



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0036727  
(43) 공개일자 2017년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6837 (2013.01)

C12Q 1/6862 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7004719

(22) 출원일자(국제) 2015년07월29일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2017년02월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/042604

(87) 국제공개번호 WO 2016/018986

국제공개일자 2016년02월04일

(30) 우선권주장

14/450,144 2014년08월01일 미국(US)

14/453,396 2014년08월06일 미국(US)

(71) 출원인

아리오사 다이어그노스틱스, 아이엔씨.

미국, 95138, 캘리포니아, 산호세, 옵티컬 코트 5945

(72) 발명자

올리펀트 아놀드

미국, 95138, 캘리포니아, 산호세, 옵티컬 코트 5945

잔 제이콥

미국, 95138, 캘리포니아, 산호세, 옵티컬 코트 5945

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한상수

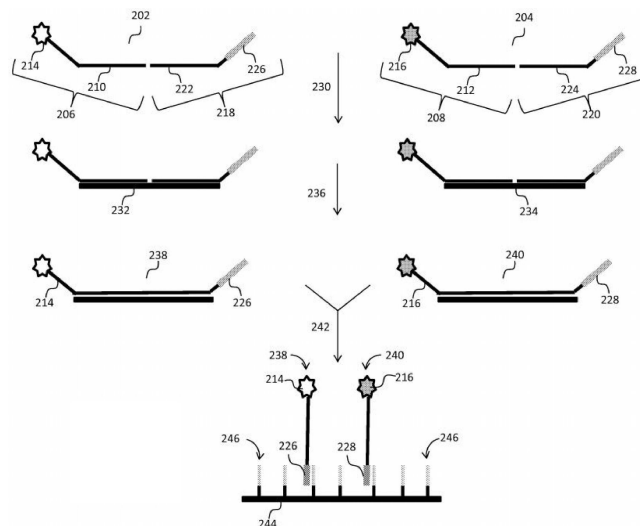
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법

### (57) 요약

본 발명은 어레이로의 혼성화를 이용하여 혼합 샘플을 포함한 샘플 내 좌위(loci) 및 게놈 영역 검출을 위한 검출 시스템과 방법을 제공한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

**C12Q 1/6883** (2013.01)

*C12Q 2537/16* (2013.01)

*C12Q 2565/519* (2013.01)

(72) 발명자

**쥬노 카라**

미국, 95138, 캘리포니아, 산호세, 옵티컬 코트  
5945

**보가드 패트릭**

미국, 95138, 캘리포니아, 산호세, 옵티컬 코트  
5945

---

**황 스테파니**

미국, 95138, 캘리포니아, 산호세, 옵티컬 코트  
5945

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

모체 및 태아 무세포 DNA를 포함하는 모체 샘플을 제공하는 단계;

제1 표적 게놈 영역의 좌위(locus)에 상보적인 영역을 포함하는 적어도 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 상기 제1 표적 게놈 영역으로부터 적어도 48개의 비-다형성 좌위를 조사하며, 상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 하나는 제1 포착 영역, 제1 라벨 결합 영역 및 2개의 제한 부위를 포함하는 단계;

제2 표적 게놈 영역의 좌위에 상보적인 영역을 포함하는 적어도 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 상기 제2 표적 게놈 영역으로부터 적어도 최소 48개의 비-다형성 좌위를 조사하며, 상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 하나는 상기 제1 포착 영역, 제2 라벨 결합 영역 및 2개의 제한 부위를 포함하는 단계;

상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 결합시키는 단계;

결찰된 상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 앰플리콘을 생성하는 단계;

상기 앰플리콘을 분할하여 분할된 앰플리콘을 생성하는 단계;

상기 분할된 앰플리콘의 상기 제1 포착 영역을 상기 제1 포착 영역에 상보적인 포착 프로브를 포함하는 어레이에 혼성화하여 상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역으로부터 분할된 앰플리콘을 검출하며, 상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역으로부터 분할된 상기 앰플리콘은 상기 제1 포착 영역에 상보적인 포착 프로브에 경쟁적으로 혼성화하는 단계;

제1 및 제2 라벨 결합 영역을 검출하여 상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역으로부터 조사한 비-다형성 좌위의 상대 빈도를 측정하기 위해 상기 분할된 앰플리콘의 포착 영역을 정량화하는 단계;

상기 제1 및 제2 라벨 결합 영역의 상대 빈도에 기준하여 상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 상대 빈도를 추정하는 단계;

각각의 다형성 좌위에 대하여 적어도 3개의 고정 서열 대립유전자 특이성 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역과 다른 적어도 1개의 표적 게놈 영역으로부터 적어도 48개의 다형성 좌위를 조사하며, 적어도 3개의 상기 대립유전자 특이성 올리고뉴클레오타이드 중 2개는 한 개의 다형성 좌위에 하나의 대립유전자에 대해 상보적인 서열, 각각의 다형성 좌위에 대하여 특이적인 포착 영역, 다형성 좌위에서 각 대립유전자에 대하여 상이한 라벨 결합 영역, 및 2개의 제한 부위를 포함하는 단계;

다형성 좌위에 특이적인 상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 결합시키는 단계;

다형성 좌위에 특이적인 결합된 상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여 앰플리콘을 생성하는 단계;

다형성 좌위에 특이적인 상기 앰플리콘을 분할하여 분할된 앰플리콘을 생성하는 단계;

상기 분할된 앰플리콘의 포착 영역을 어레이 상의 포착 영역에 경쟁적으로 혼성화시켜 다형성 좌위로부터 상기 분할된 앰플리콘을 검출하는 단계;

상기 분할된 앰플리콘 상의 각 대립유전자에 대하여 상이한 라벨 결합 영역을 검출하여 다형성 좌위의 대립유전자를 정량화함으로써 샘플 내 태아 DNA 비율을 측정하는 단계;

상기 정량화된 대립유전자로부터 태아 DNA의 비율을 측정하는 단계; 및

샘플 내 상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 추정된 상대 빈도와 태아 DNA의 비율을 이용하여 모체 샘플 내 태아 복제수 변이의 통계적 가능성을 계산하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 태아 복제수 변이의 통계적 가능성을 제공하기 위한 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

3개 이상의 합성 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역 중의 각각의 비-다형성 좌위를 조사하는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 증폭하여 앰플리콘을 생성하는 단계가 중합효소 연쇄 반응을 이용한 일반 증폭을 포함하는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

모체 DNA는 동형접합성이고 태아 DNA는 이형접합성일 경우, 다형성 좌위의 정량화된 대립유전자로부터 낮은 빈도의 대립유전자를 식별하는 단계; 및

다형성 좌위로부터의 낮은 빈도의 대립유전자를 이용하여 태아 DNA 비율을 측정하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제1 게놈 영역이 염색체인 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제2 게놈 영역이 염색체인 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제1 게놈 영역이 염색체 하부 영역인 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 제2 게놈 영역이 염색체 하부 영역인 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 고정 올리고뉴클레오타이드의 라벨 결합 영역이 라벨을 포함하는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 고정 올리고뉴클레오타이드의 라벨 결합 영역이 라벨을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 다형성 좌위가 상염색체 좌위인 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

상기 비-다형성 좌위를 조사하는 단계는 가교 올리고뉴클레오타이드의 사용을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 13

모체 및 태아 무세포 DNA를 포함하는 모체 샘플을 제공하는 단계;

각각의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 상보적 영역이 비-다형성 좌위에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에서 모체 샘플 내 제1 표적 게놈 영역의 비-다형성 좌위 세트에 상보적인 2개 이상의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 50개의 제1 세트를 도입하며, 상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 일반 프라이머 부위, 제1 포착 영역, 제1 라벨 결합 영역, 및 2개의 제한 부위를 포함하는 단계;

각각의 상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 상보적 영역이 비-다형성 좌위에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에서 모체 샘플 내 제2 표적 게놈 영역의 비-다형성 좌위 세트에 상보적인 2개 이상의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 50개의 제2 세트를 도입하며, 상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 일반 프라이머 부위, 제1 포착 영역, 제2 라벨 결합 영역, 및 2개의 제한 부위를 포함하는 단계;

각각의 상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 상보적 영역이 다형성 좌위에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에서 모체 샘플 내 다형성 좌위 세트에 상보적인 3개 이상의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 2개 이상의 제3 세트를 도입하며, 상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 3개 중 적어도 2개는 일반 프라이머 부위, 다형성 좌위에 있는 하나의 대립유전자에 상보적인 서열, 다형성 좌위에서 각 대립유전자에 대하여 상이한 라벨 결합 영역, 2개의 제한 부위, 및 포착 영역을 포함하며, 여기서 각각의 다형성 좌위에 대한 포착 영역은 하나씩 걸른 다형성 좌위에 대한 포착 영역과 상이하고 제1 포착 영역과 상이한 단계;

상기 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제1, 제2 및 제3 세트를 제1 및 제2 표적 게놈 영역과 다형성 좌위에 혼성화하는 단계;

상기 제1 및 제2 세트의 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개를 연장하여 인접하여 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 형성시키는 단계;

상기 제1 및 제2 세트로부터 인접하여 혼성화된 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 결합시켜 결합 생성물을 생성하는 단계;

일반 프라이머 부위를 이용하여 상기 결합 생성물을 증폭시켜 앰플리콘을 생성하는 단계;

상기 앰플리콘을 분할하여 분할된 앰플리콘을 생성하는 단계;

상기 분할된 앰플리콘을 어레이에 인가하며, 상기 어레이는 상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역으로부터 분할된 앰

플리콘의 제1 포착 영역에 상보적인 제1 포착 프로브를 포함하며, 또한 어레이는 각각의 다형성 좌위로부터 분할된 애플리콘의 포착 영역에 상보적인 포착 프로브를 포함하는 단계;

상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역으로부터 분할된 애플리콘의 제1 포착 영역을 어레이 상의 제1 포착 프로브에 혼성화하는 단계;

다형성 좌위로부터 분할된 상기 애플리콘의 포착 영역을 어레이 상의 포착 프로브에 혼성화하는 단계;

상기 혼성화된 분할된 애플리콘을 검출하는 단계;

상기 분할된 애플리콘 상의 각 대립유전자에 대하여 상이한 라벨 결합 영역을 검출하여 다형성 좌위로부터의 각 대립유전자의 상대 빈도를 정량화함으로써 태아 무세포 DNA 비율을 측정하는 단계;

태아 무세포 비율을 측정하는 단계;

상기 제1 및 제2 라벨 결합 영역을 검출하여 상기 제1 표적 게놈 영역의 좌위에 상응하는 분할된 애플리콘의 상대 빈도 및 상기 제2 표적 게놈 영역의 좌위에 상응하는 분할된 애플리콘의 상대 빈도를 정량화하는 단계; 및

상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 좌위에 상응하는 분할된 애플리콘의 상대 빈도 및 태아 무세포 DNA 비율을 이용하여 태아 이수성(aneuploidy)의 가능성을 계산하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 태아 염색체 이수성(aneuploidy)의 가능성을 판단하기 위한 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,

모체 DNA는 동형접합성이고 태아 DNA는 이형접합성일 경우, 다형성 좌위의 정량화된 대립유전자로부터 낮은 빈도의 대립유전자를 식별하는 단계; 및

다형성 좌위로부터 낮은 빈도의 대립유전자를 이용하여 태아 DNA 비율을 측정하는 단계; 를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 15

제13항에 있어서,

상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 좌위에 상응하는 분할된 애플리콘의 상대 빈도를 비교하는 단계; 및

태아 무세포 DNA 비율에 근거하여 태아 이수성의 가능성을 조절하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 16

제13항에 있어서,

상기 제1 표적 게놈 영역의 좌위에 상응하는 분할된 애플리콘의 상대 빈도를 총합하고, 상기 제2 표적 게놈 영역의 좌위에 상응하는 분할된 애플리콘의 상대 빈도를 총합하고, 상기 제1 표적 게놈 영역의 좌위에 상응하는 분할된 애플리콘의 합을 상기 제2 표적 게놈 영역의 좌위에 상응하는 분할된 애플리콘의 합과 비교하여 표적 게놈 영역 비율을 계산하는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 17

제13항에 있어서,

상기 다형성 좌위(loci)는 상염색체 좌위인 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 18

제13항에 있어서,

상기 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 좌위(loci)로부터 분할된 앰플리콘과 다형성 좌위로부터 분할된 앰플리콘이 단일 용기에서 증폭되는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 19

제13항에 있어서,

상기 고정 올리고뉴클레오타이드의 라벨 결합 부위는 라벨로 구성되는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

#### 청구항 20

제13항에 있어서,

상기 고정 올리고뉴클레오타이드의 라벨 결합 부위는 라벨을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 혼성화를 이용한 표적 핵산 검출 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 샘플로부터 표적 게놈 영역의 핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 관련 출원의 참조

[0003] 본 국제 PCT 출원에서는 2014년 8월 1일에 접수된 미국 특허 출원 번호 14/450,144 및 2014년 8월 6일에 접수된 미국 특허 출원 번호 14/453,396의 이익을 주장한다.

[0004] 발명의 배경

[0005] 다음 고찰에서 배경 및 소개 목적으로 특정 논문과 방법이 기술된다. 본 문서에 포함된 어떠한 것도 선행 기술을 “인정” 하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 출원인은 해당되는 경우 관련 법정 규정에 근거하여 본 문서에 참조된 논문과 방법이 선행 기술로 간주되지 않음을 입증할 권리를 명백하게 보유한다.

[0006] 유전적 이상은 염색체 수적 이상(예: 다운증후군)에 기인한 병리, 특정 유전자에서의 생식세포 돌연변이(예: 겸상적혈구빈혈), 그리고 체세포 돌연변이(예: 암)에 기인한 병리 등을 포함한 광범위한 병리의 원인이다. 유전적 이상 판단에 대한 진단 방법이 특정 질병 및 장애 확인에 대한 표준 기술이 되었으며 질병 근원과 치료 방법에 관한 소중한 정보를 제공해 오고 있다.

[0007] 유전자 복제수 변이(CNV)는 결실되거나 중복된 게놈의 특정 영역(염색체 전체 포함)에 상응하는 게놈(genomic) DNA의 변형이다. CNV는 결실, 중복, 역전, 전위 등의 게놈의 재배열에 의해 초래될 수 있다. CNV는 다양한 형태의 암(Cappuzzo F, Hirsch, et al. (2005) *J Natl Cancer Inst.*, 97(9):643-55), 자폐증(Sebat, J., et al. (2007) *Science* 316(5823):445-9)을 포함한 신경 장애, 그리고 조현병(St. Clair, D., (2008). *Schizophr Bull* 35(1):9-12)과 관련이 있다.

[0008] 따라서, 효율적이고 재현성 있는 분석 및 검출 시스템을 사용하는 복제수 변이에 대한 검색 방법이 필요하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 본 요약은 일련의 개념을 간단한 형식으로 소개하기 위해 제공되며 이 개념들은 아래 상세한 설명에서 자세히 설명된다. 본 요약은 특허 청구 대상의 주요 또는 기본 기능을 식별하기 위한 것이 아니며, 특허 청구 대상의 범위 제한을 목적으로 하지 않는다. 특허 청구 대상의 기타 특징, 세부 사항, 효용 및 이점은 첨부된 도면에 나와 있고 추가된 청구항에서 정의된 양태를 포함하여, 아래의 상세한 설명에서 명백하게 기술된다.
- [0010] 본 발명에서는 복제수 변이(CNV), 삼입, 결실, 전위, 다형성 및 돌연변이 등의 샘플 내 유전적 특성을 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명에서는 각 조사 대상 좌위(interrogated locus)에 대하여 적어도 2개의 고정 서열의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 2개 이상의 표적 게놈 영역으로부터 좌위(loci)를 조사(interrogate)하고 결찰(ligation)을 통해 직접 또는 간접적으로 고정 서열의 올리고뉴클레오타이드를 결합하는 기술을 사용한다. 선택된 게놈 영역의 다른 좌위(loci)에서 생긴 결찰 생성물은 고체 지지면에 있는 1개 이상의 포착 프로브에 상보적인 영역을 포함하도록 설계된 핵산 포착 영역을 포함한다. 포착 영역은 특정 표적 게놈 영역에서 기원한 결찰 생성물을 확인하는 검출 가능한 라벨을 1개 이상 포함한다. 다른 표적 게놈 영역에서 생긴 결찰 생성물 확인은 고체 지지면에 있는 포착 프로브에 상보적인 결찰 생성물의 포착 영역에 대한 결합으로 이루어진다.

### 과제의 해결 수단

- [0011] 특정 실시양태로, 본 발명은 모체 및 태아 무세포 DNA로 구성된 모체 샘플을 제공하고, 포착 영역을 포함하는 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드를 이용한 제1 표적 게놈 영역으로부터의 좌위(loci)를 1개 이상 조사(interrogate)하고, 포착 영역을 포함하는 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드를 이용한 제2 표적 게놈 영역으로부터의 좌위를 1개 이상 조사(interrogate)하고, 혼성화를 통해 제1 및 제2 표적 게놈 영역으로부터 분리된 선택된 좌위를 검출하여 배열하고, 분리된 좌위의 총 수를 정량화하여 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 상대 빈도를 측정하고, 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 제1 및 제2 표적 게놈 영역과 다른 적어도 1개의 표적 게놈 영역으로부터 선택된 다형성 좌위를 조사하고, 분리된 선택된 다형성 좌위를 검출하고, 분리된 선택된 다형성 좌위의 총 수를 정량화하여 모체 샘플 내 태아 무세포 DNA의 비율을 계산하고, 모체 샘플 내 태아 염색체 이수성(aneuploidy)의 통계적 가능성을 계산하는 것으로 이루어진, 태아 염색체 이수성(aneuploidy)의 통계적 가능성을 제공하기 위한 분석 방법을 제공하는데, 여기서 제1 표적 게놈 영역으로부터 좌위의 상대 빈도, 제2 표적 게놈 영역으로부터 좌위의 상대 빈도, 그리고 분리된 선택된 다형성 좌위로부터 정량화된 수가 태아 염색체 이수성(aneuploidy)의 통계적 가능성을 제공한다.
- [0012] 다른 특정 실시양태로, 본 발명은 모체 및 태아 무세포 DNA로 구성된 모체 샘플을 제공하고, 포착 영역을 포함하는 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 제1 게놈 영역으로부터의 좌위를 1개 이상 조사하고, 포착 영역을 포함하는 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 제2 표적 게놈 영역으로부터 좌위를 1개 이상 조사하고, 혼성화를 통해 제1 및 제2 표적 게놈 영역으로부터 분리된 선택된 좌위를 검출하여 배열하고, 분리된 좌위의 총 수를 정량화하여 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 상대 빈도를 측정하고, 제1 표적 게놈 영역으로부터의 좌위의 상대 빈도와 제2 표적 게놈 영역으로부터의 좌위의 상대 빈도를 사용하여, 분리된 좌위의 예상된 수치로부터의 이탈에 근거하여 모체 샘플 내 태아 염색체 이수성(aneuploidy)의 존재 또는 부재 여부를 판단하는 것으로 이루어진, 태아 염색체 이수성의 존재 또는 부재 여부를 판단하는 분석 방법을 제공한다. 특정 양태로, 예상된 수치로부터의 이탈은 샘플의 대표적인 모집단으로부터 측정된 임계 수치를 이용하여 판단하며, 바람직하게는 대표적인 모집단은 유사한 모체 연령 및/또는 재태 기간의 환자에서 얻은 샘플로 구성된다.
- [0013] 구체적인 양태로, 제1 및 제2 게놈 영역으로부터의 좌위의 조사(interrogation)는 혼성화 및 그 후 결찰을 사용한다. 더욱 구체적인 양태로, 혼성화 및 결찰 단계 후 증폭 단계를 수행한다. 다른 구체적인 양태로, 증폭은 중합효소 연쇄 반응을 이용한 보편적인 증폭이다.
- [0014] 바람직한 양태로, 2 개 이상의 다른 게놈 영역으로부터 얻은 결찰 생성물은 포착 프로브가 있는 단일 고체 지지면, 예를 들면 다른 표적 게놈 영역을 나타내는 다중 포착 영역에 상보적인 포착 프로브로 구성된 어레이(array)를 이용하여 확인한다. 2 개 이상의 다른 게놈 영역에서 기원한 결찰 생성물의 풀(pool)을 어레이에 도입하면, 동일한 포착 영역을 가지는 결찰 생성물이 어레이 상에서 상보적인 포착 프로브에 대해 경쟁적으로 혼성화하며, 각 게놈 영역으로부터의 결찰 생성물의 상대 빈도는 포착 프로브에 결합된 검출된 라벨의 양에 근거하여 추정할 수 있다. 이런 방식으로 표적 게놈 영역의 상대 빈도 자체를 측정할 수 있다. 각 표적 게놈 영역



의 상대 빈도는 각 표적 게놈 영역에서 선택된 각 좌위(locus)에 상응하는 결찰 생성물에 대하여 어레이 상의 특이적이고 알려져 있는 위치에 포착 영역의 결합을 확인하거나, 또는 표적 게놈 영역에서 기인한 결찰 생성물의 결합 후 어레이로부터의 총 형광도를 추정하여 측정할 수 있다.

[0015] 특정의 바람직한 실시양태로, 포착 영역과 포착 프로브는 특이적인 표적 게놈 영역 뉴클레오티드 서열을 반영하지 않으며, 대신 특이적인 표적 게놈 영역을 식별하는 대리(surrogate) 기능을 하는 “조작(engineered)” 된 서열이며; 따라서, 표적 게놈 영역에 상응하는 결찰 생성물의 뉴클레오티드 서열은 직접 측정될 필요가 없다. 결찰 생성물 상의 포착 영역을 사용하면 어레이 상에 있는 포착 프로브에 결찰 생성물이 결합될 수 있으며, 이는 표적 게놈 영역의 실제 뉴클레오티드 서열에 상응하는 결찰 생성물의 부분의 서열을 결정할 필요 없이 결찰 생성물이 기원하는 더 큰 표적 게놈 영역을 나타낸다. 포착 영역과 포착 프로브가 조작된 서열이기 때문에, 이는 “일반” 서열로 간주될 수 있으며; 즉 이들 포착 영역과 포착 프로브는 임의의 수의 다른 분석법과 함께 사용할 수 있고, 이 때 유일한 차이점은 포착 영역(들)과 관련된 표적 서열(들)이다.

[0016] 하나의 실시양태로, 본 발명의 어레이는 실질적으로 전부 동일한 서열을 가진 포착 프로브를 포함한다. 또 다른 실시양태로, 사용된 어레이는 실질적으로 동일한 서열을 가지는 포착 프로브가 있는 2개 내지 여러 개의 다른 특징을 포함한다. 이러한 어레이는 다른 특징과 구별되는 핵산 서열을 포함하는 각 특징을 가진 개별 특징에 대한 상보성에 의하여 개별적인 서열을 식별하는 기술에서 알려진 어레이와 대조적이다. 어레이 상에 있는 개별 특징 내의 상보적인 포착 프로브 서열을 단일 또는 한정된 수로 사용하면 어레이를 생성하는 데 필요한 생화학을 단순화할 수 있고, 예를 들어 결찰 생성물 상의 포착 영역과 포착 프로브 간의 결합 친화도 차이에서 생기는 검출 빈도의 거짓 차이 가능성을 줄일 수 있다.

[0017] 구체적인 실시양태로, 어레이는 2개 이상의 다른 표적 게놈 영역으로부터 얻은 개별적인 결찰 생성물, 단일 표적 게놈 영역의 2개 이상의 다른 좌위, 또는 선택된 좌위(locus)의 2개 이상의 다른 대립유전자(allele)를 검출하는 데 사용하는 2개 이상의 다른 포착 프로브를 포함한다. 즉, 다른 서열의 포착 프로브가 다른 표적 게놈 영역, 단일 표적 게놈 영역의 다른 좌위(loci), 또는 선택된 좌위(locus)의 다른 대립유전자(allele)에 상응하는 결찰 생성물에 있는 포착 영역으로 혼성화한다. 결찰 생성물에 있는 포착 영역은 결찰 생성물이 기원한 표적 게놈 영역 또는 선택된 좌위를 나타내거나, 다형성의 대립유전자(allele)를 나타내는 라벨과 관련이 있다.

[0018] 따라서, 본 발명의 바람직한 실시양태에서 결찰 생성물은 결찰 생성물 내에 또는 결찰 생성물에 도입되는 포착 영역에 상보적인 포착 프로브를 사용하여 식별하지만 결찰 생성물이 온전히 혼성화에 의해 표적 게놈 영역에 상보적인 특징에 상응하는 표적 게놈 영역을 식별하지는 않는다. 일부 실시양태로, 포착 프로브가 일부는 표적 게놈 영역에 상보적이고 일부는 결찰 생성물 내 포착 영역에 상보적이다. 바람직한 실시양태로, 표적 게놈 영역에 상응하는 결찰 생성물을 식별하는 데 사용하는 포착 영역은 표적 게놈 영역의 어떠한 부분에도 상보적이지 않다.

[0019] 바람직하게는, 결찰 전에 고정 서열 올리고뉴클레오티드 하나의 일부로 포착 영역이 도입되며, 단 포착 영역은 결찰 절차 후 고정 서열 올리고뉴클레오티드의 결찰 생성물의 한 쪽 말단 또는 양쪽 말단에 부착될 수 있다(예: 어댑터 결찰을 통해).

[0020] 본 발명의 혼성화 분석 형식의 또 다른 특징은 표적 게놈 영역에 상응하는 결찰 생성물의 서열을 실제로 결정하지 않고 표적 게놈 영역 내 좌위(loci)의 결찰 생성물과 관련된 라벨을 정량화하여 포착 영역 사용 시 표적 게놈 영역을 정량화할 수 있다는 점이다. 이러한 방식으로, 표적 게놈 영역의 좌위(loci)의 실제 뉴클레오티드 서열을 검출할 필요 없이 표적 게놈 영역의 결찰 생성물 빈도 (및 표적 게놈 영역 자체의 빈도)를 추정할 수 있다.

[0021] 다수의 바람직한 실시양태에서, 각 표적 게놈 영역에서 생성된 결찰 생성물의 수준 또는 양을 추정하는 데 필요한 유일한 판독치는 어레이 상에서 포착 프로브에 결합된 라벨의 정량화이며, 이는 표적 게놈 영역의 빈도를 추정하는 데 사용할 수 있다.

[0022] 발명의 방법의 이점 중 하나는 결찰 생성물이 검출 가능한 여러 개의 다른 라벨 및/또는 포착 영역과 연결될 수 있다는 것이다. 다른 실험에서 다른 라벨 및/또는 포착 영역을 사용하면 검출 가능한 특정 라벨, 포착 영역 또는 포착 프로브 사용으로 인한 빈도 편이(bias)를 경감시킬 수 있다.

[0023] 특정 실시양태로, 본 발명은 샘플 내 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 빈도 검출에 대한 방법을 제공하며 이 방법은 다음: 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오티드가 제1 표적 게놈 영역의 좌위(loci) 중 상보적인 영역에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에서 제1 및 제2고정 서열 뉴클레오티드의 제1 세트를 도입하는 단계 (이 때

제1 세트의 제1 또는 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1 개는 포착 영역과 제1 라벨로 포함한다); 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 제2 표적 게놈 영역의 좌위(loci) 중 상보적인 영역에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에서 제1 및 제2고정 서열 뉴클레오타이드의 제2 세트를 도입하는 단계 (이 때 제2 세트의 제1 또는 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 포착 영역과 제2 라벨을 포함한다); 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 결찰시켜 좌위에 상보적인 결찰 생성물을 생성시키는 단계; 어레이 상의 포착 프로브가 결찰 생성물의 포착 영역에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에서 포착 프로브를 포함하는 결찰 생성물을 도입하는 단계; 제1 및 제2 라벨을 검출하는 단계; 및 제1 및 제2 라벨의 상대 빈도를 정량화하여 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 상대 빈도를 정량화하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 결찰 생성물의 제1 및 제2 세트의 포착 영역은 상이하다. 다른 양태에서, 결찰 생성물의 제1 및 제2 세트의 포착 영역은 동일하다.

[0024] 바람직한 양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 제1 및 제2 포착 영역은 동일하다. 다른 양태에서, 작은 수의 포착 영역이 제1 및 제2 세트 둘 다의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 사용된다. 다른 양태에서, 제1 게놈 영역에 상응하는 제1 포착 영역은 제2 게놈 영역에 상응하는 제2 포착 영역과 상이하다.

[0025] 다른 바람직한 실시양태로, 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 조사에 추가적으로 2개 이상의 선택된 다형성 좌위(loci)의 SNP를 포함하는 다형성 서열을 또한 조사한다. 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제3 세트를 사용하여, 선택된 다형성 좌위를 조사하여 대립유전자(allele) 빈도를 측정한다. 대립유전자 빈도는 예를 들어 모체 혈청 샘플에 존재하는 태아 핵산 비율을 산출하는 데 사용한다.

