



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0004397
(43) 공개일자 2024년01월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6827 (2018.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12Q 1/6837 (2018.01) C12Q 1/6876 (2018.01)
C40B 70/00 (2015.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6827 (2018.05)
C12N 15/1065 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7037356
(22) 출원일자(국제) 2022년03월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년10월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/022640
(87) 국제공개번호 WO 2022/212574
국제공개일자 2022년10월06일
- (30) 우선권주장
63/167,914 2021년03월30일 미국(US)
63/311,041 2022년02월16일 미국(US)
- (71) 출원인
레졸루션 바이오사이언스, 인크.
미국 98033 워싱턴주 커클랜드 스위트 200 커클랜드 웨이 550
- (72) 발명자
구오, 지안난
미국 98033 워싱턴 커클랜드 스위트 200 커클랜드 웨이 550 레졸루션 바이오사이언스, 인크. 내
헛천, 캐롤린
미국 98033 워싱턴 커클랜드 스위트 200 커클랜드 웨이 550 레졸루션 바이오사이언스, 인크. 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상남

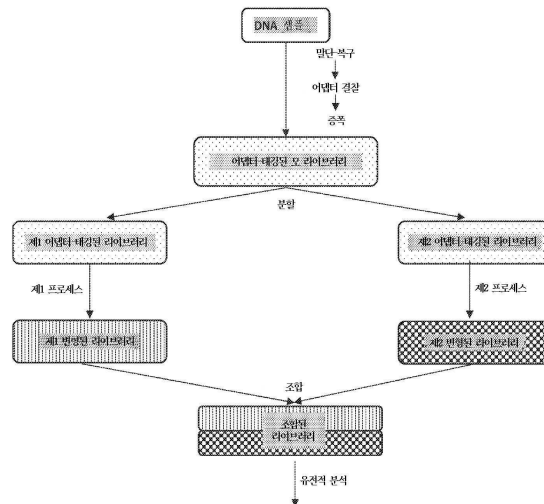
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 다중 라이브러리의 동시 유전자 분석을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 개시내용은 LPWG 라이브러리 및 표적-풍부 라이브러리를 포함하는 조합된 라이브러리와 같은 다양한 접근법에 대해 생성된 상이한 라이브러리의 단일 풀에 대해 동시 유전자 분석을 수행함으로써 다양한 유전자 분석 방법의 이점을 조합하는 조성물 및 방법을 제공한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6837 (2018.05)

C12Q 1/6876 (2018.05)

C40B 70/00 (2013.01)

C12Q 2525/191 (2013.01)

C12Q 2531/113 (2013.01)

(72) 발명자

리, 마크

미국 98033 워싱턴 커클랜드 스위트 200 커클랜드

웨이 550 레졸루션 바이오사이언스, 인크. 내

림, 리

미국 98033 워싱턴 커클랜드 스위트 200 커클랜드

웨이 550 레졸루션 바이오사이언스, 인크. 내

페커, 이라

미국 98033 워싱턴 커클랜드 스위트 200 커클랜드
웨이 550 레졸루션 바이오사이언스, 인크. 내

차이, 첸-선

미국 98033 워싱턴 커클랜드 스위트 200 커클랜드
웨이 550 레졸루션 바이오사이언스, 인크. 내

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 포획 프로브 모듈을 포함하는 키트로서,

각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고;

상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 프로브 품질 관리(Quality Control: QC) 프로세스를 통과한, 키트.

청구항 2

어댑터 세트를 포함하는 키트로서,

각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함하고;

상기 어댑터 세트는 어댑터 품질 관리(QC) 프로세스를 통과한, 키트.

청구항 3

제1항에 있어서, 어댑터 세트를 추가로 포함하되, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함하는, 키트.

청구항 4

제2항에 있어서, 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 추가로 포함하되,

각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하는, 키트.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 어댑터 세트는 어댑터 품질 관리(QC) 프로세스를 통과한, 키트.

청구항 6

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 어댑터 QC 프로세스는 어댑터 결찰에 대한 테스트를 포함하되, 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트는,

(a) 상기 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(library of adaptor-tagged DNA fragment: LIBS)를 생성하는 단계; 및

(b) 상기 LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(Library Post Amplification: LPA)를 생성하는 단계

를 포함하고;

상기 어댑터 세트는 상기 LPA의 농도가 미리 결정된 농도보다 높을 때 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주되는, 키트.

청구항 7

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 어댑터 QC 프로세스는,

(a) 상기 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계;

(b) 인덱스 서열을 포함하는 적어도 하나의 프라이머를 포함하는 프라이머 쌍을 사용하여 상기 LIBS를 증폭시켜 인덱스 증폭 후 라이브러리(Library Post Index Amplification: LPIA)를 생성하는 단계; 및

(c) 상기 LPIA에 대한 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계

를 포함하는 어댑터 분포에 대한 테스트를 포함하되;

상기 어댑터 세트는 상기 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 상기 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주되는, 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 미리 결정된 허용 기준은,

- (a) 바코드 혼선(Barcode Crosstalk)은 리드(read)의 0.05% 내지 5% 이하로 존재하고;
 - (b) 미지의 어댑터는 리드의 1% 내지 50% 이하로 존재하고;
 - (c) 고유한 어댑터 서열의 10% 내지 80% 이하는 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 0% 내지 50%인 리드 수를 갖고;
 - (d) 모든 고유한 어댑터 서열의 적어도 60% 내지 99.9%가 존재하고; 그리고
 - (e) 고유한 어댑터 서열의 5% 내지 50% 이하는 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 2배보다 큰 리드를 갖는
- 것 중 하나 이상을 포함하는, 키트.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 어댑터 세트는 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트 및/또는 상기 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과하였을 때 상기 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 키트.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브 QC 프로세스는,

- (a) 어댑터 세트를 말단-복구된 DNA 단편을 포함하는 DNA 샘플에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계;
 - (b) 상기 LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계;
 - (c) 상기 LPA를 분할하거나 또는 희석하여 표적 포획 LPA(Target Capture LPA: TC LPA) 및 전체-게놈 LPA(Whole-Genome LPA: WG LPA)를 생성하는 단계;
 - (d) 상기 WG LPA를 증폭시켜 증폭된 전체-게놈 라이브러리(Whole-Genome Library Amplified: WGLA)를 생성하는 단계;
 - (e) 테스트할 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 상기 TC LPA에 혼성화하여 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계;
 - (f) 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 분리하여 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계;
 - (g) 상기 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 효율적으로 처리하여 하이브리드 분자를 생성하는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는 상기 포획 프로브 모듈 및 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함함);
 - (h) 상기 하이브리드 분자를 증폭시켜 증폭된 표적 포획 라이브러리(Target Capture Library Amplified: TCLA)를 생성하는 단계;
 - (i) 상기 WGLA와 상기 TCLA를 합하여 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(Sequence-Ready Library: SRL)를 형성하는 단계; 및
 - (j) 상기 SRL에 대해 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계
- 를 포함하는 포획 프로브 모듈에 대한 테스트를 포함하되;

상기 DNA 샘플은 복수의 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)을 포함하고;

상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 상기 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 상기 프로브 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 미리 결정된 허용 기준은,

- (a) 포획 프로브의 적어도 60% 내지 99.9%가 적어도 1개의 총 리드를 갖고;
- (b) 포획 프로브의 적어도 60% 내지 99.9%가 적어도 10개 내지 적어도 200개의 표적 적중 총 리드를 갖고; 그리고
- (c) DNA 샘플 내에서 예상되는 SNP의 적어도 60% 내지 99.9%가 검출되는 것 중 하나 이상을 포함하는, 키트.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍을 포함하되,

각 어댑터 모듈은 증폭 영역을 포함하고;

상기 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고;

제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하는, 키트.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍을 포함하되,

각 어댑터 모듈은 증폭 영역을 포함하고;

상기 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하는, 키트.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함하는, 키트.

청구항 15

키트로서,

(a) 어댑터 세트로서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함하는, 상기 어댑터 세트;

(b) 하나 이상의 포획 프로브 모듈로서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 상기 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함하는, 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈;

(c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍으로서, 상기 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고; 상기 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하는, 상기 제1 프라이머 쌍;

(d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍으로서, 상기 제2 F 프라이머 및 상기 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 상기 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않는, 상기 제2 프라이머 쌍

을 포함하는, 키트.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함하는, 키트.

청구항 17

제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 프라이머 쌍은 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되고, 상기 제2 프라이머 쌍은 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되며, 상기 제1 변형된 라이브러리 및 상기 제2 변형된 라이브러리는 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)로 조합되도록 구성되는, 키트.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리 및 상기 제2 변형된 라이브러리는 모두 상기 테스트 샘플로부터 생성되는, 키트.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리 또는 상기 제2 변형된 라이브러리는 상기 라이브러리 태그를 포함하되, 상기 라이브러리 태그는 상기 제1 변형된 라이브러리와 상기 제2 변형된 라이브러리를 구별하도록 구성되는, 키트.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 어댑터, 포획 프로브 모듈 및 상기 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 단편이고;

상기 제2 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 어댑터 및 상기 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 단편이고,

상기 제2 변형된 라이브러리의 어댑터-태깅된 DNA 단편 중 어느 것도 포획 프로브 모듈을 포함하지 않는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호참조

[0002] 본 출원은 2022년 2월 16일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/311,041호 및 2021년 3월 30일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/167,914호의 우선권을 주장하며, 두 기초출원은 모든 목적을 위해 전체가 참조에 의해 본 명세서에 인용된다.

[0003] 발명의 기술 분야

[0004] 본 발명은 유전자 분석을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0005] 서열 목록

[0006] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되고 전체가 참조에 의해 본 명세서에 인용되어 있는 서열 목록을 포함한다. 2022년 3월 28일에 생성된 상기 ASCII 사본은 이름이 CLFK_007_02W0_SeqList_ST25이고 크기가 약 21.4KB이다.

배경 기술

[0007] 차세대 시퀀싱(next generation sequencing: NGS)은 유전적 변화를 확인하기 위해 임상 환경에서 급속도로 널리 보급되고 있다. 약물의 표적이 될 수 있는 유전자 이상 및 예측 바이오마커의 수가 증가함에 따라, NGS 기술은 단일-유전자 테스트와 같은 기존의 기법을 광범위한 게놈 변형에 대한 동시 분석으로 점점 대체되어 왔다. NGS 접근법의 현재의 적용은 표적화된 유전자 패널 및 전체 게놈 시퀀싱을 포함하며, 대부분의 적용 분야에서는 두 가지 접근법 중 하나만을 활용하거나 또는 두 접근법을 동시에 진행하는 것을 선택한다. 단일 시퀀싱 분석에서 다양한 NGS 접근법에 특이적인 라이브러리를 결합시키는 기능은 각 접근법의 이점을 통합하여 데이터 품질, 비용 및 처리 시간을 개선할 것이다. 따라서, 다중 라이브러리의 동시 유전자 분석을 위한 조성물 및 방법이 매우

요망된다.

발명의 내용

- [0008] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 포함하되, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 프로브 품질 관리(Quality Control: QC) 프로세스를 통과하였다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 어댑터 세트를 추가로 포함하되, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함한다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.
- [0009] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 어댑터 세트를 포함하되, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함하고, 어댑터 세트는 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 추가로 포함하되, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함한다.
- [0010] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 QC 프로세스는 어댑터 결찰에 대한 테스트를 포함하되, 어댑터 결찰에 대한 테스트는 (a) 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(library of adaptor-tagged DNA fragment: LIBS)를 생성하는 단계; 및 (b) LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(Library Post Amplification: LPA)를 생성하는 단계를 포함하고; 어댑터 세트는 LPA의 농도가 미리 결정된 농도보다 높을 때 어댑터 결찰에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주된다.
- [0011] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 QC 프로세스는 (a) 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계; (b) 인덱스 서열을 포함하는 적어도 하나의 프라이머를 포함하는 프라이머 쌍을 사용하여 LIBS를 증폭시켜 인덱스 증폭 후 라이브러리(Library Post Index Amplification: LPIA)를 생성하는 단계; 및 (c) LPIA에 대한 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계를 포함하는 어댑터 분포에 대한 테스트를 포함하되, 어댑터 세트는 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주된다.
- [0012] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 QC 프로세스에 대해 미리 결정된 허용 기준은 다음 중 하나 이상을 포함한다: (a) 바코드 혼선(Barcode Crosstalk)은 리드(read)의 0.05% 내지 5% 이하로 존재하고; (b) 미지의 어댑터는 리드의 1% 내지 50% 이하로 존재하고; (c) 고유한 어댑터 서열의 10% 내지 80% 이하는 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 0% 내지 50%인 리드 수를 갖고; (d) 모든 고유한 어댑터 서열의 적어도 60% 내지 99.9%가 존재하고; 그리고 (e) 고유한 어댑터 서열의 5% 내지 50% 이하는 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 2배보다 큰 리드를 갖는다.
- [0013] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 어댑터 결찰에 대한 테스트 및/또는 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과하였을 때 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 어댑터 결찰에 대한 테스트를 통과하였을 때 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과하였을 때 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 어댑터 결찰에 대한 테스트 및 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과하였을 때 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다.
- [0014] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 프로브 QC 프로세스는 (a) 어댑터 세트를 말단-복구된 DNA 단편을 포함하는 DNA 샘플에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계; (b) LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계; (c) LPA를 분할하거나 또는 희석하여 표적 포획 LPA(Target Capture LPA: TC LPA) 및 전체-게놈 LPA(Whole-Genome LPA: WG LPA)를 생성하는 단계; (d) WG LPA를 증폭시켜 증폭된 전체-게놈 라이브러리(Whole-Genome Library Amplified: WGLA)를 생성하는 단계; (e) 테스트할 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 TC LPA에 혼성화하여 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계; (f) 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 분리하여 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계; (g) 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 효소적으로 처리하여 하이브리드 분자를 생성하는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 모듈 및 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함함); (h) 하이브리드 분자를 증폭시켜 증폭된 표적 포획 라이브러리(Target Capture Library Amplified: TCLA)를 생성하는 단계; (i) WGLA와 TCLA를 합하여 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(Sequence-Ready Library: SRL)를 형성하는 단계; 및

- [0015] (j) SRL에 대해 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계를 포함하는 포획 프로브 모듈에 대한 테스트를 포함하되; DNA 샘플은 복수의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)을 포함하고; 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 프로브 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다.
- [0016] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 프로브 QC 프로세스에 대한 미리 결정된 허용 기준은 다음 중 하나 이상을 포함한다: (a) 포획 프로브의 적어도 60% 내지 99.9%가 적어도 1개의 총 리드를 갖고; (b) 포획 프로브의 적어도 60% 내지 99.9%는 적어도 10개 내지 적어도 200개의 표적 적중(on-target) 총 리드를 갖고; 및 (c) DNA 샘플 내에서 예상되는 SNP의 적어도 60% 내지 99.9%가 검출된다.
- [0017] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍을 포함하되, 각 어댑터 모듈은 증폭 영역을 포함하고; 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고; 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함한다.
- [0018] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍을 포함하되, 각 어댑터 모듈은 증폭 영역을 포함하고; 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함한다.
- [0019] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함한다.
- [0020] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (b) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고; 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)을 포함한다.
- [0021] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0022] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 프라이머 쌍은 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되고, 제2 프라이머 쌍은 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되되, 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리는 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)로 조합되도록 구성된다.
- [0023] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리는 모두 테스트 샘플로부터 생성된다.
- [0024] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리 또는 제2 변형된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함하되, 라이브러리 태그는 제1 변형된 라이브러리와 제2 변형된 라이브러리를 구별하도록 구성된다.
- [0025] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 어댑터, 포획 프로브 모듈 및 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 단편이고; 제2 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 어댑터 및 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 단편이되, 제2 변형된 라이브러리의 어댑터-태깅된 DNA 단편 중 어느 것도 포획 프로브 모듈을 포함하지 않는다.
- [0026] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 포함하되, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함한다.
- [0027] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 포함하되, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 프로브 품질 관리(QC) 프로세스를 통과하였다.
- [0028] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 어댑터 세트를 포함하되, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함한다.
- [0029] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 어댑터 세트를 포함하되, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함하

고, 어댑터 세트는 어댑터 품질 관리(QC) 프로세스를 통과하였다.

- [0030] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함함)를 포함한다.
- [0031] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함하고, 어댑터 세트는 어댑터 품질 관리(QC) 프로세스를 통과하였음)를 포함한다.
- [0032] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 프로브 품질 관리(QC) 프로세스를 통과하였음); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함함)를 포함한다.
- [0033] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 프로브 품질 관리(QC) 프로세스를 통과하였음); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함하고, 어댑터 세트는 어댑터 품질 관리(QC) 프로세스를 통과하였음)를 포함한다.
- [0034] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 QC 프로세스는 어댑터 결찰에 대한 테스트를 포함하되, 어댑터 결찰에 대한 테스트는 (a) 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계; 및 (b) LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계를 포함하고; 어댑터 세트는 LPA의 농도가 미리 결정된 농도보다 높을 때 어댑터 결찰에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주된다.
- [0035] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰에 대한 테스트의 (a) 단계의 말단-복구된 DNA 단편은 DNA 샘플로부터 생성된다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 적어도 2종의 상이한 세포주의 혼합된 DNA 샘플이다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 2종의 상이한 세포주의 혼합된 DNA 샘플이다. 일부 실시형태에서, 2종의 상이한 세포주는 50:50 비로 혼합된다. 일부 실시형태에서, 2종의 상이한 세포주는 NA09596 및 NA12878이다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 실시예 15에 기재된 50:50 혼합 샘플이다.
- [0036] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰에 대한 테스트에 사용된 DNA 샘플은 어댑터 분포에 대한 테스트에 사용된 DNA 샘플과 상이하다.
- [0037] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 5ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 10ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 15ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 20ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 25ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 30ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 35ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 40ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 50ng이다.
- [0038] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 5ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 10ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 15ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 20ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 25ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 30ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 35ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 미리 결정된 양은 40ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 50ng이다.
- [0039] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 1ng 내지 약 100ng이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 1ng 내지

시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 200 ng/ μ l 초과이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 10 ng/ μ l 내지 약 100 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 10 ng/ μ l 내지 약 90 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 20 ng/ μ l 내지 약 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 10 ng/ μ l 내지 약 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 30 ng/ μ l 내지 약 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 40 ng/ μ l 내지 약 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 50 ng/ μ l 내지 약 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 50 ng/ μ l 내지 약 70 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 60 ng/ μ l 내지 약 70 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 50 ng/ μ l 내지 약 60 ng/ μ l이다.

[0044] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 1 ng/ μ l 내지 200 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 10 ng/ μ l 내지 100 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 10 ng/ μ l 내지 90 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 20 ng/ μ l 내지 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 30 ng/ μ l 내지 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 10 ng/ μ l 내지 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 40 ng/ μ l 내지 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 50 ng/ μ l 내지 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 50 ng/ μ l 내지 70 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 60 ng/ μ l 내지 70 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 50 ng/ μ l 내지 60 ng/ μ l이다.

[0045] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 200 ng/ μ l 초과이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 200 ng/ μ l 초과이다.

[0046] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 어댑터 결합에 대한 테스트를 통과하였을 때 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다.

[0047] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 QC 프로세스는 (a) 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결합시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계; (b) 인덱스 서열을 포함하는 적어도 하나의 프라이머를 포함하는 프라이머 쌍을 사용하여 LIBS를 증폭시켜 인덱스 증폭 후 라이브러리(LPIA)를 생성하는 단계; 및 (c) LPIA에 대한 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계를 포함하는 어댑터 분포에 대한 테스트를 포함하되, 어댑터 세트는 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주된다.

[0048] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 테스트의 (a) 단계의 말단-복구된 DNA 단편은 DNA 샘플로부터 생성된다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 야생형(wt) 무세포 DNA(cfDNA)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 wt cfDNA로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 건강한 인간으로부터 얻은 wt cfDNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 실시예 16에 기재된 wt cfDNA 샘플이다.

[0049] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 테스트에 사용된 DNA 샘플은 어댑터 결합에 대한 테스트에 사용된 DNA 샘플과 상이하다.

[0050] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 QC 프로세스에 대해 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.05% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.1% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.2% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.3% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.4% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.5% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.6% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.7% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.8% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.9% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 약 1% 이하로 존재한다는 것이다.

- [illegible]

다 큰 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (e)는 고유한 어댑터 서열의 20% 내지 40% 이하가 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 2배보다 큰 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (e)는 고유한 어댑터 서열의 20% 내지 30% 이하가 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 2배보다 큰 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (e)는 고유한 어댑터 서열의 15% 내지 25% 이하가 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 2배보다 큰 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (e)는 고유한 어댑터 서열의 15% 내지 20% 이하가 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 2배보다 큰 리드를 갖는다는 것이다.

[0072] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 QC 프로세스에 대해 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a) 및 기준 (b)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (c), 기준 (d) 및 기준 (e)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a), 기준 (b) 및 기준 (c)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a), 기준 (b) 및 기준 (d)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a), 기준 (b) 및 기준 (e)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a), 기준 (b), 기준 (c) 및 기준 (d)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a), 기준 (b), 기준 (c) 및 기준 (e)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a), 기준 (b), 기준 (c), 기준 (d) 및 기준 (e)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a)(b)(c)(d) 및 (e)로부터 선택되는 적어도 하나의 기준을 포함한다.

[0073] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과하였을 때 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다.

[0074] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 어댑터 결찰에 대한 테스트 및 어댑터 분포에 대한 테스트를 모두 통과하였을 때 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다.

[0075] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 프로브 QC 프로세스는 (a) 어댑터 세트를 말단-복구된 DNA 단편을 포함하는 DNA 샘플에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계; (b) LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계; (c) LPA를 분할하거나 또는 희석하여 표적 포획 LPA(TC LPA) 및 전체-게놈 LPA(WG LPA)를 생성하는 단계; (d) WG LPA를 증폭시켜 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA)를 생성하는 단계; (e) 테스트할 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 TC LPA에 혼성화하여 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계; (f) 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 단리하여 단리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계; (g) 단리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 효소적으로 처리하여 하이브리드 분자를 생성하는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 모듈 및 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함함); (h) 하이브리드 분자를 증폭시켜 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)를 생성하는 단계; (i) WGLA와 TCLA를 합하여 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)를 형성하는 단계; (j) SRL에 대해 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계를 포함하는 포획 프로브 모듈에 대한 테스트를 포함한다.

[0076] 일부 실시형태에서, 용어 LPA 및 어댑터-태깅된 모 라이브러리는 상호교환적으로 사용된다. 일부 실시형태에서, 용어 WGLA 및 LPWG 라이브러리는 상호교환적으로 사용된다. 일부 실시형태에서, 용어 SRL 및 조합된 라이브러리는 상호교환적으로 사용된다.

[0077] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $15 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $25 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $30 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $35 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $40 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $45 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $55 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $60 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $65 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $70 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 $75 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 80

실시형태에서, WG LPA는 적어도 3.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 4 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 4.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 5.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 6 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 6.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 7 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 7.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 8 ng/ μ l이다.

[0083] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 약 0.1 ng/ μ l 내지 약 10 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 약 0.1 ng/ μ l 내지 약 8 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 약 1 ng/ μ l 내지 약 10 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 약 1 ng/ μ l 내지 약 5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 약 2 ng/ μ l 내지 약 10 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 약 2 ng/ μ l 내지 약 6 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 약 3 ng/ μ l 내지 약 5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 약 3 ng/ μ l 내지 약 4 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 약 2 ng/ μ l 내지 약 3 ng/ μ l이다.

[0084] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 0.1 ng/ μ l 내지 10 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 0.1 ng/ μ l 내지 8 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 10 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 2 ng/ μ l 내지 10 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 2 ng/ μ l 내지 6 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 3 ng/ μ l 내지 5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 3 ng/ μ l 내지 4 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 2 ng/ μ l 내지 3 ng/ μ l이다.

[illegible]

[0086] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 1.0 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 1.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 2.0 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 2.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태

트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 20 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 25 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 30 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 35 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 40 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 45 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 50 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 55 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 60 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 65 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 70 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 75 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 80 ng/ μ l이다.

[illegible]

[0091] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 1 ng/ μ l 내지 약 200 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 100 ng/ μ l 내지 약 200 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 1 ng/ μ l 내지 약 100 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 1 ng/ μ l 내지 약 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 1 ng/ μ l 내지 약 50 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 1 ng/ μ l 내지 약 40 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 1 ng/ μ l 내지 약 30 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 1 ng/ μ l 내지 약 20 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 1 ng/ μ l 내지 약 10 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 약 5 ng/ μ l 내지 약 10 ng/ μ l이다.

[0092] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 200 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 100 ng/ μ l 내지 200 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 100 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 50 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 40 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 30 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 20 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 10 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 적어도 5 ng/ μ l 내지 10 ng/ μ l이다.

[0093] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이

상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 프로브 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다.

[0094] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 프로브 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다.

[illegible]

[0096] 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 100%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 99.9%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 99.8%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 99.7%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 99.6%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 99.5%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 99.4%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 99.3%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 99.2%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 99.1%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 99%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 98.9%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 98.8%가 적어도 1개의 총 리드를 갖는다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 포획 프로브의 적어도 98.7%가 적어도 1개의

QC 프로세스에 대한 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a), 기준 (b) 및 기준 (c)를 포함한다.

- [0130] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 프로브 QC 프로세스에 사용되는 DNA 샘플은 인간 야생형 DNA를 포함한다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 프로브 QC 프로세스에 사용되는 DNA 샘플은 복수의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)을 포함한다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 프로브 QC 프로세스에 사용되는 DNA 샘플은 임의의 적합한 DNA를 포함한다.
- [0131] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 동일한 키트의 포획 프로브 모듈에 특이적인 양성 대조군 샘플로 사용되는 DNA 샘플을 포함한다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군 샘플은 인간 야생형 DNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군 샘플은 복수의 SNP를 포함한다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군 샘플은 키트의 포획 프로브 모듈의 프로브 QC 프로세스에 사용되는 DNA 샘플을 포함한다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군 샘플은 임의의 적합한 DNA를 포함한다.
- [0132] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 QC 프로세스는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법 중 어느 하나에 따라 수행된다.
- [0133] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 프로브 QC 프로세스는 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하는 방법 중 어느 하나에 따라 수행된다.
- [0134] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); 및 (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함한다.
- [0135] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); 및 (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함하되; 포획 프로브 모듈은 프로브 QC 프로세스를 통과하였다.
- [0136] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); 및 (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함하되; 어댑터 세트는 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.
- [0137] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); 및 (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함하되; 어댑터 세트는 어댑터 QC 프로세스를 통과하였고 포획 프로브 모듈은 프로브 QC 프로세스를 통과하였다.
- [0138] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함) 및 (b) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함한다.
- [0139] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함) 및 (b) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함하되; 어댑터 세트는 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.
- [0140] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터

- [0148] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)을 포함한다.
- [0149] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)을 포함하되; 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 프로브 QC 프로세스를 통과하였다.
- [0150] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)을 포함하되; 어댑터 세트는 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.
- [0151] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)을 포함하되; 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 프로브 QC 프로세스를 통과하였고 어댑터 세트는 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.
- [0152] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 프라이머 쌍은 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용된다.
- [0153] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제2 프라이머 쌍은 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용된다.
- [0154] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 프라이머 쌍은 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되고, 제2 프라이머 쌍은 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리는 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)로 조합되도록 구성된다.
- [0155] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함한다.
- [0156] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 DNA, RNA, PNA 또는 비자연 발생적 핵산, 합성 핵산, 변형된 핵산, 비자연 발생적 아미노산, 합성 아미노산 및 변형된 아미노산 중 하나 이상을 포함한다.
- [0157] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부

실시형태에서, 검출 가능한 표지는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함한다.

- [0158] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 검출 가능한 모이어티에 선택적으로 또는 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 모이어티는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함한다.
- [0159] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 테스트 샘플의 임의의 DNA 단편과 70% 이하의 서열 동일성을 갖는다.
- [0160] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 (a) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (b) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고; 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)을 포함한다.
- [0161] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되되, 키트는 (a) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함함); 및 (b) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 어댑터, 포획 프로브 모듈 및 포획 프로브 모듈의 표적 서열을 포함하는 DNA 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 변형된 라이브러리는 어댑터 및 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 DNA 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리는 모두 동일한 테스트 샘플로부터 생성된다.
- [0162] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 프라이머 쌍은 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되고, 제2 프라이머 쌍은 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용된다.
- [0163] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 어댑터, 포획 프로브 모듈 및 포획 프로브 모듈의 표적 서열을 포함하는 제1 DNA 단편을 포함한다.
- [0164] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제2 변형된 라이브러리는 어댑터 및 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 제2 DNA 단편을 포함한다.
- [0165] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리는 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)로 조합되도록 구성된다. 일부 실시형태에서, SRL은 조합된 라이브러리로도 지칭된다.
- [0166] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 어댑터, 포획 프로브 모듈 및 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 단편이다.
- [0167] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제2 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 어댑터 및 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 단편이다.
- [0168] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제2 변형된 라이브러리의 어댑터-태깅된 DNA 단편 중 어느 것도 포획 프로브 모듈을 포함하지 않는다.
- [0169] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 표적 포획 라이브러리(TCL) 또는 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)이다.
- [0170] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제2 변형된 라이브러리는 전체-게놈 라이브러리(WGL) 또는 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA)이다.
- [0171] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리 또는 제2 변형된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함하되, 라이브러리 태그는 제1 변형된 라이브러리와 제2 변형된 라이브러리를 구별하도록 구성된다.

- [0172] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 제1 라이브러리 태그를 포함하고, 제2 변형된 라이브러리는 제2 라이브러리 태그를 포함하되, 제1 라이브러리 태그 및 제2 라이브러리 태그는 동일하지 않다.
- [0173] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 5'에서 3'로: 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2) 또는 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하고; 제2 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 5'에서 3'로: 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함한다. 일부 실시형태에서, A1, A2, B1 및 B2 중 적어도 하나는 적어도 하나의 라이브러리 태그를 포함한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 표적 서열, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 테스트 샘플의 임의의 DNA 단편 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로부터 선택되는 서열과 70% 이하의 동일성을 갖는다.
- [0174] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 5'에서 3'로: 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2) 또는 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하고; 제2 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 5'에서 3'로: 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하되; A1, A2, B1 및 B2 중 적어도 하나는 라이브러리 태그를 포함하고; 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 표적 서열, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 테스트 샘플의 임의의 DNA 단편 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로부터 선택되는 서열과 70% 이하의 서열 동일성을 갖는다.
- [0175] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0176] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있는 영역에 혼성화하여 이와 이중체를 형성할 수 있다.
- [0177] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 어댑터 모듈을 포함한다.
- [0178] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 dT, dA, dC 또는 dG 오버행을 포함한다.
- [0179] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 dsDNA 단편의 5' 말단에 대한 결찰 및/또는 어댑터 이량체 형성을 방지하는 3' 말단의 변형을 포함하되, 비결찰 가닥은 이중체로부터 치환되도록 구성된다.
- [0180] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터는 고유한 ID 영역의 풀로부터 선택된 ID 영역을 포함하되, 풀은 복수의 풀로부터 선택되고, 선택된 풀은 테스트 샘플에 고유하다.
- [0181] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 (a) 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역; (b) ID 영역; 및 (c) 앵커 영역을 포함한다.
- [0182] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하되, 프라이머 결합 부위는 PCR(polymerase chain reaction: 중합효소 연쇄 반응), LAMP(loop-mediated isothermal amplification: 루프-매개 등은 증폭), NASBA(nucleic acid sequence-based amplification: 핵산 서열-기반 증폭), SDA(strand displacement amplification: 가닥 치환 증폭), RCA(rolling circle replication: 롤링 서클 복제) 또는 LCR(ligase chain reaction: 라이게이스 연쇄 반응)을 사용하여 증폭할 수 있다.
- [0183] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 20개 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0184] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 10개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 20개 내지 약 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나

또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

- [0185] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 3' 말단에 오버행을 포함한다.
- [0186] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 1개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 5개 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0187] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 1개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 5개 내지 약 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0188] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, ID 영역은 3개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 3개 내지 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0189] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 3개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 3개 내지 약 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0190] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 고유한 분자 식별자(UMI) 멀티플라이어(multiplier)를 추가로 포함한다.
- [0191] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된다.
- [0192] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 1개 내지 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0193] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 약 1개 내지 약 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0194] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 64개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0195] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 2개 내지 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 10개 내지 500개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 50개 내지 300개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다.
- [0196] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 2개 내지 약 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 10개 내지 약 500개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 50개 내지 약 300개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다.
- [0197] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0198] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, ID 영역 풀의 각 ID 영역은 약 8개의 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0199] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리(Hamming distance)만큼 떨어져 있다.
- [0200] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 각 ID 영역은 이에 부착된 DNA 단편을 식별하도록 구성된다.
- [0201] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 64개 내지 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0202] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 약 64개 내지 약 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0203] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드

드 서열로부터 선택된 고유한 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 각 서열은 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있다.

[0204] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이룬다.

[0205] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함한다.

[0206] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이고, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고; 어댑터 세트의 각 어댑터는 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 어댑터 세트의 각 어댑터의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 주어진 서열의 UMI 멀티플라이어는 주어진 서열의 하나의 ID 영역과 쌍을 이루고; 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이루고; 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함한다.

[0207] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 하나의 어댑터 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 하나 초과와 어댑터 모듈 세트를 포함한다.

[0208] 일부 실시형태에서, 키트는 2개 내지 1000개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 2개 내지 500개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 2개 내지 100개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 2개 내지 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 5개 내지 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 10개 내지 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 15개 내지 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 20개 내지 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 30개 내지 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 40개 내지 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 45개 내지 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 48개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다.

[0209] 일부 실시형태에서, 키트는 약 2개 내지 약 1000개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 2개 내지 약 500개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 2개 내지 약 100개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 2개 내지 약 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 50개 내지 약 100개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 5개 내지 약 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 10개 내지 약 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 15개 내지 약 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 20개 내지 약 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 30개 내지 약 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 40개 내지 약 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 45개 내지 약 50개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 약 48개의 어댑터 모듈 세트를 포함한다.

[0210] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 각 어댑터 모듈 세트는 주어진 테스트 샘플에 고유하다.

[0211] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 생성하기 위해 테스트 샘플의 DNA 단편에 어댑터 세트의 어댑터를 결합시키기 위한 하나 이상의 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 어댑터를 결합시키기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 라이게아스를 포함한다. 일부 실시형태에서, DNA 라이게아스는 T4 DNA 라이게아스이다.

[0212] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 (a) 어댑터 세트를 DNA 단편에 결합시켜 복수의 어댑터/DNA 단편 복합체를 생성하는 단계; 및 (b) 복수의 어댑터/DNA 단편 복합체를 하나 이상의 효소와 접촉시켜 복수의 어댑터-태깅된 DNA 단편을 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 형성하는 단계를 포함하는 방법을 사용하여 테스트 샘플의 DNA 단편에 결합되도록 구성된다. 일부 실시형태에서, 각 어댑터/DNA 단편 복합체는 DNA 단편의 각 말단에 결합된 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 (b) 단계에서 어댑터/DNA 단편 복합체로부터 치환된다.

[0213] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하기 위해 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 증폭시키기 위한 하나 이상의 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 DNA 라이브러

리를 증폭시키기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 폴리머레이스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 증폭시키기 위한 하나 이상의 시약은 하나 이상의 PCR용 프라이머를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 프라이머는 어댑터 증폭 영역의 프라이머 결합 부위와 상보적인 단일 프라이머 서열을 포함한다.

- [0214] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 LPA로부터 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA)를 생성하기 위한 하나 이상의 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, WGLA를 생성하기 위한 하나 이상의 시약은 어댑터 증폭 영역의 프라이머 결합 부위에 혼성화하는 하나 이상의 프라이머를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 프라이머는 플로우 셀(flow cell)에 결합할 수 있는 시퀀싱 어댑터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시퀀싱 어댑터는 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, WGLA를 생성하기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 폴리머레이스를 포함한다.
- [0215] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, WGLA는 시퀀싱 준비가 완료된 상태이다.
- [0216] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0217] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0218] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 파트너 올리고뉴클레오타이드에 혼성화하도록 구성된다.
- [0219] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 복수의 포획 프로브 모듈을 포함하는 포획 프로브 패널로부터 선택된다.
- [0220] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 포획 프로브 모듈은 특정 DNA 표적 영역의 하류에 혼성화하도록 구성되고, 적어도 하나의 포획 프로브 모듈은 특정 DNA 표적 영역의 상류에 혼성화하도록 구성된다.
- [0221] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 복수의 포획 프로브 모듈의 각 포획 프로브는 임의의 다른 포획 프로브의 약 200bp 내에서 이의 표적 서열에 혼성화하도록 구성된다.
- [0222] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 포획 프로브 패널의 각 포획 프로브 모듈은 어댑터-태깅된 DNA 단편에 혼성화하여 복수의 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성한다.
- [0223] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 파트너 올리고뉴클레오타이드는 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 단리를 가능하게 하는 결합 쌍의 특정 구성원을 포함한다.
- [0224] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 파트너 올리고뉴클레오타이드는 바이오틴 분자를 포함한다.
- [0225] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 단리를 가능하게 하는 결합 쌍의 특정 구성원을 포함한다.
- [0226] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈은 바이오틴 분자를 포함한다.
- [0227] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 약 60개 미만의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함한다.
- [0228] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 60개 미만의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함한다.
- [0229] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 약 40개의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함한다.
- [0230] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 40개의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함한다.
- [0231] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 단리하기 위한 구성요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 단리하기 위한 구성요소는 스트렙타비딘을 포함한다.
- [0232] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 단리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 효소적으로 처리하기 위한 하나 이상의 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 효소는 어댑터-태깅된 DNA 단편을 주형으로 사용하여 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 각 포획 프로브를 확장시켜 복수의 하이브리드 분자(표적 포획 라이브러리)를 생성하도록 구성된 5'-3' 폴리머레이스를 포함하되, 각 하

이브리드 분자는 포획 프로브 모듈 및 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함한다.

- [0233] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 하이브리드 분자를 증폭시켜 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)를 생성하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하되, 제1 변형된 라이브러리는 TCLA이다. 일부 실시형태에서, 하이브리드 분자를 증폭시키기 위한 하나 이상의 시약은 플로우 셀에 결합할 수 있는 시퀀싱 어댑터를 포함하는 하나 이상의 프라이머를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시퀀싱 어댑터는 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하이브리드 분자를 증폭시키기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 폴리머레이스를 포함한다.
- [0234] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, SRL은 시퀀싱 기계의 단일 플로우 셀에서 시퀀싱되도록 구성된다.
- [0235] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 SRL에 대한 정량적 유전자 분석을 수행하기 위한 구성요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 정량적 유전자 분석을 수행하기 위한 구성요소는 하나 이상의 시퀀싱 프라이머를 포함한다. 일부 실시형태에서, 정량적 유전자 분석은 뉴클레오타이드 전이 또는 전환, 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실, 게놈 재배열 또는 테스트 샘플 DNA 단편에서의 카피 수의 변화를 검출하는 데 사용된다.
- [0236] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 테스트 샘플은 조직 생검으로부터 얻어진다. 일부 실시형태에서, 조직 생검은 종양인 것으로 의심되는 종양 또는 조직으로부터 얻어진다. 일부 실시형태에서, 조직 생검은 악성 종양 또는 악성 종양인 것으로 의심되는 종양으로부터 얻어진다.
- [0237] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 테스트 샘플 DNA 단편은 무세포 DNA(cfDNA), 게놈 DNA(gDNA), 상보적 DNA(cDNA), 미토콘드리아 DNA, 메틸화된 DNA, 탈메틸화된 DNA 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0238] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 테스트 샘플 DNA 단편은 후성유전적 표식(epigenetic mark)을 포함한다.
- [0239] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 테스트 샘플 DNA 단편은 전체 게놈 라이브러리, 앰플리콘 라이브러리, 전체 엑솜 라이브러리, cDNA 라이브러리 또는 메틸화된 DNA 라이브러리로 이루어진 목록으로부터 선택되는 라이브러리로부터 얻어진다.
- [0240] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 테스트 샘플은 양수 샘플, 혈액 샘플, 피부 샘플, 모발 샘플, 모낭 샘플, 타액 샘플, 점액 샘플, 땀 샘플, 눈물 샘플, 상피 조직 샘플, 소변 샘플, 정액 샘플, 정액 혈장 샘플, 혈청 샘플, 전립선액 샘플, 사정전 유체(쿠퍼액) 샘플, 안구액 샘플, 배설물 샘플, 생검 샘플, 복수 샘플, 뇌척수액 샘플, 림프 샘플, 조직 추출물 샘플, 대변 샘플 및 포르말린-고정, 파라핀 포매(FFPE) 샘플로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 샘플로부터 얻어진다.
- [0241] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 테스트 샘플의 DNA 단편은 어댑터에 결합되기 전에 말단 복구되었다.
- [0242] 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, 키트는 말단 복구를 수행하기 위한 하나 이상의 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 말단 복구를 수행하기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 폴리머레이스, 카이네이스 및 클레노브(Klenow) 단편으로부터 선택되는 하나 이상의 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 말단 복구를 수행하기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 폴리머레이스 I, T4 DNA 폴리머레이스, T4 폴리뉴클레오타이드 카이네이스 및 클레노브 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 말단 복구를 수행하기 위한 하나 이상의 시약은 말단 복구 완충액을 포함한다. 일부 실시형태에서, 말단 복구 완충액은 MgCl₂, NaCl, Tris-HCL, DTT, KCL 및 dNTP를 포함한다.
- [0243] 본 개시내용의 일부 실시형태는 어댑터 세트에 대해 어댑터 품질 관리(QC) 프로세스를 수행하는 방법을 제공하되, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함한다.
- [0244] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 QC 프로세스는 어댑터 결합에 대한 테스트를 포함하되, 어댑터 결합에 대한 테스트는 (a) 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결합시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계; 및 (b) LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계를 포함하고; 어댑터 세트는 LPA의 농도가 미리 결정된 농도보다 높을 때 어댑터 결합에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주된다.
- [0245] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 결합에 대한 테스트의 (a) 단계의 말단-복구된 DNA 단편은 DNA 샘플로부터 생성된다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 적어도 2종의 상이한 세포주의 혼합된 DNA 샘플이다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 2종의 상이한 세포주의 혼합된 DNA 샘플이다. 일부 실시형태에서, 2종의 상이한 세포주는 50:50 비로 혼합된다. 일부 실시형태에서, 2종의 상이한

에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 30 ng/ μ l 내지 약 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 40 ng/ μ l 내지 약 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 50 ng/ μ l 내지 약 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 50 ng/ μ l 내지 약 70 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 60 ng/ μ l 내지 약 70 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 50 ng/ μ l 내지 약 60 ng/ μ l이다.

[0254] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 1 ng/ μ l 내지 200 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 10 ng/ μ l 내지 100 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 10 ng/ μ l 내지 90 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 20 ng/ μ l 내지 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 10 ng/ μ l 내지 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 30 ng/ μ l 내지 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 40 ng/ μ l 내지 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 50 ng/ μ l 내지 80 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 50 ng/ μ l 내지 70 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 60 ng/ μ l 내지 70 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 50 ng/ μ l 내지 60 ng/ μ l이다.

[0255] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 약 200 ng/ μ l 초과이다. 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, LPA의 미리 결정된 농도는 200 ng/ μ l 초과이다.

[0256] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 어댑터 결찰에 대한 테스트를 통과하였을 때 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다.

[0257] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 QC 프로세스는 (a) 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계; (b) 인덱스 서열을 포함하는 적어도 하나의 프라이머를 사용하여 LIBS를 증폭시켜 인덱스 증폭 후 라이브러리(LPIA)를 생성하는 단계; 및 (c) LPIA에 대한 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계를 포함하는 어댑터 분포에 대한 테스트를 포함하되, 어댑터 세트는 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주된다.

[0258] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 테스트의 (a) 단계의 말단-복구된 DNA 단편은 DNA 샘플로부터 생성된다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 야생형(wt) 무세포 DNA(cfDNA)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 wt cfDNA로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 건강한 인간으로부터 얻은 wt cfDNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 실시예 16에 기재된 wt cfDNA 샘플이다.

[0259] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 테스트에 사용된 DNA 샘플은 어댑터 결찰에 대한 테스트에 사용된 DNA 샘플과 상이하다.

[0260] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 QC 프로세스에 대해 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.05% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.1% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.2% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.3% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.4% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.5% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.6% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.7% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준 (a)는 바코드 혼선이 리드의 약 0.8% 이하로 존재한다는 것이다. 일부 실시형태에서, 기준

부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a), 기준 (b) 및 기준 (e)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a), 기준 (b), 기준 (c) 및 기준 (d)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a), 기준 (b), 기준 (c) 및 기준 (e)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a), 기준 (b), 기준 (c), 기준 (d) 및 기준 (e)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미리 결정된 허용 기준은 기준 (a) (b) (c) (d) 및 (e)로부터 선택되는 적어도 하나의 기준을 포함한다.

- [0283] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과하였을 때 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다.
- [0284] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 어댑터 결찰에 대한 테스트 및 어댑터 분포에 대한 테스트를 모두 통과하였을 때 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주된다.
- [0285] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0286] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있는 영역에 혼성화하여 이와 이중체를 형성할 수 있다.
- [0287] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 어댑터 모듈을 포함한다.
- [0288] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 dT, dA, dC 또는 dG 오버행을 포함한다.
- [0289] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 dsDNA 단편의 5' 말단에 대한 결찰 및/또는 어댑터 이량체 형성을 방지하는 3' 말단의 변형을 포함하되, 비결찰 가닥은 이중체로부터 치환되도록 구성된다.
- [0290] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터는 고유한 ID 영역의 풀로부터 선택되는 ID 영역을 포함하되, 풀은 복수의 풀로부터 선택되고, 선택된 풀은 테스트 샘플에 공유하다.
- [0291] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 (a) 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역; (b) ID 영역; 및 (c) 앵커 영역을 포함한다.
- [0292] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하되, 프라이머 결합 부위는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 등온 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 복제) 또는 LCR(라이게이스 연쇄 반응)을 사용한 증폭을 가능하게 한다.
- [0293] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 20개 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0294] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 10개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 20개 내지 약 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0295] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 3' 말단에 오버행을 포함한다.
- [0296] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 1개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 5개 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

- [0297] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 1개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 5개 내지 약 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0298] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역은 3개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 3개 내지 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0299] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 3개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 3개 내지 약 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0300] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 고유한 분자 식별자(UMI) 멀티플라이어를 추가로 포함한다.
- [0301] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된다.
- [0302] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 1개 내지 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0303] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 약 1개 내지 약 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0304] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 64개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0305] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 2개 내지 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 10개 내지 500개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 50개 내지 300개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다.
- [0306] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 2개 내지 약 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 10개 내지 약 500개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 50개 내지 약 300개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다.
- [0307] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0308] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있다.
- [0309] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 각 ID 영역은 이에 부착된 DNA 단편을 식별하도록 구성된다.
- [0310] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 64개 내지 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0311] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 약 64개 내지 약 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0312] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 고유한 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 각 서열은 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있다.
- [0313] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영

역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이룬다.

[0314] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함한다.

[0315] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이고, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고; 어댑터 세트의 각 어댑터는 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 어댑터 세트의 각 어댑터의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 주어진 서열의 UMI 멀티플라이어는 주어진 서열의 하나의 ID 영역과 쌍을 이루고; 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이루고; 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함한다.

[0316] 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 수행하는 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 (a) 어댑터 세트를 테스트 샘플의 DNA 단편에 결합시켜 복수의 어댑터/DNA 단편 복합체를 생성하는 단계; 및 (b) 복수의 어댑터/DNA 단편 복합체를 하나 이상의 효소와 접촉시켜 복수의 어댑터-태깅된 DNA 단편을 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 형성하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 각 어댑터/DNA 단편 복합체는 DNA 단편의 각 말단에 결합된 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 (b) 단계에서 어댑터/DNA 단편 복합체로부터 치환된다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 본 개시내용의 임의의 어댑터 세트이다.

[0317] 본 개시내용의 일부 실시형태는 하나 이상의 포획 프로브 모듈에 대한 프로브 품질 관리(QC) 프로세스를 수행하기 위한 방법을 제공한다.

[0318] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 (a) 어댑터 세트를 말단-복구된 DNA 단편을 포함하는 DNA 샘플에 결합시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계; (b) LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계; (c) LPA를 분할하거나 또는 희석하여 표적 포획 LPA(TC LPA) 및 전체-게놈 LPA(WG LPA)를 생성하는 단계; (d) WG LPA를 증폭시켜 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA)를 생성하는 단계; (e) 테스트할 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 TC LPA에 혼성화하여 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계; (f) 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 분리하여 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계; (g) 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 효소적으로 처리하여 하이브리드 분자를 생성하는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 모듈 및 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함함); (h) 하이브리드 분자를 증폭시켜 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)를 생성하는 단계; (i) WGLA와 TCLA를 합하여 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)를 형성하는 단계; (j) SRL에 대해 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계를 포함하는 포획 프로브 모듈에 대한 테스트를 포함한다.

[0319] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 1 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 10 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 15 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 20 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 키트의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 25 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 30 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 35 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 40 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 45 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 50 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 55 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 60 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 65 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA는 적어도 약 70 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TC LPA

스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 2 ng/ μ l 내지 6 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 3 ng/ μ l 내지 5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 3 ng/ μ l 내지 4 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, WG LPA는 적어도 2 ng/ μ l 내지 3 ng/ μ l이다.

[illegible]

[0328] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 1.0 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 1.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 2.0 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 2.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 3.0 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 3.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 4.0 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 약 적어도 4.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 5.0 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 5.5 ng/ μ l이다. 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, TCLA는 적어도 6.0

[illegible]

[0332]

[illegible]

[illegible][illegible]

- [0374] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0375] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0376] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 파트너 올리고뉴클레오타이드에 혼성화하도록 구성된다.
- [0377] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 복수의 포획 프로브 모듈을 포함하는 포획 프로브 패널로부터 선택된다.
- [0378] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 포획 프로브 모듈은 특정 DNA 표적 영역의 하류에 혼성화하도록 구성되고, 적어도 하나의 포획 프로브 모듈은 특정 DNA 표적 영역의 상류에 혼성화하도록 구성된다.
- [0379] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 포획 프로브 모듈의 각 포획 프로브는 임의의 다른 포획 프로브의 약 200bp 내에서 이의 표적 서열에 혼성화하도록 구성된다.
- [0380] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 포획 프로브 패널의 각 포획 프로브 모듈은 어댑터-태깅된 DNA 단편에 혼성화하여 복수의 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성한다.
- [0381] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 파트너 올리고뉴클레오타이드는 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 단리를 가능하게 하는 결합 쌍의 특정 구성원을 포함한다.
- [0382] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 파트너 올리고뉴클레오타이드는 바이오틴 분자를 포함한다.
- [0383] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 단리를 가능하게 하는 결합 쌍의 특정 구성원을 포함한다.
- [0384] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈은 바이오틴 분자를 포함한다.
- [0385] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 약 60개 미만의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함한다.
- [0386] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 60개 미만의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함한다.
- [0387] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 약 40개의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함한다.
- [0388] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 포획 프로브 모듈은 40개의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함한다.
- [0389] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 스트렙타비딘은 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 단리하는 데 사용된다.
- [0390] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 단리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 효소적으로 처리하여 하이브리드 분자를 생성하는 단계는 어댑터-태깅된 DNA 단편을 주형으로 사용하여 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 각 포획 프로브에 대한 5'-3' 폴리머레이스 연장을 수행하여 복수의 하이브리드 분자(표적 포획 라이브러리)를 생성하는 단계를 포함하되, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 모듈 및 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함한다.
- [0391] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, SRL은 시퀀싱 기계의 단일 플로우 셀에서 시퀀싱된다.
- [0392] 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 수행하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, SRL에 대한 정량적 유전자 분석은 하나 이상의 시퀀싱 프라이머의 사용을 포함한다. 일부 실시형태에서, 정량적 유전자 분석은 뉴클레오타이드

전이 또는 전환, 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실, 게놈 재배열 또는 테스트 샘플 DNA 단편에서의 카피 수의 변화를 검출하는 데 사용된다.

[0393] 본 개시내용의 일부 실시형태는 (a) 제1 유전자좌를 포함하는 제1 어댑터-태깅된 라이브러리에 제1 프로세스를 수행하여 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 단계; (b) 제2 유전자좌를 포함하는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리에 제2 프로세스를 수행하여 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 단계(여기서, 제1 프로세스 및 제2 프로세스는 동일하지 않음); 및 (c) 제1 변형된 라이브러리와 제2 변형된 라이브러리를 접촉시켜 조합된 라이브러리를 생성하는 단계를 포함하는 동시 DNA 분석을 위한 방법을 제공하되; 제1 어댑터-태깅된 라이브러리 및 제2 어댑터-태깅된 라이브러리는 동일한 어댑터-태깅된 모 라이브러리로부터 유래한다.

[0394] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 어댑터-태깅된 모 라이브러리를 적어도 2개의 구획(partition)으로 분할하는 초기 단계를 포함하되, 제1 구획은 제1 어댑터-태깅된 라이브러리이고, 제2 구획은 제2 어댑터-태깅된 라이브러리이다.

[0395] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자를 포함하되; 제1 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고; 제1 테스트 샘플은 제1 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 제1 유전자좌에 커플링되고; 그리고 제2 변형된 라이브러리는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자를 포함하되; 제2 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고; 제2 테스트 샘플은 제2 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 제2 유전자좌에 커플링되고; 제1 변형된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함한다.

[0396] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자를 포함하되; 제1 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고; 제1 테스트 샘플은 제1 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 제1 유전자좌에 커플링되고; 그리고 제2 변형된 라이브러리는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자를 포함하되; 제2 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고; 제2 테스트 샘플은 제2 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 제2 유전자좌에 커플링되고; 제2 변형된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함한다.

[0397] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자를 포함하되; 제1 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고; 제1 테스트 샘플은 제1 유전자좌의 서열과 동일

한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 제1 유전자좌에 커플링되고; 그리고 제2 변형된 라이브러리는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자를 포함하되; 제2 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고; 제2 테스트 샘플은 제2 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 제2 유전자좌에 커플링되고; 제1 변형된 라이브러리는 제1 라이브러리 태그를 포함하고, 제2 변형된 라이브러리는 제2 라이브러리 태그를 포함하되, 제1 및 제2 라이브러리 태그는 동일하지 않다.

- [0398] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 테스트 샘플 및 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플이다.
- [0399] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 테스트 샘플 및 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플이 아니다.
- [0400] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 유전자좌 및 제2 유전자좌는 동일하다.
- [0401] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 유전자좌 및 제2 유전자좌 동일하지 않다.
- [0402] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 제1 변형된 라이브러리의 제1 DNA 서열을 제2 변형된 라이브러리의 제2 DNA 서열과 구별한다.
- [0403] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, A1, A2, B1 및 B2 중 적어도 하나는 적어도 하나의 라이브러리 태그를 포함한다.
- [0404] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0405] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 DNA, RNA, PNA 또는 비자연 발생적 핵산, 합성 핵산, 변형된 핵산, 비자연 발생적 아미노산, 합성 아미노산 및 변형된 아미노산 중 하나 이상을 포함한다.
- [0406] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 검출 가능한 표지를 포함한다.
- [0407] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함한다.
- [0408] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 검출 가능한 모이어티에 선택적으로 또는 특이적으로 결합한다.
- [0409] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 검출 가능한 모이어티는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함한다.
- [0410] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0411] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로부터 선택되는 서열과 70% 이하의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0412] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 테스트 샘플 및 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플이 아니고; A1, A2, B1 또는 B2는 라이브러리 태그를 포함하고; 라이브러리 태그는 제1 변형된 라이브러리의 제1 DNA 서열을 제2 변형된 라이브러리의 제2 DNA 서열과 구별할 수 있고; 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로

부터 선택되는 서열과 70% 이하의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

- [0413] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 어댑터-태깅된 라이브러리 및 제2 어댑터-태깅된 라이브러리는 각 어댑터 모듈을 포함한다.
- [0414] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 어댑터는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0415] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있는 영역에 혼성화하여 이와 이중체를 형성할 수 있다.
- [0416] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 어댑터 모듈을 포함한다.
- [0417] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 dT, dA, dC 또는 dG 오버행을 포함한다.
- [0418] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 dsDNA 단편의 5' 말단에 대한 결찰 및/또는 어댑터 이량체 형성을 방지하는 3' 말단의 변형을 포함하되, 비결찰 가닥은 이중체로부터 치환되도록 구성된다.
- [0419] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 어댑터는 어댑터 세트로부터 선택되되, 어댑터 세트의 각 어댑터는 고유한 ID 영역의 풀로부터 선택되는 ID 영역을 포함하고, 풀은 복수의 풀로부터 선택되고, 선택된 풀은 테스트 샘플에 고유하다.
- [0420] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 (a) 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역; (b) ID 영역; 및 (c) 앵커 영역을 포함한다.
- [0421] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 (a) 프라이머 결합 부위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 증폭 영역; (b) ID 영역; 및 (c) 앵커 영역을 포함한다.
- [0422] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하되, 프라이머 결합 부위는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 복제) 또는 LCR(라이케이스 연쇄 반응)를 사용한 증폭을 가능하게 한다.
- [0423] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 프라이머 결합 부위는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 복제) 또는 LCR(라이케이스 연쇄 반응)를 사용한 제1 및/또는 제2 어댑터 태깅된 라이브러리의 핵산의 증폭을 가능하게 한다.
- [0424] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 20개 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0425] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 10개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 20개 내지 약 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0426] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 3' 말단에 오버행을 포함한다.
- [0427] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 1개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 5개 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0428] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 1개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 5개 내지 약 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 10개의 뉴클레오타이드를 포함

하거나 또는 이로 이루어진다.

- [0429] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역은 3개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 3개 내지 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0430] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 3개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 3개 내지 약 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0431] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 고유한 분자 식별자(UMI) 멀티플라이어를 추가로 포함한다.
- [0432] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된다.
- [0433] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 1개 내지 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0434] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 약 1개 내지 약 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0435] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 64개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0436] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈은 어댑터 분자를 포함한다.
- [0437] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 고유하다.
- [0438] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 증폭 영역은 맞춤형 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0439] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 맞춤형 프라이머 결합 부위는 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 맞춤형 프라이머 결합 부위의 서열과 100% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0440] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈은 제1 하위부분(subdivision) 및 제2 하위부분을 포함한다.
- [0441] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 어댑터 모듈은 임의의 다른 어댑터 모듈의 ID 영역의 폴리뉴클레오타이드 서열과 구별되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 ID 영역을 포함한다.
- [0442] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 2개 내지 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 10개 내지 500개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 50개 내지 300개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다.
- [0443] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 2개 내지 약 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 10개 내지 약 500개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 50개 내지 약 300개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다.
- [0444] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0445] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있다.

- [0446] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 ID 영역은 이에 부착된 DNA 단편을 식별하도록 구성된다.
- [0447] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 64개 내지 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0448] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 약 64개 내지 약 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0449] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 고유한 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 각 서열은 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있다.
- [0450] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이룬다.
- [0451] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0452] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이고, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고; 어댑터 세트의 각 어댑터는 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 어댑터 세트의 각 어댑터의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 주어진 서열의 UMI 멀티플라이어는 주어진 서열의 하나의 ID 영역과 쌍을 이루고; 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이루고; 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0453] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 하위부분은 고유한 ID 영역의 제1 세트를 포함하고, 제2 하위부분은 고유한 ID 영역의 제2 세트를 포함한다.
- [0454] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 각 어댑터 모듈은 ID 영역의 폴리뉴클레오타이드 서열과 동일하지 않은 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 추가로 포함한다.
- [0455] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 하위부분의 각 어댑터 모듈은 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 포함하고; 제2 하위부분의 각 어댑터 모듈은 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 포함하되; 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 서열은 서로 동일하지 않다.
- [0456] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈의 제1 하위부분은 제1 테스트 샘플 내의 각 DNA 분자를 식별하고, 어댑터 모듈의 제2 하위부분은 제2 테스트 샘플 내의 각 DNA 분자를 식별한다.
- [0457] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 2개 내지 10,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0458] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 50개 내지 500개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0459] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 100개 내지 400개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0460] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 60개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0461] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0462] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 64개 내지 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0463] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 3840 개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 중 하나를 포함하고, 각 뉴클레오타이드 서열은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있다.
- [0464] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 앵커 영역은 4개의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0465] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 증폭 영역은 범용 프라이머 서열을 포함하고; 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지고; 복수의 어댑터 모듈은 2개 이상의 하위부분으로 나누어지되, 어댑터 모듈의 각 하위부분은 고유한 ID 영역의 세트를 포함하고; 각 ID 영역의 폴리뉴클레오타이드 서열은 복수의 어댑터 모듈의 임의의 다른 ID 영역의 뉴클레오타이드 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고; 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0466] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 (a) 어댑터 세트를 테스트 샘플의 DNA 단편에 결합시켜 복수의 어댑터/DNA 단편 복합체를 생성하는 단계; 및 (b) 복수의 어댑터/DNA 단편 복합체를 하나 이상의 효소와 접촉시켜 복수의 어댑터-태깅된 DNA 단편을 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 형성하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 각 어댑터/DNA 단편 복합체는 DNA 단편의 각 말단에 결합된 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 비결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 (b) 단계에서 어댑터/DNA 단편 복합체로부터 치환된다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 본 개시내용의 임의의 어댑터 세트이다.
- [0467] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 프로세스는 (a) 혼성화에 적합한 조건하에서 제1 어댑터-태깅된 라이브러리를 하나 이상의 포획 프로브와 접촉시켜 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 형성하는 단계(여기서, 각 포획 프로브는 프라이머 결합 부위를 포함하는 제1 영역; 및 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 제1 유전자좌 내의 표적 영역에 혼성화할 수 있는 제2 영역을 포함함); (b) (a) 단계로부터 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 분리하는 단계(여기서, 각 분리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체는 포획 프로브 및 어댑터-태깅된 DNA 분자를 포함함); 및 (c) (b) 단계로부터 하나 이상의 분리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 효소적으로 처리하여 하나 이상의 어댑터-태깅된 하이브리드 핵산 분자(하이브리드 분자)를 생성하는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브의 적어도 일부 또는 이의 상보체; 및 어댑터-태깅된 DNA 분자의 적어도 일부 또는 이의 상보체를 포함함)를 포함한다.
- [0468] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 포획 프로브의 제1 영역은 파트너 올리고뉴클레오타이드에 대한 상보성을 갖는 서열을 추가로 포함한다.
- [0469] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 분리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 효소 처리하여 하나 이상의 어댑터-태깅된 하이브리드 분자를 생성하는 단계는 복합체 내의 어댑터-태깅된 DNA 분자를 주형으로 사용하여 포획 프로브의 5'-3' DNA 폴리머레이스 연장을 수행하는 단계를 포함한다.
- [0470] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 포획 프로브는 표적 영역의 특정 영역의 하류에 혼성화하고, 적어도 하나의 포획 프로브는 표적 영역의 특정 영역의 상류에 혼성화한다.
- [0471] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0472] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 하이브리드 분자는 적어도 하나의 라이브러리 태그를 포함한다.
- [0473] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 포획 프로브의 제1 영역은 라이브러리 태그를 포함한다.
- [0474] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0475] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 (a) 혼성화에 적합한 조건하에서 제1

어댑터-태깅된 라이브러리를 하나 이상의 포획 프로브와 접촉시켜 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 형성하는 단계(여기서, 각 포획 프로브는 프라이머 결합 부위를 포함하는 제1 영역; 및 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 제1 유전자좌 내의 표적 영역에 혼성화할 수 있는 제2 영역을 포함함); (b)는 (a) 단계로부터 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 단리하는 단계(여기서, 각 단리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체는 포획 프로브 및 어댑터-태깅된 DNA 분자를 포함함); (c) (b) 단계로부터 하나 이상의 단리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 효소적으로 처리하여 하나 이상의 어댑터-태깅된 하이브리드 핵산 분자(하이브리드 분자)를 생성하는 단계; 및 (d) 하나 이상의 하이브리드 분자를 증폭시키는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브의 적어도 일부 또는 이의 상보체; 및 어댑터-태깅된 DNA 분자의 적어도 일부 또는 이의 상보체를 포함함)를 포함한다.

- [0476] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 증폭은 5'올리고뉴클레오타이드(A1)를 포함하는 제1 프라이머 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제2 프라이머를 포함하고, 증폭된 하이브리드 분자(들) 각각은 A1 및 A2를 포함한다.
- [0477] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 표적 영역은 유전적 병변을 포함한다.
- [0478] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 표적 영역은 후성유전적 표식을 포함한다.
- [0479] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 후성유전적 표식에 결합한다.
- [0480] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 후성유전적 표식은 메틸화 표식을 포함한다.
- [0481] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 프로세스는 (a) 혼성화에 적합한 조건하에서 제1 어댑터-태깅된 라이브러리를 하나 이상의 포획 프로브와 접촉시켜 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 형성하는 단계(여기서, 각 포획 프로브는 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함하는 라이브러리 태그 및 파트너 올리고뉴클레오타이드에 대한 상보성을 갖는 서열을 포함하는 제1 영역; 및 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 제1 유전자좌 내의 표적 영역에 혼성화할 수 있는 제2 영역을 포함함); (b)는 (a) 단계로부터 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 단리하는 단계(여기서, 각 단리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체는 포획 프로브 및 어댑터-태깅된 DNA 분자를 포함함); (c) (b) 단계로부터 하나 이상의 단리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 효소적으로 처리하여 하나 이상의 어댑터-태깅된 하이브리드 핵산 분자(하이브리드 분자)를 생성하는 단계(여기서, 효소 처리는 복합체 내의 어댑터-태깅된 DNA 분자를 주형으로 사용하여 포획 프로브의 5'-3' DNA 폴리머레이스 연장을 수행하는 단계를 포함하고; 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 및 포획 프로브가 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 표적 영역에 혼성화된 곳으로부터 3'에 있는 어댑터-태깅된 DNA 분자의 상보체를 포함함); 및 (d) (c) 단계에서 하나 이상의 하이브리드 분자를 증폭시키는 단계(여기서, 증폭은 5'올리고뉴클레오타이드(A1)를 포함하는 제1 프라이머 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제2 프라이머를 하이브리드 분자에 혼성화하는 것을 포함하고, 증폭된 하이브리드 분자(들) 각각은 A1 및 A2를 포함함)를 포함한다.
- [0482] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제2 프로세스는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 제2 유전자좌를 증폭 또는 연장시키는 것을 포함한다.
- [0483] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 증폭 또는 연장은 5'올리고뉴클레오타이드(B1)를 포함하는 제1 프라이머 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 프라이머를 어댑터-태깅된 DNA 분자에 혼성화하는 것을 포함하고, 증폭되거나 또는 연장된 제2 유전자좌는 B1 및 B2를 포함한다.
- [0484] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, B1 및 B2 중 적어도 하나는 라이브러리 태그를 포함한다.
- [0485] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제2 프로세스는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 제2 유전자좌를 증폭 또는 연장시키는 단계를 포함하되, 증폭 또는 연장은 5'올리고뉴클레오타이드(B1)를 포함하는 제1 프라이머 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 프라이머를 어댑터-태깅된 DNA 분자에 혼성화하는 것을 포함하고, B1 및 B2 중 적어도 하나는 라이브러리 태그를 포함하고, 증폭되거나 또는 연장된 제2 유전자좌는 B1 및 B2를 포함한다.
- [0486] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 유전자 분석 단계를 추가로 포함한다.
- [0487] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 유전자 분석은 적어도 하나의 변형된 라이브러

리에서 적어도 하나의 라이브러리 태그의 존재를 검출하는 단계를 포함한다.

- [0488] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 유전자 분석은 복수의 시퀀싱 리드를 생성하기 위한 조합된 라이브러리의 시퀀싱 및 복수의 시퀀싱 리드에 대한 생물정보학 분석을 수행하는 것을 포함한다.
- [0489] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 제1 라이브러리 태그를 포함하고, 제2 변형된 라이브러리는 제2 라이브러리 태그를 포함한다.
- [0490] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 라이브러리 태그는 제1 신호를 생성하고, 제2 라이브러리 태그는 제2 신호를 생성한다.
- [0491] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 신호가 모두 검출되거나 또는 검출 가능하다.
- [0492] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 신호 및 제2 신호는 동일하지 않다.
- [0493] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 제2 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않다.
- [0494] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제2 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 제1 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않다.
- [0495] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리 중 하나만이 라이브러리 태그를 포함한다.
- [0496] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 제1 신호를 생성하고, 라이브러리 태그가 없으면 제2 신호를 생성한다.
- [0497] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 신호가 모두 검출되거나 또는 검출 가능하다.
- [0498] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 신호 및 제2 신호는 동일하지 않다.
- [0499] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 제2 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않다.
- [0500] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제2 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 제1 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않다.
- [0501] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 신호는 시퀀싱 리드이고, 제2 신호는 빈(empty) 시퀀싱 리드이다.
- [0502] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 빈 시퀀싱 리드(제2 신호)는 일련의 2개 이상의 G 뉴클레오타이드로 검출된다.
- [0503] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 검출된 제1 신호 및 검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있다.
- [0504] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 검출된 제1 신호 및 비검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있다.
- [0505] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 비검출된 제1 신호 및 검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있다.
- [0506] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 유전자 분석은 하나 이상의 유전적 병변을 식별하는 데 사용된다.
- [0507] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 유전적 병변은 뉴클레오타이드 전이, 뉴클레오타이드 전환, 뉴클레오타이드 삽입, 뉴클레오타이드 결실, 게놈 재배열 또는 카피 수의 변화를 포함한다.
- [0508] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 유전자 분석은 유전적 질환을 유발하거나 또는 이와 관련된 하나 이상의 유전적 병변을 검출하는 데 사용된다.

- [0509] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 유전적 질환은 암이다.
- [0510] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 유전적 병변은 염색체 재배열이다.
- [0511] 본 개시내용의 동시 DNA 분석을 위한 방법의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리는 적어도 하나의 라이브러리 태그 또는 이의 일부의 식별에 의해 시퀀싱 후 역다중화된다.
- [0512] 본 개시내용의 일부 실시형태는 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리를 포함하는 조성물을 제공하되, 제1 변형된 라이브러리는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자를 포함하되; 제1 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고; 제1 테스트 샘플은 제1 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 제1 유전자좌에 커플링되고; 그리고 제2 변형된 라이브러리는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자를 포함하되; 제2 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고; 제2 테스트 샘플은 제2 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 제2 유전자좌에 커플링되고; 제1 변형된 라이브러리 또는 제2 변형된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함한다.
- [0513] 본 개시내용의 일부 실시형태는 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리를 포함하는 조성물을 제공하되, 제1 변형된 라이브러리는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자를 포함하되; 제1 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고; 제1 테스트 샘플은 제1 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 제1 유전자좌에 커플링되고; 그리고 제2 변형된 라이브러리는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자를 포함하되; 제2 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고; 제2 테스트 샘플은 제2 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 제2 유전자좌에 커플링되고; 제1 변형된 라이브러리는 제1 라이브러리 태그를 포함하고, 제2 변형된 라이브러리는 제2 라이브러리 태그를 포함하되, 제1 및 제2 라이브러리 태그는 동일하지 않다.
- [0514] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 제1 테스트 샘플 및 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플이다.
- [0515] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 제1 테스트 샘플 및 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플이 아니다.
- [0516] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 제1 유전자좌 및 제2 유전자좌는 동일하다.
- [0517] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 제1 유전자좌 및 제2 유전자좌 동일하지 않다.
- [0518] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 제1 변형된 라이브러리의 제1 DNA 서열을 제2 변형된 라이브러리의 제2 DNA 서열과 구별한다.
- [0519] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, A1, A2, B1 및 B2 중 적어도 하나는 적어도 하나의 라이브러리 태그를 포함한다.

- [0520] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0521] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 DNA, RNA, PNA 또는 비자연 발생적 핵산, 합성 핵산, 변형된 핵산, 비자연 발생적 아미노산, 합성 아미노산 및 변형된 아미노산 중 하나 이상을 포함한다.
- [0522] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 검출 가능한 표지를 포함한다.
- [0523] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함한다.
- [0524] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 검출 가능한 모이어티에 선택적으로 또는 특이적으로 결합한다.
- [0525] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 검출 가능한 모이어티는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함한다.
- [0526] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0527] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로부터 선택되는 서열과 70% 이하의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0528] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 제1 테스트 샘플 및 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플이 아니고; A1, A2, B1 또는 B2는 라이브러리 태그를 포함하고; 라이브러리 태그는 제1 변형된 라이브러리의 제1 DNA 서열을 제2 변형된 라이브러리의 제2 DNA 서열과 구별할 수 있고; 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로부터 선택되는 서열과 70% 이하의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0529] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터는 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 비결합 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0530] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 비결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있는 영역에 혼성화하여 이와 이중체를 형성할 수 있다.
- [0531] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 어댑터 모듈을 포함한다.
- [0532] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 dT, dA, dC 또는 dG 오버행을 포함한다.
- [0533] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 비결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 dsDNA 단편의 5' 말단에 대한 결합 및/또는 어댑터 이량체 형성을 방지하는 3' 말단의 변형을 포함하되, 비결합 가닥은 이중체로부터 치환되도록 구성된다.
- [0534] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터는 고유한 ID 영역의 풀로부터 선택되는 ID 영역을 포함하되, 풀은 복수의 풀로부터 선택되고, 선택된 풀은 테스트 샘플에 고유하다.
- [0535] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 (a) 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역; (b) ID 영역; 및 (c) 앵커 영역을 포함한다.
- [0536] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 (a) 프라이머 결합 부위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 증폭 영역; (b) ID 영역; 및 (c) 앵커 영역을 포함한다.
- [0537] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하되, 프라이머 결합 부위는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 등온 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 복제) 또는 LCR(라이게이스 연쇄 반응)을 사용한 증폭을 가능하게 한다.
- [0538] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 프라이머 결합 부위는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 등온 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 복제) 또는 LCR(라이게이스 연쇄 반응)을 사용한 제1 및/또는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 핵산의 증폭을 가능하게 한다.

- [0539] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 20개 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0540] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 10개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 20개 내지 약 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0541] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 3' 말단에 오버행을 포함한다.
- [0542] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 1개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 5개 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0543] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 1개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 5개 내지 약 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 약 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0544] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, ID 영역은 3개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 3개 내지 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0545] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 3개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 3개 내지 약 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0546] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 고유한 분자 식별자(UMI) 멀티플라이어를 추가로 포함한다.
- [0547] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된다.
- [0548] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 1개 내지 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0549] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 약 1개 내지 약 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0550] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 64개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0551] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 2개 내지 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 10개 내지 500개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 50개 내지 300개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다.
- [0552] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 2개 내지 약 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 10개 내지 약 500개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 50개 내지 약 300개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ID 영역의 풀은 약 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함한다.
- [0553] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0554] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있다.
- [0555] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 각 ID 영역은 이에 부착된 DNA 단편을 식별하도록 구성된다.

- [0556] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 64개 내지 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0557] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 약 64개 내지 약 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0558] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 고유한 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 각 서열은 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있다.
- [0559] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이룬다.
- [0560] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0561] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이고, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고; 어댑터 세트의 각 어댑터는 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 어댑터 세트의 각 어댑터의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 주어진 서열의 UMI 멀티플라이어는 주어진 서열의 하나의 ID 영역과 쌍을 이루고; 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이루고; 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0562] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈은 어댑터 모듈을 포함한다.
- [0563] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 고유하다.
- [0564] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 증폭 영역은 맞춤형 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0565] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 맞춤형 프라이머 결합 부위는 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 맞춤형 프라이머 결합 부위의 서열과 100% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0566] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈은 제1 하위부분 및 제2 하위부분을 포함한다.
- [0567] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 각 어댑터 모듈은 임의의 다른 어댑터 모듈의 ID 영역의 폴리뉴클레오타이드 서열과 구별되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 ID 영역을 포함한다.
- [0568] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 제1 하위부분은 고유한 ID 영역의 제1 세트를 포함하고, 제2 하위부분은 고유한 ID 영역의 제2 세트를 포함한다.
- [0569] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 각 어댑터 모듈은 ID 영역의 폴리뉴클레오타이드 서열과 동일하지 않은 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 추가로 포함한다.
- [0570] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 제1 하위부분의 각 어댑터 모듈은 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 포함하고, 제2 하위부분의 각 어댑터 모듈은 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 포함하되; 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 서열은 서로 동일하지 않다.
- [0571] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈의 제1 하위부분은 제1 테스트 샘플 내의 각 DNA 분자를 식별하고, 어댑터 모듈의 제2 하위부분은 제2 테스트 샘플 내의 각 DNA 분자를 식별한다.
- [0572] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈의 제1 하위부분은 제1 테스트 샘플을 식별하고, 어댑터 모듈의 제2 하위부분은 제2 테스트 샘플을 식별한다.
- [0573] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 2개 내지 10,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0574] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 50개 내지 500개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0575] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 100개 내지 400개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0576] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 60개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0577] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0578] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 64개 내지 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0579] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 중에서 선택된 고유한 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 각 뉴클레오타이드 서열은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있다.
- [0580] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 앵커 영역은 4개의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0581] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 증폭 영역은 범용 프라이머 서열을 포함하고; 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지고; 복수의 어댑터 모듈은 2개 이상의 하위부분으로 나누어지되, 어댑터 모듈의 각 하위부분은 고유한 ID 영역의 세트를 포함하고, 각 ID 영역의 폴리뉴클레오타이드 서열은 복수의 어댑터 모듈의 임의의 다른 ID 영역의 뉴클레오타이드 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고; 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.
- [0582] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 테스트 샘플은 조직 생검이다.
- [0583] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 조직 생검은 종양인 것으로 의심되는 종양 또는 조직으로부터 얻어진다.
- [0584] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 조직 생검은 악성 종양 또는 악성 종양인 것으로 의심되는 종양으로부터 얻어진다.
- [0585] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, DNA 분자는 무세포 DNA(cfDNA), 게놈 DNA(gDNA), 상보적 DNA(cDNA), 미토콘드리아 DNA, 메틸화된 DNA 또는 탈메틸화된 DNA이다.
- [0586] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, DNA 분자는 후성유전적 표식을 포함한다.
- [0587] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, DNA 분자는 전체 게놈 라이브러리, 앰플리콘 라이브러리, 전체 엑솜 라이브러리, cDNA 라이브러리 또는 메틸화된 DNA 라이브러리로 이루어진 목록으로부터 선택되는 라이브러리로부터 얻어진다.
- [0588] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, DNA 분자는 테스트 샘플로부터 단리되거나 또는 생성된다.
- [0589] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 테스트 샘플은 양수 샘플, 혈액 샘플, 피부 샘플, 모발 샘플, 모낭 샘플, 타액 샘플, 점액 샘플, 땀 샘플, 눈물 샘플, 상피 조직 샘플, 소변 샘플, 정액 샘플, 정액 혈장 샘플, 혈청 샘플, 전립선액 샘플, 사정전 유체(쿠퍼액) 샘플, 안구액 샘플, 배설물 샘플, 생검 샘플, 복수 샘플, 뇌척수액 샘플, 림프 샘플, 조직 추출물 샘플, 대변 샘플 및 포르말린-고정, 파라핀 포매(FFPE) 샘플로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 샘플을 포함한다.
- [0590] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, DNA 분자는 (a) 테스트 샘플로부터 세포 DNA를 단리하는 단계; 또는 (b) 세포 DNA를 단편화하여 게놈 DNA 단편을 얻는 단계를 포함하는 단계에 의해 얻어진다.
- [0591] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 세포 DNA를 단편화하는 (b) 단계는 세포 DNA를 적어도 하나의 소화효소와 접촉시킴으로써 수행된다.
- [0592] 본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 세포 DNA를 단편화하는 (b) 단계는 세포 DNA에 기계적 스트레스를 가함으로써 수행된다.

