



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0007791
(43) 공개일자 2020년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6844 (2018.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6844 (2018.05)
C12N 9/1252 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7031802
(22) 출원일자(국제) 2018년05월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년10월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/033549
(87) 국제공개번호 WO 2018/213811
국제공개일자 2018년11월22일
(30) 우선권주장
62/508,975 2017년05월19일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
젠-프로브 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 92121 샌디에이고 제네틱 센터
드라이브 10210
(72) 발명자
피터슨, 패트릭
미국 캘리포니아주 92121 샌디에이고 제네틱 센터
드라이브 10210 젠-프로브 인코포레이티드 내
루, 토니
미국 캘리포니아주 92121 샌디에이고 제네틱 센터
드라이브 10210 젠-프로브 인코포레이티드 내
조스트, 마티아스
미국 캘리포니아주 92121 샌디에이고 제네틱 센터
드라이브 10210 젠-프로브 인코포레이티드 내
(74) 대리인
특허법인 광장리앤코

전체 청구항 수 : 총 163 항

(54) 발명의 명칭 **플랩 엔도뉴클레아제를 함유하는 건조 조성물**

(57) 요약

플랩 엔도뉴클레아제, 벌킹제 및 유기 완충제를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어진 수성 용액의 조성물이 개시되며, 상기 수성 용액은 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 상기 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는다.

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6876 (2018.05)
C12Q 2521/101 (2013.01)
C12Q 2521/301 (2013.01)
C12Q 2527/125 (2019.08)

(30) 우선권주장

62/508,990 2017년05월19일 미국(US)
62/540,478 2017년08월02일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

수성 용액의 조성물로서, 플랩 엔도뉴클레아제(flap endonuclease), 벌킹제(bulking agent) 및 유기 완충제를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 상기 수성 용액은 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 상기 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 수성 용액은 분자 분석(assay)을 수행하기에 유용한 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 수성 용액은 핵산 기반 분석을 수행하기에 유용한 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 프로브 올리고뉴클레오티드, 적합하게는 적어도 2종의 프로브 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 프로브 올리고뉴클레오티드(들)는 표적 핵산 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 플랩 엔도뉴클레아제는 Cleavase® 효소인, 조성물.

청구항 7

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 핵산에 어닐링하여 플랩 엔도뉴클레아제에 의해서 인식될 수 있는 3차원 구조를 형성할 수 있는 적어도 2종의 프로브 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 중합효소를 더 포함하는, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 적어도 1종의 중합효소는 상기 수성 용액 중의 약 0.10 U/ μ l 내지 약 0.2 U/ μ l의 농도로 상기 수성 용액 중에 존재하는 중합효소를 포함하는, 조성물.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 적어도 1종의 중합효소는 0.14 U/ μ l, 0.146 U/ μ l 및 0.1686 U/ μ l 중에 선택된 농도로 상기 수성 용액 중에 존재하는 중합효소를 포함하는, 조성물.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 중합효소는 핫-스타트 중합효소(hot-start polymerase)인 중합효소를 포함하는, 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 핫-스타트 중합효소는 재조합 Taq DNA 중합효소이고, 적합하게는, 상기 중합효소는 상기

중합효소의 중합효소 활성도를 특이적으로 차단하는 항체에 의해서 결합되는, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 핫-스타트 중합효소는 화학적으로 변형된 재조합 *Taq* DNA 중합효소이고, 상기 화학적 변형은 상기 중합효소의 중합효소 활성도를 저해하는, 조성물.

청구항 14

제8항 내지 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 중합효소는 적합하게는, 약 0.1 U/ μ l 내지 약 4.0 U/ μ l의 농도로 상기 수성 용액 중에 존재하는 역전사효소를 포함하는, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 역전사효소는 AMV 역전사효소인, 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 역전사효소는 MMLV 역전사효소인, 조성물.

청구항 17

제2항 내지 16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 침입자(invader) 프로브를 포함하는, 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 침입자 프로브의 서열은 표적 핵산 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인, 조성물.

청구항 19

제2항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 신호전달 프로브를 포함하는, 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 신호전달 프로브의 서열은 표적 핵산 서열에 부분적으로 상보성인, 조성물.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 신호전달 프로브의 서열은 플랩 영역을 포함하는, 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 플랩 영역은 적어도 부분적으로 침입자 프로브와 중첩되는, 조성물.

청구항 23

제2항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 FRET 프로브를 포함하는, 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 FRET 프로브의 상기 서열은 신호전달 프로브의 상기 플랩 영역에 부분적으로 상보성인, 조성물.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 FRET 프로브는 이에 공유 결합된 라벨(label)을 포함하는, 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 라벨은 형광 분자인, 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 라벨은 상기 FRET 프로브의 5' 단부에 위치된, 조성물.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FRET 프로브는 상기 형광 분자의 켄칭(quenching) 근접성 내에서 이에 공유 결합되고, 상기 형광 분자의 형광 형태를 적어도 부분적으로 켄칭할 수 있는 켄처(quencher) 분자를 포함하는, 조성물.

청구항 29

제2항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 표적 포획 프로브를 포함하는, 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 표적 포획 프로브는 엄격 조건 하에서 표적 핵산에 특이적으로 또는 비특이적으로 혼성화되는 표적 혼성화 부분을 갖는, 조성물.

청구항 31

제2항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 다중 분자 분석을 수행하기 위한 2종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벌킹제는 트레할로스인, 조성물.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벌킹제는 약 0.2 M 내지 약 0.5 M, 적합하게는 약 0.36M 또는 약 0.47 M의 농도로 존재하는, 조성물.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 무기 염은 약 0.373 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 약 0.029 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재하는, 조성물.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 무기 염은 염화나트륨이고, 적합하게는, 상기 염화나트륨은 약 0.292 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는 약 0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재하는, 조성물.

청구항 36

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 무기 염은 염화칼륨이고, 적합하게는, 상기 염화칼륨은 약 0.373 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 염화칼륨 내지 약 0.019 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 염화칼륨, 적합하게는 약 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재하는, 조성물.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.135 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 나트륨 이온 내지 약 0.006 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 나트륨 이온, 적합하게는 약 0.127 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 나트륨 이온을 함유하는, 조성물.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.196 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 칼륨 이온 내지 약 0.010 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 칼륨 이온, 적합하게는 약 0.016 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 칼륨 이온을 함유하는, 조성물.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.355 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 클로라이드 이온 내지 약 0.009 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 클로라이드 이온, 적합하게는 약 0.337 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 클로라이드 이온을 함유하는, 조성물.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 4 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하는, 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.298 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.234 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 무기 염을 포함하는, 조성물.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.284 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.071 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 클로라이드 이온을 포함하는, 조성물.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 3 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하는, 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.224 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.175 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 무기 염을 포함하는, 조성물.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.213 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.053 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 클로라이드 이온을 포함하는, 조성물.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 2 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하는, 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.149 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.117 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 무기 염을 포함하는, 조성물.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.142 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.036 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 클로라이드 이온을 포함하는, 조성물.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 1 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하는, 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.058 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 무기 염을 포함하는, 조성물.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.071 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.018 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 클로라이드 이온을 포함하는, 조성물.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 500 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하는,

조성물.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.037 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.029 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 무기 염을 포함하는, 조성물.

청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서, 상기 수성 용액은 약 0.036 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.009 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 클로라이드 이온을 포함하는, 조성물.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액의 상기 무기 염 농도는 1 mM 미만의 염화나트륨인, 조성물.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 염화나트륨을 함유하지 않는, 조성물.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 1 mM 미만의 마그네슘 이온을 함유하는, 조성물.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 0.1 mM 미만의 마그네슘 이온을 함유하는, 조성물.

청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 테옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP)를 더 포함하는, 조성물.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 dNTP는 상기 수성 용액 중에 0.1 mM 내지 0.4 mM, 적합하게는 0.29 내지 0.46 mM의 농도로 dATP를 포함하는, 조성물.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서, dATP는 상기 수성 용액 중에 0.3 mM 내지 0.4 mM, 예를 들어, 0.375 mM의 농도로 존재하는, 조성물.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 dNTP는 상기 수성 용액 중에 0.1 mM 내지 0.4 mM, 적합하게는 0.29 내지 0.46 mM의 농도로 dGTP를 포함하는, 조성물.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 dGTP는 상기 수성 용액 중에 0.3 mM 내지 0.4 mM, 예를 들어, 0.375 mM의 농도로 존재하는, 조성물.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 dNTP는 상기 수성 용액 중에 0.1 mM 내지 0.4 mM, 적합하게는 0.29 내지 0.46 mM의 농도로 dCTP를 포함하는, 조성물.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 dCTP는 상기 수성 용액 중에 0.3 mM 내지 0.4 mM, 예를 들어, 0.375 mM의 농도로 존재하는, 조성물.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 dNTP는 상기 수성 용액 중에 0.1 mM 내지 0.4 mM, 적합하게는 0.2 내지 0.37 mM, 예를 들어, 0.284 mM의 농도로 dTTP를 포함하는, 조성물.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 dTTP는 상기 수성 용액 중에 0.3 mM 내지 0.4 mM의 농도로 존재하는, 조성물.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 dNTP는 상기 수성 용액 중에 0.1 mM 내지 0.4 mM, 적합하게는 0.125 내지 0.234 mM, 예를 들어, 0.182 mM의 농도로 dUTP를 포함하는, 조성물.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 dUTP는 상기 수성 용액 중에 0.3 mM 내지 0.4 mM의 농도로 존재하는, 조성물.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 플랩 엔도뉴클레아제는 상기 수성 용액 중에 약 0.020 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.040 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 존재하는, 조성물.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 플랩 엔도뉴클레아제는 상기 수성 용액 중에 약 0.030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 존재하고, 적합하게는, 상기 플랩 엔도뉴클레아제는 상기 수성 용액 중에 약 0.030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 존재하는, 조성물.

청구항 72

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유기 완충제는 3-(*N*-모르폴리노)프로판설폰산(MOPS) 완충제인, 조성물.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 MOPS 완충제는 상기 수성 용액 중에 10 내지 20 mM의 농도로, 적합하게는 상기 수성 용액 중에 12.5 mM 내지 15 mM의 농도로 존재하는, 조성물.

청구항 74

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유기 완충제는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris) 완충제인, 조성물.

청구항 75

제74항에 있어서, 상기 Tris 완충제는 상기 수성 용액 중에 40mM 내지 60 mM의 농도로, 적합하게는 상기 수성 용액 중에 50mM의 농도로 존재하는, 조성물.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 구상 단백질(globular protein)을 함유하는, 조성물.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 구상 단백질은 소 혈청 알부민(BSA)인, 조성물.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 소 혈청 알부민(BSA)은 비-아세틸화된 BSA, 적합하게는, 초고순도(ultrapure) 비-아세틸화된 BSA인, 조성물.

청구항 79

제76항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구상 단백질은 0.40 내지 0.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는, 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 양으로 존재하는, 조성물.

청구항 80

제1항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, Cleavase® 효소, 트레할로스, MOPS 완충제, dNTP, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 상기 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는, 조성물.

청구항 81

제80항에 있어서, 상기 수성 용액 중에 약 0.030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 존재하는 Cleavase®, 약 0.3 M의 농도로 존재하는 트레할로스, 약 12.5 mM의 농도의 MOPS 완충제, 각각 약 0.3 mM의 농도의 dNTP, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 상기 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는, 조성물.

청구항 82

제1항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, Cleavase® 효소, 트레할로스, Tris 완충제, dNTP, 소 혈청 알부민, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 상기 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는, 조성물.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 수성 용액 중에 약 0.030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 존재하는 Cleavase® 효소, 약 0.3 M의 농도로 존재하는 트레할로스, 약 50 mM의 농도의 Tris 완충제, 각각 약 0.3 mM의 농도의 dNTP, 약 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 소 혈청 알부민, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 상기 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는, 조성물.

청구항 84

제1항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, Cleavase® 효소, 트레할로스, MOPS 완충제, dNTP, 소 혈청 알부민, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 상기 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는, 조성물.

청구항 85

제84항에 있어서, 상기 수성 용액 중에 약 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 존재하는 Cleavase® 효소, 약 0.36 M의 농도로 존재하는 트레할로스, 약 15 mM의 농도의 MOPS 완충제, 각각 약 0.38 mM의 농도의 dNTP, 약 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 소 혈청 알부민, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 상기 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는, 조성물.

청구항 86

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 알파 사이클로덱스트린을, 예를 들어, 0.1 내지 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 더 포함하는, 조성물.

청구항 87

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항의 조성물의 건조 형태.

청구항 88

건조 조성물로서, 플랩 엔도뉴클레아제, 벌킹제 및 유기 완충제를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지며, 1종 이상의 무기 염이 상기 건조 조성물의 총 질량의 0.350% 이하인 질량으로 상기 건조 조성물 중에 존재하고, 상기 건조 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는, 건조 조성물.

청구항 89

제88항에 있어서, 상기 1종 이상의 무기 염은 상기 건조 조성물의 총 질량의 약 0.311% 내지 약 0.024%인 질량으로 상기 건조 조성물 중에 존재하는, 건조 조성물.

청구항 90

제88항 또는 제89항에 있어서, 상기 1종 이상의 무기 염은 염화나트륨, 염화칼륨, 및 염화나트륨 및 염화칼륨 둘 다로 이루어진 군으로부터 선택되는, 건조 조성물.

청구항 91

제88항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 분자 분석을 수행하기에 유용한 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는, 건조 조성물.

청구항 92

제88항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 기반 분석을 수행하기에 유용한 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는, 건조 조성물.

청구항 93

제91항 또는 제92항에 있어서, 상기 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 프로브 올리고뉴클레오티드, 적합하게는 적어도 2종의 프로브 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 94

제93항에 있어서, 상기 프로브 올리고뉴클레오티드(들)는 표적 핵산 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인, 건조 조성물.

청구항 95

제88항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 플랩 엔도뉴클레아제는 Cleavase® 효소인, 건조 조성물.

청구항 96

제95항에 있어서, 표적 핵산에 어닐링하여 상기 플랩 엔도뉴클레아제에 의해서 인식될 수 있는 3차원 구조를 형성할 수 있는 적어도 2종의 프로브 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 97

제88항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 중합효소를 더 포함하는, 건조 조성물.

청구항 98

제97항에 있어서, 상기 적어도 1종의 중합효소는 상기 수성 용액 중의 약 0.10 U/ μ l 내지 약 0.2 U/ μ l의 농도로 상기 수성 용액 중에 존재하는 중합효소를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 99

제97항에 있어서, 상기 적어도 1종의 중합효소는 0.14 U/ μ l, 0.146 U/ μ l 및 0.1686 U/ μ l 중에 선택된 농도로 상기 수성 용액 중에 존재하는 중합효소를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 100

제97항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 중합효소는 핫-스타트 중합효소인 중합효소를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 핫-스타트 중합효소는 재조합 *Taq* DNA 중합효소이고, 적합하게는, 상기 중합효소는 상기 중합효소의 중합효소 활성도를 특이적으로 차단하는 항체에 의해서 결합되는, 건조 조성물.

청구항 102

제101항에 있어서, 상기 핫-스타트 중합효소는 화학적으로 변형된 재조합 *Taq* DNA 중합효소이고, 상기 화학적 변형은 상기 중합효소의 중합효소 활성도를 저해하는, 건조 조성물.

청구항 103

제97항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 중합효소는 적합하게는, 약 0.1 U/ μ l 내지 약 0.6 U/ μ l의 농도로 상기 수성 용액 중에 존재하는 역전사효소를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 104

제103항에 있어서, 상기 역전사효소는 AMV 역전사효소인, 건조 조성물.

청구항 105

제103항에 있어서, 상기 역전사효소는 MMLV 역전사효소인, 건조 조성물.

청구항 106

제92항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 침입자 프로브를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 107

제106항에 있어서, 상기 침입자 프로브의 서열은 표적 핵산 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성인, 건조 조성물.

청구항 108

제91항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 신호전달 프로브를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 109

제108항에 있어서, 상기 신호전달 프로브의 서열은 표적 핵산 서열에 부분적으로 상보성인, 건조 조성물.

청구항 110

제108항 또는 제109항에 있어서, 상기 신호전달 프로브의 서열은 플랩 영역을 포함하는, 건조 조성물.

청구항 111

제110항에 있어서, 상기 플랩 영역은 침입자 프로브와 적어도 부분적으로 중첩되는, 건조 조성물.

청구항 112

제91항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 FRET 프로브를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 113

제112항에 있어서, 상기 FRET 프로브의 서열은 신호전달 프로브의 상기 플랩 영역에 부분적으로 상보성인, 건조 조성물.

청구항 114

제112항 또는 제113항에 있어서, 상기 FRET 프로브는 이에 공유 결합된 라벨을 포함하는, 건조 조성물.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 라벨은 형광 분자인, 건조 조성물.

청구항 116

제115항에 있어서, 상기 라벨은 상기 FRET 프로브의 5' 단부에 위치된, 건조 조성물.

청구항 117

제112항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FRET 프로브는 상기 형광 분자의 켄칭 근접성 내에서 이에 공유 결합되고, 형광 분자의 형광 형태를 적어도 부분적으로 켄칭할 수 있는 켄처 분자를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 118

제91항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 표적 포획 프로브를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 119

제118항에 있어서, 상기 표적 포획 프로브는 엄격 조건 하에서 표적 핵산에 특이적으로 또는 비특이적으로 혼성화되는 표적 혼성화 부분을 갖는, 건조 조성물.

청구항 120

제91항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 용액은 다중 분자 분석을 수행하기 위한 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 건조 조성물.

청구항 121

제91항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 별킹제는 트레할로스인, 건조 조성물.

청구항 122

제91항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP)를 더 포함하는, 건조 조성물.

청구항 123

제91항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유기 완충제는 3-(*N*-모르폴리노)프로판설포산(MOPS) 완충제인, 건조 조성물.

청구항 124

제91항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유기 완충제는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris) 완충제인, 건조 조성물.

청구항 125

제91항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 건조 조성물은 구상 단백질을 함유하는, 건조 조성물.

청구항 126

제125항에 있어서, 상기 구상 단백질은 소 혈청 알부민(BSA)인, 건조 조성물.

청구항 127

제126항에 있어서, 상기 소 혈청 알부민(BSA)은 비-아세틸화된 BSA, 적합하게는, 초고순도 비-아세틸화된 BSA인, 건조 조성물.

청구항 128

제87항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 건조 조성물의 질량은 약 0.003 g 내지 약 0.004 g, 또는 약 0.0032 g 내지 약 0.0037 g, 또는 0.0033 g, 또는 0.0034 g, 또는 0.0035 g, 또는 0.0036 g이거나; 또는 건조되어 상기 건조 조성물을 형성한 수성 용액 마이크로리터당 약 0.000125 g 내지 약 0.000667 g인, 건조 조성물.

청구항 129

핵산 기반 분석을 수행하는 데 사용하기 위한 혼합물의 형성 방법으로서, 재구성 용액 및 제87항 내지 제128항 중 어느 한 항의 건조 조성물을 배합하는 단계를 포함하고, 상기 재구성 용액은 적어도 1종의 무기 염을 포함하는, 방법.

청구항 130

제129항에 있어서, 상기 재구성 용액은 1 mM 미만의 무기 염 농도를 포함하는, 방법.

청구항 131

제129항 또는 제130항에 있어서, 상기 재구성 용액은 마그네슘 이온을 포함하는, 방법.

청구항 132

제131항에 있어서, 상기 재구성 용액은 약 5 mM 내지 약 15 mM, 적합하게는, 9 mM 내지 12 mM, 예를 들어, 11.25 mM의 농도의 $MgCl_2$ 를 포함하는, 방법.

청구항 133

제129항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성 용액은 약 0.012% w/v 내지 약 0.020% w/v의 농도의 메틸 파라벤, 약 0.006% w/v 내지 약 0.010% w/v의 농도의 프로필 파라벤, 약 0.20% v/v 내지 약 0.30% v/v의 농도의 무수 에탄올(absolute ethanol), 또는 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 134

제133항에 있어서, 상기 재구성 용액 중의 상기 메틸 파라벤의 상기 농도는 0.016% w/v인, 방법.

청구항 135

제133항 또는 제134항에 있어서, 상기 재구성 용액 중의 상기 프로필 파라벤의 상기 농도는 0.008% w/v인, 방법.

청구항 136

제133항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 무수 에탄올의 상기 농도는 상기 재구성 용액 중에 약 0.26% v/v로 존재하는, 방법.

청구항 137

핵산 기반 분석을 수행하는 데 사용하기 위한 건조 조성물의 제조 방법으로서, (i) 제1항 내지 제78항 중 어느 한 항의 수성 용액을 동결시켜 상기 수성 용액의 동결 형태를 형성하는 단계; 및 (ii) 단계 (i)로부터의 상기 동결 형태를 동결건조 조건에 노출시켜, 건조 조성물을 형성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 138

제137항에 있어서, 상기 건조 조성물은 습윤 환경에 노출되고, 상기 습윤 환경의 절대 습도 수준은 30°C에서 공기 세제곱 미터 당 물 2.3 그램인, 방법.

청구항 139

제138항에 있어서, 상기 건조 조성물은 상기 습윤 환경에 최대 3시간 동안 노출되는, 방법.

청구항 140

제137항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 건조 조성물을 밀봉된 용기 내에 저장하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 141

제137항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 건조 조성물의 질량은 약 0.003 g 내지 약 0.004 g, 또는 약 0.0032 g 내지 약 0.0037 g, 또는 0.0033 g, 또는 0.0034 g, 또는 0.0035 g, 또는 0.0036 g이거나; 또는 건조되어 상기 건조 조성물을 형성한 수성 용액 마이크로리터당 약 0.000125 g 내지 약 0.000667 g인, 방법.

청구항 142

핵산 기반 분석을 수행하는 데 사용하기 위한 건조 조성물의 제조 방법으로서, 제1항 내지 제85항 중 어느 한 항의 수성 용액을, 탈수, 데시케이션(desiccation), 동결건조 및 분무 건조로 이루어진 군에서 선택된 건조 방법을 사용하여 건조시켜, 건조 조성물을 형성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 143

제142항에 있어서, 건조 방법은 동결건조이고, 상기 건조 조성물은 동결건조된 조성물인, 방법.

