의 게놈 브라우저를 통해 컴퓨터로 확인되었다(문헌[Yamada et al, Genome Res 14, 247-266, 2004]). CpG 부위는 다음과 같은 기준에 근거하여 추가로 하위 선택되었다: 50%의 최소 구아닌 및 사이토신 함량 및 0.6 이상의 관찰된 CpG 빈도/예측된 CpG 빈도의 최소 비를 갖는 길이가 400bp 이상인 즉 이어진 DNA 서열. CpG-함유 게놈 서열이 확인된 후, 본 출원인은 또한 이전에 확인된 게놈 영역의 추가 상류 및 하류의 CpG 부위, 예를 들면 PED9A 영역 A 및 C로 확장하였다.

[0109] **대상 모집 및 시료 수집**

[0110] 임신 제1 삼분기 및 제3 삼분기인 여성으로부터 태반 조직 및 상응하는 혈액 시료를 수집하였다. 태반 조직은 제왕절개 분만 후의 임신 제3 삼분기의 대상 및 임신 중절환 임신 제1 삼분기의 대상으로부터 수집하였다. 진통 개시 전 또는 임의의 산과적 절차를 수행하기 전의 모체 혈액(10ml)을 EDTA 혈액 시험관에 수집하였다. 혈액 시료를 4°C에서 10분동안 1600xg에서 원심분리하였다. 혈장을 조심스럽게 제거한 후 연막 부분을 수득하고 -20°C에서 따로 보관하였다. 태반 조직을 포스페이트 완충된 염수로 세정하고, -80°C에서 단순 폴리프로필렌 시험관에 보관하였다.

[0111] **바이설파이트 서열 분석**

[0112] 제조자의 지시에 따라 각각 퀴아엠프 DNA 미니 키트 및 퀴아엠프 DNA 혈액 미니 키트(Qiagen, 독일 힐텐)를 이용하여 태반 조직 및 모체 연막으로부터 DNA를 추출하였다. 각각의 시료에 대해, 씨피게놈(CpGenome) DNA 개질 키트(Intergen, 매사추세츠주 버링톤)에 의해 1µg의 DNA를 바이설파이트 전환시키고, 이는 메틸화되지 않은 사

이토신 잔기를 우라실로 전환시키지만, 메틸화된 사이토신 잔기를 변화시키지 않고 남겨둔다. 그런 다음, 바이 실과이트 전환된 DNA를 CpG 부위 양쪽에 있는 한 쌍의 프라이머를 이용하여 PCR 증폭시킨다(표 1). 일부 CpG-함 유 계놈 서열, 즉 영역 A, B 및 C은 2 또는 3개의 PCR에 의해 조사되었다. 프라이머는 임의의 잠재적으로 메틸 화된 사이토신 잔기에는 결합되지 않도록 디자인되었다. 3개의 프라이머가 예로서 도시되어 있으나, 이 목적으 로 사용할 수 있는 프라이머의 범위를 제한하고자 한 것은 아니다. 택맨(TaqMan) PCR 코어 시약 키트(Applied Biosystems, 캘리포니아주 포스터 시)에서 공급된 시약을 사용하였다. 각각의 PCR에 대한 시약 조성은 표 1에 상세히 개시되어 있다. 전형적으로, PCR은 MgCl₂, 프라이머, 택골드(TaqGold) 1X 버퍼(Buffer) II, 200 μM의 각 각의 dNTP, 다이메틸설폭사이드(DMSO, 이는 있거나 없다) 또는 베타인이 있는 25 μl의 최종 반응 부피에서 수행 되었다. 온도 프로파일은 95°C에서 10분의 초기 변성 단계, 이어서 95°C에서 1분간, 55 내지 65°C의 어닐링 온 도 범위에서 1분간(표 1), 72°C에서 1분간의 40 사이클, 및 72°C에서 10분간의 최종 연장으로 구성된다. 단일 분자의 해상도에서 메틸화 상태를 분석하기 위해, PCR 생성물을 pGEM-T 이지 벡터 시스템(Easy Vector System)(Promega, 위스콘신주 매디슨)을 이용하여 플라스미드 벡터로 TA-클로닝하였다. 제조자의 지시에 따라 빅다이 터미네이터 사이클 서열 분석(BigDye Terminator Cycle Sequencing) v1.1 키트(Applied Biosystems)를 이용하여 사이클 서열 분석하여 양성 재조합 클론에서 나온 삽입체를 분석하였다. 진클린(genCLEAN) 컬럼 (Genetrix)으로 정제된 후에, 시료 8 μl를 12 μl의 Hi-Di 폼아미드에 첨가하고 3100 DNA 분석기(Applied Biosystems)에서 분석하였다.

[0113] [표 1]

[0114] 21번 염색체 상의 연구된 계놈 서열의 정제, 위치, 프라이머 서열 및 PCR 반응 조건. 생명공학 정보를 위한 국 립 센터(National Center for Biotechnology Information)의 진뱅크에 수탁된 계놈 콘티그(수납 번호, 버전, 출발 및 종결 뉴클레오타이드 번호) 상의 개별적인 영역, 및 UCSC 계놈 브라우스(genome.ucsc.edu 웹 사이트에 서 이용가능함)의 인간 2004년 5월(hg17) 상의 염색체 위치(염색체, 출발 및 종결 뉴클레오타이드 번호)가 각각 두번째 및 세번째 컬럼에 도시되어 있다.

지역 이름	좌표상의 영역	정제된 위치	프라이머	지역 콘타이너	지역 PCR 조건
CG1197 영역 A	NT_019192.112292801-219192.112292801	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GTGTCGGTTC 3' GGGAGGGGAGT	KCCCGSACACC RCTCTACCTACA	2 2 200 0 0 0 1
CG1197 영역 B	NT_019192.112292805-219192.112292805	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GAGGAGGAGTGA 3' TGTGAGGAGTGA	PACCTCAGAA PACTATTCTATTTC	2 3 200 0 0 0 1
PC59A 영역 A	NT_009182.4109544-109544-109544	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	PACTATTCTATTTC PACTATTCTATTTC	3 3 200 0 0 0 1.25
PC59A 영역 B	NT_009182.41100554-1100554-1100554	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAAAACCCCTT NTAAAACCGA	3 3 400 0 0 0 0.625
PC59A 영역 C	NT_009182.4101434-101434-101434	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	ACCAAAATATG CCCAACCAATA	3 3 200 0 0 0 1.25
PC59A 영역 D	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 E	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 F	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 G	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 H	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 I	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 J	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 K	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 L	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 M	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 N	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 O	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 P	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 Q	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 R	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 S	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 T	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 U	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 V	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 W	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 X	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 Y	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25
PC59A 영역 Z	NT_019192.102292810-2292810-2292810	chr21:42,824,008-42,824,008	5' GATGAGGAGTGA 3' GATGAGGAGTGA	CAAACTCCACTG ACCAATAGTCAG	3 3 300 0 0 0 1.25

[0115]

CG009	NT_015152.1013589247	482135.853247	MAAAGGCGTTTGG	MAAGTAAATG	24	3	200	0	0	1	60
CHR1	NT_015152.1023103070	23104240	TGGTGTGATGATG	CAAGCGATGAG	24	1.5	400	0	0	1	60
SSNAM	NT_015152.1027898682	38394240	TTGAGATGAGATTAAT	TTATTCCTGCA	22	3	200	0	0	1	60
CG1409	NT_015152.11448657	44894007	AAATGTAATGAGAT	CAATCGATGATGCA	29	3	200	0	0	1	57
CG111	NT_015152.1193113	44700488	TTTGTAGTAG	CTCCCTGCT	31	2	200	3	0	1.25	52
CG121	NT_015152.11756251	45283791	TTGAGATTAAT	CAAAATTAAC	33	3	400	0	1	1.25	60
MAA066B 영역 A	NT_015152.10109785	14388273	TTGAGATTAAT	CAATCGATGATGCA	35	2	300	0	0	1.25	66
MAA066B 영역 B	NT_015152.10109785	14388273	TTGAGATTAAT	CAATCGATGATGCA	32	2	400	0	0	1.25	65
MAA066B 영역 A	NT_015152.10109785	14388273	TTGAGATTAAT	CAATCGATGATGCA	39	3	400	5	0	1.25	55
MAA066B 영역 B	NT_015152.10109785	14388273	TTGAGATTAAT	CAATCGATGATGCA	41	4	400	0	0	1.25	65
MAA066B 영역 A	NT_015152.10109785	14388273	TTGAGATTAAT	CAATCGATGATGCA	43	3	600	0	0	1.25	60
MAA066B 영역 B	NT_015152.10109785	14388273	TTGAGATTAAT	CAATCGATGATGCA	45	4	200	0	0	1.25	65

[0117]

[0119] **자료 비교 및 통계학적 분석**

[0120] CpG 부위는, 서열이 사이토신이면 메틸화된 것으로 채점되고, 타이민(우라실의 테옥시 대응물)이 차지하고 있으면 메틸화되지 않은 것으로 채점된다. 각각의 CpG 부위에 대한 메틸화된 사이토신 간의 비율이 모체 혈액 시료뿐 아니라 태반 조직 중에서 측정되었다. 각각의 CpG 부위에 대해 메틸화된 사이토신과 메틸화되지 않은 사이토신의 분포를 카이 제곱 분석에 의해 태반 조직과 모체 연락 사이에서 비교하였다. <0.05의 p-값은 통계학적으로 유의하게 상이한 것으로 간주된다. 시그마 스탯(Sigma Stat) 3.0 소프트웨어(SPSS)를 이용하여 통계학적으로 분석하였다.

[0121] **결과 및 논의**

[0122] 컴퓨터화된 조사로부터 확인된 CpG-함유 게놈 서열 중에서 13개의 유전자좌가 본 조사 대상이었다. 이들 유전자좌의 이름, 염색체 위치 및 진뱅크 수납 번호가 표 1에 열거되어 있다. 연구된 유전자좌 각각에 대해 태반 조직과 모체 혈액 세포에서 바이설파이트 서열 분석을 실시하였다.

[0123] **CGI137**

[0124] CGI137의 메틸화 프로파일을 5명의 임신 제3 삼분기의 임신부에게서 수집된 태반 조직 및 상응하는 모체 혈액 세포 중에서 연구하였다. 5개 사례 모두의 영역 A 및 B에 대한 바이설파이트 서열 분석 자료가 각각 도 1a 및 도 1b에 도시되어 있다. 각각의 패널에서 각 행은 한 클론에 대한 바이설파이트 서열 분석 결과를 나타내고, 각각의 열은 게놈 서열 내부의 개별적인 CpG 다이뉴클레오타이드를 나타낸다. 서열 분석된 모든 클론에서 메틸화된 클론의 비율, 메틸화 지수, 각각의 CpG 부위가 5개의 태반 조직 및 모체 혈액 세포 시료 모두에 대해 측정되었다. 자료가 도 2a 및 2b에 요약되어 있다. 모체 혈액 세포와 비교하였을 때 태반이 저메틸화된 것으로 볼 수 있다. 각각의 CpG 부위에서 태반 조직과 모체 혈액 세포 사이의 메틸화된 클론과 메틸화되지 않은 클론의 분포를 비교하기 위해 카이 제곱 분석을 수행하였다. 태반과 모체 혈액 세포 사이의 메틸화 지수의 차이는 21개 CpG 부위 모두에서 통계학적으로 유의하다(카이 제곱, P<0.0001, 표 2A 및 2B).

[0125] [표 2A]

[0126] CGI137 영역 A 이내의 개별적인 CpG 부위에서 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이셀파이트 서열 분석 자료 및 메틸화 프로파일을 비교하는 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:46,249,636(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

시료	메틸화 상태	지정된 CpG 부위에서의 클론의 번호										
		439	439	444	444	447	447	448	513	541	541	581
임신 제3 삼분기 태반	메틸화된	6	13	9	39	45	27	18	17	17	33	27
	메틸화되지 않음	66	59	63	33	27	45	54	55	56	39	45
임신 제3 삼분기 모체 혈액 세포	메틸화된	71	71	68	73	73	74	73	69	68	72	73
	메틸화되지 않음	3	3	6	1	1	0	1	5	6	2	1

비교		지정된 CpG 부위에서의 카이-제곱 및 p-값										
		임신 제3 삼분기 태반 대 임신 제3 삼분기 모체 혈액 세포										
		439	439	444	444	447	447	448	513	541	541	581
카이-제곱		108.9	87.458	83.127	37.965	28.477	63.957	81.126	70.247	87.187	45.343	60.43
p-값		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

[0127]

[0128] [표 2B]

[0129] CGI137 영역 B 이내의 개별적인 CpG 부위에서 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이셀파이트 서열 분석 자료 및 메틸화 프로파일을 비교하는 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:46,249,636(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

시료	메틸화 상태	지정된 CpG 부위에서의 클론의 번호									
		247	253	305	314	311	351	354	359	352	400
임신 제3 삼분기 태반	메틸화된	39	20	39	39	26	35	28	16	20	59
	메틸화되지 않음	29	48	29	29	42	33	40	52	45	59
임신 제3 삼분기 모체 혈액 세포	메틸화된	55	55	57	57	57	59	58	56	54	57
	메틸화되지 않음	4	4	2	2	2	0	3	3	5	2

비교		지정된 CpG 부위에서의 카이-제곱 및 p-값									
		임신 제3 삼분기 태반 대 임신 제3 삼분기 모체 혈액 세포									
		247	253	305	314	311	351	354	359	352	400
카이-제곱		19.207	50.587	24.301	24.301	45	37.955	38.373	62.693	49.794	84.667
p-값		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

[0130]

[0131] 포스포다이에스터라제 9A(PDE9A)

[0132] PDE9A의 메틸화 프로파일을, 5명의 임신 제3 삼분기 및 5명의 임신 제1 삼분기의 임산부에게서 수집한 태반 조직 및 상응하는 모체 혈액 세포 중에서 연구하였다. 클로닝 및 바이셀파이트 서열 분석을 수행하였고, 영역 A 앰플리콘(amplicon)에 대한 태반 조직 및 모체 혈액 세포 중의 연구된 CpG 부위의 메틸화 지수를 도 3a 및 도 3b에서 요약하였다. 영역 3B에 대한 상응하는 정보를 도 3c 및 3d에 요약하였다. 영역 C에 대한 임신 제3 삼분기의 태반 조직과 모체 혈액 세포 사이의 비교를 도 3e에 도시하였다. 일반적으로, 태반은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화되어 있다. 2가지 조직 사이의 통계학적으로 유의한 차이에 대해 평가하기 위해 상기 개시된 바와 같이 카이 제곱 분석을 수행하였다. 임신 제3 삼분기 비교에서 CpG2250을 제외한 모두가 임신 제1 삼분기 및 임신 제3 삼분기 임산부 둘 모두에서 통계학적으로 유의하게 다르다(카이 제곱 분석, 표 3A 내지 3E).

