

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091700**

(13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.10.05

(51) Int. Cl. **C12Q 1/6827 (2018.01)**
C12Q 1/6837 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.06.01

(54) **СПОСОБЫ НА ОСНОВЕ ЧИПА ДЛЯ АНАЛИЗА СМЕШАННЫХ ОБРАЗЦОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНЫХ ЗОНДОВ С РАЗНЫМИ МЕТКАМИ**

(31) **62/514,629; 62/514,681; 62/514,714**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.06.02**

**Саполски Роналд, Шаперо Майкл,
Шмидт Жанетт, Фанг Эрик, Мизрахи
Ман Орна, Ли Цзян, Чадха Моника,
Шукла Анджу (US)**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/035686**

(87) **WO 2018/223055 2018.12.06**

(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ЭФФИМЕТРИКС, ИНК. (US)

Медведев В.Н. (RU)

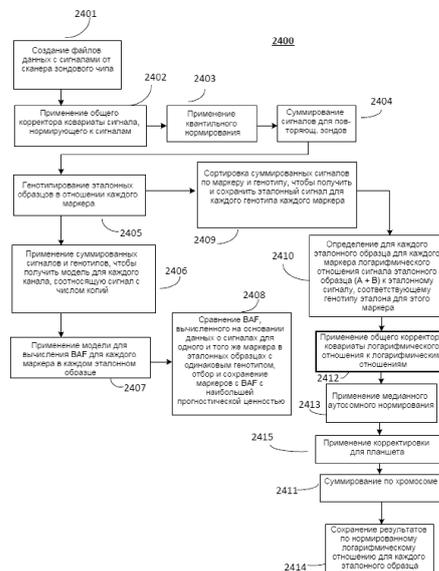
(57) Согласно настоящему изобретению предложены способы и системы, которые можно применять в основном на чипе анализе смешанных популяций нуклеиновой кислоты, включая мультиплексное генотипирование образца смешанной нуклеиновой кислоты, и для детектирования различий в числе копий целевого полинуклеотида и/или целевой хромосомы (например, микроделеций, дупликаций и анеуплоидий). Согласно настоящему изобретению также предложены способы и системы, которые можно применять в диагностике генетических отклонений в смешанной популяции нуклеиновой кислоты, полученной неинвазивно из организма, такой как образец крови, плазмы, сыворотки, мочи, кала или слюны. Раскрытые способы и системы можно применять во множестве приложений, включая пренатальное тестирование и диагностику рака. Настоящее изобретение основано на гибридизации амплифицированных фрагментов из образца, например материнского образца, во время которой могут применяться инвертируемые молекулярные зонды (MIP), с олигонуклеотидным чипом и на детектировании аллелей на основании разных сигналов от разных аллелей однонуклеотидного полиморфизма (SNP). В настоящем изобретении также раскрыто, как можно применять определение отношения аллелей в определении фетальных и материнских вариантов числа копий (CNV), например, анеуплоидий.

A1

202091700

202091700

A1



ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564101EA/032

СПОСОБЫ НА ОСНОВЕ ЧИПА ДЛЯ АНАЛИЗА СМЕШАННЫХ ОБРАЗЦОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНЫХ ЗОНДОВ С РАЗНЫМИ МЕТКАМИ РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/514681, поданной 2 июня 2017 г., предварительной заявке на патент США № 62/514714, поданной 2 июня 2017 г., и предварительной заявке на патент США № 62/514629, поданной 2 июня 2017 г. которые тем самым полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки для любых целей.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Согласно настоящему изобретению предложены способы и системы, которые можно применять для основанного на чипе анализа смешанных популяций нуклеиновой кислоты, включая генотипирование и анализ числа копий различных субпопуляций смешанной популяции нуклеиновой кислоты. Согласно настоящему изобретению также предложены способы и системы, которые можно применять для диагностики генетических отклонений в смешанной популяции нуклеиновой кислоты, полученной из организма. Например, в настоящей заявке раскрыты способы и системы, которые можно применять в диагностике фетальных генетических отклонений или опухолевых генетических отклонений с использованием образцов, полученных неинвазивно от беременных женщин или пациентов. Такие образцы могут содержать смешанные популяции нуклеиновой кислоты, происходящие из крови, плазмы, сыворотки, мочи, кала или слюны.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Анализ смешанных популяций нуклеиновой кислоты, например, образцов ДНК и РНК, полученных из одного тканевого источника, такого как кровь, моча или слюна, но содержащих отдельные субпопуляции нуклеиновой кислоты, вызвал значительный интерес в исследовательском сообществе и сообществе здравоохранения. С помощью подходящих способов можно проанализировать смешанные популяции нуклеиновой кислоты, происходящие из бесклеточной ДНК (или РНК), полученной от беременных женщин, чтобы определить фетальные характеристики, включая наследование заболевания. Аналогичным образом, смешанные популяции нуклеиновой кислоты, происходящие из бесклеточной ДНК (или РНК), полученной от пациентов с раком, могут быть проанализированы для определения различных характеристик, таких как злокачественность опухоли, происхождение опухоли или восприимчивость к лекарственным средствам. Несмотря на то, что анализ таких смешанных популяций нуклеиновой кислоты может быть технически сложным из-за высокой степени сходства между различными субпопуляциями, сложность анализа перевешивается легкостью получения соответствующих образцов нуклеиновых кислот дешевым, быстрым и неинвазивным способом с помощью процедур, таких как флеботомия или сбор

мочи/слюны. Один из режимов анализа бесклеточной ДНК, секвенирование нуклеиновой кислоты, является информативным, но дорогостоящим в расчете на один образец и занимает много времени. Анализ на основе микрочипа дешевле и быстрее, чем секвенирование, но современные коммерческие варианты реализации продуктов на основе микрочипов не позволяют легко устанавливать различие между отличающимися и очень похожими субпопуляциями, присутствующими в смешанной популяции нуклеиновой кислоты. Вследствие низкой концентрации фетальной ДНК в материнских образцах, и низкой концентрации опухолевой ДНК в образце крови, содержащем циркулирующие опухолевые клетки, одиночные анализы или анализы с низкой мультиплексностью маловероятно позволят установить различие между анеуплоидным плодом (например, трисомия хромосомы 21) и эуплоидным плодом или между опухолевой клеткой и здоровой клеткой у пациента с раком. Например, фетальная ДНК может присутствовать на уровне от 4% до 15% от общей бесклеточной ДНК в крови; ДНК, происходящая из конкретной фетальной хромосомы, будет представлять одну двадцать третью часть такой фетальной ДНК. Детектирование трисомии потребует надежного детектирования изменений сигнала всего лишь на 1-2% выше фона. Более того, анализ дополнительно осложняется ограниченным количеством нуклеиновой кислоты, доступной с помощью неинвазивных способов отбора образцов. Например, в типичном анализе из материнского образца цельной крови объемом 10 мл можно получить от 5 до 15 нг очищенной бесклеточной ДНК.

[0004] Из-за имеющихся в настоящее время сложностей, связанных с такими неинвазивными подходами, большинство беременных женщин проходят пренатальное тестирование, включая скрининг материнской сыворотки и/или ультразвуковое исследование, чтобы определить риски распространенных пороков развития, таких как те, которые возникают в результате трисомии 13, 18 и 21. Однако чувствительность и специфичность таких тестов очень низкая, что приводит к высокой частоте ложноположительных результатов. В результате высокой частоты ложноположительных результатов таких обычных тестов индивидуумы, как правило, должны проводить последующее тестирование с применением инвазивного диагностического теста, такого как проба ворсинчатого хориона (CVS), в период с 11 по 14 неделю беременности или амниоцентез после 15 недель беременности. Риск выкидыша при этих инвазивных процедурах составляет приблизительно один процент (см. Mujezinovic and Alfirevic, *Obstet. Gynecol.*, 110:687-694 (2011)). В настоящее время анализ фетальных клеток, как правило, включает кариотипирование или флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) и не предоставляет информацию о признаках одного гена. В результате этого для выявления заболеваний и нарушений одного гена требуются дополнительные тесты. Поскольку пренатальная диагностика может иметь решающее значение для ведения беременности с хромосомными отклонениями и локализованными генетическими отклонениями, точный и ранний диагноз важен для обеспечения интервенционной помощи до или во время родов и для предотвращения пагубных последствий для новорожденного.

[0005] Аналогичным образом, в области борьбы с раком для диагностики разных видов рака были разработаны мощные инструменты, такие как OncoScan[®]. Однако такие образцы, как правило, представляют собой образцы биопсии, полученные в инвазивных процедурах, которые являются как дорогостоящими, так и потенциально опасными для пациента. Благодаря использованию технологии на основе микрочипов исследователи могут идентифицировать большое количество однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) на одном чипе, что обеспечивает быстрое и точное детектирование генетических отклонений у субъекта. Одним примером такого продукта является продукт на основе микрочипа для детектирования SNP от Affymetrix, называемый OncoScan[®]. Продукт OncoScan[®] обеспечивает профили числа копий и потери гетерозиготности (LOH) по всему геному из образцов солидных опухолей. Такая технология является мощным инструментом в диагностике рака, поскольку она помогает преодолеть значительную проблему, обусловленную сложностью работы с ограниченными количествами ДНК из сильно разрушенных образцов, зафиксированных формалином и залитых парафином (FFPE). См., например, патент США № 8190373. Однако такие технологии также находят применение в ряде других областей. В частности, генетические отклонения являются причиной большого количества патологий, включая патологии, вызванные хромосомной анеуплоидией (например, синдром Дауна), мутации зародышевой линии в специфических генах (например, серповидно-клеточная анемия) и патологии, вызванные соматическими мутациями (например, рак), и во многих случаях детектирование таких генетических отклонений осложняется инвазивными диагностическими процедурами.

[0006] Таким образом, разработка теста на основе микрочипа, который является достаточно чувствительным и специфичным для детектирования генетических отклонений в образцах смешанных популяций нуклеиновой кислоты, полученных с помощью неинвазивных средств, с низкой частотой ложноположительных и ложноотрицательных результатов, обеспечит пользу для этой области молекулярной диагностики. Недавно компания Ariosa Diagnostics сообщила об исследованиях, включающих анализ на основе микрочипа бесклеточной ДНК из материнской крови для детектирования наличия фетальных анеуплоидий. См., например, Stokowski et al., *Prenatal Diagnosis* 35:1243-1246 (2015). Такие способы включали анализ общих сигналов из непалиморфных локусов (т. е. локусов, которые, как ожидается, будут идентичны как для матери, так и для плода), чтобы оценить хромосомное число копий путем простого измерения отклонений общего сигнала, детектированного как от материнской ДНК, так и от фетальной ДНК в данном генетическом локусе. В этом случае требуется стратегия конструирования, при которой чип сконфигурирован для регистрации показаний непалиморфных локусов, чтобы определить число копий основных хромосом.

[0007] Кроме того, по меньшей мере в некоторых случаях применение полиморфных локусов для оценки числа копий впоследствии обладает преимуществами применительно к тестированию фетальной анеуплоидии, поскольку сохраняется возможность определения того, который из родителей ответственен за изменение числа

копий. Однако анализ числа копий на основе сигналов, соответствующих полиморфным сайтам, может быть проблематичным, и эти проблемы усиливаются при анализе образцов из разных популяций.

[0008] Существует потребность в разработке улучшенных способов (а также ассоциированных композиций, систем, устройств и инструментов), в которых применяются возможности высокопроизводительного генотипирования анализа на основе микрочипа, чтобы получить данные от одной группы сайтов для считывания показаний (например, данные от одной группы полиморфных локусов в смешанных популяциях ДНК), которые затем можно применять как для генотипирования, так и для оценки числа копий данного локуса или хромосомы в пределах основной и второстепенной популяций ДНК в смешанных популяциях нуклеиновых кислот.

[0009] В настоящей заявке описаны способы и системы для анализа образца смешанной нуклеиновой кислоты для детектирования различий в числе копий целевого полинуклеотида, например, детектирования вариантов числа копий, указывающих на хромосомную анеуплоидию, а также способы генотипирования таких целевых полинуклеотидов, даже если они присутствуют на низких уровнях в смешанной популяции нуклеиновой кислоты.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00010] Данное краткое описание приведено для представления различных аспектов настоящего изобретения, которые дополнительно описаны ниже в подробном описании. Данное краткое описание не предназначено для ограничения объема заявленного объекта изобретения. Другие признаки, детали, варианты применения и преимущества заявленного объекта изобретения будут понятны из следующего письменного подробного описания, включая те аспекты, которые проиллюстрированы на прилагаемых чертежах и определены в прилагаемой формуле изобретения.

[00011] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены способы анализа образца нуклеиновой кислоты, полученного из организма. Образец нуклеиновой кислоты может содержать ДНК и/или РНК, или их синтетические производные. Образец нуклеиновой кислоты может содержать бесклеточную ДНК и/или бесклеточную РНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения образец нуклеиновой кислоты содержит смешанную популяцию нуклеиновой кислоты. Образец нуклеиновой кислоты, содержащий смешанную популяцию нуклеиновой кислоты, может быть получен из одного организма. Смешанная популяция нуклеиновой кислоты может содержать нуклеиновую кислоту фетального происхождения и материнского происхождения. Смешанная популяция нуклеиновой кислоты может содержать нуклеиновую кислоту, происходящую из опухолевых и здоровых клеток.

[00012] Способы, описанные в настоящей заявке, также могут включать получение или извлечение из организма образца нуклеиновой кислоты, содержащего смешанную популяцию нуклеиновой кислоты. Получение или извлечение необязательно включает любой один или более из следующих этапов: введение метки (включая массовое введение

метки или стохастическое введение метки), введение метки отдельной молекулы, амплификацию, лигирование с другими последовательностями нуклеиновых кислот, образование кольцевой молекулы, гибридизацию, отбор мишени, метилирование или связывание со специфичными для метилирования реагентами, связывание антител, захват мишени, осаждение, элюирование и тому подобное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения образец смешанной нуклеиновой кислоты содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию. Основная субпопуляция необязательно присутствует в более чем 50% от общей нуклеиновой кислоты в смешанной популяции нуклеиновой кислоты. Основная субпопуляция может присутствовать в более чем 50% от общей нуклеиновой кислоты в образце нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждая из основной и второстепенной субпопуляций содержит целевую последовательность, расположенную в первой хромосомной области. Целевая последовательность основной и второстепенной субпопуляций может представлять собой одну и ту же последовательность или перекрывающиеся последовательности. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения целевая последовательность содержит полиморфный сайт. Полиморфный сайт может содержать последовательность, содержащую первый нуклеотидный вариант и/или второй нуклеотидный вариант, необязательно в одном и том же сайте. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиморфная последовательность содержит однонуклеотидный полиморфизм (SNP). SNP может содержать один нуклеотид, идентичность которого определяет аллельный вариант полиморфного сайта. Полиморфный сайт может содержать основной аллель или второстепенный аллель или оба (например, в случае диплоидного организма).

[00013] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы, описанные в настоящей заявке (а также относящиеся к ним композиции, наборы и системы), включают селективное обогащение определенных генетических последовательностей, представляющих интерес. Селективное обогащение может включать нацеленную амплификацию, которую можно выполнять в одноплексном или мультиплексном форматах. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описанные способы могут включать применение специфичных для мишени праймеров или зондов. Необязательно способы включают применение инвертируемого молекулярного зонда. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы включают гибридизацию праймера или зонда (например, инвертируемого молекулярного зонда) с целевой последовательностью. Необязательно праймер или зонд могут быть удлинены специфичным для мишени способом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения зонд представляет собой инвертируемый молекулярный зонд, который гибридизуется рядом с полиморфным сайтом или в 5'-направлении от него. Способы могут включать удлинение праймера или

зонда путем встраивания нуклеотида, идентичность которого соответствует последовательности одного или более полиморфизмов в полиморфном сайте.

[00014] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы, описанные в настоящей заявке, включают генотипирование полиморфного сайта. Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения генотипирование включает гибридизацию по меньшей мере одного фрагмента нуклеиновой кислоты, содержащего или происходящего из популяции нуклеиновой кислоты и содержащего полиморфный сайт, с олигонуклеотидным зондом. Олигонуклеотидный зонд необязательно может быть расположен в пределах чипа из других зондов или может быть гибридизован с другим олигонуклеотидным зондом, присутствующим в чипе.

[00015] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описанные способы дополнительно включают детектирование с олигонуклеотидного чипа, с применением детектора, первого сигнала, указывающего на наличие или отсутствие первого нуклеотидного варианта («сигнал А»). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описанные способы включают детектирование второго сигнала, указывающего на наличие или отсутствие второго нуклеотидного варианта («сигнал В»). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описанные способы могут включать детектирование как первого сигнала, так и второго сигнала с одного и того же чипа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первый сигнал может указывать на наличие или отсутствие первой аллельной формы полиморфного сайта («аллель А»). Второй сигнал может указывать на наличие или отсутствие второй аллельной формы полиморфного сайта («аллель В»). Согласно некоторым вариантам реализации основная субпопуляция содержит аллель А, а второстепенная субпопуляция содержит аллель В. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описанные способы дополнительно включают генотипирование основной субпопуляции, второстепенной субпопуляции или обеих основной и второстепенной субпопуляций, необязательно с применением сигнала А, сигнала В или обоих сигналов А и В. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описанные способы дополнительно включают оценку или вычисление числа копий целевой последовательности нуклеиновой кислоты, включая полиморфный сайт в основной субпопуляции, второстепенной субпопуляции или в обеих основной и второстепенной субпопуляциях, необязательно с применением сигнала А, сигнала В или обоих сигналов А и В. Способы могут включать вычисление числа копий первой хромосомной области с применением сигнала А, сигнала В или обоих сигналов А и В. Способы могут включать детектирование наличия или отсутствия анеуплоидии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы могут включать вычисление относительных долей нуклеиновой кислоты, происходящей из основной и второстепенной субпопуляций, с применением сигнала А, сигнала В или обоих сигналов А и В. Способы могут включать вычисление

фетальной фракции образца нуклеиновой кислоты с применением сигнала А, сигнала В или обоих сигналов А и В. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы могут дополнительно включать любой один или более из следующих этапов: (а) определение числа копий первой хромосомной области во второстепенной субпопуляции с применением первого сигнала и второго сигнала; (b) определение числа копий первой хромосомной области в основной субпопуляции с применением первого сигнала и второго сигнала; (с) определение генотипа полиморфного сайта для второстепенной субпопуляции с применением первого сигнала и второго сигнала; (d) определение генотипа полиморфного сайта для основной субпопуляции с применением первого сигнала и второго сигнала, и (е) дополнительное определение относительных количеств основной субпопуляции и второстепенной субпопуляции в смешанной популяции нуклеиновой кислоты с применением первого сигнала и второго сигнала.

[00016] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы определения изменения числа копий в образце смешанной нуклеиновой кислоты, полученном из организма, причем указанный способ включает один или более из следующих этапов:

выделение геномной ДНК, чтобы получить образец смешанной нуклеиновой кислоты, содержащий смешанную популяцию нуклеиновой кислоты, которая содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию;

приведение образца нуклеиновой кислоты в контакт с пулом линейных инвертируемых молекулярных зондов, чтобы получить ренатурационную смесь, содержащую множество комплексов линейный инвертируемый молекулярный зонд-фрагмент ДНК;

разделение ренатурационной смеси на композицию первого канала и композицию второго канала;

добавление смеси дезоксинуклеотидов к каждой из композиций первого и второго каналов, причем смесь дезоксинуклеотидов, добавленная к композиции первого канала, отличается от смеси дезоксинуклеотидов, добавленной к композиции второго канала;

приведение композиций первого и второго каналов в контакт с лигазой, чтобы получить композиции с первым и вторым кольцевыми зондами;

необязательно приведение композиции с первым кольцевым зондом и композиции со вторым кольцевым зондом в контакт с первой экзонуклеазой для расщепления оставшихся линейных инвертируемых молекулярных зондов и фрагментов нуклеиновой кислоты;

расщепление композиций с первым и вторым кольцевыми зондами, чтобы получить фрагменты нуклеиновой кислоты, содержащие или происходящие из популяции нуклеиновой кислоты;

амплификацию первого и второго фрагментов нуклеиновой кислоты, содержащих или происходящих из популяции нуклеиновой кислоты;

объединение первого и второго фрагментов нуклеиновой кислоты, содержащих или происходящих из популяции нуклеиновой кислоты;

ферментативное расщепление первого и второго фрагментов нуклеиновой кислоты, содержащих или происходящих из популяции нуклеиновой кислоты;

гибридизацию по меньшей мере одного фрагмента нуклеиновой кислоты, содержащего или происходящего из популяции нуклеиновой кислоты и содержащего полиморфный сайт, с олигонуклеотидным зондом из олигонуклеотидного чипа;

введение метки в поверхностно-связанные первый и второй фрагменты нуклеиновой кислоты, содержащие или происходящие из популяции нуклеиновой кислоты, с применением первого агента, который связывается с первым нуклеотидным вариантом, и второго агента, который связывается со вторым нуклеотидным вариантом; и

анализ интенсивности сигнала, специфичного для первого агента, и интенсивности сигнала от второго агента, чтобы определить число копий хромосомы.

[00017] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен набор, который можно применять для детектирования изменения числа копий у плода, содержащий:

устройство для захвата, имеющее множество фрагментов нуклеиновой кислоты, соответствующих по меньшей мере одной целевой хромосомной области, присоединенных к нему;

множество молекулярных зондов, способных гибридизоваться со смешанной популяцией нуклеиновой кислоты, которая содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию, причем каждая из указанных основной и второстепенной субпопуляций содержит целевую последовательность, расположенную в первой хромосомной области и содержащую полиморфный сайт, при этом указанный полиморфный сайт может содержать комбинации первого нуклеотидного варианта и второго нуклеотидного варианта; и

инструкции по генотипированию и детектированию полиморфного сайта.

[00018] Эти аспекты и другие варианты реализации настоящего изобретения могут быть дополнительно описаны с помощью следующих перечисленных пунктов:

[00019] 1. Способ анализа образца смешанной нуклеиновой кислоты, полученного из организма, включающий:

получение или извлечение из организма образца нуклеиновой кислоты, содержащего смешанную популяцию нуклеиновой кислоты, которая содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию, причем каждая из указанных основной и второстепенной субпопуляций содержит целевую последовательность, расположенную в первой хромосомной области и содержащую полиморфный сайт, при этом указанный полиморфный сайт может содержать первый нуклеотидный вариант, второй нуклеотидный вариант или как первый, так и второй нуклеотидные варианты; генотипирование указанного полиморфного сайта, причем указанное генотипирование включает: (а) гибридизацию по меньшей мере одного фрагмента нуклеиновой кислоты,

содержащего или происходящего из указанной популяции нуклеиновой кислоты и содержащего указанный полиморфный сайт, с олигонуклеотидным зондом из олигонуклеотидного чипа; и (b) детектирование с олигонуклеотидного чипа, с применением детектора, первого сигнала, указывающего на наличие или отсутствие первого нуклеотидного варианта («сигнал А»), и второго сигнала, указывающего на наличие или отсутствие второго нуклеотидного варианта («сигнал В»). Необязательно указанный первый нуклеотидный вариант соответствует первому аллельному варианту, а указанный второй нуклеотидный вариант соответствует второму аллельному варианту.

[00020] 2. Способ по п. 1, также включающий определение числа копий первой хромосомной области в указанной второстепенной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

[00021] 3. Способ по п. 1, также включающий определение числа копий первой хромосомной области в указанной основной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

[00022] 4. Способ по п. 1, также включающий определение генотипа полиморфного сайта для указанной второстепенной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

[00023] 5. Способ по п. 1, также включающий определение генотипа полиморфного сайта для указанной основной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

[00024] 6. Способ по п. 1, также включающий определение относительных количеств указанных основной субпопуляции и второстепенной субпопуляции в смешанной популяции нуклеиновой кислоты с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

[00025] 7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная основная субпопуляция и указанная второстепенная субпопуляция происходят из разных источников в организме.

[00026] 8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит бесклеточную ДНК.

[00027] 9. Способ по п. 8, в котором указанная бесклеточная ДНК получена или происходит из крови, плазмы, сыворотки, мочи, кала или слюны организма.

[00028] 10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный организм содержит опухоль, указанная основная субпопуляция содержит или происходит из здоровой ткани, а указанная второстепенная субпопуляция содержит или происходит из опухоли.

[00029] 11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный организм представляет собой беременную женщину, указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты представляет собой бесклеточную ДНК, полученную из крови беременной женщины, указанная основная субпопуляция содержит или происходит из

материнской нуклеиновой кислоты, а указанная второстепенная субпопуляция, содержит или происходит из фетальной нуклеиновой кислоты.

[00030] 12. Способ по п. 11, в котором указанная второстепенная субпопуляция содержит фетальную ДНК, присутствующую не более чем в 20% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[00031] 13. Способ по п. 12, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 15% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[00032] 14. Способ по п. 12, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 10% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[00033] 15. Способ по п. 12, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 5% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[00034] 16. Способ по п. 1, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 15% и не менее 1% от общей бесклеточной ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[00035] 17. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит или происходит из бесклеточной ДНК, присутствующей в крови организма в концентрации не более 5 нг/мл и не менее 0,1 нг/мл.

[00036] 18. Способ по п. 1, в котором используемое количество смешанной популяции нуклеиновой кислоты составляет не более 50 нг, 40 нг, 30 нг, 15 нг, 10 нг, 5 нг, 3 нг или 1 нг.

[00037] 19. Способ по п. 1, в котором указанный полиморфный сайт содержит биаллельный SNP, указанный первый нуклеотидный вариант представляет собой первый аллельный вариант SNP («аллель А»), а указанный второй нуклеотидный вариант представляет собой второй аллельный вариант SNP («аллель В»).

[00038] 20. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный детектор включает первый канал детектирования и второй канал детектирования и дополнительно включает этапы детектирования первого сигнала в указанном первом канале детектирования и второго сигнала в указанном втором канале детектирования.

[00039] 21. Способ по п. 19, в котором указанный SNP может содержать аллель А или аллель В, и при этом генотип указанного SNP может быть гомозиготным по аллелю А («АА»), гомозиготным по аллелю В («ВВ») или гетерозиготным («АВ»).

[00040] 22. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап генотипирования дополнительно включает приведение указанного образца нуклеиновой кислоты в контакт с пулом линейных инвертируемых молекулярных зондов, чтобы получить ренатурационную смесь.

[00041] 23. Способ по п. 22, в котором указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит по меньшей мере 1000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

[00042] 24. Способ по п. 22, в котором указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит по меньшей мере 5000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

[00043] 25. Способ по п. 22, в котором указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит по меньшей мере 10000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

[00044] 26. Способ по п. 22, в котором указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит по меньшей мере 20000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

[00045] 27. Способ по п. 22, в котором указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит менее 200000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

[00046] 28. Способ по п. 22, в котором указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит менее 100000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

[00047] 29. Способ по п. 22, в котором указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит менее 80000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

[00048] 30. Способ по любому из пп. 22-29, в котором по меньшей мере 50% указанного пула линейных инвертируемых молекулярных зондов связывают фрагменты ДНК из хромосом 1, 5, 13, 18, 21, X и Y.