청구항 144

제142항 또는 제143항에 있어서, 상기 건조 조성물을 밀봉된 용기 내에 저장하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 145

핵산 기반 분석을 수행하는 데 사용하기 위한 키트로서, 상기 키트는 제86항 내지 제127항 중 어느 한 항의 건조 조성물을 함유하는 제1 용기 및 약 3.8 mM 내지 약 4.4 mM의 농도의 $MgCl_2$ 를 포함하는 재구성 용액을 함유하는 제2 용기를 포함하는, 키트.

청구항 146

제145항에 있어서, 상기 제1 용기는 하나 이상의 웰을 포함하는 멀티웰 플레이트인, 키트.

청구항 147

제145항에 있어서, 상기 하나 이상의 웰 각각은 0.311% 이하의 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율을 함유하는 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 함유하는, 키트.

청구항 148

제145항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 용기 및 상기 제2 용기는 상기 재구성 용액을 상기 제2 용기로부터 상기 제1 용기로 자동 전달하도록 개작된 장치 내에 혼입되는, 키트.

청구항 149

유기 완충제, 벌킹제, 클로라이드 이온 및 킬레이팅제를 함유하는 수성 용액을 포함하거나, 이것으로 이루어지거나 또는 이것으로 본질적으로 이루어진, 투석 조성물.

청구항 150

제149항에 있어서, 상기 벌킹제는 트레할로스인, 투석 조성물.

청구항 151

제149항 또는 제150항에 있어서, 상기 벌킹제는 약 100 mM 내지 300 mM, 적합하게는 200 mM의 농도로 존재하는, 투석 조성물.

청구항 152

제149항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유기 완충제는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris) 완충제인, 투석 조성물.

청구항 153

제152항에 있어서, 상기 Tris 완충제는 상기 수성 용액 중에 10mM 내지 30 mM의 농도로, 적합하게는 상기 수성 용액 중에 50mM의 농도로 존재하는, 투석 조성물.

청구항 154

제149항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 클로라이드 이온은 KCl인, 투석 조성물.

청구항 155

제154항에 있어서, 상기 KCl은 약 40 내지 60 mM, 적합하게는 50 mM의 농도로 존재하는, 투석 조성물.

청구항 156

제151항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 킬레이팅제는 EDTA인, 투석 조성물.

청구항 157

제156항에 있어서, 상기 EDTA는 0.05 내지 0.2 mM, 적합하게는, 0.1 mM의 농도로 상기 수성 용액 중에 존재하는, 투석 조성물.

청구항 158

제149항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는, Cleavase® 효소를 더 포함하는, 투석 조성물.

청구항 159

실질적인 글리세롤-무함유 플랩 엔도뉴클레아제 조성물의 제조 방법으로서, (i) 플랩 엔도뉴클레아제 및 글리세롤을 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어진 수성 용액을 제공하는 단계; (ii) 상기 수성 용액을 제149항 내지 제158항 중 어느 한 항의 투석 조성물 중에서 투석하는 단계; 및 (iii) 실질적인 글리세롤-무함유 플랩 엔도뉴클레아제 조성물을 수득하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 160

제159항에 있어서, 단계 (i)에서 상기 수성 용액은 약 0.3 내지 약 0.5%(w/v)의 글리세롤, 적합하게는, 약 0.35%(w/v)의 글리세롤을 함유하는, 방법.

청구항 161

건조된 플랩 엔도뉴클레아제-함유 조성물을 제조하기 위한, 제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 따른 수성 조성물의 용도.

청구항 162

핵산 기반 분석을 수행하기 위해서 재구성 용액과 조합된 제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 따른 수성 조성물의 용도.

청구항 163

실질적인 글리세롤-무함유 플랩 엔도뉴클레아제 조성물을 제조하기 위한 제149항 내지 제158항 중 어느 한 항에 따른 투석 조성물의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 각각 모든 목적을 위해서 전문이 참고로 포함된, 가특허 제62/508,975호(2017년 5월 19일자 출원), 제62/508,990호(2017년 5월 19일자 출원), 제62/540,478호(2017년 8월 2일자 출원) 각각의 이익을 주장한다.

배경 기술

[0003] 핵산 기반 분석(assay)을 수행하기 위한 상업적인 키트는 종종 시약, 예컨대, 효소, 뉴클레오티드, 세척제, 완충제, 프라이머, 프로브 및 무기 염, 예컨대, $MnCl_2$, $MgCl_2$, $NaCl$, 및 KCl 을 함유한다(Innis et al, (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Ch. 1, Optimizations of PCRs).

[0004] 핵산 기반 분석은 "핵산 증폭 기반 분석", 즉, 핵산 표적 서열을 증폭시키는 하나 이상의 단계를 사용하는 분석일 수 있다. 핵산 기반 분석에 사용하기 위한 다양한 증폭 방법이 당업계에 공지되어 있다. 대안적으로, 핵산-기반 분석은 "비-핵산 증폭-기반 분석", 즉, 핵산 표적 서열을 증폭시키기 위해서 임의의 단계에 의존하지 않는 분석일 수 있다. 예시적인 비-핵산 증폭-기반 분석은 "절단-기반 분석"이며, 이것은 표적 핵산에 대한 중첩 올리고뉴클레오티드의 특이적 혼성화에 의해서 형성된 선형 이중 절단 구조의, 플랩 엔도뉴클레아제(flap endonuclease)에 의한, 특이적 절단에 의존하는 분석이다. 이러한 분석에서, 침입자(invader) 올리고뉴클레오티드("침입자 프로브"라고도 지칭됨)는 분석 반응 온도에서 표적 핵산에 안정적으로 어닐링하도록 설계된다. 표적 혼성화 서열 및 침입자 올리고뉴클레오티드와 중첩된 비-표적-혼성화 플랩 영역을 함유하는 신호 프로브 올리고뉴클레오티드는 분석 온도의 것과 유사한 용융 온도로 설계된다. 그 결과, 신호 프로브는 반응 조건에서 표적 핵산으로부터 어닐링/해리의 상태로 존재한다. 신호 프로브가 플랩 엔도뉴클레아제의 존재 하에서 표적 핵산에 어닐링되는 경우, 비-표적 혼성화 플랩 영역은 플랩 엔도뉴클레아제에 의해서 중첩-의존적 방식으로 절단되어 절단 생성물을 방출한다. 이어서 절단된 플랩 영역은 신호전달 모이어티 및 켄칭 모이어티(종종 "FRET 프로브"라고도 지칭됨)를 포함하는 헤어핀 구성의 프로브와 어닐링되어 신호전달 모이어티 또는 켄칭 모이어티 중 하나에 결합되는 FRET 프로브의 부분과 절단된 플랩 부분의 일부 사이에 중첩을 형성한다. 플랩 엔도뉴클레아제의 존재 하에서, FRET 프로브는 중첩-의존적 방식으로 절단되어 FRET 프로브로부터 신호전달 모이어티 또는 켄칭 모이어티 중 하나를 방출함으로써, 검출 가능한 신호를 생성한다. 침입자 프로브에 비해서 과량의 신호 프로브 및 FRET 프로브가 이러한 분석에서 사용되기 때문에, 이것은 종종 신호 증폭 분석이라고 지칭된다. 절단-기반 분석의 원리는 당업계에 널리 공지되어 있고, 예시적인 분석은 예를 들어, 문헌[Lyamichev et al. (Nat. Biotechnol. 17:292-296, 1999), Ryan et al. (Mol. Diagn. 4: 135-144, 1999), Allawi et al. (J. Clin. Microbiol. 44:3443-3447, 2006)], 미국 특허 제5,846,717호 및 제6,706,471호(Brow 등), 및 미국 특허 제5,614,402호(Dahlberg 등)에 기술되어 있다. 절단-기반 분석은 예를 들어, 상업적으로 입수 가능한 Invader® 분석(Hologic, Inc., 미국 매사추세츠 말버러 소재)을 포함한다.

[0005] 일부 상황에서, 동일한 반응에서 "증폭-기반 분석"(예: PCR) 및 "비-증폭-기반 분석"(예: Cleavase® 효소를 사용한 분석)을 수행하는 것이 바람직할 수 있다. Cleavase® 효소는 단일 가닥 데옥시리보핵산과 이중 가닥 데옥시리보핵산 사이의 접합부에서 절단하는 열안정적인 구조-특이적 엔도뉴클레아제이다.

[0006] 마그네슘 이온은 중합효소 및 다른 효소의 활성도를 증가시키는 것으로 보고되어 있다. 염화칼륨은 핵산 혼성화를 촉진시키는 것으로 보고되어 있다. 열, 카오트로픽제 chaotropic agent) 노출 및 동결건조를 비롯한 다양한 스트레스 조건 하에서 단백질을 보호하는 다수의 무기 염이 보고되어 있다(Liu et al (2007) FEBS Letters. 581:1047; Kanaya et al (1996) J. Biol. Chem. 271:32729; Innis et al, (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Ch. 1, Optimizations of PCRs; Menendez et al (1998) J. Biol. Chem. 273:167; Janeway et al (1993) Biochemistry. 32:1601, Fox et al (1971) J. Biol. Chem. 246:5739, Chang et al (2002) J. Biol. Chem. 277:277:4663, Rutter et al (1958) J. Biol. Chem. 233:374, Huszar et al (1981) J. Virol. 37:580-588, Wang (2000) Int. J. Pharmaceutics. 203:1-60). 염은 "증폭-기반 분석" 및 "비-증폭-기반 분석" 분석에도 사용된다. 예로서, Invader® 분석을 수행하기 위한 전형적인 반응 조건은 효소 스톱 중의 염화칼륨 및 반응 완충제 중의 염화마그네슘을 포함한다.

[0007] 그러나, 동결건조된 물질의 안정성은 동결건조된 케이크에 존재하는 임의의 염의 흡습성에 의해 영향을 받는다. 그 결과 동결건조된 물질의 흡습성은 동결건조된 물질을 포장하는 데 사용 가능한 시간에 영향을 미치고, 동결건조된 물질이 저장 및 수송될 수 있는 기간 및 조건에 영향을 미친다. 동결건조된 물질의 바람직하지 않은 재수화는 동결건조된 성분의 활성도에 부정적인 영향을 미친다. 동결건조된 물질의 바람직하지 않은 재수화로 인한 부정적인 영향을 최소화하기 위해서, 이러한 물질의 장기간 저장은 일반적으로 냉장 보관으로 수행된다.

[0008] 본 발명은 특히 핵산 기반 분석 - 예컨대, 비-증폭-기반 분석 또는 증폭 기반 분석과 조합된 비-증폭-기반 분석에서 사용되는 경우 동결건조된 조성물에 개선을 제공하고자 한다.

발명의 내용

- [0009] 플랩 엔도뉴클레아제, 벌킹제(bulking agent) 및 유기 완충제를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어진 수성 용액의 조성물이 개시되며, 여기서 수성 용액은 6 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 상기 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는다.
- [0010] 적합하게는, 수성 용액은 분자 분석을 수행하기에 유용한 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드를 더 포함한다.
- [0011] 적합하게는, 수성 용액은 핵산 기반 분석을 수행하기에 유용한 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드를 더 포함한다.
- [0012] 적합하게는, 플랩 엔도뉴클레아제는 Cleavase® 효소이다.
- [0013] 적합하게는, 조성물은 적어도 1종의 중합효소를 더 포함한다.
- [0014] 적합하게는, 적어도 1종의 중합효소는 수성 용액 중의 약 0.10 U/ul 내지 약 0.25 U/ul의 농도로 수성 용액 중에 존재하는 중합효소를 포함한다.
- [0015] 적합하게는, 적어도 1종의 중합효소는 0.11 U/ul, 0.12 U/ul, 0.14 U/ul, 0.146 U/ul, 0.1687 U/ul, 0.2 U/ul, 및 0.022 U/ul 중에 선택된 농도로 수성 용액 중에 존재하는 중합효소를 포함한다.
- [0016] 적합하게는, 적어도 1종의 중합효소는 핫-스타트(hot-start) 중합효소인 중합효소를 포함한다.
- [0017] 적합하게는, 핫-스타트 중합효소는 중합효소의 중합효소 활성도를 특이적으로 차단하는 항체에 의해서 결합된 재조합 Taq DNA 중합효소이다.
- [0018] 적합하게는, 핫-스타트 중합효소는 화학적으로 변형된 재조합 Taq DNA 중합효소이고, 화학적 변형은 중합효소의 중합효소 활성도를 저해한다.
- [0019] 적합하게는, 적어도 1종의 중합효소는 적합하게는, 약 0.1 U/ul 내지 약 4.0 U/ul의 농도로 상기 수성 용액 중에 존재하는 역전사효소를 포함한다.
- [0020] 적합하게는, 역전사효소는 AMV 역전사효소이다.
- [0021] 적합하게는, 역전사효소는 MMLV 역전사효소이다.
- [0022] 적합하게는, 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 침입자 프로브를 포함한다.
- [0023] 적합하게는, 침입자 프로브의 서열은 표적 핵산 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성이다.
- [0024] 적합하게는, 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 신호전달 프로브를 포함한다.
- [0025] 적합하게는, 신호전달 프로브의 서열은 표적 핵산 서열에 부분적으로 상보성이다.
- [0026] 적합하게는, 신호전달 프로브의 서열은 플랩 영역을 포함한다.
- [0027] 적합하게는, 플랩 영역은 적어도 부분적으로 침입자 프로브와 중첩된다.
- [0028] 적합하게는, 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 FRET 프로브를 포함한다.
- [0029] 적합하게는, FRET 프로브의 서열은 신호전달 프로브의 플랩 영역에 부분적으로 상보성이다.
- [0030] 적합하게는, FRET 프로브는 이에 공유 결합된 라벨(label)을 포함한다.
- [0031] 적합하게는, 라벨은 형광 분자이다.
- [0032] 적합하게는, 라벨은 FRET 프로브의 5' 단부에 위치된다.
- [0033] 적합하게는, FRET 프로브는 형광 분자의 켄칭 근접성 내에서 이에 공유 결합되고, 형광 분자의 형광 형태를 적어도 부분적으로 켄칭할 수 있는 켄처 분자를 포함한다.
- [0034] 적합하게는, 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 표적 포획 프로브를 포함한다.

- [0035] 적합하게는, 표적 포획 프로브는 엄격 조건 하에서 표적 핵산에 특이적으로 또는 비특이적으로 혼성화되는 표적 혼성화 부분을 갖는다.
- [0036] 적합하게는, 표적 포획 프로브는 엄격 조건 하에서 표적 핵산에 비특이적으로 혼성화되는 표적 혼성화 부분을 갖는다.
- [0037] 적합하게는, 표적 포획 프로브의 비-특이적 표적 혼성화 부분은 무작위로 배열된 K 뉴클레오티드 또는 무작위로 배열된 R 뉴클레오티드를 포함한다(IUPAB-IUB 모호성 코드(ambiguity code)).
- [0038] 적합하게는, 수성 용액은 다중 분자 분석을 수행하기 위한 2개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.
- [0039] 적합하게는, 벌킹제는 트레할로스이다.
- [0040] 적합하게는, 벌킹제는 약 0.2 M 내지 약 0.5 M, 적합하게는 약 0.36 M의 농도로 존재한다.
- [0041] 적합하게는, 수성 용액은 6 mM 이하의 무기 염 농도를 포함한다. 적합하게는, 수성 용액은 약 6 mM 내지 약 0.5 mM의 무기 염 농도를 포함한다.
- [0042] 적합하게는, 무기 염은 약 0.373 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 약 0.029 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다.
- [0043] 적합하게는, 무기 염은 염화나트륨이고, 적합하게는, 여기서 염화나트륨은 약 0.35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.029 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는 약 0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다.
- [0044] 적합하게는, 무기 염은 염화칼륨이고, 적합하게는, 여기서 염화칼륨은 약 0.373 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 염화칼륨 내지 약 0.019 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 염화칼륨, 적합하게는 약 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다.
- [0045] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.135 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 나트륨 이온 내지 약 0.006 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 나트륨 이온, 적합하게는, 약 0.127 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 함유한다.
- [0046] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.196 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 칼륨 이온 내지 약 0.010 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 칼륨 이온, 적합하게는 약 0.016 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 함유한다.
- [0047] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.355 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 클로라이드 이온 내지 약 0.009 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 클로라이드 이온, 적합하게는 약 0.337 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 함유한다.
- [0048] 적합하게는, 수성 용액은 4 mM 이하의 무기 염 농도를 포함한다.
- [0049] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.298 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.234 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 무기 염을 포함한다.
- [0050] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.284 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.071 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 클로라이드 이온을 포함한다.
- [0051] 적합하게는, 수성 용액은 3 mM 이하의 무기 염 농도를 포함한다.
- [0052] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.224 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.175 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 무기 염을 포함한다.
- [0053] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.213 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.053 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 클로라이드 이온을 포함한다.
- [0054] 적합하게는, 수성 용액은 2 mM 이하의 무기 염 농도를 포함한다.
- [0055] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.149 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.117 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 무기 염을 포함한다.
- [0056] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.142 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.036 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 클로라이드 이온을 포함한다.
- [0057] 적합하게는, 수성 용액은 1 mM 이하의 무기 염 농도를 포함한다.
- [0058] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.058 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 무기 염을 포함한다.
- [0059] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.071 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.018 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 클로라이드 이온을 포함한다.
- [0060] 적합하게는, 수성 용액은 500 μM 이하의 무기 염 농도를 포함한다.

- [0061] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.037 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.029 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 무기 염을 포함한다.
- [0062] 적합하게는, 수성 용액은 약 0.036 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.009 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터의 클로라이드 이온을 포함한다.
- [0063] 적합하게는, 수성 용액의 무기 염 농도는 1 mM 미만의 염화나트륨이다.
- [0064] 적합하게는, 수성 용액은 염화나트륨을 함유하지 않는다.
- [0065] 적합하게는, 수성 용액은 1 mM 미만의 마그네슘 이온을 함유한다.
- [0066] 적합하게는, 수성 용액은 0.1 mM 미만의 마그네슘 이온을 함유한다.
- [0067] 적합하게는, 수성 용액은 테옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP)를 더 포함한다.
- [0068] 적합하게는, dNTP는 수성 용액 중에 0.1 mM 내지 0.5 mM, 적합하게는 약 0.28 mM 내지 약 0.46 mM의 농도로 dATP를 포함한다.
- [0069] 적합하게는, dATP는 수성 용액 중에 0.3 mM 내지 0.4 mM, 예를 들어, 0.375 mM의 농도로 존재한다.
- [0070] 적합하게는, dNTP는 수성 용액 중에 0.1 mM 내지 0.4 mM의 농도로 dGTP를 포함한다.
- [0071] 적합하게는, dGTP는 수성 용액 중에 0.3 mM 내지 0.4 mM, 적합하게는 0.29 내지 0.46 mM, 예를 들어, 0.375 mM의 농도로 존재한다.
- [0072] 적합하게는, dNTP는 수성 용액 중에 0.1 mM 내지 0.4 mM, 적합하게는 0.29 내지 0.46 mM의 농도로 dCTP를 포함한다.
- [0073] 적합하게는, dCTP는 수성 용액 중에 0.3 mM 내지 0.4 mM, 예를 들어, 0.375 mM의 농도로 존재한다.
- [0074] 적합하게는, dNTP는 수성 용액 중에 0.1 mM 내지 0.4 mM, 적합하게는 0.2 내지 0.37 mM, 예를 들어, 0.284 mM의 농도로 dTTP를 포함한다.
- [0075] 적합하게는, dNTP는 수성 용액 중에 0.1 mM 내지 0.4 mM, 적합하게는 0.125 내지 0.234 mM, 예를 들어, 0.182 mM의 농도로 dUTP를 포함한다.
- [0076] 적합하게는, 플랩 엔도뉴클레아제는 약 0.010 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.050 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는 약 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.047 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 수성 용액 중에 존재한다.
- [0077] 적합하게는, 플랩 엔도뉴클레아제는 약 0.030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 수성 용액 중에 존재하고, 적합하게는, 플랩 엔도뉴클레아제는 약 0.030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 수성 용액 중에 존재한다.
- [0078] 적합하게는, 유기 완충제는 3-(*N*-모르폴리노)프로판설폰산(MOPS) 완충제이다.
- [0079] 적합하게는, MOPS 완충제는 수성 용액 중에 10 내지 20 mM의 농도로, 적합하게는 수성 용액 중에 12.5 mM 내지 20 mM의 농도로 존재한다.
- [0080] 적합하게는, 유기 완충제는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris) 완충제이다.
- [0081] 적합하게는, Tris 완충제는 수성 용액 중에 40mM 내지 60 mM의 농도로, 적합하게는 수성 용액 중에 50mM의 농도로 존재한다.
- [0082] 적합하게는, 조성물은 구상 단백질을 함유한다.
- [0083] 적합하게는, 구상 단백질은 소 혈청 알부민(BSA)이다.
- [0084] 적합하게는, 소 혈청 알부민(BSA)은 비-아세틸화된 BSA, 적합하게는, 초고순도 비-아세틸화된 BSA이다.
- [0085] 적합하게는, 구상 단백질은 0.40 내지 0.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는, 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 양으로 존재한다.
- [0086] 적합하게는, 조성물은 Cleavase® 효소, 트레할로스, MOPS 완충제, dNTP, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 여기서 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는다.
- [0087] 적합하게는, 조성물은 약 0.030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 수성 용액 중에 존재하는 Cleavase® 효소, 약 0.3 M의 농도로 존재하는 트레할로스, 약 12.5 mM의 농도의 MOPS 완충제, 각각 약 0.3 mM의 농도의 dNTP(선택적으로, dATP, dGTP, 및

dCTP는 약 0.375 mM이고, dTTP는 약 0.284 mM이고, dUTP는 약 0.182 mM임), 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 여기서 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는다.

