(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0004645
(43) 공개일자 2022년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6806 (2018.01) *C12N 15/10* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6806 (2018.05)
C12N 15/1065 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7034791
(22) 출원일자(국제) 2020년03월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년10월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/024638
(87) 국제공개번호 WO 2020/198312
국제공개일자 2020년10월01일
(30) 우선권주장
62/824,757 2019년03월27일 미국(US)

(71) 출원인
주노 다이어그노스틱스, 인크.
미국 92122 캘리포니아주 샌 디에고 스위트 380 타운 센트레 드라이브 9171
(72) 발명자
반 덴 붐 더크
미국 92122 캘리포니아주 샌 디에고 타운 센터 드라이브 9171 스위트 380
에리치 마티아스
미국 92122 캘리포니아주 샌 디에고 타운 센터 드라이브 9171 스위트 380
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

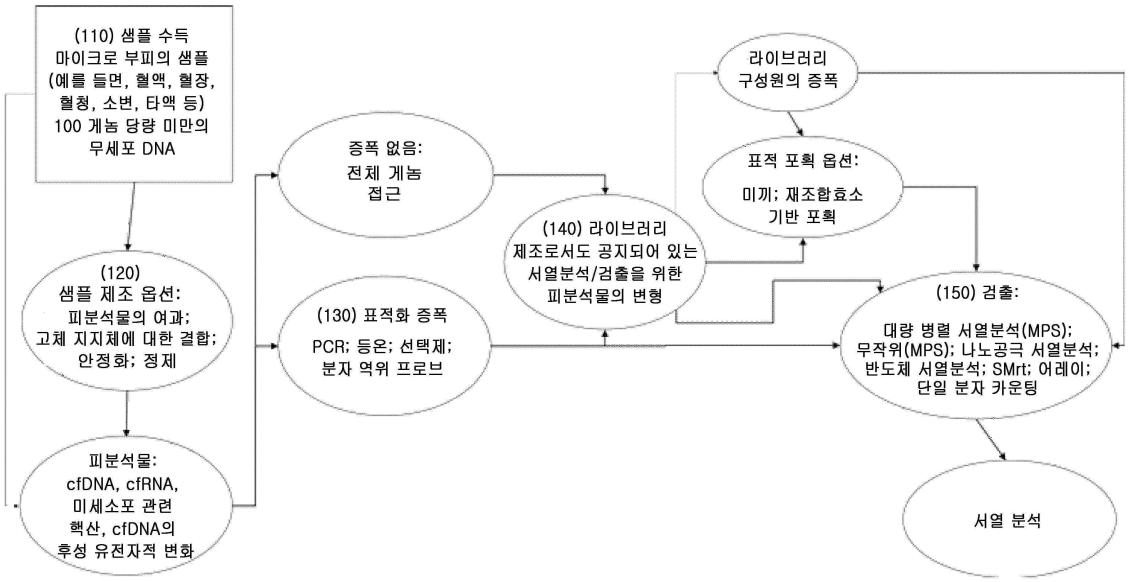
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 **최적화된 초저 부피 액체 생검 방법, 시스템 및 장치**

(57) 요 약

본원은 초저량의 생물학적 샘플 중의 무세포 태아 핵산으로부터 유전 정보를 수득하기 위한 장치, 시스템, 키트 및 방법을 제공한다. 초저량의 샘플을 수득하는 편리성으로 인해, 그 장치, 시스템, 키트 및 방법은 필요 현장에서 적어도 부분적으로 이용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12Q 2521/501 (2013.01)
C12Q 2527/101 (2019.08)
C12Q 2535/122 (2019.08)
C12Q 2537/143 (2013.01)
(72) 발명자
에스 폴
미국 92122 캘리포니아주 샌 디에고 타운 센터 드라이브 9171 스위트 380
차우바푼 짐
미국 92122 캘리포니아주 샌 디에고 타운 센터 드라이브 9171 스위트 380

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계로서, 생물학적 샘플이 무세포 데옥시리보핵산(cfDNA)을 포함하고, 생물학적 샘플이 대상체로부터 수득될 때 최대 120 마이크로리터의 부피를 갖는 것인 단계;

b) cfDNA의 적어도 일부를 태깅하여 태깅된 cfDNA를 생성하는 단계로서,

a. 하기 i, ii, iii 또는 iv 단계:

i. 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여, 5' 오버행(overhang) 또는 3' 리세스드(recessed) 말단이 제거되는, cfDNA의 블런트(blunt) 말단을 생성하는 단계,

ii. cfDNA의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계,

iii. cfDNA를 크라우딩(crowding) 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 cfDNA 사이의 반응을 향상시키는 단계, 또는

iv. 리가제(ligase)를 사용하여 cfDNA에서의 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계

를 포함하는 하나 이상의 단계로 라이게이션 적격(competent) cfDNA를 생성하며, 그리고

b. 리가제, 및 크라우딩 시약과 소분자 인핸서 중 하나 이상의 존재 하에서 라이게이션 적격 cfDNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시켜 라이게이션 적격 cfDNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션함으로써

수행하는 것인 단계;

c) 임의적으로, 태깅된 cfDNA를 증폭하는 단계; 및

d) 태깅된 cfDNA의 적어도 일부를 서열분석하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 생물학적 샘플은

a) 제1 경피 천자(puncture)를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고,

b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리며,

c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소 또는 제거하는 과정에 의해 대상체로부터 수득되는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 태깅된 cfDNA의 적어도 일부에서 적어도 하나의 표적 서열의 정상 표시, 과다표시 또는 과소표시를 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 대상체는 태아를 임신한 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, cfDNA의 성분이 태아로부터의 태아 cfDNA 성분인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 생물학적 샘플 중의 cfDNA는 약 10 게놈 당량(genome equivalent)인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 개체 및 태아 cfDNA 성분으로부터 유전자형 정보를 분석함으로써, 태아 cfDNA 성분과 유전자형 정보 사이의 유전자형 일치를 확인하여 개체가 부계적으로 태아에 기여했는지의 여부를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, (c)에서 증폭하는 단계를 포함하고, 라이게이션 적격 cfDNA를 생성하는 단계는

d) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여, 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단이 제거되는, cfDNA의 블런트 말단을 생성하는 단계;

e) cfDNA의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계;

f) cfDNA를 크라우딩 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 cfDNA 사이의 반응을 향상시키는 단계; 및

g) 리가제를 사용하여 cfDNA에서의 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계

를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, cfDNA는 대상체에서 종양, 이식된 조직 또는 장기, 또는 하나 이상의 병원체로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 하나 이상의 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 하나 이상의 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 하나 이상의 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, (c)에서 대량 다중체화 증폭으로 증폭하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 등온 증폭인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 대량 다중체화 중합효소 연쇄 반응(mmPCR)인 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 각 샘플이 상이한 대상체로부터 수득되는 2 이상의 생물학적 샘플을 풀링하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 사용함으로써 채취되는 것인 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, (b)에서 태깅하는 단계는, 라이브러리가

h) 30분 동안 섭씨 20도에서 인큐베이션하고, 이어서 30분 동안 섭씨 65도에서 인큐베이션하여 말단 복구, 5' 인산화 및 A-테일링(tailing)을 수행하고;

i) 15분 동안 섭씨 20도에서 인큐베이션하여 cfDNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션하고;

j) 15분 동안 섭씨 37도에서 인큐베이션하여 어댑터 올리고뉴클레오타이드로부터 라이게이션된 어댑터 루프를 절단하여 라이게이션 적격 cfDNA를 생성하고;

k) 하기 i, ii 및 iii:

i. 1분 동안 섭씨 98에서 라이게이션 적격 cfDNA를 변성시키고, 이어서 10초 동안 섭씨 98도에서 13 주기를 수행하고,

ii. 변성된 라이게이션 적격 cfDNA를 75초 동안 섭씨 65도에서 (i)로부터의 하나 이상의 상보적 프라이머에 어닐링하고,

iii. 라이게이션 적격 cfDNA를 5분 동안 섭씨 65도에서 연장시켜 라이게이션 적격 cfDNA의 증폭된 라이브러리를 생성함으로써

라이게이션 적격 cfDNA를 증폭하고;

l) SPRI 비드를 사용하여 라이게이션 적격 cfDNA의 증폭된 라이브러리를 정제함으로써

제조될 때, 적어도 0.5의 효율로 태깅된 cfDNA의 라이브러리를 생성하는 것인 방법.

청구항 24

a) 태아를 가진 임신 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계로서, 생물학적 샘플이 무세포 데옥시리보핵산(cfDNA)을 포함하고, 생물학적 샘플이 대상체로부터 수득될 때 약 120 마이크로리터 이하의 부피를 갖는 것인 단계;

b) 생물학적 샘플 중의 적어도 하나의 cfDNA를, 증폭 시약 및 관심 있는 서열에 상응하는 서열에 어닐링하는 폴리뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시켜, 증폭 생성물을 생성하는 단계; 및

c) 증폭 생성물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 검출 가능한 표지를 가진 올리고뉴클레오타이드 프로브를 적어도 하나의 cfDNA에 어닐링시키

는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, cfDNA의 후성 유전자 변형을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 후성 유전자 변형은 cfDNA의 유전자 좌위에서의 메틸화를 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제24항에 있어서, 증폭 생성물의 존재를 검출하는 단계는 태아의 성별을 표시하는 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, cfDNA의 성분이 태아로부터 유래한 것인 방법.

청구항 30

제24항에 있어서, 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

제24항에 있어서, 생물학적 샘플의 부피는 50 마이크로리터 이하인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 생물학적 샘플의 부피는 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터인 방법.

청구항 33

제24항에 있어서, 생물학적 샘플은

m) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고,

n) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리며,

o) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소 또는 제거하는 과정에 의해 채취되는 것인 방법.

청구항 34

대상체로부터 수득된 생물학적 샘플에서 표적 핵산의 상대적 양을 증가시키는 방법으로서,

p) 대상체의 한 부위에서 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획 및 제2 분획을 생성하는 단계;

q) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리는 단계; 및

r) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 생물학적 샘플의 오염 또는 핵산 손상을 감소 또는 제거하는 단계

를 포함하고, 제1 분획은 제2 분획 중의 표적 핵산의 분획에 비해 더 낮은 표적 핵산의 분획을 포함하는 것인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 경피 천자를 유도하기 전에 부위를 세정함으로써, 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제34항에 있어서, 핵산 손상은 생물학적 샘플 중의 비-아폽토시스성 DNA에 대한 손상을 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제34항에 있어서, 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액인 방법.

청구항 39

제34항에 있어서, 대량 다중체화 중합효소 연쇄 반응(mmPCR) 또는 핵산 서열분석으로부터 선택된 어세이를 이용하여 생물학적 샘플의 제2 분획에서 표적 핵산을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 40

a) 최대 120 마이크로리터의 부피를 포함하는 생물학적 샘플을 대상체로부터 수득하기 위한 샘플 채취기로서, 생물학적 샘플은 표적 무세포 DNA(cfDNA)를 포함하는 것인 샘플 채취기;

b) 생물학적 샘플로부터 세포를 제거하여 세포 고갈 샘플을 생성하기 위한 샘플 정제기; 및

c) 세포 고갈 샘플에서 표적 cfDNA를 검출하도록 구성된 핵산 검출기

를 포함하는 장치.

청구항 41

제40항에 있어서,

a) 라이게이션 적격 표적 cfDNA를 생성하기 위한 라이게이션 제제로서,

1) 표적 cfDNA의 블런트 말단을 생성하고, 표적 cfDNA의 블런트 말단의 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단을 제거하기에 적합한 하나 이상의 엑소뉴클레아제,

2) 블런트 말단 cfDNA 탈인산화제,

3) 크라우딩 시약,

4) DNA 손상 복구제, 또는

5) DNA 리가제

중 하나 이상을 포함하는 것인 라이게이션 제제; 및

b) 라이게이션 적격 표적 cfDNA에 라이게이션된 하나 이상의 어댑터 올리고뉴클레오타이드

를 포함하는 핵산 라이게이터(ligator)를 추가로 포함하는 장치.

청구항 42

제40항에 있어서, 백혈구 안정화제를 추가로 포함하는 장치.

청구항 43

제40항에 있어서, 핵산 검출기는 대량 다중체화 PCR 장치(mmPCR)인 장치.

청구항 44

제40항에 있어서, 라이게이션 제제는

s) 표적 cfDNA의 블런트 말단을 생성하고 표적 cfDNA의 블런트 말단의 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단을 제거하기에 적합한 하나 이상의 엑소뉴클레아제;

t) 블런트 말단 cfDNA 탈인산화제;

u) DNA 손상 복구제; 및

v) DNA 리가제

를 포함하는 것인 장치.

청구항 45

제40항에 있어서, 핵산 검출기는 핵산 서열분석기 또는 측면 유동 스트립(lateral flow strip)을 포함하는 것인 장치.

청구항 46

제45항에 있어서, 핵산 서열분석기는 신호 검출기를 포함하는 것인 장치.

청구항 47

제40항에 있어서, 샘플 정제기는 필터를 포함하고, 필터는 약 0.05 마이크론 내지 약 2 마이크론의 공극 크기를 갖는 것인 장치.

청구항 48

제47항에 있어서, 필터는 수직 필터인 장치.

청구항 49

제40항에 있어서, 샘플 정제기는 항체, 항원 결합 항체 단편, 리간드, 수용체, 펩타이드, 소분자 및 이들의 조합으로부터 선택된 결합 모이어티를 포함하는 것인 장치.

청구항 50

제40항에 있어서, 샘플 채취기는 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시켜 생물학적 샘플을 수득하도록 구성되는 것인 장치.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **기술 분야**

[0002] 본 발명은 최적화된 초저 부피 액체 생검 방법, 시스템 및 장치에 관한 것이다.

[0003] **교차참조**

[0004] 본 국제출원은 2019년 3월 27일에 출원된 미국 가출원 제62/824,757호의 이익을 주장한 것이며, 상기 가출원은 그 전체가 본원에 참고 인용되어 있다.

배 경 기 술

[0005] 유전자 검사는 대상체의 DNA 및/또는 그 DNA의 발현에 관한 정보를 수득하는 수단이다. 유전자 검사는 대상체에 관한 생물학적 정보를 수득하기 위해 계속 개발되고 있다. 이 생물학적 정보는 개체의 건강 상태 확인, 감염 또는 질환을 가진 개체의 진단, 개체에 적합한 치료의 결정, 범죄의 해결 및 친부 확인을 비롯한 많은 용도를 가진다. 현재, 유전자 검사는 이용하기 위해서는 기술적 훈련 및 전문지식을 요구하는 값비싼 거대한 장비를 갖춘 병원 및 실험실에서 훈련받은 사람에 의해 주로 수행된다. 환자로부터 생물학적 샘플을 수득하는 시간부터 유전자 검사의 결과를 환자에게 제공하기까지 전형적으로 수일 내지 수주가 소요된다.

[0006] 일례로서, 임신을 알게 된 많은 사람들은 가능한 빨리 아기의 성(여기서 본원 전체에 걸쳐 성별로서 지칭됨)을 알고 싶어 한다. 모체 혈액 중의 DNA로부터 성별 정보를 수득할 수 있게 하는 검사들이 존재한다. 모체로부터 수득된 혈액은 고도로 훈련받은 기술자에 의해 정교한 장비를 이용함으로써 분석될 수 있다. 혈액이 DNA 분석을 수행하는 실험실로부터 멀리 떨어진 장소에서 수득된 경우, 샘플은 시기적절한 방식으로 저장되고 운반되고 분석되어야 하고, 그렇지 않으면 샘플이 열화될 위험이 있다.

[0007] 무세포 핵산은 다양한 조직 유형들로부터 유래하고 개체의 순환계 내로 방출된다. 순환계에서 무세포 핵산의 풀

은 종종 기여 조직 유형의 유전적 구성을 대표한다. 건강한 개체의 경우, 이 풀은 많은 변이를 갖지 않는 매우 균질한 풀일 수 있다. 그러나, 조직이 현저히 상이한 게놈을 함유할 때, 더 불균질한 무세포 핵산 풀이 관측될 수 있다. 현저히 상이한 게놈을 가진 조직을 가진 대상체의 흔한 예는 (a) 종양 DNA가 돌연변이된 부위를 함유하는 경우, 암 환자; (b) 이식된 장기가 기증자 DNA를 무세포 DNA의 풀 내로 방출하는 경우, 이식 환자; 및 (c) 태반이 주로 태아 DNA를 대표하는 무세포 DNA를 기여하는 경우, 임산부를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 일부 경우, 게놈은 후성 유전자 변형으로 인해 현저히 상이할 수 있다. 상이한 조직, 장기 및 세포 유형으로부터의 DNA는 구별되는 후성 유전자 패턴을 가진 것으로 밝혀졌다. 따라서, 뇌, 간, 지방조직, 췌장, 내피 및 면역 세포를 포함하나 이들로 제한되지 않는 조직, 장기 및 세포로부터의 무세포 핵산을 검출할 수 있다. 또한, 개체의 조직 또는 세포 유형이 질환 또는 감염에 의해 영향을 받을 때, 그 개체에서 순환하는, 그 조직 또는 세포 유형으로부터의 무세포 DNA가 더 많을 수 있다.

발명의 내용

[0008] **발명의 개요**

[0009] 본원은 동물(인간 또는 비-인간)로부터의 샘플을 포함하는 생물학적 샘플의 성분(예를 들면, 핵산, 단백질)을 분석하는 장치, 시스템, 키트 및 방법을 개시한다. 일반적으로, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 무세포 DNA 단편화를 이용함으로써 초저 부피의 샘플로부터 유전 정보를 제공할 수 있다. 간결성을 위해, 이것은 "초저 부피 액체 생검"으로서 지칭될 수 있다. 본 개시 전에, 초저 부피가 검출되거나 정보를 제공하기에 충분한 양의 무세포 핵산을 관심 있는 특정 조직(예를 들면, 뇌, 간, 태반, 종양)으로부터 제공할 것이라고 믿어지지 않았기 때문에, 초저 부피의 샘플로부터 신뢰할만한 유용한 유전 정보를 수득할 수 있을 것이라고 예상되지 않았다. 더욱이, 다른 무세포 핵산, 특히 혈액 세포로부터의 무세포 핵산으로부터의 배경 신호가 풍부하고 대상체간 그 배경의 편차가 있었기 때문에, 검사 대상체와 대조군 대상체 사이의 재현 가능성 및 신뢰할만한 비교는 거의 불가능한 듯이 보였다. 본 개시 전에, 초저 부피의 샘플로부터 추출된 DNA의 상대적 양 및 크기 분포 프로파일이 이전에 기재된 것과 유의미하게 상이할 수 있을 것이라는 점도 예상되지 않았다.

[0010] 세포 DNA와 대조적으로, 무세포 DNA는 단편화된다. 초저 부피의 샘플로부터 무세포 DNA를 분석하기 위해, 본원에 개시된 방법, 장치, 시스템 및 키트는 반복 영역(예를 들면, 공통 서열을 가진 영역) 및/또는 다수의 영역들로부터의 무세포 DNA 단편을 통계적으로 독립적인 마커로서 사용한다. 본원에 개시된 방법, 장치, 시스템 및 키트는 반복 영역(예를 들면, 동일하거나 유사한 서열의 다수의 카피를 함유하는 게놈의 영역) 또는 집합적으로 많은 영역들로부터의 무세포 DNA 단편이 샘플에서 단편화되지 않은 DNA 서열보다 더 높은 유효 농도로 존재하기 때문에 가능하다. 따라서, 유용한 유전 정보를 수득하기에 충분한 다수의 피분석물들을 함유하는 샘플 부피는 이전에 예상된 것보다 더 낮다. 유리하게는, 반복 영역으로부터의 단편은 단일 쌍의 프라이머에 의해 증폭될 수 있거나 단일 프로브에 의해 검출될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 유사한 서열을 공유하지 않는 다수의 검출 영역들은 예를 들면, 이들에 태그를 부착시키고 이들을 범용 프라이머로 증폭하거나 (예를 들면, 다중체화된 포맷으로) 다수의 프라이머 쌍들로 증폭함으로써 작은 부피에서 검출될 수 있다.

[0011] 상기 장치, 시스템, 키트 및 방법은 초저 부피의 생물학적 샘플로부터 유용한 유전 정보를 수득하는 그들의 능력으로 인해 (1) 최소한으로 침습적이고; (2) 거의 또는 전혀 기술적 훈련 없이(예를 들면, 복잡한 장비를 요구하지 않음) 집에서 적용될 수 있고; (3) 상태(예를 들면, 임신, 감염) 초기에 정보를 제공한다는 장점을 제공한다. 이 장점들은 실험실 또는 기술자에 대한 요구를 감소시키거나 없앰으로써, 환자 접근성, 순응도 및 모니터링을 개선한다. 이것은 궁극적으로 의료 시스템에 대한 더 낮은 비용으로 개선된 건강 결과를 이끌어낸다.

[0012] 무세포 순환 핵산의 분석은 다수의 기술적 과제들을 안고 있다. 예를 들면, 혈중 순환 핵산의 증폭은 전혈의 성분들 중 일부(예를 들면, 헤모글로빈)에 의해 억제될 수 있다. 본 방법, 시스템 및 장치가 이 기술적 과제들을 해결하는 방법들 중 하나는 전혈 또는 주변 조직의 성분들로부터 샘플 손상 또는 샘플 오염을 피하는 방식으로 모세혈관 혈액으로부터 (무세포 핵산을 함유하는) 혈장을 수득하는 것이다(예를 들면, 피부의 경피 천자는 피부의 DNA가 수득된 전혈의 샘플을 오염시키킨다).

[0013] 작은 샘플 부피에서 무세포 순환 핵산을 분석하는 것은 특히 어렵다. 이 목적을 달성하기 위한 과거 시도 및 본원에 기재된 이유에도 불구하고, 해당 기술 분야는 유용하고 정확한 유전 정보가 필요 현장에서 채취될 수 있는 작은 샘플 부피(예를 들면, 손가락 찌르기(finger prick)로부터의 모세혈관 혈액)로 무세포 DNA로부터 수득될 수 있다는 것에 계속 회의적이었다. 본원에 개시된 방법, 시스템 및 장치는 이 기술적 과제들을 극복할 뿐만 아니라, 필요 현장에서 사용될 수 있는데, 이는 최신기술을 고려할 때 사실상 상상할 수 없었던 것이다.

[0014] 예를 들면, 5 밀리리터 이상의 혈액에서 순환 무세포 종양 DNA를 분석하고자 하는 과거의 시도는 샘플이 상대적으로 높은 종양 존재도(예를 들면, 15% 내지 20%), 및 변경이 더 용이하게 검출되게 하는 15% 이상의 변경된 게놈 분획(FGA)을 가졌을 때에만 정보를 제공하였다. 그러나, 대다수의 환자들에서, 종양 존재도는 훨씬 더 낮다. 따라서, 과거 시도는 환자 집단의 상당한 부분을 배제한다. 본원에 개시된 방법, 시스템, 장치 및 키트는 더 낮은 종양 존재도(예를 들면, 15% 미만)를 가진 샘플에서 종양으로부터의 무세포 핵산을 검출할 수 있게 한다.

[0015] 추가 시도에서, 더 작은 양의 생물학적 샘플의 분석은 백혈구 오염 또는 핵산 손상으로 인해 성공적이지 못하였다. 일부 실시양태에서, 본원은 모체로부터 수득된 샘플 중의 무세포 핵산의 태아 성분을 측정하는 상황에서 DNA 손상 또는 오염의 영향의 예를 개시한다. 본원에 나타낸 바와 같이(실시예 19 참조), 경피 천자 부위(예를 들면, 손가락 찌르기)의 DNA 손상 및/또는 오염은 일부 경우 무세포 핵산 단편으로서 잘못 추정되는 단편 길이의 핵산이 샘플에 존재하게 만든다. 실제로, 본원에서 확인된 바와 같이, 더 짧은 단편 길이의 과다표시는 샘플을 수득하기 위한 경피 천자에 의해 야기된, 주변 피부로부터의 DNA, 및 란셋에 의해 야기된 DNA 손상으로부터 유래하였다. 본원에 기재된 DNA 손상 및 오염은 처음으로 소량의 샘플을 채취할 때 큰 문제가 된다. 예를 들면, 20 마이크로리터 채혈 시, 이 발견에 따르면 태아 분획은 10% 내지 약 5% 떨어질 것이다. 본원에 개시된 방법, 시스템, 장치 및 키트는 (1) 첫 번째 혈액 방울을 버리고 분석을 위해 후속 혈액 방울을 수득하는 방법; (2) 더 긴 DNA 단편에 대해 선택하는 포획 방법; (3) 전기영동 방법; (4) 크기별 라이브러리 생성물의 선택 방법; 또는 (5) 크기 정보를 기반으로 설명/제거하거나 차등적으로 분석하기 위한 생물정보학적 방법의 이용을 포함하는, 경피 천자에 의해 도입된 오염 및 DNA 손상에 대한 해법을 제공한다.

[0016] 추가로, 개체로부터 5 밀리리터 이상의 혈액을 수득하는 것은 실험실 기술자를 요구하고, 이것은 환자의 유전자 분석 비용 및 불편함(예를 들면, 유전자 분석의 시간, 불쾌함 및 비용에 의해 야기된 불편함)을 증가시킨다. 본 방법, 장치 및 시스템은 필요 현장에서 채취될 수 있는 5 밀리리터보다 훨씬 더 낮은 양의 생물학적 샘플, 예컨대, 모세혈관 혈액(예를 들면, 손가락 찌르기로부터의 모세혈관 혈액)을 분석함으로써 유용하고 정확한 유전 정보를 제공하도록 구성된다.

[0017] 과거 시도들이 더 작은 샘플 부피를 분석하였을지라도, 이들은 인위적인 결과를 생성하였다. 예를 들면, 더 작은 양의 샘플을 분석하는 일부 과거 시도들은 무세포(cfDNA) 대용물을 생성하고 검출하기 위해 세포주로부터의 게놈 DNA를 희석하고 게놈 DNA를 전단한다. 세포주 DNA/전단된 DNA의 다운샘플링 또는 희석 및 인 실리코(*in silico*) 방법은 낮은 투입 수의 분자를 가진 개별 샘플에서 크기 및 길이 분포와 빈(bin) 정보를 반영하지 않기 때문에 인위적인 결과를 생성한다. 또 다른 예에서, 더 작은 양의 생물학적 샘플을 분석하기 위한 과거 시도는 "공지된 사건"으로서도 지칭될 수 있는 예정된 돌연변이의 검출에 의존하기 때문에 인위적인 결과를 생성한다. 본 개시는 비-대용 cfDNA로부터 정확한 예정되지 않은 유전 정보를 제공하는 방식으로 소량의 모세혈관 혈액(예를 들면, 손가락 찌르기)으로부터 (무세포 핵산을 함유하는) 혈장을 수득하는 방법, 시스템 및 장치를 제공한다.

[0018] 본원에 기재된 과거 시도는 초기 검출 단계에서 낮은 통과/낮은 커버리지 전체 게놈 서열분석의 조합을 이용한 후, 유전자 분석을 정확히 수행하기 위해 추가 분석을 더 상세히 수행해야 한다. 낮은 통과/낮은 커버리지 전체 게놈 서열은 공지되어 있지 않은 사건을 고감도로 검출하기에 최적이 아니고, 아마도 더 상세한 추적검사 어세이를 요구할 것이다. 유전자 분석을 제공하는 다수의 어세이들의 이용은 비싸고 비효율적이고, 필요 현장에서 대체 가능한 해법이 아니다. 대조적으로, 본 방법, 장치 및 시스템은 심지어 작은 샘플에서도 검출될 수 있는 고농도로 집합적으로 존재하는 무세포 DNA의 다수의 단편들을 사용함으로써 초저 샘플 부피로부터 정확한 유전자 분석을 수득하는 방법을 제공함으로써 상기 문제점들을 해결한다.

[0019] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 다음과 같이 요약된다.

[0020] 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계로서, 생물학적 샘플이 무세포 데옥시리보핵산(cfDNA)을 포함하고, 생물학적 샘플이 대상체로부터 수득될 때 최대 120 마이크로리터(㎕)의 부피를 갖는 것인 단계; (b) cfDNA의 적어도 일부를 태깅하여 태깅된 cfDNA를 생성하는 단계로서, (i) 다음의 (1), (2), (3) 또는 (4): (1) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여, 5' 오버행(overhang) 또는 3' 리세스드(recessed) 말단이 제거되는, cfDNA의 블런트(blunt) 말단을 생성하는 단계, (2) cfDNA의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계, (3) cfDNA를 크라우딩(crowding) 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 cfDNA 사이의 반응을 향상시키는 단계, 또는 (4) 리가제(ligase)를 사용하여 cfDNA에서 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계를 포함하는 하나 이상의 단계로 라이게이션 적격(ligation-competent) cfDNA를 생성하며, 그리고 (ii) 리가제, 및 크라우딩 시약 및 소분자 인핸서 중 하나 이상의 존재 하에서 라이

게이션 적격 cfDNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시켜 라이게이션 적격 cfDNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션함으로써 수행하는 것인 단계; 및 (c) 임의적으로, 태깅된 cfDNA를 증폭하는 단계; 및 (d) 태깅된 cfDNA의 적어도 일부를 서열분석하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 cfDNA 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 cfDNA 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 cfDNA 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 cfDNA는 약 10 게놈 당량(genome equivalent)이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 cfDNA는 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 cfDNA는 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소 또는 제거하는 과정에 의해 대상체로부터 수득되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 태깅된 cfDNA의 적어도 일부에서 적어도 하나의 표적 서열의 정상 표시, 과다표시 또는 과소표시를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 태아를 임신한 상태이다. 일부 실시양태에서, cfDNA의 성분은 태아로부터의 태아 cfDNA 성분이다. 일부 실시양태에서, 방법은 태아 cfDNA 성분과 유전자형 정보 사이의 유전자형 일치를 식별함으로써 개체가 부계적으로 태아에 기여했는지의 여부를 확인하기 위해 개체와 태아 cfDNA 성분으로부터 유전자형 정보를 분석하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (c)에서 증폭하는 단계도 포함하고, 라이게이션 적격 cfDNA를 생성하는 것은 (a) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단이 제거되는, cfDNA의 블런트 말단을 생성하는 단계; (b) cfDNA의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계; (c) cfDNA를 크라우딩 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 cfDNA 사이의 반응을 향상시키는 단계; 및 (d) 리가제를 사용하여 cfDNA의 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, cfDNA는 대상체에서 종양, 이식된 조직 또는 장기, 또는 하나 이상의 병원체로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대량 다중체화 증폭으로 증폭하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 등온 증폭이다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 대량 다중체화 중합효소 연쇄 반응(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 방법은 각 샘플이 상이한 대상체로부터 수득되는 2 이상의 생물학적 샘플들을 풀링하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 사용함으로써 채취되었다. 일부 실시양태에서, 태깅은, 라이브러리가 (a) 30분 동안 섭씨 20도에서 인큐베이션한 후 30분 동안 섭씨 65도에서 인큐베이션하여 말단 복구, 5' 인산화 및 A-테일링(tailing)을 수행하는 단계; (b) 15분 동안 섭씨 20도에서 인큐베이션하여 cfDNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션하는 단계; (c) 15분 동안 섭씨 37도에서 인큐베이션하여 어댑터 올리고뉴클레오타이드로부터 라이게이션된 어댑터 루프를 절단하여 라이게이션 적격 cfDNA를 생성하는 단계; (d) (i) 1분 동안 섭씨 98에서 라이게이션 적격 cfDNA를 변성시킨 후, 10초 동안 섭씨 98도에서 13 주기를 수행하고, (ii) 변성된 라이게이션 적격 cfDNA를 75초 동안 섭씨 65도에서 (i)로부터의 하나 이상의 상보적 프라이머에 어닐링하고, (iii) 라이게이션 적격 cfDNA를 5분 동안 섭씨 65에서 연장하여 라이게이션 적격 cfDNA의 증폭된 라이브러리를 생성하고, (iv) SPRI 비드를 사용하여 라이게이션 적격 cfDNA의 증폭된 라이브러리를 정제함으로써, 라이게이션 적격 cfDNA를 증폭하는 단계에 의해 제조될 때, 적어도 0.5의 효율로 태깅된 cfDNA의 라이브러리를 생성한다. 일부 실시양태에서, 태깅 단계는 적어도 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, 0.99 또는 1.00의 효율로 태깅된 cfDNA의 라이브러리를 생성한다.

[0021] 본원에 개시된 양태는 (a) 태아를 가진 임신 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계로서, 생물학적 샘플이 무세포 데옥시리보핵산(cfDNA)을 포함하고, 생물학적 샘풀이 대상체로부터 수득될 때 약 120 마이크로리터 이하의 부피를 갖는 것인 단계; (b) 생물학적 샘플 중의 적어도 하나의 cfDNA를, 증폭 시약 및 관심 있는 서열

에 상응하는 서열에 어닐링하는 폴리뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시켜 증폭 생성물을 생성하는 단계; 및 (c) 증폭 생성물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 검출 가능한 표지를 가진 올리고뉴클레오타이드 프로브를 적어도 하나의 cfDNA에 어닐링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 cfDNA의 후성 유전자 변형을 검출하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 후성 유전자 변형은 cfDNA의 유전자 좌위에서 메틸화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭 생성물의 존재의 검출은 태아의 성별을 표시한다. 일부 실시양태에서, cfDNA의 성분은 태아로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 cfDNA 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 cfDNA 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 cfDNA 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 cfDNA는 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 cfDNA는 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 cfDNA는 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소 또는 제거하는 과정에 의해 채취되었다.

[0022] 본원에 개시된 양태는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플에서 표적 핵산의 상대적 양을 증가시키는 방법으로서, (a) 대상체의 한 부위에서 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획 및 제2 분획을 생성하는 단계; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리는 단계; 및 (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 생물학적 샘플의 오염 또는 핵산 손상을 감소 또는 제거하는 단계를 포함하는 방법을 제공하고, 여기서 제1 분획은 제2 분획 중의 표적 핵산의 분획에 비해 보다 낮은 표적 핵산의 분획을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 경피 천자를 유도하기 전에 상기 부위를 세정함으로써, 원치 않는 오염물질을 제거하거나 감소시키는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 손상은 생물학적 샘플 중의 비-아폽토시스성 DNA에 대한 손상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 방법은 대량 다중체화 중합효소 연쇄 반응(mmPCR) 또는 핵산 서열분석으로부터 선택된 어세이를 이용하여 생물학적 샘플의 제2 분획에서 표적 핵산을 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 분획 또는 제2 분획, 또는 이들의 조합은 대상체로부터 수득될 때 최대 300 마이크로리터의 부피를 가진다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 순환 무세포 핵산 분자이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산 분자는 무세포 DNA 분자이다.

[0023] 본원에 개시된 양태는 (a) 최대 120 마이크로리터의 부피를 포함하는 생물학적 샘플을 대상체로부터 수득하기 위한 샘플 채취기로서, 생물학적 샘플은 표적 무세포 DNA(cfDNA)를 포함하는 것인 샘플 채취기; (b) 생물학적 샘플로부터 세포를 제거하여 세포 고갈 샘플을 생성하기 위한 샘플 정제기; 및 (c) 세포 고갈 샘플에서 표적 cfDNA를 검출하도록 구성되는 핵산 검출기를 포함하는 장치를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장치는 (a) 라이게

이션 적격 표적 cfDNA를 생성하기 위한 라이게이션 제제로서, (i) 표적 cfDNA의 블런트 말단을 생성하고 표적 cfDNA의 블런트 말단의 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단을 제거하기에 적합한 하나 이상의 엑소뉴클레아제, (ii) 블런트 말단 cfDNA 탈인산화제, (iii) 크라우딩 시약, (iv) DNA 손상 복구제, 또는 (v) DNA 리가제 중 하나 이상을 포함하는 라이게이션 제제; 및 (b) 라이게이션 적격 표적 cfDNA에 라이게이션된 하나 이상의 어댑터 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 라이게이터(ligator)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 백혈구 안정화제도 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 대량 다중체화 PCR 장치(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 라이게이션 제제는 (a) 표적 cfDNA의 블런트 말단을 생성하고 표적 cfDNA의 블런트 말단의 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단을 제거하기에 적합한 하나 이상의 엑소뉴클레아제; (i) 블런트 말단 cfDNA 탈인산화제; (ii) DNA 손상 복구제; 및 (iii) DNA 리가제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 핵산 서열분석기 또는 측면 유동 스트립(lateral flow strip)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열분석기는 신호 검출기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 정제기는 필터를 포함하고, 여기서 필터는 약 0.05 마이크론 내지 약 2 마이크론의 공극 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 필터는 수직 필터이다. 일부 실시양태에서, 샘플 정제기는 항체, 항원 결합 항체 단편, 리간드, 수용체, 펩타이드, 소분자, 및 이들의 조합으로부터 선택된 결합 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시켜 생물학적 샘플을 수득하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 순환 무세포 핵산 분자이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산 분자는 무세포 DNA 분자이다.

[0024] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 무세포 핵산의 적어도 일부를 임의적으로 태깅하여 임의적으로 태깅된 무세포 핵산의 라이브러리를 생성하는 단계; (c) 임의적으로 태깅된 무세포 핵산을 임의적으로 증폭하는 단계; (d) 임의적으로 태깅된 무세포 핵산의 적어도 일부를 서열분석하는 단계; 및 (e) 임의적으로 태깅된 무세포 핵산의 적어도 일부에서 적어도 하나의 표적 서열의 정상 표시, 과다표시 또는 과소표시를 검출하는 단계를 포함하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈액은 모세혈관 혈액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 각 샘플이 상이한 대상체로부터 수득되는 2 이상의 생물학적 샘플들을 풀링하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되지 않았다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, (c)에서 태깅 단계는 (a) (i) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여, 일부 실시양태에서 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단이 제거되는, 무세포 DNA의 블런트 말단을 생성하는 단계, (ii) 무세포 DNA의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계, (iii) 무세포 DNA를 크라우딩 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 무세포 DNA 사이의 반응을 향상시키는 단계, 또는 (iv) 리가제를 사용하여 무세포 DNA의 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계를 포함하는 하나 이상의 단계로 라이게이션 적격 무세포 DNA를 생성하는 단계; 및 (b) 리가제, 크라우딩 시약 및/또는 소분자 인핸서의 존재 하에서 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시켜 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 중합효소는 T4 DNA 중합효소 또는

DNA 중합효소 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 엑소뉴클레아제는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 또는 엑소뉴클레아제 III을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제는 T3 DNA 리가제, T4 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, Taq 리가제, 앰플리가제(Ampligase), 이. 콜라이 리가제 또는 Sso7-리가제 융합 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 시약은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글리코겐 또는 덱스트란, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자 인핸서는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 폴리소르베이트 20, 포름아미드 또는 디올, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (b)의 라이게이션 단계는 블런트 말단 라이게이션 또는 단일 뉴클레오타이드 오버행 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태에서, 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 Y 모양 어댑터, 헤어핀 어댑터, 스템 루프 어댑터, 분해 가능한 어댑터, 차단된 자가-라이게이션 어댑터 또는 바코딩된 어댑터, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (c)에서 라이브러리는 적어도 0.5의 효율로 생성된다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 종양으로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 태아로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 이식된 조직 또는 장기로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 하나 이상의 병원체로부터의 게놈 핵산이다. 일부 실시양태에서, 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 삽입 또는 결실(indel), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 등온 증폭이다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 중합효소 연쇄 반응(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액에 비해 태아 무세포 핵산이 낮은 세포 유형 또는 조직 유형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터인 부피를 가진다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 순환 무세포 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산 분자는 무세포 DNA 분자이다.

[0025] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 태아를 임신한 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 무세포 핵산의 적어도 일부를 임의적으로 태깅하여 임의적으로 태깅된 무세포 핵산의 라이브러리를 생성하는 단계; (c) 임의적으로 태깅된 무세포 핵산을 임의적으로 증폭하는 단계; (d) 임의적으로 태깅된 무세포 핵산의 적어도 일부를 서열분석하는 단계; (e) 태아의 부계 아버지인 것으로 의심되는 개체로부터 부계 유전자형 정보를 제공받는 단계; 및 (f) 부계 유전자형 정보를 무세포 핵산의 태아 성분과 비교하여, 태아 성분과 부계 유전자형 사이의 유전자형 일치가 있는지를 확인하는 단계를 포함하는 산전 친부 검사 방법이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 무세포 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈액은 모세혈관 혈액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 모세혈관 혈액은 40 마이크로리터 이하의 혈액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상이한 대상체로부터 각각 수득된 2개 이상의 생물학적 샘플들을 풀링하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되지 않았다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부

위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하는 단계도 포함한다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, (c)의 태깅 단계는 (a) (i) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여 일부 실시양태에서 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단이 제거되는, 무세포 DNA의 블런트 말단을 생성하는 단계, (ii) 무세포 DNA의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계, (iii) 무세포 DNA를 크라우딩 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 무세포 DNA 사이의 반응을 향상시키는 단계, 또는 (iv) 리가제를 사용하여 무세포 DNA의 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계를 포함하는 하나 이상의 단계로 라이게이션 적격 무세포 DNA를 생성하는 단계; 및 (b) 리가제, 크라우딩 시약 및/또는 소분자 인핸서의 존재 하에서 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 중합효소는 T4 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 엑소뉴클레아제는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 또는 엑소뉴클레아제 III을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제는 T3 DNA 리가제, T4 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, Taq 리가제, 앰플리가제, 이. 콜라이 리가제 또는 Sso7-리가제 융합 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 시약은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글리코겐 또는 덱스트란, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자 인핸서는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 폴리소르베이트 20, 포름아미드 또는 디올, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (b)에서 라이게이션 단계는 블런트 말단 라이게이션 또는 단일 뉴클레오타이드 오버행 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태에서, 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 Y 모양 어댑터, 헤어핀 어댑터, 스템 루프 어댑터, 분해 가능한 어댑터, 차단된 자가-라이게이션 어댑터 또는 바코딩된 어댑터, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (c)에서 라이브러리는 적어도 0.5의 효율로 생성된다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 종양으로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 태아로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 이식된 조직 또는 장기로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 하나 이상의 병원체로부터의 게놈 핵산이다. 일부 실시양태에서, 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 삽입 또는 결실(indel), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 등온 증폭이다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 중합효소 연쇄 반응(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액에 비해 태아 무세포 핵산이 낮은 세포 유형 또는 조직 유형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터인 부피를 가진다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 순환 무세포 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산 분자는 무세포 DNA 분자이다.

[0026] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 분석하는 방법으로서, (a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 임의적으로, 무세포 핵산의 적어도 일부를 태깅하여 태깅된 무세포 핵산의 라이브러리를 생성하는 단계; (c) 임의적으로 태깅된 무세포 핵산을 대량 다중체화 증폭 어세이로 증폭하는 단계; (d) 임의적으로, 증폭된 임의적으로 태깅된 무세포 핵산을 풀링하는 단계; (e) 증폭된 임의적으로 태깅된 무세포 핵산의 적어도 일부를 서열분석하는 단계; 및 (f) 임의적으로 태깅된 무세포 핵산의 적어도 일부에서 적어도 하나의 표적 서열의 정상 표시, 과다표시 또는 과소표시를 검출하는 단계를 포함하는

방법이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈액은 모세혈관 혈액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상이한 대상체로부터 각각 수득된 2개 이상의 생물학적 샘플들을 풀링하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되지 않았다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, (c)의 태깅 단계는 (a) (i) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여 일부 실시양태에서 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단이 제거되는, 무세포 DNA의 블런트 말단을 생성하는 단계, (ii) 무세포 DNA의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계, (iii) 무세포 DNA를 크라우딩 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 무세포 DNA 사이의 반응을 향상시키는 단계, 또는 (iv) 리가제를 사용하여 무세포 DNA의 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계를 포함하는 하나 이상의 단계로 라이게이션 적격 무세포 DNA를 생성하는 단계; 및 (b) 리가제, 크라우딩 시약 및/또는 소분자 인핸서의 존재 하에서 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 중합효소는 T4 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 엑소뉴클레아제는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 또는 엑소뉴클레아제 III을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제는 T3 DNA 리가제, T4 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, Taq 리가제, 앰플리가제, 이. 콜라이 리가제 또는 Sso7-리가제 융합 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 시약은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글리코겐 또는 덱스트란, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자 인핸서는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 폴리소르베이트 20, 포름아미드 또는 디올, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (b)에서 라이게이션 단계는 블런트 말단 라이게이션 또는 단일 뉴클레오타이드 오버행 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태에서, 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 Y 모양 어댑터, 헤어핀 어댑터, 스템 루프 어댑터, 분해 가능한 어댑터, 차단된 자가-라이게이션 어댑터 또는 바코딩된 어댑터, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (c)의 라이브러리는 적어도 0.5의 효율로 생성된다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 종양으로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 태아로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 이식된 조직 또는 장기로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 하나 이상의 병원체로부터의 게놈 핵산이다. 일부 실시양태에서, 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 삽입 또는 결실(indel), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 등온 증폭이다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 중합효소 연쇄 반응(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액에 비해 태아 무세포 핵산이 낮은 세포 유형 또는 조직 유형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터인 부피를 가진다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 순환 무세포 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약

10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산 분자는 무세포 DNA 분자이다.

[0027] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체로부터 데옥시리보스 핵산(DNA)을 포함하는 약 1 내지 100 마이크로리터(㎕)의 생물학적 샘플을 수득하는 단계; 및 (b) DNA의 후성 유전자 변형을 검출하는 단계를 포함하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 후성 유전자 변형은 유전자 좌위에서의 DNA 메틸화, 히스톤 메틸화, 히스톤 유비퀴틴화, 히스톤 아세틸화, 히스톤 인산화, 마이크로 RNA(miRNA)를 포함한다. 일부 실시양태에서, DNA 메틸화는 CpG 메틸화 또는 CpH 메틸화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 유전자의 프로모터 또는 조절 요소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 가변 긴 말단 반복부(LTR)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 무세포 DNA 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 히스톤 아세틸화는 히스톤 데아세틸라제(deacetylase)의 존재 또는 수준에 의해 표시된다. 일부 실시양태에서, 히스톤 변형은 히스톤 2A(H2A), 히스톤 2B (H2B), 히스톤 3(H3) 및 히스톤 4(H4)로 구성된 군으로부터 선택된 히스톤의 변형이다. 일부 실시양태에서, 히스톤 메틸화는 H3 라이신 4의 메틸화(H3K4me2)이다. 일부 실시양태에서, 히스톤 아세틸화는 H4의 탈아세틸화이다. 일부 실시양태에서, miRNA는 miR-21, miR-126, mi-R142, mi-R146a, mi-R12a, mi-R181a, miR-29c, miR-29a, miR-29b, miR-101, miRNA-155 및 miR-148a로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 상이한 대상체로부터 각각 수득된 2개 이상의 생물학적 샘플들을 풀링하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되지 않았다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하는 단계도 포함한다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터인 부피를 가진다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 순환 무세포 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산 분자는 무세포 DNA 분자이다.

[0028] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계로서, 생물학적 샘플이 최대 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유하는 것인 단계; (b) 무세포 핵산 분자의 적어도 일부를 서열분석하여 서열분석 리드를 생성하는 단계; (c) 적어도 하나의 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드의 적어도 일

부를 측정하는 단계; 및 (d) 적어도 하나의 염색체 영역의 정상 표시, 과다표시 또는 과소표시를 검출하는 단계를 포함하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 무세포 핵산 분자의 적어도 일부를 태깅하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 태깅 단계는 (a) (i) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여 일부 실시양태에서 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단이 제거되는, 무세포 DNA의 블런트 말단을 생성하는 단계, (ii) 무세포 DNA의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계, (iii) 무세포 DNA를 크라우딩 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 무세포 DNA 사이의 반응을 향상시키는 단계, 또는 (iv) 리가제를 사용하여 무세포 DNA의 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계를 포함하는 하나 이상의 단계로 라이게이션 적격 무세포 DNA를 생성하는 단계; 및 (b) 리가제, 크라우딩 시약 및/또는 소분자 인핸서의 존재 하에서 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상이한 대상체로부터 각각 수득된 2개 이상의 생물학적 샘플들을 풀링하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 중합효소는 T4 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 엑소뉴클레아제는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 또는 엑소뉴클레아제 III을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제는 T3 DNA 리가제, T4 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, Taq 리가제, 앰플리가제, 이. 콜라이 리가제 또는 Sso7-리가제 융합 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 시약은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글리코겐 또는 덱스트란, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자 인핸서는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 폴리소르베이트 20, 포름아미드 또는 디올, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (b)의 라이게이션 단계는 블런트 말단 라이게이션 또는 단일 뉴클레오타이드 오버행 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태에서, 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 Y 모양 어댑터, 헤어핀 어댑터, 스템 루프 어댑터, 분해 가능한 어댑터, 차단된 자가-라이게이션 어댑터 또는 바코딩된 어댑터, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 500 마이크로리터(㎕) 미만의 부피를 가진 생물학적 샘플이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 1 ㎕ 내지 약 100 ㎕의 부피를 가진 생물학적 샘플이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 5 ㎕ 내지 약 80 ㎕의 부피를 가진 생물학적 샘플이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터인 부피를 가진다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 순환 무세포 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 300 pg 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 3 ng 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산 분자는 무세포 DNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 방법은 혈액 샘플로부터 혈장 또는 혈청을 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 분리하는 단계는 혈액 샘플을 여과하여, 혈액 샘플로부터 세포, 세포 단편, 미세소포 또는 이들의 조합을 제거함으로써 혈장 샘플을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플을 수득하는 단계는 손가락을 찌르는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하는 단계도 포함한다. 일부 경우, 세정하는 단계는 원치 않는 오염물을 제거하거나 감소시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러

싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 임신 대상체이고, 무세포 핵산 분자는 무세포 태아 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 조직 내의 종양으로부터의 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 태아로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 이식된 조직 또는 장기로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 하나 이상의 병원체로부터의 게놈 핵산이다. 일부 실시양태에서, 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 삽입 또는 결실(indel), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 등온 증폭이다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 중합효소 연쇄 반응(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액에 비해 태아 무세포 핵산이 낮은 세포 유형 또는 조직 유형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다.

[0029] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 태아를 임신한 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계로서, 일부 실시양태에서 생물학적 샘플이 최대 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유하는 것인 단계; (b) 무세포 핵산 분자의 적어도 일부를 서열분석하여 서열분석 리드를 생성하는 단계; (c) 적어도 하나의 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드의 적어도 일부를 측정하는 단계; (d) 태아의 부계 아버지인 것으로 의심되는 개체로부터 부계 유전자형 정보를 제공받는 단계; 및 (e) 부계 유전자형 정보를 무세포 핵산의 태아 성분과 비교하여, 태아 성분과 부계 유전자형 사이에 유전자형 일치가 있는지를 확인하는 단계를 포함하는 산전 친부 검사 방법이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 무세포 핵산을 증폭하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 무세포 핵산의 적어도 일부를 태깅하여, 태깅된 무세포 핵산의 라이브러리를 생성하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 태깅된 무세포 핵산을 증폭하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 태깅 단계는 (a) (i) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여 일부 실시양태에서 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단이 제거되는, 무세포 DNA의 블런트 말단을 생성하는 단계, (ii) 무세포 DNA의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계, (iii) 무세포 DNA를 크라우딩 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 무세포 DNA 사이의 반응을 향상시키는 단계, 또는 (iv) 리가제를 사용하여 무세포 DNA의 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계를 포함하는 하나 이상의 단계로 라이게이션 적격 무세포 DNA를 생성하는 단계; 및 (b) 리가제, 크라우딩 시약 및/또는 소분자 인핸서의 존재 하에서 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상이한 대상체로부터 각각 수득된 2개 이상의 생물학적 샘플들을 풀링하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 중합효소는 T4 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 엑소뉴클레아제는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 또는 엑소뉴클레아제 III을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제는 T3 DNA 리가제, T4 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, Taq 리가제, 앰플리가제, 이. 콜라이 리가제 또는 Sso7-리가제 융합 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 시약은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글리코겐 또는 덱스트란, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자 인핸서는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 폴리소르베이트 20, 포름아미드 또는 디올, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (b)의 라이게이션 단계는 블런트 말단 라이게이션 또는 단일 뉴클레오타이드 오버행 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태에서, 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 Y 모양 어댑터, 헤어핀 어댑터, 스템 루프 어댑터, 분해 가능한 어댑터, 차단된 자가-라이게이션 어댑터 또는 바코딩된 어댑터, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득될 때 최대 500 마이크로리터인 부피를 가진다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 300 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 순환 무세포 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg)

내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 300 pg 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 3 ng 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산 분자는 무세포 DNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 혈액 샘플로부터 혈장 또는 혈청을 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 분리하는 단계는 혈액 샘플을 여과하여, 혈액 샘플로부터 세포, 세포 단편, 미세소포 또는 이들의 조합을 제거함으로써 혈장 샘플을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플을 수득하는 단계는 손가락을 찌르는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 임신 대상체이고, 무세포 핵산 분자는 무세포 태아 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 조직 내의 종양으로부터의 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 태아로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 이식된 조직 또는 장기로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 하나 이상의 병원체로부터의 게놈 핵산이다. 일부 실시양태에서, 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 삽입 또는 결실(indel), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 등온 증폭이다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 중합효소 연쇄 반응(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액에 비해 태아 무세포 핵산이 낮은 세포 유형 또는 조직 유형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다.

[0030] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 무세포 핵산을 증폭하는 단계; (c) 무세포 핵산의 적어도 일부를 임의적으로 태깅하여 태깅된 무세포 핵산의 라이브러리를 생성하는 단계; (d) 임의적으로 태깅된 무세포 핵산을 대량 다중체화 증폭 어세이로 증폭하는 단계; (e) 임의적으로, 증폭된 임의적으로 태깅된 무세포 핵산을 풀링하는 단계; (f) 증폭된 임의적으로 태깅된 무세포 핵산 분자의 적어도 일부를 서열분석하여 서열분석 리드를 생성하는 단계; (g) 적어도 하나의 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드의 적어도 일부를 측정하는 단계; 및 (h) 적어도 하나의 염색체 영역의 정상 표시, 과다표시 또는 과소표시를 검출하는 단계를 포함하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 태깅 단계는 (a) (i) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여 일부 실시양태에서 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단이 제거되는, 무세포 DNA의 블런트 말단을 생성하는 단계, (ii) 무세포 DNA의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계, (iii) 무세포 DNA를 크라우딩 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 무세포 DNA 사이의 반응을 향상시키는 단계, 또는 (iv) 리가제를 사용하여 무세포 DNA의 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계를 포함하는 하나 이상의 단계로 라이게이션 적격 무세포 DNA를 생성하는 단계; 및 (b) 리가제, 크라우딩 시약 및/또는 소분자 인핸서의 존재 하에서 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상이한 대상체로부터 각각 수득된 2개 이상의 생물학적 샘플들을 풀링하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 중합효소

는 T4 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 엑소뉴클레아제는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 또는 엑소뉴클레아제 III을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제는 T3 DNA 리가제, T4 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, Taq 리가제, 앰플리가제, 이. 콜라이 리가제 또는 Sso7-리가제 융합 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 시약은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글리코겐 또는 덱스트란, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자 인핸서는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 폴리소르베이트 20, 포름아미드 또는 디올, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (b)의 라이게이션 단계는 블런트 말단 라이게이션 또는 단일 뉴클레오타이드 오버행 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태에서, 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 Y 모양 어댑터, 헤어핀 어댑터, 스템 루프 어댑터, 분해 가능한 어댑터, 차단된 자가-라이게이션 어댑터 또는 바코딩된 어댑터, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득될 때 최대 300 마이크로리터인 부피를 가진다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 순환 무세포 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 300 pg 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 3 ng 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 혈액 샘플로부터 혈장 또는 혈청을 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 분리하는 단계는 혈액 샘플을 여과하여, 혈액 샘플로부터 세포, 세포 단편, 미세소포 또는 이들의 조합을 제거함으로써 혈장 샘플을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플을 수득하는 단계는 손가락을 찌르는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하는 단계도 포함한다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거하거나 감소시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 임신 대상체이고, 무세포 핵산 분자는 무세포 태아 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 조직 내의 종양으로부터의 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 태아로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 이식된 조직 또는 장기로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 표적 무세포 핵산은 하나 이상의 병원체로부터의 게놈 핵산이다. 일부 실시양태에서, 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 삽입 또는 결실(indel), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 등온 증폭이다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 중합효소 연쇄 반응(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 말초 혈액에 비해 태아 무세포 핵산이 낮은 세포 유형 또는 조직 유형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다.

[0031] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 태아 영양배엽 세포 표면 항원에 특이적인 항체를 사용하여 생물학적 샘플로부터 태아 영양배엽을 단리하는 단계; (c) 태아

영양배엽에서 태아 영양배엽 핵을 용해시키는 단계; (e) 용해된 태아 영양배엽으로부터 태아 게놈 DNA(gDNA)를 추출하는 단계; (f) 증폭 생성물을 생성하기 위해 태아 gDNA를 증폭 시약, 및 관심 있는 서열에 상응하는 서열에 어닐링하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계; 및 (g) (i) 증폭 생성물의 존재 또는 부재, 또는 (ii) 태아 gDNA의 적어도 일부에서 적어도 하나의 표적 서열의 정상 표시, 과다표시 또는 과소표시를 검출하는 단계를 포함하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 존재 또는 부재는 태아의 건강 상태를 표시한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 손가락 찌르기를 이용함으로써 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 손가락 찌르기 없이 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, 접촉 단계는 등온 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접촉 단계는 실온에서 수행한다. 일부 실시양태에서, 방법은 증폭이 일어날 때 태그를 증폭 생성물 내로 혼입하는 단계를 포함하고 증폭 생성물의 존재를 검출하는 단계를 추가로 포함하고, 검출하는 단계는 태그를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 태그는 뉴클레오타이드를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 증폭 생성물을 검출하는 단계는 증폭 생성물을 태그와 상호작용할 수 있는 결합 모이어티와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 측면 유동 장치 상에서 증폭 생성물을 결합 모이어티와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (c)는 15분 이내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 방법을 수행하기 위한 기술적 훈련을 받지 않은 개체에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 수득하는 단계, 접촉시키는 단계 및 검출하는 단계는 단일 소형 장치에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 건강 상태는 임신의 존재 및 부재로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건강 상태는 신경학적 장애, 대사 장애, 암, 자가면역 장애, 알레르기 반응 및 감염의 존재 및 부재로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 건강 상태는 약물 또는 요법에 대한 반응이다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득될 때 최대 300 마이크로리터인 부피를 가진다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 순환 무세포 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 300 pg 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 3 ng 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다.

[0032] 본원에 개시된 양태는 (a) 태아를 임신한 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 생물학적 샘플 중의 적어도 하나의 무세포 핵산을 증폭 시약, 및 성염색체에 상응하는 서열에 어닐링하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계; 및 (c) 증폭 생성물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한

다. 일부 실시양태에서, 존재 또는 부재는 태아의 성별을 표시한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득될 때 최대 300 마이크로리터인 부피를 가진다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 55 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 50 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 최대 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 40 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 부피는 대상체로부터 수득될 때 약 10 마이크로리터 내지 약 100 마이크로리터이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이 아니다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 순환 무세포 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 300 pg 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 3 ng 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 약 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 최대 10 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산은 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 또는 14 내지 15 게놈 당량이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 손가락 찌르기를 이용함으로써 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 손가락 찌르기 없이 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다.

[0033] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계로서, 샘플의 부피가 약 300 마이크로리터 이하이고, 생물학적 샘플이 태아 영양배엽을 포함하는 것인 단계; (b) 태아 영양배엽 세포 표면 항원에 특이적인 단일클론 항체를 사용하여 상기 생물학적 샘플로부터 태아 영양배엽을 단리하는 단계; (c) 태아 영양배엽을 용해시키는 단계; (d) 임의적으로, 태아 영양배엽 핵을 정제하는 단계; (e) 임의적으로, 태아 영양배엽 핵을 용해시키는 단계; (f) 용해된 태아 영양배엽으로부터 태아 게놈 DNA(gDNA)를 추출하는 단계; (g) 증폭 생성물을 생성하기 위해 태아 gDNA를 증폭 시약, 및 관심 있는 서열에 상응하는 서열에 어닐링하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계; 및 (h) 증폭 생성물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 상기 존재 또는 부재는 태아의 성별을 표시한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액이다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플의 부피는 120 ㎕ 이하이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이다. 일부 실시양태에서, 혈장 샘플의 부피는 50 ㎕ 이하이다. 일부 실시양태에서, 혈장 샘플의 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 40 ㎕이다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 손가락 찌르기를 이용함으로써 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 손가락 찌르기 없이 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계로서, 생물학적 샘플이 무세포 핵산을 포함하는 것인 단계; (b) 무세포 핵산을 엔도뉴클레아제와 접촉시킴으로써, 무세포 핵산들 중 적어도 하나를 단편화하여, 단편화된 핵산 분자의 라이브러리를 생성하는 단계; (c) 태깅된 무세포 핵산을 임의적으로 증폭하는 단계; 및 (d) 태깅된 무세포 핵산의 적어도 일부를 서열분석하여 관심

있는 서열을 검출하는 단계를 포함하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제는 Cas 효소이다. 일부 실시양태에서, Cas 효소는 Cas9, Cas12, 캐스케이드(Cascade) 및 Cas13, 또는 이들의 하나 이상의 서브타입 또는 오르톨로그(orthologue)이다. 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제는 무세포 핵산들 중 적어도 하나에 상보적인 가이드 가닥에 의해 무세포 핵산에 가이딩된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 엔도뉴클레아제로 무세포 핵산을 단편화하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액이다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플의 부피는 300 ㎕ 이하이다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플의 부피는 120 ㎕ 이하이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이다. 일부 실시양태에서, 혈장 샘플의 부피는 50 ㎕ 이하이다. 일부 실시양태에서, 혈장 샘플의 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 40 ㎕이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 DNA를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 5 내지 약 100 카피의 관심 있는 서열을 함유한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 손가락 찌르기를 이용함으로써 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 손가락 찌르기 없이 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다. 일부 실시양태에서, 관심 있는 서열을 검출하는 단계는 (i) 관심 있는 서열의 존재 또는 부재, 또는 (ii) 관심 있는 서열의 정상 표시, 과다표시 또는 과소표시를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출하는 단계는 대량 다중체화 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 등온 증폭이다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 중합효소 연쇄 반응(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 임신 대상체이고, 무세포 핵산 분자는 무세포 태아 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 조직 내의 종양으로부터의 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 태아로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 이식된 조직 또는 장기로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 하나 이상의 병원체로부터의 게놈 핵산이다. 일부 실시양태에서, 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 삽입 또는 결실(indel), 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0034] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계로서, 생물학적 샘플이 무세포 핵산을 포함하는 것인 단계; (b) 무세포 핵산을 전위효소(transposase) 효소와 접촉시킴으로써, 무세포 핵산들 중 적어도 하나를 단편화하고 단편화된 무세포 핵산을 합성 태그로 태깅하여, 단편화된 핵산 분자의 라이브러리를 생성하는 단계; (c) 태깅된 무세포 핵산을 임의적으로 증폭하는 단계; 및 (d) 태깅된 무세포 핵산의 적어도 일부를 서열분석하는 단계를 포함하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 전위효소는 절단 및 붙이기 기작을 이용하여 무세포 핵산을 단편화한다. 일부 실시양태에서, 전위효소는 Tn5 전위효소이다. 일부 실시양태에서, 태그는 길이가 약 9개 염기쌍이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 무세포 핵산을 전위효소로 단편화하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단편화된 무세포 핵산을 전위효소로 태깅하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득한 후 생물학적 샘플을 백혈구 안정화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액이다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플의 부피는 300 ㎕ 이하이다. 일부 실시양태에서, 혈액 샘플의 부피는 120 ㎕ 이하이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액으로부터의 혈장 샘플이다. 일부 실시양태에서, 혈장 샘플의 부피는 50 ㎕ 이하이다. 일부 실시양태

에서, 혈장 샘플의 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 40 ㎕이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 피코그램(pg) 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 DNA를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 5 내지 약 100 카피의 관심 있는 서열을 함유한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 손가락 찌르기를 이용함으로써 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 손가락 찌르기 없이 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 대상체에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, 방법은 정맥절개술을 수행하거나 대상체의 정맥 혈액으로부터 생물학적 샘플을 유도하는 단계로 구성되지 않는다. 일부 실시양태에서, 관심 있는 서열을 검출하는 단계는 (i) 관심 있는 서열의 존재 또는 부재, 또는 (ii) 관심 있는 서열의 정상 표시, 과다표시 또는 과소표시를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출하는 단계는 대량 다중체화 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 등온 증폭이다. 일부 실시양태에서, 대량 다중체화 증폭 어세이는 중합효소 연쇄 반응(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 임신 대상체이고, 무세포 핵산 분자는 무세포 태아 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 조직 내의 종양으로부터의 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 태아로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 이식된 조직 또는 장기로부터의 무세포 핵산이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 하나 이상의 병원체로부터의 게놈 핵산이다. 일부 실시양태에서, 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 삽입 또는 결실(indel), 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0035] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체의 생물학적 샘플을 채취하도록 구성된 샘플 채취기; (b) 생물학적 샘플로부터 샘플 성분을 단리하도록 구성된 샘플 처리기; (c) 생물학적 샘플 또는 샘플 성분 중의 핵산을 검출하도록 구성된 핵산 검출기; 및 (d) 핵산 정보 출력기를 포함하는 시스템이다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 백혈구 안정화제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 경피 천자 장치를 포함한다. 일부 실시양태에서, 경피 천자 장치는 바늘, 란셋, 미세바늘, 진공 및 미세바늘 어레이 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 성분은 세포, 탄수화물, 인지질, 단백질, 핵산 및 미세소포로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 샘플 성분은 혈액 세포이다. 일부 실시양태에서, 샘플 성분은 무세포 핵산을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 샘플 성분은 무세포 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 종양으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 태아로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 이식된 조직 또는 장기로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 하나 이상의 병원체로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 말초 혈액에 비해 낮은 존재도의 무세포 핵산을 가진 세포 유형 또는 조직 유형으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 성분은 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 하나 이상의 삽입결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 유전자형 어세이를 수행하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 유전자형 어세이는 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응(qPCR), 유전자형 어레이 또는 자동화된 서열분석을 포함한다. 일부 실시양태에서, qPCR은 다중체화 중합효소 연쇄 반응(mmPCR)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 성분은 혈장 또는 혈청이다. 일부 실시양태에서, 샘플 정제기는 1 밀리리터 미만의 혈액으로부터 혈장을 단리하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 샘플 정제기는 250 ㎕ 미만의 혈액으로부터 혈장을 단리하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플의 부피는 50 ㎕ 이하이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플의 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 40 ㎕이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 pg 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 DNA를 함유한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 생물학적 샘플 또는 샘플 성분 중에 약 5 내지 약 100 카피

의 관심 있는 서열을 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 300 pg 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 3 ng 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 핵산 서열분석기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 적어도 하나의 핵산 증폭 시약 및 적어도 하나의 크라우딩제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 생물학적 샘플로부터 무세포 핵산의 라이브러리를 생성하기 위한 적어도 하나의 제1 태그, 및 적어도 하나의 증폭 시약도 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 핵산 증폭 시약은 프라이머, 중합효소 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는, (a) (i) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여 일부 실시양태에서 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단이 제거되는, 핵산의 블런트 말단을 생성하는 단계; (ii) 핵산의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계; (iii) 핵산을 크라우딩 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 핵산 사이의 반응을 향상시키는 단계; 또는 (iv) 리가제를 사용하여 핵산 중 손상된 핵산을 복구 또는 제거하는 단계를 포함하는 하나 이상의 단계로 라이게이션 적격 핵산을 생성하며; 그리고 (b) 리가제, 크라우딩 시약 및/또는 소분자 인핵서의 존재 하에서 라이게이션 적격 핵산을 어댑터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시켜 라이게이션 적격 핵산을 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션함으로써, 태깅된 핵산의 라이브러리를 생성하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 중합효소는 T4 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 엑소뉴클레아제는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 또는 엑소뉴클레아제 III을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제는 T3 DNA 리가제, T4 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, Taq 리가제, 앰플리가제, 이. 콜라이 리가제 또는 Sso7-리가제 융합 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 시약은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글리코겐 또는 덱스트란, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자 인핸서는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 폴리소르베이트 20, 포름아미드 또는 디올, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (b)의 라이게이션 단계는 블런트 말단 라이게이션 또는 단일 뉴클레오타이드 오버행 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태에서, 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 Y 모양 어댑터, 헤어핀 어댑터, 스템 루프 어댑터, 분해 가능한 어댑터, 차단된 자가-라이게이션 어댑터 또는 바코딩된 어댑터, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 상이한 대상체로부터 각각 수득된 2개 이상의 생물학적 샘플들을 풀링하도록 추가로 구성된다. 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 태그를 카운팅하여, 샘플에서 관심 있는 핵산의 표시를 검출하도록 추가로 구성된다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열 출력기는 무선 통신 장치, 유선 통신 장치, 케이블 포트 및 전자 디스플레이로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 시스템의 모든 성분들은 단일 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 시스템의 모든 성분들은 단일 장치 내에 수용된다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 제1 위치에 위치하고, 샘플 정제기 및 핵산 검출기 중 적어도 하나는 제2 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기, 및 샘플 정제기 및 핵산 검출기 중 적어도 하나는 동일한 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 샘플 정제기는 필터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 필터는 약 0.05 마이크론 내지 약 2 마이크론의 공극 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 시스템은 생물학적 샘플의 적어도 일부를 수송하거나 저장하기 위한 수송 또는 저장 구획도 포함한다. 일부 실시양태에서, 수송 또는 저장 구획은 흡수 패드, 유체 용기, 샘플 보존제 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 샘플 성분 또는 생물학적 샘플로부터 핵산을 증폭하도록 구성된 핵산 증폭기를 추가로 포함하고, 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 생물학적 샘플 또는 샘플 성분에서 증폭된 핵산을 검출하도록 추가로 구성된다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭기는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 장치이다. 일부 실시양태에서, PCR 장치는 대량 다중체화 PCR 장치(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체의 정맥 혈액으로부터 유래하지 않는다.

[0036] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체의 약 1 내지 100 마이크로리터($\mu\ell$)의 생물학적 샘플을 채취하도록 구성된 샘플 채취기; (b) 생물학적 샘플로부터 샘플 성분을 단리하도록 구성된 샘플 처리기; (c) 생물학적 샘플 또는 샘플 성분에서 후성 유전자 변형을 검출하도록 구성된 검출기; 및 (d) 정보 출력기를 포함하는 시스템이다. 일부 실시양태에서, 후성 유전자 변형은 유전자 좌위에서의 DNA 메틸화, 히스톤 메틸화, 히스톤 유비퀴틴화, 히스톤 아세틸화, 히스톤 인산화, 마이크로 RNA(miRNA)를 포함한다. 일부 실시양태에서, DNA 메틸화는 CpG 메틸화 또는 CpH 메틸화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 유전자의 프로모터 또는 조절 요소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 가변 긴 말단 반복부(LTR)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 무세포 DNA 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 히스톤 아세틸화는 히스톤 데아세틸라제의 존재 또는 수준에 의해 표시된다. 일부 실시양태에서, 히스톤 변형은 히스톤 2A(H2A), 히스톤 2B(H2B), 히스톤 3(H3) 및 히스톤 4(H4)로 구성된 군으로부터 선택된 히스톤의 변형이다. 일부 실시양태에서, 히스톤 메틸화는 H3 라이

신 4의 메틸화(H3K4me2)이다. 일부 실시양태에서, 히스톤 아세틸화는 H4의 탈아세틸화이다. 일부 실시양태에서, miRNA는 miR-21, miR-126, mi-R142, mi-R146a, mi-R12a, mi-R181a, miR-29c, miR-29a, miR-29b, miR-101, miRNA-155 및 miR-148a로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈액은 모세혈관 혈액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 모세혈관 혈액은 40 마이크로리터 이하의 혈액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되지 않았다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 채취되었다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플이 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하도록 구성된다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, 시스템은 백혈구 안정화제도 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체의 정맥 혈액으로부터 유래하지 않는다.

