(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월30일
(11) 등록번호 10-2800957
(24) 등록일자 2025년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6844 (2018.01) *B01L 3/00* (2023.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6844 (2018.05)
B01L 3/5023 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7010731
(22) 출원일자(국제) 2018년09월14일
심사청구일자 2021년09월10일
(85) 번역문제출일자 2020년04월13일
(65) 공개번호 10-2020-0054268
(43) 공개일자 2020년05월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/051078
(87) 국제공개번호 WO 2019/055780
국제공개일자 2019년03월21일
(30) 우선권주장
62/558,705 2017년09월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2017074688 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
애보트 다이어그노스틱스 스카보로, 인크.
미국 메인 (우편번호 04074) 스카보로 사우스게이트 로드 10
(72) 발명자
파웰 마이클 엘.
미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 9975 서머스 리지 로드 알레레 샌디에고 인크 내
볼러 프랭크 레이
미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 9975 서머스 리지 로드 알레레 샌디에고 인크 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

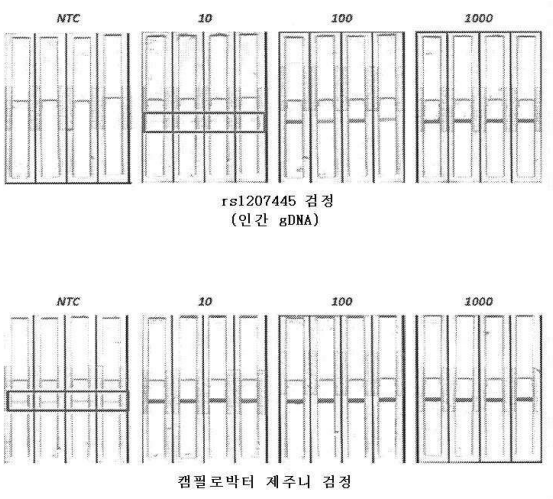
전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 **이중-합텐 프로브를 이용한 재조합효소 폴리머라제 증폭의 검출**

(57) 요 약

본 개시내용은 이중-합텐 프로브를 사용하여 표적 핵산 서열을 검출하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 개시내용은 재조합효소 폴리머라제 증폭(RPA) 및 표적 핵산 서열을 검출하는 이중-합텐 프로브를 사용하는 것에 관한 것이다. 몇몇 경우에, 상기 검출은 측면 유동 스트립 상에서 이루어진다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12Y 301/11002 (2013.01)
C12Y 302/02023 (2013.01)
B01L 2300/0825 (2013.01)
C12Q 2527/125 (2019.08)

(72) 발명자
그린우드 캐서린 진
미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 9975 서머스 리지 로드 알레레 샌디에고 인크 내
피에픈버그 올라프
미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 9975 서머스 리지 로드 알레레 샌디에고 인크 내

아르메스 나일 에이.
미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 9975 서머스 리지 로드 알레레 샌디에고 인크 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

크라우딩 촉진제(crowding agent);

이중-합텐 이탈기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 프로브; 및

뉴클레아제(nuclease) 효소

를 포함하고,

상기 크라우딩 촉진제는 3 킬로돌턴의 분자량을 갖는 PEG인, 재조합효소(recombinase) 폴리머라제 증폭 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 뉴클레아제는 폼아미도피리미딘 DNA 글리코실라제인, 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

(i) 상기 크라우딩 촉진제는 적어도 15 v/v%의 농도, 적어도 12 v/v%의 농도, 적어도 10 v/v%의 농도, 적어도 8 v/v%의 농도, 적어도 6 v/v%의 농도, 적어도 5 v/v%의 농도, 적어도 4 v/v%의 농도, 또는 적어도 3 v/v%의 농도로 조성물에 존재하거나, 또는

(ii) 상기 PEG는 6.5 v/v%의 농도인, 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 크라우딩 촉진제는 5 mPa/s 이하, 4 mPa/s 이하, 3 mPa/s 이하, 2 mPa/s 이하, 또는 1 mPa/s 이하의 20℃에서의 점도 프로파일을 갖거나, 또는 상기 크라우딩 촉진제는 3 mPa/s 이하의 20℃에서의 점도를 갖는 PEG인, 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 상기 이탈기를 상기 올리고뉴클레오타이드에 연결하는 염기가 없는 dR-O-[C]n 뉴클레오타이드를 포함하는, 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중-합텐을 가진 올리고뉴클레오타이드 프로브는, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브가 상보성 뉴클레오타이드 서열에 하이브리드화할 때 폼아미도피리미딘 DNA 글리코실라제에 의해 절단되면 상기 이중-합텐 이탈기를 방출하는, 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 이중-합텐 이탈기는 상이한 에피토프를 갖는 2개의 면역원성 기를 포함하는, 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 면역원성 기는 형광 기, 효소 또는 이의 단편, 펩타이드 또는 이의 단편, 바이오틴을 포함하고, 바람직하게는 상기 면역원성 기는 바이오틴, 플루오레세인, 디곡시게닌 또는 다이나이트로페닐을 포함하는 군으로부터 선택되는, 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 엑소뉴클레아제에 의해 절단될 수 있고, 상기 올리고뉴클레오타이드는 절단되면 상기 이중 합텐 이탈기를 방출하는, 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III인, 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 구조 5'$X(n)_aL(n)_bH(n)_cB$3'를 갖되, n은 뉴클레오타이드이고, a, b 및 c는 정수이고, X는 5'헥실, H는 THF 잔기, B는 C3 스페이서, 및 L은 복수의 합텐을 포함하는 분지화된 변형제인, 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 다음 중 적어도 하나를 특징으로 하는 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물:

(i) 상기 합텐은 DNP, FAM 및 바이오틴으로 이루어진 군으로부터 선택됨;

(ii) 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 상기 합텐들 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함함; 및

(iii) 상기 C3 스페이서는 프로판올임.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 참고 설명**

[0002] 본 출원은 미국 특허 출원 제62/558,705호(출원일: 2017년 9월 14일, 발명의 명칭: "DETECTION OF RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION USING DUAL-HAPTEN PROBE")의 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0003] **기술 분야**

[0004] 본 개시내용은 이중-합텐 프로브(dual-hapten probe)를 이용하여 표적 핵산 서열을 검출하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 개시내용은 표적 핵산 서열을 검출하기 위해 재조합효소 폴리머라제 증폭(Recombinase Polymerase Amplication: RPA) 및 이중-합텐 프로브를 이용하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 몇몇 경우에, 상기 검출은 측면 유동 스트립(lateral flow strip) 상에서 이루어진다.

배 경 기 술

[0005] 특정 등온 증폭 방법은 미량의 수준으로부터 매우 높은 검출 가능한 수준까지 약 수분 내에 표적 핵산을 증폭시킬 수 있다. 이러한 등온 방법, 예를 들어, 재조합효소 폴리머라제 증폭(RPA)은 사용자로 하여금 미량의 특정 서열을 검출할 수 있게 하고, 현장진단(point of care) 시험을 용이하게 하며 진단의 접근성 및 속도를 증가시킬 수 있게 한다.

[0006] RPA는 비-실험실 환경에서 사용하기에 적합한 것으로 밝혀져 있고, 민감도는 PCR 기반의 진단 및 표적 DNA의 실시간 검출과 비슷한 것으로 보고되어 있다. 하지만, 상기 검정들은 여전히 실험실 환경 또는 "슈트케이스내실험실(lab-in-a-suitcase)" 타입의 세트업에서 사용하기에 더욱 적합하다. 따라서, 수많은 연구진들은 정성적 데이터만이 필요한 상황을 위해 측면 유동 검정을 개발하였다. 측면 유동 시험은 훈련되지 않은 개인/가정용으로 수행이 비교적 간단하고, 수행에 고가의 장비를 필요로 하지 않으므로 자원 제한적 환경에서 사용하기에 바람직한 포맷들 중 하나이다. 하지만, 상기 측면 유동 기술은 여전히 측면 유동 분석 전에 희석 단계를 포함하는 많은 조작들을 필요로 한다. 이에, RPA 증폭 및 측면 유동 검출의 사용에 간단한 접근법은 여전히 필요한 실정이다. 이러한 개량은 RPA 측면 유동 검정을 위한 소비재(consumable)의 제조에 이점을 제공하고, 시험 디바이스의 단순화 및 이에 따른 소비재 비용의 감소를 가능하게 하고, 이러한 검정들이 실험실 외에서 사용하기에 더욱 적합하게 만든다.

발명의 내용

[0007] 본 개시내용은 표적 핵산 서열의 RPA가 희석 단계 없이 이중-합텐 프로브를 사용하여 측면 유동 스트립 상에서 정확하고 효율적으로 검출될 수 있다는 발견을 적어도 부분적으로 기반으로 한다. 이러한 발견에 비추어, 본 발명은 이중-합텐 프로브를 이용하여 표적 핵산의 존재 또는 부재(absence)를 검출하는 RPA 조성물 및 방법을 제공한다. 상기 표적 핵산 서열은 질병 또는 질환의 진단용일 수 있다.

[0008] 하나의 양상에서, 본 개시내용은 크라우딩 촉진제(crowding agent); 이중-합텐 이탈기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 프로브; 및 뉴클레아제 효소를 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 또는 이들로 본질적으로 이루어지는 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물을 특징으로 한다. 다른 양상에서, 본 개시내용은 크라우딩 촉진제; 이중-합텐 이탈기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 프로브; 및 뉴클레아제 효소를 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 또는 이들로 본질적으로 이루어지는, 측면 유동 시험 스트립 상에서 증폭 생성물을 분리하기 전에 증폭 혼합물을 희석할 필요가 없이, 샘플에 존재하는 표적 핵산의 측면 유동 분석에 사용하기 위한 재조합효소 폴리머라제 증폭 조성물을 특징으로 한다.

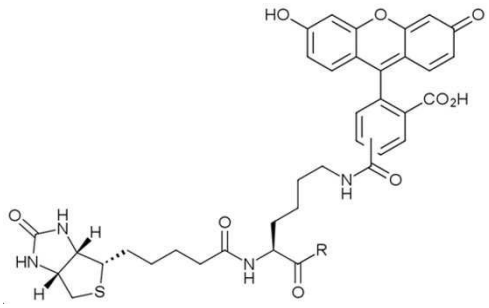
[0009] 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법의 크라우딩 촉진제는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 피콜(Ficoll), 또는 덱스트란을 포함하거나, 이들로 이루

어지거나, 또는 이들로 본질적으로 이루어진다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 적어도 1 킬로돌턴(kilodalton), 적어도 2 킬로돌턴, 적어도 3 킬로돌턴, 적어도 4 킬로돌턴, 적어도 5 킬로돌턴, 적어도 6 킬로돌턴, 적어도 8 킬로돌턴, 또는 적어도 10 킬로돌턴의 분자량을 갖는다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 적어도 15 v/v%의 농도, 적어도 12 v/v%의 농도, 적어도 10 v/v%의 농도, 적어도 8 v/v%의 농도, 적어도 6 v/v%의 농도, 적어도 5 v/v%의 농도, 적어도 4 v/v%의 농도, 또는 적어도 3 v/v%의 농도로 조성물에 존재한다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 5 mPa/s 이하, 4 mPa/s 이하, 3 mPa/s 이하, 2 mPa/s 이하, 또는 1 mPa/s 이하의 20℃에서의 점도 프로파일을 갖는다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 20℃에서의 점도 프로파일이 3 mPa/s 이하인 PEG이다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 3 킬로돌턴의 분자량을 갖는 PEG이며, 상기 PEG는 농도가 6.5 v/v%인 것이다.

[0010] 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 상기 조성물 및 방법의 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 상기 올리고뉴클레오타이드에 이탈기를 연결시키는 염기가 없는 dR-O-[C]n 뉴클레오타이드를 포함한다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 이중-합텐을 갖는 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브가 상보성 뉴클레오타이드 서열에 하이브리화될 때 폼아미도피리미딘 DNA 글리코실라제에 의해 절단되면, 이중-합텐 이탈기를 방출한다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 이중-합텐 이탈기는 상이한 에피토프를 갖는 2개의 면역원성 기들을 포함하거나, 이 기들로 이루어지거나, 또는 이 기들로 본질적으로 이루어진다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 면역원성 기들은 형광 기, 효소 또는 이의 단편, 퀩타이드 또는 이의 단편, 바이오틴을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 또는 이들로 본질적으로 이루어진다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 면역원성 기는 바이오틴, 플루오레세인(fluorescein), 디곡시게닌(digoxigenin) 또는 다이나이트로페닐(dinitrophenyl)을 포함하는 군으로부터 선택된다.

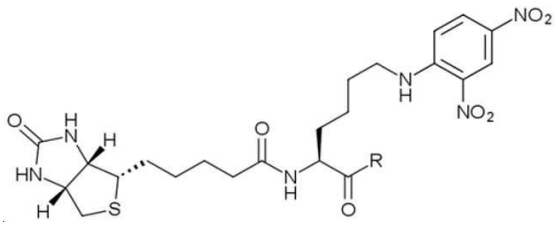
[0011] 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법의 뉴클레아제는 폼아미도피리미딘 DNA 글리코실라제이다.

[0012] 다른 양상에서, 본 개시내용은 하기 화학식의 화합물을 포함하거나, 그 화합물로 이루어지거나, 또는 그 화합물로 본질적으로 이루어지는 조성물을 특징으로 한다:

[0013] 

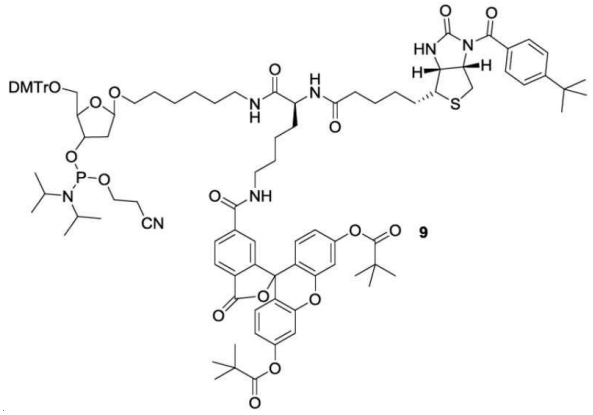
[0014] 이 식에서, R은 OH 또는 -NH(CH$_2$)$_6$OH이다.

[0015] 다른 양상에서, 본 개시내용은 하기 화학식의 화합물을 포함하거나, 그 화합물로 이루어지거나, 또는 그 화합물로 본질적으로 이루어지는 조성물을 특징으로 한다:

[0016] 

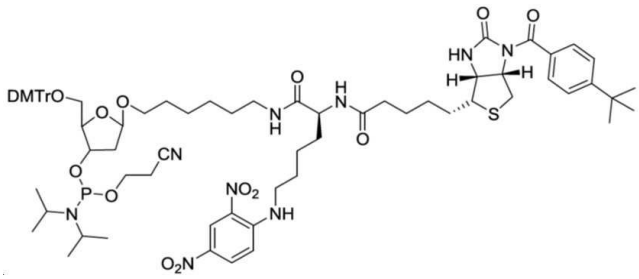
[0017] 이 식에서, R은 OH 또는 -NH(CH$_2$)$_6$OH이다.

[0018] 다른 양상에서, 본 개시내용은 하기 화학식의 화합물을 포함하거나, 그 화합물로 이루어지거나, 또는 그 화합물로 본질적으로 이루어지는 조성물을 특징으로 한다:

[0019] 

[0020] 이 식에서, DMTr은 다이메톡시트리틸이다.

[0021] 다른 양상에서, 본 개시내용은 하기 화학식의 화합물을 포함하거나, 그 화합물로 이루어지거나, 또는 그 화합물로 본질적으로 이루어지는 조성물을 특징으로 한다:

[0022] 

[0023] 이 식에서, DMTr은 다이메톡시트리틸이다.

[0024] 다른 양상에서, 본 개시내용은 하기 화학식의 화합물을 포함하거나, 그 화합물로 이루어지거나, 또는 그 화합물로 본질적으로 이루어지는 조성물을 특징으로 한다:

[0025] 

[0026] 이 식에서, 합텐1 및 합텐2는 본 명세서에 기재된 면역원성 기이고; Z는 (i) RNA 또는 DNA 올리고뉴클레오타이드 각각의 정황에 있는 무염기성(abasic) 리보스 또는 데옥시리보스 고리의 C1'로서, 아노머성 탄소 원자에서 베타-구성을 갖는 C1'; (ii) DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 연결되도록 구성된 포스포아미다이트(phosphoramidite) 화합물로부터 선택되고; Z가 DNA 또는 RNA 포스포아미다이트일 때, 합텐1 및 합텐2의 반응성 기들은 피발로일; tert-부틸벤조일; 아실; 벤조일; 또는 아이소부티릴에 의해 선택적으로 보호될 수 있으며; R은 수소, 또는 선형 또는 분지형의 C1 내지 C6 알킬을 나타내고; X1, X2 및 X4는 독립적으로 부재일 수 있거나, 또는 선형 또는 분지형의 C1 내지 C12 알킬일 수 있으며, 선택적으로 1개 이상의 -O-, -C(=O)- 또는 -NR- 기가 개재될 수 있는 연결기(linking group)이며; X3은 선형 또는 분지형 C1 내지 C6 알킬이고; 그리고 X5는 1개 이상의 -O-, -C(=O)- 또는 -NR- 기가 선택적으로 개재되는 선형 또는 분지형의 C1 내지 C12 알킬이다.

[0027] 몇몇 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 엑소뉴클레아제에 의해 절단될 수 있고, 절단되면 상기 올리고뉴클레오타이드는 이중 합텐 이탈기를 방출시킨다. 몇몇 실시형태에서, 상기 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 몇몇 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 구조 5'$X(n)_aL(n)_bH(n)_cB3'$를 갖으며, 여기서 n은 뉴클레오타이드이고, a, b 및 c는 정수이고, X는 5' 헥실 또는 합텐이고, H는 THF 잔기이고, B는 C3 스페이서(spacer)이며, L은 복수의 합텐을 포함하는 분지형 변형체(branched modifier)이다. 몇몇 실시형태에서, 상기 합텐은 예를 들어, DNP 및 바이오틴이며, 다른 합텐들이 이용될 수도 있다(예를 들어, FAM). 몇몇

실시형태에서, 올리고뉴클레오타이드 프로브는 상기 합텐들 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, a 및 c는 적어도 15개의 뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시형태에서, b는 0이다. 몇몇 실시형태에서, a는 약 15이며, c는 약 30이다. 몇몇 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 표적 핵산에 상보적이다. 몇몇 실시형태에서, L은 사이토신 뉴클레오타이드를 대체한다.

[0028] 다른 관점에서, 본 개시내용은 샘플 적용 구역; 상기 샘플 적용 구역의 하류에 있으며 유체 연통(fluid communication)되는 시약 구역으로서, 표적 핵산을 증폭시키기 위한 건조된 RPA 시약 조성물, 증폭된 표적 핵산 생성물에 특이적인 결합제 및 검출 분자를 포함하는 시약 구역; 상기 시약 구역의 하류에 있으며 유체 연통되는 적어도 하나의 시험 구역으로서, 상기 증폭된 표적 핵산 생성물에 특이적인 고정된 포획(capture) 분자를 포함하는 시험 구역; 및 상기 시험 구역의 하류에 있는 대조 구역을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 또는 이들로 본질적으로 이루어지는 측면 유동 스트립을 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어지는 디바이스(device)를 특징으로 한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 디바이스는 연속적인(예를 들어, 동시) RPA 및 검출을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 디바이스는 상기 시험 구역에 무거운 중량(heavyweight)의 흡수 패드를 포함한다.