- [0088] 적합하게는, 조성물은 Cleavase® 효소, 트레할로스, Tris 완충제, dNTP, 소 혈청 알부민, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 여기서 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는다.
- [0089] 적합하게는, 조성물은 약 0.030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 수성 용액 중에 존재하는 Cleavase® 효소, 약 0.3 M의 농도로 존재하는 트레할로스, 약 50 mM의 농도의 Tris 완충제, 각각 약 0.3 mM의 농도의 dNTP(선택적으로, dATP, dGTP, 및 dCTP는 약 0.375 mM이고, dTTP는 약 0.284 mM이고, dUTP는 약 0.182 mM임), 약 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 소 혈청 알부민, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 여기서 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는다.
- [0090] 적합하게는, 조성물은 Cleavase® 효소, 트레할로스, MOPS 완충제, dNTP, 소 혈청 알부민, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 여기서 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는다.
- [0091] 적합하게는, 조성물은 약 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 수성 용액 중에 존재하는 Cleavase®, 약 0.36 M의 농도로 존재하는 트레할로스, 약 15 mM의 농도의 MOPS 완충제, 각각 약 0.38 mM의 농도의 dNTP, 약 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 소 혈청 알부민, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지고, 여기서 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는다.
- [0092] 적합하게는, 조성물은 예를 들어, 0.1 내지 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 알파-사이클로덱스트린을 포함한다.
- [0093] 본 개시내용에 따른 조성물의 건조 형태가 또한 개시된다. 예의 방식으로, 24 μl 의 본 명세서에 기술된 수성 용액을 건조시켜 약 0.003 g 내지 약 0.004 g, 약 0.0032 g 내지 약 0.0037 g의 범위, 0.0033 g, 0.0034 g, 0.0035 g, 또는 0.0036 g의 질량을 갖는 건조 조성물을 제공한다. 단일 벌크 수성 용액의 분취물로부터 제조된 복수의 건조 조성물은 각각의 건조 조성물의 질량에 변화를 가질 것이라고 이해된다. 예의 방식으로, 벌크 수성 용액의 2개 이상의 24 μl 분취물 각각을 건조시켜 약 0.003 g 내지 약 0.004 g의 범위의 질량을 갖는 건조 조성물을 개별적으로 제공할 것이다. 따라서, 복수의 건조된 펠릿 각각의 평균 중량은 약 0.003 g 내지 약 0.004 g, 약 0.0032 g 내지 약 0.0037 g의 범위, 0.0033 g, 0.0034 g, 0.0035 g, 또는 0.0036 g이다. 수성 용액에서 성분의 농도를 변화시키면 건조 조성물의 질량이 변화될 것이다. 예를 들어, 특정 반응에서 사용하기 위해서 효소 활성도를 최적화시키기 위해서 효소의 농도를 변화시키면 건조 조성물의 질량이 변화될 수 있다. 유사하게, 사용된 성분의 유형의 변화는 건조 조성물의 질량의 변화를 초래할 수 있다. 예를 들어, 상이한 플랩 엔도뉴클레아제를 사용하면 목적하는 효소 활성도 수준을 제공하기 위한 농도 변화가 필요할 수 있다. 1종 이상의 다양한 성분의 농도 및 / 또는 유형을 변화시키는 것은 본 개시내용에 속하는 것으로 이해되고, 따라서 건조 조성물의 질량에 대한 결과적인 변화는 본 개시내용에 속하는 것으로 유사하게 이해된다.
- [0094] 플랩 엔도뉴클레아제, 벌킹제 및 유기 완충제를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어지는 건조 조성물이 또한 개시되며, 여기서 1종 이상의 무기 염이 건조 조성물의 총 질량의 0.350% 이하인 질량으로 건조 조성물 중에 존재하고, 여기서 건조 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는다.
- [0095] 건조 조성물은 재구성 이후에 핵산 기반 분석에 유용하다. 건조 조성물은 놀랍게도 습윤 환경에 장기간 노출 이후에 강력한 결과를 제공한다. 조성물의 건조 형태는 습윤 환경에 노출 이후에 핵산 기반 분석에 유용하고, 여기서 습윤 환경의 절대 습도 수준은 최대 3시간의 시간 기간 동안; 바람직하게는 90분 내지 180분의 기간 동안; 바람직하게는 약 90분; 바람직하게는 약 180분 동안 공기 세제급 미터당 2.3 그램의 물을 초과한다. 건조 조성물은 놀랍게도 미리 건조된 수성 용액의 장기간 인큐베이션 시간 이후에 강력한 결과를 제공한다.
- [0096] 적합하게는, 1종 이상의 무기 염은 건조 조성물의 총 질량의 약 0.311% 내지 약 0.024%인 질량으로 건조 조성물 중에 존재한다.
- [0097] 적합하게는, 1종 이상의 무기 염은 염화나트륨, 염화칼륨, 및 염화나트륨 및 염화칼륨 둘 다로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0098] 적합하게는, 건조 조성물은 분자 분석을 수행하기에 유용한 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드를 더 포함한다.
- [0099] 적합하게는, 건조 조성물은 핵산 기반 분석을 수행하기에 유용한 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드를 더 포함한다.

다.

- [0100] 적합하게는, 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 프로브 올리고뉴클레오티드, 적합하게는 적어도 2종의 프로브 올리고뉴클레오티드를 포함한다.
- [0101] 적합하게는, 프로브 올리고뉴클레오티드(들)는 표적 핵산 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성이다.
- [0102] 적합하게는, 플랩 엔도뉴클레아제는 Cleavase® 효소이다.
- [0103] 적합하게는, 건조 조성물은 표적 핵산에 어닐링하여 플랩 엔도뉴클레아제에 의해서 인식될 수 있는 3차원 구조를 형성할 수 있는 적어도 2종의 프로브 올리고뉴클레오티드를 더 포함한다.
- [0104] 적합하게는, 건조 조성물은 적어도 1종의 중합효소를 더 포함한다.
- [0105] 적합하게는, 적어도 1종의 중합효소는 수성 용액 중의 약 0.10 U/ μ l 내지 약 0.2 U/ μ l의 농도로 수성 용액 중에 존재하는 중합효소를 포함한다.
- [0106] 적합하게는, 적어도 1종의 중합효소는 약 0.1 U/ μ l 내지 약 0.25 U/ μ l 범위에서 선택된 농도로 수성 용액 중에 존재하는 중합효소를 포함한다.
- [0107] 적합하게는, 적어도 1종의 중합효소는 핫-스타트(hot-start) 중합효소인 중합효소를 포함한다.
- [0108] 적합하게는, 핫-스타트 중합효소는 중합효소의 중합효소 활성도를 특이적으로 차단하는 항체에 의해서 결합된 재조합 Taq DNA 중합효소이다.
- [0109] 적합하게는, 핫-스타트 중합효소는 화학적으로 변형된 재조합 Taq DNA 중합효소이고, 화학적 변형은 중합효소의 중합효소 활성도를 저해한다.
- [0110] 적합하게는, 적어도 1종의 중합효소는 적합하게는, 약 0.1 U/ μ l 내지 약 0.6 U/ μ l의 농도로 상기 수성 용액 중에 존재하는 역전사효소를 포함한다.
- [0111] 적합하게는, 역전사효소는 AMV 역전사효소이다.
- [0112] 적합하게는, 역전사효소는 MMLV 역전사효소이다.
- [0113] 적합하게는, 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 검출 프로브를 포함한다.
- [0114] 적합하게는, 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 검출 프로브를 포함한다.
- [0115] 적합하게는, 검출 프로브의 서열은 표적 핵산 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성이다.
- [0116] 적합하게는, 검출 프로브는 이에 공유 결합된 라벨을 포함한다.
- [0117] 적합하게는, 라벨은 형광 또는 화학발광 분자이다.
- [0118] 적합하게는, 라벨은 내부 켄처 분자 및 검출 프로브의 5' 단부에 위치된다.
- [0119] 적합하게는, 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 침입자 프로브를 포함한다.
- [0120] 적합하게는, 침입자 프로브의 서열은 표적 핵산 서열에 부분적으로 또는 완전히 상보성이다.
- [0121] 적합하게는, 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 신호전달 프로브를 포함한다.
- [0122] 적합하게는, 신호전달 프로브의 서열은 표적 핵산 서열에 부분적으로 상보성이다.
- [0123] 적합하게는, 신호전달 프로브의 서열은 플랩 영역을 포함한다.
- [0124] 적합하게는, 플랩 영역은 적어도 부분적으로 침입자 프로브와 중첩된다.
- [0125] 적합하게는, 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 FRET 프로브를 포함한다.
- [0126] 적합하게는, FRET 프로브의 서열은 신호전달 프로브의 플랩 영역에 부분적으로 상보성이다.
- [0127] 적합하게는, FRET 프로브는 이에 공유 결합된 라벨을 포함한다.
- [0128] 적합하게는, 라벨은 형광 분자이다.
- [0129] 적합하게는, 라벨은 FRET 프로브의 5' 단부에 위치된다. 적합하게는, FRET 프로브는 형광 분자의 켄칭 근접성

내에서 이에 공유 결합되고, 형광 분자의 형광 형태를 적어도 부분적으로 켜칠 수 있는 켜치 분자를 포함한다.

- [0130] 적합하게는, 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드는 표적 포획 프로브를 포함한다.
- [0131] 적합하게는, 표적 포획 프로브는 엄격 조건 하에서 표적 핵산에 특이적으로 또는 비특이적으로 혼성화되는 표적 혼성화 부분을 갖는다.
- [0132] 적합하게는, 표적 포획 프로브는 엄격 조건 하에서 표적 핵산에 비특이적으로 혼성화되는 표적 혼성화 부분을 갖는다.
- [0133] 적합하게는, 표적 포획 프로브의 비-특이적 표적 혼성화 부분은 무작위로 배열된 K 뉴클레오티드 또는 무작위로 배열된 R 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0134] 적합하게는, 조성물은 다중 분자 분석을 수행하기 위한 올리고뉴클레오티드를 포함한다.
- [0135] 적합하게는, 벌킹제는 트레할로스이다.
- [0136] 적합하게는, 건조 조성물은 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP)를 더 포함한다.
- [0137] 적합하게는, 유기 완충제는 3-(*N*-모르폴리노)프로판설포산(MOPS) 완충제이다.
- [0138] 적합하게는, 유기 완충제는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris) 완충제이다.
- [0139] 적합하게는, 건조 조성물은 구상 단백질을 함유한다.
- [0140] 적합하게는, 구상 단백질은 소 혈청 알부민(BSA)이다.
- [0141] 적합하게는, 소 혈청 알부민(BSA)은 비-아세틸화된 BSA, 적합하게는, 초고순도 비-아세틸화된 BSA이다.
- [0142] 핵산 기반 분석을 수행하는 데 사용하기 위한 혼합물의 형성 방법이 또한 개시되며, 이 방법은 재구성 용액 및 본 명세서에 기술된 건조 조성물을 배합하는 단계를 포함하고, 여기서 재구성 용액은 적어도 1종의 무기 염을 포함한다.
- [0143] 적합하게는, 재구성 용액은 1 mM 미만의 무기 염 농도를 포함한다.
- [0144] 적합하게는, 재구성 용액은 마그네슘 이온을 포함한다.
- [0145] 적합하게는, 재구성 용액은 약 5 mM 내지 약 15 mM, 적합하게는, 9 mM 내지 10 mM 또는 9 내지 12 mM, 선택적으로 11.25 mM의 농도의 MgCl₂를 포함한다.
- [0146] 적합하게는, 재구성 용액은 약 0.012% w/v 내지 약 0.020% w/v의 농도의 메틸 파라벤, 약 0.006% w/v 내지 약 0.010% w/v의 농도의 프로필 파라벤, 약 0.20% v/v 내지 약 0.30% v/v의 농도의 무수 에탄올(absolute ethanol), 또는 이들의 조합물로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0147] 적합하게는, 재구성 용액 중의 상기 메틸 파라벤의 농도는 0.016% w/v이다.
- [0148] 적합하게는, 재구성 용액 중의 프로필 파라벤의 농도는 0.008% w/v이다.
- [0149] 적합하게는, 무수 에탄올의 농도는 약 0.26% v/v로 재구성 용액 중에 존재한다.
- [0150] 핵산 기반 분석을 수행하는 데 사용하기 위한 건조 조성물의 제조 방법이 또한 개시되며, 이 방법은 (i) 본 개시내용의 수성 용액을 동결시켜 수성 용액의 동결 형태를 형성하는 단계; 및 (ii) 단계 (i)로부터의 동결 형태를 동결건조 조건에 노출시켜, 건조 조성물을 형성하는 단계를 포함한다.
- [0151] 적합하게는, 건조 조성물은 습윤 환경에 노출되고, 여기서 습윤 환경의 절대 습도 수준은 30°C에서 공기 세제곱미터 당 물 2.3 그램이다.
- [0152] 적합하게는, 건조 조성물은 습윤 환경에 최대 3시간 동안 노출된다.
- [0153] 적합하게는, 방법은 건조 조성물을 밀봉된 용기 내에 저장하는 단계를 포함한다.
- [0154] 핵산 기반 분석을 수행하는 데 사용하기 위한 건조 조성물의 제조 방법이 또한 개시되며, 이 방법은 본 명세서에 기술된 수성 용액을, 탈수, 데시케이션(desiccation), 동결건조 및 분무 건조로 이루어진 군에서 선택된 건조 방법을 사용하여 건조시켜, 건조 조성물을 형성하는 단계를 포함한다.

- [0155] 적합하게는, 건조 방법은 동결건조이고, 건조 조성물은 동결건조된 조성물이다.
- [0156] 적합하게는, 방법은 건조 조성물을 밀봉된 용기 내에 저장하는 단계를 더 포함한다.
- [0157] 핵산 기반 분석을 수행하는 데 사용하기 위한 키트가 또한 개시되며, 이 키트는 본 명세서에 기술된 바와 같은 건조 조성물을 함유하는 제1 용기 및 약 3.8 mM 내지 약 14.4 mM, 적합하게는 약 9.4 mM 또는 약 11.25의 농도의 $MgCl_2$ 를 포함하는 재구성 용액을 함유하는 제2 용기를 포함한다.
- [0158] 적합하게는, 제1 용기는 하나 이상의 웰을 포함하는 멀티웰 플레이트이다.
- [0159] 적합하게는, 하나 이상의 웰 각각은 0.311% 이하의 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율을 함유하는 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 함유한다.
- [0160] 적합하게는, 제1 용기 및 상기 제2 용기는 재구성 용액을 제2 용기로부터 제1 용기로 자동 전달하도록 개작된 장치 내에 혼입된다.
- [0161] 적합하게는, 하나 이상의 웰 각각은 각각의 웰 내에 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 형성하도록 건조된 수성 용액 1 마이크로리터에 대해서 약 0.000125 g 내지 약 0.000667 g의 중량을 갖는 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 함유한다.
- [0162] 적합하게는, 하나 이상의 웰 각각은 각각 약 0.003 g 내지 약 0.004 g, 약 0.0032 g 내지 약 0.0037 g의 범위, 0.0033 g, 0.0034 g, 0.0035 g, 또는 0.0036 g의 중량을 갖는 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 함유한다.
- [0163] 유기 완충제, 벌킹제, 클로라이드 이온 및 킬레이팅제를 함유하는 수성 용액을 포함하거나, 이것으로 이루어지거나 또는 이것으로 본질적으로 이루어진 투석 조성물이 또한 개시된다.
- [0164] 적합하게는, 벌킹제는 트레할로스이다.
- [0165] 적합하게는, 벌킹제는 약 100 mM 내지 300 mM, 적합하게는 200 mM의 농도로 존재한다.
- [0166] 적합하게는, 유기 완충제는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris) 완충제이다.
- [0167] 적합하게는, Tris 완충제는 수성 용액 중에 10 mM 내지 30 mM의 농도로, 적합하게는 수성 용액 중에 20mM의 농도로 존재한다. 적합하게는, pH는 약 8.0이다.
- [0168] 적합하게는, 클로라이드 이온은 KCl이다.
- [0169] 적합하게는, KCl은 약 40 내지 60 mM, 적합하게는 50 mM의 농도로 존재한다.
- [0170] 적합하게는, 킬레이팅제는 EDTA이다.
- [0171] 적합하게는, EDTA는 0.05 내지 0.2 mM, 적합하게는, 0.1 mM의 농도로 수성 용액 중에 존재한다.
- [0172] 적합하게는, 조성물은 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는, Cleavase® 효소를 포함한다.
- [0173] 실질적인 글리세롤-무함유 플랩 엔도뉴클레아제 조성물의 제조 방법이 또한 개시되며, 이 방법은 (i) 플랩 엔도뉴클레아제 및 글리세롤을 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어진 수성 용액을 제공하는 단계; (ii) 수성 용액을 본 명세서에 기술된 바와 같은 투석 조성물 중에서 투석하는 단계; 및 (iii) 실질적인 글리세롤-무함유 플랩 엔도뉴클레아제 조성물을 수득하는 단계를 포함한다.
- [0174] 적합하게는, 단계 (i)에서 수성 용액은 약 0.0 내지 약 0.5%(w/v)의 글리세롤, 적합하게는, 약 0.35%(w/v)의 글리세롤, 보다 적합하게는 0.2%(w/v) 미만의 글리세롤을 함유한다.
- [0175] 건조된 플랩 엔도뉴클레아제-함유 조성물을 제조하기 위한 본 명세서에 기술된 건조 조성물의 용도가 또한 개시된다.
- [0176] 핵산 기반 분석을 수행하기 위한 재구성 용액과 조합된 본 명세서에 기술된 건조 조성물의 용도가 또한 개시된다.
- [0177] 실질적인 글리세롤-무함유 플랩 엔도뉴클레아제 조성물을 제조하기 위한 본 명세서에 기술된 투석 조성물의 용도가 또한 개시된다.
- [0178] 정의

- [0179] 용어 "약"은 조성물의 활성도 또는 안정성에 어떠한 유의한 효과도 없는 조성물의 성분의 양의 비실질적인 변동을 나타낸다.
- [0180] "별킹제"는 건조 및 저장 동안 단백질 및 다른 시약의 침착을 위한 매트릭스를 제공한다(Carpenter et al (2002) Rational design of stable lyophilized protein formulations. Kluwer Academic/Plenum, New York, pp. 109-133). 별킹제는 생성물 "케이크" 또는 다른 구조물을 형성하기 위해서 사용될 수 있고, 단백질이 건조 동안 바이알로부터 손실되는 것을 예방하고, 단백질 안정성을 증가시킬 수 있다.
- [0181] "킬레이팅제"는 효소 활성도를 위해서 요구되는 2가 이온, 예컨대, Mg^{2+} 또는 Mn^{2+} 를 격리시키는 작용제이다.
- [0182] 용어 "동결건조", "동결건조된" 및 "동결-건조된"은 건조될 물질이 먼저 동결되고, 이어서 얼음 또는 동결된 용매가 진공 환경에서 승화에 의해서 제거되는 공정을 지칭한다. "동결건조물"은 동결건조된 물질을 지칭한다.
- [0183] 핵산 혼성화와 관련하여 용어 "엄격"("엄격 혼성화 조건" 또는 "엄격 조건" 포함)은 특정 올리고뉴클레오티드가 시험 샘플 중에 존재하는 다른 핵산 보다 표적 핵산과 혼성화될 수 있는 조건을 지칭한다. 이들 조건은 추구되는 올리고뉴클레오티드의 GC 함량 및 길이, 혼성화 온도, 혼성화 시약 또는 용액의 조성, 및 혼성화 특이성 정도를 비롯한 인자에 따라서 달라질 수 있다는 것이 인지될 것이다. 프로브, 올리고뉴클레오티드, 표적 포획 올리고뉴클레오티드, 차단제 및 다른 올리고뉴클레오티드에 대한 적절한 혼성화 조건은 당업계에 널리 공지되어 있거나, 서열 조성을 기반으로 예측될 수 있거나, 또는 일상적인 시험 방법을 사용함으로써 결정될 수 있다(예: 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), §§ 1.90-1.91, 7.37-7.57, 9.47-9.51 및 11.47-11.57, 특히 §§ 9.50-9.51, 11.12-11.13, 11.45-11.47 및 11.55-11.57]).
- [0184] 용어 "절단 구조"는 다수의 핵산의 상호작용에 의해서 형성되어 입체 구조를 형성하는 구조를 지칭하며, 여기서 핵산 각각 중 2개는 제3 핵산 상의 단일 핵염기 위치에서 혼성화하도록 구성된 핵염기를 함유하여 첫 번째 2개의 핵산 사이에 중첩이 형성되는데, 여기서 생성된 비-혼성화된 플랩 영역(예: 절단 구조)은 플랩 엔도뉴클레아제에 의해서 절단 가능하다. 절단 구조는, 작용제, 예컨대, 포스포디에스테라제에 의한 비특이적 절단(2차 구조에 관계 없이(즉, 이중 구조의 형성이 요구되지 않음) 핵산 분자를 절단함)을 위한 기질인 핵산 분자와 대조적으로, 플랩 엔도뉴클레아제에 의한 특이적 절단에 대한 기질이다. 플랩 엔도뉴클레아제 검출 분석의 다른 측면 뿐만 아니라 절단 구조에 대한 논의는 미국 특허 제5,846,717호를 참고하기 바란다.
- [0185] "플랩 엔도뉴클레아제"는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, (즉, 인접한 제1 프로브 및 제2 프로브가 표적에 혼성화하는 중첩 뉴클레오티드가 존재하도록) 핵산의 또 다른 가닥에 의해서 변위된 가닥 중 하나 상에 단일 가닥 5' 오버행 또는 플랩을 함유하는 이중체를 갖는 핵산 구조 상에서 구조-특이적 5' 엔도뉴클레아제로서 작용하는 핵산분해 효소의 부류를 지칭한다. 플랩 엔도뉴클레아제는 또한 "5' 엔도뉴클레아제" 또는 줄여서 약어 "FEN"이라고 지칭될 수 있다. FEN은 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산의 접합부에서 포스포디에스테르 결합의 가수분해 절단을 촉매작용하여, 오버행, 또는 플랩을 방출한다. FEN은 Ceska 및 Savers(*Trends Biochem. Sci.* 23:331-336, 1998) 및 Liu 등(*Annu. Rev. Biochem.* 73:589-615, 2004)에 의해서 검토되었다.
- [0186] "중첩 영역" 또는 "플랩 영역"은 표적에 혼성화되고, 제2 프로브 올리고뉴클레오티드(예: 침입자 프로브)에 의해서 중첩되는 제1 프로브 올리고뉴클레오티드(예: 신호 프로브)의 염기로 이루어진다. 제2 프로브 올리고뉴클레오티드의 3' 단부 상의 염기는 중첩 영역의 단부를 결정하고, 표적에 혼성화될 수 있거나 또는 혼성화될 수 없다.
- [0187] 절단-기반 분석과 관련하여 "제1 프로브 올리고뉴클레오티드"는 표적 핵산과 상호작용하여 제1 프로브 올리고뉴클레오티드(예: 침입자 프로브)의 상류에서 영역에 혼성화하는 "제2 프로브 올리고뉴클레오티드"의 존재 하에서 절단 구조(예: 신호 프로브)를 형성하는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 표적 핵산에 어닐링되는 경우, 제1 프로브 올리고뉴클레오티드 및 표적은 절단 구조를 형성하고, 제1 프로브 올리고뉴클레오티드 내에서 플랩 엔도뉴클레아제에 의한 절단이 일어날 수 있다. 표적 핵산을 따르는 제1 프로브 올리고뉴클레오티드의 상류에서 중첩 제2 프로브 올리고뉴클레오티드의 존재 하에서, 제1 프로브 올리고뉴클레오티드 내의 절단 부위가 마지막 중첩 염기 이후에 발생할 것이다(절단은 제2 프로브의 적어도 하나의 중첩 염기와 제1 프로브의 표적 혼성화된 염기에 좌우됨). 표적 핵산 내의 표적 서열에 혼성화하는 표적-혼성화 영역에 더하여, 제1 프로브 올리고뉴클레오티드는 5' 단부에 비-표적-혼성화 영역("플랩 영역"이라고도 지칭됨)을 함유한다. 제1 및 제2 프로브 올리고뉴클레오티드가 표적 핵산에 어닐링되는 경우, 플랩 엔도뉴클레아제에 의한 부위-특이적 절단이 발생하여 제1 프로브 올리고뉴클레오티드의 플랩 영역 및 중첩 영역을 함유하는 절단 산물을 생성한다.