[0133] [표 3A]

[0134] PDE9A 영역 A 내의 개별적인 CpG 부위에서 임신 제3 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이셀파이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:42,978,424(+1)의 역방향 스트랜드에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

모체 혈액		CpG65	CpG68	CpG67	CpG100	CpG108	CpG117	CpG147	CpG164	CpG192	CpG229	CpG243
		C	37	36	37	36	35	38	30	30	23	15
T	3	4	3	5	5	4	10	10	17	25	11	
메틸화 지수		0.90	0.90	0.93	0.89	0.88	0.90	0.75	0.76	0.58	0.39	0.73
C+T		40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
태반	C	3	3	3	4	5	4	3	3	3	3	8
	T	37	37	37	36	35	36	37	37	37	37	32
메틸화 지수		0.08	0.08	0.08	0.10	0.13	0.10	0.09	0.09	0.08	0.08	0.20
C+T		40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
카이-제곱		54.450	51.232	54.450	45.028	42.050	48.050	34.868	34.868	20.670	8.674	20.113
p-값		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.003	<0.0001

[0135]

[0136] [표 3B]

[0137] PDE9A 영역 A 내의 개별적인 CpG 부위에서 임신 제1 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이셀파이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈

브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:42,978,424(+1)의 역방향 스트랜드에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

모체 연막	CpG65	CpG68	CpG69	CpG600	CpG608	CpG617	CpG647	CpG664	CpG692	CpG693	CpG643
C	36	32	36	37	36	34	34	26	27	16	24
T	2	6	2	3	2	6	6	14	13	24	15
메틸화 지수	0.95	0.80	0.95	0.93	0.95	0.85	0.85	0.85	0.69	0.40	0.60
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
태반	C	6	6	8	7	12	8	7	3	9	6
T	34	34	32	33	28	32	33	37	31	34	32
메틸화 지수	0.15	0.15	0.20	0.18	0.30	0.20	0.18	0.08	0.23	0.15	0.20
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
카이-제곱	48.536	31.326	43.018	42.476	33.333	31.326	33.821	26.180	14.696	5.078	11.719
p-값	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.024	<0.001

[0138]

[0139]

[0140]

[표 3C]

PDE9A 영역 B 내의 개별적인 CpG 부위에서 임신 제3 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이셀파이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:42,978,718(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

모체 연막	CpG655	CpG674	CpG677	CpG686	CpG690	CpG697	CpG6913	CpG6916	CpG6922	CpG6924	CpG6930	CpG6936	CpG6941	CpG6947
C	36	40	40	36	35	37	35	40	37	39	39	39	37	39
T	2	0	0	4	5	3	5	0	3	1	1	1	3	1
메틸화 지수	0.95	1.00	1.00	0.89	0.88	0.93	0.89	1.00	0.93	0.88	0.89	0.83	0.89	
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
태반	C	18	15	17	18	15	13	14	15	12	16	14	13	16
T	24	25	23	24	25	27	26	25	25	29	24	26	27	25
메틸화 지수	0.40	0.38	0.43	0.40	0.38	0.33	0.35	0.38	0.38	0.30	0.40	0.35	0.33	
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
카이-제곱	26.128	33.613	29.535	19.835	19.263	28.213	21.059	33.513	24.231	38.565	28.16	32.201	28.213	30.142
p-값	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

[0141]

[0142]

[0143]

[표 3D]

PDE9A 영역 B 내의 개별적인 CpG 부위에서 임신 제1 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이셀파이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:42,978,718(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

모체 연막	CpG655	CpG672	CpG677	CpG685	CpG690	CpG697	CpG6913	CpG6916	CpG6922	CpG6924	CpG6930	CpG6936	CpG6941	CpG6947
C	36	40	40	39	40	39	39	40	39	40	38	40	39	38
T	4	0	0	1	0	1	1	0	1	0	2	0	1	4
메틸화 지수	0.90	1.00	1.00	0.98	1.00	0.98	0.98	1.00	0.98	1.00	0.95	1.00	0.98	0.90
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
태반	C	16	18	17	13	16	15	17	15	16	15	18	14	15
T	24	24	23	27	24	25	25	23	24	24	25	22	26	25
메틸화 지수	0.40	0.43	0.33	0.40	0.38	0.29	0.43	0.40	0.40	0.38	0.33	0.35	0.38	
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
카이-제곱	19.835	31.488	29.535	84.341	31.488	30.142	38.88	29.535	28.16	31.488	27.068	37.792	32.201	21.838
p-값	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

[0144]

[0145]

[0146]

[표 3E]

PDE9A 영역 C 내의 개별적인 CpG 부위에서 임신 제3 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이셀파이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:42,978,005(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

모체 연막	CpG715	CpG723	CpG728	CpG734	CpG739	CpG760	CpG766	CpG781	CpG783	CpG772	CpG780	CpG798	CpG808
C	37	38	40	39	40	37	40	39	40	40	38	38	39
T	3	2	0	1	0	3	0	1	0	0	2	2	1
메틸화 지수	0.93	0.95	1.00	0.98	1.00	0.95	1.00	0.98	1.00	1.00	0.95	0.95	0.98
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
태반	C	14	15	17	16	16	16	13	17	17	18	16	15
T	26	24	23	24	24	24	24	27	23	23	22	24	25
메틸화 지수	0.35	0.40	0.43	0.40	0.40	0.40	0.40	0.33	0.43	0.43	0.45	0.40	0.38
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
카이-제곱	28.18	25.128	29.535	28.18	31.488	22.362	31.488	34.341	26.535	29.535	21.488	25.128	30.142
p-값	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

모체 연막		CpG198	CpG203	CpG229	CpG234	CpG188	CpG244
C	36	39	34	39	37	38	37
T	4	1	6	1	3	1	1
메틸화 지수	0.90	0.98	0.85	0.93	0.89	0.93	0.93
C>T	40	40	40	40	40	40	40
태반							
C	32	26	28	22	20	27	27
T	8	14	12	18	20	13	13
메틸화 지수	0.80	0.66	0.70	0.65	0.60	0.69	0.69
C>T	40	40	40	40	40	40	40
카이-제곱	0.862	11.616	1.792	17.670	16.822	10.476	
p-값	0.348	<0.001	0.181	<0.001	<0.001	0.001	

[0147]

[0148]

[0149]

호모 사피엔스 단백질 포스파타제 1, 조절(억제) 서브유닛 2 슈도진 2(PPP1R2P2)

PPP1R2P2 영역 A의 메틸화 프로파일을, 5명의 임신 제3 삼분기 및 5명의 임신 제1 삼분기의 임신부에게서 수집한 태반 조직 및 상응하는 모체 혈액 세포 중에서 연구하였다. 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석을 수행하였고, 태반 조직 및 모체 혈액 세포 중의 영역 A에 대해 연구된 CpG 부위의 메틸화 지수를 도 4a 및 도 4b에서 요약하였다. 일반적으로, 태반은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화되어 있다. 2가지 조직 사이의 통계학적으로 유의한 차이에 대해 상기 개시된 바와 같이 카이 제곱 분석을 수행하였다. 연구된 CpG 부위 중에서 23개가 임신 제3 삼분기 임신부에서 통계학적으로 유의하게 상이하고, 23개가 임신 제1 삼분기 임신부에서 통계학적으로 유의하게 상이하다(카이 제곱 분석, 표 4A 및 4B). 또한, PPP1R2P2 영역 B중의 CpG 부위의 메틸화 프로파일을 5명의 임신 제3 삼분기의 임신부에게서 수집한 태반 조직 및 상응하는 모체 혈액 세포 중에서 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석하여 분석하였다. 영역 B의 대부분의 CpG 부위에서, 태반 조직은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화되어 있다. 영역 B의 메틸화 지수는 도 4c에 요약되어 있다. 2가지 조직 사이의 통계학적으로 유의한 차이를 평가하기 위해 상기 개시된 바와 같이 카이 제곱 분석을 수행하였다. 12개의 연구된 CpG 부위중에서 5개가 통계학적으로 유의하게 상이하다(카이 제곱 분석, 표 4C).

[0150]

[표 4A]

[0151]

PPP1R2P2 영역 A 내의 개별적인 CpG 부위에서 임신 제3 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이설파이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:36,180,493(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

		CpG693	CpG692	CpG697	CpG699	CpG691	CpG695	CpG693	CpG696	CpG698	CpG695	CpG697	CpG694	CpG699	CpG696	CpG699	CpG697
연막	C	61	61	60	60	60	64	62	62	60	62	60	60	67	64	69	69
T		1	1	2	4	2	8	0	0	2	0	2	2	5	8	3	4
메틸화 지수		0.98	0.98	0.97	0.94	0.97	0.87	1.00	1.00	0.97	1.00	0.97	0.97	0.92	0.87	0.95	0.91
C>T		62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62
태반	C	46	47	61	47	48	46	40	46	34	33	32	43	28	36	55	27
T		16	15	1	15	16	22	17	28	29	30	19	39	26	26	26	25
메틸화 지수		0.74	0.76	0.98	0.76	0.74	0.74	0.85	0.73	0.56	0.63	0.62	0.69	0.57	0.68	0.68	0.44
C>T		62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62
카이-제곱		13.981	12.127	11.115	14.621	10.983	2.852	24.368	17.451	27.462	36.287	30.705	14.676	36.363	11.711	21.764	33.686
p-값		<0.001	<0.001	1.000	0.013	<0.001	0.112	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

		CpG714	CpG729	CpG746	CpG746	CpG765	CpG774	CpG784	CpG782	CpG785	CpG787
연막	C	60	66	60	61	60	68	61	61	62	67
T		2	7	2	1	2	4	1	1	0	5
메틸화 지수		0.97	0.89	0.97	0.98	0.97	0.84	0.99	0.98	1.00	0.92
C>T		62	62	62	62	62	62	62	62	62	62
태반	C	49	44	44	48	51	58	37	29	38	33
T		13	18	18	13	11	3	26	33	23	29
메틸화 지수		0.79	0.71	0.71	0.79	0.82	0.96	0.60	0.47	0.83	0.53
C>T		62	62	62	62	62	62	62	62	62	62
카이-제곱		7.684	5.01	13.413	9.743	5.6	11.995	14.2674	39.842	26.936	21.437
p-값		0.006	0.025	<0.001	0.002	0.018	1.000	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

[0152]

[0153]

[0154]

[표 4B]

PPP1R2P2 영역 A 내의 개별적인 CpG 부위에서 임신 제1 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이설파이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:36,180,493(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

		CpG579	CpG5822	CpG5837	CpG5886	CpG591	CpG605	CpG613	CpG616	CpG618	CpG626	CpG627	CpG64	CpG69	CpG676	CpG688	CpG697
연막	C	53	53	53	51	52	53	51	51	54	53	53	44	45	50	49	49
	T	1	1	1	3	2	1	3	3	0	1	1	10	9	4	5	8
	메틸화 지수	0.9915	0.9916	0.991	0.9444	0.993	0.991	0.9444	0.9444	1	0.9915	0.9916	0.915	0.9333	0.9299	0.9074	0.8989
태반	C	39	35	49	29	40	49	24	33	27	29	32	35	10	27	20	13
	T	15	19	5	25	14	5	30	21	27	34	22	19	44	27	54	41
	메틸화 지수	0.7222	0.6481	0.907	0.537	0.741	0.907	0.4444	0.6111	0.5	0.3704	0.5926	0.648	0.1952	0.5	0.3704	0.3907
카이-제곱		12.999	17.734	1.588	21.283	8.878	1.588	28.498	15.482	33.383	43.295	22.097	3.017	42.83	21.999	31.695	43.567
p-값		<0.001	<0.001	0.208	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.082	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

