



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0106487
(43) 공개일자 2017년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6816 (2013.01)
C12Q 2531/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7024505
(22) 출원일자(국제) 2016년02월02일
심사청구일자 2017년08월31일
(85) 번역문제출일자 2017년08월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/016233
(87) 국제공개번호 WO 2016/126746
국제공개일자 2016년08월11일
(30) 우선권주장
62/111,075 2015년02월02일 미국(US)

(71) 출원인
투 포어 가이즈, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 95060, 샌타 크루즈, #비, 텔라
웨어 애비뉴 2161
(72) 발명자
모린, 트레버, 제이.
미국, 캘리포니아 95060, 샌타 크루즈, #비, 텔라
웨어 애비뉴 2161, 투 포어 가이즈, 인코포레이티
드 사내
슈롭서, 타일러
미국, 캘리포니아 95060, 샌타 크루즈, #비, 텔라
웨어 애비뉴 2161, 투 포어 가이즈, 인코포레이티
드 사내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

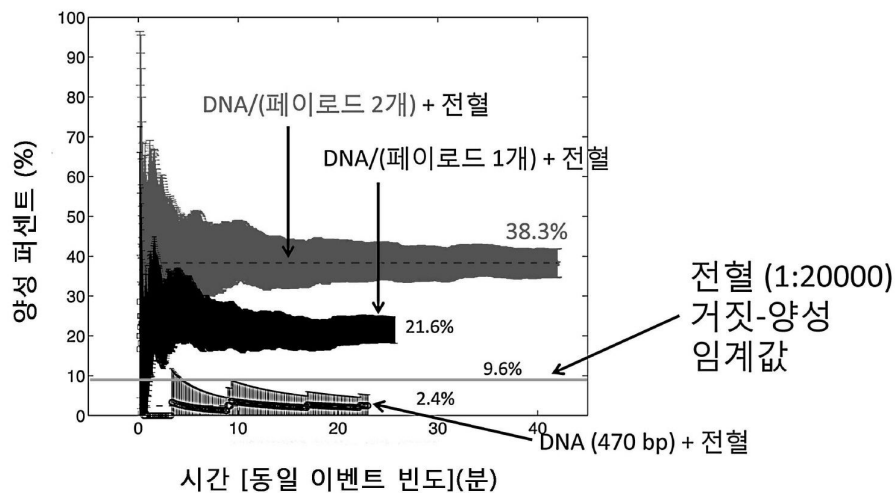
전체 청구항 수 : 총 100 항

(54) 발명의 명칭 시료 배경으로부터의 표적 폴리뉴클레오타이드의 나노포어 검출

(57) 요약

본 명세서에서는 표적 폴리뉴클레오타이드 증폭 및 나노포어 장치에서의 검출에 의해 혼합 시료 내의 표적 폴리뉴클레오타이드를 검출하기 위한 방법 및 조성물을 개시한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2563/131 (2013.01)

C12Q 2565/631 (2013.01)

(72) 발명자

던바, 윌리엄, 비.

미국, 캘리포니아 95060, 샌타 크루즈, #비, 텔라
웨어 애비뉴 2161, 투 포어 가이즈, 인코포레이티
드 사내

헬러, 대니얼, 에이.

미국, 캘리포니아 95060, 샌타 크루즈, #비, 텔라
웨어 애비뉴 2161, 투 포어 가이즈, 인코포레이티
드 사내

왕, 홍연

미국, 캘리포니아 95060, 샌타 크루즈, #비, 텔라
웨어 애비뉴 2161, 투 포어 가이즈, 인코포레이티
드 사내

명세서

청구범위

청구항 1

시료 내에 존재하는 것으로 의심되는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 검출하는 방법으로서,

프라이머 세트를 제공하는 단계로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있으며 상기 프라이머 중 적어도 하나는 페이로드 분자(payload molecule)에 특이적으로 결합할 수 있는 접합 부위(conjugation site)를 포함하도록 개질되는 단계;

상기 시료에 대해 증폭 반응을 수행하는 단계로서, 상기 시료는 상기 증폭 반응에 의해 생성된 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 앰플리콘이 상기 접합 부위를 포함하도록 상기 프라이머 세트 및 증폭 시약을 포함하는 단계;

상기 페이로드 분자를 상기 접합 부위에 결합시키는 단계;

나노포어를 포함하는 장치에 상기 시료를 탑재하는 단계로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하고, 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과 시키도록 상기 장치를 구성하고, 상기 장치는 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 구성된 센서를 각 포어에 대해 포함하는 단계; 및

상기 페이로드 분자에 결합된 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 나노포어를 통과했는지 여부를 상기 센서로부터의 데이터를 사용하여 측정함으로써 상기 시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열이 존재하는지 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 시료 내에 존재하는 것으로 의심되는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 검출하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 시료가 상기 증폭 이전에 상기 장치에 탑재되는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 시료는 상기 증폭 이후에 상기 장치에 탑재되는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 페이로드 분자는 상기 증폭 이후에 상기 앰플리콘의 상기 접합 부위에 결합되는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 페이로드 분자는 상기 증폭 이전에 상기 프라이머의 상기 접합 부위에 결합되는 방법.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 상기 증폭과 상기 나노포어에서의 검출 사이에 정제 단계를 거치지 않는 방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 1:20000 이상, 1:10000 이상, 1:5000 이상, 1:2000 이상, 1:1000 이상, 1:500 이상, 1:200 이상, 1:100 이상, 1:50 이상, 1:20 이상, 1:10 이상, 1:5 이상, 1:2 이상, 1:1.5 이상, 1:1.2 이상, 1:1.1 이상 또는 1:1.05 이상으로 희석되어 상기 나노포어 장치에 탑재되는 방법.

청구항 8

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 희석 없이 상기 나노포어 장치에 탑재되는 방법.

청구항 9

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 비표적(non-target) 폴리뉴클레오티드 및 증폭 반응 시약을 포함하는 방법.

청구항 10

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노포어는 직경이 5 nm 이상, 10 nm 이상, 20 nm 이상, 30 nm 이상, 40 nm 이상 또는 50 nm 이상인 방법.

청구항 11

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 반응은 중합 효소 연쇄 반응(PCR), 역전사 PCR, 라이게이션 매개된 PCR(ligation mediated PCR), 루프 매개된 증폭(loop mediated amplification)(LAMP), 등온 증폭, 가닥 치환 증폭(SDA), 다중 치환 증폭, 가닥 치환 증폭, 헬리카제 의존 증폭(helicase dependent amplification), 절단 효소 증폭 반응(nicking enzyme amplification) 또는 재조합 중합 효소 증폭(recombinant polymerase amplification)으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 12

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 반응은 상기 장치의 내부 공간에서 수행되는 방법.

청구항 13

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 디옥시리보핵산(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 펩타이드 핵산(PNA), 단일 가닥 리보핵산(ssRNA), DNA/RNA 혼성체 또는 이중 가닥 리보핵산(dsRNA)인 방법.

청구항 14

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 자연 발생 폴리뉴클레오티드인 방법.

청구항 15

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 인위적으로 합성된 폴리뉴클레오티드인 방법.

청구항 16

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 재조합 폴리뉴클레오티드인 방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드 분자는 덴드리머(dendrimer), 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA, DNA 앵타머(DNA aptamer), 형광 발색단, 단백질, 항체, 폴리펩타이드, 나노비드(nanobead), 나노로드(nanorod), 나노튜브(nanotube), 나노 입자(nanoparticle), 풀러렌, PEG 분자, 리포솜 또는 콜레스테롤-DNA 혼성체로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 18

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드 분자는 전하를 포함하는 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 하전된 페이로드 분자는 펩타이드, 아미노산, 하전된 나노 입자, 합성 분자, 뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 금속 또는 이온으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 20

제 18항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 하전된 페이로드 분자와 결합하는 경우, 상기 표적 폴리

뉴클레오타이드의 존재 유무에 대한 검출 민감도 또는 특이성이 결합하지 않은 표적 폴리뉴클레오타이드에 비해 증가하는 방법.

청구항 21

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드가 상기 페이로드 분자와 결합하는 경우, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 존재 유무에 대한 검출 민감도 또는 특이성이 결합하지 않은 표적 폴리뉴클레오타이드에 비해 증가하는 방법.

청구항 22

1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센서는, 상기 두 용적 사이에 전압차를 인가하고, 전류 이벤트 신호(event signature)를 생성하면서 상기 두 용적을 분리하는 상기 나노포어를 통과하는 전류 흐름을 측정하도록 구성된 전극 쌍을 포함하는 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 상기 페이로드-결합된 표적 폴리뉴클레오타이드가 상기 나노포어를 통과할 때 생성되는 전류 이벤트 신호는 평균 깊이, 최대 깊이, 지속 시간, 깊이 레벨의 갯수, 깊이 및 지속 시간의 면적 또는 노이즈 레벨에 있어 배경 분자(background molecule)의 전류 이벤트 신호와 구별되는 방법.

청구항 24

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합 부위 및 상기 페이로드 분자가 공유 결합을 통해 결합되는 방법.

청구항 25

제 24항에 있어서, 상기 공유 결합이 클릭 화학(click chemistry)에 의해 형성되는 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, 상기 클릭 화학이 구리에 의해 촉진되는 방법.

청구항 27

제 25항에 있어서, 상기 클릭 화학에는 구리가 존재하지 않는 방법.

청구항 28

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합 부위 및 상기 페이로드 분자가 비공유 결합을 통해 결합되는 방법.

청구항 29

제 28항에 있어서, 상기 비공유 결합은 수소 결합, 이온 결합, 반데르발스 상호 작용, 소수성 상호 작용, 극성 결합, 양이온 π 상호 작용, 평면 적층 상호 작용(planar stacking interaction) 또는 금속 결합인 방법.

청구항 30

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합 부위가 상기 프라이머의 3' 또는 5' 말단에 위치하는 방법.

청구항 31

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합 부위가 상기 앰플리콘의 3' 또는 5' 말단에 위치하는 방법.

청구항 32

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합 부위가 화학기, 반응기, 소분자 또는 펩타이드를 포함

하는 방법.

청구항 33

제 32항에 있어서, 상기 소분자가 비오틴(biotin)을 포함하는 방법.

청구항 34

제 32항에 있어서, 상기 반응기가 디벤조시클로옥틸(DBCO) 또는 아지드(azide)를 포함하는 방법.

청구항 35

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 페이로드 분자가 상기 앰플리콘에 결합되는 방법.

청구항 36

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장치가 2개 이상의 나노포어를 직렬로 포함하고, 상기 페이로드 분자에 결합된 상기 앰플리콘은 이동 중에 상기 2개 이상의 나노포어 내에 동시에 존재하는 방법.

청구항 37

시료에 존재하는 것으로 의심되는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 검출하는 방법으로서,

프라이머 세트를 제공하는 단계로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있으며 상기 프라이머 중 적어도 하나는 페이로드 분자에 결합하는 단계;

상기 시료에 대해 증폭 반응을 수행하는 단계로서, 상기 시료는 상기 증폭 반응에 의해 생성된 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 앰플리콘이 상기 페이로드 분자와 결합하도록 상기 프라이머 세트 및 증폭 시약을 포함하는 단계;

나노포어를 포함하는 장치에 상기 시료를 탑재하는 단계로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하고, 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과시키도록 상기 장치를 구성하고, 상기 장치는 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 구성된 센서를 각 포어에 대해 포함하는 단계; 및

상기 페이로드 분자에 결합된 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 나노포어를 통과했는지 여부를 상기 센서로부터의 데이터를 사용하여 측정함으로써 상기 시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열이 존재하는지 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 시료 내에 존재하는 것으로 의심되는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 검출하는 방법.

청구항 38

제 37항에 있어서, 상기 시료가 상기 증폭 이전에 상기 장치에 탑재되는 방법.

청구항 39

제 37항에 있어서, 상기 시료는 상기 증폭 이후에 상기 장치에 탑재되는 방법.

청구항 40

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 상기 증폭과 상기 나노포어에서의 검출 사이에 정제 단계를 거치지 않는 방법.

청구항 41

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 1:10000, 1:1000, 1:500, 1:200, 1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1.5, 1:1.2, 1:1.1 또는 1:1.05로 희석되어 상기 나노포어 장치에 탑재되는 방법.

청구항 42

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 희석 없이 상기 나노포어 장치에 탑재되는 방법.

청구항 43

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 비표적 폴리뉴클레오티드 및 증폭 반응 시약을 포함하는 방법.

청구항 44

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노포어는 직경이 5 nm 이상, 10 nm 이상, 20 nm 이상, 30 nm 이상, 40 nm 이상 또는 50 nm 이상인 방법.

청구항 45

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 반응은 중합 효소 연쇄 반응(PCR), 역전사 PCR, 라이게이션 매개된 PCR, 루프 매개된 증폭(LAMP), 등온 증폭, 가닥 치환 증폭(SDA), 다중 치환 증폭, 가닥 치환 증폭, 헬리카제 의존 증폭, 절단 효소 증폭 반응 또는 재조합 중합 효소 증폭로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 46

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 반응은 상기 장치의 내부 공간에서 수행되는 방법.

청구항 47

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 디옥시리보핵산(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 펩타이드 핵산(PNA), 단일 가닥 리보핵산(ssRNA), DNA/RNA 혼성체 또는 이중 가닥 리보핵산(dsRNA)인 방법.

청구항 48

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 자연 발생 폴리뉴클레오티드인 방법.

청구항 49

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 인위적으로 합성된 폴리뉴클레오티드인 방법.

청구항 50

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 재조합 폴리뉴클레오티드인 방법.

청구항 51

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드 분자는 덴드리머, 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA, DNA 앵커, 형광 발색단, 단백질, 항체, 폴리펩티드, 나노비드, 나노로드, 나노튜브, 나노 입자, 폴러렌, PEG 분자, 리포솜 또는 콜레스테롤-DNA 혼성체로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 52

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드 분자는 이온 전하를 포함하는 방법.

청구항 53

제 52항에 있어서, 상기 하전된 페이로드 분자는 펩타이드, 아미노산, 하전된 나노 입자, 합성 분자, 뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 금속 또는 이온으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 54

제 52항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 하전된 페이로드 분자와 결합하는 경우, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 존재 유무에 대한 검출 민감도 또는 특이성이 결합하지 않은 표적 폴리뉴클레오티드에 비해 증가하는 방법.

청구항 55

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 페이로드 분자와 결합하는 경우, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 존재 유무에 대한 검출 민감도 또는 특이성이 결합하지 않은 표적 폴리뉴클레오티드에 비해 증가하는 방법.

청구항 56

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센서는, 상기 두 용적 사이에 전압차를 인가하고, 전류 이벤트 신호를 생성하면서 상기 두 용적을 분리하는 상기 나노포어를 통과하는 전류 흐름을 측정하도록 구성된 전극 쌍을 포함하는 방법.

청구항 57

제 56항에 있어서, 상기 페이로드-결합된 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 나노포어를 통과할 때 생성되는 전류 이벤트 신호는 평균 깊이, 최대 깊이, 지속 시간, 깊이 레벨의 갯수, 깊이 및 지속 시간의 면적 또는 노이즈 레벨에 있어 배경 분자의 전류 이벤트 신호와 구별되는 방법.

청구항 58

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프라이머 및 상기 페이로드 분자가 공유 결합을 통해 결합되는 방법.

청구항 59

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프라이머 및 상기 페이로드 분자가 비공유 결합을 통해 결합되는 방법.

청구항 60

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페이로드 분자가 상기 프라이머의 3' 또는 5' 말단에 결합하는 방법.

청구항 61

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 두 개 이상의 페이로드 분자가 상기 프라이머에 결합하는 방법.

청구항 62

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 앰플리콘 및 상기 페이로드 분자가 공유 결합을 통해 결합되는 방법.

청구항 63

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 앰플리콘 및 상기 페이로드 분자가 비공유 결합을 통해 결합되는 방법.

청구항 64

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 페이로드 분자가 상기 앰플리콘에 결합되는 방법.

청구항 65

제 37항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장치는 2개 이상의 나노포어를 직렬로 포함하고, 상기 페이로드 분자에 결합된 상기 앰플리콘은 이동 중에 상기 2개 이상의 나노포어 내에 동시에 존재하는 방법.

청구항 66

시료에 존재하는 것으로 의심되는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 검출하는 방법으로서, 프라이머 세트를 제공하는 단계로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함

하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있는 단계;

상기 시료에 대해 증폭 반응을 수행하는 단계로서, 상기 시료는 상기 증폭 반응에 의해 생성된 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 앰플리콘이 100개 이상의 염기 쌍 길이를 갖도록 상기 프라이머 세트 및 증폭 시약을 포함하는 단계;

나노포어를 포함하는 장치에 상기 시료를 탑재하는 단계로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하고, 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과 시키도록 상기 장치를 구성하고, 상기 장치는 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 구성된 센서를 각 포어에 대해 포함하는 단계; 및

상기 페이로드 분자에 결합된 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 나노포어를 통과했는지 여부를 상기 센서로부터의 데이터를 사용하여 측정함으로써 상기 증폭된 시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열이 존재하는지 여부를 검출하는 단계로서, 상기 증폭된 시료는 정제되지 않은 단계를 포함하는, 시료에 존재하는 것으로 의심되는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 검출하는 방법.

청구항 67

제 66항에 있어서, 상기 시료가 상기 증폭 이전에 상기 장치에 탑재되는 방법.

청구항 68

제 66항에 있어서, 상기 시료가 상기 증폭 이후에 상기 장치에 탑재되는 방법.

청구항 69

제 66항에 있어서, 상기 앰플리콘의 길이는 200개 이상, 500개 이상, 1,000개 이상, 2,000개 이상, 5,000개 이상 또는 10,000개 이상의 염기쌍인 방법.

청구항 70

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 상기 증폭과 상기 나노포어에서의 검출 사이에 정제 단계를 거치지 않는 방법.

청구항 71

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 1:10000, 1:1000, 1:500, 1:200, 1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1.5, 1:1.2, 1:1.1 또는 1:1.05로 희석되어 상기 나노포어 장치에 탑재되는 방법.

청구항 72

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 희석 없이 상기 나노포어 장치에 탑재되는 방법.

청구항 73

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 비표적 폴리뉴클레오티드 및 증폭 반응 시약을 포함하는 방법.

청구항 74

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노포어는 직경이 2 nm 이상, 3 nm 이상, 5 nm 이상, 10 nm 이상, 20 nm 이상, 30 nm 이상, 40 nm 이상 또는 50 nm 이상인 방법.

청구항 75

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 반응은 중합 효소 연쇄 반응 (PCR), 역전사 PCR, 라이게이션 매개된 PCR, 루프 매개된 증폭, 등온 증폭, 가닥 치환 증폭(SDA) 다중 치환 증폭, 가닥 치환 증폭, 헬리카제 의존 증폭, 절단 효소 증폭 반응, 재조합 중합 효소 증폭, 루프 매개된 등온 증폭 (LAMP), 자가유지 서열 복제(self-sustained sequence replication), 전체 게놈 증폭(whole genome amplification) 또는 리가아제 매개된 PCR(ligase mediated PCR)로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 76

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 반응이 상기 장치의 내부 공간에서 수행되는 방법.

청구항 77

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 이중 가닥 디옥시리보핵산(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), DNA/RNA 혼성체, 펩타이드 핵산(PNA), 단일 가닥 리보핵산(ssRNA) 또는 이중 가닥 리보핵산(dsRNA)을 포함하는 방법.

청구항 78

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 자연 발생 폴리뉴클레오티드인 방법.

청구항 79

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 인위적으로 합성된 폴리뉴클레오티드인 방법.

청구항 80

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 재조합 폴리뉴클레오티드인 방법.

청구항 81

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 센서는, 상기 두 용적 사이에 전압차를 인가하고, 전류 이벤트 신호를 생성하며 상기 두 용적을 분리하는 상기 나노포어를 통과하는 전류 흐름을 측정하도록 구성된 전극 쌍을 포함하는 방법.

청구항 82

제 81항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 나노포어를 통과할 때 생성되는 전류 이벤트 신호가 평균 깊이, 최대 깊이, 지속 시간, 깊이 레벨의 갯수, 깊이 및 지속 시간의 면적 또는 노이즈 레벨에 있어 배경 분자의 전류 이벤트 신호와 구별되는 방법.

청구항 83

제 66항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장치가 2개 이상의 나노포어를 직렬로 포함하고, 상기 염 플리콘은 이동 중에 상기 2개 이상의 나노포어 내에 동시에 존재하는 방법.

청구항 84

키트(kit)로서,

나노포어를 포함하는 장치로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하며, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과시키도록 구성되며, 상기 장치는 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 구성된 센서를 각 포어에 대해 포함하는 장치;

프라이머 세트로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있으며 상기 프라이머 중 적어도 하나는 페이로드 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 접합 부위를 포함하도록 개질된 프라이머 세트;

증폭 이전, 도중 또는 이후에 상기 접합 부위에 결합하기 위한 페이로드 분자; 및

시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 존재하는지 여부를 검출하기 위한 사용 설명서를 포함하는 키트.

청구항 85

키트로서,

나노포어를 포함하는 장치로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하며, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과시키도록 구성되며, 상기 장치는 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 구성된 센서를 각 포어에 대해 포함하는, 장치;

프라이머 세트로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있으며 상기 프라이머 중 적어도 하나는 페이로드 분자에 결합하는 프라이머 세트; 및

시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 존재하는지 여부를 검출하기 위한 사용 설명서를 포함하는 키트.

청구항 86

키트로서,

나노포어를 포함하는 장치로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하며, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과시키도록 구성되며, 상기 장치는 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 구성된 센서를 각 포어에 대해 포함하는 장치;

프라이머 세트로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있으며 상기 프라이머는 증폭 반응 동안 100개 이상, 200개 이상, 500개 이상, 1,000개 이상, 2,000개 이상, 5,000개 이상 또는 10,000개 이상의 염기쌍의 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 앰플리콘을 생성하는 프라이머 세트; 및

시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 존재하는지 여부를 검출하기 위한 사용 설명서를 포함하는 키트.

청구항 87

시료 내에 존재하는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 양을 정량하는 방법으로서,

양을 알고 있는 대조군 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대조군 시료 및 미지의 양의 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 실험 시료를 제공하는 단계;

상기 대조군 시료를 증폭시켜 상기 대조군 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제 1 앰플리콘을 생성하고 상기 실험 시료를 증폭시켜 상기 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제 2 앰플리콘을 생성하는 단계;

상기 대조군 시료 및 상기 실험 시료를 나노포어를 포함하는 장치에 별도로 탑재하는 단계로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하고, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 제 1 또는 제 2 앰플리콘을 통과시키도록 구성되며, 상기 장치는 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 구성된 센서를 각 포어에 대해 포함하는 것인 단계; 및

상기 실험 시료 내의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 양을 정량하기 위하여 상기 나노포어에서의 상기 제 1 앰플리콘의 포집률을 상기 나노포어에서의 상기 제 2 앰플리콘의 포집률과 비교하는 단계를 포함하는, 시료 내에 존재하는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 양을 정량하는 방법.

청구항 88

제 87항에 있어서, 상기 증폭은 상기 대조군 시료 또는 상기 실험 시료를 상기 장치에 탑재한 이후에 수행되는 방법.

청구항 89

제 87항에 있어서, 상기 대조군 시료 및 상기 실험 시료가 동일한 조건 하에서 증폭되는 방법.

청구항 90

제 87항에 있어서, 상기 대조군 폴리뉴클레오티드 및 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 동일한 길이 또는 서열을 갖는 방법.

청구항 91

제 87항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 앰플리콘의 포집률은 동일한 조건 하에서 동일한 나노포어를 사용하여 측정되는 방법.

청구항 92

제 87항에 있어서, 상기 제 1 및 제 2 앰플리콘의 포집물은 유사한 크기의 나노포어를 사용하여 측정되는 방법.

청구항 93

제 87항에 있어서, 상기 실험 시료 내의 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 농도 추정치는 상기 대조군 시료 및 상기 실험 시료에 대해 시간에 따라 기록된 센서 측정치 세트를 종합하고 상기 두 세트의 데이터를 비교하여 포집물을 농도로 변환함으로써 수학적으로 생성되는 방법.

청구항 94

제 87항에 있어서, 증폭 반응 내의 각 사이클 이후, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 농도 추정치가 상기 대조군 시료 및 상기 실험 시료에 대해 시간에 따라 기록된 센서 측정치 세트를 종합하고 상기 두 세트의 데이터를 비교하여 포집물을 농도로 변환함으로써 수학적으로 생성되는 방법.

청구항 95

제 94항에 있어서, 상기 센서 측정치 비교에 근거하여 증폭 전의 상기 실험 시료 내의 표적 폴리뉴클레오티드의 양을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 96

시료 내에 존재하는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 양을 정량하는 방법으로서,

양을 알고 있는 대조군 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대조군 시료 및 미지의 양의 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 실험 시료를 제공하는 단계;

2개 이상의 다른 알려진 농도의 상기 대조군 폴리뉴클레오티드를 생성하도록 상기 대조군 시료를 희석하는 단계;

상기 2개 이상의 다른 알려진 농도의 상기 대조군 폴리뉴클레오티드의 상기 대조군 시료를 나노포어를 포함하는 장치에 탑재하는 단계로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하고, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 대조군 폴리뉴클레오티드를 통과시키도록 구성되며, 상기 장치는 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 구성된 센서를 각 포어에 대해 포함하는 것인 단계;

상기 2개 이상의 다른 알려진 농도의 상기 대조군 폴리뉴클레오티드 각각에 대해 상기 나노포어에서의 포집물을 검출하는 단계;

상기 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 앰플리콘을 생성하도록 상기 실험 시료를 증폭시키는 단계;

상기 실험 시료를 상기 나노포어를 포함하는 장치에 탑재하는 단계;

상기 나노포어에서의 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 포집물을 검출하는 단계; 및

상기 나노포어에서의 상기 제 1 앰플리콘의 포집물을 상기 나노포어에서의 상기 제 2 앰플리콘의 포집물과 비교하여 상기 실험 시료 내의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 양을 정량하는 단계를 포함하는, 시료 내에 존재하는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 양을 정량하는 방법.

시료 내에 존재하는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 양을 정량하는 방법

청구항 97

제 96항에 있어서, 상기 희석이 연속 희석인 방법.

청구항 98

제 96항에 있어서, 상기 대조군 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 99

제 96항에 있어서, 상기 희석이 상기 대조군 시료를 상기 장치에 탑재한 이후에 수행되는 방법.

청구항 100

제 96항에 있어서, 상기 증폭이 상기 실험 시료를 상기 장치에 탑재한 이후에 수행되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 2월 2일 출원된 미국 가출원 제 62/111,075호에 대한 우선권을 주장하며, 이 출원의 내용은 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.

배경 기술

[0003] 핵산 검사(nucleic acid testing)는 유기체의 게놈 및 기타 생화학적 기관(biochemical machinery)의 특정 핵산 서열 또는 일부를 검출하며, 병원균 검출, 유전자 돌연변이 분석, 질병 스크리닝(disease screening) 및 이식 유전자 스크리닝(transgene screening)을 포함한 광범위한 분야에서 유용성을 갖는다. 핵산 검사의 방법 중 하나는 DNA의 일부를 증폭하여 복수의 앰플리콘(amplicons)(즉, DNA 표적 클론)을 생성하여 핵산 표적의 존재 및/또는 양에 대한 정보를 획득하는 것이다. 이는 예를 들어, 유기체가 존재하는 것으로 간주되는지(예를 들어, 바이러스), 유전자가 돌연변이되었는지, 또는 유전자가 발현되었는지 여부를 측정하기 위해 사용될 수 있다. 일반적인 핵산 검사 방법은 증폭된 DNA의 광학적 검출에 의존한다. 이는 현장 현시 검사(point-of-care testing)가 필요한 경우 장치의 이동성을 제한할 수 있다. 또한, 광학적 검출 방법은 기기 비용 및 복잡성을 수반하는 경우가 많다. 최신 기술들에서는 훨씬 간단하면서도 화학적 성질이 없는 검출 방법인 전기화학적 감지 또는 전기적 감지를 사용함으로써 이러한 문제를 완화시키고 있다. 불행하게도, 이러한 기술은 높은 제조 비용 및 기기의 낮은 수율로 인해 상업적 실행 가능성이 높지 않다. 따라서, 신속하고 간단하며 정확하면서도, 고가이거나 시간 소모적인 광학적 또는 화학적 검출을 필요로 하지 않으면서 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 강력하게 검출하기 위한 방법, 장치 및 조성물이 요구된다.

발명의 내용

[0004] 본 명세서에 개시된 다양한 양태는 진술한 필요성 중 하나 이상을 충족시킬 수 있다. 본 명세서에 기재된 시스템 및 방법은 각각 다수의 양태를 가지며, 그 중 하나만이 단독으로 그 바람직한 속성을 담당하지는 않는다. 이하 주요한 특징들을 간략하게 기재할 것이나, 후술되는 청구항에 기재된 바와 같은 본 발명의 범위가 이로 인해 제한되는 것은 아니다. 아래의 기재를 참고함으로써, 특히 "발명의 상세한 설명"(또는 발명의 설명) 부분을 참고함으로써, 본 명세서에 기재된 예시적인 특징들이 어떠한 방식으로 개선된 시스템 및 방법을 제공하는지가 이해될 것이다.

[0005] 일부 실시형태에서, 본원은 시료 내에 표적 분자 또는 조건이 존재하는지 여부를 전기적으로 검출하기 위한 방법, 조성물 및 장치를 제공한다.

[0006] 일부 실시형태에서, 본원은 시료 내에 존재하는 것으로 의심되는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 검출하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 프라이머 세트를 제공하는 단계로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있으며, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 페이로드 분자(payload molecule)에 특이적으로 결합할 수 있는 접합 부위(conjugation site)를 포함하도록 개질된 것인 단계; 상기 시료에 대해 증폭 반응을 수행하는 단계로서, 상기 증폭 반응에 의해 생성된 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 앰플리콘이 상기 접합 부위를 포함하도록 상기 시료는 상기 프라이머 세트 및 증폭 시약을 포함하는 것인 단계; 상기 페이로드 분자를 상기 접합 부위에 결합시키는 단계; 나노포어를 포함하는 장치에 상기 시료를 탑재(로딩)하는 단계로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하는 것이고, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과시키도록 설정(구성)된 것이며, 상기 장치는 각 포어에 대한 센서로서 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 설정(구성)된 센서를 포함하는 것인 단계; 및 상기 페이로드 분자에 결합된 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 나노포어를 통과했는지 여부를 상기 센서로부터의 데이터를 사용하여 측정함으로써 상기 시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열이 존재하는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다.

[0007] 일부 실시형태에서, 상기 시료는 상기 증폭 이전에 상기 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 상

기 증폭 이후에 상기 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 페이로드 분자는 상기 증폭 이후에 상기 앰플리콘의 상기 접합 부위에 결합된다. 일부 실시형태에서, 상기 페이로드 분자는 상기 증폭 이전에 상기 프라이머의 상기 접합 부위에 결합된다.

[0008] 일부 실시형태에서, 상기 시료는 상기 증폭과 상기 나노포어에서의 검출 사이에 정제 단계를 거치지 않는다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 1:20000 이상, 1:10000 이상, 1:5000 이상, 1:2000 이상, 1:1000 이상, 1:500 이상, 1:200 이상, 1:100 이상, 1:50 이상, 1:20 이상, 1:10 이상, 1:5 이상, 1:2 이상, 1:1.5 이상, 1:1.2 이상, 1:1.1 이상 또는 1:1.05 이상으로 희석되어 상기 나노포어 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 희석 없이 상기 나노포어 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 비표적(non-target) 폴리뉴클레오타이드 및 증폭 반응 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 나노포어는 직경이 5 nm 이상, 10 nm 이상, 20 nm 이상, 30 nm 이상, 40 nm 이상 또는 50 nm 이상이다.