- [0188] 절단-기반 분석과 관련하여 "제2 프로브 올리고뉴클레오타이드"는 표적 핵산에 어닐링되는 경우, 하류 제1 프로브 올리고뉴클레오타이드 내의 표적-혼성화 서열의 5' 단부와 중첩되는 이의 3' 단부에 서열을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 지칭하며; 전형적으로, 이러한 영역은 상보성 표적 핵산을 따르는 동일한 분절에 대한 혼성화에 대해서 경쟁할 것이다. 제2 프로브는 일부 예에서 침입자 프로브뿐만 아니라 프라이머로서 사용될 수 있다. 제2 프로브 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단 뉴클레오타이드는 표적 핵산 내의 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 형성할 수 있거나 형성하지 않을 수 있다. 일부 변형에서, 3' 말단 뉴클레오타이드만이 제1 프로브 올리고뉴클레오타이드의 표적-혼성화 서열의 5' 단부에 중첩된다. 절단된 제2 프로브 올리고뉴클레오타이드는 2차 반응에 관여될 수 있는데, 여기서 이것은 Cleavase® 효소에 의해서 인식되는 중첩 구조의 형성으로 이어지는 형광 공명 에너지 전달 카세트(예: FRET 프로브 또는 FRET 카세트) 상에서 프로브로서 작용한다. FRET 카세트가 절단되는 경우 형광단이 FRET 카세트 상의 켄처로부터 방출되어 형광 신호를 생성한다.
- [0189] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "FRET 카세트"는 형광단 모이어티 및 형광단을 켄칭하는 근처의 켄처 모이어티를 함유하는 헤어핀 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 절단 산물과 FRET 카세트의 혼성화는 플랩 엔도뉴클레아제에 대한 이차 기질을 생산한다. 이러한 기질이 형성되면, 5' 형광단-함유 염기가 카세트로부터 절단되어, 형광 신호를 생성한다.
- [0190] "중폭 올리고머"는 주형-의존적 복제를 지지할 수 있는 프라이머 또는 프로모터 프라이머이다. 중폭 올리고머 쌍은 주형의 반대 가닥의 주형 의존적 복제를 지지하는 이러한 올리고머의 쌍이다. 다중 중폭은 다중 중폭 올리고머 쌍으로 동시에 수행되는 중폭이다.
- [0191] "검출 프로브"는 중폭 산물의 존재 또는 양을 나타내기 위해서 중폭 산물 또는 초기 표적 핵산에 혼성화될 수 있는 올리고뉴클레오타이드이다. 이러한 검출 프로브는 종종 형광 또는 다른 검출 가능한 신호(이러한 경우 이것은 검출 가능하게 라벨링된 프로브를 지칭함)를 제공하는 분자를 혼입한다.
- [0192] "프라이머-프로브 세트"는 주형 핵산으로부터 중폭 산물을 생성하도록 구성된 프라이머 및 검출 프로브의 조합물이다.
- [0193] "재구성 시간"은 건조된 제형을 용액으로 재수화시켜 육안으로 입자 또는 탁도가 존재하지 않는 용액을 생성하는 데 요구되는 시간이다.
- [0194] "상대 형광 단위(Relative Fluorescence Units: RFU)"는 켄칭되지 않은 형광단의 측정치이다. 핵산 기반 중폭 반응에서, 산물의 존재는 다수의 사이클 시간(Ct)에서 RFU를 측정함으로써 결정된다.
- [0195] "Ct"는 실시간 PCR에서 지수기에 도달하는 데 요구되는 사이클의 수를 지칭한다. Ct는 샘플 중의 분석물의 양에 반비례한다.
- [0196] "양성도"는 분석 반응 결과와 관련하여, 복수의 샘플을 포함하는 시험에서, 지수 임계값으로 교차한 샘플의 백분율을 지칭한다. 예를 들어, 복수의 샘플이 12개의 샘플인 경우, 그리고 교차하는 샘플의 수가 6으로 결정된 경우, 양성도는 "50%"이다.
- [0197] "단일 단위 용량" 또는 "SUD"는 단일 샘플 상에서 분석을 수행하는 데 사용되는 반응 혼합물의 부피를 지칭한다. 단일 단위 용량은 액체 형태 또는 건조 형태일 수 있다. 예의 방식으로, 단일 단위 용량은 단일 용기 내에 단일 샘플의 검출에 유용한 시약을 함유하는 건조된 펠릿일 수 있다.
- [0198] "LOD"는 분석물의 검출 한계치이다. LOD + 1은 사용자가 검출한 LOD에 1 log를 더한 것이다. 즉, LOD + 1은 LOD인 분석물의 수의 10배이다.
- [0199] dTTP 및 dUTP를 포함하는 것으로 개시된 조성물은 제시된 농도에서 dTTP 또는 dUTP 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 마찬가지로 조성물이 dTTP 또는 dUTP를 함유하는 것으로 개시된 경우, 본 개시내용은 대안적으로 제시된 농도에서 dTTP 및 dUTP 둘 모두를 포함하는 조성물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0200] I. 일반

[0201] 본 개시내용은 적어도 부분적으로, 핵산 기반 분석을 수행하기 위한 종래의 동결건조된 키트의 불안정성이 무기 염의 존재로 인한 것이라는 발견을 기반으로 한다. 이러한 염은 건조 전, 건조 동안 및 건조 후에 바람직하지 않은 혼성화 산물 또는 다른 부산물을 생성할 수 있다. 이러한 염은 또한 건조 조성물을 흡습성으로 만들어 물

을 흡수하게 하기 때문에, 습도에 제한적으로 노출되고/되거나 냉장 또는 딥 동결 저장 및/또는 건조제의 존재 하에서의 저장이 요구된다. 물 및 염의 존재는 이러한 키트의 효소 성분이 조기에 활성도를 잃게 하고, 또한 이러한 키트 내의 핵산이 서로 혼성화하는 것을 촉진할 수 있다. 본 개시내용은 본질적으로 무기 염이 존재하지 않는 벌크 시약으로부터 핵산 기반 분석을 수행하기 위해서 시약을 건조시킴으로써 이러한 문제점을 극복하였다. 이러한 염은 건조 조성물의 재구성 시에 공급된다. 무기 염이 핵산 기반 분석에 사용되는 효소의 안정성을 위해서 필수적이라는 예상과 달리, 무기 염이 본질적으로 존재하지 않는 건조된 반응 혼합물은 재구성 시에 활성도를 완전히 또는 상당히 유지하면서, 동결 하에서 장기간 동안 저장될 수 있다는 것을 발견하였다.

[0202] **II. 벌크 시약 및 건조 펠릿.**

[0203] 본 개시내용에 따른 벌크 시약(때로는 사전동결건조된 혼합물, 용액, 수성 용액 또는 조성물이라고 지칭됨)은 전형적으로 플랩 엔도뉴클레아제, 벌킹제, 유기 완충제를 포함한다. 벌크 시약은 또한 하나 이상의 핵산 및/또는 dNTP를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 벌크 시약은 킬레이터 및 RNase 저해제를 포함할 수 있다.

[0204] 이러한 벌크 시약은 무기 염이 본질적으로 존재하지 않는데, 이는 무기 염의 농도가 개별적으로 그리고 총괄적으로 5 mM 미만, 바람직하게는 1 mM 미만임을 의미한다. 바람직하게는, Mg²⁺의 농도는 1 mM 미만, 0.5 mM 미만, 0.1 mM 미만 또는 0.05 mM 미만이다. 바람직하게는, Na⁺의 농도는 1 mM 미만, 0.5 mM 미만, 0.1 mM 미만 또는 0.05 mM 미만이다. 바람직하게는, K⁺의 농도는 1 mM 미만, 0.5 mM 미만, 0.1 mM 미만 또는 0.05 mM 미만이다. 바람직하게는, Cl⁻의 농도는 1 mM 미만, 0.5 mM 미만, 0.1 mM 미만 또는 0.05 mM 미만이다.

[0205] 이러한 벌크 시약은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않는다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "실질적으로 존재하지 않는다"는 글리세롤이 효소 제제 중에 일반적으로 사용되는 양으로 존재하지 않음을 의미한다. 적합하게는, 글리세롤은 5%(w/v) 미만, 4%(w/v) 미만, 3%(w/v) 미만, 2%(w/v) 미만, 1%(w/v) 미만, 0.5%(w/v) 미만, 0.1%(w/v) 미만 또는 0.01%(w/v) 미만의 양으로 존재한다. 적합하게는, 글리세롤은 당업계에 공지된 종래의 방법을 사용하여 검출할 수 없는 양으로 존재한다. 예를 들어, Abcam(영국 캠브리지 소재) 글리세롤 분석 키트를 사용하여, 글리세롤을 효소적으로 산화시켜 프로브와 반응하는 생성물을 생성시켜 색상 및 형광을 생성시킴으로써 유리 글리세롤 농도를 측정할 수 있다. 키트는 다양한 샘플에서 50 pmol 내지 10 nmol의 글리세롤을 검출할 수 있다. 적합하게는, 글리세롤은 50 pmol 미만의 농도로 존재한다.

[0206] 반응 혼합물에 혼입시키기 위한 뉴클레오티드는 전형적으로 dNTP로서 제공된다. dNTP에 대한 예시적인 농도는 0.1 내지 0.4 mM의 dATP, 적합하게는 0.3 내지 0.4 mM의 dATP, 적합하게는 0.29 내지 0.46 mM의 dATP이고; 0.1 내지 0.4 mM의 dGTP, 적합하게는 0.3 내지 0.4 mM의 dGTP, 적합하게는 0.29 내지 0.4 mM의 dGTP; 0.1 내지 0.4 mM의 dCTP, 적합하게는 0.3 내지 0.4 mM의 dCTP, 적합하게는 0.29 내지 0.4 mM의 dCTP; 0.1 내지 0.4 mM의 dTTP, 적합하게는 0.2 내지 0.3 mM의 dATP; 및 0.1 내지 0.4 mM의 dUTP, 적합하게는, 적합하게는 0.125 내지 0.234 mM의 dUTP이다. 1.5 x 동결건조 혼합물 또는 최종 반응(즉, 1.5 X 부피에서의 재구성 후)에서의 예시적인 농도는 다음과 같다.

	동결건조 혼합물에서(mM)	반응에서(mM)
dATP	.375	.25
dGTP	.375	.25
dCTP	.375	.25
dTTP	.284	.189
dUTP	.182	.122

[0207] 이러한 혼합물은 플랩 엔도뉴클레아제를 사용하는 임의의 유형의 반응을 위해서 맞춤화될 수 있다. 이러한 혼합물은 플랩 엔도뉴클레아제 및 중합효소를 사용하는 임의의 유형의 반응을 위해서 맞춤화될 수 있다.

[0209] 플랩 엔도뉴클레아제는 상업적으로 입수 가능하거나 또는 사용자에게 의해서 제조될 수 있다. 플랩 엔도뉴클레아제는 단지 5' 뉴클레아제 활성도를 갖는 효소로 제한되지 않는다. 예를 들어, 플랩 엔도뉴클레아제는 5' 뉴클레아제 활성도를 갖는 네이티브 DNA 중합효소(예: Taq DNA 중합효소, 이. 콜라이 DNA 중합효소 I) 또는 합성 활성도를 결핍시킴으로써 5' 뉴클레아제 활성도를 갖는 변형된 DNA 중합효소(예: Cleavase® 효소)일 수 있다.

[0210] 이러한 혼합물은 PCR, RT-PCR 및 중합효소 효소 및 다른 성분의 선택에 의한 전사 매개 증폭을 비롯한 다양한 유형의 증폭에 맞춤화될 수 있다.

[0211] DNA 중합효소 효소는 상업적으로 입수 가능하거나 또는 사용자에게 의해서 제조될 수 있다. 중합효소 효소의 일

레는 Qiagen(미국 메릴랜드 저먼타운 소재, cat# 201203)으로부터 상업적으로 입수 가능한 Taq 중합효소이다. Taq 중합효소의 또 다른 예는 GoTaq® G2 Flexi DNA 중합효소(Promega, 미국 윈스콘신 매디슨 소재, cat# M7801)로서 상업적으로 입수 가능하다. 상업적으로 입수 가능한 다른 DNA 중합효소는 Tth DNA 중합효소(예: Sigma-Aldrich, 미국 미주리 세인트루이스 소재, cat# 11480022001), 및 키메라 DNA 중합효소, 예컨대, Phusion® High-Fidelity DNA 중합효소(NEB, 미국 매사추세츠 입스위치 소재, cat# M0530S)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 핫-스타트 DNA 중합효소 효소가 또한 상업적으로 입수 가능하다. 예를 들어, Taq 중합효소는 GoTaq® 핫 스타트 중합효소(Promega, cat# M5001)로서 상업적으로 입수 가능하다. GoTaq® 핫 스타트 중합효소는 항체 매개 핫 스타트 효소이며, 여기서 Taq 중합효소는 중합효소 활성도를 차단하는 항체에 결합된다. 차단 항체는 고열을 사용하여 변성되기 때문에, PCR 반응의 초기 가열 단계 동안, 항체가 변성되고, 중합효소 활성도가 회복된다. 다양한 항체, 예를 들어, TAQSTART 항체(Clontech Laboratories, 미국 캘리포니아 마운틴뷰 소재, cat#R028A)가 핫 스타트 방법과 함께 사용될 수 있다. 유사하게, 화학적으로 매개된 핫 스타트 중합효소를 비롯한, 다른 핫 스타트 중합효소 효소가 입수 가능하다. 동등한 중합효소 및 항체가 다양한 상업적인 공급원으로부터 입수 가능하고, 대안적으로, 사용자에게 의해서 제조될 수 있다.

[0212] 역전사효소 효소는 상업적으로 입수 가능하거나 또는 사용자에게 의해서 제조될 수 있다. 상업적으로 입수 가능한 역전사효소의 예는 MMLV(말로니 무린 백혈병 바이러스(Maloney Murine Leukemia Virus)) 역전사효소 및 SuperScript® III 역전사효소(예: ThermoFisher Scientific, 미국 캘리포니아 칼즈바드 소재, cat#s 28025-013 및 18080-044), MMLV RT(Sigma-Aldrich / cat# M1302), AMV 역전사효소(NEB, 미국 매사추세츠 입스위치 소재, cat# M0277S), 및 GoScript™ 역전사효소(Promega, cat# A50003)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. GoScript 역전사효소는 역전사효소 및 정량적 PCR 증폭에 최적화된 제1 가닥 cDNA의 합성을 위한 시약의 세트를 포함한다. 동등한 역전사효소 및 시약은 다양한 상업적인 공급원으로부터 입수 가능하고, 대안적으로, 사용자에게 의해서 제조될 수 있다.

[0213] 단일 단위 용량에서 플랩 엔도뉴클레아제에 대한 예시적인 농도는 약 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는, 약 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 또는 약 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 또는 약 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 또는 약 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 또는 약 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이다. 보다 적합하게는, 단일 단위 용량에서 플랩 엔도뉴클레아제에 대한 농도는 약 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이다. 보다 적합하게는, 단일 단위 용량에서 플랩 엔도뉴클레아제에 대한 농도는 약 0.030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 보다 적합하게는, 약 0.030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이다. 적합하게는, 플랩 엔도뉴클레아제는 약 0.010 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.050 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는 약 0.012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.047 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 수성 용액 중에 존재한다.

[0214] 단일 단위 용량에서 DNA 중합효소 효소에 대한 예시적인 농도는 0.1 내지 0.2 U/ μl (모든 정수 및 그 사이의 분수 포함)이다. 예를 들어, 0.14 U/ μl , 0.146 U/ μl 및 0.1687 U/ μl 이다.

[0215] DNA 중합효소의 1 단위는 74°C에서 30분 내에 산-불용성 물질 중에 10 나노몰의 dNTP의 혼입을 촉매작용하는 데 필요한 효소의 양으로 정의된다. 단일 단위 용량에서 역전사효소 효소에 대한 예시적인 농도는 0.01 U/ μl 내지 0.1 U/ μl (모든 정수 및 그 사이의 분수 포함)이다. 역전사효소의 1 단위는 37°C에서 10분 내에 1 nmol의 테옥시뉴클레오티드를 산 침전 가능한 물질 중에 전달하는 것을 촉매작용하는 데 필요한 효소의 양으로 정의된다.

[0216] 바람직한 유기 완충제는 MOPS 또는 Tris이다.

[0217] 적합하게는, MOPS 완충제는 수성 용액 중에 약 10 mM 내지 약 20 mM의 농도로, 적합하게는 수성 용액 중에 약 12.5 mM 내지 약 15 mM의 농도로 존재한다.

[0218] 적합하게는, Tris 완충제는 수성 용액 중에 약 5 mM 내지 약 60 mM의 농도로, 적합하게는 수성 용액 중에 약 40 내지 60 mM의 농도로, 적합하게는 수성 용액 중에 약 50 mM의 농도로, 적합하게는 수성 용액 중에 약 10 mM의 농도로 존재한다.

[0219] 벌크 시약에 혼입될 수 있는 대안적인 유기 완충제는 포스페이트, 시트레이트, 아세테이트, CHES, 히스티딘 및 굿 완충제(Good's buffer), 예컨대, HEPES, MES, 트리신 및 글리신아미드, 뿐만 아니라 완충제 조합물을 포함한다. 다른 유기 완충제는 석시네이트, 시트레이트, 글루코네이트, 포스페이트 등을 포함한다. 바람직한 완충제는 약 6.0 내지 약 10.0 또는 약 7.0 내지 약 9.0의 pH 범위에서 효과적이며; 적합하게는 약 7.5 또는 8.0 또는 8.5의 pH가 사용된다.

[0220] 바람직한 벌킹제는 트레할로스이다. 고려되는 다른 벌킹제는 라피노스, 수크로스, 만니톨, 트레할로스와 만니톨, 수크로스와 만니톨, 수크로스와 글리신, 및 하이드록시에틸 전분을 포함한다(문헌[Cleland et al

(2001) J. Pharm. Sci. 90:310; Meyer et al (2009) Eur. J. Pharm. Sci. 38:29; Webb et al (2003) J. Pharm. Sci. 92:715; Garzon Rodrigues et al (2004) J. Pharm. Sci. 93:684; Qiu et al (2012) Int. J. Pharmaceuticals. 437:51; Van Dijk-Wolthuis et al (1997) Polymer. 38:6235 6242] 참고). 하이드록시에틸 전분은 헤타스타치(hetastarch), 헥사스타치, 펜타스타치, 및 테트라스타치로 분류된다(예: Chow의 국제 특허 제W02014/099198호 참고). 벌크제는 바람직하게는 약 0.2 M 내지 약 0.5 M, 적합하게는, 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는 약 0.3 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는, 약 0.47 M, 적합하게는, 약 0.36 M의 농도로 존재한다.

