



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0130592
(43) 공개일자 2022년09월27일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6869 (2018.01) C12Q 1/6834 (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2018.05)
C12Q 1/6834 (2018.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0030355</p> <p>(22) 출원일자 2022년03월10일
심사청구일자 없음</p> <p>(30) 우선권주장
21163300.3 2021년03월18일
유럽특허청(EPO)(EP)
22152617.1 2022년01월21일
유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
게노밀 헬스 오와이
핀란드 20520 투르쿠 이태이넨 핏캐카투 4 비</p> <p>(72) 발명자
푸르시헤이모 유하-페카
핀란드 21530 파이미오 아흐마티에 6</p> <p>히르보넨 다투
핀란드 20540 투르쿠 피스판펠토 9 아스 20
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
리앤목특허법인</p> |
|--|--|

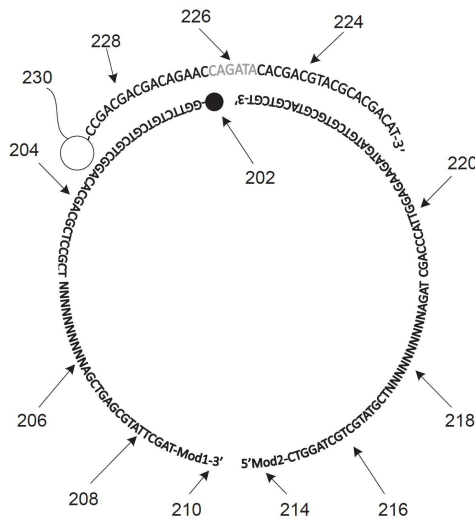
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **핵산의 정확한 병렬 정량분석을 위한 고감도 방법**

(57) 요약

본 발명은 예를 들어 대량의 비정제된 샘플 물질에서, 하나 이상의 핵산 표적의 정확한 대량 병렬 정량분석을 위한 차세대 DNA 시퀀싱 방법 및 용도에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 복합 샘플에서 유전자 표적을 검출 및 정량분석하기 위한 프로브를 포함하는 키트 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 유전자 표적당 하나 이상의 표적-특이적 핵산 프로브 (좌측 프로브 및 우측 프로브) 및 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체를 포함한다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

C12Q 2535/122 (2019.08)

C12Q 2545/10 (2019.08)

(72) 발명자

탐미넨 마누

핀란드 20500 투르쿠 카사르밍카투 5 아스 10

코르키아코스키 안토니

핀란드 20660 리토이넨 우시 리토이스텐티에 7

명세서

청구범위

청구항 1

복수의 샘플에서 하나 이상의 표적 뉴클레오티드 서열의 고처리량 검출 방법 (method for the high-throughput detection)으로서, 상기 방법은:

(i) 각 샘플에서 각 표적 뉴클레오티드 서열에 대해,

제1 프로브, 제2 프로브, 및 브릿지 올리고 (bridge oligo) 또는 서로 어닐링하여 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오티드를 제공하는 단계로서,

상기 제1 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 선택적으로 제1 서열 바코드, 및 제1 프로브의 3' 말단에 제1 표적 특이적 부분을 포함하고;

상기 제2 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제2 표적 특이적 부분, 선택적으로 제2 서열 바코드, 및 제2 프로브의 3' 말단에 제2 브릿지 올리고-특이적 서열을 포함하며;

상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는 상기 제1 프로브 및 상기 제2 프로브 각각에서의 제1 브릿지 올리고-특이적 서열 및 제2 브릿지 올리고-특이적 서열에 상보적인 서열, 및 선택적으로 제3 바코드를 함유하고;

상기 제1 서열 바코드 또는 제2 서열 바코드 또는 제3 바코드 중 적어도 하나는 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 각각에 존재하며;

상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하고;

선택적으로, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 서로 어닐링하여 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오티드 중 적어도 하나는 제1 포획 모이어티 (capture moiety)를 포함하는 것인 단계;

(ii) 상기 하나 이상의 표적 뉴클레오티드 서열 각각에 대해, 상기 제1 프로브 및 제2 프로브를, 바람직하게는 개별 튜브 내의 샘플 각각에 대해, 상기 브릿지 올리고 또는 서로 어닐링하여 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오티드와 접촉시키고, 자가-어닐링으로 복수의 결합 복합체 (ligation complexes)가 형성되도록 하는 단계;

(iii) 상기 표적 뉴클레오티드 서열에 대해 테스트할 각 샘플 내에 존재하는 핵산을 상기 결합 복합체와 접촉시키는 단계;

(iv) 각각의 제1 프로브 및 제2 프로브의 제1 표적 특이적 부분 및 제2 표적 특이적 부분을 상기 표적 서열 상의 본질적으로 인접한 섹션에 혼성화되도록 하여, 이에 의해 혼성화 복합체 (hybridization complex)가 형성되도록 하는 단계;

(v) 선택적으로, 상기 혼성화 복합체를 제2 포획 모이어티를 포함하는 고체 지지체와 접촉시키고, 상기 혼성화 복합체가 상기 고체 지지체에 연결되도록 제1 포획 모이어티 및 제2 포획 모이어티가 상호작용되도록 하고, 상기 고체-지지체-연결된 혼성화 복합체를 고체-지지체에 연결되지 않은 샘플의 성분들로부터 분리하는 단계;

(vi) 상기 혼성화 복합체에서 프로브들을 결합하여 결합된 결합 복합체 (ligated ligation complexes)를 제공하는 단계;

(vii) 선택적으로, 복수의 샘플들로부터 상기 결합된 결합 복합체를 풀링 (pooling)하는 단계;

(viii) 가닥-치환 폴리머라제 (strand-displacing polymerase)로 롤링 서클 증폭 (rolling circle amplification)을 사용하여 하나 이상의 결합된 결합 복합체로부터 핵산을 증폭시키는 단계;

(ix) 선택적으로, 단계 (viii)에서 수득된 증폭된 하나 이상의 단일-가닥 연쇄체 서열 (concatemeric

sequence)을 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 함유하는 특정 올리고뉴클레오티드와 어닐링하는 단계로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 단계 (i)에 명시된 인식 서열로 어닐링하여 상기 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위가 수득되는 것인 단계;

(x) 선택적으로, 단계 (viii)에서 수득된 단일-가닥 연쇄체 서열 또는 단계 (ix)에서 수득된 어닐링된 복합체를 상기 엔도뉴클레아제로 절단하는 단계;

(xi) 단계 (x)에서 수득된 핵산 단편 또는 단계 (viii)에서 수득된 연쇄체 서열을 고처리량 시퀀싱 기술 (high-throughput sequencing technology)에 적용하여 바코드 서열(들)을 결정하는 단계; 및

(xii) 상기 제1 표적 특이적 부분 및/또는 제2 표적 특이적 부분의 적어도 일부, 및/또는 상기 제1 바코드 및/또는 제2 바코드의 적어도 일부, 및/또는 상기 제3 바코드의 적어도 일부의 결정에 의해, 복수의 샘플에서 표적 뉴클레오티드 서열의 존재 및/또는 수를 확인하는 단계를 포함하고;

상기 단계 (vi) 및 (vii)는 임의의 순서로 수행될 수 있는 것인 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 복수의 샘플은 혈액 샘플, 타액 샘플, 소변 샘플 또는 대변 샘플을 포함하는 것인 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 제1 포획 모이어티를 포함하고, 상기 방법은 단계 (v)를 포함하며, 상기 방법은 단계 (v) 이전에 핵산을 농축하는 단계를 포함하지 않는 것인 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 제1 포획 모이어티를 포함하고, 상기 방법은 단계 (v)를 포함하며, 상기 제1 포획 모이어티는 바이오틴 모이어티이고, 상기 제2 포획 모이어티는 스트렙타비딘 모이어티 또는 아비딘 모이어티인 것인 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 제1 포획 모이어티를 포함하고, 상기 방법은 단계 (v)를 포함하며, 세척 단계는 단계 (v) 및 단계 (vi) 사이에서 수행되는 것인 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는:

- (i) 1 내지 5개의 3' 돌출 염기 (protruding bases), 및/또는
- (ii) 3' 포스페이트, 및/또는
- (iii) 3' 말단으로부터 3개의 위치 내에 하나 이상의 포스포로티오에이트 변형을 포함하는 것인 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 프로브의 3' 말단 또는 상기 제2 프로브의 5' 말단, 또는 이들 모두는 상기 제1 프로브가 상기 제2 프로브에 화학적 결합되도록 변형되는 것인 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 프로브 또는 상기 제2 프로브, 또는 이들 모두의 가교 부분 (bridging portion)은 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체에 대한 결합이 개선되도록 하는 화학적으로 변형된 염기를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적 특이적 부분, 제2 표적 특이적 부분, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 및/또는 제2 브릿지 올리고-특이적 서열은 서로 독립적으로, 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 함유하는 것인 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (viii)는 phi29 폴리머라제 또는 Bst 폴리머라제를 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, PCR 증폭은 제1 및 제2 프로브의 범용 부분 (universal parts)에 결합하는 프라이머를 사용하여 단계 (x) 및 단계 (xi) 사이에 수행되고, 상기 프라이머는 단계 (xi)에서의 후속하는 시퀀싱을 위한 어댑터 (adapters)를 선택적으로 포함하는 것인 방법.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 표적 계수 (enumeration)는 표적당 (per target) 및 샘플당 (per sample) 분자 바코드의 수를 계수함으로써 허용되는 것인 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 샘플의 경우 또는 2개 이상의 유전자좌/대립유전자 조합의 경우, 하나 이상의 서열 및/또는 다형, 예컨대 SNPs 및/또는 indels에 대해 샘플(들)의 유전자형을 분석하기 위해 바코드 서열이 사용되는 것인 방법.

청구항 14

복수의 용기를 포함하는 부재들의 키트 (Kit of parts)로서, 상기 적어도 하나의 용기는 제1 프로브 및 제2 프로브의 하나 이상의 세트를 포함하고, 적어도 하나의 용기는 하나 이상의 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오티드를 포함하며,

상기 제1 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 선택적으로 제1 서열 바코드, 및 제1 프로브의 3' 말단에 제1 표적 특이적 부분을 포함하고;

상기 제2 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제2 표적 특이적 부분, 선택적으로 제2 서열 바코드, 및 제2 프로브의 3' 말단에 제2 브릿지 올리고-특이적 서열을 포함하며;

상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는 상기 제1 프로브 및 상기 제2 프로브 각각에서의 제1 및 제2 브릿지 올리고-특이적 서열에 상보적인 서열, 및 선택적으로 제3 바코드를 포함하고;

상기 제1 서열 바코드 또는 제2 서열 바코드 또는 제3 바코드 중 적어도 하나는 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 각각에 존재하며;

상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하고;

상기 부재들의 키트는 상기 인식 서열과 어닐링하여 상기 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위가 수득될 수 있는 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함하는 것인 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 개시내용은 하나 이상의 핵산 표적의 정확한 대량 병렬 정량분석을 위한 개선된 차세대 DNA 시퀀싱 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 개시내용은 유전자 표적 및 변이체 검출에 주로 사용되는 복합 DNA 풀에서 유전자 표적을 검출 및 정량분석하기 위한 프로브를 포함하는 키트 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 유전자 표적당 하나 이상의 표적-특이적 핵산 프로브 (좌측 프로브 및 우측 프로브) 및 브릿지 올리고 (bridge

oligo) 또는 브릿지 올리고 복합체를 사용한다.