		CpG714	CpG726	CpG746	CpG765	CpG774	CpG784	CpG82	CpG815	CpG817
연막	C	52	53	52	53	52	51	51	54	51
	T	2	2	1	0	2	3	3	0	3
	메틸화 지수	0.985	0.9816	0.983	0.981	0.983	0.9444	0.9444	1	0.9444
태반	C	49	29	43	42	35	33	27	33	22
	T	14	23	11	12	19	21	27	21	22
	메틸화 지수	0.741	0.537	0.769	0.779	0.6491	0.6111	0.5	0.6111	0.5926
카이-제곱		8.878	26.797	5.597	8.745	20.693	17.999	24.416	16.482	26.173
p-값		0.003	<0.001	0.018	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

[0155]

[0156]

[0157]

[표 4C]

PPP1R2P2 영역 B 내의 개별적인 CpG 부위에서 임신 제1 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이설과이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:36,180,493(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

[0158]

[0159]

[0160]

Fem1A에 대한 유사성(카에노하르디티스 엘레간스(씨. 엘레간스))

Fem1A에 대한 유사성(씨. 엘레간스)의 메틸화 프로파일을, 5명의 임신 제3 삼분기 의 임신부에게서 수집한 태반 조직 및 상응하는 모체 혈액 세포 중에서 연구하였다. 클로닝 및 바이설과이트 서열 분석을 수행하였고, 태반 조직 및 모체 혈액 세포 중의 연구된 CpG 부위의 메틸화 지수를 각각 영역 A 및 영역 B에 대해 도 5a 및 도 5b 에서 요약하였다. 일반적으로, 태반은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화되어 있다. 2가지 조직 사이의 통계학적으로 유의한 차이에 대해 평가하기 위해 상기 개시된 바와 같이 카이 제곱 분석을 수행하였다. 연구된 CpG 부위 중에서 8개가 영역 A에서 통계학적으로 유의하게 상의하고, 7개가 영역 B에서 통계학적으로 유의하게 상의하다 (카이 제곱 분석, 표 5A 내지 5B).

[0161]

[표 5A]

[0162]

Fem1A에 대한 유사성(씨. 엘레간스) 영역 A내의 개별적인 CpG 부위에서 임신 제3 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이설과이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:14,056,070(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

		CpG358	CpG428	CpG467	CpG472	CpG475	CpG484	CpG487	CpG491
연막	C	39	44	40	42	42	42	38	41
	T	5	0	4	2	2	2	8	3
	메틸화 지수	0.89	1.00	0.91	0.95	0.95	0.95	0.66	0.93
태반	C	8	24	17	14	13	16	16	18
	T	36	20	27	30	31	28	28	26
	메틸화 지수	0.18	0.55	0.39	0.32	0.30	0.36	0.36	0.41
카이-제곱		41.1	23.359	24.104	35.799	38.012	31.609	16.97	24.893
p-값		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

[0163]

[0164]

[표 5B]

[0165]

Fem1A에 대한 유사성(씨. 엘레간스) 영역 B내의 개별적인 CpG 부위에서 임신 제3 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이설과이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:14,056,070(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

레오타이드 위치로 지정되어 있다.

		CpG623	CpG650	CpG653	CpG655	CpG689	CpG688	CpG676	CpG686	CpG682	CpG708	CpG712	CpG715
연락	C	23	24	21	18	22	21	24	24	23	23	19	23
	T	5	4	7	10	6	7	4	4	5	5	9	5
	메틸화 겨수	0.82	0.86	0.75	0.64	0.79	0.75	0.86	0.82	0.82	0.82	0.88	0.82
태반	C	23	16	14	11	12	13	9	10	9	12	12	14
	T	5	12	14	17	16	15	19	18	19	16	16	14
	메틸화 겨수	0.82	0.57	0.50	0.39	0.43	0.46	0.32	0.36	0.32	0.43	0.43	0.50
카이-제곱		0.122	4.288	2.743	2.575	6.064	3.658	14.461	12.652	12.323	7.619	2.601	5.088
p-값		0.727	0.038	0.098	0.108	0.014	0.055	P=<0.001	P=<0.001	P=<0.001	0.006	0.107	0.024

[0166]

[0167]

CGI009

[0168]

2개의 모체 혈액 세포 시료에서 나온 CGI009의 메틸화 프로파일을, 태아가 21번 삼염색체증을 갖는 임신부에서 나온 2개의 임신 제1 삼분기 태반 조직 시료 뿐만 아니라 정상 임신부에서 수집된 2개의 임신 제1 삼분기 및 2개의 임신 제3 삼분기 태반 조직 시료의 메틸화 프로파일과 비교하였다. 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석을 수행하였고, 태반 조직 및 모체 혈액 세포 중의 연구된 CpG 부위의 메틸화 지수를 도 6에서 요약하였다. 일반적으로, 태반은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화되어 있다.

[0169]

카보닐 리덕타제 1(CBR1)

[0170]

2개의 모체 혈액 세포 시료에서 나온 CBR1의 프로파일을, 태아가 21번 삼염색체증을 갖는 임신부에서 나온 2개의 임신 제1 삼분기 태반 조직 시료 뿐만 아니라 정상 임신부에서 수집된 2개의 임신 제1 삼분기 태반 조직 시료의 메틸화 프로파일과 비교하였다. 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석을 수행하였고, 태반 조직 및 모체 혈액 세포 중의 연구된 CpG 부위의 메틸화 지수를 도 7에서 요약하였다. 일반적으로, 태반은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화되어 있다. 20개의 연구된 CpG 부위 모두가 정상 및 21번 삼염색체증 임신부 둘 모두의 모체 혈액 시료와 임신 제1 삼분기 태반 조직 사이에서 통계학적으로 유의하게 상이하였다(카이 제곱 분석, 표 6).

[0171]

[표 6]

[0172]

CBR1 내의 개별적인 CpG 부위에서 정상 및 21번 삼염색체증 임신 제1 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이설파이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:36,363,538(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

CpG	모	태	부	경	경	경	경	경	경	경	경	경	경	경	경	경	경	경	경	경
모체 연락	MC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MT	26	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
임신 제1 삼분기 T21 태반	MC	11	11	9	8	8	7	7	5	10	6	7	8	6	7	8	8	7	7	7
	MT	10	12	17	16	20	19	19	21	16	18	18	16	20	19	18	19	19	16	16
임신 제1 삼분기 정상 태반	MC	8	8	6	7	8	7	8	7	6	6	8	7	7	8	6	5	8	5	8
	MT	14	14	16	16	14	15	14	15	16	14	14	15	15	16	17	16	17	14	14
임신 제1 삼분기 T21 태반 대 모체 혈액 세포	카이-제곱	12.385	6.272	7.823	6.12	6.439	6.439	10.791	7.823	6.439	5.12	6.439	7.823	7.823	6.439	4.122	6.439			
	p-값	<0.001	0.002	0.005	0.024	0.011	0.011	0.049	0.001	0.005	0.024	0.011	0.005	0.005	0.011	0.042	0.011			
임신 제1 삼분기 정상 태반 대 모체 혈액 세포	카이-제곱	5.567	6.567	6.267	7.885	6.567	7.885	6.567	7.885	6.267	7.885	6.267	6.567	7.885	6.267	2.659	6.567			
	p-값	0.002	0.002	0.012	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.012	0.005	0.002	0.005	0.005	0.102	0.005			
메틸화 겨수	모 <td>태 <td>부 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	태 <td>부 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	부 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td></td>	경 <td>경 <td>경 <td>경 </td></td></td>	경 <td>경 <td>경 </td></td>	경 <td>경 </td>	경
임신 제1 삼분기 정상 태반	0.3656	0.3656	0.2727	0.2162	0.2652	0.2162	0.2652	0.2727	0.2162	0.2727	0.2656	0.2656	0.2727	0.2656	0.2162	0.2727	0.2656			
임신 제1 삼분기 T21 태반	0.4631	0.4631	0.3652	0.2727	0.2206	0.2652	0.2206	0.1923	0.2656	0.2727	0.2656	0.2656	0.2727	0.2656	0.2206	0.2727	0.2656			
임신 제1 삼분기 모체 혈액 세포	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

[0173]

[0174]

다운 증후군 세포 유착 분자(DSCAM)

[0175]

2개의 모체 혈액 세포 시료에서 나온 DSCAM의 메틸화 프로파일을, 태아가 21번 삼염색체증을 갖는 임신부에서 나온 2개의 임신 제1 삼분기 태반 조직 시료 뿐만 아니라 정상 임신부에서 수집된 2개의 임신 제1 삼분기 및 2개의 임신 제3 삼분기 태반 조직 시료의 메틸화 프로파일과 비교하였다. 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석을 수행하였고, 태반 조직 및 모체 혈액 세포 중의 연구된 CpG 부위의 메틸화 지수를 도 8에서 요약하였다. 일반적으로, 태반은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화되어 있다. 27개의 연구된 CpG 부위 모두가 정상 및 21번 삼염색체증 임신부 둘 모두의 모체 혈액 시료와 임신 제1 삼분기 태반 조직 사이에서 통계학적으로 유의하게 상이하였다(카이 제곱 분석, 표 7).

[0176]

[표 7]

[0177]

DSCAM 내의 개별적인 CpG 부위에서 정상 및 21번 삼염색체증 임신 제1 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이설파이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:41,139,872(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

CpG	#10	#14	#17	#23	#26	#31	#32	#48	#51	#70	#72	#85	#91	#92	#97	#99	#202	#211	#212
모체 혈액	1	1	1	1	2	2	1	2	0	1	2	1	0	0	0	0	1	1	1
#C	24	25	25	25	24	24	24	26	25	24	25	24	25	26	26	26	25	25	25
#T	9	9	9	10	9	9	10	9	10	9	9	9	10	10	10	10	8	9	10
T21 태반	5	5	5	4	5	5	4	5	4	5	5	5	4	4	4	5	5	4	4
#C	4	3	3	3	3	4	4	1	8	5	5	3	2	3	2	3	2	3	2
#T	20	21	21	21	20	20	23	19	19	19	21	22	22	21	22	21	22	21	22
임신 제3 삼분기 정상 태반	8	8	8	10	8	8	8	5	8	5	8	8	8	8	7	8	7	7	7
#C	10	10	10	8	10	10	10	12	9	10	10	10	10	10	11	10	11	11	11
#T	10	10	10	8	10	10	10	12	9	10	10	10	10	10	11	10	11	11	11
임신 제1 삼분기 정상 태반 대 모체 혈액 세포																			
카이-제곱	8.222	8.424	8.424	8.424	12.936	6.222	6.222	8.424	11.284	4.885	8.023	8.424	11.284	11.284	9.289	8.424	6.883	6.883	6.883
p-value	0.013	0.004	0.004	0.004	<0.001	0.013	0.013	0.004	0.013	<0.001	0.027	0.005	0.004	<0.001	0.002	0.004	0.01	0.01	0.01
임신 제3 삼분기 정상 태반 대 모체 혈액 세포																			
카이-제곱	0.292	0.368	0.368	0.368	0.368	0.292	0.292	0.442	0.865	3.928	1.991	0.089	0.091	0.598	0.608	0.368	0.025	0.368	0.368
p-value	0.589	0.549	0.549	0.549	0.549	0.589	0.589	0.508	0.582	0.048	0.158	0.925	0.943	0.435	0.208	0.435	0.845	0.343	0.343
임신 제1 삼분기 T21 태반 대 모체 혈액 세포																			
카이-제곱	14.662	14.662	17.995	14.662	15.218	14.629	17.585	11.818	21.028	14.662	11.818	14.662	21.029	21.029	21.029	11.818	14.662	17.585	17.585
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
메틸화 지수																			
임신 제1 삼분기 정상 태반	0.4444	0.4444	0.4444	0.4444	0.5555	0.4444	0.4444	0.4444	0.4444	0.3333	0.5	0.4444	0.4444	0.4444	0.3889	0.4444	0.3889	0.3889	0.3889
임신 제3 삼분기 T21 태반	0.6039	0.6039	0.6039	0.7143	0.6039	0.6039	0.7143	0.7143	0.6039	0.7143	0.6039	0.6039	0.7143	0.7143	0.7143	0.6039	0.7143	0.6039	0.6039
임신 제3 삼분기 정상 태반	0.1887	0.126	0.126	0.126	0.126	0.1687	0.0417	0.2083	0.2083	0.126	0.2083	0.2083	0.126	0.2083	0.126	0.2083	0.126	0.2083	0.126
임신 제1 삼분기 모체 혈액 세포	0.0798	0.0385	0.0385	0.0385	0.0385	0.0798	0.0385	0.0798	0	0.0385	0.0385	0	0	0	0.0385	0.0385	0.0385	0.0385	0.0385

[0178]

[0179]

[0180]

[0181]

[0182]

[0183]

[0184]

[0185]

[0186]

[0187]

[0188]

21번 염색체 오픈 리딩 프레임 29(C21orf29)

2개의 모체 혈액 세포 시료에서 나온 C21orf29의 메틸화 프로파일을, 태아가 21번 삼염색체증을 갖는 임신부에서 나온 2개의 임신 제1 삼분기 태반 조직 시료 뿐만 아니라 정상 임신부에서 수집된 1개의 임신 제1 삼분기 및 2개의 임신 제3 삼분기 태반 조직 시료의 메틸화 프로파일과 비교하였다. 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석을 수행하였고, 태반 조직 및 모체 혈액 세포 중의 연구된 CpG 부위의 메틸화 지수를 도 9에서 요약하였다. 일반적으로, 태반은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화되어 있다. 16개의 연구된 CpG 부위 중에서, 각각 모두, 9개 및 10개 부위가 21번 삼염색체증 임신부의 임신 제1 삼분기 태반 조직, 정상 임신부의 임신 제1 삼분기 태반 조직 및 임신 제3 삼분기 태반 조직 각각에서 모체 혈액 세포와 통계학적으로 유의하게 상이하였다(카이 제곱 분석, 표 8).

