



공개특허 10-2020-0081476



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0081476
(43) 공개일자 2020년07월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01) *C12Q 1/6895* (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 1/6895 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2020-7016585
- (22) 출원일자(국제) 2018년11월13일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년06월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/060840
- (87) 국제공개번호 WO 2019/094973
국제공개일자 2019년05월16일
- (30) 우선권주장
62/585,273 2017년11월13일 미국(US)

- (71) 출원인
라이프 테크놀로지스 코포레이션
미국 캘리포니아 92008 칼스베드 뉴톤 드라이브
5823
- (72) 별명자
리 켈리
미국 캘리포니아주 92008 칼스베드 뉴톤 드라이브
5823 어텐션: 아이피 디파트먼트 라이프 테크놀로지스 코포레이션
파가니 이오안나
미국 캘리포니아주 92008 칼스베드 뉴톤 드라이브
5823 어텐션: 아이피 디파트먼트 라이프 테크놀로지스 코포레이션
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

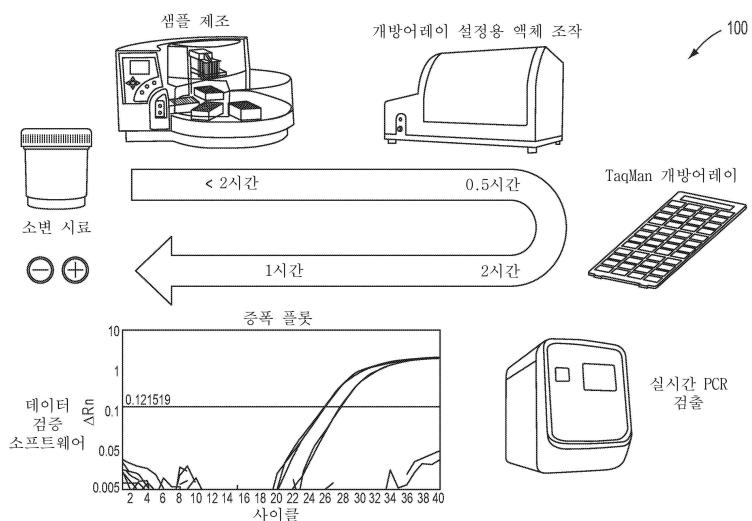
전체 청구항 수 : 총 287 항

(54) 발명의 명칭 요로 미생물 검출을 위한 조성물, 방법 및 키트

(57) 요 약

핵산 샘플에서 핵산 서열을 증폭시키기 위한 다양한 방법이 개시된다. 본 방법은 한 쌍의 증폭 프라이머를 각각 포함하는 적어도 5개의 상이한 어세이를 사용하여, 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 5개의 증폭 반응 혼합물을 형성하는 것을 포함하고, 상기 어세이는 표 1의 어세이 그룹으로부터 선택되고/되거나 표 1에 명시된 서열을 표적화한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/16 (2013.01)

(72) 발명자

리 지성

미국 캘리포니아주 92008 칼스베드 뉴톤 드라이브
5823 어텐션: 아이피 디파트먼트 라이프 테크놀로
지스 코포레이션

파텔 수날리

미국 캘리포니아주 92008 칼스베드 뉴톤 드라이브
5823 어텐션: 아이피 디파트먼트 라이프 테크놀로
지스 코포레이션

바르마 카미니

미국 캘리포니아주 92008 칼스베드 뉴톤 드라이브
5823 어텐션: 아이피 디파트먼트 라이프 테크놀로
지스 코포레이션

폰세카 조르즈

미국 캘리포니아주 92008 칼스베드 뉴톤 드라이브
5823 어텐션: 아이피 디파트먼트 라이프 테크놀로
지스 코포레이션

푸리 니틴

미국 캘리포니아주 92008 칼스베드 뉴톤 드라이브
5823 어텐션: 아이피 디파트먼트 라이프 테크놀로
지스 코포레이션

다이아몬드 에반

미국 캘리포니아주 92008 칼스베드 뉴톤 드라이브
5823 어텐션: 아이피 디파트먼트 라이프 테크놀로
지스 코포레이션

명세서

청구범위

청구항 1

핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법으로서,

한 쌍의 증폭 프라이머를 각각 포함하며 표 1의 어세이 그룹으로부터 선택되는 적어도 5개의 상이한 어세이를 사용하여, 복수의 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 5개의 증폭 반응 혼합물을 형성하고;

각각의 증폭 반응 혼합물을 반응 용기에 적용하고;

반응 용기 상에서 복수의 증폭 반응을 수행하고;

복수의 증폭 반응 동안 반응 용기 상의 하나 이상의 위치 내에서 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 검출하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 반응을 증폭 생성물 검출 시스템에서 이용하는 것; 및

증폭 생성물 검출 시스템을 작동시켜서,

반응 용기 상의 증폭 반응 혼합물의 위치들을 증폭 반응 혼합물에 이용된 어세이 ID들 중 하나 이상과 연관시키는, 선택적으로는 소정의 연관 표를 사용하여 연관시키는, 것을 추가로 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 반응 용기는 복수의 웰을 갖는 플레이트인, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 반응 용기는 어레이인, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 반응 용기는 개방 어레이 플레이트인, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 반응 용기는 칩 마이크로어레이인, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 표 1의 어세이 그룹으로부터 선택된 적어도 10개의 상이한 어세이를 사용하여, 복수의 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 10개의 증폭 반응 혼합물을 형성하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 표 1의 어세이 그룹으로부터 선택된 적어도 15개의 상이한 어세이를 사용하여, 복수의 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 15개의 증폭 반응 혼합물을 형성하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 표 1의 어세이들 중 17개의 어세이를 사용하여, 복수의 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 반응 혼합물을 형성하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 샘플 원천은 소변 시료인, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 증폭 생성물은 56 내지 105 뉴클레오타이드의 앰플리콘 길이를 갖는 핵산 샘플의 표적 앰플리콘을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932084_s1은 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)의 유전자의 명명되지 않은 영역의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932088_s1은 사이트로박터 프룬디(*Citrobacter freundii*)의 큐핀 상과 유전자인, 옥살레이트 탈탄산효소/고세균 포스포글루코스 이소머라제를 나타내는 COG2140의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932080_s1은 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)[aka 클렙시엘라 에어로게네스(*Klebsiella aerogenes*)]의 피리독살 포스페이트-의존적 히스티딘 탈탄산효소(hdc) 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932087_s1은 엔테로박터 클로아케(*Enterobacter cloacae*)의 유전자의 가설 단백질의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04646247_s1은 엔테로코쿠스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*)의 아미노기전달효소 부류 V 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932086_s1은 엔테로코쿠스 패슘(*Enterococcus faecium*)의 PhnB -MerR 계열 전사 조절인자 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04646242_s1은 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)의 COG0789 Dna-결합 전사 조절인자 MerR 계열 (Zntr) 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932079_s1은 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*)의 parC (DNA 토포이소

머라제 IV 서브유닛 A) 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932083_s1은 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)의 act-유사 단백질 유전자핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932078_s1은 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*)의 Fe2+ 운반계 단백질 FeoA 유전자를 나타내는 COG1918의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932076_s1은 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*)의 araC, ureR 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932077_s1은 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*)의 SUMF1 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932082_s1은 프로비덴시아 스튜아르티아(*Providencia stuartii*)의 추정 철-황 개질체 단백질 유전자인, 설파타제 성숙 효소 As1B, 라디칼 SAM 상과를 나타내는 COG0641의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932081_s1은 슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 나선 회전 나선 도메인 단백질 유전자인, N296_1760의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 26

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04932085_s1은 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*)의 cdaR 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 27

제1항에 있어서, 어세이 ID Ba04646276_s1은 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*)의 SIP 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 28

제1항에 있어서, 어세이 ID Fn04646233_s1은 칸디다 알비坎스(*Candida albicans*)의 IPT1 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 29

핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법으로서,

복수의 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천 - 여기서 샘플 원천은 소변 시료임 - 으로부터의 분취액을 각각 포함하는 복수의 증폭 반응 혼합물을 형성하고;

복수의 증폭 반응 혼합물을, 표 1 중의 해당 표적 영역 위치 및 해당 표적 영역 크기를 갖는 상이한 유전자를 각각 표적으로 하며 한 쌍의 증폭 프라이머를 각각 포함하는 적어도 5개의 어세이로 구성된 반응 용기에 적용하고;

반응 용기 상에서 복수의 증폭 반응을 수행하고;

복수의 증폭 반응 동안 반응 용기 상의 위치들 내에서 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 검출하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 반응 용기를 증폭 생성물 검출 시스템에서 이용하는 것; 및

증폭 생성물 검출 시스템을 작동시켜서,

반응 용기에 이용된 어세이 중 하나 이상과 반응 용기 상의 증폭 반응 혼합물의 위치를 연관시키는, 선택적으로는 소정의 연관 표를 사용하여 연관시키는, 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 31

제29항에 있어서, 상기 반응 용기는 복수의 웰을 갖는 플레이트인, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, 상기 반응 용기는 어레이인, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 33

제29항에 있어서, 상기 반응 용기는 개방 어레이 플레이트인, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 34

제29항에 있어서, 상기 반응 용기는 칩 마이크로어레이인, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 35

제29항에 있어서, 상기 반응 용기는 표 1에 열거된 상이한 유전자 각각을 표적으로 하는 적어도 10개의 어세이로 구성된, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 36

제29항에 있어서, 상기 반응 용기는 표 1에 열거된 상이한 유전자 각각을 표적으로 하는 적어도 15개의 어세이로 구성된, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 37

제29항에 있어서, 상기 반응 용기는 표 1에 열거된 유전자 각각을 표적으로 하는 어세이로 구성된, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 38

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이 중 한 어세이는 아시네토박터 바우마니에서의 명명되지 않은 영역에 해당하는 유전자에서 93인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 39

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 사이트로박터 프룬디에서의 큐핀 상과인 옥살레이트 탈탄산효소/고세균 포스포글루코스 이소머라제를 나타내는 COG2140에 해당하는 유전자에서 103 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 40

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 엔테로박터 에어로게네스(aka 클렙시엘라 에어로게네스)에서의 피리독살 포스페이트-의존적 히스티딘 탈탄산효소(hdc)에 해당하는 유전자에서 크기 98의 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 41

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 엔테로박터 클로아케에서의 가설 단백질에 해당하는 유전자에 대한 88 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 42

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 엔테로코쿠스 파에칼리스에서의 아미노기전달효소 부류 V에 해당하는 유전자에서 95 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 43

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 엔테로코쿠스 패슘에서의 PhnB -MerR 계열 전사 조절 인자에 해당하는 유전자에서 98 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 44

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 에스케리치아 콜라이에서의 COG0789 Dna-결합 전사 조절인자 MerR 계열(Zntr)에 해당하는 유전자에서 63 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 45

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 클렙시엘라 옥시토카에서의 parC (DNA 토포이소머라제 IV 서브유닛 A)에 해당하는 유전자에서 93 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 46

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 클렙시엘라 뉴모니에에서의 act-유사 단백질에 해당하는 유전자에서 56 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 47

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 모르가넬라 모르가니에서의 Fe2+ 운반계 단백질 FeoA 를 나타내는 COG1918에 해당하는 유전자에서 91 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 48

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 프로테우스 미라빌리스에서의 araC, ureR에 해당하는 유전자에서 100 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 49

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 프로테우스 불가리스에서의 SUMF1에 해당하는 유전자에서 76 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 50

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 프로비덴시아 스투아르티이에서의 추정 철-황 개질제 단백질인, 설파타제 성숙 효소 As1B, 라디칼 SAM 상과를 나타내는 COG0641에 해당하는 유전자에서 100 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 51

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 슈도모나스 에어루기노사에서의 나선 회전 나선 도메인 단백질인, N296_1760에 해당하는 유전자에서 70 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 52

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스에서의 cdaR에 해당하는 유전자에서 85 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 53

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 스트렙토코쿠스 아갈락티아에에서의 SIP에 해당하는 유전자에서 66 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 54

제29항에 있어서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 칸디다 알비칸스에서의 IPT1에 해당하는 유전자에서 105 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 55

생물학적 샘플에 적어도 하나의 표적 핵산의 존재 또는 부재를 결정하는 조성물로서,

적어도 5개의 상이한 증폭 프라이머 쌍으로서, 상기 증폭 프라이머 쌍의 각각의 프라이머는 표 1의 표적 미생물의 핵산 서열의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적합한 조건 하에서 상기 프라이머 쌍은 앰플리콘을 생성하는, 증폭 프라이머 쌍; 및

상기 프라이머 쌍에 의해 생성된 상기 앰플리콘의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 적어도 5개의 검출 프로브를 포함하는, 조성물.

청구항 56

제55항에 있어서, 복수의 상이한 핵산 표적 서열을 포함하는 대조 핵산 분자를 더 포함하고, 상기 복수의 표적 핵산 서열은 표 1의 적어도 5개의 유전자에 특이적인, 조성물.

청구항 57

제55항에 있어서, 당해 조성물은 어세이들의 패널 또는 컬렉션인, 조성물.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 어세이들의 패널 또는 컬렉션은 TaqMan 어세이들의 패널 또는 컬렉션을 포함하는, 조성물.

청구항 59

제55항에 있어서, 상기 적어도 하나의 표적 핵산은 요로 감염과 연관된 미생물에 대한 바이오마커인, 조성물.

청구항 60

제55항에 있어서, 상기 조성물은 고형 담체를 포함하는, 조성물.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 적어도 5개의 증폭 프라이머 쌍은 고형 담체 상의 위치에 의해 분리되는, 조성물.

청구항 62

제55항에 있어서, 당해 조성물은 적어도 10개의 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함하고, 상기 증폭 프라이머 쌍의 각각의 프라이머는 표 1의 표적 미생물의 핵산 서열의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적합한 조건 하에서 상기 증폭 프라이머 쌍은 앰플리콘을 생성하는, 조성물.

청구항 63

제55항에 있어서, 당해 조성물은 적어도 15개의 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함하고, 상기 증폭 프라이머 쌍의 각각의 프라이머는 표 1의 표적 미생물의 핵산 서열의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적합한 조건 하에서 상기 증폭 프라이머 쌍은 앰플리콘을 생성하는, 조성물.

청구항 64

제55항에 있어서, 당해 조성물은 적어도 17개의 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함하고, 상기 증폭 프라이머 쌍의 각각의 프라이머는 표 1의 표적 미생물의 핵산 서열의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적합한 조건 하에서 상기 프라이머 쌍은 앰플리콘을 생성하는, 조성물.

청구항 65

제55항에 있어서, 아시네토박터 바우마니에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 202100-202800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GG704574.1의 701 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 66

제55항에 있어서, 사이트로박터 프룬디에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 137400-138200에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_ANAV01000004.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 67

제55항에 있어서, 엔테로박터 에어로게네스 (aka 클렙시엘라 에어로게네스)에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 1158600-1159400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP014748.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 68

제55항에 있어서, 엔테로박터 클로아케에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 3274000-3274800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP008823.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 69

제55항에 있어서, 엔테로코쿠스 파에칼리스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 1769100-1769900에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 HF558530.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 70

제55항에 있어서, 엔테로코쿠스 패슘에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 17300-18100에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GL476131.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 71

제55항에 있어서, 에스케리치아 콜라이에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 4336000-4336700에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP015843.2의 701 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 72

제55항에 있어서, 클렙시엘라 옥시토카에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 2851700-2852600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP020358.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 73

제55항에 있어서, 클렙시엘라 뉴모니에에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 209000-2090800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP007727.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 74

제55항에 있어서, 모르가넬라 모르가니에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 375800-376600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP004345.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 75

제55항에 있어서, 프로테우스 미라빌리스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 580200-581000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP017082.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 76

제55항에 있어서, 프로테우스 불가리스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 10200-102800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 JPIX01000006.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 77

제55항에 있어서, 프로비덴시아 스투아르티이에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 493000-493800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_DS607663.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 78

제55항에 있어서, 슈도모나스 에어루기노사에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 1857600-1858400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP006831.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 79

제55항에 있어서, 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 200400-201000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AP008934.1의 601 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 80

제55항에 있어서, 스트렙토코쿠스 아갈락티아에에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 41000-41600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP010319.1의 601 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 81

제55항에 있어서, 칸디다 알비칸스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오파이드 800-1500에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AY884203.1의 701 핵산 서열 내에 있는, 조성물.

청구항 82

복수의 증폭 반응을 평가하기 위한 핵산 작제물로서,

복수의 상이한 핵산 표적 서열을 포함하는 대조 핵산 분자를 포함하고, 상기 복수의 표적 핵산 서열은 DNA 플라스미드 안으로 삽입된 표 1의 적어도 5개의 유전자에 대해 지향된, 핵산작제물.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 복수의 표적 핵산 서열은 DNA 플라스미드에서 표 1의 적어도 10개의 유전자에 대해 지향된, 핵산 작제물.

청구항 84

제82항에 있어서, 상기 복수의 표적 핵산 서열은 DNA 플라스미드에서 표 1의 적어도 15개의 유전자에 대해 지향된, 핵산 작제물.

청구항 85

제82항에 있어서, 상기 복수의 표적 핵산 서열은 DNA 플라스미드에서 표 1의 각각의 유전자에 대해 지향된, 핵산 작제물.

청구항 86

제82항에 있어서, 아시네토박터 바우마니에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 202100-202800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GG704574.1의 701 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 87

제82항에 있어서, 사이트로박터 프룬디에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 137400-138200에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_ANAV0100004.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 88

제82항에 있어서, 엔테로박터 에어로게네스(aka 클렙시엘라 에어로게네스)에 대한 표적 핵산 서열은. 게놈의 뉴클레오타이드 1158600-1159400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP014748.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 89

제82항에 있어서, 엔테로박터 클로아케에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 3274000-3274800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP008823.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 90

제82항에 있어서, 엔테로코쿠스 파에칼리스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 1769100-1769900에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 HF558530.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 91

제82항에 있어서, 엔테로코쿠스 패슘에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 17300-18100에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GL476131.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 92

제82항에 있어서, 에스케리치아 콜라이에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 4336000-4336700에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP015843.2의 701 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 93

제82항에 있어서, 클렙시엘라 옥시토카에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 2851700-2852600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP020358.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 94

제82항에 있어서, 클렙시엘라 뉴모니에에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 209000-2090800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP007727.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 95

제82항에 있어서, 모르가넬라 모르가니에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 375800-376600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP004345.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 96

제82항에 있어서, 프로테우스 미라빌리스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 580200-581000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP017082.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 97

제82항에 있어서, 프로테우스 불가리스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 10200-102800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 JPIX01000006.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 98

제82항에 있어서, 프로비덴시아 스투아르티이에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 493000-493800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_DS607663.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 99

제82항에 있어서, 슈도모나스 에어루기노사에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 1857600-1858400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP006831.1의 801 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 100

제82항에 있어서, 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 200400-201000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AP008934.1의 601 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 101

제82항에 있어서, 스트렙토코쿠스 아갈락티아에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 41000-41600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP010319.1의 601 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 102

제82항에 있어서, 칸디다 알비칸스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 800-1500에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AY884203.1의 701 핵산 서열 내에 있는, 핵산 작제물.

청구항 103

핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법으로서,

표 1에 제시된 유기체 및 해당하는 앰플리콘 크기, 영역, 및 수탁 번호와 연관된 표적 핵산 서열들의 그룹으로부터 상이한 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 각각 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 일부를 각각 포함하는 복수의 증폭 반응을 수행하고;

증폭 반응으로부터 복수의 상이한 증폭 생성물을 형성하고;

상기 복수의 상이한 증폭 생성물 중 적어도 하나의 존재 또는 부재를 결정하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 104

제103항에 있어서, 복수의 증폭 반응들 중 적어도 10개의 증폭 반응이 표 1에 제시된 유기체 및 해당하는 앰플리콘 크기, 영역, 및 수탁 번호와 연관된 표적 핵산 서열들의 그룹으로부터 상이한 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 각각 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 일부를 포함하는, 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 추가로 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 105

제103항에 있어서, 복수의 증폭 반응들 중 적어도 15개의 증폭 반응이 표 1에 제시된 유기체 및 해당하는 앰플

리콘 크기, 영역, 및 수탁 번호와 연관된 표적 핵산 서열들의 그룹으로부터 상이한 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 각각 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 일부분을 포함하는, 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 추가로 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 106

제103항에 있어서, 복수의 증폭 반응들 모두가 음성 대조군을 제외하여, 표 1에 제시된 유기체 및 해당하는 앰플리콘 크기, 영역, 및 수탁 번호와 연관된 표적 핵산 서열들의 그룹으로부터 상이한 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 각각 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 일부를 포함하는, 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 추가로 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 107

핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법으로서,

- (a) 복수의 증폭 반응들 중 적어도 5개의 증폭 반응이 표 1에 제시된 상이한 유전자의 증폭 생성물인 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 일부를 포함하는, 복수의 증폭 반응을 수행하고;
- (b) 복수의 상이한 증폭 생성물을 형성하고;
- (c) 상기 복수의 상이한 증폭 생성물을 중 적어도 하나의 존재 또는 부재를 결정하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 상기 증폭 반응들 중 적어도 5개의 증폭 반응은 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 109

제107항에 있어서, 상기 증폭 반응의 적어도 10개는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 110

제107항에 있어서, 상기 증폭 반응의 적어도 15개는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 111

제107항에 있어서, 상기 증폭 반응의 17개는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 112

제107항에 있어서, 복수의 증폭 반응들 중 적어도 10개의 증폭 반응이 표 1에 열거된 유전자의 일부분의 증폭 생성물인 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 일부분을 포함하는, 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 113

제107항에 있어서, 복수의 증폭 반응들 중 적어도 15개의 증폭 반응이 표 1에 열거된 다른 유전자의 증폭 생성물인 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 일부를 포함하는, 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 114

제107항에 있어서, 복수의 증폭 반응들 중 적어도 17개의 증폭 반응이 음성 대조군을 제외하여, 표 1에 열거된 다른 유전자의 증폭 생성물인 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 일부를 포함하는, 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 115

제107항에 있어서, 상기 증폭 생성물은 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이인, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 116

제107항에 있어서, 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 상기 증폭 프라이머들 중 적어도 한 쌍은 상기 해당하는 표적 핵산 서열의 일부에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 함유하는 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 117

제107항에 있어서, 상기 증폭 프라이머들 중 적어도 한 쌍에 대한 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리(cell-free) DNA, 순환성(circulating) DNA 또는 cDNA에 존재하는 핵산 서열과 동일하거나 그에 상보적인 핵산 서열을 함유하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 118

제117항에 있어서, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 표적 미생물의 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 또는 cDNA 내에 존재하거나 이로부터 유래되는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 119

제118항에 있어서, 상기 표적 미생물은 표 1에 열거된 미생물인, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 120

제107항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은, 10 내지 10, 000개의 상이한 증폭 생성물을 병행하여 형성하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 121

제107항에 있어서, 상기 복수의 증폭 반응들 중 적어도 2개의 증폭 반응 각각은 상이한 해당 표적 핵산 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 122

제107항에 있어서, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 표 1에 열거된 유전자의 핵산 서열 또는 그것의 해당하는 cDNA의 일부분을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 123

제122항에 있어서, 상기 유전자는 표 1에 열거된 미생물 내에 존재하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 124

제107항에 있어서, 상기 복수의 증폭 반응들 각각은 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이인 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 증폭 프라이머들의 세트를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 125

제107항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 유전자의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 함유하는 하나 이상의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 126

제125항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 미생물로부터 유래된 핵산 샘플을 사용하여 표 1에 열거된 모든 유전자에 대한 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 127

제125항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 모든 미생물 유전자에 대한 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 128

제125항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 미생물 유전자들 중 적어도 2개의 임의의 조합에 대한 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 129

제107항에 있어서, 상기 복수의 증폭 반응들 중 하나 이상의 증폭 반응은 상기 해당하는 표적 핵산 서열의 일부와 동일하거나 그에 상보적인 서열을 포함하는 검출가능하게 표지된 프로브를 더 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 130

제129항에 있어서, 적어도 하나의 증폭 반응의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성되는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 131

제129항에 있어서, 적어도 하나의 증폭 반응의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄처를 함유하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 132

제129항에 있어서, 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 작은 홈 결합제(MGB) 모이어티를 추가로 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 133

제107항에 있어서, 상기 증폭 반응들 중 적어도 하나의 증폭 반응은 담체 내 또는 그 위에 존재하는 개별 반응 부위에서 일어나고, 상기 담체는 하나 이상의 개별 반응 부위를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 134

제133항에 있어서, 상기 담체는 다중-웰 플레이트, 미세유체 카드, 및 복수의 관통공 반응 부위를 포함하는 플레이트로부터 선택되는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 135

제133항에 있어서, 상기 개별 반응 부위는 상기 증폭 프라이머들 중 하나 이상을 포함하고, 당해 증폭시키는 방법은 상기 핵산 샘플의 일부를 상기 개별 반응 부위에 분배하는 것을 추가로 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 136

제133항에 있어서, 상기 개별 반응 부위는 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 프로브를 함유하는 용액의 건조된 침착물(deposit)을 포함하고, 상기 프라이머 및 프로브 둘 모두는 표 1에 열거된 유전자로부터 유래된 핵산 서열을 증폭하도록 구성된, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 137

제135항에 있어서, 상기 개별 반응 부위는 상기 핵산 샘플의 상기 부분이 상기 반응 부위에 분포되기 전 또는 후에 상기 반응 부위에 분포된, 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 138

제107항에 있어서, 상기 핵산 샘플은 소변 시료로부터 제조되는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 139

제107항에 있어서, 상기 복수의 증폭 반응을 수행하기 전에 소변 시료로부터 상기 핵산 샘플을 제조하는 것을 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 140

샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법으로서,

- (a) 담체 내에 위치한 개별 반응 챔버들에 핵산 샘플의 부분들을 분포시키고;
- (b) 개별 반응 챔버들 각각에서, 미생물의 게놈 내에 존재하거나 그 미생물 게놈으로부터 유래된 표적 핵산 서열에 해당하는 - 여기서, 해당하는 표적 핵산 서열은 표 1에 열거된 유전자의 핵산 서열의 일부 또는 그 유전자의 해당하는 cDNA를 함유함 - 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는 병행 증폭 반응들을 수행하고, 적어도 5개의 증폭 생성물을 형성하고;
- (c) 상기 증폭 생성물이 상기 개별 반응 챔버들 중 하나 이상에 형성되었는지 여부를 결정하는 것을 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 141

제140항에 있어서, 상기 증폭 반응들 중 적어도 5개의 증폭 반응은 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 142

제140항에 있어서, 상기 증폭 반응들 중 적어도 10개의 증폭 반응은 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 143

제140항에 있어서, 상기 증폭 반응들 중 적어도 15개의 증폭 반응은 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 144

제140항에 있어서, 상기 증폭 반응들 중 17개의 증폭 반응은 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 145

제140항에 있어서, 적어도 10개의 증폭 생성물은 병행 증폭 반응들 동안 형성되는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 146

제140항에 있어서, 적어도 15개의 증폭 생성물은 병행 증폭 반응들 동안 형성되는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 147

제140항에 있어서, 적어도 17개의 증폭 생성물은 병행 증폭 반응들 동안 형성되는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 148

제140항에 있어서, 상기 증폭 생성물은 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이인, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 149

제140항에 있어서, 상기 결정은, 상기 증폭 생성물에 검출가능하게 표지된 프로브의 혼성화를 검출하는 것을, 선택적으로는 실시간으로 검출하는 것을 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 150

제140항에 있어서, 상기 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 상기 증폭 프라이머들 중 적어도 한 쌍은 상기 해당하는 표적 핵산 서열의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 함유하는 프라이머를 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 151

제140항에 있어서, 상기 증폭 프라이머들 중 적어도 한 쌍에 대한 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 또는 cDNA에 존재하는 핵산 서열과 동일하거나 이에 상보적인 핵산 서열을 함유하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 152

제151항에 있어서, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 표적 미생물의 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 또는 cDNA 내에 존재하거나 이로부터 유래되는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 153

제152항에 있어서, 상기 미생물은 표 1에 열거된 미생물인, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 154

제140항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 10 내지 10, 000개의 상이한 증폭 생성물을 병행하여 형성하는 것을 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 155

제140항에 있어서, 상기 증폭 반응들 중 적어도 2개의 증폭 반응 각각은 상이한 해당 표적 핵산 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 156

제140항에 있어서, 상기 유전자는 표 1에 열거된 미생물 내에 존재하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 157

제140항에 있어서, 상기 증폭 반응 각각은 표 1에 열거된 유전자의 적어도 일부를 증폭하도록 구성된 증폭 프라이머를 함유하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 158

제140항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 유전자의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 함유하는 하나 이상의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 159

제140항에 있어서, 상기 복수의 증폭 반응 각각은 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이인 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 증폭 프라이머들의 세트를 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 160

제158항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 미생물로부터 유래된 핵산 샘플을 사용하여 표 1에 열거된 모든 유전자에 대한 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 161

제158항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 모든 미생물 유전자에 대한 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 162

제158항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 미생물 유전자들 중 적어도 2개의 임의의 조합에 대한 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 163

제140항에 있어서, 상기 복수의 상기 증폭 반응들 중 하나 이상의 증폭 반응은 해당하는 표적 핵산 서열의 일부와 동일하거나 그에 상보적인 서열을 포함하는 검출가능하게 표지된 프로브를 추가로 함유하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 164

제163항에 있어서, 적어도 하나의 증폭 반응의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성되는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 165

제163항에 있어서, 적어도 하나의 증폭 반응의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄처를 함유하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 166

제163항에 있어서, 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 작은 홈 결합제(MGB) 부분을 추가로 함유하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 167

제140항에 있어서, 상기 증폭 반응의 적어도 하나는 담체 내에 또는 그 위에 존재하는 개별 반응 부위에서 일어나고, 상기 담체는 하나 이상의 개별 반응 부위를 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 168

제167항에 있어서, 상기 담체는 다중-웰 플레이트, 미세유체 카드, 및 복수의 관통공 반응 부위를 포함하는 플레이트로부터 선택되는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 169

제140항에 있어서, 상기 개별 반응 부위는 상기 증폭 프라이머들 중 하나 이상을 포함하고, 상기 증폭은 핵산 샘플의 일부를 상기 개별 반응 부위에 분배하는 것을 추가로 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 170

제140항에 있어서, 상기 개별 반응 챔버는 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 프로브를 함유하는 용액의 건조된 침착물을 포함하고, 상기 프라이머 및 프로브 둘 모두는 표 1에 열거된 유전자로부터 유래된 핵산 서열을 증폭하도록 구성된, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 171

제170항에 있어서, 상기 개별 반응 챔버는 상기 핵산 샘플의 상기 부분이 상기 반응 부위에 분포되기 전 또는 후에 개별 반응 챔버에 분포된, 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 172

제140항에 있어서, 상기 핵산 샘플은 소변 시료로부터 제조되는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 173

제140항에 있어서, 상기 분포시키기 전에 소변 시료로부터 상기 핵산 샘플을 제조하는 단계를 포함하는, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법.

청구항 174

핵산 증폭용 담체로서,

당해 담체 내에 또는 당해 담체의 표면 상에 위치한 복수의 반응 부위를 포함하는 담체포함하고;

상기 반응 부위들 중 적어도 5개의 반응 부위는

(1) 표적 핵산 서열에 해당하며 표 1의 미생물에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 증폭 프라이머 쌍, 및

(2) 상기 증폭 생성물에 혼성화하도록 구성된 검출가능하게 표지된 프로브를 포함하고;

상기 적어도 5개의 반응 부위들 각각은 해당하는 검출가능하게 표지된 프로브와 함께 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함하는, 담체.

청구항 175

제174항에 있어서, 적어도 10개의 상기 반응 부위를 포함하고, 상기 적어도 10개의 반응 부위들 각각은 해당하는 검출가능하게 표지된 프로브와 함께 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함하는, 담체.

청구항 176

제174항에 있어서, 적어도 15개의 상기 반응 부위를 포함하고, 상기 적어도 15개의 반응 부위들 각각은 해당하는 검출가능하게 표지된 프로브와 함께 상이한 증폭 프라이머 쌍을 함유하는, 담체.

청구항 177

제174항에 있어서, 적어도 17개의 상기 반응 부위를 포함하고, 상기 적어도 17개의 반응 부위들 각각은 해당하는 검출가능하게 표지된 프로브와 함께 상이한 증폭 프라이머 쌍을 함유하는, 담체.

청구항 178

제174항에 있어서, 상기 증폭 생성물은 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이인, 담체.

청구항 179

제174항에 있어서, 상기 반응 부위들 각각은 표 1로부터 선택된 유전자 또는 표 1에 열거된 유전자의 핵산 유도체 중 적어도 일부를 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 프로브를 함유하는, 담체.

청구항 180

제179항에 있어서, 상기 반응 부위들 각각은 표 1에 열거된 어세이 id로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 프로브를 함유하는 담체.

청구항 181

제179항에 있어서, 적어도 하나의 반응 부위의 증폭 프라이머 쌍은 상기 해당하는 표적 핵산 서열의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 함유하는 프라이머를 포함하는, 담체.

청구항 182

제181항에 있어서, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 또는 cDNA에 존재하는 핵산 서열과 동일하거나 그에 상보적인 핵산 서열을 함유하는, 담체.

청구항 183

제182항에 있어서, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 표적 미생물로부터 유래된 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 또는 cDNA 내에 존재하거나 이로부터 유래되는, 담체.

청구항 184

제183항에 있어서, 상기 표적 미생물은 표 1로부터 선택되는, 담체.

청구항 185

제174항에 있어서, 상기 반응 부위들 중 2개 이상의 반응 부위는 동일한 핵산 샘플의 부분을 함유하는, 담체.

청구항 186

제185항에 있어서, 상기 핵산 샘플은 소변 시료로부터 유래된, 담체.

청구항 187

제174항에 있어서, 상기 반응 부위들 중 적어도 하나는 증폭 생성물을 포함하는, 담체.

청구항 188

제187항에 있어서, 상기 반응 부위의 증폭 생성물은 표 1에 열거된 유전자의 일부에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 포함하는, 담체.

청구항 189

제174항에 있어서, 상기 담체는 상이한 증폭 생성물을 함유하는 10 내지 10, 000개의 반응 부위를 포함하는, 담체.

청구항 190

제189항에 있어서, 상기 담체는 표 1에 열거된 모든 유전자와 동일하거나 그에 상보적인 증폭 생성물을 함유하는 반응 부위를 포함하는, 담체.

청구항 191

제174항에 있어서, 상기 반응 부위들 중 적어도 2개 각각은 상이한 해당 표적 핵산 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유하는, 담체.

청구항 192

제174항에 있어서, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 표 1에 열거된 유전자의 핵산 서열 또는 그 유전자의 해당하는 cDNA의 일부를 함유하는, 담체.

청구항 193

제174항에 있어서, 상기 복수의 반응 부위는 표 1에 열거된 미생물로부터 유래된 핵산 샘플을 사용하여 표 1에 열거된 모든 유전자에 대한 증폭 생성물을 포함하는, 담체.

청구항 194

제174항에 있어서, 상기 복수의 반응 부위는 표 1에 열거된 적어도 2개 미생물로부터 유래된 핵산 샘플을 사용하여 표 1에 열거된 유전자들 중 적어도 2개의 임의의 조합에 대한 증폭 생성물을 포함하는, 담체.

청구항 195

제174항에 있어서, 상기 반응 부위의 적어도 하나의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레이제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성되는, 담체.

청구항 196

제174항에 있어서, 적어도 하나의 상기 반응 부위의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄쳐를 함유하는, 담체.

청구항 197

제174항에 있어서, 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 작은 홈 결합제(MGB) 모이어티를 추가로 함유하는, 담체.

청구항 198

제174항에 있어서, 상기 담체는 다중-웰 플레이트, 미세유체 카드, 및 복수의 관통공 반응 부위를 포함하는 플레이트로부터 선택되는, 담체.

청구항 199

제174항에 있어서, 상기 개별 반응 부위 중 하나 이상은 상기 증폭 프라이머의 쌍 및 상기 검출가능하게 표지된 프로브를 함유하는 용액의 건조된 침착물을 포함하는, 담체.

청구항 200

제174항에 있어서, 상기 개별 반응 부위는 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는, 담체.

청구항 201

제174항에 있어서, 상기 개별 반응 부위들 중 하나 이상은 상기 증폭 프라이머의 쌍, 상기 검출가능하게 표지된 프로브, 중합효소, 및 뉴클레오타이드를 포함하는 동결건조된 조성물을 함유하는, 담체.

청구항 202

제174항에 있어서, 상기 증폭 프라이머 쌍 및 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 표 1에 열거된 어세이들 중 하나로부터 유래하는, 담체.

청구항 203

표 1에 열거된 미생물 중 하나 이상으로부터의 적어도 하나의 표적 핵산이 생물학적 샘플에 존재 또는 부재하는지를 결정하는 조성물로서,

(a) 적어도 하나의 증폭 프라이머 쌍으로서, 상기 쌍의 프라이머들 각각은 상기 표적 핵산의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적합한 조건 하에서 상기 프라이머 쌍은 표 1의 유전자로부터의 앰플리콘을 생성하는, 적어도 하나의 증폭 프라이머 쌍; 및

(b) 상기 프라이머 쌍에 의해 생성된 상기 앰플리콘의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 적어도 하나의 검출 프로브를 포함하는, 조성물.

청구항 204

제203항에 있어서, 상기 앰플리콘은 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이인, 조성물.

청구항 205

제203항에 있어서, 표 1에 열거된 적어도 하나의 어세이를 포함하는, 조성물.

청구항 206

제203항에 있어서, 바이오마커들의 패널을 검출하기 위한 뉴클레오타이드 프로브들의 세트를 포함하고; 상기 프로브는 유전자 그룹의 DNA 및/또는 RNA 서열에 상보적이고; 상기 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들의 임의의 조합으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 207

제206항에 있어서, 상기 프로브 세트는 1 내지 17개의 상이한 프로브로 구성되는, 조성물.

청구항 208

제206항에 있어서, 상기 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들로부터 선택된 5개의 상이한 유전자로 구성되는, 조성물.

청구항 209

제203항에 있어서, 샘플에서 적어도 5개의 상이한 표적 핵산이 증폭 및 검출되고, 상기 표적 핵산은 표 1에 열거된 5개의 상이한 미생물로부터의 것인, 조성물.

청구항 210

제209항에 있어서, 상기 5개의 표적 핵산은 표 1에 열거된 상기 5개의 상이한 미생물 각각에 대해 열거된 어세이를 사용하여 증폭 및 검출되는, 조성물.

청구항 211

제206항에 있어서, 상기 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들로부터 선택된 10개의 상이한 유전자로 구성되는, 조성물.

청구항 212

제211항에 있어서, 샘플에서 적어도 10개의 상이한 표적 핵산이 증폭 및 검출되고, 상기 표적 핵산은 표 1에 열거된 10개의 상이한 미생물로부터의 것인, 조성물.

청구항 213

제212항에 있어서, 상기 10개의 표적 핵산은 표 1에 열거된 상기 10개의 상이한 미생물 각각에 대해 열거된 어세이를 사용하여 증폭 및 검출되는, 조성물.

청구항 214

제206항에 있어서, 상기 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들로부터 선택된 15개의 상이한 유전자로 구성되는, 조성물.

청구항 215

제214항에 있어서, 샘플에서 적어도 15개의 상이한 표적 핵산이 증폭 및 검출되고, 상기 표적 핵산은 표 1에 열거된 15개의 상이한 미생물로부터의 것인, 조성물.

청구항 216

제215항에 있어서, 상기 15개의 표적 핵산은 표 1에 열거된 상기 15개의 상이한 미생물 각각에 대해 열거된 어

세이를 사용하여 증폭 및 검출되는, 조성물.

청구항 217

제206항에 있어서, 상기 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들로부터 선택된 17개의 상이한 유전자로 구성되는, 조성물.

청구항 218

제217항에 있어서, 샘플에서 적어도 17개의 상이한 표적 핵산이 증폭 및 검출되고, 상기 표적 핵산은 표 1에 열거된 17개의 상이한 미생물로부터의 것인, 조성물.

청구항 219

제218항에 있어서, 상기 17개의 표적 핵산은 표 1에 열거된 상기 17개의 상이한 미생물 각각에 대해 열거된 어세이를 사용하여 증폭 및 검출되는, 조성물.

청구항 220

생물학적 샘플과 연관된 바이오마커들의 패널을 프로파일링하는 방법으로서,

- (a) 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하고;
- (b) 상기 샘플의 적어도 일부분을, 표적-특이적 프라이머들의 세트 및 중합효소를 포함하는 적어도 5개의 개별 증폭 반응들과 접촉시키고;
- (c) 증폭된 생성물을 생성할 수 있는 증폭 조건 하에서 개별 반응 당 적어도 하나의 표적 서열을 증폭시키고;
- (c) 상기 복수의 개별 반응들 각각을 상기 표적-특이적 프라이머에 의해 생성된 상기 증폭된 생성물에 대해 특이적인 검출가능하게 표지된 프로브에 접촉시키고;
- (d) 상기 생물학적 샘플에 대한 바이오마커 프로파일에 도달하도록 - 여기서 상기 바이오마커들은 표 1에 열거된 유전자들과 연관됨 - 상기 복수의 개별 증폭 반응들 각각에 상기 증폭된 생성물이 존재 또는 부재하는지를 결정하는 것을 포함하는, 생물학적 샘플과 연관된 바이오마커들의 패널을 프로파일링하는 방법.