[0029] 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 건조된 RPA 시약 조성물은 크라우딩 촉진제, 재조합효소, 폴리머라제, 뉴클레아제, 이중-합텐 프로브 및 검출 분자를 포함한다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 이중-합텐 프로브는 바이오틴 및 카복시플루오레세인(FAM)의 접합체 또는 바이오틴 및 다이나이트로페닐(DNP)의 접합체를 포함한다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 증폭된 표적 핵산에 특이적인 상기 고정된 포획 분자는 항-FAM 포획 분자 또는 항-DNP 포획 분자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 항-FAM 또는 상기 항-DNP는 다클론성 항체, 단클론성 항체 및 이의 기능성 결합 단편, 예를 들어, FAB, ScFv, Fv 또는 DAB로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 검출 분자는 금 졸(gold sol), 은 졸(silver sol), 라텍스 졸(latex sol), 셀룰로스 나노비드(cellulose nanobead) 또는 카본 나노스트링(carbon nanostring), 및 항-바이오틴(anti-biotin) 포획 분자로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0030] 모든 관점들의 몇몇 실시형태에서, 상기 대조 구역은 상기 측면 유동 스트립의 정확한 작동을 나타내는 결합 구역을 포함한다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 대조 구역은 항-마우스 항체 포획 라인을 포함한다.

[0031] 다른 양상에서, 본 개시내용은 증폭 생성물을 검출하는 방법으로서, 관심있는 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을 상기 표적 핵산의 증폭용 RPA 시약, 상기 표적 핵산에 상보적인 핵산 서열 및 공유적으로 연결된 이중-합텐 이탈기를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 뉴클레아제와 접촉시키는 단계; 상기 표적 핵산을 증폭시켜 표적 핵산 생성물을 생성하는 단계; 및 상기 표적 핵산에 하이브리드화된 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터 절단된 유리(free)의 이중-합텐 모이어티(moiety)를 검출하여 상기 표적 핵산 생성물을 검출하는 단계를 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 또는 이들로 본질적으로 이루어지는 방법을 특징으로 한다.

[0032] 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 RPA 시약들은 측면 유동 스트립의 샘플 적용 구역에 위치한다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 핵산 증폭은 상기 RPA 시약과 상기 샘플의 접촉 시에 상기 측면 유동 스트립 상에서 수행되어 핵산 증폭 혼합물을 형성한다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 핵산 증폭은 상기 RPA 혼합물에 다른 액체의 첨가 또는 희석 없이 상기 측면 유동 스트립 상에서 수행된다. 몇몇 실시형태에서, 상기 RPA 반응 및 상기 검출은 동시적(concurrent)이다.

[0033] 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터 절단된 상기 이중-합텐 모이어티는 상기 샘플 적용 구역의 하류에 위치한 측면 유동 스트립 상의 시험 구역에서 선택적으로 포획된다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 공유 연결된 이중-합텐을 포함하는 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 상기 측면 유동 스트립 상의 시험 구역에서 선택적으로 포획되지 않는다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 측면 유동 스트립은 시험 구역 및 대조 구역을 포함하거나, 그 구역들로 이루어지거나, 또는 그 구역들로 본질적으로 이루어지고, 상기 시험 구역은 상기 올리고뉴클레오타이드로부터 절단된 이중-합텐의 포획을 위한 결합쌍 멤버를 포함하거나, 그 멤버로 이루어지거나, 또는 그 멤버로 본질적으로 이루어지고, 상기 대조 구역은 내부 대조군을 위한 결합쌍 멤버를 포함한다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 대조 구역은 항-마우스 항체 또는 이의 단편을 포함하거나, 이것으로 이루어지거나 또는 이것으로 본질적으로 이루어진다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 시험 구역은 항-DNP 포획 분자 또는 항-FAM 포획 분자를 포함하거나, 그 분자로 이루어지거나, 또는 그 분자로 본질적으로 이루어진다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 항-FAM 포획 분자는 단클론성 항체, 다클론성 항체 및 이의 기능성 결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 항-DNP 포획 분자는 단클론성 항체, 다클론성 항체 및 이의 기능성 결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택

된다.

[0034] 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 증폭 생성물을 검출하는 것은 시험 구역에서 이중-합텐 이탈기를 포획하는 것 및 상기 포획된 이중-합텐 이탈기를 검출 분자에 의해 표지화하는 것을 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어진다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 검출 분자는 금 졸, 은 졸, 라텍스 졸, 셀룰로스 나노비드 및 카본 나노스트링으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0035] 다른 양상에서, 본 개시내용은 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 샘플을 측면 유동 스트립에 적용하는 단계; 상기 샘플을 RPA 시약 혼합물과 접촉시켜 상기 측면 유동 스트립의 시약 구역 위에 건조된 상기 표적 핵산을 증폭시키는 단계; 및 상기 측면 유동 스트립의 시험 구역 상에서 증폭 생성물을 존재한다면 검출하는 단계를 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 또는 이들로 본질적으로 이루어진다.

[0036] 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 표적 핵산을 함유할 것으로 의심되는 상기 샘플은 측면 유동 스트립의 적용 구역에 적용된다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 RPA 시약 혼합물은 크라우딩 촉진제, 재조합효소, 폴리머라제, 뉴클레아제 및 이중-합텐 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 또는 이들로 본질적으로 이루어진다.

[0037] 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 피콜 및 덱스트란으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 적어도 1 킬로돌턴, 적어도 2 킬로돌턴, 적어도 3 킬로돌턴, 적어도 4 킬로돌턴, 적어도 5 킬로돌턴, 적어도 6 킬로돌턴, 적어도 8 킬로돌턴 또는 적어도 10 킬로돌턴의 분자량을 갖는다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 적어도 15 v/v%, 적어도 12 v/v% 최종 농도, 적어도 10 v/v%, 적어도 8 v/v%, 적어도 6 v/v%, 적어도 5 v/v%, 적어도 4 v/v%, 또는 적어도 3 v/v% 최종 농도로 혼합물에 존재한다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 5 mPa/s 이하, 4 mPa/s 이하, 3 mPa/s 이하, 2 mPa/s 이하, 또는 1 mPa/s 이하의 20℃에서의 점도 프로파일을 갖는다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 PEG이고 3 mPa/s 이하의 20℃에서의 점도를 갖는다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 3 킬로돌턴의 분자량을 포함하는 PEG이고 상기 PEG는 6.5 v/v%의 최종 농도인 것이다.

[0038] 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 증폭 생성물이 존재한다면 검출하는 것은 상기 증폭 생성물에 하이브리드화된 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브로부터 절단된 이중-합텐 모이어티를 검출하는 것을 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 또는 이것으로 본질적으로 이루어진다. 모든 양상의 몇몇 실시형태에서, 상기 RPA 혼합물의 희석은 증폭 생성물의 검출 전에는 필요하지 않다.

[0039] 본 개시내용에 사용된 "하나 이상" 또는 "적어도 하나"란 용어는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 화합물 또는 심지어 그 이상을 나타낸다.

[0040] 본 명세서에 사용된 "샘플"은 환경으로부터 분리(예를 들어, 동물 유래의 혈액 또는 조직, 세포 또는 조직 배양물로부터의 조정된 배지)되고 피분석물 또는 다른 원하는 물질을 함유할 것으로 의심되거나, 또는 그 물질을 함유하는 것으로 알려진, 생물학적 물질을 의미한다. 또한, 샘플은 조직 또는 체액의 부분 정제된 분획일 수 있으며, 예를 들어, 특정 질병 또는 증상을 갖는 대상체에서 유래하는 것 수 있다. 대조 샘플은 상기 질병 또는 증상을 갖지 않는 공여체에서 유래하는 "정상" 샘플일 수 있다. 대조 샘플은 또한 무처리된 공여체 또는 활성 제제로 처리되지 않은(예를 들어, 무처리 또는 부형제만의 투여) 또는 질병 상태를 유도하는 증상으로 처리되지 않은 세포 배양물에서 유래한 것일 수 있다. 또한, 참조 샘플은 시험될 제제와 세포를 접촉시키기 전에 "0 시점"에서 채취될 수도 있다.

[0041] 본 명세서에서 사용된 섹션의 표제들은 단지 조직화를 위한 것이며 기재된 주요구성을 임의의 방식으로 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 인용된 참고문헌들에서 용어의 정의가 본 교시에 제공된 정의와 다른 것으로 나타나는 경우에는, 본 교시에 제공된 정의를 따를 것이다. 본 교시들에서 논의된 온도, 농도 및 시간과 같은 계량값들 앞의 암시된 "약"은 약간의 비실질적인 편차들이 본 명세서의 교시들의 범위에 존재한다는 것을 설명할 것이다. 본 출원에서, 단수의 사용은 다른 구체적인 언급이 없는 한 복수를 포함한다. 또한, "포함한다(comprise)", "포함하는(comprising)", "함유한다(contain)", "함유하는(containing)", "포함한다(include)", "포함하는(including)"의 사용은 제한하려는 것이 아니다. 상기 일반적인 설명 및 이하의 상세한 설명은 모두 예시적이며 설명하는 것일 뿐이고, 본 개시내용을 제한하는 것이 아닌 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에 사용된 단수적 표현은 물품의 문법적 대상의 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 의미하는 것이다. 예시적으로, "요소"는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0042] 다른 한정이 없는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 개시내용이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 같은 의미를 갖는다. 방법 및 재료들은 본 개시내용에 사용하기 위한 것으로 본 명세서에 기재된다; 본 기술분야에 공지된 다른 적당한 방법 및 재료들도 사용될 수 있다. 상기 재료들, 방법 및 실시예들은 단지 예시적이며 제한하려는 것이 아니다. 본 명세서에 언급된 모든 공보, 특허출원, 특허, 서열, 데이터베이스 개체 및 다른 참고문헌들은 그 전체 내용이 참고로 인용된다. 충돌이 있는 경우, 정의를 포함해서 본 명세서를 따를 것이다.

[0043] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태의 세부사항은 이하 동반되는 도면 및 상세한 설명에 기술된다. 본 개시내용의 다른 특징, 목적 및 이점들은 이하 상세한 설명 및 도면, 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1 i) 내지 iii)은 측면 유동 스트립 상에서 비희석(undiluted) 검출을 위한 소량의 이중-합텐 피분석물을 이용한 예시적인 RPA 반응 방법을 나타낸다. 도 1 i)은 3kDa PEG-유도된 코아세르베이트(coacerbate)의 형성 및 모의 RPA 반응에서 상기 코아세르베이트로의 FAM-표지된 핵산의 국재화를 나타내는 영상이다. 도 1 ii)는 본 개시내용에 따른 예시적인 이중-합텐 피분석물들의 구조를 도시한 것으로서, 아미노-변형된 프로브 올리고뉴클레오타이드들에 합성후 부착하기 위한, 바이오틴-FAM, 바이오틴-DNP 및 일반적인 표지 구조들이 제시된다. 도 1 iii)은 진행 완충액(running buffer)에 희석되거나, 모의 RPA 반응에서 비희석 진행된, 이중-표지된 올리고뉴클레오타이드, 상기 바이오틴-FAM 이중 표지(R=OH) 및 바이오틴-FAM Fpg 프로브의 검출을 나타내는 영상들이다.

도 2 i) 내지 iii)은 측면 유동 스트립 상에서 본 개시내용에 따른 이중-합텐 Fpg 프로브들을 사용한 RPA의 직접 분석을 도시한 것이다. 도 2 i)은 RPA 코아세르베이트로부터 증폭-유도된 피분석물의 방출 및 후속적인 측면 유동 스트립 상에서의 검출을 예시한 모식도이다. 도 2 ii)는 비희석된 RPA 검출의 프로토타입 검정에 대한 영상이다. 도 2 iii)은 유동 대조군을 혼입시킨 건조 접합체 포맷 시험 스트립들의 영상이다.

도 3 i) 내지 iii)은 프로브 최적화를 통한 거짓 양성 신호의 감소를 입증한 것이다. 도 3 i)은 비특이적 신호가 Fpg-의존적일 수 있는 예시적인 측면 유동 검정의 영상을 보여준다. 도 3 ii)는 예시적인 Fpg 이중-합텐 프로브(표지된 '프로브 1' 또는 'rs1207445')의 헤어핀(hairpin) 및 자기-이량체(self-dimer) 구조를 도시한 것이다. 도 3 iii)은 환원된 2차 구조를 갖는 예시적인 Fpg 이중-합텐 프로브를 함유한 증폭 영상들이 측면 유동 상에서 분석되었을 때 거짓 양성 신호들의 감소를 나타낸다는 것을 보여준다.

도 4는 rs1207445(게놈 DNA) 및 캠필로박터 제주니(*Camphylobacter jejuni*)(PCR 생성물) 주형 DNA를 비희석 RPA 검출한 영상을 도시한 것이다.

도 5 i) 및 ii)는 프로토타입 이.콜라이(*E.coli*) O157:H7 혈청형 마커 검정을 입증한 것이다. 도 5 i)은 rfbEO157 검정에 대한 TwistAmp Fpg 형광 데이터이다. NTC(적색) 및 10(황색), 100(녹색) 및 1000(청색)을 함유하는 반응은 4 반복으로 수행하였다. 형광 반응은 상기 프로토타입 직접 측면 유동 검정과 비교하였다. 도 5 ii)는 $fliC_{H7}$에 대한 TwistAmp Fpg 데이터를 각 Fpg 이중-합텐 프로브 검정과 비교한 것이다.

도 6은 '연속 유동' 측면 유동 스트립 분석을 입증하는 영상이다.

도 7은 살모넬라(*Salmonella*) *InvA* 표적에 대한 TwistAmp Nfo 검정을 측면 유동 분석한 영상이다.

도 8은 측면 유동 스트립 상에서 비희석으로 진행된 이중-표지된 앰플리콘의 제한적 검출 기전을 예시하는 모식도이다.

도 9는 비희석된 Exo RPA LF 검출의 모식도를 나타낸다.

도 10은 비희석된 Fpg vs Exo RPA LF를 나타낸다.

도 11은 동시적인 증폭/Exo LF를 이용한 검출을 나타낸다.

도 12는 예시적인 연속 유동 디바이스를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 본 개시내용은 적어도 부분적으로, 표적 핵산 서열의 RPA가 희석 단계 없이 측면 유동 스트립 상에서 이중-합텐 프로브를 사용하여 정확하고 효과적으로 검출될 수 있다는 발견을 기반으로 한다. 그 목적을 달성하기 위하여, 본 명세서에는 이중-합텐 프로브를 사용하여 표적 핵산의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 RPA 조성물이 제공된

다. 또한, 그 목적을 달성하기 위하여, 본 출원은 이중-합텐 프로브를 사용하여 측면 유동 스트립 상에서 표적 핵산 서열을 검출하는 방법을 개시한다.

[0046] 본 개시내용은 측면 유동 스트립 상에서 이중-합텐 프로브를 사용하여 표적 핵산 서열을 검출하기 위한 RPA 조성물 및 방법을 기재하지만, 통상의 기술자는 상기 개시된 방법 및 조성물이 본 기술분야에 공지된 다른 핵산 증폭 방법(예를 들어, 등온 핵산 증폭 방법)들에 적당할 수 있음을 인식할 것이다.

[0047] 핵산의 신속하고 비용 효과적이며 민감한 검출은 전염병 진단 및 식품 검사에서 병원체 검출에 이용되는 현행 규정들을 개선시키는 능력이 있다. 더욱이, 검정의 복잡함이 감소될 수 있다면, 핵산 증폭 시험들은 자원 제한적인 가정용 시나리오들에서 적절하게 사용될 수 있을 것이다.

[0048] 신규 RPA Fpg(폼아미도피리미딘 DNA 글리코실라제) 프로브 화학이 개발되었으며, 이것은 비희석 RPA 반응에서 증폭 생성물의 측면 유동 검출을 가능하게 한다. RPA 반응의 점성을 극복하기 위하여 Fpg RPA 프로브들을 위한 새로운 타입의 이중-합텐 표지가 개발되었다. 예시적 검정은 새로운 이중-합텐 프로브 화학과 함께 사용하기 위해 변형된, 기존 Fpg 형광 검정을 기반으로 하였다(rs1207445 인간 게놈 유전자좌 및 캠필로박터 제주니의 16S rRNA). 본 명세서에 개시된 이중-합텐 프로브 기술은 그 다음 이.콜라이 O157:H7의 유전자들(rfb_{O157} 및 $fliC_{H7}$)을 혈청형별로 구분하기 위한 2가지 신규 싱글플렉스(singleplex) 검정의 개발에 적용되었다. 이 유전자 마커들은 O157:H7의 복잡한 유전학으로 인하여, 다른 NAAT들이 놓칠 수 있는 이.콜라이 O157:H7의 형태들을 식별할 것으로 예측된다. 목적은 원 스텝(one step), 즉 "샘플 주입, 결과 출력(sample in, results out)" 핵산 측면 유동 면역검정(NALFIA) 및 식품 위생 시험에 사용하기 위한 O157:H7의 멀티플렉스(multiplex) 시험을 위한 소비재를 개발하는 것이었다. 또한, 상기 신규 이중-합텐 프로브 화학의 유연성은 이 기술이 비실험실적 검정들의 개발을 가능하게 하는 표적 종의 광범위한 어레이에 쉽게 적용될 수 있음을 의미한다.

[0049] 이하의 실시예들에서, 신규 핵산 측면 유동 화학은 인간 게놈 표적(rs1207445), 캠필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) 16S rDNA 및 중요한 식품 병원균 이.콜라이(*E. coli*) O157:H7의 2가지 유전자 마커들에 적용하였다. 총 4가지 검정은 증폭 반응당 10 내지 100 카피의 DNA에 대해 분석적 민감도를 나타낸다. 또한, 본 검정은 기존 RPA Nfo 측면 유동 검정 방법에 비해 적은 수의 수동 단계를 필요로 한다.

[0050] 데이터는 증폭된 표적 핵산의 검출이 RPA와 동시에 수행될 수 있다는 것을 시사하였다('연속 유동'). 이로써, 시험 시간은 감소될 것이다(샘플로부터 결과까지 약 30 분). 이러한 간단한 작업흐름은 상기 연속 유동 화학이, 예컨대, 현장진단(예를 들어, 도 12에 기재된 디바이스 또는 다른 디바이스를 사용하여)과 같은 비실험실적 환경에서 사용하기에 이상적인, 비용 효과적인 일회용 소비재로 쉽게 개조될 수 있을 것이라는 것을 의미한다.

[0051] 몇몇 경우에, 본 명세서에 기재된 이중-표지화된 올리고뉴클레오타이드 프로브는 이작용기성 구조(예를 들어, 이중-합텐 이탈기)에 연결된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 이작용기성 구조는 2개의 모이어티, 예를 들어, 2개의 합텐을 포함할 수 있으며, 상기 합텐 중 하나는 제1 결합 쌍의 제1 멤버이고 상기 제2 합텐은 제2 결합쌍의 제1 멤버이다. 상기 프로브는 이 프로브가 표적 핵산에 결합될 때, 상기 이작용기성 구조가 상기 올리고뉴클레오타이드로부터 절단되어 상기 이작용기성 구조를 방출하도록 구성된다. 이러한 유리의 이작용기성 구조(예를 들어, 유리의 이중-표지)는 그 다음 다수의 방법, 예를 들어, 측면 유동 스트립 상에서 검출될 수 있다.

