(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0040511
(43) 공개일자 2018년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12Q 1/6809* (2018.01) *C12Q 1/689* (2018.01)
(52) CPC특허분류
*C12Q 1/6809* (2013.01)
*C12Q 1/689* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7015105
(22) 출원일자(국제) 2015년11월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년06월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/059344
(87) 국제공개번호 WO 2016/085632
국제공개일자 2016년06월02일
(30) 우선권주장
62/075,648 2014년11월05일 미국(US)

(71) 출원인
**캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지**
미국 캘리포니아주 91125 파사데나 엠씨 210-85 이스트 캘리포니아 불바드 1200
**슬립칩 코포레이션**
미국 60661 일리노이주 시카고 스위트 205 엔. 클린턴 스트리트 118
(72) 발명자
**이스마기로브, 러스템**
미국 91125 캘리포니아주 파사데나 엠/씨 210-85 이스트 캘리포니아 불바드 1200 캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지 내
**코로세바, 유제니아**
미국 91125 캘리포니아주 파사데나 엠/씨 210-85 이스트 캘리포니아 불바드 1200 캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지 내
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**양영준, 김영**

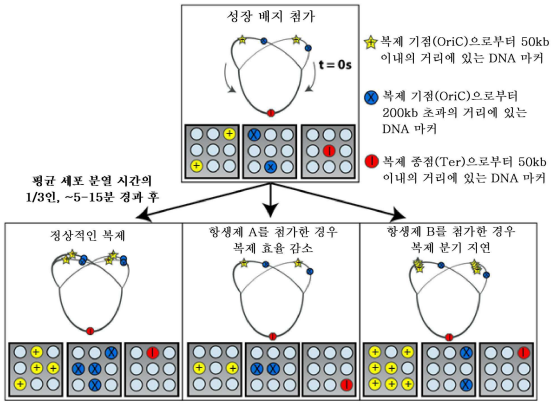
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 **유기체의 약물에 대한 반응의 미세유체 측정**

## (57) 요 약

본원에서는 샘플 중에 존재하는 미생물이 처리에 대해 감수성인지 또는 내성인지 여부를 신속하게 사정하기 위한 방법 및 장치를 개시한다.

*대 표 도* - 도4



(52) CPC특허분류
*C12Q 2537/165* (2013.01)
*C12Q 2545/114* (2013.01)
*C12Q 2565/629* (2013.01)
*C12Q 2600/136* (2013.01)
(72) 발명자
**스클라피, 트래비스**
미국 91125 캘리포니아주 파사데나 엠/씨 210-85 이스트 캘리포니아 불바드 1200 캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지 내
**커티스, 매튜, 에스.**
미국 91125 캘리포니아주 파사데나 엠/씨 210-85 이스트 캘리포니아 불바드 1200 캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지 내
**쇠프, 나탄**
미국 91125 캘리포니아주 파사데나 엠/씨 210-85 이스트 캘리포니아 불바드 1200 캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지 내
**마아마르, 헤디아**
미국 60661 일리노이주 시카고 스위트 205 엔. 클린턴 스트리트 118 슬립칩 코포레이션 내
**셴, 펭**
미국 60661 일리노이주 시카고 스위트 205 엔. 클린턴 스트리트 118 슬립칩 코포레이션 내
**주, 에릭, 비.**
미국 91125 캘리포니아주 파사데나 엠/씨 210-85 이스트 캘리포니아 불바드 1200 캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지 내

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

박테리아 집단의 제1 부분으로부터의 표적 분자를 포함하는 제1 샘플 및 상기 박테리아 집단의 제2 부분으로부터의 표적 분자를 포함하는 제2 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서, 제1 부분은 항생제로 처리된 것이고, 여기서, 제2 부분은 항생제로 처리되지 않은 것인 단계;

복수 개의 제1 분석 영역 중에 상기 제1 샘플을 분포시키는 단계;

복수 개의 제2 분석 영역 중에 상기 제2 샘플을 분포시키는 단계;

각각의 제1 및 제2 분석 영역을, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 반응을 수행하기 위한 시약과 접촉시키는 단계; 및

각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 단계로서, 여기서, 분석 영역 중의 각 샘플의 분포는 상기 반응 후 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 임계 개수의 표적 분자가 검출되고, 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 검출되지 않도록 수행되는 것인 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 임계 개수가 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 초과인 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 분석 영역 중의 각 샘플의 분포가 분석 영역 중 적어도 일부는 표적 분자를 가지지 않고, 분석 영역 중 적어도 일부는 단 하나의 표적 분자만을 가지도록 수행되는 것인 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 분석 영역 중의 각 샘플의 분포가 분석 영역 중 적어도 하나는 단 하나의 표적 분자만을 함유하도록 수행되는 것인 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 제1 샘플이 상기 시약을 포함하고, 여기서, 복수 개의 제1 분석 영역을 시약과 접촉시키는 단계는 상기 복수 개의 제1 분석 영역 중에 상기 제1 샘플을 분포시키는 상기 단계를 포함하는 것인 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 제2 샘플이 상기 시약을 포함하고, 여기서, 복수 개의 제2 분석 영역을 시약과 접촉시키는 단계는 상기 복수 개의 제2 분석 영역 중에 상기 제2 샘플을 분포시키는 상기 단계를 포함하는 것인 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 반응이 핵산 증폭을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 핵산 증폭이 본질적으로 등온인 방법.

### 청구항 9

제7항에 있어서, 상기 핵산 증폭이 중합효소 연쇄 반응인 방법.

### 청구항 10

제7항에 있어서, 상기 핵산 증폭이 핵산 서열 기반 증폭 (NASBA), 자기 유지 서열 복제 (3SR), 루프 매개 등온

증폭 (LAMP), 가닥 치환 증폭 (SDA), 전체 게놈 증폭, 다중 치환 증폭, 가닥 치환 증폭, 헬리카제 의존 증폭, 닉킹 효소 증폭 반응, 재조합 중합효소 증폭, 역전사 PCR 및 라이게이션 매개 PCR로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 11**

제1항에 있어서, 상기 분석 영역이 웰을 포함하는 것인 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 표적 분자가 핵산인 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 시약이 핵산 증폭 시약인 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 핵산을 증폭시키는 데 효과적인 조건에 각 분석 영역을 노출시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 표적 분자가 박테리아 염색체 또는 플라스미드의 세그먼트를 포함하는 것인 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 표적 분자가 복제 기점으로부터 50 kDa 미만, 100 kDa 미만, 200 kDa 미만, 또는 400 kDa 미만 내에 있는 것인 방법.

**청구항 17**

제15항에 있어서, 표적 분자가 상기 박테리아 염색체 또는 플라스미드 상에 유전자의 서열을 포함하는 것인 방법.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 표적 분자가 mRNA를 포함하는 것인 방법.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 표적 분자가 표적 분자의 서열에 상보적인 프라이머를 포함하는 증폭 반응에 의해 증폭되는 것인 방법.

**청구항 20**

제18항에 있어서, mRNA가 recA 또는 lexA를 코딩하는 것인 방법.

**청구항 21**

제1항에 있어서, 시약이 복수 개의 시약 영역에 배치되는 것인 방법.

**청구항 22**

제18항에 있어서, 접촉이 제1 또는 제2 복수 개의 분석 영역과 유체 소통하도록 복수 개의 시약 영역을 배치함으로써 수행되는 것인 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 접촉이 시약 영역을 포함하는 기판과, 제1 및 제2 복수 개의 분석 영역을 포함하는 기판 사이의 상대 운동을 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 각 복수 개의 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재의 검출을 분석하여 박테리아 집단에서의 항생제에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 25**

제1항에 있어서, 표적 분자가 제1 샘플 중 박테리아로부터 제거되고, 여기서, 박테리아의 항생제에의 초기 노출과 표적 분자의 제거 사이의 시간은 성장기 동안 박테리아의 평균 배가 시간보다 짧은 것인 방법.

**청구항 26**

제1항에 있어서, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재에 대한 상기 검출이 제1 샘플의 항생제에의 노출 종료 후 3시간, 2시간, 또는 1시간 미만 내에 수행되는 것인 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재에 대한 상기 검출이 제1 샘플의 항생제에의 노출 종료 후 45분, 30분, 15분, 또는 10분 미만 내에 수행되는 것인 방법.

**청구항 28**

제1항에 있어서, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재에 대한 상기 검출이 제1 샘플의 항생제에의 노출 종료 후 3시간 미만, 2시간 미만, 또는 1시간 미만 내에 수행되는 것인 방법.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재에 대한 상기 검출이 제1 샘플의 항생제에의 노출 종료 후 45분 미만, 30분 미만, 15분 미만, 또는 10분 미만 내에 수행되는 것인 방법.

**청구항 30**

제1항에 있어서, 상기 제1 샘플로부터의 상기 박테리아를 항생제로 2시간 이하, 1시간 이하, 45분 이하, 30분 이하, 15분 이하, 또는 10분 이하의 기간 동안 처리한 것인 방법.

**청구항 31**

제1항에 있어서, 제1 샘플로부터의 박테리아의 항생제에의 제1 노출부터 검출 단계까지의 시간이 3시간 미만, 2시간 미만, 1시간 미만, 45분 미만, 또는 30분 미만인 것인 방법.

**청구항 32**

제1항에 있어서, 제1 복수 개의 분석 영역이 적어도 10, 20, 30, 40, 또는 50개의 분석 영역을 포함하는 것인 방법.

**청구항 33**

제1항에 있어서, 제2 복수 개의 분석 영역이 적어도 10, 20, 30, 40, 또는 50개의 분석 영역을 포함하는 것인 방법.

**청구항 34**

제1항에 있어서, 제1 및 제2 샘플을 제1 및 제2 복수 개의 분석 영역 내로 분포시키는 것이 동시에 수행되는 것인 방법.

**청구항 35**

제1항에 있어서, 제1 샘플 또는 제2 샘플이 10,000, 5,000, 1,000, 500, 200, 100, 50, 20, 또는 10개 미만의 표적 분자를 포함하는 것인 방법.

**청구항 36**

박테리아 집단의 제1 부분으로부터의 표적 분자를 포함하는 제1 샘플 및 상기 박테리아 집단의 제2 부분으로부터의 표적 분자를 포함하는 제2 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서, 제1 부분은 항생제로 처리된 것이고, 여기서, 제2 부분은 항생제로 처리되지 않은 것인 단계;

복수 개의 제1 분석 영역 중에 상기 제1 샘플을 분포시키는 단계;

복수 개의 제2 분석 영역 중에 상기 제2 샘플을 분포시키는 단계;

각각의 제1 및 제2 분석 영역을, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 반응을 수행하기 위한 시약과 접촉시키는 단계;

각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 단계로서, 여기서, 분석 영역 중의 각 샘플의 분포는 상기 반응 후 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 임계 개수의 표적 분자가 검출되고, 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 검출되지 않도록 수행되는 것인 단계; 및

검출 결과를 분석하여 박테리아 집단에서의 상기 항생제에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 단계를 포함하는, 박테리아 집단에서의 항생제에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 방법.

**청구항 37**

박테리아 집단을 복수 개의 클론 단리 영역으로 분포시키는 단계로서, 분포는 클론 단리 영역 중 적어도 일부가 통계학상 각각 단일의 단리된 박테리아를 함유하는 것으로 추정되도록 수행되는 것인 단계;

단일의 단리된 박테리아를 각각 확장시켜 복수 개의 클론 집단을 생성하는 단계;

상기 복수 개의 클론 집단을 각각 복수 개의 처리 영역으로부터의 적어도 하나의 처리 영역으로, 및 복수 개의 대조군 영역으로부터의 적어도 하나의 대조군 영역으로 분포시키는 단계;

제1 복수 개의 처리 영역을 항생제와 접촉시키고, 복수 개의 대조군 영역은 항생제와 접촉시키지 않는 단계;

각각의 제1 복수 개의 처리 영역 및 각각의 복수 개의 대조군 영역에 대하여 각 클론 집단으로부터의 하나 이상의 표적 분자를 별개의 복수 개의 분석 영역으로 분포시키는 단계;

각각의 분석 영역을, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 반응을 수행하기 위한 시약과 접촉시키는 단계; 및

각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 단계로서, 여기서, 분석 영역 중의 각 샘플의 분포는 상기 반응 후 별개의 복수 개의 분석 영역 중 일부에서는 임계 개수의 표적 분자가 검출되고, 별개의 복수 개의 분석 영역 중 일부에서는 검출되지 않도록 수행되는 것인 단계를 포함하는, 박테리아 집단에서의 항생제에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 방법.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 검출 결과를 분석하여 상기 복수 개의 클론 집단 중 적어도 일부에서의 상기 항생제에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 39**

세포 집단의 제1 부분으로부터의 표적 피분석물을 포함하는 제1 샘플 및 상기 세포 집단의 제2 부분으로부터의 표적 피분석물을 포함하는 제2 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서, 제1 부분은 약물로 처리된 것이고, 여기서, 제2 부분은 약물로 처리되지 않은 것인 단계;

복수 개의 제1 분석 영역 중에 상기 제1 샘플을 분포시키는 단계;

복수 개의 제2 분석 영역 중에 상기 제2 샘플을 분포시키는 단계;

각각의 제1 및 제2 분석 영역을, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 피분석물의 존재 또는 부재를 검출하는 반응을 수행하기 위한 시약과 접촉시키는 단계; 및

각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 피분석물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계로서, 여기서, 분석

영역 중의 각 샘플의 분포는 상기 반응 후 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 임계 개수의 표적 피분석물이 검출되고, 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 검출되지 않도록 수행되는 것인 단계를 포함하는 방법.

**청구항 40**

복수 개의 분석 영역,

핵산 증폭 성분을 포함하는 복수 개의 시약 영역

을 포함하는 용기로서, 여기서, 용기는 나머지 다른 한 층을 기준으로 복수 개의 분석 영역 및 복수 개의 시약 영역이 서로 분리되어 있는 제1 위치와 복수 개의 분석 영역 중 적어도 일부는 복수 개의 시약 영역의 적어도 일부와 유체 소통하는 제2 위치 사이를 이동하도록 구성된 제1층 및 제2층을 포함하는 것인 용기; 및

박테리아 집단에서의 항생제에 대한 내성 또는 감수성 측정에 관한 사용 설명서를 포함하는 키트.

**청구항 41**

제39항에 있어서, 상기 핵산 증폭 성분이 recA 또는 lexA mRNA를 증폭시키기 위한 프라이머를 포함하는 것인 키트.

**청구항 42**

제39항에 있어서, 상기 핵산 증폭 성분이 복제 기점으로부터 50 kDa 미만, 100 kDa 미만, 200 kDa 미만, 또는 400 kDa 미만 내에 있는, 박테리아 염색체 또는 플라스미드 상의 핵산 표적을 증폭시키기 위한 프라이머를 포함하는 것인 키트.

**청구항 43**

제39항에 있어서, 용기가 적어도 10, 20, 30, 40, 또는 50개의 분석 영역을 포함하는 것인 키트.

**청구항 44**

제39항에 있어서, 용기가 적어도 10, 20, 30, 40, 또는 50개의 시약 영역을 포함하는 것인 키트.

**청구항 45**

제39항에 있어서, 상기 항생제가 아미노글리코시드, 세팔로스포린, 테트라사이클린, 술폰아미드, 마크롤라이드, 반코마이신, 및 β-락탐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 키트.

**청구항 46**

제44항에 있어서, 상기 설명서가, 상기 항생제로 처리되지 않은 박테리아 집단 중 일부와 비교하여 상기 항생제로 처리된 박테리아 집단 중 일부에서의 핵산 표적 검출이 감소하였다면, 이는 박테리아 집단이 상기 항생제에 대하여 감수성이라는 것을 시사하는 것임을 설명하는 것인 키트.

**청구항 47**

제39항에 있어서, 상기 항생제가 HPUra, 히드록시우레아, 트리메토프림, 시프로플록사신, 및 MMC로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 키트.

**청구항 48**

제46항에 있어서, 상기 설명서가, 상기 항생제로 처리되지 않은 박테리아 집단 중 일부와 비교하여 상기 항생제로 처리된 박테리아 집단 중 일부에서의 핵산 표적 검출이 증가하였다면, 이는 박테리아 집단이 상기 항생제에 대하여 감수성이라는 것을 시사하는 것임을 설명하는 것인 키트.

**청구항 49**

인큐베이션 모듈, 샘플 제조 모듈, 및 디지털 정량화 모듈을 포함하는, 샘플을 프로세싱하기 위한 장치로서, 여기서, 상기 장치는 각 모듈이 나머지 다른 모듈과 유체 소통할 수 있도록 배치되게 구성될 수 있고; 여기서, 상기 인큐베이션 모듈은 유기체를 약물과 인큐베이션시키기 위해 구성된 인큐베이션 챔버를 포함하고, 여기서, 상

기 샘플 제조 모듈은 상기 유기체로부터 표적 피분석물을 추출하도록 구성되고; 여기서, 상기 디지털 정량화 모듈은 복수 개의 반응 부위에서 상기 표적 피분석물의 존재 또는 부재를 디지털 방식으로 검출할 수 있도록 구성된 복수 개의 반응 부위를 포함하는 것인 장치.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] **상호 참조**

[0002] 본 출원은 2014년 11월 5일 출원된 미국 가출원 번호 62/075,648의 이점을 주장하고, 상기 출원은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] **연방 정부의 지원을 받은 연구에 관한 진술**

[0004] 본 발명은 미국 국립 보건원(National Institutes of Health: NIH)에 의해 수여된 허가 번호 EB012946, GM074961 및 DP1OD003584 하, 및 미국 방위 고등 연구 계획국(Defense Advanced Research Projects Agency)에 의한 협력 협정 번호 HR-0011-11-2-0006 하의 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에서 특정 권리를 가진다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 출원은 미세유체 분야, 및 생물학적 엔티티의 검출 및 증폭 분야에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0007] 항생제에 대한 내성은 전 세계 공중 위생에 주요 임박한 위협이 된다. CDC (U. S. Department of Health and Human Services, 2013, 114) 및 WHO (Organization, 2014, 257)로부터의 통계 자료는 놀라운 정도이며, 이는 자유로운 비선택적인 항생제 사용이 이루어진 현 패러다임은 계속 진행될 수 없다는 것을 강조한다. 그람 음성 유기체에서의 내성 출현은 그에 대한 치료 옵션이 제한이 되는 바, 특히 관심의 대상이 된다. 진료소에서의 광범위 항생제의 남용이 약물 내성 병원체의 진화 및 확산의 주범이 되기는 하지만; 내성을 퇴치하는 것은 모든 환경에 있어서 진단 개발을 필요로 한다.

[0008] 치료를 개선시키기 위해서는 임상 실험실은 병원체를 확인하고, 그의 항미생물제에 대한 감수성을 측정할 수 있는 신속한 시험을 필요로 한다. 현재 실험실은 24-48시간 소요되는 배양 기반 방법을 통해 확인 및 항미생물제 감수성 시험 (AST)을 수행한다. 의사는 어떤 유기체가 존재하는지 여부, 박테리아 부하량, 또는 각종 치료 접근법에 대한 유기체의 감수성에 대해 근시간 안에 알지 못하기 때문에, 임상의는 자주 광범위 (예컨대, 2세대 및 3세대) 항생제를 이용하여 치료하는 것을 선택할 수 있고, 심지어는 무증상 감염 또는 위양성도 치료할 수 있다. 복합성, 재발성, 및 특별 사례들 중에서 항생제 과잉 처방이 가장 심각하다. 이는 발열 소아, 폐쇄 환자, 예컨대, BPH, 신장 결석증을 앓는 남성, 특히, 기계를 반복적으로 사용하는 남성, 임신 중 감염을 앓은 여성, 입원 환자, 및 면역 손상된 환자를 포함한다. 이러한 상황에서, 임상의는 더욱 공격적으로 치료하는 경향이 있다. 턴어라운드를 가속화시키면, 임상의는 지연 없이 알맞은 항미생물제 요법을 투여함으로써 환자 치료를 개선시킬 수 있을 것이다. 따라서, 신흥 항미생물제 내성 문제를 개선시키고, 치료를 개선시키기 위해서, 1차 치료 환경에 있는 의사는 병원체를 확인하고, 그의 항미생물제에 대한 감수성을 측정할 수 있는 초고속 시험을 필요로 한다. 그러므로, 필요한 것은 감염 및 항미생물제 내성 또는 감수성을 신속하고 정확하게 진단하기 위한 장치 및 방법이다.

### 발명의 내용

[0009] 한 측면에서, 본 발명은 신속하게, 암 세포를 비롯한 세포, 또는 병원체를 비롯한 미생물을 확인할 수 있고, 그의 부하량을 정량할 수 있고, 약물, 예컨대, 항생제에 대한 그의 감수성 또는 내성을 진단할 수 있는 장치 및 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 임상 또는 환경 샘플을 비롯한, 각종 샘플 유형으로부터 기원할 수 있는 개별 미생물 또는 세포를 사용하여 약물 감수성 또는 약물 내성의 표현형을 검출할 수 있고, 대사적으로 프로파일링할 수 있다. 상기 샘플 유형으로는 혈액, 뇌 척수액 (CSF), 타액 및 소변을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않고, 이는 또한 환경 샘플, 예컨대, 물 또는 병원 바닥면으로부터의 환경 샘플도 포함할 수 있

다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 무오염 플랫폼에서 세포를 약물, 예컨대, 항생제와 함께 인큐베이션시킨 후, 핵산 또는 다른 분자를 신속하게 추출하고, 정량화할 수 있다. 장치는 미세유체 장치에서 디지털 단일 분자 측정을 사용할 수 있고, 이는 오염 물질로부터 병원체를 구별하고, 약물 내성 유기체 또는 세포와 약물 감수성 유기체 또는 세포를 보다 빠른 조기 시점에 구별할 수 있도록 하는 데 중요한 정량 데이터를 제공하면서, 검출 한계를 개선시키는 초고감도 측정값을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 임상 샘플로부터 개별 미생물 또는 세포의 상태를 구별할 수 있고, 약물, 예컨대, 예를 들어, 항생제에 대한 그의 개별 반응 시기를 이해할 수 있으며, 초고속으로 약물 감수성을 측정할 수 있다.

[0010] 일부 실시양태에서, 샘플과 연관된 데이터는 각 구획은 샘플의 일부를 포함하는 것인, 공간상 분리된 한 구획보다 더욱 큰 측정값을 포함한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 샘플에 대해 핵산 증폭이 수행된다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭 반응은 루프 매개 증폭(LAMP) 반응이다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭 반응은 PCR 반응이다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 대략 55-65℃의 온도 범위에서 또는 상기 온도 범위에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 샘플 중 적어도 일부는 적어도 2개 이상을 포함하는 어레이 내로 분할된다. 일부 실시양태에서, 어레이는 슬립칩(SlipChip)이다. 일부 실시양태에서, 증폭되는 핵산은 RNA이다.

[0012] 본원에서는 또한 박테리아 집단의 제1 부분으로부터의 표적 분자를 포함하는 제1 샘플 및 상기 박테리아 집단의 제2 부분으로부터의 표적 분자를 포함하는 제2 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서, 제1 부분은 항생제로 처리된 것이고, 여기서, 제2 부분은 항생제로 처리되지 않은 것인 단계; 복수 개의 제1 분석 영역 중에 상기 제1 샘플을 분포시키는 단계; 복수 개의 제2 분석 영역 중에 상기 제2 샘플을 분포시키는 단계; 각각의 제1 및 제2 분석 영역을, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 반응을 수행하기 위한 시약과 접촉시키는 단계; 및 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 단계로서, 여기서, 분석 영역 중의 각 샘플의 분포는 상기 반응 후 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 임계 개수의 표적 분자가 검출되고, 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 검출되지 않도록 수행되는 것인 단계를 포함하는, 샘플로부터 표적 분자를 검출하고, 정량화하는 방법을 제공한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 임계 개수는 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 초과이다. 일부 실시양태에서, 분석 영역 중의 각 샘플의 분포는 분석 영역 중 적어도 일부는 표적 분자를 가지지 않고, 분석 영역 중 적어도 일부는 단 하나의 표적 분자만을 가지도록 수행된다. 일부 실시양태에서, 분석 영역 중의 각 샘플의 분포는 분석 영역 중 적어도 하나는 단 하나의 표적 분자만을 함유하도록 수행된다. 일부 실시양태에서, 제1 샘플은 상기 시약을 포함하고, 여기서, 복수 개의 제1 분석 영역을 시약과 접촉시키는 단계는 상기 복수 개의 제1 분석 영역 중에 상기 제1 샘플을 분포시키는 상기 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 샘플은 상기 시약을 포함하고, 여기서, 복수 개의 제2 분석 영역을 시약과 접촉시키는 단계는 상기 복수 개의 제2 분석 영역 중에 상기 제2 샘플을 분포시키는 상기 단계를 포함한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 반응은 핵산 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭은 본질적으로 등온성이다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭은 중합효소 연쇄 반응이다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭은 핵산 서열 기반 증폭 (NASBA), 자기 유지 서열 복제 (3SR), 루프 매개 등온 증폭 (LAMP), 가닥 치환 증폭 (SDA), 전체 게놈 증폭, 다중 치환 증폭, 가닥 치환 증폭, 헬리카제 의존 증폭, 닉킹 효소 증폭 반응, 재조합 중합효소 증폭, 역전사 PCR, 또는 라이게이션 매개 PCR이다.

[0015] 일부 실시양태에서, 상기 분석 영역은 웰을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 분자는 핵산이다. 일부 실시양태에서, 시약은 핵산 증폭 시약이다. 일부 실시양태에서, 샘플로부터 표적 분자를 검출하고, 정량화하는 방법은 핵산을 증폭시키는 데 효과적인 조건에 각 분석 영역을 노출시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 표적 분자는 박테리아 염색체 또는 플라스미드의 세그먼트이다. 일부 실시양태에서, 표적 분자는 복제 기점으로부터 50 kDa 미만, 100 kDa 미만, 200 kDa 미만, 또는 400 kDa 미만만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태에서, 표적 분자는 상기 박테리아 염색체 또는 플라스미드 상에 유전자의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 분자는 mRNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 분자는 표적 분자의 서열에 상보적인 프라이머를 포함하는 증폭 반응에 의해 증폭된다. 일부 실시양태에서, mRNA는 recA 또는 lexA를 코딩한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 시약은 복수 개의 시약 영역에 배치된다. 일부 실시양태에서, 접촉은 제1 또는 제2 복수 개의 분석 영역과 유체 소통하도록 복수 개의 시약 영역을 배치함으로써 수행된다. 일부 실시양태에서, 접촉은 시약 영역을 포함하는 기판과, 제1 및 제2 복수 개의 분석 영역을 포함하는 기판 사이의 상대 운동을 수행하는

것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플로부터 표적 분자를 검출하고, 정량화하는 방법은 각 복수 개의 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재의 검출을 분석하여 박테리아 집단에서의 항생제에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 것을 추가로 포함한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 표적 분자는 제1 샘플 중 박테리아로부터 제거되고, 여기서, 박테리아의 항생제에의 초기 노출과 표적 분자의 제거 사이의 시간은 성장기 동안 박테리아의 평균 배가 시간보다 짧다. 일부 실시양태에서, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 것은 제1 샘플의 항생제에의 노출 종료 후 3시간, 2시간, 또는 1시간 미만 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 것은 제1 샘플의 항생제에의 노출 종료 후 45분, 30분, 15분, 또는 10분 미만 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 것은 제1 샘플의 항생제에의 노출 종료 후 3시간 미만, 2시간 미만, 또는 1시간 미만 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 것은 제1 샘플의 항생제에의 노출 종료 후 45분 미만, 30분 미만, 15분 미만, 또는 10분 미만 내에 수행된다.

[0019] 일부 실시양태에서, 상기 제1 샘플로부터의 박테리아를 항생제로 2시간 이하, 1시간 이하, 45분 이하, 30분 이하, 15분 이하, 또는 10분 이하의 기간 동안 처리한다. 일부 실시양태에서, 제1 샘플로부터의 박테리아의 항생제에의 제1 노출부터 검출 단계까지의 시간은 3시간 미만, 2시간 미만, 1시간 미만, 45분 미만, 또는 30분 미만이다.

[0020] 일부 실시양태에서, 제1 복수 개의 분석 영역은 적어도 10, 20, 30, 40, 또는 50개의 분석 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수 개의 분석 영역은 적어도 10, 20, 30, 40, 또는 50개의 분석 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 샘플을 제1 및 제2 복수 개의 분석 영역 내로 분포시키는 것은 동시에 수행된다. 일부 실시양태에서, 제1 샘플 또는 제2 샘플은 10,000, 5,000, 1,000, 500, 200, 100, 50, 20, 또는 10개 미만의 표적 분자를 포함한다.

[0021] 본원에서는 또한 박테리아 집단의 제1 부분으로부터의 표적 분자를 포함하는 제1 샘플 및 상기 박테리아 집단의 제2 부분으로부터의 표적 분자를 포함하는 제2 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서, 제1 부분은 항생제로 처리된 것이고, 여기서, 제2 부분은 항생제로 처리되지 않은 것인 단계; 복수 개의 제1 분석 영역 중에 상기 제1 샘플을 분포시키는 단계; 복수 개의 제2 분석 영역 중에 상기 제2 샘플을 분포시키는 단계; 각각의 제1 및 제2 분석 영역을, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 반응을 수행하기 위한 시약과 접촉시키는 단계; 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 단계로서, 여기서, 분석 영역 중의 각 샘플의 분포는 상기 반응 후 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 임계 개수의 표적 분자가 검출되고, 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 검출되지 않도록 수행되는 것인 단계; 및 검출 결과를 분석하여 박테리아 집단에서의 상기 항생제에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 단계를 포함하는, 박테리아 집단에서의 항생제에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 방법도 제공한다.

[0022] 본원에서는 또한 박테리아 집단을 복수 개의 클론 단리 영역으로 분포시키는 단계로서, 분포는 클론 단리 영역 중 적어도 일부가 통계학상 각각 단일의 단리된 박테리아를 함유하는 것으로 추정되도록 수행되는 것인 단계; 단일의 단리된 박테리아를 각각 확장시켜 복수 개의 클론 집단을 생성하는 단계; 상기 복수 개의 클론 집단을 각각 복수 개의 처리 영역으로부터의 적어도 하나의 처리 영역으로, 및 복수 개의 대조군 영역으로부터의 적어도 하나의 대조군 영역으로 분포시키는 단계; 제1 복수 개의 처리 영역을 항생제와 접촉시키고, 복수 개의 대조군 영역은 항생제와 접촉시키지 않는 단계; 각각의 제1 복수 개의 처리 영역 및 각각의 복수 개의 대조군 영역에 대하여 각 클론 집단으로부터의 하나 이상의 표적 분자를 별개의 복수 개의 분석 영역으로 분포시키는 단계; 각각의 분석 영역을, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 반응을 수행하기 위한 시약과 접촉시키는 단계; 및 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 분자의 존재 또는 부재를 검출하는 단계로서, 여기서, 분석 영역 중의 각 샘플의 분포는 상기 반응 후 별개의 복수 개의 분석 영역 중 일부에서는 임계 개수의 표적 분자가 검출되고, 별개의 복수 개의 분석 영역 중 일부에서는 검출되지 않도록 수행되는 것인 단계를 포함하는, 박테리아 집단에서의 항생제에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 방법도 제공한다.

[0023] 일부 실시양태에서, 박테리아 집단에서의 항생제에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 방법은 검출 결과를 분석하여 상기 복수 개의 클론 집단 중 적어도 일부에서의 상기 항생제에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0024] 본원에서는 또한 세포 집단의 제1 부분으로부터의 표적 피분석물을 포함하는 제1 샘플 및 상기 세포 집단의 제2 부분으로부터의 표적 피분석물을 포함하는 제2 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서, 제1 부분은 약물로 처리된 것이고, 여기서, 제2 부분은 약물로 처리되지 않은 것인 단계; 복수 개의 제1 분석 영역 중에 상기 제1 샘플을 분포시키는 단계; 복수 개의 제2 분석 영역 중에 상기 제2 샘플을 분포시키는 단계; 각각의 제1 및 제2 분석 영역을, 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 피분석물의 존재 또는 부재를 검출하는 반응을 수행하기 위한 시약과 접촉시키는 단계; 및 각 제1 및 제2 분석 영역 중 임계 개수의 표적 피분석물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계로서, 여기서, 분석 영역 중의 각 샘플의 분포는 상기 반응 후 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 임계 개수의 표적 피분석물이 검출되고, 제1 및 제2 분석 영역 중 일부에서는 검출되지 않도록 수행되는 것인 단계를 포함하는 방법도 제공한다.

[0025] 본원에서는 또한 복수 개의 분석 영역, 핵산 증폭 성분을 포함하는 복수 개의 시약 영역을 포함하는 용기로서, 여기서, 용기는 나머지 다른 한 층을 기준으로 복수 개의 분석 영역 및 복수 개의 시약 영역이 서로 분리되어 있는 제1 위치와 복수 개의 분석 영역 중 적어도 일부는 복수 개의 시약 영역의 적어도 일부와 유체 소통하는 제2 위치 사이를 이동하도록 구성된 제1층 및 제2층을 포함하는 것인 용기; 및 박테리아 집단에서의 항생제에 대한 내성 또는 감수성 측정에 관한 사용 설명서를 포함하는 키트도 제공한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 핵산 증폭 성분은 recA 또는 lexA mRNA를 증폭시키기 위한 프라이머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭 성분은 복제 기점으로부터 50 kDa 미만, 100 kDa 미만, 200 kDa 미만, 또는 400 kDa 미만 내에 있는, 박테리아 염색체 또는 플라스미드 상의 핵산 표적을 증폭시키기 위한 프라이머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 용기는 적어도 10, 20, 30, 40, 또는 50개의 분석 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 용기는 적어도 10, 20, 30, 40, 또는 50개의 시약 영역을 포함한다.

[0027] 일부 실시양태에서, 항생제는 아미노글리코시드, 세팔로스포린, 테트라사이클린, 술폰아미드, 마크롤라이드, 반코마이신, 및 β-락탐으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 상기 실시양태 중 특정의 것에서, 설명서는, 상기 항생제로 처리되지 않은 박테리아 집단 중 일부와 비교하여 상기 항생제로 처리된 박테리아 집단 중 일부에서의 핵산 표적 검출이 감소하였다면, 이는 박테리아 집단이 상기 항생제에 대하여 감수성이라는 것을 시사하는 것임을 설명한다.

[0028] 일부 실시양태에서, 항생제는 HPUra, 히드록시우레아, 트리메토프림, 시프로플록사신, 및 MMC로 이루어진 군으로부터 선택된다. 상기 실시양태 중 특정의 것에서, 설명서는, 상기 항생제로 처리되지 않은 박테리아 집단 중 일부와 비교하여 상기 항생제로 처리된 박테리아 집단 중 일부에서의 핵산 표적 검출이 증가하였다면, 이는 박테리아 집단이 상기 항생제에 대하여 감수성이라는 것을 시사하는 것임을 설명한다.

[0029] 본원에서는 또한 인큐베이션 모듈, 샘플 제조 모듈, 및 디지털 정량화 모듈을 포함하는, 샘플을 프로세싱하기 위한 장치로서, 여기서, 상기 장치는 각 모듈이 나머지 다른 모듈과 유체 소통할 수 있도록 배치되게 구성될 수 있고; 여기서, 상기 인큐베이션 모듈은 유기체를 약물과 인큐베이션시키기 위해 구성된 인큐베이션 챔버를 포함하고, 여기서, 상기 샘플 제조 모듈은 상기 유기체로부터 핵산을 추출하도록 구성되고; 여기서, 상기 디지털 정량화 모듈은 복수 개의 반응 부위에서 상기 핵산의 존재 또는 부재를 디지털 방식으로 검출할 수 있도록 구성된 복수 개의 반응 부위를 포함하는 것인 장치를 제공한다.

[0030] **참조로 포함**

[0031] 본 명세서에서 언급된 모든 공개 문헌, 특허, 및 특허 출원은 마치 각각의 개별 공개 문헌, 특허, 및 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 명시된 것과 같은 정도로 본원에서 참조로 포함된다.

[0032] 적용을 위해 개별적으로 또는 다양한 조합으로 사용될 수 있는, 본원에 열거된 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는 다수의 장치 및 방법이 본원에 기술되어 있다. 추가로, 앞서 기술된 적용을 위해 앞서 개시된 장치 및 방법과 다양한 조합으로 사용될 수 있다.

[0033] 본 출원은 임의의 모든 목적을 위한 하기 출원 그 전문을 참조로 포함한다: 2011년 4월 5일 출원된 미국 출원 61/516,628 (발명의 명칭: "Digital Isothermal Quantification of Nucleic Acids Via Simultaneous Chemical Initiation of Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Reactions on Slip Chip"); 2011년 5월 9일 출원된 미국 출원 61/518,601 (발명의 명칭: "Quantification of Nucleic Acids With Large Dynamic Range Using Multivolume Digital Reverse Transcription PCR (RT-PCR) On A Rotational Slip Chip Tested With Viral Load"); 2011년 9월 20일 출원된 미국 출원 13/257,811 (발명의 명칭: "Slip Chip Device and Methods"); 2010년 3월 23일 출원된 국제 출원 PCT/US2010/028361 (발명의 명칭: "Slip Chip Device and Methods"); 2009년 11

월 18일 출원된 미국 출원 61/262,375 (발명의 명칭: "Slip Chip Device and Methods"); 2009년 3월 24일 출원된 미국 출원 61/162,922 (발명의 명칭: "Slip Chip Device and Methods"); 2010년 3월 22일 출원된 미국 출원 61/340,872 (발명의 명칭: "Slip Chip Device and Methods"); 2012년 4월 5일 출원된 미국 출원 13/440,371 (발명의 명칭: "Analysis Devices, Kits, And Related Methods For Digital Quantification Of Nucleic Acids And Other Analytes"); 2012년 5월 9일 출원된 미국 출원 13/467,482 (발명의 명칭: "Multivolume Devices, Kits, Related Methods for Quantification and Detection of Nucleic Acids and Other Analytes"); 2013년 4월 22일 출원된 미국 출원 13/868,028 (발명의 명칭: "Fluidic Devices and Systems for Sample Preparation or Autonomous Analysis"); 2013년 4월 22일 출원된 미국 출원 13/868,009 (발명의 명칭: "Fluidic Devices for Biospecimen Preservation"); 2013년 4월 22일 출원된 국제 출원 PCT/US2013/037658 (발명의 명칭: "Fluidic Devices for Biospecimen Preservation"); 2013년 4월 22일 출원된 국제 출원 PCT/US2013/037660 (발명의 명칭: "Fluidic Devices and Systems for Sample Preparation or Autonomous Analysis"); 2013년 4월 24일 출원된 미국 출원 13/869,856 (발명의 명칭: "Slip-Induced Compartmentalization"); 2013년 10월 4일 출원된 국제 출원 PCT/US2013/063594 (발명의 명칭: "Methods and Systems for Microfluidics Imaging and Analysis"); 2014년 4월 18일 출원된 국제 출원 PCT/US2014/034728 (발명의 명칭: "Parallelized Sample Handling"); 2014년 7월 17일 출원된 국제 출원 PCT/US2014/047092 (발명의 명칭: "Digital Assay for Quantifying and Concentrating Analytes"); 2014년 8월 15일 출원된 미국 출원 62/038,036 (발명의 명칭: "The Pumping Lid: Devices and Methods for Programmable Generation of Positive and Negative Pressures"); 2014년 9월 15일 출원된 미국 출원 62/050,647 (발명의 명칭: "Digital Microfluidics Methods for Optimizing Isothermal Amplification Reactions"); 2014년 9월 18일 출원된 국제 출원 PCT/US2014/056401 (발명의 명칭: "System and Method for Movement and Timing Control"); 및 2014년 10월 16일 출원된 국제 출원 번호 PCT/US2014/060977 (발명의 명칭: "Enhanced Nucleic Acid Identification and Detection").

## *도면의 간단한 설명*

[0034] 본 발명의 신규한 특징은 특별히 첨부된 특허청구범위에서 기술된다. 본 발명의 원리가 사용되는, 예시적인 실시양태를 기술하는 하기의 상세한 설명, 및 그의 첨부된 도면을 참조로 하여 본 발명의 특징 및 이점은 더욱 잘 이해할 수 있을 것이다:

**도 1**은 요로 감염 (UTI) 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 단리물에서 복제 기점 기준으로 상대적인 rDNA 유전자의 맵핑된 위치를 보여주는 것이다.

**도 2**는 UTI 환자로부터의 이. 콜라이 단리물로부터 서열분석된 예시 게놈, 및 상기 게놈 상의 rRNA 유전자의 위치를 환형으로 표현해 놓은 것이다.

**도 3**은 감수성 세포에서 복제 기점에의 근접성에 기초한, 약물이 DNA 및 RNA 수준에 미치는 효과를 도시한 것이다.

**도 4**는 단일 세포로부터의 복제 기점으로부터 거리가 상이한 표적에서의 항생제 비처리, 항생제 A, 및 항생제 B가 복제 효율, 복제 분기 지연, 및 디지털 검출 결과에 미치는 효과를 도시한 것이다.

**도 5**는 본 발명의 실시양태에 따라 소변 샘플 중 세포의 약물에 대한 내성 또는 감수성을 측정하는 흐름도를 도시한 것이다.

**도 6a, 6b,** 및 **6c**는 본 발명의 실시양태에 따른, 인큐베이션 모듈을 포함하는 통합 장치에 대한 3개의 상이한 뷰를 보여주는 것이다.

**도 7**은 본 발명의 실시양태에 따른, 통합 장치와 함께 사용되는 블리스터 팩, 시약 팩, 또는 다른 유형의 용기에 관한 사진을 보여주는 것이다.

**도 8**은 본 발명의 실시양태에 따른, 스프링 또는 모터에 의해 구동되는 하나 이상의 층을 가진 작동 모듈에 관한 다이어그램이다.

**도 9**는 약물 처리에 대한 반응으로 나타나는 이종 집단으로부터의 개별 세포의 변화를 검출하기 위해 단일 분자 및 단일 세포 측정을 수행하는 것에 관한 흐름도를 보여주는 것이다.

**도 10**은 단일 통합 장치에서의 샘플에 대해 검정하는 현장 장치, 및 상기 검정 결과에 대한 흐름도를 도시한 것

이다.

**도 11**은 qPCR에 의해 측정된 바, 10, 20, 및 30분째에 측정된 2.5 ug/mL 시프로플록사신으로 처리된 시프로플록사신-감수성 이. 콜라이 샘플 (각 시점에서 우측 막대), 및 비처리된 샘플 (각 시점에서 좌측 막대)에 대한 rDNA 카피수 변화 배수를 보여주는 것이다.

**도 12a**는 qPCR에 의해 측정된 바, 0, 15, 및 30분째에 측정된 2.5 ug/mL 시프로플록사신으로 처리된 시프로플록사신-감수성 이. 콜라이 샘플 (각 시점에서 우측 막대), 및 비처리된 샘플 (각 시점에서 좌측 막대)에 대한 rDNA 카피수 변화 배수를 보여주는 것이다. **도 12b**는 슬립칩 상에서 디지털 PCR에 의해 측정된 것으로서, 상기와 동일한 것을 보여주는 것이다.

**도 13**은 슬립칩 상에서 디지털 PCR에 의해 측정된 바, 15분째 측정된 0.75 ug/mL 시프로플록사신으로 처리된 시프로플록사신-감수성 이. 콜라이 샘플, 및 비처리된 샘플에 대한 rDNA 카피수 변화 배수를 보여주는 것이다.

**도 14a**는 정량적 PCR에 의해 측정된 바, 30분째 측정된 테트라사이클린으로 처리된 감수성 및 내성 이. 콜라이 샘플, 및 비처리된 샘플에 대한 rDNA 카피수 변화 배수를 보여주는 것이다. **도 14b**는 정량적 PCR에 의해 측정된 바, 45분째 측정된 트리메토프림/술파메톡사졸로 처리된 감수성 및 내성 이. 콜라이 샘플, 및 비처리된 샘플에 대한 rDNA 카피수 변화 배수를 보여주는 것이다.

**도 15**는 UTI 이. 콜라이 단리물의 게놈에서 oriC로부터의 feoB, recA 및 Dna인히비터(DnaInhibitor) 단백질 유전자까지의 상대적인 거리를 보여주는 것이다. x축은 (임의로 조직화된) 각 개별 게놈을 나타낸다.

**도 16**은 BHI 배지에서 15분 동안 2.5 ug/ml의 시프로플록사신에의 노출 ("처리") 이후 감수성 및 내성인 박테리아 (A)에서의 UTI 임상 단리물 이. 콜라이 게놈 중 DNA 단편 카피수의 정량화를 위한 사이클 임계값 (Ct)을 보여주는 것이다.

**도 17a** 및 **도 17b**는 항생제를 함유하지 않는 BHI 배지에서의 처리 20분 후와 대비되는, BHI 배지 중 2.5 ug/mL의 시프로플록사신으로의 처리 20분 후 시프로플록사신에 대하여 감수성 (S) 및 내성 (R)인 UTI 임상 단리물에서의 FeoB 및 RecA 유전자 발현의 RNA 정량화를 보여주는 것이다.