청구항 221

제220항에 있어서, 적어도 10개의 개별 증폭 반응은 상기 샘플의 적어도 일부분에 의해 접촉되는, 바이오마커의 패널을 프로파일링하는 방법.

청구항 222

제220항에 있어서, 적어도 15개의 개별 증폭 반응은 상기 샘플의 적어도 일부분에 의해 접촉되는, 바이오마커의 패널을 프로파일링하는 방법.

청구항 223

제220항에 있어서, 적어도 17개의 개별 증폭 반응은 상기 샘플의 적어도 일부분에 의해 접촉되는, 바이오마커의 패널을 프로파일링하는 방법.

청구항 224

제220항에 있어서, 상기 바이오마커는 비뇨생식기 감염 및/또는 미생물총과 연관되는, 바이오마커의 패널을 프로파일링하는 방법.

청구항 225

제220항에 있어서, 상기 패널은 1 내지 17개의 상이한 바이오마커들의 세트를 포함하는, 바이오마커의 패널을 프로파일링하는 방법.

청구항 226

제220항에 있어서, 상기 복수의 개별 증폭 반응은 고형 담체 상에 있는, 바이오마커의 패널을 프로파일링하는 방법.

청구항 227

제220항에 있어서, 상기 복수의 개별 증폭 반응 각각은 표 1로부터 선택된 단일 어세이를 포함하는, 바이오마커의 패널을 프로파일링하는 방법.

청구항 228

대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법으로서,

복수의 상이한 표적 서열을 함유하는 대조 핵산 분자의 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 샘플의 부분을 각각이 포함하는 복수의 증폭 반응들을 병행으로 수행하고;

대조 핵산 분자의 적어도 2개의 상이한 표적 서열에 해당하는 복수의 상이한 증폭 생성물을 형성하고;

증폭 반응에 적어도 2개의 상이한 증폭 생성물이 존재하는지를 결정하는 것을 포함하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 229

제228항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 상이한 미생물로부터 적어도 5개의 상이한 표적 서열을 함유하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 230

제229항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 상이한 미생물로부터 적어도 10개의 상이한 표적 서열을 함유하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 231

제230항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 상이한 미생물로부터 적어도 15개의 상이한 표적 서열을 함유하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 232

제228항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 상이한 미생물로부터 상이한 표적 서열 모두를 함유하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 233

제228항에 있어서, 복수의 상이한 표적 서열은 표 1에 제시된 상이한 미생물의 계놈 또는 전사체 서열로부터 유래되는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 234

제228항에 있어서, 복수의 상이한 표적 서열은 표 1로부터 선택된 임의의 수의 미생물 유전자로부터 유래되는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 235

제228항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 병렬적으로 5 내지 100개의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 236

제235항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 병렬적으로 10 내지 50개의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 237

제228항에 있어서, 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된, 증폭 프라이머들 중 적어도 한 쌍은 해당하는 표적 서열의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 함유하는 프라이머를 포함하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 238

제228항에 있어서, 복수의 증폭 반응 중 적어도 2개 각각은 상이한 해당 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 239

제228항에 있어서, 복수 증폭 반응들 중 하나 이상의 증폭 반응은 해당하는 표적 서열의 부분과 동일하거나 그에 상보적인 서열을 포함하는 검출가능하게 표지된 프로브를 추가로 함유하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 240

제239항에 있어서, 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성되는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 241

제17항에 있어서, 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 케쳐를 함유하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 242

제228항에 있어서, 대조 핵산 분자는 DNA 플라스미드인, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 243

제242항에 있어서, DNA 플라스미드는 선형인, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 244

제228항에 있어서, 증폭 반응을 수행하기 전에 세포로부터 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플을 제조하는 것을 더 포함하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 245

대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법으로서,

복수의 상이한 표적 서열을 함유하는 대조 핵산 분자의 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 적어도 2개의 상이한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는 복수의 반응 체적부들 안으로 샘플을 분포시키고함;

상기 반응 체적부들에서 증폭 반응을 수행하고, 대조 핵산 분자의 적어도 2개의 상이한 표적 서열에 해당하는 복수의 상이한 증폭 생성물을 형성하고;

증폭 반응에 적어도 2개의 상이한 증폭 생성물이 존재하는지를 결정하는 것을 포함하는, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 246

복수의 증폭 반응을 평가하는 방법으로서,

복수의 상이한 표적 서열을 함유하는 대조 핵산 분자를 함유하는 핵산 샘플의 부분들을, 담체 내에 또는 위에 위치한 개별 반응 챔버들에 분포시키고;

개별 반응 챔버에서, 복수의 병행 증폭 반응들을 수행하며, 대조 핵산 분자의 적어도 2개의 상이한 표적 서열에 해당하는 복수의 상이한 표적 증폭 생성물을 형성하고,

여기서 각각의 증폭 반응은 대조 핵산 분자 내에 존재하는 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하고, 증폭 반응들 중 적어도 2개의 증폭 반응은 대조 핵산 분자 내에 존재하는 상이한 해당 표적 서열을 증폭하도록 구성된 증폭 프라이머를 포함함;

적어도 2개의 개별 반응 챔버에서 형성된 적어도 2개의 상이한 표적 증폭 생성물을 정량화하는 것을 포함하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 247

제246항에 있어서, 당해 방법이 대조 핵산 분자의 연속 희석물인 샘플들의 세트를 사용하여 수행되는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 248

제247항에 있어서, 연속으로 희석된 대조 핵산 분자로부터의 정량화된 표적 증폭 생성물에 기초하여, 적어도 하나의 대조 핵산 분자 표적 서열에 대한 검출 한계를 결정하는 것을 추가로 포함하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 249

제247항에 있어서, 연속으로 희석된 대조 핵산 분자로부터의 정량화된 표적 증폭 생성물에 기초하여, 적어도 하나의 대조 핵산 분자 표적 서열에 대한 동적 범위를 결정하는 것을 추가로 포함하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 250

제246항에 있어서, 상기 정량화는, 증폭 생성물에 대한 검출가능하게 표지된 프로브의 혼성화를 검출하는 것을, 선택적으로는 실시간으로 검출하는 것을 포함하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 251

제246항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 5개의 상이한 표적 서열을 포함하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 252

제251항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 10개의 상이한 표적 서열을 함유하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 253

제252항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 15개의 상이한 표적 서열을 함유하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 254

제246항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 상이한 표적 서열 모두를 함유하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 255

제246항에 있어서, 복수의 표적 서열은 표 1의 상이한 미생물의 계놈 서열로부터 유래되는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 256

제246항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 5 내지 100개의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 복

수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 257

제256항에 있어서, 상기 증폭 생성물 형성은 1 내지 17개의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 258

제246항에 있어서, 복수 증폭 반응들 중 하나 이상의 증폭 반응은 해당하는 표적 서열의 부분과 동일하거나 그에 상보적인 서열을 포함하는 검출가능하게 표지된 프로브를 추가로 함유하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 259

제258항에 있어서, 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성되는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 260

제259항에 있어서, 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄쳐를 함유하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 261

제260항에 있어서, 개별 반응 챔버는 샘플의 부분이 반응 챔버에 분포되기 전 또는 후에 개별 반응 챔버에 분포된 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 262

제246항에 있어서, 대조 핵산 분자는 DNA 플라스미드인, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 263

제262항에 있어서, DNA 플라스미드는 선형인, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법.

청구항 264

복수의 상이한 증폭 표적 서열을 포함하는 핵산 작제물로서, 적어도 2개의 증폭 표적 서열은 표 1로부터 선택된 유전자 또는 그 유전자의 해당하는 cDNA의 적어도 56개의 뉴클레오타이드 부분을 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 265

복수의 상이한 증폭 표적 서열을 포함하는 핵산 작제물로서, 적어도 2개의 증폭 표적 서열은 표 1로부터 선택된 적어도 2개의 상이한 미생물 또는 미생물 유전자로부터 유래되는, 핵산 작제물.

청구항 266

핵산 증폭용 어레이로서,

담체 내에 또는 담체 상에 위치한 복수의 반응 부위를 포함하는 담체를 포함하고;

상기 복수의 반응 부위들 각각은

- (i) 복수의 상이한 표적 서열을 함유하는 대조 핵산 분자,
- (ii) 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 증폭 프라이머 쌍, 및
- (iii) 상기 증폭 프라이머 쌍의 증폭 프라이머들 중 적어도 하나의 연장에 의해 생성된 핵산 서열에 혼성화하도록 구성된 검출가능하게 표지된 프로브를 포함하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 267

제266항에 있어서, 적어도 2개의 상이한 표적 서열은 표 1로부터 선택된 유전자 또는 그것의 해당하는 cDNA의 적어도 56개의 뉴클레오타이드 부분을 포함하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 268

제266항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터의 적어도 5개의 상이한 표적 서열을 포함하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 269

제268항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터의 적어도 10개의 상이한 표적 서열을 함유하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 270

제269항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터의 적어도 15개의 상이한 표적 서열을 함유하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 271

제270항에 있어서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터의 모든 상이한 표적 서열을 함유하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 272

제266항에 있어서, 대조 핵산 분자는 플라스미드인, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 273

제272항에 있어서, 플라스미드는 선형인, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 274

제266항에 있어서, 반응 부위 중 적어도 하나는 증폭 생성물을 포함하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 275

제266항에 있어서, 상기 담체는 상이한 증폭 생성물을 함유하는 10 내지 10,000개의 반응 부위를 포함하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 276

제266항에 있어서, 적어도 2개의 반응 부위 각각은 상이한 해당 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 277

제266항에 있어서, 적어도 하나의 반응 부위의 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성되는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 278

제266항에 있어서, 적어도 하나의 반응 부위의 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄처를 함유하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 279

제266항에 있어서, 검출가능하게 표지된 프로브는 작은 홈 결합제 모이어티를 추가로 함유하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 280

제266항에 있어서, 상기 담체는 다중-웰 플레이트, 미세유체 카드, 및 복수의 관통공 반응 부위를 포함하는 플레이트로부터 선택되는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 281

제266항에 있어서, 복수의 반응 부위는 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는, 핵산 증폭용 어레이.

청구항 282

복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법으로서,

복수의 상이한 표적 서열을 함유하는 대조 핵산 분자와, 하나 이상의 테스트 핵산 분자를 함유하는 테스트 핵산 샘플 둘 모두를 복수의 반응 체적부들 안으로 분포시키고;

상기 반응 체적부들을 핵산 증폭 조건하에 두어서 증폭 프라이머 쌍들을 사용하여 상기 반응 체적부들에서 대조 핵산 분자의 적어도 2개의 상이한 표적 서열을 증폭시키고, 여기서 대조 핵산 분자에서 상이한 표적 서열을 증폭하는 데에는 각각의 증폭 프라이머 쌍이 사용됨;

상기 반응 체적부들에 적어도 2개의 상이한 증폭된 표적 서열이 존재하는지를 검출하는 것을 포함하는, 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 283

제282항에 있어서, 대조 핵산 분자는 원형인, 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 284

제283항에 있어서, 대조 핵산 분자는 선형인, 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 285

제282항에 있어서, 대조 핵산 분자와, 테스트 핵산 샘플로부터의 테스트 핵산 분자를 상이한 반응 체적부들에 분배하는 것을 더 포함하는, 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 286

제282항에 있어서, 테스트 핵산 샘플은 또한 2개 이상의 상이한 표적 핵산 분자를 포함하고, 그 각각은 상이한 표적 서열을 함유하는, 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

청구항 287

제286항에 있어서, 증폭 프라이머 쌍들을 사용하여 반응 체적부들에서 테스트 핵산 샘플의 적어도 2개의 상이한 표적 서열을 증폭시키는 것을 더 포함하며, 표적 핵산 샘플에서 상이한 표적 서열을 증폭하는 데에는 각각의 증폭 프라이머 쌍이 사용되는, 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

배경기술

[0001] 다양한 미생물이 질환 및 장애를 유발하거나 기여할 수 있다. 감염원은 개체에서 개체로 퍼져서 인구 집단 내 질병으로 이어질 수 있다. 공생에서 숙주 상에 또는 숙주 내에 존재하는 미생물은 개체의 미생물 모집단에서 불균형이 발생할 때 숙주 질환으로 이어질 수 있다. 인간 미생물군집 프로젝트는 인간과 동물 미생물군집의 구성에 대한 풍부한 통찰력과 특정한 조직 내 균형을 유지하는 능력을 제공하고 있다.

[0002] 비뇨생식기, 방광, 및 요로 조직은 박테리아, 진균, 바이러스 및/또는 기생 미생물(예를 들어, 요로 병원균)의 발병률이 불균형을 유발할 수 있는 풍부한 환경이며, 이는 해당 부위에 심각한 영향으로 이어진다.

[0003]

매년 약 1억 5천만 명이 요로 감염(UTI)에 의해 영향을 받으며, 이는 증상 또는 무증상 여부에 관계없이 심각한 건강 문제를 나타낸다. 현재 UTI는 임상 증상 및 소변 분석(박테리아 배양 및 백혈구의 존재)을 기반으로 진단하고 항생제로 치료한다. 그러나, 인간 요로에는 다양하고 복잡한 미생물 군집이 기생하고 있으며, 방광 및 요로 미생물총(UTM)이 긍정적으로 그리고 부정적으로 비뇨기 건강에 심대한 영향을 미칠 수 있다는 새로운 증거들이 나타나고 있다. 요로에 대한 현재 진단 방법론은 표적 처리량이 부족하고 미생물 배양 분석(요검사)에 의존한다. 대조적으로, 패널-기반 분자적 시험은 특정 종의 존재를 식별할 뿐만 아니라, 해당 종의 생물학적 중요성을 이해하는 데 도움이 되고 잠재적으로 적절한 항생제에 대한 지침을 제공하고 그것에 의해 과잉치료를 감소시킬 수 있는 비뇨기 미생물총을 프로파일링할 수 있다.

[0004]

전통적인 배양-기반 방법은 종종 UTI, 특히 복합미생물 또는 혼합된 균총(flora) 환경에서 병원체 박테리아 또는 진균 검출을 놓친다. 이것은 적어도 부분적으로 모든 요로병원균이 특정 종 및/또는 미생물을 검출하는 데 있어 실패를 초래할 수 있는 표준 배양 조건에서 동일하게 잘 자라는 것은 아니기 때문이다. 추가로, 현재의 배양-기반 방법은 시간 소모적이며, 처리량이 적으며 감도 및/또는 특이성이 부족할 수 있다. 따라서, 요로 감염의 복합미생물 성질은 소변 배양에 내재된 한계를 극복하고 소변에 존재하는 요로병원균의 신속한 정확한 측정을 제공할 수 있는 분석 시스템의 개발을 요한다. 비뇨기 미생물 모니터링 및 검출에 사용하기 위한 현재의 기술은 비용이 많이 들고, 감도 및/또는 특이성이 없고, 복잡하거나 긴 작업 과정을 요한다. 비뇨생식기, 방광 및 요로 감염 및 미생물총을 모니터링하고 프로파일링하기 위한 구체적이고 효율적이며 비용-효율적인 시스템이 필요하다.

발명의 내용

[0005]

일 양태에서, 한 쌍의 증폭 프라이머를 각각 포함하는 적어도 5개의 상이한 어세이를 사용하여, 복수의 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 5개의 증폭 반응 혼합물을 형성하는 단계로, 상기 어세이는 표 1의 어세이 그룹으로부터 선택되는, 단계; 각각의 증폭 반응 혼합물을 반응 용기에 적용하는 단계; 반응 용기 상에서 복수의 증폭 반응을 수행하는 단계; 및 복수의 증폭 반응 동안 반응 용기 상에의 하나 이상의 위치 내에서 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 검출하는 단계를 포함하는 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 본 방법은 상기 반응을 증폭 생성물 검출 시스템에서 이용하고; 증폭 생성물 검출 시스템을 작동시켜서, 증폭 반응 혼합물에 이용된 어세이 ID를 중 하나 이상과 반응 용기 상의 증폭 반응 혼합물의 위치들을 연관시키는 것을 추가로 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 반응 용기는 복수의 웰들을 갖는 플레이트이다. 본 방법의 또 다른 실시형태에서, 반응 용기는 어레이이다. 본 방법의 또 다른 실시형태에서, 반응 용기는 개방 어레이 플레이트이다. 본 방법의 또 다른 실시형태에서, 반응 용기는 칩 마이크로어레이이다. 일 실시형태에서, 본 방법은 표 1의 어세이 그룹으로부터 선택된 적어도 10개의 상이한 어세이를 사용하여, 복수의 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 10개의 증폭 반응 혼합물을 형성하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 표 1의 어세이 그룹으로부터 선택된 적어도 15개의 상이한 어세이를 사용하여, 복수의 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 15개의 증폭 반응 혼합물을 형성하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 표 1의 모든 어세이를 사용하여 복수의 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 반응 혼합물을 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 샘플 원천은 소변 시료이다. 본 방법의 일 실시형태에서, 증폭 생성물은 56 내지 105 뉴클레오타이드의 앰플리콘 길이를 갖는 핵산 샘플의 표적 앰플리콘을 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932084_s1은 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)의 유전자의 명명되지 않은 영역의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932088_s1은, 예를 들어, COG2140과 같은 사이트로박터 프룬디(*Citrobacter freundii*)의 큐핀 상파(superfamily) 유전자인, 옥살레이트 탈탄산효소/고세균 포스포글루코스 이소머라제의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba07286617_s1 및/또는 Ba07286616_s1은 사이트로박터 프룬디의 철 복합체 운반계 기질-결합 단백질에 대한 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932080_s1은 클렙시엘라 에어로게네스(*Klebsiella aerogenes*) (이전에 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)로 알려짐)의 피리독살 포스페이트-의존적 히스티딘 탈탄산효소 (hdc) 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932087_s1은 엔테로박터 클로아케(*Enterobacter cloacae*)의 유전자의 가설 단백질의 핵산 서열의 일부

를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04646247_s1은 엔테로코쿠스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*)의 아미노기전달효소 부류 V 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932086_s1은 엔테로코쿠스 패슘(*Enterococcus faecium*)의 PhnB -MerR 계열 전사 조절인자 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04646242_s1은, 예를 들어, COG0789와 같은 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)의 DNA-결합 전사 조절인자 MerR 계열 (Zntr) 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932079_s1은 클렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*)의 parC (DNA 토포이소머라제 IV 서브유닛 A) 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932083_s1은 클렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*)의 act-유사 단백질 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932078_s1은 모르가넬라 모르가니 (*Morganella morganii*)의 Fe2+ 운반계 단백질 FeoA 유전자에 대한 COG1918의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932076_s1은 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*)의 araC, ureR 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932077_s1은 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*)의 SUMF1 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932082_s1은, 프로비덴시아 스튜아르티(*Providencia stuartii*) 중의, 예를 들어 COG0641과 같은, 설파타제 성숙 효소 As1B, 라디칼 SAM 상과, 추정 철-황 개질제 단백질 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932081_s1은 슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 나선 회전 나선 도메인 단백질 유전자인, N296_1760의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932085_s1은 스타필로코쿠스 사프로파티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*)의 cdaR 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Ba04646276_s1은 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*)의 SIP 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 어세이 ID Fn04646233_s1은 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 IPT1 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함한다.

[0006]

또 다른 양태에서, 복수의 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 복수의 증폭 반응 혼합물을 형성하는 단계로, 여기서 상기 샘플 원천은 소변 시료인, 단계; 복수의 증폭 반응 혼합물을 반응 용기에 적용하는 단계로, 여기서 상기 반응 용기는 표 1에서 해당하는 표적 영역 위치 및 해당하는 표적 영역 크기를 갖는 상이한 유전자를 각각 표적으로 하는 적어도 5개의 어세이로 구성되고, 여기서 각각의 어세이는 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 단계; 반응 용기 상에서 복수의 증폭 반응을 수행하는 단계; 및 복수의 증폭 반응 동안 반응 용기 상에의 위치 내에서 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 검출하는 단계를 포함하는 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 본 방법은 증폭 생성물 검출 시스템에서 반응 용기를 이용하는 단계; 및 증폭 생성물 검출 시스템을 작동시켜: 선택적으로 연관 표의 사용에 의해, 반응 용기 상에서 이용된 어세이 중 하나 이상과 반응 용기 상의 증폭 반응 혼합물의 위치를 연관시키는 단계를 추가로 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 반응 용기는 복수의 웨들을 갖는 플레이트이다. 본 방법의 또 다른 실시형태에서, 반응 용기는 어레이이다. 본 방법의 또 다른 실시형태에서, 반응 용기는 개방 어레이 플레이트이다. 본 방법의 또 다른 실시형태에서, 반응 용기는 칩 마이크로어레이이다. 본 방법의 일 실시형태에서, 반응 용기는 표 1에 열거된 상이한 유전자를 각각 표적으로 하는 적어도 10개의 어세이로 구성된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 반응 용기는 표 1에 열거된 상이한 유전자를 각각 표적으로 하는 적어도 15개의 어세이로 구성된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 반응 용기는 표 1에 열거된 유전자 17개를 표적으로 어세이로 구성된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 반응 용기는 표 1에 열거된 유전자 각각을 표적으로 하는 어세이로 구성된다. 일 실시형태에서, 본 방법은, 아시네토박터 바우마니에서 명명되지 않은 영역에 대한 유전자에 해당하며 93 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은, 사이트로박터 프룬디 중의, 예를 들어 COG2140를 포함한, 큐핀 상과 유전자인, 옥살레이트 탈탄산효소/고세균 포스포글루코스 이소머라제에 해당하며 103 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 62 및/또는 110 뉴클레오타이드 길이이고 사이트로박터 프룬디의 철 복합체 운반계 기질-결합 단백질에 대한 핵산 서열의 일부에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 98 뉴클레오타이드 길이이고 클렙시엘라 에어로게네스 (이전에 엔테로박터 에어로게네스로 알려짐)에서 피리

독살 포스페이트-의존적 히스티딘 탈탄산효소 (hdc) 유전자에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 88 뉴클레오타이드 길이이고 엔테로박터 클로아케에서 가설 단백질에 대한 유전자에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 95 뉴클레오타이드 길이이고 엔테로코쿠스 파에칼리스에서 아미노기전달효소 부류 V 유전자에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 98 뉴클레오타이드 길이이고 엔테로코쿠스 패슘에서 PhnB -MerR 계열 전사 조절인자 유전자에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 63 뉴클레오타이드 길이이고, 예를 들어, COG0789를 포함한, 에스케리치아 콜라이에서 DNA-결합 전사 조절인자 MerR 계열 (Zntr) 유전자에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 93 뉴클레오타이드 길이이고 클렙시엘라 옥시토카에서 parC (DNA 토포이소머라제 IV 서브유닛 A) 유전자에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 56 뉴클레오타이드 길이이고 클렙시엘라 뉴모니에에서 act-유사 단백질에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 모르가넬라 모르가니 중의 예를 들어 COG1918을 포함한 Fe2+ 운반계 단백질 FeoA 유전자에 상응하며 91 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 프로테우스 미라빌리스 중의 araC, ureR 유전자에 상응하며 100 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 76 뉴클레오타이드 길이이고 프로테우스 불가리스에서 SUMF1 유전자에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 프로비덴시아 스투아르티 중의, 예를 들어 COG0641을 포함한, 설파타제 성숙 효소 AsIB, 라디칼 SAM 상과, 추정 철-황 개질제 단백질에 대한 유전자에 상응하는 100 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 70 뉴클레오타이드 길이이고, 예를 들어, N296_1760을 포함한, 슈도모나스 에어루기노사에서 나선 희전 나선 도메인 단백질에 대한 유전자에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스 중의 cdaR 유전자에 상응하며 85 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 66 뉴클레오타이드 길이이고 스트렙토코쿠스 아갈락티아에서 SIP 유전자에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 105 뉴클레오타이드 길이이고 칸디다 알비칸스에서 IPT1 유전자에 상응하는 앰플리콘을 증폭시키는, 적어도 5개의 어세이들 중의 한 어세이를 포함한다.

[0007] 또 다른 양태에서, 생물학적 샘플에서 적어도 하나의 표적 핵산의 존재 또는 부재를 결정하기 위한 조성물이 제공되고, 상기 조성물은 적어도 5개의 상이한 증폭 프라이머 쌍으로, 여기서 상기 쌍의 각각의 상기 프라이머는 표 1의 표적 미생물의 핵산 서열의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적절한 조건 하에서 상기 프라이머 쌍은 앰플리콘을 생성하는, 프라이머 쌍; 및 상기 프라이머 쌍에 의해 생성된 상기 앰플리콘의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 적어도 5개의 검출 프로브를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 조성물은 복수의 상이한 핵산 표적 서열을 포함하는 대조 핵산 분자를 추가로 포함하고, 상기 복수의 상이한 핵산 표적 서열은 표 1의 적어도 5개의 유전자에 특이적이다. 일 실시형태에서, 본 조성물은 어세이들의 패널 또는 컬렉션이다. 일 실시형태에서, 어세이들의 패널 또는 컬렉션은 TaqMan 어세이들의 패널 또는 컬렉션을 포함한다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 요로 감염과 연관된 미생물에 대한 바이오마커이다. 일 실시형태에서, 본 조성물은 고형 담체(support)를 포함한다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 5개의 증폭 프라이머 쌍은 고형 담체 상의 위치에 의해 분리된다. 일 실시형태에서, 본 조성물은 적어도 10개의 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함하며, 상기 증폭 프라이머 쌍의 각각의 프라이머는 표 1의 표적 미생물의 핵산 서열의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적합한 조건 하에서 상기 프라이머 쌍은 앰플리콘을 생성한다. 일 실시형태에서, 본 조성물은 적어도 15개의 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함하며, 상기 증폭 프라이머 쌍의 각각의 프라이머는 표 1의 표적 미생물의 핵산 서열의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적합한 조건 하에서 상기 프라이머 쌍은 앰플리콘을 생성한다. 일 실시형태에서, 본 조성물은 적어도 17개의 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함하며, 상기 쌍의 각각의 상기 프라이머는 표 1의 표적 미생물의 핵산 서열의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적절한 조건 하에서 상기 프라이머 쌍은 앰플리콘을 생성한다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 아시네토박터 바우마니에 대해 특이적이고 아시네토박터 바우마니 게놈의 뉴클레오타이드 202100-202800에 해당

하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GG704574.1의 701 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 사이트로박터 프룬디에 대해 특이적이고 사이트로박터 프룬디 게놈의 뉴클레오타이드 137400-138200에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_ANAV01000004.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 사이트로박터 프룬디에 대해 특이적이고 사이트로박터 프룬디 게놈의 뉴클레오타이드 277000-277800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_ANAV01000001.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 클렙시엘라 에어로게네스 (이전에 엔테로박터 에어로게네스로 알려짐)에 대해 특이적이고 클렙시엘라 에어로게네스 (이전에 엔테로박터 에어로게네스로 알려짐) 게놈의 뉴클레오타이드 1158600-1159400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP014748.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 엔테로박터 클로아케에 대해 특이적이고 엔테로박터 클로아케 게놈의 뉴클레오타이드 3274000-3274800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP008823.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 엔테로코쿠스 파에칼리스에 대해 특이적이고 엔테로코쿠스 파에칼리스 게놈의 뉴클레오타이드 1769100-1769900에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 HF558530.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 엔테로코쿠스 패슘에 대해 특이적이고 엔테로코쿠스 패슘 게놈의 뉴클레오타이드 17300-18100에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GL476131.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 에스케리치아 콜라이에 대해 특이적이고 에스케리치아 콜라이 게놈의 뉴클레오타이드 4336000-4336700에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP015843.2의 701 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 클렙시엘라 옥시토카에 대해 특이적이고 클렙시엘라 옥시토카 게놈의 뉴클레오타이드 2851700-2852600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP020358.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 클렙시엘라 뉴모니에에 대해 특이적이고 클렙시엘라 뉴모니에 게놈의 뉴클레오타이드 209000-2090800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP007727.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 모르가넬라 모르가니에 대해 특이적이고 모르가넬라 모르가니 게놈의 뉴클레오타이드 375800-376600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP004345.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 프로테우스 미라빌리스에 대해 특이적이고 프로테우스 미라빌리스 게놈의 뉴클레오타이드 580200-581000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP017082.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 일 실시형태에서, 본 조성물은 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 중합효소는 열안정적이다. 일부 실시형태에서, 본 중합효소는 Taq DNA 중합효소이다. 일 실시형태에서, 본 조성물의 검출 프로브는 TaqMan 프로브 또는 5'뉴클레아제 프로브이다.

[0008] 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 프로테우스 불가리스에 대해 특이적이고 프로테우스 불가리스 게놈의 뉴클레오타이드 10200-102800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 JPIX01000006.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 프로비덴시아 스투아르티이에 대해 특이적이고 프로비덴시아 스튜아르티 게놈의 뉴클레오타이드 493000-493800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_DS607663.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 슈도모나스 에어루기노사에 대해 특이적이고 슈도모나스 에어루기노사 게놈의 뉴클레오타이드 1857600-1858400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP006831.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스에 대해 특이적이고 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스 게놈의 뉴클레오타이드 200400-201000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AP008934.1의 601 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 스트렙토코쿠스 아갈락티아에에 대해 특이적이고 스트렙토코쿠스 아갈락티아 게놈의 뉴클레오타이드 41000-41600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP010319.1의 601 핵산 서열 내에 있다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 표적 핵산은 칸디다 알비칸스에 대해 특이적이고 칸디다 알비칸스 게놈의 뉴클레오타이드 800-1500에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AY884203.1의 701 핵산 서열 내에 있다.

[0009] 또 다른 양태에서, 복수의 증폭 반응을 평가하기 위한 핵산 작제물이 제공되며, 본 핵산 작제물은 복수의 상이한 핵산 표적 서열을 포함하는 대조 핵산 분자를 포함하고, 상기 복수의 표적 핵산 서열은 DNA 플라스미드 안으로 삽입된 표 1의 적어도 5개의 유전자에 대해 지향된다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 상기 복수의 표적 핵산 서열은 DNA 플라스미드 내 표 1의 적어도 10개의 유전자에 대해 지향된다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 상기 복수의 표적 핵산 서열은 DNA 플라스미드 내 표 1의 적어도 15개의 유전자에 대해 지향된다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 상기 복수의 표적 핵산 서열은 DNA 플라스미드 내 표 1의 각각의 유전자에 대해 지향된다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 아시네토박터 바우마니에 대한 표적 핵산 서열은 아시네토박터 바우마니 게놈

의 뉴클레오타이드 202100-202800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GG704574.1의 701 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 사이트로박터 프룬디에 대한 표적 핵산 서열은 사이트로박터 프룬디 게놈의 뉴클레오타이드 137400-138200에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_ANAV01000004.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 사이트로박터 프룬디에 대한 표적 핵산 서열은 사이트로박터 프룬디 게놈의 뉴클레오타이드 277000-277800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_ANAV01000001.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 클렙시엘라 에어로게네스 (이전에 엔테로박터 에어로게네스로 알려짐)에 대한 표적 핵산 서열은 클렙시엘라 에어로게네스 (이전에 엔테로박터 에어로게네스로 알려짐) 게놈의 뉴클레오타이드 1158600-1159400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP014748.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 엔테로박터 클로아케에 대한 표적 핵산 서열은 엔테로박터 클로아케 게놈의 뉴클레오타이드 3274000-3274800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP008823.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 엔테로코쿠스 파에칼리스에 대한 표적 핵산 서열은 엔테로코쿠스 파에칼리스 게놈의 뉴클레오타이드 1769100-1769900에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 HF558530.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 엔테로코쿠스 패슘에 대한 표적 핵산 서열은 엔테로코쿠스 패슘 게놈의 뉴클레오타이드 17300-18100에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GL476131.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 에스케리치아 콜라이에 대한 표적 핵산 서열은 에스케리치아 콜라이 게놈의 뉴클레오타이드 4336000-4336700에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP015843.2의 701 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 클렙시엘라 옥시토카에 대한 표적 핵산 서열은 클렙시엘라 옥시토카 게놈의 뉴클레오타이드 2851700-2852600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP020358.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 클렙시엘라 뉴모니에에 대한 표적 핵산 서열은 클렙시엘라 뉴모니에 게놈의 뉴클레오타이드 209000-2090800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP007727.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 모르가넬라 모르가니에 대한 표적 핵산 서열은 모르가넬라 모르가니 게놈의 뉴클레오타이드 375800-376600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP004345.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 프로테우스 미라빌리스에 대한 표적 핵산 서열은 프로테우스 미라빌리스 게놈의 뉴클레오타이드 580200-581000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP017082.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 프로테우스 불가리스에 대한 표적 핵산 서열은 프로테우스 불가리스 게놈의 뉴클레오타이드 10200-102800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 JPIX01000006.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 프로비덴시아 스투아르티이에 대한 표적 핵산 서열은 프로비덴시아 스투아르티이 게놈의 뉴클레오타이드 493000-493800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_DS607663.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 슈도모나스 에어루기노사에 대한 표적 핵산 서열은 슈도모나스 에어루기노사 게놈의 뉴클레오타이드 1857600-1858400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP006831.1의 801 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스에 대한 표적 핵산 서열은 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스 게놈의 뉴클레오타이드 200400-201000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AP008934.1의 601 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 스트렙토코쿠스 아갈락티아에에 대한 표적 핵산 서열은 스트렙토코쿠스 아갈락티아에 게놈의 뉴클레오타이드 41000-41600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP010319.1의 601 핵산 서열 내에 있다. 핵산 작제물의 일 실시형태에서, 칸디다 알비칸스에 대한 표적 핵산 서열은 칸디다 알비칸스 게놈의 뉴클레오타이드 800-1500에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AY884203.1의 701 핵산 서열 내에 있다.

[0010] 또 다른 양태에서, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 복수의 증폭 반응을 수행하는 단계로, 상기 증폭 반응 각각은 표 1에 제시된 유기체와 연관된 표적 핵산 서열의 그룹으로부터 상이한 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 각각 구성된 핵산 샘플 및 한 쌍의 증폭 프라이머의 부분과 해당하는 앰플리콘 크기, 영역, 및 수탁 번호를 포함하는, 단계; 증폭 반응으로부터 복수의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 단계; 및 상기 복수의 상이한 증폭 생성물 중 적어도 하나의 존재 또는 부재를 결정하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 포함하며, 상기 증폭 반응들 중 적어도 10개의 반응은 표 1에 제시된 유기체와 연관된 표적 핵산 서열의 그룹으로부터 상이한 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 각각 구성된 핵산 샘플 및 한 쌍의 증폭 프라이머의 부분과 해당하는 앰플리콘 크기, 영역, 및 수탁 번호를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 포함하며, 여기서 상기 증폭 반응의 적어도 15개는 표 1에 제시된 유기체와 연관된 표적 핵산 서열의 그룹으로부터 상이한 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 각각 구성된 핵산 샘플 및 한 쌍의 증폭 프라이머의 부분과 해당하는 앰플리콘 크기, 영역, 및 수탁 번호를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 포함하며, 여기서 음성 대조군을 제외한 모든 증폭 반응은 표 1에 제시된 유

기체 및 해당하는 앰플리콘 크기, 영역, 및 수탁 번호와 연관된 표적 핵산 서열의 그룹으로부터 상이한 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 각각 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 부분을 포함한다.

[0011] 또 다른 양태에서, (a) 복수의 증폭 반응을 수행하는 단계로, 상기 증폭 반응 중 적어도 5개는 상기 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 핵산 샘플 및 한 쌍의 증폭 프라이머의 부분을 포함하고, 각각의 표적 핵산 서열은 표 1에서 유전자의 그룹으로부터 선택된 상이한 유전자의 증폭 생성물인, 단계; (b) 복수의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 단계; 및 (c) 상기 복수의 상이한 증폭 생성물 중 적어도 하나의 존재 또는 부재를 결정하는 단계를 포함하는, 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법이 제공된다. 본 방법의 일 실시형태에서 상기 증폭 반응의 적어도 5개는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 증폭 반응의 적어도 10개는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 증폭 반응의 모두는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함한다. 본 방법은, 일부 실시형태에서, 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 포함하며, 상기 증폭 반응들 중 적어도 10개의 증폭 반응은 표 1에 열거된 유전자의 일부의 증폭 생성물인 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 일부를 포함한다. 본 방법은, 일부 실시형태에서, 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 포함하며, 상기 증폭 반응들 중 적어도 15개의 증폭 반응은 표 1에 제시된 다른 유전자의 증폭 생성물인 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 일부를 포함한다. 본 방법은, 일부 실시형태에서, 복수의 증폭 반응을 수행하는 것을 포함하며, 상기 증폭 반응들 모두는 음성 대조군을 제외하여, 표 1에 제시된 다른 유전자의 증폭 생성물인 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 샘플의 일부를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 생성물은 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이이다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 적어도 한 쌍의 상기 증폭 프라이머는 상기 해당하는 표적 핵산 서열의 일부에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 함유하는 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 적어도 한 쌍의 상기 증폭 프라이머에 대해 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리(cell-free) DNA, 순환성(circulating) DNA 또는 cDNA에 존재하는 핵산 서열에 동일하거나 상보적인 핵산 서열을 함유한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 표적 미생물의 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 또는 cDNA 내에 존재하거나 이로부터 유래된다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 표적 미생물은 표 1에 열거된 미생물이다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 생성물 형성은 10 내지 10,000개의 상이한 증폭 생성물을 병렬적으로 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 복수의 증폭 반응 중 적어도 2개 각각은 상이한 해당 표적 핵산 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 표 1에 열거된 유전자의 핵산 서열 또는 그것의 해당하는 cDNA의 일부를 함유한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 유전자는 표 1에 열거된 미생물로부터 유래된 핵산 샘플을 사용하여 모든 표 1에 열거된 유전자에 대한 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 모든 미생물 유전자에 대한 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함한다.

[0012] 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키는 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 미생물 유전자들 중 적어도 2개의 임의의 조합에 대한 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 복수의 증폭 반응 중 하나 이상은 상기 해당하는 표적 핵산 서열의 일부에 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 검출가능하게 표지된 프로브를 추가로 함유한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 증폭 반응의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 액소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성된다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 증폭 반응의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄처를 함유한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 추가로 작은 홈 결합체 (MGB) 모이어티를 함유한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응의 적어도 하나는 담체 내 또는 그 위에 존재하는 개별 반응 부위에서 일어나고, 상기 담체는 하나 이상의 개별 반응 부위를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 담체는 다중

-웰 플레이트, 미세유체 카드, 및 복수의 관통공 반응 부위를 포함하는 플레이트로부터 선택된다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 개별 반응 부위는 상기 증폭 프라이머 중 하나 이상을 포함하고, 상기 증폭시키는 단계는 추가로 상기 핵산 샘플의 일부를 상기 개별 반응 부위로 분배하는 단계를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 개별 반응 부위는 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 프로브를 함유하는 용액의 건조된 침착물(deposit)을 포함하며, 상기 프라이머 및 프로브 둘 모두는 표 1에 열거된 유전자로부터 유래된 핵산 서열을 증폭하도록 구성된다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 개별 반응 부위는 추가로 상기 핵산 샘플의 상기 부분이 상기 반응 부위로 분포되기 전 또는 후 상기 반응 부위에 분포된, 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 핵산 샘플은 소변 시료로부터 제조된다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 상기 복수의 증폭 반응을 수행하는 상기 단계 전에 소변 시료로부터 상기 핵산 샘플을 제조하는 단계를 추가로 포함한다

[0013]

또 다른 양태에서, 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 (a) 담체 내에 위치한 개별 반응 챔버에 핵산 샘플의 부분을 분배하는 단계; (b) 개별 반응 챔버에서, 각각, 병행 증폭 반응들을 수행하고 적어도 5개의 증폭 생성물을 형성하는 단계로, 여기서 각각의 증폭 반응은 미생물의 계놈 내에 존재하거나, 또는 이로부터 유래된 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유하고, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 표 1에 열거된 유전자의 핵산 서열 또는 그에 해당하는 cDNA의 부분을 함유하는, 단계; 및 (c) 상기 증폭 생성물이 상기 개별 반응 챔버 중 하나 이상에서 형성되었는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응의 적어도 5개는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응의 적어도 10개는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응의 적어도 15개는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응의 모두는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 적어도 10개의 증폭 생성물은 병행 증폭 반응들 동안 형성된다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 적어도 15개의 증폭 생성물은 병행 증폭 반응들 동안 형성된다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 적어도 17개의 증폭 생성물은 병행 증폭 반응들 동안 형성된다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 생성물은 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이이다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 결정하는 단계는, 선택적으로 실시간으로, 상기 증폭 생성물에 검출가능하게 표지된 프로브의 혼성화를 검출하는 단계를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 적어도 한 쌍의 상기 증폭 프라이머는 상기 해당하는 표적 핵산 서열의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 함유하는 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 적어도 한 쌍의 상기 증폭 프라이머에 대한 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 계놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 또는 cDNA에 존재하는 핵산 서열에 동일하거나 상보적인 핵산 서열을 함유한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 표적 미생물의 계놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 또는 cDNA 내에 존재하거나 또는 이로부터 유래된다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 미생물은 표 1에 열거된 미생물이다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 생성물 형성은 10 내지 10, 000개의 상이한 증폭 생성물을 병렬적으로 형성하는 것을 포함한다.