[0026] 특정 실시양태로, 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 표적 게놈 영역의 좌위(loci)에 인접하게 혼성화하지 않으며 대신 한 좌위(locus)에 혼성화된 세트의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 간의 사이 영역(intervening region) 즉 “간격”을 가진다. 상기 사이 영역은 예를 들면 중합효소 및 dNTP를 사용하여 하나의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 말단으로 연장되어 해당 말단이 해당 세트의 다른 혼성화된 올리고뉴클레오타이드의 말단과 인접하도록 채워질 수 있다. 또 다른 실시양태로, 사이 영역은 하나의 세트의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이 및 그에 인접하여 결합하는 1개 이상의 “간격-채우기” 또는 “가교” 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 채울 수 있다. 후자의 경우, 바람직하게는, 결찰 단계에서 모든 올리고뉴클레오타이드를 단일 포착 영역을 포함하는 단일의 연속된 결찰 생성물로 결찰시킨다. 또 다른 실시양태로, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 간의 사이 공간을 채우는 데 가교 올리고뉴클레오타이드와 dNTP와 중합효소 조합을 사용할 수 있다.

[0027] 상기 실시양태에서, 선택된 각 좌위(locus) 내 2개의 별도 영역으로 (인접하거나 비인접하여) 혼성화하도록 설계된 2개의 별도 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 고정 서열 핵산 세트를 사용한다. 단, 일부 실시양태에서는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 세트가 선택한 좌위(locus)에 상보적인 말단 중 하나에서의 영역을 갖는 단일 프로브를 포함할 수 있다. 한 좌위(locus)에 상기 단일 프로브를 혼성화하면, 프로브가 해당 좌위(locus)에 인접하거나 인접하지 않도록 혼성화될 수 있는 원형 구조를 형성한다. 또한, 이러한 “전원형(precircle)” 프로브는 프로브 말단 사이의 간격과 혼성화할 수 있으며, 이 간격은 중합효소와 dNTP 또는 이의 조합을 이용하여 프로브의 말단 중 하나를 연장하여 1개 이상의 가교 올리고뉴클레오타이드의 혼성화를 통해 채워질 수 있다.

[0028] 특정 양태에서, 검출 가능한 라벨은 각 세트의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 하나에 존재하는 포착 영역에 직접 관련(즉 공유적 또는 비공유적으로 결합)되어 있다. 또 다른 실시양태에서, 결찰 생성물은 결찰 후, 예를 들면 일반 증폭으로 증폭되며, 검출 가능한 라벨은 증폭에 사용한 프라이머 내에 포함된 포착 영역과 관련된다. 다른 구체적인 양태에서, 제1 및 제2 표적 게놈 영역으로부터 분리된 좌위(loci)와 선택한 다형성 좌위로부터의 결찰 생성물을 단일 용기 내에서 증폭시킨다. 다른 양태에서, 검출 가능한 라벨은 결찰 생성물, 앰플리콘(amplicon) 또는 이의 분할(cleavage) 생성물 상의 상보적인 서열에 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드에 공유적 또는 비공유적으로 결합한다. 이러한 라벨링된 올리고뉴클레오타이드는 결찰 생성물을 포착 프로브 어레이로 도입하기 전이나 도입한 후에 결찰 생성물에 혼성화될 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 실시양태로, 다른 표적 게놈 영역에 상응하는 결찰 생성물 상의 포착 영역은 다른 서열을 포함하며, 상이한 포착 영역과 관련된 검출 가능한 상이한 라벨 사용에 근거하여 적어도 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 비교 빈도를 측정한다.

[0030] 특정 양태에서, 복제수 변이체는 샘플 내 표적 게놈 영역으로부터 얻은 결합된 결찰 생성물의 결합된 검출 가능한 라벨의 예상 비를 변형시켜 검출한다. 특정 구체적인 양태에서, 복제수 변이체는 첫 번째 선택된 좌위(locus)로부터 얻은 결찰 생성물의 제1 세트 혼성화의 증가 또는 감소 수준을 두 번째 선택된 좌위로부터 얻은

결찰 생성물의 제2 세트와 비교하여 검출한다.

- [0031] 샘플 내 좌위(loci)의 상대 빈도를 사용하여 작은 표적 게놈 영역에 대한 복제수 변이뿐 아니라 다른 좌위와 결합 및/또는 비교하여 복제수 변이를 측정할 수 있으며, 좌위의 상대 빈도는 부분 또는 전체 염색체를 포함하여 보다 큰 표적 게놈 영역에 대한 복제수 변이를 측정하는 데에도 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 일반 양태에서, 샘플 내 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 검출 방법이 제공되는데, 이는 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 제1 표적 게놈 영역의 좌위(loci)에 상보적인 영역에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 제1 및 제2 고정 서열 뉴클레오타이드의 제1 세트를 도입하는 단계, 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 제2 표적 게놈 영역의 좌위에 상보적인 영역에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 제1 및 제2 고정 서열 뉴클레오타이드의 제2 세트를 도입하는 단계, 각 세트의 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 결찰시켜 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 좌위에 상보적인 결찰 생성물을 생성시키는 단계를 포함한다. 각 세트의 적어도 1개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 어레이 상의 포착 프로브 그리고 검출 가능한 라벨에 대한 결합 영역에 상보적인 서열을 포함하는 포착 영역을 포함한다. 결찰 생성물의 포착 영역에 포착 프로브가 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 결찰 생성물의 포착 영역에 상보적인 포착 프로브를 포함하는 어레이에 결찰 생성물을 도입한다. 제1 표적 게놈 영역의 좌위(loci)에서 얻은 결찰 생성물의 포착 영역의 결합 영역에 검출 가능한 라벨이 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 제1 검출 가능한 라벨을 어레이에 도입하며, 제2 표적 게놈 영역의 좌위에서 얻은 결찰 생성물의 포착 영역의 결합 영역에 검출 가능한 라벨이 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 제2 검출 가능한 라벨을 어레이에 도입한다. 샘플 내 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 상대 빈도를 제공하기 위해 제1 및 제2 검출 가능한 라벨을 검출하고 정량화한다. 앞서 논의한 대로, 하나의 실시양태와 관련하여, 제1 및 제2 표적 게놈 영역 조사에 추가적으로 본 실시양태의 양태에서 2개 이상의 선택된 다형성 좌위(loci)의 SNP를 포함하는 다형성 서열을 조사한다. 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제3 세트를 사용하여, 선택된 다형성 좌위를 조사하여 대립유전자(allele) 빈도를 측정한다. 대립유전자 빈도는 예를 들어 모체 혈청 샘플에 존재하는 태아 핵산 비율을 산출하는 데 사용한다. 또한, 앞서 논의한 대로, 본 실시양태의 일부 양태에서, 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 추가적으로 “간격 채우기” 또는 “가교” 올리고뉴클레오타이드를 사용할 수 있으며, 본 실시양태의 일부 양태에서는 아래에 상세히 설명된 대로 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 또는 가교 올리고뉴클레오타이드가 대립유전자-특이적이다.
- [0033] 구체적인 양태로, 본 발명의 어레이는 분리된 선택된 다형성 좌위로부터 저빈도 대립유전자를 식별하고 (여기서 모체 DNA는 동형접합성이고 비-모체 DNA는 이형접합성임), 분리된 선택된 다형성 좌위로부터의 저빈도 대립유전자의 총합을 계산하며, 분리된 선택된 다형성 좌위로부터의 저빈도 대립유전자의 총합을 이용하여 모체 샘플 내 태아 염색체 이수성(anuploidy)의 통계적 가능성을 계산하여 제1 및 제2 표적 게놈 영역에 대하여 표적 게놈 영역 빈도에서 통계적으로 유의한 차이를 산출하며, 이 때 염색체 빈도의 통계적으로 유의한 차이는 태아 염색체 이수성 존재에 대한 통계적 가능성을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 일반 양태로, 샘플 내 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 빈도의 검출 방법이 제공되며, 이 방법은 샘플을 제공하는 단계, 첫 번째 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 생성하기 위해 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 제1 표적 게놈 영역의 제1 좌위(loci)의 상보적인 영역에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 제1 및 제2 고정 서열 뉴클레오타이드의 제1 세트를 도입하는 단계, 두 번째 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 생성하기 위해 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 제2 표적 게놈 영역의 두 번째 좌위의 상보적인 영역에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 제1 및 제2 고정 서열 뉴클레오타이드의 제2 세트를 도입하는 단계를 포함한다. 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제1 세트의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 포착 영역과 제1의 검출 가능한 라벨에 상보적인 라벨 결합 영역을 포함하며, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제2 세트의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 제1 세트와 실질적으로 동일한 포착 영역과 제2의 검출 가능한 라벨에 상보적인 라벨 결합 영역을 포함한다. 각각 제1 및 제2 좌위에 상보적인 영역을 포함하는 제1 및 제2 결찰 생성물을 생성하기 위하여 제1 및 제2 세트의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 결찰시키고 제1 및 제2의 검출 가능한 라벨로 라벨링한다. 결찰 생성물의 포착 영역에 포착 프로브가 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 포착 프로브를 포함하는 어레이에 제1 및 제2 결찰 생성물을 도입한다. 제1 및 제2 라벨의 상대 빈도를 측정하고 이에 따라 샘플 내 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 상대 빈도를 정량화하기 위해 제1 및 제2 라벨을 검출하고 정량화한다.
- [0035] 검출 가능한 라벨은 결찰 생성물을 어레이로 도입하기 전에 결찰 생성물로 도입할 수 있다. 달리, 검출 가능한 라벨은 결찰 생성물 혼성화 후 어레이로 도입할 수 있다.



- [0036] 또한, 특정 실시양태에서, 해당 방법은 관심 대상 서열로 혼성화된 적어도 1개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 연장을 추가적으로 사용한다. 즉, 일부 실시양태로, 1개 이상의 좌위에 혼성화하는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 인접하여 혼성화하지 않고 “간격” 또는 “사이” 영역을 남길 수 있다. 상기 사이 영역(intervening region)은 예를 들면 중합효소 및 dNTP를 사용하여 하나의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 말단으로 연장되어 해당 말단이 해당 세트의 다른 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 말단과 인접하도록 채워질 수 있다. 또 다른 실시양태로, 사이 영역(intervening region)은 한 세트의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이 및 그에 인접하여 결합하는 1개 이상의 “간격-채우기” 또는 “가교” 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 채울 수 있다. 후자의 경우, 바람직하게는 결합 단계에서 모든 올리고뉴클레오타이드를 단일 포착 영역을 포함하는 단일의 연속된 결합 생성물로 결합되며 상기 단일 포착 영역은 이후 어레이 상에서 검출될 수 있다. 또한, 가교 또는 간격-채우기 올리고뉴클레오타이드와 dNTP 그리고 중합효소의 조합을 사용하여 간격을 채울 수 있다. 추가적으로 일부 실시양태에서, 한 세트 내에서 2개의 고정 서열 뉴클레오타이드 대신 전원형(pre-circular), 자물쇠 또는 분자 역전 프로브를 사용할 수 있다.
- [0037] 간격-채우기 또는 가교 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 경우, 가교 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 짧으며, 바람직하게는 2~30개 뉴클레오타이드이고 3~28개 뉴클레오타이드 길이가 더 바람직하다. 하나의 양태로, 다중 또는 모든 위치에서 퇴화(degeneracy)를 제공하도록 가교 올리고뉴클레오타이드를 설계할 수 있으며, 예를 들면 좌위(locus)가 1개 이상의 위치에서 다형성 뉴클레오타이드를 포함하는 경우에도 좌위(loci) 검출을 보장하기 위하여 가교 올리고뉴클레오타이드가 각종 서열 변이를 가진 전체 또는 부분 랜더머(randomer)일 수 있다. 가교 올리고뉴클레오타이드의 퇴화는 좌위(loci)에 존재할 수 있는 예측된 다형성에 근거하여 설계할 수 있다. 달리, 다른 양태로, 반응에서 사용된 가교 올리고뉴클레오타이드의 풀(pool)이 좌위(loci)의 영역에 존재할 수 있는 예측된 다형성에 근거하여 1개 이상의 위치를 특이적으로 표적으로 하는 제한된 퇴화를 제공할 수 있다. 또 다른 양태로, 반응에서 사용된 가교 올리고뉴클레오타이드의 풀(pool)이 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 고정된 상태로 유지되도록 하면서 결합 부위에 인접한 뉴클레오타이드를 사용하여 각 내부 위치에 대한 퇴화를 제공할 수 있다. 퇴화된 가교 올리고뉴클레오타이드를 사용하면 본 발명의 검출 방법을 사용하기 전에 선택된 좌위(locus)에 대하여 모체 및 태아의 다형성 함량을 미리 결정할 필요가 없어지는 이점이 있다.
- [0038] 다른 양태로, 가교 올리고뉴클레오타이드는 길이가 뉴클레오타이드 10개보다 길며 바람직하게는 18~30개 뉴클레오타이드 길이이다. 바람직한 양태로, 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 선택된 좌위의 영역 사이에서 혼성화하도록 설계된 각각의 선택된 좌위에 상보적인 단일 가교 올리고뉴클레오타이드가 있다. 다른 양태로, 2개 이상의 가교 올리고뉴클레오타이드가 각 선택된 좌위(locus)에서 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이에서 혼성화하도록 설계되었으며, 바람직하게는 가교 올리고뉴클레오타이드는 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 인접하여 혼성화한다.
- [0039] 2개의 가교 올리고뉴클레오타이드가 있는 상황에서, 선택한 좌위(locus)당 3회의 결합이 발생하며 이는 제1 고정 올리고뉴클레오타이드와 제1 가교 올리고뉴클레오타이드 간의 결합, 제1 및 제2 가교 올리고뉴클레오타이드 간의 결합, 그리고 제2 가교 올리고뉴클레오타이드와 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 간의 결합이다. 다른 양태로, 가교 올리고뉴클레오타이드 간 및/또는 가교 올리고뉴클레오타이드와 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 간에 간격이 있을 수 있다. 이러한 간격은 결합 전에 예를 들면, 중합효소와 dNTP를 사용한 연장으로 채울 수 있다.
- [0040] 본 발명의 하나의 양태로, 샘플에 가교 올리고뉴클레오타이드를 도입하기 전에 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 샘플에 도입하고 좌위(loci)의 상보적 영역에 특이적으로 혼성화한다. 다른 양태로, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제1 및 제2 세트를 샘플에 도입하는 것과 동시에 가교 올리고뉴클레오타이드를 샘플에 도입한다.
- [0041] 본 발명의 다른 일반 양태로, 혼합 샘플 내 이수성의 존재나 부재 여부를 판단하는 방법이 제공되며, 이 방법은 혼합 샘플을 제공하는 단계; 제1의 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 생성하기 위해 제1 염색체의 첫 번째 좌위(loci)에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 제1 및 제2 고정 서열 뉴클레오타이드의 제1 세트를 혼합 샘플에 도입하는 단계 (이 때 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제1 세트는 제1 포착 영역과 제1 라벨 결합 영역을 포함한다); 제2의 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 생성하기 위해 제2 염색체의 두 번째 좌위에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 제1 및 제2 고정 서열 뉴클레오타이드의 제2 세트를 혼합 샘플에 도입하는 단계 (이 때 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제2 세트는 제2 포착 영역과 제2 라벨 결합 영역을 포함한다); 좌위에 상보적인 결합 생성물을 생성하도록 혼성화된 올리고뉴클레오타이드를 결합시키는 단계; 결합 생성물의 제1 및 제2 포착 영역에 포착 프로브가 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 포착 프로브를 포함하는 어레이에 결합 생성물을 도입하는 단계; 제1 라벨링된 올리고뉴클레오타이드의 표적 인식 영역이 제1 라벨 결합 영

역에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에서 제1 라벨링된 올리고뉴클레오타이드를 어레이에 도입하는 단계; 제2 라벨링된 올리고뉴클레오타이드의 표적 인식 영역이 제2 라벨 결합 영역에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에서 제2 라벨링된 올리고뉴클레오타이드를 어레이에 도입하는 단계; 제1 및 제2 라벨을 검출하는 단계; 제1 및 제2 라벨의 상대 빈도를 정량화하여 이에 의해 혼합 샘플 내 제1 및 제2 염색체 (또는 게놈 영역)의 상대 빈도를 정량화하는 단계 (이 때, 어레이 상의 라벨의 상대 빈도에서 통계적으로 유의한 차이는 혼합 샘플 내 염색체 이수성의 존재나 부재 여부를 나타낸다)를 포함한다.

[0042] 대안적인 실시양태로, 혼합 샘플 내 제1 및 제2 염색체의 상대 빈도의 관찰된 이탈에 근거하여 태아 이수성의 존재나 부재를 판정하는 데 “임계” 수준을 사용할 수 있다. 이 임계값은 예를 들어 미국 출원 2012/0149583, 2013/0324420, 2013/0029852 및 미국 특허 번호 8,532,936에서 공개된 기술을 사용하여 측정할 수 있다. 특정 양태로, 예상된 수치로부터의 이탈은 샘플의 대표적인 모집단으로부터 측정한 임계 수준을 이용하여 판단하며, 바람직하게는 대표적인 모집단은 사전 위험 프로파일, 모체 연령 및/또는 재태 기간 등의 유사한 특성을 가진 환자에서 얻은 샘플을 포함한다.

[0043] 본 발명의 바람직한 양태로, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 추가하기 전, 추가하는 동안 또는 추가한 후에 샘플 DNA가 고체 지지면에 결합된다. 본 발명의 바람직한 양태로, 이 분석에서는 결합 생성물 생성 전에 혼성화되지 않은 올리고뉴클레오타이드를 제거하기 위하여 예를 들면 세척이나 엑소뉴클레아제 절단(exonuclease digestion)을 사용한 단계를 적용한다. 다른 바람직한 양태로, 결합 후 추가적인 처리 및/또는 검출 목적으로 어레이에 도입하기 전에 결합 생성물을 분리한다. 다른 바람직한 실시양태로, 바람직하게는 일반 프라이머를 사용하여 결합 생성물을 증폭시켜 앰플리콘을 생성한다. 다른 바람직한 실시양태로, 나중에 어레이에 혼성화하기 전에 앰플리콘을 분할하여 분할된 앰플리콘을 생성한다. 결합 생성물 분할이 관여된 실시양태에서, 포착 영역을 포함하는 분할된 영역은 바람직하게는 어레이에 포착 영역 부분을 도입하기 전에 분할 생성물의 나머지에서 분리한다.

[0044] 특정 양태로, 샘플 DNA, 결합 생성물 및/또는 증폭 생성물은 본 기술 내 통상적인 기법을 사용하여 분리한다. 예를 들어, 혼성화 복합체 (예: 표적 좌위에 결합된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드), 결합 생성물 및/또는 증폭 생성물은 고체 기질에 부착시킨 후 분리 단계 (예: 세척 또는 뉴클레아제 절단)를 통해 분리할 수 있다. 구체적인 예로, 이들을 자성 비드에 부착시켜 분리할 수 있다. 다른 구체적인 예로, 이들을 결합 파트너가 있는 기질에 부착시켜 분리할 수 있으며, 예를 들어 올리고뉴클레오타이드를 비오틴화하고 기판은 아비딘이나 스트렙타비딘을 포함한다. 전원형(precircle) 프로브를 사용하는 양태에서, 혼성화 복합체 및/또는 결합 생성물은 비원형화 프로브의 뉴클레아제 절단으로 분리할 수 있다.

[0045] 본 실시양태의 일부 양태에서, 제1 및 제2 포착 영역은 동일한 뉴클레오타이드 서열을 가진다. 본 실시양태의 다른 양태에서, 제1 및 제2 포착 영역은 상이한 뉴클레오타이드 서열을 가진다. 또한 앞서 논의한 대로, 다른 실시양태와 관련하여, 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 조사에 추가적으로 이 실시양태의 양태에서 2 개 이상의 선택된 다형성 좌위의 SNP를 포함하는 다형성 서열을 조사한다. 예를 들어 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제3 세트를 사용하여, 선택된 다형성 좌위를 조사하여 대립유전자 빈도를 측정한다. 대립유전자 빈도는 예를 들어 모체 혈청 샘플에 존재하는 태아 핵산 비율을 산출하는 데 사용한다.

[0046] 앞서 논의한 대로, 본 실시양태의 일부 양태에서, 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 추가적으로 연장 결합 및/또는 “가교” 올리고뉴클레오타이드를 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 태아 염색체 이수성(anueploidy)의 가능성을 측정하는 방법을 제공하며, 이는 모체 및 태아 무세포 DNA를 포함하는 모체 샘플을 제공하는 단계, 각 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 상보적 영역이 좌위(loci)에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 모체 샘플 내 제1 표적 게놈 영역의 좌위에 상보적인 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 제1 세트를 도입하는 단계 (이 때 각 세트의 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 일반 프라이머 부위와 포착 영역을 포함한다), 각 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 상보적 영역이 좌위에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 모체 샘플 내 제2 표적 게놈 영역의 좌위에 상보적인 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 제2 세트를 도입하는 단계 (이 때 각 세트의 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 일반 프라이머 부위와 포착 영역을 포함한다), 각 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 상보적 영역이 선택한 다형성 좌위에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 모체 샘플 내 제1 표적 게놈 영역과 상이한 표적 게놈 영역의 다형성 좌위 세트에 상보적인 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 제3 세트를 도입하는 단계 (이 때 각 세트의 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 일반 프라이머 부위와 포착 영역을 포함한다), 가교 올리고뉴클레오타이드가 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 간의 좌위의 상보적 영역에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 모체 샘플에 가교 올리고뉴클레오타이드를 도입하는 단계, 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드와 가교 올리고뉴클레

오티드를 결합시켜 좌위의 상보적인 결합 생성물을 생성시키는 단계, 결합 생성물을 분리하는 단계, 일반 프라이머 부위를 사용하여 분리된 결합 생성물을 증폭시키는 단계, 증폭된 결합 생성물을 어레이에 인가하는 단계 (이 때 어레이는 결합 생성물의 포착 영역에 상보적인 포착 프로브를 포함한다), 선택한 다형성 좌위(loci)에서 얻은 각 대립유전자의 상대 빈도를 정량화하여 샘플 내 태아 무세포 DNA의 비율을 측정하는 단계, 제1 표적 게놈 영역의 좌위의 상대 빈도와 제2 표적 게놈 영역의 좌위의 상대 빈도를 정량화하는 단계, 및 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 좌위의 상대 빈도 및 태아 무세포 DNA의 비율을 이용하여 태아 염색체 이수성(anuploidy)의 존재 또는 부재 가능성을 계산하여 태아 염색체 이수성의 존재 또는 부재 가능성을 판단하는 단계를 포함한다.

[0047] 또한 본 발명은 태아 염색체 이수성(anuploidy)의 가능성을 측정하는 방법을 제공하며, 이는 모체 및 태아 무세포 DNA를 포함하는 모체 샘플을 제공하는 단계, 각 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 상보적 영역이 좌위(loci)에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 모체 샘플 내 제1 표적 게놈 영역의 좌위에 상보적인 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 제1 세트를 도입하는 단계 (이 때 각 세트의 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 일반 프라이머 부위와 포착 영역을 포함한다), 각 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 상보적 영역이 좌위에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 모체 샘플 내 제2 표적 게놈 영역의 좌위에 상보적인 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 제2 세트를 도입하는 단계 (이 때 각 세트의 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 일반 프라이머 부위와 포착 영역을 포함한다), 각 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 상보적 영역이 선택한 다형성 좌위에 특이적으로 혼성화하도록 하는 조건 하에 모체 샘플 내 제1 표적 게놈 영역과 상이한 표적 게놈 영역의 다형성 좌위 세트에 상보적인 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 제3 세트를 도입하는 단계 (이 때 각 세트의 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개는 일반 프라이머 부위와 포착 영역을 포함한다), 인접하여 혼성화된 올리고뉴클레오타이드를 생성하기 위하여 dNTP와 중합효소를 이용하여 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 중 적어도 1개를 연장시키는 단계, 인접하여 혼성화된 올리고뉴클레오타이드를 결합시켜 좌위에 상보적인 결합 생성물을 생성시키는 단계, 결합 생성물을 분리하는 단계, 일반 프라이머 부위를 사용하여 분리된 결합 생성물을 증폭시키는 단계, 증폭된 결합 생성물을 어레이에 인가하는 단계 (이 때 어레이는 결합 생성물의 포착 영역에 상보적인 포착 프로브를 포함한다), 선택한 다형성 좌위에서 얻은 각 대립유전자(allele)의 상대 빈도를 정량화하여 태아 무세포 DNA의 비율을 측정하는 단계, 제1 표적 게놈 영역의 좌위의 상대 빈도와 제2 표적 게놈 영역의 좌위의 상대 빈도를 정량화하는 단계, 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 좌위의 상대 빈도 및 태아 무세포 DNA의 비율을 이용하여 태아 염색체 이수성(anuploidy)의 존재 또는 부재 가능성을 계산하여 태아 염색체 이수성의 존재 또는 부재 가능성을 판단하는 단계를 포함한다.

[0048] 특정 양태로, 본 발명은 태아 무세포 DNA 비율에 근거하여 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 좌위(loci)의 상대 빈도를 비교하고 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 상대 빈도를 조절하여 태아 염색체 이수성(anuploidy)의 존재 또는 부재 가능성을 판단하는 단계를 추가로 포함한다. 구체적인 양태로, 각 표적 게놈 영역에 대하여 선택된 각 좌위(locus)의 상대 빈도를 합하고 각 염색체에 대한 총합을 비교하여 표적 게놈 영역 비율을 산출한다.

[0049] 샘플의 태아 무세포 DNA 비율은 1개 이상의 비모체 기어 좌위(loci)의 수준을 검출하여 산출할 수 있으며 예를 들어 Y 염색체에 있는 비모체 좌위 및/또는 비모체 좌위가 상염색체 좌위이다. 바람직한 양태로, 비모체 좌위(loci)는 모체 좌위에 비교하여 1개 이상의 유전자 변이, 예를 들어 SNP 또는 메틸화 차이 등을 포함한다.

[0050] 특정 실시양태로, 포착 영역과 라벨 결합 영역은 검출 목적으로 이용할 수 있도록 남겨 두면서 결합 생성물의 크기를 줄이기 위하여 결합 생성물을 분할한다 (예: 제한 엔도뉴클레아제 등과 같은 효소 분할 메카니즘 사용). 특정 양태로, 분할은 일반 증폭 후 발생한다.

[0051] 바람직한 실시양태로, 혼성화 후에 결합되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드로부터 좌위(loci) 및 좌위에 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 분리하여 반응에서 과잉의 미결합 올리고뉴클레오타이드를 제거한다 (예: 세척 단계 또는 미결합 올리고뉴클레오타이드의 효소 분해).

[0052] 방법들에서 사용된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제1 및 제2 세트는 (적어도 1개의 포착 영역 외에) 바람직하게는 결합 생성물을 증폭하는 데 사용할 수 있는 일반 프라이머 영역을 포함한다. 달리, 결합 후 예를 들어 일반 프라이머 서열을 포함하는 어댑터 도입 등을 통하여 결합 생성물의 말단에 일반 프라이머 서열을 추가할 수 있다.

[0053] 특정 양태로, 본 발명의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 1개 이상의 지표를 포함한다. 이러한 지표는 포착 영역 이외에 좌위(loci) 또는 좌위에 대한 특정 대립유전자를 식별하기 위한 대리(surrogate) 서열 기능을 할 수 있다. 특히, 이러한 지표는 결합 생성물 또는 이의 앰플리콘의 어레이로의 혼성화를 검출하기 위한 대리 식별 서열 기능을 할 수 있다. 구체적인 방법에서, 고정 서열 뉴클레오타이드 각 세트의 제1 또는 제2 고정 서열 올리고



고뉴클레오티드는 특정 대립유전자(allele)를 고정 서열 올리고뉴클레오티드와 연결시키는 대립 유전자 지표를 포함한다.

[0054] 특정의 구체적인 양태로, 본 방법은 각 표적 게놈 영역으로부터 적어도 50개 좌위(loci), 더욱 바람직하게는 50~100개의 좌위, 더욱 바람직하게는 100~200개의 좌위, 더욱 바람직하게는 200~500개의 좌위, 더욱 바람직하게는 500~1000개의 좌위, 바람직하게는 1000~2000개의 좌위, 바람직하게는 2000~5000개의 좌위, 및 바람직하게는 5000~10,000개의 좌위 또는 임의의 그 사이 범위에 대하여 수행된다. 특정 양태로, 표적 게놈 영역 외에, 적어도 50개의 선택한 다형성 좌위(loci)를 조사한다. 더욱 바람직하게는, 50~100개의 선택한 다형성 좌위를 조사하고, 모든 사이 범위를 포함하여, 더욱 바람직하게는 100~200개의 선택한 다형성 좌위, 더욱 바람직하게는 200~500개의 선택한 다형성 좌위, 더욱 바람직하게는 500~1000개의 선택한 다형성 좌위, 1000~2000개의 선택한 다형성 좌위, 2000~5000개의 선택한 다형성 좌위, 및 5000~10,000개의 선택한 다형성 좌위를 조사한다.

