



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년08월22일
(11) 등록번호 10-1176091
(24) 등록일자 2012년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7025434
(22) 출원일자(국제) 2005년04월18일
심사청구일자 2010년03월29일
(85) 번역문제출일자 2006년12월01일
(65) 공개번호 10-2007-0031923
(43) 공개일자 2007년03월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/013070
(87) 국제공개번호 WO 2005/111237
국제공개일자 2005년11월24일
(30) 우선권주장
10/840,208 2004년05월05일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Science 241: 708-712 (1988)
전체 청구항 수 : 총 11 항

(73) 특허권자
노바르티스 아게
스위스 바젤 씨에이치-4056 리크트스트라세 35
(72) 발명자
시에 쯔이
미국 캘리포니아 92008 칼즈배드 애쉬베리 로드
5032
한 순갑
미국 캘리포니아 92672 산 클레멘트 비아 델핀
511
와타나스쿨 텀
미국 캘리포니아 92054 오션사이드 #130 파렐 스트리트 2900
(74) 대리인
리앤목특허법인

심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **염색체 이상의 검출방법**

(57) 요약

이수성 또는 특정 돌연변이, 특히 미세결실에서 유래한 다중 염색체 이상 중 임의의 하나를 단일 분석에서 검출하는 방법 및 이에 이용하는 키트. 중합효소 연쇄반응(PCR)은 복수의 프라이머 올리고뉴클레오타이드 쌍을 이용하여 진행 게놈 DNA를 증폭하기 위해 수행하는데, 각 쌍에서 하나의 프라이머는 그 5' 말단에 부착된 검출가능 표지를 보유한다. 복수의 프라이머 쌍은 잠재적인 염색체 이상을 나타내는 당해 상이한 염색체의 DNA 단편을 표적으로 하고, 한 쌍은 대조구 유전자를 표적으로 한다. 증폭된 PCR 산물은 정제되고, 이로부터 검출가능 표지를 보유한 단일-가닥 DNA가 수득되며, 이 단일-가닥 DNA는 각 단편의 한 가닥의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 보유하는 DNA 올리고뉴클레오타이드 프로브를 각각 함유하는 마이크로어레이 상의 지점에 혼성화된다. 이 마이크로어레이는 이의 각 지점에서 표지의 존재에 대해서 이미지화되며, 우선 이 이미지 결과를 대조구 유전자에 특이적인 지점의 이미지와 비교하고, 그 다음, 정상 DNA의 이미지화에서 수득한 결과를 비교하여, 당해 표적 DNA 단편 중 1 이상에 의해 나타나는 바와 같은 염색체 이상의 존재 또는 부존재를 진단한다.

특허청구의 범위

청구항 1

a. (i) 진핵 게놈 DNA(eukaryotic genomic DNA);

(ii) 각각의 쌍에서 하나의 프라이머(primer)는 상기 진핵 게놈 DNA의 제1 DNA 가닥의 표적 단편(segment)의 3' 서열에 상보적이고, 나머지 프라이머는 상기 표적 단편의 제 2가닥의 3' 서열에 상보적이며, 상기 진핵 DNA의 단편의 길이는 50 내지 300개의 염기쌍으로 구성되고, 상기 각각의 쌍의 프라이머 중 하나는 그의 5' 말단에 부착된 검출가능 표지를 보유하며, 복수의 프라이머 쌍들은 각각 잠재적인 염색체 이상을 나타내는 선택된 상이한 목적(of interest) 염색체의 단편을 표적으로 하며, 하나의 쌍은, 이상(disorder)을 진단하기 위해 이용되는 표적 단편이 존재하는 염색체 이외의 염색체 상에 존재하는 대조구 유전자의 단편을 표적으로 하는 것인, 정방향(forward) 및 역방향(reverse) DNA 프라이머 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)의 복수 개의 쌍; 및

(iii) PCR 증폭을 수행하는데 필요한 PCR 완충액 및 효소;를 포함하는 성분을 용기에서 혼합하여 중합효소 연쇄반응(PCR)의 혼합물을 제조하는 단계;

b. 5 내지 60회의 온도 사이클로 PCR을 수행하여, 증폭된 이중-가닥 PCR 산물을 생성하는 단계;

c. 단계 (b)의 상기 산물을 정제하고, 상기 검출가능 표지를 보유하는 단일-가닥 DNA를 수득하는 단계;

d. 각각의 상기 표적 단편의 가닥 중 하나의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 보유하는 DNA 올리고뉴클레오타이드 프로브를 각각 함유하는 복수의 지점(spot)을 보유한 마이크로어레이(microarray)에 상기 단계 (c)의 산물을 접촉시키는 단계;

e. 상기 DNA 올리고뉴클레오타이드 프로브(probe)와 상기 검출가능 표지를 보유하는 단일-가닥 DNA를 혼성화시키는 단계;

f. 상기 마이크로어레이의 이미징(imaging)에 의해 수득된 이미지에서 각 지점의 강도를 측정하여, 상기 마이크로어레이에 혼성화된 PCR-증폭 산물의 존재 및 상대량을 검출하는 단계; 및

g. 각각의 상기 목적 염색체에 대한 상기 마이크로어레이 상의 관련 지점의 강도와, 상기 대조구 유전자와 관련된 지점의 강도를 비교하여 I-비율(I-ratio)을 수득하고, 그 다음, 각각의 I-비율을 정상적이라고 알려진 게놈 DNA의 시험의 결과로서, 상기 I-비율에 대한 것과 동일한 방식으로 수득된 N-비율과 비교하여 상기 상이한 목적 염색체 중 하나 이상에 대해 염색체 이상이 존재하는지 여부를 진단하며, 개별적인 C-팩터(C-factor)를 수득하기 위해 모든 I 비율과 각 N-비율을 우선 비교한 후에 수득된 평균 C-팩터를 이용하여 상기 I-비율을 최종 진단에 이용하기 전에, 각각의 I-비율을 조정하기 위해 규칙-기반 알고리즘(rule-based algorithm)으로 상기 I 비율을 처리하는 것인 단계를 포함하는, 단일 분석에서 다중의 염색체 이상 중 하나를 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 선택된 진핵 게놈 DNA의 표적 단편 중 2개 이상은 윌리엄스-보이렌 증후군(Williams-Beuren syndrome), 묘성 증후군(Cri du chat syndrome), 및 디조지 증후군(DiGeorge syndrome)으로 이루어진 그룹에서 선택된 염색체 이상을 유발할 수 있는 염색체 DNA의 잠재적 미세결실(microdeletion)과 연관된 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표적 단편 중 2개 이상은 13번 삼염색체성(trisomy), 18번 삼염색체성, 21번 삼염색체성 및 X- 및 Y-염색체 이상으로 이루어진 그룹에서 선택된 염색체 변이를 검출하기 위해 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출가능 표지는 역방향 프라이머에 부착된 색상-검출가능 표지이고, 각각의 쌍에서 정방향 프라이머는 그의 5' 말단에 포스페이트를 보유하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (c)에서, 상기 단계 (b)의 이중-가닥 산물을 먼저 정제하고, 그 후, 상기 정제된 산물의 센스 가닥을 엑소뉴클레아제에 의해 분해시켜 단일-가닥의 표지된 안티센스 가닥을 획득하는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대조구 유전자는 GAPD이고, 상기 프로브의 크기는 25개 내지 60개의 뉴클레오타이드의 범위이고, 상기 표적 단편은 100개 내지 200개의 염기쌍으로 이루어진 길이인 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 PCR 혼합물에서, 상기 진행 DNA의 단편의 길이는 100개 내지 250개의 염기쌍으로 이루어지고, 상기 각각의 쌍의 프라이머 중 하나는 5' 말단에 부착된 색상-검출가능 표지를 가지며, 상기 색상-검출가능 표지를 보유한 단일-가닥 DNA를 획득하기 위해 상기 증폭된 이중-가닥 PCR 산물의 하나의 가닥의 분해(digestion)가 이용되고, 상기 마이크로어레이에 혼성화된 PCR-증폭 산물의 상대량은 상기 마이크로어레이의 비색 이미징(colorimetric imaging)에 의해 검출되는 것인 방법.

청구항 8

(a) 각각의 쌍의 올리고뉴클레오타이드 중 하나의 프라이머는 포유동물 게놈 DNA의 표적 단편의 제1가닥의 3' 뉴클레오타이드 서열에 상보적이고, 각각의 쌍의 올리고뉴클레오타이드 중 나머지 프라이머는 표적 DNA 단편의 제2가닥의 3' 뉴클레오타이드 서열에 상보적이며, 각각의 쌍 중 상기 하나의 프라이머는 그 5' 말단에 공유적으로 결합된 검출가능 표지를 보유하고, 복수의 DNA 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍들은 각각 잠재적인 염색체 이상을 나타내는 선택된 상이한 목적 염색체의 단편을 표적으로 하며, 하나의 쌍은 이상을 검출하기 위해 이용되는 표적 단편이 존재하는 염색체 이외의 염색체 상에 존재하는 대조구 유전자의 단편을 표적으로 하고, 상기 대조구 유전자 단편은 모든 상기 표적 단편의 비교를 위해 동일한 것인, 포유동물 게놈 DNA를 증폭하기 위한 중합효소 연쇄반응에서 프라이머로서 기능할 것인 복수의 쌍의 DNA 올리고뉴클레오타이드;

(b) (i) PCR, (ii) DNA - DNA 혼성화 및 세척, 및 (iii) 비색적 정량을 수행하기 위한 완충액 및 효소;

(c) 하나 이상의 지점에 각각의 개별적인 표적 게놈 DNA 단편의 표지-보유 증폭된 가닥에 상보적인 DNA 서열을 갖는 프로브가 부착되어 있는, 복수의 지점을 보유하는 1개 이상의 마이크로어레이; 및

(d) PCR 증폭 산물과 상기 마이크로어레이 상의 개별적인 지점 간의 혼성화 반응에서 수득한 강도 이미지의 결과를 이용하여 염색체 이상을 진단하는 수단으로서, 상기 진단하는 수단은 1쌍의 중복된 마이크로어레이(duplicate microarray)를 포함하고, 상기 수단은 상기 마이크로어레이의 상기 강도 스캐닝(scanning)의 결과를 분석하기 위해 정상 게놈 DNA의 유사한 시험에서 수득한 이미지 결과 및 규칙-기반 알고리즘을 이용하는 것인 수단을 포함하는, 염색체 이상을 검출하기 위한 키트.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 프라이머 쌍 중 2개 이상은 윌리엄스-보이렌 증후군, 묘성 증후군, 및 디조지 증후군으로 이루어진 그룹에서 선택된 염색체 이상을 유발하는 염색체 DNA의 미세결실에 대한 가능성이 존재하는 포유동물 게놈 DNA의 단편을 표적으로 하는 것인 키트.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 프라이머 쌍은 13번 삼염색체성, 18번 삼염색체성, 21번 삼염색체성 및 X- 및 Y-염색체 이상으로 이루어진 그룹에서 선택된 염색체 변이를 검출하기 위해 선택된 2개 이상의 DNA 단편을 표적으로 하는 것인 키트.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각각의 쌍에서 하나의 프라이머는 형광 염료 표지를 보유하고, 상기 각각의 쌍에서 나머지 프라이머는 5' 말단에 포스페이트를 보유하며, 상기 프라이머 중 한 쌍은 대조구 유전자로서 GAPD(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 표적으로 하고, 상기 프로브의 크기는 25개 내지 60개의 뉴클레오타이드 범위이고, 상기 표적 DNA 단편은 120개 내지 200개의 염기쌍의 길이이며, 상기

효소는 PCR-증폭 산물의 센스 가닥을 분해하기 위한 엑소뉴클레아제를 포함하는 것인 키트.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 미지의 시료 내 모든 염색체 및/또는 구역(section)이 손실 또는 상당히 돌연변이된 염색체를 나타내는 복제수(copy number)를 정상 시료에서 수득한 결과와 정량적으로 비교하여 이수성 및 돌연변이, 특히 미세결실(microdeletion)를 검출하는 것에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 21번 삼염색체성(trisomy)(다운 증후군), 12번 삼염색체성, 18번 삼염색체성, 및 남성 및 여성의 성염색체 기형이 포함되는 이수성(aneuploidy) 및 묘성 증후군(Cri du chat syndrome), 윌리엄스-보이렌 증후군(Williams-Beuren syndrome), 및 디조지 증후군(DiGeorge syndrome) 및 기타 유사 장애가 포함되는 미세결실 증후군과 같은 태아의 염색체 이상에 대한 태아기 검출에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 이수성은 염색체 돌연변이의 일반적인 형태이며, 여기서 세포 내 각 염색체의 수는 정상적인 세포 내에 존재하는 수보다 많이 또는 적게 존재한다. 이배체 보폭에서 1개의 염색체가 결실된 것은 홀염색체(monosomy)라 부르고, 한편 가위의 염색체가 존재하는 것은 삼염색체라고 부른다. 21번 삼염색체는 가위의 21번 염색체가 존재하는 상태이며, 잠재적으로 심각한 정신지체의 선천적 발현인, 다운 증후군을 나타내는 이수성의 가장 일반적인 형태이다.