[0052] "결합쌍의 멤버"는 제1 모이어티 및 제2 모이어티 중 하나인 것을 의미하며, 이때 상기 제1 모이어티 및 상기 제2 모이어티는 서로 특이적 결합 친화성을 갖고 있다. 본 개시내용에 사용하기에 적합한 결합쌍은 항원/항체(예를 들어, 디곡시게닌/항-디곡시게닌, 다이나이트로페닐(DNP)/항-DNP, 단실-X-항-단실, 플루오레세인/항-플루오레세인, 루시퍼 옐로우/항-루시퍼-옐로우, 펩타이드/항-펩타이드, 리간드/수용체 및 로다민/항-로다민, 바이오틴/아비딘(또는 바이오틴/스트렙타비딘) 및 칼모듈린 결합 단백질(CBP)/칼모듈린을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 다른 적당한 결합쌍으로는 폴리펩타이드, 예컨대 FLAG-펩타이드(DYKDDDDK)[Hopp et al., BioTechnology, 6:1204 1210 (1988)]; KT3 에피토프 펩타이드(Martin et al., Science 255:192 194 (1992)); 튜불린 에피토프 펩타이드(Skinner et al., J. Biol. Chem 266:15163 15166 (1991)); 및 T7 유전자 10 단백질 펩타이드 태그(Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393 6397 (1990)) 및 이들 각각에 대한 항체를 포함한다. 일반적으로, 바람직한 실시형태에서, 입체적 고려가 중요시될 때에는 더 작은 결합쌍 파트너가 검출 가능한 표지로서 작용한다.

[0053] 본 방법과 관련하여 증폭에 적합한 핵산(예컨대, 폴리뉴클레오타이드)은 이중 가닥 핵산 분자 및 단일 가닥 핵산 분자, 예를 들어, DNA 및 RNA 분자를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 게놈, 염색체, 플라스미드, 미토

콘드리아, 세포 및 바이러스의 핵산 기원인 것일 수 있다. 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드의 경우, 증폭은 하나의 가닥 또는 양 가닥에서 이루어질 수 있다.

[0054] 여기에 기재된 바와 같이, RPA는 주형의 이중 가닥 핵산 내의 상동성 서열과 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 짝지을 수 있는 재조합효소라고 알려진 효소를 이용한다. 이러한 방식으로, 주형의 이중 가닥 핵산 내의 한정된 점들에 DNA 합성이 유도된다. 서열 특이적(예를 들어, 유전자 특이적) 프라이머를 사용함으로써, 상기 주형 핵산이 존재한다면 지수적 증폭 반응이 개시된다. 상기 반응은 신속하게 진행되고 상기 주형 이중 가닥 핵산 내에 존재하는 서열을 단 몇 카피의 주형 핵산으로부터 수 분 내에 검출 가능한 수준의 증폭된 생성물로 특이적으로 증폭시킨다. RPA 방법은 예를 들어, US 7,270,981; US 7,399,590; US 7,666,598; US 7,435,561; US 2009/0029421; 및 WO 2010/141940에 개시되어 있으며, 이 문헌들은 모두 본 발명에 참고 인용된다.

[0055] 본 명세서에 개시된 조성물은 상기 표적 핵산 서열을 증폭시키는 프라이머 세트를 함유할 수 있다. 상기 프라이머는 상기 표적 핵산 서열에 상보적인 서열 또는 상기 표적 핵산 서열과 하나 이상의 위치에서 상이한 서열로 구성될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 상기 표적 핵산 서열과 하나 이상의 위치에서 상이한 프라이머에 의한 RPA의 증폭 생성물은 하나 이상의 위치에서 상기 표적 서열과 상이할 수 있다. 본 명세서에 기재된 RPA 반응의 증폭 생성물은 표적 서열을 포함할 수 있다.

[0056] 상기 프라이머 세트는 표적 핵산 서열을 증폭시킬 수 있거나, 또는 하나 이상의 위치에서 상기 표적 핵산 서열과 상이한 서열을 도입시킬 수 있다. 이와 같이 도입된 서열은 표적 핵산 서열로 이루어질 수 있다. 제1 프라이머는 표적 핵산 서열에 상보적일 수 있다. 제2 프라이머는 표적 핵산 서열과 상보적인 제1 부분 및 하나 이상의 위치에서 상기 표적 핵산 서열과 상이한 제2 부분을 포함할 수 있다. 2개의 프라이머가 핵산 서열을 증폭시킬 때, 상기 제2 프라이머는 하나 이상의 상이한 위치를 상기 증폭 생성물 내로 혼입시킨다. 이와 같이 증폭된 영역은 하나 이상의 위치에서 상기 표적 핵산 서열과 상이하고, 상기 표적 서열로 이루어질 수 있다. 몇몇 경우에, 상기 증폭된 영역은 상기 표적 핵산 서열과 동일하다.

[0057] 본 개시내용에서 용어 "제1" 및 "제2"는 오로지 상대적 의미로 사용된 것이다. 다른 언급이 없는 한, 이 용어들은 하나 이상의 실시형태의 설명에서 단지 편리함의 문제로서 사용된 것임이 이해될 것이다. 용어 "제1" 및 "제2"는 하나의 요소를 다른 요소와 구별하기 위해 사용된 것뿐이며 개시된 기술의 권리범위가 상기 용어들에 의해 제한되지 않아야 한다. 예를 들어, 제1 요소는 제2 요소로 표기될 수 있으며, 이와 유사하게 제2 요소는 제1 요소로 표기될 수도 있다.

[0058] 본 명세서에 개시된 RPA 조성물은 재조합효소를 함유하고, 이 효소는 원핵생물, 바이러스 또는 진핵생물 기원에서 유래할 수 있다. 예시적인 재조합효소는 RecA 및 UvsX(예를 들어, 임의의 종에서 수득되는 RecA 단백질 또는 UvsX 단백질), 및 이의 단편 또는 돌연변이체, 및 이의 조합을 포함한다. 상기 RecA 및 UvsX 단백질은 임의의 종에서 수득될 수 있다. 또한, RecA 및 UvsX 단편 또는 돌연변이 단백질은 이용가능한 RecA 및 UvsS 단백질과 핵산 서열, 및 분자 생물학 기술을 사용하여 생산할 수도 있다(예를 들어, 미국 특허 제8,071,308호에 기재된 UvsX의 돌연변이 형태). 예시적인 UvsX 단백질은 미오비리대(myoviridae) 파지, 예를 들어, T4, T2, T6, Rb69, Aeh1, KVP40, 아시네토박터(*Acinetobacter*) 파지 133, 아에로모나스(*Aeromonas*) 파지 65, 시아노파지 P-SSM2, 시아노파지 PSSM4, 시아노파지 S-PM2, Rb14, Rb32, 아에로모나스 파지 25, 비브리오(*Vibrio*) 파지 nt-1, phi-1, Rb16, Rb43, Phage 31, 파지 44RR2.8t, Rb49, 파지 Rb3, 및 파지 LZ2에서 유래되는 것을 포함한다. 또 다른 예시적인 재조합효소 단백질은 원시박테리아(archaebacterial) RADA 및 RADB 단백질 및 진핵생물(예를 들어, 식물, 포유동물 및 진균류)의 Rad51 단백질(예를 들어, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, XRCC2, XRCC3, 및 recA)을 포함한다(예를 들어, 문헌[Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:10328-10333, 2006] 참조).

[0059] 본 개시내용의 임의의 공정에서, 상기 재조합효소(예를 들어, UvsX)는 돌연변이 또는 하이브리드 재조합효소일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 상기 돌연변이 UvsX는 Rb69 UvsX 아미노산 서열에 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Rb69 UvsX로서, 상기 돌연변이는 (a) 위치 64에 히스티딘이 아닌 아미노산, 위치 64에 세린, C-말단에 하나 이상의 글루탐산 잔기의 첨가, C-말단에 하나 이상의 아스파르트산 잔기의 첨가 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이다. 다른 실시형태에서, 상기 돌연변이 UvsX는 T6 UvsX 아미노산 서열에 하나 이상의 돌연변이를 갖는 T6 UvsX로서, 상기 돌연변이가 (a) 위치 66에 히스티딘이 아닌 아미노산; (b) 위치 66에 세린; (c) C-말단에 하나 이상의 글루탐산 잔기의 첨가; (d) C-말단에 하나 이상의 아스파르트산 잔기의 첨가; 및 (e) 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이다. 하이브리드 재조합효소 단백질이 사용되는 경우, 상기 하이브리드 단백질은 예를 들어, 상이한 UvsX 종에서 유래되는 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 영역을 포

함하는 UvsX 단백질일 수 있다. 상기 영역은 예를 들어, UvsX의 DNA-결합성 루프-2 영역일 수 있다.

[0060] 본 명세서에 개시된 DNA 폴리머라제는 진핵생물 또는 원핵생물의 폴리머라제일 수 있다. 진핵생물의 폴리머라제의 예로는 폴-알파(pol-alpha), 폴-베타, 폴-델타, 폴-엡실론, 및 이의 돌연변이체 또는 단편, 또는 이의 조합을 포함한다. 원핵생물성 폴리머라제로는 이.콜라이 DNA 폴리머라제 I(예를 들어, 클리나우(Klenow) 단편), 박테리오파지 T4 gp43 DNA 폴리머라제, 바실러스 스테아로써모필러스 폴리머라제 I 큰 단편, Phi-29 DNA 폴리머라제, T7 DNA 폴리머라제, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) Pol I, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) Pol I, 이.콜라이 DNA 폴리머라제 I, 이.콜라이 DNA 폴리머라제 II, 이.콜라이 DNA 폴리머라제 III, 이.콜라이 폴리머라제 IV, 이.콜라이 DNA 폴리머라제 V, 및 이의 돌연변이체 또는 단편, 또는 이의 조합을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 DNA 폴리머라제는 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성이 없는 것이다. 몇몇 실시형태에서, 상기 DNA 폴리머라제는 가닥-치환성을 갖는 것으로서, 예를 들어, 클래스 pol I 또는 pol V의 원핵생물 폴리머라제의 큰 단편들이 있다.

[0061] 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 프로브(예를 들어, 분자 비콘 프로브)는 면역원성일 수 있는 검출 가능한 표지에 의해 이중-표지화된다. 몇몇 경우에, 상기 검출 가능한 표지는 합텐이다. 프로브 상의 2개의 합텐은 동일하거나 상이할 수 있다. 몇몇 경우에, 검출 가능한 표지 중 하나는 결합쌍의 하나의 멤버이다. 본 명세서에 기재된 프로브는 합텐, 효소, 효소 기질, 조효소, 효소 저해제, 형광단(fluorophore), 켄처(quencher), 발색단(chromophore), 자성 입자 또는 비드, 산화환원 민감성 모이어티(예를 들어, 전기화학적 활성 모이어티), 발광 마커, 방사성동위원소(예를 들어, 방사성뉴클레오타이드), 및 결합쌍의 멤버에 의하여 표지화될 수 있다. 더욱 구체적인 예로는 플루오레세인, 피코빌리단백질, 테트라에틸 로다민, 및 베타-갈락토시다제를 포함한다. 결합쌍은 바이오틴/스트렙타비딘, 바이오틴/아비딘, 바이오틴/뉴트라비딘, 바이오틴/캡타비딘, 에피토프/항체, 단백질 A/면역글로불린, 단백질 G/면역글로불린, 단백질 L/면역글로불린, GST/글루타치온, His-태그/금속(예를 들어, 니켈, 코발트 또는 구리), 항원/항체, FLAG/M1 항체, 말토스 결합 단백질/말토스, 칼모듈린 결합 단백질/칼모듈린, 효소-효소 기질, 수용체-리간드 결합 쌍, 및 상기 결합쌍의 유사체 및 돌연변이체를 포함한다.

[0062] 본 명세서에 사용된, 용어 "합텐"은 결합 파트너와 특이적으로 반응하는 면역원성 소분자, 예를 들어, 그에 대항하여 생성된 항체를 의미한다. 본 명세서에 제공된 방법에 사용하기 위한 합텐은 예를 들어, 디곡시게닌, 플루오레세인, 다이나이트로페닐, 글루타치온, 및 바이오틴을 포함한다. 본 명세서에 기재된 합텐은 또한 예를 들어, 면역원성 기를 포함할 수도 있다. 몇몇 경우에, 상기 면역원성 기는 형광 기, 효소 또는 이의 단편, 펩타이드 또는 이의 단편, 또는 바이오틴을 포함한다. 몇몇 경우에, 상기 면역원성 기는 바이오틴, 플루오레세인, 디곡시게닌 또는 다이나이트로페닐을 포함하는 목록으로부터 선택된다.

[0063] 본 명세서에 사용된, 용어 "형광 표지" 및 "형광단"은 호환적으로 사용되며, 물질이 다른 파장(여기 파장)의 방사선에 의해 비춰질 때, 특정 파장(방출 파장)에서 전자기 에너지를 방출하고, 샘플 내의 관심있는 피분석물과 특이적으로 상호작용하거나 반응하여 하나 이상의 광학 신호를 제공할 수 있는 화학적 또는 생화학적 분자 또는 이의 단편을 포괄하도록 의도된 임의의 물질을 의미한다.

[0064] 본 명세서에 제공된 방법에 사용하기 위한 대표적인 형광단은 예를 들어, FAM, (테트라메틸로다민) Texas Red™, 녹색 형광 단백질, 청색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 플루오레세인, 플루오레세인 5-아이소티오시아네이트(FITC), 시아닌 염료(Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7), Bodipy 염료(Invitrogen) 및/또는 Alexa Fluor 염료(Invitrogen), 단실, 단실 클로라이드(DNS-Cl), 5-(요오도아세트아미다)플루오레세인(5-IAF), 6-아크릴로일-2-디메틸아미노나프탈렌(아크릴로단), 7-나이트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸-4-일 클로라이드(NBD-Cl), 에티디움 브로마이드, 루시퍼 옐로우, 로다민 염료(5-카복시로다민 6G 염산염, Lissamine 로다민 B 설포닐 클로라이드, 로다민-B-아이소티오시아네이트(RITC), 로다민 800); 테트라메틸로다민 5-(및 6-)아이소티오시아네이트(TRITC)), Texas Red™, 설포닐 클로라이드, 나프탈아민 설폰산, 예를 들어, 1-아닐리노나프탈렌-8-설폰산(ANS) 및 6-(p-톨루이디닐)나프탈렌-2-설폰산(TNS), 안트로일 지방산, DPH, 파리나르산(Parinaric acid), TMA-DPH, 플루오레닐 지방산, 플루오레세인-포스파티딜에탄올아민, 텍사스 레드-포스파티딜에탄올아민, 피레닐-포스파티딜콜린, 플루오레닐-포스포티딜콜린, 메로시아닌(Merocyanine) 540, 나프틸 스티릴(Naphtyl Styryl), 3,3'디프로필티아다이카보시아닌(diS-C3-(5)), 4-(p-다이펜틸 아미노스티릴)-1-메틸피리디늄(디-5-ASP), Cy-3 요오도 아세트아미드, Cy-5-N-하이드록시석신이미드, Cy-7-아이소티오시아네이트, IR-125, 티아졸 오렌지, Azure B, 나일 블루(Nile Blue), Al 프탈로시아닌, 옥사닌 1,4',6-다이아미디노-2-페닐인돌(DAPI), Hoechst 33342, TOTO, 아크리딘 오렌지(Acridine Orange), 에티디움 호모다이머(Ethidium Homodimer), N(에톡시카보닐메틸)-6-메톡시퀴놀리늄(MQAE), 후라(Fura)-2, 칼슘 그린, 카복시 SNARF-6, BAPTA, 쿠마린, 파이토플루오르(phytofluors), 코로

넨(Coronene), 및 금속-리간드 복합체를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0065] 또한, 형광 켄처도 검출 가능한 표지로 간주됨을 유의해야 한다. 예를 들어, 형광 켄처는 형광 염료에 접촉될 수 있으며, 켄칭 양이 검출된다.

[0066] 본 명세서에 기재된 실시형태는 또한 특정 표적 핵산을 절단할 수 있는 제제 또는 뉴클레아제를 포함할 수도 있다. 본 명세서에 사용된, 용어 "뉴클레아제"는 핵산의 가수분해를 촉매할 수 있고 핵산의 뉴클레오타이드 서브유닛 사이의 포스포다이에스터 결합을 절단할 수 있는 효소를 의미한다. "제한효소(restriction nuclease)"는 제한효소 부위로 알려진 특정 인식 뉴클레오타이드 서열에 있거나 그 부근에 있는 핵산 분자를 표적화하고 절단하는 뉴클레아제이다. 뉴클레아제는 다시 엔도뉴클레아제(즉, 폴리뉴클레오타이드 사슬 내의 포스포다이에스터 결합을 절단하는 효소) 및 엑소뉴클레아제(즉, 폴리뉴클레오타이드 사실의 말단(바깥쪽)으로부터 한번에 하나씩 뉴클레오타이드를 절단하여 작업하는 효소)로 분류될 수 있으며, 몇몇 효소들은 두 카테고리에 속할 수 있다. 상기 뉴클레아제는 자연 발생의 제한 엔도뉴클레아제 또는 합성 엔도뉴클레아제일 수 있다.

[0067] 몇몇 경우에, 본 명세서에 기재된 이중-합텐 프로브는 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브가 상보성 뉴클레오타이드 서열에 하이브리드화될 때 폼아미도피리미딘 DNA 글리코실라제("fpg")에 의해 절단되도록 구성되어 이중-합텐 이탈기(예를 들어, 이중 표지)를 방출한다. 몇몇 경우에, 상기 뉴클레아제는 폼아미도피리미딘 DNA 글리코실라제이다.

[0068] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에는 엑소뉴클레아제(예컨대, Exo III)에 의해 절단가능한 합텐(예를 들어, 이중 합텐 또는 고차원의 합텐) 프로브가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 구조 5'X(n)$_a$L(n)$_b$H(n)$_c$B3'를 갖고, 여기서 n은 뉴클레오타이드이며, a, b 및 c는 정수이고, X는 5'헥실 또는 합텐이고, H는 THF 잔기, B는 C3 스페이서, 및 L은 복수의 합텐을 포함하는 분지화된 변형제인 것이다. 몇몇 실시형태에서, 상기 합텐은 예를 들어, DNP 및 바이오틴이지만, 다른 합텐들이 활용될 수도 있다(예를 들어, FAM). 몇몇 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 상기 합텐들 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, a 및 c는 1 내지 50개의 뉴클레오타이드이고 b는 0 내지 50개의 뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시형태에서, a 및 c는 적어도 15개의 뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시형태에서, b는 0이다. 몇몇 실시형태에서, a는 약 15이고, c는 약 30이다. 몇몇 실시형태에서, 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는 표적 핵산에 상보적이다. 몇몇 실시형태에서, L은 사이토신 뉴클레오타이드를 대체한다. 상기 프로브의 더욱 상세한 설명은 이하 실시예 16에 기재된다.

[0069] 표적 앰플리콘을 함유하는 RPA 반응에서 Exo III은 프로브의 무염기성 잔기 H를 절단하고, 이어서 ExoIII에 의한 3'-5' 절단은 2개의 상이한 합텐에 의해 표지화된 모노뉴클레오타이드 L(5'-포스페이트 및 3'-OH를 가짐)을 방출시킨다. 이러한 이중-합텐 표지화된 모노뉴클레오타이드는 RPA 코아세르베이트에서 탈출하기에 자유롭고, 입자 및 LF 스트립의 시험 라인을 가시화하는데 있어서 항체와 상호작용한다.