[0009] 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응은 중합 효소 연쇄 반응(PCR), 역전사 PCR, 라이게이션 매개 PCR(ligation mediated PCR), 루프 매개 증폭(loop mediated amplification)(LAMP), 등온 증폭(isothermal amplification), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)(SDA) 다중 치환 증폭(multiple displacement amplification), 가닥 치환 증폭, 헬리카제 의존 증폭(helicase dependent amplification), 절단 효소 증폭 반응(nicking enzyme amplification) 또는 재조합 중합 효소 증폭(recombinant polymerase amplification)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응은 상기 장치의 내부 공간에서 수행된다.

[0010] 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드는 이중 가닥 디옥시리보핵산(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 펩타이드 핵산(PNA), 단일 가닥 리보 핵산(ssRNA), DNA/RNA 혼성체 또는 이중 가닥 리보핵산(dsRNA)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드는 자연 발생 폴리뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드는 인위적으로 합성된 폴리뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드는 재조합 폴리뉴클레오타이드이다.

[0011] 일부 실시형태에서, 상기 페이로드 분자는 덴드리머(dendrimer), 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA, DNA 앵타머(DNA aptamer), 형광 발색단, 단백질, 항체, 폴리펩타이드, 나노비드(nanobead), 나노로드(nanorod), 나노튜브(nanotube), 나노 입자, 폴리렌, PEG 분자, 리포솜 또는 콜레스테롤-DNA 혼성체로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0012] 일부 실시형태에서, 상기 페이로드 분자는 전하를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 하전된 페이로드 분자는 펩타이드, 아미노산, 하전된 나노 입자, 합성 분자, 뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드, 금속 또는 이온으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드가 상기 하전된 페이로드 분자와 결합하는 경우, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 존재 유무에 대한 검출 민감도 또는 특이성은, 결합하지 않은 표적 폴리뉴클레오타이드에 비해, 증가한다.

[0013] 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드가 상기 페이로드 분자와 결합하는 경우, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 존재 유무에 대한 검출 민감도 또는 특이성은, 결합하지 않은 표적 폴리뉴클레오타이드에 비해, 증가한다.

[0014] 일부 실시형태에서, 상기 센서는, 전류 이벤트 신호(event signature)를 생성하면서 상기 두 용적 사이에 전압차를 인가하고, 상기 두 용적을 분리하는 상기 나노포어를 통과하는 전류 흐름을 측정하도록 설정(구성)된 전극 쌍을 포함한다. 일부 실시형태에서, 페이로드-결합된 표적 폴리뉴클레오타이드가 상기 나노포어를 통과할 때 생성되는 전류 이벤트 신호는 평균 깊이, 최대 깊이, 지속 시간, 깊이 레벨의 갯수, 깊이 및 지속 시간의 면적, 또는 노이즈(noise) 레벨에 있어 배경 분자(background molecule)의 전류 이벤트 신호와 구별된다.

[0015] 일부 실시형태에서, 상기 접합 부위 및 상기 페이로드 분자는 공유 결합을 통해 결합된(또는 결합하는) 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 공유 결합은 클릭 화학(click chemistry)에 의해 형성된다. 일부 실시형태에서, 상기 클릭 화학은 구리가 촉매작용한 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 클릭 화학에는 구리가 존재하지 않는다. 일부 실시형태에서, 상기 접합 부위 및 상기 페이로드 분자는 비공유 결합을 통해 결합된(또는 결합하는) 것이다. 일부 실시형태에서, 상기 비공유 결합은 수소 결합, 이온 결합, 반데르발스 상호 작용, 소수성 상호 작용, 극성 결합, 양이온-파이(pi) 상호 작용, 평면 적층 상호 작용(planar stacking interaction) 또는 금속 결합이다. 일부 실시형태에서, 상기 접합 부위는 상기 프라이머의 3' 또는 5' 말단에 위치한다. 일부 실시형태에서, 상기 접합 부위는 상기 앰플리콘의 3' 또는 5' 말단에 위치한다.

[0016] 일부 실시형태에서, 상기 접합 부위는 화학기(chemical group), 반응기, 소분자 또는 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 소분자는 비오틴(biotin)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 반응기는 디벤조시클로

옥틸(DBCO) 또는 아지드(azide)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 페이로드 분자가 상기 앰플리콘에 결합된다(또는 결합하는 것이다). 일부 실시형태에서, 상기 장치는 2개 이상의 나노포어를 연달아(또는 직렬로) 포함하고, 상기 페이로드 분자에 결합된 상기 앰플리콘은 이동 중에 상기 2개 이상의 나노포어 내에 동시에 존재한다.

- [0017] 또한, 본원은 시료에 존재하는 것으로 의심되는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 검출하는 방법을 제공한다, 상기 방법은 프라이머 세트를 제공하는 단계로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있으며, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 페이로드 분자와 결합된 것인(또는 결합하는) 단계; 상기 시료에 대해 증폭 반응을 수행하는 단계로서, 상기 증폭 반응에 의해 생성된 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 앰플리콘이 상기 페이로드 분자와 결합하도록 상기 시료는 상기 프라이머 세트 및 증폭 시약을 포함하는 것인 단계; 나노포어를 포함하는 장치에 상기 시료를 탑재하는 단계로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하는 것이고, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과시키도록 설정(구성)된 것이며, 상기 장치는 각 포어에 대한 센서로서 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 설정(구성)된 센서를 포함하는 것인 단계; 및 상기 페이로드 분자에 결합된 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 나노포어를 통과했는지 여부를 상기 센서로부터의 데이터를 사용하여 측정함으로써 상기 시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열이 존재하는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0018] 일부 실시형태에서, 상기 시료는 상기 증폭 이전에 상기 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 상기 증폭 이후에 상기 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 상기 증폭과 상기 나노포어에서의 검출 사이에 정제 단계를 거치지 않는다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 상기 시료는 1:10000, 1:1000, 1:500, 1:200, 1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1.5, 1:1.2, 1:1.1 또는 1:1.05로 희석되어 상기 나노포어 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 희석 없이 상기 나노포어 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 비표적 폴리뉴클레오티드 및 증폭 반응 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 나노포어는 직경이 5 nm 이상, 10 nm 이상, 20 nm 이상, 30 nm 이상, 40 nm 이상 또는 50 nm 이상이다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응은 중합 효소 연쇄 반응(PCR), 역전사 PCR, 라이게이션 매개 PCR, 루프 매개 증폭(LAMP), 등온 증폭, 가닥 치환 증폭(SDA) 다중 치환 증폭, 가닥 치환 증폭, 헬리카제 의존 증폭, 절단 효소 증폭 반응 또는 재조합 중합 효소 증폭으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응은 상기 장치의 내부 공간에서 수행된다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 디옥시리보핵산(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 펩타이드 핵산(PNA), 단일 가닥 리보 핵산(ssRNA), DNA/RNA 혼성체 또는 이중 가닥 리보핵산(dsRNA)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 자연 발생 폴리뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 인위적으로 합성된 폴리뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 재조합 폴리뉴클레오티드이다.
- [0022] 일부 실시형태에서, 상기 페이로드 분자는 텐드리머, 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA, DNA 앵타머, 형광 발색단, 단백질, 항체, 폴리펩타이드, 나노비드, 나노로드, 나노튜브, 나노 입자, 풀러렌, PEG 분자, 리포솜 또는 콜레스테롤-DNA 혼성체로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 상기 페이로드 분자는 이온 전하를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 하전된 페이로드 분자는 펩타이드, 아미노산, 하전된 나노 입자, 합성 분자, 뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 금속 또는 이온으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 하전된 페이로드 분자와 결합하는 경우, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 존재 유무에 대한 검출 민감도 또는 특이성은, 결합하지 않은 표적 폴리뉴클레오티드에 비해, 증가한다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 페이로드 분자와 결합하는 경우, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 존재 유무에 대한 검출 민감도 또는 특이성은, 결합하지 않은 표적 폴리뉴클레오티드에 비해, 증가한다.
- [0025] 일부 실시형태에서, 상기 센서는, 전류 이벤트 신호를 생성하며 상기 두 용적 사이에 전압차를 인가하고, 상기 두 용적을 분리하는 상기 나노포어를 통과하는 전류 흐름을 측정하도록 설정(구성)된 전극 쌍을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 페이로드-결합된 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 나노포어를 통과할 때 생성되는 전류 이벤

트 신호는 평균 깊이, 최대 깊이, 지속 시간, 깊이 레벨의 갯수, 깊이 및 지속 시간의 면적, 또는 노이즈(noise) 레벨에 있어 배경 분자의 전류 이벤트 신호와 구별된다.

- [0026] 일부 실시형태에서, 상기 프라이머 및 상기 페이로드 분자는 공유 결합을 통해 결합된다(또는 결합된 것이다). 일부 실시형태에서, 상기 프라이머 및 상기 페이로드 분자는 비공유 결합을 통해 결합된다(또는 결합된 것이다). 일부 실시형태에서, 상기 페이로드 분자는 상기 프라이머의 3' 또는 5' 말단에 결합된다(또는 결합된 것이다).
- [0027] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 페이로드 분자가 상기 프라이머에 결합된다(또는 결합된 것이다).
- [0028] 일부 실시형태에서, 상기 앰플리콘 및 상기 페이로드 분자는 공유 결합을 통해 결합된다(또는 결합된 것이다). 일부 실시형태에서, 상기 앰플리콘 및 상기 페이로드 분자는 비공유 결합을 통해 결합된다(또는 결합된 것이다). 일부 실시형태에서, 2개 이상의 페이로드 분자가 상기 앰플리콘에 결합된다(또는 결합된 것이다).
- [0029] 일부 실시형태에서, 상기 장치는 2개 이상의 나노포어를 연달아(또는 직렬로) 포함하고, 상기 페이로드 분자에 결합된 상기 앰플리콘은 이동 중에 상기 2개 이상의 나노포어 내에 동시에 존재한다.
- [0030] 또한, 본원은 시료에 존재하는 것으로 의심되는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 존재 여부를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 프라이머 세트를 제공하는 단계로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있는 단계; 상기 시료에 대해 증폭 반응을 수행하는 단계로서, 상기 시료는, 상기 증폭 반응에 의해 생성된 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 앰플리콘이 100개 이상의 염기 쌍 길이를 갖도록 상기 프라이머 세트 및 증폭 시약을 포함하는 단계; 나노포어를 포함하는 장치에 상기 시료를 탑재하는 단계로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하고, 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과시키도록 상기 장치를 구성하며, 상기 장치는 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 구성된 센서를 각 포어에 대해 포함하는 단계; 및 상기 페이로드 분자에 결합된 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 나노포어를 통과했는지 여부를 상기 센서로부터의 데이터를 사용하여 측정함으로써 상기 증폭된 시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열이 존재하는지 여부를 검출하는 단계로서, 상기 증폭된 시료는 정제되지 않은 것인 단계를 포함한다.
- [0031] 일부 실시형태에서, 상기 시료는 상기 증폭 이전에 상기 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 상기 증폭 이후에 상기 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 앰플리콘의 길이는 200개 이상, 500개 이상, 1,000개 이상, 2,000개 이상, 5,000개 이상 또는 10,000개 이상의 염기쌍이다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 상기 증폭과 상기 나노포어에서의 검출 사이에 정제 단계를 거치지 않는다.
- [0032] 일부 실시형태에서, 상기 시료는 1:10000, 1:1000, 1:500, 1:200, 1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1.5, 1:1.2, 1:1.1 또는 1:1.05로 희석되어 상기 나노포어 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 희석 없이 상기 나노포어 장치에 탑재된다. 일부 실시형태에서, 상기 시료는 비표적 폴리뉴클레오티드 및 증폭 반응 시약을 포함한다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 상기 나노포어는 직경이 2 nm 이상, 3 nm 이상, 5 nm 이상, 10 nm 이상, 20 nm 이상, 30 nm 이상, 40 nm 이상 또는 50 nm 이상이다.
- [0034] 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응은 중합 효소 연쇄 반응(PCR), 역전사 PCR, 라이게이션 매개 PCR, 루프 매개 증폭(LAMP), 등온 증폭, 가닥 치환 증폭(SDA), 다중 치환 증폭, 가닥 치환 증폭, 헬리카제 의존 증폭, 절단 효소 증폭 반응, 재조합 중합 효소 증폭, 루프 매개 등온 증폭 (LAMP), 자가유지 서열 복제(self-sustained sequence replication), 전체 게놈 증폭(whole genome amplification) 또는 리가아제 매개 PCR(ligase mediated PCR)로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 상기 증폭 반응은 상기 장치의 내부 공간에서 수행된다.
- [0035] 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 디옥시리보핵산(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), DNA/RNA 혼성체, 펩타이드 핵산(PNA), 단일 가닥 리보핵산(ssRNA), 또는 이중 가닥 리보핵산(dsRNA)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 자연 발생 폴리뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 인위적으로 합성된 폴리뉴클레오티드이다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 재조합 폴리뉴클레오티드이다.
- [0036] 일부 실시형태에서, 상기 센서는, 전류 이벤트 신호를 생성하며 상기 두 용적 사이에 전압차를 인가하고, 상기 두 용적을 분리하는 상기 나노포어를 통과하는 전류 흐름을 측정하도록 구성된 전극 쌍을 포함한다. 일부 실시

형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 나노포어를 통과할 때 생성되는 전류 이벤트 신호는 평균 깊이, 최대 깊이, 지속 시간, 깊이 레벨의 갯수, 깊이 및 지속 시간의 면적, 또는 노이즈(noise) 레벨에 있어 배경 분자의 전류 이벤트 신호와 구별된다.

[0037] 일부 실시형태에서, 상기 장치는 2개 이상의 나노포어를 연달아(또는 직렬로) 포함하고, 상기 앰플리콘은 이동 중에 상기 2개 이상의 나노포어 내에 동시에 존재한다.

[0038] 또한 본원은, 나노포어를 포함하는 장치로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하는 것이고, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과시키도록 설정(구성)된 것이며, 상기 장치는 각 포어에 대한 센서로서 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 설정(구성)된 센서를 포함하는 장치; 프라이머 세트로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있으며 상기 프라이머 중 적어도 하나는 페이로드 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 접합 부위를 포함하도록 개질된 프라이머 세트; 증폭 이전, 도중 또는 이후에 상기 접합 부위에 결합하는 페이로드 분자; 및 시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 존재하는지 여부를 검출하기 위한 사용 설명서를 포함하는 키트(kit)를 제공한다.

[0039] 또한 본원은, 나노포어를 포함하는 장치로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하는 것이고, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과시키도록 설정(구성)된 것이며, 상기 장치는 각 포어에 대한 센서로서 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 설정(구성)된 센서를 포함하는 것인 장치; 프라이머 세트로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있으며 상기 프라이머 중 적어도 하나는 페이로드 분자에 결합된 프라이머 세트; 및 시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 존재하는지 여부를 검출하기 위한 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.

[0040] 또한 본원은, 나노포어를 포함하는 장치로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하는 것이고, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 핵산을 통과시키도록 설정(구성)된 것이며, 상기 장치는 각 포어에 대한 센서로서 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 설정(구성)된 센서를 포함하는 장치; 프라이머 세트로서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있으며, 상기 프라이머는 증폭 반응 동안 100개 이상, 200개 이상, 500개 이상, 1,000개 이상, 2,000개 이상, 5,000개 이상 또는 10,000개 이상의 염기쌍의 상기 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 앰플리콘을 생성하는 프라이머 세트; 및 시료 내에 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 존재하는지 여부를 검출하기 위한 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.

[0041] 또한, 본원은 시료 내에 존재하는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 양을 정량하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 양을 알고 있는 대조군 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대조군 시료 및 미지의 양의 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 실험 시료를 제공하는 단계; 상기 대조군 시료를 증폭시켜 상기 대조군 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제 1 앰플리콘을 생성하고 상기 실험 시료를 증폭시켜 상기 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제 2 앰플리콘을 생성하는 단계; 상기 대조군 시료 및 상기 실험 시료를 각각 별도로 나노포어를 포함하는 장치에 탑재하는 단계로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하고, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 제 1 또는 제 2 앰플리콘을 통과시키도록 설정(구성)된 것이며, 상기 장치는 각 포어에 대해 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 설정(구성)된 센서를 포함하는 것인 단계; 및 상기 실험 시료 내의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 양을 정량하기 위하여 상기 나노포어에서의 상기 제 1 앰플리콘의 포집률을 상기 나노포어에서의 상기 제 2 앰플리콘의 포집률과 비교하는 단계를 포함한다.

[0042] 일부 실시형태에서, 상기 증폭은 상기 대조군 시료 또는 상기 실험 시료를 상기 장치에 탑재한 이후에 수행된다. 일부 실시형태에서, 상기 대조군 시료 및 상기 실험 시료는 동일한 조건 하에서 증폭된다. 일부 실시형태에서, 상기 대조군 폴리뉴클레오티드 및 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 동일한 길이 또는 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 상기 제 1 및 제 2 앰플리콘의 포집률은 동일한 조건 하에서 동일한 나노포어를 사용하여 측정된다. 일부 실시형태에서, 상기 제 1 및 제 2 앰플리콘의 포집률은 유사한 크기의 나노포어를 사용하여 측정된다.

[0043] 일부 실시형태에서, 상기 실험 시료 내의 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 농도 추정치는 상기 대조군 시료 및 상기 실험 시료에 대해 시간에 따라 기록된 센서 측정치 세트를 종합하고 상기 두 세트의 데이터를 비교하여 포집률을 농도로 변환함으로써 수학적으로 생성된다. 일부 실시형태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 농도 추정치는 증폭 반응 내의 각 사이클 이후 상기 대조군 시료 및 상기 실험 시료에 대해 시간에 따라 기록된 센서 측

정치 세트를 종합하고 상기 두 세트의 데이터를 비교하여 포집물을 농도로 변환함으로써 수학적으로 생성된다.

[0044] 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 상기 센서 측정치 비교에 근거하여 증폭 전의 상기 실험 시료 내의 표적 폴리뉴클레오타이드의 양을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0045] 또한 본원은 시료 내에 존재하는 표적 폴리뉴클레오타이드 서열의 양을 정량하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 양을 알고 있는 대조군 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 대조군 시료 및 미지의 양의 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 실험 시료를 제공하는 단계; 2개 이상의 다른 알려진 농도의 상기 대조군 폴리뉴클레오타이드를 생성하도록 상기 대조군 시료를 희석하는 단계; 상기 2개 이상의 다른 알려진 농도의 상기 대조군 폴리뉴클레오타이드의 상기 대조군 시료를 나노포어를 포함하는 장치에 탑재(로딩)하는 단계로서, 상기 나노포어는 상기 장치의 내부 공간을 2개의 용적으로 분리하고, 상기 장치는 하나 이상의 포어를 통해 상기 대조군 폴리뉴클레오타이드를 통과시키도록 설정(구성)된 것이며, 상기 장치는 각 포어에 대해 상기 나노포어를 통과하는 대상을 식별하도록 설정(구성)된 센서를 포함하는 것인 단계; 상기 2개 이상의 다른 알려진 농도의 상기 대조군 폴리뉴클레오타이드 각각에 대해 상기 나노포어에서의 포집물을 검출하는 단계; 상기 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 앰플리콘을 생성하도록 상기 실험 시료를 증폭시키는 단계; 상기 실험 시료를 상기 나노포어를 포함하는 장치에 탑재(로딩)하는 단계; 상기 나노포어에서의 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 포집물을 검출하는 단계; 및 상기 실험 시료 내의 표적 폴리뉴클레오타이드 서열의 양을 정량하기 위하여 상기 나노포어에서의 상기 제 1 앰플리콘의 포집물을 상기 나노포어에서의 상기 제 2 앰플리콘의 포집물과 비교하는 단계를 포함한다.

[0046] 일부 실시형태에서, 상기 희석은 연속 희석이다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 상기 대조군 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 희석은 상기 대조군 시료를 상기 장치에 탑재한 이후에 수행된다. 일부 실시형태에서, 상기 증폭은 상기 실험 시료를 상기 장치에 탑재한 이후에 수행된다.

도면의 간단한 설명

[0047] 진술한 그리고 기타의 목적, 특징 및 장점들은 첨부 도면들에 도시되어 있는 바와 같은 본 발명의 특정 실시형태에 관한 이하의 설명으로부터 더욱 명확해질 것이다. 상이한 시야에 걸쳐 동일한 도면 부호는 동일한 부분을 나타낸다. 도면들은 반드시 일정한 비율로 도시된 것은 아니며, 본 발명의 다양한 실시형태의 원리를 나타낼 때 강조한다. 본 발명의 실시형태로서 본 발명의 특징들을 예시하는 데이터 수치들이 또한 제공되나, 이는 단지 예시적인 것일 뿐 제한적인 것이 아니다.

도 1은 상기 나노포어를 통과하는 페이로드 분자에 결합된 표적 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 도시한다.

도 2는 비표적 폴리뉴클레오타이드 및 일반적인 비-폴리뉴클레오타이드(non-polynucleotide) 배경 분자에 비교할 때, 페이로드-결합된 표적 폴리뉴클레오타이드가 상기 포어를 통과할 때의 전류 신호 차이를 도시한다.

도 3은 비오틴화된(biotinylated) 프라이머로 표적 서열을 증폭시킨 후 스트렙타비딘에 의해 결합된 비오틴화된 앰플리콘을 나노포어로 검출하는 방법을 도시한다.

도 4는 PCR 앰플리콘을 정량하는 방법의 일부로서, 정수의(m) 나노포어(n) 관찰 가능한(o) PCR(mnoPCR) 워크플로우를 도시한다.

도 5는 증폭 또는 페이로드의 부착 이전 또는 이후에 정제를 필요로 하지 않는 표적 서열 검출 워크플로우를 도시한다.

도 6은 나노포어로 3250 bp DNA를 검출하고 폴리뉴클레오타이드 이벤트와 배경 이벤트를 구별하는 경우의 (a) 대표적인 나노포어 전류 이벤트 및 (b) 나노포어 전류 이벤트 집단을 도시한다.

도 7은 470 bp DNA 이벤트와 배경 노이즈(noise) 이벤트를 비교하는 데이터를 도시하며, 상기 두 이벤트가 구별되지 않음을 나타낸다.

도 8은 프라이머 개질 없이 증폭된 470 bp DNA, 비오틴-개질된(biotin-modified) 프라이머 1개로 증폭된 470 bp DNA 및 비오틴-개질된 프라이머 2개로 증폭된 470 bp DNA의 아가로오스 겔(좌측) 및 모노스트렙타비딘 페이로드 부착 이후의 아가로오스 겔(우측)을 도시한다.

도 9는 470 bp DNA-[1 비오틴]-[1 모노스트렙타비딘] 및 470 bp DNA- [2 비오틴]-[2 모노스트렙타비딘]의 나노

포어 전류 이벤트 집단을 비교한 것이다.

도 10은 배경(전기적 노이즈(noise)) 이벤트로부터 확인된 거짓-양성(false-positive) 임계값에 대비한 470 bp DNA, 470 bp DNA-[1 비오틴]-[1 모노스트랩타비딘] 및 470 bp DNA-[2 비오틴]-[2 모노스트랩타비딘]의 양성 퍼센트 검출 기준(Positive Percentage detection criteria)을 비교한 것이다.

도 11은 항-비오틴 항체(anti-biotin antibody) 페이로드 부착 이후의 (1) 프라이머 개질 없이 증폭된 470 bp DNA, (2) 비오틴-개질된 프라이머 1개로 증폭된 DNA 및 (3) 비오틴-개질된 프라이머 2개로 증폭된 DNA의 아가로오스 겔을 도시한다.

도 12는 470 bp DNA(페이로드 없음) 및 470 bp DNA-[2 비오틴]-[2 항-비오틴 항체]에 대해 나노포어 전류 이벤트 집단을 비교한 것이다.

도 13은 1:10 희석된 PCR 배경 및 동일 PCR 배경에서의 증폭된 1074 bp DNA에 대해 나노포어 전류 이벤트 집단을 비교한 것이다.

도 14는 1:10 희석된 PCR 배경 및 동일 PCR 배경에서의 증폭된 1074 bp DNA, 페이로드가 없는 증폭된 500 bp DNA 및 증폭된 500 bp DNA-[1 비오틴]-[1 모노스트랩타비딘]에 대해 나노포어 전류 이벤트 집단을 비교한 것이다.

도 15는 (1, 4) 470 bp DNA(비오틴 프라이머로 개질되지 않음), (2) 470 bp DNA-[1 비오틴]-[1 모노스트랩타비딘] 및 (3) 470 bp DNA-[2 비오틴]-[2 모노스트랩타비딘]의 아가로오스 겔을 도시하며, 1 내지 3 레인에는 20배 과량의 모노스트랩타비딘이 존재하여 비특이적 페이로드 부착이 없음을 나타낸다.

도 16은 PCR 배경 단독(1:60 희석)의 나노포어 전류 이벤트 집단을 PCR 배경(1:60 희석) 존재 하의 470bp DNA (페이로드 없음), 470 bp DNA-[1 비오틴]-[1 모노스트랩타비딘] 및 470 bp DNA-[2 비오틴]-[2 모노스트랩타비딘]과 비교한 것이다.

도 17은 배경 이벤트(1:60 희석 PCR 배경)로부터 확인된 거짓-양성 임계값에 대비한 470bp DNA, 470 bp DNA-[1 비오틴]-[1 모노스트랩타비딘] 및 470 bp DNA-[2 비오틴]-[2 모노스트랩타비딘]의 양성 퍼센트 검출 기준을 비교한 것이다.

도 18은 전혈 배경(whole blood background) 단독(1:20000 희석)의 나노포어 전류 이벤트 집단을 전혈 배경 (1:20000 희석) 존재 하의 470bp DNA(페이로드 없음), 470 bp DNA-[1 비오틴]-[1 모노스트랩타비딘] 및 470 bp DNA-[2 비오틴]-[2 모노스트랩타비딘]과 비교한 것이다.

도 19는 배경 이벤트(1:20000 희석 전혈 배경)로부터 확인된 거짓-양성 임계값에 대비한 470 bp DNA, 470 bp DNA-[1 비오틴]-[1 모노스트랩타비딘] 및 470 bp DNA-[2 비오틴]-[2 모노스트랩타비딘]의 양성 퍼센트 검출 기준(Positive Percentage detection criteria)을 비교한 것이다.

도 20은 (1) 362 bp DNA(비오틴 프라이머로 개질되지 않음), (2) 362 bp DNA-[1 비오틴]-[1 모노스트랩타비딘] 및 (3) 362 bp DNA-[2 비오틴]-[2 모노스트랩타비딘]의 아가로오스 겔을 도시한다.

도 21은 362 bp 표적 DNA 및 470 bp 비표적 DNA(페이로드 없음)의 조합의 나노포어 전류 이벤트 집단과 362 bp 표적 DNA-[1 비오틴]-[1 모노스트랩타비딘]을 비교한 것이다.

도 22는 배경 DNA 이벤트(페이로드 미부착 470 bp 비표적 DNA)로부터 확인된 거짓-양성 임계값에 대비한 362 bp DNA-[1 비오틴]-[1 모노스트랩타비딘]의 양성 퍼센트 검출 기준을 비교한 것이다.

도 23은 대조군을 사용하여 포집률 대비 농도의 선형 추세를 확립한 후 측정된 포집률을 상기 선형 추세에 매핑(mapping)함으로써 표적 폴리뉴클레오티드의 미지 농도를 추정하는 것을 도시한다.

도 24는 PCR 반응으로부터 생성된 12, 13 및 14 사이클 앰플리콘의 농도를 포집률 대비 농도 추세에 매핑하는 것을 도시한다.

도 25는 별도의 PCR 반응으로부터 생성된 상이한 세트의 20 사이클 앰플리콘의 농도의 포집률 대비 농도 추세에 대한 매핑의 반복성을 도시한다.

도 26은 추정 농도 대비 PCR 사이클 10, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 30, 35 및 40의 S자형 추세(sigmoidal trend)를 도시한다.

도 27은 최소 희석(1:1.17) PCR 배경의 나노포어 전류 이벤트 집단을 동일한 PCR 배경에서의 증폭된 1074 bp DNA와 비교한 것이다.

도 28은 1:5, 1:2, 1:1.43 및 1:1.17 희석에서, 음성 대조군(출발 주형(starting template) 없이 10 사이클 PCR)의 농도를 포집물 대비 농도 추세에 매핑하는 것을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] 본원 전체에 걸쳐, 본 발명의 장치, 조성물, 시스템 및 방법의 다양한 실시형태가 참조된다. 본원에 기재된 다양한 실시형태는 다양한 예시적인 실시예를 제공하기 위한 것이며, 이는 대안적인 종류를 설명하는 것으로 해석되어서는 안된다. 오히려, 본원에 제공된 다양한 실시형태의 설명은 그 범위가 중복될 수 있음을 유념해야 한다. 본 명세서에 기재된 실시형태는 단지 예시적인 것이며 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다.
- [0049] 본 명세서 전체에 걸쳐, 다양한 공지내용, 특허 및 공개된 특허 명세서가 인용에 의해 참조된다. 이들 공지내용, 특허 및 공개된 특허 명세서의 전체 내용은 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0050] 본 명세서에서, 용어 "포함하는(comprising)"은 상기 시스템, 장치 및 방법이 기재된 구성 요소 또는 단계를 포함하며, 다른 것들을 배제하지는 않음을 의미한다. "본질적으로 구성된(consisting essentially of)" 이 시스템, 장치 및 방법을 정의하기 위해 사용되는 경우, 이는 해당 조합에 본질적으로 중요한 다른 구성 요소나 단계를 배제함을 의미한다. "구성된(consisting of)" 은 다른 구성 요소 또는 단계를 배제함을 의미한다. 이들 연결 어구 각각에 의해 정의된 실시형태들은 본 발명의 범위 내에 속한다.
- [0051] 범위를 포함하는 모든 수치적 한정, 예를 들어 거리, 크기, 온도, 시간, 전압 및 농도는 0.1의 증분만큼 (+) 또는 (-)로 변화되는 근사치이다. 항상 분명하게 진술되는 것은 아니지만, 모든 수치적 표기는 용어 "약"이 선행하는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 항상 분명하게 진술되는 것은 아니지만, 본원에서 기술된 구성요소들은 단지 예시일 뿐이며, 이들의 등가물이 업계에 공지되어 있다고 이해되어야 한다.
- [0052] 본 명세서에서 사용된 "내부 공간을 분리하는 나노포어를 포함하는 장치"는 개구를 포함하는 포어를 구조 내에 갖는 장치로서, 그 구조가 내부 공간을 2개의 용적 또는 챔버로 분리하는 장치를 의미한다. 상기 장치는 또한 2개 이상의 나노포어를 가질 수 있으며 이때 모든 포어 쌍 사이에 하나의 공통 챔버를 가질 수 있다.
- [0053] 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 임의의 길이의 중합체 형태의 뉴클레오티드로서, 리보뉴클레오티드 또는 디옥시리보뉴클레오티드를 의미한다. 이 용어는 상기 분자의 일차 구조만을 의미한다. 따라서, 이 용어는 이중 가닥 및 단일 가닥 DNA 및 RNA를 포함한다.
- [0054] 본 명세서에서 사용된 용어 "표적 폴리뉴클레오티드"는 관심 서열(즉, 표적 폴리뉴클레오티드 서열 또는 표적 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 표적 폴리뉴클레오티드는 상기 표적 폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 프라이머에 혼성화하기 위한 영역(예를 들어, 충분히 상보적인 서열)을 포함할 수 있다. 이들 영역은 관심 서열의 일부이거나, 관심 서열의 옆에 배치되어 있거나, 증폭 반응을 통해 관심 서열을 증폭시키기에 충분히 가깝게 위치한 관심 서열의 상류 또는 하류일 수 있다. 일부 실시형태에서, 프라이머에 혼성화하기 위한 이들 영역은 증폭 반응에 의해 생성된 앰플리콘의 두 말단에 위치한다. 본원은 관심 서열을 포함하는 표적 폴리뉴클레오티드를 검출하기 위한 방법, 장치 및 조성물을 기재한다.
- [0055] 본 명세서에 사용된 용어 "프라이머"는 복사될 폴리뉴클레오티드 가닥(예를 들어, 표적 폴리뉴클레오티드)의 합성 개시 지점으로서 작용할 수 있는 올리고머를 의미한다. 따라서, 혼성화에 도움이 되는 조건 하에서, 상기 프라이머는 상기 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 상보적 영역에 어닐링 할 것이다. 적합한 반응물(예를 들어, 중합 효소, 뉴클레오티드 트리포스페이트 등)의 첨가시, 상기 프라이머는 상기 중합제(polymerizing agent)에 의해 연장되어 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 복사본을 형성한다. 상기 프라이머는 단일 가닥이거나, 또는 부분적으로 또는 완전히 이중 가닥일 수 있다.
- [0056] 본 명세서에 사용된 용어 "혼성화할 수 있는(hybridizable)"은 혼성화가 가능함, 즉 RNA:RNA, RNA:DNA 및/또는 DNA:DNA 분자와 같은 이중 가닥 분자를 형성할 수 있음을 의미한다. 증폭을 위해, 프라이머는 증폭 반응을 위한 DNA 합성의 출발점으로 작용하기에 충분한 상보적인 염기쌍의 상호 작용을 통해 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 가닥과 이중 가닥을 형성할 수 있을 때 표적 폴리뉴클레오티드와 혼성화할 수 있다.
- [0057] 본 명세서에 사용된 용어 "결합(binding)"은 화학 결합, 예를 들어, 공유 결합, 이온 결합 또는 금속 결합의 형성을 의미한다. 결합은 반 데르 발스 힘, 소수성 상호 작용, 양이온-파이(pi) 상호 작용 및/또는 평면 적층

상호 작용을 통한 두 분자 간의 안정한 결합을 포함할 수 있다. 결합에는 클릭 화학을 통한 두 분자의 접합(conjugation)이 포함된다.