[0037] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 샘플학적 샘플의 수득을 필요로 하는 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 샘플 채취기; (b) 상기 생물학적 샘플로부터 세포를 제거하여 세포 고갈 샘플을 생성하는 샘플 정제기; 및 (c) 세포 고갈 샘플에서 복수의 무세포 DNA 단편들을 검출하도록 구성된 핵산 검출기를 포함하는 장치이다. 일부 실시양태에서, 장치는 백혈구 안정화제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 경피 천자로부터 샘플을 채취하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 제1 서열은 복수의 무세포 DNA 단편들 중 제1 무세포 DNA 단편에 존재하고, 제2 서열은 복수의 무세포 DNA 단편들 중 제2 무세포 DNA 단편에 존재하고, 일부 실시양태에서, 제1 서열은 제2 서열과 적어도 80% 동일하다. 일부 실시양태에서, 제1 서열 및 제2 서열 중 적어도 하나는 대상체의 게놈에서 적어도 2회 반복된다. 일부 실시양태에서, 제1 서열 및 제2 서열은 각각 길이가 적어도 10개 뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 제1 서열은 제1 염색체에 있고 제2 서열은 제2 염색체에 있다. 일부 실시양태에서, 제1 서열과 제2 서열은 동일한 염색체에 있으나, 적어도 1개의 뉴클레오타이드에 의해 분리된다. 일부 실시양태에서, 제1 서열과 제2 서열은 기능적으로 연결되어 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 적어도 하나의 검출 시약을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 검출 시약은 복수의 무세포 DNA 단편들 중 적어도 하나의 무세포 DNA 단편을 검출할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 검출 시약은 태아 후성 유전자적 시그니처(signature)를 검출할 수 있다. 일부 실시양태에서, 태아 후성 유전자적 시그니처는 핵산 메틸화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 메틸화는 대립유전자 특이적이다. 일부 실시양태에서, 장치는 샘플 성분 또는 생물학적 샘플로부터 핵산을 증폭하도록 구성된 핵산 증폭기도 포함하고, 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 또한 생물학적 샘플 또는 샘플 성분에서 증폭된 핵산을 검출하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭기는 등온 중합효소 연쇄 반응(PCR) 장치이다. 일부 실시양태에서, 등온 PCR 장치는 대량 다중체화 PCR 장치(mmPCR)이다. 일부 실시양태에서, 장치는 검출된 복수의 무세포 DNA 단편들을 공지된 유전자형과 비교하도록 구성된 유전자형 분석기도 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 무세포 DNA 단편들은 태아 성분을 포함하고, 공지된 유전자형은 부계 유전자형이다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭기는 제1 서열 및 제2 서열을 증폭하기 위해 적어도 하나의 핵산 증폭 시약 및 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 핵산 서열분석기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 신호 검출기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 측면 유동 스트립이다. 일부 실시양태에서, 무세포 DNA는 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 삽입 또는 결실(indel), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 DNA는 종양으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 무세포 DNA는 태아로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 무세포 DNA는 이식된 조직 또는 장기로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 말초 혈액에 비해 낮은 존재도의 무세포 핵산을 가진 세포 유형 또는 조직 유형으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 무세포 DNA는 하나 이상의 병원체로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 바이러스 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 병원체는 진균 또는 이의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 정제기는 필터를 포함하고, 일부 실시양태에서, 필터는 약 0.05

마이크론 내지 약 2 마이크론의 공극 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 필터는 수직 필터이다. 일부 실시양태에서, 샘플 정제기는 항체, 항원 결합 항체 단편, 리간드, 수용체, 펩타이드, 소분자 및 이들의 조합으로부터 선택된 결합 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 결합 모이어티는 세포외 소포에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 (a) (i) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여 일부 실시양태에서 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단이 제거되는, 무세포 DNA 단편의 블런트 말단을 생성하는 단계; (ii) 무세포 DNA 단편의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계; (iii) 무세포 DNA 단편을 크라우딩 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 무세포 DNA 단편 사이의 반응을 향상시키는 단계; 또는 (iv) 리가제를 사용하여 무세포 DNA 단편의 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계를 포함하는 하나 이상의 단계로 라이게이션 적격 무세포 DNA 단편을 생성하며; 그리고 (b) 리가제, 크라우딩 시약 및/또는 소분자 인핸서의 존재 하에서 라이게이션 적격 무세포 DNA 단편을 어댑터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시켜 라이게이션 적격 무세포 DNA 단편을 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션함으로써, 태깅된 무세포 DNA 단편의 라이브러리를 생성하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 중합효소는 T4 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 엑소뉴클레아제는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 또는 엑소뉴클레아제 III을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제는 T3 DNA 리가제, T4 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, Taq 리가제, 앰플리가제, 이. 콜라이 리가제 또는 Sso7-리가제 융합 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 시약은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글리코겐 또는 덱스트란, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자 인핸서는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 폴리소르베이트 20, 포름아미드 또는 디올, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (b)의 라이게이션 단계는 블런트 말단 라이게이션 또는 단일 뉴클레오타이드 오버행 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태에서, 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 Y 모양 어댑터, 헤어핀 어댑터, 스템 루프 어댑터, 분해 가능한 어댑터, 차단된 자가-라이게이션 어댑터 또는 바코딩된 어댑터, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 상이한 대상체로부터 각각 수득된 2개 이상의 생물학적 샘플들을 풀링하도록 추가로 구성된다. 일부 실시양태에서, 핵산 검출기는 태그를 카운팅하여, 샘플에서 관심 있는 핵산의 표시를 검출하도록 추가로 구성된다. 일부 실시양태에서, 장치는 무선 통신 장치, 유선 통신 장치, 케이블 포트 또는 전자 디스플레이를 포함하는 핵산 서열 출력기도 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 단일 하우징 내에 함유된다. 일부 실시양태에서, 장치는 실온에서 작동한다. 일부 실시양태에서, 장치는 생물학적 유체를 받은 지 약 5분 내지 약 20분 이내에 세포 고갈 샘플에서 복수의 바이오마커들을 검출할 수 있다. 일부 실시양태에서, 장치는 통신 연결을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈액은 모세혈관 혈액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 정제기는 250 ㎕ 미만의 혈액으로부터 혈장을 단리하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플의 부피는 50 ㎕ 이하이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플의 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 40 ㎕이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 25 pg 내지 약 250 pg의 총 순환 무세포 DNA를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 생물학적 샘플 또는 샘플 성분 중에 약 5 내지 약 100 카피의 관심 있는 서열을 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^9개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 약 10^4개 내지 약 10^7개의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 300 pg 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 3 ng 미만의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플이 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하도록 구성된다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 양태는 (a) 대상체의 약 1 내지 100 마이크로리터(㎕)의 생물학적 샘플을 채취하도록 구성된 샘플 채취기; (b) 생물학적 샘플로부터 샘플 성분을 단리하도록 구성된 샘플 처리기; (c) 생물학적 샘플 또는 샘플 성분에서 후성 유전자 변형을 검출하도록 구성된 검출기; 및 (d) 정보 출력기를 포함하는 장치이다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 경피 천자로부터 샘플을 채취하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 후성 유전자 변형은 유전자 좌위에서의 DNA 메틸화, 히스톤 메틸화, 히스톤 유비퀴틴화, 히스톤 아세틸화, 히스톤 인산화, 마이크로 RNA(miRNA)를 포함한다. 일부 실시양태에서, DNA 메틸화는 CpG 메틸화 또는 CpH 메틸화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 유전자의 프로모터 또는 조절 요소

를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 가변 긴 말단 반복부(LTR)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 무세포 DNA 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 좌위는 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 히스톤 아세틸화는 히스톤 데아세틸라제의 존재 또는 수준에 의해 표시된다. 일부 실시양태에서, 히스톤 변형은 히스톤 2A(H2A), 히스톤 2B(H2B), 히스톤 3(H3) 및 히스톤 4(H4)로 구성된 군으로부터 선택된 히스톤의 변형이다. 일부 실시양태에서, 히스톤 메틸화는 H3 라이신 4의 메틸화(H3K4me2)이다. 일부 실시양태에서, 히스톤 아세틸화는 H4의 탈아세틸화이다. 일부 실시양태에서, miRNA는 miR-21, miR-126, mi-R142, mi-R146a, mi-R12a, mi-R181a, miR-29c, miR-29a, miR-29b, miR-101, miRNA-155 및 miR-148a로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 간질액, 질 세포, 질액, 자궁경부 세포, 협측 세포 또는 타액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈액은 모세혈관 혈액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 모세혈관 혈액은 40 마이크로리터 이하의 혈액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 상이한 대상체로부터 각각 수득된 2개 이상의 생물학적 샘플들을 풀링하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 경피 천자에 의해 채취되지 않았다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 대상체의 표피의 세포간 연접을 용해시키도록 구성된 장치를 이용함으로써 채취되었다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 유체의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되었다. 일부 실시양태에서, 장치는 백혈구 안정화제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플이 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취되도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 샘플 채취기는 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하도록 구성된다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체의 정맥 혈액으로부터 유래하지 않는다.

[0038] 본원에 개시된 양태는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플에서 표적 핵산의 상대적 양을 증가시키는 방법으로서, (a) 한 부위에서 경피 천자를 유도하여 샘플의 제1 분획 및 제2 분획을 생성하는 단계; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리는 단계; 및 (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 생물학적 샘플의 오염 또는 핵산 손상을 감소시키거나 제거하는 단계를 포함하고, 여기서 제1 분획은 제2 분획 중의 표적 핵산의 분획에 비해 더 낮은 표적 핵산의 분획을 포함하는 것인 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 경피 천자를 유도하기 전에 부위를 세정함으로써, 원치 않는 오염물질을 제거하거나 감소시키는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위를 둘러싸는 세포 또는 조직으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, DNA는 손상된다. 일부 경우, DNA는 손상되지 않는다. 일부 실시양태에서, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 실시양태에서, 오염은 상기 부위를 둘러싸는 조직으로부터의 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 손상은 생물학적 샘플 중의 비-아폽토시스성 DNA의 손상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체의 정맥 혈액으로부터 유래하지 않는다.

[0039] 본 개시의 다른 목적, 특징 및 장점은 하기 상세한 설명으로부터 해당 기술 분야의 당업자에게 자명하게 될 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 구체적인 실시예는 본 개시의 일부 실시양태를 나타내면서 예시적으로 제시되는 것이고 제한되는 것이 아는 것으로 이해해야 한다. 본 개시의 영역 내에 속하는 많은 변화예 및 변형예가 본 개시의 사상을 벗어나지 않으면서 이루어질 있고, 본 개시는 모든 이러한 변형을 포함한다. 더욱이, 한 실시양태의 양태는 다른 상이한 실시양태에서 이용될 수 있다.

[0040] **참고 인용**

[0041] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허출원이 참고 인용되어 있는 것으로 구체적 및 개별적으로 표시된 바와 같이 동일한 정도로 본원에 참고 인용되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 본원에 개시된 방법, 장치, 시스템 및 키트의 신규 특징은 첨부된 청구범위에 구체적으로 기재되어 있다. 본원

에 개시된 본 장치, 시스템 및 키트의 특징 및 장점은 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트의 원리가 이용되는 예시적 실시양태를 기술하는 하기 상세한 설명, 및 첨부된 도면을 참고함으로써 더 잘 이해할 수 있을 것이다.

도 1은 본원에 개시된 방법의 임의적 워크플로우(workflow)를 보여준다.

도 2는 본원에 개시된 방법 및 시스템의 구성요소가 어떻게 다양한 위치들 사이에 분포될 수 있거나(물리적 및/또는 전자적), 주로 한 물리적 위치에 집중될 수 있는지를 보여주는 도표를 보여준다.

도 3은 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석에 의해 생성된 초저 샘플 양으로부터의 삼염색체증 검출의 결과를 보여준다. 기준물 및 검사 샘플로부터의 21번 염색체의 표시에 대한 Z 점수가 도시되어 있다. 점선은 3의 Z 점수를 나타낸다. 3 이상의 Z 점수를 보여주는 검사 샘플은 이 샘플이 21번 염색체의 더 높은 표시를 함유하고 21번 염색체에 대한 삼염색체증을 가진 것으로 간주됨을 의미한다. 상기 샘플이 임산부로부터 유래한 경우, 검출된 과량의 21번 염색체는 태아에 의해 기여되므로, 태아가 21번 염색체에 대한 삼염색체증을 가진다는 결론이 내려진다.

도 4a는 원격 시스템 및 개체에 연결된 장치에 대한 과정 개요를 보여준다. 도 4b는 원격 시스템 및 개체에 연결된 장치에 대한 예시적 인터페이스를 보여준다.

도 5는 모바일 장치를 보여주고, 모바일 애플리케이션이 어떻게 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트와 연결되고 통신하고 이들로부터 유전 정보 및 다른 정보를 제공받도록 구성되는지를 보여준다. 도 5a는 모바일 애플리케이션이 제공하는 다양한 기능들을 보여준다. 도 5b는 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트의 사용을 통해 사용자를 안내하기 위한 단계별 상세설명문을 보여준다. 도 5c는 사용자가 검사를 시작하고 검사 결과를 보고 공유하고 타인과 상호작용할 수 있게 하는 인터페이스 요소를 보여준다. 도 5d는 검사의 상태를 모니터링하기 위한 인터페이스를 보여준다. 도 5e는 결과가 어떻게 공유될 수 있는지를 보여준다.

도 6은 출발 양으로서 8 내지 10 ㎖의 정맥 혈액을 사용하는 낮은 커버리지 전체 게놈 서열분석의 상이한 과정 단계에서 예상된 cfDNA 단편의 전형적인 양을 보여준다.

도 7은 초저 cfDNA 투입량을 사용하는 애플리케이션에 대한 민감도를 유의미하게 개선하는 데 있어서 서열분석 라이브러리 효율 증가의 중요성을 보여준다.

도 8a 내지 8c는 감소하는 양의 무세포(cfDNA) 투입으로부터 생성된 서열분석 라이브러리의 전기영동도를 보여준다. 무세포 DNA의 투입량은 도 8a의 20 게놈 당량(20 GE)부터 도 8c의 1 게놈 당량(1 GE)까지 다양하였다. 라이브러리의 전체 수율은 감소하지만, 어댑터 이량체의 양은 유의미하게 증가하지 않고 여전히 성공적인 서열 분석에 사용될 수 있는 충분한 양 및 질의 라이브러리가 존재한다.

도 9는 정맥 혈액으로부터 단리된 초저량의 cfDNA(10 게놈 당량)를 사용한 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석을 이용한 저분획 Y 염색체(2.5% 이상)의 검출을 보여준다.

도 10은 여성 및 남성 DNA의 모세혈관 혈액/혈장 혼합물로부터 단리된 초저 투입량의 cfDNA를 사용하는 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석을 이용한 저분율 Y 염색체(2.5% 이상)의 검출을 보여준다.

도 11은 페어링된 말단 서열분석 데이터를 기반으로, 모세혈관 혈액으로부터의 cfDNA와 정맥 혈액으로부터의 cfDNA 사이에 cfDNA 단편 크기 분포를 비교한 결과를 보여준다.

도 12는 임산부의 혈액/혈장으로부터 유래한 초저 투입량의 cfDNA를 사용한 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석을 이용한 태아 염색체 이수성(aneuploidy)의 검출을 보여준다. 비-삼염색체증 기준 샘플로부터의 초저 투입량의 cfDNA를 사용하여 21번 염색체 표시의 중앙값 및 중앙값 절대 편차를 결정하였다. 검사 샘플은 정상 태아(삼염색체증 없음) 또는 21번 염색체 삼염색체증을 가진 태아를 가진 임산부로부터의 초저량의 cfDNA(10 GE)이었다.

도 13은 임산부의 혈액/혈장으로부터 유래한 초저 투입량의 cfDNA를 사용한 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석을 이용한 태아 염색체 이수성의 검출을 보여준다. 삼염색체증 21 상태를 확인하는 샘플 내부 방법을 이용하여 기준 샘플 없이 분석을 수행하였다. 검사 샘플은 정상 태아(삼염색체증 없음) 또는 21번 염색체 삼염색체증을 가진 태아를 가진 임산부로부터의 초저량의 cfDNA(10 GE)이었다.

도 14a 내지 14c는 십(10) 게놈 당량이 검사될 때, 표준 라이브러리 제조 및 서열분석 방법이 저투입 최적화된 프로토콜에 비해 더 낮은 태아 무세포 DNA 표시를 야기함을 보여준다. 도 14a 및 14b는 표준 프로토콜 데이터 세트 대 최적화된 프로토콜 데이터 세트에 대한 빈(bin)당 중앙값 빈 카운트와 중앙값 절대 편차(MAD) 사이의

관계를 보여준다. 도 14c는 상이한 라이브러리 제조 효율을 위해 서열 리드와 게놈 당량을 상호연관시킬 수 있게 하는 매트릭스를 보여준다. 도 14d는 황색으로 표시된 최적화된 프로토콜 데이터 점, 및 청색으로 표시된 표준 프로토콜 점을 보여준다. 표준 프로토콜을 이용한 라이브러리 제조 및 서열분석은 본 개시의 최적화된 프로토콜에 비해 서열분석에 있어서 더 적은 유효 샘플링 게놈 당량을 제공한다(Life의 경우 중앙값 1.355, ILMN의 경우 중앙값 = 6.065). 도 14e는 표준 프로토콜 데이터가 우수한 특이성(0개의 거짓 양성, 100% 특이성)을 보였으나, 좋지 않은 민감도(2개의 거짓 음성, 50% 민감도)를 보였음을 보여준다. 도 14f는 표준 프로토콜 라이브러리 제조 및 서열분석으로부터 유도된 데이터가 많은 노이즈를 갖고 여성 태아에 비해 남성 태아를 가진 샘플의 용이한 식별을 허용하지 않음을 보여준다. 도 14g는 모든 샘플들에 대한 조합된 태아 분획 측정이 표준 프로토콜(좌측) 및 최적화된 프로토콜(우측)을 이용함으로써 21번 염색체에 의해 도입된 관측된 효과와 잘 상호관련되어 있었음을 보여준다. 도 14h는 표준 프로토콜에 대한 태아 성별에 대해 심지어 잘못된 결과를 야기하는 표준 프로토콜에 비해 최적화된 프로토콜로부터 더 높은 유효 카피 수가 생성되었음을 보여준다. 도 14i는 표준 프로토콜에 의해 분석된 4개의 샘플들로부터 작도된 실제 데이터와 함께, 표준 프로토콜의 좋지 않은 민감도(2개의 거짓 음성)에 대한 설명을 제공하고, 이때 적색 선은 90%의 추정 PCR 효율, 단지 5%의 라이브러리 효율 및 36M 서열 리드를 사용하여 50% 민감도를 시뮬레이션한다(도 14i).

도 15는 치료 전 및 후 진행된 암을 가진 환자로부터 검색된 모세혈관 혈액 기반 순환 무세포 DNA 서열분석 데이터를 보여준다.

도 16은 혈류 감염(BSI)을 가진 입원 환자로부터 수득된 환자 모세혈관 혈액에서 클렙시엘라 뉴모니아(*K. pneumoniae*)로부터의 순환 무세포 DNA를 검출하는 예상된 결과를 보여준다.

도 17a 및 17b는 cfDNA 단편의 서열분석에 의해 확인된, 정맥 혈액(도 17a) 및 모세혈관 혈액(도 17b)으로부터의 cfDNA의 크기 분포 프로파일을 보여준다.

도 18a는 정맥 및 모세혈관 혈액 cfDNA 단편 분포의 비교를 보여준다. 도 18b는 정맥 혈액 DNA와 표면 결합된 DNA 사이의 DNA 크기 분포의 비교를 보여준다. 도 18c는 손상된 세포를 가진 정맥 혈액 및 모세혈관 혈액으로부터의 cfDNA 사이의 DNA 단편 크기 분포를 보여준다. 도 18d는 손상된 세포를 가진 정맥 혈액 및 모세혈관 혈액으로부터의 cfDNA 사이의 DNA 단편 크기 분포를 보여주되, 500 bp 미만의 단편 크기를 확대하여 보여준다.

도 19는 DNA 단편 크기 분포의 차이에 대해 "닦아낸" 모세혈관 채혈 샘플과 "닦아내지 않은" 모세혈관 채혈 샘플을 비교한 결과를 보여준다.

도 20은 본원에 기재된 방법을 이용하여 100% 정확도로 정배수성 또는 삼염색체증으로서 분류된 대조군 정배수성 샘플 또는 대조군 삼염색체증 샘플의 Z 점수를 보여준다. 3.5 이상의 Z 점수는 삼염색체증으로서 분류되었고, 3.5 미만의 Z 점수를 가진 샘플은 정배수체로서 분류되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] **특정 용어**

[0044] 하기 설명은 본원에 개시된 방법, 시스템 및 키트의 이해를 돕기 위해 제공된다. 본원에서 사용된 용어들의 하기 설명은 이 용어들의 정의를 제한하기 위한 것이 아니다. 이 용어들은 본원 전체에 걸쳐 더 기재되고 예시된다.

[0045] 일반적으로, 본원에서 교환 가능하게 사용된 용어 "무세포 폴리뉴클레오타이드", "무세포 핵산"은 세포로부터 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산을 추출하지 않으면서 샘플로부터 단리될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 및 핵산을 지칭한다. 무세포 핵산은 DNA를 포함할 수 있다. 무세포 핵산은 RNA를 포함할 수 있다. 무세포 핵산은 세포막 내에 함유되지 않은, 즉 세포 구획 내에 캡슐화되지 않은 핵산이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 세포막에 의해 결합되지 않고 혈액 또는 다른 유체에서 순환하거나 존재하는 핵산이다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 이를 함유하는 생물학적 샘플의 채취 전 및/또는 채취 시 무세포이고, 샘플의 채취 시 또는 채취 후 조작을 포함하는, 사람에 의한 의도적인 또는 다른 방식의 샘플 조작의 결과로서 세포로부터 방출되지 않는다. 일부 경우, 무세포 핵산은 세포에서 생성되고, 예를 들면, 아폽토시스 및 비-아폽토시스성 세포 사멸, 괴사, 자가포식, (예를 들면, DNA/RNA-지단백질 복합체의) 자발적 방출, 분비 및/또는 유사분열 실패를 포함하는 생리학적 수단에 의해 세포로부터 방출된다. 일부 실시양태에서, 무세포 핵산은 생물학적 기작(예를 들면, 아폽토시스, 세포 분비, 소포 방출)에 의해 세포로부터 방출된 핵산을 포함한다. 추가적 또는 부가적인 실시양태에서, 무세포 핵산은 세포 또는 샘플 처리의 인간 조작(예를 들면, 세포막 파괴, 용해, 볼텍스, 전단 등)에 의해 세포로부

터 추출된 핵산이 아니다.

[0046] 일부 경우, 무세포 핵산은 무세포 태아 핵산이다. 일반적으로, 본원에서 사용된 용어 "무세포 태아 핵산"은 본원에 기재된 무세포 핵산을 지칭하고, 이때 무세포 핵산은 태아 DNA를 포함하는 세포로부터 유래한다. 임산부에서, 태반으로부터 유래한 무세포 DNA는 무세포 DNA의 총량의 상당 부분을 차지할 수 있다. 태반 DNA는 대다수의 경우 태아의 DNA와 매우 유사하기 때문에 종종 태아 DNA의 우수한 대용물이다. 융모막 융모 샘플링과 같은 적용은 이 사실을 활용하여 진단 적용을 확립하였다. 종종, 무세포 태아 핵산의 대부분은 태반 조직이 임신 대상체의 임신 기간 동안 규칙적으로 떨어져 나온 결과로서 모체 생물학적 샘플에서 발견된다. 종종, 떨어져 나온 태반 조직 내의 세포들의 대다수는 태아 DNA를 함유하는 세포이다. 태반으로부터 떨어져 나온 세포는 태아 핵산을 방출한다. 따라서, 일부 경우, 본원에 개시된 무세포 태아 핵산은 태반 세포로부터 방출된 핵산이다.

[0047] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포 핵산"은 세포에 함유되어 있거나 생물학적 샘플의 조작으로 인해 세포로부터 방출된 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 생물학적 샘플의 조작의 비제한적 예는 원심분리, 볼텍싱, 전단, 혼합, 용해, 및 생물학적 샘플이 수득될 때 생물학적 샘플에 존재하지 않는 시약(예를 들면, 세제, 완충제, 염, 효소)을 생물학적 샘플에 첨가하는 것을 포함한다. 일부 경우, 세포 핵산은 기계, 인간 또는 로봇에 의한 세포의 파괴 또는 용해로 인해 세포로부터 방출된 핵산이다. 일부 경우, 세포 핵산(세포에 의해 함유된 핵산)은 본원에 개시된 장치 및 방법에 의해 세포로부터 의도적으로 또는 비의도적으로 방출된다. 그러나, 이들은 본원에서 사용된 용어 "무세포 핵산"으로서 간주되지 않는다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산의 분석을 제공하고, 이 과정에서 세포 핵산도 분석한다.

[0048] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "바이오마커"는 일반적으로 대상체의 생물학 또는 병태의 임의의 마커를 지칭한다. 바이오마커는 질환 또는 병태의 지표 또는 결과일 수 있다. 바이오마커는 건강의 지표일 수 있다. 바이오마커는 유전자 이상 또는 유전된 병태의 지표일 수 있다. 바이오마커는 (예를 들면, 혈액과 같은 생물학적 유체에서 발견된) 순환 바이오마커일 수 있다. 바이오마커는 (예를 들면, 간 또는 골수와 같은 고형 장기에서 발견된) 조직 바이오마커일 수 있다. 바이오마커의 비제한적 예는 핵산, 후성 유전자 변형, 단백질, 펩타이드, 항체, 항체 단편, 지질, 지방산, 스테롤, 폴리사카라이드, 탄수화물, 바이러스 입자, 미생물 입자를 포함한다. 일부 경우, 바이오마커는 전체 세포 또는 세포 단편도 포함할 수 있다.

[0049] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "태그"는 일반적으로 관심 있는 핵산을 식별하거나, 검출하거나 단리하기 위해 사용될 수 있는 분자를 지칭한다. 달리 특정되어 있지 않은 한, 용어 "태그"는 다른 용어들, 예컨대, "표지", "어댑터", "올리고" 및 "바코드"와 교환 가능하게 사용될 수 있다. 그러나, 용어 "어댑터"는 태그로서 작용하지 않으면서 핵산의 두 말단들 또는 다수의 핵산들을 라이게이션하는 데 사용될 수 있다는 것을 인지해야 한다.

[0050] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전 정보"는 일반적으로 하나 이상의 핵산 서열을 지칭한다. 일부 경우, 유전 정보는 단일 뉴클레오타이드 또는 아미노산일 수 있다. 예를 들면, 유전 정보는 단일 뉴클레오타이드 다형성의 존재(또는 부재)일 수 있다. 달리 특정되어 있지 않은 한, 용어 "유전 정보"는 후성 유전자 변형 패턴, 유전자 발현 데이터 및 단백질 발현 데이터도 지칭할 수 있다. 일부 경우, 바이오마커의 존재, 부재 또는 양은 유전 정보를 제공한다. 예를 들면, 콜레스테롤 수준은 고콜레스테롤혈증의 유전 형태를 표시할 수 있다. 따라서, 유전 정보는 핵산 서열로 제한되어서는 안 된다.

[0051] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 돌연변이"는 일반적으로 게놈의 뉴클레오타이드 서열의 변경을 지칭한다. 유전자 돌연변이는 천연 변이 또는 대립유전자 차이와 상이하다. 유전자 돌연변이는 대상체의 종의 10% 미만에서 발견될 수 있다. 유전자 돌연변이는 대상체의 종의 5% 미만에서 확인될 수 있다. 유전자 돌연변이는 대상체의 종의 1% 미만에서 발견될 수 있다. 대상체 내의 유전자 돌연변이는 대상체에서 질환 또는 병태를 야기할 수 있다. 유전자 돌연변이는 단백질 코딩 서열의 프레임시프트를 초래할 수 있다. 유전자 돌연변이는 단백질 코딩 서열의 적어도 일부의 결실을 초래할 수 있다. 유전자 돌연변이는 단백질 코딩 서열에서 정지 코돈의 상실을 야기할 수 있다. 유전자 돌연변이는 단백질 코딩 서열에서 조기 정지 코돈을 초래할 수 있다. 유전자 돌연변이는 잘못 접힌 단백질을 코딩하는 서열을 야기할 수 있다. 유전자 돌연변이는 기능이상 단백질 또는 비기능적 단백질을 코딩하는 서열(예를 들면, 결합 또는 효소 활성의 상실)을 야기할 수 있다. 유전자 돌연변이는 과다활성 단백질(예를 들면, 증가된 결합 또는 효소 활성)을 코딩하는 서열을 초래할 수 있다. 유전자 돌연변이는 단일 뉴클레오타이드에 영향을 미칠 수 있다(예를 들면, 단일 뉴클레오타이드 변이 또는 단일 뉴클레오타이드 다형성). 유전자 돌연변이는 다수의 뉴클레오타이드들에 영향을 미칠 수 있다(예를 들면, 프레임시프트, 전위).

[0052] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "에 특이적인"은 서열 또는 바이오마커가 특이성을 보이는 것에서만 발견되는

서열 또는 바이오마커를 지칭한다. 예를 들면, 서열이 Y 염색체에 특이적인 경우, 이것은 이 서열이 Y 염색체에서만 발견되고 또 다른 염색체에서는 발견되지 않는다는 것을 의미한다.

[0053] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "정상 개체" 및 "정상 대상체"는 관심 있는 병태 또는 질환을 갖지 않은 대상체를 지칭한다. 예를 들면, 기재된 방법 또는 장치가 한 유형의 암을 검출하는 데 사용되는 경우, 정상 대상체는 그 유형의 암을 갖지 않는다. 정상 대상체는 암을 전혀 갖지 않을 수 있다. 일부 경우, 정상 대상체는 임의의 질환 또는 병태를 진단받지 않는다. 일부 경우, 정상 대상체는 공지된 유전자 돌연변이를 갖지 않는다. 일부 경우, 정상 대상체는 공지된 유전자 돌연변이를 갖지 않는 정상 대상체로부터 대상체를 식별시켜줄 검출 가능한 표현형을 초래하는 유전자 돌연변이를 갖지 않는다. 일부 경우, 정상 대상체는 병원체에 의해 감염되지 않는다. 일부 경우, 정상 대상체는 병원체에 의해 감염되나, 공지된 유전자 돌연변이를 갖지 않는다.

[0054] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "게놈 당량(genome equivalent)"은 일반적으로 모든 유전자들이 존재할 것임을 보장하기 위해 정제된 샘플에 존재할 필요가 있는 DNA의 양을 지칭한다.

[0055] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조직 특이적" 또는 어구 "조직에 특이적인"은 일반적으로 특정 조직에서 우세하게 발현되는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 종종, 본원에 개시된 방법, 시스템 및 키트는 무세포 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드를 사용한다. 본원에 기재된 무세포 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드는 그가 발현되는 조직 또는 장기가 손상되거나 병들 때 생물학적 유체에서 정량될 수 있는 수준으로 발현되는 폴리뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 생물학적 유체에서 본원에 개시된 무세포 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 조직 또는 장기가 손상되거나 병들 때 무세포 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 방출에 기인하고, 무세포 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 발현의 변화에 기인하지 않는다. 본원에 개시된 무세포 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 상승된 수준은 상응하는 조직 또는 장기의 손상을 표시할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 무세포 폴리뉴클레오타이드는 여러 조직들에서 발현/생성되나, 이 조직들 중 적어도 하나에서 조직 특이적 수준으로 발현/생성된다. 이 경우, 무세포 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 절대적 또는 상대적 양은 특정 조직 또는 장기의 손상 또는 질환, 또는 조직 또는 장기의 채취를 표시한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드는 조직 특이적 변형을 가진 핵산이다. 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드는 RNA를 포함할 수 있다. 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드는 DNA를 포함할 수 있다. 비제한적 예로써, 본원에 개시된 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드 또는 마커는 조직 특이적 메틸화 패턴을 가진 DNA 분자(예를 들면, 유전자 또는 비코딩 영역의 일부)를 포함한다. 다시 말해, 상기 폴리뉴클레오타이드 및 마커는 많은 조직들에서 유사하게 발현될 수 있거나, 심지어 대상체 전체에서 편재적으로 발현될 수 있으나, 변형은 조직 특이적이다. 일반적으로, 본원에 개시된 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 수준은 질환에 특이적이지 않다. 일반적으로, 본원에 개시된 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드는 질환 기작에 연루된 단백질을 코딩하지 않는다.

[0056] 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드는 대상체의 혈액에 존재하는 양보다 더 큰 양으로 관심 있는 조직에 존재한다. 일부 경우, RNA는 혈액 세포에 존재하는 양보다 더 큰 양으로 관심 있는 조직에 존재한다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드는 혈액 세포에 의해 발현되지 않는다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 혈액보다 조직에서 적어도 2배 더 크다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 혈액보다 조직에서 적어도 5배 더 크다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 혈액보다 조직에서 적어도 10배 더 크다.

[0057] 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 대상체의 임의의 다른 조직보다 해당 조직에서 적어도 3배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 임의의 다른 조직보다 해당 조직에서 적어도 5배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 임의의 다른 조직보다 해당 조직에서 적어도 10배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 임의의 다른 조직보다 2개 이하의 조직에서 적어도 3배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 임의의 다른 조직보다 2개 이하의 조직에서 적어도 5배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 임의의 다른 조직보다 2개 이하의 조직에서 적어도 10배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 임의의 다른 조직보다 3개 이하의 조직에서 적어도 3배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 임의의 다른 조직보다 3개 이하의 조직에서 적어도 5배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 임의의 다른 조직보다 3개 이하의 조직에서 적어도 10배 더 높다.

[0058] 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드는 표적 세포 유형에 특이적이다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 비-표적 세포 유형보다 표적 세포 유형에서 적어도 3배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 비-표적 다른 세포 유형보다 표적 세포 유형에서 적어도 5배 더 높다. 일부 경우,

조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 비-표적 세포 유형보다 표적 세포 유형에서 적어도 10배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 비-표적 세포 유형보다 2개 이하의 표적 세포 유형에서 적어도 3배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 비-표적 세포 유형보다 2개 이하의 표적 세포 유형에서 적어도 5배 더 높다. 일부 경우, RNA는 비-표적 세포 유형보다 2개 이하의 표적 세포 유형에서 적어도 10배 더 높은 수준으로 발현된다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 비-표적 세포 유형보다 3개 이하의 표적 세포 유형에서 적어도 3배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 비-표적 세포 유형보다 3개 이하의 표적 세포 유형에서 적어도 5배 더 높다. 일부 경우, 조직 특이적 폴리뉴클레오타이드의 존재는 비-표적 세포 유형보다 3개 이하의 표적 세포 유형에서 적어도 10배 더 높다.

[0059] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단리한다", "정제한다", "제거한다", "포획한다" 및 "분리한다"는, 달리 특정되어 있지 않은 한, 모두 교환 가능하게 사용될 수 있다.

[0060] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "진료소", "임상 환경", "실험실" 또는 "실험실 환경"은 병원, 진료소, 약국, 연구소, 병리학 실험실, 또는 생물학적 및/또는 환경적 샘플을 처리하고/하거나 분석하기 위해 훈련받은 개인을 고용한 다른 상업적 영리 환경을 지칭한다. 이 용어들은 현장 진료, 원거리 위치, 집, 학교, 및 다른 비영리 비-기관 환경과 대조된다.

[0061] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 '약'은 해당 수에 그 수의 10%를 더하거나 해당 수에서 그 수의 10%를 뺀 것을 의미한다. 범위의 문맥에서 사용될 때 용어 '약'은 그 범위에서 그의 하한 값의 10%를 빼고 그의 상한 값의 10%를 더한 것을 의미한다.

[0062] 본원에서 사용된 바와 같이, 문맥이 달리 명시하지 않은 한, 단수형 용어는 복수형을 포함한다. 예를 들면, 용어 "샘플"은 샘플의 혼합물을 비롯한 복수의 샘플들을 포함한다.

[0063] 용어 "정확도"는 본 명세서에 비추어 볼 때 그의 가장 넓은 정의를 제공받아야 한다. 그러나, 용어 "정확도"는 이진 분류 검사가 상태를 얼마나 정확히 식별하고 배제하는지의 통계학적 척도를 지칭하는 데 사용될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "정확도"는 검사된 모든 샘플들 중에서 진짜 결과(진짜 양성 및 진짜 음성)의 비율을 지칭할 수도 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "정확도"는 "랜드(Rand) 정확도" 또는 "랜드 지수"에 의해 결정된 정확도를 포괄할 수 있다.

[0064] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상동한", "상동성" 또는 "퍼센트 상동성"은 제2 아미노산 서열 또는 핵산 서열에 대한 제1 아미노산 서열 또는 핵산 서열의 서열 유사성을 기술한다. 일부 경우, 상동성은 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993]에 기재된 바와 같이 변형된, 문헌[Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990]에 기재된 식을 이용함으로써 측정될 수 있다. 이러한 식은 문헌[Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990]의 기본 국소 정렬 검색 수단(BLAST) 프로그램 내로 혼입된다. 서열의 퍼센트 상동성은 본원의 출원일 당시 가장 최신 버전의 BLAST를 이용함으로써 측정될 수 있다. 일부 경우, 2개 이상의 서열들은 하기 서열 비교 알고리즘들 중 하나를 이용함으로써 측정되거나, 수동 정렬 및 시각적 검사에 의해 측정될 때, 이 서열들이 비교 윈도우 또는 지정된 영역에 걸쳐 비교되고 최대 상응성을 위해 정렬될 때 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% 동일성, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 공유하는 경우 상동할 수 있다. 일부 경우, 2개 이상의 서열들은 이들이 최대 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% 동일성, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 공유하는 경우 상동할 수 있다. 바람직하게는, % 동일성 또는 상동성은 길이가 적어도 16개의 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역, 또는 일부 경우, 길이가 약 50개 내지 약 100개의 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역에 걸쳐 존재한다. 일부 경우, % 동일성 또는 상동성은 길이가 약 100개 내지 약 1000개의 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역에 걸쳐 존재한다. 일부 경우, 2개 이상의 서열들은 상동할 수 있고 서열에서 적어도 100개의 아미노산에 걸쳐 적어도 20% 동일성을 공유할 수 있다. 서열 비교를 위해, 일반적으로 한 서열은 검사 서열과 비교될 수 있는 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 이용할 때, 검사 서열 및 기준 서열을 컴퓨터에 입력할 수 있고, 필요한 경우, 후속 좌표를 지정할 수 있고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정할 수 있다. 스미쓰-워터만(Smith-Waterman) 정렬 알고리즘, 비터비(Viterbi), 베이지안(Bayesian), 히든 마코브(Hidden Markov) 등을 포함하나 이들로 제한되지 않는 임의의 적합한 알고리즘을 사용할 수 있다. 디폴트 프로그램 파라미터를 사용할 수 있거나, 대안적 파라미터를 지정할 수 있다. 그 다음, 서열 비교 알고리즘을 사용하여, 프로그램 파라미터를 기반으로 기준 서열에 대한 검사 서열의 퍼센트 서열 동일성을 계산할 수 있다. 임의의 적합한 알고리즘을 사용할 수 있고, 이로써 퍼센트 동일성이 계산된다. 일부 프로그램들은 예를 들면, 잔기가 동일한 정렬된 위치의 수를 정

렬된 위치의 총수로 나눔으로써 퍼센트 동일성을 계산한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "비교 윈도우"는 10개 내지 600개 위치일 수 있는 다수의 연속 또는 불연속 위치들 중 어느 한 위치의 분절의 지칭을 포함한다. 일부 경우, 비교 윈도우는 적어도 10개, 20개, 50개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개 또는 600개의 위치를 포함할 수 있다. 일부 경우, 비교 윈도우는 최대 10개, 20개, 50개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개 또는 600개의 위치를 포함할 수 있다. 일부 경우, 비교 윈도우는 2개의 서열들이 최적으로 정렬된 후 동일한 수의 연속 또는 불연속 위치들의 기준 서열과 비교될 수 있는 서열 내의 적어도 50개 내지 200개의 위치, 또는 적어도 100개 내지 적어도 150개의 위치를 포함할 수 있다. 비교를 위해 서열을 정렬하는 방법은 해당 기술 분야에서 잘 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예를 들면, 문헌[Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘, 문헌[Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘, 문헌[Pearson and Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)]의 유사성 검색 방법, 이들 알고리즘들의 전산 실행(위스콘신 제네틱스 소프트웨어 팩키지(Wisconsin Genetics Software Package) 내의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재의 제네틱스 컴퓨터 그룹), 또는 수동 정렬 및 시각적 검사(예를 들면, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)] 참조)에 의해 수행될 수 있다. 일부 경우, 비교 윈도우는 일차 서열에서 연속적인 위치, 또는 삼차 공간에서 인접하되 일차 서열에서 불연속적인 위치에서 총 정렬의 임의의 서브세트, 또는 정렬에서 1개 잔기부터 모든 잔기까지 임의의 다른 서브세트를 포함할 수 있다.

[0065] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 과다표시 및 과소표시는 일반적으로 표적 핵산의 샘플 표시와 대조군 표시 사이의 차이를 지칭한다. 표시는 대조군 표시보다 유의미하게 더 적을 수 있으므로 과소표시될 수 있다. 표시는 대조군 표시보다 유의미하게 더 많을 수 있으므로 과소표시될 수 있다. 유의성은 통계학적 유의성일 수 있다. 통계학적 유의성을 측정하는 방법은 해당 기술 분야에서 잘 공지되어 있다. 비제한적 예로써, 통계학적 유의성은 표준 양측 t-검정을 이용함으로써 수행되었다(*: $p<0.05$; **$p<0.01$).

[0066] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "클라우드"는 전자적 데이터의 공유된 또는 공유 가능한 저장을 의미한다. 클라우드는 전자적 데이터를 보관하고 전자적 데이터를 공유하고 전자적 데이터를 분석하는 데 사용될 수 있다.

[0067] 본원 전체에서 어구 "염색체에 상응하는 핵산" 및 "염색체에 상응하는 서열"이 언급되어 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 이 어구들은 "염색체에 상응하는 핵산"이 그 염색체에서 발견된 서열과 동일하거나 상동한 핵산 서열에 의해 표시됨을 전달하기 위한 것이다. 용어 "상동한"은 상기 설명에 기재되어 있다.

[0068] 본원에서 사용된 바와 같이, "단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)"은 동일한 종의 2개의 구성원들의 게놈들 사이에 상이할 수 있는 단일 뉴클레오타이드를 지칭한다. 이 용어의 사용은 각각의 변이체가 일어나는 빈도에 대한 어떠한 제한도 내포하지 않아야 한다. 일부 경우, SNP는 일대립유전자, 이대립유전자, 삼대립유전자 또는 사대립유전자 SNP이다.

[0069] 본원에서 사용된 바와 같이, "삽입결실"은 동일한 종의 2개의 구성원들의 게놈 사이에 상이할 수 있는 핵염기의 삽입 또는 결실을 지칭한다. 일부 경우, 삽입결실은 일대립유전자, 이대립유전자, 삼대립유전자 또는 사대립유전자 삽입결실이다. 일부 경우, 삽입은 1개의 핵염기, 2개의 핵염기, 3개의 핵염기, 4개의 핵염기, 5개의 핵염기 또는 그 이상을 포함한다.

[0070] 본원 전체에 걸쳐, 염색체 위치가 언급되어 있다. 이 위치 번호는 게놈 빌드(Genome Build) hg38(UCSC) 및 GRCh38(NCBI)에 기반한다. 게놈 빌드는 해당 기술 분야에서 기준 게놈 또는 기준 조립체로서 지칭될 수도 있다. 이것은 다수의 대상체들로부터 유래할 수 있다. 다수의 기준 조립체들이 입수될 수 있고, 더 많은 기준 조립체들이 시간에 따라 생성될 수 있다는 것이 이해된다. 그러나, 해당 기술 분야에서 당업자는 또 다른 게놈 빌드 또는 기준 게놈에서 본원에서 제공된 상대적 위치를 확인할 수 있을 것이다.

[0071] **상세한 설명**

[0072] 유전자 검사는 전통적으로 실험실 또는 임상 환경에서 수행된다. 그러나, 유전자 검사가 유용할 많은 경우들에서, 실험실 또는 진료소에의 접근이 이용 불가능하거나 비현실적이다. 순환 종양 DNA의 분석 또는 태아 DNA 검사와 같은 매우 복잡한 검사는 이러한 검사에의 제한된 접근(예를 들면, 정맥절개술에 대한 요구, 시간, 요구된 예약, 진료소/실험실까지의 거리) 및 이러한 검사의 비용(예를 들면, 정맥절개술 수행, 밀리리터의 샘플의 처리, 샘플 튜브 및 시약, 운반, 특히 냉장 운반의 비용) 때문에 여전히 드물다. 따라서, 필요 현장(예를 들면, 실험실 및 진료소로부터 멀리 떨어진 위치)에서 실시될 수 있는 유전자 검사가 바람직하다. 필요 현장(예를 들면, 집, 학교, 농장)에서 실시될 유전자 검사는 바람직하게는 비용 효과적이고 훈련받지 않은 개체가 수행할 정

도로 단순하다. 필요 현장에서의 유전자 검사는 바람직하게는 소량의 생물학적 샘플만을 요구한다. 전통적으로, 유전자 검사는 분석될 충분한 DNA를 함유하는 수 밀리리터의 혈액을 수득하기 위해 정맥 채혈(정맥절개술)을 요구한다. 그러나, 정맥절개술은 필요 현장에서 실용적이지 않다. 이상적으로, 유전자 검사는 예를 들면, 경피 천자 장치 또는 다른 수단을 통해 모세혈관 혈액을 회수함으로써 달성된 양의 혈액만을 요구할 것이다. 이것은 유전자 검사를 위해 필요 현장 장치 및 방법이 샘플의 초저 투입 및 검출하고자 하는 표적 분자의 낮은 존재도에 의해 작동하도록 디자인될 필요가 있다는 것을 의미한다.

[0073] 유전자 검사도 전통적으로 경피 천자를 요구하였다. 그러나, 샘플 부피와 관계없이 경피 천자는 대상체에게 불편함, 불쾌함 및 일부 경우 통증을 야기할 수 있다. 따라서, 경피 천자에 대한 필요성을 없애는 유전자 검사 장치가 바람직하다.

[0074] 샘플의 초저 투입을 수용하는 것 이외에, 순환 무세포 핵산(DNA 및 RNA), 예를 들면, 순환 무세포 태아 DNA, 순환 종양 DNA, 이식된 기증자 장기로부터의 순환 DNA, 및 건강 관련 문제, 질환 진행 또는 치료 반응의 일부로서 특정 조직으로부터 방출된 순환 DNA를 분석할 수 있는 유전자 검사를 갖는 것이 바람직하다. 그러나, 순환 무세포 핵산의 분석은 그의 짧은 반감기 및 그에 따른 낮은 존재도로 인해 어렵다. 또한, 혈액 중의 순환 무세포 핵산은 백혈구 용해를 피하기 위해 샘플을 조심스럽게 다루지 않는 경우 백혈구로부터 방출된 DNA에 의해 희석될 수 있다. 백혈구 DNA는 순환 무세포 핵산의 검출 동안 배경 노이즈를 생성하여, 어세이 민감도 및 특이성을 감소시킨다.

[0075] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 작은 샘플 부피(예를 들면, 1 ㎖ 미만)의 부드럽고 효율적인 처리를, 순환 무세포 DNA(cfDNA)의 고도로 단편화된 성질을 이용하는 고유 표적 영역 선택 및 어세이 디자인과 조합함으로써 이 과제를 극복한다. 예를 들면, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 1회 손가락 찌르기로부터 신뢰할만한 유전 정보를 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 신뢰할만한 유전 정보는 모세혈관 혈액의 초기 관류물이 버려진 후 1회 손가락 찌르기로부터 수득된다. 다른 실시양태에서, 상기 장치, 시스템, 키트 및 방법은 신뢰할만한 유전 정보를 함유하는 유체가 경피 천자를 필요로 하지 않으면서 피부로부터 추출될 수 있도록, 예를 들면, 피부의 밀착 연접을 용해시키기 위해 경피 천자를 필요로 하지 않으면서 신뢰할만한 유전 정보를 제공한다.

[0076] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 표적 유전자가 순환계에서 단편화될 때 표적 영역이 물리적으로 분리될 가능성이 높을 정도로 충분히 멀리 떨어져 이격되어 있는 다수의 표적 영역들을 표적 유전자를 따라 분석하는 것을 제공한다. 따라서, 유전자 검사에서 전통적으로 분석되는 개별 긴 DNA 단편의 경우 통계학적 샘플링의 전술된 한계가 존재하지만, 샘플링 통계는 cfDNA 단편에 유리하게 변화한다. 모세혈관 혈액 샘플에 존재하는 단지 1 게놈 당량의 응집체가 있을 수 있지만, 많은 개별 cfDNA 단편들이 존재한다. 결과적으로, 초저 투입량으로부터 민감한 증폭이 달성될 수 있다.

[0077] 일례로서, 게놈 영역을 따라 20개의 표적 영역들이 존재하고 영역이 단편화될 때 이들이 독립적으로 분석되고 검출될 수 있을 정도로 충분히 멀리 떨어져 이격되어 있는 경우, 모든 샘플들의 99%에서 적어도 1개의 표적 영역을 갖기 위해 요구된 투입 부피는 140 마이크로리터(㎕)에서 25 ㎕로 변화하여, 민감도를 유의미하게 증가시킨다. 일부 경우, 표적 영역은 동일한 서열 또는 유사한 서열을 함유한다. 이 표적 영역은 카피로서 지칭될 수 있다.

[0078] 다른 경우, 표적 영역은 유사한 서열을 공유하지 않을 수 있으나, 유사한 후성적 상태와 같은 또 다른 특성을 공유할 수 있다. 예를 들면, 표적 영역들은 상이한 서열을 가질 수 있으나, 모두 과다메틸화된다. 영역들 사이의 유사성에 대한 기준과 관계없이, 이들은 많은 순환 cfDNA 단편들을 생성하는 순환 무세포 DNA의 단편화 패턴을 활용하기에 적절하게 이격되고, 이 순환 cfDNA 단편들 중 적어도 하나는 작은 부피에서 검출될 수 있다. 비제한적 예로서, 별개의 cfDNA 단편들에 존재할 정도로 서로 충분히 떨어져 있고 대상체가 암을 가질 때 모두 과다메틸화되어 있는 선택된 표적 영역은 중아황산염 서열분석에 의해 검출될 수 있다. 작은 샘플 부피(예를 들면, 혈액의 손가락 찌르기)에서, 이 단편들 모두가 존재할 가능성(이것은 단편화되지 않은 DNA와 동등함)은 낮으나, 적어도 하나의 단편이 존재할 가능성은 높고 암은 검출될 수 있다.

[0079] 다른 경우, 표적 영역은 유사한 서열을 함유하지 않을 수 있고 유사한 후성적 상태를 함유하지 않을 수 있다. 이 경우, 검출은 여러 상이한 표적 영역들을 검출하기 위해 다수의 프라이머 세트들 또는 라이브러리 제조 후 보편적 프라이머를 사용한 증폭을 요구할 수 있다. 비제한적 예로써, *RHD* 음성 임산부에서 태아 *RHD* 유전자의 검출은 다수의 프라이머 세트들을 사용하여 무세포 태아 DNA 단편에서 *RHD* 유전자의 다수의 상이한 엑손들을 검출함으로써, 손가락 찌르기 양의 혈액으로부터 달성될 수 있다. 민감도는 *RHD* 유전자에서 물리적으로 떨어져 있

으므로 상이한 무세포 DNA 단편에 존재할 가능성이 높은 영역을 증폭하는 프라이머를 선택함으로써 증가될 수 있다. *RHD* 음성 임산부에서 태아 *RHD* 유전자를 검출하는 것은 태아의 혈액에 대한 항체를 가진 임산부에 의한 신생아의 용혈 질환을 예방하는 데 중요하다. *RHD* 검사는 적절한 신뢰할 수 있는 결과를 달성하기 위해 전체 채혈(8 밀리리터의 혈액)로부터 오늘날 현재 수행되고 있다. 이 부피는 전체 *RHD* 유전자가 샘플에 존재할 가능성에 기반하기 때문에 신뢰할 수 있는 결과를 달성하기 위해 필요한 것으로 생각된다. 이 가정에 기반할 때, 손가락 찌르기 양의 혈액에서 전체 *RHD* 유전자를 획득할 가능성은 낮고 쉽게 거짓 음성 결과를 유발할 것이다.

[0080] 표적 영역이 어떻게 선택되는지와 관계없이, 이 영역은 증폭 또는 검출이 무세포 단편화된 DNA에 대해 수행될 때 개별 바이오마커로서 샘플에 존재한다. 표적 영역을 함유하는 단편의 농도는 상응하는 단편화되지 않은 DNA 또는 군으로서 어세이될 수 없는 단편보다 더 크다. 따라서, 단편화되지 않은 DNA, 또는 표적 영역의 1개의 카피에 대한 어세이로부터 수득할 신호보다 표적 영역으로부터의 신호가 더 많을 것이다. 반복되지 않거나 또 다른 영역과 일부 공통성을 공유하지 않는 비-표적 영역보다 초저 부피의 샘플에 존재하는 표적 영역을 검출할 가능성이 훨씬 더 높을 것이다. 다수의 DNA 단편들에서 다수의 표적 영역들을 어세이함으로써, 어세이 민감도는 전통적인 검사에 비해 증가된다. 혈액은 무세포 핵산의 신뢰할 수 있는 공급원이다. 혈액으로부터 무세포 핵산을 분석하는 본원에 개시된 방법은 무세포 핵산을 함유하는 혈장 또는 혈청 분획을 단리하는 단계를 포함한다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 필요 현장에서 혈액 샘플을 온화하게 처리할 수 있게 한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 혈액의 초기 관류물이 버려진 후에만 경피 전차(예를 들면, 손가락 찌르기) 후 혈액 샘플을 수득함으로써, 존재한다 하더라도 경피 천자에 의해 야기된 손상된 백혈구를 제거할 수 있게 한다. 다른 실시양태에서, 방법, 장치 및 시스템은 경피 천자를 필요로 하지 않으면서, 피부의 밀착 연접의 용해를 허용함으로써, 피부로부터 모세혈관 혈액과 동일한 무세포 핵산을 함유하는 유체를 추출할 수 있게 한다. 이 방법, 시스템 및 장치는 백혈구 용해를 피할 수 있거나, 방지할 수 있거나 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플이 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취될 수 있게 한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면을 세정하는 단계는 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 제공된다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질의 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다.

[0081] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 필요 현장에서 혈액 샘플의 신속한 처리를 가능하게 한다. 이것은 혈액 세포 용해로 이어질 수 있는 샘플의 연장된 저장 및 운반을 피한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치는 세포 용해를 피하거나, 감소시키거나 방지하기 위해 통합된 분리, 예를 들면, 여과를 통한 혈장의 즉시 단리를 수행한다. cfDNA로부터의 세포의 즉시 분리는 시약(예를 들면, 프로브, 프라이머, 항체) 또는 검출 방법이 높은 특이성을 제공하지 않을 때 바람직할 수 있다. 일부 경우, 임의의 백혈구 용해를 피하기 위한 노력으로 전혈을 사용하여 방법을 수행한다. 상대적으로 더 높은 특이성이 달성될 수 있을 때, 전혈로부터의 분석은 더 바람직할 수 있다.

[0082] 작은 부피의 샘플만을 요구한다는 점 이외에, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 하기 이유로 매우 바람직하다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 일반적으로 기술적 훈련을 거의 내지 전혀 요구하지 않는다. 따라서, 유전자 검사를 수행하는 비용은 훈련받은 개인에 의해 수행된 검사의 비용에 비해 감소되고, 검사는 훈련받은 개인에 접근하지 않은 대상체에 의해 이용될 수 있다. 나아가, 결과는 수분 이내(예를 들면, 1시간 미만)에 수득될 수 있다. 이것은 감염에 대해 검사할 때 특히 중요할 수 있다. 감염에 대한 검사 양성을 나타내는 개체 또는 동물은 격리되고 신속히 치료되어, 감염의 전파를 방지할 수 있다. 더욱이, 결과는 비공개로 수득될 수 있다. 일부 경우, 검사받은 환자만이 수득된 유전 정보에 접근할 수 있다. 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 이들을 원거리 위치에서 적합하고 접근 가능하게 만들 정도로 일반적으로 경량이고 소형이다. 따라서, 실험실 또는 임상 환경에 방문하는 것이 비현실적이거나 불편한 경우 이들은 집, 학교, 직장, 전쟁터, 농장 또는 임의의 다른 장소에서 사용될 수 있다. 나아가, 샘플이 현장 진료에서 분석될 수 있기 때문에, 샘플은 저장되거나 운반될 필요가 없으므로, 샘플 분해 및 식별오류(예를 들면, 샘플 바뀜)의 위험을 감소시킨다.

[0083] 도 1은 본원에 개시된 방법, 장치 및 시스템이 따를 수 있는 다양한 경로들을 가진 일반적인 순서도를 보여준다. 먼저, 단계(110)에서 샘플을 수득한다. 샘플로부터 유용한 정보를 모으기 위해 최소량의 샘플을 수득해야 한다. 샘플은 경피 천자에 의해 수득될 수 있다. 샘플은 경피 천자를 필요로 하지 않으면서 유용한 유전

정보를 추출하는 수단, 예컨대, 본원에 기재된 수단에 의해 수득될 수 있다. 샘플은 본원에 개시된 생물학적 샘플일 수 있다. 샘플은 미정제 비처리된 샘플(예를 들면, 전혈, 간질액)일 수 있다. 샘플은 처리된 샘플(예를 들면, 혈장)일 수 있다. 샘플의 양은 샘플 유형에 기반할 가능성이 있다. 전형적으로, 샘플은 증폭될 수 있고/있거나 검출될 수 있는 피분석물을 생성하기 위해 단계(120)에서 샘플을 처리하거나 피분석물(예를 들면, 핵산 또는 다른 바이오마커)을 샘플로부터 정제한다. 처리는 샘플의 여과, 피분석물을 함유하는 샘플의 성분의 결합, 피분석물의 결합, 피분석물의 안정화, 피분석물의 정제 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 샘플 성분의 비제한적 예는 세포, 바이러스 입자, 세균 입자, 엑소좀 및 뉴클레오좀이다. 일부 경우, 피분석물은 핵산이고 단계(130)에서 분석을 위해 앰플리콘을 생성하도록 증폭된다. 다른 경우, 피분석물은 핵산일 수 있거나 핵산이 아닐 수 있으나, 관계없이 증폭되지 않는다. 피분석물 또는 앰플리콘은 검출 및 분석 전에 임의적으로 변형된다(140). 일부 경우, 변형은 증폭 동안 일어난다(나타내지 않음). 예를 들면, 피분석물 또는 앰플리콘은 태깅될 수 있거나 표지화될 수 있다. 검출은 서열분석, 표적 특이적 프로브, 등온 증폭 및 검출 방법, 정량적 PCR, 또는 단일 분자 검출을 포함할 수 있다. 도 1은 본원에 개시된 장치 및 방법의 넓은 개요로서 제공되나, 본원에 개시된 장치 및 방법은 도 1에 의해 제한되지 않는다. 장치 및 방법은 각각 도 1에 표시되지 않은 추가 성분 및 단계를 포함할 수 있다.

[0084] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 유전 정보가 사용자에게 비공개로 유지될 수 있기 때문에 바람직하다. 실제로, 장치의 이용조차도 비공개로 유지될 수 있다. 대안적으로, 장치, 시스템, 키트 및 방법은 다른 사람들과 정보를 공유하도록 구성되거나 정보를 공유하도록 사용자에 의해 용이하게 맞추어질 수 있다(예를 들면, 블루투쓰 신호를 켬). 예를 들면, 정보는 간호사 또는 의사와 용이하게 공유될 수 있다. 일부 경우, 장치 또는 시스템은 보안 포탈 또는 응용 프로그래밍 인터페이스(API)를 통해 기관 또는 병원의 의사 또는 직원에게 시험 결과를 보낼/공유할 수 있다. 일부 경우, 사용자는 결과를 받은 후 의사와 개인적으로 정보를 공유하는 것을 선택할 수 있다. 일부 경우, 정보는 심지어 실시간으로 공유될 수 있다. 이 종류의 통신은 예를 들면, 군인 책무, 고용 의무, 이동 정책 또는 건강 문제에 의해 떨어져 있는 연인 또는 가족을 위해 바람직할 것이다.

[0085] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법에 대한 수많은 적용이 있다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 의학적 병태를 진단하고 모니터링할 수 있게 한다. 의학적 병태의 비제한적 예는 자가면역 병태, 대사 병태, 암 및 신경학적 병태를 포함한다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 미생물군집(microbiome) 검사, 적절한 개인 의학적 용량의 결정 및/또는 약물 또는 이의 용량에 대한 반응의 검출을 비롯한 맞춤형 의약을 가능하게 한다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 병원체에 의한 감염, 및/또는 감염을 치료하기 위해 사용될 수 있는 약물에 대한 대상체의 내성의 검출을 제공한다. 거의 모든 경우, 기술적 훈련 또는 큰 비싼 실험실 장비에 대한 필요성이 거의 내지 전혀 없다.

[0086] 도 1은 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 또는 방법을 이용하는 자가 대상체로부터의 마이크로부피(예를 들면, 밀리리터 미만)의 생물학적 샘플로 시작할 수 있음을 보여준다. 생물학적 샘플은 일반적으로 5000 게놈 당량 미만의 무세포 DNA를 함유한다. 샘플은 분석되기 위해 여과, 안정화, 정제 또는 이들의 조합에 의해 처리될 수 있다. 일부 경우, 샘플은 여과, 안정화 또는 정제와 같은 처리를 요구하지 않는다. 샘플 중의 여러 상이한 피분석물들은 정보, 예를 들면, 무세포 DNA, 무세포 RNA, 미세소포 관련 핵산, 및 무세포 DNA에 대한 후성 유전자적 마커에 대한 정보를 제공할 수 있다. 이 피분석물들 중 하나 이상은 분석될 수 있다. 일부 경우, 피분석물은 증폭되지 않는다. 일부 경우, 피분석물은 피분석물의 증폭 또는 변형 없이 서열분석된다. 일부 경우, 피분석물은 피분석물의 앰플리콘을 생성하기 위해 증폭된다(예를 들면, 중합효소 매개 핵산 증폭). 일부 경우, 앰플리콘은 서열분석된다. 일부 경우, 앰플리콘은 추가 제조 또는 변형 없이 서열분석된다. 일부 경우, 앰플리콘 또는 표적 영역 내의 특징, 예컨대, 다형성, 돌연변이, 후성 유전자적 마크 또는 이상은 추가 분석에 사용된다.

[0087] 일부 경우, 피분석물, 앰플리콘 또는 이들의 조합은 피분석물을 표지, 바코드 또는 태그로 표지화함으로써 라이브러리로 전환된다. 달리 특정되어 있지 않은 한, 용어 표지, 바코드 및 태그는 본원에서 교환 가능하게 사용된다. 일부 경우, 라이브러리 구성원은 증폭된 라이브러리 구성원을 생성하기 위해 증폭된다. 일부 경우, 라이브러리 구성원은 전체 게놈 증폭된다. 일부 경우, 라이브러리 구성원은 전체 게놈 증폭의 생성물이다. 일부 경우, 라이브러리 구성원은 증폭된 라이브러리 구성원을 생성하기 위해 증폭되지 않는다. 일부 경우, 라이브러리 구성원은 전체 게놈 증폭되지 않는다. 일부 경우, 라이브러리 구성원은 전체 게놈 증폭의 생성물이 아니다. 일부 경우, 라이브러리 구성원은 포획된 라이브러리 구성원을 생성하기 위해 포획된다. 일부 경우, 라이브러리 구성원은 포획되고 증폭된 라이브러리 구성원을 생성하기 위해 포획되고 증폭된다. 일부 경우, 라이브러리 구성원은 서열분석된다. 일부 경우, 증폭된 라이브러리 구성원은 서열분석된다. 일부 경우, 포획된 라이브러리 구성원은

서열분석된다. 일부 경우, 포획되고 증폭된 라이브러리 구성원은 서열분석된다. 일부 경우, 라이브러리 구성원은 서열분석되지 않는다. 예를 들면, 라이브러리 구성원은 프로브의 어레이 또는 단일 분자 카운팅에 의해 검출될 수 있거나 정량될 수 있다. 일부 경우, 증폭된 라이브러리 구성원은 프로브의 어레이 또는 단일 분자 카운팅에 의해 검출되거나 증폭된다. 일부 경우, 포획된 라이브러리 구성원은 프로브의 어레이 또는 단일 분자 카운팅에 의해 검출되거나 정량된다. 일부 경우, 포획되고 증폭된 라이브러리 구성원은 프로브의 어레이 또는 단일 분자 카운팅에 의해 검출되거나 정량된다.

[0088] 도 2는 본원에 개시된 방법, 시스템, 장치 및 키트가 여러 위치들 사이에 분포될 수 있음을 보여준다. 예를 들면, 본원에 개시된 방법은 집 환경 또는 다른 필요 현장에서 전체적으로 수행될 수 있다. 이것은 실험실, 핵산 처리 및 분석 장비, 또는 기술자 또는 의사에 (예를 들면, 물리적으로 또는 재정적으로) 접근하지 못하는 대상체에게 특히 중요하다. 일부 경우, 샘플은 실험실(예를 들면, 요구된 실험실 장비)에서 처리될 수 있다. 그러나, 본원에 개시된 방법, 시스템, 장치 및 키트는 여전히 집에서의 샘플 채취 및 보고를 가능하게 할 수 있다. 예를 들면, 샘플은 집에서 채취될 수 있고 처리가 일어나는 실험실로 운반될 수 있고, 결과는 전자적 통신을 통해 집에 있는 대상체에게 전달된다. 따라서, 실험실에서의 처리가 요구될 때조차도, 본원에 개시된 방법, 시스템, 장치 및 키트는 그의 샘플을 운반/수송할 수단을 가질 것만을 요구하기 때문에 여전히 사용자에게 편리하다. 일부 경우, 검사 결과를 대상체에게 통신할 수 있는 클라우드 또는 서버에서 데이터 처리가 일어나는 것이 편리하다. 일부 경우, 데이터 처리가 실험실에서 일어나고 결과가 클라우드 또는 인터넷 서버에 의존하지 않으면서 집에 있는 대상체에게 보고되는 것이 편리하다.

[0089] **방법**

[0090] 본원은 생물학적 샘플을 수득하는 단계 및 그의 성분을 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 본원에 기재된 장치, 시스템 또는 키트를 사용함으로써 수행된다. 일부 경우, 성분은 무세포 핵산, 예컨대, 무세포 DNA 또는 무세포 RNA를 포함한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 모체 혈액, 예컨대, 어머니로부터 수득된 모세혈관 혈액을 포함한다. 일부 경우, 검출된 성분은 모체 혈액의 태아 무세포 DNA 성분이다.

[0091] 생물학적 샘플을 수득하는 단계는 임상 또는 실험실 환경, 예컨대, 비제한적 예로써, 의료 진료소, 병원, 과학 연구 실험실, 병리학 실험실 또는 임상 검사 실험실에서 일어날 수 있다. 대안적으로, 수득 단계는 임상 또는 실험실 환경으로부터 멀리 떨어진 위치, 예컨대, 비제한적 예로써, 집, 가족 계획 센터, 직장, 학교, 농장 또는 전쟁터에서 일어날 수 있다. 일부 경우, 수득 단계는 본원에 기재된 장치 또는 시스템을 이용함으로써 수행된다.

[0092] 일부 경우, 성분의 검출은 생물학적 샘플을 분석하여 생물학적 샘플 중의 성분(예를 들면, 바이오마커, 무세포 DNA)의 존재, 부재 또는 수준을 검출함으로써 수행된다. 일부 경우, 방법은 적어도 하나의 대조군 대상체에서의 관심 있는 게놈 영역의 표시에 비해 성분에서의 관심 있는 게놈 영역의 과다표시 또는 과소표시가 있는지를 확인하는 단계를 포함한다.

[0093] 본원에 개시된 방법은 채취가 임상 환경에서 일어나는지 아니면 원거리 위치에서 일어나는지와 관계없이 상대적으로 작은 부피의 생물학적 샘플을 수득하고 분석하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 검출은 임상 또는 실험실 환경에서 일어난다. 다른 경우, 검출은 임상 또는 실험실 환경으로부터 멀리 떨어진 위치에서 일어난다. 본원에 개시된 방법의 다른 단계, 예를 들면, 핵산의 증폭은 임상/실험실 환경 또는 원거리 위치에서 일어날 수 있다. 일부 경우, 상기 방법은 대상체에 의해 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 방법을 수행하는 데 필요한 임의의 기술적 훈련을 받지 않은 사용자에 의해 수행된다.

[0094] 샘플의 수득

[0095] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 본원에 기재된 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함한다. 샘플은 직접 수득될 수 있다(예를 들면, 의사는 대상체로부터 혈액 샘플을 채취한다). 샘플은 간접적으로(예를 들면, 의사 또는 대상체로부터 기술자에 의한 운반을 통해) 수득될 수 있다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 생물학적 유체이다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 면봉 샘플(예를 들면, 협측 면봉, 질 및/또는 자궁경부 면봉)이다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 전혈, 혈장, 혈청, 소변, 타액, 간질액 또는 질액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 손가락 찌르기를 통해 혈액 샘플을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 1회 손가락 찌르기를 통해 혈액 샘플을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 1회 이하의 손가락 찌르기로 혈액 샘플을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 혈액 샘플은 혈액의 초기 관류

물이 버려진 후에만 손가락 찌르기를 통해 수득된다(예를 들면, 손가락을 찌르고, 초기 혈액 샘플을 깨끗이 닦아내고, 두 번째 혈액 샘플을 채취한다). 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플은 (a) 제1 경피 천자를 유도하여 생물학적 샘플의 제1 분획을 생성하고; (b) 생물학적 샘플의 제1 분획을 버리고; (c) 생물학적 샘플의 제2 분획을 채취함으로써, 백혈구 용해로 인한 생물학적 샘플의 오염을 감소시키거나 제거하는 과정에 의해 채취된다. 일부 실시양태에서, 경피 천자 부위(예를 들면, 피부)의 표면은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하기 전에 세정된다. 일부 경우, 세정 단계는 원치 않는 오염물질을 제거 또는 감소하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 원치 않는 오염물질은 경피 천자 부위로부터의 DNA를 포함한다. 일부 경우, 경피 천자 부위는 손가락의 피부이다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 모세혈관 혈액(예를 들면, 손가락 또는 피부의 찌르기로부터 수득된 혈액)을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 원하는 부피의 혈액을 수득하기 위해 찌르기로부터 혈액을 짜내거나 착유하는 단계를 포함한다. 다른 경우, 방법은 원하는 부피의 혈액을 수득하기 위해 찌르기로부터 혈액을 짜내거나 착유하는 단계를 포함하지 않는다. 손가락 찌르기가 모세혈관 혈액을 수득하는 일반적인 방법이지만, 신체의 다른 위치, 예를 들면, 발가락, 발뒤꿈치, 팔, 손바닥, 어깨, 귓볼도 적합할 것이다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 정맥절개술을 이용하지 않으면서 혈액 샘플을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 모세혈관 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 정맥 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 정맥 혈액(예를 들면, 정맥으로부터 수득된 혈액)을 수득하는 단계를 포함하지 않는다. 일부 경우, 방법은 생검을 통해 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 액체 생검을 통해 생물학적 유체를 수득하는 단계를 포함한다.

[0096] 일부 경우, 본원에 기재된 방법, 시스템 및 장치는 경피 천자를 필요로 하지 않으면서 신뢰할만한 유전 정보를 함유하는 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체의 피부의 밀착 연접은 용해됨으로써, 세포간 공간 내로 밀어 넣어질 수 있고 모세혈관에서 재흡수될 수 있으며 경피 천자를 이용하지 않으면서 침투 가능한 피부로부터 추출될 수 있는 유체가 침투할 수 있게 된다.

[0097] 일부 경우, 방법은 단편화된 핵산을 가진 샘플을 수득하는 단계를 포함한다. 샘플은 핵산의 무결성을 보존하는 데 도움이 되지 않는 조건에 노출되었을 수 있다. 비제한적 예로써, 샘플은 법의학 샘플일 수 있다. 법의학 샘플은 종종 오염되고 공기, 열, 광 등에 노출된다. 샘플은 냉동되고 해동되었을 수 있다. 샘플은 핵산을 분해하는 화학물질 또는 효소에 노출되었을 수 있다. 일부 경우, 방법은 단편화된 핵산을 포함하는 조직 샘플을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 핵산을 포함하는 조직 샘플을 수득하는 단계 및 핵산을 단편화하여 단편화된 핵산을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 조직 샘플은 냉동된 샘플이다. 일부 경우, 샘플은 보존된 샘플이다. 일부 경우, 조직 샘플은 고정된(예를 들면, 포름알데하이드에 의해 고정된) 샘플이다. 방법은 샘플로부터 (단편화된) 핵산을 단리하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 유전자 분석을 위해 용액 중의 단편화된 핵산을 제공하는 단계를 포함할 수 있다.

[0098] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 50 ㎕ 이하의 생물학적 유체 샘플을 사용함으로써 수행된다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 75 ㎕ 이하의 생물학적 유체 샘플을 사용함으로써 수행된다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 100 ㎕ 이하의 생물학적 유체 샘플을 사용함으로써 수행된다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 125 ㎕ 이하의 생물학적 유체 샘플을 사용함으로써 수행된다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 150 ㎕ 이하의 생물학적 유체 샘플을 사용함으로써 수행된다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 200 ㎕ 이하의 생물학적 유체 샘플을 사용함으로써 수행된다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 300 ㎕ 이하의 생물학적 유체 샘플을 사용함으로써 수행된다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 400 ㎕ 이하의 생물학적 유체 샘플을 사용함으로써 수행된다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 500 ㎕ 이하의 생물학적 유체 샘플을 사용함으로써 수행된다.

[0099] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 초저 부피의 생물학적 유체 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 초저 부피는 샘플 부피의 범위 내에 속한다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 1 밀리리터이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 900 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 800 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 700 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 600 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 500 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 400 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 300 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 200 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 150 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 100 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 90 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 85 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 80 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 75 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 70 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 65 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피

의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 60 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 55 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 5 ㎕ 내지 약 50 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 150 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 120 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 100 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 90 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 85 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 80 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 75 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 70 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 65 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 60 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 55 ㎕이다. 일부 경우, 샘플 부피의 범위는 약 15 ㎕ 내지 약 50 ㎕이다.

[0100] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 초저 부피의 생물학적 유체 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 초저 부피는 약 100 ㎕ 내지 약 500 ㎕이다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 초저 부피의 생물학적 유체 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 초저 부피는 약 100 ㎕ 내지 약 1000 ㎕이다. 일부 경우, 초저 부피는 약 500 ㎕ 내지 약 1 ㎖이다. 일부 경우, 초저 부피는 약 500 ㎕ 내지 약 2 ㎖이다. 일부 경우, 초저 부피는 약 500 ㎕ 내지 약 3 ㎖이다. 일부 경우, 초저 부피는 약 500 ㎕ 내지 약 5 ㎖이다.

[0101] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 초저 부피의 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 전혈이다. 초저 부피는 약 1 ㎕ 내지 약 250 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 250 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 25 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 35 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 45 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 50 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 60 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 80 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 100 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 120 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 140 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 150 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 160 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 180 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 10 ㎕ 내지 약 200 ㎕일 수 있다.

[0102] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 초저 부피의 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 혈장 또는 혈청이다. 초저 부피는 약 1 ㎕ 내지 약 200 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 1 ㎕ 내지 약 190 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 1 ㎕ 내지 약 180 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 1 ㎕ 내지 약 160 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 1 ㎕ 내지 약 150 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 1 ㎕ 내지 약 140 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 15 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 25 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 35 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 45 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 50 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 60 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 70 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 80 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 90 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 100 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 125 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 150 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 175 ㎕일 수 있다. 초저 부피는 약 5 ㎕ 내지 약 200 ㎕일 수 있다.

[0103] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 초저 부피의 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 소변이다. 일반적으로, 소변 중의 DNA의 농도는 약 40 ng/㎖ 내지 약 200 ng/㎖이다. 일부 경우, 소변의 초저 부피는 약 0.25 ㎕ 내지 1 밀리리터이다. 일부 경우, 소변의 초저 부피는 약 0.25 ㎕ 내지 약 1 밀리리터이다. 일부 경우, 소변의 초저 부피는 적어도 약 0.25 ㎕이다. 일부 경우, 소변의 초저 부피는 최대 약 1 밀리리터이다. 일부 경우, 소변의 초저 부피는 약 0.25 ㎕ 내지 약 0.5 ㎕, 약 0.25 ㎕ 내지 약 0.75 ㎕, 약 0.25 ㎕ 내지 약 1 ㎕, 약 0.25 ㎕ 내지 약 5 ㎕, 약 0.25 ㎕ 내지 약 10 ㎕, 약 0.25 ㎕ 내지 약 50 ㎕, 약 0.25 ㎕ 내지 약 100 ㎕, 약 0.25 ㎕ 내지 약 150 ㎕, 약 0.25 ㎕ 내지 약 200 ㎕, 약 0.25 ㎕ 내지 약 500 ㎕, 약 0.25 ㎕ 내지 약 1 밀리리터, 약 0.5 ㎕ 내지 약 0.75 ㎕, 약 0.5 ㎕ 내지 약 1 ㎕, 약 0.5 ㎕ 내지 약 5 ㎕, 약 0.5 ㎕ 내지 약 10 ㎕, 약 0.5 ㎕ 내지 약 50 ㎕, 약 0.5 ㎕ 내지 약 100 ㎕, 약 0.5 ㎕ 내지 약 150 ㎕, 약 0.5 ㎕ 내지 약 200 ㎕, 약 0.5 ㎕ 내지 약 500 ㎕, 약 0.5 ㎕ 내지 약 1 밀리리터, 약 0.75 ㎕ 내지 약 1 ㎕, 약 0.75 ㎕ 내지 약 5 ㎕, 약 0.75 ㎕ 내지 약 10 ㎕, 약 0.75 ㎕ 내지 약 50 ㎕, 약 0.75 ㎕ 내지 약 100 ㎕, 약 0.75 ㎕ 내지 약 150 ㎕, 약 0.75 ㎕ 내지 약 200 ㎕, 약 0.75 ㎕ 내지 약 500 ㎕, 약 0.75 ㎕ 내지 약 1 밀리리터, 약 1 ㎕ 내지 약 5 ㎕, 약 1 ㎕ 내지 약 10 ㎕, 약 1 ㎕ 내지 약 50 ㎕, 약 1 ㎕ 내지 약 100 ㎕, 약 1 ㎕ 내지 약 150 ㎕, 약 1 ㎕ 내지 약 200 ㎕, 약 1 ㎕ 내지 약 500 ㎕, 약 1 ㎕ 내지 약 1 밀리리터, 약 5 ㎕ 내지 약 10 ㎕, 약 5 ㎕ 내지 약 50 ㎕, 약 5 ㎕ 내지 약 100 ㎕, 약 5 ㎕ 내지 약 150 ㎕, 약 5 ㎕ 내지 약 200 ㎕, 약 5 ㎕ 내지 약 500 ㎕, 약 5 ㎕ 내지 약 1 밀리리터, 약 10 ㎕ 내지 약 50 ㎕, 약 10 ㎕ 내지 약

100 ㎕, 약 10 ㎕ 내지 약 150 ㎕, 약 10 ㎕ 내지 약 200 ㎕, 약 10 ㎕ 내지 약 500 ㎕, 약 10 ㎕ 내지 약 1 밀리리터, 약 50 ㎕ 내지 약 100 ㎕, 약 50 ㎕ 내지 약 150 ㎕, 약 50 ㎕ 내지 약 200 ㎕, 약 50 ㎕ 내지 약 500 ㎕, 약 50 ㎕ 내지 약 1 밀리리터, 약 100 ㎕ 내지 약 150 ㎕, 약 100 ㎕ 내지 약 200 ㎕, 약 100 ㎕ 내지 약 500 ㎕, 약 100 ㎕ 내지 약 1 밀리리터, 약 150 ㎕ 내지 약 200 ㎕, 약 150 ㎕ 내지 약 500 ㎕, 약 150 ㎕ 내지 약 1 밀리리터, 약 200 ㎕ 내지 약 500 ㎕, 약 200 ㎕ 내지 약 1 밀리리터, 또는 약 500 ㎕ 내지 약 1 밀리리터이다. 일부 경우, 사용된 소변의 부피는 약 0.25 ㎕, 약 0.5 ㎕, 약 0.75 ㎕, 약 1 ㎕, 약 5 ㎕, 약 10 ㎕, 약 50 ㎕, 약 100 ㎕, 약 150 ㎕, 약 200 ㎕, 약 500 ㎕ 또는 약 1 밀리리터이다.