배경 기술

- [0002] 유전자 변이를 연구하는 기술의 발전으로, 식물 및 동물에서 유전자 변이를 검출하는 것은 번거롭지 않다. 그러나, 특히 약한 신호를 가진 샘플에서 돌연변이와 같은 유전자 변이를 검출하고 정확하게 정량분석하는 것은 시퀀싱 비용이 감소되었음에도 불구하고 현재 여전히 번거롭고 힘들며 비용이 많이 든다. 컨센서스 배경에 대해 유전자 신호를 검출하기 위한 특이성 (specificity), 약한 유전자 신호를 검출하기 위한 민감도 (sensitivity), 검출된 신호의 정확한 정량분석을 위한 정확도 (accuracy), 분석당 표적화된 유전자 표적의 처리량 수 (throughput number), 분석 당 비용 (cost), 다수의 샘플을 병렬로 분석하는 경우 분석 비용 규모를 결정하기 위한 스케일링 (scaling) 및 샘플링으로부터 결과까지 걸리는 시간을 결정하기 위한 회전율 (turn-over)로, 다양한 문제를 보다 정확하게 표시할 수 있다.
- [0003] 현재, 액체 생검에 대한 전형적인 정량분석 방법 및 개념적으로 유사한 분석 (예: 항생제 내성 유전자 검출)에는 정량적 PCR (qPCR), 어레이 qPCR, 디지털 PCR, 다중 결찰-의존성 프로브 증폭 (MLPA) 또는 차세대 DNA 시퀀싱 데이터로부터의 정량분석을 포함한다. 상기 정량분석 방법은 강력하고 잘-확립된 방법이지만, 각 방법은 하에서 자세히 논의되는 특정 문제점과 관련이 있다:
- [0004] 정량적 PCR (Quantitative PCR): 정량적 PCR (qPCR)은 PCR 중에, 즉 실시간으로 표적 DNA 분자의 증폭을 포함하는 기술이다. 실시간 PCR은 정량적 (quantitative real-time PCR), 준정량적, 즉 DNA 분자의 소정량 이상/미만 (semi quantitative real-time PCR)으로 사용될 수 있다. 정량적 PCR (qPCR)은 유전자 표적 정량분석의 최적 표준 (gold standard)이다. 현재, qPCR 반응의 실험실 비용은 약 \$2이다. 그러나, 반응을 설정하는데 드는 상당한 시간 (인건비), 표준 곡선의 필요성과, 정량분석된 각 표적에 대한 복제를 함께 고려하면, 실제 비용은 사실상 훨씬 더 높다. 각 유전자 표적에 대해 별도의 정량분석 실험이 필요하기 때문에 시간에 대한 인건비의 양은 샘플 수가 증가함에 따라 가파르게 확장된다.
- [0005] 어레이 PCR (Array PCR): PCR 어레이는 유전자의 관련 경로- 또는 질병-중심 패널의 발현을 분석하기 위한 가장 신뢰할 수 있는 도구이다. 각 96-웰 플레이트, 384-웰 플레이트 또는 100-웰 디스크 PCR 어레이에는 중점 유전자 패널의 철저하게 연구된 패널에 대한 SYBR Green-최적화 프라이머 분석 (SYBR Green-optimized primer assays)을 포함한다. 상기 qPCR 기술의 더 새로운 반복은 개별 qPCR 반응들을 소형화하는 어레이 qPCR이다. 어레이 PCR은 개별 qPCR 반응의 비용을 낮추고, 다수의 표적 및 샘플에 대한 방법의 확장성을 개선하였다. 그러나, 이러한 방법은 현재 칩당 수천 달러의 비용과 판독 인프라의 막대한 자본 비용으로 12개의 샘플로부터 384개의 표적 (또는 반대로 384개의 샘플로부터 12개의 표적)을 프로파일링하는 것으로 제한된다. 그러므로, 전술한 설정을 사용하여 수천 개의 샘플을 프로파일링하는 것은 엄청난 비용이 든다.
- [0006] 디지털 PCR (Digital PCR): 디지털 증합효소 연쇄 반응 (digital PCR, DigitalPCR, dPCR, 또는 dePCR)은 형광 검출 및 액적-미세유체 공학을 통한 표적의 절대 정량분석을 제공하는 방법이다. 상기 방법은 상대적으로 비용-효율적이지만 (샘플당 하나의 표적은 약 \$3의 비용이 들), 각 샘플에서 각 표적에 대한 개별 실험을 준비, 설정 및 실행하는 시간당 비용은 수천 개의 샘플로 확대하기에는 좋지 않다.
- [0007] MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)는 개별 샘플에서 다수의 유전자 표적의 검출을 단순화하는 접근 방식을 제공한다. 그러나, MLPA는 표적의 상대적 정량분석만을 제공하며, 각 샘플에 대해 별도의 검출 실험을 필요로 한다. 더 최근에는 MLPA의 변형은 DNA 바코딩 (DNA barcoding)의 개념을 도입하였다. 이러한 개념은 전통적인 MLPA 워크플로우보다 더 나은 정량적 분해능 및 샘플 다중화를 허용한다.
- [0008] 차세대 시퀀싱-기반 접근 방식 (Next generation sequencing-based approaches): NGS (Next-generation sequencing)는 서열-기반 유전자 발현 분석을 아날로그 기술에 대한 대안으로 "디지털"로 만드는, 고-처리량 시퀀싱 (high-throughput sequencing)으로도 알려져 있다. 차세대 DNA 시퀀싱 데이터의 표적 계수는 DNA 시퀀싱 비용을 감소시키기 때문에 점점 더 매력적이 되었고, 현재 예를 들어 NIPT 스크리닝에 사용된다. 그러나, 현재 접근 방식은 높은 시퀀싱 라이브러리 제조 비용과 비-관련 유전자 표적을 시퀀싱하는데 낭비되는 시퀀싱 노력으로 어려움을 겪는다. 예를 들어, 암-관련 액체 생검에서, 비-표적 접근 방식은 중앙학적으로 비-관련 유전자좌에 대한 시퀀싱 노력의 낭비를 초래한다. 태아 진단에서, 유전자좌의 비-표적 샘플링은 데이터 해석을 위한 통계학적 옵션을 상당히 제한한다. Guardant Health Inc는 RNA 포획 프로브 어레이가 차세대 DNA 시퀀싱을 위한 표적을 농축하는, 보다 표적화된 시퀀싱 접근 방식을 제공한다.
- [0009] Akhras et al. (2007) PLoS ONE 2(2):e223은 바코드된 표적-특이적 프로브, 표적 원형화 및 시퀀싱을 포함하는

다중 병원체 검출 분석을 개시하였다. 표적-특이적 프로브를 결합하기 위한 브릿지 올리고뉴클레오타이드의 사용이 또한 개시되어 있다.

[0010] WO2018109206은 패드락 프로브 (padlock probes) 및 롤링 서클 증폭 (rolling circle amplification)을 사용하여 샘플에서 분석물을 검출하는 방법을 개시하였다. 가교 올리고 (bridging oligo)의 사용은 기재되지 않았다.

[0011] WO2019038372는 관심 표적 서열이 T7 폴리머라제에 대한 프로모터를 함유하는 결합 복합체로부터 인 비트로 전사에 의해 선택적으로 증폭된 다음에, cDNA 합성 및 시퀀싱되는 차세대 시퀀싱 접근 방식을 개시하였다. 이러한 방법을 사용하면 샘플에서 많은 표적 서열을 정확하게 병렬로 검출하고 정량분석할 수 있지만, 더 복잡하고 부피가 크고, 희석되고 및/또는 불순한 샘플은 여전히 어렵다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 그러므로, 전술한 논의에 비추어, 핵산 표적의 정확한 대규모 병렬 정량분석을 통해 특이성, 민감도, 정확도, 처리량, 비용, 스케일링 및 회전을 포함하지만 이에 한정되지 않는 전술한 단점을 극복할 필요가 있다.

과제의 해결 수단

[0013] **발명의 요약**

[0014] 본 발명은 대용량 샘플 (최대 수십 밀리리터) 및/또는 희석 및/또는 비-정제된 샘플 물질로부터 고도로 민감하고, 확장 가능하며 정확한 표적 정량분석을 위해 차세대 시퀀싱을 사용하는 방법을 제공한다. 또한, WO2019038372에 기재된 바와 같은 RNA 증폭 단계를 회피하여, 방법을 보다 간단하게 만들었다.

[0015] 제1 주요 양상에서, 본 발명은 복수의 샘플에서 하나 이상의 표적 뉴클레오타이드 서열의 고처리량 검출 방법 (method for the high-throughput detection)에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함하고:

[0016] (i) 각 샘플에서 각 표적 뉴클레오타이드 서열에 대해,

[0017] 제1 프로브, 제2 프로브, 및 브릿지 올리고 또는 서로 어닐링하여 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오타이드를 제공하는 단계로서,

[0018] 상기 제1 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 선택적으로 제1 서열 바코드, 및 제1 프로브의 3' 말단에 제1 표적 특이적 부분을 포함하고;

[0019] 상기 제2 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제2 표적 특이적 부분, 선택적으로 제2 서열 바코드, 및 제2 프로브의 3' 말단에 제2 브릿지 올리고-특이적 서열을 포함하며;

[0020] 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는 상기 제1 프로브 및 상기 제2 프로브 각각에서의 제1 브릿지 올리고-특이적 서열 및 제2 브릿지 올리고-특이적 서열에 상보적인 서열, 및 선택적으로 제3 바코드를 함유하고;

[0021] 상기 제1 서열 바코드 또는 제2 서열 바코드 또는 제3 바코드 중 적어도 하나는 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 각각에 존재하며;

[0022] 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하고;

[0023] 선택적으로, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 제1 포획 모이어티 (capture moiety)를 포함하는 것인 단계;

[0024] (ii) 상기 하나 이상의 표적 뉴클레오타이드 서열 각각에 대해, 상기 제1 프로브 및 제2 프로브를, 바람직하게는 개별 튜브 내의 샘플 각각에 대해, 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키고, 자가-어닐링으로 복수의 결합 복합체 (ligation complexes)가 형성되도록 하는 단계;

[0025] (iii) 상기 표적 뉴클레오타이드 서열에 대해 테스트할 각 샘플 내에 존재하는 핵산을 상기 결합 복합체와 접촉시키는 단계;

- [0026] (iv) 각각의 제1 프로브 및 제2 프로브의 제1 표적 특이적 부분 및 제2 표적 특이적 부분을 상기 표적 서열 상의 본질적으로 인접한 섹션에 혼성화되도록 하여, 이에 의해 혼성화 복합체 (hybridization complex)가 형성되도록 하는 단계;
- [0027] (v) 선택적으로, 상기 혼성화 복합체를 제2 포획 모이어티를 포함하는 고체 지지체와 접촉시키고, 상기 혼성화 복합체가 상기 고체 지지체에 연결되도록 제1 포획 모이어티 및 제2 포획 모이어티가 상호작용되도록 하고, 상기 고체-지지체-연결된 혼성화 복합체를 고체-지지체에 연결되지 않은 샘플의 성분들로부터 분리하는 단계;
- [0028] (vi) 상기 혼성화 복합체에서 프로브들을 걸찰하여 걸찰된 걸찰 복합체 (ligated ligation complexes)를 제공하는 단계;
- [0029] (vii) 복수의 샘플들로부터 상기 걸찰된 걸찰 복합체를 풀링 (pooling)하는 단계;
- [0030] (viii) 가닥-치환 폴리머라제 (strand-displacing polymerase)로 롤링 서클 증폭을 사용하여 하나 이상의 걸찰된 걸찰 복합체로부터 핵산을 증폭시키는 단계;
- [0031] (ix) 선택적으로, 단계 (viii)에서 수득된 증폭된 하나 이상의 단일-가닥 연쇄체 서열 (concatemeric sequence)을 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 함유하는 특정 올리고뉴클레오티드와 어닐링하는 단계로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 단계 (i)에 명시된 인식 서열로 어닐링하여 상기 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위가 수득되는 것인 단계;
- [0032] (x) 선택적으로, 단계 (viii)에서 수득된 단일-가닥 연쇄체 서열 또는 단계 (ix)에서 수득된 어닐링된 복합체를 상기 엔도뉴클레아제로 절단하는 단계;
- [0033] (xi) 단계 (x)에서 수득된 핵산 단편 또는 단계 (viii)에서 수득된 연쇄체 서열을 고처리량 시퀀싱 기술에 적용하여 바코드 서열(들)을 결정하는 단계; 및
- [0034] (xii) 상기 제1 표적 특이적 부분 및/또는 제2 표적 특이적 부분의 적어도 일부, 및/또는 상기 제1 바코드 및/또는 제2 바코드의 적어도 일부, 및/또는 상기 제3 바코드의 적어도 일부의 결정에 의해, 복수의 샘플에서 표적 뉴클레오티드 서열의 존재 및/또는 수를 확인하는 단계;
- [0035] 여기서 상기 단계 (vi) 및 (vii)는 임의의 순서로 수행될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 본원의 일 구체예에 따른 MLA (Multiplexed Ligation Assay)의 흐름도를 도시한다.
- 도 2a는 본원의 일 구체예에 따른 복수의 프로브 엔티티 (probe entities)를 갖는 프로브 삼중항 (probes triplet)의 원리 구조를 도시한다.
- 도 2b는 본원의 일 구체예에 따른 제1 프로브 및 제2 프로브 사이의 갭 필링 (gap filling)을 도시한다.
- 도 2c는 본원의 일 구체예에 따른 제1 프로브 및 제2 프로브 및 브릿지 복합체 사이의 갭 필링을 도시한다.
- 도 3은 제한 엔도뉴클레아제에 의한 소화 전 (라인 2) 및 소화 후 (라인 1)에 워크플로우로부터 RCA 생성물을 도시한다.
- 도 4는 분자 바코드를 계수함으로써 차세대 DNA 시퀀싱 데이터로부터 유추되는, 4개의 복제 반응에서 대수적으로 감소하는 유전자 표적 수에 대한 실험 워크플로우의 선형 반응을 도시한다. 각 행은 표적 서열의 3가지 농도를 나타낸다. 응답 (response)은 3차수에 걸쳐 선형이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 정의:
- [0038] 표적 뉴클레오티드 서열 (Target Nucleotide Sequence): 용어 표적 뉴클레오티드 서열은 검출이 필요한 관심 있는 임의의 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 해당 용어는 인접 뉴클레오티드의 서열 뿐만 아니라 상보적 서열을 갖는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 이해될 것이다. 일부 구체예에서 표적 서열은 다형 (polymorphism)을 나타내거나 또는 이와 관련된 뉴클레오티드 서열이다.
- [0039] 다형 (Polymorphism): 용어 다형은 모집단에서 2개 이상의 유전자 결정된 대체 서열 또는 대립유전자의 발생을

지칭한다. 다형 마커 또는 부위는 서열 분기가 발생하는 유전자좌이다. 다형 유전자좌는 하나의 염기쌍 만큼 작을 수 있다.