[0058] 본 명세서에 사용된 용어 "접합 부위(conjugation site)"는 하나의 생체 분자를 다른 생체 분자와 접합시키기 위한 분자 상의 부위를 의미한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 프라이머는, 상기 프라이머 자체 또는 상기 프라이머에 의해 생성된 앰플리콘을 페이로드 분자에 접합시켜 나노포어에서 페이로드결합된 앰플리콘을 검출하기 위한 접합 부위를 포함한다. 상기 접합 부위에 결합하는 메카니즘은 임의의 안정한 결합 상호 작용, 예를 들어 클릭 화학을 포함할 수 있다.

[0059] 본 명세서에 사용된 용어 "증폭(amplification)" 또는 "증폭 반응(amplification reaction)"은 표적 폴리뉴클레오타이드 서열로부터 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 다수의 클론 앰플리콘을 생성하는 반응을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 증폭 반응 시약은 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 서열의 증폭을 수행하는데 필요한 임의의 분자를 포함한다. 증폭 반응 시약에는 유리 프라이머(free primers), dNTP(디옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트, dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 중합 효소(예를 들어, Taq 또는 Pfu), 염(염화마그네슘, 황산마그네슘, 황산암모늄, 염화나트륨, 염화칼륨), BSA(소 혈청 알부민) 안정제 및 세제(예를 들어, 트리톤 X-100(triton X-100))가 포함될 수 있으나 이에 한정되지는 않는다. 증폭 반응에는 예를 들어 PCR, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction)(LCR), 전사 매개 증폭(transcription mediated amplification)(TMA), 역전사 효소 개시 PCR(reverse transcriptase initiated PCR), DNA 또는 RNA 혼성화 기술, 염기 서열 분석(sequencing), 등은 증폭 및 루프매개 등은 증폭(loop-mediated isothermal amplification)(LAMP)이 포함될 수 있으나 이에 한정되지는 않는다. 표적 폴리뉴클레오타이드 서열로부터 앰플리콘을 생성하는 증폭 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0060] 본 명세서에서 사용된 용어 "지지체(scaffold)"또는 "중합체 지지체(polymer scaffold)"는 전압 인가시 나노포어를 통해 이동하는 음으로 또는 양으로 하전된 중합체를 의미한다. 일부 실시형태에서, 중합체 지지체는 절단 가능한 도메인 또는 절단 가능한 링커(linker)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 중합체 지지체는, 절단 가능한 링커를 포함하며 전압 인가시 포어를 통해 이동하는 융합 분자에 결합할 수 있거나 결합한다. 일부 양태에서, 상기 중합체 지지체는 디옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA), 펩타이드 핵산(PNA), DNA/RNA 혼성체 또는 폴리펩타이드를 포함한다. 상기 지지체는 자연 발생 분자 또는 생물학적 분자가 아닌, 화학적으로 합성된 중합체일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 상기 중합체 지지체는, 상기 나노포어를 통한 이동 시의 신호 예측을 향상시킬 수 있고 ssDNA 또는 RNA에 존재하는 2차 구조를 감소시키는 dsDNA이다. 일부 실시형태에서, 상기 중합체 지지체는 상기 지지체의 일 단부 또는 상기 지지체의 양 단부에 존재할 수 있는 융합 분자 결합 부위를 포함한다. 상기 지지체 및 융합 분자는 공유 결합, 수소 결합, 이온 결합, 반 데르 발스 힘, 소수성 상호 작용, 양이온-파이(pi) 상호 작용, 평면 적층 상호 작용 또는 금속 결합을 통해 연결될 수 있다. 대안적으로, 상기 절단 가능한 링커 성분을 상기 지지체에 직접 공유 결합(direct covalent tethering)시킴으로써 상기 지지체와 상기 융합 분자를 연결시킬 수 있다. 대안적으로, 상기 융합 분자의 연결기 성분은 상기 절단 가능한 링커를 상기 지지체에 직접 공유 결합(direct covalent tethering)을 통해 결합시킬 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 상기 융합 분자는 지지체-결합 도메인을 포함하며, 이는 DNA, RNA, PNA, 폴리펩타이드, 콜레스테롤/DNA 혼성체 또는 DNA/RNA 혼성체일 수 있다.

[0061] 본 명세서에서 사용된 용어 "페이로드(payload)"또는 "페이로드 분자(payload molecule)"는 나노포어에서의 검출의 선택성 및/또는 감도를 향상시키기 위해 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 프라이머)에 결합되는 분자 또는 화합물을 의미한다. 일부 실시형태에서, 상기 페이로드 분자는 텐드리머, 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA, DNA 앵타머, 형광 발색단, 단백질, 폴리펩타이드, 나노로드, 나노튜브, 풀러렌, PEG 분자, 리포솜 또는 콜레스테롤-DNA 혼성체일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 상기 폴리뉴클레오타이드 및 상기 페이로드는 공유 결합, 수소 결합, 이온 결합, 반 데르 발스 힘, 소수성 상호 작용, 양이온-파이(pi) 상호 작용, 평면 적층 상호 작용, 또는 금속 결합을 통해 직접 또는 간접적으로 연결된다. 상기 페이로드는 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 또는 앰플리콘에 크기를 부가하며, 상기 페이로드에 결합된 상기 앰플리콘이 상기 나노포어를 통과할 때 배경 분자에 비해 현저하게 상이한 전류 신호를 가지므로, 상기 페이로드는 검출을 향상시킨다.

[0062] 본 명세서에서 사용된 용어 "배경(background)"은 나노포어에 의해 검출 가능하지만 상기 관심 표적 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하지는 않는, 시료 내의 분자를 지칭한다. 본 발명의 중요한 양태는 혼합 시료의 배경으로부터 표적 폴리뉴클레오타이드를 식별하는 것이다.

[0063] 본 명세서에서 사용된 용어 "나노포어(nanopore)"는 특정 크기의 중합체를 통과시키기에 충분한 크기의 개구(홀 또는 채널(hole or channel))를 의미한다. 증폭기를 사용하면 전압이 인가되어 음으로 하전된 중합체가 상기 나

노포어를 통과하도록 만들며, 상기 포어를 통과하는 전류를 통해 분자가 상기 포어를 통과하는지 여부를 검출한다.

[0064] 본 명세서에서 사용된 용어 "센서(sensor)"는 나노포어 장치로부터의 신호를 수집하는 장치를 의미한다. 많은 실시형태에서, 상기 센서는 포어 양측에 배치된 한 쌍의 전극을 포함하여, 분자 또는 다른 개체, 특히 중합체 지지체가 상기 포어를 통해 이동할 때 상기 포어를 통과하는 이온 전류를 측정한다. 상기 전극 이외에, 상기 나노포어 장치에서 광 신호(optical signal)를 검출하기 위해 추가 센서, 예를 들어 광학 센서가 사용될 수 있다. 전류 차단, 전자 터널링 전류(electron tunneling current), 전하유도 전계 효과(charge-induced field effect), 나노포어 통과 시간, 광 신호, 광 산란 및 플라즈몬 공명(plasmon resonance)과 같은 특성을 검출하기 위해 기타 센서가 사용될 수도 있다.

[0065] 본 명세서에서 사용된 용어 "전류 측정치(current measurement)"는 인가 전압에서의 시간에 따른 상기 나노포어를 통과하는 전류 흐름의 일련의 측정치들을 의미한다. 상기 전류는 이벤트를 정량하기 위한 측정치로 표시되며, 전압(전도도)에 의해 표준화된 전류 또한 이벤트를 정량하는 데 사용된다.

[0066] 본 명세서에서 사용된 용어 "개방 채널(open channel)"은 전류가 분석 소프트웨어에 의해 정의된 임계값으로부터 벗어나지 않는 노이즈(noise) 범위 내의 나노포어 채널을 통과하는 전류의 기준선 레벨을 의미한다.

[0067] 본 명세서에서 사용된 용어 "이벤트(event)"는 전류 측정치가 상기 개방 채널 값으로부터 소정의 임계값만큼 벗어날 때부터 전류가 상기 개방 채널의 임계값 내로 복귀할 때까지의 전류 임피던스 측정치 세트를 의미한다.

[0068] 본 명세서에서 사용된 용어 "전류 임피던스 신호(current impedance signature)"는 검출된 이벤트 내에서 식별된 전류 측정치 및/또는 패턴의 집합을 의미한다. 한 이벤트 내에 다수의 신호가 존재할 수 있어 분자 유형 간의 식별력을 높일 수 있다.

[0069] 본 명세서에서 사용된 용어 "포집률(capture rate)"은 나노포어 장치에서 시간에 따라 검출된 이벤트의 갯수를 의미한다. 일부 실시형태에서, 구체적으로 상기 포집률은 특정 표적 분자와 관련된 이벤트의 포집 및/또는 이동의 비율, 예를 들어 페이로드결합된 애플리곤의 이동을 의미할 수 있다. 본 명세서에서, 상기 포집률은 유사한 나노포어 조건 하의 유사한 질량/전하 비를 갖는 대조군과 비교하여 농도를 유추하는데 사용될 수 있다.

[0070] 개요

[0071] 본원은 나노포어 장치에서 검출될 수 있는 개질 애플리곤의 생성에 의해 표적 폴리뉴클레오티드를 검출하는 방법을 개시한다. 본원에 개시된 방법, 조성물 및 장치에서는 DNA 분자가 나노포어를 통과할 때 순전히 전기적으로 이를 계수(counting)할 수 있다. 기재된 실시예에 따르면, "페이로드 부착 DNA(payload attached DNA)"는 단일 DNA 분자가 상기 나노포어를 통과할 때마다 확실하고 강력한 신호를 제공한다. 이로 인해 혼합 시료로부터 정확하고 정밀하게 DNA를 정량하는 신속하고 간단한 수단을 제공할 수 있어서, 화학적 또는 광학적 검출이 필요하지 않는 전기적 검출 방법을 사용하여 수백 내지 수천 개의 표적 분자를 수분 내에 계수하고 배경 비표적 분자로부터 식별할 수 있다. 또한 저렴한 하드웨어, 저전력 소비, 소형 크기 및 나노포어의 다양한 기하학적 구조에 대한 허용 오차를 고려할 때, 상기 장치는 제조 및 장치 비용이 매우 적다. 나노포어 장치의 크기가 작아서 이동이 가능하다는 특징과 더불어, 본원에 개시된 본 발명의 여러 실시형태에서 제공되는 특징은 폴리뉴클레오티드 표적 서열을 검출하고 진단하는 신규하고 효율적인 방법을 제공한다.

[0072] 배경 식별

[0073] 일부 양태에서, 시료에 존재하는 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 방대한 배경 분자 집단을 포함하는 원시(original)(심지어 여과된) 천연 유체(혈액, 타액, 소변 등)일 수 있다. 이러한 배경 분자는 양의 전압 인가로 충분히 음으로 하전될 때 상기 나노포어를 통과한다. 일부 경우에는, 이러한 나노포어 이벤트가 상기 표적 폴리뉴클레오티드처럼 보일 수 있다. 따라서, 이러한 배경 분자는 거짓 양성(false positives)을 생성할 수 있어 검출 오류율을 높일 수 있다. 시료 준비 단계를 충분히 추가하여 큰 분자를 제거하면 도움이 되지만 거짓 양성 이벤트를 유발하는 배경 분자가 여전히 존재하여 나노포어 장치에서의 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 검출 민감도 및 특이성을 손상시키게 된다.

[0074] 배경 분자와 표적 폴리뉴클레오티드를 식별하기 위해, 프라이머 표지 방법(primer-labeling scheme)이 사용될 수 있다.

[0075] 구체적으로, 표지(label) 또는 표지 서열(가령, 페이로드 분자)이 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 서열에 혼성화할 수 있는 프라이머 또는 프로브(probe)에 결합된다. 대안적으로, 상기 프라이머 또는 프로브는 선택된 표지

또는 페이로드 분자와 특이적으로 결합하는 표지 결합 부위를 갖는다. 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 증폭시, 이들 프라이머 또는 프로브는 앰플리콘에 도입되어, 상기 표지 또는 페이로드 분자 또는 상기 표지/페이로드 분자 결합 부위를 상기 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 상기 앰플리콘에 도입시킨다. 상기 페이로드 분자에 결합된 앰플리콘은, 나노포어를 통해 이동한 상기 표적 서열을 함유하는 표적 폴리뉴클레오타이드/앰플리콘 생성물의 존재 및/또는 동일성을 확인하는데 사용될 수 있는 독특한 전류 신호를 제공한다.

[0076] 또 다른 실시형태에서, 상기 앰플리콘 단독(표지 미결합)은 배경과 충분히 구별되는 차별적 신호를 제공한다. 일반적으로 이들 실시형태에서는 배경으로부터 구별하기에 충분한 신호를 생성하기 위해 작은 나노포어 및/또는 긴 앰플리콘을 필요로 한다.

[0077] **혼합 시료에서의 표적 폴리뉴클레오타이드의 검출**

[0078] 앰플리콘 DNA를 전기적으로 검출하기 위해 고체 상태 나노포어를 사용할 수 있으며, 페이로드가 표적 DNA에만 결합하는 경우 페이로드의 부착으로 인해 표적 DNA의 검출이 용이해진다(도 1).

[0079] 특히, 앰플리콘이 상기 포어를 통과하는 동안 개방 채널 전도성 및 기록 도중에 존재하는 임의의 노이즈(noise) 또는 배경 분자보다 충분히 큰 임피던스 신호를 제공한다면, 상기 앰플리콘을 전기적으로 검출하는 데 고체 상태의 나노포어를 사용할 수 있다(도 2). 표적 서열에 "벌크 물질(bulk)"를 추가하는 경우, 상기 벌크 물질로 인해, 배경 노이즈(noise)와 배경 분자보다 높아 쉽게 측정될 수 있는 필요 신호가 제공되므로 더 큰 포어(5-100 nm)에서의 나노포어 검출이 가능해진다. 벌크 물질이 없으면, 500 bp 미만의 앰플리콘에 대해, ~5 nm 및 그 이상의 나노포어에서 대부분의 앰플리콘을 감지하지 못하여, PCR 생성물의 정확한 정량이 저해된다. 예를 들어, 개질된 프라이머(들)를 사용한 증폭 반응을 수행함으로써, 상기 프라이머의 개질이 상기 앰플리콘에 도입될 것이고, 이러한 개질은, 상기 앰플리콘을 상기 요구되는 페이로드 "벌크 물질"로 태그(tag)하여 상기 나노포어에서의 검출을 가능하게 하는 데 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 도 3에 도시된 바와 같이, 상기 프라이머는 비오틴을 사용하여 개질된다. 이렇게 수득된 PCR 앰플리콘을 스트렙타비딘 페이로드에 결합시켜 이들의 존재를 나노포어에서 검출한다.

[0080] 제시된 벌킹(bulking)의 예로는 비오틴/스트렙타비딘 및 에피토프/항체가 포함되며, 2가지 예시적인 방법이다. 대안적으로, 상기 프라이머는 화학적으로 반응성인 기, 예를 들어 알킨으로 개질될 수 있다. 이로 인해, 알킨 함유 앰플리콘이 벌키 아지드 함유 분자, 예를 들어 아지도폴리에틸렌글리콜(PEG)에 의해 클릭 화학으로 개질될 수 있다. 상기 포어를 통한 광학적 검출이 사용되는 경우, 상기 프라이머는 형광 발색단에 의해 개질될 수 있으며, 이에 따라 상기 앰플리콘이 형광에 의해 검출될 수 있다. 요약하면, 증폭 반응에 의존적으로 도입되는 분자를 도입하는 임의의 방법이 본원의 개시 내용에 통합된다.

[0081] 상기 결합 반응은 높은 친화성을 가지며, PCR 앰플리콘은 사전 정제하거나 증폭 완충액 및 성분으로부터 추출하지 않은 상태에서 태그를 붙일 수 있다. 태그를 붙인 후, 적절한 나노포어 기록 완충액(예를 들어 1M LiCl, 10mM Tris, 1mM EDTA)에서 나노포어를 사용하여 상기 앰플리콘을 검출한다. PCR 반응 혼합물과 관련된 배경 또는 시료로부터의 배경에는 상기 페이로드-결합된 표적 DNA 분자와 명백하게 상이한 나노포어 전류 임피던스 신호가 부여될 것이다(도 2). 이러한 방식으로 배경 존재 하에서 정량을 수행할 수 있으므로 시료 또는 PCR 반응 혼합물을 정제할 필요가 없어 워크플로우가 크게 단순화된다. 결과적으로, 주기적으로 PCR 반응을 수행하고 사이클 간에 앰플리콘 생성물의 나노포어 측정을 수행하는 장치는 측정 이전에 반응 혼합물을 회석하기만 하면 되므로, 저렴하게 포장 및 제조할 수 있다. 반면, 복잡한 정제 단계를 필요로 하는 장치는 기본 설비가 많기 때문에 고가이고 복잡하다.

[0082] 도 4는 "mnoPCR"(정수의(m) 나노포어(n) 관찰 가능한(o) PCR)이라는 명칭의 실시간 앰플리콘 검출 및 정량 방법을 도시한다. mnoPCR이 진행됨에 따라, 각 사이클 이후에 생성된 생성물은 페이로드와 결합되어 상기 나노포어에서 검출된다. 검출을 향상시키는 벌키 페이로드를 결합시키기 이전에 상기 PCR 앰플리콘을 정제할 필요가 없기 때문에, 이러한 실시간 검출 방법이 실현 가능하다. 이러한 측정은 다양한 회석도(미회석 포함)의 PCR 반응 혼합물 배경, 다양한 회석도(PCR 반응을 최적화하기 위한 요구 조건에 따름)의 시료 배경 및 페이로드 배경(표적 폴리뉴클레오타이드에 부착되지 않은 과량의 페이로드)에 대해 내성을 갖는다.

[0083] 반응의 진행에 따라 생성물을 측정하는 능력으로 인해, 주형/표적 갯수 또는 농도가 상이할 수 있는 2개 이상의 시료를 비교하기 위한 매우 효율적인 방법을 제공한다. 또한 상기 나노포어는 단일 분자를 검출하고 계수하므로, 실시예에 기재된 바와 같이, 생성된 앰플리콘의 정확한 정량이 가능하다.

[0084] 본원에 기술된 방법을 사용하여, 표적 뉴클레오타이드 서열의 양이 상이한 2개 이상의 시료를 비교 및 대비할 수

있다. 두 가지 비제한적 시나리오로는 1) 돌연변이 전사체와 야생형 서열의 혼합물을 포함하는 시료 및 2) 이식 유전자의 함량이 다른 시료를 들 수 있다.

[0085] 시나리오 1에서는, 돌연변이 포함 여부에 관계없이 표적 서열을 증폭시키는 프라이머 세트와 시료를 증폭시키고, 생성된 생성물의 양을 돌연변이 서열만을 증폭시키는 프라이머 세트와 생성된 양과 비교함으로써, 시료 내의 돌연변이 전사체의 양을 유추하고 해당 값을 시료들 간에 비교할 수 있다. 예를 들어, 시료 A에는 20% KRAS 돌연변이가 포함되어 있고 시료 B에는 30% KRAS 돌연변이가 포함되어 있는 것을 측정할 수 있다.

[0086] 시나리오 2의 경우, 모든 전사체에 존재하는 DNA의 일부(하우스키핑 영역(housekeeping region))를 증폭시킬 수 있고, 그 존재량을 이식 유전자만을 목표로 하는 반응으로부터 생성된 전사체 양과 비교할 수 있다. 상기 나노 포어를 사용하여 물질의 총량을 측정하여 하우스키핑 앰플리콘을 정량하고, 생성된 이식 유전자 앰플리콘의 양과 비교할 수 있다. 하우스키핑 유전자 앰플리콘을 사용하여 시료의 전체 농도를 측정하기 때문에, 이식 유전자 양에 대해서는 시작 농도가 상이한 2개의 상이한 시료를 비교할 수 있다.

[0087] 동일한 개념을 이용하여, 시료, 예를 들어 구강 탈지면으로부터 수집된 시료 내에 박테리아 속(genus)이 존재하는지 여부를 측정할 다음, 상기 속으로부터 함유된 종을 추가로 기술할 수 있다. 구체적으로, 모든 박테리아에 존재하는 유전자, 예를 들어 포도상 구균을 먼저 정량한 다음, 항생제 내성 포도상 구균에만 존재하는 유전자, 예를 들어 mecA를 증폭하고 정량한다.

[0088] 도 5는 상기 개시된 방법을 이용하여 관심 핵산 서열을 검출하기 위한 워크 플로우를 도시한다.

[0089] 검출의 통계적 유의성 부여

[0090] 일부 실시형태에서는, 시간에 따라 기록된 센서 측정치 세트를 종합하고 수학적 도구를 적용하여, 이전 절에서 상세히 설명한 바와 같은 시료에 존재하는 것으로 의심되는 표적 폴리뉴클레오타이드의 검출에 신뢰 수준 수치를 부여한다.

[0091] 나노포어 이벤트 집단 특성의 차이에 기초하여 배경(즉, 다른 분자 유형)으로부터 분자 유형을 구별하는 정량 방법이 최근 개발되었다 (Morin, T.J., et al., "Nanopore-based target sequence detection," submitted to PLoS One, Dec. 31, 2015). 이러한 구별 방법은 다양한 유형의 다른 배경 분자의 존재 하에서 특정 분자 유형이 검출될 수 있고, 검출의 통계적 중요성이 부여될 수 있음을 의미한다(예를 들어, 99% 신뢰 수준에서 시약 X 검출). 상기 방법을 후술되는 실시예에 적용하기 위해, 먼저 상기 방법을 아래에 요약한다.

[0092] 보편적으로, 상기 포어 위의 챔버 내에는 두 가지 범주의 분자가 존재한다. 유형 1은 모든 배경 분자이고, 유형 2는 관심 분자이다. 아래의 실시예에서 표적 DNA-페이로드(loading)는 일반적으로 유형 2 분자로 간주되며, 비표적 DNA 또는 자유 페이로드(free payload), 프라이머 또는 시료 또는 PCR 반응 혼합물로부터의 분자는 배경(유형 1)으로 간주된다. 실험 데이터를 기반으로, 유형 2 이벤트의 상당 부분에 존재하고 유형 1 이벤트에는 상대적으로 작은 부분에 존재하는 이벤트 신호 기준을 확인한다. 상기 신호 기준은 δG , 지속 시간, 각 이벤트 내의 레벨의 갯수 및 특성 및/또는 이벤트 신호로부터 계산된 임의의 기타 수치 또는 수치의 조합에 의해 결정될 수 있다.

[0093] 이벤트 신호 기준은 수동으로, 또는 테이블 룩업(table look-up)에 의해, 또는 자동화된 방식으로 선택될 수 있다는 점을 유념해야 한다. 예를 들어, 이전 실험에서 다양한 포어 크기 및 특정 시험에서 존재할 것으로 예상되는 기타 조건에 대해 양성 및 음성 대조군의 성능이 확인될 수 있으며, 특정 시험(즉, 특정 앰플리콘 길이 및 특정 페이로드 유형)에 대해 비슷한 조건이 발생할 때, 이러한 대조군으로부터 확인된 선택된 기준을 사용할 수 있다 (테이블 룩업 방식 사용). 자동화된 기준은 예를 들어 시료 바로 이전에 실행되는 대조군에 기반하여 실시간으로 확인할 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이 실시간으로 PCR 앰플리콘을 정량하기 위해서는, 자동화된 기준 선택이 적절하고 바람직한 접근법이다. 구체적으로, 대조군은 분자 크기/전하 및 나노포어 이벤트 특성/형태에 있어 앰플리콘을 모방하므로, 대조군 이벤트는 개시된 바와 같은 포집물 대비 농도 추세를 구축하는 데 사용될 수 있으며, 증폭된 시료를 측정할 때 배경으로부터 "앰플리콘" 유형 2 이벤트를 표시하기 위한 기준을 설정하는 "유형 2 이벤트 경계" 계산을 자동화하기 위한 이벤트 집단을 제공한다. 상기 경계는 2D 플롯(2D plot)(예를 들어, 평균 시프트(mean shift) 이내의 이벤트 대비 지속 시간의 플롯)에서 점들(points) 주위에 곡선을 피팅(fitting)하는 임의의 방법에 의해 계산될 수 있다. 커브 피팅 방법(curve fitting methods)은 최소 제곱법, 선형 또는 2차 프로그래밍 또는 임의의 형태의 수치 최적화 및 조각적 다항식(piece-wise polynomials) 또는 스플라인(splines)의 변수를 통한 경계 매개 변수화를 수반할 수 있다. 컨벡스헐(convex hull)을 계산하여 경계를 제공할 수 있다. 예를 들어 이벤트를 특징짓는 세 가지 특성(3D 경계)을 사용하는 더 높은 차원의 경계 피팅 루틴(boundary fitting routines) 또한 가능하다. 획득된 경계는 다각형이거나 매끄러울 수 있다. 이벤트의 특정

비율을 포함하는 경계로 해당 이벤트의 부분 집합을 둘러싸기 위한 관련 기술(즉, 자동화된 기준 확인을 위해 점들을 둘러쌀 때 이상치를 제거하는 메커니즘)은, 전체 확률 중 z 부분을 포함하는 최소 영역의 경계로 정의되는 z -분위수(z -quantile) 경계를 계산하는 것이다. 예를 들어, 95%-분위수 경계는 총 확률의 95%(데이터의 95%)를 포함하는 최소 영역의 경계이다. 확률 밀도가 알려져 있지 않아도 표준 기법을 사용하여 데이터로부터 추정할 수 있다.

[0094] 하나의 기준이 선택된 이후에는(수동으로, 테이블 특업에 의해 또는 자동화된 방식으로), 일정 이벤트에 대해 상기 신호 기준이 충족되면, 해당 이벤트는 유형 2로 “태그”된다. 포집 이벤트가 유형 2일 확률을 p 로 정의한다. 유형 2 분자가 존재하지 않는 대조군 실험에서 $p = 0$ 이며, 유형 2 분자가 존재하는 실험에서 $p > 0$ 이나 그 값은 알 수 없다. 거짓 양성 확률은 $q_1 = \Pr(\text{태그된 이벤트} \mid \text{유형 1 이벤트})$ 로 정의한다. 유형 2 분자가 존재하지 않는 대조군 실험 또는 실험 세트(예를 들어, 비표적 DNA를 사용하여 20 사이클 이후 상기 나노포어에 인접한 기록 완충액으로 희석된 PCR 반응 혼합물)에서, q_1 은 합리적인 포집 이벤트 개수로부터 우수한 정확도로 측정된다. 유형 2 분자가 벌크 용액에 존재하는지 여부를 측정하기 위한 검출 실험에서, 포집 이벤트가 태그될 확률은 p 의 함수이며, 다음과 같이 근사될 수 있다:

[0095] $Q(p) = (\text{태그된 이벤트의 개수}) / N$

[0096] 상기 공식에서, N 은 총 이벤트 수이다. 99% 신뢰 구간 $Q(p) \pm Q_{sd}(p)$ 는 $Q_{sd}(p) = 2.57 * \sqrt{Q(p) * (1 - Q(p)) / N}$ 로 계산될 수 있으며, 여기에서 $\sqrt{\quad}$ 는 제곱근 함수이다. 실험 과정에서 $Q(p)$ 값은 수렴하며 불확도 범위는 이벤트 갯수 N 이 증가함에 따라 감소한다. 기록 시간의 함수로서의 $Q(p) \pm Q_{sd}(p)$ 의 플롯은 각 시약 유형별로 변화한다(도 10, 도 17, 도 19 및 도 22). 유형 2 분자가 존재하지 않는 대조군 실험에서, $Q(0) = q_1$ 이다. 유형 2 분자가 일정 확률 $p^* > 0$ 로 존재하는 것으로 알려진 대조군 실험에서, 계산된 $Q(p^*)$ 값은 유형 2 분자가 존재하는지 여부를 측정하기 위한 검출 실험에서 아래에 정의된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0097] 검출 실험에서, 다음 기준이 참일 때 99% 신뢰 수준에서 유형 2 분자가 존재한다:

[0098] $Q(p) - Q_{sd}(p) > q_1$ (1)

[0099] 상기 기준이 참이면, $p > 0$ 으로 간주한다. 상기 기준이 참이 아니면, $p > 0$ 이라고 말할 수 없다. 아래에 기재된 실시예에서는 상기 프레임워크가 사용된다.

[0100] 포집률 측정치로부터의 농도 추정

[0101] 이하에서는, 표적 분자의 일련의 알려진 농도에 대응하는 포집률 측정치에 의해 표현되는 일치 관계식에 기초하여 농도를 추정하는 방법을 기재한다. 이는 대조군을 사용하여 확립된다. C 가 농도를 나타내고, $r(C)$ 가 농도 C 에 해당하는 실제의/정확한 포집률을 나타낼 때, $r(C)$ 는 C 에 비례하는 것으로 예상된다.

[0102] $r(C) = a C$

[0103] 일련의 알려진 농도 $\{C_1, C_2, \dots, C_N\}$ 에 대응하는 포집률 측정치를 수집한다. 각 포집률 측정치는 다음 형태를 취한다.

[0104] C_j 에 대한 포집률 측정치: $r_j \pm d_j$

[0105] C_j 에 대한 포집률 측정치는 다음과 같이 해석된다: r_j 는 정규 분포 $N(a C_j, d_j^2)$ 으로부터의 무작위 샘플이며, 여기서 $a C_j$ 는 정확한 포집률 측정치이고 비율 상수 a 는 알려지지 않았다. 데이터 세트 $\{r_j \pm d_j, j=1, 2, \dots, N\}$ 의 경우, a 의 사후 분포는 정규 분포 $a \sim N(u, s^2)$ 를 따르며, 여기에서 u 와 s 는 다음 식으로 표현된다.

$$s^2 = \frac{1}{\sum_{j=1}^N \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2}, \quad u = \frac{1}{\sum_{j=1}^N \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2} \sum_{j=1}^N \frac{r_j}{C_j} \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2$$

[0106]

[0107] 도 23 내지 도 25 및 도 28은 대조군을 포집률 대비 농도 플롯에 피팅하기 위한 대표적인 예를 도시한다.