[0104] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 90% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 5 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 90% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 10 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 90% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 15 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 90% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 20 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 90% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 20 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 20 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 98% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 20 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 20 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 90% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 20 ㎕ 내지 약 120 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 20 ㎕ 내지 약 120 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 97% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 20 ㎕ 내지 약 120 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 98% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 20 ㎕ 내지 약 120 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 20 ㎕ 내지 약 120 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 99.5% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 20 ㎕ 내지 약 120 ㎕의 혈액을 수득하는 단계를 포함한다.

[0105] 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 혈장 또는 혈청이다. 혈장 또는 혈청은 전혈의 대략 55%를 차지한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 90% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 10 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 98% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 10 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 90% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 12 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 12 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 98% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 12 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 12 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 90% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 10 ㎕ 내지 약 60 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 10 ㎕ 내지 약 60 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 97% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 10 ㎕ 내지 약 60 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 98% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 10 ㎕ 내지 약 60 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 10 ㎕ 내지 약 60 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 99.5% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 단지 약 10 ㎕ 내지 약 60 ㎕의 혈장 또는 혈청을 수득하는 단계를 포함한다.

[0106] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 소정량의 무세포 핵산 분자를 함유한다. 일부 경우, 생물학적 샘플의 수득 단계는 생물학적 샘플에서 세포

의 파괴 또는 용해를 초래한다. 따라서, 일부 경우, 생물학적 샘플은 세포 핵산 분자를 포함한다. 일부 경우, 세포 핵산 분자는 생물학적 샘플 중의 총 세포 핵산 분자의 약 1% 미만을 차지한다. 일부 경우, 세포 핵산 분자는 생물학적 샘플 중의 총 세포 핵산 분자의 약 5% 미만을 차지한다. 일부 경우, 세포 핵산 분자는 생물학적 샘플 중의 총 세포 핵산 분자의 약 10% 미만을 차지한다. 일부 경우, 세포 핵산 분자는 생물학적 샘플 중의 총 세포 핵산 분자의 약 20% 미만을 차지한다. 일부 경우, 세포 핵산 분자는 생물학적 샘플 중의 총 세포 핵산 분자의 약 50% 이상을 차지한다. 일부 경우, 세포 핵산 분자는 생물학적 샘플 중의 총 세포 핵산 분자의 약 90% 미만을 차지한다.

[0107] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 초저 부피의 생물학적 유체 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 유체 샘플은 초저량의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 초저량은 약 4 pg 내지 약 100 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 4 pg 내지 약 150 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 4 pg 내지 약 200 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 4 pg 내지 약 300 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 4 pg 내지 약 400 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 4 pg 내지 약 500 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 4 pg 내지 약 1 ng이다. 일부 경우, 초저량은 약 10 pg 내지 약 100 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 10 pg 내지 약 150 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 10 pg 내지 약 200 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 10 pg 내지 약 300 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 10 pg 내지 약 400 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 10 pg 내지 약 500 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 10 pg 내지 약 1 ng이다. 일부 경우, 초저량은 약 20 pg 내지 약 100 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 20 pg 내지 약 200 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 20 pg 내지 약 500 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 20 pg 내지 약 1 ng이다. 일부 경우, 초저량은 약 30 pg 내지 약 150 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 30 pg 내지 약 180 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 30 pg 내지 약 200 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 30 pg 내지 약 300 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 30 pg 내지 약 400 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 30 pg 내지 약 500 pg이다. 일부 경우, 초저량은 약 30 pg 내지 약 1 ng이다. 일부 경우, 대상체는 임신 대상체이고, 무세포 핵산은 무세포 태아 DNA를 포함한다. 일부 경우, 대상체는 종양을 갖고, 무세포 핵산은 무세포 종양 DNA를 포함한다. 일부 경우, 대상체는 장기 이식 수용자이고, 무세포 핵산은 장기 기증자 DNA를 포함한다.

[0108] 일부 경우, 방법은 약 1 ng 미만의 무세포 태아 핵산을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 약 500 pg 미만의 무세포 태아 핵산을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 약 100 pg 미만의 무세포 태아 핵산을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 적어도 3.5 pg의 무세포 태아 핵산을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 적어도 10 pg의 무세포 태아 핵산을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 약 100 pg 이하의 무세포 태아 핵산을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 약 500 pg 이하의 무세포 태아 핵산을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 약 1 ng 이하의 무세포 태아 핵산을 수득하는 단계를 포함한다.

[0109] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 유체 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 유체 샘플은 적어도 1 게놈 당량의 무세포 DNA를 함유한다. 해당 기술 분야에서 당업자는 게놈 당량이, 모든 유전자들이 존재할 것을 보장하기 위해 샘플에 존재할 필요가 있는 DNA의 양임을 이해한다. 본원에 개시된 초저 부피의 생물학적 유체 샘플은 초저 수의 게놈 당량을 함유할 수 있다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 1 게놈 당량 미만의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 적어도 5 게놈 당량의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 적어도 10 게놈 당량의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 적어도 15 게놈 당량의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 적어도 20 게놈 당량의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 약 5 내지 약 50 게놈 당량을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 약 10 내지 약 50 게놈 당량을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 약 10 내지 약 100 게놈 당량을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 50 게놈 당량 이하의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 60 게놈 당량 이하의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 80 게놈 당량 이하의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 100 게놈 당량 이하의 무세포 핵산을 함유한다.

[0110] 본원에 개시된 초저 부피의 생물학적 유체 샘플은 초저 수의 세포 당량을 함유할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 유체 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 유체 샘플은 적어도 1 세포 당량의 무세포 DNA를 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 적어도 2 세포 당량의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 적어도 5 세포 당량의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 약 5 세포 당량 내지 약 40 세포 당량의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 적어도 5 세포 당량 내지 약 100 세포 당량의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘

플은 30 세포 당량 이하의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 50 세포 당량 이하의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 80 세포 당량 이하의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 100 세포 당량 이하의 무세포 핵산을 함유한다.

[0111] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 적어도 하나의 관심 있는 무세포 핵산을 함유한다. 비제한적 예로써, 관심 있는 무세포 핵산은 무세포 태아 핵산, 무세포 종양 DNA, 또는 이식된 장기로부터의 DNA일 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 약 1개 내지 약 5개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 약 1개 내지 약 15개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 약 1개 내지 약 25개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 약 1개 내지 약 100개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 약 5개 내지 약 100개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 적어도 하나의 무세포 핵산은 본원에 개시된 표적 염색체에 특유한 서열로 표시된다.

[0112] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 약 10^2개의 무세포 핵산 내지 약 10^{10}개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 약 10^2개의 무세포 핵산 내지 약 10^9개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 약 10^2개의 무세포 핵산 내지 약 10^8개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 약 10^2개의 무세포 핵산 내지 약 10^7개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 약 10^2개의 무세포 핵산 내지 약 10^6개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 약 10^2개의 무세포 핵산 내지 약 10^5개의 무세포 핵산을 함유한다.

[0113] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 약 10^3개의 무세포 핵산 내지 약 10^{10}개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 약 10^3개의 무세포 핵산 내지 약 10^9개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 약 10^3개의 무세포 핵산 내지 약 10^8개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 약 10^3개의 무세포 핵산 내지 약 10^7개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 약 10^3개의 무세포 핵산 내지 약 10^6개의 무세포 핵산을 함유한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 약 10^3개의 무세포 핵산 내지 약 10^5개의 무세포 핵산을 함유한다.

[0114] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 전형적인 샘플 유형 부피에 상응하는 수의 무세포 핵산을 가진다. 비제한적 예로써, 임신 대상체로부터의 4 ㎖ 인간 혈액은 전형적으로 약 10^{10}개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 그러나, 태아 유전학에 대한 정보를 제공하는 데 요구된 샘플 중의 무세포 태아 핵산의 농도 및 이에 따른 샘플 부피는 샘플 유형에 의해 좌우될 것이다. 본원에서 제공된 실시예 7은 해당 기술 분야에서 당업자가 충분한 수의 무세포 태아 핵산을 수득하기 위해 필요한 최소 부피를 어떻게 확인할 수 있는지도 입증한다.

[0115] 샘플 처리

[0116] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 무세포 핵산 분자를 단리하거나 정제하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 무세포 태아 핵산 분자를 단리하거나 정제하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 본원에 기재된 생물학적 샘플로부터 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다.

[0117] 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 원치 않는 비-핵산 성분을 감소시키거나 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%의 원치 않는 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 적어도 95%의 원치 않는 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 적어도 97%의 원치 않는 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 적어도 98%의 원치 않는 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계

는 생물학적 샘플로부터 적어도 99%의 원치 않는 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 적어도 95%의 원치 않는 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 적어도 97%의 원치 않는 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 적어도 98%의 원치 않는 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 적어도 99%의 원치 않는 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다.

[0118] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플의 하나 이상의 비-핵산 성분으로부터 핵산을 단리하거나 정제하는 단계를 포함한다. 비-핵산 성분은 원치 않는 물질로서 간주될 수도 있다. 비-핵산 성분의 비제한적 예는 세포(예를 들면, 혈액 세포), 세포 단편, 세포외 소포, 지질, 단백질 또는 이들의 조합을 포함한다. 추가 비-핵산 성분은 여기 및 전체에 걸쳐 기재되어 있다. 방법은 핵산을 단리/정제하는 단계를 포함할 수 있지만, 핵산 정제 단계에서 원치 않는 물질로서 간주되는 샘플의 비-핵산 성분을 분석하는 단계도 포함할 수 있다. 단리 또는 정제 단계는 핵산 증폭 또는 검출과 같은 후기 공정 단계를 억제하거나, 방해하거나 다른 방식으로 유해한 영향을 미칠 생물학적 샘플의 성분을 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

[0119] 단리 또는 정제 단계는 본원에 개시된 장치 또는 시스템을 이용함으로써 수행될 수 있다. 단리 또는 정제 단계는 본원에 개시된 장치 또는 시스템을 이용함으로써 수행될 수 있다. 단리 및/또는 정제 단계는 본원에 개시된 샘플 정제기를 이용함으로써 일어날 수 있다. 일부 경우, 핵산의 단리 또는 정제 단계는 본원에 기재된 생물학적 샘플로부터 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 핵산의 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 비-핵산 성분을 버리는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 비-핵산 성분을 채취하고 처리하고 분석하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 비-핵산 성분은 대상체에 관한 추가 정보를 제공하기 때문에 바이오마커로서 간주될 수 있다.

[0120] 일부 경우, 핵산의 단리 또는 정제 단계는 세포를 용해시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 핵산의 단리 또는 정제 단계는 세포를 용해시키는 단계를 피한다. 일부 경우, 핵산의 단리 또는 정제 단계는 세포를 용해시키는 단계를 포함하지 않는다. 일부 경우, 핵산의 단리 또는 정제 단계는 세포를 용해시키기 위한 능동 단계를 포함하지 않는다. 일부 경우, 핵산의 단리 또는 정제 단계는 세포를 의도적으로 용해시키는 단계를 포함하지 않는다. 세포를 의도적으로 용해시키는 단계는 세포막을 기계적으로 파괴하는 단계(예를 들면, 전단)를 포함할 수 있다. 세포를 의도적으로 용해시키는 단계는 세포를 용해 시약과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 예시적 용해 시약은 본원에 기재되어 있다.

[0121] 일부 경우, 핵산의 단리 또는 정제 단계는 용해시키는 단계 및 용액 중의 "미끼(bait)"를 사용하여 표적 핵산의 서열 특이적 포획을 수행한 후, "미끼"를 자기 비드와 같은 고체 지지체에 결합시키는 단계를 포함한다(예를 들면, 문헌[Legler et al., Specific magnetic bead-based capture of free fetal DNA from maternal plasma, Transfusion and Apheresis Science 40 (2009), 153-157]). 일부 경우, 방법은 재조합효소(recombinase) 또는 나선효소(helicase)의 존재 하에서 서열 특이적 포획을 수행하는 단계를 포함한다. 재조합효소 또는 나선효소의 사용은 핵산의 열 변성에 대한 필요성을 없애고 검출 단계를 가속화할 수 있다.

[0122] 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 본원에 개시된 생물학적 샘플의 성분을 분리하는 단계를 포함한다. 비제한적 예로써, 단리 또는 정제 단계는 혈액으로부터 혈장을 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플을 원심분리하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플의 성분을 분리하기 위해 생물학적 샘플을 여과하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 비-핵산 성분을 제거하기 위해 생물학적 샘플을 여과하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플로부터 핵산을 포획하기 위해 생물학적 샘플을 여과하는 단계를 포함한다.

[0123] 일부 경우, 생물학적 샘플은 혈액이고, 핵산의 단리 또는 정제 단계는 혈액으로부터 혈장을 수득하거나 단리하는 단계를 포함한다. 혈장을 수득하는 단계는 혈액 샘플의 세포 성분으로부터 혈장을 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 혈장의 수득 단계는 혈액을 원심분리하는 단계, 혈액을 여과하는 단계, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 혈장의 수득 단계는 혈액이 중력에 노출되게 하는 단계(예를 들면, 침강)를 포함할 수 있다. 혈장의 수득 단계는 혈액의 비-핵산 성분으로부터 혈액의 일부를 빨아들이는 물질에 혈액을 노출시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 방법은 혈액을 수직 여과하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 방법은 전혈을 수용하기 위한 필터 매트릭스를 포함하는 샘플 정제기로 혈액을 처리하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 필터 매트릭스는 세포가 통과하지 못하게 하는 반면 혈장이 방해받지 않고 필터 매트릭스를 통과할 수 있게 하는 공극 크기를 가진다. 이러한 수직 여과 및 필터 매트릭스는 본원에 개시된 장치에 대해 기재되어 있다.

[0124] 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플 또는 이의 분획, 또는 이의 변형된 버전을 결합 모이어티에 노출시키는 단계를 포함한다. 결합 모이어티는 생물학적 샘플의 성분에 결합하고 이를 제거하여, 원치 않거나 관심 없는 세포, 세포 단편, 핵산 또는 단백질이 고갈된 변형된 샘플을 생성할 수 있다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플을 결합 모이어티에 노출시켜, 생물학적 샘플에서 원치 않는 물질 또는 비-핵산 성분을 감소시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플을 결합 모이어티에 노출시켜, 표적 세포, 표적 세포 단편, 표적 핵산 또는 표적 단백질이 풍부한 변형된 샘플을 생성하는 단계를 포함한다. 비제한적 예로써, 단리 또는 정제 단계는 생물학적 샘플을 결합 모이어티에 노출시켜, 태아 DNA 또는 RNA 단편을 함유할 수 있는 태반 교육된 혈소판을 포획하는 단계를 포함할 수 있다. 생성된 세포 결합된 결합 모이어티는 항체 또는 다른 방법, 예를 들면, 저속 원심분리에 의해 포획/농후화될 수 있다.

[0125] 단리 또는 정제 단계는 결합 모이어티로 생물학적 샘플 중의 세포외 소포 또는 세포외 미세입자를 포획하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 세포외 소포는 DNA 및 RNA 중 적어도 하나를 함유한다. 일부 경우, 세포외 소포는 기원이 태아/태반이다. 방법은 생물학적 샘플에서 모체 세포로부터 나온 세포외 소포 또는 세포외 미세입자를 포획하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 모체 세포로부터의 세포외 소포 또는 세포외 미세입자를 포획하고 버림으로써, 샘플에서 태아/태반 핵산을 농후화하는 단계를 포함한다.

[0126] 일부 경우, 방법은 생물학적 샘플에서 뉴클레오좀을 포획하는 단계 및 뉴클레오좀에 부착된 핵산을 분석하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 생물학적 샘플에서 엑소좀을 포획하는 단계 및 엑소좀에 부착된 핵산을 분석하는 단계를 포함한다. 뉴클레오좀 및/또는 엑소좀의 포획 단계는 용해 단계 또는 시약에 대한 필요성을 없앰으로써, 방법을 단순화할 수 있고 샘플 채취부터 검출까지 시간을 감소시킬 수 있다.

[0127] 일부 경우, 방법은 생물학적 샘플을 세포 결합 모이어티에 노출시켜, 태아 DNA 또는 RNA 단편을 함유할 수 있는 태반 교육된 혈소판을 포획하는 단계를 포함한다. 포획 단계는 태반 교육된 혈소판을 결합 모이어티(예를 들면, 세포 표면 마커에 대한 항체)와 접촉시키는 단계, 생물학적 샘플을 저속 원심분리로 처리하는 단계, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 경우, 결합 모이어티는 본원에 개시된 고체 지지체에 부착되고, 방법은 결합 모이어티가 생물학적 샘플과 접촉한 후 생물학적 샘플의 나머지 부분으로부터 고체 지지체를 분리하는 단계를 포함한다.

[0128] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 원치 않는 비-핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 비-핵산 성분을 제거하고 버리는 단계를 포함한다. 비-핵산 성분의 비제한적 예는 세포(예를 들면, 혈액 세포), 세포 단편, 세포외 소포, 지질, 단백질 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 경우, 비-핵산 성분의 제거 단계는 생물학적 샘플을 원심분리하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 비-핵산 성분의 제거 단계는 생물학적 유체 샘플을 여과하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 비-핵산 성분의 제거 단계는 생물학적 샘플을 본원에 기재된 결합 모이어티와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0129] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 샘플 중의 핵산을 정제하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 정제 단계는 핵산을 세척 완충제로 세척하는 단계를 포함하지 않는다. 일부 경우, 핵산은 무세포 태아 핵산이다. 일부 실시양태에서, 정제 단계는 핵산을 핵산 포획 모이어티로 포획하여 포획된 핵산을 생성하는 단계를 포함한다. 핵산 포획 모이어티의 비제한적 예는 실리카 입자 및 상자성 입자이다. 일부 실시양태에서, 정제 단계는 포획된 핵산을 함유하는 샘플을 소수성 상(예를 들면, 액체 또는 왁스)에 통과시키는 단계를 포함한다. 소수성 상은 핵산의 추가 조작(예를 들면, 증폭, 서열분석)을 방해할, 샘플 중의 불순물을 보유한다.

[0130] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 본원에 기재된 생물학적 샘플로부터 핵산 성분을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 제거된 핵산 성분은 버려진다. 비제한적 예로써, 방법은 DNA만을 분석하는 단계를 포함할 수 있다. 따라서, RNA는 원치 않는 물질이고 DNA에 대한 바람직하지 않은 배경 노이즈 또는 오염을 생성한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 RNA를 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 mRNA를 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 microRNA를 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 모체 RNA를 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 DNA를 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 임신 대상체의 생물학적 샘플로부터 모체 DNA를 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 핵산 성분의 제거 단계는 핵산 성분을, 핵산에 하이브리드화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 올리고뉴클레오타이드는 포획 장치(예를 들면, 비드, 컬럼, 매트릭스, 나노입자, 자기 입자 등)에 접합되거나, 부착되거나 결합된다. 일부 경우, 제거된 핵산 성분은 버려진다.

[0131] 일부 경우, 핵산 성분의 제거 단계는 겔 상에서 핵산 성분을 크기별로 분리하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 순환 무세포 태아 DNA 단편은 일반적으로 길이가 200개 염기쌍 미만이다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 무세포 DNA를 제거하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 무세포 DNA를 포획하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플로부터 무세포 DNA를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 무세포 DNA는 최소 길이를 가진다. 일부 경우, 최소 길이는 약 50개 염기쌍이다. 일부 경우, 최소 길이는 약 100개 염기쌍이다. 일부 경우, 최소 길이는 약 110개 염기쌍이다. 일부 경우, 최소 길이는 약 120개 염기쌍이다. 일부 경우, 최소 길이는 약 140개 염기쌍이다. 일부 경우, 무세포 DNA는 최대 길이를 가진다. 일부 경우, 최대 길이는 약 180개 염기쌍이다. 일부 경우, 최대 길이는 약 200개 염기쌍이다. 일부 경우, 최대 길이는 약 220개 염기쌍이다. 일부 경우, 최대 길이는 약 240개 염기쌍이다. 일부 경우, 최대 길이는 약 300개 염기쌍이다. 크기 기반 분리는 해당 기술 분야에서 잘 공지되어 있는, 제한된 크기 범위를 가진 다른 범주의 핵산(예를 들면, microRNA)에 유용할 것이다.

[0132] 일부 경우, 처리는 생물학적 샘플에서 관심 있는 태아 게놈 DNA를 함유하는 태아 영양배엽을 농후화하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 태아 영양배엽은 형태(예를 들면, 크기) 또는 마커 항원(예를 들면, 세포 표면 항원), 또는 이들 둘 다에 의해 농후화된다. 일부 경우, 영양배엽의 농후화는 상피 종양 세포(ISET)의 크기별 단리 방법을 이용함으로써 수행된다. 일부 경우, 생물학적 샘플에서 영양배엽의 농후화는 생물학적 샘플을 영양배엽의 세포 표면 항원에 특이적인 항체 또는 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계를 포함한다. 영양배엽 세포 표면 항원의 비제한적 예는 트로포미요신(tropomyosin)-1(Trop1), 트로포미요신-2(Trop2), cyto 및 syncytio-영양배엽 마커, GB25, 인간 태반 락토겐(HPL), 및 알파 인간 융모막 성선자극호르몬(알파 HCG)을 포함한다. 일부 경우, 태아 영양배엽의 정제 또는 단리 단계는 형광 활성화 세포 분류(FACS), 컬럼 크로마토그래피 또는 자기 분류(예를 들면, Dynabeads)를 이용하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 태아 유전 정보는 임의의 적합한 DNA 추출 방법, 예컨대, 본원에 기재된 방법을 이용함으로써 농후화 및/또는 정제된 영양배엽으로부터 추출된다.

[0133] 핵산의 증폭

[0134] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 샘플 중의 적어도 하나의 핵산(예를 들면, 무세포 핵산, 예컨대, 무세포 DNA 또는 무세포 RNA)을 증폭하여 적어도 하나의 증폭 생성물을 생성하는 단계를 포함한다. 적어도 하나의 핵산은 무세포 핵산일 수 있다. 샘플은 본원에 개시된 생물학적 샘플, 또는 이의 분획 또는 부분일 수 있다. 일부 경우, 방법은 샘플 중의 핵산의 카피를 생성하는 단계, 및 상기 카피를 증폭하여 적어도 하나의 증폭 생성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 샘플 중의 핵산의 역전사체를 생성하는 단계 및 상기 역전사체를 증폭하여 적어도 하나의 증폭 생성물을 생성하는 단계를 포함한다.

[0135] 일부 경우, 방법은 전체 게놈 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 전체 게놈 증폭을 수행하는 단계를 포함하지 않는다. 용어 "전체 게놈 증폭"은 생물학적 샘플 중의 모든 무세포 핵산을 증폭하는 것을 지칭할 수 있다. 용어 "전체 게놈 증폭"은 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산의 적어도 90%를 증폭하는 것을 지칭할 수 있다. 전체 게놈은 다수의 게놈을 지칭할 수 있다. 전체 게놈 증폭은 대상체의 생물학적 샘플로부터의 무세포 핵산을 증폭하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 생물학적 샘플은 대상체 및 외래 조직으로부터의 무세포 핵산을 포함한다. 예를 들면, 전체 게놈 증폭은 대상체(숙주 게놈) 및 대상체에 이식된 장기 또는 조직(기증자 게놈) 둘 다로부터의 무세포 핵산을 증폭하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 비제한적 예로써, 전체 게놈 증폭은 임신 대상체의 생물학적 샘플로부터의 무세포 핵산을 증폭하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 생물학적 샘플은 임신 대상체 및 그녀의 태아로부터의 무세포 핵산을 포함한다. 전체 게놈 증폭은 암을 가진 대상체의 생물학적 샘플로부터의 무세포 핵산을 증폭하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 생물학적 샘플은 대상체의 양성 조직 및 대상체의 종양으로부터의 무세포 핵산을 포함한다. 전체 게놈 증폭은 감염을 가진 대상체의 생물학적 샘플로부터의 무세포 핵산을 증폭하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 생물학적 샘플은 대상체 및 병원체로부터의 무세포 핵산을 포함한다.

[0136] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 핵산을 증폭하는 단계를 포함하고, 증폭 단계는 핵산의 등온 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 등온 증폭의 비제한적 예는 다음과 같다: 루프 매개 등온 증폭(LAMP), 가닥 치환 증폭(SDA), 나선효소 의존적 증폭(HDA), 닉킹 효소 증폭 반응(NEAR) 및 재조합효소 중합효소 증폭(RPA).

[0137] 해당 기술 분야에서 공지되어 있는 임의의 적절한 핵산 증폭 방법이 본원에 기재된 장치 및 방법에서 사용될 것으로 예상된다. 일부 경우, 등온 증폭이 이용된다. 일부 경우, 증폭은 등온 증폭이 시작되기 전 초기 가열 단계를 제외하고 등온이다. 각각 상이한 고려사항을 갖고 상이한 장점을 제공하는 다수의 등온 증폭 방법들이 해당 기술 분야에서 공지되어 있고 문헌, 예를 들면, 전체적으로 본원에 각각 참고로 포함된 문헌[Zanoli and Spoto,

2013, "Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Devices", Biosensors 3: 18-43] 및 문헌[Fakruddin, et al., 2013, "Alternative Methods of Polymerase Chain Reaction (PCR)", Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences 5(4): 245-252]에 논의되어 있다. 일부 경우, 임의의 적절한 등온 증폭 방법이 이용된다. 일부 경우, 이용되는 등온 증폭 방법은 루프 매개 등온 증폭(LAMP); 핵산 서열 기반 증폭(NASBA); 다중 치환 증폭(MDA); 롤링 서클 증폭(RCA); 나선효소 의존적 증폭(HDA); 가닥 치환 증폭(SDA); 닉킹 효소 증폭 반응(NEAR); 파급 증폭 방법(RAM); 및 재조합효소 중합효소 증폭(RPA)으로부터 선택된다.

[0138] 일부 경우, 이용되는 증폭 방법은 LAMP이다(예를 들면, 전체적으로 본원에 각각 참고로 포함된 문헌[Notomi, et al., 2000, "Loop Mediated Isothermal Amplification" NAR 28(12): e63 i-vii] 및 미국 특허 제6,410,278호("Process for synthesizing nucleic acid") 참조). LAMP는 자가순환 가닥 치환 데옥시리보핵산(DNA) 합성을 이용하는 1 단계 증폭 시스템이다. 일부 경우, LAMP는 열안정성 중합효소, 예를 들면, 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)(Bst) DNA 중합효소 I, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트(dNTP), 특이적 프라이머 및 표적 DNA 주형의 존재 하에서 45분 내지 60분 동안 60℃ 내지 65℃에서 수행된다. 일부 경우, 주형은 RNA이고, 역전사효소 활성 및 가닥 치환 유형 DNA 중합효소 활성 둘 다를 가진 중합효소, 예컨대, Bca DNA 중합효소가 사용되거나, 역전사효소 활성을 가진 중합효소가 역전사효소 단계를 위해 사용되고, 역전사효소 활성을 갖지 않은 중합효소가 가닥 치환 DNA 합성 단계를 위해 사용된다.

[0139] 일부 경우, 증폭 방법은 핵산 서열 기반 증폭(NASBA)이다. NASBA(3SR 및 전사 매개 증폭으로서도 공지되어 있음)는 등온 전사 기반 RNA 증폭 시스템이다. 3종의 효소들(조류 골수모세포증 바이러스 역전사효소, RNase H 및 T7 DNA 의존적 RNA 중합효소)이 단일 가닥 RNA를 생성하는 데 사용된다. 특정한 경우, NASBA는 DNA를 증폭하는 데 사용될 수 있다. 증폭 반응은 전형적으로 약 60분 내지 약 90분 동안 일정한 온도를 유지하면서 41℃에서 수행된다(예를 들면, 본원에 참고로 포함된 문헌[Fakruddin, et al., 2012, "Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) Prospects and Applications", Int. J. of Life Science and Pharma Res. 2(1):L106-L121] 참조).

[0140] 일부 경우, NASBA 반응은 약 40℃ 내지 약 42℃에서 수행된다. 일부 경우, NASBA 반응은 41℃에서 수행된다. 일부 경우, NASBA 반응은 최대 약 42℃에서 수행된다. 일부 경우, NASBA 반응은 약 40℃ 내지 약 41℃, 약 40℃ 내지 약 42℃, 또는 약 41℃ 내지 약 42℃에서 수행된다. 일부 경우, NASBA 반응은 약 40℃, 약 41℃ 또는 약 42℃에서 수행된다.

[0141] 일부 경우, 증폭 방법은 가닥 치환 증폭(SDA)이다. SDA는 4종의 상이한 프라이머들을 사용하는 등온 증폭 방법이다. 제한 부위(HincII 엑소뉴클레아제에 대한 인식 서열)를 함유하는 프라이머는 DNA 주형에 어닐링된다. 에스케리키아 콜라이(Eschericia coli) DNA 중합효소 1(엑소-클레나우(exo-Klenow))의 엑소뉴클레아제 결핍 단편은 프라이머를 연장시킨다. 각각의 SDA 주기는 (1) 치환된 표적 단편에의 프라이머 결합, (2) 엑소-클레나우에 의한 프라이머/표적 복합체의 연장, (3) 생성된 헤미포스포티오에이트 HincII 부위의 닉킹, (4) 닉킹된 부위로부터의 HincII의 해리 및 (5) 엑소-클레나우에 의한 닉의 연장 및 다운스트림 가닥의 치환으로 구성된다.

[0142] 일부 경우, 방법은 샘플 중의 DNA를 나선효소와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 증폭 방법은 나선효소 의존적 증폭(HDA)이다. HDA는 열 대신에 나선효소가 DNA를 변성시키는 데 사용되기 때문에 등온 반응이다.

[0143] 일부 경우, 증폭 방법은 다중 치환 증폭(MDA)이다. MDA는 높은 신뢰도로 전체 게놈을 증폭하기 위해 변형된 무작위 프라이머와 함께, 박테리오파지 φ29로부터의 고진행성 가닥 치환 DNA 중합효소를 사용하는 것에 기반한 등온 가닥 치환 방법이다. 이 방법은 샘플 중의 모든 DNA를 극소량의 출발 물질로부터 증폭하기 위해 개발되었다. MDA에서, φ29 DNA 중합효소는 16시간 내지 18시간 동안 30℃에서 dNTP, 무작위 육량체 및 변성된 주형 DNA와 함께 인큐베이션되고, 효소는 10분 동안 고온(65℃)에서 불활성화되어야 한다. 반복된 재순환은 요구되지 않으나, 짧은 초기 변성 단계, 증폭 단계 및 효소의 최종 불활성화가 필요하다.

[0144] 일부 경우, 증폭 방법은 롤링 서클 증폭(RCA)이다. RCA는 단일 온도, 전형적으로 약 30℃에서 프로브 DNA 서열을 10^9배 이상 증폭할 수 있게 하는 등온 핵산 증폭 방법이다. 많은 라운드의 등온 효소 합성은 원형 DNA 프로브 둘레를 연속적으로 전진함으로써 원-하이브리드화된 프라이머를 연장시키는 φ29 DNA 중합효소에 의해 수행된다. 일부 경우, 증폭 반응은 약 28℃ 내지 약 32℃에서 RCA를 이용함으로써 수행된다.

[0145] 본원에 개시된 장치 및 방법 내로 혼입될 수 있는 추가 증폭 방법은 해당 기술 분야에서 확인될 수 있다. 이상적으로, 증폭 방법은 전통적인 PCR에 비해 등온이고 빠르다. 일부 경우, 증폭은 한 반응의 생성물이 동일한 생

성물을 생성하는 추가 반응을 촉진한다는 점에서 등온 분자 연쇄 반응인 기하급수적 증폭 반응(EXPAR)을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 증폭은 엔도뉴클레아제의 존재 하에서 일어난다. 엔도뉴클레아제는 닉킹 엔도뉴클레아제일 수 있다. 예를 들면, 문헌[Wu et al., "Aligner-Mediated Cleavage of Nucleic Acids," Chemical Science (2018)]을 참조한다. 일부 경우, 증폭은 표적 DNA의 초기 열 변성을 요구하지 않는다. 예를 들면, 문헌[Toley et al., "Isothermal strand displacement amplification (iSDA): a rapid and sensitive method of nucleic acid amplification for point-of-care diagnosis," The Analyst (2015)]을 참조한다. 초고속 증폭 방법의 펄스 제어 증폭은 지앤에이 바이오솔루션스 게엠베하(GNA Biosolutions GmbH)에 의해 개발되었다.

[0146] 일부 경우, 방법은 한 쌍의 프라이머로 다수의 주기의 핵산 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 증폭이 편향을 영역의 표시 내로 도입할 수 있기 때문에, 증폭 주기의 수는 중요하다. 초저 투입량을 이용할 때, 증폭은 편향을 생성하기 훨씬 더 쉬우므로, 증폭 전에 효율을 증가시키는 것은 높은 정확도를 위해 중요하다. 모든 영역들이 동일한 효율로 증폭되는 것은 아니므로, 전체 표시는 균일하지 않을 수 있고, 이것은 분석의 정확도에 영향을 미칠 것이다. 어쨌든 증폭이 필요하다면, 통상적으로 더 적은 주기가 이상적이다. 일부 경우, 방법은 30 미만 주기의 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 25 미만 주기의 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 20 미만 주기의 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 15 미만 주기의 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 12 미만 주기의 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 11 미만 주기의 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 10 미만 주기의 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 적어도 3 주기의 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 적어도 5 주기의 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 적어도 8 주기의 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 적어도 10 주기의 증폭을 수행하는 단계를 포함한다.

[0147] 일부 경우, 증폭 반응은 약 5분 내지 약 90분 동안 수행된다. 일부 경우, 증폭 반응은 적어도 약 30분 동안 수행된다. 일부 경우, 증폭 반응은 최대 약 90분 동안 수행된다. 일부 경우, 증폭 반응은 약 30분 내지 약 35분, 약 30분 내지 약 40분, 약 30분 내지 약 45분, 약 30분 내지 약 50분, 약 30분 내지 약 55분, 약 30분 내지 약 60분, 약 30분 내지 약 65분, 약 30분 내지 약 70분, 약 30분 내지 약 75분, 약 30분 내지 약 80분, 약 30분 내지 약 90분, 약 35분 내지 약 40분, 약 35분 내지 약 45분, 약 35분 내지 약 50분, 약 35분 내지 약 55분, 약 35분 내지 약 60분, 약 35분 내지 약 65분, 약 35분 내지 약 70분, 약 35분 내지 약 75분, 약 35분 내지 약 80분, 약 35분 내지 약 90분, 약 40분 내지 약 45분, 약 40분 내지 약 50분, 약 40분 내지 약 55분, 약 40분 내지 약 60분, 약 40분 내지 약 65분, 약 40분 내지 약 70분, 약 40분 내지 약 75분, 약 40분 내지 약 80분, 약 40분 내지 약 90분, 약 45분 내지 약 50분, 약 45분 내지 약 55분, 약 45분 내지 약 60분, 약 45분 내지 약 65분, 약 45분 내지 약 70분, 약 45분 내지 약 75분, 약 45분 내지 약 80분, 약 45분 내지 약 90분, 약 50분 내지 약 55분, 약 50분 내지 약 60분, 약 50분 내지 약 65분, 약 50분 내지 약 70분, 약 50분 내지 약 75분, 약 50분 내지 약 80분, 약 50분 내지 약 90분, 약 55분 내지 약 60분, 약 55분 내지 약 65분, 약 55분 내지 약 70분, 약 55분 내지 약 75분, 약 55분 내지 약 80분, 약 55분 내지 약 90분, 약 60분 내지 약 65분, 약 60분 내지 약 70분, 약 60분 내지 약 75분, 약 60분 내지 약 80분, 약 60분 내지 약 90분, 약 65분 내지 약 70분, 약 65분 내지 약 75분, 약 65분 내지 약 80분, 약 65분 내지 약 90분, 약 70분 내지 약 75분, 약 70분 내지 약 80분, 약 70분 내지 약 90분, 약 75분 내지 약 80분, 약 75분 내지 약 90분, 또는 약 80분 내지 약 90분 동안 수행된다. 일부 경우, 증폭 반응은 약 30분, 약 35분, 약 40분, 약 45분, 약 50분, 약 55분, 약 60분, 약 65분, 약 70분, 약 75분, 약 80분 또는 약 90분 동안 수행된다.

[0148] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 하나의 온도에서 핵산을 증폭하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 단일 온도에서 핵산을 증폭하는 단계를 포함한다(예를 들면, 등온 증폭). 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 핵산을 증폭하는 단계를 포함하고, 이때 증폭은 2개 이하의 온도에서 일어난다. 증폭은 하나의 단계 또는 다수의 단계들에서 일어날 수 있다. 증폭 단계의 비제한적 예는 이중 가닥 변성, 프라이머 하이브리드화 및 프라이머 연장을 포함한다.

[0149] 일부 경우, 증폭의 적어도 하나의 단계는 실온에서 일어난다. 일부 경우, 증폭의 모든 단계들은 실온에서 일어난다. 일부 경우, 증폭의 적어도 하나의 단계는 온도 범위에서 일어난다. 일부 경우, 증폭의 모든 단계들은 온도 범위에서 일어난다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 25℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 35℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 55℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 65℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 80℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 25℃ 내지 약 80℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 35℃ 내지 약 80℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 55℃ 내지 약 80℃이다.

일부 경우, 온도 범위는 약 65℃ 내지 약 80℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 60℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 25℃ 내지 약 60℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 35℃ 내지 약 60℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 40℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -20℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -20℃ 내지 약 90℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -20℃ 내지 약 50℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -20℃ 내지 약 40℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -20℃ 내지 약 10℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 40℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 30℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 20℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 10℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 90℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 80℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 70℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 60℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 50℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 30℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 10℃ 내지 약 30℃이다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 냉각, 냉동 또는 가열을 요구하지 않으면서 실온에서 수행된다. 일부 경우, 증폭은 샘플을 무작위 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 증폭은 본원에 개시된 무세포 핵산 분자를 무작위 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 증폭은 본원에 개시된 무세포 태아 핵산 분자를 무작위 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 증폭은 본원에 개시된 태깅된 핵산 분자를 무작위 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함한다. 복수의 무작위 프라이머들을 사용한 증폭은 일반적으로 상이한 서열들의 다수의 핵산들의 비-표적화된 증폭 또는 샘플 중의 대다수의 핵산들의 전체 증폭을 야기한다.

[0150] 일부 경우, 증폭은 표적화된 증폭(예를 들면, (미국 특허 제6558928호에 기재된) 선택자 방법, 분자 역위 프로브)을 포함한다. 일부 경우, 핵산의 증폭은 핵산을, 표적 염색체 서열에 상응하는 서열을 가진 적어도 하나의 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함한다. 예시적 염색체 서열은 본원에 개시되어 있다. 일부 경우, 증폭은 핵산을, 비-표적 염색체 서열에 상응하는 서열을 가진 적어도 하나의 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 증폭은 핵산을 한 쌍 이하의 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 프라이머 쌍의 각각의 프라이머는 본원에 개시된 표적 염색체 상의 서열에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 증폭은 핵산을 다수의 프라이머 세트들과 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 제1 세트의 각각의 제1쌍 및 제2 세트의 각각의 쌍은 모두 상이하다.

[0151] 일부 경우, 증폭은 샘플을, 본원에 개시된 표적 염색체 상의 서열에 상응하는 서열을 가진 적어도 하나의 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 증폭은 샘플을, 본원에 개시된 비-표적 염색체 상의 서열에 상응하는 서열을 가진 적어도 하나의 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 증폭은 샘플을 한 쌍 이하의 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 프라이머 쌍의 각각의 프라이머는 본원에 개시된 표적 염색체 상의 서열에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 증폭은 샘플을 다수의 프라이머 세트들과 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 제1 세트의 각각의 제1쌍 및 제2 세트의 각각의 쌍은 모두 상이하다.

[0152] 일부 경우, 증폭은 다중체화(한 반응에서 복수의 핵산들의 핵산 증폭)를 포함한다. 일부 경우, 다중체화는 생물학적 샘플의 핵산을 복수의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍들과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 다중체화는 제1 핵산과 제2 핵산을 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 제1 핵산은 제1 서열에 상응하고 제2 핵산은 제2 서열에 상응한다. 일부 경우, 제1 서열과 제2 서열은 동일하다. 일부 경우, 제1 서열과 제2 서열은 상이하다. 일부 경우, 증폭은 다중체화를 포함하지 않는다. 일부 경우, 증폭은 다중체화를 요구하지 않는다. 일부 경우, 증폭은 네스티드(nested) 프라이머 증폭을 포함한다. 방법은 다수의 영역들의 다중체 PCR을 포함할 수 있고, 이때 각각의 영역은 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)을 포함한다. 다중체화는 단일 튜브에서 일어날 수 있다. 일부 경우, 방법은 100개 초과의 영역들의 다중체 PCR을 포함하고, 이때 각각의 영역은 SNP를 포함한다. 일부 경우, 방법은 500개 초과의 영역들의 다중체 PCR을 포함하고, 이때 각각의 영역은 SNP를 포함한다. 일부 경우, 방법은 1000개 초과의 영역들의 다중체 PCR을 포함하고, 이때 각각의 영역은 SNP를 포함한다. 일부 경우, 방법은 2000개 초과의 영역들의 다중체 PCR을 포함하고, 이때 각각의 영역은 SNP를 포함한다. 일부 경우, 방법은 300개 초과의 영역들의 다중체 PCR을 포함하고, 이때 각각의 영역은 SNP를 포함한다.

[0153] 일부 경우, 방법은 샘플 중의 핵산을 증폭하는 단계를 포함하고, 이때 증폭은 샘플을 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 샘플과 접촉할 때까지 활성을 나타내지 않거나 연장될 수 없다. 일부 경우, 증폭은 샘플을 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 선택된 온도에 노출될 때까지 활성을 나타내지 않거나 연장될 수 없다. 일부 경우, 증폭은 샘플을 적어도 하나

의 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 활성화 시약과 접촉될 때까지 활성을 나타내지 않거나 연장될 수 없다. 비제한적 예로써, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 차단 기를 포함할 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 사용은 프라이머 이량체를 최소화할 수 있고/있거나, 미사용된 프라이머의 인식을 가능하게 하고/하거나, 미사용된 프라이머에 의해 야기된 거짓 결과를 피할 수 있다. 일부 경우, 증폭은 샘플을, 본원에 개시된 표적 염색체 상의 서열에 상응하는 서열을 포함하는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0154] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 하나 이상의 태그의 사용을 포함한다. 하나 이상의 태그의 사용은 본원에 개시된 방법의 효율, 속도 및 정확도 중 적어도 하나를 증가시킬 수 있다. 일부 경우, 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 태그를 포함하고, 이때 태그는 표적 서열에 특이적이지 않다. 이러한 태그는 범용 태그로서 지칭될 수 있다. 일부 경우, 방법은 샘플 중의 표적 서열 또는 이의 단편을, 표적 서열에 특이적지 않은 태그로 태깅하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 태그는 인간 염색체 상의 서열에 특이적이지 않다. 대안적으로 또는 추가적으로, 방법은 샘플을, 표적 서열에 상응하는 서열을 포함하는 태그 및 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 태그는 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 분리되어 있다. 일부 경우, 태그는 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 표적 서열에 하이브리드화한 후 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 연장에 의해 생성된 증폭 생성물에 혼입된다. 태그는 올리고뉴클레오타이드, 소분자 또는 펩타이드일 수 있다. 일부 경우, 태그는 뉴클레오타이드를 포함하지 않는다. 일부 경우, 태그는 올리고뉴클레오타이드를 포함하지 않는다. 일부 경우, 태그는 아미노산을 포함하지 않는다. 일부 경우, 태그는 펩타이드를 포함하지 않는다. 일부 경우, 태그는 서열 특이적이지 않다. 일부 경우, 태그는 임의의 특정 표적 서열에 상응하지 않는 일반적인 서열을 포함한다. 일부 경우, 태그는 증폭된 서열과 관계없이 증폭 생성물이 생성될 때 검출될 수 있다. 일부 경우, 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 태그 중 적어도 하나는 펩타이드 핵산(PNA)을 포함한다. 일부 경우, 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 태그 중 적어도 하나는 잠긴 핵산(LNA)을 포함한다.

[0155] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 복수의 태그들을 사용함으로써, 방법의 정확도, 방법의 속도 및 방법에 의해 수득된 정보 중 적어도 하나를 증가시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 복수의 태그들을 사용함으로써, 신뢰할 수 있는 결과를 수득하기 위해 요구된 샘플의 부피를 감소시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 복수의 태그들은 적어도 하나의 포획 태그를 포함한다. 일부 경우, 복수의 태그들은 적어도 하나의 검출 태그를 포함한다. 일부 경우, 복수의 태그들은 적어도 하나의 포획 태그와 적어도 하나의 검출 태그의 조합을 포함한다. 포획 태그는 일반적으로 다른 영역으로부터 특정 서열 또는 영역을 단리하거나 분리하는 데 사용된다. 포획 태그의 전형적인 예는 (예를 들면, 스트렙타비딘으로 코팅된 표면을 사용함으로써 포획될 수 있는) 바이오틴이다. 검출 태그의 예는 디곡시게닌 및 형광 태그이다. 검출 태그는 직접적으로 검출될 수 있거나 (예를 들면, 레이저 조사 및/또는 방출된 광의 측정), 발광 어세이 또는 효소 어세이와 같은 이차 검출 시스템을 갖거나 이차 검출 시스템과 상호작용하는 항체를 통해 간접적으로 검출될 수 있다. 일부 경우, 복수의 태그들은 적어도 하나의 포획 태그(피분석물을 단리하는 데 사용된 태그)와 적어도 하나의 검출 태그(피분석물을 검출하는 데 사용된 태그)의 조합을 포함한다. 일부 경우, 단일 태그는 검출 태그 및 포획 태그로서 작용한다.

[0156] 일부 경우, 방법은 샘플 중의 적어도 하나의 순환 무세포 핵산을 제1 태그 및 제2 태그와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 제1 태그는 순환 무세포 핵산의 센스 가닥에 상보적인 제1 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 제2 포획 태그는 순환 무세포 핵산의 안티센스 가닥에 상보적인 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 경우, 방법은 샘플 중의 적어도 하나의 순환 무세포 핵산을 제1 태그 및 제2 태그와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 제1 태그는 제2 태그와 동일한 표지를 가진다. 일부 경우, 방법은 샘플 중의 적어도 하나의 순환 무세포 핵산을 제1 태그 및 제2 태그와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 제1 태그는 제2 태그와 상이한 표지를 가진다. 일부 경우, 상기 태그들은 동일하고 검출된 모든 프로브들/영역들의 응집체인 단일 정성적 또는 정량적 신호가 존재한다. 일부 경우, 태그들은 상이하다. 한 태그는 정제를 위해 사용될 수 있고 한 태그는 검출을 위해 사용될 수 있다. 일부 경우, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 영역(예를 들면, cfDNA 단편)에 특이적이고 형광 표지를 갖고, 제2 올리고뉴클레오타이드는 인접 영역에 특이적이고 응집체 신호만이 요구되기 때문에 동일한 형광 표지를 가진다. 다른 경우, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 영역(예를 들면, cfDNA 단편)에 특이적이고 형광 표지를 갖고, 제2 올리고뉴클레오타이드는 인접 영역에 특이적이고 2개의 상이한 영역을 검출하기 위해 상이한 형광 표지를 가진다.

[0157] 일부 경우, 방법은 증폭 생성물을 검출하는 단계를 포함하고, 이때 증폭 생성물은 본원에 개시된 표적 염색체의 적어도 일부 또는 이의 단편을 증폭함으로써 생성된다. 표적 염색체의 일부 또는 단편은 적어도 5개의 뉴클레오

타이드를 포함할 수 있다. 표적 염색체의 일부 또는 단편은 적어도 약 10개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 염색체의 일부 또는 단편은 적어도 약 15개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 증폭 생성물의 검출은 증폭 생성물을 태깅하거나 표지화하는 단계를 포함하지 않는다. 일부 경우, 방법은 증폭 생성물을 이의 양에 기반하여 검출한다. 예를 들면, 방법은 샘플에서 이중 가닥 DNA의 양의 증가를 검출할 수 있다. 일부 경우, 증폭 생성물의 검출은 적어도 부분적으로 그의 크기에 기반한다. 일부 경우, 증폭 생성물은 약 50개의 염기쌍 내지 약 500개의 염기쌍의 길이를 가진다.

[0158] 일부 경우, 증폭 생성물의 검출은 증폭 생성물을 태그와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 태그는 증폭 생성물의 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 일부 경우, 태그는 증폭 생성물의 서열에 상보적인 서열을 포함하지 않는다. 태그의 비제한적 예는 상기 및 하기 개시에 기재되어 있다.

[0159] 일부 경우, 태깅되어 있든 아니면 태깅되어 있지 않든 관계없이 증폭 생성물의 검출은 증폭 생성물을 본원에 개시된 장치, 시스템 또는 키트의 신호 검출기 또는 어세이 조립체에 노출시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 본원에 개시된 장치, 시스템 또는 키트의 어세이 조립체에서 증폭하고 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 어세이 조립체는 증폭 시약을 포함한다. 일부 경우, 방법은 기구 또는 시약을 본원에 개시된 어세이 조립체(예를 들면, 측면 유동 어세이)에 적용하여, 측면 유동 어세이를 통한 생물학적 샘플, 용액 또는 이들의 조합의 유동을 제어하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 기구는 진공, 피펫, 펌프 또는 이들의 조합이다.

[0160] 서열분석

[0161] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 핵산의 서열분석을 포함한다. 핵산은 본원에 개시된 핵산, 예컨대, 태깅된 핵산, 증폭된 핵산, 무세포 핵산, 무세포 태아 핵산, 표적 염색체에 상응하는 서열을 가진 핵산, 표적 염색체의 영역에 상응하는 서열을 가진 핵산, 비-표적 염색체에 상응하는 서열을 가진 핵산, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 경우, 핵산은 DNA이다. 일부 경우, 핵산은 RNA이다. 일부 경우, 핵산은 DNA를 포함한다. 일부 경우, 핵산은 RNA를 포함한다.

[0162] 일부 경우, 서열분석은 표적화된 서열분석을 포함한다. 일부 경우, 서열분석은 전체 게놈 서열분석을 포함한다. 일부 경우, 서열분석은 표적화된 서열분석 및 전체 게놈 서열분석을 포함한다. 일부 경우, 전체 게놈 서열분석은 해당 기술 분야에서 차세대 서열분석 또는 제2 세대 서열분석으로서도 지칭되는 대량 병렬 서열분석을 포함한다. 일부 경우, 전체 게놈 서열분석은 무작위 대량 병렬 서열분석을 포함한다. 일부 경우, 서열분석은 전체 게놈 라이브러리로부터 포획된 표적 영역의 무작위 대량 병렬 서열분석을 포함한다.

[0163] 일부 경우, 방법은 본원에 개시된 증폭된 핵산을 서열분석하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 증폭된 핵산은 표적화된 증폭(예를 들면, 관심 있는 표적 서열에 특이적인 프라이머를 사용함)에 의해 생성된다. 일부 경우, 증폭된 핵산은 비-표적화된 증폭(예를 들면, 무작위 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용함)에 의해 생성된다. 일부 경우, 방법은 증폭된 핵산을 서열분석하는 단계를 포함하고, 이때 서열분석은 대량 병렬 서열분석을 포함한다.

[0164] 일부 경우, 방법은 알고리즘을 이용하여 게놈 서열 정렬을 수행하는 단계를 포함한다. 비제한적 예로써, 알고리즘은 염색체 카피 수를 인식하도록 디자인될 수 있다. 알고리즘은 다양한 SNP 좌위들에서 각각의 관련 대립유전자들과 관련된 서열 리드의 관측된 수를 드러내도록 디자인될 수 있다. 알고리즘은 부모 유전자형 및 교차 빈도 데이터를 사용하여, 인 실리코로 측정된 좌위에서 일염색체, 이염색체 및 삼염색체 태아 유전자형을 생성한 후, 각각의 유전자형에 대한 서열분석 데이터를 예측하는 데 사용한다. 베이지안 모델을 이용하여, 최대 우도를 가진 서열분석 데이터는 카피 수 및 태아 분획으로서 선택되고, 우도는 계산된 정확도이다. 각각의 SNP에 대한 2개의 가능한 대립유전자들 각각에 대해 상이한 확률 분포가 예상될 수 있고 관측된 대립유전자와 비교될 수 있다. 이것은 문헌[Zimmermann et al., in *Prenat Diagn* (2012) 32:1233-1241]에 기재되어 있다. 그러나, 이 문헌의 저자들(Zimmermann et al.)은 4.0% 미만의 태아 분획을 함유하는 샘플이 정보를 제공할 수 없고 적어도 20 ㎖의 혈액 부피가 이 유형의 분석을 수행하기에 충분한 무세포 DNA를 수득하기 위해 필요하다고 믿었다. 대조적으로, 본원의 방법은 4% 미만의 태아 분획을 가진 샘플, 및 샘플을 그다지 많이 요구하지 않는 샘플로 이 분석을 이용할 수 있다.

[0165] 라이브러리 제조

[0166] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산을 변형시켜, 검출을 위한 무세포 핵산의 라이브러리를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 핵산 서열분석을 위해 무세포 핵산을 변형시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 검출을 위해 무세포 핵산을 변형시키는 단계를 포함하고, 이때 검출은 핵산

서열분석을 포함하지 않는다. 일부 경우, 방법은 검출을 위해 무세포 핵산을 변형시키는 단계를 포함하고, 이때 검출은 태깅된 무세포 핵산을 태그 검출의 발생에 기반하여 카운팅하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산을 변형시켜 무세포 핵산의 라이브러리를 생성하는 단계를 포함하고, 이때 상기 방법은 무세포 핵산을 증폭하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 변형은 증폭 전에 일어난다. 일부 경우, 변형은 증폭 후에 일어난다.

[0167] 일부 경우, 무세포 핵산의 변형은 핵산의 단편인 무세포 핵산의 말단을 복구하는 단계를 포함한다. 비제한적 예로서, 말단 복구는 5' 포스페이트 기, 3' 하이드록시 기 또는 이들의 조합을 무세포 핵산으로 회복시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 복구는 5' 인산화, A-테일링, 갭 채움(filling), 닉 부위의 폐쇄 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 경우, 복구는 오버행의 제거를 포함할 수 있다. 일부 경우, 복구는 상보적 뉴클레오타이드로 오버행을 채우는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 라이브러리 제조를 위한 무세포 핵산의 변형은 어댑터의 사용을 포함한다. 어댑터는 본원에서 서열분석 어댑터로서 지칭될 수도 있다. 일부 경우, 어댑터는 서열분석에 도움이 된다. 일반적으로, 어댑터는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 비제한적 예로써, 어댑터는 모두는 아니더라도 변형 후 샘플 중의 다수의 무세포 핵산들에 보편적인 서열이기 때문에 방법의 다른 단계, 예컨대, 증폭, 정제 및 서열분석을 단순화할 수 있다. 일부 경우, 무세포 핵산의 변형은 어댑터를 무세포 핵산에 라이게이션하는 단계를 포함한다. 라이게이션 단계는 블런트 라이게이션을 포함할 수 있다. 일부 경우, 무세포 핵산의 변형은 어댑터를 핵산에 하이브리드화시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 서열분석 어댑터는 헤어핀 또는 스템-루프 어댑터를 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산의 변형은 헤어핀 또는 스템-루프 어댑터를 핵산에 하이브리드화시킴으로써, 서열분석되거나 분석되는 원형 라이브러리 생성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 서열분석 어댑터는 3' 말단에서 닉을 남기면서 차단된 5' 말단을 포함한다. 이 구성의 장점은 라이브러리 효율의 증가 및 원치 않는 부산물, 예컨대, 어댑터 이량체의 감소를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 추가 경우, 어댑터는 주형을 선형화하기 위해 절단 가능한 복제 중단을 가진다.

[0168] 라이브러리 제조 단계(예를 들면, 말단 복구, 테일링 및 어댑터의 라이게이션) 및 증폭의 효율은 크라우딩제를 샘플 또는 증폭 반응에 첨가하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있다. 천연 환경에서의 효소 과정들(예를 들면, 세포에서의 DNA 복제)은 종종 혼잡한 환경에서 일어난다. 이 효소 과정들 중 일부는 혼잡한 환경에서 더 효율적이다. 예를 들면, 혼잡한 환경은 DNA 나선효소의 활성 및 DNA 중합효소의 민감도를 향상시킬 수 있다. 따라서, 크라우딩제는 혼잡한 환경을 모방하기 위해 첨가될 수 있다. 크라우딩제는 중합체일 수 있다. 크라우딩제는 단백질일 수 있다. 크라우딩제는 폴리사카라이드일 수 있다. 크라우딩제의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜, 덱스트란 및 피콜(Ficoll)이다. 생체내 혼잡을 모방하는 농도가 종종 바람직하다. 예를 들면, 4%(40 mg/㎖) PEG 1 kDa은 생체내에서 발견되는 대략적인 혼잡 효과를 제공한다. 일부 경우, 증폭 반응에서 크라우딩제의 농도는 약 2% 내지 약 20% w/v이다. 일부 경우, 증폭 반응에서 크라우딩제의 농도는 약 2% 내지 약 15% w/v이다. 일부 경우, 증폭 반응에서 크라우딩제의 농도는 약 2% 내지 약 10% w/v이다. 일부 경우, 증폭 반응에서 크라우딩제의 농도는 약 2% 내지 약 8% w/v이다. 일부 경우, 증폭 반응에서 크라우딩제의 농도는 약 3% 내지 약 6% w/v이다.

[0169] 일부 경우, 라이브러리를 제조하기 위한 무세포 핵산의 변형은 태그의 사용을 포함한다. 태그는 본원에서 바코드로서도 지칭될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 무세포 핵산을, 관심 있는 염색체 영역에 상응하는 태그로 변형시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 무세포 핵산을, 관심 없는 염색체 영역에 특이적인 태그로 변형시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 무세포 핵산의 제1 부분을 관심 있는 적어도 하나의 염색체 영역에 상응하는 제1 태그로 변형시키고 무세포 핵산의 제2 부분을 관심 없는 적어도 하나의 염색체 영역에 상응하는 제2 태그로 변형시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산의 변형은 태그를 무세포 핵산에 라이게이션하는 단계를 포함한다. 라이게이션 단계는 블런트 라이게이션을 포함할 수 있다. 일부 경우, 무세포 핵산의 변형은 태그를 핵산에 하이브리드화시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 태그는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 경우, 태그는 핵산 분석 이외의 수단에 의해 검출될 수 있는 비-올리고뉴클레오타이드 마커 또는 표지를 포함한다. 비제한적 예로써, 비-올리고뉴클레오타이드 마커 또는 표지는 형광 분자, 나노입자, 염료, 펩타이드 또는 다른 검출 가능한/정량 가능한 소분자를 포함할 수 있다.

[0170] 일부 실시양태에서, (c)의 태깅 단계는 (a) (i) 하나 이상의 중합효소 및 하나 이상의 엑소뉴클레아제를 사용하여, 일부 실시양태에서 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단이 제거되는, 무세포 DNA의 블런트 말단을 생성하는 단계, (ii) 무세포 DNA의 블런트 말단을 탈인산화하는 단계, (iii) 무세포 DNA를 크라우딩 시약과 접촉시킴으로써, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 엑소뉴클레아제 및 무세포 DNA 사이의 반응을 향상시키는 단계, 또는 (iv) 리가제를 사용하여 무세포 DNA의 DNA 손상을 복구 또는 제거하는 단계를 포함하는 하나 이상의 단계로 라이게이션 적격 무세포 DNA를 생성하는 단계; 및 (b) 리가제, 크라우딩 시약 및/또는 소분자 인핸서의

존재 하에서 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써 라이게이션 적격 무세포 DNA를 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 라이게이션하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 중합효소는 T4 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 엑소뉴클레아제는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 또는 엑소뉴클레아제 III을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제는 T3 DNA 리가제, T4 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, Taq 리가제, 앰플리가제, 이. 콜라이 리가제 또는 Sso7-리가제 융합 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 시약은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글리코겐 또는 덱스트란, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자 인핸서는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 폴리소르베이트 20, 포름아미드 또는 디올, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, (b)의 라이게이션 단계는 블런트 말단 라이게이션 또는 단일 뉴클레오타이드 오버행 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태에서, 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 Y 모양 어댑터, 헤어핀 어댑터, 스템 루프 어댑터, 분해 가능한 어댑터, 차단된 자가-라이게이션 어댑터 또는 바코딩된 어댑터, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0171] 일부 경우, 라이브러리를 제조하기 위한 무세포 핵산의 변형은 본원에서 단순히 지표로서도 지칭되는 샘플 지표의 사용을 포함한다. 비제한적 예로써, 지표는 올리고뉴클레오타이드, 소분자, 나노입자, 펩타이드, 형광 분자, 염료, 또는 다른 검출 가능한/정량 가능한 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 경우, 제1 생물학적 샘플로부터의 무세포 핵산의 제1 군은 제1 지표로 표지부착되고, 제1 생물학적 샘플로부터의 무세포 핵산의 제1 군은 제2 지표로 표지부착되고, 이때 제1 지표와 제2 지표는 상이하다. 따라서, 다수의 지표들은 다수의 샘플들이 한 번에 분석될 때 다수의 샘플들로부터 무세포 핵산을 구별할 수 있게 한다. 일부 경우, 방법은 무세포 핵산의 증폭을 개시하고, 이때 무세포 핵산을 증폭하는 데 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 지표를 포함한다.

[0172] DNA 손실이 DNA 단리 및 분석의 모든 단계에서 일어날 수 있지만, 가장 높은 손실은 전형적으로 라이브러리 제조 단계에서 나타난다. 전통적인 방법은 80% 내지 90%의 물질 손실을 보여준다. 종종 이 손실은 DNA의 농도를 차세대 서열분석에 요구된 필요 수준까지 높이기 위한 후속 증폭 단계에 의해 보상되나, 증폭은 이전 단계들 동안 일어난 정보 손실을 보상할 수 없다. 샘플 중의 초기 DNA의 80% 손실을 겪는 라이브러리는 20% 효율 또는 0.2의 효율을 가진 라이브러리로서 기재될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 0.2, 적어도 약 0.3, 적어도 약 0.4, 적어도 약 0.5, 적어도 약 0.6 또는 적어도 약 0.8의 효율을 가진 라이브러리를 달성하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 0.4의 효율을 가진 라이브러리를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 약 0.5의 효율을 가진 라이브러리를 생성하는 단계를 포함한다. 이러한 효율을 가진 라이브러리를 생성하는 방법은 본원에 기재된 바와 같이 크라우딩제의 사용 및 무세포 DNA 단편 말단의 복구, 라이게이션 방법, 정제 방법, 순환 파라미터 및 화학양론적 비로 이 효율을 달성할 수 있다. 일부 경우, 라이브러리 제조 방법은 무세포 핵산의 핵산 증폭을 요구하지 않는다. 일부 경우, 무세포 핵산의 라이브러리는 조작된 단백질이 사용되는 경우 시험관내 CRISPR-Cas 표적화된 절단 과정을 이용함으로써 생성되고, 이때 가이드 RNA(gRNA)는 상보적 DNA 표적 부위에 결합하고, 예를 들면, Cas9와 함께 블런트 말단, 이중 가닥 절단 또는 단일 가닥 닉을 생성할 수 있다. 이 DNA 절단을 이용하여, 절단된 DNA를 변형시키고 이를 이 표적 영역의 라이게이션 및/또는 증폭 과정 및 후속 분석에 적합하게 만들 수 있다. 따라서, CRISPR은 DNA 분석 또는 서열분석을 위한 표적 농후화 과정으로서 이용된다. 이 목적에 유용한 천연 CRISPR-Cas 조합 및 조작된 CRISPR-Cas 조합의 비제한적 예는 Cas9, Cas12, 케스케이드 및 Cas13, 또는 이들의 서브타입을 포함한다. 일부 경우, Cas 효소는 Cas 오르톨로그, 예컨대, 전체적으로 본원에 포함된 문헌[Adrian Pickar-Oliver et al., The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications, Nat Rev Mol Cell Biol. 2019 Aug;20(8):490-507]에 기재된 Cas 오르톨로그이다.

[0173] 추가 예에서, gRNA는 표적 단편화를 증가시키고 오프-표적 단편화를 감소시킴으로써, 증폭 없이 라이브러리 효율을 증가시키도록 조작된다. 일부 경우, 라이브러리는 엑소뉴클레아제로 처리됨으로써, 비-표적 DNA 단편을 고갈시키고 라이브러리에서 표적 단편을 농후화한다.

[0174] 일부 경우, 본원에 기재된 엔도뉴클레아제는 단일 또는 이중 가닥 DNA 절단을 시작함으로써 작용한다. 일부 경우, 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 절단은 가이드 RNA 결합 부위에 바로 인접하거나, 이 결합 부위 내부에 있거나, 이 결합 부위의 양쪽에 있다. 이 방식으로, 본원에 기재된 엔도뉴클레아제는 당면한 분석 문제에 대한 구체적인 해법을 제공하도록 디자인될 수 있다. 일부 경우, 라이브러리 제조는 이중 가닥 DNA를 단편화하고 단편(예를 들면, 올리고뉴클레오타이드)의 3' 말단 및 5' 말단에서 합성 태그를 라이게이션하는 전위효소에 의해 매개된다. 일부 경우, 이 과정은 태깅 기반 라이브러리 구축이다. 일부 경우, 전위효소는 "절단 및 붙이기" 기작으로 작동한다. 일부 경우, 전위효소는 Tn5 전위효소 또는 이의 변이체이다. 일부 경우, 태그는 길이가 약 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개 또는 15개 염기쌍인 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 경우,

태그는 유리 합성 ME 어댑터, 예컨대, NExtera DNA 키트(Illumina)에서 제공된 어댑터이다. 일부 경우, 단편화된 DNA는 본원에 기재된 방법에 의해 증폭된다.

[0175] 유전 정보의 검출

[0176] 일반적으로, 본원에 개시된 방법은 바이오마커, 피분석물 또는 이들의 변형된 형태를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 핵산을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 무세포 핵산을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 핵산의 태그를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 핵산의 앰플리콘을 검출하는 단계를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 방법은 비-핵산 성분을 검출하는 단계를 포함한다. 비제한적 예로써, 비-핵산 성분은 단백질, 펩타이드, 지질, 지방산, 스테롤, 인지질, 탄수화물, 바이러스 성분, 미생물 성분 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다. 바이러스 성분 또는 미생물 성분의 경우, 방법은 검출 전에 바이러스 또는 세균으로부터 핵산을 방출하고/하거나, 정제하고/하거나 증폭하는 단계를 포함할 수 있다.

[0177] 검출은 관심 있는 핵산을 서열분석하는 단계를 포함할 수 있다. 검출은 관심 있는 핵산 상의 태그를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 검출은 관심 있는 바이오마커 상의 태그를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 바이오마커는 후성 유전자 변형일 수 있다. 바이오마커는 후성적 프로파일(복수의 후성 유전자 변형들)일 수 있다. 바이오마커는 후성적으로 변형된 핵산일 수 있다. 검출은 중아황산염 서열분석을 포함할 수 있다. 검출은 염색질 면역침전(ChIP) 어세이를 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 검출은 관심 있는 바이오마커 상의 태그를 서열분석하는 단계를 포함할 수 있다.

[0178] 검출은 본원에 기재된 바와 같이 증폭을 포함할 수 있다. 예를 들면, 증폭은 표적 피분석물의 존재 또는 부재를 기반으로 신호를 생성하는 qPCR을 포함할 수 있다. 일부 경우, 증폭은 PCR을 포함한다. 일부 경우, 증폭은 PCR을 포함하지 않는다. 일부 경우, 증폭은 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함한다. 일부 경우, cfDNA를 DNA 리가제, 및 cfDNA에 하이브리드화되도록 디자인된 프로브와 접촉시킨다. 일부 경우, cfDNA를 먼저 절단하여(예를 들면, 제한효소로 처리하여) cfDNA 단편을 생성하고, cfDNA 단편을 상기 리가제 및 프로브와 접촉시킨다. 상기 리가제는 프로브로 표지부착된 원형화된 cfDNA를 생성한다. 임의적으로, 골격 올리고를 사용하여 cfDNA 또는 cfDNA 단편을 원형화시킨다. 이 원형화된 단편을 RCA로 복제하여 콘카타머(concatamer)를 생성한다. 프로브를 검출 가능한 올리고뉴클레오타이드(예를 들면, 형광)로 인식하고 영상화할 수 있다.

[0179] 방법은 생물학적 샘플의 핵산에서 유전자 돌연변이를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 생물학적 샘플의 핵산에서 복수의 유전자 돌연변이들을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 생물학적 샘플의 복수의 핵산들 각각에서 유전자 돌연변이를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 생물학적 샘플의 복수의 핵산들에서 복수의 유전자 돌연변이들을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0180] 방법은 생물학적 샘플의 핵산의 후성 유전자 변형을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 후성 유전자 변형의 검출은 중아황산염 서열분석을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 후성 유전자 변형의 검출은 염색질 면역침전(ChIP) 어세이를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 후성 유전자 변형은 유전성 변경이다. 일부 경우, 후성 유전자 변형은 하나 이상의 환경 자극에 대한 반응으로 세포가 전사에 영향을 미치게 할 수 있는 변경이다. 비제한적 예로써, 후성 유전자 변형은 사이토신 또는 아데닌 잔기의 메틸화일 수 있다. 일부 경우, 후성 유전자 변형은 메틸 기의 부재이다. 전형적으로, 메틸화는 유전자의 침묵을 촉진한다. 후성 유전자 변형은 히스톤의 아세틸화, 메틸화, 유비퀴틴화 및 인산화도 포함한다. 후성 유전자 변형은 생물학적 과정(예를 들면, 면역 반응, 세포 증식)을 촉진할 수 있거나, 억제할 수 있거나, 방해할 수 있거나 감소시킬 수 있다. 방법은 생물학적 샘플의 핵산의 복수의 후성 유전자 변형들을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 생물학적 샘플의 복수의 핵산들 각각의 후성 유전자 변형을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 생물학적 샘플의 복수의 핵산들의 후성 유전자 변형을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 후성 유전자 변형의 게놈 범위 분석을 수행하여, 검사 샘플과 대조군/기준 샘플 사이에 차등적으로 메틸화된 영역을 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[0181] 방법은 조직에 특이적인 하나 이상의 후성 유전자 변형을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들면, 조직은 무세포 핵산의 기원을 추적하는 데 사용될 수 있는 구별되는 메틸화 프로파일을 가진다. 이것은 무세포 핵산이 유래한 곳을 확인하는 데 유용할 수 있다. 비제한적 예로써, 후성 유전자 변형은 뇌에 특이적일 수 있고, 그 후성 유전자 변형을 가진 무세포 핵산은 신경퇴행성 질환 또는 뇌종양을 표시할 수 있다. 방법은 이러한 무세포 핵산이 검출되는 경우 조직을 검사하거나, 생검하거나, 영상화하거나 치료하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 방법은 2개의 조직들에만 특이적인 하나 이상의 후성 유전자 변형을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 3개 미만의 조직들에 특이적인 하나 이상의 후성 유전자 변형을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 5개 미

만의 조직들에 특이적인 하나 이상의 후성 유전자 변형을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0182] 방법은 핵산 또는 비-핵산 성분의 검출 가능한 표지 또는 검출 가능한 신호를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 핵산 또는 비-핵산 성분에 결합하는 결합 모이어티(예를 들면, 소분자, 펩타이드, 앱타머, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편)의 검출 가능한 표지 또는 검출 가능한 신호를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 비제한적 예로써, 검출 가능한 표지 또는 신호는 형광 분자, 생체발광 분자, 발광 분자, 방사성 신호, 자기 신호, 전기 신호 또는 염료일 수 있다. 예를 들면, 방법은 결합 모이어티와 관심 있는 단백질 사이의 상호작용을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 비제한적 예로써, 검출은 IPCR 또는 PLA를 수행하는 단계를 포함할 수 있다.

[0183] 검출은 검사의 결과가 표시되는, 본원에 개시된 장치 또는 시스템의 계면을 살펴보는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들면, 도 4 및 도 5a 내지 5e를 참조한다. 검출은 측면 유동 장치 상에서 색상 외관 또는 형광 신호를 살펴보는 단계를 포함할 수 있다. 검출은 본원에 개시된 장치 상에서 검사 결과를 받는 단계를 포함할 수 있다. 검출은 본원에 개시된 시스템의 장치와 통신하는 모바일 장치, 컴퓨터, 노트패드 또는 다른 전자 장치 상에서 검사 결과를 받는 단계를 포함할 수 있다.

[0184] 일반적으로, 본원에 개시된 방법, 키트, 시스템 및 장치는 짧은 시간 이내에 유전 정보를 제공할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 1분 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 2분 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 5분 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 10분 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 15분 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 20분 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 30분 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 45분 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 60분 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 90분 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 2시간 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 3시간 이내에 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 약 4시간 이내에 수행될 수 있다.

[0185] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 최소한의 기술적 훈련을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 어떠한 기술적 훈련도 요구하지 않는다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 본원에 개시된 방법을 실시하는 개체가 샘플 및 용액을 전달하고 혼합하는 간단한 프로토콜을 따를 것만을 요구한다. 예를 들면, 본원에 개시된 방법은 기술자 또는 의료 제공자의 보조 없이 그녀의 집에서 임신 대상체에 의해 이용될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 의학적 훈련 또는 기술적 훈련을 받지 않은 사용자에 의해 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법, 키트, 시스템 및 장치는 단순히 사용자가 생물학적 샘플을 시스템 또는 장치에 첨가하고 결과를 검토하여 유전 정보를 수득하는 것을 요구한다.

[0186] 대상체에서 질환 또는 병태를 검출하는 방법

[0187] 방법은 검출을 기반으로 질환 또는 병태의 존재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 검출을 기반으로 질환 또는 병태의 위험을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 검출을 기반으로 질환 또는 병태의 상태를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 검출을 기반으로 질환 또는 병태의 상태를 모니터링하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 검출을 기반으로 요법을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 검출을 기반으로 대상체에게 투여되는 약물의 용량을 변형시키는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 검출을 기반으로 요법에 대한 대상체의 반응을 모니터링하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들면, 질환은 암일 수 있고, 요법은 화학요법일 수 있다. 다른 암 요법은 항체, 항체-약물 접합체, 안티센스 분자, 조작된 T 세포 및 방사선을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 방법은 검출을 기반으로 대상체를 추가 검사하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들면, 질환은 암일 수 있고, 추가 검사는 영상화(예를 들면, CAT-SCAN, PET-SCAN)) 및 생검 수행을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0188] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 하나의 표적 염색체의 태아 이수성이 있음을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 서열분석 리드의 양이 본원에 개시된 샘플에서 검출될 때 적어도 하나의 표적 염색체의 태아 이수성이 있음을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 서열분석 리드의 양은 본원에 기재된 바와 같이 인간 집단에서 이수성이 존재하는 것으로 공지되어 있는 염색체 또는 염색체 영역으로부터의 서열에 상응한다.