[00049] 31. Способ по любому из пп. 22-29, в котором по меньшей мере 60% указанного пула линейных инвертируемых молекулярных зондов связывают фрагменты ДНК из хромосом 1, 5, 13, 18, 21, X и Y.

[00050] 32. Способ по любому из пп. 22-29, в котором по меньшей мере 70% указанного пула линейных инвертируемых молекулярных зондов связывают фрагменты ДНК из хромосом 1, 5, 13, 18, 21, X и Y.

[00051] 33. Способ по любому из пп. 22-29, в котором отношение общего числа линейных инвертируемых молекулярных зондов к общему числу копий фрагмента ДНК составляет приблизительно 40000:1.

[00052] 34. Способ по любому из пп. 22-29, в котором отношение общего числа линейных инвертируемых молекулярных зондов к общему числу копий фрагмента ДНК составляет по меньшей мере 15000:1.

[00053] 35. Способ по любому из пп. 22-29, в котором отношение общего числа линейных инвертируемых молекулярных зондов к общему числу копий фрагмента ДНК составляет по меньшей мере 30000:1.

[00054] 36. Способ по любому из пп. 22-29, в котором отношение общего числа линейных инвертируемых молекулярных зондов к общему числу копий фрагмента ДНК составляет менее 100000:1.

[00055] 37. Способ по любому из пп. 22-29, в котором отношение общего числа линейных инвертируемых молекулярных зондов к общему числу копий фрагмента ДНК составляет менее 60000:1.

[00056] 38. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап генотипирования дополнительно включает разделение ренатурационной смеси на композицию первого канала и композицию второго канала.

[00057] 39. Способ по п. 38, в котором указанная композиция первого канала содержит смесь дАТФ и дТТФ.

[00058] 40. Способ по п. 38 или 39, в котором указанная композиция первого канала по существу не содержит дГТФ или дЦТФ.

[00059] 41. Способ по любому из пп. 38-40, в котором указанная композиция второго канала содержит смесь дГТФ и дЦТФ.

[00060] 42. Способ по любому из пп. 38-41, в котором указанная композиция второго канала по существу не содержит дАТФ или дТТФ.

[00061] 43. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап генотипирования дополнительно включает добавление смеси дезоксинуклеотидов к каждой из указанных композиций первого и второго каналов, причем смесь дезоксинуклеотидов, добавленная к композиции первого канала, отличается от смеси дезоксинуклеотидов, добавленной к композиции второго канала.

[00062] 44. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап генотипирования дополнительно включает приведение указанных композиций первого и второго каналов в контакт с лигазой с получением композиций с первым и вторым кольцевыми зондами.

[00063] 45. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап генотипирования дополнительно включает расщепление указанных композиций с первым и вторым кольцевыми зондами с получением фрагментов нуклеиновой кислоты, содержащих или происходящих из популяции нуклеиновой кислоты.

[00064] 46. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап генотипирования дополнительно включает амплификацию указанных первого и второго фрагментов нуклеиновой кислоты, содержащих или происходящих из популяции нуклеиновой кислоты.

[00065] 47. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап амплификации осуществляют в присутствии полимеразы.

[00066] 48. Способ по п. 47, в котором указанная полимеразы представляет собой полимеразу горячего старта, содержащую полимеразу и ингибитор полимеразы.

[00067] 49. Способ по п. 48, в котором указанный ингибитор полимеразы диссоциирует от полимеразы при температуре по меньшей мере 40°C.

[00068] 50. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап генотипирования дополнительно включает объединение указанных первого и второго

фрагментов нуклеиновой кислоты, содержащих или происходящих из популяции нуклеиновой кислоты.

[00069] 51. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап детектирования дополнительно включает введение метки в поверхностно-связанные первый и второй фрагменты нуклеиновой кислоты, содержащие или происходящие из популяции нуклеиновой кислоты, с применением первого агента, который связывается с первым аллельным вариантом, и второго агента, который связывается со вторым аллельным вариантом.

[00070] 52. Способ по п. 51, в котором указанный первый агент содержит антитело.

[00071] 53. Способ по п. 51 или 52, в котором указанный первый агент содержит последовательность, комплементарную части первой целевой последовательности.

[00072] 54. Способ по любому из пп. 51-53, в котором указанный первый агент дополнительно содержит распознаваемый элемент, конъюгированный с указанной комплементарной последовательностью.

[00073] 55. Способ по п. 54, в котором указанный распознаваемый элемент представляет собой биотин.

[00074] 56. Способ по любому из пп. 51-55, в котором указанный первый агент дополнительно содержит флуоресцентномеченый авидин.

[00075] 57. Способ по любому из пп. 51-56, в котором указанный первый агент дополнительно содержит антитело, которое связывает авидин.

[00076] 58. Способ по п. 57, в котором указанное антитело, которое связывает авидин, помечено биотином.

[00077] 59. Способ по любому из пп. 51-58, в котором указанный первый агент дополнительно содержит антитело, которое связывает указанный распознаваемый элемент.

[00078] 60. Способ по п. 59, в котором указанное антитело, которое связывает распознаваемый элемент, помечено с помощью репортера.

[00079] 61. Способ по любому из пп. 51-60, в котором указанный первый агент содержит флуорофор.

[00080] 62. Способ по п. 61, в котором указанный флуорофор первого агента имеет пик испускания флуоресценции от приблизительно 640 нм до приблизительно 680 нм.

[00081] 63. Способ по п. 61 или 62, в котором указанный флуорофор первого агента представляет собой аллофикоцианин.

[00082] 64. Способ по п. 51, в котором указанный второй агент содержит последовательность, комплементарную части второй целевой последовательности.

[00083] 65. Способ по п. 64, в котором указанный второй агент дополнительно содержит распознаваемый элемент, конъюгированный с указанной комплементарной последовательностью.

[00084] 66. Способ по п. 65, в котором указанный распознаваемый элемент представляет собой FAM.

[00085] 67. Способ по любому из пп. 64-66, в котором указанный второй агент дополнительно содержит первое антитело, которое связывает указанный распознаваемый элемент.

[00086] 68. Способ по любому из пп. 64-66, в котором указанный второй агент дополнительно содержит второе антитело, которое связывает указанное первое антитело.

[00087] 69. Способ по п. 68, в котором указанное первое антитело, второе антитело или как первое, так и второе антитела помечены флуорофором.

[00088] 70. Способ по п. 69, в котором указанный флуорофор второго агента имеет пик испускания флуоресценции от приблизительно 560 нм до приблизительно 600 нм.

[00089] 71. Способ по п. 70, в котором указанный флуорофор второго агента представляет собой фикоэритрин.

[00090] 72. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап приведения композиции бесклеточной ДНК в контакт происходит в реакционном объеме, который составляет менее 50 мкл.

[00091] 73. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап приведения композиции бесклеточной ДНК в контакт происходит в реакционном объеме, который составляет менее 40 мкл.

[00092] 74. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап приведения композиции бесклеточной ДНК в контакт происходит в реакционном объеме, который составляет менее 30 мкл.

[00093] 75. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный этап приведения композиции бесклеточной ДНК в контакт происходит в реакционном объеме, который составляет менее 20 мкл.

[00094] 76. Набор, который можно применять для детектирования изменения числа копий у плода, содержащий:

устройство захвата, имеющее множество фрагментов нуклеиновой кислоты, соответствующих по меньшей мере одной целевой хромосомной области, присоединенных к нему;

множество молекулярных зондов, способных гибридизоваться со смешанной популяцией нуклеиновой кислоты, которая содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию, причем каждая из указанных основной и второстепенной субпопуляций содержит целевую последовательность, расположенную в первой хромосомной области и содержащую полиморфный сайт, при этом указанный полиморфный сайт может содержать комбинации первого нуклеотидного варианта и второго нуклеотидного варианта; и

инструкции по генотипированию и детектированию указанного полиморфного сайта.

[00095] 77. Набор по п. 74, в котором указанное устройство захвата представляет собой микрочип.

[00096] 78. Набор по п. 74 или 75, в котором указанная целевая хромосомная область находится на одной или более из хромосом 1, 5, 13, 18, 21, X и Y.

[00097] 79. Набор по любому из пп. 74-76, в котором молекулярные зонды сконструированы для генотипирования однонуклеотидного полиморфизма на одной или более из хромосом 1, 5, 13, 18, 21, X и Y.

[00098] 80. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная фетальная ДНК составляет приблизительно 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[00099] 81. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000100] 82. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная фетальная ДНК составляет более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000101] 83. Способ детектирования числа копий у плода, включающий: получение биологического образца от субъекта, который представляет собой беременную женщину, причем указанный биологический образец содержит нуклеиновую кислоту как материнского, так и фетального происхождения, содержащую целевую последовательность нуклеиновой кислоты, расположенную на первой хромосоме, при этом указанная целевая последовательность нуклеиновой кислоты содержит полиморфный сайт для однонуклеотидного полиморфизма (SNP); получение популяции фрагментов нуклеиновой кислоты, содержащих или происходящих из целевой последовательности нуклеиновой кислоты; проведение первого анализа, включающего (a) приведение указанной популяции фрагментов нуклеиновой кислоты в контакт с олигонуклеотидным чипом, содержащим первый олигонуклеотидный зонд, сконфигурированный для гибридизации с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей полиморфный сайт SNP; и (b) детектирование, с применением детектора, первых сигналов, указывающих на гибридизацию олигонуклеотидного зонда с одним или более фрагментами нуклеиновой кислоты популяции, содержащей первый аллельный вариант («аллель А») SNP, и вторых сигналов, указывающих на гибридизацию олигонуклеотидного зонда с одним или более фрагментами нуклеиновой кислоты популяции, содержащей второй аллельный вариант («аллель В») SNP; и определение с использованием указанных первых сигналов и вторых сигналов любого одного или более из следующего: (i) числа копий первой хромосомы у плода; (ii) фетального генотипа в отношении SNP; (iii) материнского генотипа в отношении SNP; и (iv) фетальной фракции указанного образца.

[000102] 84. Способ по п. 83, также включающий вычисление наблюдаемой частоты аллеля В (BAF) для аллельных вариантов SNP, присутствующих в образце.

[000103] 85. Способ по п. 84, также включающий вычисление фетальной фракции в образце с применением указанного BAF.

[000104] 86. Способ по п. 84, в котором указанный полиморфный сайт SNP может быть гомозиготным по аллелю А («АА»), гомозиготным по аллелю В («ВВ») или гетерозиготным («АВ»).

[000105] 87. Способ по любому из пп. 83-86, в котором указанный детектор имеет первый и второй каналы детектирования, и указанное генотипирование дополнительно включает детектирование первых сигналов в указанном первом канале и вторых сигналов в указанном втором канале.

[000106] 88. Способ по п. 87, в котором указанные первые сигналы в первом канале отражают количество аллеля А, присутствующего в популяции нуклеиновой кислоты, а указанные вторые сигналы отражают количество аллеля В, присутствующего в популяции нуклеиновой кислоты.

[000107] 89. Способ по п. 88, в котором определение числа копий первой хромосомы у плода включает определение отношения первого значения ко второму значению.

[000108] 90. Способ по п. 86, также включающий определение первого материнского генотипа SNP.

[000109] 91. Способ по п. 83, в котором указанный образец нуклеиновой кислоты содержит материнскую кровь, плазму или сыворотку, а указанная нуклеиновая кислота как материнского, так и фетального происхождения содержит бесклеточную ДНК (бкДНК).

[000110] 92. Способ по п. 83, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 20% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000111] 93. Способ по п. 83, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 15% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000112] 94. Способ по п. 83, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 10% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000113] 95. Способ по п. 83, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 5% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000114] 96. Способ по п. 83, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 15% и не менее 1% от общей бесклеточной ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000115] 97. Способ по п. 83, в котором указанная фетальная ДНК составляет приблизительно 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000116] 98. Способ по п. 83, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000117] 99. Способ по п. 83, в котором указанная фетальная ДНК составляет более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000118] 100. Способ по п. 89, также включающий вычисление указанного первого значения путем нормирования и суммирования указанных первых сигналов, чтобы получить нормированное и суммированное значение первого сигнала, нормирования указанных вторых сигналов, чтобы получить нормированное и суммированное значение

второго сигнала, и сложение нормированного и суммированного значения первого сигнала с нормированным и суммированным значением второго сигнала с получением первого значения.

[000119] 101. Способ по п. 100, в котором указанное второе значение получают путем: проведения первого анализа на дополнительных биологических образцах, которые применяют в качестве эталонных образцов, и идентификации эталонных образцов, имеющих генотип SNP, соответствующий первому материнскому генотипу SNP; в результате проведения указанного первого анализа на эталонных образцах получение эталонных сигналов первых сигналов, детектированных в первом канале, отражающих количество аллеля А, присутствующего в полиморфном сайте SNP, относительно дополнительных биологических образцов, и получение вторых эталонных сигналов, отражающих количество аллеля В, присутствующего в полиморфном сайте.

[000120] 102. Способ по п. 101, в котором указанные дополнительные биологические образцы получены от небеременных индивидуумов.

[000121] 103. Способ по п. 101, в котором указанные дополнительные биологические образцы включают несколько образцов от беременных женщин и несколько образцов от небеременных индивидуумов.

[000122] 104. Способ по п. 101, в котором указанные дополнительные биологические образцы включают образцы от беременных женщин, которые анализируют на том же олигонуклеотидном чипе, как и биологический образец от беременной женщины-субъекта.

[000123] 105. Способ анализа образца смешанной нуклеиновой кислоты, полученного из организма, включающий: получение или извлечение из организма образца нуклеиновой кислоты, содержащего смешанную популяцию нуклеиновой кислоты, которая содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию, причем каждая из указанных основной и второстепенной субпопуляций содержит целевую последовательность, расположенную в первой хромосомной области и содержащую полиморфный сайт, при этом указанный полиморфный сайт может содержать любую комбинацию первого нуклеотидного варианта и второго нуклеотидного варианта; и генотипирование указанного полиморфного сайта, при этом указанное генотипирование включает:

(а) гибридизацию по меньшей мере одного фрагмента нуклеиновой кислоты, происходящего из указанной смешанной популяции нуклеиновой кислоты и содержащего указанный полиморфный сайт, с олигонуклеотидным зондом из олигонуклеотидного чипа; и

(b) детектирование с олигонуклеотидного чипа, с применением детектора, первого сигнала, указывающего на наличие или отсутствие первого нуклеотидного варианта («сигнал А»), и второго сигнала, указывающего на наличие или отсутствие второго нуклеотидного варианта («сигнал В»).

[000124] 106. Способ по п. 105, дополнительно включающий определение числа копий первой хромосомной области в указанной второстепенной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

[000125] 107. Способ по п. 105, дополнительно включающий определение числа копий первой хромосомной области в указанной основной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

[000126] 108. Способ по п. 105, дополнительно включающий определение генотипа полиморфного сайта для указанной второстепенной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

[000127] 109. Способ по п. 105, дополнительно включающий определение генотипа полиморфного сайта для указанной основной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

[000128] 110. Способ по п. 105, дополнительно включающий определение относительных количеств указанной основной субпопуляции и указанной второстепенной субпопуляции в смешанной популяции нуклеиновой кислоты с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

[000129] 111. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная основная субпопуляция и указанная второстепенная субпопуляция происходят из разных источников в организме.

[000130] 112. Способ по п. 105, в котором указанный детектор включает первый канал детектирования и второй канал детектирования и дополнительно включает этапы детектирования первого сигнала в указанном первом канале детектирования и второго сигнала в указанном втором канале детектирования.

[000131] 113. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит бесклеточную ДНК.

[000132] 114. Способ по п. 111, в котором указанная бесклеточная ДНК получена или происходит из крови, плазмы, сыворотки, мочи, кала или слюны организма.

[000133] 115. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный организм содержит опухоль, указанная основная субпопуляция содержит или происходит из здоровой ткани, а указанная второстепенная субпопуляция содержит или происходит из опухоли.

[000134] 116. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный организм представляет собой беременную женщину, указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты представляет собой бесклеточную нуклеиновую кислоту, полученную из крови женщины, указанная основная субпопуляция представляет собой материнскую нуклеиновую кислоту, а указанная второстепенная субпопуляция содержит или происходит из фетальной нуклеиновой кислоты.

[000135] 117. Способ по п. 116, в котором указанная второстепенная субпопуляция содержит фетальную ДНК, присутствующую не более чем в 40% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000136] 118. Способ по п. 116, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 25% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000137] 119. Способ по п. 116, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 15% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000138] 120. Способ по п. 116, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 5% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000139] 121. Способ по п. 116, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 15% и не менее 1% от общей бесклеточной ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000140] 122. Способ по п. 116, в котором указанная фетальная ДНК составляет приблизительно 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000141] 123. Способ по п. 116, в котором указанная фетальная ДНК составляет не более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000142] 124. Способ по п. 116, в котором указанная фетальная ДНК составляет более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

[000143] 125. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит или происходит из бесклеточной ДНК, присутствующей в крови организма в концентрации не более 5 нг/мл и не менее 0,1 нг/мл.

[000144] 126. Способ по п. 105, в котором используемое количество смешанной популяции нуклеиновой кислоты составляет не более 50 нг, 40 нг, 30 нг, 15 нг, 10 нг, 5 нг, 3 нг или 1 нг.

[000145] 127. Способ по п. 105 или 116, в котором указанный полиморфный сайт содержит биаллельный SNP, указанный первый нуклеотидный вариант представляет собой первый аллельный вариант SNP («аллель А»), а указанный второй нуклеотидный вариант представляет собой второй аллельный вариант SNP («аллель В»).

[000146] 128. Способ по п. 127, в котором указанный биаллельный SNP может содержать один или оба из первого аллельного варианта («аллель А») или второго аллельного варианта («аллель В»), и при этом генотип указанного SNP может быть гомозиготным по аллелю А («АА»), гомозиготным по аллелю В («ВВ») или гетерозиготным («АВ»).

[000147] 129. Способ по п. 127, дополнительно включающий вычисление наблюдаемой частоты аллеля В (BAF) для указанного SNP в образце нуклеиновой кислоты.

[000148] 130. Способ по п. 129, дополнительно включающий вычисление фетальной фракции в образце с применением указанного BAF.

[000149] 131. Способ по п. 105 или 116, в котором указанный первый сигнал отражает количество аллеля А, присутствующего в полиморфном сайте, а указанный второй сигнал отражает количество аллеля В, присутствующего в полиморфном сайте.

[000150] 132. Способ по п. 105, 116 или 131, в котором указанный организм представляет собой беременную женщину, и при этом указанный способ дополнительно

включает определение числа копий первой хромосомной области у плода путем определения отношения первого значения ко второму значению.

[000151] 133. Способ по п. 132, также включающий вычисление указанного первого значения путем сложения первого сигнала или его нормированного значения и указанного второго сигнала или его нормированного значения.

[000152] 134. Способ по п. 133, также включающий определение первого материнского генотипа SNP с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

[000153] 135. Способ, включающий выполнение способа по п. 134 с применением одного или более дополнительных биологических образцов от беременных женщин и идентификацию подгруппы дополнительных биологических образцов, имеющих генотип SNP, соответствующий первому материнскому генотипу SNP, а также получение второго значения путем получения сумм сигнала А и сигнала В от каждого дополнительного образца в подгруппе дополнительных биологических образцов и получения среднего указанных сумм в качестве второго значения.

[000154] 136. Способ по п. 105, 115 или 116, в котором указанный полиморфный сайт содержит мутацию нуклеотида, указанный первый нуклеотидный вариант представляет собой мутированный вариант целевой последовательности нуклеиновой кислоты, а указанный второй нуклеотидный вариант представляет собой вариант дикого типа полиморфного сайта, указанный сигнал А отражает количество мутированного варианта, а указанный сигнал В отражает количество варианта дикого типа в образце.

[000155] 137. Система для применения при детектировании изменения числа копий в образце нуклеиновой кислоты, содержащая: зондовый микрочип; сканер; процессор; и память, в которой закодированы инструкции для осуществления обработки, упомянутой в любом из пп. 83-136 выше.

[000156] 138. Компьютерный программный продукт на постоянном машиночитаемом носителе, на котором хранятся инструкции для осуществления обработки, упомянутой в любом из пп. 83-137 выше.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[000157] Фиг. 1 представляет собой схематическое изображение способа анализа образца смешанной нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, на котором показано, что образец смешанной нуклеиновой кислоты разделяют на канал А/Т и канал Ц/Г, а затем через несколько этапов повторно объединяют для этапов гибридизации и окрашивания.

[000158] Фиг. 2 представляет собой схематическое изображение инвертируемого молекулярного зонда (МІР), применяемого в способе в соответствии с настоящим изобретением.

[000159] Фиг. 3 представляет собой схематическое изображение способа на основе МІР, на котором показано, слева направо, связывание МІР с нуклеиновой кислотой над положением SNP, причем пропуск над положением SNP заполнен и лигирован с

образованием кольцевого МР, обработка образца нуклеиновой кислоты экзонуклеазой, расщепление кольцевого МР, амплификация части расщепленного МР и ферментативное расщепление амплифицированного продукта.

[000160] Фиг. 4 представляет собой схематическое изображение гибридизации и окрашивания амплифицированного продукта, показанного на Фиг. 3, с применением олигонуклеотидного чипа, на котором показан амплифицированный продукт, гибридизованный с зондом на олигонуклеотидном чипе, и на котором дополнительно показано детектирование гибридизованного продукта с помощью как первого, так и второго красителя.

[000161] Фиг. 5 иллюстрирует систему обработки образцов в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения.

[000162] Фиг. 6 иллюстрирует высокоуровневую блок-схему процессора эталонного образца, реализованного с помощью системы согласно Фиг. 5 в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения.

[000163] Фиг. 7 иллюстрирует высокоуровневую блок-схему процессора испытываемого образца, реализованного с помощью системы согласно Фиг. 5 в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения.

[000164] Фиг. 8 иллюстрирует способ обработки эталонного образца в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения.

[000165] Фиг. 9 иллюстрирует способ обработки испытываемого образца в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения.

[000166] Фиг. 10 иллюстрирует примерную компьютерную систему, конфигурируемую с помощью компьютерного программного продукта, для осуществления вариантов реализации настоящего изобретения.

[000167] Несмотря на то, что настоящее изобретение описано со ссылкой на вышеупомянутые чертежи, чертежи предназначены для иллюстрации, и другие варианты реализации соответствуют сущности, а также находятся в пределах объема, настоящего изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[000168] Настоящее изобретение имеет много предпочтительных вариантов реализации и опирается на много патентов, заявок и других ссылок, в которых представлена подробная информация, известная специалистам в данной области техники. Таким образом, если патент, заявка или другая ссылка указаны или повторяются ниже, следует понимать, что они полностью включены посредством ссылки для всех целей, а также для упомянутого утверждения.

[000169] В тексте настоящего раскрытия различные аспекты настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона приведено только для удобства и краткости и не должно рассматриваться как негибкое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, описание диапазона следует рассматривать как конкретное раскрытие

всех возможных поддиапазонов, а также отдельных числовых значений в пределах этого диапазона. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует рассматривать как конкретное раскрытие поддиапазонов, таких как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельных чисел в пределах этого диапазона, например, 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это применимо независимо от ширины диапазона.

[000170] При реализации настоящего изобретения может применяться, если не указано иное, обычные методики и описания органической химии, технологии полимеров, молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие обычные методики включают матричный синтез полимеров, гибридизацию, лигирование и детектирование гибридизации с применением метки. Конкретные иллюстрации подходящих методик можно получить со ссылкой на приведенный ниже пример. Однако, безусловно, также можно применять другие эквивалентные обычные процедуры. Такие обычные методики и описания можно найти в стандартных лабораторных руководствах, таких как *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV)*, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, *Cells: A Laboratory Manual*, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, и *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (все Cold Spring Harbor Laboratory Press), Stryer, L. (1995) *Biochemistry* (4 изд.) Freeman, New York, Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A *Practical Approach*" 1984, IRL Press, London, Nelson and Cox (2000), Lehninger, *Principles of Biochemistry* 3 изд., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y. и Berg et al. (2002) *Biochemistry*, 5 изд., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y., которые все полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки для любых целей.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[000171] В настоящей заявке формы единственного числа (соотв. «a», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке) включают ссылки на множественное число объектов, если контекст явно не предписывает иное. Например, термин «агент» включает множество агентов, включая их смеси.

[000172] Все ссылки, упомянутые в настоящей заявке, полностью включены в настоящую заявку для всех их целей. В тех случаях, когда любая ссылка включает определение или термин формулы изобретения используется в ней способом, несовместимым с определениями и раскрытием, изложенными в настоящей заявке, приоритет имеют определения и раскрытие настоящей заявки.

[000173] В настоящей заявке термин «аллель» относится к одной конкретной форме последовательности нуклеиновой кислоты (такой как ген) внутри клетки, индивидуума или в пределах популяции, причем эта конкретная форма отличается от других форм этого же гена по последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере одного, а часто более чем одного, вариантного сайта в пределах последовательности гена. Последовательности в этих вариантных сайтах, которые различаются между разными аллелями, называют «вариансами», «полиморфизмами» или «мутациями». Варианты в последовательности могут возникать в результате SNP, комбинаций SNP,

гаплотипических профилей метилирования, вставок, делеций и тому подобного. Аллель может содержать вариантную форму одного нуклеотида, вариантную форму непрерывной последовательности нуклеотидов из представляющей интерес области на хромосоме или вариантную форму множества отдельных нуклеотидов (которые не обязательно все являются смежными) из представляющей интерес хромосомной области. В каждом аутосомном конкретном хромосомном положении или «локусе» индивидуум имеет два аллеля, один из которых унаследован от одного из родителей, а другой унаследован от другого, например, один от матери и один от отца. Индивидуум является «гетерозиготным» в локусе, если он имеет два разных аллеля в этом локусе. Индивидуум является «гомозиготным» в локусе, если он имеет два идентичных аллеля в этом локусе.

[000174] В настоящей заявке термин «чип» или «микрочип» содержит подложку, предпочтительно твердую, с зондами нуклеиновых кислот, присоединенными к подложке. Предпочтительные чипы, как правило, содержат множество разных зондов нуклеиновых кислот, которые связаны с поверхностью субстрата в разных известных местах. Эти чипы, также описанные как «микрочипы» или, проще говоря, «чипы», в целом описаны в данной области техники, например, в патентах США №№ 5143854, 5445934, 5744305, 5677195, 5800992, 6040193, 5424186 и Fodor et al., Science, 251:767-777 (1991). Каждый из которых полностью включен посредством ссылки для всех целей. Зонды могут иметь любой размер или последовательность и могут содержать синтетические нуклеиновые кислоты, а также их аналоги или производные, или модификации, при условии, что полученный чип способен гибридизоваться в любых подходящих условиях с образцом нуклеиновой кислоты с достаточной специфичностью, чтобы позволить установить различие между разными целевыми последовательностями нуклеиновых кислот образца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения зонды чипа имеют по меньшей мере 5, 10 или 20 нуклеотидов в длину. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения зонды имеют не более 25, 30, 50, 75, 100, 150, 200 или 500 нуклеотидов в длину. Например, зонды могут иметь от 10 до 100 нуклеотидов в длину.