[0593]

본 개시내용의 조성물의 일부 실시형태에서, 세포 DNA를 단편화하는 (b) 단계는 세포 DNA를 하나 이상의 화합물과 접촉시켜 세포 DNA의 하나 이상의 결합을 화학적으로 파괴함으로써 수행된다.

도면의 간단한 설명

[0594]

본 개시내용의 다양한 목적 및 이점과 보다 완전한 이해는 첨부된 도면과 함께 다음의 상세한 설명 및 첨부된 청구범위를 참조함으로써 명백하고 보다 쉽게 이해될 수 있다:

도 1은 3가지 상이한 유형의 어댑터 모듈을 도시하는 개략도이다.

도 2는 앵커 영역을 어댑터의 ID 영역(어댑터 요소는 예시이며, 길이는 비례하지 않음)에 일치시키기 위한 예시적인 프로세스뿐만 아니라 다른 샘플에 할당된 어댑터 세트의 생성을 도시하는 개략도이다. 이 실시형태에서, 검은색 상자는 동일한 증폭 영역을 나타내고, 패턴이 있는 상자는 별개의 ID 영역을 나타내며, 각 패턴은 서로 다른 ID 영역을 나타낸다. 회색 상자는 앵커 영역을 나타내고, 각 유형의 앵커 영역 서열은 서로 다른 회색 음영으로 표시된다.

도 3은 본 개시내용의 방법의 한 실시형태를 도시하는 개략도이다. 패턴은 라이브러리의 조성을 나타내며, 동일한 패턴은 동일한 조성(예를 들어, 제1 어댑터-태깅된 라이브러리 및 제2 어댑터-태깅된 라이브러리)을 나타내고, 두 패턴은 상이한 조성의 혼합물(예를 들어, 조합된 라이브러리)을 나타낸다.

도 4는 본 개시내용의 방법의 일부 실시형태의 예시적인 작업 흐름을 도시하는 개략도이다. 이 실시형태에서, 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA) 및 LPWG 라이브러리는 별도로 생성된 다음 시퀀싱을 위해 조합된다.

도 5는 어댑터-태깅된 모 라이브러리를 생성하기 위한 예시적인 프로세스를 도시하는 개략도이다. 일부 실시형태에서, 모 라이브러리는 다음 순서로 생성된다: 첫 번째 단계에서는, dsDNA 단편이 말단-복구되어 양쪽 가닥 끝에 5' 포스페이팅 및 3'-dA(테옥시리보핵산 아데닌) 꼬리가 있는 단편을 제공하고; 두 번째 단계에서는, 어댑터의 결합 가닥이 단편의 5' 말단에 결합되어 단편에 ID 영역 및 PCR 프라이머 결합 부위를 태깅하고; 세 번째 단계에서는, 태깅된 DNA가 채워지고(즉, 연장되고), 비결합 가닥이 어댑터로부터 분리되어 어댑터-태깅된 DNA 단편을 포함하는 어댑터-태깅된 모 라이브러리를 생성한다. 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 모 라이브러리 및/또는 어댑터-태깅된 DNA 단편의 집합(집합)은 LIB 또는 LIBS로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 네 번째 단계에서는, 연장된 어댑터-태깅된 DNA 단편이 PCR에 의해 증폭되어 증폭된 라이브러리를 생성한다. 일부 실시형태에서, 증폭된 라이브러리는 증폭 후 라이브러리(LPA)로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 세 번째 및 네 번째 단계는 반응 혼합물에 추가적인 시약을 추가하지 않고 유전자 증폭기(thermal cycler)에서 연속적으로(즉, 추가적인 시약을 추가하지 않고) 수행될 수 있다.

도 6은 표적 포획 라이브러리(TCL)를 생성하기 위한 예시적인 프로세스를 도시하는 개략도이다. 일부 실시형태에서, 제1 단계에서는, 포획 프로브 모듈이 변성된 어댑터-태깅된 DNA 단편(예를 들어, LIBS 단편 또는 LPA 단편)에 혼성화된다. 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열(녹색) 및 포획 프로브 서열(진한 청색)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 파트너 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 바이오틴 표지를 포함하는 파트너 올리고뉴클레오타이드(회색)에 혼성화된다. 일부 실시형태에서, 제2 단계에서는, 포획 프로브 모듈이 어댑터-태깅된 DNA 단편을 주형으로 사용하여 이의 3' 말단에서 연장되어 표적 포획 라이브러리(TCL)를 생성한다. 일부 실시형태에서, 세 번째 단계에서는, TCL이 프라이머 FP 및 RP를 사용하여 증폭되며, FP는 어댑터 증폭 영역의 적어도 일부에 결합하고, RP는 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열의 적어도 일부에 결합한다. 일부 실시형태에서, FP는 제1 시퀀싱 프라이머에 대한 결합 부위(적색)를 포함하고, RP는 제2 시퀀싱 프라이머에 대한 결합 부위(녹색)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 포획 프로브(녹색)의 꼬리 영역에 포매되어 있다. 생성된 증폭된 라이브러리는 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)로 지칭되며, 시퀀싱할 준비가 되어 있다.

도 7은 저역-통과 전체 게놈(LPWG) 라이브러리의 생성을 위한 방법의 예시적인 실시형태를 도시하는 개략도이다. 일부 실시형태에서, LPWG는 증폭된 전체 게놈 라이브러리(Amplified Whole Genome Library) 또는 증폭된 전체 게놈 라이브러리(WGLA)로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 모 라이브러리, 증폭된 어댑터-태깅된 모 라이브러리, LIBS 또는 LPA의 어댑터-태깅된 DNA 단편은 시퀀싱 어댑터(예를 들어, 올리고 1(적색) 및 올리고 2(청색)) 및 증폭 영역 결합 영역(황색)을 포함하는 프라이머로 증폭된다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역 결합 영역은 ACA 서열로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 올리고 1 및 올리고 2는 Illumina® P5 및 P7 서열일 수 있고; 이러한 프라이머를 사용한 증폭은 양쪽 말단에 올리고 1 및 올리고 2 서열을 갖는 DNA 단편의 라이브러리를 생성하며, 시퀀싱할 준비가 되어 있다. 일부 실시형태에서, LPWG 라이브러리(WGLA)는 리드 2 시퀀

싱 프라이머 결합 도메인을 보유하지 않는다. 일부 실시형태에서, WGLA는 라이브러리 태그를 보유하지 않는다.

도 8은 LIB 또는 LPA 입력을 이용한 8 사이클, 12 사이클 또는 16 사이클의 LPWG 증폭 후 라이브러리 농도를 보여주는 그래프이다.

도 9는 qPCR에 의해 또는 58℃ 또는 69℃의 어닐링 온도에서 8 사이클, 12 사이클 또는 16 사이클 동안 증폭된 DNA의 농도를 결정하는 데 사용된 표준 검정(검정)에 의해 측정된 LPWG 라이브러리의 농도를 보여주는 그래프이다.

도 10은 검정, 올리고 1 및/또는 올리고 2 프라이머를 사용한 qPCR 또는 4 사이클, 6 사이클, 8 사이클, 12 사이클, 14 사이클 또는 16 사이클 후에 프라이머 믹스 1S("ACA")를 사용한 qPCR에 의해 측정된 라이브러리 농도를 보여주는 그래프이다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 11은 8 사이클, 12 사이클, 14 사이클 또는 18 사이클의 증폭 후에 올리고 1/올리고 2 프라이머를 사용한 qPCR에 의해 측정된 농도에 대한 검정에 의해 측정된 농도의 비를 보여주는 그래프이다.

도 12a는 4 사이클(청색), 6 사이클(녹색) 또는 8 사이클(적색) 동안 증폭된 LPWG 라이브러리의 Bioanalyzer 흔적(trace)의 오버레이를 보여주는 그래프이다.

도 12b는 8 사이클(청색), 12 사이클(녹색), 14 사이클(청록색) 또는 16 사이클(적색) 동안 증폭된 LPWG 라이브러리의 Bioanalyzer 흔적의 오버레이를 보여주는 그래프이다.

도 13은 0 사이클(청색), 6 사이클(녹색), 8 사이클(청록색), 12 사이클(분홍색) 또는 16 사이클(적색) 동안 145bp 크기-선택된 단편으로부터 증폭된 LPWG 라이브러리의 Bioanalyzer 흔적의 오버레이를 보여주는 그래프이다.

도 14는 검정 또는 qPCR에 의해 측정된, 8 사이클 동안 5ng, 10ng, 25ng, 50ng, 75ng 또는 100ng의 야생형 LPA로부터 증폭된 LPWG 라이브러리의 농도를 보여주는 그래프이다.

도 15는 검정 또는 qPCR에 의해 측정된, 16 사이클 동안 10ng, 20ng, 50ng, 100ng 또는 200ng의 야생형 LPA로부터 증폭된 LPWG 라이브러리의 농도를 보여주는 그래프이다.

도 16는 플로우 셀에 로딩하기 전 정규화된, 16 사이클 동안 10ng, 20ng, 50ng, 100ng 또는 200ng의 야생형 LPA로부터 증폭된 LPWG 라이브러리에 대한 시퀀싱 리드의 수를 보여주는 그래프이다. (시퀀싱 실행 번호 16)

도 17은 LPWG PCR에 대한 다양한 입력량을 갖는 2개의 복제물 샘플로부터의 평균 리드 수를 보여주는 그래프이다. 오차 막대는 복제물 간의 표준 편차를 나타낸다.

도 18은 0.5x(50μl), 1x(100μl) 또는 2x(200μl) 반응 부피에서 16 사이클 동안 증폭된 LPWG 라이브러리의 농도를 보여주는 그래프이다.

도 19는 0.5x, 1x 또는 2x 반응 부피에서 증폭된 LPWG 라이브러리의 Bioanalyzer 흔적의 오버레이를 보여주는 그래프이다.

도 20은 0.5x(0.5μM), 1x(1μM) 또는 2x(2μM) 프라이머에서 16 사이클 동안 증폭된 LPWG 라이브러리의 농도를 보여주는 그래프이다.

도 21은 0.5x, 1x 또는 2x 프라이머 농도로 증폭된 LPWG 라이브러리의 Bioanalyzer 흔적의 오버레이를 보여주는 그래프이다.

도 22는 효소 1 또는 효소 2를 사용하여 8 사이클, 12 사이클, 14 사이클 또는 16 사이클 동안 증폭된 LPWG 라이브러리의 농도를 보여주는 그래프이다.

도 23은 효소 1을 사용하여 증폭된 LPWG 라이브러리의 Bioanalyzer 흔적의 오버레이를 보여주는 그래프이다.

도 24는 공동 로딩된 LPWG 및 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)의 분포를 보여주는 그래프이다.

도 25는 LPWG 라이브러리와 함께 공동 로딩된 2개의 포획 라이브러리에 대한 평균 깊이를 보여주는 그래프이다. LPWG 라이브러리의 표적 적용 범위(coverage) 및 수는 x-축을 따라 기재된다.

도 26은 16개의 임상 및 야생형 샘플의 적용 범위를 보여주는 그래프이다.

도 27은 표적 포획 라이브러리와 공동 로딩된 야생형 LPWG 라이브러리에 대해 계산된 적용 범위를 보여주는 그

래프이다. 대각선 줄무늬 상자 그림은 0.5x 적용 범위의 표적에 로딩된 라이브러리를 보여주는 반면, 수직 줄무늬 상자 그림은 1x 적용 범위에 대해 표적화된 라이브러리를 보여준다.

도 28은 리드 2 서열을 사용하여 TCLA 및 WGLA 라이브러리를 역다중화(즉, 구별)하는 예시적인 실시형태를 도시하는 개략도이다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 리드 2 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. FC 서열은 시퀀싱 기계의 플로우 셀에 결합할 수 있는 서열을 나타낸다. 이 도면에서, 시퀀싱될 DNA 분자에 결합하는 리드 1 및 리드 2 서열은 시퀀싱 프라이머를 나타내고; 바코드 서열은 고유한 서열을 포함하는 어댑터 모듈의 적어도 일부를 나타낸다.

도 29는 LPWG 라이브러리를 추가하거나 또는 추가하지 않고 TCLA 라이브러리에 대한 변이(variant) 호출을 보여주는 다이어그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0595] 본 개시내용의 일부 실시형태는 상이한 라이브러리의 단일 풀에 대한 동시 유전자 분석을 수행함으로써 상이한 유전자 분석 접근법의 이점을 결합하는 조성물 및 방법을 제공하되, 상이한 라이브러리 각각은 상이한 유전자 분석 접근법에 특이적이다. 현재 당업계에서 사용되는 차세대 시퀀싱(NGS) 방법을 이용하는 유전자 분석 접근법은 표적-풍부 라이브러리의 표적화된 시퀀싱, 전체-게놈 라이브러리의 전체 게놈 시퀀싱 및 화학적으로 형질전환된 라이브러리의 후성유전학적 분석을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 유전자 분석 접근법은 일반적으로 최종 응용분야(예를 들어, 임상 대 연구), 필요한 결과 품질, 기술 효율성 및 비용을 포함한 여러 요인을 기반으로 선택되는 동시에 각 접근법의 장점 및 단점도 고려한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 표적화된 유전자 분석 접근법은 미리 결정된 DNA 표적 영역에 초점을 맞추기 때문에, 게놈의 다른 영역(비표적 영역)에서 추가적인 DNA 이상을 식별하지 못할 수 있다. 반대로, 일부 실시형태에서, LPWG 시퀀싱은 전체 게놈에 대한 적용 범위를 제공하고, 더 낮은 시퀀싱 깊이에서 수행될 수 있지만 특정 관심 DNA 영역에 대한 민감도가 낮아질 수 있다.

[0596] 본 개시내용의 일부 실시형태는 다양한 유전자 분석 접근법에 특이적인 라이브러리를 단일 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)로 조합하는 데 사용될 수 있는 조성물 및 방법을 제공하되, SRL 내의 다양한 라이브러리는 단일 시퀀싱 분석 실험에서(예를 들어, 시퀀싱 기계의 단일 플로우 셀에서) 동시에 분석될 수 있다. 본 개시내용의 일부 실시형태에서, 이 접근법은 시퀀싱 효율을 증가시키고, 시퀀싱 적용 범위를 확장시키며, 필요한 민감도를 유지한다. 일부 실시형태에서, 특정 유전자좌에서의 표적화된 유전자 분석은 낮은 빈도의 유전적 변이를 검출하기 위한 딥 시퀀싱에 의해 수행될 수 있으며, 동시 전체-게놈 시퀀싱은 카피 수 변화에 대한 보다 정확한 평가를 제공할 수 있다.

[0597] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 수많은 이점을 제공하며, 이들 중 일부는 아래에 설명되어 있다:

[0598] 감소된 편향: 일부 실시형태에서, 테스트 샘플로부터 생성된 어댑터-태깅된 모 라이브러리 또는 증폭 후 라이브러리(LPA)는 각 어댑터-태깅된 라이브러리가 상이한 변형 프로세스를 거치기 전에 두 부분(제1 어댑터-태깅된 라이브러리 및 제2 어댑터-태깅된 라이브러리)로 분할된다. 각각의 변형 프로세스를 수행 시, 제1 어댑터-태깅된 라이브러리는 제1 변형된 라이브러리를 생성할 수 있고, 제2 어댑터-태깅된 라이브러리는 제2 변형된 라이브러리를 생성할 수 있다. 동일한 어댑터-태깅된 모 라이브러리 또는 동일한 LPA로부터 제1 및 제2 변형된 라이브러리를 생성함으로써, 제1 및 제2 변형된 DNA 라이브러리는 각각의 변형 프로세스 전에 동일한 시작점(즉, 공통 모 라이브러리)을 가질 것이다. 대조적으로, 공통 모 라이브러리를 먼저 생성하지 않고 동시에 생성된 2개의 변형된 라이브러리는 동일한 시작점을 갖지 않을 것이며, 이는 각 변형된 라이브러리가 각각의 변형 프로세스 전에 어댑터-결찰 동안 도입된 편향의 영향을 받기 때문이다. 따라서, 공통 모 라이브러리로부터 제1 및 제2 변형된 라이브러리를 생성하면 이러한 라이브러리를 별도의 프로세스(예를 들어, 상이한 샘플로부터) 또는 병렬 프로세스(예를 들어, 동일한 샘플이지만 상이한 중간 라이브러리로부터)에서 생성함으로써 도입될 수 있는 편향이 감소된다. 이러한 편향의 감소는 하류 유전자 분석으로부터의 결과 데이터에서 노이즈를 크게 줄이고 민감도를 높일 수 있다.

[0599] 포괄적인 유전자 프로파일링: 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법의 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 표적 포획 라이브러리(TCL) 또는 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)이고, 제2 변형된 라이브러리는 전체-게놈 라이브러리(WGL) 또는 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA)이다. WGLA 및 저역-통과 전체-게놈(LPWG) 라이브러리는 본 개시내용에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. TCL 또는 TCLA에 대한 표적화된 유전자 분석은 표적화된 영역에 대해 더 높은 특이도 및 민감도를 제공할 수 있지만, 염색체의 부분에 걸쳐있을 수 있는 더 큰 게놈 변이를 식별하는 데 덜 견고할 수 있다. TCL 또는 TCLA와 WGL 또는 WGLA를 단일 조합된 라이브러리로 조합함으

로써, 한 번의 시퀀싱 실행의 결과에 대해 표적화된 유전자 분석 및 광범위한 적용 범위의 전체 게놈 분석이 모두 수행될 수 있다.

[0600] 샘플 함량의 개선된 정량화: 일부 실시형태에서, 암과 관련된 하나 이상의 유전적 병변의 빈도는 본 개시내용의 방법 및 조성물을 사용하여 결정된다. 이러한 실시형태에서, 개체의 생식세포 계열 내가 아닌 종양 내에 존재하는 체세포 돌연변이는 종양으로부터 배출되는 순환 DNA의 양을 정량화하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, TCLA 및 WGLA 라이브러리의 조합은 관심 초점 영역을 조사하는 능력을 유지하면서 종양으로부터 기원하는 돌연변이의 발견을 촉진할 것이다. 생물학적 중요성에 관계없이 새로운 돌연변이의 발견은 또한 혼합된 cfDNA에서 종양 함량의 정량화를 개선한다.

[0601] 감소된 비용: 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물 및 방법을 사용하여 수행된 유전자 분석은 비용을 절감할 수 있다. 예를 들어, 유전자 분석은 시퀀싱에 의해 이루어질 수 있으며, 이는 각 개별 시퀀싱 실행에 비용이 많이 들 수 있다. 여러 라이브러리(예를 들어, 표적 포획 라이브러리 및 LPWG 라이브러리)를 단일 라이브러리로 조합하고 이 단일 라이브러리에 대한 시퀀싱을 수행함으로써, 더 적은 수의 시약의 사용, 더 낮은 시설 비용뿐만 아니라 감소된 인력 시간 단축으로 인해 비용이 낮아질 수 있다.

[0602] 본 발명은 예시적이고, 비제한적인 실시형태를 사용하고 첨부 도면을 참조하여 이하에서 더욱 완전하게 설명된다. 그러나, 본 발명은 많은 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 아래에 제시된 실시형태에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 오히려, 이러한 실시형태는 본 개시내용이 완전하고 당업자에게 본 발명의 범위를 전달하도록 제공된다.

[0603] 조성물

[0604] 본 개시내용의 일부 실시형태는 유전자 분석을 위한 DNA 라이브러리, 예를 들어, 표적화된 유전자 분석에 사용하기 위한 표적-포획 라이브러리를 생성하는 데 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 본 개시내용의 일부 실시형태는 SRL에 조합될 수 있는 상이한 라이브러리, 예를 들어, 표적-포획 라이브러리 및 전체-게놈 라이브러리를 포함하는 조합된 라이브러리를 생성하는 데 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트에 의해 생성된 SRL은 단일 시퀀싱 분석 실험에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 단일 시퀀싱 분석 실험에서 표적화된 유전자 분석 및 전체-게놈 분석 모두에 사용될 수 있되, 특정 유전자좌에서의 표적화된 유전자 분석은 낮은 빈도의 유전적 변이를 검출하고, 동시 전체-게놈 시퀀싱은 카피 수 변화의 평가를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 시퀀싱 효율을 증가시키고, 시퀀싱 적용 범위를 확장시키고/시키거나 민감도를 유지시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 시퀀싱 효율을 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 시퀀싱 적용 범위를 확장시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 민감도를 유지시킬 수 있다.

[0605] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 적어도 하나의 구성요소는 본 개시내용의 QC 프로세스를 통과하였다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 적어도 하나의 구성요소는 본 개시내용의 다중 QC 프로세스를 통과하였다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 여러 구성요소는 본 개시내용의 QC 프로세스를 통과하였다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 여러 구성요소는 본 개시내용의 다중 QC 프로세스를 통과하였다.

[0606] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 어댑터는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 어댑터 세트는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 어댑터는 실시예 16에 기재된 바와 같은 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 어댑터 세트는 실시예 16에 기재된 바와 같은 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.

[0607] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 포획 프로브 모듈은 본 개시내용의 프로브 QC 프로세스를 통과하였다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 기재된 바와 같은 프로브 QC 프로세스를 통과하였다.

[0608] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 말단 복구 완충액, 말단 복구 효소, 결찰 믹스, 라이브러리 PCR 믹스, 라이브러리 프라이머, Post Amp PCR 믹스, Post Hyb 프라이머 믹스, 게놈 믹스, FWD Seq 프라이머 및 REV Seq 프라이머로부터 선택되는 하나 이상의 시약 및/또는 프라이머를 포함한다. 이러한 시약 및 프라이머 각각은 본 개시내용의 다른 곳에 기재되거나 또는 실시예 11 내지 실시예 19에 기재된 바와 같은 상응하는 조성물일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 하나 이상의 시약 및/또는 프라이머는 본 개시내용의 QC 프로세스를 통과하였다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 하나 이상의 시약 및/또는 프라이머는 실시

예 15에 기재된 바와 같은 QC 프로세스를 통과하였다.

- [0609] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 양성 대조군 DNA 샘플은 본 개시내용의 QC 프로세스를 통과하였다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트의 양성 대조군 DNA 샘플은 실시예 17에 기재된 바와 같은 QC 프로세스를 통과하였다.
- [0610] 어댑터
- [0611] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 어댑터 또는 어댑터 모듈을 포함하는 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 어댑터 세트를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 각각 어댑터 모듈을 포함하는 2개 이상의 어댑터의 집합을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 용어 "어댑터 모듈"은 DNA 단편에 부착되어 어댑터-태깅된 DNA 분자를 형성하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다.
- [0612] 일부 실시형태에서, 용어 "어댑터 모듈"은 적어도 3개의 요소: (i) 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역; (ii) ID 영역; 및 (iii) 앵커 영역을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 용어 "어댑터"는 어댑터 모듈 또는 이의 상보체를 포함하는 DNA 분자를 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 용어 "어댑터"는 어댑터 모듈을 포함하는 부분적으로 이중-가닥 DNA 구조를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 용어 "어댑터"는 어댑터 모듈, 예를 들어, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 단일-가닥 DNA 분자를 지칭한다.
- [0613] 도 1은 3가지 상이한 유형의 어댑터를 포함하는 본 개시내용의 어댑터 모듈의 예시적인 구성을 제공한다. 도 1에 도시된 바와 같이, 첫 번째 유형의 어댑터 모듈은 별개의 섹션(section)을 포함하는 ID 영역을 포함할 수 있되, 한 섹션은 샘플 태그에 해당하고, 또 다른 섹션은 단편 태그에 해당한다. 두 번째 유형의 어댑터 모듈은 첫 번째 유형에서와 같이 별개의 섹션을 포함하지 않는 ID 영역을 포함할 수 있으며; 즉, 두 번째 유형의 어댑터의 경우, 샘플 태그는 ID 영역의 전체로 이루어지고, 단편 태그도 ID 영역의 전체로 이루어진다. 추가적으로, 두 번째 유형의 어댑터는 UMI 멀티플라이어어를 포함할 수도 있다. 세 번째 유형의 어댑터 모듈은 ID 영역, UMI 멀티플라이어 및 T 뉴클레오타이드 오버행을 포함할 수 있다.
- [0614] 일부 실시형태에서, 어댑터는 하나 이상의 증폭 영역, 하나 이상의 ID 영역, 하나 이상의 UMI 멀티플라이어 및 하나 이상의 앵커 영역을 포함한다.
- [0615] 일부 실시형태에서, 어댑터는 5'에서 3' 순서로, 증폭 영역, ID 영역, UMI 멀티플라이어 및 앵커 영역을 포함한다. 소정의 실시형태에서, UMI는 ID 영역 내에 포함되어 있고, 어댑터는 5'에서 3' 순서로, 증폭 영역, 통합된 ID 영역 / UMI 멀티플라이어 영역 및 앵커 영역을 포함한다.
- [0616] 일부 실시형태에서, 어댑터는 하나 이상의 증폭 영역, 하나 이상의 ID 영역, 하나 이상의 UMI 멀티플라이어, 하나 이상의 앵커 영역 및 효율적인 결찰 기질인 3' 오버행의 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 추가적인 실시형태에서, 어댑터 모듈은 하나 이상의 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 추가로 포함한다.
- [0617] 일부 실시형태에서, 부분적으로 이중-가닥인 DNA 어댑터 구조는 결찰 전에 DNA 분자에 커플링되어 어댑터/DNA 복합체를 형성한다. 상기 부분적으로 이중-가닥인 어댑터 구조는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0618] 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 어댑터 모듈을 포함하고, 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있는 영역에 혼성화하여 이와 이중체를 형성할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 비결찰 가닥은 상기 이중체를 형성하기 위해 결찰 가닥의 적어도 일부와 상보적이다.
- [0619] 일부 실시형태에서, 어댑터는 3' 말단 오버행을 추가로 포함하고, DNA 분자는 어댑터의 3' 말단 오버행과 상보적인 3' 말단 오버행을 포함한다. 일부 실시형태에서, 3' 말단 오버행(예를 들어, dT 꼬리)은 상보적 오버행(예를 들어, dA-오버행/꼬리)을 갖는 DNA 단편에 대한 어댑터의 효율적인 결찰을 유도하기 위해 결찰 가닥을 DNA 단편의 5' 말단에 결찰하는 데 도움이 된다.
- [0620] 본 개시내용의 조성물 및 방법에 사용될 수 있는 예시적인 어댑터의 구조가 표 9 및 표 10에 제공된다.
- [0621] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 어댑터 세트가 제공되되, 각 어댑터 세트는 주어진 샘플에 고유하게 할당되고, 각 어댑터는 임의의 하나 이상의 어댑터 세트에 있는 임의의 다른 어댑터와 구별된다. 도 2는 일 실시형태에서의 어댑터 세트의 개략도를 제공하며; 총 16개의 상이한 어댑터가 이 실시형태에서, 사용된다.
- [0622] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물은 하나 이상의 어댑터 세트를 포함하는 키트로 조립된다.

- [0623] 본 개시내용의 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 조합된 시퀀싱 준비가 완료된 DNA 라이브러리를 생성하는 데 사용되되, 조합된 라이브러리는 본 개시내용에 기재된 임의의 조합된 라이브러리이다. 일부 실시형태에서, 키트는 TCL을 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 TCLA를 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 어댑터-태깅된 DNA 단편 또는 LIBS를 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 LPA를 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 LPWG를 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 WGLA를 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 LIBS 및/또는 LPA 및 WGLA를 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 LIBS 및/또는 LPA, WGLA 및 TCL을 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 LIBS 및/또는 LPA, WGLA 및 TCLA를 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 LIBS 및/또는 LPA 및 TCL을 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 LIBS 및/또는 LPA 및 TCLA를 생성하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, TCL, TCLA, LIBS, LPA, LPWG 및 WGLA는 본 개시내용의 DNA 라이브러리 중 어느 하나이다. 일부 실시형태에서, LPWG를 생성하는 데 사용된 키트는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 통과한 어댑터를 포함한다. 일부 실시형태에서, WGLA를 생성하는 데 사용된 키트는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 통과한 어댑터를 포함한다. 일부 실시형태에서, TCLA를 생성하는 데 사용된 키트는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 통과한 어댑터 및 본 개시내용의 포획 프로브 QC 프로세스를 통과한 포획 프로브를 포함한다. 일부 실시형태에서, TCL을 생성하는 데 사용된 키트는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 통과한 어댑터 및 본 개시내용의 포획 프로브 QC 프로세스를 통과한 포획 프로브를 포함한다.
- [0624] 일부 실시형태에서, 키트는 어댑터 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트의 어댑터 세트는 본 개시내용에 기재된 임의의 어댑터 모듈을 포함할 수 있다. 키트의 높은 성능을 보장하기 위해, 어댑터 세트 각각은 키트에 포함되기 전에 품질 관리(QC) 프로세스를 거칠 수 있다.
- [0625] 일부 실시형태에서, 어댑터 세트에 대한 QC 프로세스는 어댑터 결찰 효율을 테스트한다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트에 대한 QC 프로세스는 어댑터 결찰에 대한 테스트를 포함한다. 위에 기재된 바와 같이, 어댑터 부착의 효율은 입력 DNA 단편의 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리 분자로의 전환율 또는 백분율을 지칭한다.
- [0626] 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰에 대한 테스트는 DNA 샘플을 사용하여 수행된다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 적어도 2종의 상이한 세포주의 혼합된 DNA 샘플이다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 2종의 상이한 세포주의 혼합된 DNA 샘플이다. 일부 실시형태에서, 2종의 상이한 세포주는 50:50 비로 혼합된다. 일부 실시형태에서, 2종의 상이한 세포주는 NA09596 및 NA12878이다. 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰에 대한 테스트는 실시예 15에 기재된 50:50 혼합 샘플을 사용하여 수행된다.
- [0627] 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰에 대한 테스트에 사용된 DNA 샘플은 어댑터 분포에 대한 테스트에 사용된 DNA 샘플과 상이하다.
- [0628] 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰 효율에 대한 QC 프로세스에서 각 테스트 샘플에 대해, 고유한 어댑터 세트가 할당된다. 어댑터 결찰 효율에 대한 QC 프로세스는 LPA(증폭 후 라이브러리)를 생성하기 위해 본 개시내용의 임의의 말단 복구, 어댑터 결찰 및 라이브러리 증폭 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰 효율에 대한 QC 프로세스는 LPA를 생성하기 위해 실시예 11의 방법에 따라 수행된다.
- [0629] 일부 실시형태에서, 어댑터 부착 효율에 대한 QC 프로세스에 대해 하나 이상의 허용 기준이 설정되되, 이러한 기준을 통과하는 어댑터 세트만 본 개시내용의 키트에 포함될 것이다. 어댑터 부착 효율에 대한 예시적인 허용 기준은 LPA가 5ng 내지 50ng의 입력 DNA와 함께 적어도 1 ng/ μ l 내지 적어도 200 ng/ μ l의 농도를 갖는다는 것이다.
- [0630] 일부 실시형태에서, 어댑터 세트에 대한 QC 프로세스는 어댑터 분포를 테스트한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 어댑터 분포는 어댑터 세트를 갖는 모든 어댑터 서열에 대한 시퀀싱 리드의 평균 수와 비교하여 특정 어댑터 서열에 할당된 시퀀싱 리드의 수를 지칭할 수 있다.
- [0631] 일반적으로, 당업계에서 사용되는 다른 어댑터 QC 프로세스는 어댑터 분포를 테스트하지 않는다. 무작위 인덱싱 서열은 당업계의 많은 어댑터 결찰 프로세스에서 어댑터 태그로서 흔히 사용되기 때문에, 어댑터 태그의 무작위성 및/또는 분포 균등성이 가정되지만 QC 동안 테스트되지는 않는다. 대조적으로, 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스는 본 개시내용의 어댑터의 실제 분포를 측정하고 정량화하여 본 개시내용의 어댑터의 높은 품질 및 성능을 보장하도록 설계된다. 본 개시내용의 일부 실시형태에서, 어댑터의 분포는 균일하다. 일부 실시형태에서, 어댑터 분포는 고유한 어댑터 서열에 대한 시퀀싱 리드의 수가 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 시퀀싱 리드의 수와 크게 다르지 않은 경우 균일한 것으로 간주된다. 일부 실시형태에서, 어댑터 분포는 실시예 16의 방법

에 따라 측정된다. 일부 실시형태에서, 어댑터 분포는 고유한 어댑터 서열의 10% 내지 80% 이하가 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 0% 내지 50%인 리드 수를 갖는 경우 허용 기준을 통과한 것으로 간주된다. 본 개시내용의 일부 실시형태에서, 어댑터의 분포는 본 개시내용의 어댑터를 사용하지 않는 방법 또는 키트의 분포와 비교하여 개선된다.

[0632] 일부 실시형태에서, 어댑터 분포를 테스트하기 위한 QC 프로세스는 DNA 샘플을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 WT cfDNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 WT cfDNA로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 건강한 인간으로부터 얻은 WT cfDNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 DNA 샘플은 실시예 16에 기재된 WT cfDNA 샘플이다. 예시적인 WT cfDNA 샘플은 적어도 약 0.2 ng/ μ l의 농도를 갖는다.

[0633] 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 테스트에 사용된 DNA 샘플은 어댑터 결찰에 대한 테스트에 사용된 DNA 샘플과 상이하다.

[0634] 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 QC 프로세스는 각 테스트 샘플을 고유한 어댑터 세트에 할당하는 것을 포함한다. 어댑터 결찰 효율에 대한 QC 프로세스는 각 테스트 샘플에 대한 어댑터-태깅된 DNA 단편(LIBS)의 집합을 생성하기 위해 본 개시내용의 임의의 말단 복구 및 어댑터 결찰 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 말단 복구 및 어댑터 결찰은 각 테스트 샘플에 대한 LIBS를 생성하기 위해 실시예 11의 방법에 따라 수행된다.

[0635] 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 QC 프로세스는 인덱스 프라이머를 사용한 각 테스트 샘플의 LIBS의 증폭을 포함하되, 하나 이상의 고유한 인덱스 프라이머는 각 테스트 샘플의 각 LIBS에 할당된다. 일부 실시형태에서, 인덱스 프라이머를 포함하는 하나의 프라이머 쌍이 각 테스트 샘플의 각 LIBS에 할당된다. 일부 실시형태에서, 프라이머 쌍은 인덱스 프라이머 및 프라이머 F를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 F는 서열번호 7의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 2개의 인덱스 프라이머가 각 테스트 샘플의 각 LIBS에 할당된다. 일부 실시형태에서, 인덱스 프라이머는 Illumina® P5 및 P7 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인덱스 프라이머는 서열번호 13 및 서열번호 14의 서열을 포함한다.

[0636] 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 QC 프로세스는 본 개시내용의 임의의 라이브러리 증폭 방법에 따른 라이브러리 증폭 프로세스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 QC 프로세스는 실시예 16의 방법에 따른 라이브러리 증폭 프로세스를 포함한다.

[0637] 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 QC 프로세스는 증폭된 라이브러리를 단리 또는 정제하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단리 또는 정제는 DNA 정제 비드를 사용하여 수행된다. 일부 실시형태에서, 단리 또는 정제는 실시예 16의 방법에 따라 수행된다. 이 단계(단리 또는 정제 후)의 라이브러리는 인덱스 증폭 후 라이브러리(LPIA)로 지칭될 수 있다.

[0638] 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 QC 프로세스는 각 테스트 샘플의 시퀀싱 LPIA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 어댑터 분포에 대한 QC 프로세스는 각 테스트 샘플로부터 소정의 양의 LPIA를 조합함으로써 조합된 LPIA 풀을 시퀀싱하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조합된 LPIA 풀은 실시예 16의 방법에 따라 시퀀싱될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조합된 LPIA 풀은 아래의 시퀀싱 프라이머:

[0639] FWD Seq 프라이머:

[0640] CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGCACGGGACCAGAGAATTCGAATACA(서열번호 10);

[0641] REV Seq 프라이머:

[0642] GTGACTGGCACGGGACCAGAGAATTCGAATACA(서열번호 11);

[0643] 및 사용된 인덱스 프라이머의 서열을 포함하는 인덱스 시퀀싱 프라이머를 사용하여 시퀀싱될 수 있다.

[0644] 일부 실시형태에서, 인덱스 시퀀싱 프라이머는 다음을 포함한다:

[0645] TGTATTCGAATTCTCTGGTCCCGTGCCAGTCAC(서열번호 83).

[0646] 일부 실시형태에서, 어댑터 세트가 키트의 높은 성능을 가능하게 하는 품질 요구사항을 충족하는지 여부를 결정하기 위해 QC 프로세스에 하나 이상의 허용 기준이 제공된다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 교차-오염이 분석된다. 주어진 샘플에 할당되지 않은 어댑터가 이 샘플의 시퀀싱 리드에 나타나는 경우, 어댑터 세트의 교차

-오염이 발생할 수 있다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트 교차-오염의 QC 프로세스에 대한 허용 기준은 다음을 포함할 수 있다: a. 각 샘플에 대해, "바코드 혼선"이 0.05% 내지 2% 이하이고; b. 각 샘플에 대해, 1% 내지 20% 이하의 리드가 미지의 어댑터로부터 발생한 것이다(즉, 어댑터 세트에 포함되지 않는다). 본 명세서에서 사용되는 바코드 혼선은 하나의 바코드(어댑터)의 리드가 실제로 어댑터 B로부터 생성될 때 어댑터 A로 잘못 라벨링되는 것을 지칭한다.

[0647] 일부 실시형태에서, 어댑터 분포의 QC 프로세스에 대한 하나 이상의 허용 기준은 표 13으로부터 선택된다.

[0648] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 QC 프로세스 중 하나 이상을 통과한 어댑터만이 본 개시내용의 키트에 포함된다.

[0649] 어댑터 특징의 개요

[0650] 일부 실시형태에서, 어댑터는 다음 특징을 포함한다: (i) 1단계 부착; (ii) 고효율 부착; (iii) 균일한 어댑터 분포; (iv) 샘플 다중화 및 샘플 식별의 편의성(accommodation); 및/또는 (v) 다수의 고유한 분자 식별자(UMI). 예를 들어, 본 개시내용의 키트 및 방법의 일부 실시형태는 다음을 제공한다:

[0651] 1단계 부착: 일부 실시형태에서, 전체 길이 어댑터는 한 단계로 DNA 단편에 부착될 수 있다. "전체 길이" 어댑터는 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역, 고유한 분자 식별자(UMI)를 포함하는 ID 영역, UMI 멀티플라이어 및 앵커 영역을 포함하는 적어도 4개의 영역을 포함한다. 전체 길이 어댑터를 부착하면 앵커가 먼저 부착된 다음, 어댑터의 나머지 영역이 부착되는 단계적 방식(예를 들어, 아래 기재된 카이네이스/라이게이스 결합 방법에서 어댑터 결합의 단계적 방식 참조)으로 어댑터 결합이 필요하지 않다.

[0652] 고효율 부착: 일부 실시형태에서, 어댑터는 고효율로 DNA 분자에 부착될 수 있다. 본 개시내용의 목적을 위해, 어댑터 부착의 효율은 입력 DNA 단편의 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리 분자로의 전환율 또는 백분율을 지칭한다. 예를 들어, DNA 단편은 부착된 어댑터의 ID 영역에 의해 식별될 수 있으며, DNA 단편은 어댑터에 부착되지 않은 경우 ID 영역을 사용하여 식별할 수 없다. 따라서, 어댑터 부착의 효율이 높을수록 라이브러리 전환 프로세스에서 손실되는 입력 DNA 단편의 수가 줄어들 수 있다. 이는 이용 가능한 DNA의 양이 제한되거나 또는 변이 DNA의 빈도가 매우 낮은 상황에서, 예를 들어, 많은 종양학 응용 및 다른 유전적 질환(예를 들어, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 알츠하이머병)과 관련하여 분석된 샘플에서 특히 유용하다. 이러한 상황에서, DNA 변형(예를 들어, 단일 뉴클레오타이드 변이(SNV), indel, 카피 수 변화, DNA 재배열, 선택적으로 종양/암과 관련된 것)의 발생은 전형적으로 드물기 때문에 검출하기 어려울 수 있다. 이러한 DNA 분자에 대한 본 개시내용의 어댑터의 매우 효율적인 부착은 이러한 드문 변이의 포획을 용이하게 할 수 있다. 본 개시내용의 일부 실시형태에서, 입력 DNA 분자의 적어도 50%는 어댑터의 부착에 의해 DNA 라이브러리 분자로 전환된다.

[0653] 균일한 어댑터 분포: 생물정보학 분석은 샘플 내 어댑터 성능 및 샘플 간 어댑터 성능을 분석할 수 있다. 샘플 전체에 걸친 어댑터 세트 간 성능은 분석의 민감도에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 서열 리드에 의해 측정된 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리의 균일한 어댑터 분포가 바람직하다. 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리의 어댑터의 분포에 편향이 있을 가능성이 있으며, 여기서 일부 어댑터는 DNA 분자에 결합시키는 데 덜 효율적이거나 또는 어댑터 풀의 다른 어댑터와 비교하여 덜 효율적으로 증폭될 수 있다. 이로 인해 시퀀싱 동안 앰플리콘이 줄어들고, 덜 효율적인 어댑터의 리드가 줄어들고, 덜 효율적인 어댑터에 결합된 DNA 단편의 리드가 줄어들 수 있다. 이러한 편향된 어댑터의 분포는 태깅된 DNA 라이브러리 및 시퀀싱 리드에서 어댑터의 보다 균형 잡힌 표현을 제공하기 위해 어댑터 풀에서 덜 효율적인 어댑터의 양을 증가시킴으로써 허용되거나 또는 보상될 수 있지만, 본 개시내용의 조성물 및 방법은 이러한 보상을 제거하기 위한 옵션을 제공한다. 본 개시내용의 조성물 및 방법은 균일한 어댑터 분포를 달성하는 이점을 제공할 수 있되, 각 어댑터는 시퀀싱 결과에서 대략 동일한 비로 표시된다. 이러한 균일한 어댑터 분포는 증가된 민감도를 제공한다.

[0654] 일부 실시형태에서, 균일한 어댑터 분포는 각 어댑터 세트에 모두 표시되는 여러 유형의 앵커 영역을 가짐으로써 달성될 수 있다.

[0655] 일부 실시형태에서, 결합 또는 증폭의 성능이 좋지 않은 어댑터 모듈 서열(예를 들어, G 뉴클레오타이드의 스트링을 포함하는 서열)은 본 개시내용의 방법에 사용될 후보 어댑터 모듈 서열로 선택되지 않는다.

[0656] 일부 실시형태에서, 균일한 어댑터 분포는 각 어댑터 세트에 대해 무작위로 선택된 고유한 ID 영역(각 ID 영역은 샘플 및 이에 부착된 DNA 단편 모두를 식별함)을 가짐으로써 달성될 수 있다.

[0657] 샘플 다중화 및 샘플 식별의 편의성: 샘플 다중화(즉, 상이한 샘플을 동시에 실행하는 능력)를 달성하기 위해,

일부 실시형태에서, 하나 이상의 어댑터 세트가 제공되며, 각 어댑터 세트는 하나의 샘플에 고유하게 할당된다. 어댑터-태깅된 DNA 단편은 동일한 어댑터 세트 내의 주어진 어댑터가 동일한 테스트 샘플의 DNA 분자에 부착되는 곳에 구성된다. 서열 계수(sequence counting)의 관점에서, 동일한 어댑터 세트의 각 고유한 어댑터가 이 세트의 모든 다른 어댑터와 본질적으로 동일한 거동을 갖는 것이 유리하다. 이를 달성하기 위해, 일부 실시형태에서, 각 ID 영역은 임의의 다른 ID 영역 사이에서 적어도 2의 해밍 거리를 가지며, 이에 따라 리드가 잘못된 샘플에 허위로 할당될 가능성을 줄인다. 본 개시내용에 사용되는 용어 "해밍 거리"는 2개의 뉴클레오타이드 서열 사이에 상이한 뉴클레오타이드의 수를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 각 어댑터 세트는 특정 앵커 영역과 쌍을 이루는 추가 그룹으로 분할되어 샘플 역다중화 시 오류의 가능성을 더 줄일 수 있다. 예를 들어, 해밍 거리가 2인 8량체 서열에서, 가능한 서열의 총 개수는 16,384개이다. 용어 "쌍을 이룬" 또는 "매칭된"은 2개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 상이한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA의 영역과 관련하여 사용될 때 2개의 상이한 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 상이한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA의 영역이 동일한 분자 상에 존재함을 의미한다. 예를 들어, DNA의 특정 ID 영역이 DNA의 특정 증폭 영역과 쌍을 이룬다고 하는 경우, 이는 ID 영역 및 증폭 태그가 동일한 DNA 폴리뉴클레오타이드 분자 상에 존재함을 의미한다.

[0658] 다수의 고유한 분자 식별자(UMI): 일반적으로 어댑터가 분자 생물학 관점에서 기능적으로 동일한 것이 유리하지만, 어댑터가 고유한 게놈 단편의 식별을 강화하는 매우 많은 수의 고유한 분자 식별자(UMI)(10,000개 이상)를 보유하는 것이 또한 바람직하다. 이러한 맥락에서, "강화(augment)"는 고유하게 파생된 단편을 식별하는 능력이 증가한다는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 고유하게 파생된 단편(고유한 게놈 클론)은 테스트 샘플의 단일 DNA 단편으로부터 유래된 라이브러리 클론 단편을 지칭한다. 각 게놈 클론 단편은 이중-가닥 DNA이 절단된 게놈 서열의 위치에 해당하는 특정 쌍의 단편화 부위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 각 클론이 상이한 절단 부위를 보유할 가능성이 높기 때문에, 이 절단 부위는 고유한 게놈 클론을 구별하는 데 사용될 수 있다. 그러나, 수천 개의 독립적인 클론을 보유하는 라이브러리에서, 고유하게 파생된 단편은 종종 정확히 동일한 절단 부위를 보유할 수 있다. 동일한 절단 부위를 공유하는 게놈 클론은 동일한 샘플로부터 유래된 다른 클론 서열과 관련하여 고유하거나 또는 중복된(즉, 증폭을 통하여 생성된) 것으로 분류될 수 있다. 매우 다양한 서열 태그를 도입하는 어댑터를 부착함으로써, 동일한 절단 부위를 공유하는 고유한 게놈 클론은 고유한 것으로 식별될 가능성이 더 높다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 UMI이다. 일부 실시형태에서, UMI는 ID 영역 및 앵커 영역의 조합에 의해 생성된다. 일부 실시형태에서, UMI는 ID 영역 및 UMI 멀티플라이어의 조합에 의해 생성된다. 일부 실시형태에서, UMI는 ID 영역, UMI 멀티플라이어 및 앵커 영역의 조합에 의해 생성된다. 일부 실시형태에서, UMI 및 절단 부위의 조합은 고유한 분자 식별자 요소(UMIE)를 생성하며, 이는 중복(redundant) 리드 또는 고유한 리드로서 서열 리드의 분류를 용이하게 한다. 일부 실시형태는 UMI 멀티플라이어가 전체 UMI 복잡도를 증가시키거나 또는 더 낮추기 위해 더 길거나 또는 더 짧은 서열을 포함할 수 있음을 상정한다.

[0659] 결찰 가닥

[0660] 용어 "결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드" 및 "결찰 가닥"은 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0661] 본 개시내용은 일부 실시형태에서, (i) 3' 말단 오버행; (ii) 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역; (iii) 고유한 ID 영역; (iv) 고유한 분자 식별자(UMI) 멀티플라이어; 및 (v) 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드와 적어도 부분적으로 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 앵커 영역을 포함하는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0662] 일부 실시형태에서, 결찰 가닥은 (i) 3' 말단 오버행; (ii) 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역; (iii) 고유한 ID 영역; 및 (iv) 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드와 적어도 부분적으로 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 앵커 영역을 포함한다.

[0663] 일부 실시형태에서, 어댑터의 결찰 가닥은 다음 구조를 포함할 수 있다: AMP-ID 영역/UMI 멀티플라이어-ACGTATGCCA-3'dT(서열번호 1). 일부 실시형태에서, 어댑터의 결찰 가닥은 다음 구조를 포함할 수 있다: AMP-ID 영역/UMI 멀티플라이어-CTAGCGTTAC-3'dT(서열번호 2). 일부 실시형태에서, 어댑터의 결찰 가닥은 다음 구조를 포함할 수 있다: AMP-ID 영역/UMI 멀티플라이어-GATCGACATG-3'dT(서열번호 3). 일부 실시형태에서, 어댑터의 결찰 가닥은 다음 구조를 포함할 수 있다: AMP-ID 영역/UMI 멀티플라이어-TGCATCAGGT-3'dT(서열번호 4).

[0664] 일부 실시형태에서, 어댑터는 3' dT 오버행이 있는 결찰 가닥을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 3' dT 오버행이 있는 결찰 가닥은 표 9에 나타난 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 예를 들어, 3' dT 오버행이 있는 결찰 가닥은 서열번호 22 내지 81 중 어느 하나의 서열을 포함할 수 있다. 이러한 결찰 가닥 서열 내의 "NNN"은 3-뉴클레오타이드 UMI 멀티플라이어를 나타내며, 각 N은 A, G, C 또는 T 중 어느 하나로부터 선택될 수 있다.

일부 실시형태에서, 3' dT 오버행이 있는 절찰 가닥은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 뉴클레오타이드 치환을 갖는 서열번호 22 내지 81 중 어느 하나의 서열을 포함할 수 있다.

[0665] 일부 실시형태에서, DNA 분자와 접촉 시 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 DNA 분자의 각 가닥의 5' 말단에 결합할 수 있다.

[0666] 일부 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 dT 오버행을 포함하고, DNA 분자는 각 가닥의 3' 말단에 dA 오버행을 포함한다. 용어 "3' 말단 오버행"은 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 있는 하나 이상의 뉴클레오타이드 오버행 또는 꼬리를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 3' 말단 오버행(예를 들어, dT 꼬리)은 상보적 오버행(예를 들어, dA-오버행/꼬리)을 갖는 DNA 단편에 대한 다기능성 어댑터의 효율적인 절찰을 유도하기 위해 절찰 가닥을 DNA 단편의 5' 말단에 결합하는 데 도움이 된다.

[0667] 소정의 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 dA 오버행을 포함하고, DNA 분자는 각 가닥의 3' 말단에 dT 오버행을 포함한다. 일부 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 dC 오버행을 포함하고, DNA 분자는 각 가닥의 3' 말단에 dG 오버행을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 dG 오버행을 포함하고, DNA 분자는 각 가닥의 3' 말단에 dC 오버행을 포함한다.

[0668] 일부 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 5' 말단에서 인산화되지 않는다.

[0669] 일부 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 어댑터 모듈을 포함하되, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 앵커 영역은 비절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드와 적어도 부분적으로 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 이러한 실시형태에서, 비절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 있는 영역에 혼성화하여 이와 이중체를 형성할 수 있다.

[0670] 일부 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 약 30개의 뉴클레오타이드 내지 약 70개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 약 35개 내지 약 65개의 뉴클레오타이드, 약 40개 내지 약 60개의 뉴클레오타이드 또는 약 40개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 약 47개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0671] 일부 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 30개의 뉴클레오타이드 내지 70개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 35개 내지 65개의 뉴클레오타이드, 40개 내지 60개의 뉴클레오타이드 또는 40개 내지 50개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 47개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0672] 비절찰 가닥

[0673] 용어 "비절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드" 및 "비절찰 가닥"은 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0674] 일부 실시형태에서, 비어댑터의 절찰 가닥은 서열 TGGCATACGT(서열번호 18)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비어댑터의 절찰 가닥은 서열 GTAACGCTAG(서열번호 19)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비어댑터의 절찰 가닥은 서열 CATGTCGATC(서열번호 20)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비어댑터의 절찰 가닥은 서열 ACCTGATGCA(서열번호 21)를 포함할 수 있다.

[0675] 일부 실시형태에서, 비절찰 가닥은 인산화되지 않는다. 비절찰 가닥의 인산화의 결여는 비절찰 가닥이 DNA 단편의 3' 말단에 부착하는 것을 방지할 수 있으며, 어댑터 이량체의 형성을 감소시킬 수 있다.

[0676] 일부 실시형태에서, 비절찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 DNA 분자의 5' 말단에 대한 절찰 및/또는 어댑터 이량체 형성을 방지하는 3' 말단의 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 화학적 변형이다.

[0677] 증폭 영역

[0678] 용어 "증폭 영역"은 프라이머 인식 부위 또는 프라이머 결합 부위를 포함하는 어댑터 분자의 요소를 지칭한다. 프라이머 결합 부위는 문헌[Fakruddin et al. "Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction" *J Pharm Bioallied Sci.* 2013 Oct-Dec; 5(4): 245-252]에 개시되어 있는 방법과 같이 당업계에 공지된 임의의 증폭에 적합한 임의의 프라이머에 대한 것일 수 있다. 예를 들어, 이러한 증폭 방법은 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 증폭) 또는 LCR(라이게이스 연쇄 반응)를 포함할 수 있다.

[0679] 일부 실시형태에서, 어댑터는 하나 이상의 맞춤형 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역을 포함한다. 일부

실시형태에서, 맞춤형 프라이머 결합 부위는 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 맞춤형 프라이머 결합 부위의 서열과 100% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 맞춤형 프라이머 결합 부위는 DNA 라이브러리의 단일-프라이머 증폭을 용이하게 한다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 DNA 라이브러리의 단일-프라이머 증폭을 위한 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 프라이머 결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 라이브러리 프라이머(서열번호 5)에 대한 PCR 프라이머 결합 부위를 포함한다. 라이브러리 프라이머는 본 명세서에서 AKA 프라이머로도 지칭되는 단일 증폭 프라이머일 수 있다.

[0680] 일부 실시형태에서, 서열 동일성은 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열을 정렬함으로써 결정된다. 미국 국립생물공학 정보센터(National Center for Biotechnology Information: NCBI)의 BLAST suite를 사용하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 서열을 정렬하고 서열 동일성 또는 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 다양한 방법이 존재한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 사용되는 용어 "서열 동일성"은 기본 매개변수 하에 BLAST 버전 2.12.0을 사용하여 결정된 서열 동일성을 지칭한다.

[0681] 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 5개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드, 약 10개 내지 약 45개의 뉴클레오타이드, 약 15개 내지 약 40개의 뉴클레오타이드 또는 약 20개 내지 약 30개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 10개의 뉴클레오타이드, 약 11개의 뉴클레오타이드, 약 12개의 뉴클레오타이드, 약 13개의 뉴클레오타이드, 약 14개의 뉴클레오타이드, 약 15개의 뉴클레오타이드, 약 16개의 뉴클레오타이드, 약 17개의 뉴클레오타이드, 약 18개의 뉴클레오타이드, 약 19개의 뉴클레오타이드, 약 20개의 뉴클레오타이드, 약 21개의 뉴클레오타이드, 약 22개의 뉴클레오타이드, 약 23개의 뉴클레오타이드, 약 24개의 뉴클레오타이드, 약 25개의 뉴클레오타이드, 약 26개의 뉴클레오타이드, 약 27개의 뉴클레오타이드, 약 28개의 뉴클레오타이드, 약 29개의 뉴클레오타이드, 약 30개의 뉴클레오타이드, 약 31개의 뉴클레오타이드, 약 32개의 뉴클레오타이드, 약 33개의 뉴클레오타이드, 약 34개의 뉴클레오타이드, 약 35개의 뉴클레오타이드, 약 36개의 뉴클레오타이드, 약 37개의 뉴클레오타이드, 약 38개의 뉴클레오타이드, 약 39개의 뉴클레오타이드 또는 약 40개의 뉴클레오타이드 또는 그 이상의 길이이다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 약 25개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0682] 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 5개 내지 50개의 뉴클레오타이드, 10개 내지 45개의 뉴클레오타이드, 15개 내지 40개의 뉴클레오타이드 또는 20개 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 10개의 뉴클레오타이드, 11개의 뉴클레오타이드, 12개의 뉴클레오타이드, 13개의 뉴클레오타이드, 14개의 뉴클레오타이드, 15개의 뉴클레오타이드, 16개의 뉴클레오타이드, 17개의 뉴클레오타이드, 18개의 뉴클레오타이드, 19개의 뉴클레오타이드, 20개의 뉴클레오타이드, 21개의 뉴클레오타이드, 22개의 뉴클레오타이드, 23개의 뉴클레오타이드, 24개의 뉴클레오타이드, 25개의 뉴클레오타이드, 26개의 뉴클레오타이드, 27개의 뉴클레오타이드, 28개의 뉴클레오타이드, 29개의 뉴클레오타이드, 30개의 뉴클레오타이드, 31개의 뉴클레오타이드, 32개의 뉴클레오타이드, 33개의 뉴클레오타이드, 34개의 뉴클레오타이드, 35개의 뉴클레오타이드, 36개의 뉴클레오타이드, 37개의 뉴클레오타이드, 38개의 뉴클레오타이드, 39개의 뉴클레오타이드 또는 40개의 뉴클레오타이드 또는 그 이상의 길이이다. 일부 실시형태에서, 증폭 영역은 25개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0683] ID 영역

[0684] 본 개시내용에서 사용되는 용어 "다기능성 ID 영역" 및 "ID 영역"은 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 특정 DNA 단편 및/또는 이것이 유래되는 샘플을 고유하게 식별하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 어댑터의 요소를 지칭한다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 DNA 단편 및 이것이 유래되는 샘플 모두를 고유하게 식별한다.

[0685] 일부 실시형태에서, 다기능성 ID 영역은 약 3개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드, 약 3개 내지 약 25개의 뉴클레오타이드 또는 약 5개 내지 약 15개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 다기능성 ID 영역은 약 3개의 뉴클레오타이드, 4개의 뉴클레오타이드, 약 5개의 뉴클레오타이드, 약 6개의 뉴클레오타이드, 약 7개의 뉴클레오타이드, 약 8개의 뉴클레오타이드, 약 9개의 뉴클레오타이드, 약 10개의 뉴클레오타이드, 약 11개의 뉴클레오타이드, 약 12개의 뉴클레오타이드, 약 13개의 뉴클레오타이드, 약 14개의 뉴클레오타이드, 약 15개의 뉴클레오타이드, 약 16개의 뉴클레오타이드, 약 17개의 뉴클레오타이드, 약 18개의 뉴클레오타이드, 약 19개의 뉴클레오타이드 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 또는 그 이상의 길이이다. 일부 실시형태에서, 다기능성 ID 영역은 약 8개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0686] 일부 실시형태에서, 다기능성 ID 영역은 3개 내지 50개의 뉴클레오타이드, 3개 내지 25개의 뉴클레오타이드 또는 5개 내지 15개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 다기능성 ID 영역은 3개의 뉴클레오타이드, 4개의 뉴클레오타이드, 5개의 뉴클레오타이드, 6개의 뉴클레오타이드, 7개의 뉴클레오타이드, 8개의 뉴클레오타이드, 9개의 뉴클레오타이드, 10개의 뉴클레오타이드, 11개의 뉴클레오타이드, 12개의 뉴클레오타이드, 13개의

뉴클레오타이드, 14개의 뉴클레오타이드, 15개의 뉴클레오타이드, 16개의 뉴클레오타이드, 17개의 뉴클레오타이드, 18개의 뉴클레오타이드, 19개의 뉴클레오타이드 또는 20개의 뉴클레오타이드 또는 그 이상의 길이이다. 일부 실시형태에서, 다기능성 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이다.

- [0687] 일부 실시형태에서, ID 영역은 약 2개 내지 약 10,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열, 약 50개 내지 약 500개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 또는 약 100개 내지 약 400개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 중 각 어댑터의 ID 영역은 약 60개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 중 하나를 포함한다.
- [0688] 일부 실시형태에서, ID 영역은 2개 내지 10,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열, 50개 내지 500개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 또는 100개 내지 400개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터 중 각 어댑터의 ID 영역은 60개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 중 하나를 포함한다.
- [0689] 일부 실시형태에서, 어댑터는 64개 내지 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 중 하나를 포함한다.
- [0690] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 어댑터 세트가 제공되며, 각 어댑터 세트는 주어진 샘플에 고유하게 할당되고, 각 어댑터는 하나 이상의 어댑터 세트 중 임의의 다른 어댑터의 ID 영역과 구별되는 고유한 ID 영역을 갖는다.
- [0691] 일부 실시형태에서, 사전 지정된 제1 어댑터 세트 및 사전 지정된 제2 어댑터 세트가 제공된다. 이러한 사전 지정된 어댑터 세트는 각각 단일 샘플을 나타내는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 제1 어댑터 세트는 고유한 ID 영역의 제1 세트를 포함하고, 제2 어댑터 세트는 고유한 ID 영역의 제2 세트를 포함한다. 즉, 제1 세트의 각 어댑터 모듈 서열은 제2 세트의 각 어댑터 모듈 서열과 다르고; 추가적으로, 세트 내의 각 어댑터 모듈 서열은 동일한 세트 내의 다른 모든 어댑터 모듈 서열과도 다르다. 따라서, 일부 실시형태에서, 각 어댑터 모듈 서열의 고유성은 고유하게 파생된 각 라이브러리 단편의 식별을 가능하게 한다.
- [0692] 당업자라면 어댑터 올리고뉴클레오타이드에 대해 가능한 주어진 어댑터 세트 내 별개의 올리고뉴클레오타이드의 수가 ID 영역 및/또는 UMI 멀티플라이어의 길이에 따라 달라질 것임을 인식할 것이다.
- [0693] 일 실시형태에서, ID 영역은 이에 부착된 DNA 단편 및 DNA 단편이 유래된 개별 샘플, 예를 들어, 게놈 라이브러리 공급원 모두를 식별하는 역할을 한다. 일부 실시형태에서, 각 샘플에는 복수의 약 6400만 개 내지 약 250만 개의 고유한 어댑터를 포함하는 어댑터 세트가 할당된다. 일부 실시형태에서, 각 샘플에는 복수의 6400만 개 내지 250만 개의 고유한 어댑터를 포함하는 어댑터 세트가 할당된다. 일부 실시형태에서, 각 샘플에는 복수의 약 3,840개의 고유한 어댑터를 포함하는 어댑터 세트가 할당된다. 일부 실시형태에서, 각 샘플에는 복수의 3,840개의 고유한 어댑터를 포함하는 어댑터 세트가 할당된다.
- [0694] 일부 실시형태에서, 각 샘플에는 복수의 약 1개 내지 약 100개의 고유한 ID 영역을 포함하는 어댑터 세트가 할당된다. 일부 실시형태에서, 각 샘플에는 약 1개 내지 약 60개의 고유한 ID 영역을 포함하는 어댑터 세트가 할당된다. 일부 실시형태에서, 각 샘플에는 1개 내지 60개의 고유한 ID 영역을 포함하는 어댑터 세트가 할당된다. 일부 실시형태에서, 각 샘플에는 60개의 고유한 ID 영역을 포함하는 어댑터 세트가 할당되며, 60개의 고유한 ID 영역의 각 세트는 4개의 그룹(각 그룹은 15개의 고유한 어댑터를 포함함)으로 추가로 나뉘어지고, 한 그룹의 각 ID 영역은 4개의 앵커 서열 중 하나와 쌍을 이룬다. 따라서, 이러한 실시형태에서, 샘플은 ID 영역 및 앵커 영역의 조합에 의해 식별될 수 있다.
- [0695] 일부 실시형태에서, 각 ID 영역의 뉴클레오타이드 서열은 적어도 2의 해밍 거리만큼 복수의 어댑터 모듈의 임의의 다른 ID 영역의 뉴클레오타이드 서열과 떨어져 있다(하나의 ID 영역을 또 다른 것으로 변경하기 위해 적어도 2개의 염기 변화가 필요함을 의미함).
- [0696] 소정의 실시형태에서, ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이고, 240개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 중 하나를 포함하고, UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 서열 길이이므로, 고유한 어댑터 서열의 총 수는 $240 \times 4^3 = 15,360$ 개일 것이다. 따라서, 이 실시형태에서, 각 샘플에는 DNA 단편 식별을 위한 1개 내지 15,360개의 고유한 어댑터 범위의 어댑터 세트가 할당될 수 있다. 일부 실시형태에서, 각 뉴클레오타이드 서열은 적어도 2의 해밍 거리만큼 15,360개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 임의의 다른 서열과 떨어져 있다.
- [0697] 일부 실시형태에서, 다기능성 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이고, 60개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 중 하나를 포함하고, UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이므로, 고유한 어댑터 서열의 총 수는 $60 \times 4^3 = 3840$ 개일 것이다. 따라서, 이 실시형태에서, 각 샘플에는 DNA 단편 식별을 위한 1개 내지 3840개의 고유

한 어댑터 범위의 어댑터 세트가 할당될 수 있다. 일부 실시형태에서, 각 뉴클레오타이드 서열은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있다.

[0698] 일부 실시형태에서, ID 영역은 샘플 및 DNA 단편을 모두 식별할 수 있다. 일부 실시형태에서, ID 영역은 이에 부착된 개별 DNA 단편을 식별하는 데 사용된다. 따라서, 이러한 실시형태에서, ID 영역은 민감한 변이 검출을 위해 클론 다양성을 계수(enumerate)할 수 있는 단편 태그 역할을 할 수도 있다. 이는 무작위로 생성된 바코드를 사용하여 서열을 식별하고 별도의 바코드 또는 시퀀서 인덱싱을 사용하여 샘플 식별(샘플 역다중화)을 가능하게 하는 당업계에서 사용되는 다른 어댑터와는 극명한 대조를 이룬다. 별도의 바코드(태그)를 포함하는 이러한 어댑터 모듈의 일 실시형태는 도 1(첫 번째 유형)에 도시되어 있으며, 여기서 ID 영역은 별도의 샘플 태그 및 단편 태그를 포함한다. 이러한 맥락에서, "별도의"는 샘플 태그는 샘플을 식별할 수 있지만 이에 부착된 DNA 단편은 식별할 수 없는 개별 섹션이고, 단편 태그는 DNA 단편을 식별할 수 있는 개별 섹션임을 의미한다. 대조적으로, 일부 실시형태에서, 예를 들어, 도 1의 두 번째 유형 및 세 번째 유형의 어댑터 모듈에서, ID 영역 전체가 샘플을 식별하는 데 사용되고, ID 영역의 전체가 DNA 단편을 식별하는 데 사용된다.

[0699] 일부 실시형태에서, 각 어댑터 모듈은 ID 영역의 폴리뉴클레오타이드 서열과 동일하지 않은 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 어댑터 세트의 각 어댑터 모듈은 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 포함하고, 제2 어댑터 세트의 각 어댑터 모듈은 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 포함하되; 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 서열은 서로 동일하지 않다.

[0700] UMI 멀티플라이어

[0701] 일부 실시형태에서, 추가로 가능한 서열 태그(UMI)의 다양성을 높이고 고유한 계층 단편의 식별을 강화하기 위해, UMI 멀티플라이어 어댑터 모듈에 포함된다. UMI 멀티플라이어는 UMI와 조합될 때, 어댑터 풀에서 어댑터 서열의 다양성 및 총 수를 증가시키는 짧은 염기 서열이다. 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 UMI 멀티플라이어를 포함하되, UMI 멀티플라이어는 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된다. 일부 실시형태에서, 어댑터는 8개의 뉴클레오타이드 길이인 ID 영역 및 3개의 뉴클레오타이드 길이인 UMI 멀티플라이어를 포함한다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 64개의 가능한 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된다.

[0702] 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어의 각 뉴클레오타이드 위치는 아데닌, 구아닌, 사이토신 또는 티민 중 하나를 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, n개의 뉴클레오타이드를 포함하는 UMI 멀티플라이어는 임의의 4^n 개의 가능한 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 1개의 뉴클레오타이드 길이이고, 4개의 가능한 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 2개의 뉴클레오타이드 길이이고, 16개의 가능한 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 64개의 가능한 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 4개의 뉴클레오타이드 길이이고, 256개의 가능한 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 5개의 뉴클레오타이드 길이이고, 1,024개의 가능한 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 6개의 뉴클레오타이드 길이이고, 4,096개의 가능한 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 7개의 뉴클레오타이드 길이이고, 16,384개의 가능한 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 8개의 뉴클레오타이드 길이이고, 65,536개의 가능한 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 9개의 뉴클레오타이드 길이이고, 262,144개의 가능한 서열 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 10개 이상의 뉴클레오타이드 길이이고, 1,048,576개 이상의 가능한 서열 중 하나를 포함한다.

[0703] 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 1개 내지 5개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0704] 앵커 영역

[0705] 본 개시내용에서 사용되는 용어 "앵커 영역" 및 "앵커 서열"은 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드와 적어도 부분적으로 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 앵커 영역은 일부 실시형태에서 다음 특성 중 하나 이상을 포함할 수 있다:

- [0706] (1) 각 앵커 서열은 연장 내의 각 부위에서 4개의 가능한 DNA 염기 각각을 집합적으로 나타내는 2개 이상의 고유한 앵커 유형의 세트의 일부일 수 있고; 균형 잡힌 염기 표현인 이 특징은 일부 실시형태에서 시퀀싱 리드에서 적절한 염기 호출을 보장하는 데 유용하다. 앵커 서열의 총 유형의 수는 검출 모드의 총 수와 일치하여야 한다. 예를 들어, Illumina® 시퀀싱에서는 4가지 색상이 검출되므로, 4가지 유형의 앵커 서열이 사용될 수 있다. 최대 민감도를 달성하기 위해, 각 검출 모드가 활용될 수 있다. 본 개시내용의 방법 및 조성물은 광-기반 검출, 효소-기반 검출 및 자성 검출을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 검출 모드에서 사용될 수 있다.
- [0707] (2) 각 앵커 서열은 4개의 가능한 염기 중 2개만으로 구성될 수 있으며, 이는 동일한 수의 A + C 또는 동일한 수의 G + T로 특별히 선택되고; 2개의 염기만으로 형성된 앵커 서열은 앵커 서열이 적절한 어댑터 기능을 방해하는 2차 구조 형성에 참여할 가능성을 줄인다.
- [0708] (3) 각 앵커 서열은 동일한 수의 A + C 또는 G + T로 구성될 수 있으므로, 각 앵커 서열은 세트의 다른 모든 앵커 서열과 거의 동일한 용융 온도 및 이중체 안정성을 공유할 수 있다.
- [0709] (4) 각 유형의 앵커 서열(A/T/G/C로 끝남)은 시퀀싱 리드에 대략 균등하게, 예를 들어, 대략 등분량으로 분포될 수 있다(즉, 세트의 약 25%는 A로 끝나고, 약 25%는 T로 끝나고, 약 25%는 G로 끝나고, 약 25%는 C로 끝나는 어댑터 서열을 갖는다).
- [0710] 일부 실시형태에서, 어댑터 모듈은 보다 균일한 어댑터 분포를 제공하기 위해 다양한 앵커 유형(예를 들어, 등분량의 앵커 1, 앵커 2, 앵커 3, 앵커 4)을 포함하는 등분량의 어댑터로 DNA 단편과 혼합된다. 예시적인 앵커 서열은 앵커 1 ACGTATGCCA(서열번호 1); 앵커 2 CTAGCGTTAC(서열번호 2); 앵커 3 GATCGACATG(서열번호 3); 및 앵커 4 TGCATCAGGT(서열번호 4)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0711] 일부 실시형태에서, 어댑터 서열은 3' 말단(3' T 오버행)에서 T 뉴클레오타이드로 끝난다. 일부 실시형태에서, 일부 어댑터는 3' 말단의 마지막 2개의 뉴클레오타이드로 TT를 갖고, 다른 어댑터는 3' 말단의 마지막 2개의 뉴클레오타이드로 AT, CT 또는 GT를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트의 복수의 어댑터는 비결찰 가닥에 혼성화하지 않는 3' dT 오버행을 포함한다.
- [0712] 일반적으로, 앵커 유형의 이상적인 분포는 각 앵커 유형이 동일한 분포 백분율(즉, 100%를 앵커 유형의 수로 나눈 값)을 갖게 하여 모든 DNA 단편 중에서 상이한 앵커를 포함하는 상이한 어댑터의 "균일한" 분포를 초래할 것이다. 일부 실시형태에서, 앵커 유형의 분포는 서열-준비되거나 또는 시퀀싱이 완료된 DNA 라이브러리에서 다양한 앵커 서열의 분포를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 4가지 앵커 유형의 이상적인 분포는 각 앵커 유형의 약 25% 분포를 초래할 것이다. 일부 실시형태에서, 주어진 어댑터 세트의 앵커 서열은 약 5% 내지 약 75%의 분포 백분율을 갖는다(즉, 가장 드문 앵커 유형의 분포%는 약 5%이고, 가장 빈번한 앵커 유형의 분포%는 약 75%이다). 일부 실시형태에서, 주어진 세트의 각 앵커 서열은 약 50%, 약 34%, 약 28%, 약 27%, 약 23%, 약 14% 또는 약 9%의 분포%를 갖는다.
- [0713] 일부 실시형태에서, 특정 서열 또는 유형의 앵커를 갖는 어댑터가 더 많은 양으로 존재할 수 있다. 이러한 어댑터는 어댑터 세트의 다른 앵커 유형의 1X, 2X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X 또는 10X 이상일 수 있으므로, 시퀀싱 리드에서 보다 균일한 어댑터의 분포를 초래한다.
- [0714] 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 하나 초과 앵커 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 어댑터 세트는 동시에 사용되는 4개의 상이한 앵커 서열을 포함할 수 있다. 이러한 앵커 서열은 또한 오류를 더 낮추기 위해 샘플 역다중화 중에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 시퀀싱 리드는 하류 고려 사항을 위해 포함 필터를 통과하여야 한다. 이러한 실시형태에서, 시퀀싱 리드 내 서열 위치는 고정되어 있으므로, ID 영역 및 앵커는 포함 필터를 통과하기 위해 시퀀싱 리드 내 고정된 위치를 가져야 한다.
- [0715] 일부 실시형태에서, 주어진 어댑터 세트 중 각 어댑터의 앵커 영역은 4개의 서열 중 하나를 포함한다. 도 2에 도시된 실시형태에서, 총 16개의 별개의 ID 영역은 4개의 앵커 그룹(각 뉴클레오타이드 A, C, T 및 G당 하나의 그룹)으로 분할되며, 각 앵커 그룹은 4개의 ID 영역을 포함하고, 각 ID 영역은 4개의 앵커 서열 중 하나와 매칭된다. 일부 실시형태에서, 총 240개의 ID 영역은 4개의 앵커 그룹(각 뉴클레오타이드 A, C, T 및 G당 하나의 그룹)으로 분할될 수 있으며, 각 앵커 그룹은 60개의 ID 영역을 포함하고, 각 ID 영역은 4개의 앵커 서열 중 하나와 매칭된다. 즉, 240개의 ID 영역은 60개 서열의 4개 세트로 나뉘며, 각 세트는 특정 앵커 영역과 쌍을 이룬다. 일부 실시형태에서, 각 어댑터 세트는 등분량의 각 앵커 서열을 갖는다. 따라서, 일부 실시형태에서, 식별은 ID 영역으로부터의 서열 정보뿐만 아니라 연관된 앵커 영역으로부터의 서열 정보도 포함한다. 이는 각

어댑터가 고유한 서열을 갖고 각 어댑터 세트의 복수의 어댑터가 균형 잡힌 앵커 조성을 갖게 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 총 60개의 ID 영역은 4개 세트로 분할될 수 있으며, 각 세트는 15개의 ID 영역을 포함하고 각 ID 영역은 4개의 앵커 서열 중 하나와 매칭된다.

[0716] 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 1개 내지 50개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 4개 내지 40개의 뉴클레오타이드 길이이다. 소정의 실시형태에서, 앵커 영역은 5개 내지 25개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 적어도 4개의 뉴클레오타이드, 적어도 6개의 뉴클레오타이드, 적어도 8개의 뉴클레오타이드, 적어도 10개의 뉴클레오타이드, 적어도 12개의 뉴클레오타이드, 적어도 14개의 뉴클레오타이드 또는 적어도 16개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 앵커 영역은 10개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0717] 포획 프로브 모듈

[0718] 본 개시내용의 일부 실시형태는 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 포함하는 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 포함하는 키트를 제공한다.

[0719] 다양한 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물 및 방법은 DNA 라이브러리 클론의 하나 이상의 표적 유전자좌의 표적화된 유전자 분석을 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적화된 유전자 분석은 다음 단계 중 하나 이상을 포함한다: 표적 유전자좌를 포함하는 DNA 클론을 포획 및/또는 단리하는 단계; 포획된 표적화된 유전자좌를 증폭하는 단계; 증폭된 포획된 표적화된 유전자좌를 시퀀싱하는 단계; 및 생성된 서열 리드의 생물정보학적 분석을 수행하는 단계. 본 개시내용에서 사용되는 용어 "DNA 라이브러리 클론"은 어댑터 및 게놈 DNA 단편의 조합이 고유한 DNA 서열(예를 들어, 또 다른 DNA 라이브러리 클론의 DNA 서열과 구별될 수 있는 DNA 서열)을 생성하는 DNA 라이브러리 단편을 지칭한다.

[0720] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 부분적으로 더 큰 프로브의 효율성 및 신뢰성을 유지하지만 더 작은 DNA 단편, 예를 들어, cfDNA 클론 라이브러리를 포함하는 게놈 DNA 라이브러리에서 정보가 충분하지 않은 (uninformative) 서열 생성을 최소화하도록 설계된 포획 프로브 모듈을 제공한다.

[0721] 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 포획 프로브 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열을 포함하는 제1 영역 및 태깅된 DNA 라이브러리의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 제2 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 PCR 프라이머 결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 영역은 꼬리 영역 또는 꼬리 서열로 지칭된다.

[0722] 본 개시내용에서 사용되는 용어 "꼬리 서열"은 포획 프로브 모듈의 5' 말단에 있는 폴리뉴클레오타이드를 지칭하며, 이는 일부 실시형태에서, 프라이머 결합 부위의 역할을 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다.