- [0003] 징후가 존재할 경우에, 양수 또는 음모막 음모 샘플링과 함께 핵형(karyotype)을 이용한 염색체 이상의 태아기 진단은 세계적으로 고도의 선진국에서는 표준이 되어 있다. 핵형은 염색체 보색의 상태를 특징짓는 지표의 집합이며; 핵형에는 총 염색체수, 각 염색체형의 복제수 및 염색체 형태가 포함된다. 핵형은 유사분열의 중기(또는 응집) 염색체를 염색하여 측정한다. 유사분열 중기(metaphase)의 염색체는 최근까지 빈번하게 이용되었는데, 왜냐하면 간기(interphase) 염색체를 시각화하는 것이, 이들의 분산된 상태 및 이들이 그러한 염색에 민감하지 않아서 가능하지 않았기 때문이다. 중기의 염색체는 다양한 세포학적 방법을 사용하여 염색될 수 있으며, 일반적으로 밴드(band)라고 불리는 길이적 분열의 본질로 나타낼 수 있다. 각 염색체의 밴드를 나타내는 양식은 독특하며 따라서, 임의의 기형을 포함한 명백한 염색체의 동정을 가능하게 한다. 불행하게도, 그러한 분석은 1 내지 3주가 소요되는 세포 배양 및 질이 높은 중기 염색체 준비가 요구된다.
- [0004] 세포 배양 없이 염색체를 분석하는 몇몇 시도가 있었으며, 이중 하나는 미국 특허 5,447,841 에 기술되어 있다. 배양되지 않은 간기의 양막 세포에 존재하는 염색체-특이적 DNA 표적에 관하여 형광접합보인법(fluorescence in situ hybridization)(FISH)를 이용하여 신속한 부분적 핵형 분석이 수득된다. 이러한 방법에서, 형광 표지된 프로브는 고체 지지체에 결합되어 있는 염색체 상의 상보적 부위(site)에 혼성화된다. 이러한 방법은 충분히 염색체-특이적인 착색체의 부족을 초래하는 종래의 세포 염색 방법의 제한점을 극복하는데; 특히 염색체의 DNA, 염색체의 특이 서브셋 또는 특이적 염색체의 특이적 하위영역(subregion)에 혼성화될 수 있는, 표지된 핵산 절편(fragment)의 이중의(heterogeneous) 혼합물을 함유한 시약이 제공된다. 이 FISH 방법이 중기 및 간기의 세포 모두에 있어서 신속하고 고감도의 염색체 이상의 검출의 가능성을 넓힌다고 할지라도, 여기에는 하기의 몇몇 단점이 있다: 1) 미세결실과 관계된 염색체 이상의 수를 위해서는, 여전히 중기 염색체를 필요로하는데, 이는 이들의 신호 민감성의 결핍에 기인하고, 2) 동시에 진단될 수 있는 염색체의 수는 형광 현미경 필터의 분해능에 따라 제한된다. 게다가, FISH 방법의 수행을 위하여는, 고도로 숙련된 기술자 및 고가의 장비 및 시약이 요구된다.
- [0005] 제2의, 비연관 주형을 함께 증폭하여 PCR에 의해 cDNA 종을 정량하는 방법은 문헌[Rappolee, D.A., et al., Science 241:708-712(1988)]에 게재되어 있다. 이 방법은 사이클수 및 각 종의 개시 mRNA의 양이 포함되는 특정 변수에 결정적이지게도 의존적이다. 이러한 변수가 적절하게 조절될 경우에도, 관계가 없는 대조구 주형이 미지의 시료와 엄밀하게 동일한 속도로 증폭될 수 있는 것은 아니다. 두 개의 주형의 증폭 속도에 있어서의 작은 차이는 PCR 동안 확대되며, 최종적인 시험에서 존재하는 미지의 주형의 양이 심하게도 과대 또는 축소 측정될 수 있다.
- [0006] PCR이 유전적 질병의 태아기 진단을 위해 사용되어, 태아 DNA가 병의 원인이 될 수 있는 유전자의 돌연변이된 형태를 보유하고 있는지 여부를 결정하기 위해 태아 DNA를 분석한다는 사실이 문헌[Amhelm, Norman et al. Polymerase Chain Reaction, Chemical & Engineering News, 36-47(October 1, 1990)]에 보고되어 있다. PCR 증폭에 이어서, 표지된 프로브는 질병 유발 대립유전자의 존재를 위해 PCR 시료를 시험하는데 이용된다. 이 문헌에는, 몇몇 다른 유발 유전자의 존재 또는 부재는 단일 시료에서 측정될 수 있다고 설명되어 있다. 이 문헌은 또한, PCR-증폭 산물을 나일론 멤브레인(membrane) 상에 스폿팅(spotting)하고, 그 다음 프로브가 방사능으로 표지되거나 또는 형광 또는 화학적발광에 의해 검출 가능한 분자로 표지되는, 당해 PCR 산물에 특이적으로 결합할 단일 가닥 DNA 프로브에 점-운반(dot-carrying) 멤브레인(membrane)을 노출시켜 점 블록 형태를 이용하는, 병원체를 발견하는 분석 방법에 있어서, PCR 검출 방법은 효소, 화학적발광 및 형광을 기반으로한 보고자(reporter)를 사용한다고 지적하고 있다. 이러한 절차는 한번에 하나씩의 분석대상물을 스크리닝(screening)하는 것으로 제한된다. 선택적으로 병원체-특이적 산물 그 자체를 뉴클레오타이드의 측쇄 내 표지와 혼합하여 표지하는 PCR의 이용이 기술되어 있는데, 여기서 병원체-특이적 산물은 프라이머가 표적에 결합하거나 또는 폴리머라아제(polymerase)에 의해 연장되는 능력을 저해하지 않는다. 플루오레세인(fluorescein)과 같은 형광 염료, 또는 비타민 비오틴의 혼합은 짧은 링커 아암(linker arm)에 의해 프라이머의 5' 말단 또는 프라이머 서열 내의 베이스 중 하나에 연결될 수도 있다는 것이 언급되어 있다. 그 다음, 일단 적절하게 표지되고, 증폭된 PCR 산물이 생산되면, 고체 지지체에 부착되어 있는, 표지되지 않은 병원체-특이적 프로브와 "캡처링(capturing)"에 의해 검출될 수 있다. 이러한 선택적인 방법은, 이 방법이 세투스 코포레이션(Cetus Corporation)에서 개발될 당시 역점적 절차(reverse dot blot procedure)로 불렸다. 과량을 표지된-프라이머 또는 이의 유사체 모두를 제거하기 위해 세척한 후, 분석대상물의 존재는 박테리아 단백질 스트렙타비딘(streptavidin)과 결합하고, 이후 효소로 처리하여 검출했다. 또 다른 캡처 방법으로는 형광 염료로 한 프라이머를 표지하고, 나머지 프라이머를 비오틴으로 표지한 후, 이어서 이중-나선 산물을 스트렙타비딘으로 캡처하고, 형광을 시험하는 것이 제안되어 있다. 이러한 캡처방법은 표지된 것 중 하나인, 상이한 특이적 병원체에 대한 한 집단의 프라이머를 이용하여 상

이한 진단 서열의 동시 검출을 가능하게 할 것이라고 언급되어 있다. 총 PCR 산물은 구별되는 영역을 갖는 적절한 나일론 막 지지체에, 병원체 중 하나의 PCR 산물에 특이적인 각각의 캡처 프로브와 함께 혼성화된다. 이후, 이 지지체는 혼성화에 이어 강제적으로 세척되고, 표지가 비오틴이라면, 스트렙타비딘-효소 콤플렉스의 첨가에 이어서 절절한 효소 기질이 특이한 영역에서 색상을 산출함에 의해 병원체 중 임의의 하나에 대한 존재를 나타낼 것이다. 이러한 절차는 보다 많은 발현이 포함될 수 있는 본래의 점적법(dot blot) 이상으로 바람직할 수 있는데, 이는 별도의 혼성화 실험에서 각각의 표지된, 병원체-특이적 프로브와 함께 표지되지 않은 PCR 산물의 상이한 부분표본이 시험될 것이 요구되기 때문이다.

[0007] 번(Bunn) 외에게 허여된 미국특허 제5,213,961호는 길항적 방법론에 의한 정량적 PCR 방법을 제시하고 있는데, 여기서 DNA 증폭에 영향을 미치는 매개변수 및 주형(시험구 및 대조구 모두)에서의 특징적인 상이점에 대한 비율 및 복제수가 논의되어 있다. 여기에는, 이 방법이 체세포 돌연변이를 검출하는데 이용될 수도 있다는 것이 언급되어 있다. 번 외 다수는, DNA 프라이머의 본래 성질 및 이들의 개별적인 프라이머 결합 부위로부터 주로 발생하는 증폭 과정상의 다양한 매개변수의 효과를 주장하고있는데; 그런, 이 시스템은 표적 및 시료가 PCR에 의해 동일한 속도로 함께 증폭되도록, 표적과 충분히 근접한 표준(standard)의 이용에 제한되어있다. 게다가, 이 표준은 그 길이가 효소 작용에 의해 나중에 변환될 수 있어서, 표준 및 표적이 전기영동에 의해 분리 및 정량되도록, 표적과는 상이해야 한다.

[0008] PCT 공개공보 출원 WO 94/03638에는 염색체 DNA 내에 존재하는 단기일렬반복 DNA 서열을, 단기일렬반복 서열을 증폭하는데 이용하는 PCR 방법론과 함께 이용하여 이수성을 검출하는 다른 방법이 제시되어 있다.

[0009] 한(Han)에게 허여된 미국특허 제5,888,740호는 유전적 DNA 수준의 정량적 측정을 위해 PCR 반응 동안 내부 대조구로서 가공된 DNA 주형을 이용한다. 이러한 대조구 DNA 주형은 시험 시료의 DNA 주형과 동일한, PCR 반응을 위한 프라이머의 서열을 보유하도록 설계된다. 이 목적은 동일한 속도로 증폭을 진행시키고, 이로써 증폭 속도의 제어를 제공하는 것이다. 그러나, 이러한 방법에는 각각의 염색체에 대하여 특이적인 내부 대조구, 즉 복합체가 요구된다. 이외에도, 각 염색체에 대한 PCR 반응은 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate) 또는 다른 용기의 별도 웰(well)에서 수행되어야만 한다.

[0010] 케어리(Carey)에게 허여된 미국특허 제 6,551,783호는 형광 프로브가 퀸처(quencher) 염료의 근처에서 빠져나오게 하는 방법으로, 증폭될 DNA의 가닥에 형광 마커 또는 보고자 프로브를 치환하는 시스템을 이용한 동시적 PCR 기반의 분석에서 2개의 표적 유전자의 발현을 정량하는 방법을 교시하고 있다. 두 개의 상이한 형광 프로브를 사용함으로써, 두 유전자의 PCR 다중화가 동시적으로 효과를 발생한다. 하나의 표적 유전자는 GAPDH 또는 DAD-1 과 같이 보편적으로 발현된 표지 유전자이다. 교시된 이 방법은 한번에 하나의 미지 표적에 제한되어 있다.

[0011] WO94/23023에 게시되어 있는 또 다른 방법은, 표적 유전자, 하우스키핑(housekeeping) 유전자 및 점돌연변이, 삽입 또는 결실과 같은 돌연변이와 함께 이들의 경쟁적 주형에 대한 다중 PCR을 기초로 하여 표적 유전자를 정량하는 것이다. 이 방법은 복잡 및 난해하며, 최종 분석에서 겔전기영동을 이용한다.

[0012] 염색체 이상에 대한 상기 언급된 검색 방법 중 어느 것도, 다중의 이상을 동시에 검색하기에 완전히 만족스럽다고 느껴지지 않았으며, 따라서 이용하기에 쉽고 신속한 결과를 제공하는 포괄적인 검색 절차가 계속하여 연구되고 있다.