[000175] Чипы обычно могут быть получены с применением различных методик, таких как способы механического синтеза или способы контролируемого светом синтеза, которые включают комбинацию фотолитографических способов и способов твердофазного синтеза. Методики синтеза этих чипов с применением способов механического синтеза описаны, например, в патентах США №№ 5384261 и 6040193, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей. Несмотря на то, что плоская поверхность чипа является предпочтительной, чип может быть изготовлен на поверхности практически любой формы или даже на множестве поверхностей. Чипы могут представлять собой нуклеиновые кислоты на трехмерных матриксах, гранулах, гелях, полимерных поверхностях, волокнах, таких как оптические волокна, стекле или любой другой подходящей подложке. (См. патенты США №№ 5770358, 5789162, 5708153, 6040193 и 5800992, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей.)

[000176] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения чипы, которые можно применять в способах и системах, описанных в настоящей заявке, включают коммерчески доступные от Thermo Fisher Scientific (ранее Affymetrix) под торговой маркой GeneChip[®] и предназначены для различных целей, включая генотипирование и мониторинг экспрессии генов для ряда эукариотических и прокариотических видов. Способы получения образца для гибридизации с чипом и условия для гибридизации раскрыты в руководствах, поставляемых с чипами, например, тех, которые поставляются производителем в сочетании с продуктами, такими как аналитический набор OncoScan[®] FFPE, и связанными продуктами.

[000177] В настоящей заявке термин «бесклеточная нуклеиновая кислота» означает молекулы нуклеиновой кислоты, присутствующие в теле организма, но не содержащиеся внутри каких-либо интактных клеток. Бесклеточная нуклеиновая кислота может включать ДНК («бесклеточная ДНК») или РНК («бесклеточная РНК») или их производные или аналоги. Бесклеточная нуклеиновая кислота может быть получена из крови, плазмы, слюны или мочи. Бесклеточная ДНК или РНК может включать циркулирующую бесклеточную ДНК или РНК, то есть бесклеточную ДНК или РНК, обнаруженную в плазменной фракции крови.

[000178] Следует понимать, что многочисленные способы и наборы известны специалисту в данной области техники для получения бесклеточной ДНК из образца, такого как плазма крови, сыворотка, моча, кал или слюна человека.

[000179] В настоящей заявке термин «геном» определяет или обозначает полный однокопийный набор генетических инструкций для организма, закодированных в ДНК организма. Геном может быть многохромосомным так, что ДНК распределена в клетке среди множества отдельных хромосом. Например, человек имеет 22 пары хромосом плюс связанная с полом пара XX или XY.

[000180] В настоящей заявке термин «генотипирование» относится к определению информации о последовательности нуклеиновой кислоты из образца нуклеиновой кислоты в одном или более положениях нуклеотидов. Образец нуклеиновой кислоты может содержать или может происходить из любого подходящего источника, включая геном или транскриптом. Согласно некоторым вариантам реализации генотипирование может включать определение того, какой аллель или аллели индивидуум несет в одном или более полиморфных сайтах. Например, генотипирование может включать определение того, какой аллель или аллели индивидуум несет для одного или более SNP в пределах группы полиморфных сайтов. Например, конкретный нуклеотид в геноме может представлять собой А у некоторых индивидуумов и Ц у других индивидуумов. Те индивидуумы, которые имеют А в данном положении, имеют аллель А, а те, кто имеет Ц, имеют аллель В. В диплоидном организме индивидуум будет иметь две копии последовательности, содержащей полиморфное положение, поэтому индивидуум может иметь аллель А и аллель В или, альтернативно, две копии аллеля А или две копии аллеля В. Те индивидуумы, которые имеют две копии аллеля В, являются гомозиготными по

аллелю В, те индивидуумы, которые имеют две копии аллеля А, являются гомозиготными по аллелю В, а те индивидуумы, которые имеют одну копию каждого аллеля, являются гетерозиготными. Чип может быть сконструирован для того чтобы установить различие между каждым из этих трех возможных результатов. Полиморфное положение может иметь два или более возможных аллелей, и чип может быть сконструирован, чтобы установить различие между всеми возможными комбинациями. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генотипирование включает детектирование мутации одного нуклеотида, которая возникает спонтанно в геноме, на фоне нуклеиновой кислоты дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения генотипирование включает определение фетальной группы крови из образца материнской крови. Необязательно генотипирование включает детектирование наличия опухоли в крови человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более полинуклеотидов (или часть или части полинуклеотида, продукты его амплификации или его комплементарные партнеры), которые содержат представляющую интерес последовательность (например, один (одну) или более SNP или мутаций), могут быть обработаны с помощью других методик, таких как секвенирование. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотиды могут быть секвенированы для генотипирования или определения наличия или отсутствия полиморфизма или мутации. Секвенирование может быть выполнено с помощью различных способов, доступных в данной области техники, например, способа секвенирования по Сэнгеру, который может быть выполнен, например, с помощью SeqStudio[®] Genetic Analyzer от Applied Biosystems, или метода секвенирования следующего поколения (NGS), например, Ion Torrent NGS от Thermo Fisher или NGS от Illumina.

[000181] Термин «хромосома» относится к носителю гена, несущего наследственные признаки, живой клетки, который происходит из хроматина и который содержит ДНК и белковые компоненты (в частности, гистоны). В настоящей заявке применяется обычная международно-признанная система нумерации отдельных хромосом генома человека. Размер отдельной хромосомы может варьироваться между разными типами конкретного многохромосомного генома и между разными геномами. В случае человеческого генома масса всей ДНК конкретной хромосомы обычно превышает 100000000 п.о. Например, размер всего человеческого генома составляет приблизительно 3×10^9 п.о. Самая большая хромосома, хромосома № 1, содержит приблизительно $2,4 \times 10^8$ п.о., в то время как самая маленькая хромосома, хромосома № 22, содержит приблизительно $5,3 \times 10^7$ п.о. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения хромосомы, представляющие интерес в сочетании со способами и системами согласно настоящему изобретению, включают те хромосомы, которые ассоциированы с хромосомным отклонением, такие как хромосомы 13, 18, 21, X и Y. Также следует понимать, что другие хромосомы, не ассоциированные с конкретным хромосомным отклонением, таким как анеуплоидия, могут представлять интерес в сочетании со

способами и системами согласно настоящему изобретению в качестве эталонных хромосом. Следует понимать, что эталонная хромосома может представлять собой любую из хромосом в геноме, которые не ассоциированы с конкретным хромосомным отклонением, таким как анеуплоидия, например, хромосомы 1 и 5.

[000182] В настоящей заявке термин «хромосомная область» означает часть хромосомы. Фактический физический размер или протяженность любой отдельной хромосомной области может сильно варьироваться. Термин «область» не обязательно является определяющим для конкретного одного или более генов, поскольку область не должна конкретно учитывать определенные кодирующие сегменты (экзоны) отдельного гена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения хромосомная область будет содержать по меньшей мере один полиморфный сайт.

[000183] В настоящей заявке термин «хромосомные отклонения» или «хромосомное отклонение» может включать любое генетическое отклонение, включая, но не ограничиваясь этим, анеуплоидию, такую как трисомия по 21 (также известная как синдром Дауна); трисомия по 18 (также известная как синдром Эдвардса); трисомия по 13 (также известная как синдром Патау); XXУ (также известно как синдром Клайнфельтера); моносомия по 18; X (также известно как синдром Тернера); XYУ (также известно как синдром Джейкобса) или XXX (также известно как трисомия по X); трисомия, ассоциированная с повышенной вероятностью выкидыша (например, трисомия по 15, 16 или 22); и тому подобное, а также другие генетические вариации, такие как мутации, вставки, добавления, делеции, транслокация, точечная мутация, нарушения, связанные с тринуклеотидными повторами, и/или SNP. Несмотря на то, что в настоящем изобретении описаны определенные примеры и варианты реализации, относящиеся к детектированию хромосомных отклонений у плода, следует понимать, что способы и систему, описанные в настоящей заявке, можно применять для детектирования хромосомных отклонений при других патологических состояниях, таких как рак.

[000184] В настоящей заявке «материнский образец» может представлять собой любой образец, полученный от беременного млекопитающего, который содержит как фетальную, так и материнскую бесклеточную ДНК. Предпочтительно материнские образцы для применения в сочетании с настоящим изобретением получены с помощью относительно неинвазивных средств, например, флеботомии, сбора слюны или мочи, или с помощью других стандартных методик извлечения периферических образцов у субъекта.

[000185] В настоящей заявке термин «нуклеотид» относится к комбинации основание-сахар-фосфат. Нуклеотиды представляют собой мономерные звенья последовательности нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК). Термин нуклеотид включает рибонуклеозидтрифосфаты АТФ, УТФ, ЦТФ, ГТФ и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дНТФ), такие как дАТФ, дЦТФ, дИТФ, дУТФ, дГТФ, дТТФ или их производные. Такие производные включают, например, [α S]дАТФ, 7-деаза-дГТФ и 7-деаза-дАТФ, а также производные нуклеотидов, которые придают молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей

их, устойчивость к действию нуклеаз. В настоящей заявке термин нуклеотид также относится к дидезоксирибонуклеозидтрифосфатам (ддНТФ) и их производным. Проиллюстрированные примеры дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов включают, но не ограничиваются ими, ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ, ддИТФ и ддТТФ.

[000186] В настоящей заявке термин «полиморфизм» относится к появлению двух или более генетически определенных альтернативных последовательностей в популяции. Альтернативные последовательности могут включать аллели (например, природные варианты) или спонтанно возникающие мутации, которые встречаются только в одном или нескольких отдельных организмах. «Полиморфный сайт» может относиться к положению (ям) нуклеиновой кислоты, в котором (ых) возникает различие по последовательности нуклеиновой кислоты. Полиморфизм может содержать одну или более замен оснований, инсерцию, повтор или делецию. Размер полиморфного локуса может составлять всего одну пару оснований. Полиморфные сайты включают полиморфизмы длины рестрикционных фрагментов, переменные тандемные повторы (VNTR), гиперпеременные участки, минисателлиты, динуклеотидные повторы, тринуклеотидные повторы, тетрануклеотидные повторы, простые повторы последовательности и инсерционные элементы. Первую идентифицированную вариантную или аллельную форму произвольно называют эталонной формой, а другие вариантные или аллельные формы называют альтернативными или вариантными, или мутантными аллелями. Вариантную или аллельную форму, наиболее часто встречающуюся в выбранной популяции нуклеиновой кислоты, иногда называют формой дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения форма дикого типа может называться «основной субпопуляцией», а мутант может называться «второстепенной субпопуляцией». Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения наиболее часто встречающийся аллель может называться «основной субпопуляцией», а более редкий или менее часто встречающийся аллель может называться «второстепенной субпопуляцией». Диплоидные организмы могут быть гомозиготными или гетерозиготными по аллельным формам. Диаллельный полиморфизм имеет две формы. Триаллельный полиморфизм имеет три формы. Полиморфизм между двумя нуклеиновыми кислотами может возникать естественным образом или может быть вызван воздействием или контактом с химическими веществами, ферментами или другими агентами или воздействием агентов, которые вызывают повреждение нуклеиновых кислот, например, ультрафиолетового излучения, мутагенов или канцерогенов. SNP представляют собой положения, в которых два альтернативных основания встречаются в человеческой популяции с наблюдаемой частотой (>1%), и являются наиболее распространенным типом генетической изменчивости человека.

[000187] В настоящей заявке «образец, полученный из организма» включает, но не ограничивается ими, любое количество тканей или жидкостей, таких как кровь, моча, сыворотка, плазма, лимфа, слюна, кал и вагинальные выделения, практически любого организма. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения образец,

полученный из организма, может представлять собой образец млекопитающего. Также согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения образец, полученный из организма, может представлять собой образец человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения образец, полученный из организма, может представлять собой материнский образец.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

[000188] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы, описанные в настоящем изобретении, включают этап генотипирования. Генотипирование может включать определение последовательности по меньшей мере одного нуклеотида в пределах целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап генотипирования включает анализ смешанной популяции нуклеиновой кислоты, которая содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию, причем каждая из основной и второстепенной субпопуляций содержит целевую последовательность, расположенную в первой хромосомной области и содержащую полиморфный сайт. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы, описанные в настоящей заявке, применяют для генотипирования основной субпопуляции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы, описанные в настоящей заявке, применяют для генотипирования второстепенной субпопуляции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы, описанные в настоящей заявке, применяют для генотипирования как основной субпопуляции, так и второстепенной субпопуляции.

[000189] Следует понимать, что генотипирование можно осуществлять любым способом, который можно применять для идентификации полиморфных сайтов в целевой последовательности образца нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы генотипирования, которые можно применять в сочетании с настоящим изобретением, включают способы, которые можно применять для детектирования SNP. Платформы для детектирования SNP хорошо известны в данной области техники. Подходящие способы генотипирования включают варианты удлинения на один нуклеотид, применение аллель-специфичных зондов, установление различий между аллелями на основе лигирования и тому подобное.

[000190] Применительно к анализам на основе чипа доступно множество способов генотипирования. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения поверхность чипа разделена на функциональные элементы, каждый функциональный элемент содержит множество сайтов, которые содержат копии по существу идентичных олигонуклеотидов, сконфигурированных для связывания с конкретной целевой последовательностью нуклеиновой кислоты. Гибридизацию молекул нуклеиновых кислот с различными положениями на чипе можно детектировать и определять количественно. Одним подходящим способом является применение любого чипа, содержащего аллель-специфичные зонды, которые селективно связываются только с определенными аллелями,

а не с другими. В других вариантах реализации чип содержит зонды, которые неселективно связываются со всеми различными формами аллеля, но затем их удлиняют или иным образом модифицируют аллель-специфичным образом для получения аллель-специфичного продукта. Например, зонд чипа может быть удлинен с помощью зависимой от матрицы полимеризации нуклеотидов. Согласно другому варианту зонд может быть удлинен с помощью зависимого от последовательности лигирования олигонуклеотида-метки, который может содержать испускающую сигнал группу. Тем не менее, аллель-специфичные продукты (например, продукты аллель-специфичного удлинения нуклеотидов или продукты лигирования) могут быть получены вне чипа, а затем гибридизованы с чипом, содержащим зонды, которые позволяют установить различие между разными продуктами удлинения. Сигналы, испускаемые с чипа, указывающие на гибридизацию молекул нуклеиновой кислоты с конкретными зондами чипа, можно детектировать и определять количественно. Примеры продуктов для генотипирования на основе чипов включают чипы Axiom[®] Affymetrix и чипы OncoScan Affymetrix (Thermo Fisher Scientific), а также чипы BeadChip[®] и Infinium[®] от Illumina. Подходящие способы генотипирования на основе чипов описаны, например, в работах Hoffman et al, *Genomics* 98(2):79-89 (2011) и Shen et al., *Mutation Research* 573:70-82 (2005), обе из которых полностью включены в настоящую заявку.

[000191] Один способ, который можно применять для генотипирования разных типов изменчивости в последовательности нуклеиновой кислоты (в том числе путем применения микрочипов), представляет собой анализ с применением инвертируемого молекулярного зонда (МІР). См., например, патент США № 6858412, полностью включенный в настоящую заявку посредством ссылки, относящийся к реализации анализа на основе МІР в целом.

[000192] В общем случае МІР-зонды содержат по меньшей мере 5'-целевую последовательность, 3'-целевую последовательность, сайт 5'-праймера и/или сайт 3'-праймера, последовательность метки и один или более сайтов расщепления. В одном примерном варианте реализации МІР-зонды, которые можно применять в сочетании с настоящим изобретением, могут быть представлены, как показано на Фиг. 2. МІР-зонд согласно Фиг. 2 содержит геномную гомологию 1 и геномную гомологию 2, которые соответствуют целевой последовательности на хромосомной области, которая представляет собой известный локус SNP. Геномная гомология 1 и геномная гомология 2 сконструированы так, чтобы иметь однонуклеотидный пропуск в зонде после гибридизации зонда с фрагментом нуклеиновой кислоты (например, фрагментом бесклеточной ДНК). В дополнение к геномной гомологии 1 и геномной гомологии 2 МІР-зонды, применяемые в сочетании с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения, включают первый сайт связывания праймера и второй сайт связывания праймера, последовательность метки и два сайта расщепления.

[000193] Следует понимать, что пулы МІР-зондов могут быть применены к способам и системам, описанным в настоящей заявке, для мультиплексного

детектирования SNP в образце смешанной нуклеиновой кислоты. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пул МIP-зондов можно получить на основании коммерчески доступных наборов МIP-зондов, применяемых в сочетании с продуктом OncoScan[®], доступным от Thermo Fisher Scientific. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения на основании продукта OncoScan[®] можно получить пул из приблизительно 48000 МIP-зондов, соответствующих локусам SNP в хромосомах 13, 18, 21, X и Y. Кроме того, следует понимать, что дополнительные пулы МIP-зондов, такие как те, которые соответствуют локусам SNP на хромосомах 1 и 5, могут быть получены на основании продукта OncoScan[®] для применения в качестве эталонных зондов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% МIP в пуле МIP-зондов связываются с фрагментами ДНК из хромосом 1, 5, 13, 18, 21, X и Y.

[000194] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пул МIP-зондов содержит по меньшей мере 1000 МIP, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 10000 или по меньшей мере 20000 МIP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пул МIP-зондов содержит менее 200000, менее 100000 или менее 80000 МIP.

[000195] Примерный способ анализа на основе МIP, который можно применять в сочетании с настоящим изобретением, показан на Фиг. 3. В общих чертах, МIP-зонд может быть гибридизован с целевой последовательностью, расположенной в первой хромосомной области, содержащей полиморфный сайт, на этапе ренатурации. Этап ренатурации можно осуществлять в соответствии с любым способом, общеизвестным в данной области техники, в частности, в соответствии с инструкциями производителя для коммерчески доступного набора МIP-зондов. Этап ренатурации обеспечивает множество комплексов линейного инвертируемого молекулярного зонда и фрагмента ДНК так, что последовательности геномной гомологии 1 и геномной гомологии 2 гибридизуются с хромосомной областью, содержащей полиморфный сайт, с однонуклеотидным пропуском между концами гибридизованного зонда.

[000196] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения общее количество фрагментов ДНК или смешанной популяции нуклеиновой кислоты составляет менее 50 нг, менее 40 нг, менее 30 нг, менее 20 нг, менее 15 нг или менее 10 нг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение общего числа МIP к общему числу копий фрагмента ДНК составляет по меньшей мере приблизительно 15000:1 или по меньшей мере приблизительно 30000:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение общего числа МIP к общему числу копий фрагмента ДНК составляет менее 100000:1 или менее 60000:1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение общего числа МIP к общему числу копий фрагмента ДНК составляет приблизительно 40000:1.

[000197] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап ренатурации выполняют в реакционном объеме, который составляет менее 50 мкл, менее 40 мкл, менее 30 мкл, менее 20 мкл или менее 15 мкл. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения реакционный объем составляет по меньшей мере 5 мкл или по меньшей мере 10 мкл.

[000198] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит или происходит из бесклеточной ДНК, присутствующей в крови, сыворотке и/или плазме организма в концентрации не более 5 нг/мл и не менее 0,1 нг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит или происходит из бесклеточной ДНК, присутствующей в крови, сыворотке и/или плазме организма в концентрации менее 5 нг/мл, менее 4 нг/мл, менее 3 нг/мл, менее 2 нг/мл, менее 1 нг/мл, менее 0,5 нг/мл или менее 0,3 нг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит или происходит из бесклеточной ДНК, присутствующей в крови, сыворотке и/или плазме организма в концентрации более 0,1 нг/мл, более 0,2 нг/мл, более 0,3 нг/мл, более 0,5 нг/мл, более 1 нг/мл, более 2 нг/мл или более 3 нг/мл.

[000199] После завершения этапа ренатурации ренатурационная смесь может быть, но не обязательно, разделена на первый канал и второй канал, в зависимости от конкретного приложения генотипирования. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ренатурационная смесь может быть разделена на первый канал и второй канал (как показано на Фиг. 1). В таком варианте реализации ренатурационную смесь разделяют на композицию первого канала и композицию второго канала, которая может быть перенесена в первый канал в процессе генотипирования. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ренатурационную смесь не разделяют на первый канал и второй канал, а предпочтительнее этап продолжают как одну реакцию.

[000200] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ренатурационная смесь может быть подвергнута этапу лигирования, также называемому этапом «заполнения пропуска», для встраивания нуклеотидов в пропуск между геномной гомологией 1 и геномной гомологией 2 линейного МПР, как показано на Фиг. 3. Для реакции заполнения пропуска будет достаточно любого известного в данной области способа. Например, к реакционной смеси можно добавить смесь дезоксинуклеотидов (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ, дУТФ), а также полимеразу, лигазу и другие компоненты реакции, и инкубировать при температуре приблизительно 60°C в течение приблизительно 10 минут, с последующей инкубацией при 37°C в течение приблизительно 1 минуты. После ренатурации и лигирования МПР может стать кольцевым. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеотиды, добавляемые в первый и второй канал, могут быть одинаковыми или разными.

[000201] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в которых предпочтительным является добавление различных наборов дезоксинуклеотидов в реакцию заполнения пропуска, дезоксинуклеотиды, добавляемые в один из каналов, могут представлять собой дАТФ и дТТФ, в то время как дезоксинуклеотиды, добавляемые в один из других каналов, могут представлять собой дЦТФ и дГТФ. Следует понимать, что различные смеси дезоксинуклеотидов могут быть добавлены в любой канал. Таким образом, каждый канал может обеспечить селективное детектирование разных аллелей SNP в композиции с первым кольцевым зондом и композиции со вторым кольцевым зондом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения канал может по существу не содержать дГТФ, дЦТФ или их смеси. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения канал может по существу не содержать дАТФ, дТТФ или их смеси.

[000202] Следует понимать, что лигаза, применяемая на этапе заполнения пропуска, не является особенно предпочтительной и может представлять собой любую лигазу, известную в данной области техники, и в соответствии с любым стандартным протоколом, известным в данной области техники. Многие лигазы известны и подходят для применения в сочетании с настоящим изобретением для реакции заполнения пропуска. См., например, Lehman, *Science*, 186: 790-797 (1974); Engler et al, *DNA Ligases*, pages 3-30 в Boyer, ред., *The Enzymes*, Vol. 15B (Academic Press, New York, 1982); и тому подобное. Необязательные лигазы для применения в сочетании с реакцией заполнения пропуска МР включают, но не ограничиваются ими, ДНК-лигазу Т4, ДНК-лигазу Т7, ДНК-лигазу *E. coli*, Таq-лигазу, Pfu-лигазу и Tth-лигазу. Протоколы применения таких лигаз хорошо известны (см., например, Varany, *PCR Methods and Applications*, 1: 5-16 (1991); Marsh et al, *Strategies*, 5: 73-76 (1992); и тому подобное). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лигаза может представлять собой термостабильную или (термофильную) лигазу, такую как rfu-лигаза, Tth-лигаза, Таq-лигаза и ДНК-лигаза Ampligase™ (Epicentre Technologies, Мэдисон, Висконсин, США).

[000203] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения соответствующие композиции с кольцевыми зондами, если их более одной, могут быть подвергнуты этапу ферментативного расщепления экзонуклеазой, как показано на Фиг. 3. Цель этапа ферментативного расщепления экзонуклеазой заключается в ферментативном расщеплении/удалении любых оставшихся фрагментов нуклеиновой кислоты из образца нуклеиновой кислоты, полученного из организма, и в ферментативном расщеплении/удалении любых оставшихся некольцевых МР. Следует понимать, что такой необязательный этап ферментативного расщепления может улучшить последующую амплификацию с помощью ПЦР путем удаления фрагментов нуклеиновой кислоты, которые могут препятствовать протеканию реакции ПЦР или могут образовывать химерные продукты, которые мешают последующей обработке образца в дальнейшем в данном способе. Подходящие 3'-эксонуклеазы включают, но не

ограничиваются ими, экзо I, экзо III, экзо VII, экзо V и полимеразы, поскольку многие полимеразы обладают превосходной экзонуклеазной активностью и т. д.

[000204] После необязательного удаления некольцевых МР и фрагментов ДНК, кольцевые зонды, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первые кольцевые зонды и вторые кольцевые зонды могут быть расщеплены с получением композиции с первым линейным зондом и композиции со вторым линейным зондом. Следует понимать, что расщепление можно осуществлять в соответствии с любым способом, известным в данной области техники, подходящим для применения в сочетании с принципами настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более кольцевых зондов, например, первый и/или второй кольцевые зонды, являются одноцепочечными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кольцевой (ые) зонд (ы) является (являются) двухцепочечным (и). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кольцевые зонды расщепляют с получением линейных зондов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для линеаризации зондов можно применять один или более ферментов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для линеаризации зондов можно применять фермент, способный расщеплять одноцепочечную нуклеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения такой фермент, расщепляющий одноцепочечную нуклеиновую кислоту, представляет собой урацил-N-гликозилазу. Согласно некоторым другим вариантам реализации настоящего изобретения для линеаризации зондов можно применять один или более рестрикционных ферментов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап расщепления может быть катализирован путем добавления фермента, такого как урацил-N-гликозилаза, или рестрикционного фермента к композиции с линейным зондом и, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, к композиции с первым и вторым линейными зондами, с расщеплением кольцевых зондов для получения композиции с первым линейным зондом и композиции со вторым линейным зондом. Подходящие рестрикционные ферменты включают, но не ограничиваются ими, AatII, Acc65I, AccI, AciI, AclI, AcuI, AfeI, AflII, AflIII, AgeI, AhdI, AleI, AluI, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, ApoI, AscI, AseI, AsiSI, AvaI, AvaII, AvrII, BaeGI, BaeI, BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BclI, BfaI, BfuAI, BfuCI, BglI, BglII, BlpI, BmgBI, BmrI, BmtI, BpmI, BpulOI, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, BsaI, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BscRI, BscYI, BsgI, BsiEI, BsiHKAI, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, BsrI, BssHII, BssKI, BssSI, BstAPI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZ17I, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsCI, BtsI, Cac8I, ClaI, CspCI, CviAII, CviKI-1, CviQI, DdcI, DpnI, DpnII, DraI, DraIII, DrdI, EacI, EagI, EarI, EciI, Eco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, FatI, FauI, Fnu4HI, FokI, FseI, FspI, HaeII, HaeIII, HgaI, HhaI, HincII, HindIII, HinfI, HinPII, HpaI, HpaII, HphI, Hpy166II, Hpy188I, Hpy188III, Hpy99I, HpyAV, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, KasI, KpnI, MboI, MboII, MfeI, MluI, MlyI,

MmeI, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspAII, MspI, MwoI, NaeI, NarI, Nb.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAIII, NotI, NruI, NsiI, NspI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, PacI, PaeR7I, PciI, PflFI, PflMI, PhoI, PleI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, PsiI, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, RsrII, SacI, SacII, SallI, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, ScaI, ScrFI, SexAI, SfaNI, SfcI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, StuI, StyD4I, StyI, SwaI, T, Taq α I, TfiI, TliI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspMI, TspRI, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI и ZraI. Следует понимать, что МIP-зонд может быть сконструирован так, чтобы содержать один или более и, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, два сайта рестрикции. В случае если МIP сконструированы с двумя сайтами рестрикции, специалист в данной области техники поймет, как сконструировать МIP так, чтобы рестрикционные ферменты действовали селективно на каждом сайте расщепления МIP.