[0723] 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 파트너 올리고뉴클레오타이드에 혼성화할 수 있다. 일부 실시형태에서, 예시적인 파트너 올리고뉴클레오타이드는 GTGAAACCCAGGATCAACTCCCGTGCCAGTCACATCTCAGATGAGCT/3BioTEG/(서열번호 6)일 수 있다. "3BioTEG"는 스트랩타빈딘 코팅된 자성 비드에 결합하는 바이오틴-TEG 표지일 수 있다. 일부 실시형태에서, "3BioTEG" 표지는 고체 지지체에 결합할 수 있는 당엽계에 공지된 임의의 유형의 표지일 수 있다.

[0724] 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 약 5개 내지 약 100개의 뉴클레오타이드, 약 10개 내지 약 100개의 뉴클레오타이드, 약 5개 내지 약 75개의 뉴클레오타이드, 약 5개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드, 약 5개 내지 약 25개의 뉴클레오타이드 또는 약 5개 내지 약 20개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 약 30개의 뉴클레오타이드, 약 31개의 뉴클레오타이드, 약 32개의 뉴클레오타이드, 약 33개의 뉴클레오타이드, 약 34개의 뉴클레오타이드, 약 35개의 뉴클레오타이드, 약 36개의 뉴클레오타이드, 약 37개의 뉴클레오타이드, 약 38개의 뉴클레오타이드, 약 39개의 뉴클레오타이드 또는 약 40개의 뉴클레오타이드이다.

[0725] 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 5개 내지 100개의 뉴클레오타이드, 10개 내지 100개의 뉴클레오타이드, 5개 내지 75개의 뉴클레오타이드, 5개 내지 50개의 뉴클레오타이드, 5개 내지 25개의 뉴클레오타이드 또는 5개 내지 20개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 꼬리 서열은 30개의 뉴클레오타이드, 31개의 뉴클레오타이드, 32개의 뉴클레오타이드, 33개의 뉴클레오타이드, 34개의 뉴클레오타이드, 35개의 뉴클레오타이드, 36개의 뉴클레오타이드, 37개의 뉴클레오타이드, 38개의 뉴클레오타이드, 39개의 뉴클레오타이드 또는 40개의 뉴클레오타이드이다.

[0726] 연속 어댑터-태깅된 DNA 단편(비증폭됨) 및 태깅된 DNA 라이브러리(증폭됨)는 하나 이상의 관심 유전자좌가 풍

부한 하이브리드 분자를 포함하는 라이브러리의 제조를 포함하는 다양한 시퀀싱-기반 유전적 분석에 각각 유용하며, 이는 비증폭된 또는 증폭된 라이브러리일 수 있다.

[0727] 위에 기재된 바와 같이 제조된 비증폭된 어댑터-태깅된 DNA 단편 및/또는 증폭된 태깅된 DNA 라이브러리는 포획 프로브 모듈에 혼성화하여 특정 유전자좌에 표적화된 라이브러리, 즉, 표적화된 라이브러리를 생성할 수 있다. 어댑터-태깅된 DNA 단편은 하나 이상의 포획 프로브와 혼성화할 수 있다. 각 포획 프로브는 어댑터-태깅된 DNA 단편 내의 동일한 유전자좌를 표적으로 할 수 있거나 또는 어댑터-태깅된 DNA 단편 내의 상이한 유전자좌를 표적으로 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 증폭된 태깅된 DNA 라이브러리 단편 내의 복수의 유전자좌가 표적화된다.

[0728] 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈은 세포 DNA로부터 작제된 게놈 DNA 라이브러리와 함께 사용된다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈은 cfDNA로부터 작제된 게놈 DNA 라이브러리와 함께 사용된다. cfDNA의 평균 크기가 약 150bp 내지 약 170bp이며 고도로 단편화되어 있기 때문에, 소정의 본 개시내용의 조성물 및 방법은 관심 DNA 표적 영역을 조사하기 위해 고밀도 및 상대적으로 짧은 포획 프로브의 사용을 포함한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 균일한 밀도로 모든 염색체 분절에 걸쳐 분포되어 있는 DNA 표적 영역에 혼성화할 수 있다. 이러한 포획 프로브의 세트는 "염색체 안정성 프로브"로 지칭될 수 있다. 염색체 안정성 프로브는 염색체 카피 수(예를 들어, 염색체 배수성(ploidy))의 게놈 전체 측정값을 제공하기 위해 게놈 전체 규모에서 카피 수 변화를 조사하는 데 사용된다.

[0729] 고밀도 포획 프로브의 사용과 관련된 한 가지 특별한 우려 사항은 일반적으로 포획 프로브가 특정 "서열 규칙"을 사용하여 설계된다는 것이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 중복 서열의 영역 또는 극단적인 염기 조성 편향을 나타내는 영역은 포획 프로브를 설계할 때 제외될 수 있다. 본 개시내용에 사용되는 "염기 조성"은 DNA 조성 중 다양한 퓨린 및 피리미딘(예를 들어, A, G, C, T)의 상대적인 양을 지칭한다. 그러나, 포획 프로브 설계 규칙의 유연성의 부족은 본 개시내용의 포획 프로브 모듈의 프로브 성능에 실질적으로 영향을 미치지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서, 염기 조성의 제한을 고려하지 않고 위치 제약에 의해 엄격하게 선택된 본 개시내용의 포획 프로브는 표적 적중 서열 정보를 제공하고; 표적외 및 매핑할 수 없는 리드 포획을 거의 나타내지 않고; 몇 가지 예외를 제외하고 균일하고 유용한 표적 적중 리드를 생성할 수 있다. 더욱이, 가까운 프로브 간격에서 높은 중복성은 잠재적으로 성능이 떨어지는(poor-performing) 포획 프로브를 보완할 수 있다.

[0730] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 포획 프로브 모듈은 복수의 포획 프로브가 표적 영역 또는 표적 유전자좌에 혼성화하는 고밀도 포획 프로브 전략에서 사용되도록 구성되며, 각각은 복수이다. 일부 실시형태에서, 임의의 2개 이상의 포획 프로브는 서로 약 5개의 뉴클레오타이드 내, 서로 약 10개의 뉴클레오타이드 내, 서로 약 15개의 뉴클레오타이드 내, 서로 약 20개의 뉴클레오타이드 내, 서로 약 25개의 뉴클레오타이드 내, 서로 약 30개의 뉴클레오타이드 내, 서로 약 35개의 뉴클레오타이드 내, 서로 약 40개의 뉴클레오타이드 내, 서로 약 45개의 뉴클레오타이드 내, 서로 약 50개의 뉴클레오타이드 내, 서로 약 100개의 뉴클레오타이드 내, 서로 약 200개 이상의 뉴클레오타이드 내뿐만 아니라 모든 사이에 있는 뉴클레오타이드 길이 내에서 표적 영역에 결합하도록 설계된다.

[0731] 일부 실시형태에서, 표적 영역은 포획 프로브가 혼성화하는 표적 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 영역은 복수의 포획 프로브가 혼성화하는 복수의 표적 서열을 포함한다.

[0732] 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 20개의 뉴클레오타이드, 20개의 뉴클레오타이드, 21개의 뉴클레오타이드, 22개의 뉴클레오타이드, 23개의 뉴클레오타이드, 24개의 뉴클레오타이드, 25개의 뉴클레오타이드, 26개의 뉴클레오타이드, 27개의 뉴클레오타이드, 28개의 뉴클레오타이드, 29개의 뉴클레오타이드, 30개의 뉴클레오타이드, 31개의 뉴클레오타이드, 32개의 뉴클레오타이드, 33개의 뉴클레오타이드, 34개의 뉴클레오타이드, 35개의 뉴클레오타이드, 36개의 뉴클레오타이드, 37개의 뉴클레오타이드, 38개의 뉴클레오타이드, 39개의 뉴클레오타이드, 40개의 뉴클레오타이드, 41개의 뉴클레오타이드, 42개의 뉴클레오타이드, 43개의 뉴클레오타이드, 44개의 뉴클레오타이드, 45개의 뉴클레오타이드, 46개의 뉴클레오타이드, 47개의 뉴클레오타이드, 48개의 뉴클레오타이드, 49개의 뉴클레오타이드, 50개의 뉴클레오타이드, 51개의 뉴클레오타이드, 52개의 뉴클레오타이드, 53개의 뉴클레오타이드, 54개의 뉴클레오타이드, 55개의 뉴클레오타이드, 56개의 뉴클레오타이드, 57개의 뉴클레오타이드, 58개의 뉴클레오타이드, 59개의 뉴클레오타이드 또는 60개의 뉴클레오타이드이다.

[0733] 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 60개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 65개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 70개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 75개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 80개의 뉴클레오타이드이다.

다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 85개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 90개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 95개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 100개의 뉴클레오타이드, 약 200개의 뉴클레오타이드, 약 300개의 뉴클레오타이드, 약 400개의 뉴클레오타이드 또는 약 100개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 20개의 뉴클레오타이드, 약 20개의 뉴클레오타이드 내지 약 60개의 뉴클레오타이드, 약 60개의 뉴클레오타이드 내지 약 100개의 뉴클레오타이드, 약 100개의 뉴클레오타이드 내지 약 500개의 뉴클레오타이드, 약 200개의 뉴클레오타이드 내지 약 500개의 뉴클레오타이드, 약 300개의 뉴클레오타이드 내지 약 500개의 뉴클레오타이드 또는 약 400개의 뉴클레오타이드 내지 약 500개의 뉴클레오타이드 또는 이들 사이의 임의의 범위이다.

[0734] 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 60개의 뉴클레오타이드, 65개의 뉴클레오타이드, 70개의 뉴클레오타이드, 75개의 뉴클레오타이드, 80개의 뉴클레오타이드, 85개의 뉴클레오타이드, 90개의 뉴클레오타이드, 95개의 뉴클레오타이드, 100개의 뉴클레오타이드, 200개의 뉴클레오타이드, 300개의 뉴클레오타이드, 400개의 뉴클레오타이드 또는 100개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 10개의 뉴클레오타이드 내지 20개의 뉴클레오타이드, 20개의 뉴클레오타이드 내지 60개의 뉴클레오타이드, 60개의 뉴클레오타이드 내지 100개의 뉴클레오타이드, 100개의 뉴클레오타이드 내지 500개의 뉴클레오타이드, 200개의 뉴클레오타이드 내지 500개의 뉴클레오타이드, 300개의 뉴클레오타이드 내지 500개의 뉴클레오타이드 또는 400개의 뉴클레오타이드 내지 500개의 뉴클레오타이드, 또는 이들 사이의 임의의 범위이다.

[0735] 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 60개의 뉴클레오타이드보다 실질적으로 더 작지만 동일한 DNA 표적 영역을 표적으로 하는 60개의 뉴클레오타이드 포획 프로브와 동등할 뿐만 아니라 그 이상으로 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 40개의 뉴클레오타이드이다.

[0736] 다양한 실시형태에서, 포획 프로브 모듈은 포획 프로브에 혼성화하는 태깅된 및 또는 증폭된 게놈 DNA 라이브러리(예를 들어, 세포 또는 cfDNA 라이브러리)의 하나 이상의 포획된 단편의 단리 및/또는 정제를 가능하게 하는 결합 쌍의 특정 구성원을 포함한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈은 바이오틴 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈은 바이오틴 또는 또 다른 적합한 합텐, 예를 들어, 다이나이트로페놀, 다이콕시게닌에 접합된다.

[0737] 일부 실시형태에서, 파트너 올리고뉴클레오타이드는 포획 프로브에 혼성화하는 태깅된 및 또는 증폭된 게놈 DNA 라이브러리(예를 들어, 세포 또는 cfDNA 라이브러리)의 하나 이상의 포획된 단편의 단리 및/또는 정제를 가능하게 하는 결합 쌍의 특정 구성원을 포함한다. 일부 실시형태에서, 파트너 올리고뉴클레오타이드는 바이오틴 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 파트너 올리고뉴클레오타이드는 바이오틴 또는 또 다른 적합한 합텐, 예를 들어, 다이나이트로페놀, 다이콕시게닌에 접합된다.

[0738] 다양한 실시형태에서, 포획 프로브는 복합체를 형성하기 위해 태깅되고 선택적으로 증폭된 DNA 라이브러리에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 DNA 라이브러리 내 특정 게놈 표적 영역 또는 표적 서열에 실질적으로 혼성화한다.

[0739] 혼성화(hybridization 또는 hybridizing) 조건은 2개의 뉴클레오타이드 서열이 안정적인 복합체를 형성하는 임의의 반응 조건을 포함할 수 있으며; 예를 들어, 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리 단편 및 포획 프로브는 안정적인 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리 단편-포획 프로브 복합체를 형성한다. 이러한 반응 조건은 당업계에 잘 알려져 있고, 당업자라면 이러한 조건이 적절하게, 예를 들어, 더 짧은 길이의 포획 프로브를 사용하여 본 개시내용의 범위 내에서 감소된 어닐링 온도로 변경될 수 있음을 이해할 것이다. 포획 프로브 복합체의 제2 영역이 태깅된 DNA 라이브러리의 영역과 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 85%, 80%, 75% 또는 70%의 서열 동일성, 상동성 또는 상보성을 나타내는 경우 실질적인 혼성화가 발생할 수 있다.

[0740] 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 약 40개의 뉴클레오타이드이며, 약 44°C 내지 약 47°C의 최적의 어닐링 온도를 갖는다.

[0741] 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 40개의 뉴클레오타이드이며, 44°C 내지 47°C의 최적의 어닐링 온도를 갖는다.

[0742] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물은 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 포함하는 키트로 조립된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 조합된 시퀀싱 준비가 완료된 DNA 라이브러리를 생성하는 데 사용될 수 있

되, 조합된 라이브러리는 본 개시내용에 기재된 임의의 조합된 라이브러리이다.

- [0743] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 특정 유전자 집합, 예를 들어, 표 11에 기재된 바와 같은 폐암 유전자 세트를 표적화하도록 설계된 포획 프로브 모듈의 세트를 포함한다. 이러한 포획 프로브 모듈의 세트는 포획 프로브 패널로 지칭될 수 있다. 이러한 포획 프로브 모듈 또는 포획 프로브 패널은 본 개시내용의 임의의 포획 프로브 모듈을 포함할 수 있다. 키트의 높은 성능을 보장하기 위해, 포획 프로브 모듈 또는 포획 프로브 패널 각각은 키트에 포함되기 전에 품질 관리(QC) 프로세스를 거칠 수 있다.
- [0744] 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스의 각 테스트 샘플에 대해, 고유한 어댑터 세트가 할당된다. 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 LPA를 생성하기 위해 본 개시내용의 임의의 말단 복구, 어댑터 결찰 및 라이브러리 증폭 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 LPA를 생성하기 위해 실시예 11의 방법에 따라 말단 복구, 어댑터 결찰 및 라이브러리 증폭을 수행하는 것을 포함한다.
- [0745] 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 LPA로부터 TC LPA 및 WG LPA를 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, TC LPA 및 WG LPA는 실시예 11의 방법에 따라 생성된다. 일부 실시형태에서, TC LPA 및 WG LPA에 대한 QC 프로세스가 수행될 수 있으며, QC를 통과한 라이브러리가 하류 사용을 위해 선택된다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈의 QC를 위해, 적어도 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 $80 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 의 TC LPA 및 적어도 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 $8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 의 WG LPA가 하류 프로세스에서 사용된다.
- [0746] 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 특정 포획 프로브 패널을 사용하여 TCL을 생성하기 위해 TC LPA를 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 본 개시내용의 임의의 방법에 따라 TCL을 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 실시예 12의 방법에 따라 TCL을 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 본 개시내용의 임의의 방법에 따라 TCL로부터 TCLA를 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 실시예 12의 방법에 따라 TCL로부터 TCLA를 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스에서 테스트된 포획 프로브 패널은 폐 프로브 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폐 프로브 세트 내의 각 포획 프로브 모듈은 폐암과 관련된 유전자의 특정 표적 서열에 결합한다. 일부 실시형태에서, 폐 프로브 세트 내의 각 포획 프로브 모듈은 표 11에 나열된 유전자의 특정 표적 서열에 결합한다.
- [0747] 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 본 개시내용의 임의의 방법에 따라 WGLA를 생성하기 위해 WG LPA를 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 실시예 13의 방법에 따라 WGLA를 생성하기 위해 WG LPA를 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 각 TCLA 및 WGLA는 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스의 하류 프로세스에 사용되기 위해 적어도 $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 의 농도를 가져야 한다.
- [0748] 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리를 생성하기 위해 TCLA 및 WGLA를 조합하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, TCLA 및 WGLA는 실시예 14의 방법에 따라 조합된다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 본 개시내용의 임의의 시퀀싱 방법에 따라 조합된 TCLA 및 WGLA 라이브러리를 시퀀싱하는 것을 포함한다.
- [0749] 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈이 키트의 높은 성능을 가능하게 하는 품질 요구사항을 충족하는지 여부를 결정하기 위해 QC 프로세스에 하나 이상의 허용 기준이 제공된다.
- [0750] 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스에 대한 하나 이상의 허용 기준은 표 15로부터 선택된다.
- [0751] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 QC 프로세스 중 하나 이상을 통과한 포획 프로브 모듈만이 본 개시내용의 키트에 포함된다.
- [0752] 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈에 대한 QC 프로세스는 양성 대조군 DNA 샘플을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군 DNA 샘플은 적어도 2종의 상이한 세포주의 혼합된 DNA 샘플을 포함한다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군 DNA 샘플은 세포주의 블렌드(blend): NA12878의 8% NA18511(세포주 gDNA는 Coriell Institute로부터 공급됨)로부터 전단된 게놈 DNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군 DNA 샘플은 실시예 17에 기재된 QC 프로세스를 통과하였다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군 DNA 샘플은 본 개시내용의 키트에

포함된다.

[0753] 라이브러리 태그

[0754] 본 개시내용의 일부 실시형태는 제1 변형된 라이브러리를 제2 변형된 라이브러리와 구별하는 데 사용될 수 있는 라이브러리 태그를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트를 사용하여 생성된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리를 포함하는 조합된 라이브러리를 생성하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조합된 라이브러리는 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)이다.

[0755] 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 제1 라이브러리 태그를 포함하고, 제2 변형된 라이브러리는 제2 라이브러리 태그를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함하고, 제2 변형된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함하지 않고, 제2 변형된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함한다.

[0756] 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 제1 신호를 생성하고, 라이브러리 태그가 없으면 제2 신호를 생성한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 신호가 모두 검출되거나 또는 검출 가능하다. 일부 실시형태에서, 제1 신호 및 제2 신호는 동일하지 않다. 일부 실시형태에서, 제1 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 제2 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않다. 일부 실시형태에서, 제2 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 제1 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않다.

[0757] 일부 실시형태에서, 제1 라이브러리 태그는 제1 신호를 생성하고, 제2 라이브러리 태그는 제2 신호를 생성한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 신호가 모두 검출되거나 또는 검출 가능하다. 일부 실시형태에서, 제1 신호 및 제2 신호는 동일하지 않다. 일부 실시형태에서, 제1 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 제2 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않다. 일부 실시형태에서, 제2 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 제1 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않다.

[0758] 일부 실시형태에서, 검출된 제1 신호 및 검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출된 제1 신호 및 비검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있다. 일부 실시형태에서, 비검출된 제1 신호 및 검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있다.

[0759] 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 동일한 시퀀싱 실행에서 상이한 라이브러리를 다중화할 수 있을 뿐만 아니라 시퀀싱 분석 동안 라이브러리를 역다중화할 수 있다.

[0760] 일부 실시형태에서, 동일한 시퀀싱 실행에서 상이한 라이브러리의 다중화는 제1 변형된 라이브러리가 제1 라이브러리 태그를 포함하고 제2 변형된 라이브러리가 제2 라이브러리 태그를 포함하도록 함으로써 달성될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 제1 라이브러리 태그는 제1 신호를 생성하고, 제2 라이브러리 태그는 제2 신호를 생성한다.

[0761] 일부 실시형태에서, 동일한 시퀀싱 실행에서 상이한 라이브러리의 다중화는 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리 중 하나만이 라이브러리 태그를 포함하도록 함으로써 달성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 제1 신호를 생성하고, 라이브러리 태그가 없으면 제2 신호를 생성한다.

[0762] 일부 실시형태에서, 시퀀싱 분석 동안 라이브러리의 역다중화는 제1 신호와 제2 신호를 구별함으로써 달성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출된 제1 신호 및 검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출된 제1 신호 및 비검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있다. 일부 실시형태에서, 비검출된 제1 신호 및 검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있다.

[0763] 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 포획 프로브 모듈을 사용하여 DNA 표적의 표적 포획에 의해 생성되며, 포획 프로브 모듈은 라이브러리 태그를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 변형된 라이브러리는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 DNA 단편을 증폭 또는 확장시킴으로써 생성될 수 있다.

[0764] 일부 실시형태에서, 포획 프로브 모듈 내의 라이브러리 태그는 시퀀싱 프라이머에 대한 결합 부위를 추가로 포함할 수 있다. 포획 프로브가 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 데만 사용되고 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 데는 사용되지 않는 실시형태에서, 특정 시퀀싱 프라이머는 제1 변형된 라이브러리 내의 결합 부위에만 어닐링하고, 제2 변형된 라이브러리 내의 임의의 표적에는 어닐링하지 않을 것이다. 이러한 실시형태에서, 특정 시퀀싱 프라이머와 제2 변형된 라이브러리의 혼성화의 결과는 제2 변형된 라이브러리에서 이 특정 프라이머에

대한 "빈 시퀀싱 리드"를 초래한다.

[0765] 일부 실시형태에서, 제1 신호는 시퀀싱 리드이고, 제2 신호는 "빈" 시퀀싱 리드이다. 일부 실시형태에서, 제1 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 제2 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않다. 본 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 제1 신호 및 제2 신호는 모두 검출되거나 또는 검출 가능하다. 본 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, 빈 시퀀싱 리드(제2 신호)는 일련의 2개 이상의 G 뉴클레오타이드로 검출된다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 도 28의 "표적 포획 라이브러리" 패널에 도시된 바와 같이, 시퀀싱 프라이머 리드 1에 대한 프라이머 결합 부위 및 시퀀싱 프라이머 리드 2에 대한 프라이머 결합 부위를 모두 포함하는 DNA 분자가 시퀀싱 프라이머 리드 1 및 리드 2를 사용하여 시퀀싱되는 경우, 2개의 시퀀싱 리드가 생성될 것이며, 여기서 각각의 시퀀싱 리드는 시퀀싱된 분자의 적어도 일부에 상응한다. 일 실시형태에서, 도 28의 "전체 게놈 라이브러리" 패널에 도시된 바와 같이, 시퀀싱 프라이머 리드 1 서열에 대한 프라이머 결합 부위만을 포함하고 시퀀싱 프라이머 리드 2에 대한 프라이머 결합 부위는 포함하지 않는 DNA 분자가 시퀀싱 프라이머 리드 1 및 리드 2를 사용하여 시퀀싱되는 경우, 시퀀싱 프라이머 리드 1만이 시퀀싱된 분자의 적어도 일부에 상응하는 시퀀싱 리드를 생성할 것인 반면, 시퀀싱 프라이머 리드 2는 일련의 2개 이상의 G 뉴클레오타이드일 수 있는 "빈" 시퀀싱 리드를 생성할 것이다. 이러한 방식으로 빈 시퀀싱 리드를 검출할 수 있는 장치는, 예를 들어, Illumina NextSeq 2-색 화학을 사용하는 시퀀서를 포함할 수 있다.

[0766] 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 TCL 또는 증폭된 TCL이고, 제2 변형된 라이브러리는 WGL 또는 WGLA이다. 일부 실시형태에서, TCL 또는 TCLA는 라이브러리 태그를 보유한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 맞춤형 "리드 2" 시퀀싱 프라이머에 대한 결합 도메인이다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 포획 프로브 모듈의 꼬리 영역에 내장되어 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 WGL 또는 WGLA 라이브러리는 리드 2 시퀀싱 프라이머 결합 도메인을 보유하지 않으므로 리드 2 시퀀싱 리드를 생성하지 않는다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 표적 포획 라이브러리 또는 TCLA에 대한 포획 프로브 게놈 위치를 지정할 수 있지만, LPWG 라이브러리에 대해 생성된 리드 2 서열은 G(구아닌)의 스트링이며; 이는 형광 신호를 나타내지 않는 클러스터가 G 염기로 해석되는 Illumina 2-색 시퀀싱 방식의 결과이다.

[0767] 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 검출 표지를 포함한다. 상기 검출 표지는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 라이브러리의 생체분자 내의 작용기에 화학적으로 부착된 형광 염료를 포함하는 형광 모이어티이다. 형광 검출 표지는 당업계에 공지된 형광 이미징 방법을 사용하여 시각화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 중합체에 캡슐화되거나 또는 부착된 나노미터-크기의 산화철 입자로 만들어진 자성 비드를 포함하는 자성 또는 상자성 모이어티이다. 상기 자성 또는 상자성 모이어티의 검출 방법은 자성 면역검정(MIA) 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 서양고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase: HRP) 및/또는 알칼리 포스파테이스(alkaline phosphatase: AP)를 포함하는 효소 모이어티이다. 상기 효소 모이어티의 검출 방법은, 예를 들어, 발색, 화학발광, 형광 방법 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 신호전달 모이어티 및 인식 모이어티를 포함하는 화학센서를 포함하는 결합 모이어티이되, 신호전달 모이어티는 인식 모이어티가 입력 신호를 인식할 때 출력 신호를 생성할 수 있다. 상기 결합 모이어티의 검출 방법은, 예를 들어, 전자기 방사선에 기초한 광학적 방법, 전기화학적 검출 방법 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 항체에 의해 인식될 수 있는 폴리펩타이드를 포함하는 에피토프이다. 상기 에피토프의 검출 방법은, 예를 들어, ELISA 방법, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance: SPR) 방법 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 감마, 베타, 알파 또는 다중 방사선 방출 방출할 수 있는 방사성 핵종을 포함하는 방사성 모이어티이다. 상기 방사성 모이어티의 검출 방법은, 예를 들어, 이온화 챔버, 사진 필름 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법을 사용하는 것을 포함할 수 있다.

[0768] 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 검출 가능한 모이어티에 선택적으로 또는 특이적으로 결합한다. 상기 검출 표지는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 라이브러리의 생체분자 내의 작용기에 화학적으로 부착된 형광 염료를 포함하는 형광 모이어티이다. 형광 검출 표지는 당업계에 공지된 형광 이미징 방법을 사용하여 시각화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 중합체에 캡슐화되거나 또는 부착된 나노미터-크기의 산화철 입자로 만들어진 자성 비드를 포함하는 자성 또는 상자성 모이어티이다. 상기 자성 또는 상자성 모이어티의 검출 방법은 자성 면역검정(MIA) 또는 당업계에 공지된 임의의 다른

방법을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 서양고추냉이 과산화효소(HRP) 및/또는 알칼리 포스파테이스(AP)를 포함하는 효소 모이어티이다. 상기 효소 모이어티의 검출 방법은, 예를 들어, 발색, 화학발광, 형광 방법 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 신호전달 모이어티 및 인식 모이어티를 포함하는 화학센서를 포함하는 결합 모이어티이되, 신호전달 모이어티는 인식 모이어티가 입력 신호를 인식할 때 출력 신호를 생성할 수 있다. 상기 결합 모이어티의 검출 방법은, 예를 들어, 전자기 방사선에 기초한 광학적 방법, 전기화학적 검출 방법 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 항체에 의해 인식될 수 있는 폴리펩타이드를 포함하는 에피토프이다. 상기 에피토프의 검출 방법은, 예를 들어, ELISA 방법, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 방법 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 표지는, 예를 들어, 감마, 베타, 알파 또는 다중 방사선 방출 방출할 수 있는 방사성 핵종을 포함하는 방사성 모이어티이다. 상기 방사성 모이어티의 검출 방법은, 예를 들어, 이온화 챔버, 사진 필름 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법을 사용하는 것을 포함할 수 있다.

[0769] 테스트 샘플

[0770] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 DNA를 포함하는 임의의 적합한 테스트 샘플에 사용될 수 있다. 본 개시내용의 키트는 DNA를 포함하는 임의의 적합한 테스트 샘플과 함께 사용될 수 있다. 본 개시내용에서 사용되는 용어 "DNA"는 데옥시리보핵산을 지칭한다. 다양한 실시형태에서, 용어 DNA는 cfDNA, 게놈 DNA, 재조합 DNA, 합성 DNA, cDNA, 미토콘드리아 DNA, 메틸화된 DNA 또는 탈메틸화된 DNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는 자연 발생적 또는 비자연 발생적인 임의의 형태의 DNA를 지칭한다. 일부 실시형태에서, DNA는 게놈 DNA 또는 cfDNA(무세포 DNA)를 지칭한다. 일부 실시형태에서, DNA는 후성유전적 표식을 포함한다. 후성유전적 표식은 DNA 메틸화를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 후성유전적 표식일 수 있다.

[0771] 일부 실시형태에서, DNA는 DNA 서열을 포함한다. DNA 서열은 cfDNA, 게놈 DNA, 재조합 DNA, 합성 DNA, cDNA, 미토콘드리아 DNA, 메틸화된 DNA 또는 탈메틸화된 DNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는 자연 발생적 또는 비자연 발생적인 임의의 형태의 DNA일 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 서열은 게놈 DNA 또는 cfDNA이다. 일부 실시형태에서, DNA 서열은 후성유전적 표식을 포함한다. 후성유전적 표식은 DNA 메틸화를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 후성유전적 표식일 수 있다.

[0772] 일부 실시형태에서, DNA 서열은 DNA 표적을 포함한다. DNA 표적은 cfDNA, 게놈 DNA, 재조합 DNA, 합성 DNA, cDNA, 미토콘드리아 DNA, 메틸화된 DNA 또는 탈메틸화된 DNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는 자연 발생적 또는 비자연 발생적인 임의의 형태의 DNA일 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 표적은 게놈 DNA 또는 cfDNA이다. 일부 실시형태에서, DNA 표적은 후성유전적 표식을 포함한다. 후성유전적 표식은 DNA 메틸화를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 후성유전적 표식일 수 있다.

[0773] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 DNA 라이브러리는 게놈 DNA 라이브러리, RNA로부터 구축된 cDNA 라이브러리, 예를 들어, RNA 발현 라이브러리, 앰플리콘 라이브러리, 전체 엑솜 라이브러리 및 메틸화된 라이브러리를 포함할 수 있다. 다양한 실시형태에서, DNA 라이브러리는 하나 이상의 추가적인 DNA 서열 및/또는 태그를 포함한다.

[0774] 본 개시내용에서 사용되는 용어 "순환 DNA", "순환 무세포 DNA" 및 "무세포 DNA"는 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 세포의 DNA인 DNA, 세포로부터 압출된 DNA 또는 괴사 또는 세포자멸성 세포로부터 방출된 DNA인 DNA를 지칭한다. 이 용어는 본 개시내용에서 상호교환적으로 사용되며, 세포(즉, 뉴클레오스) 내에 함유되어 있고 세포를 용해하거나 또는 그렇지 않으면 이의 온전성을 파괴함으로써 본 개시내용에 기재된 것과 같은 분자 생물학적 기법으로만 접근할 수 있는 게놈 DNA를 지칭하는 "세포 게놈 DNA" 또는 "세포 DNA"와 대조적으로 종종 사용된다. 일부 실시형태에서, cfDNA는 이중 가닥 DNA의 세포외 분자이다. 일부 실시형태에서, cfDNA는 약 70bp 내지 약 200bp 길이의 작은 DNA 단편을 포함할 수 있다.

[0775] 일부 실시형태에서, 용어 "DNA 단편"은 DNA 분자의 단편화된 조각을 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 단편화는 자연적으로 또는 기계적 프로세스(예컨대, 초음파 처리)를 통해 발생할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 단편은 말단-복구된 DNA 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 단편은 어댑터 모듈에 부착될 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 분자는 DNA 단편일 수 있다.

[0776] 본 명세서에서 사용되는 용어 "테스트 샘플"은 유전자 분석에 사용되는 DNA의 공급원을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 테스트 샘플은 조직 생검이다. 소정의 실시형태에서, 테스트 샘플은 종양 또는 종양으로 의심되는 조직의 생검이다. 일부 실시형태에서, 테스트 샘플은 악성 종양 또는 악성으로 의심되는 종양으로부터 얻은 생검이

다. 일부 실시형태에서, 테스트 샘플은 암세포 또는 암성으로 의심되는 세포를 포함한다.

[0777] 일부 실시형태에서, DNA 분자 또는 DNA 단편은 테스트 샘플로부터 단리되거나 또는 생성된다.

[0778] 일부 실시형태에서, 라이브러리는 임의의 적합한 양의 DNA로부터 생성될 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA의 양은 약 1pg 내지 약 500ng, 약 1ng 내지 약 400ng, 약 5ng 내지 약 300ng, 약 10ng 내지 약 250ng 또는 약 20ng 내지 약 200ng이다. 일부 실시형태에서, DNA의 양은 약 5ng 내지 약 50ng이다. 일부 실시형태에서, DNA의 양은 1pg 내지 500ng, 1ng 내지 400ng, 5ng 내지 300ng, 10ng 내지 250ng 또는 20ng 내지 200ng이다. 일부 실시형태에서, DNA의 양은 5ng 내지 50ng이다.

[0779] 일부 실시형태에서, 본 개시내용에서 상정되는 방법 및 조성물은 이중-가닥 DNA(dsDNA), 예컨대, 무세포 DNA(cfDNA), 게놈 DNA(gDNA), 상보적 DNA(cDNA), 미토콘드리아 DNA, 메틸화된 DNA 또는 탈메틸화된 DNA로부터 선택되는 dsDNA를 사용한다.

[0780] 일부 실시형태에서, 게놈 DNA는 골수, 식도, 위, 십이지장, 직장, 결장, 회장, 췌장, 폐, 간, 전립선, 뇌, 신경, 뇌막 조직, 신장 조직, 자궁내막 조직, 자궁경부 조직, 유방, 림프절, 근육 또는 피부를 포함하지만 이에 제한되지 않는 조직으로부터 채취된 조직 샘플 또는 생검으로부터 얻어진다.

[0781] 세포 또는 세포로 구성된 생물학적 조직으로부터 게놈 DNA를 정제하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 당업자라면 조직 및 조직이 얻어지는 조건에 따라 최적의 절차 또는 상업적 키트를 인식할 것이다. 일부 실시형태는 조직으로부터 세포 DNA를 정제하는 것이 내부의 세포 DNA를 노출시키기 위해, 예를 들어, 조직 샘플의 혼합, 분쇄 또는 초음파 처리와 같은 화학적 및 물리적 방법에 의한 세포 파괴 또는 세포 용해; 세포 용해에도 작용하는 세제 또는 계면활성제를 첨가함으로써 막 지질을 제거하는 것이고, 선택적으로, 예를 들어, 프로테아제를 첨가함으로써 단백질을 제거하는 것; 예를 들어, RNase를 첨가함으로써 RNA를 제거하는 것; 예를 들어, 세포 용해 단계 동안 사용되는 세제, 단백질, 염 및 시약으로부터의 DNA 정제가 필요할 것이라는 것을 상정한다. DNA 정제는, 예를 들어, 에탄올 또는 아이소프로판올을 사용한 침전에 의해; 또는 페놀-클로로포름 추출에 의해 수행될 수 있다.

[0782] 일부 실시형태에서, 조직 및/또는 세포로부터 얻은 세포 DNA는 본 개시내용에 기재된 바와 같이 게놈 DNA 라이브러리를 수득, 생성, 제조, 형성 및/또는 생산하는 과정 이전 및/또는 도중에 단편화된다. 당업자라면 DNA 단편화를 위한 여러 적합한 기법이 있으며, 차세대 시퀀싱을 포함하지만 이에 제한되지 않는 DNA 시퀀싱을 위한 게놈 DNA 라이브러리를 생성할 목적으로 세포 DNA를 단편화하기에 적합한 기법을 인식하고 식별할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 소정의 실시형태는 세포 DNA가 물리적 단편화, 효소 단편화 및 화학적 전단을 포함하지만 이에 제한되지 않는 방법에 의해 라이브러리를 생성하기 위해 적절하고/하거나 충분한 길이의 단편으로 단편화될 수 있다는 것을 상정한다.

[0783] 물리적 단편화는 음향 전단, 초음파 처리 및 유체역학적 전단을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 세포 DNA는 물리적 단편화에 의해 단편화된다. 일부 실시형태에서, 세포 DNA는 음향 전단 또는 초음파 처리에 의해 단편화된다. 일부 실시형태는 음향 전단 및 초음파 처리가 세포 DNA를 전단하는 데 사용되는 일반적인 물리적 방법임을 상정한다. Covaris® 기기(매사추세츠주 우번 소재)는 DNA를 100kb bp 내지 5kb bp로 파괴하는 음향 장치이다. Bioruptor®(뉴저지주 덴빌 소재)는 염색질, DNA를 전단하고 조직을 파괴하는 데 이용되는 초음파 처리 장치이다. 소량의 DNA는 150bp 내지 1kb 길이로 전단될 수 있다. Digilab의 Hydroshear (매사추세츠주 말버러 소재)는 유체역학적 힘을 이용하여 DNA를 전단한다. 분무기(Life Tech, 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)는 또한 압축 공기를 사용하여 액체를 원자화하여 몇 초 만에 DNA를 100bp 내지 3kb 단편으로 전단할 수 있다. 분무화는 비용이 저렴하지만 이 과정을 통해 원래의 샘플에서 세포 DNA의 약 30%가 손실될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 세포 DNA는 초음파 처리에 의해 단편화된다.

[0784] 효소 단편화는 제한 엔도뉴클레아제, 예를 들어, DNase I을 사용한 처리 또는 비특이적 뉴클레아제를 사용한 처리를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 세포 DNA는 효소 단편화에 의해 단편화된다. 일부 실시형태에서, 세포 DNA는 제한 엔도뉴클레아제를 사용한 처리에 의해 단편화된다. 일부 실시형태에서, 세포 DNA는 비특이적 뉴클레아제를 사용한 처리에 의해 단편화된다. 소정의 실시형태에서, 세포 DNA는 전위효소를 사용한 처리에 의해 단편화된다. 소정의 실시형태는 세포 DNA를 작은 조각으로 전단하는 효소적 방법이 DNase I, 말토스 결합 단백질(MBP)-T7 엔도 I과 비특이적 뉴클레아제 비브리오 벌니피커스(*Vibrio vulnificus*: Vvn) New England Biolabs's(매사추세츠주 이프위치 소재) 단편화효소의 조합 및 Nextera 태깅화 기술(Illumina, 캘리포니아주 샌디에고 소재)을 포함한다는 것을 상정한다. 비특이적 뉴클레아제와 T7 엔도의 조합은 상승적으로

작용하여 비특이적 Nick 및 카운터 Nick을 생성하여 Nick 부위로부터 8개 이하의 뉴클레오타이드를 분리하는 단편을 생성한다. 태깅화는 어댑터를 이중 가닥 DNA에 동시에 단편화하고 삽입하기 위해 전위효소를 사용한다.

- [0785] 화학적 단편화는 열 및 2가 금속 양이온을 사용한 처리를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 게놈 DNA는 화학적 단편화에 의해 단편화된다. 일부 실시형태는 화학적 전단이 게놈 DNA와 반대로 긴 RNA 단편의 분해에 더 일반적으로 사용된다는 것을 상정한다. 화학적 단편화는 전형적으로 2가 금속 양이온(마그네슘 또는 아연)을 사용한 DNA의 열 분해를 통해 수행된다. DNA 단편의 길이는 인큐베이션 시간을 늘리거나 또는 줄임으로써 조정될 수 있다.
- [0786] 일부 실시형태에서, 게놈 DNA는 200bp 단편을 생성하는 데 적합한 설정에서 초음파 처리기(Covaris)를 사용하여 초음파 처리에 의해 단편화될 수 있다.
- [0787] 일부 실시형태에서, 생성된 단편은 상장성 AMPure XP 비드(Beckman)를 사용한 "양면" 비드 정제를 사용하여 추가로 정제되고 크기가 선택될 수 있다.
- [0788] 일부 실시형태에서, 전단된 세포주 DNA의 혼합물은 연구 목적에 적합한 다양한 비로 존재할 수 있으며, 이들을 여성 및/또는 남성 대상체(X 및/또는 Y 염색체 상의 유전자를 설명하기 위해)로부터의 야생형(WT) cfDNA와 혼합하여 단일 뉴클레오타이드 변이(SNV), 예컨대, 단일 유전자 다형성(SNP), 삽입 및/또는 결실(indel), 유전자 배열, 예컨대, 전좌, 융합, 역전, 중복(카피 수 변화) 및 정의된 대립유전자 빈도(AF)의 다른 변이가 있는 실험실에서 생성된 샘플을 생성할 수 있다.
- [0789] 일부 실시형태에서, 본 개시내용에서 상정되는 방법 및 조성물은 저역 통과 전체 게놈 라이브러리, 앰플리콘 라이브러리, 전체 엑솜 라이브러리, cDNA 라이브러리 또는 메틸화된 DNA 라이브러리로부터 얻은 dsDNA를 사용한다.
- [0790] 일부 실시형태에서, 본 개시내용에서 상정되는 방법 및 조성물은 분석물로서 무세포 DNA(cfDNA)를 사용한다. 일부 실시형태에서, cfDNA의 크기 분포는 약 150bp 내지 약 180bp 단편 범위이다. 일부 실시형태에서, cfDNA의 크기 분포는 150bp 내지 180bp 단편 범위이다. cfDNA의 작고 단편화된 특성은 내핵분해 및/또는 외핵분해 활성의 결과일 수 있으며, cfDNA의 정확하고 신뢰할 수 있으며 견고한 분석에 대해 아주 어려운 과제를 제시한다. cfDNA 분석의 또 다른 과제는 혈류 내 반감기가 약 15분 정도로 짧다는 것이다. 임의의 특정 이론에 얽매이지 않고, 본 개시내용은 부분적으로 cfDNA의 분석이 "액체 생검"과 같으며 현재 생물학적 프로세스의 실시간 스냅샷이라는 점을 상정한다.
- [0791] 더욱이, cfDNA는 세포 내에서 발견되지 않으며 생물학적 유체 및 대변 샘플을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 적합한 공급원으로부터 얻을 수 있기 때문에, 이는 분석 중인 조직에 대한 직접적인 접근과 같이 종양의 차세대 시퀀싱 분석을 성가시게 하는 기존의 제한사항이 적용되지 않는다.
- [0792] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 유전자 분석 방법은 cfDNA를 하나 이상의 말단-복구 효소로 처리하여 말단-복구된 cfDNA를 생성하는 것 및 하나 이상의 어댑터를 말단-복구된 cfDNA의 각 말단에 결합시켜 어댑터-태깅된 cfDNA 라이브러리를 생성하는 것을 포함하는 cfDNA 라이브러리를 생성하는 단계를 포함한다.
- [0793] 일부 실시형태에서, cfDNA를 단리하는 데 적합한 공급원인 생물학적 유체의 예시적인 예는 양수, 혈액, 혈장, 혈청, 정액, 림프액, 뇌척수액, 안구액, 소변, 타액, 점액 및 땀을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0794] 일부 실시형태에서, 생물학적 유체는 혈액 또는 혈장이다.
- [0795] 소정의 실시형태에서, 상업적으로 이용 가능한 키트 및 당업자에게 공지된 다른 방법은 대상체의 생물학적 유체로부터 또는 이전에 수득되고 선택적으로, 예를 들어, 냉동 및/또는 EDTA, EGTA 또는 2가 양이온에 특이적인 기타 킬레이트제를 포함하지만 이에 제한되지 않는 효소 킬레이트제의 첨가에 의해 안정화된 생물학적 샘플로부터 직접 cfDNA를 단리하는 데 사용될 수 있다.
- [0796] 일부 실시형태에서, 유전자 변이를 보유하는 불멸화된 세포(Coriell Institute for Medical Research 또는 SeraCare Life Sciences, Inc.)로부터 단리된 무세포 DNA 또는 게놈 DNA(예를 들어, cfDNA 또는 gDNA)이 NGS 라이브러리 구축에 사용될 수 있다.
- [0797] 일부 실시형태에서, 무세포 DNA는 QIAmp DSP Circulating NA 키트(Qiagen)를 사용하여 혈장 샘플로부터 추출될 수 있다.
- [0798] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 양성 대조군 DNA 샘플을 포함한다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군

샘플은 적어도 2종의 상이한 세포주의 혼합된 DNA 샘플을 포함한다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군 샘플은 세포주의 블렌드로부터의 전단된 게놈 DNA: NA12878의 8% NA18511(세포주 gDNA는 Coriell Institute로부터 공급됨)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군 DNA 샘플은 실시예 17에 기재된 QC 프로세스를 통과하였다. 일부 실시형태에서, 양성 대조군 DNA 샘플은 본 개시내용의 포획 프로브 모듈과 함께 사용되도록 구성된다.

[0799] 세부 방법

[0800] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물, 키트 및 방법은 표적화된 유전자 분석에 사용된다. 본 개시내용의 조성물, 키트 또는 방법 중 어느 하나를 사용하는 예시적인 프로세스가 도 3에 도시되어 있다. 조성물, 키트 또는 방법 중 어느 하나를 사용하는 특정 예를 설명하는 예시적인 작업 흐름이 도 4에 도시되어 있으며 아래에서 논의된다. 본 개시내용의 방법의 일부 실시형태는 또한 키트 구성요소를 생성하기 위한 품질 관리(QC) 프로세스에서 사용될 수 있다.

[0801] DNA 말단-복구

[0802] 일부 실시형태에서, 입력 DNA 분자(예를 들어, 무세포 DNA 단편)는 말단-복구된 DNA 단편이 단일 반응 혼합물에서 5' 포스페이티기 및 3' dA 뉴클레오타이드 오버행을 갖도록 말단-복구된 DNA 분자로 전환된다. 상업적으로 이용 가능한 키트(예를 들어, NEB Ultra II 말단 복구/dA 테일링 모듈 E7546L)가 DNA 단편을 말단 복구하는 데 사용될 수 있거나, 또는 개시된 바와 같은 개별 효소 및 완충액 중 하나 이상이 5' 포스페이티기 및 3' dA 뉴클레오타이드 오버행을 갖는 말단-복구된 DNA 단편의 제조를 위해 조합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 말단-복구 반응 부피는 50 μ l보다 적다.

[0803] 본 개시내용의 DNA 단편은 처리된 형태로 얻어질 수 있지만, 본 개시내용의 방법은 본 개시내용의 어댑터에 대한 결찰이 가능한 DNA 단편을 얻기 위해 생물학적 샘플의 처리를 가능하게 한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 DNA 단편의 처리된 형태는 평활 말단, 평활 3' 말단, 평활 5' 말단, 데옥시리보핵산 아데닌(dA)-꼬리, 3' 말단의 dA-꼬리, 5' 말단의 dA-꼬리, 데옥시리보핵산 사이토신(dC)-꼬리, 3' 말단의 dC-꼬리, 5' 말단의 dC-꼬리, 데옥시리보핵산 구아닌(dG)-꼬리, 3' 말단의 dG-꼬리, 5' 말단의 dG-꼬리, 데옥시리보핵산 티민(dT)-꼬리, 3' 말단의 dT-꼬리, 5' 말단의 dT-꼬리, d(X)_n 꼬리(여기서, X는 적어도 2이고, n은 A, C, G 및 T 중 어느 하나로부터 선택될 수 있음), 인산화된 핵산, 3' 말단의 인산화된 핵산 및 5' 말단의 인산화된 핵산 중 하나 이상을 포함하는 DNA 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0804] 소정의 실시형태에서, "말단 복구"는 탈인산화된, 내부적으로 손상 복구된, 평활 말단, 5' 인산화된 DNA 단편을 생성하기 위해 또는 3' 오버행이 있는 DNA 단편을 생성하기 위해 수행될 수 있다.

[0805] DNA 단편의 처리를 포함하는 본 개시내용의 방법의 일부 실시형태에서, DNA 변형 반응 중 하나 이상은 동시에 및/또는 동일한 반응 용기 내에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 말단을 평활화시키는 DNA 복구 반응(예를 들어, 외핵분해성 절단 또는 폴리머레이스 연장), A-테일링 반응 및 인산화 반응 중 하나 이상이 단일 단계에서 동시에 수행될 수 있다.

[0806] 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 생성하는 단계는 단리된 cfDNA 또는 단편화된 세포 DNA의 말단-복구를 포함한다. 단편화된 cfDNA 또는 세포 DNA는 말단-복구 효소에 의해 처리되어 평활 말단, 5'-오버행 또는 3'-오버행이 있는 말단-복구된 cfDNA를 생성한다. 일부 실시형태에서, 말단-복구된 cfDNA 또는 세포 DNA는 평활 말단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 말단-복구된 세포 DNA 또는 cfDNA는 평활 말단을 포함하도록 처리된다. 일부 실시형태에서, 말단-복구된 cfDNA 또는 세포 DNA의 평활 말단은 단일 염기 쌍 오버행을 포함하도록 추가로 변형된다. 일부 실시형태에서, 평활 말단을 포함하는 말단-복구된 cfDNA 또는 세포 DNA는 아데닌(A)/티민(T) 오버행을 포함하도록 추가로 처리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 평활 말단을 포함하는 말단-복구된 cfDNA 또는 세포 DNA는 단일 염기 쌍 오버행으로서 아데닌(A)/티민(T) 오버행을 포함하도록 추가로 처리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 말단-복구된 cfDNA 또는 세포 DNA는 비주형(non-templated) 3' 오버행을 갖는다. 일부 실시형태에서, 말단-복구된 cfDNA 또는 세포 DNA는 3' 오버행을 포함하도록 처리된다. 일부 실시형태에서, 말단-복구된 cfDNA 또는 세포 DNA는 3' 오버행을 포함하도록 말단 트랜스퍼레이스(terminal transferase: TdT)로 처리된다. 일부 실시형태에서, G-꼬리는 TdT에 의해 추가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 말단-복구된 cfDNA 또는 세포 DNA는 임의의 공지된 제한 효소(예를 들어, 효소 Sau3A 등)를 사용한 부분적 소화를 사용하여 오버행 말단을 포함하도록 처리된다.

[0807] 일부 실시형태에서, DNA 단편의 탈인산화는 알칼리 포스파테이스와 같은 열불안정성 포스파테이스에 의해 수행될 수 있다. 상업적인 예는 APexTM 열불안정성 알칼리 포스파테이스, NTPhosTM 열불안정성 포스파테이스, KTTM

열불안정성 포스파테이스 및 새우 알칼리 포스파테이스(shrimp alkaline phosphatase: SAP)를 포함한다.

- [0808] 일부 실시형태에서, 내부 DNA 손상은 DNA 단편의 내부 손상을 복구할 수 있는 하나 이상의 복구 효소에 의해 복구될 수 있다. 예는 Taq DNA 라이게이스, 엔도뉴클레이스 IV, Bst DNA 폴리머레이스 Fpg, 우라실-DNA 글리콜레이스(Uracil-DNA Glycolase: UDG), T4 PDG 및 엔도뉴클레이스 VIII을 포함한다. 일부 실시형태에서, 모든 전술한 효소가 사용될 수 있다. 전술한 효소의 상업적으로 이용 가능한 카테일(예를 들어, PreCR 효소 키트)가 사용될 수 있거나 또는 카테일은 하나 이상의 개별 효소를 임의의 조합으로 첨가함으로써 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 내부 손상 복구는 수행되지 않을 수 있다.
- [0809] 일부 실시형태에서, dA-테일링을 위한 내부 DNA 손상 복구, 말단-복구 및 말단 트랜스퍼레이스(TdT)는 단일 단계 및 단일 반응 혼합물로 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, NEB의 PreCR 효소 키트 또는 Quick 평활 키트와 같은 상업적으로 이용 가능한 키트가 상기 단일 단계 반응에 사용될 수 있다.
- [0810] 일부 실시형태에서, DNA 말단 복구는 평활 말단 DNA 단편을 생성하기 위해 하나 이상의 말단-복구 효소를 사용함으로써 수행될 수 있다. 상기 효소는 3' - 5' 엑소뉴클레이스, 5'-3' DNA 폴리머레이스(예를 들어, 클레노브 단편) 및 5' FLAP 엔도뉴클레이스를 포함할 수 있다.
- [0811] 일부 실시형태에서, dA-테일링을 위한 DNA 말단-복구, 5' 인산화 및 말단 트랜스퍼레이스(TdT)는 3'-오버행 말단으로 5' 인산화된, 예를 들어, 5' 인산화되고 3'dA-테일링된 dsDNA 단편을 생성하기 위해 단일 단계 및 단일 반응 혼합물로 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, NEB의 Next Ultra II 말단 복구/dA-테일링 키트와 같은 상업적으로 이용 가능한 키트가 상기 단일 단계 반응에 사용될 수 있다.
- [0812] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 다음 반응 각각: 탈인산화, 내부 DNA 손상 복구, 평활 말단 생성, 5' 말단 인산화 및 3' 오버행 생성에 대한 효소 및 시약을 단일 혼합물에 배합함으로써 적절한 양의 단편화된 DNA 샘플이 "단일-단계 말단-복구"될 수 있음을 상정한다. 이러한 단일-단계 단일-반응 프로세스는 5' 인산화된 말단 및 3' 오버행을 갖는 말단-복구된 이중 가닥 DNA 단편을 생성한다. 일부 실시형태에서, 3' 오버행은 dA 꼬리를 포함한다.
- [0813] 일부 실시형태에서, 말단-복구될 수 있는 DNA의 양은 임의의 적합한 양일 수 있다. 일부 실시형태에서, 말단-복구되는 DNA의 양은 1ng 내지 500ng, 5ng 내지 400ng, 10ng 내지 300ng, 15ng 내지 250ng 또는 20ng 내지 200ng이다. 일부 실시형태에서, 말단-복구되는 DNA의 양은 20ng 내지 50ng이다.
- [0814] 일부 실시형태에서, DNA 말단 복구는 실시예 11의 방법에 따라 수행된다.
- [0815] **어댑터 결합**
- [0816] 일부 실시형태에서, 결합 단계는 "태깅된" cfDNA 라이브러리를 생성하기 위해 어댑터 모듈을 말단-복구된 cfDNA에 결합시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 어댑터가 하나 이상의 샘플로부터 말단-복구된 dsDNA 분자에 결합되어(다중화) dsDNA 분자의 5' 말단에 어댑터가 부착된다. 일부 실시형태에서, 결합 반응 부피는 100 μ l보다 낮다. 어댑터-태깅된 DNA 단편은 100 μ l보다 낮은 반응 부피에서 단리되고 세척된다. 도 5는 어댑터 결합 프로세스의 일 실시형태의 예시적인 다이어그램을 제공한다.
- [0817] 일부 실시형태에서, 단일 어댑터 모듈이 사용된다. 일부 실시형태에서, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 어댑터 모듈이 사용된다. 일부 실시형태에서, 동일한 서열의 어댑터 모듈은 단편화된 말단-복구된 DNA의 각 말단에 결합된다.
- [0818] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 하나 이상의 어댑터의 결합은 당업자에게 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0819] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 하나 이상의 어댑터는 평활 말단을 포함하는 말단-복구된 cfDNA에 결합된다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 하나 이상의 어댑터는 사용된 결합 방법에 적절한 상보적 말단을 포함하는 말단-복구된 cfDNA에 결합된다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 하나 이상의 어댑터는 3'오버행을 포함하는 말단-복구된 cfDNA에 결합된다.
- [0820] 일부 실시형태에서, 어댑터 및 DNA 단편은 결합 완충액, 시약 및 DNA 라이게이스(예를 들어, T4 라이게이스 또는 Taq 라이게이스) 및/또는 RNA 라이게이스와 같은 결합 효소와 혼합될 수 있다. 이러한 라이게이스는 위에 기재된 바와 같이 결합 가닥을 DNA 단편의 5' 말단에 결합시키는 데 사용될 수 있다.
- [0821] 일부 실시형태에서, 어댑터의 결합 가닥은 결합 가닥의 3' 말단 오버행 및 DNA 단편의 3' 오버행의 상보성을 통

해 단일 단계로 dsDNA 단편의 5' 말단에 결합되는 반면, 비결찰 가닥은 DNA 단편의 3' 말단에 부착되지 않은 채로 남아 있다.

- [0822] 일부 실시형태에서, 결합 단계는 어댑터를 dsDNA 단편에 결합시켜 어댑터/dsDNA 단편 복합체를 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단일 어댑터가 사용된다. 일부 실시형태에서, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 어댑터가 사용된다. 일부 실시형태에서, 동일한 서열의 어댑터 모듈이 단편화된 말단-복구된 DNA의 각 말단에 부착된다.
- [0823] 일부 실시형태에서, 동일한 어댑터가 DNA 단편의 양쪽 말단에 부착된다. 일부 실시형태에서, 상이한 어댑터가 dsDNA 단편의 각 말단에 부착된다.
- [0824] 일부 실시형태에서, 결합 단계는,
- [0825] (a) 복수의 어댑터를 복수의 dsDNA 단편과 결합시켜 복수의 어댑터/dsDNA 복합체를 생성하는 단계(여기서, 어댑터는 본 개시내용의 어댑터 중 어느 하나임);
- [0826] (b) (a) 단계로부터의 어댑터/DNA 복합체를 하나 이상의 효소와 접촉시켜 복수의 연속 어댑터-태깅된 DNA 단편을 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 생성하는 단계
- [0827] 를 포함한다.
- [0828] 일부 실시형태에서, (b) 단계의 어댑터/DNA 복합체는 결합 가닥을 주형으로 사용하여 DNA 폴리머레이스 연장에 의해 연속 이중 가닥 어댑터-태깅된 DNA 단편으로 만들어진다.
- [0829] 일부 실시형태에서, 부착되지 않은 비결찰 가닥은 결합 가닥을 주형으로 사용하여 DNA 단편의 5'-3' 폴리머레이스 연장에 의해 결합 가닥으로부터 분리된다. 일부 실시형태에서, 비결찰 가닥은 선택적으로 dsDNA 단편의 5' 말단에 대한 결합 및/또는 어댑터 이량체 형성을 방지하는 3' 말단의 변형을 포함할 수 있다.
- [0830] 일부 실시형태에서, 비결찰 가닥은 주형으로서 결합 가닥 그리고 닉 봉합(closure)을 위한 DNA 라이게이스를 사용하여 DNA 폴리머레이스 닉-복구(닉 번역)에 의해 DNA 단편의 3' 말단에 결합된다.
- [0831] 일부 실시형태에서, dsDNA 단편은 무세포 DNA(cfDNA), 게놈 DNA(gDNA), 상보적 DNA(cDNA), 미토콘드리아 DNA 또는 메틸화된 DNA 또는 탈메틸화된 DNA이다.
- [0832] 일부 실시형태에서, 복수의 dsDNA 단편은 복수의 어댑터와 결합시키기 전에 말단-복구된다.
- [0833] 일부 실시형태에서, 복수의 dsDNA 단편은 저역 통과 전체 게놈 라이브러리, 앰플리콘 라이브러리, 전체 엑솜 라이브러리, cDNA 라이브러리 또는 메틸화된 DNA 라이브러리로 이루어진 목록으로부터 선택되는 라이브러리로부터 얻어진다.
- [0834] 일부 실시형태에서, 복수의 dsDNA 단편은 무세포 DNA(cfDNA), 게놈 DNA(gDNA), 상보적 DNA(cDNA), 미토콘드리아 DNA, 메틸화된 DNA 또는 탈메틸화된 DNA를 포함한다.
- [0835] 일부 실시형태에서, 복수의 dsDNA 단편은 테스트 샘플로부터 단리되거나 또는 생성되되; 테스트 샘플은 양수 샘플, 혈액 샘플, 피부 샘플, 모발 샘플, 모낭 샘플, 타액 샘플, 점액 샘플, 땀 샘플, 눈물 샘플, 상피 조직 샘플, 소변 샘플, 정액 샘플, 정액 혈장 샘플, 혈청 샘플, 전립선액 샘플, 사정전 유체(쿠퍼액) 샘플, 안구액 샘플, 배설물 샘플, 생검 샘플, 복수 샘플, 뇌척수액 샘플, 림프 샘플, 조직 추출물 샘플, 대변 샘플 및 포르말린-고정, 파라핀 포매(FFPE) 샘플로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 샘플을 포함한다.
- [0836] 일부 실시형태에서, 복수의 dsDNA 단편은 전체 게놈 라이브러리, 앰플리콘 라이브러리, 전체 엑솜 라이브러리, cDNA 라이브러리 또는 메틸화된 DNA 라이브러리로 이루어진 목록으로부터 선택되는 라이브러리로부터 얻어진다.
- [0837] 일부 실시형태에서, 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 dsDNA 단편의 5' 말단에 대한 결합 및/또는 어댑터 이량체 형성을 방지하는 3' 말단의 변형을 포함한다.
- [0838] 일부 실시형태에서, 복수의 dsDNA 단편은 카이네이스/라이게이스 결합 방법의 (c) 단계 전에 손상-복구된다.
- [0839] 일부 실시형태에서, DNA 손상은 탈아미노화된 사이토신(우라실), 비염기성 부위, 구아닌의 O6MeG로의 메틸화, 하나 이상의 DNA 닉, 하나 이상의 DNA 겹 또는 티민 이량체이다.
- [0840] 일부 실시형태에서, 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드보다 더 짧고, 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드의 앵커 영역과 적어도 부분적으로 상보적인 앵커 영역을 포함한다. 일부 실시형태에

서, 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 10bp보다 짧다. 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 8bp이다.

- [0841] 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰 기간은 결찰에 적합한 임의의 기간일 수 있다. 일부 실시형태에서, 기간은 적어도 약 5분이다. 일부 실시형태에서, 기간은 약 5분 내지 약 72시간이다. 일부 실시형태에서, 기간은 약 5분 내지 약 2시간이다. 일부 실시형태에서, 결찰 기간은 약 1시간 미만, 약 30분 미만, 약 15분 미만 또는 약 10분 미만이다.
- [0842] 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰 기간은 결찰에 적합한 임의의 기간일 수 있다. 일부 실시형태에서, 기간은 적어도 5분이다. 일부 실시형태에서, 기간은 5분 내지 72시간이다. 일부 실시형태에서, 기간은 5분 내지 2시간이다. 일부 실시형태에서, 결찰 기간은 1시간 미만, 30분 미만, 15분 미만 또는 10분 미만이다.
- [0843] 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰 부피는 자동화 및 샘플 핸들링 로봇에 적합한 것이다. 일부 실시형태에서, 반응 부피는 약 $1\mu\text{l}$ 내지 약 $1000\mu\text{l}$, 약 $1\mu\text{l}$ 내지 약 $350\mu\text{l}$, 약 $1\mu\text{l}$ 내지 약 $200\mu\text{l}$, 약 $1\mu\text{l}$ 내지 약 $100\mu\text{l}$, 약 $1\mu\text{l}$ 내지 약 $50\mu\text{l}$, 약 $5\mu\text{l}$ 내지 약 $25\mu\text{l}$, 약 $10\mu\text{l}$ 내지 약 $40\mu\text{l}$, 약 $20\mu\text{l}$ 내지 약 $40\mu\text{l}$ 이다. 일부 실시형태에서, 반응 부피는 약 $100\mu\text{l}$ 이다. 일 실시형태에서, 부피는 약 $30\mu\text{l}$ 이다.
- [0844] 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰 부피는 자동화 및 샘플 핸들링 로봇에 적합한 것이다. 반응 부피는 $1\mu\text{l}$ 내지 $1000\mu\text{l}$, $1\mu\text{l}$ 내지 $350\mu\text{l}$, $1\mu\text{l}$ 내지 $200\mu\text{l}$, $1\mu\text{l}$ 내지 $100\mu\text{l}$, $1\mu\text{l}$ 내지 $50\mu\text{l}$, $5\mu\text{l}$ 내지 $25\mu\text{l}$, $10\mu\text{l}$ 내지 $40\mu\text{l}$, $20\mu\text{l}$ 내지 $40\mu\text{l}$ 이다. 일부 실시형태에서, 반응 부피는 $100\mu\text{l}$ 이다. 일 실시형태에서, 반응 부피는 $30\mu\text{l}$ 이다.
- [0845] 일부 실시형태에서, 어댑터 결찰은 튜브의 스트립 또는 미세역가 플레이트 웰 또는 자동화되고/되거나 고속 대량 처리를 가능하게 하는 데 적합한 임의의 다른 형식에서 수행될 수 있다.
- [0846] 일부 실시형태에서, 어댑터 양은 임의의 적합한 농도일 수 있다. 일부 실시형태에서, 어댑터의 농도는 적어도 $0.01\mu\text{M}$ 이다. 일부 실시형태에서, 어댑터의 농도는 약 $0.01\mu\text{M}$ 내지 약 $200\mu\text{M}$, 약 $0.01\mu\text{M}$ 내지 약 $50\mu\text{M}$, 약 $0.1\mu\text{M}$ 내지 약 $50\mu\text{M}$, 약 $0.2\mu\text{M}$ 내지 약 $20\mu\text{M}$, 약 $0.2\mu\text{M}$ 내지 약 $10\mu\text{M}$, 약 $1\mu\text{M}$ 내지 약 $10\mu\text{M}$ 또는 약 $2\mu\text{M}$ 내지 약 $8\mu\text{M}$ 이다. 일부 실시형태에서, 어댑터 농도는 적어도 약 $2\mu\text{M}$ 이다. 일부 실시형태에서, 어댑터 농도는 약 $5\mu\text{M}$ 이다.
- [0847] 일부 실시형태에서, 어댑터의 농도는 $0.01\mu\text{M}$ 내지 $200\mu\text{M}$, $0.01\mu\text{M}$ 내지 $50\mu\text{M}$, $0.1\mu\text{M}$ 내지 $50\mu\text{M}$, $0.2\mu\text{M}$ 내지 $20\mu\text{M}$, $0.2\mu\text{M}$ 내지 $10\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ 내지 $10\mu\text{M}$ 또는 $2\mu\text{M}$ 내지 $8\mu\text{M}$ 이다. 일부 실시형태에서, 어댑터 농도는 적어도 $2\mu\text{M}$ 이다. 일부 실시형태에서, 어댑터 농도는 약 $5\mu\text{M}$ 이다.
- [0848] 일부 실시형태에서, 결찰 반응 혼합물은 약 10°C 내지 약 30°C 의 온도에서 인큐베이션될 수 있다. 일부 실시형태에서, 결찰 반응 혼합물은 약 20°C 에서 인큐베이션될 수 있다.
- [0849] 일부 실시형태에서, 결찰 반응 혼합물은 10°C 내지 30°C 의 온도에서 인큐베이션될 수 있다. 일부 실시형태에서, 결찰 반응 혼합물은 20°C 에서 인큐베이션될 수 있다.
- [0850] 일부 실시형태에서, 결찰 후, 어댑터-태깅된 DNA 분자는 분리되고 세척될 수 있다. 이는 어댑터-DNA 분자는 비드에 부착된 상태로 유지되고 오염 물질은 세척되도록 Ampure XP(Beckman) 또는 Spectra mix와 같은 DNA 정제 비드를 사용하여 수행될 수 있다. 용리된 정화된 상청액은 복수의 어댑터-태깅된 DNA 단편을 포함하는 분리된 라이브러리를 포함한다. 라이브러리를 포함하는 상청액은 증폭을 위해 새로운 PCR 튜브 또는 마이크로리터 플레이트 웰로 옮겨질 수 있다.
- [0851] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 어댑터는 실시예 11의 방법에 따라 결찰된다.
- [0852] 일부 실시형태에서, 어댑터는 카이네이스/라이게이스 결찰 방법을 사용하여 dsDNA 단편에 결찰될 수 있다. 상기 카이네이스/라이게이스 결찰 방법은 다음 단계를 포함한다: (a) dsDNA 단편을 하나 이상의 말단-복구 효소로 처리하여 말단-복구된 dsDNA 단편을 생성하는 단계; (b) 이중-가닥 DNA 사전-어댑터(pre-adaptor)의 결찰 가닥을 말단-복구된 DNA 단편의 각 가닥의 3' 말단에 결찰시켜 사전-어댑터/말단-복구된 DNA 복합체를 형성하는 단계; (c) 사전-어댑터/말단-복구된 DNA 복합체로부터 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드를 복구 올리고뉴클레오타이드로 치환하는 단계; (d) 카이네이스/라이게이스 전략을 사용하여 복구 올리고뉴클레오타이드를 말단-복구된 DNA 단편의 5' 말단에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 복합체를 형성하는 단계; (e) 어댑터/말단-복구된 DNA 복합체를 하나 이상의 효소로 처리하여 하나 이상의 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편을 포함하는 어댑터-태깅된 라이브러리를 형성하는 단계(여기서, 각각의 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편은 dsDNA 단편의 각 말단에 결찰된 어댑터를 포함함); 및 선택적으로 (f) (e) 단계의 어댑터-태깅된 라이브러리를 증폭시켜 하나 이상의 증폭된 연속

어댑터-태깅된 dsDNA 단편을 포함하는 증폭된 어댑터-태깅된 라이브러리를 생성하는 단계.

- [0853] 일부 실시형태에서, 카이네이스/라이게이스 전략이 사용되는 경우, 부분적으로 이중-가닥인 DNA 사전-어댑터 구조는 결찰 전에 DNA 분자에 커플링되어 사전-어댑터/DNA 복합체를 형성한다. 상기 dsDNA 사전-어댑터 구조는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0854] 일부 실시형태에서, 사전-어댑터 구조의 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 사전-어댑터/DNA 복합체로부터 분리되고, 복구 올리고뉴클레오타이드로 대체된다. 일부 실시형태에서, 복구 올리고뉴클레오타이드는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 앵커 영역과 적어도 부분적으로 상보적인 앵커 영역을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 복구 올리고뉴클레오타이드는 어댑터 모듈을 추가로 포함하며, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역과 적어도 부분적으로 상보적이다.
- [0855] 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 복구 올리고뉴클레오타이드 각각은 PCR 프라이머 결합 부위를 추가로 포함하되, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 PCR 프라이머 결합 부위는 복구 올리고뉴클레오타이드의 PCR 프라이머 결합 부위와 상보적이지 않다. 소정의 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 PCR 프라이머 결합 부위에 결합하는 프라이머는 복구 올리고뉴클레오타이드의 PCR 프라이머 결합 부위에 실질적으로 결합하지 않는다.
- [0856] 일부 실시형태에서, 게놈 DNA 단편을 복수의 어댑터에 부착시키는 단계는 말단 복구된 cfDNA 또는 세포 DNA 단편을 앵커 영역의 적어도 일부를 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드 전체 앵커 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드는 비결찰 가닥에 혼성화된 5' 인산화된 결찰 가닥을 포함하는 DNA 이중체이되, 비결찰 가닥은 3' 말단에서 화학적 변형에 의해 부착이 차단되고, 결찰 가닥은 게놈 DNA 단편에 부착된다. 소정의 실시형태에서, 앵커 영역의 적어도 일부에 부착된 DNA 단편은 이어서 전장 어댑터 서열을 암호화하는 DNA 올리고뉴클레오타이드와 어닐링된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 카이네이스, 하나 이상의 DNA 라이게이스 및/또는 하나 이상의 DNA 폴리머레이스가 게놈 DNA 단편 및 전장 어댑터 서열을 암호화하는 DNA 올리고뉴클레오타이드에 첨가된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 카이네이스는 T4 폴리뉴클레오타이드 카이네이스이다. 일부 실시형태에서, DNA 라이게이스는 Taq DNA 라이게이스이다. 소정의 실시형태에서, DNA 폴리머레이스는 Taq 폴리머레이스이다. 일부 실시형태에서, DNA 폴리머레이스는 전장 Bst 폴리머레이스이다.
- [0857] 일부 실시형태에서, dsDNA 단편을 하나 이상의 말단-복구 효소로 처리하는 단계는 dsDNA 단편으로부터 말단 포스페이트 잔기를 제거하는 것을 포함한다.
- [0858] 일부 실시형태에서, dsDNA 사전-어댑터는 복수의 dsDNA 사전-어댑터로부터 선택된다.
- [0859] 일부 실시형태에서, 복구 올리고뉴클레오타이드는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 앵커 영역과 적어도 부분적으로 상보적인 앵커 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복구 올리고뉴클레오타이드는 어댑터 모듈을 추가로 포함하고, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역과 적어도 부분적으로 상보적이다. 일부 실시형태에서, 복구 올리고뉴클레오타이드는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드보다 더 길고, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 앵커 영역과 적어도 부분적으로 상보적인 앵커 영역, ID 영역 및 PCR 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0860] 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 복구 올리고뉴클레오타이드보다 더 짧고, 복구 가닥 올리고뉴클레오타이드의 앵커 영역과 적어도 부분적으로 상보적인 앵커 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 15bp보다 짧다. 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 10bp이다.
- [0861] 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 복구 올리고뉴클레오타이드 각각은 PCR 프라이머 결합 부위를 추가로 포함하되, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 PCR 프라이머 결합 부위는 복구 올리고뉴클레오타이드의 PCR 프라이머 결합 부위와 상보적이지 않다. 일부 실시형태에서, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 PCR 프라이머 결합 부위에 결합하는 프라이머는 복구 올리고뉴클레오타이드의 PCR 프라이머 결합 부위에 실질적으로 결합하지 않는다.
- [0862] 일부 실시형태에서, (e) 단계의 카이네이스/라이게이스 전략은 포스페이트기를 말단-복구된 DNA 단편의 각 가닥의 5' 말단 뉴클레오타이드에 추가하고, 복구 올리고뉴클레오타이드를 말단-복구된 DNA 단편의 각 가닥의 인산화된 5' 말단에 결찰시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 카이네이스/라이게이스 전략은 말단-복구된 DNA 단편의 5' 말단 뉴클레오타이드의 제거를 포함하지 않는다.

- [0863] 일부 실시형태에서, 카이네이스/라이게이스 결찰 방법의 (c) 단계는 제1 온도에서 수행되고, 단계 (d)는 제2 온도에서 수행되며, 제2 온도는 제1 온도보다 더 높고, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드로부터 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 치환을 초래한다. 일부 실시형태에서, 제1 온도는 22℃ 이하이고, 제2 온도는 37℃ 이상이다.
- [0864] 일부 실시형태에서, 카이네이스 결찰 방법의 (g) 단계에서 하나 이상의 프라이머가 사용된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 프라이머는 어댑터 모듈의 프라이머 인식 부위에 혼성화하는 범용 프라이머 결합 서열을 포함한다.
- [0865] 일부 실시형태에서, 각 dsDNA 사전-어댑터는 (1) 어댑터 모듈을 포함하는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 (2) 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단의 영역에 혼성화하여 이와 함께 이중체를 형성할 수 있는 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하되, 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 앵커 영역은 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드와 적어도 부분적으로 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0866] **DNA 라이브러리 증폭**
- [0867] 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 모 라이브러리가 생성된다. 도 5는 어댑터-태깅된 모 라이브러리를 생성하는 프로세스의 일 실시형태를 도시한다.
- [0868] 일부 실시형태에서, 3' dA-꼬리 DNA 분자는 DNA 단편의 5' 말단에 부착된 결찰 가닥을 주형으로 사용하여 DNA 단편의 3' 말단으로부터 연장되어 증폭에 적합한 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편을 만들고, 비결찰 가닥은 결찰 가닥으로부터 분리된다. 일부 실시형태에서, DNA 단편의 3' 말단의 상기 연장은 PCR 증폭과 동시에 일어날 수 있다. "연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편"의 집합은 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리이다. 일부 실시형태에서, 연장 반응 부피는 100 μ l보다 낮다.
- [0869] 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 모 라이브러리는 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리이다.
- [0870] 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리는 어댑터의 증폭 영역에서 프라이머 결합 부위를 인식하는 프라이머로 PCR 증폭되어 증폭된 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리가 생성된다. 증폭된 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리는 증폭 후 라이브러리(LPA) 또는 증폭된 라이브러리(LIB AMP)로도 지칭된다. 본 개시내용에서, "증폭된 어댑터-태깅된-DNA 라이브러리", "증폭된 태깅된 DNA 라이브러리" 및 "LIB AMP"는 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0871] 일부 실시형태에서, 증폭 반응 부피는 100 μ l보다 낮다. 일부 실시형태에서, 증폭된 태깅된 DNA 라이브러리는 100 μ l보다 낮은 부피로 추가로 단리되고 세척된다. 일부 실시형태에서, 단리되거나 또는 정제된 LIB AMP는 표적 포획 증폭 후 라이브러리(TC LPA)로 지칭된다.
- [0872] 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 모 라이브러리는 증폭된 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리이다. 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 모 라이브러리는 TC LPA이다.
- [0873] 개시된 방법의 일부 실시형태에서, dsDNA 단편의 5'-3' 연장이 먼저 수행되어 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편을 생성한 다음, 상기 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편이 증폭되어 복수의 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편을 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 생성한다.
- [0874] 일부 실시형태에서, 단일 단계로 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 생성하기 위해, 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편을 형성하는 dsDNA 단편의 5'-3'연장의 제1 단계 및 상기 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편을 증폭하는 제2 단계가 조합된다. DNA 라이브러리의 어댑터-태깅된 dsDNA 단편은 동일한 증폭 영역을 포함하는 양 말단의 어댑터의 측면에 있을 수 있되, 증폭 영역의 서열은 PCR 증폭 프라이머와 같은 단일 증폭 프라이머에 의해 인식될 수 있는 증폭 프라이머 결합 부위로서 기능할 수 있다.
- [0875] 일부 실시형태에서, 부착되지 않은 비결찰 가닥은 결찰 가닥을 주형으로 사용하여 DNA 단편의 5'-3' 폴리머레이스 연장에 의해 결찰 가닥으로부터 분리된다. 일부 실시형태에서, 비결찰 가닥은 선택적으로 dsDNA 단편의 5' 말단에 대한 결찰 및/또는 어댑터 이량체 형성을 방지하는 3' 말단의 변형을 포함할 수 있다.
- [0876] 소정의 실시형태에서, 비결찰 가닥은 주형으로서 결찰 가닥 및 Nick 봉합을 위한 DNA 라이게이스를 사용하여 DNA 폴리머레이스 Nick-복구에 의해 DNA 단편의 3' 말단에 결찰된다.
- [0877] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 DNA 클론 라이브러리 또는 DNA 클론의 라이브러리를 생성하기 위해 DNA 라이브러리의 증폭을 포함한다. DNA 라이브러리의 각 분자는 말단-복구된 DNA의 각 말단에 결찰된 어댑터를

포함할 수 있고, 각 어댑터는 하나 이상의 PCR 프라이머 결합 부위를 포함한다. 일 실시형태에서, 상이한 어댑터는 말단-복구된 DNA의 상이한 말단에 결합된다.