[0014]

샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하기 위한 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응의 적어도 2개 각각은 상이한 해당 표적 핵산 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 유전자는 표 1에 열거된 미생물 내에 존재한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 각각의 상기 증폭 반응은 표 1에 열거된 유전자의 적어도 일 부분을 증폭하도록 구성된 증폭 프라이머를 함유한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 유전자의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 함유하는 하나 이상의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 각각의 상기 복수의 증폭 반응은 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이인 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 증폭 프라이머들의 세트를 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 미생물로부터 유래된 핵산 샘플을 사용하여 표 1에 열거된 모든 유전자에 대해 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 미생물 유전자 모두에 대해 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 증폭 생성물 형성은 표 1에 열거된 미생물 유전자들 중 적어도 2개의 임의의 조합에 대한 별도의 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 복수의 상기 증폭 반응 중 하나 이상은 해당하는 표적 핵산 서열의 부분에 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 검출가능하게 표지된 프로브를 추가로 함유한다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 증폭 반응의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성된다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 증폭 반응의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는, 그것의 5'

말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄처를 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 작은 홈 결합제 (MGB) 모이어티를 추가로 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 증폭 반응의 적어도 하나는 담체 내 또는 그 위에 존재하는 개별 반응 부위에서 일어나고, 상기 담체는 하나 이상의 개별 반응 부위를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 담체는 다중-웰 플레이트, 미세유체 카드, 및 복수의 관통공 반응 부위를 포함하는 플레이트로부터 선택된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 개별 반응 부위는 상기 증폭 프라이머 중 하나 이상을 포함하고, 상기 증폭시키는 단계는 핵산 샘플의 부분을 상기 개별 반응 부위에 분배하는 단계를 추가로 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 개별 반응 챔버는 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 프로브를 함유하는 용액의 진조된 침착물을 포함하며, 여기서 상기 프라이머 및 프로브 둘 모두는 표 1에 열거된 유전자로부터 유래된 핵산 서열을 증폭하도록 구성된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 개별 반응 챔버는 상기 핵산 샘플의 상기 부분이 상기 반응 부위에 분포되기 전 또는 후에 개별 반응 챔버에 분포된, 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 핵산 샘플은 소변 시료로부터 제조된다. 일 실시형태에서, 본 방법은 상기 분배하는 단계 전에 소변 시료로부터 상기 핵산 샘플을 제조하는 단계를 추가로 포함한다.

[0015]

또 다른 양태에서, 핵산 증폭용 담체가 제공되며, 상기 담체는 상기 담체 내에 또는 상기 담체의 표면 상에 위치한 복수의 반응 부위를 포함하는 담체; 및 (1) 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 증폭 프라이머 쌍으로, 여기서 상기 증폭 생성물은 표 1의 미생물에 상응하는, 증폭 프라이머 쌍, 및 (2) 상기 증폭 생성물에 혼성화하도록 구성된 검출가능하게 표지된 프로브를 함유하는 적어도 5개의 상기 반응 부위를 포함하고; 여기서 각각의 적어도 5개의 상기 반응 부위는 해당하는 검출가능하게 표지된 프로브와 함께 상이한 증폭 프라이머 쌍을 함유한다. 일 실시형태에서, 본 담체는 적어도 10개의 상기 반응 부위를 포함하며, 여기서 각각의 적어도 10개의 상기 반응 부위는 해당하는 검출가능하게 표지된 프로브와 함께 상이한 증폭 프라이머 쌍을 함유한다. 일 실시형태에서, 본 담체는 적어도 15개의 상기 반응 부위를 포함하며, 여기서 각각의 적어도 15개의 상기 반응 부위는 해당하는 검출가능하게 표지된 프로브와 함께 상이한 증폭 프라이머 쌍을 함유한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 증폭 생성물은 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이이다. 본 담체의 일 실시형태에서, 각각의 상기 반응 부위는 표 1로부터 선택된 유전자 또는 표 1에 열거된 유전자의 핵산 유도체 중 적어도 일부를 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 프로브를 함유한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 각각의 상기 반응 부위는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 프로브를 함유한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 반응 부위의 증폭 프라이머 쌍은 상기 해당하는 표적 핵산 서열의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 함유하는 프라이머를 포함한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 또는 cDNA에 존재하는 핵산 서열에 동일하거나 상보적인 핵산 서열을 함유한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 표적 미생물은 표 1로부터 선택된다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 반응 부위 중 2종 이상은 동일한 핵산 샘플의 부분을 함유한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 핵산 샘플은 소변 시료로부터 유래된다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 반응 부위 중 적어도 하나는 증폭 생성물을 포함한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 반응 부위의 상기 증폭 생성물은 표 1에 열거된 유전자의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 포함한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 담체는 상이한 증폭 생성물을 함유하는 10 내지 10, 000개의 반응 부위를 포함한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 담체는 표 1에 열거된 모든 유전자에 동일하거나 상보적인 증폭 생성물을 함유하는 반응 부위를 포함한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 반응 부위의 적어도 2개 각각은 상이한 해당 표적 핵산 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 표 1에 열거된 유전자의 핵산 서열 또는 그것의 해당하는 cDNA의 일부를 함유한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 복수의 반응 부위는 표 1에 열거된 미생물로부터 유래된 핵산 샘플을 사용하여 표 1에 열거된 모든 유전자에 대한 증폭 생성물을 포함한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 복수의 반응 부위는 표 1에 열거된 적어도 2개의 미생물로부터 유래된 핵산 샘플을 사용하여 표 1에 열거된 유전자들 중 적어도 2개의 임의의 조합에 대한 증폭 생성물을 포함한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 반응 부위의 적어도 하나의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성된다. 본 담체의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 상기 반응 부위의 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄처를 함유한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 작은 홈 결합제 (MGB) 모이어티를 추가로 함유한

다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 담체는 다중-웰 플레이트, 미세유체 카드, 및 복수의 관통공 반응 부위를 포함하는 플레이트로부터 선택된다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 개별 반응 부위 중 하나 이상은 상기 증폭 프라이머의 쌍 및 상기 검출가능하게 표지된 프로브를 함유하는 용액의 견조된 침착물을 포함한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 개별 반응 부위는 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 개별 반응 부위 중 하나 이상은 상기 증폭 프라이머의 쌍, 상기 검출가능하게 표지된 프로브, 중합효소, 및 뉴클레오타이드를 포함하는 동결건조된 조성물을 함유한다. 본 담체의 일 실시형태에서, 상기 증폭 프라이머 쌍 및 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 표 1에 열거된 어세이 중 하나로부터 유래한다.

[0016]

또 다른 양태에서, 생물학적 샘플에서 표 1에 열거된 미생물 중 하나 이상으로부터 적어도 하나의 표적 핵산의 존재 또는 부재를 결정하는 조성물이 제공되며, 상기 조성물은 (a) 적어도 하나의 증폭 프라이머 쌍으로, 여기서 상기 쌍의 각각의 상기 프라이머는 상기 표적 핵산의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고 그리고 적절한 조건 하에서 상기 프라이머 쌍은 표 1의 유전자로부터의 앰플리콘을 생성하는, 증폭 프라이머 쌍; 및 (b) 상기 프라이머 쌍에 의해 생성된 상기 앰플리콘의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 적어도 하나의 검출 프로브를 포함한다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 상기 앰플리콘은 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이이다. 일 실시형태에서, 본 조성물은 표 1에 열거된 적어도 하나의 어세이를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 조성물은 바이오마커들의 패널을 검출하기 위한 뉴클레오타이드 프로브들의 세트를 포함하고; 상기 프로브는 유전자 그룹의 DNA 및/또는 RNA 서열에 상보적이고; 상기 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들의 임의의 조합으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 상기 프로브 세트는 1 내지 17개의 상이한 프로브로 구성된다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 상기 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들로부터 선택된 5개의 상이한 유전자로 구성된다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 샘플에서 적어도 5개(5)의 상이한 표적 핵산이 증폭 및 검출되며, 상기 표적 핵산은 표 1에 열거된 5개(5)의 상이한 미생물로부터의 것이다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 상기 5개의 표적 핵산은 표 1에 열거된 상기 5개의 상이한 미생물의 각각에 대해 열거된 어세이를 사용하여 증폭되고 검출된다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 상기 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들로부터 선택된 10개의 상이한 유전자로 구성된다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 샘플에서 적어도 10개(10)의 상이한 표적 핵산이 증폭 및 검출되며, 상기 표적 핵산은 표 1에 열거된 10개(10)의 상이한 미생물로부터의 것이다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 상기 10개의 표적 핵산은 표 1에 열거된 상기 10개의 상이한 미생물의 각각에 대해 열거된 어세이를 사용하여 증폭되고 검출된다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 상기 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들로부터 선택된 15개의 상이한 유전자로 구성된다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 샘플에서 적어도 15개(15)의 상이한 표적 핵산이 증폭 및 검출되며, 상기 표적 핵산은 표 1에 열거된 15개(15)의 상이한 미생물로부터의 것이다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 상기 15개의 표적 핵산은 표 1에 열거된 상기 15개의 상이한 미생물의 각각에 대해 열거된 어세이를 사용하여 증폭되고 검출된다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 상기 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들로부터 선택된 17개의 상이한 유전자로 구성된다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 샘플에서 적어도 17개(17)의 상이한 표적 핵산이 증폭 및 검출되며, 상기 표적 핵산은 표 1에 열거된 17개(17)의 상이한 미생물로부터의 것이다. 본 조성물의 일 실시형태에서, 상기 17개의 표적 핵산은 표 1에 열거된 상기 17개의 상이한 미생물의 각각에 대해 열거된 어세이를 사용하여 증폭되고 검출된다. 일 실시형태에서, 본 조성물은 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 중합효소는 열안정성이다. 일부 실시형태에서, 본 중합효소는 Taq DNA 중합효소이다. 일 실시형태에서, 본 조성물의 검출 프로브는 TaqMan 프로브 또는 5'뉴클레아제 프로브이다.

[0017]

또 다른 양태에서, 생물학적 샘플과 연관된 바이오마커들의 패널을 프로파일링하는 방법이 제공되며 상기 방법은 (a) 대상체로부터 상기 생물학적 샘플을 수득하는 단계; (b) 적어도 5개의 개별 증폭 반응과 상기 샘플의 적어도 일부분을 접촉시키는 단계로, 각각의 상기 개별 반응은 표적-특이적 프라이머들의 세트 및 중합효소를 포함하는, 단계; (c) 증폭된 생성물을 생성할 수 있는 증폭 조건 하에서 개별 반응 당 적어도 하나의 표적 서열을 증폭시키는 단계; (c) 각각의 상기 복수의 개별 반응을 상기 표적-특이적 프라이머에 의해 생성된 상기 증폭된 생성물에 대해 특이적인 검출가능하게 표지된 프로브와 접촉시키는 단계; (d) 상기 생물학적 샘플에 대한 바이오마커 프로파일에 도달하도록 각각의 상기 복수의 개별 증폭 반응에서 상기 증폭된 생성물의 존재 또는 부재를 결정하는 단계로, 여기서 상기 바이오마커는 표 1에 열거된 유전자와 연관되는, 단계를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 적어도 10개의 개별 증폭 반응은 상기 샘플의 적어도 일부분에 의해 접촉된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 적어도 15개의 개별 증폭 반응은 상기 샘플의 적어도 일부분에 의해 접촉된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 적어도 17개의 개별 증폭 반응은 상기 샘플의 적어도 일부분에 의해 접촉된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 바이오마커는 비뇨생식기 감염 및/또는 미생물총과 연관된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 패널은 1 내지 17개의 상이한 바이오마커들의 세트를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 상기 복수의 개별

증폭 반응은 고형 담체 상에 있다. 본 방법의 일 실시형태에서, 각각의 상기 복수의 개별 증폭 반응은 표 1로부터 선택된 단일 어세이를 포함한다. 또 다른 양태에서, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법이 제공되고, 상기 방법은 복수의 증폭 반응을 병렬적으로 수행하는 단계로, 상기 복수의 증폭 반응 각각은 샘플의 부분 및 대조 핵산 분자에서 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하고, 여기서 상기 대조 핵산 분자는 복수의 상이한 표적 서열을 함유하는, 단계; 대조 핵산 분자에서 적어도 2개의 상이한 표적 서열에 해당하는 복수의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 단계; 및 증폭 반응에서 적어도 2개의 상이한 증폭 생성물의 존재를 결정하는 단계를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 상이한 미생물로부터 적어도 5개의 상이한 표적 서열을 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 상이한 미생물로부터 적어도 10개의 상이한 표적 서열을 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 상이한 미생물로부터 적어도 15개의 상이한 표적 서열을 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 상이한 미생물로부터 모든 상이한 표적 서열을 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 복수의 상이한 표적 서열은 표 1에 제시된 상이한 미생물의 계놈 또는 전사체 서열로부터 유래된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 복수의 상이한 표적 서열은 표 1로부터 선택된 임의의 수의 미생물 유전자로부터 유래된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 증폭 생성물 형성은 5 내지 100개의 상이한 증폭 생성물을 병렬적으로 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 증폭 생성물 형성은 10 내지 50개의 상이한 증폭 생성물을 병렬적으로 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된, 증폭 프라이머들의 적어도 한 쌍은 해당하는 표적 서열의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 함유하는 프라이머를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 복수의 증폭 반응 중 적어도 2개 각각은 상이한 해당 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 다수 중 하나 이상의 증폭 반응은 해당하는 표적 서열의 부분에 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 검출가능하게 표지된 프로브를 추가로 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄처를 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 DNA 플라스미드이다. 본 방법의 일 실시형태에서, DNA 플라스미드는 선형이다. 일 실시형태에서, 본 방법은 증폭 반응을 수행하기 전에 세포로부터 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플을 제조하는 단계를 추가로 포함한다.

[0018]

또 다른 양태에서, 대조 핵산 분자를 함유하는 샘플에서 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법이 제공되고, 상기 방법은 복수의 반응 체적부들 안으로 샘플을 분배하는 단계로, 대조 핵산 분자는 복수의 상이한 표적 서열을 함유하고, 반응 체적부들은 대조 핵산 분자에서 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 적어도 2개의 상이한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 단계; 반응 체적부들에서 증폭 반응을 수행하고 대조 핵산 분자에서 적어도 2개의 상이한 표적 서열에 해당하는 복수의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 단계; 및 증폭 반응에서 적어도 2개의 상이한 증폭 생성물의 존재를 결정하는 단계를 포함한다.

[0019]

또 다른 양태에서, 복수의 증폭 반응을 평가하는 방법이 제공되는 바, 이 방법은 복수의 상이한 표적 서열을 함유하는 대조 핵산 분자를 함유하는 핵산 샘플의 부분들을 담체 내에 또는 위에 위치한 개별 반응 챔버들에 분포시키고; 개별 반응 챔버에서, 복수의 병행 증폭 반응들을 수행하며, 대조 핵산 분자 중의 적어도 2개의 상이한 표적 서열에 해당하는 복수의 상이한 표적 증폭 생성물을 형성하고, 여기서 각각의 증폭 반응은 대조 핵산 분자 내에 존재하는 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하고, 증폭 반응들 중 적어도 2개의 증폭 반응은 대조 핵산 분자 내에 존재하는 상이한 해당 표적 서열을 증폭하도록 구성된 증폭 프라이머를 포함함; 및 적어도 2개의 개별 반응 챔버에서 형성된 적어도 2개의 상이한 표적 증폭 생성물을 정량화하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 대조 핵산 분자의 연속 희석물인 샘플들의 세트를 사용하여 수행된다. 일 실시형태에서, 본 방법은 연속으로 희석된 대조 핵산 분자로부터 정량화된 표적 증폭 생성물에 기초한 적어도 하나의 대조 핵산 분자 표적 서열에 대한 검출 한계를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 연속으로 희석된 대조 핵산 분자로부터 정량화된 표적 증폭 생성물에 기초한 적어도 하나의 대조 핵산 분자 표적 서열에 대한 동적 범위를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 정량화하는 단계는 선택적으로 실시간으로 증폭 생성물에 대한 검출가능하게 표지된 프로브의 혼성화를 검출하는 단계를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 5개의 상이한 표적 서열을 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 10개의 상이한 표적 서열을 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 15개의 상이한 표적 서열을 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 10개의 상이한 표적 서열을 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 복수의 표적 서

열은 표 1의 상이한 미생물의 계놈 서열로부터 유래된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 증폭 생성물 형성은 5 내지 100개의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 증폭 생성물 형성은 1 내지 17개의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 다수 중 하나 이상의 증폭 반응은 해당하는 표적 서열의 부분에 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 검출가능하게 표지된 프로브를 추가로 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄쳐를 함유한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 개별 반응 챔버는 샘플의 부분이 반응 챔버에 분포되기 전 또는 후에 개별 반응 챔버에 분포된 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 DNA 플라스미드이다. 본 방법의 일 실시형태에서, DNA 플라스미드는 선형이다.

[0020] 또 다른 양태에서, 복수의 상이한 증폭 표적 서열을 포함하는 핵산 작제물이 제공되며, 여기서 적어도 2개의 증폭 표적 서열은 표 1로부터 선택된 유전자 또는 그것의 해당하는 cDNA의 적어도 56개의 뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 또 다른 양태에서, 복수의 상이한 증폭 표적 서열을 포함하는 핵산 작제물이 제공되며, 여기서 적어도 2개의 증폭 표적 서열은 표 1로부터 선택된 적어도 2개의 상이한 미생물 또는 미생물 유전자로부터 유래된다.

[0021] 또 다른 양태에서, 담체 내에 또는 담체 상에 위치한 복수의 반응 부위를 포함하는 담체를 포함하는, 핵산 증폭 용 어레이가 제공되고; 각각의 복수의 반응 부위는 (i) 복수의 상이한 표적 서열을 함유하는 대조 핵산 분자, (ii) 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 증폭 프라이머 쌍, 및 (iii) 적어도 하나의 쌍의 증폭 프라이머의 연장에 의해 생성된 핵산 서열에 혼성화하도록 구성된 검출가능하게 표지된 프로브를 함유한다. 어레이의 일 실시형태에서, 적어도 2개의 상이한 표적 서열은 표 1로부터 선택된 유전자 또는 그것의 해당하는 cDNA의 적어도 56개의 뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 어레이의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 5개의 상이한 표적 서열을 포함한다. 어레이의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 10개의 상이한 표적 서열을 함유한다. 어레이의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 15개의 상이한 표적 서열을 함유한다. 어레이의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 모든 상이한 표적 서열을 함유한다. 어레이의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 10,000개의 반응 부위를 포함한다. 어레이의 일 실시형태에서, 적어도 2개의 반응 부위 각각은 상이한 해당 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유한다. 어레이의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 반응 부위의 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성된다. 어레이의 일 실시형태에서, 적어도 하나의 반응 부위의 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄쳐를 함유한다. 어레이의 일 실시형태에서, 검출 가능하게 표지된 프로브는 작은 흠 결합체 모이어티를 추가로 함유한다. 어레이의 일 실시형태에서, 본 담체는 다중-웰 플레이트, 미세유체 카드, 및 복수의 관통공 반응 부위를 포함하는 플레이트로부터 선택된다. 어레이의 일 실시형태에서, 복수의 반응 부위는 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.

[0022] 또 다른 양태에서, 복수의 반응 체적부들 안으로 대조 핵산 분자 및 테스트 핵산 샘플 둘 모두를 분배하는 단계로, 대조 핵산 분자는 복수의 상이한 표적 서열을 포함하고 테스트 핵산 샘플은 하나 이상의 테스트 핵산 분자를 포함하는, 단계; 본 반응 체적부들을 핵산 증폭 조건으로 하고 증폭 프라이머의 쌍을 사용하여 반응 체적부들에서 대조 핵산 분자의 적어도 2개의 상이한 표적 서열을 증폭시키는 단계로, 각각의 증폭 프라이머의 쌍은 대조 핵산 분자에서 상이한 표적 서열을 증폭하기 위해 사용되는, 단계; 반응 체적부들에서 적어도 2개의 상이한 증폭된 표적 서열의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 복수의 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법이 제공된다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 원형이다. 본 방법의 일 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 선형이다. 일 실시형태에서, 본 방법은 상이한 반응 체적부들에 대조 핵산 분자 및, 테스트 핵산 샘플로부터의 테스트 핵산 분자를 분배하는 단계를 추가로 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 테스트 핵산 샘플은 또한 그 각각이 상이한 표적 서열을 함유하는, 2개 또는 그 초과의 상이한 표적 핵산 분자를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 증폭 프라이머의 쌍을 사용하여 반응 체적부들에서 테스트 핵산 샘플의 적어도 2개의 상이한 표적 서열을 증폭시키는 단계를 추가로 포함하며, 각각의 증폭 프라이머의 쌍은 표적 핵산 샘플에서 상이한 표적 서열을 증폭하기 위해 사용된다.

[0023] 또 다른 양태에서, 생물학적 샘플에서 요로병원체의 존재를 검출하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 표 1로부터

선택된 적어도 하나의 어세이의 사용을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 표 1로부터 선택된 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 바람직하게는, 적어도 17개의 어세이의 사용을 포함한다. 일부 실시형태에서, 요로병원체의 존재를 검출하는 방법은 본원에서 기재된 바와 같이, 복수의 핵산 표적 서열을 합성 및/또는 증폭시키는 방법의 사용을 포함한다. 일부 실시형태에서, 합성 및/또는 증폭시키는 방법은 PCR을 포함한다. 일부 실시형태에서, PCR은 qPCR이다. 일부 실시형태에서, 합성 및/또는 증폭시키는 단계는 고형 담체, 예컨대 TaqMan 오픈어레이 (OpenArray) 상에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플에서 요로병원체의 존재를 검출하는 qPCR 방법은 전통적 배양-기반 방법을 사용하여 수득된 결과보다 적어도 2x 더 정확한 및/또는 민감한 결과를 제공한다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플에서 요로병원체의 존재를 검출하는 qPCR 방법은 전통적 배양-기반 방법을 사용하여 수득된 결과보다 적어도 3x 더 정확한 및/또는 민감한 결과를 제공한다. 일부 실시형태에서, 검출하는 방법의 정확도 및/또는 민감도는 생거(Sanger) 서열분석 방법을 사용하여 확인된다.

도면의 간단한 설명

[0024]

임의의 특정 요소 또는 동작의 논의를 용이하게 식별하기 위해, 참조 번호에서 가장 중요한 숫자 또는 숫자들은 그 요소가 처음 도입되는 도면 번호를 참조한다.

도 1은 일부 실시형태에 따른 복수의 핵산 서열을 증폭시키기 위한 작업흐름(100)을 예시한다.

도 2는 일부 실시형태에 따른 반응 용기(200)를 예시한다.

도 3은 일부 실시형태에 따른 핵산 샘플에서 복수의 핵산 서열을 증폭시키기 위한 방법(300)을 예시한다.

도 4는 표시된 바와 같은 다양한 농도에서 템플레이트로서 선형화된 대조 DNA 플라스미드(즉, 슈퍼플라스미드) 샘플을 사용하여 17개의 UTM 어세이(어세이의 목록을 나타내는 표 1 참조) 및 2개의 대조 어세이(RNaseP 및 Xeno)의 패널에 대한 연속 희석 데이터를 도시한다.

도 5는 하위-어레이 ($5 \mu l$) 당 또는 관통공 (33nl) 당 PCR 반응인, 모액의 맥락에서 복제/ μl 를 제시하는 대안적인 방식을 예시한다.

도 6은 다양한 농도에서 템플레이트로서 선형화된 대조 DNA 플라스미드(즉, 슈퍼플라스미드) 샘플을 사용하여 17개의 UTM 어세이(어세이의 목록을 나타내는 표 1 참조) 및 2개의 대조 어세이(RNaseP 및 Xeno)의 패널에 대한 연속 희석 어세이들의 R-자승 및 기울기를 요약하는 실험 결과를 나타낸다.

도 7은 다양한 농도에서 템플레이트로서 선형화된 대조 DNA 플라스미드(즉, 슈퍼플라스미드) 샘플을 사용하여 표 1에 열거된 17개의 미생물의 그룹으로부터 선택된 9개의 상이한 표적의 패널에 대해 지향된 어세이에 대한 검출의 한계 및 동적 범위에 대한 그래픽 결과를 도시한다. 각각의 그래프에서, X-축은 템플레이트 농도의 \log_{10} 을 나타내고 Y-축은 PCR Ct 값을 나타낸다.

도 8은 ATCC gDNA 포괄성 패널에 대한 17개의 UTM 어세이(어세이의 목록에 대해 표 1 참고)의 정확도 및 특이성을 평가하는 실험 결과를 예시한다.

도 9는 ATCC gDNA 배타성 패널에 대한 17개의 UTM 어세이(어세이의 목록에 대해 표 1 참고)의 정확도 및 특이성을 평가하는 실험 결과를 예시한다.

도 10은 본원에서 기재된 바와 같은 qPCR UTM 어세이 또는 배양물-기반 방법을 사용하여 주어진 요로병원체에 대해 양성으로 확인된 샘플의 수를, 115개 소변 샘플의 컬렉션으로부터 예시한다.

도 11은 qPCR UTM 검정(검정의 목록에 대해 표 1 참고)을 사용하여 17개의 소변 샘플의 정확도 및 특이성을 평가하는 실험 결과를 예시한다. 소변 시료는 본원에서 기재된 바와 같은 qPCR UTM 어세이 또는 전통적 배양 방법을 사용하여 분석되었다. qPCR에 대한 양성 결과는 평균 Ct 값(3중으로 수행된 검정 경우)으로 나타나고 양 어두운 및 회색 강조된 정사각형에 의해 표시되어 있다. 배양에 대한 양성 결과는 어두운 회색 강조된 정사각형에 의해 표시되어 있다.

도 12는 음성 또는 확정적이지 않은 배양 성장을 갖는 샘플에 대한 양성 OpenArray™ 결과를 확인하기 위한 생거 서열분석에 의한 소변 샘플의 칙교 시험을 도시한다.

도 13a 및 13b는 본원에서 기재된 바와 같은 qPCR UTM 어세이에 의해 시험된 샘플 대 전통적 배양 방법에 의해 분석된 샘플 간의 일치 수를 예시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 미생물의 선택 세트들의 증폭 및 특성규명을 위한 방법, 조성물, 및 키트에 관한 것이다. 예를 들어, 본원에 개시된 실시형태는 비뇨생식기, 방광, 및 요로 미생물군집 구성성분 및 역학을 검출 및/또는 모니터링하기 위한 방법, 조성물, 및 키트를 제공한다.
- [0026] 본원에 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 광범위한 박테리아, 진균, 원생동물, 및 바이러스를 포함한, 비뇨기 균총의 건강한 병원성 미생물의 검출에 이용될 수 있다.
- [0027] 본원에 제공된 방법, 조성물, 및 키트는 박테리아성 및 진균성 방광 및 요로 감염(UTI)과 연관된 병원체 및 미생물총의 검출에 사용될 수 있다. 본 방법으로부터의 결과 및 조성물은 피검사 샘플을 수득한 개체에 적합한 치료 요법(들)을 결정하는 데 사용될 수 있다. 본원에 제공된 방법 및 조성물은, 추가로, 개체를 치료하는 동안 및 치료한 후에 미생물총 조성물 및/또는 역학을 모니터링하는 데 사용될 수 있다.
- [0028] 미생물 핵산은 샘플을 다중 개별 증폭 반응을 거치도록 함으로써 샘플에서 검출될 수 있는데, 그 각각의 반응은 표적 미생물 핵산의 적어도 일부에 대해 특이적이도록 설계된 한 쌍의 증폭 프라이머를 가지고, 프라이머에 의해 증폭된 표적 서열에 대해서 검출 가능하게 표지되는 프로브를 특정하면서 수행된다. 일부 양태에서, 본원에서 개시된 바와 같은 다중 개별 증폭 반응은 증폭 프라이머 및 검출기 프로브가 설계 또는 구성된 각각의 미생물에 대한 개별 증폭 생성물을 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 개별 증폭 반응으로부터의 표적화된 증폭 생성물의 존재 또는 부재(+ 또는 -)를 결정함으로써 샘플의 미생물 프로파일에 도달한다. 일부 실시형태에서, 각각이 상이한 표적화된 증폭 생성물을 포함하는 복수의 개별 증폭 반응은 동시에 분석되어 주어진 샘플의 미생물 프로파일에 도달한다.
- [0029] 검출 어세이는 미생물 종-특이 유전자 표적의 증폭 및 검출을 위해 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 검출 가능하게 표지된 프로브를 이용할 수 있다. 일부 검출 어세이는 미생물 종-특이 유전자 표적의 증폭 및 검출을 위해 TaqMan® 유전자 발현 어세이를 이용할 수 있다.
- [0030] 추가의 증폭 반응 및 어세이는 참조 및/또는 대조 반응 및 어세이로 수행될 수 있다. 비제한적으로, 이를 참조 및/또는 대조 반응 및 어세이는 생물학적 샘플 또는 핵산 샘플의 적절성을 평가하고, 미생물 존재를 정상화하고 /하거나 생물학적 또는 핵산 샘플에서 증폭 억제제의 존재를 검출하기 위해 상대적 정량화 적용에 사용될 수 있다. 이러한 참조 및/또는 대조 어세이를 위한 예시적인 표적 핵산은, 비제한적으로, 원핵 16S rRNA, 인간 RNase P 유전자 DNA (RNaseP), 첨가된 외인성 핵산, 및/또는 이종 핵산 (Xeno; XNA)을 포함한다.
- [0031] 일부 사례에서 방법, 조성물, 및 키트는 동일한 어세이 조건 하에서 및/또는 실질적으로 동일한 시간에 복수의 단일-플렉스 핵산 증폭 반응을 수행하는 데 사용될 수 있다.
- [0032] 샘플에서 표적 서열을 증폭시키는 것은 샘플의 적어도 일부분을 본원에서 개시된 바와 같은 표적-특이적 프라이머 및 적어도 하나의 중합효소와 증폭 조건 하에서 접촉시키는 단계를 포함할 수 있고, 그에 의해 적어도 하나의 증폭된 표적 서열을 생성한다. 이것은 샘플의 적어도 일부분을 증폭 조건 하에서 표적-특이적 프라이머 쌍 및 적어도 하나의 중합효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있고, 그에 의해 적어도 하나의 증폭된 표적 서열을 생성한다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 핵산 샘플 중의 핵산 서열은, 한 쌍의 증폭 프라이머 및 검출 가능하게 표지된 프로브를 각각 포함하는 적어도 5개의 상이한 어세이를 사용하여, 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 5개의 상이한 증폭 반응 혼합물을 형성하도록 분취될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상이한 어세이가 표 1에 열거된 TaqMan® 유전자 발현 어세이 ID의 그룹으로부터 선택된다.

표 1

미생물 유전자 표적 영역 및 어세이

미생물의 유형	미생물 - 종	표적화된 유전자	표적 영역에 대한 수탁#	표적 영역의 위치	표적 영역의 크기	어세이 콘크리 크기	어세이 ID
박테리아-그램 음성	아시네토박teri 바우마니(AB)	명명되지 않은 영역	NZ_GG704 574.1	202100-202800	701	75	Ba0493208 4_s1
박테리아-그램 음성	사이트로박teri 프로운디(CF)	COG2140 옥살레이트 탈탄산효소고세균 포스포글루코스 이소머라제, 큐핀 상과	NZ_ANAV 01000004.1	137400-138200	801	103	Ba0493208 8_s1
박테리아-그램 음성	사이트로박teri 프로운디(CF-I)	철 복합체 운반계 기질-결합 단백질	NZ_ANAV 01000001.1	277000-277800	801	62	Ba0728661 7_s1
박테리아-그램 음성	사이트로박teri 프로운디(CF-2)	철 복합체 운반계 기질-결합 단백질	NZ_ANAV 01000001.1	277000-277800	801	110	Ba0728661 6_s1
박테리아-그램 음성	엔테로박teri 에이로제네스 (EA)-현재 클렙시엘라 에이로제네스 (KA)로 알려짐	파리독살 포스페이트-의존적 히스티딘 탈탄산효소(hdc) 유전자	CP014748.1	1158600-1159400	801	98	Ba0493208 0_s1
박테리아-그램 음성	엔테로박teri 클로라이제(EntC)	가설 단백질	CP008823.1	3274000-3274800	801	88	Ba0493208 7_s1
박테리아-그램 양성	엔테로코쿠스 폐에갈리스(EF b)	아미노기전달효소 부류 V	HF558530.1	1769100-1769900	801	95	Ba0464624 7_s1
박테리아-그램 음성	엔테로코쿠스 폐슘(EF)	PhnB-MerR 계열 전사 조절인자	NZ_GL4761 31.1	17300-18100	801	98	Ba0493208 6_s1
박테리아-그램 음성	에스캐리치아 콜라이(EsC)	COG0789 DNA-결합 전사 조절인자 MerR 계열 (Znt)	CP015843.2	4336000-4336700	701	63	Ba0464624 2_s1
박테리아-그램 음성	클렙시엘라 옥시토카(KO)	parC(DNA 토포이소머라제 IV 서브유-닛 A)	CP020358.1	2851700-2852600	901	93	Ba0493207 9_s1
박테리아-그램 음성	클렙시엘라 뉴보나에(KP)	ACT 유형 단백질	CP007727.1	209000-209800	801	56	Ba0493208 3_s1

[0034]

박테리아-그램 음성	모르가넬라 모르가니(MM)	COG1918-Fc2+ 운반계 단백질 FeoA	CP004345.1	375800-376600	801	91	Ba04932078_s1
박테리아-그램 음성	프로테우스 미라빌리스(PM)	araC, ureR	CP017082.1	580200-581000	801	100	Ba04932076_s1
박테리아-그램 음성	프로테우스 불가리스(PV)	SUMFI 유전자	JPIX010000 06.1	102000-102800	801	76	Ba04932082_s1
박테리아-그램 음성	프로비텐시아 스튜아르티아(PS)	COG0641 설피타제 성숙 효소 AsfB, 라디칼 SAM 상과, 추정 철-황 개질제 단백질	NZ_DS6076 63.1	493000-493800	801	100	Ba04932077_s1
	슈도모나스 에어루기노사 (PA)	N296_1760, 나선 회전 나선 도메인 단백질	CP006831.1	1857600-1858400	801	70	Ba04932081_s1
박테리아-그램 양성	스타필로코쿠스 사프로피티쿠스 (SS)	cdaR	AP008934.1	200400-201000	601	85	Ba04932085_s1
박테리아-그램 양성	스트렙토코쿠스 아갈락타이아에(SA)	SIP	CP010319.1	41000-41600	601	66	Ba04646276_s1
진균/효모	칸디다알비кан스 (CA)	IPT1	AY884203.1	800-1500	701	105	Fn04646233_s1

[0035] 일부 양태에서, 각각의 증폭 반응 혼합물이 반응 용기에 적용되고, 그 후에 증폭 반응이 반응 용기 상에서 수행되고, 이어서 증폭 반응 동안 반응 용기 상의 하나 이상의 위치 내에 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물의 검출이 따른다. 본원에서 개시된 바와 같이, 반응은 증폭 반응 혼합물에 이용된 어세이 ID 중 하나 이상과 반응 용기 상의 증폭 반응 혼합물의 위치를 연계시키도록 작동된, 증폭 생성물 검출 시스템에 이용될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 반응 용기는 튜브, 웰들을 갖는 플레이트, 카드, 어레이, 개방 어레이, 또는 칩 마이크로어레이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 반응 용기는 고형 담체 ("담체")이다. 일부 실시형태에서, 반응 용기 또는 담체는 추가로 반응 부위 또는 복수의 반응 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서 반응 부위는, 비제한적으로, 임의의 전술한 반응 용기 상에 또는 그 안에 위치한 챔버, 웰, 관통공, 스팟, 용기 또는 구획일 수 있다.

[0036] 일부 양태에서, 본 방법은 표 1의 어세이 그룹으로부터 선택된 복수의 상이한 어세이를 사용하여, 핵산 서열을 포함한 샘플 원천로부터의 분취액을 각각 포함하는 복수의 증폭 반응 혼합물을 형성하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 표 1의 어세이 그룹(어세이 ID의 목록 참고)으로부터 선택된 적어도 5개의 상이한 어세이를 사용하여, 핵산 서열을 포함한 샘플 원천로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 5개의 증폭 반응 혼합물을 형성하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 방법은 표 1의 어세이 그룹으로부터 선택된 적어도 10개의 상이한 어세이를 사용하여, 핵산 서열을 포함한 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 10개의 증폭 반응 혼합물을 형성하는 단계; 또는 표 1의 어세이 그룹으로부터 선택된 적어도 15개의 상이한 어세이를 사용하여, 핵산 서열을 포함한 샘플 원천로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 15개의 증폭 반응 혼합물을 형성하는 단계; 또는 표 1의 모든 어세이를 사용하여, 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천로부터의 분취액을 각각 포함하는 반응 혼합물을 형성하는 것을 포함한다.

[0037] 일부 실시형태에서, 샘플 원천은 전형적으로, 꼭 그렇지는 않지만, 소변 시료이다. 일부 실시형태에서, 소변 시료는 소변 배뇨에 의해, 카테터의 사용을 통해, 또는 치골상 흡인에 의해 컬렉션된다.

[0038] 일부 실시형태에서, 샘플 원천은 전형적으로, 꼭 그렇지는 않지만, 소변 시료이다. 일부 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932084_s1은 아시네토박터 바우마니의 유전자의 명명되지 않은 영역의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932088_s1은 사이트로박터 프룬디의 큐핀 상과 유전자인, 옥살레이트 탈탄산효소 / 고세균 포스포글루코스 이소머라제에 대한 COG2140의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba07286617_s1 및/또는 Ba07286616_s1은 사이트로박터 프룬디의 철 복합체 운반계 기질-결합 단백질의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932080_s1은 클렙시엘라 에어로게네스 (이전에 엔테로박터 에어로게네스로 알려짐)의 피리독살 포스페이트-의존적 히스티딘 탈탄산효소(hdc) 유전자의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시

형태에서, 어세이 ID Ba04932087_s1은 엔테로박터 클로아케의 유전자의 가설 단백질의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04646247_s1은 엔테로코쿠스 파에칼리스의 아미노기전달효소 부류 V 유전자의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932086_s1은 엔테로코쿠스 패슘의 PhnB-MerR 계열 전사 조절인자 유전자의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04646242_s1은 에스케리치아 콜라이의 COG0789 DNA-결합 전사 조절인자 MerR 계열 (Zntr) 유전자의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932079_s1은 클렙시엘라 옥시토카의 parC (DNA 토포이소마라제 IV 서브유닛 A) 유전자의 핵산 서열의 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932083_s1은 클렙시엘라 뉴모니에의 act-유사 단백질 유전자의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932078_s1은 모르가넬라 모르가니의 Fe2 + 운반체 단백질 FeoA 유전자에 대한 COG1918의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932076_s1은 프로테우스 미라빌리스의 araC, ureR 유전자의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932077_s1은 프로테우스 불가리스의 SUMF1 유전자의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932082_s1은 프로비덴시아 스투아르티의 라디칼 SAM 상파, 추정 철-황 개질체 단백질 유전자인, 설파타제 성숙 효소 AslB에 대한 COG0641의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932081_s1은 슈도모나스 에어루기노사의 나선 회전 나선 도메인 단백질 유전자인, N296_1760의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04932085_s1은 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스의 cdaR 유전자의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Ba04646276_s1은 스트렙토코쿠스 아갈락티아에의 SIP 유전자의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머에 대해 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 어세이 ID Fn04646233_s1은 칸디다 알비칸스의 IPT1 유전자의 핵산 서열 일부를 표적으로 하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다.

[0040] 일부 실시형태에서, 표 1에 열거된 것과 같은, 종-특이적 어세이의 사용에 의해 핵산 샘플의 증폭에 의해 생성된 표적 앰플리콘은 20 내지 200 뉴클레오타이드, 30 내지 150 뉴클레오타이드, 40 내지 120 뉴클레오타이드, 또는 50 내지 110 뉴클레오타이드, 예를 들어, 56 내지 105 뉴클레오타이드의 앰플리콘 길이를 가질 수 있다.

[0041] 핵산 샘플에서 핵산 서열을 증폭시키는 단계는 일부 실시형태에서 핵산 서열을 포함한 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 증폭 반응 혼합물을 형성하는 단계로, 여기서 샘플 원천은 소변 시료인, 단계, 본 증폭 반응 혼합물을 반응 용기에 적용하는 단계로, 여기서 반응 용기는 표 1에 열거된 해당하는 표적 영역 내에 위치한 상이한 유전자를 각각 표적으로 하는 적어도 5개의 어세이로 구성되는, 단계를 포함한다. 각각의 어세이는 증폭 반응이 반응 용기 상에서 수행되는, 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하고, 그리고 검출은 증폭 반응 동안 반응 용기 상의 위치 내에 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물에 대해 수행된다. 일부 실시형태에서, 증폭 생성물 검출 시스템은 반응 용기 상 또는 그 안의 증폭 반응 혼합물의 위치를 반응 용기 상에서 이용된 어세이 중 하나 이상과 연계시킨다. 다양한 실시형태에서, 반응 용기는 웰들을 갖는 플레이트, 어레이, 다중 관통공을 갖는 오픈어레이, 또는 칩 마이크로어레이이다.