[000205] Как упоминалось выше, МIP-зонд может быть сконструирован с одним или двумя сайтами праймеров. В настоящей заявке термин «универсальный праймерный сайт» представляет собой сайт, с которым будет гибридизоваться универсальный праймер. В общем случае «универсальный» относится к применению одного праймера или набора праймеров для множества реакций амплификации. Например, при детектировании или генотипировании 100 различных целевых последовательностей все МIP могут содержать идентичные универсальные праймерные последовательности, что позволяет осуществлять мультиплексную амплификацию 100 различных зондов с применением одного набора праймеров. Это обеспечивает легкость синтеза (например, изготавливают только один набор праймеров), что приводит к снижению затрат, а также к преимуществам в кинетике гибридизации. Наиболее важно, что применение таких праймеров значительно упрощает мультиплексирование, поскольку для амплификации множества зондов необходимы только два праймера. Обычно каждая (ый) из универсальных праймерных последовательностей/праймеров содержит от приблизительно 12 до приблизительно 40 пар оснований в длину. Подходящие универсальные праймерные последовательности известны специалисту в данной области техники и конкретно включают те, которые приведены в качестве примеров в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения МIP также сконструирован с последовательностью метки или последовательностью штрих-кода, которая обеспечит специфичное детектирование зондов в двух каналах с применением двухцветной системы. В таком примере универсальная праймерная последовательность на одном конце линейных зондов, будь то на 5'- или на 3'-конце, в зависимости от приложения и платформы детектирования, будет содержать специфичную последовательность для распознавания конкретной цветной метки. Таким образом, конструирование МIP с сайтом рестрикции между двумя универсальными 3'- и 5'-концами универсальных праймеров может быть предпочтительным.

[000206] После расщепления кольцевых зондов с получением линейных зондов такие зонды могут быть подвергнуты этапу амплификации композиции с первым

линейным зондом в присутствии первого концевой праймера, чтобы получить композицию первого амплифицированного продукта, и амплификации композиции со вторым линейным зондом в присутствии второго концевой праймера, чтобы получить композицию второго амплифицированного продукта, причем указанный первый концевой праймер имеет концевую последовательность, которая отличается от второго концевой праймера. Этап амплификации можно осуществлять с помощью любого способа, известного в данной области техники. Реакцию ПЦР можно осуществлять в присутствии полимеразы, которую можно применять в сочетании с настоящим изобретением, такой как USD Taq. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап амплификации осуществляют в присутствии полимеразы горячего старта, содержащей полимеразу и ингибитор полимеразы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор полимеразы диссоциирует от полимеразы при температуре по меньшей мере 40°C. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап амплификации осуществляют в присутствии полимеразы Titanium Taq. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап амплификации осуществляют в присутствии ДНК-полимеразы Platinum SuperFi.

[000207] Согласно настоящему изобретению также предусмотрены способы получения образца в определенных предпочтительных вариантах реализации. Геномный образец может быть амплифицирован до или одновременно с генотипированием с помощью различных механизмов, в некоторых из которых может применяться ПЦР. См., например, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (ред. Н. А. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (ред. Innis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19, 4967 (1991); Eckert et al., PCR Methods and Applications 1, 17 (1991); PCR (ред. McPherson et al., IRL Press, Oxford); и патенты США №№ 4683202, 4683195, 4800159, 4965188 и 5333675, каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей. Образец может быть амплифицирован на чипе. См., например, патент США № 6300070 и заявку на патент США № 09/513300, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки.

[000208] Другие подходящие способы амплификации включают лигазную цепную реакцию (LCR) (например, Wu and Wallace, Genomics 4, 560 (1989), Landegren et al., Science 241, 1077 (1988) и Barringer et al. Gene 89:117 (1990)), транскрипционную амплификацию (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173 (1989) и WO88/10315), самоподдерживаемую репликацию последовательности (Guatelli et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 1874 (1990) и WO90/06995), селективную амплификацию целевых последовательностей полинуклеиновых кислот (патент США № 6410276), полимеразную цепную реакцию с использованием в качестве праймера консенсусной последовательности (CP-PCR) (патент США № 4437975), полимеразную цепную реакцию с произвольными праймерами (AP-PCR) (патенты США №№ 5413909, 5861245) и амплификацию на основе последовательности нуклеиновой кислоты (NASBA) (см,

патенты США №№ 5409818, 5554517 и 6063603, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки). Другие способы амплификации, которые можно применять, включают: Qbeta Replicase, описанный в РСТ заявке на патент № РСТ/US87/00880, способы изотермической амплификации, такие как SDA, описанный в Walker et al. 1992, *Nucleic Acids Res.* 20(7):1691-6, 1992, и амплификацию по типу катящегося кольца, описанную в патенте США № 5648245. Другие способы амплификации, которые можно применять, описаны в патентах США №№ 5242794, 5494810, 4988617 и в U.S. 09/854317, патентах США №№ 8673560 и 8728728 и публикации US 20030143599, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ДНК амплифицируют с помощью мультиплексной локус-специфичной ПЦР. Например, ДНК может быть амплифицирована с применением продуктов AmpliSeq[®] от Thermo Fisher. В одном варианте реализации ДНК амплифицируют с применением лигирования адаптерной последовательности и однопраймерной ПЦР. Также можно применять другие доступные способы амплификации, такие как сбалансированная ПЦР (Makrigiorgos, et al. (2002), *Nat Biotechnol*, Vol. 20, pp. 936-9).

[000209] После завершения этапа амплификации композиция первого амплифицированного продукта и композиция второго амплифицированного продукта, в вариантах реализации, в которых образец нуклеиновой кислоты был разделен на два канала для отдельного детектирования аллеля, могут быть объединены с получением смеси амплифицированных продуктов, содержащей первые амплифицированные продукты и вторые амплифицированные продукты. Первый и второй амплифицированные продукты затем готовы для гибридизации и введения метки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиции амплифицированных продуктов, которые подвергают этапам гибридизации и введения метки, могут быть проанализированы путем детектирования на основе чипа. Согласно другому варианту композиции амплифицированных продуктов могут быть обработаны с помощью других методик, таких как обычное или массовое параллельное секвенирование. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиции амплифицированных продуктов, которые могут быть необязательно расщеплены, как описано ниже, далее подвергают детектированию на основе секвенирования. Секвенирование может быть выполнено с помощью различных способов, доступных в данной области техники, например, способов, включающих встраивание одного или более концевых нуклеотидов цепи, например, способа секвенирования по Сэнгеру, который может быть выполнен, например, с помощью SeqStudio[®] Genetic Analyzer от Applied Biosystems. В других вариантах реализации секвенирование может включать выполнение способа секвенирования следующего поколения (NGS), например, удлинение праймера с последующим детектированием на основе полупроводника (например, системы Ion Torrent[™] от Thermo Fisher Scientific) или с помощью флуоресцентного детектирования (например, системы Illumina).

[000210] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения после завершения амплификации композиции амплифицированных продуктов могут быть расщеплены с применением одного или более ферментов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиции амплифицированных продуктов, например, композиции первого и/или второго амплифицированных продуктов, имеют сайт, распознаваемый рестрикционным ферментом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап расщепления может быть катализирован путем добавления рестрикционного фермента к композициям амплифицированных продуктов и, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, к композициям первых и вторых амплифицированных продуктов. Подходящие рестрикционные ферменты включают, но не ограничиваются ими, AatII, Acc65I, AccI, AciI, AclI, AcuI, AfeI, AflII, AflIII, AgeI, AhdI, AleI, AluI, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, ApoI, AscI, AseI, AsiSI, AvaI, AvaII, AvrII, BaeGI, BaeI, BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BclI, BfaI, BfuAI, BfuCI, BglI, BglIII, BlpI, BmgBI, BmrI, BmtI, BpmI, BpuI, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, BsaI, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BscRI, BscYI, BsgI, BsiEI, BsiHKAI, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, BsrI, BssHII, BssKI, BssSI, BstAPI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZ17I, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsCI, BtsI, Cac8I, ClaI, CspCI, CviAII, CviKI-1, CviQI, DdcI, DpnI, DpnII, DraI, DraIII, DrdI, EacI, EagI, EarI, EciI, Eco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, FatI, FauI, Fnu4HI, FokI, FseI, FspI, HaeII, HaeIII, HgaI, HhaI, HincII, HindIII, HinfI, HinPII, HpaI, HpaII, HphI, Hpy166II, Hpy188I, Hpy188III, Hpy99I, HpyAV, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, KasI, KpnI, MboI, MboII, MfeI, MluI, MlyI, MmeI, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspAII, MspI, MwoI, NaeI, NarI, Nb.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAIII, NotI, NruI, NsiI, NspI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, PacI, PaeR7I, PciI, PflFI, PflMI, PhoI, PleI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, PsiI, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, ScaI, ScrFI, SexAI, SfaNI, SfcI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, StuI, StyD4I, StyI, SwaI, T, TaqαI, TfiI, TliI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspMI, TspRI, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI и ZraI. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рестрикционный фермент, применяемый для расщепления композиций первого и второго амплифицированных продуктов, является одинаковым или различным. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в которых для расщепления композиций первого и второго амплифицированных продуктов применяют одинаковый рестрикционный фермент, рестрикционный фермент HaeIII применяют для расщепления его специфического сайта, присутствующего в первом и втором амплифицированных продуктах. Следует понимать, что композиция амплифицированного продукта, которая содержит амплифицированные МIP-зонды согласно настоящему изобретению, может быть сконструирована так, чтобы содержать один или более сайтов рестрикции. В том случае, если МIP сконструированы с двумя или более сайтами рестрикции, специалист в

данной области техники поймет, как сконструировать МПР так, чтобы рестрикционные ферменты действовали селективно на каждый сайт расщепления МПР. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения расщепление композиций амплифицированных продуктов происходит до или после объединения композиций первого и второго амплифицированных продуктов с получением смеси амплифицированных продуктов.

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

[000211] Этап гибридизации по меньшей мере одного фрагмента нуклеиновой кислоты, содержащего или происходящего из популяции нуклеиновой кислоты и содержащего полиморфный сайт, с олигонуклеотидным зондом из олигонуклеотидного чипа можно осуществлять в соответствии с любым способом, известным в данной области техники и, в частности, в сочетании с инструкциями, полученными с любой платформой, которую можно применять в сочетании с настоящим изобретением, такой как набор реагентов Axiom 2.0.

[000212] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап гибридизации дополнительно включает этап фиксации. Фиксация может включать приведение олигонуклеотидного чипа с гибридизованной с ним нуклеиновой кислотой в контакт с подходящим фиксирующим агентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап фиксации происходит после завершения этапа гибридизации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап фиксации происходит спустя длительное время после этапа гибридизации, например, после того, как гибридизованный чип промывают и окрашивают смесью красителей. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения чип может быть подвергнут этапам гибридизации, промывки, окрашивания и фиксации, в этом порядке, наряду с другими этапами.

[000213] Последовательности, амплифицированные с применением различных пар праймеров, могут быть дифференцированы на основе спектрально различимых зондов (например, зондов, помеченных 2 разными красителями, таких как Taqman или зонды на основе запертых нуклеиновых кислот (Universal Probe Library, Roche)). При таком подходе все зонды объединяют в один реакционный объем и устанавливают различие на основании различий в цвете, испускаемом каждым зондом. Например, зонды, нацеленные на один полинуклеотид (например, испытываемую хромосому, такую как хромосома 21), могут быть конъюгированы с красителем первого цвета, а зонды, нацеленные на второй полинуклеотид (например, эталонную хромосому, такую как хромосома 1) в реакции, могут быть конъюгированы с красителем второго цвета. Отношение цветов затем отражает отношение между испытываемой и эталонной хромосомами.

[000214] В качестве иллюстрации, композиции первого и второго амплифицированных продуктов содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая, в некоторых вариантах, соответствует композиции канала. В качестве примера, композиция амплифицированного продукта из первого канала может содержать первую

последовательность нуклеиновой кислоты, а композиции амплифицированных продуктов из второго канала могут содержать вторую последовательность нуклеиновой кислоты. В качестве иллюстрации, первая и вторая последовательности нуклеиновой кислоты могут связывать или гибридизовать различные агенты для измерения количества амплифицированного продукта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиции амплифицированных продуктов помечают и измеряют непосредственно.

[000215] Композиции первого и второго амплифицированных продуктов могут быть повторно объединены и детектированы на одном чипе или могут храниться отдельно и детектироваться на по меньшей мере 2 отдельных чипах. В вариантах реализации, в которых применяют один чип, каждая из композиций первого и второго амплифицированных продуктов может быть помечена с применением разного репортера, чтобы обеспечить возможность идентификации композиций первого и второго продуктов на чипе. В вариантах реализации, в которых применяют по меньшей мере 2 чипа, композиции первого и второго амплифицированных продуктов могут быть помечены с применением одинаковых или разных репортеров. Примерные одноканальные системы включают «Gene Chip» от Affymetrix, «Bead Chip» от Illumina, одноканальные чипы Agilent, чипы «CodeLink» от Applied Microarrays и «DualChip & Silverquant» от Eppendorf.

[000216] Гибридизацию композиции амплифицированного продукта с чипом можно детектировать различными способами, включая непосредственное или опосредованное присоединение флуоресцентных групп, колориметрических групп, хемилюминесцентных групп и тому подобное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гибридизацию зонд-мишень можно детектировать и количественно определять путем детектирования агентов, содержащих флуорофорную, радио-, серебряную или хемилюминесцентную метку, чтобы определить относительное содержание последовательностей нуклеиновой кислоты в мишени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция амплифицированного продукта непосредственно помечена с применением флуорофорной, радио-, серебряной или хемилюминесцентной метки. Многие всеобъемлющие обзоры методологий введения метки в ДНК обеспечивают руководство, применимое для получения меченых олигонуклеотидных меток согласно настоящему изобретению. Такие обзоры включают Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 9 изд. (Molecular Probes, Inc., Eugene, 2002); Keller and Manak, DNA Probes, 2 изд. (Stockton Press, New York, 1993); Eckstein, ред., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991); Wetmur, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 26: 227-259 (1991); Fung et al, патент США № 4757141; Hobbs, Jr., et al патент США № 5151507; Cruickshank, патент США № 5091519. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в качестве меток можно применять один или более флуоресцентных красителей. Некоторые примерные красители описаны Menchen et al, патент США № 5188934 (4,7-дихлорофлуоресцеиновые красители); Begot et al, патент США № 5366860

(спектрально разрешимые родаминовые красители); Lee et al, патент США № 5847162 (4,7-дихлорородаминовые красители); Khanna et al, патент США № 4318846 (эфир-замещенные флуоресцеиновые красители); Lee et al, патент США № 5800996 (красители для переноса энергии); Lee et al, патент США № 5066580 (ксантоновые красители); Mathies et al, патент США № 5688648 (красители для переноса энергии); Macevicz (заявка на патент США № 2005/0250147); Faham et al. (патент США № 7208295); и тому подобное.

[000217] Возможные способы детектирования включают непосредственное детектирование репортера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения олигонуклеотид, комплементарный композиции амплифицированного продукта, содержит либо флуоресцентную/люминесцентную/хромогенную метку, либо впоследствии может быть подвергнут взаимодействию с дополнительными соединениями (например, иммуноокрашивающими, аптамерами) для получения сигнала. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вместо меченых гаптенами зондов для детектирования меченые зонды могут содержать непосредственно конъюгированные флуорофоры, которые устраняют опосредуемую антителами амплификацию сигнала.

[000218] Как описано в настоящей заявке, композиция амплифицированного продукта может быть получена в результате ПЦР с помощью праймеров, фланкирующих маркеры. Эти ампликоны могут быть получены по отдельности или в мультиплексных реакциях. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиции амплифицированных продуктов могут быть получены в виде оцДНК с помощью асимметричной ПЦР с одного праймера, фланкирующего полиморфизм, или в виде РНК, транскрибированной *in vitro* с промоторов, связанных с праймерами. В качестве примера, флуоресцентная метка может быть введена в композиции амплифицированных продуктов непосредственно в виде нуклеотидов, несущих краситель, или связана после амплификации со встроенными биотинсодержащими нуклеотидами с применением комплексов краситель-стрептавидин. В качестве иллюстрации, для композиций амплифицированных продуктов, полученных с помощью асимметричной ПЦР, репортер (например, флуоресцентный краситель) может быть связан непосредственно с 5'-концом праймера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиции амплифицированных продуктов могут быть помечены на 3'-конце с применением TdT и биотинилированного дАТФ. В качестве иллюстрации, это может быть выполнено для каждой из отдельных реакций заполнения пропуска. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения введение 3'-метки с применением TdT и биотинилированного АТФ приводит к считыванию одного цвета с двух чипов.

[000219] Композицию амплифицированного продукта гибридизуют с чипом до или во время непосредственного введения метки или косвенного с применением агента для детектирования. После или во время этапа гибридизации может быть введен первый

агент, который связывает первую последовательность нуклеиновой кислоты композиций амплифицированных продуктов. Первый агент может быть сконфигурирован для связывания с первой последовательностью нуклеиновой кислоты, присутствующей в амплифицированных продуктах из первого канала. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первый агент содержит последовательность, комплементарную части первой целевой последовательности (например, первой последовательности нуклеиновой кислоты).

[000220] В качестве иллюстрации, композиции первого и второго амплифицированных продуктов содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая, в некоторых вариантах, соответствует композиции из канала. В качестве примера, композиция амплифицированного продукта из первого канала может содержать первую последовательность нуклеиновой кислоты, а композиции амплифицированных продуктов из второго канала могут содержать вторую последовательность нуклеиновой кислоты.

[000221] После или во время этапа гибридизации может быть введен первый агент, который связывает первую последовательность нуклеиновой кислоты из композиций амплифицированных продуктов. Первый агент может быть сконфигурирован для связывания с первой последовательностью нуклеиновой кислоты, присутствующей в амплифицированных продуктах из первого канала. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первый агент содержит последовательность, комплементарную части первой целевой последовательности (например, первой последовательности нуклеиновой кислоты).

[000222] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первый агент содержит первую комплементарную последовательность и первый распознаваемый элемент, конъюгированный с первой комплементарной последовательностью. Иллюстративные примеры первых распознаваемых элементов включают флуорофоры, биотин, пептидные метки, их комбинации или любой известный приемлемый распознаваемый элемент, известный в данной области техники. В некоторых примерах первый агент содержит биотин, конъюгированный с первой комплементарной последовательностью.

[000223] Первый агент может дополнительно содержать конъюгат, меченный первым репортером, который связывается с первым распознаваемым элементом, как показано на Фиг. 4. Конъюгат, меченный первым репортером, может представлять собой авидин, антитело, аптамер, их комбинации или любой известный приемлемый конъюгат, который связывает распознаваемый элемент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат, меченный первым репортером, может быть помечен с применением первого репортера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первый репортер представляет собой флуорофор.

[000224] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первый агент может дополнительно содержать первое антитело-конъюгат, как показано на

Фиг. 4. В иллюстративных вариантах реализации первое антитело-конъюгат связывается с конъюгатом, меченным первым репортером. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первое антитело-конъюгат содержит распознаваемый элемент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения распознаваемый элемент первого антитела-конъюгата может быть таким же, как первый распознаваемый элемент. В некоторых примерах первое антитело-конъюгат может быть помечено биотином.

[000225] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат, меченный первым репортером, связывает распознаваемый элемент, конъюгированный с первой комплементарной последовательностью, первое антитело-конъюгат или как распознаваемый элемент, конъюгированный с первой комплементарной последовательностью, так и первое антитело-конъюгат, как показано на Фиг. 4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат, меченный первым репортером, связывает как распознаваемый элемент, конъюгированный с первой комплементарной последовательностью, так и первое антитело-конъюгат, причем каждый из конъюгатов, меченных первым репортером, содержит одинаковый первый репортер.

[000226] Первый репортер может представлять собой флуорофор, ферментную метку, такую как ПХ, радиоизотоп, их комбинацию, или любой подходящий репортер, как правило, применяемый в биохимических анализах, как показано на Фиг. 4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения флуорофор может иметь пик испускания от приблизительно 640 нм до приблизительно 680 нм. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения флуорофор представляет собой аллофикоцианин.

[000227] После или во время этапа гибридизации может быть введен второй агент, который связывает первую последовательность нуклеиновой кислоты из композиций амплифицированных продуктов, как показано на Фиг. 4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второй агент содержит последовательность, комплементарную части второй целевой последовательности (например, второй последовательности нуклеиновой кислоты).

[000228] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второй агент содержит вторую комплементарную последовательность и второй распознаваемый элемент, конъюгированный со второй комплементарной последовательностью, как показано на Фиг. 4. Иллюстративные примеры вторых распознаваемых элементов включают флуорофоры, биотин, пептидные метки, их комбинации или любой другой известный приемлемый распознаваемый элемент, известный в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второй агент содержит флуорофор, конъюгированный со второй комплементарной последовательностью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения флуорофор может представлять собой FAM.

[000229] Второй агент может дополнительно содержать конъюгат, меченный вторым репортером, который связывается со вторым распознаваемым элементом, как показано на Фиг. 4. Конъюгат, меченный вторым репортером, может содержать авидин, антитело, аптамер, их комбинации или любой известный приемлемый конъюгат, который связывает распознаваемый элемент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат, меченный вторым репортером, содержит антитело. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат, меченный вторым репортером, может быть помечен с применением второго репортера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второй репортер представляет собой флуорофор.

[000230] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второй агент может дополнительно содержать второе антитело-конъюгат, как показано на Фиг. 4. В иллюстративных вариантах реализации второе антитело-конъюгат связывается с конъюгатом, меченным вторым репортером. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второе антитело-конъюгат содержит распознаваемый элемент. В некоторых примерах распознаваемый элемент второго антитела-конъюгата может быть таким же, как и второй распознаваемый элемент. В некоторых примерах второе антитело-конъюгат может быть помечено с применением FAM.

[000231] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат, меченный вторым репортером, связывает распознаваемый элемент, конъюгированный со второй комплементарной последовательностью, второе антитело-конъюгат или как распознаваемый элемент, конъюгированный со второй комплементарной последовательностью, так и второе антитело-конъюгат, как показано на Фиг. 4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат, меченный вторым репортером, связывает как распознаваемый элемент, конъюгированный со второй комплементарной последовательностью, так и второе антитело-конъюгат, причем каждый из конъюгатов, меченных вторым репортером, содержит одинаковый второй репортер.

[000232] Второй репортер может представлять собой флуорофор, ферментную метку, такую как ПХ, радиоизотоп, их комбинацию, или любой подходящий репортер, как правило, применяемый в биохимических анализах, как показано на Фиг. 4. Согласно некоторым вариантам реализации флуорофор может иметь пик испускания от приблизительно 560 нм до приблизительно 600 нм. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения флуорофор представляет собой фикоэритрин.

[000233] Следует понимать, что согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первый агент может быть сконфигурирован для связывания композиций амплифицированных продуктов, происходящих из первого канала, а второй агент может быть сконфигурирован для связывания композиций амплифицированных продуктов второго канала. Также следует понимать, что согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первый агент может быть сконфигурирован для

связывания композиций амплифицированных продуктов, происходящих из второго канала, а второй агент может быть сконфигурирован для связывания композиций амплифицированных продуктов первого канала. Соответственно, в некоторых вариантах, репортеры (например, флуорофор (ы)) первого агента отличаются от репортеров (например, флуорофора (ов)) второго агента, как показано на Фиг. 4.

[000234] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения набор зондов (например, набор зондов, нацеленных на испытываемую хромосому, например, хромосому 21), может быть нацелен на разные области целевого полинуклеотида, однако каждый зонд в наборе имеет одинаковые сайты связывания универсальных праймеров. В некоторых случаях каждый зонд имеет одинаковый сайт связывания зонда. В некоторых случаях два или более зондов в реакции могут иметь разные сайты связывания зонда. В некоторых случаях зонды, добавленные к таким реакциям, конъюгированы с идентичным сигнальным агентом (например, флуорофорами одного цвета). В некоторых случаях разные сигнальные агенты (например, два разных цвета) конъюгированы с одним или более зондами.

[000235] Олигонуклеотидный зонд также может содержать последовательность, которая комплементарна зонду, присоединенному к маркеру, такому как краситель или флуоресцентный краситель (например, зонд TaqMan). В некоторых случаях зонд TaqMan связан с одним типом красителя (например, FAM, VIC, TAMRA, ROX). В других случаях на олигонуклеотиде имеется более одного сайта зонда TaqMan, причем каждый сайт способен связываться с разным зондом TaqMan (например, зондом TaqMan с отличающимся типом красителя). Также может быть несколько сайтов зонда TaqMan с одинаковой последовательностью олигонуклеотидного зонда, описанного в настоящей заявке. Часто зонд TaqMan может связываться только с сайтом на олигонуклеотидном зонде, описанном в настоящей заявке, но не с геномной ДНК, но в некоторых случаях зонд TaqMan может связывать геномную ДНК.

АНАЛИЗ

[000236] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раскрытые способы (а также относящиеся к ним композиции, системы, инструменты и программное обеспечение) включают этап анализа данных, полученных с чипа, чтобы проанализировать свойства образца нуклеиновой кислоты (или его производного), который внесен на чип. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения образец нуклеиновой кислоты содержит смешанную популяцию нуклеиновой кислоты, содержащую основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию.

[000237] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раскрытые способы могут включать детектирование одного или более сигналов с олигонуклеотидного чипа с применением детектора.

[000238] Необязательно детектирование включает детектирование сигнала («первый сигнал» или «сигнал А»), указывающего на наличие или отсутствие первого

нуклеотидного варианта. Первый нуклеотидный вариант необязательно соответствует первому аллельному варианту.

[000239] Необязательно детектирование включает детектирование сигнала («второй сигнал» или «сигнал В»), указывающего на наличие или отсутствие второго нуклеотидного варианта. Второй нуклеотидный вариант необязательно соответствует второму аллельному варианту.

[000240] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раскрытые способы могут включать определение числа копий первой хромосомной области во второстепенной субпопуляции с применением первого сигнала и второго сигнала.

[000241] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раскрытые способы могут включать определение числа копий первой хромосомной области в основной субпопуляции с применением первого сигнала и второго сигнала.

[000242] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раскрытые способы могут включать определение генотипа полиморфного сайта для второстепенной субпопуляции с применением первого сигнала и второго сигнала.

[000243] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раскрытые способы могут включать определение генотипа полиморфного сайта для основной субпопуляции с применением первого сигнала и второго сигнала.

[000244] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раскрытые способы могут включать определение относительных количеств основной субпопуляции и второстепенной субпопуляции в смешанной популяции нуклеиновой кислоты с применением первого сигнала и второго сигнала.