- [0878] 일 실시형태에서, 동일한 어댑터는 DNA의 양쪽 말단에 결합된다. 말단-복구된 DNA의 양쪽 말단에 동일한 어댑터를 결합시키면 단일 프라이머 서열로 PCR 증폭이 가능하다. 일부 실시형태에서, 어댑터-결합된 DNA 라이브러리의 일부는 증폭을 유도하는 단일 프라이머 서열과 함께 표준 PCR 기법을 사용하여 증폭될 수 있다. 일 실시형태에서, 단일 프라이머 서열은 약 25개의 뉴클레오타이드이고, 선택적으로 표준 이온 강도 조건하에서 예상된 T_m 이 55°C 이상이다.
- [0879] 일부 실시형태에서, DNA 폴리머레이스가 사용된다. DNA 폴리머레이스는 PCR 또는 항온(thermostatic)/등온(isothermal) 증폭을 위해 호열성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 5'-3' 연장을 위한 시약 및 효소 및 후속 증폭을 위한 효소를 포함하는 마스터 믹스(master mix: MM)가 배합된다. 이러한 연장 및 증폭을 위한 상업적으로 입수 가능한 효소 및 시약 키트는, 예를 들어, NEB Ultra II 2X PCR 증폭 키트(New England Biolabs), Hi-Fidelity Q5 효소 PCR(NEB), KAPA(Roche), KAPA 2X(Roche), TruSeq Nano(thermofisher) 및 AmpliTaq(Thermofisher)를 포함한다. 도 22 및 도 23에서, 효소 1은 KAPA 효소를 지칭할 수 있고, 효소 2는 Hi-Fidelity Q5 효소를 지칭할 수 있다.
- [0880] 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리의 일부는 증폭을 유도하는 단일 프라이머 서열과 함께 표준 PCR 기법을 사용하여 증폭될 것이다. 일 실시형태에서, 단일 프라이머 서열은 약 25개의 뉴클레오타이드이고, 선택적으로 표준 이온 강도 조건하에서 예상된 T_m 이 55°C 이상이다. 일부 실시형태에서, 단일 증폭 프라이머는 어댑터 모듈의 증폭 영역 내의 서열에 상보적이다. 일 실시형태에서, 단일 증폭 프라이머는 TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACA(서열번호 5)의 서열을 포함한다.
- [0881] 일부 실시형태에서, 증폭은 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 등온 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 증폭), LCR(라이게이스 연쇄 반응)와 같은 당업계에 공지된 임의의 증폭에 의해 수행될 수 있다.
- [0882] 일부 실시형태에서, 증폭 동안, 일부 앰플리콘은 단편의 양쪽 말단에 결합되는 어댑터로 인해 스템-루프 구조를 형성할 것이다. 이 전략은 매우 짧은 산물(예를 들어, 프라이머 이중체)이 증폭되는 것과 생성된 라이브러리가 편향되는 것을 방지하는 데 효율적이다.
- [0883] 일부 실시형태에서, 결합 가닥 주형 연장에 의해 복수의 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편을 형성하기 위해 초기 3분 인큐베이션 주기가 수행된다.
- [0884] 일부 실시형태에서, 증폭된 태깅된 DNA 라이브러리를 형성하기 위해 복수의 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편에 대해 PCR 증폭이 수행된다.
- [0885] 일부 실시형태에서, 피코그램의 복수의 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편은 마이크로그램의 DNA 클론(어댑터-태깅된 DNA 라이브러리)으로 증폭되며, 이는 10,000-배 증폭을 의미한다. 증폭된 산물의 양은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, Qubit 2.0 또는 Nanodrop 기기에서의 정량화를 사용하여 측정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 증폭된 라이브러리의 양은 도 9, 도 10, 도 11, 도 14 및 도 15의 Qubit 2.0을 사용하는 검정과 같은 DNA의 농도를 결정하는 데 사용되는 표준 검정(검정)에 의해 측정될 수 있다. 도 9, 도 10, 도 11, 도 14 및 도 15에서 "검정"은 이러한 표준 검정을 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 정량화를 위해 상업적으로 이용 가능한 키트, 예를 들어, Qubit™ dsDNA HS 검정 키트(Invitrogen™)가 사용된다.
- [0886] 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 라이브러리는 실시예 11의 방법에 따라 증폭된다.
- [0887] 일부 실시형태에서, 증폭된 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리는 DNA 정제 비드를 사용하여 분리되고, 세척 완충액, 예를 들어, Tris-EDTA 완충액(TEZ)(pH 8.0)으로 세척될 수 있다. 정화된 상층액은 새로운 PCR 튜브 또는 미세역가 플레이트 웰 또는 자동화 및/또는 고속 대량에 적합한 임의의 다른 형식으로 옮겨질 수 있다.
- [0888] 일반적으로, 라이브러리를 증폭시키기 위해서는 가능한 적은 PCR 사이클을 사용하는 것이 바람직하다. 작업 흐름 시간을 줄이는 것 외에도, PCR 동안 편향이 발생할 위험도 제한된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 말단-복구 및 어댑터 결합의 효율성을 증가시킬 수 있어 시퀀싱 또는 다른 중간 하류 작업 흐름에 필요한 라이브러리 수율을 달성하는 데 더 적은 PCR 사이클이 필요하게 된다. 기재된 작업 흐름 및 프로세스는 작업 시간의 단축, 시약 수의 감소, 사용되는 기기/기계 수 감소 및 비용 절감과 같은 이점을 제공할 수 있다.
- [0889] 이러한 위의 프로세스, 어댑터 및 태깅된 DNA 라이브러리는 임의의 테스트 샘플에 존재하는 관심 유전자좌가 풍

부한 포획 프로브 라이브러리를 만드는 데 사용될 수 있다.

[0890] 일부 실시형태에서, DNA 라이브러리 증폭은 실시예 11의 방법에 따라 수행된다.

[0891] 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리의 생성

[0892] 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 모 라이브러리는 제1 어댑터-태깅된 라이브러리 및 제2 어댑터-태깅된 라이브러리로 분할된다. 일부 실시형태에서, 어댑터-태깅된 모 라이브러리는 2개 초과 어댑터-태깅된 라이브러리로 분할된다. 일부 실시형태에서, 제1 어댑터-태깅된 라이브러리는 TC LPA(표적 포획 증폭 후 라이브러리)이다. 일부 실시형태에서, TC LPA는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리를 생성하기 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 제2 어댑터-태깅된 라이브러리는 TC LPA의 10-배 희석을 생성함으로써 생성된다. 일부 실시형태에서, 제2 어댑터-태깅된 라이브러리는 전체 게놈 증폭 후 라이브러리(WG LPA)로 지칭된다.

[0893] 일부 실시형태에서, 포획 프로브는 바이오티닐화된 파트너 올리고뉴클레오타이드에 적어도 부분적으로 혼성화된 제1 영역 및 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 특정 영역과 상보성을 갖는 서열을 포함하는 제2 영역을 포함한다. 포획 프로브의 제2 영역은 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 특정 표적 영역에 혼성화되어 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 영역은 어댑터-태깅된 라이브러리에 있는 DNA 분자의 게놈 영역이며, 상기 DNA 분자에 부착된 어댑터 내의 영역을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브의 제1 영역은 라이브러리 태그를 포함한다.

[0894] 일부 실시형태에서, 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체는 자성 스트렙타비딘-비드를 사용하여 혼성화되지 않은 단편으로부터 분리된다.

[0895] 일부 실시형태에서, 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체는 비드에 부착된다. 일부 실시형태에서, 복합체의 비드-지지된 포획 프로브는 태깅된 DNA 단편을 주형으로 사용하여 3' 말단으로부터 연장되어 어댑터-태깅된 하이브리드 분자(하이브리드 분자)를 생성하되, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 및 포획 프로브가 표적화된 DNA 서열에 혼성화되는 곳으로부터 3'에 있는 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함한다.

[0896] 일부 실시형태에서, 분리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체의 포획 프로브는 태깅된 DNA 단편을 주형으로 사용하여 3' 말단으로부터 연장되어 어댑터-태깅된 하이브리드 분자(하이브리드 분자)를 생성하되, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 및 포획 프로브가 표적화된 DNA 서열에 혼성화되는 곳으로부터 3'에 있는 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함한다.

[0897] 일부 실시형태에서, 하이브리드 분자는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 비드로부터 방출된다. 일부 실시형태에서, 열 변성은 하이브리드 분자를 자성 비드에서 용액으로 방출한다. 일부 실시형태에서, 자성 비드에서 용액으로 하이브리드 분자를 방출시키기 위해 용리 완충액이 첨가된다. 방출된 하이브리드 분자의 집합은 표적 포획 라이브러리(TCL)로 지칭될 수 있다.

[0898] 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 TCL 또는 TCLA이다.

[0899] 일부 실시형태에서, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1)를 포함하는 정방향 프라이머(Forward Primer: FP)는 하이브리드 분자 내의 어댑터 모듈의 증폭 영역에 있는 프라이머 결합 부위에 혼성화하고, 연속 이중 가닥 하이브리드 분자를 만들기 위해 하이브리드 분자를 주형으로 사용하여 포획 프로브를 5' → 3'로 연장한다.

[0900] 일부 실시형태에서, 연속 이중 가닥 하이브리드 분자의 FP-연장된 가닥은 변성되고, 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 역방향 프라이머(RP)는 하이브리드 분자의 통합된 포획 프로브 제1 영역에서 변성된 FP-연장된 분자/가닥에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 태그는 RP용 프라이머 결합 부위를 포함한다.

[0901] 일부 실시형태에서, RP는 Illumina 시퀀싱 또는 당업계의 임의의 다른 공지된 방법에 의한 시퀀싱을 위한 준비가 되어 있는 증폭된 이중 가닥 하이브리드 분자를 만들기 위해 하이브리드 분자를 주형으로 사용하여 5' → 3'로 연장한다.

[0902] 일부 실시형태에서, 증폭된 하이브리드 분자의 각 말단은 P5 또는 P7 서열과 같은 시퀀싱 어댑터 또는 임의의 다른 시퀀싱 어댑터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시퀀싱 어댑터는 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다.

[0903] 일부 실시형태에서, 증폭된 하이브리드 분자의 집합은 증폭된 표적 포획 라이브러리 또는 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)로 지칭된다.

[0904] 일부 실시형태에서, 증폭 반응 부피는 100 μ l보다 낮다. 일부 실시형태에서, 증폭된 하이브리드 분자는 단리되고

세척된다.

- [0905] 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 증폭된 표적 포획 라이브러리이다.
- [0906] 도 6은 표적 포획 라이브러리를 생성하는 일 실시형태의 개략적인 프로세스를 도시한다.
- [0907] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 태깅된 cfDNA 라이브러리-포획 프로브 복합체를 단리하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, DNA 복합체를 단리하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있고, 당업자가 적절하다고 간주하는 임의의 방법이 본 개시내용의 방법과 함께 사용될 수 있다(Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2007-2012). 일부 실시형태에서, 복합체는 바이오틴-스트렙타비딘 단리 기법을 사용하여 단리된다.
- [0908] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 (a) 혼성화에 적합한 조건하에서 어댑터-태깅된 라이브러리를 하나 이상의 포획 프로브와 접촉시켜 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 형성하는 단계(여기서, 각 포획 프로브는 프라이머 결합 부위를 포함하는 제1 영역; 및 어댑터-태깅된 라이브러리의 유전자좌에 있는 표적 영역에 혼성화할 수 있는 제2 영역을 포함함); (b)는 (a) 단계로부터 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 단리하는 단계(여기서, 각 단리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체는 포획 프로브 및 어댑터-태깅된 DNA 분자를 포함함); 및 (c) b) 단계로부터의 하나 이상의 단리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 효소적으로 처리하여 하나 이상의 어댑터-태깅된 하이브리드 분자(하이브리드 분자)를 생성하는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브의 적어도 일부 또는 이의 상보체 및 어댑터-태깅된 DNA 분자의 적어도 일부 또는 이의 상보체를 포함함)를 포함한다.
- [0909] 일부 실시형태에서, c) 단계의 효소 처리는 단일 가닥 3' 말단을 제거하기 위해 3'-5' 엑소뉴클레이스 활성을 갖는 효소를 사용하여 b)로부터의 하나 이상의 포획 프로브-어댑터-태깅된 DNA 복합체에 대해 3'-5' 엑소뉴클레이스 효소 처리를 수행하는 것을 포함한다.
- [0910] 다양한 효소가 단리된 태깅된 DNA 라이브러리-포획 프로브 복합체의 3'-5' 엑소뉴클레이스 효소 처리를 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서 사용될 수 있는 3'-5' 엑소뉴클레이스 효소 활성을 나타내는 적합한 효소의 예시적인 예는 T4 또는 엑소뉴클레이스 I, III, V(문헌[Shevelev IV, **Hübscher** U., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(5):364-76 (2002)]도 참조)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 3'-5' 엑소뉴클레이스 활성을 포함하는 효소는 T4 폴리머레이스이다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, T4 또는 엑소뉴클레이스 I, III, V를 포함하여 3'-5' 엑소뉴클레이스 효소 활성을 나타내고 프라이머 주형 연장이 가능한 효소가 사용될 수 있다. *Id.*
- [0911] 일부 실시형태에서, 단리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체로부터 단일 가닥 3'-말단의 제거가 상정된다. 소정의 실시형태에서, 방법은 단일 가닥 3' 말단을 제거하기 위해 단리된 태깅된 DNA 라이브러리-포획 프로브 복합체의 3'-5' 엑소뉴클레이스 효소 처리를 포함한다.
- [0912] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 상기 및 본 개시내용의 다른 곳에 논의된 3'-5' 엑소뉴클레이스 효소 처리된 복합체에 대해 시퀀싱 및/또는 PCR을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브 분자의 꼬리 부분은 하이브리드 분자를 생성하기 위해 카피된다. 일 실시형태에서, 생성된 하이브리드 분자는 포획 프로브 및 포획 프로브 꼬리 서열의 상보체 에 혼성화할 수 있는 표적 영역을 포함한다.
- [0913] 소정의 실시형태에서, 효소 처리 c) 단계는 어댑터-태깅된 DNA 분자를 주형으로 이용하여 포획 프로브의 5'-3' DNA 폴리머레이스 연장을 수행하는 것을 포함한다.
- [0914] 5'-3' DNA 폴리머레이스 연장 프로세스에 적합한 효소는 임의의 호열성, 열안정성 DNA 폴리머레이스일 수 있다. 상업적으로 이용 가능한 DNA 폴리머레이스의 예는 고충실도 Q5 DNA 폴리머레이스(NEB), NEBNext Ultra PCR, NEBNext Ultra II PCR(NEB) 및 KAPA 2X(Roche)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0915] 일 실시형태에서, c) 단계의 효소 처리는 5' FLAP 엔도뉴클레이스의 공동 작용, DNA 중합 및 DNA 라이게이스에 의한 Nick 봉합을 통해 하나 이상의 하이브리드 포획 프로브-어댑터-태깅된 DNA 분자를 생성하는 것을 포함한다.
- [0916] 소정의 실시형태에서, 방법은 5' FLAP 엔도뉴클레이스의 공동 작용, DNA 중합 및 DNA 라이게이스에 의한 Nick 봉합을 통해 하이브리드 포획 프로브-어댑터-태깅된 DNA 표적 분자, 예를 들어, 태깅된 cfDNA 표적 분자 또는 태깅된 세포 DNA 표적 분자를 생성하는 것을 포함한다.
- [0917] 특정 실시형태에서, 유전자 분석은 a) 하나 이상의 포획 프로브를 복수의 어댑터-태깅된 DNA 분자 내의 하나 이

상의 표적 유전자좌에 혼성화하여 하나 이상의 포획 프로브-어댑터-태깅된 DNA 복합체를 형성하는 단계; b) a)로부터의 하나 이상의 포획 프로브-어댑터-태깅된 DNA 복합체를 단리하는 단계; c) b) 단계로부터의 하나 이상의 단리된 포획 프로브-어댑터-태깅된 DNA 복합체를 효소적으로 처리하는 단계; d) c)로부터의 효소적으로 처리된 복합체에 PCR을 수행하여 증폭된 하이브리드 분자를 생성하는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브의 적어도 일부 또는 이의 상보체 및 어댑터-태깅된 DNA 분자의 적어도 일부 또는 이의 상보체를 포함함); 및 e) d)로부터의 증폭된 하이브리드 분자에 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계를 포함한다.

[0918] 일부 실시형태에서, PCR은 당업자에게 잘 알려진 임의의 표준 PCR 반응 조건을 사용하여 수행될 수 있다. 소정의 실시형태에서, d)에서의 PCR 반응은 2개의 PCR 프라이머를 사용한다. 일부 실시형태에서, d)에서의 PCR 반응은 하이브리드 분자의 어댑터 서열 내의 영역에 혼성화하는 제1 PCR 프라이머를 사용한다. 일부 실시형태에서, d)에서의 PCR 반응은 꼬리 서열의 적어도 일부에 혼성화하는 제2 PCR 프라이머를 사용한다. 소정의 실시형태에서, d)에서의 PCR 반응은 하이브리드 분자의 어댑터 서열 내의 영역에 혼성화하는 제1 PCR 프라이머 및 꼬리 서열의 적어도 일부에 혼성화하는 제2 PCR 프라이머를 사용한다. 일부 실시형태에서, 제2 프라이머는 프라이머의 적어도 하나 이상의 뉴클레오타이드가 표적 유전자좌에 혼성화하고 프라이머의 적어도 하나 이상의 뉴클레오타이드가 꼬리 서열에 혼성화하도록 표적 유전자좌/꼬리 접합부에 혼성화한다.

[0919] 일부 실시형태에서, 루프 매개 증폭(Loop mediated isothermal amplification: LAMP), 전체 게놈 증폭(WGA), 가닥 치환 증폭(SDA), 헬리케이스-의존적 증폭(helicase-dependent amplification: HDA), 리콤비네이스 폴리머레이스 증폭(Recombinase polymerase amplification: RPA), 핵산 서열-기반 증폭(NASBA), 니킹 효소 증폭 반응(Nicking Enzyme Amplification Reaction: NEAR) 및 라이게이스 연쇄 반응(LCR)에 의해서와 같은 증폭은 등온일 수 있다.

[0920] 일부 실시형태에서, 등온 증폭을 위한 DNA 폴리머레이스는 중간 온도 반응(25℃ 내지 40℃)을 위한 클레노브 단편, Bst 대형 단편 및 phi29와 같은 DNA 폴리머레이스 및 더 높은 온도(50℃ 내지 65℃) 반응을 위한 Bst DNA 폴리머레이스의 대형 단편을 포함한다. LCR에 적합한 효소는 열안정성 Taq 라이게이스 및 Taq 폴리머레이스와 같은 열안정성 DNA 폴리머레이스를 포함한다.

[0921] 소정의 실시형태에서, d) 단계로부터 얻은 증폭된 하이브리드 분자는 시퀀싱되고, 서열은 수평으로 정렬, 즉, 서로 정렬되지만 참조 서열에는 정렬되지 않는다. 일부 실시형태에서, 단계 a) 내지 단계 d)는 하나 이상의 포획 프로브를 사용하여 1회 이상 반복된다. 포획 프로브는 동일하거나 또는 상이할 수 있으며, 표적 유전자좌의 cfDNA 가닥을 표적으로 하도록 설계된다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브가 상이한 경우, 이들은 어댑터-태깅된 cfDNA 라이브러리의 표적 유전자좌 내의 중첩되거나 또는 인접한 표적 서열에서 혼성화된다. 일 실시형태에서, 복수의 포획 프로브가 표적 유전자좌에 혼성화하고, 복수의 포획 프로브 각각이 모든 개체 거리를 포함하여 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리에서 표적 유전자좌에 혼성화하는 약 5bp, 10bp, 15bp, 20bp, 25bp, 30bp, 35bp, 40bp, 45bp, 50bp, 100bp, 200bp 이상의 임의의 다른 포획 프로브 내에서 표적 유전자좌에 혼성화하는 고밀도 포획 프로브 전략이 사용된다. 일 실시형태에서, 복수의 포획 프로브가 표적 유전자좌에 혼성화하고, 복수의 포획 프로브 각각이 모든 개체 거리를 포함하여 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리에서 표적 유전자좌에 혼성화하는 5bp, 10bp, 15bp, 20bp, 25bp, 30bp, 35bp, 40bp, 45bp, 50bp, 100bp, 200bp 이상의 임의의 다른 포획 프로브 내에서 표적 유전자좌에 혼성화하는 고밀도 포획 프로브 전략이 사용된다.

[0922] 일부 실시형태에서, 방법은 표적 유전자좌당 2개의 포획 프로브를 사용하여 수행될 수 있되, 하나는 표적 영역의 상류의 "왓슨" 가닥(논코딩 또는 주형 가닥)에 혼성화하고, 다른 하나는 표적 영역의 하류의 "크릭" 가닥(코딩 또는 비주형 가닥)에 혼성화한다.

[0923] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 임의의 수의 포획 프로브, 예를 들어, 표적 유전자좌당 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 포획 프로브를 사용하여 수 회 추가로 수행될 수 있으며, 이들 중 임의의 수는 임의의 조합으로 왓슨 또는 크릭 가닥에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 얻어진 서열은 다수의 차이점 중 임의의 것을 식별하기 위해 서로 정렬될 수 있다.

[0924] 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 포획 프로브를 사용하여 단일 반응에서 복수의 표적 유전자좌, 예를 들어, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1500개, 2000개, 2500개, 3000개, 3500개, 4000개, 4500개, 5000개, 10000개, 50000개, 100000개, 500000개 이상이 조사된다.

[0925] 일부 실시형태에서, 효소적 말단-복구 단계는 수행되지 않는다. 일부 실시형태에서, 단리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체는 DNA 폴리머레이스가 5' → 3' 연장을 수행하여 하이브리드 분자의 라이브러리를 형성하는

곳에서 직접 증폭된다. 일부 실시형태에서, 하이브리드 분자를 포함하는 라이브러리는 시퀀싱 어댑터(예컨대, Illumina NextSeq NGS 기술의 P5 및 P7)를 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 추가로 증폭되어 시퀀싱 준비가 완료된 증폭된 하이브리드 분자의 표적화된 라이브러리를 생성한다.

- [0926] 효소적 말단-복구 단계를 제거함으로써, 개시된 방법을 사용하여 표적화된 라이브러리가 더 빠르게 생성된다. 이러한 더 빠른 방법은 태깅된 DNA 라이브러리 및 표적화된 라이브러리에서 DNA 단편에 존재하는 관심 유전자좌의 유전자 분석의 성능을 개선하고 더 빠르게 만든다. 당업자라면 유전자좌가 DNA 변경, 예를 들어, SNV, indel, 유전자 재구성 및 카피 수 변화에 대해 분석될 수 있다는 것을 인식할 것이다.
- [0927] 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 표적 포획 라이브러리(TCL)이며, 실시예 12의 방법에 따라 생성된다. 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 표적 포획 라이브러리(TCLA)이며, 실시예 12의 방법에 따라 생성된다.
- [0928] 다양한 실시형태에서, 게놈 DNA, 예를 들어, 게놈 세포 DNA 또는 cfDNA의 유전자 분석 방법은 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리의 다중 유전자좌의 유전자 분석을 포함한다. 일부 실시형태에서, 유전자 분석은 증폭된 라이브러리를 생성하기 위한 어댑터-태깅된 DNA 분자의 증폭; 증폭된 라이브러리의 시퀀싱; 및 생성된 서열 리드의 생물정보학적 분석을 포함한다.
- [0929] 일부 실시형태에서, 정방향 프라이머(FP)는 DNA 분자에 부착된 5' 어댑터의 증폭 영역에 있는 프라이머 결합 부위에 혼성화하고, 역방향 프라이머(RP)는 DNA 분자에 부착된 3' 어댑터의 증폭 영역에 있는 프라이머 결합 부위에 혼성화하며, DNA 분자는 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭되거나 또는 연장된다.
- [0930] 일부 실시형태에서, FP 및 RP는 각각 ACA 결합 부위를 갖는다. FP 및 RP의 ACA 결합 부위는 어댑터-태깅된 DNA 분자의 5' 말단에 위치한 어댑터의 증폭 영역에 있는 "ACA 서열"에 혼성화할 수 있다. 어댑터의 "ACA 서열"은 뉴클레오타이드 ACA를 포함하는 서열에 혼성화할 수 있다. 일부 실시형태에서, ACA 결합 부위를 갖는 프라이머는 라이브러리 프라이머 또는 ACA 프라이머로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 프라이머는 서열번호 5의 서열을 포함한다.
- [0931] 일부 실시형태에서, 증폭되거나 또는 연장된 제2 DNA 표적의 각 말단은 우선적으로 플로우 셀에 결합할 수 있는 시퀀싱 어댑터, 예컨대, P5 또는 P7 서열 또는 임의의 다른 Illumina® 시퀀싱 어댑터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시퀀싱 어댑터는 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다.
- [0932] 일부 실시형태에서, 증폭되거나 또는 연장된 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 집합은 저역 통과 전체 게놈(LPWG) 라이브러리 또는 증폭된 전체 게놈 라이브러리(WGLA)로 지칭된다.
- [0933] 일부 실시형태에서, LPWG 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함하지 않는다.
- [0934] 일부 실시형태에서, 제2 변형된 라이브러리는 WGLA 라이브러리이다. 일부 실시형태에서, 제2 변형된 라이브러리는 생성된 실시예 13의 방법에 따라 생성된 WGLA 라이브러리이다.
- [0935] **변형된 라이브러리 조합**
- [0936] 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 변형된 라이브러리는 조합된 라이브러리를 생성하기 위해 조합된다. 일부 실시형태에서, 조합된 라이브러리는 또한 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)로도 지칭된다. 일부 실시형태에서, 표적 포획 라이브러리 및 LPWG 라이브러리가 조합된 라이브러리를 생성하기 위해 접촉된다. 일부 실시형태에서, TCLA 및 WGLA가 조합된 라이브러리를 생성하기 위해 접촉된다.
- [0937] 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리는 동일한 엔티티(entity)에 의해 생성된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 변형된 라이브러리도 상기 동일한 엔티티에 의해 조합된다.
- [0938] 일부 실시형태에서, 제1 변형된 라이브러리는 제1 엔티티에 의해 생성되고, 제2 변형된 라이브러리는 제2 엔티티에 의해 생성되되, 제1 및 제2 엔티티는 동일하지 않다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 변형된 라이브러리는 제1 엔티티에 의해 조합된다. 소정의 실시형태에서, 제1 및 제2 변형된 라이브러리는 제2 엔티티에 의해 조합된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 변형된 라이브러리는 제3 엔티티에 의해 조합되되, 제3 엔티티는 제1 및 제2 엔티티와 상이하다.
- [0939] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 변형된 라이브러리는 본 개시내용의 어댑터를 포함하는 키트를 사용하여 생성된다.

- [0940] 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 변형된 라이브러리는 실시예 14의 방법에 따라 조합된다.
- [0941] **계놈 등가물 수의 결정**
- [0942] 다양한 실시형태에서, DNA 유전자 분석 방법은 DNA 클론 라이브러리의 계놈 등가물의 수를 결정하는 단계를 포함한다. 본 개시내용에서 사용되는 용어 "계놈 등가물"은 각 라이브러리의 계놈 카피의 수를 지칭한다. 본 개시내용의 조성물 및 방법에 의해 충족되는 중요한 과제는 희귀한 유전적 돌연변이 또는 유전적 서열의 차이를 검출하고 분석하기 위한 충분한 검정 민감도를 달성하는 것이다. 샘플 별로 검정 민감도 값을 결정하기 위해, 시퀀싱 라이브러리에 존재하는 계놈 등가물의 수를 측정함으로써 각 샘플에 존재하는 서로 다른 개별 서열의 수가 측정된다. 민감도를 달성하기 위해, 계놈 등가물의 수는 각 샘플 라이브러리에 대해 측정되어야 한다.
- [0943] 계놈 등가물의 수는 qPCR 검정에 의해 또는 시퀀싱이 수행된 후 생물정보학-기반 계수를 사용함으로써 결정될 수 있다. 임상 샘플의 프로세스 흐름에서, 계놈 등가물의 qPCR 측정은 DNA 라이브러리에 대한 QC 단계로 사용된다. 서열 분석 전에 검정 민감도에 대한 기대치를 확립하고, 해당 DNA 클론 라이브러리에 필요한 계놈 등가물의 깊이가 부족한 경우 샘플을 분석으로부터 제외시킬 수 있다. 궁극적으로, 계놈 등가물의 생물정보학-기반 계수가 또한 주어진 각 DNA 클론 라이브러리에 대한 계놈 등가물(및 이에 따른 검정 민감도 및 위음성 추정치)을 식별하는 데 사용된다.
- [0944] 경험적 qPCR 검정 및 통계적 계수 검정은 서로 잘 연관되어 있어야 한다. 시퀀싱으로 DNA 클론 라이브러리의 서열 깊이를 밝혀내지 못하는 경우, DNA 클론 라이브러리의 재처리 및/또는 추가적인 시퀀싱이 필요할 수 있다.
- [0945] 일 실시형태에서, 세포 DNA 또는 cfDNA 클론 라이브러리의 계놈 등가물은 정량적 PCR(qPCR) 검정을 사용하여 결정된다. 특정 실시형태에서, 표준 곡선을 구성하고, qPCR 검정으로부터의 측정값을 생성된 표준 곡선에 피팅하고, 계놈 등가물에 대한 값을 이로부터 도출하기 위해 공지된 농도의 표준 라이브러리가 사용된다. 본 발명자들은 계놈의 공통 서열, 예를 들어, 반복 서열에 특이적으로 혼성화하는 하나의 프라이머 및 어댑터의 프라이머 결합 부위에 결합하는 또 다른 프라이머를 포함하는 qPCR "반복-기반" 검정이 어댑터 특이적 프라이머(DNA 클론의 양쪽 말단에 존재함)만을 사용하는 방법에 비해 계놈 등가물이 8-배 증가하는 것으로 측정되었음을 발견하였다. 반복-기반 검정에 의해 측정된 계놈 등가물의 수는 보다 일관된 라이브러리간 성능 및 시퀀싱 실행에서 계놈 등가물의 qPCR 추정치와 생물정보학적으로 계수된 태그 등가물 간의 더 나은 정렬을 제공한다.
- [0946] 본 개시내용의 반복-기반 계놈 등가물 검정에서 사용하기에 적합한 반복의 예시적인 예는 짧은 산재 핵 요소(short interspersed nuclear element: SINE), 예를 들어, Alu 반복; 긴 산재 핵 요소(long interspersed nuclear element: LINE), 예를 들어, LINE1, LINE2, LINE3; 미소부수체 반복 요소, 예를 들어, 짧은 탠덤 반복(short tandem repeat: STR), 단순 서열 반복(simple sequence repeat: SSR); 및 포유동물 전체에 걸친 산재 반복(mammalian-wide interspersed repeat: MIR)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0947] 일 실시형태에서, 반복은 Alu 반복이다.
- [0948] **시퀀싱**
- [0949] 일부 실시형태에서, 조합된 라이브러리의 차세대 시퀀싱(NGS)은 Illumina NextSeq 550 시퀀서를 사용하여 수행된다.
- [0950] 일부 실시형태에서, 시퀀싱 리드 1(151nt 길이) 및 시퀀싱 리드 2(17nt 길이)는 맞춤형 정방향 및 역방향 시퀀싱 프라이머를 사용하여 수행된다.
- [0951] 일부 실시형태에서, 정량적 유전자 분석은 복수의 고유한 시퀀싱 리드를 얻기에 충분한 시퀀싱 깊이를 생성하기 위해 상기 개시내용의 다른 곳에서 논의된 바와 같이 복수의 하이브리드 분자를 시퀀싱하는 것을 포함한다. 본 개시내용에서 사용되는 용어 "고유한 리드" 또는 "고유한 계놈 서열"(UGS)은 본 개시내용에서 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 개별 중복 리드를 "패밀리"로 함께 그룹화함으로써 식별된다. 중복 리드는 동일한 UMIE 공유(예를 들어, 계놈 서열 내에서 동일한 리드 코드 및 동일한 DNA 서열 시작 위치를 공유)하고 단일 부착 이벤트로부터 파생되어 중복에서 파생된 서로의 "형제(sibling)"인 서열 리드이다. 중복 리드 패밀리를 대표하는 단일 컨센서스는 고유한 리드 또는 UGS로 운반된다. 각각의 고유한 리드 또는 UGS는 고유한 부착 이벤트로 간주된다. 특정 포획 프로브에 해당하는 고유한 리드의 합계는 해당 특정 포획 프로브에 대한 "원시 계놈 깊이"(raw genomic depth: RGD)로 지칭된다. 각 포획 프로브는 패밀리로 그룹화함으로써 총 리드로부터 계산적으로 추출된 고유한 리드의 세트를 생성한다. 일부 실시형태에서, 하이브리드 분자에 있는 전체 포획 프로브 영역이 시퀀싱된다. 일부 실시형태에서, 하이브리드 분자에 있는 포획 프로브 영역의 일부가 시퀀싱된다.

- [0952] 그런 다음, 주어진 샘플에 대한 고유한 리드(예를 들어, 샘플에 대한 원시 게놈 깊이)가 프로브 별로 관찰된 모든 고유한 리드의 평균으로 계산된다. 각각의 고유한 리드는 고유한 게놈 DNA 클론으로부터 유래되어야 하기 때문에 고유한 리드가 중요하다. 각각의 고유한 리드는 게놈 DNA의 반수체 등가물의 입력 및 분석을 나타낸다. 고유한 리드의 합계는 분석된 반수체 게놈의 합계이다. 분석된 게놈의 수는 결국 시퀀싱 검정의 민감도를 규정한다. 비제한적인 예로서, 평균 고유 리드 수가 100개의 게놈 등가물이면, 100개 또는 1%에서 하나의 돌연변이 리드를 검출할 수 있는 민감도를 갖는다. 이보다 낮은 임의의 관찰은 방어할 수 없다.
- [0953] 명백한 카피 수 변화(예를 들어, 노이즈가 있는 프로브(noisy probe)의 예)가 있는 경우 샘플 평균을 계산하는데 사용되는 데이터 세트로부터 제외된다. 본 개시내용에서, "노이즈가 있는 프로브"는 대규모 세트의 동일한 샘플 중에서 매우 다양한 수의 고유한 리드(예를 들어, 12개 내지 16개의 샘플 복제물 중에서 매우 다양한 수의 고유한 리드)를 포획하는 프로브를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 노이즈가 있는 프로브와 관련된 고유한 리드의 수는 샘플의 고유한 리드의 평균 수에 비해 50% 이상 증가된다. 일부 실시형태에서, 노이즈가 있는 프로브와 관련된 고유한 리드의 수는 샘플의 고유한 리드의 평균 수에 비해 50% 이상 감소된다. 일부 실시형태에서, 특정 분석에 사용되는 프로브의 약 2% 내지 약 4%는 노이즈가 있는 프로브로 식별되며, 주어진 샘플에 대한 고유한 리드의 평균 수를 결정하기 위한 계산에서 제외된다. 일부 실시형태에서, 특정 분석에 사용된 프로브의 2% 내지 4%는 노이즈가 있는 프로브로 식별되며, 주어진 샘플에 대한 고유한 리드의 평균 수를 결정하기 위한 계산에서 제외된다.
- [0954] 일부 실시형태에서, 시퀀싱 리드는 "표적 적중 리드" 또는 "표적외 리드"로 식별된다. 표적 적중 리드는 게놈 라이브러리를 생성하는 데 사용되는 포획 프로브의 근처에 매핑되는 게놈 DNA 서열을 보유한다. 일부 실시형태에서, 각 게놈 서열이 특정 포획 프로브에 물리적으로 연결되고 게놈 분절 및 포획 프로브의 서열이 모두 통합된 정보의 조각으로 결정되는 경우, 표적 적중 리드는 시작 좌표가 상응하는 포획 프로브의 3' 말단의 400bp 이내, 보다 일반적으로 200bp 이내로 매핑되는 임의의 게놈 서열로 정의된다. 표적외 리드는 포획 프로브에 비해 500개 이상의 염기쌍 위치에서 참조 게놈에 정렬되는(그리고 더 자주 완전히 다른 염색체에 매핑되는) 게놈 서열을 갖는 것으로 정의된다.
- [0955] 일부 실시형태에서, 정량적 유전자 분석은 복수의 샘플로부터 유래된 하이브리드 분자의 다중화 시퀀싱을 포함한다.
- [0956] 다양한 실시형태에서, 정량적 유전자 분석은 하나 이상 또는 복수의 어댑터-태깅된 DNA 분자를 얻는 것(여기서, 각 클론은 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열을 포함하되, 제1 DNA 서열은 표적화된 유전자좌의 서열을 포함하고, 제2 DNA 서열은 포획 프로브 서열을 포함함); 하나 이상의 클론에 대해 쌍을 이룬 말단 시퀀싱 반응을 수행하는 것, 하나 이상의 시퀀싱 리드를 얻거나 또는 약 100, 200, 300, 400, 500개 이상의 뉴클레오타이드를 초과하는 단일의 긴 시퀀싱 리드가 얻어지는 하나 이상의 클론에 대해 시퀀싱 반응을 수행하는 것(여기서, 리드는 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열을 모두 식별하는 데 충분함); 및 시퀀싱 리드의 프로브 서열에 따라 하나 이상의 클론의 시퀀싱 리드를 정렬하거나 또는 클러스터링하는 것을 포함한다.
- [0957] **생물정보학 분석**
- [0958] 다양한 실시형태에서, 정량적 유전자 분석은 시퀀싱 리드의 생물정보학적 분석을 추가로 포함한다. 생물정보학적 분석은 시퀀싱을 위한 조성물 또는 방법 없이 수행된 임의의 순전히 정신적인 분석은 제외한다. 소정의 실시형태에서, 생물정보학 분석은 서열 정렬; 게놈 등가물 분석; 단일 뉴클레오타이드 변이(SNV) 분석; 유전자 카피 수 변화(CNV) 분석; 염색체 카피 수의 측정; 유전적 병변의 검출; 및 후성유전적 표식의 검출을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 생물정보학 분석은 cfDNA 클론 라이브러리에서 분석된 게놈 등가물의 수를 정량화하고; 표적 유전자좌의 유전적 상태를 검출하고; 표적 유전자좌에서 유전적 병변을 검출하고; 표적 유전자좌 내에서 카피 수 변동을 측정하는 데 유용하다.
- [0959] 일부 실시형태에서, 용어 "유전자 분석"은 뉴클레오타이드 서열 및/또는 후성유전적 표식을 분석하는 것을 포함하는 임의의 방법을 지칭할 수 있다.
- [0960] 일부 실시형태에서, 시퀀싱의 대상이 될 수 있는 본 개시내용의 방법에 따라 생성된 분자는 유전자 분석을 거친다.
- [0961] 일부 실시형태에서, 서열 리드 1 및 2가 유전자 분석에 사용된다.
- [0962] 일부 실시형태에서, 표적 포획 라이브러리의 라이브러리 태그는 맞춤형 시퀀싱 프라이머에 대한 결합 부위를 포

함하며, LPWG 라이브러리의 시퀀싱 리드로부터 표적 포획 라이브러리의 시퀀싱 리드를 역다중화하는 데 사용된다.

- [0963] 일부 실시형태에서, 생물정보학 분석은 카피 수, SNV, indel, 유전자 및 염색체 재배열과 같은 유전적 변이를 식별하기 위해 수행된다.
- [0964] 서열 정렬은 서열 리드와 하나 이상의 인간 참조 DNA 서열 사이에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 시퀀싱 정렬은 뉴클레오타이드 전이 또는 전환, 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실, 게놈 재배열, 카피 수의 변화 또는 유전자 융합의 검출을 포함하지만 이에 제한되지 않는 표적 유전자좌의 유전적 병변을 검출하는 데 사용될 수 있다. 원인 또는 예후 지표인 유전적 병변의 검출은 특정 유전적 병태 또는 질환의 진단, 예후예측, 치료 및/또는 모니터링에 유용할 수 있다.
- [0965] 본 개시내용에서 사용되는 용어 "표적 유전자좌"는 DNA 서열 내의 관심 영역을 지칭할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 표적화된 유전적 분석은 표적 유전자좌에 대해 수행된다. 일부 실시형태에서, DNA 표적 영역은 특정 유전적 상태, 유전적 병태, 유전적 질환; 태아 테스트; 유전적 모자이크 현상, 친자확인 테스트; 약물 치료에 대한 반응 예측; 의학적 병태의 진단 또는 모니터링; 마이크로바이옴 프로파일링; 병원체 스크리닝; 또는 장기 이식 모니터링과 관련된 유전자의 영역이다. 추가 실시형태에서, DNA 표적 영역은 특정 상염색체 또는 X-연관 염색체와 같은 특정 인간 염색체 또는 이의 영역(예를 들어, 고유한 염색체 영역)과 연관된 DNA 서열이다.
- [0966] 또한, 본 개시내용에는 본 개시내용에서 수행 서열 분석으로 지칭되는 참조 서열에 대한 정렬을 필요로 하지 않고 수행될 수 있는 서열 정렬 분석이 있다. 이러한 분석은 본 개시내용의 방법 또는 임의의 다른 방법에 의해 생성된 임의의 서열에 대해 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열 분석은 본 개시내용의 방법에 의해 얻은 리드에 대해 서열 정렬을 수행하는 것을 포함한다.
- [0967] 일 실시형태에서, cfDNA 클론 라이브러리의 게놈 등가물은 시퀀싱이 수행된 후 생물정보학-기반 계수를 사용하여 결정된다. 각각의 시퀀싱 리드는 특정 포획 프로브와 회합되며, 각 포획 프로브에 할당된 리드의 집합은 그룹으로 분석된다. 그룹 내에서, 개별 리드의 세트는 게놈 서열 내에서 동일한 리드 코드 및 동일한 DNA 서열 시작 위치를 공유한다. 이러한 개체 리드는 "패밀리"로 그룹화되고, 이 패밀리를 대표하는 단일 컨센서스는 "고유한 리드"로 운반된다. 패밀리를 구성하는 모든 개별 리드는 단일 부착 이벤트로부터 파생되므로 증폭에서 파생된 서로의 "형제"이다. 각각의 고유한 리드는 고유한 부착 이벤트로 간주되며, 고유한 리드의 합계는 분석된 게놈 등가물의 수와 동일한 것으로 간주된다.
- [0968] 고유한 클론의 수가 가능한 서열 조합의 총 수에 가까워짐에 따라 동일한 코드 및 시작 부위 조합이 독립적인 이벤트에 의해 생성될 것이며, 이러한 독립적인 이벤트는 단일 패밀리 내에서 부적절하게 그룹화될 확률이 낮아진다. 순(net) 결과는 게놈 등가물을 과소평가하게 될 것이며, 희귀한 돌연변이 리드는 동일한 식별자를 보유하는 야생형 리드와 중첩되기 때문에 시퀀싱 오류로 폐기될 수 있다.
- [0969] 일부 실시형태에서, cfDNA 클론 라이브러리에 대한 정확한 분석을 제공하기 위해, 분석된 게놈 등가물의 수는 가능한 고유한 클론의 약 1/10, 약 1/12, 약 1/14, 약 1/16, 약 1/18, 약 1/20, 약 1/25 이하이다. 일부 실시형태에서, cfDNA 클론 라이브러리에 대한 정확한 분석을 제공하기 위해, 분석된 게놈 등가물의 수는 가능한 고유한 클론의 1/10, 1/12, 1/14, 1/16, 1/18, 1/20, 1/25 이하이다. 위에 개괄된 절차는 단지 예시일 뿐이며 제한하는 것이 아니라는 점을 이해하여야 한다.
- [0970] 일부 실시형태에서, 분석될 게놈 등가물의 수는 증가시킬 필요가 있을 수 있다. 게놈 등가물의 깊이를 확장시키기 위해, 적어도 2가지 해결 방안이 상정된다. 첫 번째 해결 방안은 샘플당 하나 초과 어댑터 세트를 사용하는 것이다. 어댑터를 조합시킴으로써, 가능한 클론의 총 수를 급셈적으로 확장시킬 수 있으므로 게놈 입력의 한계를 손쉽게 확장시킬 수 있다. 두 번째 해결 방안은 리드 코드를 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이상의 염기로 확장시키는 것이다. 다른 모든 리드 코드와 적어도 2개의 염기만큼 다른 가능한 리드 코드의 수는 $4^{(n-1)}$ 로 확장되며, n은 리드 코드 내의 염기 수이다. 따라서, 비제한적인 예에서, 리드 코드가 5개의 뉴클레오타이드이고 $4^{(5-1)} = 256$ 인 경우; 따라서, 추가적인 염기를 포함시키면 각각의 추가적인 염기에 대해 이용 가능한 레퍼토리가 4배로 확장된다.
- [0971] 일 실시형태에서, 정량적 유전자 분석은 희귀한 단일 뉴클레오타이드 변이(SNV)를 식별하기 위한 시퀀싱 리드의 생물정보학적 분석을 포함한다.
- [0972] 차세대 시퀀싱은 대략 0.2% 내지 0.5%의 고유 오류율을 가지며, 이는 1/200에서 1/500까지의 염기 호출이 부정

확하다는 것을 의미한다. 이보다 더 낮은 빈도, 예를 들어, 1000개의 서열당 1개의 빈도로 발생하는 변이 및 다른 돌연변이를 검출하기 위해, 분자 주석 전략을 적용할 필요가 있다. 비제한적인 예로서, 표적화된 서열 포획 기술을 사용한 5000개의 고유한 분자의 분석은 50,000개 초과 리드의 충분한 시퀀싱 깊이에서 5000개의 고유한 리드의 집합을 생성할 것이며, 각각의 고유한 리드는 모두 동일한 리드 코드를 갖는 리드의 "패밀리"에 속한다. 패밀리 내에서 발생하는 SNV는 희귀한 변이의 후보이다. 이 동일한 변이가 하나 초과 패밀리에서 관찰되는 경우, 이는 시작 샘플 내에 존재하는 희귀한 변이가 될 가능성이 매우 높은 후보가 된다. 대조적으로, 패밀리 내에서 산발적으로 발생하는 변이는 시퀀싱 오류일 가능성이 높으며, 하나의 패밀리에서만 발생하는 변이는 드물거나 또는 생체외에서 발생한 염기 변형(예를 들어, DNA 염기의 산화 또는 PCR로 인한 오류)의 결과이다.

[0973] 일 실시형태에서, SNV를 검출하는 방법은 검정의 목적하는 표적 민감도로서 10-배 이상의 게놈 입력(게놈 또는 게놈 등가물)을 도입하는 단계를 포함한다. 하나의 비제한적인 예에서, 목적하는 민감도가 2%(100분의 2)이면, 실험 목표는 2000개의 게놈 입력이다.

[0974] 일부 실시형태에서, 시퀀싱 데이터의 생물정보학 분석은 유전적 상태, 병태 또는 질환과 관련된 SNV의 검출 또는 확인, 유전적 모자이크 현상, 태아 테스트, 친자확인 테스트, 약물 치료에 대한 반응 예측, 의학적 병태의 진단 또는 모니터링, 마이크로바이옴 프로파일링, 병원체 스크리닝 및 장기 이식 모니터링에 사용된다.

[0975] 카피 수 분석

[0976] 본 개시내용은 특히 세포 게놈 DNA(예를 들어, 조직 생검 샘플로부터의 것) 또는 cfDNA(예를 들어, 혈액 샘플로부터의 것)의 샘플 내에서의 돌연변이적 변화, SNP, 전좌, 역위, 결실, 카피 수의 변화 또는 다른 유전적 변화의 검출에 유용한 조성물 및 방법을 포함한다. 본 개시내용의 조성물 및 방법은 정교한 분해능으로 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액)로부터 cfDNA의 카피 수 변화를 검출하기가 매우 어려운 것을 검출하는 데 특히 유용하다. 특히, 본 개시내용의 일부 실시형태는 어댑터에 부착된 게놈 DNA 단편으로 구성된 게놈 DNA 라이브러리를 생성하고, 복수의 포획 프로브로 DNA 표적 영역을 포획하고, DNA 표적 영역을 포함하는 DNA 라이브러리 단편을 단리하고, DNA 표적 영역의 정량적 유전자 분석을 수행하여 DNA 표적 영역의 카피 수를 결정함으로써 테스트 샘플로부터 DNA 표적 영역의 카피 수를 검출하는 방법에 관한 것이다. 추가적으로, 본 개시내용의 일부 실시형태는, 예를 들어, 본 개시내용의 방법에 따라 LPWG 라이브러리를 생성하고, LPWG 라이브러리에서 유전자좌의 정량적 유전자 분석을 수행함으로써 게놈 전체에 걸쳐 수많은 유전자좌의 카피 수를 검출하는 방법에 관한 것이다. 넓은 범위의 게놈을 분석함으로써, 각 유전자좌의 카피 수 분석을 위한 통계 데이터의 품질이 개선된다. 본 개시내용에 기재된 어댑터는 시퀀싱되는 개별 DNA 단편뿐만 아니라 게놈 DNA의 샘플 또는 공급원의 동일성을 식별할 수 있게 한다.

[0977] 본 개시내용은 부분적으로 직접 조직 생검 및 말초 혈액을 포함하지만 이에 제한되지 않는 여러 샘플 유형에 적용할 수 있는 표적-특이적 카피 수 변화를 검출하기 위한 조성물 및 방법을 포함한다. 암 유전체학, 특히 고형 종양의 분석을 위한 특정 무세포 DNA(cfDNA) 검정의 맥락에서, 종양 DNA의 양은 종종 전체 DNA의 매우 작은 부분이다. 또한, 카피 수 손실은 게놈 DNA 검정, 특히 카피 수 변화가 샘플의 총 게놈 DNA의 일부에만 존재할 수 있는 게놈 DNA 검정, 예를 들어, cfDNA 검정에서 검출하기 어렵다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 암 환자로 부터 추출된 무세포 DNA의 대부분은 정상적인 공급원으로부터 유래하며 이배체 카피 수(남성 대상체에서 X-연관 유전자 제외)를 가질 것이다. 암 환자에서, 예를 들어, 혈장으로부터 추출된 순환 DNA의 2%가 종양으로부터 유래하는 환자와 같이 종양으로부터 유래된 DNA의 분획은 종종 낮은 소수 대립유전자 빈도를 갖는다. 종양 억제 유전자(예를 들어, 유방암에서 BRCA1)의 1개 카피의 손실은 검출 가능한 게놈 단편이 없는 경우 소수 대립유전자 빈도가 1%라는 것을 의미한다. 이 시나리오에서, 조작된 카피 수 손실 검정은 100개 카피(정상)와 99개 카피(이종접합성 유전자 손실)를 구별할 수 있어야 한다. 따라서, 일부 실시형태는 본 개시내용의 방법 및 조성물이 cfDNA의 맥락에서도 소수 대립유전자 빈도에서 카피 수의 변화를 검출하기에 충분한 분해능으로 카피 수 변화를 검출할 수 있게 한다는 것을 상정한다.

[0978] 다양한 실시형태에서, DNA 표적 영역 DNA의 카피 수 분석을 위한 방법이 제공된다. 소정의 실시형태에서, 카피 수 분석은 게놈 DNA 단편 및 어댑터를 각각 포함하는 DNA 라이브러리 단편의 게놈 DNA 라이브러리를 생성하고, DNA 표적 영역을 포함하는 DNA 라이브러리 단편을 단리하고, DNA 표적 영역의 정량적 유전자 분석을 수행함으로써 수행된다. "정량적 유전자 분석"은 DNA 돌연변이, SNP, 전좌, 결실 및 카피 수 변화(CNV)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 DNA(예를 들어, 관심 유전자, 유전자좌, 표적 영역 등)의 변화를 정량화할 수 있는 임의의 분자 생물학적 기법에 의해 수행되는 분석을 의미한다. 소정의 실시형태에서, 정량적 유전자 분석은 시퀀싱, 예를 들어, 차세대 시퀀싱에 의해 수행된다.

- [0979] 다양한 실시형태에서, 하나 이상 또는 복수의 클론을 얻는 단계를 포함하는 카피 수 결정 분석을 위한 방법이 제공되며, 각 클론은 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열을 포함하되, 제1 DNA 서열은 표적화된 유전자좌의 서열을 포함하고, 제2 DNA 서열은 포획 프로브 서열을 포함한다. 관련 실시형태에서, 하나 이상의 클론에 대한 쌍을 이룬 말단 시퀀싱 반응이 수행되고, 하나 이상의 시퀀싱 리드가 얻어진다. 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 클론에 대한 시퀀싱 반응이 수행되어 약 100개의 뉴클레오타이드를 초과하는 단일의 긴 시퀀싱 리드가 얻어지되, 리드는 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열 모두를 식별하는 데 충분하다. 하나 이상의 클론의 시퀀싱 리드는 시퀀싱 리드의 프로브 서열에 따라 정렬되거나 또는 클러스터링될 수 있다.
- [0980] 카피 수 분석은 주어진 게놈 DNA 샘플에서 발생하는 특정 유전자 또는 돌연변이의 카피 수를 검사하는 분석을 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 주어진 유전자의 카피 수 또는 주어진 샘플의 서열 차이의 정량적 결정을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 카피 수 분석은 유전적 상태, 병태 또는 질환과 관련된 유전자 증폭을 검출하거나 또는 확인하는 것, 태아 테스트, 유전적 모자이크 현상, 친자확인 테스트, 약물 치료에 대한 반응 예측, 의학적 병태의 진단 또는 모니터링, 마이크로바이옴 프로파일링, 병원체 스크리닝 및 장기 이식 모니터링에 사용된다.
- [0981] 일부 실시형태에서, 카피 수 분석은 염색체 불안정성을 측정하는 데 사용된다. 이러한 실시형태에서, 염색체 안정성 프로브를 포함하는 포획 프로브의 세트는 모든 염색체 세트에 걸쳐 균일한 밀도로 카피 수 변화를 결정하는 데 사용된다. 각 염색체 안정성 프로브에 대해 카피 수 분석이 수행된 다음, 염색체 안정성 프로브가 염색체 표적에 따라 정렬된다. 이는 게놈 전반에 걸쳐 카피 수 손실 또는 증가를 시각화할 수 있게 하며, 염색체 안정성의 척도 역할을 할 수 있다.
- [0982] 일부 실시형태에서, 시퀀싱 데이터의 생물정보학 분석은 뉴클레오타이드 전이 또는 전환, 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실, 게놈 재배열, 카피 수의 변화 또는 유전자 융합의 검출을 포함하지만 이에 제한되지 않는 표적 유전자좌에서의 하나 이상의 서열 또는 유전적 병변을 검출하거나 또는 식별하는 데 사용된다. 원인 또는 예후 지표인 유전적 병변의 검출은 특정 유전적 병태 또는 질환의 진단, 예후, 치료 및/또는 모니터링에 유용할 수 있다. 일 실시형태에서, 유전적 병변은 유전적 상태, 병태 또는 질환, 태아 테스트, 유전적 모자이크 현상, 친자확인 테스트, 약물 치료에 대한 반응 예측, 의학적 병태의 진단 또는 모니터링, 마이크로바이옴 프로파일링, 병원체 스크리닝 및 장기 이식 모니터링과 관련이 있다.
- [0983] 일부 실시형태에서, 샘플에 존재하는 DNA 표적 영역의 카피 수는 정량적 유전자 분석에 의해 결정된다. 일부 실시형태에서, DNA 표적 영역의 카피 수는 샘플에 존재하는 DNA 표적 영역의 카피의 양을 비교하고 이를 알려진 카피 수를 갖는 하나 이상의 샘플에 존재하는 DNA 표적 영역의 양과 비교함으로써 결정된다.
- [0984] 일부 실시형태는 본 개시내용에 기재된 조성물 및 방법이 게놈 DNA 샘플에서 카피 수의 변화를 검출하는 데 특히 유용하며, 여기서 샘플 내 총 게놈 DNA의 일부만이 카피 수의 변화를 갖는다는 것을 상정한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 상당한 중앙 돌연변이가 샘플, 예를 들어, 대립유전자 빈도가 일반적으로 약 100%, 50% 또는 0%인 기존의 SNP 유전형 분석과 달리 50%보다 상당히 낮은(예를 들어, 0.1% 내지 20% 초과 범위) 소수 대립유전자 빈도로 존재하는 무세포 DNA의 샘플에 존재할 수 있다. 당업자라면 본 개시내용의 조성물 및 방법이 또한 단일 뉴클레오타이드 변이(SNV), 짧은(예를 들어, 40개 미만의 염기쌍(bp)) 삽입 및 결실(indel) 및 발암성 유전자 융합을 포함하는 게놈 재배열을 포함하는 다른 유형의 돌연변이를 검출하는 데 유용하다는 것을 인식할 것이다.
- [0985] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물 및/또는 방법은 샘플의 총 게놈 DNA의 약 20% 미만, 약 19% 미만, 약 18% 미만, 약 17% 미만, 약 16% 미만, 약 15% 미만, 약 14% 미만, 약 13% 미만, 약 12% 미만, 약 11% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.2% 미만 또는 약 0.1% 미만으로 존재하는 하나 이상의 DNA 표적 영역의 카피 수의 변화를 검출, 확인, 관찰 및/또는 밝힐 수 있고, 이에 적합하고/하거나 이를 가능하게 하는 데 유용하다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 샘플의 총 게놈 DNA의 약 0.01% 내지 약 100%, 약 0.01% 내지 약 50% 또는 약 0.1% 내지 약 20%로 존재하는 하나 이상의 DNA 표적 영역의 카피 수의 변화를 검출, 확인, 관찰 및/또는 밝힐 수 있고, 이에 적합하고/하거나 이를 가능하게 하는 데 유용하다.
- [0986] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물 및/또는 방법은 샘플의 총 게놈 DNA의 20% 미만, 19% 미만, 18% 미만, 17% 미만, 16% 미만, 15% 미만, 14% 미만, 13% 미만, 12% 미만, 11% 미만, 10% 미만, 9% 미만, 8% 미만, 7% 미만, 6% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만, 0.2% 미만 또는 0.1% 미만으로 존재하는 하나 이상의 DNA 표적 영역의 카피 수의 변화를 검출, 확인, 관찰 및/또는 밝힐 수 있고, 이에 적합하

고/하거나 이를 가능하게 하는 데 유용하다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 샘플의 총 게놈 DNA의 0.01% 내지 100%, 0.01% 내지 50% 또는 0.1% 내지 20%로 존재하는 하나 이상의 DNA 표적 영역의 카피 수의 변화를 검출, 확인, 관찰 및/또는 밝힐 수 있고, 이에 적합하고/하거나 이를 가능하게 하는 데 유용하다.

[0987] 일부 실시형태에서, cfDNA의 유전자 분석을 위한 방법은 cfDNA 라이브러리를 생성하고 증폭시키는 단계, cfDNA 라이브러리에서 게놈 등가물의 수를 결정하는 단계; 및 하나 이상의 게놈 표적 유전자좌의 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계를 포함한다.

[0988] 일부 실시형태는 본 개시내용에 기재된 임의의 방법 및 조성물이 유전적 상태, 유전적 병태, 유전적 질환, 유전적 모자이크 현상을 효율적으로 분석, 검출, 진단 및/또는 모니터링하는 것, 태아 진단, 친자확인 테스트, 마이크로바이옴 프로파일링, 병원체 스크리닝, 및 샘플의 총 게놈 DNA의 일부만이 관심 특징, 예를 들어, 유전적 병변, 돌연변이, 단일 뉴클레오타이드 변이(SNV)를 갖는 경우 게놈 DNA, 예를 들어, 세포 또는 cfDNA를 사용한 장기 이식 모니터링에 사용하기에 효과적인 것으로 상정한다. 일부 실시형태에서, 관심 특징은 질환 또는 병태와 관련된 유전적 특징이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 상당한 종양 돌연변이는 샘플, 예를 들어, 대립유전자 빈도가 일반적으로 약 100%, 50% 또는 0%인 기존의 SNP 유전형 분석과 달리 50%보다 현저히 낮은(예를 들어, 0.1% 내지 20% 초과 범위) 소수 대립유전자 빈도로 존재하는 cfDNA의 샘플에 존재할 수 있다.

[0989] **임상적 응용**

[0990] 다양한 실시형태에서, 본 개시내용은 관심 영역에서 돌연변이적 변화, SNP, 전좌, 역위, 결실, 카피 수의 변화 또는 다른 유전적 변화를 검출함으로써 대상체의 병태 또는 질환을 검출, 식별, 예측, 진단 또는 모니터링하는 방법을 상정한다.

[0991] 다양한 실시형태에서, 본 개시내용은 대상체의 병태 또는 질환을 검출, 식별, 예측, 진단 또는 모니터링하는 방법을 상정한다.

[0992] 일부 실시형태에서, 대상체의 유전적 상태, 병태 또는 질환을 검출, 식별, 예측, 진단 또는 모니터링하는 방법은 DNA 클론 라이브러리에서 하나 이상의 표적 유전자좌의 정량적 유전자 분석을 수행하여 하나 이상의 표적 유전자좌에서 서열의 변화를 검출 또는 식별하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 변화는 카피 수의 변화이다.

[0993] 일 실시형태에서, 유전적 상태, 병태 또는 질환을 검출, 식별, 예측, 진단 또는 모니터링하는 방법은 대상체의 생물학적 샘플로부터 세포 DNA 또는 cfDNA를 분리하거나 또는 얻는 단계; 세포 DNA 또는 cfDNA를 하나 이상의 말단-복구 효소로 처리하여 말단-복구된 DNA를 생성하는 단계; 하나 이상의 어댑터를 말단-복구된 DNA의 각 말단에 부착시켜 게놈 DNA 라이브러리를 생성하는 단계; DNA 라이브러리를 증폭시켜 DNA 클론 라이브러리를 생성하는 단계; DNA 클론 라이브러리에서 게놈 등가물의 수를 결정하는 단계; 및 DNA 클론 라이브러리에서 하나 이상의 표적 유전자좌의 정량적 유전자 분석을 수행하여 서열의 변화, 예를 들어, 하나 이상의 표적 유전자좌에서의 SNP, 전좌, 역위, 결실 또는 카피 수의 변화를 검출 또는 식별하는 단계를 포함한다.

[0994] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 유전적 질환; 유전적 모자이크 현상; 태아 테스트; 친자확인 테스트; 친자확인 테스트; 약물 치료에 대한 반응 예측 및/또는 모니터링; 의학적 병태의 진단 또는 모니터링; 마이크로바이옴 프로파일링; 병원체 스크리닝; 및 장기 이식 모니터링으로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전적 상태 또는 유전적 병태 또는 질환을 검출, 식별, 예측, 진단 또는 모니터링하는 방법을 제공하되, 해당 방법은 대상체의 생물학적 샘플로부터 게놈 DNA를 분리하거나 또는 얻는 단계; DNA를 하나 이상의 말단-복구 효소로 처리하여 말단-복구된 DNA를 생성하는 단계; 하나 이상의 어댑터를 말단-복구된 DNA의 각 말단에 부착시켜 게놈 DNA 라이브러리를 생성하는 단계; 게놈 DNA 라이브러리를 증폭시켜 DNA 클론 라이브러리를 생성하는 단계; DNA 클론 라이브러리에서 게놈 등가물의 수를 결정하는 단계; 및 DNA 클론 라이브러리에서 하나 이상의 표적 유전자좌의 정량적 유전자 분석을 수행하여 하나 이상의 표적 유전자좌에서 서열의 뉴클레오타이드 전이 또는 전환, 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실, 게놈 재배열, 카피 수의 변화 또는 유전자 융합을 검출 또는 식별하는 단계를 포함한다.

[0995] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 암이 있는 대상체에서 표적화된 요법의 효능을 결정하는 방법을 제공하며, 해당 방법은 제1 시점에서 대상체로부터 분리된 생물학적 샘플에서 제1 무세포 종양 부하(cfTL)를 검출하는 단계; 제2 시점에서 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플에서 제2 cfTL을 검출하는 단계(여기서, 대상체는 제1 시점과 제2 시점 사이에 적어도 1회 용량의 표적화된 요법을 투여받았음); 및 제1 cfTL과 비교하여 감소된 제2 cfTL을 나타낼 때 대상체에서 표적화된 요법이 효과적인 것으로 확인하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 제2 cfTL은 제1 cfTL과 비교하여 적어도 약 1%, 적어도 약 2%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도

약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 약 90% 초과만큼 감소될 수 있다. 본 개시내용에서 사용된 바와 같이, cfTL은 하나 이상의 유전적 변경 및/또는 이수성(aneploidy)을 갖는 순환 종양 DNA를 지칭할 수 있다.

[0996] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 검출, 확인, 예측, 진단 또는 모니터링될 수 있는 유전적 질환의 예시적인 예는 암, 알츠하이머병(APOE1), 샤르코-마리에-투스병, 레버 유전성 시신경병증(Leber hereditary optic neuropathy: LHON), 안젤만 증후군(UBE3A, 유비퀴틴-단백질 라이게이스 E3A), 프라더-윌리 증후군(염색체 15번 영역), β -지중해빈혈(HBB, β -글로빈), 고셔병(유형 I)(GBA, 글루코세레브로시데이스), 낭포성 섬유증(CFTR 상피 클로라이드 채널), 겸상 적혈구병(HBB, β -글로빈), 테이-삭스병(HEXA, 헥소사미니테이스 A), 페닐케톤뇨증(PAH, 페닐알라닌 하이드로레이스), 가족성 고콜레스테롤혈증(LDLR, 저밀도 지방단백질 수용체), 성인 다낭성 신장 질환(PKD1, 폴리스틴), 헌팅턴병(HDD, 헌팅틴), 신경섬유종증 유형 I(NF1, NF1 종양 억제 유전자), 근긴장성 이영양증(DM, 미오토닌), 결절성 경화증(TSC1, 투베린), 연골무형성증(FGFR3, 섬유아세포 성장 인자 수용체), 취약 X 증후군(FMR1, RNA-결합 단백질), 뒤센형 근이영양증(DMD, 디스트로핀), A형 혈우병(F8C, 혈액 응고 인자 VIII), 레쉬-니한 증후군(HPRT1, 하이포잔틴 구아닌 리보실트랜스퍼레이스 1) 및 부신백질이영양증(ABCD1)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0997] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 검출, 확인, 예측, 진단 또는 모니터링될 수 있는 암의 예시적인 예는 B 세포 림프종, 예를 들어, 다발성 골수종, 흑색종, 유방암, 폐암(예컨대, 비소세포 폐암종 또는 NSCLC), 기관지암, 결장직장암, 전립선암, 췌장암, 위암, 난소암, 방광암, 뇌암 또는 중추신경계암, 말초신경계암, 식도암, 자궁경부암, 자궁암 또는 자궁내막암, 구강암 또는 인두암, 간암, 신장암, 고환암, 담도암, 소장암 또는 맹장암, 침샘암, 갑상선암, 부신암, 골육종, 연골육종, 혈액 조직암, 선암종, 염증성 근섬유아세포 종양, 위장관 기질 종양(gastrointestinal stromal tumor: GIST), 결장암, 다발성 골수종(multiple myeloma: MM), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome: MDS), 골수증식성 장애(myeloproliferative disorder: MPD), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia: ALL), 급성 골수구성 백혈병(acute myelocytic leukemia: AML), 만성 골수구성 백혈병(chronic myelocytic leukemia: CML), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia: CLL), 진성다혈구증, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma: NHL), 연조직 육종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 골성육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 수질 암종, 기관지성 암종, 신장세포 암종, 간종양, 담관 암종, 융모막 암종, 정상피종, 배아 암종, 율름스 종양, 방광 암종, 상피 암종, 신경아교종, 성상세포종, 수아세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관아세포종, 천신경종, 희소돌기아교세포종신경아교종, 수막종, 신경아세포종, 망막아세포종, 여포성 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 외투세포 림프종, 간세포 암종, 갑상선암, 위암, 두경부암, 소세포암, 본태성 혈소판증가증, 원인불명 골수화생, 과다호산구 증후군, 전신비만세포증, 친숙한 과다호산구증가증, 만성 호산구성 백혈병, 신경내분비암, 카르시노이드 종양 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0998] 일 실시형태에서, 유전적 병변은 Cosmic 데이터베이스에 주석이 달린 병변(병변 및 서열 데이터는 온라인에서 이용 가능하며, Cosmic 웹사이트의 Cancer Gene Census 부분에서 다운로드할 수 있음) 또는 Cancer Genome Atlas에서 주석이 달린 병변(병변 및 서열 데이터는 온라인에서 이용 가능하며, Cancer Genome Atlas 웹사이트에서 다운로드할 수 있음)이다.

[0999] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 검출, 확인, 예측, 진단 또는 모니터링될 수 있는 암과 관련된 하나 이상의 유전적 병변을 보유하는 유전자의 예시적인 예는 ABCB1, ABCC2, ABCC4, ABCG2, ABL1, ABL2, AKT1, AKT2, AKT3, ALDH4A1, ALK, APC, AR, ARAF, ARFRP1, ARID1A, ATM, ATR, AURKA, AURKB, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L2, BCL6, BRAF, BRCA1, BRCA2, C1orf144, CARD11, CBL, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDH1, CDH2, CDH20, CDH5, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CEBPA, CHEK1, CHEK2, CRKL, CRLF2, CTNNB1, CYP1B1, CYP2C19, CYP2C8, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, DNMT3A, DOT1L, DPYD, EGFR, EPHA3, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHB1, EPHB4, EPHB6, EPHX1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC2, ERG, ESR1, ESR2, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EWSR1, EZH2, FANCA, FBXW7, FCGR3A, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT1, FLT3, FLT4, FOXP4, GATA1, GNAI1, GNAQ, GNAS, GPR124, GSTP1, GUCY1A2, HOXA3, HRAS, HSP90AA1, IDH1, IDH2, IGF1R, IGF2R, IKBKE, IKZF1, INHBA, IRS2, ITPA, JAK1, JAK2, JAK3, JUN, KDR, KIT, KRAS, LRP1B, LRP2, LTK, MAN1B1, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MCL1, MDM2, MDM4, MEN1, MET, MITF, MLH1, MLL, MPL, MRE11A, MSH2, MSH6, MTHFR, MTOR, MUTYH, MYC, MYCL1, MYCN, NF1, NF2, NKX2-1, NOTCH1, NPM1, NQO1, NRAS, NRP2, NTRK1, NTRK3, PAK3, PAX5, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PIK3R1, PKHD1, PLCG1, PRKDC, PTCH1, PTEN, PTPN11, PTPRD, RAF1, RARA, RB1, RET, RICTOR, RPTOR, RUNX1, SLC19A1,

SLC22A2, SLC01B3, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMO, SOD2, SOX10, SOX2, SRC, STK11, SULT1A1, TBX22, TET2, TGFBR2, TMPRSS2, TNFRSF14, TOP1, TP53, TPMT, TSC1, TSC2, TYMS, UGT1A1, UMPS, USP9X, VHL 및 WT1을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- [1000] 일부 실시형태에서, 유전적 병변은 뉴클레오타이드 전이 또는 전환, 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실, 게놈 재배열, 카피 수의 변화 또는 유전자 융합을 포함한다.
- [1001] 일 실시형태에서, 유전적 병변은 ALK 유전자의 3' 코딩 영역을 또 다른 유전자에 융합시키는 유전자 융합이다.
- [1002] 일 실시형태에서, 유전적 병변은 ALK 유전자의 3' 코딩 영역을 EML4 유전자에 융합시키는 유전자 융합이다.
- [1003] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 검출, 확인, 예측, 진단 또는 모니터링될 수 있는 태아 테스트에 적합한 병태의 예시적인 예는 다운 증후군(21번 3염색체증), 에드워드 증후군(18번 3염색체증), 파타우 증후군(13번 3염색체증), 클라인펠터 증후군(XXY), XXX 증후군, XYY 증후군, 8번 3염색체증, 16번 3염색체증, 터너 증후군(XO), 로버트소니안 전좌, 디조지 증후군 및 울프-허쉬호른 증후군을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [1004] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 검출, 확인, 예측, 진단 또는 모니터링될 수 있는 친자확인 테스트에 적합한 대립유전자의 예시적인 예는 D20S1082, D6S474, D12ATA63, D22S1045, D10S1248, D1S1677, D11S4463, D4S2364, D9S1122, D2S1776, D10S1425, D3S3053, D5S2500, D1S1627, D3S4529, D2S441, D17S974, D6S1017, D4S2408, D9S2157, 아멜로게닌, D17S1301, D1GATA113, D18S853, D20S482 및 D14S1434 중 16개 이상을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [1005] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 검출, 확인, 예측, 진단 또는 모니터링될 수 있는 약물 치료에 대한 반응 예측에 적합한 유전자의 예시적인 예는 다음 유전자: ABCB1(ATP-결합 카세트, 하위-패밀리 B(MDR/TAP), 구성원 1), ACE(안지오텐신 I 전환 효소), ADH1A(알코올 데하이드로게네이스 1A(클래스 I), 알파 폴리펩타이드), ADH1B(알코올 데하이드로게네이스 IB(클래스 I), 베타 폴리펩타이드), ADH1C(알코올 데하이드로게네이스 1C(클래스 I), 감마 폴리펩타이드), ADRB1(아드레날린 작용성, 베타-1-, 수용체), ADRB2(아드레날린 작용성, 베타-2-, 수용체, 표면), AHR(아릴 탄화수소 수용체), ALDH1A1(알데하이드 데하이드로게네이스 1 패밀리, 구성원 A1), ALOX5(아라키도네이트 5-리폭시게네이스), BRCA1(유방암 1, 조기 발병), COMT(카테콜-O-메틸트랜스퍼레이스), CYP2A6(사이토크롬 P450, 패밀리 2, 하위패밀리 A, 폴리펩타이드 6), CYP2B6(사이토크롬 P450, 패밀리 2, 하위패밀리 B, 폴리펩타이드 6), CYP2C9(사이토크롬 P450, 패밀리 2, 하위패밀리 C, 폴리펩타이드 9), CYP2C19(사이토크롬 P450, 패밀리 2, 하위패밀리 C, 폴리펩타이드 19), CYP2D6(사이토크롬 P450, 패밀리 2, 하위패밀리 D, 폴리펩타이드 6), CYP2J2(사이토크롬 P450, 패밀리 2, 하위패밀리 J, 폴리펩타이드 2), CYP3A4(사이토크롬 P450, 패밀리 3, 하위패밀리 A, 폴리펩타이드 4), CYP3A5(사이토크롬 P450, 패밀리 3, 하위패밀리 A, 폴리펩타이드 5), DPYD(다이하이드로피리미딘 데하이드로게네이스), DRD2(도파민 수용체 D2), F5(응고 인자 V), GSTP1(글루타티온 S-트랜스퍼레이스 pi), HMGCR(3-하이드록시-3-메틸글루타릴-Co효소 A 리덕테이스), KCNH2(포타슘 전압-개폐 채널, 하위패밀리 H(eag-관련), 구성원 2), KCNJ11(포타슘 내향성-정류 채널, 하위패밀리 J, 구성원 11), MTHFR(5,10-메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕테이스(NADPH)), NQO1(NAD(P)H 데하이드로게네이스, 퀴논 1), P2RY1(퓨린성 수용체 P2Y, G-단백질 결합, 1), P2RY12(퓨린성 수용체 P2Y, G-단백질 결합, 12), PTGIS(프로스타글란딘 I2(프로스타사이클린) 합성효소), SCN5A(소듐 채널, 전압-개폐, 유형 V, 알파(긴 QT 증후군 3형)), SLC19A1(용질 운반체 패밀리 19(플레이트 수송체), 구성원 1), SLC01B1(용질 운반체 유기 음이온 수송체 패밀리, 구성원 1B1), SULT1A1(설포트랜스퍼레이스 패밀리, 세포질성, 1A, 페놀-선택, 구성원 1), TPMT(티오펜린 S-메틸트랜스퍼레이스), TYMS(티미딜레이트 합성효소), UGT1A1(UDP 글루쿠로노실트랜스퍼레이스 1 패밀리, 폴리펩타이드 A1), VDR(바이타민 D(1,25- 다이하이드록시바이타민 D3) 수용체), VKORC1(바이타민 K 에폭사이드 리덕테이스 복합체, 서브유닛 1) 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [1006] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 검출, 확인, 예측, 진단 또는 모니터링될 수 있는 의학적 병태의 예시적인 예는 뇌졸중, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌 손상, 심장 질환, 심장 마비, 협심증, 죽상동맥경화증 및 높은 고혈압을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [1007] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 스크리닝될 수 있는 병원체의 예시적인 예는 세균, 진균 및 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [1008] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 스크리닝될 수 있는 세균 종의 예시적인 예는 마이코박테리움 종(*Mycobacterium* spp.), 뉴모코커스 종(*Pneumococcus* spp.), 에스케리키아 종(*Escherichia* spp.), 캄필로박터 종(*Campylobacter* spp.), 코리네박테리움 종(*Corynebacterium* spp.), 클로스트리디움 종(*Clostridium* spp.),

스트렙토코커스 종(*Streptococcus* spp.), 스태필로코커스 종(*Staphylococcus* spp.), 슈도모나스 종(*Pseudomonas* spp.), 시겔라 종(*Shigella* spp.), 트레포네마 종(*Treponema* spp.) 또는 살모넬라 종(*Salmonella* spp.)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[1009] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 스크리닝될 수 있는 진균 종의 예시적인 예는 아스퍼질리스 종(*Aspergillus* spp.), 블라스토마이세스 종(*Blastomyces* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 콕시시오이데스 종(*Coccidioides* spp.), 크립토코커스 종(*Cryptococcus* spp.), 더마토포테스(*dermatophytes*), 티네아 종(*Tinea* spp.), 트리코피톤 종(*Trichophyton* spp.), 마이크로스포룸 종(*Microsporum* spp.), 후사리움 종(*Fusarium* spp.), 히스토플라스마 종(*Histoplasma* spp.), 뮤코로마이코티나 종(*Mucoromycotina* spp.), 뉴모시스티스 종(*Pneumocystis* spp.), 스포로트릭스 종(*Sporothrix* spp.), 엑세로필룸 종(*Exserophilum* spp.) 또는 클라도스포리움 종(*Cladosporium* spp.)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[1010] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 스크리닝될 수 있는 바이러스의 예시적인 예는 인플루엔자 A, 예컨대, H1N1, H1N2, H3N2 및 H5N1(조류 독감), 인플루엔자 B, 인플루엔자 C 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, 로타바이러스, 노르워크 바이러스 그룹의 임의의 바이러스, 장내 아데노바이러스, 파코바이러스, 뎅기열 바이러스, 원숭이 두창, 모노네가바이러스목, 라이사바이러스, 예컨대, 광견병 바이러스, 라고스 박쥐 바이러스, 모콜라 바이러스, 듀벤헤이즈 바이러스, 유럽 박쥐 바이러스 1 및 2 및 오스트레일리아 박쥐 바이러스, 에페메로바이러스, 베시쿨로바이러스, 수포성 구내염 바이러스(Vesicular Stomatitis Virus: VSV), 헤르페스바이러스, 예컨대, 단순 포진 바이러스 유형 1 및 2, 대상포진, 사이토메갈로바이러스, 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Bar virus: EBV), 인간 헤르페스바이러스(human herpesvirus: HHV), 인간 헤르페스바이러스 유형 6 및 8, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(Moloney murine leukemia virus: M-MuLV), 몰로니 뮤린 육종 바이러스(Moloney murine sarcoma virus: MoMSV), 하비 뮤린 육종 바이러스(Harvey murine sarcoma virus: HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스(murine mammary tumor virus: MuMTV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(gibbon ape leukemia virus: GaLV), 고양이 백혈병 바이러스(feline leukemia virus: FLV), 스푸마바이러스, 프렌드 뮤린 백혈병 바이러스, 뮤린 줄기 세포 바이러스(Murine Stem Cell Virus: MSCV) 및 라우스 육종 바이러스(Rous Sarcoma Virus: RSV), HIV(인간 면역결핍 바이러스; HIV 유형 1 및 HIV 유형 2 포함), 비스나-마에디 바이러스(visna-maedi virus: VMV) 바이러스, 염소 관절염-뇌염 바이러스(caprine arthritis-encephalitis virus: CAEV), 말 감염성 빈혈 바이러스(equine infectious anemia virus: EIAV), 고양이 면역결핍 바이러스(feline immunodeficiency virus: FIV), 소 면역결핍 바이러스(bovine immune deficiency virus: BIV) 및 유인원 면역결핍 바이러스(simian immunodeficiency virus: SIV), 유두종 바이러스, 뮤린 감마헤르페스바이러스, 아레나바이러스, 예컨대, 아르헨티나 출혈열 바이러스, 볼리비아 출혈열 바이러스, 사비아-관련 출혈열 바이러스, 베네수엘라 출혈열 바이러스, 라사열 바이러스, 마추포 바이러스, 림프구성 맥락수막염 바이러스(Lymphocytic choriomeningitis virus: LCMV), 버나비리디아에, 예컨대, 크림-콩고 출혈열 바이러스, 한타바이러스, 신증후군을 동반한 출혈열을 일으키는 바이러스, 리프트 밸리열 바이러스, 에볼라 출혈열 및 마르부르크 출혈열을 포함한 필로비리디아에(필로바이러스), 키야사나 삼림병 바이러스를 포함한 플라비비리디아에, 움스크 출혈열 바이러스, 진드기 매개 뇌염 유발 바이러스 및 파라믹소비리디아에, 예컨대, 헨드라 바이러스 및 니파 바이러스, 대두창 및 소두창(천연두), 알파바이러스, 예컨대, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 동부 말 뇌염 바이러스, 서부 말 뇌염 바이러스, SARS-관련 코로나바이러스(SARS-associated coronavirus: SARS-CoV), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2), 웨스트 나일 바이러스 및 임의의 뇌염 유발 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[1011] 본 개시내용의 조성물 및 방법으로 검출, 확인, 예측, 진단 또는 모니터링될 수 있는 이식 수용자의 장기 이식을 모니터링하기에 적합한 유전자의 예시적인 예는 다음 유전자: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP 및 HLA-DQ 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[1012] 일부 실시형태에서, 생물정보학적 분석은 cfDNA 클론 라이브러리에서 분석된 게놈 등가물의 수를 정량화하거나; 표적 유전자좌에서 유전적 변이를 검출하거나; 표적 유전자좌 내의 돌연변이를 검출하거나; 표적 유전자좌 내의 유전적 융합을 검출하거나; 또는 표적 유전자좌 내의 카피 수 변동을 측정하는 데 사용된다.