[0042] 다양한 실시형태에서, 반응 용기는 일부 사례에서 표 1에 열거된 상이한 유전자를 각각 표적으로 하는 적어도 5개의 어세이로 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 반응 용기는 일부 사례에서 표 1에 열거된 상이한 유전자를 각각 표적으로 하는 적어도 10개의 어세이, 또는 표 1에 열거된 상이한 유전자를 각각 표적으로 하는 적어도 15개의 어세이, 또는 표 1에 열거된 유전자들 중 하나를 각각 표적으로 하는 적어도 17개의 어세이로 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 아시네토박터 바우마니에서 명명되지 않은 영역에 해당하는 유전자에서 93 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 사이트로박터 프룬디의 큐핀 상파인, 옥살레이트 탈탄산효소 / 고세균 포스포글루코스 이소마라제에 대한 COG2140에 해당하는 유전자에서 103 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 사이트로박터 프룬디의 철 복합체 운반체 기질-결합 단백질에서 큐핀 상파인, 옥살레이트 탈탄산효소 / 고세균 포스포글루코스 이소마라제에 대한 COG2140에 해당하는 유전자에서 62 및/또는 110 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 클렙시엘라 에어로게네스 (이전에 엔테로박터 에어로게네스로 알려짐)에서 피리독살 포스페이트-의존적 히스티딘 탈탄산효소 (hdc)에 해당하는 유전자에서 98 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 엔테로박터 클로아케에

서 가설 단백질에 해당하는 유전자에 대해 88 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 엔테로코쿠스 파에칼리스에서 아미노기전달효소 부류 V에 해당하는 유전자에서 95 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 엔테로코쿠스 패슘에서 PhnB-MerR 계열 전사 조절인자에 해당하는 유전자에서 98 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 에스케리치아 콜라이에서 COG0789 Dna-결합 전사 조절인자 MerR 계열 (Zntr)에 해당하는 유전자에서 63 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 클렙시엘라 옥시토카에서 parC (DNA 토포이소마라제 IV 서브유닛 A)에 해당하는 유전자에서 93 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 클렙시엘라 뉴모니에에서 act-유사 단백질에 해당하는 유전자에서 56 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 모르가넬라 모르가니에서 Fe2+ 운반계 단백질 FeoA에 대한 COG1918에 해당하는 유전자에서 91 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 프로테우스 미라빌리스에서 araC, ureR에 해당하는 유전자에서 100 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 프로테우스 불가리스에서 SUMF1에 해당하는 유전자에서 76 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 프로비덴시아 스투아르티이에서 라디칼 SAM 상파, 추정 철-황 개질체 단백질인, 설파타제 성숙 효소 AslB에 대한 COG0641에 해당하는 유전자에서 100 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 슈도모나스 에어루기노사에서 나선 회전 나선 도메인 단백질인, N296_1760에 해당하는 유전자에서 70 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스에서 cdaR에 해당하는 유전자에서 85 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개의 어세이들 중 한 어세이는 칸디다 알비칸스에서 IPT1에 해당하는 유전자에서 105 뉴클레오타이드 길이인 앰플리콘을 증폭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개; 적어도 10개; 또는 적어도 15개의 어세이 중 적어도 하나의 어세이는 표 1에서 **볼드체**로 강조된 3개의 어세이 ID 중 임의의 것으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개; 적어도 10개; 또는 적어도 15개의 어세이 중 적어도 하나의 어세이는 표 1에서 **볼드체**로 강조된 3개의 미생물-종 중 임의의 것에 대해 특이적이다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개; 적어도 10개; 또는 적어도 15개의 어세이 중 적어도 하나의 어세이는 표 1에서 **볼드체**로 강조된 3개의 어세이 ID 중 임의의 것으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개; 적어도 10개; 또는 적어도 15개의 어세이 중 적어도 하나의 어세이는 엔테로박터 클로아케 (EnC), 프로테우스 불가리스 (PV), 및/또는 프로비덴시아 스투아르티이 (PS)에 대해 표 1에 열거된 3개의 어세이 ID 중 임의의 것으로부터 선택된다.

[0043] 이들 방법에 따르면, 생물학적 샘플에서 적어도 하나의 표적 핵산의 존재 또는 부재를 결정하는 조성물은 적어도 5개의 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함하며, 여기서 쌍의 프라이머의 각각은 표 1의 표적 미생물의 핵산 서열의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적절한 조건 하에서 프라이머 쌍은 앰플리콘을 생성하고, 그리고 여기서 적어도 5개의 검출 프로브는 프라이머 쌍에 의해 생성된 앰플리콘의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 상이한 핵산 표적 서열을 포함하는 대조 핵산 문자; 표 1의 유전자들 중 적어도 5개에 특이적인 표적 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 대조 핵산 문자는 표 1에 열거된 상이한 유전자 (예를 들어, 표 1에 열거된 적어도 5개, 적어도 10개, 또는 적어도 15개의 상이한 유전자, 또는 모든 유전자)에 대해 특이적인 복수의 표적 핵산 서열을 포함하는 DNA 플라스미드이다. 일부 실시형태에서, 본 조성물은 어세이들의 패널 또는 컬렉션, 예를 들어 TaqMan® 어세이들의 패널 또는 컬렉션이다. 일부 실시형태에서, 본 조성물은 어세이들의 패널 또는 컬렉션, 예를 들어, 표 1에 열거된 (특이적 어세이 ID를 갖는) 적어도 5개; 적어도 10개; 적어도 15개; 또는 모든 TaqMan® 유전자 발현 어세이를 포함한 TaqMan® 어세이들의 패널 또는 컬렉션이다. 일부 실시형태에서, 어세이들의 패널 또는 컬렉션은 복수의 TaqMan® 유전자 발현 어세이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 어세이들의 패널 또는 컬렉션은 Thermo Fisher Scientific으로부터 입수된 또는 이에 의해 공급된 복수의 TaqMan® 유전자 발현 어세이를 포함한다.

[0044] 적어도 하나의 표적 핵산은 요로 감염과 연관된 미생물에 대한 바이오마커일 수 있고/있거나 본 조성물은 고형 담체일 수 있다. 적어도 5개의 증폭 프라이머 쌍은 고형 담체 상의 위치에 의해 분리된다. 다른 실시형태에서, 본 조성물은 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 17개의 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함하며, 여기서 쌍의 프라이

며의 각각은 표 1의 표적화된 유전자의 핵산 서열의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적절한 조건 하에서 프라이머 쌍은 앰플리콘을 생성한다. 일부 실시형태에서, 표 1의 표적화된 유전자의 핵산 서열의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 프라이머의 쌍으로부터 생성된 연관된 앰플리콘은 표 1에 열거된 각각의 해당하는 어세이에 대해 표시된 크기를 갖는다.

[0045] 일부 양태에서, 본원에 제공된 방법은 표적 핵산 영역("표적 영역") 내의 표적 핵산 서열(또는 상보적 서열)에 혼성화되도록 설계된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 또는 프라이머들의 세트 및/또는 프로브를 포함하는 어세이를 이용한다. 일부 실시형태에서, 표적 영역은 특정 수탁 번호와 연관된 더 큰 서열 내에 있다. 일부 실시형태에서, 표적 영역은 500 내지 1000 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 영역은 표 1에 열거된 이들 표적 영역들 중 임의의 것으로부터 선택된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 선택된 미생물 종에 대한 표적 핵산 서열은 특정 수탁 번호와 연관된 서열 내에 표적 영역 내에 있을 수 있으며, 상기 영역은 수탁 번호와 연관된 상기 서열 내에 확인가능한 위치를 갖는다. 일부 실시형태에서, 아시네토박터 바우마니에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 202100-202800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GG704574.1의 701 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 사이트로박터 프룬디에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 137400-138200에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_ANAV01000004 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 사이트로박터 프룬디에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 277000-277800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_ANAV01000001.1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 클렙시엘라 에어로게네스 (이전에 엔테로박터 에어로게네스로 알려짐)에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 1158600-1159400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP014748 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 엔테로박터 클로아케에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 3274000-3274800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP008823 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 엔테로코쿠스 파에칼리스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 1769100-1769900에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 HF558530 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 엔테로코쿠스 패슘에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 17300-18100에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GL476131 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 에스케리치아 콜라이에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 4336000-4336700에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP015843 .2의 701 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 클렙시엘라 옥시토카에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 2851700-2852600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP020358 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 클렙시엘라 뉴모니에에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 209000-2090800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP007727 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 모르가넬라 모르가니에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 375800-376600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP004345 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 프로테우스 미라빌리스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 580200-581000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP017082 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로테우스 불가리스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 10200-102800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 JPIX01000006 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로비덴시아 스투아르티이에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 493000-493800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_DS607663 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 슈도모나스 에어루기노사에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 1857600-1858400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP006831 .1의 801 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 200400-201000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AP008934 .1의 601 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 스트렙토코쿠스 아갈라티아에에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 41000-41600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP010319 .1의 601 핵산 서열 내일 수 있다. 일부 실시형태에서, 칸디다 알비칸스에 대한 표적 핵산 서열은 게놈의 뉴클레오타이드 800-1500에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AY884203 .1의 701 핵산 서열 내일 수 있다.

[0046] 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드 안으로 삽입된 표 1의 표적화된 유전자들 중 적어도 5개에 대해 지향된 상이한 핵산 표적 서열을 포함하는 대조 핵산 분자를 포함하는, 증폭 반응을 평가하기 위한 핵산 작제물이 따라서 이용될 수 있다. 복수의 표적 핵산 서열은 일부 사례에서 DNA 플라스미드 안으로 삽입된 표 1의 유전자들 중 적어도 10개, 또는 DNA 플라스미드 안으로 삽입된 표 1의 유전자들 중 적어도 15개, 또는 DNA 플라스미드 안으로 삽입된 표 1의 유전자 각각에 대해 지향될 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수의 핵산 표적 서열을 포함하는 DNA 플라스미드는 증폭을 위한 양성 대조군 핵으로서 사용될 수 있다.

[0047] 일부 실시형태에서, 복수의 표적 핵산 서열을 포함하는 DNA 플라스미드("슈퍼플라스미드")는 표 1에 열거된 것

들로부터 선택된 어세이의 사용에 의해 생성된 앰플리콘에 동일하거나 상보적인 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 17개의 상이한 핵산 표적 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 202100-202800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GG704574 .1의 701 핵산 서열 내에 있는 아시네토박터 바우마니에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 137400-138200에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_ANAV01000004 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 사이트로박터 프룬디에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 277000-277800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_ANAV01000001.1의 801 핵산 서열 내에 있는 사이트로박터 프룬디에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 1158600-1159400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP014748 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 클렙시엘라 에어로게네스 (이전에 엔테로박터 에어로게네스로 알려짐)에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 3274000-3274800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP008823 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 엔테로박터 클로아케에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 1769100-1769900에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 HF558530 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 엔테로코쿠스 파에칼리스에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 17300-18100에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_GL476131 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 엔테로코쿠스 패슘에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 4336000-4336700에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP015843 .2의 701 핵산 서열 내에 있는 에스케리치아 콜라이에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 2851700-2852600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP020358 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 클렙시엘라 옥시토카에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 209000-2090800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP007727 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 클렙시엘라 뉴모니에에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 375800-376600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP004345 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 모르가넬라 모르가니에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 580200-581000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP017082 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 프로테우스 미라빌리스에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 10200-102800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 JPIX01000006 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 프로테우스 불가리스에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 493000-493800에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 NZ_DS607663 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 프로비덴시아 스투아르티이에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 1857600-1858400에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP006831 .1의 801 핵산 서열 내에 있는 슈도모나스 에어루기노사에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 200400-201000에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AP008934 .1의 601 핵산 서열 내에 있는 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 41000-41600에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 CP010319 .1의 601 핵산 서열 내에 있는 스트렙토코쿠스 아갈락티아에에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, DNA 플라스미드는 게놈의 뉴클레오타이드 800-1500에 해당하는 영역에 위치된 수탁 번호 AY884203 .1의 701 핵산 서열 내에 있는 칸디다 알비칸스에 대한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0048] 핵산 샘플에서 핵산 서열을 증폭시키는 방법은 따라서 증폭 반응을 수행하는 단계로, 본 증폭 반응 각각은 표 1에 제시된 미생물 및 해당하는 앰플리콘 크기, 영역, 및 수탁 번호를 포함한 표적 핵산 서열의 그룹으로부터 상이한 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 각각 구성된 핵산 샘플의 일부 및 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는 단계, 증폭 반응으로부터 상이한 증폭 생성물을 형성하는 단계, 및 적어도 하나의 상이한 증폭 생성물의 존재 또는 부재를 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 개시된 방법은 표 1에 제시된 유기체 및 해당하는 앰플리콘 크기, 영역, 및 수탁 번호에 대한 핵산 서열을 표적화하는 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 모든 증폭 반응을 이용할 수 있다.

[0049] 일부 실시형태에서, 핵산 샘플에서 핵산 서열을 증폭시키는 방법은 (a) 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 핵산 샘플의 일부 및 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는 증폭 반응을 수행하는 단계로, 여기서 각각의 표적 핵산 서열은 표 1에 제시된 상이한 유전자의 증폭 생성물인, 단계, (b) 상이한 증폭 생성물을 형성하는 단계, 및 (c) 및 적어도 하나의 상이한 증폭 생성물의 존재 또는 부재를 결정하는 단계로, 여기서

적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 모든 증폭 반응은 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 단계를 포함한다.

[0050] 일부 실시형태에서, 증폭 생성물 형성은 병렬적으로 5 내지 100개의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 단계, 또는 병렬적으로 10 내지 50개의 상이한 증폭 생성물을 형성하는 것을 포함할 수 있다.

[0051] 일부 실시형태에서, 증폭 생성물 또는 앰플리콘은 약 50 내지 110 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 예를 들어, 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이. 일부 실시형태에서, 한 쌍의 증폭 프라이머는 해당하는 표적 핵산 서열의 일부 또는 모두에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 포함하는 증폭 생성물을 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 해당하는 표적 핵산 서열은 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 및/또는 cDNA에 존재하는 핵산 서열에 동일하거나 상보적인 핵산 서열을 포함할 수 있다. 해당하는 표적 핵산 서열은 표적 미생물의 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 또는 cDNA 내에 존재할 수 있거나 또는 이로부터 유래될 수 있고, 여기서 상기 표적 미생물은 표 1에 열거된 미생물이다. 일부 실시형태에서, 본 방법은, 병렬적으로, 10 내지 10,000개의 상이한 증폭 생성물을 생성할 수 있다. 적어도 2개의 증폭 반응 각각은 상이한 해당 표적 핵산 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유할 수 있다. 해당하는 표적 핵산 서열은 표 1에 열거된 유전자의 핵산 서열 또는 그것의 해당하는 cDNA의 일부를 포함할 수 있다. 유전자는 전형적으로 표 1에 열거된 미생물 내에 존재할 것이다. 일부 실시형태에서, 각각의 증폭 반응은 약 50 내지 110 뉴클레오타이드 길이인 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 증폭 프라이머들의 세트를 포함할 수 있고/있거나 표 1에 열거된 유전자의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 포함한 증폭 생성물들 중 하나 이상을 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표 1에 열거된 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 각각의 미생물로부터 유래된 핵산 샘플을 사용하여 표 1에 열거된 유전자들 중 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 모두에 대한 별도의 증폭 생성물이 형성된다. 증폭 반응 중 하나 이상은 해당하는 표적 핵산 서열 및/또는 증폭 생성물 (예를 들어, 앰플리콘)의 일부에 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 검출가능하게 표지된 프로브를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 액소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄쳐를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 검출가능하게 표지된 프로브는 작은 흠 결합체 (MGB) 모이어티를 추가로 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 증폭 반응 중 적어도 하나는 반응 용기 내에 또는 그 위에 존재하는 개별 반응 부위에서 일어날 수 있고, 본 반응 용기는 하나 이상의 개별 반응 부위를 포함한다.

[0052] 일부 실시형태에서, 반응 용기는 다중-웰 플레이트, 미세유체 카드, 및 관통공 반응 부위를 포함한 플레이트로부터 선택될 수 있다. 개별 반응 부위는 증폭 프라이머 중 하나 이상을 포함할 수 있고, 증폭시키는 단계는 개별 반응 부위에 핵산 샘플의 부분을 분배하는 단계를 포함할 수 있다. 개별 반응 부위는 한 쌍의 증폭 프라이머 및 핵산 프로브를 포함한 용액의 건조된 침착물을 포함할 수 있으며, 여기서 프라이머 및 프로브 둘 모두는 표 1에 열거된 유전자로부터 유래된 핵산 서열을 증폭하도록 구성된다. 개별 반응 부위는 핵산 샘플의 부분이 반응 부위에 분포되기 전 또는 후에, 중합효소 및 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다. 핵산 샘플은 소변 시료로부터 제조될 수 있다.

[0053] 샘플에서 미생물 핵산의 존재를 검출하는 방법은 따라서 (a) 반응 용기 또는 담체 내에 위치한 개별 반응 부위 또는 챔버에 핵산 샘플의 부분을 분배하는 단계, (b) 각각 개별 반응 부위 또는 챔버에서, 병행 증폭 반응들을 수행하고 적어도 5개의 증폭 생성물을 형성하는 단계로, 여기서 각각의 증폭 반응은 미생물의 게놈 내에 존재하거나, 또는 이로부터 유래된 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유하고, 상기 해당하는 표적 핵산 서열은 표 1에 열거된 유전자의 핵산 서열 또는 그것의 해당하는 cDNA의 부분을 포함하는, 단계, 및 (c) 본 증폭 생성물이 개별 반응 부위 또는 챔버 중 하나 이상에서 형성되었는지 여부를 결정하는 단계로, 여기서 적어도 5개의 증폭 반응은 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함하는, 단계를 포함한다. 다른 실시형태에서, 적어도 10개, 또는 15개, 또는 모든 증폭 반응은 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함한다.

[0054] 증폭 생성물에 대한 검출가능하게 표지된 프로브의 혼성화는 검출될 수 있으며, 선택적으로 실시간으로 검출될 수 있다. 증폭 프라이머들 중 적어도 한 쌍은 해당하는 표적 핵산 서열의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 포함하는 프라이머를 포함하는 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하도록 구성될 수 있다. 증폭 프라이머들 중 적어도 한 쌍에 대한 해당하는 표적 핵산 서열은 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 및/또는 cDNA에 존재하는 핵산 서열에 동일하거나 상보적인 핵산 서열을 함유할 수 있다. 해당하는 표적 핵산 서열은 표적 미생물의 게놈 DNA, RNA, miRNA, mRNA, 세포유리 DNA, 순환성 DNA 및/또는 cDNA 내에

존재할 수 있거나 또는 이로부터 유래될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 미생물은 표 1에 열거된 미생물 종이다.

[0055] 이들 방법을 수행하기 위해 사용된 개별 반응 부위 또는 챔버는 핵산 샘플의 부분이 반응 부위에 분포되기 전 또는 후에 반응 부위에 첨가 또는 분포된 중합효소 및 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0056] 일부 실시형태에서, 핵산 증폭을 위한 반응 용기 또는 담체는 용기 또는 담체 내에 또는 담체의 표면 상에 위치한 반응 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 모든 반응 부위는 (1) 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 생성하기 위한 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함하며, 여기서 증폭 생성물은 표 1의 미생물에 상응한다. 일부 다른 실시형태에서, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 모든 반응 부위는 추가로 (2) 증폭 생성물에 혼성화하도록 구성된 검출가능하게 표지된 프로브를 포함한다. 따라서 일부 실시형태에서, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 각각의 반응 부위는 증폭 프라이머 쌍에 의해 생성된 증폭 생성물 또는 앰플리콘에 특이적인 해당하는 검출가능하게 표지된 프로브를 갖는 상이한 증폭 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0057] 일부 실시형태에서, 각각의 반응 부위는 표 1로부터 선택된 유전자 또는 표 1에 열거된 유전자의 핵산 유도체의 적어도 일부를 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 프로브를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 반응 부위는 표 1에 열거된 어세이 ID로부터 선택된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 프로브를 포함할 수 있다.

[0058] 생물학적 샘플에서 표 1에 열거된 미생물 중 하나 이상으로부터 적어도 하나의 표적 핵산의 존재 또는 부재를 결정하는 조성물은 (a) 적어도 하나의 증폭 프라이머 쌍으로, 여기서 쌍의 프라이머의 각각은 표적 핵산의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 표적 혼성화 영역을 포함하고, 적절한 조건 하에서 프라이머 쌍은 표 1의 유전자로부터 앰플리콘을 생성하는, 프라이머 쌍, 및 (b) 프라이머 쌍에 의해 생성된 앰플리콘의 영역의 모두 또는 일부에 특이적으로 혼성화하도록 구성된 적어도 하나의 검출 프로브를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서와 같이, 앰플리콘은 약 50 내지 110 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이일 수 있고, 조성물은 표 1에 열거된 적어도 하나의 어세이를 포함할 수 있다. 조성물은 유전자 그룹의 DNA 및/또는 RNA 서열에 상보적인 프로브인, 바이오마커들의 패널을 검출하기 위한 뉴클레오타이드 프로브들의 세트를 포함할 수 있고, 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들의 임의의 조합으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다. 상기 프로브 세트는 1 내지 17개의 상이한 프로브로 구성될 수 있다. 유전자 그룹은 표 1에 열거된 것들로부터 선택된 적어도 5개(5)의 상이한 유전자를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플에서 적어도 5개(5)의 상이한 표적 핵산이 증폭 및 검출되고, 본 표적 핵산은 표 1에 열거된 5개(5)의 상이한 미생물로부터의 것이다(다른 실시형태는 표 1의 유기체의 10, 15, 또는 17개를 표적화할 수 있다). 일부 실시형태에서, 표적 핵산은 표 1에 열거된 5개의 상이한 미생물 각각에 대해 열거된 어세이를 사용하여 증폭 및 검출된다. 일부 실시형태에서, 표적 핵산은 표 1에 열거된 앰플리콘 크기를 갖는 해당하는 앰플리콘을 생성하기 위해 증폭된다.

[0059] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득되고 생물학적 샘플의 적어도 일부분은 개별 증폭 반응과 접촉되며, 여기서 개별 반응 당 적어도 하나의 표적 서열이 증폭되어 증폭된 생성물을 생성한다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 적어도 5개, 적어도 10개, 또는 적어도 15개의 개별 증폭 반응과 접촉되며, 여기서 개별 반응 당 적어도 하나의 표적 서열이 증폭되어 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개의 증폭된 생성물을 생성한다. 일부 다른 실시형태에서, 각각의 개별 반응은 표적-특이적 프라이머에 의해 생성된 증폭된 생성물에 대해 특이적인 검출가능하게 표지된 프로브와 접촉되고, 각각의 개별 증폭 반응에서 증폭된 생성물의 존재 또는 부재가 결정된다. 일부 실시형태에서, 각각의 개별 증폭 반응에서 증폭된 생성물의 존재 또는 부재를 사용하여 생물학적 샘플에 대한 바이오마커 프로파일에 도달하고, 여기서 바이오마커는 표 1에 열거된 임의의 유전자와 연관된다. 일부 실시형태에서, 바이오마커는 표 1에 열거된 유전자의 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개 또는 모두와 연관된다.

[0060] 바이오마커는 방광, 요로 및/또는 비뇨생식기 감염 및/또는 미생물총과 연관된다. 패널은 1 내지 17개의 상이한 바이오마커들의 세트를 포함할 수 있다. 개별 증폭 반응은 그 각각이 표 1로부터 선택된 단일의 상이한 어세이를 이용하는 개별 증폭 반응을 갖는, 고형 담체 상에서 될 수 있다.

[0061] 각각 대조 핵산 분자에서 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머 및 샘플의 부분을 포함하는 증폭 반응은 병렬적으로 수행될 수 있으며, 여기서 대조 핵산 분자는 상이한 표적 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 대조 핵산 분자에서 상이한 표적 서열에 해당하는 상이한 증폭 생성물이 형성되고, 증폭 반응에서 적어도 2개의 상이한 증폭 생성물의 존재가 결정된다. 다양한 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 상이한 미생물로부터 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 모든 상이한 표적 서열을 포함할

수 있다.

- [0062] 일부 실시형태에서, 상이한 표적 서열은 표 1에 제시된 바와 같은 상이한 미생물의 계놈 또는 전사체 서열, 및 더 특이적으로, 표 1에 열거된 선택된 표적 유전자로부터 유래된다. 증폭 프라이머들 중 적어도 한 쌍은 해당하는 표적 서열의 부분에 상보적이거나 동일한 핵산 서열을 포함하는 프라이머를 포함하는 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성될 수 있다. 적어도 2개의 증폭 반응 각각은 상이한 해당 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함할 수 있다.
- [0063] 증폭 반응 중 하나 이상은 해당하는 표적 서열의 부분에 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 검출가능하게 표지된 프로브를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레이제 활성을 갖는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄처를 포함할 수 있다. 대조 핵산 분자는 DNA 플라스미드 (예를 들어, 슈퍼플라스미드)일 수 있고, 일부 사례에서 플라스미드 또는 슈퍼플라스미드는 선형이다. 대조 핵산 분자를 포함하는 샘플은 증폭 반응의 수행 전에 세포로부터 제조될 수 있다.
- [0064] 일부 실시형태에서, 대조 핵산 분자를 포함하는 샘플에서 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법은 반응 체적부들 안으로 샘플을 분배하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 대조 핵산 분자는 상이한 표적 서열을 포함할 수 있고, 반응 체적부들은 대조 핵산 분자에서 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 증폭 프라이머의 적어도 2개의 상이한 쌍을 포함한다. 일부 실시형태에서, 증폭 반응은 반응 체적부들에서 수행되고, 대조 핵산 분자에서 적어도 2개의 상이한 표적 서열에 해당하는 상이한 증폭 생성물이 형성된다. 증폭 반응에서 적어도 2개의 상이한 증폭 생성물의 존재가 그 다음 결정될 수 있다.
- [0065] 핵산 샘플의 부분은 담체 내에 또는 그 위에 위치한 개별 반응 챔버에 분포될 수 있으며, 여기서 핵산 샘플은 대조 핵산 분자를 포함할 수 있고, 대조 핵산 분자는 상이한 표적 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 증폭 반응은 병렬적으로 수행되고 상이한 표적 증폭 생성물이 개별 반응 챔버에서 대조 핵산 분자 내 적어도 2개의 상이한 표적 서열에 상응하여 형성되며, 여기서 각각의 증폭 반응은 대조 핵산 분자 내에 존재하는 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 함유하고, 증폭 프라이머를 포함하는 적어도 2개의 증폭 반응은 대조 핵산 분자 내에 존재하는 상이한 해당 표적 서열을 증폭하도록 구성된다. 적어도 2개의 개별 반응 챔버에서 형성된 적어도 2개의 상이한 표적 증폭 생성물은 정량화될 수 있다. 본 방법은 대조 핵산 분자의 연속 희석물인 샘플들의 세트를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0066] 검출 한계는 연속으로 희석된 대조 핵산 분자로부터의 정량화된 표적 증폭 생성물에 기반하여 대조 핵산 분자 표적 서열 중 적어도 하나에 대해 결정될 수 있다.
- [0067] 대조 핵산 분자 표적 서열 중 적어도 하나에 대한 동적 범위는 연속으로 희석된 대조 핵산 분자로부터의 정량화된 표적 증폭 생성물에 기반하여 결정될 수 있다.
- [0068] 일부 실시형태에서, 정량화하는 단계는, 선택적으로 실시간으로, 증폭 생성물에 대해 검출가능하게 표지된 프로브의 혼성화를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 2개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 모든 상이한 표적 서열을 포함할 수 있다. 표적 서열은 표 1에 열거된 상이한 미생물의 계놈 서열로부터 유래될 수 있다. 1 내지 17개의 상이한 증폭 생성물이 형성될 수 있다. 복수의 증폭 반응 중 하나 이상의 증폭 반응은 해당하는 표적 서열의 부분에 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 검출가능하게 표지된 프로브를 추가로 포함할 수 있다. 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 엑소뉴클레이제 활성을 가지는 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성될 수 있다. 적어도 하나의 증폭 반응의 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄처를 포함할 수 있다. 개별 반응 챔버는 샘플의 부분이 반응 챔버에 분포되기 전 또는 후에 반응 챔버에 첨가된 중합효소 및 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다. 대조 핵산 분자는 DNA 플라스미드, 예를 들어 선형 플라스미드, 본원에서 기재된 바와 같은 이러한 슈퍼플라스미드일 수 있다.
- [0069] 핵산 작제물은 상이한 증폭 표적 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 증폭 표적 서열 중 적어도 2개는 표 1로부터 선택된 유전자 또는 그것의 해당하는 cDNA의 적어도 56 뉴클레오타이드 부분을 포함한다.
- [0070] 핵산 작제물은 상이한 증폭 표적 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 증폭 표적 서열 중 적어도 2개는 표 1로부터 선택된 적어도 2개의 상이한 미생물 또는 미생물 유전자로부터 유래된다.
- [0071] 핵산 증폭을 위한 담체는 어레이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 어레이는 어레이 내에 또는 어레이 상에 위치

한 반응 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 반응 부위는 (i) 해당하는 표적 서열을 증폭하도록 구성된 증폭 프라이머 쌍, 및 (ii) 쌍의 증폭 프라이머 중 적어도 하나의 연장에 의해 생성된 핵산 서열에 혼성화하도록 구성된 검출가능하게 표지된 프로브를 포함할 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 반응 부위는 (iii) 상이한 표적 서열을 포함하는 대조 핵산 분자를 추가로 포함할 수 있다. 상이한 표적 서열 중 적어도 2개는 표 1로부터 선택된 유전자 또는 그것의 해당하는 cDNA의 적어도 56 뉴클레오타이드 부분을 포함할 수 있다. 대조 핵산 분자는 표 1에 제시된 미생물로부터 적어도 2개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 모든 상이한 표적 서열을 포함할 수 있다. 대조 핵산 분자는 플라스미드, 예를 들어 선형인 플라스미드, 본원에서 기재된 바와 같은 이러한 슈퍼플라스미드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 반응 부위는 증폭 생성물을 포함한다.

[0072] 본 담체는 상이한 증폭 생성물을 포함하는 10 내지 10, 000개의 반응 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 반응 부위 중 적어도 2개는 각각 상이한 해당 표적 서열을 증폭하도록 구성된 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함한다. 적어도 하나의 반응 부위의 검출가능하게 표지된 프로브는 5' 뉴클레아제 어세이를 사용하여 중합효소에 의해 절단을 당하도록 구성될 수 있다. 적어도 하나의 반응 부위의 검출가능하게 표지된 프로브는 그것의 5' 말단에 형광 표지를, 그리고 그것의 3' 말단에 켄쳐를 함유할 수 있다. 검출가능하게 표지된 프로브는 작은 흠 결합체 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 본 담체는 다중-웰 플레이트, 미세유체 카드, 및 관통공 반응 부위를 포함한 플레이트로부터 선택될 수 있다. 반응 부위는 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다.

[0073] 핵산 표적 서열을 증폭시키는 방법은 대조 핵산 분자 및/또는 테스트 핵산 샘플을 반응 체적부들 안으로 분배하는 단계로, 여기서 대조 핵산 분자는 상이한 표적 서열을 포함하고 테스트 핵산 샘플은 하나 이상의 테스트 핵산 분자를 포함하는, 단계, 반응 체적부들을 핵산 증폭 조건으로 하고 증폭 프라이머의 쌍을 사용하여 반응 체적부들에서 대조 핵산 분자의 적어도 2개의 상이한 표적 서열을 증폭시키는 단계로, 각각의 증폭 프라이머의 쌍은 대조 핵산 분자에서 상이한 표적 서열을 증폭하기 위해 사용되는, 단계, 및 반응 체적부들에서 적어도 2개의 상이한 증폭된 표적 서열의 존재를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 대조 핵산 분자는 원형, 또는 선형일 수 있다. 대조 핵산 분자 및 테스트 핵산 샘플은 상이한 반응 부위에 분포될 수 있다. 테스트 핵산 샘플은 또한 2개 또는 그 초과의 상이한 표적 핵산 분자를 포함할 수 있으며, 그 각각은 상이한 표적 서열을 포함한다. 반응 체적부들에서 테스트 핵산 샘플 중 적어도 2개의 상이한 표적 서열은 증폭 프라이머의 쌍을 사용하여 증폭될 수 있으며, 증폭 프라이머의 쌍 각각은 표적 핵산 샘플에서 상이한 표적 서열을 증폭하기 위해 사용된다.

[0074] 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 핵산 샘플의 적어도 일부분을 표 1의 표적-특이적 프라이머 쌍 및 프로브 세트(또는 어세이) 및 적어도 하나의 중합효소와 접촉시킴에 의해 형성된다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 증폭 조건 하에서 인큐베이션되고 그것에 의해 적어도 하나의 증폭된 표적 서열을 생성한다. 일부 추가의 실시 형태에서, 적어도 하나의 증폭된 표적 서열이 검출되고 핵산 샘플에서 증폭된 표적 서열 존재가 결정된다. 각각의 표적-특이적 프라이머 및 프로브 세트는 정방향 및 역방향 프라이머에 의해 증폭된 핵산에 특이적인 표적 서열 및 검출가능하게 표지된 프로브를 특이적으로 증폭하도록 설계된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 포함할 수 있다.

[0075] 본원에 개시된 방법, 조성물 및 키트는 단일 샘플 제제에 표 1에 열거된 미생물의 존재를 검출하기 위해 개발된 어세이를 사용하여, 생물학적 샘플에서 표적 미생물의 특정 세트를 검출, 프로파일링, 및 모니터링하기 위해 이용될 수 있다. Applied Biosystems™ TaqMan™ 어세이는 표적 핵산을 증폭하고 검출하기 위해 조합하여 작동하도록 설계된 증폭 프라이머 쌍 및 형광으로 표지된 프로브의 조합이고, 개시된 방법 및 조성물은 표 1에 열거된 Applied Biosystems™ TaqMan™ 어세이(어세이 ID)에 제공된 프라이머 쌍 및 프로브를 포함할 수 있다.

[0076] 각각의 프라이머/프로브 조합이 표 1에 선택된 미생물에 대해 특이적인 증폭 프라이머 쌍 및 해당하는 검출가능하게 표지된 프로브의 패널이 제공된다. 미생물 패널, 반응의 독립성, 추출, 및/또는 다른 대조 표적은 표 1에 열거된 미생물에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0077] 표 1에 열거된 특정한 표적 유전자에 대한 증폭 프라이머 쌍의 패널이 본원에서 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 유전자 패널, 반응의 독립성, 추출, 및/또는 다른 대조 표적은 표 1에 열거된 유전자들 중 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 또는 모두에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다.

[0078] 개시된 방법은 각각의 프라이머/프로브 조합이 표 1에 열거된 미생물 유전자 표적에 대해 특이적인, 증폭 프라이머 쌍 및 해당하는 검출가능하게 표지된 프로브의 패널을 이용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 미생물 유전자 패널, 반응의 독립성, 추출, 및/또는 다른 대조 표적은 표 1에 열거된 유전자들 중 적어도 5개, 적어도 10개,

적어도 15개, 또는 모두에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다.

[0079] 생물학적 샘플에서 미생물의 유형 또는 존재는 생물학적 샘플로부터 제조된 핵산 샘플을 분석함에 의해 확인 또는 결정될 수 있다. 원천, 예를 들어 대상체 또는 환자로부터 일단 수득 또는 컬렉션되면, 생물학적 샘플은 샘플 내에 존재하는 핵산을 추출하기 위한 알려진 방법에 따라 가공될 수 있다. 다른 사례에서, 총 핵산 샘플은 생물학적 샘플로부터 제조될 수 있다. 일부 경우에서, 생물학적 샘플에서 미생물을 풍부하게 하기 위한 단계들이 핵산 추출 이전에 취해질 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 샘플은 알려진 방법, 예컨대 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 따라 증폭된다. 일부 바람직한 실시형태에서, PCR은 정량적 PCR(qPCR)이다.

[0080] PCR-기반 기술에 대한 정량적 방법(예를 들어, qPCR)을 적용할 때, 표적 증폭의 진행을 결정하기 위한 수단을 제공하기 위해 형광 프로브 또는 다른 검출가능한 표지가 반응 안으로 포함될 수 있다. 형광 프로브의 경우, 반응은 생성된 핵산 생성물의 양에 비례하여 형광반응할 수 있다. 이와 같이, PCR을 사용하여, 미생물 유전자에 해당하는 뉴클레오타이드 서열에 대한 어세이는 표적 서열이고, 생물학적 샘플에서 미생물의 존재 또는 부재 또는 미생물 프로파일을 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0081] 증폭 반응은 반응 부위를 갖는 담체 상에서 일어날 수 있고, 각각의 반응 부위는 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함할 수 있다. 증폭 반응은 반응 용기에서 일어날 수 있고, 각각의 반응은 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함할 수 있다. 반응 용기는 적어도 하나의 표적 특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브를 추가로 포함할 수 있으며, 본 프로브는 개별적으로 담체 내 또는 상의 반응 부위에 존재하는 증폭 프라이머 쌍에 의해 증폭된 핵산 부분에 특이적이다. 반응 부위는 지지 플레이트 내의 관통공일 수 있고, 각각의 관통공은 본원에 기재된 바와 같이 한 쌍의 증폭 프라이머 및 적어도 하나의 검출가능하게-표지된 프로브를 포함할 수 있다. 프라이머 또는 프라이머 및 프로브는 반응 용기의 각각의 반응 부위에서 건조될 수 있다. 모든 반응 부위는 일부 사례에서 동일한 담체 또는 반응 용기에 있을 수 있다.

[0082] 담체는 임의의 이용가능한 방법에 의해 증폭 시약(예를 들어, 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 프로브 및/또는 프라이머)의 고정화, 부착 또는 배치를 위한 표면을 제공할 수 있어, 이들이 서로에 대해 자유롭게 확산 또는 이동하는 것을 상당히 또는 완전히 방지할 수 있다. 시약은, 예를 들어, 담체와 접촉하여 배치될 수 있고, 선택적으로 공유적으로 또는 비공유적으로 부착되거나 또는 부분적으로/완전히 포매된다. 적합한 담체는 상업적으로 입수 가능하며, 당업자에게 명백할 것이다. 본원에 기재된 방법, 조성물 및 키트에 고형 담체가 사용될 수 있다. 이러한 고형 담체는, 비제한적으로, 종이, 니트로셀룰로스, 수초, 유리, 실리카, 나일론, 플라스틱 예컨대 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 또는 폴리스티렌, 또는 다른 고형 물질을 포함할 수 있다. 또한, 담체는, 기계적 강도, 전기전도도 또는 다른 원하는 물리적 특성을 제공하기 위해, 더욱 단단한 표면 예컨대 유리 또는 금속 상에 자체로 중첩될 수 있는, 아가로스, 폴리아크릴아미드, 다당류 또는 단백질과 같은 이러한 물질로부터 구축된 겔일 수 있다. 담체는 평평한(평면) 표면, 또는 적어도 표면-결합된 올리고뉴클레오타이드가 대략 동일 평면에 부착되는 구조를 포함할 수 있다. 고형 담체는 일부 사례에서 비-평면일 수 있고 더욱이 별개의 단위, 예를 들어 마이크로비드로부터 형성될 수 있다.

[0083] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "표면"은 원하는 올리고뉴클레오타이드(들)가 부착되거나 또는 고정화되는 고형 담체 상의 임의의 일반적으로 2-차원의 구조를 의미한다.

[0084] 증폭 반응 용기는 또한 본원에서 개시된 바와 같은 증폭 반응 혼합물의 다른 성분 시약 예컨대, 예를 들어, dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 및/또는 dUTP), 하나 이상의 중합효소, 완충액(들), 하나 이상의 염(들), 하나 이상의 계면활성제(들), 하나 이상의 증폭 억제제 차단제(들), 및/또는 하나 이상의 발포방지제(들)를 함유할 수 있다. 따라서, 반-고형 또는 고형 담체에는 증폭 반응 혼합물 또는 마스터 믹스와 함께 증폭 프라이머 쌍을 포함하는 반응 부위 또는 반응 챔버가 제공될 수 있다. 반응 용기 또는 개별 반응 부위에서 프라이머 쌍 및 반응 혼합물 조합은 건조될 수 있다. 반응 부위 또는 반응 용기에서 반응 혼합물은 동결건조될 수 있고 일부 실시 형태에서, 건조된 침착물로서 반응 부위 또는 용기에 적용될 수 있다. 반-고형 또는 고형 담체에는 반응 혼합물을 형성하기 위해 증폭 마스터 믹스와 함께 증폭 프라이머 쌍 및 검출가능하게 표지된 프로브를 포함하는 반응 부위가 제공될 수 있다. 반응 부위 또는 반응 용기에서 반응 혼합물은 건조될 수 있다. 반응 부위 또는 반응 용기에서 반응 혼합물은 또한 동결건조될 수 있다.