발명의 상세한 설명

[0013] **발명의 개요**

[0014] 본 발명은 게놈 유전자의 다중 PCR 및 PCR 산물과의 혼성화를 위해 정량가능한 마이크로어레이 플랫폼의 조합을 이용하여 종래 방법의 단점을 극복하는 것으로서 하기의 특징을 제공한다: 1) 이수체 및 돌연변이, 특히 미세결실을 동시에 커버하는 포괄적인 검색; 2) 24-48 시간 내에 신속한 결과를 산출; 및 (3) 사용에 있어서의 용이성. 마이크로어레이의 이미지 패턴을 해석하기 위한 규칙-기반(rule-based) 진단 알고리즘의 이용은 정량된 결과의 정확도를 증강시킨다. 본 발명은 신속, 정확, 간단 및 저비용의 염색체 이상 검출 키트 및 방법을 제공하며, 이는 이수성(21번 삼염색체, 13번 삼염색체, 18번 삼염색체, 및 성 염색체(예, X 염색체), 기형) 및 윌리엄스-보이렌 증후군, 묘성 증후군, 디조지 증후군, 프라다-윌리 증후군(Prader-Willi syndrome) 및 안젤만 증후군(Angelman syndrome)(양자는 모두 15번 염색체 부분의 결실과 관련되어 있음), 칼만 증후군(Kallman's syndrome), 및 스테로이드 설파타아제(steroid sulfatase) 증후군이 포함되는 미세결실의 동시 검출을 위해 이용될 수 있다.

- [0015] 보다 구체적으로는, 본 발명은 PCR, 염색체-특이적 프로브와의 혼성화, 및 진단을 이용하는, 다운 증후군, 및 기타 이수성 및 염색체 이상의 태아기 검출 키트 및 방법을 제공한다. 진단 결과는 규칙-기반 알고리즘을 이용하여 증강된다.
- [0016] 하나의 특정 양태에 있어서, 본 발명은 단일 분석에서 다중의 염색체 이상 중 임의의 하나를 검출하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (a) (i) 진핵 게놈 DNA(eukaryotic genomic DNA); (ii) 각각의 쌍에서 하나의 프라이머(primer)는 진핵 DNA의 제1 DNA 가닥의 표적 단편의 3 서열에 상보적이고, 나머지 프라이머는 표적 단편의 제2 가닥의 3 서열에 상보적이며, 진핵 DNA의 단편의 길이는 약 50 내지 약 300 베이스페어(base pair) 사이이고, 상기 각각의 쌍의 프라이머 중 하나는 그 5' 말단에 부착된 검출가능 표지를 보유하며, 상기 복수의 프라이머 쌍들은 각각 잠재적인 염색체 이상을 나타내는 당해 선택된 상이한 염색체의 단편(segment)을 표적으로 하며, 하나의 쌍은 대조구 유전자의 단편을 표적으로 하는 것이 특징인, 복수의 쌍의 포워드(forward) 및 리버스(reverse) DNA 프라이머 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide); 및 (iii) PCR 증폭을 수행하는데 필수적인 PCR 완충액 및 효소를 함유하는 성분을 용기에서 혼합하여 중합효소 연쇄반응(PCR)의 혼합물을 제조하는 단계, (b) 약 5 내지 약 60회 사이의 온도 사이클로 PCR을 수행하여, 증폭된 PCR 산물을 조성하는 단계, (c) 단계 (b)의 상기 산물을 정제하고, 검출가능 표지를 보유하는 단일-가닥 DNA를 획득하는 단계, (d) 각각의 상기 표적 단편의 상기 가닥 중 하나의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 보유하는 DNA 올리고뉴클레오티드 프로브를 각각 함유하는 복수의 지점(spot)을 보유한 마이크로어레이(microarray)에 단계 (c)의 산물을 접촉시키는 단계, (e) 상기 DNA 올리고뉴클레오티드 프로브(probe)와 상기 PCR-증폭 표지-함유 단일-가닥 산물을 혼성화시키는(hybridize) 단계, (f) 마이크로어레이를 이미지화하여, 마이크로어레이에 혼성화된 PCR-증폭 산물의 존재 및 상대량을 검출하는 단계 및 (g) 선택된 염색체의 상기 각각의 표적 단편에 대한 상기 마이크로어레이 상의 관련 지점의 상기 이미지와, 상기 대조구 유전자와 관련된 지점의 이미지를 비교하고, 그 다음, 정상적이라고 알려진 게놈 DNA의 유사한 시험에서 수득한 결과와 비교하여, 상기 선택된 상이한 염색체 중 1 이상에 관련하여 염색체 이상이 존재하는지 여부를 진단하는 단계를 포함한다.
- [0017] 또 다른 특정 양태에서, 본 발명은 염색체 이상을 검출하는 키트를 제공하는데, 이 키트는 (a) 각각의 쌍의 올리고뉴클레오티드 중 하나의 프라이머는 포유동물 게놈 DNA의 표적 단편의 제1가닥의 3' 뉴클레오티드 서열에 상보적이고, 각각의 쌍의 올리고뉴클레오티드 중 나머지 프라이머는 표적 DNA 단편의 제2가닥의 3' 뉴클레오티드 서열에 상보적이며, 각각의 쌍 중 상기 하나의 프라이머는 그 5' 말단에 공유적으로 결합된 검출가능 표지를 보유하는 것이 특징인, 포유동물 게놈 DNA를 증폭하기 위한 중합효소 연쇄반응(PCR)에서 프라이머로서 기능할 것인 복수의 쌍의 DNA 올리고뉴클레오티드; (b) 잠재적인 염색체 이상을 나타내는 당해 선택된 상이한 염색체의 단편을 증폭하는 것을 목표로 하고, 그 중 한 쌍은 대조구 유전자의 단편을 증폭하는 것을 목표로 하는 상기 복수의 쌍의 DNA 프라이머; (c) (i) PCR, (ii) DNA - DNA 혼성화 및 세척, 및 (iii) 비색적 정량을 수행하기 위한 완충액 및 효소; (d) 적어도 하나의 지점에는 각각 개별 표적 게놈 DNA 단편의 표지-보유 증폭된 가닥에 상보적인 DNA 서열이 부착되어 있는, 복수의 지점을 보유하는 1 이상의 마이크로어레이; 및 (e) PCR 증폭 산물과 마이크로어레이 상의 각 지점 사이의 혼성화 반응에서 수득한 강도 이미지의 결과를 이용하여 염색체 이상을 진단하는 수단으로서, 정상 게놈 DNA의 유사한 시험에서 수득한 이미지의 결과도 이용하는 수단을 포함한다.
- [0018] 추가적인 특정 양태에서, 본 발명은 단일 분석에서 다중의 염색체 이상 중 임의의 하나를 검출하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 하기의 단계를 포함한다: (a) (i) 진핵 게놈 DNA; (ii) 각각의 쌍에서 하나의 프라이머는 진핵 DNA의 제1 진핵 DNA 가닥의 표적 단편의 3 서열에 상보적이고, 나머지 프라이머는 표적 단편의 제2가닥의 3 서열에 상보적이며, 진핵 DNA의 단편의 길이는 약 100 내지 약 250 베이스페어 사이이고, 상기 각각의 쌍의 프라이머 중 하나는 그 5' 말단에 부착된 색상-검출가능 표지를 보유하며, 상기 복수의 프라이머 쌍들은 잠재적인 염색체 이상을 나타내는 당해 선택된 상이한 염색체의 단편을 표적으로 하며, 하나의 쌍은 대조구 유전자의 단편을 표적으로 하는 것이 특징인, 복수의 쌍의 포워드 및 리버스 DNA 프라이머 올리고뉴클레오티드; 및 (iii) PCR 증폭을 수행하는데 필수적인 PCR 완충액 및 효소를 함유하는 성분을 용기에서 혼합하여 중합효소 연쇄반응(PCR)의 혼합물을 제조하는 단계, (b) 약 5 내지 약 60회 사이의 온도 사이클로 PCR을 수행하여, 증폭된 PCR 산물을 조성하는 단계, (c) 단계 (b)의 상기 산물을 정제하고, 증폭된 이중-가닥 PCR 산물의 한 가닥을 분해하여 색상-검출가능 표지를 보유하는 단일-가닥 DNA를 획득하는 단계, (d) 상기 표적 단편의 상기 가닥 중 하나의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 보유하는 DNA 올리고뉴클레오티드 프로브를 각각 함유하는 복수의 지점을 보유한 마이크로어레이에 단계 (c)의 산물을 접촉시키는 단계, (e) 상기 DNA 올리고뉴클레오티드 프로브와 상기 PCR-증폭 표지-함유 단일-가닥 산물을 혼성화시키는 단계, (f) 마이크로어레이를 비색적으로 이미지화하여, 마이크로어레이에 혼성화된 PCR-증폭 산물의 존재 및 상대량을 검출하는 단계; 및 (g) 우선 각각의

당해 상기 염색체에 대한 상기 마이크로어레이 상의 관련 지점의 상기 이미지를 상기 대조구 유전자에 관련된 지점의 이미지와 비교하여 I-비율을 수득하고; 그 다음 각각의 I-비율을 정상적이라고 알려진 게놈 DNA의 유사한 시험의 결과로서 수득된 N-비율과 비교하여 당해 상기 상이한 1 이상의 염색체에 관련하여, 염색체 이상이 존재하는지 여부를 진단하는 단계

[0019] **바람직한 구체예의 상세한 설명**

[0020] 상기 일반적으로 나타낸 바와 같이, 본 발명은 21번, 18번, 13번 삼염색체성 및 성 염색체 기형이 포함되고 때때로 유전자수 기형 또는 변이(aberration)라고 불리는 염색체 이수성의 검출을 용이하게 한다. 동시에, 염색체 돌연변이, 특히 미세결실 증후군이라 불리는 다양한 이상 중 하나를 초래하는 유전자 서열의 일부분의 결실 형태로 존재하는 것들은, 영향을 받는 유전자 영역(즉, 결실 영역) 내에 존재하는 또는 이를 포함하는 표적 서열을 선택하고, 그러한 결실이 일어난 영역임을 나타내는 유전자수(gene dose)를 내부 대조구 및 정상 DNA와 비교하여 검출될 수 있다. 몇몇 그러한 염색체 미세결실 증후군 및 표적이 될 결실 영역의 예에는: 프라더-윌리 및 안젤만 증후군(결실 부위 15q11-q13), 윌리엄-보이렌 증후군(결실 부위 7q11.23), 묘성 증후군(결실 부위 5p), 칼만 증후군(결실 부위 Xp22.3), 디 조지 증후군(결실 부위 22q 11.2), 듀센/베커(Duchenne/Becker) 증후군(결실 부위 Xp21), 및 스테로이드 설페타아제 결핍증(결실 부위 Xp22)가 포함된다. 몇몇 비교에 대해서는, 동일한 성별의 실험유전자의 정상 DNA와 비교했을 때, 가장 좋은 비교 결과가 나타났다.

[0021] 하기의 용어 및 약어의 정의는 이하 설명되는 상세한 설명을 보다 잘 이해할 수 있도록 제공되는 것이다.

[0022] 염색체 이상(Chromosomal disorder)이란 하나의 염색체 또는 다수의 염색체 내 임의의 심각한 기형을 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, 이에 21번 염색체 내 삼염색체성, X-염색체 및 Y-염색체 내 변이, 및 결실, 삽입 및/또는 개별 유전자의 변형과 같은 돌연변이의 검출이 포함된다.

[0023] 혼성화(hybridization)는 본 출원에서, 2 가닥 중 한 가닥이 바람직하게는 고체 표면 또는 매트릭스 상에 고정되어 있는 DNA의 상보적인 가닥 사이에 이중(duplex) 구조의 형태를 나타내기 위해 사용된다.

[0024] 어닐링(Annealing)은 본원에서, 프로브 또는 프라이머가 분석대상 핵산 내에 이들의 상보적인 서열에 결합할 수 있도록 하는 혼성화 조건 하에, 서서히 감소하는 온도 또는 단일 온도 중 하나에서 단일-가닥 또는 열-변성 이중 핵산 분석대상물을 올리고뉴클레오티드 프로브 또는 프라이머와 함께 배양하는 것을 의미하기 위해 사용된다.

[0025] 분석대상물(analyte) 또는 분석대상 핵산은 분석의 목적이 되는 DNA 시료 내의 화합물을 나타내기 위해 사용된다.