[000245] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы могут включать вычисление отношения первого сигнала ко второму сигналу или логарифмического отношения сигналов.

[000246] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы включают анализ сигнала А и сигнала В от функционального элемента чипа, сконфигурированного для гибридизации с целевой нуклеиновой кислотой, содержащей полиморфный сайт, и применение сигнала А и сигнала В для определения генотипа полиморфного сайта в пределах основной и второстепенной субпопуляций, а также числа копий (или относительного числа копий) полиморфного сайта в пределах основной и второстепенной субпопуляций.

[000247] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, применительно к зондовому чипу, раскрытые способы и системы включают анализ сигналов, ассоциированных с первым и вторым нуклеотидными вариантами, присутствующими в образце нуклеиновой кислоты из организма, для измерения числа копий, причем указанный образец нуклеиновой кислоты содержит смешанную популяцию нуклеиновой кислоты. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения число копий (например, хромосомы и/или хромосомной области и/или конкретной

нуклеотидной последовательности) измеряют (например, оценивают) в отношении второстепенной субпопуляции в пределах смешанной популяции нуклеиновой кислоты из образца нуклеиновой кислоты. Согласно одному варианту реализации образец нуклеиновой кислоты получен от беременной матери и содержит основную субпопуляцию нуклеиновой кислоты, соответствующую ДНК матери, и второстепенную субпопуляцию, соответствующую фетальной ДНК. В другом варианте реализации образец нуклеиновой кислоты получен от индивидуума с раком или другими опухолями, и основная субпопуляция нуклеиновой кислоты соответствует ДНК из неопухолевых клеток, а второстепенная субпопуляция соответствует ДНК из опухолевых клеток. Некоторые варианты реализации также применимы к различным другим ситуациям, в которых измерение числа копий является желательным для образца нуклеиновой кислоты, содержащего смешанную популяцию нуклеиновой кислоты, включая по меньшей мере основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию.

[000248] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сигналы, соответствующие зондам, гибридизованным с нуклеотидными вариантами, ассоциированными с полиморфными сайтами, применяют для измерения числа копий второстепенной субпопуляции из смешанной популяции нуклеиновой кислоты в образце нуклеиновой кислоты, полученном из организма.

[000249] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения зондовый чип содержит множество зондов для полиморфных сайтов, которые можно применять для измерения возможных изменений числа копий в образцах, и сигналы от предварительно отобранной подгруппы множества зондов применяют для оценки фетальной фракции (или, в других вариантах реализации, фракции другого типа субпопуляции, ассоциированной с образцом), предварительно отобранная подгруппа зондов была выбрана на основании эффективности зондов с помощью модели, используемой для прогнозирования частоты аллелей на основании значений сигналов.

[000250] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения значения эталонных сигналов, которые являются специфичными для генотипа для полиморфного локуса, применяют для детектирования изменений числа копий.

[000251] Далее в тексте описаны различные варианты реализации способов анализа смешанных популяций нуклеиновой кислоты и определения генотипа и/или числа копий конкретных генетических локусов, присутствующих в пределах различных субпопуляций (например, в основной и второстепенной субпопуляциях) смешанной популяции нуклеиновой кислоты.

[000252] На Фиг. 5 проиллюстрирована система обработки образца 2100 в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения. Система включает чип, содержащий зонды, специфичные для полиморфных локусов в представляющих интерес хромосомах (например, хромосомах 13, 18, 21, X и Y), а также в типичных эталонных хромосомах (например, хромосомы 1 и 5), которые, как предполагают, являются диплоидными. Разные зонды в разных сайтах на чипе сконфигурированы для селективной

гибридизации с продуктами аллель-специфичного удлинения, которые получены до гибридизации с чипом, таким образом, разные продукты аллель-специфичного удлинения будут гибридизоваться с разными сайтами на чипе, даже если они отличаются всего одним нуклеотидом. Затем гибридизованные аллель-специфичные продукты обрабатывают для того чтобы получить детектируемый сигнал, который пропорционален количеству присутствующего гибридизованного продукта. Способ обработки с целью получения сигнала выполняют в соответствии с процедурами, описанными в руководстве для Axiom 2.0, которое поставляется с набором реагентов Axiom 2.0 (каталожный № 901758). Сигналы, испускаемые с чипа, детектировали и анализировали, как описано далее в тексте.

[000253] Система обработки образца содержит зондовый чип 2101, сканер 2102 и компьютер 2103, который конфигурируется с помощью компьютерной программы 2104 для обработки данных, полученных от сканера 2102. Специалисты в данной области техники поймут, что различные другие компоненты системы обработки образца, такие как система 2100, будут присутствовать, но не проиллюстрированы отдельно в настоящей заявке, включая, например, систему обработки жидкости для обработки различных жидкостей (включая, например, биологические образцы, которые должны быть приведены в контакт с зондовым чипом 2101, различные промывочные средства, буферы и другие жидкости), и автозагрузчик для обработки и транспортировки одного или более зондовых чипов, таких как зондовый чип 2101, включающий позиционирование зондовых чипов для взаимодействия с системой обработки жидкости и со сканером 2102.

[000254] Согласно одному варианту реализации зондовый чип 2101 оптимизирован для применения при анализе биологических образцов, полученных от беременной женщины. В конкретном варианте реализации зондовый чип 2101 содержит зонды для множества полиморфных сайтов на одной или более хромосомах, причем каждый полиморфный сайт ассоциирован с однонуклеотидным полиморфизмом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения зондовый чип 2101 содержит зонды, соответствующие: 10867 или более уникальным SNP на хромосомах 1 и 5; 7559 или более уникальным SNP на хромосоме 13; 4855 или более уникальным SNP на хромосоме 18; 2083 или более уникальным SNP на хромосоме 21; 10661 уникальному SNP на хромосоме X; и 593 уникальным SNP на хромосоме Y. Согласно одному варианту реализации зондовый чип содержит приблизительно 2-50 или более повторяющихся зондов, соответствующих каждому SNP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в которых ограничения пространства чипа ограничивают возможность иметь как большое количество зондов, так и большое количество повторов, результаты улучшаются за счет меньшего количества повторов (например, 2-6) так, что большее число уникальных зондов (для разных полиморфных локусов) могут поместиться на чипе сопоставимого размера. Один из возможных вариантов реализации (только для иллюстративных целей), в котором число копий является относительно низким (2 повтора для одних зондов и 6 повторов для других) и число уникальных зондов является

относительно высоким для зондового чипа заданного размера, представлен в таблице I ниже:

ТАБЛИЦА I

Хромосома	Число уникальных зондов с 2 повторами на уникальный зонд	Число уникальных зондов с 6 повторами на уникальный зонд	Всего
1 и 5	1233	9634	10867
13	1322	6237	7559
18	518	4337	4855
21	264	1819	2083
X	0	8661 (+2000 дополнительных с 4 повторами)	10661
Y	0	592	593

[000255] В альтернативных вариантах реализации вышеуказанные числа могут значительно варьироваться, не отступая от варианта реализации, в котором число уникальных зондов максимально увеличено относительно пространства чипа, при этом на чипе все еще имеется несколько повторяющихся зондов.

[000256] На Фиг. 6 и Фиг. 7 проиллюстрированы блок-схемы систем обработки сигналов эталонного образца и испытываемого образца для реализации примерных вариантов реализации настоящего изобретения. На Фиг. 8 и Фиг. 9 подробно представлены способы обработки, которые, в соответствии с примерными вариантами реализации настоящего изобретения, осуществляют с помощью систем обработки сигналов эталонного образца и испытываемого образца согласно Фиг. 6 и Фиг. 7. Системы и способы согласно Фиг. 6-9 могут быть реализованы на компьютере, таком как компьютер 2103 согласно Фиг. 5. В некоторых альтернативных вариантах реализации эти системы и способы могут быть реализованы с помощью сети компьютеров, обменивающихся данными с компьютером 2103. В таких альтернативных вариантах все или часть инструкций по хранению компьютерного программного продукта для выполнения вариантов реализации настоящего изобретения могут храниться на удаленных сетевых компьютерах, а не на компьютере конечного пользователя.

[000257] На Фиг. 6 проиллюстрирован процессор эталонного образца 2200. Процессор 2200 включает различные модули обработки для обработки данных о сигналах от эталонных образцов в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения. Конкретные элементы, показанные на Фиг. 6, не обязательно все являются необходимыми в различных альтернативных вариантах реализации настоящего изобретения. Также согласно альтернативным вариантам реализации конкретные элементы и, в некоторых случаях, порядок этих элементов могут отличаться от тех, которые показаны.

[000258] Как будет обсуждаться далее применительно к другим фигурам ниже, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, части эталонного процессора 2200 можно применять для обработки множества испытываемых образцов, причем указанные испытываемые образцы также применяют в качестве эталонных образцов. Однако для ясности иллюстрации и пояснения эталонный процессор 2200 описан применительно к обработке только эталонных образцов.

[000259] В хранилище данных 2207 хранятся файлы с сигналами, полученными с чипов с зондами для сканирования, в которые были введены и селективно гибридизованы эталонные образцы. В модуле обработки сигналов зонда 2201 принимаются и обрабатываются сигналы, полученные из хранилища 2207. В модуле 2201 сигналы нормируются и суммируются, как будет пояснено далее применительно к Фиг. 8-9. В модуле для генотипирования 2202 нормированные и суммированные значения сигналов применяются для выполнения генотипирования, чтобы обеспечить генотипы для каждого эталонного образца в отношении каждого SNP. В модуле 2203 получают модельные эталонные сигналы для каждого генотипа каждого SNP и сохраняют их в хранилище эталонных сигналов (например, в файле данных) 2208.

[000260] В модуле 2204 данные генотипирования из модуля 2202 применяются для получения моделей, соотносящих значения сигналов с числом копий для каждого из двух сигнальных каналов (как будет дополнительно описано применительно к Фиг. 8). В модуле 2205 вычисляется частота аллеля В («BAF») для каждого маркера в каждом эталонном образце, используя модели, полученные с помощью модуля 2204. Используя данные по известному эталонному числу копий, полученные из хранилища данных 2209, значения BAF, соответствующие числу копий одного и того же аллеля А и В и одному и тому же маркеру в эталонных образцах, сравнивают друг с другом и/или со значением BAF, вычисленным на основании известного числа копии. На основе этого сравнения с помощью модуля 2205 идентифицируют маркеры, в которых частоты аллеля В, вычисленные на основании сигналов, обладают наибольшей прогностической ценностью для фактического числа копий аллеля, и сохраняют их в хранилище набора маркеров фетальной фракции 2211. Идентифицированные маркеры сохраняют для последующего применения при определении фетальной фракции в испытываемых материнских образцах (например, образцы беременных пациентов женского пола).

[000261] С помощью модуля 2206 по отдельности обрабатывают сигналы для отдельных эталонных образцов, чтобы вычислить логарифмические отношения относительно эталонных сигналов, хранящихся в хранилище 2208. С помощью модуля 2206 сохраняют результаты в хранилище эталонных логарифмических отношений 2210.

[000262] На Фиг.7 проиллюстрирован процессор испытываемого образца 2300. Процессор 2300 включает различные модули обработки для обработки данных о сигналах от испытываемых образцов (например, пациента) в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения. Конкретные элементы, показанные на Фиг. 7, не обязательно все необходимы в различных альтернативных вариантах реализации настоящего изобретения.

Также в альтернативных вариантах реализации конкретные элементы и, в некоторых случаях, порядок этих элементов могут отличаться от тех, которые показаны.

[000263] В хранилище данных 2307 хранятся файлы с сигналами, полученными от чипов с зондами для сканирования, в которые были введены и селективно гибридизованы испытываемые образцы. Модуль обработки сигналов зонда 2301 принимает и обрабатывает сигналы, полученные из хранилища 2307. В модуле 2301 осуществляется та же обработка, что и в модуле 2201, как будет пояснено далее применительно к Фиг. 8-9. В модуле для генотипирования 2302 нормированные и суммированные значения сигналов, полученные от модуля 2301, применяются для выполнения генотипирования, чтобы обеспечить генотипы для каждого испытываемого образца в отношении каждого SNP.

[000264] Проиллюстрированный вариант реализации включает модуль 2303, в котором применяются сигналы от множества испытываемых образцов, обработанных на одном и том же планшете для образца, чтобы получить модельные эталонные сигналы для каждого генотипа каждого SNP, и с помощью модуля 2303 их сохраняют в хранилище эталонных сигналов (например, файл данных) 2308. Следует отметить, что, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, модельные эталонные сигналы, полученные из предшествующего эталонного анализа, были предварительно определены с помощью эталонного процессора, такого как процессор 2200, проиллюстрированный на Фиг. 6. В таких альтернативных вариантах в процессоре испытываемого образца, таком как процессор 2300, не обязательно потребуется отдельный модуль определения модельного эталонного сигнала, такой как модуль 2303 согласно Фиг. 7. Однако преимущество применения испытываемых образцов для получения модельных эталонных образцов заключается в сведении к минимуму эффектов, которые в противном случае могли бы быть отнесены к характеристикам конкретного планшета для образцов и/или условиям анализа, если эталонные данные получены из другого планшета для образцов, проанализированного ранее.

[000265] В модуле 2304 применяются данные генотипирования из модуля 2302 и специфичные для маркера модели из модуля 2204, соотносящие сигналы А с числом копий аллеля А и сигналы В с числом копий аллеля В для преобразования значений сигнала А в число копий А и значений сигнала В в число копий В, а затем рассчитывается частота аллеля В (BAF) для каждого маркера. Как будет описано более подробно применительно к Фиг. 9, с помощью калькулятора фетальной фракции 2305 вычисляют оцениваемую фетальную фракцию, используя распределение значений BAF.

[000266] С помощью анализатора фетальной фракции 2309 определяют, достаточно ли в образце фетальной фракции для оценки анеуплоидии. Если это так, то в анализаторе фетальной фракции 2309 фетальная фракция применяется, чтобы обновить эталонные значения для ожидаемых сигналов с учетом оценки фетальной фракции, как будет дополнительно описано применительно к Фиг. 9.

[000267] В модуле 2306 происходит обработка отдельного испытываемого образца, чтобы получить логарифмические отношения для сигнала, соответствующего каждому

маркеру, относительно соответствующего эталонного сигнала, и сохранение логарифмических отношений в хранилище 2310. В частности, в модуле 2306 эталонный сигнал, соответствующий определенному генотипу основной субпопуляции (например, генотипу материнской ДНК) для этого маркера (как будет дополнительно описано применительно к Фиг. 9), применяется, чтобы получить значение логарифмического отношения для значения сигнала субъекта для этого маркера относительно эталонного значения. В предпочтительном варианте реализации оцененная фетальная фракция используется для определения ожидаемого порога сигнала для отклоняющегося логарифмического отношения. Однако в альтернативном варианте реализации определенная фетальная фракция не обязательно используется для определения ожидаемого сигнала для отклоняющегося логарифмического отношения; предпочтительнее можно применять все, что не сопоставимо с нормальным логарифмическим отношением.

[000268] В модуле 2311 происходит анализ значения логарифмического отношения, чтобы определить, соблюдаются ли пороговые значения для проявления (calling) анеуплоидии.

[000269] На Фиг. 8 проиллюстрирован способ обработки эталонного образца 2400. Согласно одному варианту реализации способ 2400 выполняют с помощью эталонного процессора 2200 согласно Фиг. 6. Конкретные этапы, показанные на Фиг. 8, не обязательно все необходимы в различных альтернативных вариантах реализации настоящего изобретения. Также в альтернативных вариантах реализации конкретные этапы и, в некоторых случаях, порядок могут отличаться от тех, которые показаны.

[000270] На этапе 2401 получают файлы данных о сигналах с использованием данных о сигналах, полученных от сканера 2102 (показанного на Фиг. 5). Сканер 2102 детектирует сигналы зондов в двух разных каналах для каждого маркера, первый канал соответствует аллелю А этого маркера, а второй канал соответствует аллелю В этого маркера. В этом варианте реализации зонды сконструированы так, чтобы быть специфичными для маркера, но детектируемыми в разных каналах в зависимости от того, на каком аллеле (А или В) маркера гибридизован зонд. Следует отметить, что в альтернативных вариантах реализации для каждого аллеля маркера можно применять разные зонды.

[000271] На этапах 2402-2404 выполняют начальную обработку сигналов зонда. В частности, на этапе 2402 применяется общий корректор ковариаты сигнала, нормирующий к сигналам. Согласно одному варианту реализации эта обработка нормирует сигналы относительно переменных, таких как, например, содержание гуанина и цитозина (содержание ГЦ) и длина фрагмента зонда. На этапе 2403 применяется квантильное нормирование. На этапе 2404 происходит суммирование значений повторяющихся зондов. В одном примере это включает определение, для каждого маркера по отношению к каждому эталонному образцу, медианного значения сигнала для всех

повторяющихся зондов, гибридизованных с аллелем А (сигнал А), и медианного значения сигнала для всех повторяющихся зондов, гибридизованных с аллелем В (сигнал В).

[000272] На этапе 2405 происходит генотипирование каждого эталонного образца по отношению к каждому маркеру. Затем на этапе 2409 получают эталонный сигнал, соответствующий каждому из трех возможных генотипов каждого маркера, следующим образом: для первого маркера сигнал А первого эталонного образца для этого маркера прибавляют к сигналу В первого эталонного образца для этого маркера, чтобы получить объединенный сигнал А+В для первого маркера относительно первого эталона. Этот этап повторяют для всех других эталонных образцов в отношении первого маркера. Затем определяют медианный сигнал для первого маркера для всех эталонов с конкретным генотипом. Например, для маркера 1 медианное значение сигнала (А+В) для всех эталонов, имеющих генотип АА для этого маркера, сохраняется в качестве эталонного сигнала. Аналогичным образом, для маркера 1 медианное значение сигнала (А+В) для всех эталонов, имеющих генотип ВВ для этого маркера, сохраняется в качестве отдельного эталонного сигнала. Для маркера 1 также сохраняется медианное значение сигнала (А+В) для всех эталонов, имеющих генотип АВ. Этот этап повторяют для каждого маркера, показания которого регистрировали с помощью зондового чипа. Пример нормированных эталонных сигналов (А+В), определенных таким способом для трех разных маркеров в хромосоме 1, представлен в таблице II ниже:

ТАБЛИЦА II

Маркер	Хромосома	Медиана для эталонных образцов с генотипом АА	Медиана для эталонных образцов с генотипом ВВ	Медиана для эталонного образца с генотипом АВ
tag002626	1	984,0628318	745,1495922	864,2744595
tag002753	1	660,4613573	969,9901649	756,9943685
tag002806	1	1128,81335	973,3259848	988,8751251

[000273] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения логарифмические отношения могут быть вычислены и дополнительно обработаны на этапах 2410, 2412, 2413, 2415 и 2411 для каждого эталонного образца, как описано далее. На этапе 2410 для каждого эталонного образца определяется логарифмическое отношение для каждого маркера как логарифмическое отношение сигнала эталонного образца для этого маркера к соответствующему медианному эталонному сигналу (например, такому как значения в таблице II выше) в зависимости от того, был ли эталонный образец генотипирован как АА, ВВ или АВ для этого маркера. На этапе 2412 применяется общее нормирование ковариаты логарифмического отношения к логарифмическим отношениям. На этапе 2413 необязательно применяется медианное аутомное нормирование для каждого образца. В частности, если медиана медианных логарифмических отношений по всем хромосомам не равна 0 для данного образца, то все значения корректируют с шагом,

необходимым для получения медианы медиан равной 0. На этапе 2415 необязательно применяется корректировка для планшета путем применения медианного аутосомного нормирования еще раз, но на этот раз для всех образцов на планшете, применяя соответствующую корректировку с приращениями, которая необходима для получения медианы медиан равной 0. На этапе 2411 суммируется каждый эталонный образец по хромосоме или по какой-либо другой единице, представляющей интерес. Согласно одному варианту реализации эта единица может представлять собой плечо хромосомы или представляющую интерес область с меньшей или большей длиной. Согласно одному варианту реализации этот этап выполняют путем получения медианы всех логарифмических отношений для всех маркеров на данной хромосоме в качестве суммированного значения для этой хромосомы для данного образца. В альтернативных вариантах реализации можно применять среднее значение или другие способы суммирования. На этапе 2414 сохраняют результаты для нормированных логарифмических отношений для каждого эталонного образца.

[000274] Этапы 2406-2408 применяют для отбора конкретных маркеров, которые являются предпочтительными для применения при определении фетальной фракции испытываемого образца. Отбирают маркеры, для которых продемонстрирована хорошая способность прогнозировать частоту аллеля В по меньшей мере для одного из гомозиготных генотипов.

[000275] На этапе 2406 для создания модели, соотносящей значение сигнала с числом копий для каждого аллеля каждого маркера, применяют суммированные сигналы с этапа 2404 и генотипы с этапа 2405. Согласно одному варианту реализации модель представляет собой линейную модель. В другом варианте реализации модель является нелинейной, такой как, например, модель Ленгмюра. Один способ создания линейной модели будет более подробно описан далее. Однако, разумеется, описанный способ может изменяться в альтернативных вариантах реализации.

[000276] Согласно одному варианту реализации две модели, А-модель и В-модель, получают для всех аутосомных маркеров, где каждый из трех возможных генотипов представлен по меньшей мере двумя эталонными образцами. А-модель соотносит значение сигнал А с числом копий А, а В-модель соотносит значение сигнала В с числом копий В. Сначала генотип эталонного образца маркера преобразуют в «число копий А» и «число копий В» в соответствии с таблицей III:

ТАБЛИЦА III

Генотип	Число копий А	Число копий В
АА	2	0
АВ	1	1
ВВ	0	2

Затем взвешенную линейную регрессию выполняют отдельно на (i) всех значениях сигнала А (в зависимости от числа копий А) для всех эталонных образцов для маркера и

(ii) всех значениях сигнала В (в зависимости от числа копий В) для всех эталонных образцов для маркера. Согласно одному варианту реализации веса применяют на основании прогнозируемого стандартного отклонения для каждого числа копий. Прогнозируемое стандартное отклонение определяют по результатам применения линейной регрессии на наблюдаемых стандартных отклонениях для наблюдаемых эталонных сигналов. Полученное в результате прогнозируемое стандартное отклонение для числа копий CNi (где $i=0, 1$ или 2) указано в настоящей заявке как « pSD_{Cni} ». Затем, при применении взвешенной линейной регрессии на наблюдаемых значениях сигналов в зависимости от числа копий, вес наблюдаемого значения получают путем умножения его на $1/(pSD_{Cni})^2$, где pSD_{Cni} представляет собой прогнозируемое стандартное отклонение, соответствующее числу копий, ассоциированному с генотипом эталонного образца для маркера.

[000277] Упомянутую выше взвешенную линейную регрессию применяют на значениях сигнала А и соответствующих числах копий А, чтобы получить значения параметров $Aintercept$ и $Aslope$ для следующего уравнения А-модели:

$$Asignal = Aintercept + Aslope * Acopynumber$$

Упомянутую выше взвешенную линейную регрессию применяют на значениях сигнала В и соответствующих числах копий В, чтобы получить значения параметров $Bintercept$ и $Bslope$ для следующего уравнения В-модели:

$$Bsignal = Bintercept + Bslope * Bcopynumber.$$

[000278] Используя приведенные выше уравнения А-модели и В-модели, на этапе 2407 прогнозируют число копий А ($pAcopynumber$) и число копий В ($pBcopynumber$) для отдельного эталонного образца на основании, соответственно, значения сигнала А и значения сигнала В (следует отметить, что сигнал А представляет собой суммированный сигнал, в котором применяется медианное значение сигналов А для всех повторяющихся зондов, а сигнал В представляет собой суммированный сигнал, в котором применяется медианное значение сигналов В для всех повторяющихся зондов) для конкретного маркера. Таким образом, $pAcopynumber = (Asignal - Aintercept) / Aslope$ и $pBcopynumber = (Bsignal - Bintercept) / Bslope$. ВAF вычисляют для каждого маркера в каждом эталонном образце с использованием предсказанного числа копий следующим образом:

$$pBcopynumber / (pAcopynumber + pBcopynumber).$$

[000279] На этапе 2407 вычисляют значения ВAF (на основании модели из 2406) для известных данных о числе копий из эталонных образцов для каждого маркера с достаточной эталонной информацией. Затем на этапе 2408 вычисленные значения ВAF для одного и того же маркера и генотипа сравнивают друг с другом. Основываясь на этом сравнении, маркеры, для которых вычисленные ВAF для генотипов АА имеют самое низкое стандартное отклонение, отбирают для АА ВAF, а маркеры, для которых вычисленные значения ВAF для генотипов ВВ имеют самое низкое стандартное отклонение, отбирают для ВВ ВAF. Отбор выполняют для последующего применения при оценке фетальной фракции на основании сигналов от испытываемых образцов.

[000280] На Фиг. 9 проиллюстрирован способ обработки испытываемого образца 2500. Согласно одному варианту реализации способ 2500 выполняют с помощью процессора испытываемого образца 2300 согласно Фиг. 7. Конкретные этапы, показанные на Фиг. 8, не обязательно все необходимы в различных альтернативных вариантах реализации настоящего изобретения. Также в альтернативных вариантах реализации конкретные этапы и, в некоторых случаях, порядок могут отличаться от тех, которые показаны.

[000281] Этапы 2501, 2502, 2503, 2504 и 2505 по существу идентичны этапам 2401, 2402, 2403, 2404 и 2405 способа 2400 согласно Фиг. 8, и не будут повторно подробно описаны в настоящей заявке, но следует отметить, что этапы применительно к способу 2500 выполняют на файлах данных, полученных в результате сканирования испытываемых образцов (например, пациента), полученных от беременных женщин. Аналогично этапу 2404, результаты этапа 2504 представляют собой суммированные сигналы А-канала (например, медианное значение сигнала) для всех повторяющихся зондов, гибридизованных с аллелем А для каждого маркера для каждого испытываемого образца (сигналы А), и суммированные сигналы В-канала (например, медианное значение сигнала) для всех повторяющихся зондов, гибридизованных с аллелем В для каждого маркера для каждого испытываемого образца (сигналы В).

[000282] На этапе 2505, как и на этапе 2405, получают генотипы для каждого испытываемого образца в отношении каждого маркера. Несмотря на то, что образец от беременной женщины, предположительно, содержит фетальную фракцию, на этапе 2505 определяют явный генотип матери или генотип основной субпопуляции.

[000283] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для получения эталонных сигналов для последующих вычислений логарифмического отношения можно применять несколько разных испытываемых материнских образцов, обработанных на одном и том же планшете для образцов. В таких вариантах реализации на этапе 2518 происходит сортировка суммированных сигналов для всех испытываемых образцов по генотипу, чтобы определить эталонные сигналы таким же способом, как ранее описанный этап 2409 на Фиг. 8. Единственное отличие состоит в том, что на этапе 2518 применяют текущие испытываемые образцы на текущем планшете для образца, чтобы определить эталонные сигналы, специфичные для генотипа. Однако в альтернативных вариантах реализации, которые не включают этап 2518, вместо этого можно применять специфические для генотипа эталонные сигналы, установленные для группы эталонных образцов, предварительно проанализированных на другом планшете для образцов (например, как установлено на этапе 2409 согласно Фиг. 8).