[0085] 표 1에 열거된 유전자의 적어도 5개, 적어도 10개, 또는 적어도 15개에 대해 특이적인 프라이머 또는 프라이머 쌍을 포함하는 반응 부위를 포함하는 담체가 제공될 수 있다. 표 1에 열거된 모든 유전자에 대해 특이적인 프라이머 또는 프라이머 쌍을 포함하는 담체가 제공될 수 있거나, 또는 각각의 반응 부위가 표 1에 열거된 유전자의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 또는 17개에 대해 특이적인 상이한 프라이머 또

는 프라이머 쌍을 포함하는 반응 부위를 포함하는 담체가 제공될 수 있다. 제공된 담체는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 내부 및/또는 외부 대조군에 대해 특이적인 프라이머 또는 프라이머 쌍을 포함하는 반응 부위를 추가로 포함할 수 있다.

[0086] 본 개시내용의 요지를 보다 명확하고 간결하게 설명하고 지적하기 위해, 특정 용어들에 대한 특정 정의가 제공될 수 있으며, 이는 하기 설명 및 첨부된 청구범위에서 사용된다. 명세서 전반에 걸쳐, 특정 용어의 예시는 비제한적인 예로서 간주되어야 한다.

[0087] 본 개시내용은 증폭 대조로 사용하기 위한 조성물 및 핵산 증폭 공정에서 이의 사용 방법을 지칭할 수 있다. 제공된 대조 조성물 및 이의 용도에 대한 방법은 사용자에게 핵산 증폭 작업흐름을 모니터링, 평가, 문제해결 및 제어하기 위한 그 도구 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 대조 핵산 분자는 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 15 또는 적어도 17개의 상이한 표적 서열을 포함한다.

[0088] 제공된 추출 및/또는 증폭 대조 핵산 조성물은 핵산 증폭 및/또는 검출을 포함한 작업흐름에 대한 양성 및/또는 음성 대조군으로 작용할 수 있다. 본원에 제공된 대조 조성물 및 이의 사용 방법은 생물학적 샘플에서 미생물로부터 유래된 선별된 핵산, 또는 그것의 각각의 cDNA의 증폭 및 특성규명을 위한 조성물 및 방법과 조합하여 사용될 수 있다. 본원에서 제공된 바와 같은 대조 조성물 및 이의 사용 방법은, 예를 들어, 방광, 요로, 및 비뇨생식기 미생물군집 구성성분 및 동력학을 검출 및/또는 모니터링하기 위해, 선별된 조직 및 해부상의 영역의 미생물총 프로파일의 검출 및/또는 평가하기 위한 조성물 및 방법과 조합하여 사용될 수 있다. 이와 같이, 생물학적 샘플에서 표적 핵산 또는 미생물에 대한 선별된 어세이 세트에 대한 증폭 반응과 조합하여 사용될 때, 사용된 대조 핵산 분자는 증폭 및/또는 검출 어세이가 지향하는 동일한 표적 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 어세이가 지향된 표적 서열의 서브셋을 포함할 수 있다. 대조 핵산 분자는 추가의 참조 또는 대조 어세이가 지향된 추가의 표적 서열을 포함할 수 있다. 대조 핵산 분자는 대조 어세이가 지향된 (임의의 유기체에 대해 알려진 상동성이 아닌) 이종 표적 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 대조 핵산 분자는, 본원에서 일명 슈퍼플라스미드인, 복수의 표적 서열을 포함하는 플라스미드 분자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 슈퍼플라스미드 대조 핵산 분자는 선형화된다.

[0089] 일부 실시형태에서, 증폭 조건 하에서 샘플의 적어도 일부분을 표적-특이적 프라이머 및 중합효소와 접촉시키고 그것에 의해 적어도 하나의 증폭된 표적 서열을 생성하는 것을 포함하는 대조 핵산 분자 샘플에서 표적 서열을 증폭시키는 방법이 본원에 제공된다. 본원에서 기재된 바와 같이, 대조 핵산 분자는 상이한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 본 개시내용은 증폭 조건 하에서 샘플의 적어도 일부분을 본원에서 개시된 바와 같은 표적-특이적 프라이머 및 중합효소와 접촉시키고 그것에 의해 적어도 하나의 증폭된 표적 서열을 생성하는 것을 포함하는 대조 핵산 분자 샘플에서 표적 서열을 증폭시키는 방법을 제공하며, 여기서 각각의 표적-특이적 프라이머는 다수의 개별의 반응에 (예를 들어, 단일-플렉스 반응으로) 제공된다. 본 개시내용은 증폭 조건 하에서 샘플의 적어도 일부분을 본원에서 개시된 바와 같은 표적-특이적 프라이머 및 중합효소와 접촉시키고 그것에 의해 적어도 하나의 증폭된 표적 서열을 생성하는 것을 포함하는 대조 핵산 분자 샘플에서 표적 서열을 증폭시키는 방법을 제공하며, 여기서 표적-특이적 프라이머는 단일의 조합된 반응에 (예를 들어, 다중 반응으로) 제공된다. 본원에 제공된 방법은 증폭 조건 하에서 샘플의 적어도 일부분을 본원에서 개시된 바와 같은 표적-특이적 프라이머 및 프로브 세트 (예를 들어, 검정) 및 중합효소와 접촉시키고 그것에 의해 적어도 하나의 증폭된 표적 서열을 생성하고 적어도 하나의 증폭된 표적 서열의 존재를 검출하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 각각의 어세이는 정방향 및 역방향 프라이머에 의해 증폭된 핵산 (예를 들어, 앰플리콘)에 특이적인 표적 서열 및 검출가능하게 표지된 프로브를 특이적으로 증폭하도록 설계된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 포함한다.

[0090] 본원에 제공된 방법은 상이한 표적 서열을 포함하는 대조 핵산 분자를 포함한 샘플이, 각각의 개별 반응이 프라이머에 의해 증폭된 표적 서열에 특이적인 대조 핵산 분자 및 검출가능하게 표지된 프로브에서의 표적 서열의 적어도 일부에 특이적이 되도록 설계된 한 쌍의 증폭 프라이머로 수행된, 다중 개별 증폭 반응 (즉 단일-플렉스 반응)을 받도록 하는 것을 포함한다. 다중 개별 증폭 반응은 증폭 프라이머 및 검출기 프로브가 설계되는 각각의 표적 서열에 대해 개별의 반응에서 개별 증폭 생성물을 생성할 수 있다. 다중 증폭 반응의 평가는 개별 (단일-플렉스) 증폭 반응으로부터 표적화된 증폭 생성물의 존재 또는 부재를 결정, 및/또는 정량화함에 의해 달성될 수 있다.

[0091] 본원에 제공된 방법은 상이한 표적 서열을 포함하는 대조 핵산 분자를 포함한 샘플이 대조 핵산 샘플에서 표적 서열에 특이적이 되도록 설계된 프라이머 쌍의 조합을 포함한 증폭 반응(즉 다중 반응)을 받도록 하는 것을 포함한다. 본 반응은 상이한 프라이머에 의해 증폭된 각각의 상이한 표적 서열에 대해 특이적인 대조 핵산 분자

및 검출가능하게 표지된 프로브에서 적어도 2개의 상이한 표적 서열에 대해 특이적이 되도록 설계된 증폭 프라이머의 적어도 2개의 상이한 쌍으로 수행된다. 증폭 반응은 증폭 프라이머와 검출기 프로브의 조합이 설계되는 각각의 표적 서열에 대해 다중 증폭 생성물을 생성할 수 있다. 다중 증폭 반응의 평가는 조합된 (다중) 증폭 반응 내에서 표적화된 증폭 생성물의 존재 또는 부재를 결정, 및/또는 정량화함에 의해 달성될 수 있다.

[0092] 본원에 제공된 조성물의 검출 검정 및 방법은 대조 핵산 특이적 표적 서열의 증폭 및 검출을 위해 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 검출가능하게 표지된 프로브의 사용을 포함할 수 있다. 표적-특이적 프라이머 및 프로브 세트들은 반응에서 단일 핵산 표적에 대해 특이적인 프라이머들 및 프로브들의 단일 세트를 갖는, 단일-플렉스 반응의 일부로 제공될 수 있다. 표적 특이적 프라이머 및 프로브 세트들은 대안적으로 동일한 반응 내에서 다수의 상이한 핵산 표적들에 대해 특이적인 프라이머들 및 프로브들의 세트를 다수로 갖는, 다중 반응의 일부로 제공될 수 있다.

[0093] 본원에 제공된 조성물의 검출 검정 및 방법은 대조 핵산 특이적 표적 서열의 증폭 및 검출을 위해 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 검출가능한 핵산 결합 모이어티의 사용을 포함한다. 표적-특이적 프라이머 및 검출가능한 핵산 결합 모이어티는 단일-플렉스 반응의 일부로 제공된다. 표적 특이적 프라이머 및 검출가능한 핵산 결합 모이어티는 대안적으로 다중 반응의 일부로 제공될 수 있다. 검출가능한 핵산 결합 모이어티는 핵산 결합 염료일 수 있다. 염료는 이중-가닥 DNA 결합 염료일 수 있다. 일부 실시형태에서, 염료는 SYBR 그런일 수 있다.

[0094] 본원에 제공된 조성물, 방법 및 키트는 추가의 참조 또는 대조 반응 및 어세이로 수행되는 추가의 증폭 반응 및 어세이를 포함한다. 비제한적으로, 이들 추가의 참조 또는 대조 반응 및 어세이는 생물학적 샘플 또는 핵산 샘플의 적정성을 평가하고, 미생물 존재를 정규화하고/하거나 생물학적 또는 핵산 샘플에서 증폭 억제제의 존재를 검출하기 위한 상대적 정량화 적용에 사용될 수 있다. 이러한 추가의 참조 또는 대조 어세이를 위한 예시적인 표적 핵산은, 비제한적으로, 원핵 16S rRNA 유전자 서열, 인간 RNase P 유전자 서열, 이종 핵산 (XNA) 서열 및/또는 첨가된 외인성 핵산을 포함한다.

[0095] 본 개시내용은 동일한 검정 조건 하에서 및/또는 실질적으로 동일한 시간에서 단일-플렉스 핵산 증폭 반응을 수행하기 위한 조성물, 방법, 및 키트에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 동일한 검정 조건 하에서 및/또는 실질적으로 동일한 시간에서 다중 핵산 증폭 반응을 수행하기 위한 조성물, 방법, 및 키트에 관한 것이다.

[0096] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 특정 표적 미생물로부터 유래된 표적 서열의 특정 세트를 포함하는 대조 핵산 분자의 추출 및/또는 증폭을 검출, 모니터링, 및 평가하기 위한 조성물, 방법, 및 키트에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 대조 핵산 분자는 다중 표적 서열을 포함하는 플라스미드의 일부(즉, 다중-표적 플라스미드 또는 슈퍼플라스미드)이다. 예를 들어, 본원에서 기재된 바와 같은 일부 실시형태에서, 증폭 대조 핵산 분자는 표 1에 열거된 미생물 및/또는 미생물 유전자로부터 유래된 적어도 2개의 상이한 표적 서열을 함유하도록 개발된다.

[0097] Applied Biosystems™ TaqMan® 어세이는 특정 표적 핵산을 증폭하고 검출하기 위해 조합하여 작동하도록 설계된 증폭 프라이머 쌍 (정방향 프라이머 및 역방향 프라이머) 및 형광으로 표지된 프로브의 조합이다. 본원에 개시된 조성물 및 방법은 미생물-특이적 및/또는 유전자-특이적 TaqMan® 어세이를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 조성물 및 방법은 방광, 비뇨생식기, 및/또는 요로 미생물총에 대해 지향된 미생물-특이적 TaqMan® 어세이를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 조성물 및 방법은 표 1에 열거된 Applied Biosystems™ TaqMan® 검정에 제공된 프라이머 쌍 및 프로브 중 적어도 하나를 포함한다. 본 방법은 표 1에 열거된 TaqMan® 검정에 제공된 프라이머 쌍 및 프로브 중 적어도 2개의 상이한 세트를 포함할 수 있다. 본 방법은 표 1에 열거된 TaqMan® 어세이들에 제공된 프라이머 쌍들 및 프로브들의 상이한 세트들 중 선별된 그룹 또는 패널을 포함할 수 있다. 본 방법은 표 1에 열거된 TaqMan® 검정에 제공된 프라이머 쌍 및 프로브의 모든 상이한 세트를 포함할 수 있다.

[0098] 일부 실시형태에서, 본원에서 기재된 바와 같은 TaqMan 검정의 사용은 배양-기반 방법으로부터 컬렉션된 데이터에 비교할 때 요로 미생물총의 검출 및 확인을 위한 보다 민감하고 보다 정확한 방법을 제공한다. UTI 병원체를 검출하고 식별하기 위한 전통적 또는 일상적인 ("골드 표준") 접근법은 소변 샘플로부터 소변 배양물을 제조하고 24시간 동안 미생물의 성장을 모니터링하는 것이다. 배양물이 미생물 성장을 나타내는지 여부는 소변 샘플이 주어진 요로병원체에 대해 양성 (+성장) 또는 음성 (-성장)인지를 결정하는 데 사용된다. 이것은 요검사를 위한 "배양-기반" 방법으로 지칭된다.

[0099] 소변 배양 결과는 전형적으로 미생물 성장의 양 및 순도에 기초하여 분류된다. 박테리아 및/또는 진균 성장을 정의하기 위해 일반적으로 사용되는 기준은 소변의 밀리리터당 $\geq 10^5$ 콜로니 형성 단위 (CFU)의 존재이다. 미생물 농도가 $\geq 10^5$ CFU/mL인 경우 UTI 배양물은 전형적으로 특정 미생물에 대해 양성인 것으로 간주되는 반면, 이

농도 미만은 음성이거나 "유의한 성장이 없는" 것으로 간주된다. 대부분의 경우, 인식된 역치 ($\leq 10^5$ CFU/mL) 미만, 특히 하나 초과 유형의 유기체가 존재하는 경우, 성장된 유기체는 오염 물질일 가능성이 있다. 역치 이상에서 실제 요로 감염이 발생할 가능성이 보다 높다. 그러나, 일부 사례에서, 소변의 밀리리터 당 $\geq 10^5$ CFU의 농도로 성장할 수 있지만, UTM을 정확하게 식별하거나 구별하기에는 너무 많은 상이한 미생물 ("혼합된 균총")가 있다. 이들 경우에, 배양 결과는 다수 (예를 들어, 2개 초과) 유기체의 성장이 또한 오염된 시료일 가능성이 높기 때문에 확정적이지 않은 데이터를 갖는 "음성"으로 지정된다. 따라서, "진성 음성" 배양물은 없거나 낮은 ($\leq 10^5$ cfu/mL) 성장을 갖는 것이고 "진성 양성" 배양물은 상당한 성장 (즉, $\geq 10^5$ CFU/mL)을 갖는 것인 반면, 혼합된 균총 @ $\geq 10^5$ CFU/mL"를 갖는 "음성" 샘플은 결과가 확정적이지 않거나 확인 가능하지 않은 샘플이다.

[0100] 일부 실시형태에서, 본원에서 기재된 바와 같은 TaqMan 검정의 사용은 전통적 배양-기반 방법으로부터 수득된 결과에 비교할 때 UTI 병원체의 검출 및/또는 확인에 대해 적어도 2x 배 더 민감하고/하거나 정확하다. 일부 실시형태에서, UTI TaqMan 어세이는 전통적 배양 방법으로부터 수득된 결과에 비교할 때 적어도 2x, 3x, 4x, 5x 또는 10x 더 민감하고/하거나 정확할 수 있다. 일부 실시형태에서, UTI TaqMan 어세이는 전통적 배양 방법으로부터 수득된 결과에 비교할 때 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 99% (및 그 사이의 모든 백분율 수를 포함함) 더 민감하고/하거나 정확할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에서 기재된 바와 같은 TaqMan 검정의 사용은 동일한 소변 샘플을 시험할 때 전통적 배양-기반 방법을 사용하여 확인된 미생물의 수에 비교하여 소변 샘플에서 (표 1에 열거된 것들로부터) 적어도 1개 더, 2개 더, 3개 더, 5개 더, 10개 더, 15개 더, 또는 17개 더 많은 미생물의 존재를 확인할 수 있다.

[0101] 일부 실시형태에서, 본원에서 기재된 바와 같은 PCR 방법은 (요로병원체의 존재를 확인하는 데 있어) 양성 및/또는 음성 요검사 결과를 제공할 수 있으며, 여기서 결과는 생거 서열분석 방법에 의해 수득된 양성 및/또는 음성 요검사 결과와 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% (및 그 사이의 모든 백분율 수를 포함함) 조화된다.

[0102] 일부 실시형태에서, 본원에서 기재된 바와 같은 PCR 방법은 (요로병원체의 존재를 확인하는 데 있어) 양성 및/또는 음성 요검사 결과를 제공할 수 있으며, 여기서 결과는 전통적 배양-기반 방법에 의해 수득된 양성 및/또는 음성 요검사 결과와 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% (및 그 사이의 모든 백분율 수를 포함함) 조화된다.

[0103] 상이한 미생물의 선택된 계놈 또는 전사체 서열로부터 유래된 표적 서열을 함유하는 대조 핵산 분자가 제공된다. 표적 서열은 박테리아, 진균, 원생동물, 및/또는 바이러스로부터 계놈 또는 전사체 서열로부터 유래될 수 있다. 대조 핵산 분자는 표 1로부터 상이한 미생물의 상이한 계놈 또는 전사체 서열로부터 유래된 상이한 표적 서열, 예를 들어, 2 내지 약 17개 상이한 표적 서열, 또는 5 내지 17개 상이한 표적 서열, 또는 10 내지 17개, 또는 15 내지 17개 상이한 표적 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상이한 미생물 유전자로부터 유래된 적어도 5, 적어도 10, 적어도 15, 또는 적어도 17개의 상이한 표적 서열을 포함하는 대조 핵산 분자가 제공된다.

[0104] 대조 핵산 분자에서 상이한 표적 서열은 길이가 다양할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 대조 핵산 분자에서 각각의 상이한 표적 서열은 약 15 뉴클레오타이드 내지 약 1000 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 대조 핵산 분자에서 각각의 상이한 표적 서열은 약 20 내지 약 800, 약 25 내지 약 600, 약 30 내지 약 500, 약 40 내지 약 400, 약 50 내지 약 300, 약 56 내지 105 뉴클레오타이드 길이이다.

[0105] 대조 핵산 분자는 상이한 표적 서열의 어느 하나의 면이나 양면에 측접하는 (flank) 계놈 또는 전사체 서열 또는 서열들의 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 대조 핵산 분자는 대조 핵산 분자의 적어도 2개의 상이한 표적 서열에 대해 3' 측접하는 서열의 부분, 5' 측접하는 서열의 부분 또는 3' 및 5' 측접하는 서열 둘 모두의 부분을 포함할 수 있다. 대조 핵산 분자는 대조 핵산 분자의 각각의 상이한 계놈 또는 전사체 표적 서열에 해당하는 3' 측접하는 서열의 부분, 5' 측접하는 서열의 부분 또는 3' 및 5' 측접하는 서열 둘 모두의 부분을 포함할 수 있다. 각각의 표적 서열에 측접하는 계놈 또는 전사체 영역 또는 영역들에 해당하는 측접하는 서열 (3' 또는 5'인 경우) 또는 서열들 (3' 및 5'인 경우)은 5 내지 500개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 각각의 표적 서열에 측접하는 계놈 또는 전사체 영역 또는 영역들에 해당하는 측접하는 서열(들)은 약 10 내지 400, 약 15 내지 200, 약 20 내지 100, 또는 약 25 내지 50개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 대조 핵산 분자는 상이한 미생물의 선택된 계놈 또는 전사체 서열로부터 유래된 표적 서열뿐만 아니라 그것의 해당하는 3', 5', 또는 3' 및 5' 계놈 또는 전사체 측접하는 서열일 수 있다. 대조 핵산 분자는 단지 상이한 표적 서열의 부분에만 해당하는 측접하는

서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 측접하는 서열은 상이한 표적 서열의 단지 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20, 25, 또는 30, 등에 대한 표적 핵산 분자에 포함될 수 있다. 상이한 표적 서열 및 단독 그것의 해당하는 3' 측접하는 서열은 대조 핵산 분자에 포함될 수 있고, 및/또는 상이한 표적 서열 및 단독 그것의 해당하는 5' 측접하는 서열은 대조 핵산 분자에 포함될 수 있고, 및/또는 상이한 표적 서열 및 양자의 그것의 해당하는 3'- 및 5'- 측접하는 서열은 대조 핵산 분자에 포함될 수 있다. 상이한 표적 서열 및 각각의 표적 서열에 대해 해당하는 3' 측접하는, 5' 측접하는, 3' 및 5' 측접하는 또는 측접하지 않는 서열 중 어느 하나의 조합이 대조 핵산 분자에 있을 수 있다. 대조 핵산 분자는 일부 사례에서 해당하는 게놈 또는 전사체 측접하는 서열을 포함하지 않을 수 있다.

[0106] 상이한 표적 서열 (포함된 측접하는 서열이 있거나 없음)을 포함하는 대조 핵산 분자는 길이가 다양할 수 있다. 전체 대조 핵산 분자의 길이는 0.5 kb 내지 50 kb 길이일 수 있다. 전체 대조 핵산 분자는 약 1 kb 내지 20 kb, 약 2 kb 내지 15 kb, 약 3 kb 내지 10 kb 길이, 또는 약 4 kb 내지 5 kb 길이일 수 있다. 대조 핵산 분자의 일부 또는 전체 서열은, 비제한적으로, 벡터, 플라스미드, 또는 바이러스를 포함한, 핵산 작제물 안으로 삽입되거나 또는 그 내부로 함유될 수 있다.

[0107] 중합효소 연쇄 반응 (PCR)-기반 기술에 대한 정량적 방법(예를 들어, qPCR)을 적용할 때, 표적 증폭의 진행을 결정하기 위한 수단을 제공하기 위해 형광 프로브 또는 다른 검출가능한 표지가 반응 안으로 포함될 수 있다. 형광 프로브 또는 다른 검출가능한 표지, 예컨대 핵산 결합 모이어티의 사용을 통해, 반응은 생성된 핵산 생성물의 양에 비례하여 형광반응할 수 있다. 이와 같이, PCR을 사용할 때, 대조 표적 서열에 해당하는 뉴클레오타이드 서열에 대한 어세이는 대조 핵산 샘플에 대한 증폭 반응 및/또는 추출 공정의 효능을 결정하는 데 사용될 수 있다. 형광 프로브는 특이적 핵산의 검출을 위한 서열-특이적 방식으로 사용될 수 있다. 검출가능한 표지는 핵산의 일반적인 검출을 위해 비-서열-특이적 방식으로 사용될 수 있다.

[0108] 증폭 반응은 반응 부위를 갖는 담체 상에서 일어나고 각각의 반응 부위는 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함할 수 있다. 증폭 반응은 반응 용기에서 일어나고 각각의 반응은 한 쌍의 증폭 프라이머를 포함할 수 있다. 반응 용기는 적어도 하나의 표적 특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브를 추가로 포함할 수 있으며, 본 프로브는 반응 용기에 존재하는 증폭 프라이머 쌍에 의해 증폭된 핵산의 부분에 대해 특이적이다. 지적된 바와 같이, 반응 용기는 개별 반응 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 반응 부위는 담체 플레이트 내의 관통공일 수 있고 각각의 관통공은 본원에서 기재된 바와 같이 한 쌍의 증폭 프라이머 및 적어도 하나의 검출가능하게-표지된 프로브를 포함할 수 있다. 프라이머 및 프로브는 대조 핵산 분자를 포함하는 대조 핵산 샘플과 접촉하기 전에 각각의 반응 부위 또는 반응 용기에서 건조될 수 있다.

[0109] 증폭 반응 용기는 또한 증폭 반응 혼합물의 다른 성분 시약 예컨대, 예를 들어, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 및/또는 dUTP), 중합효소, 완충액(들), 적어도 하나의 엔(들), 적어도 하나의 계면활성제(들), 적어도 하나의 증폭 억제제 차단제(들), 및/또는 적어도 하나의 발포방지제(들)를 함유할 수 있다. 따라서, 반-고형 또는 고형 담체에는 증폭 마스터 믹스와 함께 대조 핵산 분자 및 증폭 프라이머 쌍을 포함하는 반응 부위가 제공될 수 있다. 반응 부위 또는 반응 용기에서 프라이머 쌍 및 마스터 믹스 조합은 대조 핵산 샘플의 부가 전에 건조될 수 있다. 반-고형 또는 고형 담체에는 증폭 마스터 믹스와 함께 대조 핵산 분자, 증폭 프라이머 쌍 및 검출가능하게 표지된 프로브를 포함하는 반응 부위가 제공될 수 있다. 반응 부위 또는 반응 용기에서 프라이머 쌍, 프로브, 및 마스터 믹스 조합은 대조 핵산 샘플의 부가 전에 건조될 수 있다.

[0110] 일부 실시형태에서, 핵산 샘플은 DNA 또는 RNA, 예컨대 게놈 DNA (gDNA)일 수 있다. 핵산 샘플은 단일-가닥 또는 이중-가닥 핵산 분자를 포함할 수 있다. 핵산 샘플은 예를 들어 배양 세포 또는 생물학적 테스트 샘플을 포함한 임의의 원천으로부터 수득될 수 있다. 핵산 샘플은 당업계에서 알려진 임의의 다양한 절차, 예를 들어, MagMAX™ DNA 멀티-샘플 울트라 키트 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), MagMAX™ Express-96 자기 입자 프로세서 및 KingFisher™ Flex 자기 입자 프로세서 (Thermo Fisher Scientific), ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation 및 ABI Prism™ 6700 Automated Nucleic Acid Workstation (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), 및 기타 동종의 것을 사용하여 생물학적 원천으로부터 단리될 수 있다는 것이 인정될 것이다. 핵산 샘플은 기계적, 제한 엔도뉴클레아제 절단, 또는 당업계에서 알려진 임의의 방법과 같은 절차의 사용을 포함하여, 분석 전에 단편화될 수 있다는 것이 인정될 것이다. 일부 실시형태에서, 핵산 샘플은 증폭 및/또는 분석될 때 조 용해물에 있을 수 있다.

[0111] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단어 "a" 또는 "an"은 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 적어도 하나를 의미한다. 본 명세서에서, 단수의 사용은 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 복수를 포함한다. 예를 들어, 제한으로

서는 아니지만, "표적 핵산"은 1개 초과의 표적 핵산; 예를 들어, 특정 표적 핵산 종의 하나 이상의 카피뿐만 아니라 표적 핵산의 2 또는 그 초과의 상이한 종이 존재할 수 있다는 것을 의미한다. 용어 "및/또는"은 슬래시 전후의 용어가 함께 또는 별도로 취해질 수 있음을 의미한다. 제한으로서가 아닌 설명을 위해, "X 및/또는 Y"는 "X" 또는 "Y" 또는 "X" 및 "Y"를 의미할 수 있다.

[0112] 본 개시내용에서 논의된, 온도, 농도, 시간 등에 앞서 암시된 "약"이 존재하여, 약간의 그리고 대단찮은 편차가 본원에서 본 교시의 범위 내에 있다는 것이 인정될 것이다. 또한, "포함한다", "포함하다", "포함하는", "함유하다", "포함할 수 있다", "포함하는", "포함한다", "포함하다", 및 "포함하는"의 사용은 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 전술한 일반적인 설명 및 상세한 설명은 단지 예시적이고 설명적인 것이며 교시를 제한하는 것이 아님을 이해해야 한다.

[0113] 본 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 다양한 성분을 "포함하는"을 언급하는 본 명세서의 실시형태는 또한 언급된 성분으로 "구성되는" 또는 "본질적으로 구성되는"으로 고려되고; 다양한 성분으로 "구성되는"을 언급하는 명세서의 실시형태는 또한 언급된 성분을 "포함하는" 또는 "본질적으로 구성되는"것으로 고려되고; 그리고 다양한 성분으로 "본질적으로 구성되는"을 언급하는 명세서의 실시형태는 또한 언급된 성분으로 "구성되는" 또는 "포함하는" 것으로 고려된다 (이 상호교환성은 청구범위에서 이들 용어의 사용에는 적용하지 않는다).

[0114] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어들 "증폭", "핵산 증폭", 또는 "증폭시키는 것"은 핵산 템플레이트에 상보적인 다수 복제의 핵산 템플레이트의 생성, 또는 다수 핵산 서열 복제의 생성을 지칭한다. 본 용어들 (용어 "증합화"를 포함함)은 또한 (예를 들어, 중합에 의해) 핵산 템플레이트를 연장하는 것을 지칭할 수 있다. 증폭 반응은 중합효소-매개된 연장 반응 예컨대, 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응 (PCR)일 수 있다. 그러나, 임의의 알려진 증폭 반응이 본원에서 기재된 바와 같은 사용에 적합할 수 있다. 표적 핵산에서 "지수" 증가를 전형적으로 지칭하는 용어 "증폭시키는 것"은 본원에서 핵산의 선택된 표적 서열의 수에서의 선형 및 지수 증가 둘 모두를 기술하기 위해 사용될 수 있다.

[0115] 본원에서 사용된 바와 같이 용어들 "앰플리콘" 및 "증폭 생성물"은 일반적으로 증폭 반응의 생성물을 지칭한다. 앰플리콘은 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있고, 이중-가닥 증폭 생성물을 변성시킴에 의해 수득되는 분리된 성분 가닥들을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나의 증폭 주기의 앰플리콘은 후속 증폭 주기에서 템플레이트로서 작용할 수 있다.

[0116] 비제한적으로, 어원의 변형인 "혼성화한다" 및 "어닐링한다"를 포함한, 용어들 "어닐링" 및 "혼성화"는 상호교환적으로 사용되고, 이중, 삼중, 또는 다른 고차 구조의 형성을 초래하는 또 다른 핵산과 일 핵산의 뉴클레오타이드 염기쌍화 상호작용을 의미한다. 일차 상호작용은 전형적으로 왓슨-크릭 및 휴그스틴-형 수소 결합에 의해 뉴클레오타이드 염기 특이적, 예를 들어, A:T, A:U, 및 G:C이다. 특정 실시형태에서, 염기-적층 및 소수성 상호작용이 또한 듀플렉스 안정성에 기여할 수 있다. 프라이머 및 프로브가 상보적 서열에 어닐링하는 조건은 당해 분야에서 잘 알려져 있고, 예를 들어, 문헌 [Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, Hames and Higgins, eds., IRL Press, Washington, D.C. (1985)] 및 문헌 [Wetmur and Davidson, Mol. Biol. 31:349 (1968)]에 기재된 바와 같다.

[0117] 일반적으로, 이러한 어닐링이 발생하는 여부는 무엇보다도 표적 측접하는 서열 및/또는 앰플리콘에서의 프라이머 및 상보성 부분의 상보적 부분의 길이, 또는 리포터 프로브 및 그것의 결합 부위의 해당하는 상보적 부분의 길이; pH; 온도; 1가- 및 2가 양이온의 존재; 혼성화 영역에서 G 및 C 뉴클레오타이드의 비율; 배지의 점도; 및 변성제의 존재에 의해 영향을 받는다. 그와 같은 변수는 혼성화에 필요한 시간에 영향을 미친다. 따라서, 바람직한 어닐링 조건은 특정한 적용에 의존할 것이다. 그러나, 그와 같은 조건은 과도한 실험과정 없이 당해 분야의 일반적 숙련가에 의해 일상적으로 결정될 수 있다. 바람직하게는, 어닐링 조건은 프라이머 및/또는 프로브가 해당하는 표적 측접하는 서열 또는 앰플리콘에서 상보적 서열과 선택적으로 혼성화하도록 하지만, 제2 반응 온도에서 반응 조성물 내 상이한 표적 핵산 또는 비-표적 서열에는 임의의 상당한 정도로 혼성화하지 않도록 선택된다.

[0118] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "또는 이들의 조합"은 용어에 선행하는 열거된 용어들의 모든 순열 및 조합을 지칭한다. 예를 들어, "A, B, C, 또는 이들의 조합"은 A, B, C, AB, AC, BC, 또는 ABC 중 적어도 하나, 그리고 특정 맥락에서 순서가 중요한 경우, 또한 BA, CA, CB, ACB, CBA, BCA, BAC, 또는 CAB를 포함하는 것으로 의도된다. 본 예를 지속하여, 하나 이상의 항목 또는 용어의 반복을 함유하는 조합, 예컨대 BB, AAA, AAB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, 등이 명백하게 포함된다. 당업자는 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한 전형적으로 임의의 조합에서 항목 또는 용어들의 수에 대해 어떤 제한도 없다는 것을 이해할 것이다.

- [0119] 본원에서 사용된 바와 같이 용어들 "변성시키는" 및 "변성"은 적어도 하나의 표적 핵산을 포함한 게놈 DNA (gDNA) 단편, 이중-가닥 앰플리콘, 또는 적어도 하나의 이중-가닥 분절을 포함한 폴리뉴클레오타이드를 비제한적으로 포함하는 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드가 2개의 단일-가닥 폴리뉴클레오타이드, 또는 단일-가닥 또는 실질적으로 단일-가닥 폴리뉴클레오타이드로 적절하게 전환되는 임의의 과정을 지칭한다. 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드를 변성시키는 것에는, 이중-가닥 핵산을 예를 들어 비제한적으로 단일-가닥 또는 실질적으로 단일-가닥으로 만들어서, 2개의 올리고뉴클레오타이드를 포함한 듀플렉스 또는 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드를 2개의 개별 단일-가닥 성분으로 해리(releasing)시키는 다양한 열 및 화학 기술이 비제한적으로 포함된다. 당해 기술의 숙련가는 이용된 변성 기술이 일반적으로 증폭 반응의 후속적인 어닐링 또는 효소적 단계, 또는 특정 방법에서, 형광 신호의 검출을 실질적으로 방해하지 않는 한 제한되지 않는다는 것을 이해할 것이다.
- [0120] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "Tm"은 용융 온도와 관련하여 사용된다. 용융 온도는 이중-가닥 핵산 분자의 모집단이 단일 가닥으로 절반으로 해리되는 온도이다.
- [0121] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "작은 흄 결합체"는 이중-가닥 DNA의 작은 흄 안으로, 때때로 서열 특이적 방식으로 끼워지는 소분자를 지칭한다. 일반적으로, 작은 흄 결합체는 초승달-유사 형상을 채택할 수 있는 길고 평평한 분자이고, 따라서 이중 나선의 작은 흄에 적절하게 맞으며 종종 물을 대체한다. 작은 흄 결합 분자는 전형적으로 비틀림 자유를 갖는 결합에 의해 연결된 몇 개의 방향족 고리, 예를 들어, 비제한적으로, 푸란, 벤젠, 또는 피롤 고리를 포함한다.
- [0122] 용어 "종점" 측정은 반응이 일단 중단된 후에만 데이터 컬렉션이 일어나는 방법을 지칭한다.
- [0123] 용어들 "실시간" 및 "실시간 연속"은 교환가능하고 중합 반응의 과정 동안 주기적 모니터링을 통해 데이터 컬렉션이 일어나는 방법을 지칭한다. 따라서, 본 방법은 증폭과 검출을 단일 단계로 결합시킨다.
- [0124] 본원에서 사용된 바와 같이 용어들 "Ct" 및 "사이클 역치"는 형광 강도가 배경 형광보다 큰 시간을 지칭한다. 이들은 표적 증폭이 먼저 검출되는 시점 (또는 PCR 사이클)을 특징으로 한다. 결과적으로, 개시 물질에서 표적 DNA의 양이 많을수록 형광 신호의 현저한 증가가 더 빨리 나타나서, 더 낮은 Ct를 얻는다.
- [0125] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "프라이머" 및 그것의 유도체는 일반적으로 표적 핵산에 혼성화할 수 있는 임의의 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 프라이머는 또한 핵산 합성을 프라이밍하는 역할을 할 수 있다. 프라이머는 핵산 분자의 증폭 또는 중합 동안 뉴클레오타이드 단량체의 공유결합에 의해 연장되는 합성 또는 생물학적으로 생성된 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드이다. 핵산 증폭은 종종 핵산 중합효소 또는 역전사효소에 의한 핵산 합성에 기초한다. 많은 이러한 중합효소 또는 역전사효소는 이러한 핵산 합성을 개시하도록 연장될 수 있는 프라이머의 존재를 요한다. 프라이머는 전형적으로 약 11 염기 내지 약 35 염기 길이이지만, 필요에 따라 더 짧은 또는 더 긴 프라이머가 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 프라이머는 17 염기이거나 더 길다. 특정 실시형태에서, 프라이머는 약 17 염기 내지 약 25 염기 길이이다. 프라이머는 표준, 비-표준, 유도된 및 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 당해 분야의 숙련가에 의해 인정되는 바와 같이, 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드가 다양한 연장, 합성, 또는 증폭 반응에서 하나 이상의 프라이머로서 사용될 수 있다.
- [0126] 전형적으로, PCR 반응은 증폭되어 지는 RNA 또는 DNA의 영역을 한정하는 "상류" 또는 "정방향" 프라이머 및 "하류" 또는 "역방향" 프라이머를 포함하는 한 쌍의 증폭 프라이머를 사용한다. 제1 프라이머 및 제2 프라이머는 정방향 또는 역방향 프라이머일 수 있으며 본원에서 상호교환적으로 사용되며 제한되지 않아야 한다.
- [0127] 용어들 "상보적" 및 "상보적"은 교환가능하고 서로 염기쌍을 형성하는 폴리뉴클레오타이드의 능력을 지칭한다. 염기쌍은 역평행 폴리뉴클레오타이드 가닥 또는 영역에서 뉴클레오타이드 단위 사이의 수소 결합에 의해 전형적으로 형성된다. 상보적 폴리뉴클레오타이드 가닥 또는 영역은 왓슨-크릭 방식 (예를 들어, A 대 T, A 대 U, C 대 G)으로 염기쌍을 이룰 수 있다. 100% 상보적은 하나의 폴리뉴클레오타이드 가닥 또는 영역의 각각의 뉴클레오타이드 단위가 제2 폴리뉴클레오타이드 가닥 또는 영역의 각각의 뉴클레오타이드 단위와 수소 결합할 수 있는 상황을 지칭한다. "보다 덜 완벽한 상보적"은 2개의 가닥 또는 2개의 단위의 뉴클레오타이드 단위 전부는 아니지만 일부가 서로 수소 결합할 수 있는 상황을 지칭한다.
- [0128] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "역 상보체"는 왓슨-크릭 염기 짹짓기에 의해 정의된 규칙 및 DNA-DNA, RNA-RNA, 및 RNA-DNA 이중 나선의 역평행 성질에 따라 제2 올리고뉴클레오타이드에 어닐링/염기쌍 또는 실질적으로 어닐링/염기쌍을 할 서열을 지칭한다. 따라서, 예로서, RNA 서열 5'-AAUUUGC의 역 상보체는 5'-GCAAAUU일 것이다. 비제한적으로 G-U 짹짓기를 포함한, 대안적인 염기 짹짓기 방식은 또한 역 상보체에 포함될 수 있다.