**도 18**은 항생제를 함유하지 않는 BHI 배지에서의 처리 20분 후와 대비되는, BHI 배지 중 10 ug/mL의 시프로플록사신으로의 처리 20분 후 시프로플록사신에 대하여 감수성 및 내성인 UTI 임상 단리물에서의 FeoB 및 RecA 유전자 발현의 RNA 정량화를 보여주는 것이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0035] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 청구 대상이 속하는 관련 기술분야의 통상이 기술자가 보편적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 달리 언급하지 않는 한, 본 개시내용 전체 전역에 걸쳐 언급된 모든 특허, 특허 출원, 공개된 출원, 및 공개 문헌, 진뱅크 서열, 웹사이트 및 다른 공개 자료는 그 전문이 참조로 포함된다. 본원의 용어에 대하여 복수 개의 정의가 존재하는 경우, 본 섹션의 것을 우선으로 한다. URL 또는 다른 상기 식별자 또는 어드레스를 참조할 경우, 상기 식별자는 변경될 수 있고, 인터넷 상의 특정 정보는 변할 수 있지만, 예컨대, 인터넷 및/또는 적절한 데이터베이스를 검색함으로써 등가의 정보를 알고, 그에 쉽게 접속할 수 있다. 그에 대한 참조가는 상기 정보의 이용가능성 및 공개적인 보급을 입증한다.

[0036] 본원에서 사용되는 바, 단수 형태는 문맥상 달리 명백하게 명시되지 않는 한, 복수 개의 지시 대상을 포함한다. 본 출원에서, 단수 형태의 것을 사용하는 것은 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 복수 형태의 것을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "또는"을 사용하는 것은 달리 언급되지 않는 한, "및/또는"을 의미한다. 추가로, "포함하는"이라는 용어 및 다른 형태 (예컨대, "포함한다", 포함하다" 및 "포함한")를 사용하는 것은 제한하는 것이 아니다.

[0037] 본원에서 사용되는 바, 범위 및 양은 "약" 특정 값 또는 범위로 표현될 수 있다. 약은 또한 정확한 양도 포함한다. 그러므로, "약 10도"라는 것은 "약 10도" 및 "10도" 또한 의미한다. 일반적으로, "약"이라는 용어는 실험상 오차 범위에 있는 것으로 기대되는 양을 포함할 수 있다.

[0038] **검정법**

[0039] 본원에 기술된 장치 및 방법은 유기체의 약물 감수성 또는 내성을 검출하는 검정법에 적용될 수 있다. 검출은 검정법, 예를 들어, 유기체에서의 약물에 대한 내성 또는 감수성과 연관된 핵산, 또는 핵산의 정량화를 검출하

는 검정법에 의해 발생되는 신호의 검출일 수 있다.

[0040] 검정법은 약물에 노출된 유기체로부터의 핵산에 대해 반응 (예컨대, 증폭)을 수행하고, 반응 결과 (예컨대, 반응 결과, 양의 또는 음의 신호 발생)를 약물에 노출되지 않는 유기체로부터의 핵산에 대해 수행된 반응을 비교하는 것을 포함할 수 있다. 이를 통해 유기체가 약물에 대하여 감수성인지 또는 내성인지를 밝혀낼 수 있다.

[0041] 특정 실시양태에서, 본 방법은 미생물을 함유하는 샘플의 일부를 약물에 노출시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 미생물로부터 핵산을 추출하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 미생물로부터의 핵산의 서열 특이 정량화를 수행하는 것을 포함한다. 이어서, 정량화 정보는 미생물이 약물에 대하여 내성인지 또는 감수성인지를 측정하거나, 또는 정량화하는 데 사용된다.

[0042] 검정법은 디지털 포맷으로 수행될 수 있고, 즉, 검정법은 일부 분할 구역은 신호를 보내지 않는 반면, 다른 분할 구역은 신호를 보내도록 분할 구역 (즉, 분석 영역)으로 분할된 샘플에 대해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분할 구역은 1개 또는 0개의 표적 피분석물 (예컨대, 표적 세포, 세포의 일부, 또는 표적 분자, 예컨대, 핵산 분자 또는 단백질)을 함유한다. 일부 경우에서, 일부 분할 구역은 1개 초과의 표적 피분석물을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 반응 효율은 양성 신호를 달성하는 데 임계 개수의 표적 피분석물이 필요한 것이다. 이러한 경우, 분할 구역 중 일부는 임계값을 초과하는 다수의 표적 피분석물을 함유하고, 분할 구역 중 일부는 임계값 미만의 다수의 표적 피분석물을 함유한다면, 포맷은 디지털이다. 일부 실시양태에서, 임계값은 분할 구역마다 다를 수 있고, 따라서, 더 적은 소수의 표적 피분석물을 포함하는 일부 분할 구역은 신호를 발생하는 반면, 더 많은 표적 표적 피분석물을 포함하는 일부 분할 구역은 신호를 발생하지 않는다. 이러한 경우, 디지털 검출은, 일부 분할 구역은 신호를 발생시키지 않고, 일부는 발생시키는 한, 여전히 복수 개의 웰에 대하여 적용된 확률적 임계값에 기초하여 수행될 수 있다.

[0043] 일부 경우에서, 대다수의 분할 구역은 0개 또는 1개의 표적 피분석물을 함유한다. 이러한 디지털 또는 단일 분자 포맷은 핵산의 확인, 검출, 유전자형 분석, SNP 검출, 희귀 대립유전자 검출, 및 정량화를 비롯한, 본원에 기술된 검정법과 함께 사용될 수 있다.

[0044] 검정법은 약 600분, 540분, 480분, 420분, 360분, 300분, 240분, 180분, 120분, 110분, 100분, 90분, 80분, 70분, 60분, 50분, 40분, 30분, 20분, 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분, 또는 1분 이하로 수행될 수 있다. 검정법의 정확도는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%일 수 있다. 위양성률은 10% 미만, 1% 미만, 0.1% 미만, 0.01% 미만, 0.001% 미만, 또는 0.0001% 미만일 수 있다. 위음성률은 10% 미만, 1% 미만, 0.1% 미만, 0.01% 미만, 0.001% 미만, 또는 0.0001% 미만일 수 있다.

[0045] 검정법은 카피수 변이 (CNV)를 검출하는 데 사용될 수 있다. CNV는 DNA의 하나 이상의 섹션의 카피수를 변화시키는 게놈의 DNA의 구조적 변이, 변경 형태이다. CNV는 특정 염색체 상에서 결질 또는 복제된 비교적 큰 게놈 영역에 상응할 수 있다. 다른 유형의 유전자 변이와 같이, 일부 CNV도 질환에 대한 감수성 또는 내성과 연관이 있다. 암 세포에서는 유전자 카피수가 상승될 수 있다. 본원에 기술된 방법을 통해서는 또한 염색체 수준에서 유전적 변화를 확인할 수 있다.

[0046] DNA 복제 측정 (예컨대, CNV 검출)을 통해 이루어지는 항생제 감수성 검사 방법은 항생제, 및 세포 성장을 손상시키는 다른 작용제에 대한 반응, 및 진행생물을 비롯한 단세포 유기체 및 다세포 유기체 모두에서의 게놈 DNA 복제를 평가하는 데 적용될 수 있다. "상대적인 염색체 DNA 복제율" 측정값은 약물 (예컨대, 항생제)의 존재 대 부재하에서 성장하는 감수성 세포와, 약물의 존재 대 부재하에서 성장하는 내성 세포 사이를 구별하는 유용한 측정가능한 파라미터이다. 일부 실시양태에서, 상기 마커의 차이는 평균 세포 분열 시간보다 짧은 시간 이내에 본원에 개시된 장치 및 방법을 사용하여 관찰할 수 있으며, 이를 통해 세포 분열에 의존하는 검출 방법보다 더 빠른 조기 시점에 세포 중의 세포 복제를 검출할 수 있다. 그러므로, 본원에 기술된 방법 및 장치를 통하여 약물 내성인 세포와 약물 감수성인 세포와 세포를 신속하게 구별할 수 있다. 본원에서 제공하는 방법 및 장치는 또한 (예컨대, 치료에 대한 반응으로 종양 생검을 모니터링할 때의) 인간 세포 스크리닝을 비롯한, 임의의 약물 스크리닝에도 적용될 수 있다.

[0047] 한 실시양태에서, 세포내 rDNA의 카피수는, 세포를 항생제의 존재 및 부재하에서 단기간 동안 인큐베이션시킨 이후에 측정하고, 이러한 변화 규모의 차이를 사용하여 세포의 약물 내성 및 감수성을 측정한다. 일부 실시양태에서, rDNA 카피수 변화는 핵산 증폭 기술 (예컨대, 예를 들어, qPCR 또는 디지털 PCR 또는 디지털 등온 증폭)을 사용하여 측정하고, 결과를 사용하여 약물에 대하여 내성인지 또는 감수성인지를 측정한다. 일부 실시

양태에서, 약물 감수성을 측정하는 방법은 디지털 정량화를 사용한다. 일부 실시양태에서, 개별 세포로부터 기원하는 평균 DNA 단편 카피는 디지털 방식으로 정량화되고, 원래의 선택된 유전자에 대한 근접률/그에 대한 원거리율을 측정하게 된다.

[0048] 일부 실시양태에서, 약물 감수성 검사는 RNA에 기초하여, 예컨대, 전사 수준을 비교함으로써 이루어진다. 일부 실시양태에서, 약물 감수성 검사는 RNA에 기초하여, 예컨대, 디지털 정량화를 사용하여 전사 수준을 비교함으로써 이루어진다. 일부 실시양태에서, 정량화 전략법 (예컨대, 예로서, 다른 것들 중에서도 특히, NASBA, qRT-PCR, 서열분석, 나노스트링)이 적절할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플로부터 수득된 세포로부터의 RNA는 디지털 포맷으로 정량화된다. 일부 실시양태에서, 각 개별 세포에서의 유전자 표적 발현 수준은 장치, 예컨대, 본원에 기술된 장치에서의 단일 세포 측정을 통하여 정량화된다.

[0049] 검정법은 핵산, 예컨대, recA mRNA를 정량적으로 검출하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 환자로부터 샘플을 채취하는 단계, 샘플 중 RNA를 입수하거나, 또는 샘플로부터 RNA를 추출하는 단계, 적어도 하나의 RT-LAMP 프라이머를 사용하여 역전사시키고, 정질 및/또는 정량적 포맷으로 mRNA를 증폭시키는 단계, 및 증폭 검사를 수행하여 recA mRNA를 포함하나, 이에 제한되지 않는 핵산의 존재를 확인하는 단계를 포함하는 방법이 사용될 수 있다.

[0050] 일부 실시양태에서, 상대적인 RNA 및/또는 DNA 증폭이 사용된다. 일부 실시양태에서, 상대적인 RNA 및/또는 DNA 정량화가 사용된다. 일부 실시양태에서, 디지털 검출은 RNA 및/또는 DNA 정량화에 사용된다. 일부 실시양태에서, 다중의 신뢰가능한 RNA 및/또는 DNA 표적이 멀티플렉스 포맷으로 동시에 사용될 것이다. 일부 실시양태에서, 동일한 생리학적 프로세스 또는 항생제 반응 기전에 관여하는 RNA 표적 및/또는 그의 유전자가 사용될 수 있다.

[0051] 일부 실시양태에서, 본 발명은 종양 세포의 약물 내성 검사에 적용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 암성 세포의 약물 내성 검사에 적용될 수 있다. 본원에 기술된 장치는 임상 샘플 유형 (예컨대, 예를 들어, 입원 환자 대 외래 환자, 이전에 치료를 받은 경험이 있는 경우, 대 치료를 받은 경험이 없는 나이브인 경우, 감염 수준 (예컨대, 예를 들어, 음성 대 양성 대 오염된 경우), 및 샘플 보관/취급 (예컨대, 예를 들어, 신선한 상태인 경우 대 보레이트 보존된 경우 대 냉동된 경우)을 비롯한, 다양한 샘플 유형을 이용하는 용도에 적용가능하다.

[0052] 일부 실시양태에서, 저속 성장하는 미생물의 약물 내성은 본원에 기술된 장치 및 방법을 사용하여 염색 및 유전자 마커의 조합을 통해 사정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 성장의 유전자 마커 및 항생제 감수성의 유전자 마커의 조합을 사용하여 저속 성장하는 세포의 항생제에 대한 유전적 내성을 측정할 수 있다.

[0053] 본원에 기술된 검정법, 반응, 및 기술은 튜브, 모세관, 소적, 미세유체 장치 (예컨대, 슬립칩 장치), 웰, 웰 플레이트, 마이크로플레이트, 미세유체 웰, 미세유체 소적, 에멀젼, 고체 지지체 (예컨대, 비드 또는 마이크로어레이), 마이크로칩, 또는 겔 (예컨대, 2D 겔, 3D 겔) 및 표면 상 및 겔 중의 폴로니(polony) PCR에서와 같이, "폴로니"를 포함하는 겔 내부의 반응물을 포함하나, 이에 한정되지 않는 임의의 적합한 플랫폼 상에서 수행될 수 있다.

[0054] 한 실시양태에서, 세포의 내성 또는 감수성을 측정하는 검정법은 하기와 같이 수행된다: 세포를 희석시키기 전에 다양한 매트릭스 (예컨대, 박토 뇌-심장 침출 브로쓰(Bacto Brain-Heart Infusion broth: BHI)와 풀링된 인간 소변의 믹스인 BHI, 및/또는 인간의 전체 소변) 중에서 원하는 밀도 (예컨대, $10^1$개의 세포/mL, $10^2$개의 세포/mL, $10^3$개의 세포/mL, $10^4$개의 세포/mL, $10^5$개의 세포/mL, $10^6$개의 세포/mL, $10^7$개의 세포/mL, $10^8$개의 세포/mL, 또는 $10^9$개의 세포/mL)로 미리 배양하고 (예컨대, 37℃에서), 약물 존재하에 또는 부재하에서 인큐베이션시킨다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 원하는 온도 (예컨대, 37℃)에서 수행된 후, 원하는 농도의 항생제로 처리한다. 분취량의 배양물 또는 원래의 시험 샘플을 핵산 추출을 위해 사용하기 전 일정 기간 동안 (예컨대, <10분, 10분, 15분, 20분, 30분, 45분, 60분, 또는 >60분) 항생제의 존재하에서 및 부재하에서 세포를 인큐베이션시킬 수 있다. 핵산을 표준 방법 (예컨대, 예로서, 다른 것들 중에서도 특히, 1 단계 DNA 추출용 완충제 또는 1 단계 RNA 추출용 완충제 (예컨대, 에피센터(Epicentre)로부터 이용가능)을 사용하여 추출할 수 있다. 일부 실시양태에서, 추출 후, 핵산 증폭 기술, 예컨대, 예로서, 정량적 PCR 또는 디지털 PCR을 사용하여 핵산을 정량화한다. 엔테로박터(*Enterobacter*)에서의 23S 유전자를 정량화하기 위해, 엔테로박터에 특이적인 하기의 23S 프라이머가 사용될 수 있다: TGCCGTAACTTCGGGAGAAGGCA; TCAAGGACCAGTGTTCAGTGTC; 428 bp 생성물. (문헌 [Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Kado Y, Nomoto K. Sensitive Quantitative Detection of Commensal

Bacteria by rRNA-Targeted Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(1):32-39. doi:10.1128/AEM.01224-06] 참조). 이. 콜라이게놈은 소수의 서열 차이를 보이는 7개의 상이한 오페론, 예컨대, (예컨대, (rrnA, rrnB, rrnC, rrnD. rrnE, rrnG (aka rrnF) 및 rrnH를 함유한다. 본원에서 사용되는 바, "rDNA"라는 용어는 rRNA 오페론 서열을 의미한다. 상기 용어는 코딩 서열 및 비코딩 서열/스페이서, 둘 모두를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 대부분의 보존적 서열과, 특이적인 종을 표적화하는 프라이머를 디자인하는 충분하는 가변 서열, 둘 모두를 제공하는 데 rDNA를 이용한다. rRNA를 코딩하는 전형적인 오페론 (예컨대, 진뱅크: J01695.2)은 5S, 16S 및 23S rRNA 뿐만 아니라, tRNA를 코딩하고, 상기 서열들 사이에 스페이서를 가진다. 복제 마커로서 rDNA 유전자를 사용할 때, rRNA 오페론의 일부를 코딩하는 프라이머, 또는 그들 사이의 스페이서를 코딩하는 프라이머, 또는 그 둘 모두가 선택될 수 있다.

[0055] **샘플**

[0056] 본원에서는 샘플 분석과 관련된 방법, 장치, 시스템을 개시한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 유기체로부터 샘플을 수득하는 것을 포함한다. 샘플은 대상체 (예컨대, 환자 또는 애완 동물)로부터 수득될 수 있고, 혈액, 대변, 소변, 타액 또는 다른 체액을 포함할 수 있다. 샘플은 환자에 의해 또는 전문 의료진에 의해 수득될 수 있다. 전문 의료진의 예로는 의사, 응급 구조사, 간호사, 최초 대처자, 심리학자, 의학 물리학 직원, 전문 간호사, 외과 전문의, 치과 의사, 및 임의의 다른 전문 의료진을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 샘플은 임의의 체액, 예를 들어, 양수, 안방수, 담즙, 림프, 모유, 간질액, 혈액, 혈액 혈장, 귀지 (귀밥), 쿠퍼액 (Cowper's fluid) (사정전 요도액), 유상액, 유미즙, 여성 사정액, 생리혈, 점액, 타액, 소변, 토사물, 눈물, 질액, 땀, 혈청, 정액, 피지, 고름, 흉수, 뇌척수액, 윤활액, 세포내 액, 및 유리체액으로부터 수득될 수 있다. 한 예에서, 샘플은 채혈에 의해 수득되고, 여기서, 전문 의료진은 예컨대, 시린지에 의해 대상체로부터 혈액을 채혈하게 된다.

[0057] 샘플을 샘플 수집 용기에 수집할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플 수집 용기에 검출될 수 있는 정보를 코딩한다. 예를 들어, 검출기는 바코드를 인식할 수 있다. 바코드는 샘플이 수집된 장소, 또는 샘플 수집의 기원이 된 개체에 대한 정보를 포함할 수 있다. 검출기는 상기 정보를 취하고, 그를 사용하여 샘플에 관하여 생성된 데이터를 프로세싱 또는 전송할 수 있다. 예를 들어, 카메라폰은 샘플 수집 용기를 촬영할 수 있다. 카메라폰은 환자를 식별하는, 용기 상의 바코드를 인식할 수 있다. 이어서, 카메라폰은 샘플에 관하여 생성된 데이터를 샘플의 수득 기점이 된 환자와 연관시킬 수 있다. 이어서, 연관된 데이터는 환자에게로, 또는 환자 담당 의사에게 전송될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 영상은 샘플 수집 용기 및 샘플 분석 장치로부터 생성된다.

[0058] 식품 샘플 또한 분석될 수 있다. 샘플은 잠재적으로 표적 유기체를 포함하는 임의의 조성물일 수 있다. 샘플 공급원으로는 지열 및 열수 지역, 산성 토양, 술포타라(sulfotara) 및 보일링 머드 포트, 풀, 효소가 알칼리에 대하여 중성인 온천 및 간헐천, 해양 방선균, 후생동물, 내외 공생물, 열대 토양, 온대 토양, 편건성 토양, 퇴비 더미, 두엄 더미, 해양 퇴적물, 담수 퇴적물, 수 농축물, 고염 및 과냉 해빙, 북극 툰드라, 조해, 외해 원양, 바다눈, 미생물 매트 (예컨대, 고래 시체, 샘, 및 열수 분출공), 곤충 및 선충 소화관 미생물 군락, 내부 기생 식물, 착생 수 샘플, 공업 용지, 및 현장외 환경을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 추가로, 샘플은 진핵생물, 원핵생물, 믹소박테리아 (에포틸온), 공기, 물, 퇴적물, 토양 또는 바위, 식물 샘플, 식품 샘플, 소화관 샘플, 타액 샘플, 혈액 샘플, 땀 샘플, 소변 샘플, 척수액 샘플, 조직 샘플, 질 면봉, 대변 샘플, 양수 샘플, 지문, 기침에 의해 생성되는 에어로졸을 비롯한, 에어로졸, 피부 샘플, 생검으로부터의 조직을 비롯한, 조직, 및/또는 구강 청결제 샘플로부터 단리될 수 있다. 다른 샘플 유형은 임상 검사 (예컨대, 예를 들어, 입원 환자 대 외래 환자, 이전에 치료를 받은 경험이 있는 경우, 대 치료를 받은 경험이 없는 나이브인 경우), 감염 수준 검사 (예컨대, 예를 들어, 음성 대 양성 대 오염된 경우), 및 보관/취급 검사 (예컨대, 예를 들어, 신선한 상태인 경우 대 보레이트 보존된 경우 대 냉동된 경우)를 위한 샘플을 포함한다.

[0059] 샘플은 유기체를 포함할 수 있다. 샘플은 미생물을 포함할 수 있다. 샘플 중 미생물의 개수는 10개 미만, 100개 미만, 1,000개 미만, $10^4$개 미만, $10^5$개 미만, 또는 $10^6$개 미만일 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 프로세싱된 샘플 (예컨대, 농축된, 여과된 샘플 등)이다.

[0060] 샘플은 유기체로부터의 표적 피분석물을 포함할 수 있다. 표적 피분석물은 예를 들어, 세포, 세포 일부, 폴리펩티드, 또는 핵산을 포함할 수 있다. 핵산은 무세포 핵산일 수 있다. 핵산은 세포로부터 단리된 것일 수 있다. 핵산은 단일 또는 이중 가닥일 수 있다. 표적 피분석물은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, RNA는 tRNA, mRNA, rRNA, trRNA, snRNA, snoRNA, smY, scaRNA, gRNA, RNase P, RNase MRP, aRNA, crRNA,

incRNA, miRNA, piRNA, siRNA, tasi RNA, rasiRNA, 7SK, vRNA 또는 그의 임의 조합이다. DNA는 ssDNA, dsDNA, cDNA, 또는 그의 임의 조합일 수 있다. 일부 경우에서, DNA는 유전자 또는 유전자 단편을 포함한다. 유전자 또는 유전자 단편은 돌연변이를 포함할 수 있다. 돌연변이는 점 돌연변이, 삽입, 결실, 증폭, 전좌, 역위, 카피수 변이, 및/또는 다른 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, DNA는 비코딩 영역을 포함한다. 비코딩 영역은 기능성 서열, 조절 요소, 인트론, 엑손, 슈도진, 반복 서열, 트랜스존, 바이러스 요소, 텔로머라제, 유전자 스위치, 전사 인자 부위, 오퍼레이터, 인핸서, 사일런서, 프로모터, 인슐레이터, 및/또는 다른 영역을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, DNA는 cDNA를 포함한다. 일부 경우에서, DNA는 박테리아 또는 바이러스로부터의 것이다. 일부 경우에서, DNA는 세포로부터 수집된 것이다. 일부 예에서, DNA는 세포내 DNA이다. 일부 경우에서, DNA는 세포외 DNA이다.

[0061] 표적 피분석물은 RNA를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, RNA는 mRNA를 포함한다. 일부 경우에서, RNA는 비코딩 RNA (ncRNA)를 포함한다. 비코딩 RNA는 전달 RNA (tRNA), 리보솜 RNA (rRNA), 전달-전령 RNA (tmRNA), 소형 인 RNA (snoRNA), 마이크로RNA (miRNA), 소형 간섭 RNA (siRNA), 소형 핵 RNA (snRNA), 피위-상호작용 (piwi-interacting) RNA (piRNA), 장쇄 ncRNA (lncRNA), 및/또는 다른 유형의 ncRNA를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, RNA는 박테리아 또는 바이러스로부터의 것이다. 일부 경우에서, RNA는 세포로부터 수집된 것이다. 일부 예에서, RNA는 세포내 RNA이다. 일부 경우에서, RNA는 세포외 RNA이다.

[0062] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 "핵산" 및 "핵산 분자"라는 용어는 뉴클레오티드리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 그 둘 모두로 구성된 분자을 지칭한다. 상기 용어는 리보뉴클레오티드 및 데옥시리보뉴클레오티드의 단량체 및 중합체를 포함하고, 여기서, 중합체인 경우, 리보뉴클레오티드 및/또는 데옥시리보뉴클레오티드는 5'에서 3' 연결을 통해 함께 연결된다. 그러나, 연결은 예를 들어, 5'에서 2' 연결을 포함하는 핵산을 비롯한, 핵산 합성 분야에 공지되는 연결 중 임의의 것을 포함한다. 핵산 분자에서 사용되는 뉴클레오티드는 자연적으로 발생된 것일 수 있거나, 또는 자연적으로 발생된 염기쌍과 염기쌍 관계를 형성할 수 있는 합성적으로 제조된 유사체일 수 있다. 염기쌍 관계를 형성할 수 있는 비자연적으로 발생된 염기의 예로는 아자 및 데아자 피리미딘 유사체, 아자 및 데아자 퓨린 유사체, 및 퓨린 및 피리미딘 고리의 탄소 및 질소 원자 중 하나 이상이 헤테로원자, 예컨대, 산소, 황, 셀레늄, 인 등에 의해 치환된 것인 다른 헤테로시클릭 염기 유사체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 핵산은 샘플로부터 검출될 수 있다.

[0063] 본원에서 사용되는 바, "올리고뉴클레오티드"라는 용어는 다중 뉴클레오티드를 포함하는 핵산 분자를 지칭한다. 올리고뉴클레오티드는 약 2 내지 약 300개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0064] 표적 피분석물은 세포 성장의 유전자 마커 및 항생제 감수성의 유전자 마커를 포함할 수 있다. 표적 피분석물은 종양 세포에 대한 약물 내성 또는 감수성을 나타내는 마커를 포함할 수 있다. 표적 피분석물은 예컨대, 약물 처리에 대한 반응으로 세포 생존가능성을 검정하는 산화-감수성 염료로 검출될 수 있는 산화적 스트레스에 대한 마커를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 피분석물은 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 피분석물은 세포막 또는 세포막 결합 분자를 포함하며, 여기서, 세포막 또는 세포막 결합 분자의 변화는 약물에 대한 유기체의 반응과 연관이 있는 것이다.

[0065] **유기체**

[0066] "유기체"라는 용어는 박테리아, 효모, 진균, 바이러스, 원생생물 (원생동물, 미세조류), 고세균, 식물 및 진핵생물을 비롯한, 임의의 유기체 또는 미생물을 지칭한다. 진핵생물은 단세포 진핵 세포일 수 있다. 박테리아는 그람 양성 박테리아 및 그람 음성 박테리아를 포함한다. "유기체"라는 용어는 본 발명의 방법에 의해 검출 및 확인될 수 있는 핵산을 포함하는 살아있는 물질 및 바이러스를 지칭한다. 유기체는 박테리아, 고세균류, 원핵생물, 진핵생물, 바이러스, 원생동물, 마이코플라스마, 진균, 식물 및 선충을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상이한 유기체는 상이한 계통, 상이한 변종, 상이한 종, 상이한 속, 상이한 과, 상이한 목, 상이한 강, 상이한 문, 및/또는 상이한 계일 수 있다. 유기체는 수성 환경으로부터의 미립자들에 부착된, 토양 침출액, 해양 퇴적물, 담수 퇴적물, 온천, 붕빙(ice shelves), 외계 샘플, 바위 틈, 구름을 포함한 환경적 공급원으로부터 단리될 수 있고, 다세포 유기체와의 공생 관계에 연루될 수 있다. 상기 유기체의 예로는 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 종 및 자연 공급원으로부터 알려져 있지 않은/특징화되지 않은 종을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 유기체는 유전자 조작된 유기체 또는 유전자 변형된 유기체를 포함할 수 있다. 유기체는 트랜스제닉 식물을 포함할 수 있다. 유기체는 유전자 변형된 작물을 포함할 수 있다. 임의의 유기체는 유전자 변형된 것일 수 있다. 유전자 변형될 수 있는 유기체의 예로는 플랜테인, 참마, 수수, 고구마, 대두, 카사바, 감자, 벼, 밀, 또는 옥수수를 포함한다.

[0067] 유기체는 박테리아 병원체, 예컨대, 아에로모나스 히드로필라(*Aeromonas hydrophila*) 및 다른 종 (종(spp.)); 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*); 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*); 클로스트리디움(*Clostridium*)의 종을 생성하는 보툴리눔 뉴로톡신(*Botulinum neurotoxin*); 브루셀라 아보르투스(*Brucella abortus*); 브루셀라 멜리텐시스(*Brucella melitensis*); 브루셀라 수이스(*Brucella suis*); 부르크홀데리아 말레이(*Burkholderia mallei*)(이전에는 슈도모나스 말레이(*Pseudomonas mallei*)); 부르크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*)(이전에는 슈도모나스 슈도말레이(*Pseudomonas pseudomallei*)); 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*); 클라미디아 프시타시(*Chlamydia psittaci*); 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*); 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*); 클로스트리디움 페르프린겐스(*Clostridium perfringens*); 코키디오이데스 임미티스(*Coccidioides immitis*); 코키디오이데스 포사다시이(*Coccidioides posadasii*); 코우드리아 루미난티움(*Cowdria ruminantium*) (하트워터(Heartwater)); 콕시엘라 부르네티이(*Coxiella burnetii*); 엔테로비룰렌트 에스케리키아 군(*Enterovirulent Escherichia coli group*) (EEC 군), 예컨대, 에스케리키아 콜라이 - 장독소생성 (ETEC), 에스케리키아 콜라이 - 장병원성 (EPEC), 에스케리키아 콜라이 - O157:H7 장출혈성 (EHEC) 및 에스케리키아 콜라이 - 장침습성 (EIEC); 에를리키아(*Ehrlichia*) 종, 예컨대, 에를리키아 샤페엔시스(*Ehrlichia chaffeensis*); 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*); 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophilia*); 리베로박터 아프리카누스(*Liberobacter africanus*); 리베로박터 아시아티쿠스(*Liberobacter asiaticus*); 리스테리아 모노시토게네스(*Listeria monocytogenes*); 다양한 엔테릭스, 예컨대, 클레브시엘라(*Klebsiella*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 프로테우스(*Proteus*), 시트로박터(*Citrobacter*), 아에로박터(*Aerobacter*), 프로비덴시아(*Providencia*), 및 세라티아(*Serratia*); 미코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*); 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*); 마이코플라스마 카프리콜룸(*Mycoplasma capricolum*); 마이코플라스마 미코이데스 종 미코이데스(*Mycoplasma mycoides ssp mycoides*); 페로노스클레로스포라 필리피넨시스(*Peronosclerospora philippinensis*); 파코프소라 파키리지(*Phakopsora pachyrhizi*); 플레시오모나스 시겔로이데스(*Plesiomonas shigelloides*); 랄스토니아 솔라나케아룸(*Ralstonia solanacearum*) 레이스 3, 생태형 2; 리케치아 프로와제키이(*Rickettsia prowazekii*); 리케치아 리케치이(*Rickettsia rickettsii*); 살모넬라(*Salmonella*) 종; 스클레로프토라 라이스시아에 바르제아에(*Schlerophthora rayssiae varzeae*); 시겔라(*Shigella*) 종; 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*); 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*); 신키트리움 엔도비오티쿰(*Synchytrium endobioticum*); 비브리오 콜레라에 논-O1(*Vibrio cholerae* non-O1); 비브리오 콜레라에 O1; 비브리오 파라하에몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) 및 다른 비브리오; 비브리오 불니피쿠스(*Vibrio vulnificus*); 크산토모나스 오리자에(*Xanthomonas oryzae*); 크실렐라 파스티디오사(*Xylella fastidiosa*)(감귤류 다종 위황병 균주(citrus variegated chlorosis strain); 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 및 예르시니아 슈도투베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*); 및 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*)를 포함할 수 있다.

[0068] 본원에 개시된 방법 및 장치를 이용하여 검출 및 분석될 수 있는 공지된 약물 내성 특성을 가진 병원체에 관한 비제한적인 목록은 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*), 카르바페넴-내성 엔테로박테리아세아에(*Enterobacteriaceae*) (CRE), 약물 내성 네이세리아 고노레아에(*Neisseria gonorrhoeae*), 다중약물 내성 아시네토박터(*Acinetobacter*), 약물 내성 캄필로박터, 플루코나졸-내성 칸디다(*Candida*) (진균), 확장된 스펙트럼 β-락타마제를 생성하는 엔테로박테리아세아에 (ESBL), 반코마이신-내성 엔테로코쿠스(*Enterococcus*) (VRE), 다중약물 내성 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 약물 내성 비-장티푸스성 살모넬라, 약물 내성 살모넬라 타이피(*Salmonella Typhi*), 약물 내성 시겔라, 메티실린-내성 스타필로코쿠스 아우레우스 (MRSA), 약물 내성 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 약물 내성 M. 튜베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 반코마이신-내성 스타필로코쿠스 아우레우스 (VRSA), 에리트로마이신-내성 그룹 A 스트렙토코쿠스, 및 클린다마이신-내성 그 B 스트렙토코쿠스를 포함한다.

[0069] **항미생물제/항생제 화합물**

[0070] 유기체를 약물과 함께 인큐베이션시켜 약물에 대한 그의 내성 또는 감수성을 나타내는 반응을 측정한다. 일부 실시양태에서, 약물은 종양 치료용 화합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 약물은 항생제 화합물 또는 항미생물제 화합물이다. 본원에서 사용되는 바, 항미생물제라는 용어는 미생물을 사멸시키거나, 또는 그의 성장을 억제시키는 데 사용되는 천연, 반합성 또는 합성 기원의 임의 물질을 포함하는 것을 의미한다. 바람직한 실시양태에서, 항미생물제는 미생물의 숙주에는 해를 끼치지 않는다. 본원에서 사용되는 바, "항미생물제"라는 용어 및 "항생제"라는 용어는 상호교환이 가능하다. 항미생물제 또는 항생제 화합물의 예로는 아미카신, 겐타마이신, 카나마이신, 네오마이신, 네틸마이신, 토브라마이신, 파로모마이신, 스트렙토마이신, 스펙티노마이

신(Bs), 겔다나마이신, 헤르비마이신, 리팍시민, 로라카베프, 에르타페넴, 도리페넴, 이미페넴/실라스티틴, 메로페넴, 세파드록실, 세파졸린, 세팔로틴/세팔로틴, 세팔렉신, 세파클러, 세파만돌, 세폭시틴, 세프로질, 세푸록심, 세펙심, 세프디니르, 세프디토렌, 세포페라존, 세포탁심, 세프포독심, 세프타지딤, 세프티부텐, 세프티족심, 세프트리악손, 세페핌, 세프타롤린 포사밀, 세프토비프롤, 테이코플라닌, 반코마이신, 텔라반신, 달바반신, 오리타반신, 클린다마이신, 린코마이신, 답토마이신, 아지트로마이신, 클라리트로마이신, 디리트로마이신, 에리트로마이신, 록시트로마이신, 트롤레안도마이신, 텔리트로마이신, 스피라마이신, 아즈트레오남, 푸라졸리돈, 니트로푸란토인(Bs), 리네졸리드, 포시졸리드, 라데졸리드, 토레졸리드, 아목실린, 암피실린, 아즐로실린, 카르베니실린, 클록사실린, 디클록사실린, 플루클록사실린, 메즐로실린, 메티실린, 나프실린, 옥사실린, 페니실린 G, 페니실린 V, 피페라실린, 페니실린 G, 테모실린, 티카르실린, 아목시실린/클라불라네이트, 암피실린/술박탐, 피페라실린/타조박탐, 티카르실린/클라불라네이트, 바시트라신, 콜리스틴, 폴리믹신 B, 시프로플록사신, 에녹사신, 가티플록사신, 게미플록사신, 레보플록사신, 로메플록사신, 목시플록사신, 날리딕스산, 노르플록사신, 오플록사신, 트로바플록사신, 그레파플록사신, 스파플록사신, 테마플록사신, 마페니드, 술파세타미드, 술파디아진, 실버 술파디아진, 술파디메톡신, 술파메티졸, 술파메톡사졸, 술파아닐리미드 (아르카익), 술파살라진, 술피속사졸, 트리메토프림-술파메톡사졸 (코-트리목사졸) (TMP-SMX), 술폰아미도크리소이딘 (아르카익), 데메클로사이클린, 독시사이클린, 미노사이클린, 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 클로파지민, 답손, 카프레오마이신, 사이클로세린, 에탐부톨(Bs), 에티온아미드, 이소니아지드, 피라진아미드, 리팜피신 (미국에서는 리팜핀), 리파부틴, 리파펜틴, 아르스페너민, 클로람페니콜(Bs), 포스포마이신, 후시드산, 메트로니다졸, 무피로신, 플라텐시마이신, 퀴누프리스틴/달포프리스틴, 티암페니콜, 티게사이클린(Bs), 티니다졸, 및 트리메토프림(Bs)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0071] 상이한 항생제 또는 항미생물제는 상이한 작용 기전을 가질 수 있고, 복제 증식 및 복제 재개시에 차별적으로 영향을 줄 수 있다. 일부 정균성 항생제 (예컨대, 아미노글리코시드, 세팔로스포린, 테트라사이클린, 술폰아미드, 및 마크롤라이드)는 단백질 합성을 억제시키는 반면, 살균성 항생제는 세포벽 (예컨대, 반코마이신 및 β-락탐), 또는 박테리아 DNA (예컨대, 플루오로퀴놀론)에 작용할 수 있다. 일부 항생제, 예컨대, 트리메토프림 및 술파메톡사졸은 대사 경로를 방해하고 DNA 복제에 간접적으로 영향을 미치며, 일부 (니트로푸란토인)는 DNA 복제를 비롯한, 세포의 다중 프로세스에 영향을 미친다.

[0072] 일부 실시양태에서, 치료 조건은 모든 항생제 군에 대하여 항생제가 DNA 복제에 미치는 효과를 강화시킬 수 있도록 조정될 것이다. 일부 실시양태에서, 치료 조건은 모든 항생제 군에 대하여 항생제가 DNA 복제에 미치는 효과에 대한 관찰 결과의 속도를 가속화시키기 위해 조정될 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에서 기술된 방법은 상대적인 유전자 정량화를 통해 항생제 감수성에 대하여 시험한다.

[0073] **표적/표적 피분석물**

[0074] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공하는 방법 및 장치는 항미생물제의 존재 또는 부재에 대한 반응으로 나타나는 미생물의 성장을 나타내는 표적 피분석물 (예컨대, 마커)을 표적한다. 일부 실시양태에서, OriC에 근접해 있는 유전자 (예컨대, 예를 들어, 면역 적격성 유전자)의 발현 및 카피수 변화를 측정한다. 본 발명자들의 방법 및 장치를 통해 각각의 관심 박테리아 종에 대한 ori에 근접해 있는 전체 유전자 카피수를 신속하게 및 고감도로 정량화할 수 있다.

[0075] 저속으로 성장하는 세포는 더욱 느리게 그의 염색체를 복제할 수 있고, 이를 통해 항생제에 의해 영향을 받은 세포와, 그에 의해 사멸된 세포를 구별할 수 있게 된다. 추가로, 대사가 손상된 세포는 다소 특이적인 RNA 표적을 생성할 수 있다. 이러한 표적의 선별 및 정량화를 본원에 기술된다.

[0076] 일부 실시양태에서, 관심 표적 피분석물은 DNA이다. 일부 실시양태에서, DNA 영역, 예컨대, 공개된 박테리아 게놈 중 다중 카피로 나타나는 것이 표적으로서 선택된다 (예컨대, rDNA). 일부 실시양태에서, 1개 초과의 표적 (예컨대, DNA 단편 또는 유전자)이 동시 정량화를 위해 선택되고; 이들 표적은 복제 기점에 근접하게 위치할 수 있고/거나, 복제 양 방향 모두를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 초과의 표적 (예컨대, DNA 단편 또는 유전자)는 동시 정량화를 위해 선택되고; 이들 표적 중 하나 이상의 것은 복제 기점에 근접하게 위치하고, 하나 이상의 것은 복제 기점으로부터 원거리에 위치한다. 특정 시점에 (일부 경우에서는 복제 완료 이전에) 상기 표적의 비를 측정함으로써, 일부 실시양태에서는 독립적으로 세포 개수를 측정할 필요 없이, 복제를 신속하게 검출할 수 있다. 이는 극소수의 세포가 샘플 중에 존재할 때, 및/또는 극소수의 세포를 분석할 때, 및/또는 분할된 샘플 각 부분에 존재하는 세포의 개수의 정확도가 푸아송(Poisson) 통계에 의해 제공될 때 큰 가치를 띠게 된다.

[0077] 일부 실시양태에서, 항미생물제 처리에 기인한 유전자 중복을 검출함으로써 감수서 균주를 검출할 수 있게 된다. 일부 실시양태에서, 유전자량 접근법에 대한 표적으로는 Ori, 또는 OriC와 인접한 거리에 위치하는 유전자 (예컨대, 예로서, OriC로부터 50 kb 이내, 100 kb 이내, 150 kb 이내, 200 kb 이내, 및/또는 300 kb 이내)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 약물 감수성 세포 중의 DNA/유전자량은 감소하기보다는 증가하게 될 것이다.

[0078] 일부 실시양태에서, 공개된 박테리아 게놈 게놈 중 단일 카피로 또는 다중 카피로 나타나는 DNA 표적이 표적으로서 선택된다 (예컨대, 예로서, 그 중에서도 특히 rDNA, feoB 유전자, rpoB 유전자, 면역 적격성 유전자). 일부 실시양태에서, 1개 초과의 표적 (예컨대, DNA 단편 또는 유전자)은 동시 정량화를 위해 선택되고; 이들은 우선적으로 양 방향으로 복제 기점에 근접하게 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 표적은 리보솜 DNA, rDNA, 서열이다. 리보솜 유전자 서열은 박테리아 사이에서는 잘 보존되며, 이는 예컨대, 특이적인 프로브 및/또는 프라이머를 선택함으로써 확인 및/또는 군 확인을 위한 표적으로서 사용될 수 있다.

[0079] 일부 신속하게 성장하는 박테리아 종에서, 리보솜 유전자 (및 전사 및 번역과 연관된 다수의 유전자)는 우선적으로 복제 기점에 근접하게 위치하는 경향이 있는 것으로 나타났으며, 이는 게놈 안정성과는 상대적인 것으로 밝혀진, 진화적 압력이 존재함을 제안한다 (Etienne Couturier, Eduardo P. C. Rocha. Replication-associated gene dosage effects shape the genomes of fast-growing bacteria but only for transcription and translation genes, 2006, Molecular microbiology, Volume 59, Issue 5, Pages 1506-1518 , DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05046.). 이들 유전자는 복제 정량화를 위한 표적으로서 사용될 수 있으며, 이로써, 단기간 동안, 예컨대, 세포 복제 기간보다 더 짧은 시간 동안에 걸쳐 성장 조건에 노출된 유기체를 검출할 수 있다. 이들 유전자를 디지털 정량화를 위한 표적으로서 사용할 경우, 심지어 (세포 분열 이전에 발생한) 불완전한 DNA 복제도 검출할 수 있다.

[0080] 예를 들어, UTI 감염과 연관된 11개의 이용가능한 게놈-서열분석된 이. 콜라이 균주의 서브세트에서 복제 기점을 기준으로 한 rDNA 유전자의 위치를 맵핑하였다. **도 1**은 UTI 이. 콜라이 단리물에서 oriC로부터의 rDNA의 상대적인 거리를 보여주는 것이다. 적색 점 (상단 및 하단 행)은 두 리플리코어(replichore) 둘 모두에 대하여 환형 염색체에서의 OriC에서부터 복제 종점까지의 거리를 보여줌으로써 게놈 크기를 도시한 것이다. 상이한 분포로 리보솜 유전자를 가지는 희귀 종의 예는 실험실 조건에서 인공 선발된 박테리아 게놈에 속하는 것으로서, 예컨대, UTI 임상 단리물은 아니지만, 니트로푸란토인 내성에 대해 선발된 UTI 환자 소화관으로부터의 이. 콜라이인, 그래프 상에서 좌측으로부터 5번째에 있는 게놈이다 (진뱅크: CP007265.1). 이는 rDNA 유전자가 복제 기점 근거리에서 클러스터링되는 성향을 보여주는 것이다.

[0081] 복제 기점 근거리에서 클러스터링되는 rDNA의 또 다른 예는 UTI 환자로부터 서열분석된 예시 게놈을 환형으로 표현해 놓은, **도 2**에 제시되어 있다. 게놈의 리보솜 RNA 코딩 영역은 적색으로 표시되어 있다. 복제 기점 (OriC)은 도 2의 상단에 표시되어 있다. rDNA은 우선적으로 복제 기점 근거리에서 클러스터링된다.

[0082] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 관심 세포 중 적어도 일부에서는 염색체 분리에 있어서 구체적인 시간상 순서가 존재할 수 있다는 사실을 이용한다. 예를 들어, 이. 콜라이에서, 염색체 동역학적 성질이 구체적인 시간상 순서로 염색체의 특정 부분의 분리를 결정짓는다. 일부 실시양태에서, 조기에 복제되는 유전자 표적의 정량화를 통해 감수성 박테리아보다 내성 박테리아를 더욱 고감도로 또는 더욱 신속하게 측정할 수 있다. 추가로, 복제 기점 및 복제 종점은 게놈을 리딩 가닥으로서 상이한 가닥을 가지는 리플리코어로 나눈다. 일부 실시양태에서, 리딩 가닥 및 래깅 가닥 상의 표적 유전자는 복제가 손상되지 않았을 때와 비교하여 복제가 손상되었을 때에는 선택적으로 표적화될 수 있고, 이로써, 그의 상이한 전사 수준이 측정될 수 있다.