- [0040] 샘플 (Samples): 용어 샘플은 2개 이상의 표적 서열을 함유하는 2개 이상의 샘플에 대해 본원에서 사용된다. 본 발명에 따른 방법에 제공되는 샘플은 적어도 표적 핵산을 추출하고 본 발명에서 사용되는 프로브에 접근 가능하도록 준비되었을 수 있다. 구체적으로, 일부 구체예에서, 샘플 각각은 적어도 2개의 상이한 표적 서열, 바람직하게는 적어도 100개, 더 바람직하게는 적어도 250개, 더 바람직하게는 적어도 500개, 가장 바람직하게는 적어도 2000개, 또는 초과를 포함한다. 용어 샘플은 소변, 생검, 타액 및 기타 분비물, 호기 수분 추출물, 조직, 혈장 (액체 생검)을 포함하는 인간/동물 신체로부터 수득된 2개 이상의 샘플, 또는 물, 폐수, 토양, 식물을 포함하는 환경으로부터 수득된 2개 이상의 샘플, 또는 바이러스 또는 박테리아 또는 유사물을 함유하는 2개 이상의 샘플을 지칭할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 일 구체예에서, 복수의 샘플은 혈액 샘플, 타액 샘플, 소변 샘플 또는 대변 샘플, 다른 체액 샘플 또는 신체 물질로부터의 추출물, 예를 들어 모발 또는 피부 플레이크를 포함한다.
- [0041] 프로브 (Probe): 용어 프로브는 DNA 또는 RNA 샘플에서 프로브의 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열 (DNA 또는 RNA 표적)의 존재를 검출하는데 사용될 수 있는 가변 길이 (통상 50-1000개의 염기 길이, 바람직하게는 50 - 200개의 염기 길이)의 DNA 또는 RNA의 단편이다. 표적 서열에 상보적인 올리고뉴클레오티드 프로브의 선택은 샘플의 각 표적 서열에 대해, 좌측 및 우측 프로브 쌍이 제공되고, 이에 의해 프로브 각각은 이들의 극말단에 상기 표적 서열의 일부에 상보적인 섹션을 함유하도록 디자인된다. 또한, 본 개시내용은 좌측 프로브 및 우측 프로브를 연결하기 위해 사용되는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체를 개시하였다.
- [0042] 범용 (Universal): 용어 범용이 증폭 절차를 설명하는데 사용되는 경우, 복수의 증폭 반응에 단일 프라이머 또는 프라이머 세트의 사용을 가능하게 하는 서열을 지칭한다. 이러한 프라이머의 사용은 복수의 선택된 핵산 서열을 증폭시키는데 2개의 프라이머 만이 필요하다는 점에서 다중화를 크게 단순화한다. 용어 범용이 프라이밍 부위를 설명하는데 사용되는 경우, 범용 프라이머가 혼성화될 부위이다. 또한 범용 프라이밍 서열/프라이머의 "세트"가 사용될 수 있다는 점에 유의해야 한다.
- [0043] 혼성화 (Hybridization): 용어 혼성화 (또는 hybridisation)는 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 분자가 상보적 DNA 또는 RNA에 어닐링되는 과정을 서술한다. DNA 또는 RNA 복제, 및 DNA의 RNA로의 전사는 모두 뉴클레오티드 혼성화에 의존한다.
- [0044] 결합 (Ligation): 용어 결합은 효소 작용을 통해 2개의 핵산 단편들을 연결하는 것이다. DNA 리가제는 상보적 가닥의 인접 부위에서 결합된 2개의 폴리뉴클레오티드 가닥들(의 말단들) 사이의 포스포디에스테르 결합의 형성을 촉매할 수 있는 효소이다. 일 구체예에서, 구체적으로 폴리뉴클레오티드의 인접한 양쪽 말단이 화학적 결합 되도록 변형되는 경우, 결합은 또한 화학적으로 수행될 수 있다.
- [0045] 증폭 (Amplification): 본원에서 사용된 용어 증폭은 뉴클레오티드 서열들의 혼합물내 특정 뉴클레오티드 서열의 농도를 증가시키기 위한 DNA 폴리머라제의 사용을 나타낸다. "PCR" 또는 "중합효소 연쇄 반응"은 특정 DNA/RNA 세그먼트의 인 비트로 효소 증폭을 위한 신속한 절차이다. 증폭시킬 DNA/RNA는 샘플을 가열하여 변성될 수 있다. 용어 프라이머는 DNA 합성의 출발점 역할을 하는 RNA 또는 DNA의 짧은 가닥 (일반적으로 약 18-22개의 염기)이다. 이러한 과정을 촉매하는 효소인 DNA 폴리머라제는 기존 DNA 가닥에 새로운 뉴클레오티드를 추가할 수 있기 때문에 DNA 복제를 필요로 한다.
- [0046] 폴리머라제 (Polymerase): 폴리머라제는 핵산의 긴 사슬 또는 폴리머를 합성하는 효소이다. DNA 폴리머라제 및 RNA 폴리머라제는 염기쌍 상호작용을 이용하여 DNA 또는 RNA 주형 가닥을 카피하여, DNA 및 RNA 분자 각각을 조립하는데 사용된다.
- [0047] 고처리량 (High throughput): 용어 고처리량은 다수의 DNA 샘플을 동시에 처리하고 스크리닝할 수 있고; 뿐만 아니라 단일 DNA 샘플내 다수의 상이한 유전자좌를 동시에 스크리닝할 수 있는 능력을 지칭한다. 고처리량 시퀀싱 또는 스크리닝은 종종 HTS로 약칭되고, 특히 다량의 샘플을 동시에 효과적으로 스크리닝하는 것과 관련된 과학적 실험 방법이다.
- [0048] 엔도뉴클레아제 (Endonuclease): 엔도뉴클레아제는 DNA 이중 또는 단일 가닥을 무작위 또는 명시된 위치에서 절단하는 효소이다.
- [0049] 상기 기재된 바와 같이, 본 개시내용은 결합-의존성 분석들을 레버리징 (leveraging)함으로써 매우 많은 수의 샘플에서 표적 뉴클레오티드 서열 검출의 고처리량 검출 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은 차세대 시퀀싱에

의해 허용되는 기술을 사용하여 복합 핵산 풀에서 유전자 표적의 서열을 결정하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 또한 결찰-의존성 분석들을 레버리징함으로써, 다수의 샘플, 바람직하게는 매우 많은 수의 샘플에서 다수의 유전자 표적을 프로파일링하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 복수의 샘플에서 상이한 표적 핵산을 쿼리할 수 있게 하는 다중 결찰-의존성 프로브 증폭을 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 상이한 표적 핵산들에 대한 복수의 상이한 프로브 세트를 제공하는, 복수의 샘플에서 하나 이상의 표적 뉴클레오티드 서열의 시퀀싱을 허용한다. 시퀀싱 데이터를 처리하는 경우 샘플 풀에서 개별 샘플의 절대 정량분석 및 유전자 표적의 식별을 위해 고유한 서열 식별인자가 사용된다.

- [0050] 제1 주요 양상에서, 본 발명은 복수의 샘플에서 하나 이상의 표적 뉴클레오티드 서열의 고처리량 검출 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함하고:
- [0051] (i) 각 샘플에서 각 표적 뉴클레오티드 서열에 대해,
- [0052] 제1 프로브, 제2 프로브 및 브릿지 올리고 또는 서로 어닐링하여 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오티드를 제공하는 단계로서,
- [0053] 상기 제1 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 선택적으로 제1 서열 바코드, 및 제1 프로브의 3' 말단에 제1 표적 특이적 부분을 포함하고;
- [0054] 상기 제2 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제2 표적 특이적 부분, 선택적으로 제2 서열 바코드, 및 제2 프로브의 3' 말단에 제2 브릿지 올리고-특이적 서열을 포함하며;
- [0055] 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는 상기 제1 프로브 및 상기 제2 프로브 각각에서의 제1 브릿지 올리고-특이적 서열 및 제2 브릿지 올리고-특이적 서열에 상보적인 서열, 및 선택적으로 제3 바코드를 함유하고;
- [0056] 상기 제1 서열 바코드 또는 제2 서열 바코드 또는 제3 바코드 중 적어도 하나는 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 각각에 존재하며;
- [0057] 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하고;
- [0058] 선택적으로, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 제1 포획 모이어티를 포함하는 것인 단계;
- [0059] (ii) 상기 하나 이상의 표적 뉴클레오티드 서열 각각에 대해, 상기 제1 프로브 및 제2 프로브를, 바람직하게는 개별 튜브 내의 샘플 각각에 대해, 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오티드와 접촉시키고, 자가-어닐링으로 복수의 결찰 복합체가 형성되도록 하는 단계;
- [0060] (iii) 상기 표적 뉴클레오티드 서열에 대해 테스트할 각 샘플 내에 존재하는 핵산을 상기 결찰 복합체와 접촉시키는 단계;
- [0061] (iv) 각각의 제1 프로브 및 제2 프로브의 제1 표적 특이적 부분 및 제2 표적 특이적 부분을 상기 표적 서열 상의 본질적으로 인접한 섹션에 혼성되도록 하여, 이에 의해 혼성화 복합체가 형성되도록 하는 단계;
- [0062] (v) 선택적으로, 상기 혼성화 복합체를 제2 포획 모이어티를 포함하는 고체 지지체와 접촉시키고, 상기 혼성화 복합체가 상기 고체 지지체에 연결되도록 제1 포획 모이어티 및 제2 포획 모이어티가 상호작용되도록 하고, 상기 고체-지지체-연결된 혼성화 복합체를 고체-지지체에 연결되지 않은 샘플의 성분들로부터 분리하는 단계;
- [0063] (vi) 상기 혼성화 복합체에서 프로브들을 결찰하여 결찰된 결찰 복합체를 제공하는 단계;
- [0064] (vii) 복수의 샘플들로부터 상기 결찰된 결찰 복합체를 풀링하는 단계;
- [0065] (viii) 가닥-치환 폴리머라제로 롤링 서클 증폭을 사용하여 하나 이상의 결찰된 결찰 복합체로부터 핵산을 증폭시키는 단계;
- [0066] (ix) 선택적으로, 단계 (viii)에서 획득된 증폭된 하나 이상의 단일-가닥 연쇄체 서열을 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 함유하는 특정 올리고뉴클레오티드와 어닐링하는 단계로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 단계 (i)에 명시된 인식 서열로 어닐링하여 상기 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위가 획득되는 것인 단계;
- [0067] (x) 선택적으로, 단계 (viii)에서 획득된 단일-가닥 연쇄체 서열 또는 단계 (ix)에서 획득된 어닐링된 복합체를

상기 엔도뉴클레아제로 절단하는 단계;