[0026] 표지 또는 검출 표지(또는 "태그(tag)")는 핵산 서열의 검출 및/또는 정량을 가능하게 하는 핵산 서열에 부착될 수 있는 치환체를 말한다. 그 예에는 ³²P, ³³P, 및 ³⁵S와 같은 방사성표지; 형광물질, 화학적발광물질 또는 착색 화합물과 같은 비색적 지시약(colorimetric indicator); 비오틴과 같은 리간드; 및 질량 또는 기타 분광학적 특성에 의해 구별가능한 화학적 그룹이 포함된다. 적절한 표지의 보다 구체적인 예에는 잔틴(xanthine) 염료, 로다민(rhodamine) 염료, 나프틸아민, 벤즈옥사디아졸, 스틸벤, 피렌(pyrene), 아크리딘(acridine), 시아닌(Cyanine) 3 및 시아닌 5가 포함된다. 표지는 화학 반응, 효소 반응, 또는 중간체 리간드와 표지를 혼성화 또는 어닐링함에 의한 간접적인 첨가가 이용될 수 있다고 할 지라도, 바람직하게는 프라이머의 일부로서 분석대상 핵산에 직접 혼입하여 삽입된다.

[0027] 프로브는 혼성화 반응을 통해 분석대상 핵산에서 그의 상보적인 서열에 결합하는 시약으로서 사용되는 핵산 서열을 말한다. 포획 프로브(Capture probe)는 본원에서, 혼성화 반응에서 고체 표면 상에 상보적 서열을 함유하는 핵산 또는 올리고뉴클레오티드의 포획을 가능하게 하는, 고체 표면에 대하여 일 말단에 결합된(즉, 구속된) 프로브를 의미하기 위해 사용된다.

[0028] 서열은 특정한 순서 및 사슬 길이로 함께 연결되어 있는, DNA 내 A, G, C, T 잔기를 함유하는 핵산 내에 염기의 선(string)을 의미한다.

[0029] 보족 또는 상보적 서열은 2-가닥(이중) 구조를 형성할 수 있는 두 개의 서열을 말한다.

[0030] 표적, 표적 서열, 표적 가닥 또는 표적 핵산은 본원에서, 예를 들어 특정 DNA 프로브와의 혼성화를 통해 그 존재가 검출의 목적인 핵산 서열을 언급하기 위해 사용된다. 용어 "표적이 된(targeted)"은 때때로 염색체의 특정 핵산 단편의 선택을 의미하는 넓은 의미로 사용된다.

- [0031] 구속된, 또는 표면-구속(surface-tethered)은 본원에서, 표면상의 작용기와 DNA 프로브의 일 말단에서의 작용기 사이에 형성되는 공유결합 또는 이외의 강한 결합을 통해, 어떤 표면과 함께 일 말단에 결합된 올리고뉴클레오타이드 DNA 프로브를 언급하기 위해 사용된다.
- [0032] 고체상 혼성화(solid phase hybridization)는 이중 구조의 형성에 참여하는 2개의 "반응물 가닥" 중 하나가 고체 지지체 상에 구속 또는 고정화되도록 수행되는 혼성화 반응을 의미한다.
- [0033] 플랭킹(flanking) 또는 경계(bordering)는 염색체의 표적 DNA 단편의 말단에 근접, 인접하고/인접하거나 그 말단을 포함하는 핵산 단편을 언급하기 위해 사용된다.
- [0034] 올리고뉴클레오타이드는 화학적으로 합성될 수 있는, 전형적으로 약 100 뉴클레오타이드까지의 길이를 갖는 짧은 DNA 가닥을 의미한다.
- [0035] 유전자는 유전 기능의 단위로서, 단백질을 부호화(coding)하는 서열, 유전자 내에 산재된 인트론(비부호화(noncoding)) 서열, 및 유전자 조절 기능성의 추가적인 서열이 포함된다.
- [0036] 마이크로레이 또는 DNA 칩은 전형적으로 축소화된 포맷(format)에서, 1mm 미만의 중심-대-중심 간격으로 배열된 개별적 DNA 프로브와의 복수의 혼성화 반응에 대한 동시적인 분석을 가능하게 하는, 표면 또는 표면에 고정된 미세지점(microspot) 상에 형성된 표면-구속 DNA 프로브의 2차원적 또는 3차원(3D)적인 배열을 의미한다.
- [0037] 프라이머는 유리 3'-OH 말단을 보유하는 올리고뉴클레오타이드로서, "주형(template) 가닥"과 함께하는 염기쌍이 될 것이며, 이로써 중합효소에 의해 신장될 수 있다. 예를 들어, DNA 주형으로 어닐링된 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 DNA 중합효소를 위한 기질(데옥시뉴클레오시드 5'-트리포스페이트와 함께)로서 기능할 수 있으며, 이 결과가 PCR 반응에서 "프라이머 신장(primer extension)"이다.
- [0038] 프라이머 쌍(pair)은 표적 핵산 단편의 반대 가닥에 결합한 2개의 프라이머를 의미한다.
- [0039] PCR 절편은 중합효소 연쇄반응에 의해 형성된 한정된 길이(주형 상의 시발(priming) 부위 사이의 간격에 의해 한정되는)의 DNA 절편을 의미한다.
- [0040] 변성(denature) 또는 변성된이란 것은 가장 일반적으로, 온도의 상승("열-변성")으로 이중 나선을 불안정화시키는 조건 하에서 이중 핵산 분자의 2개 가닥의 분리(해리)를 의미한다.
- [0041] 5'-말단/종말은 뉴클레오타이드의 데옥시리보스(deoxiribose) 상에 에스테르화 되지 않은 탄소-5를 갖는 뉴클레오타이드를 함유하는 핵산 사슬의 말단을 의미한다.
- [0042] 3'-말단/종말은 뉴클레오타이드의 데옥시리보스 상에 에스테르화 되지 않은 탄소-3을 갖는 뉴클레오타이드를 함유하는 핵산 사슬의 말단을 의미한다.
- [0043] PCR - 중합효소 연쇄반응
- [0044] SSC - 구연산나트륨 염수(saline sodium citrate), 150mM 염화나트륨 및 15mM 구연산나트륨을 함유하는 용액.
- [0045] 출원인의 진단 방법은 PCR을 이용하여 초기에, 총 DNA에 비하여 적은 양으로 존재하는 특정 DNA 서열을 증폭한다. PCR을 이용함으로써 특정 DNA 서열은 10만배 이상으로 증폭되어 개시 DNA에 존재할 때, 그 검출을 용이하게 할 수 있게된다.
- [0046] 본원에 참고인용된, 미국특허 제4,683,202호, 제4,683,195호, 제4,800,159호 및 제4,965,188호는 본 발명에서 이용하는 지금은 잘 알려진 PCR 방법의 상세한 설명을 제공한다. PCR은, 반대 및 겹치는 방향으로 프라이머-유도 DNA 합성에 효과가 있는 당해 특정 부위를 플랭킹하는 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용하여, DNA 서열을 수 시간 내에 다소의 오차범위로 증폭한다. 그러한 플랭킹 서열(flanking sequence)에 관한 지식은 프라이머로서 기능할, 대개 약 20 뉴클레오타이드 길이의 2개의 합성된, 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 설계하는데 이용된다. 이러한 각각의 프라이머의 서열은 미리 선택된 이의 개별적인 플랭킹 서열과 상보적인 염기쌍을 보유하도록 선택된다. PCR은 이중-가닥의 표적 DNA를 변성시킴으로서 시작되고, 이어서 프라이머(각각의 가닥 당 하나씩)를 표적 분석대상물의 좌우 측면에 위치하는 서열에 어닐링한다. 각각의 프라이머는, 프라이머의 3 히드록실 말단이 표적 분석대상 서열과 마주하도록 하나의 플랭킹 서열과 이중구조(duplex)를 형성한다. DNA 중합효소 및 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 첨가는 새로운 DNA 가닥의 형성을 유발하는데, 프라이머에서 시작하여, 표적 서열을 가로질러 신장하며, 이로써 표적의 복제물(copy)을 제조한다. 이러한 단계, 즉, DNA 변성, 프라이머 어닐링 및 DNA 중합효소 신장(extension)은 하나의 PCR 사이클을 나타내며; 각각의 단계는

적절한 온도에서 수행된다. 이 신장된 산물은 일반적으로 표적 서열의 다른 말단에서 프라이머에 상보적인 서열로 신장되며, 이를 포함하게 된다. 따라서 각각의 새로운 신장된 산물은, 이후 변성으로부터 시작되는 다음 사이클의 주형으로서 기능하게 된다.

[0047] 고온에서의 주형의 변성, 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 재어닐링(reannealing), 및 중합효소-매개 신장의 반복된 사이클을 이용함으로써, DNA 서열은 충실하게도 수십만 배 증폭될 수 있다. 일반적으로 PCR은 각각의 주형에 대한 2개의 상이한 프라이머가, 1개 센스 가닥의 포워드 프라이머 및 1개 안티센스 가닥의 역방향 프라이머로 각각 설계될 수 있도록, 증폭될 주형 또는 단편의 5' 말단 및 3' 말단 모두의 서열에 대한 지식이 요구된다.

[0048] 본 발명의 PCR 과정은 당해 바람직한 DNA 단편의 DNA 합성의 시발점(point of initiation)으로서의 역할을 할 수 있는 상이한 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 복수의 프라이머 쌍을 이용한다. 이들 각각은 증폭되기를 희망하는 이중구조 단편의 두 개의 3 보더(border) 중 하나에 상보적이며; 이들은 종종 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 불린다. 정방향 프라이머는 유전자의 5 영역에서 3 영역으로 진행하고(즉, 이들은 비부호화(noncoding) 또는 안티센스 가닥에 상보적이다), 역방향 프라이머는 유전자의 3 영역에서 5 영역으로 진행한다(즉, 이들은 부호화 또는 센스 가닥에 상보적이다). 이들 프라이머는 프라이머의 신장을 유발하는 조건 하에서 기타 PCR 시약, 즉 4개의 상이한 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트(또는 이들의 유사체), 적절한 중합효소 및 적절한 완충액("완충액"은 원하는 pH 및 이온 강도 등을 달성하게 할 제제를 함유한다)과 혼합되고 적절한 온도에서 유지된다. 중합효소가 Taq 중합효소 또는 동등한 중합효소인 PCR 방법에서는, 완충액은 마그네슘염, 바람직하게는 $MgCl_2$ 1.2-2mM, 뉴클레오타이드 트리포스페이트 각각 15-200 μM , 프라이머 각각 1 μM 을 함유할 수 있으며, 예컨대 50mM KCl, pH 8.4에서 10mM 트리스(Tris) 완충액 및 100 $\mu g/ml$ 젤라틴을 함유할 수 있다. PCR 증폭을 위한 그러한 키트는 다수의 공급자로부터 상업적으로 입수 가능하다.

[0049] 인간 염색체 이상의 검출을 위한 적절한 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 프라이머 서열의 설계 및 최적화에 대하여 현재 이용가능한 서열 정보 및 당해 기술분야에 알려진 표준 기술을 이용하여 용이하게 설계할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 당해 기술분야에 공지된 표준 방법, 예컨대, 바이오서치(Bioserch)(캘리포니아주 노바토 소재)에서 입수가능하고; 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)(캘리포니아주 포스터 시티 소재) 및 기타 회사에서 상업적으로 입수가능한 것들 중에 하나인 자동화된 DNA 합성기의 이용에 의해 합성될 수 있다. 본원에서 사용되는 프라이머는 특히 중요한 이상을 나타낼 염색체의 DNA 단편에 인접한 선택된 플랭킹 부위에서 하나의 가닥에 특이적으로 혼성화되기에 충분한 길이이다. 그러한 DNA 단편의 길이에는 14, 15, 16, 17, 18 또는 19 베이스페어(base pair)만큼 짧은 길이가 포함될 수 있으나, 종종 이들은 통상 20, 30, 40, 50, 50, 70, 80, 90 또는 100 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 증폭될 DNA 단편은 종종 10 내지 250 뉴클레오타이드 베이스페어(bp)일 것인데; 그러나, 예컨대 이수성을 분석하는 경우에는 50 내지 300bp의 단편을 증폭하는 것이 바람직할 수 있다. 프로브 및 프라이머의 길이는 14, 15, 16, 17, 18 또는 19 뉴클레오타이드만큼 짧을 수 있으나, 이들은 통상 적어도 20, 30, 40, 또는 50 뉴클레오타이드 또는 그 이상을 함유한다.

[0050] 각각의 프라이머는, 적절한 중합효소 및 상기 언급된 것과 같은 기타 시약의 존재 하에 신장될 DNA 산물의 합성을 개시 또는 시발시킬 수 있도록 충분히 길어야 한다. 적절한 프라이머의 길이는 잘 알려진 바와 같이, 다양한 요소에 의해 좌우되는데; 전형적으로, 본 발명을 실시하는데 있어서는, 통상 약 15-40 뉴클레오타이드 잔기(residue)를 함유하는 프라이머가 이용된다. 상대적으로 짧은 프라이머 분자는, 연쇄 신장 반응을 지지하는 프라이머-주형 복합체를 형성 및 유지하기 위해서, 일반적으로 낮은 반응 온도를 요구한다.