- [0129] 본원에서 사용된 용어 "프로브"는, 규정된 엄격도(stringency) 하에서 표적 핵산 서열에 특이적으로(즉, 우선적으로) 혼성화되게 하는 특정 뉴클레오타이드 서열들을 설계 또는 선택에 의해 함유하는, 합성 또는 생물학적으로 생성된 핵산(DNA 또는 RNA)을 지칭한다.
- [0130] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 증폭 대조 핵산은 생물학적 샘플로부터 핵산 샘플에서 표적 핵산을 증폭, 검출, 프로파일링 및/또는 모니터링하기 위한 방법, 조성물 및 키트와 조합하여 사용된다.
- [0131] "생물학적 샘플" 또는 "테스트 샘플"은 세포, 조직의 섹션 예컨대 생검 및 부검 샘플, 및 조직학적 목적을 위해 취해진 냉동 섹션뿐만 아니라 세포 또는 조직으로부터 생기는 유체 또는 분비 시료를 포함한다 그와 같은 샘플은 생검, 혈액 및 혈액 분획 또는 생성물 (예를 들어, 혈청, 혈소판, 적혈구, 및 기타 동종의 것), 텁프, 골수, 가래, 기관지폐포 세척, 양수, 모발, 피부, 배양 세포, 예를 들어, 일차 배양물, 외식편, 및 형질전환된 세포, 대변, 소변, 등을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플이 소변으로부터 유래된 경우, 샘플은 카테터의 사용을 통해 또는 치골상 흡인에 의해 소변 배뇨에 의해 컬렉션될 수 있다. 표적 핵산 제조 전에, 생물학적 샘플은 신선하거나 냉동되거나 포르말린- 또는 파라포르말린-고정 파라핀-포매된 조직(FFPE)일 수 있다. "생검"은 진단 또는 예후 평가를 위해 조직 샘플을 제거하는 과정 및 조직 시료 자체를 지칭한다. 적용되는 생검 기술은, 다른 인자 중에서, 평가되어 지는 조직 유형(예를 들어, 피부, 점막 등), 조직 샘플의 크기 및 유형에 따라 달라질 것이다. 대표적인 생검 기술은, 비체한적으로, 절제 생검, 절개 생검, 바늘 생검, 및 외과적 생검을 포함한다.
- [0132] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 증폭 대조 핵산은 생물학적 또는 테스트 샘플에서 표적 미생물의 특정 세트로부터 핵산을 증폭, 검출, 프로파일링 및/또는 모니터링하기 위한 방법, 조성물 및 키트와 조합하여 사용된다. 일부 실시형태에서, 생물학적 또는 테스트 샘플은 요로 (예를 들어, 비뇨생식기 점막, 요도, 비뇨생식기 영역)로부터 유래하고, 이들 해부상의 부위로부터 세포, 조직 및/또는 유체 (예를 들어, 요로 분비물, 비뇨기 유체, 및 비뇨생식기 분비물)를 포함한다.
- [0133] 소변 샘플은 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 임의의 소변 컬렉션 장치, 용기 또는 기기를 사용하여 컬렉션될 수 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, 소변은 BD Vacutainer® 소변 컬렉션 컵; BD Vacutainer® 요검사 보존제 투브; BD Vacutainer® Plus C&S 보존제 투브; Hologics® Aptima 소변 시료 이송 투브(Urine Specimen Transport Tubes) 및 기타 동종의 것을 사용하여 컬렉션될 수 있다. 소변 시료는 당해 분야의 숙련가에게 알려진 임의의 수단에 의해 컬렉션될 수 있다. 예를 들어, 소변은 카테터의 사용을 통해 또는 치골상 흡인에 의해, 소변 배뇨에 의해 컬렉션될 수 있다. 예를 들어, 요도 또는 비뇨생식기 생물학적 샘플과 양립가능한 컬렉션 시스템, 시약, 및 배지는 당해 기술에 공지되어 있고 본원에서 개시된 바와 같은 방법, 조성물 및 키트와 함께 사용이 고려된다.
- [0134] 핵산은 당업계에서 알려진 임의의 다양한 절차, 예를 들어, MagMAX™ DNA 멀티-샘플 울트라 키트 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), MagMAX™ Express-96 자기 입자 프로세서 (Thermo Fisher Scientific), KingFisher™ Flex 자기 입자 프로세서 (Thermo Fisher Scientific), PureLink™ Microbiome DNA 정제 키트 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), FFPE용 RecoverAll™ Total Nucleic Acid 단리 키트 (Ambion™, Thermo Fisher Scientific), PureLink™ FFPE RNA 단리 키트 (Ambion™, Thermo Fisher Scientific), ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation 및 ABI Prism™ 6700 Automated Nucleic Acid Workstation (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), 및 기타 동종의 것을 사용하여 생물학적 원천으로부터 단리될 수 있다는 것이 인정될 것이다. 생물학적 샘플로부터 표적 핵산은 기계력, 초음파처리, 제한 엔도뉴클레아제 절단, 또는 당업계에서 알려진 임의의 방법과 같은 절차의 사용을 포함하여, 분석 전에 절단 또는 전단될 수 있다는 것이 인정될 것이다.
- [0135] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "템플레이트"는 "표적 분자" 또는 "표적 핵산"과 교환가능하고 증폭된, 복제되거나 또는 연장된, 합성된, 또는 서열화되는 이중-가닥 또는 단일-가닥 핵산 분자를 지칭한다. 이중-가닥 DNA 분자의 경우에, 제1 및 제2 가닥을 형성하기 위해 그것의 가닥의 변성이 수행되어 이를 분자를 증폭, 서열화, 또는 합성한다. 표적 핵산은 증폭 또는 합성 반응에 유용한 프라이머가 중합효소에 의한 연장 전에 혼성화될 수 있는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 템플레이트의 일부에 상보적인 프라이머가 적합한 조건 하에서 혼성화되고, 그 다음 중합효소(예를 들어, DNA 중합효소 또는 역전사효소)가 템플레이트 또는 이의 일부에 상보적인 핵산 분자를 합성할 수 있다. 본 개시내용에 따른 새로 합성된 분자는 최초 템플레이트 보다 길이에서 동등하거나 더 짧을 수 있다. 새로 합성된 분자의 합성 또는 연장 동안 불일치 혼입은 하나 또는 다수의 불일치된 염기쌍을 초래할 수 있다. 따라서, 합성된 분자는 템플레이트에 정확하게 상보적일 필요는 없다. 템플레이트는 RNA 분자, DNA 분자, 또는 DNA/RNA 하이브리드 분자일 수 있다. 새로 합성된 분자는 후속적인 핵산 합성 또는 증폭을 위한

템플레이트로 작용할 수 있다.

[0136] 표적 핵산은 핵산(예를 들어, DNA 또는 RNA), 계놈 DNA(gDNA), 세포유리 DNA, 순환성 DNA, cDNA, 메신저 RNA(mRNA), 트랜스퍼 RNA(tRNA), 작은 간섭하는 RNA(siRNA), microRNA(miRNA), 또는 다른 성숙한 작은 RNA일 수 있고, 핵산 유사체 또는 다른 핵산 모방체를 포함할 수 있다. 표적은 메틸화되거나, 비-메틸화되거나, 또는 둘 모두일 수 있다. 표적은 우라실로 전환된 바이설파이트-처리되고 비-메틸화된 시토신일 수 있다. 또한, "표적 핵산"은 표적 핵산 자체뿐만 아니라 이의 대리물, 예를 들어, 증폭 생성물 및 고유 서열을 지칭할 수 있다는 것이 인정될 것이다.

[0137] 표적 핵산은 임의의 원천으로부터 수득될 수 있고, 임의의 수의 상이한 조성물의 성분을 포함할 수 있다. 본 교시의 표적 분자는 비제한적으로, 바이러스, 원시동물, 원생동물, 원핵생물 및 진핵생물을 포함한, 임의의 수의 공급원으로부터, 예를 들어, 진핵 유기체, 가장 바람직하게는 포유동물 예컨대 영장류 예를 들어, 침팬지 또는 인간으로부터 수득된 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있다. 표적 핵산은 당업계에서 알려진 임의의 다양한 절차, 예를 들어, MagMAX™ DNA 멀티-샘플 울트라 키트 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), MagMAX™ Express-96 자기 입자 프로세서 및 KingFisher™ Flex 자기 입자 프로세서 (Thermo Fisher Scientific), FFPE용 RecoverAll™ Total Nucleic Acid 단리 키트 및 PureLink™ FFPE RNA 단리 키트 (Ambion™, Thermo Fisher Scientific), ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation 및 ABI Prism™ 6700 Automated Nucleic Acid Workstation (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), 및 기타 동종의 것을 사용하여 생물학적 샘플로부터 단리될 수 있다는 것이 인정될 것이다. 표적 핵산은 기계력, 초음파처리, 제한 엔도뉴클레아제 절단, 또는 당업계에서 알려진 임의의 방법과 같은 절차의 사용을 포함하여, 분석 전에 절단 또는 전단될 수 있다는 것이 인정될 것이다. 일반적으로, 본 교시의 표적 핵산은 단일-가닥일 것이고, 일부 실시형태에 걸쳐서는 표적 핵산은 이중-가닥일 수 있고, 그리고 단일-가닥은 변성으로 기인될 수 있다.

[0138] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "혼입"은 DNA 또는 RNA 분자 또는 프라이머의 일부가 되는 것을 의미한다.

[0139] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "핵산 결합 모이어티"는 핵산 분자 예컨대 DNA, RNA 또는 DNA/RNA 하이브리드를 결합하는 것에 대해 친화력을 갖는 분자를 지칭한다.

[0140] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "핵산 결합 염료"는 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드에 특이적이거나 단일가닥 폴리뉴클레오타이드보다 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드와 연관될 때 적어도 실질적으로 더 큰 형광 향상을 나타내는 형광 분자를 지칭한다. 전형적으로, 핵산 결합 염료 분자는 이중-가닥 분절, 또는 둘 모두의 큰 흄이나 작은 흄에 결합하는 것이 아닌, 이중-가닥 분절의 염기쌍 사이에 삽입작용에 의해 폴리뉴클레오타이드의 이중-가닥 분절과 회합한다. 핵산 결합 염료의 비-제한적인 예는 에티듐 브로마이드, DAPI, 비제한적으로 Hoechst 33258 및 Hoechst 33342를 포함한 Hoechst 유도체, 란탄족 퀼레이트를 포함한 삽입제 (예를 들어, 비제한적으로, 2개의 형광 네자리 β -디케톤-Eu3+ 퀼레이트를 담지하는 나프탈렌 디이미드 유도체 (NDI-(BHQCT-Eu3+)₂), 예를 들어, 문헌 [Nojima et al., Nucl. Acids Res. Suppl. No. 1 105 (2001)] 참고, 및 특정 비대칭 시아닌 염료 예컨대 SYBR® 녹색 및 PicoGreen®을 포함한다.

[0141] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어들 "폴리뉴클레오타이드", "올리고뉴클레오타이드", 및 "핵산"은 상호교환적으로 사용되고, 비제한적으로, 뉴클레오타이드간 포스포디에스테르 결합 연결기, 또는 뉴클레오타이드간 유사체, 및 연관된 반대 이온, 예를 들어, H⁺, NH4⁺, 트리알킬암모늄, Mg²⁺, Na⁺, 및 기타 동종의 것에 의해 연결된 2'-데옥시리보뉴클레오타이드 (DNA) 및 리보뉴클레오타이드 (RNA)를 비롯한, 뉴클레오타이드 단량체의 단일-가닥 및 이중-가닥 폴리머를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 전적으로 데옥시리보뉴클레오타이드, 전적으로 리보뉴클레오타이드, 또는 키메라 이들의 혼합물로 구성될 수 있고, 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 단량체 단위는, 비제한적으로, 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함한, 본원에 기재된 임의의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 크기가 전형적으로 수 단량체 단위, 예를 들어, 이들이 때때로 올리고뉴클레오타이드로 당업계에서 지칭될 때 5-40으로부터, 수천의 단량체성 뉴클레오타이드 단위까지의 범위이다. 달리 나타내지 않는 한, 폴리뉴클레오타이드 서열이 제시될 때마다, 뉴클레오타이드는 왼쪽에서 오른쪽으로 5'-에서 -3' 순서이고, 달리 지적되지 않는 한 "A"는 데옥시아데노신을 나타내고, "C"는 데옥시시토신을 나타내고, "G"는 데옥시구아노신을 나타내고, "T"는 데옥시티미딘을 나타내고, "U"는 데옥시우리딘을 나타낸다는 것이 이해될 것이다.

[0142] 용어 "뉴클레오타이드"는 뉴클레오사이드의 포스페이트 에스테르, 예를 들어, 트리포스페이트 에스테르를 지칭하고, 여기서 에스테르화의 가장 혼한 부위는 펜토스의 C-5 위치에 부착된 하이드록실기이다.

- [0143] 용어 "뉴클레오사이드"는 2'-데옥시 및 2'-하이드록실 형태를 포함한, 1' 위치에서 펜토스에 연결된, 퓨린, 테아자퓨린, 또는 퍼리미딘 뉴클레오사이드 염기, 예를 들어, 아데닌, 구아닌, 시토신, 우라실, 티민, 테아자아데닌, 테아자구아노신, 등으로 구성되는 화합물을 지칭한다. 뉴클레오사이드 염기가 퓨린 또는 7-데아자퓨린인 경우, 펜토스는 퓨린 또는 테아자퓨린의 9- 위치에서 핵염기에 부착되고, 핵염기가 퓨리미딘인 경우, 펜토스는 퍼리미딘의 1-위치에서 핵염기에 부착된다.
- [0144] 용어 "유사체"는 변형된 염기 부분, 변형된 당 부분 및/또는 변형된 포스페이트 에스테르 부분을 갖는 합성 유사체를 포함한다. 포스페이트 유사체는 일반적으로 인 원자가 +5 산화 상태로 되고 산소 원자 중 하나 이상이 비-산소 부분, 예를 들어 황으로 대체된 포스페이트의 유사체를 포함한다. 예시적인 포스페이트 유사체는, 연관된 반대이온, 예를 들어, H^+ , NH_4^+ , Na^+ 을 포함한, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포라닐리데이트, 포스포르아미데이트, 보로노포스페이트를 포함한다. 예시적인 염기 유사체는 2,6-디아미노퓨린, 하이포잔틴, 슈도우리딘, C-5-프로핀, 이소시토신, 이소구아닌, 2-티오피리미딘을 포함한다. 예시적인 당 유사체는 2'- 또는 3'-수정을 포함하고 여기서 2'- 또는 3'-위치는 수소, 하이드록시, 알콕시, 예를 들어, 메톡시, 에톡시, 알릴옥시, 이소프로록시, 부톡시, 이소부톡시 및 페녹시, 아지도, 아미노 또는 알킬아미노, 플루오로, 클로로, 및 브로모이다.
- [0145] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "슈퍼플라스미드"는 다수의, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 17개의 관심 있는 핵산 표적 서열을 포함하는 삽입 단편을 포함한 플라스미드(DNA 분자)를 지칭한다. 핵산 표적 서열은 게놈 또는 전사체 서열일 수 있다. 핵산 표적 서열은 이종 핵산(XNA)일 수 있다. 핵산 표적 서열은 게놈, 전사체 또는 이종 핵산 서열의 임의의 조합일 수 있다.
- [0146] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "반응 용기"는 반응이 본 교시에 따라 일어날 수 있는, 임의의 용기, 챔버, 장치, 카드, 플레이트, 칩, 어레이 또는 어셈블리를 일반적으로 지칭한다. 일부 실시형태에서, 반응 용기는 마이크로튜브, 예를 들어, 비제한적으로, 0.2 mL 또는 0.5 mL 반응 튜브 예컨대 MicroAmp™ 옵티칼 튜브 (Life Technologies Corp., 캘리포니아주 칼스배드 소재) 또는 마이크로-원심관, 또는 분자 생물학 실험에서 일반적 관행의 다른 용기일 수 있다. 일부 실시형태에서, 반응 용기는 개별 반응 부위를 포함할 수 있고, 예를 들어, 반응 부위는 다중-웰 플레이트 (예컨대 48-, 96-, 또는 384-웰 미세적정 플레이트)의 웰, 유리 슬라이드 상의 스팟, TaqMan™ 어레이 카드에서 웰 또는, 비제한적으로 TaqMan™ 저밀도 어레이를 포함한 미세유체공학 디바이스의 채널 또는 챔버, 또는 TaqMan™ OpenArray™ Real-Time PCR 플레이트 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)의 관통공을 포함할 수 있다. 제한이 아닌, 예를 들어, 다중 반응 부위는 동일한 담체 상에 또는 동일한 반응 용기 내에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, OpenArray™ 플레이트는 3072 관통공 또는 상이한 반응 부위를 갖는 반응 플레이트이다. 이러한 플레이트에서 각각의 이러한 관통공은 단일 TaqMan™ 어세이를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 랩-온-어-칩-유사 디바이스가 예를 들어, 캘리퍼 (Caliper) 또는 플루이디엄(Fluidigm)으로부터 입수 가능하다. 그 일부가 다중 반응 부위를 포함하는 다양한 반응 용기가 상업적으로 입수 가능하거나 또는 본 교시의 관점에서 사용하기 위해 설계될 수 있다는 것이 인식될 것이다.
- [0147] 용어 "리포터 그룹"은 본원에서 넓은 의미로 사용되고 임의의 확인가능한 또는 검출가능한 태그, 표지, 또는 부분을 지칭한다.
- [0148] 효소와 관련하여 사용될 때 용어 "열안정성"은 열에 의한 불활성화에 저항성인 효소(예컨대 핵산 중합효소 활성을 갖는 폴리펩타이드)를 지칭한다. "열안정성" 효소는 열처리에 의해 불활성화될 수 있는 "열불안정성" 중합효소와 대조적이다. 열불안정성 단백질은 생리학적 온도에서 불활성화될 수 있고, 중간열안정성(약 45°C 내지 약 65°C에서 불활성화) 및 열안정성 (약 65°C 초과에서 불활성화)으로 분류될 수 있다. 예를 들어, 열불안정성 T5 및 T7 DNA 중합효소의 활성은 효소를 약 90의 온도에 약 30초 동안 노출시킴에 의해 완전히 불활성화될 수 있다. 열안정성 중합효소 활성은 열불안정성 중합효소보다 열 불활성화에 더 저항성이다. 그러나, 열안정성 중합효소는 열불활성화에 완전히 저항성인 효소를 지칭하는 것을 의미하지는 않으며; 따라서, 열처리는 예를 들어 특히 장시간에 걸쳐 및/또는 반복되는 수의 열에 노출되는 경우 중합효소 활성을 어느 정도 감소시킬 수 있다. 열안정성 중합효소는 전형적으로 열불안정성 DNA 중합효소보다 더 높은 최적 온도를 또한 가질 것이다.
- [0149] 용어 "작동 농도"는 특정 기능(예컨대 핵산 분자의 합성 또는 소화)을 수행하기 위해 용액에 사용된 최적 농도 이거나 그 근처에 있는 시약의 농도를 지칭한다. 시약의 작동 농도는 또한 시약의 "1X 농도" 또는 "1X 용액"(시약이 용액에 있는 경우)과 동등하게 기술된다. 따라서, 더 높은 농도의 시약은 또한 작동 농도에 기초하여 기술될 수 있으며; 예를 들어, 시약의 "2X 농도" 또는 "2X 용액"은 시약의 작동 농도보다 2배 높은 농도 또는 용액

으로 정의되고; "5X 농도" 또는 "5X 용액"은 작동 농도보다 5배 높고, 그리고 등등이다.

[0150]

용어 "반응 혼합물" 및/또는 "마스터 믹스"는 표적 핵산을 합성 또는 증폭하는 데 사용되는 다양한 (일부 또는 전부) 시약 및/또는 성분을 포함한 조성물을 지칭할 수 있다. 이러한 반응은 또한 고형 담체 또는 반-고형 담체 (예를 들어, 어레이)를 사용하여 수행될 수 있다. 반응은 또한 사용자가 원하는 대로 단일 또는 다중 형식으로 수행될 수 있다. 이를 반응은 전형적으로 효소, 수성 완충액, 염, 증폭 프라이머, 표적 핵산 및 뉴클레오사이드 트리포스페이트를 포함한다. 증폭 반응 혼합물 및/또는 마스터 믹스는 예를 들어, 완충액(예를 들어, Tris), 하나 이상의 염(예를 들어, MgCl₂, KCl), 글리세롤, dNTP(dA, dT, dG, dC, dU), 재조합 BSA(소과 혈청 알부민), 염료(예를 들어, ROX 수동적인 기준 염료 또는 추적 염료), 하나 이상의 계면활성제(예를 들어, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 20, Brij-58), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리비닐 피롤리돈(PVP), 젤라틴(예를 들어, 어류 또는 소과 원천) 및/또는 밸포방지제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 상황에 따라, 혼합물은 완전한 또는 불완전한 증폭 반응 혼합물일 수 있다. 일부 실시형태에서, 마스터 믹스는 증폭 반응에 사용하기 전에 증폭 프라이머를 포함하지 않는다. 일부 다른 실시형태에서, 마스터 믹스는 증폭 반응에 사용하기 전에 표적 핵산을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 증폭 마스터 믹스는 증폭 프라이머와 접촉하기 전에 표적 핵산 샘플과 혼합된다. 일부 다른 실시형태에서, 증폭 마스터 믹스는 표적 핵산 샘플과 접촉하기 전에 증폭 프라이머와 혼합된다.

[0151]

일부 실시형태에서, 증폭 반응 혼합물은 증폭 프라이머 및 마스터 믹스를 포함한다. 일부 다른 실시형태에서, 증폭 반응 혼합물은 증폭 프라이머, 검출가능하게 표지된 프로브, 및 마스터 믹스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 증폭 프라이머 및 마스터 믹스 또는 증폭 프라이머, 프로브 및 마스터 믹스의 반응 혼합물은 보관 용기 또는 반응 용기에서 조제된다. 일부 다른 실시형태에서, 증폭 프라이머 및 마스터 믹스 또는 증폭 프라이머, 프로브 및 마스터 믹스의 반응 혼합물은 보관 용기 또는 반응 용기에서 동결건조된다.

[0152]

본 개시내용은 단일 핵산 원천 또는 샘플로부터 다중 표적-특이적 서열의 증폭에 관한 것이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서 그 단일 핵산 샘플은 RNA(또는 달리는 미생물)를 포함할 수 있고 다른 실시형태에서, 그 단일 핵산 샘플은 게놈 DNA(미생물 게놈 DNA를 포함함)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 원천으로부터 핵산 분자(예를 들어, 외부 대조 핵산)는 표적-특이적 증폭 전에 반응 혼합물에서 단일 핵산 샘플과 조합된다. 샘플을 단일 개체로부터 유래할 수 있다는 것이 구상된다. 표적-특이적 프라이머 및 프라이머 쌍은 핵산 분자, 예를 들어, 대조 핵산 분자의 특정 영역을 증폭할 수 있는 표적-특이적 서열이다. 표적-특이적 프라이머는 RNA의 역전사를 프라이밍할 수 있어 표적-특이적 cDNA를 생성한다. 표적-특이적 프라이머는 미생물 DNA, 예컨대 박테리아 DNA, 진균(예를 들어, 효모) DNA, 원생동물 DNA, 또는 바이러스 DNA를 증폭시킬 수 있다.

[0153]

일 실시형태에서, 하나 이상의 표적 서열을 포함하는 샘플은 본원에 개시된 표적-특이적 프라이머 중 임의의 하나 이상을 사용하여 증폭될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본원에 개시된 방법 및 연관된 조성물 및 키트를 사용하여 수득된 증폭된 표적 서열은 다운스트림 과정, 예컨대 비제한적으로, 핵산 서열분석에 커플링될 수 있다. 예를 들어, 증폭된 표적 서열의 핵산 서열이 알려지면, 핵산 서열은 하나 이상의 참조 샘플에 비교될 수 있다. 증폭 절차로부터의 출력물은 예를 들어 핵산 서열분석에 의해 선택적으로 분석되어 표적-특이적 프라이머에 기초한 기대된 증폭 생성물이 증폭 출력물 안에 존재하는지 여부를 결정할 수 있다. 일부 실시형태에서, 선택적 증폭에 의해 생성된 앰플리콘은 서열분석 이전에 클로닝될 수 있거나 또는 앰플리콘은 클로닝 없이 직접적으로 서열분석될 수 있다. 앰플리콘은 적절한 DNA 서열분석 플랫폼을 사용하여 서열분석될 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 이해될 것이다. 예를 들어, 앰플리콘은 Ion Personal Genome Machine™(PGM™) 시스템 또는 Ion Proton™ 시스템(Thermo Fisher Scientific) 또는 당업자에게 알려진 임의의 다른 상업적으로 입수 가능한 플랫폼 또는 방법론을 사용하여 서열분석될 수 있다.

[0154]

일부 실시형태에서, 생성된 앰플리콘의 길이는 선택된 프라이머 쌍의 사용을 통하여 조절될 수 있다. 일부 양태에서, 각각의 프라이머 세트(예를 들어, 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머)는 선택된 프라이머 쌍으로 표적 핵산을 증폭시키는 것이 특이적 크기를 갖는 앰플리콘을 초래하도록 표적 핵산의 상이한 영역의 모두 또는 일부에 구체적으로 혼성화하도록 구성될 수 있다. 각각의 프라이머가 혼성화되는 표적 핵산의 상이한 영역은 적어도 10 뉴클레오타이드, 적어도 20 뉴클레오타이드, 적어도 50 뉴클레오타이드, 적어도 100 뉴클레오타이드, 적어도 250 뉴클레오타이드, 적어도 500 뉴클레오타이드, 적어도 750 뉴클레오타이드, 등으로 분리될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 선택된 프라이머 세트는 적어도 10 뉴클레오타이드 길이, 적어도 20 뉴클레오타이드 길이, 적어도 50 뉴클레오타이드 길이, 적어도 100 뉴클레오타이드 길이, 적어도 250 뉴클레오타이드 길이, 적어도 500 뉴클레오타이드 길이, 적어도 750 뉴클레오타이드 길이, 등인 앰플리콘을 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 선택된 프라이머 쌍은 길이에서 500 염기 미만, 길이에서 300 염기 미만, 길이에서 200 염기 미만, 또는 길

이에서 100 염기 미만인 앰플리콘을 생성한다. 일부 실시형태에서, 생성된 앰플리콘은 20 내지 500 뉴클레오타이드 길이이다. 예를 들어, 앰플리콘은 20 뉴클레오타이드 길이, 50 뉴클레오타이드 길이, 100 뉴클레오타이드 길이, 200 뉴클레오타이드 길이, 300 뉴클레오타이드 길이, 400 뉴클레오타이드 길이, 500 뉴클레오타이드 길이, 또는 그 사이 임의의 길이(예를 들어, 20 내지 500 뉴클레오타이드 길이를 포함하고 그 사이의 임의의 길이)일 수 있다. 본원에 기재된 방법, 조성물 및 키트에 따른 사용을 위해, 원하는 앰플리콘 크기를 제공하는 증폭 프라이머의 세트를 설계하고 선택하는 시스템 및 방법은 당해 분야의 숙련가에게 알려져 있다. 예를 들어, 국제공개 WO2013134341 A1호 및 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>를 참고한다. 당해 분야의 숙련가는 또한 앰플리콘 길이를 결정하는 표준 방법을 쉽게 결정할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 상대적인 앰플리콘 크기를 입증하기 위해 DNA 크기 마커가 사용될 수 있다.

[0155]

일 실시형태에서, 하나 이상의 표적 서열을 포함하는 핵산 대조군은 본원에 개시된 표적-특이적 프라이머 중 임의의 하나 이상을 사용하여 증폭될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본원에 개시된 방법 및 연관된 조성물 및 키트를 사용하여 수득된 증폭된 표적 서열은 다운스트림 과정, 예컨대 비제한적으로, 핵산 서열분석에 커플링될 수 있다. 예를 들어, 증폭된 표적 서열의 핵산 서열이 알려지면, 핵산 서열은 하나 이상의 참조 샘플에 비교될 수 있다. 증폭 절차로부터의 출력물은 예를 들어 핵산 서열분석에 의해 선택적으로 분석되어 표적-특이적 프라이머에 기초한 기대된 증폭 생성물이 증폭 출력물 안에 존재하는지 여부를 결정할 수 있다. 일부 실시형태에서, 선택적 증폭에 의해 생성된 앰플리콘은 서열분석 이전에 클로닝될 수 있거나 또는 앰플리콘은 클로닝 없이 직접적으로 서열분석될 수 있다. 앰플리콘은 적절한 DNA 서열분석 플랫폼을 사용하여 서열분석될 수 있다. 예를 들어, 앰플리콘은 Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) 시스템 또는 Ion Proton™ 시스템 (Thermo Fisher Scientific) 또는 임의의 다른 상업적으로 입수 가능한 계기 장비를 사용하여 서열분석될 수 있다.

[0156]

표적 핵산을 증폭하기 위해 사용된 방법은 당해 분야의 숙련가가 이용가능한 임의의 것일 수 있다. 핵산의 표적 서열의 복제를 배가시키기 위한 임의의 시험관내 수단이 이용될 수 있다. 이들은 선형, 로그, 실시간, 정량적, 종점 및/또는 임의의 다른 증폭 방법을 포함한다. 본 개시내용은 일반적으로 핵산 증폭 반응으로 중합효소 연쇄 반응(PCR 또는 qPCR)을 사용하는 것을 언급할 수 있지만, 본원에 기술하는 조성물, 방법 및 키트는 양 중합효소-매개된 증폭 반응(예컨대 헬리카제-의존적 증폭(HDA), 재조합효소-중합효소 증폭(RPA), 및 회전환 증폭(RCA)), 뿐만 아니라 리가제-매개된 증폭 반응(예컨대 리가제 검출 반응(LDR), 리가제 연쇄 반응(LCR), 및 각각의 캡-버전), 및 핵산 증폭 반응 예컨대 LDR 및 PCR의 조합(예를 들어, 미국 특허 번호 제6,797,470호 참고)을 포함한, 다른 유형의 핵산 증폭 반응에도 효과적이다는 것이 기대된다. 핵산 합성에 대한 예시적인 방법은 그 중에서도 중합효소 연쇄 반응(PCR; 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,683,202호; 제4,683,195호; 제4,965,188호; 및/또는 제5,035,996호 참고), 등온 절차 (하나 이상의 RNA 중합효소를 사용함(예를 들어, PCT 공개 번호 WO 2006/081222호 참고), 가닥 변위(예를 들어, 미국 특허 번호 RE39007E호 참고), 프라이머 분자의 부분적인 파괴(예를 들어, PCT 공개 번호 WO 2006/087574호 참고)), 리가제 연쇄 반응(LCR)(예를 들어, 문헌 [Wu, et al., Genomics 4: 560-569 (1990)]], 및/또는 문헌 [Barany, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193 (1991)] 참고), Q β RNA 레플리카제 시스템(예를 들어, PCT 공개 번호 WO 1994/016108호 참고), RNA 전사-기반 시스템(예를 들어, TAS, 3SR), 회전환 증폭(RCA)(예를 들어, 미국 특허 번호 제5,854,033호; 미국 특허 공개 번호 제2004/265897호; 문헌 [Lizardi et al. Nat. Genet. 19: 225-232 (1998)]; 및/또는 문헌 [Baner et al. Nucleic Acid Res., 26: 5073-5078 (1998)] 참고), 및 가닥 변위 증폭(SDA)(Little, et al. Clin. Chem. 45:777-784 (1999))을 포함한다. 당업자에게 이용가능한 많은 다른 시스템과 함께, 이를 시스템은 본원에서 기재된 바와 같은 사용을 위해 표적 핵산을 중합 및/또는 증폭시키는 데 사용하기에 적합할 수 있다.

[0157]

특정 실시형태에서, 증폭 기술은 적어도 하나의 증폭 사이클을, 예를 들어, 성분 가닥들을 분리하기 위한 이중-가닥 핵산을 변성시키는 단계; 프라이머 또는 프라이머들의 세트를 앰플리콘의 표적 서열 또는 프라이머-결합 부위(들)(또는 적절한 경우, 어느 하나의 상보체)에 혼성화시키는 단계; 및 DNA 중합효소 활성을 갖는 폴리펩타이드 또는 DNA 중합효소를 사용하여 템플레이트-의존 방식으로 뉴클레오타이드의 가닥을 합성하는 단계를, 비제한적으로 포함한다. 본 사이클은 또는 반복되거나 반복되지 않을 수 있다. 특정 실시형태에서, 증폭 사이클은 다수의 증폭 사이클, 예를 들어, 비제한적으로 20 사이클, 25 사이클, 30 사이클, 35 사이클, 40 사이클, 45 사이클 또는 45 사이클 초과의 증폭을 포함한다.

[0158]

일부 실시형태에서, 증폭시키는 것은 기기, 예를 들어, 비제한적으로, GeneAmp® PCR 시스템 9700, 9600, 2700 또는 2400 열주기장치, Applied Biosystems® ViiA™ 7 Real-Time PCR 시스템, Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR 시스템, 7900HT Fast Real-Time PCR 시스템, StepOne® Real-Time PCR 시스템, StepOnePlus® Real-Time PCR 시스템, QuantStudio™ 3 또는 5 Real-Time PCR 시스템, QuantStudio™ 6K, 7K

또는 12K Flex Real-Time PCR 시스템, QuantStudio™ Dx Real-Time PCR 시스템 및 기타 동종의 것 (모두 Thermo Fisher Scientific 제품)을 사용하여 열 사이클링을 포함한다. 본 방법에 사용하기 위한 분광광도법적 열주기장치의 다른 예는, 비제한적으로, Bio-Rad iCycler iQ™, Cepheid SmartCycler® II, Corbett Research Rotor-Gene 3000, Idaho Technologies R.A.P.I.D.™, MJ Research Chromo 4™, Roche Applied Science LightCycler®, Roche Applied Science LightCycler®2.0, Stratagene Mx3000P™, 및 Stratagene Mx4000™을 포함한다. 다양한 기기가 상업적으로 입수 가능하고 본원에서 개시된 바와 같은 방법과 함께 사용하기에 적합하다는 것이 인식될 것이다.

[0159] 일부 실시형태에서, 표적 RNA 서열의 역전사와 수득한 cDNA의 증폭 둘 모두가 동일한 반응 혼합물에서 일어나는 역전사 - 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)이 수행된다. 일부 실시형태에서, RT-PCR은 2-단계 또는 다단계 과정으로 수행된다. 다른 실시형태에서, RT PCR은 단일 단계(예를 들어, 1-단계 RT-PCR)에서 수행된다. 일부 실시형태에서, RT-PCR 반응 혼합물은 증폭된 cDNA의 검출이 또한 동일한 반응 혼합물에서 일어나도록 추가로 검출가능하게 표지된, 표적-특이적 프로브를 포함한다.

[0160] 특정 실시형태에서, 증폭 반응은 동일한 검정 조건 하에서 및/또는 실질적으로 동일한 시간에서 병렬적으로 수행된 복수 또는 다중도의 단일-플렉스 반응을 포함한다. 일부 실시형태에서, 증폭 반응을 수행하는 것은 병렬적으로 상이한 증폭 생성물을 형성한다. 특정 실시형태에서, 증폭 반응을 수행하는 것은 병렬적으로 10 내지 10,000개의 상이한 증폭 생성물을 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 증폭 반응을 수행하는 것은 병렬적으로 10 내지 1000 상이한 증폭 생성물을 형성할 수 있다. 특정 실시형태에서, 증폭 반응을 수행하는 것은 병렬적으로 10 내지 100 상이한 증폭 생성물 또는 10 내지 50 상이한 증폭 생성물을 형성할 수 있다.

[0161] 특정 실시형태에서, 증폭 반응은 다수의 상이한 표적 핵산 및/또는 다수의 상이한 증폭 생성물 종이 다수의 상이한 프라이머 세트를 사용하여 동시에 증폭되는 다중 증폭을 포함한다. 특정 실시형태에서, 다중 증폭 반응 및 다수의 단일-플렉스 또는 저-플렉스의 반응(예를 들어, 비제한적으로, 2-플렉스, 3-플렉스, 4-플렉스, 5-플렉스 또는 6-플렉스 반응)을 포함한 단일-플렉스 증폭 반응은 병렬적으로 수행된다.

[0162] 본원에서 기재된 바와 같이, 핵산을 중합 및/또는 증폭시키기 위한 예시적인 방법은, 예를 들어, 중합효소-매개된 연장 반응을 포함한다. 예를 들어, 중합효소-매개된 연장 반응은 중합효소 연쇄 반응(PCR 또는 qPCR)일 수 있다. 다른 실시형태에서, 핵산 증폭 반응은 단일-플렉스 또는 다중 PCR 또는 qPCR 반응이다. 예를 들어, 본원에서 기재된 바와 같은 사용에 적합한 핵산을 중합 및/또는 증폭시키고 검출하기 위한 예시적인 방법은 TaqMan® 어세이로 상업적으로 입수 가능하다(예를 들어, 미국 특허 번호 제4,889,818호; 제5,079,352호; 제5,210,015호; 제5,436,134호; 제5,487,972호; 제5,658,751호; 제5,210,015호; 제5,487,972호; 제5,538,848호; 제5,618,711호; 제5,677,152호; 제5,723,591호; 제5,773,258호; 제5,789,224호; 제5,801,155호; 제5,804,375호; 제5,876,930호; 제5,994,056호; 제6,030,787호; 제6,084, 소변 시료 102호; 제6,127,155호; 제6,171,785호; 제6,214,979호; 제6,258,569호; 제6,814,934호; 제6,821,727호; 제7,141,377호; 및/또는 제7,445,900호를 참고하고, 이들 모두는 이로써 전체적으로 참고로 본원에 포함된다). TaqMan® 어세이는 5'-대-3' 뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 중합효소, 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화할 수 있는 적어도 하나의 프라이머, 및 프라이머에 비하여 표적 폴리뉴클레오타이드 3'에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여 표적 폴리뉴클레오타이드 상에 핵산 증폭을 수행함에 의해 전형적으로 수행된다. 올리고뉴클레오타이드 프로브는 검출가능한 표지 (예를 들어, a 형광 리포터 분자) 및 리포터 분자의 형광을 소광할 수 있는 켄처 분자를 전형적으로 포함한다. 전형적으로, 필요하지는 않지만, 검출가능한 표지 및 켄처 분자는 단일 프로브의 일부이다. 증폭이 진행함에 따라, 중합효소는 프로브를 단리하여 켄처 분자로부터 검출가능한 표지를 분리한다. 검출가능한 표지(예를 들어, 형광)은 반응 동안 모니터링되며, 여기서 표지의 검출은 핵산 증폭의 발생에 상응한다(예를 들어, 신호가 높을수록 증폭의 양이 더 크다). 다양한 TaqMan® 검정(예를 들어, LNA™ 스파이킹된 TaqMan® 검정)이 당해 기술에 공지되어 있고 본원에 기재된 방법에 사용하기에 적합할 것이다.

[0163] 5'-뉴클레아제 프로브, 예컨대 TaqMan® 검정에 사용된 프로브에 부가하여, 다양한 프로브가 당해 기술에 공지되어 있고 제공된 방법에서 증폭된 핵산을 검출하는 데 사용하기에 적합하다. 예시적인 프로브는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 다양한 스템-루프 분자 비콘(beacon)(예를 들어, 미국 특허 번호 제6,103,476호 및 제5,925,517호 및 문헌 [Tyagi and Kramer, *Nature Biotechnology* 14:303-308 (1996)]), 출기없는 또는 선형 비콘(예를 들어, PCT 공개 번호 WO 99/21881호; 미국 특허 번호 제6,485,901호), PNA Molecular Beacons™ (예를 들어, 미국 특허 번호 제6,355,421호 및 제6,593,091호), 선형 PNA 비콘(예를 들어, Kubista et al., *SPIE* 4264:53-58 (2001)), 비-FRET 프로브(예를 들어, 미국 특허 번호 제6,150,097호), Sunrise® /Amplifluor® 프로브(미국 특허 번호 제6,548,250호), 스템-루프 및 듀플렉스 Scorpions™ 프로브(Solinas et al., *Anal Chem* 73:2007-2012 (2001)) 및 기타 유익한 표지(예를 들어, 미국 특허 번호 제6,548,250호)를 포함한다.

ta l., Nucleic Acids Research 29:E96 (2001) 및 미국 특허 번호 제6,589,743호), 팽출 루프 프로브(미국 특허 번호 제6,590,091호), 가 매듭 프로브(미국 특허 번호 제6,589,250호), 싸이클리콘(미국 특허 번호 제6,383,752호), MGB Eclipse™ 프로브(Epoch Biosciences), 헤어핀 프로브(미국 특허 번호 제6,596,490호), 펩타이드 핵산(PNA) 라이트-업 프로브(Svanvik, et al. Anal Biochem 281:26-35 (2000)), 예를 들어, 미국 특허 번호 제6,485,901호; 문헌 [Mhlanga et al., Methods 25:463-471 (2001)]; 문헌 [Whitcombe et al., Nature Biotechnology. 17:804-807 (1999)]; 문헌 [Isacsson et al., Molecular Cell Probes. 14:321-328 (2000)]; 문헌 [Wolffs et al., Biotechniques 766:769-771 (2001)]; 문헌 [Tsourkas et al., Nucleic Acids Research. 30:4208-4215 (2002)]; 문헌 [Riccelli et al., Nucleic Acids Research 30:4088-4093 (2002)]; 문헌 [Zhang et al., Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai). 34:329-332 (2002)]; 문헌 [Maxwell et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9606-9612 (2002)]; 문헌 [Broude et al., Trends Biotechnol. 20:249-56 (2002)]; 문헌 [Huang et al., Chem Res. Toxicol. 15:118-126 (2002)]; 및 문헌 [Yu et al., J. Am. Chem. Soc. 14:11155-11161 (2001)]에 기재된 자기-조립된 나노입자 프로브, 페로센-변형된 프로브; Quant iProbes®(Qiagen), HyBeacons®(French, et al. Mol. Cell. Probes 15:363-374 (2001)), 변위 프로브(Li, et al. Nucl. Acids Res. 30:e5 (2002)), HybProbes(Cardullo, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8790-8794 (1988)), MGB Alert(www.nanogen.com), Q-PNA(Fiandaca, et al. Genome Res. 11:609-611 (2001)), Plexor™(Promega), LUX™ 프라이머(Nazarenko, et al. Nucleic Acids Res. 30:e37 (2002)), DzyNA 프라이머(Todd, et al. Clin. Chem. 46:625-630 (2000)). 검출가능하게-표지된 프로브는 또한, 예를 들어, 블랙 홀 켄쳐(Biosearch), Iowa Black™ 켄쳐(IDT), QSY 켄쳐(Molecular Probes™; Thermo Fisher Scientific), 및 Dabsyl and Dabcyl 셀포네이트/카복실레이트 켄쳐(Epoch)를 비롯한, 검출가능한 표지의 형광을 소광하는 비-검출가능한 켄쳐 부분을 포함할 수 있다. 검출가능하게-표지된 프로브는 또한 2개의 프로브를 포함할 수 있으며, 여기서 예를 들어 형광단은 하나의 프로브 상에 있고, 켄쳐는 다른 프로브 상에 있고, 표적 상에 함께 2개의 프로브의 혼성화는 신호를 소광하거나, 또는 표적 상에 혼성화는 형광에서의 변화에 의해 신호 특징을 변경한다. 예시적인 시스템은 또한 FRET, 살리실레이트/DTPA 리간드 시스템(Oser et al. Angew. Chem. Int. Engl. 29(10):1167 (1990)), 변위 혼성화, 상동성 프로브, 및/또는 유럽 특허 번호 EP 070685호 및/또는 미국 특허 번호 제6,238,927호에 기재된 어세이를 포함할 수 있다. 검출가능한 라벨은 또한 카복실레이트기 대신에 S03를 갖는 플루오레세인 염료의 설플로네이트 유도체, 플루오레세인의 포스포르아미다이트 형태, Cy5의 포스포르아미다이트 형태(예를 들어 Amersham으로부터 입수 가능)를 포함할 수 있다. 상기에 인용된 모든 참조문헌은 이로써 전체적으로 참고로 본원에 포함된다.