- [0068] (xi) 단계 (x)에서 획득된 핵산 단편 또는 단계 (viii)에서 획득된 연쇄체 서열을 고처리량 시퀀싱 기술에 적용하여 바코드 서열(들)을 결정하는 단계; 및
- [0069] (xii) 상기 제1 표적 특이적 부분 및/또는 제2 표적 특이적 부분의 적어도 일부, 및/또는 상기 제1 바코드 및/또는 제2 바코드의 적어도 일부, 및/또는 상기 제3 바코드의 적어도 일부의 결정에 의해, 복수의 샘플에서 표적 뉴클레오티드 서열의 존재 및/또는 수를 확인하는 단계;
- [0070] 여기서 상기 단계 (vi) 및 (vii)는 임의의 순서로 수행될 수 있다.
- [0071] 도 1은 본 발명의 방법의 일 구체예의 비-제한적인 구체예의 도해를 제공한다.
- [0072] 본 발명의 방법은 3개의 핵산 프로브를 활용하며, 그 중 2개의 표적-특이적 핵산 프로브 (좌측 프로브 및 우측 프로브)는 유전적 표적에 대해 특이적이고, 하나의 핵산 프로브는 전형적으로 범용이다 (브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체). 상기 좌측 및 우측 프로브는 브릿지 프로브 또는 브릿지 올리고 복합체에 혼성화되어, 결합 복합체를 형성한다. 샘플 DNA 또는 RNA 상의 표적 식별 부위를 갖는 결합 복합체 (하나 이상의 바코드 서열 함유)는 쿼리 샘플의 상보적 표적 서열에 대해 혼성화될 수 있다. 혼성화 후에, 상기 좌측 및 우측 프로브는 DNA 리가제에 의해 화학적 또는 효소적으로 결합되어 결합된 결합 복합체를 형성한다. 본 발명에서, 복수의 이러한 결합된 결합 복합체는 분석할 복수의 샘플에서 샘플 분석 중에 형성될 것이다.
- [0073] 일 구체예에서, "복수의 샘플 (plurality of samples)"은 생검, 타액 및 기타 분비물, 호기 수분 추출물, 조직, 혈장 (액체 생검)을 포함하는 인간 또는 동물 신체로부터 획득된 2개 이상의 샘플, 물, 폐수, 토양, 식물을 포함하는 환경으로부터 획득된 2개 이상의 샘플, 또는 바이러스 또는 박테리아 또는 유사물을 함유하는 2개 이상의 샘플을 지칭할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 일 구체예에서, 상기 샘플은 핵산의 사전 정제 또는 농축 없이 사용된다. 다른 구체예에서, 상기 샘플은 예를 들어 핵산을 노출시키기 위해 세포를 용해시키는, 사전-처리될 수 있다.
- [0074] 상기 표적 서열은 검출이 필요한 관심 있는 임의의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 표적 뉴클레오티드 서열은 환자 혈액내 DNA의 단편 또는 모체 혈액내 DNA의 단편으로부터 획득될 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 환자 혈액내 DNA의 단편은 아포토시스/괴사성 암 세포로부터 획득될 수 있거나, 또는 모체 혈액내 DNA의 단편은 태아 및/또는 모체 기원으로부터 획득될 수 있다. 또한, 분석 결과는 예를 들어 해당 유형의 암에 대한 개인의 위험을 평가하고, 해당 암에 대한 주어진 치료의 효능, 종양에서 약물-저항성-관련 돌연변이의 발생, 또는 통상의 삼염색체증 (trisomies)인 다운 (Down), 파타우 (Patau) 및 에드워드 (Edwards) 증후군과 같은 유전자 장애를 가진 태아의 위험을 결정하는데 사용된다. 소정의 구체예에서, 상기 방법은 각 표적 뉴클레오티드 서열에 대해 복수의 상이한 프로브 세트를 제공하는 단계를 포함한다.
- [0075] 본원에서 사용된, 용어 프로브 세트 (probe sets)는 제1 프로브, 제2 프로브 및 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체를 포함한다.
- [0076] 소정의 구체예에서, 상기 제1 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 선택적으로 5' 포스페이트, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 선택적으로 제1 범용 서열, 선택적으로 제1 서열 바코드, 및 이의 3' 말단에 제1 표적 특이적 부분을 포함한다. 소정의 구체예에서, 상기 제2 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 선택적으로 5' 포스페이트, 제2 표적 특이적 부분, 선택적으로 제2 서열 바코드, 선택적으로 제2 범용 서열, 및 이의 3' 말단에 제2 브릿지 올리고-특이적 서열을 포함한다.
- [0077] 바람직한 일 구체예에서, 상기 제1 프로브 또는 상기 제2 프로브는 제1 서열 바코드 또는 제2 서열 바코드 중 적어도 하나를 함유한다. 상기 제1 서열 바코드 또는 상기 제2 서열 바코드, 또는 이들 모두는 무작위 서열일 수 있거나, 또는 표적 계수를 위한 표적 뉴클레오티드 서열 식별인자 서열, 샘플 식별인자 서열 및/또는 분자 바코드를 함유할 수 있다.
- [0078] 바람직한 구체예에서, 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는 제1 및 제2 프로브 각각에서의 제1 및 제2 브릿지 올리고-특이적 서열에 상보적인 서열, 선택적으로 범용 서열을 함유하고, 및/또는 무작위 서열일 수 있거나 또는 샘플 또는 서열 식별인자 서열을 함유할 수 있는 제3 바코드를 함유할 수 있다. 이와 관련하여, 제3 바코드는 제1 및 제2 바코드가 이미 존재한다는 것을 반드시 의미하지는 않는다. 앞서 설명한 바와 같이, 테스트된 모든 샘플에서 모든 결합 복합체내에 복합체를 고유하게 정의할 수 있는, 적어도 하나의 바코드가 상기 결합된 결합 복합체내에 존재해야 한다.

- [0079] 또한, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함한다. 상기 인식 서열은 단계 (x)에서 연쇄체 서열의 절단을 위해 필요하다. 일 구체예에서, 상기 인식 서열은 제한 엔도뉴클레아제 예컨대 EcoRI에 대한 인식 서열이다. 다른 구체예에서, 상기 인식 서열은 귀소 엔도뉴클레아제 (homing endonuclease) 예컨대 I-CeuI에 대한 인식 서열이다. 다른 구체예에서, 상기 인식 서열은 가이드 DNAaseI 또는 CRISPR-Cas-유사 절단 시스템에 대한 인식 서열이다.
- [0080] 선택적으로, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 제1 포획 모이어티를 포함한다. 제1 포획 모이어티가 본원에서 사용되는 경우, 상기 프로브, 결찰 복합체 또는 혼성화 복합체가 고체 지지체에 연결된 제2 포획 모이어티에 의해 포획, 즉 이에 결합되도록 하는 모이어티 예컨대 화학기를 지칭한다. 당해 분야에 알려져 있는 임의의 적절한 포획 모이어티가 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다. 잘 알려진 적절한 예는 스트렙타비딘-코팅된 자기 비드를 사용하여 바이오틴화된 분자를 포획하는 것이다. 따라서, 일 구체예에서, 상기 제1 포획 모이어티는 바이오틴 모이어티이며, 이는 자기 비드와 같은 고체 지지체에 연결된 스트렙타비딘 또는 아비딘 모이어티 (제2 포획 모이어티)와 상호작용할 수 있다. 다른 옵션으로는 스트렙타비딘/아비딘과의 접합에 사용될 수 있는, 바이오틴 유도체 예컨대 이중-바이오틴 (dual-biotin), 데스티오바이오틴 (desthiobiotin) 또는 광절단성 바이오틴 (photocleavable biotin)을 포함한다. 추가 옵션으로는 아크리다이트/아크릴아미드 접합을 위한 티올 및 아크리다이트 기, 클릭 화학을 위한 알킨 및 아지드 기 및 항-디곡시게닌 항체 접합을 위한 디곡시게닌의 사용을 포함한다. 접합 파트너는 임의의 고체 표면 예컨대 비드 (자기 또는 기타) 또는 고체 지지체에 제공될 수 있다.
- [0081] 상기 제1 표적 특이적 부분, 제2 표적 특이적 부분, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 및/또는 제2 브릿지 올리고-특이적 서열은 바람직하게는 프로브 결합을 증가시키기 위해 서로 독립적으로 적어도 하나의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 함유한다. 프로브 결합을 증가시키는 화학적 변형은 리보핵산, 펩티드 핵산 및 잠금 핵산 (locked nucleic acids)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다 (예: WO2019038372의 도 3에 예시된 바와 같으며, 본원에 참조로 통합됨). 일 구체예에서, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브, 또는 이들 모두의 가교 부분 (bridging portion)은 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체에 대한 결합을 개선하도록 하는 화학적으로 변형된 염기(들)를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 제1 표적 특이적 부분, 제2 표적 특이적 부분, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 및/또는 제2 브릿지 올리고-특이적 서열은 서로 독립적으로 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 함유한다. 소정의 구체예에서, 화학적 변형은 인접한 프로브의 화학적 결찰을 허용한다. 일부 구체예에서, 전술한 프로브는 완전히 인접한 유전자좌에 또는 최대 500개의 염기쌍으로 이격된, 예를 들어 최대 200개의 염기쌍으로 이격, 예컨대 최대 50개의 염기쌍으로 이격, 바람직하게는 최대 40개의 염기쌍으로 이격, 더 바람직하게는 최대 30개의 염기쌍으로 이격, 더 바람직하게는 최대 20개의 염기쌍으로 이격, 더 바람직하게는 최대 10개의 염기쌍으로 이격, 가장 바람직하게는 최대 5개의 염기쌍으로 이격되어 결합한다.
- [0082] 일부 구체예에서, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는 DNA 시퀀싱 플랫폼 예컨대 (이에 한정되지 않는) Illumina를 위한 어댑터 서열을 포함할 수 있다. 이러한 어댑터 서열들은 생성된 시퀀싱 라이브러리가 Illumina 유세포와 같은 시퀀싱 장치의 검출 부재에 결합되도록 한다.
- [0083] 또한, 일부 구체예에서, 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는 하기를 포함한다:
- [0084] (i) 1 내지 5개의 3' 돌출 염기 (protruding bases) (즉, 제2 프로브와 이중 나선을 형성하지 않는 추가 염기), 및/또는
- [0085] (ii) 3' 포스페이트, 및/또는
- [0086] (iii) 3' 말단으로부터 3개의 위치 내에 하나 이상의 포스포로티오에이트 변형.
- [0087] 프로브를 표적 서열을 포함하는 샘플과 접촉시키기 전에, 상기 제1 프로브 및 제2 프로브를, 바람직하게는 개별 튜브 내의 샘플 각각에 대해, 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오티드와 접촉시키고, 결찰 복합체로의 자가-어닐링이 허용된다 (단계 (ii)). 브릿지가 1개의 올리고가 아니라 서로 어닐링하여 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오티드 예컨대 3개 또는 5개의 올리고뉴클레오티드인 일 구체예에서 (본원의 도 2c에 도시됨), 상기 복수의 올리고뉴클레오티드는 제1 및 제2 프로브로 어닐링하기 전에 사전-어닐링될 수 있거나, 또는 모든 어닐링 단계는 한 번에 수행될 수 있다.
- [0088] 바람직하게는 각 결찰 복합체는 제1 표적 특이적 서열, 제2 표적 특이적 서열 및 하나 이상의 바코드 서열의 조합에 대해 고유하다. 이는 증폭 및 결과의 분석 후에 표적 서열의 계수를 가능하게 한다.

- [0089] 그 후, 복수의 샘플에서 하나 이상의 표적 뉴클레오티드 서열을 복수의 결합 복합체와 접촉시킨다 (단계 (iii)). 각각의 제1 프로브 및 제2 프로브의 제1 표적 특이적 부분 및 제2 표적 특이적 부분은 표적 서열 상의 본질적으로 인접한 섹션에 혼성화되어, 이에 의해 혼성화 복합체를 형성한다 (단계 (iv)). 일부 구체예에서, 상기 샘플은 100 마이크로리터 (microliters) 초과, 예컨대 1 ml 초과, 부피를 갖는다. 추가의 일 구체예에서, 상기 샘플은 5 pmol 이하, 예컨대 1 pmol 이하, 예를 들어 200 fmol 이하의 핵산 농도를 갖는다. 일 구체예에서, 복수의 샘플은 하나 이상의 혈액 샘플, 하나 이상의 타액 샘플, 하나 이상의 소변 샘플, 또는 하나 이상의 대변 샘플을 포함한다.
- [0090] 후속하여, 일부 구체예에서, 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나가 제1 포획 모이어티를 포함하는 경우, 상기 혼성화 복합체(들)는 제2 포획 모이어티를 포함하는 고체 지지체와 접촉시키고, 상기 제1 포획 모이어티 및 제2 포획 모이어티는 혼성화 복합체(들)가 상기 고체 지지체(들)에 연결되도록 상호작용되도록 한다 (선택적 단계 (v)). 그 후에, 상기 고체-지지체-연결된 혼성화 복합체는 고체-지지체에 연결되지 않은 샘플의 성분들로부터 분리된다. 상기 고체 지지체가 자기 비드인 경우, 상기 비드는 자석을 사용하여 비드를 고정화될 수 있고, 나머지 액체 샘플을 제거할 수 있다. 선택적으로, 세척 단계는 진행하기 전에 수행된다.
- [0091] 단계 (v)는 핵산에 대한 정제 및 농축을 유도하여, 특히 고도로 불순한 샘플에 대해 결과를 향상시킨다. 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 단계 (v) 이전에 핵산을 농축하는 단계를 포함하지 않는다. 따라서, 일 구체예에서, 상기 방법은 단계 (vi) 이전에 원래 샘플내 핵산이 2배 초과, 10배 초과 또는 100배 초과로 농축되는 단계를 포함하지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 단계 (vi)에서 결합에 후속하는 정제 단계를 포함하지 않는다.
- [0092] 후속하여, 형성된 혼성화 복합체에서 프로브들의 결합은 결합된 결합 복합체를 제공하기 위해 효소적으로 또는 화학적으로 수행된다 (단계 (vi)). 선택적으로, 단계 (vi)의 일부로서, 제1 프로브 및 제2 프로브 사이에 갭이 존재하는 경우, 폴리머라제 및 하나 이상의 뉴클레오티드를 도입함으로써 필링 (filling)될 수 있다. 상기 폴리머라제는 (a) 범용 브릿지 올리고 서열에 상보적이고 및/또는 (b) 바코드 서열에 상보적인 뉴클레오티드를 부가하고, 이에 의해 상기 제1 프로브 및 제2 프로브 사이의 2개의 갭을 필링하여 좌측 및 우측 프로브를 결합시키고, 범용 서열 및/또는 제3 바코드 서열을 브릿지 상보 가닥으로 포함시킨다. 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브에 존재하는 표적 서열 식별인자 서열이 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체로 통합되도록 상기 결합된 프로브에 상보적인 5' 부위 또는 3' 부위로부터 연장된다. 바람직하게는, 이중가닥 DNA를 분해하지 않는 폴리머라제, 가령 예를 들어 Taq 폴리머라제가 사용되어, 제1 프로브 및 제2 프로브가 표적 서열에 어닐링되는 경우에 상기 제1 프로브가 제2 프로브로 결합되는 것을 방해하지 않는다.
- [0093] 그 다음에 상기 결합된 결합 복합체는 하나 이상의 표적 샘플들로부터 풀링된다 (단계 (vii)). 단계 (vi) 및 (vii)는 명시된 순서로 또는 대안으로서 역순서로 수행될 수 있다.
- [0094] 다음, 핵산은 하나 이상의 결합된 결합 복합체로부터 증폭된다 (단계 (viii)). 증폭은 가닥-치환 폴리머라제 예컨대 phi29 폴리머라제 (UniProtKB - P03680; DPOL_BPPH2) 또는 Bst 폴리머라제 (P52026; DP01_GEOSE)로 롤링 서클 증폭을 사용하여 수행된다. 다음 단계 (ix)에서, 단계 (viii)에서 획득된 증폭된 하나 이상의 단일-가닥 연쇄체 서열은 선택적으로 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 함유하는 특정 올리고뉴클레오티드로 어닐링되며, 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 단계 (i)에 명시된 인식 서열로 어닐링하여 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위가 획득된다. 상기 인식 서열을 함유하는 특정 올리고뉴클레오티드는 절단에 안정한 이중-나선을 형성하도록 하기 위해 전형적으로 상기 인식 서열 주위에 일부 추가의 특정 서열을 함유할 것이다.
- [0095] 후속하여, 단계 (viii)에서 획득된 단일-가닥 연쇄체 서열 또는 단계 (ix)에서 획득된 어닐링된 복합체는 선택적으로 상기 엔도뉴클레아제로 절단되어 (단계 (x)), NGS 라이브러리가 생성된다.
- [0096] 선택적으로, 증폭 후에, 상기 고체 지지체가 존재하는 경우 이를 제거하고, 상등액을 후속 처리에 사용한다. 예를 들어, 상기 고체 지지체가 자기 입자인 경우, 자석을 사용하여 제거할 수 있다. 본 발명의 방법의 일부 다른 구체예에서, 상기 제1 포획 모이어티 및 제2 포획 모이어티 사이의 상호작용은 단계 (vi) 직후, 단계 (vii) 이후, 또는 단계 (viii) 이후에 중단된다. 예를 들어, 상기 제1 포획 모이어티가 바이오틴이고, 제2 포획 모이어티가 스트렙타비딘인 경우, 과량의 가용성 바이오틴을 부가하여 상호작용을 중단시킬 수 있다. 상기 스트렙타비딘이 자기 입자에 결합된 경우, 이는 이후에 자석을 사용하여 제거할 수 있다.