[0189] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 하나의 표적 염색체에 상응하는 서열분석 리드 대 적어도 하나의 비-표적 염색체에 상응하는 서열분석 리드의 비가 정배수체 태아를 가진 대조군 임신 대상체로부터의 대조군 생물학적 샘플에서의 각각의 비와 상이할 때 적어도 하나의 표적 염색체의 태아 이수성이 있음을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 하나의 표적 염색체에 상응하는 서열분석 리드 대 적어도

하나의 비-표적 염색체에 상응하는 서열분석 리드의 비가 정배수체 태아를 가진 대조군 임신 대상체로부터의 대조군 생물학적 샘플에서의 각각의 비와 상이하기 때문에 적어도 하나의 표적 염색체의 태아 이수성이 있음을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 하나의 표적 염색체에 상응하는 서열분석 리드 대 적어도 하나의 비-표적 염색체에 상응하는 서열분석 리드의 비가 정배수체 태아를 가진 대조군 임신 대상체로부터의 대조군 생물학적 샘플에서의 각각의 비와 상이하지 않기 때문에 적어도 하나의 표적 염색체의 태아 이수성이 없음을 검출하는 단계를 포함한다.

[0190] 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체에 상응하는 서열분석 리드는 적어도 하나의 표적 염색체의 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드를 포함한다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체에 상응하는 서열분석 리드는 비-표적 염색체의 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드를 포함한다. 일부 경우, 염색체 영역은 길이가 적어도 약 10개 염기쌍이다. 일부 경우, 염색체 영역은 길이가 적어도 약 20개 염기쌍이다. 일부 경우, 염색체 영역은 길이가 적어도 약 50개 염기쌍이다.

[0191] 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 13번 염색체, 16번 염색체, 18번 염색체, 21번 염색체, 22번 염색체, X 염색체 또는 Y 염색체 중 적어도 하나이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 13번 염색체, 18번 염색체 및 21번 염색체 중 적어도 하나이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 13번 염색체, 18번 염색체, 21번 염색체 및 X 염색체 중 적어도 하나이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 13번 염색체, 18번 염색체, 21번 염색체 및 Y 염색체 중 적어도 하나이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 13번 염색체, 18번 염색체, 21번 염색체, X 염색체 및 Y 염색체 중 적어도 하나이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 13번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 16번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 18번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 21번 염색체이다. 일부 경우, 표적 염색체는 22번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 성염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 X 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 Y 염색체이다.

[0192] 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 13번 염색체, 16번 염색체, 18번 염색체, 21번 염색체, 22번 염색체, X 염색체 또는 Y 염색체 이외의 염색체들 중 적어도 하나이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 13번 염색체, 16번 염색체, 18번 염색체, 21번 염색체, 22번 염색체, X 염색체 또는 Y 염색체가 아니다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 1번 염색체, 2번 염색체, 3번 염색체, 4번 염색체, 5번 염색체, 6번 염색체, 7번 염색체, 8번 염색체, 9번 염색체, 10번 염색체, 11번 염색체, 12번 염색체, 14번 염색체, 15번 염색체, 17번 염색체, 19번 염색체 및 20번 염색체로부터 선택된다. 일부 경우, 비-표적 염색체는 1번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 2번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 3번 염색체이다. 일부 경우, 비-표적 염색체는 4번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 5번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 6번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 7번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 8번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 9번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 10번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 11번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 12번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 14번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 15번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 17번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 19번 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 20번 염색체이다.

[0193] 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 13번 염색체이고, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 13번 염색체 이외의 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 16번 염색체이고, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 16번 염색체 이외의 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 18번 염색체이고, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 18번 염색체 이외의 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 21번 염색체이고, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 21번 염색체 이외의 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 22번 염색체이고, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 22번 염색체 이외의 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 X 염색체이고, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 X 염색체 이외의 염색체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 염색체는 Y 염색체이고, 적어도 하나의 비-표적 염색체는 Y 염색체 이외의 염색체이다.

[0194] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 임신 대상체의 태아가 유전자 이상을 가짐을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 유전자 이상은 표적 염색체 영역 내의 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 삽입에 기인한다. 일부 경우, 유전자 이상은 표적 염색체 영역 내의 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 결실에 기인한다. 일부 경우, 유전자 이상은 제1 표적 염색체 영역과 제2 염색체 표적 영역 사이의 뉴클레오타이드 전위에 기인한다. 일반적으로, 제1 표

적 염색체 영역과 제2 염색체 표적 영역은 상이한 염색체에 위치된다.

[0195] 일부 경우, 표적 염색체 영역은 최소 길이에 의해 정의된다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 길이가 적어도 약 50개 염기쌍이다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 길이가 적어도 약 100개 염기쌍이다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 길이가 적어도 약 200개 염기쌍이다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 길이가 적어도 약 300개 염기쌍이다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 길이가 적어도 약 500개 염기쌍이다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 길이가 적어도 약 1000개 염기쌍이다.

[0196] 일부 경우, 표적 염색체 영역은 최대 길이에 의해 정의된다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 약 100,000개 염기쌍만큼 길다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 약 500,000개 염기쌍만큼 길다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 약 1,000,000개 염기쌍만큼 길다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 약 10,000,000개 염기쌍만큼 길다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 약 100,000,000개 염기쌍만큼 길다. 일부 경우, 표적 염색체 영역은 약 200,000,000개 염기쌍만큼 길다.

[0197] 일부 경우, 유전자 이상은 카피 수 변이이다. 일부 경우, 카피 수 변이는 적어도 하나의 염색체 상의 유전자의 결실을 포함한다. 일부 경우, 카피 수 변이는 적어도 하나의 염색체 상의 유전자의 중복을 포함한다. 일부 경우, 카피 수 변이는 적어도 하나의 염색체 상의 유전자의 삼중화를 포함한다. 일부 경우, 카피 수 변이는 유전자의 3개 초과의 카피를 포함한다. 일부 경우, 카피 수 변이는 적어도 하나의 염색체 상의 비-단백질 코딩 서열의 중복을 포함한다. 일부 경우, 카피 수 변이는 적어도 하나의 염색체 상의 비-코딩 영역의 삼중화를 포함한다. 일부 경우, 카피 수 변이는 적어도 하나의 염색체 상의 비-코딩 영역의 중복을 포함한다.

[0198] 일부 경우, 유전자 이상은 염색체 아암의 적어도 약 0.001%가 중복되게 한다. 일부 경우, 유전자 이상은 염색체 아암의 적어도 약 0.01%가 중복되게 한다. 일부 경우, 유전자 이상은 염색체 아암의 적어도 약 0.1%가 중복되게 한다. 일부 경우, 유전자 이상은 염색체 아암의 적어도 약 1%가 중복되게 한다. 일부 경우, 유전자 이상은 염색체 아암의 적어도 약 10%가 중복되게 한다. 일부 경우, 염색체 아암의 적어도 약 20%가 중복된다. 일부 경우, 염색체 아암의 적어도 약 30%가 중복된다. 일부 경우, 염색체 아암의 적어도 약 50%가 중복된다. 일부 경우, 염색체 아암의 적어도 약 70%가 중복된다. 일부 경우, 염색체 아암의 적어도 약 90%가 중복된다. 일부 경우, 전체 염색체 아암이 중복된다.

[0199] 일부 경우, 유전자 이상은 염색체 아암의 적어도 약 0.001%가 결실되게 한다. 일부 경우, 유전자 이상은 염색체 아암의 적어도 약 0.01%가 결실되게 한다. 일부 경우, 유전자 이상은 염색체 아암의 적어도 약 0.1%가 결실되게 한다. 일부 경우, 유전자 이상은 염색체 아암의 적어도 약 1%가 결실되게 한다. 일부 경우, 유전자 이상은 염색체 아암의 적어도 약 10%가 결실되게 한다. 일부 경우, 염색체 아암의 적어도 약 20%가 결실된다. 일부 경우, 염색체 아암의 적어도 약 30%가 결실된다. 일부 경우, 염색체 아암의 적어도 약 50%가 결실된다. 일부 경우, 염색체 아암의 적어도 약 70%가 결실된다. 일부 경우, 염색체 아암의 적어도 약 90%가 결실된다. 일부 경우, 전체 염색체 아암이 결실된다.

[0200] 일부 경우, 방법은 표적 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드의 양이 검출될 때 태아가 유전자 이상을 가짐을 검출하는 단계를 포함하고, 이때 상기 양은 유전자 이상을 표시한다.

[0201] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 핵산을 서열분석하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 핵산은 무세포 핵산이다. 일부 경우, 핵산은 무세포 태아 핵산을 포함한다. 일부 경우, 핵산은 무세포 태아 핵산이다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 적어도 최소량의 서열분석 리드를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 서열분석 리드의 최소량은 약 100이다. 일부 경우, 서열분석 리드의 최소량은 약 1000이다. 일부 경우, 서열분석 리드의 최소량은 약 2000이다. 일부 경우, 서열분석 리드의 최소량은 약 3000이다. 일부 경우, 서열분석 리드의 최소량은 약 4000이다. 일부 경우, 서열분석 리드의 최소량은 약 5000이다. 일부 경우, 서열분석 리드의 최소량은 약 6000이다. 일부 경우, 서열분석 리드의 최소량은 약 7000이다. 일부 경우, 서열분석 리드의 최소량은 약 8000이다. 일부 경우, 서열분석 리드의 최소량은 약 9000이다. 일부 경우, 서열분석 리드의 최소량은 약 10,000이다.

[0202] 일부 경우, 방법은 (1) 표적 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드 대 (2) 적어도 하나의 비-표적 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드의 비가 유전자 이상을 갖지 않은 태아를 가진 대조군 임신 대상체로부터의 대조군 생물학적 샘플에서의 각각의 비와 상이할 때 태아가 유전자 이상을 가짐을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 (1) 표적 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드 대 (2) 적어도 하나의 비-표적 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드의 비가 유전자 이상을 갖지 않은 태아를 가진 대조군 임신 대상체로부터의 대조군 생물학적 샘플에서의 각각의 비와 상이하기 때문에 태아가 유전자 이상을 가짐을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우,

방법은 (1) 표적 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드 대 (2) 적어도 하나의 비-표적 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드의 비가 유전자 이상을 갖지 않은 태아를 가진 대조군 임신 대상체로부터의 대조군 생물학적 샘플에서의 각각의 비와 상이하지 않을 때 태아가 유전자 이상을 갖지 않음을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 염색체 영역과 비-표적 염색체 영역은 동일한 염색체 상에 있다. 일부 경우, 염색체 영역과 비-표적 염색체 영역은 상이한 염색체 상에 있다.

[0203] 일부 경우, 유전 정보는 어느 정도의 정확도로 검출된다. 유전 정보의 비제한적 예는 태아 이수성, 유전자 이상, 종양 DNA의 존재/양, 및 이식된 장기/조직 DNA의 존재/양을 포함한다. 일부 경우, 유전 정보는 적어도 약 95% 정확도로 검출된다. 일부 경우, 유전 정보는 적어도 약 96% 정확도로 검출된다. 일부 경우, 유전 정보는 적어도 약 97% 정확도로 검출된다. 일부 경우, 유전 정보는 적어도 약 98% 정확도로 검출된다. 일부 경우, 유전 정보는 적어도 약 99% 정확도로 검출된다. 일부 경우, 유전 정보는 적어도 약 99.5% 정확도로 검출된다. 일부 경우, 유전 정보는 적어도 약 99.9% 정확도로 검출된다. 일부 경우, 유전 정보는 적어도 약 99.99% 정확도로 검출된다.

[0204] 각각의 염색체로부터의 리드는 염색체의 길이에 따라 대략적으로 표시된다. 대다수의 리드는 1번 염색체로부터 수득되는 반면, 상염색체로부터의 가장 적은 리드는 21번 염색체로부터 유래할 것이다. 삼염색체증 샘플을 검출하는 일반적인 방법은 정배수체 샘플의 집단에서 한 염색체로부터 유래한 리드의 퍼센트를 측정하는 것이다. 그 다음, 이 염색체 퍼센트 값 세트에 대한 평균 및 표준 편차를 계산한다. 컷오프 값은 3 표준 편차를 평균에 더함으로써 결정된다. 새로운 샘플이 컷오프 값보다 더 높은 염색체 퍼센트 값을 가진 경우, 그 염색체의 과다표시를 추정할 수 있고, 이것은 염색체의 삼염색체증과 종종 일치한다. 염색체의 과다표시를 검출하는 예언적 예는 실시예 13에서 제공된다.

[0205] 일부 경우, 태아 이수성은 (1) 적어도 하나의 표적 염색체에 상응하는 서열분석 리드 대 (2) 적어도 하나의 비-표적 염색체에 상응하는 서열분석 리드의 비가 정배수체 태아를 가진 대조군 임신 대상체로부터의 대조군 생물학적 샘플에서의 각각의 비와 적어도 약 0.1% 상이할 때 검출된다. 일부 경우, 상기 비는 적어도 1% 상이하다.

[0206] 일부 경우, 대조군 임신 대상체는 정배수체 임신 대상체이다. 일부 경우, 대조군은 임신 대상체 군으로부터의 평균 또는 중앙값이다. 일부 경우, 대조군은 임신 대상체로부터의 혈장 샘플의 풀로부터의 평균 또는 중앙값이다. 일부 경우, 대조군은 정배수체 태아를 가진 임신 대상체를 모방하는 핵산의 인공 혼합물로부터 유사하게 수득된 값이다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체는 정배수체 염색체 세트를 가진 태아를 가진 정배수체 임신 대상체이다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체는 유전자 이상, 예를 들면, 카피 수 변이를 갖지 않는다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체가 임신한 태아는 유전자 이상, 예를 들면, 카피 수 변이를 갖지 않는다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체는 본원에 개시된 표적 염색체의 유전자 이상을 갖지 않는다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체가 임신한 태아는 본원에 개시된 표적 염색체의 유전자 이상을 갖지 않는다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체 및 그녀의 태아 중 적어도 하나는 이수성을 가진다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체 및 그녀의 태아 중 적어도 하나는 본원에 개시된 유전자 이상을 가진다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체 및 그녀의 태아 중 적어도 하나는 본원에 개시된 표적 염색체의 유전자 이상을 가진다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 대조군 임신 집단으로부터의 대조군 생물학적 샘플에서의 각각의 비의 사용을 포함한다. 일부 경우, 각각의 비는 대조군 임심 집단에서의 각각의 평균 비로부터 나온다. 일부 경우, 각각의 비는 대조군 임신 집단에서의 각각의 중앙값 비로부터 나온다.

[0207] 태아 성별을 검출하는 방법

[0208] 일부 실시양태에서, 본원은 여성 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하는 방법을 개시하고, 이때 상기 생물학적 샘플은 Y 염색체에 특유한 서열을 포함하는 적어도 하나의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 일부 경우, Y 염색체에 특유한 서열은 태아가 남아임을 표시한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 여성 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 상기 생물학적 샘플은 Y 염색체에 특유한 서열을 포함하는 약 1개 내지 약 5개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 여성 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 상기 생물학적 샘플은 Y 염색체에 특유한 서열을 포함하는 약 1개 내지 약 15개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 여성 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 상기 생물학적 샘플은 Y 염색체에 특유한 서열을 포함하는 약 1개 내지 약 25개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 여성 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 상기 생물학적 샘플은 Y 염색체에 특유한 서열을 포함하는 약 1개 내지 약 100개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 여성 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 상기 생물학적 샘플은 Y 염색체에 특유한 서열을 포함하는 약 5개 내지 약

100개의 무세포 태아 핵산을 함유한다.

[0209] 비제한적 예로써, 방법은 소형 장치로 여성 임신 대상체로부터 유체 샘플을 수득하는 단계로서, 상기 유체 샘플의 부피가 300 ㎕ 이하인 단계; 소형 장치로 상기 유체 샘플 중의 적어도 하나의 무세포 핵산을 서열분석하는 단계; 소형 장치의 디스플레이를 통해 Y 염색체에 상응하는 서열의 존재 또는 부재를 검출함으로써, 여성 임신 대상체 내의 태아의 성별을 확인하는 단계; 및 소형 장치로 성별을 또 다른 대상체에게 통신하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 생물학적 샘플의 부피는 약 120 ㎕ 이하이다. 일부 경우, 상기 방법은 Y 염색체에 상응하는 서열분석 리드를 검출하는 단계를 포함한다.

[0210] 또한, 비제한적 예로써, 방법은 여성 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계로서, 상기 생물학적 샘플의 부피가 약 120 ㎕ 이하인 단계; 샘플 중의 적어도 하나의 순환 무세포 핵산을 증폭하기 위해 상기 샘플을, Y 염색체에 상응하는 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접촉시키는 단계; 증폭 생성물의 부재를 검출함으로써, 태아가 여아임을 표시하는 단계를 포함할 수 있다. 수득, 접촉 및 검출은 단일 장치에 의해 일어날 수 있다.

[0211] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 게놈의 제1 서열 및 게놈의 제2 서열을 증폭할 수 있는 적어도 하나의 핵산 증폭 시약 및 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 제1 서열과 제2 서열은 유사하고, 제1 서열이 대상체의 제1 무세포 핵산에 존재하고 제2 서열이 대상체의 제2 무세포 핵산에 존재하도록 제1 서열은 제2 서열로부터 물리적으로 충분히 멀리 떨어져 있다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 바로 인접해 있다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 적어도 하나의 뉴클레오타이드에 의해 분리된다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 적어도 2개의 뉴클레오타이드에 의해 분리된다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 적어도 약 5개, 적어도 약 10개, 적어도 약 15개, 적어도 약 20개, 적어도 약 30개, 적어도 약 40개, 적어도 약 50개, 또는 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드에 의해 분리된다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 적어도 약 50% 동일하다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 적어도 약 60% 동일하거나, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99% 또는 100% 동일하다. 일부 경우, 제1 서열 및 제2 서열은 각각 길이가 적어도 10개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 제1 서열 및 제2 서열은 각각 길이가 적어도 약 10개, 적어도 약 15개, 적어도 약 20개, 적어도 약 30개, 적어도 약 50개 또는 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 제1 서열 및 제2 서열은 동일한 염색체에 존재한다. 일부 경우, 제1 서열은 제1 염색체에 존재하고, 제2 서열은 제2 염색체에 존재한다. 일부 경우, 제1 서열과 제2 서열은 기능적으로 연결되어 있다. 예를 들면, 유전자 *AOX1*의 프로모터 영역 내의 모든 CpG 부위들은 전립선암에서 동일한 과다메틸화를 보이므로, 이 부위들은 기능적으로 동일한 정보를 갖지만, 하나 이상의 뉴클레오타이드에 의해 떨어져 위치하기 때문에 기능적으로 연결되어 있다.

[0212] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 무세포 핵산의 가닥에 어닐링할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브 또는 올리고뉴클레오타이드 프라이머 중 적어도 하나를 포함하고, 이때 무세포 핵산은 관심 있는 영역 또는 이의 일부에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 Y 염색체의 영역이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 X 염색체의 영역이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 상염색체의 영역이다. 일부 경우, 관심 있는 영역 또는 이의 일부는 게놈에 1회 초과의 빈도로 존재하는, 본원에 기재된 반복부 서열을 포함한다.

[0213] 일부 경우, 본원에 개시된 관심 있는 영역은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 1,000,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 적어도 10개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 적어도 100개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 영역은 길이가 적어도 1000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 500,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 300,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 100개의 뉴클레오타이드 내지 약 1,000,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 100개의 뉴클레오타이드 내지 약 500,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 100개의 뉴클레오타이드 내지 약 300,000개의 염기쌍이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 1000개의 뉴클레오타이드 내지 약 1,000,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 1000개의 뉴클레오타이드 내지 약 500,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 1000개의 뉴클레오타이드 내지 약 300,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 10,000개의 뉴클레오타이드 내지 약 1,000,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 10,000개의 뉴클레오타이드 내지 약 500,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 10,000개의 뉴클레오타이드 내지 약 300,000개의 뉴클레오타이드

이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 300,000개의 뉴클레오타이드이다.

[0214] 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 5개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 8개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 10개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 15개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 20개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 50개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 5개의 뉴클레오타이드 내지 약 1000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 1000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 500개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 400개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 300개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 50개의 뉴클레오타이드 내지 약 1000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 50개의 뉴클레오타이드 내지 약 500개의 뉴클레오타이드이다.

[0215] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 무세포 핵산의 가닥에 어닐링할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 올리고뉴클레오타이드 프라이머 중 적어도 하나를 포함하고, 이때 무세포 핵산은 본원에 개시된 관심 있는 하위영역에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 하위영역은 1회 초과의 빈도로 관심 있는 영역에 존재하는 서열로 표시된다. 일부 경우, 하위영역은 길이가 약 10개 내지 약 1000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 하위영역은 길이가 약 50개 내지 약 500개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 하위영역은 길이가 약 50개 내지 약 250개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 하위영역은 길이가 약 50개 내지 약 150개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 하위영역은 길이가 약 100개의 뉴클레오타이드이다.

[0216] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열을 가진다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열을 가진다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열로 구성된다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열로 구성된다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 75% 동일하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 80% 동일하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 85% 동일하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 80% 동일하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 90% 동일하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 95% 동일하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 97% 동일하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 100% 동일하다.

[0217] 단일 뉴클레오타이드 다형성의 검출

[0218] 일부 경우, 본원에 기재된 방법은 (a) 임신 대상체로부터 무세포 태아 핵산을 포함하는 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 임의적으로, 생체외에서 혼합된 샘플에 존재할 수 있는 무세포 태아 핵산을 농후화하는 단계; (c) 임의적으로, 생체외에서 무세포 핵산을 증폭하는 단계; (d) 생체외에서 무세포 태아 핵산의 특정 좌위를 우선적으로 농후화하는 단계; (e) 생체외에서 무세포 핵산을 측정하여 유전자형 데이터를 생성하는 단계; 및 (f) 생체외에서 컴퓨터 상에서 수득된 유전자형 데이터를 분석하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자형 데이터는 염색체 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자형 데이터는 게놈의 하나 이상의 유전자 돌연변이 또는 천연 변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 분석하는 단계 (f)는 최대 우도 기법을 계산함으로써 수행된다.

일부 실시양태에서, 최대 우도 기법은 각각의 가설과 관련된 대립유전자 분포를 이용하여 각각의 가설에 대해 컨디셔닝된 데이터의 우도를 추정한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 하나 이상의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP) 또는 삽입결실, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0219] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 하기 장치, 시스템 및 키트를 사용한다.

[0220] **장치, 시스템 및 키트**

[0221] 본원에 개시된 양태는 생물학적 샘플로부터 유전 정보를 수득하는 장치, 시스템 및 키트를 제공한다. 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 사용자로 하여금 선택된 위치에서 생물학적 샘플을 채취하고 검사하여 샘플에서 표적 피분석물의 존재 및/또는 양을 검출할 수 있게 한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 상기 방법에서 사용된다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 대상체의 생물학적 샘플로부터 적어도 하나의 성분(예를 들면, 세포, 세포 단편, 단백질)을 제거하는 샘플 정제기; 생물학적 샘플 중의 적어도 하나의 핵산을 서열분석하는 핵산 서열분석기; 및 서열 정보를 장치, 시스템 또는 키트의 사용자에게 전달하는 핵산 서열 출력기를 포함한다.

[0222] 일반적으로, 본 개시의 장치, 시스템 및 키트는 다수의 기능들, 예를 들면, 표적 피분석물(예를 들면, 이의 증폭 생성물을 포함함)의 정제, 증폭 및 검출, 및 이들의 조합을 통합시킨다. 일부 경우, 다수의 기능들은 단일 어세이 조립체 유닛 또는 단일 장치 내에서 수행된다. 일부 경우, 모든 기능들은 단일 유닛 또는 장치의 외부에서 일어난다. 일부 경우, 기능들 중 적어도 하나는 단일 유닛 또는 장치의 외부에서 일어난다. 일부 경우, 기능들 중 하나만이 단일 유닛 또는 장치의 외부에서 일어난다. 일부 경우, 샘플 정제기, 핵산 증폭 시약, 올리고뉴클레오타이드, 및 검출 시약 또는 성분은 단일 장치 내에 수용된다. 일반적으로, 본 개시의 장치, 시스템 및 키트는 디스플레이, 디스플레이에의 연결, 또는 생물학적 샘플에 대한 정보를 1명 이상의 사람들에게 전달하기 위한 디스플레이에의 통신을 포함한다.

[0223] 일부 경우, 장치, 시스템 및 키트는 본원에 개시된 추가 구성요소를 포함한다. 추가 구성요소의 비제한적 예는 샘플 수송 구획, 샘플 저장 구획, 샘플 및/또는 시약 용기, 온도 표시기, 전자 포트, 통신 연결, 통신 장치, 샘플 채취 장치 및 하우징 유닛을 포함한다. 일부 경우, 추가 구성요소는 장치와 통합된다. 일부 경우, 추가 구성요소는 장치와 통합되지 않는다. 일부 경우, 추가 구성요소는 샘플 정제기, 핵산 증폭 시약, 올리고뉴클레오타이드, 및 검출 시약 또는 성분과 함께 단일 장치 내에 수용된다. 일부 경우, 추가 구성요소는 단일 장치 내에 수용되지 않는다.

[0224] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 샘플을 수득하고 무세포 핵산을 추출하고 무세포 핵산을 정제하기 위한 구성요소를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 샘플을 수득하고 무세포 핵산을 추출하고 무세포 핵산을 정제하고 무세포 핵산의 라이브러리를 제조하기 위한 구성요소를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 샘플을 수득하고 무세포 핵산을 추출하고 무세포 핵산을 정제하고 무세포 핵산을 서열분석하기 위한 구성요소를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 샘플을 수득하고 무세포 핵산을 추출하고 무세포 핵산을 정제하고 무세포 핵산의 라이브러리를 제조하고 무세포 핵산을 서열분석하기 위한 구성요소를 포함한다. 비제한적 예로써, 샘플을 수득하기 위한 구성요소는 경피 천자 장치, 및 혈액으로부터 혈장을 수득하기 위한 필터이다. 또한, 비제한적 예로써, 무세포 핵산을 추출하고 정제하기 위한 구성요소는 완충제, 비드 및 자석을 포함한다. 완충제, 비드 및 자석은 손가락 찌르기로부터 일반적인 샘플 부피(예를 들면, 50 내지 150 ㎕의 혈액)를 수용하기에 적절한 부피로 공급될 수 있다.

[0225] 일부 경우, 장치, 시스템 및 키트는 생물학적 샘플을 수용하기 위한 용기를 포함한다. 용기는 1 ㎕ 내지 1 ㎖ 부피의 생물학적 샘플을 보유하도록 구성될 수 있다. 용기는 1 ㎕ 내지 500 ㎕ 부피의 생물학적 샘플을 보유하도록 구성될 수 있다. 용기는 1 ㎕ 내지 200 ㎕ 부피의 생물학적 샘플을 보유하도록 구성될 수 있다. 용기는 나머지 장치/시스템 구성요소에 의한 처리 및 분석을 위한 샘플의 적합한 부피와 동일한 소정의 부피를 가질 수 있다. 이것은 장치, 시스템 또는 키트의 사용자가 샘플의 특정된 부피를 측정할 필요성을 없앨 것이다. 사용자는 용기를 채움으로써, 적절한 부피의 샘플이 장치/시스템에게 전달되었음을 확인할 필요만이 있을 것이다. 일부 경우, 장치, 시스템 및 키트는 생물학적 샘플을 수용하기 위한 용기를 포함하지 않는다. 일부 경우, 샘플 정제기는 생물학적 샘플을 직접 수용한다. 용기에 대한 상기 설명과 유사하게, 샘플 정제기는 나머지 장치/시스템 구성요소에 의한 처리 및 분석에 적합한 소정의 부피를 가질 수 있다. 일반적으로, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 전적으로 현장 진료에서 사용되기 위한 것이다. 그러나, 일부 경우, 사용자는 현장 진료에서 수득된 결과의 추가 분석 또는 확인을 위해 분석된 샘플을 보존하거나 또 다른 위치(예를 들면, 실험실, 진료소)로 보내기를 원할 수 있다. 비제한적 예로써, 장치/시스템은 혈액으로부터 혈장을 분리할 수 있다. 혈장은 현장 진료

에서 분석될 수 있고 혈액으로부터의 세포는 분석을 위해 또 다른 위치로 운반될 수 있다. 일부 경우, 장치, 시스템 및 키트는 이 목적을 위해 수송 구획 또는 저장 구획을 포함한다. 수송 구획 또는 저장 구획은 생물학적 샘플, 이의 성분 또는 이의 일부를 함유할 수 있다. 수송 구획 또는 저장 구획은 즉시 사용자로부터 멀리 떨어진 장소로 전달되는 동안 생물학적 샘플, 이의 일부 또는 이의 성분을 함유할 수 있다. 수송 구획 또는 저장 구획은 세포가 검사를 위해 즉시 사용자로부터 멀리 떨어진 장소에 보내질 수 있도록 생물학적 샘플로부터 제거된 세포를 함유할 수 있다. 즉시 사용자로부터 멀리 떨어진 장소의 비제한적 예는 즉시 사용자가 집에 있을 때 실험실 또는 진료소일 수 있다. 일부 경우, 집은 생물학적 샘플의 추가 분석을 수행하기 위한 기계 또는 추가 장치를 갖지 않는다. 수송 구획 또는 저장 구획은 생물학적 샘플을 장치에 첨가하는 단계로부터 비롯된 반응 또는 과정의 생성물을 함유할 수 있다. 일부 경우, 반응 또는 과정의 생성물은 핵산 증폭 생성물 또는 역전사 생성물이다. 일부 경우, 반응 또는 과정의 생성물은 본원에 기재된 결합 모이어티에 결합된 생물학적 샘플 성분이다. 생물학적 샘플 성분은 핵산, 세포 단편, 세포외 소포, 단백질, 펩타이드, 스테롤, 지질, 비타민 또는 글루코스를 포함할 수 있고, 이들 중 임의의 성분은 사용자로부터 멀리 떨어진 위치에서 분석될 수 있다. 일부 경우, 수송 구획 또는 저장 구획은 흡수 패드, 종이, 유리 용기, 플라스틱 용기, 중합체 매트릭스, 지질 용액, 겔, 보존제 또는 이들의 조합을 포함한다. 흡수 패드 또는 종이는 스크리닝을 위해 단백질 또는 다른 바이오마커를 가진 건조된 생물학적 유체를 안정화시키고 수송하는 데 유용할 수 있다.

[0226] 일부 경우, 본원에 개시된 장치 및 시스템은 샘플의 무세포 핵산(예를 들면, 순환 RNA 및/또는 DNA) 및 비-핵산 성분의 분석을 제공한다. 무세포 핵산 및 비-핵산 성분 둘 다의 분석은 둘 다 필요 현장에서 일어날 수 있다. 일부 경우, 시스템 및 장치는 필요 현장에서의 무세포 핵산의 분석, 및 필요 현장으로부터 멀리 떨어진 장소에서의 비-핵산 성분의 분석을 위한 샘플의 적어도 일부 또는 성분의 보존을 제공한다. 일부 경우, 시스템 및 장치는 필요 현장에서의 비-핵산 성분의 분석, 및 필요 현장으로부터 멀리 떨어진 장소에서의 무세포 핵산의 분석을 위한 샘플의 적어도 일부 또는 성분의 보존을 제공한다. 이 장치 및 시스템은 유전 질환, 예컨대, 본원에 개시된 유전 질환의 보균자 검사 및 검출에 유용할 수 있다.

[0227] 일부 경우, 수송 구획 또는 저장 구획은 보존제를 포함한다. 보존제는 본원에서 안정화제 또는 생물학적 안정화제로서 지칭될 수도 있다. 일부 경우, 장치, 시스템 또는 키트는 저장 및/또는 수송 동안 효소 활성을 감소시키는 보존제를 포함한다. 일부 경우, 보존제는 전혈 보존제이다. 전혈 보존제 또는 이의 성분의 비제한적 예는 글루코스, 아데닌, 구연산, 구연산삼나트륨, 덱스트로스, 이인산나트륨 및 일염기성 인산나트륨이다. 일부 경우, 보존제는 EDTA를 포함한다. EDTA는 핵산을 분해시킬 효소 활성을 감소시킬 수 있다. 일부 경우, 보존제는 포름알데하이드를 포함한다. 일부 경우, 보존제는 포름알데하이드의 공지된 유도체이다. 포름알데하이드 또는 이의 유도체는 단백질을 가교결합시킴으로써, 세포를 안정화시킬 수 있고 세포 용해를 방지할 수 있다.

[0228] 일반적으로, 본원에 개시된 장치 및 시스템은 단일 사람을 위해 휴대 가능하다. 일부 경우, 장치 및 시스템은 소형이다. 일부 경우, 장치 및 시스템은 최대 길이, 최대 폭 또는 최대 높이를 가진다. 일부 경우, 장치 및 시스템은 최대 길이, 최대 폭 또는 최대 높이를 가진 단일 유닛 내에 수용된다. 일부 경우, 최대 길이는 12 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 길이는 10 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 길이는 8 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 길이는 6 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 폭은 12 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 폭은 10 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 폭은 8 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 폭은 6 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 폭은 4 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 높이는 12 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 높이는 10 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 높이는 8 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 높이는 6 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 높이는 4 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 높이는 2 인치 이하이다. 일부 경우, 최대 높이는 1 인치 이하이다.

[0229] 샘플 채취

[0230] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 샘플 채취기를 포함한다. 일부 경우, 샘플 채취기는 장치, 시스템 또는 키트의 나머지 부분과 별도로 제공된다. 일부 경우, 샘플 채취기는 장치, 시스템 또는 키트, 또는 이의 구성요소와 물리적으로 통합된다. 일부 경우, 샘플 채취기는 본원에 기재된 용기와 통합된다. 일부 경우, 샘플 채취기는 생물학적 유체를 적용하기 위한 컵, 튜브, 모세관 또는 웰일 수 있다. 일부 경우, 샘플 채취기는 소변을 적용하기 위한 컵일 수 있다. 일부 경우, 샘플 채취기는 컵 내의 소변을 장치, 시스템 또는 키트에 적용하기 위한 피펫을 포함할 수 있다. 일부 경우, 샘플 채취기는 혈액을 적용하기 위해 본원에 개시된 장치와 통합된 모세관일 수 있다. 일부 경우, 샘플 채취기는 타액을 적용하기 위해 본원에 개시된 장치와 통합된 튜브, 웰, 패드 또는 종이일 수 있다. 일부 경우, 샘플 채취기는 땀을 적용하기 위한 패드 또는 종이일 수 있다.

[0231] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 경피 천자 장치를 포함한다. 경피 천자 장치의 비제한적 예

는 바늘 및 란셋이다. 일부 경우, 샘플 채취기는 경피 천자 장치를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 미세바늘, 미세바늘 어레이 또는 미세바늘 패치를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 중공형 미세바늘을 포함한다. 비제한적 예로써, 경피 천자 장치는 대상체가 그의 손가락을 찌를 때, 혈액이 그의 성분의 분석을 위해 시스템 또는 장치에 의해 이용될 수 있는 웰 또는 모세관 내로 방출되도록 웰 또는 모세관과 통합된다. 일부 경우, 경피 천자 장치는 오목 표면 내에 바늘 또는 란셋을 가진 누름 버튼 장치이다. 일부 경우, 바늘은 미세바늘이다. 일부 경우, 경피 천자 장치는 미세바늘의 어레이를 포함한다. 오목 표면의 비-바늘 면에 있는 작동기, 버튼 또는 위치를 누름으로써, 바늘은 란셋보다 더 제어된 방식으로 대상체의 피부를 찌른다. 나아가, 누름 버튼 장치는 천자 부위로부터 혈액을 뽑는 것을 돕기 위해 진공 공급원 또는 플런저를 포함할 수 있다.

[0232] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 유체가 신뢰할만한 유전 정보를 함유하도록, 예를 들면, 피부의 밀착 연접을 용해시키기 위해 경피 천자를 요구하지 않는 장치를 포함한다.

[0233] 샘플 처리기 및 정제기

[0234] 본원은 샘플의 성분을 제거하거나 샘플을 다수의 분획들(예를 들면, 혈액 세포 분획과 혈장 또는 혈청)로 분리하기 위해 생물학적 샘플을 변형시키는 샘플 처리기를 포함하는 장치, 시스템 및 키트를 개시한다. 샘플 처리기는 생물학적 샘플의 원치 않는 물질 또는 비-표적 성분을 제거함으로써, 샘플을 변형시키도록 구성된 샘플 정제기를 포함할 수 있다. 생물학적 샘플의 공급원에 따라, 원치 않는 물질은 단백질(예를 들면, 항체, 호르몬, 효소, 혈청 알부민, 지단백질), 유리 아미노산 및 다른 대사물질, 미세소포, 핵산, 지질, 전해질, 우레아, 유로빌린, 약학 약물, 점액, 세균 및 다른 미생물, 및 이들의 조합을 포함할 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 일부 경우, 샘플 정제기는 본원에 개시된 생물학적 샘플의 성분을 분리한다. 일부 경우, 본원에 개시된 샘플 정제기는 후기 과정 단계, 예컨대, 핵산 증폭 또는 검출을 억제하거나, 방해하거나 다른 방식으로 해로운 영향을 미칠 샘플 성분을 제거한다. 일부 경우, 생성된 변형된 샘플은 표적 피분석물에 대해 농후화된다. 이것은 표적 피분석물의 간접적인 농후화로서 간주될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 표적 피분석물은 직접적으로 포획될 수 있고, 이것은 표적 피분석물의 직접적인 농후화로서 간주된다.

[0235] 일부 경우, 생물학적 샘플은 일부 경우 태아의 유전 정보(예를 들면, RNA, DNA)를 함유하는 태아 영양배엽을 포함한다. 일부 경우, 샘플 처리기는 예컨대, 형태(예를 들면, 크기) 또는 마커 항원(예를 들면, 세포 표면 항원)으로 생물학적 샘플에서 태아 영양배엽을 농후화하도록 구성된다. 일부 경우, 샘플 처리기는 상피 종양 세포(ISET)의 크기별 단리 방법을 이용하여 영양배엽을 농후화하도록 구성된다. 일부 경우, 샘플 처리기는 생물학적 샘플을 영양배엽의 세포 표면 항원에 특이적인 항체 또는 항원 결합 단편과 접촉시킴으로써 생물학적 샘플에서 영양배엽을 농후화하도록 구성된다. 영양배엽 세포 표면 항원의 비제한적 예는 트로포미요신-1(Tropl), 트로포미요신-2(Trop2), cyto 및 syncytio-영양배엽 마커, GB25, 인간 태반 락토겐(HPL), 및 알파 인간 융모막 성선자극호르몬(알파 HCG)을 포함한다. 일부 경우, 샘플 정제기는 형광 활성화 세포 분류(FACS), 컬럼 크로마토그래피 또는 자기 분류(예를 들면, Dynabeads)를 이용하여 생물학적 샘플로부터 태아 영양배엽을 정제하거나 단리하도록 구성된다. 태아 게놈 DNA는 임의의 적합한 DNA 추출 방법, 예컨대, 본원에 기재된 방법을 이용함으로써, 샘플 정제기에 의해 농후화 및/또는 정제된 영양배엽으로부터 추출된다.

[0236] 일부 경우, 샘플 처리기는 (1) 생물학적 샘플로부터 영양배엽을 단리하고; (2) 단리된 영양배엽을 용해시키고; (3) 단리된 태아 영양배엽을 용해시키고; (4) 단리된 태아 영양배엽으로부터 게놈 DNA를 정제함으로써 태아 영양배엽을 처리하도록 구성된다. 일부 경우, 태아 핵을 용해 또는 단리 전에 DNAase로 처리한다. 비제한적 예에서, 태아 세포 및 모체 세포(예를 들면, 영양배엽)을 함유하는 생물학적 샘플을 원심분리하고 배지에 재현탁한다. 그 다음, 자기 분리 절차(예를 들면, 세포 표면 항원 특이적 단일클론 항체에 접합된 자기 나노입자)를 이용하여 세포를 기계적으로 분리한다. 세포를 세척하고 배지에 현탁한다. DynaMag™ 회전 자석(Life Technologies)을 이용하여 자기화된 (세포 표면 항원 양성) 태아 영양배엽 세포로부터 모체 세포(예를 들면, 세포 표면 항원 음성)를 분리한다. 자석을 이용하여 태아 영양배엽 세포를 다회 세척하여 잔류 모체 세포를 제거한다. 단리된 태아 영양배엽 세포를 용액에 재현탁한다. 용해 완충제를 첨가하여 단리된 태아 영양배엽 세포를 용해시킨 후, 저속으로 원심분리하여 온전한 태아 영양배엽 세포 핵을 펠렛화한다. 상청액을 제거하고, 핵을 다회 세척한다. 25 마이크로리터의 3X 농축 DNA 추출 완충제를 태아 영양배엽 세포 핵에 첨가함으로써 태아 영양배엽 세포 핵으로부터 게놈 DNA를 추출하고 약 3시간 동안 인큐베이션한다. 임의적으로, 예를 들면, 시판되는 DNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 DNA를 더 정제한다.

[0237] 일부 경우, 샘플 정제기는 생물학적 샘플로부터 환자 세포 이외의 원치 않는 물질을 제거하기 위한 분리 물질을

포함한다. 유용한 분리 물질은 이 물질과 결합하거나 회합하는 특이적 결합 모이어티를 포함할 수 있다. 결합은 공유 또는 비공유 결합일 수 있다. 특정 물질을 제거하는 것으로 해당 기술 분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 결합 모이어티가 사용될 수 있다. 예를 들면, 항체 및 이의 단편은 샘플로부터 단백질을 제거하는 데 통상적으로 사용된다. 일부 경우, 본원에 개시된 샘플 정제기는 생물학적 샘플 중의 핵산, 단백질, 세포 표면 마커 또는 미세소포 표면 마커에 결합하는 결합 모이어티를 포함한다. 일부 경우, 결합 모이어티는 항체, 항원 결합 항체 단편, 리간드, 수용체, 펩타이드, 소분자, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0238] 일부 경우, 본원에 개시된 샘플 정제기는 필터를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 샘플 정제기는 막을 포함한다. 일반적으로, 필터 또는 막은 본원에 개시된 생물학적 샘플로부터 세포, 세포 입자, 세포 단편, 무세포 핵산 이외의 혈액 성분, 또는 이들의 조합을 분리할 수 있거나 제거할 수 있다.

[0239] 일부 경우, 샘플 정제기는 혈액 샘플의 세포 성분으로부터의 혈장 또는 혈청의 분리를 용이하게 한다. 일부 경우, 샘플 정제기는 분자 증폭 반응 또는 서열분석 반응을 시작하기 전에 혈액 샘플의 세포 성분으로부터의 혈장 또는 혈청의 분리를 용이하게 한다. 혈장 또는 혈청 분리는 원심분리, 침강 또는 여과와 같은 여러 상이한 방법들에 의해 달성될 수 있다. 일부 경우, 샘플 정제기는 전혈을 수용하기 위한 필터 매트릭스를 포함하고, 상기 필터 매트릭스는 세포가 통과하지 못하게 하는 반면, 혈장 또는 혈청이 방해받지 않으면서 필터 매트릭스를 통과할 수 있게 하는 공극 크기를 가진다. 일부 경우, 필터 매트릭스는 필터의 상부에서 큰 공극 크기와 필터의 하부에서 작은 공극 크기를 겸비하므로, 여과 과정 동안 세포를 매우 순하게 처리하여 세포 분해 또는 용해를 방지한다. 이것은 세포 분해 또는 용해가 표적 무세포 핵산을 오염시킬 혈액 세포 또는 모체 세포로부터의 핵산 방출을 야기할 것이기 때문에 유리하다. 이러한 필터의 비제한적 예는 Pall Vivid™ GR 막, 문크텔 알스트롬(Munktell Ahlstrom) 필터지(예를 들면, 국제 특허출원 공개 제WO2017017314호 참조), 테라포어(TeraPore) 필터를 포함한다.

[0240] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 모세관력에 의해 유발된 수직 여과를 이용하여, 샘플로부터 성분 또는 분획(예를 들면, 혈액으로부터 혈장)을 분리한다. 비제한적 예로써, 수직 여과는 중력 보조 혈장 분리를 포함할 수 있다. 고효율 초소수성 혈장 분리기는 예를 들면, 문헌[Liu et al., A High Efficiency Superhydrophobic Plasma Separation, Lab Chip 2015]에 기재되어 있다.

[0241] 샘플 정제기는 측면 필터를 포함할 수 있다(예를 들면, 샘플은 중력 방향으로 이동하지 않거나, 샘플은 중력 방향에 수직으로 이동한다). 샘플 정제기는 수직 필터를 포함할 수 있다(예를 들면, 샘플은 중력 방향으로 이동한다). 샘플 정제기는 수직 필터 및 측면 필터를 포함할 수 있다. 샘플 정제기는 수직 필터에 이어 측면 필터를 사용하여 샘플 또는 이의 일부를 수용하도록 구성될 수 있다. 샘플 정제기는 측면 필터에 이어 수직 필터를 사용하여 샘플 또는 이의 일부를 수용하도록 구성될 수 있다. 일부 경우, 수직 필터는 필터 매트릭스를 포함한다. 일부 경우, 수직 필터의 필터 매트릭스는 세포가 통과하지 못하게 하는 반면, 혈장이 방해받지 않으면서 필터 매트릭스를 통과할 수 있게 하는 공극 크기를 가진 공극을 포함한다. 일부 경우, 필터 매트릭스는 필터의 상부에서 큰 공극 크기와 필터의 하부에서 작은 공극 크기를 겸비하므로, 여과 과정 동안 세포를 매우 순하게 처리하여 세포 분해를 방지하기 때문에, 이 적용에 특히 적합한 막을 포함한다.

[0242] 일부 경우, 샘플 정제기는 무세포 핵산을 제거하지 않으면서 생물학적 샘플로부터 원치 않는 물질을 제거하는 적절한 분리 물질, 예를 들면, 필터 또는 막을 포함한다. 일부 경우, 분리 물질은 크기를 기반으로 생물학적 샘플 중의 물질을 분리하고, 예를 들면, 분리 물질은 세포를 배제하나, 무세포 핵산을 투과시키는 공극 크기를 가진다. 따라서, 생물학적 샘플이 혈액일 때, 혈장 또는 혈청은 샘플 정제기에서 분리 물질을 통해 혈액 세포보다 더 신속히 이동할 수 있고, 임의의 무세포 핵산을 함유하는 혈장 또는 혈청은 분리 물질의 구멍을 투과한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 혈액이고, 분리 물질에서 지연되고/되거나 잡혀 있는 세포는 적혈구, 백혈구 또는 혈소판이다. 일부 경우, 세포는 (소변 중의) 방광 또는 요로 상피 세포, 또는 (타액 중의) 협측 세포를 포함하나 이들로 제한되지 않는, 체내 생물학적 샘플과 접촉한 조직으로부터 유래한다. 일부 경우, 세포는 세균 또는 다른 미생물이다.

[0243] 일부 경우, 샘플 정제기는 세포를 손상시키지 않으면서 세포를 지연시키고/시키거나 잡아둠으로써, 무세포 핵산의 후속 평가를 방해할 수 있는 세포 핵산 및 다른 단백질 또는 세포 단편을 포함하는 세포 내용물의 방출을 피할 수 있다. 이것은 예를 들면, 측면 유동 스트립 또는 다른 적합한 어세이 포맷의 경로를 따라 공극 크기를 점차적으로 계속 감소시켜 세포 이동을 완만하게 지연시킴으로써, 세포에 가해지는 힘을 최소화함으로써 달성될 수 있다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 세포의 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 최대 100%가 분리 물질에 잡혀 있을 때 온전한 상태로 유지된다. 크기 분리 이외에 또는 크기 분리와 독립적으로, 분리 물질은 크

기 이외의 세포 성질을 기반으로 원치 않는 물질을 잡아둘 수 있거나 분리할 수 있고, 예를 들면, 분리 물질은 세포 표면 마커에 결합하는 결합 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 경우, 결합 모이어티는 항체 또는 항원 결합 항체 단편이다. 일부 경우, 결합 모이어티는 혈액 세포 또는 미세소포 상의 수용체에 대한 리간드 또는 수용체 결합 단백질이다.

[0244] 일부 경우, 본원에 개시된 시스템 및 장치는 샘플 정제기, 필터 및/또는 막을 통해 생물학적 샘플을 이동시키거나, 뽑아내거나, 밀어내거나 당기는 분리 물질을 포함한다. 일부 경우, 상기 물질은 위킹 물질이다. 세포를 제거하기 위해 샘플 정제기에서 이용되는 적절한 분리 물질의 예는 폴리비닐리덴 디플루오라이드, 폴리테트라플루오로에틸렌, 아세틸셀룰로스, 니트로셀룰로스, 폴리카르보네이트, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 유리 섬유, 보로실리케이트, 염화비닐, 은을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 적합한 분리 물질은 세포의 통과를 방해하는 것을 특징으로 할 수 있다. 일부 경우, 분리 물질은 적혈구의 통과를 방해할 수 있는 성질을 가진 한 제한되지 않는다. 일부 경우, 분리 물질은 소수성 필터, 예를 들면, 유리 섬유 필터, 합성 필터, 예를 들면, Cytosep(예를 들면, Ahlstrom Filtration 또는 Pall Specialty Materials, 뉴욕주 포트 워싱톤 소재), 또는 친수성 필터, 예를 들면, 셀룰로스(예를 들면, Pall Specialty Materials)이다. 일부 경우, 상업적으로 입수 가능한 키트(예를 들면, Arrayit® 혈액 카드 혈청 단리 키트, 카탈로그 ABCS, Arrayit Corporation, 캘리포니아주 선니베일 소재)를 사용하여 본 개시의 방법에 따라 추가 처리하기 위해 전혈을 적혈구, 백혈구 및 혈청 성분으로 분획화할 수 있다.

[0245] 일부 경우, 샘플 정제기는 적어도 하나의 공극 크기를 특징으로 하는 적어도 하나의 필터 또는 적어도 하나의 막을 포함한다. 일부 경우, 샘플 정제기는 다수의 필터들 및/또는 막들을 포함하고, 이때 적어도 제1 필터 또는 막의 공극 크기는 제2 필터 또는 막과 상이하다. 일부 경우, 적어도 하나의 필터/막의 적어도 하나의 공극 크기는 약 0.05 마이크론 내지 약 10 마이크론이다. 일부 경우, 공극 크기는 약 0.05 마이크론 내지 약 8 마이크론이다. 일부 경우, 공극 크기는 약 0.05 마이크론 내지 약 6 마이크론이다. 일부 경우, 공극 크기는 약 0.05 마이크론 내지 약 4 마이크론이다. 일부 경우, 공극 크기는 약 0.05 마이크론 내지 약 2 마이크론이다. 일부 경우, 공극 크기는 약 0.05 마이크론 내지 약 1 마이크론이다. 일부 경우, 적어도 하나의 필터/막의 적어도 하나의 공극 크기는 약 0.1 마이크론 내지 약 10 마이크론이다. 일부 경우, 공극 크기는 약 0.1 마이크론 내지 약 8 마이크론이다. 일부 경우, 공극 크기는 약 0.1 마이크론 내지 약 6 마이크론이다. 일부 경우, 공극 크기는 약 0.1 마이크론 내지 약 4 마이크론이다. 일부 경우, 공극 크기는 약 0.1 마이크론 내지 약 2 마이크론이다. 일부 경우, 공극 크기는 약 0.1 마이크론 내지 약 1 마이크론이다.

[0246] 일부 경우, 샘플 정제기는 순한 샘플 정제기임을 특징으로 한다. 순한 샘플 정제기, 예컨대, 세포의 통과를 허용하지 않는 공극을 가진 필터 매트릭스, 수직 필터, 위킹 물질 또는 막을 포함하는 샘플 정제기는 무세포 핵산을 분석하는 데 특히 유용하다. 예를 들면, 모체 혈액 중의 무세포 태아 핵산의 산전 적용은 무세포 태아 핵산에 대한 큰 배경 신호를 생성하는 무세포 모체 핵산의 존재 하에서의 무세포 태아 핵산의 분석이라는 추가 과제를 제공받는다. 비제한적 예로써, 모체 혈액의 샘플은 이 샘플이 샘플 채취 방법에 의해 야기된 세포 용해 또는 다른 세포 파괴 없이 수득될 때 전혈 밀리리터당 약 500 내지 750 게놈 당량의 총 무세포 DNA(모체 및 태아)를 함유할 수 있다. 임산부로부터 샘플링된 혈액 중의 태아 분획은 약 10%, 즉 ㎖당 약 50 내지 75 게놈 당량일 수 있다. 무세포 핵산을 수득하는 과정은 통상적으로 혈액으로부터 혈장을 수득하는 단계를 포함한다. 조심스럽게 수행되지 않으면, 모체 백혈구가 파괴되어, 추가 세포 핵산을 샘플 내로 방출함으로써, 태아 무세포 핵산에 대한 많은 배경 노이즈를 생성할 수 있다. 전형적인 백혈구 카운트는 혈액 ㎖당 약 4*10^6개 내지 10*10^6개 세포이므로, 이용 가능한 핵 DNA는 전체 무세포 DNA(cfDNA)보다 약 4,000배 내지 10,000배 더 높다. 결과적으로, 모체 백혈구의 극히 일부만이 파괴되어, 핵 DNA를 혈장 내로 방출하는 경우, 태아 분획은 현저히 감소된다. 예를 들면, 0.01%의 백혈구 파괴는 태아 분획을 10%에서 약 5%까지 감소시킬 수 있다. 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 이 배경 신호를 감소시키는 것을 목적으로 한다.

[0247] 일부 경우, 샘플 처리기는 전혈로부터 혈액 세포를 분리하도록 구성된다. 일부 경우, 샘플 처리기는 전혈로부터 혈장을 단리하도록 구성된다. 일부 경우, 샘플 처리기는 전혈로부터 혈청을 단리하도록 구성된다. 일부 경우, 샘플 처리기는 1 밀리리터 미만의 전혈로부터 혈장 또는 혈청을 단리하도록 구성된다. 일부 경우, 샘플 처리기는 1 밀리리터 미만의 전혈로부터 혈장 또는 혈청을 단리하도록 구성된다. 일부 경우, 샘플 처리기는 500 ㎕ 미만의 전혈로부터 혈장 또는 혈청을 단리하도록 구성된다. 일부 경우, 샘플 처리기는 400 ㎕ 미만의 전혈로부터 혈장 또는 혈청을 단리하도록 구성된다. 일부 경우, 샘플 처리기는 300 ㎕ 미만의 전혈로부터 혈장 또는 혈청을 단리하도록 구성된다. 일부 경우, 샘플 처리기는 200 ㎕ 미만의 전혈로부터 혈장 또는 혈청을 단리하도록 구성된다. 일부 경우, 샘플 처리기는 150 ㎕ 미만의 전혈로부터 혈장 또는 혈청을 단리하도록 구성된다. 일부 경우,

샘플 처리기는 100 ㎕ 미만의 전혈로부터 혈장 또는 혈청을 단리하도록 구성된다.

[0248] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 원치 않거나 관심 없는 세포, 세포 단편, 핵산 또는 단백질이 고갈된 변형된 샘플을 생성하기 위해 결합 모이어티를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 생물학적 샘플에서 원치 않거나 관심 없는 세포, 세포 단편, 핵산 또는 단백질을 감소시키기 위해 결합 모이어티를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 표적 세포, 표적 세포 단편, 표적 핵산 또는 표적 단백질이 풍부한 변형된 샘플을 생성하기 위해 결합 모이어티를 포함한다.

[0249] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 핵산, 단백질, 펩타이드, 세포 표면 마커 또는 미세소포 표면 마커에 결합할 수 있는 결합 모이어티를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 생물학적 샘플에서 세포외 소포 또는 세포외 미세입자를 포획하기 위해 결합 모이어티를 포함한다. 일부 경우, 세포외 소포는 DNA 및 RNA 중 적어도 하나를 함유한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 세포외 소포에 함유된 DNA 또는 RNA를 분석하기 위해 시약 또는 성분을 포함한다. 일부 경우, 결합 모이어티는 항체, 항원 결합 항체 단편, 리간드, 수용체, 단백질, 펩타이드, 소분자, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0250] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 세포로부터 방출된 세포외 소포와 상호작용할 수 있거나 이 세포외 소포를 포획할 수 있는 결합 모이어티를 포함한다. 일부 경우, 세포는 태아 세포이다. 일부 경우, 세포는 태반 세포이다. 태아 세포 또는 태반 세포는 여성 임신 대상체의 생물학적 유체(예를 들면, 혈액)에서 순환할 수 있다. 일부 경우, 세포외 소포는 장기, 분비선 또는 조직으로부터 방출된다. 비제한적 예로써, 장기, 분비선 또는 조직은 병들 수 있거나, 노화될 수 있거나, 감염될 수 있거나 성장할 수 있다. 장기, 분비선 및 조직의 비제한적 예는 뇌, 간, 심장, 신장, 결장, 췌장, 근육, 지방, 갑상선, 전립선, 유방 조직 및 골수이다.

[0251] 비제한적 예로써, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 모체 샘플로부터 세포외 소포 또는 세포외 미세입자를 포획하고 버림으로써, 상기 샘플을 태아/태반 핵산에 대해 농후화할 수 있다. 일부 경우, 세포외 소포는 기원이 태아/태반이다. 일부 경우, 세포외 소포는 태아 세포로부터 유래한다. 일부 경우, 세포외 소포는 태아 세포에 의해 방출된다. 일부 경우, 세포외 소포는 태반 세포에 의해 방출된다. 태반 세포는 영양배엽 세포일 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 태아 DNA 또는 RNA 단편을 함유할 수 있는 태반 교육된 혈소판을 포획화기 위해 세포 결합 모이어티를 포함한다. 이들은 항체 또는 다른 방법(저속 원심분리)에 의해 포획/농후화될 수 있다. 이러한 경우, 태아 DNA 또는 RNA 단편을 본원에 기재된 바와 같이 분석하여, 염색체 정보(예를 들면, 성별)를 검출할 수 있거나 표시할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 모체 세포로부터 나오는 생물학적 샘플에서 세포외 소포 또는 세포외 미세입자를 포획하기 위해 결합 모이어티를 포함한다.

[0252] 일부 경우, 결합 모이어티가 생물학적 샘플과 접촉한 후, 결합 모이어티는 고체 지지체에 부착되고, 이때 고체 지지체는 생물학적 샘플의 나머지 부분으로부터 분리될 수 있거나, 생물학적 샘플은 고체 지지체로부터 분리될 수 있다. 고체 지지체의 비제한적 예는 비드, 나노입자, 자기 입자, 칩, 마이크로칩, 섬유성 스트립, 중합체 스트립, 막, 매트릭스, 컬럼, 플레이트 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0253] 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 세포 용해 시약을 포함할 수 있다. 세포 용해 시약의 비제한적 예는 세제, 예컨대, NP-40, 도데실황산나트륨, 및 암모늄, 염화물 또는 칼륨을 포함하는 염 용액을 포함한다. 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 세포 용해 구성요소를 가질 수 있다. 세포 용해 구성요소는 구조적 또는 기계적 구성요소일 수 있고 세포를 용해시킬 수 있다. 비제한적 예로써, 세포 용해 구성요소는 세포를 전단하여 핵산과 같은 세포내 성분을 방출시킬 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 세포 용해 시약을 포함하지 않는다. 본원에 개시된 일부 장치, 시스템 및 키트는 무세포 핵산을 분석하기 위한 것이다.

[0254] 핵산 증폭

[0255] 일반적으로, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 핵산을 증폭할 수 있다. 종종, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 DNA 중합효소를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 본원에 개시된 생물학적 샘플 중의 RNA로부터 상보적 DNA(cDNA)를 생성하기 위해 역전사효소를 포함하고, 이때 cDNA는 본원에 기재된 바와 같이 게놈 DNA와 유사하게 증폭될 수 있고/있거나 분석될 수 있다. 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 DNA 중합효소 및 나선효소와 같은 효소의 효율을 증가시킬 수 있는 크라우딩제도 종종 함유한다. 크라우딩제는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이 라이브러리의 효율을 증가시킬 수 있다. 크라우딩제는 중합체, 단백질, 폴리사카라이드 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트에서 사용될 수 있는 크라우딩제의 비제한적 예는 덱스트란, 폴리(에틸렌 글리콜) 및 덱스트란이다.

[0256] 전통적인 중합효소 연쇄 반응은 열순환을 요구한다. 이것은 가능할 것이나, 열순환기 기계가 없는 전형적인 집 사용자에게는 불편할 것이다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 장치 또는 시스템, 또는 이의 구성요소의 온도를 변화시키지 않으면서 핵산을 증폭할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 핵산을 등온 증폭할 수 있다. 등온 증폭의 비제한적 예는 다음과 같다: 루프 매개 등온 증폭(LAMP), 가닥 치환 증폭(SDA), 나선효소 의존적 증폭(HDA), 닉킹 효소 증폭 반응(NEAR) 및 재조합효소 중합효소 증폭(RPA). 따라서, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 등온 증폭을 수행하기 위해 필요한 시약을 포함할 수 있다. 등온 증폭 시약의 비제한적 예는 재조합효소 중합효소, 단일 가닥 DNA 결합 단백질 및 가닥 치환 중합효소를 포함한다. 일반적으로, 재조합효소 중합효소 증폭(RPA)을 이용한 등온 증폭은 (1) 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 DNA 내의 상동성 서열과 페어링시키고, (2) 치환된 DNA 가닥을 안정화시켜 프라이머 치환을 방지하고, (3) 가닥 치환 DNA 중합효소를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 연장시키기 위해 3종의 핵심 효소들, 즉 재조합효소, 단일 가닥 DNA 결합 단백질 및 가닥 치환 중합효소를 사용한다. 페어링된 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 사용 시, 기하급수적 DNA 증폭을 실온(최적 37℃)에서 인큐베이션에 의해 일어날 수 있다.

[0257] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 소정의 온도에서 핵산을 증폭할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 2개 이하의 온도에서 핵산을 증폭할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 3개 이하의 온도에서 핵산을 증폭할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 장치, 시스템 또는 키트의 한 시약 또는 구성요소를 먼저 가열할 것만을 요구한다.

[0258] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 온도 범위에서 핵산을 증폭할 수 있다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 90℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 80℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 70℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 60℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 50℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 40℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 30℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 20℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 10℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 90℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 80℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 70℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 60℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 50℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 40℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 30℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 20℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 10℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 90℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 80℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 70℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 60℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 50℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 40℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 30℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 10℃ 내지 약 30℃이다. 일부 경우, 모든 구성요소들 및 모든 시약들을 포함하는, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 냉각, 냉동 또는 가열을 요구하지 않으면서 실온에서 완전히 작동될 수 있다.

[0259] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트의 적어도 일부는 약 20℃ 내지 약 50℃에서 작동한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트의 적어도 일부는 약 37℃에서 작동한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트의 적어도 일부는 약 42℃에서 작동한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 유리하게는 실온에서 작동한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트의 적어도 일부는 약 20℃ 내지 약 30℃에서 핵산을 등온 증폭할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트의 적어도 일부는 약 23℃ 내지 약 27℃에서 핵산을 등온 증폭할 수 있다.

[0260] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 증폭을 모니터링하기 위해 무염기 부위, 형광단 및 소광제를 가진 하이브리드화 프로브를 포함한다. 무염기 부위를 절단하고 소광제를 방출하여 형광 여기를 허용하기 위해 엑소뉴클레아제 III이 포함될 수 있다. 일부 경우, 포획 분자(예를 들면, 바이오틴)를 증폭 프라이머들 중 하나에 부착시키고, 포획하여 검출하기 위해 하이브리드화 프라이머를 5' 항원성 분자(예를 들면, 플루오레세인 유도체 FAM)로 표지부착시킴으로써, 측면 유동을 통해 증폭 생성물을 검출하거나 모니터링한다. 따라서, 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 측면 유동 장치에서의 핵산 및 증폭 생성물의 검출을 제공한다. 측면 유동 장치는 본원에 기재되어 있다.

[0261] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 게놈의 제1 서열 및 게놈의 제2 서열을 증폭할 수 있는 적어도 하나의 핵산 증폭 시약 및 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 제1 서열과 제2 서열은 유사하고, 제1 서열이 대상체의 제1 무세포 핵산에 존재하고 제2 서열이 대상체의 제2 무세포 핵산에 존

재하도록 제1 서열은 제2 서열로부터 물리적으로 충분히 멀리 떨어져 있다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 바로 인접해 있다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 적어도 하나의 뉴클레오타이드에 의해 분리된다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 적어도 2개의 뉴클레오타이드에 의해 분리된다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 적어도 약 5개, 적어도 약 10개, 적어도 약 15개, 적어도 약 20개, 적어도 약 30개, 적어도 약 40개, 적어도 약 50개, 또는 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드에 의해 분리된다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 적어도 약 50% 동일하다. 일부 경우, 적어도 2개의 서열들은 적어도 약 60% 동일하거나, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99% 또는 100% 동일하다. 일부 경우, 제1 서열 및 제2 서열은 각각 길이가 적어도 10개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 제1 서열 및 제2 서열은 각각 길이가 적어도 약 10개, 적어도 약 15개, 적어도 약 20개, 적어도 약 30개, 적어도 약 50개 또는 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 제1 서열 및 제2 서열은 동일한 염색체에 존재한다. 일부 경우, 제1 서열은 제1 염색체에 존재하고, 제2 서열은 제2 염색체에 존재한다. 일부 경우, 제1 서열과 제2 서열은 기능적으로 연결되어 있다. 예를 들면, 유전자 *AOX1*의 프로모터 영역 내의 모든 CpG 부위들은 전립선암에서 동일한 과다메틸화를 보이므로, 이 부위들은 기능적으로 동일한 정보를 갖지만, 하나 이상의 뉴클레오타이드에 의해 떨어져 위치하기 때문에 기능적으로 연결되어 있다.

[0262] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 무세포 핵산의 가닥에 어닐링할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브 또는 올리고뉴클레오타이드 프라이머 중 적어도 하나를 포함하고, 이때 무세포 핵산은 관심 있는 영역 또는 이의 일부에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 Y 염색체의 영역이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 X 염색체의 영역이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 상염색체의 영역이다. 일부 경우, 관심 있는 영역 또는 이의 일부는 게놈에 1회 초과의 빈도로 존재하는, 본원에 기재된 반복부 서열을 포함한다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 1,000,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 적어도 10개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 적어도 100개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 영역은 길이가 적어도 1000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 500,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 300,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 100개의 뉴클레오타이드 내지 약 1,000,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 100개의 뉴클레오타이드 내지 약 500,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 100개의 뉴클레오타이드 내지 약 300,000개의 염기쌍이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 1000개의 뉴클레오타이드 내지 약 1,000,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 1000개의 뉴클레오타이드 내지 약 500,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 1000개의 뉴클레오타이드 내지 약 300,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 10,000개의 뉴클레오타이드 내지 약 1,000,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 10,000개의 뉴클레오타이드 내지 약 500,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 10,000개의 뉴클레오타이드 내지 약 300,000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역은 길이가 약 300,000개의 뉴클레오타이드이다.

[0263] 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 5개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 8개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 10개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 15개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 20개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 50개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 관심 있는 영역에 상응하는 서열은 길이가 적어도 약 100개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 5개의 뉴클레오타이드 내지 약 1000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 1000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 500개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 400개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 300개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 50개의 뉴클레오타이드 내지 약 1000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 상기 서열은 길이가 약 50개의 뉴클레오타이드 내지 약 500개의 뉴클레오타이드이다.

[0264] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 무세포 핵산의 가닥에 어닐링할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 올리고뉴클레오타이드 프라이머 중 적어도 하나를 포함하고, 이때 무세포 핵산은 본원에 개시된 관심 있는 하위영역에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 하위영역은 1회 초과의 빈도로 관심 있는 영역에

존재하는 서열로 표시된다. 일부 경우, 하위영역은 길이가 약 10개 내지 약 1000개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 하위영역은 길이가 약 50개 내지 약 500개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 하위영역은 길이가 약 50개 내지 약 250개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 하위영역은 길이가 약 50개 내지 약 150개의 뉴클레오타이드이다. 일부 경우, 하위영역은 길이가 약 100개의 뉴클레오타이드이다.

[0265] 해당 기술 분야에서 공지되어 있는 임의의 적절한 핵산 증폭 방법이 본원에 기재된 장치 및 방법에서 사용될 것으로 예상된다. 일부 경우, 등온 증폭이 이용된다. 일부 경우, 증폭은 등온 증폭이 시작되기 전 초기 가열 단계를 제외하고 등온 증폭이다. 상이한 고려사항들을 각각 갖고 상이한 장점을 제공하는 다수의 등온 증폭 방법들이 해당 기술 분야에서 공지되어 있고 문헌, 예를 들면, 전체적으로 본원에 각각 참고로 포함된 문헌[Zanoli and Spoto, 2013, "Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Device," Biosensors 3: 18-43] 및 문헌[Fakruddin, et al., 2013, "Alternative Methods of Polymerase Chain Reaction (PCR)," Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences 5(4): 245-252]에 논의되어 있다. 일부 경우, 임의의 적절한 등온 증폭 방법이 이용된다. 일부 경우, 이용되는 등온 증폭 방법은 루프 매개 등온 증폭(LAMP); 핵산 서열 기반 증폭(NASBA); 다중 치환 증폭(MDA); 롤링 서클 증폭(RCA); 나선효소 의존적 증폭(HDA); 가닥 치환 증폭(SDA); 닉킹 효소 증폭 반응(NEAR); 파급 증폭 방법(RAM); 및 재조합효소 중합효소 증폭(RPA)으로부터 선택된다.

[0266] 일부 경우, 이용되는 증폭 방법은 LAMP이다(예를 들면, 전체적으로 본원에 각각 참고로 포함된 문헌[Notomi, et al., 2000, "Loop Mediated Isothermal Amplification" NAR 28(12): e63 i-vii] 및 미국 특허 제6,410,278호("Process for synthesizing nucleic acid") 참조). LAMP는 자가순환 가닥 치환 데옥시리보핵산(DNA) 합성을 이용하는 1 단계 증폭 시스템이다. 일부 경우, LAMP는 열안정성 중합효소, 예를 들면, 바실러스 스테아로써모필러스(Bst) DNA 중합효소 I, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트(dNTP), 특이적 프라이머 및 표적 DNA 주형의 존재 하에서 45분 내지 60분 동안 60℃ 내지 65℃에서 수행된다. 일부 경우, 주형은 RNA이고, 역전사효소 활성 및 가닥 치환 유형 DNA 중합효소 활성 둘 다를 가진 중합효소, 예를 들면, Bca DNA 중합효소가 사용되거나, 역전사효소 활성을 가진 중합효소가 역전사 단계를 위해 사용되고, 역전사효소 활성을 갖지 않은 중합효소가 가닥 치환 DNA 합성 단계를 위해 사용된다.

[0267] 일부 경우, 증폭 반응은 본원에 기재된 온도 또는 온도 범위에서 LAMP를 이용함으로써 수행된다. 일부 경우, 증폭 반응은 본원에 기재된 시간 또는 시간 범위 동안 LAMP를 이용함으로써 수행된다.

[0268] 일부 경우, 증폭 방법은 핵산 서열 기반 증폭(NASBA)이다. (3SR 및 전사 매개 증폭으로서도 공지되어 있는) NASBA는 등온 전사 기반 RNA 증폭 시스템이다. 3종의 효소들(조류 골수아구증 바이러스 역전사효소, RNase H 및 T7 DNA 의존적 RNA 중합효소)이 단일 가닥 RNA를 생성하는 데 사용된다. 일부 경우, NASBA는 DNA를 증폭하는 데 사용될 수 있다. 증폭 반응은 전형적으로 약 60분 내지 약 90분 동안 일정한 온도를 유지하면서 41℃에서 수행된다(예를 들면, 본원에 참고로 포함된 문헌[Fakruddin, et al., 2012, "Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) Prospects and Applications," Int. J. of Life Science and Pharma Res. 2(1):L106-L121] 참조).

[0269] 일부 경우, NASBA 반응은 약 40℃ 내지 약 42℃에서 수행된다. 일부 경우, NASBA 반응은 41℃에서 수행된다. 일부 경우, NASBA 반응은 최대 약 42℃에서 수행된다. 일부 경우, NASBA 반응은 약 40℃ 내지 약 41℃, 약 40℃ 내지 약 42℃, 또는 약 41℃ 내지 약 42℃에서 수행된다. 일부 경우, NASBA 반응은 약 40℃, 약 41℃ 또는 약 42℃에서 수행된다.

[0270] 일부 경우, 증폭 반응은 본원에 기재된 시간 또는 시간 범위 동안 NASBA를 이용함으로써 수행된다.

[0271] 일부 경우, 증폭 방법은 가닥 치환 증폭(SDA)이다. SDA는 4종의 상이한 프라이머들을 사용하는 등온 증폭 방법이다. 제한 부위(HincII 엑소뉴클레아제에 대한 인식 서열)를 함유하는 프라이머는 DNA 주형에 어닐링된다. 에스케리키아 콜라이 DNA 중합효소 1(엑소-클레나우)의 엑소뉴클레아제 결핍 단편은 프라이머를 연장시킨다. 각각의 SDA 주기는 (1) 치환된 표적 단편에의 프라이머 결합, (2) 엑소-클레나우에 의한 프라이머/표적 복합체의 연장, (3) 생성된 헤미포스포티오에이트 HincII 부위의 닉킹, (4) 닉킹된 부위로부터의 HincII의 해리 및 (5) 엑소-클레나우에 의한 닉의 연장 및 다운스트림 가닥의 치환으로 구성된다.

[0272] 일부 경우, 증폭 방법은 다중 치환 증폭(MDA)이다. MDA는 높은 신뢰도로 전체 게놈을 증폭하기 위해 변형된 무작위 프라이머와 함께, 박테리오파지 ϕ29로부터의 고진행성 가닥 치환 DNA 중합효소를 사용하는 것에 기반한 등온 가닥 치환 방법이다. 이 방법은 극소량의 출발 물질로부터 샘플 중의 모든 DNA를 증폭하기 위해 개발되었

다. MDA에서, ϕ29 DNA 중합효소는 16시간 내지 18시간 동안 30℃에서 dNTP, 무작위 육량체 및 변성된 주형 DNA와 함께 인큐베이션되고, 효소는 10분 동안 고온(65℃)에서 불활성화되어야 한다. 반복된 재순환은 요구되지 않으나, 짧은 초기 변성 단계, 증폭 단계 및 효소의 최종 불활성화가 필요하다.

[0273] 일부 경우, 증폭 방법은 롤링 서클 증폭(RCA)이다. RCA는 단일 온도, 전형적으로 약 30℃에서 프로브 DNA 서열을 10^9배 이상 증폭할 수 있게 하는 등온 핵산 증폭 방법이다. 많은 라운드의 등온 효소 합성은 원형 DNA 프로브 둘레를 연속적으로 전진함으로써 원-하이브리드화된 프라이머를 연장시키는 ϕ29 DNA 중합효소에 의해 수행된다. 일부 경우, 증폭 반응은 약 28℃ 내지 약 32℃에서 RCA를 이용함으로써 수행된다.

[0274] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열을 가진다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열을 가진다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열로 구성된다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하고, 이때 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열로 구성된다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 75% 상동하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 80% 상동하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 85% 상동하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 80% 상동하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 90% 상동하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 95% 상동하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 적어도 97% 상동하다. 일부 경우, Y 염색체 서열에 상보적이거나 상응하는 서열(들)은 야생형 인간 Y 염색체 서열과 100% 상동하다.

[0275] 핵산 라이게이터

[0276] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 검출을 위해 핵산 라이브러리를 제조할 수 있다. 일부 경우, 핵산은 본원에 기재된 핵산 증폭기 및/또는 증폭 시약에 의해 임의적으로 증폭된다. 일부 경우, 본원에 기재된 장치 또는 시스템은 검출을 위해 라이브러리 적격 표적 핵산을 생성할 수 있는 핵산 라이게이터를 포함한다.

[0277] 일부 실시양태에서, 핵산 라이게이터는 라이게이션 적격 표적 핵산(예를 들면, 무세포 핵산)을 생성하기 위해 라이게이션 제제를 포함한다. 라이게이션 제제는 (i) 표적 무세포 핵산의 블런트 말단을 생성하고 표적 무세포 핵산의 블런트 말단의 5' 오버행 또는 3' 리세스드 말단을 제거하기에 알맞은 하나 이상의 엑소뉴클레아제; (ii) 블런트 말단 무세포 핵산 탈인산화제; (iii) 크라우딩 시약; (iv) 핵산 손상 복구제; 또는 (v) 핵산 리가제 중 하나 이상을 포함한다. 일부 경우, 라이게이션 제제는 (i) 내지 (v) 중 2개 이상, (i) 내지 (v) 중 3개 이상, 또는 (i) 내지 (v) 중 4개 전부를 포함한다. 핵산 라이게이터는 라이게이션 적격 표적 무세포 핵산에 라이게이션된 하나 이상의 어댑터 올리고뉴클레오타이드도 포함한다.