[표 8]

C21orf29 내의 개별적인 CpG 부위에서 정상 및 21번 삼염색체증 임신 제1 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이설파이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:44,953,288(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

CpG	#33	#36	#38	#39	#41	#42	#43	#44	#45	#46	#47	#48	#49	#50	#51	#52	#53	#54	#55
임신 제1 삼분기 정상 태반	5	4	6	4	8	4	3	1	1	4	3	1	1	2	3	1			
#C	3	4	2	4	0	4	5	7	7	4	5	7	7	6	5	7			
#T	9	10	9	5	12	10	11	12	7	12	12	11	7	8	8	8			
임신 제1 삼분기 T21 태반	7	6	7	11	4	6	5	4	9	4	4	5	9	8	8	8			
#C	5	6	4	2	13	4	14	7	8	11	8	2	1	2	1	4			
#T	17	16	18	20	9	18	8	15	14	11	17	20	21	20	21	18			
임신 제3 삼분기 정상 태반	0	1	0	1	2	1	3	2	1	2	0	1	2	1	0	1			
#C	24	23	24	23	22	23	21	22	23	22	24	23	22	23	24	23			
#T	24	23	24	23	22	23	21	22	23	22	24	23	22	23	24	23			
임신 제1 삼분기 모체 혈액 세포																			
카이-제곱	13.3581	6.4010	17.5043	6.4000	19.3939	6.4000	1.0940	1.1226	N/A	4.3761	6.0077	N/A	1.1226	1.1034	6.0077	N/A			
p-value	0.0003	0.0114	0.0000	0.0114	0.0000	0.0114	0.2956	0.7262	N/A	0.0364	0.0142	N/A	0.7282	0.2935	0.0142	N/A			
임신 제1 삼분기 T21 태반 대 임신 제1 삼분기 모체 혈액 세포																			
카이-제곱	14.3429	3.8028	14.9385	13.589	10.994	15.939	7.0898	15.939	22.287	15.116	5.0239	9.598	12.038	9.886					
p-value	0.00015	0.0002	0.00015	0.0015	0.0002	0.0009	7E-05	0.0078	7E-05	2E-06	6E-05	0.0025	0.0026	0.0005	0.0026				
임신 제3 삼분기 정상 태반 대 임신 제1 삼분기 모체 혈액 세포																			
카이-제곱	3.99865	3.3277	3.76351	0.0379	11.5461	1.054	10.761	2.6898	5.6535	7.8513	3.9087	0.9379	0.0661	0.0919	1.054				
p-value	0.04854	0.077	0.05844	0.0061	0.0008	0.2951	0.001	0.1023	0.0174	0.005	0.0455	0.2061	0.9379	0.9649	0.2951				
메틸화 지수																			
임신 제1 삼분기 정상 태반	0.6230	0.5000	0.7500	0.5000	1.0000	0.5000	0.3750	0.1250	0.1250	0.5000	0.3750	0.1250	0.1250	0.2500	0.3750	0.1250			
임신 제3 삼분기 T21 태반	0.8025	0.8250	0.3625	0.3125	0.7000	0.6000	0.8875	0.7000	0.4375	0.7000	0.7000	0.8275	0.6375	0.5000	0.9000	0.6000			
임신 제3 삼분기 정상 태반	0.2273	0.2727	0.1818	0.0909	0.5909	0.1818	0.6364	0.3182	0.3636	0.5000	0.2273	0.2909	0.0445	0.0909	0.0445	0.1818			
임신 제1 삼분기 모체 혈액 세포	0.0000	0.6417	0.0000	0.6417	0.9833	0.6417	0.1250	0.6833	0.6417	0.3933	0.0000	0.6417	0.3933	0.6417	0.0000	0.6417			

태반 조직과 모체 혈액 세포 사이에서 서로 다른 메틸화 패턴을 보이지 않는 유전자좌

태반 조직과 모체 혈액 세포 사이의 서로 다른 메틸화가 모든 연구된 유전자좌에서 보편적으로 관찰되지는 않았다. CGI111의 메틸화 프로파일을 4명의 임신 제3 삼분기 임신부에서 수집된 태반 조직과 상응하는 모체 혈액 세포 중에서 연구하였다. 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석을 수행하였고, 결과는 도 10에 도시되어 있다. 모체 혈액 세포와 태반 조직 둘 모두에서 나온 클론은 주로 메틸화되어 있지 않다.

유사하게, CGI121의 경우 5명의 임신 제3 삼분기 임신부의 모체 혈액 세포와 태반 조직의 메틸화 프로파일은 CpG 부위 1603을 제외하고는 유의하게 서로 다르지 않았다(도 11 및 표 9).

[표 9]

CGI121 내의 개별적인 CpG 부위에서 임신 제1 삼분기 태반 조직과 모체 혈액 세포의 바이설파이트 서열 분석 자료, 메틸화 지수 및 메틸화 프로파일을 비교한 카이 제곱 분석의 요약. 개별적인 CpG 부위는 UCSC 게놈 브라우저의 인간 2004년 5월(hg17) 어셈블리의 chr21:45,262,112(+1)에 대한 뉴클레오타이드 위치로 지정되어 있다.

		CpG477	CpG486	CpG488	CpG495	CpG492	CpG494	CpG496	CpG498	CpG503	CpG505	CpG506	CpG507	CpG508	CpG509	CpG510	CpG511	CpG512	CpG513	CpG514	CpG515	CpG516	CpG517
연막	C	3	1	3	5	8	8	10	9	8	3	5	8	3	10	7	10	14	14	13	17		
	T	19	21	19	11	14	14	12	13	18	14	19	11	14	19	12	15	12	8	8	9	8	
메틸화수		0.14	0.05	0.14	0.23	0.36	0.36	0.45	0.41	0.27	0.38	0.14	0.23	0.38	0.14	0.45	0.32	0.45	0.84	0.84	0.59	0.77	
	DMT	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
태반	C	7	5	7	9	14	15	14	9	8	13	4	3	8	11	11	9	8	10	14	14	11	
	T	15	17	15	13	8	7	8	13	16	9	16	19	13	11	11	13	16	12	8	8	11	
메틸화수		0.32	0.23	0.32	0.41	0.64	0.68	0.64	0.41	0.27	0.59	0.18	0.14	0.41	0.50	0.41	0.27	0.45	0.64	0.64	0.5		
	DMT	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
카이-제곱		1.165	1.737	1.105	0.843	2.273	3.280	0.825	0.084	0.115	1.468	85.16	0.153	0.056	5.133	0.061	0.098	0.884	0.825	0.096	0.096	2.465	
p-값		0.280	0.188	0.290	0.352	0.152	0.070	0.384	0.759	0.736	0.227	1.000	0.896	0.747	0.022	0.763	0.794	0.347	0.384	0.764	0.767	0.117	

[0189]

[0190]

[0191]

[0192]

[0193]

[0194]

[0195]

[0196]

[0197]

[0198]

한편, KIAA0656, 열쇼크 전사 인자 2 결합 단백질(HSF2BP) 및 COL6A1의 경우, 연구된 태반 조직과 모체 혈액 세포는 둘 모두 메틸화 지수의 유의한 차이 없이 주로 메틸화되어 있었다.

실시예 2

태반 조직과 모체 혈액 세포 사이에 서로 다른 메틸화 프로파일을 갖는 CG-함유 게놈 서열은 모체 혈액 검출을 위한 태아 후생학적 마커로서 유용하다. 태아-유래된 DNA 분자를 모체 혈액중의 모체-유래된 것들과 구별하기 위해서, 분석은 각각의 서로 다르게 메틸화되는 유전자좌의 태반-특이적 후생학적 형태의 검출을 목표로 해야만 한다. CGI137의 태반 특이적 형태, 즉, 메틸화되지 않은 분자를 목표로 하는 분석법이 개발되었고, 그의 특이성을 평가하였다.

재료 및 방법

시료 가공 및 DNA 추출

임신 제3 삼분기 태반 조직 시료 및 상응하는 모체 혈액 시료를 선택적 제왕절개에 의해 분만 대상으로부터 수집하였다. 분만 후뿐 아니라 분만 전에 모체 혈액(10ml)을 EDTA 시험관에 수집하였다. 혈액 시료를 4°C에서 1600xg에서 10분동안 원심분리하였다. 혈장을 조심스럽게 제거한 후에 연막 부분을 수집하여 -20°C에서 따로 저장하였다. 혈장을 1600xg에서 10분동안 추가로 원심분리하고, 아래쪽의 세포 펠렛이 교반되지 않도록 조심하면서 1.6ml의 혈장을 깨끗한 폴리프로필렌 시험관으로 옮겼다. 태반 조직 생검물을 인산염 완충된 염수로 세정하고 -80°C에서 단순 폴리프로필렌 시험관에 저장하였다. 퀴아엠프 DNA 미니 키트(Qiagen, 독일 힐텐)를 이용하여 태반 조직으로부터 DNA를 추출하였다. 제조사의 지시에 따라 퀴아엠프 DNA 혈액 미니 키트(Qiagen, 독일 힐텐 소재)를 이용하여 모체 혈장 및 연막으로부터 DNA를 추출하였다. 각각의 태반 및 연막 DNA 시료에 대해, 메틸램프(Methylamp: 상표명) DNA 개질 키트(Epigentek Inc. 뉴욕주 뉴욕)에 의해 1µg의 DNA를 바이설파이트 전환시켰고, 이는 메틸화되지 않은 사이토신 잔기를 우라실로 전환시키지만, 메틸화된 사이토신 잔기를 변화시키지 않고 남겨둔다. 1.6ml의 혈장에서 추출된 DNA를 또한 바이설파이트 전환시켰다. 95:5의 비의 연막 및 태반 DNA 준비물의 혼합물로 구성된 혼합된 바이설파이트-전환된 DNA의 추가 분획을 또한 준비하였다.

균질 매스익스텐드(MassEXTEND) 분석법

CGI137에서 태반 조직은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화되어 있기 때문에, (도 1 및 2), CGI137의 메틸화되지 않은 형태의 검출을 목표로 하는 분석법이 고안되었다. 분석법은 매스어레이(MassARRAY)(Sequenom, 캘리포니아주 산 디에고) 플랫폼에 근거한다. CGI137의 메틸화되지 않은 형태를 특이적으로 증폭시키기 위해 메틸화 특이적 프라이머를 고안한다. 프라이머의 위치의 실레가 도 12에 도시되어 있고, 프라이머 서열을 표 10에 열거한다. 정방향 프라이머는 CpG 부위 472, 477, 481 및 486에 걸쳐져 있다. 역방향 프라이머는 CpG 부위 553 및 561에 걸쳐져 있다. 앰플리콘은 진뱅크 수납 번호: NT_011515의 경우 좌표:2742998 내지 2743130 사이에 걸쳐져 있다. 균질 매스익스텐드 (hME) 프로토콜에 근거한 프라이머 연장 분석(도 12)은 CpG 부위 541의 메틸화 상태를 알아보기 위해 고안된다. 기본적으로, 프라이머 연장 프라이머는 CpG 부위 541의 3' 뉴클레오타이드까지 걸쳐져 있다(표 10). 메틸화되지 않은 분자는 dd(2',3'-디데옥시뉴클레오사이드)ATP의 혼입을 이용하여 하나의 뉴클레오타이드에 의해 연장될 것인 반면, 메틸화된 분자는 dGTP에 이은 ddATP의 혼입을 이용하여 2개의 뉴클레오타이드에 의해 연장될 것이다. 후속적으로 메틸화되지 않은 분자와 메틸화된 분자는 매스어레이(등록상표) 애널리저 컴팩트(Analyzer Compact)(Sequenom) 질량 분광계에서의 질량 차이에 의해 검출되고 분리된다.

