(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월29일
(11) 등록번호 10-2814480
(24) 등록일자 2025년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6853 (2018.01) *C12Q 1/6818* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6853 (2018.05)
C12Q 1/6818 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-7035707
(22) 출원일자(국제) 2021년03월12일
심사청구일자 2024년03월08일
(85) 번역문제출일자 2022년10월13일
(65) 공개번호 10-2023-0012467
(43) 공개일자 2023년01월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/022192
(87) 국제공개번호 WO 2021/183941
국제공개일자 2021년09월16일
(30) 우선권주장
62/989,140 2020년03월13일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US06090552 A
US05866336 A*
BioChip Journal. vol. 13, no. 4, 341-351(2019)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
어-오 랩스 인코포레이션
미국 95054 캘리포니아 산타클라라 빅터 스트리트 3485
(72) 발명자
볼, 카메론, 스콧
미국 95054 캘리포니아 산타클라라 빅터 스트리트 3485 어-오 랩스 인코포레이션 내
(74) 대리인
특허법인에이아이피

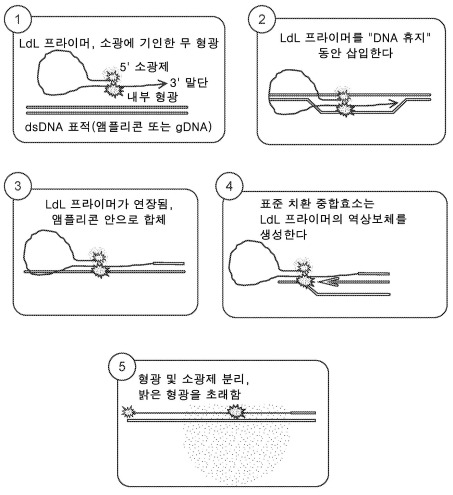
전체 청구항 수 : 총 33 항 심사관 : 최지다

(54) 발명의 명칭 **표적 핵산을 검출하기 위한 루프형 프라이머 및 루프-드-루프 방법**

(57) 요 약

본 개시내용은 바이오센서-표지된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 표적 핵산을 검출하는 신규한 루프-드-루프 방법을 제공한다. 추가로 방법에 사용하기 위한 루프형 프라이머 및 키트가 본 명세서에 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2525/301 (2013.01)
C12Q 2527/107 (2019.08)
C12Q 2563/107 (2013.01)
C12Q 2565/101 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

표적 서열의 루프-드-루프 증폭을 위한 프라이머 혼합물로서,

(i) 5'에서 3'으로 하기를 포함하는, 루프형 프라이머:

제1 센서 분자;

제1 클램핑 올리고뉴클레오티드;

스페이싱 올리고뉴클레오티드, 여기서 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 표적 서열에 상보적이지 않음;

제2 클램핑 올리고뉴클레오티드,

여기서 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m) 미만의 온도에서 헤어핀 구조를 형성할 수 있음;

제2 센서 분자,

여기서 제1 센서 분자 및 제2 센서 분자는 제1 바이오센서 쌍임; 및

표적 서열 상의 제1 결합 부위에 상보적인 제1 프라이머 서열,

여기서 루프형 프라이머는 표적 서열에 결합될 때 가닥 치환 중합효소에 의해 증폭되도록 구성되고,

(ii) 정방향 내부 프라이머(FIP), (iii) 역방향 내부 프라이머(BIP), (iv) 정방향 프라이머(F3), (v) 역방향 프라이머(B3), (vi) 루프 정방향 프라이머(LF) 및 (vii) 루프 역방향 프라이머(LB)를 포함하고, 여기서 FIP, BIP, F3, B3, LF, 및 LB는 표적 서열 상의 6개의 상이한 결합 부위에 결합하고, FIP, BIP, F3, B3, LF, 및 LB의 적어도 하나는 제1 결합 부위에 결합하는, 프라이머 혼합물.

청구항 2

표적 서열의 루프-드-루프 증폭을 위한 키트로서,

제1항의 프라이머 혼합물 및 중합효소를 포함하고, 여기서 중합효소는 가닥 치환 중합효소인, 키트.

청구항 3

샘플에서 표적 서열을 검출하는 방법으로서, 상기 방법은

샘플을 제공하는 단계;

(i) 제1항의 프라이머 혼합물 및 중합효소를 샘플에 첨가하고, 이에 의해 반응 혼합물을 생성하는 단계; 및

50-85℃에서 반응 혼합물을 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 반응 혼합물로부터 형광 신호를 검출하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 5

표적 서열의 루프-드-루프 증폭(LdL)을 위한 루프형 프라이머로서, 5'에서 3'으로 다음을 포함하고:

제1 센서 분자;

제1 클램핑 올리고뉴클레오티드;

스페이싱 올리고뉴클레오티드;

제2 클램핑 올리고뉴클레오티드,

여기서 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m) 미만의 온도에서 헤어핀 구조를 형성할 수 있음;

제2 센서 분자,

여기서 제1 센서 분자 및 제2 센서 분자는 제1 바이오센서 쌍임; 및

표적 서열 상의 제1 결합 부위에 상보적인 제1 프라이머 서열; 및

적어도 제1 부가 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함하고, 여기서 제1 부가 올리고뉴클레오티드는 루프형 프라이머의 5' 말단에 있는, 루프형 프라이머.

청구항 6

제5항에 있어서, 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드에 상보적인, 루프형 프라이머.

청구항 7

제5항에 있어서, 제1 바이오센서 쌍은 에너지 공여체 및 수용체 쌍인, 루프형 프라이머.

청구항 8

제7항에 있어서, 제1 바이오센서 쌍은 형광 공명 에너지 전달(FRET) 또는 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)을 위한 에너지 공여체 및 수용체 쌍인, 루프형 프라이머.

청구항 9

제5항에 있어서, 제1 센서 분자 및 제2 센서 분자는 검출가능한 광 신호를 생성하는 복합체를 형성할 수 있는, 루프형 프라이머.

청구항 10

제5항에 있어서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 60℃ 초과인, 루프형 프라이머.

청구항 11

제10항에 있어서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 70℃ 초과인, 루프형 프라이머.

청구항 12

제11항에 있어서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 80℃ 초과인, 루프형 프라이머.

청구항 13

제10항에 있어서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 70 내지 80℃인, 루프형 프라이머.

청구항 14

제5항에 있어서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 60℃ 미만인, 루프형 프라이머.

청구항 15

제5항에 있어서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드 각각은 3 내지 10-뉴클레오티드 길이인, 루프형 프라이머.

청구항 16

제5항에 있어서, 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 5 내지 35-뉴클레오티드 길이인, 루프형 프라이머.

청구항 17

제5항에 있어서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드, 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 함께 15 내지 35-뉴클레오티드 길이인, 루프형 프라이머.

청구항 18

제5항에 있어서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드, 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 (i) 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실로부터 선택된 핵염기, (ii) 잠금 핵산, (iii) 2' O-메틸 RNA 염기, (iv) 포스포로티오화된 DNA 염기, (v) 포스포로티오화된 RNA 염기, (vi) 포스포로티오화된 2'-O-메틸 RNA 염기, 또는 (vii) 이의 조합을 포함하는, 루프형 프라이머.

청구항 19

제5항에 있어서, 제2 부가 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함하고, 여기서 제2 부가 올리고뉴클레오티드는 제1 센서 분자와 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드 사이에 있는, 루프형 프라이머.

청구항 20

제5항에 있어서, 제1 부가 올리고뉴클레오티드는 바코드 서열인, 루프형 프라이머.

청구항 21

제5항에 있어서, 표적 서열은 병원체 게놈에 특이적인, 루프형 프라이머.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 병원체는 *나이세리아 고노루애* 또는 SARS-CoV-2인, 루프형 프라이머.

청구항 23

제5항의 루프형 프라이머를 포함하는, 표적 서열의 루프-드-루프 증폭을 위한 프라이머 혼합물.

청구항 24

제23항에 있어서, (i) 정방향 내부 프라이머(FIP), (ii) 역방향 내부 프라이머(BIP), (iii) 정방향 프라이머(F3) 및 역방향 프라이머(B3)를 추가로 포함하며, 여기서 FIP, BIP, F3, 및 B3은 표적 서열 상의 6개의 상이한 결합 부위에 결합하는, 프라이머 혼합물.

청구항 25

제24항에 있어서, (i) 루프 정방향 프라이머(LF) 및 (ii) 루프 역방향 프라이머(LB)를 추가로 포함하며, 여기서 LF 및 LB는 표적 서열 상의 2개의 상이한 결합 부위에 결합하는, 프라이머 혼합물.

청구항 26

제1항 또는 제23항에 있어서, 제2 루프형 프라이머를 추가로 포함하며, 여기서 제2 루프형 프라이머는 하기를 포함하는, 프라이머 혼합물:

제3 센서 분자;

제3 클램핑 올리고뉴클레오티드;

제2 스페이싱 올리고뉴클레오티드;

제4 클램핑 올리고뉴클레오티드,

여기서 제3 클램핑 올리고뉴클레오티드, 제2 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제3 및 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m) 미만의 온도에서 헤어핀 구조를 형성할 수 있음;

제4 센서 분자,

여기서 제3 센서 분자 및 제4 센서 분자는 제2 바이오센서 쌍이고, 제2 바이오센서 쌍은 제1 바이오센서 쌍과 상이함; 및

제2 표적 서열 상의 제1 결합 부위에 상보적인 제2 프라이머 서열.

청구항 27

제26항에 있어서, 표적 서열과 제2 표적 서열은 상이한, 프라이머 혼합물.

청구항 28

제26항에 있어서, (i) 제2 정방향 내부 프라이머(SFIP), (ii) 제2 역방향 내부 프라이머(SBIP), (iii) 제2 정방향 프라이머(SF3) 및 (iv) 제2 역방향 프라이머(SB3)를 추가로 포함하며, 여기서 SFIP, SBIP, SF3, 및 SB3은 제2 표적 서열 상의 6개의 상이한 결합 부위에 결합하는, 프라이머 혼합물.

청구항 29

제26항에 있어서, (i) 제2 루프 정방향 프라이머(SLF) 및 (ii) 제2 루프 역방향 프라이머(SLB)를 추가로 포함하며, 여기서 SLF 및 SLB는 제2 표적 서열 상의 2개의 상이한 결합 부위에 결합하는, 프라이머 혼합물.

청구항 30

제26항에 있어서, 제3 루프형 프라이머를 추가로 포함하며, 여기서 제3 루프형 프라이머는 하기를 포함하는, 프라이머 혼합물:

제5 센서 분자;

제5 클램핑 올리고뉴클레오티드;

제3 스페이싱 올리고뉴클레오티드;

제6 클램핑 올리고뉴클레오티드,

여기서 제5 클램핑 올리고뉴클레오티드, 제3 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제5 및 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m) 미만의 온도에서 헤어핀 구조를 형성할 수 있음;

제6 센서 분자,

여기서 제5 센서 분자 및 제6 센서 분자는 제3 바이오센서 쌍이고, 제3 바이오센서 쌍은 제1 바이오센서 쌍 및 제2 바이오센서 쌍과 상이함; 및

제3 표적 서열 상의 제1 결합 부위에 상보적인 제3 프라이머 서열.

청구항 31

표적 서열의 루프-드-루프 증폭을 위한 키트로서, 제5항의 루프형 프라이머 및 중합효소를 포함하는, 키트.

청구항 32

제2항 또는 제31항에 있어서, 역전사효소를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 중합효소는 *지오바실러스 스테아로테르모필루스* 중합효소인, 키트.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차-참조**

[0002] 이 출원은 2020년 3월 13일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/989,140에 대한 우선권을 주장하며, 이것은 그 전체가 참고로 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해 제출되고 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함된 XXX 서열을 갖는 서열 목록을 함유한다. XXXX에 생성된 상기 ASCII 사본은 48397WO_sequencelisting.txt로 명명되고 크기는 XXX 바이트이다.

배 경 기 술

[0005] 핵산 서열의 상보성을 사용하여 표적 핵산을 검출하는 방법은 전통적인 서던 혼성화로부터 현재까지 다양하게 개선 또는 변형되어 왔다. 특히, 중합효소 연쇄 반응(PCR), 가닥 치환 증폭(SDA), 핵산 서열-기반 증폭(NASBA), 롤링 서클 증폭(RCA), 및 루프-매개된 등온 증폭(LAMP)과 같은 다양한 시험관내 핵산 증폭 방법의 확립이 더 적은 양의 표적 핵산을 검출할 수 있게 했다. 방법은 감염의 의학적 진단, 돌연변이 유전자형의 결정, 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 및 점 돌연변이의 검출 등을 위해 샘플에서 표적 핵산의 서열-특이적 검출 및 정량화에 사용되었다. 핵산 증폭 방법은 그 높은 특이성과 민감도 때문에 시험에 대한 황금 표준이 되었다.