[0083] 일부 실시양태에서, 복제 기점에 인접하게 위치하는 DNA 단편 및 유전자 (예컨대, 기점 그 자체 또는 인접 유전자, 예컨대, gln udhA dnaB 또는 일부 rDNA)의 정량화를 수행한다. 일부 실시양태에서, 항생제로 처리된 세포와 처리되지 않은 세포 사이의 세포당 카피수의 차이는 본원에 기술된 방법 및 장치 (예컨대, 디지털 증폭)에 의해 검출될 수 있다.

[0084] 일부 실시양태에서, 복제 종료 부위 (ter)에 인접하게 위치하는 DNA 표적이 정량화된다. 이는 복제되는 게놈의 마지막 부분이기 때문에, 상기 영역은 세포 성장 상태, 또는 항생제 존재에 기초하였을 때, 더 적은 카피수 변동을 보이는 경향이 있다. 일부 실시양태에서, ter 근처의 DNA 표적의 복제 측정은 다른 표적으로부터 얻은 데이터를 표준화하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 전체 게놈을 복제하기에는 충분하지 않은 단기간 동안 약물에 노출되었을 때, 상기의 ter에 인접한 영역은 로딩된 세포 개수의 척도로서 사용될 수 있는 반면, ori에 더 가까운 영역은 약물에 대한 내성 및 DNA 복제를 입수하는 데 사용될 수 있고; 이는 예를 들

어, 로딩되는 세포 개수가 적은 바 (예를 들어, 100개 미만 또는 10개 미만), 이에 측정하기 어려운 경우에 유용하다. 일부 실시양태에서, 약물로 처리 및/또는 처리되지 않는 상기 영역의 카피수의 변동은 감수성 박테리아로부터 내성 박테리아를 구별하는 데 사용된다. 복제 분기가 실패하도록 유발하는 약물, 예컨대, 항미생물제는 상기 효과를 추가로 증폭시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산 서열의 복제는 약물 (예컨대, 항생제)의 존재하에서 인큐베이션된 세포 (예컨대, 박테리아)에서 유전자의 내성 프로파일을 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0085] 일부 실시양태에서, 항생제로 처리 및/또는 처리되지 않는 상기 표적의 상대적인 정량화는 항생제 감수성을 측정하는 데 사용될 것이다. 이를 통해 내성 균주와 감수성 균주를 매우 신속하게 구별할 수 있게 된다.

[0086] 일부 실시양태에서, 예컨대, 세포의 새로운 복제 분기가 복제 기점으로부터 시작될 때, 다른 기존의 복제 기점은 내개시 이벤트에는 독립적으로 계속해서 복제가 이루어질 수 있다 (Fossum, S., E. Crooke, et al. (2007). "Organization of sister origins and replisomes during multifork DNA replication in *Escherichia coli*." The EMBO Journal 26(21): 4514-4522. Mohan C. Joshi, et al., 2010, "*Escherichia coli* sister chromosome separation includes an abrupt global transition with concomitant release of late-splitting intersister snaps", PNAS, vol. 108 no. 7,2765-2770). 따라서, 일부 실시양태에서, 약물 내성/감수성 검사에 사용되는 유전자 표적은 기점으로부터 원거리에 위치할 수 있다 (예컨대, oriC는 약물 내성/감수성을 측정하는 데 충분할 정도로 빠르게 여전히 복제될 것이다).

[0087] 복제 기점에 가까운 표적을 사용함으로써 세포내 전체 유전 물질 중의 상기 유전자의 상대적인 카피수를 정량화하여 DNA 복제 완료 이전 또는 세포 분열 완료 이전에 그보다 더 빠른 시점에서의 항생제 처리하의 감수성 및 내성 세포를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 감수성 유기체에서의 약물에 대한 노출은 복제를 감소시키기 때문에, 약물로 처리된 감수성 유기체의 표적 유전자의 카피수는 내성 유기체 또는 비처리 유기체 의 표적 유전자의 카피수보다 적다. 그러나, 일부 항생제는 감수성 세포에서 염색체 DNA의 특정 영역의 카피수를 증가시킨다. 도 3은 두 ter 영역 모두에서 0과 교차하는 선으로서 제시된, 항생제 투약에 대한 감수성 세포의 효과, 구체적으로, 복제 기점 (oriC)으로부터의 거리와 비교하여, 트리메토프림으로 처리한 후, 이. 콜라이에서의 상대적인 DNA 카피수를 도시한 것이다 (Slager, J., M. Kjos, et al. (2014). "Antibiotic-Induced Replication Stress Triggers Bacterial Competence by Increasing Gene Dosage near the Origin." Cell 157(2): 395-406). 도 3은 기준선에서의 수준이 0인 것과 비교하였을 때, 트리메토프림에의 노출 이후 DNA 카피수는 복제 기점에 가까운 것에서 최고점을 가진다는 것을 보여주는 것이다.

[0088] 다수의 항생제 (예컨대, 퀴놀론)는 복제 분기 지연을 유도한다. DNA 복제 개시는 계속되는 동안, 복제 분기 지연이 일어남에 따른 직접적인 결과로서, DNA 복제를 표적화하는 모든 항생제는 박테리아에서 기점에 인접한 유전자의 카피수를 상향 조절하고, 전반적인 전사 변화를 유도한다. 이는 양의 결과의 수를 증가시키면서, 약물로 처리되는 감수성 유기체에서 DNA 복제를 저속화시키는 상기 항생제와 상반되는 결과를 초래한다. 성장을 저속화시키는 항생제, 및 복제 분기 지연을 유도하는 항생제에 대한, 본원에 기술된 디지털 검정법의 예측 결과는 도 4에 제시되어 있다. 도 4에서, "항생제 A"는 감수성 세포에서 복제 효율을 감소시켜, 내성 세포와 비교하였을 때, 복제 기점 근거리에 있는 유전자 카피수를 하락시키는 항미생물제를 나타낸다. "항생제 B"는 세포에서 복제 분기 지연을 초래하여 복제 기점 근거리에 있는 새로운 복제 개시를 증가시킴으로써 내성 세포와 비교하였을 때, 감수성 세포에서 복제 기점 근거리에 있는 유전자 카피수를 증가시키는 항미생물제를 나타낸다.

[0089] 도 4에 나타낸 바와 같이, "항생제 A"로는 단백질 합성을 억제시키는 정균성 항생제 (예컨대, 아미노글리코시드, 세팔로스포린, 테트라사이클린, 술폰아미드, 및 마크롤라이드), 및 세포벽에 작용하는 살균성 항생제 (예컨대, 반코마이신 및 β-락탐)를 포함한다. 일부 실시양태에서, DNA 복제를 저속화시키는 상기 항생제의 경우, 항생제 노출은 예컨대, 제1 철이온, pH 및 마그네슘 이온의 농도를 제어함으로써, 및 호기성 조건을 보장함으로써 세포에서 산화 스트레스를 유도하도록 변경된다.

[0090] 도 4에 나타낸 바와 같이, "항생제 B"로는 감수성 세포에서 염색체 DNA의 특정 영역의 카피수를 증가시키는 항생제를 포함한다. 예를 들어, oriC-ter 비는 B. 세레우스, S. 아우레우스, 및 이. 콜라이 및 S. 뉴모니아에에서 일부 항생제 처리 (예컨대, HPUra, 히드록시우레아, 트리메토프림, 시프로플록사신, 및 MMC)에 의해 영향을 받는다. 이들 항생제는, 트리메토프림이 DNA 복제에 간접적으로 영향을 미치는 것과 같이, 염색제 복제를 손상시키는 것으로 알려져 있다. 니트로푸란토인은 복제를 비롯한 다수의 세포 프로세스를 직접적으로 손상시킨다. 6(p-히드록시페닐아조)-우라실 (HPUra)은 그람 양성 박테리아 DNA의 선택적 억제제이다. 히드록시카르바미드는 데옥시리보뉴클레오티드 생산을 감소시킨다. 시프로플록사신은 DNA 기라제 및 토포이소머라제와의 그의 상호작

용에 기인하여 DNA 단편화를 유발하고, 복제 분기를 지연시키는 플루오로퀴놀론이다 ([Slager, J., M. Kjos, et al. (2014). "Antibiotic-Induced Replication Stress Triggers Bacterial Competence by Increasing Gene Dosage near the Origin." Cell 157(2): 395-406], 및 [Tamayo M, Santiso R, Gosalvez J, Bou G, Fernaendez JL. Rapid assessment of the effect of ciprofloxacin on chromosomal DNA from *Escherichia coli* using an in situ DNA fragmentation assay. BMC Microbiology. 2009;9:69]).

[0091] 어느 한 유형의 항생제에 대한 세포의 내성 또는 감수성은 본원에 기술된 방법 및 장치를 사용하여 검출될 수 있다. 추가로, 디지털 PCR은 복제 분기 지연 이전에 카피된 유전자가 염색체 또는 플라스미드 DNA로부터 단편화되었는지 여부에 따라 상이한 결과를 제공할 것이다. 상기 유전자가 단편화되지 않았다면, 이는 별개의 웰로 분리될 수 없고, 이로써, 세포의 특징을 규명하는 추가의 분석 수준을 제공할 것이다. 상이한 항생제 처리하에 뉴클레오이드로부터 유리된 DNA 단편의 크기는 뉴클레오이드의 DNA 루프의 추정 크기 및 돌출된 DNA 기라제-매개 절단 부위와 유사한 (Snyder M, Drlica K. DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid. J Mol Biol. 1979;131(2):287-302, Condemine, Smith CL. Transcription regulates oxolinic acid-induced DNA gyrase cleavage at specific sites on the *E. coli* chromosome. Nucleic Acids Res. 1990;18(24):7389-7396, and Hsu Y-H, Chung M-W, Li T-K. Distribution of gyrase and topoisomerase IV on bacterial nucleoid: implications for nucleoid organization. Nucleic Acids Res. 2006;34(10):3128-3138.), 50 내지 100 kb인 것으로 추정된다 (Tamayo M, Santiso R, Gosalvez J, Bou G, Fernaendez JL. Rapid assessment of the effect of ciprofloxacin on chromosomal DNA from *Escherichia coli* using an in situ DNA fragmentation assay. BMC Microbiology. 2009;9:69).

[0092] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 약물 감수성 세포로부터 약물 내성 세포를 구별하기 위해 단기간 동안 국소적으로 증폭된 유전자 및 유전자 단편을 검출하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 일부 항생제는 복제 기점 근거리에 위치하는 DNA 단편, 예컨대, 일부 면역 적격성 유전자 및 복제 기점 그 자체를 우선적으로 증폭시킨다는 사실을 이용한다. 일부 실시양태에서, 두 리플리코어 모두에서 복제 기점으로부터 50-200 kb 이내에 위치하는 DNA 단편 또는 유전자는 그의 약물 감수성 측정을 위해 소수의 세포로부터 디지털 포맷으로 정량화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 일부 항생제는 DNA 단편을 축적시킨다는 사실을 이용한다. 이는 복제 분기가 지연되도록 하는 항생제에 의해 유발되는 것으로 밝혀졌다. 이는 축적된 영역 내부의 유전자의 정량화, 축적된 영역 외부의 유전자의 정량화를 통해, 또는 상기 둘 사이의 비를 통해 분석될 수 있다.

[0093] 일부 실시양태에서, 염색체 상의 선택된 위치에 대한 상대적인 복제율의 변화는 20분 미만의 약물에의 노출 시간 이후에 감수성 단리물에서 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 염색체 상의 선택된 위치에 대한 상대적인 복제율의 차이는 특정 시점 이후에만 인식될 수 있고, 이는 상이한 항생제 유형, 유기체, 세포 및/또는 약물에 따라 다를 수 있다. 일부 실시양태에서, 박테리아 염색체 상의 선택된 위치에 대한 상대적인 복제율의 변화는 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 또는 180분 미만의 약물에의 노출 시간 이후에 감수성 단리물에서 검출될 수 있다.

[0094] 일부 실시양태에서, 시프트 업 프로토콜 (예를 들어, 성장 및 유전자 발현 및 DNA 복제를 자극하기 위해 영양분 및 신호전달 분자를 첨가하는 것)은 복제 재개시 시간이 경과함에 따라 일부의 확실한 제어가 이루어질 수 있도록 보장하기 위해 사용될 수 있다.

[0095] 일부 실시양태에서, 유전자 발현 변화는 유기체에서 항미생물제 감수성 또는 내성의 마커로서 사용된다. 일부 실시양태에서, 약물 감수성 검사는 예컨대, 전사 수준을 비교함으로써 RNA에 기초한다. 일부 실시양태에서, 약물 감수성 검사는 예컨대, 디지털 정량화를 사용하여 전사 수준을 비교함으로써 RNA에 기초한다. 일부 실시양태에서, 항미생물제에 대한 반응으로 내성 또는 감수성인 것과 연관된 마커를 측정할 수 있다.

[0096] 일부 실시양태에서, 약물 또는 항생제에 대한 반응으로 차별적으로 조절되는 유전자가 사용될 수 있다. 유전자는 예를 들어, 항생제-유도성 산화적 스트레스에 대한 반응으로 OxyR 및 SoxS에 의해 유도되는 (Dwyer, *et al.*, 2014, Proceedings of the National Academy of Sciences, E2100-E2109), recA 및 LexA (Barczak, *et al.*, 2012, Proceedings of the National Academy of Sciences, 6217-6222) 유전자를 포함할 수 있다.

[0097] 감수성 박테리아에서, 다수의 RNA 표적은 단기간의 약물 노출에 대한 반응으로 상향 조절되거나, 또는 하향 조절되는 것으로 밝혀졌다. 다수의 상기 유전자는 또한 배양 조건 변동에 따른 반응으로서 및 단리물별로 발현 수준에 있어서 유의적인 변화를 나타낸다. 일부 유전자 발현 (예컨대, SOS 반응에 관여하는 recA)는 다중 항생제에 대한 반응으로 여러 종에서 상향 조절되는 반면, 다른 전사적 변화는 유기체 및/또는 기전 특이적이다.

[0098] (qPCR, 마이크로어레이, RNAseq를 통한) RNA 표적 RNA 수준의 변화는 숙주 세포로부터의 또는 다른 미생물로부터의 비특이 핵산의 존재에 기인하여, 그 뿐만 아니라, 임상 샘플로부터의 억제제의 존재에 기인하여 및 단기간의 처리 시간에 기인하여 (예컨대, 통상의 역전사 및 등옥 또는 PCR 증폭에 의해) 벌크로 단기간 약물/항생제 처리 후 현행 방법을 사용하여 검출하기는 어려울 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이너리, 디지털 및 멀티볼륨 디지털 포맷은 국소 농도가 높은 볼륨 중의 표적을 단리시키는 데 사용될 수 있으며, 이로써, 심지어 상기 샘플에서도 신속하게 및 신뢰가능하게 정량화할 수 있다.

[0099] 일부 실시양태에서, 세포에 존재하는 카피수가 더 높은 DNA 표적은 심지어 개수가 극도로 적은 세포 (예컨대, 혈액 또는 뇌 척수액)에서도 내성 프로파일을 검출할 수 있도록 하는 데 사용될 것이다. 예를 들어, 대부분의 이. 콜라이 균주 및 단리물의 게놈에는 ~7개의 rDNA 카피가 존재하지만, 적어도 2개, 그러나, 잠재적으로는 다수의 복제 분기가 존재하는 것에 기인하여, 일부 경우에는 그의 성장 속도에 의존하여 세포당 12 내지 35개의 rDNA를 가질 것으로 예상할 수 있다 (*E. coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. Frederic C. Neidhardt, editor in Chief. v2. ASM press, Washington DC. 1996). 일부 실시양태에서, 세포에 존재하는 카피수가 더 높은 유전자를 사용함으로써 극소수의 세포가 존재할 때, 증가된 통계학적 정량화 분석을 위해 항생제에 대한 내성을 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 정량화는 증폭에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 정량화는 디지털 증폭 방법을 이용한다.

[0100] 일부 실시양태에서, 추가의 표적은 공개적으로 이용가능한 연구, 예컨대, 브로드 연구소(Broad Institute)에 의해 공개된 것으로부터 평가된다. 일부 실시양태에서, 분석을 위한 표적은 DNA/RNA-seq 데이터 분석으로부터 생성된다. 일부 실시양태에서, 정량화 전략법 (예컨대, 예로서, 그 중에서도 특히 NASBA, qRT-PCR, 서열분석, 나노스트링)이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 디지털 포맷으로 샘플로부터 수득된 세포로부터의 RNA가 정량화된다. 일부 실시양태에서, 각 개별 세포에서 유전자 표적 발현 수준은 단일 세포 측정을 통해 정량화된다.

[0101] 약물 (예컨대, 시프로플록사신)에 대한 세포의 반응을 평가하기 위해 다중 및/또는 단일 사용으로 사용될 수 있는 예시적인 RNA 표적 목록은 하기 표 1에 제공되어 있다.

[0102] <표 1>

| 유전자 | 시프로플록사신에 대한 반응 |
|---|---|
| EcHS_A0999_dmsA_혐기성_디메틸_술폭시드_리덕타제,_A_서브유닛 | 동일하거나, 또는 하향 조절됨 |
| EcHS_A1247_pepT_펩티다제_T | 동일하거나, 또는 하향 조절됨 |
| EcHS_A1333_narK_니트라이트_압출_단백질_1 | 동일하거나, 또는 하향 조절됨 |
| EcHS_A1334_narG_니트레이트_리덕타제,_알파_서브유닛 | 동일하거나, 또는 하향 조절됨 |
| EcHS_A1335_narH_니트레이트_리덕타제,_베타_서브유닛 | 동일하거나, 또는 하향 조절됨 |
| EcHS_A1557_fdnG_포르메이트_데히드로게나제,_니트레이트_유도성,_알파_서브유닛,_셀레노시스테인-함유 | 동일하거나, 또는 하향 조절됨 |
| EcHS_A1755_-_가상_단백질 | 동일하거나, 또는 하향 조절됨 |
| EcHS_A1987_flhC_전사_활성화제_FlhC | 동일하거나, 또는 하향 조절됨 |
| EcHS_A1988_flhD_전사_활성화제_FlhD | 동일하거나, 또는 하향 조절됨 |
| EcHS_A2346_napF_페레독신-유형_단백질 | 동일하거나, 또는 하향 조절됨 |
| EcHS_A2342_napH_퀴놀_데히드로게나제_막_성분 | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A2343_napG_퀴놀_데히드로게나제_주변세포질_성분 | 유의하게 하향 조절됨 |

[0103]

| | |
|---|---|
| EcHS_A2380_glpT_sn-글리세롤-3-포스페이트_수송체 | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A2381_-_ 가상 _단백질 | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A2382_glpA_sn-글리세롤-3-포스페이트_데히드로게나제_서브유닛_A | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A2597_aegA1_옥시도리덕타제_Fe-S_결합_서브유닛 | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A3117_ansB_L-아스파라기나제_II | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A3561_nirB_니트라이트_리덕타제_[NAD(P)H],_큰_서브유닛 | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A3562_nirD_니트라이트_리덕타제_작은_서브유닛 | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A3605_feoA_제 1 철_철_수송_단백질_A | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A3606_feoB_제 1 철_철_수송_단백질_B | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A3607_-_가상_단백질 | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A3616_malT_전사_조절제_MalT | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A4395_frdD_푸마레이트_리덕타제_서브유닛_D | 유의하게 하향 조절됨 |
| EcHS_A1940_-_DNA_손상-유도성_단백질_YebG | 유의하게 상향 조절됨 |
| EcHS_A2835_recA_레콤비나제_A | 유의하게 상향 조절됨 |
| EcHS_A4283_lexA_LexA_리프레서 | 유의하게 상향 조절됨 |
| EcHS_A4284_dinF_DNA-손상-유도성_SOS_반응_단백질 | 유의하게 상향 조절됨 |
| EcHS_A4300_uvrA_엑시뉴클레아제_ABC_서브유닛_A | 유의하게 상향 조절됨 |
| EcHS_A2341_napB_시트레이트_리덕타제_시토크롬_c 형_서브유닛 | 평가 필요 |
| EcHS_A2344_napA_니트레이트_리덕타제_촉매성_서브유닛 | 평가 필요 |
| EcHS_A3610_gntX_글루코네이트_주변세포질_결합_단백질 | 평가 필요 |
| EcHS_A3612_-_ 가상 _단백질 | 평가 필요 |
| EcHS_A3821_secB_프리단백질_트랜스로카제_서브유닛_SecB | 평가 필요 |

[0104]

| | |
|---|---|
| EcHS_A4404_rsgA_리보솜-연관_GTPase | 평가 필요 |
| EcHS_A4424_-_23S_rRNA_(구아노신-2'-O-)-메틸트랜스퍼라제 | 평가 필요 |
| 23S rRNA | 평가 필요 |
| EcHS_A3544_-_가상_단백질 | 평가 필요 |
| EcHS_A0467_phoB_전사_조절제_PhoB | 평가 필요 |
| EcHS_A0468_phoR_포스페이트_레귤론_센서_단백질 | 평가 필요 |
| EcHS_A1067_sulA_SOS_세포_분열_억제제 | 평가 필요 |
| EcHS_A3855_DNA-손상-유도성 단백질 D_DinD | 평가 필요 |
| EcHS_A2357_2-성분 반응 조절제 RscB | 평가 필요 |
| EcHS_A1184_dinI_DNA_손상-유도성_단백질_I | 평가 필요 |
| EcHS_A4417_FtsH_프로테아제_조절제_HflC | 평가 필요 |

[0105]

[0106] 장치의 일부 실시양태에서, 모든 단일 세포에서 산화적 스트레스를 검출하는 데 반응 종이 사용될 수 있다. 비-생존가능한 세포는 세포질에서 환원성 환경을 유지할 수 없기 때문에, 산화-민감성 염료가 대다수의 생존가능성 검정법을 구성한다.

[0107] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 장치 및 방법은 항생제-유도성 산화적 스트레스 반응의 증거로서 OxyR 및 SoxR 전사 인자에 의해 상향 조절된 유전자의 발현 증가를 검출하는 데 사용될 수 있다. 상기 유전자의 예로는 예컨대, 예를 들어, (Mn 보조 인자 슈퍼옥시드 디스뮤타제를 코딩하는) sodA, 및 (다중약물 유출 펌프를 코딩하는) acrAB, soxS (2차 전사 인자, 및 KatG 및 Ahp 유전자, OxyS, RecA가 있다.

[0108] 일부 실시양태에서, Fe 이온 수송 및 조절에 관여하는 RNA 표적 및/또는 그의 유전자가 선택된다. 일부 실시양태에서, 산화 스트레스에 관여하는 RNA 표적 및/또는 그의 유전자가 선택된다.

[0109] FeoB는 제1 철 이온 흡수 (FeoB) 수송체 패밀리에 속하는 제1 철 이온 흡수 시스템이다 (Kammler M, Schoen C, Hantke K. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 1993;175(19):6212-6219). FeoB는 전사가, 이. 콜라이 단리물 전체 RNA 발현에 대한 RNAseq 분석에서 시프로플록사신 처리에 대한 반응으로 하향 조절된 것으로 보고된 다수의 유전자들 중 하나이다 (Shishkin, A. A., G. Giannoukos, et al. (2015). "Simultaneous generation of many RNA-seq libraries in a single reaction." Nat Meth 12(4): 323-325). FeoB 전사는 Fur에 의한 억제하에 있는 것으로 알려져 있다. 일부 실시양태에서, 표적은 Fur에 의해 활성화 또는 억제되는 상기 유전자들 중에서 선택된다.

[0110] FeoB 발현은 또한 RstAB 2 성분 시스템에 의해 활성화된다. 일부 실시양태에서, 표적은 RastAB 2 성분 시스템에 의해 활성화 또는 억제되는 상기 유전자들 중에서 선택될 것이다.

[0111] 일부 실시양태에서, 세포를 항생제에 노출시키는 데 사용되는 배지의 pH 및 Mg2+ 농도는 항생제에 대한 세포의 반응을 증진시키기 위하여 본원에 기술된 방법과 함께 협력하여 증가 또는 감소될 것이다. 일부 실시양태에서, 박테리아 세포는 항생제에 대한 반응으로 FeoB 발현 변화의 진폭을 증가시키기 위해 비교적 낮은 Mg2+, 낮은 pH (경미한 산성 조건) 및 Fe의 상이한 선택 제어 수준으로 처리된다.

[0112] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법은 1) 낮은 Mg 및 낮은 Fe(2+) 및 낮은 pH (경미한 산성 조건)에서 세포를 미리 인큐베이션시키는 단계, 및 2) 높은 Fe(2+)와 함께 항생제를 첨가하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 1) 낮은 Mg 및 높은 Fe(2+) 및 낮은 pH (경미한 산성 조건)에서 세포를 미리 인큐베이션시키는 단계, 및 2) 항생제를 첨가하는 단계를 포함한다.

[0113] 일부 실시양태에서, FeoB 발현 수준 측정을 통하여 가장 신속하고/가장 신뢰가능한 AST를 수행하기 위해 용존 산소량, PH, Fe2+, 은 이온 농도, Mg2+ 농도, 및 다른 염 농도를 조정한다. 이들 변량은 본 명세서에서 언급된 유전자 발현 표적과 조합될 수 있다. 이를 통해 본 표적을 정량화함으로써 항생제 감수성을 더 높은 고감도로 측정할 수 있을 것이다. 일부 실시양태에서, 항생제의 존재하에서 인큐베이션되는 박테리아에게 대기/산소를 제공한다. 일부 실시양태에서, 박테리아에서 산화적 스트레스는 퍼옥시드의 첨가를 통해서 증진된다.

[0114] 일부 실시양태에서, 표적 피분석물은 pH, $Mg^{2+}$ 및 산화적 스트레스에 대하여 반응하는 개별 표적 또는 표적 군, 예컨대, 기능이 유사한 단백질을 코딩하는 유전자 군 (예컨대, 상기 언급되고, 철 대사와 연관되어 있는 유전자 군)으로부터의 RNA를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 피분석물은 산화적 스트레스 (산화 스트레스)와 관련된 유전자 군으로부터의 RNA를 포함할 것이다.

[0115] 일부 실시양태에서, recA 유전자 및/또는 recA RNA를 정량화하여 항생제 감수성을 측정한다. 일부 실시양태에서, SOS 반응에서의 다른 유전자가 항생제 감수성을 측정하기 위해 정량화하는 데 있어서 표적으로서 사용된다. 일부 실시양태에서, FeoB RNA 및/또는 recA RNA를 정량화하여 항생제 감수성을 측정한다. 일부 실시양태에서, FeoB RNA 및 recA RNA를 정량화하고, 그의 비를 검출하면서, 항생제 감수성 및 내성을 측정한다. 일부 실시양태에서, 항생제에 대한 반응으로 상향 조절 및 하향 조절된 다른 유전자를 함께 정량화하고, 그의 비를 검출하여 미생물에서의 항생제 감수성 및 내성을 측정한다.

[0116] 일부 실시양태에서, 본 장치는 단일 세포 상에서 실시간 RT-PCR을 사용하여 내성 및 감수성 세포 또는 미생물을 검출하기 위핸 전구체 rRNA 및 리보솜 RNA 마커의 조합을 사용하였다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 범용 약물 감수성 및/또는 특수 약물 내성 검출을 위한 마커의 조합을 통합할 수 있다.

[0117] **샘플 프로세싱**

[0118] 일부 실시양태에서, 미생물을 약물에 노출시켜 그의 약물에 대한 반응을 검정하고, 미생물이 약물에 대하여 내성인지 또는 감수성인지 여부를 측정한다. 일부 실시양태에서, 단리물을 다양한 매트릭스 (예컨대, 예를 들어, 그 중에서도 특히, 박테리아 배양 배지 또는 인간 소변)에서 미리 배양할 수 있거나, 또는 그에 노출시킬 수 있고, 이어서, 다양한 약물 (예컨대, 항생제, 예컨대, 시프로플록사신, 니트로푸란토인, 트리메토프림, 테트라사이클린, 및 술파메톡사졸 등)의 존재 또는 부재하에서 인큐베이션시킬 수 있으며, 여기서, 다중 약물 및/또는 다중 첨가제에의 노출은 같은 장치에서 실질적으로 동시에 수행된다. 일부 실시양태에서, 미생물은 약물에의 노출 동안에는 실질적으로 분열하지 않는다. 일부 실시양태에서, 단일 세포로서 한정되어 있거나, 또는 세포의 작은 군에 있고/거나, 세포의 응집체로 있는 미생물은 평균 집단보다 더 빠르게 약물에 대하여 반응한다.

[0119] 본원에 기술된 장치 및 방법은 미생물 중 일부가 단일 세포로서, 또는 세포의 작은 군 및/또는 세포의 응집체로서 , 예컨대, 예를 들어, 3개 미만의 세포, 10개 미만의 세포, 30개 미만의 세포, 100개 미만의 세포가 같은 구획 내에 한정되어 있을 때의 것을 포함할 수 있다. 구획의 부피는 100 fL 내지 1 nL, 1 nL 내지 100 nL, 또는 100 nL 내지 500 nL 범위일 수 있다.

[0120] 일부 실시양태에서, 디지털 검정법은 샘플로부터의 단일 세포를 클론 단리 영역으로 한정시키는 것을 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 세포 각각을 클론 단리 영역에서 배양하여 샘플로부터 복수 개의 클론 집단을 생성한다. 일부 실시양태에서, 확장 이전 또는 이후에 단리된 세포를 약물로 처리한다. 일부 실시양태에서, 단리된 세포로부터의 배양 및 확장 이후, 클론 집단을 2개 이상의 처리 영역으로 분할한다. 이로써, 클론 집단 중 적어도 하나의 부분은 약물로 처리될 수 있고, 동시에 클론 집단의 또 다른 부분은 약물로 처리되지 않는다. 이어서, 본원에 기술된 검정법은 클론 집단 중 세포가 하나 이상의 약물에 대하여 감수성인지 또는 내성인지 여부를 측정하기 위해 수행될 수 있다.

[0121] 일부 실시양태에서, 특이적인 배양 조건을 사용하여 약물에 대한 미생물의 반응 속도를 가속화시킨다 (예컨대, 쿼럼 센싱 분자, 가스 부분 압력, 온도 등). 일부 실시양태에서, 미생물을 가스 또는 가스 혼합물, 예컨대, $H_2S$, CO, 및 NO를 함유하는 기체 혼합물에 노출시킨다. 상기 가스는 예를 들어, 항생제에 대한 미생물의 감수성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 상기 가스는 혐기성, 호기성, 또는 미호기성(microoxic)일 수 있는 가스 혼합물로 희석될 수 있다. 상기 가스 혼합물은 $CO_2$를 함유할 수 있다.

[0122] 일부 실시양태에서, 진핵 세포 및/또는 다른 미생물과 상기 미생물의 공동 배양을 사용하여 약물에 대한 미생물의 반응 속도를 가속화시킨다.

[0123] 일부 실시양태에서, 배양에서 복제 평균 회수 및/또는 복제 개시 위치 및/또는 시간을 제어하는 조치를 수행한다. 예를 들어, 세포를 항생제에 노출시키기 이전에 고영양 또는 저영양 조건에 배치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포가 성장 조건의 변화 (예컨대, 예를 들어, 감염된 혈액과 영양이 풍부한 배지의 혼합)에 순응하게 되면, DNA 복제율에는 변동일 일어나게 된다. 일부 실시양태에서, 이러한 효과는 성장 배지 변형에 의해 완화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 데이터 분석을 통해 상기 잡음에 대한 복제율 변화를 포착할 수 있다. 일부 실시양태에서, 배지가 복제에 미치는 효과를 사용하여 약물 처리의 효과를 증진시킬 수 있다.

[0124] 일부 실시양태에서, 세포를 하기와 같이 항생제에 노출시킨다: 세포를 희석시키기 전에 박토 뇌-심장 침출 브로쓰(BHI)와 풀링된 인간 소변의 믹스인 BHI, 및/또는 인간의 전체 소변을 비롯한, 다양한 매트릭스 중에서 최대 $10^9$개의/mL인 밀도로 37℃에서 미리 배양하고, 항생제 존재하에 또는 부재하에서 인큐베이션시킨다. 처리에 사용된 항생제로는 시프로플록사신, 니트로푸란토인, 트리메토프림, 테트라사이클린, 및 술파메톡사졸을 포함한다. $10^5$ - $10^8$개의/mL 범위의 농도를 시작으로 37℃에서 인큐베이션을 수행한 후, 이어서, 처리에 따라 0.75 ug/mL - 156 ug/mL 범위 농도의 항생제로 처리하였다. 분취량의 배양물을 핵산 추출을 위해 사용하기 이전에 10분, 15분, 20분, 30분, 45분, 또는 60분을 비롯한, 일정 기간 동안 세포를 항생제 존재하에 또는 부재하에서 인큐베이션시켰다.

[0125] 일부 실시양태에서, 미생물을 4시간 미만, 3시간 미만, 2시간 미만, 1시간 미만, 30분 미만, 15분 미만, 10분 미만, 5분 미만, 3분 미만, 또는 1분 미만의 시간 동안 약물에 노출시킨다.

[0126] 핵산을 분석 이전에 추출할 수 있다. 핵산을 추출하는 데 사용되는 정확한 프로토콜은 샘플 및 수행하고자 하는 정확한 검정법에 의존한다. 표적 박테리아로부터 핵산을 추출하는 것은 보통 세포 용해 단계 이후, 핵산 정제를 포함한다. 세포 용해 단계는 세포 및 세포막을 파괴시켜 유전 물질을 방출시킨다. 이는 대개 용해 계면활성제, 예컨대, 소듐 도데실 술페이트를 사용하여 달성되는데, 이는 또한 세포에 존재하는 다량의 단백질도 변성시킨다.

[0127] 이어서, 세척 및 저이온 강도 완충제 중에서의 용리 이전에 알콜 침전 단계, 보통은 빙냉 에탄올 또는 이소프로판올을 이용하여, 또는 전형적으로 고농도의 카오트로픽 염의 존재하에 칼럼 중 실리카 매트릭스, 수지에서 또는 상자성 비드 상에서의 고체상 정제 단계를 통해 핵산을 정제할 수 있다. 핵산 침전 이전의 임의적 단계는 샘플을 추가로 정제하기 위하여 단백질을 분해시키는 프로테아제 첨가이다.

[0128] 일부 실시양태에서, 핵산을 1 단계 DNA 추출용 완충제 또는 1 단계 RNA 추출용 완충제 (에피센터로부터 이용가능)를 포함하는 표준 방법을 사용하여 추출한다. 추출 후, 핵산을 정량적 PCR 및 디지털 PCR을 비롯한 핵산 증폭 기술을 사용하여 정량화하였다.

[0129] 일부 실시양태에서, 샘플의 미생물을 용해시킨다. 일부 실시양태에서, 억제제를 샘플로부터 제거한다. 일부 실시양태에서, 샘플 중 억제제를 불활성화시킨다. 일부 실시양태에서, 샘플을 핵산 분해를 방지하는 조건 또는 시약에 노출시킨다. 일부 실시양태에서, 샘플에서 리보솜 RNA를 고갈시킨다. 일부 실시양태에서, 원치않는 RNA는 샘플로부터 제거한다. 일부 실시양태에서, 샘플 중 미생물을 유리 핵산에 결합하고, 그에 증폭을 막는 시약, 예컨대, PMA 및 EMA로 처리한다. 일부 실시양태에서, 샘플에 방사선을 조사하여 광화학 반응을 개시함으로써 원치않는 핵산의 증폭을 막는다. 일부 실시양태에서, 추출된 핵산을 정량화 이전에 추가로 정제한다.

[0130] 일부 실시양태에서, 정량화 반응 이전의 샘플 제조는 2시간 미만, 1시간 미만, 30분 미만, 15분 미만, 10분 미만, 5분 미만, 3분 미만, 1분 미만, 또는 30초 미만이 소요된다.

[0131] 일부 실시양태에서, 디지털 정량화 이전에 기술, 예컨대, 변성, 제한 분해, 단편화, 복제된 DNA 단편의 분해가 사용된다. 이를 통해 개별 유전자의 검출 및 증폭을 위한 개별 볼륨로의 단리가 증진될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 사이의 제한 분해를 사용하여 개별 볼륨의, 표적 유전자를 보유하는 개별 볼륨의 DNA 분자로의 단리를 촉진시킬 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 게놈 1개당 7개의 카피로 이. 콜라이에서 표적 rDNA로서 사용할 경우, 디지털 실험은 큰 게놈 단편 1개당 단 1개의 양성 볼륨만을 나타낼 수 있다. 게놈이 변성, 단편화 및/또는 분해되었을 때, 각 유전자는 개별 볼륨으로 단리될 수 있고, 이로써, 장치에서의 분석에 대해 단일 게놈으로부터 24 내지 70개의 주형-양성 볼륨을 제공하게 된다.

[0132] 일부 실시양태에서, 사멸 세포로부터의 핵산의 증폭을 억제시키는 작용제가 사용될 수 있다 (예컨대, 프로피디움 모노아지드 (PMA) 또는 에티디움 모노아지드). 일부 실시양태에서, 세포를 항생제와 인큐베이션시키기 이전에 사멸 세포로부터의 핵산의 증폭을 억제시키는 상기 작용제로 처리할 것이다. 일부 실시양태에서, 세포를 항생제와 인큐베이션시킨 이후에 사멸 세포로부터의 핵산의 증폭을 억제시키는 상기 작용제로 처리할 것이다.

[0133] 일부 실시양태에서, 염색체 DNA의 제한 분해는 예컨대, 검출 및 정량화에 적합화 관심 단편은 보존하면서, 다중 복제된 표적 유전자의 카피를 함유하는 DNA 단편을 분리하기 위해 정량화 이전에 수행된다.

[0134] 일부 실시양태에서, 양성 주형의 개수를 증폭시키기 위해 하나 이상의 변성 단계가 수행된다 (예를 들어, 주어진 샘플 중 이. 콜라이 세포가 (성장률, 개별 연령 및 개별 상태에 따른) 특정 조건하에서 12 내지 35개의 rDNA 유전자 카피를 가질 수 있고, - 변성 후 수율이 예를 들어, 24-70개의 단편일 경우, 이는 일부 경우에서 디지털

접근법에서 시각화를 개선시킬 수 있다).

[0135] 일부 실시양태에서, 예컨대, 억제된 세포 및 활발하게 복제하는 세포 사이를 분리를 증가시키기 위해 변성 또는 분해를 사용하여 복제 분기에서 DNA를 분리할 수 있고 - 새로 복제된 DNA 조각은 상이한 웰로 분할될 수 있다.

[0136] 일부 실시양태에서, 디지털 검정법은 소수의 또는 단일 표적 핵산 분자를 개별 반응 볼륨으로 한정시키는 것을 사용한다. 복제가 완료되기 이전에, 표적 DNA 가닥을 독립 볼륨으로의 분리를 증진시키기 위해 변성제 (예컨대, 예로서, 그 중에서도 특히, 열, 우레아, 구아니디늄 클로라이드, 산, 염기, 기계적 변형, 효소, 제한 효소)가 사용될 수 있다. 이는 특히 예를 들어, 다중 표적 영역이 단일 게놈 내에 존재할 경우에 유용할 수 있다.

[0137] 일부 실시양태에서, 전체 염색체 DNA의 변성은 디지털 정량화 수행 이전에 수행된다.

[0138] **증폭**

[0139] 일부 실시양태에서, 표적 피분석물 (예컨대, 표적 핵산)을 증폭시키기 위해 핵산 증폭 반응이 수행된다. 증폭 반응은 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 핵산 서열 기반 증폭 (NASBA), 자기 유지 서열 복제 (3SR), 루프 매개 등온 증폭 (LAMP), 가닥 치환 증폭 (SDA), 전체 게놈 증폭, 다중 치환 증폭, 가닥 치환 증폭, 헬리카제 의존 증폭, 닉킹 효소 증폭 반응, 재조합 중합효소 증폭, 역전사 PCR 또는 라이게이션 매개 PCR을 포함할 수 있다. 핵산 증폭 또는 검출 방법은 PCR, RT-PCR, 또는 등온 증폭 방법을 비롯한 다른 방법을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 등온 핵산 증폭 방법은 가닥 치환 증폭 (SDA), 전사 매개 증폭, 핵산 서열 기반 증폭 (NASBA), 리콤비나제 폴리머라제 증폭 (RPA), 회전 환 증폭, 분지 증폭, 헬리카제-의존성 등온 DNA 증폭, 루프 매개 등온 증폭 (LAMP), 신호 증폭 및 표적 증폭, 둘 모두에 기반하는 방법, 예컨대, 분지형 DNA 기반 검출 방법, 하이브리드화 연쇄 반응, 또는 핵산 기반 논리 게이트 및 DNA 회로 (예컨대, 문헌 [Qian and Winfree, Scaling Up Digital Circuit Computation with DNA Strand Displacement Cascades, Science 2011; 6034: 1196-1201] 참조)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0140] 증폭 반응 검정법은 PCR일 수 있다. PCR은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 이러한 유형의 반응에 관한 종합적인 설명은 문헌 [E. van Pelt-Verkuil et al., Principles and Technical Aspects of PCR Amplification, Springer, 2008]에 제공되어 있다.

[0141] PCR은 복합 DNA의 배경에 대하여 표적 DNA 서열을 증폭시키는 데 매우 효과적인 기술이다. RNA를 (PCR에 의해) 증폭시키고자 할 경우, 이를 먼저 역전사효소로 불리는 효소를 사용하여 cDNA (상보성 DNA)로 전사시켜야 한다. 이후, 생성된 cDNA를 PCR에 의해 증폭시킨다.

[0142] PCR은 반응을 지속시키는 조건이 허용되는 한, 계속 진행되는 지수적 프로세스이다. 반응의 성분은 하기와 같다:

[0143] 1. 프라이머 쌍 - 표적 서열에 플랭킹되어 있는 영역에 상보적인 약 10-30개의 뉴클레오티드를 포함하는 DNA의 짧은 단일 가닥

[0144] 2. DNA 폴리머라제- DNA를 합성하는 열안정성 효소

[0145] 3. 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트 (dNTP) - 새로 합성된 DNA 가닥 내로 도입되는 뉴클레오티드를 제공하는 것

[0146] 4. 완충제 - DNA 합성에 최적인 화학적 환경을 제공하기 위한 것.

[0147] PCR을 사용하는 실시양태에서, 반응 성분은 샘플과 접촉 상태일 수 있다. 반응 성분은 샘플을 담고 있는 용기에 첨가될 수 있다. 반응 성분은 용기에 존재할 수 있고, 샘플이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 적어도 하나의 용기는 PCR 반응 성분을 담고 있는 것인, 복수 개의 작은 용기를 포함할 수 있다. 키트는 슬립 칩 및 반응 성분을 포함할 수 있다.

[0148] PCR은 전형적으로 상기 반응물을 추출된 핵산을 포함하는 작은 튜브 (~10-50 ㎕)에 넣는 것을 포함한다. 상기 튜브를, 다른 시간 동안 연속된 상이한 온도에 대하여 반응을 진행하는 장치인 열 순환기에 배치한다. 각 열 순환을 위한 표준 프로토콜은 변성 단계, 어닐링 단계, 및 연장 단계를 포함한다. 연장 단계는 종종 프라이머 연장 단계로 지칭된다. 상기 3 단계 프로토콜 이외에도, 어닐링 및 연장 단계가 조합된, 2 단계 열 프로토콜이 사용될 수 있다. 변성 단계는 전형적으로 반응 온도를 90-95℃로 승온시켜 DNA 가닥을 변성시키는 것을 포함하고; 어닐링 단계에서, 프라이머를 어닐링시키기 위해 온도를 ~50-60℃로 하강시킨 후; 이어서, 연장 단계에서,

프라이머 연장을 위해 온도를 60-72℃인 최적의 DNA 폴리머라제 활성 온도로 승온시킨다. 상기 프로세스는 약 20-40회에 걸쳐 순환적으로 반복되고, 최종 결과는 프라이머 사이의 표적 서열의 카피가 수백만개 생성되는 것이다.

[0149] 증폭 반응 검정법은 PCR의 변형법일 수 있다. 증폭 반응 검정법은 표준 PCR 프로토콜에 대한 변형법, 예컨대, 분자 진단을 위해 개발된 것들 중 그 중에서도 특히, 멀티플렉스 PCR, 링커-프라이밍 PCR, 직접 PCR, 탠덤 PCR, 실시간 PCR 및 역전사효소 PCR로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0150] 증폭 반응 검정법은 멀티플렉스 PCR일 수 있다. 멀티플렉스 PCR은 상이한 DNA 서열에 특이적인 다양한 크기의 앰플리콘을 제조하기 위해 단일 PCR 혼합물 내에서 다중의 프라이머 세트를 사용한다. 다른 경우에서는 수회의 실험이 필요한 반면, 한번에 다중의 유전자를 표적화함으로써 추가 정보를 단일 시험 실행으로부터 획득할 수 있다.

[0151] 일부 실시양태에서, 예를 들어, 복수 개의 프라이머 세트를 반응 혼합물에 첨가하고, 각각은 같은 볼륨 내에서 그의 특이화된 표적을 증폭시키는 것인, 멀티플렉스형 PCR 반응이 수행된다. 다른 실시양태에서, 샘플은, 단일 프라이머 세트가 도입되는 복수 개의 더 작은 볼륨으로 분할된다.