[0108] 다음으로, 대조군을 사용하여 포집률 대비 농도 추세를 확립(상기 기술한 바와 같음)한 후, 미지의 농도의 표적 분자의 포집률을 측정함으로써 미지의 농도를 추정하는 방법을 설명한다. 표기법에 있어서는, 미지의 농도 C_X 에 대응하는 포집률을 측정하고 이를 다음과 같이 표현한다.

[0109] C_X 에 대한 포집률 측정치: $r_X \pm d_X$

[0110] C_X 는 다음과 같이 표현된다.

$$C_X = \frac{aC_X}{a} = \frac{r_X + d_X \varepsilon_1}{u + s \varepsilon_2}$$

[0111]

[0112] 위 식에서 ε_1 및 ε_2 는 독립적인 표준 정규 랜덤 변수이다.

$$\varepsilon_1 \sim N(0,1) \text{ 이고 } \varepsilon_2 \sim N(0,1)$$

[0113]

[0114] 기울기 a 가 상대적 불확도가 작은 다른 데이터 점들로부터 측정된다고 가정할 때, $s/u \ll 1$ 이다. 이러한 가정에 C_X 의 근사치를 계산할 수 있다. 구체적으로 C_X 의 추정치는 다음과 같을 것이다.

$$C_X = \frac{r_X}{u} \left(1 \pm \sqrt{\left(\frac{d_X}{r_X}\right)^2 + \left(\frac{s}{u}\right)^2} \right)$$

[0115]

[0116] 위 식에서 u 및 s 는 다음 식을 사용하여 데이터 점들로부터 계산된다

$$s^2 = \frac{1}{\sum_{j=1}^N \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2}, \quad u = \frac{1}{\sum_{j=1}^N \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2} \sum_{j=1}^N \frac{r_j}{C_j} \left(\frac{C_j}{d_j}\right)^2$$

[0117]

[0118] 도 23 내지 도 25 및 도 28은 포집률 측정치를 포집률 대비 농도 추세(대조군으로 확립함)에 피팅함으로써 미지의 농도를 추정하기 위한 대표적인 예를 도시한다.

[0119] 기재된 실시예 중에서, "실시예 9: 앰플리콘 농도의 정량"은 본 절에 제시된 방법이 어떻게 구현될 수 있는지를 예시에 의해 교시한다.

[0120] 구성

[0121] 일부 실시형태에서, 본원은 페이로드 분자에 결합된 프라이머를 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본원은 페이로드 분자 결합 부위를 포함하는 프라이머를 제공한다. 두 실시형태 모두에서, 상기 프라이머는 페이로드 분자에 결합된 또는 결합할 수 있는 앰플리콘을 생성할 수 있어 나노포어에서의 검출을 향상시킬 수 있다.

[0122] 일부 실시형태에서, 상기 페이로드 분자는 텐드리머, 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA, DNA 앵타머, 형광 발색단, 단백질, 폴리펩타이드, 나노로드, 나노튜브, 풀러렌, PEG 분자, 리포솜 또는 콜레스테롤-DNA 혼성체일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 상기 폴리뉴클레오타이드 및 상기 페이로드는 공유 결합, 수소 결합, 이온 결합, 반 데르 발스 힘, 소수성 상호 작용, 양이온-파이(pi) 상호 작용, 평면 적층 상호 작용, 또는 금속 결합을 통해 직접 또는 간접적으로 연결된다. 상기 페이로드는 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 또는 앰플리콘에 크기를 부가하며, 상기 페이로드에 결합된 상기 앰플리콘이 상기 나노포어를 통과할 때 배경 분자에 비해 현저하게 상이한 전류 신호를 가지므로, 상기 페이로드는 검출을 향상시킨다. 일부 실시형태에서, 상기 페이로드 분자는 상기 프라이머에 부착하기 위한 아지드 화학 손잡이(azide chemical handle)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 프라이머는 비오틴 분자에 결합한다. 일부 실시형태에서, 상기 페이로드 분자는 다른 분자에 결합하여 분자의 벌키성(bulkiness)에 영향을 미칠 수 있으며, 이에 따라 나노포어에서의 앰플리콘의 검출 민감도를 향상시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 프라이머는 비오틴 분자에 결합하거나, 비오틴 분자에 결합하기 위한 결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 비오틴은 나노포어에서의 배경 분자 대비 검출 향상을 목적으로 상기 페이로

드 분자의 크기를 증가시키기 위해 스트랩타비딘과 추가로 결합된다. 벌크 추가로 인해 표적 서열을 포함하는 앰플리콘과 배경 분자 사이에 보다 명확한 신호 차이가 생성될 수 있다.

[0123] 이 실시형태에서, 프라이머 또는 앰플리콘에 대한 페이로드의 부착은 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어 상기 프라이머는 디벤조시클로옥틴(DBCO)으로 개질된 프라이머일 수 있어서, DBCO 화학기로 모든 앰플리콘을 표지하여, 구리가 존재하지 않는 "클릭" 화학 반응을 통해 아지드-태그된 앰플리콘 또는 프라이머에 접합하기 위한 목적으로 사용될 수 있다.

[0124] 일부 양태에서, 상기 프라이머는 페이로드 분자의 인식 및 결합을 야기하거나 촉진시키는 화학적 개질을 포함한다. 예를 들어, 메틸화된 DNA 서열은 전사 인자, DNA 메틸 전이효소(DNA methyltransferases) 또는 메틸화 회복 효소(methylation repair enzymes)에 의해 인식될 수 있다. 다른 실시형태에서, 비오틴은 아비딘 패밀리 구성원(avidin family members)에 도입되고 이에 의해 인식될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 비오틴은 융합 결합 도메인을 형성하고, 아비딘 또는 아비딘 패밀리 구성원은 상기 융합 분자 상의 중합체 지지체(스캐폴드)-결합 도메인이다. 결합 상보성으로 인하여, 프라이머/앰플리콘 상의 페이로드 분자 결합 도메인 및 페이로드 분자 상의 프라이머 결합 도메인이 뒤바뀌어 상기 페이로드 결합 도메인이 상기 프라이머 결합 도메인이 될 수 있으며, 그 반대의 경우도 가능하다.

[0125] 뉴클레오티드 결합 모티프(nucleotide binding motifs)를 특이적으로 인식할 수 있는 분자, 특히 단백질은 당업계에서 공지되어 있다. 예를 들어, 헬릭스-턴헬릭스(helix-turn-helix), 징크 핑거(zinc finger), 류신 지퍼(leucine zipper), 윙드 헬릭스(winged helix), 윙드 헬릭스 턴 헬릭스 (winged helix turn helix), 헬릭스-루프-헬릭스(helix-loop-helix) 및 HMG-박스(HMG-box)와 같은 단백질 도메인이 뉴클레오티드 서열에 결합할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이들 중 임의의 분자가 상기 앰플리콘 또는 프라이머에 결합하는 페이로드 분자로서 기능할 수 있다.

[0126] 일부 양태에서, 상기 페이로드 결합 도메인은 잠금 핵산(locked nucleic acid(LNA)), 가교 핵산(bridged nucleic acid, BNA), 모든 유형의 단백질 핵산(예를 들어, bisPNA, 감마PNA), 전사 활성화 인자-유사 이펙터 뉴클레아제(transcription activator-like effector nucleases; TALENs), 주기적인 거리로 분포하는 짧은 회문 구조 반복서열(clustered regularly interspaced short palindromic repeats; CRISPRs), 또는 앵타머(예를 들어, DNA, RNA, 단백질 또는 이들의 조합)일 수 있다.

[0127] 일부 양태에서, 상기 페이로드 결합 도메인은 DNA 결합 단백질(예를 들어, 징크 핑거 단백질), 항체 단편(Fab), 화학적으로 합성된 바인더(예를 들어, PNA, LNA, TALENs, 또는 CRISPR), 또는 상기 합성 중합체 지지체(스캐폴드) 내의 화학적 개질(즉, 반응성 부분)(예를 들어, 티올레이트, 비오틴, 아민, 카르복실레이트) 중 하나 이상이다.

[0128] 나노포어 장치

[0129] 본원에 제공된 나노포어 장치는 상기 장치의 내부 공간을 두 개의 용적으로 분리하는 구조에 개구를 형성하는 하나 이상의 포어 및 상기 포어를 통과하는 대상을 식별하도록(예를 들어, 대상을 나타내는 매개 변수의 변화를 검출함으로써) 구성된 하나 이상의 센서를 포함한다. 본원에 기술된 방법에 사용되는 나노포어 장치는 PCT 공보 WO/2013/012881에도 개시되어 있으며, 이 출원의 전체 내용은 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0130] 상기 나노포어 장치의 포어(들)은 나노 규모 또는 마이크로 규모를 갖는다. 일 양태에서, 각 포어는 소분자, 대분자 또는 미생물이 통과할 수 있는 크기를 갖는다. 일 양태에서, 각 포어는 직경이 약 1 nm 이상이다. 대안적으로, 각 포어는 직경이 약 2nm 이상, 3nm 이상, 4nm 이상, 5nm 이상, 6nm 이상, 7nm 이상, 8nm 이상, 9nm 이상, 10nm 이상, 11nm 이상, 12nm 이상, 13nm 이상, 14nm 이상, 15nm 이상, 16 nm 이상, 17 nm 이상, 18 nm 이상, 19 nm 이상, 20 nm 이상, 25 nm 이상, 30 nm 이상, 35 nm 이상, 40 nm 이상, 45 nm 이상, 50 nm 이상, 60 nm 이상, 70 nm 이상, 80 nm 이상, 90 nm 또는 100 nm 이상이다.

[0131] 일 양태에서, 상기 포어는 직경이 약 100 nm 이하이다. 대안적으로, 상기 포어는 직경이 약 95nm 이하, 90nm 이하, 85nm 이하, 80nm 이하, 75nm 이하, 70nm 이하, 65nm 이하, 60nm 이하, 55nm 이하, 50nm 이하, 45nm 이하, 40nm 이하, 35nm 이하, 30nm 이하, 25nm 이하, 20nm 이하, 15nm 이하 또는 10nm 이하이다.

[0132] 일 양태에서, 상기 포어는 직경이 약 1 nm 내지 약 100 nm, 또는 약 2 nm 내지 약 80 nm, 또는 약 3 nm 내지 약 70 nm, 또는 약 4 nm 내지 약 60 nm, 또는 약 5 nm 내지 약 50 nm, 또는 약 10 nm 내지 약 40 nm, 또는 약 15 nm 내지 약 30 nm이다.

- [0133] 일부 양태에서, 상기 나노포어 장치는 상기 포어를 가로질러 중합체 지지체(스캐폴드)를 이동시키는 수단 및/또는 상기 포어를 통과하는 대상을 식별하는 수단을 추가로 포함한다. 이하, 이에 대한 자세한 설명을 2-포어 장치의 맥락에서 제공한다.
- [0134] 단일-포어 나노포어 장치에 비해, 2-포어 장치는 상기 포어를 가로지르는 상기 중합체 지지체의 운동 속도 및 방향을 양호하게 제어하도록 보다 용이하게 구성될 수 있다.
- [0135] 일 실시형태에서, 상기 나노포어 장치는 복수의 챔버를 포함하며, 각각의 챔버는 하나 이상의 포어를 통해 인접한 챔버와 소통한다. 이들 포어 중, 2개의 포어, 즉 제 1 포어 및 제 2 포어는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부가 제 1 포어로부터 제 2 포어로 이동하도록 배치된다. 또한, 상기 장치는 상기 이동시 상기 표적 폴리뉴클레오티드를 식별할 수 있는 센서를 각 포어에 포함한다. 일 양태에서, 상기 식별은 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 개별 성분을 식별하는 것을 수반한다. 또 다른 양태에서, 상기 식별은 상기 표적 폴리뉴클레오티드에 결합된 페이로드 분자를 식별하는 것을 수반한다. 단일 센서 사용시, 상기 단일 센서는 포어 양단에 배치된 2개의 전극을 포함하여 상기 포어를 통과하는 이온 전류를 측정할 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 단일 센서는 전극 이외의 구성 요소를 포함한다.
- [0136] 일 양태에서, 상기 장치는 2개의 포어를 통해 연결된 3개의 챔버를 포함한다. 3개 초과 챔버를 갖는 장치는 3-챔버 장치의 일 측면 상에 또는 상기 3개의 챔버 중 임의의 2개 사이에 하나 이상의 추가적인 챔버를 포함하도록 용이하게 설계될 수 있다. 마찬가지로, 상기 챔버를 연결하기 위해 상기 장치 내에 2개 초과 포어가 포함될 수 있다.
- [0137] 일 양태에서, 복수의 중합체 지지체가 한 챔버에서 다음 챔버로 동시에 이동할 수 있도록 하기 위해, 2개의 인접한 챔버 사이에 2개 이상의 포어가 존재할 수 있다. 이러한 다중 포어 설계로 인해 상기 장치에서의 표적 폴리뉴클레오티드 분석 처리량이 향상될 수 있다. 다중 검출(multiplexing)을 위해, 한 챔버가 한 유형의 표적 폴리뉴클레오티드를 갖고, 다른 챔버는 다른 표적 폴리뉴클레오티드 유형을 가질 수 있다.
- [0138] 일부 양태에서, 상기 장치는 표적 폴리뉴클레오티드를 한 챔버에서 다른 챔버로 이동시키는 수단을 추가로 포함한다. 일 양태에서, 상기 이동으로 인해, 표적 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 상기 표적 서열을 포함하는 증폭 생성물 또는 애플리곤)가 제 1 포어 및 제 2 포어 둘 다를 동시에 가로지르면서 탑재되게 된다. 또 다른 양태에서, 또한 상기 수단으로 인해, 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 동일한 방향으로 두 포어 모두를 통과하여 이동할 수 있다.
- [0139] 예를 들어, 3-챔버 2-포어 장치("2-포어"장치)에서, 상기 챔버 각각은 전원 공급 장치에 연결하기 위한 전극을 포함할 수 있어서 상기 챔버 사이의 포어 각각을 가로질러 별도의 전압이 인가될 수 있다.
- [0140] 일 실시형태에 따르면, 본 발명은 상부 챔버, 중간 챔버 및 하부 챔버를 포함하는 장치를 제공하며, 상기 상부 챔버는 제 1 포어를 통해 상기 중간 챔버와 소통하고, 상기 중간 챔버는 제 2 포어를 통해 상기 하부 챔버와 소통한다. 이러한 장치는 이전에 "이중-포어 장치(Dual-Pore Device)"라는 명칭의 미국 특허 출원 공보 제 2013-0233709호에 개시된 크기 또는 기타 특성 중 하나를 가질 수 있으며, 이 출원의 전체 내용은 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0141] 일 양태에서, 각 포어는 직경이 약 1 nm 이상이다. 대안적으로, 각각의 포어는 약 2nm 이상, 3nm 이상, 4nm 이상, 5nm 이상, 6nm 이상, 7nm 이상, 8nm 이상, 9nm 이상, 10nm 이상, 11nm 이상, 12nm 이상, 13nm 이상, 14nm 이상, 15nm 이상, 16 nm 이상, 17 nm 이상, 18 nm 이상, 19 nm 이상, 20 nm 이상, 25 nm 이상, 30 nm 이상, 35 nm 이상, 40 nm 이상, 45 nm 이상, 50 nm 이상, 60 nm 이상, 70 nm 이상, 80 nm 이상, 90 nm 이상 또는 100 nm 이상이다.
- [0142] 일 양태에서, 각 포어는 직경이 약 100 nm 이하이다. 대안적으로, 상기 포어는 직경이 약 95nm 이하, 90nm 이하, 85nm 이하, 80nm 이하, 75nm 이하, 70nm 이하, 65nm 이하, 60nm 이하, 55nm 이하, 50nm 이하, 45nm 이하, 40nm 이하, 35nm 이하, 30nm 이하, 25nm 이하, 20nm 이하, 15nm 이하 또는 10nm 이하이다.
- [0143] 일 양태에서, 상기 포어는 직경이 약 1 nm 내지 약 100 nm, 또는 약 2 nm 내지 약 80 nm, 또는 약 3 nm 내지 약 70 nm, 또는 약 4 nm 내지 약 60nm, 또는 약 5nm 내지 약 50nm, 또는 약 10nm 내지 약 40nm, 또는 약 15nm 내지 약 30nm이다.
- [0144] 일부 양태에서, 상기 포어는 실질적으로 둥근 형태를 갖는다. 본 명세서에서 사용된 "실질적으로 둥근(substantially round)"은 약 80% 또는 90% 이상 원통형(실린더형)인 형태를 의미한다. 일부 실시형태에서, 상

기 포어는 정사각형, 직사각형, 삼각형, 타원형 또는 육각형 형상이다.

- [0145] 일 양태에서, 상기 포어는 깊이가 약 1 nm 내지 약 10,000 nm, 또는 약 2 nm 내지 약 9,000 nm, 또는 약 3 nm 내지 약 8,000 nm 등이다.
- [0146] 일부 양태에서, 상기 나노포어는 멤브레인을 통해 연장된다. 예를 들어, 상기 포어는 지질 이중막에 삽입된 단백질 채널일 수 있다. 또는 상기 포어는 드릴링(drilling), 에칭(etching), 또는 이산화규소, 질화규소, 그래핀(graphene)과 같은 고체 상태의 기질 또는 이들 재료의 조합 또는 다른 재료와의 조합으로 형성된 층을 통과하여 상기 포어를 형성함으로써 제작될 수 있다. 나노포어는 지지체(스캐폴드):융합분자:페이로드 또는 촉매 활성 이후의 이 분자의 생성물이 상기 포어를 통과할 수 있도록 크기가 부여된다. 다른 실시형태에서, 상기 포어의 일시적인 차단이 분자 유형 식별에 바람직할 수 있다.
- [0147] 일부 양태에서, 상기 나노포어의 길이 또는 깊이는 두 개의 별도의 용적을 연결하는 채널을 형성할 정도로 충분히 크다. 이러한 일부 양태에서, 각각의 포어는 깊이가 100 nm 초과, 200 nm 초과, 300 nm 초과, 400 nm 초과, 500 nm 초과, 600 nm 초과, 700 nm 초과, 800 nm 초과 또는 900 nm 초과이다. 일부 양태에서, 각 포어는 깊이가 2000 nm 이하 또는 1000 nm 이하이다.
- [0148] 일 양태에서, 상기 포어는 약 10 nm 내지 약 1000 nm의 거리로 이격되어 있다. 일부 양태에서, 상기 포어들 사이의 거리는 1000 nm 초과, 2000 nm 초과, 3000 nm 초과, 4000 nm 초과, 5000 nm 초과, 6000 nm 초과, 7000 nm 초과, 8000 nm 초과 또는 9000 nm 초과이다. 일부 양태에서, 상기 포어는 30000 nm 이하, 20000 nm 이하 또는 10000nm 이하의 거리로 이격되어 있다. 일 양태에서, 상기 거리는 약 10 nm 이상, 또는 대안적으로 약 20 nm 이상, 30 nm 이상, 40 nm 이상, 50 nm 이상, 60 nm 이상, 70 nm 이상, 80 nm 이상, 90 nm 이상, 100 nm 이상, 150 nm 이상, 200 nm 이상, 250 nm 이상 또는 300 nm 이상이다. 다른 양태에서, 상기 거리는 약 1000 nm 이하, 900 nm 이하, 800 nm 이하, 700 nm 이하, 600 nm 이하, 500 nm 이하, 400 nm 이하, 300 nm 이하, 250 nm 이하, 200 nm 이하, 150 nm 이하 또는 100 nm 이하이다.
- [0149] 또 다른 양태에서, 상기 포어 간의 거리는 약 20 nm 내지 약 800 nm, 약 30 nm 내지 약 700 nm, 약 40 nm 내지 약 500 nm 또는 약 50 nm 내지 약 300 nm이다 .
- [0150] 상기 2개의 포어는, 상기 챔버들 간의 유체 소통이 허용되고 소정의 크기 및 거리를 갖는 한 임의의 위치에 배치될 수 있다. 일 양태에서, 상기 포어는 포어들 사이에 직접적인 막힘이 없도록 배치된다. 일 양태에서, 상기 포어는 실질적으로 동축이다(coaxial).
- [0151] 일 양태에서, 상기 장치는 하나 이상의 전원 공급 장치에 연결된 전극을 상기 챔버 내에 갖는다. 일부 양태에서, 상기 전원 공급 장치는 전압클램프(voltage-clamp) 또는 패치클램프(patch-clamp)를 포함하며, 이들은 각 포어를 가로질러 전압을 공급하고 각 포어를 통과하는 전류를 독립적으로 측정할 수 있다. 이러한 관점에서, 상기 전원 공급 장치 및 상기 전극 구성은 상기 중간 챔버를 두 전원 공급 장치에 대한 공통 접지로 설정할 수 있다. 일 양태에서, 상기 전원 공급 장치 또는 장치들은 상기 상부 챔버(챔버 A) 및 상기 중간 챔버(챔버 B) 사이에 제 1 전압(V_1)을 인가하고 상기 중간 챔버 및 상기 하부 챔버(챔버 C) 사이에 제 2 전압(V_2)을 인가하도록 구성된다.
- [0152] 일부 양태에서, 상기 제 1 전압(V_1) 및 상기 제 2 전압(V_2)은 독립적으로 조정 가능하다. 일 양태에서, 상기 중간 챔버는 상기 두 전압에 대하여 접지가 되도록 조정된다. 일 양태에서, 상기 중간 챔버는 상기 중간 챔버 내의 전극과 각각의 포어 사이에 전도도를 제공하기 위한 매질을 포함한다. 일 양태에서, 상기 중간 챔버는 상기 중간 챔버 내의 전극과 각각의 포어 사이에 저항을 제공하기 위한 매질을 포함한다. 나노포어 저항에 비해 이러한 저항을 충분히 작게 유지하는 것은 상기 포어를 가로지르는 상기 두 전압 및 전류를 분리시키는데 유용하며, 이는 상기 전압을 독립적으로 조정하는 데 도움이 된다.
- [0153] 상기 전압의 조정은 상기 챔버 내에서의 하전된 입자의 이동을 제어하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 두 전압이 동일한 극성으로 설정된 경우, 적절하게 하전된 입자는 상기 상부 챔버로부터 상기 중간 챔버로, 그리고 하부 챔버로, 또는 반대로, 순차적으로 이동될 수 있다. 일부 양태에서, 상기 두 전압이 반대 극성으로 설정된 경우, 하전된 입자는 상기 상부 또는 하부 챔버로부터 상기 중간 챔버로 이동되어 거기에 머무를 수 있다.
- [0154] 상기 장치에서의 상기 전압의 조정은 두 포어를 동시에 가로지르는 정도로 충분히 큰 대분자, 예를 들어 하전된 중합체 지지체의 이동을 제어하는데 특히 유용할 수 있다. 이러한 양태에서, 상기 분자의 이동 방향 및 속도는 아래에 기술된 바와 같이 전압의 상대적인 크기 및 극성에 의해 제어될 수 있다.

- [0155] 상기 장치는 액체 시료, 특히 생물학적 시료를 수용하는데 적합한 물질 및/또는 나노 제조에 적합한 물질을 함유할 수 있다. 일 양태에서, 이러한 물질에는 유전체 물질, 예를 들어 규소, 질화규소, 이산화규소, 그래핀, 탄소 나노튜브, TiO_2 , HfO_2 , Al_2O_3 또는 기타 금속층, 또는 이들 물질들의 임의의 조합이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 양태에서, 예를 들어, 약 0.3 nm 두께의 그래핀 멤브레인의 단일 시트가 상기 포어-함유 멤브레인으로 사용될 수 있다.
- [0156] 미세 유체 장치이며 2-포어 미세 유체 칩 구현물(two-pore microfluidic chip implementations)을 수용하는 장치는 다양한 수단 및 방법에 의해 제작될 수 있다. 두 개의 평행한 멤브레인으로 구성된 미세 유체 칩과 관련하여, 단일 빔으로 두 멤브레인을 동시에 뚫어 두 개의 동심 포어를 형성할 수 있지만, 임의의 적합한 정렬 기술과 함께 상기 멤브레인의 각 측면 상에 상이한 빔을 사용할 수도 있다. 일반적으로, 상기 하우징(housing)은 챔버 A 내지 챔버 C의 밀봉된 분리를 보장한다.
- [0157] 일 양태에서, 상기 장치는 스페이서(spacer)로 연결된 두 개의 평행한 멤브레인으로 구성된 미세 유체 칩("이중-포어 칩"으로 분류됨)을 포함한다. 각 멤브레인은 멤브레인의 증상을 통과하여 단일 빔으로 뚫린 포어를 함유한다. 또한, 상기 장치는 바람직하게는 상기 칩을 위한 테프론®(Teflon®) 하우징 또는 폴리카보네이트 하우징을 갖는다. 상기 하우징은 챔버 A 내지 챔버 C의 밀봉된 분리를 보장하며, 상기 전극에 대한 최소 접근 저항을 제공하여 각 전압이 주로 각각의 포어를 가로질러 인가되도록 한다.
- [0158] 보다 구체적으로, 상기 포어-함유 멤브레인은 5-100 nm 두께의 규소, 질화규소, 또는 이산화규소 층을 갖는 투과 전자 현미경(TEM) 격자를 이용하여 제조될 수 있다. 상기 멤브레인들을 분리하는데 스페이서가 사용될 수 있으며, 이는 절연체, 예를 들어 SU-8, 포토레지스트, PECVD 산화물, ALD 산화물, ALD 알루미늄, 또는 증발된 금속 물질, 예를 들어 Ag, Au, 또는 Pt를 사용하며 상기 멤브레인들 사이의 챔버 B에서 상기 멤브레인이 없으면 수성일 부분 내에 작은 용적을 차지한다. 홀더는 챔버 B의 가장 큰 용적 분획으로 구성된 수성 배스(aqueous bath)에 배치된다. 챔버 A 및 챔버 C는 멤브레인 밀봉 부분으로 이어지는 직경이 더 큰 채널(낮은 접근 저항을 위한 것임)에 의해 접근 가능하다.
- [0159] 집속 전자 또는 이온 빔을 사용하여 상기 멤브레인을 통과하여 포어를 뚫고 이들을 자연스럽게 정렬할 수 있다. 또한, 상기 포어는 각 층에 정확한 빔을 적용함으로써 더 작은 크기로 만들(축소할) 수 있다. 단일 나노포어 드릴링 방법을 사용하여, 특정한 방법 및 상기 멤브레인의 두께에 대해 가능한 드릴 깊이를 고려하여 상기 두 개의 멤브레인에 한 쌍의 포어를 뚫을 수도 있다. 소정의 깊이로 마이크로포어를 미리 뚫은 다음 멤브레인의 나머지 부분에 나노포어를 뚫어서 멤브레인 두께를 추가로 개선할 수도 있다.
- [0160] 상기 장치의 포어에 존재하는 전압으로 인해, 하전된 분자가 챔버 사이의 포어를 통과하여 이동될 수 있다. 상기 이동의 속도 및 방향은 상기 전압의 크기 및 극성에 의해 제어될 수 있다. 또한, 두 전압 각각이 독립적으로 조정될 수 있기 때문에, 하전된 분자의 이동 방향 및 속도가 각 챔버에서 정교하게 제어될 수 있다.
- [0161] 일 실시예는 두 개의 공극의 깊이와 상기 두 개의 공극 간의 거리의 합을 포함하는 조합된 거리보다 긴 길이를 갖는 표적 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 예를 들어, 1000 bp dsDNA는 길이가 약 340 nm이고, 이는 깊이가 10 nm이고 20 nm만큼 이격되어 있는 두 개의 포어에 걸린 길이 40 nm보다 훨씬 더 길 것이다. 제 1 단계에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 상부 또는 하부 챔버로 탑재된다. 약 7.4 pH의 생리학적 조건 하에서의 음전하로 인해, 상기 폴리뉴클레오티드는 전압이 인가되는 포어를 가로질러 이동할 수 있다. 따라서, 제 2 단계에서는, 동일한 극성 및 동일하거나 유사한 크기의 두 개의 전압을 포어에 인가하여, 두 포어를 가로질러 상기 폴리뉴클레오티드를 순차적으로 이동시킨다.
- [0162] 상기 폴리뉴클레오티드가 상기 제 2 포어에 도달할 때쯤, 상기 전압 중 하나 또는 모두를 변화시킬 수 있다. 상기 두 포어 간의 거리가 상기 폴리뉴클레오티드의 길이보다 더 짧도록 선택되기 때문에, 상기 폴리뉴클레오티드가 상기 제 2 포어에 도달할 때, 이는 또한 제 1 포어 내에도 존재한다. 따라서, 상기 제 1 포어에서의 전압의 극성의 빠른 변화는 상기 폴리뉴클레오티드를 상기 제 2 포어로부터 끌어당기는 힘을 발생시킬 것이다.
- [0163] 상기 두 포어가 동일한 전압-힘 영향 하에 있고 $|V_1| = |V_2| + \delta V$ 이라고 가정할 때, $|V_1|$ (또는 V_2) 방향으로 조율 가능한 이동을 하기 위해 $\delta V > 0$ (또는 < 0)을 조정할 수 있다. 실제로, 각 포어에서의 전압-유도된(voltage-induced) 힘은 $V_1 = V_2$ 와 동일하지는 않지만, 보정 실험을 수행하여 특정한 2-포어 칩에 대하여 동일한 당김력(pulling forces)을 초래할 적절한 바이어스 전압을 확인할 수 있으며; 그런 다음, 상기 바이어스 전압 주변에서의 변화를 이용하여 방향을 제어할 수 있다.