[0006] 그러나, 현재의 핵산 증폭 방법은 증폭 반응 및 신호 검출이 통제된 환경과 고가의 장비로 정밀한 측정을 필요로 하기 때문에 한계가 있다. 따라서, 방법은 현장 진료 상황에서 사용하기에는 종종 비용-제한적이다. 부가적으로, 방법은 단일 환자 샘플에서 다중화된 표적의 검출에 최적화되어 있지 않다. 다중화된 표적의 검출은 단일-포트 반응(형광 스펙트럼 다중화, 전기화학적 검출기의 어레이)에서 신호 다중화, 고유한 반응 용기로의 다중 반응의 물리적 분리 또는 이의 조합에 의해 달성될 수 있다. 그러나, CLIA 면제 테스트의 경우, 3가지 이하의 간단한 단계가 단일 환자 샘플을 사용하여 핵산 표적의 패널을 동시적으로 쿼리하기 위해 사용자에 의해 요구되어야 한다. 따라서, 복잡한 장치나 일회용품이 자동으로 처리를 조작하지 않는 한, 별도 챔버 안으로 샘플의 물리적 분리는 CLIA 면제 테스트의 경우 빠르게 실행 불가능해진다. 형광을 사용한 스펙트럼 다중화는 핵산 표적의 패널을 표적화하는데 필요한 고유한 반응의 수를 줄일 수 있지만 스펙트럼 다중화 LAMP 반응은 검정 속도 또는 신호 강도에서 급격한 희생을 요구하여, POC 시험에 대하여 성공적인 적용에 대한 전망을 약화시켰다.

[0007] 따라서, 저비용에서 높은 민감도와 특이성으로 표적 핵산, 특히 다중화된 표적의 용이한 증폭 및 검출을 가능하게 하는 새로운 방법의 개발에 대한 필요성이 있다.

발명의 내용

[0008] **요약**

[0009] 본 개시내용은 폐쇄된 시스템에서 표적 핵산의 용이한 검출을 가능하게 하는 새로운 증폭 방법을 제공한다. 방법은 바이오센서 쌍을 갖는 루프형 프라이머를 사용함에 의해 높은 특이성과 민감도로 소량의 표적 핵산의 검출을 허용한다. 바이오센서 쌍은, 예를 들어, 형광/소광제 FRET 기술을 사용함에 의해 루프형 프라이머의 형태 변화를 검출함에 의해 표적 서열의 루프-드-루프("LDL") 증폭의 결정을 허용한다. 부가적으로, 다중 바이오센서의 사용은 단일 튜브에서 다중화된 표적의 검출을 가능하게 한다. 루프형 프라이머는 루프-매개된 등온 증폭(LAMP)뿐만 아니라 가닥 치환 중합효소를 이용하는 임의의 다른 핵산 증폭 방법과 조합되어 사용될 수 있다.

[0010] 출원인은 루프-드-루프 증폭 방법이 DARQ(소광의 해제에 의한 증폭의 검출) 및 OSD(1-단계 변위) 프로브와 같은 억제성 형광 프로브를 포함하는 이전에 공지된 방법과 비교하여 더 빠른 턴어라운드 시간에 개선된 민감도 및 특이성을 갖는 표적 핵산 분자의 서열-특이적 증폭을 허용한다는 것을 입증하였다. 더욱이, 루프-드-루프 증폭 방법은 QUASR(비통합된 증폭 신호 리포터의 소광)과 달리 증폭 신호의 실-시간 검출을 허용한다. 루프-드-루프 방법은 미정제 샘플에서도 강한 신호를 제공하므로 저렴한 장비로 방법을 수행할 수 있다.

[0011] 따라서, 본 발명은 루프형 프라이머(예를 들어, 형광단-표지된 프라이머)를 사용하여 샘플에 존재하는 하나 이상의 표적 핵산을 검출하는 방법을 제공한다. 형광단-표지된 프라이머는 바이오센서 쌍, 예를 들어 형광단 또는 소광제 분자와 함께 비변형된 프라이머 서열의 5' 말단 또는 그 부근에서 내부적으로 표지된 표적 핵산 및 인접 루프 서열에 상보성을 갖는 형광단-표지된 올리고뉴클레오티드이다. 형광단-표지된 프라이머는 추가된 루프 서열의 5' 말단 또는 그 근처에 각각 소광제 또는 형광단으로 표지되어 이전 지점에서 기술된 내부 표지로 FRET를 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, 형광단-표지된 프라이머는 첨가된 루프 서열의 5' 말단 또는 그 부근에서 형광단으로 표지되고 내부 부위는 소광제로 표지된다. 형광단-표지된 프라이머는 루프 서열의 3' 말단(비변형된 프라이머 서열과의 교차점)에 제1 클램핑 서열을 추가로 함유한다. 이 서열은 비변형된 프라이머 서열과 중첩되거나, 비변형된 프라이머 서열에 직접적으로 인접하거나, 비변형된 프라이머 서열과 이격될 수 있다. 서열은 dNTP, 잠금 핵산, 또는 임의의 다른 형태의 핵산 변형 또는 치환을 포함할 수 있다.

[0012] 상기 클램핑 서열의 용융 온도는 바람직하게는 가닥 치환 중합효소를 사용한 검정의 확장 온도보다 약 10℃ 더 높지만, 검정의 확장 온도보다 낮거나 같거나 더 높을 수 있다.

[0013] 클램핑 서열의 용융 온도가 반응의 확장 온도보다 낮은 경우, 실시간 검출은 이 방법에서 평가변수 검출(클램핑 서열의 Tm 근처 또는 그 이하로 반응 냉각)로 대체될 수 있다. 이 경우, 루프형 프라이머를 전체 강도(비변형된

프라이머를 루프형 프라이머 유사체로 100% 치환)로 사용해도 반응의 억제가 없다.

[0014] 클램핑 서열의 용융 온도가 반응의 확장 온도와 동일한 경우, 실시간 검출은 여전히 실행 가능하지만 평가변수 결정을 위해 반응을 냉각시킬 때까지 배경 형광이 더 높을 수 있다.

[0015] 클램핑 서열의 용융 온도가 반응의 확장 온도보다 더 높은 경우, 실시간 검출이 지배적인 작동 모드이고 최소한의 배경 형광이 있을 것이다.

[0016] 형광단-표지된 프라이머는 프라이머가 선형(신장된) 형태일 때 FRET를 억제하기 위해 내부적으로 접합된 형광단 또는 소광제를 5'-말단 소광제 또는 형광단으로부터 적절한 거리만큼 분리하는 스페이싱 서열을 추가로 함유하고, 따라서 형광을 증가시킨다. 스페이싱 서열은 서열 및 길이가 임의적이고 데옥시리보뉴클레오티드, 잠금 핵산 등을 포함할 수 있다. 길이는 25개 뉴클레오티드일 수 있지만 더 짧거나 더 길 수 있다.

[0017] 형광단-표지된 프라이머는 루프 서열의 5' 말단 또는 그 부근에 제2 클램핑 서열, 즉 제1 클램핑 서열의 역상보체를 추가로 함유한다. 형광단-표지된 프라이머는 루프-드-루프 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 추가로 부가 DNA 바코드, 프로브 또는 서열을 추가로 포함할 수 있다. 서열은 dNTP, 잠금 핵산, 또는 임의의 다른 형태의 핵산 변형 또는 치환을 포함할 수 있다.

[0018] 제1 클램핑 서열과 쌍을 이루는 제2 클램핑 서열의 용융 온도는 바람직하게는 가닥 치환 중합효소를 사용한 검정의 확장 온도보다 10℃ 더 높지만, 검정의 확장 온도보다 낮거나, 같거나, 임의의 양만큼 높을 수 있다.

[0019] 루프형 형광단-표지된 프라이머는 핵산 캡처, 분자 바코딩, 자기 분리, 컬럼 정제, 전기영동 분리와 같은 추가 적용을 가능하게 하기 위해 5' 말단에 부가 서열, 분자, 정제 태그, 비드 또는 기타 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 기질 상에 패턴화된 프로브 캡처 올리고뉴클레오티드는 증폭된 생성물을 캡처하는 데 사용할 수 있으므로 형광, 비색, 발광 또는 기타 밴드 또는 영역을 생성할 수 있다.

[0020] 루프형 프라이머는 비용을 최소화하거나 민감도 및 특이성을 증가시키기 위해 다양한 정도로 검정에 적정될 수 있다.

[0021] 본 명세서에 기재된 바와 같은 루프형 프라이머는 형광단 이외의 센서 분자, 예를 들어 발광, 색상 변화 또는 다른 측정가능한 신호를 근접하거나 충분히 떨어져 이동할 때 제공하는 리포터 분자로 설계될 수 있다. 일부 경우에, NanoLuc, Nanobit, NonoBRET과 같은 바이오 센서가 사용될 수 있다.

[0022] 발광 단백질이 사용되는 경우, 신호에서 감소는 양성 반응의 핵심 지표가 될 수 있다. 일부 실시형태에서, 생물발광에 의한 평가변수 분석이 수행될 수 있다.

[0023] 가닥 치환이 가능한 효소는 표적 서열의 증폭을 위해 사용될 수 있다. 선택한 핵산 증폭 방법에 필요한 다른 시약이 추가로 사용될 수 있다.

[0024] 본 명세서에 제공된 방법은 비표적 RNA 또는 DNA의 높은 농도를 갖는 높은 배경 조건에서 형광 신호의 특이적 검출을 허용하기 때문에 위양성 및 비특이적 증폭 검출을 감소시킬 수 있다. 형광 검출은 표지된 프라이머(들)를 합체하는 이들 앰플리콘 및 생성물만의 특이적 검출을 허용한다. 이는 생식기 면봉, 대변, 타액, 소변, 혈액, 식물 재료, 토양, 환경 샘플 등과 같은, 미가공 또는 가공되지 않은 샘플이 사용되는 경우에도 특이적 검출을 허용한다.

[0025] 일부 실시형태에서, 방법은 하나 이상의 고유한 핵산 표적의 검출에 적용될 수 있다. 이러한 이중, 삼중 또는 고차 다중화된 LAMP 검정에서 표적은 차등적으로 표지될 수 있다. 예를 들어, 일 표적은 FAM으로 표지되고 다른 것은 Cy5로 표지된다. 일부 경우에, 검출은 다중 표지된 프라이머로 단일 핵산 표적을 검출하기 위해 스펙트럼으로 다중화되어, 가양성으로부터 참을 구별하는 능력을 더욱 감소시킨다. 일부 경우에, 검출은 다중 표적에 대해 FAM과 같은 단일 표지를 사용하고, 각 표적의 동일성은 검정의 특정 맥락(예를 들어 상대적 신호 강도, 결과에 대한 시간 등)에 따라 실-시간 또는 평가변수 신호의 분석에 기반하여 결정될 수 있다. 일부 경우에, 다중화는 물리적으로 반응 챔버에서 반응을 수행함에 의해 성취될 수 있다. 일부 경우에, 다중화는 단일 반응 챔버에서 성취될 수 있다.

[0026] 본 명세서에 제공된 방법은 다른 실시간 LAMP 변위 프로브 기술에 비해 억제를 최소화하여 이 방법을 매우 민감하게 만든다. 검정에 대한 적정은 루프 프라이머 치환의 적어도 50%에 대해 전체 반응 속도가 유지됨을 입증한다. 검정에 대한 적정은 내부 프라이머 치환의 적어도 25%에 대해 전체 반응 속도가 유지됨을 입증한다.

[0027] 본 명세서에서 제공되는 루프형 프라이머는 *지오바실러스 스테아로테르모필루스*(이전의 *바실러스 스테아로테르*

모필루스)로부터 단리되거나 각색된 중합효소와 같은 가닥 치환 중합효소를 이용하는 루프 매개된 증폭(LAMP)에 사용될 수 있다. 이 경우에 루프형 프라이머는 정방향 내부 프라이머, 역방향 내부 프라이머, 루프 정방향 프라이머, 루프 역방향 프라이머, F3 프라이머, 및 B3 프라이머를 포함한 LAMP용 다른 프라이머와 함께 사용될 수 있다.

[0028] 일부 실시형태에서, 프라이머 및 가능하게는 다른 반응 성분은 동결건조의 공정을 포함하나 이에 제한되지 않는 공정을 사용하여 건조된다. 건조된 프라이머는 진단 키트에 포함될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 동결건조의 공정은 LAMP 프라이머 세트의 민감도에 영향을 미치지 않는다.