[0152] 증폭 반응 검정법은 라이게이션 어댑터 PCR로도 공지되어 있는, 링커-프라이밍 PCR일 수 있다. 링커-프라이밍 PCR은 표적-특이 프라이머를 필요로 하지 않으면서 복합 DNA 혼합물 중의 본질적으로 모든 DNA 서열을 핵산 증폭시킬 수 있도록 하는 데 사용되는 방법이다. 본 방법은 먼저 표적 DNA 집단을 적합한 제한 엔도뉴클레아제(효소)로 분해하는 것을 포함한다. 이어서, 적합한 오버행 단부가 있는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드 링커(이는 또한 어댑터로도 명명된다)를 리가제 효소를 사용하여 표적 DNA 단편의 단부에 라이게이션시킨다. 이어서, 링커 서열에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 핵산 증폭을 수행한다. 이러한 방식으로, 링커 올리고뉴클레오티드에 의해 플랭킹된 DNA 공급원의 모든 단편이 증폭될 수 있다.

[0153] 증폭 반응 검정법은 직접 PCR일 수 있다. 직접 PCR은 어떤 핵산 추출도 없이, 또는 최소의 핵산 추출하에 샘플에 대하여 직접적으로 PCR이 수행되는 시스템을 기술한다. 적절한 화학법 및 샘플 농도를 사용함으로써 최소의 DNA 정제가 이루어진 PCR, 직접 PCR을 수행할 수 있다. 직접 PCR을 위해 PCR 화학법으로 조정하는 것은 완충제 강도 증가, 활성 및 진행도가 높은 폴리머라제 사용, 잠재적 폴리머라제 억제제와 킬레이트 화합물을 형성하는 첨가제를 포함한다.

[0154] 증폭 반응 검정법은 탠덤 PCR일 수 있다. 탠덤 PCR은 정확한 앰플리콘이 증폭될 수 있는 확률을 증가시키기 위해 2 라운드에 걸친 상이한 핵산 증폭을 이용한다. 한 형태의 탠덤 PCR은, 별개의 핵산 증폭 라운드에서 단일 유전자좌를 증폭시키는 데 2개의 PCR 프라이머 쌍이 사용되는 네스티드 PCR이다. 증폭 반응 검정법은 네스티드 PCR일 수 있다. 제1 프라이머 쌍은 표적 핵산 서열 외부의 영역에 있는 핵산 서열에 하이브리드화된다. 제2 라운드의 증폭에서 사용되는 제2 프라이머 쌍 (네스티드 프라이머)은 제1 PCR 생성물 내에 결합하여 제1 표적 핵산보다 짧을 수 있는, 표적 핵산을 함유하는 제2 PCR 생성물을 제조하게 된다. 상기 전략법 이면의 논리는, 만약 제1 라운드의 핵산 증폭 동안 오류에 의해 잘못된 유전자좌가 증폭되었다면, 제2회차에서 제2 프라이머 쌍에 의해서 또한 증폭될 확률은 매우 낮고, 이로써, 특이성은 증가한다는 점이다.

[0155] 증폭 반응 검정법은 실시간 PCR일 수 있다. 증폭 반응 검정법은 정량적 PCR일 수 있다. 실시간 PCR, 또는 정량적 PCR은 실시간으로 PCR 생성물의 정량을 측정하는 데 사용된다. 반응에서 표준 세트와 함께 형광단-함유 프로브 또는 형광성 염료를 사용함으로써, 샘플 중 핵산의 출발량을 정량화할 수 있다. 이는 특히 치료 옵션이 샘플 중 병원체 로드에 따라 달라질 수 있는 분자 진단에서 유용하다.

[0156] 증폭 반응 검정법은 역전사효소 PCR (RT-PCR)일 수 있다. 역전사효소 PCR (RT-PCR)은 RNA로부터 DNA를 증폭시키는 데 사용된다. 역전사효소는 RNA를 상보적인 DNA (cDNA)로 역전시키는 데 사용되는 효소이며, 상기 cDNA는 이어서, PCR에 의해 증폭된다. RT-PCR은 발현 프로파일링에서, 유전자 발현을 측정하기 위해, 또는 전사 출발 및 종료 부위를 포함하는, RNA 전사체의 서열을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 이는 RNA 바이러스, 예컨대, 인간 면역결핍 바이러스 또는 C형 간염 바이러스를 증폭시키는 데 사용될 수 있다.

[0157] 증폭 반응 검정법은 등온성인 것일 수 있다. 등온 증폭은 증폭 반응 동안 표적 핵산의 열적 변성에 의존하지 않고, 이로써, 다중의 신속한 온도 변화를 필요로 하지 않을 수 있는 핵산 증폭 형태이다. 그러므로, 등온 핵산 증폭 방법은 실험실 환경 내부 또는 외부에서 수행될 수 있다. 가닥 치환 증폭 (SDA), 전사 매개 증폭 (TMA), 핵산 서열 기반 증폭 (NASBA), 리콤비나제 폴리머라제 증폭 (RPA), 회전 환 증폭 (RCA), 분지 증폭 (RAM), 헬리카제-의존성 등온 DNA 증폭 (HDA), 환형 헬리카제-의존성 증폭 (cHDA), 루프 매개 등온 증폭

(LAMP), 단일 프라이머 등온 증폭 (SPIA), RNA 기술의 신호 매개 증폭 (SMART), 자기 유지 서열 복제 (3SR), 게놈 지수적 증폭 반응 (GEAR) 및 등온 다중 치환 증폭 (IMDA)을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다수의 등온 핵산 증폭 방법이 개발되었다. 상기 증폭 화학법에 관한 추가의 예는 예를 들어, 문헌 ("Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review, Pascal Craw and Wamadeva Balachandrana Lab Chip, 2012, 12, 2469-2486, DOI: 10.1039/C2LC40100B") (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술되어 있다. 제한 효소가 전형적인 PCR 작동 온도하에서는 충분한 안정성을 띠지 않을 경우, 증폭 프로세스와 제한 효소와의 화합성을 개선시키기 위해 PCR 작동 온도보다 낮은 온도에서 작동하는 등온 증폭 방법이 사용될 수 있다.

[0158] 추가로, 신호 증폭 및 표적 증폭, 둘 모두에 기반하는 방법, 예컨대, 분지형 DNA 기반 검출 방법이 본 접근법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, (예컨대, 문헌 [Tsongalis, Branched DNA Technology in Molecular Diagnostics, Am J Clin Pathol 2006; 126: 448-453]에 기술되어 있는 바와 같이), 분지형 DNA 기반 검출 방법의 경우, 포획 연장제 및 라벨 연장제의 결합을 위해 사용되는 두 위치 사이에 위치하는 표적을 절단할 수 있는 효소를 사용하는 것이 제한 효소가 표적을 인식하고, 절단할 때, 검정법에서 수득되는 신호를 감소시킬 수 있다.

[0159] 증폭 반응 검정법은 가닥 치환 증폭 (SDA)일 수 있다. 가닥 치환 증폭 (SDA)은 반-변형된 DNA의 변형되지 않은 가닥을 닉킹할 수 있는 특정 제한 효소의 능력, 및 하류 가닥을 연장하고, 치환할 수 있는 5'-3' 엑소뉴클레아제 결핍 폴리머라제의 능력에 의존할 수 있다. 이어서, 지수적인 핵산 증폭은, 센스 반응으로부터의 가닥 치환이 안티센스 반응에 대한 주형으로서의 역할을 하는 센스 및 안티센스 반응 커플링에 의해 달성될 수 있다. 통상의 방식으로는 DNA를 커팅하지 않지만, DNA 가닥 중 하나 위에 닉을 형성하는 닉카제 효소, 예컨대, N. Alw1, N. BstNB1 및 Mly1을 사용하는 것은 예를 들어, 본 방법에서 사용될 수 있다. SDA는 열-안정성 제한 효소 (Ava1) 및 열-안정성 엑소-폴리머라제 (Bst 폴리머라제)의 조합의 사용에 의해 개선되었다. 이러한 조합은 반응의 증폭 효율을 $10^8$배 증폭 내지 $10^{10}$배 증폭 시키는 것으로 밝혀졌으며, 이로써, 상기 기술을 사용하여 독특한 단일 카피 분자를 증폭시킬 수 있다.

[0160] 증폭 반응 검정법은 전사 매개 증폭 (TMA)일 수 있다. 증폭 반응 검정법은 핵산 서열 기반 증폭 (NASBA)일 수 있다. 전사 매개 증폭 (TMA) 및 핵산 서열 기반 증폭 (NASBA)은 상응하는 게놈 DNA가 아닌, RNA 서열을 카피하는 데 RNA 폴리머라제를 사용할 수 있다. 본 기술은 2개의 프라이머 및 2 또는 3개의 효소, RNA 폴리머라제, 역전사효소 및 임의적으로, RNase H (역전사효소가 RNase 활성이 없는 경우)를 사용할 수 있다. 한 프라이머는 RNA 폴리머라제에 대한 프로마터 서열을 함유할 수 있다. 핵산 증폭의 제1 단계에서, 상기 프라이머는 정의된 부위의 표적 리보솜 RNA (rRNA)에 하이브리드화된다. 역전사효소는 프로모터 프라이머의 3' 단부로부터의 연장에 의해 표적 rRNA의 DNA 카피를 생성할 수 있다. 생성된 RNA:DNA 이중체 중의 RNA는 존재할 경우, 역전사효소의 RNase 활성에 의해 또는 추가의 RNase H에 의해 분해될 수 있다. 이어서, 제2 프라이머는 DNA 카피에 결합한다. 역전사효소에 의해 상기 프라이머의 단부로부터 새 DNA 가닥이 합성되어 이중 가닥 DNA 분자가 생성된다. RNA 폴리머라제는 DNA 주형 중의 프로모터 서열을 인식하고, 전사를 개시한다. 각각의 새로 합성된 RNA 앰플리콘은 상기 프로세스로 재진입하여 새 라운드의 복제를 위한 주형으로서의 역할을 한다.

[0161] 증폭 반응 검정법은 리콤비나제 폴리머라제 증폭 (RPA)일 수 있다. 리콤비나제 폴리머라제 증폭 (RPA)에서, 특이적인 DNA 단편의 등온 증폭은 상대 올리고뉴클레오티드 프라이머를 주형 DNA엥 결합시키고, DNA 폴리머라제에 의해 그를 연장시킴으로써 달성된다. 이중 가닥 DNA (dsDNA) 주형을 변성시키는 데 열이 항상 필요한 것은 아니다. 대신, RPA는 dsDNA를 스캐닝하고, 동족 부위의 가닥 교환을 촉진시키기 위해 리콤비나제-프라이머 복합체를 사용할 수 있다. 생성된 구조는 치환된 주형 가닥과 상호작용하는 단일 가닥 DNA 결합 단백질에 의해 안정화되고, 이로써, 분지 이동에 의한 프라이머의 방출은 막을 수 있다. 리콤비나제 디스어셈블리는 올리고뉴클레오티드의 3' 단부가 가닥 치환 DNA 폴리머라제, 예컨대, 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) Pol I (Bsu)의 큰 단편으로 접근가능하게 하고, 프라이머 연장이 이에 후속하여 이루어진다. 지수적인 핵산 증폭은 상기 프로세스의 순환적 반복에 의해 달성된다.

[0162] 증폭 반응 검정법은 헬리카제-의존성 증폭 (HDA)일 수 있다. 헬리카제-의존성 증폭 (HDA)은 프라이머 하이브리드화, 및 이어지는 DNA 폴리머라제에 의한 프라이머 연장을 위해 단일 가닥 주형을 생성하기 위하여 DNA 헬리카제 효소를 사용한다는 점에서 생체내 시스템을 모방한다. HDA 반응의 제1 단계에서, 헬리카제 효소는, 후속하여 단일 가닥 결합 단백질이 결합하게 되는 두 가닥을 연결합하는 수소 결합을 파괴하면서, 표적 DNA를 따라 횡단한다. 헬리카제에 의한 단일 가닥 표적 영역의 노출을 통해 프라이머는 어닐링할 수 있다. 이어서, DNA 폴

리머라제는 유리 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트 (dNTP)를 사용하여 각 프라이머의 3' 단부를 연장하여 2개의 DNA 복제물을 생성한다. 복제된 2개의 dsDNA 가닥은 독립적으로 다음 HDA 사이클로 진입하게 되고, 이를 통해 표적 서열의 지수적인 핵산 증폭이 이루어지게 된다.

[0163] 증폭 반응 검정법은 회전 환 증폭 (RCA)일 수 있다. 다른 DNA 기반 등온 기술로는, DNA 폴리머라제가 환형 DNA 주형 주변을 따라 계속해서 프라이머를 연장함으로써 다수의 반복된 서클 카피로 이루어진 장쇄 DNA 생성물을 생성하는 회전 환 증폭 (RCA)을 포함한다. 반응 종료시까지, 폴리머라제는, 카피의 쇄는 원래의 표적 DNA에 연결되어 있는, 다수의 환형 주형 카피를 생성한다. 이를 통해 표적의 공간적 분석 및 신호의 신속한 핵산 증폭이 이루어질 수 있다. 최대 $10^{12}$개의 주형 카피가 1시간내 생성될 수 있다. 분지 증폭은 RCA의 변형이며, 이는 폐환 프로브 (C-프로브) 또는 패드록 프로브 및 등온 조건하에서 C-프로브를 지수적으로 증폭시키기 위해 높은 진행도를 가진 DNA 폴리머라제를 이용한다.

[0164] 증폭 반응 검정법은 루프 매개 등온 증폭 (LAMP)일 수 있다. LAMP는 고감도를 제공하고, DNA 폴리머라제, 및 표적 DNA 상의 총 6개의 상이한 서열을 인식하는 4개의 특수 디자인된 프라이머 세트를 이용한다. 표적 DNA의 센스 및 안티센스 가닥의 서열을 함유하는 내부 프라이머가 LAMP를 개시한다. 외부 프라이머에 의해 프라이밍된 후속 가닥 치환 DNA 합성이 단일 가닥 DNA를 유리시킨다. 이는 표적의 나머지 다른 한쪽 단부에 하이브리드화하는 제2 내부 및 외부 프라이머에 의해 프라이밍되는 DNA 합성을 위한 주형으로서의 역할을 하며, 이를 통해 스템 루프 DNA 구조가 생성된다. 후속 LAMP 순환에서, 한 내부 프라이머는 생성물 상의 루프에 하이브리드화되고, 치환 DNA 합성을 개시함으로써 원래의 스템 루프 DNA 및 길이가 2배 정도되는 스템을 가진 새 스템 루프 DNA가 생성된다. 순환 반응은 계속 진행되고, 이로써, 1시간 미만 내에 다수의 표적 카피가 축적된다. 최종 생성물은 동일 가닥에서 표적의 교대로 도립된 반복부 사이의 어닐링에 의해 형성된 다중 루프를 포함하는 콜리플라워 유사 구조 및 표적의 수개의 도립 반복부를 포함하는 스템 루프 DNA이다.

[0165] 일부 실시양태에서, 증폭은 모든 반응이 수행되는 mRNA를 정량화하기 위한 1 단계 디지털 역전사 루프 매개 등온 증폭 (dRT-LAMP) 반응이다. LAMP는 칼세인 중 망가니즈를 마그네슘으로 대체함으로써 밝은 형광 신호를 발생한다. 일부 실시양태에서, 이어서, 시판용 휴대폰 카메라를 사용하여 상기 형광을 검출하고, 계수할 수 있다.

[0166] 핵산-기반 논리 게이트 및 DNA 회로가 핵산 증폭에 사용될 수 있다. 핵산-기반 논리 게이트 및 DNA 회로와 함께 제한 효소를 사용함으로써 DNA 네트워크에 대한 고유한 누출 문제를 감소시키거나, 중단시킬 수 있다. 제한 효소 및 DNA 네트워크, 둘 모두의 분자 인식 능력을 조합하는 제한 효소 논리 게이트는 바이오컴퓨터 장치의 디자인 및 구성을 위해 고도로 활성을 띠는 성분일 수 있다 (예컨대, 문헌 [Qian and Winfree, Scaling Up Digital Circuit Computation with DNA Strand Displacement Cascades, Science 2011; 6034: 1196-1201] 참조).

[0167] 일부 실시양태에서, 사용되는 증폭은 각종의 상이한 배지, 예컨대, 예를 들어, 수용액, 중합체 매트릭스, 고체 지지체 등에서 이루어질 수 있다.

[0168] **검출**

[0169] 검정 결과는 광학 기술, 전기 기술 또는 자기 기술을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 반응의 진행 또는 결과를 검출하는 데 사용되는 다양한 판독치로부터 선택되는 판독치 또는 검출 기전을 포함할 수 있다. 예로는 전기화학적 판독치, 광학 판독치 (예를 들어, 형광 판독치 포함), 비색적 판독치, 화학발광, 전기 신호, 퀀칭, 프로브 결합, 프로브 하이브리드화, 금속 표지, 조영제 표지, 흡광도, 질량 분석법, 서열분석, 측방 유동 스트립, 및 이종성 물질 (예컨대, 침전, 기포) 발생을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0170] 판독 기전은 형광을 포함할 수 있다. 예를 들어, 형광성 염료는 핵산을 표지하는 데 사용될 수 있고, 핵산 생성물이 많은 반응일수록 더 많은 형광 신호가 발생될 수 있다. 형광성 염료로는 에티디움 브로마이드, 베르베린, 프로플라빈, 다우노마이신, 독소루비신, 탈리도미드, YOYO-1, SYBR 그린 I, SYBR 그린 II, 옥사졸 엘로우 (YO), 티아졸 오렌지 (TO), 피코그린 (PG), TOTO, TO-PRO, SYTOX, SYTO, 다른 시아닌 염료, 및 칼세인을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 형광 강도는 종점에서 으로 측정될 수 있거나, 또는 실시간으로 측정될 수 있으며, 이로써, 반응 진행을 측정할 수 있다. 예를 들어, 주어진 형광 수준은 디지털 또는 준(quasi)-디지털 구획으로부터의 양성 신호에 대한 임계값으로서 설정될 수 있다.

[0171] 일부 경우에서, 신호는 포획된 표적 피분석물에 결합시키기 위해 디지털 장치에 적용된 리포터 모이어티 및 친화성 모이어티를 가진 분자로부터 생성될 수 있다. 리포터 분자 또는 리포터 모이어티는 형광성일 수 있다.

디지털 장치 또는 포착 영역을 세척하여 비결합 리포터를 제거할 수 있다. 일부 경우에서, 리포터 분자는 칼세인, 또는 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드를 포함하는 세틸 (칼세인-CTAB)일 수 있다. 일부 경우에서, 리포터는 인터칼레이팅 염료일 수 있다. 표적 피분석물은 예를 들어, 산화 및 환원될 수 있는 기질 분자를 전기-활성화함으로써 전기 신호를 발생할 수 있는 효소로 표지될 수 있다. 표지는 예를 들어, 샌드위치 검정법에서와 같이 친화성 작용제와의 결합에 의해 이루어질 수 있다. 표지는 인터칼레이팅 염료에 의해 이루어질 수 있다.

[0172] 판독 기전은 질량 분석법을 포함할 수 있다. 예를 들어, (예컨대, 제한 분해 또는 라이게이션으로부터의) 상이한 크기의 핵산은 질량 분석법에 의해 구별되고/거나, 계수될 수 있다. 대안적으로, 판독 기전은 질량 분석법 없이도 작동될 수 있다.

[0173] 판독 기전은 겔 전기영동을 비롯한, 전기영동을 포함할 수 있다. 예를 들어, (예컨대, 제한 분해 또는 라이게이션으로부터의) 상이한 크기의 핵산은 전기영동에 의해 확인 또는 구별될 수 있다. 대안적으로, 판독 기전은 전기영동 없이도 작동될 수 있다.

[0174] 판독 기전은 서열분석을 포함할 수 있다. 서열분석, 또는 서열 측정 기술은 생어(Sanger) 서열분석, 일루미나(Illumina) (솔렉사(Solexa)) 서열분석, 피로시퀀싱, 차세대 서열분석, 막삼-길버트(Maxam-Gilbert) 서열분석, 쇄 종결 방법, 샷건 서열분석, 또는 브릿지 PCR을 포함하나, 이에 제한되지 않는 방법에 의해 수행될 수 있으며; 차세대 서열분석 방법은 대량 병렬 시그니처 서열분석, 폴로니 서열분석, SOLiD 서열분석, 이온 토렌트 반도체(Ion Torrent semiconductor) 서열분석, DNA 나노볼 서열분석, 헬리스코프(Heliscope) 단일 분자 서열분석, 단일 분자 실시간 (SMRT) 서열분석, 나노포어 DNA 서열분석, 터널 전류 DNA 서열분석, 하이브리드화에 의한 서열분석, 질량 분석법을 이용한 서열분석, 미세유체 생어 서열분석, 현미경검사법 기반 기술, RNA 폴리머라제 서열분석 또는 시험관내 바이러스 고처리량 서열분석을 포함할 수 있다.

[0175] 신호는 전자기적일 수 있다. 신호는 물리적 개체, 예컨대, 비드의 존재 또는 부재를 포함할 수 있다. 포획된 표적 피분석물은 형광성 작용제 또는 조영제로 표지될 수 있다. 표적 피분석물은 형광성 신호를 발생할 수 있는 효소로 표지될 수 있다. 표적 피분석물은 기질을 색상을 변색시켜 비색적 신호를 발생할 수 있는 효소로 표지될 수 있다. 일부 경우에서, 신호는 친화성 분자에 결합되고, 포획된 표적 피분석물에 결합하도록 디지털 장치에 적용되는 리포터 분자로부터 생성될 수 있다.

[0176] 서열분석 판독치를 사용하여 반응 생성물을 확인할 수 있고, 주어진 핵산 생성물에 대하여 생성된 서열분석 판독치의 수치를 사용하여 반응을 평가할 수 있다. 예를 들어, 서열분석 판독치에 대한 주어진 수치는 디지털 또는 준-디지털 구획으로부터의 양성 신호에 대한 임계값으로서 설정될 수 있다. 대안적으로, 판독 기전은 서열분석 없이도 작동될 수 있다.

[0177] 멀티플렉스형 신호 검출은 멀티플렉스형 신호 검출에는 같은 볼륨 내에 다수의 신호 증폭을 구별할 수 있는 능력 뿐만 아니라, 상이한 볼륨으로부터의 상이한 신호를 구별할 수 있는 능력도 존재한다는 것을 보장한다.

[0178] **바이너리 정량화/디지털 증폭**

[0179] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법 및 검정법은 디지털 및 바이너리 정량화 방법을 사용하며; 디지털 방법을 통해 저농도의 세포를 함유하는 샘플 중의 표적을 정량화할 수 있다 (예컨대, 예를 들어, 샘플 (예컨대, 혈액)이 여전히 임상적으로 관련이 있거나, 또는 심지어 생명을 위협하는 질병을 나타내는 범위로 저넝도의 병원체 (예컨대, 1개의 박테리아 세포/mL 또는 10개의 세포/mL)를 가지고 있을 때). 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 디지털 방법을 사용하여 감수성 세포와 내성 세포 사이를 신뢰가능하게 고감도로 정량화할 수 있다.

[0180] 바이너리 정량화 프로세스는 표적 피분석물을 함유할 수 있는 샘플로부터 시작된다. 표적 피분석물은 정량화 또는 검색하고자 하는 분자, 예를 들어, 특정 핵산, 특정 핵산 서열, 유전자, 또는 단백질일 수 있다. 샘플은 다수의 별개의 반응 볼륨으로 분할될 수 있다. 일부 실시양태에서, 반응 볼륨은 별개의 분석 영역이다. 일부 실시양태에서, 별개의 반응 볼륨은 예를 들어, 별개의 웰, 챔버, 슬라이드 표면 상의 영역, 소적, 비드 또는 분취물로 물리적으로 분리되어 있다. 일부 실시양태에서, 별개의 반응 볼륨은 예를 들어, 같은 용기에 존재할 수 있고, 표적 피분석물은 기판에 고정되거나, 또는 비드에 부착될 수 있다. 반응 볼륨은 비드 상에, 슬라이드 표면 상에 존재할 수 있거나, 또는 기판에 부착되어 있을 수 있다. 샘플은 반응 볼륨 전부는 아니지만, 그 중 일부가 양성 신호를 발생하도록 다수의 별개의 반응 볼륨에 분포된다.

[0181] 샘플은 각 개별 반응 볼륨이 양성 신호를 발생하기 위한 임계값 미만 또는 초과인 개수로 표적 피분석물을 함유하도록 다수의 별개의 반응 볼륨에 분포된다. 반응 볼륨으로부터의 양성 신호 발생은 상기 반응 볼륨에 의해 포획, 트랩, 또는 결합된 표적 피분석물의 개수 또는 농도에 의존할 수 있다. 일부 경우에서, 반응 볼륨에 의

해 포획, 트랩, 또는 결합된 표적 피분석물의 임계 개수를 통해 상기 반응 볼륨으로부터 양성 신호가 발생될 수 있다. 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50개 또는 그 초과의 표적 피분석물일 수 있다. 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 표적 피분석물일 수 있다. 일부 경우에서, 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 1 내지 19개의 표적 피분석물일 수 있다. 일부 경우에서, 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 2 내지 19개의 표적 피분석물일 수 있다. 일부 경우에서, 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 3 내지 19개의 표적 피분석물일 수 있다. 일부 경우에서, 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 4 내지 19개의 표적 피분석물일 수 있다. 일부 경우에서, 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 5 내지 19개의 표적 피분석물일 수 있다. 일부 경우에서, 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 6 내지 19개의 표적 피분석물일 수 있다. 일부 경우에서, 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 7 내지 19개의 표적 피분석물일 수 있다. 일부 경우에서, 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 8 내지 19개의 표적 피분석물일 수 있다. 일부 경우에서, 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 9 내지 19개의 표적 피분석물일 수 있다. 일부 경우에서, 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수는 10 내지 19개의 표적 피분석물일 수 있다. 일부 경우에서, 반응 볼륨에 의해 포획, 트랩, 또는 결합된 피분석물의 임계 농도를 통해 상기 반응 볼륨으로부터 양성 신호가 발생될 수 있다. 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 농도는 적어도 약 0 젭토몰 (zM), 1 zM, 10 zM, 100 zM, 1 아토몰 (aM), 10 aM, 100 aM, 1 펨토몰 (fM), 10 fM, 100 fM, 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M, 또는 그 초과일 수 있다. 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 농도는 최대 약 1, fM, 10 fM, 100 fM, 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M 또는 그 미만일 수 있다. 반응 볼륨으로부터 양성 신호 발생을 허용하는 표적 피분석물의 임계 개수 또는 농도는 제어될 수 있다. 임계 개수 또는 농도를 제어하는 데 반응 볼륨과 함께 억제제가 사용될 수 있다. 예를 들어, 신호가 반응 볼륨으로부터 발생될 수 있도록 하기 위해서는 표적 피분석물의 개수 또는 농도는 상기 반응 볼륨 중의 억제제의 개수 또는 농도보다 더 높아야 할 수도 있다.

[0182] 일부 경우에서, 반응 볼륨으로부터 양성 신호가 발생될 수 있는 확률은 상기 반응 볼륨에 의해 포획, 트랩, 또는 결합된 표적 피분석물의 개수 또는 농도에 의존한다. 반응 볼륨으로부터 양성 신호가 발생될 수 있는 확률은 제어될 수 있다. 예를 들어, 신호 발생 반응의 효율은 제어될 수 있고, 이로써, 신호 발생 확률을 제어할 수 있으며; 더 낮은 효율 반응은 주어진 개수 또는 농도의 표적 피분석물에 대하여 더 낮은 신호 발생 확률의 결과를 초래할 수 있다.

[0183] 일부 실시양태에서, 샘플은 각 개별 반응 볼륨이 0개의 표적 피분석물이 개별 존재하는 것, 또는 하나 이상의 표적 피분석물이 개별 존재하는 것을 함유하도록 다수의 별개의 반응 볼륨에 분포된다. 하나 이상의 분자는 0개가 아닌 개수의 분자를 의미할 수 있다. 하나 이상의 분자는 1개의 분자를 의미할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 분자는 1개의 분자, 2개의 분자, 3개의 분자, 4개의 분자 등을 의미할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각 별개의 반응 볼륨은 웰에 함유되어 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 각 반응 볼륨은 평균적으로 1개 미만의 표적 피분석물의 개별 분자를 포함하도록 분포된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 대부분의 반응 볼륨이 0 또는 1개의 표적 피분석물 분자를 포함하도록 분포된다. 이어서, "예 또는 아니오"를 묻는 정질 시험을 수행하여 별개의 양성 및 음성 반응 볼륨의 패턴을 판독함으로써 각 반응 볼륨이 하나 이상의 표적 피분석물을 함유하는지 여부를 측정할 수 있다. 양성 반응 볼륨은 하나 이상의 표적 피분석물을 함유하는 것으로 측정된 반응 볼륨일 수 있다. 양성 반응 볼륨은 하나 이상의 표적 피분석물의 존재와 상관관계가 있는 신호를 가지는 것으로 측정된 반응 볼륨일 수 있다. 양성 반응 볼륨은 하나 이상의 표적 피분석물의 존재와 상관관계가 있는 임계값 초과의 신호를 가지는 것으로 측정된 반응 볼륨일 수 있다. 일부 실시양태에서, 양성 반응 볼륨은 1로서, 또는 1의 단순 중복으로, 예컨대, 2, 3 등으로 정량화되는 반면, 음성 반응 볼륨은 0 또는 임계값 미만으로 정량화된다. 일부 실시양태에서, 양성 반응 볼륨은 1로 정량화되고, 음성 반응 볼륨은 0으로 정량화된다. 음성 반응 볼륨은 0개의 표적 피분석물을 함유하는 것으로 측정된 반응 볼륨일 수 있다. 음성 반응 볼륨은 하나 이상의 표적 피분석물의 존재와 상관관계가 있는 신호를 가지지 않는 것으로 측정된 반응 볼륨일 수 있다. 음성 반응 볼륨은 하나 이상의 표적 피분석물의 존재와 상관관계가 있는 임계값 초과의 신호를 가지지 않는 것으로 측정된 반응 볼륨일 수 있다. 각 반응 볼륨을 양성 또는 음성 반응 볼륨으로서 측정하고/거나, 지정하는 것

이 바이너리 검정법 또는 디지털 검정법으로서 지칭될 수 있다. 이러한 "예 또는 아니오 시험" 또는 이와 유사한 시험이 바이너리 검정법으로서 지칭될 수 있다. 이어서, 어느 반응 볼륨이 음성 반응 볼륨이고, 어느 반응 볼륨이 양성 반응 볼륨인지에 관한 상기의 정질적 분석은 푸아송 분석을 사용하여 샘플 중 표적 피분석물의 정량적 농도로 해석될 수 있다. 다수의 반응 볼륨을 사용함으로써 높은 동력학적 범위를 달성할 수 있다. 상이한 크기의 반응 볼륨을 가지는 장치를 사용함으로써 높은 동력학적 범위를 달성할 수 있다. 샘플을 다수의 웰로 및/또는 상이한 크기의 웰로 분할함으로써 높은 동력학적 범위를 달성할 수 있다.

[0184] 상기의 전반적인 프로세스는 핵산의 바이너리 정량화로 명명될 수 있다. 상기 프로세스는 표적 피분석물의 개수 계수로 명명될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이너리 정량화는 각 반응 볼륨이 0개 또는 0개 아닌 개수의 표적 피분석물을 함유하도록 샘플을 복수 개의 반응 볼륨에 분할하고; 표적 피분석물과 관련하여 어느 반응 볼륨이 양성 반응 볼륨이고, 어느 반응 볼륨이 음성 반응 볼륨인지 측정하고/거나, 지정하고; 양성 및 음성 반응 볼륨에 대한 정보를 샘플 중 표적 피분석물의 정량 또는 농도에 대한 정보로 해석하는 프로세스이다. 일부 실시양태에서, 표적 피분석물의 절대 개수를 측정한다. 일부 실시양태에서, 어느 반응 볼륨이 양성 반응 볼륨이고, 어느 반응 볼륨이 음성 반응 볼륨인지에 대한 정보를 샘플 중 표적 피분석물의 양, 분자의 절대 개수, 또는 농도에 대한 정보로 해석하는 것이 표적 피분석물의 디지털 정량화로 명명된다. 일부 실시양태에서, 표적 피분석물은 핵산이다. 일부 실시양태에서, 핵산의 바이너리 정량화가 달성된다. 일부 실시양태에서, 핵산 표적 피분석물의 바이너리 정량화는 샘플이 수개의 반응 볼륨으로 분할되고, 여기서, 반응 볼륨은 슬립칩 상에 있는 경우에 측정이 이루어진다.

[0185] 일부 실시양태에서, 샘플 중 표적 피분석물의 바이너리 정량화는 샘플을 다중의 반응 볼륨으로 공간적으로 분리시키지 않고 달성될 수 있다. 상기 실시양태에서, 표적 피분석물은 정보를 제공하는 분리에 의해 계수될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플 중 표적 피분석물에 대해, 표적 피분석물에 정보 보유 분자 풀을 태그부착하고, 증폭시키거나, 또는 카피하고, 증폭 또는 카피된 상이한 정보 보유 분자의 개수를 계수하여 표적 피분석물의 시작 개수를 정량화하는 프로세스를 통한 바이너리 정량화 (예컨대, WO 2012148477 참조)를 수행한다. 일부 실시양태에서, 정보 보유 분자는 화학적 바코드 풀일 수 있다. 일부 실시양태에서, 정보 보유 분자는 핵산 서열 세트일 수 있다.

[0186] 디지털 분석은 RNA 또는 DNA 농도를 정량화하는 방법으로서 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 재조합 중합효소 증폭 (RPA), 및 루프 매개 증폭 (LAMP)을 사용함으로써 달성될 수 있다. 증폭, 예컨대, 등온 화학법을 사용할 수 있는 RPA 및 LAMP는 가정 및 자원이 제한된 환경에서의 사용을 위해 잘 적합화될 수 있다. 특히, LAMP 화학법은, 온도 저항성 범위가 비교적 넓을 수 있고, 간단하고 저렴함 화학 기반 히터 및 상 변화 물질을 이용하여 작업할 수 있으며, 양성 웰로 형광을 획득할 수 있는 바, 가정 또는 자원이 제한된 환경 플랫폼에서의 사용을 위한 것으로 관심의 대상이 되는 후보이다.

[0187] **견고성**

[0188] 견고성은 연속된 반복적인 정량적 측정을 통해 다양한 실험 조건하에서도 유사한 측정 세트를 제공하는 정도일 수 있다. 예를 들어, 휴대폰 카메라는 현실에서 나타나는 다양한 조건하에서 슬립칩 상에서 성공적으로 유사한 측정을 수행할 수 있도록 하는 데 사용될 수 있다. 유사한 측정은 동일한 측정일 수 있다. 유사한 측정은 동일한 진단일 수 있다. 유사한 측정은 동일한 답변일 수 있다. 유사한 측정은 서로 실험상의 오차 범위 내의 1개 초과의 측정을 의미할 수 있다. 유사한 측정을 통해 통계학상 유의적인 일관된 결과를 얻을 수 있다. 유사한 측정은 예를 들어, 서로 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 1,000% 범위 내의 유사한 수치 크기일 수 있다. 견고한 검정법은 주어진 조건 세트 하에서 특정된 경우에 대해 대개는 예를 들어, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9%, 99.99% 초과로 유사한 측정을 수행할 수 있다.

[0189] 상이한 유형의 검정법은 견고한 검정법일 수 있다. 핵산 증폭 및 정량화 검정법은 견고한 검정법일 수 있다. 단백질, 또는 다른 표적, 예컨대, 세포, 엑소좀, 리포좀, 박테리아, 바이러스 등을 검출하는 검정법은 견고한 검정법일 수 있다. LAMP 검정법은 견고한 검정법일 수 있다. RT-LAMP 검정법은 견고한 검정법일 수 있다. dRT-LAMP 검정법은 견고한 검정법일 수 있다. 바이너리 LAMP 반응은 견고한 반응일 수 있다. 바이너리, 2 단계 LAMP 반응은 견고한 반응일 수 있다. PCR 반응은 견고한 반응일 수 있다. qPCR 검정법은 견고한 검정법일 수 있다. 정량적 핵산 증폭 반응은 견고한 반응일 수 있다. 정량적 핵산 증폭 반응은 견고한 반응일 수 있다. 핵산 서열의 증폭에 기초하여 건강 상태의 결과를 진단하는 방법은 견고한 방법일 수 있다. 슬립칩 내의 프로세스는 견고한 프로세스일 수 있다. LAMP 반응 이후의 슬립칩의 영상화 및 분석은 견고한 프로세스일 수 있다.

[0190] dRT-LAMP의 절대 효율은 i) 더욱 효율적인 역전사효소를 사용함으로써, ii) RNase H를 도입하여 DNA-RNA 하이브리드를 파괴함으로써, 및 iii) RT 단계 동안 오직 BIP 프라이머만을 부가함으로써 10배 초과로, 예컨대, ~2% 내지 ~28% 증가될 수 있다. dRT-LAMP는 플라스틱 슬립칩 장치과 화합성일 수 있고, HIV RNA를 정량화하는 상기의 2 단계 방법을 사용할 수 있다. 일부 경우에서, dRT-LAMP 정량화 결과는 환자의 HIV RNA의 서열에 매우 민감하였다.

[0191] 검정법은 실험 변수와 관련하여 견고할 수 있다. 검정법은 주어진 온도 범위와 관련하여 견고할 수 있다. 검정법은 온도 범위에 걸쳐 견고할 수 있다. 검정법이 견고할 수 있는 일부 비제한적인 온도로는 예를 들어, 1℃, 2℃, 3℃, 4℃, 5℃, 6℃, 7℃, 8℃, 9℃, 10℃, 11℃, 12℃, 16℃, 20℃, 24℃, 28℃, 32℃, 40℃, 50℃, 60℃, 80℃, 100℃, 150℃, 200℃, 250℃, 또는 300℃를 포함한다. 검정법이 견고한 온도 범위는 절대 온도 눈금 상의 온도 중앙에 위치할 수 있다. 검정법이 견고한 온도 범위의 중앙일 수 있는 일부 비제한적인 온도로는 예를 들어, -40℃, -30℃ -20℃, -10℃, 0℃, 10℃, 20℃, 실온, 25℃, 30℃, 35℃, 체온, 37℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 80℃, 90℃, 100℃, 110℃, 150℃, 또는 200℃를 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이너리 LAMP 검정법은 샘플 중 핵산 서열을 증폭시키고, 이어서, 그를 영상화 및 정량화하는 데 사용된다. 상기 실시양태에서, 본 검정법은 약 60℃가 중앙에 위치하는 9℃의 간격을 온도 범위에 걸쳐 핵산 서열에 대한 견고한 정량화일 수 있다. 샘플 중 핵산 서열을 증폭시키고, 이어서, 그를 영상화 및 정량화하는 데 사용되는 바이너리 LAMP 검정법은 약 55℃ 내지 약 66℃의 온도 범위에 걸쳐 견고한 검정법일 수 있다. 일부 실시양태에서, 슬립칩은 영상화될 수 있고, 데이터는 프로세싱되어 약 5℃ 내지 약 70℃의 온도 범위에 걸쳐 견고한 관찰 결과를 제공할 수 있다.

[0192] 검정법은 시간과 관련하여 견고할 수 있다. 검정법은 시점 범위에 걸쳐 일관된 결과를 제공할 수 있다. 검정법은 오직 종점 판독치만을 필요로 할 수 있다. 바이너리 DNA 증폭 실험은 오직 종점 판독치만을 필요로 할 수 있다. 종점 판독치는 증폭이 거의 완료되는 시점에, 또는 상기 시점 이후의 시간에 수득될 수 있다. 견고한 DNA 증폭 검정법은 반응이 거의 종료되는 시점에 및/또는 반응 완료 이후의 시점에 일관된 결과를 제공할 수 있다. 검정법이 견고할 수 있는 반응 시간의 비제한적인 범위로는 예를 들어, 0.01 min, 0.1 min, 0.5 min, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 9 min, 10 min, 12 min, 14 min, 16 min, 20 min, 24 min, 28 min, 32 min, 40 min, 45 min, 50 min, 1.0시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 16시간, 18시간, 1일, 2일, 3일, 7일, 1개월 또는 1년을 포함한다. 일부 경우에서, 바이너리 DNA 증폭 실험에서는 정확한 시간을 알 필요는 없다. 바이너리 DNA 증폭 결과는 최적의 반응 시간 범위 초과의 반응 시간 변동에 대해서 견고할 수 있다. 일부 실시양태에서, 슬립칩 상에서의 d-LAMP 검정법은 예를 들어, LAMP 반응 시작 후 40분 내지 60분 사이의 20분이라는 기간 동안에 걸쳐 견고하다.

[0193] 검정법은 대기 습도와 관련하여 견고할 수 있다. 일부 실시양태에서, 검정법은 대기 습도와 상관 없이 견고할 수 있다. 일부 실시양태에서, 검정법은 다양한 대기 습도에서 견고할 수 있다. 습도 범위는 약 0% 내지 100% 상대 습도일 수 있다. 검정법이 견고할 수 있는 대기 습도의 범위는 약 30℃에서 대기 1 $m^3$당 물 약 0 내지 약 40 g일 수 있다. 일부 실시양태에서, 검정법은 예를 들어, 약 0% 습도 내지 약 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 습도에서 견고할 수 있다. 일부 실시양태에서, 검정법은 약 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 습도의 습도 범위에 걸쳐 견고할 수 있다. 일부 실시양태에서, 슬립칩에서 실행되는 d-LAMP 검정법은 약 0% 내지 약 100% 대기 습도의 습도 범위에 걸쳐 견고한 검정법으로서 영상화되고, 분석될 수 있다.

[0194] 일부 실시양태에서, 본 검정법은 정량적 분석 측정을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 샘플 내의 핵산 서열의 양 및/또는 농도를 정량적 양으로서 측정하고, 디스플레이할 수 있다. 이러한 측정은 예를 들어, 핵산 서열의 화학적 증폭 동안, 광학 데이터 측정 동안, 및/또는 데이터 프로세싱 동안 존재하는 실험 조건과 관련하여 견고할 수 있다.

[0195] 일부 실시양태에서, 표적 농도상의 작은 차이는 항생제 처리에 대한 2개 이상의 유전자의 반응을 정량화함으로써 더욱 큰 통계학적 유의도로 분석될 수 있다. 예를 들어, 약물로 처리되지 않은 샘플 대비로 약물로 처리된 샘플을 비교하였을 때, 두 유전자는 농도에 있어서 1.2배의 변화를 경험하게 되는 시나리오가 있다. 정량화 결과, p 값이 약 0.10인 경우에, 상기 1.2배의 차이를 얻었다면, 이때 상기 차이는 독립적으로 분석되었을 때에는 통계학상 유의적이지 못할 것이다. 그러나, (처리된 박테리아 핵산과 처리되지 않은 박테리아 핵산은 동일하다는) 동일한 전체 널 가설을 가지는 수개의 독립 검정으로부터의 결과를 조합하는 피셔의 방법을 사용함으로써 각 개별 검정보다 더 낮은 p 값을 얻게 될 것이다. 독립 검정법으로부터의 p 값을 조합하는 데 사용된 검정 통

계치는 $\chi^2$이고, 공식은 하기와 같다:

[0196] $$\chi^2_{2k} = -2\sum_{i=1}^{k}\ln(p_i)$$ .

[0197] 예를 들어, 상기 방법을 사용하여 p 값이 0.10인 두 독립 검정법을 조합한다면, 전체 p 값은 이제 0.05가 될 것이며, 이는 95% 신뢰 수준에서 유의적이다. 일부 실시양태에서, 디지털 NA (핵산) 정량화는 POC 진단에 따라 더 쉽게 진행될 수 있다.

[0198] 일부 실시양태에서, 다중 유전자로부터의 RNA의 비를 사용하여 약물 감수성을 측정한다. 일부 실시양태에서, 본 접근법은 상대적인 유전자 발현 변화를 측정하기 위해 하우스키핑 유전자를 이용하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 접근법은 약물 처리에 대한 반응으로 상향 조절된 유전자와 하향 조절된 유전자 사이의 비를 이용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 중 소수의 세포 (일부 실시양태에서는 단지 1개의 세포)가 존재할 때, 반응을 더 높은 고감도로 정량화할 수 있도록 하는 데 유전자 비가 사용된다.

[0199] **분석**

[0200] 본원에 기술된 예시적인 방법 및 시스템은 다양한 형태의 하드웨어, 소프트웨어, 펌웨어, 특수 목적의 프로세서, 또는 그의 조합으로 실행될 수 있음을 이해하여야 한다. 이들 명령어 및 프로그램은 비-일시적 컴퓨터 판독 가능 매체에 의해 실행되고/거나, 그 위에 저장될 수 있다. 본원의 방법은 하나 이상의 프로그램 저장 장치에서 유형적으로 구현되는 어플리케이션 프로그램으로서 소프트웨어로 실행될 수 있다. 어플리케이션 프로그램은 적합한 아키텍처를 포함하는 임의 기계, 장치, 또는 플랫폼에 의해 수행될 수 있다. 본원에 기술된 시스템 및 방법 중 일부는 소프트웨어로 실행되기 때문에, 시스템 컴포넌트 (또느 프로세스 단계) 사이의 실제 연결은 본 발명이 프로그램화되는 방식에 따라 달라질 수 있다는 것도 추가로 이해하여야 한다.