[0055] 다른 양태로, 본 분석 방법은 표적 게놈 영역 내 각 좌위에 상응하는 적어도 5개의 포착 영역, 더욱 바람직하게는 표적 게놈 영역 내 각 좌위에 상응하는 적어도 10개의 포착 영역, 더욱 바람직하게는 표적 게놈 영역 내 각 좌위에 상응하는 적어도 20개의 포착 영역, 바람직하게는 표적 게놈 영역 내 각 좌위에 상응하는 적어도 50개의 포착 영역, 더욱 바람직하게는 표적 게놈 영역 내 각 좌위에 상응하는 적어도 100개의 포착 영역, 더욱 바람직하게는 표적 게놈 영역 내 각 좌위에 상응하는 적어도 200개의 포착 영역을 검출할 것으로 추정된다. 일부 실시양태에서, 각 샘플에 대하여 표적 게놈 영역 내 각 좌위에 상응하는 5000개 이하의 포착 영역이 검출된다. 다른 실시양태로, 각 샘플에 대하여 표적 게놈 영역 내 각 좌위에 상응하는 2000개 이하의 포착 영역이 검출된다.

[0056] 본 발명의 이들 양태 및 다른 특징과 이점이 아래에서 보다 상세하게 설명된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1은 본 발명의 전반적 양태를 설명하는 흐름도이다.
- 도 2는 좌위(loci)의 혼성화 검출을 활용하는 본 발명의 방법의 일 실시예를 도시한 것이다.
- 도 3은 좌위의 혼성화 검출을 활용하는 본 발명의 방법의 대안적인 실시예를 도시한 것이다.
- 도 4는 좌위의 혼성화 검출을 활용하는 본 발명의 방법의 다른 대안적인 실시예를 도시한 것이다.
- 도 5는 좌위의 혼성화 검출을 활용하는 본 발명의 방법의 또 다른 대안적인 실시예를 도시한 것이다.
- 도 6은 고정 서열 올리고뉴클레오티드와 함께 가교 올리고뉴클레오티드 및 좌위의 혼성화 검출을 활용하는 본 발명의 방법의 또 다른 대안적인 실시예를 도시한 것이다.
- 도 7은 다형성(polymorphism)을 검출하기 위하여 좌위의 혼성화 검출을 활용하는 본 발명의 방법의 다른 대안적인 실시예를 도시한 것이다.
- 도 8은 다형성을 검출하기 위하여 좌위의 혼성화 검출을 활용하는 본 발명의 방법의 다른 대안적인 실시예를 도시한 것이다.
- 도 9는 다형성을 검출하기 위하여 핵산 영역의 혼성화 검출을 활용하는 본 발명의 방법의 다른 대안적인 실시예를 도시한 것이다.
- 도 10은 가교 올리고뉴클레오티드를 가진 핵산 영역의 혼성화 검출과 이중 분할을 활용하는 본 발명의 방법을 도시한 것이다.
- 도 11은 다형성을 검출하기 위하여 가교 올리고뉴클레오티드를 가진 핵산 영역의 혼성화 검출과 이중 분할을 활용하는 본 발명의 방법을 도시한 것이다.
- 도 12는 단일 분할 및 상이하게 라벨링된 일반 프라이머 사용에 기인한 핵산 영역의 혼성화 검출을 활용하는 본 발명의 방법을 도시한 것이다.
- 도 13은 단일 분할 및 상이하게 라벨링된 일반 프라이머 사용에 기인한 핵산 영역의 혼성화 검출을 또한 활용하는 도 12에 도시되어 있는 방법에 대한 대안적인 방법을 도시한 것이다.
- 도 14는 어레이에 대하여 샘플에 걸친 분석 변이성 분포 및 차세대 염기서열 분석을 도시한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] **정의**
- [0059] 본 문서에 사용된 용어는 당해 분야에서 통상의 기술을 가진 자가 이해하는 바에 따른 평이한 통상의 의미를 가지도록 의도되었다. 다음 정의는 독자가 본 발명을 이해하는 데 도움을 주는 것을 목적으로 하며 구체적으로 명시되지 않는 한 해당 용어의 의미를 변경하거나 달리 제한하지 않는다.
- [0060] 용어 “대립유전자(allele) 지표”는 일반적으로 특정 SNP에 상응하는 일련의 뉴클레오티드를 가리킨다. 대립유전자 지표는 1개 이상의 염기의 삭제, 치환 또는 삽입을 검출 할 수 있도록 하는 추가적인 뉴클레오티드를 포함 할 수 있다. 대립유전자 지표는 2가지 성질 (예: 샘플 식별 지표, 대립유전자-좌위 지표)에 대한 정보를 제공하는 1개의 지표를 생성하기 위해 다른 지표와 결합될 수 있다.
- [0061] “어레이”는 표면, 바람직하게는 (하지만 전적일 필요는 없음) 평면 또는 실질적으로 평면인 표면을 가지는 고상 지지면을 가리키며, 여기에는 핵산을 포함하는 부위의 어레이가 있어 어레이의 각 부위가 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 실질적으로 동일하거나 동일한 복제를 포함하고 공간적으로 정의되며 해당 어레이의 다른 구성체 부위와 겹치지 않는, 즉, 해당 부위가 공간적으로 분리되어 있다. 어레이 또는 마이크로어레이(microarray)는 또한 비드나 웰 등과 같은 표면을 가진 비평면 조사 가능(interrogatable)한 구조를 포함할 수 있다. 어레이의 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드는 고체 지지면에 공유적으로 결합되거나 비공유적으로 결합될 수 있다. 통상적인 마이크로어레이 기법은 예를 들면 Schena, Ed., Microarrays: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (2000) 등에서 검토되어 있다. “어레이 분석”, “어레이에 의한 분석” 또는 “마이크로어레이에 의한 분석”은 예를 들어 서열 분석 등과 같이 어레이를 이용한 1개 이상의 생물학적 분자에 대한 분석을 가리킨다. 용어 “어레이”는 마이크로어레이, 배열된 비드, 웰 내 분자 어레이, 또는 “액상” 어레이를 포함하여 배열된 고체 기판의 임의의 형식을 가리킨다.
- [0062] 용어 “결합 쌍”은 공유 및/또는 비공유 결합을 이용하여 서로 간에 특이적으로 결합하는 임의의 2개의 분자를 의미하며, 예를 들어 기질에 유전자 물질 부착을 위해 사용할 수 있다. 예에는 리간드와 그의 단백질 결합 파트너, 예를 들어 비오틴과 아비딘, 비오틴과 스트렙타비딘, 항체와 그에 대한 특정 에피토프 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 용어 “염색체 이상”은 염색체의 전부 또는 일부에 대한 임의의 유전자 변이를 가리킨다. 유전자 변이에는 복제 또는 삭제, 전위, 역전, 그리고 돌연변이 등과 같은 임의의 복제수 변이가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 용어 “상보적” 또는 “상보성”은 염기 짝짓기 규칙에 관련된 핵산 분자 (즉, 뉴클레오티드 서열)와 관련하여 사용한다. 상보적 뉴클레오티드는 일반적으로 A와 T (또는 A와 U), 또는 C와 G이다. 2개의 단일 사슬 RNA이나 DNA 분자는 한 사슬의 뉴클레오티드가 최적으로 정렬되어 있고 적절한 뉴클레오티드가 삽입되거나 삭제된 상태이며 쌍이 적어도 약 90% 내지 약 95% 상보성, 더욱 바람직하게는 약 98% 내지 약 100% 상보성, 더욱 더 바람직하게는 100% 상보성을 가지는 경우 실질적으로 상보적이라고 한다. 달리, RNA나 DNA 사슬이 해당 보체로 선택적으로 혼성화되는 조건 하에서 혼성화될 때 실질적 상보성이 존재한다. 선택적 혼성화 조건에는 엄격한 혼성화(stringent hybridization) 조건이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 엄격한 혼성화 조건에는 전형적으로 약 1 M 미만, 보다 일반적으로는 약 500 mM 미만, 바람직하게는 약 200 mM 미만의 염 농도가 포함된다. 혼성화 온도는 일반적으로 용융 온도(T<sub>m</sub>)보다 적어도 약 2° C 내지 약 6° C 낮다.
- [0065] 본 문서에서 사용하는 용어 “진단 도구”는 예를 들어 환자 샘플에 대하여 진단 검사 또는 검출 시스템을 수행하기 위하여 시스템에서 병합하여 사용하는 본 발명의 임의의 조성이나 시스템을 가리킨다.
- [0066] 용어 “혼성화”는 일반적으로 핵산의 상보적 사슬의 짝짓기라 발생하는 반응을 의미한다. DNA는 보통 이중 사슬이며, 사슬이 분리되면 이들은 적절한 조건 하에서 재혼성화한다. 혼성체(hybrid)는 DNA-DNA, DNA-RNA 또는 RNA-RNA 간에 형성될 수 있다. 이들은 짧은 사슬과 짧은 사슬에 상보적인 영역을 포함하는 긴 사슬 간에 형성될 수 있다. 불완전한 혼성체가 또한 형성될 수 있으나, 이들이 불완전할수록 덜 안정하다 (따라서 형성될 가능성이 낮다).
- [0067] 본 문서에서 사용하는 용어 “연결효소”는 일반적으로 효소 계열인 DNA 연결효소(전형적으로 T4 DNA 연결효소)를 가리키며 이는 DNA의 조각을 함께 연결할 수 있다. 이 조각들은 반드시 호환성 말단 (양쪽 모두 평활(blunt) 말단 또는 상호 호환성 접착성(sticky) 말단)을 가지고 있어야 하며 반응에는 ATP가 필요하다. “결합(ligation)연결”은 DNA의 두 조각을 함께 연결하는 과정이다.



- [0068] 본 문서에서 사용하는 용어 “좌위(locus, loci)”는 게놈 내 알려진 위치의 핵산 영역을 가리킨다.
- [0069] 본 문서에서 사용하는 용어 “모체 샘플”은 태아 및 모체 무세포 DNA 둘다를 포함하는 임신한 포유동물에서 취한 임의의 샘플을 가리킨다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용하는 모체 샘플은 상대적으로 비침습적인 방법(예: 정맥절개) 또는 시험대상에서 말초 샘플 추출을 위한 기타 표준 기술을 사용하여 수집한다.
- [0070] 본 문서에서 사용하는 용어 “올리고뉴클레오타이드” 또는 “올리고”는 왓슨-크릭(Watson-Crick) 유형의 염기 짝짓기, 염기 쌍기, 후그스틴(Hoogsteen) 또는 역-후그스틴 유형의 염기 짝짓기 등과 같은 단량체-대-단량체의 규칙적인 패턴을 통해 단일 사슬 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합할 수 있는, 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 이들의 아노머형, 펩티드 핵산 단량체(PNA), 봉쇄형 핵산 단량체(LNA) 등과 이들의 조합을 포함한 천연 또는 변형된 핵산 단량체의 선형 올리고머를 가리킨다. 보통 단량체는 인산디에스테르 결합 또는 이의 유사물질로 연결되어 소수(예: 8~12)의 단량체 단위 내지 수십 개의 단량체 단위(예: 100~200 또는 그 이상)의 크기 범위에 이르는 올리고뉴클레오타이드를 형성한다. 적절한 핵산 분자는 Beaucage 및 Carruthers(Tetrahedron Lett., 22:1859-1862 (1981))가 기술한 포스포르아미다이트 방법 또는 Matteucci 등(J. Am. Chem. Soc., 103:3185 (1981))에 따른 트리에스테르 방법으로 제조할 수 있고 이 두 방법 모두 본 문서에서 참고 문헌에 포함되어 있으며 또는 상업적으로 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성기 사용 등과 같은 다른 화학적 방법으로 제조할 수 있다.
- [0071] 본 문서에서 사용하는 “뉴클레오타이드”는 염기-당-인산 조합을 가리킨다. 뉴클레오타이드는 핵산 서열(DNA 및 RNA)의 단량체 단위이다. 용어 뉴클레오타이드에는 리보뉴클레오시드 3인산 ATP, UTP, CTG, GTP 그리고 dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP 또는 그의 유도체 등의 데옥시리보뉴클레오시드 3인산이 포함된다. 그러한 유도체에는 예를 들어 [αS]dATP, 7-deaza-dGTP 및 7-deaza-dATP, 그리고 유도체를 함유하는 핵산 분자에 대한 뉴클레아제 저항성을 부여하는 뉴클레오타이드 유도체가 포함된다. 본 문서에서 사용하는 용어 뉴클레오타이드는 또한 디데옥시리보뉴클레오시드 3인산(ddNTP)과 그 유도체를 가리킨다. 그림으로 표시된 디데옥시리보뉴클레오시드 3인산의 예에는 ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP 및 ddTTP가 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 본 문서에서 사용하는 용어 “중합효소”는 다른 사슬을 템플릿으로 사용하여 개별 뉴클레오타이드를 하나의 긴 사슬로 연결하는 효소를 가리킨다. DNA를 합성하는 DNA 중합효소와 RNA를 합성하는 RNA 중합효소의 2가지 일반 유형의 중합효소가 있다. 이 두 가지 계열 내에, 어떤 유형의 핵산이 템플릿 기능을 할 수 있는지 그리고 어느 유형의 핵산이 형성되는지에 따라 다수의 하부 유형의 중합효소가 있다.
- [0073] 본 문서에서 사용하는 “중합효소 연쇄 반응” 즉 “PCR”은 과잉의 비특이성 DNA가 존재하는 경우에도 표적 DNA의 특이성 조각을 in vitro 시험관내(</에서 복제하는 기법을 가리킨다. 표적 DNA에 프라이머를 추가하며, 이 때 프라이머는 핵산 그리고 전형적으로 Taq 중합효소 등을 사용하여 표적 DNA 복제를 개시한다. 온도를 순환시켜, 표적 DNA가 반복적으로 변성되고 복제된다. 다른 무작위 DNA와 서로 혼합되더라도, 표적 DNA의 단일 복제본이 증폭되어 수십억 개의 복제본을 얻을 수 있다. 극소량의 DNA를 검출하고 측정하는 데 그리고 DNA의 맞춤형 조각을 생성하는 데 중합효소 연쇄 반응을 사용할 수 있다. 일부 경우, PCR에 대한 대안으로 선형 증폭 방법을 사용할 수도 있다.
- [0074] 본 문서에서 사용하는 용어 “다형성(polymorphism)”은 특정 좌위(loci)를 나타내는 것일 수 있는 좌위에서의 유전적 변화 또는 변이체를 가리키는 것으로 이에에는 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 메틸화 차이, 단편 일렬 반복(short tandem repeat, STR) 등이 포함되지만, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 일반적으로 “프라이머”는 중합효소 연쇄 반응의 합성 단계나 프라이머 연장 기법 등에서 예를 들어 DNA 연장, 결찰 및/또는 합성을 프라이밍하는 데 사용하는 올리고뉴클레오타이드이다. 프라이머는 또한 특정 핵산 영역 검출을 위하여 핵산 영역의 상보성을 포착 올리고뉴클레오타이드에 제공하는 수단으로서 혼성화 기법에서 사용할 수 있다.
- [0076] 본 문서에서 사용하는 용어 “연구 도구”는 약물 및/또는 생물학적 치료제 개발을 포함하여 과학적, 학술적 또는 상업적 본질의 탐구를 위하여 사용하는 본 발명의 임의의 구성이나 시스템을 가리킨다. 본 발명의 연구 도구는 치료용이나 규제 승인 대상을 목적으로 하지 않고; 본 발명의 연구 도구는 연구를 원활히 하고 규제 목적의 제출을 뒷받침하기 위한 정보를 얻기 위한 목적으로 실시하는 임의의 활동을 포함하여 그러한 개발 활동에 도움이 되도록 사용한다.
- [0077] 용어 “샘플”은 생물체의 모든 또는 일부 유전자 정보를 포함하는 임의의 샘플을 가리키며 이에에는 바이러스, 박테리아, 진균, 식물과 동물 및 특히 포유동물이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 유전자 샘플 내에서 조

사할 수 있는 유전자 정보에는 게놈 DNA (암호화 부위 및 비암호화 부위 둘 다), 미토콘드리아 DNA, RNA, 그리고 이들 각각으로부터 유도되는 핵산 생성물이 포함된다. 그러한 핵산 생성물에는 mRNA에서 생성되는 cDNA 또는 분석용 물질을 증가시키기 위한 전증폭(pre-amplification) 생성물이 포함된다.

[0078] 용어 “표적 게놈 영역” 는 전체 염색체, 염색체 하부 영역, 좌위(loci) 그룹 또는 단일 좌위를 포함한 한 개 또는 여러 개 염색체 전부 또는 일부를 가리킨다.

[0079] **상세한 설명**

[0080] 본 문서에서 설명하는 실행 기법은 달리 명시되지 않는 한, 유기화학, 폴리머 기술, 분자생물학 (제조합 기법 포함), 세포생물학, 생화학 및 어레이 기법의 통상적 기법과 설명을 적용하며 이는 발명이 속하는 분야에 종사하는 자의 기술 범위 이내에 속한다. 이러한 통상적 기법에는 폴리머 어레이 합성, 폴리뉴클레오티드의 혼성화 및 결찰, 그리고 라벨을 사용한 혼성화 검출이 포함된다. 적절한 기법에 대한 구체적인 설명은 본 문서의 실시예를 참고하여 찾아볼 수 있다. 그러나, 이에 상응하는 다른 통상적 기법 또한 물론 사용할 수 있다. 그러한 통상적 기법과 설명은 다음과 같은 표준 실험실 설명서에서 찾아볼 수 있다: Green, et al., Eds. (1999), *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series* (Vols. I-IV); Weiner, Gabriel, Stephens, Eds. (2007), *Genetic Variation: A Laboratory Manual*; Dieffenbach, Dveksler, Eds. (2003), *PCR Primer: A Laboratory Manual*; Bowtell and Sambrook (2003), *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual*; Mount (2004), *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*; Sambrook and Russell (2006), *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; and Sambrook and Russell (2002), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (all from Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) *Biochemistry* (4th Ed.) W.H. Freeman, New York N.Y.; Gait, “*Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*” 1984, IRL Press, London; Nelson and Cox (2000), *Lehninger, Principles of Biochemistry* 3<sup>rd</sup> Ed., W. H. Freeman Pub., New York, N.Y.; and Berg et al. (2002) *Biochemistry*, 5<sup>th</sup> Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y. 이 모두는 모든 목적에 있어 참고용으로 전문 본 문서에 포함되어 있다.

[0081] 단, 본 문서 및 추가된 청구항에서 사용된 단수형 "a," "an," 및 "the" 는 문맥상 명백하게 달리 표시되는 경우가 아닌 한 복수형을 포함한다. 따라서, 예를 들어 “대립유전자(allele)” 를 언급하는 경우 각종 서열 변이를 가진 1개 이상의 대립유전자(allele) 복제본을 가리키며, “검출 시스템” 에는 발명이 속하는 분야의 기술을 가진 자에게 알려져 있는 대등한 단계와 방법에 대한 참조가 포함된다.

[0082] 달리 정의되지 않는 한, 본 문서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 통상의 기술을 가진 자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 가진다. 본 문서에서 언급된 모든 출판물은 본 문서에서 설명된 발명에서 또는 그와 함께 사용될 수 있는 장치, 시약, 기법과 방법론의 기술 및 공개 목적을 포함하여 모든 목적을 위하여 참고용으로 본 문서에 전문 포함된다.

[0083] 수치 범위가 제공되는 경우, 해당 범위의 상한과 하한 사이의 각 사이 수치 그리고 명시된 범위 내 임의의 언급 수치나 사이 수치가 본 발명에 포함되는 것으로 이해한다. 이러한 보다 작은 범위의 상한과 하한은 보다 작은 범위에 독립적으로 포함될 수 있으며, 명시된 범위에서 구체적으로 제외된 임의의 한계도 본 발명에 포함된다. 명시된 범위에 한계 중 하나 또는 둘다 포함되는 경우, 한계에 포함된 수치 중 하나를 제외하는 범위 또한 본 발명에 포함된다.

[0084] 아래 설명에, 본 발명에 대한 보다 철저한 이해를 위하여 다수의 구체적인 세부사항이 기술되어 있다. 그러나, 본 발명이 속하는 분야의 기술을 가진 자에게는 이러한 구체적인 세부사항 중 1가지 또는 그 이상 없이 본 발명을 실행할 수도 있음이 명백할 것이다. 다른 경우에서, 본 발명을 복잡하게 하지 않기 위해서, 잘 알려진 특징 그리고 본 발명이 속하는 분야의 기술을 가진 자에게 잘 알려져 있는 절차는 설명하지 않았다.

[0085] **발명의 전반적인 사항**

[0086] 본 발명은 유전자 샘플 내 삽입, 삭제, 전위, 돌연변이 및 다형성(polymorphism)을 포함하여 핵산 영역 (좌위, 좌위 세트 및 보다 큰 표적 게놈 영역 (예: 염색체))의 복제수 변이체를 확인하기 위한 분석 방법을 제공한다. 하나의 양태로, 분석 방법은 유도된 결찰 분석 후 어레이에 부착된 라벨링된 올리고뉴클레오티드 검출을 이용하여 샘플 내 2개 이상의 표적 게놈 영역의 좌위(loci)를 조사한다. 라벨링된 올리고뉴클레오티드를 정량화하면 샘플 내 표적 게놈 영역으로부터 검출된 좌위의 정량 수치 간의 비교 (예: 단일 염색체의 2개 이상의 영역 간의 비교 또는 2개 이상의 다른 염색체 간의 비교)에 근거하여 또는 동일하거나 상이한 샘플로부터 얻은 기준 염색

체와 비교하여 특정 표적 게놈 영역의 비전형적인 복제수를 측정할 수 있다.

[0087] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 2개 이상의 표적 게놈 영역 내의 좌위(loci)에 선택적으로 혼성화하는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 세트를 이용하여 샘플 내 표적 게놈 영역의 유도 분석을 적용한다. 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 직접 또는 간접적으로 결합되어 결합 생성물을 생성한다. 제1 표적 게놈 영역과 관련된 좌위에 상응하는 결합 생성물은 제1 검출 가능한 라벨과 관련되며, 제2 표적 게놈 영역과 관련된 좌위에 상응하는 결합 생성물은 제2 검출 가능한 라벨과 관련된다. 제1 및 제2 검출 가능한 라벨을 정량화하면, 제1 및 제2 표적 게놈 영역의 상대 빈도를 측정할 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서, 해당 방법은 2개의 상이한 표적 게놈 영역을 식별하기 위하여 사용하는 2개의 상이한 라벨을 사용한다. 본 발명의 다른 양태에서, 해당 방법은 3개의 상이한 표적 게놈 영역을 식별하기 위하여 사용하는 3개의 상이한 라벨을 사용하는 식이다.

[0088] 결합 생성물은 혼성화로 검출하며, 특히 결합 생성물에 존재하는 포착 영역에 상보적인 포착 프로브의 어레이에 대한 혼성화로 검출한다. 특정 실시양태로, 결합 생성물은 동일하거나 실질적으로 유사한 포착 프로브를 가지는 특징을 포함하는 “일반 어레이”를 사용하여 검출한다. 다른 특정 실시양태로, 어레이는 공통 서열을 가지는 복수 특징의 2개 이상의 세트를 포함하며, 각 세트는 다른 서열을 가지고, 예를 들면 어레이 상에 있는 최대 100개의 특징이 실질적으로 동일한 서열을 가지는 어레이이다. 상기 두 가지 중 어느 하나의 경우, 어레이 상에 있는 포착 프로브는 좌위 서열 또는 그 보체에 대해서가 아니라 결합 생성물의 포착 영역에 상보적이다. 이러한 어레이는 좌위의 서열에 관계 없이 임의의 표적 게놈 영역(들)에 대하여 임의의 좌위를 조사하는 데 사용할 수 있다.

[0089] 바람직하게는 포착 영역이 샘플 내 좌위를 조사하는 데 사용하는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 내 결합 생성물에 도입된다. 일부 바람직한 실시양태로, 포착 영역이 사용되는 모든 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 간에 동일하여, 모든 좌위로부터의 결합 생성물 또는 앰플리콘 또는 이의 분할(cleavage) 생성물이 어레이 상에 있는 동일한 서열의 포착 프로브에 경쟁적으로 혼성화된다. 다른 실시양태로, 어레이는 다수의 상이한 포착 프로브로 구성되며, 상이한 좌위로부터의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 세트는 상이한 포착 영역을 포함한다.

[0090] 도 1은 본 발명의 예시적인 방법을 설명하는 흐름도 (100)이다. 단계 (102)에서, 샘플이 제공된다. 단계 (104)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 표적 게놈 영역의 좌위에 혼성화하도록 하는 조건 하에서 라벨 결합 영역을 포함하는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 세트를 샘플에 도입하며, 단계 (106)에서 상기 올리고뉴클레오타이드가 표적 게놈 영역에 혼성화된다. 단계 (108)에서, 각 세트로부터의 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 결합되어 결합 생성물을 생성한 후 이는 단계 (110)에서 증폭되어 결합 생성물에 상보적인 앰플리콘을 생성한다. 단계 (112)에서, 앰플리콘을 혼성화 어레이에 도입한 후 어레이 상에 있는 포착 프로브에 경쟁적으로 혼성화하도록 둔다. 단계 (114)에서, 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 세트를 앰플리콘에 도입한 후 앰플리콘의 상보적 서열로 혼성화하도록 둔다. 선택적으로, 라벨링된 올리고뉴클레오타이드를 어레이 상에 있는 포착 프로브에 결합시킨다 (도면에 나와 있지 않음). 단계 (116)에서, 라벨이 검출된다.

[0091] 각 세트의 각각의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 선택한 좌위에 상보적인 영역을 포함한다 (도 2에 보다 상세하게 설명됨). 각 세트 중 적어도 1개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 포착 영역을 추가로 포함하며, 이는 2개 이상의 표적 게놈 영역을 조사하는 데 사용되는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 모든 세트에 대하여 동일할 수 있거나, 2개 이상의 표적 게놈 영역을 조사하는 데 사용되는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 세트 쌍에 대해 동일할 수 있거나, 개별적인 표적 게놈 영역에 대하여 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 세트 간에 상이할 수 있다. 추가적으로, 실시양태에 따라, 세트 중 하나의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 검출 가능한 라벨 또는 검출 가능한 라벨이 있는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 결합을 위한 라벨 결합 영역을 포함한다. 구체적인 실시양태로, 라벨 결합 영역은 검출 가능한 라벨과 결합되어 있는 라벨링된 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 영역일 수 있다.

[0092] 일부 실시양태로, 포착 영역을 포함하는 각 세트의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 라벨이나 라벨 결합 영역을 포함하지 않으며; 즉, 세트의 다른 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 라벨이나 라벨 결합 영역을 포함하고 (예를 들어 도 2, 3, 5-8에 도시되어 있는 예시적인 실시양태 참조); 다른 실시양태로, 포착 영역을 포함하는 각 세트의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 또한 라벨이나 라벨 결합 영역을 포함한다 (도 4에 도시되어 있는 예시적인 실시양태 참조).

[0093] 특정의 구체적인 양태로, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제1 세트가 제1 표적 게놈 영역의 좌위에 혼성화되고, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제2 세트가 제2 표적 게놈 영역의 좌위에 혼성화된다. 결합 생성물을 생성하기 위한 결합 단계 후, 선택적으로 일반 프라이머를 사용하여 결합 생성물은 증폭한 후 어레이로 혼

상화한다. 다른 실시양태로, 증폭 생성물을 분할하고 (예: 제한 엔도뉴클레아제 사용), 포착 영역을 포함하는 증폭 생성물의 일부를 혼성화와 검출을 위해 어레이에 도입한다. 바람직한 실시양태로, 표적 게놈 영역을 조사하는 데 사용되는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 각 세트에는 동일한 라벨 또는 라벨 결합 영역이 포함된다. 즉, 제1 세트의 모든 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 제1 라벨과 결합되고, 제2 세트의 모든 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 제2 라벨과 결합되고, 제3 세트의 모든 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 제3 라벨과 결합된다.

[0094] 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 직접 라벨링되는 경우, 결합 생성물, 앰플리콘 또는 그의 분할 생성물은 어레이 상의 포착 프로브에 혼성화될 수 있으며 라벨의 판독치로 검출할 수 있다. 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 대신 라벨링된 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 라벨 결합 영역 (“라벨 결합 서열”)이 포함되는 경우, 검출 전에 결합 생성물이나 앰플리콘에 라벨링된 올리고뉴클레오타이드를 반드시 추가해야 한다. 두 가지 경우 중 하나에서, 그 다음 라벨을 검출하고 정량화하여 각 라벨의 상대 빈도를 측정한다. 각 라벨을 정량화하면 각 표적 게놈 영역을 정량화할 수 있다.

[0095] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 모든 세트에는 실질적으로 동일한 포착 영역이 포함된다. 이들 실시양태에서, 모든 표적 게놈 영역의 모든 좌위에서 얻은 결합 생성물은 어레이 상의 포착 프로브에 상보적인 동일한 포착 영역을 공유하기 때문에, 각 표적 게놈 영역에서 얻은 결합 생성물은 일반 어레이 상의 포착 프로브와 경쟁적으로 혼성화한다.

[0096] 다른 실시양태로, 어레이 상의 포착 프로브는 상이한 포착 영역에 상보적인 다중 서열을 포함하며 해당 어레이는 이러한 상이한 포착 프로브를 함유하는 특징을 포함한다. 이러한 일부 실시양태에서, 각 포착 프로브는 고유한 포착 영역으로 혼성화될 수 있다. 이러한 다른 실시양태에서, 상이한 게놈 영역의 좌위를 나타내는 1개 이상의 포착 프로브가 단일 포착 영역으로 혼성화될 수 있다.