[1013] 다양한 실시형태에서, 대상체의 생물학적 샘플로부터 게놈 DNA를 분리하거나 또는 얻는 단계; DNA를 하나 이상의 말단-복구 효소로 처리하여 말단-복구된 DNA를 생성하는 단계; 하나 이상의 어댑터를 말단-복구된 DNA의 각 말단에 부착시켜 DNA 라이브러리를 생성하는 단계; DNA 라이브러리를 증폭시켜 DNA 클론 라이브러리를 생성하는 단계; DNA 클론 라이브러리에서 게놈 등가물의 수를 결정하는 단계; 및 DNA 클론 라이브러리에서 유전적 질환과 관련된 하나 이상의 바이오마커의 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계를 포함하는 유전적 질환에 대한 동반 진

단이 제공되되, 하나 이상의 바이오마커 중 적어도 하나의 검출 또는 검출 실패는 대상체가 유전적 질환에 대해 치료를 받아야 하는지 여부를 나타낸다. 일부 실시형태에서, DNA는 cfDNA이다. 일부 실시형태에서, DNA는 세포 DNA이다.

[1014] 본 개시내용에서 사용되는 용어 "동반 진단"은 특정 항암 요법과 연계된 진단 테스트를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 진단 방법은 생물학적 샘플과 연관된 바이오마커에서의 유전적 병변의 검출을 포함하여 환자가 항암 요법으로 치료를 받아야 하는지 또는 받지 않아야 하는지를 신속하게 식별할 수 있게 한다.

[1015] 항암 요법은 수술, 방사선, 화학치료제, 항암 약물 및 면역조절제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[1016] 항암 약물의 예시적인 예는 알킬화제, 예컨대, 티오테파 및 사이클로포스파미드(CYTOXAN™); 알킬 설포네이트, 예컨대, 뷰셀판, 임프로셀판 및 피포셀판; 아지리딘, 예컨대, 벤조도파, 카보쿰, 메투레도파 및 우레도파; 알트레타민, 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌포스포르미드, 트라이에틸렌티오포스포아미드 및 트라이메틸올멜라민 구제약물(resume)을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸멜라민; 나이트로젠 머스타드, 예컨대, 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 아이포스파미드, 메클로메타민, 메클로메타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노렙비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 나이트로소우레아, 예컨대, 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예컨대, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-다이아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 및 이의 폐결화된 제형, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 튜베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물질, 예컨대, 메토타렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체, 예컨대, 데노프테린, 메토타렉세이트, 프테로프테린, 트라이메타렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대, 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자시티딘, 카르모푸르, 시타라빈, 다이테옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로젠, 예컨대, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스테인, 테스토라톤; 항부신제, 예컨대, 아미노글루테티미드, 미토테인, 트릴로스테인; 폴산 보충물, 예컨대, 폴산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 다이아지쿠온; 엘포르미틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 나이트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다물; 나이트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK®; 라족세인; 시조피란; 스피로저마늄; 테누아존산; 트라이아지쿠온; 2,2',2"-트라이클로로트라이에틸아민; 우레탄; 빈테신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, 뉴저지주 프린스턴 소재) 및 도세탁셀(TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, 프랑스 앙토니 소재); 클로람부실; 젠시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토타렉세이트; 백금 유사체, 예컨대, 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나렐빈; 노반트론; 테니포시드; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포아이소머레이스 저해제 RFS 2000; 다이플루오로멜티로미딘(DMF0); 레티노산 유도체, 예컨대, Targretin™(백사로텐), Panretin™(알리트레티노인); ONTAK™(테닐류킨 디피톡스); 에스페라미신; 카페시타빈; 및 위의 임의의 것의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 이 정의에는, 예를 들어, 타목시펜, 랄록시펜, 아로마테이스 저해 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트라이옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜(Fareston)을 포함하는 항-에스트로젠과 같은 암에 대한 호르몬 작용을 조절 또는 저해하는 작용을 하는 항-호르몬제; 및 항-안드로젠제, 예컨대, 플루타미드, 닐루타미드, 바이칼루타미드, 류프롤라이드 및 고세렐린; 및 위의 임의의 것의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[1017] 면역조절제의 예시적인 예는 사이클로스포린, 타크롤리무스, 트레스페리무스, 피메크롤리무스, 시롤리무스, 베롤리무스, 라플루니무스, 라퀴니모드 및 이미퀴모드뿐만 아니라 이들의 유사체, 유도체, 염, 이온 및 복합체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[1018] 일부 실시형태에서, 항암 약물은 폴리-ADP 리보스 폴리머레이스(PARP) 저해제를 포함할 수 있다. PARP 저해제의 예시적인 예는 올라파립(AZD-2281), 루카파립(AG014699 또는 PF-01367338), 니라파립(MK-4827), 탈라조파립(BMN-673) 벨리파립(ABT-888), CEP 9722, E7016, BGB-290, 3-아미노벤즈아마이드를 포함하지만 이에 제한되지

않는다.

- [1019] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 출원 및 발행된 특허는 각각의 개별 간행물, 특허 출원 또는 발행된 특허가 참조에 의해 인용되도록 구체적이고 개별적으로 표시된 것처럼 참조에 의해 본 명세서에 인용된다. 특히, 국제 PCT 공개 제WO 2014/093330호, 제WO 2016/028316호, 제WO 2017/083562호 및 제WO 2018/039463호의 전체 내용이 구체적으로 참조에 의해 인용된다.
- [1020] 전술한 개시내용은 명확한 이해를 위해 예시 및 실시예를 통해 어느 정도 상세하게 설명되었지만, 첨부된 청구 범위의 사상 또는 범위를 벗어나지 않고 소정의 변경 및 수정이 이루어질 수 있다는 것은 본 개시내용의 교시에 비추어 당업자에게 쉽게 명백해질 것이다. 다음 실시예는 예시로서만 제공되며 제한의 방식으로 제공되지 않는다. 당업자는 본질적으로 유사한 결과를 도출하기 위해 변경되거나 수정될 수 있는 다양한 중요하지 않은 매개 변수를 쉽게 인식할 것이다.
- [1021] 본 개시내용의 일부 실시형태의 실시는 달리 구체적으로 반대로 나타내지 않는 한 당업계의 기술 내에 있는 화학, 생화학, 유기 화학, 분자 생물학, 미생물학, 제조합 DNA 기법, 유전학, 면역학 및 세포 생물학의 통상적인 방법을 사용할 것이며, 이들 중 다수는 예시의 목적으로 아래에 기술되어 있다. 이러한 기법은 문헌에 자세히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); 및 Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998)]을 참조한다.
- [1022] 본 개시내용의 기타 실시형태
- [1023] 첨부된 청구범위에도 불구하고, 다음의 번호가 매겨진 실시형태도 본 개시내용의 일부를 형성한다.
- [1024] 1. 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 포함하는 키트로서,
- [1025] 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함 하되;
- [1026] 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 프로브 품질 관리(QC) 프로세스를 통과한, 키트.
- [1027] 2. 어댑터 세트를 포함하는 키트로서,
- [1028] 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함하고;
- [1029] 상기 어댑터 세트는 어댑터 품질 관리(QC) 프로세스를 통과한, 키트.
- [1030] 3. 키트로서,
- [1031] a. 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함함);
- [1032] b. 각 포획 프로브 모듈이 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하는, 하나 이상의 포획 프로브 모듈
- [1033] 을 포함하되;
- [1034] 상기 어댑터 세트는 어댑터 품질 관리(QC) 프로세스를 통과한, 키트.
- [1035] 4. 키트로서,
- [1036] a. 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함함);
- [1037] b. 각 포획 프로브 모듈이 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하는, 하나 이상의 포획 프로브 모듈

- [1038] 을 포함하되;
- [1039] 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 프로브 품질 관리(QC) 프로세스를 통과한, 키트.
- [1040] 5. 키트로서,
- [1041] a. 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함함),
- [1042] b. 각 포획 프로브 모듈이 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하는, 하나 이상의 포획 프로브 모듈
- [1043] 을 포함하되;
- [1044] 상기 어댑터 세트는 어댑터 품질 관리(QC) 프로세스를 통과하였고;
- [1045] 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 프로브 품질 관리(QC) 프로세스를 통과한, 키트.
- [1046] 6. 실시형태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 QC 프로세스는 어댑터 결찰에 대한 테스트를 포함하되, 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트는,
- [1047] a. 상기 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계; 및
- [1048] b. 상기 LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계
- [1049] 을 포함하고;
- [1050] 상기 어댑터 세트는 상기 LPA의 농도가 미리 결정된 농도보다 높을 때 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주되는, 키트.
- [1051] 7. 실시형태 6에 있어서, 상기 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 5ng 내지 약 50ng이고, 상기 LPA의 미리 결정된 농도는 약 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 약 $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 인, 키트.
- [1052] 8. 실시형태 6 또는 실시형태 7에 있어서, 상기 어댑터 세트는 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트를 통과하였을 때 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 키트.
- [1053] 9. 실시형태 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 QC 프로세스는,
- [1054] a. 상기 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계;
- [1055] b. 인덱스 서열을 포함하는 적어도 하나의 프라이머를 포함하는 프라이머 쌍을 사용하여 상기 LIBS를 증폭시켜 인덱스 증폭 후 라이브러리(LPIA)를 생성하는 단계; 및
- [1056] c. 상기 LPIA에 대한 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계
- [1057] 를 포함하는 어댑터 분포에 대한 테스트를 포함하되;
- [1058] 상기 어댑터 세트는 상기 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 상기 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주되는, 키트.
- [1059] 10. 실시형태 9에 있어서, 상기 미리 결정된 허용 기준은,
- [1060] a. 바코드 혼선은 리드의 0.05% 내지 5% 이하로 존재하고;
- [1061] b. 미지의 어댑터는 리드의 1% 내지 50% 이하로 존재하고;
- [1062] c. 고유한 어댑터 서열의 10% 내지 80% 이하는 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 0% 내지 50%인 리드 수를 갖고;
- [1063] d. 모든 고유한 어댑터 서열의 적어도 60% 내지 99.9%가 존재하고;
- [1064] e. 고유한 어댑터 서열의 5% 내지 50% 이하는 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 2배보다 큰 리드 수를 갖는
- [1065] 것 중 하나 이상을 포함하는, 키트.

- [1066] 11. 실시형태 9 또는 10에 있어서, 상기 어댑터 세트는 상기 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과하였을 때 상기 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 키트.
- [1067] 12. 실시형태 9 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트는 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트 및 상기 어댑터 분포에 대한 테스트를 모두 통과하였을 때 상기 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 키트.
- [1068] 13. 실시형태 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 프로브 QC 프로세스는,
- [1069] a. 어댑터 세트를 말단-복구된 DNA 단편을 포함하는 DNA 샘플에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계;
- [1070] b. 상기 LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계;
- [1071] c. 상기 LPA를 분할하거나 또는 희석하여 표적 포획 LPA(TC LPA) 및 전체-게놈 LPA(WG LPA)를 생성하는 단계;
- [1072] d. 상기 WG LPA를 증폭시켜 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA)를 생성하는 단계;
- [1073] e. 테스트할 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 상기 TC LPA에 혼성화하여 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계;
- [1074] f. 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 분리하여 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계;
- [1075] g. 상기 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 효소적으로 처리하여 하이브리드 분자를 생성하는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는 상기 포획 프로브 모듈 및 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함함);
- [1076] h. 상기 하이브리드 분자를 증폭시켜 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)를 생성하는 단계;
- [1077] i. 상기 WGLA와 상기 TCLA를 합하여 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)를 형성하는 단계;
- [1078] j. 상기 SRL에 대해 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계
- [1079] 를 포함하는 포획 프로브 모듈에 대한 테스트를 포함하되,
- [1080] 상기 DNA 샘플은 복수의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)을 포함하고;
- [1081] 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 상기 프로브 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 키트.
- [1082] 14. 실시형태 13에 있어서, 상기 TC LPA는 적어도 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $80 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이고, 상기 WG LPA는 적어도 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이고, 상기 TCLA는 적어도 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $80 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이고, 상기 WGLA는 적어도 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $80 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 인, 키트.
- [1083] 15. 실시형태 13 또는 실시형태 14에 있어서, 상기 미리 결정된 허용 기준은,
- [1084] a. 포획 프로브의 적어도 60% 내지 99.9%가 적어도 1개의 총 리드를 갖고;
- [1085] b. 포획 프로브의 적어도 60% 내지 99.9%가 적어도 10개 내지 적어도 200개의 표적 적중 총 리드를 갖고; 그리고
- [1086] c. 상기 DNA 샘플 내에서 예상되는 SNP의 적어도 60% 내지 99.9%가 검출되는
- [1087] 것 중 하나 이상을 포함하는, 키트.
- [1088] 16. 실시형태 12 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 프로브 QC 프로세스에 사용되는 DNA 샘플을 포함하는, 키트.
- [1089] 17. 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트는 실시형태 174 내지 219 중 어느 하나의 방법에 따라 수행되는 어댑터 QC 프로세스를 통과한, 키트.
- [1090] 18. 실시형태 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 실시형태 220 내지 240 중 어느 하나의 방법에 따라 수행되는 프로브 QC 프로세스를 통과한, 키트.
- [1091] 19. 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머

쌍을 포함하되,

- [1092] 각 어댑터 모듈은 증폭 영역을 포함하고;
- [1093] 상기 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고;
- [1094] 상기 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하는, 키트.
- [1095] 20. 실시형태 19에 있어서, 상기 제1 프라이머 쌍은 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되는, 키트.
- [1096] 21. 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍을 포함하되,
- [1097] 상기 제2 F 프라이머 및 상기 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하는, 키트.
- [1098] 22. 실시형태 21에 있어서, 상기 제2 프라이머 쌍은 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되는, 키트.
- [1099] 23. 실시형태 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서,
- [1100] (c) 각 어댑터 모듈이 증폭 영역을 포함하는, 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍,
- [1101] (여기서, 상기 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고,
- [1102] 상기 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함);
- [1103] (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍
- [1104] (여기서, 상기 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)
- [1105] 을 포함하는, 키트.
- [1106] 24. 실시형태 23에 있어서, 상기 제1 프라이머는 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되고, 상기 제2 프라이머는 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되는, 키트.
- [1107] 25. 실시형태 24에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리 및 상기 제2 변형된 라이브러리는 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)로 조합되도록 구성되는, 키트.
- [1108] 26. 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함하는, 키트.
- [1109] 27. 실시형태 26에 있어서,
- [1110] (c) 각 어댑터 모듈이 증폭 영역을 포함하는, 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍,
- [1111] (여기서, 상기 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고,
- [1112] 상기 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함);
- [1113] (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍
- [1114] (여기서, 상기 제2 F 프라이머 및 상기 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고,
- [1115] 상기 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)
- [1116] 을 포함하는, 키트.
- [1117] 28. 실시형태 27에 있어서, 상기 제1 프라이머는 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되고, 상기 제2 프라이머는 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되는, 키트.
- [1118] 29. 실시형태 28에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리 및 상기 제2 변형된 라이브러리는 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)로 조합되도록 구성되는, 키트.
- [1119] 30. 실시형태 26 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함하는, 키트.

- [1120] 31. 실시형태 26 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 DNA, RNA, PNA 또는 비자연 발생적 핵산, 합성 핵산, 변형된 핵산, 비자연 발생적 아미노산, 합성 아미노산 및 변형된 아미노산 중 하나 이상을 포함하는, 키트.
- [1121] 32. 실시형태 26 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 검출 가능한 표지를 포함하는, 키트.
- [1122] 33. 실시형태 32에 있어서, 상기 검출 가능한 표지는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함하는, 키트.
- [1123] 34. 실시형태 26 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 검출 가능한 모이어티에 선택적으로 또는 특이적으로 결합하는, 키트.
- [1124] 35. 실시형태 34에 있어서, 상기 검출 가능한 모이어티는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함하는, 키트.
- [1125] 36. 실시형태 26 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 키트.
- [1126] 37. 실시형태 36에 있어서, 상기 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 상기 테스트 샘플의 임의의 DNA 단편과 70% 이하의 서열 동일성을 갖는, 키트.
- [1127] 38. 키트로서,
- [1128] a. 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함);
- [1129] b. 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 상기 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함하는, 하나 이상의 포획 프로브 모듈;
- [1130] c. 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고; 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하는, 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍;
- [1131] d. 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않는, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍
- [1132] 을 포함하는, 키트.
- [1133] 39. 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리를 생성하기 위한 키트로서,
- [1134] a. 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함함);
- [1135] b. 각 포획 프로브 모듈이 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하는, 하나 이상의 포획 프로브 모듈
- [1136] 을 포함하되;
- [1137] 상기 제1 변형된 라이브러리는 어댑터, 포획 프로브 모듈 및 포획 프로브 모듈의 표적 서열을 포함하는 DNA 단편을 포함하고;
- [1138] 상기 제2 변형된 라이브러리는 어댑터 및 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 DNA 단편을 포함하는, 키트.
- [1139] 40. 실시형태 39에 있어서, 상기 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함하는, 키트.
- [1140] 41. 실시형태 39 또는 실시형태 40에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리 및 상기 제2 변형된 라이브러리는 모두 테스트 샘플로부터 생성되는, 키트.
- [1141] 42. 실시형태 39 내지 41 중 어느 하나에 있어서,
- [1142] (c) 각 어댑터 모듈이 증폭 영역을 포함하는, 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍,
- [1143] (여기서, 상기 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고,

- [1144] 상기 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및
- [1145] (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍
- [1146] (여기서, 상기 제2 F 프라이머 및 상기 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)
- [1147] 을 포함하는, 키트.
- [1148] 43. 실시형태 39 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함하는, 키트.
- [1149] 44. 실시형태 43에 있어서,
- [1150] (c) 각 어댑터 모듈이 증폭 영역을 포함하는, 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍,
- [1151] (여기서, 상기 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고,
- [1152] 상기 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함);
- [1153] (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍
- [1154] (여기서, 제2 F 프라이머 및 상기 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고,
- [1155] 상기 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)
- [1156] 을 포함하는, 키트.
- [1157] 45. 실시형태 38 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 프라이머 쌍은 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되고, 상기 제2 프라이머 쌍은 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 데 사용되는, 키트.
- [1158] 46. 실시형태 45에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리 및 상기 제2 변형된 라이브러리는 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)로 조합되도록 구성되는, 키트.
- [1159] 47. 실시형태 39 내지 46 중 어느 하나에 있어서,
- [1160] 상기 제1 변형된 라이브러리는 어댑터, 포획 프로브 모듈 및 포획 프로브 모듈의 표적 서열을 포함하는 제1 DNA 단편을 포함하고;
- [1161] 상기 제2 변형된 라이브러리는 어댑터 및 상기 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 제2 DNA 단편을 포함하는, 키트.
- [1162] 48. 실시형태 39 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리 및 상기 제2 변형된 라이브러리는 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)로 조합되도록 구성되는, 키트.
- [1163] 49. 실시형태 39 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 어댑터, 포획 프로브 모듈 및 상기 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 단편이고;
- [1164] 상기 제2 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 어댑터 및 상기 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부를 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 단편인, 키트.
- [1165] 50. 실시형태 49에 있어서, 상기 제2 변형된 라이브러리의 어댑터-태깅된 DNA 단편 중 어느 것도 포획 프로브 모듈을 포함하지 않는, 키트.
- [1166] 51. 실시형태 39 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리는 표적 포획 라이브러리(TCL) 또는 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)인, 키트.
- [1167] 52. 실시형태 39 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 변형된 라이브러리는 전체-게놈 라이브러리(WGL) 또는 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA)인, 키트.
- [1168] 53. 실시형태 39 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리 또는 상기 제2 변형된 라이브러리는 상기 라이브러리 태그를 포함하되, 상기 라이브러리 태그는 상기 제1 변형된 라이브러리와 상기 제2 변형된 라이브러리를 구별하도록 구성되는, 키트.

- [1169] 54. 실시형태 39 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리는 제1 라이브러리 태그를 포함하고, 상기 제2 변형된 라이브러리는 제2 라이브러리 태그를 포함하되, 상기 제1 라이브러리 태그 및 상기 제2 라이브러리 태그는 동일하지 않은, 키트.
- [1170] 55. 실시형태 39 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 5'에서 3'로,
- [1171] 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 상기 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2) 또는
- [1172] 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 상기 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)
- [1173] 를 포함하되;
- [1174] 상기 제2 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 5'에서 3'로,
- [1175] 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 상기 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는, 키트.
- [1176] 56. 실시형태 55에 있어서, A1, A2, B1 및 B2 중 적어도 하나는 적어도 하나의 라이브러리 태그를 포함하는, 키트.
- [1177] 57. 실시형태 56에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 표적 서열, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 상기 테스트 샘플의 임의의 DNA 단편 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로부터 선택되는 서열과 70% 이하의 동일성을 갖는, 키트.
- [1178] 58. 실시형태 39 내지 57 중 어느 하나에 있어서,
- [1179] 상기 제1 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 5'에서 3'로,
- [1180] 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 상기 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2) 또는
- [1181] 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 상기 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)
- [1182] 를 포함하되;
- [1183] 상기 제2 변형된 라이브러리의 각 라이브러리 단편은 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 상기 테스트 샘플의 DNA 서열의 적어도 일부, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하고;
- [1184] A1, A2, B1 및 B2 중 적어도 하나는 상기 라이브러리 태그를 포함하고;
- [1185] 상기 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 표적 서열, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 상기 테스트 샘플의 임의의 DNA 단편 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로부터 선택되는 서열과 70% 이하의 서열 동일성을 갖는, 키트.
- [1186] 59. 실시형태 38 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함하는, 키트.
- [1187] 60. 실시형태 38 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 DNA, RNA, PNA 또는 비자연 발생적 핵산, 합성 핵산, 변형된 핵산, 비자연 발생적 아미노산, 합성 아미노산 및 변형된 아미노산 중 하나 이상을 포함하는, 키트.
- [1188] 61. 실시형태 38 내지 60 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 검출 가능한 표지를 포함하는, 키트.
- [1189] 62. 실시형태 61에 있어서, 상기 검출 가능한 표지는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함하는, 키트.

- [1190] 63. 실시형태 38 내지 62 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 검출 가능한 모이어티에 선택적으로 또는 특이적으로 결합하는, 키트.
- [1191] 64. 실시형태 63에 있어서, 상기 검출 가능한 모이어티는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함하는, 키트.
- [1192] 65. 실시형태 38 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 키트.
- [1193] 66. 실시형태 65에 있어서, 상기 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 상기 테스트 샘플의 임의의 DNA 단편과 70% 이하의 서열 동일성을 갖는, 키트.
- [1194] 67. 실시형태 1 내지 66 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터는 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 키트.
- [1195] 68. 실시형태 67에 있어서, 상기 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 상기 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있는 영역에 혼성화하여 이와 이중체를 형성할 수 있는, 키트.
- [1196] 69. 실시형태 67 또는 실시형태 68에 있어서, 상기 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 어댑터 모듈을 포함하는, 키트.
- [1197] 70. 실시형태 67 내지 69 중 어느 하나에 있어서, 상기 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 상기 3' 말단에 dT, dA, dC 또는 dG 오버행을 포함하는, 키트.
- [1198] 71. 실시형태 67 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 상기 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 dsDNA 단편의 5' 말단에 대한 결찰 및/또는 어댑터 이량체 형성을 방지하는 3' 말단의 변형을 포함하되, 상기 비결찰 가닥은 이중체로부터 치환되도록 구성되는, 키트.
- [1199] 72. 실시형태 1 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터는 고유한 ID 영역의 풀로부터 선택되는 ID 영역을 포함하되, 상기 풀은 복수의 풀로부터 선택되고, 상기 선택된 풀은 테스트 샘플에 고유한, 키트.
- [1200] 73. 실시형태 1 내지 72 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 모듈은,
- [1201] a. 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역;
- [1202] b. ID 영역; 및
- [1203] c. 앵커 영역
- [1204] 을 포함하는, 키트.
- [1205] 74. 실시형태 73에 있어서, 상기 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하되, 상기 프라이머 결합 부위는 PCR (중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 등온 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 복제) 또는 LCR(라이게이스 연쇄 반응)을 사용한 증폭을 가능하게 하는, 키트.
- [1206] 75. 실시형태 73 또는 실시형태 74에 있어서, 상기 증폭 영역은 약 10개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 키트.
- [1207] 76. 실시형태 75에 있어서, 상기 증폭 영역은 약 20개 내지 약 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 키트.
- [1208] 77. 실시형태 76에 있어서, 상기 증폭 영역은 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 키트.
- [1209] 78. 실시형태 73 내지 77 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵커 영역은 상기 3' 말단에 오버행을 포함하는, 키트.
- [1210] 79. 실시형태 73 내지 78 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵커 영역은 약 1개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 키트.
- [1211] 80. 실시형태 79에 있어서, 상기 앵커 영역은 약 5개 내지 약 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 키트.

- [1212] 81. 실시형태 80에 있어서, 상기 앵커 영역은 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 키트.
- [1213] 82. 실시형태 73 내지 81 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역은 약 3개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 키트.
- [1214] 83. 실시형태 82에 있어서, 상기 ID 영역은 약 3개 내지 약 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 키트.
- [1215] 84. 실시형태 83에 있어서, 상기 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 키트.
- [1216] 85. 실시형태 73 내지 84 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 모듈은 고유한 분자 식별자(UMI) 멀티플라이어를 추가로 포함하는, 키트.
- [1217] 86. 실시형태 85에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함되는, 키트.
- [1218] 87. 실시형태 85 또는 실시형태 86에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 약 1개 내지 약 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 키트.
- [1219] 88. 실시형태 87에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 64개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 키트.
- [1220] 89. 실시형태 72 내지 88 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 약 2개 내지 약 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 키트.
- [1221] 90. 실시형태 89에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 약 10개 내지 약 500개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 키트.
- [1222] 91. 실시형태 90에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 약 50개 내지 약 300개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 키트.
- [1223] 92. 실시형태 91에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 키트.
- [1224] 93. 실시형태 72 내지 92 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이인, 키트.
- [1225] 94. 실시형태 72 내지 94 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있는, 키트.
- [1226] 95. 실시형태 72 내지 94 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 ID 영역은 이에 부착된 DNA 단편을 식별하도록 구성되는, 키트.
- [1227] 96. 실시형태 72 내지 95 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 약 64개 내지 약 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키트.
- [1228] 97. 실시형태 96에 있어서, 상기 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 고유한 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 각 서열은 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있는, 키트.
- [1229] 98. 실시형태 73 내지 97 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이루는, 키트.
- [1230] 99. 실시형태 73 내지 98 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함하는, 키트.
- [1231] 100. 실시형태 99에 있어서,
- [1232] 상기 ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이되, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고;
- [1233] 상기 어댑터 세트의 각 어댑터는 상기 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 주어진 서열의 UMI

멀티플라이어는 주어진 서열의 하나의 ID 영역과 쌍을 이루고;

- [1234] 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이루는, 키트.
- [1235] 101. 실시형태 38 내지 100 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트는 어댑터 품질 관리(QC) 프로세스를 통과한, 키트.
- [1236] 102. 실시형태 101에 있어서, 상기 어댑터 QC 프로세스는 어댑터 결찰에 대한 테스트를 포함하되, 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트는,
- [1237] a. 상기 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계; 및
- [1238] b. 상기 LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계
- [1239] 를 포함하고;
- [1240] 상기 어댑터 세트는 상기 LPA의 농도가 미리 결정된 농도보다 높을 때 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주되는, 키트.
- [1241] 103. 실시형태 101에 있어서, 상기 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 5ng 내지 약 50ng이고, 상기 LPA의 미리 결정된 농도는 약 1 ng/ μ l 내지 약 200 ng/ μ l인, 키트.
- [1242] 104. 실시형태 101 내지 103 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트는 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트를 통과하였을 때 상기 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 키트.
- [1243] 105. 실시형태 101 내지 104 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 QC 프로세스는,
- [1244] a. 상기 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계;
- [1245] b. 인덱스 서열을 포함하는 적어도 하나의 프라이머를 사용하여 상기 LIBS를 증폭시켜 인덱스 증폭 후 라이브러리(LPIA)를 생성하는 단계; 및
- [1246] c. 상기 LPIA에 대한 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계
- [1247] 를 포함하는 어댑터 분포에 대한 테스트를 포함하되;
- [1248] 상기 어댑터 세트는 상기 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 상기 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주되는, 키트.
- [1249] 106. 실시형태 101 내지 105 중 어느 하나에 있어서, 상기 미리 결정된 허용 기준은,
- [1250] a. 바코드 혼선은 리드의 0.05% 내지 5% 이하로 존재하고;
- [1251] b. 미지의 어댑터는 리드의 1% 내지 50% 이하로 존재하고;
- [1252] c. 고유한 어댑터 서열의 10% 내지 80% 이하는 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 0% 내지 50%인 리드 수를 갖고;
- [1253] d. 모든 고유한 어댑터 서열의 적어도 60% 내지 99.9%가 존재하고;
- [1254] e. 고유한 어댑터 서열의 5% 내지 50% 이하는 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 2배보다 큰 리드를 갖는
- [1255] 것 중 하나 이상을 포함하는, 키트.
- [1256] 107. 실시형태 105 또는 실시형태 106에 있어서, 상기 어댑터 세트는 상기 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과하였을 때 상기 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 키트.
- [1257] 108. 실시형태 102 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트는 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트 및 상기 어댑터 분포에 대한 테스트를 모두 통과하였을 때 상기 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 키트.

- [1258] 109. 실시형태 101 내지 108 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트는 실시형태 174 내지 219 중 어느 하나의 방법에 따라 수행되는 어댑터 QC 프로세스를 통과한, 키트.
- [1259] 110. 실시형태 1 내지 109 중 어느 하나에 있어서, 하나 초과와 어댑터 모듈 세트를 포함하는, 키트.
- [1260] 111. 실시형태 110에 있어서, 약 2개 내지 약 100개의 어댑터 모듈 세트를 포함하는, 키트.
- [1261] 112. 실시형태 111에 있어서, 48개의 어댑터 모듈 세트를 포함하는, 키트.
- [1262] 113. 실시형태 110 내지 112 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 어댑터 모듈 세트는 주어진 테스트 샘플에 고유한, 키트.
- [1263] 114. 실시형태 1 내지 113 중 어느 하나에 있어서, 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 생성하기 위해 상기 어댑터 세트의 어댑터를 상기 테스트 샘플의 DNA 단편에 결합시키기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는, 키트.
- [1264] 115. 실시형태 114에 있어서, 상기 어댑터를 결합시키기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 라이게이스를 포함하는, 키트.
- [1265] 116. 실시형태 115에 있어서, 상기 DNA 라이게이스는 T4 DNA 라이게이스인, 키트.
- [1266] 117. 실시형태 1 내지 116 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트는,
 - a. 상기 어댑터 세트를 상기 DNA 단편에 결합시켜 복수의 어댑터/DNA 단편 복합체를 생성하는 단계; 및
 - b. 상기 복수의 어댑터/DNA 단편 복합체를 하나 이상의 효소와 접촉시켜 복수의 어댑터-태깅된 DNA 단편을 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 형성하는 단계
- [1269] 를 포함하는 방법을 사용하여 상기 테스트 샘플의 DNA 단편에 결합되도록 구성되는, 키트.
- [1270] 118. 실시형태 117에 있어서, 상기 각 어댑터/DNA 단편 복합체는 상기 DNA 단편의 각 말단에 결합된 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 키트.
- [1271] 119. 실시형태 117 또는 실시형태 118에 있어서, 상기 비결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 단계 b 단계에서 상기 어댑터/DNA 단편 복합체로부터 치환되는, 키트.
- [1272] 120. 실시형태 114 내지 119 중 어느 하나에 있어서, 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하기 위해 상기 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 증폭시키기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는, 키트.
- [1273] 121. 실시형태 120에 있어서, 상기 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 증폭시키기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 폴리머레이스를 포함하는, 키트.
- [1274] 122. 실시형태 120 또는 실시형태 121에 있어서, 상기 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 증폭시키기 위한 하나 이상의 시약은 하나 이상의 PCR용 프라이머를 포함하는, 키트.
- [1275] 123. 실시형태 122에 있어서, 상기 하나 이상의 프라이머는 상기 어댑터 증폭 영역의 프라이머 결합 부위와 상보적인 단일 프라이머 서열을 포함하는, 키트.
- [1276] 124. 실시형태 120 내지 123 중 어느 하나에 있어서, 상기 LPA로부터 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA)를 생성하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는, 키트.
- [1277] 125. 실시형태 124에 있어서, 상기 WGLA를 생성하기 위한 하나 이상의 시약은 상기 어댑터 증폭 영역의 프라이머 결합 부위에 혼성화하는 하나 이상의 프라이머를 포함하는, 키트.
- [1278] 126. 실시형태 125에 있어서, 상기 하나 이상의 프라이머는 플로우 셀에 결합할 수 있는 시퀀싱 어댑터를 포함하는, 키트.
- [1279] 127. 실시형태 126에 있어서, 상기 시퀀싱 어댑터는 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함하는, 키트.
- [1280] 128. 실시형태 124 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 상기 WGLA를 생성하기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 폴리머레이스를 포함하는, 키트.
- [1281] 129. 실시형태 124 내지 128 중 어느 하나에 있어서, 상기 WGLA는 시퀀싱 준비가 완료된 상태인, 키트.
- [1282] 130. 실시형태 1 내지 129 중 어느 하나에 있어서, 상기 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 프라이머 결합 부위를

포함하는, 키트.

- [1283] 131. 실시형태 1 내지 130 중 어느 하나에 있어서, 상기 꼬리 서열은 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함하는, 키트.
- [1284] 132. 실시형태 1 내지 131 중 어느 하나에 있어서, 상기 꼬리 서열은 파트너 올리고뉴클레오타이드에 혼성화하도록 구성되는, 키트.
- [1285] 133. 실시형태 1 내지 132 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 포획 프로브 모듈은 복수의 포획 프로브 모듈을 포함하는 포획 프로브 패널로부터 선택되는, 키트.
- [1286] 134. 실시형태 133에 있어서, 상기 적어도 하나의 포획 프로브 모듈은 특정 DNA 표적 영역의 하류에 혼성화하도록 구성되고, 적어도 하나의 포획 프로브 모듈은 상기 특정 DNA 표적 영역의 상류에 혼성화하도록 구성되는, 키트.
- [1287] 135. 실시형태 133 또는 실시형태 134에 있어서, 상기 복수의 포획 프로브 모듈의 각 포획 프로브는 임의의 다른 포획 프로브의 약 200bp 내에서 이의 표적 서열에 혼성화하도록 구성되는, 키트.
- [1288] 136. 실시형태 133 내지 135 중 어느 하나에 있어서, 상기 포획 프로브 패널의 각 포획 프로브 모듈은 어댑터-태깅된 DNA 단편에 혼성화하여 복수의 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는, 키트.
- [1289] 137. 실시형태 132 내지 136 중 어느 하나에 있어서, 상기 파트너 올리고뉴클레오타이드는 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 단리를 가능하게 하는 결합 쌍의 특정 구성원을 포함하는, 키트.
- [1290] 138. 실시형태 137에 있어서, 상기 파트너 올리고뉴클레오타이드는 바이오틴 분자를 포함하는, 키트.
- [1291] 139. 실시형태 1 내지 136 중 어느 하나에 있어서, 각 포획 프로브 모듈은 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 단리를 가능하게 하는 결합 쌍의 특정 구성원을 포함하는, 키트.
- [1292] 140. 실시형태 139에 있어서, 상기 포획 프로브 모듈은 바이오틴 분자를 포함하는, 키트.
- [1293] 141. 실시형태 1 내지 140 중 어느 하나에 있어서, 각 포획 프로브 모듈은 60개 미만의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함하는, 키트.
- [1294] 142. 실시형태 141에 있어서, 각 포획 프로브 모듈은 40개의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함하는, 키트.
- [1295] 143. 실시형태 136 내지 142 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 단리하기 위한 구성요소를 포함하는, 키트.
- [1296] 144. 실시형태 143에 있어서, 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 단리하기 위한 구성요소는 스트랩타비딘을 포함하는, 키트.
- [1297] 145. 실시형태 143 또는 실시형태 144에 있어서, 상기 단리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 효소적으로 처리하기 위한 하나 이상의 효소를 포함하는, 키트.
- [1298] 146. 실시형태 145에 있어서, 상기 하나 이상의 효소는 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편을 주형으로 사용하여 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 각 포획 프로브를 연장시켜 복수의 하이브리드 분자(표적 포획 라이브러리)를 생성하도록 구성된 5'-3' 폴리머레이스를 포함하되, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 모듈 및 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함하는, 키트.
- [1299] 147. 실시형태 146에 있어서, 상기 하이브리드 분자를 증폭시켜 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)를 생성하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하되, 상기 제1 변형된 라이브러리는 TCLA인, 키트.
- [1300] 148. 실시형태 147에 있어서, 상기 하이브리드 분자를 증폭시키기 위한 하나 이상의 시약은 플로우 셀에 결합할 수 있는 시퀀싱 어댑터를 포함하는 하나 이상의 프라이머를 포함하는, 키트.
- [1301] 149. 실시형태 148에 있어서, 상기 시퀀싱 어댑터는 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함하는, 키트.
- [1302] 150. 실시형태 147 내지 149 중 어느 하나에 있어서, 상기 하이브리드 분자를 증폭시키기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 폴리머레이스를 포함하는, 키트.
- [1303] 151. 실시형태 13 내지 150 중 어느 하나에 있어서, 상기 SRL은 시퀀싱 기계의 단일 플로우 셀에서 시퀀싱되도

록 구성되는, 키트.

- [1304] 152. 실시형태 13 내지 151 중 어느 하나에 있어서, 상기 SRL에 대한 정량적 유전자 분석을 수행하기 위한 구성요소를 포함하는, 키트.
- [1305] 153. 실시형태 152에 있어서, 상기 정량적 유전자 분석을 수행하기 위한 구성요소는 하나 이상의 시퀀싱 프라이머를 포함하는, 키트.
- [1306] 154. 실시형태 152 또는 실시형태 153에 있어서, 상기 정량적 유전자 분석은 뉴클레오타이드 전이 또는 전환, 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실, 게놈 재배열 또는 상기 테스트 샘플 DNA 단편에서의 카피 수의 변화를 검출하는 데 사용되는, 키트.
- [1307] 155. 실시형태 38 내지 154 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 프로브 품질 관리(QC) 프로세스를 통과한, 키트.
- [1308] 156. 실시형태 155에 있어서, 상기 프로브 QC 프로세스는,
- [1309] a. 어댑터 세트를 말단-복구된 DNA 단편을 포함하는 DNA 샘플에 결합시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계;
- [1310] b. 상기 LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계;
- [1311] c. 상기 LPA를 분할하거나 또는 희석하여 표적 포획 LPA(TC LPA) 및 전체-게놈 LPA(WG LPA)를 생성하는 단계;
- [1312] d. 상기 WG LPA를 증폭시켜 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA)를 생성하는 단계;
- [1313] e. 테스트할 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 상기 TC LPA에 혼성화하여 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계;
- [1314] f. 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 분리하여 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계;
- [1315] g. 상기 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 효소적으로 처리하여 하이브리드 분자를 생성하는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 모듈 및 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함함);
- [1316] h. 상기 하이브리드 분자를 증폭시켜 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)를 생성하는 단계;
- [1317] i. 상기 WGLA와 상기 TCLA를 합하여 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)를 형성하는 단계;
- [1318] j. 상기 SRL에 대해 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계
- [1319] 를 포함하는 포획 프로브 모듈에 대한 테스트를 포함하되;
- [1320] 상기 DNA 샘플은 복수의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)을 포함하고;
- [1321] 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 상기 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 상기 프로브 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 키트.
- [1322] 157. 실시형태 156에 있어서, 상기 TC LPA는 적어도 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $80 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이고, 상기 WG LPA는 적어도 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이고, 상기 TCLA는 적어도 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $80 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이고, 상기 WGLA는 적어도 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $80 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 인, 키트.
- [1323] 158. 실시형태 156 또는 실시형태 157에 있어서, 상기 미리 결정된 허용 기준은,
- [1324] a. 포획 프로브의 적어도 60% 내지 99.9%가 적어도 1개의 총 리드를 갖고;
- [1325] b. 포획 프로브의 적어도 60% 내지 99.9%가 적어도 10개 내지 적어도 200개의 표적 적중 총 리드를 갖고; 그리고
- [1326] c. DNA 샘플 내에서 예상되는 SNP의 적어도 60% 내지 99.9%가 검출되는
- [1327] 것 중 하나 이상을 포함하는, 키트.
- [1328] 159. 실시형태 155 내지 158 중 어느 하나에 있어서, 상기 프로브 QC 프로세스에 사용되는 상기 DNA 샘플을 포함하는, 키트.

- [1329] 160. 실시형태 155 내지 159 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 실시형태 220 내지 240 중 어느 하나의 방법에 따라 수행되는 프로브 QC 프로세스를 통과한, 키트.
- [1330] 161. 실시형태 1 내지 160 중 어느 하나에 있어서, 상기 테스트 샘플은 조직 생검으로부터 얻어지는, 키트.
- [1331] 162. 실시형태 161에 있어서, 상기 조직 생검은 종양인 것으로 의심되는 종양 또는 조직으로부터 얻어지는, 키트.
- [1332] 163. 실시형태 162에 있어서, 상기 조직 생검은 악성 종양 또는 악성 종양인 것으로 의심되는 종양으로부터 얻어지는, 키트.
- [1333] 164. 실시형태 1 내지 163 중 어느 하나에 있어서, 상기 테스트 샘플 DNA 단편은 무세포 DNA(cfDNA), 게놈 DNA(gDNA), 상보적 DNA(cDNA), 미토콘드리아 DNA, 메틸화된 DNA, 탈메틸화된 DNA 또는 이들의 조합을 포함하는, 키트.
- [1334] 165. 실시형태 1 내지 164 중 어느 하나에 있어서, 상기 테스트 샘플 DNA 단편은 후성유전적 표식을 포함하는, 키트.
- [1335] 166. 실시형태 1 내지 165 중 어느 하나에 있어서, 상기 테스트 샘플 DNA 단편은 전체 게놈 라이브러리, 앰플리콘 라이브러리, 전체 엑솜 라이브러리, cDNA 라이브러리 또는 메틸화된 DNA 라이브러리로 이루어진 목록으로부터 선택되는 라이브러리로부터 얻어지는, 키트.
- [1336] 167. 실시형태 1 내지 166 중 어느 하나에 있어서, 상기 테스트 샘플은 양수 샘플, 혈액 샘플, 피부 샘플, 모발 샘플, 모낭 샘플, 타액 샘플, 점액 샘플, 땀 샘플, 눈물 샘플, 상피 조직 샘플, 소변 샘플, 정액 샘플, 정액 혈장 샘플, 혈청 샘플, 전립선액 샘플, 사정전 유체(쿠퍼액) 샘플, 안구액 샘플, 배설물 샘플, 생검 샘플, 복수 샘플, 뇌척수액 샘플, 림프 샘플, 조직 추출물 샘플, 대변 샘플 및 포르말린-고정, 파라핀 포매(FFPE) 샘플로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 샘플로부터 얻어지는, 키트.
- [1337] 168. 실시형태 1 내지 167 중 어느 하나에 있어서, 상기 테스트 샘플의 DNA 단편은 어댑터에 결합되기 전 말단 복구되는, 키트.
- [1338] 169. 실시형태 168에 있어서, 말단 복구를 수행하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는, 키트.
- [1339] 170. 실시형태 169에 있어서, 상기 말단 복구를 수행하기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 폴리머레이스, 카이네이스 및 클레노브 단편으로부터 선택되는 하나 이상의 효소를 포함하는, 키트.
- [1340] 171. 실시형태 170에 있어서, 상기 말단 복구를 수행하기 위한 하나 이상의 시약은 DNA 폴리머레이스 I, T4 DNA 폴리머레이스, T4 폴리뉴클레오타이드 카이네이스 및 클레노브 단편을 포함하는, 키트.
- [1341] 172. 실시형태 169 내지 171 중 어느 하나에 있어서, 상기 말단 복구를 수행하기 위한 하나 이상의 시약은 말단 복구 완충액을 포함하는, 키트.
- [1342] 173. 실시형태 172에 있어서, 상기 말단 복구 완충액은 MgCl₂, NaCl, Tris-HCL, DTT, KCL 및 dNTP를 포함하는, 키트.
- [1343] 174. 어댑터 세트에 대해 어댑터 품질 관리(QC) 프로세스를 수행하기 위한 방법으로서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함하는, 방법.
- [1344] 175. 실시형태 174에 있어서, 상기 어댑터 QC 프로세스는 어댑터 결합에 대한 테스트를 포함하되, 상기 어댑터 결합에 대한 테스트는,
- [1345] a. 상기 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결합시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계; 및
- [1346] b. 상기 LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계
- [1347] 를 포함하고;
- [1348] 상기 어댑터 세트는 상기 LPA의 농도가 미리 결정된 농도보다 높을 때 상기 어댑터 결합에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주되는, 방법.
- [1349] 176. 실시형태 175에 있어서, 상기 말단-복구된 DNA 단편의 미리 결정된 양은 약 5ng 내지 약 50ng이고, 상기

LPA의 미리 결정된 농도는 약 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 약 $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 인, 방법.

- [1350] 177. 실시형태 175 또는 실시형태 176에 있어서, 상기 어댑터 세트는 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트를 통과하였을 때 상기 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 방법.
- [1351] 178. 실시형태 174 내지 177 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 QC 프로세스는,
- [1352] a. 상기 어댑터 세트를 미리 결정된 양의 말단-복구된 DNA 단편에 결찰시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계;
- [1353] b. 인덱스 서열을 포함하는 적어도 하나의 프라이머를 사용하여 상기 LIBS를 증폭시켜 인덱스 증폭 후 라이브러리(LPIA)를 생성하는 단계; 및
- [1354] c. 상기 LPIA에 대한 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계
- [1355] 를 포함하는 어댑터 분포에 대한 테스트를 포함하되;
- [1356] 상기 어댑터 세트는 상기 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 상기 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과한 것으로 간주되는, 방법.
- [1357] 179. 실시형태 178에 있어서, 상기 미리 결정된 허용 기준은,
- [1358] a. 바코드 혼선은 리드의 0.05% 내지 5% 이하로 존재하고;
- [1359] b. 미지의 어댑터는 리드의 1% 내지 50% 이하로 존재하고;
- [1360] c. 고유한 어댑터 서열의 10% 내지 80% 이하는 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 0% 내지 50%인 리드 수를 갖고;
- [1361] d. 모든 고유한 어댑터 서열의 적어도 60% 내지 99.9%가 존재하고;
- [1362] e. 고유한 어댑터 서열의 5% 내지 50% 이하는 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 2배보다 큰 리드를 갖는
- [1363] 것 중 하나 이상을 포함하는, 키트.
- [1364] 180. 실시형태 178 또는 실시형태 179에 있어서, 상기 어댑터 세트는 상기 어댑터 분포에 대한 테스트를 통과하였을 때 상기 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 방법.
- [1365] 181. 실시형태 175 내지 180 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트는 상기 어댑터 결찰에 대한 테스트 및 상기 어댑터 분포에 대한 테스트를 모두 통과하였을 때 상기 어댑터 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 방법.
- [1366] 182. 실시형태 174 내지 181 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터는 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.
- [1367] 183. 실시형태 182에 있어서, 상기 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 상기 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있는 영역에 혼성화하여 이와 이중체를 형성할 수 있는, 방법.
- [1368] 184. 실시형태 182 또는 실시형태 183에 있어서, 상기 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 어댑터 모듈을 포함하는, 방법.
- [1369] 185. 실시형태 182 내지 184 중 어느 하나에 있어서, 상기 결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 dT, dA, dC 또는 dG 오버행을 포함하는, 방법.
- [1370] 186. 실시형태 182 내지 186 중 어느 하나에 있어서, 상기 비결찰 가닥 올리고뉴클레오타이드는 dsDNA 단편의 5' 말단에 대한 결찰 및/또는 어댑터 이량체 형성을 방지하는 3' 말단의 변형을 포함하되, 상기 비결찰 가닥은 이중체로부터 치환되도록 구성되는, 방법.
- [1371] 187. 실시형태 174 내지 186 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터는 고유한 ID 영역의 풀로부터 선택되는 ID 영역을 포함하되, 상기 풀은 복수의 풀로부터 선택되고, 상기 선택된 풀은 테스트 샘플에 고유한, 방법.
- [1372] 188. 실시형태 174 내지 187 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 모듈은,

- [1373] a. 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역;
- [1374] b. ID 영역; 및
- [1375] c. 앵커 영역
- [1376] 을 포함하는, 방법.
- [1377] 189. 실시형태 188에 있어서, 상기 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하되, 상기 프라이머 결합 부위는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 등온 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 복제) 또는 LCR(라이게이스 연쇄 반응)을 사용한 증폭을 가능하게 하는, 방법.
- [1378] 190. 실시형태 188 또는 실시형태 189에 있어서, 상기 증폭 영역은 약 10개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1379] 191. 실시형태 190에 있어서, 상기 증폭 영역은 약 20개 내지 약 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1380] 192. 실시형태 191에 있어서, 상기 증폭 영역은 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1381] 193. 실시형태 188 내지 192 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵커 영역은 3' 말단에 오버행을 포함하는, 방법.
- [1382] 194. 실시형태 188 내지 193 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵커 영역은 약 1개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1383] 195. 실시형태 194에 있어서, 상기 앵커 영역은 약 5개 내지 약 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1384] 196. 실시형태 195에 있어서, 상기 앵커 영역은 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1385] 197. 실시형태 188 내지 196 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역은 약 3개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1386] 198. 실시형태 197에 있어서, 상기 ID 영역은 약 3개 내지 약 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1387] 199. 실시형태 198에 있어서, 상기 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1388] 200. 실시형태 188 내지 199 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 모듈은 고유한 분자 식별자(UMI) 멀티플라이어를 추가로 포함하는, 방법.
- [1389] 201. 실시형태 200에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 상기 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함되는, 방법.
- [1390] 202. 실시형태 200 또는 실시형태 201에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 약 1개 내지 약 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1391] 203. 실시형태 202에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 64개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [1392] 204. 실시형태 187 내지 203 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 약 2개 내지 약 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 방법.
- [1393] 205. 실시형태 204에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 약 10개 내지 약 500개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 방법.
- [1394] 206. 실시형태 205에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 약 50개 내지 약 300개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 방법.
- [1395] 207. 실시형태 206에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 방법.
- [1396] 208. 실시형태 187 내지 207 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길

이인, 방법.

- [1397] 209. 실시형태 188 내지 208 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있는, 방법.
- [1398] 210. 실시형태 188 내지 209 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 ID 영역은 이에 부착된 DNA 단편을 식별하도록 구성되는, 방법.
- [1399] 211. 실시형태 174 내지 210 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 약 64개 내지 약 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [1400] 212. 실시형태 211에 있어서, 상기 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 고유한 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 각 서열은 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있는, 방법.
- [1401] 213. 실시형태 188 내지 212 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이루는, 방법.
- [1402] 214. 실시형태 188 내지 213 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함하는, 방법.
- [1403] 215. 실시형태 214에 있어서,
- [1404] 상기 ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이고, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고;
- [1405] 상기 어댑터 세트의 각 어댑터는 상기 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 주어진 서열의 상기 UMI 멀티플라이어는 주어진 서열의 하나의 ID 영역과 쌍을 이루고;
- [1406] 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이루는, 방법.
- [1407] 216. 실시형태 182 내지 215 중 어느 하나에 있어서,
- [1408] a. 상기 어댑터 세트를 테스트 샘플의 DNA 단편과 결합시켜 복수의 어댑터/DNA 단편 복합체를 생성하는 단계; 및
- [1409] b. 상기 복수의 어댑터/DNA 단편 복합체를 하나 이상의 효소와 접촉시켜 복수의 어댑터-태깅된 DNA 단편을 포함하는 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 형성하는 단계
- [1410] 를 포함하는, 방법.
- [1411] 217. 실시형태 216에 있어서, 상기 각 어댑터/DNA 단편 복합체는 상기 DNA 단편의 각 말단에 결합된 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.
- [1412] 218. 실시형태 216 또는 실시형태 217에 있어서, 상기 비결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 b 단계에서 상기 어댑터/DNA 단편 복합체로부터 치환되는, 방법.
- [1413] 219. 실시형태 174 내지 218 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트는 실시형태 1 내지 173 중 어느 하나의 키트로부터 선택되는, 방법.
- [1414] 220. 하나 이상의 포획 프로브 모듈에 대해 프로브 품질 관리(QC) 프로세스를 수행하는 방법으로서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하는, 방법.
- [1415] 221. 실시형태 220에 있어서, 상기 프로브 QC 프로세스는,
- [1416] a. 어댑터 세트를 말단-복구된 DNA 단편을 포함하는 DNA 샘플에 결합시켜 어댑터-태깅된 DNA 단편의 라이브러리(LIBS)를 생성하는 단계;
- [1417] b. 상기 LIBS를 증폭시켜 증폭 후 라이브러리(LPA)를 생성하는 단계;

- [1418] c. 상기 LPA를 분할하거나 또는 희석하여 표적 포획 LPA(TC LPA) 및 전체-게놈 LPA(WG LPA)를 생성하는 단계;
- [1419] d. 상기 WG LPA를 증폭시켜 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA)를 생성하는 단계;
- [1420] e. 테스트할 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 상기 TC LPA에 혼성화하여 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계;
- [1421] f. 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 분리하여 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는 단계;
- [1422] g. 상기 분리된 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 효소적으로 처리하여 하이브리드 분자를 생성하는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 모듈 및 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함함);
- [1423] h. 상기 하이브리드 분자를 증폭시켜 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)를 생성하는 단계;
- [1424] i. 상기 WGLA와 상기 TCLA를 합하여 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)를 형성하는 단계;
- [1425] j. 상기 SRL에 대해 정량적 유전자 분석을 수행하는 단계
- [1426] 를 포함하는 포획 프로브 모듈에 대한 테스트를 포함하되;
- [1427] 상기 DNA 샘플은 복수의 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)을 포함하고;
- [1428] 상기 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 상기 정량적 유전자 분석을 위해 하나 이상의 미리 결정된 허용 기준이 충족될 때 상기 프로브 QC 프로세스를 통과한 것으로 간주되는, 방법.
- [1429] 222. 실시형태 221에 있어서, 상기 TC LPA는 적어도 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $80 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이고, 상기 WG LPA는 적어도 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이고, 상기 TCLA는 적어도 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $80 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이고, 상기 WGLA는 적어도 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 내지 적어도 $80 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 인, 방법.
- [1430] 223. 실시형태 221 또는 실시형태 222에 있어서, 상기 미리 결정된 허용 기준은,
- [1431] a. 포획 프로브의 적어도 60% 내지 99.9%가 적어도 1개의 총 리드를 갖고;
- [1432] b. 포획 프로브의 적어도 60% 내지 99.9%가 적어도 10개 내지 적어도 200개의 표적 적중 총 리드를 갖고; 그리고
- [1433] c. 상기 DNA 샘플 내에서 예상되는 SNP의 적어도 60% 내지 99.9%가 검출되는
- [1434] 것 중 하나 이상을 포함하는, 방법.
- [1435] 224. 실시형태 220 내지 223 중 어느 하나에 있어서, 상기 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 프라이머 결합 부위를 포함하는, 방법.
- [1436] 225. 실시형태 220 내지 224 중 어느 하나에 있어서, 상기 꼬리 서열은 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함하는, 방법.
- [1437] 226. 실시형태 220 내지 225 중 어느 하나에 있어서, 상기 꼬리 서열은 파트너 올리고뉴클레오타이드에 혼성화하도록 구성되는, 방법.
- [1438] 227. 실시형태 220 내지 226 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 포획 프로브 모듈은 복수의 포획 프로브 모듈을 포함하는 포획 프로브 패널로부터 선택되는, 방법.
- [1439] 228. 실시형태 227에 있어서, 상기 적어도 하나의 포획 프로브 모듈은 특정 DNA 표적 영역의 하류에 혼성화하도록 구성되고, 적어도 하나의 포획 프로브 모듈은 상기 특정 DNA 표적 영역의 상류에 혼성화하도록 구성되는, 방법.
- [1440] 229. 실시형태 227 또는 실시형태 228에 있어서, 상기 복수의 포획 프로브 모듈의 각 포획 프로브는 임의의 다른 포획 프로브의 약 200bp 내에서 이의 표적 서열에 혼성화하도록 구성되는, 방법.
- [1441] 230. 실시형태 227 내지 229 중 어느 하나에 있어서, 상기 포획 프로브 패널의 각 포획 프로브 모듈은 어댑터-태깅된 DNA 단편에 혼성화하여 복수의 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체를 형성하는, 방법.
- [1442] 231. 실시형태 226 내지 230 중 어느 하나에 있어서, 상기 파트너 올리고뉴클레오타이드는 상기 어댑터-태깅된

DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 단리를 가능하게 하는 결합 쌍의 특정 구성원을 포함하는, 방법.

- [1443] 232. 실시형태 231에 있어서, 상기 파트너 올리고뉴클레오타이드는 바이오틴 분자를 포함하는, 방법.
- [1444] 233. 실시형태 220 내지 232 중 어느 하나에 있어서, 각 포획 프로브 모듈은 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 단리를 가능하게 하는 결합 쌍의 특정 구성원을 포함하는, 방법.
- [1445] 234. 실시형태 233에 있어서, 상기 포획 프로브 모듈은 바이오틴 분자를 포함하는, 방법.
- [1446] 235. 실시형태 220 내지 234 중 어느 하나에 있어서, 각 포획 프로브 모듈은 60개 미만의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함하는, 방법.
- [1447] 236. 실시형태 235에 있어서, 각 포획 프로브 모듈은 40개의 뉴클레오타이드 길이인 포획 프로브를 포함하는, 방법.
- [1448] 237. 실시형태 231 내지 236 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합 쌍은 스트렙타비딘을 포함하는, 방법.
- [1449] 238. 실시형태 221 내지 237 중 어느 하나에 있어서, (g) 단계는 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편을 주형으로 사용하여 상기 어댑터-태깅된 DNA 단편-포획 프로브 모듈 복합체의 각 포획 프로브의 5'-3' 연장을 수행하여 복수의 하이브리드 분자(표적 포획 라이브러리)를 생성하는 것을 포함하되, 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 모듈 및 어댑터-태깅된 DNA 단편의 상보체를 포함하는, 방법.
- [1450] 239. 실시형태 221 내지 238 중 어느 하나에 있어서, 상기 (j) 단계는 시퀀싱 기계의 단일 플로우 셀에서 상기 SRL에 대한 시퀀싱을 포함하는, 방법.
- [1451] 240. 실시형태 221 내지 239 중 어느 하나에 있어서, 상기 정량적 유전자 분석은 뉴클레오타이드 전이 또는 전환, 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실, 게놈 재배열 또는 상기 테스트 샘플 DNA 단편에서의 카피 수의 변화를 검출하는 데 사용되는, 방법.
- [1452] 241. 동시 DNA 분석을 위한 방법으로서,
- [1453] (a) 제1 유전자좌를 포함하는 제1 어댑터-태깅된 라이브러리에 제1 프로세스를 수행하여 제1 변형된 라이브러리를 생성하는 단계;
- [1454] (b) 제2 유전자좌를 포함하는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리에 제2 프로세스를 수행하여 제2 변형된 라이브러리를 생성하는 단계;
- [1455] (여기서, 상기 제1 프로세스 및 상기 제2 프로세스는 동일하지 않음); 및
- [1456] (c) 상기 제1 변형된 라이브러리와 상기 제2 변형된 라이브러리를 접촉시켜 조합된 라이브러리를 생성하는 단계;
- [1457] (여기서, 상기 제1 어댑터-태깅된 라이브러리 및 상기 제2 어댑터-태깅된 라이브러리는 상기 동일한 어댑터-태깅된 모 라이브러리로부터 유래함)
- [1458] 를 포함하는, 방법.
- [1459] 242. 실시형태 241에 있어서, 방법은 상기 어댑터-태깅된 모 라이브러리를 적어도 2개의 구획으로 분할하는 초기 단계를 더 포함하되, 제1 구획은 상기 제1 어댑터-태깅된 라이브러리이고, 제2 구획은 상기 제2 어댑터-태깅된 라이브러리인, 방법.
- [1460] 243. 실시형태 241 또는 실시형태 242에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리는,
- [1461] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는
- [1462] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는
- [1463] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자를 포함하되;
- [1464] 상기 제1 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고;

- [1465] 제1 테스트 샘플은 상기 제1 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 그리고
- [1466] 상기 제1 5' 어댑터 모듈, 상기 제1 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 상기 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 상기 제1 유전자좌에 커플링되고;
- [1467] 상기 제2 변형된 라이브러리는,
- [1468] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는
- [1469] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는
- [1470] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자를 포함하되;
- [1471] 상기 제2 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고;
- [1472] 제2 테스트 샘플은 상기 제2 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 그리고
- [1473] 상기 제2 5' 어댑터 모듈, 상기 제2 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 상기 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 상기 제2 유전자좌에 커플링되고;
- [1474] 상기 제1 변형된 라이브러리 또는 상기 제2 변형된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함하거나, 또는
- [1475] 상기 제1 변형된 라이브러리는 제1 라이브러리 태그를 포함하고, 상기 제2 변형된 라이브러리는 제2 라이브러리 태그를 포함하되, 상기 제1 및 제2 라이브러리 태그는 동일하지 않은, 방법.
- [1476] 244. 실시형태 243에 있어서, 상기 제1 테스트 샘플 및 상기 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플인, 방법.
- [1477] 245. 실시형태 243에 있어서, 상기 제1 테스트 샘플 및 상기 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플이 아닌, 방법.
- [1478] 246. 실시형태 243 내지 245 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 유전자좌 및 상기 제2 유전자좌는 동일한, 방법.
- [1479] 247. 실시형태 243 내지 245 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 유전자좌 및 상기 제2 유전자좌 동일하지 않은, 방법.
- [1480] 248. 실시형태 243 내지 247 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 상기 제1 변형된 라이브러리의 제1 DNA 서열을 상기 제2 변형된 라이브러리의 제2 DNA 서열과 구별하는, 방법.
- [1481] 249. 실시형태 243 내지 248 중 어느 하나에 있어서, A1, A2, B1 및 B2 중 적어도 하나는 적어도 하나의 라이브러리 태그를 포함하는, 방법.
- [1482] 250. 실시형태 243 내지 249 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.
- [1483] 251. 실시형태 243 내지 250 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 DNA, RNA, PNA 또는 비자연 발생적 핵산, 합성 핵산, 변형된 핵산, 비자연 발생적 아미노산, 합성 아미노산 및 변형된 아미노산 중 하나 이상을 포함하는, 방법.
- [1484] 252. 실시형태 243 내지 251 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 검출 가능한 표지를 포함하는, 방법.
- [1485] 253. 실시형태 252에 있어서, 상기 검출 가능한 표지는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함하는, 방법.
- [1486] 254. 실시형태 243 내지 253 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 검출 가능한 모이어티에 선택적으로 또는 특이적으로 결합하는, 방법.
- [1487] 255. 실시형태 254에 있어서, 상기 검출 가능한 모이어티는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

- [1488] 256. 실시형태 243 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.
- [1489] 257. 실시형태 256에 있어서, 상기 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로부터 선택되는 서열과 70% 이하의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 방법.
- [1490] 258. 실시형태 243 내지 257 중 어느 하나에 있어서,
- [1491] 상기 제1 테스트 샘플 및 상기 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플이 아니고;
- [1492] A1, A2, B1 또는 B2는 라이브러리 태그를 포함하고;
- [1493] 상기 라이브러리 태그는 상기 제1 변형된 라이브러리의 제1 DNA 서열을 상기 제2 변형된 라이브러리의 제2 DNA 서열과 구별할 수 있고;
- [1494] 상기 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 그리고
- [1495] 상기 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로부터 선택되는 서열과 70% 이하의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 방법.
- [1496] 259. 실시형태 241 내지 258 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 어댑터-태깅된 라이브러리 및 상기 제2 어댑터-태깅된 라이브러리는 각각 어댑터 모듈을 포함하는, 방법.
- [1497] 260. 실시형태 241 내지 259 중 어느 하나에 있어서, 각 어댑터는 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드 및 비결합 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 방법.
- [1498] 261. 실시형태 260에 있어서, 상기 비결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 상기 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있는 영역에 혼성화하여 이와 이중체를 형성할 수 있는, 방법.
- [1499] 262. 실시형태 260 또는 실시형태 261에 있어서, 상기 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 어댑터 모듈을 포함하는, 방법.
- [1500] 263. 실시형태 260 내지 262 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단에 dT, dA, dC 또는 dG 오버행을 포함하는, 방법.
- [1501] 264. 실시형태 260 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 상기 비결합 가닥 올리고뉴클레오타이드는 dsDNA 단편의 5' 말단에 대한 결합 및/또는 어댑터 이량체 형성을 방지하는 3' 말단의 변형을 포함하되, 상기 비결합 가닥은 이중체로부터 치환되도록 구성되는, 방법.
- [1502] 265. 실시형태 241 내지 264 중 어느 하나에 있어서, 각 어댑터는 어댑터 세트로부터 선택되되, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터는 고유한 ID 영역의 풀로부터 선택되는 ID 영역을 포함하되, 상기 풀은 복수의 풀로부터 선택되고, 상기 선택된 풀은 테스트 샘플에 고유한, 방법.
- [1503] 266. 실시형태 241 내지 265 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 어댑터 모듈은,
- [1504] a. 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역;
- [1505] b. ID 영역; 및
- [1506] c. 앵커 영역
- [1507] 을 포함하는, 방법.
- [1508] 267. 실시형태 266에 있어서, 상기 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하되, 상기 프라이머 결합 부위는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 등온 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 복제) 또는 LCR(라이게이스 연쇄 반응)을 사용한 증폭을 가능하게 하는, 방법.
- [1509] 268. 실시형태 241 내지 265 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 어댑터 모듈은,
- [1510] a. 프라이머 결합 부위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 증폭 영역;
- [1511] b. ID 영역; 및

- [1512] c. 앵커 영역
- [1513] 을 포함하는, 방법.
- [1514] 269. 실시형태 268에 있어서, 상기 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 프라이머 결합 부위는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 복제) 또는 LCR(라이게이스 연쇄 반응)을 사용한 상기 제1 및/또는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 핵산의 증폭을 가능하게 하는, 방법.
- [1515] 270. 실시형태 266 내지 269 중 어느 하나에 있어서, 상기 증폭 영역은 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1516] 271. 실시형태 270에 있어서, 상기 증폭 영역은 20개 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1517] 272. 실시형태 271에 있어서, 상기 증폭 영역은 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1518] 273. 실시형태 266 내지 272 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵커 영역은 3' 말단에 오버행을 포함하는, 방법.
- [1519] 274. 실시형태 266 내지 273 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵커 영역은 1개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1520] 275. 실시형태 274에 있어서, 상기 앵커 영역은 5개 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1521] 276. 실시형태 275에 있어서, 상기 앵커 영역은 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1522] 277. 실시형태 266 내지 276 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역은 3개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1523] 278. 실시형태 277에 있어서, 상기 ID 영역은 3개 내지 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1524] 279. 실시형태 278에 있어서, 상기 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1525] 280. 실시형태 266 내지 279 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 어댑터 모듈은 고유한 분자 식별자(UMI) 멀티플라이어를 추가로 포함하는, 방법.
- [1526] 281. 실시형태 280에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 상기 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함되는, 방법.
- [1527] 282. 실시형태 280 또는 실시형태 281에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 1개 내지 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1528] 283. 실시형태 282에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 64개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 방법.
- [1529] 284. 실시형태 265 내지 283 중 어느 하나에 있어서, 복수의 어댑터 모듈은 상기 어댑터 모듈을 포함하는, 방법.
- [1530] 285. 실시형태 284에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 고유한, 방법.
- [1531] 286. 실시형태 284 내지 285 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 증폭 영역은 맞춤형 프라이머 결합 부위를 포함하는, 방법.
- [1532] 287. 실시형태 286에 있어서, 상기 맞춤형 프라이머 결합 부위는 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 맞춤형 프라이머 결합 부위의 서열과 100% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 방법.
- [1533] 288. 실시형태 284 내지 287 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈은 제1 하위부분 및 제2 하위부분을 포함하는, 방법.

- [1534] 289. 실시형태 288에 있어서, 각 어댑터 모듈은 임의의 다른 어댑터 모듈의 상기 ID 영역의 폴리뉴클레오타이드 서열과 구별되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 ID 영역을 포함하는, 방법.
- [1535] 290. 실시형태 289에 있어서, 상기 제1 하위부분은 고유한 ID 영역의 제1 세트를 포함하고, 상기 제2 하위부분은 고유한 ID 영역의 제2 세트를 포함하는, 방법.
- [1536] 291. 실시형태 288 내지 290 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 어댑터 모듈은 상기 ID 영역의 폴리뉴클레오타이드 서열과 동일하지 않은 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 추가로 포함하는, 방법.
- [1537] 292. 실시형태 291에 있어서, 상기 제1 하위부분의 각 어댑터 모듈은 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 포함하되; 상기 제2 하위부분의 각 어댑터 모듈은 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 포함하고; 상기 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 서열은 서로 동일하지 않은, 방법.
- [1538] 293. 실시형태 288 내지 292 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 모듈의 제1 하위부분은 상기 제1 테스트 샘플 내의 각 DNA 분자를 식별하고, 상기 어댑터 모듈의 제2 하위부분은 상기 제2 테스트 샘플 내의 각 DNA 분자를 식별하는, 방법.
- [1539] 294. 실시형태 284 내지 293 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 2개 내지 10,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [1540] 295. 실시형태 294에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 50개 내지 500개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [1541] 296. 실시형태 295에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 100개 내지 400개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [1542] 297. 실시형태 296에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 60개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [1543] 298. 실시형태 284 내지 297 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역 8개의 뉴클레오타이드 길이인, 방법.
- [1544] 299. 실시형태 284 내지 298 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 64개 내지 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [1545] 300. 실시형태 299에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 중 하나를 포함하고, 각 뉴클레오타이드 서열은 상기 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있는, 방법.
- [1546] 301. 실시형태 284 내지 300 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 앵커 영역은 4개의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [1547] 302. 실시형태 301에 있어서,
- [1548] 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 증폭 영역은 범용 프라이머 서열을 포함하고;
- [1549] 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지고;
- [1550] 상기 복수의 어댑터 모듈은 2개 이상의 하위부분으로 나누어지되, 어댑터 모듈의 상기 각 하위부분은 고유한 ID 영역의 세트를 포함하고, 각 ID 영역의 상기 폴리뉴클레오타이드 서열은 상기 복수의 어댑터 모듈의 임의의 다른 ID 영역의 뉴클레오타이드 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고;
- [1551] 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 상기 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 방법.
- [1552] 303. 실시형태 265 내지 283 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 2개 내지 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 방법.
- [1553] 304. 실시형태 303에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 방법.

- [1554] 305. 실시형태 265 내지 304 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이인, 방법.
- [1555] 306. 실시형태 265 내지 305 중 어느 하나에 있어서, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있는, 방법.
- [1556] 307. 실시형태 265 내지 306 중 어느 하나에 있어서, 각 ID 영역은 이에 부착된 DNA 단편을 식별하도록 구성되는, 방법.
- [1557] 308. 실시형태 265 내지 307 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 64개 내지 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [1558] 309. 실시형태 308에 있어서, 상기 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 고유한 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 각 서열은 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있는, 방법.
- [1559] 310. 실시형태 265 내지 309 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이루는, 방법.
- [1560] 311. 실시형태 265 내지 310 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함하는, 방법.
- [1561] 312. 실시형태 311에 있어서,
- [1562] 상기 ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이고, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고;
- [1563] 상기 어댑터 세트의 각 어댑터는 상기 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 주어진 서열의 상기 UMI 멀티플라이어는 주어진 서열의 하나의 ID 영역과 쌍을 이루는, 방법.
- [1564] 313. 실시형태 241 내지 312 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 프로세스는,
- [1565] (a) 혼성화에 적합한 조건하에서 상기 제1 어댑터-태깅된 라이브러리를 하나 이상의 포획 프로브와 접촉시켜 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 형성하는 단계(여기서, 각 포획 프로브는,
- [1566] 프라이머 결합 부위를 포함하는 제1 영역; 및
- [1567] 상기 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 제1 유전자와 내의 표적 영역에 혼성화할 수 있는 제2 영역을 포함함);
- [1568] (b)는 (a) 단계로부터 상기 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 분리하는 단계(여기서, 각 분리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체는 포획 프로브 및 어댑터-태깅된 DNA 분자를 포함함); 및
- [1569] (c) (b) 단계로부터 상기 하나 이상의 분리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 효소적으로 처리하여 하나 이상의 어댑터-태깅된 하이브리드 핵산 분자(하이브리드 분자)를 생성하는 단계(여기서, 각 하이브리드 분자는,
- [1570] (i) 상기 포획 프로브의 적어도 일부 또는 이의 상보체; 및
- [1571] (ii) 상기 어댑터-태깅된 DNA 분자의 적어도 일부 또는 이의 상보체를 포함함)
- [1572] 를 포함하는, 방법.
- [1573] 314. 실시형태 313에 있어서, 상기 포획 프로브의 제1 영역은 파트너 올리고뉴클레오타이드에 대한 상보성을 갖는 서열을 포함하는, 방법.
- [1574] 315. 실시형태 313 또는 실시형태 314에 있어서, (c) 단계의 상기 효소 처리는 상기 복합체 내의 어댑터-태깅된 DNA 분자를 주형으로 사용하여 상기 포획 프로브의 5'-3' DNA 폴리머레이스 연장을 수행하는 것을 포함하는, 방법.
- [1575] 316. 실시형태 313 내지 315 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 포획 프로브는 상기 표적 영역의 특정 영역의 하류에 혼성화하고, 적어도 하나의 포획 프로브는 상기 표적 영역의 특정 영역의 상류에 혼성화하는, 방법.