[0051] 이용되는 프라이머는 증폭될 것인 선택된 서열을 함유하는 핵산에 실질적으로 상보적이어야 하는데, 다시 말해서, 프라이머는 선택된 서열(또는 그의 보족)을 함유하는 핵산에 결합, 즉 혼성화되어야 한다. 프라이머 서열이 완벽하게, 주형의 정확한 보족일 필요는 없으나; 예를 들어, 상보적이지 않은 뉴클레오타이드 절편 또는 기타 모이어티(moiety)가 프라이머의 5' 말단에 부착될 수 있다. 그러나, 프라이머 서열의 나머지는 바람직하게는 선택된 핵산서열에 상보적이며, 그러한 것들이 전형적으로 이용된다.

[0052] 일반적으로, 핵산 서열을 따라 원하는 상대적인 위치에 위치하는 원하는 서열의 상이한 가닥에 혼성화될 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 제조될 수 있도록 충분히 자세하게 서열의 양 말단에 염기의 충분한 수가 알려져 있는 한, 임의의 특정 핵산 서열이 PCR 방법에 의해 증폭될 수 있다. 이 결과, 하나의 프라이머에서 합성된 신장 산물(extension product)은 그 주형(보체)에서 분리된 후에, 다음 사이클에 지정된 길이의 핵산으로 신장될 다른 프라이머의 주형으로서 역할을 할 것이다.

[0053] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 프라이머는 쌍으로 이용된다. 프라이머 중 하나, 즉 정방향 프라이머는 표적 DNA 단편의 안티센스의 3' 말단에 위치하는 서열에 상보적이고; 이 서열은 표적 단편의 안티센스 가닥의 3' 말

단에 근접, 인접하고/하거나 이를 포함한다. 나머지 프라이머, 즉 역방향 프라이머는 표적 DNA 단편의 센스 또는 부호화 가닥의 3' 말단에 위치하는 서열에 상보적이고; 이는 표적 단편의 센스 가닥의 3' 말단을 포함하고/하거나, 인접 또는 근접하여 위치한다.

[0054] 이 프라이머는 바람직하게는 약 15 내지 약 40 뉴클레오티드 사이의 길이이며, 보다 바람직하게는 약 18 내지 약 35 뉴클레오티드 사이의 길이이다. 마이크로어레이 상에 부착 또는 구속된 프로브는 바람직하게는 약 25 내지 약 60 뉴클레오티드 사이의 길이이며, 보다 바람직하게는 약 35 내지 약 50 뉴클레오티드 사이의 길이이다. 표지된 산물을 포획하기 위한 프로브 서열은 적당히 엄중한 혼성화 조건 하에서 혼성화되기에 충분한 뉴클레오티드를 함유해야 한다. 프로브가 2D 어레이와 같은 평판 부재의 표면에 부착될 수 있다고 할 지라도, 이하 언급하는 바와 같이 3D 어레이가 바람직하다.

[0055] 태아 DNA와 같은, 인간 DNA, 종종 양수에서 수득되거나, 또는 산모의 혈액에서 수득 가능한 태아기의 DNA는 적절하게도 다수의 공급자에게서 입수가능한 형태의 상업적 DNA 정제 키트를 이용하여 정제된다. 진핵 게놈 DNA의 농도는 형광 광도측정기 및 착색제로서 피코그린(PicoGreen) 염료를 이용하여 측정된다. 선택적으로, DNA는 표준 DNA 추출 기법에 의해 태아 세포에서 추출될 수 있는데, 이 세포는 양수천자(amniocentesis)와 같은 적절한 절차에 의해 수득된 것이다. 적당한 희석 후에, 정제된 태아 DNA의 일부분은 PCR 반응 튜브에 첨가된다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 첨가된 반응 성분에는 바람직한 pH 및 이온 강도를 유지하기 위한 제제를 함유하는 적당한 농도의 효소 및 완충액, 및 기타 반응 조건 + 적당한 양의 테옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트가 포함된다.

[0056] 프라이머의 세트(set)는 당해 이상의 징후를 나타낼 특정 염색체의 구역 또는 단편에 특이적하도록 선택된다. 예를 들어, 존재하는 모든 염색체의 복제수를 정량적으로 비교하는 것이 바람직할 수 있다. 선택적으로, 정상적인 염색체와 비교되는 결실 염색체의 작은 구역이 존재할 수 있는지 여부를 결정하는 것이 바람직하다. 이러한 목표를 달성하기 위해서, 프라이머는 적절하게도 분석될 조건의 징후를 나타낼 표적 영역을 플랭킹할 프라이머가 선택된다. 이외에도, 전반적인 프라이머 세트는 대조구 유전자를 증폭시키도록 설계된 한 쌍을 포함한다. 이 대조구 유전자는 인간 진핵 DNA에 존재하고, 바람직하게는 보편적으로 발현된 유전자이고, 이상을 진단하는데 이용될 표적 단편이 존재하는 염색체 이외의 염색체 상에 존재한다. 바람직한 유전자 중 하나는 12번 염색체에서 발견되는 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로지나아제(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)(GAPD)이다.

[0057] 대조구 유전자 GAPD에 적절한 포워드 및 역방향 프라이머 및 프로브, 및 5개의 예증적인 이수성의 염색체 이상에 대하여 진단하는데 이용할 수 있는 프라이머의 쌍은 하기 설명된다.

[0058] GAPD에 대하여, 프라이머는 하기의 뉴클레오티드 서열을 보유할 수 있다: SEQ ID NOS: 1 및 2. 이에 상응하는 프로브에는 하기의 서열이 포함될 수 있다: SEQ. ID NO: 19.

[0059] 여성에서 X 염색체의 비정상적인 수와 관계된 터너 증후군 또는 트리플 X 이상 또는 남성이 X 염색체를 하나 보다 많이 가진 클라인펠터 증후군에 대하여는, 포워드 및 역방향 프라이머의 쌍이 Xp22 영역이 포함되는 158bp PCR 절편을 생산하는데 이용될 수 있다. 이 프라이머들은 하기의 서열을 가질 수 있다: SEQ ID NOS: 3 및 4. 이에 상응하는 프로브는 하기의 서열이 포함될 수 있다: SEQ. ID NO: 20.

[0060] 남성 및 여성을 구별하고, 클라인펠터 증후군의 몇몇 희귀한 경우를 진단하기 위해서, 그 서열이 SEQ ID NOS: 5 및 6인 한쌍의 프라이머는 Y-염색체 상에 SRY 유전자와 관계된 148bp PCR 절편을 생산하는데 이용된다. 상응하는 프로브에는 하기의 서열이 포함될 수 있다: SEQ. ID NO: 21.

[0061] 파타우 증후군(Patau Syndrome), 즉 13번 삼염색체성을 진단하기 위해 설계된 한 쌍의 프라이머는 ATP7B 유전자와 관계된 127bp PCR 절편의 생산을 위해 이용되며, 이들은: SEQ ID NOS: 7 및 8이다. 이에 상응하는 프로브에는 하기의 서열이 포함될 수 있다: SEQ. ID NO:22.

[0062] 에드워즈 증후군, 즉 18번 삼염색체성을 진단하기 위해 설계된 한 쌍의 프라이머는 WDR7 유전자에 관계된 154bp PCR 절편을 생산하는 결과를 낳고, 이들은: SEQ ID NOS: 9 및 10이다. 이에 상응하는 프로브에는 하기의 서열이 포함될 수 있다: SEQ. ID NO:23.

[0063] 다운 증후군 또는 21번 삼염색체성을 진단하기 위해 설계된 한 쌍의 프라이머는 SOD1 유전자에 관계된 124bp PCR 절편을 생산하고, 이들은 SEQ ID NOS: 11 및 12이다. 이에 상응하는 프로브 서열에는 하기의 서열이 포함될 수 있다: SEQ. ID NO:24.

- [0064] 이하 설명하는 것은 인간 염색체 내에 미세결실을 분석하기 위해 설계된 특정 프라이머 쌍의 예이다.
- [0065] 묘성 증후군에 대하여, 5번 염색체 상의 잠재적 결실 부위가 나타날 수 있는 TAS2R1 유전자의 영역을 표적으로 하는 167bp PCR 절편을 제조하는데 이용될 수 있는 한 쌍의 적절한 프라이머는: SEQ ID NOS: 13 및 14이다. 이에 상응하는 프로브에는 하기의 서열이 포함될 수 있다: SEQ. ID NO 25.
- [0066] 윌리엄스-보이렌 증후군에 대하여, 7번 염색체 상의 잠재적 결실 부위가 나타날 수 있는 ELN 유전자의 영역을 표적으로 하는 138bp PCR 절편을 제조하는데 이용될 수 있는 한 쌍의 적절한 프라이머는: SEQ ID NOS: 15 및 16이다. 이에 상응하는 프로브에는 하기의 서열이 포함될 수 있다: SEQ. ID NO 26.
- [0067] 디조지 증후군에 대하여, 22번 염색체 상의 잠재적 결실 부위가 나타날 수 있는 DGCR2 유전자의 영역을 표적으로 하는 145bp PCR 절편을 제조하는데 이용될 수 있는 한 쌍의 적절한 프라이머는: SEQ ID NOS: 17 및 18이다. 이에 상응하는 프로브에는 하기의 서열이 포함될 수 있다: SEQ. ID NO 27.
- [0068] 상기 일련의 포워드 및 역방향 프라이머 및 이에 상응하는 프로브가 본 발명의 다양한 양태를 구체화하는 분석에 이용되기에 만족스럽다고 여겨질 지라도, 초기에 작업이 수행된 이래로, 3개 세트의 프라이머 및 이에 상응하는 프로브가 현재 이러한 기형 중 3개에 대한 진단을 위해 개발되었으며, 하나의 세트는 다른 마커, 즉 FGF9 유전자를 이용하여 파타우 증후군(13번 삼염색체성)을 분석하기 위해 개발되었다. 이러한 그룹의 프라이머 및 프로브는 분석에 이용가능한 DNA의 양이 최소일 경우에 바람직하다. 이러한 4개의 프라이머 및 프로브 세트는 하기 설명되어 있고, 하기의 4개 유전자 상의 기형을 분석하는데 이용된다: SRY, FGF9, WDR7 및 SOD1. 이러한 4개의 세트는 현재, 각각의 이상을 진단하는데 바람직하다.
- [0069] SRY에 대하여: 프라이머는 SEQ ID NOS: 28 및 29이고; 프로브는 SEQ ID NO: 36이다. 이러한 프라이머는 175bp PCR 절편을 생산한다.
- [0070] FGF9에 대하여: 프라이머는 SEQ ID NOS: 30 및 31이고; 프로브는 SEQ ID NO: 37이다. 이러한 프라이머는 139bp PCR 절편을 생산한다.
- [0071] WDR7에 대하여: 프라이머는 SEQ ID NOS: 32 및 33이고; 프로브는 SEQ ID NO: 38이다. 이러한 프라이머는 172bp PCR 절편을 생산한다.
- [0072] SOD1에 대하여: 프라이머는 SEQ ID NO: 34 및 35이고; 프로브는 SEQ ID NO: 39이다. 이러한 프라이머는 129bp PCR 절편을 생산한다.
- [0073] 또 다른 세트의 프라이머 및 프로브는 표적 FGF9 유전자 대신에 13번 염색체 상의 ATP7B 유전자를 표적으로 하는 것으로 대체하기 위해 개발되었다. 이러한 세트는 적어도 약 10ng의 DNA가 분석에 이용될 수 있을 경우에 바람직하며, 프라이머 SEQ ID NOS 40 및 41 및 프로브 SEQ ID NO:42로 구성된다.
- [0074] 분석을 용이하게 하기 위해서, 모든 필요한 도구가 포함된 키트가 제공된다. 예를 들어, 다중의 염색체 이상을 검출하기 위한 키트는 하기의 성분을 포함해야 한다:
- [0075] (a) 각각의 쌍 중 하나의 프라이머는 이의 5' 말단에 공유적으로 결합된 검출가능한 표지를 보유하는 것이 특징인, 포유동물 게놈 DNA를 증폭시키기 위한 중합효소 연쇄반응에서 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 기능할 것인, 복수의 쌍의 DNA 올리고뉴클레오타이드(이러한 프라이머는, 잠재적인 염색체 이상의 징후를 나타내는 당해 상이한 포유동물 염색체의 표적 DNA 단편을 증폭하도록 설계되어 있고, 그 중 한 쌍은 대조구 유전자를 증폭하는 것을 목적으로 한다);
- [0076] (b) (i) PCR, (ii) DNA - DNA 혼성화 및 세척, 및 (iii) 비색적 정량을 수행하기 위한 완충액 및 효소;
- [0077] (c) 지점 중 적어도 하나는 각각 표적이 되는 게놈 DNA 단편의 표지-보유 증폭된 가닥에 상보적인 DNA 프로브 서열에 부착된, 복수의 지점을 가진 1 이상의 마이크로어레이(및 바람직하게는 2개의 이중 마이크로 어레이); 및
- [0078] (d) 정상적인 게놈 DNA의 유사한 시험에서 수득한 이미지 결과를 이용하는, PCR 증폭 산물과 마이크로 어레이 상의 각 지점 사이에서의 혼성화 반응에서 유래한, 강도의 이미지 결과를 이용하여 염색체 이상을 진단하기 위한 수단.
- [0079] 이 마이크로어레이는 이에 부착된 DNA 프로브를 보유하는 복수의 미세지점을 보유하고 있는데, 이러한 프로브는 각각 증폭된 DNA의 표지된 가닥 중 하나에 각각 상보적이다. 표지된 DNA 표적에 대하여 개발된 무수한 어레이