[0029] 일 양태에서, 본 개시내용은 5'에서 3'으로: 제1 센서 분자; 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드; 스페이싱 올리고뉴클레오티드; 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드로, 여기서 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm) 미만의 온도에서 헤어핀 구조를 형성할 수 있음; 제2 센서 분자로, 여기서 제1 센서 분자와 제2 센서 분자는 제1 바이오센서 쌍임; 및 표적 서열 상의 제1 결합 부위에 상보적인 제1 프라이머 서열을 포함하는, 표적 서열의 루프-드-루프 증폭(LdL)을 위한 루프형 프라이머를 제공한다.

[0030] 일부 실시형태에서, 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드에 상보적이다.

[0031] 일부 실시형태에서, 제1 바이오센서 쌍은 에너지 공여체 및 수용체 쌍이다. 일부 실시형태에서, 제1 바이오센서 쌍은 형광 공명 에너지 전달(FRET) 또는 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)을 위한 에너지 공여체 및 수용체 쌍이다. 일부 실시형태에서, 제1 센서 분자는 FRET 형광단이고 제2 센서 분자는 FRET 소광제이다. 일부 실시형태에서, 제1 센서 분자는 FRET 소광제이고 제2 센서 분자는 FRET 형광단이다. 일부 실시형태에서, 제1 센서 분자는 BRET 에너지 공여체이고 제2 센서 분자는 BRET 에너지 수용체이다. 일부 실시형태에서, 제1 센서 분자는 BRET 에너지 수용체이고 제2 센서 분자는 BRET 에너지 공여체이다. 일부 실시형태에서, 제1 센서 분자 및 제2 센서 분자는 검출가능한 광 신호를 생성하는 복합체를 형성할 수 있다.

[0032] 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm)는 60℃ 초과이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm)는 65℃ 초과이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm)는 70℃ 초과이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm)는 80℃ 초과이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm)는 70 내지 80℃다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm)는 72.5 내지 77.5℃이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm)는 약 75℃이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm)는 60℃ 미만이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm)는 60 내지 65℃이다.

[0033] 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 3 내지 10-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 3 내지 7-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 6-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 5 내지 35-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 10 내지 20-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 13 내지 18-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 13-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드, 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 함께 15개 내지 35-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드, 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 함께 20 내지 30-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 함께 23 내지 28-뉴클레오티드 길이이다.

[0034] 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드, 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 (i) 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실로부터 선택된 핵염기, (ii) 잠금 핵산, (iii) 2" O-메틸 RNA 염기, (iv) 포스포로티오화된 DNA 염기, (v) 포스포로티오화된 RNA 염기, (vi) 포스포로티오화된 2"-O-메틸 RNA 염기, 또는 (vii) 이의 조합을 포함한다.

[0035] 일부 실시형태에서, 루프형 프라이머는 루프형 프라이머의 5' 말단에 제1 부가 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 루프형 프라이머는 제1 센서 분자와 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드 사이에 제2 부가 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다.

[0036] 일부 실시형태에서, 제1 또는 제2 부가 올리고뉴클레오티드는 바코드 서열이다.

[0037] 일부 실시형태에서, 표적 서열은 병원체 게놈에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *클라미디아 트라코마티스*에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *orf8* 또는 *cds2*로부터의 것이다. 일부 실시형태에서, 루프형 프라이머는 서열번호: 15의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0038] 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *나이세리아 고노루애*에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *porA* 또는 *glnA*로부터의 것이다. 일부 실시형태에서, 루프형 프라이머는 서열번호: 5 또는 7의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0039] 일부 실시형태에서, 표적 서열은 바이러스에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 바이러스는 SARS-CoV-2이다.

[0040] 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *호모 사피엔스*에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *tbc1d3*으로부터의 것이다. 일부 실시형태에서, 루프형 프라이머는 서열번호: 22의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0041] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 제공된 루프형 프라이머를 포함하는, 표적 서열의 루프-드-루프 증폭을 위한 프라이머 혼합물을 제공한다.

[0042] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 (i) 정방향 내부 프라이머(FIP), (ii) 역방향 내부 프라이머(BIP), (iii) 정방향 프라이머(F3) 및 역방향 프라이머(B3)를 추가로 포함하며, 여기서 FIP, BIP, F3, 및 B3은 표적 서열 상의 6개의 상이한 결합 부위에 결합한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 (i) 루프 정방향 프라이머(LF) 및 (ii) 루프 역방향 프라이머(LB)를 포함하며, 여기서 LF 및 LB는 표적 서열 상의 2개의 상이한 결합 부위에 결합한다. 일부 실시형태에서, FIP, BIP, F3, B3, LF, 또는 LB는 표적 서열 상의 제1 결합 부위에 결합한다. 일부 실시형태에서, FIP는 제1 결합 부위에 결합하고, 프라이머 혼합물에서 FIP와 루프형 프라이머의 양 사이의 비는 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1이다. 일부 실시형태에서, BIP는 제1 결합 부위에 결합하고, 프라이머 혼합물에서 BIP와 루프형 프라이머의 양 사이의 비는 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1이다. 일부 실시형태에서, LF는 제1 결합 부위에 결합하고, 프라이머 혼합물에서 LF와 루프형 프라이머의 양 사이의 비율은 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1이다. 52. 일부 실시형태에서, LB는 제1 결합 부위에 결합하고, 프라이머 혼합물에서 LB와 루프형 프라이머의 양 사이의 비율은 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1이다.

[0043] 일부 실시형태에서, F3은 서열번호: 1의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 2의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 3의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 4의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LF는 서열번호: 6의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 또는 LB는 서열번호: 8의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0044] 일부 실시형태에서, F3은 서열번호: 1의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 2의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 3의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 4의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LF는 서열번호: 6의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LB는 서열번호: 8의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0045] 일부 실시형태에서, F3은 서열번호: 9의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 10의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 11의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 12의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LF는 서열번호: 13의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 또는 LB는 서열번호: 14의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0046] 일부 실시형태에서, F3은 서열번호: 9의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 10의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 11의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 12의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LF는 서열번호: 13의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LB는 서열번호: 14의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0047] 일부 실시형태에서, F3은 서열번호: 16의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 17의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 18의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 19의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LF는 서열번호: 20의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 또는 LB는 서열번호: 21의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0048] 일부 실시형태에서, F3은 서열번호: 16의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 17의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 18의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 19의 올리고뉴클레오

티드를 포함하고, LF는 서열번호: 20의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LB는 서열번호: 21의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0049] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 제2 루프형 프라이머, 여기서 제2 루프형 프라이머는 제3 센서 분자를 포함함; 제3 클램핑 올리고뉴클레오티드; 제2 스페이싱 올리고뉴클레오티드; 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드, 여기서 제3 클램핑 올리고뉴클레오티드, 제2 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제3 및 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm) 미만의 온도에서 헤어핀 구조를 형성할 수 있음; 제4 센서 분자, 여기서 제3 센서 분자와 제4 센서 분자는 제2 바이오센서 쌍이고, 제2 바이오센서 쌍은 제1 바이오센서 쌍과 상이함; 및 제2 표적 서열 상의 제1 결합 부위에 상보적인 제2 프라이머 서열을 추가로 포함한다.

[0050] 일부 실시형태에서, 제3 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드에 상보적이다. 일부 실시형태에서, 표적 서열 및 제2 표적 서열은 동일하다. 일부 실시형태에서, 표적 서열 및 제2 표적 서열은 상이하다.

[0051] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 (i) 제2 정방향 내부 프라이머(SFIP), (ii) 제2 역방향 내부 프라이머(SBIP), (iii) 제2 정방향 프라이머(SF3), 및 (iv) 제2 역방향 프라이머(SB3)를 추가로 포함하며, 여기서 SFIP, SBIP, SF3, 및 SB3은 제2 표적 서열 상의 6개의 상이한 결합 부위에 결합한다.

[0052] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 (i) 제2 루프 정방향 프라이머(SLF) 및 (ii) 제2 루프 역방향 프라이머(SLB)를 추가로 포함하며, 여기서 SLF 및 SLB는 상의 제2 표적 서열 상의 2개의 상이한 결합 부위에 결합한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 제3 루프형 프라이머, 여기서 제3 루프형 프라이머는 제5 센서 분자를 포함함; 제5 클램핑 올리고뉴클레오티드; 제3 스페이싱 올리고뉴클레오티드; 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드, 여기서 제5 클램핑 올리고뉴클레오티드, 제3 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제5 및 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(Tm) 미만의 온도에서 헤어핀 구조를 형성할 수 있음; 제6 센서 분자, 여기서 제5 센서 분자와 제6 센서 분자는 제3 바이오센서 쌍이고, 제3 바이오센서 쌍은 제1 바이오센서 쌍 및 제2 바이오센서 쌍과 상이함; 및 제3 표적 서열 상의 제1 결합 부위에 상보적인 제2 프라이머 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제5 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드에 상보적이다. 일부 실시형태에서, 표적 서열, 제2 표적 서열 및 제3 표적 서열은 동일하다. 일부 실시형태에서, 표적 서열, 제2 표적 서열 및 제3 표적 서열은 상이하다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 (i) 제3 정방향 내부 프라이머(TFIP), (ii) 제3 역방향 내부 프라이머(TBIP), (iii) 제3 정방향 프라이머(TF3), 및 (iv) 제3 역방향 프라이머(TB3)를 추가로 포함하며, 여기서 TFIP, TBIP, TF3 및 TB3은 제3 표적 서열 상의 6개의 상이한 결합 부위에 결합한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 (i) 제3 루프 정방향 프라이머(TLF) 및 (ii) 제3 루프 역방향 프라이머(TLB)를 추가로 포함하며, 여기서 TLF 및 TLB는 제3 표적 서열 상의 2개의 상이한 결합 부위에 결합한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 제4 루프형 프라이머를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 제5 루프형 프라이머를 추가로 포함한다.

[0053] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 제공된 루프형 프라이머 또는 프라이머 혼합물을 동결건조함에 의해 수득된 건조된 프라이머 혼합물을 제공한다.

[0054] 일 양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 제공된 루프형 프라이머, 프라이머 혼합물, 또는 건조된 프라이머 혼합물을 포함하는, 표적 서열의 루프-드-루프 증폭을 위한 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 키트는 중합효소를 추가로 포함하고, 여기서 중합효소는 선택적으로 바실러스 스테아로테르모필루스 중합효소이다. 일부 실시형태에서, 키트는 dNTP, MgSO4, 및 완충액을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 역전사효소를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 RNase 억제제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, RNase 억제제는 돼지 또는 뮤어라인 RNase 억제제이다.

[0055] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 샘플을 제공하는 단계; 본 명세서에 기재된 바와 같이 건조된 프라이머 혼합물을 재수화시켜 수득한 (i) 프라이머, (ii) 프라이머 혼합물, 또는 (iii) 재구성된 프라이머 혼합물 및 중합효소를 샘플에 첨가하여 반응 혼합물을 생성하는 단계; 및 50-85℃에서 반응 혼합물을 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 샘플에서 표적 서열을 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 50-70℃에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 60-65℃에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 62-65℃에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 중합효소는 *바실러스 스테아로테르모필루스* 중합효소이다. 일부 실시형태에서, 방법은 반응 혼합물로부터 신호를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 신호는 형광 신호이다. 일부 실시형태에서, 검출하는 단계는 인큐베이션의 단계 동안 수행된다. 일부 실시형태에서, 방법은 샘플에서 표적 서열의 존재 또는 부재를 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0056] 일부 실시형태에서, 방법은 샘플을 준비하는 선행 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플을 준비하는 단계는 RNA 분자를 역전사효소와 상호작용시켜 DNA 분자를 포함하는 샘플을 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플을 준비하는 단계는 역전사효소와의 상호작용 전 또는 동안에 RNA 분자를 예열하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 RNase 억제제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, RNase 억제제는 돼지 또는 뮤어라인 RNA 억제제이다.

[0057] 일부 실시형태에서, 샘플은 정제된 RNA, 정제된 DNA, 전체 SARS-CoV-2 바이러스, 전체 인간 세포, 타액 또는 비강 면봉, 또는 비강 또는 비인두 면봉을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플은 게놈 DNA, 합성 DNA, 전체 박테리아 또는 질 면봉으로부터의 전체 인간 세포를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0058] **도 1**은 루프형 프라이머의 구조와 루프-드-루프 방법에서 DNA 증폭이 어떻게 진행되는지를 예시한다.

도 2a는 개재하는 염료(SYTO)로 시각화된 *클라미디아 트라코마티스*(CT) 및 *나이세리아 고노루애*(NG)에 대한 LAMP 검정으로부터의 결과를 제공한다. 증폭은 CT의 경우 적어도 5 로그의 [DNA] 및 NG의 경우 6 로그에 비해 신속하다(<30분). NG 검정 분석적 민감도(LOD50)는 PROBIT 분석에 의한 35cp/10 μL 반응이다.

도 2b는 신규 루프형 프라이머를 사용하여 표적 증폭으로부터 판독값을 제공한다. 결과는 SYTO 염료에 비해 최소 억제 및 증강된 특이성으로 표적의 극도로 밝은 실-시간 검출을 나타낸다.