[0201] 반응 볼륨으로부터 발생되는 신호에 기초하여 샘플 중 표적 피분석물의 개수 또는 농도를 계산할 수 있다. 양성 반응 볼륨의 개수, 위치, 유형, 또는 그의 조합이 샘플 중 표적 피분석물의 개수 또는 농도를 계산하는 데 사용될 수 있다. 양성 포착 영역의 개수, 위치, 유형, 또는 그의 조합이 샘플 중 표적 피분석물의 개수 또는 농도를 계산하는 데 사용될 수 있다.

[0202] 결과를 이론적 모델과 비교함으로써 검정 결과를 측정할 수 있다. 예를 들어, 푸아송 통계 분석을 적용하여 형광성 영역 및 비-형광성 영역의 개수를 정량화할 수 있다. 상이한 볼륨의 웰로부터 얻은 결과를 조합함으로써 전체적으로 표준 오차를 최소화하고, 매우 큰 동점 범위에 걸친 고품질의 분석을 제공한다.

[0203] 본원에 기술된 컴퓨터 컴포넌트, 소프트웨어 모듈, 함수, 데이터 스토어 및 데이터 구조는 그의 작동에 필요한 데이터의 흐름을 허용하기 위해 서로 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 모듈이라는 용어의 의미는 소프트웨어 작동을 수행하는 코드 단위를 포함하나, 이에 제한되지 않고, 예를 들어, 코드의 서브루틴 단위로서, 또는 코드의 소프트웨어 함수 단위로서, 또는 객체로서 (객체 지향형 패러다임에서와 같이), 또는 애플릿으로서, 또는 컴퓨터 스크립트 언어로서, 또는 또 다른 유형의 컴퓨터 코드로서 실행될 수 있다는 것에도 주의하여야 한다. 소프트웨어 컴포넌트 및/또는 기능성은 당면한 상황에 따라 단일 컴퓨터 상에 위치할 수 있거나, 다중 컴퓨터에 걸쳐 보급될 수 있다. 추가의 또 다른 측면에서, 컴퓨터 판독 가능 명령어를 비롯한, 컴퓨터 판독 가능 매체를 제공하며, 여기서, 컴퓨터 판독 가능 명령어는 본원에 기술된 방법을 실행하는 프로세서를 지시한다. 명령어는 소프트웨어 실행 환경에서 작동할 수 있다. 추가의 또 다른 측면에서, 네트워크를 사용하여 전송될 수 있는 데이터 신호를 제공하며, 데이터 신호는 본원에 기술된 방법의 단계에서 계산된 데이터를 포함한다. 데이터 신호는 유선 또는 무선 네트워크를 통해 전송되는 패킷화된 데이터를 추가로 포함할 수 있다. 한 측면에서, 컴퓨터 판독 가능 매체는 컴퓨터 판독 가능 명령어를 포함하고, 실행시, 명령어는 샘플로부터 수득된 데이터에 기초하여 환자의 의학적 상태에 대한 확률 계산을 수행한다. 컴퓨터 판독 가능 명령어는 프로세서의 소프트웨어 실행 환경에서 작동할 수 있다. 일부 실시양태에서, 소프트웨어 실행 환경은 공통적으로 사용되는 함수 및 소프트웨어 패키지가 필요로 하는 기능을 제공한다. 비록 수개의 다른 실행 환경의 예가 존재하지만, 소프트웨어 실행 환경의 예로는, 컴퓨터 운영 체계, 가상 머신 또는 분산 운영 체계를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 컴퓨터 판독 가능 명령어는 소프트웨어 제품, app, 또는 소프트웨어 패키지의 부분으로서 패키징되고, 시판될 수 있다. 예를 들어, 명령어는 검정용 키트와 함께 패키징될 수 있다.

[0204] 컴퓨터 판독 가능 매체는 저장 장치일 수 있다. 컴퓨터 판독 가능 매체는 또한 서보, 프로세서, 또는 컴퓨터에

의해 접속될 수 있는 임의의 이용가능한 매체일 수 있다. 컴퓨터 판독 가능 매체는 컴퓨터 기반 시스템의 일부로서 도입될 수 있고, 의학적 상태에 대한 컴퓨터 기반 사정을 위해 사용될 수 있다.

[0205] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 계산은 컴퓨터 시스템 상에서 수행될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 하기: 프로세서, 저장 장치, 소프트웨어, 펌웨어, 네트워크 통신 장치, 디스플레이, 데이터 입력값, 및 데이터 출력값 중 임의의 것 또는 그들 모두를 포함할 수 있다. 컴퓨터 시스템은 서버일 수 있다. 서버는 복수 개의 입력 장치 및/또는 복수 개의 출력 장치와 네트워크를 통해 통신하는 중앙 서버일 수 있다. 서버는 적어도 하나의 저장 장치, 예컨대, 하드 드라이브 또는 프로세서 또는 외부 장치에 의해 접속이 이루어지는 정보를 저장하기 위한 임의의 다른 장치를 포함할 수 있고, 여기서, 저장 장치는 하나 이상의 데이터베이스를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 데이터베이스는 수백 개 내지 수백 만개의 샘플로부터의 데이터에 상응하는 수백 개 내지 수백 만개의 데이터 점을 저장할 수 있다. 저장 장치는 또한 외부 데이터베이스로부터 판독된 또는 사용자에 의한 입력값으로서의 과거 데이터를 저장할 수 있다. 한 실시양태에서, 저장 장치는 서버와 통신 중이거나, 또는 통신한 입력 장치로부터 받은 데이터를 저장한다. 저장 장치는 복수 개의 데이터베이스를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 각각의 복수 개의 데이터베이스는 각각의 복수 개의 샘플에 상응한다. 개별 데이터베이스는 또한 복수 개의 가능한 샘플 컨테인먼트 장치에 대한 정보를 포함할 수 있다. 추가로, 컴퓨터 시스템은 다중 서버를 포함할 수 있다. 프로세서는 저장 장치로부터 또는 입력 장치로부터 데이터에 접속하여 데이터로부터의 출력 결과를 계산할 수 있다. 프로세서는 사용자에 의해 제공되는, 또는 컴퓨터 시스템 또는 서버에 의해 제공되는 소프트웨어 또는 컴퓨터 판독 가능 명령어를 수행할 수 있다. 프로세서는 입력 장치로부터 직접 환자 데이터를 받기 위한 수단, 저장 장치에 대상체 데이터를 저장하기 위한 수단, 및 데이터를 프로세싱하기 위한 수단을 가질 수 있다. 프로세서는 또한 사용자로부터 또는 사용자 인터페이스로부터 명령어를 받기 위한 수단을 포함할 수 있다. 프로세서는 메모리, 예컨대, 임의 접근 기억 장치를 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 프로세서와 통신하는 출력 장치를 제공한다. 계산을 수행한 후, 프로세서는 예컨대, 계산으로부터의 출력값을 다시 예를 들어, 입력 장치 또는 저장 장치로, 같은 또는 다른 컴퓨터 시스템의 또 다른 저장 장치로, 또는 출력 장치로 제공할 수 있다. 프로세서로부터의 출력값은 데이터 디스플레이에 의해 디스플레이될 수 있다. 데이터 디스플레이는 디스플레이 스크린 (예를 들어, 디지털 장치 상의 모니터 또는 스크린), 프린트 아웃, 데이터 신호 (예를 들어, 패킷), 알람 (예를 들어, 섬광등 또는 사운드), 그래픽 사용자 인터페이스 (예를 들어, 웹페이지), 또는 상기 중 임의의 것의 조합일 수 있다. 한 실시양태에서, 출력값은 네트워크 (예를 들어, 무선 네트워크)를 통해 출력 장치로 전송된다. 출력 장치는 데이터-프로세싱 컴퓨터 시스템으로부터 출력값을 받는 사용자에 의해 사용될 수 있다. 사용자가 출력값을 받은 후, 사용자는 조치 과정을 결정할 수 있거나, 사용자가 의료인인 경우, 조치 과정, 예컨대, 의학적 치료를 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, 출력 장치는 입력 장치와 동일한 장치이다. 출력 장치의 예로는 전화, 무선 전화, 모바일 폰, PDA, 플래시 메모리 드라이브, 광원, 사운드 발생 장치, 컴퓨터, 컴퓨터 모니터, 프린터, 및 웹페이지를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 사용자 스테이션은 프린터 또는 디스플레이 모니터와 통신하여 서버에 의해 프로세싱된 정보를 출력할 수 있다.

[0206] 클라이언트-서버, 관련 데이터베이스 아키텍처가 본 발명의 실시양태에서 사용될 수 있다. 클라이언트 서버 아키텍처는 네트워크 상의 각 컴퓨터 또는 프로세스가 클라이언트 또는 서버인, 네트워크 아키텍처이다. 서버 컴퓨터는 전형적으로 디스트 드라이브 (파일 서버), 프린터 (프린트 서버), 또는 네트워크 교통 (네트워크 서버) 관리 전용의 강력한 효능을 가진 컴퓨터이다. 클라이언트 컴퓨터는 PC (개인용 컴퓨터), 휴대폰, 또는 사용자가 어플리케이션을 실행하는 워크스테이션 뿐만 아니라, 본원에 개시된 예시적인 출력 장치를 포함한다. 클라이언트 컴퓨터는 리소스, 예컨대, 파일, 장치, 및 심지어 프로세싱 능력을 위해 서버 컴퓨터에 의존한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 서버 컴퓨터는 데이터베이스 기능 모두를 처리한다. 클라이언트 컴퓨터는 프론트 엔드 데이터 관리 모두를 처리하고, 또한 사용자로부터의 데이터 입력을 받을 수도 있는 소프트웨어를 가질 수 있다.

[0207] 대상 데이터를 프로세서 또는 사용자에 의한 인식을 위해 독특한 식별자를 이용하여 저장할 수 있다. 또 다른 단계에서, 프로세서 또는 사용자는 특정 환자 데이터에 대한 적어도 하나의 기준을 선택함으로써 저장된 데이터 검색을 수행할 수 있다. 이어서, 특정 환자 데이터를 검색할 수 있다. 컴퓨터 시스템에서 프로세서는 입력 데이터를 컴퓨터 시스템에 이용가능한 데이터베이스로부터의 과거 데이터와 비교하는 계산을 수행할 수 있다. 이어서, 컴퓨터 시스템은 데이터베이스에 계산으로부터 얻은 출력값을 저장하고/거나, 출력값을 네트워크를 통해 출력 장치, 예컨대, 웹페이지, 텍스트, 또는 이메일로 통신할 수 있다. 사용자는 컴퓨터 시스템으로부터 출력값을 받은 후, 사용자는 출력값에 따라 의학적 조치 과정을 취할 수 있다. 예를 들어, 사용자가 의사이고, 출력값이 암 확률이 임계값을 초과하는 경우, 이때 의사하는 의심되는 조직의 생검을 수행하거나, 또는 지시할 수 있다. 사용자 세트는 웹 브라우저를 사용하여 데이터를 바이오마커 검정으로부터 웹페이지의 그래픽 사용자 인

터페이스로 입력할 수 있다. 웹페이지는 프런트 엔드 서버와 연관된 그래픽 사용자 인터페이스이고, 여기서, 프런트 엔드 서버는 사용자의 입력 장치 (예를 들어, 컴퓨터) 및 백 엔드 서버와 통신할 수 있다. 프런트 엔드 서버는 임의 유형의 데이터, 예를 들어, 사용자 계정 정보, 사용자 입력값, 및 사용자에게 출력된 레포트를 저장할 수 있는 프런트 엔드 데이터베이스를 가지는 저장 장치를 포함할 수 있거나, 또는 그와 통신할 수 있다. 이어서, 각 사용자로부터의 데이터를, 데이터를 조작할 수 있는 백 엔드 서버로 전송하여 결과를 생성할 수 있다. 예를 들어, 백 엔드 서버는 유사한 휴대폰 또는 유사한 샘플 수집 장치로부터 발생된 컴파일 데이터에 대한 보정을 계산할 수 있다. 백 엔드 서버는 프런트 엔드 서버로 다시 조작 또는 계산 결과를 전송할 수 있고, 여기서, 데이터베이스에 저장될 수 있거나, 또는 레포터 작성에 사용될 수 있다. 결과를 프런트 엔드 서버로부터 출력 장치 (예를 들어, 웹 브라우저가 있는 컴퓨터 또는 휴대폰)로 전송하여 사용자에게 전달할 수 있다. 다른 사용자는 데이터를 입력하고, 데이터를 받을 수 있다. 한 실시양태에서, 결과를 레포트로 전달한다. 또 다른 실시양태에서, 결과를 사용자에게 경고할 수 있는 출력 장치로 직접 전달할 수 있다.

[0208] 검정법으로부터의 정보를 정량하고, 본 발명의 컴퓨터 시스템으로 전송할 수 있다. 정보는 또한 정질적 정보, 예컨대, 패턴 또는 형광을 관찰하는 것일 수 있으며, 이는 사용자에 의해, 또는 판독기 또는 컴퓨터 시스템에 의해 자동적으로 정량적 척도로 해석될 수 있다. 한 실시양태에서, 대상체는 또한 컴퓨터 시스템에 샘플 검정 정보 이외의 다른 정보, 예컨대, 인종, 신장, 체중, 연령, 성별, 눈 색상, 모발 색상, 가족 병력, 아이덴티티, 위치 및 사용자에게 유용할 수 있는 다른 임의의 정보를 제공할 수 있다.

[0209] 일부 실시양태에서, 추가 정보는 장치와 연관된 센서에 의해 제공된다. 예를 들어, 위성 위치 추적 자료, 가속화 데이터, 기압, 또는 수분 수준을 영상 센서를 포함하는 장치에 의해 측정할 수 있다. 상기 추가 정보는 본 발명의 컴퓨터 시스템에 의해 사용될 수 있다.

[0210] 정보는 영상 센서로부터 데이터를 판독 또는 제공하는 장치에 의해 자동으로 컴퓨터 시스템에 전송될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 사용자 (예를 들어, 대상체 또는 전문 의료진)에 의해 입력 장치를 사용하여 정보를 컴퓨터 시스템에 입력한다. 입력 장치는 개인용 컴퓨터, 모바일 폰 또는 다른 무선 장치일 수 있고, 또한 웹페이지의 그래픽 사용자 인터페이스일 수 있다. 예를 들어, JAVA에서 프로그램화된 웹페이지는 상이한 입력 박스를 포함할 수 있고, 사용자는 여기에 텍스트를 추가할 수 있으며, 여기서, 이어서, 사용자에 의한 스트링 입력은 프로세싱을 위해 컴퓨터 시스템으로 전송된다. 대상은 다양한 방식의, 또는 다양한 장치를 사용하여 입력 데이터일 수 있다. 데이터는 자동으로 수득될 수 있고, 또 다른 컴퓨터로부터 또는 데이터 입력 시스템으로부터 컴퓨터로 입력될 수 있다. 데이터를 데이터베이스에 입력하는 또 다른 방법은 데이터베이스에 직접 데이터를 입력하기 위한 입력 장치, 예컨대, 키보드, 터치 스크린, 트랙볼 또는 마우스를 사용하는 것이다.

[0211] 한 실시양태에서, 컴퓨터 시스템은 저장 장치, 프로세서, 및 네트워크 통신 단위를 포함한다. 예를 들어, 컴퓨터 시스템은 개인용 컴퓨터, 랩톱 컴퓨터, 또는 복수 개의 컴퓨터일 수 있다. 컴퓨터 시스템은 또한 서버 또는 복수 개의 서버일 수 있다. 컴퓨터 판독 가능 명령어, 예컨대, 소프트웨어 또는 펌웨어는 컴퓨터 시스템의 저장 장치에 저장될 수 있다. 저장 장치는 또한 컴퓨터 시스템에 의해 받고, 작성된 정보를 저장 및 조직화하기 위한 적어도 하나의 데이터베이스를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 데이터베이스는 과거 데이터를 포함하고, 여기서, 과거 데이터는 또 다른 데이터베이스로부터 자동으로 파퓰레이티드되거나, 또는 사용자에 의해 입력될 수 있다.

[0212] 한 실시양태에서, 컴퓨터 시스템의 프로세서는 데이터베이스 중 적어도 하나에 접속하거나, 프로세싱하고자 하는 정보의 공급원으로서 입력 장치로부터 직접 정보를 받는다. 프로세서는 예를 들어, 동적 스크리닝을 수행하거나, 확률 계산 방법을 수행하여 정보 공급원에 대해 계산을 수행할 수 있다. 계산 후, 프로세서는 결과를 데이터베이스로 또는 출력 장치로 직접 전송할 수 있다. 결과를 받은 데이터베이스는 입력 데이터 베이스 또는 과거 데이터베이스와 동일한 것일 수 있다. 출력 장치는 네트워크를 통해 본 발명의 컴퓨터 시스템과 통신할 수 있다. 출력 장치는 프로세싱된 결과를 사용자에게 전달할 수 있는 임의 장치일 수 있다.

[0213] 본 발명의 컴퓨터 시스템과 장치 사이의 통신이 예를 들어, 인터넷을 통해 이루어지는 것을 비롯한 임의의 디지털 통신 방법일 수 있다. 네트워크 통신은 무선, 이더넷-기반, 광섬유, 또는 파이어와이어를 통해, USB, 또는 통신할 수 있는 임의의 다른 연결일 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 시스템 또는 방법에 의해 전송되는 정보는 암호화될 수 있다.

[0214] 시스템 및 방법은 하나 이상의 데이터 프로세싱 또는 저장 장치와의 통신을 위해 네트워크 (예를 들어, 근거리 통신망, 광역 네트워크, 인터넷), 광섬유 매체, 반송파, 무선 네트워크를 통해 전달되는 데이터 신호를 포함할 수 있다는 것에 추가로 주목한다. 데이터 신호는 장치에 또는 장치로부터 제공되는 본원에 개시된 데이터 중

임의의 것 또는 그들 모두를 전달한다.

[0215] 추가로, 본원에 기술된 방법 및 시스템은 장치 프로세싱 서브시스템에 의해 수행될 수 있는 프로그램 명령어를 포함하는 프로그램 코드에 의해 다수의 상이한 유형의 프로세싱 장치에서 수행될 수 있다. 소프트웨어 프로그램 명령어는 소스 코드, 객체 코드, 기계 코드 또는 프로세싱 시스템이 본원에 기술된 방법을 실행하도록 하는 데 작동가능한 임의의 다른 저장된 데이터를 포함할 수 있다. 그러나, 예컨대, 본원에 기술된 방법 및 시스템을 수행하기 위해 구성된 펌웨어 또는 심지어는 적절하게 디자인된 하드웨어와 같은 다른 실행 또한 사용될 수 있다.

[0216] 컴퓨터 시스템은 대상체로부터 값을 얻는 데 사용되는 장치로부터 물리적으로 분리될 수 있다. 한 실시양태에서, 그래픽 사용자 인터페이스 또한 컴퓨터 시스템, 예를 들어, 네트워크와 통신하는 무선 장치의 일부로부터 원거리에 있을 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 컴퓨터 및 장치는 같은 장치이다.

[0217] 컴퓨터 시스템의 출력 장치 또는 입력 장치는 관련 기술분야에 공지된 그래픽 사용자 인터페이스에서 통상 발견되는 것과 같은, 인터페이스 소자, 예컨대, 버튼, 풀다운 메뉴, 스크롤 바, 텍스트 입력을 위한 필드 등을 포함하는 그래픽 사용자 인터페이스를 포함하는 하나 이상의 사용자 장치를 포함할 수 있다. 사용자 인터페이스에의 입력 요청은 시스템 중 어플리케이션 프로그램 (예컨대, 웹 플리케이션)으로 전송된다. 한 실시양태에서, 시스템에서 사용자 장치의 사용자는 시스템의 웹 브라우저 및 웹 서버에 의해 제공되는 HTML 인터페이스를 사용하여 직접 데이터에 접속할 수 있다.

[0218] 그래픽 사용자 인터페이스는 다이 운영 체계 또는 서버의 일부로서 그래픽 사용자 인터페이스 코드에 의해 생성될 수 있고, 이는 데이터를 입력하는 데 및/또는 입력 데이터를 디스플레이하는 데 사용될 수 있다. 프로세싱된 데이터의 결과는 인터페이스 또는 상이한 인터페이스에서 디스플레이될 수 있고/거나, 시스템과 통신하는 프린터 상에서 인쇄될 수 있고/거나, 메모리 장치에 저장될 수 있고/거나, 네트워크를 통해 전송될 수 있다. 사용자 인터페이스는 사용자에게 제시되는 그래픽, 텍스트 또는 청각적 정보를 지칭할 수 있고, 이는 또한 프로그램 또는 장치, 예컨대, 키 누름, 이동, 또는 선택을 조절하는 데 사용되는 제어 순서를 지칭할 수 있다. 또 다른 예에서, 사용자 인터페이스는 터치 스크린, 모니터, 키보드, 마우스, 또는 사용자가 본 발명의 시스템과 상호작용할 수 있도록 허용하는 임의의 다른 아이템일 수 있다.

[0219] **항생제 감수성 데이터의 용도**

[0220] 추가의 또다른 측면에서, 샘플 분석에 기초하여 의학적 조치 과정을 개시하는 것을 비롯한, 사용자에 의해 의학적 조치 과정을 취하는 방법을 제공한다. 의학적 조치 과정은 의학적 치료를 상기 대상체에게 전달할 수 있다. 의학적 치료 하기: 제약, 수술, 장기 절제, 및 방사선 요법으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 제약은 예를 들어, 암 요법을 위한 화학요법적 화합물을 포함할 수 있다. 의학적 조치 과정은 예를 들어, 의학적 검사 시행, 상기 대상체에 대한 의학적 영상화, 의학적 치료를 전달하기 위한 특정 시간 설정, 생검, 및 전문 의료진과의 상담을 포함할 수 있다. 의학적 조치 과정은 예를 들어, 상기 기술된 방법을 반복 수행하는 것을 포함할 수 있다. 본 방법은 상기 샘플을 사용하여 상기 사용자에 의해 대상체의 의학적 상태를 진단하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 시스템 또는 방법은 의학적 치료를 전달하거나, 또는 의학적 조치 과정을 개시하는 것을 포함할 수 있다. 질환이 본 발명의 방법 또는 시스템으로 사정 또는 진단된 것이라면, 전문 의료진은 사정 또는 진단을 평가할 수 있고, 그의 평가에 따라 의학적 치료를 전달할 수 있다. 의학적 치료는 질환 또는 상기 질환의 증상을 치료하고자 하는 임의의 방법 또는 생성물일 수 있다. 한 실시양태에서, 시스템 또는 방법은 의학적 조치 과정을 개시한다. 의학적 조치 과정은 대개 본 발명의 컴퓨터 시스템의 프로세서로부터의 결과를 평가하는 전문 의료진에 의해 결정된다. 예를 들어, 전문 의료진은 대상체가 특정 의학적 상태를 앓을 확률이 97%라고 통보하는 출력 정보를 받을 수 있다. 상기 확률에 기초하여, 전문 의료진은 가장 적절한 의학적 조치 과정, 예컨대, 생검, 수술, 의학적 치료, 또는 어떤 조치도 취하지 않는 것을 선택할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 컴퓨터 시스템은 의학적 조치 과정에 대한 복수 개의 예를 데이터베이스로 저장할 수 있고, 여기서, 프로세싱된 결과는 출력된 조치 과정에 대한 하나 또는 복수 개의 예가 사용자에게 전달될 수 있도록 할 수 있다. 한 실시양태에서, 컴퓨터 시스템은 정보 및 의학적 조치 과정의 예를 출력한다. 또 다른 실시양태에서, 컴퓨터 시스템은 적절한 의학적 조치 과정을 개시할 수 있다. 예를 들어, 프로세싱된 결과에 기초하여, 컴퓨터 시스템은 제약을 대상체에게 전달할 수 있는 장치와 소통할 수 있다. 또 다른 예에서, 컴퓨터 시스템은 프로세싱 결과에 기초하여, 응급 의료 종사자 또는 전문 의료진과 연락할 수 있다. 환자가 취할 수 있는 의학적 조치 과정으로는 약물의 자가 투여, 연고 도포, 업무 스케줄 변경, 수면 스케줄 변경, 휴식, 섭식 변경, 드레싱 제거, 또는 전문 의료진과의 약속 및/또는 방문 스케줄링을 포함할 수 있다. 전문 의료진은 예를 들어, 의사, 응급 의

료 종사자, 약사, 정신과 의사, 심리학작, 척추 지압사,침술사, 피부과 전문의, 비뇨기과 전문의, 항문과 의사, 발병 전문가, 종양학자, 부인과 의사, 신경과 전문의, 병리학자, 소아과 의사, 방사선 전문의, 치과 의사, 내분비학자, 위장병전문의, 혈액학자, 신장전문의, 안과 의사, 물리 치료사, 영양사, 물리 요법사, 또는 외과 전문의일 수 있다.

[0221] 일단 양성 웰 또는 반응 챔버의 개수를 측정하고 나면, 푸아송 통계치 및 해당 칩에 대한 사전 정보를 사용하여 상기 개수를 프로세싱하여 칩내 샘플의 원래의 농도를 측정한다. 이어서, 상기 정보는 자동으로 이메일을 통해 임의의 유효한 이메일 계정으로 전송된 후, 영상 분석을 실행한 컴퓨터 기준으로 어느 세계에 존재하는지 상관없이, 영상을 촬영한 원작자가 받게 된다. 비록 실제 시간이 휴대폰 네트워크 상에서는 속도가 업로드되고, 컴퓨터 네트워크 상에서는 속도가 다운로드되지만, 영상 촬영 시점부터 이메일 확인을 받은 시점까지 경과한 시간은 1분 미만으로 잘 수행되었다. 분석 과정에서 오류가 검출되다면, 예컨대, 4개 스폿 모두가 발견되지 못한다면, 사용자는 신속하게 변경하여 또 다른 영상을 촬영하여야 하기 때문에 이는 중요하다. 소프트웨어는 상기를 수행하도록 프로그램화될 수 있고, 사용자는 전형적으로 1분 미만으로 또 다른 영상 촬영에 대하여 알 수 있다. 이메일에 의해 통보할 수 있는 능력을 가짐으로써 텍스트를 통해 통보할 수 있는 능력을 제공할 수 있다. 휴대폰 제공자는 이메일 본문을 텍스트로 특정 사용자에게 전송할 수 있는 서비스를 가질 수 있다. 다른 서버는 SMS 메신저로서 영향을 미칠 수 있다. 분석 프로세스는 영상이 사용될 수 있는지 사용자에게 여부를 통보하는 컴퓨터 자동화를 사용할 수 있다. 통보는 예를 들어, SMS 메세지, 이메일 메세지, 전화 통화, 웹 포스팅, 또는 전자 메세지일 수 있다. 일부 실시양태에서, 영상 업로딩 시점부터 사용자가 통보를 받을 때까지의 시간은 분석 프로세스로서 지칭될 수 있다. 분석 프로세스는 예를 들어, 5 min, 4 min, 3 min, 2 min, 1 min, 50 sec, 45 sec, 40 sec, 30 sec, 20 sec, 10 sec, 9 sec, 8 sec, 7 sec, 6 sec, 5 sec, 4 sec, 3 sec, 2 sec, 1 sec, 0.5 sec, 0.4 sec, 0.3 sec, 0.2 sec, 또는 0.1 sec 미만으로 소요될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분석 프로세스는 1 min 미만이 소요된다.

[0222] 일부 실시양태에서, 보정 방출을 제공하는 적어도 하나의 보정 공급원, 및 보정 방출을 감지하는 적어도 하나의 보정 포토다이오드를 제공할 수 있고, 여기서, 제어 회로망은 각각의 검출 포토다이오드 결과로부터 보정 포토다이오드 결과를 감산하기 위한 차동 회로를 가진다.

[0223] 통신 인터페이스는 외부 케이싱이 범용 직렬 버스 (USB) 드라이브로서 구성되도록 하는 USB 연결일 수 있다.

[0224] 일부 경우에서, 정보는 다시 영상화하는 데 사용된 모바일 장치로 전송된다. 예를 들어, 영상을 수득할 수 있고, 분석을 위해 별개의 컴퓨터로 전송할 수 있고, 이어서, 영상, 및 영상과 관련된 데이터를 다시 모바일 장치로 전송할 수 있다. 일부 실시양태에서, 사용자가 별개의 장치, 예컨대, 의사의 모바일 장치로 전송하는 영상 및/또는 프로세싱된 영상 및/또는 생성된 데이터가 정보를 받을 수 있다. 일부 경우에서, 2개의 정보 또는 정보 세트를 2개 이상의 장치에 전송한다. 2개 이상의 정보 세트는 동일한 정보일 수 있거나, 또는 일부 실시양태에서, 별개의 데이터는 각 사용자에게 전송된다. 예를 들어, 환자는 영상과 관련된 일부 정보를 받을 수 있는 반면, 환자의 의사는 의사의 분석에 더욱 적합한 정보를 받는다.

[0225] "더 클라우드"에 대한 영상 분석을 오프로드함으로써 원시 데이터의 트레이서빌리티 및 아카이빙, 글로벌 액세스 및 실제로 모든 스마트폰 작동 시스템과의 호환성을 비롯한, 다수의 이점을 제공할 수 있는 반면, 이는 충분한 고대역폭의 무선 데이터 연결을 필요로 하며; 따라서, 일부 시나리오에서는 직접 통화에 의해 분석이 바람직할 수 있다.

[0226] **플랫폼/장치**

[0227] 본원에서는 암 세포를 비롯한 세포, 또는 병원체를 비롯한 미생물을 신속하게 확인하고, 그의 로드를 정량화하고, 약물, 예컨대, 항생제에 대한 그의 감수성 또는 내성을 진단할 수 있는 장치 (예컨대, 미세유체 장치) 및 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 장치를 통해 임상 샘플 또는 환경 샘플을 비롯한, 각종 샘플 유형으로부터 기원할 수 있는 개별 미생물 또는 세포를 사용하여 약물 감수성 또는 약물 내성의 표현형을 검출하고, 대사 프로파일링을 수행할 수 있다. 상기 샘플 유형으로는 혈액, 뇌 척수액 (CSF), 타액 및 소변을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않고, 이는 또한 환경 샘플, 예컨대, 물 또는 병원 표면으로부터의 것도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치를 통해 세포를 약물, 예컨대, 항생제와 함께 인큐베이션시킬 수 있고, 이어서, 무오염 플랫폼에서 핵산 또는 다른 분자을 신속하게 추출 및 정량화할 수 있다. 본 장치는 미세유체 장치에서 디지털 단일 분자 측정을 사용할 수 있고, 오염 물질과 병원체를 구별하는 데 중요하고, 약물 내성 유기체 또는 세포와 감수성 유기체 또는 세포를 조기에 구별할 수 있도록 하는 데 중요한 정량적 데이터를 제공하면서, 검출 한계를 개선시키는 초민감성 측정을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 임상 샘플로부터 개별 미생

물 또는 세포의 상태를 구별할 수 있고, 약물, 예컨대, 예를 들어, 항생제에 대한 그의 개발 반응 소요 시간을 이해함으로써 초고속 약물 감수성 측정을 제공할 수 있다.

[0228] 일부 실시양태에서, 항생제 스트레스에 대한 반응으로 일부 미생물은 (락타마제와 같은) 항생제 내성 유전자를 100개 카피로 복제할 수 있고, 이로써, 상기 미생물은 진화할 수 있게 되는 바, 본 장치 및 방법은 각각의 주어진 세포에 대하여 유전자 중복 측정을 사정하는 데 사용될 수 있다.

[0229] 일부 실시양태에서, 본 장치 및 방법을 통해 약물 감수성 박테리아 및/또는 약물 내성 박테리아 및/또는 병원성 및/또는 비병원성 박테리아를 포함하는 오염물질 - 또는 이들 유형의 일부 조합을 포함할 수 있는 임상 샘플과 같은 박테리아 폴로부터 약물 내성 박테리아를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 세포를 약물과 함께 인큐베이션시키고, 이어서, 무오염 플랫폼에서 핵산, 예컨대, 예를 들어, RNA를 신속하게 추출 및 정량화하여 약물 감수성을 측정하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공하는 방법 및 장치는 CLIA 임상 실험실 외부에서의 미생물 및 세포 확인 및 약물 감수성 검사를 가능하게 한다.

[0230] 장치는 채널 및 유로, 예컨대, 미세유체 채널을 포함할 수 있다. 장치는 쥬입구, 배출구, 또는 그의 임의 조합을 포함할 수 있다. 장치는 웰, 저장소, 또는 그의 임의 조합을 포함할 수 있다. 장치는 반응 볼륨을 포함할 수 있다. 장치는 프리-로딩 시약을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 미세유체 장치는 예를 들어, 미국 특허 출원 13/257,811, PCT 출원 번호 PCT/US2010/028361, 미국 특허 공개 번호 20120329038 A1, 및 미국 특허 공개 번호 WO 2013072069 A1 (상기 특허는 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술된 바와 같이, 슬립칩 장치를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응 수행을 위해 샘플을 시약과 접촉시킨다. 본원에서 사용되는 바, "접촉시키는"이란, 물질과 접촉시키고자 하는 엔티티를 포함하는 영역 중에 또는 용액 중에서 물질을 도입시키거나, 또는 물질을 유지시키는 것을 지칭한다. 예를 들어, 표적 핵산의 증폭을 위한 영역과 반응 수행을 위한 시약을 접촉시키는 것은 시약을 별개로 또는 이미 표적 핵산과 함께 챔버 내로 유동시키거나, 또는 증폭을 위한 영역으로 이미 프리로딩된 시약을 포함하는 챔버 내로 시약을 유동시키는 것을 포함할 수 있다. 접촉은 두 물질이 결합, 터치, 반응 촉진을 위한 조건하에서 상호작용할 때, 또는 다르게는 원하는 조건하에서 인접하게 유지될 때 발생할 수 있다.

[0231] 플랫폼은 샘플 볼륨, 시약 볼륨, 및 다른 유체의 로딩, 언로딩, 믹싱, 및 다른 취급을 가능하게 하는 유체 취급 기전을 포함할 수 있다. 예를 들어, 유체를 웰 또는 소적으로 로딩하기 위한, 웰 또는 소적의 성분을 혼합하기 위한, 또는 웰 또는 소적의 성분을 오프-로딩하기 위한 채널을 포함하는 미세유체 장치를 사용할 수 있다.

[0232] 일부 플랫폼은 본원에 기술된 바와 같이, 디지털 또는 준-디지털 포맷으로 검정법을 수행하는 데 유용하다. 예를 들어, 웰, 웰 플레이트, 마이크로웰, 미세유체 소적, 에멀젼, 비드, 및 마이크로어레이는 디지털 또는 준-디지털 검정법을 수행하는 데 유용한 플랫폼을 제공할 수 있다. 상기 검정법에서, 구획은 개별 웰, 소적, 비드, 또는 마이크로어레이 스폿을 포함할 수 있다.

[0233] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 장치는 슬립칩 디지털 증폭 기술 및 슬립칩 샘플 제조 기술을 도입하고 (Shen, et al., 2010, Analytical Chemistry, 4606-4612, Shen, et al., 2010, Lab on a Chip, 2666-2672, Shen, et al., 2011, Analytical Chemistry, 3533- 3540, Shen, et al., 2011, J Am Chem Soc, 17705-17712), 세포 및 미생물, 예컨대, 예를 들어, 크렙시엘라 뉴모니아에, 슈도모나스 아에루기노사, 및 장외 병원성 이. 콜라이로부터 신속한 단일 분자 확인 및 핵산 정량화를 수행할 수 있다. 샘플은 다양한 인간 체액, 예컨대, 예를 들어, 혈액, 혈장, 타액, CSF 또는 다양한 환경 샘플, 예컨대, 예를 들어, 물 또는 병원 표면으로부터 수득할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이를 통해 일부 실시양태에서, 감염, 예컨대, 예를 들어, UTI를 차별적으로 진단할 수 있는 작업 흐름을 임상적으로 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 전체 세포 로드 및 종 및/또는 균주 확인을 정량화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 검정 결과는 45분 미만, 30분 미만, 20분 미만, 10분 미만, 5분 미만, 3분 미만, 또는 1분 미만 내에 이용가능할 수 있다.

[0234] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 기술을 통하여 참조 균주의 세포 배양물과 혼합된 소변 샘플로부터 추출된 핵산, 예컨대, 예를 들어, 박테리아 DNA 및 RNA를 확인 및 정량화할 수 있다. 참조 균주는 그의 품질 관리 프로토콜의 일부로서 임상 실험실에서 통상 사용되는 것, 예컨대, 예를 들어, K. 뉴모니아에 (ATCC 700603), P. 아에루기노사 (ATCC 27853), 및 이. 콜라이(ATCC 25922) (Institute., 2012, M07-A09)이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 기술된 기술 및 장치는 핵산을 추출하는 표준 벤치 방법 및 키트 (퀴아젠 퀴앰프(Qiagen Qiamp) DNA 키트)와 통합될 수 있고, 핵산 농도를 정량화하기 위해 앞서 공개된 범용 프라이머가 유전자, 예컨대, 예를 들어, 16S 유전자의 보존 영역을 표적화하는 데 사용될 수 있다 (Clifford, *et al.*, 2012, PLoS ONE, e48558, Nadkarni, *et al.*, 2002, Microbiology, 257-266). 예를 들어, 본 기술은 16S 유전자의 초가변 영역

을 표적화하여 미생물을 정량화하고, 확인하는 데 사용될 수 있다 (Baker, *et al.*, 2003, Journal of Microbiological Methods, 541-555, Hansen, *et al.*, 2013, PLoS ONE, e61439, Spilker, *et al.*, 2004, Journal of Clinical Microbiology, 2074-2079).

[0235] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 장치를 통해 약물 감수성 박테리아 및/또는 약물 내성 박테리아 및/또는 병원성 및/또는 비병원성 박테리아를 포함하는 오염물질, 또는 그의 임의 조합을 포함할 수 있는 박테리아 풀, 예컨대, 임상 샘플로부터 약물 내성 박테리아를 확인할 수 있다.

[0236] 일부 실시양태에서, 본 기술은 예를 들어, 3배의 고감도로 및 95% 신뢰 구간으로 예를 들어, 1,000 내지 $1x10^7$ 개의 카피/mL의 동적 범위에 걸쳐 디지털 슬립칩을 사용하는 박테리아 DNA 및 RNA 증폭 검정법에 사용될 수 있다. 상기 동적 범위는 450 내지 $9.7x10^7$개의 카피/mL의 동적 범위 및 120개의 카피/mL의 검출 한계로, 0.84 nL 웰을 10,240개 함유하는, 상업적으로 제작된 디지털 슬립칩에 잘 적용된다.

[0237] 본 발명의 실시양태에 따라 약물에 대한 소변 샘플 중의 세포의 내성 또는 감수성을 측정하는 작업 흐름은 도 5에 제시되어 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치가 샘플 프렙 (예컨대, 샘플 중 유기체의 약물에의 노출, 및 샘플로부터 표적 핵산의 추출) 및 디지털 증폭 (예컨대, 표적 핵산을 분포 및 증폭시켜 샘플 중에 존재하는 표적 핵산을 정량화하여 약물에 대한 유기체의 감수성 또는 내성을 측정), 둘 모두를 수행하는 검정법을 가능하게 한다.

[0238] 통합 장치

[0239] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공하는 장치는 하나 이상의 모듈을 포함하는 통합 장치이다. 이들 모듈은 인큐베이션 모듈, 샘플 제조 모듈, 증폭 모듈, 및 판독 모듈을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이들 모듈은 각각 본원에 기술되어 있다. 일부 실시양태에서, 통합 장치는 약물에 대한 반응으로 세포 중 유기체의 특성을 검출하기 위한 간소화된 프로세싱 흐름을 제공하는 2개 이상의 모듈을 조합한다. 인큐베이션 챔버 및 샘플의 인큐베이션 챔버로의 유동을 조절하는 장치를 포함하는 통합 장치의 예는 도 6a, 6b, 및 6c에 도시되어 있다.

[0240] 인큐베이션 모듈

[0241] 일부 실시양태에서, 통합 장치는 인큐베이션 모듈을 포함한다. 인큐베이션 모듈은 예컨대, 미생물을 약물에 노출시키기 위한 인큐베이션 챔버를 포함할 수 있다 (도 6a, 6b, 및 6c 참조). 일부 실시양태에서, 인큐베이션 모듈은 유체, 예컨대, 샘플, 배지, 시약의 삽입을 허용하는 유입구를 포함한다. 상기 용액은 예를 들어, 도 6c에 제시된 바와 같이 펌핑 리드 또는 플런저로부터의 양압과 같은 일부 수단을 통해 슬립칩-유사 장치로 압입된다. 일부 실시양태에서, 슬립칩 층에 인접한 층은 샘플의 유동이 그를 통해 이루어질 수 있는 채널을 포함한다. 일부 실시양태에서, 최상부 층은 환기 및 압력 조절을 위해 하나 이상의 개구부를 가진다. 일부 실시양태에서, 슬립칩 층의 개구부는 용액으로 충전되고, 샘플은 상이한 볼륨으로 분할된다. 상기 층은 이어서, 슬립되고, 슬립칩 층의 개구부는 이동하여 별개 층과의 연결부, 예를 들어, 인큐베이션 챔버로의 개구부를 형성한다. 샘플은 중앙 슬립칩 층으로부터 수송될 수 있고, 인큐베이션 챔버 내에 함유되어 있는 용액, 예컨대, 배지, 또는 항생제와 혼합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션 챔버를 가열 배쓰에 안착시킬 수 있거나, 또는 다르게는 인큐베이션을 위한 가열 소자와 접촉하도록 안착시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 막, 예컨대, 소수성 필름이 환기용으로 사용된다. 일부 실시양태에서, 압력 조절을 위해 장치의 하나 이상의 층에 하나 이상의 개구부가 존재한다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션 챔버를 함유하는 층 또한 슬립될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션 챔버로부터의 유체는 별개의 모듈, 예컨대, 증폭 모듈로 수송된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 슬립칩 층, 예를 들어, 샘플 프렙 또는 다른 모듈로의 개구부를 포함하는 인큐베이션 챔버 아래의 것이 사용된다. 일부 실시양태에서, 통합 장치는 추가의 인큐베이션 모듈을 포함한다.

[0242] 일부 실시양태에서, 인큐베이션 모듈에서 인큐베이션 챔버는 항생제 감수성 검사를 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 세포를 필터를 통해 미리 분류한다. 일부 실시양태에서, 필터를 사용하여 박테리아 세포를 포획한다. 일부 실시양태에서, 관심 박테리아 세포를 용해시키지 않고, 포유동물 세포를 선택적으로 용해시킨다. 일부 실시양태에서, 선택적 용해 및 여과 단계를 조합한다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션 챔버는 세포를 세포의 한정을 위한 서브챔버의 어레이를 포함한다.

[0243] 일부 실시양태에서, 인큐베이션 챔버는 하기: (i) 샘플을 분할하거나, (ii) 약물/항생제를 분할하거나, (iii) 샘플을 약물/항생제와 함께 조합하거나, (iv) 혼합하거나, (v) 샘플을 인큐베이션시키거나, 또는 (vi) 유체를 별개의 챔버로 수송하는 것 중 하나 이상의 것을 수행하도록 구성된 모듈이다.

[0244] 일부 실시양태에서, 디지털 검정법은 샘플로부터의 세포를 인큐베이션 챔버 또는 클론 단리 영역으로 한정시키는 것을 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 세포를 개별 인큐베이션 챔버에서 배양하여 샘플로부터 복수 개의 클론 집단을 생성한다. 일부 실시양태에서, 단리된 세포를 확장 이전 또는 이후에 약물로 처리한다. 일부 실시양태에서, 단리된 세포로부터의 배양 및 확장 후, 클론 집단을 2개 이상의 처리 영역으로 분할한다. 이로써, 클론 집단 중 적어도 하나의 부분은 약물로 처리될 수 있고, 동시에 클론 집단의 또 다른 부분은 약물로 처리되지 않는다. 이어서, 본원에 기술된 검정법은 클론 집단 중 세포가 하나 이상의 약물에 대하여 감수성인지 또는 내성인지 여부를 측정하기 위해 수행될 수 있다.

[0245] 일부 실시양태에서, 분할은 끝단(dead-end) 충전을 사용하는 슬립칩 디자인을 통해 수행한다. 일부 실시양태에서, 수용액을 이용하여 끝단 채널 충전을 달성하기 위해, 소수성 막은 수용액의 유동은 차단하지만, 비수성 액체 및 가스는 통과시킬 수 있는 채널 단부에서 사용될 수 있다.

[0246] 일부 실시양태에서, 슬립핑 (즉, 층 이동)은 회전축을 이용하여 자동으로 작동될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 축은 모터에 의해 조절되고, 임의적으로, 특정 속도, 방향 및/또는 회전 각도로 코딩 또는 프로그램화될 수 있다.