- [0097] 또한, 선택적으로, PCR 증폭은 제1 및 제2 프로브의 범용 부분에 결합하는 프라이머를 사용하여 단계 (x) 및 단계 (xi) 사이에서 수행되며, 상기 프라이머는 선택적으로 단계 (xi)에서의 후속하는 시퀀싱을 위한 어댑터 서열을 포함한다.
- [0098] 복수의 샘플에서 표적 뉴클레오티드 서열의 존재 및/또는 수의 확인은 제1 및/또는 제2 표적 특이적 부분의 적어도 일부, 제1 및/또는 제2 바코드의 적어도 일부, 및/또는 제3 바코드의 적어도 일부를 고처리량 시퀀싱 기술 (단계 (xi) 및 (xii))에 의해, 예를 들어 Illumina iSeq, MiSeq, HiSeq, NextSeq 또는 NovaSeq를 포함하지만 이에 한정되지 않는 차세대 시퀀싱 플랫폼을 사용하여 결정함으로써 수행될 수 있다. 바람직하게는, 상기 유전자 표적 계수는 표적당 (per target) 및 샘플당 (per sample) 분자 바코드의 수를 계수함으로써 허용된다. 상기 샘플은 서열 데이터로부터 분리 (de-convoluted)되고, 상기 서열 표적은 DNA 시퀀싱 후에 in silico 정량분석되었다.
- [0099] 바람직한 일 구체예에서, 상기 분자는 제1 프라이머 및 제2 프라이머로 추가로 증폭되어 증폭 산물을 제공한다. 바람직하게는 범용 제1 프라이머 및 범용 제2 프라이머가 사용되며, 결합된 복합체에 존재하는 제1 또는 제2 범용 서열에 역상보적이다.
- [0100] 본 발명의 이점은 전통적인 핵산 시퀀싱 기술과 비교하여, 저비용, 고단순성, 고특이성, 고민감도, 고정확도, 고처리량, 고확장성 및 고전환율을 갖는 정량 분석을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 방법이 인간 및 동물 집단을 포함하고 대량의 비-정제된 샘플 물질을 포함하는 다수의 샘플에서 복수의 핵산 표적의 정확한 대규모 병렬 정량분석을 가능하게 한다는 점이다. 언급된 바와 같이, 바람직한 일 구체예에서, 소변 샘플과 같은 샘플은 핵산의 사전 정제 또는 농축 없이 사용된다. 다른 구체예에서, 상기 샘플은 예를 들어 핵산을 노출시키기 위해 세포를 용해시키는 사전-처리될 수 있다. 본 발명의 1가지 특정한 이점은 독특한 프로브 디자인, 즉 프로브 삼중항을 사용하여 관심 표적 서열의 검출 및 증폭을 가능하게 하는 것이다. 상기 프로브는 어닐링 및 결합 효율을 향상시키는 변형된 뉴클레오티드가 특별히 위치하도록 디자인되었다. 결합 특성의 개선은 더 높은 분석 특이성, 민감도 및 정확도로 이어진다. 본 발명의 방법은 마찬가지로 유전자 변이체를 연구하는데 적용 가능하며, 진단 및 예후에서의 적용을 발견하였고, 이는 하나 이상의 서열 및/또는 다형 예컨대 SNPs 및/또는 indels, 암 진단 또는 모체 혈액으로부터 태아 염색체 장애에 대해 샘플(들)의 유전자형 분석을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 바람직한 일 구체예에서, 2개 이상의 샘플의 경우 또는 2개 이상의 유전자좌/대립유전자 조합의 경우, 하나 이상의 서열 및/또는 다형 예컨대 SNPs 및/또는 indels에 대해 샘플의 유전자형을 분석하기 위해 바코드 서열이 사용된다.
- [0101] 다른 양상에서, 본 발명은 복수의 용기를 포함하는 부재들의 키트 (kit of parts)를 제공하며, 상기 적어도 하나의 용기는 제1 프로브 및 제2 프로브의 하나 이상의 세트를 포함하고, 적어도 하나의 용기는 하나 이상의 브릿지 올리고 또는 서로 어닐링하여 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오티드를 포함하며,
- [0102] 상기 제1 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 선택적으로 제1 서열 바코드, 및 제1 프로브의 3' 말단에 제1 표적 특이적 부분을 포함하고;
- [0103] 상기 제2 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제2 표적 특이적 부분, 선택적으로 제2 서열 바코드, 및 제2 프로브의 3' 말단에 제2 브릿지 올리고-특이적 서열을 포함하며;
- [0104] 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는 상기 제1 프로브 및 상기 제2 프로브 각각에서의 제1 및 제2 브릿지 올리고-특이적 서열에 상보적인 서열, 및 선택적으로 제3 바코드를 포함하고;
- [0105] 상기 제1 서열 바코드 또는 제2 서열 바코드 또는 제3 바코드 중 적어도 하나는 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 각각에 존재하며;
- [0106] 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체 중 적어도 하나는 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하고;
- [0107] 상기 부재들의 키트는 상기 인식 서열로 어닐링하여 상기 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위가 수득될 수 있는 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다.
- [0108] 바람직하게는, 제1 프로브의 3' 말단 또는 제2 프로브의 5' 말단, 또는 이들 모두는 제1 프로브의 제2 프로브에 대한 화학적 결합을 허용하도록 변형된다.
- [0109] 바람직하게는, 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는 제1 프로브의 서열에 상보적인 서열 또는 제2

프로브의 서열에 상보적인 서열, 또는 이들 모두에 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

- [0110] 바람직하게는, 제1 프로브의 3' 말단 또는 제2 프로브의 5' 말단, 또는 이들 모두는 제1 프로브의 제2 프로브에 대한 화학적 결합을 허용하도록 변형된다.
- [0111] 바람직하게는, 제1 프로브 또는 제2 프로브, 또는 이들 모두의 가코 부분은 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체에 대한 결합을 향상시키도록 화학적으로 변형된 염기(들)를 포함한다.
- [0112] 특정한 일 구체예에서, 제1 및 제2 프로브의 세트를 포함하는 적어도 하나의 용기, 및 브릿지 올리고 또는 서로 어닐링하여 브릿지 올리고 복합체를 형성할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 적어도 하나의 용기는 하나의 동일한 용기이다. 이러한 경우에, 3개의 프로브가 사전-어닐링되어 결합된 복합체를 형성할 수 있다.
- [0113] 본 발명의 한가지 특정한 이점은 독특한 프로브 디자인, 즉 프로브 삼중항을 사용하여 관심 표적 서열의 검출 및 증폭을 가능하게 하는 것이다. 결합 특성이 향상된 프로브를 디자인하여 더 높은 분석 특이성, 민감도 및 정확도를 유도한다. 본 발명은 분자 생물학, 진화 생물학, 메타유전체학, 유전자형 분석 분야에의 적용, 보다 구체적으로 하나 이상의 서열 및/또는 다형 예컨대 SNPs 및/또는 indels에 대해 샘플(들)의 유전자형을 분석하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 암 진단 또는 태아 염색체 장애에 한정되지 않는 적용을 발견하였다.
- [0114] 특정한 바람직한 일 구체예에서, 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체는 샘플을 식별하기 위한 정보를 포함하고, 고유 바코드를 포함한다. 이러한 경우에, 상기 제1 및 제2 프로브는 모든 샘플에 범용으로 적용 가능하다 (표적을 식별하기 위한 정보만을 포함한다). 그러므로, 바람직한 일 구체예에서, 상기 브릿지 올리고 또는 브릿지 올리고 복합체가 각 샘플의 표적 서열의 계수를 가능하게 하는 고유한 서열을 포함하는 바코드를 포함하는, 본 발명에 따른 방법 또는 키트가 제공된다.
- [0115] 또한, 본 발명은 하기에 관한 것이다:
- [0116] 구체예 1: 복수의 샘플에서 하나 이상의 표적 뉴클레오티드 서열의 고처리량 검출 방법으로서, 상기 방법은:
- [0117] (i) 각 샘플에서 각 표적 뉴클레오티드 서열에 대해,
- [0118] 제1 프로브, 제2 프로브 및 브릿지 올리고를 제공하는 단계로서,
- [0119] 상기 제1 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 선택적으로 제1 서열 바코드, 및 제1 프로브의 3' 말단에 제1 표적 특이적 부분을 포함하고;
- [0120] 상기 제2 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제2 표적 특이적 부분, 선택적으로 제2 서열 바코드, 및 제2 프로브의 3' 말단에 제2 브릿지 올리고-특이적 서열을 포함하며;
- [0121] 상기 브릿지 올리고는 상기 제1 프로브 및 상기 제2 프로브 각각에서의 제1 브릿지 올리고-특이적 서열 및 제2 브릿지 올리고-특이적 서열에 상보적인 서열, 및 선택적으로 제3 바코드를 함유하고;
- [0122] 상기 제1 서열 바코드 또는 제2 서열 바코드 또는 제3 바코드 중 적어도 하나는 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 각각에 존재하고;
- [0123] 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 중 적어도 하나는 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하고;
- [0124] 선택적으로, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 중 적어도 하나는 제1 포획 모이어티를 포함하는 것인 단계;
- [0125] (ii) 상기 하나 이상의 표적 뉴클레오티드 서열 각각에 대해, 상기 제1 프로브 및 제2 프로브를, 바람직하게는 개별 튜브 내의 샘플 각각에 대해, 상기 브릿지 올리고와 접촉시키고, 자가-어닐링으로 복수의 결합 복합체가 형성되도록 하는 단계;
- [0126] (iii) 상기 표적 뉴클레오티드 서열에 대해 테스트할 각 샘플 내에 존재하는 핵산을 상기 결합 복합체와 접촉시키는 단계;
- [0127] (iv) 각각의 제1 프로브 및 제2 프로브의 제1 표적 특이적 부분 및 제2 표적 특이적 부분을 상기 표적 서열 상의 본질적으로 인접한 섹션에 혼성화되도록 하여, 이에 의해 혼성화 복합체가 형성되도록 하는 단계;
- [0128] (v) 선택적으로, 상기 혼성화 복합체를 제2 포획 모이어티를 포함하는 고체 지지체와 접촉시키고, 상기 혼성화 복합체가 상기 고체 지지체에 연결되도록 제1 포획 모이어티 및 제2 포획 모이어티가 상호작용되도록 하고, 상

기 고체-지지체-연결된 혼성화 복합체를 고체-지지체에 연결되지 않은 샘플의 성분들로부터 분리하는 단계;