도 2c는 신규 루프형 프라이머로 *나이세리아 고노루애*의 검출을 제공한다. 결과는 방법이 반복가능하고 빠르고, 강력하고, 높은 신호-대-잡음비 증폭을 생성한다는 것을 나타낸다. 프로브는 가양성을 제거한다.

도 3은 50% 치환에서 FAM-표지된 LF 프라이머로 루프-드-루프 방법을 사용하여 *클라미디아 트라코마티스*의 표적 핵산의 증폭을 나타내는 시간에 따른 실-시간 형광 신호의 플롯이다. 오른쪽 표에 표시된 바와 같이 양성 및 음성 샘플 둘 모두를 테스트했다. y-축 상의 각 "주기"는 섭씨 65도에서 30초의 경과 시간을 나타낸다.

도 4는 50% 치환에서 FAM-표지된 LF 프라이머로 루프-드-루프 방법을 사용하여 *나이세리아 고노루애*의 표적 핵산의 증폭을 나타내는 시간에 따른 실-시간 형광 신호의 플롯이다. 오른쪽 표에 표시된 바와 같이 양성 및 음성 샘플 둘 모두를 테스트했다. y-축 상의 각 "주기"는 섭씨 65도에서 30초의 경과 시간을 나타낸다.

도 5는 50% 치환에서 FAM-표지된 LF 프라이머로 루프-드-루프 방법을 사용하여 *호모 사피엔스*의 표적 핵산의 증폭을 나타내는 시간에 따른 실-시간 형광 신호의 플롯이다. 오른쪽 표에 표시된 바와 같이 양성 및 음성 샘플 둘 모두를 테스트했다. y-축 상의 각 "주기"는 섭씨 65도에서 30초의 경과 시간을 나타낸다.

도 6은 루프-드-루프 프라이머로 4개의 양성(왼쪽) 및 4개의 음성(오른쪽) 반응을 함유하는 튜브의 이미지를 제공한다. 형광은 파란색 LED로 여기되었고 파란색 겔 필터를 통해 빛을 냈고 방출은 카메라 폰에 유지된 호박색 플라스틱 필터로 시각화되었다.

도 7은 PCR 튜브에서 동결건조에 의해 제조된 클라미디아 *트라코마티스(상단), 나이세리아 고노루애(중앙)* 및 *호모 사피엔스(하단)*에 대한 루프형 프라이머 검정을 위한 건조(동결건조) 혼합물을 함유하는 튜브의 이미지를 제공한다.

도 8은 사용 전에 재구성된 도 7의 건조된 혼합물을 사용한 루프-드-루프 반응에서 *트라코마티스, 나이세리아 고노루애* 및 *호모 사피엔스*의 표적 핵산의 증폭을 나타내는 실-시간 형광 신호를 제공한다. 결과는 건조된 다음 재구성된 프라이머의 유지된 검정 활성 및 민감도를 나타낸다.

도 9a(1차 테스트) 및 **9b**(2차 테스트)는 다양한 온도에서 POP7b(*H. 사피엔스* RNA 트랜스크립트) 또는 ORF1ab(SARS-CoV-2 게놈 RNA) 프라이머 세트를 사용하여 루프-드-루프 LAMP 반응으로부터 결과를 얻는데 필요한 시간을 플롯팅한다.

도 10은 *H. 사피엔스, C. 트라코마티스, N. 고노루애* 또는 *SARS-CoV-2*로부터의 DNA를 표적화하는 루프-드-루프 프라이머의 용융 곡선을 제공한다. 루프-드-루프 프라이머는 반응 온도인 65℃보다 약 10℃ 높게 펼쳐지도록 설계되었다. 곡선은 루프-드-루프 프라이머의 스템-루프 서열이 형광 신호를 담당한다는 것을 입증한다.

도 11은 25%, 50% 또는 100% 강도에서 프라이머를 사용하여 루프-드-루프 반응으로부터 실-시간 형광 신호를 제공한다. 이 맥락에서 "강도"는 루프-드-루프 방법에 대해 프라이머가 루프형 버전으로 치환되는 정도이다. 데이터는 더 강한 프라이머가 결과까지 시간에서 1-2분 느려지는 대신 더 큰 신호를 제공하는 경향이 있음을 나타낸

다. 100% 강도에서 루프-드-루프 프라이머는 검정 속도를 늦췄지만 다른 실-시간 LAMP 변위 프로브 방법의 정도만큼은 아니다. y-축 상의 각 "주기"는 섭씨 65도에서 30초의 경과 시간을 나타낸다.

도 12는 0.4μM 루프-드-루프 프라이머와 2μM SYTO 개재 염료 둘 모두를 포함하는 루프-드-루프 반응으로부터 상대적 형광 신호를 제공한다. 2-채널 형광 데이터는 개재 염료(SYTO) 및 루프-드-루프 신호의 전개를 위한 동일한 타이밍을 입증한다. 루프-드-루프 대 개재 염료로는 신호 지연이 없었고 루프-드-루프 반응은 SYTO보다 더 큰 신호를 제공했다.

도 13a 및 13b는 루프-드-루프 반응을 사용한 *클라미디아 트라코마티스*의 표적 서열의 증폭으로부터 실-시간 형광 신호를 나타낸다. **도 13a**는 신선하게 혼합된 반응 혼합물로부터 결과이고, **도 13b**는 동결-건조된 반응 혼합물로부터 결과이다. 동결-건조된 검정 혼합물은 3개월 초과 동안 안정적이었고 양호한 판독값을 제공했다. 검정은 14개 복제, 검정의 LoD_{95}(낮은 양성)에서 각각의 Ct E BOUR(*클라미디아 트라코마티스* 균주)(20.7사본/μL), 플러스 2개 무 주형 대조군(NTC)으로 실행되었다. 신선 반응 혼합물과 동결-건조된 반응 혼합물 사이에 민감도(LoD_{95}에서 각각 12/14) 또는 결과까지 평균 시간(16분, T-검정, P-값 = 0.66)에는 변화가 없었다.

도 14a, 14b 및 14c는 단일 튜브 반응(단일 포트)에서 SARS-CoV-2 및 인간 표적 서열의 루프-드-루프 증폭으로부터 스펙트럼으로 이중화된 형광 신호를 나타낸다. 파선 신호는 SARS-CoV-2(FAM)로부터의 것이고 실선 신호는 인간 내부 대조군(Cy5)으로부터의 것이다. 3가지 유형의 샘플이 사용되었다 - 표적 서열 없는 대조군 샘플(도 14a), 조 인간 비강 면봉(도 14b) 및 열-불활성화된 SARS-CoV-2와 조합된 조 인간 비강 면봉(게놈 RNA 표적 서열이 있는 온전한 바이러스)(도 14c). 데이터는 표적 서열의 존재에서만 특정 증폭 신호를 나타낸다. 데이터는 단일 반응 용기에서 루프-드-루프 방법으로 반응의 스펙트럼 다중화를 추가로 입증한다.

도 15a는 다양한 농도의 POP7b 프라이머에서 루프-드-루프 증폭으로부터 실-시간 형광 신호를 나타낸다. POP7b 프라이머의 농도가 감소함에 따라 신호 강도가 감소했다(화살표). 단일 반응 부피에서 하나 초과의 프라이머 세트를 갖는 다중화 적용에서, 프라이머의 100%가 단일 세트에 속하는 반응에 비해 임의의 주어진 프라이머 세트의 농도가 감소될 것이다. **도 15b**는 다양한 농도의 POP7b 프라이머에서 결과까지 시간(분)을 플롯팅한다. 결과까지 시간은 프라이머 농도가 40% 미만으로 떨어졌을 때 영향을 받았으며, 이는 단일 튜브에서 2개 초과 표적을 다중화하는 이점이 속도에 대한 임상 또는 시장-기반 요구보다 중요한 많은 적용에 대해 허용된다. 반응에서 10^{-4} gBlock DNA가 21μL 반응 부피에 사용되었다.

도 16은 어느 하나의 SARS-CoV-2에 특이적인 RNA 표적 서열(ORF1ab), *호모 사피엔스*에 특이적인 RNA 표적 서열(POP7b), 두 표적, 또는 코로나바이러스-양성 대상체로부터 얻은 미처리된 비강 면봉에서 어느 것도 아닌 표적의 루프-드-루프 RT-LAMP 증폭으로부터 실-시간 형광 신호를 나타낸다. 비강 면봉을 루프-드-루프 RT-LAMP 시약 안으로 직접적으로 용리하고 반응 혼합물 안으로 4 농도로 희석하였다. 1x 면봉은 이 테스트 구성에 사용된 샘플의 표준 농도를 단위 부피당 용리된 면봉의 단위로 나타낸다. 이 경우에 SARS-CoV-2 및 인간 RNA 프라이머 세트는 단일 튜브에서 이중화되었다. 각 프라이머 세트는 동일한 형광단 및 소광제 쌍(단일 형광 채널)으로 각각 표지된 1개의 루프형 프라이머를 함유했다. 결과는 SARS-CoV-2와 인간 RNA 둘 모두가 검출된 반응이 이중-증폭 신호를 특징으로 했다는 것이었다. 두 표적 모두의 검출을 초래한 희석액은 "이중 양성"으로 표시된다; 어느 하나의 표적의 검출을 초래하는 것들, "단일 양성"; 어느 표적의 검출도 초래하지 않는 것들, "이중 음성". 이 데이터는 이 코로나바이러스-양성 지원자의 면봉 샘플에 대해, 실-시간 루프-드-루프 RT-LAMP 검정이 반응에서 두 표적 모두를 감지하는 데 필요한 것보다 적어도 370배 더 민감하였다는 것을 입증했다.

도 17은 음성 대상체로부터 얻은 비강 면봉에서 SARS-CoV-2에 특이적인 표적 서열의 루프-드-루프 증폭으로부터 실-시간 형광 신호를 나타낸다.

도 18은 SARS-CoV-2 및 인간 표적 서열의 다중화된 루프-드-루프 증폭으로부터의 형광 신호를 나타내고 루프-드-루프 반응의 특이성을 입증한다. SARS-CoV-2 및 인간 프라이머 세트 둘 모두는 FAM-표지된 프라이머를 사용하여 루프-드-루프에 대해 변형되었으므로 이중 양성 대조군은 2개 증폭 이벤트를 나타낸다. RPPOS는 22개 비-표적 호흡기 병원체로부터 유전 물질을 함유하는 호흡기 병원체 패널 양성(Exact Diagnostics LLC)이다. PRNEG는 핵산이 없는 RPPOS 생성물에 대한 배경 매트릭스 대조군이다. 데이터는 SARS-CoV-2 및 인간 표적을 검출하기 위한 루프-드-루프 RT-LAMP 반응이 표적-외 핵산을 증폭하지 않는다는 것을 나타낸다.

도 19는 높은 *C. 트라코마티스*(Ct)(반응당 10,000 카피 당량) 및 높은 *N. 고노루애*(Ng)(반응당 10,000 카피 당량)를 함유하는 샘플의 루프-드-루프 증폭으로부터의 형광 신호를 나타낸다.

도 20은 음성 대조군 - 면봉 단독 대조군(왼쪽 2개 패널) 또는 완충액 단독 대조군(오른쪽 2개 패널)의 루프-드-루프 증폭으로부터의 형광 신호를 나타낸다.

도면은 단지 예시의 목적으로 본 발명의 다양한 실시형태를 묘사한다. 당업자는 본 명세서에 기술된 발명의 원리를 벗어나지 않고 본 명세서에 예시된 구조 및 방법의 대안적인 실시형태가 이용될 수 있음을 다음의 논의로부터 용이하게 인식할 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] ### 6.1. 정의

[0060] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상인에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 다음 용어는 이들에 대해 아래에 부여된 의미를 갖는다.

[0061] 본 명세서에 사용된 용어 "**바이오센서 쌍**"은 두 센서 분자 사이의 특정 물리적 상호작용에 의해 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 센서 분자의 쌍을 지칭한다. 예를 들어, 바이오센서 쌍은 형광 공명 에너지 전달(FRET)과 같은 포스터 공명 에너지 전달에 사용되는 공여체 분자 및 수용체 분자의 쌍일 수 있다. 이 경우에, 형광 신호는 공여체 분자에서 수용체 분자로 에너지의 거리-의존적 전달에 의해 생성될 수 있다. 다른 실시형태에서, 바이오센서 쌍은 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)에 사용되는 센서 분자의 쌍이다. 이 경우에, 생물발광 신호는 공여체 분자에서 수용체 분자로 에너지의 거리-의존적 전달에 의해 생성될 수 있다. 당업계에 공지된 다른 바이오센서 쌍이 본 개시내용의 다양한 실시형태에서 사용될 수 있다.