[0070] 또한, 하나 이상의 단일 가닥 DNA 결합 단백질은 상기 반응에서 진행 중인 다양한 교환 반응 동안 핵산을 안정화시키는데 사용될 수 있다. 하나 이상의 단일 가닥 DNA 결합 단백질은 임의의 종, 예를 들어, 원핵생물, 바이러스 또는 진핵생물 종에서 유래하거나 수득될 수 있다. 비제한적인 예시적 단일 가닥 DNA 결합 단백질은 이.콜라이 SSB 및 미오비리대 파지에서 유래하는 것, 예를 들어, T4, T2, T6, Rb69, Aeh1, KVP40, 아시네토박터 파지 133, 아에로모나스 파지 65, 시아노파지 P-SSM2, 시아노파지 PSSM4, 시아노파지 S-PM2, Rb14, Rb32, 아에로모나스 파지 25, 비브리오 파지 nt-1, phi-1, Rb16, Rb43, Phage 31, 파지 44RR2.8t, Rb49, 파지 Rb3, 및 파지 LZ2에서 유래되는 것을 포함한다. 단일 가닥 DNA 결합 단백질의 다른 예로는 에이.데니트리피칸스 알라이드(A. denitrificans Alide)_2047, Burkholderia thailandensis BthaB_33951, Prevotella pallens HMPREF9144_0124, 및 진핵생물성 단일 가닥 DNA 결합 단백질 복제 단백질 A를 포함한다.

[0071] 본 개시내용의 임의의 방법은 크라우딩 촉진제의 존재하에 수행될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리비닐 알코올, 폴리스티렌, 피콜, 덱스트란, 폴리(비닐피롤리돈)(PVP) 및 알부민 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 상기 크라우딩 촉진제는 200,000 돌턴 미만의 분자량을 갖는다. 또한, 상기 크라우딩 촉진제는 예를 들어, 약 0.5% 내지 약 15% 중량/부피(w/v)의 양으로 존재할 수 있다. 몇몇 경우에, 상기 크라우딩 촉진제는 PEG이다.

[0072] 몇몇 경우에, 상기 크라우딩 촉진제는 분자량이 적어도 1 킬로돌턴, 적어도 2 킬로돌턴, 적어도 3 킬로돌턴, 적어도 4 킬로돌턴, 적어도 5 킬로돌턴, 적어도 6 킬로돌턴, 적어도 8 킬로돌턴, 또는 적어도 10 킬로돌턴인 것이다.

[0073] 몇몇 경우에, 상기 크라우딩 촉진제는 조성물에 적어도 15 v/v%의 농도, 적어도 12 v/v%의 농도, 적어도 10 v/v%의 농도, 적어도 8 v/v%의 농도, 적어도 6 v/v%의 농도, 적어도 5 v/v%의 농도, 적어도 4 v/v%의 농도, 또는 적어도 3 v/v%의 농도로 조성물에 존재한다.

[0074] 몇몇 경우에, 상기 크라우딩 촉진제는 5 mPa/s 이하, 4 mPa/s 이하, 3 mPa/s 이하, 2 mPa/s 이하, 또는 1 mPa/s 이하의 20℃에서의 점도 프로파일을 갖는다.

[0075] 몇몇 경우에, 상기 크라우딩 촉진제는 분자량이 3 킬로돌턴이고 최종 농도가 6.5%인 PEG이다. 몇몇 경우에, 상기 크라우딩 촉진제는 PEG이고 20℃에서의 점도는 3 mPa/s 이하이다.

[0076] 재조합효소 로딩 단백질이 사용되는 경우, 상기 재조합효소 로딩 단백질은 원핵생물 기원, 바이러스 기원 또는 진핵생물 기원인 것일 수 있다. 예시적인 재조합효소 로딩 단백질은 이.콜라이 RecO, 이.콜라이 RecR, UvsY, 및 이의 돌연변이체 또는 단편, 또는 이의 조합을 포함한다. 예시적인 UvsY 단백질은 미오비리대 파지에서 유래하는 것, 예를 들어, T4, T2, T6, Rb69, Aeh1, KVP40, 아시네토박터 파지 133, 아에로모나스 파지 65, 시아노파지 P-SSM2, 시아노파지 PSSM4, 시아노파지 S-PM2, Rb14, Rb32, 아에로모나스 파지 25, 비브리오 파지 nt-1, phi-1, Rb16, Rb43, Phage 31, 파지 44RR2.8t, Rb49, 파지 Rb3, 및 파지 LZ2에서 유래되는 것을 포함한다. 본 개시내용의 임의의 방법에서, 상기 재조합효소 로딩 제제는 미오비리대 파지에서 유래될 수 있다. 상기 미오비리대 파지는 예를 들어, T4, T2, T6, Rb69, Aeh1, KVP40, 아시네토박터 파지 133, 아에로모나스 파지 65, 시아노파지 P-SSM2, 시아노파지 PSSM4, 시아노파지 S-PM2, Rb14, Rb32, 아에로모나스 파지 25, 비브리오 파지 nt-1, phi-1, Rb16, Rb43, Phage 31, 파지 44RR2.8t, Rb49, 파지 Rb3, 및 파지 LZ2에서 유래될 수 있다.

[0077] 또한, 본 개시내용의 임의의 방법은 차단된 프라이머에 의해 수행될 수 있다. 차단된 프라이머는 폴리머라제에 의한 연장을 허용하지 않는 프라이머이다. 차단된 프라이머가 사용되는 경우, 탈차단제(unblocking agent)를 사용하여 프라이머를 탈차단시켜 연장할 수 있도록 할 수 있다. 탈차단제는 프라이머로부터 차단 기를 절단시킬 수 있는 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제일 수 있다. 예시적인 탈차단제로는 이.콜라이 엑소뉴클레아제 III 및 이.콜라이 엔도뉴클레아제 IV를 포함한다.

[0078] 본 개시내용의 방법은 표적 핵산이 제한효소 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제에 대한 천연 절단 부위를 포함할 수 있는 표적 핵산 서열의 검출을 포함한다. 또한, 절단 부위는 하나 이상의 위치가 표적 핵산 서열과 상이한 프라이머를 이용하여 상기 표적 서열을 증폭시킴으로써 상기 표적 핵산 서열에 도입될 수 있다. 인공 절단 부위 또는 표적 핵산 서열에서 발견되지 않는 절단 부위의 도입은 상기 표적 핵산 서열 또는 상기 표적 핵산 서열 중의 SNP의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다.

[0079] 본 명세서에 기재된 방법은 또한 다양한 제한효소 엔도뉴클레아제 또는 본 명세서에 기재된 뉴클레아제에 의해 병렬로 수행될 수 있다. 증폭 생성물의 검출은 병렬로 기준 샘플과 비슷한 증폭 속도로 수행될 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법은 표적 서열의 검출, 또는 서열의 유전자형을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0080] 몇몇 실시형태에서, 핵산 증폭 생성물의 증가 모니터링은 경시적으로 반응 혼합물에 있는 증폭 생성물의 수 또는 비율을 결정하거나, 또는 이중-합텐 또는 유리의 이중-합텐/표지와 같은 이중 표지의 수 또는 비율을 결정하는 것을 포함할 수 있다.

[0081] 몇몇 실시형태에서, 상기 이중-합텐은 육안에 의해 검출 가능하다. 몇몇 실시형태에서, 상기 이중-합텐 표지는 형광, 위상차 현미경법, 발광 검출, 분광(색) 검출, 자성 검출, 방사성동위원소 검출 및/또는 전기화학적 검출을 사용하여 검출한다. 본 기술분야의 통상의 기술자는 혼합물 중의 핵산 증폭 생성물의 양을 측정하는 본 기술분야에 공지된 임의의 기술이 증폭 생성물을 검출하고 증폭 생성물의 증가를 경시적으로 모니터하는데 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 본 명세서에 기재된 몇몇 RPA 방법에서 검출 가능한 표지는 RPA 반응의 진행(증폭 생성물의 생성)을 모니터하는데 사용될 수 있다.

[0082] 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물은 예를 들어, 표적 핵산 서열을 검출하는데 사용될 수 있다. 본 개시내용은 또한 야생형 대립유전자에 대비하여 SNP를 포함하는 변형 대립유전자를 식별할 수도 있다. 몇몇 경우에, 이 SNP는 특정 질병 상태 또는 진단(예를 들어, 겸상적혈구세포 빈혈의 진단, 또는 종양 또는 암의 진단)에 연관될 수 있고, 또는 약물 내성 또는 감수성과 연관될 수 있다. 본 명세서에 기재된 등온 증폭 반응 방법 및 조성물은 표적 서열 및/또는 본 명세서에서 결합된 다형태체의 신속한 검출을 가능하게 한다.

[0083] **실시예**

[0084] 실시예 1: 측면 유동 스트립 재료 및 제조

[0085] 완충액 제제를 위한 시약 및 화학물질은 피셔(Fisher) 또는 시그마(Sigma)에서 구입하였다.

[0086] 측면 유동 스트립은 다른 언급이 없는 한, Prima 40 나이트로셀룰로스(GE), 접착성 백킹 카드(HF000MC100, Millipore), 및 CF5 흡수 패드재(GE)를 사용하여 제조하였다. 연속 유동 실험을 위하여, 시험된 추가 흡인 패드(wicking pad) 재료에는 CF6(GE) 및 등급(Grade) 320 두께 중량의 셀룰로스(Ahlstrom)가 포함되었다. 항-DNP(MAB2223, Millipore) 및 항-FAM(MIF2902, Thermo Fisher) 단클론성 항체 및 항-마우스 다클론성 항체(A16162, Novex)는 Amicon Ultra 10k MWCO 원심 농축기를 제조업체의 지시에 따라 사용하여, 저장 완충액을 10mM 인산나트륨 pH 7.4 + 0.005% Triton X100으로 교환함으로써 분배용으로 제조하였다. 정제된 항체는 예비절단된 스트립(0.5 ㎍/스트립) 상에 점적하거나 Biodot ZX1010 분배 플랫폼을 사용하여 1㎍/막cm의 속도로 막 위에 분배하였다. 막 또는 점적된 스트립은 적층 전에 가압 공기 오븐에서 40℃ 하에 1시간 동안 건조하였다.

[0087] 다른 언급이 없는 한, 스트립 적층체는 상기 백킹 카드의 하나의 긴 에지(edge)(300㎜×45㎜로 예비절단됨)와 끝을 맞추어 300㎜×25㎜의 항-FAM/항-DNP 막을 적층시켜 제조하였다. CF5 흡수재의 300㎜×22㎜ 스트립은 그 다음 상기 백킹 카드의 상단 에지와 끝을 맞추어 적층시켜 상기 흡인 패드가 상기 막과 2㎜ 중첩되도록 하였다. 적층된 카드는 그 다음 Biodot CM5000 절단기를 사용하여 5㎜×45㎜ 스트립으로 절단하였다. 절단된 스트립은 사용하기 전까지 데시케이터에서 실온 하에 보관하였다.

[0088] 접합체 패드들이 이용된 경우에는 금 접합체를 9000xg에서 20분 동안 원심분리하여 완충액 교환하여, 상청액은 제거하고 금은 50mM Borax, 10% 수크로스, 1% 카제인 및 0.5% Brij-35에 최초 부피로 복원시켰다. 접합체는 유리 섬유 스트립(GFDX103000, Millipore) 상에 Biodot ZX1010 분배기를 사용하여 3㎕/cm의 속도로 분무하였다. 그 다음, 금 접합체 패드는 적층 전에 40℃에서 2시간 동안 건조하였다.

[0089] 실시예 2: 20㎚ 금 콜로이드에 항-바이오틴의 접합

[0090] 단클론성 항-바이오틴(ab201341, Abcam)은 AbPure BSA 제거 키트(Innova Biosciences)를 제조업체의 지시에 따라 사용하여 접합을 위해 제조하였다. 정제된 항-바이오틴은 InnovaCoat Gold 20㎚ 키트(Innova Biosciences)를 역시 제조업체의 지시에 따라 사용하여 금에 접합시켰다; 단, 이 접합 단계에서 항-바이오틴은 0.5 ㎎/㎖로 존재하였다. 항-바이오틴 금은 전술한 바와 같이 접합체 패드 상에 분무되지 않는다면, 일반적으로 상기 RPA 반응에 직접 첨가하였다.

[0091] 실시예 3: 올리고뉴클레오타이드 및 프로브 표지화

[0092] 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 비표지화된 Fpg 측면 유동 프로브는 Eurogentec에서 입수하였고; 비표지화된 프로브는 무염기성 dR 부위에 아미노-변형을 갖고, 3' 말단에 C3 스페이서 변형을 갖는 것으로 구입하였다. 모든 형광 Fpg 프로브는 LGC Biosearch에서 입수하였다.

[0093] 실시예 4: 이중-합텐 표지의 합성 및 올리고 표지화

[0094] Fmoc-Lys(Mtt)-Wang 수지는 머크(Merck)에서 구입하였다. 닌하이드린 정성 시험 키트는 아나스펙(Anaspec)에서 구입하였다. 다이클로로메탄(DCM), 펩타이드 합성 등급의 N,N-디메틸포름아미드(DMF), (벤조트라이아졸-1-일옥시)트라이피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyBOP), N-메틸모르폴린(NMM), 피페리딘, D-바이오틴, 트라이아이소프로필실란(TIS), 5(6)-카복시플루오레세인, 메탄올, 폼산, 아세토나이트릴, 다이에틸 에터, HPLC용 트라이에틸아민(TEA), 아세트산, $NaHCO_3$, NaOH, 2,4-다이나이트로플루오로벤젠, 및 N,N,N',N'-테트라메틸-O-(N-석신이미딜)우로늄 테트라플루오로보레이트(TSTU)는 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific)에서 구입하였다. 트라이플루오로아세트산(TFA), N,N'-다이사이클로헥실카보다이이미드(DCC), N-하이드록시석신이미드(NHS), $N_{\square}$-DNP-L-Lys, 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(HFIP), *N,N*-다이아이소프로필에틸아민(DiPEA), LCMS용 트라이에틸아민(TEA), 및 LCMS용 물은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 구입하였다. 다이메틸설폭사이드(DMSO)는 어플리켐(AppliChem)에서 입수하였다. HCl 및 아세톤은 VWR에서 입수하였다. 밀리포어(Millipore) 물은 합성 및 탈염에 사용하였다; HPLC-등급의 물은 HPLC 정제에 사용하였다. NAP-10 크기-배제(SE) 컬럼은 GE에서 입수하였다. *N*-하이드록시석신이미도바이오틴(바이오틴-OSu)은 아이리스 바이오텍(Iris Biotech)에서 구입하였다.

[0095] LCMS 분석은 Agilent 6410B Triple Quadrupole ESI-MS와 함께 Agilent 1200 LC 시스템 상에서 수행하였다. 모든 LC 방법은 Agilent Eclipse Plus C18, 3.5㎛, 3.0×150 ㎜ 컬럼을 실온에서 이용하였다; 언급된 모든 수율은 254㎚에서의 흡광도를 기반으로 한다. LC 용매: A = 물 + 0.1% 폼산; B = 아세토나이트릴 + 0.1% 폼산; C = 200mM HFIP, 4mM TEA aq.; D = 메탄올. LC 방법: 1 (용매 A 및 B) = 25분에 걸쳐 5 내지 95% B, 그 다음 5분 동안 95% B; 2 (용매 C 및 D) = 3분에 걸쳐 20% D, 그 다음 5분에 걸쳐 20 내지 30% D, 그 다음 7분에 걸쳐 30

내지 50% D, 그 다음 5분에 걸쳐 50 내지 60% D, 그 다음 1분에 걸쳐 60 내지 80% D, 그 다음 1분에 걸쳐 80% D.

[0096] 표지화된 올리고뉴클레오타이드의 RP-HPLC 정제는 분획 수집기, 및 Oligo-RP 가드 카트리지를 갖춘 Phenomenex Clarity 10u Oligo-RP 250×4.6mm 컬럼(AJO-8135, Phenomenex)이 장착된 Agilent 1100/1200 LC 시스템 상에서 수행하였다. LC 용매 A = 메탄올; B = 50mM TEAA 중의 5 v/v% 아세토나이트릴, pH 7.4. LC 정제 방법: 5분에 걸쳐 5% B; 35분에 걸쳐 5 내지 50% B; 5분에 걸쳐 50 내지 60% B. 크로마토그램은 254nm에서, 그리고 494nm (Bio-FAM 표지화의 경우) 또는 360nm(Bio-DNP 표지화의 경우)에서 기록하였다.

[0097] 최종 표지화된 올리고뉴클레오타이드는 260nm에서 Thermo-Fisher NanoDrop 2000을 사용하여 정량하였고, Bio-FAM 표지에 대해 ε_{260} = 20960 $M^{-1}cm^{-1}$로 추정되었고 Bio-DNP 표지에 대한 ε_{260}은 무시되었다. NMR 분석은 Bruker Avance 콘솔(console)이 장착된 Oxford 400 MHz 자석을 사용하여 수행하였다; d6-DMSO (99.9% 원자 D)는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 입수하였다.

[0098] 실시예 5: Bio-FAM 이중-합텐 표지의 고상 합성

[0099] (D-)Bio-(L-)Lys(5(6)FAM)-OH는 Fmoc-Lys(Mtt)-Wang 수지로부터 시작해서 표준 고상 합성 기술을 사용하여 합성하였다(W. C. Chan and P. D. White, in *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, W. C. Chan and P. D. White, Oxford University Press, Oxford, 2000, ch. 3, pp. 41-76). 구체적으로, 수지(0.25g, 0.57 mmol/g 로딩)는 DCM을 사용하여 1 h 동안 팽창시킨 후, 소량의 샘플을 시험하여 유리의 아민의 부재를 확인하였다(정성적 닌하이드린 시험). Fmoc 보호기는 DMF 중의 20 v/v% 피페리딘(2×6분)을 사용하여 제거하였고, 상기 수지는 DMF(3x), 그 다음, DCM(3x)으로 세척한 후, 정성적 닌하이드린 시험을 통해 유리 아민의 존재를 확인하였다. D-바이오틴(3 eq.)은 DMF(4.3mℓ) 중의 PyBOP(3 eq.) 및 NMM(5 eq.)을 이용하여 초음파처리 하에 4분 동안 활성화시킨 다음, 상기 수지와 60℃에서 38분 동안 반응시켰다; 상기 수지는 이어서 DMF(3x) 및 DCM(3x)으로 세척하였다. 상기 수지 샘플의 닌하이드린 시험으로 유리 아민의 부재를 확인하였고; 그 다음 DCM 중의 1 v/v% TFA, 5 v/v% TIS에 의해 30분(2x) 동안 탈보호화하였고, 이어서 DMF(3x) 및 DCM(3x)으로 세척하였다. 상기 수지 샘플의 닌하이드린 시험은 유리의 아민을 나타내었다. 5(6)-카복시플루오레세인(3 eq.)은 DMF(4.3mℓ) 중의 PyBOP(3 eq.) 및 NMM (5 eq.)으로 10초 동안 활성화시켰고, 그 다음 상기 수지와 60℃에서 38분 동안 반응시켰다; 상기 수지는 이어서 DMF(3x) 및 DCM(3x)으로 세척하였다. 상기 수지는 DMF 중의 20 v/v% 피페리딘(2×10분)으로 처리하여 플루오레세인 이량체를 절단하였고, 그 후 상기 수지를 DMF(3x), DCM(3x), 그 다음 MeOH(3x)으로 세척하였다; 세척된 수지는 건조하고 밤새 냉각기(약 5℃)에 보관하였다. 유리의 표지를 수득하기 위하여, 상기 수지는 DCM(2h)에서 팽창시켰고, 그 다음 팽창된 수지의 약 1/2을 2.5mℓ의 90/2.5/2.5 v/v/v TFA/TIS/H_2O를 이용하여 실온에서 2시간 동안 절단하였고, TFA(2×1mℓ)로 세척하였다. 절단 칵테일(cocktails)과 TFA 세척물의 합산물을 유리 RB 플라스크 내에서 진공하에 건조하였고, 그 후 DCM 세척물과 함께 5mℓ Eppendorf 튜브로 전이시키고, Ar(g)으로 취출시켰고, 빙랭시킨 다이에틸 에터(4.5mℓ)를 첨가하자마자 황색 고체가 침전되었으며, 원심분리하여 펠릿화하였다. 상청액은 버리고, 상기 펠릿은 다이에틸 에터(2×4.5mℓ)를 이용하여 원심 세척하였다. 황색 고체 30mg(58% 수율)을 수득하였다. 상기 생성물의 LCMS(방법 1)는 양호한 순도(90%, t_R 11.85분)를 나타내었다; ESI-MS(pos. m/z): 731.3(100%, $[M+H]^+$). 유리의 표지의 2.05mM DMSO 용액을 제조하였고, 이 용액은 유리의 Bio-FAM 표지를 이용하는 측면 유동 연구를 위해 물로 추가 희석하였다.