[0097] 다른 실시양태로, 동일하거나 상이한 표적 게놈 영역의 상이한 좌위는 서로에 대하여 경쟁적으로 혼성화되도록 구성되어 동일한 포착 영역을 포함할 수 있는 반면, 동일하거나 상이한 표적 게놈 영역의 다른 좌위는 어레이에 따라 서로에 대하여 경쟁적으로 혼성화되도록 구성될 수 있다.

[0098] 표적 게놈 영역은 전체 염색체와 같이 큰 게놈 영역일 수 있거나, 단일 염색체의 하위 영역 또는 상이한 염색체의 하위 영역, 심지어는 단일 좌위에 이르기 까지 보다 작은 게놈 영역일 수 있다. 따라서, 본 발명은 염색체 이수성(aneuploidy) 및 부분 염색체 이수성뿐만 아니라 돌연변이, SNP, 재배열, 삽입 및 삭제 등과 같은 게놈 변이를 검출하는 데 사용할 수 있다. 전체 염색체를 비교하는 경우, 제1 표적 게놈 영역은 예를 들면 염색체 21일 수 있으며, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제1 세트와 함께 조사할 모든 좌위는 염색체 21에서 얻는다.

[0099] 결합 분석에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 선택한 좌위에 바로 인접한 영역에 결합하는 경우, 표적 게놈 영역 특이성 라벨과 연결된 결합 생성물을 생성하기 위하여 고정 올리고뉴클레오타이드를 결합시킬 수 있다. 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 게놈 영역 내의 바로 인접한 영역에 결합하지 않는 경우 - 즉 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 간격이 있는 경우 - 이 간격은 프라이머 연장 및/또는 1개 이상의 가교 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 채울 수 있다. 직접적으로 또는 연장 작업이나 가교 올리고뉴클레오타이드 도입 후에 올리고뉴클레오타이드가 연속적으로 혼성화되면, 이 올리고뉴클레오타이드는 표적 게놈 영역 특이성 라벨과 연결된 결합 생성물을 생성하기 위하여 결합될 수 있다.

[0100] 특정 양태로, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제1 세트는 제1 염색체 또는 제1 표적 게놈 영역에 대해 선택적이며, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 제2 세트는 상이한 염색체 또는 제2 표적 게놈 영역에 대해 선택적이다. 도 2는 라벨링된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 각 세트가 상이한 염색체의 좌위로 혼성화되고 포착 프로브를 포함하는 어레이 상에서 결합 생성물이 경쟁적으로 평가되는 하나의 실시양태가 도시되어 있다. 라벨링된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (202), (204)의 두 세트가 제공되며, 각 세트는 제1 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (206), (208)을 가지고 있고 선택한 좌위 (210), (212)와 라벨 (214), (216)에 상보적인 서열을 포함하며, 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (218), (220)은 선택한 좌위 (222), (224) 및 포착 영역 (226), (228)에 상보적인 서열을 포함한다. 검출 중에 제1 표적 게놈 영역 (이 경우에는 제1 염색체)와 제2 표적 게놈 영역 (이 경우에는 제2 염색체)을 구별할 수 있도록 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 각 세트에 대하여 라벨 (214), (216)이 상이하다. 단계 (230)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (202), (204)의 세트를 샘플에 도입하여 2개의 상이한 염색체의 좌위 (232), (234)에 혼성화되도록 한다. 혼성화 후, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 샘플의 나머지에서 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 단계 (236)에서, 포착 영역 (226), (228)과 라벨 (214), (216)을 포함하는 결합 생성물 (238), (240)을 생성하기 위하여 고정 서열 올리고



뉴클레오타이드를 결합시킨다. 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 좌위에서 인접하여 혼성화되는 것으로 도 2에 나와 있기는 하지만, 간격 또한 있을 수 있으며 이 간격은 예를 들면 연장 반응이나 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이에서 인접하게 혼성화하는 가교 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 채울 수 있다. 단계 (242)에서, 복수의 포착 프로브 (246)을 포함하는 혼성화 어레이 (244)에 결합 생성물을 도입하고, 이 때 결합 생성물 (238), (240)의 포착 영역 (226), (228)은 포착 프로브 (246)에 경쟁적으로 혼성화된다. 바람직한 실시양태로, (226)과 (228)은 실질적으로 동일한 서열을 가진다. 어레이에 결합 생성물을 혼성화한 후, 혼성화되지 않은 결합 생성물은 바람직하게는 어레이에서 제거한다 (도면에 나와 있지 않음). 그 다음 사용되는 라벨 유형에 따라 적절한 검출 기전을 사용하여 라벨 (214), (216)을 검출할 수 있으며 제1 및 제2 염색체 각각에 대응하는 좌위를 정량화하여 유전자 샘플 중 각 염색체의 존재 여부와 존재량을 측정할 수 있다.

[0101]

본 발명에 따라, “뉴클레오타이드”는 잘 알려진 기법으로 라벨링을 제거하거나 검출 가능하도록 라벨링할 수 있다. 형광 라벨 및 이들의 올리고뉴클레오타이드에의 부착물은 다음과 같은 다수 검토에 기술되어 있다: Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 9th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR (2002); Keller and Manak, *DNA Probes*, 2nd Ed., Stockton Press, New York (1993); Eckstein, Ed., *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1991); Wetmur, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26:227-259 (1991). 본 발명에 적용가능한 다른 방법론은 다음 등의 참고문헌에 개시되어 있다: Fung et al., 미국 특허 번호 4,757,141; Hobbs, Jr., et al., 미국 특허 번호 5,151,507; Lee et al., 미국 특허 번호 5,091,519; Menchen et al., 미국 특허 번호 5,188,934; Begot et al., 미국 특허 번호 5,366,860; Lee et al., 미국 특허 번호 5,847,162; Khanna et al., 미국 특허 번호 4,318,846; Lee et al., 미국 특허 번호 5,800,996; Lee et al., 미국 특허 번호 5,066,580; Mathies et al., 미국 특허 번호 5,688,648 등. 라벨링은 또한 다음 특허와 특허공보에 개시된 대로 양자점을 사용하여 수행할 수 있다: 미국 특허 번호 6,322,901; 6,576,291; 6,423,551; 6,251,303; 6,319,426; 6,426,513; 6,444,143; 5,990,479; 6,207,392; 2002/0045045; 및 2003/0017264. 검출 가능한 라벨에는 예를 들어 방사성 동위원소, 형광 라벨, 화학발광 라벨, 생물발광 라벨 및 효소 라벨 등이 포함된다. 뉴클레오타이드의 형광 라벨에는 플루오레신, 5-카복시플루오레신(FAM), 2'7'-디메톡시-4'5'-디클로로-6-카복시플루오레신(JOE), 로다민, 6-카복시로다민(R6G), N,N,N',N'-테트라메틸-6-카복시로다민(TAMRA), 6-카복시-X-로다민(ROX), 4-(4'디메틸아미노페닐아조) 벤조산(DABCYL), CASCADE BLUE®(피레닐옥시트리술폰산), Oregon Green™(2',7'-디플루오로플루오레신), Texas Red™(술포로다민 101 산 염화물), 시아닌 및 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-술폰산(EDANS)이 포함될 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 형광 라벨링된 뉴클레오타이드의 구체적인 예에는 [R6G]dUTP, [TAMRA]dUTP, [R110]dCTP, [R6G]dCTP, [TAMRA]dCTP, [JOE]ddATP, [R6G]ddATP, [FAM]ddCTP, [R110]ddCTP, [TAMRA]ddGTP, [ROX]ddTTP, [dR6G]ddATP, [dR110]ddCTP, [dTAMRA]ddGTP, 및 [dROX]ddTTP (이상 Perkin Elmer(Foster City, Calif.)로부터 구매 가능), FluoroLink DeoxyNucleotides, FluoroLink Cy3-dCTP, FluoroLink Cy5-dCTP, FluoroLink FluorX-dCTP, FluoroLink Cy3-dUTP 및 FluoroLink Cy5-dUTP (이상 Amersham(Arlington Heights, IL)으로부터 구매 가능); 플루오레신-15-dATP, 플루오레신-12-dUTP, 테트라메틸-로다민-6-dUTP, IR770-9-dATP, 플루오레신-12-ddUTP, 플루오레신-12-UTP, 및 플루오레신-15-2'-dATP (이상 Boehringer Mannheim(Indianapolis, IN)으로부터 구매 가능); 및 염색체 라벨링된 뉴클레오타이드, BODIPY-FL-14-UTP, BODIPY-FL-4-UTP, BODIPY-TMR-14-UTP, BODIPY-TMR-14-dUTP, BODIPY-TR-14-UTP, BODIPY-TR-14-dUTP, Cascade Blue®-7-UTP(피레닐옥시트리술폰산-7-UTP), Cascade Blue®-7-dUTP(피레닐옥시트리술폰산-7-dUTP), 플루오레신-12-UTP, 플루오레신-12-dUTP, Oregon Green™ 488-5-dUTP(2',7'-디플루오로플루오레신-5-dUTP), Rhodamine Green™-5-UTP((5-{2-[4-(아미노메틸)페닐]-5-(피리딘-4-일)-1H-i-5-UTP)), Rhodamine Green™-5-dUTP ((5-{2-[4-(아미노메틸)페닐]-5-(피리딘-4-일)-1H-i-5-UTP)), 테트라메틸로다민-6-UTP, 테트라메틸로다민-6-dUTP, Texas Red™-5-UTP(sulforhodamine 101 acid chloride-5-UTP), Texas Red™-5-dUTP (술포로다민 101 산 염화물-5-dUTP) 및 Texas Red™-12-dUTP (술포로다민 101 산 염화물-12-dUTP) (이상 Molecular Probes(Eugene, OR)에서 구매 가능)가 포함된다.

[0102]

본 발명의 특정 양태로, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 세트를 샘플에 추가하기 전에 유전자 물질을 기질에 연결하거나 직접 공유 결합으로 부착시키기 위하여 예를 들면 비오틴과 스트렙타비딘 등과 같은 결합 쌍을 이용하여 샘플의 핵산을 기질과 연결할 수 있다. 간단히 말해, 결합 쌍의 제1 구성원 (예: 비오틴)은 샘플의 핵산에 연결될 수 있고, 핵산은 기질의 표면에 있는 결합 쌍의 제2 구성원 (예: 아비딘 또는 스트렙타비딘)을 통해 기질에 부착될 수 있다. 샘플로부터의 핵산에 연결하면 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 혼성화 후 혼성화되지 않

은 올리고뉴클레오타이드를 제거하고/하거나 올리고뉴클레오타이드를 좌위에 가교하는 데 특히 유용할 수 있다. 간단히 말해, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 샘플로부터의 핵산을 혼성화할 수 있고, 그 다음 혼성화 복합체는 기질에 결합된다. 달리, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 혼성화 전에 또는 그와 동시에 샘플로부터의 핵산을 고체 지지면에 부착할 수 있다. 어느 경우든, 핵산을 고체 지지면에 혼성화하고 부착한 후, 또는 달리 혼성화된 올리고뉴클레오타이드를 결합시킨 후, 세척하거나 또는 Willis 등의 미국 특허 번호 7,700,323 및 6,858,412에서 논의된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드의 분해 등과 같은 다른 제거 방법으로 혼성화되지 않거나 결합되지 않은 올리고뉴클레오타이드를 제거하기 위하여 지지면을 처리할 수 있다. 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 동일한 프로브에 있어 결합로 인해 원형화된 프로브가 생기는 경우에는 올리고뉴클레오타이드 분해가 바람직한 양태이다. 그 다음 파인 프로브와 샘플 DNA를 포함하여 원형화되지 않은 핵산을 분해하는 데 엑소뉴클레아제를 사용할 수 있다.

[0103] 핵산을 결합 쌍과 연결하는 데 사용할 수 있는 다수의 방법이 있다. 예를 들어, 무작위 광비오티화(photobiotinylation), 비오티신을 사용한 말단 라벨링, 비오티틴화된 뉴클레오타이드를 사용한 복제, 비오티틴 라벨링된 프라이머를 사용한 복제 등과 같이 비오티신을 사용하여 핵산을 라벨링하는 데 다양한 방법을 사용할 수 있다.

[0104] 본 발명의 방법에서 각 염색체에 대하여 분석한 좌위 수는 분석한 표적 게놈 영역 당 2~20,000 또는 그 이상까지 다양할 수 있다. 바람직한 양태로, 표적 게놈 영역당 좌위 수는 48~1000이다. 다른 양태로, 표적 게놈 영역당 좌위 수는 적어도 100이다. 다른 양태로, 표적 게놈 영역당 좌위 수는 적어도 400이다. 다른 양태로, 표적 게놈 영역당 좌위 수는 1000 이하이다. 다른 양태로, 표적 게놈 영역당 좌위 수는 적어도 500이나 2000 이하이다.

[0105] 도 2에 도시되어 있는 실시양태에서는 검출 가능한 라벨에 직접 커플링된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 사용하지만, 그 대신 검출이 가능하도록 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 결합 생성물 또는 앰플리콘 또는 이의 분할된 앰플리콘(아래 설명됨)에 혼성화된 별개의 라벨링된 올리고뉴클레오타이드로 라벨을 제공할 수 있다. 선택적으로, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 또는 앰플리콘 또는 분할된 앰플리콘에 혼성화한 후 라벨링된 올리고뉴클레오타이드를 포착 프로브에 결합시킨다. 도 3은 본 발명의 하나의 실시양태의 실례이며, 여기에서는 라벨링된 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하고 라벨을 검출하기 전에 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 관심 대상 좌위에 혼성화하고, 결합시키고, 증폭시켜 어레이에 도입한다. 도 3에 도시된 방법에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드(302), (304)의 두 세트가 제공되며, 이 때 세트들은 제1 고정 서열 올리고뉴클레오타이드(306), (308)를 포함하며, 각 세트는 선택한 좌위(310), (312), 라벨 결합 영역(314), (316), 및 일반 프라이머 영역(318), (320)에 상보적인 서열을 포함하며; 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드(322), (324)는 선택한 좌위(326), (328), 포착 영역(330), (332) 및 일반 프라이머 영역(334), (336)에 상보적인 서열을 포함한다. 다수의 실시양태에서, 포착 영역(330), (332)는 실질적으로 동일한 서열을 포함하며 둘 다 어레이 상의 동일한 포착 프로브에 혼성화된다. 라벨 결합 영역(314), (316)은 각 표적 게놈 영역에 대한 좌위와 연결된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 차별화된 라벨링이 가능하도록 고정 서열 올리고뉴클레오타이드(302), (304)의 각 세트에 대하여 상이한 서열을 포함하는 한편, 어레이 상의 포착 특징에 결합 생성물이 경쟁적으로 혼성화될 수 있도록 하기 위해 포착 영역(330), (332)는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드(302), (304) 두 세트 모두에 대해 동일하다. 단계(338)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드(302), (304) 세트를 샘플에 도입하여 상이한 표적 게놈 영역의 좌위(340), (342)에 혼성화되도록 한다. 혼성화 후, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 유전자 샘플의 나머지로 분리한다(도면에 나와 있지 않음).

[0106] 단계(344)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드(302), (304) 세트를 결합시켜 결합 생성물(346), (348)을 생성한다. 단계(358)에서, 일반 프라이머(350), (352), (354) 및(356)을 결합 생성물(346), (348)에 도입하며, 결합 생성물은 일반 프라이머 영역(318), (334), (320) 및(336)에 각각 결합하여 앰플리콘(360), (362)를 생성하고 이들 각각은 포착 영역(364), (366)과 라벨 결합 영역(368), (370)을 포함한다. 특징의 바람직한 실시양태로, (350)과(354)는 실질적으로 동일한 서열을 가지며, 이는(318)과(320) 둘 다에 대해 상보적이고, (352)와(356)은 실질적으로 동일한 서열을 가지며, 이는(334)와(336) 둘 다에 대해 상보적이다. 복수의 포착 프로브(374)를 포함하는 혼성화 어레이(372)에 앰플리콘을 도입하고, 이 때 앰플리콘(360), (362)의 포착 영역 364, 366은 포착 프로브(374)에 혼성화된다. 단계(378)에서, 어레이(372)에 라벨링된 올리고뉴클레오타이드(380), (382)를 도입하고, 이 때 앰플리콘(360), (362)의 라벨 결합 영역(368), (370)은 라벨링된 올리고뉴클레오타이드(380), (382)의 표적 인식 영역(384), (386)에 혼성화된다. 선택적으로, 라벨링된 올리고뉴클레오타이드를 어레이 상에 있는 포착 프로브에 결합시킨다(도면에 나와 있지 않음). 라벨링된 올리고뉴클레

오티드를 혼성화한 후, 혼성화되지 않은 라벨링된 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 어레이에서 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 그 다음 라벨을 검출하고 각 표적 게놈 영역에 상응하는 좌위를 정량화하여 샘플 내 각 표적 게놈 영역의 존재 여부와 존재량에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0107] 도 3에 나타낸 실시양태와 같은 특정 실시양태에서, 결찰 생성물 또는 앰플리콘 또는 분할된 앰플리콘이 어레이에 혼성화된 후, 라벨링된 올리고뉴클레오티드가 고정 서열 올리고뉴클레오티드 또는 앰플리콘 또는 그의 분할된 앰플리콘에 혼성화된다. 다른 특정 실시양태에서, 어레이에 혼성화하기 전에, 라벨링된 올리고뉴클레오티드가 고정 서열 올리고뉴클레오티드 또는 앰플리콘 또는 그의 분할된 앰플리콘에 혼성화된다.

[0108] 결찰 생성물 또는 그의 앰플리콘 혼성화를 원활히 하기 위해, 어레이에 혼성화하기 전에 결찰 생성물 또는 앰플리콘 크기를 줄일 수 있다. 특정 실시양태에서, 예를 들면, 포착 영역과 라벨 결합 영역은 검출 목적으로 이용할 수 있도록 남겨 두면서 검출하고자 하는 결찰 생성물의 크기를 줄이기 위하여 결찰 생성물을 분할한다 (예: 제한 엔도뉴클레아제 또는 기타 효소 분할 기전 사용). 분할된 라벨링된 결찰 생성물 또는 분할된 앰플리콘의 검출은 전체 결찰 생성물을 검출하는 대신 대리(surrogate) 기능을 할 수 있다.

[0109] 결찰 생성물, 앰플리콘 및/또는 라벨링된 결찰 생성물의 크기를 줄이면 예를 들어 혼성화 동역학을 향상시키고 입체 장애(steric hindrance)를 감소시켜 어레이 상에서의 결합을 원활히 할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제한 효소를 사용하여 결찰 생성물 또는 앰플리콘을 분할하여 결찰 생성물의 크기를 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 고정 서열 올리고뉴클레오티드 각 세트 중 고정 서열 올리고뉴클레오티드 하나는 포착 영역 또는 라벨 결합 영역 (또는 실시양태에 따라, 그의 상응하는 상보적 서열)에 근위적인 제한 효소 인식 부위를 포함한다. 제한 효소는 라벨 또는 라벨 결합 영역 및 포착 영역은 혼성화 및 검출 목적으로 이용할 수 있도록 남겨 두면서 제한 효소 인식 부위에 있는 결찰 생성물을 분할하는 데 사용할 수 있다. 제한 효소 인식 부위는 분할 후 포착 영역과 라벨 결합 영역은 검출 목적으로 이용할 수 있도록 남겨 두는 임의의 위치에 있을 수 있다. 예를 들어, 제한 효소 인식 부위는 포착 영역 또는 라벨 결합 부위 바로 옆에 위치하거나 포착 영역 또는 라벨 결합 영역 중 하나에서 몇 개 염기 이내로 떨어진 위치에 위치할 수 있다. 바람직하게는, 결찰 생성물이나 앰플리콘에 라벨링된 올리고뉴클레오티드를 혼성화하기 전에 분할을 수행한다. 다른 특정 양태로, 분할은 검출 목적으로 어레이에 혼성화한 후 실시한다.

[0110] 도 4는 본 발명의 구체적인 실시양태의 실례이며, 여기에서는 어레이에 혼성화하기 전에 결찰 생성물이 분할된다. 도 4에 도시되어 있는 방법에서, 고정 서열 올리고뉴클레오티드 (402), (404)의 두 세트가 제공된다. 각 세트는 제1 고정 서열 올리고뉴클레오티드 (406), (408)을 포함하며, 이 올리고뉴클레오티드는 좌위 (410), (412), 라벨 결합 영역 (414), (416), 포착 영역 (418), (420), 일반 프라이머 영역 (422), (424) 및 제한 효소 인식 부위 (426), (428)에 상보적인 서열을 포함한다. 라벨 결합 영역 (414), (416)은 각 표적 게놈 영역에 연결된 고정 서열 올리고뉴클레오티드의 차별화된 라벨링이 가능하도록 고정 서열 올리고뉴클레오티드 (402), (404)의 세트에 대하여 상이한 서열을 포함하며, 혼성화 어레이 상의 포착 특징에 경쟁적으로 혼성화될 수 있도록 하기 위해 본 실시양태에서 포착 영역 (418), (420)은 고정 서열 올리고뉴클레오티드 (402), (404) 두 세트 모두에 대해 동일하다. 제한 효소 인식 부위 (426), (428)은 실시양태에 따라, 고정 서열 올리고뉴클레오티드 (402), (404) 두 세트 모두에 대해 동일하거나 각 세트에 대해 상이할 수 있다.

[0111] 단계 (442)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오티드 (402), (404) 세트를 샘플에 도입하여 선택한 좌위 (444), (446)에 혼성화되도록 한다. 혼성화 및/또는 결찰 후, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 샘플의 나머지에서부터 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 단계 (448)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오티드 (402), (404) 세트를 결찰시켜 결찰 생성물 (450), (452)를 생성한다. 단계 (454)에서, 일반 프라이머 (456), (458), (460) 및 (462)를 결찰 생성물 (450), (452)에 도입하며, 결찰 생성물은 일반 프라이머 영역 (422), (438), (424) 및 (440)에 각각 결합하여 앰플리콘 (464), (466)을 생성하고 이 각각은 라벨 결합 영역 (472), (474), 포착 영역 (468), (470) 및 제한 효소 인식 부위 (476), (478)을 포함한다. 단계 (480)에서, 제한 효소를 앰플리콘 (464), (466)에 도입하고 앰플리콘은 제한 효소 인식 부위 (476), (478)에 결합하고, 라벨 결합 영역 (472), (474) 및 포착 영역 (468), (470)을 포함하는 분할된 앰플리콘 (482), (484)는 남겨 두면서 앰플리콘을 분할한다. 또한 단계 (480)에서, 복수의 포착 프로브 (488)을 포함하는 혼성화 어레이 (486)에 분할된 앰플리콘 (482), (484)를 도입하고, 이 때 분할된 앰플리콘 (482), (484)의 포착 영역 (468), (470)은 포착 프로브 (488)에 경쟁적으로 혼성화된다. 단계 (492)에서, 어레이 (486)에 라벨링된 올리고뉴클레오티드 (492), (494)를 도입하고, 이 때 분할된 각 앰플리콘 (482), (484)의 라벨 결합 영역 (472), (474)는 라벨링된 올리고뉴클레오티드 (492), (494)의 표적 인식 영역 (496), (497)에 혼성화된다. 라벨링된 올리고뉴클레오티드를 분할된 앰플리콘에 혼성화한 후, 혼성화되지 않은 라벨링된 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 어레이에서



제거한다 (도면에 나와 있지 않음). 그 다음 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 (492), (494)의 라벨 (498), (499)를 검출하고 각 표적 게놈 영역에 상응하는 분할된 앰플리콘을 정량화하여 샘플 내 각 표적 게놈 영역의 존재 여부와 존재량에 대한 정보를 제공할 수 있다. 도 4에서 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 (492), (494)가 포착 프로브 (488)에 인접해 있으며, 따라서 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 (492), (494)가 포착 프로브 (488)에 결합되어 결합 안정성을 증가시킬 수 있음에 유의한다. 그 다음 분할된 앰플리콘 (482), (484)는 세척을 통해 어레이에서 제거될 수 있다.

[0112] 도 5는 본 발명의 또 다른 구체적인 실시양태의 실례이며, 여기에서는 어레이에 혼성화하기 전에 결합 생성물이 분할된다. 도 5에 도시된 방법에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (502), (504)의 두 세트가 제공된다. 각 세트는 제1 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (506), (508)을 포함하며, 이 올리고뉴클레오타이드는 좌위 (510), (512), 라벨 결합 영역 (514), (516), 포착 영역 (518), (520), 일반 프라이머 영역 (522), (524) 및 제한 효소 인식 부위 (526), (528)에 상보적인 서열을 포함한다. 라벨 결합 영역 (514), (516)은 각 표적 게놈 영역에 연결된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 차별화된 라벨링이 가능하도록 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (502), (504)의 세트에 대하여 상이한 서열을 포함하는 반면, 혼성화 어레이 상의 포착 특징에 경쟁적으로 혼성화될 수 있도록 하기 위해 본 실시양태에서 포착 영역 (518), (520)은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (502), (504) 두 세트 모두에 대해 동일하다. 제한 효소 인식 부위 (526), (528)은 실시양태에 따라, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (502), (504) 두 세트 모두에 대해 동일하거나 각 세트에 대해 상이할 수 있다.

[0113] 단계 (542)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (502), (504) 세트를 샘플에 도입하여 좌위 (544), (546)에 혼성화되도록 한다. 혼성화 후, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 샘플의 나머지로 부터 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 단계 (548)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (502), (504) 세트를 결합시켜 결합 생성물 (550), (552)를 생성한다. 단계 (554)에서, 일반 프라이머 (556), (558), (560) 및 (562)를 결합 생성물 (550), (552)에 도입하며, 결합 생성물은 일반 프라이머 영역 (522), (538), (524) 및 (540)에 각각 결합하여 앰플리콘 (564), (566)을 생성하고 이 각각은 라벨 결합 영역 (572), (574), 포착 영역 (568), (570) 및 제한 효소 인식 부위 (576), (578)을 포함한다. 단계 (580)에서, 제한 효소를 앰플리콘 (564), (566)에 도입하고 앰플리콘은 제한 효소 인식 부위 (576), (578)에 결합하고, 라벨 결합 영역 (572), (574) 및 포착 영역 (568), (570)을 포함하는 분할된 앰플리콘 (582), (584)는 남겨 두면서 앰플리콘을 분할한다. 분할 생성물이 각 라벨 (582), (584)에 대한 (580)에 결합되고 복수의 포착 프로브 (588)을 포함하는 혼성화 어레이 (586)에 도입되며, 이 때 분할된 앰플리콘 (588)의 포착 영역 (568), (570)은 포착 프로브 (590)에 경쟁적으로 혼성화한다.

[0114] 본 발명의 상기 실시양태의 특정 양태로 (그리고 도 4에 도시되어 있고 이에 관하여 논의된 대로), 결합 안정성을 증가시키기 위하여 라벨링된 올리고뉴클레오타이드를 혼성화 어레이의 포착 프로브에 결합시킬 수 있다. 상기 실시양태에서는 라벨링된 올리고뉴클레오타이드와 포착 프로브의 병렬을 필요로 한다. 포착 프로브, 분할된 결합 생성물 및 라벨링된 올리고뉴클레오타이드는 라벨링된 올리고뉴클레오타이드와 포착 프로브가 서로에 인접하여 혼성화되도록 구성될 수 있거나, 또는 라벨링된 올리고뉴클레오타이드와 포착 프로브가 연장될 수 있거나 본 문서 다른 부분에서 설명된 대로 간격 채우기 올리고뉴클레오타이드를 사용할 수 있다.

#### [0115] 복제수 변이 검출

[0116] 앞서 언급한 대로, 본 발명은 샘플 내 표적 게놈 영역 (상대적으로 짧은 게놈 영역, 보다 큰 게놈 영역, 염색체 하부 영역 및 염색체), 돌연변이 및 다형성(polymorphism)을 복제수 변이체를 확인하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 모체 및 태아 DNA 둘 다 포함하는 모체 샘플 내 태아 염색체 이수성을 확인하는 데 있어 매우 강력한 방법을 제공한다.

[0117] 본 발명의 방법은 또한 복수 염색체 상의 복수 좌위를 분석하고 특정 염색체의 좌위(loci) 빈도에 대한 평균을 내는 데 사용할 수 있다. 1개 이상의 표적 서열에 대하여 빈도 표준화 또는 정규화를 실시할 수 있다.

[0118] 일부 양태로, 본 발명의 방법은 예를 들어 라벨의 전체 신호를 검출한 후 한 염색체의 좌위에서 구한 라벨의 총합을 다른 염색체의 좌위에서 구한 라벨의 총합과 비교하여 염색체 이상 존재 여부를 판정하는 방식으로, 모체 혈청 샘플 등과 같은 혼합 샘플에서 두 공급원 모두에 대한 각 염색체의 좌위 빈도 총합을 구하는 데 사용할 수 있다. 달리, 염색체 이상 존재 여부를 판정하기 위하여 각 염색체 상의 좌위의 하위세트를 분석할 수 있다. 동일한 염색체로부터의 영역 간 또는 상이한 염색체로부터의 영역 간에 대해 비교할 수 있다.