- [0221] 벌크 시약은 1종 이상의 핵산, 예컨대, 프로브 올리고머, 증폭 올리고머, 포획 프로브, 양성 대조군 주형, 및 음성 대조군 주형 등을 포함할 수 있다. 벌크 시약은 1종 이상의 프로브 올리고뉴클레오티드를 포함하는 비-중폭 기반 분석을 수행하기 위한 1종 이상의 핵산을 포함할 수 있다. 벌크 시약은 1종 이상의 프로브 올리고뉴클레오티드 및/또는 1종 이상의 증폭 올리고머 및/또는 1종 이상의 증폭 올리고머 쌍 및/또는 다중 증폭 올리고머 쌍을 비롯한, 비-중폭 기반 분석 및 증폭 기반 분석을 수행하기 위한 1종 이상의 핵산을 포함할 수 있다.
- [0222] 벌크 시약의 선택적인 추가 성분은 RNase 저해제, 세제, 썬비터이온성 세제, 음이온성 세제, 양이온성 세제, 비이온성 세제, 계면활성제, 프라이머, 프로브, 주형, 중합체, 바이오중합체, 올리고당, 다당류, 폴리-글루코스, 아밀로스, 킬레이팅제, 메틸 파라벤 및 프로필 파라벤을 포함한다. 메틸 파라벤에 대한 예시적인 농도는 0.01 내지 0.024중량%, 예를 들어, 약 0.016%, 또는 대안적으로, 약 0.010%, 약 0.014%, 약 0.016%, 약 0.020%, 약 0.024%, 및 이들 값이 경계가 되는 임의의 범위이다. 프로필 파라벤의 예시적인 농도 범위는 0.002 내지 0.016% 또는 0.008%, 또는 대안적으로, 약 0.002%, 약 0.004%, 약 0.006%, 약 0.008%, 약 0.010%, 약 0.012%, 약 0.014%, 약 0.016% 또는 이들 값이 경계가 되는 임의의 범위이다. 1 단위는 5 ng의 리보뉴클레아제 A의 활성도를 50% 저해하는 데 요구되는 RNasin® 리보뉴클레아제 저해제의 양으로서 정의된다. 활성도는 리보뉴클레아제 A에 의한 시티딘 2', 3'-시클릭 모노포스페이트의 가수분해를 저해함으로써 측정된다.
- [0223] 킬레이팅제 EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산), EGTA(에틸렌 글리콜 테트라아세트산), EDDS(에틸렌디아민-N,N'-디석신산), MGDA(메틸글리신디아민테트산), 및 DTPA(디에스테르틸렌 트리아민 펜타아세트산) 중 하나 이상을 포함한다. 킬레이팅제에 대한 예시적인 농도는 1.0 mM 내지 2.5 mM이다. 일 실시양태에서, EDTA의 사용이 바람직하다. 적합하게는, EDTA는 약 0.05 내지 약 0.2 mM, 적합하게는, 약 0.1 mM의 농도로 존재한다.
- [0224] RNase 저해제 단백질은 네이티브 및 재조합이고, 1:1 비로 RNase에 비공유 결합함으로써 RNase A 패밀리와 인간 태반 RNase를 저해하는 50kDa 단백질이다(Promega Corp., 미국 윈스콘신 매디슨 소재)(문헌[Botella-Estrada et al (2001) Cancer Gene Ther. 8:278; Polakowski et al (1992) EXS. 61:428] 참고). RNase 저해제의 예시적인 농도는 약 0.04 U/ μ l 내지 약 0.4 U/ μ l이다.
- [0225] 벌크 시약은 저 농도의 세제를 함유할 수 있다. 세제는 다수의 상업적인 공급원(예: Geno Technology, Inc., 미국 미주리 세인트루이스 소재)으로부터 입수 가능한 이온성(양이온성 또는 음이온성), 비-이온성 및 썬비터이온성 세제를 포함한다. 예는 리튬 라우릴 설페이트, 암프롤름 히드로클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 콜린 p-톨루엔설포네이트 염, 도데실트리메틸암모늄 클로라이드, 3-[(3-클로아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트, 에틸헥사데실디메틸암모늄 브로마이드, 헥사데실피리디늄 클로라이드, 헥사데실트리메틸암모늄 클로라이드, 나트륨 도데실 설페이트, 헥사데실트리메틸암모늄 p-톨루엔설포네이트, luviquat™, 메틸벤즈에토늄 클로라이드, 미리스틸트리메틸암모늄 브로마이드, N,N',N'-폴리옥시에틸렌 (10)-N-탈로우-1,3-디아미노프로판 액체, 옥시페노늄 브로마이드, 테트라헵틸암모늄 브로마이드, 테트라키스(데실)암모늄 브로마이드, 트리카프릴릴메틸암모늄 클로라이드, 아미도설포베타인-16, 트리도데실메틸암모늄 클로라이드, 트리메틸옥타데실암모늄 브로마이드, 노니데트(Nonidet) P-40®, Tween-20®, Tween-80®, Brij-35®, Triton X-100®을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.
- [0226] 벌크 시약의 예시적인 부피는 약 1 μ l, 약 5 μ l, 약 10 μ l, 약 20 μ l, 약 24 μ l, 약 50 μ l, 약 100 μ l, 약 200 μ l, 약 300 μ l, 약 400 μ l, 약 500 μ l, 약 600 μ l, 약 700 μ l, 약 800 μ l, 약 900 μ l, 약 1,000 μ l(1 mL), 약 2 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 20 mL, 약 50 mL 등을 포함한다. 재구성된 조성물은 벌크 시약과 동일한 부피, 더 낮은 부피 또는 더 큰 부피로 형성될 수 있다. 더 낮은 부피는 벌크 시약에 비해서 약 90%, 약 80%, 약 60%, 약 40%, 약 20%, 약 10%, 또는 약 5%일 수 있다. 더 큰 부피는 벌크 시약의 부피의 약 120%, 140%, 160%, 180%, 200%(2배), 약 4배, 약 6배, 약 8배, 약 10배, 약 20배일 수 있다.
- [0227] 분석될 샘플은 재구성 전에, 재구성과 동시에 또는 재구성 후에 벌크 시약에 첨가될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 재구성 후 전체 건조 조성물은 샘플과 조합하기 위해서 사용되며, 여기서 재구성 용액/샘플의 상대적인 부피는 예를 들어, 약 9.9/0.1, 9.8/0.2, 9.5/0.5, 9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5 등일 수 있다.

- [0228] 달리 명시되지 않는 한, 벌크 시약 중의 시약의 농도는 예를 들어, 0.0%(시약 없음), 0.001%, 0.004%, 0.008%, 0.0012%, 0.0016%, 0.0020%, 0.0030%, 0.0040%, 0.0050%, 0.0060%, 0.0080%, 0.01%, 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.8%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 등일 수 있다. "거의" 상기 농도, 상기 농도 미만, 상기 농도 초과, 상기 농도의 임의의 둘을 포함하는 범위인 시약이 또한 제공된다.
- [0229] 예시적인 벌크 시약 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않고, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 0.1 내지 0.4 mM, 적합하게는 각각 약 0.3 mM의 dATP, dGTP dCTP 및 dUTP 또는 dTTP 및 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는 약 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제를 갖는다. 일부 조성물은 벌킹제, 적합하게는 트레할로스를 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는 약 0.3 M로 포함한다. 일부 조성물은 적합하게는 약 7.5의 pH의 완충제, 적합하게는 MOPS 완충제를 포함한다.
- [0230] 또 다른 예시적인 벌크 시약 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않고, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 0.1 내지 0.4 mM, 적합하게는 각각 약 0.375 mM의 dATP, dGTP dCTP 및 약 0.182 mM의 dUTP 또는 약 0.284 mM의 dTTP, 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는 약 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 및 0.1 U/ μl 내지 0.2 U/ μl , 적합하게는, 0.146 U/ μl 의 중합효소를 갖는다. 일부 조성물은 벌킹제, 적합하게는 트레할로스를 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는 약 0.3 M로 포함한다. 일부 조성물은 적합하게는 약 7.5의 pH의 완충제, 적합하게는 MOPS 완충제를 포함한다.
- [0231] 또 다른 예시적인 벌크 시약 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않고, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 0.1 내지 0.4 mM, 적합하게는 각각 약 0.375 mM의 dATP, dGTP dCTP 및 약 0.182 mM의 dUTP 또는 약 0.284 mM의 dTTP, 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는 약 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 0.1 U/ μl 내지 0.2 U/ μl , 적합하게는, 0.146 U/ μl 의 중합효소, 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는 약 0.3 M의 벌킹제, 적합하게는 트레할로스 및 적합하게는 약 7.5의 pH의 완충제, 적합하게는 MOPS 완충제를 갖는다.
- [0232] 또 다른 예시적인 벌크 시약 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않고, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 0.1 내지 0.4 mM, 적합하게는 각각 약 0.375 mM의 dATP, dGTP dCTP 및 약 0.182 mM의 dUTP 또는 약 0.284 mM의 dTTP 및 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는 약 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제를 갖는다. 일부 조성물은 벌킹제, 적합하게는 트레할로스를 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는 약 0.3 M로 포함한다. 일부 조성물은 구상 단백질, 적합하게는, 소 혈청 알부민(BSA), 보다 적합하게는, 초고순도 비-아세틸화된 BSA를 포함한다. 구상 단백질은 0.40 내지 0.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는, 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 양으로 존재할 수 있다. 일부 조성물은 적합하게는 약 8.5의 pH의 완충제, 적합하게는 Tris 완충제를 포함한다.
- [0233] 또 다른 예시적인 벌크 시약 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않고, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 0.1 내지 0.4 mM, 적합하게는 각각 약 0.375 mM의 dATP, dGTP dCTP 및 약 0.182 mM의 dUTP 또는 약 0.284 mM의 dTTP 및 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는 약 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 및 0.1 U/ μl 내지 0.2 U/ μl , 적합하게는, 0.146 U/ μl 의 중합효소를 갖는다. 일부 조성물은 벌킹제, 적합하게는 트레할로스를 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는 약 0.3 M로 포함한다. 일부 조성물은 구상 단백질, 적합하게는, 소 혈청 알부민(BSA), 보다 적합하게는, 초고순도 비-아세틸화된 BSA를 포함한다. 구상 단백질은 0.40 내지 0.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는, 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 양으로 존재할 수 있다. 일부 조성물은 적합하게는 약 8.5의 pH의 완충제, 적합하게는 Tris 완충제를 포함한다.
- [0234] 또 다른 예시적인 벌크 시약 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않고, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 0.1 내지 0.4 mM, 적합하게는 각각 0.3 mM의 dATP, dGTP dCTP 및 dUTP 또는 dTTP 및 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는 약 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제 및 0.1 U/ μl 내지 0.2 U/ μl , 적합하게는, 0.146 U/ μl 의 중합효소, 벌킹제, 적합하게는 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는 약 0.3 M의 트레할로스, 구상 단백질, 적합하게는, 소 혈청 알부민(BSA), 보다 적합하게는, 초고순도 비-아세틸화된 BSA(상기 구상 단백질은 0.40 내지 0.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는, 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 존재함), 및 적합하게는 약 8.5의 pH의 완충제, 적합하게는 Tris 완충제를 갖는다.
- [0235] 또 다른 예시적인 벌크 시약 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않고, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 0.1 내지 0.4 mM, 적합하게는 각각 0.375 mM의 dATP, dGTP dCTP 및 dUTP 또는 dTTP 및 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는 약 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제를 갖는다. 일부 조성물에서, 플랩 엔도뉴클레아제는 Cleavase® 효소이다. 일부 조성물은 벌킹제, 적합하게는 트레할로스를 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는 약 0.36 M로 포함한다. 일부 조성물은 구상 단백질, 적합하게는, 소 혈청 알부민

(BSA), 보다 적합하게는, 초고순도 비-아세틸화된 BSA를 포함한다. 구상 단백질은 0.40 내지 0.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는, 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 양으로 존재할 수 있다. 일부 조성물은 적합하게는 약 7.5의 pH의 완충제, 적합하게는 MOPS 완충제를 포함한다.

[0236] 또 다른 예시적인 벌크 시약 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않고, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 0.1 내지 0.4 mM, 적합하게는 각각 0.375 mM의 dATP, dGTP dCTP 및 dUTP 또는 dTTP 및 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는 약 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 및 0.1 U/ μl 내지 0.2 U/ μl , 적합하게는, 0.167 U/ μl 의 중합효소를 갖는다. 일부 조성물은 벌킹제, 적합하게는 트레할로스를 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는 약 0.36 M로 포함한다. 일부 조성물은 구상 단백질, 적합하게는, 소 혈청 알부민 (BSA), 보다 적합하게는, 초고순도 비-아세틸화된 BSA를 포함한다. 구상 단백질은 0.40 내지 0.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는, 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 양으로 존재할 수 있다. 일부 조성물은 적합하게는 약 7.5의 pH의 완충제, 적합하게는 MOPS 완충제를 포함한다.

[0237] 또 다른 예시적인 벌크 시약 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않고, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 0.1 내지 0.4 mM, 적합하게는 각각 0.375 mM의 dATP, dGTP dCTP 및 dUTP 또는 dTTP 및 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는 약 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제 및 0.1 U/ μl 내지 0.2 U/ μl , 적합하게는, 0.167 U/ μl 의 중합효소, 벌킹제, 적합하게는 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는 약 0.36 M의 트레할로스, 구상 단백질, 적합하게는, 소 혈청 알부민(BSA), 보다 적합하게는, 초고순도 비-아세틸화된 BSA(상기 구상 단백질은 0.40 내지 0.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는, 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 존재함), 및 적합하게는 약 7.5의 pH의 완충제, 적합하게는 MOPS 완충제(예컨대, 15 mM MOPS 완충제)를 갖는다.

[0238] 또 다른 예시적인 벌크 시약 조성물은 글리세롤이 실질적으로 존재하지 않고, 5 mM 이하의 무기 염 농도를 갖고, 0.1 내지 0.4 mM, 적합하게는 각각 0.375 mM의 dATP, dGTP dCTP 및 dUTP 또는 dTTP 및 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 0.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제, 적합하게는 약 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 플랩 엔도뉴클레아제 및 0.1 U/ μl 내지 0.2 U/ μl , 적합하게는, 0.169 U/ μl 의 중합효소, 벌킹제, 적합하게는 약 0.2 M 내지 약 0.4 M, 적합하게는 약 0.36 M의 트레할로스, 구상 단백질, 적합하게는, 소 혈청 알부민(BSA), 보다 적합하게는, 초고순도 비-아세틸화된 BSA(상기 구상 단백질은 0.40 내지 0.60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 적합하게는, 0.51 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 존재함), 적합하게는 약 7.5의 pH의 완충제, 적합하게는 MOPS 완충제(예컨대, 15 mM MOPS 완충제) 및 적합하게는 약 0.05 내지 0.2 mM, 적합하게는, 약 0.15 mM의 농도의 킬레이팅제, 적합하게는 EDTA를 갖는다.

[0239] 벌크 시약 조성물의 형성 후에, 그것은 건조 이전에 상당한 기간 동안 실온에 둘 수 있다. 건조 단계가 시작되기 전에 그 기간은 최대 8시간 동안일 수 있거나, 또는 대안적으로, 건조 단계가 시작되기 전에 최대 1시간, 최대 2시간, 최대 4시간, 최대 6시간, 최대 10시간, 최대 12시간, 최대 14시간 동안일 수 있다. 벌크 시약에 염을 포함시키면 이러한 인큐베이션 기간 동안 바람직하지 않은 혼성화 산물 및 다른 부산물이 생성된다. 이러한 바람직하지 않은 혼성화 및 부산물은 본질적으로 무기 염 없이 벌크 시약 조성물을 형성함으로써 감소 또는 제거된다.

[0240] 벌크 시약에서 무기 염의 존재는 하기 바람직하지 않은 특성 중 하나 이상을 초래할 수 있다. 핵산은 함께 혼성화될 수 있으며, 혼성화는 무기 염, 예컨대, 칼륨, 나트륨, 망간, 마그네슘 및/또는 클로라이드의 존재에 의해서 자극된다. 또한 무기 염, 예컨대, 망간 및 마그네슘의 존재 하에서, 바람직하지 않은 효소 활성도가 발생할 수 있다. 염의 존재 하에서 핵산 혼성화 및 효소 활성도의 결과로서, 바람직하지 않은 부산물이 형성하기 시작할 수 있다. 추가로, 무기 염은 흡습성이고, 건조된 펠릿 내로 수분을 끌어들이는다. 건조된 펠릿의 재수화는 저장 안정성, 효소 안정성을 감소시키고, 추가적인 의사(spurious) 부산물 형성을 허용한다.

[0241] 건조된 펠릿은 1 단일 단위 용량(SUD), 또는 선택적으로는, 2 이상의 SUD를 제공하는 시약을 함유할 수 있다. 단일 단위 용량은 하나를 초과하는 단일 샘플 상에서 핵산 기반 분석을 수행하는 데 필수적인 시약의 집합물이다. 단일 단위 용량은 액체 시약 또는 건조된 펠릿을 지칭할 수 있다. 단일 단위 용량은 본 명세서에서 지칭되는 바와 같이 단일 샘플 상에서 핵산 기반 분석을 수행하는 데 필수적인 시약 모두를 함유할 필요는 없다는 것이 주목된다. 단일 단위 용량은 핵산 기반 분석 반응을 수행하는 데 필요한 시약이 결핍될 수 있다. 유사하게, 단일 단위 용량은 핵산 기반 분석 반응을 수행하기에 불충분한 양의 시약을 함유할 수 있다. 단지 예의 방식으로, 건조된 단일 단위 용량 펠릿은 핵산 기반 분석을 수행하기에 적절한 단위의 플랩 엔도뉴클레아제를 포함할 수 있지만, 마그네슘을 함유하지 않을 수 있다. 이와 같은 예에서, 마그네슘은 예컨대, 재구성 용액에 의해서 건조된 단일 단위 용량 펠릿에 첨가될 수 있다. 또한 단지 예의 방식으로, 건조된 단일 단위 용량은 핵산 기반 분석을 수행하기에 부적절한 양의 dNTP를 포함할 수 있다. 이와 같은 예에서, dNTP의 나머지는 예컨대, 재구성

용액에 의해서 건조된 단일 단위 용량 펠릿에 첨가될 수 있다. 본 개시 내용이 속한 당업자는 이들 예가 비제한적이므로 다양한 조성을 갖는 SUD 및 건조된 펠릿 SUD를 용이하게 생성할 것이다.

[0242] 바람직한 실시양태에서, 벌크 시약은 5 mM 이하의 무기 염 함량, 보다 바람직하게는 4 mM 이하의 무기 염 함량, 보다 바람직하게는 3 mM 이하의 무기 염 함량, 보다 바람직하게는 2 mM 이하의 무기 염 함량, 보다 바람직하게는 1 mM 이하의 무기 염 함량, 또는 보다 바람직하게는 500 μM 이하의 무기 염 함량을 포함한다. 따라서 벌크 시약 중의 무기 염의 바람직한 농도 범위는 약 5 mM 내지 0 mM의 무기 염 함량(그 사이의 모든 정수 및 분수 값 포함)이다. 핵산 기반 분석 반응 혼합물을 위한 일반적인 무기 염은 몇몇 예로 나트륨, 칼륨, 망간, 마그네슘 및 클로라이드 중 1종 이상을 포함한다.

[0243] 일 측면에서, 벌크 시약은 5 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 무기 염은 0.373 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.332 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.292 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 5 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 염화나트륨은 0.292 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.146 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 5 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 나트륨은 0.115 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.057 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 5 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 염화칼륨은 0.373 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.186 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 5 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 칼륨은 0.196 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.098 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 5 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 클로라이드는 0.355 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.178 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.089 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 건조된 펠릿은 5 mM 이하의 무기 염을 포함하는 액체 벌크 시약을 건조시켜 제조되고, 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율은 0.311% 이하, 0.277% 이하, 또는 0.244% 이하이다. 추가 측면에서, 0.311% 이하, 0.277% 이하, 또는 0.244% 이하의 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율을 갖는 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 함유하는 용기가 제공된다. 추가 측면에서, 하나 이상의 웰을 포함하는 멀티웰 플레이트가 제공되며, 여기서 하나 이상의 웰 각각은 0.311% 이하, 0.277% 이하, 또는 0.244% 이하의 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율을 함유하는 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 함유한다.

[0244] 일 측면에서, 벌크 시약은 4 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 무기 염은 0.298 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.266 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.234 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 4 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 염화나트륨은 0.234 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.117 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 4 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 나트륨은 0.092 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.046 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 4 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 염화칼륨은 0.298 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.149 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 4 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 칼륨은 0.156 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.078 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 4 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 클로라이드는 0.284 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.142 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.071 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 건조된 펠릿은 4 mM 이하의 무기 염을 포함하는 액체 벌크 시약을 건조시켜 제조되고, 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율은 0.249% 이하, 0.222% 이하, 또는 0.195% 이하이다. 추가 측면에서, 0.249% 이하, 0.222% 이하, 또는 0.195% 이하의 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율을 갖는 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 함유하는 용기가 제공된다. 추가 측면에서, 하나 이상의 웰을 포함하는 멀티웰 플레이트가 제공되며, 여기서 하나 이상의 웰 각각은 0.249% 이하, 0.222% 이하, 또는 0.195% 이하의 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율을 함유하는 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 함유한다.

[0245] 일 측면에서, 벌크 시약은 3 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 무기 염은 0.224 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.199 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.175 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 3 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 염화나트륨은 0.175 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.088 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 3 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 나트륨은 0.069 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.034 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 3 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 염화칼륨은 0.224 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.112 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 3 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 칼륨은 0.117 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.059 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 3 mM 이하의 무기 염을 포함하고, 클로라이드는 0.213 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.107 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 0.053 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하, 또는 0.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 건조된 펠릿은 3 mM 이하의 무기 염을 포함하는 액체 벌크 시약을 건조시켜 제조되고, 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율은 0.186% 이하, 0.166% 이하, 또는 0.146% 이하이다. 추가

[0249] 일 측면에서, 벌크 시약은 약 5 mM 내지 약 500 μM 의 무기 염을 포함하고, 무기 염은 약 0.373 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.029 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 약 5 mM 내지 약 500 μM 의 무기 염을 포함하고, 염화나트륨은 0.292 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.029 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 약 5 mM 내지 약 500 μM 의 무기 염을 포함하고, 나트륨은 0.115 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.006 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 약 5 mM 내지 약 500 μM 의 무기 염을 포함하고, 염화칼륨은 약 0.373 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.019 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 약 5 mM 내지 약 500 μM 의 무기 염을 포함하고, 칼륨은 0.196 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.010 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 약 5 mM 내지 약 500 μM 의 무기 염을 포함하고, 클로라이드는 0.355 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.009 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 약 5 mM 내지 약 500 μM 의 무기 염을 포함하고, 무기 염은 약 0.373 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.029 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재하고, 염화나트륨은 약 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 벌크 시약은 약 5 mM 내지 약 500 μM 의 무기 염을 포함하고, 무기 염은 약 0.373 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 약 0.029 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재하고, 염화칼륨은 약 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 질량/마이크로리터로 존재한다. 추가 측면에서, 건조된 펠릿은 5 mM 내지 500 μM 의 무기 염을 포함하는 액체 벌크 시약을 건조시켜 제조되고, 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율은 약 0.311% 내지 0.024%이다. 추가 측면에서, 건조된 펠릿은 5 mM 내지 500 μM 의 무기 염을 포함하는 액체 벌크 시약을 건조시켜 제조되고, 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율은 약 0.311% 내지 0.024%이고, 펠릿의 질량에 대한 염화나트륨의 질량 백분율은 약 0%이거나, 또는 펠릿의 질량에 대한 염화칼륨의 질량 백분율은 약 0%이다. 추가 측면에서, 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 함유하는 용기가 제공되고, 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율은 약 0.311% 내지 0.024%이거나, 펠릿의 질량에 대한 염화나트륨의 질량 백분율은 약 0%이거나 또는 펠릿의 질량에 대한 염화칼륨의 질량 백분율은 약 0%이다. 추가 측면에서, 하나 이상의 웰을 포함하는 멀티웰 플레이트가 제공되며, 여기서 하나 이상의 웰 각각은 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 함유하고, 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율은 약 0.311% 내지 0.024%이고, 펠릿의 질량에 대한 염화나트륨의 질량 백분율은 약 0%이거나 또는 펠릿의 질량에 대한 염화칼륨의 질량 백분율은 약 0%이다.