- [0129] (vi) 상기 혼성화 복합체에서 프로브들을 걸찰하여 걸찰된 걸찰 복합체를 제공하는 단계;
- [0130] (vii) 복수의 샘플들로부터 상기 걸찰된 걸찰 복합체를 풀링하는 단계;
- [0131] (viii) 가닥-치환 폴리머라제로 롤링 서클 증폭을 사용하여 하나 이상의 걸찰된 걸찰 복합체로부터 핵산을 증폭시키는 단계;
- [0132] (ix) 선택적으로, 단계 (viii)에서 수득된 증폭된 하나 이상의 단일-가닥 연쇄체 서열을 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 함유하는 특정 올리고뉴클레오티드와 어닐링하는 단계로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 단계 (i)에 명시된 인식 서열로 어닐링하여 상기 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위가 수득되는 것인 단계;
- [0133] (x) 단계 (viii)에서 수득된 단일-가닥 연쇄체 서열 또는 단계 (ix)에서 수득된 어닐링된 복합체를 상기 엔도뉴클레아제로 절단하는 단계;
- [0134] (xi) 단계 (x)에서 수득된 핵산 단편을 고처리량 시퀀싱 기술에 적용하여 바코드 서열(들)을 결정하는 단계; 및
- [0135] (xii) 상기 제1 표적 특이적 부분 및/또는 제2 표적 특이적 부분의 적어도 일부, 및/또는 상기 제1 바코드 및/또는 제2 바코드의 적어도 일부, 및/또는 상기 제3 바코드의 적어도 일부의 결정에 의해, 복수의 샘플에서 표적 뉴클레오티드 서열의 존재 및/또는 수를 확인하는 단계를 포함하고;
- [0136] 상기 단계 (vi) 및 (vii)는 임의의 순서로 수행될 수 있는 것인 방법.
- [0137] 구체예 2: 구체예 1에 있어서, 상기 복수의 샘플은 혈액 샘플, 타액 샘플, 소변 샘플 또는 대변 샘플을 포함하는 것인 방법.
- [0138] 구체예 3: 구체예 1 또는 2에 있어서, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 중 적어도 하나는 제1 포획 모이어티를 포함하고, 상기 방법은 단계 (v)를 포함하며, 상기 방법은 단계 (v) 이전에 핵산을 농축하는 단계를 포함하지 않는 것인 방법.
- [0139] 구체예 4: 구체예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 중 적어도 하나는 제1 포획 모이어티를 포함하고, 상기 방법은 단계 (v)를 포함하며, 상기 제1 포획 모이어티는 바이오틴 모이어티이고, 상기 제2 포획 모이어티는 스트렙타비딘 모이어티 또는 아비딘 모이어티인 것인 방법.
- [0140] 구체예 5: 구체예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 중 적어도 하나는 제1 포획 모이어티를 포함하고, 상기 방법은 단계 (v)를 포함하며, 세척 단계는 단계 (v) 및 단계 (vi) 사이에서 수행되는 것인 방법.
- [0141] 구체예 6: 구체예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 브릿지 올리고는:
 - [0142] (i) 1 내지 5개의 3' 돌출 염기, 및/또는
 - [0143] (ii) 3' 포스페이트, 및/또는
 - [0144] (iii) 3' 말단으로부터 3개의 위치 내에 하나 이상의 포스포로티오에이트 변형을 포함하는 것인 방법.
- [0145] 구체예 7: 구체예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 프로브의 3' 말단 또는 상기 제2 프로브의 5' 말단, 또는 이들 모두는 상기 제1 프로브가 상기 제2 프로브에 화학적 걸찰되도록 변형되는 것인 방법.
- [0146] 구체예 8: 구체예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 프로브 또는 상기 제2 프로브, 또는 이들 모두의 가교 부분은 상기 브릿지 올리고에 대한 결합이 개선되도록 하는 화학적으로 변형된 염기를 포함하는 것인 방법.
- [0147] 구체예 9: 구체예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 표적 특이적 부분, 제2 표적 특이적 부분, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 및/또는 제2 브릿지 올리고-특이적 서열은 서로 독립적으로, 하나 이상의 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 함유하는 것인 방법.
- [0148] 구체예 10: 구체예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 단계 (viii)는 phi29 폴리머라제 또는 Bst 폴리머라제를 사용하여 수행되는 것인 방법.
- [0149] 구체예 11: 구체예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, PCR 증폭은 제1 및 제2 프로브의 범용 부분에 결합하는 프라이머를 사용하여 단계 (x) 및 단계 (xi) 사이에 수행되고, 상기 프라이머는 단계 (xi)에서의 후속하는 시퀀싱

을 위한 어댑터를 선택적으로 포함하는 것인 방법.

- [0150] 구체예 12: 구체예 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 유전자 표적 계수는 표적당 (per target) 및 샘플당 (per sample) 분자 바코드의 수를 계수함으로써 허용되는 것인 방법.
- [0151] 구체예 13: 구체예 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 2개 이상의 샘플의 경우 또는 2개 이상의 유전자좌/대립 유전자 조합의 경우, 하나 이상의 서열 및/또는 다형, 예컨대 SNPs 및/또는 indels에 대해 샘플(들)의 유전자형을 분석하기 위해 바코드 서열이 사용되는 것인 방법.
- [0152] 구체예 14: 복수의 용기를 포함하는 부재들의 키트로서, 상기 적어도 하나의 용기는 제1 프로브 및 제2 프로브의 하나 이상의 세트를 포함하고, 적어도 하나의 용기는 하나 이상의 브릿지 올리고를 포함하며,
- [0153] 상기 제1 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 선택적으로 제1 서열 바코드, 및 제1 프로브의 3' 말단에 제1 표적 특이적 부분을 포함하고;
- [0154] 상기 제2 프로브는 그 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제2 표적 특이적 부분, 선택적으로 제2 서열 바코드, 및 제2 프로브의 3' 말단에 제2 브릿지 올리고-특이적 서열을 포함하며;
- [0155] 상기 브릿지 올리고는 상기 제1 프로브 및 상기 제2 프로브 각각에서의 제1 및 제2 브릿지 올리고-특이적 서열에 상보적인 서열, 및 선택적으로 제3 바코드를 포함하고;
- [0156] 상기 제1 서열 바코드 또는 제2 서열 바코드 또는 제3 바코드 중 적어도 하나는 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 각각에 존재하며;
- [0157] 상기 제1 프로브 또는 제2 프로브 또는 브릿지 올리고 중 적어도 하나는 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하고;
- [0158] 상기 부재들의 키트는 상기 인식 서열로 어닐링하여 상기 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위가 수득될 수 있는 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함하는 것인 키트.

[0160] **실시예**

[0161] **방법**

[0162] 1. 프로브 복합체의 형성

[0163] 프로브 복합체는 게놈 표적화, 샘플 인덱싱 및 Illumina 시퀀싱 라이브러리 구축에 필요한 서열을 함유한다.

[0164] 하기를 포함하는, 3부분의 프로브 복합체가 형성되도록 하였고 (도 2에 도시된 바와 같음):

[0165] (a) 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제1 브릿지 올리고-특이적 서열, 및 제1 프로브의 3' 말단에 제1 표적 특이적 부분을 갖는 제1 프로브;

[0166] (b) 분자의 5' 말단으로부터 시작하여, 제2 표적 특이적 부분, 제2 서열 바코드, 및 제2 프로브의 3' 말단에 제2 브릿지 올리고-특이적 서열을 갖는 제2 프로브; 및

[0167] (c) 상기 제1 프로브 및 상기 제2 프로브 각각에서의 제1 브릿지 올리고-특이적 서열 및 제2 브릿지 올리고-특이적 서열에 상보적인 서열을 갖는 브릿지 올리고,

[0168] 프로브 복합체는 어닐링 반응에서 3가지 부분 (브릿지, 우측 암 및 좌측 암)을 모두 등몰량으로 조합하여 제작된다. 상기 반응은 열순환기 (thermo cycler)에서 수행된다 (하기 표 1의 어닐링 프로그램).

표 1

[0169]

단계	온도	시간
1	+95°C	5분
2	+95°C	1분
-1°C/1분, 2로 이동 40x		
3	+55°C	10분
4	+55°C	1분
-1°C/1분, 4로 이동 35x		

5	+4℃	유지
---	-----	----

[0170] 2. 표적 포획

[0171] 관심 돌연변이(들)를 포함하는 특정 게놈 영역을 표적으로 하였다. 정제된 DNA (예: 조직, 혈장, 소변 또는 타액 유래)는 샘플 또는 샘플들로서 사용될 수 있고, 이들은 비-정제될 수 있지만, 예를 들어 끓임 및/또는 원심분리에 의해 사전-처리될 수 있다.

[0172] 상기 프로브 복합체는 염기 서열 상보적 상호작용을 통해 표적 영역에 혼성화된다. 표적 포획을 개시하기 위해, 반응 프로브 및 표적 DNA를 혼합하고, 열 순환기 (thermal cycler)에서 인큐베이션하였다 (표 2의 표적 포획 및 GapFill 프로그램).

표 2

단계	온도	시간	공정
1	+75℃	9분	변성
2	+75℃	1분	
-1℃/ 1분, 2로 이동 20x			표적 포획
3	+55℃	60분	GapFill
4	+50℃	10분	
5	+45℃	45분	
6	+4℃	유지	

[0174] 3. 갭필 (GapFill) 반응

[0175] 표적 포획 이후에, 프로브 복합체를 연장되고, Phusion DNA 폴리머라제, 뉴클레오티드 및 Ampligase DNA 리가제의 조합을 부가하고, +45℃에서 45분 동안 인큐베이션하여 결합하였다.

[0176] 4. 롤링 서클 증폭

[0177] 연장 및 결합 이후에, 원형 프로브 분자를 RCA (Rolling Circle Amplification) 처리하였다. RCA 반응의 경우, 표적 포획 반응을 EquipPhi29 (Thermo Scientific) 폴리머라제를 함유하는 RCA 반응 믹스와 혼합하였다. 반응을 +42℃에서 30분 - 2시간 동안 인큐베이션하였다. RCA 반응 이후에, 반응 효율은 Qubit 형광계로 단일가닥 DNA (ssDNA)의 농도를 측정하여 분석하였다.

[0178] 5. 효소 소화

[0179] RCA 반응은 표적 라이브러리의 다수의 카피를 갖는 긴 연쇄체 ssDNA 분자를 생성하였다. 각 완전한 표적 라이브러리를 EcoRI 제한 효소 인식 서열에 의해 분리하였다. 이러한 서열은 EcoRI 제한 효소 인식 서열을 함유하는 특정 올리고뉴클레오티드를 사용한 어닐링을 통해 긴 연쇄체의 서열-특이적 절단하고, 준비된 표적 라이브러리를 방출하였다. 이들 라이브러리는 간단한 정제 단계 후에 추가 분석을 위해 준비되었다. RCA 생성물을 EcoRI로 +37℃에서 1시간 동안 소화시켰다.

[0180] 6. 라이브러리 정제

[0181] EcoRI 소화 이후에, 라이브러리 분자는 전기영동 후 아가로스 겔로부터 또는 크기 선택 비드 (예: Macherey Nagel NucleoMag)로 추출하여 정제되었다.

[0182] 7. 시퀀싱

[0183] 정제된 MiSeq- 또는 iSeq100-적합성 라이브러리를 최첨단 시퀀싱 기기를 사용하여 서열 분석하였다. 중요하게는, 상기 라이브러리는 간단한 올리고뉴클레오티드 변형에 의해 임의의 이용 가능한 시퀀싱 플랫폼에 맞게 변환될 수 있다. 시퀀싱 데이터는 Unix command line tools 및 Python 및 R 프로그래밍 언어의 조합을 사용하여 처리되었다. 간략하게, 서열 처리의 근거는 각 리드 (read) 내에서 프로브 서열을 식별하고, 이들 사이의 게놈 영역을 시퀀싱하고, 각 유전자 표적과 회합된 분자 바코드의 수를 계수하는 것이었다.

[0185] **실험 1.**

- [0186] 제1 실험에서, 프로브 믹스는 4개의 복제 반응 (replicate reactions)을 유도하는 4개의 차등 인덱스 프로브의 컬렉션이었다. 이들은 EML-ALK 융합을 표적으로 하였다. 표적 올리고뉴클레오타드는 각 표적을 식별할 수 있는 고유한 인식 서열을 갖는다.
- [0187] 샘플로서, 3개의 합성 표적 올리고뉴클레오타드를 대수적으로 증가하는 농도로 혼합하였다. 표적 포획, 연장 및 결찰 반응, 롤링 서클 증폭 및 후속하는 EcoRI 소화를 상기에 기재된 바와 같이 수행하였다. 전형적인 결과의 예가 도 3에 개시되어 있다.
- [0188] 준비된 라이브러리를 MiSeq 및 iSeq100 기기로 시퀀싱하였고, 각 리드 내에서 프로브 서열들을 일치시키고, 프로브 서열들 사이의 게놈 서열 영역을 식별하고, 분자 바코드를 계수함으로써, 서열 데이터 내에서 검출되었다. 상기 계수 데이터는 스파이크-인된 (spiked-in) 주형 분자의 수를 정확하게 반영하였고, 검출된 신호는 표적 분자의 존재에 대해 매우 특이적이었다 (도 4).