[0164]

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "검출가능한 표지"는 핵산 합성 및/또는 증폭을 나타내는 임의의 다양한 신호 전달 문자를 지칭한다. 반응 혼합물은 검출가능한 표지 예컨대 SYBR® 그린 및/또는 다른 DNA-결합 염료를 포함할 수 있다. 그와 같은 검출가능한 라벨은, 예를 들어, 핵산 개재 물질 또는 비-개재 물질일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 개재 물질은 이중-가닥 핵산 분자의 적층된 염기쌍 사이에 비-공유 삽입될 수 있는 제제 또는 부분이다. 비-개재 물질은 이중-가닥 핵산 분자 안으로 삽입되지 않은 물질이다. 핵산 결합제는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 신호를 생성할 수 있다. 본 신호는, 예를 들어, 형광 및/또는 흡광을 사용하여 직접적으로, 또는 예를 들어, 이중-가닥 핵산 분자에 근접함에 의해 검출가능하게 영향을 받는 임의의 부분 또는 리간드를 사용하여 간접적으로 검출가능할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 개재 물질은 이중-가닥 핵산 분자의 적층된 염기쌍 사이에 비-공유 삽입될 수 있는 제제 또는 부분이다. 핵산 결합제에 부착된 치환된 표지 부분 또는 결합 리간드와 같은 비-개재 물질 산이 적합하다. 동일한 제제가 용액 내에 있거나 단일-가닥 핵산에 결합될 때 생성된 신호로부터 구별할 수 있도록 이중-가닥 핵산에 결합될 때 검출가능한 신호를 생성하는 것이 핵산 결합제에 전형적으로 필요하다. 예를 들어, 개재 물질 예컨대 에티듐 브로마이드는 단일-가닥 DNA, RNA에 결합될 때보다 이중-가닥 DNA 안으로 개재될 때, 또는 용액에서 보다 강렬하게 형광을 나타낸다(예를 들어, 미국 특허 번호 제5,994,056호; 제6,171,785호; 및/또는 제6,814,934호). 유사하게, 악티노마이신 D는 단일-가닥 핵산에 결합될 때 UV/VIS 스펙트럼의 적색 부분에서 형광을 나타내고, 이중-가닥 핵산에 결합될 때 UV/VIS 스펙트럼의 녹색 부분에서 형광을 나타낸다. 그리고 또 다른 예에서, 광반응성 소랄렌 4-아미노메틸-4-5',8-트리메틸소랄렌(AMT)은 장파장에서 줄어든 흡수를 나타내고 이중-가닥 DNA 안으로 삽입에 의해 형광을 나타내는 것으로 보고되었다(문헌 [Johnson et al. Photochem. & Photobiol., 33:785-791 (1981)]). 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,257,774호는 DNA에 형광 삽입제의 직접적인 결합을 기술한다(예를 들어, 에티듐 염, 다우노마이신, 메파크린 및 아크리딘 오렌지, 4',6-디아미디노- α -페닐인돌). 비-개재 물질(예를 들어, 작은 흠 결합제 모이어티(MGB), 예컨대 Hoechst 33258, 디스타마이신, 네트롭신이 또한 본원에서 기재된 바와 같은 조성물, 방법 및 키트와 사용하기에 적합할 수 있다. 예를 들어, Hoechst 33258(문헌 [Searle, et al. Anal. Biochem. 281:26-35 (2000)]).

ta 1. Nucl. Acids Res. 18(13):3753-3762 (1990)])은 표적 핵산의 증가하는 양으로 변경된 형광을 나타낸다.

[0165]

본원에서 기재된 바와 같이, 하나 이상의 검출가능한 라벨 및/또는 켄칭제는 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브(예를 들어, 검출가능한 표지)에 부착될 수 있다. 검출가능한 표지는 유리될 때 또는 표적 핵산 중 하나에 결합될 때 신호를 방출할 수 있다. 검출가능한 표지는 또한 또 다른 검출가능한 표지에 근접할 때 신호를 방출할 수 있다. 검출가능한 라벨은 또한 신호가 켄쳐 문자에 충분히 가까이 근접하지 않았을 때에만 검출가능하도록 켄쳐 문자와 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 검정 시스템은 검출가능한 표지가 켄팅 문자로부터 해리되도록 할 수 있다. 임의의 몇 개의 검출가능한 라벨이 본원에 기재된 방법에 사용된 프라이머 및 프로브를 표지하도록 사용될 수 있다. 본원에서 기재된 바와 같이, 일부 실시형태에서 검출가능한 표지는, 프라이머 안으로 합체될 수 있거나, 또는 달리는 증폭된 표적 핵산(예를 들어, 검출가능한 핵산 결합제 예컨대 삽입작용 또는 비-삽입작용 염료)에 결합할 수 있는, 프로브에 부착될 수 있다. 1개 초과의 검출가능한 표지를 사용하는 경우, 각각은 라벨이 서로로부터 구별될 수 있거나 또는 함께 검출가능한 라벨이 검출가능한 표지 단독에 의해서는 방출되지 않는 신호를 방출하도록 그것의 스펙트럼 특성에서 상이하여야 한다. 예시적인 검출가능한 라벨은, 예를 들어, 형광 염료 또는 형광단 (예를 들어, 형광 또는 인광을 방출하도록 광에 의해 여기될 수 있는 화학기), 형광 공여체 염료로부터의 형광 신호를 소광할 수 있는 "수용체 염료", 및 기타 동종의 것을 포함한다. 적절한 검출가능한 라벨은, 당해 분야의 숙련가에게 알려진 바와 같이 그 중에서도, 예를 들어, 플루오로세인(예를 들어, 5-카복시-2,7-디클로로플루오로세인; 5-카복시플루오로세인 (5-FAM); 5-하이드록시 트립타민 (5-HAT); 6-JOE; 6-카복시플루오로세인 (6-FAM); FITC; 6-카복시-1,4-디클로로-2',7'-디클로로플루오로세인 (TET); 6-카복시-1,4-디클로로-2',4',5',7'-테트라클로로플루오로세인 (HEX); 6-카복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오로세인 (JOE); Alexa fluor® 형광단(예를 들어, 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750); BODIPY™ 형광단(예를 들어, 492/515, 493/503, 500/510, 505/515, 530/550, 542/563, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650-X, 650/665-X, 665/676, FL, FL ATP, FI-세라미드, R6G SE, TMR, TMR-X 콘주게이트, TMR-X, SE, TR, TR ATP, TR-X SE), 쿠마린(예를 들어, 7-아미노-4-메틸쿠마린, AMC, AMCA, AMCA-S, AMCA-X, ABQ, CPM 메틸쿠마린, 쿠마린 팔로이딘, 하이드록시 쿠마린, CMFDA, 메톡시쿠마린), 칼세인, 칼세인 AM, 칼세인 블루, 칼슘 염료(예를 들어, 칼슘 크림슨, 칼슘 그린, 칼슘 오렌지, 칼코플루오르 화이트), 캐스케이드 블루, 캐스케이드 엘로우; CyTM 염료(예를 들어, 3, 3.18, 3.5, 5, 5.18, 5.5, 7), 시안 GFP, 환형 AMP 플루오로센서(FiCrHr), 형광 단백질(예를 들어, 녹색 형광 단백질(예를 들어, GFP, EGFP), 청색 형광 단백질(예를 들어, BFP, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalama1), 청록색 형광 단백질(예를 들어, ECFP, 세룰리안, CyPet), 황색 형광 단백질(예를 들어, YFP, 시트린, 비너스, YPet)), FRET 공여체/수용체 쌍(예를 들어, 플루오로세인/테트라메틸로다민, IAEDANS/플루오로세인, EDANS/다브실, 플루오로세인/플루오로세인, BODIPY® FL/BODIPY® FL, 플루오로세인/QSY7 및 QSY9), Lysotracker® 및 Lysosensor™(예를 들어, Lysotracker® 블루 DND-22, Lysotracker® 블루-화이트 DPX, Lysotracker® 엘로우 HCK-123, Lysotracker® 그린 DND-26, Lysotracker® 레드 DND-99, Lysosensor™ 블루 DND-167, Lysosensor™ 그린 DND-189, Lysosensor™ 그린 DND-153, Lysosensor™ 엘로우/블루 DND-160, Lysosensor™ 엘로우/블루 10,000 MW 텍스트란), 오레곤 그린(예를 들어, 488, 488-X, 500, 514); 로다민(예를 들어, 실시간 PCR 검출 시스템 110, 123, B, B 200, BB, BG, B 액스트라, 5-카복시테트라메틸로다민(5-TAMRA), 5 GLD, 6-카복시로다민 6G, 리스사민, 리스사민 로다민 B, 팔리시딘, 팔로이딘, 레드, Rhod-2, ROX(6-카복시-X-로다민), 5-ROX(카복시-X-로다민), 설포로다민 B can C, 설포로다민 G Extra, TAMRA(6-카복시테트라메틸로다민), 테트라메틸로다민(TRITC), WT), 텍사스 레드, 텍사스 레드-X, VIC 및 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 제2009/0197254호(본원에 전체적으로 참고로 포함됨)에 기재된 다른 라벨을 포함할 수 있다. 당해 분야의 숙련가에게 알려진 바와 같은 다른 검출가능한 라벨이 또한 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 제2009/0197254호(본원에 전체적으로 참고로 포함됨) 참고). 증폭된 표적 핵산을 검출하기 위해 임의의 이들 시스템 및 검출가능한 라벨뿐만 아니라 많은 다른 것들이 사용될 수 있다.

[0166]

다른 DNA 결합 염료가 당해 분야의 숙련가에게 이용가능하고, 단독으로 또는 검정 시스템의 다른 제제 및/또는 성분과 조합하여 사용될 수 있다. 예시적인 DNA 결합 염료는, 예를 들어, 그 중에서도, 아크리딘(예를 들어, 아크리딘 오렌지, 아크리플라빈), 악티노마이신 D(Jain, et al. J. Mol. Biol. 68:21 (1972)), 안트라마이신, BOBO™-1, BOBO™-3, BO-PRO™-1, 씨브로모마이신, DAPI(Kapuseinski, et al. Nucl. Acids Res. 6(112): 3519 (1979)), 다우노마이신, 디스타마이신(예를 들어, 디스타마이신 D), 미국 특허 번호 제7,387,887호에 기재된 염료, 엘립티신, 에티듐 염(예를 들어, 에티듐 브로마이드), 플루오르코우마닌, 미국 특허 번호 제4,257,774 호에 기재된 바와 같은 형광 삽입제, GelStar®(Lonza), Hoechst 33258(Searle and Embrey, Nucl. Acids Res. 18:3753-3762 (1990)), Hoechst 33342, 호미듐, JO-PRO™-1, LIZ 염료, LO-PRO™-1, 메파크린, 미트라마이신,

NED 염료, 네트롭신, 4',6-디아미디노- α -페닐인돌, 프로플라빈, POPOTM-1, POPOTM-3, PO-PROTM-1, 프로피듐 아이오다이드, 루테늄 폴리페리딜, S5, SYBR[®] Gold, SYBR[®] 그린 I(미국 특허 번호 제5,436,134호 및 제5,658,751호), SYBR[®] 그린 II, SYTOX[®] 블루, SYTOX[®] 그린, SYTO[®] 43, SYTO[®] 44, SYTO[®] 45, SYTOX[®] 블루, TO-PRO[®]-1, SYTO[®] 11, SYTO[®] 13, SYTO[®] 15, SYTO[®] 16, SYTO[®] 20, SYTO[®] 23, 티아졸 오렌지(Sigma-Aldrich Chemical Co.), TOTOTM-3, YO-PRO[®]-1, 및 YOYO[®]-3(Molecular Probes; Thermo Fisher Scientific)을 포함할 수 있다. 예를 들어, SYBR[®] 그린 I(예를 들어, 미국 특허 번호 제5,436,134호; 제5,658,751호; 및/또는 제6,569,927호)는 PCR 반응을 모니터링하기 위해 사용되었다. 다른 DNA 결합 염료가 또한 당해 분야의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이 적절할 수 있다.

[0167]

일부 양태에서, 검출가능한 표지 또는 신호의 검출은 형광으로부터 형광에서의 변화를 검출하는 임의의 시약 또는 기기를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 검출은 임의의 분광광도법적 열주기장치를 사용하여 수행될 수 있다. 분광광도법적 열주기장치의 예는, 비제한적으로, Applied Biosystems (AB) PRISM[®] 7000, AB 7300 실시간 PCR 시스템, AB 7500 실시간 PCR 시스템, AB PRISMTM 7900HT, Bio-Rad ICycler IQTM, Cepheid SmartCycler[®] II, Corbett Research Rotor-Gene 3000, Idaho Technologies R.A.P.I.D.TM, MJ Research Chromo 4TM, Roche Applied Science LightCycler[®], Roche Applied Science LightCycler[®]2.0, Stratagene Mx3000PTM, 및 Stratagene Mx4000TM을 포함한다. 새로운 기기는 빠른 속도로 발전되고 있고 임의의 유사한 기기가 본 방법에 사용될 수 있다는 것에 유의해야 한다.

[0168]

개시된 핵산 증폭 반응에 이용될 수 있는 핵산 중합효소는 예를 들어, 원핵, 진균, 바이러스, 박테리오파아지, 식물, 및/또는 진핵 핵산 중합효소를 비롯한, 원하는 반응을 수행하는 기능을 하는 임의의 것일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "DNA 중합효소"는 템플레이트로서 핵산 가닥을 사용하여 새로운 DNA 가닥을 합성하는 효소 또는 폴리펩타이드를 지칭한다. 일반적으로, DNA 중합효소는 DNA 합성을 위해 템플레이트로서 존재하는 DNA 또는 RNA를 이용하고 템플레이트 가닥을 따라 데옥시리보뉴클레오타이드의 중합을 촉매작용하며, 이것은 적절한 뉴클레오타이드의 혼입을 판독한다. 새로 합성된 DNA 가닥은 템플레이트 가닥에 상보적이다. DNA 중합효소는 새로 형성하는 가닥의 3'-하이드록실 말단에 유리 뉴클레오타이드 만을 부가할 수 있다. 이것은 성장하는 올리고뉴클레오타이드 사슬의 3'-하이드록실기에 데옥시리보뉴클레오사이드 트리포스페이트(dNTP)로부터의 뉴클레오사이드 모노포스페이트의 전이에 의해 올리고뉴클레오타이드를 합성한다. 이것은 5'-대-3' 방향에서 신규한 가닥의 연신을 초래한다. DNA 중합효소는 DNA 합성 반응을 시작하도록 기존의 3'-OH 기 상에만 뉴클레오타이드를 부가할 수 있기 때문에, DNA 중합효소는 제1 뉴클레오타이드를 부가할 수 있는 프라이머를 필요로 한다. 적합한 프라이머는 RNA 또는 DNA의 올리고뉴클레오타이드, 또는 이들의 키메라(예를 들어, RNA/DNA 키메라성 프라이머)를 포함할 수 있다. DNA 중합효소는 상기-언급된 활성을 갖는 자연 발생 DNA 중합효소 또는 자연 효소의 변이체일 수 있다. 예를 들어, 이것은 가닥 치환 활성을 갖는 DNA 중합효소, 5'-대-3' 엑소뉴클레아제 활성을 결여하는 DNA 중합효소, 역전사효소 활성을 갖는 DNA 중합효소, 또는 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 중합효소를 포함할 수 있다.

[0169]

본 교시에 따라 사용된 중합효소는 전형적으로 5'에서 3' 방향으로 핵산 템플레이트로부터 핵산 분자를 합성할 수 있는 임의의 효소일 수 있다. 적절한 핵산 중합효소는 또한 전효소(holoenzyme), 전효소의 기능적 부분, 중합효소 활성을 갖는 키메라 또는 융합 중합효소 또는 폴리펩타이드, 또는 핵산 분자의 합성을 유발할 수 있는 임의의 변형된 중합효소를 포함할 수 있다. 본 개시내용 내에서, DNA 중합효소는 또한 중합효소, 말단 전달효소, 역전사효소, 텔로머라제, 폴리뉴클레오타이드 포스포릴라제 및/또는 중합효소 활성을 갖는 임의의 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.

[0170]

본원에 개시된 방법에 사용된 핵산 중합효소는 중온성 또는 호열성일 수 있다. 예시적인 중온성 DNA 중합효소는 T7 DNA 중합효소, T5 DNA 중합효소, 클레나우(Klenow) 단편 DNA 중합효소, DNA 중합효소 III 및 기타 동종의 것을 포함한다. 중합효소의 비-제한적인 예는, 예를 들어, T7 DNA 중합효소, 진핵 미토콘드리아 DNA 중합효소 γ , 원핵 DNA 중합효소 I, II, III, IV, 및/또는 V; 진핵 중합효소 α , β , γ , δ , ε , η , ζ , ι , 및/또는 κ ; E. 콜라이(*E. coli*) DNA 중합효소 I; E. 콜라이 DNA 중합효소 III 알파 및/또는 앱실론 서브유닛; E. 콜라이 중합효소 IV, E. 콜라이 중합효소 V; T. 아쿠아티쿠스(*T. aquaticus*) DNA 중합효소 I; B. 스테아로씨모필루스(*B. stearothermophilus*) DNA 중합효소 I; 유리고세균 중합효소; 말단 데옥시뉴클레오타이드 전달효소(TdT); S. 세레비지애(*S. cerevisiae*) 중합효소 4; 트랜스레션 합성 중합효소; 역전사효소; 및/또는 텔로머라제를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 적합한 열안정성 DNA 중합효소의 비-제한적인 예는, 비제한적으로, 테르무스 씨모필루스(*Thermus thermophilus*)(Tth) DNA 중합효소, 테르무스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*)(Taq) DNA 중합효소, 씨모토가 네오플리타나(*Thermotoga neapolitana*)(Tne) DNA 중합효소, 씨모토가 마리티마(*Thermotoga*

maritima) (Tma) DNA 중합효소, 써모코쿠스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*) (Tli 또는 VENT™) DNA 중합효소, 파이로코쿠스 푸리오서스(*Pyrococcus furiosus*) (Pfu) DNA 중합효소, DEEPVENT™ DNA 중합효소, 파이로코쿠스 우시(*Pyrococcus woosii*) (Pwo) DNA 중합효소, 바실러스 스테로씨모필루스(*Bacillus steroothermophilus*) (Bst) DNA 중합효소, 바실러스 칼도필러스(*Bacillus caldophilus*) (Bca) DNA 중합효소, 설포버스 악시도칼다리우스(*Sulfbus acidocaldarius*) (Sac) DNA 중합효소, 써모플라즈마 악시도필럼(*Thermoplasma acidophilum*) (Tac) DNA 중합효소, 테르무스 플라부스(Tf1/Tub) DNA 중합효소, 테르무스 루버(Tru) DNA 중합효소, 테르무스 브록키아누스(*Thermus brockianus*) (DYNAZYME™) DNA 중합효소, 메타노박테리움 써모아우토트로피쿰(*Methanobacterium thermoautotrophicum*) (Mth) DNA 중합효소, 마이코박테리움 DNA 중합효소 (Mtb, Mlep), 및 이의 돌연변이체, 및 변이체 및 유도체(미국 특허 번호 제5,436,149호; 미국 특허 번호 제4,889,818호; 미국 특허 번호 제4,965,188호; 미국 특허 번호 제5,079,352호; 미국 특허 번호 제5,614,365호; 미국 특허 번호 제5,374,553호; 미국 특허 번호 제5,270,179호; 미국 특허 번호 제5,047,342호; 미국 특허 번호 제5,512,462; WO 92/06188호; WO 92/06200호; WO 96/10640호; 문헌 [Barnes, Gene 112:29-35 (1992)]; 문헌 [Lawyer, et al., PCR Meth. Appl. 2:275-287 (1993)]; 문헌 [Flaman, et al., Nucl. Acids Res. 22(15):3259-3260 (1994)])를 포함한다. RNA 중합효소 예컨대 T3, T5 및 SP6 및 이의 돌연변이체, 변이체 및 유도체가 또한 본 교시에 따라 사용될 수 있다. 일반적으로, 비록 임의의 유형 I DNA 중합효소가 본 발명에 따라 사용될 수 있지만, 비제한적으로, 유형 III 또는 계열 A, B, C 등 DNA 중합효소를 포함한, 다른 DNA 중합효소도 사용될 수 있다. 또한, 임의의 유전자적으로 조작된 DNA 중합효소, 감소된 또는 무의미한 3'-대-5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 것(예를 들어, SuperScript™ DNA 중합효소), 및/또는 유전자적으로 조작된 DNA 중합효소(예를 들어, 활성 부위 돌연변이 F667Y를 갖는 것들 또는 F667Y의 등가물(예를 들어, Tth에서), AmpliTaq™FS, ThermoSequenase™), AmpliTaq™ Gold, Platinum™ Taq DNA 중합효소, Therminator I, Therminator II, Therminator III, Therminator 감마 (New England Biolabs, 매사추세츠주 베벌리 소재), 및/또는 임의의 유도체 및 이의 단편이 본 교시에 따라 사용될 수 있다. 실질적으로 3'에서 엑소뉴클레아제 활성을 결여하는 DNA 중합효소의 예는, 비제한적으로, Taq, Tne(exo-), Tma(exo-), Pfu (exo-), Pwo(exo-) 및 Tth DNA 중합효소, 및 이의 돌연변이체, 변이체 및 유도체를 포함한다. 당해 분야의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같은 다른 핵산 중합효소가 또한 적합할 수 있다.

[0171]

본원에 제공된 방법, 조성물 및 키트에 사용하기 위한 효소는 또한 역전사효소 활성을 갖는 임의의 효소 또는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 그와 같은 효소는, 비제한적으로, 레트로바이러스 역전사효소, 레트로트랜스포즌 역전사효소, 간염 B 역전사효소, 꽃양배추 모자이크 바이러스 역전사효소, 박테리아 역전사효소, Tth DNA 중합효소, Taq DNA 중합효소(Saiki, et al., Science 239:487-491 (1988); 미국 특허 번호 제4,889,818호 및 제4,965,188호), Tne DNA 중합효소(WO 96/10640호), Tma DNA 중합효소(미국 특허 번호 제5,374,553호) 및 이의 돌연변이체, 단편, 변이체 또는 유도체(예를 들어, 그 전체가 참고로 본원에 편입되어 있는, 미국 특허 번호 제5,948,614호 및 제6,015,668호 참고)를 포함한다. 당해 분야의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이, 변형된 역전사효소 및 역전사효소 활성을 갖는 DNA 중합효소는 당업계에서 잘 알려진 재조합 또는 유전적 공학 기술에 의해 수득될 수 있다. 돌연변이체 역전사효소 또는 중합효소는, 예를 들어, 부위 지향적 또는 랜덤 돌연변이유발에 의해 관심 있는 역전사효소 또는 중합효소를 인코딩하는 유전자 또는 유전자들을 돌연변이시킴에 의해 수득될 수 있다. 그와 같은 돌연변이는 점 돌연변이, 결실 돌연변이 및 삽입 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 점 돌연변이(예를 들어, 하나 이상의 아미노산을 하나 이상의 상이한 아미노산으로 치환)가 사용되어 본 발명에서 사용하기 위한 돌연변이체 역전사효소 또는 중합효소를 구축한다. 역전사효소 또는 중합효소의 단편은 또한 당업계에서 잘 알려진 재조합 기술에 의하거나, 또는 임의의 수의 잘-알려진 단백질분해효소를 사용하여 관심 있는 역전사효소(들) 또는 중합효소(들)의 효소적 단리에 의한 결실 돌연변이에 의해 수득될 수 있다.

[0172]

본원에 제공된 방법에 사용하기 위한 역전사효소 활성을 갖는 예시적인 폴리펩타이드는 몰로니 첫과 백혈병 바이러스(M-MLV) 역전사효소, 루 육종 바이러스(RSV) 역전사효소, 조류 골수모세포증 바이러스(AMV) 역전사효소, 루 연관 바이러스(RAV) 역전사효소, 골수모세포증 연관 바이러스(MAV) 역전사효소 및 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 역전사효소, 및 WO 98/47921호에 기재된 기타 및 이의 유도체, 변이체, 단편 또는 돌연변이체, 및 이들의 조합을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 역전사효소는 RNase H 활성에서 감소되거나 또는 실질적으로 감소되고, M-MLV H- 역전사효소, RSV H- 역전사효소, AMV H- 역전사효소, RAV H- 역전사효소, MAV H- 역전사효소 및 HIV H- 역전사효소와, 이의 유도체, 변이체, 단편 또는 돌연변이체, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 특히 관심 있는 역전사효소는 AMV RT 및 M-MLV RT, 그리고 선택적으로 감소된 또는 실질적으로 감소된 RNase H 활성을 갖는 AMV RT 및 M-MLV RT(예를 들어, AMV RT 알파 H-/BH+ 및 M-MLV RT H-)를 포함한다. 본 발

명에서 사용하기 위한 역전사효소는 Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)으로부터 입수 가능한 SuperScript™, SuperScript™ II, ThermoScript™ 및 ThermoScript™ II를 포함한다. 일반적으로, WO 98/47921호, 미국 특허 번호 제5,244,797호 및 제5,668,005호를 참고하고, 이를 각각의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0173] 본원에 제공된 방법에 사용하기 위한 역전사효소 활성을 갖는 폴리펩타이드는, 예를 들어, from Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific), Pharmacia (뉴저지주 피스카타웨이 소재), Sigma (미주리주 세인트루이스 소재) 또는 Boehringer Mannheim Biochemicals (인디아나주 인디애나폴리스 소재)로부터 상업적으로 입수될 수 있다. 대안적으로, 역전사효소 활성을 갖는 폴리펩타이드는 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 천연 단백질을 단리 및 정제하는 표준 절차에 따라 그것의 천연 바이러스 또는 박테리아 공급원으로부터 단리될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Houts, et al., J. Virol. 29:517 (1979)] 참고). 또한, 역전사효소 활성을 갖는 폴리펩타이드는 당해 분야의 숙련가에게 친숙한 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Kotewicz, et al., Nucl. Acids Res. 16:265 (1988)]; 문헌 [Soltis and Skalka, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3372-3376 (1988)] 참고).

[0174] 본원에서 개시된 바와 같은 조성물, 방법 및 키트에 사용하기 위한 DNA 중합효소는, 예를 들어, Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific), Pharmacia (뉴저지주 피스카타웨이 소재), Sigma (미주리주 세인트루이스 소재), Boehringer Mannheim, 및 New England Biolabs (매사추세츠주 베벌리 소재)로부터 상업적으로 입수될 수 있다.

[0175] 본원에 기재된 방법을 수행하기 위한 키트가 또한 제공된다. 본원에 기재된 방법을 수행하기 위한 증폭 대조 핵산을 포함하는 키트가 또한 제공된다. 본원에서 사용된 용어 "키트"는 관련된 성분들의 포장된 세트, 전형적으로는 하나 이상의 화합물 또는 조성물의 포장된 세트를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본 키트는 적어도 하나의 증폭 대조 핵산 조성물을 포함할 수 있고, 대조 핵산으로부터 적어도 하나의 표적 서열을 중합 및/또는 증폭시키기 위한 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 또는 프라이머, 핵산 중합효소, 및/또는 대조 핵산의 검출을 위한 검출가능한 표지로 표지된 해당하는 하나 이상의 프로브를 추가로 포함할 수 있다. 본 키트는 적어도 하나의 증폭 대조 핵산 분자를 포함한 적어도 하나의 증폭 대조 핵산 조성물을, 예컨대 플라스미드, 또는 본원에서 기재된 바와 같은 슈퍼플라스미드의 형태로 포함할 수 있고, 대조 핵산 분자로부터 적어도 하나의 표적 서열을 중합 및/또는 증폭시키기 위한 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드, 핵산 중합효소, 및/또는 대조 핵산의 검출을 위한 검출가능한 표지로 표지된 해당하는 하나 이상의 프로브를 추가로 포함할 수 있다. 본 키트는 또한 대조 반응에 사용되어 지는 다른 사전-정의된 표적 핵산을 포함하는 샘플을 포함할 수 있다. 본 키트는 또한 생물학적 샘플로부터 적어도 하나의 표적 핵산을 중합 및/또는 증폭시키기 위한 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 또는 프라이머를 포함할 수 있다. 본 키트는 또한 모액, 완충액, 효소, 계면활성제, 증폭 안정화 성분, RNase 억제제 성분, 검출 가능한 라벨 또는 증폭 및/또는 검출을 위해 사용된 다른 시약, 튜브, 막, 및 증폭 반응을 완료하기 위해 사용될 수 있는 기타 동종의 것을 선택적으로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 다중 프라이머 세트가 포함된다. 일부 실시형태에서, 본 키트는, 예를 들어, 완충액(예를 들어, Tris), 하나 이상의 염(예를 들어, KCl), 글리세롤, dNTP(dA, dT, dG, dC, dU), 재조합 BSA(소과 혈청 알부민), 염료(예를 들어, ROX 수동적인 기준 염료), 하나 이상의 계면활성제(예를 들어, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 20, Brij-58), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리비닐 피롤리돈(PVP), 젤라틴(예를 들어, 어류 또는 소과 원천) 및/또는 하나 이상의 용기에 제공된 발포방지제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 당해 분야의 숙련가에 의해 이해되어 지는 특정 시스템 및 키트의 다른 실시형태가 또한 고려된다.

[0176] 일부 실시형태에서, 도 1을 참고로 하면, 핵산 서열을 증폭시키기 위한 작업흐름(100)은 소변 시료를 컬렉션하는 단계 및 당해 분야의 숙련가에게 쉽게 이용가능하고/하거나 알려진 임의의 시스템 또는 방법을 사용하여 샘플에 대해 샘플 제조를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플 제조 시스템은 개방 어레이 미세유체 플레이트에서의 후속적인 이용을 위해 소변에서의 미생물 세포로부터 핵산 샘플을 추출한다. 개방 어레이 미세유체 플레이트는 소수성 외부 및 친수성 내부를 포함한 각각의 관통공을 갖는 복수의 관통공을 포함한다. 관통공의 내측은 증폭 반응에 대해 선택된 어세이로 스팟되었다. 제조된 샘플이 개방 어레이 미세유체 플레이트 상에 장입될 때, 플레이트의 유체 특성은 각각의 관통공에서 동일한 부피의 샘플을 유지한다. 일부 실시형태에서, 개방 어레이 미세유체 플레이트가 장입되면 이것은 실시간 PCR 또는 정량적 PCR 검출 시스템으로 이전되어 증폭 반응을 겪는다. 증폭 반응 동안, 일부 실시형태에서, 실시간/정량적 PCR 검출 시스템은 형광 염료의 검출을 통해 앰플리콘의 형성을 검출한다. 형광 염료의 검출은 특정 관통공 내에서 이용된 어세이에 해당하는 미생물의 존재를 나타낸다.

[0177] 일부 실시형태에서, 도 2를 참고로 하면, 관통공을 각각 포함하는 마이크로-서브어레이를 포함하는 현미경 슬라

이드-크기의 플레이트와 같은 반응 용기(200)가 이용된다. 일부 실시형태에서, 각각의 플레이트는 3,072개의 관통공 또는 반응 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 각각의 플레이트는 64개의 관통공을 갖는 48개의 서브레이이를 함유한다. 일부 실시형태에서, 각각의 관통공은 직경이 300 μm 이고 깊이가 300 μm 이다. 일부 실시형태에서, 각각의 관통공은 소수성 외부 및 친수성 내부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 친수성 내측은 표 1에 열거된 것과 같은 어세이로 스팟되어 진다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물을 표면 장력에 의해 관통공에 유지된다.

[0178] 일부 실시형태에서, 도 3을 참고로 하면, 핵산 샘플에서 핵산 서열을 증폭시키기 위한 방법(300)은 핵산 서열을 포함하는 샘플 원천으로부터의 분취액을 각각 포함하는 적어도 5개의 증폭 반응 혼합물을 형성하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 한 쌍의 증폭 프라이머를 각각 포함하는 적어도 5개의 상이한 어세이를 사용하며, 본 어세이는 표 1의 검정 그룹으로부터 선택되었다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 각각의 증폭 반응 혼합물을 반응 용기에 적용한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 증폭 생성물 검출 시스템에서 반응을 이용한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 증폭 생성물 검출 시스템을 작동한다. 일부 실시형태에서, 증폭 생성물 검출 시스템은 연관 표에서 증폭 반응 혼합물에 이용된 어세이 ID 중 하나 이상과 반응 용기 상의 증폭 반응 혼합물의 위치를 연관시킨다. 일부 실시형태에서, 증폭 생성물 검출 시스템은 반응 용기에서 증폭 반응을 수행한다. 일부 실시형태에서, 증폭 생성물 검출 시스템은 증폭 반응 동안 반응 용기 상의 하나 이상의 위치 내의 표적 핵산 서열에 해당하는 증폭 생성물을 검출한다.

[0179] 본 교시가 이들 예시적인 실시형태의 관점에서 기재되었지만, 당업자는 이들 예시적인 실시형태의 수많은 변형 및 수정이 과도한 실험과정 없이 가능하다는 것을 쉽게 이해할 것이다. 모든 그와 같은 변형 및 수정은 현재 교시의 범위 내에 있다. 본 교시의 양태는 하기 실시예에 비추어 한층 더 이해될 수 있으며, 이는 어떤 식으로든 교시의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0180] 실시예

[0181] TaqManTM 어세이들의 패널은 요로 미생물총(UTM)을 다양한 UTM과 연관된 지표 유전자(signature gene)를 표적화함에 의해 검출 및/또는 프로파일링하도록 설계되었다. 이러한 어세이들의 패널은 방광, 요로 및 비뇨생식기 영역과 연관된 병원성 미생물을 포함하는 17종의 상이한 미생물의 종들을 구별하도록 설계되었다. 패널은 표 1에 열거된 미생물들을 포함하여 미생물(박테리아, 및/또는 진균)을 검출하기 위한 어세이를 포함한다. 표 1에 열거된 17가지 종 중, 이들 대부분은 광범위한 박테리아(13가지 그람 음성 및 3가지 그람 양성)를 커버하는 박테리아이다. 패널은 또한 하나의 진균 표적을 커버한다. 표 1에 열거된 모든 미생물은 요로 건강과 밀접하게 연관된다.

[0182] 패널에 대해, 형광 표지된 어세이는 도 2에서 예시된 바와 같은 고처리량 OpenArrayTM 플레이트 상으로 스팟되어 졌다. 표 1에 열거된 각각의 검정에 특이적인 앰플리콘 서열을 함유하는 플라스미드(예를 들어, 슈퍼플라스미드)가 또한 본원에서 기재된 바와 같이 설계되고 제조되었다. 슈퍼플라스미드 DNA는 QuantStudioTM 3D 디지털 PCR 시스템을 사용하여 디지털 PCR에 의해 정량화되었다. 표 1에 열거된 모든 UTM 검정의 앰플리콘에 대한 합성 서열을 함유하는 슈퍼플라스미드가 제작되었고 양성 대조군으로 사용되었다. 포괄 및 배타성 패널의 게놈 DNA(gDNA) 대조군은 ATCC로부터 구매되었다. 패널 어세이는 QuantStudioTM 12Flex Real Time PCR SystemTM 상에서 TaqMan[®] OpenArray[®] 실시간 PCR 마스터 믹스(Thermo Fisher)를 사용하여 합성 슈퍼플라스미드 및/또는 ATCC 게놈 DNA 샘플로 평가되었다. 검정 패널의 평가를 위해 사용된 작업흐름 및 시스템은 본원에 더욱 상세하게 기재되고 또한 도 1 및 3에 예시되어 있다.

[0183] 증폭 대조 핵산 분자에 대해, DNA 서열이 설계되고 해당하는 DNA 분자는 상기 기재된 패널에서 미생물-특이적 어세이를 위한 모든 표적 앰플리콘 및 그것의 측첩 영역의 부분, 뿐만 아니라 인간 RNase P 유전자 서열로부터 100-200 뉴클레오타이드 이종 서열 및 서열 단편을 포함한 몇 개의 대조 템플레이트를 포함하도록 합성되었다. 다운스트림 선형화를 위한 고유의 제한 부위가 또한 표적 앰플리콘 및 그것의 해당하는 5'- 및 3'- 측첩하는 서열 각각의 부분을 포함하는 DNA 서열 안으로 조작되었다. 합성된 DNA 분자는 박테리아 플라스미드 벡터 안으로 클로닝되어 다중-표적 플라스미드(즉, 슈퍼플라스미드)를 생성하였다. 이들 실시예에서, 슈퍼플라스미드는 상기에서 언급된 바와 같이 다른 대조 서열과 함께 표 1에 열거된 17개의 어세이들의 패널("UTM 슈퍼플라스미드")에 대한 표적 서열을 포함하도록 설계되었다. E. 콜라이 안으로의 슈퍼플라스미드의 형질전환 및 후속적인 플라스미드 DNA의 추출 후, 본 플라스미드는 제한 효소 단리에 의해 고유의 제한 부위에 선형화되고 플라스미드 제조물이 정량화되었다. 선형화된 대조 플라스미드 제조물은 1×10^7 복제/마이크로리터의 최종 농도로

정규화되었고, 1×10^7 복제/마이크로리터로부터 1×10^2 복제/마이크로리터의 농도로 연속으로 희석되었고, 하기 언급된 지시된 농도에서 사용되었다.

[0184] 실시예 1

[0185] 선형화된 대조 플라스미드 조제물(preparation)의 증폭은 상기 기재된 17개의 상이한 TaqMan™ 어세이와 이에 더해진 2개의 대조 어세이(Xeno 및 RNase P)의 패널이 사전-스팟된 TaqMan™ OpenArray™ 플레이트(Applied Biosystems)를 사용하여 시험되었다. 각각의 어세이는 검출가능한 표지를 갖는 한 쌍의 증폭 프라이머 및 올리고뉴클레오타이드 TaqMan™ 프로브를 포함했다. TaqMan™ 증폭 프라이머 및 프로브는 표 1에 나타낸 바와 같은 각각의 검정에 대해 열거된 해당하는 유전자에 특이적인 표적이 되도록 설계되었다. 증폭 반응이 실행되고 제조자의 지침에 따라 QuantStudio™ 12K Flex 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems) 상에서 분석되었다.

[0186] 증폭 전, 증폭 대조 플라스미드 제조물은 5 log에 걸쳐, 마이크로리터 당 10^7 복제로부터 마이크로리터 당 10^2 복제로 연속으로 희석되었다. 각각의 서브어레이를 위해, PCR 반응 혼합물은 제조자의 지침에 따라 2.5 마이크로리터의 TaqMan™ OpenArray 실시간 PCR 마스터 믹스(Thermo Fisher)에 2.5 마이크로리터의 희석된 대조 플라스미드 제조물을 부가함에 의해 준비되었다. 다양한 농도에서의 대조 핵산 샘플을 갖는 5 마이크로리터의 PCR 반응 혼합물이 OpenArray AccuFill 시스템을 사용하여 OpenArray™ 플레이트 상으로 장입되고 제조자의 지침에 따라 QuantStudio™ 12K Flex 시스템(Thermo Fisher) 상에서 실행되었다. 각각의 희석에 대해 4번 반복이 실행되었다.

[0187] 시험된 모든 어세이는 적어도 100 복제/마이크로리터까지 검출의 한계(LOD)를 나타냈다. 시험된 각각의 상이한 어세이로 선형화된 대조 플라스미드로 양호한 PCR 민감도가 달성되었다. 도 4는 입력 샘플로 슈퍼플라스미드 대조 DNA를 이용하는 검정의 분석 민감도를 예시한다. 도 4에서, 연속 희석은 10^7 복제/μl 스톡으로부터 10^2 복제/μl까지의 모든 검정에 대한 템플레이트를 함유하는 UTM 슈퍼플라스미드로 수행되었다. 도 5는 모액의 맥락에서 복제/μl, 하위-어레이(5 μl) 당 또는 관통공(33 nl) 당 PCR 반응을 제시하기 위한 선택을 나타내는 전환표를 예시한다.