[0247] 일부 실시양태에서, 샘플을 약물/항생제와 조합 및 혼합하는 것은 용액 중 하나 이상의 것을 또 다른 용액으로 수송하는 챔버의 가압에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 챔버 가압은 실을 형성하고, 상기 구획의 부피를 바꾸는 펌핑 리드에 의해 발생되며; 이는 수동으로 또는 다른 작동 중에서도 회전축을 통해 작동될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유체의 성장 챔버 모듈 내부로의 또는 외부로의 수송은 챔버의 가압에 의해, 예컨대, 예를 들어, 펌핑 리드 (수동으로 또는 자동으로), 밸브의 개구부에 의해, 또는 다른 방법, 예컨대, 예로서, 피펫팅에 의해 수행될 수 있다.

[0248] 일부 실시양태에서, 인큐베이션 챔버 모듈은 가열 소자를 함유한다. 가열 소자 제어 장치의 일부 예는 온도 및 시간 또는 상 변화 물질을 제어하는 수단을 포함하는 회로 보드를 포함한다.

[0249] 일부 실시양태에서, 인큐베이션 챔버는 1 mL 내지 10 mL를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션 챔버는 100 ㎕ 내지 3 mL를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션 챔버는 10 ㎕ 내지 100 mL를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션 챔버는 가능하게는 단일 세포를 함유하는 샘플을 프로세스하도록 디자인된다.

[0250] 샘플 제조 모듈

[0251] 일부 실시양태에서, 본 장치는 샘플 제조 모듈을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 관심 약물 (예컨대, 항생제)을 함유할 수 있거나, 또는 함유할 수 없는 상이한 구획으로 분할될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항생제 약물과 함께/그의 부재하에서 샘플을 인큐베이션시킨 후, RNA 및/또는 DNA 추출을 위하여 관심 세포 (예컨대, 예를 들어, 박테리아 병원체의 것)를 (예컨대, 용해 완충제에 의해) 용해시킨다. 일부 실시양태에서, 샘플 제조 모듈을 사용하여 소변으로부터 핵산을 자동으로 추출할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플 제조를 위해, 필터 칼럼을 사용하여 용해된 샘플로부터 RNA/DNA를 포획하고, 용해된 샘플 중에 존재하는 세포 파편 또는 다른 성분들을 세척하여 제거할 수 있다.

[0252] 일부 실시양태에서, 자동화 또는 반자동화 샘플 제조 모듈을 제공한다. 일부 실시양태에서, 자동화 또는 반자동화 샘플 제조 모듈은 실링된 환경에서 용해된 샘플에 대해 압력을 발생시켜 필터 칼럼 (예컨대, 핵산-결합 칼럼, 예컨대, 유리 섬유 칼럼)을 통해 용해된 샘플을 가압한다.

[0253] 일부 실시양태에서, 샘플 프렙 모듈은 1 mL 내지 10 mL를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 샘플 프렙 모듈은 100 ㎕ 내지 100 mL를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 샘플 프렙 모듈은 10 ㎕ 내지 1 L를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 샘플 프렙 모듈은 1 ㎕ 내지 1 mL를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 샘플 제조 모듈은 플라스틱으로 제조될 수 있고, 일부 실시양태에서, 외부력 또는 사용자의 활발한 개입을 필요로 하지 않는다.

[0254] 디지털 정량화 모듈

[0255] 일부 실시양태에서, 본 장치는 디지털 (또는 바이너리) 정량화 모듈, 예컨대, 각 검출 소자당 0개, 1개 또는 그 초과의 표적 (예컨대, RNA/DNA) 분자가 포획되고, 통합에 적합한 다중 검출 소자를 함유하는 모듈을 포함한다.

[0256] 일부 실시양태에서, 강화된 표적 (예컨대, DNA/RNA)을 후속 또는 동시 실험에서 사용하기 위해 장치로부터 회수

한다. 일부 실시양태에서, 통합 장치는 복수 개의 정량화 모듈을 가진다.

[0257] 일부 실시양태에서, 정량화 모듈은 30 ㎕ 내지 60 ㎕를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 정량화 모듈은 1 ㎕ 내지 100 ㎕를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 정량화 모듈은 100 nL 내지 1 mL를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 정량화 모듈은 10 nL 내지 10 mL를 프로세스하도록 디자인된다.

[0258] 시약 보관

[0259] 일부 실시양태에서, 통합 장치는 보관된 시약을 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치 중 액체 (상기 기술된 것 포함)는 예컨대, 블리스터 팩, 시약 팩, 또는 그가 실링되는 다른 유형의 용기에 보관될 수 있다 (도 7).

[0260] 일부 실시양태에서, 본 장치는 핵산 정량화 반응을 위해 세포 또는 미생물의 핵산을 제조하는 데 적합한 시약 팩을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 핵산 정량화 반응에 적합한 시약 팩을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약 팩은 핵산 정량화 반응을 수행하기 위한 효소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약 팩은 핵산 정량화를 수행하기 위한 (예컨대, PCR 또는 등온 증폭을 위한) 프라이머를 포함한다.

[0261] 시약 팩 중의 예시적인 시약으로는 용해액, 세척액, 용리액, 재수화 용액, 효소 용액 (예컨대, 핵산 증폭 효소, 폴리머라제 효소, 제한 효소), 완충제, 액제, 분제, 펠릿, 겔, 마이크로비드, 프로브, 프라이머, 핵산, DNA, RNA, 폴리펩티드, 뉴클레오시드 트리포스페이트 (NTPs), 항체, 희생(sacrificial) 시약 또는 그의 임의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 희생 시약은 수용액, 윤활제, 오일, 수성-비혼성 액체, 겔, 가스, 플루오로카본유, 계면활성제, 가스, 대기, 또는 그의 임의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 대기는 혼합을 위해 기포를 발생시키는 데 사용될 수 있다. 또 다른 예로서, 대기 및 비혼성 액체는 매트릭스 중 남은 용액 (무용 부피)을 제거하는 데 사용될 수 있다. 시약을 혼합하여 그의 조성에 변화를 줄 수 있다. 예를 들어, 한 유형의 완충제를 또 다른 완충제 또는 건조 시약과 혼합하여 그의 조성을 또 다른 완충제로 바꿀 수 있다.

[0262] 일부 실시양태에서, 본 장치는 효소 존재 및/또는 활성을 검정하기 위한 시약 팩, 예컨대, 예를 들어, 모노브로모비만, 7-디에틸아미노-3-(4'-말레이미딜페닐)-4-메틸쿠마린, N-(7-디메틸아미노-4-메틸쿠마린-3-일))말레이미드), NiWa 블루 (1-벤질 4-메틸 5-(tert-부톡시카르보닐아미노)-2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로피롤-1-일)테레프탈레이트), NiWa 블루 II (디메틸 5-아세트아미도-2-(2,5-디옥소-2,5-디히드로피롤-1-일)테레프탈레이트), NiWa 오렌지 (디메틸 2-아미노-5-((2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)에틸)아미노)테레프탈레이트), 엘만 (Ellman) 시약/DTNB (5,5'-디티오비스-(2-니트로벤조산)), 움벨리페론-유도된 세팔로스포린, 플루오레세인-유도된 세팔로스포린, 레조루핀-유도된 세팔로스포린, 로다민-유도된 세팔로스포린, 이미페넴, 및 p-니트로페놀 방출 기질을 포함한다.

[0263] 일부 실시양태에서, 본 장치는 하나 이상의 약물을 하나 이상의 농도로 함유하는 시약 팩을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 하나 이상의 항생제를 하나 이상의 농도로 함유하는 시약 팩을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 약물에 대한 세포 또는 미생물의 반응을 가속화시키는 데 적합한 성분 (예컨대, 쿼럼 센싱 분자 등)을 함유하는 시약 팩을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 세포 성장을 증진시키는 배양 배지를 함유하는 시약 팩을 포함한다.

[0264] 일부 실시양태에서, 본 장치는 가스, $H_2S$, CO, 및 NO를 함유하는 가스 혼합물을 함유하는 시약 팩을 포함한다. 상기 가스는 예를 들어, 항생제에 대한 미생물의 감수성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 상기 가스는 혐기성, 호기성, 또는 미호기성일 수 있는 가스 혼합물로 희석될 수 있다. 상기 가스 혼합물은 $CO_2$를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 세포간 성분을 노출시키기 위해 용해 시약을 함유하는 시약 팩을 포함한다.

[0265] 일부 실시양태에서, 상기 용기는 용액의 증발을 막는다. 일부 실시양태에서, 시약은 용기의 특정 영역의 피어싱에 의해, 또는 적절한 시점에 용기의 일부를 선택적으로 개방함으로써 하나 이상의 용기로부터 방출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 장치에서 발생된 압력은 블리스터/용기의 성분을 방출시킬 수 있고; 일부 실시양태에서, 이들 유체는 장치의 다른 부분으로 수송된다. 일부 실시양태에서, 시약 (예컨대, 예로서, 증폭 시약)은 건조된 시약으로서, 장치 상에, 블리스터 팩에 또는 용기에 (또는 그의 일부 조합에) 보관된다. 시약은 동결건조되고/거나, 당 (예컨대, 그 중에서도 특히, 수크로스, 트레할로스)과 함께 보관되고/거나, 비드와 함께 보관될 수 있다.

[0266] 작동 모듈

[0267] 일부 실시양태에서, 본 장치는 작동 모듈, 예컨대, 예를 들어, 장치 (통합 장치 포함)를 작동시키는 모듈을 포함한다. 일부 실시양태에서, 작동 모듈은 하기 기능: 모터 제어, 축 회전, 가열, 영상 포착, 및 영상 프로세싱 중 하나 이상의 것을 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, 작동 모듈은 하나 이상의 모터 및 축을 이용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 작동 모듈은 하나 이상의 회전식 밸브를 이용할 수 있다.

[0268] 일부 실시양태에서, 작동 모듈은 하나 또는 다중의 성분으로 이루어지는데, 그 중 하나 또는 다중의 성분은 스프링 또는 모터에 의해 구동/회전될 수 있다 (도 8). 일부 실시양태에서, 스프링 또는 모터는 나사 부분을 회전시키는 데 사용될 수 있고, 이 나사 부분은 (펌핑 리드 특허 출원에서 기술된 바와 같은) 이전 부분의 반대 나사와 함께 별개의 리드/플런저에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 스프링 또는 모터가 제1 나사 부분을 회전시킴에 따라, 플런저/리드는 이동할 수 있고, 하나 이상의 공동에 존재하는 부피 및 압력을 변화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 리드/플런저는 하나 이상의 공동 내에서 허메틱 실을 형성한다. 일부 실시양태에서, 발생된 압력은 필터 칼럼을 통해 공동내 존재하는 액체 샘플을 유동시키는 데 사용될 수 있다.

[0269] 유동 관리

[0270] 일부 실시양태에서, 본 장치는 별개 또는 동시 실험을 위해 용해된 샘플의 볼륨을 장치 밖으로 수송하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 장치를 통해 용액의 유동을 제어하기 위해 압력을 발생시키기 위한 밸브 (예컨대, 상이한 용액을 칼럼을 통해 유동되거나, 또는 일시적으로는 칼럼을 통해 유동하지 못하도록 저지된다)를 장치에 도입한다. 일부 실시양태에서, 장치 작동 동안 음압을 사용한다. 일부 실시양태에서, 장치 개시 이전에 장치 내 챔버에 가압하거나, 또는 감압할 수 있다.

[0271] 일부 실시양태에서, 1 단계 또는 다단계 프로세스는 예컨대, 장치의 회전층에 필터 칼럼을 배치함으로써 조절될 수 있다. 일부 실시양태에서, 필터 칼럼이 장치에서 회전되는 바, 샘플은 상이한 시약을 함유할 수 있는, 장치 중의 다른 챔버로 이동될 수 있고; 이들 유체는 순차적으로 또는 비순차적으로 필터 칼럼을 통하여 유동될 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 챔버 중에 존재하는 액체는 (예컨대, 펌핑 리드의 발생된 압력을 통해) 이동하게 될 것이며, 용액은 필터 칼럼을 통하여 유동하게 될 것이다. 일부 실시양태에서, 장치 중 필터 칼럼이 제1 위치에 있을 때, 용액은 제1 공동 밖으로 펌핑될 수 있고; 일부 실시양태에서, 장치가 제2 위치 내로 이동할 때, 제2 용액은 펌핑된다. 장치는 필터 칼럼, 및 액체를 함유하는 하나 이상의 챔버와 하나 이상의 오버랩을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상이한 오버랩 위치 사이의 거리 및/또는 각도는 장치 디자인에 의해 프로그램화될 수 있다.

[0272] 일부 실시양태에서, 필터 칼럼 상에서 표적 (예컨대, DNA 또는 RNA)을 포획하기 위해 용해된 샘플을 필터 칼럼를 통해 유동시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 후속 단계는 세척을 포함하며 - 예컨대, 내성 또는 감수성 세포에 특이적인 포획된 DNA 또는 RNA를 예컨대, 세척 완충제로 세척하고, 용리 완충제로 칼럼에서 용리시켜 칼럼으로부터 유리시킬 수 있다.

[0273] 일부 실시양태에서, 표적 (예컨대, DNA/RNA)을 강화시키고, 칼럼에서 용리시킨 후, 용리된 DNA/RNA를 칼럼으로부터, 일부 실시양태에서는 표적 (예컨대, DNA/RNA) 분자를 정량호하는 적합한, 정량화 모듈 또는 장치로 명명되는 다음 챔버 또는 모듈로 수송할 수 있다.

[0274] 다른 모듈 및 소자

[0275] 일부 실시양태에서, 본 장치는 작동 모듈, 예컨대, 예를 들어, 장치 (통합 장치 포함)를 작동시키는 모듈을 포함한다. 일부 실시양태에서, 작동 모듈은 하기 기능: 모터 제어, 축 회전, 가열, 영상 포착, 및 영상 프로세싱 중 하나 이상의 것을 수행하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 작동 모듈은 하나 이상의 모터 및 축을 포함한다. 일부 실시양태에서, 작동 모듈은 하나 이상의 회전식 밸브를 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 층은 축에 연결되고, 회전이 가능하다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 층은 축으로부터 분리시키도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 층은 디텐트 볼을 포함하고, 저 토오크에서는 축에 연결된 상태를 그대로 유지하지만, 고 토오크에서는 (즉, 층이 물리적으로 정지되었을 때에는)분리된다.

[0276] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 층은 명시된 각도로 회전하도록 미리 프로그램화된다. 일부 실시양태에서, 작동 모듈은 하나 이상의 층을 물리적으로 정지시키기 위한 정지 성분을 포함한다.

[0277] 일부 실시양태에서, 본 장치는 강화 또는 사전 농축 모듈을 포함한다. 일부 실시양태에서, 강화 모듈은 유기체 개수를 농축시킨다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 임계 모듈을 포함한다. 일부 실시양태에서, 컷오프 모듈이 유기체 개수를 임계값으로 제한한다. 일부 실시양태에서, 강화 및 임계 모듈이 조합된다. 일부 실시양태에서,

강화 모듈은 1 mL 내지 10 mL를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 강화 모듈은 100 ㎕ 내지 100 mL를 프로세스하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 강화 모듈은 100 ㎕ 내지 1 L를 프로세스하도록 디자인된다.

[0278] 일부 실시양태에서, 본 장치는 인큐베이션 챔버 및 적어도 하나의 검출 챔버를 예컨대, 서로 10 cm 이내로 인접하게 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 인큐베이션 챔버 및 적어도 하나의 검출 챔버를 예컨대, 서로 20 cm 이내로 인접하게 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 인큐베이션 챔버 및 적어도 하나의 검출 챔버를 예컨대, 서로 1 m 이내로 인접하게 포함한다.

[0279] 일부 실시양태에서, 통합 장치는 하기 강화 모듈, 컷오프 모듈, 인큐베이션 모듈, 샘플 프렙 모듈, 정량화 모듈, 및 작동 모듈 중 하나 이상의 것을 통합한다. 일부 실시양태에서, 통합 장치는 인큐베이션 모듈을 자율 장치 및 디지털 슬립칩과 통합한다. 일부 실시양태에서, 모듈은 연동 특징을 가진다. 일부 실시양태에서, 모듈은 상호교환이 가능하다. 일부 실시양태에서, 샘플 제조 및 취급에 유용한 모듈이 본 장치에 포함된다.

[0280] 일부 실시양태에서, 통합 장치의 크기는 10x10x10 cm보다 작거나, 또는 통합 장치의 크기는 20x20x20 cm보다 작다.

[0281] 일부 실시양태에서, 본 장치는 가요성 물질, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, PDMS, 탱고(Tango)+ (3D-인쇄가능 연성 물질), 또는 고무를 포함한다. 가요성 물질을 통해 장치는 모듈 중에서 (예컨대, 샘플 제조 모듈에서 증폭 모듈 사이에서) 샘플을 누수 없이 액체를 이동시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 계면 모듈에 대해 채널/마이크로채널을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 시린지 펌프/테플론 배관을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 3D 인쇄부에 포매된 채널을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 3D 인쇄 밸브를 포함한다. 이들 성분을 통해서도 또한 장치는 상기 모듈 중에서 샘플을 누수 없이 액체를 이동시킬 수 있다.

[0282] 일부 실시양태에서, 정량화 장치는 다양한 볼륨의 연속 구획을 가진다. 일부 실시양태에서, 정량화 장치는 연속된 단일 볼륨 구획에 로딩하기 전에 연속된 온-칩 희석을 도입한다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 비정상적으로 큰 구획 크기 없이도 큰 동적 범위를 가능하게 한다.

[0283] 한 예로서, 샘플을 4회에 걸친 연속 시점에 1:10로 희석할 수 있다. 각 희석액을 연속된 단일 볼륨 디지털 구획 내로 로딩한다. 400개의 구획이 정량화할 수 있고, 1-log 동적 범위로 1.5배의 농도차를 분석할 수 있다. 따라서, 예시적인 장치는 각각 400개의 구획으로 이루어진 4개 세트로 이루어져 있다. 4개의 10x 희석액을 상기 4개의 단일 볼륨 구획 세트 내로 로딩할 수 있고, 이를 통해 4-log 동적 범위 및 항생제 감수성 검사로 1.5배로 분석할 수 있다.

[0284] 일부 실시양태에서, 본 장치는 판독치를 생성하는 판독 모듈 또는 기전을 포함한다. 플랫폼은 하나 이상의 판독 또는 검출 기전과 화합성을 띨 수 있다. 예를 들어, 플랫폼은 부분적으로 또는 전체적으로 투명하거나, 또는 반투명할 수 있고, 이로써, 형광성 측정, 침전물 또는 기포 검출, 또는 다른 시각적 관찰 결과가 이루어질 수 있다. 플랫폼은 시각적 검출기, 예컨대, CCD, CMOS 센서, 카메라, 광자 검출기, 및 다른 센서를 포함한다. 또 다른 예에서, 플랫폼은 전기 센서, 예컨대, 마이크로웰 내에 위치하는 전극을 포함할 수 있다. 플랫폼은 분석을 위한 샘플의 오프-로딩과 화합성을 띨 수 있다. 예를 들어, 플랫폼은 질량 분석법, 서열분석, 또는 전기영동을 위해 소적, 또는 웰 내용물의 언로딩을 허용할 수 있다.

[0285] 일부 실시양태에서, 정량화 모듈을 판독하는 방법은 그 중에서도 특히, 형광 현미경법, 명시양 현미경법, 카메라, 디지털 카메라, 또는 휴대폰 카메라를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 카메라를 이용하는 기지국은 영상을 포착하는 데 사용된다. 영상 프로세싱을 기지국에서 통합할 수 있거나, 영상 파일을 컴퓨터로 전송할 수 있다. 일부 실시양태에서, 휴대폰 사진을 촬영한다. 폰 소프트웨어를 이용하여 영사을 프로세싱할 수 있거나, 영상 프로세싱을 위해 영상을 서버에 업로드할 수 있다.

[0286] 일부 실시양태에서, 가열 소자는 장치, 예컨대, 인큐베이션 모듈이 그 안으로 삽입될 수 있는 장치, 예컨대, 예를 들어, 열전도도가 높은 물질을 함유하는 배쓰에 포매된다. 일부 실시양태에서, 표적 (예컨대, RNA/DNA)의 증폭 및 검출은 장치 상에 가열 소자를 포함할 수 있다. 가열 소자의 예로는 전력, 화학 반응, 상 변화 물질을 이용하여 가열하는 것을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 가열 장치를 통해 증폭 영역의 영상을 포착할 수 있도록 하기 위하여 투명한 열 전도 물질이 사용될 수 있다.

[0287] 일부 실시양태에서, 본 장치는 혼합 방법을 도입한다. 일부 실시양태에서, 제트 마크로-혼합을 사용하여 용액을 혼합할 수 있다 (Nealon, A. J., O'Kennedy, R. D., Titchener-Hooker, N. J., & Lye, G. J. (2006).

Quantification and prediction of jet macro-mixing times in static microwell plates. Chemical engineering science, 61(15), 4860-4870). 상기 접근법에서, 하나 이상의 용액을 가압되고, 그들 사이의 개구부를 통해 한 용액은 나머지 다른 쪽으로 유동할 수 있거나, 또는 두 용액 모두 충돌할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 용액은 가스성 혼합물이고, 기포를 발생하여 기포 믹서를 형성한다. 일부 실시양태에서, 혼합을 사용하여 액체 샘플 및 건식 시약을 혼합한다. 양압 및 음압을 교대로 가하여 혼합을 개선시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 혼합은 기계적으로, 예를 들어, 임펠러, 자기 비드 교반, 중력, 수동적 구조 등, 또는 상기 방법의 조합에 의해 달성될 수 있다.

[0288] 일부 실시양태에서, 본 장치 시약을 조합 또는 혼합하기 위한 챔버 또는 챔버 어레이를 포함한다.

[0289] 일부 실시양태에서, 본 장치는 특수 물질을 함유한다. 일부 실시양태에서, 장치 중의 하나 이상의 물질은 유기체와 화합성을 띤다 (예컨대, 생존가능성에 부정적인 영향을 미치거나, 또는 미치지 않는 물질). 일부 실시양태에서, 하기 목적중 하나 이상의 것을 위해, 그 중에서도 특히, 열 전도 특성을 증진시키기 위해, 표면 화학적 성질/표면 장력 (소수성)을 제어하기 위해, 유기체 생존가능성을 증진시키기 위해, 확산 특성을 변경시키기 위해, 흡착을 막기 위해, 실링을 위해, 리칭(leeching)을 막기 위해 (즉, 플라스틱), 강성을 변경시키기 위해서 물질 또는 표면 코팅제를 물질에 첨가할 수 있다.

[0290] 일부 실시양태에서, 본 장치는 하나 이상의 수동 단계 - 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 샘플 첨가, 시약 삽입, 세팅 조정, 슬립핑, 회전, 펌핑 리드 부착, 펌핑 작동, 물질 삽입, 모듈 연결, 장치 개시, 가열 개시, 유체 전달, 모듈 제거, 영상 포착 등을 이용한다.

[0291] 일부 실시양태에서, 본 장치는 3D 인쇄, 사출 성형, 엠보싱, 습식 에칭, 및 관련 기술분야에 공지된 다른 방법을 비롯한, 다수의 방법에 의해 제작될 수 있다.

[0292] 장치 용도

[0293] 본 장치의 일부 실시양태에서, 디지털 플랫폼을 통해 현행 핵산-기반 기술에서보다 존재량이 더 낮은 박테리아를 검출할 수 있으며, 이로써, 혈액 및 CSF 샘플을 더욱 견고하게 분석할 수 있다. 디지털 기술의 정확도 증가는 요법에 대한 환자 반응 모니터링을 개선시킨다.

[0294] 샘플-프렙 모듈은 불안정한 RNA의 분해는 감소시키면서, 5 min 이내의 신속한 핵산 추출 및 정제를 제공할 수 있다.

[0295] 현장용 모듈을 통해 광범위한 감염에 걸쳐 임상 집단에서, 및 임상 시험 및 감시, 둘 모두에서 광범위한 검사를 수행할 수 있다.

[0296] 디지털 증폭 모듈을 통해 배양 방법보다 더욱 가까운 기간 내에 저수준의 감염에 대하여 더욱 명확하게 이해할 수 있고, 항미생물제에 대한 반응에 대한 이질성에 관한 정보를 얻을 수 있다.

[0297] 한 실시양태에서, 본 장치는 표적 미생물 또는 세포, 예컨대, 예를 들어, 크렙시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*), 슈도모나스 아에루기노사, 및 장외 병원성 이. 콜라이로부터 신속하게 및 고수율로 박테리아 DNA 및 RNA를 단리시키기 위하여 샘플 제조 기술과 함께 사용될 수 있고, 이는 임상 샘플을 포함할 수 있고, 다양한 체액, 예컨대, 예를 들어, 소변을 포함할 수 있다. 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)를 함유하는 소변 샘플로부터의 박테리아 DNA 및 RNA 추출 및 정제를 위한 샘플-프렙 슬립칩은 앞서 입증된 바 있다. HCV 또는 HIV 바이러스 입자를 함유하는 혈장 샘플로부터의 바이러스 RNA 추출 및 정제 또한 입증된 바 있다. 한 실시양태에서, 본 장치는 샘플은 다양한 부위, 예컨대, 예를 들어, 최대 0.5 mL를 취급하며, 5 min 이내에 샘플 제조를 수행하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 낮은 박테리아 로드를 함유하는 샘플을 신속하게 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0298] 일부 실시양태에서, 본 장치는 일부 경우에서는 극도로 짧은 기간 내에 (예컨대, 예를 들어, 5분 미만내에) 및 일부 경우에서는 표준 벤치 방법과 비교하여 80% 더 높은 수율로, 및 디지털 및 실시간 정량화, 둘 모두에 적합한 품질로, 박테리아 표적 (예컨대, 예를 들어, K. 뉴모니아에, P. 아에루기노사, 또는 이. 콜라이)과 혼합된 샘플 (예컨대, 소변 샘플)로부터 핵산, 예컨대, 박테리아 DNA 및 RNA를 추출 및 정제하기 위해 사용될 수 있다.

[0299] 박테리아 RNA는 불안정한 것으로 알려져 있으며, 발현 수준은 빠르게 변할 수 있다. 정제된 RNA의 정량 및 정질이 손상될 수 있는 경우에는, 샘플 제조 프로토콜을 예컨대, 예를 들어, 3 min 미만으로 추가로 단축시키기 위해 본 개시내용에 기술된 장치가 사용될 수 있다. 상기 기간은 혈액 혈장으로부터 바이러스 RNA를 단리시키

기 위한 기간인 것으로 앞서 입증된 방 있다. 일부 실시양태에서, RNase의 활성을 최소화하기 위해 추가의 계면활성제 또는 억제제를 첨가함으로써 용해 단계를 변형시킬 수 있다.

[0300] 일부 실시양태에서, 본 장치는 예를 들어, 100 CFU/mL 내지 $1x10^6$ CFU/mL의 K. 뉴모니아에, P. 아에루기노사, 또는 이. 콜라이와 혼합된 샘플 (예컨대, 임상적 소변 샘플) 중의 핵산, 예컨대, 예를 들어, 박테리아 RNA 수준을 3배의 고감도로 신속하고, 재현가능하게 및 정량적으로 측정하기 위하여 슬립칩 샘플 제조 및 디지털 정량화 기술을 조합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 장치는 99% 초과의 특이성보다 더욱 우수한 성능을 가진다.

[0301] 일부 실시양태에서, 장치 또는 플랫폼은 예를 들어, 임상적 소변 샘플 중의 표적 미생물을 정량화 및 확인하기 위해 1개 초과의 모듈을 조합한다.

[0302] 일부 실시양태에서, 본 장치를 통해 샘플 프렙 및 디지털 증폭, 둘 모두를 수행하는 검정법을 실행할 수 있을 것이다. 일부 실시양태에서, 총 검정 시간은 60 min 미만, 30분 미만, 15분 미만일 수 있다. 현행 PCR 프로토콜은 변성 시간, 변성 온도를 최적화함으로써, 또는 어닐링 및 연장 단계 (바이오-래드(Bio-Rad))를 조합함으로써 단축될 수 있다. 최적화된 증폭 효소 또는 고속 열 순환기를 사용함으로써 10분 증폭을 달성할 수 있다 (Wheeler, et al., 2011, Analyst, 3707-3712, Neuzil, et al., 2006, Nucleic Acids Research, e77). 일부 실시양태에서, 본 장치는 샘플 프렙을 5 min 미만내에, 역전사 단계를 5 min 미만내에, 및 디지털 슬립칩 작업 흐름을 35 min 미만내에 수행하여 예를 들어, 45 min 미만 작업 흐름을 달성할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 상기 RT 디지털 PCR 장치를 사용하여 칩 열 순환 프로토콜을 최적화시키는 데 도움을 줄 수 있다.

[0303] 일부 실시양태에서, 본 장치를 통해 임상 샘플로부터 직접 기원하는 소수의 세포를 사용하여 약물 내성을 신속하게 진단할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 장치는, 다회에 걸친 세포 분열에 의존하지 않는 신속한 AST 검정법의 디자인에 필수적이고, 대개는 혈액 및 CSF에 대한 경우에서와 같이, 제한된 개수의 세포가 이용가능할 때, AST 검정법을 수행하는 데 필수적인 하기의 질의에 답변하는 데 사용될 수 있다: (i) 단기간의 약물 노출시 약물 감수성 및 약물 내성 미생물 집단 또는 세포의 단일 세포 성장, 표현형, 및 유전자 발현 프로파일은 어떠한가? (ii) 상기 집단 또는 세포의 감수성 또는 내성을 매우 신속하게 (15분 또는 심지어는 7분 미만 내에) 예측할 수 있는 "감시" 세포가 존재하는가? (iii) 임상적으로 관련된 박테리아 집단의 약물 감수성 또는 내성을 신뢰가능하게 예측하는 몇개의 세포가 필요한가? (iv) 측정이 풀링된 세포에서 수행되었을 때, 항생제 감수성 및 내성을 신뢰가능하게 예측하는 유전자 발현 시그니처 및 최단기간의 약물 노출은 무엇이며, 상기 측정값이 단일 세포 검정법의 성능에 얼마나 가깝게 근접할 수 있는가?

[0304] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 장치를 사용하여 약물 노출에 대한 반응으로 표적 유기체 또는 세포로부터의 단일 세포를 모니터링할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 단일 세포 수준에서 성장, 대사 활성, 표현형 변이, 및 유전자 발현 수준을 모니터링할 수 있는 능력을 가진다.

[0305] 일부 실시양태에서, 본 장치를 통해 약물, 예컨대, 예를 들어, 시프로플록사신 (플루오로퀴놀론) 또는 암피실린 (예컨대, β-락탐)의 표준 희석액의 존재하에서 감수성 균주 또는 세포의 성장률 분포 및 그의 배가 시간을 측정할 수 있다. 시프로플록사신은 임상의에 의해 성장을 즉시 방해할 수 있는 능력을 가지는 것으로 간주되는 반면 (Barcina, et al., 1995, Journal of Microbiological Methods, 139-150), 암피실린의 작용 모드는 용해가 발생되기 이전에 5세대만큼의 세포 분열을 허용하는 것으로 간주된다 (Rolinson, 1980, Journal of General Microbiology, 317-323). 항생제는 플라스틱 장치, 예컨대, 플루다임(Fluidigm) 칩용의 PDMS에서는 빠르게 손실될 수 있다고 널리 알려져 있다. 그러므로, 일부 실시양태에서, 본 발명자들의 장치는 유리로 구성될 수 있고, 일부 실시양태에서, 이는 검정 이후 항생제 농도 측정을 위해 유체를 회수하는 데 사용될 수 있다 (Ma, et al., 2014, PNAS, Ma, et al., 2014, Integrative Biology).

[0306] 일부 실시양태에서, 본 장치는 단일 세포에 존재하는 RNA를 정량화함으로써 유전자 발현을 측정할 수 있다. 슬립칩 장치는 개별 웰로부터 살아있는 박테리아로부터의 DNA를 분석할 수 있고 (Ma, et al., 2014, PNAS, Ma, et al., 2014, Integrative Biology), 각 웰 중의 RNA 카피수를 정량화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 상기 적용을 조합하여 단일 세포 유전자 발현 검정법을 생성할 수 있다.

[0307] 일부 실시양태에서, 본 장치는 항생제에 대한 반응으로 차별적으로 조절되는 것으로 보고된 유전자, 예컨대, recA 및 LexA (Barczak, et al., 2012, Proceedings of the National Academy of Sciences, 6217-6222), 항생제-유도성 산화적 스트레스에 대한 반응으로 OxyR 및 SoxS에 의해 유도되는 유전자 (Dwyer, et al., 2014,

Proceedings of the National Academy of Sciences, E2100-E2109), 및 DNA 복제를 표적화하는 항생제 처리 이후에 증폭되는 복제 기점 (oriC) 근거리에 있는 척도 유전자 (Burgess, 2014, Nat Rev Genet, 362-362, Slager, et al., 2014, Cell, 395-406)를 사용할 수 있다.

[0308] 한 실시양태에서, 본 장치는 유전자 발현 마커 (예컨대, 예를 들어, 16S RNA 및 프리-rRNA)의 특이적인 정량화를 위해, 약물 감수성을 확인하기 위해 (Mach, et al., 2011, The Journal of Urology, 148-153, Rolain, et al., 2004, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 538-541) 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 장치는 다양한 인큐베이션 조건 및 시간 (예컨대, 예를 들어, 10 min 미만, 또는 약 10 min, 20 min, 또는 30 min)하에 적어도 20개의 임상 단리물을 이용하여 유전자 발현에 있어 검출가능한 최소 변화를 확립하는 데 사용될 수 있다.

[0309] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 기술은 임상 샘플의 내성을 정량화하는 상기 방법을 최적화 및/또는 가속화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 장치에서 수행된 검정 결과는 몇 시간이 아닌 몇 분 이내에 이용가능하게 될 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명을 통해서 다양한 부피 규모로 다양한 조작 세트를 수행할 수 있다 (예컨대, 예컨대, 예를 들어, 샘플 제조에서부터 단일 세포 조작, 단일 분자 정량화, 및 휴대폰 판독).

[0310] 일부 실시양태에서, 본 발명은 디지털 단일 분자 측정을 사용하여 항미생물제 감수성을 처리하고, 검출 한계를 급진적으로 개선시킬 수 있고, 오염과 병원체를 구별하는 데 중요하고, 약물 내성 유기체와 감수성 유기체를 조기에 구별할 수 있도록 하는 데 중요한 정량적 데이터를 제공할 수 있는 초민감성 측정을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 항생제에 대한 반응으로 표현형, 대사, 및 유전자 발현 프로파일링을 측정하는 데 사용될 수 있고, 이는 개별 박테리아 세포를 사용할 수 있고, 임상적 환경으로부터 기원하는 샘플을 사용할 수 있다.

[0311] 일부 실시양태에서, 본 발명은 임상 진료소에서 고처리량 단일 박테리아-세포 측정을 사용하여 항생제 감수성을 측정한다. 일부 실시양태에서, 본 발명을 통해 개별 미생물 또는 세포, 예컨대, 예를 들어, 임상적 인간 샘플로부터 또는 환경 샘플로부터 수득된 샘플의 상태를 구별할 수 있고, 항생제에 대한 그의 개별 반응을 시간적으로 정량화할 수 있으며, 이로써, 초고속으로 약물 감수성을 측정할 수 있다.

[0312] 일부 실시양태에서, 본 장치는 신속하게 세포를 확인하고, 그의 로드를 정량화하고, 그의 감수성 프로파일을 제공하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 세포를 약물과 인큐베이션시킨 후, 핵산, 예컨대, 예를 들어, RNA를 무오염 플랫폼에서 신속하게 추출 및 정량화하여 약물 감수성을 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명을 통해 CLIA 임상 실험실 외부에서도 미생물 및 세포를 확인 및 약물 감수성 검사를 수행할 수 있다.

[0313] 일부 실시양태에서, 본 장치를 통해 신속하게 및 효율적으로 핵산을 추출할 수 있으면서, 다중 단계에 걸쳐 대량의 샘플을 취급할 수 있다. 샘플 제조 슬립칩은 C. 트라코마티스와 혼합된 소변으로부터 박테리아 RNA를, 및 HCV 바이러스 입자와 혼합된 혈액 혈장으로부터 바이러스 RNA를 추출 및 정제하는 것에 대해 앞서 입증된 바 있다. 본 장치는 0.5 mL 임상 샘플을 프로세스할 수 있고, 및 원료 샘플에서부터 정제된 핵산까지 전체 작업 흐름은 사용자의 개입 없이도 5분 이내에 완료될 수 있다. 본 장치는 C. 트라코마티스와 혼합된 소변 샘플로부터의 박테리아 DNA를, HIV 바이러스 입자와 혼합된 혈액 혈장으로부터의 바이러스 RNA를 및 인플루엔자 바이러스의 배양물로부터 바이러스 RNA를 분석하는 것에 대해 입증된 바 있다.

[0314] 일부 실시양태에서, 본 발명은 핵산 정량화를 도입한, 세포 또는 미생물의 약물 내성을 측정하는 장치를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 약물과 함께 미리 인큐베이션된 유기체로부터 유래된 샘플이 상기 기술된 장치 내로 도입된 장치를 포함한다.

[0315] 일부 실시양태에서, 본 장치는 준치사 용량의 약물 노출 이후에, 예컨대, 예를 들어, OriC에 근접해 있는 유전자 (예컨대, 예를 들어, 면역 적격성 유전자)와 같은, 유전자의 발현의 변화 또는 유전자 카피수 변화를 측정한다. 일부 실시양태에서, 유전자 발현, 예컨대, OriC에 인접한 유전자의 발현을 하우스홀드 유전자의 발현과, 또는 선택된 유전자와, 예컨대, 종결인자 (ter) 부위에 위치하는 유전자와 비교할 수 있다.

[0316] 일부 실시양태에서, 본 장치는 약물 감수성에 대한 검정법으로서 준치사 용량의 약물에 대한 반응으로 세포 적격성 그 자체를 사정할 수 있다.

[0317] 일부 실시양태에서, 본 장치는 확률론적 한정을 통해 (예컨대, 피코리터 또는 나노리터와 같은 작은 크기의 소적 또는 웰을 통해) 소량으로 세포 또는 미생물을 구획화함으로써 박테리아 감수성, 예컨대, 예를 들어, β-락탐 항생제에 대한 감수성을 검정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 혈액 또는 소변 또는 CSF로부터

채취된 것이다. 일부 실시양태에서, 세포는 항생제 또는 형광원성 리포터의 존재하에 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 지속 생존물(persister) 및 유전자형 방식으로 내성을 검출할 수 있지만, 표현형상으로는 침묵형인 세포를 예컨대, 예를 들어, 내성 표현형의 유도에 의해 검출할 수 있다.

[0318] 일부 실시양태에서, 본원의 장치 및 방법은 시간 추이에 따른 샘플 중 미생물의 유전자 발현을 분석하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 분석은 약물에 대한 반응으로 나타나는 유전자 발현의 변화를 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 약물 처리 직전 및 미생물에 약물을 첨가한 후 1회 이상의 시간 간격 (상기 시간 간격은 약 3분, 약 5분, 약 7분, 약 10분, 약 15분, 약 20분 중 하나 이상의 것을 포함할 수 있다)을 둔 유전자 발현 시점이 사용될 수 있다.

[0319] 일부 실시양태에서, 본원의 장치 및 방법은 제어된 온도, 예컨대, 예를 들어, 35℃, 37℃, 38℃, 39℃, 또는 40℃에서 미생물을 인큐베이션시키는 것을 포함할 수 있다.

[0320] 단일 세포 분석 사용을 통해 빠르게 반응하는 아웃라이어(outlier) 세포가 평균 결과보다 더 이른 시점에 결과를 제공할 수 있도록 하면서, 확률론적 반응 시간을 관찰할 수 있게 될 것이다.

[0321] 일부 실시양태에서, 본 장치는 병원성 박테리아에서 항생제 처리에 대한 상대적인 핵산 농도의 작은 변화 및 이종성 세포 반응을 검출하는 단일 분자 및 단일 세포 측정을 수행하는 기전을 제공한다 (도 9). 먼저, 세포 군을 항생제로 처리한 후, 선택된 유전자 발현의 변화를 2가지 방법으로 정량화한다. 단일 분자 디지털 증폭의 경우, 세포를 함께 용해시킨 후, 고감도로 RNA를 정량화하여 작은 전체 변화를 검출한다. 단일 세포 측정의 경우, 세포를 미세유체 장치 중의 개별 웰로 한정시키고, 각 세포 상의 qPCR을 사용하여 "감시" 세포에서의 큰, 조기 반응을 이용한다.

[0322] 일부 실시양태에서, 본 장치를 이용하여 본 발명자들의 장치에서 단리물 및 임상 샘플로부터의 박테리아를 검정할 수 있고, 단일 세포 분석이 풀링된 세포 분석에서 가능한 것보다 더 이른 조기 시점에 감수성 또는 내성을 예측하는 "감시 세포"임을 밝혀낼 수 있는지 여부를 평가할 수 있다 (도 9). 일부 실시양태에서, 본 장치를 이용하여 모든 왕성한 세포가 성장 기색을 확실하게 나타낼 수 있도록 하는 데 필요한 최소량의 시간을 측정하기 위해 장치내 배지 및 성장 조건을 최적화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치를 사용하여 약물 감수성 및 약물 내성, 예를 들어, 크렙시엘라 뉴모니아에, 슈도모나스 아에루기노사, 또는 장외 병원성 에스케리키아 콜라이의 항생제 감수성 및 내성을 측정하는 신속한 검정법을 디자인 및 최적화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 이종내성 (시험 샘플이 감수성 균주 또는 세포 및 내성 균주 또는 세포, 둘 모두를 함유하는 경우)을 검출할 수 있다. 이러한 현상은 그람 양성 박테리아 (Musta, et al., 2009, Journal of Clinical Microbiology, 1640-1644, Kim, et al., 2002, Journal of Clinical Microbiology, 1376-1380, Wong, et al., 1999, Clinical Infectious Diseases, 760-767, Ariza, et al., 1999, The Lancet, 1587-1588, Editors, 2001, Journal of Medical Microbiology, 1018-1020) 및 일부 그람 음성 (Pournaras, et al., 2007, Journal of Medical Microbiology, 66-70)에 대하여 문서상으로 잘 입증되어 있고, 비록 이종내성 검출이 그람 음성 박테리아에 대하여 빈번하게 나타나는 임상 문제로서 간주되는 것은 아니지만, 환자 치료 및 결과와 관련은 있다. 일부 실시양태에서, 이종내성이 관찰될 때, 본원에 개시된 장치를 사용하여 샘플 유형에 의해 이종내성을 확인할 수 있고, 이로써, 이는 예컨대, 예를 들어, 단일 세포 플랫폼에 의한 분석용으로 표적화될 수 있다.

[0323] 일부 실시양태에서, 본 장치를 사용하여 예컨대, 예를 들어, K. 뉴모니아에의 단리물을 예를 들어, 세파졸린, 세프트리악손, 시프로플록사신, 피페라실린-타조박탐, 트리메토프림-술파메톡사졸, 및 메로페넴의 항생제 샘플과 함께, 및 P. 아에루기노사의 단리물을 시프로플록사신, 피페라실린-타조박탐, 메로페넴의 항생제 샘플과 함께 인큐베이션시키는 것과 같이, 미생물 또는 세포를 인큐베이션시킬 수 있다.

[0324] 일부 실시양태에서, 본 장치를 통합하여 예를 들어, 샘플-프렙 슬립칩 및 디지털 슬립칩을 통합시켜 작업 흐름/효율을 개선시키고, 오염을 회피할 수 있다. 두 칩의 통합은 RNA 분해를 막고, 오염을 제거하며, 작업 흐름을 간소화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 통합될 수 있고, 이로써, 예를 들어, 장치는 확인 장치 및 AST 장치를 조합하여 병원체, 그의 로드, 및 그의 항생제 감수성을 확인할 수 있다 (도 10).

[0325] 일부 실시양태에서, 본 발명은 박테리아를 확인하고, 정량하고, 항미생물제 감수성을 사정한다. 일부 실시양태에서, 플랫폼은 시험 메뉴의 확장을 허용하는 "개방" 포맷으로 심지어 최소 규모의 임상 실험실까지도 저비용 디지털 PCR 능력을 가능하게 하면서, 대부분의 실험실에서 발견된 현존 열순환기를 강화시킨다. 본 장치의 일부 실시양태에서, 샘플 제조는 외부력을 필요로 하지 않는 거대유체 1회용 칩에 대해 수행될 수 있다.

[0326] 일부 실시양태에서, 본 발명은 1차 치료 및 전체 건강 환경에서 기술에 접근할 수 있도록 하기 위해 항미생물제 감수성을 CLIA-보류 구조로 정량화 및 사정할 수 있는 능력을 도입한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 슬립칩 플랫폼 상에서 잘 연구되어 왔고, 다양한 환경 조건하에서 무장비 검사가 이루어지게 할 수 있는 등온 효소를 사용한다. 추가로, 일부 실시양태에서, 결과는 휴대폰으로 판독가능하며, 최소로 훈련받은 사용자에 의해 얻을 수 있다.

[0327] 일부 실시양태에서, 본 장치는 혈액과의 사용을 위해 변형될 수 있고, 이는 또한 시험 스위트에 아시네토박터 바우만니이(*Acinetobacter baumannii*) 또한 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 존재비가 낮은 표본과 사용될 수 있고, RT PCR 능력을 가지며, 이를 통해 심지어 존재비가 낮은 표본에서도 항미생물제 감수성을 더욱 정확하게 검사할 수 있다. 이러한 능력은 병원 환경에서 유의적으로 임상적인 가치를 제공한다.