[0190] **도 1 및 2의 상세한 설명**

- [0191] 도 1은 개시된 발명의 일 구체예의 워크플로우를 예시한다. 단계 1에서, 샘플 (102)내 핵산 (DNA 또는 RNA)을 결찰 복합체 세트 (104)와 접촉하게 한다. 상기 결찰 복합체는 표적 핵산 (106)에 어닐링된다. 단계 2에서, 상기 표적-결합된 결찰 복합체는 선택적으로 샘플 물질로부터 포획되어, 샘플 불순물 (103)을 남겼다. 단계 3에서, 상기 어닐링된 결찰 복합체들이 결찰되어, 결찰된 결찰 복합체를 생성한다. 단계 4에서, 다수의 샘플 (110)로부터 상기 결찰된 결찰 복합체가 함께 풀링된다 (112). 단계 5에서, 상기 프로브 서열은 phi29 폴리머라제 또는 다른 가닥 치환 폴리머라제를 사용하여 롤링 서클 증폭에 의해 증폭되어, 상기 프로브 (116)의 긴 연쇄체 카피를 생성한다. 단계 6에서, 상기 연쇄체 프로브 카피는 선택적으로 EcoRI와 같은 제한 엔도뉴클레아제 또는 I-CeuI와 같은 귀소 뉴클레아제 (homing nuclease)를 사용하여 모노머 유닛으로 절단되고, 선택적으로 PCR 또는 에멀전 PCR (117)을 사용하여 추가로 증폭된다. 단계 7에서, 상기 증폭된 DNA는 차세대 DNA 시퀀싱을 사용하여 시퀀싱된다. 단계 8에서, 상기 DNA 시퀀싱 결과는 생물정보학 파이프라인을 사용하여 표적 계수로 전환된다.
- [0192] 도 2a는 본원의 일 구체예에 따른 복수의 프로브 엔티티를 갖는 프로브 삼중항의 원리 구조를 도시하였다. 상기 복수의 프로브 엔티티는 샘플 어닐링 전에 조립된 좌측 프로브, 우측 프로브 및 브릿지 올리고를 포함한다. 상기 좌측 프로브의 제1 염기는 선택적으로 변형 1 (202)로 언급되는 인접한 프로브의 5' 말단에 화학적 결찰을 허용하는 변형 또는 효소 결찰을 위한 포스페이트 모이어티를 포함한다. 상기 좌측 프로브의 15-25개의 염기는 브릿지 결합 서열 1 (204)을 포함하며, 이는 브릿지 부위 1로 언급되는 효과적인 브릿지 올리고 결합을 위해 화학적으로 변형된 염기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 좌측 프로브는 선택적으로 바코드 1 (206)로 언급되는 분자-특이적 바코드 또는 샘플-특이적 바코드를 형성하는 무작위 뉴클레오타드의 세그먼트를 포함하는 5' 말단으로부터 다음 10-20개의 염기를 추가로 포함한다. 상기 좌측 프로브는 5' 말단으로부터 다음 15-30개의 염기를 추가로 포함하고, 유전자 표적 (208)에 결합한다. 204 또는 208의 뉴클레오타드들 중 일부 또는 전부는 표적 또는 브릿지 올리고 (226)에 대한 프로브의 친화도를 증가시키는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 좌측 프로브의 마지막 염기는 선택적으로 변형 1 (210)로 언급되는 인접한 프로브의 5' 말단에 화학적 결찰을 허용하는 변형 또는 효소적 결찰을 위한 포스페이트 모이어티를 포함한다.
- [0193] 상기 우측 프로브의 제1 염기는 선택적으로 변형 2 (214)로 언급되는 인접한 프로브의 5' 말단에 화학적 결찰을 허용하는 변형 또는 효소 결찰을 위한 포스페이트 모이어티를 포함한다. 상기 우측 프로브의 5' 말단으로부터 15-30개의 염기는 유전자 표적 (216)에 결합하는 우측 프로브의 일부를 포함한다. 상기 우측 프로브의 5' 말단으로부터 다음 10-20개의 염기는 선택적으로 바코드 2 (218)로 언급되는 분자-특이적 바코드 또는 샘플-특이적 바코드를 형성하는 무작위 뉴클레오타드의 세그먼트를 포함한다. 상기 우측 프로브의 마지막 15-25개의 염기는 브릿지 서열 2 (220)로 언급되는 효과적인 브릿지 올리고 결합을 위한 서열을 포함한다. 204, 208, 216 또는 220의 뉴클레오타드들 중 일부 또는 전부는 표적 또는 브릿지 올리고에 대한 프로브의 친화도를 증가시키는 화학적 변형을 포함할 수 있다.
- [0194] 상기 브릿지 올리고의 5' 말단으로부터 처음 15-25개의 염기는 브릿지 서열 3 (228)으로 언급되고, 우측 프로브 (204)의 브릿지 서열 1에 역상보적이며, 선택적으로 결합 증가를 위해 화학적으로 변형된 뉴클레오타드를 포함한다. 상기 브릿지의 마지막 15-25개의 염기는 브릿지 서열 2 (224)로 언급되고, 좌측 프로브 (220)의 브릿지

서열 2 서열에 역상보적이며, 선택적으로 결합 증가를 위해 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 상기 브릿지 서열은 본원에서 EcoRI와 같은 제한 엔도뉴클레아제 또는 I-CeuI와 같은 귀소 엔도뉴클레아제 (226)에 대한 인식 부위를 포함한다. 상기 브릿지 올리고의 5' 말단은 결합 복합체를 포획하는데 사용되는 포획 모이어티 (230)를 포함한다.

[0195] 도 2b는 본원의 일 구체예에 따른 제1 프로브 및 제2 프로브 사이의 갭 필링을 도시한다. 본원에서, 상기 브릿지 올리고는 브릿지 서열 1 (228) 및 브릿지 서열 2 (224) 사이에 갭 1을 함유한다. 갭 2는 프로브 1 및 2 (208 및 216)의 표적 결합 부분들 사이에 형성된다. 이러한 갭들은 폴리머라제 및 하나 이상의 뉴클레오티드를 도입하여 필링된다. 이러한 과정을 위해, Stoffel 단편, Taq 폴리머라제 또는 Phusion 폴리머라제, 및 DNA 리가제 예컨대 Ampligase의 혼합물을 사용할 수 있다. 상기 폴리머라제는 (a) 범용 브릿지 올리고 서열에 상보적이고 (b) 표적 서열에 상보적인 뉴클레오티드를 부가하고, 이에 의해 제1 프로브 및 제2 프로브 사이의 2개의 갭 즉 갭 1 및 갭 2에 필링되고, DNA 리가제의 후속 작용으로 브릿지 올리고 및 표적 서열에 상보적인 좌측 프로브 및 우측 프로브를 원형 복합체로 결합되도록 유도하였다.

[0196] 도 2c는 본원의 일 구체예에 따른 복수의 프로브 엔티티를 갖는 프로브 오중항 (probe quintet)의 원리 구조를 도시하였다. 상기 복수의 프로브 엔티티는 좌측 프로브, 우측 프로브 및 3개의 올리고들로 구성된 브릿지를 포함한다. 본원에서 상기 프로브 복합체는 좌측 프로브 및 제2 브릿지 (228 및 236) 사이, 제2 브릿지 및 우측 프로브 (240 및 222) 사이, 제1 및 제3 브릿지 올리고들 (238 및 242) 사이, 및 좌측 프로브 및 우측 프로브 (208 및 216) 사이에 갭들을 포함한다. 이러한 갭들은 폴리머라제 및 하나 이상의 뉴클레오티드를 도입하여 필링된다. 이러한 과정을 위해, Stoffel 단편, Taq 폴리머라제 또는 Phusion 폴리머라제, 및 DNA 리가제 예컨대 Ampligase의 혼합물을 사용할 수 있다. 상기 폴리머라제는 이러한 갭들을 필링하고, DNA 리가제의 후속 작용으로 프로브 및 브릿지 올리고를 원형 복합체로 결합되도록 유도하였다.

[0197] 상기 좌측 프로브의 15-25개의 염기는 브릿지 결합 서열 1 (228)을 포함하며, 이는 선택적으로 브릿지 서열 1로 언급되는 효과적인 브릿지 올리고 결합을 위해 화학적으로 변형된 염기를 포함한다. 상기 좌측 프로브는 선택적으로 라이브러리 인덱싱 (204)에 사용되는 범용 서열을 포함하는, 5' 말단으로부터 다음 10-20개의 염기를 추가로 포함한다. 상기 좌측 프로브는 선택적으로 바코드 1 (206)로 언급되는 분자-특이적 바코드 또는 샘플-특이적 바코드를 형성하는 무작위 뉴클레오티드의 세그먼트를 포함하는, 5' 말단으로부터 다음 10-20개의 염기를 추가로 포함한다. 상기 좌측 프로브는 5' 말단으로부터 다음 15-30개의 염기를 추가로 포함하고, 유전자 표적 (208)에 결합한다. 228의 뉴클레오티드들 중 일부 또는 전부는 표적 또는 브릿지 (226)에 대한 프로브의 친화도를 증가시키는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 좌측 프로브의 마지막 염기는 선택적으로 변형 1 (210)로 언급되는 인접한 프로브의 5' 말단에 화학적 결합을 허용하는 변형 또는 효소적 결합을 위한 포스페이트 모이어티를 포함한다.

[0198] 상기 우측 프로브의 제1 염기는 선택적으로 변형 2 (214)로 언급되는 인접한 프로브의 5' 말단에 화학적 결합을 허용하는 변형 또는 효소 결합을 위한 포스페이트 모이어티를 포함한다. 상기 우측 프로브의 5' 말단으로부터 15-30개의 염기는 유전자 표적 (216)에 결합하는 우측 프로브의 일부를 포함한다. 상기 우측 프로브의 5' 말단으로부터 다음 10-20개의 염기는 선택적으로 바코드 2 (218)로 언급되는 분자-특이적 바코드 또는 샘플-특이적 바코드를 형성하는 무작위 뉴클레오티드의 세그먼트를 포함한다. 상기 우측 프로브의 5' 말단으로부터 다음 10-20개의 염기는 선택적으로 범용 서열 (220)을 포함한다. 상기 우측 프로브의 마지막 15-25개의 염기는 브릿지 서열 8 (222)로 언급되고, 제3 브릿지 올리고 (224)의 브릿지 서열 7에 역상보적이다. 208, 216, 222 또는 228의 뉴클레오티드들 중 일부 또는 전부는 표적 또는 브릿지 올리고에 대한 프로브의 친화도를 증가시키는 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[0199] 상기 제1 브릿지 올리고의 5' 말단으로부터 처음 15-25개의 염기는 브릿지 서열 3 (226)으로 언급되고, 우측 프로브 (228)의 브릿지 서열 1에 역상보적이며, 선택적으로 결합 증가를 위해 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 상기 제1 브릿지 올리고의 마지막 15-25개의 염기는 브릿지 서열 2 (238)로 언급되고, 제2 브릿지 올리고 (236)의 브릿지 서열 4 서열에 역상보적이며, 선택적으로 결합 증가를 위해 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 상기 제1 브릿지 올리고의 5' 말단은 선택적으로 결합 복합체를 포획하는데 사용되는 포획 모이어티 (230)를 포함한다.

[0200] 상기 제2 브릿지 올리고의 5' 말단으로부터 처음 15-25개의 염기는 브릿지 서열 5 (240)로 언급되고, 제3 브릿지 올리고의 브릿지 서열 6 (242)에 역상보적이며, 선택적으로 결합 증가를 위해 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 상기 제2 브릿지 올리고의 마지막 15-25개의 염기는 브릿지 서열 4 (236)로 언급되고, 제1 브릿

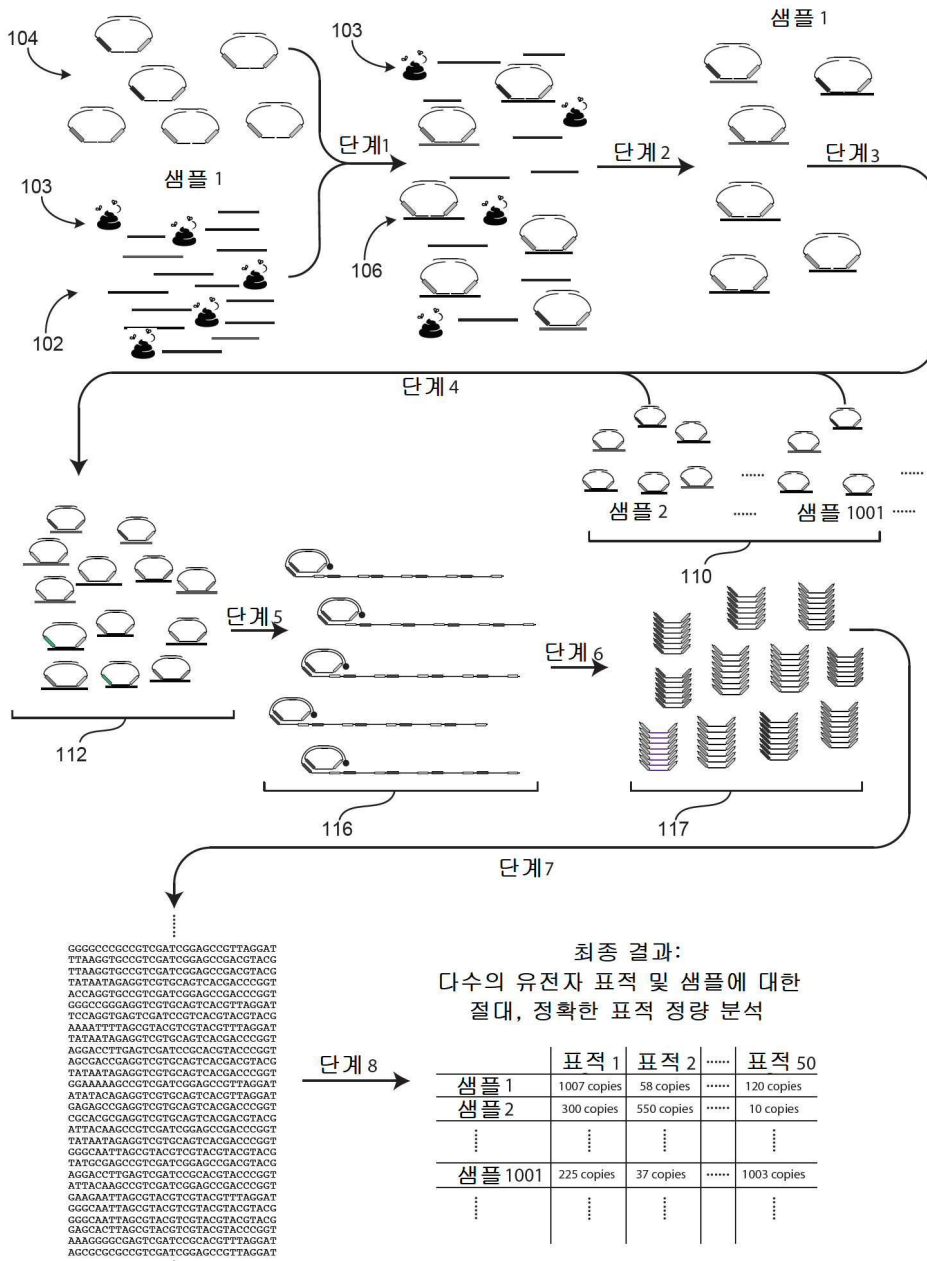
지 올리고 (238)의 브릿지 서열 2 서열에 역상보적이며, 선택적으로 결합 증가를 위해 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0201]