[0188] 실시예 2

[0189] 도 6 및 도 7은 상기에 기재된 바와 같이 개방 어레이 상에 요로 미생물총(UTM) 검정(TaqMan™ 검정)의 동적 범위를 시험하는 연구로부터의 실험 결과를 예시한다. 1:10 연속 희석은 5 log를 가로질러 10^7 의 모액으로부터 10^2 복제/μl까지의 UTM 슈퍼플라스미드로 수행되었다. PCR 반응은 64개 관통공을 함유하는 각각의 서브어레이에 대해 2.5 μl 마스터 믹스에 2.5 μl 희석된 대조 플라스미드를 혼합함에 의해 준비되었다. 각각의 서브어레이에는 56개 어세이가 스팟되었고 각각의 희석은 4회 반복으로 실행되었다. 도 6은 각각의 표적/검정에 대한 연속 희석의 R-자승 및 슬로프를 요약한다. 양호한 PCR 효율 및 재현성이 OpenArray™ 플레이트 상에서 시험된 각각의 상이한 어세이로 선형화된 대조 플라스미드로 달성되었다(도 6). 도 7은 산포도로 도시된 9개의 어세이를 예시한다. 각각의 플롯에 대해, X-축은 슈퍼플라스미드 대조 템플레이트 농도(복제/μl)의 \log_{10} 이고 Y-축은 각각의 농도에서 Ct 값이다. 도 6 및 도 7에서 실증된 바와 같이, 모든 시험된 검정의 검출의 한계(LOD)는 적어도 100 복제/마이크로리터로 낮았으며, 적어도 5 log의 희석에 걸쳐 있고 0.99 초과의 R^2 을 가졌다. 이 데이터는 함께 적어도 5 log에 걸친 양호한 동적 범위와 강하고 재생가능한 선형성을 입증한다.

[0190] 실시예 3

[0191] 표 1에 열거된 17개의 상이한 UTM TaqMan™ 어세이의 패널이 시험된 표적을 포괄하는 ATCC 미생물 배양물로부터 구매된 gDNA 샘플의 패널(도 8) 및 시험된 표적을 제외한 ATCC 미생물 배양물로부터 구매된 gDNA 샘플의 패널(도 9)을 사용하여 그것의 정확도 및 특이성에 대해 평가되었다. ATCC gDNA 샘플은 QuantStudio™ 3D 디지털 PCR 시스템(Thermo Fisher)을 사용하여 dPCR에 의해 정량화되었다. 도 8 및 도 9 둘 모두에서, 각각의 행은 표 1에 열거된 해당하는 미생물의 검출을 위해 사용된 TaqMan 어세이 ID 번호를 나타낸다. 도 8에서, 열은 도시된 바와 같은 미생물로부터 시험된 표적을 포괄하는 다양한 ATCC gDNA 샘플 및 본원에서 기재된 바와 같이 제조된 슈퍼플라스미드 핵산 분자/양성 대조군 샘플(마지막 열)을 포함한, 각각의 검정에 대해 사용된 샘플 유형을 나타낸다. 도 9에서, 열은 "NTC"-무 템플레이트 대조/음성 대조군 샘플(제1 열); 도시된 바와 같은 다양한 미생물로부터 시험된 표적을 제외한 다양한 ATCC gDNA 샘플; 및 본원에서 기재된 바와 같이 제조된 슈퍼플라스미드 핵산 분자/양성 대조군 샘플(마지막 열)을 포함한, 각각의 검정에 대해 사용된 샘플 유형을 나타낸다. 모든 시험

된 gDNA 샘플은 dPCR 판독에 기반하여 10^5 복제/ μl 의 농도로 사용되었다. 도 8 및 도 9 둘 모두에 양성 대조군으로 포함된 UTM 슈퍼플라스미드("SP-UTM") 또한 10^5 복제/ μl 의 농도로 사용되었다. $2.5\mu\text{l}$ 의 각각의 대조군 샘플의 부피는 $2.5\mu\text{l}$ TaqMan™ OpenArray™ 실시간 PCR 마스터 믹스(Thermo Fisher)와 혼합되어 총 $5\mu\text{l}$ PCR 반응을 만들었다. PCR 반응은 모든 UTM 어세이가 상기에 기재된 바와 같이 스팽되어 진 OpenArray™ 플레이트의 각각의 서브어레이 상으로 장입되었다. OpenArray™ 플레이트는 제조자의 지침에 따라 QuantStudio™ 12 Flex 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems) 상에서 열 사이클링되었다.

[0192] 도 8에서, 대각선 수(대시기호로 된 윤곽)는 원하는 온-표적(on-target) 신호에 대한 4 반복의 평균 Ct 값을 나타낸다. 무작위 배경 노이즈는 도 8과 도 9 모두에 나타나 있지만, 일반적으로 4 반복 중 하나에서 검출된 산발적 신호였다. 배경 Ct 값은 온-표적과 오프-표적 신호 사이의 큰 Ct 차이로 인해 유의하지 않은 것으로 결정되었다($\Delta\text{Ct} > 10$). 도시된 바와 같이, 바람직한 온-표적(정확도) 및 중요하지 않은 오프-표적(특이성)으로 탁월한 성능이 관찰되었다. ATCC 포괄성 패널(도 8)을 사용하여 수득된 데이터는 탁월한 정확도와 패널-내 특이성을 입증하며, 반면에 ATCC 배타성 패널(도 9)을 사용하여 수득된 데이터는 인접하는 종 근처에 밀접하게 관련된 높은 특이성을 입증한다.

[0193] 실시예 4

[0194] 소변 저장소 연구 샘플은 제조자의 지침에 따라 KingFisher Flex(Thermo Fisher Scientific) 플랫폼 상에서 MagMAX™ DNA 멀티-샘플 울트라 키트(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 가공되었다. 샘플은 그 다음 상기에 기재된 바와 같이 표적 특이적 TaqMan® UTM 어세이를 사용하여 나노유체의 TaqMan® OpenArray® qPCR 기술에 의해 선별되었다. 소변 샘플로부터 추출된 DNA는 표 1에 열거된 검정 중 16개를 각각 사용하여 별도의 독립적인 연구("부위 1 qPCR" 및 "부위 2 qPCR") 하에서 2개의 상이한 시간/위치에서 OpenArray™ 플레이트를 사용하여 실행되었고; 일 어세이는 부위 간에 사이하였다(*E. 콜라이). OpenArray 상의 qPCR에서 UTM TaqMan 어세이를 사용하여, 표시된 요로병원체를 갖는 것에 대해 양성으로 확인된 샘플의 수는 도 10에 도시되어 있다(각각의 미생물에 대해 제1 및 제2 막대).

[0195] 소변 샘플은 또한 혈액-한천 평판 상에서 24시간 동안 배양되었고 CFU/mL이 각각의 샘플에 대해 카운트되었다. 요로병원체는 그 다음 제조자의 지침에 따라 Vitek-2(Biomerieux) 플랫폼을 사용하여 확인되었다. 배양 방법을 사용하여, 표시된 요로병원체를 포함하는 것에 대해 양성으로 확인된 샘플의 수는 도 10에 도시되어 있다(각각의 미생물에 대해 제3 막대). 도 10이 입증하는 바와 같이, qPCR 결과는, 본원에서 기재된 바와 같이 UTM TaqMan 어세이를 사용하여 상이한 위치에서 수행된 2개의 별개의 qPCR 연구 간에는 재현성이 높고 >97%의 일치율이었다. 그러나, qPCR에 비교하여 배양으로의 일치율은 더 낮았다(예를 들어, <80%). 본 데이터는 qPCR UTM TaqMan 어세이가 전통적 배양-기반 방법보다 더 많은 요로병원체를 확인할 수 있었음을 추가로 나타낸다.

[0196] 도 11에서, 소변 샘플들의 세트는 배양 방법을 사용하여 시험하였고 양성 또는 음성으로 표시되었다. 적어도 하나의 병원체의 동일성을 갖고 $\geq 10^5$ CFU/mL의 상당한 성장을 나타내는 각각의 샘플은 배양 양성으로 표시되었다(도 11; 두 번째 열 참조). 배양 샘플은 상당한 성장이 없는 경우($\leq 10^5$ CFU/mL) 또는 이용가능한 마이크로 데이터가 없는 경우 배양 음성으로 표시되었다. 약간의 추가 샘플도 상당한 성장을 보였다 해도, 이들도 배양 음성으로 표시되었다. 이것은, 2개 초과의 유기체가 존재하고, 혼합된 균총을 적절히 구별하고/하거나 그것들을 (오염된 배양에 비교하여) 진성 양성 배양이라 식별하는 것이 불가능한 경우의 배양의 제한으로부터 기인한 것이었다. 이들 경우에, 2개 초과의 유기체가 존재하기 때문에 (즉, "혼합된 균총"를 가짐), 요검사 결과는 확정적이지 않거나 식별할 수 없는 것으로 밝혀졌으며 배양 음성으로 분류되었다. 양성 및 음성 배양 결과는 그 다음 본원에서 기재되고 표 1에서 상기에 열거된 바와 같은 UTM TaqMan 어세이를 사용하여 OpenArray™ 플레이트를 사용하여 동일한 소변 샘플에 대해 수득된 결과와 비교되었다(도 11 참고; "배양 및 qPCR 양성" 대 "qPCR 양성 단독").

[0197] OpenArray™ 플레이트 상에서 수행된 qPCR로부터 수득된 결과는 확인된 다양한 병원체에 대해 평균 C_T 값(3개의 기술 반복의 평균)으로 나타내었다(도 11 참고; 강조된 정사각형). 배양 결과와 일치하는 qPCR 샘플 결과는 어두운 회색으로 강조되어 있다. 배양 결과와 불일치하는 qPCR 결과는 밝은 회색으로 강조되어 있다.

[0198] 여러 배양 불일치 샘플의 서브셋(즉, qPCR에 의해 양성이고 배양 성장에 대해 음성인 샘플은 생거 서열분석 방법을 사용하여 추가로 확인되었다. 서열분석 결과는 시험된 각각의 샘플에 대해 OpenArray™ qPCR을 사용하여 수득된 결과와 일치도에서 100% 일치했다(도 12 참고). 이를 실험으로부터 결과는 본원에서 기재된 바와 같은 UTM 검정 패널을 사용하는 OpenArray™ qPCR이 요로 미생물의 확인 및/또는 검출을 위한 전통적인 배양 방법을

사용하는 것보다 더 민감하다는 것을 시사한다.

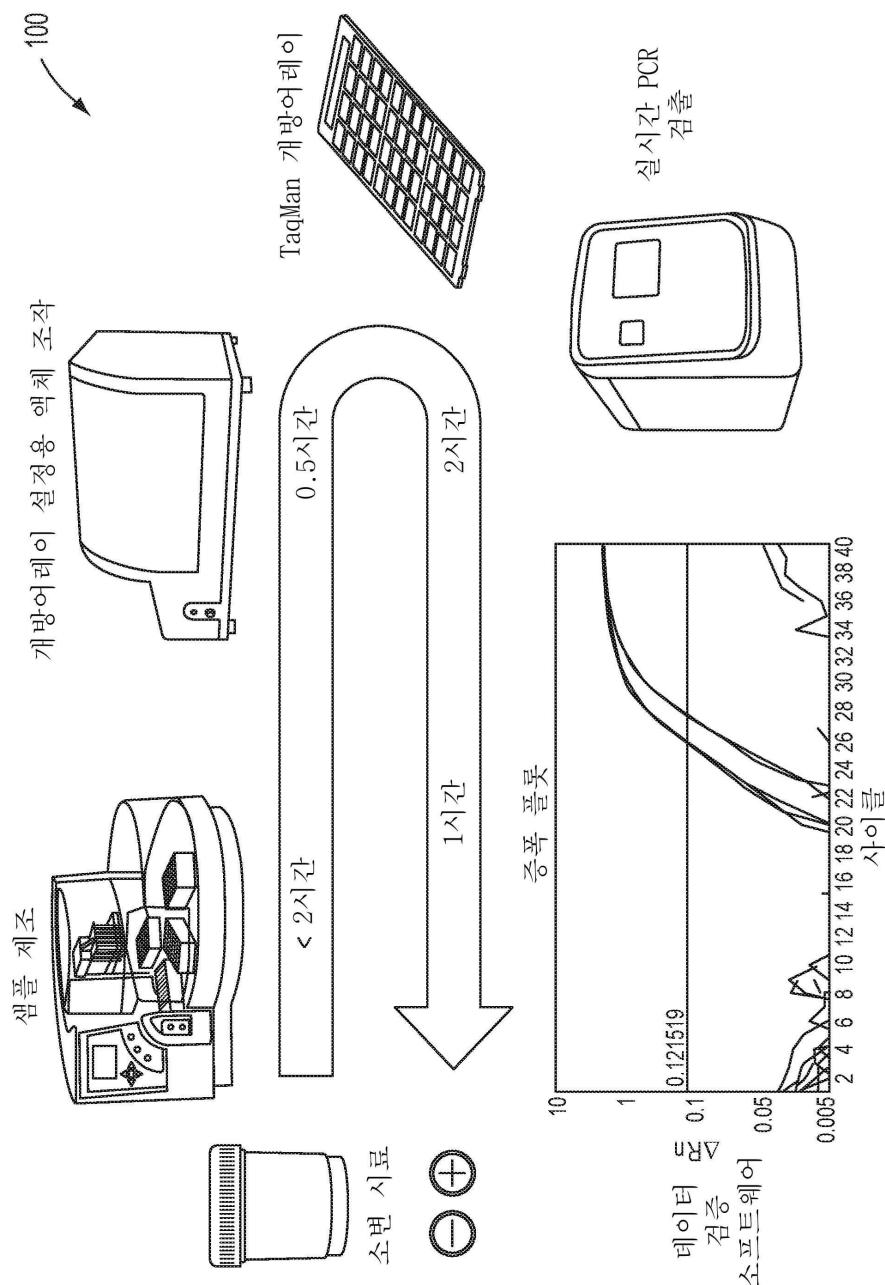
[0199] 도 13a 및 13b는 전통적인 배양 방법을 사용하거나 표 1의 UTM TaqMan 어세이를 사용하여 요로병원체에 대해 양성 또는 음성으로 확인된 샘플 수의 일치율을 추가로 예시한다. 진성 양성 및 진성 음성에 대한 일치율은 95.8% 이었다(도 13a 참조). 배양 방법에 의해 확인된 모든 양성 샘플은 OpenArray™ 나노유체 플랫폼에서 qPCR 검정에 의해 양성으로 확인되었다.

[0200] 배양 음성 샘플을 관찰 및 제한에 기초하여 상이한 카테고리로 나누었다. UTM TaqMan 검정의 패널을 사용하는 qPCR은 전통적 배양 방법보다 더 많은 요로병원체를 식별할 수 있었으므로 전체 배양 음성 샘플에 대한 불일치도가 높았다(도 13b 참고).

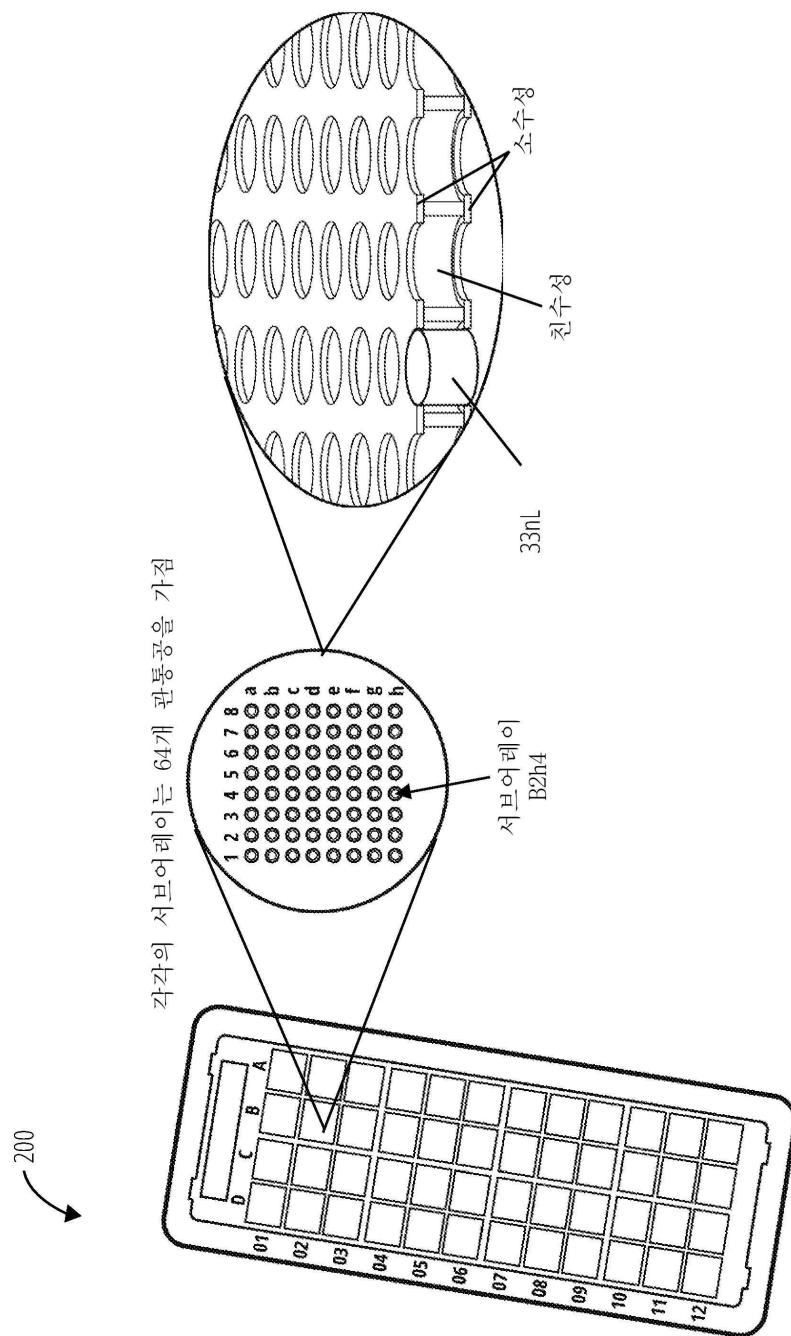
[0201] 이 데이터는 함께 본원에 제시된 UTM TaqMan 어세이를 사용하는 OpenArray™ qPCR은 "골드 표준" 배양 데이터와 비교할 때 더 민감하고 정확함을 입증한다.

도면

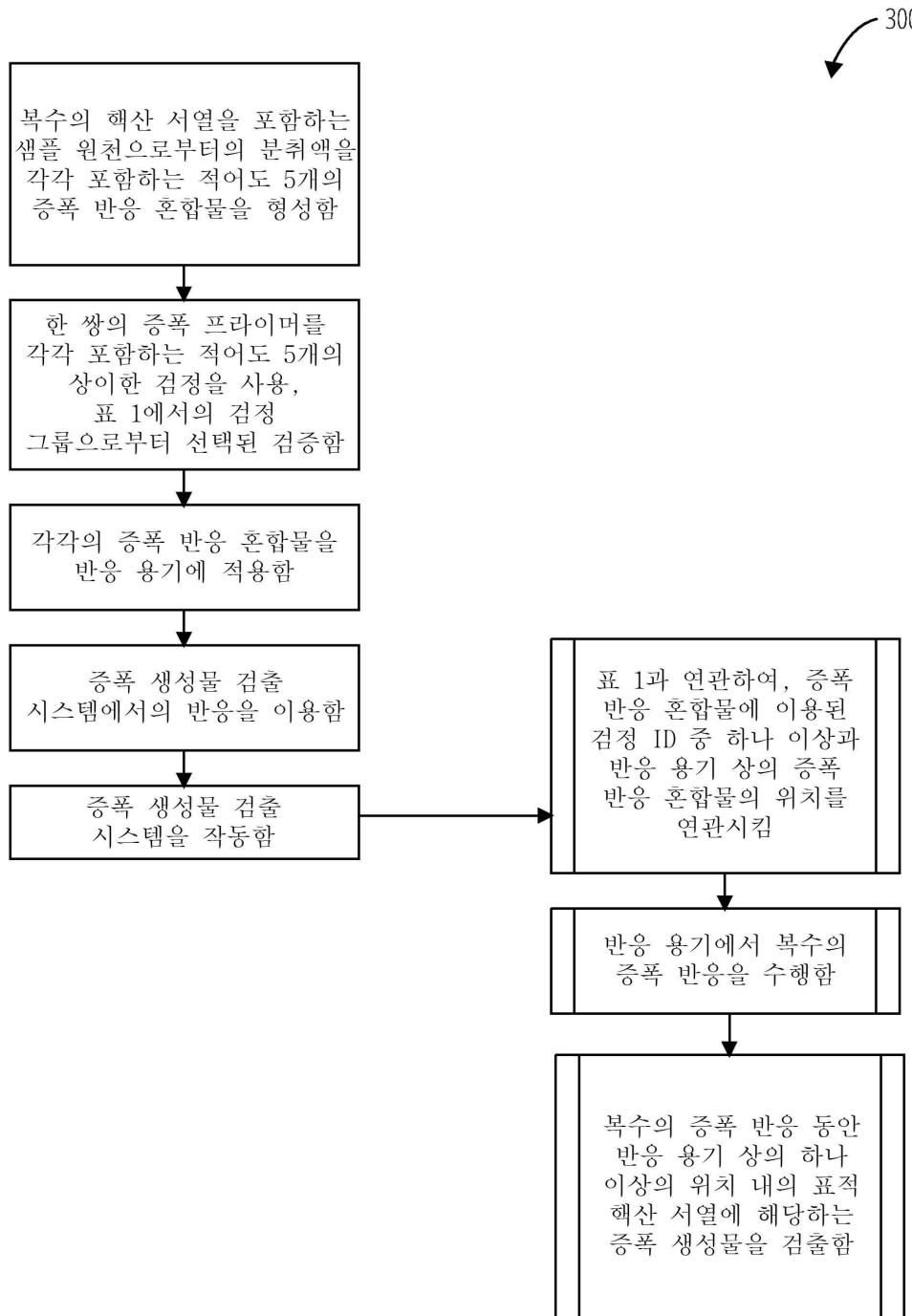
도면1



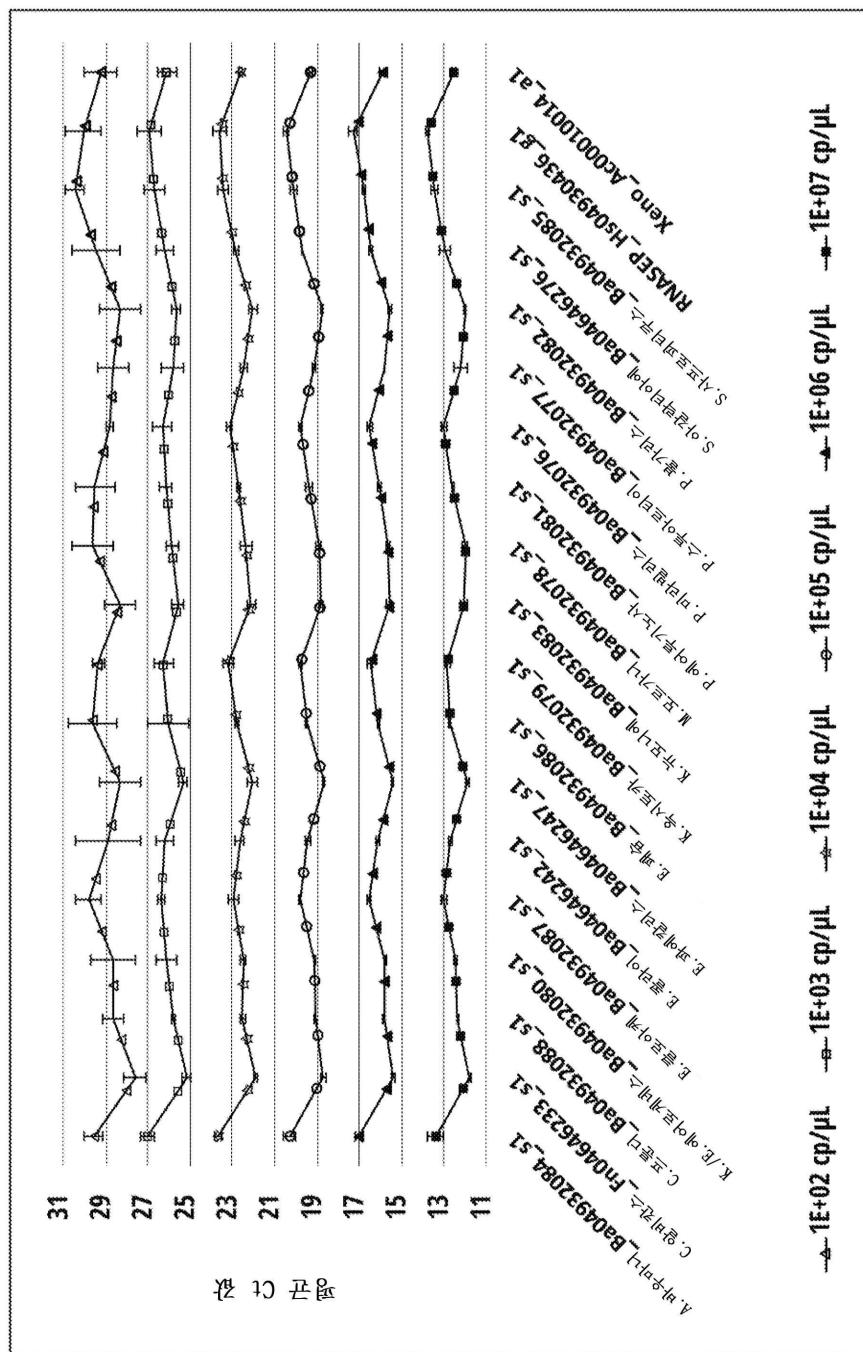
도면2



도면3



도면4



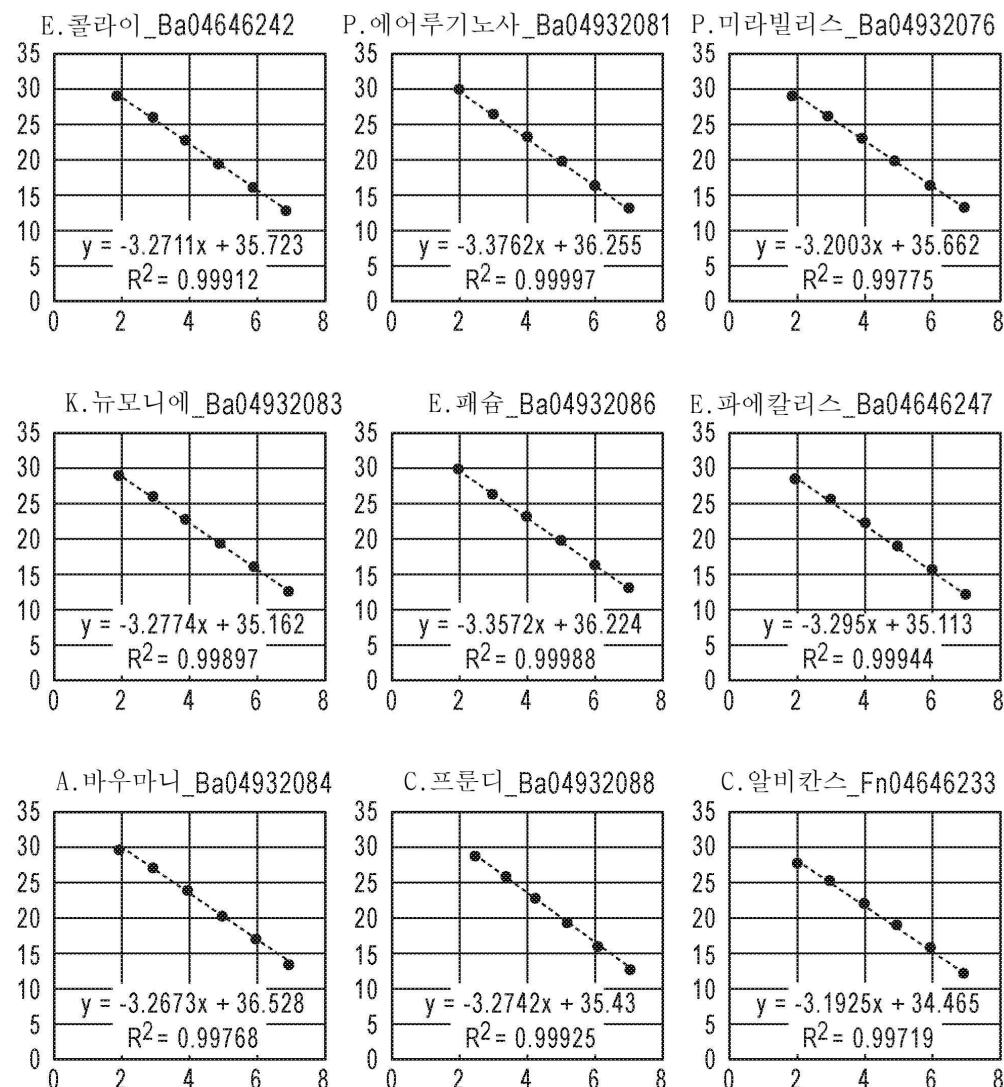
도면5

모액 내 복제/ μ l	서브어레이 당 복제/ μ l (5 μ l)	관통공 당 복제/ μ l (33nl)
10000000	5000000	165000
1000000	500000	16500
100000	50000	1650
10000	5000	165
1000	500	16.5
100	50	1.65
10	25	0.165

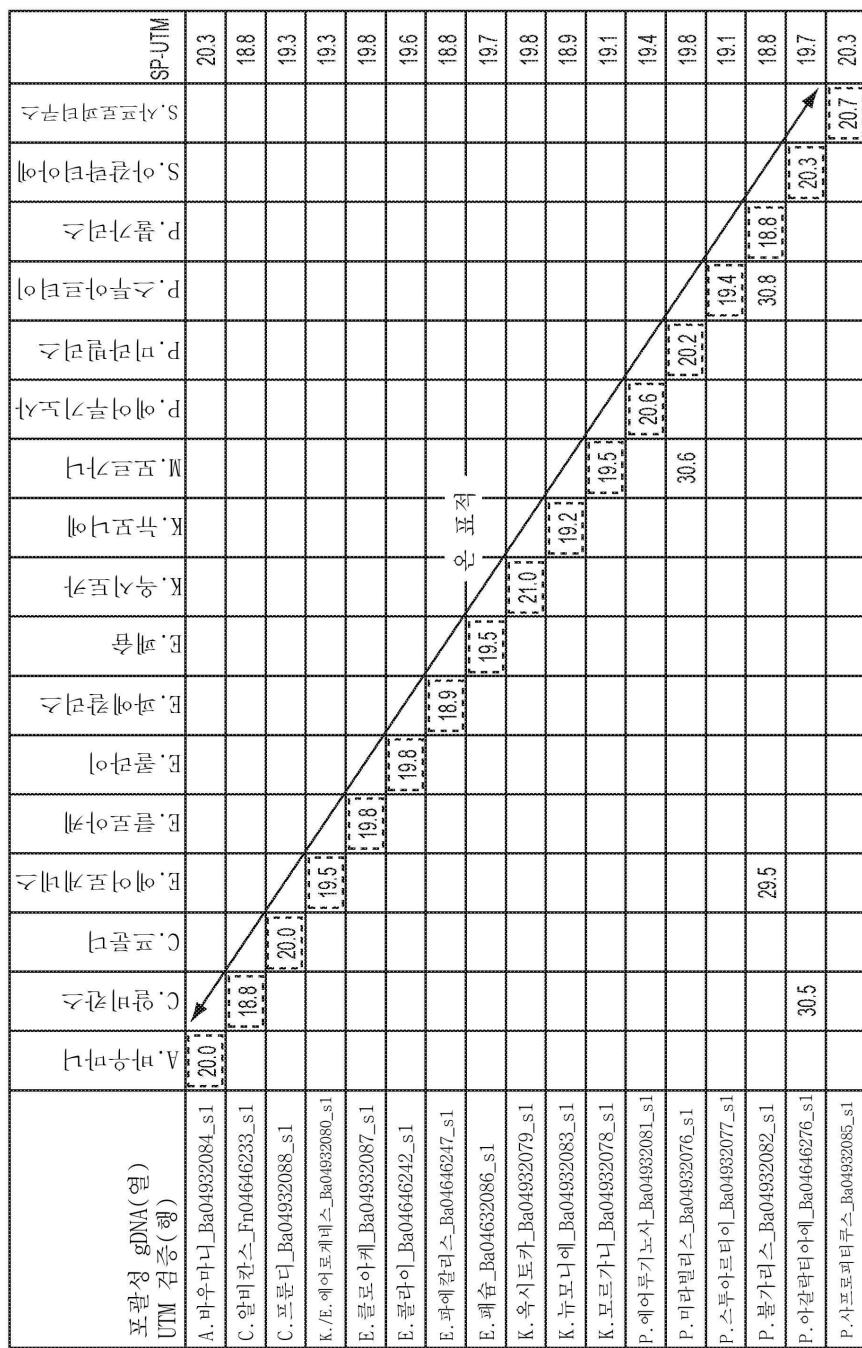
도면6

종 및 검증	R ²	슬로프
A. 바우마니_Ba04932084_s1	0.9977	-3.27
C. 알비칸스_Fn04646233_s1	0.9972	-3.19
C. 프룬디_Ba04632088_s1	0.9992	-3.27
K./E. 에어로개네스_Ba04932080_s1	0.9984	-3.29
E. 클로아케_Ba04932087_s1	0.9998	-3.33
E. 콜라이_Ba04646242_s1	0.9991	-3.27
E. 파에칼리스_Ba04646247_s1	0.9994	-3.30
E. 패슘_Ba04932086_s1	0.9999	-3.36
K. 옥시토카_Ba04632079_s1	0.9996	-3.34
K. 뉴모니에_Ba04932086_s1	0.9990	-3.28
M. 모르가니_Ba04932078_s1	0.9996	-3.49
P. 에어루기노사_Ba04932081_s1	1.0000	-3.38
P. 미라빌리스_Ba04932076_s1	0.9992	-3.38
P. 스투아르티이_Ba04932077_s1	0.9990	-3.30
P. 불가리스_Ba04932082_s1	0.9988	-3.29
S. 아갈락티아에_Ba04646276_s1	0.9998	-3.28
S. 사프로피티쿠스_Ba04932085_s1	0.9996	-3.38
RNASEP_Hs04930436_g1	0.9999	-3.36
Xeno_Ac00010014_a1	0.9999	-3.20

도면7



도면8

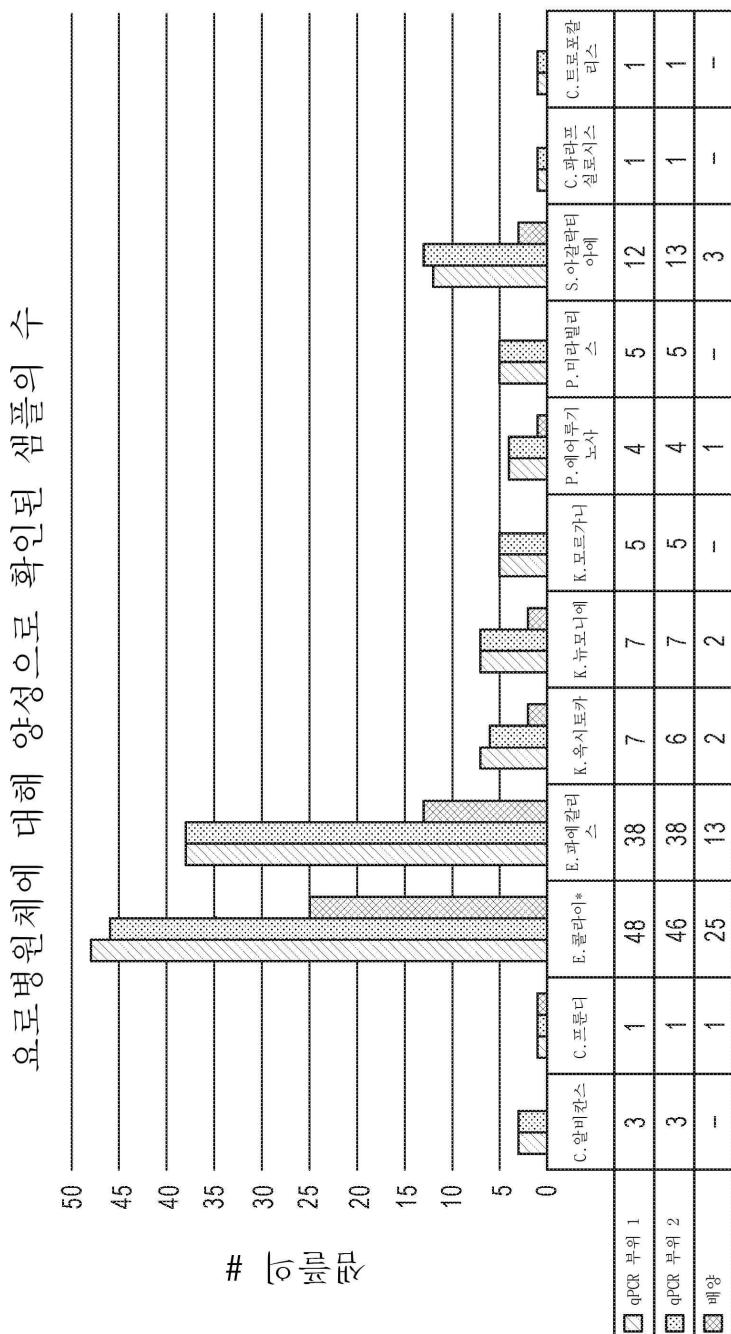


□ = 표적(On Target)

도면9

표본명	검증 유형	검증 결과	검증 날짜
포괄성 gDNA (열) UTM 검증 (열)	NTC	검증 완료	SP-UTM
A. 바우마니_Ba04932084_s1			20.3
C. 알비칸스_Fn04646233_s1		30.5	28.8
C.프티_Ba04932088_s1			34.1
K. E. 에이로케네스_Ba04932080_s1			19.3
E. 클로아케_Ba04932087_s1			19.3
E. 퀀라리오_Ba04646242_s1		38.1	19.8
E. 캐에컬리스_Ba04646247_s1	29.5		19.6
E. 페슈_Ba04632086_s1			30.7
K. 옥시토카_Ba04932079_s1			18.8
K. 뉴모니아_Ba04932083_s1			19.7
K. 모르가니_Ba04932078_s1			19.8
P. 에어루기노자_Ba04932081_s1			18.9
P. 미라빌리스_Ba04932076_s1			19.1
P. 스투어르티오_Ba04932077_s1			19.4
P. 불가리스_Ba04932082_s1		30.6	18.8
P. 아질락티아에_Ba04646276_s1		31.2	19.7
P. 시프로피티쿠스_Ba04932085_s1			20.3

도면10



도면11

샘플명	배양 양성/음성	C.알마진스	C.프로니	E.풀라이	E.파에콜리스	K.옥시토카	K.뉴포니에	K.포르가나	P.미라빌리스	S.아출락티아에
PUX17-000345	양성			14.8						
PUX17-000346	양성			14.7	20.4	28.0				
PUX17-000348	양성			15.4		30.1				
PUX17-000453	양성			13.5	22.6	30.2			22.7	
PUX17-000452	양성					17.1				
PUX17-000442	양성				13.4	23.5				
PUX17-000563	양성								22.8	18.8
PUX17-000362	양성			13.6			29.6			30.5
PUX17-000562	양성			30.5	29.2					
PUX17-000349	양성									
PUX17-000363	음성(상당한 성장 없음)			24.8						29.8
PUX17-000365	음성(혼합된 균총 >10^5 CFU/ML)			23.9						26.9
PUX17-000451	음성(혼합된 균총 >10^5 CFU/ML)			22.4	27.8					19.6
PUX17-000574	음성(혼합된 균총 >10^5 CFU/ML)			21.5	19.4		25.2		26.6	23.8
PUX17-000577	음성(이용가능한 마이크로 테이터 없음)	23.1			17.4					
PUX17-000580	음성(이용가능한 마이크로 테이터 없음)			12.4	28.0	20.4				
PUX17-000764	음성(혼합된 균무리 >10^5 CFU/ML)			13.07	20.16					23.91

배양 및 qPCR 양성 단독

도면12

연구샘플 ID	미생물	qPCR에 의한 확인	생거 서열분석에 의한 확인	배양 결과
PUX17-000566	S.아갈락티아에	예	예	음성
	K.뉴모니에	예	예	음성
PUX17-000574	P.미라빌리스	예	예	음성
	E.파에칼리스	예	예	음성
	E.파슘	예	예	음성
PUX17-000577	C.알비칸스	예	예	음성
	K.옥시토카	예	예	음성
PUX17-000580	K.뉴모니에	아니오	아니오	음성
	E.콜라이	예	예	음성
	E.파에칼리스	예	예	음성
PUX17-000764	S.아갈락티아에	예	예	음성
	E.콜라이	예	예	음성
PUX17-000777	E.파에칼리스	예	예	음성
PUX17-000375	S.아우례우스	예	예	음성

도면13a

진성 양성 및 진성 음성 샘플 비교(N=73)			
	비 양 양성	비 양 음성	(무 성장)
qPCR 양성	40	3	
qPCR 음성	-	30	
일치율	100%	90.90%	
총 일치율		95.8%	

도면 13b

qPCR 및 배양 음성 샘플의 비율