[000284] На этапе 2507 вычисляют частоту аллеля В (BAF) для маркеров, идентифицированных на этапе 2408 согласно Фиг. 8, для которых материнский генотип испытываемого образца, как определено на этапе 2505 согласно Фиг. 9, представляет собой AA или BB. Перед вычислением BAF на этапе 2507 происходит преобразование значений сигнала А в прогнозируемые числа копий А и значений сигнала В в

прогнозируемые числа копий В с помощью способа, аналогичного тому, который описан применительно к этапу 2407 согласно Фиг. 8, то есть с применением эталонных моделей, таких как модели, определенные на этапе 2406 согласно Фиг. 8.

[000285] На этапе 2508 идентифицируют маркеры, для которых вычисленное значение BAF соответствует или превышает пороговое значение, что указывает на генотип плода АВ (т. е. отличный от генотипа матери, который представляет собой АА или ВВ для каждого маркера, используемого на этапе 2508). Согласно одному варианту реализации, если материнский генотип представляет собой АА для маркера, BAF от приблизительно 0,015 до 0,2 указывает на генотип плода, который отличается от АА, и инициирует отбор маркера для применения при определении фетальной фракции. Кроме того, в таком варианте реализации, если материнский генотип представляет собой ВВ для маркера, BAF от приблизительно 0,8 до 0,985 указывает на генотип плода, который отличается от ВВ, и инициирует отбор маркера для применения при определении фетальной фракции. Однако в альтернативных вариантах реализации эти диапазоны могут варьироваться, или для разных маркеров можно применять разные диапазоны, не обязательно отступая от объема этого аспекта настоящего изобретения.

[000286] На этапе 2509 оценивают фетальную фракцию с применением отобранных маркеров. В частности, согласно одному варианту реализации, фетальную фракцию оценивают для отобранных маркеров следующим образом. Для маркеров, в которых генотип матери представляет собой АА, фетальную фракцию α оценивают на основе уравнения $BAF = \alpha/2$, т.е. $\alpha = 2 * BAF$. Основанием этого уравнения является следующее: если мать представляет собой АА, а плод представляет собой АВ, $W_{score} = \alpha$ и $A_{score} = 2 * (1 - \alpha) + \alpha = 2 - \alpha$. Таким образом, $A_{score} + W_{score} = 2 - \alpha + \alpha = 2$. Аналогичным образом, если генотип матери представляет собой ВВ, фетальную фракцию β оценивают на основе уравнения $BAF = 1 - \beta/2$. Основанием этого уравнения является следующее: если мать представляет собой ВВ, а плод представляет собой АВ, $W_{score} = 2 * (1 - \beta) + \beta = 2 - \beta$ и $A_{score} = \beta$. Таким образом, $A_{score} + W_{score} = 2$ и $BAF = (2 - \beta)/2 = 1 - \beta/2$.

[000287] На этапе 2510 определяют, является ли фетальная фракция, определенная на этапе 2509, достаточно высокой и/или достаточно надежной для применения образца субъекта для скрининга анеуплоидии. Согласно одному варианту реализации на этапе 2510 достаточность/надежность фетальной фракции определяют в два этапа следующим образом: во-первых, определяют, имеет ли достаточно большая фракция маркеров, для которых генотип матери представляет собой АА, $\alpha \geq 3\%$ И имеет ли достаточно большая фракция маркеров, для которых генотип матери представляет собой ВВ, $\beta \geq 3\%$. Применение 3% порога может варьироваться в зависимости от шума конкретного применяемого анализа. Однако, согласно одному варианту реализации, предполагается, что уровень шума таков, что некоторые маркеры, которые представляют собой АА (или ВВ) как у матери, так и у плода, будут демонстрировать BAF, соответствующие фетальной фракции, более 3%. В отношении процента маркеров, которые должны

соответствовать 3% порогу, согласно одному варианту реализации, если менее 20% маркеров, для которых мать представляет собой AA, имеют $\alpha \geq 3\%$ или если менее 9% маркеров, для которых генотип матери представляет собой AA, имеют $\beta \geq 3\%$, то тест отклоняется. Соответствующие пороговые значения 20% и 9% могут варьироваться в альтернативных вариантах реализации. Обычно они представляют собой пороговые значения, определенные эмпирически, предназначенные для оптимизации специфичности и чувствительности, и они могут варьироваться в сторону любого из этих показателей эффективности в зависимости, в некоторых случаях, от шума при анализе.

[000288] Если образец проходит пороговые значения надежности, такие как, например, указанные выше, медиану α и медиану β по всем соответствующим маркерам, согласно одному варианту реализации, применяют для оценки фетальной фракции. Необязательно применяют дополнительный порог надежности и образец отклоняют, если α и β не находятся в пределах указанного числа процентных точек друг от друга для образца, который будет принят. Согласно одному варианту реализации указанное число процентных точек составляет 2-3% (например, если $\alpha=4\%$ и $\beta=8\%$, оценка считается недостаточно надежной). Однако, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, этот дополнительный порог надежности не применяется. Как только α и β установлены и считаются приемлемыми, образец отклоняют, если значения α и β (например, среднее или средневзвешенное значение) указывают на фетальную фракцию менее 4%.

[000289] Если результатом этапа 2510 является «нет», то на этапе 2511 образец отклоняют. Предположительно, в большинстве случаев, у беременной женщины может быть взят другой образец для повторного тестирования, если это необходимо, на более позднем сроке. В некоторых альтернативных вариантах реализации любое отклонение испытываемого образца на основании различных критериев, указанных выше для отклонения по надежности и/или достаточности, является только условным, и условно отклоненный образец все еще потенциально рассматривается, если соответствующие логарифмические отношения, проанализированные на этапе 2517 (более подробно обсуждается ниже), достаточно экстремальны, чтобы четко указывать на анеуплоидию.

[000290] Если результатом этапа 2510 является «да», то предпочтительно на этапе 2512 оцененная фетальная фракция применяется, чтобы обновить пороговые значения, используемые для логарифмического отношения. На этапе 2513 отбирают подходящий эталонный сигнал на основании определенного материнского генотипа для маркера (например, для конкретного маркера отбирают один из трех эталонных сигналов, показанных в таблице III выше, соответствующих материнскому генотипу) и определяют логарифмическое отношение сигнала испытываемого образца для соответствующего маркера (суммированный сигнал A+суммированный сигнал B) к соответствующему выбранному эталонному сигналу.

[000291] Дальнейшую обработку осуществляют на этапах 2515, 2516, 2519 и 2514, сходных с теми, которые уже описаны выше применительно к этапам 2412, 2413, 2415 и 2411, соответственно, согласно Фиг. 8.

[000292] На этапе 2517 проводят анализ полученных нормированных логарифмических отношений и проявлений анеуплоидии, если отношения выше порога, указывающего на аберрацию. Теоретическое логарифмическое отношение для нормального образца составляет 0, в то время как для трисомного образца с 5% фетальной фракцией оно составляет $\text{Log}_2((2*0,95+3*0,05)/2)=0,03562$. Однако в конкретном осуществленном варианте реализации коэффициент ослабления может быть определен эмпирическим путем и рассмотрен. Например, в варианте реализации с коэффициентом ослабления 0,8 прогнозируемое логарифмическое отношение для трисомии плода, когда фетальная фракция составляет 5%, составляет $0,8*0,03562$. В одном таком варианте реализации (т. е. с 5% фетальной фракцией и связанным с анализом ослаблением 0,8) пороговое логарифмическое отношение для проявления анеуплоидии может быть от 0,02 до 0,03. Однако в альтернативных вариантах реализации можно применять другие пороговые значения или другие способы вычисления ослабления.

[000293] Системы, устройства и способы, описанные в настоящей заявке, могут быть реализованы с применением компьютерного программного продукта, материально реализованного в носителе информации, например, в постоянном машиночитаемом устройстве для хранения информации, для выполнения с помощью программируемого процессора; и этапы способа, описанные в настоящей заявке, включая один или более этапов способов согласно Фиг. 8 и Фиг. 9, а также альтернативные варианты реализации могут быть реализованы с применением одной или более компьютерных программ, которые выполняются с помощью такого процессора. Компьютерная программа представляет собой набор инструкций компьютерной программы, которые можно использовать, непосредственно или косвенно, в компьютере для выполнения определенной деятельности или для достижения определенного результата. Компьютерная программа может быть написана на любом языке программирования, включая скомпилированные или интерпретированные языки, и может быть развернута в любой форме, в том числе как отдельная программа или как модуль, компонент, подпрограмма или другой блок, подходящий для применения в вычислительной среде.

[000294] На Фиг. 10 показан пример компьютерной системы 2600, одна или более из которых могут обеспечить один или более компонентов или альтернативных вариантов компьютера 2103 согласно Фиг. 5. Компьютерная система 2600 исполняет командный код, содержащийся в компьютерном программном продукте 2660 (который может представлять собой, например, компьютерный программный продукт 2104 варианта реализации согласно Фиг. 5). Компьютерный программный продукт 2660 содержит исполняемый код на машиночитаемом носителе, который может дать команду одному или более компьютерам, таким как компьютерная система 2600, выполнить обработку, которая осуществляет примерные этапы способа, выполняемые с помощью вариантов

реализации, упомянутых в настоящей заявке. Машиночитаемый носитель может представлять собой любой постоянный носитель, который хранит информацию в электронном виде и может быть доступен локально или удаленно, например, с помощью сетевого соединения. В альтернативных вариантах носитель может быть временным. Носитель может включать множество географически распределенных носителей, каждый из которых сконфигурирован для хранения разных частей исполняемого кода в разных местах и/или в разное время. Исполняемый командный код на машиночитаемом носителе дает указание проиллюстрированной компьютерной системе 2600 осуществить различные примерные задачи, описанные в настоящей заявке. Исполняемый код для управления осуществлением задач, описанных в настоящей заявке, как правило, будет реализован в программном обеспечении. Однако специалисты в данной области техники поймут, что компьютеры или другие электронные устройства могут использовать код, реализованный в аппаратных средствах, для выполнения многих или всех установленных задач, не отступая от настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники поймут, что можно найти много вариантов исполняемого кода, с помощью которых можно реализовать примерные способы в пределах сущности и объема настоящего изобретения.

[000295] Код или копия кода, содержащегося в компьютерном программном продукте 2660, может находиться на одном или более постоянных носителях для хранения информации (не показаны отдельно), обменивающихся данными с системой 2600 для загрузки и хранения в постоянном устройстве для хранения информации 2670 и/или памяти 2610 для выполнения с помощью процессора 2620. Компьютерная система 2600 также включает I/O-подсистему 2630 и периферийные устройства 2640. I/O-подсистема 2630, периферийные устройства 2640, процессор 2620, память 2610 и постоянное устройство для хранения информации 2670 связаны посредством шины 2650. Сходно с постоянным устройством для хранения информации 2670 и любым другим постоянным устройством для хранения информации, которое может содержать компьютерный программный продукт 2660, память 2610 представляет собой постоянный носитель (даже если она реализована как типичное устройство энергозависимой памяти компьютера). Кроме того, специалисты в данной области техники поймут, что в дополнение к хранению компьютерного программного продукта 2660 для осуществления обработки, описанной в настоящей заявке, память 2610 и/или постоянное устройство для хранения информации 2670 могут быть сконфигурированы для хранения различных элементов данных, упомянутых и проиллюстрированных в настоящей заявке.

[000296] Специалисты в данной области техники поймут, что компьютерная система 2600 иллюстрирует только один пример системы, в которой может быть реализован компьютерный программный продукт в соответствии с настоящим изобретением. В качестве упоминания только одного примера альтернативного варианта реализации, выполнение команд, содержащихся в компьютерном программном продукте в соответствии с настоящим изобретением, может быть распределено по нескольким компьютерам, таким как, например, компьютеры распределенной вычислительной сети.

[000297] Несмотря на то, что способы и системы, раскрытые в настоящей заявке, были конкретно описаны в отношении проиллюстрированных вариантов реализации, следует понимать, что различные изменения, модификации и адаптации могут быть сделаны на основании настоящего изобретения и предусмотрено, что они находятся в пределах его объема. Следует понимать, что объем и сущность настоящего изобретения не ограничиваются вариантами реализации, явным образом описанными в настоящей заявке, а, напротив, предназначены для включения различных модификаций и эквивалентных способов реализации, включенных в объем основных принципов, приведенных в качестве примера в различных вариантах реализации, упомянутых выше и ниже.

НАБОРЫ

[000298] Также раскрыты наборы для выполнения раскрытых способов. Наборы могут содержать пулы инвертируемых молекулярных зондов, сконструированных для амплификации множества целевых последовательностей. Целевые последовательности выбраны так, чтобы каждая из них содержала полиморфный сайт, представляющий интерес. Инвертируемые молекулярные зонды могут быть объединены в контейнеры, которые содержат 2 или более зондов, захватывающих различные последовательности. Набор может дополнительно содержать адаптеры, универсальные праймеры, дНТФ, лигазу, буфер и полимеразу.

[000299] Наборы можно применять для амплификации группы целевых последовательностей. Амплификацию можно осуществлять путем фрагментации образца, лигирования адаптера с фрагментами, гибридизации захватывающих зондов с лигированными с адаптером фрагментами, удлинения захватывающего зонда и амплификации удлиненных захватывающих зондов с применением пары универсальных праймеров.

[000300] Наборы также могут включать компьютерную систему для считывания и анализа данных микрочипа. Кроме того, наборы могут включать микрочип (чип) для гибридизации целевых последовательностей и введения в них метки.

ПРИЛОЖЕНИЯ

[000301] Способы и системы, описанные в настоящей заявке, можно применять для детектирования генетических отклонений многочисленных типов, которые указывают на наличие заболевания или возможность развития заболевания. Например, как описано в настоящей заявке, настоящее изобретение можно применять для детектирования вариантов числа копий в материнском образце, который содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию, причем каждая из указанных основной и второстепенной субпопуляций содержит целевую последовательность, расположенную в первой хромосомной области и содержащую полиморфный сайт. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения основная популяция представляет собой материнскую ДНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второстепенная популяция представляет собой фетальную ДНК. Согласно некоторым

вариантам реализации настоящего изобретения фетальная ДНК составляет не более 15% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты или не более 10% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты, или не более 5% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения основную субпопуляцию генотипируют в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второстепенную субпопуляцию генотипируют в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке.

[000302] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения образец содержит смешанную популяцию нуклеиновой кислоты из разных субпопуляций (например, основной и второстепенной субпопуляций). Согласно одному варианту реализации образец содержит смесь материнских нуклеиновых кислот (основная субпопуляция) и фетальных нуклеиновых кислот (второстепенная субпопуляция). Согласно одному варианту реализации нуклеиновые кислоты из каждой субпопуляции представляют собой бесклеточную ДНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения количество фетальной ДНК в образце варьируется от приблизительно 1% до приблизительно 50% от общего количества ДНК в образце. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения количество фетальной ДНК в образце составляет приблизительно 1%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45% или приблизительно 50% от общего количества ДНК в образце, или любое другое промежуточное количество в пределах указанных выше значений. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения количество фетальной ДНК в образце составляет не более приблизительно 1%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45% или приблизительно 50% от общего количества ДНК в образце, или любое другое промежуточное количество в пределах указанных выше значений. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения количество фетальной ДНК в образце составляет более или не менее чем приблизительно 1%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45% или приблизительно 50% от общего количества ДНК в образце, или любое другое промежуточное количество в пределах указанных выше значений.

[000303] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смешанная популяция нуклеиновой кислоты в образце, которая может быть обработана в соответствии с различными способами, раскрытыми в настоящей заявке, содержит бесклеточную ДНК из основных и второстепенных источников. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смешанная популяция нуклеиновой

кислоты представляет собой циркулирующую ДНК, выделенную из цельной крови, плазмы, сыворотки или некоторой другой жидкости организма. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит материнскую и фетальную бесклеточную ДНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения количество смешанной популяции нуклеиновой кислоты в образце находится в диапазоне от одного или более наногرامмов (нг) до приблизительно одного или более миллиграммов (мг). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения количество смешанной популяции нуклеиновой кислоты составляет приблизительно 1 нг, приблизительно 3 нг, приблизительно 5 нг, приблизительно 10 нг, приблизительно 15 нг, приблизительно 30 нг, приблизительно 40 нг, приблизительно 50 нг, приблизительно 100 нг, приблизительно 150 нг, приблизительно 300 нг, приблизительно 400 нг, приблизительно 500 нг, приблизительно 1 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 5 мг или более, или любое промежуточное количество в пределах указанных выше значений. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения используемое количество смешанной популяции нуклеиновой кислоты составляет не более приблизительно 50 нг, приблизительно 40 нг, приблизительно 30 нг, приблизительно 15 нг, приблизительно 10 нг, приблизительно 5 нг, приблизительно 3 нг или приблизительно 1 нг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения количество смешанной популяции нуклеиновой кислоты составляет приблизительно или менее чем приблизительно 50 нг, приблизительно 40 нг, приблизительно 30 нг, приблизительно 15 нг, приблизительно 10 нг, приблизительно 5 нг, приблизительно 3 нг или приблизительно 1 нг.

[000304] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения образец, который обрабатывают в соответствии с различными способами, раскрытыми в настоящей заявке, содержит смешанную популяцию нуклеиновой кислоты, происходящую из одного или более из цельной крови, плазмы, сыворотки, мочи, кала или слюны. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смешанная популяция нуклеиновой кислоты может происходить из крови. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кровь, например, цельную кровь, можно дополнительно обрабатывать, чтобы обеспечить плазму и/или сыворотку, из которых получают смешанную популяцию нуклеиновой кислоты для образца.

[000305] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения раскрытые способы (а также относящиеся к ним композиции, наборы и системы) можно применять при детектировании генетических изменений в небольших количествах цельной крови, плазмы, сыворотки или другой жидкости организма. Например, количество жидкости организма (например, цельной крови, плазмы, сыворотки или слюны), которое применяют для получения смешанной популяции нуклеиновой кислоты образца, может находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 до нескольких миллилитров (мл). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

количество цельной крови, плазмы, сыворотки или другой жидкости организма, которое применяют для получения смешанной популяции нуклеиновой кислоты, составляет приблизительно 0,1 мл, приблизительно 0,25 мл, приблизительно 0,5 мл, приблизительно 0,75 мл, приблизительно 1 мл, приблизительно 1,5 мл, приблизительно 2 мл, приблизительно 2,5 мл, приблизительно 3 мл, приблизительно 3,5 мл, приблизительно 4 мл, приблизительно 4,5 мл, приблизительно 5 мл, приблизительно 5,5 мл, приблизительно 6 мл, приблизительно 6,5 мл, приблизительно 7 мл, приблизительно 7,5 мл, приблизительно 8 мл, приблизительно 8,5 мл, приблизительно 9 мл, приблизительно 9,5 мл или приблизительно 10 мл, или любые промежуточные объемы в пределах указанных выше значений.

[000306] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в которых цельную кровь применяют, чтобы обеспечить смешанную популяцию нуклеиновой кислоты образца, количество крови составляет приблизительно или менее чем 0,1 мл, 0,25 мл, приблизительно 0,5 мл, приблизительно 0,75 мл, приблизительно 1 мл, приблизительно 1,5 мл, приблизительно 2 мл, приблизительно 2,5 мл или приблизительно 3 мл. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения количество крови составляет не более чем приблизительно 0,25 мл, приблизительно 0,5 мл, приблизительно 0,75 мл, приблизительно 1 мл, приблизительно 1,5 мл, приблизительно 2 мл, приблизительно 2,5 мл или приблизительно 3 мл.

[000307] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в которых плазму или сыворотку применяют, чтобы обеспечить смешанную популяцию нуклеиновой кислоты образца, количество плазмы или сыворотки составляет приблизительно или менее чем 0,1 мл, 0,25 мл, приблизительно 0,5 мл, приблизительно 0,75 мл, приблизительно 1 мл, приблизительно 1,5 мл, приблизительно 2 мл, приблизительно 2,5 мл или приблизительно 3 мл. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения количество плазмы или сыворотки составляет не более чем приблизительно 0,25 мл, приблизительно 0,5 мл, приблизительно 0,75 мл, приблизительно 1 мл, приблизительно 1,5 мл, приблизительно 2 мл, приблизительно 2,5 мл или приблизительно 3 мл.

[000308] Способы и системы, описанные в настоящей заявке, также можно применять для детектирования циркулирующих опухолевых клеток из биологического образца, например, крови, который содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию, причем каждая из указанных основной и второстепенной субпопуляций содержит целевую последовательность, расположенную в первой хромосомной области и содержащую полиморфный сайт. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второстепенную субпопуляцию можно генотипировать для идентификации известного генетического маркера рака, такого как SNP, хромосомная инверсия, хромосомная делеция, хромосомная вставка и тому подобное. Следует понимать, что в данной области техники известны многочисленные маркеры рака.

ПРИМЕРЫ

[000309] Пример 1: ренатурация

[000310] Ренатурацию выполняли, как описано в общих чертах для аналитического набора Oncoscan™ FFPE (каталожный № 902293), доступного от Thermo Fisher.

[000311] В общих чертах, аналитический планшет с микролунками на 96 образцов подготавливали на льду. В каждую лунку добавляли по 10 мкл ДНК. Образец ДНК может представлять собой аналитический образец гДНК (разрезанный до медианной длины 170 п.о.); аналитическую смесь гДНК, смешанной с трисомной гДНК при 0, приблизительно 5% или приблизительно 10% трисомии по отношению к аналитической гДНК (разрезанной до медианной длины 170 п.о.); или клиническую бесклеточную ДНК (бкДНК), очищенную из образцов материнской крови объемом 10-20 мл с помощью способов с применением набора для экстракции MagMAX (доступен от Thermo Fisher).

[000312] Основную смесь для ренатурации (АММ) получали путем смешивания буфера А аналитического набора Oncoscan™ FFPE со смесью МІР-зондов, содержащей приблизительно 48000 МІР из библиотеки OncoScan™. К каждому образцу ДНК добавляли приблизительно 2,24 мкл АММ, реагенты смешивали, встряхивали и центрифугировали.

[000313] Планшет с микролунками помещали в амплификатор и инкубировали в течение ночи в соответствии с протоколом анализа Oncoscan™ FFPE.

[000314] Пример 2: заполнение пропуска и разделение на каналы

[000315] Заполнение пропуска выполняли, как описано в общих чертах для анализа Oncoscan™ FFPE.

[000316] В общих чертах, буфер А, дНТФ и буфер для расщепления оттаивали на льду.

[000317] Рекомбинантный фермент SAP смешивали с буфером А и ферментной смесью для заполнения пропуска. По 2 мкл приготовленной смеси добавляли в планшет с микролунками из примера 1. Содержимое лунок затем равномерно разделяли на два новых планшета с микролунками для создания двух каналов.

[000318] Планшеты с микролунками помещали в амплификатор и инкубировали в течение 11 минут, используя программу Gap Fill, как описано в руководстве OncoScan™.

[000319] Пример 3: добавление дНТФ

[000320] По 2,4 мкл смеси АТФ/ТТФ или ГТФ/ЦТФ добавляли в лунки, содержащие ДНК, как описано в Примере 2. Планшеты с микролунками помещали обратно в амплификатор для завершения программы Gap-Fill.

[000321] Пример 4: обработка экзонуклеазой

[000322] Основную смесь Ехo (ЕММ) получали путем смешивания Ехo Міх из набора OncoScan™ с глицерином, и лунки обрабатывали, как описано в анализе Oncoscan™ FFPE.

[000323] В общих чертах, по 2 мкл ЕММ добавляли и смешивали с растворами в планшете с микролунками из примера 3. Планшеты с микролунками помещали в амплификатор и продолжали программу в соответствии с анализом Oncoscan™ FFPE.

[000324] Пример 5: расщепление и ПЦР

[000325] Основную смесь для расщепления (СММ) получали путем смешивания буфера для расщепления и фермента для расщепления в соответствии с анализом Oncoscan™ FFPE. Смеси для ПЦР получали путем смешивания комплементарной смеси (А/Т или Ц/Г) с Titanium Taq (доступна от ClonTech).

[000326] В лунки планшета с микролунками из примера 4 добавляли по 15,0 мкл СММ и смешивали.

[000327] В соответствующие лунки добавляли по 15,0 мкл смесей для ПЦР и смешивали.

[000328] Планшеты с микролунками помещали в амплификатор и инкубировали в соответствии с программой для расщепления и ПЦР, как описано в анализе Oncoscan™ FFPE.

[000329] Пример 6: ферментативное расщепление

[000330] Этап ферментативного расщепления выполняли в соответствии с анализом Oncoscan™ FFPE.

[000331] В общих чертах, буфер В оттаивали на льду. Основную смесь НаеIII (НЗММ) получали путем смешения буфера В с ферментом НаеIII и EhoI в соответствии с анализом Oncoscan™ FFPE.

[000332] По 40 мкл НЗММ добавляли в каждую лунку для образцов на новом планшете с микролунками. В каждой заполненной лунке 10 мкл продукта А/Т смешивали с 10 мкл продукта Ц/Г и перемешивали.

[000333] Планшет помещали в амплификатор и инкубировали с применением программы НаеIII Digest в соответствии с анализом Oncoscan™ FFPE.

[000334] Пример 7: денатурация и гибридизация

[000335] Денатурацию и гибридизацию выполняли в соответствии с инструкцией для набора реагентов Аxiom 2.0 (каталожный № 901758), доступного от Thermo Fisher, и с применением реагентов из этого набора.

[000336] В общих чертах, смесь Hybe оттаивали на льду, а затем в планшет с микролунками с помощью пипетки вносили по 82,3 мкл/лунку.

[000337] В каждую лунку, содержащую смесь Hybe, добавляли по 36 мкл ферментативного расщепленного продукта из Примера 6. Планшет инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре. Планшет с микролунками затем инкубировали в амплификаторе при 95°C в течение 10 минут, затем при 49°C в течение по меньшей мере 3 минут.

[000338] Приблизительно 100 мкл денатурированного продукта из каждой лунки добавляли в лоток Hybe из набора Аxiom 2.0, и планшет помещали в многоканальный инструмент GeneTitan™ (GTMC) и инкубировали в течение 23,5 часов.

[000339] Пример 8: промывка, фиксация и окрашивание

[000340] Лоток Hybe промывали и окрашивали в целом в соответствии с руководством Аxiom 2.0.

[000341] В общих чертах, лоток для поддержания подготавливали путем добавления 150 мкл буфера для поддержания Аxiom в каждую лунку планшета с микролунками. Стабилизирующий/фиксирующий раствор получали в соответствии с руководством Аxiom 2.0, и в каждую лунку планшета с микролунками добавляли по 150 мкл раствора.

[000342] Первую смесь для окрашивания получали в соответствии с руководством Аxiom 2.0 и модифицировали, используя поликлональное антитело, и в каждую лунку двух планшетов с микролунками добавляли по 105 мкл раствора.