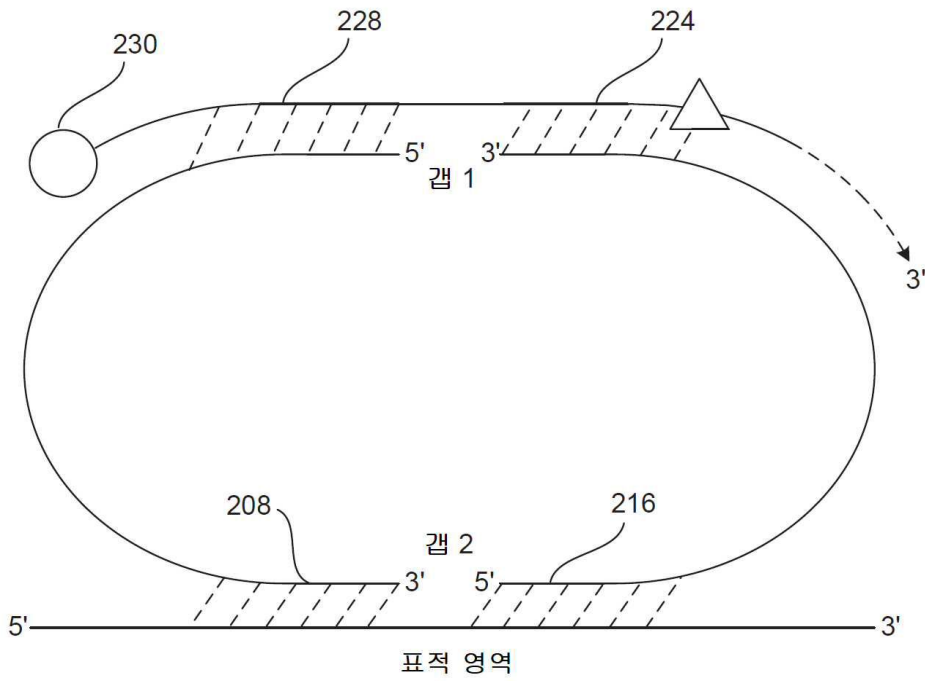
상기 5' 말단으로부터 제3 브릿지 올리고의 처음 15-25개의 염기는 브릿지 서열 6 (242)으로 언급되고, 제2 브릿지 올리고 (240)의 브릿지 서열 5 서열에 역상보적이며, 선택적으로 결합 증가를 위해 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 제1 브릿지 올리고의 마지막 15-25개의 염기는 브릿지 서열 7 (224)로 언급되고, 우측 프로브 (222)의 브릿지 서열 8 서열에 역상보적이며, 선택적으로 결합 증가를 위해 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 제3 브릿지 올리고의 3' 말단은 선택적으로 겹 필링 중에 연장을 방지하기 위해 포스페이트 (또는 다른 절단 가능한) 모이어티 (234)를 포함한다.

도면

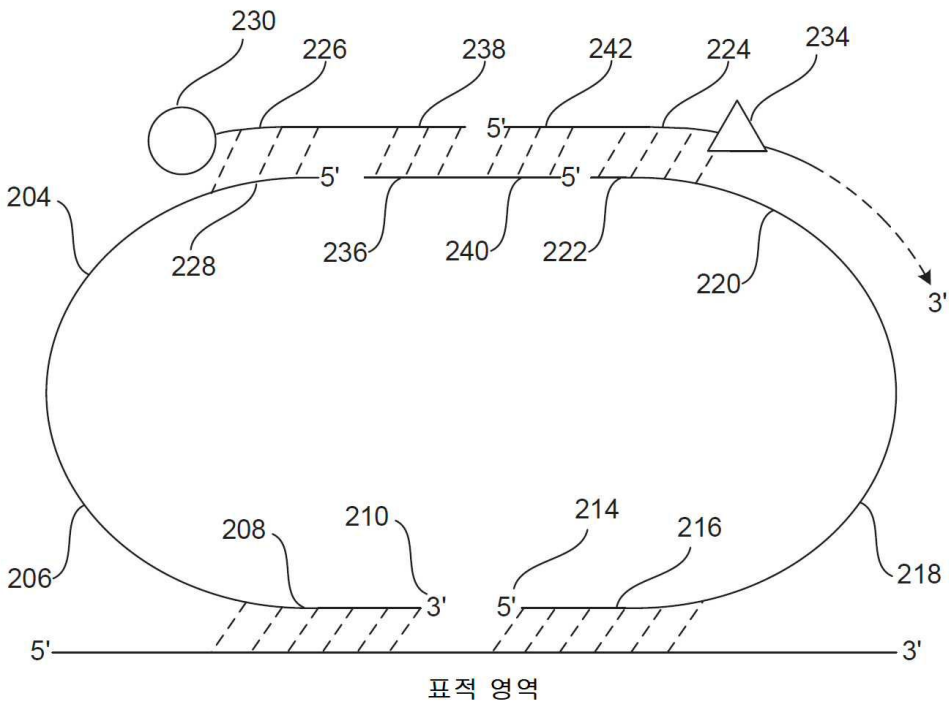
도면1



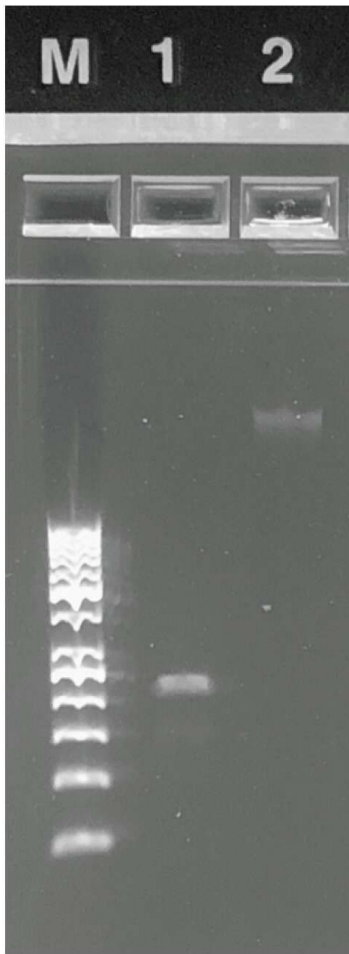
도면2b



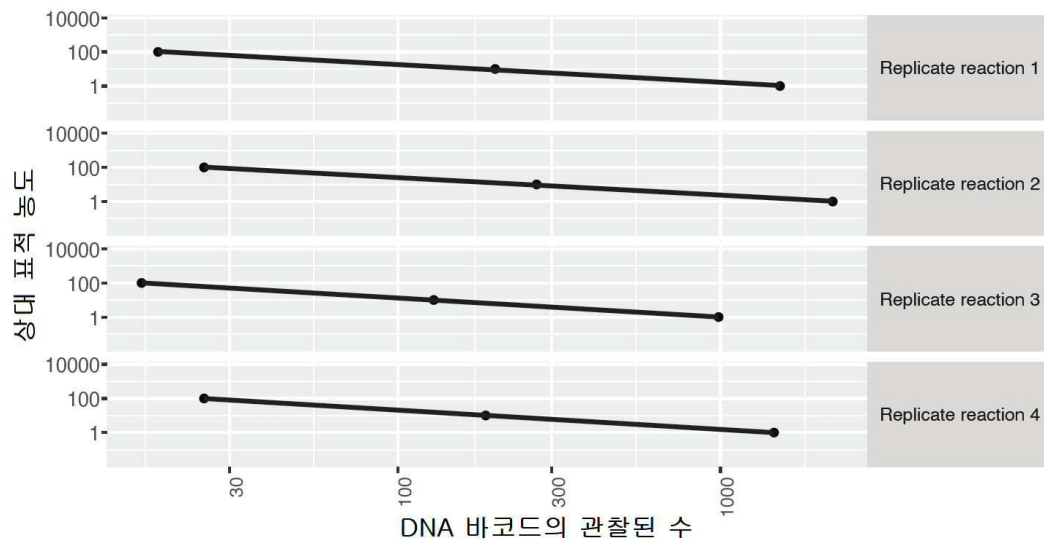
도면2c



도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genomill Health Oy

<120> HIGHLY SENSITIVE METHODS FOR ACCURATE PARALLEL QUANTIFICATION OF
NUCLEIC ACIDS

<130> Genomi11003EP

<140> EP21163300.3

<141> 2021-03-18

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> random sequence

<400> 1

ggggcccgcc gtcgatcgga gccgtagga t 31

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> random sequence - just for illustration

<400> 2

ttaagtgcc gtcgatcgga gccgacgtac g 31

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> random sequence - just for illustration

<400> 3

ttaagtgcc gtcgatcgga gccgacgtac g 31

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> random sequence - just for illustration

<400> 4

tataatagag gtcgtgcagt cacgacccgg t 31

<210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 5
 accagtgcc gtcgatcgga gccgacccgg t 31
 <210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 6
 gggccgggag gtcgtgcagt cacgttagga t 31
 <210> 7
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 7
 tccagtgag tcgatccgtc acgtacgtac g 31
 <210> 8
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 8
 aaaatttag cgtacgtcgt acgtttagga t 31
 <210> 9
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 9
 tataatagag gtcgtgcagt cacgaccgg t 31
 <210> 10

 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 10
 aggaccttga gtcgatccgc acgtaccgg t 31
 <210> 11
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 11
 agcgaccgag gtcgtgcagt cacgacgtac g 31
 <210> 12
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration

 <400> 12
 tataatagag gtcgtgcagt cacgaccgg t 31
 <210> 13
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 13
 ggaaaaagcc gtcgatcga gccgttagga t 31
 <210> 14
 <211> 31

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 14
 atatacagag gtcgtgcagt cacgttagga t 31
 <210> 15

 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 15
 gagagccgag gtcgtgcagt cacgacccgg t 31
 <210> 16
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 16
 cgcacgcgag gtcgtgcagt cacgacgtac g 31
 <210> 17
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration

 <400> 17
 attacaagcc gtcgatcgga gccgacccgg t 31
 <210> 18
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 18
 tataatagag gtcgtgcagt cacgacccgg t 31

<210> 19
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 19
 gggcaattag cgtacgtcgt acgtacgtac g 31
 <210> 20

 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 20
 tatgcgagcc gtcgatcgga gccgacgtac g 31
 <210> 21
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 21
 aggaccttga gtcgatccgc acgtaccgg t 31
 <210> 22
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration

 <400> 22
 attacaagcc gtcgatcgga gccgaccgg t 31
 <210> 23
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration

<400> 23
gaagaattag cgtacgtcgt acgtttagga t 31

<210> 24
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> random sequence - just for illustration
<400> 24
gggcaattag cgtacgtcgt acgtacgtac g 31

<210> 25

<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> random sequence - just for illustration
<400> 25
gggcaattag cgtacgtcgt acgtacgtac g 31

<210> 26
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> random sequence - just for illustration
<400> 26
gagcacttag cgtacgtcgt acgtaccgg t 31

<210> 27
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> random sequence - just for illustration

<400> 27
aaaggggcga gtcgatccgc acgtttagga t 31

<210> 28
<211> 31
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 28
 agcgcgcgcc gtcgatcgga gccgtagga t 31
 <210> 29
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <400> 29
 cgacgacgac agaaccagat acacgacgta cgcacgacat 40
 <210> 30

 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <220><221> misc_feature
 <222> (33)..(42)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 30
 ggttctgtcg tcgtcggaca cgacgctccg ctnnnnnnnn nnagctgagc gtattcgat 59
 <210> 31
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> random sequence - just for illustration
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(27)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 31
 ctggatcgtc gtatgctnnn nnnnnnngat cgaccattg gagaagatga tgtcgtgcgg 60

 tacgtcgt 68