[0062] 본 명세서에 사용된 용어 "**루프-드-루프 증폭**" 또는 "**LdL 증폭**"은 에너지의 거리-의존적 전달에 의해 형광 신호를 생성할 수 있는 루프형 프라이머를 사용한 표적 핵산의 증폭을 지칭한다.

[0063] 본 명세서에 사용된 용어 "**LOD**"는 검출의 한계를 지칭한다. 예를 들어, LOD95는 검출의 한계, 95번째 백분위수이다. 이것은 검정이 통계적으로 시간의 양성 결과 95%를 검출할 것으로 예상되는 표적의 농도이다.

[0064] ### 6.2. 기타 해석 규약

[0065] 본 명세서에 인용된 범위는 인용된 평가변수를 포함하여 범위 내의 모든 값에 대한 약기인 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 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, 및 50으로 구성된 군으로부터 임의의 수, 수의 조합 또는 하위-범위를 포함하는 것으로 이해된다.

[0066] 달리 지시되지 않는 한, 하나 이상의 입체중심을 갖는 화합물에 대한 언급은 각각의 입체이성질체 및 그의 입체이성질체의 모든 조합을 의미한다.

[0067] ### 6.3. 루프형 프라이머

[0068] 일 양태에서, 본 발명은 루프-드-루프 증폭을 위한 루프형 프라이머를 제공한다. 루프 프라이머는 5'에서 3'으로 하기를 포함한다:

[0069] 제1 센서 분자;

[0070] 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드;

[0071] 스페이싱 올리고뉴클레오티드;

[0072] 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드,

[0073] 여기서 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m) 미만의 온도에서 헤어핀 구조를 형성할 수 있음;

[0074] 제2 센서 분자,

[0075] 여기서 제1 센서 분자 및 제2 센서 분자는 제1 바이오센서 쌍임; 및

[0076] 표적 서열 상의 제1 결합 부위에 상보적인 제1 프라이머 서열

[0077] 일부 실시형태에서, 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드에 상보적이다. 일부 실시

형태에서, 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있지만 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드에 완전히 상보적이지는 않다.

[0078] 당업계에 공지된 다양한 바이오센서가 본 명세서에 제공된 방법에 대해 사용될 수 있다. 예를 들어, 근접하거나 충분한 거리에서 색상을 변경하거나 측정가능한 신호를 생성하는 분자의 쌍(예를 들어 발광 단백질을 기반으로 하는 NanoLuc, Nanobit, NonoBRET 기술)이 사용될 수 있다.

[0079] 일부 실시형태에서, 제1 바이오센서 쌍은 에너지 공여체 및 수용체 쌍이다. 일부 실시형태에서, 제1 바이오센서 쌍은 포스터 공명 에너지 전달을 위한 에너지 공여체 및 수용체 쌍이다. 일부 실시형태에서, 제1 바이오센서 쌍은 형광 공명 에너지 전달(FRET) 또는 생물발광 공명 에너지 전달(BRET)을 위한 에너지 공여체 및 수용체 쌍이다. 일부 실시형태에서, 제1 센서 분자는 FRET 형광단이고 제2 센서 분자는 FRET 소광제이다. 일부 실시형태에서, 제1 센서 분자는 FRET 소광제이고 제2 센서 분자는 FRET 형광단이다. 일부 실시형태에서, 제1 센서 분자는 BRET 에너지 공여체이고 제2 센서 분자는 BRET 에너지 수용체이다. 일부 실시형태에서, 제1 센서 분자는 BRET 에너지 수용체이고 제2 센서 분자는 BRET 에너지 공여체이다.

[0080] 일부 실시형태에서, FRET 소광제는 5' Iowa Black® FQ라는 상표명으로 Integrated DNA technologies로부터 이용가능한 5IABkFQ이다. 5' Iowa Black® FQ는 531nm에서 피크 흡광도를 갖는 420 내지 620nm의 범위인 넓은 흡광도 스펙트럼을 갖는 FRET 소광제이다. 이 소광제는 플루오레세인 및 녹색에서 분홍색 스펙트럼 범위에서 방출하는 기타 형광 염료와 함께 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 소광제는 임의의 Black Hole Quenchers® (Biosearch Technologies에서 이용가능), 어느 하나의 Iowa Black® 소광제(Integrated DNA technologies에서 이용가능), Zen® 소광제(Integrated DNA Technologies에서 이용가능), 임의의 Onyx® 소광제(Millipore-Sigma에서 이용가능), 또는 임의의 ATTO® 소광제(ATTO-TEC GmbH에서 이용가능)이다.

[0081] 일부 실시형태에서, FRET 형광단은 Int 6-FAM(Azide)이라는 명칭으로 Integrated DNA technologies로부터 이용가능한 i6-FAMK(FAM(플루오레세인) 아지드)이다. 이 형태의 FAM은 클릭 화학을 사용하여 올리고뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 이 변형의 내부 버전은 dT 베이스를 통해 올리고에 부착된다. dT 뉴클레오티드는 변형의 위치에서 부가될 수 있다. 대안적으로, 추가 뉴클레오티드의 부가를 피하기 위해, 서열에 존재하는 T 뉴클레오티드를 필요한 변형으로 대체할 수 있다. 일부 실시형태에서, 형광단은 Cy3, Cy5, TAMRA, 또는 Yakima Yellow® (Integrated DNA Technologies로부터 이용가능)이다.

[0082] 일 실시형태에서, 루프형 프라이머는 내부 소광제(예를 들어, Zen® 또는 Onyx A®) 및 5' 형광단(예를 들어, Yakima Yellow® 또는 HEX)을 포함한다.

[0083] 일부 실시형태에서, 제1 센서 분자 및 제2 센서 분자는 검출가능한 광 신호를 생성하는 복합체를 형성할 수 있다.

[0084] 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 서로 상보적이므로 서로 결합할 수 있다. 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m) 미만의 온도에서 헤어핀 구조를 형성할 수 있다.

[0085] 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 60℃ 초과이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 65℃ 초과이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 70℃ 초과이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 80℃ 초과이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 70 내지 80℃다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 72.5 내지 77.5℃다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 약 75℃ 초과이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 60℃ 미만이다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 60 내지 65℃다.

[0086] 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m)는 가닥 치환 중합효소를 사용한 검정의 확장 온도보다 10℃ 더 높다. 일부 실시형태에서, 용융 온도는 검정의 확장 온도보다 낮거나, 같거나, 그보다 임의의 양 더 높다.

[0087] T_m이 반응의 확장 온도보다 낮을 때, 실시간 검출은 평가변수 검출(클램핑 서열의 T_m에 가깝거나 그 미만으로 반

응을 냉각)로 대체될 수 있고, 루프-드-루프 프라이머를 전체 강도에서 사용하는 경우(100% 치환)에도, 반응의 억제가 없을 수 있다.

[0088] T_m이 반응의 확장 온도와 동일한 경우, 실시간 검출은 여전히 실행가능하지만, 평가변수 결정을 위해 반응을 냉각할 때까지 배경 형광이 더 높을 수 있다.

[0089] T_m이 반응의 확장 온도보다 높을 때, 실시간 검출이 작동의 지배적인 모드일 수 있고 최소 배경 형광이 있을 것이다.

[0090] 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 3 내지 10-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 3 내지 7-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 6-뉴클레오티드 길이이다. 전형적인 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 동일한 길이를 갖는다.

[0091] 일부 실시형태에서, 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 5 내지 35-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 10 내지 20-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 13 내지 18-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 13-뉴클레오티드 길이이다.

[0092] 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드, 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 함께 15 내지 35-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드, 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 함께 20 내지 30-뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시형태에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드, 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 함께 23 내지 28-뉴클레오티드 길이이다.

[0093] 루프형 프라이머는 (i) 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실로부터 선택된 핵염기, (ii) 잠금 핵산, (iii) 2' O-메틸 RNA 염기, (iv) 포스포로티오화된 DNA 염기, (v) 포스포로티오화된 RNA 염기, (vi) 포스포로티오화된 2'-O-메틸 RNA 염기, 또는 (vii) 이의 조합을 포함할 수 있다. 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드, 스페이싱 올리고뉴클레오티드, 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 (i) 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실로부터 선택된 핵염기, (ii) 잠금 핵산, (iii) 2' O-메틸 RNA 염기, (iv) 포스포로티오화된 DNA 염기, (v) 포스포로티오화된 RNA 염기, (vi) 포스포로티오화된 2'-O-메틸 RNA 염기, 또는 (vii) 이의 조합을 포함한다.

[0094] 일부 실시형태에서, 루프형 프라이머는 루프형 프라이머의 5' 말단에 제1 부가 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 루프형 프라이머는 제1 센서 분자와 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드 사이에 제2 부가 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 또는 제2 부가 올리고뉴클레오티드는 바코드 서열이다.

[0095] 일부 실시형태에서, 루프형 프라이머는 루프형 프라이머의 5' 말단에 추가로 부가 바코드 서열, 프로브 서열 또는 기타 서열을 포함한다. 부가 서열은 핵염기 또는 그의 변형을 포함할 수 있다.

[0096] 일부 실시형태에서, 표적 서열은 병원체 게놈에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *클라미디아 트라코마티스*에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *orf8* 또는 *cds2*로부터의 것이다. 구체적으로, 표적 결합 부위는 서열번호: 15의 서열을 가질 수 있다.

[0097] 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *나이세리아 고노루애*에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *porA* 또는 *glnA*로부터의 것이다. 구체적으로, 표적 결합 부위는 서열번호: 5 또는 7의 서열을 가질 수 있다.

[0098] 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *호모 사피엔스*에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 *tbc1d3*으로부터의 것이다. 구체적으로, 표적 결합 부위는 서열번호: 22의 서열을 가질 수 있다.

[0099] **6.4. 루프-드-루프 증폭용 프라이머 혼합물**

[0100] 또 다른 양태에서, 본 발명은 루프-드-루프 증폭을 위한 프라이머 혼합물을 제공한다. 프라이머 혼합물은 본 명세서에 제공된 루프형 프라이머를 포함한다.

[0101] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 하나의 루프형 프라이머를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 하나 초과의 루프형 프라이머를 포함한다. 하나 초과의 루프형 프라이머를 포함하는 경우 혼합물에서 프라

이머는 단일 표적 서열 또는 다중 표적 서열에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수의 루프형 프라이머는 다중 공급원으로부터 표적 서열을 검출하도록 설계된다. 예를 들어, 혼합물은 복수의 병원체로부터 표적 서열을 검출하도록 설계된 복수의 루프형 프라이머를 포함할 수 있다.

[0102] 프라이머 혼합물은 증폭 반응을 위한 부가 프라이머를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 프라이머 혼합물은 (i) 정방향 내부 프라이머(FIP), (ii) 역방향 내부 프라이머(BIP), (iii) 정방향 프라이머(F3) 및 역방향 프라이머(B3)를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 FIP, BIP, F3 및 B3은 표적 서열 상의 6개의 서로 다른 결합 부위에 결합한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 (i) 루프 정방향 프라이머(LF) 및 (ii) 루프 역방향 프라이머(LB)를 추가로 포함하며, 여기서 LF 및 LB는 표적 서열 상의 2개의 상이한 결합 부위에 결합한다. 일부 실시형태에서, 부가 프라이머, 예를 들어 FIP, BIP, F3, B3, LF 또는 LB 중 하나는 제1 결합 부위, 즉 루프형 프라이머와 표적 서열 상의 동일한 결합 부위에 결합한다.

[0103] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 하나의 프라이머 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 본 명세서에 제공된 루프-드-루프 증폭을 위한 루프형 프라이머, (i) 정방향 내부 프라이머(FIP), (ii) 역방향 내부 프라이머(BIP), (iii) 정방향 프라이머(F3), 및 (iv) 역방향 프라이머(B3)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 (i) 루프 정방향 프라이머(LF) 및 (ii) 루프 역방향 프라이머(LB)를 추가로 포함한다.

[0104] 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 본 명세서에 제공된 루프-드-루프 증폭을 위한 루프형 프라이머, 및 (i) 정방향 내부 프라이머(FIP), (ii) 역방향 내부 프라이머(BIP), (iii) 정방향 프라이머(F3) 및 (iv) 역방향 프라이머(B3)로부터 선택된 3개의 프라이머를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 루프형 프라이머, BIP, F3 및 B3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 루프형 프라이머, FIP, F3 및 B3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 루프형 프라이머, FIP, BIP 및 B3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 루프형 프라이머, FIP, BIP 및 F3을 포함한다.