[000343] Вторую смесь для окрашивания получали в соответствии с руководством Аxiom 2.0 и модифицировали, используя поликлональное антитело, и в каждую лунку планшета с микролунками добавляли по 105 мкл раствора.

[000344] Лотки помещали в инструмент GTMC. Инструмент GTMC выполнял промывку, окрашивание, фиксацию и поддержание-наполнение в соответствии с руководством Аxiom 2.0.

[000345] Пример 9: сбор данных

[000346] Лоток после окрашивания из примера 8 визуализировали в соответствии с протоколом Аxiom 2.0. Данные собирали и анализировали в соответствии с Примером 10.

[000347] Пример 10: анализ данных

[000348] Данные, полученные в примере 9, анализировали для определения фетальной фракции и детектирования хромосомных анеуплоидий, как описано выше в предыдущих разделах.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ анализа образца смешанной нуклеиновой кислоты, полученного из организма, включающий:

получение или извлечение из организма образца нуклеиновой кислоты, содержащего смешанную популяцию нуклеиновой кислоты, которая содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию, причем каждая из указанных основной и второстепенной субпопуляций содержит целевую последовательность, расположенную в первом локусе нуклеиновой кислоты и содержащую полиморфный сайт, при этом указанный полиморфный сайт может содержать комбинации первого нуклеотидного варианта и второго нуклеотидного варианта;

генотипирование указанного полиморфного сайта, причем указанное генотипирование включает:

(а) гибридизацию по меньшей мере одного фрагмента нуклеиновой кислоты, содержащего или происходящего из указанной популяции нуклеиновой кислоты и содержащего указанный полиморфный сайт, с олигонуклеотидным зондом из олигонуклеотидного чипа; и

(б) детектирование с олигонуклеотидного чипа, с применением детектора, первого сигнала, указывающего на наличие или отсутствие первого нуклеотидного варианта («сигнал А»), соответствующего первому аллельному варианту, и второго сигнала, указывающего на наличие или отсутствие второго нуклеотидного варианта («сигнал В»), соответствующего второму аллельному варианту.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий определение числа копий первого локуса нуклеиновой кислоты в указанной второстепенной субпопуляции, основной субпопуляции или как в основной, так и во второстепенной субпопуляциях с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

3. Способ по п. 1, дополнительно включающий определение числа копий хромосомы, содержащей первый локус нуклеиновой кислоты в указанной основной субпопуляции, второстепенной субпопуляции или как в основной, так и во второстепенной субпопуляциях с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

4. Способ по п. 1, дополнительно включающий определение генотипа полиморфного сайта для указанной второстепенной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

5. Способ по п. 1, дополнительно включающий определение генотипа полиморфного сайта для указанной основной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

6. Способ по п. 1, дополнительно включающий определение относительных количеств указанной основной субпопуляции и второстепенной субпопуляции в смешанной популяции нуклеиновой кислоты с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанная основная субпопуляция и второстепенная субпопуляция происходят из разных источников в организме.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит бесклеточную ДНК.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанная бесклеточная ДНК получена или происходит из крови, плазмы, сыворотки, мочи, кала или слюны организма.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный организм содержит опухоль, указанная основная субпопуляция содержит или происходит из здоровой ткани, а указанная второстепенная субпопуляция содержит или происходит из опухоли.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный организм представляет собой беременную женщину, указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты представляет собой бесклеточную ДНК, полученную из крови беременной женщины, указанная основная субпопуляция содержит или происходит из материнской нуклеиновой кислоты, а указанная второстепенная субпопуляция содержит или происходит из фетальной нуклеиновой кислоты.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанная второстепенная субпопуляция содержит фетальную ДНК, присутствующую не более чем в 20% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 15% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

14. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 10% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

15. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 5% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

16. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 15% и не менее 1% от общей бесклеточной ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

17. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет приблизительно 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

18. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

19. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

20. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит или происходит из бесклеточной ДНК, присутствующей в крови организма в концентрации не более 5 нг/мл и не менее 0,1 нг/мл.

21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что используемое количество смешанной популяции нуклеиновой кислоты составляет не более 50 нг, 40 нг, 30 нг, 15 нг, 10 нг, 5 нг, 3 нг или 1 нг.

22. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный полиморфный сайт содержит биаллельный однонуклеотидный полиморфизм (SNP), указанный первый нуклеотидный вариант представляет собой первый аллельный вариант SNP («аллель А»), а указанный второй нуклеотидный вариант представляет собой второй аллельный вариант SNP («аллель В»).

23. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный детектор включает первый канал детектирования и второй канал детектирования и дополнительно включает этапы детектирования первого сигнала в указанном первом канале детектирования и второго сигнала в указанном втором канале детектирования.

24. Способ по п. 22, отличающийся тем, что указанный SNP может содержать аллель А или аллель В, и при этом генотип указанного SNP может быть гомозиготным по аллелю А («АА»), гомозиготным по аллелю В («ВВ») или гетерозиготным («АВ»).

25. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап генотипирования дополнительно включает приведение образца нуклеиновой кислоты в контакт с пулом линейных инвертируемых молекулярных зондов, чтобы получить ренатурационную смесь.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит по меньшей мере 1000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

27. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит по меньшей мере 5000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

28. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит по меньшей мере 10000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

29. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит по меньшей мере 20000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

30. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит менее 200000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

31. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит менее 100000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

32. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанный пул линейных инвертируемых молекулярных зондов содержит менее 80000 линейных инвертируемых молекулярных зондов.

33. Способ по любому из пп. 25-32, отличающийся тем, что по меньшей мере 50% указанного пула линейных инвертируемых молекулярных зондов связывают фрагменты ДНК из хромосом 1, 5, 13, 18, 21, X и Y.

34. Способ по любому из пп. 25-32, отличающийся тем, что по меньшей мере 60% указанного пула линейных инвертируемых молекулярных зондов связывают фрагменты ДНК из хромосом 1, 5, 13, 18, 21, X и Y.

35. Способ по любому из пп. 25-32, отличающийся тем, что по меньшей мере 70% указанного пула линейных инвертируемых молекулярных зондов связывают фрагменты ДНК из хромосом 1, 5, 13, 18, 21, X и Y.

36. Способ по любому из пп. 25-32, отличающийся тем, что отношение общего числа линейных инвертируемых молекулярных зондов к общему числу копий фрагмента ДНК составляет приблизительно 40000:1.

37. Способ по любому из пп. 25-32, отличающийся тем, что отношение общего числа линейных инвертируемых молекулярных зондов к общему числу копий фрагмента ДНК составляет по меньшей мере 15000:1.

38. Способ по любому из пп. 25-32, отличающийся тем, что отношение общего числа линейных инвертируемых молекулярных зондов к общему числу копий фрагмента ДНК составляет по меньшей мере 30000:1.

39. Способ по любому из пп. 25-32, отличающийся тем, что отношение общего числа линейных инвертируемых молекулярных зондов к общему числу копий фрагмента ДНК составляет менее 100000:1.

40. Способ по любому из пп. 25-32, отличающийся тем, что отношение общего числа линейных инвертируемых молекулярных зондов к общему числу копий фрагмента ДНК составляет менее 60000:1.

41. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап генотипирования дополнительно включает разделение ренатурационной смеси на композицию первого канала и композицию второго канала.

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что указанная композиция первого канала содержит смесь дАТФ и дТТФ.

43. Способ по п. 41 или 42, отличающийся тем, что указанная композиция первого канала по существу не содержит дГТФ или дЦТФ.

44. Способ по любому из пп. 41-43, отличающийся тем, что указанная композиция второго канала содержит смесь дГТФ и дЦТФ.

45. Способ по любому из пп. 41-44, отличающийся тем, что указанная композиция второго канала по существу не содержит дАТФ или дТТФ.

46. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап генотипирования дополнительно включает добавление смеси

дезоксинуклеотидов к каждой из указанной композиции первого и второго каналов, причем смесь дезоксинуклеотидов, добавленная к композиции первого канала, отличается от смеси дезоксинуклеотидов, добавленной к композиции второго канала.

47. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап генотипирования дополнительно включает приведение указанных композиций первого и второго каналов в контакт с лигазой с получением композиций с первым и вторым кольцевыми зондами.

48. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап генотипирования дополнительно включает расщепление композиций с первым и вторым кольцевыми зондами с получением фрагментов нуклеиновой кислоты, содержащих или происходящих из популяции нуклеиновой кислоты.

49. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап генотипирования дополнительно включает амплификацию указанных первого и второго фрагментов нуклеиновой кислоты, содержащих или происходящих из популяции нуклеиновой кислоты.

50. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап амплификации осуществляют в присутствии полимеразы.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что указанная полимеразы представляет собой полимеразу горячего старта, содержащую полимеразу и ингибитор полимеразы.

52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что указанный ингибитор полимеразы диссоциирует от полимеразы при температуре по меньшей мере 40°C.

53. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап генотипирования дополнительно включает объединение указанных первого и второго фрагментов нуклеиновой кислоты, содержащих или происходящих из популяции нуклеиновой кислоты.

54. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап детектирования дополнительно включает введение метки в поверхностно-связанные первый и второй фрагменты нуклеиновой кислоты, содержащие или происходящие из популяции нуклеиновой кислоты, с применением первого агента, который связывается с первым аллельным вариантом, и второго агента, который связывается со вторым аллельным вариантом.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что указанный первый агент содержит антитело.

56. Способ по п. 54 или 55, отличающийся тем, что указанный первый агент содержит последовательность, комплементарную части первой целевой последовательности.

57. Способ по любому из пп. 54-56, отличающийся тем, что указанный первый агент дополнительно содержит распознаваемый элемент, конъюгированный с комплементарной последовательностью.

58. Способ по п. 54, отличающийся тем, что указанный распознаваемый элемент представляет собой биотин.

59. Способ по любому из пп. 54-58, отличающийся тем, что указанный первый агент дополнительно содержит флуоресцентномеченый авидин.

60. Способ по любому из пп. 54-59, отличающийся тем, что указанный первый агент дополнительно содержит антитело, которое связывает авидин.

61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что указанное антитело, которое связывает авидин, помечено биотином.

62. Способ по любому из пп. 54-61, отличающийся тем, что указанный первый агент дополнительно содержит антитело, которое связывает указанный распознаваемый элемент.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что указанное антитело, которое связывает распознаваемый элемент, помечено с применением репортера.

64. Способ по любому из пп. 54-63, отличающийся тем, что указанный первый агент содержит флуорофор.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что указанный флуорофор первого агента имеет пик испускания флуоресценции от приблизительно 640 до приблизительно 680 нм.

66. Способ по п. 64 или 65, отличающийся тем, что указанный флуорофор первого агента представляет собой аллофикоцианин.

67. Способ по п. 54, отличающийся тем, что указанный второй агент содержит последовательность, комплементарную части второй целевой последовательности.

68. Способ по п. 67, отличающийся тем, что указанный второй агент дополнительно содержит распознаваемый элемент, конъюгированный с комплементарной последовательностью.

69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что указанный распознаваемый элемент представляет собой FAM.

70. Способ по любому из пп. 67-69, отличающийся тем, что указанный второй агент дополнительно содержит первое антитело, которое связывает указанный распознаваемый элемент.

71. Способ по любому из пп. 67-69, отличающийся тем, что указанный второй агент дополнительно содержит второе антитело, которое связывает первое антитело.

72. Способ по п. 71, отличающийся тем, что указанное первое антитело, второе антитело или оба первое и второе антитела помечены флуорофором.

73. Способ по п. 72, отличающийся тем, что указанный флуорофор второго агента имеет пик испускания флуоресценции от приблизительно 560 до приблизительно 600 нм.

74. Способ по п. 73, отличающийся тем, что указанный флуорофор второго агента представляет собой фикоэритрин.

75. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап приведения композиции бесклеточной ДНК в контакт происходит в реакционном объеме, который составляет менее 50 мкл.

76. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап приведения композиции бесклеточной ДНК в контакт происходит в реакционном объеме, который составляет менее 40 мкл.

77. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап приведения композиции бесклеточной ДНК в контакт происходит в реакционном объеме, который составляет менее 30 мкл.

78. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный этап приведения композиции бесклеточной ДНК в контакт происходит в реакционном объеме, который составляет менее 20 мкл.

79. Набор, который можно применять для детектирования изменения числа копий у плода, включающий:

а. устройство захвата, имеющее множество фрагментов нуклеиновой кислоты, соответствующих по меньшей мере одной целевой хромосомной области, присоединенных к нему;

б. множество молекулярных зондов, способных гибридизоваться со смешанной популяцией нуклеиновой кислоты, которая содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию, причем каждая из указанных основной и второстепенной субпопуляций содержит целевую последовательность, расположенную в первой хромосомной области и содержащую полиморфный сайт, при этом указанный полиморфный сайт может содержать комбинации первого нуклеотидного варианта и второго нуклеотидного варианта; и

с. инструкции по генотипированию и детектированию указанного полиморфного сайта.

80. Набор по п. 79, отличающийся тем, что указанное устройство захвата представляет собой микрочип.

81. Набор по п. 79 или 80, отличающийся тем, что указанная целевая хромосомная область находится на одной или более из хромосом 1, 5, 13, 18, 21, X и Y.

82. Набор по любому из пп. 79-81, отличающийся тем, что молекулярные зонды сконструированы для генотипирования однонуклеотидного полиморфизма на одной или более из хромосом 1, 5, 13, 18, 21, X и Y.

83. Способ детектирования числа копий у плода, включающий:

получение биологического образца от субъекта, который представляет собой беременную женщину, причем указанный биологический образец содержит нуклеиновую кислоту как материнского, так и фетального происхождения, содержащую целевую последовательность нуклеиновой кислоты, расположенную на первой хромосоме, причем указанная целевая последовательность нуклеиновой кислоты содержит полиморфный сайт для однонуклеотидного полиморфизма (SNP);

получение популяции фрагментов нуклеиновой кислоты, содержащих или происходящих из указанной целевой последовательности нуклеиновой кислоты;

проведение первого анализа, включающего (а) приведение указанной популяции фрагментов нуклеиновой кислоты в контакт с олигонуклеотидным чипом, содержащим первый олигонуклеотидный зонд, сконфигурированный для гибридизации с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей полиморфный сайт SNP; и (b) детектирование, с применением детектора, первых сигналов, указывающих на гибридизацию олигонуклеотидного зонда с одним или более фрагментами нуклеиновой кислоты популяции, содержащей первый аллельный вариант («аллель А») SNP, и вторых сигналов, указывающих на гибридизацию олигонуклеотидного зонда с одним или более фрагментами нуклеиновой кислоты популяции, содержащей второй аллельный вариант («аллель В») SNP; и

определение, используя указанные первые сигналы и вторые сигналы, любого одного или более из следующего:

- числа копий первой хромосомы у плода;
- фетального генотипа в отношении SNP;
- материнского генотипа в отношении SNP; и
- фетальной фракции указанного образца.

84. Способ по п. 83, дополнительно включающий вычисление наблюдаемой частоты аллеля В (BAF) для аллельных вариантов SNP, присутствующих в образце.

85. Способ по п. 84, дополнительно включающий вычисление фетальной фракции образца с применением указанного BAF.

86. Способ по п. 84, отличающийся тем, что указанный полиморфный сайт SNP может быть гомозиготным по аллелю А («АА»), гомозиготным по аллелю В («ВВ») или гетерозиготным («АВ»).

87. Способ по любому из пп. 83-86, отличающийся тем, что указанный детектор имеет первый и второй каналы детектирования, и указанное генотипирование дополнительно включает детектирование первых сигналов в указанном первом канале и вторых сигналов в указанном втором канале.

88. Способ по п. 87, отличающийся тем, что указанные первые сигналы в первом канале отражают количество аллеля А, присутствующего в популяции нуклеиновой кислоты, а указанные вторые сигналы отражают количество аллеля В, присутствующего в популяции нуклеиновой кислоты.

89. Способ по п. 88, отличающийся тем, что определение числа копий первой хромосомы у плода включает определение отношения первого значения ко второму значению.

90. Способ по п. 86, дополнительно включающий определение первого материнского генотипа SNP.

91. Способ по п. 83, отличающийся тем, что указанный образец нуклеиновой кислоты содержит материнскую кровь, плазму или сыворотку, а указанная нуклеиновая кислота как материнского, так и фетального происхождения содержит бесклеточную ДНК (бкДНК).

92. Способ по п. 83, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 20% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

93. Способ по п. 83, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 15% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

94. Способ по п. 83, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 10% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

95. Способ по п. 83, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 5% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

96. Способ по п. 83, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 15% и не менее 1% от общей бесклеточной ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

97. Способ по п. 83, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет приблизительно 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

98. Способ по п. 83, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

99. Способ по п. 83, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

100. Способ по п. 89, дополнительно включающий вычисление указанного первого значения путем нормирования и суммирования указанных первых сигналов, чтобы получить нормированное и суммированное значение первого сигнала, нормирования указанных вторых сигналов, чтобы получить нормированное и суммированное значение второго сигнала, и сложение нормированного и суммированного значения первого сигнала с нормированным и суммированным значением второго сигнала с получением первого значения.

101. Способ по п. 100, отличающийся тем, что указанное второе значение получают путем:

проведения первого анализа на дополнительных биологических образцах, которые применяют в качестве эталонных образцов, и идентификации эталонных образцов, имеющих генотип SNP, соответствующий первому материнскому генотипу SNP;

в результате проведения первого анализа на эталонных образцах получение эталонных сигналов первых сигналов, детектированных в первом канале, отражающих количество аллеля А, присутствующего в полиморфном сайте SNP, относительно дополнительных биологических образцов, и получение вторых эталонных сигналов, отражающих количество аллеля В, присутствующего в полиморфном сайте.

102. Способ по п. 101, отличающийся тем, что указанные дополнительные биологические образцы получены от небеременных индивидуумов.

103. Способ по п. 101, отличающийся тем, что указанные дополнительные биологические образцы включают несколько образцов от беременных женщин и несколько образцов от небеременных индивидуумов.

104. Способ по п. 101, отличающийся тем, что указанные дополнительные биологические образцы включают образцы от беременных женщин, которые анализируют

на том же олигонуклеотидном чипе, что и биологический образец от беременной женщины-субъекта.

105. Способ анализа образца смешанной нуклеиновой кислоты, полученного из организма, включающий:

получение или извлечение из организма образца нуклеиновой кислоты, содержащего смешанную популяцию нуклеиновой кислоты, которая содержит основную субпопуляцию и второстепенную субпопуляцию, причем каждая из указанных основной и второстепенной субпопуляций содержит целевую последовательность, расположенную в первой хромосомной области и содержащую полиморфный сайт, при этом указанный полиморфный сайт может содержать любую комбинацию первого нуклеотидного варианта и второго нуклеотидного варианта; и

генотипирование указанного полиморфного сайта, причем указанное генотипирование включает:

(а) гибридизацию по меньшей мере одного фрагмента нуклеиновой кислоты, происходящего из указанной смешанной популяции нуклеиновой кислоты и содержащего указанный полиморфный сайт, с олигонуклеотидным зондом из олигонуклеотидного чипа; и

(b) детектирование с олигонуклеотидного чипа, с применением детектора, первого сигнала, указывающего на наличие или отсутствие первого нуклеотидного варианта («сигнал А»), и второго сигнала, указывающего на наличие или отсутствие второго нуклеотидного варианта («сигнал В»).

106. Способ по п. 105, дополнительно включающий определение числа копий первой хромосомной области в указанной второстепенной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

107. Способ по п. 105, дополнительно включающий определение числа копий первой хромосомной области в указанной основной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

108. Способ по п. 105, дополнительно включающий определение генотипа полиморфного сайта для указанной второстепенной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

109. Способ по п. 105, дополнительно включающий определение генотипа полиморфного сайта для указанной основной субпопуляции с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

110. Способ по п. 105, дополнительно включающий определение относительных количеств указанных основной субпопуляции и второстепенной субпопуляции в смешанной популяции нуклеиновой кислоты с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

111. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанные основная субпопуляция и второстепенная субпопуляция происходят из разных источников в организме.

112. Способ по п. 105, отличающийся тем, что указанный детектор имеет первый канал детектирования и второй канал детектирования и дополнительно включает этапы детектирования первого сигнала в указанном первом канале детектирования и второго сигнала в указанном втором канале детектирования.

113. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит бесклеточную ДНК.

114. Способ по п. 111, отличающийся тем, что указанная бесклеточная ДНК получена или происходит из крови, плазмы, сыворотки, мочи, кала или слюны организма.

115. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный организм содержит опухоль, указанная основная субпопуляция содержит или происходит из здоровой ткани, а указанная второстепенная субпопуляция содержит или происходит из опухоли.

116. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный организм представляет собой беременную женщину, указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты представляет собой бесклеточную нуклеиновую кислоту, полученную из крови женщины, указанная основная субпопуляция представляет собой материнскую нуклеиновую кислоту, а указанная второстепенная субпопуляция содержит или происходит из фетальной нуклеиновой кислоты.

117. Способ по п. 116, отличающийся тем, что указанная второстепенная субпопуляция содержит фетальную ДНК, присутствующую не более чем в 40% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

118. Способ по п. 116, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 25% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

119. Способ по п. 116, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 15% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

120. Способ по п. 116, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 5% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

121. Способ по п. 116, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 15% и не менее 1% от общей бесклеточной ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

122. Способ по п. 116, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет приблизительно 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

123. Способ по п. 116, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет не более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

124. Способ по п. 116, отличающийся тем, что указанная фетальная ДНК составляет более 30% от общей ДНК в образце нуклеиновой кислоты.

125. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанная смешанная популяция нуклеиновой кислоты содержит или происходит из бесклеточной ДНК, присутствующей в крови организма в концентрации не более 5 нг/мл и не менее 0,1 нг/мл.

126. Способ по п. 105, отличающийся тем, что используемое количество смешанной популяции нуклеиновой кислоты составляет не более 50 нг, 40 нг, 30 нг, 15 нг, 10 нг, 5 нг, 3 нг или 1 нг.

127. Способ по п. 105 или 116, отличающийся тем, что указанный полиморфный сайт содержит биаллельный SNP, указанный первый нуклеотидный вариант представляет собой первый аллельный вариант SNP («аллель А»), а указанный второй нуклеотидный вариант представляет собой второй аллельный вариант SNP («аллель В»).

128. Способ по п. 127, отличающийся тем, что указанный биаллельный SNP может содержать один или оба из первого аллельного варианта («аллель А») или второго аллельного варианта («аллель В»), и при этом генотип указанного SNP может быть гомозиготным по аллелю А («АА»), гомозиготным по аллелю В («ВВ») или гетерозиготным («АВ»).

129. Способ по п. 127, дополнительно включающий вычисление наблюдаемой частоты аллеля В (BAF) для указанного SNP в образце нуклеиновой кислоты.

130. Способ по п. 129, дополнительно включающий вычисление фетальной фракции в образце с применением указанного BAF.

131. Способ по п. 105 или 116, отличающийся тем, что указанный первый сигнал отражает количество аллеля А, присутствующего в полиморфном сайте, а указанный второй сигнал отражает количество аллеля В, присутствующего в полиморфном сайте.

132. Способ по п. 105, 116 или 131, отличающийся тем, что указанный организм представляет собой беременную женщину, и при этом указанный способ дополнительно включает определение числа копий первой хромосомной области у плода путем определения отношения первого значения ко второму значению.

133. Способ по п. 132, дополнительно включающий вычисление указанного первого значения путем сложения первого сигнала, или его нормированного значения, и второго сигнала, или его нормированного значения.

134. Способ по п. 133, дополнительно включающий определение первого материнского генотипа SNP с применением указанного первого сигнала и указанного второго сигнала.

135. Способ, включающий выполнение способа по п. 134 с применением одного или более дополнительных биологических образцов от беременных женщин и идентификацию подгруппы дополнительных биологических образцов, имеющих генотип SNP, соответствующий первому материнскому генотипу SNP, а также получение второго значения путем получения сумм сигнала А и сигнала В от каждого дополнительного образца в подгруппе дополнительных биологических образцов и получения среднего указанных сумм в качестве второго значения.

136. Способ по п. 105, 115 или 116, отличающийся тем, что указанный полиморфный сайт содержит мутацию нуклеотида, указанный первый нуклеотидный вариант представляет собой мутированный вариант целевой последовательности нуклеиновой кислоты, а указанный второй нуклеотидный вариант представляет собой

вариант полиморфного сайта дикого типа, указанный сигнал А отражает количество мутированного варианта, а указанный сигнал В отражает количество варианта дикого типа в образце.

137. Система для применения при детектировании изменения числа копий в образце нуклеиновой кислоты, включающая:

зондовый микрочип;

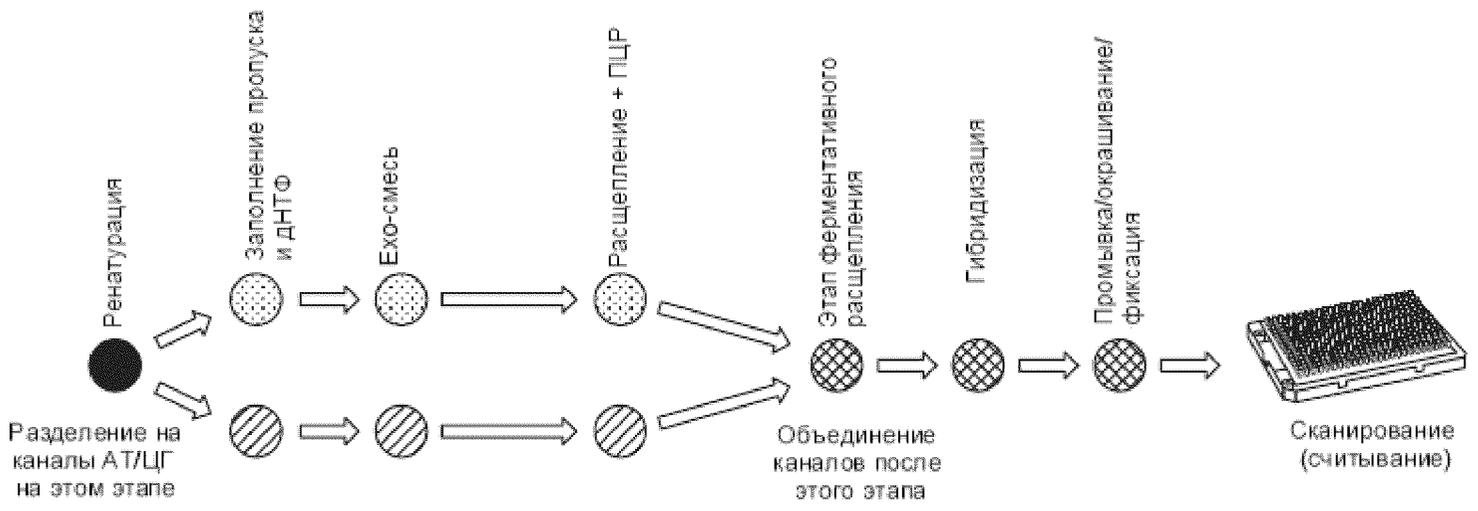
сканер;

процессор; и

память, в которой закодированы инструкции для осуществления обработки, упомянутой в любом из пп. 83-136 выше.