중 임의의 하나가 이용될 수 있다고 하더라도, 표적에 대한 프로브가 평면 부재에 직접 결합되어 있거나, 마이크로티터 플레이트의 웰 내에 존재하는 2차원 분석을 포함하여, 미국특허 제6,174,683호 및 발명의 명칭이 "3차원 형태의 바이오칩(Three Dimensional Format Biochips)"인 공개된 국제출원 W002/059372호에 기술된 것들과 같은 3차원 바이오칩을 제공하는 것이 바람직하다. 그러한 3차원 어레이에서, 프로브는 플레이트 내 웰의 고체 표면 또는 유리 슬라이드 또는 기타 평면 플레이트에 직접 연결되어 있지 않고, 대신에 중합화된 하이드로겔(hydrogel)의 미세지점에 부착되어 3차원 어레이에 존재한다. 이러한 배열은 프로브를 고체 부재로부터 분리시키고, 프로브의 제시(presentation) 및 표지된 분자의 궁극적인 포획을 위한 확장된 표면적을 제공한다. 바람직하게는 그러한 복수의 3D altp지점은 분석에 이용되는 각각의 상이한 표적을 위해, 각각의 유리 슬라이드 상에 또는 마이크로웰(microwell) 플레이트의 각각의 웰 상에 제공된다.

[0080] 프라이머 세트 및 마이크로어레이 이외에, 키트의 범주에 포함되는 부분의 부품으로서 제공되는 품목은 상업적으로 입수 가능하고 임의의 PCR 키트의 부품으로서 일반적으로 포함되는 잘 알려진 품목이다. 이들은 현재는 잘 알려진 PCR 방법의 상세한 설명을 제공하는 상기 언급된 4개의 미국 참고인용문에 자세하게 기술되어 있다. 상기 언급한 바와 같이, 이 키트는 또한 혼성화 반응을 촉진시킬 적절한 화학물질을 함유하고 있다. 슬라이드 또는 웰을 이용하여 혼성화 용액을 배양한 후에, 형광 염료가 이용되었을 경우에는 형광 검출기를 이용하고, 또는 키트를 위해 선택된 특정 표지의 성질에 좌우되는 적절한 검출기를 이용하는 것처럼 임의의 적절한 방법으로 수득된 슬라이드가 측정될 수 있도록 결합되지 않은 표지된 표적 물질을 제거하기 위해 세척을 수행한다. 적절한 알고리즘은 키트 내에 제공되어 있으며, 마이크로어레이의 비색적 스캐닝의 결과를 해석하는데 이용되는데, 그러한 알고리즘은 대조구 시료에서 미리 산출된 데이터를 기반으로 개발된 것이다.

[0081] 이수성 또는 미세결실에서 유발되는 다중의 염색체 이상 중 임의의 하나를 검출하는데 사용될 수 있는 본 발명의 다양한 양태를 보유하는 분석 절차의 예로서, 우선 소량의 진핵 게놈 DNA를 수득했다. 이는 태아 급원 또는 기타 다른 급원에서 수득될 수 있는데; 종종, 분석은 양수에서 수득한 게놈 DNA를 분석하는데 이용된다. 적어도 약 0.1나노그램의 게놈 DNA가 충분하다고 생각되나; 입수 가능하다면, 10ng 가량이 이용될 수 있다. 이 DNA는 상업적으로 입수 가능한 정제 키트를 이용하여 관례적으로 정제될 것이다. 정제 단계 이후에, 농도 및 순도를 적절하게 측정하고, 긍정적인 표시의 순도 및 농도가 수득되자마자, 다중 PCR 반응을 수행한다.

[0082] 약 50마이크로리터의 부피를 보유하는 반응 챔버가 이용될 수 있는데, 이 챔버에는 상업적으로 입수 가능한 PCR 시스템의 내용물이, 조사하려고 하는 잠재적인 이상의 징후를 나타낼 다양한 염색체의 표적 영역을 플랜킹하도록 설계된 복수의 프라이머 쌍의 세트와 함께 첨가된다. 이러한 프라이머 쌍은 물론, 분석 키트의 일부로서 제공될 마이크로어레이 상의 지점에 결합될 프로브와 배위결합될 것이다. 예를 들어 미세결실이 조사되고 있는 프로브는 잠재적이 결실이 일어나고, 따라서 프로브에서 측정된 강도가 상당히 낮을 경우가 그러한 미세결실이 발생하였다는 징후일 것인 영역에서, 정상적인 안티센스 가닥의 단편에 바람직하게 결합하도록 설계될 것이다. 임의의 수의 그러한 프라이머 쌍에는, 예컨대 심지어 100 이상의 쌍이 포함될 수 있다. 그러나, 단일 키트의 일부로서는 5 내지 25개의 상이한 쌍이 포함되는 것이 보다 일반적이다. 당해 염색체 이상을 나타내는 것에 대하여, 선택된 그러한 복수의 프라이머 쌍 이외에도, 선택된 대조구 유전자에 특이적인 한 쌍의 프라이머가 또한 포함된다. 각각의 쌍의 프라이머는 바람직하게도, 약 50 내지 300베이스페어, 보다 바람직하게는 약 100bp 내지 250bp 및 가장 바람직하게는 약 120bp 및 200bp 범위가 될 수 있는 DNA 서열의 증폭을 수득할 염색체 상의 위치에 결합하도록 선택된다. 각각 약 1 μ M의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머가 제공된다. 물론, 상업적 PCR 시스템 키트에는 적절한 양의 데옥시리보뉴클레오타이드 기질, Taq, 바람직하게는 고온 개시가능 중합효소(hot-start capable polymerase)와 같은 적절한 효소, 및 완충액이 함유되어 있다.

[0083] 각각의 쌍의 프라이머 중 하나가 표지되어 있고, 그 쌍의 나머지 프라이머는 5-포스페이트로 유도된다. 바람직한 구체예에서, 정방향 프라이머는 5-말단이 인산화되며, 역방향 프라이머는 검출가능 표지에 공유적으로 결합된다. 상기 정의 부분에서 나타낸 바와 같이, 이에 포함될 수 있는 광범위한 종류의 검출 가능 표지가 존재하나, 바람직하게는 비색적 표지가 이용되고, 보다 바람직하게는 시아닌(cyanine)과 같은 형광 표지가 이용된다.

[0084] 일반적으로 PCR 복제 방법의 약 5 내지 60회 사이의 온도 사이클이 수행되며; 종종 약 20-30회의 사이클이, 수행될 조사를 용이하게 위해 바람직한 양의 다양한 증폭된 핵산 서열을 제조하기에 충분할 것이다. PCR 증폭을 완료하면, 이중-가닥 산물은 예컨대 100 베이스페어 이상의 크기를 가진 분자를 머무르게 하도록 설계된, 컬럼 정제와 같은 표준 절차를 이용하여 정제한다. 그러한 정제를 용이하게 하기 위해서 상업적 키트가 이용될 수도 있다.

- [0085] 정제 단계 이후에, 정제된 물질의 센스 가닥은 분해 목적에 적절한 엑소뉴클레아제를 이용하여 분해되고; 이러한 단계의 결과, PCR 증폭의 단일-가닥 산물이 수득된다. 분해 단계 이후에, 이 분해된 혼합물은 혼성화 완충액으로 적절하게 희석된다. 수득된 용액을 약 95℃의 온도까지 약 5 내지 10분간 가열하여, 엑소뉴클레아제를 불활성화하고, 단일-가닥 생성물을 변성시킨다. 수득한, 표지된 안티센스 가닥은 혼성화 용액에서 용해되고, 바람직하게는 한 쌍의 이중 마이크로어레이가 나란히 이용될 수 있는 2개의 동등한 부분으로 분리된다. 각각의 마이크로어레이에 혼성화시키는 것은 적절한 완충액을 함유하는 이러한 용액에서, 약 10 내지 20 시간, 바람직하게는 약 14 내지 16 시간 동안, 45℃처럼 적절한 온도에서 수행된다. 혼성화 단계 이후에, 각각의 마이크로어레이는 적절한 완충액-함유 용액을 이용하여 수 회 세척되고, 레이저 스캐너 또는 이에 상응하는 장치를 이용하여 형광 이미지화된다. 물론, 상이한 형태의 비색적 표지가 이용된다면, 또는 방사능 또는 기타 범주의 알려진 표지가 대신에 이용된다면, 적절한 스캐너/검출기가 그 대신 사용될 것이다.
- [0086] 바람직한 분석 절차에서 증폭된 이중-가닥의 PCR 산물의 센스 가닥이 분해되기 때문에, 마이크로어레이에는 선택된 대조구 유전자의 센스 가닥의 선택된 단편인 프로브가 제공된다. 게시된 프라이머 쌍과 함께 이용될 상응하는 프로브의 예는 상기 설명한 바와 같다. 일반적으로 프로브는 약 25 내지 약 60 뉴클레오티드 범위의 길이이다. 이중 마이크로어레이가 나란히 진행된 후에, 각각의 마이크로어레이 상에 프로브의 형광 강도가 기록되며, 이러한 이미지화된 결과를 규칙-기반 알고리즘을 이용하여 진단하는데 이용한다.
- [0087] 각각의 프로브의 신호 강도는 기록된 값을, 내부 표준의 신호 강도, 예를 들어, 12번 염색체 상의 GAPD 유전자의 센스 가닥의 단편인 프로브를 가진 지점에서의 신호 강도로 나누어서 초기에 표준화시킨다. 이러한 초기 계산은 선택된 내부 표준에 대하여 각각의 프로브에 대한 값을 비율의 형태로 산출하게되는데, 이러한 비율을 I-비율(i-ratio)이라고 부른다.
- [0088] 이후, 각각 2개의 이중 슬라이드 상에서 같은 프로브에 대하여 수득된 이 I-비율을 비교한다. X 염색체 및 Y 염색체에 대하여 이중 슬라이드 사이의 특정 프로브에 대한 이들 비율의 차이가 30%를 초과한다면, 이러한 값은 잠정적으로 신뢰할 수 없다고 여겨지므로, 따라서 차후 계산에서는 이 값을 배제한다. 유사하게, 다른 염색체 상의 표적 단편을 위한 특정 프로브에 대한 I-비율의 차이가 20%를 초과한다면, 이러한 특정 프로브는 마찬가지로 추가적인 계산 및 분석에서 배제한다. 그러한 연속적인 배제 과정에서 남은 값에 대하여 2개 I-팩터의 평균을 내고, 이 값을 이후에 이용한다.
- [0089] 그러한 미지의 시료에서 수득한 결과의 분석을 위한 기초를 제공하기 위해, 정상적인 것으로 알려진 DNA 세트를 우선 분석하고, 이 결과를 각각의 선택된 DNA 서열에 관하여 정상 비율을 결정하는데 이용한다. 예를 들어, 12번의 정상적인 남성 시료를 분석하고, 각각의 시료에 대하여 내부 표준(여기서는 GAPD 유전자로서 선택된)에 대항하는 각각의 프로브에 대한 비율을 계산한다. 이후, 이러한 12번의 비율을 평균을 내어 정상적인 남성 DNA 시료에서 기대되는 "정상 비율"(N-비율)을 제공한다. 정상적인 여성의 12번 염색체에서 수득한 DNA를 분석하는데 유사한 방법이 수행된다. 이러한 값을 유사하게 평균을 내고, 이들은 정상적인 여성 DNA에서 기대되는 N-비율을 제공하는데 이용된다.
- [0090] 분석의 다음 단계로서, 분석될 미지의 DNA 유래의 내부 표준에 대항하여 수득된 초기 비율(I-비율)을 같은 성별의 사람에 대하여 각각 N-비율로 나누어서 전환율(conversion factor)(C-팩터)이라고 정의되는 팩터를 수득한다. 이러한 절차는 각각의 프로브에 대한 C-팩터를 계산하는데 이용된다. 이러한 각각의 C-팩터는 약 1.25 내지 0.75 사이이어야 한다고 여겨지며, 이 범위 밖에 있는 임의의 C-팩터는 비정상적인 것으로 결정을 내리고, 차후의 분석에서는 배제한다. C-팩터가 마이크로어레이 상에 각각의 프로브에 대하여 계산된 후에, 내부 대조구를 나타내는 프로브를 제외하고, C-팩터들을 모두 평균을 내어 평균 C-팩터(이도 역시 0.75 내지 1.25 사이가 될 것이다)를 제공한다. 일단 이 평균 C-팩터가 이중 마이크로어레이 중 하나의 세트에 확립되면, 처음 수득된 원래의 평균 I-비율을 각각 이 평균 C-팩터로 나누어 각각에 대하여 조정된 비율(A-비율)을 산출한다. 이러한 특정 단계가 마이크로어레이에 대하여 임의의 특정 제조 과정 중에 내부 표준의 차이로부터 유래할 수 있는 전체적인 차이를 감소시키는데 효율적일 수 있으며; 이러한 방법으로, 전체적인 차이의 계수는, 상당하다고 여겨지는 약 2-4%로 감소된다.
- [0091] A-비율을 수득하기 위해서 평균 C-팩터를 이용하여 이렇게 N-비율을 조정한 후에, 정상 비율의 값에서 25% 이상 벗어난 임의의 비율 값은 게놈 DNA 시료가 특정 표적 단편에 대하여 비정상이라는 것을 나타내는 것이라는 또 다른 규칙을 이용하여 각각의 프로브에 대한 진단을 수행한다. 예를 들어, 남성 시료에 대하여 21번 염색체를 나타내는 프로브의 신호 대 2개의 이중 마이크로어레이 상에 이용되는 내부 표준의 I-비율이 1.01이라면, 이러한 특정 시험 절차에 대하여는, 평균 C-팩터가 1.10인 것으로 계산되고, 21번 염색체 프로브 비율에 대하여 제