[0278] 일부 실시양태에서, 핵산 손상 복구제는 하나 이상의 중합효소를 포함한다. 일부 경우, 하나 이상의 중합효소는 T4 DNA 중합효소 또는 DNA 중합효소 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 엑소뉴클레아제는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 또는 엑소뉴클레아제 III을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제는 T3 DNA 리가제, T4 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, Taq 리가제, 앰플리가제, 이. 콜라이 리가제 또는 Sso7-리가제 융합 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 시약은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 글리코겐 또는 덱스트란, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자 인핸서는 디메틸 설폭사이드(DMSO), 폴리소르베이트 20, 포름아미드 또는 디올, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 라이게이터는 블런트 말단 라이게이션 또는 단일 뉴클레오타이드 오버행 라이게이션을 수행하도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 어댑터 올리고뉴클레오타이드는 Y 모양 어댑터, 헤어핀 어댑터, 스템 루프 어댑터, 분해 가능한 어댑터, 차단된 자가-라이게이션 어댑터 또는 바코딩된 어댑터, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0279] 일부 경우, 라이게이션 제제는 엔도뉴클레아제, 예컨대, 클러스터링된 규칙적으로 이격된 짧은 팔린드롬 반복부(CRISPR)-Cas 조합을 포함한다. 일부 경우, Cas 효소는 Cas9, Cas12, 캐스케이드 및 Cas13, 또는 이들의 서브타입을 포함한다. 일부 경우, Cas 효소는 Cas 오르톨로그, 예컨대, 문헌[Nat Rev Mol Cell Biol. 2019 Aug;20(8):490-507]에 기재된 Cas 오르톨로그이다. 일부 경우, 라이게이션 제제는 전위효소를 포함한다. 일부 경우, 전위효소는 "절단 및 붙이기" 기작, 예컨대, Tn5 전위효소 또는 이의 변이체를 가진다.

[0280] 핵산 검출기

[0281] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 핵산 검출기를 포함한다. 일부 경우, 핵산 검출기는 핵산 서열분석기를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 핵산을 증폭하고 핵산 증폭기로부터 생성된 증폭된 핵산, 또는 핵산 라이게이터로부터의 라이게이션 적격 표적 핵산, 또는 이들 둘 다를 서열분석하도록 구성된다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 핵산을 증폭하지 않으면서 핵산을 서열분석하도록 구성된다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 핵산 서열분석기를 포함하나, 핵산 증폭 시약 또는 핵산 증폭 구성요소를 포함하지 않는다. 일부 경우, 핵산 서열분석기는 성공적인 증폭 또는 성공적이지 못한 증폭을 반영하는 신호를 검출하는 신호 검출기를 포함한다. 일부 경우, 핵산 서열분석기는 신호 검출기이다. 일부 경우, 신호 검출기는 핵산 서열분석기를 포함한다.

[0282] 일부 경우, 핵산 서열분석기는 핵산 서열분석기로부터의 서열분석 리드를 분석하는 전자 장치와의 통신 연결을 가진다. 일부 경우, 통신 연결은 하드웨어에 내장되어 있다. 일부 경우, 통신 연결은 무선이다. 예를 들면, 모바일 장치 앱 또는 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대, 본원에 개시된 모바일 장치 앱 또는 컴퓨터 소프트웨어는 서열분석 리드를 받을 수 있고, 서열분석 리드를 기반으로 샘플에 대한 유전 정보(예를 들면, 질환/감염의 존재, 약물에 대한 반응, 태아의 유전자 이상 또는 돌연변이)를 디스플레이할 수 있거나 보고할 수 있다.

[0283] 일부 경우, 핵산 서열분석기는 나노공극 서열분석기를 포함한다. 일부 경우, 나노공극 서열분석기는 나노공극을 포함한다. 일부 경우, 나노공극 서열분석기는 막, 및 막을 횡단하는 전류를 생성하고 나노공극을 통해 하전된 분자(예를 들면, 핵산)의 이동을 유도하는 용액을 포함한다. 일부 경우, 나노공극 서열분석기는 막횡단 단백질, 이의 일부 또는 이의 변형물을 포함한다. 일부 경우, 막횡단 단백질은 세균 단백질이다. 일부 경우, 막횡단 단백질은 세균 단백질이 아니다. 일부 경우, 나노공극은 합성 나노공극이다. 일부 경우, 나노공극은 고체 상태 나노공극 서열분석을 수행한다. 일부 경우, 나노공극 서열분석기는 포켓 크기, 휴대 가능한 크기 또는 대략 휴대폰 크기를 가진 것으로서 기재된다. 일부 경우, 나노공극 서열분석기는 RNA 및 DNA 중 적어도 하나를 서열분석하도록 구성된다. 나노공극 서열분석 장치의 비제한적 예는 옥스포드 나노포어 테크놀로지스(Oxford Nanopore Technologies) MinION 및 SmidgION 나노공극 서열분석 USB 장치를 포함한다. 이 장치들 둘 다가 손으로 잡을 수 있을 정도로 충분히 작다. 나노공극 서열분석 장치 및 구성요소는 둘 다 본원에 참고로 포함된 문헌[Howorka, Nat Nanotechnol. 2017 Jul 6;12(7):619-630] 및 문헌[Garrido-Cardenas *et al.*, Sensors (Basel). 2017 Mar 14;17(3)]에 더 기재되어 있다. 나노공극 서열분석 장치의 다른 비제한적 예는 일렉트로닉 바이오사이언시스(Electronic Biosciences), 투 포어 가이스(Two Pore Guys), 스트라토스(Stratos) 및 아질런트(Agilent)에 의해 제공된다(원래 제니아(Genia)의 기술).

[0284] 일부 경우, 핵산 검출기는 후성 유전자 변형을 검출하기 위한 중아황산염 서열분석을 위해 요구된 시약 및 구성요소를 포함한다. 예를 들면, 많은 메틸화 마커들을 가진 긴 영역은 단편화될 수 있다. 여기서, 메틸화 마커를 가진 각각의 단편은 독립적인 신호일 수 있다. 모든 단편들로부터의 신호는 유용한 유전 정보를 수득하기 위한 조합에 충분하다.

[0285] 일부 경우, 핵산 검출기는 핵산 서열분석기를 포함하지 않는다. 일부 경우, 핵산 검출기는 태깅된 핵산을 카운팅하도록 구성되고, 이때 핵산 검출기는 하나 이상의 태그로부터 모은 신호를 정량한다.

[0286] 포획 및 검출

[0287] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 생물학적 샘플에서 핵산을 검출하기 위해 핵산 검출기, 포획 구성요소, 신호 검출기, 검출 시약 또는 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 경우, 포획 구성요소와 신호 검출기는 통합되어 있다. 일부 경우, 포획 구성요소는 고체 지지체를 포함한다. 일부 경우, 고체 지지체는 비드, 칩, 스트립, 막, 매트릭스, 컬럼, 플레이트, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0288] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 염색체 또는 이의 단편의 후성적으로 변형된 영역에 대한 적어도 하나의 프로브를 포함한다. 일부 경우, 염색체의 후성적으로 변형된 영역의 후성 유전자 변형은 성별 또는 성별의 마커를 표시한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 모체 DNA에 존재하지 않는 부계 유

전된 서열에 대한 적어도 하나의 프로브를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 부계 유전된 단일 뉴클레오타이드 다형성에 대한 적어도 하나의 프로브를 포함한다. 일부 경우, 염색체는 Y 염색체이다. 일부 경우, 염색체는 X 염색체이다. 일부 경우, 염색체는 Y 염색체이다. 일부 경우, 염색체는 상염색체이다. 일부 경우, 프로브는 펩타이드, 항체, 항원 결합 항체 단편, 핵산 또는 소분자를 포함한다.

[0289] 일부 경우, 장치, 시스템 및 키트는 본원에 개시된 샘플 정제기 및 본원에 개시된 포획 구성요소를 포함한다. 일부 경우, 샘플 정제기는 포획 구성요소를 포함한다. 일부 경우, 샘플 정제기와 포획 구성요소는 통합되어 있다. 일부 경우, 샘플 정제기와 포획 구성요소는 분리되어 있다.

[0290] 일부 경우, 포획 구성요소는 본원에 기재된 결합 모이어티를 포함한다. 일부 경우, 결합 모이어티는 측면 유동 어세이에 존재한다. 일부 경우, 결합 모이어티는 샘플이 측면 유동 어세이에 첨가되기 전에 샘플에 첨가된다. 일부 경우, 결합 모이어티는 신호전달 분자를 포함한다. 일부 경우, 결합 모이어티는 신호전달 분자와 물리적으로 연결된다. 일부 경우, 결합 모이어티는 신호전달 분자와 물리적으로 연결될 수 있다. 일부 경우, 결합 모이어티는 신호전달 분자에 연결된다. 신호전달 분자의 비제한적 예는 금 입자, 형광 입자, 발광 입자 및 염료 분자를 포함한다. 일부 경우, 포획 구성요소는 본원에 기재된 증폭 생성물과 상호작용할 수 있는 결합 모이어티를 포함한다. 일부 경우, 포획 구성요소는 본원에 기재된 증폭 생성물 상의 태그와 상호작용할 수 있는 결합 모이어티를 포함한다.

[0291] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 검출 시스템을 포함한다. 일부 경우, 검출 시스템은 신호 검출기를 포함한다. 신호 검출기의 비제한적 예는 형광 판독기, 비색계, 센서, 와이어, 회로, 수신기를 포함한다. 일부 경우, 검출 시스템은 검출 시약을 포함한다. 검출 시약의 비제한적 예는 형광단, 화학물질, 나노입자, 항체 및 핵산 프로브를 포함한다. 일부 경우, 검출 시스템은 pH의 변화를 검출하는 데 이용될 수 있는 pH 센서 및 상보적 산화금속 반도체를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 또는 방법에 의한 증폭 생성물의 생성은 pH를 변화시킴으로써, 유전 정보를 표시한다.

[0292] 일부 경우, 검출 시스템은 신호 검출기를 포함한다. 일부 경우, 신호 검출기는 광자를 검출하는 광검출기이다. 일부 경우, 신호 검출기는 형광을 검출한다. 일부 경우, 신호 검출기는 화학물질 또는 화합물을 검출한다. 일부 경우, 신호 검출기는 증폭 생성물이 생성될 때 방출된 화학물질을 검출한다. 일부 경우, 신호 검출기는 증폭 생성물이 검출 시스템에 첨가될 때 방출된 화학물질을 검출한다. 일부 경우, 신호 검출기는 증폭 생성물이 생성될 때 생성된 화합물을 검출한다. 일부 경우, 신호 검출기는 증폭 생성물이 검출 시스템에 첨가될 때 생성된 화합물을 검출한다.

[0293] 일부 경우, 신호 검출기는 전기 신호를 검출한다. 일부 경우, 신호 검출기는 전극을 포함한다. 일부 경우, 신호 검출기는 회로, 전류 또는 전류 생성기를 포함한다. 일부 경우, 회로 또는 전류는 2개 이상의 용액 또는 중합체의 구배에 의해 제공된다. 일부 경우, 회로 또는 전류는 에너지원(예를 들면, 배터리, 휴대전화, 콘센트로부터의 와이어)에 의해 제공된다. 일부 경우, 본원에 개시된 핵산, 증폭 생성물, 화학물질 또는 화합물은 전류를 파괴함으로써 전기 신호를 제공하고, 신호 검출기는 전기 신호를 검출한다.

[0294] 일부 경우, 신호 검출기는 광을 검출한다. 일부 경우, 신호 검출기는 광 센서를 포함한다. 일부 경우, 신호 검출기는 카메라를 포함한다. 일부 경우, 신호 검출기는 휴대전화 카메라 또는 이의 구성요소를 포함한다.

[0295] 일부 경우, 신호 검출기는 핵산에서 상이한 염기들의 전하를 검출하는 나노와이어를 포함한다. 일부 경우, 나노와이어는 약 1 nm 내지 약 99 nm의 직경을 가진다. 일부 경우, 나노와이어는 약 1 nm 내지 약 999 nm의 직경을 가진다. 일부 경우, 나노와이어는 무기 분자, 예를 들면, 니켈, 백금, 규소, 금, 아연, 그래핀 또는 타타늄을 포함한다. 일부 경우, 나노와이어는 유기 분자(예를 들면, 뉴클레오타이드)를 포함한다.

[0296] 일부 경우, 검출 시스템은 표적 피분석물(예를 들면, 핵산 증폭 생성물)을 검출할 수 있는 어세이 조립체를 포함한다. 일부 경우, 어세이 조립체는 본원 및 해당 기술 분야에서 측면 유동 어세이, 측면 유동 검사 또는 측면 유동 장치로서도 지칭되는 측면 유동 스트립을 포함한다. 일부 경우, 측면 유동 어세이는 본원에 개시된 증폭 생성물을 검출하기 위해 신속하고 저렴하고 기술적으로 단순한 방법을 제공한다. 일반적으로, 본원에 개시된 측면 유동 어세이는 유체를 수송하는 다공성 물질 또는 다공성 매트릭스, 및 증폭 생성물이 존재할 때 이 증폭 생성물을 검출하는 검출기를 포함한다. 다공성 물질은 다공성 종이, 중합체 구조물, 소결된 중합체 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 경우, 측면 유동 어세이는 생물학적 유체 또는 이의 일부(예를 들면, 혈액 샘플의 혈장)를 수송한다. 일부 경우, 측면 유동 어세이는 생물학적 유체 또는 이의 일부를 함유하는 용액을 수송한다. 예를 들면, 방법은 샘플을 장치 또는 시스템에 첨가하기 전 또는 동안 용액을 생물학적 유체에 첨가하는 단계를

포함할 수 있다. 상기 용액은 측면 유동 어세이를 통한 샘플 및/또는 증폭 생성물의 수송을 용이하게 하는 염, 중합체 또는 임의의 다른 성분을 포함할 수 있다. 일부 경우, 핵산은 측면 유동 스트립을 통해 이동한 후 증폭된다.

[0297] 일부 경우, 장치 또는 검출 시스템은 다수의 섹터들 또는 대역들을 포함하는 측면 유동 장치를 포함하고, 이때 각각의 원하는 기능은 별도의 섹터 또는 대역에 존재할 수 있다. 일반적으로, 측면 유동 장치에서, 표적 피분석물을 함유하는 액체 샘플, 예를 들면, 본원에 기재된 체액 샘플은 측면 유동 장치의 섹터 또는 대역을 통해 외력의 보조를 받거나 받지 않으면서 이동한다. 일부 경우, 표적 피분석물은 예를 들면, 모세관 작용에 의한 외력의 보조 없이 이동한다. 일부 경우, 표적 피분석물은 예를 들면, 측면 유동 장치의 이동에 의한 모세관 작용의 촉진에 의해 외력의 보조를 받아 이동한다. 이동은 측면 유동 장치의 외부 투입, 예를 들면, 진탕, 회전, 원심분리, 전기장 또는 자기장 적용, 펌프의 적용, 진공의 적용 또는 진동에 의해 야기된 임의의 이동을 포함할 수 있다.

[0298] 일부 경우, 측면 유동 장치는 예를 들면, 서로의 뒤 또는 앞에서 측면으로 위치된 대역 또는 섹터를 포함하는 측면 유동 검사 스트립이다. 일반적으로, 측면 유동 검사 스트립은 각각의 기능적 대역 또는 섹터의 큰 표면적이 노출된 결과로서 검사 스트립의 각각의 면(예를 들면, 위 및 아래)으로부터의 기능적 대역 또는 섹터의 접근성을 허용한다. 이것은 샘플 정제 또는 표적 피분석물 증폭, 및/또는 검출에 사용된 시약을 비롯한 시약의 첨가를 용이하게 한다.

[0299] 해당 기술 분야에서 당업자에게 공지되어 있는 임의의 적합한 측면 유동 검사 스트립 검출 포맷이 본 개시의 어세이 조립체에 사용될 것으로 예상된다. 측면 유동 검사 스트립 검출 포맷은 잘 공지되어 있고 문헌에 기재되어 있다. 측면 유동 검사 스트립 어세이 포맷은 예를 들면, 전체적으로 본원에 참고로 포함된 문헌[Sharma et al., (2015) Biosensors 5:577-601]에 일반적으로 기재되어 있다. 측면 유동 검사 스트립 샌드위치 어세이 포맷을 이용한 핵산의 검출은 예를 들면, 전체적으로 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제9,121,849호("Lateral Flow Assays")에 기재되어 있다. 측면 유동 검사 스트립 경쟁 어세이 포맷을 이용한 핵산의 검출은 예를 들면, 전체적으로 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제9,423,399호("Lateral Flow Assay for Tagged Analytes")에 기재되어 있다.

[0300] 일부 경우, 측면 유동 검사 스트립은 샌드위치 포맷, 경쟁 포맷 또는 다중체 검출 포맷을 이용하여 검사 샘플에서 표적 피분석물을 검출한다. 전통적인 샌드위치 어세이 포맷에서, 검출된 신호는 샘플에 존재하는 표적 피분석물의 양에 정비례하므로, 표적 피분석물의 증가하는 양은 증가하는 신호 강도로 이어진다. 전통적인 경쟁 어세이 포맷에서, 검출된 신호는 존재하는 피분석물의 양과 반비례 관계를 갖고, 피분석물의 증가하는 양은 감소하는 신호 강도로 이어진다.

[0301] "샌드위치 어세이"로서도 지칭되는 측면 유동 샌드위치 포맷에서, 검사 샘플은 전형적으로 검사 스트립의 한 말단에서 샘플 적용 패드에 적용된다. 적용된 검사 샘플은 샘플 적용 패드부터 샘플 적용 패드에 인접하여 위치된 접합체 패드까지 검사 스트립을 통해 유동하고, 이때 접합체 패드는 샘플 유동의 방향에서 다운스트림에 있다. 일부 경우, 접합체 패드는 표지부착된 가역적으로 고정된 프로브, 예를 들면, 염료, 효소 또는 나노입자로 표지부착된 항체 또는 앱타머를 포함한다. 표지부착된 프로브-표적 피분석물 복합체는 표적 피분석물이 검사 샘플에 존재하는 경우 형성된다. 그 다음, 이 복합체는 표적 피분석물에 특이적인 고정된 제2 프로브를 포함하는 제1 검사 대역 또는 섹터(예를 들면, 검사 선)로 유동함으로써, 임의의 표지부착된 프로브-표적 피분석물 복합체를 잡아둔다. 일부 경우, 제1 검사 대역 또는 섹터에서의 신호, 예를 들면, 색채의 강도 또는 크기를 이용하여, 검사 샘플에서 표적 피분석물의 존재 또는 부재, 양, 또는 존재 및 양을 표시한다. 제2 검사 대역 또는 섹터는 여분의 표지부착된 프로브에 결합하는 제3 프로브를 포함할 수 있다. 적용된 검사 샘플이 표적 피분석물을 포함하는 경우, 표적 피분석물이 접합체 패드 상에서 표지부착된 프로브에 의해 포획된 후 여분의 표지부착된 프로브는 검사 스트립에 거의 또는 전혀 존재하지 않을 것이다. 결과적으로, 제2 검사 대역 또는 섹터는 어떠한 표지부착된 프로브에도 결합하지 않을 것이고, 제2 검사 대역 또는 섹터에서 신호(예를 들면, 색채)는 거의 또는 전혀 관측되지 않을 것으로 예측된다. 따라서, 제2 검사 대역 또는 섹터에서의 신호의 부재는 제1 검사 대역 또는 섹터에서 관측된 신호가 표적 피분석물의 존재에 기인한다는 확신을 제공할 수 있다.

[0302] 일부 경우, 본원에 개시된 장치 및 시스템은 샌드위치 어세이를 포함한다. 일부 경우, 샌드위치 어세이는 본원에 개시된 생물학적 샘플을 수용하고 샘플 성분(예를 들면, 핵산, 세포, 미세입자)을 보유하도록 구성된다. 일부 경우, 샌드위치 어세이는 생물학적 샘플의 핵산을 남기면서 생물학적 샘플의 비-핵산 성분(예를 들면, 단백질, 세포, 미세입자)을 씻어내는 유동 용액을 수용하도록 구성된다. 일부 경우, 샌드위치 어세이는 유동 용액이

적용될 때 핵산을 보유하는 것을 돕기 위해 핵산에 결합하는 막을 포함한다. 핵산에 결합하는 막의 비제한적 예는 키토산 변형 니트로셀룰로스를 포함한다.

[0303] 유사하게, 측면 유동 경쟁 포맷에서, 검사 샘플은 검사 스트립의 한 말단에서 샘플 적용 패드에 적용되고, 표적 피분석물은 표지부착된 프로브에 결합하여, 샘플 적용 패드의 다운스트림에 있는 접합체 패드에서 프로브-표적 피분석물 복합체를 형성한다. 경쟁 포맷에서, 제1 검사 대역 또는 섹터는 전형적으로 표적 피분석물 또는 표적 피분석물의 유사체를 포함한다. 제1 검사 대역 또는 섹터 내의 표적 피분석물은 접합체 패드에서 검사 피분석물에 결합하지 않은 임의의 유리 표지부착된 프로브에 결합한다. 따라서, 제1 검사 대역 또는 섹터에서 관측된 신호의 양은 표적 피분석물이 존재할 때보다 표적 피분석물이 적용된 검사 샘플에 없을 때 더 높다. 제2 검사 대역 또는 섹터는 프로브-표적 피분석물 복합체에 특이적으로 결합하는 프로브를 포함한다. 이 제2 검사 대역 또는 섹터에서 관측된 신호의 양은 표적 피분석물이 적용된 검사 샘플에 존재할 때 더 높다.

[0304] 측면 유동 검사 스트립 다중체 검출 포맷에서, 예를 들면, 각각의 표적 피분석물에 특이적인 프로브를 포함하는 추가 검사 대역 또는 섹터의 사용을 통해 검사 스트립을 사용함으로써 하나 초과의 표적 피분석물을 검출한다.

[0305] 일부 경우, 측면 유동 장치는 예를 들면, 서로의 위 또는 아래에서 내측으로 위치된 층들에 존재하는 대역 또는 섹터를 포함하는 적층된 측면 유동 장치이다. 일부 경우, 하나 이상의 대역 또는 섹터는 소정의 층에 존재한다. 일부 경우, 각각의 대역 또는 섹터는 개별 층에 존재한다. 일부 경우, 층은 다수의 대역들 또는 섹터들을 포함한다. 일부 경우, 층은 적층되어 있다. 적층된 측면 유동 장치에서, 확산에 의해 제어되고 농도 구배에 의해 유도된 과정은 가능한 구동력이다. 예를 들면, 샘플 액체에 함유된 피분석물의 형광측정 어세이 또는 형광측정 정량적 분석을 위한 다층 분석 요소는 본원에 참고로 포함된 유럽 특허 제0097952호("Multilayer analytical element")에 기재되어 있다.

[0306] 측면 유동 장치는 하나 이상의 기능적 대역 또는 섹터를 포함할 수 있다. 일부 경우, 검사 조립체는 1개 내지 20개의 기능적 대역 또는 섹터를 포함한다. 일부 경우, 기능적 대역 또는 섹터는 적어도 하나의 샘플 정제 대역 또는 섹터, 적어도 하나의 표적 피분석물 증폭 대역 또는 섹터, 적어도 하나의 표적 피분석물 검출 대역 또는 섹터, 및 적어도 하나의 표적 피분석물 검출 대역 또는 섹터를 포함한다.

[0307] 일부 경우, 표적 피분석물은 핵산 서열이고, 측면 유동 장치는 핵산 측면 유동 어세이이다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 핵산 측면 유동 어세이를 포함하고, 이때 핵산 측면 유동 어세이는 핵산 증폭 기능을 포함한다. 일부 경우, 핵산 증폭 기능에 의해 수행되는 표적 핵산 증폭은 증폭된 핵산 종의 검출 전에 또는 검출과 동시에 일어난다. 일부 경우, 검출은 표적 피분석물의 존재의 정성적, 반정량적 또는 정량적 검출 중 하나 이상을 포함한다.

[0308] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 어세이 조립체를 포함하고, 이때 표적 핵산 피분석물은 측면 유동 검사 스트립에서 증폭되어, 표지부착된 증폭 생성물, 또는 증폭 후 표지부착될 수 있는 증폭 생성물을 생성한다. 일부 경우, 표지는 증폭 후 하나 이상의 증폭 프라이머에 존재하거나, 나중에 하나 이상의 증폭 프라이머에 접합된다. 일부 경우, 적어도 하나의 표적 핵산 증폭 생성물은 측면 유동 검사 스트립 상에서 검출된다. 예를 들면, 측면 유동 검사 스트립 상의 하나 이상의 대역 또는 섹터는 표적 핵산 증폭 생성물에 특이적인 프로브를 포함할 수 있다.

[0309] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 그래핀 바이오센서를 포함하는 검출기를 포함한다. 그래핀 바이오센서는 예를 들면, 문헌[Afsahi et al., 표제: "Novel Graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection, Biosensor and Bioelectronics," (2018) 100:85-88]에 기재되어 있다.

[0310] 일부 경우, 본원에 개시된 검출기는 나노공극, 나노센서 또는 나노스위치를 포함한다. 예를 들면, 검출기는 막을 횡단하는 전류를 기반으로 나노공극을 통해 핵산을 수송하는 방법인 나노공극 서열분석을 할 수 있고, 상기 검출기는 특정 뉴클레오타이드에 상응하는 전류의 파괴를 측정한다. 나노스위치 또는 나노센서는 검출 가능한 신호에 노출되었을 때 구조적 변화를 겪는다. 예를 들면, 문헌[Koussa et al., "DNA nanoswitches: A quantitative platform for gel-based biomolecular interaction analysis," (2015) Nature Methods, 12(2): 123-126]을 참조한다.

[0311] 일부 경우, 검출기는 관심 있는 피분석물에 대한 프로브가 실시간 검출을 위해 사용된 칩 상에서 생성되는 신속 다중체 바이오마커 어세이를 포함한다. 따라서, 태그, 표지 또는 리포터가 필요하지 않다. 피분석물과 이 프로브의 결합은 피분석물의 농도에 상응하는 굴절 지수의 변화를 야기한다. 모든 단계들은 자동화될 수 있다. 인큐베이션은 필요하지 않을 수 있다. 결과는 1시간(예를 들면, 10분 내지 30분) 이내에 입수될 수 있다. 이러한 검

출기의 비제한적 예는 게날라이트 마버릭(Genalyte Maverick) 검출 시스템이다.

[0312] 추가 검사

[0313] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 핵산 이외의 생물학적 성분의 검출 또는 분석을 위해 추가 특징, 시약, 검사 또는 어세이를 포함한다. 비제한적 예로써, 상기 생물학적 성분은 펩타이드, 지질, 지방산, 스테롤, 탄수화물, 바이러스 성분, 미생물 성분 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다. 상기 생물학적 성분은 항체일 수 있다. 상기 생물학적 성분은 대상체에서 펩타이드에 반응하여 생성된 항체일 수 있다. 이들 추가 어세이는 본원 전체에 걸쳐 개시된 작은 부피 또는 샘플 크기로 생물학적 성분을 검출할 수 있거나 분석할 수 있다. 추가 검사는 관심 있는 생물학적 성분과 상호작용할 수 있는 시약을 포함할 수 있다. 이러한 시약의 비제한적 예는 항체, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 앱타머 및 소분자, 및 이들의 조합을 포함한다. 상기 시약은 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 상기 시약은 검출 가능한 표지와 상호작용할 수 있다. 상기 시약은 검출 가능한 신호를 제공할 수 있다.

[0314] 추가 검사는 하나 이상의 항체를 요구할 수 있다. 예를 들면, 추가 검사는 면역-PCR(IPCR)의 수행을 제공하는 시약 또는 성분을 포함할 수 있다. IPCR은 관심 있는 단백질에 대한 제1 항체가 고정되고 샘플에 노출되는 방법이다. 샘플이 관심 있는 단백질을 함유하는 경우, 이 단백질은 제1 항체에 의해 포획될 것이다. 그 후, 포획된 관심 있는 단백질은 관심 있는 단백질에 결합하는 제2 항체에 노출된다. 제2 항체는 실시간 PCR에 의해 검출될 수 있는 폴리뉴클레오타이드에 커플링되어 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 추가 검사는 샘플이 관심 있는 단백질에 특이적인 2종의 항체들에 노출되는 인접 라이게이션 어세이(PLA)의 수행을 제공하는 시약 또는 성분을 포함할 수 있고, 이때 각각의 항체는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 두 항체들이 관심 있는 단백질에 결합하는 경우, 각각의 항체의 올리고뉴클레오타이드는 증폭되고/되거나 검출될 정도로 충분히 가까이 있을 것이다.

[0315] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 대상체가 임신하고 있음을 확인하기 위한 임신 검사를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 Y 염색체의 존재 또는 Y 염색체의 부재에 대한 검사(성별 검사)를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 임신 적령기에 대한 검사를 포함한다.

[0316] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 다중 임신, 예를 들면, 쌍둥이 또는 세쌍둥이에 대한 검사를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 1명, 2명 또는 모든 태아가 남아인지 아니면 여아인지, 정배수체인지 아니면 이수체인지 등을 검출하기 위해 모체 샘플 중의 태아 핵산의 (절대적 또는 상대적) 총량, 및 다양한 상염색체들, X 염색체 및 Y 염색체에 의해 표시된 서열의 양을 정량한다.

[0317] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 대상체가 임신한 상태임을 표시하거나, 검출하거나 검증하기 위한 임신 검사를 포함한다. 일부 경우, 임신 검사는 임신 관련 인자를 측정하기 위한 시약 또는 성분을 포함한다. 비제한적 예로써, 임신 관련 인자는 인간 융모막 성선자극호르몬 단백질(hCG), 및 항-hCG 항체를 포함하는, hCG에 대한 시약 또는 성분일 수 있다. 또한 비제한적 예로써, 임신 관련 인자는 hCG 전사체일 수 있고, hCG 전사체를 측정하기 위한 시약 또는 성분은 hCG 전사체에 하이브리드화하는 올리고뉴클레오타이드 프로브 또는 프라이머이다. 일부 경우, 임신 관련 인자는 초기 임신 인자(EPF)로서도 공지되어 있는 열 충격 단백질 10 kDa 단백질 1이다.

[0318] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 태아의 연령을 알려줄 수 있다. 예를 들면, 신호는 장치 또는 시스템으로부터 생성될 수 있고, 이때 신호의 수준은 대상체로부터의 샘플 중의 hCG의 양에 상응한다. 신호의 이 수준 또는 강도는 샘플 중의 hCG의 양을 표시하는 수치 값으로 해석될 수 있거나 이해될 수 있다. hCG의 양은 태아의 대략적인 연령을 표시할 수 있다.

[0319] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 임신의 표시 또는 검증, 임신 연령의 표시 또는 검증, 및 성별의 표시 또는 검증을 제공한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 90%의 신뢰도로 임신, 임신 연령 및/또는 성별의 표시를 제공한다(예를 들면, 90%의 시간, 표시는 정확하다). 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95%의 신뢰도로 임신, 임신 연령 및/또는 성별의 표시를 제공한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99%의 신뢰도로 임신, 임신 연령 및/또는 성별의 표시를 제공한다.

[0320] 성능 파라미터

[0321] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 하나 이상의 온도에서 작동할 수 있다. 일부 경우, 장치, 시

스템 또는 키트의 구성요소 또는 시약의 온도는 장치, 시스템 또는 키트가 작동될 수 있도록 변경될 필요가 있다. 일반적으로, 장치, 시스템 및 키트는 생물학적 샘플 중의 바이오마커(예를 들면, RNA/DNA, 펩타이드)에 의해 전달된 정보를 제공할 때 "작동 가능한" 것으로서 간주된다. 일부 경우, 장치, 시스템, 키트, 이의 구성요소 또는 이의 시약이 작동할 수 있는 온도는 일반 가정에서 수득된다. 비제한적 예로써, 일반 가정에서 수득된 온도(들)는 실온, 냉장고, 냉동고, 마이크로파, 스토브, 전기 가열 포트, 가열/냉각 수조 또는 오븐에 의해 제공될 수 있다.

[0322] 일부 경우, 본원에 기재된 장치, 시스템, 키트, 이의 구성요소 또는 이의 시약은 단일 온도에서 작동할 수 있다. 일부 경우, 본원에 기재된 장치, 시스템, 키트, 이의 구성요소 또는 이의 시약은 작동할 수 있기 위해 단일 온도만을 요구한다. 일부 경우, 본원에 기재된 장치, 시스템, 키트, 이의 구성요소 또는 이의 시약은 작동할 수 있기 위해 2개의 온도만을 요구한다. 일부 경우, 본원에 기재된 장치, 시스템, 키트, 이의 구성요소 또는 이의 시약은 작동할 수 있기 위해 3개의 온도만을 요구한다.

[0323] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 사용자가 적어도 하나의 온도를 수득할 수 있게 하는 가열 장치 또는 냉각 장치를 포함한다. 가열 장치 및 냉각 장치의 비제한적 예는 냉장고 또는 냉동고에서 냉각되거나, 스토브 상단부에서 마이크로파처리되거나 끓여지거나, 전기 소켓에 꽂혀진 후, 본원에 개시된 장치 또는 이의 구성요소에 적용됨으로써, 열을 상기 장치 또는 이의 구성요소에 전달할 수 있거나 상기 장치 또는 이의 구성요소를 냉각시킬 수 있는 물질의 파우치 또는 백이다. 가열 장치의 또 다른 비제한적 예는 장치 또는 이의 일부를 관통하는 전기 와이어 또는 코일이다. 전기 와이어 또는 코일은 외부(예를 들면, 태양광, 콘센트) 또는 내부(예를 들면, 배터리, 휴대전화) 전력에 의해 활성화되어, 열을 장치 또는 이의 일부에게 전달할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트는 사용자가 온도 범위 내의 온도를 가늠하는 것을 보조하기 위한 온도계 또는 온도 표시기를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 사용자는 전형적인 집 환경 내의 장치(예를 들면, 온도계, 휴대전화 등)를 이용하여 온도를 가늠한다.

[0324] 일부 경우, 장치, 시스템, 키트, 이의 구성요소 또는 이의 시약은 온도 범위, 또는 온도 범위 내에 속하는 적어도 하나의 온도에서 작동할 수 있다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 90℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 80℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 70℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 60℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 50℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 40℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 30℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 20℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 -50℃ 내지 약 10℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 90℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 80℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 70℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 60℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 50℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 40℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 30℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 20℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 0℃ 내지 약 10℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 100℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 90℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 80℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 70℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 60℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 50℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 40℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 15℃ 내지 약 30℃이다. 일부 경우, 온도 범위는 약 10℃ 내지 약 30℃이다. 일부 경우, 그의 모든 구성요소들 및 그의 모든 시약들을 포함하는, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트는 냉각, 냉동 또는 가열을 요구하지 않으면서 실온에서 완전히 작동할 수 있다.

[0325] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 생물학적 샘플을 제공받는 시간 범위 내에서 생물학적 샘플의 성분 또는 이의 생성물(예를 들면, 증폭 생성물, 접합 생성물, 결합 생성물)을 검출한다. 일부 경우, 검출은 본원에 기재된 신호전달 분자를 통해 일어난다. 일부 경우, 시간 범위는 약 1초 내지 약 1분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 10초 내지 약 1분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 10초 내지 약 1분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 30초 내지 약 1분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 10초 내지 약 2분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 10초 내지 약 3분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 10초 내지 약 5분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 10초 내지 약 10분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 10초 내지 약 15분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 10초 내지 약 20분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 30초 내지 약 2분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 30초 내지 약 5분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 30초 내지 약 10분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 30초 내지 약 15분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 30초 내지 약 20분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 30초 내지 약 30분이다. 일

부 경우, 시간 범위는 약 1분 내지 약 2분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 1분 내지 약 3분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 1분 내지 약 5분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 1분 내지 약 10분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 1분 내지 약 20분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 1분 내지 약 30분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 5분 내지 약 10분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 5분 내지 약 15분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 5분 내지 약 20분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 5분 내지 약 30분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 5분 내지 약 60분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 30분 내지 약 60분이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 30분 내지 약 2시간이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 1시간 내지 약 2시간이다. 일부 경우, 시간 범위는 약 1시간 내지 약 4시간이다.

[0326] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 소정의 시간 이내에 생물학적 샘플의 성분 또는 이의 생성물(예를 들면, 증폭 생성물, 접합 생성물, 결합 생성물)을 검출한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 소정의 시간 이내에 생물학적 샘플의 성분 또는 이의 생성물의 분석을 제공한다. 일부 경우, 상기 시간은 1분 미만이다. 일부 경우, 상기 시간은 5분 미만이다. 일부 경우, 상기 시간은 10분 미만이다. 일부 경우, 상기 시간은 15분이다. 일부 경우, 상기 시간은 20분 미만이다. 일부 경우, 상기 시간은 30분 미만이다. 일부 경우, 상기 시간은 60분 미만이다. 일부 경우, 상기 시간은 2시간 미만이다. 일부 경우, 상기 시간은 8시간 미만이다.

[0327] 통신 & 정보 저장

[0328] 일반적으로, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 핵산 정보 출력기를 포함한다. 핵산 정보 출력기는 샘플로부터의 유전 정보를 사용자에게 통신하도록 구성된다. 일부 경우, 핵산 정보 출력기는 수득된 유전 정보를 물리적으로 존재하지 않는 다른 사람들(예를 들면, 가족 구성원, 의사 또는 유전 상담사)과 공유할 수 있도록 통신 연결 또는 인터페이스를 포함한다. 통신 연결 또는 인터페이스는 다른 공급원으로부터의 입력도 허용할 수 있다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 수득된 유전 정보를 기반으로 정보를 제공받기 위한 인터페이스를 포함한다. 인터페이스 또는 통신 연결은 사용자로부터 비-유전 정보(예를 들면, 의학적 이력, 의학적 병태, 연령, 체중, 심박수, 혈압, 신체 활동 등)도 제공받을 수 있다. 인터페이스 또는 통신 연결은 사용자 이외의 누군가 또는 무엇인가에 의해 제공된 정보도 제공받을 수 있다. 비제한적 예로써, 이것은 웹 기반 정보, 의사로부터의 정보 및 보험 회사로부터의 정보를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 수득된 유전 정보를 기반으로 정보를 통신하기 위한 인터페이스를 포함한다. 일부 경우, 인터페이스는 유전자 또는 염색체 이상의 설명을 제공한다. 일부 경우, 인터페이스는 유전자 또는 염색체 이상을 가진 아동의 가족을 지원하는 의사, 지원군, 상점 및 서비스 제공자와 같은 지역 연락처 목록을 제공한다. 일부 경우, 인터페이스는 유전자 또는 염색체 이상을 가진 아동에 유용할 물품 또는 서비스의 온라인 목록을 제공한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 정보 저장 유닛, 예를 들면, 컴퓨터 칩을 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 유전 정보를 안전하게 저장하기 위한 수단을 포함한다. 예를 들면, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 데이터 칩, 또는 하드 드라이버, 서버, 데이터베이스 또는 클라우드에의 (유선 또는 무선) 연결을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 장치 및 시스템을 위한 인터페이스의 비제한적 예는 도 4b 및 도 5a 내지 5e에 표시되어 있다.

[0329] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 안전한 방식으로 사용자로부터 정보를 수집하고/하거나 암호화하고/하거나 저장할 수 있다. 이러한 정보의 비제한적 예는 건강 정보, 그의 웨어러블(wearable)로부터의 정보, 수행하였거나 수행할 다른 검사, 인구통계 정보 등을 포함한다.

[0330] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 생물학적 샘플 중의 바이오마커에 대한 정보를 통신 장치에 통신할 수 있다. 일부 경우, 통신 장치는 (예를 들면, 포트 또는 무선 연결을 통해) 인터넷에 연결될 수 있다. 일부 경우, 통신 장치는 인터넷에 연결된다. 일부 경우, 통신 장치는 인터넷에 연결되지 않는다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 통신 장치를 통해 생물학적 샘플 중의 바이오마커에 대한 정보를 인터넷에 통신할 수 있다. 통신 장치의 비제한적 예는 휴대전화, 전자 노트패드 및 컴퓨터이다.

[0331] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 통신 연결 또는 통신 인터페이스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 통신 인터페이스는 유선 인터페이스를 제공한다. 추가 실시양태에서, 유선 통신 인터페이스는 범용 시리얼 버스(USB)(미니-USB, 마이크로-USB, USB A형, USB B형 및 USB C형을 포함함), IEEE 1394(FireWire), 썬더볼트(Thunderbolt), 이더넷(Ethernet) 및 광학 인터커넥트를 이용한다.

[0332] 일부 실시양태에서, 통신 인터페이스는 무선 인터페이스를 제공한다. 예를 들면, 도 5a 내지 5e를 참조한다. 추가 실시양태에서, 무선 통신 인터페이스는 무선 통신 프로토콜, 예컨대, 적외선 근거리 통신(NFC)(RFID를 포함함), 블루투쓰, 블루투쓰 저에너지(BLE), 지그비(ZigBee), ANT, IEEE 802.11(Wi-Fi), 무선 지역 네트워크

(WLAN), 무선 개인 네트워크(WPAN), 무선 광역 네트워크(WWAN), WiMAX, IEEE 802.16(마이크로파 접근을 위한 전세계적 상호운영성(WiMAX)), 또는 3G/4G/LTE/5G 전화 통신 방법을 이용한다.

[0333] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 디지털 처리 장치, 또는 이의 사용을 포함한다. 추가 실시양태에서, 디지털 처리 장치는 장치의 기능을 수행하는 하나 이상의 하드웨어 중앙 처리 유닛(CPU) 또는 일반 목적 그래픽 처리 유닛(GPGPU)을 포함한다. 추가 실시양태에서, 디지털 처리 장치는 실행될 수 있는 지시를 수행하도록 구성된 운용 시스템도 포함한다. 일부 실시양태에서, 디지털 처리 장치는 하나 이상의 주변부 장치, 하나 이상의 상이한 디지털 처리 장치, 하나 이상의 전산 시스템, 하나 이상의 컴퓨터 네트워크 및/또는 하나 이상의 통신 네트워크와 통신하기 위한 통신 인터페이스(예를 들면, 네트워크 어댑터)를 포함한다.

[0334] 일부 실시양태에서, 디지털 처리 장치는 통신 인터페이스의 도움을 받아 컴퓨터 네트워크("네트워크")에 통신 가능하게 커플링된다. 적합한 네트워크는 개인 네트워크(PAN), 지역 네트워크(LAN), 광역 네트워크(WAN), 인트라넷, 엑스트라넷, 인터넷(월드 와이드 웹에의 접근을 제공함) 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 경우, 네트워크는 전화통신 및/또는 데이터 네트워크이다. 다양한 경우, 네트워크는 분산된 전산, 예컨대, 클라우드 전산을 가능하게 하는 하나 이상의 컴퓨터 서버를 포함한다. 일부 경우, 네트워크는 장치의 도움을 받아 장치에 커플링된 장치가 고객 또는 서버로서 행동할 수 있게 하는 피어-투-피어(peer-to-peer) 네트워크를 실행한다.

[0335] 본원의 설명에 따라, 적합한 디지털 처리 장치는 비제한적 예로써 서버 컴퓨터, 데스크탑 컴퓨터, 랩탑 컴퓨터, 노트북 컴퓨터, 서브노트북 컴퓨터, 넷북 컴퓨터, 네트패드 컴퓨터, 셋-탑 컴퓨터, 매체 스트리밍 장치, 소형 컴퓨터, 인터넷 가전제품, 피트니스 트랙커(fitness tracker), 스마트 시계, 모바일 스마트폰, 태블릿 컴퓨터 및 개인 디지털 단말기를 포함한다. 해당 기술 분야에서 당업자는 많은 스마트폰들이 본원에 기재된 시스템에 사용되기에 적합하다는 것을 인식할 것이다. 해당 기술 분야에서 당업자는 임의적 컴퓨터 네트워크 연결을 가진 선택된 텔레비전, 비디오 재생기 및 디지털 음악 재생기가 본원에 기재된 시스템에 사용되기에 적합하다는 것도 인식할 것이다. 적합한 태블릿 컴퓨터는 해당 기술 분야에서 당업자에게 공지되어 있는 부클릿(booklet), 슬레이트 및 전환 가능한 구성을 가진 태블릿 컴퓨터를 포함한다.

[0336] 일부 실시양태에서, 디지털 처리 장치는 실행 가능한 지시를 수행하도록 구성된 운영 시스템을 포함한다. 운영 시스템은 예를 들면, 장치의 하드웨어를 관리하고 애플리케이션의 실행을 위한 서비스를 제공하는, 프로그램 및 데이터를 포함하는 소프트웨어이다. 해당 기술 분야에서 당업자는 적합한 서버 운영 시스템이 비제한적 예로써, FreeBSD, OpenBSD, NetBSD®, 리눅스(Linux), 애플(Apple)® Mac OS X 서버(Server)®, 오라클(Oracle)® 솔라리스(Solaris)®, 윈도우즈 서버(Windows Server)® 및 노벨(Novell)® 네트웨어(NetWare)®를 포함한다는 것을 인식할 것이다. 해당 기술 분야에서 당업자는 적합한 개인 컴퓨터 운영 시스템이 비제한적 예로써, 마이크로소프트(Microsoft)® 윈도우즈®, 애플® Mac OS X®, UNIX®, 및 UNIX 유사 운영 시스템, 예컨대, GNU/리눅스®를 포함한다는 것을 인식할 것이다. 일부 실시양태에서, 운영 시스템은 클라우드 전산에 의해 제공된다. 해당 기술 분야에서 당업자는 적합한 모바일 스마트폰 운영 시스템이 비제한적 예로써, 노키아(Nokia)® 심비안(Symbian)® OS, 애플® iOS®, 리서치 인 모션(Research In Motion)® 블랙베리(BlackBerry) OS®, 구글(Google)® 안드로이드(Android)®, 마이크로소프트® 윈도우즈 폰® OS, 마이크로소프트® 윈도우즈 모바일® OS, 리눅스® 및 팜(Palm)® WebOS®를 포함한다는 것도 인식할 것이다. 해당 기술 분야에서 당업자는 적합한 매체 스트리밍 장치 운영 시스템이 비제한적 예로써, 애플 TV®, 로쿠(Roku)®, 박시(Boxee)®, 구글 TV®, 구글 크롬캐스트(Chromecast)®, 아마존 파이어(Amazon Fire)®, 및 삼성(Samsung)® 홈신크(HomeSync)®를 포함하는 것도 인식할 것이다. 일부 경우, 운영 시스템은 사물 인터넷(IoT) 장치를 포함한다. IoT 장치의 비제한적 예는 아마존의 알렉사(Alexa)®, 마이크로소프트의 코타나(Cortana)®, 애플 홈 팟(Apple Home Pod)®, 및 구글 스피커(Google Speaker)®를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 가상 현실 및/또는 증강 현실 시스템을 포함한다.

[0337] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 저장 및/또는 메모리 장치를 포함한다. 저장 및/또는 메모리 장치는 일시적으로 또는 영구적으로 데이터 또는 프로그램을 저장하는 데 이용되는 하나 이상의 물리적 장비이다. 일부 실시양태에서, 상기 장치는 소멸성 메모리이고 저장된 정보를 유지하기 위해 전력을 요구한다. 일부 실시양태에서, 상기 장치는 비소멸성 메모리이고 디지털 처리 장치가 전력을 공급받지 않을 때 저장된 정보를 유지한다. 추가 실시양태에서, 비소멸성 메모리는 플래시 메모리를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비소

멸성 메모리는 동적 임의 접근 메모리(DRAM)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비소멸성 메모리는 강유전성 임의 접근 메모리(FRAM)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비소멸성 메모리는 상 변화 임의 접근 메모리(PRAM)를 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 장치는 비제한적 예로써, CD-ROM, DVD, 플래시 메모리 장치, 자기 디스크 드라이브, 자기 테이프 드라이브, 광학 디스크 드라이브 및 클라우드 전산 기반 저장을 포함하는 저장 장치이다. 추가 실시양태에서, 저장 및/또는 메모리 장치는 본원에 개시된 장치들과 같은 장치들의 조합이다.

[0338] 일부 실시양태에서, 디지털 처리 장치는 시각적 정보를 사용자에게 보내기 위한 디스플레이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 디스플레이는 액정 디스플레이(LCD)이다. 추가 실시양태에서, 디스플레이는 박막 트랜지스터 액정 디스플레이(TFT-LCD)이다. 일부 실시양태에서, 디스플레이는 유기 발광 다이오드(OLED) 디스플레이이다. 다양한 추가 실시양태에서, OLED 디스플레이는 수동 매트릭스 OLED(PMOLED) 또는 능동 매트릭스 OLED(AMOLED) 디스플레이이다. 일부 실시양태에서, 디스플레이는 플라스마 디스플레이이다. 다른 실시양태에서, 디스플레이는 비디오 프로젝터이다. 다른 실시양태에서, 디스플레이는 디지털 처리 장치와 통신하는 머리 착용 디스플레이, 예컨대, VR 헤드셋이다.

[0339] 일부 실시양태에서, 디지털 처리 장치는 사용자로부터 정보를 제공받기 위한 입력 장치를 포함한다. 일부 실시양태에서, 입력 장치는 키보드이다. 일부 실시양태에서, 입력 장치는 비제한적 예로써, 마우스, 트랙볼, 트랙패드, 조이스틱, 게임 제어기 또는 스타일러스를 비롯한 포인팅 장치이다. 일부 실시양태에서, 입력 장치는 터치 스크린 또는 멀티터치 스크린이다. 다른 실시양태에서, 입력 장치는 소리 또는 다른 음향 입력을 포착하기 위한 마이크로폰이다. 다른 실시양태에서, 입력 장치는 움직임 또는 시각적 입력을 포착하기 위한 비디오 카메라 또는 다른 센서이다. 추가 실시양태에서, 입력 장치는 키넥트(Kinect), 립 모션(Leap Motion) 등이다. 추가 실시양태에서, 입력 장치는 본원에 개시된 장치들과 같은 장치들의 조합이다.

[0340] 모바일 애플리케이션

[0341] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 디지털 처리 장치 또는 이의 사용을 포함하고, 이때 디지털 처리 장치는 모바일 애플리케이션의 형태로 실행 가능한 지시를 제공받는다. 일부 실시양태에서, 모바일 애플리케이션은 제작될 때 모바일 디지털 처리 장치에 제공된다. 다른 실시양태에서, 모바일 애플리케이션은 본원에 기재된 컴퓨터 네트워크를 통해 모바일 디지털 처리 장치에 제공된다. 본원에 개시된 모바일 애플리케이션은 정보를 찾고/찾거나, 암호화하고/하거나, 인덱싱하고/하거나, 접근하도록 구성될 수 있다. 본원에 개시된 모바일 애플리케이션은 데이터를 획득하고, 암호화하고, 생성하고, 조작하고, 인덱싱하고 정독하도록 구성될 수 있다.

[0342] 도 5a를 참조하건대, 특정 실시양태에서, 모바일 애플리케이션은 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트와 연결되거나 통신하거나, 이들로부터 유전 정보 및 다른 정보를 제공받도록 구성된다. 도 5a는 모바일 애플리케이션이 임의적으로 사용자에게 제공하는 다양한 기능을 묘사하는 도표이다. 이 실시양태에서, 모바일 애플리케이션은 임의적으로, 1) 사용자의 개인 정보 및 환경설정에 기반한 맞춤형 조정된 사용자 경험(UX); 2) 장치, 시스템 및 키트를 사용하는 방법을 사용자에게 알려주기 위한 상호작용 문자-, 오디오- 및/또는 비디오-유도된 지시 경험; 3) 논문, 기사, 매체, 게임 등에의 접근을 사용자에게 제공하는 컨텐트 플랫폼; 및 4) 정보, 검사 결과 및 사건을 추적하고 공유하기 위한 수단을 제공한다.

[0343] 도 5b를 참조하건대, 특정 실시양태에서, 모바일 애플리케이션은 임의적으로 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트의 사용을 통해 사용자를 안내하기 위한 단계별 상세설명을 제공하는 상호작용 인터페이스를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 상호작용 상세설명은 사용자에게 알려주고 지시하기 위해 문자, 영상, 만화, 오디오, 비디오 등을 포함한다.

[0344] 도 5c를 참조하건대, 특정 실시양태에서, 모바일 애플리케이션은 임의적으로 사용자가 본원에 개시된 모바일 애플리케이션 기능에 접근할 수 있게 하는 홈 스크린을 포함한다. 이 실시양태에서, 홈 스크린은 맞춤형 인사뿐만 아니라, 사용자가 검사를 시작하고, 현재의 검사 결과 및 과거의 검사 결과를 살펴보고, 검사 결과를 공유하고 더 큰 커뮤니티의 사용자와 상호작용할 수 있게 하는 인터페이스 요소도 포함한다.

[0345] 도 5d를 참조하건대, 특정 실시양태에서, 모바일 애플리케이션은 임의적으로 본원에 개시된 장치, 시스템 또는 키트에 연결하는 과정의 상태를 사용자에게 알려주는 진행 도표를 포함한다. 이 실시양태에서, 상기 도표는 모든 단계들을 보여주고 현재의 단계를 표시한다. 상기 단계들은 1) 예를 들면, 블루투쓰를 통해 장치와 페어링하는 단계; 2) 장치에서 샘플을 검출하는 단계; 및 3) 샘플이 처리되기를 기다리는 단계이다. 일부 실시양태에서, 상기 도표는 매체 또는 다른 컨텐트와 상호작용하거나, 이 매체 또는 다른 컨텐트에 의해 동영상화되거나 증강

된다.

[0346] 도 5e를 참고하건대, 특정 실시양태에서, 모바일 애플리케이션은 임의적으로 사용자가 검사 결과를 공유하기 위해 특징에 접근할 수 있게 하는 사회적 공유 스크린을 포함한다. 많은 서비스들, 플랫폼들 및 네트워크들은 검사 결과 및 다른 정보 및 사건을 공유하기에 적합하다. 적합한 사회적 네트워킹 및 공유 플랫폼은 비제한적 예로써, 페이스북(Facebook), 유튜브(YouTube), 트위터(Twitter), 링크드인(LinkedIn), 핀터레스트(Pinterest), 구글 플러스(Google Plus)+, 텀블러(Tumblr), 인스타그램(Instagram), 레딧(Reddit), VK, 스냅챗(Snapchat), 플릭커(Flickr), 바인(Vine), 미트업(Meetup), Ask.fm, 클래스메이트(Classmates), QQ, 위챗(WeChat), 스웜 바이 포스퀘어(Swarm by Foursquare), 킥(Kik), 익 약(Yik Yak), 숏츠(Shots), 페리스코프(Periscope), 미디움(Medium), 사운드클라우드(Soundcloud), 틴더(Tinder), 왓츠앱(WhatsApp), 스냅 챗(Snap Chat), 슬랙(Slack), 뮤지컬리(Musical.ly), 피치(Peach), 블랩(Blab), 렌렌(Renren), 시나 웨이보(Sina Weibo), 렌렌(Renren), 라인(Line) 및 모모(Momo)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검사 결과는 SMS, MMS 또는 인스턴트 메시지에 의해 공유된다. 일부 실시양태에서, 검사 결과는 이메일에 의해 공유된다.

[0347] 일부 실시양태에서, 모바일 애플리케이션은 임의적으로 사용자가 임의적으로 공유되는 검사 결과와 관련된 중요한 정보 및 사건의 블로그 및 타임라인과 같은 추가 특징에 접근할 수 있게 하는 홈 스크린을 포함한다. 다양한 실시양태에서, 적합한 정보 및 사건은 임상 시험 결과, 새로 시판된 치료제, 영양, 운동, 태아 발달, 건강 등에 관한 정보 및 사건을 포함한다. 이 실시양태에서, 홈 스크린은 사용자 환경 및 설정에의 접근도 포함한다.

[0348] 일부 경우, 본원에 개시된 장치 및 시스템은 모바일 애플리케이션과 통신한다. 모바일 애플리케이션은 환자 ID 및 전자 건강 기록(EHR)의 수득, (사용자에게 및/또는 사용자로부터) 장치 운반 준비, 검사 결과의 온라인 주문을 제공할 수 있다. 모바일 애플리케이션은 한 지점부터 또 다른 지점까지 장치 또는 이의 일부(예를 들면, 운반/저장 구획), 또는 장치에 의해 수득된 정보의 추적을 제공할 수 있다. 다양한 지점은 운반, 집, 샘플 처리 실험실 및 의사 진료실로부터 선택될 수 있다.

[0349] 본원에서 제공된 개시에 비추어 볼 때, 모바일 애플리케이션은 해당 기술 분야에서 공지되어 있는 하드웨어, 언어 및 개발 환경을 이용함으로써 해당 기술 분야에서 당업자에게 공지되어 있는 기법에 의해 생성된다. 해당 기술 분야에서 당업자는 모바일 애플리케이션이 여러 언어로 작성된다는 것을 인식할 것이다. 적합한 프로그래밍 언어는 비제한적 예로써, C, C++, C#, 오브젝티브(Objective)-C, 자바(Java)™, 자바스크립(Javascript), 파스칼(Pascal), 오브젝트 파스칼(Object Pascal), 파이톤(Python)™, 루비(Ruby), VB.NET, WML, 및 CSS를 갖거나 갖지 않는 XHTML/HTML, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0350] 적합한 모바일 애플리케이션 개발 환경은 여러 공급원들로부터 이용될 수 있다. 상업적으로 이용될 수 있는 개발 환경은 비제한적 예로써, 에어플레이SDK(AirplaySDK), 알케모(alcheMo), 앱셀러레이터(Appcelerator)®, 셀시우스(Celsius), 베드락(Bedrock), 플래시 라이트(Flash Lite), .NET 컴팩트 프레임워크(Compact Framework), 로모바일(Rhomobile) 및 워크라이트 모바일 플랫폼(WorkLight Mobile Platform)을 포함한다. 비제한적 예로써, 라자루스(Lazarus), 모비플렉스(MobiFlex), 모신크(MoSync) 및 폰갭(Phonegap)을 비롯한 다른 개발 환경은 비용 없이 이용될 수 있다. 또한, 모바일 장치 제작자들은 비제한적 예로써, 아이폰(iPhone) 및 아이패드(iPad)(iOS) SDK, 안드로이드™ SDK, 블랙베리® SDK, BREW SDK, 팜® OS SDK, 심비안 SDK, webOS SDK, 및 윈도우스® 모바일 SDK를 비롯한 소프트웨어 개발자 키트를 배포한다.

[0351] 해당 기술 분야에서 당업자는 비제한적 예로써, 애플® 앱 스토어(App Store), 구글® 플레이(Play), 크롬 웹스토어(Chrome WebStore), 블랙베리® 앱 월드(App World), 팜 장치용 앱 스토어, webOS용 앱 카탈로그(App Catalog), 모바일용 윈도우스® 마켓플레이스, 노키아® 장치용 오비 스토어(Ovi Store), 및 삼성® 앱스(Apps)를 비롯한 여러 상업적 포럼들이 모바일 애플리케이션의 배포를 위해 이용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0352] **장치, 시스템, 키트 및 방법과 관련된 양태**

[0353] 하기 양태들은 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법과 관련된다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 일반적으로 여성 대상체의 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산을 처리하고 분석하도록 디자인된다. 무세포 핵산, 생물학적 샘플 및 대상체의 하기 설명은 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법의 유용성을 이해하는 데 도움이 될 수 있다.

[0354] 질환 및 병태

[0355] 본원은 대상체에서 질환 또는 병태의 존재, 부재 또는 중증도를 검출하는 장치, 시스템, 키트 및 방법을 개시한다. 일부 경우, 질환 또는 병태는 유전자 돌연변이에 기인한다. 유전자 돌연변이는 유전될 수 있다(예를 들면, 돌연변이는 조상 또는 친척에 존재하였다). 유전자 돌연변이는 자연발생적 돌연변이(예를 들면, DNA 복제 또는 복구의 오류)일 수 있다. 유전자 돌연변이는 환경적 요인(예를 들면, 자외선, 발암물질)에의 노출에 기인할 수 있다. 비제한적 예로써, 유전자 돌연변이는 프레임시프트 돌연변이, 삽입 돌연변이, 결실 돌연변이, 치환 돌연변이, 단일 뉴클레오타이드 다형성, 카피 수 변이 및 염색체 전위로부터 선택될 수 있다.

[0356] 일부 경우, 질환 또는 병태는 환경적 요인(예를 들면, 발암물질, 식단, 스트레스, 병원체)에 기인한다. 일부 경우, 환경적 요인은 유전자 돌연변이를 야기한다. 다른 경우, 환경적 요인은 유전자 돌연변이를 야기하지 않는다. 일부 경우, 환경적 요인은 건강한 개체에 비해 대상체에서 하나 이상의 후성 유전자 변형의 변화를 야기한다. 일부 경우, 환경적 요인은 더 이른 시점에서의 대상체의 후성 유전자 변형에 비해 대상체의 하나 이상의 후성 유전자 변형의 변화를 야기한다.

[0357] *조직 또는 세포 유형 특이적 질환*

[0358] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 하나 이상의 조직, 장기 또는 세포 유형에 영향을 미치는 질환 또는 병태를 검출하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 질환 또는 병태는 하나 이상의 조직, 장기 또는 세포 유형으로부터의 핵산의 방출을 야기할 수 있다. 질환 또는 병태는 건강한 개체에서 일어나는 상응하는 방출에 비해 하나 이상의 조직, 장기 또는 세포 유형으로부터의 핵산의 방출을 증가시킬 수 있다. 조직은 상피, 결합, 근육 또는 신경 조직으로서 분류될 수 있다. 조직의 비제한적 예는 지방조직, 근육, 결합 조직, 유선 조직 및 골수이다. 장기의 비제한적 예는 뇌, 흉선, 갑상선, 폐, 심장, 비장, 간, 신장, 췌장, 위, 소장, 대장, 결장, 전립선, 난소, 자궁 및 방광이다. 세포 유형의 비제한적 예는 내피 세포, 혈관 평활근 세포, 심근세포, 간세포, 췌장 베타 세포, 지방세포, 신경, 자궁내막 세포, 면역 세포(T 세포, B 세포, 수지상 세포, 단핵세포, 대식세포, 쿠퍼 세포, 미세아교세포)이다.

[0359] *장기 이식 모니터링*

[0360] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 일반적인 건강을 검출하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 신체건강을 검출하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 장기 이식 수용자의 건강 및/또는 이식된 장기의 건강을 검출하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다.

[0361] *증식 질환(암)*

[0362] 종양학 분야에서, 액체 생검은 많은 경우 조직 기반 생검 방법의 실행 가능한 대안이다. 구체적으로, 액체 생검은 절차가 너무 비싸거나, 환자에게 부당한 위험을 제시하거나, 환자에게 불편을 초래하거나, 전이성 질환, 신경학적 질환 및 생검될 조직이 없는 모니터링 환경의 경우와 같이 비실용적일 때 유리하다.

[0363] 일부 실시양태에서, 본원은 실시예 15에 나타낸 바와 같이, 조기 암 검출(스크리닝), 질환 모니터링 및 특징규명, 및 질환 존재도 확인, 정밀 치료법의 도출에 유용한 장치, 시스템, 키트 및 방법을 개시한다.

[0364] 질환 또는 병태는 비정상적인 세포 생장 또는 증식을 포함할 수 있다. 질환 또는 병태는 백혈병을 포함할 수 있다. 백혈병의 비제한적 유형은 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 및 모발 세포 백혈병(HCL)을 포함한다. 질환 또는 병태는 림프종을 포함할 수 있다. 림프종은 비호지킨 림프종(예를 들면, B 세포 림프종, 미만성 B 대세포 림프종, T 세포 림프종, 발덴스트롬 거대글로불린혈증) 또는 호지킨 림프종일 수 있다. 질환 또는 병태는 암을 포함할 수 있다. 암은 유방암일 수 있다. 암은 폐암일 수 있다. 암은 식도암일 수 있다. 암은 췌장암일 수 있다. 암은 난소암일 수 있다. 암은 자궁암일 수 있다. 암은 자궁경부암일 수 있다. 암은 고환암일 수 있다. 암은 전립선암일 수 있다. 암은 방광암일 수 있다. 암은 결장암일 수 있다. 암은 육종일 수 있다. 암은 선암종일 수 있다. 암은 단리될 수 있다. 즉, 암은 암이 유래한 장기 또는 조직 이외의 다른 조직으로 퍼지지 않았다. 암은 전이성을 가질 수 있다. 암은 인접 조직으로 퍼졌을 수 있다. 암은 암이 유래한 장기 또는 조직과 물리적으로 접촉된 세포, 조직 또는 장기로 퍼졌을 수 있다. 암은 암이 유리한 장기 또는 조직과 물리적으로 접촉되지 않은 세포, 조직 또는 장기로 퍼졌을 수 있다. 암은 초기, 예컨대, 0 기(암이 될 잠재력을 가진 비정상적 세포) 또는 1 기(작고 한 조직으로 국한됨) 암일 수 있다. 암은 기원 종양의 조직과 물리적으로 접촉된 조직 및 림프절 내로 성장된 중기, 예컨대, 2 또는 3기 임일 수 있다. 암은 진행된, 예컨대, 4기 또는 5기 암일 수 있고, 이때 암은 기원 종양의 조직과 떨어져 있는(예를 들면, 인접하지 않거나 물리적으로 접촉되지 않은) 조직으로 전이되었다. 일부 경우, 암은 진행되지 않

는다. 일부 경우, 암은 전이성을 갖지 않는다. 일부 경우, 암은 전이성을 가진다.

[0365] *자가면역 질환*

[0366] 질환 또는 병태는 자가면역 장애를 포함할 수 있다. 자가면역 및 면역 장애는 1형 당뇨병, 류마티스성 관절염, 건선, 다발성 경화증, 루푸스, 염증성 장 질환, 애디슨병, 그레이브스병, 크론병 및 셀리악병을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0367] *대사 질환*

[0368] 질환 또는 병태는 대사 장애를 포함할 수 있다. 대사 병태 및 질환은 비만, 갑상선 장애, 고혈압, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 비알코올성 지방간염, 관상 동맥 질환 및 죽상동맥경화증을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0369] 질환 또는 병태는 심혈관 병태를 포함할 수 있다. 심혈관 병태의 비제한적 예는 죽상동맥경화증, 심근경색증, 심낭염, 심근염, 허혈성 졸중, 고혈압성 심장 질환, 류마티스성 심장 질환, 심근병증, 선천성 심장 질환, 판막 심장 질환, 심장염, 대동맥류, 말초 동맥 질환, 혈전색전증 질환 및 정맥 혈전증이다.

[0370] *신경학적 질환*

[0371] 질환 또는 병태는 신경학적 장애를 포함할 수 있다. 신경학적 장애는 신경퇴행성 질환을 포함할 수 있다. 신경퇴행성 장애 및 신경학적 장애의 비제한적 예는 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병, 척수소뇌 운동실조, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 운동 신경 질환, 만성 통증 및 척수 근위축증이다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 대상체의 정신병적 장애 및/또는 정신병적 장애를 치료하기 위한 약물에 대한 반응을 검사하고/하거나, 검출하고/하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다.

[0372] *감염성 질환*

[0373] 질환 또는 병태는 감염을 포함할 수 있다. 질환 또는 병태는 감염에 의해 야기될 수 있다. 질환 또는 병태는 감염에 의해 악화될 수 있다. 감염은 바이러스 감염일 수 있다. 감염은 세균 감염일 수 있다. 감염은 진균 감염일 수 있다.

[0374] *노화*

[0375] 질환 또는 병태는 노화와 관련될 수 있다. 노화와 관련된 질환 및 병태는 암, 골다공증, 치매, 황반 변성, 대사 병태 및 신경퇴행성 장애를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0376] *혈액 질환 또는 장애*

[0377] 질환 또는 병태는 혈액 장애일 수 있다. 혈액 장애의 비제한적 예는 빈혈, 혈우병, 혈액 응고 및 혈전성향증이다. 예를 들면, 혈전성향증의 검출은 인자 V 라이덴(FV), 프로트롬빈 유전자(PT G20210A) 및 메틸렌테트라하이드로폴레이트 환원효소(MTHFR)로부터 선택된 유전자에 존재하는 다형성의 검출을 포함할 수 있다.

[0378] *알레르기 또는 과민증*

[0379] 질환 또는 병태는 음식, 액체 또는 약물에 대한 알레르기 또는 과민증일 수 있다. 비제한적 예로써, 대상체는 락토스, 밀, 콩, 유제품, 카페인, 알코올, 견과류, 조개류 및 계란에 대한 알레르기 또는 과민증을 가질 수 있다. 대상체는 약물, 보충제 또는 화장품에 대한 알레르기 또는 과민증을 가질 수도 있다. 일부 경우, 방법은 피부 유형 또는 피부 건강을 예측하는 유전자 마커를 분석하는 단계를 포함한다.

[0380] 일부 경우, 병태는 알레르기와 관련된다. 일부 경우, 대상체는 질환 또는 병태를 갖는 것으로 진단되지 않으나, 질환 또는 병태가 존재함을 시사하는 증상을 경험한다. 다른 경우, 대상체는 질환 또는 병태를 가진 것으로 이미 진단되고, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 질환 또는 병태, 또는 질환 또는 병태에 대한 약물의 효과를 모니터링하는 데 유용하다.

[0381] 염색체 이상

[0382] 본원은 염색체 이상을 검출하는 장치, 시스템, 키트 및 방법을 개시한다. 해당 기술 분야에서 당업자는 염색체 이상을 염색체 변이로서 지칭할 수도 있다. 일부 경우, 염색체 이상은 염색체 중복이다. 일부 경우, 염색체 이상은 염색체 결실이다. 일부 경우, 염색체 이상은 염색체의 아암의 결실이다. 일부 경우, 염색체 이상은 염색체의 아암의 부분적 결실이다. 일부 경우, 염색체 이상은 적어도 한 카피의 유전자를 포함한다. 일부 경우, 염색체 이상은 염색체의 분해에 기인한다. 일부 경우, 염색체 이상은 제2 염색체의 일부로의 제1 염색체의 일부의

전위에 기인한다.

[0383] 많은 공지된 염색체 이상들은 염색체 장애를 초래한다. 따라서, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 염색체 장애를 검출하는 데 사용될 수 있다. 비제한적 예로써, 염색체 장애는 다운 증후군(삼염색체증 21), 에드워드 증후군(삼염색체증 18), 파타우 증후군(삼염색체증 13), 고양이 울음 증후군(5번 염색체의 짧은 아암의 부분적 결실), 울프-허쉬호른 증후군(4번 염색체의 짧은 아암의 결실), 야콥센 증후군(11번 염색체의 긴 아암의 결실), 디조지 증후군(22번 염색체의 작은 결실), 클라인펠터 증후군(남성에서 추가 X 염색체의 존재) 및 터너 증후군(여성에서 단일 X 염색체만의 존재)을 포함한다.

[0384] 생물학적 샘플

[0385] 본원은 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산을 분석하는 장치, 시스템, 키트 및 방법을 개시한다. 생물학적 샘플의 비제한적 예는 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 소변, 땀, 눈물, 질액 및 자궁경부액 또는 생검의 샘플을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 전혈을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 생물학적 물질을 함유하는 환경적 샘플이다. 예를 들면, 생물학적 샘플은 바이러스, 세균 또는 이의 단편/입자를 함유하는 식품 샘플 또는 물 샘플일 수 있다.

[0386] 본원에 기재된 방법, 시스템 및 키트는 일반적으로 무세포 핵산을 검출하고 정량한다. 이 이유로, 본원에 기재된 생물학적 샘플은 일반적으로 실질적으로 무세포이거나 무세포 생물학적 유체로 변형될 수 있는 생물학적 유체이다. 비제한적 예로써, 대상체로부터의 샘플은 세포가 제거된 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액 또는 질액일 수 있다. 예를 들면, 무세포 핵산은 대상체의 혈류에서 순환할 수 있으므로, 검출 시약은 대상체로부터의 혈액 또는 혈청 샘플 중의 마커를 검출하거나 정량하는 데 사용될 수 있다. 달리 표시되어 있지 않은 한, 용어 "혈장"과 "혈청"은 본원에서 교환 가능하게 사용된다. 그러나, 일부 경우, 이들은 둘 다 설명 또는 청구범위에 의해 커버됨을 표시하기 위해 샘플 종의 단일 목록에 포함된다. 일부 경우, 생물학적 유체는 양수를 포함하지 않는다.

[0387] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 생물학적 샘플로부터 세포를 제거할 수 있다. 수득된 샘플은 세포 고갈 샘플로서 지칭될 수 있다. 세포 고갈 샘플은 샘플학적 샘플보다 적어도 95% 더 적은 전체 온전한 세포를 가질 수 있다. 세포 고갈 샘플은 샘플학적 샘플보다 적어도 90% 더 적은 전체 온전한 세포를 가질 수 있다. 세포 고갈 샘플은 샘플학적 샘플보다 적어도 80% 더 적은 전체 온전한 세포를 가질 수 있다. 세포 고갈 샘플은 샘플학적 샘플보다 적어도 약 75%, 적어도 약 70%, 적어도 약 60%, 적어도 약 50%, 적어도 약 40% 또는 적어도 약 25% 더 적은 전체 온전한 세포를 가질 수 있다. 세포 고갈 샘플은 임의의 전체 온전한 세포를 완전히 결여할 수 있다.

[0388] 모세혈관(예를 들면, 손가락, 발가락과 같은 사지의 혈관)으로부터 수득된 혈액은 본원에서 "모세혈관 혈액"으로서 지칭될 수 있다. 정맥(예를 들면, 팔, 손의 중간)으로부터 수득된 혈액은 본원에서 "정맥 혈액"으로서 지칭될 수 있다. 정맥 혈액을 수득하기 위한 정맥천자를 위한 일반적인 정맥은 정중 주와 정맥, 두부 정맥, 기저 정맥 및 등쪽 중수골 정맥이다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 본질적으로 모세혈관 혈액으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 모세혈관 혈액으로 구성된다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 정맥 혈액을 포함하지 않는다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 혈장을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 본질적으로 혈장으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 혈장으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 혈청을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 본질적으로 혈청으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 혈청으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 소변을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 본질적으로 소변으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 소변으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 타액을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 본질적으로 타액으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 타액으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 유체는 질액을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 유체는 본질적으로 질액으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 유체는 질액으로 구성된다. 일부 경우, 질액은 임신 대상체의 질 면봉을 수행함으로써 수득된다. 일부 경우, 생물학적 유체는 간질액을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 유체는 본질적으로 간질액으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 유체는 활액을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 유체는 본질적으로 활액으로 구성된다. 일부 경우, 생물학적 유체는 액체 생검으로부터의 유체를 포함한다. 일부 경우, 생물학적 유체는 본질적으로 액체 생검으로부터의 유체로 구성된다. 액체 생검의 일례는 암 환자로부터 혈액을 수득하고 종양 또는 암 세포로부터 혈류 내로 방출된 핵산에 대해 검사하는 것이다. 핵산은 괴사, 아폽토시스, 자가포식, 및 암 세포에 사멸/손상을 야기하는 암 요법으로 인해 종양 또는 암 세포로부터 방출될 수 있다.

[0389] 일부 경우, 생물학적 샘플은 전혈이다. 일반적으로, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 매우 작은 전혈 샘플로부터 무세포 핵산을 분석할 수 있다. 일부 경우, 작은 전혈 샘플은 예컨대, 란셋 또는 핀/바늘을 이용함으로써 수행된 손가락 찌르기에 의해 수득될 수 있다. 일부 경우, 작은 전혈 샘플은 정맥절개술을 이용하지 않고 수득될 수 있다.

[0390] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 1 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 10 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 20 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 30 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 40 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 50 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 60 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 70 ㎕의 혈액을 요구한다.

[0391] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 1 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 10 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 20 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 30 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 40 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 60 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 80 ㎕의 혈액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 90% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 100 ㎕의 혈액을 요구한다.