[표 10]

[0199] CGI137의 메틸화되지 않은 형태를 목표로 하는 hME 분석법의 프라이머 서열

프라이머	서열(5'에서 3') (서열 번호)
정방향 프라이머	TGTTATAGGTAGGGATATGTTTTGTTGACGT (52)
역방향 프라이머	TCTCTACCTACAATTCTATAAAAAACACTTATCCA (48)
연장 프라이머	ATCCCAACATTTTCCC (49)

[0200]

[0201]

태반, 모체 연막 시료 및 혼합물에서 나온 3 μ l의 바이설과이트-전환된 DNA(바이설과이트 전환 전의 150ng의 DNA와 등가), 및 또한 10 μ l의 바이설과이트-전환된 혈장 DNA(1.6ml 모체 혈장에서 추출된 DNA와 등가)를 각각 25 μ l의 PCR 반응을 위해 증폭시켰다. 각각의 반응물은 2.0mM MgCl₂(Applied Biosystems), 200 μ M의 각각의 dATP, dGTP 및 dCTP, 400 μ M의 dUTP(Applied Biosystems), 200nM의 각각의 정방향 및 역방향 프라이머(Integrated DNA Technologies, 아이오와주 코탈빌) 및 1U의 앰플리택 골드(AmpliTaq Gold, 등록상표) DNA 중합효소(Applied Biosystems)를 갖는 1X PCR 완충액(Applied Biosystems, 캘리포니아주 포스터시)을 함유한다. PCR 반응은 95 $^{\circ}$ C에서 10분에서 시작한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초 변성, 60 $^{\circ}$ C에서 40초간 어닐링, 72 $^{\circ}$ C에서 40초간 연장을 40회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 최종 항온처리한다.

[0202]

임의의 남아있는 dNTP를 탈인산화시키고 이들이 후속적인 프라이머 연장 분석에 혼입되는 것을 방지하기 위해 PCR 생성물을 새우 알칼리 포스파타제로 처리하였다. 각각의 25 μ l의 PCT 반응을 위해, 0.34 μ l의 hME 완충액(Sequenom), 0.6 μ l의 새우 알칼리 포스파타제(Sequenom) 및 3.06 μ l의 물을 첨가하였다. 반응 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 40분간 항온처리한 후, 85 $^{\circ}$ C에서 5분간 열 불활성화시켰다.

[0203]

프라이머 연장 반응을 위해, 1500nMdl 연장 프라이머(Integrated DNA Technologies), 1.15U의 써모시퀀나제(Sequenom) 및 64 μ M의 각각의 ddATP, ddCTP, dTTP 및 dGTP(Sequenom)을 함유하는 염기 연장 반응 카테일 4 μ l를 10 μ l의 PCT 생성물에 첨가하였다. 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 2분, 및 이어서 94 $^{\circ}$ C에서 5초, 52 $^{\circ}$ C에서 5초 및 72 $^{\circ}$ C에서 5초를 75 사이클 반복하였다.

[0204]

최종 염기 연장 생성물을 스펙트로클린(SpectroCLEAN)(Sequenom) 수지를 이용하여 정화하여 질량 분광 분석을 방해할 수 있는 염을 제거하였다. 24 μ l의 물 및 12mg의 수지를 각각의 염기 연장 생성물에 첨가하였다. 최종 혼합물을 20분동안 회전기에서 혼합하였다. 361g에서 5분동안 원심분리한 후, 스펙트로포인트(SpectroPoint) 나노분배기(Sequenom)를 이용하여, 약 10nL의 반응 용액을 3-하이드록시피콜린산 매트릭스가 미리 점적되어 있는 384-포맷 스펙트로칩(SpectroCHIP)(Sequenom) 상으로 분배하였다.

[0205]

결과 및 논의

[0206]

매스어레이 분석을 위한 질량 스펙트럼이 도 13에 도시되어 있다. 메틸화되지 않은 형태의 CGI137에 대한 프라이머 연장 생성물은 95:5의 모체 연막과 태반 DNA의 혼합물뿐만 아니라, 태반 및 분만 전 혈장 DNA 시료에서도 검출될 수 있다. 이들 자료는 분석법이, 5%의 부분 농도까지 내려가는, 모체 혈장 및 DNA 혼합물 중에서 태반에서 유래된 메틸화되지 않은 형태의 CGI137의 검출에 민감함을 제안한다. 분만 후 모체 혈장 시료에서 아무런 신호도 검출되지 않았고, 이는 메틸화되지 않은 형태의 CGI137의 임신-특이성을 확인하여준다. 모체 연막 시료 중에서 신호가 없는 것 또한 메틸화되지 않은 형태의 CGI137의 검출에 대한 분석법의 특이성을 확인한다. 요약하자면, CGI137의 메틸화 프로파일이 태반 조직과 모체 혈액 세포에서 서로 다르기 때문에, 모체 혈액 세포로부터 유래된 바탕값의 CGI137 메틸화된 분자 중에서 CGI137의 태반 유래된 형태를 검출하는 것을 목표로 하는 민감하고 특이적인 분석법이 개발될 수 있었다. 태반이 태아 DNA를 모체 순환계로 방출시키는 조직 공급원이고(문헌 [Chim et al, Proc Natl Acad Sci USA., 102: 14753-14758]), 여기서 후자는 모체 혈액 세포로부터 유래된 높은 바탕값의 DNA를 함유하고 있기 때문에(문헌 [Liu et al.]), 태반-특이적 후생학적 마커를 목표로 하는 분석법은 모체 혈액 중에서 태아-특이적 핵산을 검출하는데 유용하다.

[0207]

실시예 3

[0208]

대안적인 방법인 조합된 바이설과이트 제한 효소 분석법(COBRA)(문헌[Xiong and Laird Nucleic Acids Res 25: 2532-2534, 1997])를 이용하여 태반에서 나온 DNA와 모체 혈액 세포에서 나온 DNA 사이에서 21번 염색체 상의 3개의 게놈 서열에 서로 다른 메틸화가 존재하는지를 평가하였다.

[0209]

[표 11]

[0210]

21번 염색체 상의 연구된 게놈 서열의 정체, 위치, 프라이머 서열 및 PCR 반응 조건. 생명공학 정보를 위한 국립 센터의 진뱅크에 수탁된 게놈 콘티그(수납 번호, 버전, 출발 및 종결 뉴클레오타이드 번호) 상의 개별적인

영역, 및 UCSC 게놈 브라우저(genome.ucsc.edu 웹 사이트)의 인간 2004년 5월(hg17) 상의 염색체 위치(염색체, 출발 및 종결 뉴클레오타이드 번호)가 각각 두번째 및 세번째 열에 도시되어 있다.

시퀀스 이름	게놈 좌표	염색체 위치	F-프라이머	R-프라이머	PCR 조건	PCR 인헨서	환상성 확률 (%)	이동형 온도(°C)	시퀀스 횟수
HCS 영역 A	NC 011612.10 2401567-2401590	chr21:37,275,090-37,275,427	GGAGGTGAATTG GTATTGTTGTTAT	CCCTACCCCTTC CCCTACCTCCAA	3 200 2x	2x	0.4	58	55
HCS 영역 B1	NC 011612.10 2401597-2401785	chr21:37,275,427-37,275,074	AGAGGTGAGGT GTATTGTTGTTAT	CCCTACCTCCAA AATCCCAAAA	2.5 200 2x	2x	0.4	60	50
HCS 영역 B2	NC 011612.10 2401985-2401981	chr21:37,214,851-37,215,083	GTTTAGTTGTTAT GTATTGTTGTTAT	CTAAATATAAAA CAATATCCAAAA	3 200 2x	2x	0.4	58	55
COB08	NC 011612.10 1288248-1288468	chr21:25,893,248-25,893,488	AAAAGGTTTGG TTGGTTAGGATAT	AACTTAATCCAAAA CCCTACCTCCAAAA	3 200 2x	2x	0.4	58	50
CG112	NC 011615.11 2831182-2831188	chr21:45,888,281-45,888,480	TTTGGCTTAT GGGCAATTAGTT	CGAAAGGACAC AACCAATCCAAA	3 200 2x	2x	0.4	58	50

[0211]

[0212]

[0213]

[0214]

재료 및 방법

조합된 바이설파이트 제한 효소 분석법(COBRA)

제조자의 지시에 따라 EZ DNA 메틸화 키트(Zymo Research, 캘리포니아주 오렌지)에 의해 1 μ g의 DNA를 바이설파이트 전환시켰다. 그런 다음, 40ng의 바이설파이트-전환된 DNA(원래의 전환되지 않은 DNA 투입량에 근거)를 실시예 1에 개시된 바와 같이(약간 변형시켰음) PCR 증폭시켰다. 핫스타 택 DNA 중합효소 키트(HotStar Taq DNA Polymerase Kit)(Qiagen, 독일 힐텐)에서 공급된 시약을 사용하였다. 각각의 PCR에 대한 시약 조성은 표 11에 상세히 개시되어 있다. 전형적으로 PCR은 MgCl₂, 프라이머, 핫스타 택, 1XPCR 완충액, 50 μ M의 각각의 dNTP, 및 2X PCRx 인헨서(Invitrogen, 캘리포니아주 칼스바드)가 있는 총 20 μ l의 최종 반응 부피에서 수행되었다. 온도 프로파일은 95°C에서 15분의 초기 변성 단계, 및 이어서, 95°C에서 20초, 58 또는 60°C에서 30초(표 11), 72°C에서 1.5분의 50 내지 55 사이클 반복, 및 72°C에서 3분간의 최종 연장으로 구성된다. 그런 다음, PCR 생성물을 제한 효소로 분해시켰다. 각각의 유전자좌에 대해 사용된 제한 효소는 바이설파이트 전환 후에 메틸화된 서열과 메틸화되지 않은 서열을 식별할 수 있는 능력으로 선택된다. 본질적으로, 제한 효소 부위는 메틸화되거나 메틸화되지 않은 서열중 하나에서만 존재할 수 있고, 둘 모두에서는 존재할 수 없어서, 서열중 하나는 분해되지만 다른 하나는 분해되지 않고 유지된다(표 12). 제한 효소 분해는 제조자의 추천된 온도 하에서 2시간동안 5 μ l의 PCR 생성물, 1X 적절한 완충액 및 10U의 제한 효소(또는 가짜 분해를 위해 제한 효소 없이)를 갖는 20 μ l의 최종 부피에서 수행된다. 모든 효소는 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)(매사추세츠주 비버리)에서 구입하였다. 그런 다음 분해된 생성물을 겔 전기영동에 의해 분석하였다.

[0215]

[표 12]

[0216] COBRA 분석에 대한 결과 예측

유전자 좌 이름	효소	제한 상태	메틸화 상태	완전히 분해된 생성물(bp)
HLCS 영역 A	<i>Bst</i> I	제한되지 않음	메틸화되지 않음	338
		제한됨	메틸화됨	285, 53
HLCS 영역 B1	<i>Bst</i> I	제한되지 않음	메틸화되지 않음	310
		제한됨	메틸화됨	45, 22, 176, 30, 37
HLCS 영역 B2	<i>Bst</i> I	제한되지 않음	메틸화되지 않음	413
		제한됨	메틸화됨	34, 22, 179, 30, 151
CGI009	<i>Bst</i> I	제한되지 않음	메틸화되지 않음	211
		제한됨	메틸화됨	82, 63, 51, 15
CGI132	<i>Bst</i> I	제한되지 않음	메틸화되지 않음	210
		제한됨	메틸화됨	60, 49, 56, 45

[0217]

[0218] 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석

[0219] 상기 도시된 "조합된 바이설파이트 제한 효소 분석(COBRA)" 절에 개시된 바와 동일한 PCR 증폭 반응에서 나온 DNA는 클로닝과 바이설파이트 서열 분석에 유용하였다. 단일 분자의 해상도에서 메틸화 상태를 분석하기 위해, PCR 생성물을 pGEM-T 이지 벡터 시스템(pGEM-T Easy Vector System)(Promega, 위스콘신주 매디슨)을 이용하여 플라스미드 벡터로 TA-클로닝하였다. 양성 재조합 클론에서 나온 삽입체를, 제조자의 지시에 따라 빅다이 터미네이터 사이클 시퀀싱(BigDye Terminator Cycle Sequencing) v1.1 키트(Applied Biosystems)를 이용한 사이클 서열 분석에 의해 분석하였다. 에탄올 침전으로 정제한 후, 시료를 10µl의 Hi-Di 포름아마이드에 재현탁시키고 3100 DNA 분석기(Applied Biosystems)로 분석하였다.

[0220] 재료 및 논의

[0221] 홀로카복실라제 신테타제(HLCS)

[0222] 2개의 모체 혈액 세포 시료에서 나온 HLCS의 추정 프로모터 영역의 메틸화 프로파일을, 2개의 21번 삼염색체증에서 나온 임신 제1 삼분기 태반 조직 시료뿐 아니라 정상 임신부에서 수집된 2개의 임신 제1 삼분기 및 2개의 임신 제3 삼분기 태반 조직 시료와 비교하였다. COBRA 분석법을 수행하고, 영역 A, 영역 B1 및 영역 B2에 대한 겔 전기영동 자료를 각각 도 14a, 14b 및 14c에 도시하였다. 일반적으로 태반은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화된다. 메틸화 상태를 단일 분자 해상도에서 추가로 분석하기 위해 클로닝 및 바이설파이트 서열 분석 실험을 영역 B2에서 수행하였고, 도 17에 도시된 결과는 HLCS에서의 메틸화가 태반 특이적임을 확인하였다.

[0223] CGI009

[0224] 2개의 모체 혈액 시료에서 나온 CGI009의 메틸화 프로파일을, 21번 삼염색체증에서 나온 2개의 임신 제1 삼분기 태반 시료 조직 뿐 아니라 정상 임신에서 수집된 2개의 임신 제1 삼분기 및 2개의 임신 제3 삼분기 태반 조직 시료와 비교하였다. COBRA 분석법을 수행하고 겔 전기영동 자료를 도 15에 도시하였다. 일반적으로 태반은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화된다.