- [0164] 여기에서, 상기 제 1 포어에서의 전압-유도된 힘의 크기가 상기 제 2 포어에서의 전압-유도된 힘의 크기보다 작으면, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 제 2 포어를 향해, 하지만 더 낮은 속도로, 두 포어를 가로질러 계속 이동할 것이다. 이러한 점에서, 상기 폴리뉴클레오티드의 이동 속도 및 방향은 두 전압의 극성 및 크기에 의해 제어될 수 있다는 점이 쉽게 인식된다. 아래에 추가로 기술되는 바와 같이, 이러한 정교한 이동 제어는 광범위하게 응용 가능하다. 표적 폴리뉴클레오티드의 정량에 있어 2-포어 장치 구현물의 유용성은, 제어된 전달 및 감지 동안 상기 표적 폴리뉴클레오티드 또는 상기 페이로드결합된 표적 폴리뉴클레오티드가 반복적으로 측정될 수 있어 검출 결과에 신뢰 수준을 부가한다는 것이다.
- [0165] 따라서, 일 양태에서, 본원은 나노포어 장치를 통과하는 하전된 중합체 지지체의 이동을 제어하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (a) 상기 실시형태 중 어느 하나의 장치의 상기 상부 챔버, 중간 챔버 또는 하부 챔버 중 하나에 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 시료(예를 들어, 표적 폴리뉴클레오티드 앰플리콘)를 탑재하는 단계로서, 상기 장치는 상기 상부 챔버 및 상기 중간 챔버 사이에 제 1 전압을 공급하고 상기 중간 챔버 및 상기 하부 챔버 사이에서 제 2 전압을 제공하기 위한 하나 이상의 전원 공급 장치에 연결되는 단계; (b) 상기 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 챔버 사이를 이동하도록 초기 제 1 전압 및 초기 제 2 전압을 설정하여, 상기 제 1 및 제 2 포어 둘 다를 가로지르도록 상기 중합체 지지체를 배치시키는 단계; 및 (c) 상기 제 1 전압 및 상기 제 2 전압을 조정하여 두 전압이 상기 중간 챔버로부터 상기 하전된 표적 폴리뉴클레오티드를 끌어당기는 힘을 생성하도록 하는 단계(전압-경쟁 방식)로서, 상기 두 전압은 제어된 조건하에서 크기가 상이하여 상기 표적 폴리뉴클레오티드 지지체가 두 포어를 가로질러 어느 방향으로든 제어된 방식으로 이동하는 단계를 포함한다.
- [0166] 일 양태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드를 함유하는 시료가 상기 상부 챔버에 탑재되고 상기 초기 제 1 전압은 상기 표적 폴리뉴클레오티드를 상기 상부 챔버로부터 상기 중간 챔버로 끌어당기도록 설정되고 상기 초기 제 2 전압은 상기 표적 폴리뉴클레오티드를 상기 중간 챔버로부터 상기 하부 챔버로 끌어당기도록 설정된다. 마찬가지로, 상기 시료는 초기에 상기 하부 챔버에 탑재될 수 있고, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 상기 중간 및 상부 챔버로 끌어당겨질 수 있다.
- [0167] 또 다른 양태에서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드를 함유하는 시료는 상기 중간 챔버에 탑재되고; 상기 초기 제 1 전압은 상기 하전된 중합체 지지체를 상기 중간 챔버로부터 상기 상부 챔버로 끌어당기도록 설정되고; 상기 초기 제 2 전압은 상기 표적 폴리뉴클레오티드를 상기 중간 챔버로부터 상기 하부 챔버로 끌어당기도록 설정된다.
- [0168] 일 양태에서, 단계 (c)에서의 상기 제 1 전압 및 상기 제 2 전압에 대한 실시간 또는 온라인 조정이 최고 수백 메가헤르츠의 클럭 속도(clock rate)에서 전용 하드웨어 및 소프트웨어를 사용하여 능동 제어 또는 피드백 제어에 의해 수행된다. 상기 제 1 전압, 제 2 전압, 또는 두 전압 모두에 대한 자동화된 제어는 제 1 전압, 제 2 전압, 또는 두 전압 모두에 대한 이온 전류 측정치 피드백에 기초한다.
- [0169] **센서**
- [0170] 상술한 바와 같이, 다양한 양태에서, 상기 나노포어 장치는 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 검출을 수행하기 위한 하나 이상의 센서를 추가로 포함한다.
- [0171] 상기 장치에 사용되는 센서는 페이로드 분자에 결합되거나 결합되지 않은 표적 폴리뉴클레오티드 앰플리콘을 식별하는데 적합한 임의의 센서일 수 있다. 예를 들어, 센서는 상기 표적 폴리뉴클레오티드와 관련된 전류, 전압, pH 값, 광학적 특징 또는 체류 시간을 측정함으로써 상기 중합체를 식별하도록 구성될 수 있다. 다른 양태에서, 상기 센서는 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 개별 성분 또는 상기 표적 폴리뉴클레오티드에 결합되거나 부착된 하나 이상의 성분을 식별하도록 구성될 수 있다. 상기 센서는 측정 가능한 매개 변수의 변화를 검출하도록 구성된 임의의 구성 요소로 형성될 수 있으며, 여기에서 상기 변화는 상기 표적 폴리뉴클레오티드, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 성분, 또는 바람직하게는 상기 표적 폴리뉴클레오티드에 결합된 성분을 나타낸다. 일 양태에서, 상기 센서는 분자 또는 기타 개체, 특히 표적 폴리뉴클레오티드가 상기 포어를 통해 이동할 때 상기 포어를 가로지르는 이온 전류를 측정하기 위해, 상기 포어의 양 측면에 배치된 전극 쌍을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 포어를 가로지르는 이온 전류는 상기 포어를 통과하는 표적 폴리뉴클레오티드 부분이 페이로드 분자에 결합될 때 측정 가능하게 변화한다. 이러한 전류의 변화는, 예를 들어 상기 표적 폴리뉴클레오티드 분자의 존재, 부재, 및/또는 크기에 따라 예측 가능하고 측정 가능한 방식으로 변화할 수 있다.
- [0172] 바람직한 실시형태에서, 상기 센서는, 전압을 인가하고 상기 나노포어를 가로지르는 전류를 측정하는데 사용되는 전극을 포함한다. 상기 나노포어를 통과하는 분자의 이동은 옴의 법칙 $V = IZ$ 에 따라 상기 나노포어를 통과하는 전류에 영향을 주는 전기 임피던스(Z)를 제공하며, 여기에서 V 는 인가된 전압, I 는 상기 나노포어를 통과

하는 전류이고, Z 는 임피던스이다. 반대로, 나노포어 이벤트를 신호하고 정량하기 위해 전도도 $G = 1/Z$ 가 관찰된다. 분자가 전기장 내에서(예를 들어, 전압 인가 하에서) 나노포어를 통해 이동할 때의 결과는 전류 신호의 추가 분석시 상기 나노포어를 통과하는 분자와 상관될 수 있는 전류 신호이다.

[0173] 전류 신호로부터의 체류 시간 측정치가 사용될 때, 상기 구성 요소의 크기는 상기 감지 장치를 통과하는데 걸리는 시간의 길이에 기초하여 상기 특정 구성 요소와 상관될 수 있다.

[0174] 일 실시형태에서, 상기 중합체, 상기 중합체의 성분(또는 단위), 또는 상기 중합체에 결합되거나 부착된 성분의 광학적 특성을 측정하는 센서가 상기 나노포어 장치에 제공된다. 이러한 측정의 일례에는 특정 단위에 고유한 흡수 밴드를 적외선(또는 자외선) 분광법으로 식별하는 것이 포함된다.

[0175] 일부 실시형태에서, 상기 센서는 전기 센서이다. 일부 실시형태에서, 상기 센서는 형광성 신호를 검출한다. 이 신호를 검출하기 위해 상기 포어의 출구에 배치된 방사선원(radiation source)이 사용될 수 있다.

[0176] 실시예

[0177] 하기 실시예 및 실험을 참조하여 본 기술을 추가로 정의한다. 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 많은 변형이 실시될 수 있다는 점은 당업자에게 명백할 것이다.

[0178] 실시예 1: DNA의 나노포어 검출

[0179] 고체 상태 나노포어는 두 개의 수성 용적을 분리하는 얇은 고체 상태 멤브레인에 형성된 나노 규모 개구이다. 전압클램프 증폭기는 상기 개방된 포어를 통과하는 이온 전류를 측정하면서 상기 멤브레인에 전압 V 를 인가한다. 다른 단일 분자 센서와 달리, 상기 나노포어 장치는 매우 저렴한 비용으로 휴대형 인자에 포장될 수 있다. 이중 가닥 DNA(dsDNA)와 같은 단일 하전 분자가 전기 영동에 의해 상기 포어를 통해 포집되고 이동될 때, 전류 시프트 측정치, 전도도 시프트 깊이($\delta G = \delta I/V$) 및 지속 시간이 상기 이벤트를 특징짓는 데 사용된다(도 6의 a).

[0180] 일부 실시형태에서, δG (ΔG 로도 표기됨) 값은 평균 전류 시프트를 전압으로 나눈 값으로 계산된다. 다른 실시형태에서, δG (ΔG 로도 표기됨) 값은 최대 전류 시프트를 전압으로 나눈 값으로 계산된다. 일반적으로 지속 시간은 시프트 폭으로 계산된다.

[0181] 실험 도중의 많은 이벤트를 기록한 후, 상기 이벤트의 분포를 분석하여 대응하는 분자를 특징짓는다. 도 6의 b는 전압 $V = 100$ mV(1M LiCl)에서 27 nm 직경의 나노포어를 통과하면서 10분간 744건의 기록 이벤트를 생성한 0.1 nM의 3.2 kb dsDNA의 이벤트 특성을 도시한다. 두 개의 원으로 표시된 대표적인 이벤트는, DNA가 펼쳐진 상태로 통과할 때 더 넓고 얇은 이벤트가 생성되고, DNA가 접힌 상태로 통과할 때 더 빠르지만 더 깊은 이벤트가 생성됨을 나타낸다. 1kb 이하의 dsDNA는 펼쳐진 상태로만 상기 포어를 통과한다.

[0182] 나노포어 실험에서는 전기적 노이즈(noise) 스파이크가 거짓-이벤트(false-event)(전기적 "배경 노이즈(noise)")를 생성하는 것이 일반적이다. 이러한 거짓 이벤트는 3.2kb 이벤트보다 빠르고 얇아서 식별하기 용이하다. 일반적으로 분당 배경 이벤트 1-2는 멤브레인의 일시적인 용량 변화로 인해 완충액에서만 관찰되며 빠르고(<0.1 ms) 얇은(<1.5 nS) 이벤트를 생성한다. 아래 실시예에 기재된 바와 같이, 짧은 DNA를 사용할 때, 배경 전기적 노이즈(noise) 거짓 이벤트는 실제 DNA 이벤트와 분리하기 어렵기 때문에 실제 이벤트와 거짓 이벤트를 구분하기가 어렵다. 5 nm 미만의 나노포어는 노이즈(noise)에 의한 거짓 이벤트로부터 DNA의 실제 이벤트를 분리할 수 있는 반면(Briggs, Kyle, Harold Kwok, and Vincent Tabard-Cossa. "Automated Fabrication of 2-Nm Solid-State Nanopores for Nucleic Acid Analysis." Small 10, no. 10 (May 28, 2014): 207786. doi:10.1002/smll.201303602), 이러한 포어는 다른 배경 분자 유형(예를 들어, 시료 또는 PCR 반응 혼합물 또는 결합되지 않은 페이로드 분자)이 소량만 존재해도 막히는 경향이 있다. 이는 많은 배경 분자들의 크기가 5 nm 이상이어서(예를 들어, 페이로드로 작용하는 모노스트렙타비딘 단백질은 5 nm 이하이다), 상기 포어가 5 nm 이하일 때 상기 포어 내에 포집될 수는 있지만 상기 포어를 통과할 수는 없기 때문이다. 이러한 다양한 유형의 배경 분자에 내성을 갖기 위해, 직경이 5 nm 이상인 포어를 사용하는 것이 바람직하다. 결과적으로, 짧은 앰플리콘(예를 들어, 500 bp 이하)의 경우, 정량하기 위해서는 페이로드를 부착하여 (큰) 나노포어에서 충분히 관찰될 수 있도록 해야 한다. 반면에 500 bp보다 큰 앰플리콘(예를 들어, 1 kb)은 시료(구강 면봉 채취물, 전혈) 및 다양한 희석도의 PCR 반응 혼합물을 포함한 다양한 유형의 배경의 존재 하에, 페이로드 부착 없이 더 큰 포어(직경이 10 nm 이상 50 nm 이하)로 정량될 수 있다.

[0183] 실시예 2: 앰플리콘 생성 및 페이로드 부착 방법

- [0184] 페이로드-결합된 DNA를 사용하는 다음 실시예에서는 다음과 같은 길이의 앰플리콘을 사용한다: 500 bp DNA, 470 bp DNA(SRY 유전자를 포함함) 및 362 bp DNA(SMCY 유전자를 포함함)를 사용한다.
- [0185] SRY(성 결정 영역 Y) 유전자는 Y-염색체 상에 위치하며, 따라서 남성에게만 존재한다. SRY 유전자(더 정확히 말하면 이의 영역)의 부족은 남성 불임(Abusheikha, N., A. Lass, and P. Brinsden. "XX males without SRY gene and with infertility: Case report." *Human Reproduction* 16.4 (2001): 717-718) 또는 기타 건강 질환(예를 들어, 스와이어 증후군(Swyer syndrome))의 보편적인 원인이다. 따라서, 중합 효소 연쇄 반응(PCR) 분석법은 불임 남성에 결핍된 SRY 유전자 부분을 증폭시켜 남성성 및 불임 가능성에 대한 시험을 제공하도록 설계될 수 있다. 상기 앰플리콘이 생성되는 경우, 상기 시험은 남성에서 유래하며 SRY 유전자의 상기 영역을 함유한다.
- [0186] 가임 남성으로부터의 구강 스왑(swab)을 1x Terra Direct Buffer(p/n 639287), 0.3 μ M SRY 순방향 프라이머(GAATATTCCTCCGCTCTCCGGA), 0.3 μ M SRY 역방향 프라이머(GCTGGTGCTCCATTCTTGAG) 및 PCR Direct Polymerase Terra Mix(p/n 639287) 1 μ l과 혼합함으로써, SRY 유전자의 470 염기쌍 부분을 증폭하였다. 이 반응 혼합물에 다음과 같은 6-단계 PCR 프로토콜을 수행하였다: 1) 98° C에서 2 분간, 2) 98° C에서 10 초간, 3) 60° C에서 15 초간, 4) 68° C에서 1 분간, 5) 2) 내지 4) 단계를 40 사이클 반복 6) 4° C에서 유지. 상기 분자의 5' 및/또는 3' 말단에 비오틴을 도입하기 위해, 5' 말단이 비오틴화된 프라이머를 상기 반응 혼합물에 사용하였다. 출발 시료 물질로서 1:1000 희석 혈액 방울 2 μ l를 사용하여 동일한 반응을 수행하였다. 음성 대조군으로서의 비특이적인 증폭에 대비하여 시험하기 위해, 결과물이 생성되지 않을 것으로 예측되는 물질인 물 또는 여성의 구강 스왑을 시료로 사용하였다.
- [0187] SMCY 유전자는 Y-염색체 상에 위치하며 따라서 남성에게만 존재한다. SMCY 유실은 전립선 암에서 관찰되며 암이 진행됨에 따라 빈도가 증가한다(PERINCHERY, GEETHA, et al. "Deletion of Y-chromosome specific genes in human prostate cancer." *The Journal of urology* 163.4 (2000): 1339-1342).
- [0188] 상기와 동일한 프로토콜을 사용하되 SMCY 유전자 특이적 프라이머(순방향 프라이머 CCTCCAGACCTGGACAGAAT, 역방향 프라이머 TGTGGTCTGTGGAAGGTGCA)를 사용하여 SMCY 유전자의 증폭을 수행하였다. 그 결과 362 염기쌍의 앰플리콘이 생성되었다.
- [0189] 열순환 처리 이후, 이용 가능한 비오틴 분자에 약 10 배 초과량의 페이로드를 추가함으로써 비오틴화된 DNA(SRY 및 SMCY)를 모노스트랩타비딘 페이로드 또는 항-비오틴 항체 페이로드로 태그 부착하였다. 증폭 반응 동안 생성되는 비오틴화된 DNA(SRY 및 SMCY)의 양을 확인하기 위해, PCR 생성물을 PCR 반응 혼합물로부터 정제하고 분광광도계를 사용하여 정량하는 별도의 실험을 수행하였다.
- [0190] 별도의 PCR 반응 산물 5 μ l로 2%가 포함된 아가로오스 겔을 이용하여 수행된 복수의 반응으로부터의 증폭 일관성을 입증하였다(도 8, 좌측 이미지). 이어서, 모노스트랩타비딘 단백질(비오틴 부위에 대해 10X)과 함께 배양하여 상기 페이로드를 부착시켰다(0개, 1개 또는 2개). PCR 생성물이 모노스트랩타비딘 단백질 1 개(비오틴 개질된 프라이머가 1개 사용된 경우) 또는 2개(개질된 프라이머가 2개 사용된 경우)에 의해 효과적으로 별크화되는지 확인하기 위해, 상기 혈액 방울 원재료에 대해 2% 아가로오스 겔을 사용하였다(도 8, 우측 이미지). 여성의 구강 스왑을 출발 물질로 사용하는 음성 대조군도 겔을 사용하여 입증하였으며, 여기에서는 관찰 가능한 밴드가 생성되지 않았다(미도시).
- [0191] SRY 앰플리콘을 생성하기 위해 사용된 구강 스왑 원재료로부터의 시약을 5% 폴리아크릴아미드 겔에서 150 V로 80 분 동안 전기 영동시켰다. 그런 다음 상기 DNA를 1% Sybr Green DNA 특이적 형광 염료의 1x 용액(시료 7.5 μ l + 염료 1.5 μ l)으로 염색하고 자외선을 사용하여 이미지화하였다. 존재하는 경우, 모든 겔에서의 "M"은 상기 DNA를 추적하기 위한 100 bp 사이징 마커(sizing marker)를 나타낸다. 도 11은 수행된 SRY 앰플리콘을 다음 순서로 도시한다. 레인 1) SRY 앰플리콘, 레인 2) 1 개의 항-비오틴 항체 페이로드가 부착된 SRY 앰플리콘, 3) 2 개의 항-비오틴 페이로드가 부착된 SRY 앰플리콘이다. 레인 2와 레인 3의 작고 낮은 밴드는 각각 페이로드 없는 SRY와 1 개의 페이로드가 있는 SRY를 나타냈다. 다른 겔(도 15)에서는 20X 모노스트랩타비딘의 존재 하에서, 프라이머 개질되지 않은 SRY(레인 1)를 1 개의 비오틴화된 프라이머(레인 2) 및 2 개의 비오틴화된 프라이머(레인 3)의 경우와 비교하여, 결합 반응의 특이성을 도시한다(레인 4는 SRY가 없는 모노스트랩타비딘을 나타냄).
- [0192] SMCY 앰플리콘을 생성하기 위해 사용된 구강 스왑 원재료로부터의 PCR 반응물 5 μ l(대략 100 ng의 DNA)을 5% 폴리아크릴아미드 겔에서 150 V에서 80분 동안 전기 영동시켰다. 도 20은 수행된 SMCY 앰플리콘을 다음 순서로 도시한다. 레인 1) SMCY 앰플리콘, 레인 2) 1개의 모노스트랩타비딘 페이로드가 첨부된 SMCY 앰플리콘, 레인 3) 2개의 모노스트랩타비딘 페이로드가 첨부된 SMCY이다.

- [0193] 열순환 처리 및 페이로드 부착(해당되는 경우) 이후, 시료를 기록 완충액으로 희석하여 pH 7.5에서 1 M LiCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA 내에서의 최종 SRY 또는 SMCY 농도 0.1 nM 내지 1 nM를 수득하였다.
- [0194] **실시예 3: SRY 유전자 검출**
- [0195] 페이로드가 부착되지 않은 SRY 앰플리콘 이벤트 및 전기적 노이즈(noise) 배경 거짓이벤트는 구별할 수 없으므로, 상기 분석이 거짓 양성에 너무 민감해지게 된다. 특히, 도 7은 상기 포어를 통과하는 개별 분자의 최대 시프트 대비 지속 시간의 이벤트 플롯(100 mV)을 도시하여, 페이로드가 없는 SRY 앰플리콘(흑색)을 전기적 배경 이벤트(적색)와 비교한 것이다. 상기 SRY가 1 nM(고농도)이지만, 대부분의 이벤트를 놓치며, 분당 3.5건의 검출 이벤트만이 생성되었다(69 이벤트, 20분). 이는 배경 이벤트 집단(47 이벤트, 75 분)과 이벤트 비율 및 분포 면에서 중첩된다. 대부분의 DNA 이벤트를 탐지할 수 없으며 배경과 구별할 수 없기 때문에 포집률로부터의 농도 유추가 불가능하다. 이 실험에서는 15 nm 멤브레인에서 20 nm 포어를 사용하였다.
- [0196] 반면, 하나 및 두 개의 모노스트랩타비딘 단백질 페이로드가 부착된 SRY 앰플리콘(각각 SRY-1MS 및 SRY-2MS)은, 이벤트 비율의 증가 및 노이즈(noise) 이벤트에서는 생성되지 않는 명확한 이벤트 분포 면에서, 전기적 노이즈(noise) 배경 거짓-이벤트와 명확하게 구별되었다. 특히, 페이로드-부착된 SRY 분자를 겔 가공(gel proofing)한 후에(도 8), 도 7에 도시된 동일한 나노포어 상에서 상기 시약을 순차적으로 시험하여, 도 9에서 a의 최대 시프트 대비 지속 시간의 이벤트 분포 플롯을 생성하였다. 도 9의 b는 최대 시프트 이벤트 막대 그래프를 도시한 것이다. 상기 SRY-1MS 복합체는 45분 동안 1074건의 이벤트를 생성하였으며, 0.072 ms보다 긴 이벤트의 비율은 41.5%(446건)였다. 상기 SRY-2MS 복합체는 80분 동안 937건의 이벤트를 생성했으며, 0.072 ms보다 긴 이벤트의 비율은 43.9%(411건)였다. 이에 비해, 0.072 ms보다 긴 노이즈(noise) 거짓-이벤트는 28%였다. 또한 페이로드가 없는 SRY 이벤트는 0.072 ms보다 긴 이벤트를 단지 4.4% 생성하였다.
- [0197] 상기 "검출의 통계적 유의성 부여" 섹션에서 확립된 프레임워크를 적용함으로써, 1개 및 2개의 페이로드가 결합된 SRY 앰플리콘의 검출에 통계적 신뢰 수준을 부여할 수 있다. 구체적으로, 배경 이벤트는 유형 1로 간주되고 DNA-페이로드 이벤트는 유형 2로 간주된다. 실시예 기준은 이벤트가 0.072 ms보다 긴 경우 해당 이벤트를 유형 2로 태그하는 것이다. 배경 노이즈(noise) 거짓-양성 이벤트를 사용하여 $q1 = 0.28(28\%)$ 을 계산할 수 있다.
- [0198] 상기 DNA-페이로드 결과는 모의 검출 실험으로서 사용될 수 있고, 또한 상기 수학적 프레임워크의 방정식 (1)을 적용함으로써 유형 2 분자가 존재하는지 여부를 측정하는데 사용될 수 있다. 유형 2 분자인 SRY-1MS의 경우, 결과는 $Q(p) - Q_{sd}(p) = 0.415 - 0.037 = 0.38 > 0.28$ 이며, 이는 SRY-1MS 분자가 존재한다고 99% 신뢰 수준에서 말할 수 있음을 의미한다. 유형 2 분자인 SRY-2MS의 경우, 결과는 $Q(p) - Q_{sd}(p) = 0.439 - 0.04 = 0.40 > 0.28$ 이며, 이는 SRY-2MS 분자가 존재한다고 99% 신뢰 수준에서 말할 수 있음을 의미한다. 반면, SRY 이벤트 집단은 방정식 (1)의 기준을 만족시키지 못하므로, SRY 분자가 배경 위에 존재한다고 99% 신뢰 수준으로 말할 수 없다.
- [0199] 도 10은 각 시약 유형(SRY, SRY-1MS, SRY-2MS)에 대한 기록 시간의 함수로서 $Q(p) \pm Q_{sd}(p)$ 의 플롯을 도시한다. 상기 추세를 배경 거짓-양성 이벤트로부터 확인된 거짓-양성 임계값과도 비교한다. SRY-1MS와 SRY-2MS는 기록 후 5분 내에 99%의 신뢰 수준에서 검출된다.
- [0200] 이벤트를 유형 2로 태그하는 것의 예시 기준은, 페이로드-부착된 SRY 분자 유형 모두에 대해 양성 검출 결과를 산출한 0.072 ms보다 이벤트 지속 시간이 긴지 여부이다. 이 결과는 지속 시간 임계값을 변경하는 동안에도 유지되어, 상기 결과가 고유하거나 협소한 기준값 범위에 의존하지 않음을 보여준다. 이벤트 지속 시간이 0.02 내지 0.1 ms 사이의 임의의 값이면 동일한 검출 결과가 유지된다.
- [0201] 상이한 기준 또한 사용될 수 있고 검출 결과는 여전히 유지된다. 구체적으로 최대 $\delta G > 1$ nS이면 이벤트를 유형 2로 태그하는 기준을 고려할 수 있다. 배경 노이즈(noise) 거짓-양성 이벤트를 사용하여 $q1 = 0.23(23\%)$ 을 계산할 수 있다. 이 기준을 사용하면, 유형 2 분자인 SRY-1MS에 대해, $Q(p) - Q_{sd}(p) = 0.333 - 0.037 = 0.29 > 0.23$ 이며, 이는 SRY-1MS 분자가 존재한다고 99% 신뢰 수준에서 말할 수 있음을 의미한다. 유형 2 분자인 SRY-2MS의 경우, 2 개의 페이로드를 갖는 이들 분자가 더 깊은 이벤트를 더 많이 생성하기 때문에 그 결과가 더 두드러진다. 구체적으로, $Q(p) - Q_{sd}(p) = 0.581 - 0.041 = 0.54 > 0.23$ 이며, 이는 SRY-2MS 분자가 존재한다고 99%의 신뢰 수준에서 말할 수 있음을 의미한다. 전술한 바와 같이, SRY 이벤트 집단은 방정식 (1)의 기준을 만족하지 못하기 때문에($Q(p) = 0.13$ 이기 때문에), 상기 SRY 분자가 배경 위에 존재한다고 99% 신뢰 수준에서 존재한다고 말할 수 없다.
- [0202] 최대 $\delta G > 1$ nS 기준의 결과는, 이 기준이 SRY-1MS 분자를 포함하는 배경 위의 SRY-2MS 분자를 검출하는 데 사

용될 수 있음을 암시한다. 즉, 분석에서 단일 MS 페이로드를 사용하여 1MS-결합된 표적을 검출한 후 이어서 이중 MS 페이로드 생성물을 시험한 경우, 최대 $\delta G > 1$ nS 기준을 사용하여 2MS-결합된 표적이 존재하는지 여부를 확인할 수 있다. 이로 인해 일종의 멀티플렉싱이 제공된다. 이 데이터 세트에서, SRY-1MS가 배경의 한 형태라면, 방정식 (1)의 적용시 $q_1 = 0.333$ 이다. $Q(p) - Q_{sd}(p) = 0.581 - 0.041 = 0.54 > 0.333$ 이므로, SRY-2MS 분자가 SRY-1MS 분자를 포함하는 배경 위에 존재한다고 99% 신뢰 수준에서 말할 수 있다.

[0203] 실시예 4: 더 큰 페이로드를 갖는 더 큰 나노포어에서의 SRY 유전자 검출

[0204] 아래의 데이터는 화학적 개질(비오틴)을 포함하는 프라이머를 사용하여 앰플리콘을 “벌크화(bulking)” 하는 방법을 입증하며, 여기에서 “벌크화” 페이로드는 항체이다. 겔 이미지로부터 1개 및 2개의 페이로드가 결합된 SRY 분자에서의 신뢰 수준이 증명되었다(도 11). 항-비오틴 항체(bAb)는 모노스트렙타비딘(66 kDa)보다 약 3배 더 크며(150 kDa), 더 큰 페이로드를 제공한다. 페이로드가 더 크기 때문에, Ab-결합된 SRY 이벤트가 MS-결합된 SRY에서 관찰된 것보다 더 깊은 임피던스 시프트를 가질 것으로 예측되었으며 데이터로부터 증명되었다. 예를 들어 1.5 nS보다 깊은 SRY-2MS 이벤트의 비율은 16.0085%(150/937)이고 이는 20 nm 포어를 사용한 경우이다. 이에 비해 1.5 nS보다 깊은 SRY-2bAb 이벤트의 비율은 60.023%(1042/1736)이고, 이는 2배 큰 포어(직경 45 nm 포어, 30 nm 멤브레인)를 사용한 경우이다. 대조적으로, 페이로드가 없는 SRY는 30분 동안 41건의 이벤트만을 생성하였으며, 1.5 nS보다 깊은 이벤트는 12.2%에 불과했다. 도 12는 페이로드가 없는 SRY(흑색) 및 SRY-2bAb(핑크색)에 대해, 상기 포어를 통과하는 개별 분자의 최대 δG 대비 최대 지속 시간의 이벤트 플롯을 도시한다. 따라서 페이로드가 클수록 깊은 이벤트 신호를 제공하며 큰 나노포어에서의 검출(99% 신뢰 수준)도 가능해진다.

[0205] 실시예 5: PCR 배경으로부터의 앰플리콘의 식별

[0206]하기 실시예는 PCR 앰플리콘이 다음 두 가지 방법 중 하나로 PCR 반응 혼합물로 인한 배경 이벤트로부터 식별될 수 있음을 입증한다. 즉, 길이가 1000 bp 이상인 앰플리콘을 사용하는 방법(도 13) 또는 페이로드를 첨가하는 방법이다(도 14).

[0207]도 13은 22 nm 멤브레인에서 25 nm 포어를 사용하여, PCR 배경 존재 하에서의 0.7 nM 1074 bp 앰플리콘의 이벤트 분포 플롯(청색) 및 PCR 배경 단독의 이벤트 분포 플롯(흑색)을 도시한다. 두 경우 모두 1:10 희석 PCR 배경을 사용하였다. 희석은 예상되는 앰플리콘 비율에 비해 배경 이벤트 비율이 너무 크지 않도록 제어될 수 있다. PCR로부터의 배경으로 인한 더 뚜렷하고 분산된 이벤트가 존재하는 경우, 배경 대비 표적 서열의 검출 가능한 이벤트 비율이 식별 인자가 된다. 상기 앰플리콘은 충분히 길기 때문에, 검출이 가능하다.

[0208]15 사이클의 PCR(5.6 지지체(스캐폴드)를 사용하는 808 pg의 주형)을 수행하고 정제 없이 기록 완충액으로 1:10으로 희석하여 0.7 nM의 1074 bp DNA를 수득하였고, 이는 10분 동안 1502건의 이벤트를 생성하였다(2.51/초). PCR 배경은 10분 동안 97건의 이벤트를 생성하였다(0.171/초). 측정된 PCR 반응 혼합물은 주형 대신에 물을 이용한 반응(주형이 첨가되면 사용되었을 체적과 등가인 체적의 물)을 사용하여 생성하였고, 마찬가지로 15회 사이클링한 다음 기록 완충액(recording buffer)으로 1:10으로 희석하였다.

[0209]PCR 배경은, 사용된 증폭 프로토콜에 따라 존재할 수 있는 여러 요소들 중에 특히, 비혼성 프라이머(non-hybridized primers), dNTP(디옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트, dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 중합 효소(예를 들어, Taq 또는 Pfu), 염(염화마그네슘, 황산마그네슘, 황산암모늄, 염화나트륨, 염화칼륨), BSA(소 혈청 알부민-안정제) 및 세척제(트리톤 X-100)를 포함한다.

[0210]도 14는 PCR 반응 혼합물 배경 위에서 검출 가능하도록 하기 위해 페이로드 부착을 필요로 하는 앰플리콘의 길이를 개념적으로 도시한다. 구체적으로, 1MS의 페이로드가 사용되지 않은 0.2 nM 500 bp 앰플리콘 이벤트(녹색) 및 사용된 0.2 nM 500 bp 앰플리콘 이벤트(적색)(단일 프라이머는 5' 말단에 비오틴 개질을 가짐)가 도 13의 데이터 위에 오버레이된다. 페이로드가 없으면, PCR 배경과 비교해 DNA의 이벤트 비율이 충분히 높지 않으며(30분 동안 29건의 이벤트) 대부분의 DNA가 검출되지 않은 채 상기 센서를 통과한다. 반면, 페이로드(500 bp-MS)를 사용하면 이벤트 비율이 검출할 수 있을 만큼 충분히 높으며(18분 동안 238건의 이벤트), DNA-페이로드 이벤트 집단에 의해 둘러싸인 이벤트의 부분 집합과 관련된 검출 기준을 식별함으로써 통계적 신뢰 범위 내에서 배경으로부터 식별될 수 있다. 아래 실시예에서는 PCR 배경 위의 앰플리콘의 식별에 대한 통계적 신뢰 수준 평가에 대해 중점적으로 기재한다.