조정한 것은 하기와 같이 계산된다: 1.01/1.10은 0.92(A-비율). 이후, 이 A-비율(즉 0.92)을 정상적인 남성 시료의 21번 염색체에 대한 신호의 N-비율과 비교하고, 이 값은 약 0.68이 될 것이다. 따라서 이 값이 정상적인 비율보다 약 35% 높고; 이로써 이 시료는 21번 삼염색체성의 징후를 나타내는 것으로 진단될 것이다. 흥미있는 사실은, 21번 삼염색체성에 대한 이론적 값은 일반적으로 약 1.02인 것으로 받아들여지고 있으며, 본 분석의 결과로서 수득된 재조정된 비율인 0.92와 꽤 근접하다는 것이다.

[0092] 각각의 프로브에서 수득한 값에 대한 분석을 같은 방법으로 수행했고, 이 결과, 단일 분석 절차에서 이렇게 선택된 각각의 잠재적 이상에 관하여 염색체 이상의 존재 또는 부존재를 진단하는 것이 가능했다. 예를 들어, 삼염색체성 이상이 검출되면, 각 프로브에서의 강도는 상당히 높을 것이고, 다른 돌연변이 상의 미세결실이 발견될 경우, 각 프로브의 강도는 상당히 낮을 것이다. 마이크로어레이를 이용한 이러한 시험절차를 증명하기 위해서, 상기 언급한 8개의 특이적 염색체 이상을 각각 보유하는 DNA를 이용하여 시험을 수행했으며, 수득된 시험결과는 정상이라고 알려진 24개의 DNA 시료 및 특정 기형을 함유하고 있다고 알려진 48개의 다른 DNA 시료에 관하여 100% 민감도 및 100% 특이성으로 시연하였다. 이번에는 오로지 8개의 잠재적인 염색체 이상이 시험되었지만, 이수성 및/또는 미세결실의 기타 조건이 단일 마이크로어레이 상에서 수행될 것이 그러한 시험의 일부로서 용이하게 포함될 수 있을 것이라는 것은 자명하고, 유사한 검출 및 진단이 수득될 것으로 충분히 생각된다.

[0093] 하기의 실시예는 9개의 다른 염색체에 관한 프로브 및 프라이머 세트를 이용하여 본 발명을 수행하기 위한 현재까지 알려진 최상의 양태를 제공하기 위해 제공되는 것이며, 이중 8개는 직접적으로 잠재적인 이상에 관한 것이다. 그러나, 이러한 실시예들은 예증의 목적으로만 제공되는 것이라는 것이 이해되어야 하며, 물론 본원의 종반부에 제시한 청구의 범위에 의해 또한 정의되는 본 발명의 범주를 제한하려는 임의의 방법으로 생각되어서는 안 된다.

실시예

[0094] 실시예 1

[0095] 8개의 상이한 염색체에 관하여 이수성 또는 미세결실에서 유래하는 결과인 염색체 이상 중 임의의 하나를 검출하기 위해 이용될 수 있는 분석 절차의 한 실시예로서, 10ng의 진핵 게놈 DNA를 수득하고 관례적으로 정제했다. 정제 단계 이후에, 다중 PCR 반응을 표 1에 나타낸 배합물을 이용하여 수행했다:

표 1. PCR 성분의 부피

성분	양 (μL)
AmpliTaq 골드 PCR 마스터 믹스	25
정제된 게놈 DNA (UMB1839-M, 2 ng/μL)	5
프라이머 믹스	5
DEPC 물	15
총계	50

[0096] 약 50마이크로리터의 부피를 가진 반응 챔버를 이용했다. 프라이머 쌍, 즉 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO:18은 연구를 위해 선택된 다양한 염색체의 표적 영역을 플랜킹하도록 설계했다.

[0098] 프라이머 믹스(10x) 내 농도는 1.25 μM 내지 2.5 μM 범위였다. 상업적으로 판매되는 PCR 마스터 믹스(PCR Master Mix)는 적절한 양의 테옥시리보뉴클레오타이드 기질, Taq와 같은 적절한 효소, 및 완충액을 함유했다. 정방향 프라이머는 5'-인산화되었고, 역방향 프라이머는 형광 표지, 즉 시아닌(Cy-3)과 공유적으로 결합되었다. 모든 성분의 혼합물을 ABI 9700 써모사이클러(Thermocycler)를 이용하여 증폭했다. 이 PCR 사이클 시간 및 온도는 하기와 같았다:

[0099] 95°C 11' ; 96°C 1' ; 94°C 30" , 55°C 30" 및 70°C 30" 10 사이클; 94°C 30" , 55°C 30" 및 70°C 30" 13 사이클; 60°C 10' .

[0100] PCR 증폭을 종료한 직후, 이중-가닥의 증폭된 물질을 QIA퀵 PCR 정제 키트(QIAquick PCR Purification Kit)(쿼아젠(Qiagen))으로 정제했다. 이렇게 정제된 물질의 센스 가닥은 람다 엑소뉴클레아제(1.5 μL, μL 당 5 유닛,

뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs)로 37℃에서 30분간 분해시켰다.

[0101] 수득한, 표지된 단일 가닥 물질을 3x SSC 및 0.1% 트리톤 X-100(Triton X-100)을 함유한 혼성화 용액에서 용해하고, 2개의 동등한 부분으로 분리했다. 각각의 시료를 9개의 상이한 프로브, 즉 SEQ ID NO:19 내지 SEQ ID NO:27이 존재하는 3D 마이크로어레이에 혼성화했다. 1x SSC 및 0.1% 트리톤 X-100을 함유한 세척 용액으로 37℃에서 15분간 세척하여 비결합 표적을 제거했다. 이후, 이들을 10mM MgCl₂ 및 5mM 트리스-HCl 완충액으로 실온, pH 8.0에서 15초간 한번 더 세척했다. 이를 건조한 다음, 각각의 혼성화된 3D 마이크로어레이(A 및 B)의 형광 이미지를 레이저 스캐너(ScanArray® Lite, 퍼킨 엘머(Perkin Elmer))로 수득했다.

[0102] 이 이미지를 하기와 같이 규칙-기반 알고리즘을 이용하여 분석했다:

표 2. 2개의 3D 마이크로어레이의 형광 강도

레이저 파워 60
PMT 이득율 85

유전자	A	B
GAPD	31,177	32,908
Xp22	6,642	7,177
SRY	5,286	5,334
SOD1	31,223	33,624
ATP7B	21,703	23,202
WDR7	9,119	9,325
ELN	10,201	10,498
TAS2R1	9,650	9,825
DGCR2	11,579	13,181

[0103]

[0104] 우선, 각각의 유전자에 대한 신호 대 GAPD에 대한 신호의 비율을 계산했다. 결과는 표 3에 나타났다.

표 3. 내부 표준 GAPD에 대한 각 신호의 초기 비율 (I-비율)

유전자	A	B
Xp22	0.21	0.22
SRY	0.17	0.16
SOD1	1.00	1.02
ATP7B	0.70	0.71
WDR7	0.29	0.28
ELN	0.33	0.32
TAS2R1	0.31	0.30
DGCR2	0.37	0.40

[0105]

[0106] 이후, 각각의 유전자에 대한 값들 사이의 평균 비율 및 %차이(%difference)를 계산했다.

표 4. 평균 비율 및 2개의 3D 마이크로어레이 사이의 %차이

	평균 비율	2개의 3D 마이크로어레이 사이의 %차이
Xp22	0.22	2
SRY	0.17	5
SOD1	1.01	2
ATP7B	0.70	1
WDR7	0.29	3
ELN	0.33	3
TAS2R1	0.30	4
DGCR2	0.39	8

[0107]

[0108] 이 시료에서, %차이 중 어느 것도 높은 변화도를 나타내지 않았다.

표 5. 전환율 계산 및 평균 C-팩터로 조정된 비율

유전자	평균 비율	N-비율	C-팩터	A-비율
Xp22	0.22	0.19	1.14	0.20
SRY	0.17	0.17	1.02	0.15
SOD1	1.01	0.68		0.92
ATP7B	0.70	0.59	1.20	0.63
WDR7	0.29	0.26	1.13	0.26
ELN	0.33	0.35	0.96	0.30
TAS2R1	0.30	0.25	1.18	0.27
DGCR2	0.39	0.35	1.10	0.35
평균 C-팩터			1.10	

[0109]

[0110] 이 시료에서, SOD1을 제외한 모든 유전자의 A-비율은 N-비율의 약 15% 이내인데, 이는 이러한 유전자에 의해 표현되는 이상이 시료에 존재하지 않는다는 것을 의미한다. SOD1의 A-비율은 0.92였고, 이는 N-비율의 0.68보다 35% 높은 수치였다. %차이의 크기는 시료가 21번 삼염색체성에 영향을 받기 쉬운 시료라는 것을 나타내며; 게다가 21번 삼염색체성의 이론적 값은 0.93이다. 시험된 DNA가 나중에 21번 삼염색체성을 앓고 있는 실험유전자의 DNA를 실제로 보유하는 것으로 나타났으므로, 따라서 이 시험은 이러한 키트를 이용한 진단방법을 유효하게 하는 것으로 여겨졌다.

[0111]

실시예 2

[0112] 또 다른 실시예로서, 실시예 1에서 기술한 것과 유사한 분석 절차를 수행했고, 여기에서 8개의 상이한 염색체를 표적으로 하는 프라이머 및 프로브를 이용했다. 진핵 게놈 DNA 10ng을 획득하고, 관례적으로 정제했다. 정제 단계 이후에, 실시예 1에서와 동일한 배합물을 이용하여 다중 PCR 반응을 수행했다.

[0113] 약 50마이크로리터의 부피를 가진 반응 챔버를 이용했다. 실시예 1에서 사용한 것과 동일한 프라이머 믹스를 연구될 9개 염색체의 표적 영역을 플랭킹하도록 설계된 프라이머 쌍과 함께 이용했다.

[0114] 이 프라이머 믹스의 농도는 1.25 μ M 내지 2.5 μ M 범위였다. 상업적으로 판매되는 PCR 마스터 믹스는 적절한 양의 테옥시리보뉴클레오타이드 기질, Taq와 같은 적절한 효소, 및 완충액이 함유되어 있었다. 정방향 프라이머는 5'-인산화되어 있었고, 역방향 프라이머는 형광 표지, 즉 시아닌(Cy-3)과 공유적으로 결합되어 있었다.

[0115] PCR 증폭, 정제 및 정제된 물질의 센스 가닥의 분해를 실시예 1에서와 같이 수행했다.