[0392] 일부 경우, 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 약 1 ㎕ 내지 약 500 ㎕의 혈액만을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 약 10 ㎕ 내지 약 200 ㎕의 혈액만을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 약 15 ㎕ 내지 약 150 ㎕의 혈액만을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 약 20 ㎕ 내지 약 100 ㎕의 혈액만을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 98% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 약 20 ㎕ 내지 약 100 ㎕의 혈액만을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 약 20 ㎕ 내지 약 100 ㎕의 혈액만을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99.5% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 약 20 ㎕ 내지 약 100 ㎕의 혈액만을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99.9% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 약 20 ㎕ 내지 약 100 ㎕의 혈액만을 요구한다.

[0393] 일부 경우, 생물학적 샘플은 혈장 또는 혈청이다. 혈장 또는 혈청은 전혈의 대략 55%를 구성한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 1 ㎕의 혈장 또는 혈청을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 10 ㎕의 혈장 또는 혈청을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 20 ㎕의 혈장 또는 혈청을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 30 ㎕의 혈장 또는 혈청을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 40 ㎕의 혈장 또는 혈청을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95%

신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 50 ㎕의 혈장 또는 혈청을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 10 ㎕의 혈장 또는 혈청을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 20 ㎕의 혈장 또는 혈청을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 30 ㎕의 혈장 또는 혈청을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 40 ㎕의 혈장 또는 혈청을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 50 ㎕의 혈장 또는 혈청을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 약 10 ㎕ 내지 약 50 ㎕의 혈장 또는 혈청만을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 약 20 ㎕ 내지 약 60 ㎕의 혈장 또는 혈청만을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트는 적어도 약 99% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 약 10 ㎕ 내지 약 50 ㎕의 혈장 또는 혈청만을 요구한다.

[0394] 일부 경우, 생물학적 샘플은 타액이다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 100 ㎕의 타액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 200 ㎕의 타액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 500 ㎕의 타액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 1 ㎖의 타액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 2 ㎖의 타액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 3 ㎖의 타액을 요구한다.

[0395] 일부 경우, 생물학적 샘플은 질액이다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 50 ㎕의 질액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 100 ㎕의 질액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 200 ㎕의 질액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 500 ㎕의 질액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 1 ㎖의 질액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 2 ㎖의 질액을 요구한다. 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 적어도 약 95% 신뢰도 또는 정확도로 검사 결과를 제공하기 위해 적어도 약 3 ㎖의 질액을 요구한다.

[0396] 일부 경우, 본원에 개시된 생물학적 샘플은 무세포 핵산을 포함하고, 이때 무세포 핵산의 분획은 외래 조직 또는 비정상적 조직으로부터 유래한다. 상기 분획 중의 무세포 핵산은 "외래 무세포 핵산" 또는 "외래 무세포 핵산"으로서 지칭될 수 있다. 비제한적 예로써, 외래 또는 비정상적 조직은 대상체 내로 이식된 조직 또는 장기를 포함할 수 있다. 외래 또는 비정상적 조직은 기증자 조직으로서 지칭될 수 있고, 대상체는 숙주 조직으로서 지칭될 수 있다. 또한, 비제한적 예로써, 비정상적 조직은 종양을 포함할 수 있다. 일부 경우, 분획은 생물학적 샘플 중의 모든(총) 무세포 핵산의 분획이고, 이때 상기 분획은 외래 또는 비정상적 무세포 핵산을 포함한다. 일부 경우, 상기 분획은 본질적으로 외래 또는 비정상적 무세포 핵산으로 구성된다. 일부 경우, 외래 또는 비정상적 무세포 핵산은 DNA를 포함한다. 일부 경우, 외래 또는 비정상적 무세포 핵산은 RNA를 포함한다. 일부 경우, 외래 또는 비정상적 무세포 핵산은 본질적으로 DNA로 구성된다. 일부 경우, 외래 또는 비정상적 무세포 핵산은 본질적으로 RNA로 구성된다.

[0397] 외래 또는 비정상적 조직으로부터 유래한 무세포 핵산의 분획은 샘플 중의 총 무세포 핵산의 퍼센트로서 특징져질 수 있다. 일부 경우, 외래 또는 비정상적 조직으로부터 유래한 무세포 핵산의 분획은 25% 미만이다. 일부 경우, 외래 또는 비정상적 조직으로부터 유래한 무세포 핵산의 분획은 20% 미만이다. 일부 경우, 상기 분획은 15% 미만이다. 일부 경우, 상기 분획은 10% 미만이다. 일부 경우, 상기 분획은 8% 미만이다. 일부 경우, 상기 분획은 6% 미만이다. 일부 경우, 상기 분획은 5% 미만이다. 일부 경우, 상기 분획은 4% 미만이다. 일부 경우, 상기

분획은 2% 미만이다. 일부 경우, 상기 분획은 적어도 1%이다. 일부 경우, 상기 분획은 약 1.5% 내지 약 15%이다. 일부 경우, 상기 분획은 약 2% 내지 약 12%이다. 일부 경우, 상기 분획은 약 4% 내지 약 10%이다. 일부 경우, 상기 분획은 약 4% 내지 약 9%이다. 일부 경우, 상기 분획은 약 4% 내지 약 8%이다. 일부 경우, 상기 분획은 약 1% 내지 약 5%이다. 일부 경우, 상기 분획은 약 1% 내지 약 4%이다.

[0398] 일부 경우, 본원에 개시된 생물학적 샘플은 무세포 핵산을 포함하고, 이때 무세포 핵산의 분획은 태아로부터 유래한다. 이 분획은 태아 분획으로서 지칭될 수 있다. 일부 경우, 태아 분획은 생물학적 샘플 중의 모든(총) 핵산의 분획이고, 이때 상기 분획은 태아 핵산으로 구성된다. 일부 경우, 핵산 및/또는 태아 핵산은 DNA를 포함한다. 일부 경우, 핵산 및/또는 태아 핵산은 RNA를 포함한다. 일부 경우, 핵산 및/또는 태아 핵산은 본질적으로 DNA로 구성된다. 일부 경우, 핵산 및/또는 태아 핵산은 DNA 및 RNA를 포함한다. 일부 경우, 태아 분획은 생물학적 샘플 중의 총 무세포 핵산의 약 1.5% 내지 약 15%이다. 일부 경우, 태아 분획은 생물학적 샘플 중의 총 무세포 핵산의 약 2% 내지 약 12%이다. 일부 경우, 태아 분획은 생물학적 샘플 중의 총 무세포 핵산의 약 4% 내지 약 10%이다. 일부 경우, 태아 분획은 생물학적 샘플 중의 총 무세포 핵산의 약 4% 내지 약 9%이다. 일부 경우, 태아 분획은 생물학적 샘플 중의 총 무세포 핵산의 약 4% 내지 약 8%이다. 일부 경우, 태아 분획은 생물학적 샘플 중의 총 무세포 핵산의 약 1% 내지 약 5%이다. 일부 경우, 태아 분획은 생물학적 샘플 중의 총 무세포 핵산의 약 1% 내지 약 4%이다. 일부 경우, 태아 핵산의 적어도 일부는 태아로부터 유래한다. 일부 경우, 태아 핵산의 적어도 일부는 태반으로부터 유래한다. 일부 경우, 태아 핵산의 적어도 일부는 태아로부터 유래하고 태아 핵산의 적어도 일부는 태반으로부터 유래한다. 일부 경우, 태아 핵산은 태아로부터만 유래한다. 일부 경우, 태아 핵산은 태반으로부터만 유래한다. 일부 경우, 태아 핵산은 태아 및 태반으로부터의 모든 핵산이다. 일부 경우, 태아 핵산은 모체 조직 또는 모체 유체로부터 유래하지 않는다. 일부 경우, 모체 조직은 태반 이외의 모체 조직이다. 일부 경우, 모체 유체는 양수 이외의 모체 유체이다.

[0399] 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 생물학적 샘플을 증폭 또는 서열분석에 적합하게 만들기 위해 생물학적 유체를 변형시키는 단계를 포함한다. 일부 경우, 본원에 개시된 방법은 완충제, 염, 단백질 또는 핵산을 생물학적 샘플에 첨가하는 단계를 포함할 수 있다. 비제한적 예로써, EDTA를 혈액 샘플에 첨가하여 응고를 방지할 수 있다. 간결함을 위해, 이러한 변형된 생물학적 샘플은 여전히 '생물학적 샘플'로서 지칭된다.

[0400] 무세포 핵산

[0401] 일부 경우, 본 개시의 조성물 및 방법은 생물학적 샘플 중의 무세포 핵산을 평가하기에 유용하다. 무세포 핵산은 동물로부터 유래할 수 있다. 무세포 핵산은 포유류로부터 유래할 수 있다. 무세포 핵산은 인간 대상체로부터 유래할 수 있다. 무세포 핵산은 식물로부터 유래할 수 있다. 무세포 핵산은 병원체로부터 유래할 수 있다. 무세포 핵산은 동물로부터 유래한 생물학적 샘플에 존재하는 병원체로부터 유래할 수 있다. 무세포 핵산은 인간 대상체로부터 유래한 생물학적 샘플에 존재하는 병원체로부터 유래할 수 있다. 병원체는 세균 또는 이의 성분을 포함할 수 있다. 병원체는 바이러스 또는 이의 성분일 수 있다. 병원체는 진균 또는 이의 성분일 수 있다.

[0402] 일부 경우, 무세포 핵산은 DNA(cf-DNA)이다. 일부 경우, 무세포 핵산은 게놈 DNA이다. 일부 경우, 무세포 핵산은 RNA(cf-RNA)이다. 일부 경우, 무세포 핵산은 본원에서 무세포 태아 핵산으로서 지칭되는, 태아의 세포로부터의 핵산이다. 일부 경우, 무세포 태아 핵산은 무세포 태아 DNA(cff-DNA) 또는 무세포 태아 RNA(cff-RNA)이다. 일부 경우, cf-DNA 또는 cff-DNA는 게놈 DNA이다. 일부 경우, 무세포 핵산은 cf-RNA 또는 cff-RNA의 역전사에 의해 생성된 상보적 DNA(cDNA)의 형태로 존재한다. 일부 경우, cf-DNA는 미토콘드리아 DNA를 포함한다. 일부 경우, cf-RNA 또는 cff-RNA는 메신저 RNA(mRNA), microRNA(miRNA), 미토콘드리아 RNA 또는 천연 안티센스 RNA(NAS-RNA)이다. 일부 경우, 무세포 핵산 서열은 작은 간섭 RNA(siRNA), microRNA(miRNA), pre-miRNA, pri-miRNA, mRNA, pre-mRNA, 바이러스 RNA, 비로이드 RNA, 비루소이드(virusoid) RNA, 원형 RNA(circRNA), 리보좀 RNA(rRNA), 전달 RNA(tRNA), pre-tRNA, 긴 비코딩 RNA(lncRNA), 작은 핵 RNA(snRNA), 순환 RNA, 무세포 RNA, 엑소좀 RNA, 벡터 발현 RNA, RNA 전사체 및 이들의 조합으로부터 선택된 RNA 분자 또는 단편화된 RNA 분자(RNA 단편)를 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 모체 핵산과 태아 핵산의 혼합물이다. 모체 혈류에서 순환하는 무세포 태아 핵산은 "순환 무세포 핵산" 또는 "순환 세포외 DNA"로서 지칭될 수 있다. 일부 경우, 무세포 핵산은 후성 유전자 변형을 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 성별 또는 관심 있는 다른 유전 정보에 상응하는 후성 유전자 변형의 패턴을 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 메틸화된 사이토신을 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 성별 또는 관심 있는 다른 유전 정보에 상응하는 사이토신 메틸화 패턴을 포함한다.

[0403] 일부 경우, 본원에 개시된 방법, 장치, 시스템 및 키트는 세포 핵산, 예컨대, 파괴된 세포 또는 용해된 세포로부터의 핵산을 검출하거나 정량하도록 구성된다. 일부 경우, 세포 핵산은 의도적으로 파괴되거나 용해된 세포로

부터 유래한다. 일부 경우, 세포 핵산은 비의도적으로 파괴되거나 용해된 세포로부터 유래한다. 본원에 개시된 방법, 장치, 시스템 및 키트는 의도적으로 파괴되거나 용해된 세포를 분석하되, 비의도적으로 파괴되거나 용해된 세포를 분석하지 않도록 구성될 수 있다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 0.1% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 1% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 5% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 10% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 20% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 30% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 40% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 50% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 60% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 70% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 80% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 생물학적 샘플 중의 총 핵산의 약 90% 미만은 세포 핵산이다. 일부 경우, 장치, 시스템, 키트 및 방법은 실험 대조군 또는 이의 사용을 포함한다. 일부 경우, 실험 대조군은 핵산, 단백질, 펩타이드, 항체, 항원 결합 항체 단편, 결합 모이어티를 포함한다. 일부 경우, 실험 대조군은 실험 대조군을 검출하기 위한 신호를 포함한다. 신호의 비제한적 예는 형광 분자, 염료 분자, 나노입자 및 비색 표시기이다. 일부 경우, 실험 대조군은 무세포 핵산을 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 무세포 태아 핵산을 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 모체 무세포 핵산을 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 (예를 들면, 샘플 프로세싱 동안 일어나는 세포 파괴/용해의 양을 추정하기 위해) 모체 무세포 핵산을 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 상염색체에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 성염색체에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 이수성을 가질 가능성이 있는 염색체(예를 들면, 13번 염색체, 16번 염색체, 18번 염색체, 21번 염색체, 22번 염색체, X 염색체, Y 염색체)에 상응하는 서열을 포함한다. 일부 경우, 무세포 핵산은 이수성을 가질 가능성이 거의 없는 염색체(예를 들면, 1번 내지 12번 염색체, 14번 염색체, 15번 염색체, 17번 염색체, 19번 염색체 또는 20번 염색체)에 상응하는 서열을 포함한다.

[0404] 일부 경우, 생물학적 샘플은 모체 체액 샘플을 포함한다. 일부 경우, 모체 체액 샘플은 혈액, 예를 들면, 전혈, 말초 혈액 샘플 또는 혈액 분획(혈장, 혈청)을 포함한다. 일부 경우, 모체 체액 샘플은 땀, 눈물, 가래, 소변, 귀액, 림프, 타액, 뇌척수액, 골수 현탁액, 질액, 자궁경부 세척액, 뇌액, 복수 또는 모유를 포함합니다. 일부 경우, 모체 체액 샘플은 호흡기, 장 및 비뇨생식기의 분비물, 양수 또는 백혈구성분채집술 샘플을 포함한다. 일부 경우, 생물학적 유체 샘플은 비침습적 절차에 의해 용이해게 수득될 수 있는 모체 체액 샘플, 예를 들면, 혈액, 혈장, 혈청, 땀, 눈물, 가래, 소변, 귀액 또는 타액이다. 일부 경우, 샘플은 적어도 2개의 체액 샘플들의 조합이다. 일부 경우, 일부 경우, 무세포 태아 핵산은 모체 태반, 예를 들면, 아폽토시스가 일어난 태반 세포로부터 유래한다. 일부 경우, 생물학적 샘플은 태반 혈액이다.

[0405] 일부 경우, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법에 의해 평가되거나 분석되는 핵산은 바람직한 길이를 가진다. 일부 경우, 핵산은 무세포 태아 DNA 단편이다. 일부 경우, 무세포 태아 DNA 단편은 Y 염색체로부터 유래한다. 일부 경우, 핵산은 길이가 약 15 bp 내지 약 500 bp이다. 일부 경우, 핵산은 길이가 약 50 bp 내지 약 200 bp이다. 일부 경우, 핵산은 길이가 적어도 약 15 bp이다. 일부 경우, 핵산은 길이가 최대 약 500 bp이다. 일부 경우, 핵산은 길이가 약 15 bp 내지 약 50 bp, 약 15 bp 내지 약 75 bp, 약 15 bp 내지 약 100 bp, 약 15 bp 내지 약 150 bp, 약 15 bp 내지 약 200 bp, 약 15 bp 내지 약 250 bp, 약 15 bp 내지 약 300 bp, 약 15 bp 내지 약 350 bp, 약 15 bp 내지 약 400 bp, 약 15 bp 내지 약 450 bp, 약 15 bp 내지 약 500 bp, 약 50 bp 내지 약 75 bp, 약 50 bp 내지 약 100 bp, 약 50 bp 내지 약 150 bp, 약 50 bp 내지 약 200 bp, 약 50 bp 내지 약 250 bp, 약 50 bp 내지 약 300 bp, 약 50 bp 내지 약 350 bp, 약 50 bp 내지 약 400 bp, 약 50 bp 내지 약 450 bp, 약 50 bp 내지 약 500 bp, 약 75 bp 내지 약 100 bp, 약 75 bp 내지 약 150 bp, 약 75 bp 내지 약 200 bp, 약 75 bp 내지 약 250 bp, 약 75 bp 내지 약 300 bp, 약 75 bp 내지 약 350 bp, 약 75 bp 내지 약 400 bp, 약 75 bp 내지 약 450 bp, 약 75 bp 내지 약 500 bp, 약 100 bp 내지 약 150 bp, 약 100 bp 내지 약 200 bp, 약 100 bp 내지 약 250 bp, 약 100 bp 내지 약 300 bp, 약 100 bp 내지 약 350 bp, 약 100 bp 내지 약 400 bp, 약 100 bp 내지 약 450 bp, 약 100 bp 내지 약 500 bp, 약 150 bp 내지 약 200 bp, 약 150 bp 내지 약 250 bp, 약 150 bp 내지 약 300 bp, 약 150 bp 내지 약 350 bp, 약 150 bp 내지 약 400 bp, 약 150 bp 내지 약 450 bp, 약 150 bp 내지 약 500 bp, 약 200 bp 내지 약 250 bp, 약 200 bp 내지 약 300 bp, 약 200 bp 내지 약 350 bp, 약 200 bp 내지 약 400 bp, 약 200 bp 내지 약 450 bp, 약 200 bp 내지 약 500 bp, 약 250 bp 내지 약 300 bp, 약 250 bp 내지 약 350 bp, 약 250 bp 내지 약 400 bp, 약 250 bp 내지 약 450 bp, 약 250 bp 내지 약 500 bp, 약 300 bp 내지 약 350 bp, 약 300 bp 내지 약 400 bp, 약 300 bp 내지 약 450 bp, 약 300 bp 내지 약 500 bp, 약 350 bp 내지 약 400 bp, 약 350 bp 내지 약 450 bp, 약 350 bp 내지 약 500 bp, 약 400 bp 내지 약 450 bp,

약 400 bp 내지 약 500 bp, 또는 약 450 bp 내지 약 500 bp이다. 일부 경우, 핵산은 길이가 약 15 bp, 약 50 bp, 약 75 bp, 약 100 bp, 약 150 bp, 약 200 bp, 약 250 bp, 약 300 bp, 약 350 bp, 약 400 bp, 약 450 bp 또는 약 500 bp이다.

[0406] 본 개시의 장치, 시스템, 키트 및 방법을 사용함으로써 평가되는 무세포 핵산의 크기는 예를 들면, 사용된 구체적인 체액 샘플에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 무세포 DNA 서열은 모체 무세포 DNA 서열보다 더 짧은 것으로 관측되었고, 무세포 DNA 및 모체 무세포 DNA 둘 다가 혈장 샘플보다 소변에서 더 짧은 것으로 관측되었다.

[0407] 일부 경우, 소변에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 약 20 bp 내지 약 300 bp이다. 일부 경우, 소변 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 약 15 bp 내지 약 300 bp이다. 일부 경우, 소변 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 적어도 약 15 bp이다. 일부 경우, 소변 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 최대 약 300 bp이다. 일부 경우, 소변 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 약 15 bp 내지 약 20 bp, 약 15 bp 내지 약 30 bp, 약 15 bp 내지 약 60 bp, 약 15 bp 내지 약 90 bp, 약 15 bp 내지 약 120 bp, 약 15 bp 내지 약 150 bp, 약 15 bp 내지 약 180 bp, 약 15 bp 내지 약 210 bp, 약 15 bp 내지 약 240 bp, 약 15 bp 내지 약 270 bp, 약 15 bp 내지 약 300 bp, 약 20 bp 내지 약 30 bp, 약 20 bp 내지 약 60 bp, 약 20 bp 내지 약 90 bp, 약 20 bp 내지 약 120 bp, 약 20 bp 내지 약 150 bp, 약 20 bp 내지 약 180 bp, 약 20 bp 내지 약 210 bp, 약 20 bp 내지 약 240 bp, 약 20 bp 내지 약 270 bp, 약 20 bp 내지 약 300 bp, 약 30 bp 내지 약 60 bp, 약 30 bp 내지 약 90 bp, 약 30 bp 내지 약 120 bp, 약 30 bp 내지 약 150 bp, 약 30 bp 내지 약 180 bp, 약 30 bp 내지 약 210 bp, 약 30 bp 내지 약 240 bp, 약 30 bp 내지 약 270 bp, 약 30 bp 내지 약 300 bp, 약 60 bp 내지 약 90 bp, 약 60 bp 내지 약 120 bp, 약 60 bp 내지 약 150 bp, 약 60 bp 내지 약 180 bp, 약 60 bp 내지 약 210 bp, 약 60 bp 내지 약 240 bp, 약 60 bp 내지 약 270 bp, 약 60 bp 내지 약 300 bp, 약 90 bp 내지 약 120 bp, 약 90 bp 내지 약 150 bp, 약 90 bp 내지 약 180 bp, 약 90 bp 내지 약 210 bp, 약 90 bp 내지 약 240 bp, 약 90 bp 내지 약 270 bp, 약 90 bp 내지 약 300 bp, 약 120 bp 내지 약 150 bp, 약 120 bp 내지 약 180 bp, 약 120 bp 내지 약 210 bp, 약 120 bp 내지 약 240 bp, 약 120 bp 내지 약 270 bp, 약 120 bp 내지 약 300 bp, 약 150 bp 내지 약 180 bp, 약 150 bp 내지 약 210 bp, 약 150 bp 내지 약 240 bp, 약 150 bp 내지 약 270 bp, 약 150 bp 내지 약 300 bp, 약 180 bp 내지 약 210 bp, 약 180 bp 내지 약 240 bp, 약 180 bp 내지 약 270 bp, 약 180 bp 내지 약 300 bp, 약 210 bp 내지 약 240 bp, 약 210 bp 내지 약 270 bp, 약 210 bp 내지 약 300 bp, 약 240 bp 내지 약 270 bp, 약 240 bp 내지 약 300 bp, 또는 약 270 bp 내지 약 300 bp이다. 일부 경우, 소변 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 약 15 bp, 약 20 bp, 약 30 bp, 약 60 bp, 약 90 bp, 약 120 bp, 약 150 bp, 약 180 bp, 약 210 bp, 약 240 bp, 약 270 bp 또는 약 300 bp이다.

[0408] 일부 경우, 혈장 또는 혈청 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 적어도 약 20 bp이다. 일부 경우, 혈장 또는 혈청 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 적어도 약 40 bp이다. 일부 경우, 혈장 또는 혈청 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 적어도 약 80 bp이다. 일부 경우, 혈장 또는 혈청 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 최대 약 500 bp이다. 일부 경우, 혈장 또는 혈청 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 약 100 bp 내지 약 500 bp이다. 일부 경우, 혈장 또는 혈청 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 약 50 bp 내지 약 500 bp이다. 일부 경우, 혈장 또는 혈청 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 약 80 bp 내지 약 100 bp, 약 80 bp 내지 약 125 bp, 약 80 bp 내지 약 150 bp, 약 80 bp 내지 약 175 bp, 약 80 bp 내지 약 200 bp, 약 80 bp 내지 약 250 bp, 약 80 bp 내지 약 300 bp, 약 80 bp 내지 약 350 bp, 약 80 bp 내지 약 400 bp, 약 80 bp 내지 약 450 bp, 약 80 bp 내지 약 500 bp, 약 100 bp 내지 약 125 bp, 약 100 bp 내지 약 150 bp, 약 100 bp 내지 약 175 bp, 약 100 bp 내지 약 200 bp, 약 100 bp 내지 약 250 bp, 약 100 bp 내지 약 300 bp, 약 100 bp 내지 약 350 bp, 약 100 bp 내지 약 400 bp, 약 100 bp 내지 약 450 bp, 약 100 bp 내지 약 500 bp, 약 125 bp 내지 약 150 bp, 약 125 bp 내지 약 175 bp, 약 125 bp 내지 약 200 bp, 약 125 bp 내지 약 250 bp, 약 125 bp 내지 약 300 bp, 약 125 bp 내지 약 350 bp, 약 125 bp 내지 약 400 bp, 약 125 bp 내지 약 450 bp, 약 125 bp 내지 약 500 bp, 약 150 bp 내지 약 175 bp, 약 150 bp 내지 약 200 bp, 약 150 bp 내지 약 250 bp, 약 150 bp 내지 약 300 bp, 약 150 bp 내지 약 350 bp, 약 150 bp 내지 약 400 bp, 약 150 bp 내지 약 450 bp, 약 150 bp 내지 약 500 bp, 약 175 bp 내지 약 200 bp, 약 175 bp 내지 약 250 bp, 약 175 bp 내지 약 300 bp, 약 175 bp 내지 약 350 bp, 약 175 bp 내지 약 400 bp, 약 175 bp 내지 약 450 bp, 약 175 bp 내지 약 500 bp, 약 200 bp 내지 약 250 bp, 약 200 bp 내지 약 300 bp, 약 200 bp 내지 약 350 bp, 약 200 bp 내지 약 400 bp, 약 200 bp 내지 약 450 bp, 약 200 bp 내지 약 500 bp, 약 250 bp 내지 약 300 bp, 약 250 bp 내지 약 350 bp, 약 250 bp 내지 약 400 bp, 약 250 bp 내지 약 450 bp, 약 250 bp 내지 약 500 bp, 약 300 bp 내지 약 350 bp, 약 300 bp 내지 약 400 bp, 약 300 bp 내지 약 450 bp, 약 300 bp 내지 약 500 bp, 약 350 bp 내지 약 400 bp, 약 350 bp 내지 약 450 bp, 약 350 bp 내지 약 500 bp, 약 400 bp 내지 약 450 bp, 약

400 bp 내지 약 500 bp, 또는 약 450 bp 내지 약 500 bp이다. 일부 경우, 혈장 또는 혈청 샘플에서 평가되는 무세포 DNA 서열은 길이가 약 80 bp, 약 100 bp, 약 125 bp, 약 150 bp, 약 175 bp, 약 200 bp, 약 250 bp, 약 300 bp, 약 350 bp, 약 400 bp, 약 450 bp 또는 약 500 bp이다.

[0409] 대상체

[0410] 본원은 대상체로부터의 샘플에서 생물학적 성분을 분석하는 장치, 시스템, 키트 및 방법을 개시한다. 대상체는 인간일 수 있다. 대상체는 비-인간일 수 있다. 대상체는 비-포유류(예를 들면, 조류, 파충류, 곤충)일 수 있다. 일부 경우, 대상체는 포유류이다. 일부 경우, 포유류는 암컷이다. 일부 경우, 대상체는 인간 대상체이다. 일부 경우, 포유류는 영장류(예를 들면, 인간, 큰 유인원, 작은 유인원, 원숭이)이다. 일부 경우, 포유류는 갯과 동물(예를 들면, 개, 여우, 늑대)이다. 일부 경우, 포유류는 고양잇과 동물(예를 들면, 집 고양이, 대형 고양이)이다. 일부 경우, 포유류는 말과 동물(예를 들면, 말)이다. 일부 경우, 포유류는 소과 동물(예를 들면, 소, 버팔로, 들소)이다. 일부 경우, 포유류는 양이다. 일부 경우, 포유류는 염소이다. 일부 경우, 포유류는 돼지이다. 일부 경우, 포유류는 설치류(예를 들면, 마우스, 래트, 토끼, 기니 피그)이다.

[0411] 일부 경우, 본원에 기재된 대상체는 질환 또는 병태에 의해 영향을 받는다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 질환 또는 병태에 대해 검사하고/하거나, 질환 또는 병태를 검출하고/하거나, 질환 또는 병태를 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 유전된 형질의 존재에 대해 검사하고, 신체건강을 모니터링하고 가족 관계를 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0412] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 대상체에서 암을 검사하고/하거나, 검출하고/하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 암의 비제한적 예는 유방암, 전립선암, 피부암, 폐암, 대장암/결장암, 방광암, 췌장암, 림프종 및 백혈병을 포함한다.

[0413] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 대상체에서 면역 장애 또는 자가면역 장애를 검사하고/하거나, 검출하고/하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 자가면역 및 면역 장애는 1형 당뇨병, 류마티스성 관절염, 건선, 다발성 경화증, 루푸스, 염증성 장 질환, 애디슨병, 그레이브스병, 크론병 및 셀리악병을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0414] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 대상체의 노화와 관련된 질환 또는 병태를 검사하고/하거나, 검출하고/하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 노화와 관련된 질환 및 병태는 암, 골다공증, 치매, 황반 변성, 대사 병태 및 신경퇴행성 장애를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0415] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 혈액 장애를 검사하고/하거나, 검출하고/하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 혈액 장애의 비제한적 예는 빈혈, 혈우병, 혈액 응고 및 혈전성향증이다. 예를 들면, 혈전성향증의 검출은 인자 V 라이덴(FVL), 프로트롬빈 유전자(PT G20210A) 및 메틸렌테트라하이드로폴레이트 환원효소(MTHFR)로부터 선택된 유전자에 존재하는 다형성의 검출을 포함할 수 있다.

[0416] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 대상체에서 신경학적 장애 또는 신경퇴행성 장애를 검사하고/하거나, 검출하고/하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 신경퇴행성 장애 및 신경학적 장애의 비제한적 예는 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병, 척추소뇌 실조증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 운동 신경 질환, 만성 통증 및 척수근 위축증이다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 대상체의 정신병적 장애, 및/또는 정신병적 장애를 치료하기 위한 약물에 대한 반응을 검사하고/하거나, 검출하고/하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다.

[0417] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 대사 병태 또는 질환을 검사하고/하거나, 검출하고/하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 대사 병태 및 질환은 비만, 갑상선 장애, 고혈압, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 비-알콜성 지방간염, 관상 동맥 질환 및 죽상동맥경화증을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0418] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 식품, 액체 또는 약물에 대한 알레르기 또는 과민증을 검사하고/하거나, 검출하고/하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 비제한적 예로써, 대상체는 락토스, 밀, 콩, 유제품, 카페인, 알코올, 견과류, 갑각류 및 계란에 대한 알레르기 또는 과민증을 가질 수 있다. 대상체는 약물, 보충제 또는 화장품에 대한 알레르기 또는 과민증을 가질 수도 있다. 일부 경우, 방법은 피부 유형 또는 피부 건강을 예측하는 유전 마커를 분석하는 단계를 포함한다.

[0419] 일부 경우, 병태는 알레르기와 관련된다. 일부 경우, 대상체는 질환 또는 병태를 가진 것으로 진단되지 않으나, 질환 또는 병태가 존재함을 표시하는 증상을 경험한다. 다른 경우, 대상체는 질환 또는 병태를 가진 것으로 이미 진단되었고, 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 질환 또는 병태, 또는 질환 또는 병태에 대한 약

물의 효과를 모니터링하는 데 유용하다.

[0420] 본원은 임신 대상체로부터의 모체 생물학적 샘플에서 태아로부터의 무세포 핵산을 분석하는 장치, 시스템, 키트 및 방법을 개시한다. 일반적으로, 임신 대상체는 인간 임신 대상체이다. 그러나, 해당 기술 분야에서 당업자는 본 개시가 아마도 농장 또는 동물원에서 번식 목적으로 다른 포유류에 적용될 수 있음을 이해할 것이다. 일부 경우, 임신 대상체는 정배수체이다. 일부 경우, 임신 대상체는 이수성을 포함한다. 일부 경우, 임신 대상체는 유전자 또는 이의 일부의 카피 변이를 가진다. 일부 경우, 임신 대상체는 유전자 삽입 돌연변이를 가진다. 일부 경우, 임신 대상체는 유전자 결실 돌연변이를 가진다. 일부 경우, 임신 대상체는 유전자 미스센스 돌연변이를 가진다. 일부 경우, 임신 대상체는 단일 뉴클레오타이드 다형성을 가진다. 일부 경우, 임신 대상체는 단일 뉴클레오타이드 다형성을 가진다. 일부 경우, 임신 대상체는 융합 유전자를 야기하는 전위 돌연변이를 가진다. 비제한적 예로써, BCR-ABL 유전자는 많은 백혈병 환자들의 22번 염색체에서 발견될 수 있는 융합 유전자이다. 변경된 22번 염색체는 필라델피아 염색체로서 지칭된다.

[0421] 일부 경우, 임신 대상체는 임신 약 2주 내지 임신 약 42주이다. 일부 경우, 임신 대상체는 임신 약 3주 내지 임신 약 42주이다. 일부 경우, 임신 대상체는 임신 약 4주 내지 임신 약 42주이다. 일부 경우, 임신 대상체는 임신 약 5주 내지 임신 약 42주이다. 일부 경우, 임신 대상체는 임신 약 6주 내지 임신 약 42주이다. 일부 경우, 임신 대상체는 임신 약 7주 내지 임신 약 42주이다. 일부 경우, 임신 대상체는 임신 약 8주 내지 임신 약 42주이다.

[0422] 일부 경우, 임신 대상체는 임신 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 12주, 약 16주, 약 20주, 약 21주, 약 22주, 약 24주, 약 26주 또는 약 28주 미만이다. 일부 경우, 임신 대상체는 겨우 임신 5주이다. 일부 경우, 인간 대상체는 임신 적어도 약 5주, 적어도 약 6주, 적어도 약 7주, 또는 적어도 약 8주에 도달한 임신 인간 여성이다. 일부 경우, 인간 대상체는 임신 적어도 약 5주 내지 약 8주에 도달한 임신 인간 여성이다. 일부 경우, 인간 대상체는 임신 적어도 약 5주 내지 약 8주, 적어도 약 5주 내지 약 12주, 적어도 약 5주 내지 약 16주, 적어도 약 5주 내지 약 20주, 적어도 약 6주 내지 약 21주, 적어도 약 6주 내지 약 22주, 적어도 약 6주 내지 약 24주, 적어도 약 6주 내지 약 26주, 적어도 약 6주 내지 약 28주, 적어도 약 6주 내지 약 9주, 적어도 약 6주 내지 약 12주, 적어도 약 6주 내지 약 16주, 적어도 약 6주 내지 약 20주, 적어도 약 6주 내지 약 21주, 적어도 약 6주 내지 약 22주, 적어도 약 6주 내지 약 24주, 적어도 약 6주 내지 약 26주, 또는 적어도 약 6주 내지 약 28주에 도달한 임신 인간 여성이다. 일부 경우, 인간 대상체는 임신 적어도 약 7주 내지 약 8주, 적어도 약 7주 내지 약 12주, 적어도 약 7주 내지 약 16주, 적어도 약 7주 내지 약 20주, 적어도 약 7주 내지 약 21주, 적어도 약 7주 내지 약 22주, 적어도 약 7주 내지 약 24주, 적어도 약 7주 내지 약 26주, 적어도 약 7주 내지 약 28주, 적어도 약 8주 내지 약 9주, 적어도 약 8주 내지 약 12주, 적어도 약 6주 내지 약 16주, 적어도 약 8주 내지 약 20주, 적어도 약 8주 내지 약 21주, 적어도 약 6주 내지 약 22주, 적어도 약 8주 내지 약 24주, 적어도 약 8주 내지 약 26주, 또는 적어도 약 8주 내지 약 28주에 도달한 임신 인간 여성이다. 일부 경우, 임신 기간은 임신 기간을 마지막 생리 기간의 첫날부터 측정함으로써 검출된다.

[0423] 일부 경우, 생물학적 샘플은 임신 대상체, 임신한 것으로 의심되는 대상체, 또는 최근, 예를 들면, 지난 하루 이내에 출산한 대상체로부터 수득된 모체 체액 샘플이다. 일부 경우, 대상체는 포유류이다. 일부 경우, 포유류는 암컷이다. 일부 경우, 포유류는 영장류(예를 들면, 인간, 큰 유인원, 작은 유인원, 원숭이), 갯과 동물(예를 들면, 개, 여우, 늑대), 고양잇과 동물(예를 들면, 집 고양이, 큰 고양이), 말과 동물(예를 들면, 말), 소과 동물(예를 들면, 소, 버팔로, 들소), 양과 동물(예를 들면, 양), 염소과 동물(예를 들면, 염소), 돼지과 동물(예를 들면, 돼지), 코뿔소 또는 설치류(예를 들면, 마우스, 래트, 토끼, 기니 피그)이다. 일부 경우, 대상체는 그녀의 임신 첫 번째 3개월, 두 번째 3개월 또는 세 번째 3개월에 있는 임신 인간 여성이다. 일부 경우, 인간 대상체는 임신 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 11주, 약 12주, 약 13주, 약 14주, 약 15주, 약 16주, 약 17주, 약 18주, 약 19주, 약 20주, 약 21주, 약 22주, 약 23주, 약 24주, 약 25주, 약 26주, 약 27주, 약 28주, 약 29주, 약 30주, 약 31주, 약 32주, 약 33주, 약 34주, 약 35주, 약 36주, 약 37주, 약 38주, 약 39주 또는 약 40주 미만의 임신 인간 여성이다.

[0424] 친부 검사

[0425] 본원에 개시된 방법, 장치 및 시스템의 한 적용은 비침습적 친부 검사이다. 아동의 친부 확인은 아동에 대한 법적 및 사회적(경제적) 혜택(예를 들면, 사회 보장, 상속 혜택, 퇴역군인 혜택)을 확립뿐만 아니라, 아동의 건강을 더 잘 관리하기 위해 병력을 정확히 제공하는 것을 비롯한 여러 이유로 중요하다. 또한, 다른 비-인간 유기체의 자손에 대한 부계 기여자의 확인은 특정 종의 분자 생태 및 진화를 밝히는 데 중요하다.

[0426] 현재 친부 검사는 태아에 다양한 위험을 각각 제기하는 양수천자 또는 융모막 융모 샘플링과 같은 침습적 절차를 수반한다. 등장한 비침습적 친부 확인 방법은 임신 대상체로부터의 수 밀리리터의 말초 혈액뿐만 아니라, 친부로 주장되는 아버지로부터의 협측 면봉, 타액 또는 수 밀리리터의 말초 혈액도 요구한다는 상당한 단점을 가진다. 이 단점으로 인해 종종 사혈전문의 및 매우 종종 의사가 필요하고, 이것은 과정을 비싸고 시간 소모적인 과정으로 만든다. 나아가, 현재 비침습적 친부 확인 방법은 많은 임신 대상체들 및 친부로 주장된 아버지에 대한 원하는 수준의 사생활보호를 결여하고, 이것은 일부 경우 이러한 검사의 이용을 방해한다.

[0427] 일부 실시양태에서, 본원은 아동 또는 태아의 친부를 확인하기 위해 아동 또는 태아로부터 수득된 생물학적 샘플을 분석하는 방법, 시스템 및 장치를 개시한다. 일부 실시양태에서, 방법, 시스템 및 장치는 아동으로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 아동의 유전 정보(예를 들면, DNA)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법, 시스템 및 장치는 임신 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계를 포함하고, 이때 생물학적 샘플은 태아의 유전 정(예를 들면, 무세포 태아 DNA)보를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 아동 또는 태아의 아버지인 것으로 의심되는 대상체로부터 수득된다.

[0428] 기존 친부 검사와 대조적으로, 본원에 개시된 방법, 시스템 및 장치는 정확한 친부 확인을 위해 요구된 DNA(예를 들면, 아버지 DNA, 아동 DNA, 및/또는 태아 무세포 DNA)의 양을 최소화함으로써, 큰 샘플 부피에 대한 필요성을 없앤다. 샘플이 아동, 임신 대상체 또는 부계 아버지인 것으로 의심되는 대상체로부터 수득된 혈액인 경우, 손가락 찌르기로 충분한 양의 혈액을 수득할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 방법 및 시스템은 정맥천자에 대한 필요성을 없앰으로써, 검사비의 상당한 감소와 함께 현장 진료에서의 친부 검사를 제공한다.

[0429] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 실험실 장비를 필요로 하지 않고 샘플이 바뀔 위험 없이 사생활이 보호된 집에서 유전 정보를 수득할 수 있다. 유전 정보는 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법에 의해 수분 또는 수초 이내에 검출될 수 있다. 추가로, 아동 또는 태아의 친부를 확인하는 장치, 시스템, 키트 및 방법은 (1) 최소한으로 침습적이고, (2) 거의 또는 전혀 기술적 훈련 없이 집에서 적용될 수 있고, (3) 일반적으로 복잡하거나 값비싼 장비를 요구하지 않는다는 장점을 제공한다.

[0430] 본원은 (a) 태아를 임신한 대상체로부터 태아 무세포 핵산을 포함하는 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 태아 무세포 핵산의 적어도 일부를 임의적으로 태깅하여 임의적으로 태깅된 태아 무세포 핵산의 라이브러리를 생성하는 단계; (c) 임의적으로 태깅된 무세포 핵산을 임의적으로 증폭하는 단계; (d) 임의적으로 태깅된 태아 무세포 핵산의 적어도 일부를 서열분석하는 단계; (e) 태아의 친부인 것으로 의심되는 개체로부터 부계 유전자형 정보를 제공받는 단계; 및 (f) 부계 유전자형 정보를 태아 무세포 핵산과 비교하여, 일치가 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 태아의 친부를 확인하는 방법, 장치, 시스템 및 키트를 개시한다.

[0431] 일부 양태에서, 장치, 시스템, 키트 및 방법은 (a) 아동 또는 태아의 생물학적 아버지인 것으로 의심되는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 분석하는 단계; (b) 하나 이상의 부계 DNA 시그니처를 확인하는 단계; (c) 아동인 대상체로부터 DNA를 포함하는 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (d) DNA를 임의적으로 증폭하는 단계; (e) DNA의 적어도 일부를 태깅하여 태깅된 DNA의 라이브러리를 생성하는 단계; (f) 임의적으로, 태깅된 DNA를 증폭하는 단계; (g) 태깅된 DNA의 적어도 일부를 서열분석하는 단계; 및 (h) 태깅된 DNA의 적어도 일부에서 하나 이상의 부계 DNA 시그니처를 검출하는 단계를 포함한다.

[0432] 일부 양태에서, 장치, 시스템, 키트 및 방법은 (a) 아동 또는 태아의 생물학적 아버지인 것으로 의심되는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 분석하는 단계; (b) 하나 이상의 부계 DNA 시그니처를 확인하는 단계; (c) 임신 대상체로부터 무세포 태아 핵산을 포함하는 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (d) 임의적으로, 무세포 핵산을 증폭하는 단계; (e) 무세포 핵산의 적어도 일부를 태깅하여 태깅된 무세포 핵산의 라이브러리를 생성하는 단계; (f) 임의적으로, 태깅된 무세포 핵산을 증폭하는 단계; (g) 태깅된 무세포 핵산의 적어도 일부를 서열분석하는 단계; 및 (h) 태깅된 무세포 핵산의 적어도 일부에서 하나 이상의 부계 DNA 시그니처를 검출하는 단계를 포함한다.

[0433] 일부 양태에서, 장치, 시스템, 키트 및 방법은 (a) 아동 또는 태아의 생물학적 아버지인 것으로 의심되는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 분석하는 단계; (b) 하나 이상의 부계 DNA 시그니처를 확인하는 단계; (c) 임신 대상체로부터 최대 약 10^9개의 무세포 태아 핵산 분자를 함유하는 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (d) 무세포 태아 핵산의 적어도 일부를 서열분석하여 서열분석 리드를 생성하는 단계; (e) 적어도 하나의 표적 핵산에 상응하는 서열분석 리드를 측정하는 단계; 및 (f) 부계 DNA 시그니처가 적어도 하나의 표적 핵산에 존재함을 98% 초과의 정확도로 측정하는 단계를 포함한다.

[0434] 일부 양태에서, 본원은 (a) 아동 또는 태아의 생물학적 아버지인 것으로 의심되는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 분석하는 단계; (b) 하나 이상의 부계 DNA 시그니처를 확인하는 단계; (c) 임신 대상체로부터 최대 약 10^9개의 무세포 태아 핵산 분자를 함유하는 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (d) 적어도 2000개의 무세포 태아 핵산을 서열분석하여 서열분석 리드를 생성하는 단계; (e) 적어도 하나의 표적 핵산에 상응하는 적어도 1000개의 서열분석 리드를 측정하는 단계; 및 (f) 부계 DNA 시그니처가 적어도 하나의 표적 핵산에 존재함을 98% 초과의 정확도로 측정하는 단계를 포함하는 방법을 기술한다. 서열분석 리드의 이 수는 생물학적 샘플의 총 무세포 핵산 분자 중 무세포 태아 핵산 분자의 분획이 낮을 때조차도 충분하다.

[0435] 일부 양태에서, 본원은 (a) 아동 또는 태아의 생물학적 아버지인 것으로 의심되는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플을 분석하는 단계; (b) 하나 이상의 부계 DNA 시그니처를 확인하는 단계; (c) 임신 대상체로부터 최대 약 10^9개의 무세포 태아 핵산 분자를 함유하는 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (d) 적어도 8000개의 무세포 태아 핵산을 서열분석하여 서열분석 리드를 생성하는 단계; (e) 적어도 하나의 표적 핵산에 상응하는 적어도 4000개의 서열분석 리드를 측정하는 단계; 및 (f) 부계 DNA 시그니처가 적어도 하나의 표적 핵산에 존재함을 98% 초과의 정확도로 측정하는 단계를 포함하는 방법을 기술한다. 서열분석 리드의 이 수는 생물학적 샘플의 총 무세포 핵산 분자 중 무세포 태아 핵산 분자의 분획이 낮을 때조차도 충분하다. 일부 경우, 상기 방법은 적어도 8000개의 태깅된 무세포 핵산 분자를 서열분석하기 전에 태깅된 무세포 DNA 단편을 증폭하는 단계를 포함한다.

[0436] 본원에서 사용된 바와 같이 "DNA 시그니처"는 생물학적 샘플의 공급원을 또 다른 추정 공급원으로부터 식별하는 데 사용될 수 있는 생물학적 샘플의 핵산 조성을 지칭한다. 일부 실시양태에서, DNA 시그니처는 생물학적 샘플의 공급원의 게놈 내의 하나 이상의 유전자 돌연변이 또는 천연 변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자 돌연변이 또는 천연 변이는 단일 뉴클레오타이드 변이(SNV) 또는 삽입결실(예를 들면, 하나 이상의 핵산의 결실 또는 삽입)을 포함한다. 일부 실시양태에서, DNA 시그니처는 (a) 통계적 분석을 수행함으로써 생물학적 아버지인 것으로 의심되는 대상체가 생물학적 아버지일 확률을 계산하는 단계를 포함하는 컴퓨터 실행 방법을 이용함으로써 확인된다. 일부 실시양태에서, 통계적 분석은 최대 우도 추정(MLE) 또는 최대 사후 기법을 포함한다.

[0437] 비침습적 산전 검사(NIPT)

[0438] 태아 염색체 또는 유전자 이상의 위험 평가는 많은 국가들에서 임신 관리에 있어서 진료의 표준이다. 산모가 임신하는 동안 태아로부터 유전 정보를 확인하는 전통적인 방법은 종종 불확실하고, 임신 기간 초기에 제한된 민감도를 갖고, 침습적이며(예를 들면, 융모막 융모 샘플링(태반 조직의 샘플링)), 산모 및 태아에게 위험이 된다(예를 들면, 양수천자). 나아가, 전통적인 산전 검사에의 접근은 이 검사가 임상 환경에서 기술적 훈련을 받은 의료 제공자를 요구하기 때문에 제한된다.

[0439] 비침습적 산전 검사(NIPT)의 최근 진전에도 불구하고, 현재 NIPT 방법은 적절한 스크리닝 수행을 달성하기 위해 충분한 다량(예를 들면, 16 밀리리터)의 모체 혈액/혈장을 수득하기 위해 정맥천자(예를 들면, 정맥절개술)를 요구한다. 정맥절개술에의 접근은 수행하기 위해 의료 인력을 요구하고, 이것은 많은 산모들에 대한 현재 NIPT 검사의 접근성을 감소시키고 비용을 증가시키도록 작동한다.

[0440] 본원은 초저 부피의 초기 생물학적 샘플을 사용하여 NIPT 검사를 수행하는 방법, 장치, 시스템 및 키트를 개시한다. 기존 NIPT와 대조적으로, 본원에 개시된 방법, 시스템 및 장치는 태아 염색체 이상의 정확한 스크리닝을 위해 요구된 무세포 태아 DNA의 양을 최소화함으로써, 정맥절개술에 대한 필요성을 없앤다. 샘플이 혈액인 경우, 손가락 찌르기로 충분한 양의 혈액을 수득할 수 있다.

[0441] 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 유리하게는 임신 매우 초기에 유전 정보를 수득할 수 있다. 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법은 실험실 장비를 필요로 하지 않고 샘플이 바뀔 위험 없이 사생활이 보호된 집에서 태아의 유전 정보를 수득할 수 있다. 유전 정보는 본원에 개시된 장치, 시스템, 키트 및 방법에 의해 수분 또는 수초 이내에 검출될 수 있다.

[0442] 일부 양태에서, 본원은 임신 대상체로부터 최대 적어도 또는 약 10 게놈 당량의 무세포 태아 DNA를 함유하는 생물학적 샘플을 수득하는 단계; 무세포 태아 핵산 분자의 적어도 일부를 서열분석하여 서열분석 리드를 생성하는 단계; 적어도 하나의 염색체 영역에 상응하는 서열분석 리드의 적어도 일부를 측정하는 단계; 및 적어도 하나의 염색체 영역의 정상 표시, 과다표시 또는 과소표시를 검출하는 단계를 포함하는 방법을 개시한다. 실시예 21을 참조한다. 일부 경우, 본원에 기재된 방법은 적어도 또는 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 정확도로 수행된다. 실시예 21을 참조한다.

[0443] 일부 경우, 과다표시 또는 과소표시는 적어도 하나의 대조군 임신 대상체에서의 염색체 또는 염색체 영역의 표시와 비교된다. 일부 경우, 적어도 하나의 대조군 임신 대상체는 임신 정배수체 대상체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 대조군 임신 대상체는 임신 이수체 대상체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 대조군 임신 대상체는 염색체 이상을 갖지 않은 임신 대상체이다. 일부 경우, 적어도 하나의 대조군 임신 대상체는 적어도 하나의 염색체 이상을 가진 임신 대상체이다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체는 정배수체 태아를 가진다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체는 이수체 태아를 가진다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체는 유전자 이상을 갖지 않은 태아를 가진다. 일부 경우, 대조군 임신 대상체는 적어도 하나의 유전자 이상을 가진 태아를 가진다. 일부 경우, 적어도 하나의 대조군 임신 대상체는 염색체 이상의 동일한 존재 또는 결여를 가진 복수의 임신 대상체들을 포함한다.

[0444] 일부 경우, 본원에 개시된 방법, 장치, 시스템 및 키트는 추가 대조군을 사용한다. 일부 경우, 대조군은 태아가 정배수체인 경우 예상된 염색체의 표시이다. 일부 경우, 대조군은 태아가 이수체인 경우 예상된 염색체의 표시이다. 일부 경우, 대조군은 태아가 정배수체인 경우 예상된 염색체의 양이다. 일부 경우, 대조군은 태아가 이수체인 경우 예상된 염색체의 양이다. 일부 경우, 대조군은 태아가 정배수체인 경우 예상된 염색체에 상응하는 서열분석 리드의 양이다. 일부 경우, 대조군은 태아가 이수체인 경우 예상된 염색체에 상응하는 서열분석 리드의 양이다. 일부 경우, 방법은 대조군 샘플에서 유전 정보를 분석하고 검출하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 방법은 대조군 샘플에서 유전 정보를 분석하고 검출하는 단계를 포함하고, 대신에 대조군 기준 데이터로부터 수득된 소정의 대조군 기준 값을 사용한다. 이것은 임신 대상체가 집에서 그녀의 샘플의 분석을 수행하고 대조군 샘플에 접근하지 못할 때 특히 유용할 것이다. 그러나, 종종, 임신 대상체는 (예를 들면, 친척, 배우자, 친구로부터) 대조군 샘플을 용이하게 수득할 수도 있다. 나아가, 본원에 기재된 시스템 및 방법은 각각의 샘플을 인덱싱함으로써 다수의 샘플들을 동시에 분석하는 것을 제공한다.

[0445] **실시예**

[0446] 하기 실시예는 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트의 다양한 실시양태들을 예시할 목적으로 제공되고, 본 장치, 시스템 및 키트를 어떠한 방식으로든 제한하기 위한 것이 아니다. 본 실시예는 본원에 기재된 방법과 함께 현재 바람직한 실시양태를 대표하고, 예시하고, 본원에 기재된 발명적 개념의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다. 청구범위에 의해 정의된, 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트의 사상 내에 포함되는 변화 및 다른 용도는 해당 기술 분야에서 당업자에게 인식될 것이다.

[0447] **실시예 1: 초저량(약 20 ㎕)의 모체 혈액에서의 삼염색체증 검출**

[0448] 삼염색체증 검출은 다른 염색체로부터 유래한 유전 물질에 비해 한 염색체로부터 유래한 유전 물질의 정확한 표시에 의존한다. 이 비는 정배수체 집단에서의 비의 분포에 비교된다. 삼염색체증은 ((21번 염색체/모든 염색체)-MEDIAN(21번 염색체))/MAD(21번 염색체)의 비가 그 분포와 통계적으로 유의미하게 상이할 때 지칭된다.

[0449] 10% 태아 분획이 9주 임신 연령 이상에서 전형적인 집단의 중앙값이지만, 모든 샘플들이 10%만큼 높은 태아 분획 수준을 갖지는 않을 것이고 일부는 훨씬 더 높은 수준을 가질 것이다. 태아 분획에 대한 전형적인 컷오프는 4%이다. 전형적인 집단에서의 태아 분획의 분포를 고려하고 특이성(99.9%) 및 민감도(99%)에 대한 더 일반적인 컷오프 값을 요구하는 모델은 이 방법을 위한 투입 요건을 예시하는 데 도움이 될 수 있다. 약 5백만 마커 카운트(서열 리드)를 사용할 때, 이 민감도가 달성될 수 있다. 그러나, 염색체당 하나의 마커를 분석하는 경우, 이것은 실현 불가능한 30,000 세포 당량을 요구할 것이다.

[0450] 본원에 개시된 방법 및 시스템은 각각의 게놈 당량이 아폽토시스 과정을 통해 본질적으로 2천만 개의 cfDNA 단편들로 나누어진다는 사실에 기반한다(cfDNA의 150개 염기쌍 평균 크기로 나누어진 게놈당 3십억 개 염기쌍). 이것은 cfDNA의 모든 단일 분자가 혈액으로부터 서열분석기로 운반될 수 있는 경우, 정배수체 게놈의 4분의 1의 당량이 분석에 충분하다는 것을 함축한다.

[0451] 그러나, 현실적으로 과정의 모든 단계는 다양한 양의 DNA 손실에 의해 손상된다. 따라서, 라이브러리 생성 및 서열분석 과정을 통해 훨씬 더 많은 양이 샘플링되고 이동된다. DNA 손실이 과정의 모든 단계에서 일어나지만, 가장 높은 손실은 전형적으로 라이브러리 제조 단계에서 나타난다. 전통적인 방법은 물질의 80% 내지 90%의 손실을 보여준다. 종종, 이 손실은 DNA 농도를, 차세대 서열분석을 위해 요구된 필요 수준까지 높이기 위한 후속 증폭 단계(범용 PCR)에 의해 보상된다. 증폭이 서열분석을 위해 사용될 수 있는 전체 핵산 물질을 증가시키는 좋은 방법이지만, 특정 조건 하에서 증폭은 이전 단계 동안 일어난 정보의 손실을 보상할 수 없다. 정보 손실을 이해하는 데에는 간단한 사고 실험이 도움이 될 수 있다. $20*10^9$개의 cfDNA 단편을 표시하는 1000 게놈 당량으로 시작한다고 가정한다. 막대한 손실을 가정한다면, 2개의 단편만이 증폭에 사용될 수 있다. 한 단편은 기준

영역으로부터 유래하고 다른 한 단편은 표적 영역으로부터 유래한다. 2개의 단편만으로는 서열분석 장비를 로딩하기에 충분하지 않으나, 증폭(PCR)을 통해 각각의 단편을 수십억 번 용이하게 복제할 수 있다. 이제 증폭 후 충분한 물질이 서열분석 과정을 시작하는 데 사용될 수 있으나, 샘플의 정보는 이들 두 카피에 보유된 정보로 감소되었다. 그리고, 이 경우, 두 샘플 유형이 식별 불가능한 50% 분획을 보일 것이기 때문에, 정보는 정배수체 샘플과 삼염색체증 샘플의 분류에 불충분하다.

[0452] 전형적인 차세대 서열분석기에 대한 사양은 5 ㎕의 4 nM 용액을 995 ㎕의 NaOH으로 희석하여 20 pM 용액을 만들고, 이 중 600 ㎕를 서열분석기에 로딩할 것을 요구한다. 결과적으로, 총 $1.2*10^{10}$개의 DNA 단편이 2천만 서열분석 카운트를 생성하는 데 필요하다. 앞서 입증된 바와 같이, 2천만 카운트는 4개의 샘플에 충분하므로, 각각의 샘플은 약 $3*10^{9}$개의 DNA 단편을 기여해야 한다. (각각의 게놈 당량이 2천만 개의 DNA 단편에 기여하기 때문에, 손실 및 증폭이 일어나지 않을 때 총 150 게놈 당량이 필요할 것이다). 이것은 도 6에 요약되어 있다.

[0453] 전형적인 NIPT 프로토콜은 다량의 cfDNA(6000 게놈 당량)로 시작하고, 이것은 라이브러리 제조 동안 다량의 손실을 허용한다. 그 다음, 물질을 증폭하고 서열분석에 적합하도록 고도로 희석한다. 전형적인 NIPT 프로토콜의 문제점은 나중에 고도로 희석되는 라이브러리 제조 동안의 다량의 손실이 염색체로부터 유래한 유전 물질의 부정확한 표시를 유발할 것이라는 점이다.

[0454] 예를 들면, 전형적인 샘플은 혈액 혈장 ㎖당 1500 게놈 당량의 cfDNA를 함유한다. 8 내지 10 ㎖의 혈액의 규칙적인 채혈은 약 4 ㎖의 혈장을 제공하여, 6000 게놈 당량의 cfDNA가 사용될 수 있게 한다. DNA 추출 효율(90%) 및 라이브러리 제조 효율(10%)에 대한 전형적인 수치를 가정하면, 약 540 게놈 당량이 증폭으로 이동하였다(전형적으로, 8 내지 10 주기, 여기서 예를 들면, 1000배 증폭). 증폭 후, 총 540000 게놈 당량 또는 $1.08*10^{13}$개의 DNA 단편이 서열분석에 사용될 수 있다. 1000배 초과의 희석을 수행하여, 증폭된 라이브러리를 요구된 4 nM로 조절한다. 표 1을 참조한다.

표 1

표준 8 내지 10 ㎖ 채혈

[0455]

1500 GE/㎖에서 4 ㎖ 혈장	cfDNA 게놈 당량	cfDNA 단편	효율
채혈	6000	1.20E+11	
DNA 추출	5400	1.08E+11	0.9
라이브러리 제조	540	1.08E+10	**0.1**
증폭	540000	1.08E+13	1000
정규화 및 다중체화	150	3.00E+09	0.0003
변성	90	1.80E+09	0.6
서열분석	0.25	5.00E+06	0.003

[0456] 이 데이터는 이 과정에서 생성된 엄청난 과량의 DNA 단편 때문에 100㎕ 미만의 혈액 부피를 수용할 정도로 반응을 간단히 축소할 수 있을 것이라고 잘못 암시할 것이다. 그러나, 상기 언급된 정보 손실 때문에, 이것은 가능하지 않다. 표 2를 참조한다. DNA 추출(효율 90%) 및 라이브러리 제조(효율 10%) 동안의 손실뿐만 아니라 PCR 증폭(약 10 주기) 동안의 손실도 고려하는, 태아 분획의 하한(4%)에서의 시뮬레이션 수행은 민감도가 투입 DNA 물질의 25 카피(10에서 변곡점) 미만으로 감소함을 보여준다. 10 카피에서의 민감도는 89%로 감소되고 5 카피에서의 민감도는 81%로 감소되고, 이 값들은 둘 다 4% 태아 분획에서 샘플에 대한 약 95% 이론적 민감도를 요구하는 시장에서 허용될 수 없을 것이다. 도 7을 참조한다.

표 2

20 ㎕ 채혈에 대한 축소된 표준 프로토콜

1500 GE/㎖에서 4 ㎖ 혈장	cfDNA 게놈 당량	cfDNA 단편	효율
채혈	10	2.00E+08	
DNA 추출	9	1.80E+08	0.9
라이브러리 제조	1.8	3.60E+07	**0.1**
증폭	1800	3.60E+10	1000
정규화 및 다중체화	150	3.00E+09	0.0833
변성	90	1.80E+09	0.6
서열분석	0.25	5.00E+06	0.003

[0457]

[0458] 대조적으로, 본 개시는 라이브러리 제조 효율을 증가시키고 라이브러리 제조 동안 다량의 손실을 방지하고 과다 증폭 및 높은 희석에 대한 필요성을 없애는 방법, 시스템 및 장치를 제공한다. 따라서, 본 개시는 염색체로부터 유래한 유전 물질의 정확한 표시를 유지함으로써 전형적인 NIPT 프로토콜과 관련된 문제점을 해결한다. (예를 들면, 크라우딩제, 말단 복구를 사용한) 본 실시양태에 따른 라이브러리 효율 증가 및 증폭 감소는 5 미만의 카피 수(게놈 당량)에서도 보존된 더 많은 유전 정보 및 95% 이상의 민감도를 제공한다. 표 3 및 도 7을 참조한다.

표 3

증가된 라이브러리 효율 및 낮은 증폭을 이용하는 프로토콜

1500 GE/㎖에서 20 ㎕ 혈장	cfDNA 게놈 당량	cfDNA 단편	효율
채혈	10	2.00E+08	
DNA 추출	9	1.80E+08	0.9
라이브러리 제조	4.5	9.00E+07	**0.5**
증폭	450	9.00E+09	100
정규화 및 다중체화	150	3.00E+09	0.33
변성	90	1.80E+09	0.6
서열분석	0.25	5.00E+06	0.003

[0459]

[0460] **실시예 2. 초저 투입량의 ccfDNA(1 내지 20 게놈 당량)를 사용하는 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석의 실행 가능성**

[0461] 정맥 천자를 통해 남성 전혈(10 ㎖)을 스트렉(Streck) 무세포 DNA BCT 내로 채취하고 다음과 같이 이중 회전 원심분리로 혈장으로 처리하였다:

[0462] 회전 1 - 20분 동안 1330 rpm, 중단 없음

[0463] 회전 2 - 10분 동안 3300 rpm

[0464] 사용할 때까지 혈장을 4℃ 또는 -80℃에서 저장하였다. 55 ㎕의 EB로 용출하는 제조사의 프로토콜에 따라 퀴아젠(Qiagen) 순환 핵산 추출 키트에 대한 4 ㎖ 프로토콜을 이용하여 혈장으로부터 순환 무세포 DNA를 추출하였다. 퀀트스튜디오(Quantstudio) 6 실시간 기구 상에서 SRY/RNase P 택만(Taqman) 이중체(biplex) qPCR 어세이(Life Technologies)를 이용하여 각각의 샘플에 대한 게놈 당량을 측정하였다. 일루미나(Illumina)용 NEBNext 다중체 올리고(인덱스 세트 프라이머 1)를 가진 NEBNext Ultra II DNA 라이브러리 제조 키트(New England Biolabs)를 사용하여 DNA 라이브러리를 제조하였다. 라이브러리 제조용 주형 ccfDNA를 라이브러리당 96 GE부터 1 GE까지 1:5 적정하였다. 감소된 부피를 이용하여 라이브러리를 생성함으로써, 더 낮은 주형 양의 화학

양론을 설명하였다. 사용된 부피는 주형의 투입량에 의해 좌우되었다. 라이브러리 제조는 하기 단계들로 구성되었다:

[0465] 1. 20℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후 65℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 말단 복구, 5'-인산화 및 A-테일링을 수행하는 단계.

[0466] 2. 20℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 어댑터를 라이게이션한 후, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 라이게이션된 어댑터 루프를 절단하는 단계. 어댑터를 0.6 μM 작업 농도까지 1:25 희석하였다. 이어서, 절단된 어댑터 라이게이션된 라이브러리를, SPRISelect 비드를 사용하는 비드 기반 정제로 처리하였다. 어댑터 라이게이션 후, 고도로 단편화된 저농도 ccfDNA의 결합을 더 향상시키기 위해 비드의 부피를 116 ㎕까지 증가시켰다.

[0467] 3. 1분 동안 98℃에서 초기 변성시킨 후, 10초 동안 98℃ 변성 및 75초 동안 65℃ 어닐링/연장의 13 주기를 수행한 다음, 5분 동안 65℃에서 최종 연장시켜 라이브러리 증폭/인덱싱을 수행하는 단계. 그 다음, SPRISelect 비드(45 ㎕)를 사용하여 증폭된 라이브러리를 정제하였다.

[0468] 고감도 DNA 칩을 가진 아질런트 생물분석기 2100(Agilent Technologies)을 이용하여 모든 라이브러리들을 크기 분류하고 특징규명하였다. 서열분석 전에 라이브러리 희석을 위해 Qubit v3.0(Life Technologies)을 사용하여 농도를 측정하였다. 각각의 라이브러리를 2 nM의 농도로 정규화하였고 서열분석 전에 변성 및 희석을 위해 풀링하였다. 1.5 pM의 로딩 농도에서 일루미나 NextSeq 550을 이용하여 합성에 의한 서열분석을 수행하였다. 각각의 인덱스/샘플에 대해 75 주기 페어링된 말단 서열분석(2x75)을 수행하였다. 일반적으로, 각각의 샘플은 각각의 방향으로 대략 4백만 개의 통과 필터 리드를 생성하였다. 정렬 파라미터 "-k 1-n 0"과 함께 Bowtie를 이용하여 인간 기준 게놈 빌드 hg38에 대해 모든 서열분석 데이터(fasta.gz files)를 정렬하였다. 추가 분석을 위해, 인간 게놈을 50 kb 빈(bin)으로서도 지칭되는 연속 50,000개의 염기쌍 영역들로 나누었고, 소수점 이하 3자리까지의 정확도로 각각의 빈에 대해 염기 "G" 및 "C"의 분획을 계산하였다. 각각의 빈에 대해, 빈에서 시작되는 정렬된 서열 리드를 카운팅하였다. 추가 분석을 위해, 1번 내지 22번 염색체(예를 들면, X 염색체 및 Y 염색체는 배제되었음)에 없는 빈을 여과하여 데이터를 감소시켰다. 이 여과 후, 빈당 GC 함량과 리드 카운트 사이의 Loess 회귀를 수행하였고, 중앙값 빈 카운트를 계산하였다. Loess 회귀는 예측 값으로서도 지칭되는, 각각의 GC 함량 값에 대한 예측 빈 카운트를 제공하였다. 이 예측 값을 중앙값 빈 카운트로 나누어 보정계수를 구하였다. 이어서, 측정된 빈 카운트를 보정계수로 나누어 GC 보정 빈 카운트를 생성하였고, GC 보정 빈 카운트의 중앙값을 계산하였다. 모든 50 kb 빈을 중앙값 GC 보정 빈 카운트로 나누어 GC 정규화 빈 카운트를 제공하였고, 각각의 빈에 대해 중앙값 및 중앙값 절대 편차(MAD)를 계산하였다. 낮은 MAD 및 1의 예측 값 근처의 중앙값을 가진 빈을 선택하였다(MAD >=0.25 또는 중앙값 <0.7 또는 중앙값 >1.3을 가진 빈은 여과되었다).

[0469] 라이브러리의 전기영동도는 감소하는 양의 ccfDNA 투입으로부터 생성되었고 총 라이브러리 생성물이 투입에 의해 감소하나 어댑터 이량체 양이 유의미하게 증가하지 않음을 보여주었다. 도 8a 내지 8c를 참조한다. y 축은 상대적 형광 유닛(강도)을 보여주고 x 축은 시간을 초 단위로 보여준다. 70초에서의 일차 피크는 원하는 300 bp 라이브러리 생성물이다. 도 8a부터 도 8c까지, 투입 게놈 당량을 20 GE부터 1:5 적정하였다. 1 GE까지 감소된 투입은 주형 투입이 훨씬 더 높은 다른 정배수체 샘플에 비해 허용 가능한 서열분석 메트릭스를 사용한 실행 가능한 합성에 의한 서열분석에 충분한 라이브러리를 생성하였다.

[0470] **실시예 3. 모세혈관 혈액으로부터 단리된 초저 투입량의 ccfDNA(10 게놈 당량)를 사용하는 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석을 이용한 저분획 Y 염색체(2.5% 이상)의 검출**

[0471] 접촉 활성화 란셋(BD Microtainer)을 이용한 손가락 끝 모세혈관 층 천자 및 SAFE-T_FILL 모세혈관 채취 장치(KABE Labortechnik, GMBH) 내로의 채혈로 여성 또는 남성 전혈을 채취하였다. 다음과 같이 이중 회전 원심분리를 통해 모세혈관 혈액을 혈장으로 처리하였다:

[0472] 회전 1 - 20분 동안 1330 rpm

[0473] 회전 2 - 10분 동안 3300 rpm

[0474] 혈장을 사용할 때까지 4℃에서 저장하였다. 남성 혈장을 2.5 부피% 내지 20 부피%의 다양한 퍼센트로 여성 혈장에 섞어 넣었다. 이어서, MagMax 무세포 DNA 단리 키트(Life Technologies)와 함께 10 ㎕ 혈장용 변형된 프로토콜을 이용하여 혈장으로부터 순환 무세포 DNA를 추출하였다. 단리는 하기 단계들로 구성되었다:

[0475] 1. 20분 동안 60℃에서 혈장을 단백질분해효소 K(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)와 함께 인큐베이션하는 단계.

[0476] 2. 실온에서 10분 동안 결합시켜 혈장과 DynaBeads MyOne 실란 상자성 비드(2.5 내지 5 ㎕)를 용해/결합시키는 단계.

[0477] 3. 비드/ccfDNA 복합체(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)를 세척하는 단계.

[0478] 4. 80% 에탄올(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)을 사용하여 비드/ccfDNA 복합체를 린싱하는 단계.

[0479] 5. 2분 동안 실온에서 인큐베이션하여 비드(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)로부터 ccfDNA를 용출하는 단계.

[0480] 10 ㎕ 내지 4000 ㎕의 부피에서의 이전 추출 및 공개된 데이터에 기반할 때 각각의 샘플에 대한 게놈 당량은 혈장 ㎕당 1 GE인 것으로 추정되었다. 모든 용출된 ccfDNA를 라이브러리 생성용 투입물로서 사용하였다. 일루미나용 NEBNext 다중체 올리고(인덱스 세트 프라이머 1)를 가진 NEBNext Ultra II DNA 라이브러리 제조 키트(New England Biolabs)를 사용하여 DNA 라이브러리를 제조하였다. 보다 낮은 주형 양의 화학양론을 설명하기 위해 감소된 부피를 사용하여 라이브러리를 생성하였다. 사용된 부피는 주형의 투입량에 의해 좌우되었다. 라이브러리 제조는 하기 단계들로 구성되었다:

[0481] 1. 20℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후 65℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 말단 복구, 5'-인산화 및 A-테일링을 수행하는 단계.

[0482] 2. 20℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 어댑터를 라이게이션한 후, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 라이게이션된 어댑터 루프를 절단하는 단계. 어댑터를 0.6 μM 작업 농도까지 1:25 희석하였다. 이어서, 절단된 어댑터 라이게이션된 라이브러리를, SPRISelect 비드를 사용하는 비드 기반 정제로 처리하였다. 어댑터 라이게이션 후, 고도로 단편화된 저농도 ccfDNA의 결합을 더 향상시키기 위해 비드의 부피를 116 ㎕까지 증가시켰다.

[0483] 3. 1분 동안 98℃에서 초기 변성시킨 후, 10초 동안 98℃ 변성 및 75초 동안 65℃ 어닐링/연장의 13 주기를 수행한 다음, 5분 동안 65℃에서 최종 연장시켜 라이브러리 증폭/인덱싱을 수행하는 단계. 그 다음, SPRISelect 비드(45 ㎕)를 사용하여 증폭된 라이브러리를 정제하였다.

[0484] 고감도 DNA 칩을 가진 아질런트 생물분석기 2100(Agilent Technologies)을 이용하여 모든 라이브러리들을 크기 분류하고 특징규명하였다. 서열분석 전에 라이브러리 희석을 위해 Qubit v3.0(Life Technologies)을 사용하여 농도를 측정하였다. 각각의 라이브러리를 2 nM의 농도로 정규화하였고 서열분석 전에 변성 및 희석을 위해 풀링하였다. 1.5 pM의 로딩 농도에서 일루미나 NextSeq 550을 이용하여 합성에 의한 서열분석을 수행하였다. 각각의 인덱스/샘플에 대해 75 주기 페어링된 말단 서열분석(2x75)을 수행하였다. 일반적으로, 각각의 샘플은 대략 4백만 통과 필터를 생성하였다. 정렬 파라미터 "-k 1-n 0"과 함께 Bowtie를 이용하여 인간 기준 게놈 빌드 hg38에 대해 모든 서열분석 데이터(fasta.gz files)를 정렬하였다. 추가 분석을 위해, 인간 게놈을 50 kb 빈으로서도 지칭되는 연속 50,000개의 염기쌍 영역들로 나누었고, 소수점 이하 3자리까지의 정확도로 각각의 빈에 대해 염기 "G" 및 "C"의 분획을 계산하였다. 각각의 빈에 대해 빈에서 시작되는 정렬된 서열 리드를 계산하였다. 추가 분석을 위해, 1번 내지 22번 염색체(예를 들면, X 염색체 및 Y 염색체는 배제되었음)에 없는 빈을 여과하여 데이터를 감소시켰다. 이 여과 후, 빈당 GC 함량과 리드 카운트 사이의 Loess 회귀를 수행하였고, 중앙값 빈 카운트를 계산하였다. Loess 회귀는 예측 값으로서도 지칭되는, 각각의 GC 함량 값에 대한 예측 빈 카운트를 제공하였다. 이 예측 값을 중앙값 빈 카운트로 나누어 보정계수를 구하였다. 이어서, 측정된 빈 카운트를 보정계수로 나누어 GC 보정 빈 카운트를 생성하였고, GC 보정 빈 카운트의 중앙값을 계산하였다. 모든 50 kb 빈을 중앙값 GC 보정 빈 카운트로 나누어 GC 정규화 빈 카운트를 제공하였고, 각각의 빈에 대해 중앙값 및 중앙값 절대 편차(MAD)를 계산하였다. 낮은 MAD 및 1의 예측 값 근처의 중앙값을 가진 빈을 선택하였다(MAD >=0.25 또는 중앙값 <0.7 또는 중앙값 >1.3을 가진 빈은 여과되었다). 구체적으로, Y 염색체 표시의 계산을 위해, Y 염색체로부터 유래한 빈에 대해 LOESS 회귀를 수행하였다. 도 10 및 11을 참조한다. 도 10은 남성 및 여성 DNA의 모세혈관 혈액/혈장 혼합물로부터 단리된 초저 투입량의 cfDNA를 사용하는 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석을 이용하여 저분획 Y 염색체(2.5% 이상)의 검출을 보여준다. 본 발명자들은 손가락 찌르기에 의해 채취된 모세혈관 혈액으로부터 유래한 여성/남성 혈장의 혼합물 중의 초저량의 cfDNA를 사용하여, 남성 모세혈관 혈액 유래 혈장의 양이 증가함에 따라 Y 염색체 표시의 상응하는 증가가 여전히 있음을 확인하였다. 도 11은 페어링된 말단 서열분석 데이터를 기반으로 모세혈관 혈액의 cfDNA와 정맥 혈액의 cfDNA 사이에 cfDNA 단편 크기 분포를 비교한 결과를 보여준다. 정맥 혈액 및 모세혈관 혈액으로부터 유래한 초저량의 혈장으로부터의 cfDNA의 크기 프로파일은 유사해 보였다. Y 염색체로부터 유래한 빈에 대한 모든 GC 정규화 값을 합산하고 21번 및 19번 염색체로부터 유래한 값을 제외한 모든 GC 정규화 값의 합계로 나눔으로써, Y 염색체로부터 유래한 서열 리드의 퍼센트 표시를 계산하였다.