[0119] 좌위 빈도를 측정하는 데 사용되는 데이터에서 실험 오류에 기인한 것으로 보이거나 특정 샘플 내 원인불명 유



전자 편이(genetic bias)에 따라 수준이 상승하거나 억제된 것으로 보이는 이상치 데이터(outlier data)는 제외할 수 있다. 하나의 실시예에서, 총합을 내는 데 사용되는 데이터에서 1개 이상의 샘플에서 특히 상승된 빈도를 가진 DNA 영역을 제외할 수 있다. 다른 실시예에서, 총합을 내는 데 사용되는 데이터에서 1개 이상의 샘플에서 특히 낮은 존재비로 나타내는 좌위를 제외할 수 있다.

[0120] 좌위의 하위세트를 무작위로 선택할 수 있으나 염색체 이상 존재 여부를 판정하는 데 통계적으로 유의한 결과를 내는 데 충분한 수여야 한다. 통계 검정력을 높이기 위해 혼합 샘플 내에서 및 상이한 어레이 상에서 좌위의 상이한 하위세트에 대한 여러 분석을 실시할 수 있다. 예를 들어, 염색체 21에 대한 좌위가 100개, 염색체 18에 대한 좌위가 100개 있는 경우, 상이한 어레이 상의 각 염색체에 대해서는 100개 미만의 좌위를 평가하는 일련의 분석을 실시할 수 있다. 상기 실시예에서, 표적 서열은 선택적으로 제외하지 않는다.

[0121] 특정 염색체에 대해 검출 가능한 상이한 좌위의 양은 모체 샘플 내 태아 좌위의 일반 표현(representation), 모체 샘플 내 태아 좌위를 나타내는 상이한 좌위의 분해 비율, 샘플 제조 방법 등과 같은 다수의 요인에 따라 달라질 수 있다.

# [0122] 일렬 결찰 분석

[0123] 특정 양태로, 본 발명의 방법은 표적 게놈 영역의 좌위에 상보적인 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사용을 포함하는 일렬 연결 방법을 사용하며, 상기 표적 게놈 영역의 예에는 관심 대상 염색체 또는 기준 염색체, 및 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이 및 그에 바로 인접한 좌위 영역에 상보적인 1개 이상의 짧은 가교 올리고뉴클레오타이드 (또한 “덧대(splint)” 올리고뉴클레오타이드 또는 “간격” 이나 “간격 채우기” 올리고뉴클레오타이드라고도 함)가 있다. 선택한 좌위(locus)에서 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이에 이들 올리고뉴클레오타이드를 혼성화한 후 이들 올리고뉴클레오타이드를 결찰시키면 결찰 생성물이 생성되고 이는 따라서 원하는 경우 증폭용 템플릿을 제공한다. 결찰이 일어나려면 두 결찰 부위 모두에 고정 서열 및 가교 올리고뉴클레오타이드 그리고 선택한 좌위(locus) 간에 완벽한 상보성이 반드시 존재해야 하기 때문에, 일렬 결찰 분석은 단일 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하거나 단 2개의 고정 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 경우보다 식별성이 크다.

[0124] 바람직한 양태로, 일렬 결찰 방법에서 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이에 인접하여 혼성화되는 단일 가교 올리고뉴클레오타이드를 사용한다. 달리, 일부 양태로, 일렬 결찰 방법에서 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 영역 사이에 핵산 영역에서 인접하게 혼성화되는 2개 이상의 가교 올리고뉴클레오타이드 세트를 가진 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 세트를 사용한다. 이들 가교 올리고뉴클레오타이드는 서로에 대해 그리고 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 인접하여 혼성화된다. 결찰 반응 시 2개의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드와 2개의 가교 올리고뉴클레오타이드가 결찰되어 단일 결찰 생성물을 생성하며 이는 증폭용 템플릿 기능을 하며 궁극적으로 검출용으로 사용된다.

[0125] 본 발명의 다른 양태로, 해당 방법은 선택한 좌위(locus) 내 인접하지 않은 영역에 결합하는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 세트를 사용하며, 결찰 단계 전에 혼성화된 올리고뉴클레오타이드의 연속된 세트를 생성하기 위해 프라이머 연장을 활용한다. 달리, 해당 방법은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 세트, 1개 이상의 가교 올리고뉴클레오타이드 그리고 1개 이상의 혼성화된 올리고뉴클레오타이드 연장을 사용할 수 있다. 연장과 결찰을 조합하면 결찰 생성물이 생성되고 이는 증폭용 템플릿 기능을 하며 이후 검출 및 정량화 목적으로 사용된다.

[0126] 바람직한 양태로, 본 발명의 방법은 선택한 각 좌위에 대하여 3개 이상의 올리고뉴클레오타이드 세트를 사용하는 다중(multiplex) 반응을 사용한다. 이런 일반적인 양태는 도 6에 도시되어 있으며 이 양태에서는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (602), (604)의 두 세트가 제공된다. 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (602), (604)의 각 세트는 각 각 관심 대상 핵산 영역 (610), (612), 라벨 결합 영역 (614), (616), 그리고 일반 프라이머 영역 (618), (620)에 상보적인 서열을 포함하는 제1고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (606), (608), 및 관심 대상 핵산 영역 (626), (628), 포착 영역 630, 632 및 일반 프라이머 영역 (634), (636)에 상보적인 서열을 포함하는 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (622), (624)를 포함한다. 단계 (638)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (602), (604) 세트를 샘플에 도입하여 표적 게놈 영역의 좌위 (640), (642)의 상보적인 부분에 특이적으로 혼성화되도록 한다. 혼성화 후, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 유전자 샘플의 나머지에서부터 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 달리, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 제거는 다음 결찰 단계 후 유전자 샘플의 나머지에서부터 분리할 수 있다. 단계 (644)에서, 가교 올리고뉴클레오타이드 (646), (648) 세트를 샘플에 도입하여 제1 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (606), (608)과 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (622), (624) 사이의 좌위 영역에 특이적으로 혼성화되도록 한다. 달리, 가교 올리고뉴클레오타이드

드 (646), (648)을 고정 서열 올리고뉴클레오타이드와 동시에 도입할 수 있다.

[0127] 단계 (650)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (602), (604) 세트와 가교 올리고뉴클레오타이드 (630), (632)를 결합시켜 좌위 (640), (642)에 상보적인 결합 생성물 (652), (654)를 생성한다. 또한, 단계 (650)에서, 일반 프라이머 (658), (660), (662) 및 (664)를 결합 생성물 (652), (654)에 도입하며, 이 때 일반 프라이머는 일반 프라이머 영역 (618), (634), (620) 및 (636)에 각각 결합하고, 결합 생성물을 증폭시켜 앰플리콘 (678), (680)을 생성하고 이 앰플리콘은 라벨 결합 영역 (666), (668)과 포착 영역 (662), (664)를 포함한다. 특정의 바람직한 실시양태로, 일반 프라이머 (658)과 (662)는 실질적으로 동일한 서열을 가지며, 이는 (618)과 (620) 둘 다에 대해 상보적이고, 일반 프라이머 (660)과 (664)는 실질적으로 동일한 서열을 가지며, 이는 (634)와 (636) 둘 다에 대해 상보적이다. 복수의 포착 프로브 (672)를 포함하는 혼성화 어레이 (670)에 앰플리콘 (678), (680)을 도입하고, 이 때 앰플리콘 (658), (660)의 포착 영역 (662), (664)는 포착 프로브 (672) 상의 표적 포착 영역 (674)에 경쟁적으로 혼성화된다. 단계 (676)에서, 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 (688), (690)의 표적 인식 영역 (682), (684)는 앰플리콘 (678), (680)의 라벨 결합 영역 (666), (668)에 특이적으로 혼성화된다. 라벨링된 올리고뉴클레오타이드를 혼성화한 후, 혼성화되지 않은 라벨링된 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 어레이에서 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 그 다음 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 (688), (690)의 라벨 (686), (688)을 검출하고 선택적으로 좌위를 정량화하여 유전자 샘플 내 각 게놈 영역의 존재 여부와 존재량에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0128] 특정 양태로, 가교 올리고뉴클레오타이드는 각 위치에서 퇴화 상태인 올리고뉴클레오타이드의 혼합물로 구성될 수 있으며, 따라서 가교 올리고뉴클레오타이드의 혼합물은 주어진 길이의 가교를 필요로 하는 다중 분석에서 모든 반응과 호환성이 있다. 하나의 실시예에서, 가교 올리고뉴클레오타이드는 랜더머(randomer)이며, 이 때 가교 올리고뉴클레오타이드의 모든 조합이 합성된다. 하나의 실시예로서, 염기 5개의 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 경우 고유한 가교 올리고뉴클레오타이드의 수는  $4^5 = 1024$ 이다. 가능한 모든 가교 뉴클레오타이드가 반응에 존재하기 때문에 이는 표적 영역의 수와 무관하게 된다. 다른 양태로, 올리고뉴클레오타이드 혼합물이 상이한 길이의 가교 올리고뉴클레오타이드를 필요로 하는 결합 반응과 호환성이 있도록 가교 올리고뉴클레오타이드는 길이가 다양할 수 있다.

[0129] 또 다른 양태로, 가교 올리고뉴클레오타이드는 특정 위치 (즉, 알려진 다형성 부위)에서 퇴화 상태일 수 있으며 일련 결합 반응은 다형성 부위에서 제공되는 특정 서열을 필요로 하는 경우로 제한된다.

[0130] 다른 실시예에서, 가교 올리고뉴클레오타이드는 간격의 서열에 일치하도록 합성된 특이성을 가진다. 하나의 실시예로서, 염기 5개의 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 경우 분석에서 제공되는 고유 올리고뉴클레오타이드의 수는 좌위의 수와 동일하거나 그 미만이다. 간격 서열이 2개 이상의 좌위 간에 공유되는 경우 가교 올리고뉴클레오타이드의 수가 좌위의 수 미만일 수 있다. 상기 실시예의 하나의 양태로, 간격 서열 내 동일한 중첩이 가능한 많도록 의도적으로 좌위 및 특히 간격 서열을 선택할 수 있으며 이에 따라, 다중(multiplex) 반응에 필요한 가교 올리고뉴클레오타이드의 수가 최소화된다.

[0131] 다른 양태로, 가교 올리고뉴클레오타이드의 각 말단에서 모든 좌위가 동일한 염기(들)를 공유하도록 가교 올리고뉴클레오타이드 서열이 설계되고 좌위가 선택된다. 예를 들어, 모든 간격에 대해 간격의 첫 번째 위치에는 “A” 염기 그리고 마지막 위치에는 “G” 염기를 공유하도록 좌위와 간격 위치를 선택할 수 있다. 조사하는 게놈, 해당 부위의 서열 변이 가능성 등과 같은 인자에 따라, 첫 번째와 마지막 염기의 임의의 조합을 활용할 수 있다. 상기 실시예의 구체적인 양태로, 가교 올리고뉴클레오타이드는 가교 올리고뉴클레오타이드 내부 위치에 있는 염기의 무작위 퇴화에 의해 합성될 수 있으며, 가교 올리고뉴클레오타이드의 첫 번째와 마지막 위치에는 뉴클레오타이드 특이성을 가진다. 5-mer의 경우, 두 번째, 세 번째, 네 번째 위치에서 퇴화가 발생하며, 가교 올리고뉴클레오타이드의 말단에 2개의 특이적 뉴클레오타이드가 고정된다. 이 경우, 고유한 올리고뉴클레오타이드의 수는  $4^3 = 64$ 이다.

[0132] 인간 게놈에서, 디뉴클레오타이드 CG의 빈도는 각각의 모노뉴클레오타이드 빈도로 예상되는 것보다 훨씬 낮다. 이는 가교 올리고뉴클레오타이드의 특정 혼합물을 이용한 분석의 특이성을 증가시킬 기회를 제공한다. 이 양태에서, 가교 올리고뉴클레오타이드가 5' G와 3' C를 가지도록 선택할 수 있다. 이렇게 염기를 선택하면 각 올리고뉴클레오타이드가 인간 게놈에서 높은 빈도를 갖도록 하지만 두 가교 올리고뉴클레오타이드가 서로에 인접하게 혼성화되는 경우는 드물게 된다. 그러면 분석에서 표적 대상이 아닌 게놈의 위치에서 여러 올리고뉴클레오타이드가 결합될 확률이 줄어든다.

[0133] 특정 양태로, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 세트가 혼성화되고, 혼성화되지 않은 모든 고정 서열 올리고뉴클레

오티드를 선택적으로 제거한 후 가교 올리고뉴클레오타이드를 반응에 추가한다. 핵산 영역에 완전히 상보적이지 않은 것은 아닌 올리고뉴클레오타이드의 잘못된 혼성화를 방지하기 위하여, 혼성화 반응 조건을 바람직하게는 가교 올리고뉴클레오타이드의  $T_m$  근처에서 최적화한다. 가교 올리고뉴클레오타이드가 고정 서열 올리고뉴클레오타이드보다 현저하게 낮은  $T_m$ 을 가지는 경우, 가교 올리고뉴클레오타이드를 바람직하게는 연결효소 반응의 일부로 추가한다.

[0134] 짧은 가교 올리고뉴클레오타이드 사용의 이점은 가교 올리고뉴클레오타이드의 모든 염기가 간격 서열에 일치하는 경우에만 한 쪽 말단에서 결찰이 발생할 가능성이 있다는 점이다. 짧은 가교 올리고뉴클레오타이드 사용의 추가적인 이점은 필요한 상이한 가교 올리고뉴클레오타이드 수가 좌위 수 보다 작을 수 있으며, 이에 따라 올리고뉴클레오타이드의 유효 농도가 높아져 완전 일치가 더 빠르게 발생한다는 점이다. 가교 뉴클레오타이드의 수가 더 적으면 비용 절감과 품질 관리의 이점이 생긴다. 첫 번째와 마지막 염기가 고정되고 그 사이에는 무작위 염기를 사용하는 이점에는 반응에 사용하는 총 가교 올리고뉴클레오타이드 수를 줄이면서 보다 높은 특이성을 위하여 보다 긴 가교 올리고뉴클레오타이드를 사용할 수 있다는 점이 포함된다.

#### [0135] 다형성(Polymorphism) 검출

[0136] 특정 양태로, 본 발명의 방법은 다형성을 포함하는 1개 이상의 표적 게놈 영역을 검출한다. 일부 실시양태로, 이 방법은 반드시 특정 대립유전자 (예: 모체 대 태아)를 식별하도록 설계된 것이 아니라, 표적 게놈 영역의 좌위에 상응하는 상이한 대립유전자가 본 발명의 정량화 방법에 포함되도록 하기 위한 것이다. 그러나, 특정 양태로, 표적 게놈 영역 내 모든 좌위를 계수하기 위한 대립유전자 정보와 예를 들어 모체 샘플 내에 포함된 태아 DNA의 양을 계산하거나 암 환자의 유전자 샘플에서 특정 돌연변이가 있는 대립유전자 비율을 확인하기 위한 대립유전자 정보를 모두 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 분석의 전체 효율성을 보장하기 위하여 SNP의 정량화뿐만 아니라 검출을 통하여 복제수 변이를 직접 측정하기 위한 SNP 함유 좌위의 검출에 대한 두 기전을 포함시키는 것을 목적으로 한다.

[0137] 따라서, 본 발명의 특정 양태로, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 통해 또는 좌위 검출을 위해 사용되는 가교 올리고뉴클레오타이드를 통한 대립유전자 판별이 제공된다. 이러한 실시양태에서, 라벨 결합 영역은 세트 내 제1 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 또는 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 임베딩되어 있는 대립유전자 지표 기능을 한다. 구체적인 특정 양태로, 좌위 내 2개 이상의 다형성을 검출하기 위한 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 둘 다에 대립유전자 지표 (예: 라벨 결합 영역)가 존재한다. 이러한 양태에서 사용되는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 수는 선택한 좌위에 대한 평가 대상인 가능한 대립유전자 수에 상응하며, 대립유전자 지표와 관련된 라벨 검출은 유전자 샘플 내 특정 대립유전자의 존재, 존재량, 또는 부재를 검출할 수 있다.

[0138] 도 7에는 본 발명의 하나 양태가 도시되어 있으며, 이 양태에서는 어레이에 대한 경쟁적 혼성화를 사용하여 다형성을 검출한다. 도 7에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 두 세트 (702), (704)가 제공되며, 각 세트의 제1 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (706), (708)은 예를 들어 각각 A/T 또는 G/C SNP를 포함하는 관심 대상 좌위 (710), (712)에 상보적인 서열과 라벨 (714), (716)을 포함한다. 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (722), (724)는 선택한 좌위 (726), (728)에 상보적인 서열과 포착 영역 (730), (732)을 포함한다. 일부 실시양태로, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (706)은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (708)과 동일한데, 단 각각 SNP (718) 및 (720) 그리고 라벨 (714) 및 (716)은 예외이며; 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (722)는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (724)와 동일하다. 즉, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 세트 간의 차이는 조사한 SNP와 SNP에 상응하는 라벨이다. 단계 (734)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (702), (704) 세트를 샘플에 도입하여 SNP (740), (742)를 포함하는 관심 대상 좌위 (736), (738)에 특이적으로 혼성화되도록 한다. 혼성화 또는 결찰 후, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 유전자 샘플의 나머지로부터 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 단계 (744)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (702), (704) 세트를 결찰시켜 결찰 생성물 (746), (748)을 생성한다. 상기 실시양태에서 대립유전자-특이 뉴클레오타이드가 결찰 접합부에 밀접되어 있는 한 결찰이 대립유전자에 특이적임에 주목하는 것이 중요하다. 전형적으로, 대립유전자-특이 뉴클레오타이드는 반드시 결찰된 말단의 뉴클레오타이드 5개 이내에 있어야 하지만; 바람직한 양태에서 대립유전자-특이 뉴클레오타이드는 말단 염기이다.

[0139] 단계 (750)에서, 복수의 포착 프로브 (754)를 포함하는 혼성화 어레이 (752)에 결찰 생성물을 도입하고, 이 때 결찰 생성물 (746), (748)의 포착 영역 (730), (732)은 포착 프로브 (754)에 혼성화된다. 결찰 생성물의 혼성화 후, 혼성화되지 않은 결찰 생성물은 바람직하게는 유전자 샘플의 나머지로부터 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 그 다음 라벨 (714), (716)을 검출하고 각 표적 게놈 영역에 상응하는 좌위에 특이적인 대립유전자를



정량화하여 유전자 샘플 내 각 대립유전자 및 표적 게놈 영역의 존재 여부와 존재량에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0140] 다른 실시양태로, 제1 및/또는 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 내에 대립유전자-특이 뉴클레오타이드를 배열하며 가교 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 결찰 생성물을 생성한다. 도 8에 본 발명의 상기 양태가 도시되어 있다. 도 8에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (802), (804)의 두 세트가 제공되며, 이 때 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 두 세트 모두 선택한 동일한 좌위에서 상이한 SNP를 조사하도록 구성되어 있다. 각 세트의 제1 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (806), (808)은 예를 들어 각각 A/T 또는 G/C SNP를 포함하는 선택한 좌위 (810), (812), 라벨 결합 영역 (814), (816), 및 일반 프라이머 영역 (818), (820)에 상보적인 서열을 포함하며; 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (826), (828)은 선택한 좌위 (830), (832), 포착 영역 (834), (836) 및 일반 프라이머 영역 (838), (840)에 상보적인 서열을 포함한다. 다형성 분석에서, 제2 고정 서열 뉴클레오타이드 (826)과 (828)은 실질적으로 동일한 서열을 가지며 제1 고정 서열 뉴클레오타이드 (806), (808)은 SNP 부위와 라벨 결합 영역 (814), (816)을 제외하고 실질적으로 동일한 서열을 가진다. 단계 (842)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (802), (804) 세트를 샘플에 도입하여 SNP (848), (850)을 포함하는 좌위 (844), (846)에 혼성화되도록 한다. 혼성화 후, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 유전자 샘플의 나머지에서 분리한다 (도면에 나와 있지 않음).

[0141] 단계 (852)에서, 가교 올리고뉴클레오타이드 (854), (856) 세트를 샘플에 도입하여 각 세트의 제1 및 제2 고정 서열 뉴클레오타이드 사이의 좌위 (844), (846)에 혼성화되도록 한다. 바람직한 실시양태에서, (854)과 (856)은 실질적으로 동일한 서열을 가진다. 단계 (858)에서, 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드와 혼성화된 가교 올리고뉴클레오타이드를 결찰시켜 결찰 생성물 (860), (862)를 생성한다. 단계 (864)에서, 일반 프라이머 (866), (868), (870) 및 (872)를 결찰 생성물 (860), (862)에 도입하며, 이는 일반 프라이머 영역 (818), (838), (820) 및 (840)에 각각 결합하고 결찰 생성물 (860), (862)를 증폭시켜 앰플리콘 (874), (876)을 생성하고 이 앰플리콘은 라벨 결합 영역 (882), (884)와 포착 영역 (878), (880)을 포함한다. 포착 프로브 (888)를 포함하는 혼성화 어레이 (886)에 앰플리콘을 도입하고, 이 때 앰플리콘 (874), (876)의 포착 영역 (878), (880)은 포착 프로브 (888)에 혼성화된다. 단계 (892)에서, 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 (894), (895)의 표적 인식 영역 (896), (897)이 앰플리콘 (874), (876)의 라벨 결합 영역 (882), (884)에 선택적으로 혼성화되도록 하는 조건 하에서, 혼성화 어레이 (886)에 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 (894), (895)를 도입한다. 라벨링된 올리고뉴클레오타이드를 혼성화한 후, 혼성화되지 않은 라벨링된 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 어레이에서 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 그 다음 라벨 (898), (899)를 검출하고 각 표적 게놈 영역에 상응하는 좌위에 대립 유전자를 정량화하여 유전자 샘플 내 좌위에서의 대립유전자와 표적 게놈 영역의 존재 여부와 존재량에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0142] 본 발명의 특정 양태로, 가교 뉴클레오타이드를 통하여 대립유전자 판별이 제공된다. 상기 양태에서, 가교 올리고뉴클레오타이드는 SNP에 걸쳐 위치하며, 바람직하게는 대립유전자-특이성을 제공할 수 있도록 결찰 접합부의 한 말단에 충분히 밀접하게 위치한다.

[0143] 하나의 실시예에서, 동일한 반응 혼합물에 두 대립유전자 가교 올리고뉴클레오타이드 변이체가 모두 존재하며 혼성화 어레이에 연결된 라벨의 차후 혼성화로부터 대립유전자를 검출할 수 있다. 도 9에 상기 양태가 도시되어 있다.

[0144] 도 9에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (902), (904)의 두 세트가 제공되며, 이 때 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 두 세트 모두 선택한 동일한 좌위를 조사하도록 구성되어 있으며 라벨 결합 영역을 제외하고 동일하다. 상기 실시양태에서, 가교 올리고뉴클레오타이드는 SNP를 조사하며, 분석은 적어도 결찰 단계가 발생했을 때까지 2개의 별도의 용기에서 실시해야 한다. 각 세트의 제1 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (906), (908)은 좌위 (910), (912), 포착 영역 (914), (916) 및 일반 프라이머 영역 (918), (920)에 상보적인 서열을 포함한다. 각 세트의 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (922), (924)는 좌위 (926), (928), 라벨 결합 영역 (930), (932) 및 일반 프라이머 영역 (934), (936)에 상보적인 서열을 포함한다. 단계 (938)에서, 각 세트 (902), (904)가 SNP (944), (946)을 포함하는 선택한 좌위 (940), (942)에 특이적으로 혼성화되도록 하는 조건 하에서 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (902), (904) 세트를 샘플에 도입한다. 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 혼성화 후 (또는 달리 결찰 후), 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 유전자 샘플의 나머지에서 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 단계 (948)에서, A/T SNP 또는 G/C SNP에 상응하는 가교 올리고뉴클레오타이드 (950), (952)를 도입하고 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이의 좌위 (940), (942)의 영역에 결합하도록 한다. 달리, 가교 올리고뉴클레오타이드를 고정 서열 올리고뉴클레오타이드와 동시에 도입할

수 있다.

[0145] 단계 (954)에서, 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드와 가교 올리고뉴클레오타이드를 결합시켜 결합 생성물 (956), (958)을 생성한다. 이 시점에서 두 가지 개별 분석을 한 용기에 합할 수 있으나 반드시 필요한 것은 아니다. 단계 (960)에서, 일반 증폭 프라이머 (962), (964), (966) 및 (968)을 결합 생성물 (956), (958)에 도입하며, 이 때 일반 프라이머는 일반 프라이머 영역 (918), (934), (920) 및 (936)에 각각 결합하고 결합 생성물 (956), (958)을 증폭시켜 앰플리콘 (970), (972)를 생성하고 각 앰플리콘은 라벨 결합 영역 (980), (982)와 포착 영역 (974), (976)을 포함한다. 복수의 포착 프로브 (986)을 포함하는 혼성화 어레이 (984)에 앰플리콘 (970), (972)를 도입하고, 이 때 앰플리콘 (970), (972)의 포착 영역 (974), (976)은 포착 프로브 (986)에 경쟁적으로 혼성화된다. 단계 (990)에서, 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 (992), (994)를 혼성화 어레이 (984)에 도입하며 이 때 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 (992), (994)의 표적 인식 영역 (996), (997)이 앰플리콘 (970), (972)의 라벨 결합 영역 (980), (982)에 혼성화된다. 라벨링된 올리고뉴클레오타이드를 혼성화한 후, 혼성화되지 않은 라벨링된 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 어레이에서 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 그 다음 라벨 (998), (999)를 검출하고 표적 게놈 영역에 상응하는 좌위에 상응하는 대립유전자를 정량화하여 샘플 내 각 대립유전자 및 표적 게놈 영역의 존재 여부와 존재량에 대한 정보를 제공할 수 있다.

#### [0146] 추가 실시양태

[0147] 도 10에는 본 발명의 또 다른 구체적인 실시양태가 도시되어 있으며, 여기에서 가교 올리고뉴클레오타이드가 사용되고 어레이에 혼성화하기 전에 결합 생성물이 이중 분할된다. 도 10에 도시된 방법에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1002), (1004)의 두 세트가 제공된다. 각 세트는 제1 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1006), (1008)을 포함하며, 이 올리고뉴클레오타이드는 좌위 (1010), (1012), 라벨 결합 영역 (1018), (1020), 포착 영역 (1014), (1016), 일반 프라이머 영역 (1022), (1024) 및 제한 효소 인식 부위 영역 (1026), (1028)에 상보적인 서열을 포함한다. 라벨 결합 영역 (1018), (1020)은 각각의 상이한 표적 게놈 영역에 연결된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 차별화된 라벨링이 가능하도록 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1002), (1004)의 세트에 대하여 상이한 서열을 포함하며, 혼성화 어레이 상의 포착 특징에 경쟁적으로 혼성화될 수 있도록 하기 위해 본 실시양태에서 포착 영역 (1014), (1016)은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1002), (1004) 두 세트 모두에 대해 동일하다. 제한 효소 인식 부위 (1026), (1028)은 각 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 상의 분할 부위 둘 다에 대해 동일할 수 있으며/있거나 실시양태에 따라 상이한 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1002), (1004)에 대해 동일할 수 있다. 또한 각 세트에 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1030), (1032)가 있으며, 이 때 각각의 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 좌위 (1034), (1036) 및 일반 프라이머 영역 (1038), (1040)에 상보적인 서열을 포함한다.

[0148] 단계 (1042)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1002), (1004) 세트를 샘플에 도입하여 좌위 (1044), (1046)에 혼성화되도록 한다. 혼성화 (달리 결합) 후, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 샘플의 나머지로 부터 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 단계 (1048)에서, 가교 올리고뉴클레오타이드 (1026), (1028)을 각 세트에 추가하고 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이에 인접하게 혼성화한다. 단계 (1054)에서, 올리고뉴클레오타이드 세트를 결합시켜 결합 생성물 (1050), (1052)를 생성한다. 단계 (1054)에서, 일반 프라이머 (1056), (1058), (1060) 및 (1062)를 결합 생성물 (1050), (1052)에 도입하며, 결합 생성물은 일반 프라이머 영역 (1022), (1038), (1024) 및 (1040)에 각각 결합하여 앰플리콘 (1064), (1066)을 생성하고 이 앰플리콘들은 라벨 결합 영역 (1018), (1020), 포착 영역 (1014), (1016) 및 제한 효소 인식 부위 (1072), (1074), (1076), (1078)을 포함한다. 단계 (1070)에서, 1개 이상의 제한 효소를 앰플리콘 (1064), (1066)에 도입하고 앰플리콘을 이중 분할하여 분할된 앰플리콘을 생성하며, 이 앰플리콘은 라벨 결합 영역 (1018), (1020) 및 포착 영역 (1014), (1016)을 포함한다. 복수의 포착 프로브 (1088)을 포함하는 혼성화 어레이 (1086)에 분할 생성물을 도입하고, 이 때 분할된 앰플리콘의 포착 영역 (1014), (1016)은 포착 프로브 (1090)에 경쟁적으로 혼성화된다. 그 다음 혼성화된 포착 영역이 분할된 생성물 상의 상보적 서열에 결합하는 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 (1082), (1084)에 도입되고 검출된다.