[0225] CGI132

[0226] 2개의 모체 혈액 시료에서 나온 CGI132의 메틸화 프로파일을, 21번 삼염색체증에서 나온 2개의 임신 제1 삼분기 태반 시료 조직 뿐 아니라 정상 임신에서 수집된 2개의 임신 제1 삼분기 및 2개의 임신 제3 삼분기 태반 조직 시료와 비교하였다. COBRA 분석법을 수행하고 겔 전기영동 자료를 도 16에 도시하였다. 일반적으로 태반은 모체 혈액 세포에 비해 저메틸화된다.

[0227] 실시예 4

[0228] 태반 조직과 모체 혈액 세포에서 확인된 마커의 서로 다른 메틸화 특징에 근거하여, 태반과 모체 혈액 세포에서 나온 DNA 사이의 HLCS 영역 B2(표 11)의 게놈 서열의 서로 다른 메틸화를 정량 분석하기 위해, 메틸화 민감성 제한 효소 분해 후 실시간 정량적 PCR을 이용한 대안적 방법을 개발하였다.

[0229] 재료 및 방법

[0230] 메틸화 민감성 제한 효소 분해

[0231] 퀴아엠프 DNA 미니 키트(Qiagen, 독일 힐텐 소재)를 이용하여 태반 조직으로부터 DNA를 추출하였다. 모체 연막 및 혈장으로부터 나온 DNA를 제조자의 지시에 따라 퀴아엠프 DNA 혈액 미니 키트(Qiagen, 독일 힐텐 소재)에 의해 추출하였다. 각각의 태반 및 연막 DNA 시료에 대해, 100ng의 DNA를 메틸화 민감성 제한 효소 분해시켰다. 제한 효소 분해는 제조자가 추천한 온도에서 16시간 이상동안 DNA, 1X 적절한 완충액 및 25U의 Hpa II 및 50U의 Bst I(또는 가짜 분해의 경우 이를 포함하지 않음)이 있는 50µl의 최종 반응 부피에서 수행되었다. 각각의 모체 혈장 시료의 경우, 1.6ml의 혈장을 DNA 추출에 이용하였고, 50µl의 탈이온수에 희석시키고, 이중 21µl를 제

한 효소 분해시켰다. 제한 효소 분해는 제조자가 추천한 온도에서 16시간 이상동안 DNA, 1X 적절한 완충액 및 25U의 *Hpa* II 및 30U의 *Bst*U I(또는 가짜 분해의 경우 이를 포함하지 않음)이 있는 30 μ l의 최종 반응 부피에서 수행되었다. 모든 효소는 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)(매사추세츠주 비버리)에서 구입하였다. 그런 다음 분해된 생성물을 실시간 정량적 PCR로 분석하였다. 선택된 제한 효소는 메틸화되지 않은 DNA만 분해하고 메틸화된 DNA는 분해하지 않는다. 실시예 3에서 나온 자료가, *HLC5*가 태반 조직에서는 과메틸화되어 있고, 모체 혈액 세포에서는 저메틸화되어 있다는 것을 보여주기 때문에, 태반 조직에서 나온 DNA 부분이 검출될 수 있는 상태로 남아있는 반면, 모체 혈액 세포에서 나온 대부분의 DNA는 분해되어 제한 효소 처리 후에 검출되지 않을 것으로 예상된다.

[0232] **실시간 정량적 PCR**

[0233] 제한 효소로 분해하거나 분해하지 않고 *HLC5* 게놈 DNA를 정량적으로 분석하기 위해 실시간 PCR 분석법을 개발하였다. 4 μ l의 제한 효소로 처리된 DNA 또는 가짜 분해 시료를 실시간 PCR 분석법에 이용하였다. 각각의 반응은 1X 택맨 유니버살 PCR 마스터 믹스(TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems, 캘리포니아주 포스터시), 300nM의 정방향 프라이머(5'-CCGTGTGGCCAGAGGTG-3'; 서열 번호 60), 300 nM의 역방향 프라이머 (5'-TGGGAGCCGGAACCTACC-3'; 서열 번호 61), 및 100 nM의 택맨 프로브 (5'- 6FAM- TCCCGACCTGGCCCTTGGCC-TAMRA-3'; 서열 번호 62)를 함유한다. 온도 프로파일은 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분, 그리고 95 $^{\circ}$ C에서 15초 및 60 $^{\circ}$ C에서 1분을 50 사이클 반복하였다. 모든 반응은 이중으로 수행하였고, 평균 양을 측정하였다. 광학 밀도 측정에 의해 원래 정량화된, 연속 희석된 인간 게놈 DNA를 분석용 정량 기준으로 이용하였다. 제한효소 분해 후에 검출가능한 *HLC5* DNA가 메틸화된 분획을 나타내기 때문에, 메틸화 지수로서 실시간 정량적 PCR을 표현하였다. 시료의 메틸화 지수는 효소 분해 후의 *HLC5* DNA 농도를 가짜 분해에 의해 획득된 농도로 나누어 계산된다.

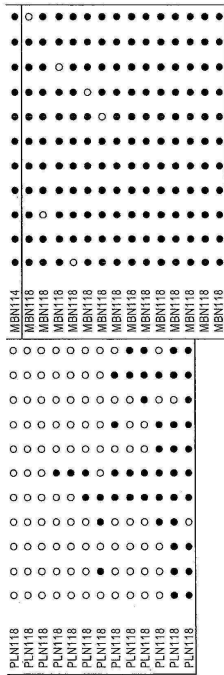
[0234] **결과 및 논의**

[0235] 8개의 모체 혈액 세포 시료에서 나온 *HLC5*의 추정 프로모터 영역의 메틸화 프로파일을 정상 임신부에서 수집된 2개의 임신 제1 삼분기 및 2개의 임신 제3 삼분기 태반 조직 시료에서 나온 것과 비교하였다. 제한 효소 분해 후의 실시간 PCR 분석을 수행하였고, 결과는 도 18에 도시되어 있다. 모든 모체 혈액 세포 시료에서 나오는 DNA는 제한 효소에 의해 대부분 분해되었고 결과적으로 0에 가까운 메틸화 지수를 생성하였고, 반면 태반 조직에서 나온 것은 부분적으로 분해되어, 0.567 내지 0.966의 범위의 메틸화 지수를 생성하였다.

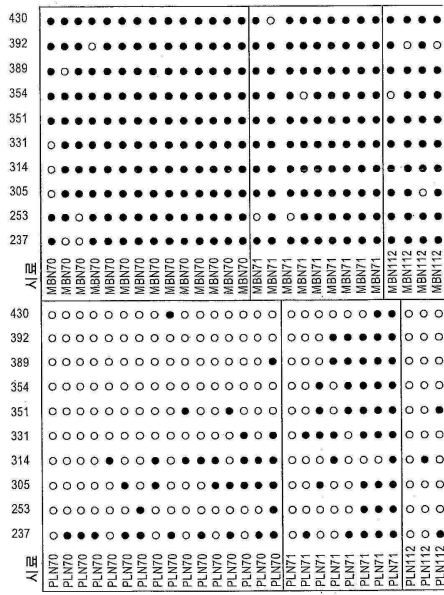
[0236] 이전의 자료는 태반이 태아 DNA의 주된 조직 공급원인 반면, 모체 혈액 세포가 모체 혈장에서 검출될 수 있는 바탕값 DNA의 주된 원인이다. *HLC5* DNA의 태반-특이적(모체 혈액 세포 기준) 분획, 즉 메틸화되거나 분해되지 않는 분획이 모체 혈장에서 검출될 수 있고 임신-특이적이라고 생각된다. 25명의 정상 임신부에서 나온 쌍을 이룬 분만 전 및 분만후 임신 제3 삼분기 혈장 시료를 모집하였다. 제한 효소 분해 후 실시간 PCR 분석을 수행하였고, 결과를 도 19에 나타낸다. *HLC5* 신호는 효소 분해된 분만 전 임신 제3 삼분기 혈장 시료에서 양성으로 검출되고, 분만 후에 감소되는 것으로 나타났다. 효소 분해 후 분만 후 혈장 시료에서의 *HLC5* 농도의 중간값은 효소 분해 후 분만 전 혈장 시료 중의 *HLC5* 농도의 중간값의 8.1%였다(도 19a). 효소 처리된 분만 전 및 분만 후의 혈장에서 나온 청정 패턴은 검출된 *HLC5* 신호가 임신 특이적임을 나타낸다. 반면, 가짜 제한 효소 분해된 분만 후 모체 혈장 중의 *HLC5* DNA 농도의 중간값은 가짜 분해된 분만 전 시료의 중간값의 83.8%였다(도 19b).

[0237] 공개된 아미노산 또는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한, 본원에 언급된 모든 특허, 특허 출원 및 다른 공개 공보는 본원에 그 전체가 참고로 혼입되어 있다.