[0116] 수득한, 표지된 단일 가닥 물질을 3x SSC 및 0.1 트리톤 X-100을 함유한 혼성화 용액에 용해시키고, 2개의 동등한 부분으로 분리했다. 각각의 시료는 9개의 상이한 프로브가 개별 지점에 결합된, 실시예 1에서 이용한 것과 동일한 3D 마이크로어레이에, 45℃에서 14시간동안 배양에 의해 혼성화했다. 1x SSC 및 0.1% Triton X-100을 함유한 세척 용액으로 37℃에서 15분간 세척하여 비결합 표적을 제거했다. 건조 후에, 각각의 혼성화된 3D 마이크로어레이(A 및 B)의 형광 이미지를 레이저 스캐너(ScanArray® Lite, 퍼킨 엘머)로 수득했다.

[0117] 이 이미지를 하기와 같이 규칙-기반 알고리즘으로 분석했다:

표 6. 2개의 3D 마이크로어레이의 형광 신호 강도

레이저 파워 70
PMT 이득율 85

유전자	A	B
GAPDH	45,888	45,918
XP22	15,407	16,675
SRY	백그라운드	백그라운드
SOD1	30,392	32,665
ATP7B	26,406	25,668
WDR7	10,193	10,014
ELN	17,115	15,766
TAS2R1	9,938	10,210
DGCR2	9,248	10,244

[0118]

[0119] 우선, 각각의 유전자에 대한 신호 대 GAPD에 대한 신호의 비율을 계산했다.

[0120] 결과는 표 7에 나타냈다.

표 7. 내부 표준 GAPD의 신호에 대한 각 신호의 초기 비율 (I-비율)

유전자	A	B
XP22	0.34	0.36
SRY	-	-
SOD1	0.66	0.71
ATP7B	0.58	0.56
WDR7	0.22	0.22
ELN	0.37	0.34
TAS2R1	0.22	0.22
DGCR2	0.20	0.22

[0121]

[0122] 이후, 평균 비율 및 각각의 유전자에 대한 값 사이의 %차이를 계산했다.

표 8. 평균 비율 및 2개의 3D 마이크로어레이 사이의 % 차이

	평균 비율	2개의 3D 마이크로어레이 사이의 %차이
XP22	0.35	8
SRY	-	-
SOD1	0.69	7
ATP7B	0.57	3
WDR7	0.22	2
ELN	0.36	9
TAS2R1	0.22	3
DGCR2	0.21	11

[0123]

[0124] 이 시료에서, %차이 중 어느 것도 높은 변화도를 나타내지 않았다.

표 9. 전환율 계산 및 평균 C-팩터로 조정된 비율

유전자	평균 비율	N-비율	C-팩터	A-비율
XP22	0.35	0.35	1.00	0.35
SRY	-	-	-	-
SOD1	0.69	0.65	1.06	0.70
ATP7B	0.57	0.56	1.02	0.57
WDR7	0.22	0.25	0.89	0.22
ELN	0.36	0.33	1.07	0.36
TAS2R1	0.22	0.25	0.88	0.22
DGCR2	0.21	0.32		0.22
평균 C-팩터			0.99	

[0125]

[0126] 이 시료에서, SRY 유전자의 부재는 당해 실험유전자가 여성의 것이었다는 것을 나타내며(Y-염색체의 결핍에서 기인하므로); DGCR2를 제외하고 나머지 모든 유전자의 A-비율은 N-비율의 약 12% 범위 내였는데, 이는 이러한 유전자에 의해 표현되는 이상이 시료에 존재하지 않는다는 것을 의미한다. DGCR2에 대한 A-비율은 0.22였고, 이는 N-비율 값인 0.32보다 31% 낮은 값이었다. %차이의 크기는 시료가 디조지 증후군을 앓는 실험유전자에서 유래한 것이라는 것을 나타낸다.

[0127] 이후에, 시험된 DNA를 동정하여, 정말로 디조지 증후군을 앓는 여성 실험유전자의 조직에 존재했던 것인지를 밝혀내었는데, 이로써, 이 시험은 이 키트를 이용하여 진단하는 방법이 유효하다는 것을 입증하는 것으로 생각된다.

[0128] 실시예 3

[0129] 실시예 1에서 사용한 것과 동일한 DNA의 시료 0.3ng을 상기 실시예 1에서 설명한 바와 같이 수득, 정제, 증폭, 분해 및 혼성화를 위해 준비했다. 그런, 본 절차에서, 분석은 유전자 GAPD, XP22, SRY, FG9, WDR7, 및 SOD1에 대하여만 수행했다. 프라이머 믹스에 함유되어 있는 프라이머 세트는 SEQ ID NO:1 및 2; SEQ ID NO:3 및 4; SEQ ID NO:28 및 29; SEQ ID NO:30 및 31; SEQ ID NO:32 및 33; 및 SEQ ID NO:34 및 35였다.

[0130] 적절한 완충액을 함유하는 수득한 혼성화 용액을 다시 2개의 동등한 부분으로 분리했다. 각각의 부분을 개별적

인 위치에 6개의 상이한 프로브가 결합되어 있는 3D 마이크로어레이에 혼성화 시켰으며; 여기서 사용한 프로브는 SEQ ID NO:19 및 20 및 SEQ ID NO:36 내지 39였다. 이전과 같이 배양을 수행했고, 비결합 표적은 동일한 방법으로 세척하여 제거했다. 건조 후에, 각각의 마이크로어레이를 실시예 1에서 사용한 레이저 스캐너로 스캔하여 이들의 형광 이미지를 수득했다.

[0131] 실시예 1에 대하여 설명한 것과 동일한 방법으로 규칙-기반 알고리즘을 이용하여 결과를 분석했다. 이 결과도 역시, 유전자 중 4개에 대한 A-비율이 N-비율의 15% 이내였으나; SOD1에 대한 A-비율은 예외였다. 결과적으로 게놈 DNA 시료 0.3ng을 이용하여 수행한 시험도 역시 21번 삼염색체성(다운 증후군)을 앓는 실험유전자 중 하나로서 진단된 것이다.

[0132] 본 발명이 본 발명자의 발명을 수행하기에 현재에는 발명자에게 가장 잘 알려진 방법으로 구성된 몇몇 바람직한 구체예에 대하여 설명되었지만, 본 기술분야에서 보통으로 숙련된 자들에게는, 본원에 첨부된 청구의 범위에서 나타낸 본 발명의 범주에서 벗어남이 없이 다양한 변화 및 변형이 자명할 것이라는 것은 이해되어야 한다. 예를 들어, 적어도 본원에 설명된 서열 전부가 함유된 프로브를 사용하는 것이 바람직하다고 해도, 원한다면 인용된 서열의 주요한 부분을 갖는 프로브가 또한 이용될 수 있다. 모든 미국 특허 및 출원 및 문서는 특별히 본원에 참고인용하였다.

[0133] 염기서열의 간단한 설명

[0134] SEQ ID NO 1 및 SEQ ID NO 2는 인간의 GAPD 유전자의 139베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0135] SEQ ID NO 3 및 SEQ ID NO 4는 인간의 X-염색체의 158베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0136] SEQ ID NO 5 및 SEQ ID NO 6은 인간의 SRY 유전자의 171베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0137] SEQ ID NO 7 및 SEQ ID NO 8은 인간의 ATP7B 유전자의 127베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0138] SEQ ID NO 9 및 SEQ ID NO 10은 인간의 WDR7 유전자의 151베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0139] SEQ ID NO 11 및 SEQ ID NO 12는 SOD1 유전자의 124베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0140] SEQ ID NO 13 및 SEQ ID NO 14는 인간의 TAS2R1 유전자의 167베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0141] SEQ ID NO 15 및 SEQ ID NO 16은 ELN 유전자의 138베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0142] SEQ ID NO 17 및 SEQ ID NO 18은 DGCR2 유전자의 145베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0143] SEQ ID NO 19 내지 SEQ ID NO 27은 마이크로어레이 상의 지점에 부착되도록 설계된 5' 말단 및 한 가닥의 분해 이후에 각 증폭된 PCR 산물을 혼성화할 수 있는 3 영역을 보유하는 프로브 올리고머이다.

[0144] SEQ ID NO 28 및 SEQ ID NO 29는 인간의 SRY 유전자의 175베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0145] SEQ ID NO 30 및 SEQ ID NO 31은 FGF9 유전자의 139베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0146] SEQ ID NO 32 및 SEQ ID NO 33은 인간의 WDR7 유전자의 172베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0147] SEQ ID NO 34 및 SEQ ID NO 35는 SOD1 유전자의 129베이스페어 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0148] SEQ ID NO 36 내지 SEQ ID NO 39는 마이크로어레이 상의 지점에 부착되도록 설계된 5' 말단 및 한 가닥의 분해 이후에 각 증폭된 PCR 산물을 혼성화할 수 있는 3 영역을 보유하는 프로브 올리고머이다.

[0149] SEQ ID NO 40 및 SEQ ID NO 41은 FGF9 유전자의 단편을 증폭하기 위한 프라이머이다.

[0150] SEQ ID NO 42는 마이크로어레이 상의 지점에 부착되도록 설계된 5' 말단 및 한 가닥의 분해에 이어서 FGF9의 PCR-증폭 단편을 혼성화할 수 있는 3 영역을 보유하는 프로브 올리고머이다.

서열 목록

<110> Biocept, Inc.

<120> DETECTION OF CHROMSOMAL DISORDERS

<130> 81665/6776

<140> 10/840,208
<141> 2004-05-05

<160> 42

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 1
tggatgaagca ggcgtcgga

19

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
aagtggatcgt tgagggaat gc

22

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3

caggaggcg tttctcaagg at 22

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 4
 tccaagagga aatccccacc ct 22

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 5
 cgcattcatc gtgtggtctc gc 22

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 6
 ctgtgcctcc tggaagaatg gc 22

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
acatgggtccc tgaggtcttc gg 22

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
gctccattga aggcaaggtc cg 22

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 9
ccgccacgaa ggttgagaac aa 22

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 10

tcaaacatcg tccaccccag gg 22

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 11
 agcagatgac ttgggcaaag gt 22

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 12
 ggcctcagac tacatccaag gg 22

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 13
 tgttgctgag ttctcagtgc catt 24

<210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 14
tcaggaagga caggatagac agca 24

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 15
cgttggtgct actgcttggt gg 22

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 16
cgctccctc ttgtttcctt gc 22

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 17

cccgatgaagt tccatgtgcc a 21

<210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 18
 agattaagcg ggttctgtgc ga 22

<210> 19
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 19
 ctacactgag caccaggtgg tctcctctga cttcaacagc gacac 45

<210> 20
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 20
 ctcaaggata agagcgacac ggcctgacag tcactagtat tcatt 45

<210> 21
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 21
tctagagaat cccagaatgc gaaactcaga gatcagcaag cagct 45

<210> 22
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 22
ctgataagtg atgacggcct cttggttgct gagtgagact ttgac 45

<210> 23
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 23
acgtattccg tctgcacagg caaccaaggc cagtagaaag ctatg 45

<210> 24
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 24

caaagtgga aatgaagaaa gtacaaagac aggaaacgct ggaag 45

<210> 25
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 25
 gctcttgatt ttctctctgg ggaggcacac cggcaaatg agaa 44

<210> 26
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 26
 gaatgtaaac ctttgtaac cccatcccat gccctccga ctcc 44

<210> 27
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 27
 cagagacaca aacatacaaa ggaaagatcc agacattcaa cgtaga 46

<210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 28
tggctttcgt acagtcaccc ct 22

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 29
cacagaaatt acaggccatg caca 24

<210> 30
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 30
ctcatcaaac ctatataagc acgtggacac tgga 34

<210> 31
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 31

gggtccactg gtctaggtaa aaaatgtgtg aattt 35

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 32
tgctcagtt tctagtcagc caat 24

<210> 33
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 33
aggtctttac cccaggcatt caca 24

<210> 34
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 34
tttgggtatt gttgggagga ggtagtgatt actt 34

<210> 35
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 35

tcctgtcttt gtactttctt catttccacc ttgac

35

<210> 36

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 36

tcttcgcctt ccgacgaggt cgatacttat aattcgggta ttctc

45

<210> 37

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 37

gatactatgt tgcattaaat aaagatggga ccccgagaga agggga

45

<210> 38

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 38

cagcccaaag ttatcttctt aaatttttta caggtccatg aaaaa 45

<210> 39
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 39
 cagcccaaag ttatcttctt aaatttttta caggtccatg aaaaa 45

<210> 40
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 40
 gattctcatg ggttgccag gata 24

<210> 41
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 41
 actccagagc tcaaagtaac ccac 24

<210> 42
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 42

acatcttctg tctattgaaa ggcaacttac ggctgggcgt ggtg

44