- [1576] 317. 실시형태 313 내지 316 중 어느 하나에 있어서, 상기 포획 프로브는 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함하는, 방법.
- [1577] 318. 실시형태 313 내지 317 중 어느 하나에 있어서, 상기 하이브리드 분자는 적어도 하나의 라이브러리 태그를 포함하는, 방법.
- [1578] 319. 실시형태 313 내지 318 중 어느 하나에 있어서, 상기 포획 프로브의 제1 영역은 라이브러리 태그를 포함하는, 방법.
- [1579] 320. 실시형태 318 또는 실시형태 319에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함하는, 방법.
- [1580] 321. 실시형태 318 내지 320 중 어느 하나에 있어서, (d) (c) 단계의 상기 하나 이상의 하이브리드 분자를 증폭시키는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [1581] 322. 실시형태 321에 있어서, 상기 증폭은 5'올리고뉴클레오타이드(A1)를 포함하는 제1 프라이머 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제2 프라이머를 포함하되, 상기 증폭된 하이브리드 분자(들) 각각은 A1 및 A2를 포함하는, 방법.
- [1582] 323. 실시형태 313 내지 322 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적 영역은 유전적 병변을 포함하는, 방법.
- [1583] 324. 실시형태 313 내지 323 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적 영역은 후성유전적 표식을 포함하는, 방법.
- [1584] 325. 실시형태 324에 있어서, 상기 포획 프로브는 후성유전적 표식에 결합하는, 방법.
- [1585] 326. 실시형태 325에 있어서, 상기 후성유전적 표식은 메틸화 표식을 포함하는, 방법.
- [1586] 327. 실시형태 313 내지 326 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 프로세스는,
- [1587] (a) 혼성화에 적합한 조건하에서 상기 제1 어댑터-태깅된 라이브러리를 하나 이상의 포획 프로브와 접촉시켜 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 형성하는 단계(여기서, 각 포획 프로브는,
- [1588] 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함하는 라이브러리 태그 및
- [1589] 파트너 올리고뉴클레오타이드에 대한 상보성을 갖는 서열을 포함하는 제1 영역; 및
- [1590] 상기 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 제1 유전자좌 내의 표적 영역에 혼성화할 수 있는 제2 영역을 포함함);
- [1591] (b)는 (a) 단계로부터 상기 하나 이상의 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 단리하는 단계(여기서, 각 단리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체는 포획 프로브 및 어댑터-태깅된 DNA 분자를 포함함);
- [1592] (c) (b) 단계로부터 상기 하나 이상의 단리된 포획 프로브/어댑터-태깅된 DNA 복합체를 효소적으로 처리하여 하나 이상의 어댑터-태깅된 하이브리드 핵산 분자(하이브리드 분자)를 생성하는 단계
- [1593] (여기서, 상기 효소 처리는 상기 복합체 내의 어댑터-태깅된 DNA 분자를 주형으로 사용하여 상기 포획 프로브의 5'-3' DNA 폴리머레이스 연장을 수행하는 것을 포함하고;
- [1594] 각 하이브리드 분자는 포획 프로브 및 상기 포획 프로브가 상기 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 표적 영역에 혼성화된 곳으로부터 3'에 있는 어댑터-태깅된 DNA 분자의 상보체를 포함함); 및
- [1595] (d) (c) 단계에서 상기 하나 이상의 하이브리드 분자를 증폭시키는 단계(여기서, 상기 증폭은 5'올리고뉴클레오타이드(A1)를 포함하는 제1 프라이머 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제2 프라이머를 하이브리드 분자에 혼성화하는 것을 포함하고, 상기 증폭된 하이브리드 분자(들) 각각은 A1 및 A2를 포함함)
- [1596] 를 포함하는, 방법.
- [1597] 328. 실시형태 241 내지 327 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 프로세스는 상기 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 제2 유전자좌를 증폭 또는 연장시키는 것을 포함하는, 방법.
- [1598] 329. 실시형태 328에 있어서, 상기 증폭 또는 연장은 5'올리고뉴클레오타이드(B1)를 포함하는 제1 프라이머 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 프라이머를 어댑터-태깅된 DNA 분자에 혼성화하는 것을 포함하되, 상기 증폭되거나 또는 연장된 제2 유전자좌는 B1 및 B2를 포함하는, 방법.
- [1599] 330. 실시형태 329에 있어서, B1 및 B2 중 적어도 하나는 라이브러리 태그를 포함하는, 방법.

- [1600] 331. 실시형태 241 내지 330 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 프로세스는 상기 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 제2 유전자좌를 증폭 또는 연장시키는 단계를 포함하되, 상기 증폭 또는 연장은 5'올리고뉴클레오타이드(B1)를 포함하는 제1 프라이머 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 프라이머를 어댑터-태깅된 DNA 분자에 혼성화하는 것을 포함하며, B1 및 B2 중 적어도 하나는 라이브러리 태그를 포함하고, 상기 증폭되거나 또는 연장된 제2 유전자좌는 B1 및 B2를 포함하는, 방법.
- [1601] 332. 실시형태 241 내지 331 중 어느 하나에 있어서, 유전자 분석 단계를 더 포함하는, 방법.
- [1602] 333. 실시형태 332에 있어서, 상기 유전자 분석은 적어도 하나의 변형된 라이브러리에서 적어도 하나의 라이브러리 태그의 존재를 검출하는 것을 포함하는, 방법.
- [1603] 334. 실시형태 333에 있어서, 상기 유전자 분석은 조합된 라이브러리를 시퀀싱하여 복수의 시퀀싱 리드를 생성하고, 상기 복수의 시퀀싱 리드에 대한 생물정보학 분석을 수행하는 것을 포함하는, 방법.
- [1604] 335. 실시형태 334에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리는 제1 라이브러리 태그를 포함하고, 상기 제2 변형된 라이브러리는 제2 라이브러리 태그를 포함하는, 방법.
- [1605] 336. 실시형태 335에 있어서, 상기 제1 라이브러리 태그는 제1 신호를 생성하고, 상기 제2 라이브러리 태그는 제2 신호를 생성하는, 방법.
- [1606] 337. 실시형태 336에 있어서, 상기 제1 및 제2 신호가 모두 검출되거나 또는 검출 가능한, 방법.
- [1607] 338. 실시형태 337에 있어서, 상기 제1 신호 및 상기 제2 신호는 동일하지 않은, 방법.
- [1608] 339. 실시형태 336에 있어서, 상기 제1 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 상기 제2 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않은, 방법.
- [1609] 340. 실시형태 336에 있어서, 상기 제2 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 상기 제1 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않은, 방법.
- [1610] 341. 실시형태 334에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리 및 상기 제2 변형된 라이브러리 중 하나만이 라이브러리 태그를 포함하는, 방법.
- [1611] 342. 실시형태 341에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 제1 신호를 생성하고, 상기 라이브러리 태그가 없으면 제2 신호를 생성하는, 방법.
- [1612] 343. 실시형태 342에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 신호가 모두 검출되거나 또는 검출 가능한, 방법.
- [1613] 344. 실시형태 343에 있어서, 상기 제1 신호 및 상기 제2 신호는 동일하지 않은, 방법.
- [1614] 345. 실시형태 341에 있어서, 상기 제1 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 상기 제2 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않은, 방법.
- [1615] 346. 실시형태 341에 있어서, 상기 제2 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 상기 제1 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않은, 방법.
- [1616] 347. 실시형태 341 내지 346 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 신호는 시퀀싱 리드이고, 상기 제2 신호는 빈 시퀀싱 리드인, 방법.
- [1617] 348. 실시형태 347에 있어서, 상기 제1 신호는 검출되거나 또는 검출 가능하고, 상기 제2 신호는 검출되지 않거나 또는 검출 가능하지 않은, 방법.
- [1618] 349. 실시형태 348에 있어서, 상기 제1 신호 및 상기 제2 신호가 모두 검출되거나 또는 검출 가능한, 방법.
- [1619] 350. 실시형태 349에 있어서, 상기 빈 시퀀싱 리드(제2 신호)는 일련의 2개 이상의 G 뉴클레오타이드로 검출되는, 방법.
- [1620] 351. 실시형태 336 내지 350 중 어느 하나에 있어서,
- [1621] 상기 검출된 제1 신호 및 상기 검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있거나; 또는
- [1622] 상기 검출된 제1 신호 및 상기 비검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있거나; 또는
- [1623] 상기 비검출된 제1 신호 및 상기 검출된 제2 신호는 서로 구별될 수 있는, 방법.

- [1624] 352. 실시형태 332 내지 351 중 어느 하나에 있어서, 상기 유전자 분석은 하나 이상의 유전적 병변을 식별하는 데 사용되는, 방법.
- [1625] 353. 실시형태 352에 있어서, 상기 하나 이상의 유전적 병변은 뉴클레오타이드 전이, 뉴클레오타이드 전환, 뉴클레오타이드 삽입, 뉴클레오타이드 결실, 게놈 재배열 또는 카피 수의 변화를 포함하는, 방법.
- [1626] 354. 실시형태 332 내지 353 중 어느 하나에 있어서, 상기 유전자 분석은 유전적 질환을 유발하거나 또는 이와 관련된 하나 이상의 유전적 병변을 검출하는 데 사용되는, 방법.
- [1627] 355. 실시형태 354에 있어서, 상기 유전적 질환은 암인, 방법.
- [1628] 356. 실시형태 355에 있어서, 상기 하나 이상의 유전적 병변은 염색체 재배열인, 방법.
- [1629] 357. 실시형태 332 내지 356 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리는 적어도 하나의 라이브러리 태그 또는 이의 일부의 식별에 의해 시퀀싱 후 역다중화되는, 방법.
- [1630] 358. 조성물로서,
- [1631] 제1 변형된 라이브러리 및 제2 변형된 라이브러리를 포함하되,
- [1632] 상기 제1 변형된 라이브러리는,
- [1633] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는
- [1634] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자; 또는
- [1635] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(A1), 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌의 서열, 제1 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(A2)를 포함하는 제1 DNA 분자를 포함하되;
- [1636] 상기 제1 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고;
- [1637] 제1 테스트 샘플은 상기 제1 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 그리고
- [1638] 상기 제1 5' 어댑터 모듈, 상기 제1 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 상기 제1 어댑터-태깅된 라이브러리의 제1 유전자좌에 커플링되고;
- [1639] 상기 제2 변형된 라이브러리는,
- [1640] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는
- [1641] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자; 또는
- [1642] 5'에서 3'로, 5' 올리고뉴클레오타이드(B1), 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌의 서열, 제2 3' 어댑터 모듈 및 3' 올리고뉴클레오타이드(B2)를 포함하는 제2 DNA 분자를 포함하되;
- [1643] 상기 제2 유전자좌는 DNA 영역을 포함하고;
- [1644] 제2 테스트 샘플은 상기 제2 유전자좌의 서열과 동일한 서열 또는 이의 상보적 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고; 그리고
- [1645] 상기 제2 5' 어댑터 모듈, 상기 제2 3' 어댑터 모듈 또는 둘 다는 상기 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 제2 유전자좌에 커플링되고;
- [1646] 상기 제1 변형된 라이브러리 또는 상기 제2 변형된 라이브러리는 라이브러리 태그를 포함하거나, 또는
- [1647] 상기 제1 변형된 라이브러리는 제1 라이브러리 태그를 포함하고, 상기 제2 변형된 라이브러리는 제2 라이브러리 태그를 포함하되, 상기 제1 및 제2 라이브러리 태그는 동일하지 않은, 조성물.
- [1648] 359. 실시형태 358에 있어서, 상기 제1 테스트 샘플 및 상기 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플인, 조성물.

- [1649] 360. 실시형태 358에 있어서, 상기 제1 테스트 샘플 및 상기 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플이 아닌, 조성물.
- [1650] 361. 실시형태 358 내지 360 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 유전자좌 및 상기 제2 유전자좌는 동일한, 조성물.
- [1651] 362. 실시형태 358 내지 360 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 유전자좌 및 상기 제2 유전자좌 동일하지 않은, 조성물.
- [1652] 363. 실시형태 358 내지 362 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 상기 제1 변형된 라이브러리의 제1 DNA 서열을 상기 제2 변형된 라이브러리의 제2 DNA 서열과 구별하는, 조성물.
- [1653] 364. 실시형태 358 내지 363 중 어느 하나에 있어서, A1, A2, B1 및 B2 중 적어도 하나는 적어도 하나의 라이브러리 태그를 포함하는, 조성물.
- [1654] 365. 실시형태 358 내지 364 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.
- [1655] 366. 실시형태 358 내지 365 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 DNA, RNA, PNA 또는 비자연 발생적 핵산, 합성 핵산, 변형된 핵산, 비자연 발생적 아미노산, 합성 아미노산 및 변형된 아미노산 중 하나 이상을 포함하는, 조성물.
- [1656] 367. 실시형태 358 내지 366 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 검출 가능한 표지를 포함하는, 조성물.
- [1657] 368. 실시형태 367에 있어서, 상기 검출 가능한 표지는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함하는, 조성물.
- [1658] 369. 실시형태 358 내지 368 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 검출 가능한 모이어티에 선택적으로 또는 특이적으로 결합하는, 조성물.
- [1659] 370. 실시형태 369에 있어서, 상기 검출 가능한 모이어티는 형광 모이어티, 자성 또는 상자성 모이어티, 효소 모이어티, 결합 모이어티, 에피토프 및 방사성 모이어티 중 하나 이상을 포함하는, 조성물.
- [1660] 371. 실시형태 358 내지 370 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.
- [1661] 372. 실시형태 371에 있어서, 상기 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로부터 선택되는 서열과 70% 이하의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 조성물.
- [1662] 373. 실시형태 358에 있어서,
- [1663] 상기 제1 테스트 샘플 및 상기 제2 테스트 샘플은 동일한 샘플이 아니고;
- [1664] A1, A2, B1 또는 B2는 라이브러리 태그를 포함하고;
- [1665] 상기 라이브러리 태그는 상기 제1 변형된 라이브러리의 제1 DNA 서열을 상기 제2 변형된 라이브러리의 제2 DNA 서열과 구별할 수 있고;
- [1666] 상기 라이브러리 태그는 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 그리고
- [1667] 상기 고유한 폴리뉴클레오타이드 서열은 A1, B1, A2, B2, 제1 5' 어댑터 모듈, 제1 유전자좌, 제1 3' 어댑터 모듈, 제2 5' 어댑터 모듈, 제2 유전자좌 및 제2 3' 어댑터 모듈로 이루어진 목록으로부터 선택되는 서열과 70% 이하의 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 조성물.
- [1668] 374. 실시형태 358 내지 373 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 어댑터 모듈은 어댑터 모듈 세트로부터 선택되되, 상기 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 고유한 ID 영역의 풀로부터 선택되는 ID 영역을 포함하고, 상기 풀은 복수의 풀로부터 선택되고, 상기 선택된 풀은 테스트 샘플에 고유한, 조성물.
- [1669] 375. 실시형태 358 내지 374 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 어댑터 모듈은,
- [1670] a. 프라이머 결합 부위를 포함하는 증폭 영역;

- [1671] b. ID 영역; 및
- [1672] c. 앵커 영역
- [1673] 을 포함하는, 조성물.
- [1674] 376. 실시형태 375에 있어서, 상기 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하되, 상기 프라이머 결합 부위는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 복제) 또는 LCR(라이게이스 연쇄 반응)을 사용한 증폭을 가능하게 하는, 조성물.
- [1675] 377. 실시형태 358 내지 374 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 어댑터 모듈은,
- [1676] a. 프라이머 결합 부위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 증폭 영역;
- [1677] b. ID 영역; 및
- [1678] c. 앵커 영역
- [1679] 을 포함하는, 조성물.
- [1680] 378. 실시형태 377에 있어서, 상기 증폭 영역은 프라이머 결합 부위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 프라이머 결합 부위는 PCR(중합효소 연쇄 반응), LAMP(루프-매개 증폭), NASBA(핵산 서열-기반 증폭), SDA(가닥 치환 증폭), RCA(롤링 서클 복제) 또는 LCR(라이게이스 연쇄 반응)을 사용한 상기 제1 및/또는 제2 어댑터-태깅된 라이브러리의 핵산의 증폭을 가능하게 하는, 조성물.
- [1681] 379. 실시형태 377 내지 378 중 어느 하나에 있어서, 상기 증폭 영역은 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1682] 380. 실시형태 379에 있어서, 상기 증폭 영역은 20개 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1683] 381. 실시형태 380에 있어서, 상기 증폭 영역은 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1684] 382. 실시형태 377 내지 381 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵커 영역은 3' 말단에 오버행을 포함하는, 조성물.
- [1685] 383. 실시형태 377 내지 382 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵커 영역은 1개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1686] 384. 실시형태 383에 있어서, 상기 앵커 영역은 5개 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1687] 385. 실시형태 384에 있어서, 상기 앵커 영역은 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1688] 386. 실시형태 377 내지 385 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역은 3개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1689] 387. 실시형태 386에 있어서, 상기 ID 영역은 3개 내지 15개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1690] 388. 실시형태 387에 있어서, 상기 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1691] 389. 실시형태 377 내지 388 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 모듈은 고유한 분자 식별자(UMI) 멀티플라이어를 추가로 포함하는, 조성물.
- [1692] 390. 실시형태 389에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 상기 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함되는, 조성물.
- [1693] 391. 실시형태 389 또는 실시형태 390에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 1개 내지 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1694] 392. 실시형태 391에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 64개의 고유한 뉴클레

오타이드 서열의 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 조성물.

- [1695] 393. 실시형태 377 내지 392 중 어느 하나에 있어서, 복수의 어댑터 모듈은 상기 어댑터 모듈을 포함하는, 조성물.
- [1696] 394. 실시형태 393에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 고유한, 조성물.
- [1697] 395. 실시형태 393 내지 394 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 증폭 영역은 맞춤형 프라이머 결합 부위를 포함하는, 조성물.
- [1698] 396. 실시형태 395에 있어서, 상기 맞춤형 프라이머 결합 부위는 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 맞춤형 프라이머 결합 부위의 서열과 100% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 조성물.
- [1699] 397. 실시형태 393 내지 396 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈은 제1 하위부분 및 제2 하위부분을 포함하는, 조성물.
- [1700] 398. 실시형태 397에 있어서, 상기 각 어댑터 모듈은 임의의 다른 어댑터 모듈의 상기 ID 영역의 폴리뉴클레오타이드 서열과 구별되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 ID 영역을 포함하는, 조성물.
- [1701] 399. 실시형태 398에 있어서, 상기 제1 하위부분은 고유한 ID 영역의 제1 세트를 포함하고, 상기 제2 하위부분은 고유한 ID 영역의 제2 세트를 포함하는, 조성물.
- [1702] 400. 실시형태 397 내지 399 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 어댑터 모듈은 상기 ID 영역의 폴리뉴클레오타이드 서열과 동일하지 않은 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 추가로 포함하는, 조성물.
- [1703] 401. 실시형태 400에 있어서, 상기 제1 하위부분의 각 어댑터 모듈은 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 포함하고, 상기 제2 하위부분의 각 어댑터 모듈은 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 샘플 태그를 포함하되; 상기 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 서열은 서로 동일하지 않은, 조성물.
- [1704] 402. 실시형태 397 내지 401 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 모듈의 제1 하위부분은 상기 제1 테스트 샘플 내의 각 DNA 분자를 식별하고, 상기 어댑터 모듈의 제2 하위부분은 상기 제2 테스트 샘플 내의 각 DNA 분자를 식별하는, 조성물.
- [1705] 403. 실시형태 393 내지 402 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 2개 내지 10,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [1706] 404. 실시형태 403에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 50개 내지 500개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [1707] 405. 실시형태 404에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 100개 내지 400개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [1708] 406. 실시형태 405에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 60개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [1709] 407. 실시형태 393 내지 406 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1710] 408. 실시형태 393 내지 407 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 64개 내지 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [1711] 409. 실시형태 408에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열 중에서 선택된 고유한 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 각 뉴클레오타이드 서열은 상기 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있는, 조성물.
- [1712] 410. 실시형태 393 내지 409 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 앵커 영역은 4개의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [1713] 411. 실시형태 410에 있어서, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 증폭 영역은 범용 프라이머 서열을 포함하고;
- [1714] 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어

지고;

- [1715] 상기 복수의 어댑터 모듈은 2개 이상의 하위부분으로 나누어지되, 어댑터 모듈의 각 하위부분은 고유한 ID 영역의 세트를 포함하고, 각 ID 영역의 상기 폴리뉴클레오타이드 서열은 상기 복수의 어댑터 모듈의 임의의 다른 ID 영역의 뉴클레오타이드 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고;
- [1716] 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈은 상기 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 상기 복수의 어댑터 모듈의 각 어댑터 모듈의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1717] 412. 실시형태 375 내지 411 중 어느 하나에 있어서, 상기 증폭 영역은 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1718] 413. 실시형태 412에 있어서, 상기 증폭 영역은 25개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1719] 414. 실시형태 375 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵커 영역은 3' 말단에 오버행을 포함하는, 조성물.
- [1720] 415. 실시형태 375 내지 414 중 어느 하나에 있어서, 상기 앵커 영역은 1개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1721] 416. 실시형태 415에 있어서, 상기 앵커 영역은 10개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1722] 417. 실시형태 375 내지 416 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역은 3개 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1723] 418. 실시형태 417에 있어서, 상기 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1724] 419. 실시형태 375 내지 418 중 어느 하나에 있어서, 상기 각 어댑터 모듈은 고유한 분자 식별자(UMI) 멀티플라이어를 추가로 포함하는, 조성물.
- [1725] 420. 실시형태 419에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 상기 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함되는, 조성물.
- [1726] 421. 실시형태 419 또는 실시형태 420에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 1개 내지 5개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어지는, 조성물.
- [1727] 422. 실시형태 421에 있어서, 상기 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 64개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 조성물.
- [1728] 423. 실시형태 374 내지 422 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 2개 내지 10,000개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 조성물.
- [1729] 424. 실시형태 423에 있어서, 상기 ID 영역의 풀은 60개의 고유한 ID 영역 서열을 포함하는, 조성물.
- [1730] 425. 실시형태 374 내지 424 중 어느 하나에 있어서, 상기 ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이인, 조성물.
- [1731] 426. 실시형태 374 내지 425 중 어느 하나에 있어서, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있는, 조성물.
- [1732] 427. 실시형태 374 내지 426 중 어느 하나에 있어서, 각 ID 영역은 이에 부착된 상기 DNA 단편을 식별하도록 구성되는, 조성물.
- [1733] 428. 실시형태 374 내지 427 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 64개 내지 2,560,000개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.
- [1734] 429. 실시형태 428에 있어서, 상기 어댑터 모듈 세트의 각 어댑터 모듈은 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 고유한 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 3840개의 고유한 뉴클레오타이드 서열의 각 서열은 임의의 다른 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있는, 조성물.

- [1735] 430. 실시형태 375 내지 429 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 앵커 영역은 1개 내지 4개의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 주어진 서열의 각 ID 영역은 주어진 서열의 4개의 앵커 영역 중 단 하나와 쌍을 이루는, 조성물.
- [1736] 431. 실시형태 375 내지 430 중 어느 하나에 있어서, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 증폭 영역은 동일한 프라이머 결합 부위를 포함하는, 조성물.
- [1737] 432. 실시형태 431에 있어서,
- [1738] 상기 ID 영역 풀의 각 ID 영역은 8개의 뉴클레오타이드 길이이고, 각 ID 영역 서열은 임의의 다른 ID 영역 서열로부터 적어도 2의 해밍 거리만큼 떨어져 있고;
- [1739] 상기 어댑터 세트의 각 어댑터는 상기 ID 영역에 인접하거나 또는 그 내부에 포함된 UMI 멀티플라이어를 포함하되, 상기 어댑터 세트의 각 어댑터의 UMI 멀티플라이어는 3개의 뉴클레오타이드 길이이고, 주어진 서열의 상기 UMI 멀티플라이어는 주어진 서열의 하나의 ID 영역과 쌍을 이루는, 조성물.
- [1740] 433. 실시형태 358 내지 432 중 어느 하나에 있어서, 상기 테스트 샘플은 조직 생검인, 조성물.
- [1741] 434. 실시형태 433에 있어서, 상기 조직 생검은 종양인 것으로 의심되는 종양 또는 조직으로부터 얻어지는, 조성물.
- [1742] 435. 실시형태 434에 있어서, 상기 조직 생검은 악성 종양 또는 악성 종양인 것으로 의심되는 종양으로부터 얻어지는, 조성물.
- [1743] 436. 실시형태 358 내지 435 중 어느 하나에 있어서, 상기 DNA 분자는 무세포 DNA(cfDNA), 게놈 DNA(gDNA), 상보적 DNA(cDNA), 미토콘드리아 DNA, 메틸화된 DNA 또는 탈메틸화된 DNA인, 조성물.
- [1744] 437. 실시형태 436에 있어서, 상기 DNA 분자는 후성유전적 표식을 포함하는, 조성물.
- [1745] 438. 실시형태 358 내지 437 중 어느 하나에 있어서, 상기 DNA 분자는 전체 게놈 라이브러리, 앰플리콘 라이브러리, 전체 엑솜 라이브러리, cDNA 라이브러리 또는 메틸화된 DNA 라이브러리로 이루어진 목록으로부터 선택되는 라이브러리로부터 얻어지는, 조성물.
- [1746] 439. 실시형태 358 내지 438 중 어느 하나에 있어서, 상기 DNA 분자는 상기 테스트 샘플로부터 단리되거나 또는 생성되는, 조성물.
- [1747] 440. 실시형태 439에 있어서, 상기 테스트 샘플은 양수 샘플, 혈액 샘플, 피부 샘플, 모발 샘플, 모낭 샘플, 타액 샘플, 점액 샘플, 땀 샘플, 눈물 샘플, 상피 조직 샘플, 소변 샘플, 정액 샘플, 정액 혈장 샘플, 혈청 샘플, 전립선액 샘플, 사정전 유체(쿠퍼액) 샘플, 안구액 샘플, 배설물 샘플, 생검 샘플, 복수 샘플, 뇌척수액 샘플, 림프 샘플, 조직 추출물 샘플, 대변 샘플 및 포르말린-고정, 파라핀 포매(FFPE) 샘플로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 샘플을 포함하는, 조성물.
- [1748] 441. 실시형태 358 내지 440 중 어느 하나에 있어서, 상기 DNA 분자는,
- [1749] (a) 상기 테스트 샘플로부터 세포 DNA를 단리하는 단계; 또는
- [1750] (b) 상기 세포 DNA를 단편화하여 게놈 DNA 단편을 얻는 단계
- [1751] 를 포함하는 단계에 의해 얻어지는, 조성물.
- [1752] 442. 실시형태 441에 있어서, (b) 단계는 상기 세포 DNA를 적어도 하나의 소화 효소와 접촉시킴으로써 수행되는, 조성물.
- [1753] 443. 실시형태 441에 있어서, (b) 단계는 기계적 응력을 상기 세포 DNA에 적용시킴으로써 수행되는, 조성물.
- [1754] 444. 실시형태 443에 있어서, 상기 기계적 응력은 상기 세포 DNA를 초음파 처리함으로써 적용되는, 조성물.
- [1755] 445. 실시형태 441에 있어서, (b) 단계는 상기 세포 DNA를 하나 이상의 화합물과 접촉시켜 상기 세포 DNA의 하나 이상의 결합을 화학적으로 파괴함으로써 수행되는, 조성물.
- [1756] 446. 시약을 포함하는 키트로서, 실시형태 241 내지 357 중 어느 하나의 방법을 포함하는 유전자 분석에 사용될 수 있는, 키트.

[1757] **추가적인 정의**

[1758] 본 개시내용에서 달리 정의되지 않는 한, 본 출원에서 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 가져야 한다. 일반적으로, 본 개시내용에 기술된 화학, 분자 생물학, 세포 및 암 생물학, 면역학, 미생물학, 약리학, 단백질 및 핵산 화학과 관련하여 사용되는 명명법 및 기법은 당업계에서 잘 알려져 있으며 일반적으로 사용되는 것들이다.

[1759] 본 개시내용에서 사용된 바와 같이, 다음 용어는 달리 명시되지 않는 한 그에 따른 의미를 갖는다.

[1760] "단수형"은 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)를 지칭하기 위해 본 개시내용에서 사용된다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[1761] 대안(예를 들어, "또는")의 사용은 대안 중 하나, 둘 다 또는 임의의 이들의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[1762] 용어 "및/또는"은 대안 중 하나 또는 둘 다를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[1763] 본 개시내용에서 사용되는 용어 "약" 또는 "대략"은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 최대 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%만큼 달라지는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 지칭한다. 일 실시형태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ 또는 $\pm 1\%$ 의 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이 범위를 지칭한다.

[1764] 본 개시내용에서 사용되는 용어 "단리된"은 본래의 상태에서 일반적으로 수반되는 구성요소가 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 의미한다. 일부 실시형태에서, 용어 "포획된", "얻어진" 또는 "유래된"은 단리된과 동의어로 사용된다.

[1765] 본 개시내용에서 사용되는 "대상체", "개체" 또는 "환자"는 본 개시내용의 조성물로 검출되거나 또는 확인될 수 있는 병태의 증상을 나타내는 임의의 동물을 포함한다. 적합한 대상체는 실험실 동물(예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터 또는 기니피그), 농장 동물(예컨대, 말, 소, 양, 돼지) 및 가축 또는 반려동물(예컨대, 고양이 또는 개)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 포유동물이다. 소정의 실시형태에서, 대상체는 비인간 영장류이고, 일부 실시형태에서 대상체는 인간이다.

[1766] 본 발명은 위에 제시된 특정 실시형태와 관련하여 설명되었지만, 본 발명의 많은 대안, 수정 및 다른 변형이 당업자에게 명백할 것이다. 모든 이러한 대안, 수정 및 변형은 본 발명의 사상 및 범위 내에 속하도록 의도된다.

[1767] 또한, 본 개시내용에 기술된 임의의 방법은 본 개시내용에 기술된 임의의 장애를 치료함에 있어서 약제의 제조를 위해 본 개시내용에 기술된 임의의 작용제의 사용을 위해 스위스-타입 형식으로 재작성될 수 있도록 의도된다. 마찬가지로, 본 개시내용에 기술된 임의의 방법은 용도 청구항을 위한 화합물로서 또는 화합물 청구항의 용도로서 재작성되도록 의도된다.

[1768] 본 개시내용에 기술된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 전체가 참조에 의해 본 명세서에 인용된다.

[1769] **실시예**

[1770] 본 개시내용은 다음 실시예에 의해 추가로 설명되며, 이는 본 개시내용에 기술된 특정 절차에 대한 범위 또는 사상을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 실시예는 소정의 실시형태를 예시하기 위해 제공되며 이에 의해 개시내용의 범위가 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 본 개시내용의 사상에서 벗어나지 않고 당업자에게 제안될 수 있는 다양한 다른 실시형태, 수정 및 등가물에 의지할 수 있다는 것이 추가로 이해되어야 한다.

[1771] 실시예 1 - 샘플 역다중화를 위한 실험 가능성 연구

[1772] 고안된 세포주 DNA 샘플을 사용하여 샘플 역다중화 및 유전자 결실 확인을 위한 개념 증명(proof-of-concept)으로서의 초기 실험을 수행하였다. 2종의 상이한 세포주: ATM 결실을 포함하는 NA09596 및 BRCA2 결실을 포함하는 NA02718을 알려진 빈도로 세포주 NA12878과 혼합하였다. 위에 기술된 "카이네이스/라이게이스 결찰 방법"을 사용하여 증폭된 어댑터-태깅된 라이브러리(LPA)를 제조하였다.

[1773] 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 63(표 1)을 사용하여 50ng의 LPA를 6 사이클 내지 8 사이클 동안 증폭시켰다. 최종 LPWG 라이브러리를 제조업체의 지침에 따라 Qubit으로 정량화하고, 맞춤형 프라이머, 정방향 프라이머

및 역방향 프라이머 62를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 Illumina NextSeq550에서 시퀀싱하였다.

표 1

프라이머 서열

증폭 프라이머		서열 번호
정방향 프라이머:	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCATGCAGGACCAGAGAA TTCGAATACA	7
역방향 프라이머 63:	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGCACGCGGACCAGAGAAT TCGAATACA	8
역방향 프라이머 LPWG_AMP_ R:	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGTGCAGGACCAGAGAAT TCGAATACA	9
시퀀싱 프라이머		
정방향 프라이머:	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGCACGCGGACCAGAGAAT TCGAATACA	10
역방향 프라이머 62:	GTGACTGGCACGCGGACCAGAGAATTCGAATACA	11
역방향 프라이머 LPWG_SEQ_ R:	GTGACTGGTGCAGGACCAGAGAATTCGAATACA	12
qPCR 프라이머		
올리고 1:	AATGATACGGCGACCACCGA	13
올리고 2:	CAAGCAGAAGACGGCATACGA	14
올리고 1c:	TCGGTGGTCGCCGTATCATT	15
올리고 2c:	TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG	16
라이브러리 프라이머:	TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACA	5

[1774]

[1775] 모든 샘플은 성공적으로 시퀀싱되었고, 유전자 결실 및 증폭은 예상대로 검출되었으며, 이는 LPWG 시퀀싱이 CNV의 검출에 유용함을 시사한다.

[1776] LPWG 라이브러리는 성공적으로 시퀀싱될 수 있지만, 전형적으로 4nM로 로딩되는 라이브러리는 과소 클러스터링된다(under-clustered). 모든 dsDNA를 측정하는 Qubit 또는 P5 및 P7 Illumina 시퀀싱 어댑터를 모두 사용하여 라이브러리를 측정하는 KAPA 라이브러리 정량화 키트를 사용하는 qPCR에 의한 라이브러리의 정량화는 총 dsDNA와 표 2에 나타난 바와 같이 LPWG 라이브러리에 대한 클러스터를 생성할 수 있지만 표적 포획 라이브러리에 대해서는 클러스터를 생성할 수 없는 라이브러리 간에 눈에 띄는 차이를 보여주었다.

표 2

NA12878 과 혼합된 NA02718 로부터의 LPWG 라이브러리 또는 표적 포획 라이브러리의 측정된 농도

LPA 풀	시퀀싱 실행	라이브러리 유형	Qubit 에 의한 라이브러리 농도 (ng/uL)	qPCR 에 의한 라이브러리 농도 (ng/uL)	클러스터 밀도 (K/mm ²)
1	3	LPWG	3.34	0.37	33
	12	표적 포획	56.0	57.34	208
2	4	LPWG	2.65	1.20	108
	13	표적 포획	13.7	15.48	194

[1777]

[1778]

전체 게놈 시퀀싱을 위해 라이브러리(LIB) 또는 증폭 후 라이브러리(LPA)를 증폭시키는 것의 실행 가능성을 테스트하였다. 위에 기술된 "카이네이스/라이게이스 걸찰 방법"을 사용하여 야생형 cfDNA를 처리하였다. 2 μ L의 풀링된 LIB 또는 LPA(각각 8ng 및 5ng)를 정방향 프라이머 및 프라이머 63을 사용하여 69 $^{\circ}$ C 어닐링 온도에서 8 사이클, 12 사이클 또는 16 사이클 동안 증폭시켰다. LPWG 증폭된 라이브러리를 25 μ L TEZ에서 Agencourt AMPure XP 자성 비드(제조업체의 제안에 따라)로부터 용리시키고, Qubit으로 측정하였다.

[1779]

LIBS 또는 LPA를 사용하여 생성된 LPWG 라이브러리의 농도는 도 8에 도시되어 있다. LIBS 및 LPA는 모두 시퀀싱에 충분한 라이브러리 물질이 있도록 LPWG 프로토콜을 사용하여 증폭될 수 있다. 이러한 희석된 LPA를 LPWG 증폭을 위한 주형으로 사용하여 추가 개발을 수행하였다.

[1780]

실시예 2 - 증폭 조건의 최적화

[1781]

어닐링 온도

[1782]

정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 63을 사용하여 58 $^{\circ}$ C 또는 69 $^{\circ}$ C의 프라이머 어닐링 온도로 증폭 효율을 조사하였다. 전단된 NA12878 세포주로부터의 LPA를 8 사이클, 12 사이클 또는 16 사이클 동안 증폭시켰다. Qubit 또는 qPCR로 측정된 LPWG 라이브러리 농도는 도 9에 도시되어 있다. 모든 qPCR 반응은 제조업체의 권장 사항에 따라 Roche Lightcycler 480 qPCR 기기를 사용하여 수행하였다:

[1783]

초기 변성 95 $^{\circ}$ C 5분 1 사이클.

[1784]

변성 95 $^{\circ}$ C 30초 35 사이클.

[1785]

어닐링/연장/테이퍼 수집 60 $^{\circ}$ C 45초 35 사이클.

[1786]

69 $^{\circ}$ C의 어닐링 온도와 비교하여 58 $^{\circ}$ C의 프라이머 어닐링 온도를 사용한 8 사이클 후에 약간 더 많은 산물이 나타났다. 그러나, 이러한 불일치는 12 사이클까지 사라졌다. PCR 프라이머 어닐링 온도는 12 사이클과 16 사이클 사이에 생성된 PCR 산물의 양에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 65 $^{\circ}$ C의 어닐링 온도는 LPWG 시퀀싱을 위한 라이브러리 증폭의 추가 개발에도 사용하였다.

[1787]

증폭 사이클 수

[1788]

이전의 실행 가능성 실험은 LPWG 라이브러리가 성공적으로 시퀀싱될 수 있음을 보여주었지만, 로딩은 전형적으로 시퀀서에서 라이브러리의 과소 클러스터링을 초래하였다. Qubit 및 qPCR(KAPA 라이브러리 정량화 키트 사용)에 의한 라이브러리 측정은 불일치한 값을 나타내었으며(표 2 참조), 이는 6 사이클 내지 8 사이클 후에 라이브러리 풀에서 측정된 dsDNA가 클러스터를 생성할 수 있는 일부 라이브러리와 클러스터를 생성할 수 없는 다른 라이브러리 혼합물로 이루어져 있음을 시사한다. 이 관찰이 증폭 사이클 수에 의해 영향을 받았는지 여부를 결정하기 위해, LPWG 라이브러리 조성물에 대한 사이클 수의 영향을 테스트하였다.

[1789]

5개의 독립적인 실험에서, 65 $^{\circ}$ C 어닐링 온도 및 "프라이머 63"(n=3) 또는 "LPWG_AMP_R"(n=4) 역방향 프라이머(표 1에 기재되어 있음)와 함께 정방향 프라이머를 사용하면서 야생형 샘플로부터 풀링된 50ng의 LPA를 증폭시켰다. 반응은 8 사이클, 12 사이클, 14 사이클 또는 16 사이클의 증폭 동안 진행하였으며, 생성된 라이브러리는

KAPA 라이브러리 정량화 키트를 사용하여 표준을 사용하여 Qubit 또는 qPCR로 정량화하였다. 후속 실험(n=1)에서, 야생형(WT) cfDNA 샘플로부터 풀링된 50ng의 LPA를 4 사이클, 6 사이클, 8 사이클 또는 16 사이클 동안 증폭시켰다. PCR 산물의 구성요소를 추가로 분석하기 위해, P5 및 P7 프라이머(시퀀싱 클러스터를 형성할 수 있는 라이브러리를 정량화함), P5 단독, P7 단독, P5 역 상보적 프라이머와 P5 또는 P7 역 상보적 프라이머와 P7을 사용하여 qPCR을 수행하였다. 또한, 라이브러리를 프라이머 믹스 1S("ACA")로 증폭시키고, 공지된 농도의 LPA 표준으로 정량화하여 PCR 산물이 태깅된 LPA로 이루어져 있는지 여부를 결정하였다.

[1790] 8 사이클, 12 사이클, 14 사이클 및 16 사이클의 증폭 후 평균 측정된 앰플리콘 농도뿐만 아니라 4 사이클 또는 6 사이클 후 측정된 앰플리콘 농도가 도 10에 도시되어 있다.

[1791] qPCR 또는 Qubit로 결정된 농도 값 사이의 불일치는 4 사이클 내지 12 사이클의 증폭 후에 볼 수 있다. 8 사이클 후, Qubit으로 측정된 농도는 qPCR로 측정된 것보다 대략 2.5-배에서 10-배까지 다양하다. 흥미롭게도, 이러한 불일치는 P5/P5 또는 P7/P7 어댑터가 포함된 산물로 인한 것이 아니다. Qubit과 qPCR 측정 사이의 증폭 산물의 비는 4 사이클 후에 30까지 높았고 14 사이클까지 감소하였으나, 14 사이클 내지 16 사이클은 도 11에 도시된 바와 같이 일관되게 1에 가까운 비 값을 보여주었다.

[1792] LPWG 시퀀싱이 효과적이고 재현 가능한 검정이 되기 위해서는, 측정된 라이브러리 농도가 클러스터를 생성할 수 있는 라이브러리의 양을 반영하는 것이 중요하다. 표 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 높은 로딩 농도를 목표로 삼지 않는 한 6 내지 8 PCR 사이클 후에 과소 클러스터링되었다. 이는 LPWG 라이브러리가 클러스터를 생성할 수 있는 라이브러리와 그렇지 않은 라이브러리의 혼합물로 이루어졌기 때문일 수 있다. 로딩은 측정된 DNA 질량을 측정하였지만 DNA 라이브러리 서열은 구별하지 않을 Qubit 측정으로부터 계산하였다. 클러스터 밀도는 라이브러리 12 사이클 내지 16 사이클 동안 증폭되었을 때 150 K/mm² 내지 270 K/mm²의 QC 메트릭스를 일관되게 통과하였다.

표 3

LPWG 시퀀싱 실험에서 클러스터 밀도.

(로딩은 Qubit 정량화 측정을 기반으로 계산되었음)

실험 횟수	샘플 유형	PCR 사이클	예측 라이브러리 크기 (bp)	표적 로딩 농도 (nM)	클러스터 밀도 (K/mm ²)	클러스터 밀도 통과/실패
1	gDNA	7	300	3.6	57.3	실패
2	cfDNA	7	300	15	168.1	통과
3	gDNA	6	396	4	33	실패
4	gDNA	8	396	4	108.3	실패
5	cfDNA	12	330	4	176.8	통과
6	cfDNA	14	330	4	208.0	통과
7	cfDNA	14	330	4	243.5	통과
8	cfDNA	14	330	4	190.0	통과
9	gDNA	16	420	4	204.5	통과
10	gDNA	16	420	4	196.8	통과
11	gDNA	16	420	4	192.0	통과

[1793] 다양한 사이클 수 동안 증폭된 LPWG 라이브러리의 Bioanalyzer 분석

[1795] LPWG 프로토콜에서 정방향 프라이머 및 LPWG_AMP_R 프라이머를 사용하여 4 사이클, 6 사이클, 8 사이클, 12 사이클, 14 사이클 또는 16 사이클 동안 PCR 증폭된 라이브러리를 10-배 희석한 후 고민감도 DNA Bioanalyzer 칩 (Agilent, 부품 번호 5067-4627)에 로딩하였다. "Agilent 고민감도 DNA 키트 가이드"에 기술된 바와 같이 Agilent Bioanalyzer를 사용하여 전기영동으로 라이브러리를 분리하였다. LPWG 라이브러리로부터의 Bioanalyzer(BA) 추적에 중첩시켰으며, 이는 도 12a 및 도 12b에 도시되어 있다.

[1796] 4 사이클의 증폭 후, 주요 피크는 약 300bp에서 나타났다. 6 사이클 후에 두 번째 330bp 피크가 나타났으며, 이

는 적어도 2개의 상이한 산물이 이 라이브러리에서 발견될 수 있음을 시사한다. 이들 산물 중 더 큰 것은 후속 사이클에서 우선적으로 증폭되는 것으로 나타났으며, 12 사이클 내지 16 사이클 후에 나타나는 주요 피크와 정렬되었고, 이는 이 더 큰 산물이 P5 및 P7 프라이머로 증폭될 수 있었던 반면 더 작은 산물은 그렇지 않았음을 시사한다. 흥미롭게도, 16 사이클 후, 330bp의 cfDNA 라이브러리가 상대적으로 감소하고 더 큰 크기의 라이브러리가 증가하였다. 한 가지 가능한 설명은 이것이 과증폭으로 인해 생성된 잘못 어닐링된 DNA의 "테이지 사슬(daisy chain)"을 나타낼 수 있다는 것이다.

[1797] 2-뉴클레오타이드 cfDNA 산물과 잠재적인 "테이지 사슬"을 구별하기 위해, Pippin 크기-선택에 의해 분리된 DNA의 145bp 단편으로부터 라이브러리를 구성하고, 다양한 사이클 수 동안 LPWG 프라이머로 증폭시켰다. 도 13에서 볼 수 있는 바와 같이, 6 사이클의 증폭 후, 2개의 산물이 명백히 나타났으며: 하나는 LPA 주형보다 약 35bp 내지 40bp 더 크고, 하나는 LPA 주형보다 약 70bp 더 크다. 이 더 큰 산물을 다음 10 사이클에 걸쳐 우선적으로 증폭시켰다. 16 사이클 후, 330bp 산물의 양이 감소하였고 470bp 산물의 양은 증가하였다. 이 더 큰 산물은 LPA 주형에서 볼 수 없었으며, 이는 이것이 과증폭의 산물임을 나타낸다. 라이브러리의 과증폭은 클러스터 밀도(표 3) 또는 시퀀싱 품질에 영향을 미치지 않는 것으로 보이지만, 14 사이클의 PCR은 과증폭과 Qubit에 의한 정확한 라이브러리 정량화의 균형을 맞추는 것으로 나타났다.

[1798] 실시예 3 - 라이브러리 입력의 최적화

[1799] 2개의 독립적인 실험에서 야생형 cfDNA로부터의 LPA를 사용하여 LPWG 라이브러리를 제조하였다: 하나는 반응에 대해 5ng, 10ng, 25ng, 50ng, 75ng 또는 100ng의 LPA 입력을 사용하여 수행하고 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로서 프라이머 63을 사용하여 8 사이클 동안 증폭시켰고, 다른 하나는 반응에 대해 10ng, 20ng, 50ng, 100ng 또는 200ng의 LPA 입력을 사용하여 수행하고 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로서 LPWG_AMP_R을 사용하여 16 사이클 동안 증폭시켰다. 전체 게놈 시퀀싱 라이브러리 농도를 표 1에 나열된 P5, P7, P5c 및 P7c 프라이머를 사용하여 Qubit 및/또는 qPCR로 정량화하였다. 8 사이클의 증폭 후 PCR 산물의 농도는 도 14에 도시되어 있다.

[1800] 8 사이클 후, 모든 입력량에서 측정된 라이브러리 농도 사이에는 큰 불일치가 있었으며, qPCR보다 Qubit으로 측정된 농도가 8-배 더 높았다. P5 및 P7 어댑터가 모두 있는 라이브러리는 증폭 반응에 대해 대략 50ng을 입력한 후 정제되는 것으로 나타났으며, 이는 PCR에 입력을 증가시키면 8 사이클 후에 더 많은 dsDNA가 생성되지만 시퀀싱 클러스터를 생성할 수 있는 라이브러리가 더 많이 생성되지는 않았음을 시사한다.

[1801] 도 15에서 볼 수 있는 바와 같이, 10ng 내지 100ng을 LPWG qPCR 반응에 추가한 경우, 16 PCR 사이클 후에 Qubit 또는 qPCR로 측정된 농도 값에는 거의 차이가 없었다. 200ng을 추가한 경우, Qubit 측정값은 qPCR로 측정된 값보다 대략 3-배 더 높았다. Qubit 측정을 사용하여 플로우 셀에 로딩하기 위해 이러한 LPWG 라이브러리를 정규화하였을 때, 생성된 리드 수는 도 16에 도시된 바와 같이 200ng의 입력 샘플이 과소 로딩(under-loaded)되었음을 시사한다.

[1802] LPWG 증폭에 대한 입력으로 2ng(10 ng/ μ l 샘플의 1/10 희석의 2 μ l)만큼 낮은 입력을 사용할 수 있었다. 따라서, LPWG에 대해 2ng이 증폭된 다음 최대 수의 포획 라이브러리가 있는 플로우 셀에 로딩될 때 리드의 수를 결정하였다.

[1803] 야생형 샘플로부터의 8개의 LPA를 저역 통과 전체 게놈 시퀀싱을 위해 증폭시켰다. 각각 1ng, 2ng, 10ng 또는 15ng의 입력 물질이 포함된 2개의 복제물을 풀링한 다음, 65°C 어닐링 온도로 16 사이클 동안 증폭시켰다. LPWG 증폭된 라이브러리를 Ampure 비드로 정제하고, Qubit으로 정량화한 다음, 야생형 샘플과 함께 공동 로딩하였다. LPWG 라이브러리를 실시예 5의 계산에 기술된 바와 같이 0.5x의 표적 적용 범위로 로딩하였다.

[1804] 도 17에서 볼 수 있는 바와 같이, 시퀀싱에 대한 입력을 증가시키면 시퀀싱 리드가 증가하였지만, 1ng 및 2ng의 cfDNA에서는 샘플당 각각 대략 500만 개 및 300만 개의 리드가 발생하였다.

[1805] 따라서, 더 농축된 샘플의 LPWG 증폭 풀에 추가된 2ng의 샘플은 분석에 필요한 필수 최소 리드보다 적게 생성되어 샘플이 과소 시퀀싱되는 결과를 가져올 가능성이 높을 것이다. 샘플의 과소 또는 과잉 시퀀싱을 방지하기 위해, LPWG 증폭 반응에 풀링할 때 샘플 입력을 정규화하거나 또는 샘플을 개별적으로 증폭시키고 시퀀싱 플로우 셀에 로딩할 때 정규화하는 것이 필요하다는 것이 밝혀졌다.

[1806] 실시예 4 - 반응 조건의 최적화

[1807] 반응 부피

- [1808] 4개의 WT cfDNA로부터의 LPA를 동일한 질량으로 풀링하고, 총 50ng의 DNA로 LPWG 증폭 반응에 첨가하였다. 65℃의 어닐링 온도 및 16 사이클과 함께 "LPWG_AMP_R" 프라이머를 PCR 반응에 사용하였다. 100 μ l(1x), 200 μ l(2x) 또는 50 μ l(0.5x)의 반응 부피를 테스트하였다. 생성된 PCR 산물을 Ampure 비드로 정제하고, Qubit 및 qPCR로 농도를 결정하였다. 0.5x, 1x 또는 2x 반응 부피의 PCR 산물의 농도는 도 18에 도시되어 있다.
- [1809] 반응 부피의 증가는 PCR 산물의 양을 증가시켰다. PCR 산물의 증가는 qPCR 측정과 비교하여 Qubit 측정에서 더 컸으며, 이는 추적에서 확인되었다(도 19).
- [1810] 프라이머 농도
- [1811] WT cfDNA의 4개 샘플로부터의 LPA를 풀링하고, 총 50ng으로 LPWG 증폭 반응에 첨가하였다. 라이브러리를 16 사이클의 PCR 동안 정방향 프라이머 및 LPWG_AMP_R 프라이머로 증폭시켰다. 1 μ M(1x), 2 μ M(2x) 또는 0.5 μ M(0.5x)의 프라이머 농도를 테스트하였다. 생성된 PCR 산물을 Ampure 비드로 정제하고, 농도를 Qubit 및 qPCR로 결정하였다. 0.5 μ M(0.5x), 1 μ M(1x) 또는 2 μ M(2x) 반응 부피로 증폭된 PCR 산물의 농도는 도 20에 도시되어 있다.
- [1812] 도 20에 도시된 바와 같이, PCR 프라이머의 농도를 2-배(최대 2 μ M) 증가시키면, Qubit 또는 qPCR로 측정하였을 때 각각 LPWG 라이브러리 산물이 42% 및 14% 증가하였다. 흥미롭게도, 도 21의 전기영동도에서도 도시된 바와 같이 프라이머 농도가 증가하면 과증폭 동안 프라이머 결합으로 인해 발생하는 것으로 생각되는 "테이지 사슬"이 감소하지 않는 것으로 나타났다.
- [1813] 폴리머레이스
- [1814] WT cfDNA의 4개 샘플로부터의 LPA를 풀링하고, 총 50ng으로 LPWG 증폭 반응에 첨가하였다. 65℃의 어닐링 온도와 정방향 프라이머 및 LPWG_AMP_R 프라이머를 반응에 사용하였으며, 주형은 HiFi Q5 폴리머레이스(NEB) 또는 Roche의 KAPA HiFi 폴리머레이스(카탈로그 번호 KK2600)를 사용하여 8 사이클, 12 사이클, 14 사이클 또는 16 사이클 동안 증폭시켰다. 생성된 PCR 산물을 Ampure 비드로 정제하고, 농도를 Qubit 또는 qPCR로 결정하였다. 산물을 Agilent Bioanalyzer로 정량적으로 평가하였다.
- [1815] 도 22에 도시된 바와 같이, 12 내지 14 PCR 사이클 후, KAPA HiFi Hotstart를 PCR 반응에 사용하였을 때 Qubit 또는 qPCR에 의해 유사한 농도값이 발견되었다. 그러나, 16 사이클 후 Qubit 값과 qPCR 값 사이에 약 1.6X의 차이가 있었으며, 이는 부분적으로 "테이지 사슬"을 형성하는 산물의 더 큰 부분으로 인해 발생할 수 있다. "테이지 사슬"의 증가를 도 23의 Bioanalyzer 추적에서 볼 수 있지만, 동일한 전기영동도 추적에서도 수율이 전반적으로 감소한 것으로 나타났으며, 이는 qPCR 정량화가 DNA 산물을 과도하게 측정할 수 있음을 시사한다.
- [1816] KAPA HiFi Hotstart 폴리머레이스를 사용한 PCR 증폭은 표 4에 도시된 바와 같이 LPWG 라이브러리 산물의 85% 내지 500% 증가를 제공한다. KAPA HiFi Hotstart 폴리머레이스를 사용한 PCR의 최적의 사이클 수는 8 사이클 내지 12 사이클에 있다.

표 4

Q5 폴리머레이스와 비교하여 KAPA 폴리머레이스로 증폭할 때 라이브러리 농도의 증가.

사이클	증가 %		
	Qubit	qPCR P5/P7	qPCR ACA
8	86	85	86
12	282	302	304
14	335	316	223
16	312	506	525

[1817]

[1818] 실시예 5 - 표적 적용 범위의 평가

[1819] 도 25에 도시된 바와 같이, LPWG 라이브러리는 위에 기술된 계산을 사용하여 표적 적용 범위에 정확하게 로딩될 수 있다. 실시예 4에 기술된 바와 같이 16 사이클 동안 개별 반응에서 증폭된 샘플("개별") 및 실시예 3에 기술

된 바와 같이 풀링된 증폭 반응으로 정규화된 샘플("풀링된 정규화")은 적용 범위에서 가장 적은 가변성을 나타낸 반면, 풀링된 PCR에 2ng 내지 15ng 범위의 입력이 포함된 샘플은 적용 범위에서 더 높은 가변성을 나타내었다.

[1820] 실험을 수행하기 위해, LPWG에 대해 증폭된 WT 라이브러리를 WT 라이브러리와 공동 로딩하는 3가지 시퀀싱 실행이 있었다. 라이브러리 로딩은 위에 기재된 바와 같이 계산하였다. 적용 범위는 각 바코드 샘플에 대해 생성된 리드 수로부터 계산하였다.

[1821] 도 24는 표적 포획 라이브러리와 공동 로딩된 야생형 LPWG 라이브러리에 대해 계산된 적용 범위를 보여준다. 적색 상자 그림은 0.5x 적용 범위의 표적에 로딩된 라이브러리를 나타내는 반면, 청색 상자 그림은 1x 적용 범위로 표적화된 라이브러리를 보여준다.

[1822] 실시예 6 - 공동 로딩된 라이브러리에서 포획 라이브러리 깊이의 평가

[1823] 도 25에 도시되고 표 6에 요약된 바와 같이, 표적 포획 라이브러리와 함께 시퀀싱 실행에 LPWG 라이브러리를 포함시키는 것은 표적 포획 라이브러리의 평균 깊이를 감소시켰다. 표 5에 도시된 바와 같이, LPWG 적용 범위의 깊이가 증가함에 따라 표적화된 대상 라이브러리의 깊이 손실도 증가하였다. 이는 라이브러리의 깊이가 다양할 수 있으며, 목적하는 검정 민감도에 필요한 표적 포획 라이브러리 리드를 최적화할 수 있음을 보여준다.

[1824] 이 실험을 실행하기 위해, LPWG를 위해 증폭되고 표적 포획 라이브러리와 함께 공동 로딩된 WT 라이브러리를 평가하는 3가지 시퀀싱 실행이 있었다: 14번, 15번 및 16번. LPWG 라이브러리를 동일한 플로우 셀에 로딩하였을 때 포획 라이브러리 깊이의 손실 가능성을 결정하기 위해, 각 공동 로딩된 포획 라이브러리의 평균 깊이를 동일한 라이브러리를 단독으로 분석하였을 때 관찰된 평균 깊이와 비교하였다(NB552199_0026 및 NB551744_0099).

표 5

2 개의 포획 라이브러리에 있는 5 개의 WT 샘플의 평균 깊이의 평균 손실 퍼센트.

포획 라이브러리	샘플	표적 적용 범위 및 LPWG 라이브러리의 수		
		1x, n=4	0.5x, n=8	0.5x, n=5
2	WTR537995		8.35	7.23
2	WTR538001		8.20	7.21
2	WTR538005		8.53	7.39
1	WTR537984	6.72		
1	WTR537989	5.39		
1	WTR537995	5.24		

[1825]

[1826] 실시예 7 - 정규화 방법의 최적화

[1827] 도 26에 도시된 바와 같이, 조사된 4개의 정규화 프로세스 중, 정규화를 PCR 증폭으로 들어가기 전과 앰플리콘을 풀링한 후 플로우 셀로 들어가기 전에 수행하였을 때 적용 범위의 가변성이 가장 적었다. 이 실험에서, 샘플을 단일 증폭 반응으로 풀링한 다음 정규화하였을 때 적용 범위의 가변성이 가장 크게 나타났다. 그러나, 이전의 실험에서는 도 27에서 볼 수 있는 바와 같이 단일 증폭으로의 풀링이 더 적은 가변성을 나타내었다. 종합하면, 샘플을 개별적으로 증폭한 다음 정규화하고 풀링하였을 때 시퀀싱된 샘플 전체에 걸쳐 균일한 적용 범위가 관찰되었다.

[1828] 10명의 환자 및 6개의 야생형 샘플로부터의 임상 cfDNA를 LPA로 전환시키고 희석하였다. 샘플을 다음 4가지 방식 중 하나로 정규화하고, 시퀀싱 적용 범위의 가변성을 결정하였다:

[1829] 1. 50ng의 각각 희석된 LPA를 LPWG 증폭에 대한 입력으로 사용하였다. 각 샘플을 별도의 반응으로 증폭시키고, 비드 세척 후 농도를 결정하였다. 100ng의 각 산물을 풀링하고, 4nM을 플로우 셀에 로딩하였다. 실행 번호: 6.

[1830] 2. 5ng의 각각 희석된 LPA를 단일 증폭 반응으로 풀링하였다. 생성된 PCR 산물의 농도를 비드 세척 후 결정하고, 4nM를 플로우 셀에 로딩하였다. 실행 번호: 7.

- [1831] 3. $3\mu\text{l}$ 의 각각 희석된 LPA를 별도의 반응으로 증폭시키고, 비드 세척 후 농도를 결정하였다. 100ng의 각 산물 풀링하고, 4nM을 플로우 셀에 로딩하였다. 실행 번호: 17.
- [1832] 4. 50ng의 각 희석된 LPA를 LPWG 증폭에 대한 입력으로 사용하였다. 각 샘플을 별도의 반응으로 증폭시키고, 비드 세척 후 각 반응으로부터 $5\mu\text{l}$ 를 풀링하였다. 풀링된 LPWG 산물의 농도를 결정하고, 4nM을 플로우 셀에 로딩하였다. 실행 번호: 8.
- [1833] 실시에 8 - 표적화된 및 전체 게놈 라이브러리의 동시 공동 시퀀싱
- [1834] 어댑터-태깅된 게놈 라이브러리를 도 4에 도시된 바와 같이 제조하였다. 어댑터-태깅된 라이브러리를 증폭 후 두 부분으로 분할하였으며, 한 부분은 저역 통과 전체 게놈(LPWG) 라이브러리의 시퀀싱을 위해 처리하고, 다른 부분은 표적 포획을 통해 별도로 농축시킨 다음 표적화된 라이브러리의 시퀀싱을 위해 처리하였다. 그런 다음, 두 라이브러리 유형을 모두 풀링하고, 동일한 플로우 셀에서 동시 시퀀싱하였다. 이 실시예에서, 도 28에 도시된 바와 같이 리드 2 서열을 통해 17 사이클의 시퀀싱 후 라이브러리를 역다중화하였다. 결과는 이 신규한 전략의 효과를 명확하게 입증하였다.
- [1835] 게놈 라이브러리를 QIAmp DSP 순환 NA 키트(Qiagen 카탈로그 번호 61504)를 사용하여 야생형 혈장 샘플로부터 추출된 cfDNA로부터 제조하였다. 각 샘플에 대해, 30ng의 무세포 DNA(cfDNA)를 새우 알칼리 포스파테이스(New England Biolabs/NEB 카탈로그 번호 M0371B))에 이어 T4 DNA 폴리머레이스(NEB 카탈로그 번호 M0203B)) 및 PreCR 복구 믹스(NEB 카탈로그 번호 M0309B))로 처리하여 말단-복구시켰다. 생성된 평활-말단 DNA를 바코드 올리고뉴클레오타이드에 커플링시키고, Taq 라이게이스(NEB 카탈로그 번호 M0208B), T4 폴리뉴클레오타이드 카이네이스(NEB 카탈로그 번호 M0201B) 및 Bst 폴리머레이스(NEB 카탈로그 번호 M0328B)를 사용하여 이중-가닥을 만들었다. 바코드 커플링 단계는 Ultra II 결찰 키트(NEB 카탈로그 번호 E7648B)를 사용하여 cfDNA 단편에 결찰된 앵커 올리고를 통해 매개된 후 Ampure XP 비드(Beckman Coulter 카탈로그 번호 A63882)로 정제되었다. 바코드 올리고뉴클레오타이드 샘플 식별을 위한 바코드 서열(ID 영역) 및 증폭을 위한 프라이머 결합 서열(증폭 영역)로 구성되었다. Ampure XP 비드를 사용한 정제 후, 게놈 라이브러리를 NEBNext HF PCR 믹스(NEB 카탈로그 번호 M0541B) 및 게놈 라이브러리 PCR 프라이머($1\mu\text{M}$)를 사용하여 PCR(98°C 30초, 65°C 30초, 72°C 30초의 8 사이클)로 증폭시켰다.
- [1836] 포획 프로브의 페 패널을 사용하여 2개의 게놈 라이브러리에 표적화된 농축을 수행하였다. 페 포획 프로브 패널은 다음 유전자를 표적으로 하는 바이오티닐화된 포획 프로브로 구성되었다: AKT1, ALK, ALS, B2M, BRAF, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KEAP1, KRAS, MAP2K1, MET, MYC, NRAS, NTRK1, PIK3CA, PTEN, RET, RICTOR, ROS1, STK11 및 TP53. 프로브 패널 및 태깅된 게놈 라이브러리를 혼성화 완충액에서 65°C 에서 밤새 혼성화하였다. 혼성화 후, 표적화된 태깅된 게놈 라이브러리를 스트랩타비딘 코팅된 상자성 마이크로스피어(Thermo Fisher Scientific 카탈로그 번호 6500)를 사용하여 단리한 다음, 세척 완충액으로 세척하여 비결합된 태깅된 게놈 라이브러리를 제거하였다.
- [1837] 단리한 포획 프로브를 태깅된 게놈 라이브러리 단편을 주형으로 사용하여 NEBNext HF PCR 믹스로 연장시켜 포획 프로브, 포획 프로브가 cfDNA 단편에 결합하는 곳의 3'에 있는 cfDNA 단편의 역상보체 및 바코드 태그(ID 영역 + 증폭 영역)를 포함하는 하이브리드 분자를 생성하였다. 그런 다음, 하이브리드 분자를 다음과 같이 5 사이클 동안 하이브리드 PCR 프라이머($0.4\mu\text{M}$)를 사용하여 PCR 증폭시켰다:
- [1838] 연장: 60°C 30초, 72°C 2분, 98°C 30초의 1 사이클에 이어
- [1839] 증폭: 98°C 30초, 65°C 30초, 72°C 30초의 5 사이클.
- [1840] $100\mu\text{l}$ 의 생성된 산물을 스트랩타비딘 상자성 비드로부터 용리시키고, $100\mu\text{l}$ 의 NEBNext Ultra II Q5 마스터 믹스와 합하여 12 이상의 사이클 동안 증폭시켰다. 최종 산물을 Ampure XP 비드로 정제하였다.
- [1841] 저역 통과 전체 게놈 증폭을 다음과 같이 2개의 라이브러리에서 수행하였으며, 그 중 하나는 표적 포획 풀에도 있었다: 12.5ng의 각 게놈 라이브러리를 풀링하고, LPWG PCR 프라이머($0.4\mu\text{M}$ 의 정방향 프라이머 및 프라이머 63)와 함께 Q5 폴리머레이스(NEB 카탈로그 번호 M0492)를 사용하여 증폭시켰다. 라이브러리를 65°C 의 어닐링 온도로 14 사이클 동안 증폭시키고, 생성된 산물을 Ampure XP 비드로 정제하였다.
- [1842] LPWG 시퀀싱을 위한 표적 적용 범위는 1x였다. 이를 달성하기 위해, 풀링된 LPWG 라이브러리가 최종 시퀀싱 라이브러리 풀의 22%로 이루어지고 표적 포획 라이브러리가 풀의 78%로 이루어지도록 시퀀싱을 위해 라이브러리를 혼합하였다. NextSeq 500/550 시퀀서(Illumina)를 사용하여 리드 1의 경우 151 사이클, 리드 2의 경우 17 사이

프라이머)(0.4 μM)를 사용하여 증폭시켰다. 라이브러리를 98℃ 30초, 65℃ 30초, 72℃ 30초의 12 사이클 동안 증폭시켰다. 생성된 산물을 Ampure XP 비드로 정제하였다.

[1859] 각 LPWG 라이브러리가 1x 적용 범위로 시퀀싱되도록 표적 포획 라이브러리 및 LPWG 라이브러리를 풀링하였다. 최종 라이브러리를 두 리드에 대해 맞춤형 프라이머를 사용하여 리드 1의 경우 151 사이클, 리드 2의 경우 17 사이클 동안 NextSeq 500/550 시퀀서(Illumina)로 시퀀싱하였다.

[1860] 결과는 표적화된 포획 라이브러리로부터의 SNV/Indel 호출이 LPWG 라이브러리와 공동 시퀀싱에 의해 영향을 받지 않았음을 나타낸다. 이 실험은 또한 상이한 라이브러리 제조 방법을 사용하여 공동 시퀀싱을 수행할 수 있음을 보여주었다.

[1861] 역다중화 시퀀싱 리드의 결과는 표 7에 나타나 있으며, 이는 LPWG 라이브러리가 재현 가능하게 역다중화되고 (LPWG 리드의 분율%는 샘플 간에 일관됨), 동일한 샘플-식별 어댑터 모듈을 보유하는 표적화된 라이브러리와 구별될 수 있음을 나타낸다(예상 적용 범위 1은 실현 적용 범위에 가까움).

표 7

LPWG+ 표적화된 앰플리콘의 플로부터의 LPWG 라이브러리에 대한 서열 적용 범위

복제물	역다중화된 LPWG 리드의 수	리드의 LPWG 분율	적용 범위
1	19745521	16%	0.781
2	17946984	16%	0.712
3	17286025	16%	0.685
4	15855059	16%	0.628

[1862]

[1863] 표적화된 라이브러리의 시퀀싱으로부터 생성된 변이 호출은 도 29에 도시되어 있다. 도 29에 나열된 16개의 변이는 표적화된 라이브러리가 단독으로 시퀀싱된 8개의 샘플 모두(검은색 사각형) 및 저역 통과 전체 게놈 라이브러리와 함께 공동 시퀀싱된 4개의 표적화된 라이브러리 모두(검은색 삼각형)에 대해 호출되었다. 한 변이인 BRIP1 P1017L은 하나의 라이브러리에서만 호출되었고; 이 변이는 검정의 검출 한계 바로 이하에 있었다. 결과는 표적 포획과 함께 LPWG 시퀀싱을 포함하는 것이 돌연변이의 식별에 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

[1864] 실시예 10 - LPWG 및 포획 라이브러리 공동-로딩의 실행 가능성

[1865] 8NNN-47을 갖는 WT R538001 및 8NNN-48을 갖는 WT R538001(표적화된 라이브러리와 시퀀싱 공간을 공유하지 않는 LPWG 샘플)에 대한 적용 범위 깊이는 각각 0.93x 및 0.82x으로 계산되었으며, 이는 적용 범위가 아래 설명된 계산으로 정확하게 표적화될 수 있음을 시사한다:

1. LPWG 라이브러리를 로딩할 플로우 셀의 비율을 계산함(여기서, n 은 라이브러리에서의 샘플의 수; PL = 저역 통과 라이브러리의 비율; PC = 포획 라이브러리의 비율; VL = 저역 통과 라이브러리의 부피; VC = 포획 라이브러리의 부피; V = 총 부피):

$$1x \text{ 적용 범위의 경우: } n * 0.056 = PL$$

$$0.5x \text{ 적용 범위의 경우: } n * 0.028 = PL$$

$$1 - PL = PC$$

* 다중 LPWG 라이브러리의 경우, 다음과 같을 것이다:

$$1 - \text{SUM}(PL) = PC$$

2. 100 ng 에 대해 추가할 각각의 부피를 계산한다

$$PL * 100 / \text{라이ברי 농도} = VL$$

$$PC * 100 / \text{라이ברי 농도} = VC$$

3. 최종 라이브러리 부피를 계산한다

$$VL + VC = V$$

4. 최종 라이브러리 농도를 계산한다:

$$100 / V = \text{최종 라이브러리 농도}$$

[1866]

[1867]

도 24의 라이브러리 분포에 도시된 바와 같이, 3개의 샘플(LPWG 1개, 포획 1개 및 두 라이브러리 유형 1개) 각각으로부터 1000개의 리드를 검사하여 샘플로부터의 LPWG 및 표적 포획 라이브러리를 동일한 시퀀싱 플로우 셀에 공동 로딩하고, 해당 라이브러리를 리드 2 결과를 사용하여 성공적으로 역다중화할 수 있다는 개념 증명을 확립하였다.

[1868]

야생형 샘플로부터의 LPWG 라이브러리를 실시예 9에 기술된 바와 같이 처리된 야생형 샘플과 공동 로딩하였다. 4개의 LPA를 풀링하고, LPWG 라이브러리에 대해 증폭시켰다: 2개는 포획 라이브러리 샘플과 중첩되는 바코드를 갖고, 2개는 그렇지 않은 바코드를 갖는다. 각 야생형으로부터의 LPA(12.5ng)를 풀링한 다음, 65°C 어닐링 온도로 16 사이클 동안 증폭시킨 후, Ampure 비드로 정제하고 Qubit로 정량화하였다. 위의 계산에서 기술된 바와 같이 저역 통과 전체 게놈 라이브러리를 1x의 표적 적용 범위로 로딩하였다. 정방향 및 역방향 시퀀싱 프라이머는 표 1에 기술된 것이었으며, 리드 1은 표적 포획된 라이브러리(TCLA) 및 LPWG 라이브러리를 모두 시퀀싱할 것인 반면, 리드 2는 표적 포획된 라이브러리만을 시퀀싱할 것이다. LPWG 라이브러리로부터의 빈 서열은 리드 2에서 17개의 "G"로 표시되었다. 따라서, 리드 2를 사용하면 포획 라이브러리 서열과 LPWG 라이브러리 서열을 구별할 수 있다. 각 바코드 샘플(ID 영역 식별자)에 대한 리드의 총 수는 표 8에 나열되어 있다.

표 8

공동 로딩된 LPWG 및 포획 라이브러리로부터의 샘플당 총 리드.

바코드	샘플	라이브러리 유형	리드
8NNN-41	WT R537984	LPWG + 포획	53717504
8NNN-42	WT R537984	LPWG + 포획	55803131
8NNN-37	WT R537984	포획	33782985
8NNN-40	WT R537984	포획	35254861
8NNN-38	WT R537989	포획	43717435
8NNN-39	WT R537989	포획	41882025
8NNN-34	WT R537989	포획	42191765
8NNN-33	WT R537989	포획	42594803
8NNN-35	WT R537995	포획	47287483
8NNN-36	WT R537995	포획	45628161
8NNN-43	Lung8 Pos 대조군	포획	19031726
8NNN-44	NTC	포획	8880
8NNN-47	WT R538001	LPWG	20474208
8NNN-48	WT R538001	LPWG	18130947

[1869]

[1870] 실시예 11 - 어댑터-태깅된 모 라이브러리의 제조 방법

[1871] 어댑터-태깅된 모 라이브러리를 제조하는 동안 샘플 준비, 말단 복구 및 어댑터 결합의 예시적인 방법이 아래에 제공된다. 이들 방법은 임의의 개시된 키트 구성요소와 함께 본 개시내용의 임의의 품질 관리(QC) 프로세스에서 또는 임의의 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 당업자라면 아래의 시약이 예시적인 목적임을 인식할 것이며, 즉, 아래 시약의 양은 임의의 적합한 양으로 변경될 수 있고 특정 시약 다른 적절한 시약과 상호교환될 수 있다.

[1872] 샘플 준비

[1873] 각 DNA 샘플을 적합한 농도(예를 들어, 10 ng/ μ l)로 준비하고, TEZ 완충액(TRIS-EDTA)과 같은 적절한 완충액으로 희석하였다.

[1874] 말단 복구

[1875] 상업적으로 입수 가능한 효소 및 완충액을 사용하여 DNA 단편을 말단 복구하였다. 5 μ l의 말단 복구 마스터 믹스를 단일 튜브 반응 혼합물의 각 DNA 샘플에 첨가하였다. 말단 복구 마스터 믹스는 상업적으로 이용 가능한 말단 복구 효소(예를 들어, NEBNext Ultra II End Prep Enzyme MIX®)와 적절한 말단 복구 완충액(예를 들어, NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer®)을 배합함으로써 제조하였다. 반응 혼합물을 다음 반응 조건하에 유전자증폭기에서 인큐베이션하였다: 20°C에서 15분 동안, 이어서 70°C에서 10분 동안.

[1876] 어댑터 결합

[1877] 복수의 어댑터 모듈을 포함하는 하나의 고유한 어댑터 세트를 각각의 말단-복구된 샘플에 할당하였다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다. 5 μ l의 어댑터 세트를 할당된 말단-복구된 샘플에 첨가한 후, DNA 라이게이스(예를 들어, NEB Ultra II Ligation Mix®)를 포함하는 30 μ l의 결합 믹스를 첨가하였다. 반응 혼합물을 20°C에서 30분 동안 인큐베이션하여 어댑터-태깅된 DNA 단편을 생성하였다.

[1878] 각 어댑터의 결합 가닥 모듈은 47nt 길이였고, (5' → 3'로) 증폭 영역(AMP, 25nt), 두 샘플을 식별할 수 있는 다기능성 ID 영역(8nt) 및 고유한 단편, UMI 멀티플라이어(3nt), 앵커(10nt) 및 3' dT 오버행으로 구성된다. 예시적인 어댑터 구조는 표 9에 제공되어 있다. 예시적인 어댑터 결합 가닥은 표 10에 제공되어 있다.

[1879] 어댑터 모듈 세트는 각 어댑터 세트가 4가지 유형의 앵커 영역을 포함하는 등몰량의 어댑터 모듈을 포함하도록 제조하였으며, 여기서 각 앵커 유형은 A, T, C 및 G로부터 선택된 3' 말단 뉴클레오타이드를 가졌다.

표 9

예시적인 어댑터 구조

어댑터 이름	설명/서열
결찰 가닥/ 앵커 영역 1 (16-1)	AMP-ID 영역/UMI 멀티플라이어-ACGTATGCCA (서열번호 1)-3'dT
결찰 가닥/ 앵커 영역 2 (16-2)	AMP-ID 영역/UMI 멀티플라이어-CTAGCGTTAC (서열번호 2)-3'dT
결찰 가닥/ 앵커 영역 3 (16-3)	AMP-ID 영역/UMI 멀티플라이어-GATCGACATG (서열번호 3)-3'dT
결찰 가닥/ 앵커 영역 4 (16-4)	AMP-ID 영역/UMI 멀티플라이어-TGCATCAGGT (서열번호 4)-3'dT
비결찰 가닥/앵커 영역 1 (16_1)	<i>TGGCATACGT</i> (서열번호 18)
비결찰 가닥/앵커 영역 2 (16_2)	<i>GTAACGCTAG</i> (서열번호 19)
비결찰 가닥/앵커 영역 3 (16_3)	<i>CATGTCGATC</i> (서열번호 20)
비결찰 가닥/앵커 영역 4 (16_4)	<i>ACCTGATGCA</i> (서열번호 21)

[1880]

표 10

예시적인 어댑터 결찰 가닥 서열

3' dT 오버행을 갖는 어댑터 모듈 결찰 가닥	서열번호
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAAAAATCCTNNNACGTATGCCAT	22
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAAATGATCTNNNACGTATGCCAT	23
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAAGTAATAGNNNACGTATGCCAT	24
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACACCTCCGNNNACGTATGCCAT	25
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACGCCCCATNNNACGTATGCCAT	26
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACTACCAAGNNNACGTATGCCAT	27
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACTGTCGTTNNNACGTATGCCAT	28
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGCAAATGGNNNACGTATGCCAT	29
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGCTCGAGCNNNACGTATGCCAT	30
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGTCCACAANNNACGTATGCCAT	31
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGTTACCCTNNNACGTATGCCAT	32
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATAGTTTTNNNACGTATGCCAT	33
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATCTCAGAGNNNACGTATGCCAT	34
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATGACCTCCTNNNACGTATGCCAT	35
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATTACGGCANNNACGTATGCCAT	36
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAAACAAAACNNNTGCATCAGGTT	37
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAACACTGCANNNTGCATCAGGTT	38
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAATCGCGATNNNTGCATCAGGTT	39
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAATGGTGGANNNTGCATCAGGTT	40
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACAACCTCTNNNTGCATCAGGTT	41
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACGCCCGAANNNTGCATCAGGTT	42
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACGTATGACNNNTGCATCAGGTT	43
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGAAACGACNNNTGCATCAGGTT	44
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGACTCTGANNNTGCATCAGGTT	45
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGTCACTCTNNNTGCATCAGGTT	46
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATACTGGACNNNTGCATCAGGTT	47
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATGCGATACNNNTGCATCAGGTT	48
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATGTTAATGNNNTGCATCAGGTT	49
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATTGTACTTNNNTGCATCAGGTT	50
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATTTGGCTCNNNTGCATCAGGTT	51
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAAACGCCTANNNGATCGACATGT	52
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAAAGTTTCANNNGATCGACATGT	53
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAACAGCGAANNNGATCGACATGT	54
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAAGCGCCTGNNNGATCGACATGT	55
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACAACCCTTNNNGATCGACATGT	56
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACAGAATAANNNGATCGACATGT	57
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACGGACACCNNNGATCGACATGT	58

[1881]

TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGCCTATTNNNGATCGACATGT	59
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGCGTCCAGNNNGATCGACATGT	60
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGGTACAAGNNNGATCGACATGT	61
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATAACCCTCNNNGATCGACATGT	62
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATAGGAGTGNNNGATCGACATGT	63
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATCCGCATTNNNGATCGACATGT	64
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATGCGTCAANNNGATCGACATGT	65
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATTGGTAATNNNGATCGACATGT	66
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAAATAGCTTNNNCTAGCGTTACT	67
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAAGAGAGAGNNNCTAGCGTTACT	68
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACAACCTGANNNCTAGCGTTACT	69
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACATATGGCNNNCTAGCGTTACT	70
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACCATATCCNNNCTAGCGTTACT	71
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACGAGGTCCNNNCTAGCGTTACT	72
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACGTCAATGNNNCTAGCGTTACT	73
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACACTTATCATNNNCTAGCGTTACT	74
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGCATTGACNNNCTAGCGTTACT	75
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACAGGAGGTATNNNCTAGCGTTACT	76
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATAACAGTTNNNCTAGCGTTACT	77
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATCGAACACNNNCTAGCGTTACT	78
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATGCATAATNNNCTAGCGTTACT	79
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATGTCATAANNNCTAGCGTTACT	80
TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACATTGCGCGGNNNCTAGCGTTACT	81

* 표 10 의 서열에서 NNN 은 3-뉴클레오타이드 UMI 멀티플라이어를 나타내며, 여기서 각각의 N 은 A, G, C, T 중 어느 하나로부터 선택될 수 있다.