[0485] **실시예 4. 초저 투입량의 ccfDNA(10 게놈 당량)를 사용하는 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석을 이용한 저분획 Y 염색체(2.5% 이상)의 검출**

[0486] 정맥 천자를 통해 여성 또는 남성 전혈(10 ㎖)을 스트렉 무세포 DNA BCT 내로 채취하고 다음과 같이 이중 회전 원심분리를 통해 혈장으로 처리하였다:

[0487] 회전 1 - 20분 동안 1330 rpm, 중단 없음

[0488] 회전 2 - 10분 동안 3300 rpm

[0489] 혈장을 사용할 때까지 4℃에서 저장하였다. 남성 혈장을 2.5 부피% 내지 20 부피%의 다양한 퍼센트로 여성 혈장에 섞어 넣었다. 이어서, MagMax 무세포 DNA 단리 키트(Life Technologies)와 함께 10 ㎕ 또는 20 ㎕ 혈장용 변형된 프로토콜을 이용하여 혈장으로부터 순환 무세포 DNA를 추출하였다. 단리는 하기 단계들로 구성되었다:

[0490] 1. 20분 동안 60℃에서 혈장을 단백질분해효소 K(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)와 함께 인큐베이션하는 단계.

[0491] 2. 실온에서 10분 동안 결합시켜 혈장과 DynaBeads MyOne 실란 상자성 비드(2.5 내지 5 ㎕)를 용해/결합시키는 단계.

[0492] 3. 비드/ccfDNA 복합체(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)를 세척하는 단계.

[0493] 4. 80% 에탄올(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)을 사용하여 비드/ccfDNA 복합체를 린싱하는 단계.

[0494] 5. 2분 동안 실온에서 인큐베이션하여 비드(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)로부터 ccfDNA를 용출하는 단계.

[0495] 10 ㎕ 내지 4000 ㎕의 부피에서의 이전 추출 및 공개된 데이터에 기반할 때 각각의 샘플에 대한 게놈 당량은 혈장 ㎕당 1 GE인 것으로 추정되었다. 모든 용출된 ccfDNA를 라이브러리 생성용 투입물로서 사용하였다. 일루미나용 NEBNext 다중체 올리고(인덱스 세트 프라이머 1)를 가진 NEBNext Ultra II DNA 라이브러리 제조 키트(New England Biolabs)를 사용하여 DNA 라이브러리를 제조하였다. 보다 낮은 주형 양의 화학양론을 설명하기 위해 감소된 부피를 사용하여 라이브러리를 생성하였다. 사용된 부피는 주형의 투입량에 의해 좌우되었다. 라이브러리 제조는 하기 단계들로 구성되었다:

[0496] 1. 20℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후 65℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 말단 복구, 5'-인산화 및 A-테일링을 수행하는 단계.

[0497] 2. 20℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 어댑터를 라이게이션한 후, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 라이게이션된 어댑터 루프를 절단하는 단계. 어댑터를 0.6 μM 작업 농도까지 1:25 희석하였다. 이어서, 절단된 어댑터 라이게이션된 라이브러리를, SPRISelect 비드를 사용하는 비드 기반 정제로 처리하였다. 어댑터 라이게이션 후, 고도로 단편화된 저농도 ccfDNA의 결합을 더 향상시키기 위해 비드의 부피를 116 ㎕까지 증가시켰다.

[0498] 3. 1분 동안 98℃에서 초기 변성시킨 후, 10초 동안 98℃ 변성 및 75초 동안 65℃ 어닐링/연장의 13 주기를 수행한 다음, 5분 동안 65℃에서 최종 연장시켜 라이브러리 증폭/인덱싱을 수행하는 단계. 그 다음, SPRISelect 비드(45 ㎕)를 사용하여 증폭된 라이브러리를 정제하였다.

[0499] 고감도 DNA 칩을 가진 아질런트 생물분석기 2100(Agilent Technologies)을 이용하여 모든 라이브러리들을 크기 분류하고 특징규명하였다. 서열분석 전에 라이브러리 희석을 위해 Qubit v3.0(Life Technologies)을 사용하여 농도를 측정하였다. 각각의 라이브러리를 2 nM의 농도로 정규화하였고 서열분석 전에 변성 및 희석을 위해 풀링하였다. 1.5 pM의 로딩 농도에서 일루미나 NextSeq 550을 이용하여 합성에 의한 서열분석을 수행하였다. 각각의 인덱스/샘플에 대해 75 주기 페어링된 말단 서열분석(2x75)을 수행하였다. 일반적으로, 각각의 샘플은 대략 4백만 통과 필터를 생성하였다. 정렬 파라미터 "-k 1-n 0"과 함께 Bowtie를 이용하여 인간 기준 게놈 빌드 hg38에 대해 모든 서열분석 데이터(fasta.gz files)를 정렬하였다. 추가 분석을 위해, 인간 게놈을 50 kb 빈으로서도 지칭되는 연속 50,000개의 염기쌍 영역들로 나누었고, 소수점 이하 3자리까지의 정확도로 각각의 빈에 대해 염기 "G" 및 "C"의 분획을 계산하였다. 각각의 빈에 대해, 빈에서 시작되는 정렬된 서열 리드를 카운팅하였다. 추가 분석을 위해, 1번 내지 22번 염색체(예를 들면, X 염색체 및 Y 염색체는 배제되었음)에 없는 빈을 여과하여 데이터를 감소시켰다. 이 여과 후, 빈당 GC 함량과 리드 카운트 사이의 Loess 회귀를 수행하였고, 중앙값 빈 카운트를 계산하였다. Loess 회귀는 예측 값으로서도 지칭되는, 각각의 GC 함량 값에 대한 예측 빈 카운트를 제공하였다. 이 예측 값을 중앙값 빈 카운트로 나누어 보정계수를 구하였다. 이어서, 측정된 빈 카운트를 보정계수로 나누어 GC 보정 빈 카운트를 제공하였고, GC 보정 빈 카운트의 중앙값을 계산하였다. 모든 50 kb 빈을 중앙

값 GC 보정 빈 카운트로 나누어 GC 정규화 빈 카운트를 제공하였고, 각각의 빈에 대해 중앙값 및 중앙값 절대 편차(MAD)를 계산하였다. 낮은 MAD 및 1의 예측 값 근처의 중앙값을 가진 빈을 선택하였다(MAD >=0.25 또는 중앙값 <0.7 또는 중앙값 >1.3을 가진 빈은 여과되었다).

[0500] 구체적으로, Y 염색체 표시의 계산을 위해, Y 염색체로부터 유래한 빈에 대해 LOESS 회귀도 수행하였다. Y 염색체로부터 유래한 빈에 대한 모든 GC 정규화 값을 합산하고 21번 및 19번 염색체로부터 유래한 값을 제외한 모든 GC 정규화 값의 합계로 나눔으로써, Y 염색체로부터 유래한 서열 리드의 퍼센트 표시를 계산하였다. 도 9를 참조한다. 도 9는 정맥 혈액으로부터 단리된 초저량의 cfDNA(10 게놈 당량)를 사용하는 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석을 이용한 저분획 Y 염색체(2.5% 이상)의 검출을 보여준다. 여성/남성 혈장 혼합물을 생성하기 위해 남성 혈장을 고정된 양으로 여성 혈장에 혼합하였다. 혈장 혼합물로부터 cfDNA를 추출하고 서열분석하였다. 여성 혈장에 혼합된 남성 혈장의 양이 증가함에 따라 Y 염색체 표시의 상응하는 증가가 초저 투입량의 cfDNA로부터 여전히 정확히 검출될 수 있음을 보여주기 위해 Y 염색체의 표시를 확인하였다.

[0501] **실시예 5. 초저 투입량의 ccfDNA(10 게놈 당량)를 사용하는 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석을 이용한 태아 염색체 이수성의 검출**

[0502] 정맥 천자를 통해 전혈(10 ㎖)을 스트렉 무세포 DNA BCT 내로 채취하고 이중 회전 원심분리를 통해 혈장으로 처리하였다. 혈장을 신선한 상태로 처리하고 사용할 때까지 4℃ 또는 -80℃에서 저장하였다. 그 다음, 상자성 비드와 함께 1.2 ㎖ 혈장용 변형된 프로토콜을 이용하여 혈장으로부터 순환 무세포 DNA를 추출하였다. 단리는 하기 단계들로 구성되었다:

[0503] 1. 용해/결합을 위해 20분 동안 실온에서 혈장을 단백질분해효소 K, 글리코겐 및 용해 완충제 및 비드와 함께 인큐베이션하는 단계.

[0504] 2. 비드/ccfDNA 복합체를 세척하는 단계.

[0505] 3. 10분 동안 55℃에서 인큐베이션하여 비드(42 ㎕)로부터 ccfDNA를 용출하는 단계.

[0506] 업스트림 적용을 위해 추출된 DNA를 정량하였다. 모든 샘플들을 라이브러리당 33 pg(10 GE) 총 투입으로 정규화하였다. 일루미나용 NEBNext 다중체 올리고(인덱스 세트 프라이머 1)를 가진 NEBNext Ultra II DNA 라이브러리 제조 키트(New England Biolabs)를 사용하여 DNA 라이브러리를 제조하였다. 보다 낮은 주형 양의 화학양론을 설명하기 위해 감소된 부피를 사용하여 라이브러리를 생성하였다. 사용된 부피는 주형의 투입량에 의해 좌우되었다. 라이브러리 제조는 하기 단계들로 구성되었다:

[0507] 1. 20℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후 65℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 말단 복구, 5'-인산화 및 A-테일링을 수행하는 단계.

[0508] 2. 20℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 어댑터를 라이게이션한 후, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 라이게이션된 어댑터 루프를 절단하는 단계. 어댑터를 0.6 μM 작업 농도까지 1:25 희석하였다. 이어서, 절단된 어댑터 라이게이션된 라이브러리를, SPRISelect 비드를 사용하는 비드 기반 정제로 처리하였다. 어댑터 라이게이션 후, 고도로 단편화된 저농도 ccfDNA의 결합을 더 향상시키기 위해 비드의 부피를 116 ㎕까지 증가시켰다.

[0509] 3. 1분 동안 98℃에서 초기 변성시킨 후, 10초 동안 98℃ 변성 및 75초 동안 65℃ 어닐링/연장의 13 주기를 수행한 다음, 5분 동안 65℃에서 최종 연장시켜 라이브러리 증폭/인덱싱을 수행하는 단계. 그 다음, SPRISelect 비드(45 ㎕)를 사용하여 증폭된 라이브러리를 정제하였다.

[0510] 고감도 DNA 칩을 가진 아질런트 생물분석기 2100(Agilent Technologies)을 이용하여 모든 라이브러리들을 크기 분류하고 특징규명하였다. 서열분석 전에 라이브러리 희석을 위해 Qubit v3.0(Life Technologies)을 사용하여 농도를 측정하였다. 각각의 라이브러리를 2 nM의 농도로 정규화하였고 서열분석 전에 변성 및 희석을 위해 풀링하였다. 1.5 pM의 로딩 농도에서 일루미나 NextSeq 550을 이용하여 합성에 의한 서열분석을 수행하였다. 각각의 인덱스/샘플에 대해 75 주기 페어링된 말단 서열분석(2x75)을 수행하였다. 일반적으로, 각각의 샘플은 대략 4백만 통과 필터를 생성하였다. 정렬 파라미터 "-k 1-n 0"과 함께 Bowtie를 이용하여 인간 기준 게놈 빌드 hg38에 대해 모든 서열분석 데이터(fasta.gz files)를 정렬하였다. 추가 분석을 위해, 인간 게놈을 50 kb 빈으로서도 지칭되는 연속 50,000개의 염기쌍 영역들로 나누었고, 소수점 이하 3자리까지의 정확도로 각각의 빈에 대해 염기 "G" 및 "C"의 분획을 계산하였다. 각각의 빈에 대해, 빈에서 시작되는 정렬된 서열 리드를 카운팅하였다. 추가 분석을 위해, 1번 내지 22번 염색체(예를 들면, X 염색체 및 Y 염색체는 배제되었음)에 없는 빈을 여과하여 데이터를 감소시켰다. 이 여과 후, 빈당 GC 함량과 리드 카운트 사이의 Loess 회귀를 수행하였고, 중앙값 빈 카

운트를 계산하였다. Loess 회귀는 예측 값으로서도 지칭되는, 각각의 GC 함량 값에 대한 예측 빈 카운트를 제공하였다. 이 예측 값을 중앙값 빈 카운트로 나누어 보정계수를 구하였다. 이어서, 측정된 빈 카운트를 보정계수로 나누어 GC 보정 빈 카운트를 제공하였고, GC 보정 빈 카운트의 중앙값을 계산하였다. 모든 50 kb 빈을 중앙값 GC 보정 빈 카운트로 나누어 GC 정규화 빈 카운트를 제공하였고, 각각의 빈에 대해 중앙값 및 중앙값 절대 편차(MAD)를 계산하였다. 낮은 MAD 및 1의 예측 값 근처의 중앙값을 가진 빈을 선택하였다(MAD >=0.25 또는 중앙값 <0.7 또는 중앙값 >1.3을 가진 빈은 여과되었다).

[0511] 감소되고 정규화된 데이터로부터, 21번 염색체로부터 유래한 모든 서열 빈을 확인하였다. 21번 염색체로부터 유래한 빈에 대한 모든 GC 정규화 값을 합산하고 합계를, 21번 및 19번 염색체(뿐만 아니라 초기 단계에서 이미 배제된 다른 염색체, 예를 들면, 1번 내지 22번 이외의 X 및 Y 염색체)로부터 유래한 빈의 GC 정규화 값을 제외한 모든 GC 정규화 값의 합계로 나눔으로써, 21번 염색체로부터 유래한 서열 리드의 퍼센트 표시를 계산하였다. 그 다음, 21번 염색체 표시의 중앙값 및 MAD를 공지된 정배수체 샘플(기준 샘플) 세트로부터 계산하였다. 각각의 샘플에 대해, 샘플 특이적 21번 염색체 표시로부터 중앙값 21번 염색체 표시를 차감하여, 샘플 특이적 차이를 얻었다. 이 샘플 특이적 차이를 21번 염색체 표시 MAD로 나누어, Z 점수로서 지칭되는 값을 제공하였다. 이어서, 검사 샘플들을 그들의 Z 점수를 기준으로 분류하였는데, 이때 3 이상의 Z 점수를 가진 샘플은 삼염색체증으로서 분류되었고, 3 미만의 Z 점수를 가진 샘플은 정배수체로서 분류되었다. 도 12를 참조한다. 사용된 기준 샘플 세트는 36개의 서열분석 결과 전체로 구성되었다. 한 명의 남성 개체로부터 20을 수득하였다. 다양한 양의 초저 투입량의 순환 무세포 DNA(cfDNA)로 라이브러리를 생성하였다: 1 게놈 당량(GE)의 cfDNA 투입량(약 3.5 pg의 cfDNA)으로부터 2개의 서열분석 라이브러리를 생성하였고; 4 GE의 cfDNA(약 14 pg의 cfDNA)로부터 2개의 서열분석 라이브러리를 생성하였고; 10 GE의 cfDNA(약 35 pg의 cfDNA)로부터 4개의 서열분석 라이브러리를 생성하였고; 19 GE의 cfDNA로부터 2개의 서열분석 라이브러리를 생성하였고; 25 GE의 cfDNA로부터 3개의 서열분석 라이브러리를 생성하였고; 50 GE의 cfDNA로부터 3개의 서열분석 라이브러리를 생성하였고; 96 GE의 cfDNA로부터 1개의 서열분석 라이브러리를 생성하였고; 100 GE의 cfDNA로부터 2개의 서열분석 라이브러리를 생성하였고; 2000 GE의 cfDNA로부터 1개의 서열분석 라이브러리를 생성하였다.

[0512] 임산부의 혈액의 초저 투입 순환 무세포 DNA로부터 태아 삼염색체증의 존재를 확인하는 기준 샘플 독립적 방법을 확립하기 위해 데이터도 분석하였다. 정렬 파라미터 "-k 1-n 0"을 가진 Bowtie를 이용하여 인간 기준 게놈 빌드 hg38에 대해 모든 서열분석 데이터(fasta.gz files)를 정렬하였다. 추가 분석을 위해, 인간 게놈을 50 kb 빈으로서도 지칭되는 연속 50,000개의 염기쌍 영역으로 나누었고, 소수점 이하 3자리까지의 정확도로 각각의 빈에 대해 염기 "G" 및 "C"의 분획을 계산하였다. 각각의 빈에 대해, 빈에서 시작되는 정렬된 서열 리드를 카운팅하였다.

[0513] 추가 분석을 위해, 1번 내지 22번 염색체(예를 들면, X 염색체 및 Y 염색체는 배제되었음)에 없는 빈을 여과하여 데이터를 감소시켰다. 이 여과 후, 빈당 GC 함량과 리드 카운트 사이의 Loess 회귀를 수행하였고, 중앙값 빈 카운트를 계산하였다. Loess 회귀는 예측 값으로서도 지칭되는, 각각의 GC 함량 값에 대한 예측 빈 카운트를 제공하였다. 이 예측 값을 중앙값 빈 카운트로 나누어 보정계수를 구하였다. 이어서, 측정된 빈 카운트를 보정계수로 나누어 GC 보정 빈 카운트를 제공하였고, GC 보정 빈 카운트의 중앙값을 계산하였다.

[0514] 모든 50 kb 빈을 중앙값 GC 보정 빈 카운트로 나누어 GC 정규화 빈 카운트를 제공하였고, 각각의 빈에 대해 중앙값 및 중앙값 절대 편차(MAD)를 계산하였다. 낮은 MAD 및 1의 예측 값 근처의 중앙값을 가진 빈을 선택하였다(MAD >=0.25 또는 중앙값 <0.7 또는 중앙값 >1.3을 가진 빈은 여과되었다).

[0515] 잠재적 염색체 이상(예를 들면, 삼염색체증)을 검출하기 위해, 각각의 검사 샘플에 대해 한 염색체로부터 유래한 모든 빈을 선택하였고 보정계수를 차감하였다. 이 분석에서 사용된 구체적인 보정 값은 다음과 같았다:

[0516] 1번 염색체 0.018246891, 2번 염색체 0.020434185, 3번 염색체 0.011982353, 4번 염색체 0.001049686, 5번 염색체 0.020581150, 6번 염색체 0.009152075, 7번 염색체 0.005677261, 8번 염색체 0.022754399, 9번 염색체 0.015059119, 10번 염색체 0.021188753, 11번 염색체 0.017143964, 12번 염색체 0.007069202, 13번 염색체 0.002157471, 14번 염색체 0.010356892, 15번 염색체 0.019037573, 16번 염색체 0.009929239, 17번 염색체 0.004990359, 18번 염색체 0.023177486, 19번 염색체 -0.063998368, 20번 염색체 0.042335516, 21번 염색체 0.00498782, 22번 염색체 0.025008553.

[0517] 그 다음, 이 여과된 세트에서 21번 염색체로부터 유래한 빈의 수(이 데이터 세트에서 657)를 카운팅한 후, 다양한 상이한 염색체들로부터 유래한 빈을 함유하도록 동일한 양의 빈(657)을 모든 사용 가능한 빈으로부터 무작위로 선택하였다. 이어서, 이 무작위로 선택된 빈 세트에 대한 퍼센트 표시를 계산하였다. 이 무작위로 선택된 빈

세트에 대한 모든 GC 정규화 값을 합산하고 모든 GC 정규화 값의 합계로 나누었다. 마지막 단계를 10,000번 반복하였고, 각각의 값을 저장하였다. 그 후, 21번 염색체로부터 유래한 빈에 대한 모든 GC 정규화 값을 합산함으로써, 21번 염색체로부터 유래한 서열 리드의 퍼센트 표시를 계산하였고, 이 수를 모든 GC 정규화 값의 합계로 나누었다. 21번 염색체로부터 유래한 빈의 퍼센트 표시가 무작위로 선택된 빈의 10,000개 반복부로부터의 염색체 표시보다 몇 배 더 높은지를 계산하였다. 도 13을 참조한다. 10,000으로 나누어진 합계는 본원에서 "백분위수"로서 지칭되는, 0과 1 사이의 값이다. 샘플들을 이들의 백분위수 값을 기준으로 분류하였다: 10,000의 값(백분위수 1)은 샘플을 삼염색체증으로서 분류하고, 10,000보다 낮은 값(1 미만의 백분위수)은 샘플을 정배수체로서 분류한다.

[0518] **실시예 6. 집에서의 비침습적 산전 검사**

[0519] 유산 이력이 있는 임산부는 자신이 다시 임신했으며 아마도 임신 약 6주라고 생각한다. 그녀는 자신이 실제로 임신 상태인지, 그리고 태아가 위험을 초래할 수 있는 임의의 유전자 이상을 갖는지를 가능한 빨리 알고 싶어 한다. 그녀는 본원에 개시된 비침습적 산전 검사 장치를 구입하여 집으로 가져간다. 그녀는 그녀의 가장 가까운 가족 구성원과 친구의 정서적 지원을 받으면서, 그녀의 손가락을 장치의 웰 내의 미세바늘 어레이에 대고 누름으로써 검사를 시작한다. 장치 내의 나노공극 서열분석기는 그녀의 혈액 샘플 중의 충분한 양의 핵산(10^9개 미만의 태아 핵산)을 서열분석하여 약 1시간 이내에 원하는 유전 정보를 보여준다. USB 포트 또는 무선 기술은 서열 정보를 그녀의 휴대전화 상의 앱 또는 그녀의 컴퓨터 상의 웹사이트에 전달한다. 앱 또는 웹사이트는 소프트웨어를 이용하여 서열분석 리드로부터 유전 정보를 수득함으로써, 여성이 검토할 결과의 패널을 보여준다. 대안적으로, 장치 그 자체가 장치의 윈도우에서 서열을 읽고 패널을 생성하기 위한 소프트웨어를 가진다. 패널은 여성이 임신하고 있음을 확인시켜주고 태아가 공지된 염색체 이상(13번, 16번, 18번, 21번, 22번 및/또는 X/Y 염색체의 삼염색체증) 또는 다른 유전자 이상을 갖고 있는지에 대한 정보를 포함한다. 패널은 그녀가 임신하고 있고 그녀가 아들을 기대하고 있다는 것도 확인시켜준다.

[0520] **실시예 7: 마이크로부피의 모체 샘플을 사용한 비침습적 산전 검사**

[0521] DNA 추출(효율 90%) 및 라이브러리 제조(효율 10%) 동안뿐만 아니라 PCR 증폭(약 10 주기) 동안에도 표준 방법의 손실을 고려하는, 태아 분획의 하한(4%)에서의 시뮬레이션 수행은 정확도가 투입 DNA 물질의 25(10에서 변곡점) 카피 미만으로 감소함을 보여준다. 10 카피에서의 정확도는 89%로 감소되고 5 카피에서의 정확도는 81%로 감소되며, 이 값들은 둘 다 4% 태아 분획에서 샘플에 대한 약 95% 이론적 정확도를 요구하는 시장에서 허용될 수 없을 것이다. 도 7의 밝은 회색 선을 참조한다.

[0522] (10%에 비해 50%까지) 라이브러리 효율을 증가시키고 증폭을 감소시킬 때, 더 많은 정보가 보존되고 95% 초과의 민감도가 5 미만의 카피 수(게놈 당량)에서조차도 달성될 수 있다. 도 7의 짙은 회색 선을 참조한다.

표 4

20 ㎕ 혈장으로부터 태아 유전 정보를 수득하는 워크플로우

[0523]

㎖당 1500 게놈 당량에서 20 ㎕ 혈장	cfDNA 게놈 당량 (태아+ 모체)	총 cfDNA 단편	효율
채혈	10	2.00E+08	
DNA 추출	9	1.80E+08	0.9
라이브러리 제조	4.5	9.00E+07	**0.5**
증폭	450	9.00E+09	100
정규화 및 다중체화	150	3.00E+09	0.33
변성	90	1.80E+09	0.6
서열분석	0.25	5.00E+06	0.003

[0524] **실시예 8: 임산부로부터의 무세포 DNA의 전체 게놈 서열분석에 의한 태아 염색체 이상의 분석**

[0525] 약 100 ㎕의 혈액 중의 무세포 DNA의 양과 동등한 양인 180 pg의 무세포 DNA를 임산부의 생물학적 유체로부터 수득하였다. 무세포 DNA는 DNA 복구 키트에 의해 정제되었고 그의 무결성을 보존하기 위해 완충된 용액 내에 함

유되었다.

[0526] 서열결정을 위한 무세포 DNA를 제조하기 위해, 무세포 DNA 단편의 말단을 DNA 단편 말단 복구 키트로 복구시켰다. 그 다음, 복구된 말단을 어댑터에 라이게이션하여 어댑터 라이게이션된 DNA를 생성하였다.

[0527] 어댑터 라이게이션된 DNA를, DNA에 결합할 수 있는 비드와 함께 인큐베이션함으로써 어댑터 라이게이션된 DNA를 정제하였다. 비드를 잡아당기는 자석을 이용하여, DNA를 가진 비드를 에탄올 용액으로 여러 번 세척한 후, 어댑터 라이게이션된 DNA를 비드로부터 용출하였다.

[0528] 30초 동안 98℃에서 초기 변성 단계 후, 10초 동안 98℃ 및 75초 동안 65℃의 10 주기를 수행한 다음 5분 동안 65℃에서 최종 연장시켜, 어댑터 라이게이션된 DNA의 순환된 증폭을 수행하였다. 임의적으로, 동일한 서열분석기 실시 시 다수의 샘플들을 실시하는 경우 유용할 수 있는 인덱스 프라이머를 사용하여 어댑터 라이게이션된 DNA를 증폭할 수 있다. 이들은 라이브러리 증폭 전에 도입된 고유 바코드/태그와 상이하였다. 어댑터 라이게이션된 DNA와 유사하게, 증폭된 DNA를 비드 및 자석 시스템으로 정제하였다. 생성된 정제된 증폭된 DNA를 서열분석하였다.

[0529] 30개 내지 500개의 염기쌍의 리드 길이를 가진 수백만 개의 서열분석 리드를 생성하는 고처리율 서열분석기로 서열분석을 수행하였다. 인덱스는 다수의 샘플들로부터 서열분석 리드를 동시에 수득할 수 있게 하였다. 서열분석 실시당 샘플당 대략 4백만 개의 리드가 수득되었다.

[0530] 각각의 샘플에 대해 하기 단계들을 수행하였다:

[0531] 모든 서열분석 리드의 게놈 기원을 검출하기 위한 서열 정렬.

[0532] 게놈의 서브세트를 50 kb 길이의 비-중첩 빈에 넣었다. 기준 게놈을 기반으로 각각의 빈에 대한 GC 함량을 계산하였다. 각각의 빈 영역에 위치된 서열 리드의 수를 카운팅하였다. GC 함량과 빈 카운트 사이의 관계에 대한 선형 모델을 y=ax+b(y: 예상 카운트, a: 기울기, x: GC 함량, b: 절편)에 따라 계산하였다. 선형 모델을 기반으로 빈당 카운트를 조절하여 GC 편향을 감소시켰다. 각각의 빈에 대해 모든 빈의 중앙값 카운트 사이의 차이를 계산하였고, 예상 카운트 값을 선형 피트로부터 차감하였다. 이 차이를 각각의 빈에 대한 관측 카운트 값에 더하였다. 관심 있는 염색체로부터 유래한 서열 리드의 퍼센트를 계산하였다. 이 예에서, 관심 있는 염색체는 21번 염색체이었다.

[0533] 기준 샘플 세트를 사용하여, 21번 염색체로부터 유래한 서열 리드의 퍼센트(ref.p21로서 지칭됨)를 계산하였다. ref.p21 샘플 세트에 대한 중앙값 절대 편차(MAD)(ref.mad로서 지칭됨)와 함께 중앙값(ref.med로서 지칭됨)을 계산하였다.

[0534] 유사한 값을 적어도 하나의 검사 샘플에서 측정하였다(전술된 바와 동일한 프로토콜). 21번 염색체로부터 유래한 서열 리드의 퍼센트(test.p21로서 지칭됨)를 계산하였다. 각각의 샘플에 대해, 21번 염색체로부터 유래한 서열 리드의 검사 샘플 퍼센트와 기준의 중앙값 사이의 차이(test.p21-ref.med)를 계산하고 이 차이를 기준 세트의 중앙값 절대 편차로 나눔으로써([test.p21-ref.med]/mad.ref) Z 점수를 계산하였다. 결과에 대해 도 3을 참조한다.

[0535] Z 점수 값이 소정의 컷오프(전형적으로 컷오프는 3과 동등함)를 초과한 것으로 확인된 경우, 샘플은 21번 염색체로부터 유래한 게놈 물질의 과다표시를 가진 것으로 해석될 수 있었다. 이 과다표시는 태아 삼염색체증 21을 표시하였다. 대조적으로, Z 점수가 소정의 컷오프 미만인 경우, 샘플은 게놈 물질의 정상 또는 과소표시를 가진 것으로 해석될 수 있었다. 이 분석은 다른 염색체 또는 염색체 영역에 적용될 수 있었다.

[0536] **실시예 9. 모체 혈장 중의 무세포 태아 핵산을 서열분석함으로써 유전자 이상의 검출**

[0537] 임신 대상체로부터 혈액 샘플을 채취한다. 임신 대상체는 임신 5주에 불과할 수 있다. 일부 경우, 그녀는 임신 7주에 불과하다. 일부 경우, 임신 대상체는 집에서 장치 상에서 그녀의 손가락을 찔러 스스로 혈액을 채취한다. 임신 대상체는 장치 또는 용기 내의 그녀의 샘플을, 샘플 처리 및 서열분석 장비를 가진 실험실로 보낸다. 대안적으로, 장치는 샘플 처리(예를 들면, 정제, 표적 농후화) 및/또는 서열분석을 수행하므로, 임신 대상체는 그녀의 샘플을 실험실로 보낼 필요가 없다. 손가락 찌르기는 약 100 ㎕의 혈액을 수득하고, 이로부터 약 50 ㎕의 혈장 또는 혈청이 수득된다. 샘플링 시 혈장 샘플의 총 무세포 핵산 중 무세포 태아 핵산의 퍼센트가 평균 10%이기 때문에, 50 ㎕의 혈장은 약 1.5 x 10^8개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 일부 경우, 태아 분획은 단지 4%이고, 100 ㎕의 혈액 샘플은 약 6 x 10^7개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 혈장 샘플의 총 무세포 핵산 중 무세포 태아 핵산의 퍼센트가 1%만큼 낮을 수 있기 때문에, 어느 임신 단계에서든 신뢰할만한 정보를 보장하기 위

해 대상체로부터 수득되어야 하는 혈액의 최소 부피는 약 2 ㎕이다.

[0538] **실시예 10. 모체 소변 중의 무세포 태아 핵산을 서열분석함으로써 유전자 이상의 검출**

[0539] 임신 대상체로부터 소변 샘플을 채취한다. 임신 대상체는 임신 5주에 불과할 수 있다. 일부 경우, 그녀는 임신 7주에 불과하다. 일부 경우, 임신 대상체는 집에서 스스로 소변을 채취한다. 임신 대상체는 장치 또는 용기 내의 그녀의 샘플을, 샘플 처리 및 서열분석 장비를 가진 실험실로 보낸다. 대안적으로, 임신 대상체는 처리(예를 들면, 정제, 표적 농후화) 및/또는 서열분석을 수행하는 집 장치에 소변 샘플을 넣으므로, 임신 대상체는 그녀의 샘플을 실험실로 보낼 필요가 없다. 일부 경우, 소변 샘플은 약 100 ㎕의 부피를 가진다. 샘플링 시 소변 샘플의 총 무세포 핵산 중 무세포 태아 핵산의 퍼센트가 4%이고 소변 중의 무세포 핵산의 전형적인 농도가 ㎖당 8 x 10^11개의 단편이기 때문에, 100 ㎕의 소변은 약 8 x 10^10개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 일부 경우, 태아 분획은 4%이고, 소변 샘플은 약 3.2 x 10^9개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 소변 샘플의 총 무세포 핵산 중 무세포 태아 핵산의 퍼센트가 1%만큼 낮을 수 있기 때문에, 어느 임신 단계에서든 신뢰할만한 정보를 보장하기 위해 대상체로부터 수득되어야 하는 소변의 최소 부피는 약 2 ㎕이다.

[0540] **실시예 11. 집에서 채취된 샘플로부터의 모체 혈장 중의 무세포 태아 핵산을 실험실에서 카운팅함으로써 유전자 이상의 검출**

[0541] 임신 대상체로부터 혈액 샘플을 채취한다. 임신 대상체는 임신 5주에 불과할 수 있다. 일부 경우, 그녀는 임신 7주에 불과하다. 일부 경우, 임신 대상체는 예를 들면, 집에서 장치 상에서 그녀의 손가락을 찌름으로써 스스로 모세혈관 혈액을 채취한다. 일부 경우, 장치는 혈액을 혈장으로 분리한다. 임신 대상체는 장치 또는 용기 내의 그녀의 혈액(또는 혈장 샘플)을, 샘플 처리, 핵산 라이브러리 제조 및 서열분석용 시약 및 장비를 가진 실험실로 보낸다. 일부 경우, 라이브러리 제조는 카운팅되거나 정량된 표지 또는 신호를 사용하여 무세포 태아 핵산을 태깅하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 표지 또는 신호는 특정 무세포 태아 핵산에 하이브리드화하는 올리고뉴클레오타이드에 연결된다.

[0542] 특정 무세포 태아 핵산의 양은 신호 또는 표지를 통해 수량으로 환산되고 임신 대상체, 장치 또는 분석을 수행하는 기술자에 의해 검출된다. 손가락 찌르기는 약 100 ㎕의 혈액을 수득하고, 이로부터 약 50 ㎕의 혈장 또는 혈청이 수득된다. 샘플링 시 혈장 샘플의 총 무세포 핵산 중 무세포 태아 핵산의 퍼센트가 약 10%이기 때문에, 50 ㎕의 혈장은 약 1.5 x 10^8개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 일부 경우, 태아 분획은 약 4%이고, 100 ㎕의 혈액 샘플은 약 6 x 10^7개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 혈장 샘플의 총 무세포 핵산 중 무세포 태아 핵산의 퍼센트가 1%만큼 낮을 수 있기 때문에, 어느 임신 단계에서든 신뢰할만한 정보를 보장하기 위해 대상체로부터 수득되어야 하는 혈액의 최소 부피는 약 2 ㎕이다.

[0543] 실험실에서의 분석 결과는 전자적으로 임신 대상체에게 보내진다.

[0544] **실시예 12. 집에서 처리된 샘플로부터의 모체 혈장 중의 무세포 태아 핵산을 실험실에서 카운팅함으로써 유전자 이상의 검출**

[0545] 임신 대상체로부터 혈액 샘플을 채취한다. 임신 대상체는 임신 5주에 불과할 수 있다. 일부 경우, 그녀는 임신 7주에 불과하다. 일부 경우, 임신 대상체는 집에서 장치 상에서 그녀의 손가락을 찌름으로써 스스로 혈액을 채취한다. 장치는 샘플 처리(예를 들면, 정제, 표적 농후화) 및 라이브러리 제조를 수행한다. 따라서, 임신 대상체는 그녀의 처리되고 제조된 샘플을, 서열분석 시설 또는 핵산을 서열분석할 수 있는 시설에 보내기만 하면 된다.

[0546] 특정 무세포 태아 핵산의 양은 신호 또는 표지를 통해 수량으로 환산되고 임신 대상체, 장치 또는 분석을 수행하는 기술자에 의해 검출된다. 손가락 찌르기는 약 100 ㎕의 혈액을 수득하고, 이로부터 약 50 ㎕의 혈장 또는 혈청이 수득된다. 샘플링 시 혈장 샘플의 총 무세포 핵산 중 무세포 태아 핵산의 퍼센트가 약 10%이기 때문에, 50 ㎕의 혈장은 약 1.5 x 10^8개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 일부 경우, 태아 분획은 약 4%이고, 100 ㎕의 혈액 샘플은 약 6 x 10^7개의 무세포 태아 핵산을 함유한다. 혈장 샘플의 총 무세포 핵산 중 무세포 태아 핵산의 퍼센트가 1%만큼 낮을 수 있기 때문에, 어느 임신 단계에서든 신뢰할만한 정보를 보장하기 위해 대상체로부터 수득되어야 하는 혈액의 최소 부피는 약 2 ㎕이다.

[0547] 실험실에서의 분석 결과는 전자적으로 임신 대상체에게 보내진다.

[0548] **실시예 13. 태아 삼염색체증의 검출**

[0549] 각각의 염색체로부터의 리드는 염색체 길이에 따라 대략적으로 표시된다. 대부분의 리드는 1번 염색체로부터 수

득되는 반면, 상염색체로부터의 가장 적은 리드는 21번 염색체로부터 유래할 것이다. 삼염색체증 샘플을 검출하는 일반적인 방법은 정배수체 샘플 집단에서 염색체로부터 유래한 리드의 퍼센트를 측정하는 것이다. 그 다음, 이 염색체 세트 퍼센트 값에 대한 평균 및 표준 편차를 계산한다. 3 표준 편차를 평균에 더하여 컷오프 값을 결정한다. 새로운 샘플이 컷오프 값보다 더 높은 염색체 퍼센트 값을 가진 경우, 그 염색체의 과다표시가 추정될 수 있고, 이것은 염색체의 삼염색체증과 종종 일치한다.

[0550] 정배수체 태아를 가진 임신 대상체의 경우, 21번 염색체로부터 수득된 리드의 퍼센트에 대한 평균 값은 0.01%의 표준 편차를 가진 1.27%이다. 따라서, 삼염색체증을 표시하는 컷오프는 1.30%이다. 이 이론적 예는 10%의 태아 분획 및 1.34의 21번 염색체 퍼센트를 가진 삼염색체증 샘플을 보여준다. 샘플은 컷오프보다 더 높고 삼염색체증 샘플로서 정확히 분류될 것이다. 정배수체 태아를 가진 정배수체 대상체의 샘플 중의 모든 염색체들에 대한 염색체 퍼센트의 예시적 평균뿐만 아니라, 이수체 태아를 가진 정배수체 대상체의 샘플 중의 모든 염색체들에 대한 퍼센트도 표 5에 표시되어 있다.

표 5

염색체에 대한 염색체 퍼센트의 평균

염색체	정배수체 샘플에 대한 염색체 퍼센트의 평균	염색체 퍼센트의 표준 편차	평균 플러스 3 표준 편차 방법을 기반으로 삼염색체증을 검출할 수 있게 하기 위한 염색체 퍼센트에 대한 컷오프	삼염색체증 21 샘플 퍼센트의 예
1	8.38	0.02	8.46	8.39
2	8.51	0.02	8.59	8.48
3	6.92	0.02	7.01	6.93
4	6.27	0.03	6.39	6.22
5	6.18	0.03	6.31	6.18
6	5.88	0.02	5.96	5.87
7	5.55	0.01	5.61	5.54
8	5.13	0.02	5.20	5.13
9	4.10	0.01	4.15	4.08
10	4.96	0.01	5.00	4.97
11	4.87	0.01	4.91	4.85
12	4.76	0.03	4.86	4.75
13	3.23	0.02	3.32	3.21
14	3.21	0.02	3.28	3.20
15	3.02	0.02	3.09	3.06
16	3.07	0.02	3.15	3.07
17	3.07	0.02	3.17	3.04
18	2.69	0.01	2.72	2.68
19	2.27	0.03	2.40	2.28
20	2.44	0.03	2.55	2.44
21	1.27	0.01	1.30	**1.34**
22	1.46	0.02	1.54	1.45
X	2.50	0.02	*	2.47
Y	0.25	0.01	*	0.24

* 이 예시적 방법이 상염색체에만 적용될 수 있기 때문에, 성염색체에 대해서는 유사한 컷오프가 이용될 수 없다.

[0551]

[0552] **실시예 14: 모체 혈액으로부터의 태아 무세포 핵산의 분석을 위한 장치**

[0553] 무세포 핵산을 분석하기 위해 전혈로부터 혈장을 분리하는 장치는 6개의 층을 포함한다. 이들은 아래부터 위까지 다음과 같다:

[0554] (1) 하부 접착 시트

[0555] (2) 하부 분리 디스크: 하부 접착 시트를 향하는 면에 접착제를 가진 접착 시트 물질(DNA 또는 혈장에 대한 불활성을 나타내는 중합체 물질)의 16 mm 직경 디스크

[0556] (3) 다양한 크기, 전형적으로 6 내지 16 mm의 폴리에테르설폰(PES) 막, 바람직한 디자인 특징 10 mm PES 막. 막은 모세관력을 통해 필터로부터 혈장을 끌어당기는 위킹 물질로서 작용한다.

[0557] (4) 필터 디스크(예를 들면, Pall Vivid™ 막), 16 mm 직경, 거친 면이 위로 향하고, 반짝이는 면이 PES 막을 향한다.

[0558] (5) 상부 분리 디스크: 하부 분리 디스크와 동일한 물질, 크기 12 또는 14 mm 직경, 중심에 4 mm 구멍을 함유함. 접착 시트 물질을 사용할 때, 접착제 면은 상부 접착 시트와 만나도록 위로 향한다. 상부 분리 디스크는 직경이 필터 디스크보다 더 작다. 이것은 상부 접착 시트로부터의 접착제가 필터 디스크의 가장자리와 상호작용함으로써 이를 가장자리에서 밀봉하게 한다.

[0559] (6) 상부 접착 시트, 장치의 중심이 위치할 위치에 6 mm 구멍이 뚫려있다.

[0560] 모든 층들을 그들의 중심에서 줄을 세운 후, 표준 사무용 적층 기계를 이용하여 적층시킨다.

[0561] 장치는 실시예 6에 기재된 검사를 수행하도록 구성된다.

[0562] 장치에의 혈액 및 여과의 적용은 다음과 같이 일어난다:

[0563] 100 ㎕의 전혈을 상부 접착 시트 내의 구멍 및 상부 분리 디스크 내의 구멍을 통해 장치의 중심에 적용한다. 혈액은 모세관력에 의해 필터 디스크 전체에 구심적으로 분포한다. 혈장도 모세관력에 의해 필터 디스크를 통해 PES 막 내로 빨려 들어간다. 약 2분 후, 최대량의 혈장이 PES 막 내로 옮겨진다. PES 막을 가진 장치 또는 이의 일부를, DNA 검사를 위해 실험실로 운반한다.

[0564] 무세포 핵산을 함유하는 PES 막을 다음과 같이 회수한다:

[0565] PES 막을 장치로부터 제거한다. 예를 들면, PES 막의 가장자리 근처에서 장치를 잘라낸다. 막은 필터 및 하부 디스크로부터 용이하게 분리된다.

[0566] DNA를 다음과 같이 막으로부터 용출한다:

[0567] 혈장을 함유하는 PES 막을 에펜도르프 튜브(0.5 ㎖) 내로 옮기고 100 ㎕의 용출 완충제를 첨가한다(용출 완충제는 후속 분자 분석에 적합한 H_2O, EB 완충제(QGEN), PBS, TE 등일 수 있다). 막으로부터 DNA를 용출한 후, 용출된 cfDNA를 함유하는 완충제를, 핵산 증폭, 태깅, 서열분석 또는 이들의 조합을 포함하는 유전자 분석으로 처리한다.

[0568] **실시예 15. 암 질환 진행을 모니터링하기 위해 비침습적 초저 부피 액체 생검 검사를 이용한 게놈 변경의 검출**

[0569] 접촉 활성화 란셋(BD Microtainer)을 이용한 손가락 끝 모세혈관 층 천자 및 SAFE-T_FILL 모세혈관 채취 장치(KABE Labortechnik, GMBH) 내로의 채혈로 전혈을 채취한다.

[0570] 다음과 같이 이중 회전 원심분리를 통해 모세혈관 혈액을 혈장으로 처리한다:

[0571] 1. 회전 1 - 20분 동안 1330 rpm

[0572] 2. 회전 2 - 10분 동안 3300 rpm

[0573] 3. 혈장을 사용할 때까지 4℃에서 저장한다.

[0574] 이어서, MagMax 무세포 DNA 단리 키트(Life Technologies)와 함께 10 ㎕ 혈장용 변형된 프로토콜을 이용하여 혈장으로부터 순환 무세포 DNA를 추출한다. 단리는 하기 단계들로 구성되었다:

[0575] 1. 20분 동안 60℃에서 혈장을 단백질분해효소 K(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)와 함께 인큐베이션하는

단계.

[0576] 2. 실온에서 10분 동안 결합시켜 혈장과 DynaBeads MyOne 실란 상자성 비드(2.5 내지 5 ㎕)를 용해/결합시키는 단계.

[0577] 3. 비드/ccfDNA 복합체(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)를 세척하는 단계.

[0578] 4. 80% 에탄올(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)을 사용하여 비드/ccfDNA 복합체를 린싱하는 단계.

[0579] 5. 2분 동안 실온에서 인큐베이션하여 비드(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)로부터 ccfDNA를 용출하는 단계.

[0580] 10 ㎕ 내지 4000 ㎕의 부피에서의 이전 추출 및 공개된 데이터에 기반할 때 각각의 샘플에 대한 게놈 당량은 혈장 ㎕당 1 GE인 것으로 추정된다. 모든 용출된 ccfDNA를 라이브러리 생성용 투입물로서 사용한다. 일루미나용 NEBNext 다중체 올리고(인덱스 세트 프라이머 1)를 가진 NEBNext Ultra II DNA 라이브러리 제조 키트(New England Biolabs)를 사용하여 DNA 라이브러리를 제조한다. 보다 낮은 주형 양의 화학양론을 설명하기 위해 감소된 부피를 사용하여 라이브러리를 생성한다. 사용된 부피는 주형의 투입량에 의해 좌우되었다.

[0581] 라이브러리 제조는 하기 단계들로 구성되었다:

[0582] 1. 20℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후 65℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 말단 복구, 5'-인산화 및 A-테일링을 수행하는 단계.

[0583] 2. 20℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 어댑터를 라이게이션한 후, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 라이게이션된 어댑터 루프를 절단하는 단계. 어댑터를 0.6 μM 작업 농도까지 1:25 희석한다. 이어서, 절단된 어댑터 라이게이션된 라이브러리를, SPRISelect 비드를 사용하는 비드 기반 정제로 처리한다. 어댑터 라이게이션 후, 고도로 단편화된 저농도 ccfDNA의 결합을 더 향상시키기 위해 비드의 부피를 116 ㎕까지 증가시킨다.

[0584] 3. 1분 동안 98℃에서 초기 변성시킨 후, 10초 동안 98℃ 변성 및 75초 동안 65℃ 어닐링/연장의 13 주기를 수행한 다음, 5분 동안 65℃에서 최종 연장시켜 라이브러리 증폭/인덱싱을 수행하는 단계. 그 다음, SPRISelect 비드(45 ㎕)를 사용하여 증폭된 라이브러리를 정제한다.

[0585] 고감도 DNA 칩을 가진 아질런트 생물분석기 2100(Agilent Technologies)을 이용하여 모든 라이브러리들을 크기 분류하고 특징규명한다. 서열분석 전에 라이브러리 희석을 위해 Qubit v3.0(Life Technologies)을 사용하여 농도를 측정한다. 각각의 라이브러리를 2 nM의 농도로 정규화하고 서열분석 전에 변성 및 희석을 위해 풀링한다.

[0586] 1.5 pM의 로딩 농도에서 일루미나 NextSeq 550을 이용하여 합성에 의한 서열분석을 수행한다. 각각의 인덱스/샘플에 대해 75 주기 페어링된 말단 서열분석(2x75)을 수행한다. 일반적으로, 각각의 샘플은 대략 2천만 통과 필터를 생성하였다.

[0587] 정렬 파라미터 "-k 1-n 0"을 가진 Bowtie를 이용하여 인간 기준 게놈 빌드 hg38에 대해 모든 서열분석 데이터(fasta.gz files)를 정렬한다. 추가 분석을 위해, 인간 게놈을 50 kb 빈으로서도 지칭되는 연속 50,000개의 염기쌍 영역들로 나누고, 소수점 이하 3자리까지의 정확도로 각각의 빈에 대해 염기 "G" 및 "C"의 분획을 계산한다. 그 다음, 본 발명자들은 각각의 빈에 대해 얼마나 많은 정렬된 서열 리드가 빈에서 시작되는지를 카운팅하였다. 추가 분석을 위해, 본 발명자들은 1번 내지 22번 염색체(예를 들면, X 염색체 및 Y 염색체는 배제됨)에 없는 빈을 여과하여 데이터를 감소시켰다. 이 여과 후, 빈당 GC 함량과 리드 카운트 사이의 Loess 회귀를 수행하고, 중앙값 빈 카운트를 계산한다. Loess 회귀는 예측 값으로서도 지칭되는, 각각의 GC 함량 값에 대한 예측 빈 카운트를 제공하였다. 이 예측 값을 중앙값 빈 카운트로 나누어 보정계수를 구한다. 이어서, 측정된 빈 카운트를 보정계수로 나누어 GC 보정 빈 카운트를 제공하고, GC 보정 빈 카운트의 중앙값을 계산한다. 모든 50 kb 빈을 중앙값 GC 보정 빈 카운트로 나누어 GC 정규화 빈 카운트를 제공하고 각각의 빈에 대해 중앙값 및 중앙값 절대 편차(MAD)를 계산한다. 낮은 MAD 및 1의 예측 값 근처의 중앙값을 가진 빈을 선택한다(MAD >=0.25 또는 중앙값 <0.7 또는 중앙값 >1.3을 가진 빈은 여과된다).

[0588] 도 15는 치료 전 및 후 진행된 암을 가진 환자로부터 검색된 모세혈관 혈액 기반 순환 무세포 DNA 서열분석 데이터를 보여준다. 이 샘플은 14번 염색체의 p-아암으로부터의 리드의 양의 상당한 증가를 보여준다(검은색으로 표시됨). 14번 염색체의 일부의 이 과다표시는 여분의 14번 염색체 물질을 가진 순환 종양 DNA가 전체 순환 무세포 DNA에 크기 기여함으로써 야기된다. 암 조직의 수술적 제거 후, 모세혈관 혈액 샘플을 받고 분석한다. 여분의 14번 염색체 물질에 기여하는 순환 종양 DNA의 공급원인 암 조직이 수술에 의해 효과적으로 제거되었기 때문에, 14번 염색체의 상대적 표시는 정상화되었다(검은색으로 표시된 영역은 현재 정상적으로 표시된다).

[0589] **실시예 16. 초저 액체 생검 검사를 이용한 바이러스 게놈의 검출**

[0590] 집게 손가락의 경피 천자를 통해 대상체로부터 모세혈관 혈액 샘플을 채취한다. 먼저 천자 부위를 물로 세정한 후, 알코올 패드로 세정한다. 집게 손가락의 천자 후 수득된 첫 번째 혈액 방울을 버린다. 그 다음, 응고제를 함유하는 마이크로튜브 내로 손가락을 "짜내어" 총 100 ㎕의 모세혈관 혈액을 채취한다. 이어서, 모세혈관 혈액을 즉시 원심분리하여 혈장을 생성하고 (배경 게놈 DNA의 추가 증가를 방지하기 위해) 백혈구 용해를 최소화하고, 피펫팅으로 혈장을 조심스럽게 제거한다.

[0591] ***DNA 추출***

[0592] 변형된 MagMax 비드 프로토콜을 이용하여 혈장(45 ㎕)으로부터 순환 무세포 DNA를 추출한다.

[0593] ***라이브러리 제조***

[0594] 인덱싱(세부사항) 프라이머를 사용하는 NEB Ultra 2 키트(프로토콜에 대한 세부사항 제공)를 사용하여 추출된 cfDNA로부터 서열분석 라이브러리를 생성한다.

[0595] ***서열분석 라이브러리***

[0596] 페어링된 말단 서열분석을 이용하는 일루미나 NextSeq500 서열분석기(리드 길이 및 인덱스에 대한 세부사항 추가) 상에서 서열분석 라이브러리를 서열분석한다. 샘플에 대해 2천 5백만 개의 리드를 수득한다.

[0597] 1. 접촉 활성화 란셋(BD Microtainer)을 이용한 손가락 끝 모세혈관 층 천자 및 SAFE-T_FILL 모세혈관 채취 장치(KABE Labortechnik, GMBH) 내로의 채혈로 전혈을 채취한다. 다음과 같이 이중 회전 원심분리를 통해 모세혈관 혈액을 혈장으로 처리한다:

[0598] 2. 회전 1 - 20분 동안 1330 rpm

[0599] 3. 회전 2 - 10분 동안 3300 rpm

[0600] 4. 혈장을 사용할 때까지 4℃에서 저장한다.

[0601] 5. 이어서, MagMax 무세포 DNA 단리 키트(Life Technologies)와 함께 10 ㎕ 혈장용 변형된 프로토콜을 이용하여 혈장으로부터 순환 무세포 DNA를 추출한다. 단리는 하기 단계들로 구성되었다:

[0602] a. 20분 동안 60℃에서 혈장을 단백질분해효소 K(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)와 함께 인큐베이션하는 단계.

[0603] b. 실온에서 10분 동안 결합시켜 혈장과 DynaBeads MyOne 실란 상자성 비드(2.5 내지 5 ㎕)를 용해/결합시키는 단계.

[0604] c. 비드/ccfDNA 복합체(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)를 세척하는 단계.

[0605] d. 80% 에탄올(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)을 사용하여 비드/ccfDNA 복합체를 린싱하는 단계.

[0606] e. 2분 동안 실온에서 인큐베이션하여 비드(출발 투입에 의해 좌우되는 부피)로부터 ccfDNA를 용출하는 단계.

[0607] 6. 10 ㎕ 내지 4000 ㎕의 부피에서의 이전 추출 및 공개된 데이터에 기반할 때 각각의 샘플에 대한 게놈 당량은 혈장 ㎕당 1 GE인 것으로 추정된다. 모든 용출된 ccfDNA를 라이브러리 생성용 투입물로서 사용한다. 일루미나용 NEBNext 다중체 올리고(인덱스 세트 프라이머 1)를 가진 NEBNext Ultra II DNA 라이브러리 제조 키트(New England Biolabs)를 사용하여 DNA 라이브러리를 제조한다. 보다 낮은 주형 양의 화학양론을 설명하기 위해 감소된 부피를 사용하여 라이브러리를 생성한다. 사용된 부피는 주형의 투입량에 의해 좌우되었다.

[0608] 7. 라이브러리 제조는 하기 단계들로 구성된다:

[0609] a. 20℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후 65℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 말단 복구, 5'-인산화 및 A-테일링을 수행하는 단계.

[0610] b. 20℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 어댑터를 라이게이션한 후, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 라이게이션된 어댑터 루프를 절단하는 단계. 어댑터를 0.6 μM 작업 농도까지 1:25 희석한다. 이어서, 절단된 어댑터 라이게이션된 라이브러리를, SPRISelect 비드를 사용하는 비드 기반 정제로 처리한다. 어댑터 라이게이션 후, 고도로 단편화된 저농도 ccfDNA의 결합을 더 향상시키기 위해 비드의 부피를 116 ㎕까지 증가시킨다.

[0611] c. 1분 동안 98℃에서 초기 변성시킨 후, 10초 동안 98℃ 변성 및 75초 동안 65℃ 어닐링/연장의 13 주기를 수행한 다음, 5분 동안 65℃에서 최종 연장시켜 라이브러리 증폭/인덱싱을 수행하는 단계. 그 다음, SPRISelect 비드(45 ㎕)를 사용하여 증폭된 라이브러리를 정제한다.

[0612] 고감도 DNA 칩을 가진 아질런트 생물분석기 2100(Agilent Technologies)을 이용하여 모든 라이브러리들을 크기 분류하고 특징규명한다. 서열분석 전에 라이브러리 희석을 위해 Qubit v3.0(Life Technologies)을 사용하여 농도를 측정한다. 각각의 라이브러리를 2 nM의 농도로 정규화하고 서열분석 전에 변성 및 희석을 위해 풀링한다.

[0613] 1.5 pM의 로딩 농도에서 일루미나 NextSeq 550을 이용하여 합성에 의한 서열분석을 수행한다. 각각의 인덱스/샘플에 대해 75 주기 페어링된 말단 서열분석(2x75)을 수행한다. 일반적으로, 각각의 샘플은 대략 3천 5백만 통과 필터를 생성하였다.

[0614] 데이터 처리: 디폴트 파라미터를 이용하여 bcl2fast9 v2.17.1.14로 서열분석 데이터를 탈다중화한다. 리드를 품질 트리밍하고 20개 염기보다 더 짧은 리드를 Trimmomatic v0.32로 여과한다. Bowtie v2.2.4를 이용하여 통과 필터 리드를 인간 기준물에 대해 정렬하고 따로 보관한다. 인간 마이크로세틀라이트 DNA와 같은 반복부 영역으로부터 잠재적으로 유래한 리드를 여과한다. BLAST v2.2.30을 이용하여 남은 리드를 미생물 기준 데이터베이스에 대해 정렬한다. 기준 데이터베이스 서열들 중 임의의 서열과 높은 동일성을 보이는 리드는 보유된다. 정렬 데이터를 기반으로 미토콘드리아 DNA 및 PCR 중복체와 정렬하는 리드를 제거한다.

[0615] 미생물의 상대적 양 및 분류군 존재도의 측정은 정렬 결과(기준 서열 데이터와 유전적 이동(drift)에 의해 야기된 서열 리드 사이의 잠재적 불일치를 보상하기 위한 서열분석 리드 양 및 정렬 점수)에 기반한다. 호모 사피엔스 및 미생물에 대한 정렬을 위한 기준 게놈은 국립 생명공학 정보 센터 ftp 사이트로부터 검색된다.

[0616] ***예상 결과***

[0617] 혈류 감염(BSI)을 가진 입원 환자로부터 수득된 모세혈관 혈액으로부터 순환 무세포 DNA를 추출한다. cfDNA 서열분석 데이터는 클렙시엘라 뉴모니아(*K. pneumoniae*)의 높은 상대적 존재도를 확인시켜주었다. 10일 걸쳐 채취된 일련의 모세혈관 혈액 샘플들은 항생제 세프타지딤(Ceftazidime)을 사용한 환자의 치료 성공을 모니터링할 수 있게 하였다. 3일째 날 치료를 시작한 후, 클렙시엘라 뉴모니아의 상대적 존재도는 치료 시간의 증가에 따라 유의미하게 감소되었다. 도 16은 이 실험으로부터의 예시적 결과를 제공한다.

[0618] **실시예 17. 이온 반도체 서열분석 기술에 대한 기존 최적화되지 않은 프로토콜은 모세 샘플에서 총 무세포 및 태아 무세포 DNA 분획을 적절히 표시하지 못한다.**

[0619] 모체 샘플에서 무세포 DNA를 검출하는 표준 프로토콜(예를 들면, 라이브러리 제조 및 서열분석 방법)과 본원에 기재된 최적화된 프로토콜을 비교하였다. 표준 라이브러리 제조 프로토콜이 본 개시의 최적화된 프로토콜과 동등한 정확도를 제공할지를 평가하기 위해 삼염색체증 검출 상황에서 상기 두 프로토콜들로부터의 서열분석 데이터를 분석하였다.

[0620] 이 연구에서, 정배수체 태아를 가진 여성으로부터 수득된 4개의 샘플들 및 삼염색체증 21을 가진 태아를 가진 여성으로부터 수득된 4개의 샘플들을 포함하는 8개의 cfDNA 샘플들을 분석하였다. 두 세트의 실험 조건을 이용하여 이 8개의 샘플들을 처리하였다. 제1 세트에서, 서열분석 라이브러리를 생성하기 위해 낮은 투입 cfDNA 양에 대해 최적화된 부피 및 비로 최적화된 라이브러리 제조 키트(NEBNext Ultra II 라이브러리 키트)를 이용하였고, 서열분석을 수행하기 위해 형광 기반 차세대 서열분석기를 이용하였다. 제2 세트에서, 서열분석 라이브러리를 생성하기 위해 최적화되지 않은 라이브러리 제조 키트(이온토렌트 키트를 위한 NEBNext DNA 라이브러리 제조 세트)를 사용하였고, 서열분석을 위해 이온 반도체 서열분석기를 이용하였다. 두 조건들에서, 10 게놈 당량(GE)의 cfDNA를 라이브러리 제조 과정의 투입물로서 사용하였다.

[0621] ***방법***

[0622] cfDNA를 포획하기 위해 상자성 비드를 사용하여 혈액 혈장으로부터 순환 무세포 DNA를 단리하였다. 요약하건대, 원심분리를 통해 전혈로부터 혈장을 분리하였고 단백질분해효소 K, 구아니딘 염산염, 비드 및 글리코겐의 용액에서 비드에 용해/결합시켰다. 이어서, 트리톤 X-100, 구아니딘 염산염 및 염화나트륨을 사용하여 비드를 3 단계에서 세척하였다. 나트륨 아지드를 함유하는 물을 사용하여 cfDNA의 용출을 수행하였다. 그 다음, 모든 샘플들을 정량하여, 다운스트림 검사를 위한 cfDNA의 수율을 측정하였다.

[0623] 서열분석 라이브러리를 생성하기 전, 모든 샘플들을 라이브러리 반응 내로 투입하기 위해 10 GE의 cfDNA로 정규

화하였다.

[0624] *방법 1: 표준 프로토콜*

[0625] 표준 프로토콜을 변형시킨 이온 토렌트용 NEBNext 신속 DNA 라이브러리 제조 세트를 사용하여 이온 반도체 서열분석기용 라이브러리를 생성하였다. 라이브러리 생성은 말단 복구, 이온 토렌트 특이적 어댑터 라이게이션, Ampure XP 비드를 사용한 반응 세정, 이온 토렌트 특이적 프라이머를 사용한 라이브러리 증폭, 및 Ampure XP 비드를 사용한 증폭된 라이브러리의 정제 및 증폭된 라이브러리의 최종 용출로 구성되었다. 어댑터를 모든 라이브러리들에 대해 1:10 희석하였고, 15 주기로 증폭을 수행하였고, 모든 라이브러리들을 25 ㎕의 분자 등급 물로 용출하였다. 라이브러리 생성 후, 아질런트 생물분석기 2100 고감도 DNA 칩을 사용하여 모든 샘플들을 크기 분류하고 정량하였다. 이어서, 써모피셔(ThermoFisher) Qubit 3.0을 사용하여 정량을 반복하였다. 서열분석 과정으로부터 어댑터-이량체 생성물을 제거하기 위해 라이브러리를 더 크기 선택하였다. 크기 선택된 라이브러리의 순도 및 농도를 전술된 바와 같이 확인하였다.

[0626] 이온 540 키트 및 이온 540 칩과 함께 이온 셰프(Ion Chef)를 이용하여 이온 토렌트 S5 서열분석 주형 및 칩 생성을 수행하였다. 실시는 데이터에서 샘플당 최소 2천만 개의 리드를 생성하면서 일반적으로 대략 1억 개의 리드를 생성하였다.

[0627] *방법 2: 저투입량을 위한 최적화*

[0628] 일루미나용 NEBNext 다중체 올리고(인덱스 세트 프라이머 1)를 가진 NEBNext Ultra II DNA 라이브러리 제조 키트(New England Biolabs)를 사용하여 DNA 라이브러리를 제조하였다. 보다 낮은 주형 양의 화학양론을 설명하기 위해 감소된 부피를 사용하여 라이브러리를 생성하였다. 사용된 부피는 주형의 투입량에 의해 좌우되었다. 라이브러리 제조는 하기 단계들로 구성되었다:

[0629] 1. 20℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후 65℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 말단 복구, 5'-인산화 및 A-테일링을 수행하는 단계.

[0630] 2. 20℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 어댑터를 라이게이션한 후, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 라이게이션된 어댑터 루프를 절단하는 단계. 어댑터를 0.6 μM 작업 농도까지 1:25 희석하였다. 이어서, 절단된 어댑터 라이게이션된 라이브러리를, SPRISelect 비드를 사용하는 비드 기반 정제로 처리하였다. 어댑터 라이게이션 후, 고도로 단편화된 저농도 ccfDNA의 결합을 더 향상시키기 위해 비드의 부피를 116 ㎕까지 증가시켰다.

[0631] 3. 1분 동안 98℃에서 초기 변성시킨 후, 10초 동안 98℃ 변성 및 75초 동안 65℃ 어닐링/연장의 13 주기를 수행한 다음, 5분 동안 65℃에서 최종 연장시켜 라이브러리 증폭/인덱싱을 수행하는 단계. 그 다음, SPRISelect 비드(45 ㎕)를 사용하여 증폭된 라이브러리를 정제하였다.

[0632] 고감도 DNA 칩을 가진 아질런트 생물분석기 2100(Agilent Technologies)을 이용하여 모든 라이브러리들을 크기 분류하고 특징규명하였다. 서열분석 전에 라이브러리 희석을 위해 Qubit v3.0(Life Technologies)을 사용하여 농도를 측정하였다. 각각의 라이브러리를 2 nM의 농도로 정규화하였고 서열분석 전에 변성 및 희석을 위해 풀링하였다. 1.5 pM의 로딩 농도에서 일루미나 NextSeq 550을 이용하여 합성에 의한 서열분석을 수행하였다. 각각의 인덱스/샘플에 대해 75 주기 페어링된 말단 서열분석(2x75)을 수행하였다. 일반적으로, 각각의 샘플은 대략 4백만 통과 필터를 생성하였다.

[0633] 투입 물질의 양(순환 무세포 DNA의 10 게놈 당량으로 정규화됨)에 기반할 때, 분석을 위해 사용되어야 하는 cfDNA 단편의 이론적 하한은 대략 10M(또는 0.5 GE)이다. 샘플 제조 동안 대다수의 과정 단계들이 일부 샘플 손실을 동반할 것이기 때문에, 서열분석을 위해 사용될 수 있는 10M cfDNA 단편을 갖기 위해서는 더 높은 수가 혈액으로부터 샘플링되어야 한다. 라이브러리 제조 효율이 가장 영향을 많이 받는/가장 덜 효율적인 과정 단계들 중 하나라는 것은 일반적으로 인정된다. 얼마나 많은 cfDNA 단편들이 반응에 참여하고 궁극적으로 서열분석되는지를 조절하는 것은 중요하다. 간단히 말해, 1 GE는 약 20M cfDNA 단편(3 B 염기쌍; 150 bp 단편 길이)으로 표시된다. 채혈부터 어댑터 라이게이션까지의 효율이 단지 1%일 때, PCR 전 출발 물질은 단지 200,000개의 cfDNA 단편들이다. PCR 단계 동안 이 200,000개의 단편들은 차세대 서열분석에 충분한 정도까지 증폭될 수 있다. 이 200,000개의 cfDNA 단편들이 2M회 서열분석될 때, cfDNA 단편들의 대다수는 다회 서열분석된다. 대조적으로, 100%의 효율로 처리된 동일한 샘플은 서열분석을 위한 20M 잠재적 cfDNA 단편을 제공하고 동일한 2M 서열 리드에서 작은 서브세트만이 1회 초과의 빈도로 서열분석될 것이다.

[0634] 이온 반도체 서열분석기 상에서 이전에 이용된 표준 라이브러리 제조 프로토콜이 초저 투입량을 위해 최적화된

방법과 동등한 정확도를 제공할 수 있는지를 평가하기 위해 삼염색체증 검출 상황에서 서열분석 데이터를 분석하였다.

[0635] ***중앙값 및 중앙값 편차***

[0636] 2개의 데이터 세트에 대해 빈당 중앙값 빈 카운트와 중앙값 절대 편차(MAD) 사이의 관계를 조사하였다. 중앙값 카운트는 MAD와 양의 상관관계를 가졌다. 또한, 더 높은 MAD를 가진 빈의 서브세트가 있다. 이 효과는 원시 데이터 및 GC 보정 데이터에 존재하는데, 이것은 더 높은 MAD가 처리 동안 도입된 GC 편향에 의해 야기되지 않았으나, 그 대신에 진정한 생물학적 변이를 표시함을 시사한다. 두 가지 라이브러리 제조/서열분석 방법들의 비교는 이전 관측결과를 확인시켜준다(도 14a 및 14b). 중앙값 정규화된 GC 보정 빈 카운트는 2개의 상이한 데이터 세트들 사이에 유사하다(p-값 = 0.31, t-검정). 빈 특이적 MAD는 표준 프로토콜 데이터세트에서 더 낮고(p-값 < 2.2e-16, t-검정), 이것은 표준 프로토콜 데이터에 대한 CNV 분류에 있어서 더 우수한 성능을 잠재적으로 시사한다. 더 낮은 빈 특이적 중앙값은 표준 프로토콜 데이터세트에서 사용될 수 있었던 유의미하게 더 높은 서열 카운트의 결과일 것이다.

[0637] 도 14a 및 14b는 표준 프로토콜 데이터세트 대 최적화된 프로토콜 데이터세트에 대한 빈당 중앙값 빈 카운트와 중앙값 절대 편차(MAD) 사이의 관계를 보여준다. 중앙값 정규화된 GC 보정 빈 카운트는 2개의 상이한 데이터세트들 사이에 유사하다(p-값 = 0.31, t-검정). 빈 특이적 MAD는 표준 프로토콜 데이터세트에서 더 낮고(p-값 < 2.2e-16, t-검정), 이것은 표준 프로토콜 데이터에 대한 CNV 분류에 있어서 더 우수한 성능을 잠재적으로 시사한다. 더 낮은 빈 특이적 중앙값은 표준 프로토콜 데이터세트에서 사용될 수 있었던 유의미하게 더 높은 서열 카운트의 결과일 것이다.

[0638] ***중복체***

[0639] 중복체 서열 리드의 분석을 이용하여, 라이브러리 제조 후 서열분석을 위해 사용될 수 있는 게놈 당량(및 이로써 cfDNA 단편)의 수를 추정하였다. 계산은 복잡하고 이후에 요약될 것이다. 이론적으로, 중복체 리드의 양은 a) 얼마나 많은 cfDNA 단편이 반응에 참여하였는지, 및 b) 얼마나 많은 서열 리드가 생성되는지에 의해 좌우된다.

[0640] 예측 값을 계산하기 위해, 포아송(Poisson) 분포에 대한 예측 람다 값을 측정하였고, 이것은 서열 리드/cfDNA 단편이다. 예측 중복률은 단순히 두 번 이상 관측할 확률이 아니다. 본 발명자들은 0 카운트에 대한 측정치를 갖지 않기 때문에 이를 배제할 필요가 있다. 따라서, 본 발명자들의 예측 중복률은 1 이상의 카운트를 관측할 확률에 비해 2 이상의 카운트를 관측할 확률이다[(1-P(0)-P(1))/(1-P(0))]. 이어서, 본 발명자들은 서열 리드의 수를 중복률에 일치시킴으로써 투입 게놈 당량을 확인하기 위해 이 예측 값 행렬을 조회 표로서 이용할 수 있다.

[0641]
```
poom<-1-dpois(0,seq.count.vec/cpy.tmp) #P(>=1) 확률 1 이상
peo<-dpois(1,seq.count.vec/cpy.tmp) #P(1) pro 확률 정확히 1
ptom<-poom-peo # P(>=2) 확률 2 이상
mat.dup.rate[i,]<-ptom/poom#/#(peo+ptom) # 깨끗하지 않은 비트는 ptom/poom 일 수도 있음
```

[0642] 도 14c는 본 개시의 최적화된 프로토콜에 비해, 표준 프로토콜을 이용한 라이브러리 제조 및 서열분석이 서열분석을 위한 더 적은 게놈 당량을 제공함을 보여준다(Life에 대한 중앙값 = 1.355, ILMN에 대한 중앙값 = 6.065).

[0643] 각각의 샘플의 라이브러리 제조를 위해 출발 양인 10 GE를 사용하였다. 도 14c는 본 개시의 최적화된 프로토콜에 비해, 표준 프로토콜을 이용한 라이브러리 제조 및 서열분석이 서열분석을 위한 더 적은 게놈 당량을 제공함을 보여준다(Life에 대한 중앙값 = 1.355, ILMN에 대한 중앙값 = 6.065).

[0644] 사용 가능한 cfDNA 단편의 수는 분류 정확도를 위한 결정계수이고, 이 데이터는 표준 프로토콜을 이용한 표준 처리가 사용 가능한 cfDNA 단편의 유의미한 감소를 야기함을 보여준다.

[0645] 도 14d는 최적화된 프로토콜 데이터 점을 황색으로 보여주고 표준 프로토콜 점을 청색으로 보여준다.

[0646] ***염색체 표시 퍼센트 및 Z 점수***

[0647] 상기 두 프로토콜들에 대해 모든 적격 상염색체들(21번 및 19번 염색체 제외)의 표시에 비해 21번 염색체로부터 유래한 단편의 퍼센트 표시를 계산하였다. Y 염색체 및 X 염색체에 대한 퍼센트도 계산하였다. 성염색체의 퍼센

트 표시를 사용하여 태아의 성별을 확인할 수 있다. 남성 샘플의 경우, 성염색체 표시의 퍼센트는 태아로부터 유래한 cfDNA의 분획(태아 분획)을 추정하는 데에도 사용될 수 있다. 21번 염색체에 대해, 본 발명자들은 잘 확립된 방법에 따라 Z 점수를 계산하였다. 정배수체 기준 샘플 세트에 대한 중앙값 및 MAD를 계산하였다. 그 다음, 그 기준 중앙값으로부터 각각의 샘플에 대한 중앙값의 차이를 계산하였다. 마지막으로, 상기 차이를 기준 MAD로 나누어 Z 점수를 유도하였다. 3 초과의 점수는 삼염색체증 21의 존재를 표시한다.

[0648] 도 14e는 표준 프로토콜 라이브러리 제조 및 서열분석으로부터 유도된 데이터가 많은 노이즈를 갖고 남아 태아를 가진 샘플과 여아 태아를 가진 샘플의 용이한 구별을 허용하지 않음을 보여준다.

[0649] 그러나, Y 염색체 표시에 대한 본 개시의 최적화된 더 효율적인 라이브러리 제조 및 서열분석 프로토콜로부터의 데이터는 명확하고 세트가 세(3)개의 남성 샘플들 및 다섯(5)개의 여성 샘플들을 포함함을 보여준다. 추가로, Y 염색체 측정에 있어서 두 데이터세트들 사이에 우수한 일치가 없다. 결과적으로, X 염색체 표시는 남은 분석을 위해 남성 샘플 중의 태아 분획의 추정에 사용되었다.

[0650] **표준 라이브러리 제조 및 서열분석 프로토콜과 최적화된 라이브러리 제조 및 서열분석 프로토콜 데이터 사이의 성능 비교**

[0651] 이상치(outlier) 빈에 대한 보정 후, Z 점수 분석은 최적화된 라이브러리 제조 및 ILMN 서열분석 데이터가 예상된 바와 같이 수행되었음을 보여준다. 도 14f는 표준 프로토콜 데이터가 우수한 특이성(0개의 거짓 양성, 100% 특이성)을 보여주었으나 좋지 않은 민감도(2개의 거짓 음성, 50% 민감도)를 보여주었음을 보여준다. 두 데이터 세트는 정확히 동일한 샘플을 함유하고 정확히 동일한 양의 투입 물질을 제공받았다. 표준 프로토콜 데이터는 샘플당 유의미하게 더 많은 서열 리드를 가진다. 그러나, 상기 인지된 바와 같이, 서열 리드의 수는 원래의 샘플 중의 무세포 DNA의 정확한 표시와 반드시 상관관계를 갖지는 않는다. 그 다음, 사용 가능한 cfDNA 단편, 태아 분획 및 Z 점수 사이의 관계.