[0149] 도 11에는 본 발명의 또 다른 구체적인 실시양태가 도시되어 있으며, 여기에서는 가교 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 동일한 좌위 내 상이한 대립유전자를 식별하고 어레이에 혼성화하기 전에 결합 생성물이 이중 분할된다. 도 11에 도시된 방법에서, 가능한 다형성(polymorphism)을 가지는 단일 좌위에 대하여 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1102), (1104)의 두 세트가 제공된다. 각 세트는 제1 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1106), (1108)을 포함하며, 이 올리고뉴클레오타이드는 선택한 좌위 (1110), (1112)의 한 대립유전자, 라벨 결합 영역 (1118), (1120), 포착 영역 (1114), (1116), 일반 프라이머 영역 (1122), (1124) 및 제한 효소 인식 부위 영역 (1126),

(1128)에 상보적인 서열을 포함한다. 라벨 결합 영역 (1118), (1120)은 각각의 상이한 대립유전자에 연결된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 차별화된 라벨링이 가능하도록 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1102), (1104)의 세트에 대하여 상이한 서열을 포함하는 한편, 혼성화 어레이 상의 포착 특징에 경쟁적으로 혼성화될 수 있도록 하기 위해 본 실시양태에서 포착 영역 (1114), (1116)은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1102), (1104) 두 세트 모두에 대해 동일하다. 제한 효소 인식 부위 (1126), (1128)은 각 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 분할 부위 둘 다에 대해 동일할 수 있으며/있거나 실시양태에 따라 상이한 세트의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1102), (1104)에 대해 동일할 수 있다. 또한 각 세트에 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1130), (1132)가 있으며, 이 때 각각의 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 선택한 좌위 (1134), (1136) 및 일반 프라이머 영역 (1138), (1140)에 상보적인 서열을 포함한다.

[0150]

단계 (1142)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1102), (1104) 세트를 샘플에 도입하여 선택한 좌위 1144, 1146에 혼성화되도록 한다. 혼성화 (또는 결찰) 후, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 샘플의 나머지에서 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 단계 (1148)에서, 가교 올리고뉴클레오타이드 (1126), (1128)을 각 세트에 추가하고 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이에 인접하게 혼성화한다. 단계 (1154)에서, 올리고뉴클레오타이드 세트를 결찰시켜 결찰 생성물 (1150), (1152)를 생성한다. 단계 (1154)에서, 일반 프라이머 (1156), (1158), (1160) 및 (1162)를 결찰 생성물 (1150), (1152)에 도입하며, 결찰 생성물은 일반 프라이머 영역 (1122), (1138), (1124) 및 (1140)에 각각 결합하여 앰플리콘 (1164), (1166)을 생성하고 이들은 라벨 결합 영역 (1118), (1120), 포착 영역 (1114), (1116) 및 제한 효소 인식 부위 (1172), (1174), (1176), 및 (1178)을 포함한다. 단계 (1170)에서, 1개 이상의 제한 효소를 앰플리콘 (1164), (1166)에 도입하고 앰플리콘을 이중 분할하여 분할된 앰플리콘을 생성하는데 이 앰플리콘은 라벨 결합 영역 (1118), (1120) 및 포착 영역 (1114), (1116)을 포함한다. 복수의 포착 프로브 (1188)을 포함하는 혼성화 어레이 (1186)에 분할 생성물을 도입하고, 이 때 분할된 앰플리콘의 포착 영역 (1118), (1120)은 포착 프로브 (1190)에 경쟁적으로 혼성화된다. 그 다음 혼성화된 포착 영역을 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 (1182), (1184)에 도입하며 (1188), 이는 분할된 생성물 상의 상보성 서열에 결합하여 검출되어 좌위의 상이한 대립유전자를 차별화한다.

[0151]

도 12에는 본 발명의 또 다른 구체적인 실시양태가 도시되어 있으며, 여기에서는 가교 올리고뉴클레오타이드가 사용되고 어레이에 혼성화하기 전에 결찰 생성물이 분할된다. 상기 실시양태에서, 결찰 생성물을 증폭하는 데 사용하는 프라이머는 상이하게 라벨링된다. 도 12에 도시되어 있는 방법에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1202), (1204)의 두 세트가 제공된다. 각 세트는 첫 번째 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1206), (1208)를 포함하며, 이 올리고뉴클레오타이드는 좌위 (1210), (1212), 프라이머 결합 영역 (1218), (1224)(상이함), 포착 영역 (1214), (1220) 및 제한 효소 인식 부위 영역(1226), (1228)에 상보적인 서열을 포함한다. 프라이머 결합 영역 (1218), (1224)는 각각의 상이한 표적 게놈 영역에 연결된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 차별화된 라벨링이 가능하도록 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1202), (1204)의 세트에 대하여 상이한 서열을 포함하는 한편, 혼성화 어레이 상의 포착 특징에 경쟁적으로 혼성화될 수 있도록 하기 위해 본 실시양태에서 포착 영역 (1214), (1220)은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1202), (1204) 두 세트 모두에 대해 동일하다. 제한 효소 인식 부위 (1226), (1228)은 각 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 분할 부위 둘 다에 대해 동일할 수 있으며/있거나 실시양태에 따라 상이한 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1302), (1304)에 대해 동일할 수 있다. 또한 각 세트에 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1230), (1232)가 있으며, 이 때 각 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 좌위 (1234), (1236) 및 프라이머 영역 (1238), (1240)에 상보적인 서열을 포함한다.

[0152]

단계 (1242)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1202), (1204) 세트를 샘플에 도입하여 좌위 (1244), (1246)에 혼성화되도록 한다. 혼성화 (또는 달리 결찰) 후, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 샘플의 나머지에서 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 단계 (1248)에서, 가교 올리고뉴클레오타이드 (1226), (1228)을 각 세트에 추가하고 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이에 인접하게 혼성화한다. 단계 (1254)에서, 올리고뉴클레오타이드 세트를 결찰시켜 결찰 생성물 (1250), (1252)를 생성한다. 단계 (1254)에서, 프라이머 (1256), (1258), (1260) 및 (1262)를 결찰 생성물 (1250), (1252)에 도입하며, 결찰 생성물은 프라이머 영역 (1218), (1238), (1224) 및 (1240)에 각각 결합하여 앰플리콘 (1264), (1266)을 생성하고 이들 앰플리콘은 프라이머 결합 영역 (1278), (1284), 포착 영역 (1276), (1280) 및 제한 효소 인식 부위 (1272) 및 (1274)를 포함한다. 프라이머 (1256)과 (1260)은 상이하게 라벨링되어 앰플리콘이 어레이 상에 혼성화되면 상이한 좌위의 앰플리콘 간에 차별화가 일어날 수 있게 된다. 단계 (1270)에서, 1개 이상의 제한 효소를 앰플리콘 (1264), (1266)에 도입하고 앰플리콘을 분할하여 분할된 앰플리콘을 생성하며, 이 앰플리콘은 프라이머 결합 영역 (1278), (1284) 및 포착 영역 (1276), (1280)을 포함한다. 복수의 포착 프로브 (1288)을 포함하는 혼성화



어레이 (1286)에 단계 (1290)에서 상기 분할 생성물을 도입하고, 이 때 분할 애플리콘의 포착 영역 (1276), (1280)은 포착 프로브 1288에 경쟁적으로 혼성화된다.

[0153] 도 13에는 본 발명의 또 다른 구체적인 실시양태가 도시되어 있으며, 여기에서는 가교 올리고뉴클레오타이드가 사용되고 어레이에 혼성화하기 전에 결찰 생성물이 분할된다. 도 13에는 도 12와 매우 유사한 실시양태가 도시되어 있다. 상기 실시양태에서, 결찰 생성물을 증폭하는 데 사용하는 프라이머가 차별적으로 라벨링된다. 도 13에 도시된 방법에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1302), (1304)의 두 세트가 제공된다. 각 세트는 제1 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1306), (1308)을 포함하며, 이 올리고뉴클레오타이드는 좌위 (1310), (1312), 프라이머 결합 영역 (1318), (1324) (이들은 상이함), 포착 영역 (1314), (1320) (이들은 동일함) 및 제한 효소 인식 부위 영역 (1326), (1328)에 상보적인 서열을 포함한다. 프라이머 결합 영역 (1318), (1324)는 각각 상이한 표적 게놈 영역에 연결된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 차별화된 라벨링이 가능하도록 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1302), (1304)의 세트에 대하여 상이한 서열을 포함하는 반면, 혼성화 어레이 상의 포착 특징에 경쟁적으로 혼성화될 수 있도록 하기 위해 본 실시양태에서 포착 영역 (1314), (1320)은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1302), (1304) 두 세트 모두에 대해 동일하다. 제한 효소 인식 부위 (1326), (1328)은 각 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 분할 부위 둘 다에 대해 동일할 수 있으며/있거나 실시양태에 따라 상이한 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1302), (1304)에 대해 동일할 수 있다. 또한 각 세트에 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1330), (1332)가 있으며, 이 때 각 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 좌위 (1334), (1326) 및 프라이머 영역 (1338), (1340)에 상보적인 서열을 포함한다.

[0154] 단계 (1342)에서, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 (1302), (1304) 세트를 샘플에 도입하여 좌위 (1344), (1346)에 혼성화되도록 한다. 혼성화 (또는 달리 결찰) 후, 혼성화되지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 샘플의 나머지에서 분리한다 (도면에 나와 있지 않음). 단계 (1348)에서, 가교 올리고뉴클레오타이드 (1326), (1328)을 각 세트에 추가하고 혼성화된 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 사이에 인접하게 혼성화한다. 단계 (1354)에서, 올리고뉴클레오타이드 세트를 결찰시켜 결찰 생성물 (1350), (1352)를 생성한다. 단계 (1354에서), 프라이머 (1356), (1358), (1360) 및 (1362)를 결찰 생성물 (1350), (1352)에 도입하며, 이 결찰 생성물은 프라이머 영역 (1318), (1338), (1324) 및 (1340)에 각각 결합하여 애플리콘 (1364), (1366)을 생성하고 이들 애플리콘은 프라이머 결합 영역 (1378), (1384), 포착 영역 (1376), (1380) 및 제한 효소 인식 부위 (1372) 및 (1374)를 포함한다. 프라이머 (1356)과 (1360)은 차별적으로 라벨링되어 애플리콘이 어레이 상에 혼성화된 후 상이한 좌위의 애플리콘 사이에서 차별화될 수 있도록 한다. 단계 (1370)에서, 1개 이상의 제한 효소를 애플리콘 (1364), (1366)에 도입하고 애플리콘을 분할하여 분할된 애플리콘을 생성하며, 이 애플리콘은 프라이머 결합 영역 (1378), (1384) 및 포착 영역 (1376), (1380)을 포함한다. 복수의 포착 프로브 (1388)를 포함하는 혼성화 어레이 (1386)에 단계 (1390)에서 분할된 생성물을 도입하고, 이 때 분할 애플리콘의 포착 영역 (1376), (1380)은 포착 프로브 (1388)에 경쟁적으로 혼성화된다.

[0155] 도 10~13의 실시양태에서 어레이에 도입되는 분할 애플리콘에는 표적 게놈 영역의 임의의 부분이나 그의 상보적인 서열이 포함되지 않는다. 포착 영역이 상이한 표적 게놈 영역과 관련하여 사용되며, 라벨링된 올리고뉴클레오타이드가 영역 사이에서 차별화하는 데 사용된다. 이 방식으로, 분할된 애플리콘이 공통의 포착 프로브에 경쟁적으로 혼성화되며, 표적 게놈 영역의 정량화는 어레이에 결합하는 분할된 생성물에 상응하는 검출된 라벨로 측정한다.

[0156] 앞서 설명된 바대로, 도 2~13에 나와 있는 본 발명의 상기 실시양태에서는 각 좌위 또는 대립유전자를 조사하는 데 사용되는 2개의 별도의 고정 서열 올리고뉴클레오타이드가 도시되어 있다. 하지만, 일부 양태에서, 전원형 (precircle) 프로브를 포함하여 좌위에 상보적인 2개 이상의 별개의 인접하지 않은 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 단일 프로브를 사용할 수 있다. 이러한 전원형 (precircle) 프로브는 예를 들면 미국 특허 번호 5,854,033 및 6,316,229에서 Lizardi가 설명하였으며, 어레이에 혼성화되기 전에 예를 들어 프로브 내 제한 엔도뉴클라아제에 대한 부위를 포함하여 선형화될 수 있다.

#### [0157] 일반 증폭

[0158] 본 발명의 특정 양태로, 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 및 결찰 후, 직접 또는 연장 후 또는 가교 올리고뉴클레오타이드 도입 후 결찰 생성물을 증폭하는 데 일반 증폭을 사용한다. 다중(multiplex) 분석 시스템에서, 증폭은 바람직하게는 각 세트의 제1 및 제2 고정 서열 올리고뉴클레오타이드 상의 일반 프라이머 영역에 혼성화되는 일반 프라이머를 사용한 일반 증폭을 통해 수행한다. 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 일반 프라이머 영역은 결찰 생성물의 일부가 되며, 그 다음 결찰 생성물은 단일의 일반 증폭 반응에서 증폭될 수 있다.

다. 이러한 일반 프라이머 서열은 바람직하게는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드를 통해 도입하며, 이 서열은 또한 결찰을 통해 결찰 생성물의 근위 말단에 추가할 수 있다. 고정 서열 올리고뉴클레오타이드에 일반 프라이머 영역을 도입하면 어레이 혼성화 전에 결찰 생성물의 전부 또는 일부의 조절된 일반 증폭을 차후 연이어 수행할 수 있다. 이 증폭 과정에서 생성된 앰플리콘은 검출 목적으로 어레이에 도입하기 전에 직접 사용하거나 추가적으로 처리할 수 있다. 특정 실시양태로, 앰플리콘을 분할하고, 포착 영역을 포함하는 부분을 혼성화와 검출을 위해 어레이에 도입한다. 중합효소 연쇄 반응(PCR)에서 관찰되는 바와 같은, DNA 증폭 동안 편이(bias)와 변이성이 도입될 수 있다. 증폭 반응이 다중 반응인 경우, 좌위가 상이한 속도나 효율성으로 증폭될 가능성이 있다. 프라이머와 템플릿 DNA의 서열 전후관계, 완충액 조건 및 기타 조건에 따라 주어진 좌위의 프라이머 세트가 다르게 행동할 수 있다. 특정 양태로, 해당 방법에서 사용되는 일반 프라이머 영역은 많은 수의 핵산을 동시에 분석하는 일반 프라이밍 기법을 활용하는 통상적인 다중 분석 방법과 호환 가능하도록 설계되었다. 이러한 “일반” 프라이밍 방법을 사용하면 유전자 샘플 내에 존재하는 핵산 영역의 양의 효율적인 고용량 분석이 가능하며, 그러한 샘플 내 핵산 영역의 존재를 포괄적으로 정량화할 수 있다.

- [0159] 결찰 반응 전체 또는 결찰 반응의 분취물을 일반 증폭에 사용할 수 있다. 분취물을 사용하면 실험 조건에 기인한 편이(bias)가 우발적으로 도입되지 않도록 하기 위해 동일하거나 상이한 조건 (예: 중합효소, 완충액 등)을 사용하여 평행적인 증폭 반응을 실시할 수 있다. 또한, 서열 특이적 증폭 주기 수를 효과적으로 제한하기 위해 프라이머 농도를 변화시킬 수 있다. 다중 분석 방법의 예에는 Oliphant 등의 미국 특허 번호 7,582,420에서 설명된 방법이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0160] 본 문서에 상세히 설명된 대로, 본 발명의 다수 방법에서 다중 검출을 위해 커플링된 반응(coupled reaction)을 활용하며, 이 때 다단계 과정의 초기 단계의 올리고뉴클레오타이드에는 해당 과정의 후기 단계에서 사용될 수 있는 서열이 포함되어 있다. 샘플 내 핵산을 증폭 및/또는 검출하는 방법에 대하여 본 발명이 속하는 분야에서 알려져 있는 절차는 단독 또는 아래 설명된 방법 (이로 제한되는 것은 없음)과 함께 사용될 수 있다. 특정 양태로, 본 발명의 방법은 다음의 선택적 및 일반 증폭 기법을 병합한 것 중 하나를 활용한다. (1) LDR커플링PCR; (2) 1차 PCR 커플링 2차 PCR 커플링 LDR; 및 (3) 1차 PCR 커플링 2차 PCR. 이들 병합한 기법 각각은 절차의 후기 단계에서 프라이머 서열로 사용할 수 있는 절차의 초기 단계의 프로브 영역을 활용할 수 있다.
- [0161] Barany 등 (미국 특허 번호 6,852,487, 6,797,470, 6,576,453, 6,534,293, 6,506,594, 6,312,892, 6,268,148, 6,054,564, 6,027,889, 5,830,711, 5,494,810)은 다양한 핵산 샘플에서 뉴클레오타이드의 특정 서열 검출 목적으로 연결효소 연쇄 반응(LCR) 검정법의 사용을 기술하고 있다.
- [0162] Barany 등 (미국 특허 번호 7,807,431, 7,455,965, 7,429,453, 7,364,858, 7,358,048, 7,332,285, 7,320,865, 7,312,039, 7,244,831, 7,198,894, 7,166,434, 7,097,980, 7,083,917, 7,014,994, 6,949,370, 6,852,487, 6,797,470, 6,576,453, 6,534,293, 6,506,594, 6,312,892, 및 6,268,148)은 핵산 검출 목적으로 중합효소 연쇄 반응("PCR")과 커플링된 연결효소 검출 반응("LDR")의 사용을 기술하고 있다.
- [0163] Barany 등 (미국 특허 번호 7,556,924 및 6,858,412)은 핵산 검출 목적으로 커플링된 연결효소 검출 반응("LDR")과 중합효소 연쇄 반응("PCR")을 이용한 자물쇠 프로브 (또한 “전원형 프로브” 또는 “다역전 프로브”)의 사용을 기술하고 있다.
- [0164] Barany 등 (미국 특허 번호 7,807,431, 7,709,201 및 7,198, 814)은 핵산 서열 검출 목적으로 엔도뉴클라제 분할 및 결찰 반응 병합 사용을 기술하고 있다.
- [0165] Willis 등 (미국 특허 번호 7,700,323 및 6,858,412)은 다중 핵산 증폭, 검출 및 유전형질분석(genotyping)에서 전원형 프로브 사용을 기술하고 있다.
- [0166] Ronaghi 등 (미국 특허 번호 7,622,281)은 고유한 프라이머와 바코드를 포함하는 어댑터를 사용하여 핵산을 라벨링하고 증폭하는 증폭 기법을 기술하고 있다.
- [0167] 혼성화 기법과 어레이를 사용하여 관심 대상 핵산 영역을 확인한다. 검출 목적으로 폴리뉴클레오타이드 혼성화 분석을 수행하는 방법은 본 발명이 속하는 분야에서 잘 개발되어 있고 잘 알려져 있다. 혼성화 분석 절차 및 조건은 적용 사항에 따라 다르며 다음에 나와 있는 방법을 포함하여, 알려진 일반 결합 방법에 따라 선택한다: Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Berger and Kimmel Methods in Enzymology, Vol. 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987); Young and Davis, P.N.A.S., 80: 1194 (1983). 반복되고 조절된 혼성화 반응을 실시하는 방법과 기구는 미국 특허 번호 5,871,928, 5,874,219, 6,045,996 및 6,386,749, 6,391,623에 설명



되어 있으며 이들 각각은 본 문서에 참고 문헌으로 포함되어 있다.

- [0168] 일부 실시양태에서, 어레이는 예를 들어 미국 출원 번호 20140057269 및 미국 출원 번호 20140042366 및 미국 출원 번호 20140024550에 교시된 바와 같이 용액 내 여러 기질을 포함한다.
- [0169] 본 발명은 또한 바람직한 특정 양태에서 리간드 간의 혼성화의 신호 검출을 고찰한다. 미국 특허 번호 5,143,854, 5,578,832; 5,631,734; 5,834,758; 5,936,324; 5,981,956; 6,025,601; 6,141,096; 6,185,030; 6,201,639; 6,218,803; 그리고 6,225,625, 미국 특허 출원 60/364,731 및 PCT 출원 PCT/US99/06097(W099/47964로 공개됨)을 참고한다.
- [0170] 신호 검출 및 강도 데이터 처리에 대한 방법과 기구는 예를 들어 미국 특허 번호 5,143,854, 5,547,839, 5,578,832, 5,631,734, 5,800,992, 5,834,758; 5,856,092, 5,902,723, 5,936,324, 5,981,956, 6,025,601, 6,090,555, 6,141,096, 6,185,030, 6,201,639; 6,218,803; 및 6,225,625, 미국 특허 출원 60/364,731 및 PCT 출원 PCT/US99/06097(W099/47964로 공개됨)에 공개되어 있다.
- [0171] 특정 양태로, 단일 샘플 또는 그의 애플리콘에서 생기는 결찰 생성물의 포착 영역에는 결찰 생성물이 특정 샘플에서 얻어진 것을 식별하는 지표 서열이 포함되어 있다. 상기 어레이의 특징은 좌위가 기원된 특정 샘플의 좌위를 확인할 수 있도록 상이한 샘플의 지표 서열에 상보적인 서열을 포함하는 포착 프로브를 포함한다.
- [0172] **모체 샘플 내 태아 DNA 비율 추정**
- [0173] 태아 비율은 염색체 함량(chromosomal dosage)의 예상되는 통계적 존재에 관한 중요한 정보를 제공하기 때문에, 본 발명의 위험 계산의 일부로서 모체 샘플 내 태아 DNA 비율을 사용할 수 있다. 예상되는 통계적 존재로부터의 변이는 태아 염색체 이수성(aneuploidy), 특히 특정 염색체의 태아 삼염색체(trisomy) 또는 단염색체(monosomy)를 나타내는 것일 수 있다.
- [0174] 모체 샘플 내 태아 DNA 비율을 추정하기 위해 본 발명이 속하는 분야에서 알려져 있는 임의의 방법을 사용할 수 있으며, 이에 태아가 남성인지를 보기 위해 Y 서열을 정량화하거나 후성적 표지자(epigenetic marker)를 살펴보는 방법이 포함된다 (예를 들면, Chim, et al., PNAS USA, 102:14753-58 (2005) 참고). 태아 비율을 위험 계산의 한 요소로 사용하는 것은 모체 샘플 내 태아 DNA 수준이 낮은 경우 특히 도움이 된다. 또한, 태아 DNA 비율의 특정 하한에서는 시스템이 신뢰성 있는 분석을 수행할 수 없을 수 있으므로, 샘플에 대해 추가 분석을 실시할 수 있는지 결정하기 위해 태아 DNA 비율 수치를 사용할 수 있다. 다른 양태로, 모체 샘플 내 태아 DNA 비율 측정은 태아 염색체 이수성 검출의 확실성이나 검출력 수준에 추가적으로 영향을 미칠 수 있다.
- [0175] 모체 샘플 내 태아 함량의 총 비율 측정에 대하여 다음 방법이 설명되어 있기는 하나, 비율은 또한 염색체 기준으로 염색체에 대해 측정할 수 있다. 예를 들어, 태아 염색체 21에 대한 빈도 정보는 태아 염색체 18과 비교하여 측정할 수 있다. 다른 실시예에서, 태아 비율을 검출하는 데 2개 이상의 염색체를 사용할 수 있으며, 예를 들어 염색체 1과 2의 좌위 빈도를 사용할 수 있다. 특정 양태로, 태아 비율 측정에 사용되는 염색체는 염색체 이수성의 가능성에 대해 조사하는 염색체이다. 다른 양태로, 태아 비율 측정에 사용되는 염색체는 특이적으로 염색체 이수성의 가능성에 대해 조사하는 염색체가 아니다.
- [0176] 태아의 DNA는 모체로부터 물려받은 좌위가 약 50%이며 부체로부터 물려받은 좌위가 약 50%이다. 비-모체 기원의 유전자 좌위가 태아에 기여하는지 (정보 제공 좌위) 판단하면 모체 샘플 내 태아 DNA 비율을 추정할 수 있으며, 이는 관심 대상 염색체에 대하여 염색체 함량에 있어 통계적으로 유의한 차이를 계산하는 데 사용하는 정보를 제공한다.
- [0177] 특정 양태로, 비-모체 다형성 측정은 모체 샘플 내 태아 DNA 비율을 추정하기 위한 표적 SNP 및/또는 돌연변이 분석을 통해 실시하며, 이는 본 발명의 어레이 분석에 특히 적용될 수 있는 과정이다. 모체 샘플 내 태아 무세포 DNA 비율은 모체 또는 부체 유전자형의 사전 지식 없이 다중(multiplex) SNP 검출을 이용하여 정량화할 수 있다. 이 양태에서, 각 영역 내 알려진 SNP가 있는 2개 이상의 선택한 다형성 핵산 영역을 사용한다. 바람직한 양태로, 선택한 다형성 핵산 영역은 이수성(aneuploid)일 가능성이 낮은 상염색체 (예: 염색체 21, 18, 13 아님)에 위치해 있다. 모체 샘플 (예: 혈장)로부터 선택한 다형성 핵산 영역이 증폭된다. 바람직한 양태로, 증폭은 일반적이며, 바람직한 실시양태에서 선택한 다형성 핵산 영역이 한 용기 내에서 한 반응으로 증폭되며, 바람직한 실시양태에서, 선택한 다형성 핵산 영역이 한 용기 내에서 한 반응으로 염색체 이수성을 판단하기 위해 사용되는 고정 서열 올리고뉴클레오타이드의 결찰 생성물과 함께 증폭된다. 모체 샘플 내의 선택한 다형성 핵산 영역의 각 대립유전자를 측정하고 정량화한다. 바람직한 양태로, 이러한 측정과 정량화에 고처리 염기서열

분석(high throughput sequencing)을 사용한다.

[0178] 따라서 모체 및 비-모체 유전자형이 상이한 경우의 좌위가 확인되며; 예를 들면, 모체 유전자형은 동형접합성이고 비-모체 유전자형은 이형접합성이다. 이러한 정보 제공 좌위(informative loci)는 선택한 특정 핵산 영역에 대하여 한 대립유전자의 빈도가 높고(>80%) 다른 대립유전자의 빈도가 낮은(<20% 및 >0.15%) 것으로 관찰되면 확인된다. 좌위 사이의 대립유전자 존재비 측정에 있어 변이 양이 감소되기 때문에 여러 좌위를 사용하면 특히 유리하다. 이 요건에 부합하는 좌위 전부 또는 하위집합을 사용하여 통계 분석을 통해 태아 기여도를 측정한다. 하나의 양태로, 2개 이상의 좌위의 낮은 빈도를 합한 후 낮은 빈도와 높은 빈도 대립유전자의 합으로 나눈 후 2를 곱하여 태아 기여도를 측정한다.

[0179] 다수 대립유전자의 경우, 모체 및 비-모체 서열은 동형접합성이고 동일할 수 있으며, 따라서 이 정보는 모체 DNA와 비-모체 DNA를 구별하지 않으므로 모체 샘플 내 태아 DNA 비율을 측정하는 데 유용하지 않다. 본 방법은 태아 DNA 비율 계산에 있어 비-모체 DNA와 모체 DNA 간에 명확한 차이가 있는 대립 유전자 정보 (예: 모체 대립 유전자와 상이한 적어도 1개의 대립유전자를 포함하는 태아 대립유전자)를 활용한다. 따라서, 모체 및 비-모체 DNA에 대하여 동일한 대립유전자 영역에 관한 데이터는 분석 목적으로 선택하지 않거나, 유용한 데이터를 가리지 않도록 태아 DNA 비율 추정 전에 관련 데이터에서 제거한다. 모체 혈장 내 태아 DNA 정량화를 위한 추가적인 예시 절차가 예를들면, 문헌: Chu, et al., Prenat. Diagn., 30:1226-29 (2010)에 나와 있으며, 이는 본 문서에 참고 문헌으로 포함되어 있다.

#### [0180] 데이터 분석

[0181] 태아 무세포 DNA를 계산한 후, 이 데이터를 이수성 검출에 대한 방법과 병합하여 태아에게 이수성이 포함되어 있을 가능성을 판단한다. 하나의 양태로, 무작위 DNA 분절 분석을 활용하는 이수성 검출 방법을 사용하며, 그러한 예가 문헌: Quake, USSN 11/701,686 및 Shoemaker et al., USSN No. 12/230,628에 설명되어 있다. 바람직한 양태로, 선택한 핵산 영역 분석을 활용하는 이수성 검출 방법을 사용한다. 이 양태에서, 샘플에 대한 태아 무세포 DNA 비율을 계산한다. 본 문서에서 설명한 대로, 해당 샘플에 대한 염색체 비율, 정상 모집단에 대한 염색체 비율 그리고 정상 모집단에 대한 염색체 비율에 대한 변이를 측정한다. 달리, 계산된 염색체 비율은 염색체적으로 정상인 샘플에 대한 기대치와 이수성 샘플에 대한 기대치를 사용한다. 그 다음 샘플에 대하여 계산한 염색체 비율을 예상치와 비교한다.