[0328] 일부 실시양태에서, 본 장치는 종 확인 및 정량화를 거쳐 감염, 예컨대, 예를 들어, 요로 감염 (UTI)을 신속하게 진단할 수 있고, 일부 실시양태에서, 본 장치는 또한 감염을 유발하는 종의 약물 내성의 특징을 규명할 수 있다. 따라서, 본 장치는 항생제를 관리할 수 있고, 또한 UTI가 존재하지 않을 때, 또는 박테리아 계수가 요법을 정당화시키지 못할 때, 비적절한 치료를 회피할 수 있는 임상의 능력을 유의적으로 증진시킬 수 있다.

[0329] 일부 실시양태에서, 의사는 전형적으로는 더 낮은 저농도의 박테리아는 치료하지 못하는 바, 본 장치는 박테리아 로드가 요법을 정당화시키는지 여부를 측정하기 위해 샘플 수집시에 존재하는 박테리아의 개수를 정량화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치에 대해 입증 또한 수행될 수 있다. 본 장치로부터의 박테리아 농도는 박테리아 검출 및 특징 규명을 위한 현행 "최적 표준(gold standard)" 배양 방법을 사용하여 수득된 콜로니 계수와 상관관계를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 디지털 칩 포맷 상에서 핵산 검출을 사용하여 어떤 박테리아가 존재하는지 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0330] 일부 실시양태에서, 본 장치는 확인된 유기체의 항미생물제 내성을 사정하여 최상의 요법을 가이드하는 데 도움을 줄 수 있도록 하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플, 예컨대, 소변 샘플을 다양한 약물, 예컨대, 항생제와 함께 인큐베이션시킬 수 있고, 유전자 발현 시험을 통해 (예를 들어, 박테리아가 어느 약물에 대하여 감수성인지를 확인함으로써) 어떤 약물 요법이 감염을 치료하는 가장 적합한지를 결정할 수 있다.

[0331] 일부 실시양태에서, 본 장치는 99% 초과의 특이성으로 박테리아 종을 확인할 수 있고, 3배 더 우수한 고감도로 100 CFU/mL 내지 1,000,000 CFU/mL의 동적 범위에 걸쳐 소변 중의 박테리아 로드를 정량화할 수 있다.

[0332] 본 장치 및 방법의 일부 실시양태에서, 작업 흐름을 통해 95분 미만, 30분 미만, 15분 미만, 5분 미만 내에 하나 이상의 약물 패널에 대한 하나 이상의 종 또는 균주 또는 세포 유형의 신속한 AST (항미생물제 감수성 검사)를 수행할 수 있다.

[0333] 일부 실시양태에서, 본 장치는 샘플 제조 및 디지털 정량화를 수행할 수 있고, 이로써, 적어도 80%의 핵산 회수율로 AST를 위해 박테리아 로드 정량화 및 유전자 발현 정량화, 이 둘 모두를 위해 사용될 수 있는 통합 장치이다.

[0334] 일부 실시양태에서, 본 장치는 확인 장치 및 AST 장치를 조합하여 유기체를 확인하고, 그의 로드를 정량화하고, 그의 항생제 감수성을 측정할 수 있는 작업 흐름을 가능하게 한다.

[0335] 소변으로부터의 샘플 제조 장치는 현존 퀴아젠 샘플 제조 키트와 비교하여 표준 핵산 기준으로 적어도 80%의 핵산 회수율을 가진다. 일부 실시양태에서, 샘플 제조는 자동적으로, 원심분리 없이, 5 min 내에 수행될 수 있는 반면, 퀴아젠 방법은 30 min이 소요된다.

[0336] 일부 실시양태에서, 박테리아 종 확인은 배양과 비교하여 유기체에 대하여 99% 초과의 특이성으로 수행될 수 있다.

[0337] 일부 실시양태에서, 예컨대, 소변 중 살아있는 박테리아 로드의 정량화는 일반 배양 방법과 비교하여 3배 더 우수한 고감도로 100 CFU/mL 내지 1,000,000 CFU/mL의 동적 범위에 걸쳐 수행될 수 있다.

[0338] 일부 실시양태에서, 본 발명은 95 min 내에 약물 또는 2종 이상의 항생제 패널에 대한 1개의 종 또는 다중 종의 신속한 AST (항미생물제 감수성 검사)를 허용하는 작업 흐름을 가능하게 한다.

[0339] 일부 실시양태에서, 본 발명은 준비 모듈 또는 장치, 확인 및 정량화 모듈 또는 장치 및 AST 모듈 또는 장치를 조합하여 2.5시간 미만, 2시간 미만, 1시간 미만, 30분 미만 내에 유기체를 확인하고/거나, 그의 로드를 정량화하고/거나, 그의 항생제 감수성을 측정할 수 있는 작업 흐름을 가능하게 한다.

[0340] 일부 실시양태에서, 본 장치는 참조 실험실에서 전형적으로 사용되는 장비와 유사한 품질로 CLIA-기반 및 자원이 제한된 환경 (LRS)에서 핵산 또는 단백질을 멀티플렉스 방식으로 및 정량적으로 진단 측정한다.

[0341] 일부 실시양태에서, 플랫폼은 "개방형"이며, 이로써, 다른/추가 박테리아에 대한 시약이 첨가될 수 있고, 측정 범주는 확장될 수 있다.

[0342] 일부 실시양태에서, 본 장치를 통해 $10^5$의 동적 범위로 HCV 및 HIV 바이러스 로드를 멀티플렉스 방식으로 및 디지털 핵산-기반으로 정량적으로 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치를 통해 병원체 (박테리아 및 진균 포함)를 멀티플렉스 방식으로 검출할 수 있다.

[0343] 일부 실시양태에서, 본 장치는 미세유체 장치, 예컨대, 하기 특징들 중 하나 이상을 가지는 샘플 제조를 가능하게 하는 슬립칩이다: 저비용 제작을 위한 상업적 표준을 충족 또는 초과하는 장치, 궁극적으로 사용자 개입을 필요로 하지 않는 장치, 궁극적으로 작동을 위해 전기를 필요로 하지 않는 장치, 5 min 내에 HCV, 클라미디아, 및 고노레아, 및 인플루엔자에 대한 샘플 프렙을 가능하게 하는 샘플-프렙 모듈 또는 장치, 저렴한 플라스틱을 사용하고, 대량 생산 기술을 쉽게 받아들일 수 있는 장치, 작동 및 영상화가 미숙련 아동에 의해 수행될 수 있는 장치, 및 작동 및 영상화가 자동 클라우드 기반 분석 및 데이터 전송을 사용하여 수행될 수 있는 장치.

[0344] 일부 실시양태에서, 본 장치는 99% 초과의 특이성으로 박테리아 종을 확인할 수 있고, 3배 더 우수한 고감도로 100 CFU/mL 내지 1,000,000 CFU/mL의 동적 범위에 걸쳐 소변 중의 박테리아 로드를 정량화할 수 있다.

[0345] 일부 실시양태에서, 본 장치는 소변 임상 샘플로부터 유기체, 예컨대, 예를 들어, 크렙시엘라 뉴모니아에, 슈도모나스 아에루기노사, 및 장외 병원성 에스케리키아 콜라이로부터 박테리아 DNA 및 RNA를 확인하고, 그를 정량적으로 측정할 수 있고, 적합화하여 박테리아 로드의 정량적 척도 또한 제공할 수 있다.

[0346] 일부 실시양태에서, 본 장치는 K. 뉴모니아에, P. 아에루기노사, 및 이. 콜라이와 혼합된 소변 샘플로부터 추출된 박테리아 DNA 및 RNA의 확인 및 정량화를 위한 디지털 미세유체 장치, 예컨대, 디지털 슬립칩이다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 유기체 또는 세포에 대한 DNA/RNA 증폭에 대하여 99% 초과의 특이성을 가질 수 있고, 3배의 고감도로 1,000 내지 1x107개의 카피/mL의 동적 범위에 걸쳐 추출된 DNA/RNA를 정량화한다.

[0347] 일부 실시양태에서, 본 장치는 디지털 미세유체 장치, 예컨대, 디지털 슬립칩으로서, 16S rRNA의 정량화에 의해 소변 샘플 중 살아있는 박테리아 로드를 정량화하는 데 사용될 수 이다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 신속한 인큐베이션 단계 (10 min 미만)를 도입할 수 있고, 다양한 보관 조건하에서 상이한 샘플 유형에 대한 유전자 발현의 재정규화를 평가할 수 있다.

[0348] 일부 실시양태에서, 본 장치는 표준 벤치 방법을 사용하여 정제된 RNA 마커를 정량화하여 살아있는 박테리아 로드를 정량화할 수 있는 디지털 미세유체 장치, 예컨대, 디지털 슬립칩이다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 참조 균주 및 K. 뉴모니아에, P. 아에루기노사, 및 이. 콜라이의 임상 단리물의 경우, DNA 및 RNA, 둘 모두에 대하여 80% 초과의 회수율을 가질 수 있는 샘플-프렙 장치, 예컨대, 샘플-프렙 슬립칩이다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 디지털 장치 적용 및 실시간 qPCR, 둘 모두에 적합한, 정제된 DNA 및 RNA의 품질을 회복시킬 수 있다.

[0349] 일부 실시양태에서, 본 장치는 5분 미만 내에 표준 벤치 방법과 비교하여 80% 초과의 회수율로 K. 뉴모니아에, P. 아에루기노사, 및 이. 콜라이의 참조 균주와 혼합된 소변 샘플로부터 박테리아 DNA 및 RNA를 추출 및 정제할 수 있다.

[0350] 일부 실시양태에서, 본 방법은 다관능성을 가진 통합 장치를 이용하고, 다른 실시양태에서, 본 방법은 비-통합 장치, 예컨대, 별개의 샘플-트렙 장치 및 확인 및 정량화를 위한 디지털 장치를 이용한다. 일부 실시양태에서, 확인을 위해 통합된 샘플-프렙 장치 및 디지털 장치의 조합을 99% 초과의 특이성으로 성능을 수행하고, 3배 고감도로 100 CFU/mL 내지 1,000,000 CFU/mL의 동적 범위에 걸쳐 박테리아 로드를 정량화할 수 있다.

[0351] 일부 실시양태에서, 본 장치는 단기간 동안 샘플을 약물과 인큐베이션시킨 후, 이어서 RNA 발현 마커를 정량화함으로써 유기체, 예컨대, K. 뉴모니아에, P. 아에루기노사 및 이. 콜라이에 대한 신속한 항미생물제 감수성 시험 (AST)을 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 샘플에 2.5시간 미만 또는 2시간 미만 또는 1시간 미만의 턴어라운드 답변 기회를 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 임상 단리물 또는 임상 샘플과 함께 사용될 수 있다.

[0352] 일부 실시양태에서, 본 장치는 100개의 카피/mL 내지 10,000,000개의 카피/mL의 동적 범위에 걸쳐 유전자 발현

마커를 정량화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 같은 동적 범위에 걸쳐 검출가능한 최소의 차이를 확인하는 데 사용될 수 있고, 이는 특정 세포 또는 미생물에 대한 인큐베이션 시간 및 항미생물제 감수성 시험에 대한 가이드라인을 제공할 것이다.

[0353] 일부 실시양태에서, 본 장치는 암피실린의 존재 또는 부재에서 적어도 20개의 이. 콜라이의 임상 단리물과 함께 샘플을 인큐베이션시키는 데 사용될 수 있다. 본 장치의 일부 실시양태에서, 박테리아 RNA가 제조될 수 있고, 하나 이상의 RNA 마커가 정량화될 수 있다. 본 장치의 일부 실시양태에서, 결과는 표준 임상 방법과 동일하게 적어도 95%가 될 것이다.

[0354] 일부 실시양태에서, 본 장치는 이. 콜라이를 약물, 예컨대, 세파졸린, 세프트리악손, 시프로플록사신, 피페라실린-타조박탐, 트리메토프림-술파메톡사졸, 및 메로페넴을 비롯한 항생제와 함께 인큐베이션시키는 데 사용될 수 있다. 본 장치의 일부 실시양태에서, 박테리아 RNA가 제조될 수 있고, 디지털 방법을 사용하여 95 min 미만, 60분 미만, 30분 미만, 15분 미만이라는 기간 내에 RNA 마커의 발현 수준을 정량화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 세파졸린, 세프트리악손, 시프로플록사신, 피페라실린-타조박탐, 트리메토프림-술파메톡사졸, 및 메로페넴의 존재 및 부재에서 적어도 20개의 이. 콜라이의 임상 단리물과 혼합된 음성 소변을 인큐베이션시키는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 5% 미만의 중요 오류, 및 매우 중요한 오류가 없는 작업 흐름 성능으로 RNA 마커의 발현 수준을 정량화할 수 있다.

[0355] 일부 실시양태에서, 본 장치는 약물 또는 임상적으로 관련된 약물 패널의 존재 및 부재에서 적어도 하나의 임상 단리물의 샘플을 인큐베이션시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 박테리아 DNA 중 RNA 마커의 발현 수준을 정량화하여 AST를 수행할 수 있고, 5% 미만의 중요 오류를 가지고, 매우 중요한 오류는 없다.

[0356] 일부 실시양태에서, 본 장치는 샘플 제조 및 디지털 능력을 통합한다. 장치 통합은 분해를 막을 수 있고, 오염을 제거하며, 99% 초과의 특이성으로 55분 미만, 30분 미만, 15분 미만 내에 핵산 추출, 정제, 및 디지털 정량화를 가능하게 한다.

[0357] 일부 실시양태에서, 본 장치는 99% 초과의 특이성으로 55분 미만 내에 예컨대, K. 뉴모니아에 (ATCC 700603), P. 아에루기노사 (ATCC 27853), 및 이. 콜라이 (ATCC 25922)와 혼합된 소변 샘플로부터 박테리아 DNA 및 RNA를 정량적으로 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 장치 또는 통합 장치는 3배 더 우수한 고감도로 100 CFU/mL 내지 1,000,000 CFU/mL의 동적 범위에서 박테리아 로드를 정량화할 수 있다.

[0358] 일부 실시양태에서, 본 장치는 선택된 약물의 존재 및 부재에서 인큐베이션된 적어도 20, 적어도 50 또는 적어도 100개의 임상 단리물에 대한 유전자 발현 수준을 정량화하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 박테리아 로드 및 AST를 비롯한 본 장치의 성능은 CLSI 참조 방법과 유사하다. 일부 실시양태에서, 성능 오류는 5% 미만의 가벼운 오류, 2.5% 미만의 가벼운 오류, 1% 미만의 가벼운 오류이다.

[0359] 일부 실시양태에서, 성능은 1% 미만의 중요 오류, 0.5% 미만의 중요 오류, 0.1% 미만의 중요 오류을 가진다. 일부 실시양태에서, 본 장치는 매우 중요한 오류는 없다.

[0360] **키트**

[0361] 키트는 슬립칩 장치, 및 핵산 증폭에 참여하도록 하는 데 선택된 시약 공급물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시약은 제1 성분의 도관, 제2 성분의 도관, 또는 그 둘 모두와 맞물리도록 적합화된 용기에 배치되어 있을 수 있다. 상기 용기는 피펫, 시린지 등일 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 히터를 포함한다.

[0362] 본 장치의 일부 실시양태는 핵산 표지를 사용하여 상이한 생물학적 표적, 예컨대, 예를 들어, 단백질, 박테리아, 바이러스, 감염원 등을 검출하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적에, 검출에 사용될 수 있는 올리고뉴클레오티드를 태그부착한다. 올리고뉴클레오티드 태그는 다수의 상이한 핵산 증폭 전략법, 예컨대, 예를 들어, PCR, LAMP, RPA, NASBA, RCA 등 중 어느 하나를 사용하여 추가로 증폭될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 태그는 또한 예를 들어, 첸(Chen) (후앙(Huang), 쑤센(Suxian), 및 용첸(Yong Chen))에 의해 제시된 바와 같이, 형광성 프로브를 사용하여 시각화될 수 있다.

[0363] 문헌 ["Polymeric Sequence Probe for Single DNA Detection." *Analytical chemistry* 83.19 (2011): 7250-7254)].

[0364] **실시예**

[0365] 본 실시예는 본원에서 제공하는 특허청구범위의 범주를 제한하고자 하는 것인 아니라, 단지 예시 목적으로 제공

되는 것이다.

[0366] **실시예 1: 슬립칩 형성**

[0367] 소다 석회 유리를 사용하여 원하는 유리 슬립칩을 제작하는 방법은 이전 연구에 기초하였다. 2 단계 노출-에칭 프로토콜을 적합화하여 깊이가 다른 웰 2개를 생성하였다 (열 확장 웰의 경우, 5 ㎛, 나머지 다른 웰의 경우, 55 ㎛). 에칭 후, 유리 플레이트를 피라냐산 및 DI 수로 철처하게 세정하고, 질소 가스로 건조시켰다. 이어서, 유리 플레이트를 10분 동안 플라스마 클리너 중에서 산화시키고, 1시간 동안 실란 처리하기 위해 데시케이터로 바로 옮겼다. 이를 클로로포름, 아세톤, 및 에탄올로 철처하게 세정하고, 사용 전에 질소 가스로 건조시켰다.

[0368] 플라스틱 폴리카르보네이트 슬립칩 장치를 미세유체 칩숍 게엠베하(ChipShop GmbH)로부터 받은 후에 이를 15분 동안 플라스마 클리너 중에서 바로 산화시킨 후, 90분 동안 실란 처리하기 위해 데시케이터로 옮겼다. 이를 65 ℃에서 15분 동안 테트라데칸 중에 침지시킨 후, 이어서, 에탄올로 철저하게 세정하고, 이어서, 사용 전에 질소 가스로 건조시켰다. 플라스틱 슬립칩 장치는 재사용하지 않았다.

[0369] 슬립칩을 기체가 제거된 오일 (광유: 테트라데칸 1:4 v/v; 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific)) 하에서 어셈블리하였다. 상부 및 하부 플레이트, 둘 모두를 오일상 내에 침지시키고, 면 대 면으로 마주하도록 배치하였다. 두 플레이트를 입체경 (레이카(Leica: 독일)) 하에 정렬하고, 바인더 클립을 사용하여 고정시켰다. 유체 유입구로서의 역할을 하는 스루-홀 2개를 상부 플레이트에 드릴링하여 만들었다. 피펫팅에 의해 시약 용액을 유입구를 통해 로딩하였다.

[0370] **실시예 2: 슬립칩에서의 디지털 증폭**

[0371] 문헌 [Shen et al. 2010). Feng Shen, Wenbin Du, Jason E. Kreutz, Alice Fok, and Rustem F. Ismagilov, "Digital PCR on a SlipChip," Lab Chip **2010** 10: 2666-2672]에 기술된 프로토콜에 따라 슬립칩 상에서 디지털 PCR을 수행하였다.

[0372] 간략하면, 상기 공개된 방법에서, 상부 및 하부 슬립칩 플레이트를 미세유체 채널 및 웰과 함께 포토리소그래피 및 HF 에칭을 통해 에칭하였다. 상부 및 하부 플레이트를 20% 광유/80% 테트라데칸의 혼합물 중에서 정렬한 후, 클램핑하여 제자리에 고정시켰다. 상기 기술된 추출물로부터의 DNA를 PCR 마스터 믹스에 첨가하였다. 피펫으로 상기 용액을 슬립칩 장치 내로 로딩하였다. 로딩한 후, 슬립은 채널을 1,280개의 3 nL 개별 구획으로 분리시켰다. 이어서, 슬립칩을 크램핑하고, 실링하고, 하기 온도에 대해 열순환기 상에 배치하였다: 3분 동안 92℃, 20초 동안 92℃, 20초 동안 62℃, 및 25초 동안 72℃로 40 사이클. 슬립칩을 영상화하고, 양성 및 음성 웰을 계수하고, 푸아송 통계치를 사용하여 표적 DNA의 농도를 계산하였다.

[0373] **실시예 3: 시간 경과에 따른 처리/비처리된 감수성 이. 콜라이 사이의 rDNA 차이 검출**

[0374] 한 실험에서, 요로 감염 환자로부터의 시프로플록사신 감수성 이. 콜라이 단리물을 높은 세포 밀도로 박토 뇌심장 침출 (BHI) 배지 중에서 미리 배양한 후, 희석하고, 10, 20, 및 30분 동안 2.5 ug/mL 시프로플록사신으로 처리 및 처리하지 않았다. 처리 및 비처리 샘플로부터의 DNA를 에피센터 퀵익스트랙트(Epicentre QuickExtract) DNA 추출용 완충제를 이용하여 추출하였다. 23S에 대한 표적 rDNA 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 정량적 PCR을 수행하였다. 23S rDNA에 대한 특이적인 하기 프라이머를 사용하였다:

[0375] 5'-TGCCGTAACTTCGGGAGAAGGCA-3' (서열식별번호(SEQ ID NO): 1)

[0376] 5'-TCAAGGACCAGTGTTCAGTGTC-3' (서열식별번호: 2).

[0377] 10, 20, 및 30분째, 처리된 샘플 (각 시점에서 우측 막대) 및 비처리된 샘플 (각 시점에서 좌측 막대) 사이에는 1.37, 1.58, 및 1.70배의 rDNA 카피수 변화가 있는 것으로 측정되었다 (도 11).

[0378] **실시예 4: qPCR 및 디지털 PCR에 의한 시간 경과에 따른 처리/비처리된 감수성 및 내성 이. 콜라이 사이의 rDNA 차이 검출**

[0379] 한 실험에서, 요로 감염 환자로부터의 시프로플록사신 감수성 이. 콜라이 단리물을 높은 세포 밀도로 박토 뇌심장 침출 배지 중에서 미리 배양한 후, 희석하고, 30분 동안 2.5 ug/mL 시프로플록사신으로 처리 및 처리하지 않았다. 처리 및 비처리 샘플로부터의 DNA를 0, 15, 및 30분째에 에피센터 퀵익스트랙트 DNA 추출용 완충제를 이용하여 추출하였다. 실시예 3에서 제공된 바와 같은 표적 23S rDNA 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 추출된 DNA에 대하여 정량적 PCR을 수행하였다. 15분째, 감수성 단리물로부터의, 처리된 샘플 (각 시점에서 우

측 막대) 및 비처리된 샘플 (각 시점에서 좌측 막대) 사이에는 1.27배의 rDNA 카피수 변화가 있는 것으로 측정되었다 (도 12a).

[0380] 실시예 3에서 제공된 바와 같은 표적 23S rDNA 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 슬립칩 중 추출된 DNA에 대하여 디지털을 수행하였다. 한 칩은 처리되지 않은 박테리아로부터의 DNA를 함유한 반면, 나머지 다른 한 칩은 항생제로 처리된 박테리아로부터의 DNA를 함유하였다. 농도를 비교하고, 차이 배수를 계산하였다. 디지털 PCR을 통해 1.5배의 rDNA 카피수 변화가 검출되었다. 내성 단리물에 대해서는 rDNA 카피수에 있어서 어떤 유의적인 변화도 관찰되지 않았다 (도 12b).

[0381] 본 실험을 시프로플록사신에도 감수성인, 요로 감염 환자로부터의 상이한 이. 콜라이 단리물에 대하여 반복하였다. 15분째, qPCR을 통해 1.8배의 rDNA 카피수 변화가 측정되었고, 디지털 PCR을 통해 1.5배의 rDNA 카피수 변화가 측정되었다.

[0382] **실시예 5: 디지털 PCR에 의한 시간 경과에 따른 처리/비처리된 감수성 이. 콜라이 사이의 rDNA 차이 검출**

[0383] 한 실험에서, 요로 감염 환자로부터의 시프로플록사신 감수성 이. 콜라이 단리물을 풀링된 인간 소변 중에서 미리 배양한 후, 15분 동안 0.75 ug/mL 시프로플록사신을 포함 및 포함하지 않는 1:1 BHI:소변 중에서 희석하고, 처리하였다. 처리 및 비처리 샘플로부터의 DNA를 에피센터 퀵익스트랙트 DNA 추출용 완충제를 이용하여 추출하였다. 실시예 3에서 제공된 바와 같은 표적 23S rDNA 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 추출된 DNA에 대하여 수행되는 정량적 PCR을 사용함으로써 처리 및 비처리된 샘플 사이에는 rDNA 카피수에 있어 2.61배의 변화가 있는 것으로 측정되었다. 또한, 실시예 3에서 제공된 바와 같은 표적 23S rDNA 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 추출된 DNA에 대하여 디지털 PCR을 수행하였다. 디지털 PCR을 통해 2.4배의 rDNA 카피수 변화가 검출되었다. 디지털 PCR 데이터의 결과는 도 13에 제시되어 있다.

[0384] **실시예 6: 테트라사이클린 및 트리메토프림/술파메톡사졸로 처리/비처리된 감수성 및 내성 이. 콜라이의 차이 검출**

[0385] 한 실험에서, 요로 감염 환자로부터 유래되고, 다양한 항생제에 대해 감수성을 띠는 이. 콜라이 단리물을 BHI 또는 소변 중에서 미리 배양한 후, 다양한 처리 시간 동안 항생제를 포함 및 포함하지 않는 1:1 BHI:소변 중에서 희석하고, 처리하였다. 처리 및 비처리 샘플을 에피센터 퀵익스트랙트 DNA 추출용 완충제를 이용하여 추출하였다. 실시예 3에서 제공된 바와 같은 표적 23S rDNA 유전자에 특이적인 프라이머와 함께 정량적 PCR을 사용함으로써 처리 및 비처리된 샘플 사이에는 rDNA 카피수에 있어 검출가능한 변화 배수가 측정되었다. 테트라사이클린 처리하에서는 30분째에 1.55배의 rDNA 카피수 변화가 관찰되었고 (도 14a), 니트로푸란토인 처리하에서는 15분째에 1.62배의 rDNA 카피수 변화가 관찰되었으며, 트리메토프림/술파메톡사졸 처리하에서는 45분째에 1.35배의 rDNA 카피수 변화가 관찰되었다 (도 14b).

[0386] **실시예 7: 내성 세포와 감수성 세포의 차이를 검출하기 위한 qPCR 및 디지털 PCR 비교**

[0387] 본 실시예에서는 qPCR에 비하여 디지털 증폭의 분석이 증진되어 있음을 제시한다. 구체적으로, 항생제로 처리되지 않은 것과 비교하여 처리된 박테리아에서 발견되는 핵산의 차이를 디지털 핵산 정량화 (PCR 또는 LAMP 포함)를 이용하여 분석할 수 있는 반면, qPCR 방법 (또는 qLAMP)은 그 차이를 신뢰할 수 있게 분석할 수 없고/거나, 다수의 더 많은 복제물을 사용하지 않고는 그 차이를 신뢰할 수 있게 분석할 수 없다.

[0388] 요로 감염 환자로부터의 시프로플록사신 감수성 이. 콜라이 단리물을 풀링된 인간 소변 중에서 미리 배양한 후, 30분 동안 0.75 ug/mL 시프로플록사신을 포함 및 포함하지 않는 1:1 BHI:소변 중에서 희석하고, 처리하였다. 처리 및 비처리 샘플로부터의 DNA를 에피센터 퀵익스트랙트 DNA 추출용 완충제를 이용하여 추출하였다.

[0389] 실시예 3에서 제공된 것과 같은 프라이머와 함께 표적 32S rDNA 유전자 (샘플당 3개의 복제물)에 특이적인 프라이머를 사용하여 각 샘플에 대하여 정량적 PCR을 수행하였고, 하기 Cq를 얻었다: 처리--22.84 +/- 0.53; 비처리--22.13 +/- 0.07. 문헌 [Weaver, et al. "Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution," Methods 2010 50: 271-276]에 기술된 방법을 사용할 때, 각 샘플에 대하여 3개 대신 10개의 qPCR 복제물이 존재하는 것이 아니라면, rDNA 카피수에 있어 1.6배의 차이는 통계학상 유의적이지 않다.

[0390] 같은 샘플을 1:10으로 희석하고, 디지털 증폭을 위해 슬립칩에 로딩하였다. 한 칩은 처리되지 않은 박테리아로부터의 DNA를 함유한 반면, 나머지 다른 한 칩은 항생제로 처리된 박테리아로부터의 DNA를 함유하였다. 추출된 DNA에 대하여 디지털 PCR을 수행하여 실시예 3에 제공된 프라이머를 사용하여 23S rDNA를 증폭시켰다.

[0391] 결과를 측정하고, 푸아송 통계치를 사용하여 하기 농도를 계산하였다: 처리--148,031 +/- 7,103개의 카피/mL; 비처리---84,964 +/- 5,171개의 카피/mL. 문헌 [Kreutz et al., "Theoretical Design and Analysis of Multivolume Digital Assays with Wide 동적 범위 Validated Experimentally with Microfluidic Digital PCR," Analytical Chemistry 2011 83: 8158-8168]에 기술된 통계학적 방법을 사용하여, p 값은 2e-13으로, 통계학상 유의적인 차이를 계산하였다.

[0392] 따라서, 디지털 PCR은 처리된 박테리아 DNA 대 처리되지 않은 박테리아 DNA를 성공적으로 분석한 반면, qPCR은 전형적인 개수의 복제물 (3개)을 이용해서는 농도상의 차이를 분석하지 못했다.

[0393] 본 실험과 함께 기술된 통계학적 접근법은 더욱 일반적으로 적용될 수 있다. qPCR 실험으로부터 Cq에서 0.16 이상의 표준 편차가 전형적이다. 상기 표준 편차로 두 샘플 사이의 1.25배의 분석률을 달성하기 위해 qPCR을 18개의 복제물을 필요로 할 수 있다 (Weaver et al. (2010)). 같은 분석률 (1.25)을 위해, 한 디지털 PCR 실험은 디지털 PCR 실험에서 구획 개수가 1,200개를 초과하는 한, 수행될 수 있다 (상기 문헌 동일).

[0394] **실시예 8: 복제 기점 기준의 상대적인 유전자 표적 맵핑**

[0395] UTI 환자와 연관된 16개의 이용가능한 게놈 서열분석된 이. 콜라이 균주의 서브세트에서 feoB, recA, 및 DnaA인히비터(DnaAInhibitor) 단백질 유전자의 위치를 복제 기점 기준으로 상대적으로 맵핑하였다. 본 결과는 FeoB 유전자는 복제 기점에 인접하게 위치하는 경향을 보인 반면, recA 및 DnaA인히비터 단백질 유전자는 복제 기점으로부터 더욱 원거리에 위치한다 (도 15). 복제 개시 이벤트의 결과로서, feoB 유전자는 복제 기점으로부터 feoB 유전자와 유사한 거리에 위치하는, 복제 기점에 가깝게 위치하는 모든 다른 유전자 (예컨대, malB 유전자 (GDB J01648))와 함께 조기에 복제되는 것으로 예상된다.

[0396] **실시예 9: 염색체 복제 데이터의 상이한 시점에서의 DNA 마커**

[0397] 본 실험에서는 1개의 감수성 UTI 이. 콜라이 단리물 및 1개의 내성 UTI 이. 콜라이를 15분 동안 2.5 ug/mL 시프로플록사신으로 처리하였다. 그의 핵산을 퀵엑스트라(QuickExtra) DNA 추출용 키트 (에피센터)로 추출하고, DNA를 rDNA (23S), FeoB 유전자, DnaA 억제 단백질 유전자, 및 RecA 유전자 특이 프라이머를 이용하여 qPCR을 통해 정량화하였다.

[0398] 도 16은 BHI 배지에서 15분 동안 2.5 ug/ml의 시프로플록사신에의 노출 ("처리") 이후 감수성 및 내성인 박테리아에서의 UTI 임상 단리물 이. 콜라이 게놈 중 DNA 단편 카피수의 정량화를 위한 사이클 임계값 (Ct)을 보여주는 것이다. 하기 표 2는 감수성 및 내성의 처리/비처리된 샘플 사이의 각 표적에 대한 사이클 임계값 및 변화 배수를 제공한다.

[0399] <표 2>

| | 23S CT 비처리/처리 | 23S 배수 변화 | FeoB 비처리/처리 | FeoB 배수 변화 | dnaAinh CT 비처리/처리 | dnaAinh 배수 변화 | recA CT 비처리/처리 | recA 배수 변화 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 감수성 | 20.19/20.84 | 1.57 | 23.3/23.71 | 1.33 | 23.93/23.97 | 1.03 | 24.81/24.65 | 0.89 (1.13 상향) |
| 내성 | 20.22/20.13 | 0.94 (1.06 상향) | 23.19/23.1 | 0.94 (1.06 상향) | 23.68/23.89 | 1.16 | 27.19/27.05 | 0.91 (1.10 상향) |

[0400]

[0401] 감수성 균주에서, 항생제로 처리되지 않은 세포와 비교하였을 때, 시프로플록사신으로 처리된 세포는 23S DNA는 1.57배 감소, FeoB DNA는 1.33배 감소를 보였고, dnaAinh DNA는 어떤 변화도 보이지 않았고, recA는 1.13배 증가를 보였다.

[0402] 내성 균주에서, 항생제로 처리되지 않은 세포와 비교하였을 때, 시프로플록사신으로 처리된 세포는 23S DNA 및 FeoB DNA는 어떤 변화도 보이지 않았고, dnaAinh DNA는 1.16배 감소, 및 recA는 1.10배 증가를 보였다.

[0403] 본 실시예에서, 내성 단리물과 비교하였을 때, 감수성 단리물의 게놈에서 더 적은 수의 rDNA (23S DNA) 카피 및 더 적은 FeoB 유전자 카피가 관찰된 반면; 다른 유전자 단편 - dnaA 인히비터 유전자 및 복제 기점으로부터 더

욱 원거리에 위치하는 recA 유전자의 경우, 약물로 처리된 박테리아와 처리되지 않은 박테리아 사이에 통계학상 엄격한 차이는 없었다.

[0404] **실시예 10 - 약물 내성 또는 감수성을 측정하기 위한 표적 mRNA**

[0405] 수개의 관심 표적을 사용하여 본 발명자들의 약물 감수성 검정법을 입증한다. 이는 시프로플록사신에 대하여 내성을 띠는 단리물 중의 표적 FeoB 및 RecA RNA를 포함한다.

[0406] 시프로플록사신의 존재하에서 FeoB 발현은 하향 조절된다. 낮은 수준에서 하향 조절됨에도 불구하고, 이는 감수성인 (분열하지 않거나, 사멸한) 박테리아에서 하향 조절되고, 이로써, 비처리된 세포 또는 내성 세포와 비교하여 우수한 분석을 보장하게 될 것이다.

[0407] 본 실시예에서, FeoB 및 RecA RNA 수준을 사용하여 BHI 배지 중 2.5 ug/mL 시프로 처리 20 min 후 시프로플록사신에 대하여 감수성 또는 내성인 임상 단리물인 세포를 측정하였다. 본 실시예에서는, FeoB 및 RecA 유전자 특이 프라이머를 사용하여 qRTPCR에 의해 RNA 정량화를 수행하였다. 본 실시예에서, FeoB 발현은 항생제 처리 후 감수성 단리물에서 하향 조절되었다. 같은 실험에서 RecA 발현은 감수성 단리물에서 유의적으로 하향 조절되지 않았다.

[0408] feoB 및 recA에 대한 RNA 비를 통해 항생제 처리 20분 후 감수성 및 내성 UTI 이. 콜라이 단리물을 구별할 수 있다.

[0409] 한 예에서, 밤새도록 배양한 배양물로부터의 1개의 감수성 UTI 이. 콜라이 단리물 및 1개의 내성 UTI 이. 콜라이를 가온 BHI 배지 중에서 1:100 (1 mL 중 10 ㎕)으로 희석하고, 37℃에서 ~3-4시간 동안 성장시켰다. 각각의 잘 혼합된 배양물의 두 샘플을 항생제 노출 검정법을 위해 채취하였다. 이를 A) 가온 (37℃) BHI 배지 (대조군) 또는 B) 시프로플록사신이 2.5 ㎍/mL 농도로 첨가된 가온 (37℃) BHI 배지를 함유하는 미리 가온된 1.7 mL VWR 미세원심분리관에 첨가하고; 상기 관 모두에 대한 랙 또한 37℃로 미리 가온시켜 온도 변동을 최소화하였다. 대조군 및 항생제 함유 샘플, 둘 모두를 37℃에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 상기 샘플 A 및 B를 얼음 상에 바로 배치한 후, RLT 완충제 (퀴아젠) 중에 1/5로 희석하였다. 퀴아젠 RNA이지 미니(Qiagen RNAeasy Mini) 키트 칼럼 및 완충제를 사용하여 그의 전체 핵산을 추출하고, 1 단계 RT qPCR을 통해 분석하여 0.3 U/㎕ RNases 억제제 슈퍼라제 인(Superase In) (앰비온(Ambion) 및 1 ㎍/㎕ BSA (로슈(Roche))의 존재하에 맥시마(Maxima) H-RT 및 SSO 고속 에바그린(EvaGreen) PCR 혼합물을 사용하여 FeoB 및 RecA RNA를 정량화하였다. 하기 플롯에 내성 단리물로부터 채취된 샘플은 UTI R로 표시되어 있고, 감수성 샘플로부터 채취된 샘플은 UTI S로 표시되어 있다. 시프로플록사신의 존재하에서 인큐베이션된 샘플은 그의 명치에 "시프로"라고 덧붙여 표시되어 있다.

[0410] 도 17a 및 도 17b는 항생제를 함유하지 않는 BHI 배지에서의 처리 20분 후와 대비되는, BHI 배지 중 2.5 ug/mL의 시프로플록사신으로의 처리 20분 후 시프로플록사신에 대하여 감수성 (S) 및 내성 (R)인 UTI 임상 단리물에서의 FeoB 및 RecA 유전자 발현의 RNA 정량화를 보여주는 것이다. 시프로플록사신에 노출된 감수성 세포와 비교하여, 비처리된 감수성 세포는 2.28의 사이클 차이로 관찰되는 바와 같이, FeoB 표적 발현에 있어 4.86배 증가를 보였다. 내성 세포에서의 유전자 발현에서는 어떤 유의적인 변화도 관찰되지 않았다. 내성 및 감수성 세포, 둘 모두 recA 발현에서는 어떤 유의적인 변화도 보이지 않았다.

[0411] **실시예 11 - 시프로플록사신이 FeoB 및 RecA의 RNA 발현에 미치는 효과**

[0412] UTI 환자로부터 임상 단리물을 수득하고, TSA 혈액 아가 배지 상에서 회수하였다. 혈액 아가 플레이트로부터의 콜로니를 3 mL의 BHI 배지에 접종하고, 밤새도록 성장시켰다. 밤새도록 배양한 배양물로부터의 1개의 감수성 UTI 이. 콜라이 단리물 및 1개의 내성 UTI 이. 콜라이를 가온 BHI 배지 중에서 1:100 (1 mL 중 10 ㎕)으로 희석하고, 37℃에서 약 3시간 동안 성장시켰다. 각각의 잘 혼합된 배양물의 두 샘플을 항생제 노출 검정법을 위해 채취하였다. 이를 A) 가온 (37℃) BHI 배지 (대조군) 또는 B) 시프로플록사신이 10 ug/mL 농도로 첨가된 가온 (37℃) BHI 배지를 함유하는 미리 가온된 1.7 mL VWR 미세원심분리관에 첨가하고; 상기 관 모두에 대한 랙 또한 37℃로 미리 가온시켜 온도 변동을 최소화하였다. 대조군 및 항생제 함유 샘플, 둘 모두를 37℃에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 상기 샘플 A 및 B를 얼음 상에 바로 배치한 후, 30 ㎕의 각 샘플을 130 ㎕의 냉 RLT 완충제 (퀴아젠)에 첨가하였다. 퀴아젠 RNA이지 미니 키트 칼럼 및 완충제를 사용하여 그의 전체 핵산을 추출하고, 1 단계 RT qPCR을 통해 분석하여 RNases 억제제 및 BSA의 존재하에 맥시마 H-RT (및 SSO 고속 에바그린 PCR 혼합물)을 사용하여 FeoB 및 RecA RNA를 정량화하였다.

[0413] 도 18은 항생제를 함유하지 않는 BHI 배지에서의 처리 20분 후와 대비되는, BHI 배지 중 10 ug/mL의 시프로플록

사신으로의 처리 20분 후 시프로플록사신에 대하여 감수성 및 내성인 UTI 임상 단리물에서의 FeoB 및 RecA 유전자 발현의 RNA 정량화를 보여주는 것이다. 결과는 하기 표 3에 제공되어 있다.

[0414] <표 3>

| | **FeoB** | | **RecA** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | CT 비처리/처리 | 하향 조절된 배수 변화 | CT 비처리/처리 | 상향 조절된 배수 변화 | 배수 변화 비 |
| 감수성 1 | 20.88/24.45 | 11.88 | 20.87/18.11 | 6.77 | 80.45 |
| 감수성 2 | 23.99/26.21 | 4.66 | 23.00/20.21 | 6.91 | 32.22 |
| 감수성 3 | 22.28/24.73 | 5.46 | 22.08/19.42 | 6.32 | 34.54 |
| 내성 | 20.45/20.53 | 1.06 | 22.54/22.57 | 0.98 | 1.04 |

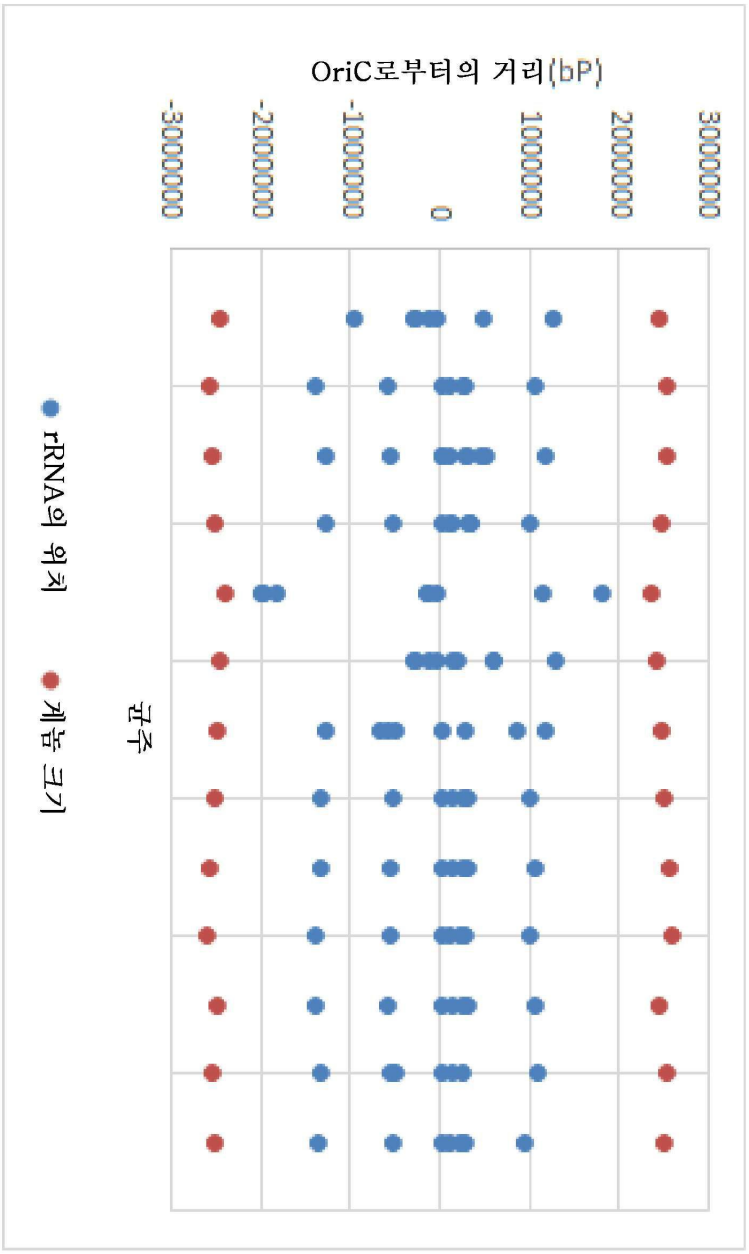
[0415]

[0416] 시프로플록사신으로 처리되지 않은 감수성 세포와 비교하여, 처리된 감수성 세포는 FeoB 유전자의 유의적인 하향 조절을 보였다. 3개의 상이한 감수성 단리물은 세포에서 상기 RNA의 존재하에 11.88, 4.66, 및 5.46배의 감소를 나타내었다. 내성 단리물은 어떤 유의적인 변화도 보이지 않았다. 시프로플록사신으로 처리되지 않은 감수성 세포와 비교하여, 처리된 감수성 세포는 RecA 유전자의 유의적인 상향 조절을 보였다. 3개의 상이한 감수성 단리물은 세포에서 상기 RNA의 존재하에 6.77, 6.92, 및 6.32배의 증가를 나타내었다. 내성 단리물은 어떤 유의적인 변화도 보이지 않았다. 개별적으로 사이 변화 중 어느 하나를 사용하여 감수성 세포를 내성 세포와 구별할 수 있지만, FeoB 변화 대 RecA 변화의 비를 구함으로써 내성 세포와 감수성 세포를 더욱더 잘 분석할 수 있다. 시험된 감수성 균주는 80.45, 32.22, 및 34.54배 변화비를 나타낸 반면, 내성 세포에서의 상기 비는 1.04였다.