[0105] 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 본 명세서에 제공된 루프-드-루프 증폭을 위한 루프형 프라이머, 및 (i) 정방향 내부 프라이머(FIP), (ii) 역방향 내부 프라이머(BIP), (iii) 정방향 프라이머(F3), (iv) 역방향 프라이머(B3), (v) 루프 정방향 프라이머(LF) 및 (vi) 루프 역방향 프라이머(LB)로부터 선택된 5개의 프라이머를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 루프형 프라이머, BIP, F3, B3, LF 및 LB를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 루프형 프라이머, FIP, F3, B3, LF 및 LB를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 루프형 프라이머, FIP, BIP, B3, LF 및 LB를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 루프형 프라이머, FIP, BIP, F3, LF 및 LB를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 루프형 프라이머, FIP, BIP, F3, B3 및 LF를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 루프형 프라이머, FIP, BIP, F3, B3 및 LB를 포함한다.

[0106] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 2개의 프라이머 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서 프라이머 혼합물은 3개의 프라이머 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 4개 또는 5개의 프라이머 세트를 포함한다.

[0107] 일부 실시형태에서, 각각의 프라이머 세트는 고유한 표적 서열을 증폭하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 동일한 표적 서열을 증폭하기 위한 2개 이상의 프라이머 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 동일한 표적 서열 상의 동일한 결합 부위에 결합하는 2개 이상의 루프형 프라이머를 포함한다.

[0108] 루프형 프라이머는 증폭 반응에 최적화된 임의의 비율로 부가 프라이머와 혼합될 수 있다. 일부 실시형태에서, FIP는 제1 결합 부위에 결합하고, 프라이머 혼합물에서 FIP와 루프형 프라이머의 양 사이의 비는 0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1이다. 일부 실시형태에서, BIP는 제1 결합 부위에 결합하고, 프라이머 혼합물에서 BIP와 루프형 프라이머의 양 사이의 비는 0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1이다. 일부 실시형태에서, LF는 제1 결합 부위에 결합하고, 프라이머 혼합물에서 LF와 루프형 프라이머의 양 사이의 비는 0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1이다. 일부 실시형태에서, LB는 제1 결합 부위에 결합하고, 프라이머 혼합물에서 LB와 루프형 프라이머의 양 사이의 비는 0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1이다.

[0109] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 *나이세리아 고노루에*에 특이적인 표적 서열을 검출하도록 설계된다. 일부 실시형태에서, F3은 서열번호: 1의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 2의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 3의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 4의 올리고뉴클레오티드를

포함하고, LF는 서열번호: 6의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 또는 LB는 서열번호: 8의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일 실시형태에서, F3은 서열번호: 1의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 2의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 3의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 4의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LF는 서열번호: 6의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LB는 서열번호: 8의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 루프형 프라이머는 서열번호: 5 또는 7의 올리고뉴클레오티드이다.

[0110] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 *클라미디아 트라코마티스*에 특이적인 표적 서열을 검출하도록 설계된다. 일부 실시형태에서, F3은 서열번호: 9의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 10의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 11의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 12의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LF는 서열번호: 13의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 또는 LB는 서열번호: 14의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일 실시형태에서, F3은 서열번호: 9의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 10의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 11의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 12의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LF는 서열번호: 13의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LB는 서열번호: 13의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 루프형 프라이머는 서열번호: 15의 올리고뉴클레오티드이다.

[0111] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 *호모 사피엔스*에 특이적인 표적 서열을 검출하도록 설계된다. 일부 실시형태에서, F3은 서열번호: 16의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 17의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 18의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 19의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LF는 서열번호: 20의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 또는 LB는 서열번호: 21의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일 실시형태에서, F3은 서열번호: 16의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, B3은 서열번호: 17의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, FIP는 서열번호: 18의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, BIP는 서열번호: 19의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LF는 서열번호: 20의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, LB는 서열번호: 21의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 루프형 프라이머는 서열번호: 22의 올리고뉴클레오티드이다.

[0112] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 바이러스에 특이적인 표적 서열을 검출하도록 설계된다. 일부 실시형태에서, 바이러스는 SARS-CoV-2이다.

[0113] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 프라이머 혼합물은 다중 표적 서열의 검출을 위해 추가로 조합된다. 일부 실시형태에서, 다중 표적 서열은 상이한 유기체에 특이적이다. 예를 들어, 다중 표적 서열은 상이한 병원체에 특이적이다.

[0114] 따라서, 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 제2 루프형 프라이머를 추가로 포함하며, 여기서 제2 루프형 프라이머는 다음을 포함한다:

[0115] 제3 센서 분자;

[0116] 제3 클램핑 올리고뉴클레오티드;

[0117] 제2 스페이싱 올리고뉴클레오티드;

[0118] 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드,

[0119] 여기서 제3 클램핑 올리고뉴클레오티드, 제2 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제3 및 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m) 미만의 온도에서 헤어핀 구조를 형성할 수 있음;

[0120] 제4 센서 분자,

[0121] 여기서 제3 센서 분자 및 제4 센서 분자는 제2 바이오센서 쌍이고, 제2 바이오센서 쌍은 제1 바이오센서 쌍과 상이함; 및

[0122] 제2 표적 서열 상의 제1 결합 부위에 상보적인 제2 프라이머 서열.

[0123] 일부 실시형태에서, 제3 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드에 상보적이다. 일부 실시형태에서, 제3 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있지만 제4 클램핑 올리고뉴클레오티드에 완전히 상보적이지는 않다.

[0124] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 (i) 제2 정방향 내부 프라이머(SFIP), (ii) 제2 역방향 내부 프라이머

(SBIP), (iii) 제2 정방향 프라이머(SF3), 및 제2 역방향 프라이머(SB3)를 추가로 포함하며, 여기서 SFIP, SBIP, SF3, 및 SB3은 제2 표적 서열 상의 6개의 상이한 결합 부위에 결합한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 (i) 제2 루프 정방향 프라이머(SLF) 및 (ii) 제2 루프 역방향 프라이머(SLB)를 추가로 포함하며, 여기서 SLF 및 SLB는 제2 표적 서열 상의 2개의 상이한 결합 부위에 결합한다.

[0125] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 제3 루프형 프라이머를 추가로 포함하며, 여기서 제3 루프형 프라이머는 다음을 포함한다:

[0126] 제5 센서 분자;

[0127] 제5 클램핑 올리고뉴클레오티드;

[0128] 제3 스페이싱 올리고뉴클레오티드;

[0129] 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드,

[0130] 여기서 제5 클램핑 올리고뉴클레오티드, 제3 스페이싱 올리고뉴클레오티드 및 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제5 및 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드의 용융 온도(T_m) 미만의 온도에서 헤어핀 구조를 형성할 수 있음;

[0131] 제6 센서 분자,

[0132] 여기서 제5 센서 분자 및 제6 센서 분자는 제3 바이오센서 쌍이고, 제3 바이오센서 쌍은 제1 바이오센서 쌍 및 제2 바이오센서 쌍과 상이함; 및

[0133] 제3 표적 서열 상의 제1 결합 부위에 상보적인 제2 프라이머 서열

[0134] 일부 실시형태에서, 제5 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드에 상보적이다. 일부 실시형태에서, 제5 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드에 결합하지만, 제5 클램핑 올리고뉴클레오티드는 제6 클램핑 올리고뉴클레오티드에 완전히 상보적이지 않다.

[0135] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 (i) 제3 정방향 내부 프라이머(TFIP), (ii) 제3 역방향 내부 프라이머(TBIP), (iii) 제3 정방향 프라이머(TF3) 및 제3 역방향 프라이머(TB3)를 포함하며, 여기서 TFIP, TBIP, TF3, 및 TB3은 제3 표적 서열 상의 6개의 상이한 결합 부위에 결합한다.

[0136] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 (i) 제3 루프 정방향 프라이머(TLF) 및 (ii) 제3 루프 역방향 프라이머(TLB)를 포함하며, 여기서 TLF 및 TLB는 제3 표적 서열 상의 2개의 상이한 결합 부위에 결합한다.

[0137] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 루프형 프라이머를 포함한다. 프라이머 혼합물이 2개 이상의 루프형 프라이머를 포함하는 경우, 각각의 루프형 프라이머는 각각 검출을 위한 고유한 신호를 제공하는 고유한 바이오센서 쌍을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 바이오센서 쌍은 검출을 위한 고유한 시각적 신호(예를 들어, 색상)를 제공한다. 일부 실시형태에서, 각각의 바이오센서 쌍은 고유한 염료 분자를 포함한다.

[0138] 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물에서 2개 이상의 루프형 프라이머는 동일한 바이오센서 쌍을 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물에서 2개 이상의 루프형 프라이머는 FAM으로 표지된다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물에서 2개의 상이한 루프형 프라이머는 FAM으로 표지된다.

[0139] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 프라이머 혼합물은 동결건조된다. 건조된 프라이머 혼합물은 본 명세서에 기술된 루퍼형 프라이머 또는 프라이머 혼합물 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 루프형 프라이머를 포함하는 프라이머 혼합물은 동결건조된다. 일부 실시형태에서, 프라이머 혼합물은 동결건조된 비드의 형태이다.

[0140] **6.5.** 루프-드-루프 증폭용 키트

[0141] 또 다른 양태에서, 루프-드-루프 증폭용 키트가 제공된다. 키트는 본 명세서에 제공된 임의의 루프형 프라이머 또는 프라이머 혼합물을 포함할 수 있다.

[0142] 일부 실시형태에서, 키트는 하나의 프라이머 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는 본 명세서에 제공된 루프-드-루프 증폭용 루프형 프라이머, (i) 정방향 내부 프라이머(FIP), (ii) 역방향 내부 프라이머(BIP), (iii) 정방향 프라이머(F3) 및 역방향 프라이머(B3)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머 세트는

(i) 루프 정방향 프라이머(LF) 및 (ii) 루프 역방향 프라이머(LB)를 추가로 포함한다.

[0143] 일부 실시형태에서, 키트는 2개의 프라이머 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서 키트는 3개의 프라이머 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 4개 또는 5개의 프라이머 세트를 포함한다.

[0144] 일부 실시형태에서, 키트는 단일 용기에 함유된 복수의 프라이머 세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 복수의 프라이머 세트를 포함하며, 여기서 각각의 프라이머 세트는 별도의 용기에 개별적으로 함유된다.

[0145] 일부 실시형태에서, 키트는 중합효소를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 중합효소는 가닥-치환 DNA 중합효소이다. 일부 실시형태에서, 중합효소는 *바실러스 스테아로테르모필루스* 중합효소이다. 일부 실시형태에서, 중합효소는 Bst 2.0 WarnStart® DNA 중합효소(NEB로부터 이용가능)이다. 일부 실시형태에서, 키트는 다른 반응 효소, 예를 들어 역전사효소를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 역전사효소는 WarmStart® RTx 역전사효소(NEB로부터 이용가능)이다. 일부 실시형태에서, 키트는 RNase 억제제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, RNase 억제제는 돼지 또는 뮤어라인 RNase 억제제이다.

[0146] 일부 실시형태에서, 키트는 증폭 반응을 위한 시약을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 시약은 dNTP, $MgSO_4$, 및 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 완충제는 계면활성제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 완충제는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10%의 Tween-20을 포함한다. 일부 실시형태에서, 시약은 트레할로스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시약은 수크로스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 시약은 안정화를 위한 중합체를 포함한다. 증폭 시약은 중합효소에 따라 선택되고 최적화될 수 있다.

[0147] 일부 실시형태에서, 키트는 dNTP, $MgSO_4$, 완충제, 루프-드-루프 증폭용 하나 이상의 프라이머 세트, 및 중합효소를 포함하는 혼합물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 dNTP, 루프-드-루프 증폭용 하나 이상의 프라이머 세트, 중합효소, 역전사효소, 및 RNase 억제제를 포함하는 혼합물을 포함한다.

[0148] 일부 실시형태에서, 혼합물은 액체 형태로 된다. 일부 실시형태에서, 혼합물은 건조된 형태로 된다. 일부 실시형태에서, 혼합물은 동결건조된 비드 또는 펠릿으로 제형화된다.

[0149] 일부 실시형태에서, 키트는 증폭 반응을 위한 장치를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 루프-매개된 등온 증폭을 위한 장치를 포함한다.

[0150] 일부 실시형태에서, 키트는 증폭 반응을 실행하기 위한 반응 튜브를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 증폭 반응 전에 샘플의 여과 또는 정제를 위한 성분을 추가로 포함한다.

[0151] 일부 실시형태에서, 키트는 감염 질환의 진단을 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 키트는 *클라미디아 트라코마티스* 및 *나이세리아 고노루에*와 같은 병원성 감염의 진단을 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 키트는 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 및 점 돌연변이의 결정을 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 돌연변이 유전자형의 결정을 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 키트는 약물-내성 표현형과 연관된 돌연변이 유전자형의 결정을 위해 사용된다. 예를 들어, 약물 내성 마커, 예를 들어 세프트리악손/세픽심 내성 마커, 퀴놀론(시프로플록사신) 내성 마커, 마크로라이드 내성 마커(아지트로마이신)가 검출될 수 있다.