[0100] 실시예 6: 아미노-변형된 FPG 프로브에 Bio-FAM 표지의 부착

[0101] Bio-FAM 이중 표지(5mg, 6.8 μmol)는 암실에서 DCC(2.1mg, 10 μmol) 및 NHS(1.2mg, 10 μmol)을 이용하여 3시간 동안 활성화시켰고, 그 후 반응 혼합물의 샘플을 메탄올로 희석하고 LCMS(방법 1)로 분석한 결과, Bio-FAM NHS 에스터의 존재를 21% 수율로 나타내었다(t_R 12.97분; ESI-MS(pos. m/z): 828.8(9%, $[M+H]^+$). 3.5시간의 반응 시간 후, 10μℓ의 활성화 혼합물을, 물(20μℓ) 및 1M pH 9 $NaHCO_3$ 수용액(10μℓ) 중의 약 1mM의 아미노-변형된 프로브 올리고(rs1207445)의 혼합물에 첨가하였다. 상기 표지화 혼합물을 볼텍싱하고, 10분 동안 초음파처리한 뒤, 볼텍싱한 다음 암실에서 실온 하에 밤새 방치하였다. 이 혼합물을 그 다음 NAP-10 SE 컬럼을 이용하여 탈염시키고 RP-HPLC로 정제하였으며(표적 t_R 29.78분), 상기 표적 분획은 진공 농축하고, NAP-10 SE에 의해 탈염시키고, 다시 진공 농축하여 표적 Bio-FAM-표지화된 올리고의 13.4 μM 용액 190μℓ를 제공하였다(25% 수율). 상기 표지화된 올리고는 LCMS(방법 2)를 이용하여 특성화하였다; 94% 순도, t_R 11.58분, ESI-MS (neg.): 요구치 11584.4,

실측치 11584.4. UV-Vis 특성화(Thermo-Fisher NanoDrop 2000)는 FAM-표지화된 DNA 올리고와 일치하는 259nm 및 496nm에서의 흡광도 피크를 나타내었다.

[0102] 실시예 7: Bio-DNP 이중-합텐 표지의 용액상 합성

[0103] (D-)Bio-(L-)Lys(DNP)-OH는 FAM 대신에 DNP 모이어티를 혼입시키기 위하여 DMF(4.3㎖) 중의 2,4-다이나이트로플루오로벤젠(3 eq.) 및 DiPEA(4 eq.)를 이용하여, 상기 Bio-FAM 표지에 대해 전술한 바와 같은 표준 고상 합성 기술을 사용하여 합성하였다. 하지만, 개량된 용액상 합성은 여기에 기술된 바와 같이 개발되었다. 구체적으로, 바이오틴-OSu(602 μmol, 1.05 eq.) 및 $N_{\square}$-DNP-L-Lys(1 eq.)을 DMF(5.7㎖) 및 DiPEA(0.25㎖)에 현탁시키고, 30분 동안 초음파처리하여 투명한 용액을 얻은 후 실온에서 교반하였다. 2h 후, 반응 혼합물에서 침전물이 관찰되었고, 이를 밤새 실온에서 교반시킨 후, (2x 와트만 제1호(Whatman No.1) 여과지를 통해) 여과하고 아세톤(10㎖) 및 다이에틸 에터(130㎖)로 세척하여 황색 고체(244mg)를 수득하였다. 상기 유기 세척물을 합하고 추가 다이에틸 에터(100㎖)를 첨가한 후, 전술한 바와 같이 여과하고 추가 다이에틸 에터(100㎖)로 세척하여 황색 고체의 2차 수확물(30mg)을 수득하였다. 상기 표적 표지의 DiPEA 염의 두 수확물을 합하여 0.5M NaOH 수용액(5㎖)에 용해하여 진한 오렌지-황색 용액을 제공한 후, 1M HCl 수용액(5㎖)을 첨가하여 카복실산 표적을 황색 고체로서 침전시켰다. 이 혼합물을 얼음 상에서 냉각시킨 후, 고체를 (2x 와트만 제1호 여과지를 통한) 흡인 여과에 의해 수집하고, 빙랭시킨 1M HCl 수용액(2×25㎖), 그 다음 H_2O(2×25㎖), 그 다음 다이에틸 에터(650㎖)로 세척하였다. 세척액은 버리고 황색 고체는 진공 건조하여 상기 표적을 양호한 수율(0.41 mmol, 72%)로 수득하였다. LCMS(방법 1) 97% 순도, t_R 13.71분, ESI-MS(pos. m/z): 539.2(18%, $[M+H]^+$).; 1H NMR(400 MHz, d6-DMSO) δ_H 12.51(br s, 1 H, OH), 8.88(d, 1H, J = 5.8 Hz, NH-Ar), 8.86(d, 1H, J = 2.7 Hz, Ar-H3), 8.25(dd, 1H, J = 9.7, 2.6 Hz, Ar-H5), 8.05(d, 1H, J = 7.8 Hz, NHC(O)CH_2), 7.22(d, 1H, J = 9.7 Hz, Ar-H6), 6.38(d, 2H, J = 16.2 Hz, NHC(O)NH), 4.29(dd, 1H, J = 7.5, 5.0 Hz, CH(CH_2)S), 4.20-4.10(m, 2H, CHCO_2H, NHCHCH(R)S), 3.52-3.43(m, 2H, CH_2NHAr), 3.10-3.06(m, 1H, NHCHCH(R)S), 2.80(dd, 1H, J = 12.4, 5.0 Hz, CH(H)S), 2.56(d, 1H, J = 12.4 Hz, CH(H)S), 2.11(t, 2H, NHC(O)CH_2), 1.78-1.25(m, 12H, 6×CH_2).

[0104] 실시예 8: 아미노-변형된 FPG 프로브에 Bio-DNP 표지의 부착

[0105] Bio-DNP 이중 표지(10mg, 18.6 μmol)는 TSTU(8.4mg, 27.9 μmol) 및 DiPEA(9.7㎕, 27.9 μmol)를 이용하여 8분 동안 활성화시킨 다음, 반응 혼합물의 샘플을 아세토나이트릴로 희석시켜 LCMS(방법 1)로 분석한 결과, Bio-DNP NHS 에스터의 존재가 19% 수율로 나타났다(t_R 15.09분; ESI-MS(pos. m/z): 636.3(9%, $[M+H]^+$). 1.5시간 반응 시간 후, 10㎕의 활성화 혼합물을 물(20㎕) 및 1M pH 9 $NaHCO_3$ 수용액(10㎕) 중의 약 1mM의 아미노-변형된 프로브 올리고(rs1207445)의 혼합물에 첨가하였다. 상기 표지화 혼합물을 볼텍싱하고, 10분 동안 초음파 처리한 후, 실온의 암실에서 밤새 방치하였다. 상기 혼합물을 그 다음 NAP-10 SE 컬럼에 의해 탈염시키고, RP-HPLC에 의해 정제하고(표적 t_R 31.10분), 표적 분획을 진공 농축한 후, NAP-10 SE에 의해 탈염시키고, 진공 하에 추가 농축하여 표적 Bio-DNP 표지화된 올리고의 7.1μM 용액 470㎕를 제공하였다(17% 수율). 상기 표지화된 올리고는 LCMS(방법 2)에 의해 특성화되었다; 90% 순도, t_R 10.48분, ESI-MS(neg.): 요구치 11392.4, 실측치 11392.2.

[0106] 실시예 9: RPA 조건

[0107] 모든 RPA 반응은 다른 언급이 없는 한 40℃에서 20 분 동안 항온처리하였다. 측면 유동용 RPA 제제(Fpg)는 각각 420nM의 적당한 정방향 및 역방향 프라이머, 120nM의 이중-합텐 Fpg 프로브, 50mM 트리스 아세테이트(Tris Acetate) pH 8.3, 100mM KOAc, 5mM DTT, 1x 크레아틴 키나제, 30㎍ Gp32, 30㎍ UvsX, 7㎍ UvsY, 6.5% 3kDa PEG, 5.7% 트레할로스, 8.6㎍ DNA 폴리머라제 I(에스. 아우레우스(*S. aureus*)), 9.48㎍ Fpg, 1x E-mix, 1.8mM dNTP 및 0.5% Brij-35를 함유한다. 반응은 적당한 주형과 $Mg(OAc)_2$(22.5mM 최종 농도)를 함유하는 혼합물을 100㎕의 최종 부피로 첨가함으로써 개시되었다.

[0108] Nfo RPA 반응 제제는 Gp32(28㎍/반응) 및 폴리머라제(12.8 ㎍/반응)를 제외하고는 Fpg와 동일하였다. 추가로, Fpg는 Nfo(엔도뉴클레아제 IV; 4.6㎍/반응)로 교체된다.

[0109] 형광 Fpg 반응은 시중에서 입수용이한 TwistAmp Fpg 키트를 제조업체의 지시에 따라 T8 기구(Axxin) 상에서 사용하여 수행하였다. 반응은 40℃에서 20 분 동안 항온처리하였다.

[0110] 실시예 10: 측면 유동 스트립 검출

[0111] 다른 언급이 없는 한, 1.5㎕ 항-바이오틴 금은 종결된 RPA 반응에 직접 첨가되었고, 측면 유동 스트립이 첨가되었다. 스트립들은 20분 동안 흡인시킨 후, 실온에서 10분 동안 건조하였다. 흡수 패드 및 유리섬유 접합체 패드(적당한 경우)를 제거하고 스트립들을 스캔하였다.

[0112] PCRD 스트립(Abingdon Health) 상에서의 희석 검출은 5㎕ 앰플리콘을 70㎕ PCRD 추출 완충액에 희석시켜 수행하였다. 전체 75㎕는 제조업체의 지시에 따라 PCRD 디바이스 상에서 처리되었다.

[0113] 실시예 11: 측면 유동 스트립 상에서 신규 피분석물의 비희석 검출

[0114] 지금까지 측면 유동 디바이스 상에서의 RPA 생성물의 검출은 시중에서 입수가능한 NALFIA 스트립, 예를 들어, Milenia Hybridetect 스트립, Abingdon Health PCRD 스트립 및 UStar 디바이스를, 하이브리드화하여 샌드위치 측면 유동 면역검정에 의해 검출될 수 있는 이중-합텐 표지를 형성할 수 있는 단일 가닥의 핵산에 부착된 각 표지를 포함하는 이중-합텐 표지화된 앰플리콘을 생성하는 TwistAmp Nfo 화학과 함께 사용하여 달성되어 왔다. 이 기술은 민감도 및 특이성 면에서 형광 프로브 기반의 접근법과 비슷하게 수행하지만, 최종 사용자는 먼저 고 점성인 앰플리콘을 희석시켜 검정 스트립을 따라 표지가 이동할 수 있게 하고, 상기 측면 유동 스트립 상에서 증폭 생성물을 성공적으로 결정할 수 있게 해야 한다(도 8). 도 8에는 측면 유동 스트립 상에서 비희석적으로 진행되었을 때 이중-표지화된 앰플리콘의 제한적 검출에 대한 기전을 예시하는 모식도가 도시된다. 상기 TwistAmp Nfo 반응은 3' 차단된, 합텐-표지화된 프로브(내부 테트라하이드로퓨란(THF) 잔기를 함유함), 합텐-표지화된 역방향 프라이머 및 엔도뉴클레아제 IV(Nfo)를 함유한다. 본 연구에서, 프로브들은 전형적으로 바이오틴에 의해 표지화되는 반면, 상기 역방향 프라이머는 DNP 또는 FAM에 의해 표지화되었다. 증폭 시, 상기 바이오틴-표지화된 프로브는 새롭게 합성된 DNP/FAM-표지화된 가닥에 결합한다. 프로브가 결합된 즉시, Nfo는 상기 THF 잔기의 5' 포스포다이에스터 결합을 절단한다(단계 1). 절단된 프로브는 상기 프로브를 연장시키는 폴리머라제를 이동시키는 가닥에 대한 프라이머로서 작용하여 3' 블록을 효과적으로 제거한다(단계 2). 이에 따라, RPA의 연속 라운드들은 이중-합텐 표지화된 앰플리콘의 생성을 초래한다(단계 3). 하지만, 본 발명자들은 반응이 희석되지 않는 한, 피분석물의 대부분이 RPA 코아세르베이트 내에 격리된 상태로 남아 있어(단계 4), 시험 라인에서 결합하는데 대부분 이용할 수 없게 되어 거짓 음성/약한 진정한 양성 시험 라인 신호를 초래한다고 생각한다.

[0115] 본 개시내용은 최종 사용자에게 감소된 수의 수동 단계들을 이용하여, 특히 RPA 앰플리콘 혼합물로부터 직접 성공적인 측면 유동 분리하는데 필요한 희석 단계 없이(직접 검출), 측면 유동 결정을 수행하는 수단을 제공한다.

[0116] 초기에는 희석 없이 측면 유동 디바이스 상에서 RPA의 직접 분석이 성공적이지 못한 것으로 판명되었다. 표준 RPA 증폭 혼합물에 사용된 35 kDa PEG의 고농도는 반응물들이 완전히 흡인되기에는 너무 점성인 것으로 여겨졌고, 금 콜로이드의 상당 부분이 스트립의 기부 말단에서 응집되었다. 본 개시내용은 35 kDa PEG를 사용할 때 관찰되는 효과들을 줄이도록 설계된, 개량된 RPA 혼합물을 제공한다. 변형된 RPA 혼합물은 크라우딩 촉진제로서 저분자량의 PEG(6.5% 3 kDa PEG) 및 0.5% v/v Brij-35를 활용하고, 이는 나이트로셀룰로스 막을 통한 금 콜로이드의 이동을 크게 향상시킨다. 시중에서 입수가능한 TwistAmp Nfo 화학(35 kDa PEG를 포함함)은 상업적으로 또는 사내에서 생산된 기존 측면 유동 검정 스트립 상에서 진행 완충액에 의해 적당하게 희석되자마자 앰플리콘의 약간의 검출을 허용하였지만, 낮은 MW PEG(6.5% 3 kDa PEG) Nfo RPA가 스트립 상에서 희석되지 않은 채 진행될 때에는 NTC 대비 1,000 카피의 주형을 함유하는 RPA 반응물의 시험 스팟에서는 검출 가능한 신호의 자극이 거의 일어나지 않았다(도 7).

[0117] 도 7에는 살모넬라 *InvA* 표적에 대한 TwistAmp Nfo 검정의 측면 유동 분석이 도시된다. TwistAmp Nfo 반응물(NTC 및 반응당 1,000 카피의 주형 DNA; TwistAmp Nfo 반응물은 35kDa PEG를 함유한다). RPA는 진행 완충액에 1/50로 희석되어 시판 측면 유동 스트립(PCRD, 왼쪽 패널) 및 사내에서 생산된 항-FAM 스트립(중간 패널) 상에서 분석되었다. 이와 병렬로 3kDa PEG RPA 반응물은 동일한 배취(batch)의 항-FAM 스트립(오른쪽 패널) 상에서 희석없이 분석되었다.

[0118] 이중-합텐 표지가 측면 유동 스트립 상에서 직접 비희석 검출에 더욱 절 적용될 것인지를 결정하기 위하여, 스트립 상에서 분석하기 전에 3종의 피분석물을 TBST(0 내지 120nM)에 혼입하거나, 또는 모든 RPA 성분을 6.5% 3kDa PEG에 함유하는 모의 RPA 반응물에 혼입하였다. 상기 3종의 피분석물은 다음과 같다: 1) 합텐 표지화된 앰플리콘을 모의하기 위해 사용된, 5' 말단 및 3' 말단이 각각 FAM 및 바이오틴으로 표지화된 28mer 올리고뉴클레오타이드; 2) 신규 Bio-FAM 이중-합텐 프로브; 3) 무염기성 dR 기가 Bio-FAM 이중-합텐에 의해 표지화된 Fpg 프로브. 중요하게도, 3종의 피분석물은 모두 완충액에 혼입되었을 때 유사한 정도로 검출되었고, 시험된 피분석물

의 최저 농도(대략 1nM)에 대해 양성 신호가 관찰되었다. 검출이 희석되지 않은 채 혼입된 모의 RPA에 대하여 수행된 경우, 피분석물의 부재 하에 진행된 스트립들은 약간의 약한 비특이적 신호를 나타내 보였다. 또한, 약한 신호들은 상기 이중-표지화된 올리고뉴클레오타이드 및 상기 이중-합텐 Fpg 프로브에 대하여 120nM의 피분석물까지도 관찰되었다. 하지만, 음성 샘플에 대비하여, 시험 라인 신호의 유의적인 자극은 유리의 이중-합텐 피분석물에서만 관찰되었다(도 1 iii)). 이들 데이터는 측면 유동 스트립 상에서 RPA 생성물의 비희석 검출에는 작은 표지들이 사용될 수 있는 반면, 표지화된 핵산 표지들(기존 시판 Nfo RPA 반응물에서 해리된 경우)은 이들의 부피가 큰 프로브들이 RPA 코아세트베이트 내에 국재화됨으로 인하여 쉽게 검출될 수 없으며, 이것이 상기 측면 유동 스트립 상에서 상기 표지들을 검출할 수 있는 이용가능성을 제한한다는 가설과 일치한다.

[0119] 실시예 12: 측면 유동 스트립 상에서 RPA의 직접 검출

[0120] RPA의 검출에 상기 이중-합텐 피분석물을 사용하기 위해서는 증폭이 일어날 때까지 표지가 효과적으로 격리되어 있어야 할 필요가 있다. 따라서, 상기 rs1207445 표적에 대한 Fpg 프로브는 상기 이중-합텐 표지(rs1207445 프로브 1)에 접합될 수 있는 내부 아미노-변형된 dR 무염기성 부위가 있는 것으로 구입하였다. RPA 동안, 상기 프로브는 앰플리콘에 하이브리드화하며, 이 때 Fpg는 상기 dR 기의 5' 및 3'에 있는 무염기성 부위를 β δ 제거에 의해 절단하여(도 2 i), 단계 1), 상기 이중-합텐 표지를 방출시킨다(도 2 i), 단계 2). 상기 이중-합텐 피분석물은 이의 작은 크기로 인하여 RPA 코아세르베이트로부터 탈출하기에 자유롭고(도 2 i), 단계 3), 이에 따라 측면 유동 스트립 상에서 샌드위치 면역검정에 의해 검출될 수 있게 된다(도 2 i), 단계 4). 중요한 것은, 미가공된 프로브(두 합텐에 커플링되면, 이론적으로 검출될 수 있음)는 RPA 코아세르베이트 내에 격리될 가능성이 있어, 증폭이 일어나지 않은 RPA 반응물에서는 대부분 검출할 수 없게 된다는 것이다. 이 효과는 모의 RPA 반응물에 혼입된 순수 프로브는 유리의 표지보다 덜 검출성이라는 사실에 의해 예시된다(도 1 iii)).