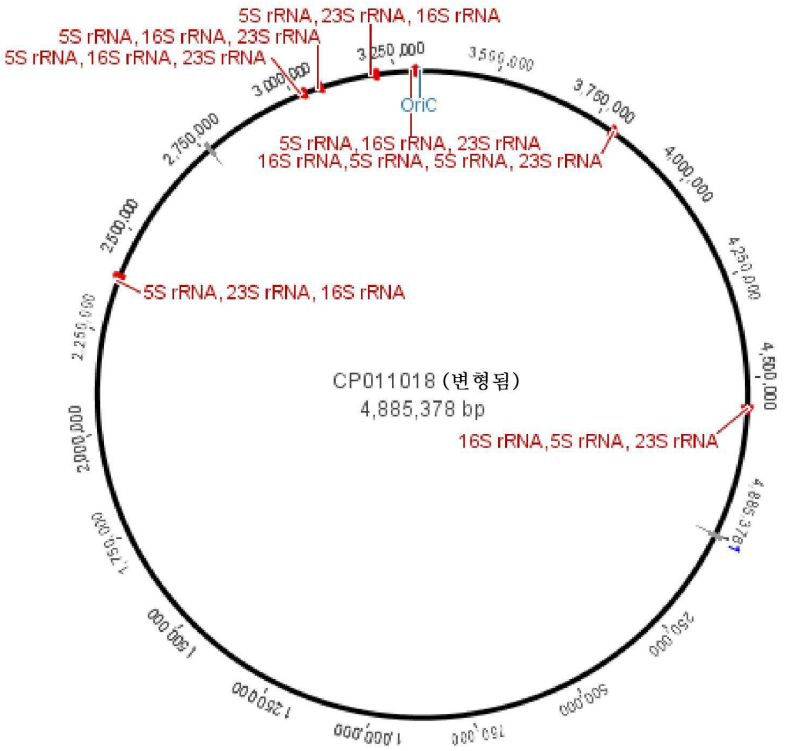
[0417] 본 발명의 바람직한 실시양태는 본원에 제시되고, 기술되었지만, 상기 실시양태는 단지 예로 제공된 것임은 통상의 기술자에게는 자명할 것이다. 이제, 본 발명으로부터 벗어남 없이 다수의 변형, 변경, 및 치환이 통상의 기술자에게 이루어질 것이다. 본원에 기술된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는 데 사용될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 하기 특허청구범위가 본 발명의 범주를 정의하고, 이러한 특허청구범위의 범주 내에 포함되어 있는 방법 및 구조 및 그의 등가물이 그에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

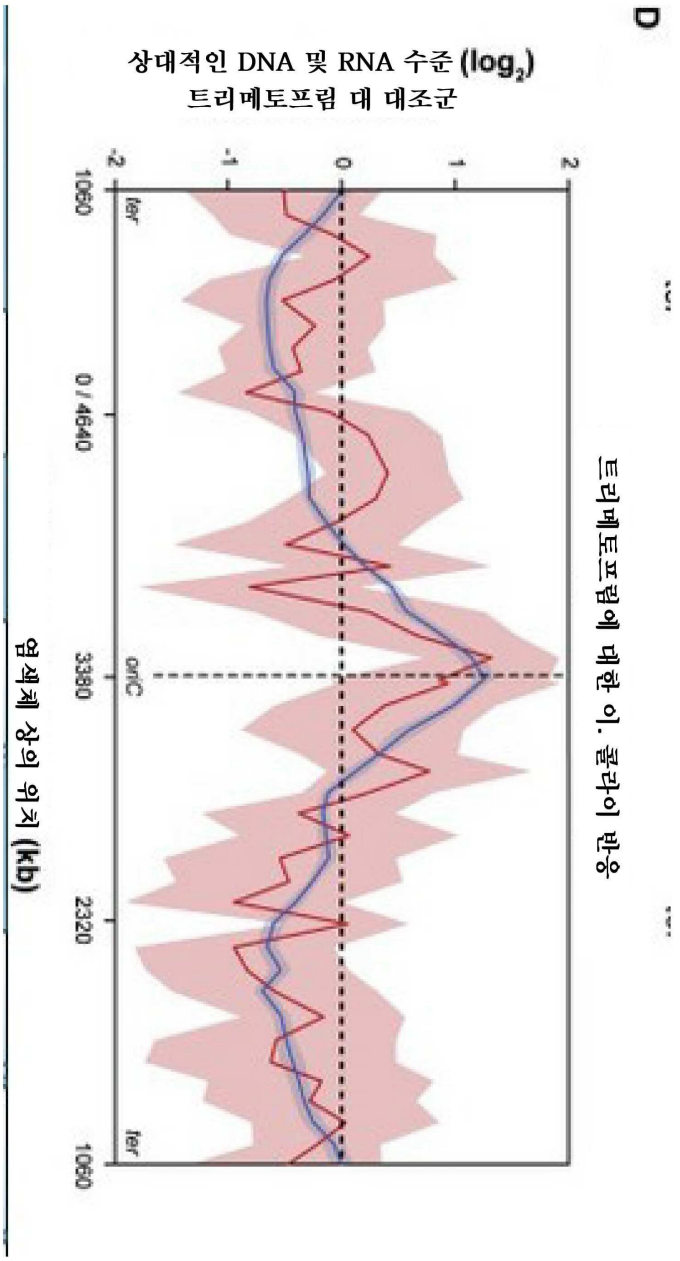
도면1


OriC로부터의 거리(bP)
-3000000
-2000000
-1000000
0
1000000
2000000
3000000
균주
rRNA의 위치
계놈 크기

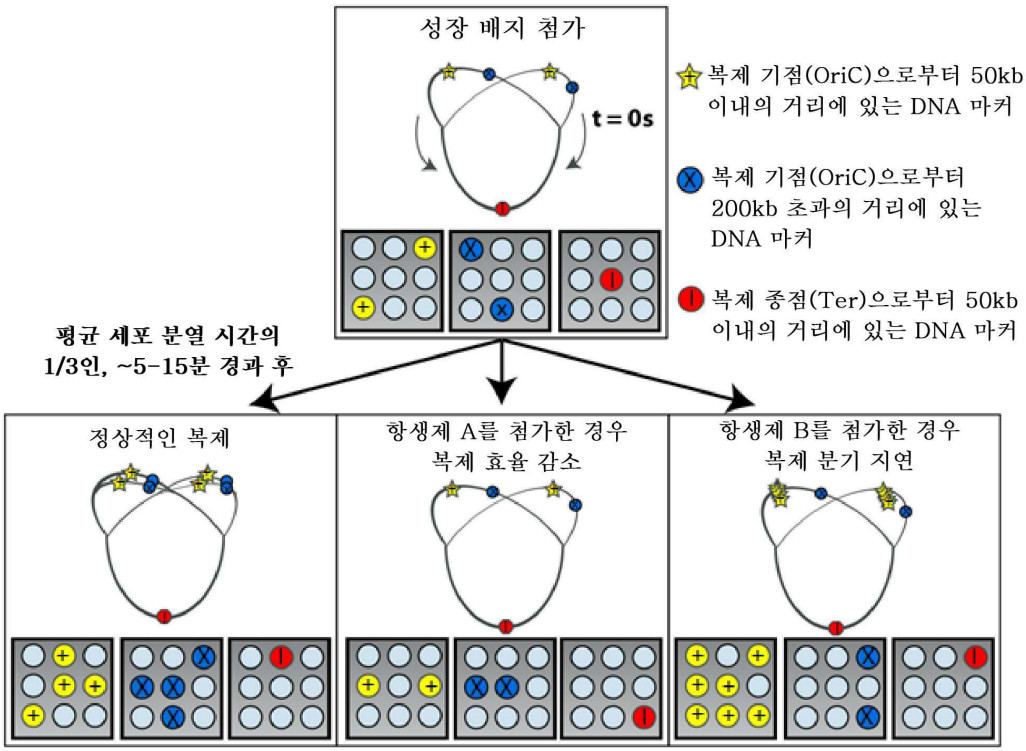
도면2


5S rRNA, 23S rRNA, 16S rRNA
5S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA
5S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA
OriC
5S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA
16S rRNA, 5S rRNA, 5S rRNA, 23S rRNA
5S rRNA, 23S rRNA, 16S rRNA
CP011018 (변형됨)
4,885,378 bp
16S rRNA, 5S rRNA, 23S rRNA

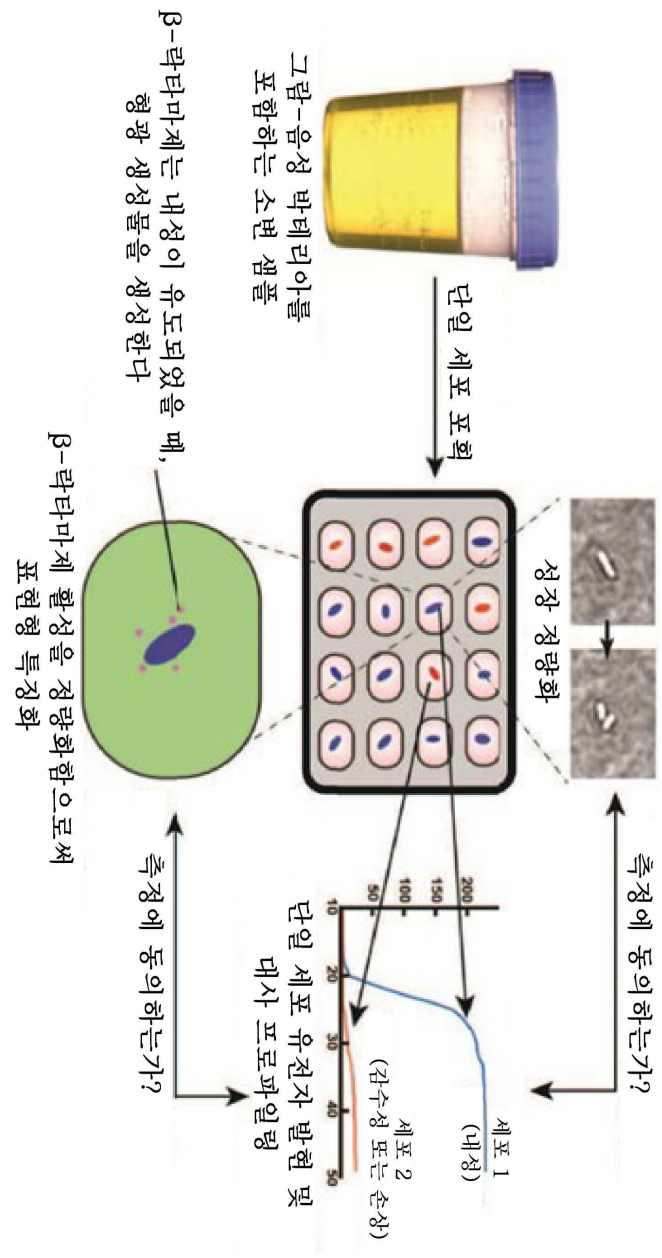
도면3


D
상대적인 DNA 및 RNA 수준 (log2)
트리메토프림 대 대조군
-2
-1
0
1
2
ter
0 / 4640
oriC
ter
1060
3380
2320
1060
염색체 상의 위치 (kb)
트리메토프림에 대한 이. 콜라이 반응

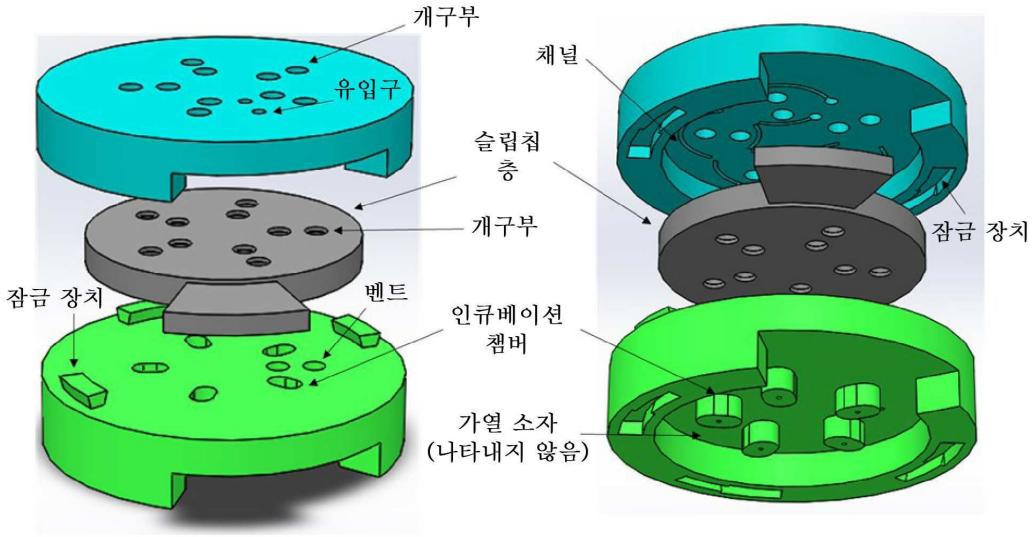
도면4


성장 배지 첨가
t = 0s
복제 기점(OriC)으로부터 50kb 이내의 거리에 있는 DNA 마커
복제 기점(OriC)으로부터 200kb 초과의 거리에 있는 DNA 마커
복제 종점(Ter)으로부터 50kb 이내의 거리에 있는 DNA 마커
평균 세포 분열 시간의 1/3인, ~5-15분 경과 후
정상적인 복제
항생제 A를 첨가한 경우 복제 효율 감소
항생제 B를 첨가한 경우 복제 분기 지연

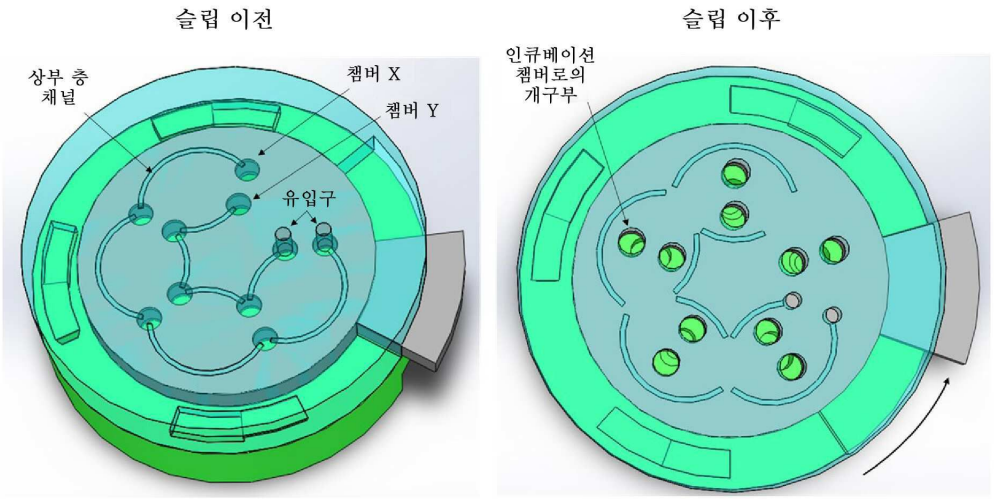
도면5


그람-음성 박테리아를
포함하는 소변 샘플
단일 세포 포획
성장 정량화
측정에 동의하는가?
세포 1
(내성)
세포 2
(감수성 또는 손상)
단일 세포 유전자 발현 및
대사 프로파일링
측정에 동의하는가?
β-락타마제는 내성이 유도되었을 때,
형광 생성물을 생성한다
β-락타마제 활성을 정량화함으로써
표현형 특징화

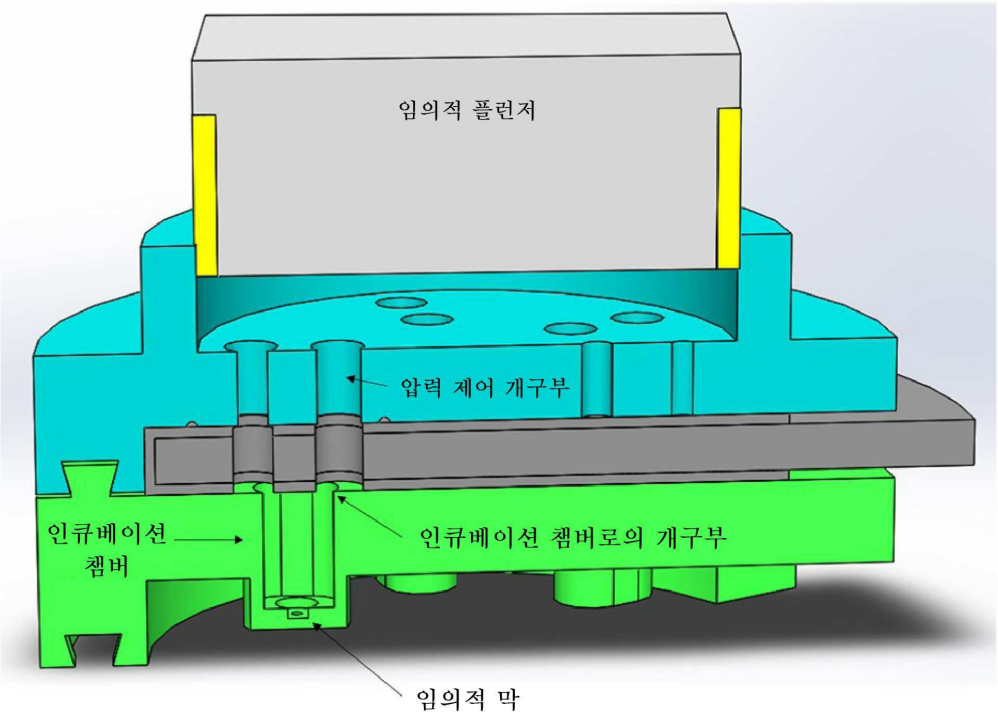
도면6a


개구부
유입구
슬립칩
층
개구부
잠금 장치
벤트
인큐베이션
챔버
가열 소자
(나타내지 않음)
채널
잠금 장치

도면6b


슬립 이전
슬립 이후
상부 층
채널
챔버 X
챔버 Y
유입구
인큐베이션
챔버로의
개구부

도면6c

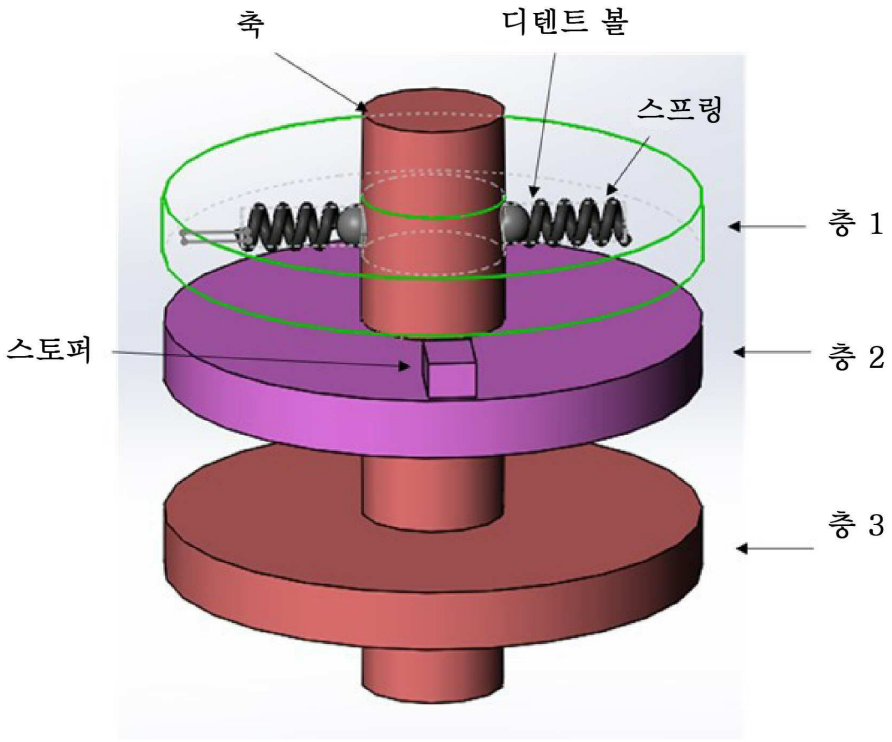



도면7

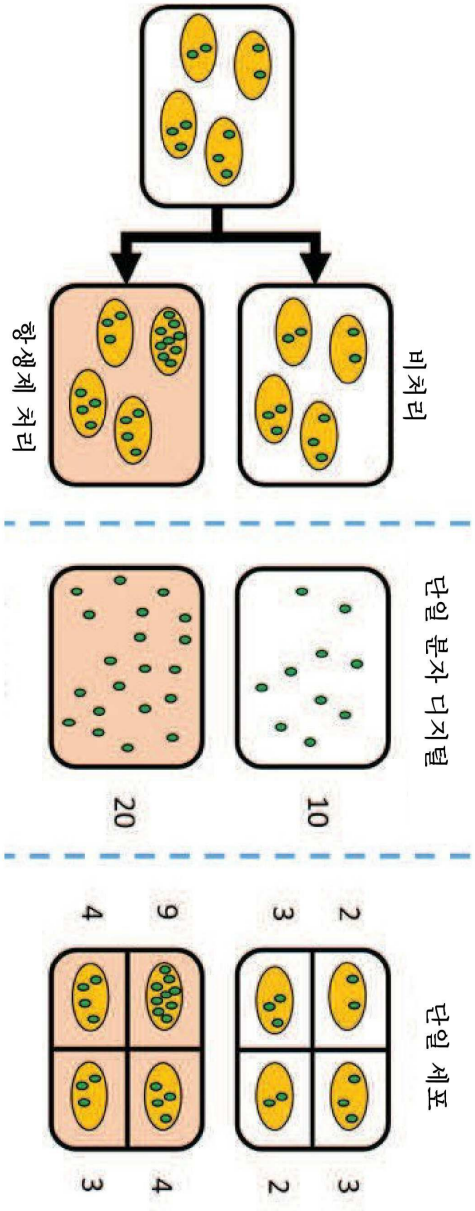




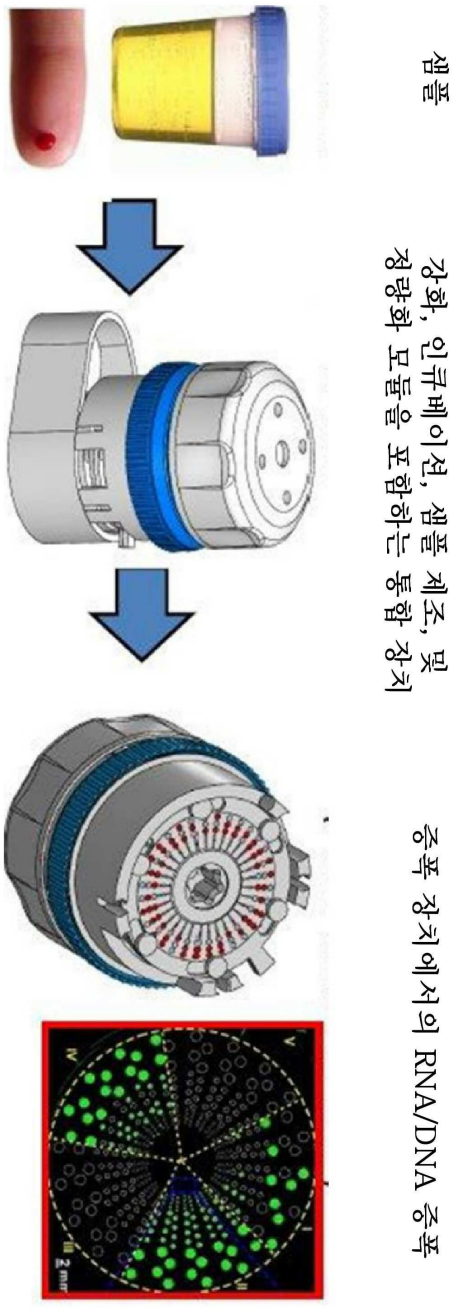
도면8



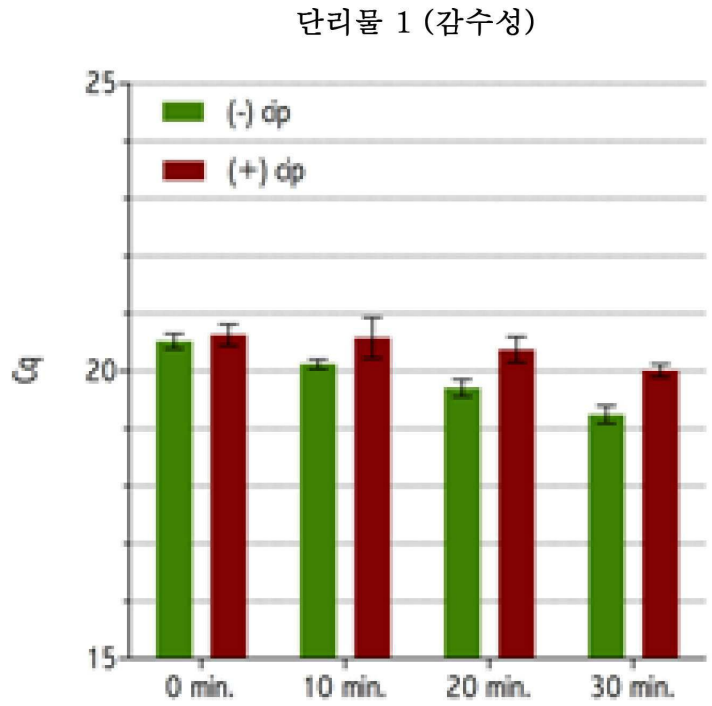
도면9



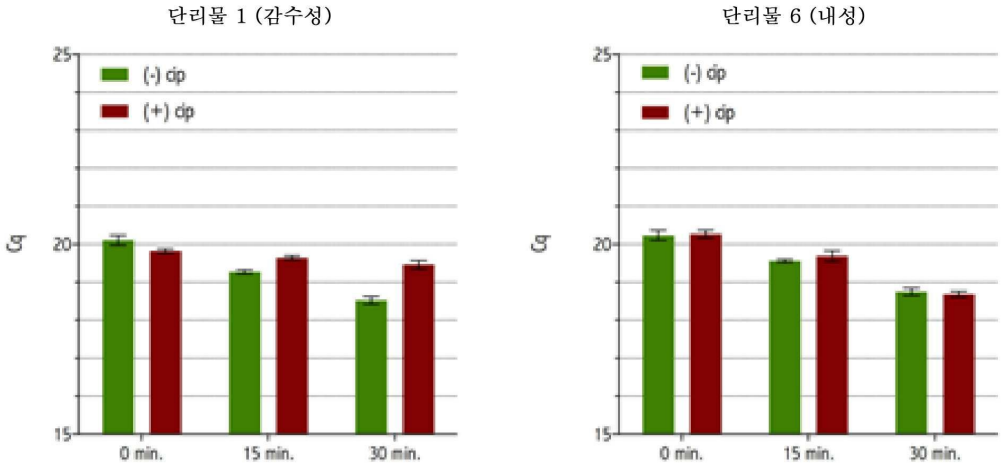
도면10



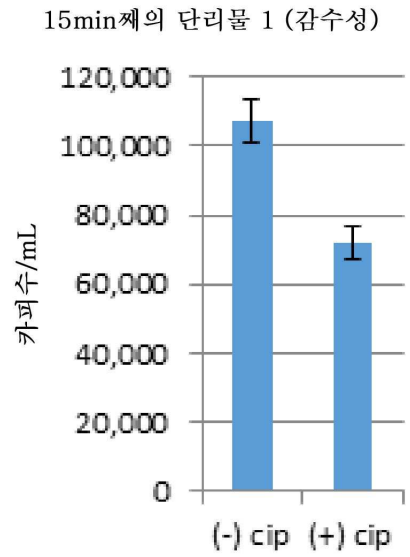
도면11


단리물 1 (감수성)
25
20
15
Cq
(-) dp
(+) dp
0 min.
10 min.
20 min.
30 min.

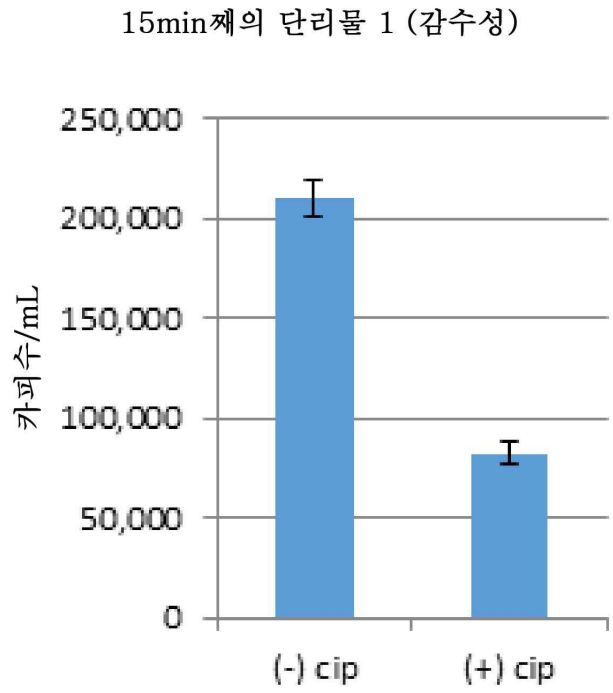
도면12a


단리물 1 (감수성)
25
20
15
Cq
(-) dp
(+) dp
0 min.
15 min.
30 min.
단리물 6 (내성)
25
20
15
Cq
(-) dp
(+) dp
0 min.
15 min.
30 min.

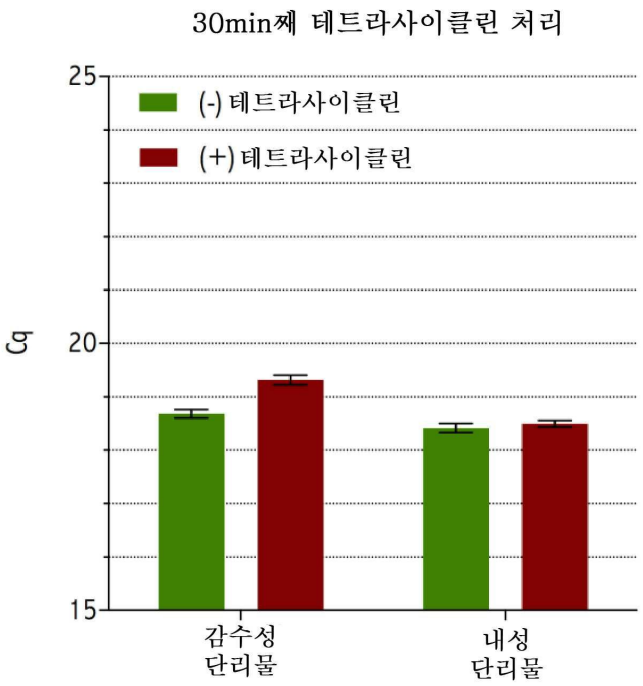
도면12b


15min째의 단리물 1 (감수성)
120,000
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
카피수/mL
(-) cip
(+) cip

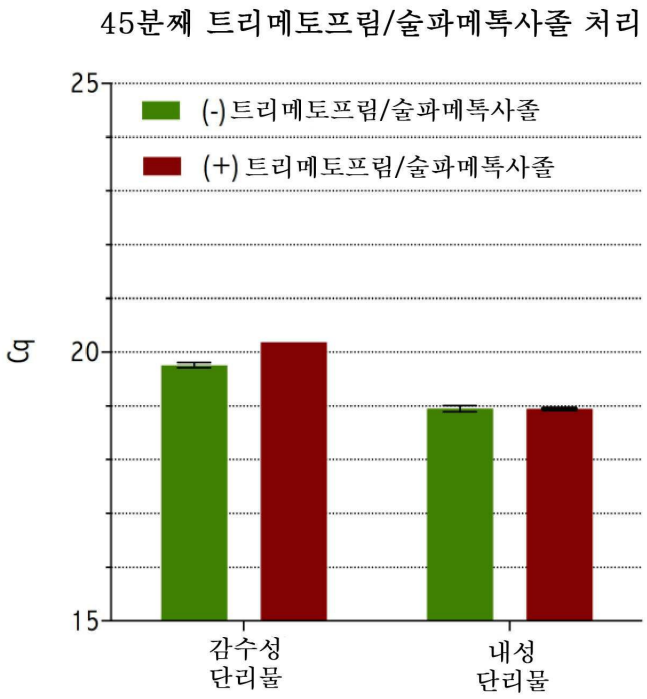
도면13


15min째의 단리물 1 (감수성)
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
카피수/mL
(-) cip
(+) cip

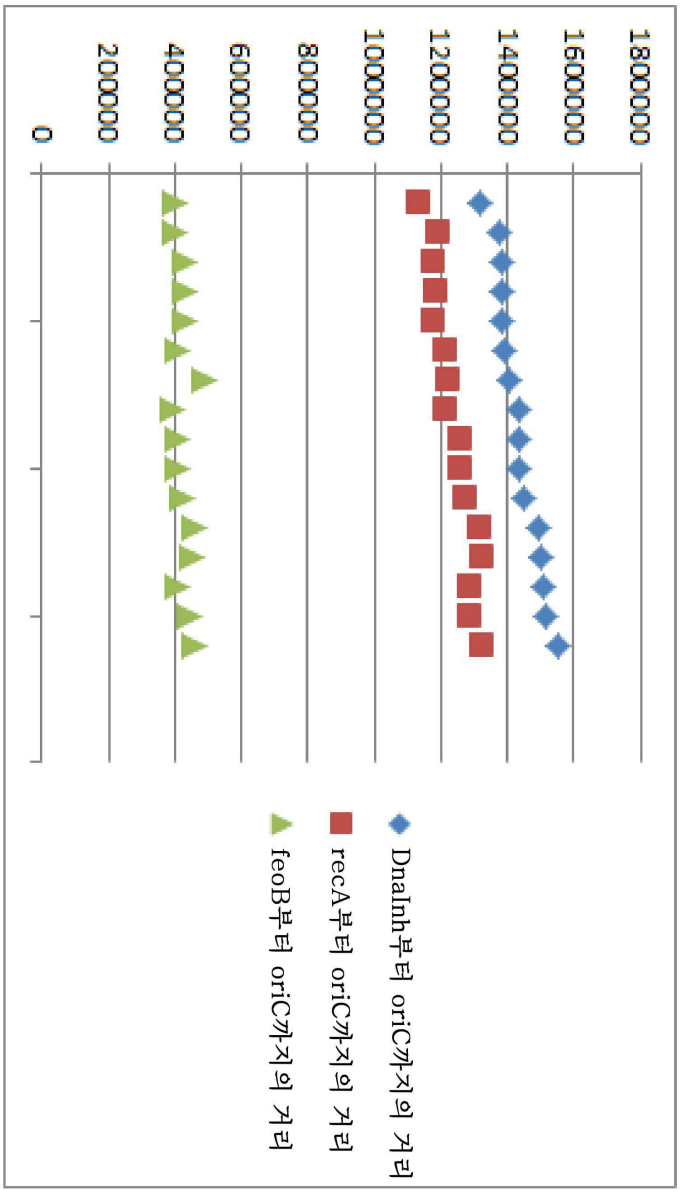
도면14a


30min째 테트라사이클린 처리
25
20
15
Cq
(-) 테트라사이클린
(+) 테트라사이클린
감수성
단리물
내성
단리물

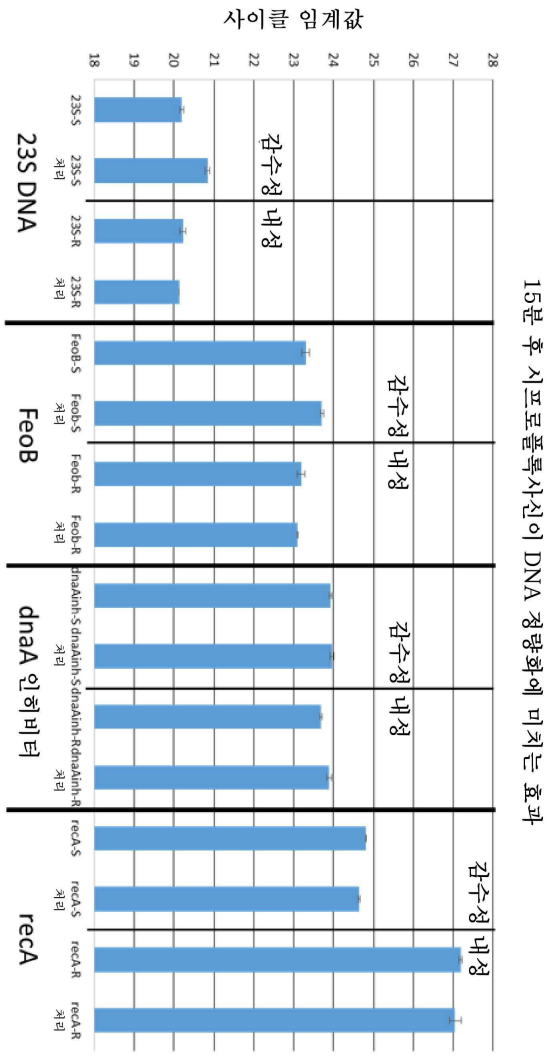
도면14b


45분째 트리메토프림/술파메톡사졸 처리
25
20
15
Cq
(-) 트리메토프림/술파메톡사졸
(+) 트리메토프림/술파메톡사졸
감수성
단리물
내성
단리물

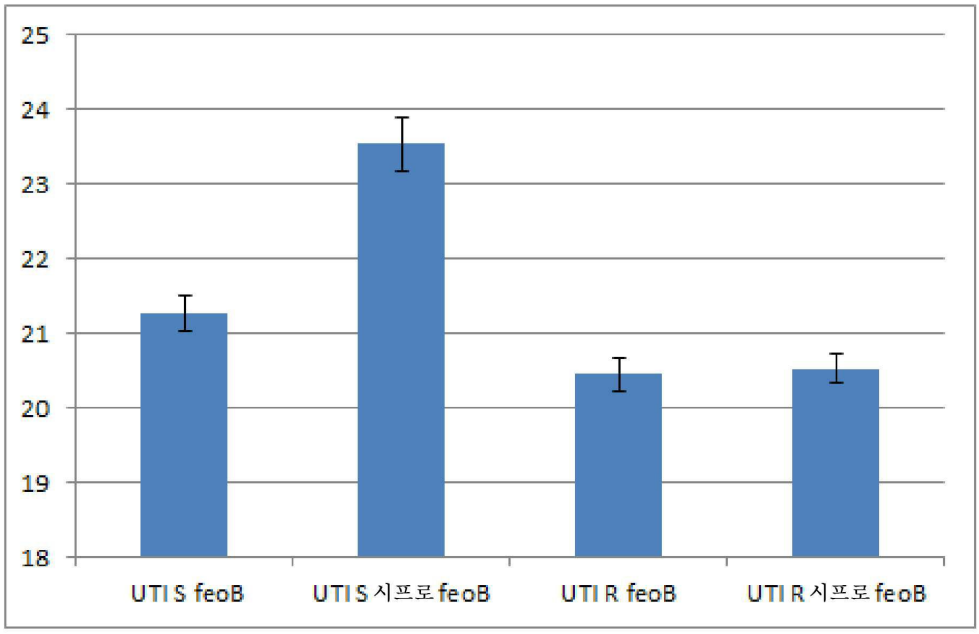
도면15


1800000
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
DnaInh부터 oriC까지의 거리
recA부터 oriC까지의 거리
feoB부터 oriC까지의 거리

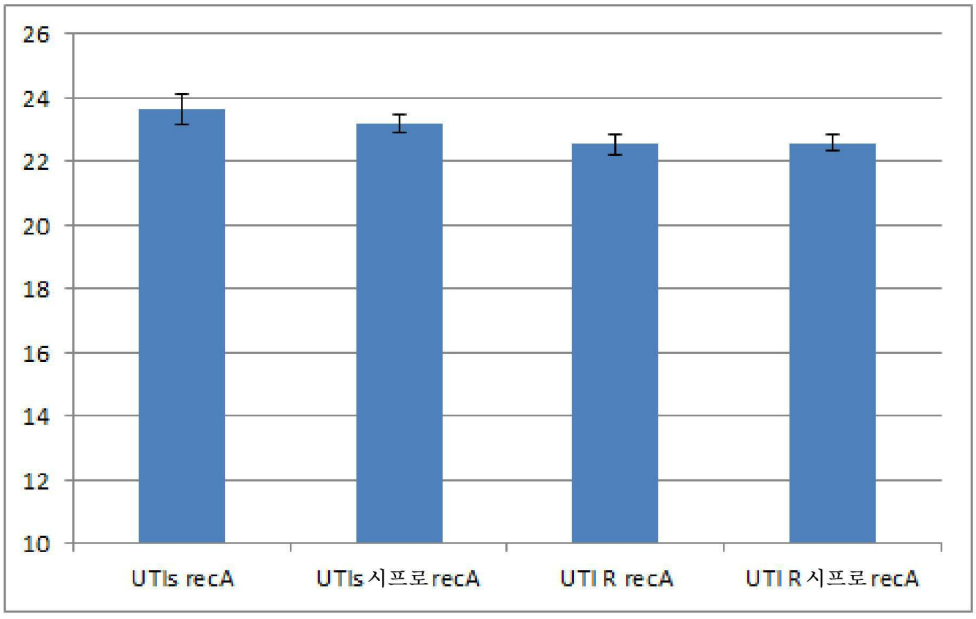
도면16


15분 후 시프로플록사신이 DNA 정량화에 미치는 효과
사이클 임계값
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
감수성
내성
23S DNA
FeoB
dnaA 인히비터
recA
23S-S
23S-S 처리
23S-R
23S-R 처리
FeoB-S
Feob-S 처리
Feob-R
Feob-R 처리
dnaAinh-S
dnaAinh-S 처리
dnaAinh-R
dnaAinh-R 처리
recA-S
recA-S 처리
recA-R
recA-R 처리

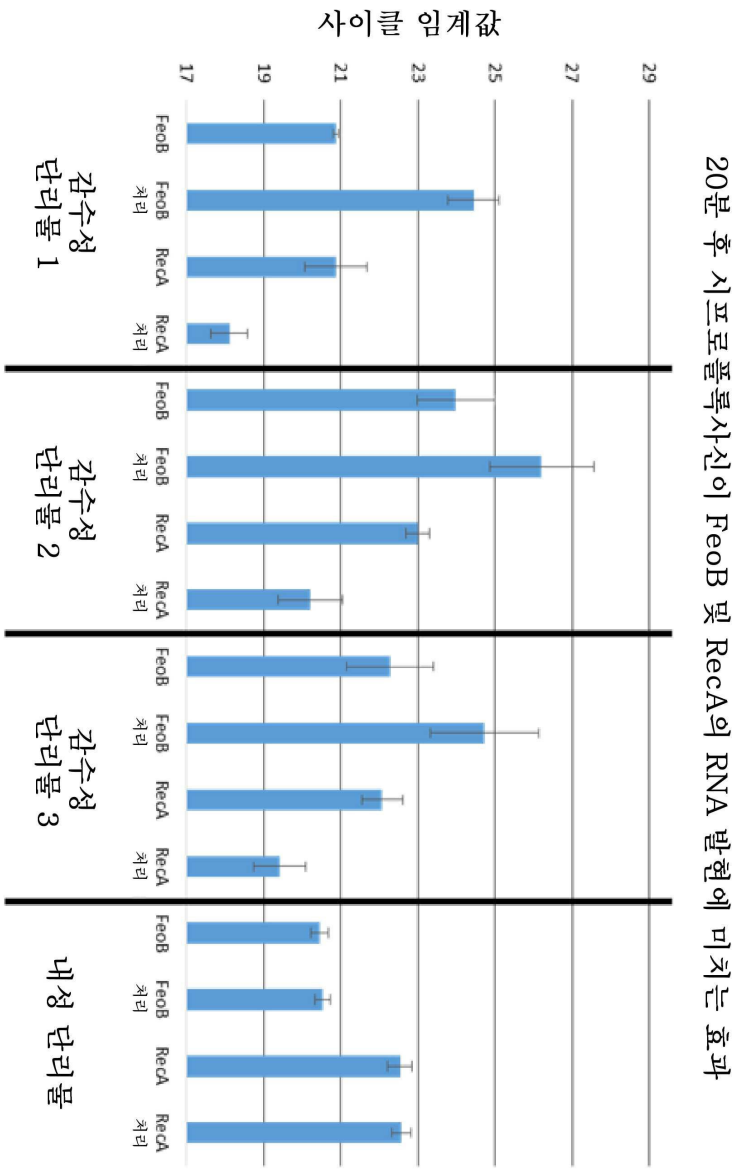
도면17a


25
24
23
22
21
20
19
18
UTI S feoB
UTI S 시프로 feoB
UTI R feoB
UTI R 시프로 feoB

도면17b


26
24
22
20
18
16
14
12
10
UTIs recA
UTIs 시프로 recA
UTI R recA
UTI R 시프로 recA

도면18




서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY

SLIPCHIP CORPORATION

<120> MICROFLUIDIC MEASUREMENTS OF THE RESPONSE OF AN ORGANISM TO A DRUG

<130> 32590-31072/PCT

<140> PCT/US2015/059344

<141> 2015-11-05

<150> 62/075,648

<151> 2014-11-05

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

tgccgtaact tcgggagaag gca 23

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

tcaaggacca gtgttcagtg tc 22