[0652] 태아 분획, 카피 수 및 Z 점수 사이의 관계를 조사하기 위해, 21번 염색체 및 Y 염색체에 대한 퍼센트 표시를 계산하였다. 이 퍼센트를 사용하여, 샘플 중의 태아 유전 물질의 분획(본원에서 태아 분획으로서 지칭됨)을 추정하였다. 여성 샘플은 상승된 Y 염색체 표시를 갖지 않을 것이다. 21번 염색체 과다표시를 보이는 여성 샘플들에 대해, 21번 염색체 과다표시로부터 태아 분획을 계산하였다. 샘플은 최적화된 프로토콜 데이터세트에서의 그의 Y 염색체 표시가 $8.2 * 10^{-4}$ 미만인 경우 여성으로서 확인되었다.

[0653] 도 14g는 태아 삼염색체증(적색)을 가진 샘플 및 정배수체 태아(흑색)를 가진 샘플을 표시하는 도표를 보여준다.

[0654] 염색체 표시 퍼센트 측정치를 태아 분획 추정치로 변환시킨 후, Y 염색체, X 염색체 및 21번 염색체에 대한 값은 동일한 스케일로 존재하였다. 모든 남성 샘플들이 이용 가능한 태아 분획 추정치를 가졌다. 모든 삼염색체증 21도 이용 가능한 추정치를 가졌다. 앞서 확인된 바와 같이, 최적화된 프로토콜 데이터는 남성/여성 샘플과 정배수체/삼염색체증 샘플을 명확히 구별한다. 표준 프로토콜 데이터는 노이즈가 많고 명확한 분리를 허용하지 않는다. 그 다음, 본 발명자들은 모든 남성 샘플들에 대해 X 염색체 측정을 이용하고 삼염색체증 21을 가진 모든 여성 샘플들에 대해 21번 염색체 측정을 이용하는 태아 분획을 측정을 구축하였다. 여성 정배수체 샘플에 대한 태아 분획은 이용될 수 없었다.

[0655] 도 14g는 모든 샘플들에 대한 조합된 태아 분획 측정이 최적화된 프로토콜(우측)에 비해 표준 프로토콜(좌측)을 이용할 때 21번 염색체에 의해 도입된 관측된 효과와 우수한 상관관계를 가짐을 보여준다.

[0656] **Z 점수, 카피 수 및 태아 분획**

[0657] 카피 수, 태아 분획 및 Z 점수 사이의 관계를 작도하였다. 정배수체 샘플들은 카피 수/태아 분획 평면에 분포하나, 그들의 Z 점수는 이 파라미터들과 상관관계를 갖지 않는다. 이 거동은 예상되나, 가시화를 복잡하게 한다. 프로토콜 데이터는 카피 수에 있어서 표준 프로토콜 데이터와 상이하다.

[0658] 도 14h는 상기 프로토콜들 둘 다의 경우 정확히 분류된 샘플(진짜 양성, TP)이 부정확히 분류된 샘플(거짓 음성, FN)로부터 분리됨을 보여준다. 표준 프로토콜에 비해 최적화된 프로토콜로부터 비롯된 더 많은 카피 수도 확인된다.

[0659] 본 발명자들은 라이브러리 제조 과정의 모든 단계들에서 샘플링 오류를 고려하는 컴퓨터 시뮬레이션을 이용하여, 사용 가능한 cfDNA 단편과 태아 분획의 각각의 조합에 대한 성능을 예측하는 모델을 구축할 수 있다.

90%의 추정된 PCR 효율, 5%의 라이브러리 효율 및 36M 서열 리드에서, 50% 민감도를 표시하는 생성된 선은 거짓 음성 샘플로부터 진짜 양성을 완벽히 분리한다(도 14i).

[0660] **결론**

[0661] 본원은 동일한 저투입량이 사용될 때, 저투입량을 위해 최적화되지 않은 표준 라이브러리 제조 및 서열분석 방법이 최적화된 프로토콜에 비해 감소된 양의 무세포 DNA 카피를 유발한다는 증거를 개시한다. 감소된 카피 수 표시는 염색체 표시에서의 더 높은 노이즈(noise) 및 이로써 더 낮은 비정상 검출 성능의 결과이다.

[0662] **실시예 18. 기준 단편 길이 프로파일의 확인**

[0663] 채혈 및 DNA 추출 과정 동안 태아 분획을 낮출 수 있는 인위적 결과가 있다. 이 인위적 결과는 기계적 응력, 오염, 및 가장 현저하게는 백혈구(WBC) 분해를 포함한다. 예를 들면, 손가락 찌르기를 통해 샘플링된 혈액은 용기 내에 수집되기 전에 피부의 표면과 접촉한다. 그 접촉 동안, 예를 들면, 떨어져 나온 피부 세포로부터의 추가 DNA가 선택되고 모체 DNA의 전체 풀에 첨가될 수 있다. 더욱이, 피부 천자의 방법도 정맥 채혈과 손가락 찌르기 사이에 매우 상이하다. 정맥 채혈에 있어서 바늘은 피부를 통해 슬라이싱하고 정맥 내부에 위치되도록 디자인된다. 바늘의 개방된 끝이 피부 천자로부터 떨어져 위치되기 때문에, 피부 천자 동안 손상된 세포는 모체 배경에 유의미하게 기여할 가능성이 거의 없다. 손가락 찌르기 동안, 샘플링된 혈액 세척물은 천자된 피부를 직접 통과하여 표면 상에서 수집된다. 그 통과 동안 피부를 천자할 때 손상된 모든 세포로부터 DNA를 수집할 수 있다. 이 DNA 오염은 작지만, 소량의 혈액이 채취될 때 영향을 미치게 된다. 예를 들면, 동일한 10% 태아 분획 및 1000 GE의 cfDNA/㎖ 혈장을 가정할 때, 본 발명자들은 20 ㎕ 모세혈관 채혈에서 총 10 GE cfDNA(9 모체 및 1 태아)를 예상할 것이다. 일례에서, 본 발명자들은 10개의 세포들이 손상되고 채혈에 기여한다고 가정한다. 20 ㎕의 모세혈관 채혈에서, 태아 분획은 10%에서 5%로 떨어질 것이다.

[0664] 아폽토시스를 겪지 않은 DNA, 예컨대, 기계적 세포 손상 후 방출된 뉴클레오좀 DNA 또는 떨어져 나온 피부 표면 세포에 대한 DNA는 상이한 단편 길이 분포를 보인다. 본 발명자들은 정맥 채혈로부터 유래한 cfDNA 단편의 크기 길이 프로파일을 분석하고 이를 다른 공급원으로부터의 cfDNA 단편 길이 프로파일과 비교함으로써, 비-cfDNA의 영향을 기술할 수 있다. NIPT의 상황에서, 이 비-cfDNA는 태아 분획의 감소로 이어지는 모체 배경 오염으로서 간주될 수 있다.

[0665] *정맥 혈액*

[0666] 정맥 혈액으로부터 추출된 cfDNA의 길이 프로파일은 해당 기술 분야에 기재되어 있고 해당 기술 분야에서 당업자에게 약 166 내지 168 bp의 배수로 이해되어 있다. 이것은 뉴클레오좀 DNA가 뉴클레오좀을 감싸고 이 뉴클레오좀들 사이에서 절단되는 아폽토시스 과정에 의해 설명된다. 생성된 패턴은 혈장으로부터 단리된 cfDNA의 특징적인 크기 프로파일이다(도 17a). 아폽토시스를 겪지 않은 게놈 DNA는 특징적인 크기 프로파일을 나타내지 않는 대신에, 더 작은 단편 길이를 향해 편향된 크기 분포를 보인다.

[0667] *모세혈관 혈액*

[0668] 1회용 란셋으로 손가락을 찔러 손가락의 외측 원위 단부에서 피부를 침투하고 절개 부위에서 EDTA 수집 튜브 내로 채혈하는 단계를 포함하는 표준 모세혈관 채혈을 수행하였다. 혈장을 채혈한 지 20분 이내에 분리하였고 표준 cfDNA 추출을 수행하였다. 추출된 DNA의 서열분석은 정맥 혈액으로부터 유래한 cfDNA에 비해 상이한 단편 길이 분포를 보여주었다(도 17a). 상이한 샘플들 사이에 단편 길이 분포가 비교될 수 있게 하기 위해, 각각의 길이에 대한 카운트를 분포 방식으로 나누었다. 도 17b는 168 bp 피크보다 더 작은 단편 및 168 bp보다 더 큰 단편의 과다표시를 특징으로 하는, 모세혈관 혈액에 대한 프로파일을 보여준다.

[0669] (예를 들면, 추가 DNA의 오염 또는 기계적 응력에 의해) 채혈 과정이 짧은 단편 길이의 과다표시를 야기하였는지를 확인하기 위해, 피부로부터 추출된 DNA를 분석하였다.

[0670] *피부 표면으로부터의 DNA*

[0671] 본 발명자들은 피부 표면으로부터의 DNA를 측정하기 위해 물을 손가락 끝의 표면에 적용한 후 이를 채취하였다. 물의 적용 동안, 표면에 위치된 DNA는 물에 용해된다. 물 채취 후, DNA를 추출하고 서열분석하였다. 크기 프로파일은 보다 긴 단편 길이를 향한 꾸준한 감소와 함께 작은 단편 길이에서의 가장 높은 표시를 보여준다(도 18a). 이 단편화 크기 패턴은 뉴클레오좀에 의한 분해로부터 보호되지 않은 DNA, 예컨대, 떨어져 나온 피부 세포로부터의 뉴클레오좀 DNA를 대표한다.

[0672] *세포 손상으로부터의 DNA*

[0673] 본 발명자들은 무세포 DNA 및 손상된 DNA를 함유하는 샘플을 (168 bp 피크보다 더 작은 단편 및 168 bp보다 더 큰 단편의 가능한 공급원으로서) 모델링하기 위해, 5번째 손가락의 원위 단부에서 국소 저산소혈증을 유도하여 세포 손상을 도입하였다. 일반적인 모세혈관 채혈과 유도된 세포 손상을 가진 모세혈관 채혈 사이의 단편화 길이 차이 사이의 차이를 조사함으로써 손상된 세포로부터의 DNA의 성분을 추정하였다. 각각의 단편 길이 빈의 비교 분석을 정맥 혈액에서의 그 빈의 표시로 정규화하였다. 손상된 세포의 단편 길이 분포는 정맥 혈액으로부터의 단편 길이 분포의 국소 최소치에서 최대화된다(도 18c 및 18d).

[0674] 특정 이론에 의해 구속받지는 않지만, 정맥 혈액에 비해 모세혈관 혈액에서의 단편 길이의 과다표시는 일반적인 cfDNA와 비-아폽토시스성 게놈 DNA의 혼합물이라는 가정과 일치한다. 비-아폽토시스성 게놈 DNA의 공급원은 란셋을 이용한 피부의 천공에 의해 도입된 세포 손상일 가능성이 높다.

[0675] **실시예 20. 예시적 오염 감소 방법**

[0676] 본 발명자들은 비-아폽토시스성 게놈 DNA의 기여에 대한 상이한 채취 방법의 영향을 조사하기 위해, 표준 손가락 찌르기 채혈 프로토콜을 본 발명자들이 최적화한 프로토콜과 비교하였다. 표준 프로토콜은 에탄올로 손가락 끝을 철저히 세정하는 단계, 일회용 란셋으로 피부를 천자하는 단계, 및 EDTA 용기 내로 채혈하는 단계를 포함한다(이하 "닦아내지 않는" 조건으로서 지칭됨). 최적화된 프로토콜에서, 혈액이 채취되기 전에 추가 단계를 수행한다. 피부를 일회용 란셋으로 천자한 후, 첫 번째 혈액 방울을 거즈 패드로 닦아낸다(이하 "닦아내는" 조건으로서 지칭됨). 이 첫 번째 방울 다음 혈액만이 EDTA 용기 내로 채취된다.

[0677] *방법*

[0678] 채취된 혈액을 혈장으로 처리하였고 채취한 지 2시간 이내에 DNA를 추출하였다. 실시간 PCR을 이용하여 DNA 양을 평가하였다. 단편 길이 분포를 ILMN 차세대 서열분석기 상에서 페어링된 말단 서열분석으로 확립하였다. 표준 방법을 이용하는 기준물로서 정맥 혈액을 채취하였다.

[0679] *DNA 양*

[0680] 닦아내지 않는 조건으로 채취된 샘플에 대한 DNA 양은 닦아내는 채취 프로토콜에 비해 대략 50% 더 높다. 더 높은 DNA 수율은 일반적으로 NIPT 분석에 유리한 것으로서 간주된다. 그러나, 단편 길이 분포의 분석은 닦아내지 않는 조건에서의 세포 손상을 시사하는, 단편 길이의 더 강한 과다표시를 보여주었다(도 19).

[0681] 임의의 특정 이론에 의해 구속되지는 않지만, 첫 번째 혈액 방울을 닦아내는 것은 세포 손상으로부터 유래한 DNA의 기여를 감소시킨다. 대안적으로 또는 추가적으로, 손상 및 오염으로부터 유래한 DNA라는 문제점에 대한 해법은 (1) 더 긴 DNA 단편에 대해 선택하는 포획 방법, (2) 전기영동 방법, (3) 라이브러리 생성물의 크기별 선택, 및 (4) 크기 정보를 기반으로 설명/제거하거나 차등적으로 분석하는 생물정보학 방법을 포함한다.

[0682] **실시예 21. 초저 투입량의 순환 cfDNA(10 게놈 당량)를 사용하는 낮은 커버리지 전체 게놈 합성에 의한 서열분석을 이용한 태아 염색체 이수성의 검출**

[0683] 접촉 활성화 란셋(BD Microtainer)을 이용한 손가락 끝 모세혈관 층 천공 및 SAFE-T_FILL 모세혈관 채취 장치(KABE Labortechnik, GMBH) 내로의 채혈을 통해 전혈을 채취한다. 다음과 같이 이중 회전 원심분리를 통해 모세혈관 혈액을 혈장으로 처리한다:

[0684] 1. 회전 1 - 20분 동안 1330 rpm

[0685] 2. 회전 2 - 10분 동안 3300 rpm

[0686] 혈장을 신선한 상태로 처리하고 사용할 때까지 4℃ 또는 -80℃에서 저장하였다.

[0687] 그 다음, 상자성 비드 프로토콜을 이용하여 10 ㎕의 혈장으로부터 순환 무세포 DNA를 추출하였다. 단리는 하기 단계들로 구성되었다:

[0688] 1. 용해/결합을 위해 교반하면서 10분 동안 실온에서 혈장을 용해 완충제 및 비드와 함께 인큐베이션하는 단계.

[0689] 2. 비드/ccfDNA 복합체를 세척 용액 1로 세척하는 단계.

[0690] 3. 비드/ccfDNA 복합체를 세척 용액 2로 세척하는 단계.

[0691] 4. 5분 동안 실온에서 인큐베이션하여 비드(20 ㎕)로부터 ccfDNA를 용출하는 단계.

[0692] 추출된 DNA를 라이브러리 생성용 투입물로서 사용하였다. 일루미나용 NEBNext 다중체 올리고(인덱스 세트 프라이머 1)를 가진 NEBNext Ultra II DNA 라이브러리 제조 키트(New England Biolabs)를 사용하여 DNA 라이브러리를 제조하였다. 라이브러리 제조는 하기 단계들로 구성되었다:

[0693] 1. 20℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후 65℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 말단 복구, 5'-인산화 및 A-테일링을 수행하는 단계.

[0694] 2. 20℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 어댑터를 라이게이션한 후, 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 라이게이션된 어댑터 루프를 절단하는 단계. 어댑터를 0.6 μM 작업 농도까지 1:25 희석하였다. 이어서, 절단된 어댑터 라이게이션된 라이브러리를, SPRISelect 비드를 사용하는 비드 기반 정제로 처리하였다. 어댑터 라이게이션 후, 고도로 단편화된 저농도 ccfDNA의 결합을 더 향상시키기 위해 비드의 부피를 116 ㎕까지 증가시켰다.

[0695] 3. 1분 동안 98℃에서 초기 변성시킨 후, 10초 동안 98℃ 변성 및 75초 동안 65℃ 어닐링/연장의 15 주기를 수행한 다음, 5분 동안 65℃에서 최종 연장시켜 라이브러리 증폭/인덱싱을 수행하는 단계. 그 다음, SPRISelect 비드(45 ㎕)를 사용하여 증폭된 라이브러리를 정제하였다.

[0696] 고감도 DNA 칩을 가진 아질런트 생물분석기 2100(Agilent Technologies)을 이용하여 모든 라이브러리들을 크기 분류하고 특징규명하였다. 서열분석 전에 라이브러리 희석을 위해 Qubit v3.0(Life Technologies)을 사용하여 농도를 측정하였다. 각각의 라이브러리를 2 nM의 농도로 정규화하였고 서열분석 전에 변성 및 희석을 위해 풀링하였다. 1.5 pM의 로딩 농도에서 일루미나 NextSeq 550을 이용하여 합성에 의한 서열분석을 수행하였다. 각각의 인덱스/샘플에 대해 75 주기 페어링된 말단 서열분석(2x75)을 수행하였다. 이 샘플 세트에 대한 중앙값 서열분석 카운트는 6.4M 페어링된 서열 리드 통과 필터이었다. 정렬 파라미터 "-k 1-n 0"을 가진 Bowtie를 이용하여 인간 기준 게놈 빌드 hg38에 대해 모든 서열분석 데이터(fasta.gz files)를 정렬하였다. 추가 분석을 위해, 인간 게놈을 50 kb 빈으로서도 지칭되는 연속 50,000개의 염기쌍 영역들로 나누었고, 소수점 이하 3자리까지의 정확도로 각각의 빈에 대해 염기 "G" 및 "C"의 분획을 계산하였다. 각각의 빈에 대해, 빈에서 시작되는 정렬된 서열 리드를 카운팅하였다. 추가 분석을 위해, 1번 내지 22번 염색체(예를 들면, X 염색체 및 Y 염색체는 배제되었음)에 없는 빈을 여과하여 데이터를 감소시켰다. 이 여과 후, 빈당 GC 함량과 리드 카운트 사이의 Loess 회귀를 수행하였고, 중앙값 빈 카운트를 계산하였다. Loess 회귀는 예측 값으로서도 지칭되는, 각각의 GC 함량 값에 대한 예측 빈 카운트를 제공하였다. 이 예측 값을 중앙값 빈 카운트로 나누어 보정계수를 구하였다. 이어서, 측정된 빈 카운트를 보정계수로 나누어 GC 보정 빈 카운트를 제공하였고, GC 보정 빈 카운트의 중앙값을 계산하였다. 모든 50 kb 빈을 중앙값 GC 보정 빈 카운트로 나누어 GC 정규화 빈 카운트를 제공하였고, 각각의 빈에 대해 중앙값 및 중앙값 절대 편차(MAD)를 계산하였다. 낮은 MAD 및 1의 예측 값 근처의 중앙값을 가진 빈을 선택하였다(모든 MAD 빈 값들의 95번째 백분위수 이상의 MAD를 가진 빈을 여과하였고; 모든 중앙값 빈 값들의 5번째 백분위수 이하 또는 95번째 백분위수 이상의 중앙값을 가진 빈을 여과하였다).

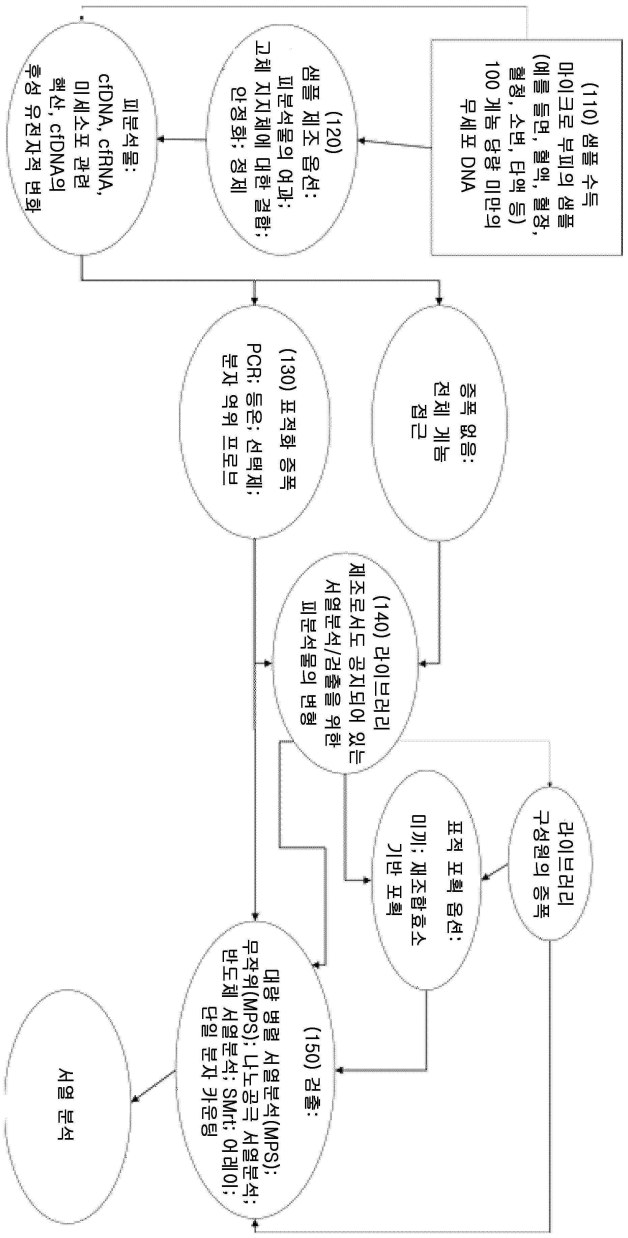
[0697] 감소되고 정규화된 데이터로부터, 21번 염색체로부터 유래한 모든 서열 빈들을 확인하였다. 21번 염색체로부터 유래한 빈에 대한 모든 GC 정규화 값들을 합산하고 합계를, 21번 및 19번 염색체(뿐만 아니라 초기 단계에서 이미 배제된 다른 염색체, 예를 들면, 1번 내지 22번 이외의 X 및 Y 염색체)로부터 유래한 빈의 GC 정규화 값을 제외한 모든 GC 정규화 값들의 합계로 나눔으로써, 21번 염색체로부터 유래한 서열 리드의 퍼센트 표시를 계산하였다. 그 다음, 21번 염색체 표시의 중앙값 및 MAD를 공지된 정배수체 샘플(기준 샘플) 세트로부터 계산하였다. 각각의 샘플에 대해, 샘플 특이적 21번 염색체 표시로부터 (기준 세트로부터 수득된) 중앙값 21번 염색체 표시를 차감하여, 샘플 특이적 차이를 얻었다. 이 샘플 특이적 차이를 (기준 세트로부터 수득된) 21번 염색체 표시 MAD로 나누어, Z 점수로서 지칭되는 값을 제공하였다. 이어서, 검사 샘플들을 그들의 Z 점수를 기준으로 분류하였는데, 이때 3.5 이상의 Z 점수를 가진 샘플은 삼염색체증으로서 분류되었고, 3.5 미만의 Z 점수를 가진 샘플은 정배수체로서 분류되었다. 도 20을 참조한다. 정배수체를 임신한 것으로 추정되는 개체로부터 16개의 샘플들을 수득하였고 삼염색체증 21을 가진 태아를 가진 것으로 확인된 여성으로부터 8개의 샘플들을 수득하였다. 정배수체인 것으로 추정된 모든 16개의 샘플들은 정배수체로서 분류되었고, 삼염색체증 21로 확인된 모든 8개의 샘플들은 삼염색체증 21로서 분류되었다. 이것은 이 데이터세트에 대한 100%의 민감도 및 100%의 특이성을 제공하였다.

[0698] 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트의 바람직한 실시양태들이 본원에 제시되고 기재되어 있지만, 이러한 실시양태들이 단지 예로써 제공된다는 것은 해당 기술 분야에서 당업자에게 자명할 것이다. 본원에 개시된 장치, 시스템 및 키트로부터 벗어나지 않으면서 다수의 변경예, 변화예 및 대체예가 해당 기술 분야에서 당업자에게 인

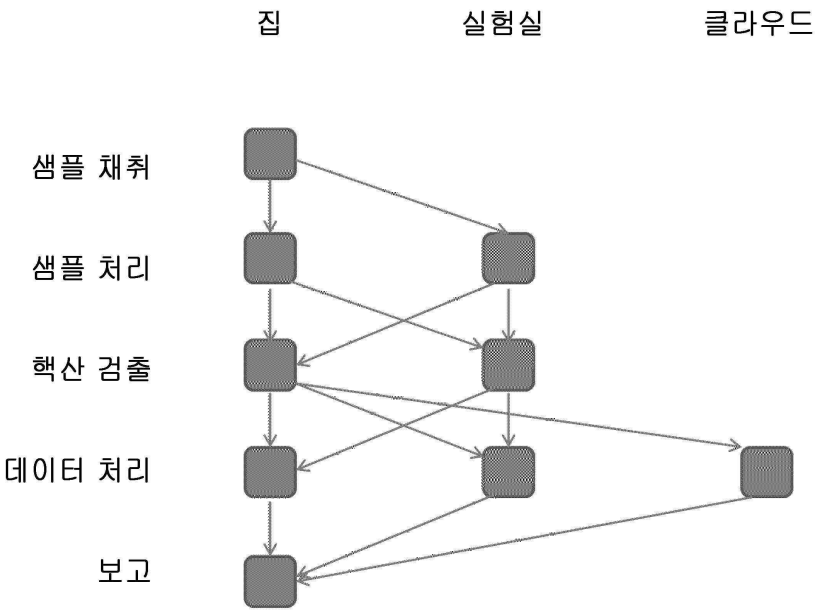
식될 것이다. 본원에 기재된 장치, 시스템 및 키트의 실시양태들의 다양한 대안이 발명적 개념을 실시하는 데 이용될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 하기 청구범위는 장치, 시스템 및 키트의 범위를 정의하고 이 청구범위 및 이의 균등물의 범위 내에 있는 방법 및 구조는 그 범위에 의해 커버된다.

도면

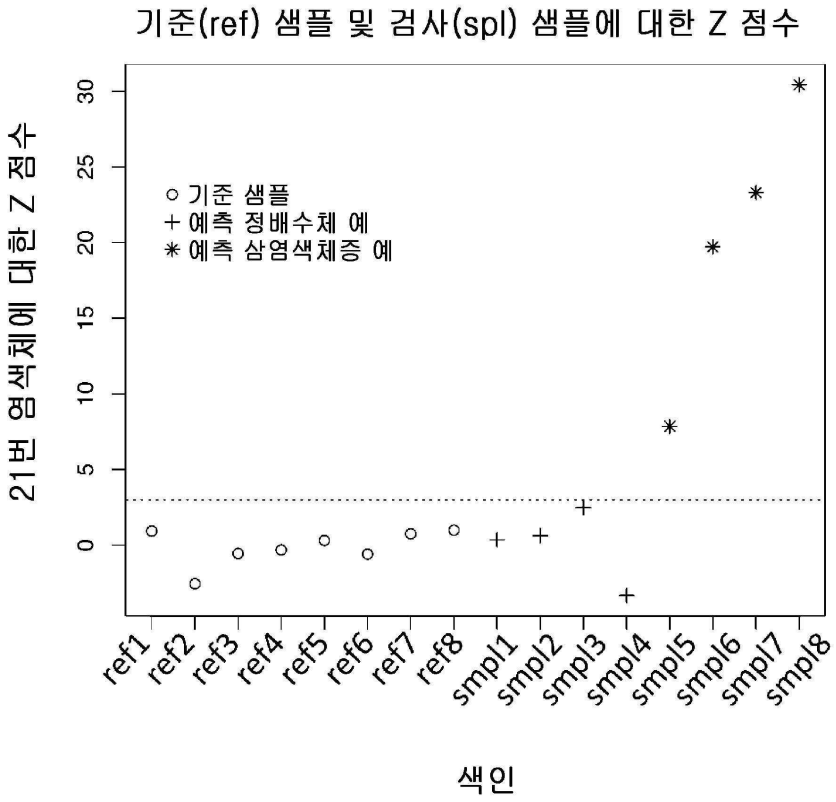
도면1



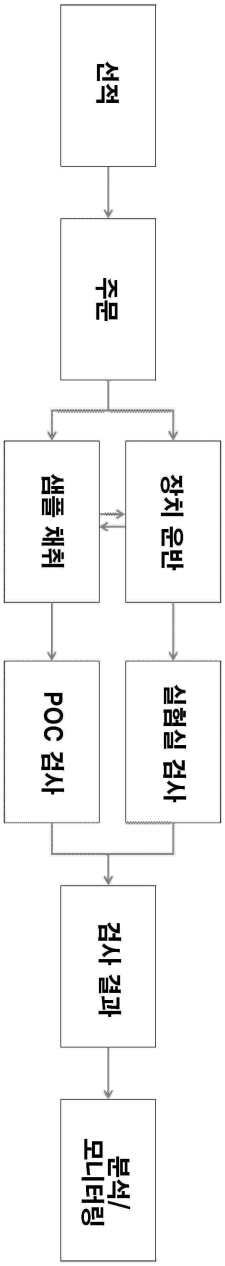
도면2


집
실험실
클라우드
샘플 채취
샘플 처리
핵산 검출
데이터 처리
보고

도면3


기준(ref) 샘플 및 검사(spl) 샘플에 대한 Z 점수
21번 염색체에 대한 Z 점수
○ 기준 샘플
+ 예측 정배수체 예
✳ 예측 삼염색체증 예
0
5
10
15
20
25
30
ref1
ref2
ref3
ref4
ref5
ref6
ref7
ref8
spl1
spl2
spl3
spl4
spl5
spl6
spl7
spl8
색인

도면4a



도면4b


Dr. Jane Doe
상태 대시보드
Claudia
상태 대시보드
메시지
검사 이력
신체 활동
음식 일지
일정
상담
환자군
보험
지불
추천
추정 검사 비용
$200
예상 완료
3일
다음 예약
9/10/19
동기화 상태
Dx 장치
아이폰 건강 데이터
EHR 데이터베이스
샘플 상태: 실험실 도착
DNA 준비
완료
라이브러리 제조
완료
서열분석
진행중
데이터 분석
결과 보고
바이오메트릭 : 심박수(분당 박동)
100
80
60
40
20
0
1일째 날
2일째 날
3일째 날
유전자 검사: 비침습적 산전 검사 ("NIPT")
NIPT는 엄마로부터의 혈액 샘플을 사용하여, 아기의 건강에 영향을 미칠 수 있는 다운 증후군과 같은 특정 염색체 병태에 대해 태반으로부터의 DNA를 분석한다. 임신 동안, 아기의 유전 정보를 가진, 태반으로부터의 DNA 중 일부는 엄마의 혈류 내로 통과한다.
더 알아보기
MacBook Pro

도면5a


아이디어
각각의 개체에 맞춰진
개인적인 사용자 경험
간단함
단계별 지시 및 안심을
제공하는 앱 안내 과정
Welcome!
Sign In
콘텐트 플랫폼
유익하고, 재미있고 접근
가능한 추가 컨텐트에
대한 플랫폼
공유
결과 공유, 타인과 연결,
또는 당신의 발전 추적

도면5b



도면5c



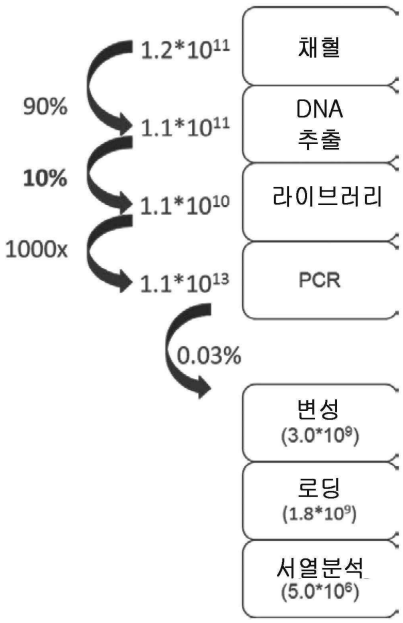
도면5d



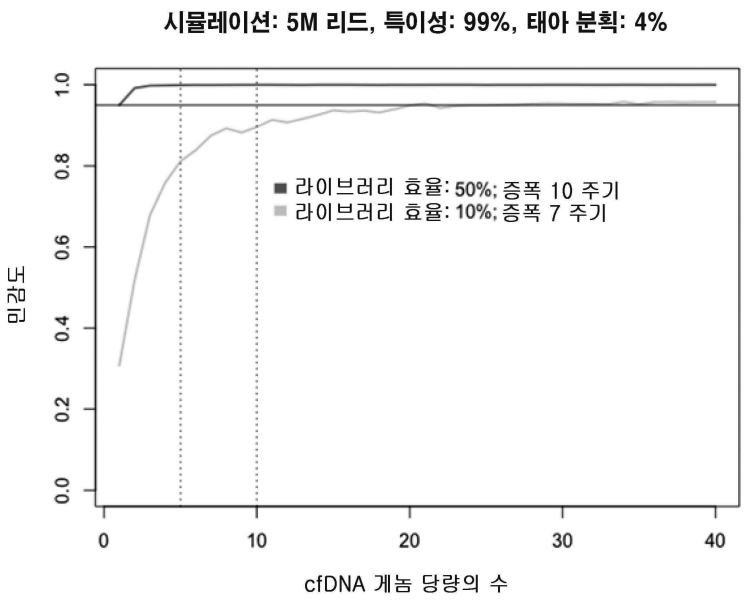
도면5e



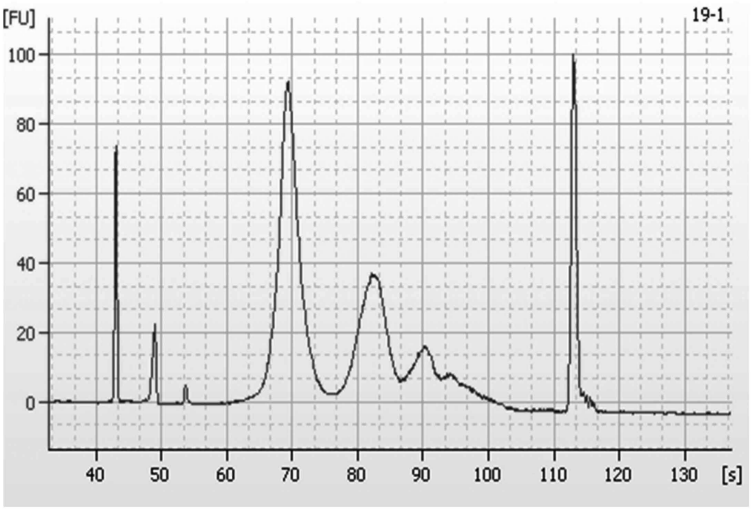
도면6


1.2*10^11
채혈
90%
1.1*10^11
DNA
추출
10%
1.1*10^10
라이브러리
1000x
1.1*10^13
PCR
0.03%
변성
(3.0*10^9)
로딩
(1.8*10^9)
서열분석
(5.0*10^6)

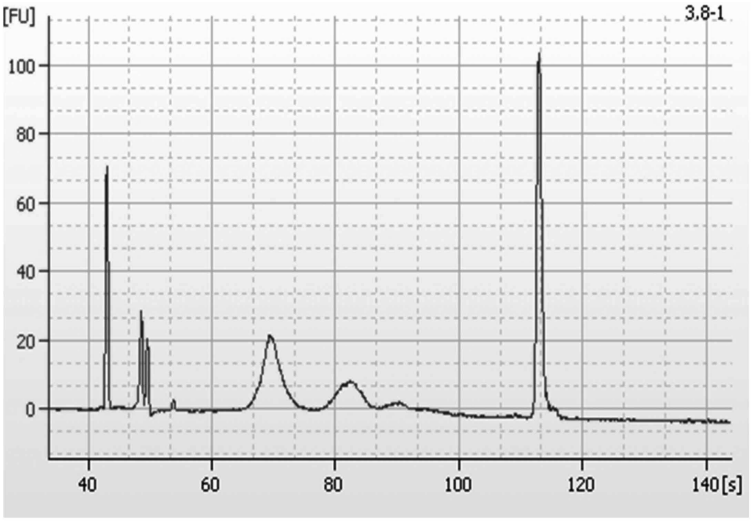
도면7


시뮬레이션: 5M 리드, 특이성: 99%, 태아 분획: 4%
라이브러리 효율: 50%; 증폭 10 주기
라이브러리 효율: 10%; 증폭 7 주기
밀도
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
10
20
30
40
cfDNA 게놈 당량의 수

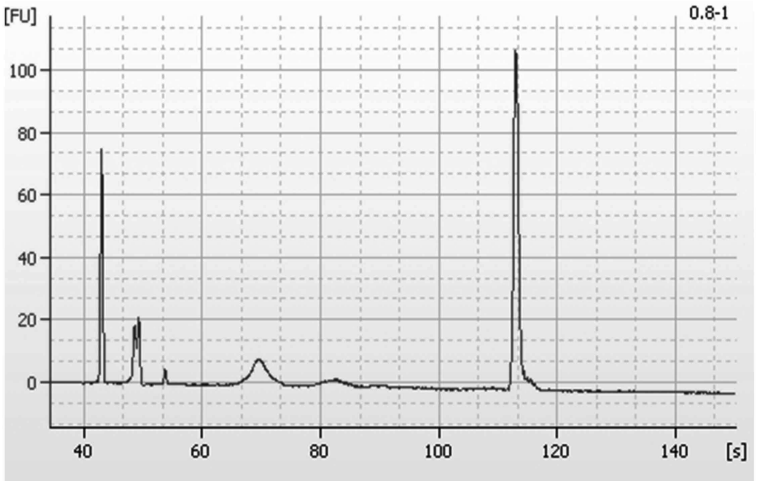
도면8a



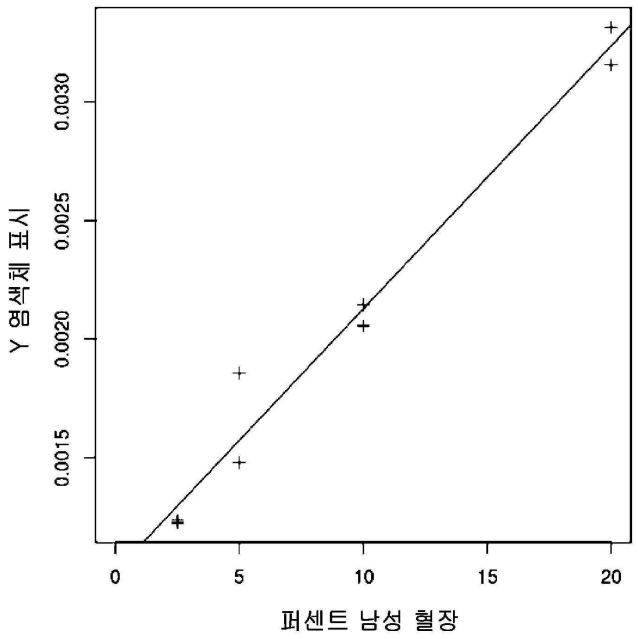
도면8b



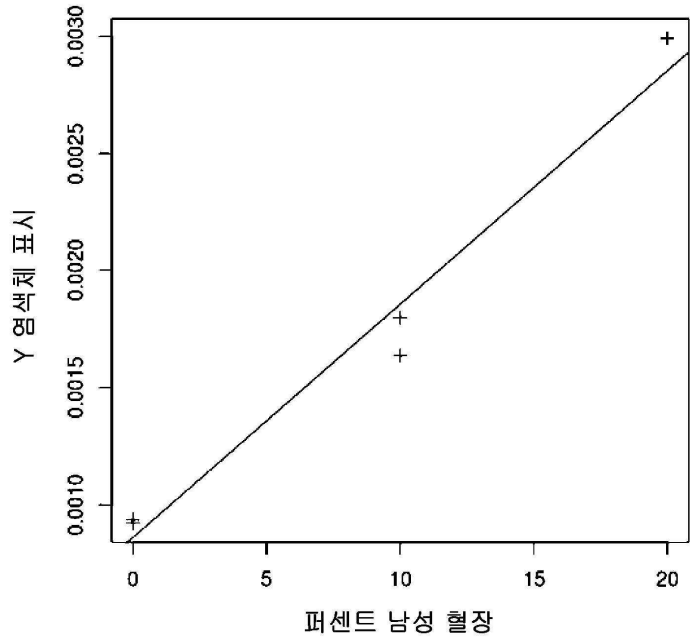
도면8c



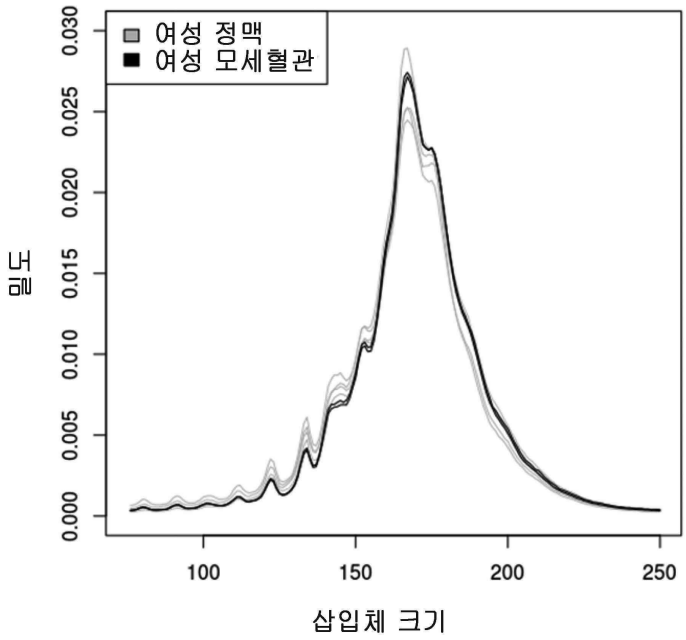
도면9


Y 염색체 표시
0.0015
0.0020
0.0025
0.0030
0
5
10
15
20
퍼센트 남성 혈장

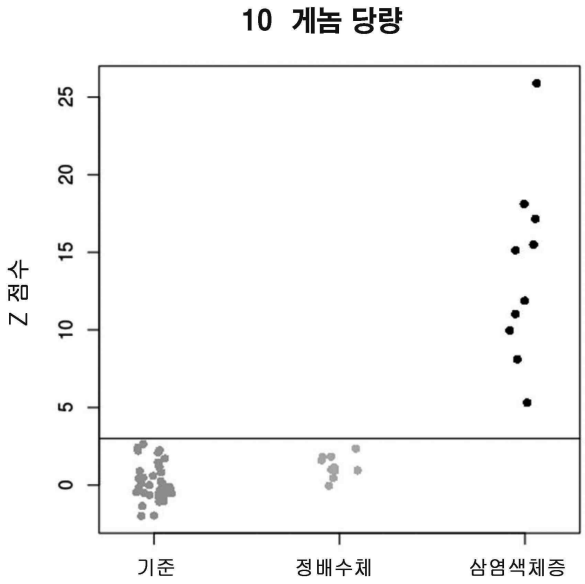
도면10


Y 염색체 표시
0.0010
0.0015
0.0020
0.0025
0.0030
0
5
10
15
20
퍼센트 남성 혈장

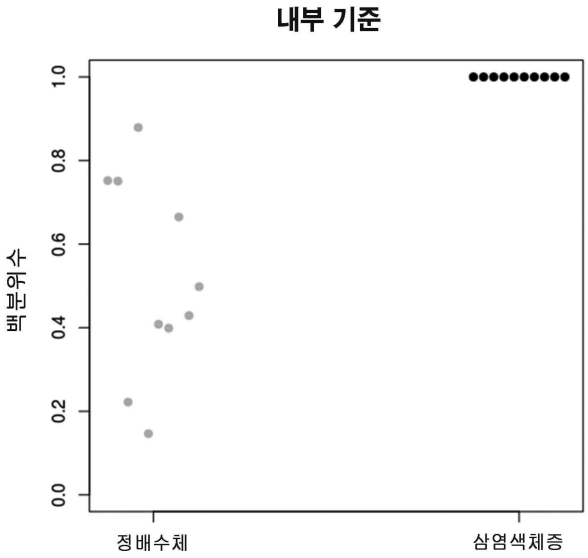
도면11


여성 정맥
여성 모세혈관
밀도
0.000
0.005
0.010
0.015
0.020
0.025
0.030
100
150
200
250
삽입체 크기

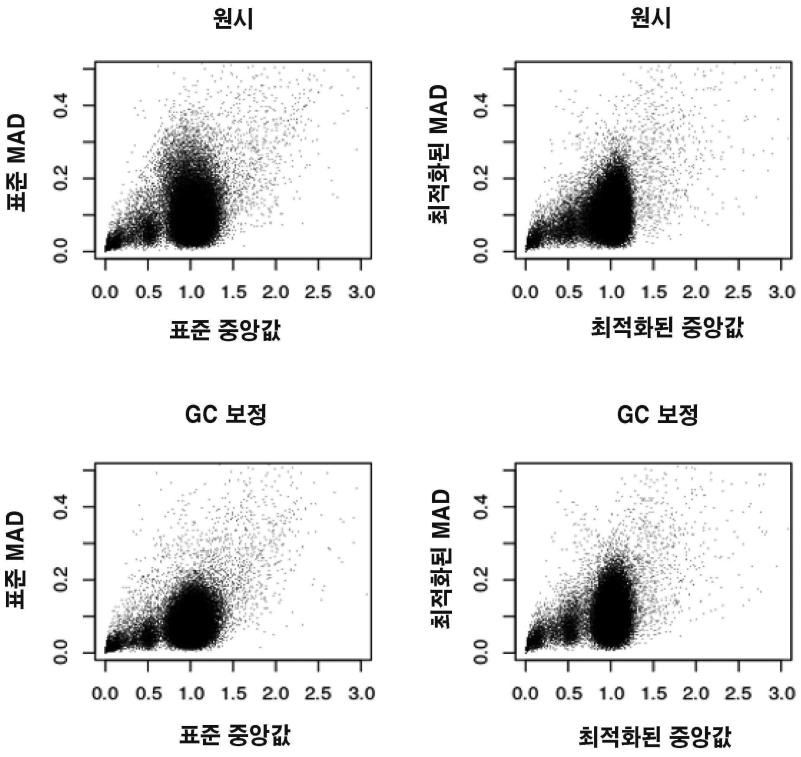
도면12


10 게놈 당량
Z 점수
0
5
10
15
20
25
기준
정배수체
삼염색체증

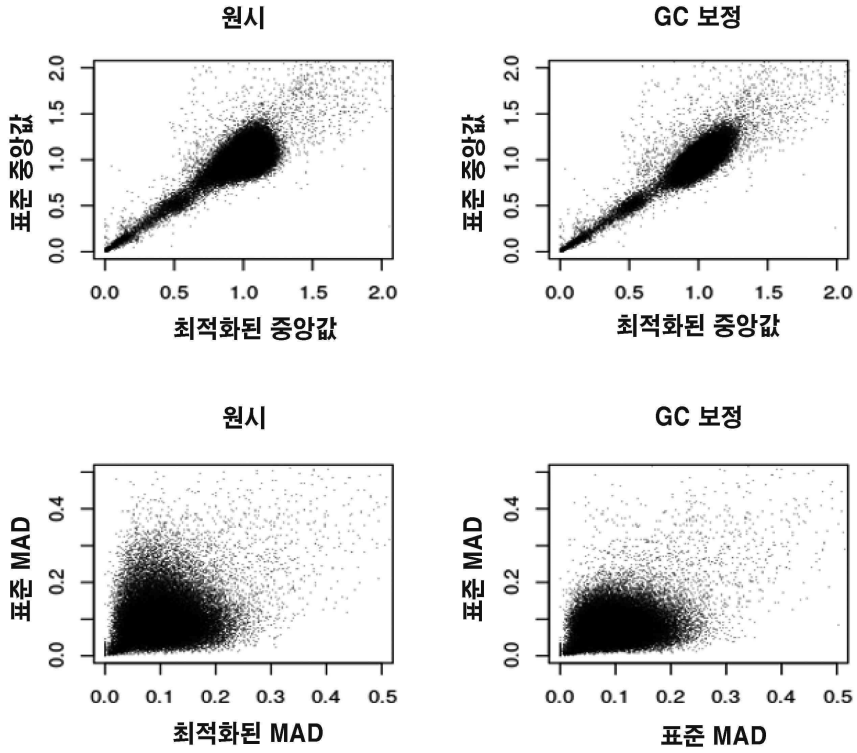
도면13


내부 기준
백분위수
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
정배수체
삼염색체증

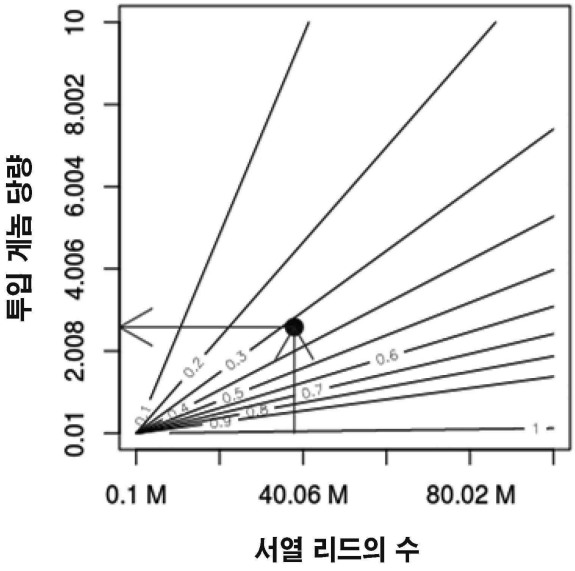
도면14a


원시
표준 MAD
표준 중앙값
원시
최적화된 MAD
최적화된 중앙값
GC 보정
표준 MAD
표준 중앙값
GC 보정
최적화된 MAD
최적화된 중앙값
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0
0.0 0.2 0.4

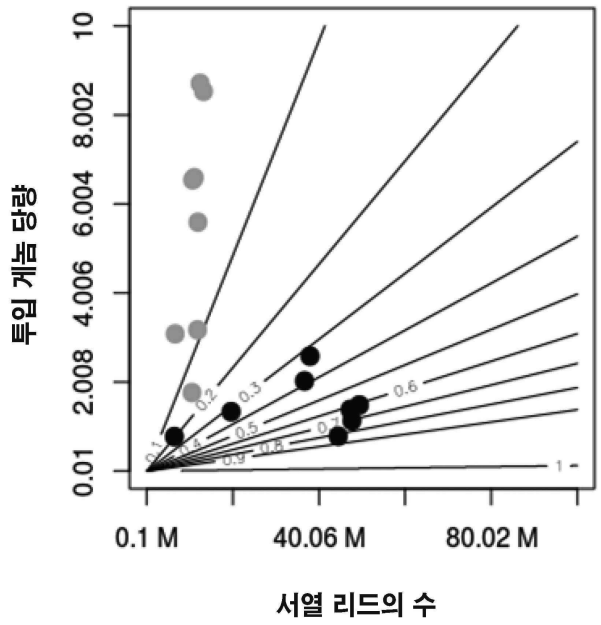
도면14b


원시
GC 보정
표준 중앙값
최적화된 중앙값
원시
GC 보정
표준 MAD
최적화된 MAD
표준 MAD

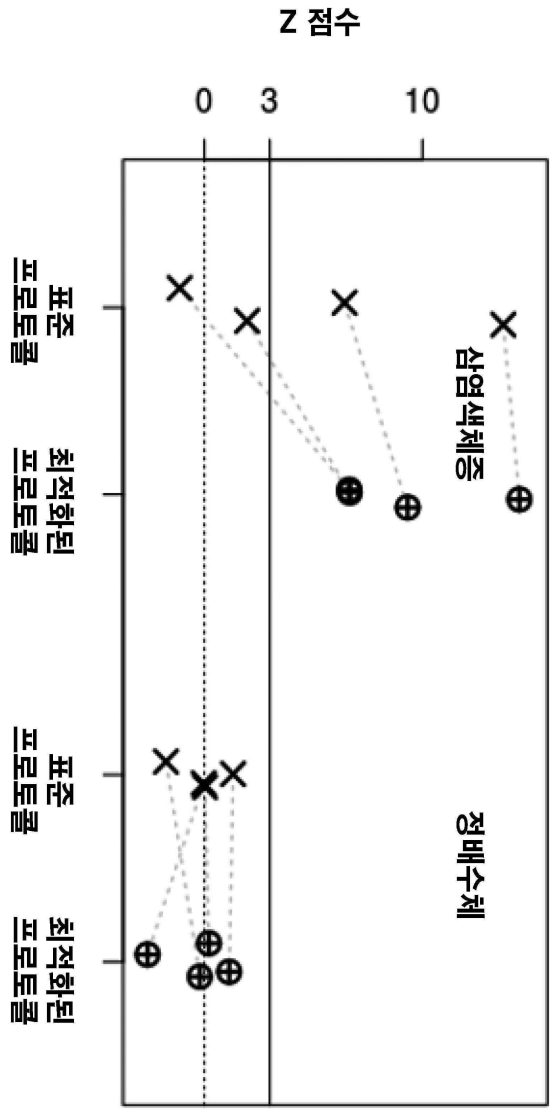
도면14c


투입 게놈 당량
0.01
2.008
4.006
6.004
8.002
10
0.1 M
40.06 M
80.02 M
서열 리드의 수

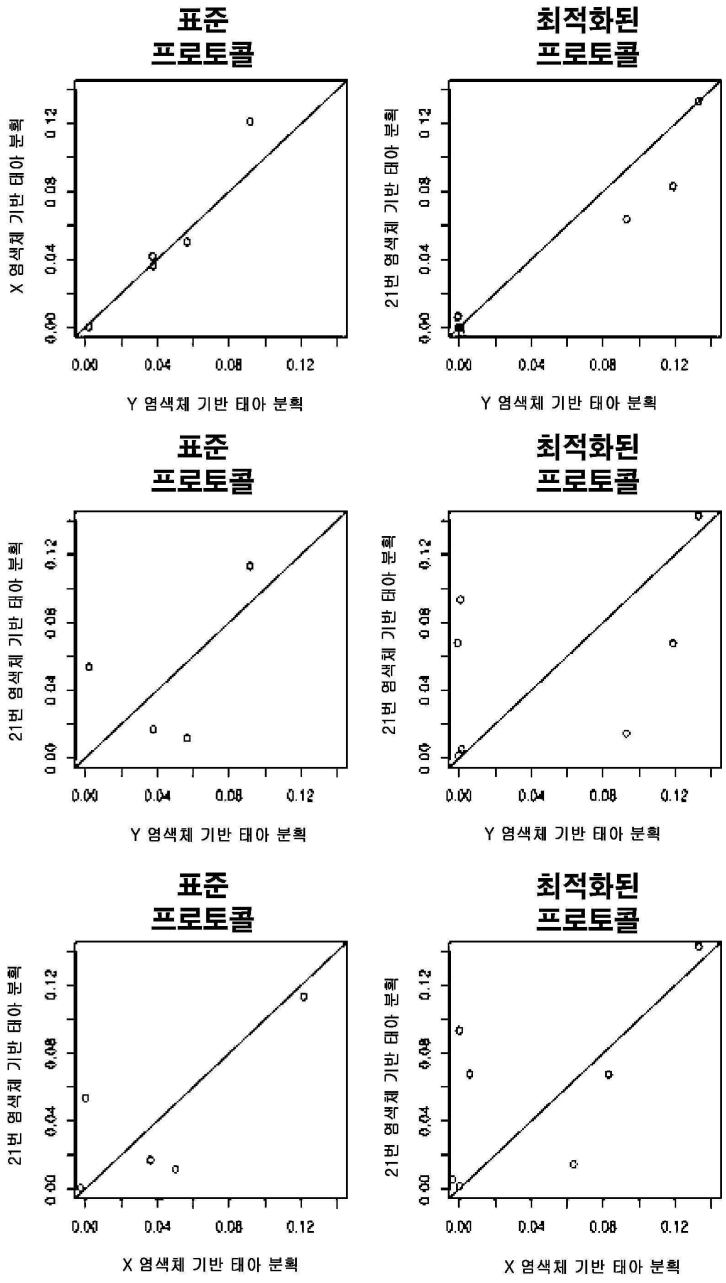
도면14d


투입 게놈 당량
0.01
2.008
4.006
6.004
8.002
10
0.1 M
40.06 M
80.02 M
서열 리드의 수
0.2
0.3
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1

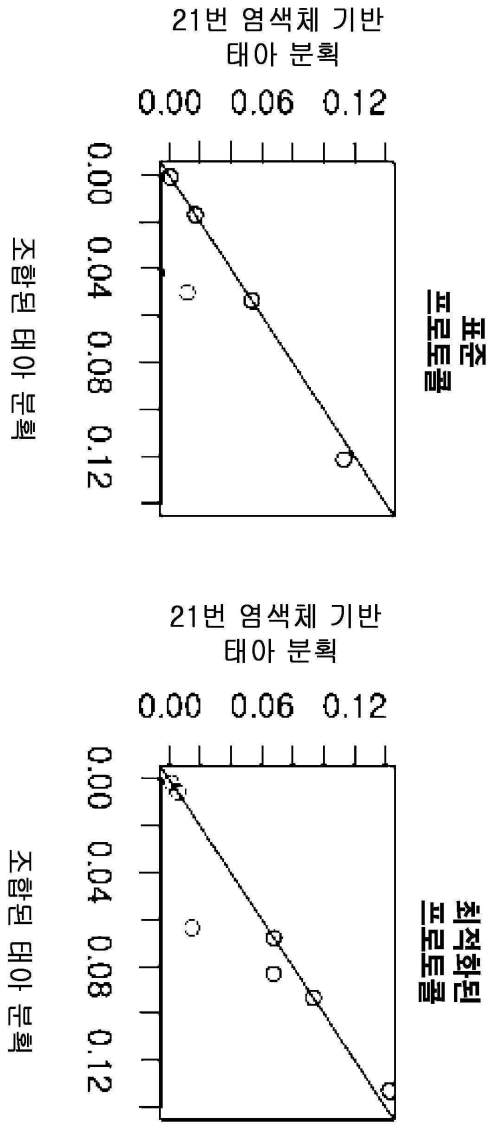
도면14e



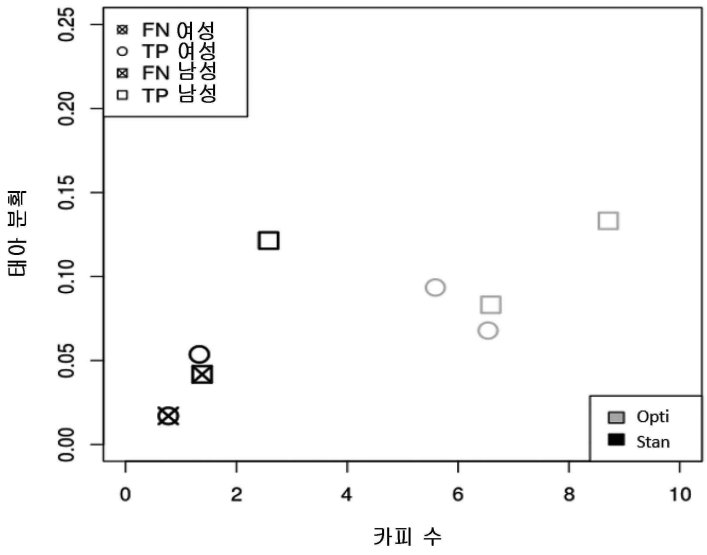
도면14f


표준
프로토콜
최적화된
프로토콜
X 염색체 기반 태아 분획
21번 염색체 기반 태아 분획
Y 염색체 기반 태아 분획
0.00
0.04
0.08
0.12

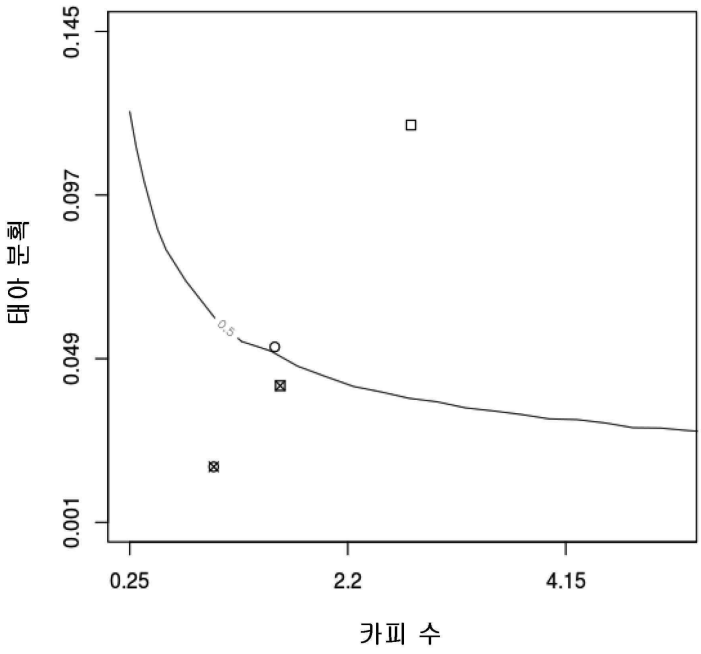
도면14g


21번 염색체 기반
태아 분획
0.00 0.06 0.12
0.00 0.04 0.08 0.12
조합된 태아 분획
표준 프로토콜
21번 염색체 기반
태아 분획
0.00 0.06 0.12
0.00 0.04 0.08 0.12
조합된 태아 분획
최적화된 프로토콜

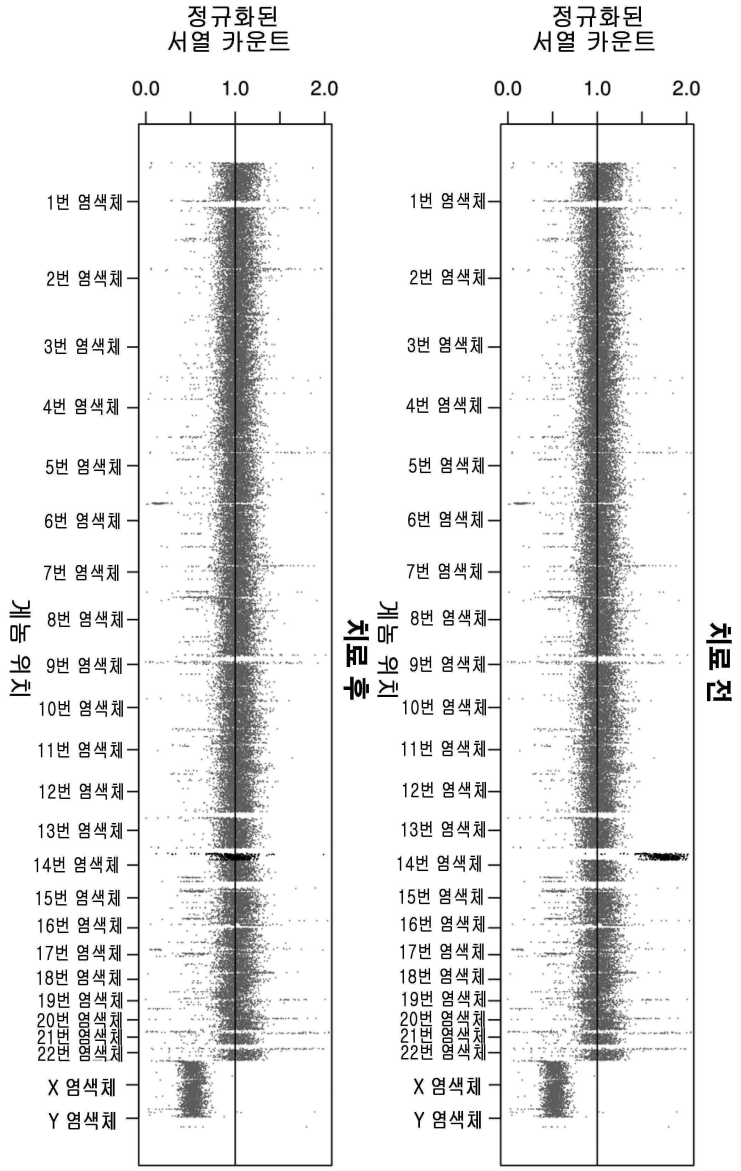
도면14h


FN 여성
TP 여성
FN 남성
TP 남성
Opti
Stan
태아 분획
0.00 0.05 0.10 0.15 0.20 0.25
0 2 4 6 8 10
카피 수

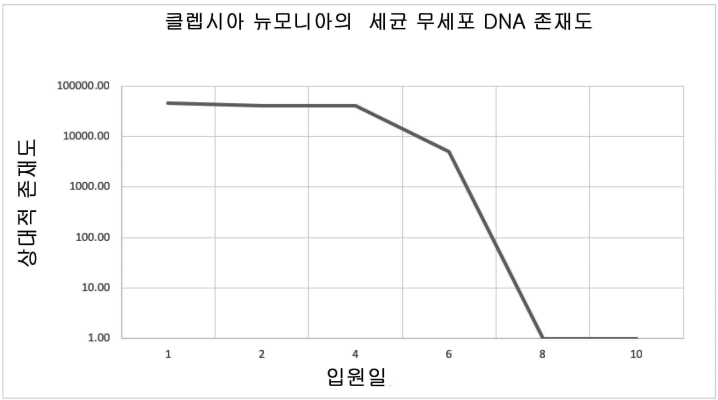
도면14i



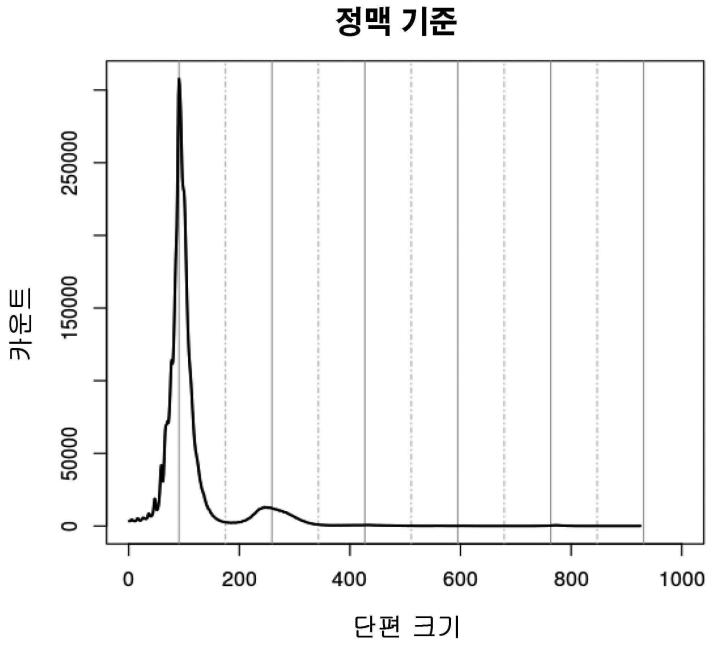
도면15


정규화된
서열 카운트
0.0
1.0
2.0
1번 염색체
2번 염색체
3번 염색체
4번 염색체
5번 염색체
6번 염색체
7번 염색체
8번 염색체
9번 염색체
10번 염색체
11번 염색체
12번 염색체
13번 염색체
14번 염색체
15번 염색체
16번 염색체
17번 염색체
18번 염색체
19번 염색체
20번 염색체
21번 염색체
22번 염색체
X 염색체
Y 염색체
게놈 위치
치료 후
치료 전

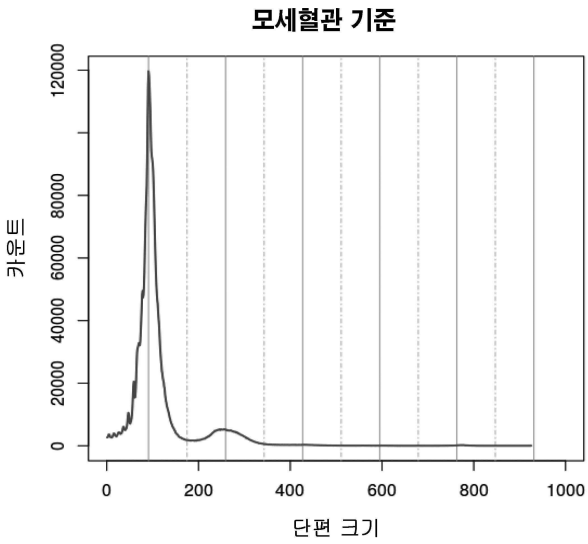
도면16


클렙시아 뉴모니아의 세균 무세포 DNA 존재도
상대적 존재도
100000.00
10000.00
1000.00
100.00
10.00
1.00
1
2
4
6
8
10
입원일

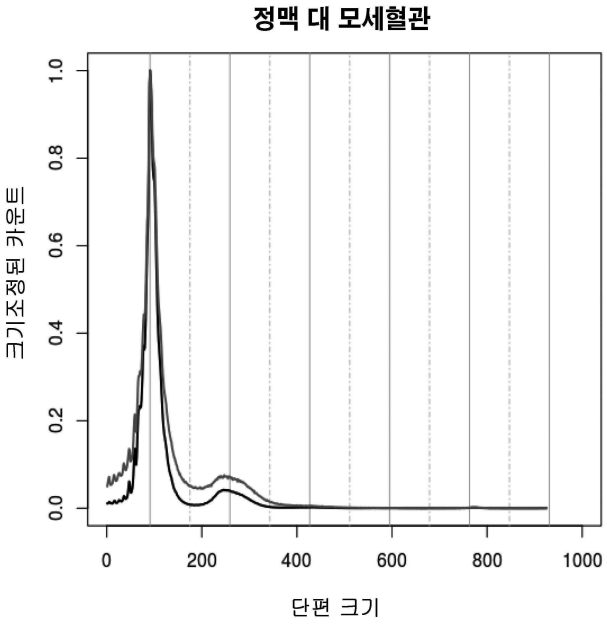
도면17a


정맥 기준
카운트
0
50000
150000
250000
0
200
400
600
800
1000
단편 크기

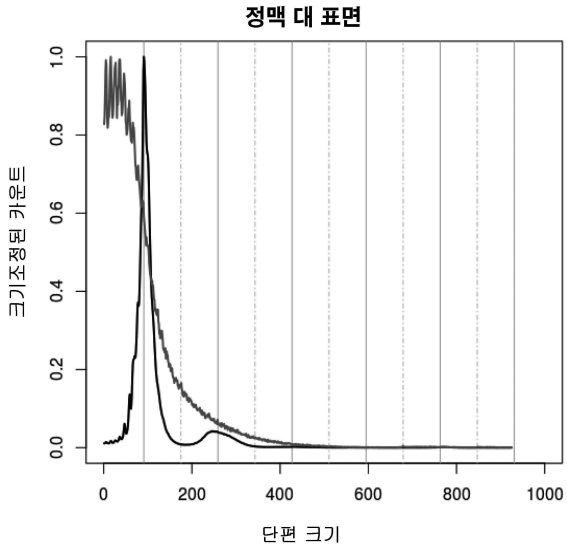
도면17b


모세혈관 기준
카운트
0
20000
40000
60000
80000
120000
0
200
400
600
800
1000
단편 크기

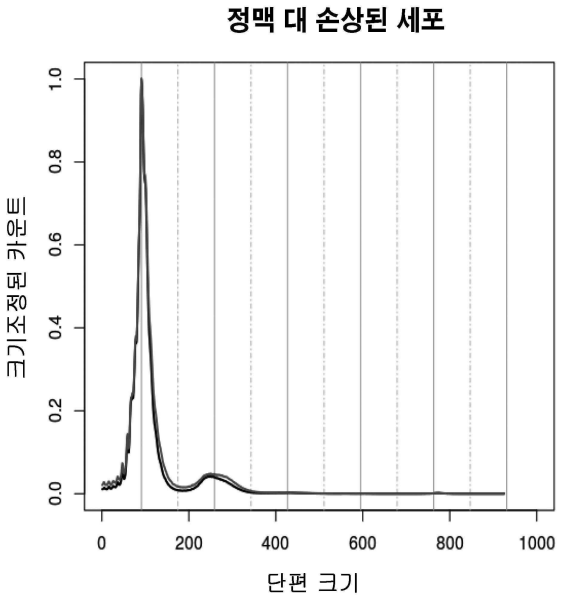
도면18a


정맥 대 모세혈관
크기조정된 카운트
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
200
400
600
800
1000
단편 크기

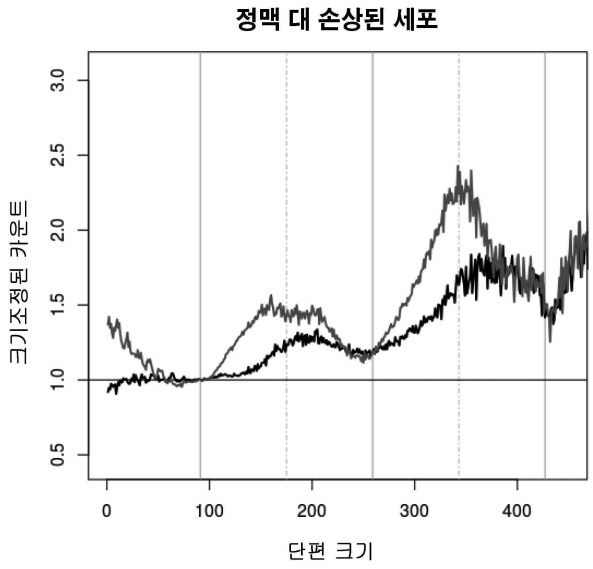
도면18b


정맥 대 표면
크기조정된 카운트
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
200
400
600
800
1000
단편 크기

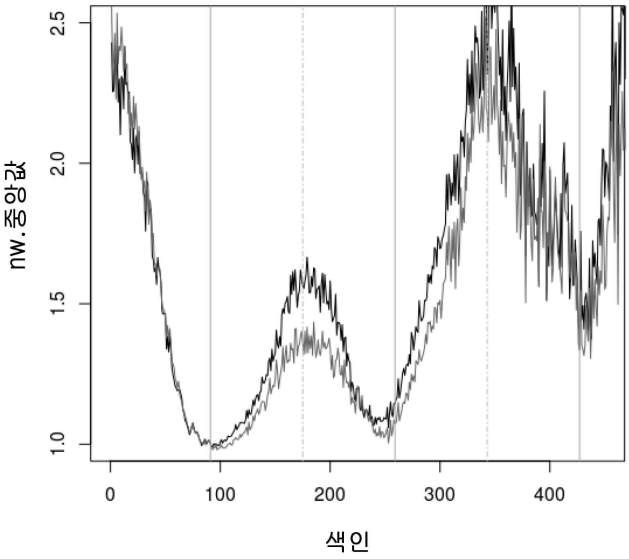
도면18c


정맥 대 손상된 세포
크기조정된 카운트
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
200
400
600
800
1000
단편 크기

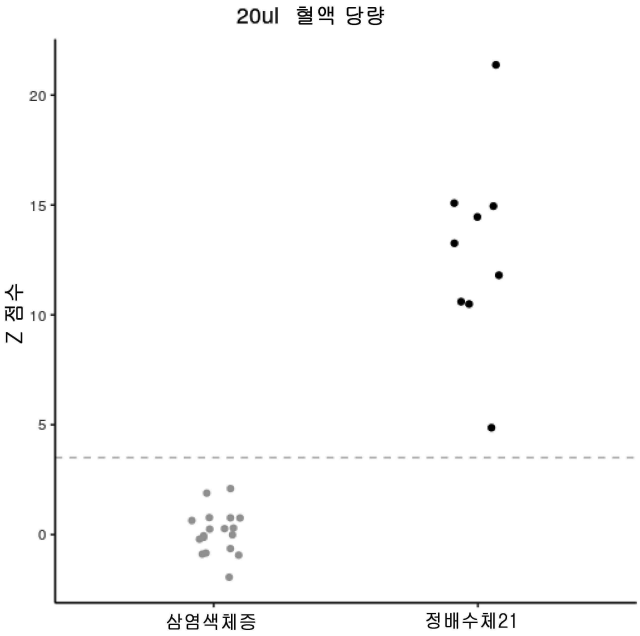
도면18d


정맥 대 손상된 세포
크기조정된 카운트
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
0
100
200
300
400
단편 크기

도면19


nw.중앙값
2.5
2.0
1.5
1.0
0
100
200
300
400
색인

도면20


20ul 혈액 당량
Z 점수
20
15
10
5
0
삼염색체증
정배수체21