[0121] Fpg 이중-합텐 프로브들이 측면 유동 상에서 RPA의 직접 종점 검출(direct endpoint detection)에 사용될 수 있다는 원리 증명을 수득하기 위하여, rs1207445 이중-합텐 프로브(프로브 1)를 함유하는 반응당 10, 100 및 1000 카피의 인간 gDNA(및 NTC)에 대한 저 MW PEG RPA 반응을 4 반복으로 수행하였다. 1.5㎕ 항-바이오틴 금을 첨가하였고, 앰플리콘/금 혼합물 내에 상기 스트립을 떨어뜨렸다. NTC 반응물에서는 약간의 비특이적 신호가 관찰되었지만, 10 카피의 주형을 함유하는 RPA의 2/4 반복물에서는 시험 라인의 자극 신호가 미약하게 관찰되었다. NTC에 대비하여 시험 라인 신호의 강한 자극은 반응당 100 카피 이상의 gDNA를 함유하는 모든 반응물에서 관찰되었다(도 2 ii)). 이러한 예비 데이터는 신규 Fpg 프로브 화학이 측면 유동 스트립 상에서 RPA 생성물의 비희석 검출을 가능하게 한다는 것을 나타낸다.

[0122] 많은 시판 NALFIA 스트립은 상기 콜로이드를 접합체 패드 내로 건조시킴으로써 상기 스트립 상에 상기 검출 접합체를 혼입시킨다. 또한, 대부분의 스트립들은 또한 유동 대조 라인(flow control line)을 포함하며, 이것은 스트립들이 효과적으로 흡인되었는지를 확인하는 작용을 한다. 상기 특징들이 혼입된 스트립들이 RPA의 직접 검출을 위해 생산될 수 있는지를 결정하기 위하여, 스트립에 항-DNP 시험 라인, 항-마우스 유동 대조 라인(상기 시험 라인을 지나친 임의의 접합체를 결합시킴) 및 건조된 항-바이오틴 금 콜로이드를 함유하는 유리 섬유 접합체 패드를 이용하여 라이닝하였다. rs1207445 검정은 1000 카피의 인간 gDNA의 부재 또는 존재 하에 수행하였고, 그 후 반응이 종결되는 즉시 RPA 내로 직접 상기 스트립을 떨어뜨렸다. 모든 경우에, 유동 대조 라인에서 강한 신호에 의하여 증명되는 것처럼, 효과적인 유동이 관찰되었다. 앞서 관찰된 것과 유사하게, 약간의 약한 비특이적 신호가 음성(negative) 증폭 중의 항-DNP 시험 라인에서 관찰되었다; 하지만, 양성(positive) 증폭에서는 주형이 없는 것에 대비하여 시험 라인 신호에서는 유의적인 자극이 관찰되었다(도 2 iii)).

[0123] 종합해보면, 상기 데이터들은 신규 이중-합텐 Fpg 프로브가 측면 유동 스트립 상에서 RPA 생성물의 직접적인 비희석 검출에 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0124] 실시예 13: 음성 RPA 반응 중의 거짓 양성 신호에 미치는 프로브 설계의 효과

[0125] 몇몇 음성 반응들에서는 비특이적 신호들이 육안으로 관찰될 수 있다; 하지만, 디지털 판독기(이 디바이스는 시판 측면 유동 검정에 통용된다)를 이용한다면, 영상 분석 알고리즘을 통해 배경 신호를 제거하도록 기기장치가 구성될 수 있다. 검정 시험 스트립들이 자원-제한적 환경에서 사용되어야 하는 경우에는 육안에 의해 상기 검정 스트립이 가시화될 수 있어야 할 필요가 있고, 이 경우, 시험 라인에서 비특이적 신호를 최소화하는 능력은 사용자가 결과를 오역할 가능성을 줄이는데 바람직하다.

[0126] 비특이적 신호가 음성 반응에서 관찰된다는 사실은 상기 측면 유동 스트립이 스트립 판독기를 사용하여 분석되는 경우에는 모든 분석에서 배경 신호를 제거할 수 있으므로 반드시 문제가 되는 것은 아니다. 하지만, 스트립

들이 자원-부족 환경에서 사용되어야 하는 경우에는, 상기 스트립들이 육안에 의해 가시화될 수 있는 것이 바람직하며, 이러한 경우에 상기 시험 라인에서의 비특이적 신호는 바람직하지 못하다. 따라서, Fpg의 존재 또는 부재 하에 rs1207445에 대한 낮은 MW PEG Fpg RPA 반응들을 수행하여 거짓 양성 신호의 원인을 결정함으로써, 상기 노이즈가 상기 시험 라인에 직접 결합한 올리고뉴클레오타이드 프로브 때문인지, 또는 Fpg 효소에 의한 비정상적인 프로브 가공의 결과 때문인지를 결정하였다. Fpg의 존재 하에, rs1207445 RPA는 NTC 반응에서 거짓 양성 신호를 입증해 보였고, 1000 카피의 인간 게놈 DNA 주형을 함유하는 반응들에서는 시험 라인 신호의 자극이 나타났다. Fpg의 부재 하에 수행된 반응들은 NTC 반응(및 1,000 카피의 주형 DNA를 함유하는 무 증폭 반응)에서 현저하게 감소된 비특이적 신호를 나타내 보였으며, 이는 상기 rs1207445 이중-합텐 프로브가 비정상적으로 가공되어 거짓 양성 신호를 산출하였음을 암시한다(도 3i). 몇몇 경우에, 일부 비특이적 신호는 Fpg의 부재 하에 남아 있으며, 이 신호는 상기 막을 차단함에 의해 효과적으로 제거될 수 있다.

[0127] Fpg-의존적인 비특이적 신호의 원인을 결정하기 위하여, 상기 rs1207445 이중-합텐 Fpg 프로브 서열을 NetPrimer(http://www.premierbiosoft.com/netprimer/에서 입수가능) 또는 OligoAnalyser 3.1 프로그램(IDT; https://eu.idtdna.com/calc/analyzer에서 입수가능)을 사용하여 헤어핀, 프라이머/프로브 이량체 및 프로브/프로브 이량체에 대해 분석하였다. 이 분석은 상기 프로브가 약한 헤어핀 구조(△G = -7.9 kcal/mol) 및 강한 자기-이량체(△G = -14.19 kcal/mol)를 형성할 수 있음을 밝혀내었다. 두 경우 모두, dR 기(도 3ii에서 적색으로 강조됨)는 이중 가닥 정황에 놓여 있고, 이에 따라 Fpg 효소의 기질로서 작용할 수 있어, NTC RPA 반응에서 Fpg-의존적 노이즈가 존재하는 이유에 대하여 잠재적인 설명을 제공한다.

[0128] 2가지 신규 rs1207445 프로브는 다음과 같이 설계하였다: 1) 프로브 1 mod - 이 프로브는 프로브 1과 동일한 서열을 갖고 동일한 구조를 형성한다. 하지만, 무염기성 부위가 지금은 추정상의 이중가닥 영역의 외측에 위치하여, Fpg에 의해 가공되지 않아야 한다; 2) 프로브 2 - 이 이중-합텐 프로브는 상기 rs1207445 앰플리콘 내의 다른 영역에 하이브리드화하도록 설계된다. 이 프로브는 프로브 1 및 프로브 1 mod에 대비하여 감소된 헤어핀(△G = -2.07kcal/mol) 및 자기-이량체 형성(△G = -8.05kcal/mol)을 나타내 보였다. 또한, 상기 dR 기는 임의의 이중가닥 정황의 외측에 위치하여 Fpg의 기질로서 작용하지 않아야 한다(도 3 ii 및 iii).

[0129] 개량된 프로브 설계가 양성 증폭에서 RPA를 검출하는 능력을 유지하면서 음성 증폭에서 비특이적 신호를 감소시킬 수 있는지를 결정하기 위하여, NTC 및 3개의 프로브의 존재 하의 양성(1000 카피의 인간 gDNA를 함유함) RPA 반응은 측면 유동 스트립 상에서 희석 없이 검출되었다. 모든 양성 반응은 음성 증폭에 비해 시험 라인 신호의 유의적인 자극을 입증하였고, 이는 RPA가 예측한 바와 같이 수행되었음을 암시한다(도 3iii). rs1207445 프로브 1은 음성 증폭에서 가장 높은 배경 신호를 입증하였다. 상기 비특이적 신호는 프로브 1 mod를 함유하는 음성 증폭에서는 거의 검출할 수 없었고, 프로브 2를 함유하는 반응에서는 전혀 볼 수 없었다(도 3iii). 따라서, 음성 증폭에서 비특이적 신호는 2차 구조, 자기 이량체 또는 교차 이량체를 형성하지 않거나, 형성할 가능성이 감소된 프로브를 설계함으로써 효과적으로 감소되거나 제거될 수 있다. 몇몇 경우에는 이러한 구조들을 피할 수 없고, 무염기성 부위는 임의의 이중가닥 정황의 외측에 위치해야 한다.

[0130] 실시예 14: 측면 유동 상에서의 RPA의 직접 검출 - 분석 민감도 및 다른 표적들에 적용가능성

[0131] RPA의 직접 검출을 위한 상기 Fpg 이중-합텐 프로브의 추가 예가 예시되었다. 캠필로박터 제주니에 대한 상기 rs1207445 검정 및 다른 기존의 사내 검정법을 먼저 비교하였다. 씨. 제주니(*C. jejuni*) 검정법에는 기존 Fpg 프로브 서열이 직접 측면 유동 검출을 위해 설계된 신규 이중-합텐 표지화된 프로브로 대체된 변형만을 제외하고는 앞서 설계된 상기 16S rRNA에 대해 표적화된 프라이머를 활용하였다.

[0132] 두 예에서, 낮은 MW PEG RPA는 10, 100 또는 1,000 카피의 적당한 주형 DNA(rs1207445 검정 및 캠필로박터 검정 각각에 대해 인간 gDNA 및 합성 16S 씨. 제주니 rDNA 주형)를 함유하는 반응물을 가지고 4반복으로 수행하였다. 그 다음, RPA 생성물은 항-DNP 측면 유동 스트립 상에서 희석없이 분석하였다. 상기 개량된 rs1207445 검정(re1207445 프로브 2를 활용함)에서는 NTC 반응의 시험 라인에서 신호가 전혀 관찰되지 않았다. 시험 라인은 10 카피의 주형 DNA(도 4 i)에서 녹색 윤곽; 스트립 에지에서 더욱 가시화됨)를 함유하는 모든 RPA에서 약하지만 존재하였고, 100 카피 이상의 인간 gDNA를 함유하는 모든 RPA 반응들의 시험 스트립에서는 양호한 신호들이 관찰되었다(도 4 i).

[0133] 씨. 제주니 검정에서는 모든 NTC에서 약한 거짓 양성 신호가 존재하였다(이 프로브는 측면 유동용으로 재설계되지 않았으며, 이것은 약간의 부반응인 2차 구조 및 자기-이량체화를 나타낸다는 것을 유의한다). 하지만, 10 카피 이상의 주형 DNA를 함유하는 모든 증폭에서는 매우 강한 시험 라인 신호들이 관찰되었다(도 4 ii).

[0134] 종합하면, 상기 데이터는 측면 유동 스트립 검출이 상기 증폭 반응의 성공에 의해서만 제한적임을 암시한다; 직접 검출 측면 유동 검정과 함께 사용하기 위한 동일한 개량된 RPA 화학은 두 사례에 모두 사용되었다. 또한, 상기 데이터는 개량된 Fpg 프로브 화학이 표적 핵산을 검출하기 위한 광범위한 RPA 공정에 적용될 수 있음을 입증한다. 이와 같이 개량된 기술은 많은 잠재적 표적들에 쉽게 적용될 수 있으며, 분석적 민감도는 다른 시판 NAAT 검정 포맷들과 동등할 것으로 예측된다. 씨. 제주니 검정에서는 몇몇 거짓 양성 신호들이 관찰되었지만, 이러한 관찰들은, rs1207445에 대한 검정에 사용된 개조된 프로브에 의해 관찰된 것과 같이, 자기-이량체/2차 구조가 형성될 가능성을 최소화하는 프로브 뉴클레오타이드 서열의 신중한 선택 과정을 통해 경감될 수 있을 것으로 예측된다.

[0135] 개량된 직접 검출 측면 유동 기술의 추가 예시가 수행되었다. 이.콜라이 O157:H7의 검출을 위한 신규 RPA 프라이머 및 프로브가 제조되었다. 이러한 검정은 식품 검사에 사용될 수 있으며, 대변 샘플을 이용해 신속한 질병의 진단에 사용할 수 있는 잠재성이 있다. RPA 측면 유동 검정은 이.콜라이 O157:H7의 모든 균주들 내에 있는 고도로 보존적인 영역들을 나타내는 혈청형 마커 유전자(rfb_{O157}) 및 ($fliC_{H7}$)을 식별하는데 사용될 수 있는 것으로 개발되었다. 신규 개발된 RPA 검정은 처음 싱글플렉스 시험으로서 설계되었으며, 향후 이 시험은 생화학적 멀티플렉스화할 여지를 갖고 있다(Bio-DNP 및 Bio-FAM 이중-합텐 표지로 각각 표지화된 Fpg 프로브를 사용함, 이 프로브들은 측면 유동 시험 스트립에서 상이한 포획 라인에서 독립적으로 검출될 수 있기 때문임).

[0136] 이.콜라이 혈청형에 대한 모든 프라이머/프로브 조합의 예비 선별은, 신속한 증폭 동역학(높은 최대 형광에 의해 10 카피에서 6분 미만의 개시 시간)에 의해 반응당 약 10 카피의 분석 민감도를 나타내는 프라이머/프로브 조합을 발굴하기 위한 의도로서, 등온의 T8 기구를 사용하여 TwistAmp Fpg 형광 프로브 검정(5.5% 35kDa PEG 함유)을 통해 수행하였다. 그 다음, 형광 검정에서 최상의 수행성인 프로브를, 직접 검정 측면 유동에 사용되는 낮은 MW PEG RPA 중의 이중-합텐 Fpg 프로브로서 사용하기 위해 변형시켰다(상기 프라이머들은 형광 검정 및 측면 유동 검정 간에 동일함).

[0137] 도 5 i)은 측면 유동 스트립 상에서 낮은 MW PEG RPA 반응의 직접 비희석 검출 검정에 대한 신규 rfb_{O157} 형광 Fpg 검정(35kDa PEG)을 비교한 것이다. 형광 프로브 검정(35kDa PEG 사용)은 10 카피의 주형 DNA(정량화된 합성 DNA)의 모든 복제물에서 NTC 기준선(적색)을 초과하는 신호를 나타낸다. 예측된 바와 같이, 100 카피(녹색) 및 1,000 카피(청색)를 함유하는 모든 반응들은 양성이었고, 개시 시간 및 최대 형광도는 반응당 주형 DNA의 양과 상당한 상관성이 있었다. 직접 측면 유동 검정에서, 양성 시험 라인 신호들은 10 카피의 주형 DNA에서 4개의 복제물 중 3개에서 관찰되었다(100 카피 이상의 주형을 함유하는 모든 복제물은 강한 양성이었다). NTC에서는 가시성인 거짓 양성 신호가 전혀 관찰되지 않았으며, 이것은 또한 양호한 프로브 설계가 그러한 가공물을 제거할 수 있음을 입증하는 것이다(rs1207445 검정에 사용된 것과 동일한 스트립 화학을 이. 콜라이의 검출에도 활용하였기 때문임).

[0138] 도 5 ii)는 직접 측면 유동 방법과 비교한, $fliC_{H7}$ 형광 프로브 싱글플렉스의 성능을 나타낸 것이다. 역시, 형광 프로브 검정은 시험된 모든 복제물에서 10 카피(황색)에 대해 강한 증폭을 나타내었고, 최대 형광도 및 개시 시간은 반응에 존재하는 정량화된 합성 DNA 주형의 카피 양과 상당한 상관성이 있었다. Fpg 이중-합텐 측면 유동 검정에서, 4개의 복제물 중 3개의 복제물의 10 카피에서 약한 신호가 관찰되었고, 하나의 복제물에서는 신호가 더 강했다. $fliC_{H7}$ 검정에 대한 모든 NTC에서는 매우 약한 거짓 양성 신호가 관찰되었다; 이러한 비특이적 신호는 앞서 입증된 바와 같이 차단 시약의 사용 및 추가 반복적인 프로브 설계를 통해 제거될 수 있을 것이다.

[0139] 이 데이터들은 신규 이중-합텐 Fpg 프로브 화학의 유연성을 입증하며, 중대한 병원균들에 대하여 민감한 검정법이 비교적 용이하게 설계될 수 있으며, 기존의 시판 형광 Fpg 검정법들과 비교했을 때, 비슷한 검정 민감도를 달성할 수 있음을 입증한다.

[0140] 실시예 15: Fpg 이중-합텐 측면 유동 검정의 개량된 사용 용이성 - '연속 유동'

[0141] RPA 생성물의 직접 비희석 검출은 검정 소비재의 복잡성을 감소시킬 수 있어, 최종 사용자에게 더 간단한 시험 절차를 제공하면서 제조 비용을 감소시킬 수 있다. 본 개시내용은 Fpg 이중-합텐 측면 유동 RPA 검정에 의하여 약 40분으로부터 필요한 검정 민감도에 따라 30분 이하로 시험 시간을 감소시킬 수 있다.

[0142] 실행가능성 연구는 증폭 사이클 동안 RPA 반응에 존재하는 측면 유동 검정 스트립이 존재함으로써의 이점을 입증하기 위해 수행하였다. 유의적인 증폭이 일어나기 전에 혼합물이 스트립을 따라 이동하기 시작한다는 사실에 맞추기 위하여 반응 부피를 100㎕에서 200㎕로 증가시켰다. 먼저, 앰플리콘이 축적되기 전에 패드로부터 접합체

의 방출을 방지하기 위하여, 증폭 전에 RPA 반응 혼합물 내에 항-바이오틴 금 콜로이드 표지를 직접 배치하였다. 스트립 상에서 가공될 수 있는 반응의 부피를 증가시키기 위하여, 상이한 무거운 중량의 흡인성 패드 재료(대조군 재료: CF5, 중간 중량의 셀룰로스 섬유; 실험 재료: CF6 및 등급 320, 무거운 중량의 셀룰로스)를 평가하였다. 검정 스트립들에는 접착제 커버 테이프를 적층시켜, RPA 검정이 진행될 때 흡인성 패드가 디바이스로부터 박리되지 않도록 보조하였다.