138. Компьютерный программный продукт на постоянном машиночитаемом носителе, на котором хранятся инструкции для осуществления обработки, упомянутой в любом из пп. 83-137 выше.

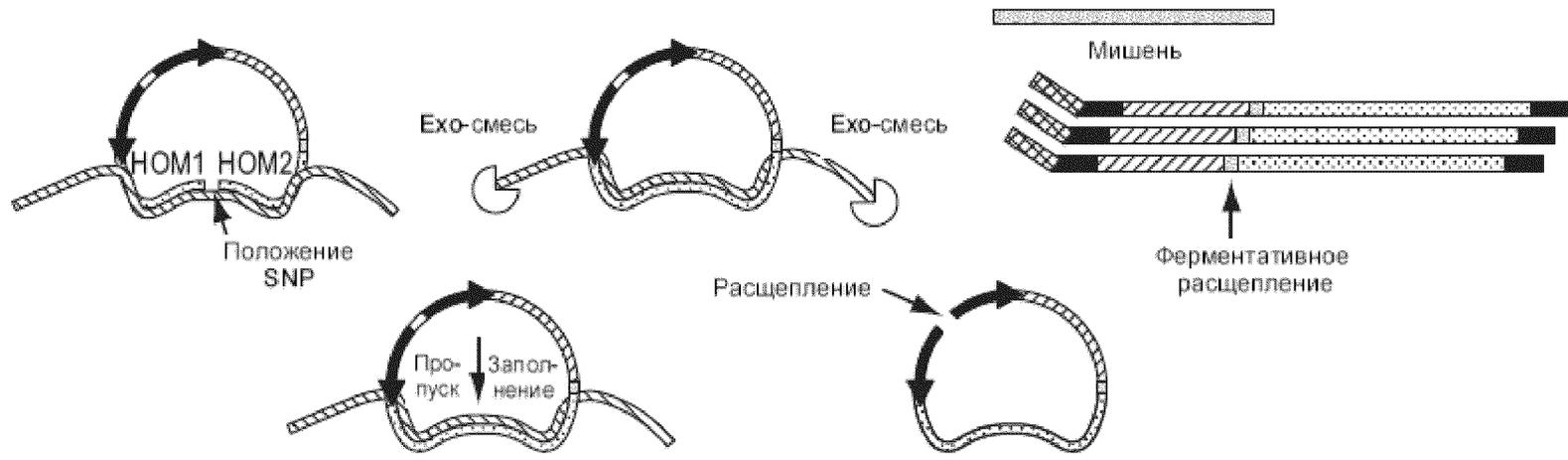
По доверенности



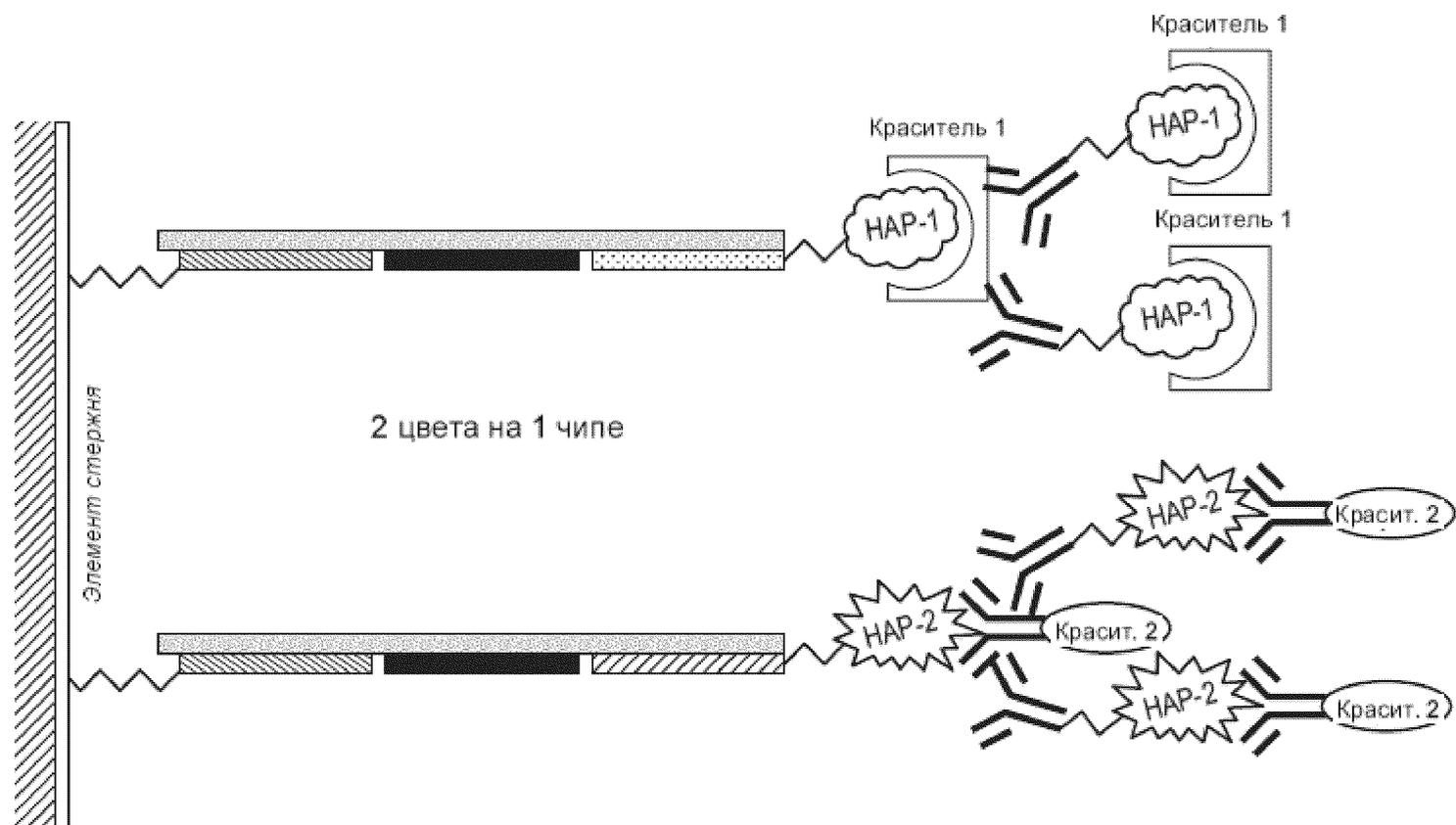
ФИГ. 1



ФИГ. 2

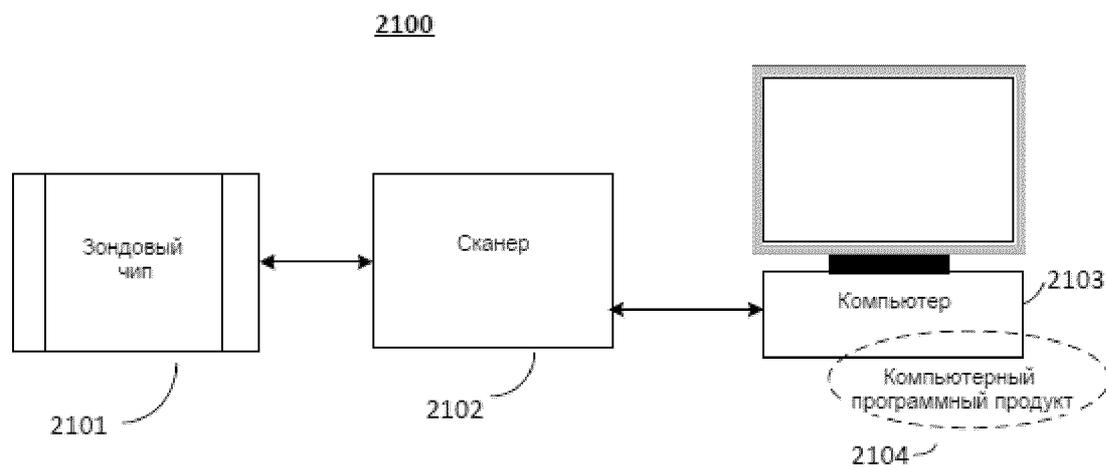


ФИГ. 3

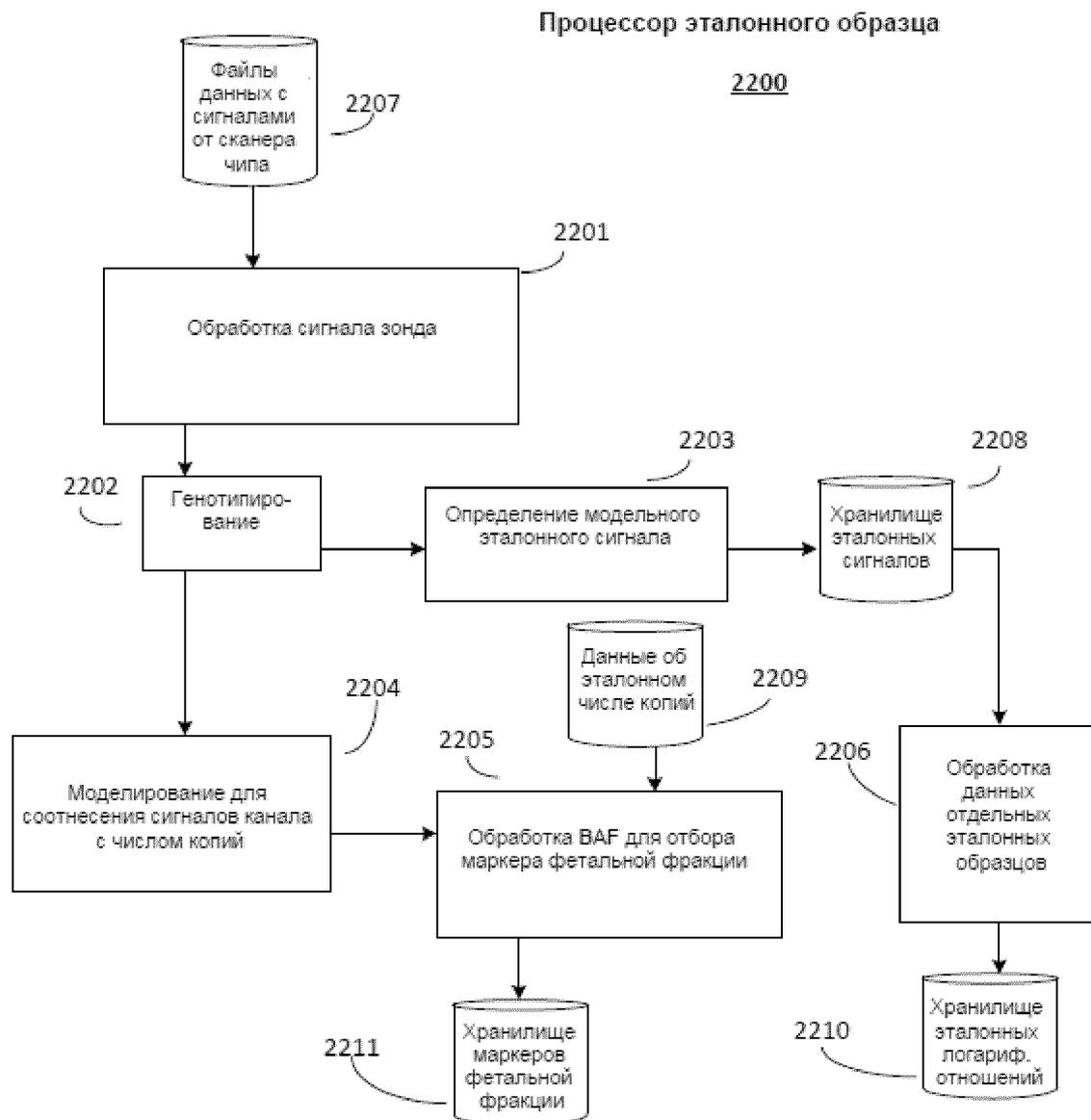


ФИГ. 4

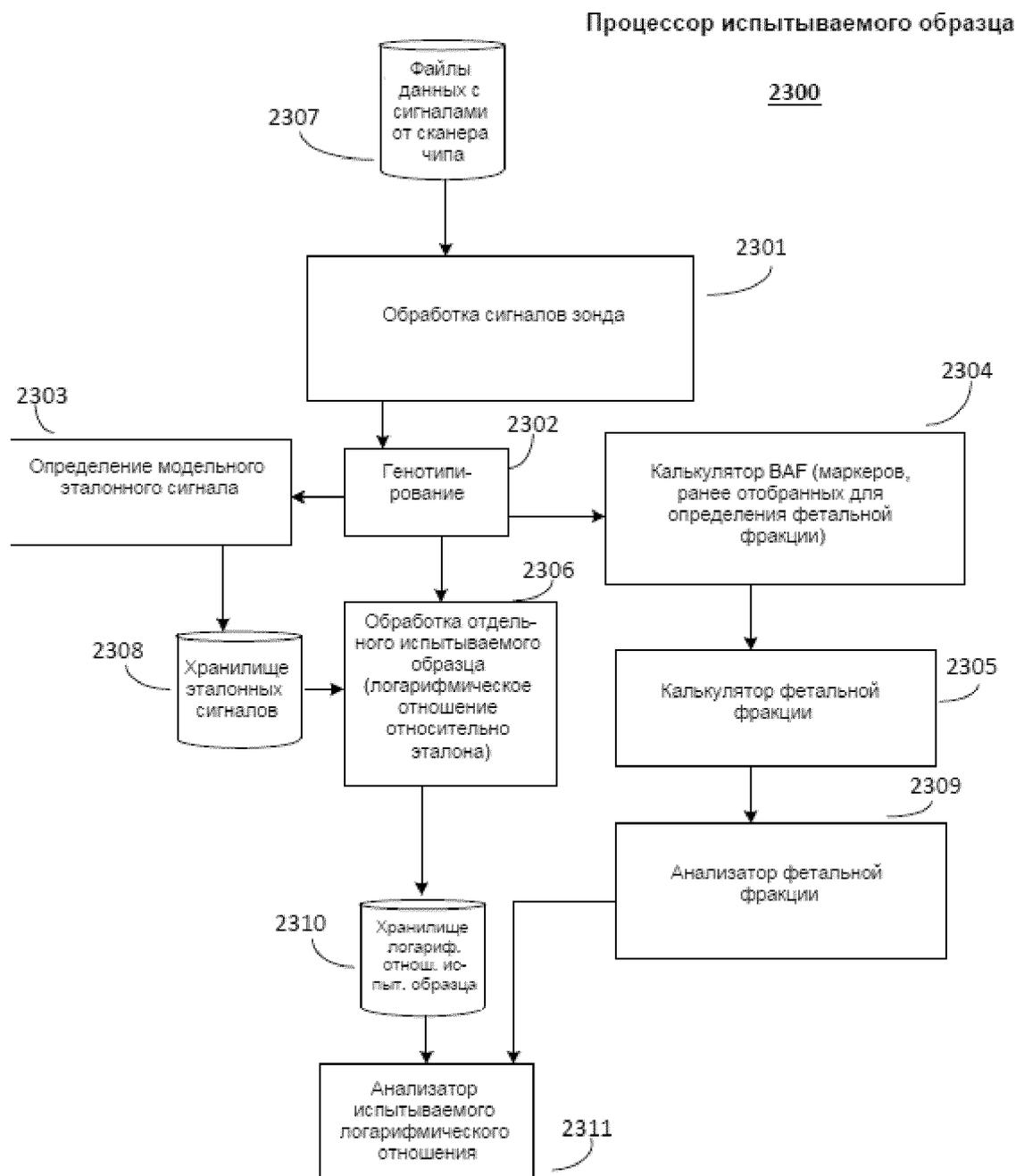
Система обработки образца



ФИГ. 5

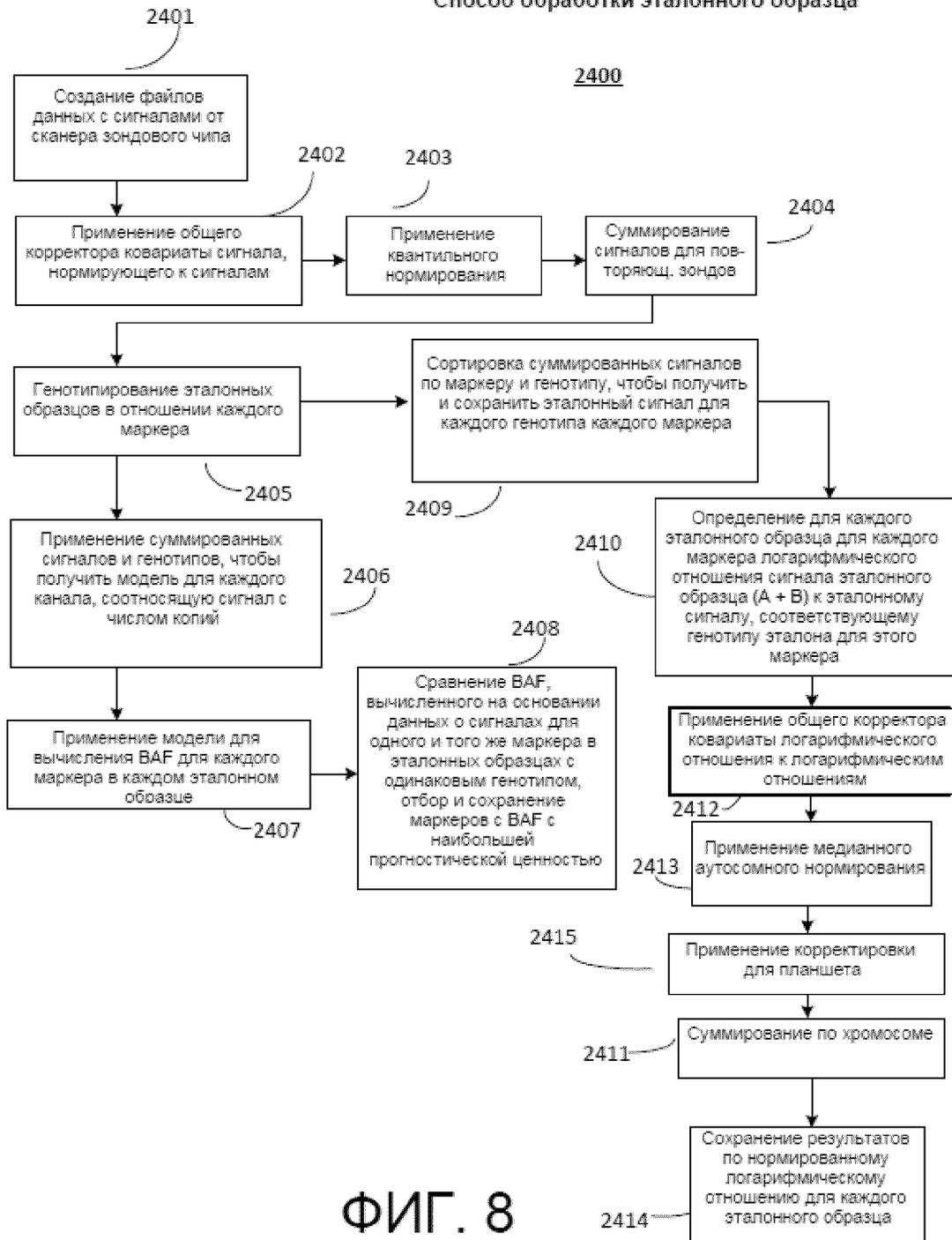


ФИГ. 6



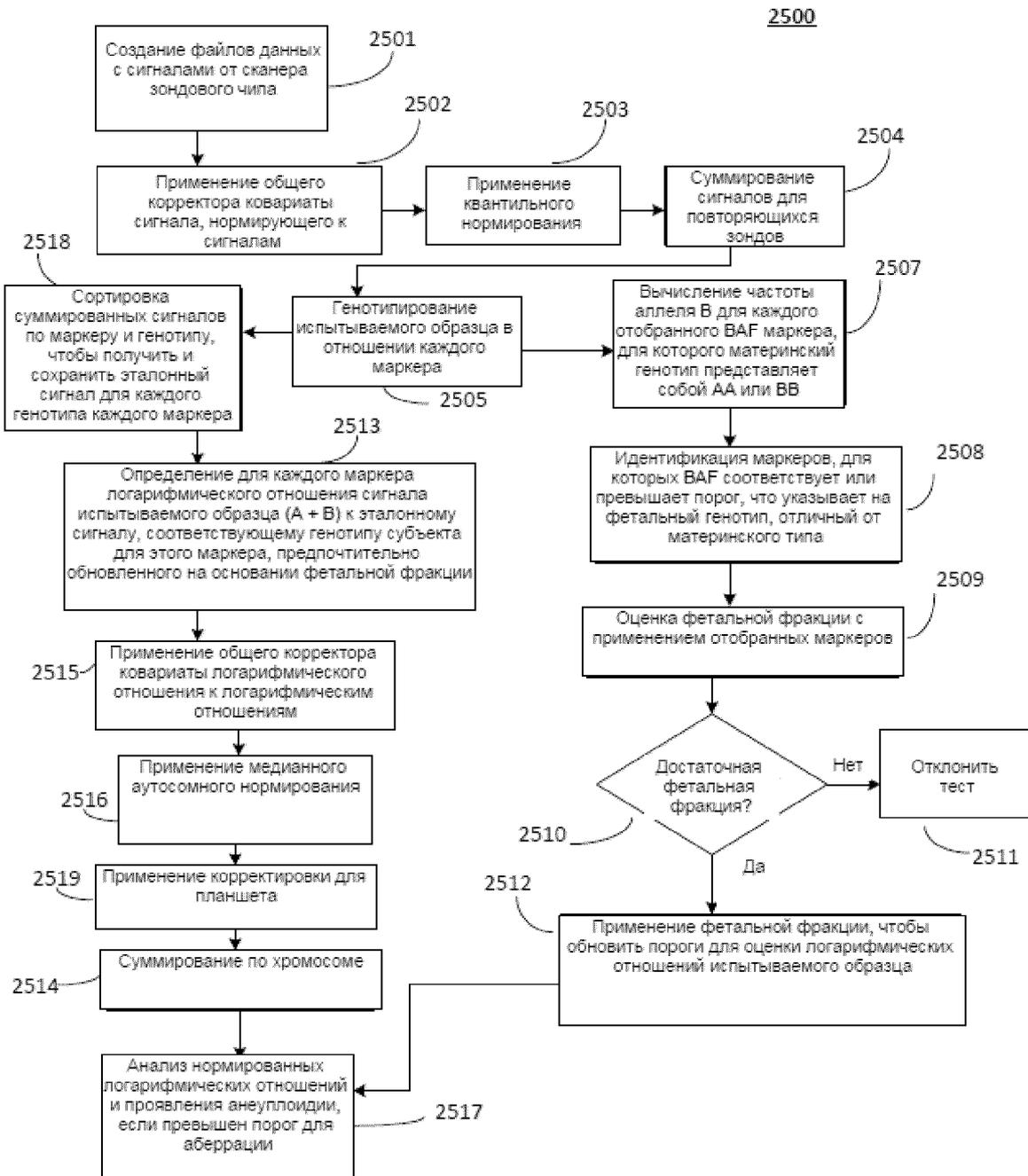
ФИГ. 7

Способ обработки эталонного образца

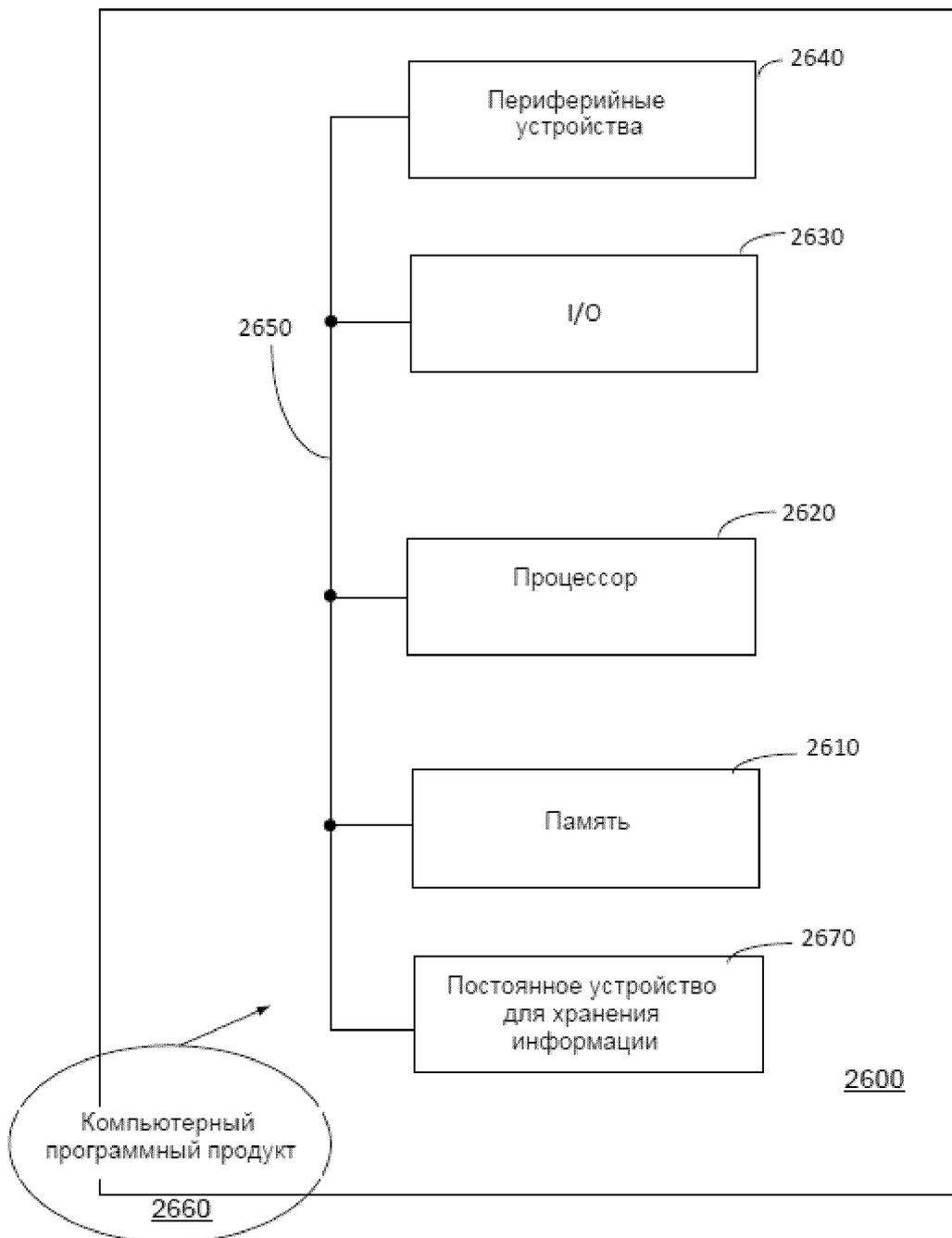


ФИГ. 8

Способ обработки испытываемого образца



ФИГ. 9



ФИГ. 10