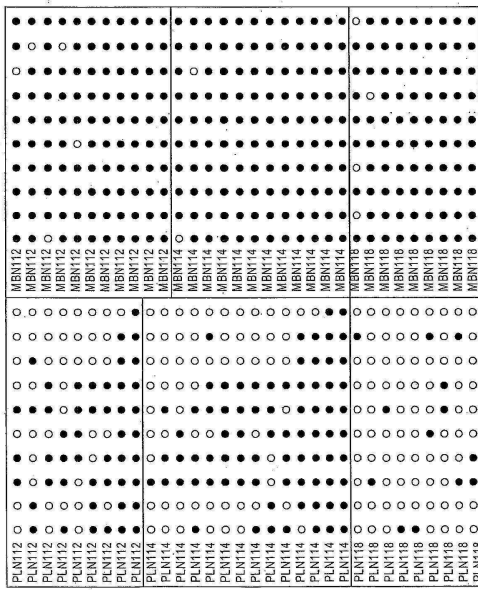
도면1ac



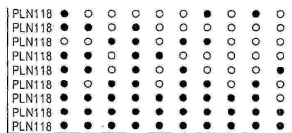
도면1ba



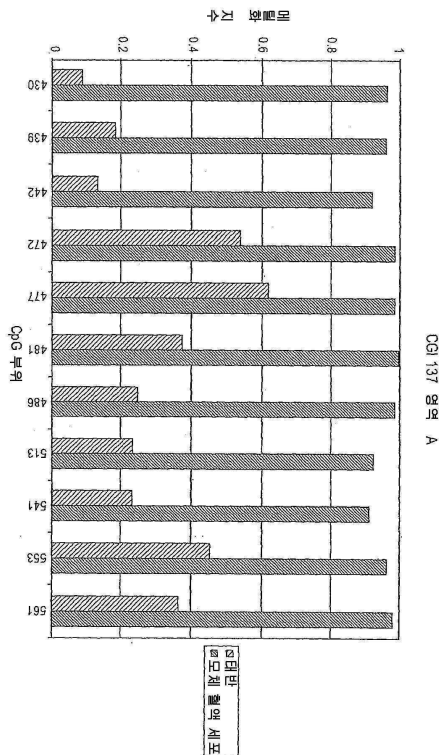
도면1bb



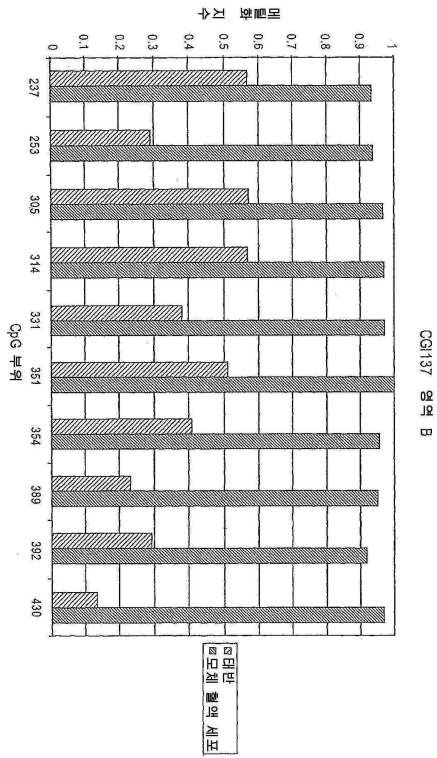
도면1bc



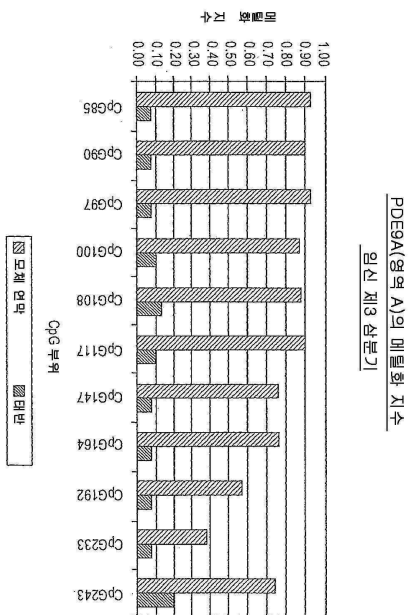
도면2a



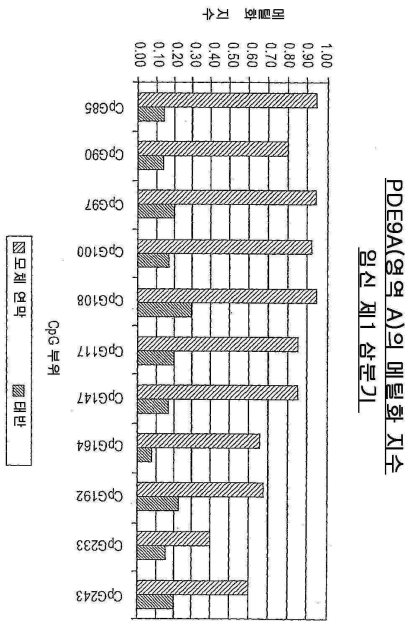
도면2b



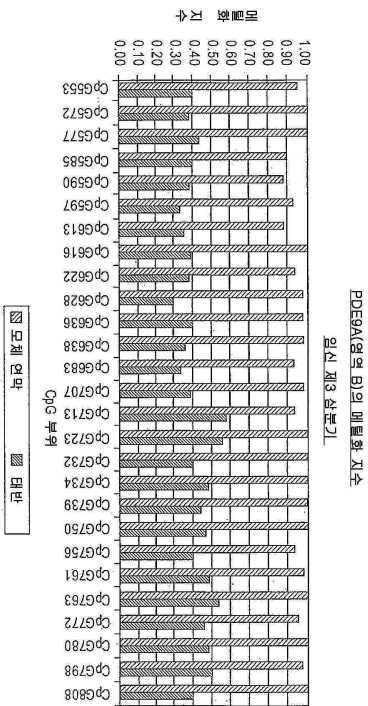
도면3a



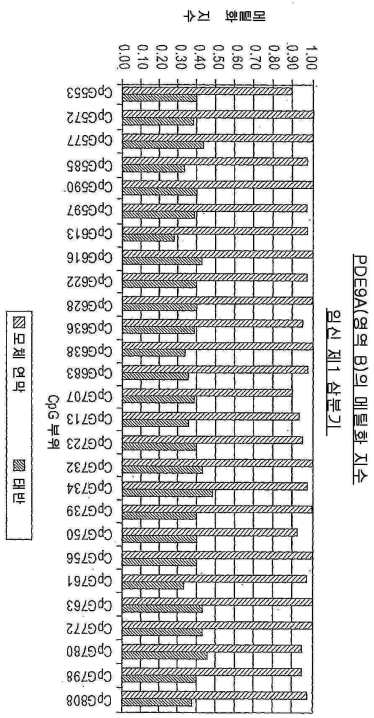
도면3b



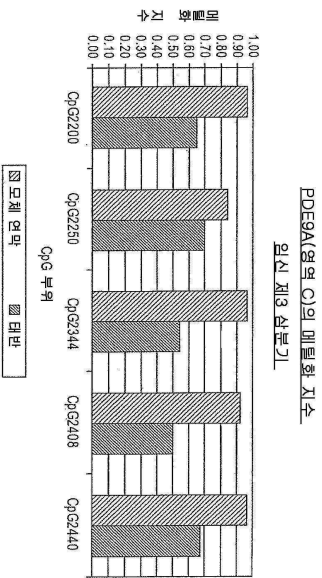
도면3c



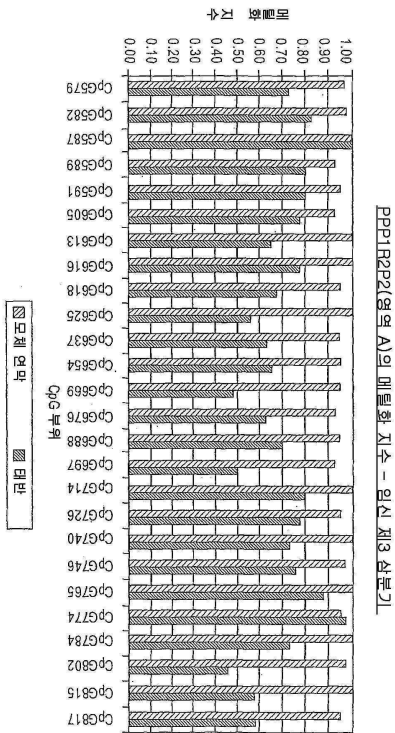
도면3d



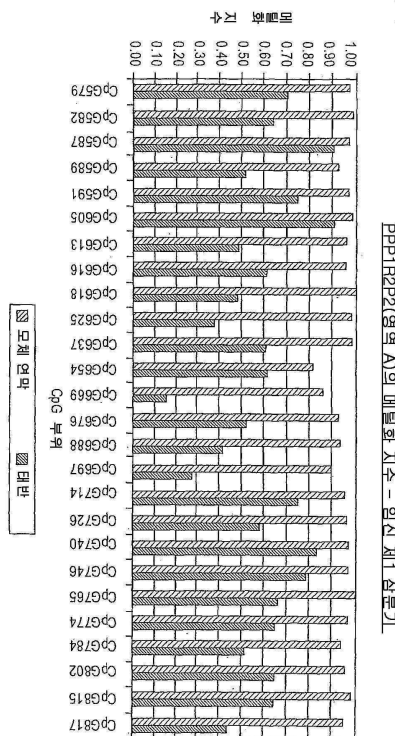
도면3e



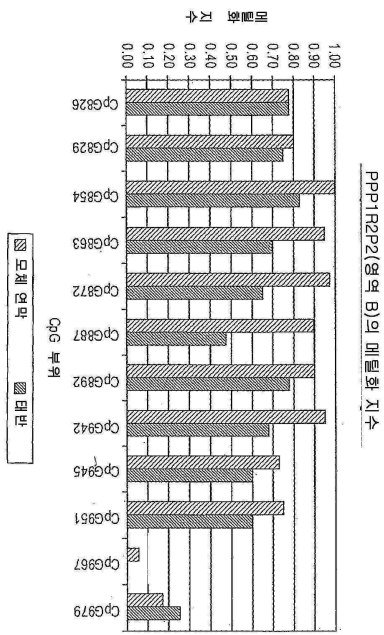
도면4a



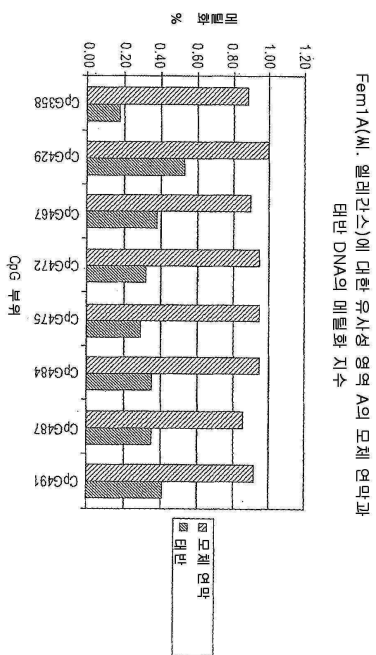
도면4b



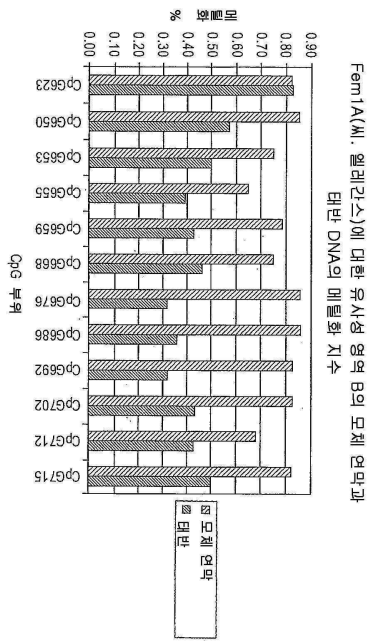
도면4c



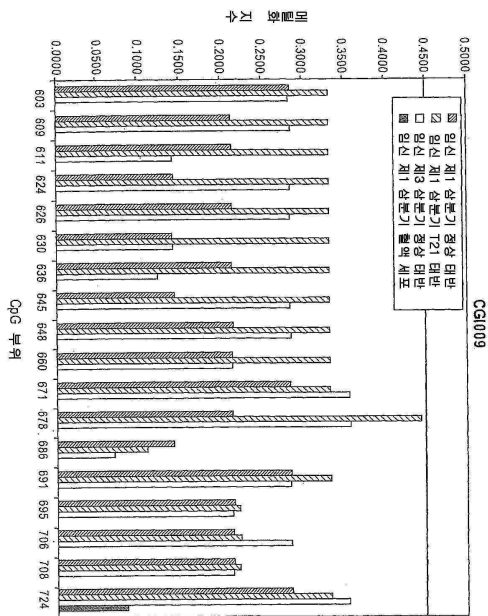
도면5a



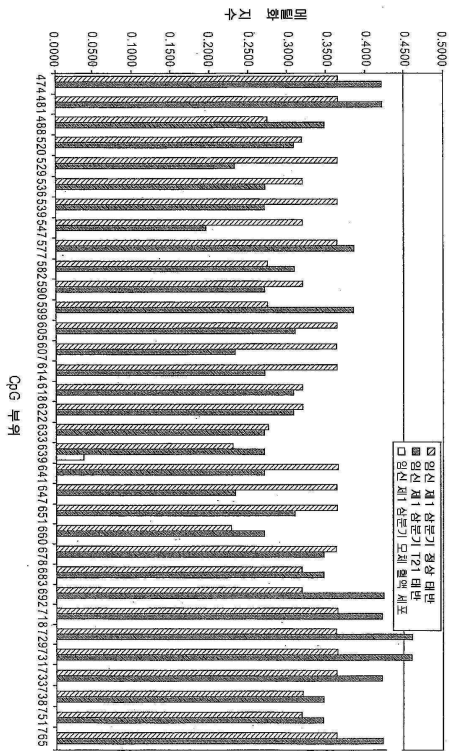
도면5b



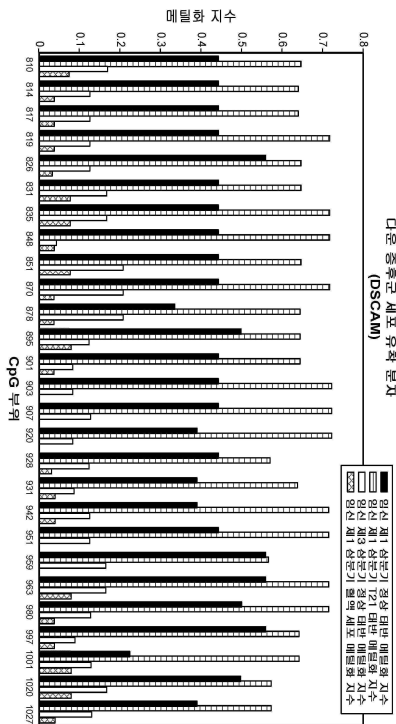
도면6



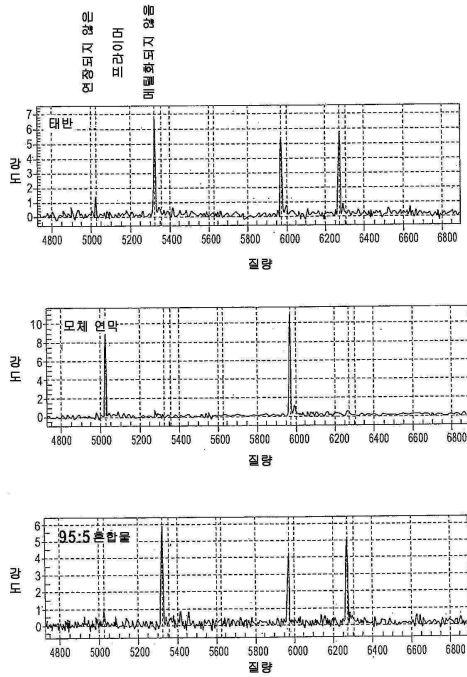
도면7



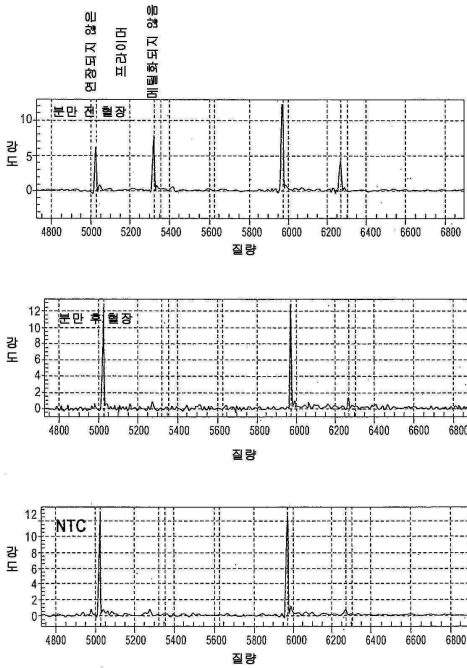
도면8



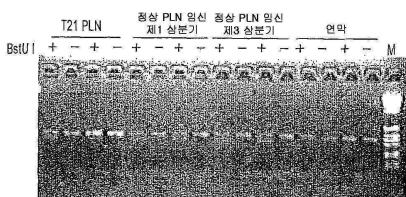
도면13a



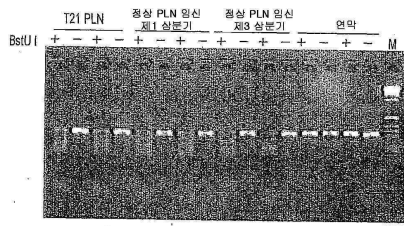
도면13b



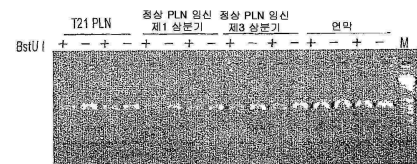
도면14a



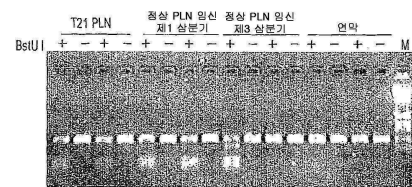
도면14b



도면14c



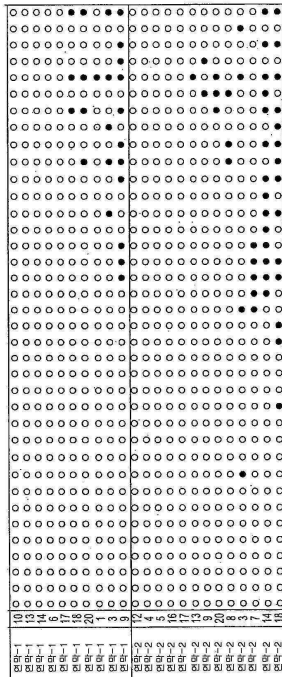
도면15



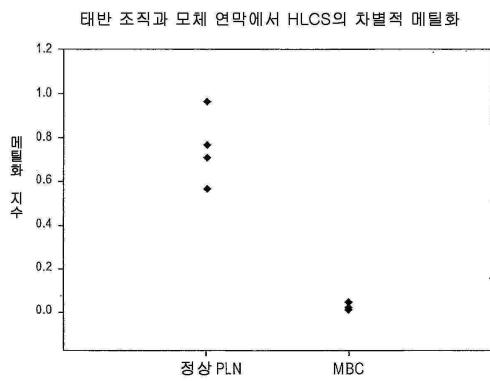
도면16



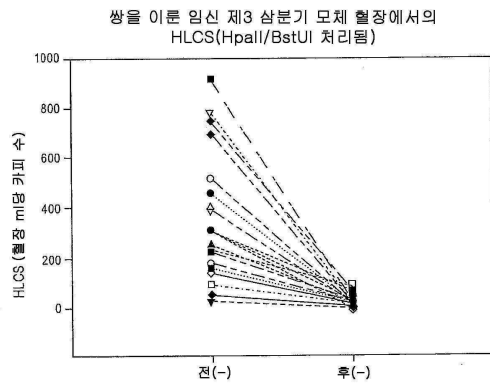
도면17c



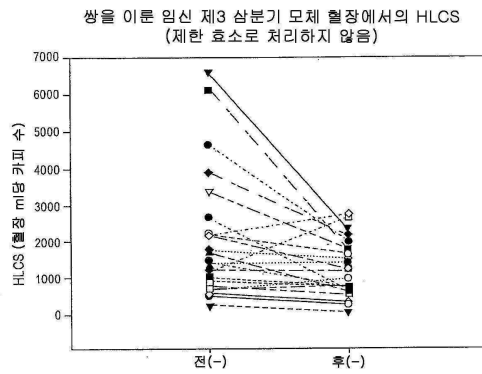
도면18



도면19a



도면19b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Lo, Yuk Ming Dennis
 Chiu, Rossa Wai Kwun
 Chim, Stephen Siu Chung
 Ding, Chunming
 Jin, Shengnan
 Lee, Tracy Yuen Han
 Lun, Fiona Miu Fun
 The Chinese University of Hong Kong
- <120> Novel Markers for Prenatal Diagnosis and
 Monitoring
- <130> 016285-005010PC
- <140> WO PCT/Not yet assigned
- <141> Not yet assigned
- <150> US 60/797,456
- <151> 2006-05-03
- <150> US 11/Not yet assigned

- <151> 2007-04-06
- <160> 62
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 180
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<220>

<223> CGI137 amplified region original DNA sequence

<221> modified_base

<222> (1)...(180)

<223> n = methylated cystosine

<400> 1

cttcacctgn ggggaccng gngagcccct caggtgccac aggcagggac angcctngct 60
 ngatngtca caccatgtgg ccaccagagc tnggggaaaa tgctggggac cctgcatttc 120
 ngtttcaggt ggngaacaag ngcccctcac agaactgcag gtagagangg gccnggggca 180

<210> 2

<211> 180

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CGI137 amplified region bisulfite-converted DNA
 sequence

<221> modified_base

<222> (1)...(180)

<223> n = methylated cytosine

<400> 2

ttttatttgn ggggatttng gngagttttt taggtgttat aggtagggat angtttngtt 60
 ngatngtga tattatgtgg ttattagagt tnggggaaaa tgttggggat tttgtatttt 120
 ngtttttagt ggngaataag ngttttttat agaattgtag gtagagacgg gttcggggta 180

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> homogenous MassEXTEND protocol primer extension

assay methylation specific CGI137 forward primer

<400> 3

tgttataggt agggatatgt tttgtttgac gt

32

<210> 4

<211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> homogenous MassEXTEND protocol primer extension
 assay methylation specific CGI137 reverse primer
 <400> 4
 agagatggat gttaagatat tttttgtgaa taggt 35
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> homogenous MassEXTEND protocol primer extension
 assay methylation specific CGI137 extension primer
 <400> 5
 gtttttagtg gtggataagt 20
 <210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CGI137 region A F-primer
 <400> 6
 ggttgggttg gaggaggta gt 22
 <210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CGI137 region A R-primer
 <400> 7
 accccraacc crtctctacc taca 25
 <210>

8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CGI137 region B F-primer

<400> 8

aaggggagtt gagatattgt agggtttat 29

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CGI137 region B R-primer

<400> 9

aacacctaaa aaactcrccr aaa 23

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> phosphodiesterase 9A (PDE9A) region A F-primer

<400> 10

gtttttaggg aggggtatt tygagt 26

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> phosphodiesterase 9A (PDE9A) region A R-primer

<400> 11

aatctatddd ctatattca ctatttccaa ataaaa 36

<210> 12

<211> 36

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> phosphodiesterase 9A (PDE9A) region B F-primer
 <400> 12
 gtatgtatta attaaatgaa aagatgagtt tgtgat 36
 <210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> phosphodiesterase 9A (PDE9A) region B R-primer
 <400> 13
 craaaaaccc cttataaaaa accra 25
 <210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> phosphodiesterase 9A (PDE9A) region C F-primer
 <400> 14
 ggtggttgtg tgtgtttggt ttttagt 27
 <210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> phosphodiesterase 9A (PDE9A) region C R-primer
 <400> 15
 acccaaaaat accccaacc ataaa 25
 <210> 16
 <211>
 > 26
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)
 subunit 2 pseudogene 2 (PPP1R2P2) region A
 F-primer
 <400> 16
 aggtttttta gtgggaaaa aatggt 26
 <210> 17
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)
 subunit 2 pseudogene 2 (PPP1R2P2) region A
 R-primer
 <400> 17
 craaacttcc ractcttaac tcaaaataac ta 32
 <210> 18
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)
 subunit 2 pseudogene 2 (PPP1R2P2) region B
 F-primer
 <400> 18
 gattttaygt ygagtagtta ttttgagta ag 32
 <210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)
 subunit 2 pseudogene 2 (PPP1R2P2) region B

R-primer

<400> 19
aactcctert ccacactccc rta 23

<210> 20
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Similarity to Fem1A (C. elegans) region A F-primer

<400> 20
aggttaatga tttgtatatt taaaagtttt taggatattt 40

<210> 21
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Similarity to Fem1A (C. elegans) region A R-primer

<400> 21
accaaatact ccaccacrtc caaataa 27