[0182] 바람직한 하나의 양태로, 유사한 태아 DNA 비율을 가진 정상 샘플로부터 정상 모집단에 대한 염색체 비율과 그 변이를 측정한다. 이수성 염색체의 기여율을 추가하여 그 태아 무세포 DNA 비율을 가진 DNA 샘플에 대하여 예상되는 이수성 염색체 비율을 계산한다. 그 다음 해당 샘플에 대한 염색체 비율을 정상 모집단에 대한 염색체 비율 그리고 예상되는 이수성 염색체 비율과 비교하여, 염색체 비율 변이를 이용해 통계적으로 해당 샘플이 정상이거나 이수성일 가능성이 높은지 그리고 이 둘 중 하나일 통계적 확률을 측정한다.

[0183] 바람직한 양태로, 단일 반응에서 태아 이수성을 검출하기 위하여 선택한 모체 샘플 영역에는 태아 DNA 함량 추정을 위한 영역뿐만 아니라 2개 이상의 염색체의 비-다형성 영역이 둘 다 포함된다. 염색체 이상의 존재 또는 부재를 판단하는 데 도움이 되도록 태아 DNA 함량을 이용하는 경우, 단일 반응을 사용하면 분석 시스템의 여러 단계 동안 결과를 왜곡시킬 수 있는 오염이나 편이(bias)가 도입될 위험을 최소화하는 데 도움이 된다.

[0184] 다른 양태로, 태아 DNA 함량 추정뿐만 아니라 태아 염색체 이상 검출 둘 다를 위해 선택한 핵산 영역 또는 영역들을 활용할 수 있다. 태아 DNA 함량을 추정하는 데 선택한 핵산 영역에 대한 대립유전자를 사용할 수 있으며, 이들 동일한 선택한 핵산 영역을 사용하여 대립유전자 정보를 무시하는 태아 염색체 이상을 검출하는 데 사용할 수 있다. 태아 DNA 함량 및 염색체 이상 검출 둘다에 대하여 동일한 선택한 핵산 영역을 사용하면 실험 오류나 오염으로 인한 임의의 편이(bias)를 최소화하는 데 도움이 될 수 있다.

[0185] 하나의 실시양태로, 태아 성별과 관계 없이 모체 샘플 내 태아 근원 기여도는 상염색체 SNP를 사용하여 측정한다 (Sparks, et al., Am. J. Obstet & Gyn., 206:319.e1-9 (2012) 참고). 이 방법에서 부체 유전 정보에 관계 없이 비-모체 대립유전자가 확인되기 때문에, 활용하는 과정에는 부체 유전자형의 사전 지식이 필요하지 않다. 이항 분포를 사용하는 최대 가능성 추정치를 사용하여 각 모체 샘플의 여러 정보 제공 좌위에 걸쳐 추정된 태아 핵산 기여도를 계산할 수 있다. 사용된 태아 핵산 기여도 계산 절차는 미국 특허 출원 공개 번호 2013/0024127에 설명되어 있다. 태아 기여도 측정에 사용하는 다형성 영역은 염색체 1-12일 수 있으며, 바람직하게는 혈액 군 항원을 표적으로 하지 않는다. 시험 염색체가 삼염색체성(trisomic)인 경우 예상되는 반응 정도를 정의하기 위해 다형성 분석으로부터의 태아 기여도 추정치를 사용하며, 이는 통계적 검정 정보를 제공한다. 통계적

검정은 샘플이 이염색체성(disomic)일 때 예상되는 비율로부터의 편차 측정치; 및 샘플이 삼염색체성(trisomic)일 때 예상되는 비율로부터의 편차 측정치의 두 가지 요소로 구성될 수 있다. 각 요소는 Wald 통계 (예: Harrell, Regression modeling strategies, (2001, Springer-Verlag), 9.2.2절 및 10.5절)의 형태이며, 이는 관찰 비율과 예상 비율을 비교하여 관찰치의 변이로 나눈다.

[0186] 샘플  $j$ 가 이염색체성일 때 예상치로부터의 편차를 측정하는 데  $W_j$  통계를 사용할 수 있으며 이는 다음과 같이 정의된다.

$$W_j = \frac{p_j - p_0}{\sigma_{p_j}},$$

[0188] 이 때  $p_j$  및  $p_0$ 는  $Z$  통계를 사용하여 위에 설명된 대로 정의되며,  $\sigma_{p_j}$ 는 주어진 관심 대상 염색체에 대하여 관찰된 표현 비율의 표준 편차이다. 관심 대상 염색체에 대한 평균 수치와 표준 오차에 근거한  $p_j$  비율 분포를 생성하기 위하여 표준 편차는 모수적 부트스트랩(parametric bootstrap) 샘플링을 이용하여 추정할 수 있다. 이 차 통계는  $\tilde{W}_j$ 이며, 이 경우  $p_0$ 이 태아 분율 조절 기준 비율인  $\hat{p}_j$ 로 교체되며 이는 다음과 같이 정의된다.

$$\hat{p}_j = \frac{(1 + 0.5f_j)p_0}{((1 + 0.5f_j)p_0)(1 - p_0)},$$

[0190] 이 때  $f_j$ 는 샘플  $j$ 에 대한 태아 분율이며  $p_0$ 는 이전에서와 같이 기준 비율이다. 이러한 조절은 태아가 삼염색체성(trisomic)일 때 시험 염색체의 표현 증가를 고려한 것이다. 다수의 좌위에 걸친 상기 수치 분산은 시험 염색체에 대한 여러 비-다형성 분석 사용에 따른 자연적 결과로 측정되기 때문에, 모든 추정치는 초기 데이터 세트 이내에서 취하며 예상 비율 주변 분산에 대해 일반적으로 필요한 외부 기준 샘플이나 공정 흐름(process drift)에 대한 대조군에의 정규화 조정의 과거 정보를 필요로 하지 않는다.

[0191] 사용한 최종 통계는  $S_j = W_j + \tilde{W}_j$ 이다. 개념적으로, 이염색체성 예상치와 삼염색체성 예상치로부터의 편차를 동시에 평가하여 상기 단일 통계로 요약한다. 이들 두 표시자(indicator)를 병합하는 것의 특별한 이점은 이염색체성으로부터의 편차가 높을 수 있더라도 특정한 태아 기여 수준에서 삼염색체성에 대하여 예상되는 편차에 도달하지 않을 수 있다는 점이다. 이 경우  $\tilde{W}_j$  요소는 음수가 되어 이염색체성으로부터의 편차를 불리하게 한다.  $S_j = 0$ 은 이염색체성(disomic) 대 삼염색체성(trisomic) 가능성이 동일함을 나타낸다.

#### [0192] 발명 절차의 컴퓨터 실행

[0193] 예시적 실시양태에 따라, 컴퓨터에서 태아 비율을 계산하는 소프트웨어 요소를 실행하고 이 정보를 게놈 영역 및/또는 염색체 함량 수치에 적용한다. 하나의 실시양태로, 컴퓨터는 개인용 컴퓨터를 포함할 수 있으나 컴퓨터는 적어도 1개의 프로세서와 메모리가 포함된 임의의 유형의 기계를 포함할 수 있다.

[0194] 소프트웨어 요소의 출력은 게놈 영역 및/또는 염색체가 함량 이상을 가질 확률 수치가 나와 있는 보고서를 포함한다. 바람직한 양태로, 이 보고서는 영역 또는 염색체가 2개의 복제 (즉, 이염색체성)를 가질 확률 수치 및 염색체가 더 많은 복제 (즉, 삼염색체성) 또는 더 적은 복제 (즉, 단염색체성)를 가질 확률 수치에 대한 승산비(odds ratio)이다. 보고서는 출력하는 용지이거나 모니터에 표시 및/또는 이메일, FTP, 문자 메시지, 서버에 게시되는 등 전자적으로 통신되는 전자 형식일 수 있다.

[0195] 본 발명의 정규화 과정은 소프트웨어로 실행되는 것으로 나와 있으나, 하드웨어와 소프트웨어의 병합으로 실행될 수도 있다. 또한, 정규화를 위한 소프트웨어는 동일하거나 다른 컴퓨터에서 운영되는 여러 요소로 실행될 수 있다.

[0196] 서버와 컴퓨터 둘 다에는 프로세서, 입력 장치 (예: 키보드, 포인팅 장치, 음성 명령을 위한 마이크로폰, 버튼, 터치스크린 등) 및 출력 장치(예: 디스플레이 장치, 스피커 등)를 포함한 일반 컴퓨팅 기기의 하드웨어 요소가 포함될 수 있다. 서버와 컴퓨터에는 프로세서에 의해 실행될 때 공개되는 기능을 실행하는 컴퓨터 지침이 포함된 메모리와 저장 장치(예: 플래시 메모리, 하드 드라이브, 광학 디스크 드라이브, 자기 디스크 드라이브 등)와 같은 컴퓨터 관련 매체가 포함될 수 있다. 또한 서버와 컴퓨터에는 통신을 위한 유선 또는 무선 네트워크 통신 인터페이스가 포함될 수 있다.

[0197] **실시예**

[0198] 다음 실시예는 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 본 발명으로 만들고 사용하는 방법을 완전히 공개하고 설명하기 위하여 제시되며, 발명자가 자신의 발명으로 간주하는 범위를 제한하거나 아래 실험이 실행한 실험의 전부이거나 유일한 실험임을 나타내거나 암시하기 위한 목적이 아니다. 본 발명이 속하는 분야에서 숙련된 기술을 가진 자는 광범위하게 설명된 본 발명의 진의나 범위에서 벗어나지 않고 특정 양태에서 보여진 바대로 본 발명에 다수의 변화 및/또는 변경을 실시할 수 있음을 알게 될 것이다. 따라서 본 양태는 모든 면에서 실례가 되는 것으로서 제공하되 제한적이지 않은 것으로 간주해야 한다.

[0199] 사용한 숫자 (예: 양, 온도 등)에 관하여 정확성을 보장하도록 노력을 다하였으나, 일부 실험 오차나 이탈을 감안해야 한다. 달리 명시되지 않는 한, 비율은 중량 비율이며, 분자량은 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압이다.

[0200] **실시예 1: 시험 대상**

[0201] 다음 삼염색체(trisomy) 상태 분류에 따라 총 878개의 모체 정맥혈 샘플을 분석하였다: 691개는 이염색체성이었으며, 18개는 삼염색체성이었고 13, 37개는 삼염색체성이었으며 18, 그리고 132개는 삼염색체성이었다 21. 재태 기간 10-34주에서 단생아 임신인 한 최소 18세의 임신 여성으로부터 혈액 샘플을 수집하였다. 시험한 모든 샘플에 대하여 이전에 삼염색체 상태 분류를 측정하였으며; 486개 샘플은 처음에 Harmony Prenatal Test f (Ariosa Diagnostics, Inc. 산호세, 캘리포니아)를 사용하여 시험하였고, 396개 샘플은 양수 진단 핵형분석 또는 산후 신생아 검진 후 삼염색체성이 의심되는 경우 핵형분석을 받은 환자로부터 수집하였다.

[0202] **실시예 2: 샘플 준비**

[0203] 샘플 준비와 분석은 문헌: Sparks, et al., Am J. Obstet Gynecol., 207(5):374.e1-6 (2012)에서 설명된 대로 실시하였다. 각 환자의 혈장으로부터 무세포 DNA를 정제하였고 염색체 13, 18, 및 21의 좌위로부터 DANSR™ (Digital Analysis of Selected Regions, 선택한 부위의 디지털 분석) 분석 생성물 (예: 일렬 결찰 생성물)을 얻었다. 이 분석의 경우, 각 염색체 13, 18, 및 21의 864개 게놈 영역에 상응하는 고정 서열 올리고뉴클레오티드 및 가교 올리고뉴클레오티드의 세트를 사용하여 결찰 분석을 사용하였다. DNA 샘플을 고체 지지면에 부착하였고 혼성화되지 않은 올리고뉴클레오티드는 결찰 전에 제거하였다. 또한, 각 샘플 내 태아 cfDNA 비율을 평가하기 위하여 염색체 1-12의 576개 다형성 부위에 상응하는 고정 서열 올리고뉴클레오티드 세트와 가교 올리고뉴클레오티드를 사용한 결찰 분석을 개발하였다. 각 샘플에서 생성된 결찰 분석 생성물 일부를 일반 프라이머를 사용하여 증폭시켜 염기서열 분석을 수행하였으며, 결찰 분석 생성물의 나머지 부분은 사용자 정의 제조된 DNA 어레이에 혼성화시켰다. 혼성화 전, 앰플리콘을 분할하였다. 이들 부분에는 동일한 생성물이 포함되었다.

[0204] **실시예 3: 어레이를 사용한 결찰 생성물 정량화**

[0205] DANSR 분석의 생성물을 특이적으로 정량화하기 위하여 사용자 정의 DNA 어레이는 Affymetrix, Inc. (산타클라라, 캘리포니아)에서 제조하였다. DNA 어레이는 Affymetrix GeneTitan® 다중 채널(Multi-Channel, MC) 기기에서 영상화하였다. 각 환자 샘플은 단일 사용자 정의 DNA 어레이에서 분석하였다. DNA 어레이는 상호연결된 세트 384개에서 제조되고 처리되었다. Illumina HiSeq® 2500 (샌디에고, 캘리포니아)로 차세대 염기서열 데이터를 생성하였다. 클러스터는 TruSeq™ 클러스터 생성 시약 (샌디에고, 캘리포니아)을 사용하여 Illumina Cluster Station에서 생성하였다. 평균적으로 분석당 1104개의 염기서열 수가 수집되었다.

[0206] **실시예 4: 데이터 분석**

[0207] Fetal-Fraction Optimized Risk of Trisomy Evaluation (FORTE™)라는 제목의 이전에 발표된 알고리즘을 사용하여 위험 점수를 지정하였다(see, e.g., Sparks, et al., Am J. Obstet Gynecol., 207(5):374.e1-6(2012)). 염색체 13, 18, 및 21에 대한 비-다형성 결찰 분석을 사용하여 이들 염색체 각각에 대한 염색체 비율을 측정하였다. 다형성 결찰 분석을 사용하여 태아 비율을 확인하였다. 분석 변이성은 샘플 간에 걸친 분석의 서열 수 (염기서열 분석) 또는 강도 (DNA 어레이) 변동 계수(CV)로 정의하였으며, 분석 변이성이 낮을수록 바람직하다. 태아 비율 변이성은 측정된 태아 비율의 상대적 표준 오차로 정의한다.

[0208] **실시예 5: 결과**

[0209] 삼염색체성 위험에 대하여 분석한 878개 혈장 샘플에 대하여, 혼성화에 의한 결찰 분석 및 검출을 이용하였을 때 어레이 기반 위험 점수와 삼염색체성 상태 간 완전 일치에 관찰되었다. 이와 대조적으로, 서열 기반 위험 점수와 삼염색체성 상태 간의 일치도는 99.6%였다. 이전 NIPT 선별에서 낮은 위험 점수를 보였던 2개 샘플에



대하여 염기서열 분석에서 높은 위험 점수가 보고되었다. 이러한 데이터로 어레이 기반 분석에서 수집한 삼염색체성 위험 점수가 정확함이 입증된다.

[0210] 또한, 어레이 데이터는 분석 변이성을 약 2배 감소시킨다. 분석 변이성 감소로 측정된 정확성은 염기서열 기반 분석과 비교하여 어레이 기반 혼성화 분석의 경우 향상되었다. 어레이 서열 검출에 대한 분석 변이성 중간값은 차세대 염기서열 기반 검출에 비하여 거의 2배가 향상되었다 (0.051 대비 0.099,  $p < 0.0001$ ) (도 14 참조). 히스토그램의 막대는 분석 변이성(x축)의 특정 범위를 공유하는 결찰 분석 수(y축)를 나타낸다. 어레이 데이터는 진회색으로 표시되었고, 염기서열 데이터는 흰색으로 표시되어 있다. 데이터의 두 모집단이 겹치는 경우, 막대는 연회색으로 표시되었다. 어레이 기반 정량화된 결찰 생성물은 현저하게 낮은 분석 변이성을 보이며, 분석 변이성은 낮을수록 좋다.

[0211] 태아 비율 변이성을 낮추기 위하여 어레이를 활용할 수 있다. 혈장 내 태아 DNA 비율은 검사 정확성에 영향을 미친다. 본 발명의 방법은 거짓 양성 비율이 낮고 높은 감도 결과를 제공하기 위하여 FORTE 알고리즘을 사용하여 태아 비율을 측정, 보고 및 활용한다(Sparks, et al., Am J Obstet Gynecol., 206(4):319.e1-9 (2012)). FORTE로 산출한 태아 비율은 어레이 기반 및 염기서열 기반 분석 데이터 간 재현성이 매우 높다( $R^2 > 0.99$ ). 다중 염기서열 분석에 비교하여 어레이는 다수의 결찰 분석을 동시에 측정할 수 있기 때문에, 어레이 기반 분석을 이용한 태아 산출값이 보다 정밀하며 상대 표준 오차 중간값은 0.013이다 (염기서열 분석의 경우 0.021).

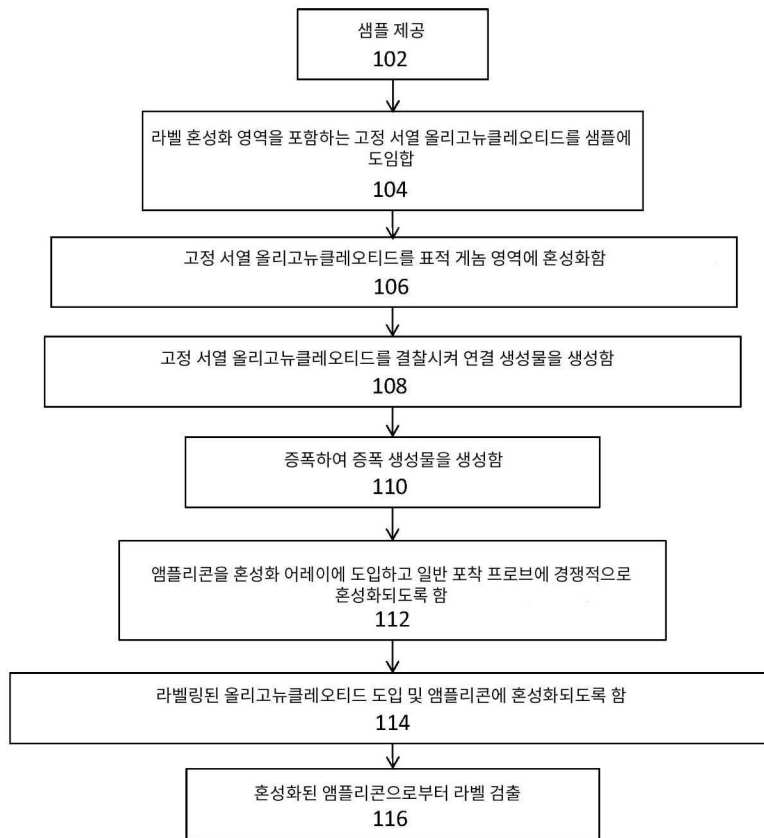
[0212] 본 실시예에서 제시된 데이터에서 차세대 염기서열 분석에 비교하여 어레이의 경우 데이터 변이성이 더 낮은 2가지 주요 원인이 나와 있다: 1) 다형성 분석을 이용하여 측정된 태아 비율 변이 (태아 비율 변이성) 및 2) 샘플에 걸친 비-다형성 분석 변이 (분석 변이성). 보다 다형성인 분석을 포함시킴으로써, 보다 낮은 태아 비율 변이성을 제공하여 향상된 정밀도를 보이도록 어레이 기반 결찰 생성물 산전 검사를 조작하였다. 분석 변이성을 낮춤으로써, 태아 비율이 낮은 샘플에서 관찰되는 보다 작은 변화 등과 같은 보다 작은 이수성 변화를 측정할 수 있다. 이러한 데이터는 어레이 플랫폼이 신뢰성 있는 이수성 평가를 할 수 있음을 입증한다. 또한, 어레이 영상화는 신속한 과정이며 샘플 정량화 소요 시간이 샘플당 1분 미만으로 감소된다. 이들 실시예에서 사용한 특정 검출 시스템 (GENETITAN™ Multi-Channel Instrument)은 기기-시간당 >90개 어레이를 영상화할 수 있다. 이와 대조적으로, 레인당 96개의 샘플을 한 그룹으로 샘플을 다중화하는 경우에도 HISEQ™ 2500 염기서열 시스템은 기기-시간당 15개의 샘플을 처리한다. 이러한 기기 시간과 복잡성 감소는 어레이 염기 서열 검출 사용 시 비용 절감으로 직접 이어진다.

[0213] 서열 기반 분석에서는 이용 가능한 서열 용량을 경제적으로 효율적으로 사용하기 위하여 샘플 다중화(multiplexing)를 활용한다. 그러나, 정규화를 하지 않으면 단일 샘플이 플로우 셀(flow-cell) 내 서열 판독치의 대부분을 소모하여 나머지 샘플에서 삼염색체성 위험을 측정하는 데 이용할 수 있는 판독치가 감소될 수 있다. 다중(multiplex) 샘플을 정확하게 반영하기 위하여, 입력 DNA의 양을 정규화하기 위한 고비용의 어려운 과정이 필요하다. 샘플 입력을 균일하게 하도록 노력을 하는 경우에도, 최근 연구에서 보고된 바와 같이, 12중(12-plex) 반응에 대하여 샘플당 데이터 중간값에서 4배 변이가 관찰되었다(Jensen, et al., PLoS ONE, 8(3):e57381 (Jul 2014)). 어레이 기반 NIPT 방법에는 샘플 다중화가 필요하지 않다. 대신, 각 샘플이 단일 어레이에 개별적으로 혼성화된다. 편리한 고처리 취급을 위하여, 예를 들어 384개의 어레이를 한 개의 다중 어레이로 물리적으로 연결함으로써 처리량이 향상된다. 각 샘플이 개별적으로 취급되기 때문에 시간이 절약되고 비용이 감소된다.

[0214] 본 발명의 바람직한 양태와 관련하여 상세하게 설명된 대로 본 발명은 다수의 여러 형태의 양태에서 이루어지지만, 제시된 공개 사항은 본 발명의 원칙의 예시로 간주되고 본 문서에서 예시되고 설명된 특정 양태에만 제한되는 것이 아니다. 본 발명이 속하는 분야에서 숙련된 기술을 가진 자는 본 발명의 진의에서 벗어나지 않고 수많은 변경을 할 수 있다. 본 발명의 범위는 첨부된 청구항과 이에 상응하는 사항으로 이루어진다. 요약 및 제목은 관련 당국 그리고 일반 대중이 본 발명의 일반 본질을 신속하게 판단할 수 있도록 하는 것을 목적으로 하며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 용어 “수단”이 사용되는 경우를 제외하고, 다음에 나오는 청구항에서, 35 U.S.C. § 112, ¶6에 따라 기술되는 어떠한 특징이나 요소도 기능식 청구항(Mean plus function) 제한으로 해석되어서는 안 된다.