[0211] 실시예 6: PCR 배경 존재 하에서의 SRY 유전자 검출

- [0212] 도 16 및 도 17는, SRY-1MS 및 SRY-2MS가 1:60 희석 PCR 배경의 존재 하에서 99% 신뢰 수준에서 검출될 수 있는 반면, SRY 단독은 PCR 배경과 구별될 수 없음을 나타낸다. 이러한 결과는 15 nm 멤브레인에서 20 nm 포어를 사용하여 수득되었다(100 mV). 도 16은 PCR 배경 단독(적색), 페이로드 없는 SRY(청색), SRY-1MS(흑색) 및 SRY-2MS(청록색)에 대해, 평균 8 G 대비 상기 포어를 통과하는 개별 분자의 지속 시간의 이벤트 플롯을 도시하며, 여기에서 모든 SRY 시약은 1:60으로 희석된 PCR 배경 존재 하에 시험되었다. PCR 배경 단독에서는 40분에 10건의 이벤트가 발생했는데 이는 SRY(비오틴 및 페이로드 미사용)가 20분에 73건의 이벤트를 발생시킨 것과 비교할 만하다. SRY 이벤트 비율이 배경보다 약간 높기는 하지만 이벤트 집단이 너무 많이 중첩되어 신뢰 수준 내에서 SRY를 검출할 수 없다. 예를 들어, PCR 배경과 SRY는 0.072 ms보다 긴 이벤트를 각각 10%와 4% 갖는다. 대조적으로, 0.5 nM의 페이로드결합된 SRY 이벤트에서는 상기 페이로드에 의해 이들 분자의 식별 가능성이 높아지기 때문에 상당히 더 높은 포집률을 나타냈다. SRY-1MS는 34분 동안 1769건의 이벤트를 생성하였고 SRY-2MS는 6분 동안 326건의 이벤트를 생성하였다. 아래에 상술된 바와 같이, 상기 제시된 수학적 프레임워크를 적용하여 이들 페이로드결합된 앰플리콘 둘 다에 대해 99%의 검출 신뢰 수준을 달성할 수 있다.
- [0213] 시각적으로, 도 16의 이벤트 플롯은 페이로드결합 이벤트가 더 깊은 이벤트를 더 큰 비율로 생성한다는 것을 암시한다. 이로부터, 이벤트 깊이에 기초하여 기준을 선택할 수 있다. 구체적으로, 평균 $\delta G > 2.7$ nS인 경우 이벤트를 유형 2로 태그하는 기준을 고려해 본다. PCR 배경 거짓-양성 이벤트를 사용하여 $q_1 = 0.1(10\%)$ 를 계산할 수 있다. 이 기준의 경우, SRY-1MS를 유형 2 분자로 사용하면 $Q(p) - Q_{sd}(p) = 0.22 - 0.025 = 0.19 > 0.1$ 이 되며, 이는 SRY-1MS 분자가 존재한다고 99% 신뢰 수준에서 말할 수 있음을 의미한다. 유형 2 분자인 SRY-2MS의 경우, 2개의 페이로드를 갖는 이들 분자는 더 깊은 이벤트를 더 많이 생성하기 때문에 그 결과가 더 두드러진다. 구체적으로, $Q(p) - Q_{sd}(p) = 0.34 - 0.067 = 0.27 > 0.1$ 이며, 이는 SRY-2MS 분자가 존재한다고 99%의 신뢰 수준에서 말할 수 있음을 의미한다. 앞서와 같이, SRY 이벤트 집단은 방정식 (1)의 기준을 만족하지 못하기 때문에($Q(p) = 0.066$ 이기 때문에), SRY 분자가 배경을 초과하여 존재한다고 99% 신뢰 수준으로 말할 수 없다.
- [0214] 도 17은 기록 시간의 함수로서의 $Q(p) \pm Q_{sd}(p)$ 의 플롯을 1:60 희석 PCR 배경의 존재 하의 각각의 시약 유형에 대해 도시한다. 여기에서, 기록 시간의 큰 차이로 인해 수평축 상의 시간의 정규화가 수행되었다. 상기 추세는 또한 PCR 배경 거짓-양성 이벤트로부터 확인된 거짓-양성 임계값과 비교된다. SRY-1MS와 SRY-2MS는 모두 60초의 기록 시간 이내에 99%의 신뢰 수준에서 검출된다.
- [0215] **실시예 7: PCR 및 전혈 배경 존재 하에서의 SRY 유전자 검출**
- [0216] 도 18 및 도 19는 2가지 형태의 배경이 동시에 존재할 때 SRY-1MS 및 SRY-2MS가 99%의 신뢰 수준에서 검출될 수 있음을 나타낸다. 배경 중 첫 번째는 모방(mock) "시료"(1:20000 희석된 전혈)이고 두 번째는 상기 앰플리콘을 생산하는 데 사용되는 PCR 반응 시약의 1:100 희석물이다. 위에서 기술된 다른 경우와 마찬가지로 SRY 단독은 이러한 형태의 배경으로부터 구별될 수 없다. 이러한 결과는 25 nm 멤브레인에서 25 nm 포어를 사용하여 수득되었다(100 mV).
- [0217] 처음에 1:1000 희석 전혈을 시험하였고, 14분 후에 포어가 막혔다. 포어를 회복시키기 위해, 희석물을 주입하고 문헌(Beamish, Eric, Harold Kwok, Vincent Tabard-Cossa, and Michel Godin. "Precise Control of the Size and Noise of Solid-State Nanopores Using High Electric Fields." Nanotechnology 23, no. 40 (September 14, 2012): 4053018)에서 확립된 기술에 따라 제어된 유전체 컨디셔닝(controlled dielectric conditioning)을 사용하여 포어를 확대시켰다. 짧은 앰플리콘(페이로드 없음)을 검출하기 위해 작은 포어를 사용해야 한다면, 포어 확대가 요구되는 이러한 막힘 현상으로 인해 시험이 종결되고 결과도 얻을 수 없다는 점에 유의해야 한다. 본원의 페이로드-부착 방법은 큰 포어에서도 앰플리콘을 검출하기 때문에 포어 확대가 필요한 막힘 현상(특히 "지저분한" 시료에서 빈번하게 발생할 수 있음)으로 인한 시험 실패가 초래되지 않는다. 큰 포어는 더 많은 배경을 견딜 수 있으면서도(큰 포어는 막히기가 더 어려움) 시험 결과를 얻을 수 있다.
- [0218] 도 18은 최대 8 G 대비 상기 포어를 통과하는 개별 분자의 지속 시간의 이벤트 플롯을 도시한다. 기록된 에포크(epoch)은 다음을 포함한다: 완충액 단독(12 이벤트, 30분); 1:1000 전혈(WB)(154 이벤트, 14 분)(플롯되지 않음); 1:20000 WB(157 이벤트, 16분)(플롯됨(청록색)); 및 DNA(1:20000 혈액 희석물 내, 0.5 nM SRY(비오틴 없음))(293 이벤트, 23분). 페이로드가 없는 SRY는 WB 단독의 경우보다 더 뾰족한 진폭 분포 및 지속 시간을 나타냈다. 예를 들어, WB 세트는 0.072 ms보다 긴 이벤트를 20% 나타내는 반면 SRY 단독은 단지 8%를 나타낸다(보다 빠른 이벤트). SRY에 뒤이어, 1:20000 WB 내의 SRY-1MS 0.5 nM을 시험하였고 이벤트 발생 수가 크게 증가하여

26분에 1093건의 이벤트를 생성하였다. 이후 1:20000 WB 내의 SRY-2MS 0.5 nM은 42분 동안 1297건의 이벤트를 생성하였다(모든 경우에서 1:100 PCR 반응 혼합물 또한 존재함). 이전의 실시예에서와 같이, 상기 제시된 수학적 프레임워크를 적용하여 페이로드-결합된 앰플리콘 둘 다에 대해 99%의 검출 신뢰 수준을 달성할 수 있으며, 아래에서 이를 상술한다.

[0219] 시각적으로, 도 18의 이벤트 플롯은 상기 페이로드결합 이벤트가 더 깊은 이벤트를 더 큰 비율로 생성한다는 것을 암시한다. 이로부터, 이벤트 깊이에 기초하여 최소 지속 시간으로 기준을 선택할 수 있다. 구체적으로, 평균 $\delta G > 3$ nS이고 지속 시간 > 24 us인 경우 해당 이벤트를 유형 2로 태그하는 기준을 고려해 본다. 1:20000 WB + 1:100 PCR 배경 거짓-양성 이벤트를 사용하여 $q1 = 0.096$ (9.6%)을 계산할 수 있다. 이 기준의 경우, 유형 2 분자인 SRY-1MS에 대해 $Q(p) - Q_{sd}(p) = 0.184 > 0.096$ 이 되며, 이는 SRY-1MS 분자가 존재한다고 99% 신뢰 수준에서 말할 수 있음을 의미한다. 유형 2 분자인 SRY-2MS의 경우, 2개의 페이로드를 갖는 이들 분자는 더 깊은 이벤트를 더 많이 생성하기 때문에 그 결과가 더 두드러진다. 구체적으로, $Q(p) - Q_{sd}(p) = 0.348 > 0.096$ 이며, 이는 SRY-2MS 분자가 존재한다고 99%의 신뢰 수준에서 말할 수 있음을 의미한다. 앞서와 같이, 페이로드가 없는 SRY 이벤트 집단은 배경의 존재 하에 방정식 (1)의 기준을 만족하지 못하기 때문에($Q(p) = 0.024$ 이기 때문에), SRY 분자가 배경을 초과하여 존재한다고 99% 신뢰 수준으로 말할 수 없다.

[0220] 도 19는 기록 시간의 함수로서의 $Q(p) \pm Q_{sd}(p)$ 의 플롯을 1:20000 WB + 1:100 PCR 배경의 존재 하에 각각의 시약 유형에 대해 도시한다. 상기 추세는 또한 상기 배경 거짓-양성 이벤트로부터 확인된 거짓-양성 임계값과 비교된다. SRY-1MS와 SRY-2MS 둘 다 기록 시간 최초 90초 이내에 99%의 신뢰 수준에서 검출된다.

[0221] 실시예 8: 비표적 DNA 배경의 존재 하에서 SMCY 유전자 검출

[0222] 도 21 및 도 22는 SMCY-1MS가, 배경의 모방 형태(mock form)로 다량으로 존재하는 비표적 DNA의 존재 하에서 99% 신뢰수준으로 검출될 수 있음을 도시한다. 대조적으로, SMCY 단독은 이러한 유형의 배경으로부터 구별될 수 없다. 이러한 결과는 15 nm 멤브레인에서 21 nm 포어를 사용하여 획득되었다(100 mV).

[0223] 페이로드-부착된 SMCY 앰플리콘(도 20)을 겔 가공한 후에, 동일한 나노포어에서 다음의 시약을 순차적으로 시험하였다. 배경의 모방 형태로서, SMCY(362 bp)를 동일 농도의 SRY(470 bp)의 존재 하에 시험하였다(총 0.5nM) (각각 0.25nM). SMCY 단독(미도시)은 SRY 단독과 구별할 수 없었다. 특히 짧은 SMCY 앰플리콘은 전기적 배경 단독과 유사한 이벤트 비율을 보인 반면 SRY는 전기적 노이즈(noise) 배경 이벤트의 약 5배의 이벤트 비율을 나타냈다. 따라서 SRY + SMCY에서 28분 동안 기록된 560건의 이벤트 중 대부분이 SRY에 의한 것일 가능성이 높다. 단, 어떤 이벤트가 어느 앰플리콘에 기인하는지 구분할 방법은 없다. 이 형태의 배경에서 SMCY의 존재를 검출하기 위해, 일 단부에 비오틴화된 프라이머가 사용되었고, MS가 부착되었다. 0.5 nM SMCY-1MS에서 20분간 1879건의 이벤트가 기록되었다

[0224] 도 21은 평균 δG 대비 상기 포어를 통과하는 개별 분자의 지속 시간의 이벤트 플롯을 도시한다. 시각적으로, 상기 이벤트 플롯은 페이로드-결합된 이벤트가 더 깊은 이벤트를 더 높은 비율로 생성함을 나타낸다. 이로부터, 최대 $\delta G > 4$ nS인 경우 해당 이벤트를 유형 2로 태그하는 기준을 선택할 수 있다. SRY + SMCY 배경 거짓-양성 이벤트를 사용하여 $q1 = 0.116$ (11.6 %)을 계산할 수 있다. 이 기준의 경우, 유형 2 분자인 SRY-1MS에 대해 $Q(p) - Q_{sd}(p) = 0.287 - 0.026 = 0.26 > 0.116$ 이 되며, 이는 SRY-1MS 분자가 존재한다고 99% 신뢰 수준에서 말할 수 있음을 의미한다. 앞서와 같이, 페이로드가 없는 SRY 이벤트 집단은 배경의 존재하에 방정식 (1)의 기준을 만족하지 못하기 때문에(미도시), SMCY 분자가 배경 위에 존재한다고 99% 신뢰 수준으로 말할 수 없다.

[0225] 도 22는 비표적 DNA(주로 SRY) 배경 대비 SMCY-1MS의, 기록 시간의 함수로서의 $Q(p) \pm Q_{sd}(p)$ 의 플롯을 도시한다. SRY-1MS는 기록 시간 최초 2분 이내에 신뢰 수준 99%로 검출된다.

[0226] 실시예 9: 앰플리콘 농도의 정량

[0227] 도 23은 포집률이 농도에 따라 선형적으로 변화하며, 대조군을 사용하여 상기 선형 추세를 확립하고 측정된 비율을 상기 선에 매핑하여 농도를 추정함으로써 미지의 농도를 추정할 수 있음을 나타낸다. 이는 상기 미지의 농도의 포집률 동역학과 일치하는 대조군을 사용함(즉, 동일한 앰플리콘 길이를 사용하고 동일한 페이로드(사용되는 경우)를 사용함)을 의미한다. 포어 크기 간에 포집률의 차이가 있지만, 동일한 포어에서 미지의 농도 관측 이전에 대조군을 수행함으로써 이러한 불확실성의 원인이 제거된다.

[0228] 도 23의 데이터는 15 nm 멤브레인에서 24 nm 포어를 사용하여 페이로드가 없는 1074 bp 앰플리콘을 사용하여 확

인되었다. 알고 있는 농도 및 미지의 농도 각각에 대한 포집률은 지수 분포로서의 포집 시간 분포를 피팅함으로써 측정된다(이는 나노포어 과학 분야에서 잘 알려져 있으며, 일례로 Wang, Hongyun, Nicholas Hurt, and William B Dunbar. "Measuring and Modeling the Kinetics of Individual DNA-DNA Polymerase Complexes on a Nanopore." ACS Nano 7, no. 5 (May 28, 2013): 387686)을 들 수 있다).

[0229] 중점 PCR을 사용하여 대조군을 생성하였고 1074 bp 앰플리콘을 제조하였다. 이를 실리카 상에서 정제하고 분광광도계를 사용하여 정량하였다. 각 대조군을 생성하기 위해, 상기 모액을 기록 완충액으로 희석하고 기록 실험 이전에 다시 측정하였다. 사용된 표준 농도는 0.075 nM 내지 1.1 nM(0.075 nM, 0.15 nM, 0.8 nM, 1.1 nM)의 범위였다. 미지의 시료는 프라이머를 사용하여 20 PCR 사이클을 수행하여 5600 bp 길이의 출발 물질 100 pg으로부터 1074 앰플리콘을 생성함으로써 생성되었다. 사이클링 후, 기록 완충액에서 1:50으로 희석하고 나노포어 실험을 수행하였다. 대조군에 피팅하고 추정치에 불확도를 할당하면서 미지 시료를 추정하는 방법은 "포집률 측정치로부터의 농도 추정" 섹션에 제시되어 있다. 본 실시예의 추정치와 관하여, 50배 희석에서 0.7 nM은 35 nM에 해당하며, 이는 희석 전의 시료의 사양 측정으로부터 추정된 51 nM 값에 가깝다.

[0230] 실시예 10: mnoPCR의 실행

[0231] 도 24 및 도 25는 정수의(m) 나노포어(n) 관찰 가능한(o) PCR(mnoPCR) 방법의 효과를 나타낸다. 두 데이터 세트 모두에 대해, 먼저 상기 나노포어를 사용하여 알고 있는 농도의 3가지 표준의 포집률을 측정하여 미지의 시료를 매핑할 수 있는 곡선을 확립하였다. 도 24에서, PCR 사이클 12, 13 및 14회 이후의 미지 농도의 시료에 대해 수행하고 대응하는 농도를 추정하였다. 도 25에서, 일반적인 출발 물질 양 및 사이클 횟수를 사용하여 3개의 개별 PCR 반응을 수행하여 포집률을 비교함으로써 미지 시료의 측정 정확도를 평가하였다.

[0232] 도 24는 0.2, 0.7 및 1.2 nM 표준으로부터의 표준 곡선 및 측정치에 있어서의 99% 신뢰 수준을 나타내는 오차 막대(+/- 0.46 nM)와 함께 상기 곡선에 매핑된 사이클 12, 13 및 14의 미지 시료를 도시한다. 기록은 1M LiCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5, 100 mV에 수행되고 10 kHz에서 재필터링하였다. 포어 크기는 22-25 nm이고 멤브레인 두께는 30 nm였다. 수득된 미지 시료의 농도는 12, 13 및 14 사이클에 대해 각각 1.32 nM, 2.42 nM 및 4.56 nM였다. 이전 실시예에서와 같이, 배경 이벤트는 기록된 총 이벤트의 1% 미만이었다. 표준 및 미지 시료의 이벤트 플롯(미도시)은 기록된 모든 앰플리콘이 동일한 길이라는 점으로부터 예측되는 바와 같이 뾰족하고 중첩된 집단을 나타내었다. 도 24의 플롯은 표준(적색 점)과 표준 곡선에 맞춰진 청색의 미지 시료(12, 13 및 14 사이클)를 나타낸다. 상기 선의 선형성과 각 표준의 측정 오차에 기초할 때, 보고된 농도는 5% 이내에서 99% 정확하다.

[0233] 반응의 진행에 따라 각 사이클(또는 사이클의 임의의 조합) 이후에 측정함으로써, 어느 사이클의 앰플리콘이 검출 가능한지를 측정할 수 있다. 추가 정보는 반응의 진행에 따라 앰플리콘을 측정할 때 획득할 수 있다. 예를 들어, 반응이 로그 단계에 있을 때 PCR 반응의 실제 효율(이론적인 배가(doubling)는 정확하게 달성되지 않는 경우가 많기 때문임), 종점 검출 및 다양한 표적 서열 번호의 2개 이상의 시료 간의 정확한 비교를 들 수 있다. 여기에서, 로그 단계는 사이클 13에서 시작하고 반응 당 효율성은 1.8배이다(이론값인 2.0이 아님). 사이클 10에서 검출이 시작되었다.

[0234] 이들 데이터는 추정 농도에서 5% 최대 오차를 생성하였으며, 이는 출발 물질에서 1.1 배 차이의 식별이 가능해야 함을 암시한다. 이 실시예는 qPCR과 마찬가지로 시작 주형 농도가 다를 수 있는 두 개 이상의 샘플 간에 정확한 비교가 가능하되, 분자 집합체로부터의 형광과는 대조적으로 나노포어가 단일 분자를 계수하므로 더 정확하게 비교할 수 있음을 보여준다.

[0235] 도 25는 정량 정밀도의 평가 결과를 나타낸다. 구체적으로, 동일한 로그 단계 사이클 횟수(20 사이클) 및 동일한 출발 물질 양을 사용하여, 3가지 독립적인 PCR 반응을 수행하여 물질을 생성하였다. 농도 추정치는 매우 보존적이어서, 정밀함을 나타낸다. 결과에는 다음과 같은 추정치가 포함된다. 20 사이클 A = 54.3 nM; 20 사이클 B = 57.4 nM; 20 사이클 C = 58.1 nM이다. 분석 정밀도 = 4%(스프레드(spread)/평균)이다. 또한 사이클 횟수를 변화시키면서 반복 실험을 통해 1-5%의 실행 정밀도가 관찰되었다.

[0236] 실시예 11: mnoPCR을 사용한 출발 물질의 유추

[0237] 이 실시예의 집계된 데이터는 증폭 이전의 시료에서 출발 분자의 갯수를 계산하기 위한 워크플로우의 구성 요소를 나타낸다. 상기 mnoPCR 방법은 대조군을 사용하여 반응 효율을 확인하고 반응이 로그 단계에 진입하는 때를 확인할 수 있다. 도 26은 사이클 10, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 30, 35 및 40 이후에 반응을 측정한 후 S자형 곡선을 도시한다. 특히, PCR을 수행하고 사이클 10, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 30, 35 및 40 이후에 시료가 채

취된다. 각 사이클은 독립적으로 나노포어에서 실행된다. 대조군으로서, 이는 포집을 대비 농도 선형 추세를 확립하는 데 사용될 수 있다. 미지 시료로서는, 상기 비율을 상기 선에 피팅하여, 표시된 사이클 후에 생성된 생성물의 양을 농도 추정 방법으로 측정한다. 일련의 PCR 사이클 생성물을 시험하기 전에 포집을 대비 농도 추세를 확립하기 위해 두 가지 대조군(고농도 및 저농도)만 시험할 필요가 있다는 점에 유의해야 한다. 이 대조군 데이터 세트의 경우, 사이클 15 후에 반응이 로그 단계에 진입하고, 1.7배의 준최적 배가를 나타내며, 사이클 35 이후에 종점에 도달하였다. 실제로, 이는 대조군 곡선으로서의 역할을 하여, 정량된 반응 효율 성능 및 출발 물질의 양을 추정하기 위한 미지의 곡선과 함께 사용된다.

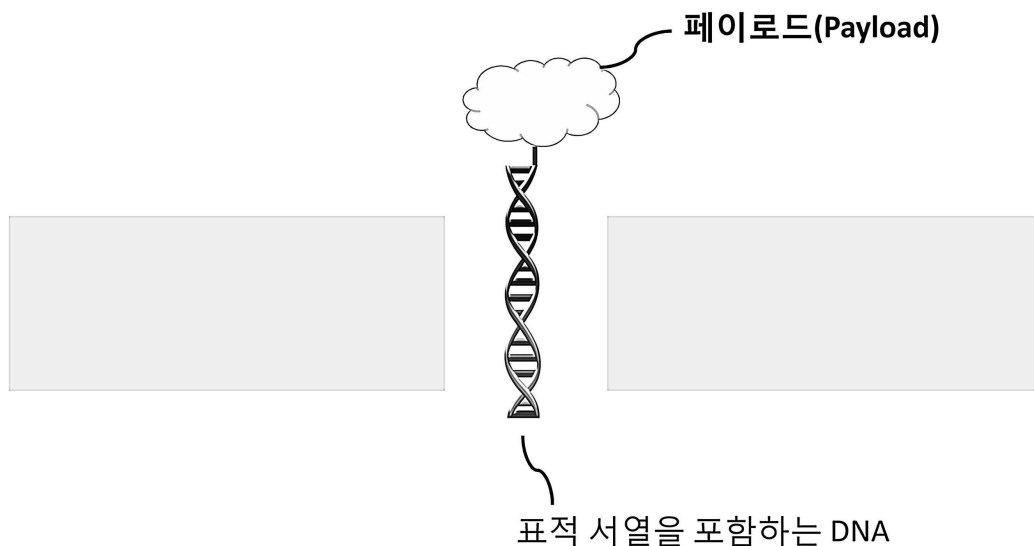
[0238] 애플리콘이 첨가되는(또는 생성되는) 공통 챔버를 공유하는 포어 어레이를 사용하면, 높은 희석을 용인하여 조기에 낮은 사이클 수를 검출할 수 있으므로 상기 곡선의 저농도 단부에서 우수한 분해능 및 확산을 제공할 수 있음을 유의해야 한다. 이는 결과적으로 미지 시료의 정량을 개선하고 유추 오차를 낮춘다.

[0239] **실시예 12: PCR 반응 혼합물의 최소 희석도 탐색**

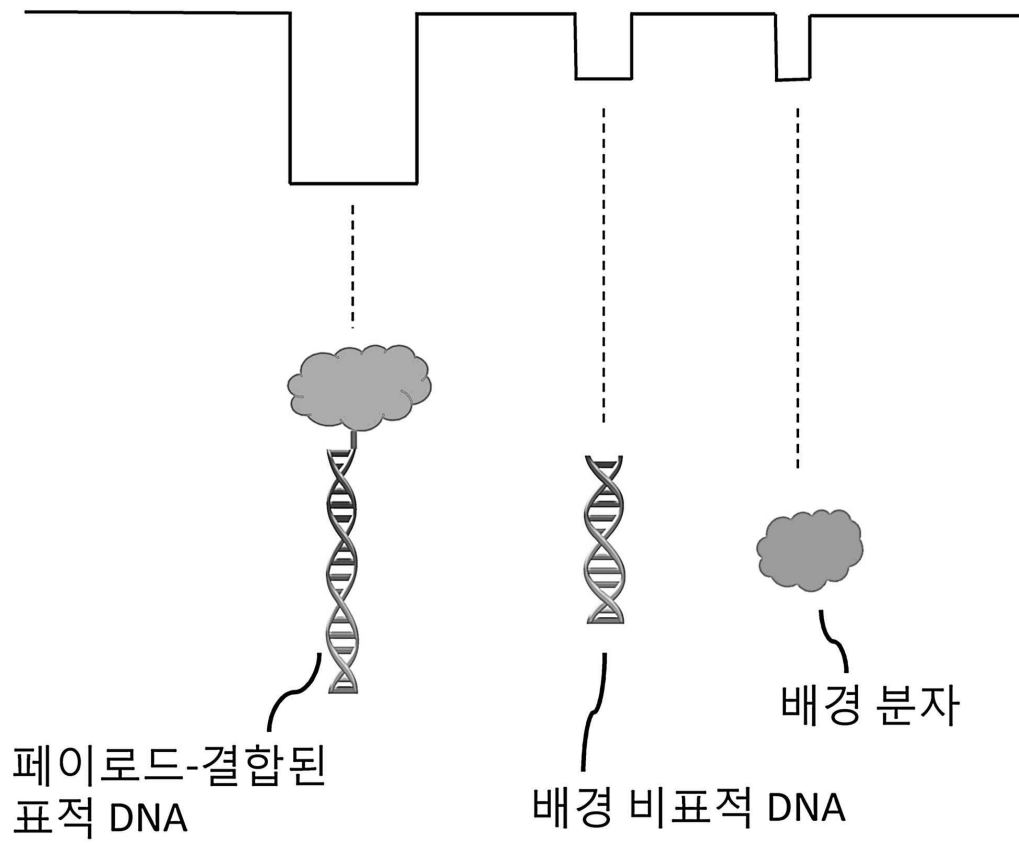
[0240] 도 27 및 도 28은 mmoPCR 방법의 정확도를 유지하면서 희석이 얼마나 필요한지를 보여준다. 도 27은 평균 8G 대비 상기 포어를 통과하는 개별 분자의 지속 시간의 이벤트 플롯을 나타낸다. 상기 플롯은 15 사이클 후 PCR 반응 혼합물(적색)과 1:1.17 희석된 음성 대조군(물)(85.7% PCR 반응 혼합물)에 대한 이벤트를 도시하고, 뒤이어 동일한 혼합물과 1074 bp의 생성된 애플리콘(양성 대조군, 15 사이클)의 이벤트(흑색)를 도시하고 있으며, 이는 큰 증가를 나타내고 있다. 25 nm 멤브레인에서 25 nm 포어를 사용했을 때, 0.5 nM의 1074 bp DNA가 10분 동안 1856건의 이벤트를 생성하는 반면, 85.7% PCR 생성물은 10분 동안 단지 39건의 이벤트를 생성하였다. 고려된 음성 대조군 희석물은 모두 이벤트 비율 및 확산(스프레드, spread)에 있어 비교할 수 있을 만큼 기능하였다. 1:5 희석물(20%), 1:2 희석물(50%), 1:1.43 희석물(70%), 1:1.17 희석물(85.7%)이었다. 도 28은 음성 대조군 PCR 생성물이 최소로 희석될 때(1:1.17), 덜 정확한 농도 추정을 유발하기에 충분한 이벤트를 생성한다는 것을 보여준다. 이러한 효과는 시료를 30% 초과로 희석하면 최소화된다.