[1882]

[1883]

결찰 후, 100 μ l의 DNA 정제 비드(예를 들어, Ampure XP®; Beckman®)를 각 샘플에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2분 동안 인큐베이션하였다. 비드를 자석 위에서 200 μ l의 80% 에탄올/물(v/v)로 2회 세척하고, 공기 건조시킨 다음, 25 μ l의 TRIS-EDTA(TEZ)로 용리시켰다. 어댑터-태깅된 DNA 단편을 포함하는 약 25 μ l의 용리된 정화된 상청액을 증폭을 위해 새로운 PCR 튜브 또는 미세역가 플레이트 웰로 옮겨 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리를 생성하였다. 일부 실시형태에서, 이 단계에서의 DNA 라이브러리는 LIBS로 지칭될 수 있다.

[1884]

라이브러리 증폭

[1885]

어댑터 결찰 후, PCR 시약, 고성능(high-fidelity) DNA 폴리머레이스 효소(예를 들어, NEBNext® Ultra II Q5® 마스터 믹스; New England Biolabs®)를 포함하는 75 μ l의 라이브러리 PCR 믹스 및 라이브러리 프라이머를 각 샘플에 첨가하였다. 반응 혼합물을 다음 PCR 매개변수를 사용하여 증폭시켰다:

[1886]

60°C 30초, 72°C 2분, 98°C 30초;

[1887]

98°C 30초, 65°C 30초 및 72°C 30초의 8 사이클.

[1888]

라이브러리 프라이머는 서열 TGCAGGACCAGAGAATTCGAATACA(서열번호 5)를 갖는 단일 증폭 프라이머이다.

[1889]

초기 3분 인큐베이션 주기를 수행하여 결찰-가닥-주형 연장에 의해 복수의 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편을 형성한 후, 연속 어댑터-태깅된 dsDNA 단편의 8 사이클 PCR 증폭을 수행하여 어댑터-태깅된 DNA 단편 분자를 포함하는 증폭된 태깅된 DNA 라이브러리를 형성하였다.

[1890]

증폭 후, 120 μ l의 DNA 정제 비드를 결찰 믹스에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2분 동안 인큐베이션하였다. 비드를 자석 위에서 200 μ l의 80% 에탄올/물(v/v)로 2회 세척하고, 공기 건조시킨 다음, 20 μ l의 TEZ 완충액으로 용리시켰다. 증폭된 태깅된 DNA 라이브러리를 포함하는 정화된 상청액을 새로운 PCR 튜브로 옮겼다.

[1891]

이 단계의 라이브러리는 어댑터-태깅된 모 라이브러리 또는 증폭 후 라이브러리(LPA)로 지칭될 수 있다. LPA는 표적 포획 증폭 후 라이브러리(TC LPA) 및 전체-게놈 증폭 후 라이브러리(WG LPA)를 생성하기 위해 적어도 2개의 부분으로 분할하였다. TC LPA는 LPA의 일부를 취하여 직접 생성하였다. WG LPA는 LPA 또는 TC LPA를 1:10 희석하여 생성하였다.

[1892]

일부 실시형태에서, TC LPA 및 WG LPA는 품질 관리(QC) 프로세스를 거칠 수 있다. 제조업체의 지침에 따라

Qubit™ dsDNA HS 검정 키트를 사용하여 LPA의 농도를 결정하였다. LPA의 농도도 TC LPA의 농도였다. LPA 또는 TC LPA를 1:10 희석하여 WG LPA를 만든 경우, 먼저 WG LPA의 농도를 결정하고 TC LPA 농도를 $10 \times [\text{WG LPA의 농도}]$ 로 계산하였다. 일부 실시형태에서, 농도가 적어도 $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 내지 적어도 $80 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 인 TC LPA만을 하류 프로세스에서 사용하였다. 일부 실시형태에서, 농도가 적어도 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 내지 적어도 $8 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 인 WG LPA만을 하류 프로세스에서 사용하였다.

[1893] 실시예 12 - 표적 포획 라이브러리(TCL) 또는

[1894] 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA)의 제조 방법

[1895] 관심 유전자좌(표적 영역)를 포획하고 농축시키기 위해, 실시예 11에 기술된 바와 같이 제조된 어댑터-태깅된 모 라이브러리의 일부를 표적 유전자 패널에 특이적인 포획 프로브 모듈의 풀에 다중화하고 혼성화할 수 있다. 표적 유전자 패널은 질환에 특이적인 유전자의 집합일 수 있다. 예를 들어, 포획 프로브 모듈은 아래 표 11에 기술된 바와 같은 하나 이상의 폐암 유전자에 특이적일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폐암 유전자에 특이적인 포획 프로브 모듈의 세트는 폐 프로브로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 포획 프로브의 특정 세트, 예를 들어, 상동 재조합이 결핍되도록 설계된 포획 프로브 세트(HRD 프로브)가 키트 구성요소의 QC 프로세스에 사용될 수 있다. HRD 프로브에 대한 표적 유전자의 예시적인 세트는 *AR*, *ATM*, *ATR*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *ERBB2*, *ESR1*, *FANCA*, *FANCL*, *HDAC2*, *KRAS*, *MYC*, *PALB2*, *PIK3CA*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD54L*, *RB1*, *SRY* 및 *TP53*으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 포함한다.

표 11

폐암에 대한 예시적인 표적 유전자

변이 유형	유전자의 번호	유전자 이름
SNV(단일-뉴클레오타이드 변이) /Indel	27	<i>AKT1</i> , <i>ALK</i> , <i>BRM</i> , <i>BRAF</i> , <i>CD274</i> , <i>CDK2NA</i> , <i>EGFR</i> , <i>ERBB2</i> , <i>FGFR1</i> , <i>FGFR2</i> , <i>FGFR3</i> , <i>KEAP1</i> , <i>KRAS</i> , <i>MAP2K1</i> , <i>MET</i> , <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>MYC</i> , <i>NRAS</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>PMS2</i> , <i>PTEN</i> , <i>RET</i> , <i>ROS1</i> , <i>STK11</i> , <i>TP53</i>
융합/재배열	8	<i>ALK</i> , <i>BRAF</i> , <i>EGFR</i> , <i>FGFR2</i> , <i>FGFR3</i> , <i>NTRK1</i> , <i>RET</i> , <i>ROS1</i>
CNV (카피 수 변이)	23	<i>AKT1</i> , <i>B2M</i> , <i>BRAF</i> , <i>CD274</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>EGFR</i> , <i>ERBB2</i> , <i>FGFR1</i> , <i>FGFR2</i> , <i>FGFR3</i> , <i>KRAS</i> , <i>MET</i> , <i>MYC</i> , <i>NRAS</i> , <i>NTRK1</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>PMS2</i> , <i>PTEN</i> , <i>RET</i> , <i>RICTOR</i> , <i>ROS1</i> , <i>STK11</i> , <i>TP53</i>
대조군	1	<i>SRY</i>

[1896]

[1897] 실시예 11에 따라 제조된 LPA의 일부를 표적 포획을 위한 출발 물질로서 사용하였다. 이 단계의 라이브러리(예를 들어, LPA의 일부) 표적 포획 증폭 후 라이브러리(TC LPA)로도 지칭될 수 있다.

[1898] TC LPA를 혼성화 반응 혼합물에서 포획 프로브 모듈과 배합하였다. 포획 프로브 모듈의 양은 임의의 적합한 양일 수 있다. 이 실시예에서, 포획 프로브 모듈의 부피는 TC LPA의 총 부피의 $\frac{1}{2}$ 이었다.

[1899] 혼성화 반응 혼합물을 유전자 증폭기에서 98°C 에서 2분 동안 변성시켰다. 그런 다음, 혼성화 반응 혼합물을 60°C 로 낮추고, 얼음 위에서 미리 냉각된 PCR 랙으로 옮겼다. 혼성화 완충액을 첨가하고, 각 혼성화 반응 혼합물을 유전자 증폭기에서 98°C 온도에서 1분 동안 변성시켰다. 그런 다음, 온도를 65°C 로 낮추고, 12시간 내지 24시간 동안 혼성화 반응을 진행시켰다.

[1900] 혼성화 반응이 완료된 후, TEZ 완충액 중 $30\mu\text{L}$ 의 스트렙타비딘-코팅된 비드(Dynabeads MyOne C1)를 각 혼성화 반응물과 배합하고, 실온에서 20분 동안 방치하였다. 비드를 자석 위에서 수집하고, $200\mu\text{L}$ 의 TEZ 완충액으로 1회 세척하였다. 세척된 비드를 $20\mu\text{L}$ 의 TEZ 완충액에 재현탁시켰다. $80\mu\text{L}$ 의 적합한 세척 완충액을 재현탁된 비드에 첨가하고, 혼합물을 45°C 에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 비드를 자석을 사용하여 분리하고, $200\mu\text{L}$ 의 TEZ 완충액으로 세척하였다. 세척된 비드를 $20\mu\text{L}$ 의 TEZ 완충액에 재현탁시켰다.

- [1901] 혼성화 후, 포획 프로브의 프라이머 연장을 사용하여 포획된 게놈 서열, DNA 단편 접합부의 A/T 오버행 및 부착된 어댑터 모듈을 카피하여 하이브리드 분자의 라이브러리를 형성하였다. 연장된 포획 프로브, 즉, 하이브리드 분자는 한 쪽 끝에는 포획 프로브 모듈이 있고 및 다른 쪽 끝에는 어댑터 모듈이 측면에 있는 DNA 말단을 포함한다. POST-CAP 마스터 믹스를 혼성화 반응 혼합물(즉, 위에서 재현탁된 세척된 비드)에 첨가하여 비드상 프로브 연장을 수행하였다. POST-CAP 마스터 믹스는 Post Amp PCR 믹스 및 Post Hyb 프라이머 믹스를 포함한다. Post Hyb 프라이머 믹스를 사용하여 시퀀싱 어댑터, 예를 들어, Illumina® 시퀀싱 어댑터를 하이브리드 분자에 혼입시켰다. 일부 실시형태에서, Post Amp PCR 믹스는 고충실도 DNA 폴리머레이스, 예를 들어, NEBNext Ultra II Q5 마스터 믹스로 구성되었다. 일부 실시형태에서, 80 μ l의 POST-CAP 마스터 믹스를 각 혼성화 반응 혼합물에 첨가하였다.
- [1902] 일부 실시형태에서, Post Hyb 프라이머 믹스는 다음을 포함한다:
- [1903] 정방향 프라이머:
- [1904] AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCATGCAGGACCAGAGAATTCTGAATACA(서열번호 7) 및
- [1905] 역방향 프라이머:
- [1906] CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGCACGGGAGTTGATCCTGGTTTTCAC(서열번호 82).
- [1907] 비드상 프로브 연장 반응을 다음 프로그램에 따라 유전자 증폭기에서 수행하였다: 60 $^{\circ}$ C 30초; 72 $^{\circ}$ C 30초; 98 $^{\circ}$ C 30초; 98 $^{\circ}$ C 30초; 65 $^{\circ}$ C 30초; 72 $^{\circ}$ C 30초의 5 사이클.
- [1908] 이 단계에서 세척된 비드를 포함하는 반응 혼합물은 표적 포획 라이브러리(TCL)로 지칭될 수 있다.
- [1909] 다음으로, 비드를 자석 위에서 반응 혼합물로부터 분리하였다. 상청액을 새로운 PCR 튜브로 옮기고, Post AMP PCR 믹스 및 Post Hyb 프라이머 믹스를 포함하는 TC AMP 마스터 믹스와 배합하였다. 일부 실시형태에서, 100 μ l의 TC AMP 마스터 믹스를 상청액을 포함하는 각 PCR 튜브에 첨가하였다. 상청액을 포함하는 생성된 혼합물을 다음 증폭 프로그램을 사용하여 유전자 증폭기에서 증폭시켰다:
- [1910] 98 $^{\circ}$ C 30초; 65 $^{\circ}$ C 30초; 72 $^{\circ}$ C 30초의 12 사이클.
- [1911] 증폭 후, 120 μ l의 DNA 정제 비드(예를 들어, Ampure XP®; Beckman®)를 각 PCR 튜브에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2분 동안 인큐베이션하였다. 비드를 자석 위에서 200 μ l의 80% 에탄올/물(v/v)로 2회 세척하고, 공기 건조시킨 다음, 50 μ l의 TRIS-EDTA(TEZ)로 용리시켰다. 증폭된 하이브리드 분자를 포함하는 약 50 μ l의 용리된 정화된 상청액을 새로운 PCR 튜브로 옮겼다. 이 단계에서의 DNA 라이브러리는 증폭된 표적 포획 라이브러리(TCLA) 또는 증폭된 표적 포획 라이브러리로 지칭될 수 있다. 일부 실시형태에서, TCLA 내의 증폭된 하이브리드 분자는 도 28에 도시된 바와 같이 분자의 두 말단에 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다는 점에서 "시퀀싱 준비"가 완료되어 있다.
- [1912] 실시에 13 - 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA)의 제조 방법
- [1913] WG LPA 라이브러리를 실시에 11에 따라 생성하였다. 각 WG LPA는 제조업체의 지침에 따라 Qubit™ dsDNA HS 검정 키트를 사용하여 정량화할 수 있다.
- [1914] WG LPA의 증폭 전에, 하나 초과 테스트 샘플이 분석되었기 때문에 샘플 입력 정규화 단계를 수행하였다. 각 테스트 샘플에 대해, 고유하게 할당된 어댑터 세트를 사용하여 하나의 WG LPA를 생성하였으며, 각 WG LPA를 "전송 풀"로 풀링하였다. 적합한 양의 전송 풀을 새로운 튜브로 옮기고, TEZ 완충액을 사용하여 샘플 부피를 40 μ l로 조정하여 증폭 준비가 된 정규화된 WG LPA 풀을 생성하였다.
- [1915] 각 WG LPA 풀에 WG AMP 마스터 믹스를 첨가하여 WG LPA 증폭 혼합물을 생성하였다. WG AMP 마스터 믹스는 Post AMP PCR 믹스 및 게놈 믹스를 포함한다. 게놈 믹스는 다음을 포함하는 프라이머 혼합물이다:
- [1916] 게놈 믹스 프라이머 F:
- [1917] AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCATGCAGGACCAGAGAATTCTGAATACA
- [1918] (서열번호 7)
- [1919] 게놈 믹스 프라이머 R:

- [1920] CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGTGCAGGACCAGAGAATTCGAATACA
- [1921] (서열번호 9).
- [1922] 60 μ l의 WG AMP 마스터 믹스를 각각의 WG PLA 풀에 첨가하였다.
- [1923] WG LPA 증폭 혼합물을 다음 증폭 프로그램을 사용하여 유전자 증폭기에서 증폭시켰다:
- [1924] 98 $^{\circ}$ C 30초; 65 $^{\circ}$ C 30초; 72 $^{\circ}$ C 30초의 12 사이클.
- [1925] 증폭 후, 120 μ l의 DNA 정제 비드(예를 들어, Ampure XP $^{\circ}$; Beckman $^{\circ}$)를 각 PCR 튜브에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2분 동안 인큐베이션하였다. 비드를 자석 위에서 200 μ l의 80% 에탄올/물(v/v)로 2회 세척하고, 공기 건조시킨 다음, 50 μ l의 TRIS-EDTA(TEZ)로 용리시켰다. 약 50 μ l의 증폭된 라이브러리를 포함하는 용리된 정화된 상청액을 새로운 PCR 튜브로 옮겼다. 이 단계에서의 DNA 라이브러리는 증폭된 전체-게놈 라이브러리(WGLA) 또는 저역 통과 전체 게놈(LPWG) 라이브러리로 지칭될 수 있다.
- [1926] 실시예 14 - 조합된 라이브러리의 시퀀싱 방법
- [1927] 실시예 11 내지 실시예 13에 따라 생성된 TCLA 및 WGLA를 조합하여 시퀀싱 준비가 완료된 라이브러리(SRL)를 생성하였다.
- [1928] 일부 실시형태에서, 조합 전에, TCLA 및 WGLA는 품질 관리(QC) 프로세스를 거쳤다. TCLA 및 WGLA의 농도를 제조업체의 지침에 따라 Qubit $^{\text{TM}}$ dsDNA HS 검정 키트를 사용하여 결정하였다. 일부 실시형태에서, 농도가 적어도 1 ng/ μ l 내지 적어도 80 ng/ μ l인 TCLA만을 하류 프로세스에서 사용하였고; 농도가 적어도 1 ng/ μ l 내지 적어도 80 ng/ μ l인 WGLA만을 하류 프로세스에서 사용하였다.
- [1929] TCLA 및 WGLA를 적합한 부피로 조합하여 SRL을 생성하였다. 생성된 SRL을 시퀀싱 전에 제조업체의 지침에 따라 Qubit $^{\text{TM}}$ dsDNA HS 검정 키트를 사용하여 정량화하였다.
- [1930] 제조업체의 지침에 따라 Illumina $^{\circ}$ 시퀀서, 예를 들어, NextSeq 550을 사용하여 SRL을 시퀀싱하였다. 아래 서열을 포함하는 시퀀싱 프라이머를 사용하였다:
- [1931] FWD Seq 프라이머:
- [1932] CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGCACGGGACCAGAGAATTCGAATACA(서열번호 10)
- [1933] REV Seq 프라이머:
- [1934] GTGACTGGCACGGGACCAGAGAATTCGAATACA(서열번호 11).
- [1935] 실시예 15 - 키트 시약 및 프라이머의 품질 관리
- [1936] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물을 말단 복구 완충액, 말단 복구 효소, 결찰 믹스, 라이브러리 PCR 믹스, 라이브러리 프라이머, Post Amp PCR 믹스, Post Hyb 프라이머 믹스, 게놈 믹스, FWD Seq 프라이머 및 REV Seq 프라이머로부터 선택된 하나 이상의 시약 및/또는 프라이머를 포함하는 키트로 조립하였다. 이들 시약 및 프라이머 각각은 본 개시내용의 다른 곳에서 기술되거나 또는 실시예 11 내지 실시예 14에 기술된 바와 같은 상응하는 조성물일 수 있다.
- [1937] 본 개시내용의 키트의 높은 성능을 보장하기 위해, 키트의 상기 시약 및 프라이머 중 하나 이상은 사용 전에 품질 관리(QC) 프로세스를 거칠 수 있다. 이 QC 프로세스는 50:50 비의 세포주의 블렌드인 NA09596/NA12878로부터의 전단된 게놈 DNA를 포함하는 샘플을 사용할 수 있다(세포주 gDNA는 Coriell Institute로부터 공급됨). 이 샘플은 또한 50:50 혼합 샘플로도 지칭될 수 있다.
- [1938] 이 예시적인 실시예에서, 적합한 양의 50:50 혼합 샘플을 각각 포함하는 적어도 2개의 테스트 샘플을 TEZ 완충액에서 제조하였다. 고유한 어댑터 세트를 각 테스트 샘플에 할당하였다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다. 각 테스트 샘플에 대해, 말단 복구, 어댑터 결찰 및 라이브러리 증폭을 실시예 11의 방법에 따라 수행하여 LPA를 생성하였다. LPA의 생성 후, TC LPA 및 WG LPA를 실시예 11의 방법에 따라 생성하였다. TC LPA 및 WG LPA에 대한 QC 프로세스를 수행하고, QC를 통과한 라이브러리를 하류 사용을 위해 선택하였다. 이 실시예에서 시약 및 프라이머의 QC를 위해, 농도가 적어도 1 ng/ μ l 내지 적어도 80 ng/ μ l인 TC LPA를 하류 프로세스에서 사용하였고; 농도가 적어도 0.1 ng/ μ l 내지 적어도 8 ng/ μ l인 WG LPA를 하

류 프로세스에서 사용하였다.

[1939] 각 테스트 샘플의 TC LPA를 사용하여 실시예 12의 방법에 따라 HRD 프로브를 사용하여 TCL을 생성하였고, 이어서 실시예 12의 방법에 따라 TCLA를 생성하였다. 각 테스트 샘플의 WG LPA를 사용하여 실시예 13의 방법에 따라 WGLA를 생성하였다. 생성된 TCLA 및 WGLA 각각에 대해 QC 프로세스를 수행하였으며, QC를 통과한 각 TCLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 적어도 80 ng/ μ l의 농도를 갖고, QC를 통과한 각 WGLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 적어도 80 ng/ μ l의 농도를 갖는다. QC를 통과한 각 테스트 샘플의 TCLA 및 각 WGLA를 조합하여 실시예 14의 방법에 따라 시퀀싱하였다.

[1940] 시퀀싱 분석 후, 하나 이상의 허용 기준에 따라 이 실시예에서 시약 및 프라이머가 키트의 높은 성능을 가능하게 하는 품질 요구사항을 충족하는지 여부를 결정하였다. 하나 이상의 허용 기준은 시약 및 프라이머의 QC에 대해 설정하였다. 허용 기준의 예시적인 세트가 표 12에 기술되어 있다.

표 12

키트의 시약 및 프라이머에 대한 예시적인 허용 기준

테스트 설명	샘플	허용 기준
SNP (단일-뉴클레오타이드 다형성) 검출	50:50 혼합 샘플	표 16에 따라 SNP의 적어도 90%가 검출됨
카피 수 손실	50:50 혼합 샘플	적어도 하나의 카피 수 손실이 검출됨
Homopolymer (저역 통과 증폭)	50:50 혼합 샘플	적어도 100,000개 내지 2,000,000개의 리드가 주어진 샘플에 대해 검출됨
적용 범위	50:50 혼합 샘플	관심 영역의 적어도 90%가 3%의 AF (대립유전자 빈도)에서 변이를 검출할 수 있는 적용 범위를 가짐
표적외 리드	50:50 혼합 샘플	총 시퀀싱 리드의 20% 이하

[1941]

[1942] 실시예 16 - 키트 어댑터 세트의 품질 관리

[1943] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물을 하나 이상의 어댑터 세트를 포함하는 키트로 조립하였다. 이러한 어댑터 세트는 본 개시내용에 기재된 임의의 어댑터 모듈을 포함할 수 있다. 어댑터의 높은 성능을 보장하기 위해, 각 어댑터 세트는 키트에 포함되기 전에 품질 관리(QC) 프로세스를 거칠 수 있다.

[1944] 어댑터 결찰 효율성을 위한 QC.

[1945] 이 실시예에서, 어댑터 결찰 효율을 테스트하기 위한 어댑터 QC 프로세스를 위에 기술된 50:50 혼합 샘플을 사용하여 수행하였다.

[1946] 적합한 양의 50:50 혼합 샘플을 각각 포함하는 적어도 2개의 테스트 샘플을 TEZ 완충액에서 제조하였다. 고유한 어댑터 세트를 각 테스트 샘플에 할당하였다. 각 테스트 샘플에 대해, 말단 복구, 어댑터 결찰 및 라이브러리 증폭을 실시예 11의 방법에 따라 수행하여 LPA를 생성하였다.

[1947] 각 어댑터 세트에서 어댑터 부착의 효율을 측정하기 위해 LPA에 대해 QC 프로세스를 수행하였다. 위에 기재된 바와 같이, 어댑터 부착의 효율은 입력 DNA 단편의 어댑터-태깅된 DNA 라이브러리 분자로의 전환율 또는 백분율을 지칭한다. 어댑터 부착 효율의 QC를 위해 하나 이상의 허용 기준을 설정하였다. 이 실시예에서, 어댑터 부착 효율에 대한 허용 기준은 LPA 5ng 내지 50ng의 입력 DNA와 함께 적어도 1 ng/ μ l 내지 200 ng/ μ l의 농도를 갖는 것이었다.

[1948] 어댑터 분포 및 서열 식별을 위한 QC

- [1949] 야생형(WT) cfDNA 샘플을 사용하여 어댑터 분포 및 서열 식별을 테스트하기 위한 QC 프로세스를 수행하였다. WT cfDNA 샘플은 농도가 적어도 $0.2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 였으며, 건강한 사람 또는 다수의 건강한 사람으로부터 얻었다.
- [1950] 적합한 양의 WT cfDNA를 각각 포함하는 적어도 2개의 테스트 샘플을 TEZ 완충액에서 제조하였다. 고유한 어댑터 세트 각 테스트 샘플에 할당하였다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다. 각 테스트 샘플에 대해, 말단 복구 및 어댑터 결찰을 실시예 11의 방법에 따라 수행하여 어댑터-태깅된 DNA 단편(LIBS)의 집합을 생성하였다.
- [1951] 각 테스트 샘플의 LIBS의 증폭을 인덱스 프라이머를 사용하여 수행하였으며, 여기서 하나 이상의 고유한 인덱스 프라이머는 각 테스트 샘플의 각 LIBS에 할당하였다. 이 실시예에서, 인덱스 프라이머는 Illumina[®] P5 및/또는 P7 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인덱스 프라이머는 서열번호 13 또는 서열번호 14의 서열을 포함한다. 적절한 인덱스 프라이머, 라이브러리 PCR 믹스(실시예 11에 기재된 바와 같음) 및 서열번호 7의 서열을 포함하는 프라이머 F를 각 LIBS에 첨가하여 증폭 혼합물을 생성하였다. 생성된 혼합물을 아래 프로그램에 따라 유전자 증폭기에서 증폭시켰다:
- [1952] 60°C 30초, 72°C 2분, 98°C 30초;
- [1953] 98°C 30초, 65°C 30초 및 72°C 30초의 12 사이클.
- [1954] 증폭 후, $120\mu\text{l}$ 의 DNA 정제 비드(예를 들어, AMPure 비드)를 결찰 믹스에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2분 동안 인큐베이션하였다. 비드를 자석 위에서 $200\mu\text{l}$ 의 80% 에탄올/물(v/v)로 2회 세척하고, 공기 건조시킨 다음, $20\mu\text{l}$ 의 TEZ 완충액으로 용리시켰다. 증폭된 태깅된 DNA 라이브러리를 포함하는 정화된 상청액을 새로운 PCR 튜브로 옮겼다.
- [1955] 이 단계에서의 라이브러리는 인덱스 증폭 후 라이브러리(LPIA)로 지칭될 수 있다. LPIA의 농도는 제조업체의 지침에 따라 Qubit[™] dsDNA HS 검정 키트를 사용하여 결정하였다.
- [1956] 시퀀싱 전에, 각 LPIA를 새로운 PCR 튜브에 배합하여 각 테스트 샘플의 LPIA를 풀링하였다. TEZ 완충액을 사용하여 조합된 LPIA 풀을 적합한 농도로 만들었다. 조합된 LPIA 풀의 농도를 제조업체의 지침에 따라 Qubit[™] dsDNA HS 검정 키트를 사용하여 결정하였다.
- [1957] 제조업체의 지침에 따라 Illumina[®] 시퀀서, 예를 들어, NextSeq 550을 사용하여 LPIA 풀을 시퀀싱하였다. 아래 서열을 포함하는 시퀀싱 프라이머를 사용하였다:
- [1958] FWD Seq 프라이머:
- [1959] CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGCACGGGACCAGAGAATTCGAATACA(서열번호 10);
- [1960] REV Seq 프라이머:
- [1961] GTGACTGGCACGGGACCAGAGAATTCGAATACA(서열번호 11);
- [1962] 및 증폭 동안 사용된 인덱스 프라이머의 서열을 포함하는 인덱스 시퀀싱 프라이머.
- [1963] 시퀀싱 분석 후, 하나 이상의 허용 기준에 따라 어댑터 세트가 키트의 높은 성능을 가능하게 하는 품질 요구사항을 충족하는지 여부를 결정하였다. 어댑터 분포 및 서열 식별의 QC에 대해 하나 이상의 허용 기준을 설정하였다. 이 실시예에서 사용된 어댑터 분포 및 서열 식별의 QC에 대한 예시적인 허용 기준은 표 13에 나열되어 있다.
- [1964] 어댑터 세트의 교차-오염을 또한 분석하였다. 주어진 샘플에 할당되지 않은 어댑터가 이 샘플의 시퀀싱 리드에 나타나면 어댑터 세트의 교차-오염이 발생할 수 있다. 이 실시예에서, 어댑터 세트 교차-오염의 QC에 대한 허용 기준은 다음을 포함한다:
- [1965] a. 각 샘플에 대해, "바코드 혼선"의 0.05% 내지 2% 이하인 것;
- [1966] b. 각 샘플에 대해, 리드의 1% 내지 20% 이하가 미지의 어댑터로부터 발생하는 것(즉, 어댑터 세트에 포함되지 않음).
- [1967] 본 명세서에서 사용되는 바코드 혼선은 하나의 바코드(어댑터)의 리드가 실제로 어댑터 B로부터 생성될 때 어댑터 A로 잘못 라벨링되는 것을 지칭한다.

[1968] 어댑터 분포 및 서열 식별에 대한 허용 기준의 예시적인 세트는 표 13에 제시되어 있다.

표 13

어댑터 분포 및 서열 식별에 대한 예시적인 허용 기준

테스트 설명	샘플	허용 기준
바코드 혼선	WT cfDNA	리드의 0.05% 내지 2% 이하
미지의 어댑터	WT cfDNA	리드의 1% 내지 20% 이하
어댑터 분포	WT cfDNA	고유한 어댑터 서열의 10% 내지 80% 이하가 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 0% 내지 50%인 리드 수를 가짐
UMI 적용 범위	WT cfDNA	어댑터 세트 내의 모든 고유한 어댑터 서열의 적어도 80% 내지 99.9% 테스트 샘플에 존재함
UMI 분포	WT cfDNA	고유한 어댑터 서열의 5% 내지 50% 이하가 모든 고유한 어댑터 서열에 대한 평균 리드 수의 2 배를 초과하는 리드를 가짐

[1969]

[1970] 실시예 17 - 키트 양성 대조군 샘플의 품질 관리

[1971] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물은 양성 대조군 DNA 샘플을 포함하는 키트로 조립된다. 일부 실시형태에서, 주어진 키트의 양성 대조군 DNA 샘플은 동일한 키트의 포획 프로브 모듈에 특이적이다. 키트의 높은 성능을 보장하기 위해, 양성 대조군 DNA 샘플은 키트에 포함되기 전에 품질 관리(QC) 프로세스를 거칠 수 있다.

[1972] 이 실시예에서, 양성 대조군 DNA 샘플은 세포주의 블렌드: NA12878의 8% NA18511로부터의 전단된 게놈 DNA를 포함한다(세포주 gDNA는 Coriell Institute로부터 공급됨). 양성 대조군 샘플을 테스트하기 위해, 위에 기술된 50:50 혼합 샘플을 포함하는 내부 대조군 샘플을 사용하였다.

[1973] 상이한 농도의 양성 대조군 샘플을 포함하는 적어도 2개의 테스트 샘플을 TEZ 완충액에서 제조하였고, 50:50 혼합 샘플을 포함하는 내부 대조군 샘플을 TEZ 완충액에서 제조하였다. 고유한 어댑터 세트를 각 테스트 샘플 및 내부 대조군 샘플에 할당하였다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다. 각 테스트 샘플 및 내부 대조군 샘플에 대해, 말단 복구, 어댑터 결합 및 라이브러리 증폭을 실시예 11의 방법에 따라 수행하여 LPA를 생성하였다.

[1974] LPA의 생성 후, TC LPA 및 WG LPA를 실시예 11의 방법에 따라 생성하였다. TC LPA 및 WG LPA에 대해 QC 프로세스를 수행하고, 하류 사용을 위해 QC를 통과한 라이브러리를 선택하였다. 이 실시예에 대해, 농도가 적어도 1 ng/ μ l 내지 적어도 80 ng/ μ l인 TC LPA를 하류 프로세스에서 사용하였고, 농도가 적어도 0.1 ng/ μ l 내지 8 ng/ μ l인 WG LPA를 하류 프로세스에서 사용하였다.

[1975] 각 테스트 샘플 및 내부 대조군 샘플의 TC LPA를 사용하여 실시예 12의 방법에 따라 HRD 프로브를 사용하여 TCL을 생성하였다. 이어서, 상응하는 TCLA를 실시예 12의 방법에 따라 생성하였다. 각 테스트 샘플 내부 대조군 샘플의 WG LPA를 사용하여 실시예 13의 방법에 따라 WGLA를 사용하였다. 생성된 TCLA 및 WGLA 각각에 대해 QC 프로세스를 수행하였으며, 여기서 QC를 통과한 각 TCLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 적어도 80 ng/ μ l의 농도를 갖고, QC를 통과한 각 WGLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 적어도 80 ng/ μ l의 농도를 갖는다. QC를 통과한 각 테스트 샘플의 TCLA와 WGLA를 조합하여 실시예 14의 방법에 따라 시퀀싱하였다.

[1976] 시퀀싱 분석 후, 하나 이상의 허용 기준에 따라 양성 대조군 DNA 샘플이 키트의 높은 성능을 가능하게 하는 품질 요구사항을 충족하는지 여부를 결정하였다. 양성 대조군 DNA 샘플의 QC에 대해 하나 이상의 허용 기준을 설정하였다. 양성 대조군 DNA 샘플의 QC에 대한 시적인 허용 기준은 표 14에 제공되어 있다.

표 14

양성 대조군 DNA 샘플에 대한 예시적인 허용 기준

테스트 설명	샘플	허용 기준
SNP 검출	내부 대조군 샘플 (50:50 혼합 샘플)	표 16에 따른 SNP의 적어도 90%
SNP 검출	다양한 입력량의 양성 대조군 DNA 샘플	표 17에 따른 예상 SNP의 적어도 90%가 1%와 20% 사이에서 검출됨
카피 수 손실	내부 대조군 샘플 (50:50 혼합 샘플)	적어도 하나의 카피 수 손실 이벤트가 검출됨
블렌딩	다양한 입력량의 양성 대조군 DNA 샘플	0.1%와 10% 사이의 예상 SNP(표 17에 나열됨)의 평균 AF
조합	다양한 입력량의 양성 대조군 DNA 샘플	1% 이상에서 10개 내지 50개 미만의 예상치 못한 SNP(표 18에 나열됨)가 검출됨
적용 범위	내부 대조군 샘플 (50:50 혼합 샘플)	관심 영역의 적어도 90%가 3% AF(대립유전자 빈도)에서 변이를 검출할 수 있는 적용 범위를 가짐
적용 범위	가장 낮은 입력량의 양성 대조군 DNA 샘플	관심 영역의 적어도 90%가 4% AF(대립유전자 빈도)에서 변이를 검출할 수 있는 적용 범위를 가짐
적용 범위	가장 높은 입력량의 양성 대조군 DNA 샘플	관심 영역의 적어도 90%가 4% AF(대립유전자 빈도)에서 변이를 검출할 수 있는 적용 범위를 가짐

[1977]

[1978]

실시에 18 - 키트 포획 프로브 모듈의 품질 관리

[1979]

일부 실시형태에서, 본 개시내용의 조성물은 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 포함하는 키트로 조립된다. 특정 유전자 집합, 예를 들어, 표 11에 기재된 바와 같은 폐암 유전자 세트를 표적화하도록 설계된 포획 프로브 모듈의 세트는 포획 프로브 패널로 지칭될 수 있다. 이러한 포획 프로브 모듈 또는 포획 프로브 패널은 본 개시내용의 임의의 포획 프로브 모듈을 포함할 수 있다. 키트의 높은 성능을 보장하기 위해, 각 포획 프로브 모듈 또는 포획 프로브 패널은 키트에 포함되기 전에 품질 관리(QC) 프로세스를 거칠 수 있다.

[1980]

양성 대조군 DNA 샘플을 사용하여 포획 프로브 패널의 성능을 테스트하기 위한 QC 프로세스를 수행하였다. 이 실시예에서, 양성 대조군 샘플은 세포주의 블렌드: NA12878의 8% NA18511로부터의 전단된 게놈 DNA를 포함한다 (세포주 gDNA는 Coriell Institute로부터 공급됨). 양성 대조군 DNA 샘플은 실시예 17에 기재된 QC 프로세스를 통과하였다.

[1981]

양성 대조군 DNA 샘플을 각각 포함하는 적어도 2개의 테스트 샘플을 TEZ 완충액에서 제조하였다. 고유한 어댑터 세트를 각 테스트 샘플에 할당하였다. 일부 실시형태에서, 어댑터 세트는 본 개시내용의 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다. 각 테스트 샘플에 대해, 말단 복구, 어댑터 절찰 및 라이브러리 증폭을 실시예 11의 방법에 따라 수행하여 LPA를 생성하였다. LPA의 생성 후, TC LPA 및 WG LPA를 실시예 11의 방법에 따라 생성하였다. TC LPA 및 WG LPA에 대한 QC 프로세스를 수행하고, 하류 사용을 위해 QC를 통과한 라이브러리를 선택하였다. 이 실시예에 대해, 농도가 적어도 1 ng/μl 내지 적어도 80 ng/μl인 TC LPA를 하류 프로세스에서 사용하였고; 농도가 적어

도 0.1 ng/ μ l 내지 적어도 8 ng/ μ l인 WG LPA를 하류 프로세스에서 사용하였다.

[1982] 각 테스트 샘플의 TC LPA를 사용하여 실시예 12의 방법에 따라 특정 포획 프로브 패널을 사용하여 TCL을 생성하였고, 이어서 TCLA를 실시예 12의 방법에 따라 생성하였다. 특정 포획 프로브 패널은 폐 프로브 세트 구성되었다. 일부 실시형태에서, 폐 프로브 세트 내의 각각의 포획 프로브 모듈은 폐암과 관련된 유전자의 특정 표적 서열에 결합한다. 일부 실시형태에서, 폐 프로브 세트 내의 각각의 포획 프로브 모듈은 표 11에 나열된 유전자의 특정 표적 서열에 결합한다.

[1983] 각 테스트 샘플의 WG LPA를 사용하여 실시예 13의 방법에 따라 WGLA를 생성하였다. 생성된 TCLA 및 WGLA 각각에 대해 QC 프로세스를 수행하였으며, 여기서 QC를 통과한 각 TCLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 적어도 80 ng/ μ l의 농도를 갖고, QC를 통과한 각 WGLA는 적어도 1 ng/ μ l 내지 적어도 80 ng/ μ l의 농도를 갖는다. QC를 통과한 각 테스트 샘플의 TCLA와 WGLA를 조합하여 실시예 14의 방법에 따라 시퀀싱하였다.

[1984] 시퀀싱 분석 후, 하나 이상의 허용 기준에 따라 포획 프로브 모듈이 키트의 높은 성능을 보장하기 위한 품질 요구사항을 충족하는지 여부를 결정하였다. 포획 프로브 모듈의 QC에 대해 하나 이상의 허용 기준을 설정하였다. 포획 프로브 모듈에 대한 허용 기준의 예시적인 세트는 표 15에 제시되어 있다.

표 15

포획 프로브 모듈에 대한 예시적인 허용 기준

테스트 설명	샘플	허용 기준
프로브 존재	양성 대조군 DNA 샘플	적어도 90% 내지 99.9%의 프로브가 1 이상의 총 리드를 가짐
표적 적중 리드	양성 대조군 DNA 샘플	적어도 90%의 프로브가 70 개 이상의 표적 적중 총 리드를 가짐
표적외 리드	양성 대조군 DNA 샘플	양성 대조군 샘플에 대한 표적외 표적화된 리드 및 정렬되지 않은 표적화된 리드의 조합은 해당 샘플에 대한 총 표적화된 리드의 20% 미만임
SNP 검출	양성 대조군 DNA 샘플	예상 SNP (표 19 에 나열됨)의 적어도 90%가 검출됨
적용 범위	양성 대조군 DNA 샘플	관심 영역의 적어도 90%가 3% AF(대립유전자 빈도)에서 변이를 검출할 수 있는 적용 범위를 가짐

[1985]

[1986] 실시예 19 - 추가적인 키트

[1987] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 포함하되, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함한다.

[1988] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 하나 이상의 포획 프로브 모듈을 포함하되, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 따라 수행된 프로브 QC 프로세스를 통과하였다.

[1989] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 어댑터 세트를 포함하되, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함한다.

[1990] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 어댑터 세트를 포함하되, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함하고, 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.

[1991] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함함)를 포함한다.

[1992] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함하고, 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스

를 통과하였음)를 포함한다.

- [1993] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 따라 수행된 프로브 QC 프로세스를 통과하였음); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함함)를 포함한다.
- [1994] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 따라 수행된 프로브 QC 프로세스를 통과하였음); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 어댑터 모듈을 포함하고, 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스를 통과하였음)를 포함한다.
- [1995] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); 및 (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함한다.
- [1996] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); 및 (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함하되; 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 따라 수행된 프로브 QC 프로세스를 통과하였다.
- [1997] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); 및 (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함하되; 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.
- [1998] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); 및 (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함하되; 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스를 통과하였고, 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 따라 수행된 프로브 QC 프로세스를 통과하였다.
- [1999] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함) 및 (b) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함한다.
- [2000] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함) 및 (b) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함하되; 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.
- [2001] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영

역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함한다.

- [2002] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함하되; 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 따라 수행된 프로브 QC 프로세스를 통과하였다.
- [2003] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함하되; 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.
- [2004] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈이 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 꼬리 서열 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각이 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함)을 포함하되; 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스를 통과하였고, 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 따라 수행된 프로브 QC 프로세스를 통과하였다.
- [2005] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함)를 포함한다.
- [2006] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함하고, 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스를 통과하였음)를 포함한다.
- [2007] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함)를 포함하되, 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 따라 수행된 프로브 QC 프로세스를 통과하였다.
- [2008] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); 및 (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함)를 포함하되, 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 따라 수행된 프로브 QC 프로세스를 통과하였고, 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.
- [2009] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브

모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)을 포함한다.

[2010] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)을 포함하되; 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 따라 수행된 프로브 QC 프로세스를 통과하였다.

[2011] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)을 포함하되; 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.

[2012] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트, 키트는 (a) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); (b) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)을 포함하되; 하나 이상의 포획 프로브 모듈은 실시예 18에 따라 수행된 프로브 QC 프로세스를 통과하였고, 어댑터 세트는 실시예 16에 따라 수행된 어댑터 QC 프로세스를 통과하였다.

[2013] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키트는 (a) 어댑터 세트(여기서, 각 어댑터는 증폭 영역을 포함하는 어댑터 모듈을 포함함); (b) 하나 이상의 포획 프로브 모듈(여기서, 각 포획 프로브 모듈은 꼬리 서열 및 테스트 샘플 내의 표적 서열에 혼성화할 수 있는 포획 프로브 서열을 포함하고, 각 포획 프로브 모듈의 꼬리 서열은 라이브러리 태그를 포함함); (c) 제1 F 프라이머 및 제1 R 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 쌍(여기서, 제1 F 프라이머는 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고; 제1 R 프라이머는 라이브러리 태그 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함함); 및 (d) 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 쌍(여기서, 제2 F 프라이머 및 제2 R 프라이머 각각은 증폭 영역 결합 영역 및 시퀀싱 프라이머 결합 영역을 포함하고, 제2 프라이머 쌍의 프라이머의 어느 것도 라이브러리 태그에 결합하지 않음)을 포함한다.

표 16

세포주 변이

샘플	좌표	TP/FN	점수	af	길이	DP4	유형
B413010-A	chr13:32912299:T:C	TP	186.4	0.0602	1097	319;712;28;38	HET
B413010-A	chr16:23646295:T:C	TP	197.9	0.0511	1448	842;532;48;26	HET
B413010-A	chr16:23646857:A:G	TP	194.1	0.0536	1305	769;466;47;23	HET
B413010-A	chr17:7578210:T:C	TP	200.4	0.0442	1695	943;677;34;41	HET
B413010-A	chr17:41245471:C:T	TP	185.7	0.045	1511	808;635;35;33	HET
B413010-A	chr17:7417663:C:T	TP	558.3	0.1257	1400	642;581;79;97	HOM
B413010-A	chr17:7348625:A:G	TP	530.9	0.1183	1471	652;645;92;82	HOM
B413010-A	chr17:7342148:T:A	TP	527	0.1155	1472	703;599;102;68	HOM
B413010-A	chr17:60137085:T:C	TP	514.8	0.1282	1271	519;589;84;79	HOM
B413010-A	chr13:32504939:A:C	TP	484.2	0.1246	1228	572;502;80;73	HOM
B413010-A	chr17:60188441:G:A	TP	457.3	0.1184	1233	535;552;80;66	HOM
B413010-A	chr16:89328477:A:G	TP	452.5	0.1106	1320	564;610;68;78	HOM
B413010-A	chr6:114084492:A:G	TP	442.7	0.1134	1252	552;558;72;70	HOM
B413010-A	chr17:60376908:G:A	TP	415.8	0.1117	1200	573;492;80;54	HOM
B413010-A	chr17:7411447:C:T	TP	408.4	0.0999	1331	645;553;68;65	HOM
B413010-A	chr16:23143876:A:G	TP	390.1	0.1047	1222	555;538;57;71	HOM
B413010-A	chr17:7342682:C:T	TP	376.8	0.1002	1227	626;477;75;48	HOM
B413010-A	chr17:7537792:T:C	TP	366.1	0.0913	1336	642;572;63;59	HOM
B413010-A	chr6:114554866:A:G	TP	358.2	0.11	1055	510;429;60;56	HOM
B413010-A	chr17:7402600:T:C	TP	355	0.0904	1316	581;616;61;58	HOM
B413010-A	chr16:89081075:A:G	TP	264.7	0.0617	1508	708;707;51;42	HET
B413010-A	chr6:114409122:C:T	TP	264.6	0.0728	1236	536;610;41;49	HET
B413010-A	chr22:29540920:C:T	TP	259.6	0.0719	1251	654;507;49;41	HET
B413010-A	chr6:113975118:C:T	TP	259.4	0.0694	1283	592;602;44;45	HET
B413010-A	chr13:32811607:G:A	TP	257.5	0.0655	1359	624;646;48;41	HET
B413010-A	chr11:107542394:C:T	TP	255.8	0.073	1191	563;541;43;44	HEM
B413010-A	chr16:23724753:G:A	TP	254.8	0.0644	1381	690;600;47;42	HET
B413010-A	chr11:107707070:G:T	TP	250.7	0.0685	1271	540;640;36;51	HEM
B413010-A	chr11:107655949:A:G	TP	249.7	0.0725	1213	632;492;44;44	HEM
B413010-A	chr16:23080634:C:A	TP	249.4	0.0636	1369	617;665;39;48	HET
B413010-A	chr13:33526366:A:C	TP	246	0.0593	1484	728;668;41;47	HET
B413010-A	chr17:41735120:T:C	TP	245.6	0.0652	1320	537;695;36;50	HET
B413010-A	chr16:90028106:T:G	TP	243.7	0.0716	1187	512;590;37;48	HET
B413010-A	chr17:41726325:A:G	TP	243.5	0.0733	1146	555;507;43;41	HET
B413010-A	chr17:7400815:T:C	TP	241	0.0594	1447	676;685;44;42	HET
B413010-A	chr17:7461343:G:A	TP	231.6	0.0551	1505	624;797;35;48	HET
B413010-A	chr11:108905350:C:T	TP	228.1	0.0646	1223	534;610;39;40	HEM

[2014]

샘플	좌표	TP/FN	점수	af	깊이	DP4	유형
B413010-A	chr6:114228368:C:T	TP	226.1	0.0644	1226	568;579;41;38	HET
B413010-A	chr11:107729106:C:T	TP	225.7	0.0625	1264	568;616;45;34	HEM
B413010-A	chr17:40849842:A:G	TP	224.7	0.0607	1335	622;631;38;43	HET
B413010-A	chr11:107474795:A:G	TP	223.4	0.0625	1263	530;654;31;48	HEM
B413010-A	chr17:7514544:C:T	TP	222.2	0.0553	1446	621;745;41;39	HET
B413010-A	chr6:114168573:G:T	TP	222.2	0.0577	1368	650;639;43;36	HET
B413010-A	chr16:90024206:A:G	TP	221.5	0.0606	1288	557;653;32;46	HET
B413010-A	chr17:41710104:C:T	TP	218.9	0.0554	1407	624;704;30;48	HET
B413010-A	chr6:114361180:G:A	TP	217.8	0.0564	1365	625;661;36;41	HET
B413010-A	chr17:60789405:T:C	TP	216.7	0.0564	1383	617;686;35;43	HET
B413010-A	chr13:32833878:A:G	TP	216.6	0.0586	1315	618;620;36;41	HET
B413010-A	chr16:23195646:T:C	TP	210.8	0.0583	1287	542;670;32;43	HET
B413010-A	chr17:60769803:A:G	TP	208.9	0.0597	1307	627;602;37;41	HET
B413010-A	chr16:89038880:G:T	TP	208.3	0.0531	1412	684;653;50;25	HET
B413010-A	chr13:32826186:G:A	TP	207.8	0.0618	1181	572;536;38;35	HET
B413010-A	chr17:60795074:T:G	TP	207.6	0.0502	1493	647;771;37;38	HET
B413010-A	chr11:108858032:A:C	TP	207.1	0.0709	1002	484;447;36;35	HEM
B413010-A	chr16:23074431:T:C	TP	206.7	0.0614	1188	574;541;32;41	HET
B413010-A	chr17:60470547:C:T	TP	206.4	0.0601	1214	563;577;33;40	HET
B413010-A	chr17:41131645:C:A	TP	204.5	0.0536	1361	639;649;32;41	HET
B413010-A	chr6:114361189:C:T	TP	204.3	0.054	1353	629;650;35;38	HET
B413010-A	chr11:107673628:T:C	TP	201.8	0.052	1403	598;732;27;46	HEM
B413010-A	chr17:41692606:G:T	TP	201.4	0.0575	1234	577;586;38;33	HET
B413010-A	chr17:7453505:C:A	TP	201.2	0.0495	1475	727;675;42;31	HET
B413010-A	chr17:40897470:T:C	TP	199.6	0.0556	1277	594;612;31;40	HET
B413010-A	chr17:7458795:A:G	TP	197.9	0.052	1385	595;718;35;37	HET
B413010-A	chr13:32965310:G:A	TP	196.8	0.0684	994	537;389;41;27	HET
B413010-A	chr11:107496966:A:G	TP	196.1	0.059	1170	619;482;45;24	HEM
B413010-A	chr13:32979138:T:C	TP	195.4	0.0649	1079	486;522;38;32	HET
B413010-A	chr6:114028139:C:T	TP	194.7	0.0618	1100	496;535;35;33	HET
B413010-A	chr17:40507980:A:C	TP	194.2	0.0583	1184	521;593;32;37	HET
B413010-A	chr13:32547131:T:C	TP	194	0.058	1190	511;610;34;35	HET
B413010-A	chr11:107663103:C:G	TP	193.1	0.0562	1228	496;662;28;41	HEM
B413010-A	chr6:114568687:C:T	TP	192.1	0.0558	1218	591;559;25;43	HET
B413010-A	chr6:113886419:T:A	TP	191.9	0.0531	1299	653;577;35;34	HET
B413010-A	chr16:23077748:A:G	TP	191.2	0.0539	1279	686;524;34;35	HET
B413010-A	chr11:108464209:T:C	TP	190.1	0.053	1303	620;614;35;34	HEM
B413010-A	chr16:90114833:T:C	TP	189.4	0.0554	1227	515;644;36;32	HET
B413010-A	chr6:114226445:C:T	TP	189.3	0.0568	1180	552;561;35;32	HET
B413010-A	chr11:108256859:C:T	TP	189	0.0569	1177	603;507;30;37	HEM

[2015]

샘플	좌표	TP/FN	점수	af	깊이	DP4	유형
B413010-A	chr17:40658533:C:T	TP	188.6	0.0497	1367	697,602;38;30	HET
B413010-A	chr16:24030162:A:C	TP	186.9	0.0529	1266	586,613;33;34	HET
B413010-A	chr16:90110950:C:T	TP	184.9	0.0523	1282	611,603;33;34	HET
B413010-A	chr11:108384207:C:T	TP	184.7	0.0549	1203	580,556;30;36	HEM
B413010-A	chr6:114242899:T:C	TP	184.2	0.0539	1225	581,578;35;31	HET
B413010-A	chr6:114410689:A:G	TP	183.5	0.0553	1193	557,570;29;37	HET
B413010-A	chr17:41173086:G:A	TP	183.4	0.0609	1084	413,605;29;37	HET
B413010-A	chr6:114077332:T:C	TP	183.2	0.0649	1033	510,456;34;33	HET
B413010-A	chr16:90027838:G:A	TP	182.7	0.049	1346	611,667;31;35	HET
B413010-A	chr16:23754561:A:G	TP	181.1	0.0518	1274	612,595;33;33	HET
B413010-A	chr11:107706832:C:T	TP	179.9	0.0542	1181	534,580;33;31	HEM
B413010-A	chr22:29710360:T:C	TP	178.8	0.0498	1304	619,620;28;37	HET
B413010-A	chr13:32683151:A:G	TP	175.4	0.0548	1150	598,489;30;33	HET
B413010-A	chr13:32821976:T:C	TP	175	0.0533	1183	604,516;37;26	HET
B413010-A	chr13:32707663:A:G	TP	174.8	0.0561	1123	559,501;39;24	HET
B413010-A	chr17:60755746:T:G	TP	174.2	0.0517	1218	521,633;28;35	HET
B413010-A	chr11:107481518:C:T	TP	174.1	0.057	1087	542,483;33;29	HEM
B413010-A	chr13:32565539:T:C	TP	171.7	0.0518	1216	592,561;30;33	HET
B413010-A	chr6:114348520:T:C	TP	171.6	0.0545	1138	574,502;29;33	HET
B413010-A	chr13:32986219:A:G	TP	170.2	0.05	1239	573,604;33;29	HET
B413010-A	chr11:108425790:T:C	TP	169.2	0.0538	1134	573,500;39;22	HEM
B413010-A	chr6:114233646:G:A	TP	168	0.0544	1103	490,553;30;30	HET
B413010-A	chr22:29630337:G:A	TP	167.5	0.0503	1213	558,593;29;32	HET
B413010-A	chr11:107625409:T:C	TP	167.3	0.0652	889	360,471;29;29	HEM
B413010-A	chr22:29361159:A:G	TP	165.5	0.0487	1253	559,633;26;35	HET
B413010-A	chr13:32983250:G:A	TP	165.3	0.0476	1260	596,604;26;34	HET
B413010-A	chr13:32864488:G:C	TP	164.7	0.0502	1214	604,549;28;33	HET
B413010-A	chr11:108437928:T:G	TP	163.7	0.0539	1095	496,540;26;33	HEM
B413010-A	chr17:41145527:C:T	TP	163.3	0.0516	1143	573,511;32;27	HET
B413010-A	chr13:32653377:A:G	TP	163.3	0.051	1196	583,552;29;32	HET
B413010-A	chr13:32857769:A:C	TP	163.3	0.0654	872	433,382;20;37	HET
B413010-A	chr16:24029774:C:A	TP	161.9	0.0517	1121	571,492;28;30	HET
B413010-A	chr11:107478586:G:C	TP	161.8	0.0541	1091	518,514;31;28	HEM
B413010-A	chr11:107623767:G:T	TP	158.4	0.0568	1003	445,501;29;28	HEM
B413010-A	chr11:107858027:G:C	TP	157	0.0542	1070	517,492;31;27	HEM
B413010-A	chr11:108038477:A:G	TP	156.7	0.0537	1061	513,491;29;28	HEM
B413010-A	chr11:107956771:T:C	TP	156.5	0.0557	1006	461,488;29;27	HEM
B413010-A	chr6:114691511:G:A	TP	156.1	0.0482	1182	561,564;24;33	HET
B413010-A	chr22:29640019:C:T	TP	155.1	0.0451	1286	589,639;26;32	HET
B413010-A	chr16:23970677:T:C	TP	154.5	0.0483	1180	542,581;30;27	HET

[2016]

샘플	좌표	TP/FN	접수	af	길이	DP4	유형
B413010-A	chr13:32707287:A:G	TP	153.3	0.0507	1105	497,552,26;30	HET
B413010-A	chr16:23076410:C:T	TP	153.2	0.0462	1211	519,634,24;32	HET
B413010-A	chr17:7448288:C:G	TP	152.5	0.0473	1227	556,613;32;26	HET
B413010-A	chr17:41056245:A:G	TP	151.9	0.0453	1235	663;516;30;26	HET
B413010-A	chr6:114625448:C:A	TP	150.2	0.0522	1034	481;498;28;26	HET
B413010-A	chr13:32545856:G:A	TP	149.7	0.0511	1056	465;535;19;35	HET
B413010-A	chr16:23098422:A:G	TP	148.5	0.054	982	597;332;38;15	HET
B413010-A	chr16:89471246:A:C	TP	148.4	0.0438	1257	599;603;30;25	HET
B413010-A	chr6:113989441:G:A	TP	147.5	0.0516	1028	550;424;33;20	HET
B413010-A	chr11:108383676:A:G	TP	146	0.0479	1128	491;583;31;23	HEM
B413010-A	chr16:90032255:C:G	TP	145.6	0.0444	1215	560;601;15;39	HET
B413010-A	chr16:23737679:A:G	TP	143.5	0.0456	1163	554;554;27;26	HET
B413010-A	chr11:108887701:G:A	TP	142.5	0.0469	1108	507;549;25;27	HEM
B413010-A	chr11:108509754:A:G	TP	140.2	0.0461	1128	505;571;27;25	HEM
B413010-A	chr6:114229352:A:G	TP	139.4	0.0389	1362	645;664;22;31	HET
B413010-A	chr17:60264240:G:T	TP	139	0.0428	1214	565;596;25;27	HET
B413010-A	chr6:114316305:T:C	TP	137.1	0.0465	1096	613;432;37;14	HET
B413010-A	chr22:29495373:C:T	TP	137.1	0.0443	1150	581;517;25;26	HET
B413010-A	chr6:114437276:C:T	TP	135.4	0.045	1110	575;482;30;20	HET
B413010-A	chr11:107485515:G:A	TP	135.2	0.0447	1119	545;521;24;26	HEM
B413010-A	chr17:40858841:T:C	TP	132.1	0.0422	1160	638;473;31;18	HET
B413010-A	chr17:41738823:G:A	TP	131.1	0.0507	946	571;327;30;18	HET
B413010-A	chr16:23718623:G:A	TP	125.7	0.0354	1355	645;662;26;22	HET
B413010-A	chr17:60264211:C:T	TP	125.2	0.0393	1197	514;636;21;26	HET
B413010-A	chr6:114398669:A:G	TP	118.5	0.0421	1045	495;506;17;27	HET
B413010-A	chr11:108849093:C:T	TP	116	0.0417	1032	492;497;17;26	HEM

[2017]

표 17

예상 SNP 의 목록

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs10083789	A	NA	chr16	PALB2	23080634	C
rs1024375	A	NA	chr13	BRCA2	32710920	G
rs1043284	T	NA	chr17	BRCA1	41145527	C
rs1048149	T	NA	chr16	FANCA	90110950	C
rs10509544	G	NA	chr10	PTEN	90168074	T
rs10852891	A	NA	chr17	TP53	7490810	G
rs10890742	G	NA	chr11	ATM	107474795	A
rs11078685	T	NA	chr17	TP53	7411447	C
rs11078708	C	NA	chr17	TP53	7720091	G
rs11078716	T	NA	chr17	TP53	7820183	G
rs11079387	G	NA	chr17	BRCA1	41510850	A
rs11202435	G	NA	chr10	PTEN	89295958	T
rs11212320	T	NA	chr11	ATM	107542394	C
rs112632517	A	NA	chr17	BRCA1	41394329	G
rs11616892	A	NA	chr13	BRCA2	32545856	G
rs11862875	T	NA	chr16	FANCA	89145541	A
rs11865549	A	NA	chr16	FANCA	89099226	G
rs11865731	C	NA	chr16	PALB2	24030162	A
rs11868590	C	NA	chr17	BRCA1	40672922	T
rs12100085	T	NA	chr13	BRCA2	33471737	C
rs12250975	G	NA	chr10	PTEN	89282145	A
rs12290206	G	NA	chr11	ATM	107761113	A
rs12293030	A	NA	chr11	ATM	107700502	T
rs12416046	G	NA	chr10	PTEN	89861218	A
rs12576509	T	NA	chr11	ATM	107494405	G
rs12864812	G	NA	chr13	BRCA2	32653377	A
rs12927285	A	NA	chr16	PALB2	23589483	G
rs12948043	C	NA	chr17	BRCA1	41615830	T
rs13056977	C	NA	chr22	CHEK2	29710360	T
rs1320304	C	NA	chr17	BRCA1	41673990	T
rs146186955	C	NA	chr13	RB1	48622938	T
rs1529370	T	NA	chr13	RB1	49478028	G
rs1544724	G	NA	chr17	TP53	7621777	T
rs1553468	G	NA	chr17	BRCA1	40849842	A
rs161626	G	NA	chr17	BRCA1	41059795	A
rs16965228	G	NA	chr16	FANCA	89059879	A
rs16972944	T	NA	chr16	PALB2	23899609	C

[2018]

rs17077321	C	NA	chr13	BRCA2	32814974	T
rs17882163	T	NA	chr17	BRCA1	40481170	A
rs187406	G	NA	chr16	PALB2	23737679	A
rs1963626	G	NA	chr11	ATM	107693120	A
rs1984518	G	NA	chr17	BRCA1	41521666	T
rs2038158	C	NA	chr22	CHEK2	28368473	T
rs205010	A	NA	chr13	BRCA2	32735718	G
rs206319	G	NA	chr13	BRCA2	32986219	A
rs206340	A	NA	chr13	BRCA2	32965310	G
rs2074439	T	NA	chr17	BRCA1	41692606	G
rs2228129	C	NA	chr17	TP53	7402600	T
rs2239815	C	NA	chr22	CHEK2	29192670	T
rs2269738	G	NA	chr16	PALB2	23143876	A
rs2287499	G	NA	chr17	TP53	7592168	C
rs2302764	C	NA	chr17	TP53	7360110	T
rs2303153	C	NA	chr16	PALB2	23390201	G
rs2593595	G	NA	chr17	BRCA1	41056245	A
rs2846412	T	NA	chr11	ATM	108384207	C
rs2846418	C	NA	chr11	ATM	108476461	T
rs28758793	T	NA	chr11	ATM	107707070	G
rs2887481	G	NA	chr16	PALB2	23307915	A
rs3132818	C	NA	chr11	ATM	107478586	G
rs3178915	G	NA	chr22	CHEK2	29453027	A
rs323495	A	NA	chr17	BRCA1	41074487	G
rs34241435	A	NA	chr16	PALB2	23313185	G
rs34539888	T	NA	chr13	BRCA2	33016603	G
rs35537731	G	NA	chr13	RB1	48746364	T
rs357680	C	NA	chr13	RB1	49493436	T
rs378609	C	NA	chr13	BRCA2	33553549	A
rs3809682	A	NA	chr16	PALB2	23724753	G
rs383	C	NA	chr13	BRCA2	32504939	A
rs3904629	T	NA	chr13	BRCA2	33530851	C
rs4151120	A	NA	chr17	TP53	7342148	T
rs4383207	G	NA	chr17	TP53	7936282	A
rs472817	A	NA	chr13	BRCA2	32983250	G
rs4785648	G	NA	chr16	FANCA	89328477	A
rs4788423	G	NA	chr16	PALB2	24018863	A
rs4793011	G	NA	chr17	BRCA1	41726325	A
rs4823006	G	NA	chr22	CHEK2	29451671	A
rs4934378	C	NA	chr10	PTEN	89867693	T
rs493770	A	NA	chr11	ATM	107529940	G

[2019]

rs524611	T	NA	chr11	ATM	107531320	C
rs541504918	G	NA	chr16	PALB2	23582278	A
rs55901083	G	NA	chr13	RB1	48856336	T
rs566238	T	NA	chr11	ATM	107706832	C
rs56872996	G	NA	chr17	TP53	7928924	A
rs5723	G	NA	chr16	PALB2	23226787	C
rs5728	G	NA	chr16	PALB2	23227362	A
rs5752793	G	NA	chr22	CHEK2	29160314	A
rs5752867	A	NA	chr22	CHEK2	29513729	G
rs5762430	G	NA	chr22	CHEK2	28378472	A
rs5762788	A	NA	chr22	CHEK2	29174770	C
rs5762795	A	NA	chr22	CHEK2	29182500	C
rs57752647	G	NA	chr17	TP53	7381256	T
rs58258018	C	NA	chr11	ATM	107679779	G
rs58465745	G	NA	chr16	PALB2	23389816	A
rs59001570	C	NA	chr16	FANCA	89997947	G
rs593925	T	NA	chr11	ATM	107492199	G
rs59602687	T	NA	chr13	RB1	49377156	A
rs59806584	G	NA	chr16	FANCA	89660509	A
rs60034915	T	NA	chr10	PTEN	89872699	C
rs6005863	G	NA	chr22	CHEK2	29156448	A
rs6005907	A	NA	chr22	CHEK2	29227971	G
rs6005915	C	NA	chr22	CHEK2	29233262	T
rs60646729	G	NA	chr16	FANCA	89102240	A
rs607506	G	NA	chr11	ATM	107655949	A
rs62031942	C	NA	chr16	PALB2	23254025	T
rs62059833	T	NA	chr17	TP53	7514544	C
rs647756	A	NA	chr11	ATM	107535758	G
rs6761	T	NA	chr17	TP53	7417663	C
rs693963	C	NA	chr13	BRCA2	32979138	T
rs701893	A	NA	chr10	PTEN	90144950	G
rs7069968	T	NA	chr10	PTEN	90043824	C
rs7070980	T	NA	chr10	PTEN	89855608	C
rs7077182	G	NA	chr10	PTEN	90216244	C
rs7092284	A	NA	chr10	PTEN	89451838	G
rs7092392	A	NA	chr10	PTEN	89451853	G
rs7097903	C	NA	chr10	PTEN	90049968	G
rs7103534	C	NA	chr11	ATM	107911652	T
rs7116354	G	NA	chr11	ATM	107622778	A
rs7192878	A	NA	chr16	FANCA	89342733	G
rs7198060	C	NA	chr16	FANCA	89115822	T

[2020]

rs7200084	C	NA	chr16	FANCA	89089220	T
rs7201172	A	NA	chr16	FANCA	89293525	G
rs7210527	T	NA	chr17	BRCA1	41409959	C
rs7213700	G	NA	chr17	BRCA1	41056260	T
rs7220372	G	NA	chr17	BRCA1	40656043	T
rs72815600	C	NA	chr16	FANCA	89136182	T
rs7287918	A	NA	chr22	CHEK2	29281710	G
rs732098	T	NA	chr11	ATM	107764164	G
rs7324259	T	NA	chr13	BRCA2	33509030	G
rs73245806	A	NA	chr17	TP53	7947908	T
rs73256250	C	NA	chr16	FANCA	89038114	G
rs73314948	C	NA	chr17	BRCA1	41471691	T
rs7335609	G	NA	chr13	BRCA2	33055431	T
rs7336874	C	NA	chr13	BRCA2	33396698	T
rs73480207	C	NA	chr13	RB1	49337306	T
rs73540963	T	NA	chr16	PALB2	24009879	C
rs73548783	G	NA	chr11	ATM	108414373	A
rs73550205	C	NA	chr16	PALB2	23714311	T
rs7359598	C	NA	chr17	BRCA1	40897470	T
rs737173	T	NA	chr11	ATM	107824091	A
rs738453	T	NA	chr22	CHEK2	28301743	C
rs738748	C	NA	chr22	CHEK2	28993183	T
rs739769	C	NA	chr17	BRCA1	41735120	T
rs74033443	G	NA	chr16	FANCA	89294044	A
rs743920	G	NA	chr22	CHEK2	29621128	C
rs76092147	G	NA	chr16	PALB2	23865984	T
rs767664	G	NA	chr11	ATM	108437928	T
rs77687672	A	NA	chr11	ATM	107432154	G
rs780169	G	NA	chr16	PALB2	23754561	A
rs78790828	A	NA	chr17	TP53	7830280	G
rs7895494	C	NA	chr10	PTEN	89379732	A
rs7904229	A	NA	chr10	PTEN	90221561	C
rs7947466	A	NA	chr11	ATM	107771148	G
rs7993336	C	NA	chr13	RB1	48433801	T
rs8000270	C	NA	chr13	RB1	49412235	T
rs8001409	C	NA	chr13	BRCA2	33510213	T
rs8057712	G	NA	chr16	PALB2	23403744	A
rs8068764	C	NA	chr17	BRCA1	41490161	T
rs8136754	C	NA	chr22	CHEK2	28197815	T
rs868045	G	NA	chr16	FANCA	90102835	A
rs9526401	T	NA	chr13	RB1	48420828	A

[2021]

rs9535120	A	NA	chr13	RB1	49539246	G
rs9568668	G	NA	chr13	BRCA2	33522655	A
rs9590896	A	NA	chr13	BRCA2	32877696	G
rs9594995	G	NA	chr13	BRCA2	32707663	A
rs9595159	A	NA	chr13	BRCA2	32798953	G
rs9595469	A	NA	chr13	BRCA2	32984336	T
rs9595932	C	NA	chr13	RB1	49158816	T
rs9595958	T	NA	chr13	RB1	49242249	C
rs9596011	G	NA	chr13	RB1	49368949	A
rs9596042	A	NA	chr13	RB1	49472485	G
rs9596539	C	NA	chr13	BRCA2	33498938	A
rs9620804	A	NA	chr22	CHEK2	28919200	G
rs9625679	G	NA	chr22	CHEK2	29456699	A
rs9806913	G	NA	chr16	FANCA	89953773	A
rs9890403	G	NA	chr17	BRCA1	41458614	A
rs9891119	C	NA	chr17	BRCA1	40507980	A
rs9901673	A	NA	chr17	TP53	7484101	C
rs990324	G	NA	chr13	BRCA2	33387246	A
rs9903378	C	NA	chr17	TP53	7588006	A
rs9912587	A	NA	chr17	BRCA1	41173086	G
rs9915640	C	NA	chr17	BRCA1	41603882	T
rs9921637	A	NA	chr16	FANCA	89146714	G
rs9922448	T	NA	chr16	PALB2	23236090	C

[2022]

표 18

예상치 못한 SNP 의 목록(1% 이상인 경우 오염을 나타냄)

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs10153241	C	NA	chr17	BRCA1	40493337	T
rs10431058	T	NA	chr11	ATM	107481518	C
rs10492397	A	NA	chr13	BRCA2	32976358	G
rs10492790	T	NA	chr16	PALB2	23076410	C
rs10502107	A	NA	chr11	ATM	108893765	C
rs10509408	A	NA	chr10	PTEN	89310281	G
rs10509539	T	NA	chr10	PTEN	89998283	G
rs1053005	C	NA	chr17	BRCA1	40465910	T
rs10749570	G	NA	chr10	PTEN	90038033	T
rs10887818	T	NA	chr10	PTEN	90183102	C
rs11078697	T	NA	chr17	TP53	7469229	C
rs11078710	A	NA	chr17	TP53	7777041	C
rs11078711	T	NA	chr17	TP53	7777214	G
rs111785947	T	NA	chr13	RB1	49210785	A
rs111789652	CA	NA	chr13	RB1	48800978	-
rs111916330	C	NA	chr17	TP53	7721917	T
rs11202441	G	NA	chr10	PTEN	89301014	A
rs11202528	T	NA	chr10	PTEN	89483062	C
rs11202691	T	NA	chr10	PTEN	90005048	C
rs11202754	T	NA	chr10	PTEN	90226590	A
rs11212509	C	NA	chr11	ATM	107956771	T
rs11212704	C	NA	chr11	ATM	108425790	T
rs11212837	G	NA	chr11	ATM	108864444	A
rs1123547	C	NA	chr17	TP53	7619861	T
rs112402962	AC	NA	chr13	RB1	48856333	-
rs112465465	A	NA	chr10	PTEN	90043769	-
rs112467246	C	NA	chr13	BRCA2	33513982	T
rs11389505	A	NA	chr13	RB1	48556635	-
rs11406289	A	NA	chr13	RB1	49412212	-
rs114126369	G	NA	chr13	RB1	48657979	A
rs114539386	A	NA	chr10	PTEN	89427833	C
rs11619762	T	NA	chr13	RB1	49499087	A
rs116469311	A	NA	chr10	PTEN	89879673	G
rs11648589	C	NA	chr16	PALB2	23295974	T
rs11653545	A	NA	chr17	TP53	7512074	G
rs116600817	G	NA	chr17	TP53	7458795	A

[2023]

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs117385313	C	NA	chr10	PTEN	90168094	G
rs117836982	T	NA	chr10	PTEN	90109809	C
rs118044350	C	NA	chr13	RB1	49478033	G
rs11868946	G	NA	chr17	TP53	7673605	A
rs12157905	A	NA	chr22	CHEK2	28192423	G
rs12162045	A	NA	chr16	PALB2	23331743	G
rs12226290	G	NA	chr11	ATM	107496966	A
rs12274468	T	NA	chr11	ATM	108905350	C
rs12357948	T	NA	chr10	PTEN	90202273	C
rs12444767	T	NA	chr16	PALB2	23200107	A
rs12446463	A	NA	chr16	PALB2	23387393	G
rs12449814	T	NA	chr17	TP53	7911709	G
rs12453250	A	NA	chr17	TP53	7761512	C
rs12485095	G	NA	chr22	CHEK2	29540198	T
rs12572813	T	NA	chr10	PTEN	90069353	C
rs12574049	C	NA	chr11	ATM	107858027	G
rs12600401	G	NA	chr17	BRCA1	41465867	A
rs12628787	T	NA	chr22	CHEK2	29495373	C
rs12709089	A	NA	chr16	FANCA	89630311	G
rs12793497	T	NA	chr11	ATM	108599993	C
rs12877579	G	NA	chr13	BRCA2	33321045	A
rs12924133	A	NA	chr16	FANCA	89638290	C
rs12930806	T	NA	chr16	FANCA	89203073	C
rs12935297	T	NA	chr16	PALB2	24031478	C
rs12941509	G	NA	chr17	TP53	7448288	C
rs12943692	A	NA	chr17	TP53	7332930	G
rs12946015	T	NA	chr17	BRCA1	41478455	C
rs13058031	A	NA	chr22	CHEK2	29273966	G
rs132280	T	NA	chr22	CHEK2	29540920	C
rs13332145	G	NA	chr16	FANCA	89081075	A
rs13333659	T	NA	chr16	FANCA	89038880	G
rs13339649	G	NA	chr16	PALB2	23098422	A
rs134195	C	NA	chr22	CHEK2	28656691	T
rs1359393	A	NA	chr13	RB1	48383104	G
rs1359688	T	NA	chr13	RB1	49146072	A
rs138125275	A	NA	chr10	PTEN	89579689	G
rs141184053	A	NA	chr10	PTEN	89451879	-
rs141670949	A	NA	chr13	RB1	49350399	-
rs142703354	G	NA	chr10	PTEN	89579697	T
rs144848	C	NA	chr13	BRCA2	32906729	A

[2024]

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs1460819	C	NA	chr13	BRCA2	32857769	A
rs1468087	G	NA	chr13	BRCA2	32683151	A
rs147173441	A	NA	chr10	PTEN	89295976	-
rs148550648	C	NA	chr13	RB1	48592100	T
rs1557670	C	NA	chr16	PALB2	23292173	A
rs16940016	A	NA	chr16	PALB2	23322445	G
rs16956822	A	NA	chr17	TP53	7499349	G
rs16968177	G	NA	chr17	BRCA1	41080815	A
rs16985575	C	NA	chr22	CHEK2	28217319	T
rs16986280	C	NA	chr22	CHEK2	28695642	T
rs17077875	G	NA	chr13	BRCA2	33376118	A
rs17078082	G	NA	chr13	BRCA2	33485961	A
rs17085	G	NA	chr13	RB1	48414487	A
rs17098687	C	NA	chr10	PTEN	89579599	G
rs17107183	A	NA	chr11	ATM	107452482	G
rs17199565	G	NA	chr16	PALB2	23273704	A
rs17256755	A	NA	chr16	PALB2	23336365	C
rs17431184	C	NA	chr10	PTEN	89720251	T
rs17451544	G	NA	chr22	CHEK2	29553039	A
rs1753621	T	NA	chr13	RB1	49499060	C
rs17834230	G	NA	chr13	RB1	49377189	A
rs17856697	G	NA	chr17	TP53	7348625	A
rs17881556	C	NA	chr17	TP53	7570869	T
rs17882626	G	NA	chr17	TP53	7306727	A
rs183078	G	NA	chr13	RB1	49513352	A
rs1834456	C	NA	chr11	ATM	108858032	A
rs1884816	C	NA	chr22	CHEK2	29106733	T
rs191994935	T	NA	chr13	RB1	48878279	C
rs1935580	C	NA	chr10	PTEN	90197181	T
rs195993	T	NA	chr16	PALB2	24017961	C
rs196014	T	NA	chr16	PALB2	23989600	G
rs1974953	A	NA	chr11	ATM	108887701	G
rs201071425	GT	NA	chr13	RB1	48433748	-
rs201404152	C	NA	chr13	RB1	48461537	T
rs2025416	C	NA	chr13	BRCA2	32821976	T
rs205013	A	NA	chr13	BRCA2	32807586	T
rs206321	C	NA	chr13	BRCA2	32990780	A
rs2076505	A	NA	chr22	CHEK2	28424507	G
rs2077873	T	NA	chr10	PTEN	89315395	C
rs2078326	C	NA	chr13	BRCA2	32859674	A

[2025]