[0152] **6.6. 루프-드-루프 증폭 방법**

[0153] 또 다른 양태에서, 루프-드-루프 증폭 방법이 제공된다. 방법은 다음 단계를 포함할 수 있다:

[0154] 샘플을 제공하는 단계;

[0155] (i) 본 명세서에 제공된 건조된 프라이머 혼합물을 재수화함에 의해 얻은 프라이머, 프라이머 혼합물 또는 재구성된 프라이머 혼합물, 및 (ii) 중합효소를 샘플에 첨가하고, 이에 의해 반응 혼합물을 생성하는 단계; 및

[0156] 50-85℃에서 반응 혼합물을 인큐베이션하는 단계

[0157] 반응 온도는 중합효소 및 표적 서열에 의존하여 조정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 50-70℃에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 55-70℃에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 60-65℃에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 62-65℃에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 60, 61, 62, 63, 64, 또는 65℃에서 수행된다.

[0158] 일부 실시형태에서, 방법은 반응 혼합물로부터 신호를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 형광 신호를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 색 또는 탁도의 변화를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 비-시각적 신호를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서,

검출하는 단계는 인큐베이션의 단계 동안 수행된다. 일부 실시형태에서, 검출하는 단계는 인큐베이션의 단계의 완료 후에 수행된다. 일부 실시예에서, 신호는 실시간으로 검출된다. 일부 실시형태에서, 신호는 실시간으로 기록되고 인큐베이션의 단계의 완료 후에 분석된다.

[0159] 일부 실시형태에서, 이 방법은 루프-드-루프 증폭을 위한 샘플을 준비하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플을 준비하는 단계는 RNA 분자를 역전사효소와 상호작용시키고, 이에 의해 DNA 분자를 포함하는 샘플을 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플을 준비하는 단계는 역전사효소와 상호작용하기 전에 샘플 또는 RNA 분자를 함유하는 반응 혼합물을 예열하는 것을 추가로 포함한다.

[0160] 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 증폭을 위한 샘플은 정제된 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플은 정제된 RNA, 정제된 DNA, 전체 SARS-CoV-2 바이러스, 전체 인간 세포, 타액 또는 비강 면봉, 또는 비강 또는 비인두 면봉을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플은 게놈 DNA, 합성 DNA, 전체 박테리아 또는 질 면봉으로부터의 전체 인간 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 증폭을 위한 샘플은 조 샘플이다. 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 증폭을 위한 샘플은 정제된 샘플이다.

[0161] 일부 실시형태에서, 하나 초과의 유형의 신호가 검출된다. 일부 실시형태에서, 다중 형광 또는 다른 시각적 신호가 검출된다. 일부 실시형태에서, 다중 신호가 검출되어 다중 표적 서열의 존재 또는 부재를 결정한다. 일부 실시형태에서, 다중 신호가 검출되어 단일 표적 서열의 존재 또는 부재를 확인한다. 일부 실시형태에서, 다중 신호가 검출되어 방법에 대한 부가의 민감도 및 특이성을 제공한다.

[0162] 표적 서열의 증폭을 위해, 당업계에 공지된 다양한 증폭 방법이 사용될 수 있다.

[0163] 전형적인 실시형태에서, 루프 매개된 등온 증폭("LAMP")은 표적 핵산의 루프-드-루프 증폭에 사용된다. LAMP는 중합효소로 알려진 효소의 가닥 치환 활성에 의존하는 등온 DNA 증폭 방법으로, 이는 염기-특이적 방식으로 연장하는 DNA 또는 RNA 가닥에 뉴클레오티드 염기를 부가하여 상보적 서열을 갖는 이중 가닥 핵산을 형성한다. 등온 증폭 방법에서, 가닥 치환 중합효소 예컨대 *지오바실러스 스테아로테르모필루스* 박테리아로부터의 것(Bst 중합효소 및 그 변이체)은 상보적 가닥을 중합할 때 이중 가닥 DNA의 한 가닥을 대체하고 따라서 열 순환을 요하지 않는다.

[0164] LAMP 방법은 표적 DNA 서열의 6개의 별개 영역을 인식하도록 특별히 설계된 4개의 상이한 프라이머(F3, B3, 내부 정방향 프라이머 또는 FIP 및 내부 역방향 프라이머 또는 BIP)를 사용할 수 있다. 반응의 속도를 향상시키기 위해 2개의 부가 "루프" 프라이머가 부가될 수 있다. 반응 혼합물에서 프라이머의 농도는 다양할 수 있지만 전형적으로 FIP 및 BIP 프라이머의 경우 1.6μM, 순방향 및 역방향 루프 프라이머(LF, LB)의 경우 0.8μM, F3 및 B3 프라이머의 경우 0.2μM으로 설정된다. LAMP 방법의 일부 실시형태에서, 5개의 프라이머가 이용될 수 있다(2개의 가능한 LAMP 프라이머 중 1개만 사용). LAMP 반응은 가닥 치환 반응을 사용하여 일정한 온도(약 65℃)에서 진행된다. 표적의 증폭 및 검출은 샘플, 프라이머, 가닥 치환 활성이 있는 DNA 중합효소, 완충제, 기질을 일정한 온도에서 인큐베이션함에 의해 일 단계에서 완료될 수 있다. LAMP를 위한 전형적인 혼합물 조성은 다음 시약을 함유한다: 20mM Tris-HCL, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 50mM KCl, 8mM $MgSO_4$, 0.1% Tween® 20, 1.4mM dNTP, 0.32U/μL Bst 중합효소, 앞서 언급한 농도에서의 프라이머, 및 20℃에서 pH가 8.8로 조정된 물. 반응 부피는 전형적으로 5μL에서 50μL 사이이다. 반응의 온도는 사용하는 특정 효소와 프라이머에 대해 최적화되고, 반응은 5 내지 60분 동안 진행된다. LAMP는 고도로 민감성이고 특이적이고 효율적이다.

[0165] LAMP는 특정 DNA 또는 RNA 표적(RNA 표적은 먼저 DNA로의 역전사를 필요로 함)을 증폭하기 위해 6개의 표적 부위를 인식하는 적어도 4개의 프라이머(예를 들어 F3, B3, FIP 및 BIP)에 의존한다. 루프 프라이머(예를 들어, LF, LB)가 포함된 경우, 표적 핵산에서 총 8개의 고유한 부위가 6개의 프라이머에 의해 인식된다. 본 명세서에 제공된 다양한 실시형태에서, 총 8개의 고유한 부위 중 하나는 본 명세서에 기재된 루프형 프라이머에 의해 인식될 수 있다. 표적이 샘플에 존재하는 경우, 증폭 반응이 일어날 수 있고 많은 양의 DNA를 제공할 수 있다.

[0166] 본 명세서에 기술된 신규 루프-드-루프 방법은 LAMP 이외의 다른 등온 증폭 방법에 적용될 수 있다. 중합효소 연쇄 반응(PCR)의 온도 순환 의존성을 해결하기 위해 수많은 등온 증폭 방법이 만들어졌다. 이들 방법은 상당히 다를 수 있지만, 그 모두는 몇 가지 공통된 기능을 공유한다. 예를 들어, DNA 가닥은 열 변성되지 않기 때문에, 모든 등온 방법은 프라이머 결합 및 증폭 반응의 개시를 가능하게 하는 대체적인 접근법에 의존한다. 반응이 개시되면 중합효소는 또한 관심있는 서열에 아직 어닐링되는 가닥을 옮겨야 한다. 등온 방법은 전형적으로 이중 가닥 DNA를 분리하기 위해 DNA 중합효소의 가닥-변위 활성을 이용한다. 이 능력을 갖는 중합효소는 Klenow Fragment(3'-5' exo-), Bsu 큰 단편, 및 온건한 온도 반응(25-40℃)을 위한 phi29, 및 더 높은 온도(50-65℃)

반응을 위한 Bst DNA 중합효소의 큰 단편을 포함한다. RNA 종을 검출하기 위해 반응의 온도와 호환되는 역전사효소를 부가하여 증폭의 등온 특성을 유지한다. dsDNA를 분리하기 위한 가닥 변위 메커니즘에 부가하여, 등온 방법은 개시를 위한 초기 변성 요구사항을 피하기 위해 효소 또는 프라이머 디자인이 필요할 수 있다.

[0167] 상기에서 논의된 바와 같이, 루프-매개된 등온 증폭(LAMP)은 표적 DNA의 6-8개 별개의 영역을 인식하는 4-6개의 프라이머를 사용한다. 가닥-치환 DNA 중합효소가 합성을 개시하고 프라이머 중 2개가 루프 구조를 형성하여 후속 증폭 라운드를 용이하게 한다. LAMP는 빠르고 민감하고, 증폭은 매우 광범위하여 LAMP는 현장 진단에 아주-적합하다. 루프-드-루프 프라이머는 단일 또는 임의의 조합 또는 내부 및 또는 루프 프라이머에 사용할 수 있다.

[0168] 가닥 치환 증폭(SDA)은 가닥-치환 DNA 중합효소, 전형적으로 *Bst* DNA 중합효소, 큰 단편 또는 Klenow Fragment (3'-5' exo-)에 의존하여 프라이머에 함유된 부위에 가닥-제한된 제한 엔도뉴클레아제 또는 닉킹 효소에 의해 생성된 닉에서 개시한다. SDA에는 1개의 정방향 및 1개의 역방향 프라이머뿐만 아니라 1개의 범핑 정방향 프라이머 및 1개의 범핑 역방향 프라이머가 필요하다. 닉킹 부위는 각 중합효소 치환 단계로 재생성되어 지수적 증폭을 초래한다. SDA는 전형적으로 임상 진단에 사용된다. SDA에 대한 기존 형광 모니터링 기술이 존재하지만 (Nadeau et al., Real-Time, Sequence-specific detection of nucleic acids during strand displacement amplification, 276m 2 177-187 (1999)), 제한 엔도뉴클레아제 효소의 작용에 의존하여 형광을 생성한다. 정방향 또는 역방향 SDA 프라이머는 형광단과 소광제 쌍 사이에 절단 부위의 위치가 필요하지 않은 루프-드-루프 방법과 함께 사용하기 위해 조정될 수 있다. 절단 부위는 루프-드-루프 프라이머의 클램핑 서열 옆에, 프라이머의 3' 말단 쪽으로 존재하여, 제한 엔도뉴클레아제에 의한 프라이머 절단 이전에, 상보적 가닥 상의 중합효소에 의해 프라이머의 5' 말단의 완전한 확장에 의해 형광이 생성된다.

[0169] 헬리카제-의존적 증폭(HDA)은 가닥을 분리하기 위해 헬리카제의 이중-가닥 DNA 풀림 활성을 이용하여, 가닥-치환 DNA 중합효소에 의한 프라이머 어닐링 및 연장을 가능하게 한다. PCR과 마찬가지로 이 시스템은 2개의 프라이머, 1개의 정방향 프라이머 및 1개의 역방향 프라이머만 필요로 한다. HDA는 여러 진단 장치 및 FDA-승인된 테스트에 이용되었다. HDA에서 어느 하나의 프라이머는 루프-드-루프 방법과 함께 사용을 위해 적용되어 실시간으로 반응의 폐쇄된 튜브 모니터링을 실-시간 생성할 수 있다. HDA에서 헬리카제 효소는 루프-드-루프 프라이머의 루프 구조를 열 수 있으며, 이는 단일 가닥의 결합 단백질에 의해 안정화될 수 있고, 그런 다음 DNA 중합효소에 의해 이중-가닥의 형광 앰플리콘으로 전환될 수 있다.

[0170] 닉킹 효소 증폭 반응(NEAR)은 닉킹 효소에 의해 생성된 닉에서 개시되는 가닥-치환 DNA 중합효소를 이용하여 표적 서열로부터 많은 짧은 핵산을 빠르게 생성한다. 이 과정은 매우 빠르고 민감하여 몇 분 안에 적은 목표 양의 검출을 가능하게 한다. NEAR은 일반적으로 임상 및 생물안전 적용에서 병원체 검출에 사용된다. NEAR용 정방향 또는 역방향 프라이머는 루프-드-루프 방법을 사용하여 DNA 중합효소를 치환하는 가닥에 의한 루프의 확장을 통해 실-시간 형광을 생성할 수 있다.

[0171] **6.7. 사용의 방법**

[0172] 본 명세서에 제공된 루프-드-루프 증폭 방법은 다양한 공급원으로부터 표적 서열을 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 그것은 바이러스 게놈, 박테리아 게놈, 고세균 게놈, 식물 게놈, 동물 게놈, 원생생물 게놈, 원핵생물 게놈 또는 진핵생물 게놈에 특이적인 표적 서열을 검출하는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 방법은 RNA(예를 들어, 포지티브 센스 RNA, 네거티브 센스 RNA), 또는 DNA를 검출하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 합성적으로 생성된 표적 서열을 검출하는 데 사용된다.