도면

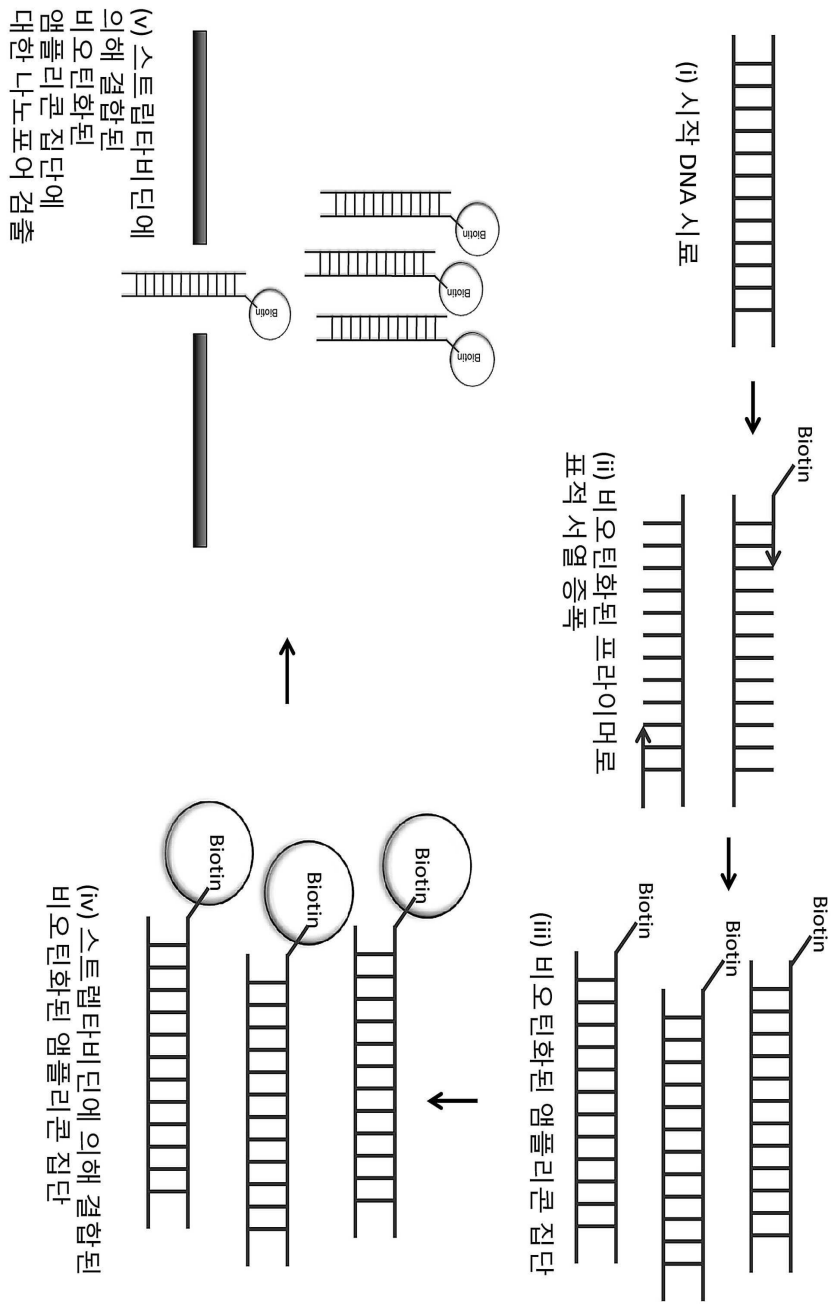
도면1



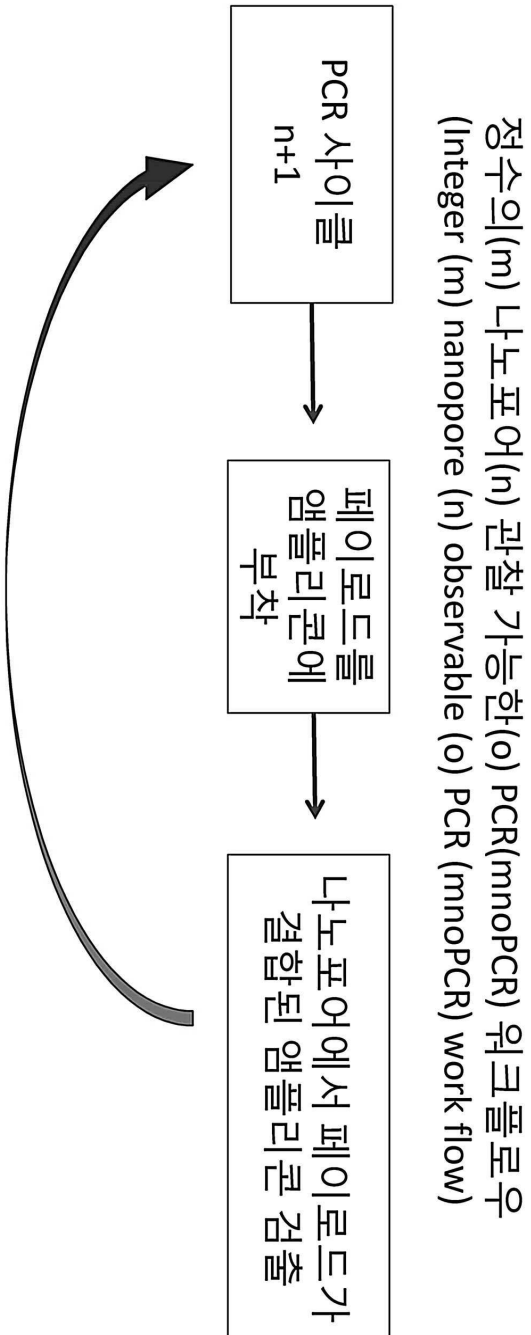
도면2



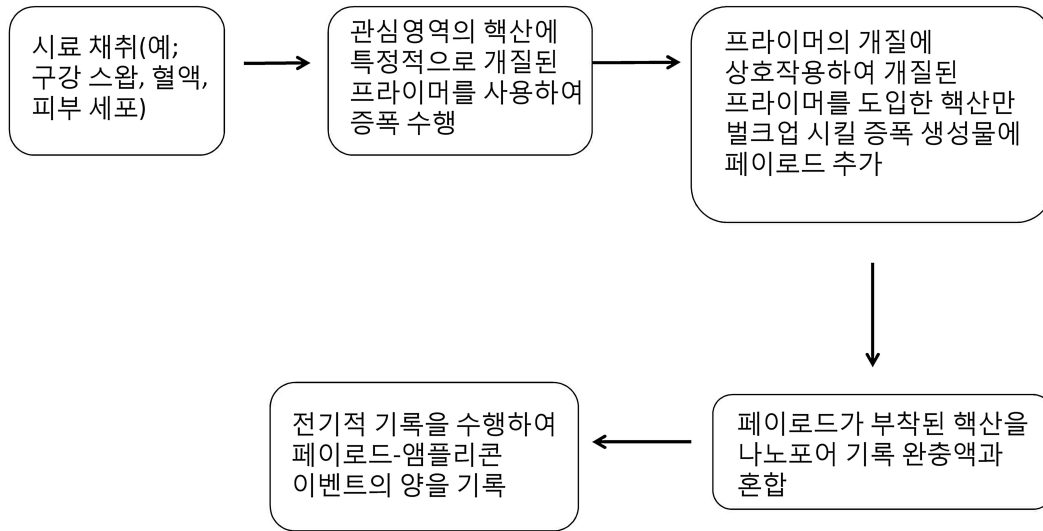
도면3



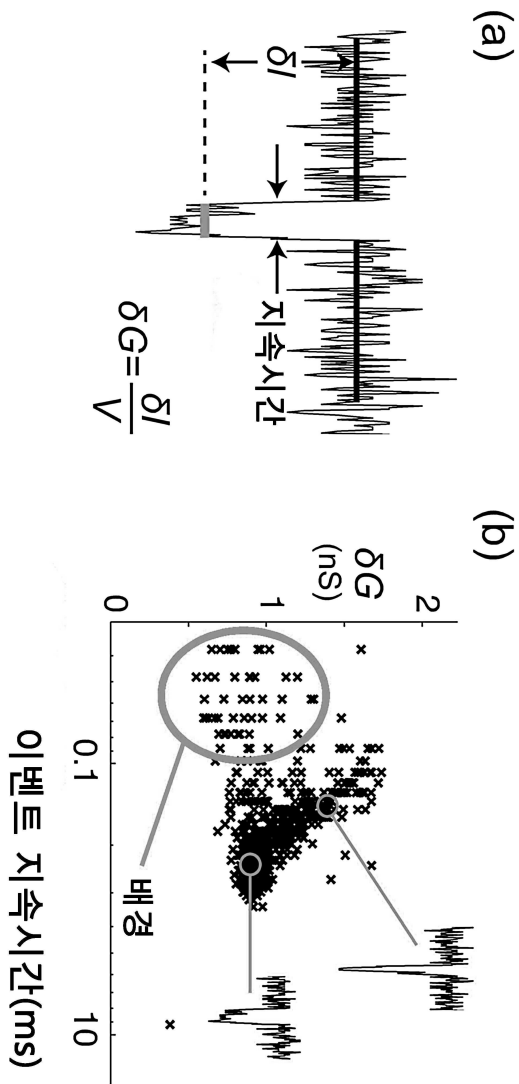
도면4



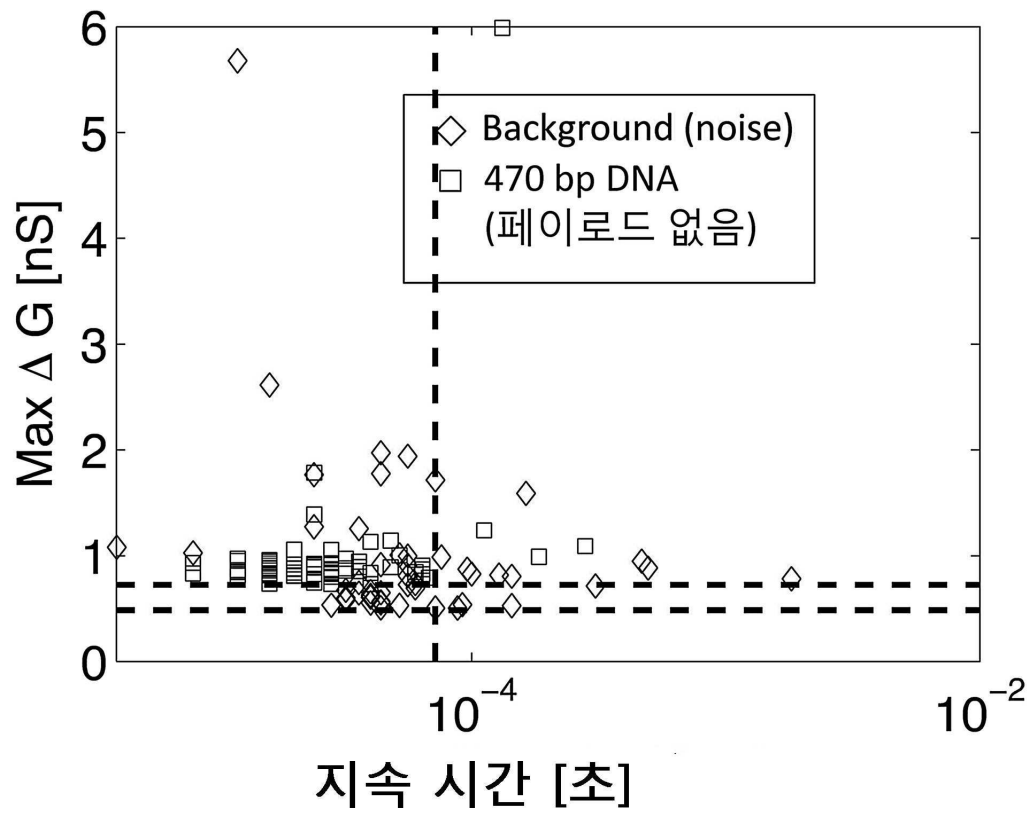
도면5



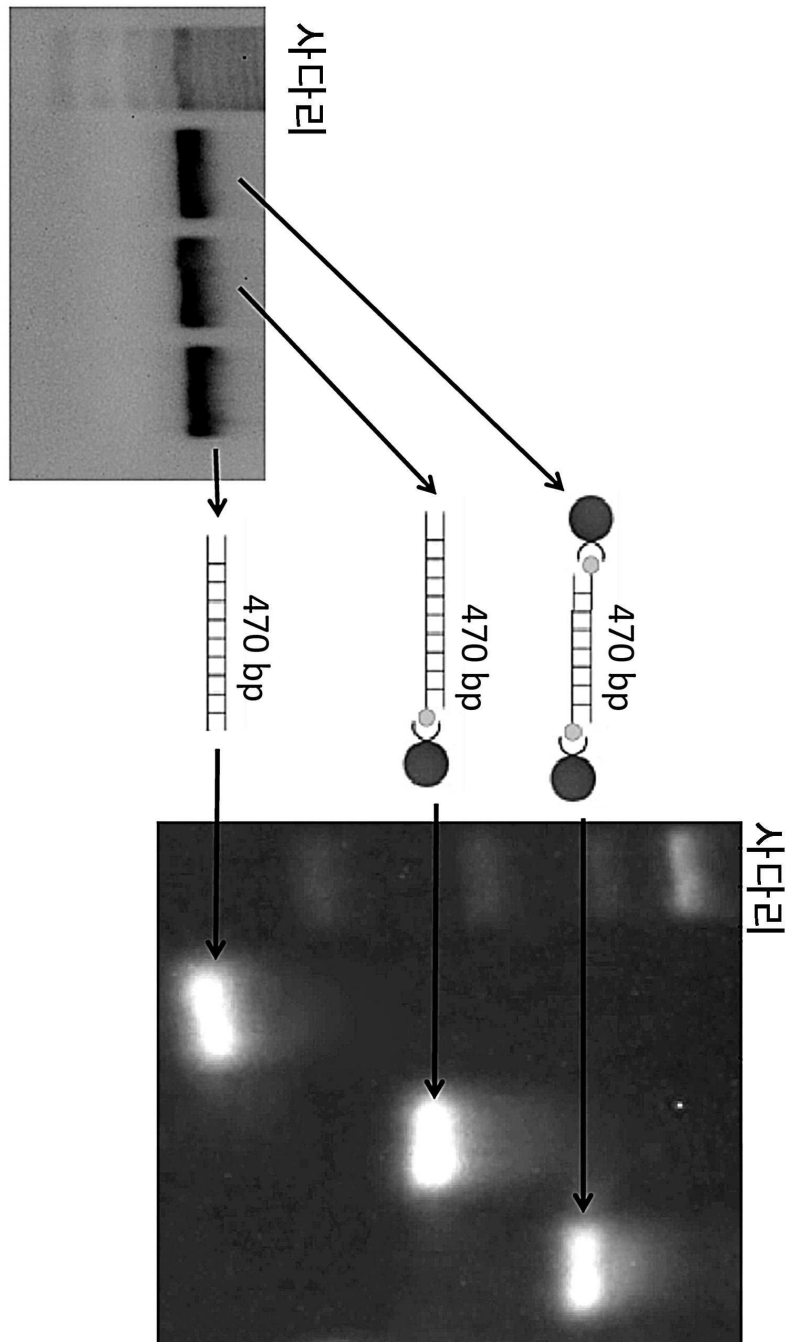
도면6



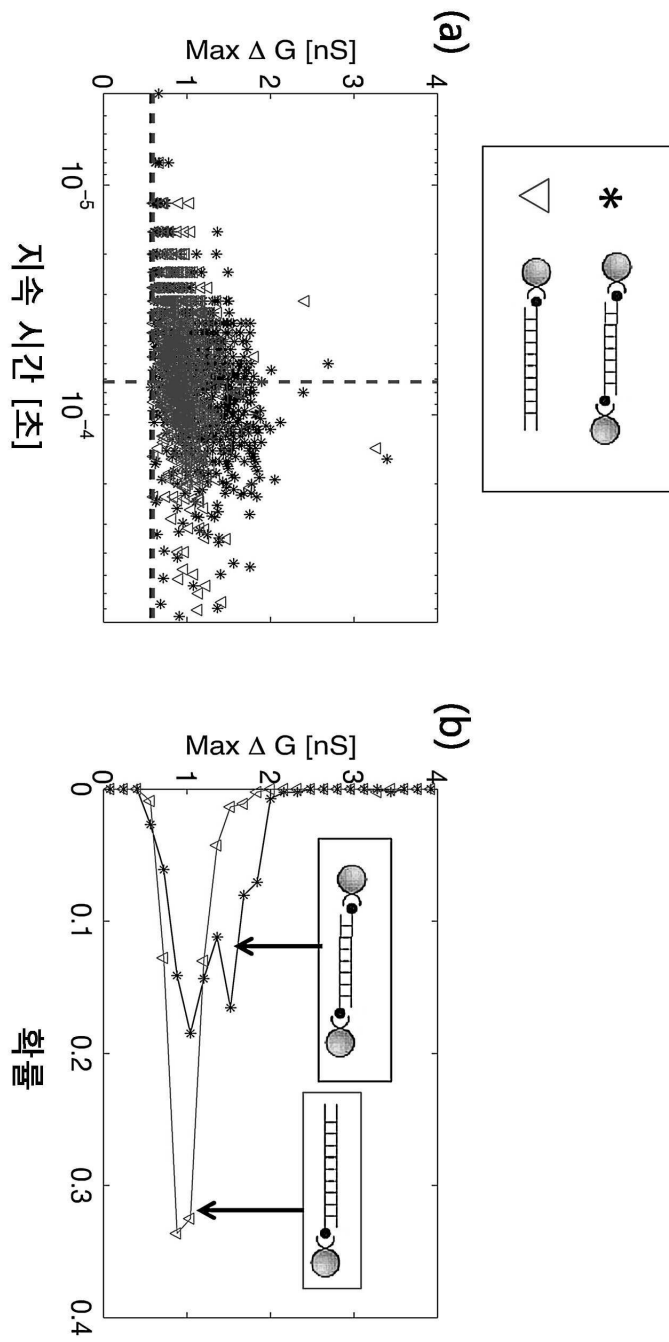
도면7



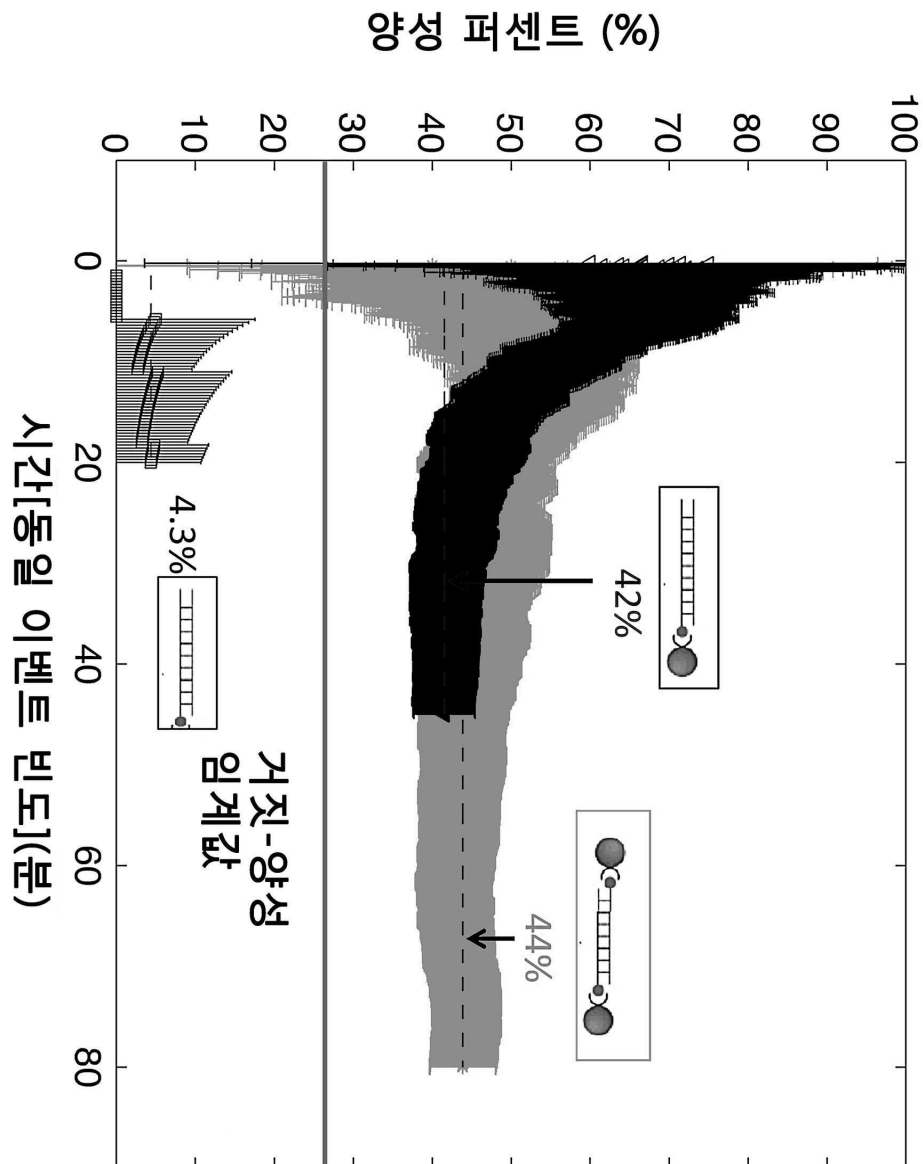
도면8



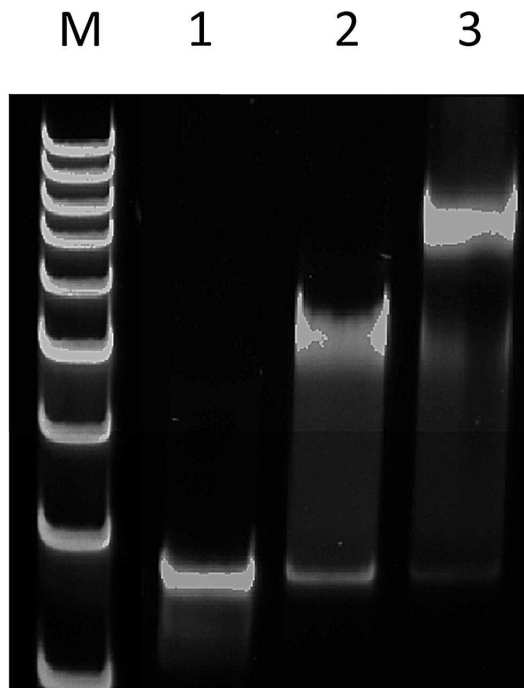
도면9



도면10

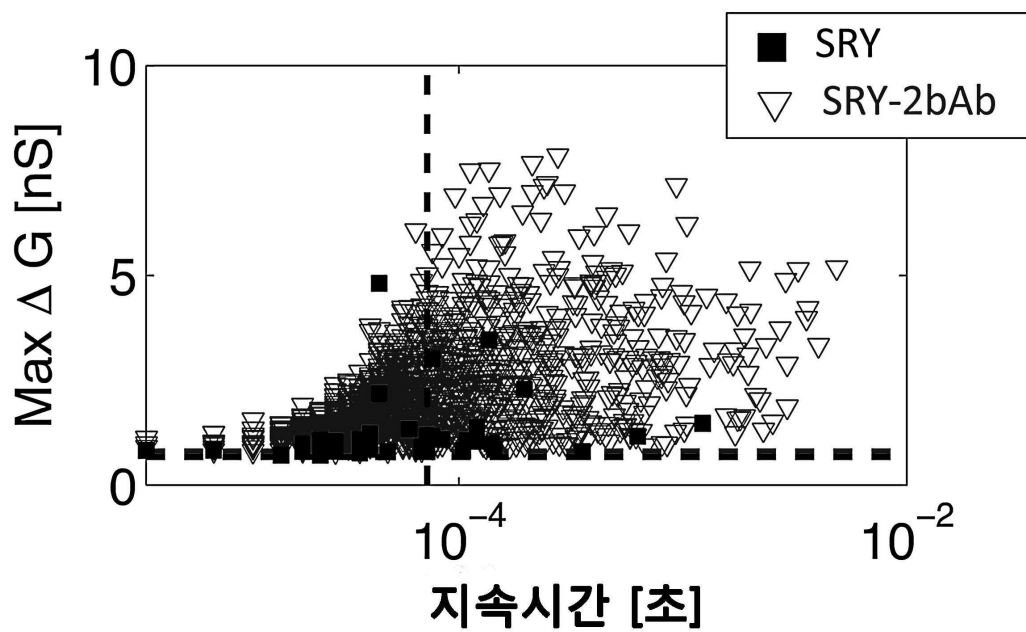


도면11

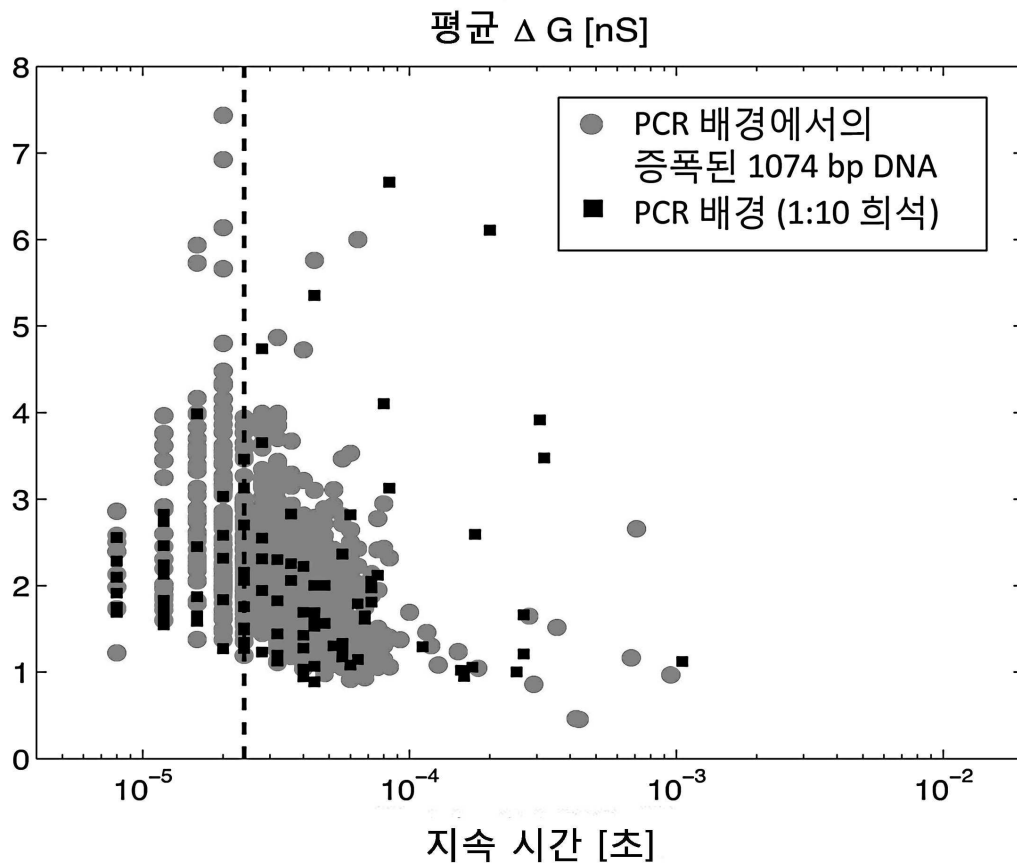


SRY 0, 1, 2 Ab

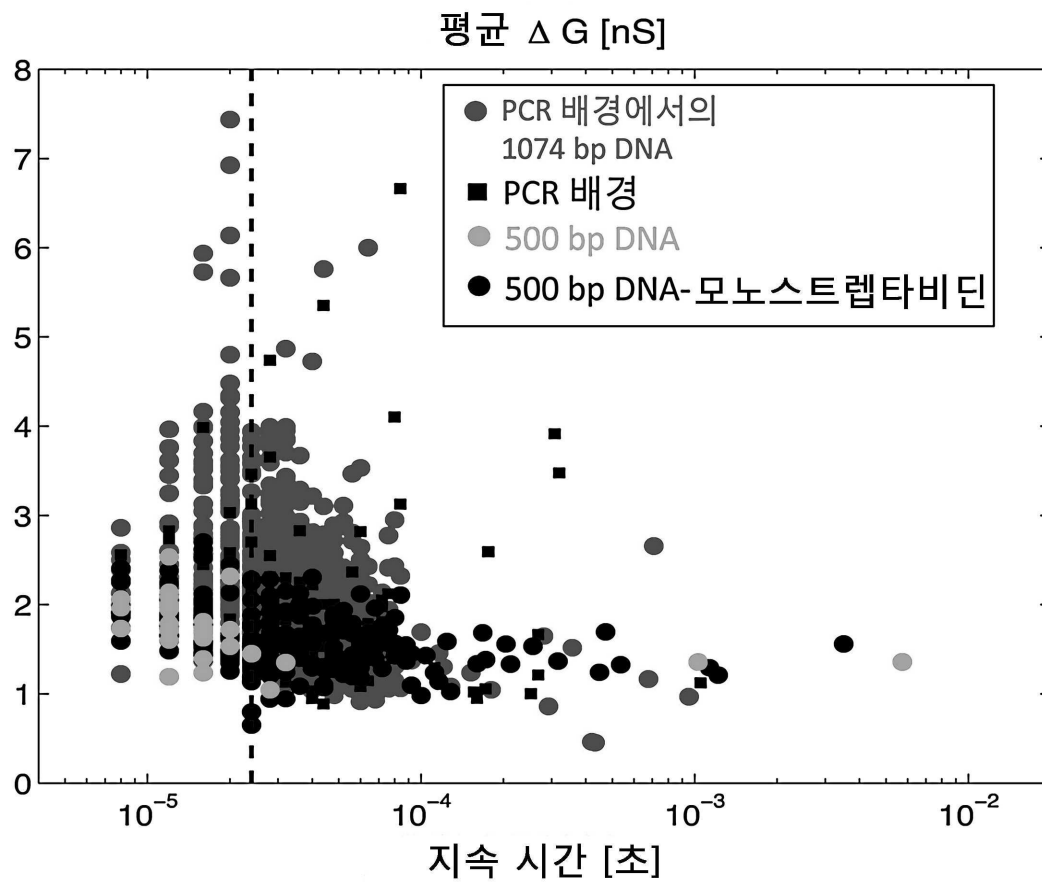
도면12



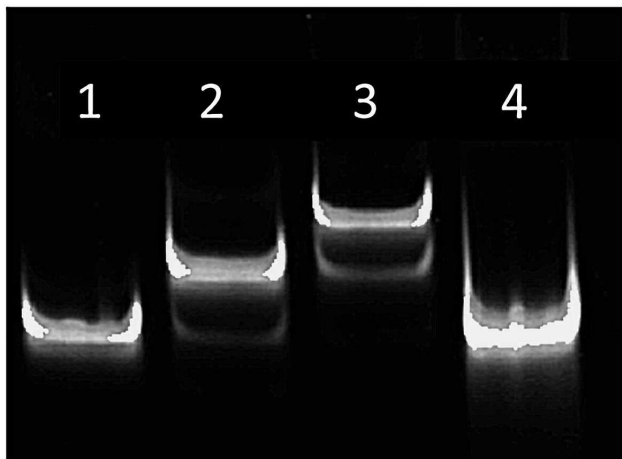
도면13



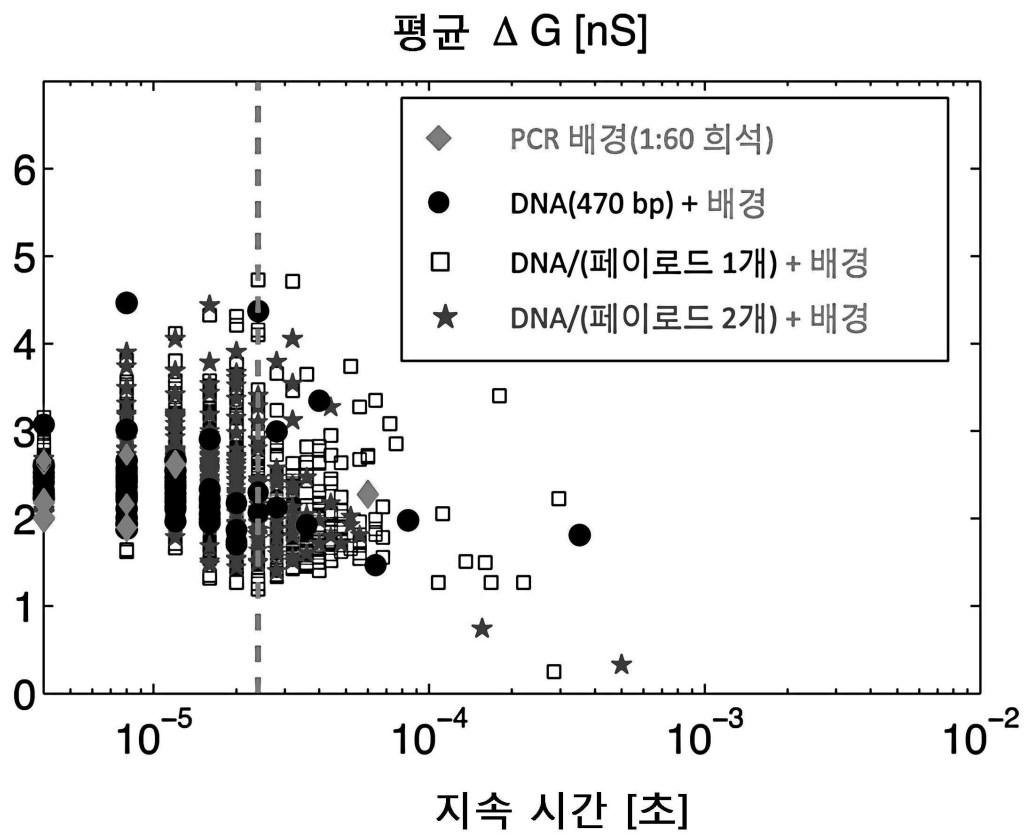
도면14



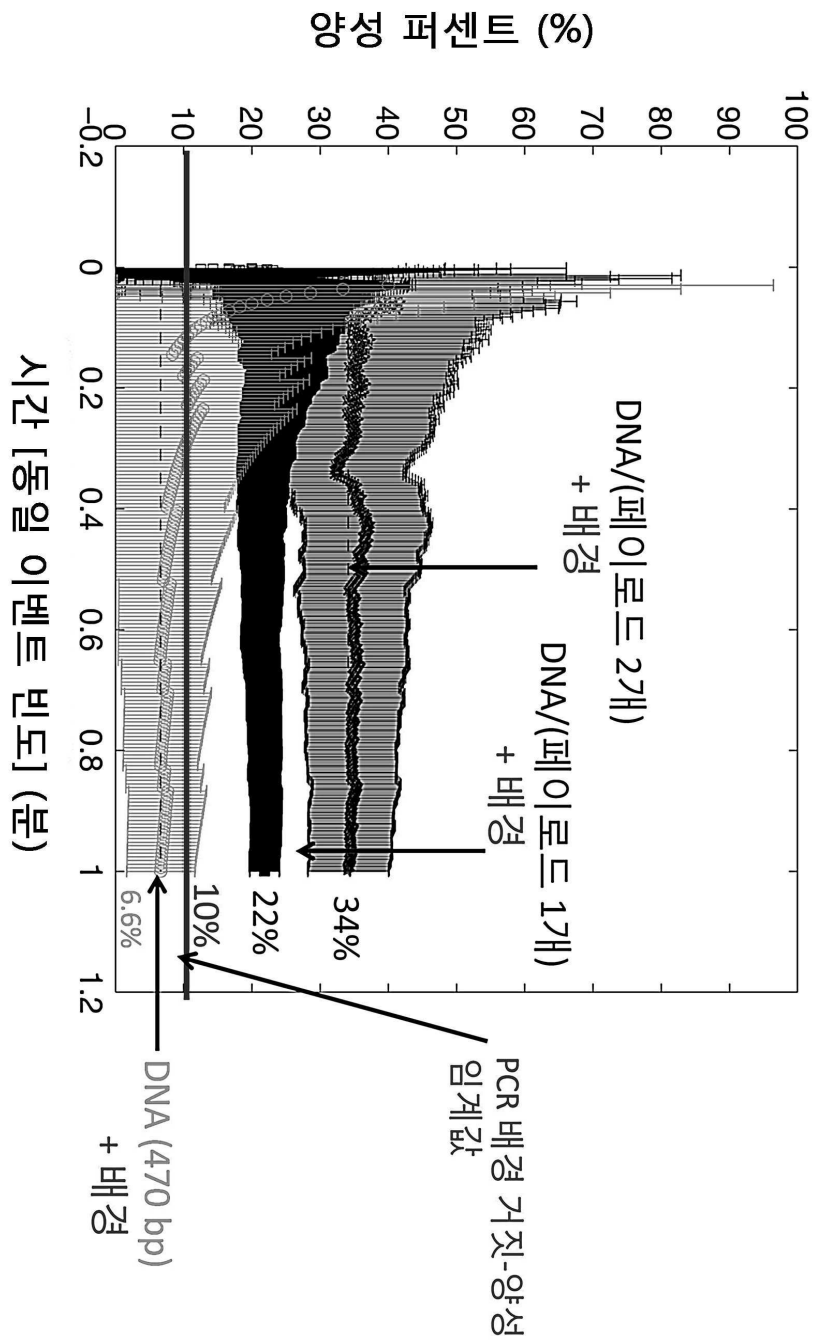
도면15



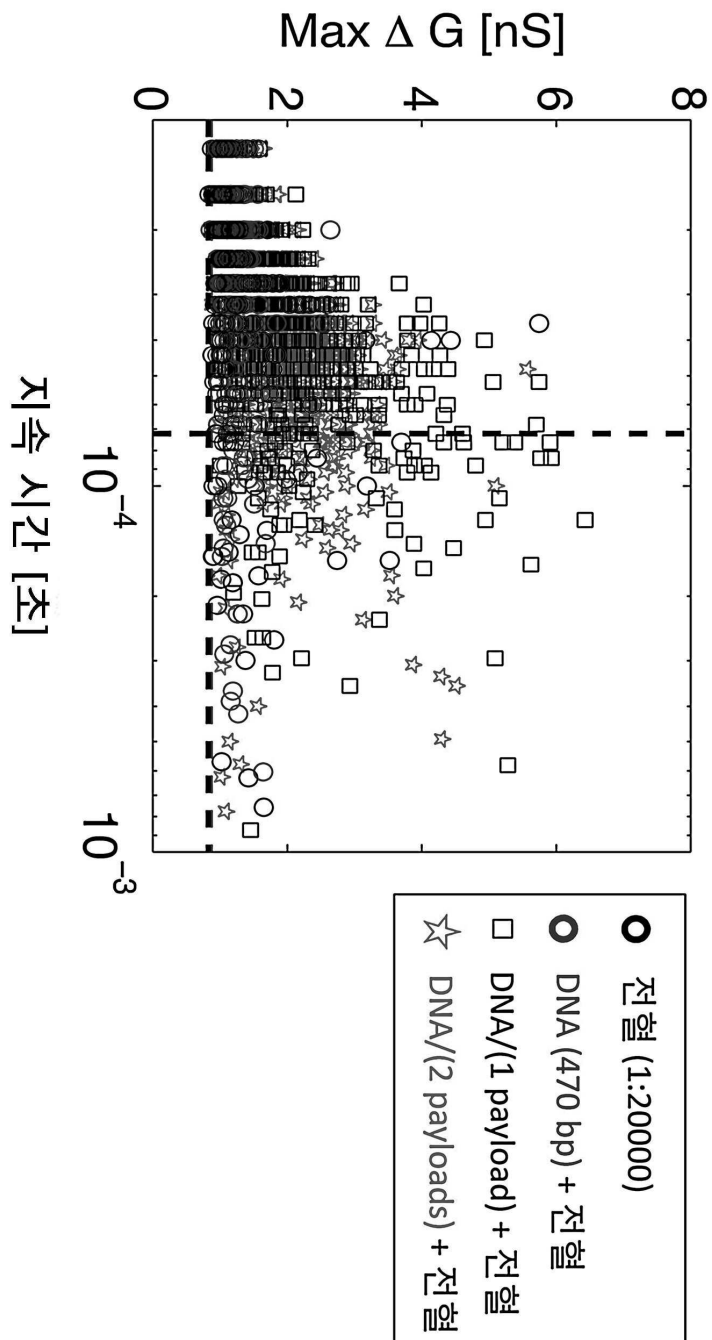
도면16



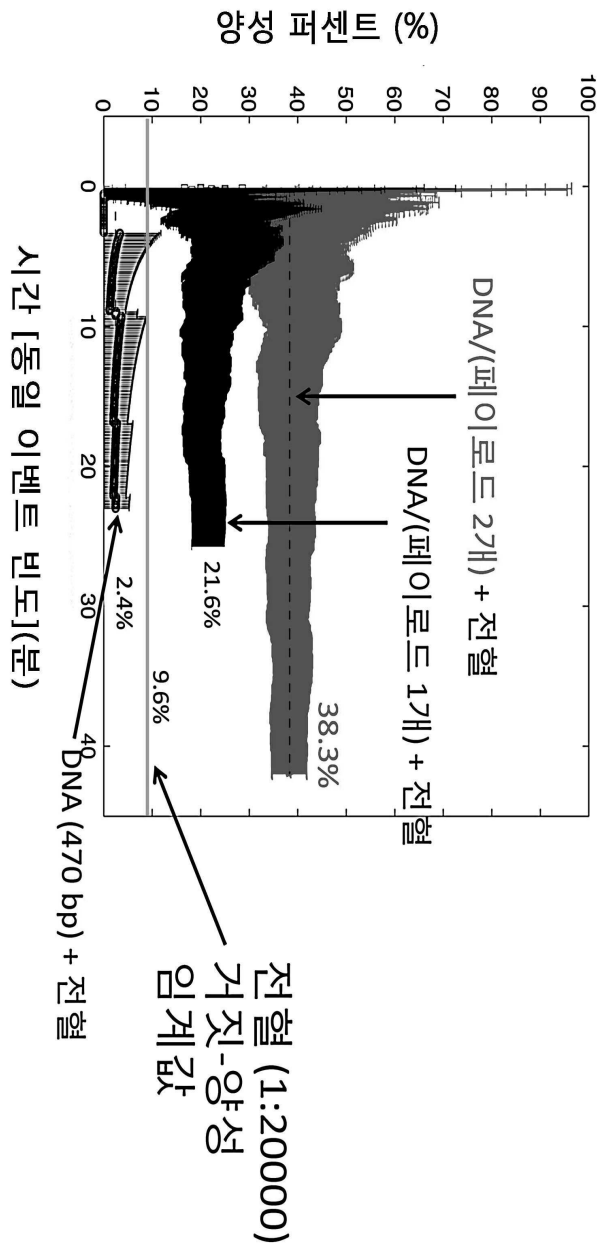
도면17



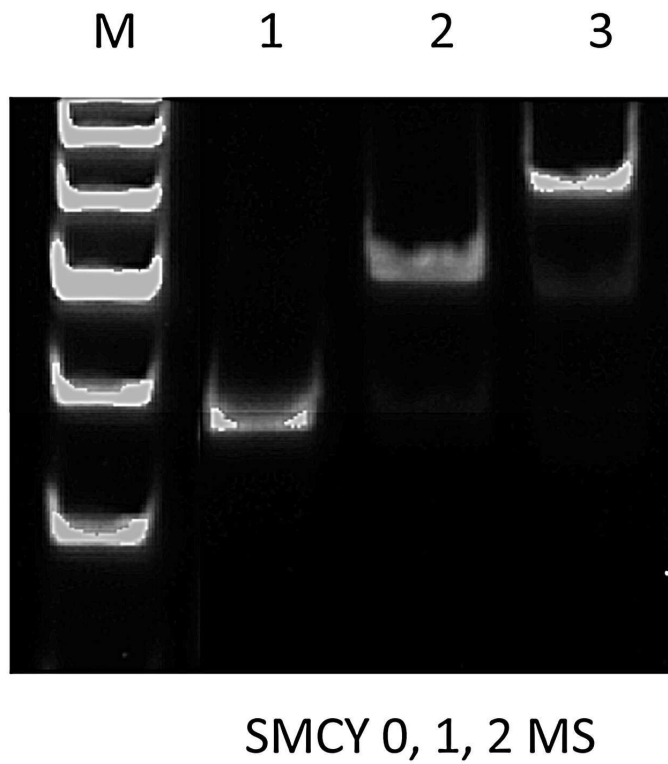
도면18



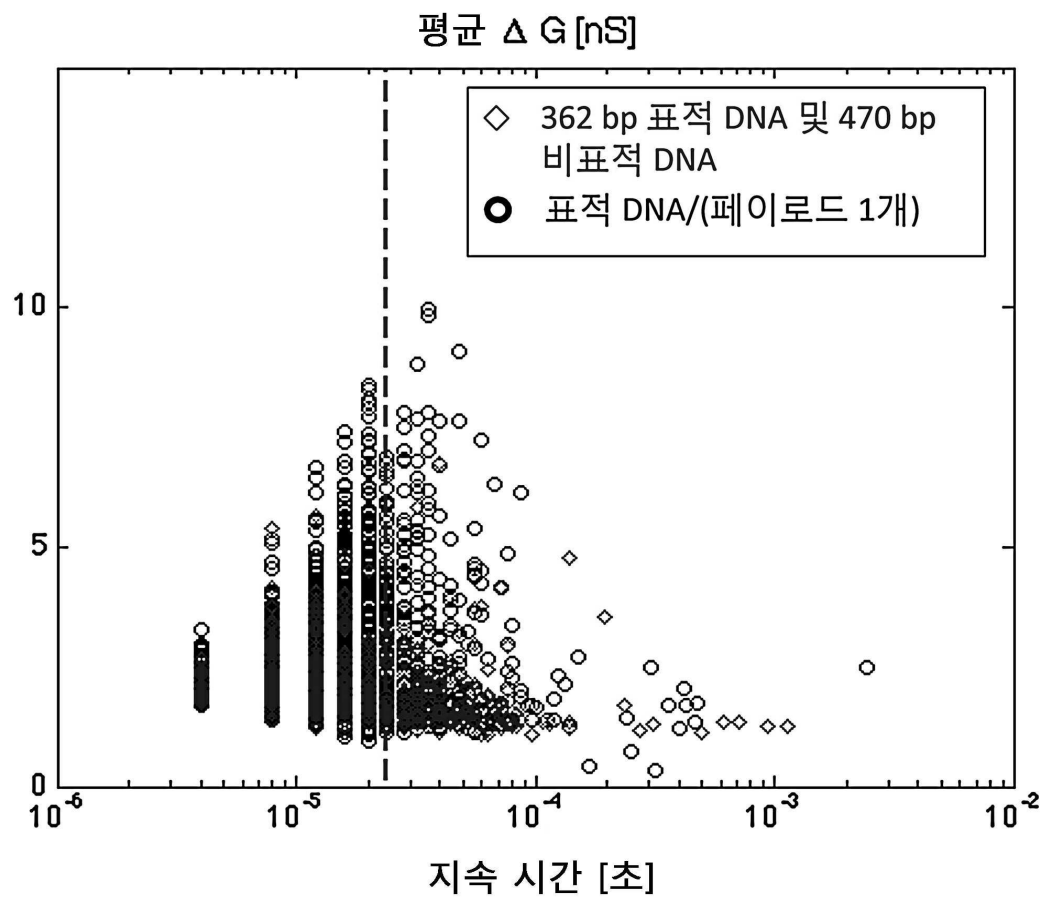