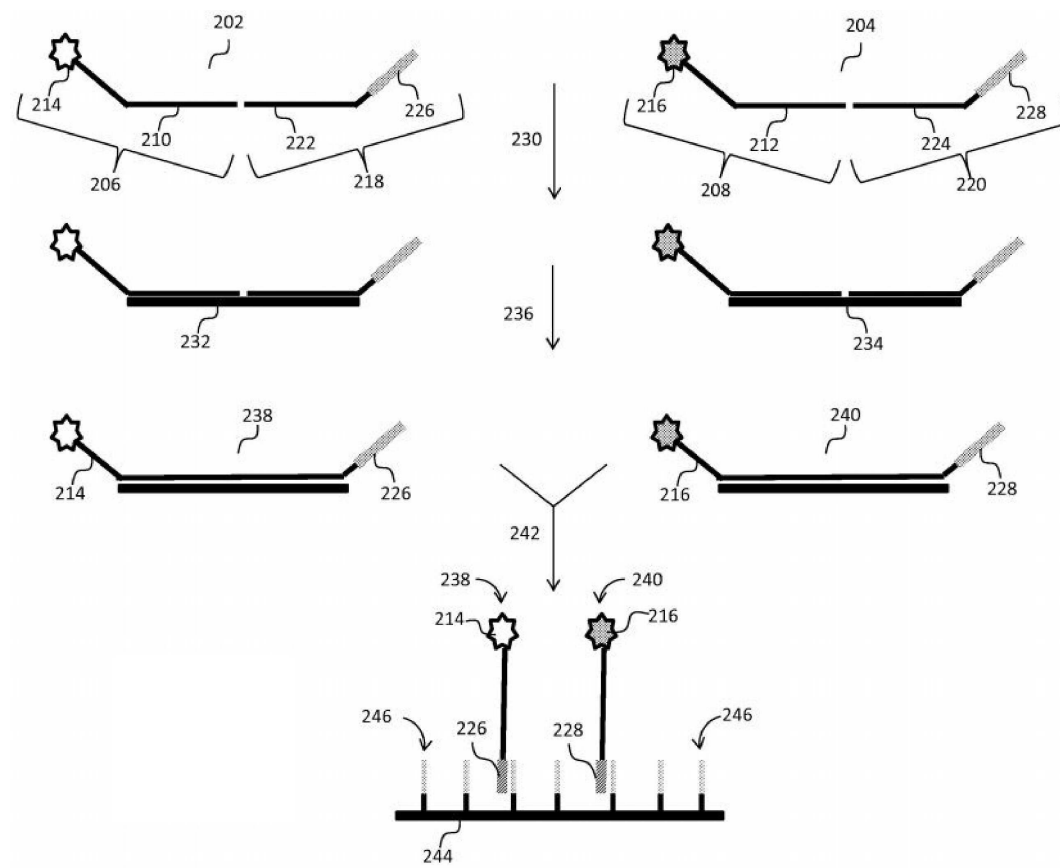
도면

도면1

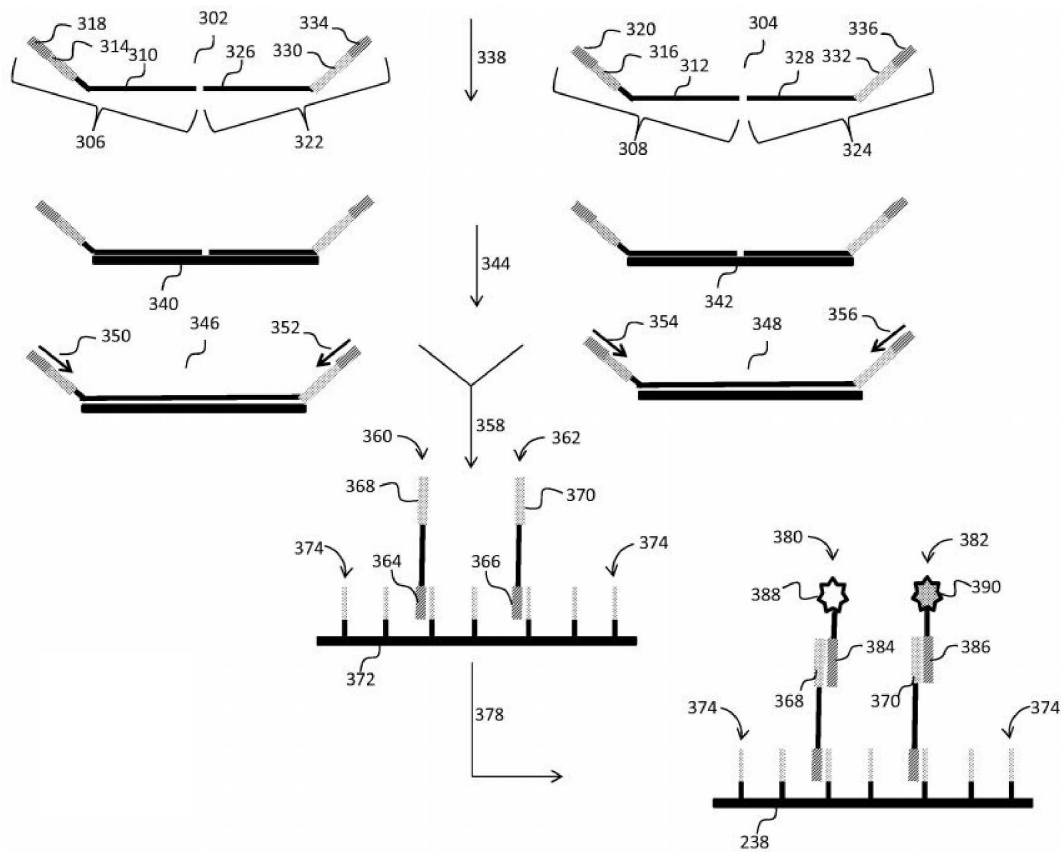


도 1

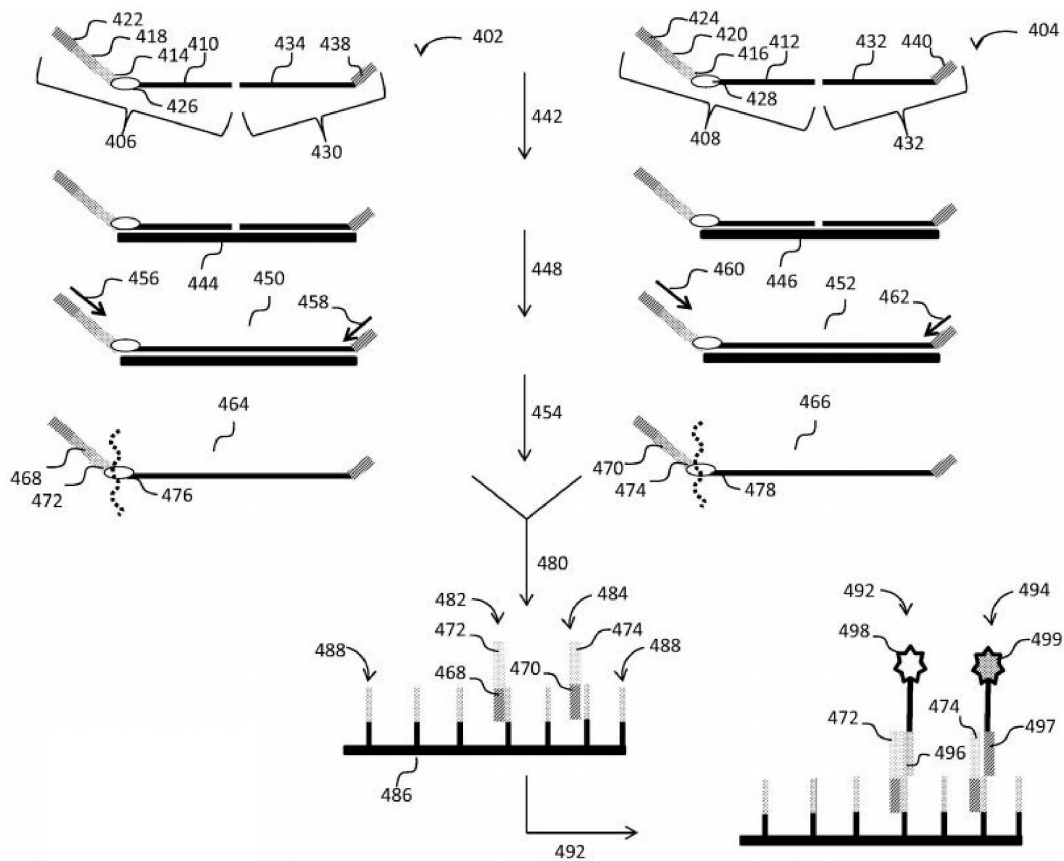
도면2



도면3

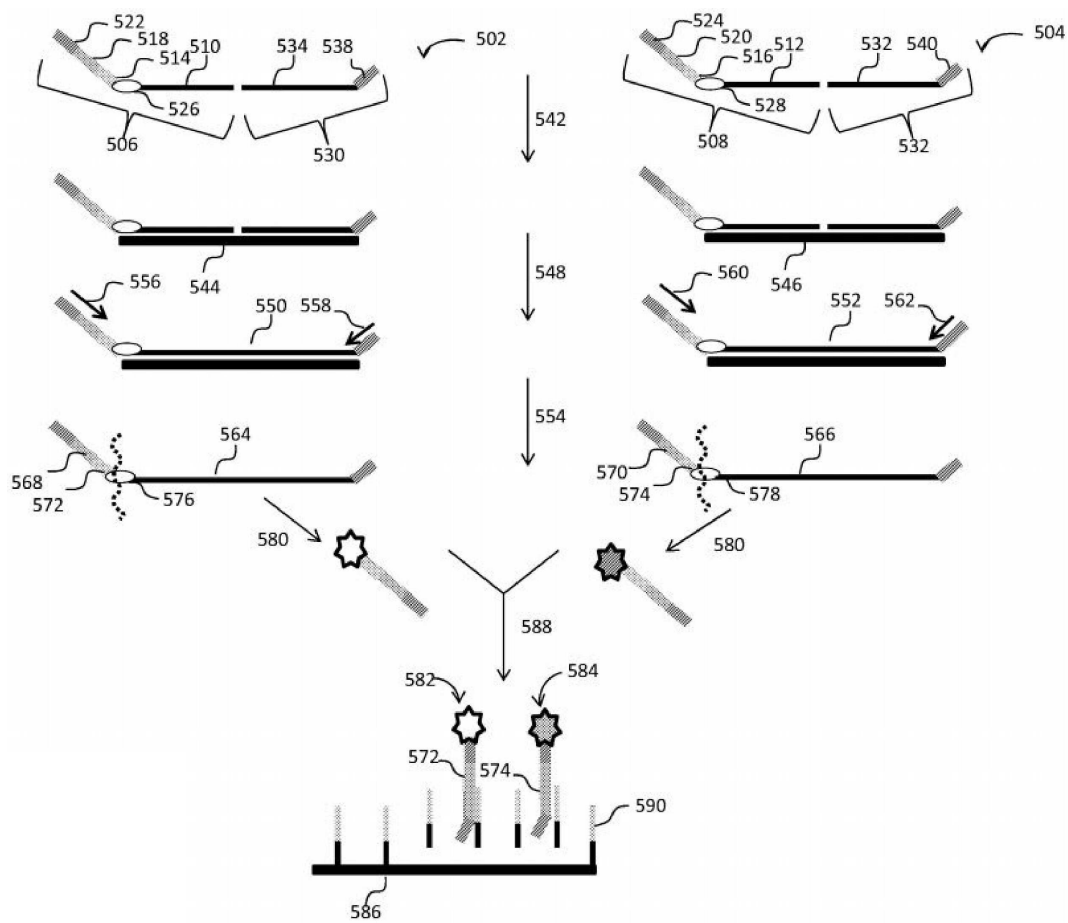


도면4

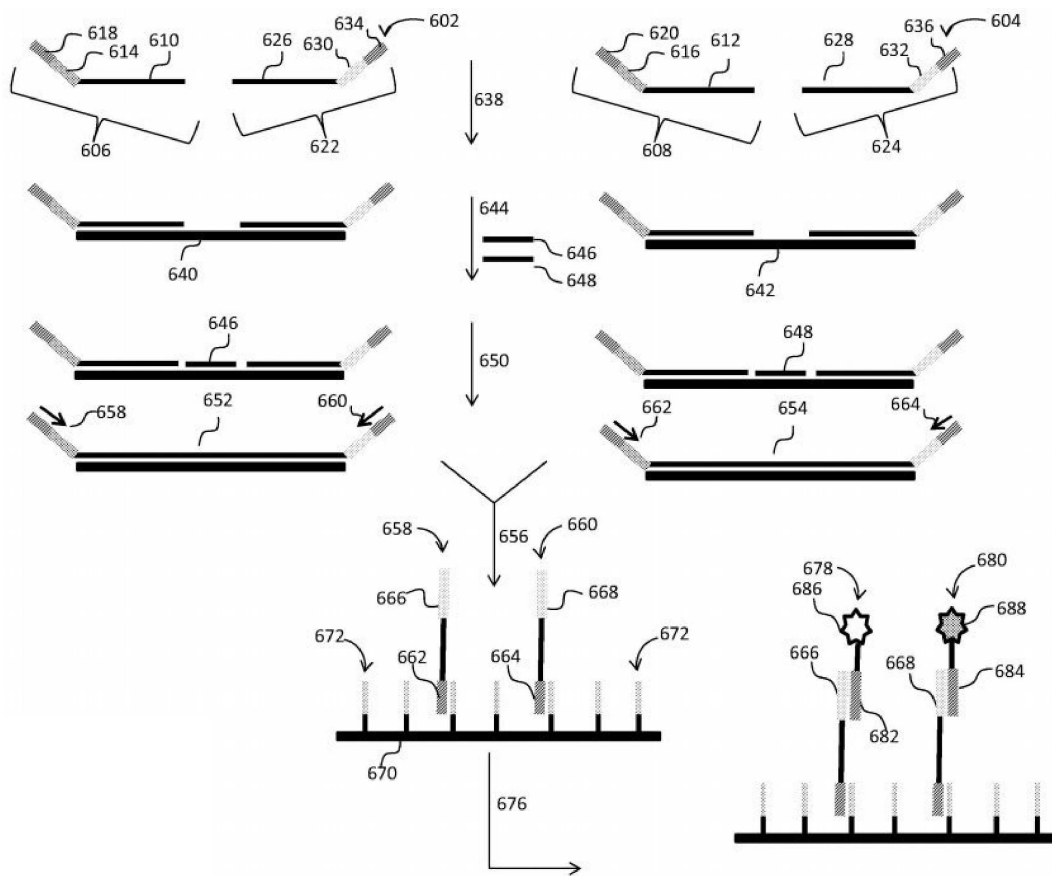




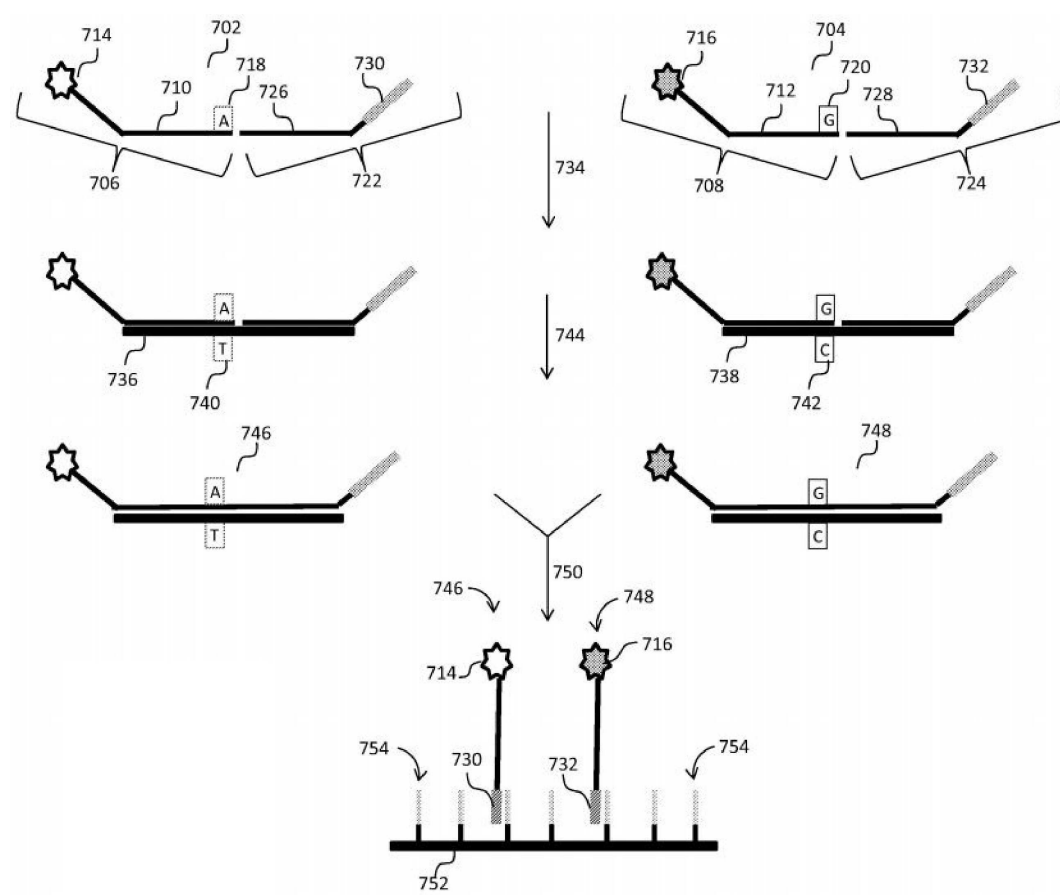
도면5



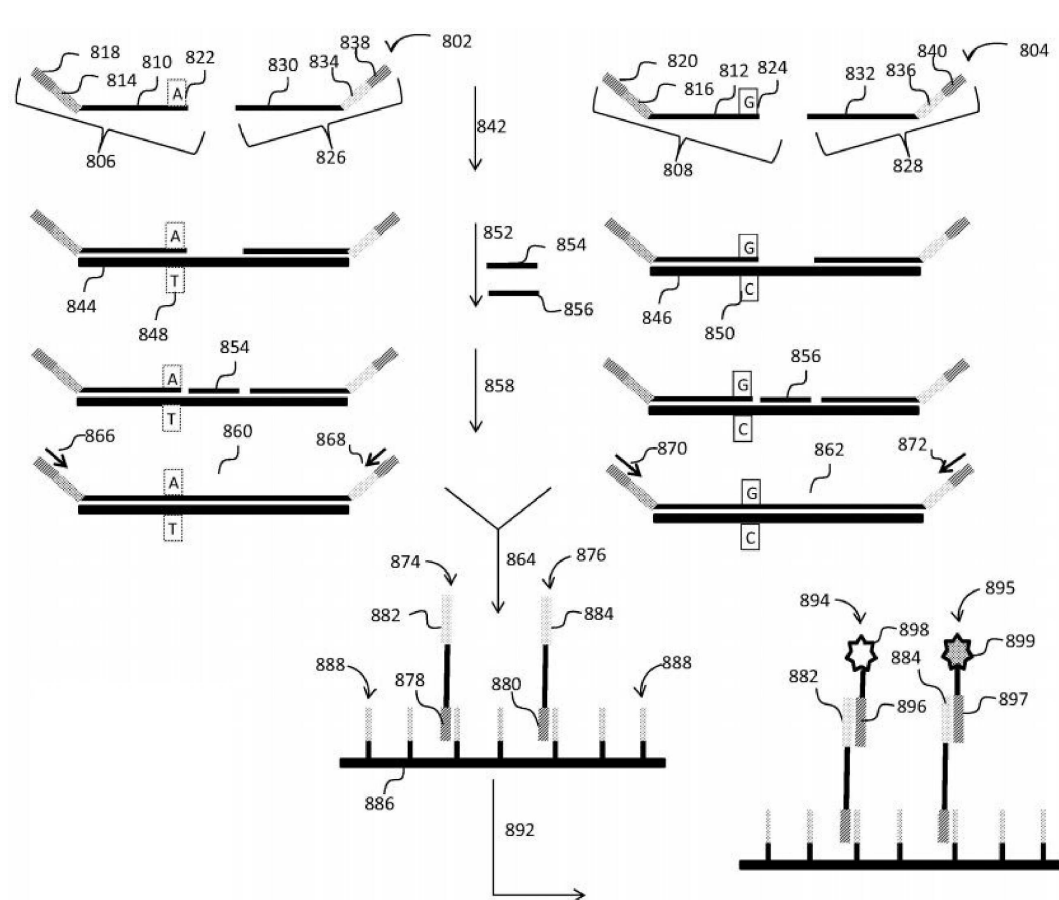
도면6



도면7

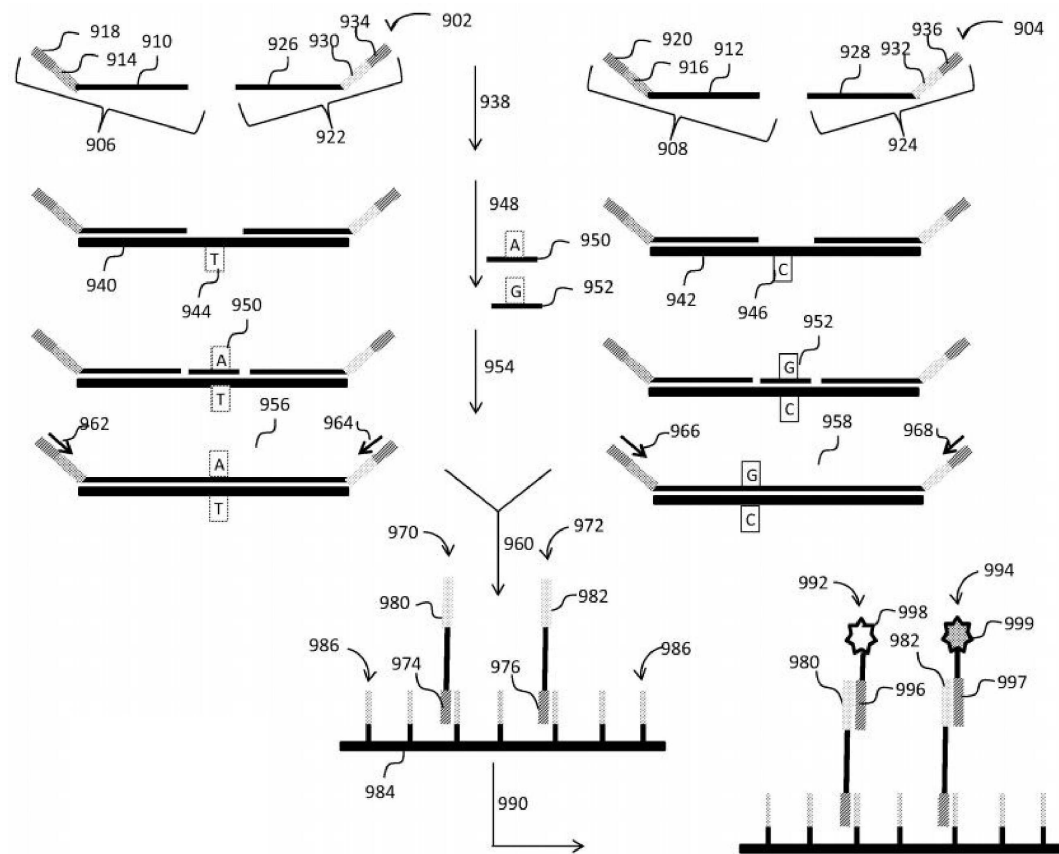


도면8

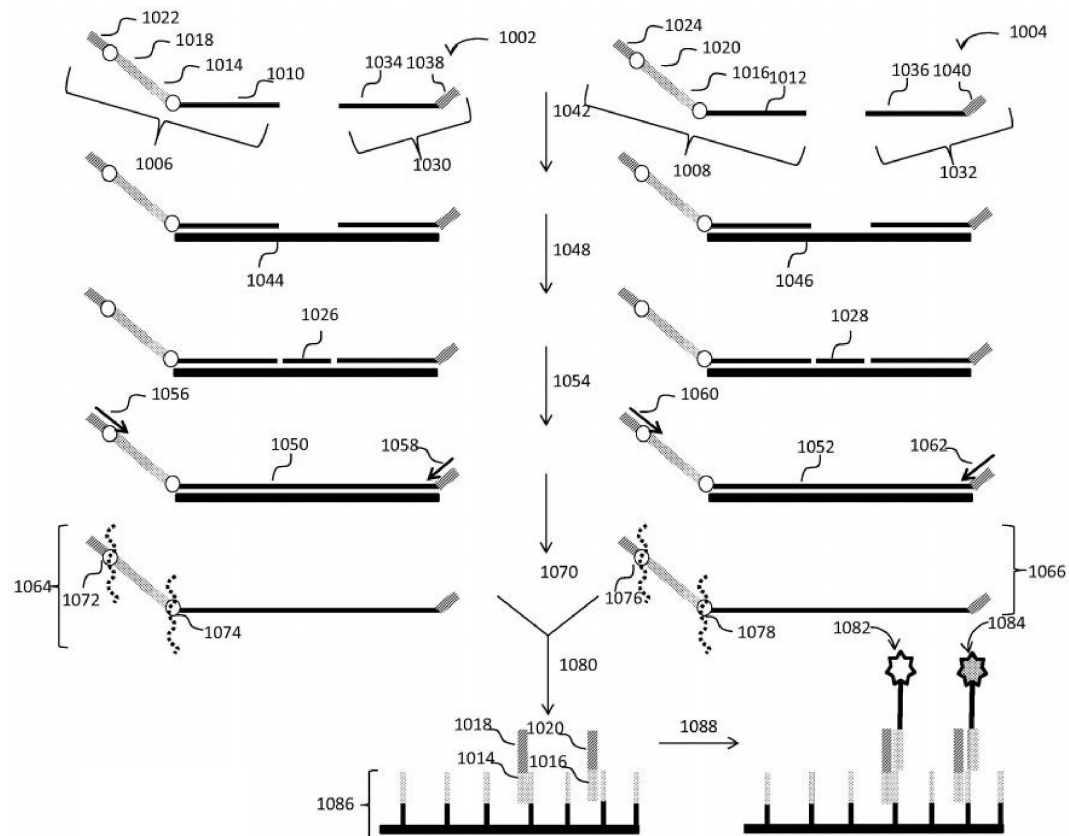




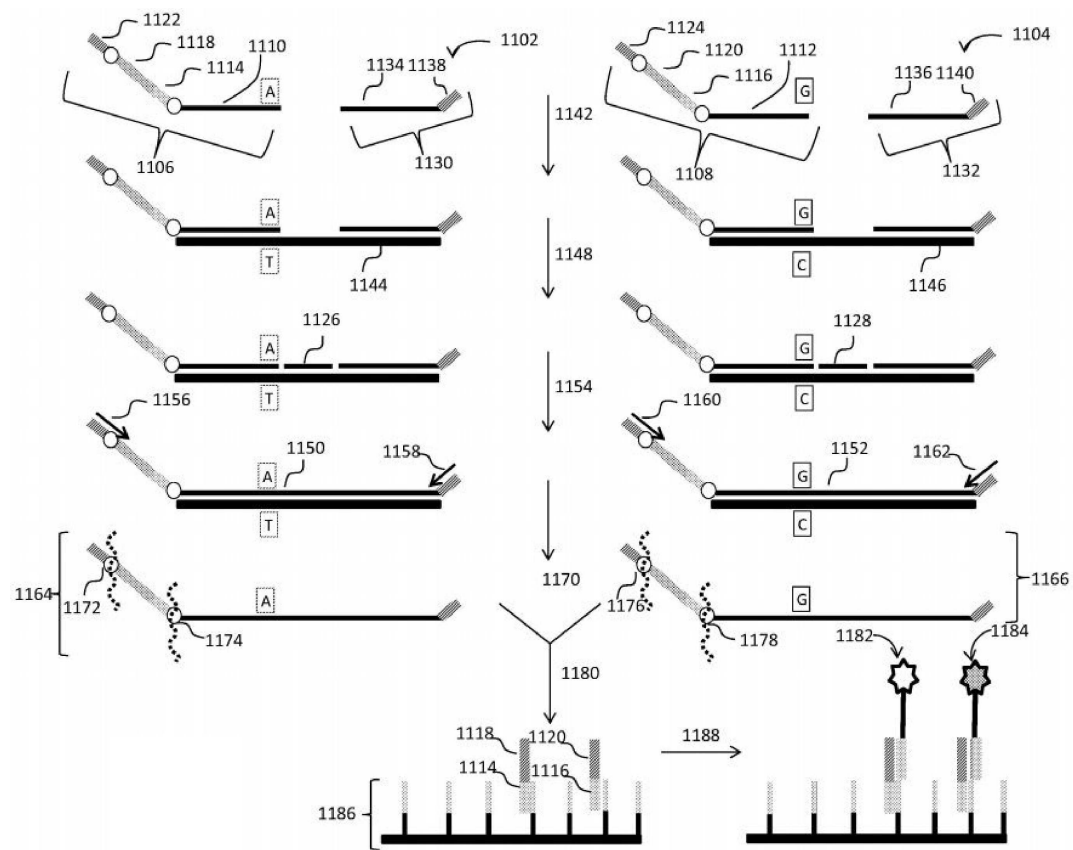
도면9



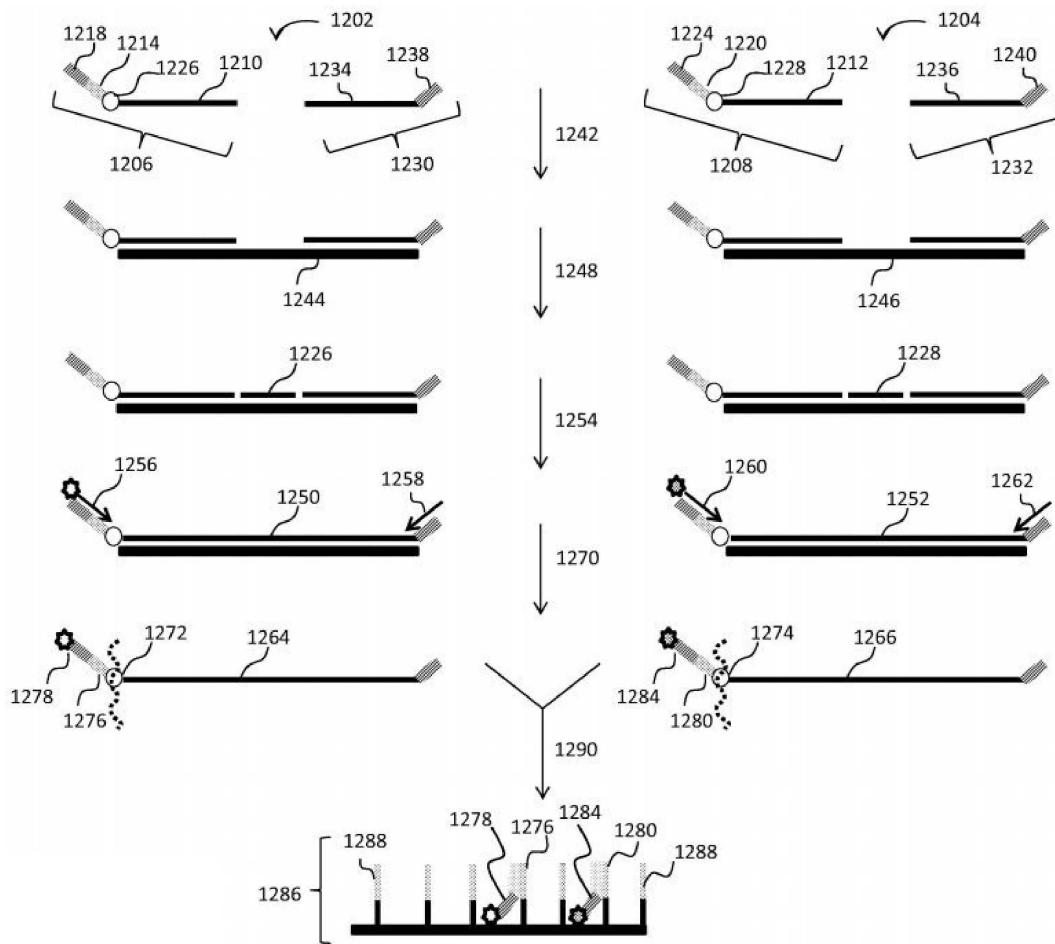
도면10



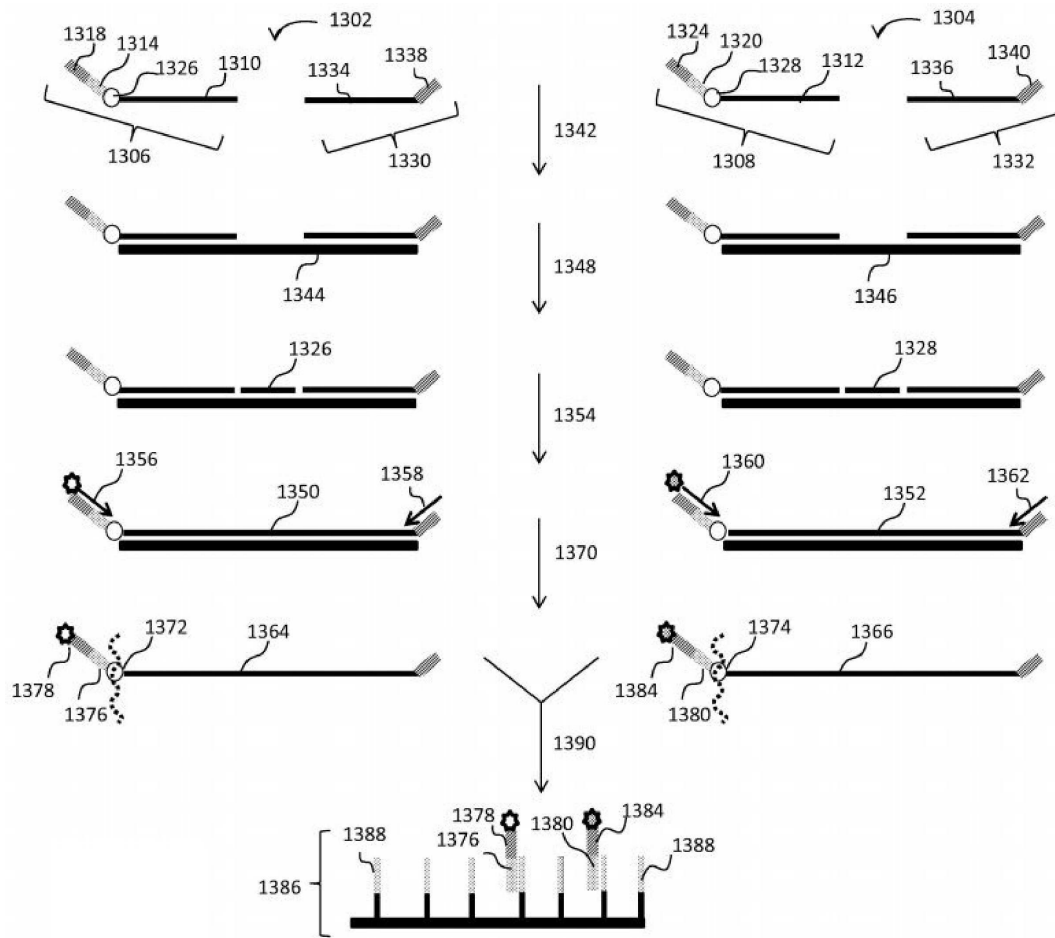
도면11



도면12



도면13





도면14