[0250] 일 실시양태에서 하나 이상의 웰을 포함하는 멀티웰 플레이트가 제공된다. 일 측면에서, 하나 이상의 웰은 낮은 수증기 투과율, 열 전도율, 광학 투명도, 낮은 자가형광 또는 이들의 조합을 포함하는 물질로부터 구성된 벽을 포함한다. 일 측면에서, 하나 이상의 웰은 원뿔형인 벽을 포함한다. 일 측면에서, 웰은 핵산 기반 분석 반응을 수행하기 위한 장치의 면적을 수용하는 열 전도성 튜브에 적절하도록 구성된 벽을 포함한다. 일 측면에서, 멀티웰 플레이트의 하나 이상의 웰은 웰의 챔버에 접근하기 위한 개구부를 포함한다. 일 측면에서, 하나 이상의 웰은 각각 연관된 웰의 개구부를 밀봉하기 위한 캡을 포함한다. 일 측면에서, 하나 이상의 웰 각각의 개구부는 낮은 수증기 투과율의 포일인 캡으로 밀봉된다. 일 측면에서, 하나 이상의 웰 각각의 개구부는 낮은 수증기 투과율의 엘라스토퍼 물질인 캡으로 밀봉된다. 일 측면에서, 멀티웰 플레이트는 본 명세서에 기술된 바와 같은 하나 이상의 웰을 포함하고, 여기서 웰의 챔버는 플랩 엔도뉴클레아제 및 무기 염을 포함하는 건조된 단일 단위 용량 펠릿을 함유하고, 여기서 펠릿의 질량에 대한 무기 염의 질량 백분율은 약 0.311% 내지 0.024%이다.

[0251] **III. 건조를 위한 장비 및 방법**

[0252] 벌크 시약은 표준 방법 및 장비를 사용하여 동결건조될 수 있다. 동결 건조기는 예를 들어, GEA Process Engineering(미국 메릴랜드 컬럼비아 소재)으로부터 입수 가능하다. 계약 동결 건조 서비스는 예를 들어, Biopharma Technology Ltd.(영국 햄프셔 윈체스터 소재) 및 BioPharma Solutions Sterile Contract Manufacturing, Baxter Healthcare Corp(미국 일리노이 테어필드 소재)에 의해서 제공된다. 동결건조에 대한 지침은 예를 들어, 문헌[L. Rey, J.C. May (eds.) (2010) Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceuticals and Biological Products, 3rd ed. Informa Healthcare, NY or Methods in Enzymology, Vol. 22, Pages 33-39, Academic Press, New York (1971)]; 또는 [Freeze-Drying, E. W. Flosdorf, Rheinhold, New York (1949)]으로부터 입수 가능하다. 선택적으로는, 산소 함량은 동결-건조 동안 감소될 수 있다(Phillips et al (2001) Biologics. 19:219).

[0253] 다양한 용기가 건조에 적합하다. 용기가 밀봉되어, 부분 진공 하에서 저장되는 경우, 용기는 외부 압력을 견딜 수 있어야 한다. 용기는 외부에서 내부로 열을 타당하게 전달할 수 있는 물질로 제조되어야 한다. 용기의 크기는 오버 플로우를 피하기 위해 건조될 용액이 총 부피의 20% 이하를 차지하도록 하는 것이 바람직하다.

[0254] 샘플은 별도의 용기 또는 다중 시편 용기에서 건조될 수 있다. 다중 시편 용기는 2개 이상의 시편을 함유하여 그것이 동시에 그러나 개별적으로 저장 및 조작될 수 있도록 하는 연속 용기를 의미한다. 다중 시편 리셉터클에

대한 표준 포맷은 6, 24, 96, 384 또는 1536웰을 포함한다. 96웰 포맷의 예에서 각각의 웰의 부피는 약 300 내지 400 마이크로리터이고, 작업 부피는 약 75 내지 200 마이크로리터이다. 부피는 각각의 웰에 대해서 전형적으로 1 nL 내지 10 mL의 범위에서 일반적으로 웰의 수에 역으로 달라지지만, 다른 크기가 또한 고려된다. 예시적인 웰은 특히 편평한 바닥, 둥근 바닥, 또는 V자형 바닥을 가질 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용기는 웰이라고도 지칭된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 다중 시편 용기는 멀티웰 플레이트라고도 지칭된다. 또한, 웰은 때로는 반응 웰이라고 추가로 지칭된다. 용어 반응 웰은 임의의 반응이 실제로 반응 웰에서 일어날 필요는 없다. 오히려, 그 용어는 시약을 함유하고, 그 내에서 반응이 없을 수 있거나, 그 내에서 부분적인 반응을 가질 수 있거나 또는 그 내에서 완전 반응을 가질 수 있는 용기 또는 웰을 지칭하도록 사용된다.

[0255] 본 명세서에서 일부 실시양태에서, 멀티웰 플레이트는 동결건조되어 수성 용액으로부터 건조 조성물을 형성할 수 있다. 동결건조는 네스트 장치(nest device)에서 일어날 수 있다(동시 계속 출원 미국 특허 제62/200,370호 참고). 네스트는 밀폐된 동결건조 챔버 외부로부터 작동 가능한 메커니즘에 의해서 폐쇄될 수 있는 통기구를 갖는 카트리지를 위한 컨테이너이다. 멀티웰 플레이트를 함유하는 네스트는 개방 위치에서 하나 이상의 통기구를 갖는 동결건조 챔버 내에 위치된다. 이어서, 챔버를 밀봉하고, 동결건조 분위기를 네스트 내의 공간을 포함하는 챔버 전체에 적용한다. 이어서 하나 이상의 통기구를 폐쇄하여, 네스트를 밀봉한다. 동결건조 챔버 상의 밀봉을 추후에 해제하고, 멀티웰 플레이트를 함유하는 네스트를 제거한다. 이어서, 작업자가 내부에 위치한 동결건조된 조성물을 사용할 준비가 되거나 또는 추가 저장 또는 판매를 위해서 동결건조된 시편을 함유하는 멀티웰 플레이트를 재밀봉할 준비가 될 때까지, 네스트는 멀티웰 플레이트를 재배치하고 저장할 수 있다. 이어서, 멀티웰 플레이트의 웰을 밀봉하여, 주변 공기로부터 수분의 침입을 실질적으로 저해할 수 있다. 밀봉된 멀티웰 플레이트 내로의 소량의 수분의 유입은 건조제를 함유하는 파우치에서 밀봉된 멀티웰 플레이트를 저장함으로써 예방될 수 있다. 유사하게, 별도의 용기는 동결건조될 수 있고, 네스트에서 동결건조될 수 있다.

[0256] 다른 건조 방법은 분무 건조, 유동층 건조, 제습기, 및 필터 케이크가 진공 하에서 저온에서 자유 유동 건조 생성물로 건조되는 배치식 접촉 건조를 포함한다(NP Cheremisinoff (2000) Handbook of Chemical Processing Equipment, Butterworth Heinemann, Boston, MA). 제습기는 Bry Air, Inc.(미국 오하이오 선버리 소재) 및 DST Seibu Giken(미국 펜실베이니아 와이오밍 소재)로부터 입수 가능하다. 회전식 건조기, 원추형 건조기 및 선반 건조기가 입수 가능하다(McGill AirPressure LLC, 미국 오하이오 컬럼버스 소재). 일 실시양태에서, 진공 건조기는 물질을 감압에 노출시킴으로써 수분을 제거하고, 여기서 충분한 열을 사용하여 기화를 통해서 손실된 것을 대체한다. 건조제는 실리카겔 건조제, 분자체 건조제, 예컨대, 알루미늄실리케이트 및 합성 제올라이트 및 벤토나이트 건조제를 포함한다.

[0257] 반응 혼합물은 바람직하게는 이것이 사용을 위해서 재구성될 용기와 동일한 용기에서 건조된다.

[0258] 동결건조되거나 달리 건조된 제형은 낮은 물 함량, 예를 들어, 5중량% 미만의 물, 4중량% 미만, 3중량% 미만, 2중량% 미만, 1.0중량% 미만, 0.5중량% 미만, 0.2중량% 미만, 0.1중량% 미만, 0.05중량% 미만, 0.02중량% 미만, 0.01중량% 미만 등을 갖는다.

[0259] **IV. 저장**

[0260] 동결건조되거나 달리 건조된 조성물은 사용 전에 저장된다. 저장 기간은, 건조 조성물이 주변 공기에 노출되는 실온에 저장되는 시간 기간을 포함할 수 있다. 이러한 기간은 최대 3시간, 또는 대안적으로, 최대 1.0시간, 최대 1.5시간, 최대 2.0시간, 최대 2.5시간 또는 임의의 시간의 범위, 예컨대, 1분 내지 180분, 또는 1분 내지 100분, 또는 1분 내지 60분, 또는 1분 내지 30분 또는 1분 내지 20분, 또는 1분 내지 10분 동안일 수 있다. 이러한 저장 동안 절대 습도는 30°C에서 적어도 2.3 g 물/공기 세제곱 미터, 또는 대안적으로, 30°C에서 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0 그램의 물/공기 세제곱 미터 초과일 수 있다.

[0261] 저장은 또한 건조 조성물이 밀봉되어 밀봉부 외부의 주변 공기와의 접촉을 실질적으로 예방하는 더 긴 기간을 포함할 수 있다. 이러한 저장 기간은 장기간, 예를 들어, 적어도 1주, 적어도 1개월, 적어도 6개월, 적어도 1년 또는 적어도 2년 동안일 수 있다. 1개월 내지 2년의 기간이 예시적이다.

[0262] 장기간 저장 또는 장기간 또는 단기간 안정성 연구의 범위는 예를 들어, 0 내지 2°C, 0 내지 4°C, 2 내지 4°C, 2 내지 6°C, 20°C, 25°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 뿐만 아니라 0°C 미만의 온도 예컨대, -4 내지 -2°C, -6 내지 -2°C, -8 내지 -2°C, -10 내지 -2°C, -20°C, -40°C, -60°C, -80°C, 액체 질소 하를 포함한다. 바람직하게는, 저장은 빙점 초과이고, 약 4 내지 8°C의 범위이다. 가속 분해 연구는 약 25°C, 약 30°C, 약 35°C, 약 40°C에서, 예를 들어, 1시간, 2시간, 4시간, 24시간, 2일, 4일, 8일, 1개월 등의 기간 동안 수행될 수

있다. 저장 또는 대안적으로, 안정성에 대한 조건은 시험될 수 있고, 온도가 변동하는 조건, 예를 들어, 빙점 초과 내지 빙점 미만으로 변동하는 조건일 수 있다.

[0263] 무기 염의 본질적인 부재는 건조 전에 벌크 시약의 저장 동안, 밀봉 전에 건조 조성물의 단기간 저장 동안, 및 밀봉 후 장기간 저장 동안 효소 활성도의 손실 및 부산물의 형성을 감소시킨다. 바람직하게는 모든 저장 후 효소 활성도는 저장을 시작하기 직전의 값의 적어도 99%, 저장을 시작하기 전 값의 적어도 98%, 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50%, 적어도 40%, 적어도 30%, 적어도 20%, 및 이들 백분율이 경계가 되는 범위, 또는 대안적으로, 최적의 조건 하에서 저장된 대조군 샘플의 값이다.

[0264] **V. 재구성**

[0265] 바람직한 재구성 용액은 물 중의 약 3.0 내지 약 12.0 mM의 MgCl₂ 및 약 0 내지 약 80 mM의 KCl을 제공한다. 재구성 용액은 또한 다른 성분 중에서 약 0.012 내지 약 0.020%(w/v)의 메틸 파라벤, 약 0.006 내지 약 0.010%(w/v)의 프로필 파라벤, 및/또는 약 0.25 내지 약 0.35%(v/v)의 무수 에탄올을 함유할 수 있다.

[0266] 건조 조성물의 의도된 사용에 적합한 수성 용액이 건조 조성물과 접촉된 후, 재구성 시간은 1초 미만, 2초 미만, 5초 미만, 10초 미만, 15초 미만, 20초 미만, 50초 미만, 또는 60초(1분) 미만일 수 있고, 접촉은 진탕, 탭핑, 보텍싱, 진동(rocking), 피펫 팁의 내부 및 외부로의 배출, 또는 가단성(malleable) 바이알의 접힘 또는 압착에 의해서 선택적으로 촉진된다. 예시적인 재구성 시간은 2초 내지 10초이다. 재구성 시간은 냉장고 온도 (약 4°C), 약 23°C에서의 주변 온도 용액, 또는 약 37°C에서의 따뜻한 용액 중 임의의 것에서 재구성 용액으로 측정될 수 있다. 전형적으로, 건조 조성물은 냉장고로부터 제거되었고, 재구성 용액의 첨가 이전에 차갑다. 이러한 절차 중 임의의 것에 대한 환경(공간)은 전형적으로 주변 온도 또는 약 23°C이다. 물질이 재구성되는 것으로 결정되는 시간은 예를 들어, 물질이 완전히 가용화되는 것으로 결정되는 시간일 수 있다. 완전한 가용화는 육안 검사에 의해서 결정될 수 있는데, 예를 들어, 탁도의 부재 또는 슈리렌(schlieren) 패턴의 부재가 완전한 가용화의 척도이다. 대안적으로, 완전한 가용화는 광 산란을 측정하는 기계와 같은 광학 기기를 통해서 결정될 수 있다.

[0267] **VI. 조성물의 안정성**

[0268] 조성물의 안정성은 전형적으로 활성도(즉, 검출 속도 또는 수율) 또는 조성물 중에서 발생하는 부산물의 형성을 결정함으로써 건조된 생성물의 재구성 후에 평가된다. 안정성의 결여는 건조 전 또는 후에 저장 동안 활성도의 손실 또는 부산물의 형성으로 인해 발생할 수 있다. 활성도 또는 부산물의 형성은 절대적 또는 상대적 측정치일 수 있다. 상대적인 경우, 비교를 위한 기준선은 건조 및 재구성 전의 벌크 시약 혼합물 또는 정의된 방식(예: Mg²⁺ 또는 다른 염의 존재)에서 시험 중인 것과 상이한 대조군 재구성 혼합물일 수 있다. 활성도는 실시간 절단 또는 증폭 속도 또는 절단 또는 증폭 산물의 최종 수율 또는 적중률에 의해서 평가될 수 있다. 부산물은 겔 전기영동, 겔 스캐너, 아가로스 겔, 모세관 전기영동 등 중 하나 이상의 의해서 분석될 수 있다.

[0269] 재구성된 증폭 혼합물의 활성도(상이한 부피의 재구성으로 인한 임의의 차이에 대해서 필요한 경우 보정됨)는 바람직하게는 75, 80, 85, 90, 또는 95% 이내이거나 또는 건조 전 벌크 시약의 것으로부터 실험 오차 내에서 구별 가능하지 않다. 재구성된 증폭 혼합물 내에 존재하는 부산물(상이한 부피의 재구성으로 인한 임의의 차이에 대해서 필요한 경우 보정됨)은 바람직하게는 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 또는 1중량% 미만 또는 건조 전에 벌크 시약에 존재하는 본래 화합물의 평균 몰이다. 때로는 부산물은 검출 한계 미만이다.

[0270] **VII. 키트**

[0271] 상기에 기술된 건조 조성물은 키트 내에 제공될 수 있다. 이러한 키트는 용기, 예컨대, 튜브 내에 건조 조성물을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 하나 이상의 웰을 포함하는 멀티웰 플레이트를 함유한다. 일부 키트는 개별 용기 내에 공급된 복수의 건조 조성물을 함유한다. 일부 키트는 다중벽 멀티웰 플레이트의 하나 이상의 밀봉된 웰 부재 내에 다수의 건조 조성물을 포함하는 하나 이상의 멀티웰 플레이트를 포함한다.

[0272] 일부 키트는 또한 건조 조성물과 별개의 용기 내에 재구성 용액을 포함한다. 재구성 용액은 분취물을 개별 건조 조성물 용기 내에 분배하기 위해서 벌크로 제공될 수 있거나 또는 각각 건조 조성물을 함유하는 단일 용기와 조합하기 위해서, 하나 이상의 단위 투여량의 형태로 제공될 수 있다.

[0273] 선택적으로는 건조 조성물을 함유하는 용기 및 재구성 용액을 함유하는 용기는 부서지기 쉬운 재료에 의해서 분리될 수 있다. 부서지기 쉬운 재료는 알루미늄 포일, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리비닐클로라이드(PVC), 폴리에틸렌일 수 있다. 장벽은 1개, 2개, 3개 또는 그 초과와 층을 포함할 수 있고, 각각의 층은 동일한 조성물

을 갖거나, 또는 각각의 층은 상이한 조성물, 예컨대, PVC 층과 접촉한 포일 층을 갖는다. 필름은 예를 들어, Dow Chemical Co.(미국 미시간 미들랜드 소재) 또는 Arkema, Inc.(미국 펜실베이니아 킹 오브 프러시아 소재)로부터 입수할 수 있다. 부서지기 쉬운 재료의 천공은 재구성 용액이 동결 건조된 조성물과 접촉할 수 있게 한다.

[0274] 키트는 효소 반응이 키트의 구획에서 직접 수행되어 조성물을 상이한 반응 용기 또는 이러한 용기를 보유하는 컨테이너로 전달할 필요성이 없도록 열사이클러(thermocycler) 또는 인큐베이터에 적절하도록 설계될 수 있다.

[0275] 키트는 예를 들어, 포트, 호스, 셉텀을 천공하는 주사기(특히 제US2014/0121515호 및 제US2014/0276356호 참고)에 의해서, 사용자 공급 시약을 키트 내의 용기에 도입하도록 개작될 수 있거나, 또는 대안적으로, 사용자 공급 시약, 예컨대, 핵산 주형은 사용자 공급 컨테이너에서 본 개시내용의 시약과 혼합될 수 있다. 키트의 구획 중 하나 이상은 빈 상태로 공급되어 혼합 챔버로서 사용될 수 있다.

[0276] **VIII. 플랩 엔도뉴클레아제의 투석**

[0277] 본 개시내용에 사용하기 위한 일부 효소는 글리세롤 함유 완충제에서 제조된다. 글리세롤 함량은 동결건조를 손상시킬 수 있다. 따라서, 효소를 글리세롤-무함유 완충제 중에서 투석함으로써, 글리세롤-무함유 효소 용액을 함유하고 실질적으로 무기 염이 없는 용액을 제조하는 것이 필요하다. 이러한 투석을 사용하여 실질적으로 글리세롤을 제거하고, 그것을 완충제로 대체할 수 있다. 이어서, 투석된 효소를 사용하여 실질적으로 무기 염이 없는 글리세롤-무함유 동결건조 제형을 제조할 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 유기 완충제, 벌킹제, 클로라이드 이온 및 킬레이팅제를 함유하는 수성 용액을 포함하거나, 이것으로 이루어지거나 또는 이것으로 본질적으로 이루어진 투석 조성물이 또한 개시된다. 벌킹제는 트레할로스일 수 있다. 벌킹제는 약 100 mM 내지 300 mM, 적합하게는 200 mM의 농도로 존재할 수 있다. 유기 완충제는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris) 완충제일 수 있다. Tris 완충제는 10 mM 내지 30 mM의 농도, 적합하게는 50 mM의 농도로 존재할 수 있다. 클로라이드 이온은 KCl일 수 있다. 클로라이드 이온은 약 40 내지 60 mM, 적합하게는 50 mM의 농도로 존재할 수 있다. 킬레이팅제는 EDTA일 수 있다. 킬레이팅제는 0.05 내지 0.2 mM, 적합하게는, 0.1 mM의 농도로 수성 용액 중에 존재할 수 있다. 투석 조성물은 플랩 엔도뉴클레아제를 포함할 수 있다.

[0278] 예시적인 투석 조성물은 Tris 완충제(pH 8.0), 트레할로스, KCl 및 EDTA를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어진 수성 용액이다.

[0279] 또 다른 예시적인 투석 조성물은 약 20 mM의 Tris 완충제(pH 8.0), 약 200 mM의 트레할로스, 약 50 mM의 KCl 및 약 0.1 mM의 EDTA를 포함하거나, 이들로 이루어지거나 또는 이들로 본질적으로 이루어진 수성 용액이다.

[0280] 실질적인 글리세롤-무함유 플랩 엔도뉴클레아제 조성물의 제조 방법이 또한 개시되며, 여기서 플랩 엔도뉴클레아제 및 글리세롤을 투석하여 실질적인 글리세롤-무함유 플랩 엔도뉴클레아제 조성물을 수득한다. 적합하게는, 글리세롤은 약 0 내지 약 0.35%(w/v)의 글리세롤, 적합하게는, 약 0 내지 약 0.2%(w/v)의 글리세롤, 적합하게는, 약 0.1%(w/v)의 글리세롤, 적합하게는, 약 0.01%(w/v)의 글리세롤의 양으로 존재한다.

[0281] **실시예**

[0282] **실시예 1 벌크 시약**

[0283] 실시예 1 내지 3은, 벌크 시약을 제조하는 것, 벌크 시약의 단일 단위 용량(SUD) 부피를 건조시켜 용기 내에 SUD 건조된 펠릿을 수득하는 것, 건조된 펠릿을 재구성하여 SUD 증폭 및 검출 혼합물을 수득하는 것을 설명한다. 표 1 및 표 2는 건조를 위한 예시적인 벌크 시약의 성분을 개시한다. 두 표는 또한 예시적인 단위 용량 농도를 개시한다. 마스터 믹스 1은 각각 0.4 mM의 dATP, dGTP, dCTP 및 dTTP; 0.8 mM의 dUTP; BSA를 포함하고, 실질적으로 무기 염이 없는 2X 마스터 믹스였다. 표 1의 Taq 중합효소는 양이온성 세제를 함유하는 글리세롤 무함유 Tris 완충제 중에 존재하였다. 2X 마스터 믹스 2는 0.4 mM의 dATP, dGTP, dCTP, 0.8 mM의 dUTP, Tris 및 비-아세틸화된 BSA를 함유하는 독점 완충제(글리세롤 무함유) 중의 0.74 U/μL의 GoTaq® MDx 핫 스타트 중합효소, 0.48 M의 트레할로스이다. 50X GoScript RT 믹스는 하기와 같다: 20 U/μL의 GoScript®, 8 단위/μL의 표 2의 RNasin®과 RNase 저해제; 10 U/μL의 GoScript®, 8 단위/μL의 표 1의 RNasin TM 플러스.

[0284] GoScript® RT 커스텀은 160 U/μL의 GoScript RT, 글리세롤 무함유, RNase 저해제 무함유의 농축 용액이다. 포함될 수 있는 안정화제는 탈아미드화 저해제, 항산화제, 세제 및 계면활성제, 예컨대, 계면활성제: 소르비탄 폴리에톡실레이트의 지방산 에스테르(예: 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80), 및 폴록사머 188이다.