도면19



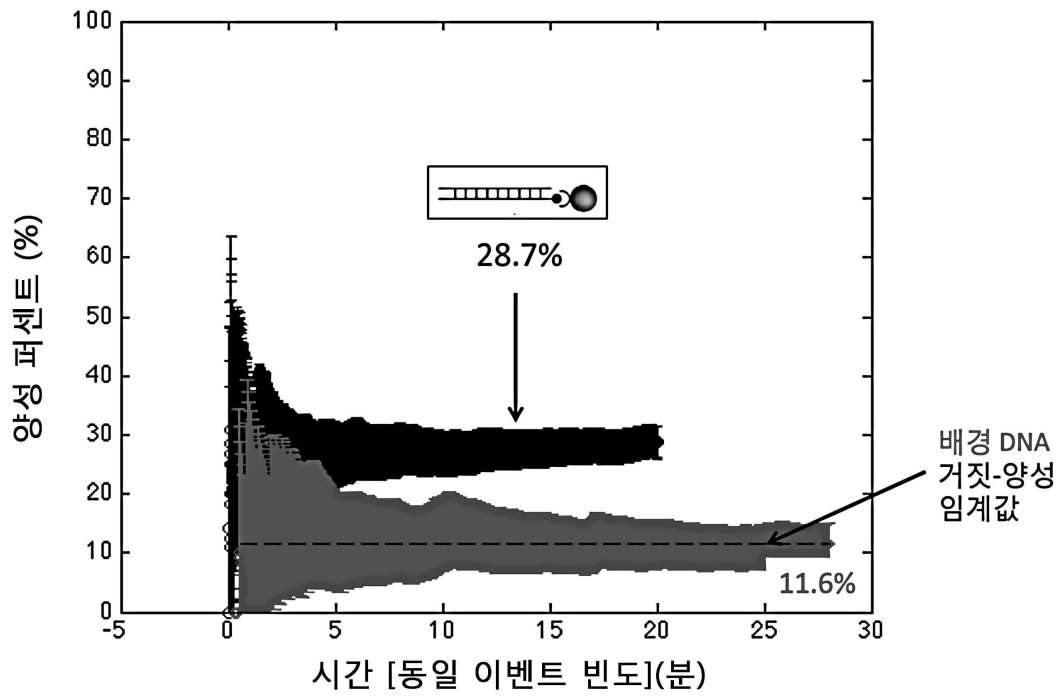
도면20



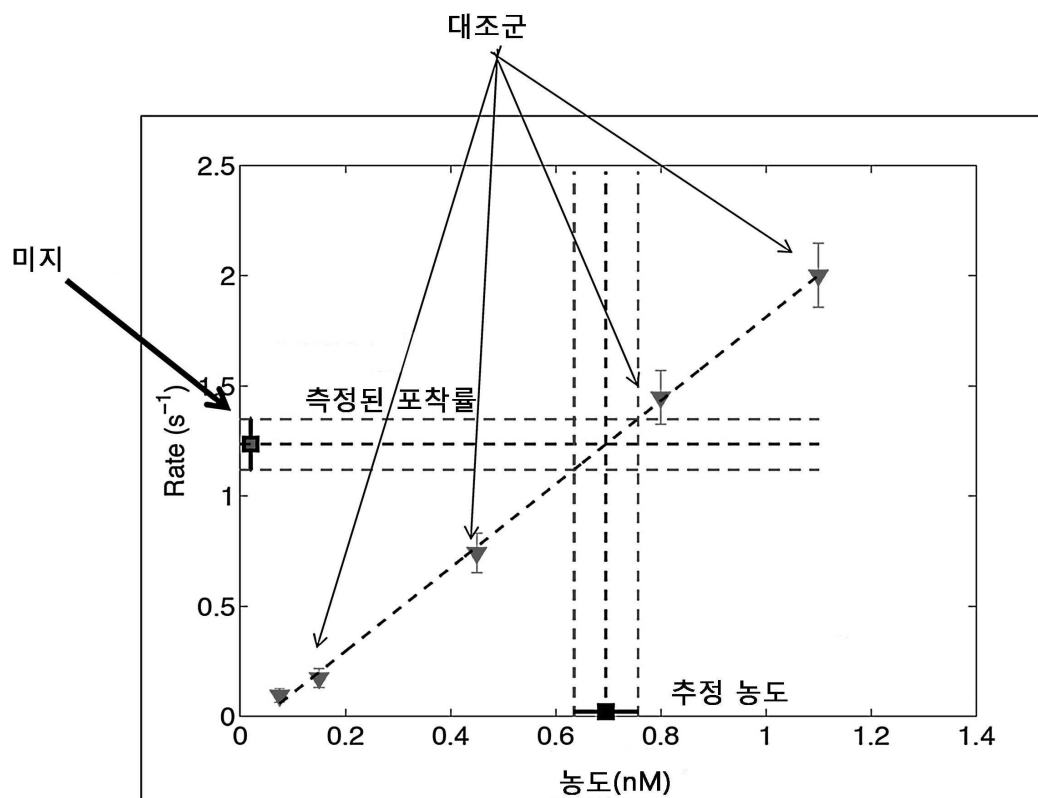
도면21



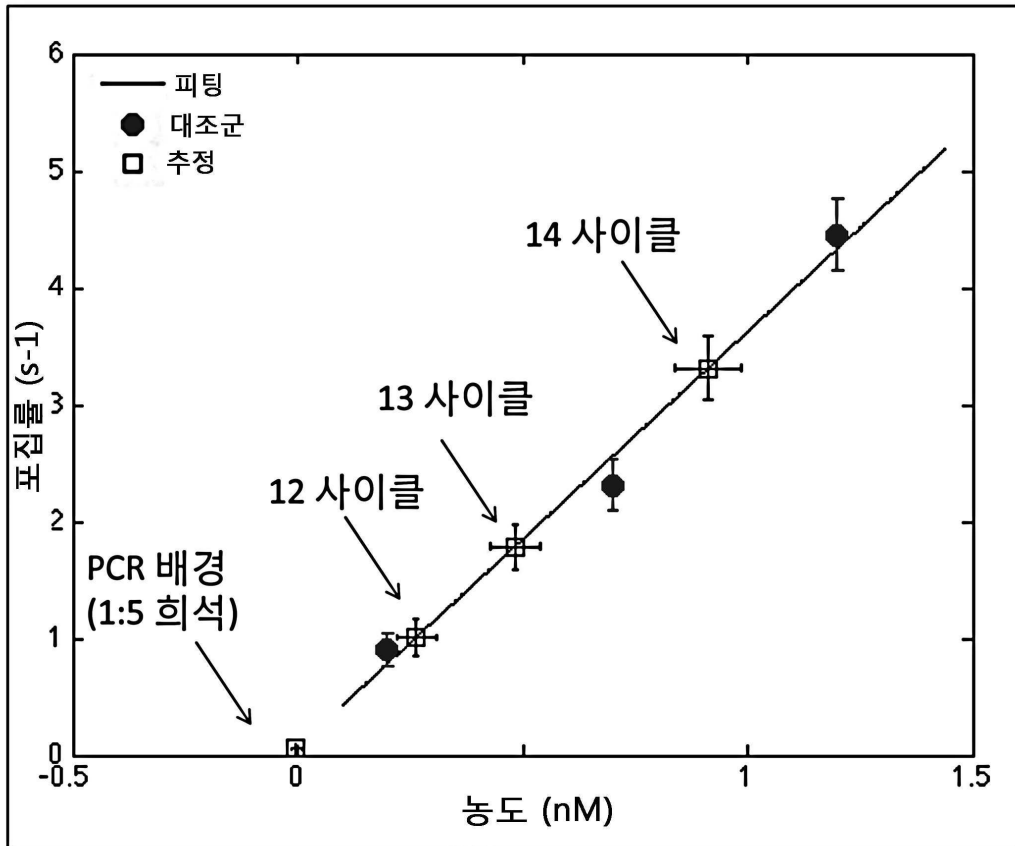
도면22



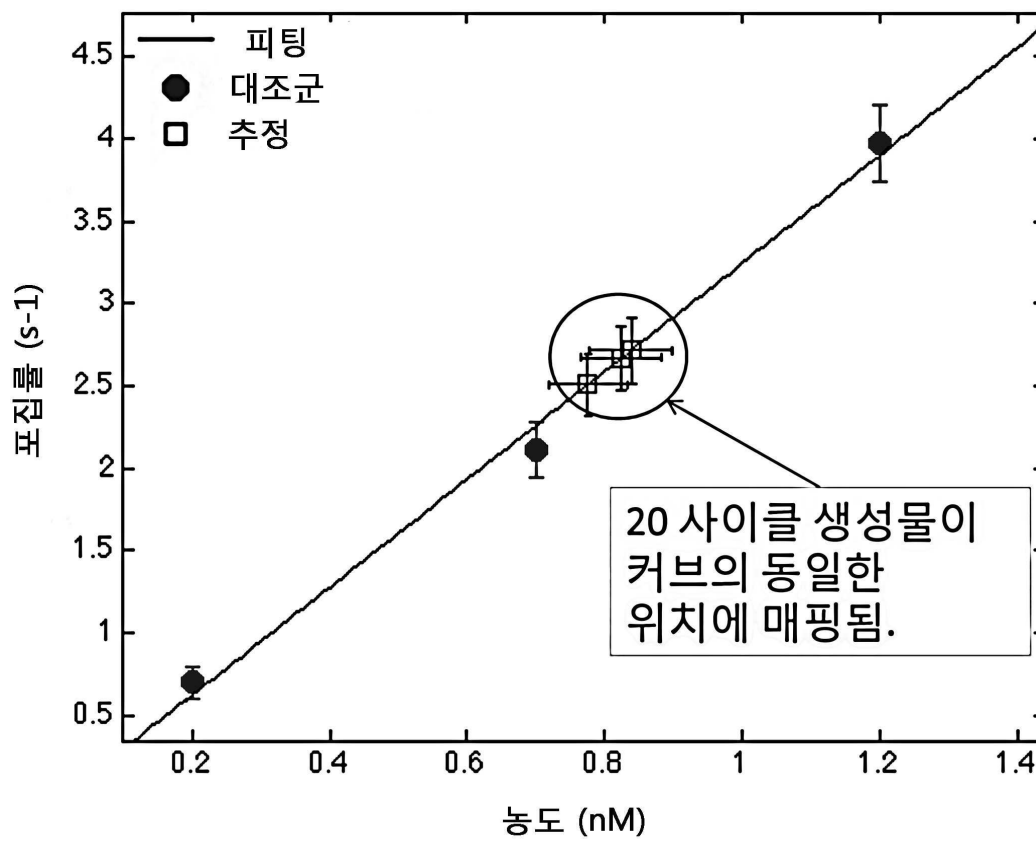
도면23



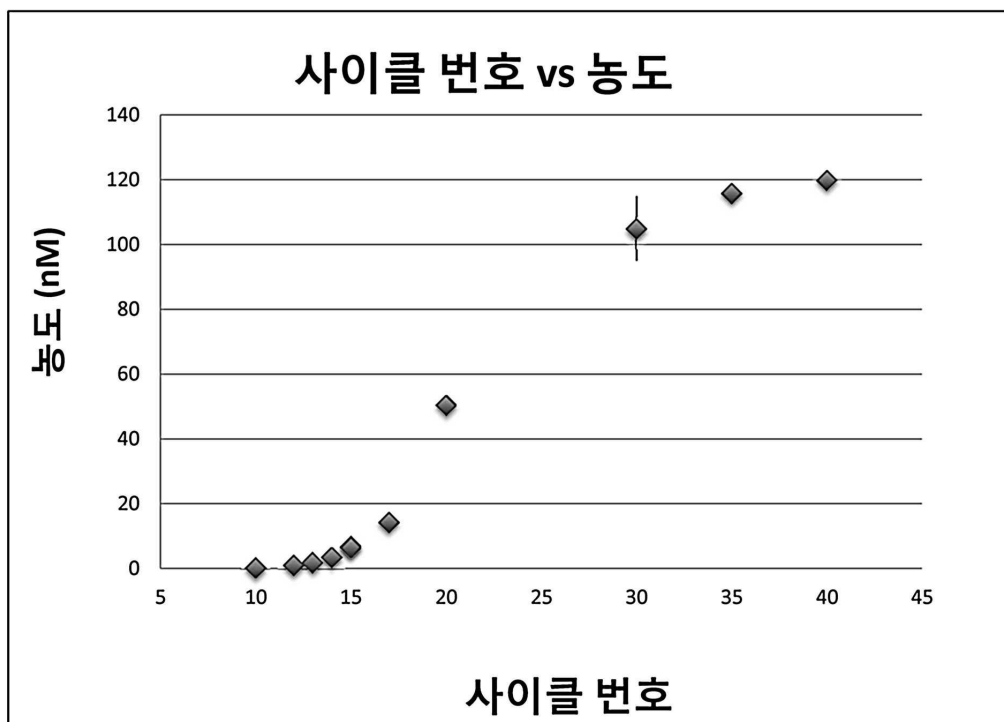
도면24



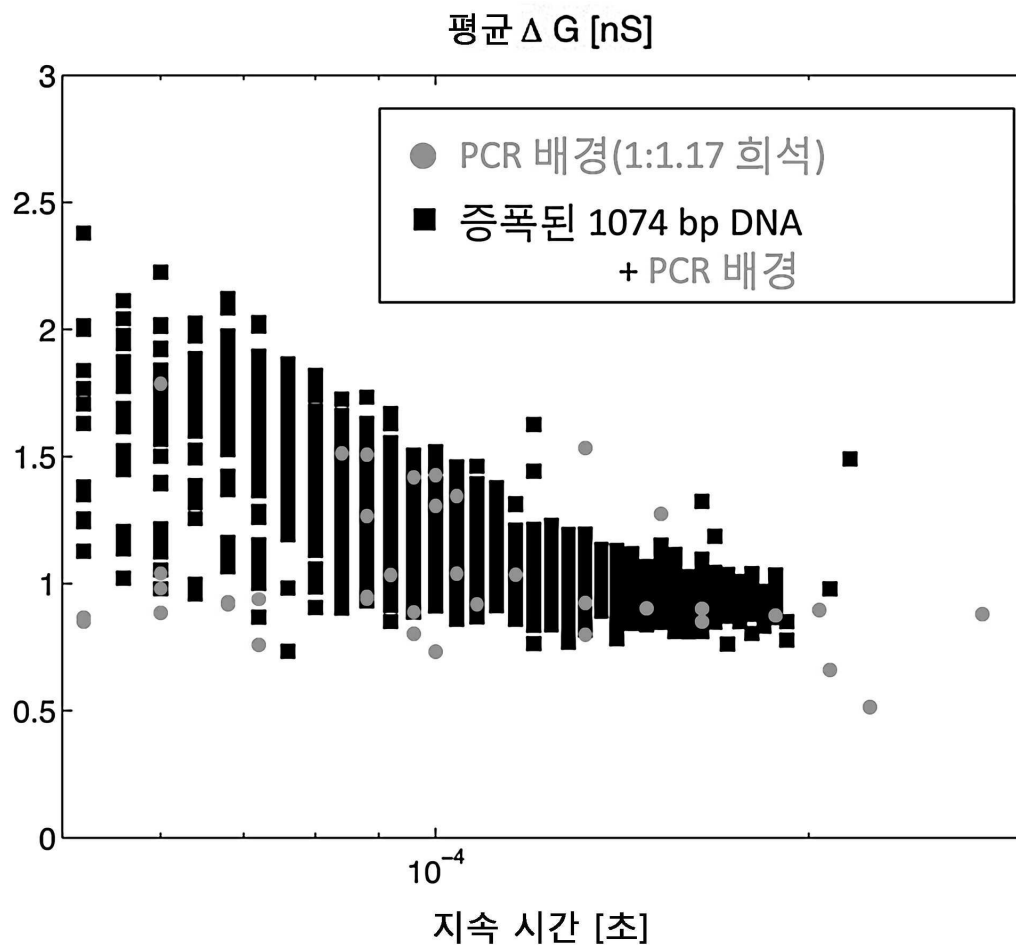
도면25



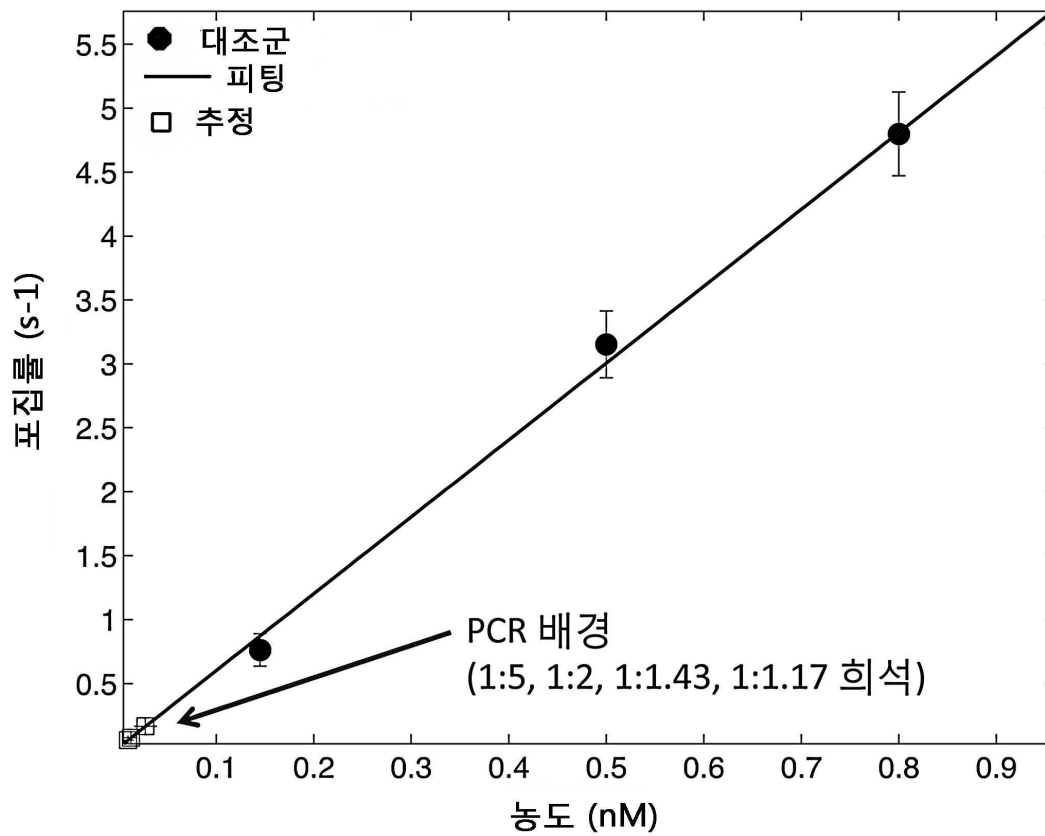
도면26



도면27



도면28



서열 목록

- <110> TWO PORE GUYS, INC.
- <120> NANOPORE DETECTION OF TARGET POLYNUCLEOTIDES FROM SAMPLE BACKGROUND
- <130> IF17P147/US
- <150> PCT/US 2016/016233
- <151> 2016-02-02
- <150> US 62/111,075
- <151> 2015-02-02
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer
- <400> 1

gaatattccc gctctccgga 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 2

gctgggtgctc cattcttgag 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 3

cctccagacc tggacagaat 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 4

tgtgggtctgt ggaaggtgtc a 21