[0143] 개념 증명은 측면 유동 검정(3kDa PEG)에 사용하기 위한 200㎕ 동결건조된 RPA 펠릿을 사용하는 rs1207445 Fpg 이중-합텐(Bio-DNP) 검정에 의해 확립되었다. 펠릿은 0 또는 5000 카피의 주형 DNA 및 1.5㎕의 항-바이오틴 금 콜로이드 및 CF5(대조군), CF6 또는 등급 320 무거운 중량의 패드로 제조된 심지를 갖는 항-DNP 스트립이 담긴 완충액 용기에서 수화시켰다; 모든 반응 혼합물은 각각의 측면 유동 스트립에 즉시 첨가하였고, 40℃에서 30 분 동안 항온처리하였다.

[0144] 도 6에서, 표시된 흡수 패드 재료로 제조된 스트립은 RPA 반응에서 증폭 동안 항온처리되었다. 제시된 데이터는 rs1207445 이중-합텐 Fpg 검정에 대한 것이고, NTC 반응은 5000 카피의 주형 DNA를 함유하는 것과 비교하였다.

[0145] 대조군(CF5) 스트립에서는 모든 NTC 반응에서 매우 강한 거짓 양성 신호가 관찰되었으며, 5000 카피의 유입 주형 DNA에서만 미약한 시험 라인 신호의 자극이 관찰되었다(도 6 i), 상부 패널). 하지만, CF6 스트립은 약간의 거짓 양성 신호(대조군 스트립에서보다 더 약한)를 제공하는 한편, 등급 320 스트립을 사용한 경우에는 거짓 양성 반응이 효과적으로 제거되었다. 이 효과는 CF5 또는 CF6 재료에 비해 개량된 모세관 작용을 가질 수 있는 등급 320 스트립 재료의 큰 베드 부피에서 초래되는 것으로 예측된다. 피분석물은 CF5 스트립에 비해 등급 320 재료를 기반으로 하는 스트립을 통해 더욱 쉽게 유동할 수 있어, 비특이적 상호작용이 일어날 수 있게 하는 시간의 양을 감소시킨다. 또한, 주형 DNA를 함유하는 증폭에서는 현저한 시험 라인 신호의 자극이 존재하였다(도 6, 하부 패널).

[0146] 실시예 16: 엑소 프로브 설계

[0147] 본 실시예는 엑소뉴클레아제 III(엑소) 절단성 프로브에 대한 예시적인 프로브 설계를 설명한다. 예시적인 프로브 구조는 하기에 제시된다. 하기의 서열은 프로브의 일례이며; 이 서열은 증폭된 표적 DNA에 상보적이도록 설계된다.

[0148] 5'-**X**AAATTTCTACTTTTGGCCAGTTCTACAATTTGTT**LH**ATATCACATGGATGT**B**-3' (서열번호 1)

[0149] 여기서,

[0150] X = 5' 헥실

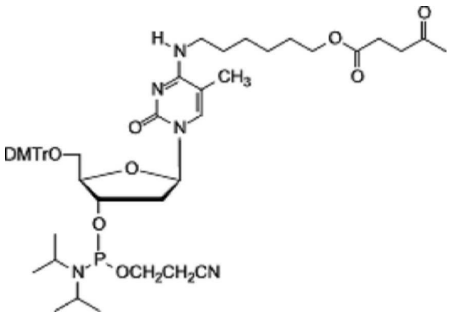
[0151] H = THF 잔기

[0152] B = C3 스페이서(3'-5' 뉴클레아제 분해에 대한 블록)

[0153] L = DNP TEG 및 바이오틴 헥실을 함유하는 분지화된 변형체; DNP TEG와 바이오틴 헥실 모이어티 사이에는 포스포로티오에이트(PS) 연결이 사용되어 합텐간 연결의 안정성을 도모할 수 있다.

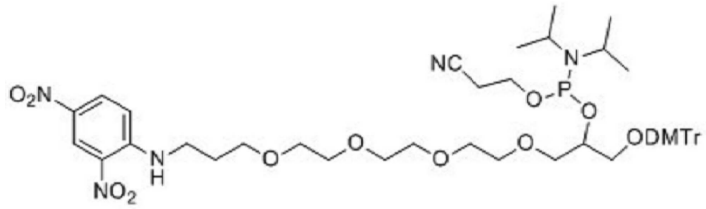
[0154] 프로브는 3' 블록 B(예를 들어, C3 스페이서, 예를 들어, 프로판올)가 상기 프로브의 원치 않는 뉴클레아제 분해를 방지하도록 설계된다. 분지화된 변형체, L은 무염기성 THF 잔기 H의 5' 측에 혼입된다. 상기 실시예에서, L은 H의 5' 옆이지만, 가능하게는 L은 H로부터 5' 방향으로 추가 연장될 수 있다. THF 잔기는 약 30nt의 상보성 서열 상류 및 약 15 nt의 상보성 서열 하류에 위치한다.

[0155] L은 변형된 사이토신(C) 뉴클레오염기를 나타내고, 이 자체가 프로브 서열 내의 C 잔기를 대체해야 한다. L은 하기 구조를 갖는 시판 포스포아미다이트(LGC LINK (영국 테딩턴 소재) 물품 번호 2150)를 이용한 고상 올리고 합성 동안 혼입된다:

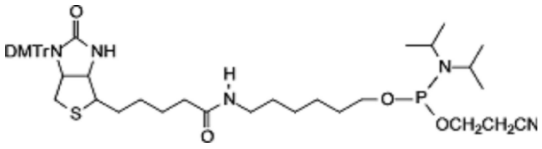


[0156]

[0157] 이 포스포아미다이트는 정상의 고상 DNA 올리고 합성 과정 동안 혼입되며; 상기 올리고의 5'-OH는 탈보호되고(DMTr 보호기가 제거됨), 그 다음 5' 블록 X(예를 들어, C6, 예를 들어, 헥실)이 캡핑(capping)된 후, 상기에 나타낸 변형된 사이토신의 고리외(exocyclic)의 아민에 부속된 레불리닐 보호기가 제거된다 - 이것은 다른 포스포아미다이트에 의해, 추가로 상기 사이토신 뉴클레오염기로부터 멀리 연장되어 분지화하도록 하는 하이드록시기를 유리시킨다. 합텐-혼입 아미다이트, 예를 들어, DNP TEG(상부 아래, LGC LINK 물품 번호 2549), 그 다음 바이오틴('Bio') 헥실(하부 아래, LGC LINK 물품 번호 2109)은 분지화된 변형체 L에서 합텐들에 의해 이중-표지화된 프로브를 생성한다.



[0158]



[0159]

[0160] 표적 앰플리콘을 함유하는 RPA 반응에서, Exo III은 프로브의 무염기성 잔기 H를 절단하고, Exo III에 의한 후속적인 3'-5' 분해는 2개의 상이한 합텐에 의해 표지화된 모노뉴클레오타이드 L(5'-포스페이트 및 3'-OH를 가짐)을 유리시킨다. 이러한 이중-합텐-표지화된 모노뉴클레오타이드는 RPA 코아세르베이트에서 탈출하기에 자유롭고, 입자 및 LF 스트립의 시험 라인을 가시화하는데 있어서 항체와 상호작용한다.

[0161] 상기 기재된 엑소 프로브 설계는 시중에서 입수용이한 포스포아미다이트를 사용하여 분지 부위 L에서 상이한 합텐의 모듈식 혼입(modular incorporation)을 가능하게 한다. L에서 Bio/DNP, Bio/FAM 및 FAM/DNP 표지화가 모두 가능하며; L의 사이토신 뉴클레오염기에 상기 합텐들의 부착 순서도 역시 자유롭게 전환될 수 있다. 마지막으로, 합텐(예컨대, DNP/FAM/BIO)은 제3의 상이한 합텐이 미가공된 프로브의 결합 및 여과에 바람직한 경우에, 예컨대, 헥실 대신에 상기 프로브의 5'-캡 X로서 이용될 수 있다. 상기 기술된 DNP-TEG 포스포아미다이트는 5'-캡으로서 이용된다면, DMTr 기를 제거하고 최종 5'-OH를 예컨대, 헥실로 차단하기 위하여 추가적인 탈보호 및 캡핑 단계가 사용된다.

[0162] 도 9는 엑소(Exo) 프로브의 예시적인 구조 및 이의 사용을 나타낸다. 왼쪽 패널은 Fpg 프로브 피분석물과 엑소 프로브 피분석물을 비교한 것이며, 상기 엑소 프로브는 테트라하이드로퓨란 잔기의 상류에 있는 하나의 뉴클레오타이드에 위치한 바이오틴 헥실 및 DNP TEG에 의해 표지화된 레불닐 dC 분지화된 변형체를 갖는다. 오른쪽 패널은 피분석물이 RPA에서 생성되는 방식에 대하여 고찰된 기전을 나타낸다. 상기 프로브가 상기 앰플리콘의 상보성 가닥에 결합하면, THF에서 Exo가 절단하고, 그 다음 3' 엑소뉴클레아제 활성을 이용하여 역으로 반응하여 바이오틴/DNP 표지화된 사이토신을 방출시키고, 이것은 그 다음 스트립 상에서 검출된다(항-DNP 시험 라인 및 항-바이오틴 금 콜로이드 또는 다른 나노입자를 사용함).

[0163] ***반응 제제***

[0164] 간략히 설명하면, Exo LF RPA 반응은 40℃에서 20분 동안 항온처리된다. 측면 유동(Exo)을 위한 RPA 제제는 각각 420nM의 적당한 정방향 및 역방향 프라이머, 120nM의 이중-합텐 엑소 프로브, 50mM 트리스 아세테이트 pH 8.3, 100mM KOAc, 5mM DTT, 1x 크레아틴 키나제, 30㎍ Gp32, 30㎍ UvsX, 7㎍ UvsY, 6.5% 3kDa PEG, 5.7% 트레

할로스, 8.6㎍ DNA 폴리머라제 I(S.aureus), 10㎍ 엑소뉴클레아제 III, 50mM 포스포크레아틴, 2.5mM ATP, 1.8mM dNTP 및 0.5% Brij-35를 함유한다. 반응은 적당한 주형 및 $Mg(OAc)_2$(22.5mM 최종 농도)를 함유하는 혼합물을 100㎕의 최종 부피로 첨가하여 개시시킨다.

[0165] ***연속 유동 - 원스텝 RPA 측면 유동***

[0166] Exo LF 프로브 화학의 높은 민감도는 RPA 핵산 증폭 및 스트립 검출이 동시에 수행되어 결과까지의 시간을 주형 첨가로부터 약 5분으로 감소시킬 수 있는 '연속 유동' 시스템에 사용할 수 있게 하였다(낮은 유입 DNA 카피 수에 대해서는 최적의 민감도를 위해 20 내지 30분). 이것을 실현가능하게 하기 위하여, 측면 유동 스트립은 비희석 RPA LF 시스템만에서보다 더 많은 피분석물을 가공할 수 있어야 하며, 이것은 종점 검출 스트립에 사용된 CF5 재질에 대비하여 무거운 중량의 흡수 패드 재질(예, 등급 320 코튼 린터(Ahlstrom))을 사용함으로써 달성될 수 있다. 이 재질은 스트립 상에서 더 많은 피분석물이 유동할 수 있게 할 뿐만 아니라, 유속도 증가시키는 것으로 나타나며, 이것은 다른 패드 종류에 대비하여 비특이적 신호를 감소시킨다. 또한, 상기 스트립은 박리 감소에 도움을 주는 커버 테이프를 포함하며; 이것은 무거운 중량의 흡수 패드를 사용할 때 일반적인 것이다.

[0167] 결과가 나오는 시간의 감소 외에도, 연속 유동 시스템의 이점은 대체로 다음과 같다: 1) 증폭 반응을 가공/희석할 필요성이 없음(오염 위험을 저하시키고, 잠재적인 소비재 유동성을 단순화함); 2) 소비재 유동성의 감소(본질적으로 상기 소비재는 RPA가 일어나게 하기 위한 가열된 챔버로서, 측면 유동 스트립과 직접 접촉한다).

[0168] 도 10은 상기 실시예들에 기재된 2가지 이.콜라이 검정에서 전술한 비희석 Exo LF 화학을 사용하고 전술한 Fpg 검정과 비교한 데이터를 나타낸다(숫자는 유입 DNA 카피수를 나타내고; NTC는 주형이 없는 대조군이다). 또한, 스트립은 증폭 후에 첨가된다. Exo 검정은 더 높은 민감성 및 강한 시험 라인 신호를 나타내었다. 신호들은 Fpg 화학보다 훨씬 빠르게 발생한다. 또한, 일부 거짓 양성 신호가 남아 있지만, Fpg 세트업보다 훨씬 개선된다.

[0169] 도 11은 엑소 프로브 화학을 사용한 동시 증폭/검출을 나타낸 것이다. 동시 증폭 및 검출은 결과가 나오는 시간이 더 빠르고(20 내지 30분), 또한 소비재 디자인이 더 간단해지게 한다는 이점이 있다. 도 10의 데이터는 연속 유동에 의한 종점 검출을 비교한 것이다. 둘 사이에 유사한 민감도가 관찰된다. 거짓 양성 신호는 연속 유동에서 더 강하며, 이것은 커버 테이프의 존재 때문일 수 있다.

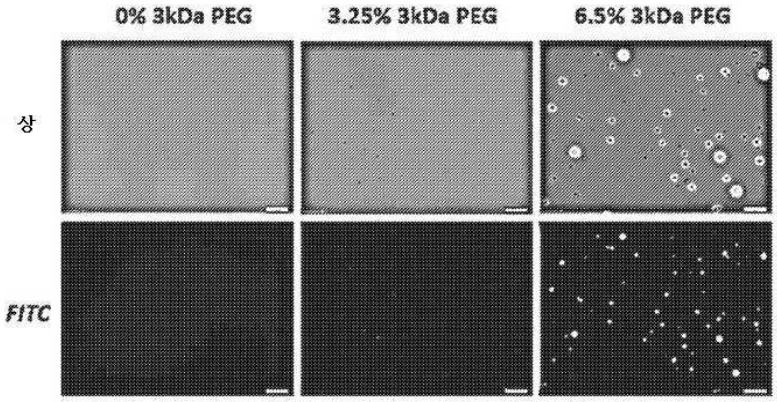
[0170] 도 12는 원스텝 RPA 측면 유동에 사용하기 위한 예시적 디바이스이다. 이 디바이스는 분석 시약을 위한 반응 챔버 및 증폭 동안 검출하기 위한 스트립 챔버를 보유한다. 도 12에 도시된 디바이스에는 두 챔버들 간의 유동을 허용하는, 반응 챔버와 스트립 챔버 사이의 채널이 존재한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 챔버는 RPA 성분을 함유하는 동결건조된 펠릿을 보유한다. 주형 DNA, 완충액의 첨가 및 40℃의 가열 블록 위에 챔버의 배치는 증폭을 개시시킨다. 몇몇 실시형태에서, 상기 챔버는 혼합을 위한 자석교반기를 보유한다. 증폭은 반응이 스트립 상으로 진행할 때 일어나서 시험 라인 신호를 산출한다.

[0171] **다른 실시형태**

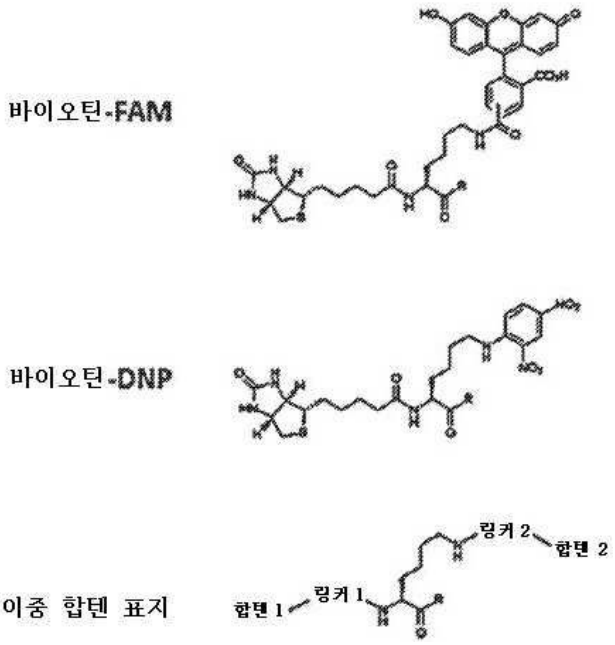
[0172] 본 개시내용은 이의 상세한 설명과 함께 기재되었지만, 상기 상세한 설명은 후속 청구의 범위에 의해 한정되는 본 개시내용의 범위를 예시하는 것이지 제한하는 것이 아님을 이해하여야 한다. 다른 양상, 이점 및 변형은 이하 청구의 범위에 속하는 것이다.