표 1

표 1: 건조를 위한 예시적인 벌크 시약

설명	벌크 시약 (적절한 단위를 갖는 농도)	리터당 양	SUD (적절한 단위를 갖는 농도)	사용 가능한 범위 (적절한 단위를 갖는 농도)
1.4 M 트레할로스	0.30 M	214 mL	0.24 M	0.16 내지 0.32 M
용액, EDTA 0.5M pH 8.0	2.19 mM	4.4 mL	1.75 mM	0.0 내지 3.5 mM
2X 마스터 믹스 1, 염 없음, MgCl ₂ 없음	1.25X	625 mL	1X	
Taq 중합효소(50 U/μl)	0.4 U/ μL	400 kU (8.00 mL)	0.32 U/μL	0.1 내지 1.0 U/μl
1-단계 RT-qPCR 을 위한 50X GoScript™ RT 믹스, 저 글리세롤, 커스텀	1.25X	25.0 mL	1X	
GoScript™ RT 커스텀 제형, 160 U/μL	0.25 U/μL	250 kU (1.6 mL)	0.20 U/μL	0.1 내지 0.6 U/μl
10X 올리고뉴클레오티드 믹스	1.25X	125 mL	1X	0.7X 내지 1.3X

[0285]

표 2

표 2: 건조를 위한 예시적인 벌크 시약

설명	벌크 시약 (적절한 단위를 갖는 농도)	리터당 양	SUD (적절한 단위를 갖는 농도)	사용 가능한 범위 (적절한 단위를 갖는 농도)
용액 EDTA 0.5M pH 8.0	2.19 mM	4.38 mL	1.75 mM	0.0 내지 3.5 mM
2X 마스터 믹스 2, 염 없음, MgCl ₂ 없음, 추가의 Taq Pol 있음, 트레할로스 있음, 뉴클레오티드 있음	1.25X	625 mL	1X	
트레할로스로부터	0.30 M	“	0.24 M	0.16 내지 0.32 M
Taq Pol 로부터	0.46 U/μL	“	0.37 U/μL	0.1 내지 1.0 U/μl
1-단계 RT-qPCR 을 위한 50X GoScript™ RT 믹스, 저 글리세롤, 커스텀, RNasin 플러스 있음	1.25X	25.0 mL	1X	
RT 로부터	0.5 U/μL	“	0.4 U/μL	0.1 내지 0.6 U/μl
10X 올리고뉴클레오티드 믹스	1.25X	125 mL	1X	0.7X 내지 1.3X

[0286]

표 3

표 3: 건조를 위한 예시적인 벌크 시약

설명	스톡 농도	최종 농도	최종 부피
AllStart 2X 마스터 믹스(KCL 없음, MgCl ₂ 없음)	2X	1X	12 µl/반응
10X PnP 믹스	10X	1X	2.5 µl /반응
Z05 DNA 중합효소	200 U/µl	4 U/µl	1 µl /50 µl 반응 혼합물 부피
AMV 역전사효소	80 U/µl	5 U/µl	3.13 µl /50 µl 반응 혼합물 부피
T4G32P(접하지 않은 핵산을 위한 단백질)	10 U/µl	2.5 U/µl	12.50 µl /50 µl 반응 혼합물 부피
효소 희석 완충제			33.4 µl /50 µl 반응 혼합물 부피
10X 올리고뉴클레오타이드 믹스	10X	1.25X	1X

[0287]

[0288]

표 1 내지 표 3에 대한 벌크 증폭 시약 각각에서 10X 올리고뉴클레오타이드 믹스는 하기 실시예에서 증폭 및 검출 반응을 수행하기 위한 프라이머 및 프로브의 집합물을 포함하였다. 당업자는 증폭 반응을 위한 프라이머 및 프로브 혼합물을 제조하는 방법을 이해할 것이다(예: 문헌[Innis, Michael A. et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)] 참고). 하기 실시예에 대해서, 프라이머 및 프로브는 약 8 µM 내지 약 12 µM의 농도로 벌크 시약 중에 존재하였다.

[0289]

실시예 2. 동결건조

[0290]

본 실시예에서, 벌크 반응 혼합물을 동결건조기를 사용하여 건조하였다. 실시예 1에 일반적으로 기술된 24 마이크로리터의 벌크 증폭 시약을 용기에 첨가하고, 이어서 동결건조 챔버에 적재하였다. 본 명세서에서 실시예의 경우, 24 µl는 단일 샘플(단일 단위 용량 또는 SUD라고도 지칭됨) 상에서 증폭 및 검출 반응을 수행하기 위해서 사용되는 벌크 시약의 양을 나타낸다. 본 실시예에서, 멀티웰 플레이트(구체적으로 12-웰 플레이트)를 동결건조 반응 및 멀티웰 플레이트의 웰에 존재하는 동결건조된(건조된) 펠릿의 저장 둘 모두를 위해서 사용하였다. 12-웰 플레이트의 12개의 웰 각각은 벌크 반응 혼합물의 24 µl 분취물이 제공되었다. 동결건조 사이클을 시작하였다(약 36시간 실행). 동결건조 사이클 후에, 12-웰 플레이트를 회수하고, 12-웰 플레이트의 개별 용기가 밀봉되는 위치로 옮겼다. 용기의 용기 개구부 위를 금속 포일로 밀봉하였다. 금속 포일은 낮은 수증기 투과율 포일이었다. 이어서, 밀봉된 12-웰 플레이트를 건조제와 함께 파우치에 넣었다.

[0291]

실시예 3. 재구성 용액

[0292]

본 실시예는 하나의 재구성 용액을 설명한다. 재구성 용액의 목적은 샘플 상에서 검출 핵산 기반 반응을 수행하기 위해서 재구성된 펠릿을 사용하기 위한 제제에서 건조된 펠릿을 재수화시키는 것이다. 실시예 2로부터의 12-웰 플레이트의 12-웰 각각에, 웰 상의 포일 커버를 사전 천공하고, 이어서 웰에 재구성 용액을 분배함으로써 24 µl의 재구성 용액을 분배하였다. 표 4는 본 실시예에서 사용된 재구성 용액을 개시하고, 벌크 재구성 용액 농도 및 최종 분석 농도 둘 모두를 제공한다. 건조된 펠릿의 재구성 이후에, 샘플로부터의 표적 핵산을 웰에 첨가하고, PCR 증폭 및 검출 반응을 수행하였다.

표 4

표 4: 범용 재구성 용액

설명	제형 중량	벌크 재구성 용액 (적절한 단위를 갖는 농도)	리터당 양	최종 검정 용액(적절한 단위를 갖는 농도)
MgCl ₂	1.00 M 액체 스톡	5.19 mM	5.19 ml	4.15 mM
KCl	74.55 g	81.3 mM	6.06	65 mM
메틸 파라벤	152.15 g/mol	0.02% w/v	0.20 g	.016%
프로필 파라벤	180.2 g/mol	0.01% w/v	0.10 g	.008%
에틸 알코올, 무수	46.07 g/mol	0.33% v/v	3.30 mL	0.26%

[0293]

[0294]

실시예 4. 건조된 벌크 시약에 대한 무기 염의 부정적인 영향

[0295]

본 실시예는 벌크 시약 중의 무기 염의 존재가 건조된 펠릿에 미치는 부정적인 영향을 설명한다. 2종의 벌크 시약 혼합물을 일반적으로 실시예 1 및 표 5에 따라서 제조하였다. 표 5에서 벌크 시약 A와 벌크 시약 B 간의 차이는 반응 혼합물 중의 MgCl₂의 존재 또는 부재였다.

표 5

표 5: 무기 염이 존재하거나 존재하지 않는 벌크 시약

	벌크 시약 A (MgCl ₂ 없음 및 KCl 없음)	벌크 시약 B (MgCl ₂ 있음 및 KCl 없음)
트레할로스	0.30 M	0.30 M
핫 스타트 Taq DNA 중합효소 (글리세롤 무함유)	0.46 단위/마이크로리터	0.46 단위/마이크로리터
역전사효소	0.5 단위/마이크로리터	0.5 단위/마이크로리터
RNasin	0.2 단위/마이크로리터	0.2 단위/마이크로리터
dNTP 믹스	0.25 mM dNTP, 0.5 mM UTP	0.25 mM dNTP, 0.5 mM UTP
핵산 [§]	7 마이크로몰(μM)	7 마이크로몰(μM)
KCl	0 mM	0 mM
MgCl ₂	0 mM	2.5 mM
저 글리세롤 완충제	2.7 mM Na ⁺ 0.035 mM K ⁺	2.7 mM Na ⁺ 0.035 mM K ⁺

[§] 핵산은 하기 프라이머 프로브 세트에 구성된 다중 프라이머 및 프로브 믹스였다:

인플루엔자 A의 증폭 및 검출의 경우 2개의 정방향 프라이머, 3개의 역방향 프라이머, 및 3개의 프로브(2개의 상이한 fl u A 표적 영역)가 존재하였고; 인플루엔자 B의 경우 1개의 정방향 프라이머, 1개의 역방향 프라이머, 및 1개의 프로브가 존재하였고; RSV의 경우, RSV A의 경우 1개의 정방향 프라이머, 1개의 역방향 프라이머, 및 1개의 프로브가 존재하였고; RSV B의 경우 1개의 정방향 프라이머, 1개의 역방향 프라이머, 및 1개의 프로브가 존재하였고; 내부 대조군의 경우 1개의 정방향 프라이머, 1개의 역방향 프라이머 및 1개의 프로브가 존재하였다. 7 마이크로몰의 값은 모든 프라이머 농도의 합이고, 여기서 각각의 프라이머는 약 400 nM이다.

[0296]

- [0297] 액체 벌크 시약 A 및 B 각각은 얼음 상에서 제조되었다. 이어서 벌크 시약 A 및 B를 각각 개별적으로 다수의 멀티웰 플레이트의 웰에 분취하였다(여기서 구체적으로, 12-웰 플레이트를 사용하였음). 이어서 벌크 시약 A의 12개의 분취물 또는 벌크 시약 B의 12개의 분취물을 함유하는 이러한 12-웰 플레이트를 4가지의 상이한 인큐베이션 조건으로 분리하였다: (1) 얼음 상에서 90분 인큐베이션; (2) 실온에서 90분 인큐베이션; (3) 얼음 상에서 180분 인큐베이션; 또는 (4) 실온에서 180분 인큐베이션. 따라서, 각각의 벌크 시약 혼합물의 한 부분을 실온에서 180분 동안 인큐베이션시키고, 나머지 부분을 180분 동안 얼음 상에서 인큐베이션시켰다. 마찬가지로, 각각의 벌크 시약 혼합물의 한 부분을 실온에서 90분 동안 인큐베이션시키고, 나머지 부분을 90분 동안 얼음 상에서 인큐베이션시켰다. 모든 경우에, 반응 혼합물에 핵산 성분을 첨가하는 것(최종 성분으로서 첨가됨)은 인큐베이션 시간의 시작을 나타내었다.
- [0298] 인큐베이션 시간 이후, 이어서, 12-웰 플레이트 내의 분취된 벌크 시약을 실질적으로 건조 조성물이 수득될 때까지 동결건조시켰다. 12-웰 플레이트의 웰 내의 생성된 건조 조성물 각각은 샘플에서 인플루엔자 A, 인플루엔자 B 및 호흡기 세포 융합 바이러스 B 중 1종 이상을 식별하기 위한 삼중 증폭 및 검출 반응을 위한 건조된 단일 단위 용량을 나타내었다.
- [0299] 건조 조성물을 65 mM의 KCl, 각각 0.02% w/v 및 0.01% w/v의 메틸 및 프로필 파라벤 및 0.33% v/v의 에틸 알코올(무수)을 함유하는 재구성 용액으로 재구성하였다. 벌크 시약 A로부터 제조된 건조 조성물을 위한 재구성 용액은 또한 2.5 mM의 MgCl₂를 함유하였다.
- [0300] 인플루엔자 A, 인플루엔자 B 및 호흡기 세포 융합 바이러스 B 양성 샘플 3종 모두를 이들의 LoD의 3배로 재구성된 반응 혼합물 중에 조합하여, 재구성된 믹스의 모든 성분이 이들의 벌크 시약 농도의 약 80%가 되도록 하였다. 이들 양성 샘플을 수송 배지와 조합된 음성 혈장에서 바이러스를 추출하였고, 이것을 목적하는 농도로 연속희석하였다(RSVB 샘플 연속 희석이 10배로 감소된 것 제외). 표 6에 나타낸 바와 같이, 프라이머 및 프로브 믹스는 단일 분자 반응임에도 불구하고, 별개의 형광 채널에서 3종의 바이러스 표적, 즉, 인플루엔자 A, 인플루엔자 B, 또는 호흡기 세포 융합 바이러스 유형 B 각각을 특이적으로 검출하도록 설계되었다.
- [0301] 샘플을 실시간 PCR 호환성 열 사이클러(ABI 7500FAST, Applied Biosystems, 미국 캘리포니아 칼즈배드 소재)를 사용하여 분석하였다. 결과를 표 6에 나타낸다. 표의 양의 백분율 값은 시험된 12개의 샘플의 백분율로서 임계 값을 초과한 RFU 값을 갖는 샘플의 수를 나타낸다. 바이러스의 양(분석당 바이러스 입자)은 양성 대조군과 비교할 때 적어도 95양성 %을 제공하기에 충분한 양이었다.

표 6

표 6: 결과

조건	인플루엔자 A 양성 샘플에 대한 평균 RFU 양성의 수/양성 %	인플루엔자 B 양성 샘플에 대한 평균 RFU 양성의 수/양성 %	RSVB 양성 샘플에 대한 평균 RFU 양성의 수/양성 %
#1 벌크 시약 B 90 분 인큐베이션 얼음 상에서	602,587 12 중의 6/50%	303,112 12 중의 11/92%	320,017 12 중의 12/100%
#2 벌크 시약 A 90 분 인큐베이션 얼음 상에서	1,235,701 12 중의 12/100%	1,028,348 12 중의 12/100%	1,107,497 12 중의 12/100%
#3 벌크 시약 B 90 분 인큐베이션 실온	163,536 12 중의 4/33%	94,229 12 중의 11/92%	684,384 12 중의 12/100%
#4 벌크 시약 A 90 분 인큐베이션 실온	1,699,434 12 중의 12/100%	1,832,464 12 중의 12/100%	1,064,536 12 중의 12/100%
#5 벌크 시약 B 180 분 인큐베이션 얼음 상에서	576,226 12 중의 12/100%	530,568 12 중의 12/100%	1,048,669 12 중의 12/100%
#6 벌크 시약 A 180 분 인큐베이션 얼음 상에서	1,396,077 12 중의 12/100%	1,314,236 12 중의 12/100%	934,325 12 중의 12/100%
#7 벌크 시약 B 180 분 인큐베이션 실온	34,092(RLU 임계값 미만) 12 중의 0/0%	57,484 12 중의 3/25%	394,945 12 중의 12/100%
#8 벌크 시약 A 180 분 인큐베이션 실온	1,970,034 12 중의 12/100%	1,896,883 12 중의 12/100%	1,074,004 12 중의 12/100%

[0302]

[0303]

이러한 결과는, 벌크 시약(MgCl₂ 및 KCl이 없는 사전동결건조 용액)이 실온에서 적어도 180분 동안 안정적이었
다는 것을 나타낸다. 벌크 시약 A로부터의 건조된 SUD 펠릿은, 일단 재구성되고 샘플과 조합되면, 벌크 시약 B
로부터 건조된 SUD 펠릿에 의해서 제공된 것보다 더 강력한 증폭 및 검출 반응을 제공하였다. 벌크 시약 B는,
실온 또는 심지어는 얼음 상에서 90분 동안 인큐베이션되고, 이어서 건조 및 재구성되어 증폭 반응 혼합물을 생
성하는 경우, 동일한 조건 하에서 벌크 시약 A와 비교할 때 작은 부산물의 비교적 더 낮은 신호 및 풍부도를 갖
는 증폭 반응을 제공하였다. 무기 염을 거의 또는 전혀 함유하지 않는 벌크 시약은 중합효소 효소 성분, dNTP
및 핵산을 비롯한 증폭 반응을 위한 성분을 함유하는 건조 조성물을 생성하기 위한 건조에 유용하다.

[0304]

실시예 5. 염이 있거나 또는 없는 건조된 펠릿의 안정성

[0305]

본 실시예는 염을 함유하는 단일 단위 용량의 건조된 펠릿과 염을 함유하지 않는 단일 단위 용량의 건조된 펠릿
(6 mM 미만의 무기 염)의 안정성을 비교한다. 벌크 시약을 일반적으로 상기 표 5에 기술된 바와 같이 건조시킴
으로써 단일 단위 용량 펠릿을 제조하였다. 합성 직후, 벌크 시약 A 및 벌크 시약 B를 각각 별개의 멀티웰 반응
플레이트(12-웰)에 분취하고, 동결건조기를 사용하여 건조시켰다. 동결건조 후, 건조된 펠릿을 함유하는 멀티웰
플레이트를 약 5%의 상대 습도를 갖는 질소 기체 환경에 넣고, 웰 개구부를 포일로 덮어서 멀티웰 플레이트를
밀봉하였다. 밀봉된 플레이트를 건조제를 함유하는 알루미늄 파우치에 넣고, 파우치를 밀봉하였다. 멀티웰 플레
이트 내에 건조된 펠릿을 함유하는 밀봉된 파우치를 8일 동안 4°C에서 저장하였다.

[0306]

일 후, 파우치 내의 멀티웰 플레이트를 하기 3가지 조건 중 하나로 옮겼다: 조건 #1 - 벌크 시약 A로부터의 건
조된 펠릿을 함유하는 파우치 내의 멀티웰 플레이트의 1개의 하위세트 및 벌크 시약 B로부터의 건조된 펠릿을
함유하는 파우치 내의 멀티웰 플레이트의 1개의 하위세트를 파우치로부터 꺼내고, 70% 상대 습도를 갖는 15°C
환경에 두었음; 조건 #2 - 벌크 시약 A로부터의 건조된 펠릿을 함유하는 파우치 내의 멀티웰 플레이트의 1개의
하위세트 및 벌크 시약 B로부터의 건조된 펠릿을 함유하는 파우치 내의 멀티웰 플레이트의 1개의 하위세트를 파
우치로부터 꺼내고 15% 상대 습도를 갖는 45°C 환경에 두었음(가속 안정성); 및 조건 #3 - 벌크 시약 A로부터의

건조된 펠릿을 함유하는 파우치 내의 멀티웰 플레이트의 1개의 하위세트 및 벌크 시약 B로부터의 건조된 펠릿을 함유하는 파우치 내의 멀티웰 플레이트의 1개의 하위세트를 4°C에 두었음(멀티웰 플레이트는 건조제가 있는 파우치에 존재하였고, 따라서 습도는 0%였음). 플레이트를 이러한 조건에 30일 동안 추가로 두었다.

[0307] 인큐베이션의 종료 시에, 조건 각각으로부터의 건조된 펠릿을 2.5 mM의 최종 농도를 위해서 100 mM의 KCl 및 충분한 MgCl₂를 함유하는 재구성 용액을 사용하여 재구성하였다. 재구성된 반응 혼합물을 실시간 PCR 열 사이클러 (ABI PRISM 7000 / Applied Biosystems, 미국 캘리포니아 칼즈베드)를 사용하여 인플루엔자 A 표적의 증폭 및 검출에 대해서 시험하였다. 간략하면, 인플루엔자 A 표적을 대등한 액체 대조군과 함께 LOD 10⁰(+ / - 1 log)에서 음성 풀에서 추출하였다. 결과를 표 7에 나타낸다.

표 7

표 7

	평균 총 RFU(N = 4)
벌크 시약 A 4° C / 4° C	1,203,798
벌크 시약 B 4° C / 4° C	255,184
벌크 시약 A 4°C / 15°C	1,012,184
벌크 시약 B 4°C / 15°C	261,882
벌크 시약 A 4°C / 45°C	1,163,704
벌크 시약 B 4°C /45°C	382,725

[0308]

[0309] 이러한 결과는, 2.5 mM 미만의 무기 염을 함유하는 단일 증폭 반응의 건조된 펠릿이 2.5 mM 이상의 무기 염을 함유하는 단일 증폭 반응의 건조된 펠릿과 비교할 때 다수의 상이한 온도 및 습도 조건에서 저장 이후에 더 높은 RFU 값을 갖는다는 것을 보여준다.

[0310] **실시예 6. Cleavase® 효소 함유 벌크 시약의 동결건조**

[0311] 플랩 엔도뉴클레아제 Cleavase®를 함유하는 벌크 시약을 0.35%의 최종 글리세롤 농도를 함유하도록 제조하였다. 이 벌크 시약을 상기에 일반적으로 기술된 바와 같이 분취하고, 동결건조시켰다. 데이터는, 이러한 수준의 글리세롤 함량이 "멜트 백(melt back)"으로서 지칭되는 것을 유발함으로써 SUD 펠릿의 동결건조를 손상시킨다는 것을 나타내었다(데이터 나타내지 않음). 멜트 백은 일반적으로 동결건조된 생성물의 붕괴를 지칭한다. 멜트 백은 전형적으로 1차 건조 단계 동안 물질의 존재로부터 기인되며, 여기서 물질은 견고한 동결 건조된 조성물의 형성에 해롭다. 글리세롤은 그러한 물질 중 하나이다. 따라서, 20 kDa MWCO Slyde-A-Lyzer 카세트 시스템(ThermoFisher P/N#66005)을 사용하여 Cleavase® 효소(이것은 50% 글리세롤 완충제 중에 저장됨)를 글리세롤-무함유 완충제 중에서 투석함으로써 글리세롤-무함유 Cleavase® 및 실질적으로 무기 염이 없는 용액을 제조하였다. 투석 완충제 조성물을 표 8에 열거한다.

표 8

표 8: Cleavase® 투석 완충제 1 조성물

시약	농도
Tris	20 mM
트레할로스	200 mM
KCl	50 mM
EDTA	0.1 mM
pH	8.0

[0312]

[0313]

이러한 완충제 중에서의 Cleavase® 효소의 투석은 글리세롤을 제거하였고, 그것을 표 8에 나타난 완충제로 대체하였다. 이어서, 투석된 Cleavase® 효소를 사용하여 실질적으로 무기 염이 없는 글리세롤-무함유 벌크 시약을 제조하였다(표 9). 이어서, 벌크 시약을 멀티웰 플레이트의 웰 내에 다수의 SUD로서 분취하고, 동결건조시켰다. 모든 SUD 펠릿은 펠트 백의 어떠한 징후도 없이 동결건조되었다.