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs2086824	C	NA	chr16	FANCA	89471246	A
rs2089115	C	NA	chr17	BRCA1	40858841	T
rs2128243	G	NA	chr11	ATM	108509754	A
rs2143180	A	NA	chr22	CHEK2	28298336	G
rs2213645	G	NA	chr22	CHEK2	29361159	A
rs2228128	C	NA	chr17	TP53	7400815	T
rs2287357	A	NA	chr16	FANCA	89250145	G
rs2287498	T	NA	chr17	TP53	7592560	C
rs2290294	T	NA	chr11	ATM	107904379	C
rs2292954	G	NA	chr16	FANCA	89613123	A
rs2292957	C	NA	chr16	FANCA	89653173	T
rs2433340	G	NA	chr10	PTEN	90160023	A
rs2488273	C	NA	chr10	PTEN	90116871	T
rs2575384	T	NA	chr16	PALB2	23837694	C
rs2596242	C	NA	chr13	RB1	49505805	T
rs2640738	C	NA	chr11	ATM	108464209	T
rs2640779	T	NA	chr11	ATM	108381247	C
rs2640784	G	NA	chr11	ATM	108409442	A
rs2640785	A	NA	chr11	ATM	108409784	T
rs2673813	T	NA	chr10	PTEN	89801899	G
rs2673822	C	NA	chr10	PTEN	89793086	G
rs2806634	A	NA	chr13	BRCA2	32826186	G
rs2806638	G	NA	chr13	BRCA2	32833878	A
rs2806639	A	NA	chr13	BRCA2	32811607	G
rs3092989	A	NA	chr13	BRCA2	32889363	G
rs34140758	A	NA	chr10	PTEN	89726794	C
rs34598902	T	NA	chr17	TP53	7915912	C
rs34704253	C	NA	chr13	RB1	49417493	T
rs34870602	G	NA	chr10	PTEN	89705371	C
rs35264225	G	NA	chr16	FANCA	89643464	C
rs35743999	C	NA	chr13	RB1	49417531	-
rs35749740	C	NA	chr16	FANCA	90114833	T
rs35758127	A	NA	chr17	BRCA1	41727924	G
rs36047689	A	NA	chr16	PALB2	23717833	G
rs365873	C	NA	chr13	BRCA2	32547131	T
rs3742318	C	NA	chr13	BRCA2	33017043	T
rs3744258	G	NA	chr17	TP53	7623394	A
rs3751688	A	NA	chr16	FANCA	89634439	G
rs3785361	T	NA	chr16	PALB2	23363399	A
rs3785414	T	NA	chr16	FANCA	89250399	C

[2026]

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs3812996	G	NA	chr16	PALB2	23077748	A
rs3950176	A	NA	chr22	CHEK2	29630337	G
rs399622	C	NA	chr13	BRCA2	33212785	A
rs4073930	C	NA	chr16	PALB2	23195646	T
rs4151122	T	NA	chr17	TP53	7342682	C
rs4287627	A	NA	chr17	TP53	7932788	G
rs4411548	T	NA	chr17	BRCA1	40658533	C
rs447529	G	NA	chr16	PALB2	23633423	C
rs4554861	A	NA	chr11	ATM	107839211	G
rs4577093	T	NA	chr16	PALB2	23234654	C
rs470097	A	NA	chr22	CHEK2	28373744	C
rs472826	T	NA	chr11	ATM	107623767	G
rs4753808	A	NA	chr11	ATM	107465180	G
rs478839	G	NA	chr10	PTEN	89731870	A
rs488512	T	NA	chr11	ATM	107729106	C
rs492661	T	NA	chr11	ATM	107567754	C
rs4941698	G	NA	chr13	BRCA2	33485053	A
rs4943021	G	NA	chr13	BRCA2	33514547	T
rs4943043	C	NA	chr13	BRCA2	33534926	T
rs4968031	A	NA	chr16	PALB2	23765774	G
rs4968044	C	NA	chr16	PALB2	23074431	T
rs516091	G	NA	chr11	ATM	107663103	C
rs517118	G	NA	chr13	BRCA2	32970586	A
rs533531826	AGGA AGGA GGGG AGAG CAGG TAGG AGGG AGGA GC	NA	chr10	PTEN	89879755	-
rs556153	C	NA	chr11	ATM	107673628	T
rs55645971	G	NA	chr13	BRCA2	33189589	C
rs564444	C	NA	chr11	ATM	107625409	T
rs5752851	G	NA	chr22	CHEK2	29398459	A
rs5752866	A	NA	chr22	CHEK2	29498118	G
rs5762497	G	NA	chr22	CHEK2	28546346	T
rs5762930	A	NA	chr22	CHEK2	29378708	C
rs5762981	C	NA	chr22	CHEK2	29480954	T
rs57985356	G	NA	chr17	TP53	7735063	T
rs58040082	G	NA	chr17	BRCA1	41555780	A

[2027]

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs597788	T	NA	chr11	ATM	108256859	C
rs5997320	G	NA	chr22	CHEK2	28270372	T
rs5997443	T	NA	chr22	CHEK2	29521631	C
rs60030426	C	NA	chr16	FANCA	90068417	T
rs6006075	T	NA	chr22	CHEK2	29640019	C
rs60543910	A	NA	chr17	TP53	7928643	G
rs60791058	G	NA	chr22	CHEK2	29515642	A
rs61227616	G	NA	chr10	PTEN	89445636	T
rs61348941	T	NA	chr13	BRCA2	33401101	C
rs62045818	C	NA	chr16	FANCA	89047654	T
rs62059804	A	NA	chr17	TP53	7453505	C
rs62070781	T	NA	chr16	FANCA	89361222	C
rs6503369	C	NA	chr17	BRCA1	41463821	G
rs652243	G	NA	chr11	ATM	107470916	A
rs6561461	A	NA	chr13	RB1	49118569	G
rs6561487	G	NA	chr13	RB1	49521542	T
rs6586129	T	NA	chr10	PTEN	90137045	C
rs667131	C	NA	chr13	RB1	49485613	A
rs683763	T	NA	chr10	PTEN	89807680	G
rs701848	C	NA	chr10	PTEN	89726745	T
rs7069120	A	NA	chr10	PTEN	90101723	G
rs7076715	G	NA	chr10	PTEN	89459041	A
rs7086211	G	NA	chr10	PTEN	90056152	A
rs7100988	G	NA	chr10	PTEN	89339054	A
rs7127880	T	NA	chr11	ATM	107600570	C
rs71327329	G	NA	chr22	CHEK2	29327347	A
rs71475111	A	NA	chr11	ATM	108885698	G
rs7184655	C	NA	chr16	FANCA	89601554	T
rs7197490	T	NA	chr16	FANCA	89691798	C
rs7220814	G	NA	chr17	TP53	7290695	A
rs7222675	C	NA	chr17	BRCA1	41705105	T
rs7224790	C	NA	chr17	BRCA1	41748964	G
rs72820004	A	NA	chr10	PTEN	90096580	G
rs72820016	T	NA	chr10	PTEN	90136998	C
rs72820018	C	NA	chr10	PTEN	90144956	T
rs72842820	A	NA	chr17	TP53	7329134	G
rs730517	T	NA	chr22	CHEK2	29550379	G
rs73184603	G	NA	chr13	RB1	49453685	C
rs73191734	C	NA	chr13	RB1	48868999	T
rs7319930	T	NA	chr13	BRCA2	33311005	G

[2028]

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs73233606	G	NA	chr17	TP53	7750936	A
rs73235718	A	NA	chr17	TP53	7837228	G
rs73237655	G	NA	chr17	TP53	7911911	A
rs732508	G	NA	chr17	BRCA1	41526526	A
rs7337786	G	NA	chr13	BRCA2	33479823	T
rs73481288	A	NA	chr13	RB1	48689348	G
rs73540400	A	NA	chr16	PALB2	23287060	G
rs73550211	A	NA	chr16	PALB2	23718623	G
rs73557760	G	NA	chr11	ATM	107493106	C
rs73882474	C	NA	chr22	CHEK2	29523092	T
rs73977765	G	NA	chr17	TP53	7728764	A
rs74150466	G	NA	chr10	PTEN	89260712	A
rs74150467	T	NA	chr10	PTEN	89260724	A
rs74406212	G	NA	chr10	PTEN	89926667	A
rs74765359	T	NA	chr17	BRCA1	41088292	C
rs74899331	A	NA	chr16	FANCA	89267096	C
rs75022285	A	NA	chr10	PTEN	89980912	G
rs75128833	T	NA	chr13	RB1	48527317	C
rs75263440	C	NA	chr16	FANCA	89421388	A
rs75318090	T	NA	chr10	PTEN	89861266	A
rs75764178	T	NA	chr13	RB1	48592112	G
rs75967297	C	NA	chr13	BRCA2	33526366	A
rs76154312	C	NA	chr11	ATM	108639173	T
rs76523936	T	NA	chr13	RB1	48711833	C
rs76682226	C	NA	chr13	RB1	48505462	T
rs76730553	T	NA	chr17	TP53	7771462	C
rs76933266	T	NA	chr10	PTEN	89980900	C
rs77057175	A	NA	chr17	BRCA1	41643970	G
rs77077633	C	NA	chr13	BRCA2	33437517	T
rs77495014	T	NA	chr13	RB1	49448209	C
rs77661220	G	NA	chr11	ATM	108597413	T
rs78048465	C	NA	chr13	RB1	49485591	T
rs78208831	A	NA	chr16	FANCA	89087705	G
rs78236738	G	NA	chr11	ATM	108584854	C
rs78430727	A	NA	chr10	PTEN	90116882	G
rs78579751	T	NA	chr16	FANCA	89198762	C
rs78744936	A	NA	chr17	TP53	7461343	G
rs7895674	A	NA	chr10	PTEN	90096625	G
rs7897058	G	NA	chr10	PTEN	89787293	A
rs79037983	A	NA	chr22	CHEK2	28459665	G

[2029]

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs7912780	T	NA	chr10	PTEN	90096642	A
rs79201073	A	NA	chr16	FANCA	89611199	G
rs79207621	A	NA	chr13	RB1	48584933	G
rs792212	T	NA	chr10	PTEN	90174153	C
rs792224	G	NA	chr10	PTEN	90109816	C
rs79230416	C	NA	chr16	FANCA	89517502	G
rs79278399	A	NA	chr13	BRCA2	32794568	T
rs7934423	T	NA	chr11	ATM	108849093	C
rs79375168	T	NA	chr13	BRCA2	32880009	C
rs7937558	T	NA	chr11	ATM	108495541	C
rs79401250	G	NA	chr16	PALB2	23871457	T
rs79651004	G	NA	chr13	BRCA2	32707287	A
rs79750876	T	NA	chr17	BRCA1	41710104	C
rs79833791	C	NA	chr16	FANCA	90012737	T
rs79840905	G	NA	chr10	PTEN	89323144	A
rs798980	A	NA	chr13	BRCA2	32750571	C
rs799524	C	NA	chr13	BRCA2	32523928	T
rs799923	A	NA	chr17	BRCA1	41251931	G
rs80201685	A	NA	chr13	BRCA2	32820039	G
rs80333342	C	NA	chr22	CHEK2	28728983	T
rs8051733	G	NA	chr16	FANCA	90024206	A
rs8052423	T	NA	chr16	FANCA	89269178	G
rs8054767	A	NA	chr16	PALB2	24029774	C
rs8055868	A	NA	chr16	PALB2	23348251	G
rs8062311	A	NA	chr16	FANCA	90027838	G
rs872345	T	NA	chr17	TP53	7720858	A
rs920679	G	NA	chr11	ATM	108038477	A
rs9534076	C	NA	chr13	BRCA2	32864488	G
rs9534154	A	NA	chr13	BRCA2	32886213	G
rs9566949	C	NA	chr13	BRCA2	32565539	T
rs9568672	C	NA	chr13	BRCA2	33528456	G
rs9568679	T	NA	chr13	BRCA2	33536160	C
rs9590684	A	NA	chr13	BRCA2	32570500	G
rs9595227	G	NA	chr13	BRCA2	32836633	A
rs9595871	T	NA	chr13	RB1	48794101	C
rs9666351	G	NA	chr11	ATM	108468768	A
rs9895916	A	NA	chr17	TP53	7950394	G
rs9898682	A	NA	chr17	BRCA1	41738823	G
rs990253	A	NA	chr11	ATM	108494855	G
rs9902697	C	NA	chr17	BRCA1	41682852	G

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs9905358	G	NA	chr17	BRCA1	41555474	A
rs9908405	C	NA	chr17	TP53	7467461	A
rs9914497	T	NA	chr17	BRCA1	41009445	C
rs9923604	C	NA	chr16	FANCA	90068980	G
rs9940479	C	NA	chr16	PALB2	23964004	T

표 19

폐 프로브를 사용하여 검출된 양성 대조군 DNA 샘플에서의 예상 SNP의 목록

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs10509544	G	NA	chr10	PTEN	90168074	T
rs10852891	A	NA	chr17	TP53	7490810	G
rs11078685	T	NA	chr17	TP53	7411447	C
rs11078708	C	NA	chr17	TP53	7720091	G
rs11078716	T	NA	chr17	TP53	7820183	G
rs11079387	G	NA	chr17	BRCA1	41510850	A
rs11202435	G	NA	chr10	PTEN	89295958	T
rs12250975	G	NA	chr10	PTEN	89282145	A
rs12416046	G	NA	chr10	PTEN	89861218	A
rs1320304	C	NA	chr17	BRCA1	41673990	T
rs1544724	G	NA	chr17	TP53	7621777	T
rs1553468	G	NA	chr17	BRCA1	40849842	A
rs1984518	G	NA	chr17	BRCA1	41521666	T
rs2228129	C	NA	chr17	TP53	7402600	T
rs2287499	G	NA	chr17	TP53	7592168	C
rs2302764	C	NA	chr17	TP53	7360110	T
rs2846412	T	NA	chr11	ATM	108384207	C
rs4151120	A	NA	chr17	TP53	7342148	T
rs4383207	G	NA	chr17	TP53	7936282	A
rs472817	A	NA	chr13	BRCA2	32983250	G
rs4934378	C	NA	chr10	PTEN	89867693	T
rs566238	T	NA	chr11	ATM	107706832	C
rs56872996	G	NA	chr17	TP53	7928924	A
rs57752647	G	NA	chr17	TP53	7381256	T
rs60034915	T	NA	chr10	PTEN	89872699	C
rs62059833	T	NA	chr17	TP53	7514544	C
rs6761	T	NA	chr17	TP53	7417663	C
rs693963	C	NA	chr13	BRCA2	32979138	T
rs701893	A	NA	chr10	PTEN	90144950	G
rs7069968	T	NA	chr10	PTEN	90043824	C
rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs7077182	G	NA	chr10	PTEN	90216244	C
rs7092284	A	NA	chr10	PTEN	89451838	G
rs7092392	A	NA	chr10	PTEN	89451853	G
rs7097903	C	NA	chr10	PTEN	90049968	G
rs73245806	A	NA	chr17	TP53	7947908	T
rs7359598	C	NA	chr17	BRCA1	40897470	T

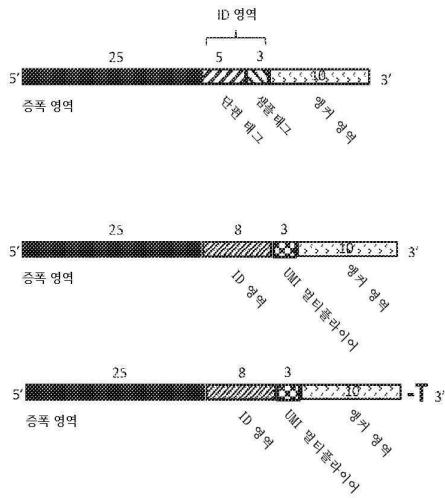
[2032]

rs	alt	cds_효과	chr	유전자	pos	ref
rs78790828	A	NA	chr17	TP53	7830280	G
rs7895494	C	NA	chr10	PTEN	89379732	A
rs7904229	A	NA	chr10	PTEN	90221561	C
rs8068764	C	NA	chr17	BRCA1	41490161	T
rs9891119	C	NA	chr17	BRCA1	40507980	A
rs9901673	A	NA	chr17	TP53	7484101	C
rs9903378	C	NA	chr17	TP53	7588006	A

[2033]

도면

도면1

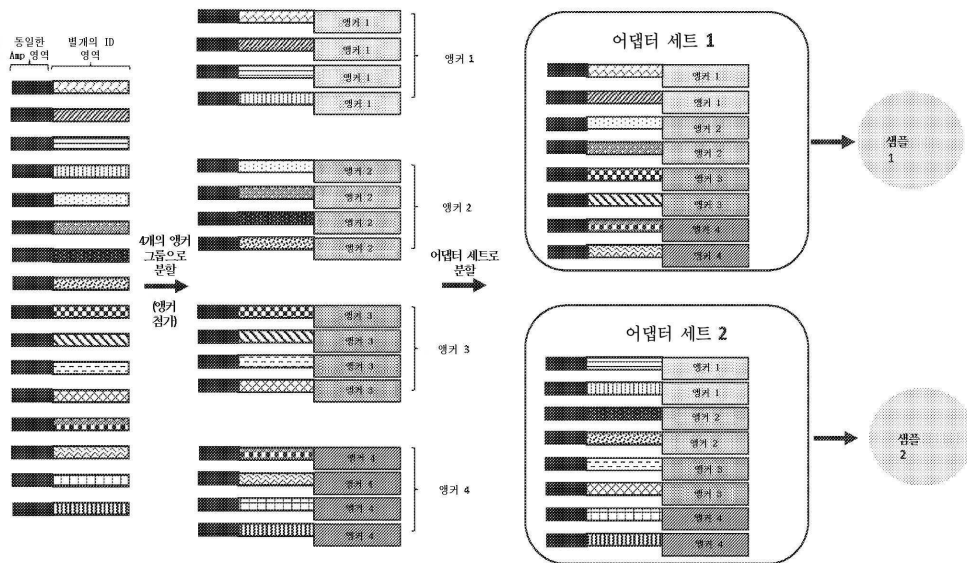


첫 번째 타입 - ID 영역은 별개의 샘플 태그 및 단편 태그를 포함한다

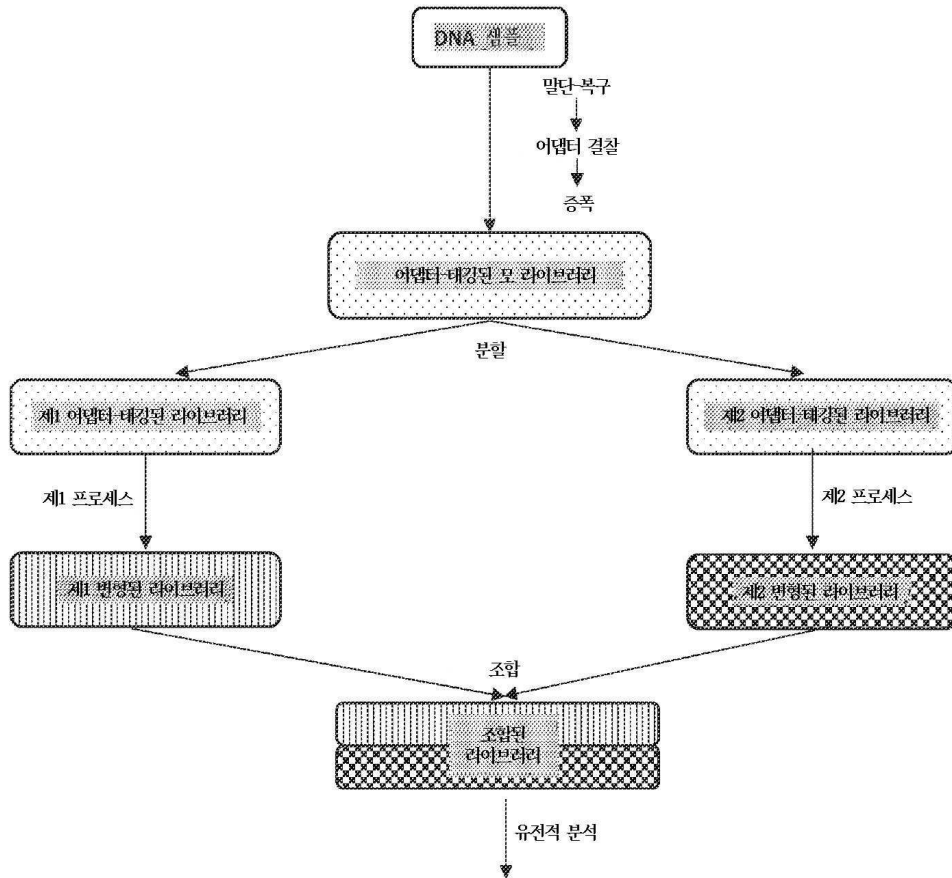
두 번째 타입 - ID 영역은 샘플 및 단편을 모두 식별한다

세 번째 타입 - 3' 말단에 T 오버행이 있는 두 번째 타입 어댑터

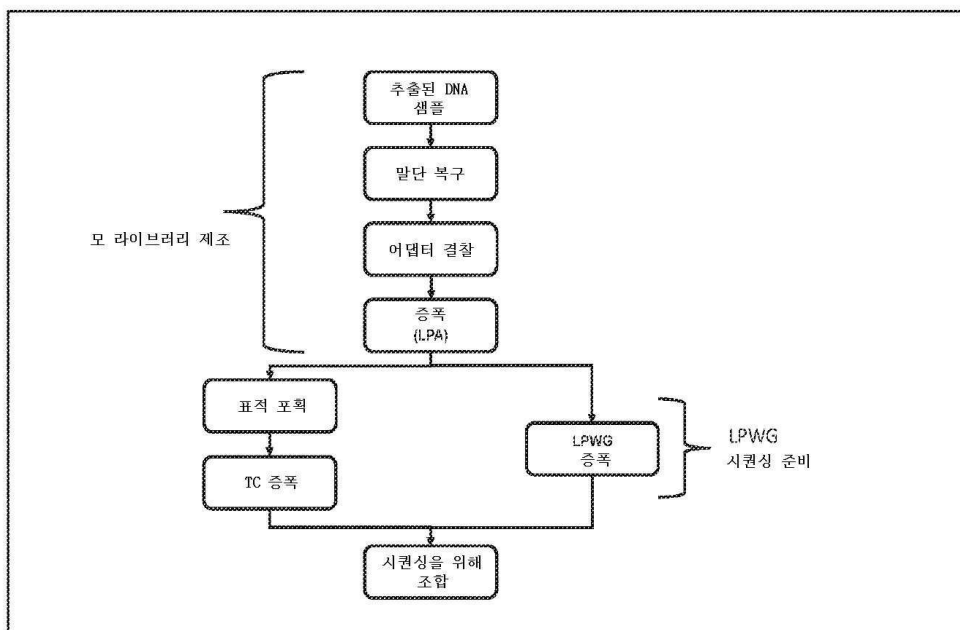
도면2



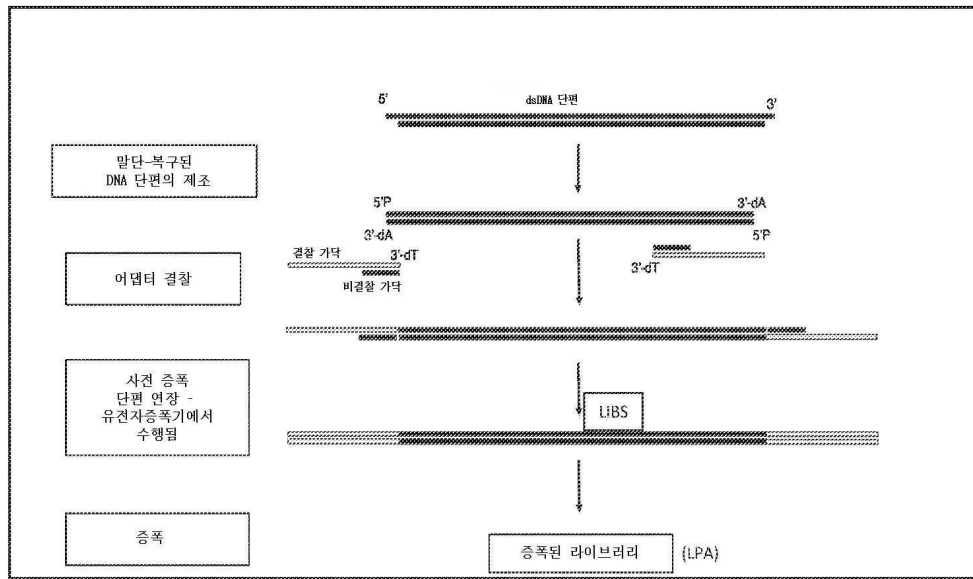
도면3



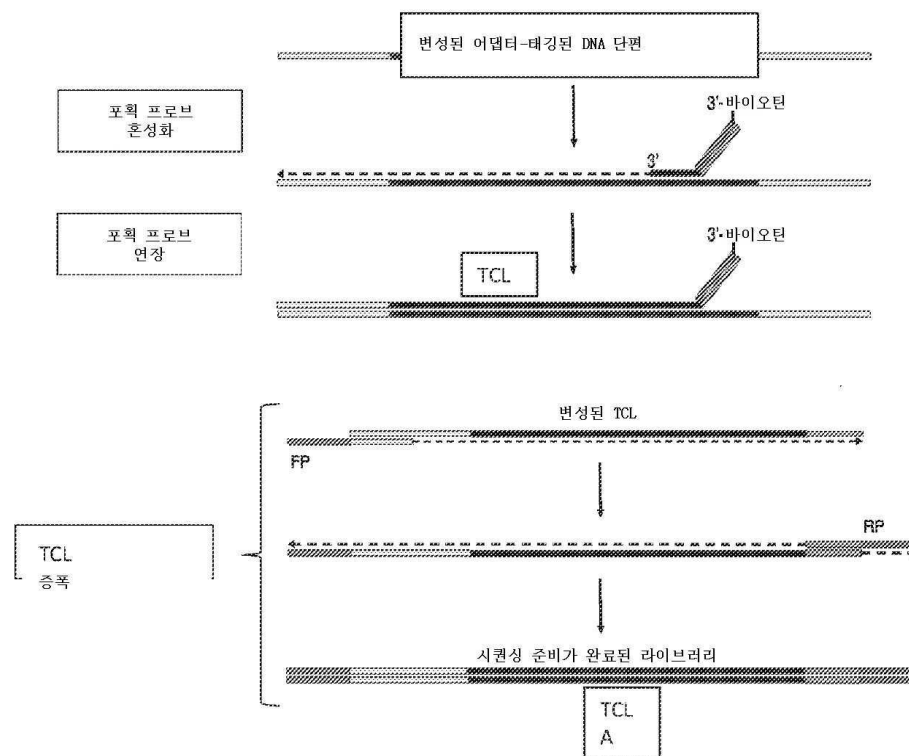
도면4



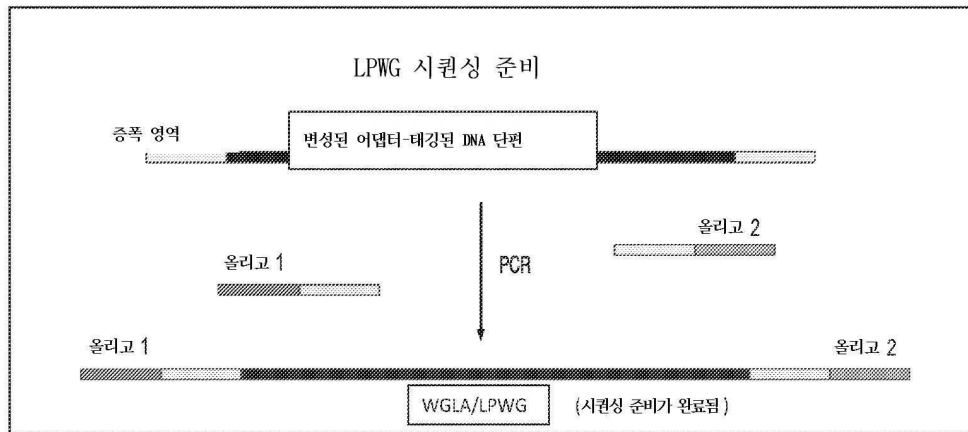
도면5



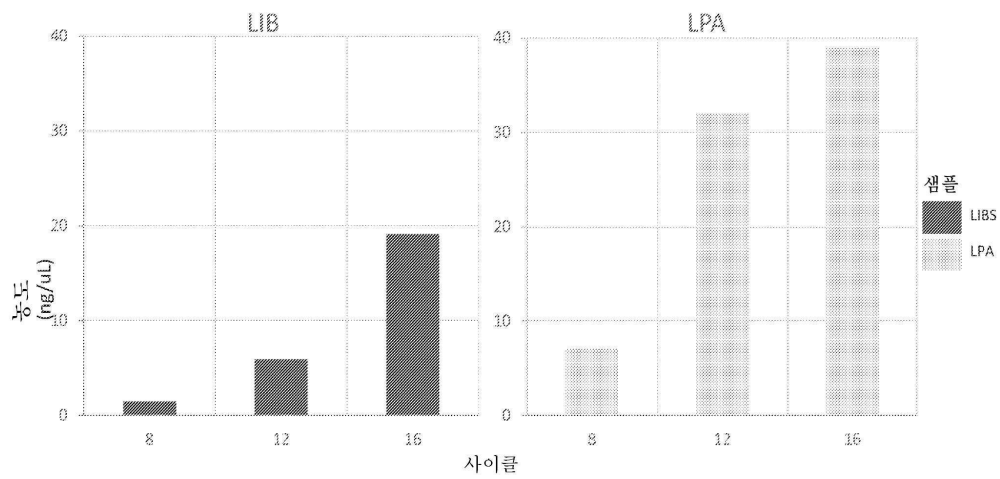
도면6



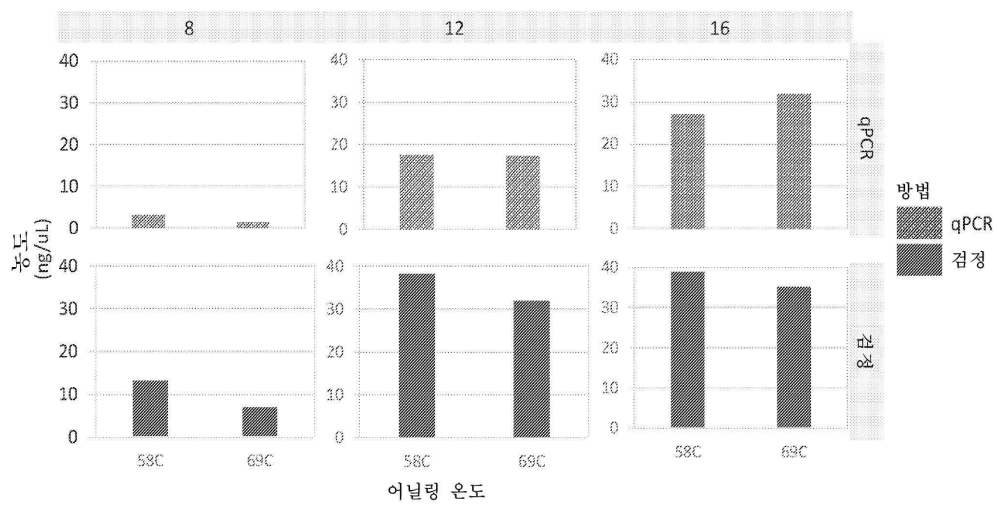
도면7



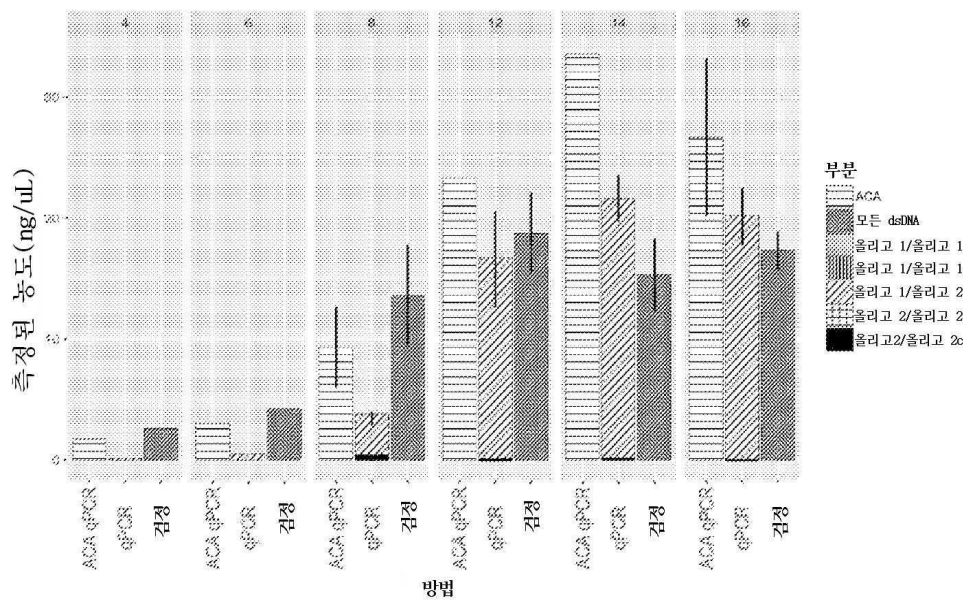
도면8



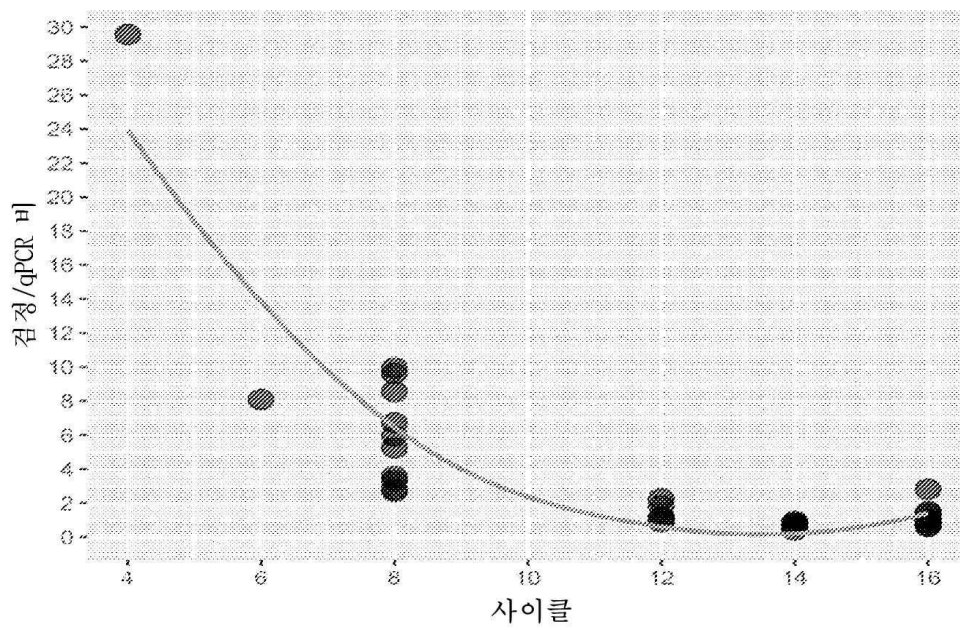
도면9



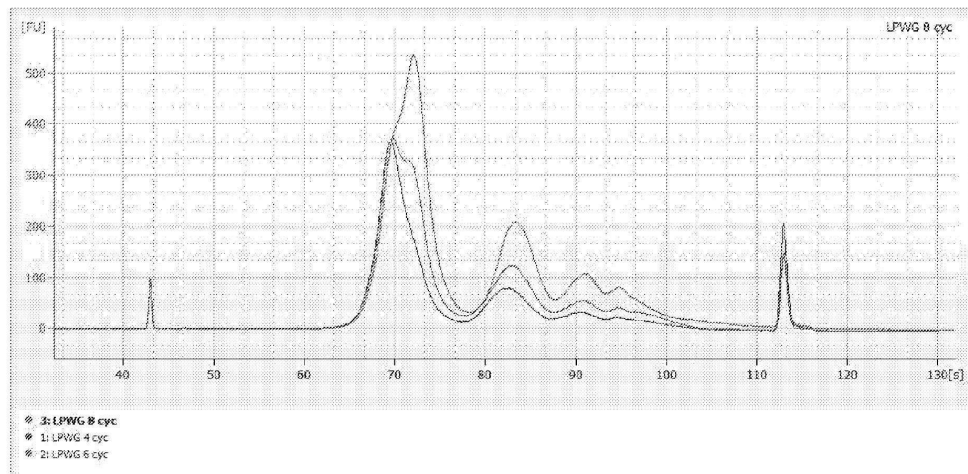
도면10



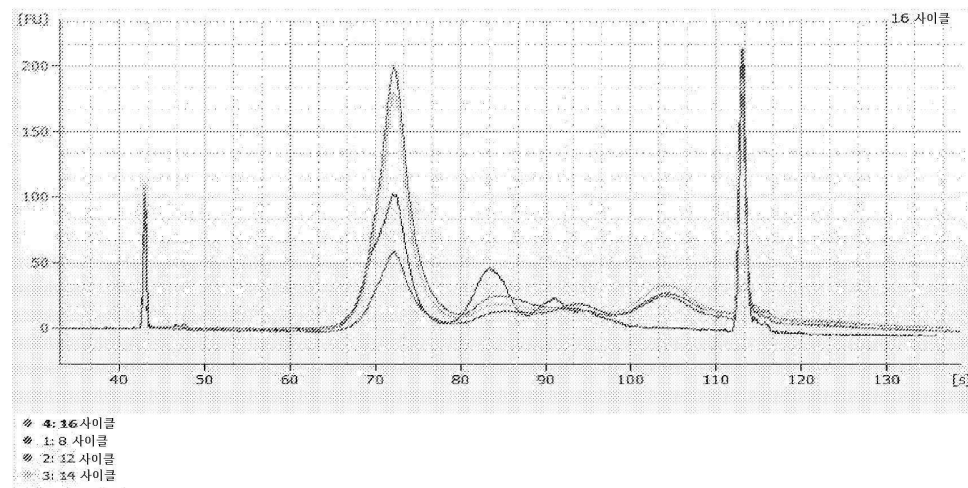
도면11



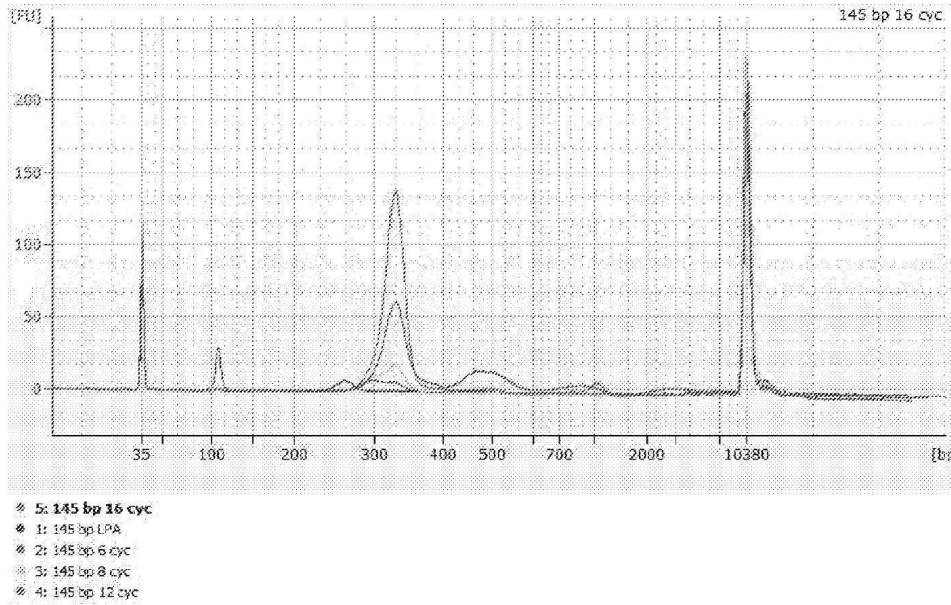
도면12a



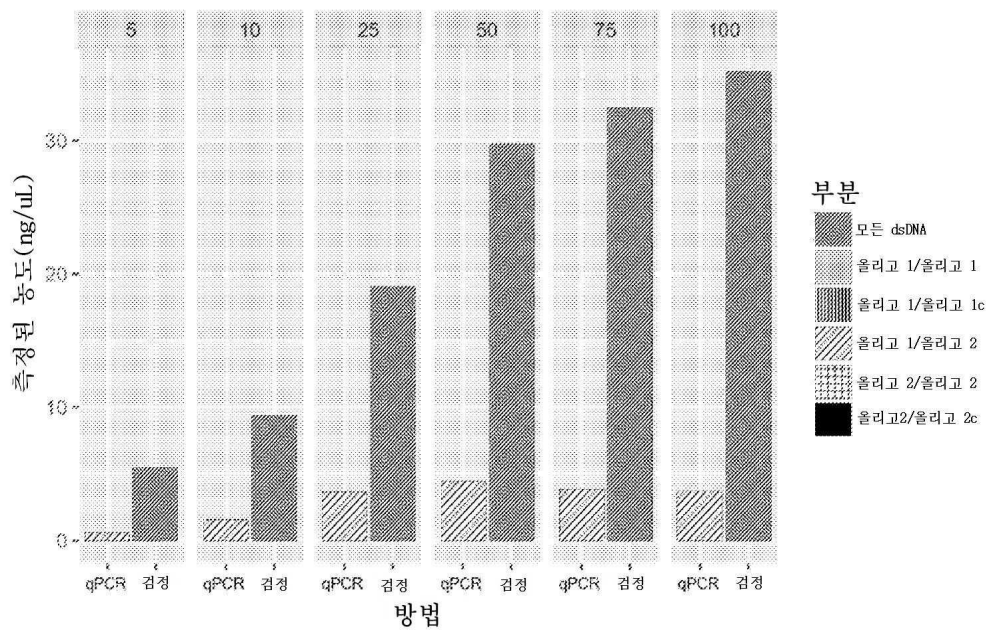
도면12b



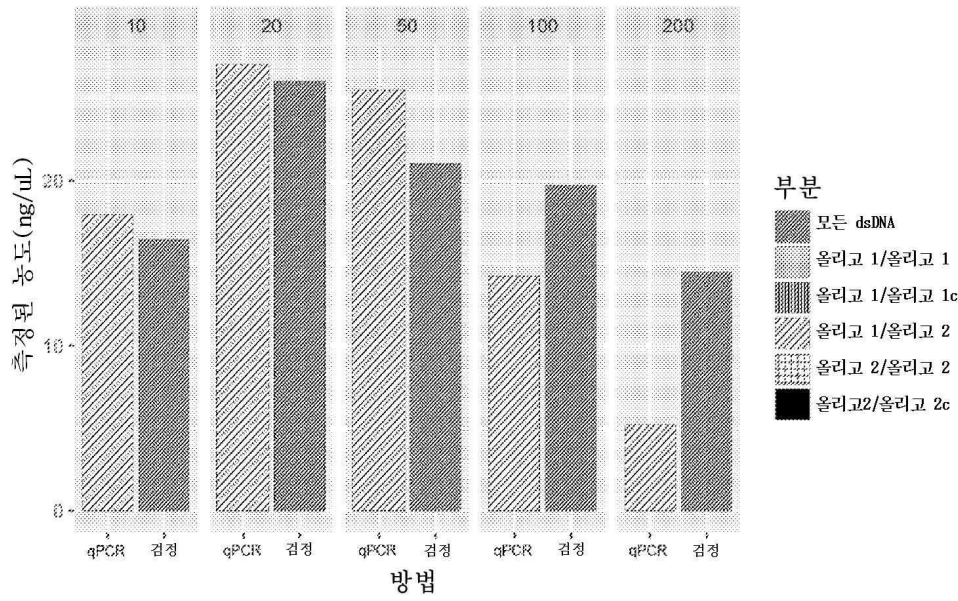
도면13



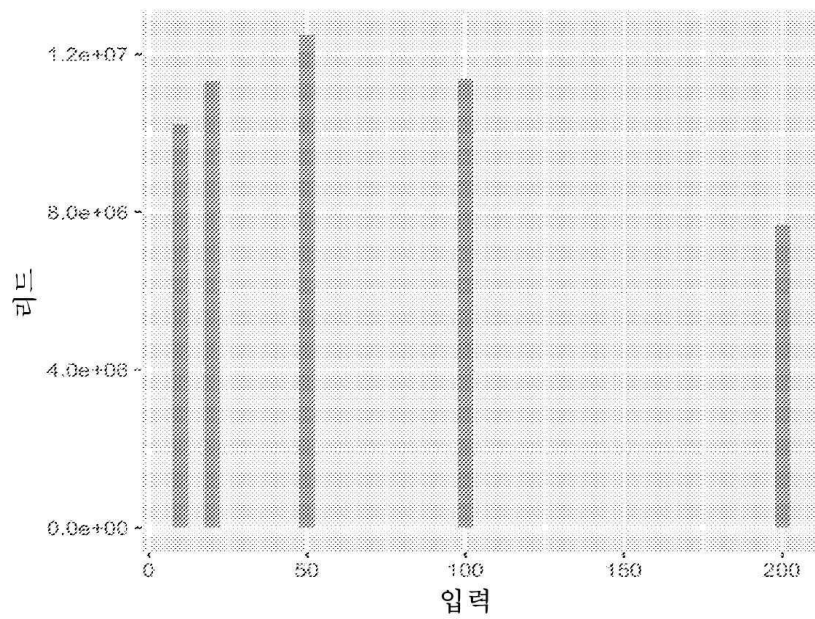
도면14



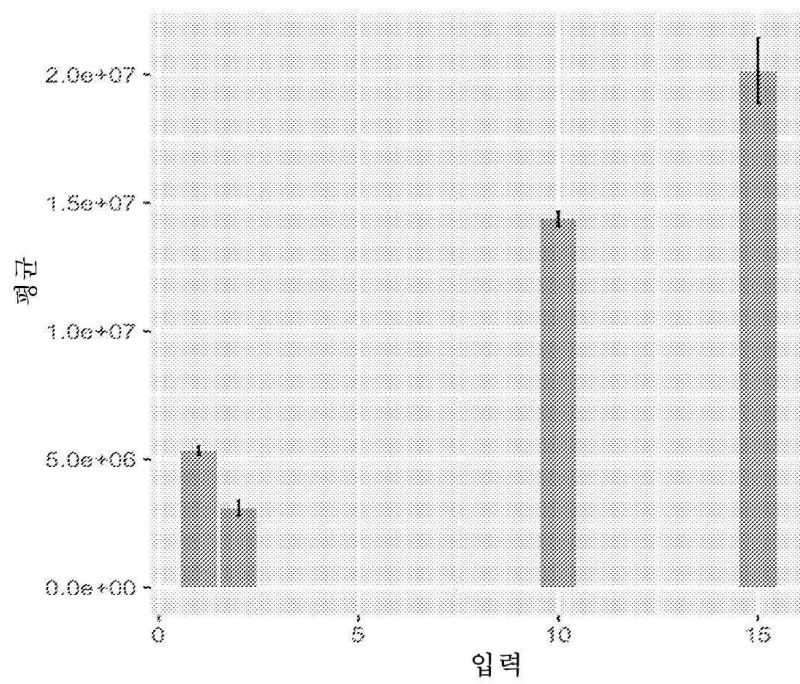
도면15



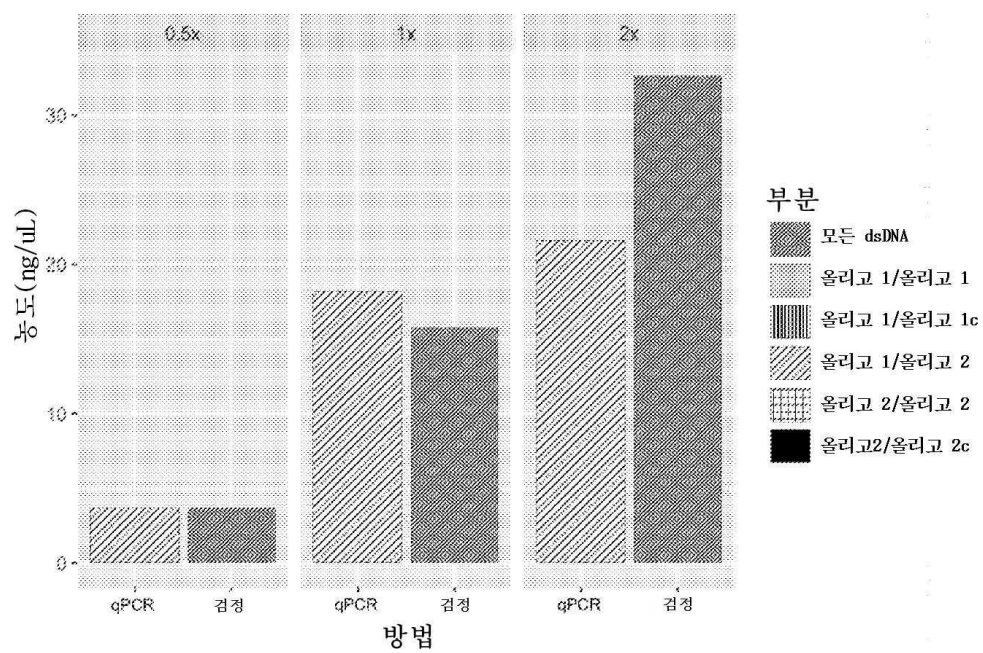
도면16



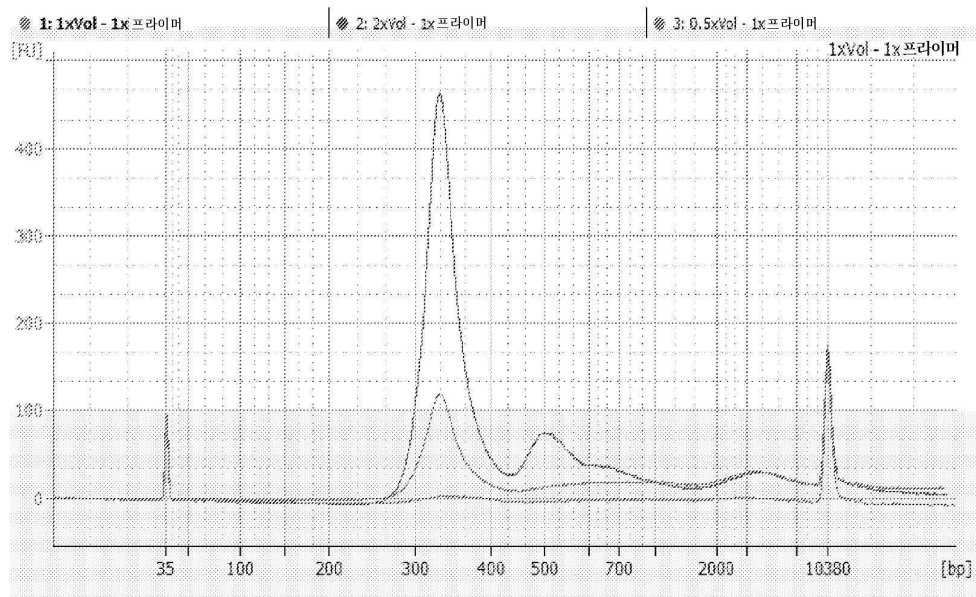
도면17



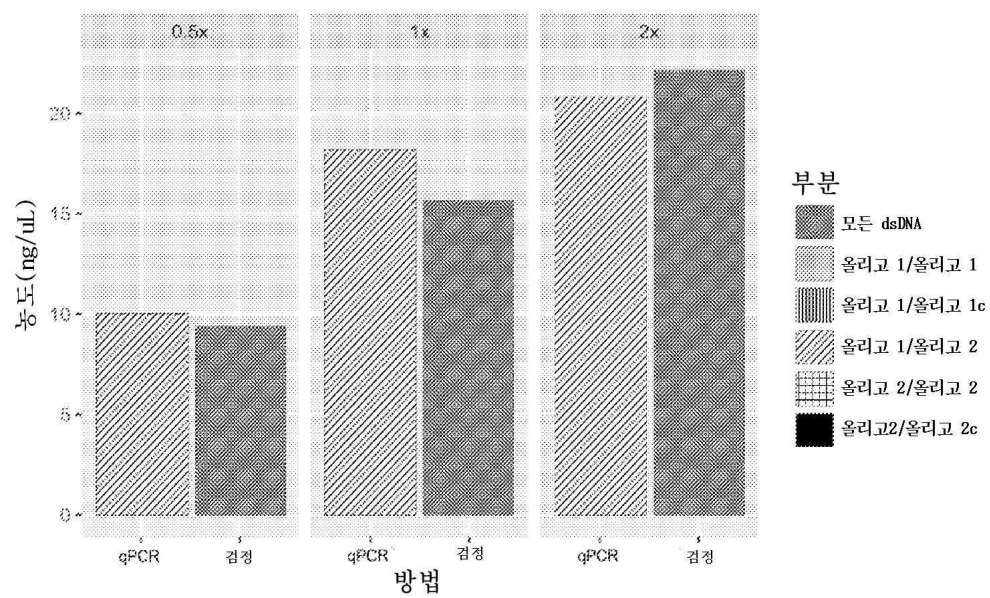
도면18



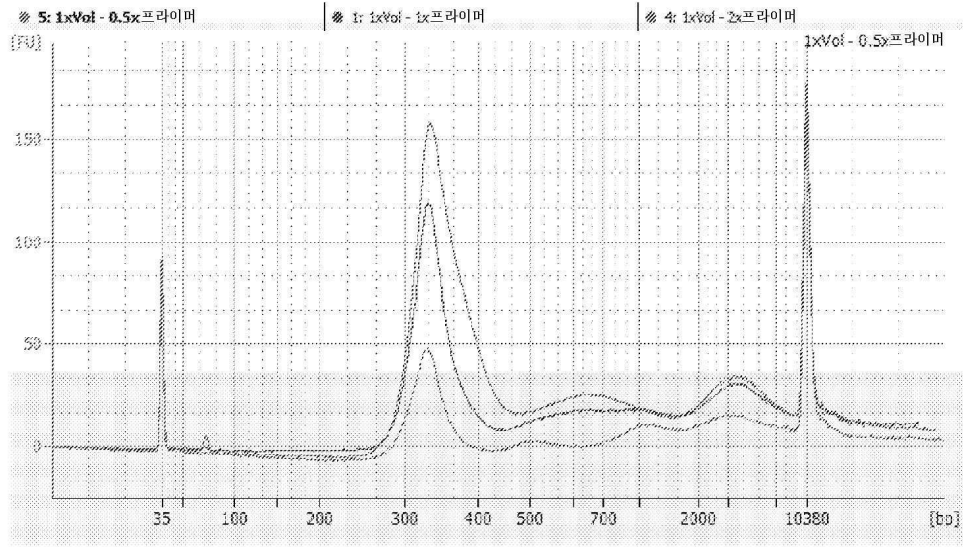
도면19



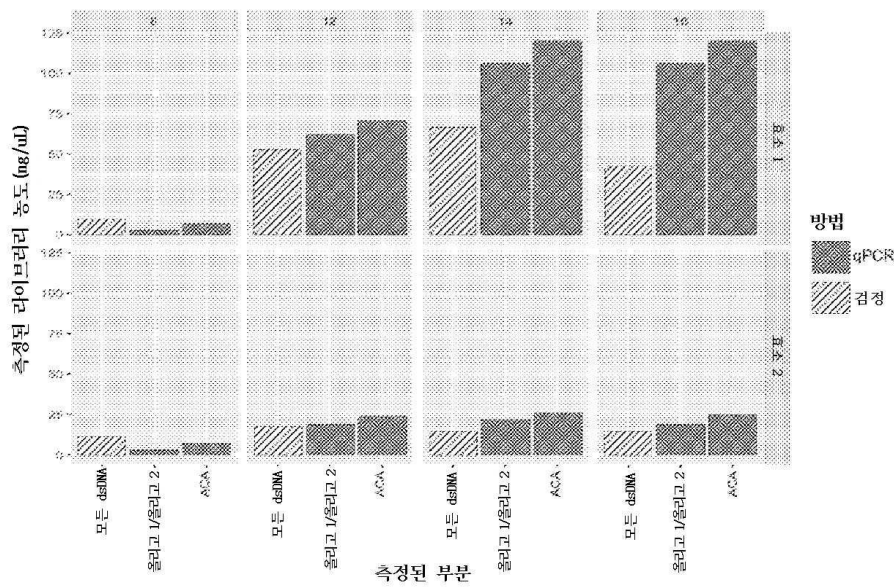
도면20



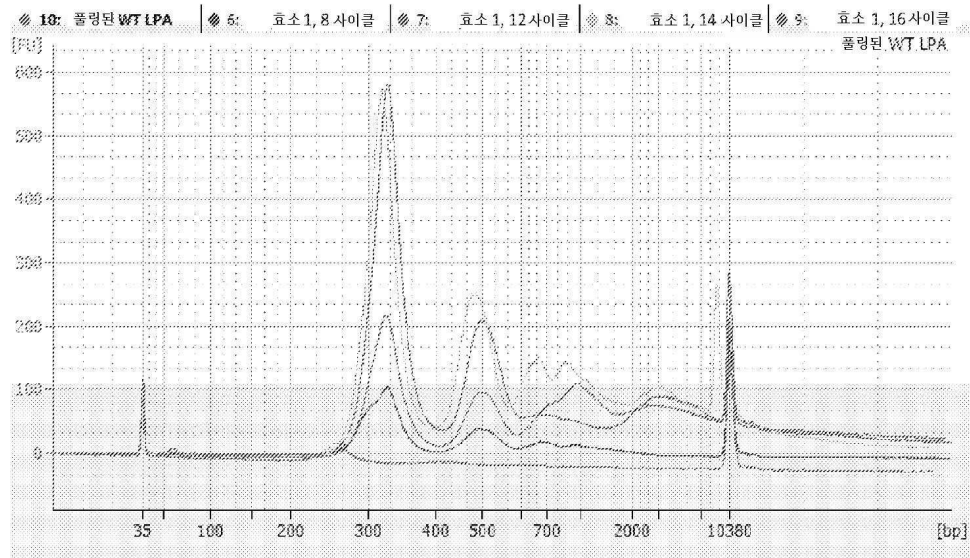
도면21



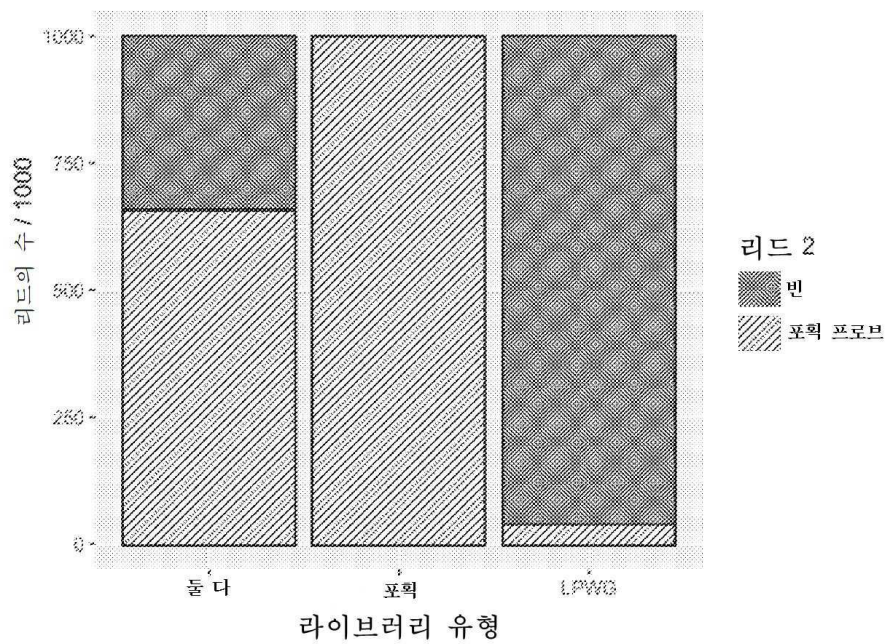
도면22



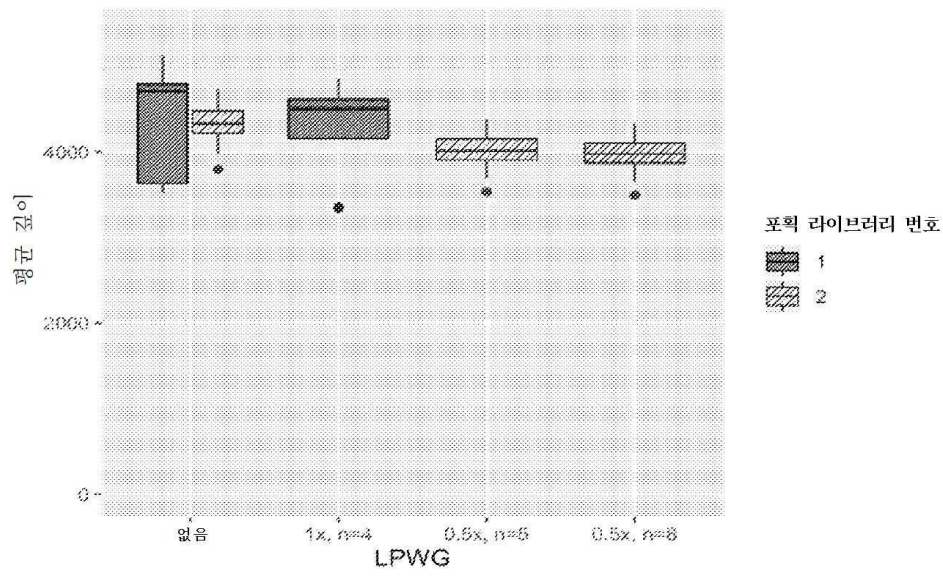
도면23



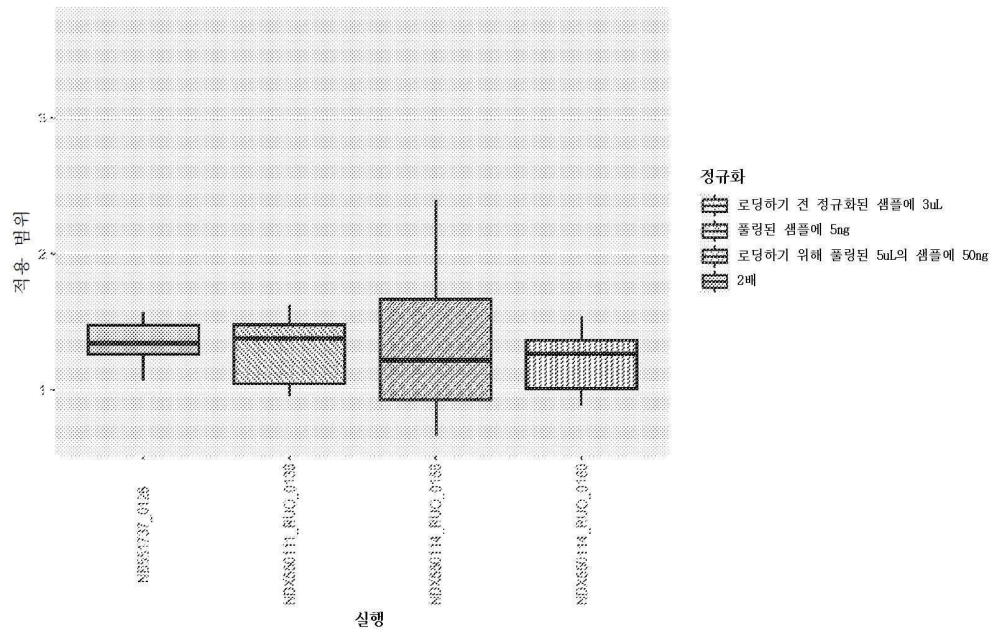
도면24



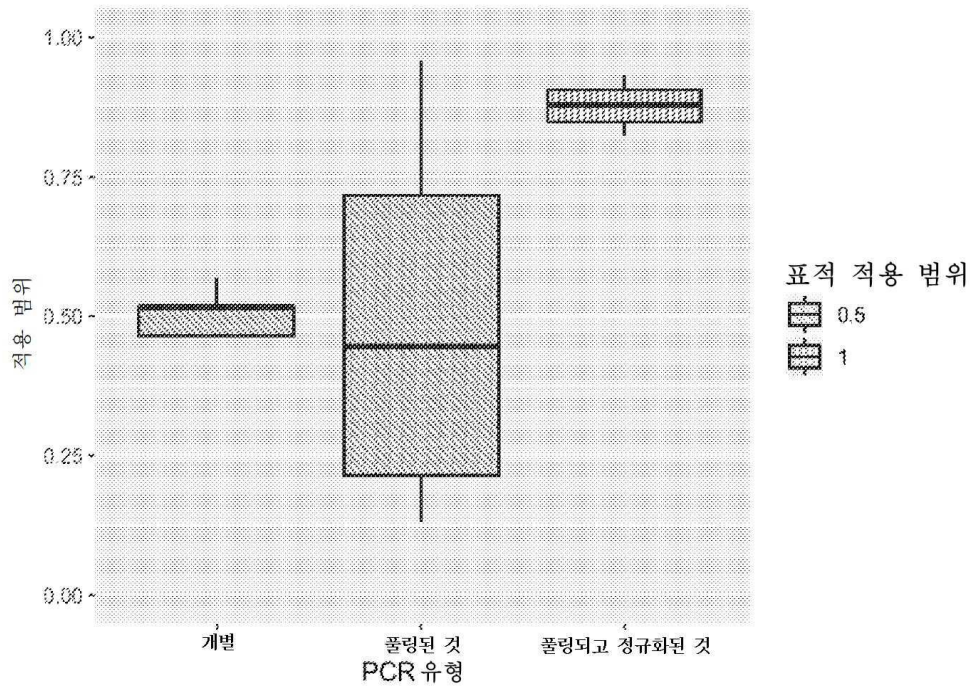
도면25



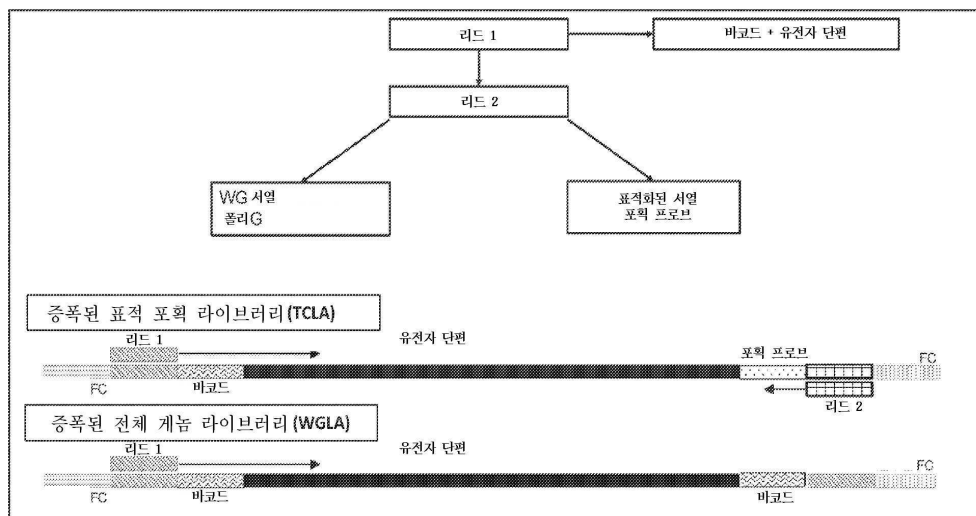
도면26



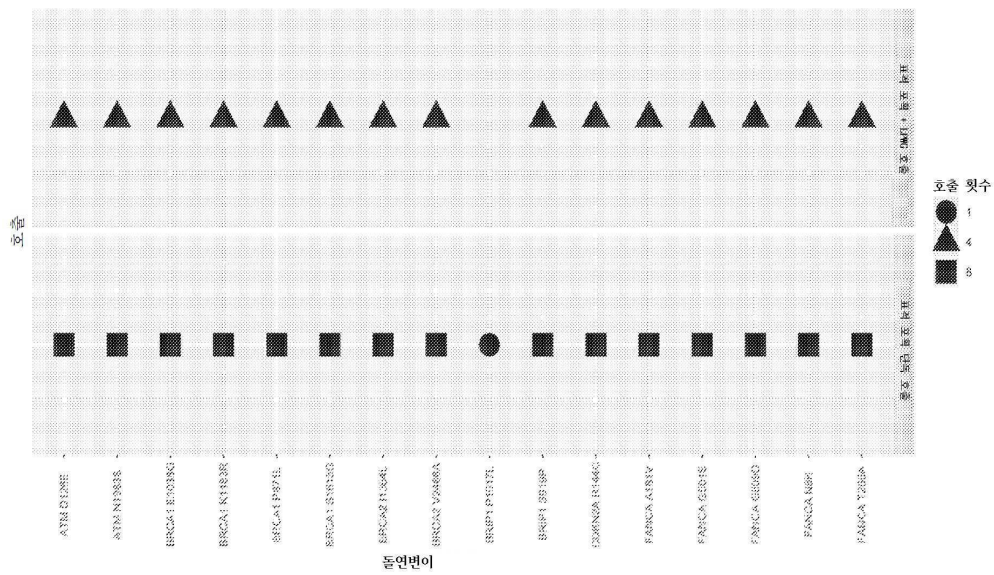
도면27



도면28



도면29



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Resolution Bioscience, Inc.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR SIMULTANEOUS GENETIC ANALYSIS OF
MULTIPLE LIBRARIES

<130> W02022212574

<140> PCT/US2022/022640

<141> 2022-03-30

<150> US 63/311,041

<151> 2022-02-16

<150> US 63/167,914

<151> 2021-03-30

<160> 83

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Exemplary Anchor 1

 $\langle 400 \rangle$ 1

acgtatgccca	10
<210> 2	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Exemplary Anchor 2	
<400> 2	
ctagcggttac	10
<210> 3	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Exemplary Anchor 3	
<400> 3	
gatcgacatg	10
<210> 4	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Exemplary Anchor 4	
<400> 4	
tgcacaggt	10
<210> 5	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Library Primer (single amplification primer; AKA primer)	
<400> 5	
tgcaggacca gagaattcga ataca	25

<210> 6
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary partner oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (47)..(47)
 <223> Biotin-TEG label attached
 <400> 6
 gtgaaaacca ggatcaactc ccgtgccagt cacatctcag atgagct 47

 <210> 7
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Forward Primer (Post Hyb Primer mix/Genomic Mix F/Primer F)
 <400> 7
 aatgatacgg cgaccaccga gatctacag tcatgcagga ccagagaatt cgaataca 58
 <210> 8
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Reverse Primer 63
 <400> 8
 caagcagaag acggcatacg agatgtgact ggcacgggac cagagaattc gaataca 57
 <210> 9
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Reverse Primer LPWG_AMP_R (Genomic Mix R)

<400> 9
caagcagaag acggcatacg agatgtgact ggtgcaggac cagagaattc gaataca 57
<210> 10
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Seq Forward Primer (FWD Seq Primer)
<400> 10
caagcagaag acggcatacg agatgtgact ggcacgggac cagagaattc gaataca 57
<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Seq Reverse Primer 62 (REV Seq Primer)
<400> 11
gtgactggca cgggaccaga gaattcgaat aca 33
<210>
> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Reverse Primer LPWG_SEQ_R:
<400> 12
gtgactggcg caggaccaga gaattcgaat aca 33
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligo 1 (Genomic Mix):
<400> 13
aatgatacgg cgaccaccga 20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligo 2 (Genomic Mix):

<400> 14

caagcagaag acggcatacg a

21

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligo 1c:

<400> 15

tcggtggtcg ccgtatcatt

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligo 2c:

<400> 16

tcgtatgccg tcttctgctt g

21

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> Empty read tag

<400> 17

gggggggggg gggggggg

17

<210> 18

<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> non-ligation-anchor region 1	
<400> 18	
tggcatacgt	10
<210> 19	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> non-ligation-anchor region 2	
<400> 19	
gtaacgctag	10
<210> 20	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> non-ligation-anchor region 3	
<400> 20	
catgtcgatc	10
<210> 21	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> non-ligation-anchor region 4	
<400> 21	
acctgatgca	10
<210> 22	
<211> 47	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 1

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 22

tgcaggacca gagaattcga atacaaaaat cctnnnacgt atgccat 47

<210> 23

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 2

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 23

tgcaggacca gagaattcga atacaaatga tctnnnacgt atgccat 47

<210> 24

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 3

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 24

tgcaggacca gagaattcga atacaagtaa tagnnnacgt atgccat 47

<210> 25

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 4

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 25

tgcaggacca gagaattcga atacacacct ccgnnnacgt atgccat 47

<210> 26

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 5

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 26

tgcaggacca gagaattcga atacacgccc catnnnacgt atgccat 47

<210> 27

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 6

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 27

tgcaggacca gagaattcga atacactacc aagnnnacgt atgccat 47

<210> 28

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 7

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 28

tgcaggacca gagaattcga atacactgtc gttnnnacgt atgccat

47

<210> 29

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 8

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 29

tgcaggacca gagaattcga atacagcaaa tggnnnacgt atgccat

47

<210> 30

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 9

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 30

tgcaggacca gagaattcga atacagctcg agcnnnacgt atgccat

47

<210> 31

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 10

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 31

tgcaggacca gagaattcga atacagtcca caannnacgt atgccat

47

<210> 32

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 11

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 32

tgcaggacca gagaattcga atacagttac cctnnnacgt atgccat

47

<210> 33

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 12

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 33

tgcaggacca gagaattcga atacatagtt ttcnnnacgt atgccat

47

<210> 34

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 13

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 34

tgcaggacca gagaattcga atacatctca gagnnnacgt atgccat 47

<210> 35

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 14

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 35

tgcaggacca gagaattcga atacatgacc ttcnnnacgt atgccat 47

<210> 36

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 15

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 36

tgcaggacca gagaattcga atacattacg gcannnacgt atgccat 47

<210> 37

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 16
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 37
 tgcaggacca gagaattcga atacaacaaa aacnnntgca tcaggtt 47

<210> 38
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 17
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 38
 tgcaggacca gagaattcga atacaacact gcanntgca tcaggtt 47

<210> 39
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 18
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 39
 tgcaggacca gagaattcga atacaatcgc gatnnntgca tcaggtt 47

<210> 40
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> exemplary ligation strand 19

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 40

tgcaggacca gagaattcga atacaatggt ggannntgca tcaggtt 47

<210> 41

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 20

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 41

tgcaggacca gagaattcga atacacaact ctcnntgca tcaggtt 47

<210> 42

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 21

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 42

tgcaggacca gagaattcga atacacgccc gaannntgca tcaggtt 47

<210> 43

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 22

<220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 43
 tgcaggacca gagaattcga atacacgtat gacnnntgca tcaggtt 47

<210> 44
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 23
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 44
 tgcaggacca gagaattcga atacagaaac gacnnntgca tcaggtt 47

<210> 45
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 24
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 45
 tgcaggacca gagaattcga atacagactc tgannntgca tcaggtt 47

<210> 46
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 25

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 46

tgcaggacca gagaattcga atacagtcac tctnnntgca tcaggtt 47

<210> 47

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 26

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 47

tgcaggacca gagaattcga atacatactg gacnnntgca tcaggtt 47

<210> 48

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 27

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 48

tgcaggacca gagaattcga atacatgcga tacnnntgca tcaggtt 47

<210> 49

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 28

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 49

tgcaggacca gagaattcga atacatgtta atgnnntgca tcaggtt

47

<210> 50

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 29

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 50

tgcaggacca gagaattcga atacattgta cttnnntgca tcaggtt

47

<210> 51

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 30

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 51

tgcaggacca gagaattcga atacatttgg ctcnnntgca tcaggtt

47

<210> 52

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 31

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 52

tgcaggacca gagaattcga atacaaacgc ctannngatc gacatgt 47

<210> 53

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 32

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 53

tgcaggacca gagaattcga atacaaagtt tcannngatc gacatgt 47

<210> 54

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 33

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 54

tgcaggacca gagaattcga atacaacagc gaannngatc gacatgt 47

<210> 55

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 34

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 55

tgcaggacca gagaattcga atacaagcgc ctgnnngatc gacatgt

47

<210> 56

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 35

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 56

tgcaggacca gagaattcga atacacaacc cttnnngatc gacatgt

47

<210> 57

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 36

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 57

tgcaggacca gagaattcga atacacagaa taannngatc gacatgt

47

<210> 58

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 37

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t
 <400> 58
 tgcaggacca gagaattcga atacacggac accnnngatc gacatgt 47
 <210> 59
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 38
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 59
 tgcaggacca gagaattcga atacagccta ttcnnngatc gacatgt 47
 <210> 60
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 39
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 60
 tgcaggacca gagaattcga atacagcgtc cagnnngatc gacatgt 47
 <210> 61
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 40
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 61

tgcaggacca gagaattcga atacaggtac aagnnngatc gacatgt

47

<210> 62

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 41

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 62

tgcaggacca gagaattcga atacataacc ctcnnngatc gacatgt

47

<210> 63

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 42

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 63

tgcaggacca gagaattcga atacatagga gtgnnngatc gacatgt

47

<210> 64

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 43

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 64
 tgcaggacca gagaattcga atacatccgc attnnngatc gacatgt 47

<210> 65
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 44
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 65
 tgcaggacca gagaattcga atacatgcgt caannngatc gacatgt 47

<210> 66
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 45
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 66
 tgcaggacca gagaattcga atacattggt aatnnngatc gacatgt 47

<210> 67
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 46
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 67

tgcaggacca gagaattcga atacaaatag cttnnnctag cgttact 47

<210> 68

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 47

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 68

tgcaggacca gagaattcga atacaagaga gagnnnctag cgttact 47

<210> 69

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 48

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 69

tgcaggacca gagaattcga atacacaacc tgannnctag cgttact 47

<210> 70

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 49

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 70

tgcaggacca gagaattcga atacacatat ggcnnnctag cgttact 47
 <210> 71
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 50
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 71
 tgcaggacca gagaattcga atacaccata tccnnnctag cgttact 47
 <210> 72
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 51
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 72
 tgcaggacca gagaattcga atacacgagg tccnnnctag cgttact 47
 <210> 73
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 52
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 73

tgcaggacca gagaattcga atacacgtca atgnnnctag cgttact 47

<210> 74

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 53

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 74

tgcaggacca gagaattcga atacacttat catnnnctag cgttact 47

<210> 75

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 54

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 75

tgcaggacca gagaattcga atacagcatt gacnnnctag cgttact 47

<210> 76

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 55

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 76

tgcaggacca gagaattcga atacaggagg tatnnnctag cgttact 47
 <210> 77
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 56
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 77
 tgcaggacca gagaattcga atacataaca gttnnnctag cgttact 47
 <210> 78
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 57
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 78
 tgcaggacca gagaattcga atacatcgaa cacnnnctag cgttact 47
 <210> 79
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> exemplary ligation strand 58
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 79

tgcaggacca gagaattcga atacatgcat aatnnnctag cgttact 47

<210> 80

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 59

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 80

tgcaggacca gagaattcga atacatgtca taannnctag cgttact 47

<210> 81

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary ligation strand 60

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 81

tgcaggacca gagaattcga atacattgcg cggnnnctag cgttact 47

<210> 82

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse Primer (Post Hyb Primer mix)

<400> 82

caagcagaag acggcatacg agatgtgact ggcacgggag ttgatcctgg ttttcac 57

<210> 83

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Index sequencing primer

<400> 83

tgtattcgaa ttctctggtc ccgtgccagt cac

33