<210> 22
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Similarity to Fem1A (C. elegans) region B F-primer

<400> 22
ayggttattt ggaygtggtg gagtatt 27

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Similarity to Fem1A (C. elegans) region B R-primer

<400> 23	
ccrattaacc acctccaat taacctaata	30
<210> 24	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CGI009 F-primer	
<400> 24	
aaaaaggygt ttgtyggtt atgagttat	29
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CGI009 R-primer	
<400> 25	
aaactaaaat cractacct acaa	24
<210> 26	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> carbonyl reductase 1 (CBR1) F-primer	
<400> 26	
gttaytggg tagttaatag ttagtagtta gagattagtt	40
<210> 27	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> carbonyl reductase 1 (CBR1) R-primer	
<400> 27	
caaacrata cccttattac ctccaa	26

R-primer	
<400> 31	
aactttctca tctactccc taaatctata	30
<210> 32	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CGI111 F-primer	
<400> 32	
tttttttagg tagtgaaag aaaagg	26
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CGI111 R-primer	
<400> 33	
cctccctcct caaaataaac	20
<210> 34	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CGI121 F-primer	
<400> 34	
tttttagata tttttgggt ttaaggtt	28
<210> 35	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> CGI121 R-primer	
<400> 35	

aaatccacct acccaaacac c	21
<210> 36	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> KIAA0656 region A F-primer	
<400> 36	
ttggtggyg ygaagtgtt ttgtagtat t	31
<210> 37	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> KIAA0656 region A R-primer	
<400> 37	
acctctcaa ccraataaac ctaacaaaac	30
<210> 38	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> KIAA0656 region B F-primer	
<400> 38	
gygygygtt aayggtttg ttaggttat	30
<210> 39	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> KIAA0656 region B R-primer	
<400> 39	
cataataata acttctcaa ccccaatca	30

<210> 40
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heat shock transcription factor 2 binding protein
 (HSF2BP) region A F-primer
 <400> 40
 tayggagtag agaagagagt gattatttat tttagt 37
 <210> 41
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heat shock transcription factor 2 binding protein
 (HSF2BP) region A R-primer
 <400> 41
 cracaacrac cataaacraa acra 24
 <210> 42
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heat shock transcription factor 2 binding protein
 (HSF2BP) region B F-primer
 <400> 42
 gtttaaatay gttggygtyg gttagggt 28
 <210> 43
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heat shock transcription factor 2 binding protein

(HSF2BP) region B R-primer

<400> 43

ttacatcaaa aactaacttt ccttetactt taaaa 35

<210> 44

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> COL6A1 region A F-primer

<400> 44

gttyggygg gaggtttgt gatatt 26

<210> 45

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> COL6A1 region A R-primer

<400> 45

aactacraaa craaataaac aaccrttaac ata 33

<210> 46

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> COL6A1 region B F-primer

<400> 46

tyggtttatt gyggttgat tattagggtt 30

<210> 47

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> COL6A1 region B R-primer

<400> 47
tccataacat cgacgacact aaccaa 26

<210> 48
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> homogenous MassEXTEND protocol primer extension
assay methylation specific CGI137 reverse primer

<400> 48
tctctaccta caattctata aaaaacactt atcca 35

<210> 49
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> homogenous MassEXTEND protocol primer extension
assay methylation specific CGI137 extension primer

<400> 49
atccccaaca ttttccc 17

<210> 50
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> holocarboxylase synthetase (HLCS) region A
F-primer

<400> 50
ggagtgttaa atttggttat ttttgtttgt tat 33

<210> 51
<211> 28
<212>
> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> holocarboxylase synthetase (HLCS) region A
 R-primer
 <400> 51
 crctaccctt ctccactaac tactcaaa 28
 <210> 52
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> holocarboxylase synthetase (HLCS) region B1
 F-primer
 <400> 52
 aggagttaga ygttttagtt ygtgtggtt 29
 <210> 53
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> holocarboxylase synthetase (HLCS) region B1
 R-primer
 <400> 53
 ctaaacaccc raatcccaca aa 22
 <210> 54
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> holocarboxylase synthetase (HLCS) region B2
 F-primer
 <400> 54
 gtttttagtty gtgtggttag aggtggt 27
 <210> 55
 <211> 31

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> holocarboxylase synthetase (HLCS) region B2
 R-primer
 <400> 55
 ctaaaaaata aaaaacaaaa tccaaaacaa a 31

<210> 56
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CGI009 F-primer
 <400> 56
 aaaaggygtt tgtygggta tgagttat 28

<210> 57
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CGI009 R-primer
 <400> 57
 aaactaaaat cractacct acaataccaa aaa 33

<210> 58
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CGI132 F-primer
 <400> 58
 ttgygggta yggggattta gttt 24

<210> 59
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CGI132 R-primer
 <400> 59
 craaaacraa craaccaaac ctaa 24
 <210> 60
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> holocarboxylase synthetase (HLCS) real time
 quantitative PCR forward primer
 <400> 60
 ccgtgtggcc agaggtg 17
 <210> 61
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> holocarboxylase synthetase (HLCS) real time
 quantitative PCR reverse primer
 <400> 61
 tgggagccgg aacctacc 18
 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> real time quantitative PCR TaqMan probe
 <221> modified_base
 <222> (1)...(1)
 <223> n = t modified by 6FAM
 <221> modified_base

<222> (20)...(20)

<223> n = c modified by TAMRA

<400> 62

ncccgacctg gccctttgcn

20