표 9

표 9: 1.25x 사전-동결건조 제형(버전 2 제형)

시약	공급원 및 P/N	스톡 농도	반응당 부피	최종 농도
GoTaq, 글리세롤-무함유 (1:10)	Promega X650X	5 U/μl 작업 스톡	0.67 μl	0.14 U/μl
Cleavase® 2.0, 투석됨	R&D	2.0 μg/μl	0.363 μl	0.03 μg/μl
10X dNTP	R&D	각각 2.5 mM	3.0 μl	각각 약 0.313 mM
10X 에스. 아우레우스 올리고 믹스	R&D	10X	3.0 μl	1X
MOPS 완충제, pH 7.5	J62839	500 mM	0.6 μl	12.5 mM
트레할로스	R&D	1.2 M	6.0 μl	0.3 M
물, MBG	H20MB0106	-	10.36 μl	-

올리고 믹스는 PCR 반응을 위한 프라이머, 및 절단 기반 검정 반응을 위한 제 1 프로브/제 2 프로브/FRET 카세트를 포함하였다. FRET 카세트를 각각 형광단 FAM, HEX, 또는 ROX 중 하나로 라벨링하였다.

[0314]

[0315]

스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) ("에스. 아우레우스")의 PCR 증폭 및 절단-기반 분석 검출을 위한 올리고뉴클레오티드를 함유하는 건조 조성물을 재구성 용액(스톡 재구성 용액은 9.375 mM의 MgCl₂, 0.02%(w/v)의 메틸 파라벤, 0.01%(w/v)의 프로필 파라벤, 0.33%(v/v)을 포함하였고, 물을 사용하여 총 부피를 1리터로 하였음)으로 채수화시켜 복수의 반응 마스터믹스를 생성하였다. 에스. 아우레우스 표적 DNA(양성) 또는 뉴클레아제 무함유 물(음성)을 첨가하여 재구성된 마스터믹스를 분리하고, 실리콘 오일을 위에 덮었다. 증폭 및 검출 분석을 Panther Fusion 열사이클러를 사용하여 수행하였다. 비-동결건조된 벌크 시약을 대조군으로서의 동결건조된 제형과 함께 시험하였다.

[0316]

하기 표 10의 결과는, 이러한 시험에서, 증폭 및 검출 시스템이 습식 믹스 대조군과 비교할 때 에스. 아우레우스 양성 샘플을 모든 3개의 채널에서 양성으로서, 그리고 음성 샘플을 모든 3개의 채널에서 음성으로서 성공적으로 증폭 및 검출할 수 있음을 나타낸다.

표 10

표 10: 벌크 시약 버전 2의 시험 - 동결건조된 대조군 대 비-동결건조된 대조군

포맷	샘플	FAM Ct	FAM RFU	HEX Ct	HEX RFU	ROX Ct	ROX RFU
비-동결건조된 대조군	음성	검출되지 않음	918	검출되지 않음	329	검출되지 않음	137
	양성	30.0	25,977	32.0	9,006	32.4	2,142
	양성	29.5	29,762	31.6	10,692	32.0	2,536
동결건조됨	음성	검출되지 않음	495	검출되지 않음	308	검출되지 않음	110
	양성	31.1	16,924	33.2	4,672	34.4	1,329
	양성	30.4	19,403	32.5	5,915	33.6	1,559

[0317]

[0318]

실시예 7. Cleavase® 사전-동결건조 제형 버전 3

[0319]

초고순도 비-아세틸화된 BSA를 포함하고, 완충제가 MOPS 완충제로부터 Tris 완충제로 변화된 에스. 아우레우스 사전-동결건조 제형의 수정된 버전을 제조하였다(표 11).

표 11

표 11: 2X MMA GoTaq 공급원을 사용한 1.25x 사전-동결건조된 제형(버전 3 제형)

시약	공급원 및 P/N	스톡 농도	사전-동결건조 반응당 부피	사전-동결건조 믹스 중의 최종 농도
GoTaq, 글리세롤-무함유, 2X 마스터믹스 A	Promega X991X	0.74 U/μl	4.75 μl	0.146 U/μl
Cleavase® 2.0, 투석됨	R&D	2.2 μg/μl	0.33 μl	0.03 μg/μl
BSA, 초고순도 비-아세틸화됨*	Ambion	50 μg/μl	0.20 μl	약 0.5 μg/μl
10X dNTP*	R&D	각각 2.5 mM	2.24 μl	각각 약 0.31 mM
10X 에스. 아우레우스 올리고 믹스	R&D	10X	3.0 μl	1X
Tris 완충제, pH 8.5 *	R&D	1.0 M	1.0 μl	약 50 mM
트레할로스 *	R&D	1.2 M	4.1 μl	0.3 M
물, MBG	H20MB0106	-	8.24 μl	-

* 표 11의 제형은 트레할로스, Tris 완충제, dNTP 및 비-아세틸화된 BSA가 보충되었다.

이러한 시약을 첨가하여 Promega 2X 마스터믹스 시약에 이미 포함된 물질을 보충하였다.

[0320]

[0321]

Promega X991X를 2X 마스터믹스로서 제형화하였는데, 이것은 1:1로 희석되는 경우 25 ul 반응 혼합물 중에 0.24 M의 트레할로스, 0.2 mM의 dNTP(0.4 mM의 dUTP), 및 9.25 U의 GoTaq, 뿐만 아니라 비-아세틸화된 BSA 및 Tris를 갖는 반응 혼합물을 산출할 것이다. 이러한 제형으로부터의 총 25개의 카트리지를 제조하였고, 성공적으로 동결건조되었다.

[0322]

증폭 및 검출 반응물을 제조하였고, 일반적으로 실시예 6에 상기에 기술된 바와 같이 수행하였다. MgCl₂의 농도를 증가시켜 재구성된 반응 혼합물 중에 12.5 mM의 MgCl₂를 제공한 것을 제외하고는, 동결건조된 펠릿을 실시예 6에 기술된 것과 유사한 재구성 용액을 사용하여 재구성하였다. 대조군으로서, 다수의 비-동결건조된 반응 혼합물을 제조하고, 시험하였다. 이러한 반응에서 사용된 에스. 아우레우스 표적 핵산은 100 카피/mL 및 1,000 카피/mL(이 표적에 대한 분석 LoD의 대략 3배)에서의 에스. 아우레우스 gDNA였다. 12.5 mM의 MgCl₂의 존재 하에서, Tris 완충 반응물은 에스. 아우레우스 양성 샘플에 대해서 연장된 Ct, 감소된 RFU 및 감소된 T-기울기 값을 나타내었다. 추가로, Tris 완충제 제형을 사용한 음성 샘플은 반응 혼합물 중의 MgCl₂ 농도에 관계 없이 10 mM MOPS 완충제 제형을 사용한 음성 샘플에 비해서 증가된 배경 생성을 나타내었다. 따라서, 이러한 결과를

기초로, MOPS 완충제는 벌크 제형에서의 사용에 이점을 제공하고, 최종 카트리지 제형 중에서 최대 약 15 mM의 농도로 사용될 수 있다.

[0323] 표 11에 나타난 제형을 추가로 변화시키고, 시험하였다. 11%의 트레할로스가 다양한 트레할로스/당/중합체 조합물로 치환된 일련의 벌크 시약으로서 제형 변화를 만들었다. 이러한 벌크 시약 제형은 하기 시약 조합물을 함유하였고, 상기에 기술된 바와 같이 동결건조시키고 시험하였다:

[0324] a) 3%의 트레할로스 / 1%의 10 kDa 폴리비닐 프로피렌.

[0325] b) 3%의 트레할로스 / 2%의 10 kDa 폴리비닐 프로피렌.

[0326] c) 3%의 트레할로스 / 3%의 10 kDa 폴리비닐 프로피렌.

[0327] d) 3%의 트레할로스 / 1%의 29 kDa 폴리비닐 프로피렌.

[0328] e) 3%의 트레할로스 / 2%의 29 kDa 폴리비닐 프로피렌.

[0329] f) 3%의 트레할로스 / 3%의 29 kDa 폴리비닐 프로피렌.

[0330] g) 3%의 트레할로스 / 1%의 55 kDa 폴리비닐 프로피렌.

[0331] h) 3%의 트레할로스 / 2%의 55 kDa 폴리비닐 프로피렌.

[0332] i) 3%의 트레할로스 / 3%의 55 kDa 폴리비닐 프로피렌.

[0333] j) 3%의 트레할로스 / 1%의 수크로스.

[0334] k) 3%의 트레할로스 / 2%의 수크로스.

[0335] l) 3%의 트레할로스 / 3%의 수크로스.

[0336] m) 11%의 트레할로스(대조군).

[0337] 조건 i) 및 대조군 조건 m)을 제외하고는, 모든 조합물은 양호하게 동결건조되었고, 어떠한 초기 붕괴도 나타내지 않았다. $t = 0$ 에서의 기능성 시험은 또한 조합물 a) 내지 m) 중 임의의 것에서 유의한 C_t 지연이 존재하지 않음을 나타내었다. 그러나, 37°C/95% RH에서의 가속 안정성 하에 존재하는 경우, 대조군 조건을 제외한 모든 조합물은 4일 후에 붕괴를 나타내었다. 11%의 트레할로스를 갖는 대조군 카트리지 14 내지 16일까지 37°C/95% RH에서 붕괴를 나타내지 않았다. 따라서, 11%를 함유하는 벌크 시약 제형이 사용 전에 동결건조된 펠릿의 장기간 저장에 적합하다.

[0338] **실시예 8. Cleavase® 사전-동결건조 제형 버전 4**

[0339] 샘플 투입 부피를 변경하는 것이 바람직하다. 적은 샘플 부피는 환자 샘플에 대한 다중 시험을 수용하는 데 유용하다. 210 ul 내지 420 ul의 샘플 투입 부피를 시험하였다. 적은 샘플 채취 부피에서 민감도를 유지시키기 위해서, PCR 반응에 사용된 용리액 부피를 5 ul에서 10 ul로 증가시켰다. 여분의 5 ul의 용리액 샘플은 반응 혼합물 중의 시약의 농도를 변화시킨다. 상이한 용리액 부피를 설명하기 위해서 벌크 시약에 대한 시약 농도를 조정하였다(표 13 참고).

[0340] 420 ul/5 ul 대 210 ul/10 ul 조건의 비교는 성능이 두 조건 모두에서 동등함을 나타내었다(표 12):

표 12

표 12: 420/5 µl 대 210/10 µl

% POS	CFU/mL	n	FAM Pos	HEX Pos	ROX Pos
대조군 (420/5)	0	12	0%	0%	0%
	100	18	0%	0%	78%
	400	18	0%	11%	100%
변형됨 (210/10)	100	18	0%	11%	78%
	400	18	0%	22%	100%
Ct	CFU/mL	n	FAM Pos	HEX Pos	ROX Pos
대조군 (420/5)	0	12	--	--	--
	100	18	--	--	39.8
	400	18	--	40.9	37.7
변형됨 (210/10)	100	18	--	40.0	39.3
	400	18	--	40.4	37.3
RFU	CFU/mL	n	FAM Pos	HEX Pos	ROX Pos
대조군 (420/5)	0	12	--	--	--
	100	18	--	--	1514
	400	18	--	9870	2030
변형됨 (210/10)	100	18	--	8893	1645
	400	18	--	3780	2169

[0341]

[0342]

용리액 부피를 5 µl에서 10 µl까지 증가시키면 30 µl의 총 반응 혼합물 부피(예: 20 µl 마스터 믹스 + 10 µl 용리액)를 제공하기 위해서 SUD 펠릿 농도가 "1.5x"로 변화되었다. 표 13은 부피 변화를 반영하고, 또한 Tris 완충제를 10 mM MOPS 완충제, pH 7.5로 대체한다.

표 13

표 13: MOPS 완충제를 갖는 1.5x 에스. 아우레우스 사전-동결건조 제형 버전 4

시약	공급원 및 P/N	스톡 농도	사전-동결건조 반응당 부피	사전-동결건조 믹스 중의 최종 농도
GoTaq, 글리세롤-무함유, 2X 마스터믹스 A	Promega X991X	0.74 U/µl	5.47 µl	0.1687 U/µl
Cleavase® 2.0, 투석됨	R&D	1.82 µg/µl	0.46 µl	0.035 µg/µl
BSA, 초고순도 비-아세틸화됨*	Ambion	50 µg/µl	0.24 µl	~0.509 µg/µl
10X dNTP*	R&D	각각 2.5 mM	2.73 µl	각각 약 0.375 mM
10X 에스. 아우레우스 올리고믹스	R&D	10X	3.6 µl	1X
EDTA/EGTA, 0.1M	101068	각각 0.1 M	0.036 µl	각각 0.15 mM
MOPS 완충제, pH 7.5	R&D	500 mM	0.72 µl	15 mM
트레할로스 *	R&D	1.2 M	5.01 µl	0.36 M
물, MBG	H20MB0106	-	5.77 µl	-

[0343]

*이러한 시약을 첨가하여 2X 마스터믹스 A 시약에 이미 포함된 물질을 보충한다.

[0344]

이러한 버전 4 제형은 보다 농축된 시약을 가져서 PCR 반응을 위해서 샘플 용리액 부피가 2배(5 µl → 10 µl)로 증가하는 것을 허용한다. 제형의 농도의 변화에 따라서, 제형의 견고성을 보장하기 위해서 새로운 유지 시간 연구를 수행하였다. 0일에, 액체 에스. 아우레우스 반응 혼합물을 상기 표 13에 따라서 제조하고, 3개의 분취물로 나누었다. 제1 분취물을 즉시 동결건조시켰고, 믹스의 제2 분취물을 2 내지 8°C에서 2일 저장 후에 동결건조시

켰고, 마지막 분취물을 2 내지 8℃에서 4일 저장 후에 동결건조시켰다. 생성된 카트리지를 밀봉하고, 기준선에 서 시험하였고(데이터 나타내지 않음), 또한 30℃/95% 상대 습도(RH)에서 4주 가속 안정성에 적용하였다. 조건 당 10회 반복으로, LoD(1,000 CFU/mL)의 0.5 log 초과에서 MRSA 세포 균주를 사용하여 시험을 수행하였다. 결과는, 이러한 제형이 LoD의 0.5 log 초과에서 MRSA를 검출할 수 있고, 동결건조 이전에 0 내지 4일의 보유 시간 및 동결건조 후 30℃/95% RH에서 최대 30일의 가속 안정성과 관련하여 견고성을 나타냄을 보여주었다.

[0345] 실시예 9

[0346] 알파-사이클로텍스트린을 동결건조될 조성물에 첨가하여 물질, 예컨대, SDS(이것은 포획된 핵산을 세척하는 데 사용될 수 있음)의 저해 효과를 상쇄시킬 수 있다. SDS의 일부는 핵산 용액 중에 남아있어서, 그 다음 핵산 증폭 및 검출 반응에 남아있을 것이다. 본 발명자들은 먼저 표 13의 것과 유사한 시뮬레이티드 비강액(Simulated Nasal Fluid: SNF)에서 1,000 CFU/ml로 에스. 아우레우스 세포(GP1822)를 사용하여 하기 차이를 갖는, 4가지 버전의 제형을 제조하였다: (1) 0 µg/µl의 사이클로텍스트린; (2) 0.1 µg/µl의 사이클로텍스트린; (3) 0.25 µg/µl의 사이클로텍스트린; 또는 (4) 0.5 µg/µl의 사이클로텍스트린. 시편을 Panther Fusion Instrument(P182) 상에서 가공하였다. 30%의 세척 완충제를 용리 완충제로 스파이킹하였다(즉, 정상 WB 캐리 오버 +30%). 이어서, 펠릿을 MRSA 표적 핵산의 증폭 및 검출을 위한 시험 반응에서 사용하였다. SDS를 이러한 증폭 반응에 첨가하지 않았다. 이 실험은, 혼합물에 사이클로텍스트린을 첨가하는 것이 펠릿을 사용하여 수행되는 핵산 반응에 영향을 미치는지의 여부를 결정한다. 표 14의 조건 1 내지 4에서 인지될 수 있는 바와 같이, ct 값은 시험 조건 각각에 대해서 실질적으로 동일하였는데, 이는 적어도 0.5 µg/µl의 사이클로텍스트린을 함유하는 펠릿의 성능에 부정적인 영향이 없음을 나타낸다.

[0347] 제1 실험 후에 표 13의 것과 유사한 4가지 버전의 제형을 다시 제조하였고, 이것은 (1) 0 µg/µl 사이클로텍스트린; (2) 0.1 µg/µl 사이클로텍스트린; (3) 0.25 µg/µl 사이클로텍스트린; 또는 (4) 0.5 µg/µl 사이클로텍스트린 중 하나를 함유하였다. 이어서, 생성된 펠릿을 MRSA 표적 핵산의 증폭 및 검출을 위한 시험 반응에서 사용하였다. 이러한 증폭 반응 세트에, SDS를 반응 혼합물 중의 30% v/v의 최종 농도로 첨가하였다. 증폭 및 검출 반응을 수행하였다. 표 14의 조건 5 내지 8에서 인지될 수 있는 바와 같이, SDS는 핵산 반응에 대해서 저해 효과를 갖는다(조건 5). 0.1 µg/µl의 사이클로텍스트린은 SDS의 저해를 거의 완전히 중화시켰고(조건 6), 0.25 µg/µl 및 0.5 µg/µl는 SDS의 저해를 완전히 중화시켰다(조건 7 및 조건 8).

표 14

표 14

	사이클로텍스트린-알파 농도	FAM				HEX			ROX			RED677		
		n	n pos	평균 Ct	Ct 표준 편차	n pos	평균 Ct	Ct 표준 편차	n pos	평균 Ct	Ct 표준 편차	n pos	평균 Ct	Ct 표준 편차
0% 세척 완충제	0 ug/ul	24	24	34.22	1.12	24	34.82	0.39	24	33.75	0.40	24	31.78	1.37
	0.10 ug/ul	24	24	34.18	0.61	24	35.03	0.42	24	33.86	0.48	24	31.6	0.92
	0.25 ug/ul	24	24	33.95	0.52	24	35.08	0.31	34	33.78	0.44	24	31.32	1.01
	0.50 ug/ul	24	24	33.79	0.32	24	34.88	0.28	24	33.73	0.39	24	31.18	0.36
30% 세척 완충제	0 ug/ul	24	0	-	-	24	39.79	1.84	24	37.97	2.44	20	37.86	4.30
	0.10 ug/ul	24	22	36.96	1.56	24	37.73	0.92	24	36.33	0.83	24	33.53	1.35
	0.25 ug/ul	24	24	35.00	2.24	24	35.43	0.31	24	34.56	0.30	24	32.06	1.22
	0.50 ug/ul	24	24	34.63	0.69	24	35.78	0.92	24	34.71	0.82	24	32.88	0.99

[0348]

[0349] 시뮬레이티드 비강액(SNF) 중의 1,000 CFU/mL에서 또한 에스. 아우레우스 세포(GP1822)를 사용하여 추가 데이터 세트를 시험하였다. 시편을 Panther Fusion Instrument(P368) 상에서 가공하였다. 30%의 세척 완충제를 용리 완충제로 스파이킹하였다(즉, 정상 WB 캐리 오버 +30%).

표 15

표 15

	사이클로텍스트린-알파 농도	FAM				HEX				ROX			RED677		
		n	n pos	평균 Ct	Ct 표준 편차	n pos	평균 Ct	Ct 표준 편차	n pos	평균 Ct	Ct 표준 편차	n pos	평균 Ct	Ct 표준 편차	
0% 세력 완충제	0.01 ug/ul	12	12	37.77	0.96	12	38.93	0.62	12	38.38	0.63	12	40.48	1.37	
	0.05 ug/ul	12	12	37.38	0.67	12	39.08	0.52	12	38.19	0.79	12	40.15	0.47	
	0.10 ug/ul	12	12	37.55	0.70	12	38.65	0.42	12	37.93	0.48	12	39.92	0.73	
	0.25 ug/ul	12	12	37.60	0.60	12	38.97	0.99	12	38.24	0.50	12	40.25	0.77	
	1.00 ug/ul	12	12	37.17	0.60	12	38.84	0.69	12	38.21	0.94	12	39.62	0.85	
	3.00 ug/ul	12	11	38.14	1.90	12	39.03	0.96	12	37.83	0.68	12	40.37	1.07	
30% 세력 완충제	5.00 ug/ul	12	12	37.19	0.60	12	38.71	0.73	12	38.00	1.07	12	39.67	0.82	
	0.01 ug/ul	12	3	43.33	1.34	11	43.09	0.91	11	41.13	1.71	5	46.70	1.59	
	0.05 ug/ul	12	7	42.77	3.09	12	42.70	0.90	12	40.85	1.31	9	46.57	4.30	
	0.10 ug/ul	12	11	40.84	1.21	12	42.38	0.67	12	40.39	0.43	12	44.95	1.82	
	0.25 ug/ul	12	12	39.81	0.69	12	42.33	0.92	12	40.14	0.69	12	42.98	1.31	
	1.00 ug/ul	12	12	38.20	0.64	12	40.18	0.54	12	39.23	0.34	12	41.17	0.93	
3.00 ug/ul	12	12	37.84	0.61	12	39.69	0.57	12	38.59	0.52	12	41.78	0.96		
5.00 ug/ul	12	12	37.43	0.50	12	39.43	0.40	12	38.54	0.56	12	41.31	0.95		

[0350]

[0351]

표는, 5.0 ug/ml 이하의 더 높은 농도의 사이클로텍스트린이 SDS를 중화시키는 데 효과적임을 보여준다.

[0352]

따라서, 제형, 예컨대, 표 13의 것은 사이클로텍스트린, 예를 들어, 0.1 내지 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 또는 0.1 내지 0.5의 사이클로텍스트린으로 보충될 수 있다.

[0353]

상기로부터, 구체적인 실시양태가 예시의 목적으로 본 명세서에 기술되어 있지만, 다양한 변형이 명시적인 본 개시내용의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않고 수행될 수 있음이 인지될 것이다. 따라서, 본 발명은 명시적인 본 개시내용에 의해서 제한되지 않는다. 문맥에서 달리 명백하지 않는 한, 임의의 실시양태, 특징, 양태 또는 단계가 임의의 다른 것과 조합하여 사용될 수 있다. 문맥에서 달리 명백하지 않는 한, 열거된 성분을 포함한다고 언급된 임의의 조성물은 또한 이들 성분으로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어질 수 있다. 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해서 전문이 참고로 포함된다.