도면

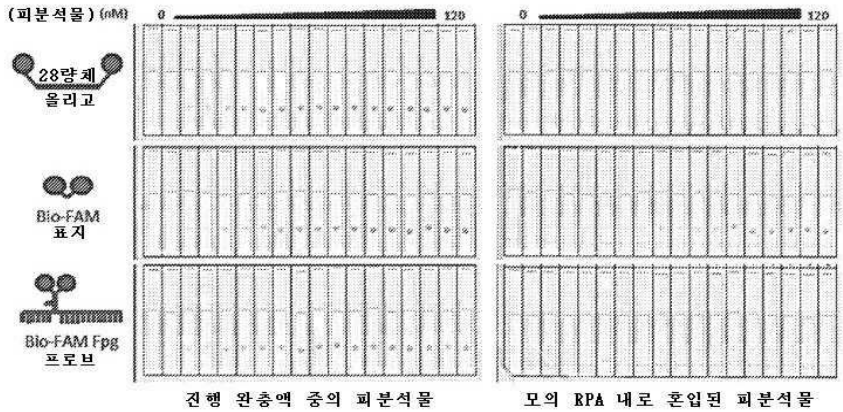
도면1a



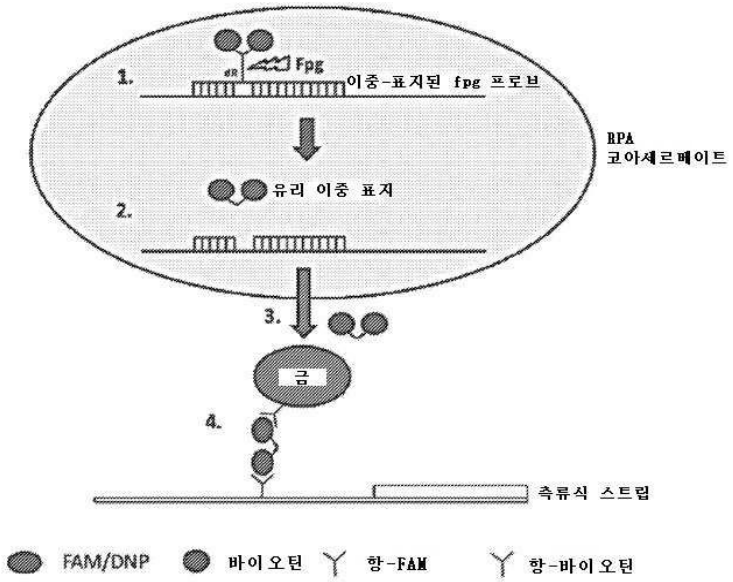
도면1b



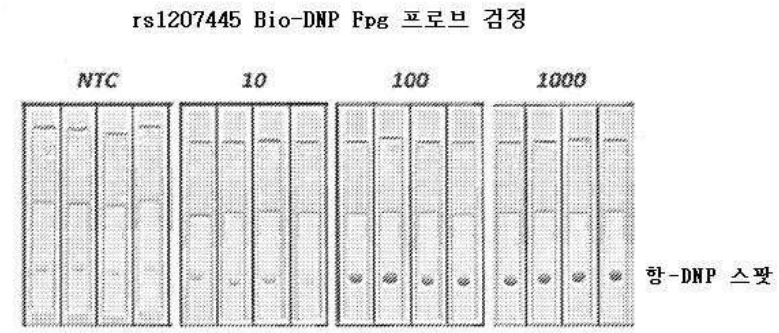
도면1c



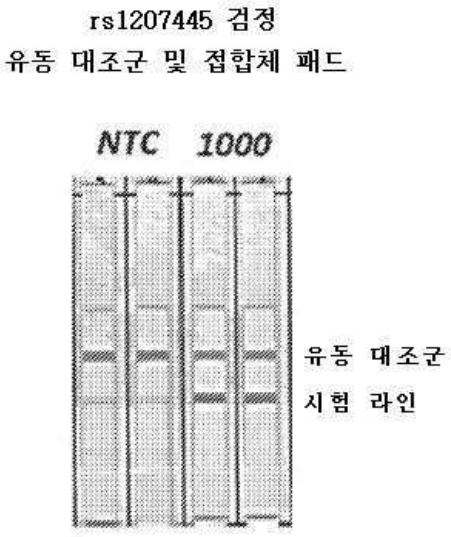
도면2a



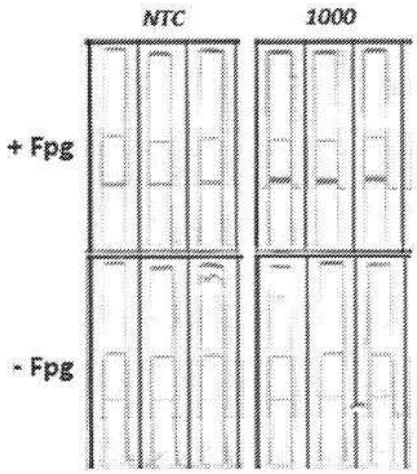
도면2b



도면2c



도면3a



도면3b

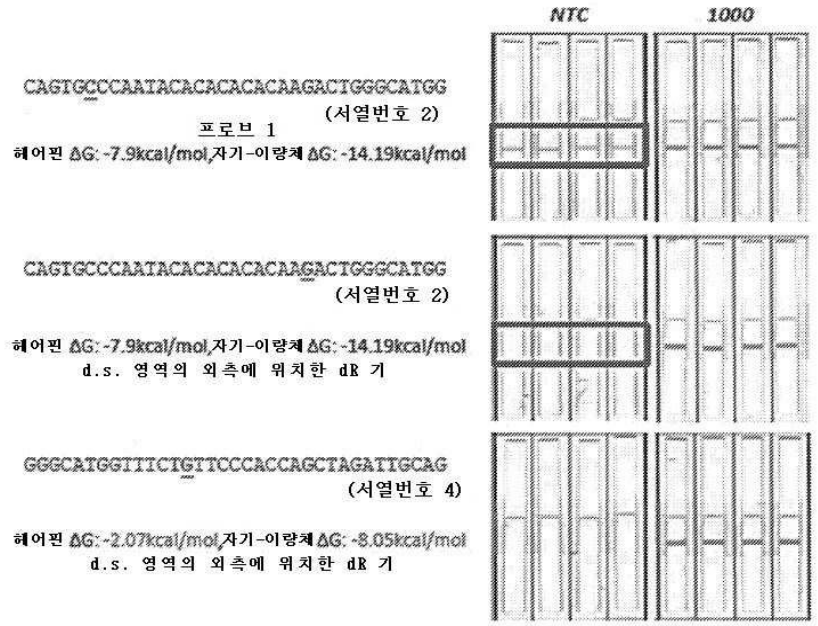


프로브 헤어핀
ΔG = -7.9kcal/mol

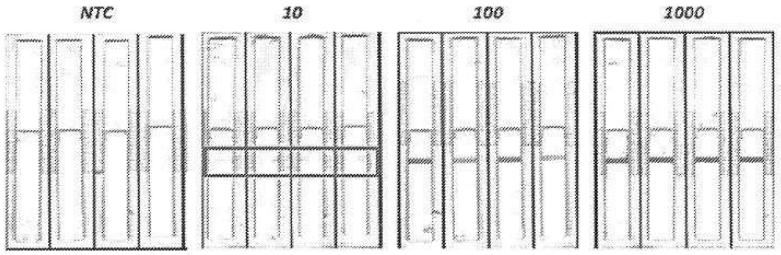
CAGTGCCCAATACACACACACAAGACTGGCATGG (서열번호 2)
GGTACGGGTCAGAACACACACACATAACCCGTGAC (서열번호 3)

프로브 자기-이량체
ΔG = -14.19kcal/mol

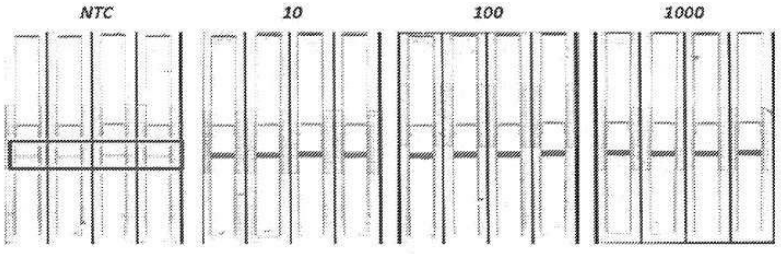
도면3c



도면4

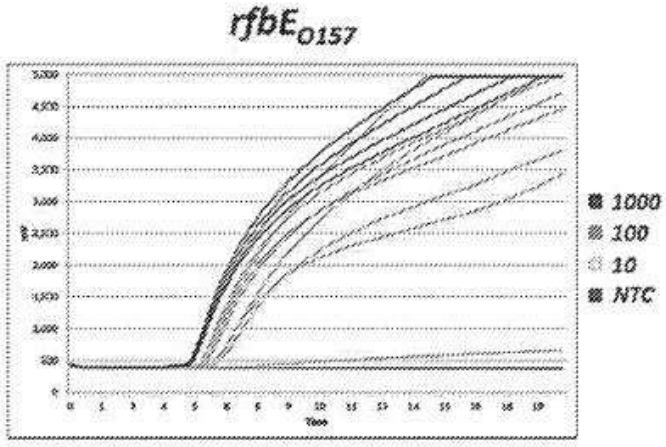


rs1207445 검정
(인간 gDNA)

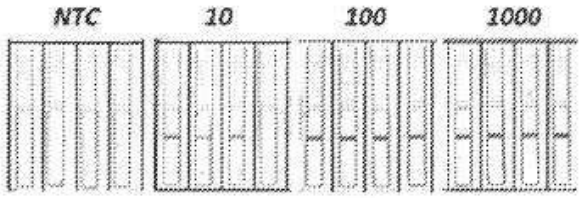


캠필로박터 제주니 검정

도면5a

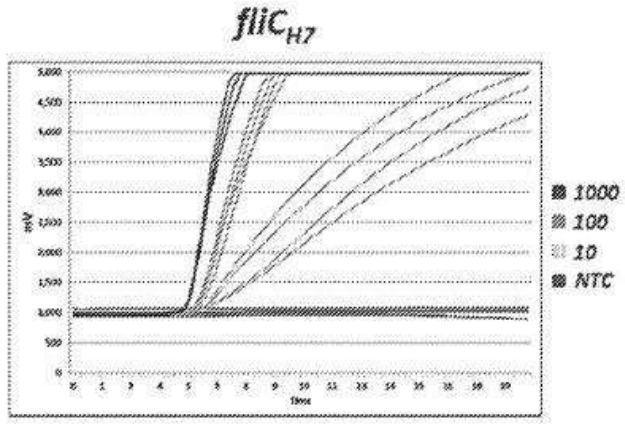


TwistAmp Fpg (35kDa PEG)

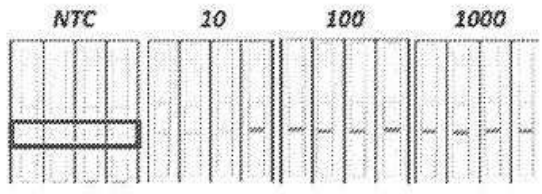


동결 건조된 LF 펠릿 (3kDa PEG)

도면5b

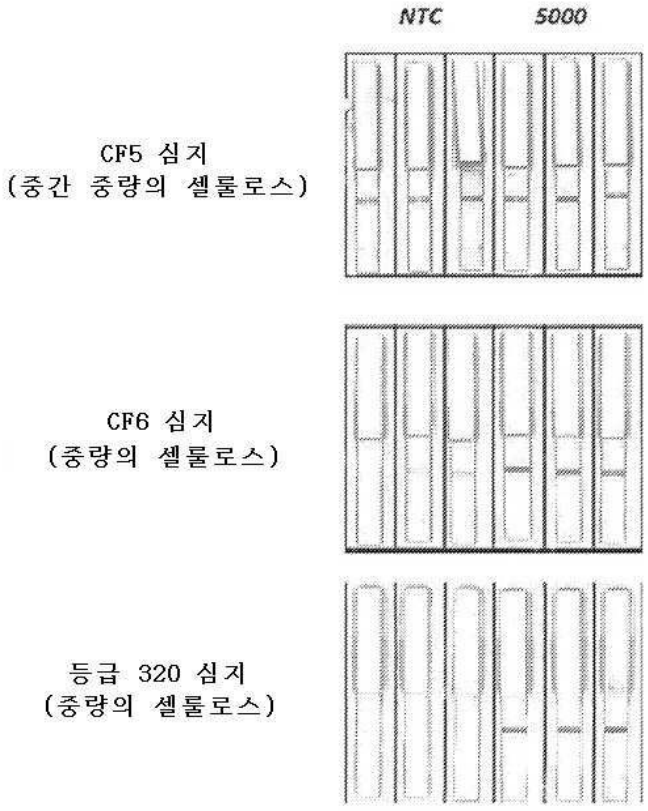


TwistAmp Fpg (35kDa PEG)

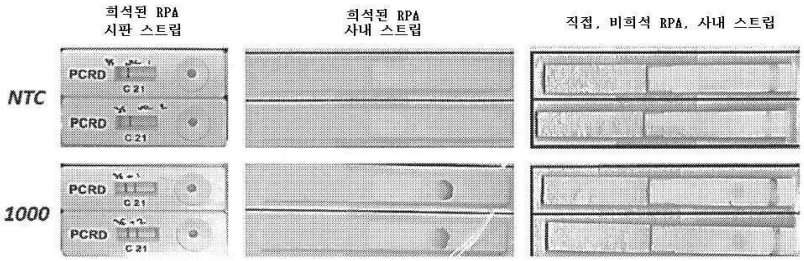


동결 건조된 LF 펠릿

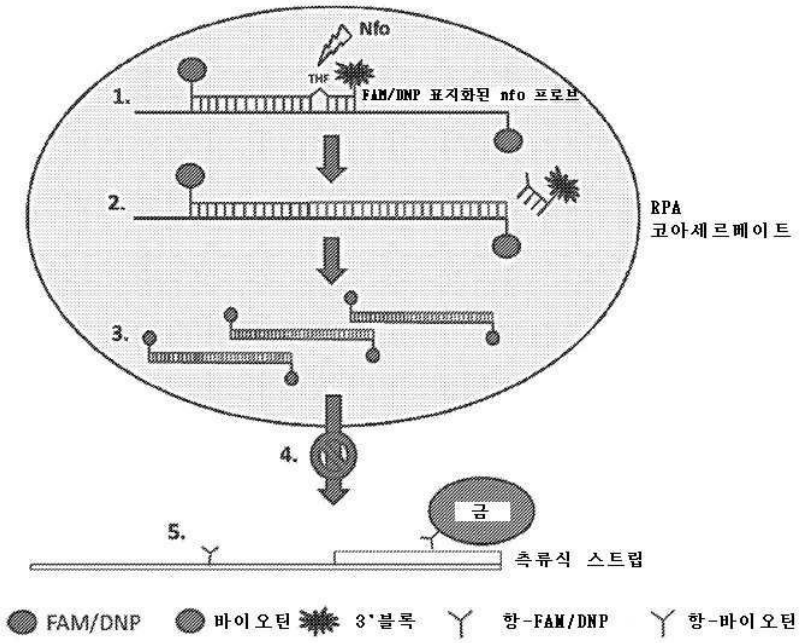
도면6


NTC
5000
CF5 심지
(중간 중량의 셀룰로스)
CF6 심지
(중량의 셀룰로스)
등급 320 심지
(중량의 셀룰로스)

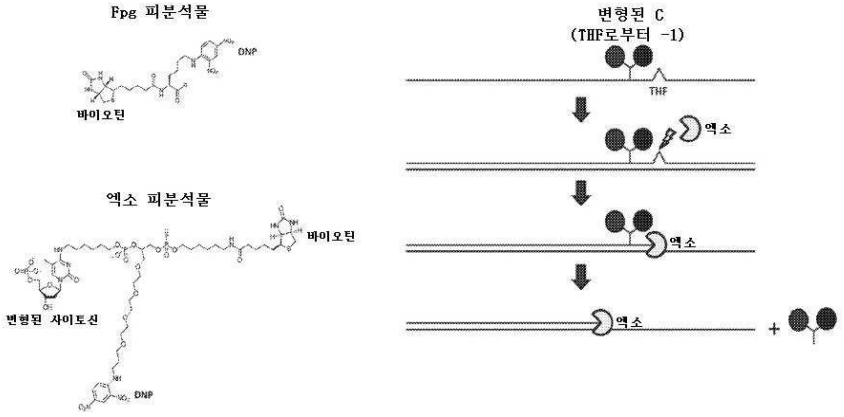
도면7


희석된 RPA
시판 스트립
희석된 RPA
사내 스트립
직접, 비희석 RPA, 사내 스트립
NTC
1000
PCRD
C21

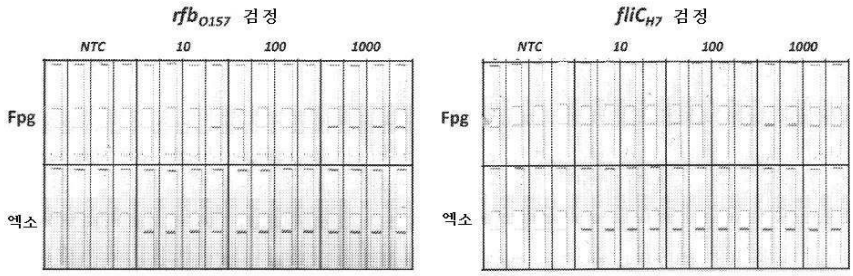
도면8


Nfo
THF
1.
FAM/DNP 표지화된 nfo 프로브
2.
RPA
코아세르베이트
3.
4.
금
5.
측류식 스트립
FAM/DNP
바이오틴
3'블록
항-FAM/DNP
항-바이오틴

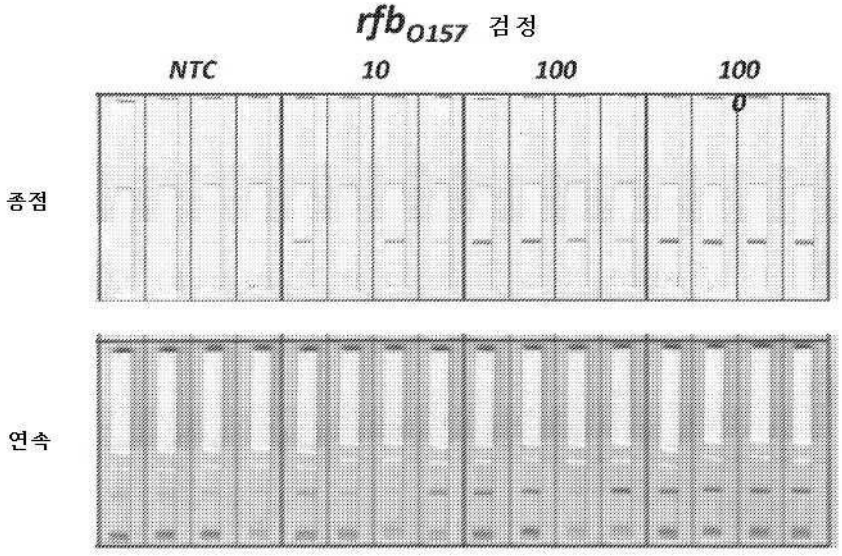
도면9


Fpg 피분석물
DNP
바이오틴
엑소 피분석물
바이오틴
변형된 사이토신
DNP
변형된 C
(THF로부터 -1)
THF
엑소
엑소
엑소
+

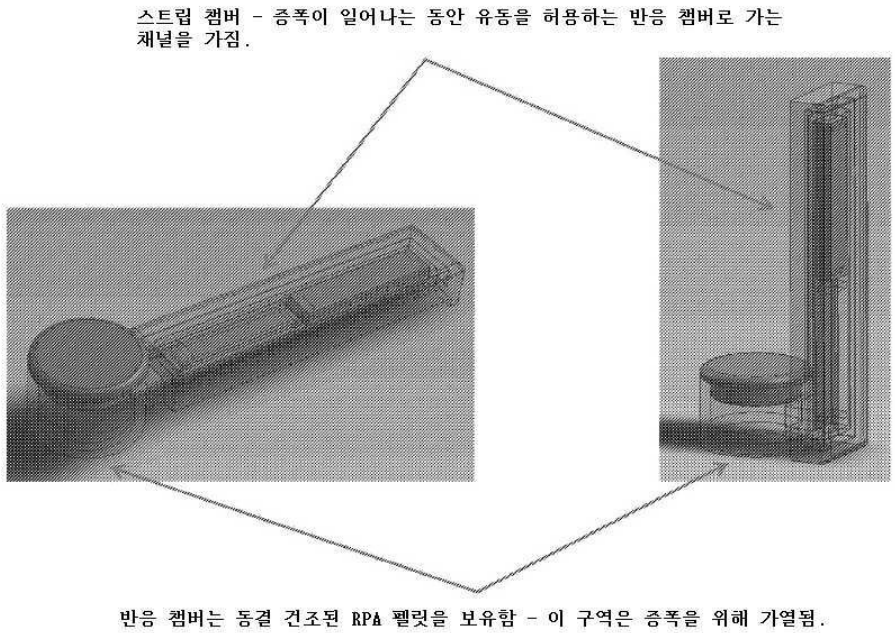
도면10


rfb O157 검정
NTC
10
100
1000
Fpg
엑소
fliC H7 검정
NTC
10
100
1000
Fpg
엑소

도면11



도면12



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ALERE SAN DIEGO INC.

<120> DETECTION OF RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION USING DUAL-HAPTEN PROBE

<130> ALERE-35632/WO-1/ORD

<150> 62/558,705

<151> 2017-09-14

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 53

<212> DNA

<213> Synthliboramphus antiquus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n=5' hexyl

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> n=branched modifier comprising DNP TEG and Biotin Hexyl

<220

><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> n=THF residue

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> n=C3 spacer

<400> 1

naaatttcta cttttggcca gttctacaat ttgttnnata tcacatggat gtn 53

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Synthliboramphus antiquus

<400> 2

cagtgcccaa tacacacaca caagactggg catgg 35

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Synthliboramphus antiquus

<400> 3

ggtacgggtc agaacacaca cacataaccc gtgac 35

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Synthliboramphus antiquus

<400> 4

gggcatggtt tctgttccca ccagctagat tgcag 35