[0173] 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 방법은 병원체에 특이적인 DNA의 검출을 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 병원체는 바이러스, 박테리아, 진균, 원생동물 또는 벌레이다. 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 방법을 사용하여 STD와 연관된 병원체를 검출한다. 일부 실시형태에서, 병원체는 *클라미디아 트라코마티스*이다. 일부 실시형태에서, 병원체는 *나이세리아 고노루에*이다. 일부 실시형태에서, 병원체는 SARS-CoV-2이다.

[0174] 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 방법이 감염의 진단에 사용된다. 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 방법은 돌연변이 유전자형의 결정에 사용된다. 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 방법은 약물-내성 표현형과 연관된 돌연변이 유전자형의 결정에 사용된다. 예를 들어, 약물 내성 마커, 예를 들어 세프트리악손/세픽심 내성 마커, 퀴놀론(시프로플록사신) 내성 마커, 마크로라이드 내성 마커(아지트로마이신)가 검출될 수 있다.

[0175] 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 방법은 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP)의 결정에 사용된다. 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 방법은 돌연변이의 결정에 사용된다.

[0176] 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 방법은 단일 표적의 검출에 사용된다. 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 방법은 하나 초과의 표적의 검출에 사용된다. 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 방법은 2, 3, 4, 또는 5개의 표적의 검출에 사용된다.

[0177] 일부 실시형태에서, 루프-드-루프 방법은 샘플의 분석 또는 특성화에 사용된다. 일부 실시예에서 루프-드-루프 방법은 샘플의 출처를 식별하는데 사용된다. 예를 들어, 루프-드-루프 방법은 인간 샘플을 식별하는데 사용된다.

[0178] 본 명세서에 기술된 루프-드-루프 방법은 다양한 샘플의 분석에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈액, 소변, 정액, 조직 또는 타액 샘플이 분석된다. 일부 실시형태에서, 샘플은 동물 또는 인간 환자로부터 수집된다. 일부 실시형태에서, 정제된 샘플이 분석된다. 일부 실시형태에서, 조 샘플이 분석된다. 일부 실시형태에서, 샘플은 정제된 RNA, 정제된 DNA, 전체 SARS-CoV-2 바이러스, 전체 인간 세포, 타액 또는 비강 면봉, 또는 중-비갑개 또는 비인두 면봉을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플은 게놈 DNA, 합성 DNA, 전체 박테리아 또는 질 면봉으로부터의 전체 인간 세포를 포함한다.

[0179] **6.8. 실시예**

[0180] 다음 실시예는 제한이 아닌 예시의 방식으로서 제공된다.

[0181] **6.8.1. 실시예 1: 개재 염료(SYTO)를 사용한 클라미디아 트라코마티스 및 나이세리아 고노루애에 대한 LAMP 검정**

[0182] LAMP 반응 혼합물을 준비하여 *클라미디아 트라코마티스* 게놈 DNA 및 *나이세리아 고노루애* 게놈 DNA를 별도로 검출하였다. 반응은 10 μL 부피로 준비하였고 다음 시약을 함유했다: 20mM Tris-HCL, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 50mM KCl, 8mM $MgSO_4$, 0.1% Tween® 20, 1.4mM dNTP, 0.32U/μL *Bst* 2.0 WarmStart® 중합효소, 1.6 μM에서 FIP 및 BIP를 갖는 프라이머(서열번호 1-4, 6, 8-14), 0.8 μM에서 LF 및 LB, 0.2 μM에서 F3 및 B3, 2.5 μM SYTO 85 개재 염료 및 20℃에서 8.8로 조정된 pH를 갖는 물. 표적 게놈 DNA를 ATCC에서 구입한 스톡 용액으로부터의 pH 8.0 Tris-HCL 완충액에서 10-배수 희석했다. 무 주형 대조군에 대해, 표적 DNA 또는 DNA-유리 완충액을 각 PCR 튜브 내의 용액 혼합물 9 μL에 1 μL로 첨가했다. 반응의 온도는 65℃였고, 반응은 SYTO 85 형광을 통해 모니터링되었다. 실시간 PCR 기계를 사용하여 반응을 가열하고 실시간으로 형광을 측정하는 둘 모두를 했다. 반응을 60분 동안 실행하였다. 도 2a에 도시된 데이터는, 3가지 수준의 게놈 DNA 표적 각각 - 높음(스톡 농도), 낮음(*Ct*의 경우 스톡 DNA의 10^{-5} 희석, *Ng*의 경우 스톡 DNA의 10^{-6} 희석) 및 무 주형 대조군(무 DNA(NTC))에 대해, 개재 염료에 의해 모니터링된 *클라미디아 트라코마티스*(녹색) 및 *나이세리아 고노루애*(파란색)에 대한 LAMP 반응으로부터 수직 축 상의 실시간 형광(임의 단위) 대 수평 축 상의 시간의 대표적인 곡선을 나타낸다.

[0183] **6.8.2. 실시예 2: 루프-드-루프 증폭에 의한 *클라미디아 트라코마티스*의 검출**

[0184] 루프-드-루프 LAMP 반응 혼합물을 준비하여 *클라미디아 트라코마티스* 게놈 DNA를 검출하였다. 반응은 10 μL 부피로 준비하였고 다음 시약을 함유했다: 20mM Tris-HCL, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 50mM KCl, 8mM $MgSO_4$, 0.1% Tween® 20, 1.4mM dNTP, 0.32U/μL *Bst* 2.0 WarmStart® 중합효소, 1.6 μM에서 FIP 및 BIP를 갖는 프라이머(서열번호 9-15), 0.4 μM에서 LF 및 LF-LdL, 0.8 μM에서 LB, 0.2 μM에서 F3 및 B3, 및 20℃에서 8.8로 조정된 pH를 갖는 물. 정량화된 표적 게놈 DNA를 ATCC에서 구입한 스톡 용액으로부터의 pH 8.0 Tris-HCL 완충액에서 10-배수 또는 2-배수(더 미세한 분해능을 위해) 희석했다. 무 주형 대조군에 대해, 표적 DNA 희석액 또는 DNA-유리 완충액을 각 PCR 튜브 내의 용액 혼합물 9 μL에 1 μL로 첨가하고 농도당 최대 20개 복제물을 몇몇-로그 농도 범위에 걸쳐서 사용하여 검정 감도를 확인했다. 반응의 온도는 65℃였고, 루프-드-루프 프라이머에 의해 발산되는 FAM 형광을 통해 반응을 모니터링하였다. 실시간 PCR 기계를 사용하여 반응을 가열하고 실시간으로 형광을 측정하는 둘 모두를 했다. 반응을 60분 동안 실행하였다. 도 3에 표시된 데이터는 게놈 DNA 표적의 10-배수 희석에 대한 *클라미디아 트라코마티스*에 대한 루프-드-루프 LAMP 반응으로부터 수직 축 상의 실시간 형광(임의 단위) 대 수평 축 상의 시간(각 '주기'는 30초를 나타냄)의 대표적인 곡선을 나타낸다. 검정 감도(검출의 한계, 50% 및 95% 확률)는 검정의 평가변수 결정을 기반으로 하는 PROBIT 분석에 의해 추정되었다.

[0185]

유기체	표적	속도 (분)	LoD_{95} (cp/rxn)	LoD_{50} (cp/rxn)
C. 트라코마티스	*orf8* (숨은 플라스미드)	8-19	20.7	3.14

[0186] **6.8.3. 실시예 3: 루프-드-루프 증폭에 의한 *나이세리아 고노루애*의 검출**

[0187] 루프-드-루프 LAMP 반응 혼합물을 준비하여 *나이세리아 고노루애* 게놈 DNA를 검출하였다. 반응은 10μL 부피로 준비하였고 다음 시약을 함유했다: 20mM Tris-HCL, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 50mM KCl, 8mM $MgSO_4$, 0.1% Tween® 20, 1.4mM dNTP, 0.32U/μL *Bst* 2.0 WarmStart® 중합효소, 1.6μM에서 FIP 및 BIP를 갖는 프라이머(서열번호 1-4, 6-8), 0.4μM에서 LF 및 LF-LdL, 0.8μM에서 LB, 0.2μM에서 F3 및 B3, 및 20℃에서 8.8로 조정된 pH를 갖는 물. 정량화된 표적 게놈 DNA를 ATCC에서 구입한 스톡 용액으로부터의 pH 8.0 Tris-HCL 완충액에서 10-배수 또는 2-배수(더 미세한 분해능을 위해) 희석했다. 무 주형 대조군에 대해, 표적 DNA 희석액 또는 DNA-유리 완충액을 각 PCR 튜브 내의 용액 혼합물 9μL에 1μL로 첨가하고 농도당 최대 20개 복제물을 몇몇-로그 농도 범위에 걸쳐서 사용하여 검정 감도를 확인했다. 반응 온도는 65℃였고, 루프-드-루프 프라이머에 의해 발산되는 FAM 형광을 통해 반응을 모니터링하였다. 실시간 PCR 기계를 사용하여 반응을 가열하고 실시간으로 형광을 측정하는 둘 모두를 했다. 반응을 60분 동안 실행하였다. 도 2b-c에 도시된 데이터는 게놈 DNA 표적의 10-배수 희석에 대한 *나이세리아 고노루애*에 대한 루프-드-루프 LAMP 반응으로부터 수직 축 상의 실시간 형광(임의 단위) 대 수평 축 상의 시간의 대표적인 곡선을 나타낸다. 도 2b는 루프-드-루프 검정으로부터의 신호를 도 2a에 도시된 바와 같이 루프-드-루프 프라이머 없이 그리고 SYTO 85 염료로 수행된 LAMP 검정의 신호와 비교한다. 루프-드-루프 검정은 양성 증폭의 경우 훨씬 더 큰 신호를 제공한다. 도 2c에서, 루프-드-루프 검정의 재현성뿐만 아니라 무시할 수 있는 배경 형광 및 무 주형 대조군에서 감소된 늦은 의사의 증폭 생성물이 입증되었다. 도 4에 도시된 데이터는 게놈 DNA 표적의 10-배수 희석에 대한 *나이세리아 고노루애*에 대한 루프-드-루프 LAMP 반응으로부터 수직 축 상의 실시간 형광(임의 단위) 대 수평 축 상의 시간(각 '주기'는 30초를 나타냄)의 대표적인 곡선을 나타낸다. 그런 다음 검정의 평가변수 결정을 기반으로 한 PROBIT 분석에 의한 일련의 희석 시험 결과로부터 검정 감도(검출의 한계, 50% 및 95% 확률)가 추정되었다.

유기체	표적	속도 (분)	LoD_{95} (cp/rxn)	LoD_{50} (cp/rxn)
N. 고노루애	*porA* 위유전자	10-20	543	82.4

[0188]

[0189] **6.8.4. 실시예 4: 루프-드-루프 증폭에 의한 *호모 사피엔스*의 검출**

[0190] 루프-드-루프 LAMP 반응 혼합물을 준비하여 *호모 사피엔스* 게놈 DNA를 검출하였다. 반응은 10μL 부피로 준비하였고 다음 시약을 함유했다: 20mM Tris-HCL, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 50mM KCl, 8mM $MgSO_4$, 0.1% Tween® 20, 1.4mM dNTP, 0.32U/μL *Bst* 2.0 WarmStart® 중합효소, 1.6μM에서 FIP 및 BIP를 갖는 프라이머(서열번호 16-22), 0.4μM에서 LF 및 LF-LdL, 0.8μM에서 LB, 0.2μM에서 F3 및 B3, 및 20℃에서 8.8로 조정된 pH를 갖는 물. 정량화된 표적 게놈 DNA를 ATCC에서 구입한 스톡 용액으로부터의 pH 8.0 Tris-HCL 완충액에서 10-배수 또는 2-배수(더 미세한 분해능을 위해) 희석했다. 무 주형 대조군에 대해, 표적 DNA 희석액 또는 DNA-유리 완충액을 각 PCR 튜브 내의 용액 혼합물 9μL에 1μL로 첨가하고 농도당 최대 20개 복제물을 몇몇-로그 농도 범위에 걸쳐서 사용하여 검정 감도를 확인했다. 반응 온도는 65℃였고, 루프-드-루프 프라이머에 의해 발산되는 FAM 형광을 통해 반응을 모니터링하였다. 실시간 PCR 기계를 사용하여 반응을 가열하고 실시간으로 형광을 측정하는 둘 모두를 했다. 반응을 60분 동안 실행하였다. 도 3에 도시된 데이터는 게놈 DNA 표적의 10-배수 희석에 대한 *호모 사피엔스*에 대한 루프-드-루프 LAMP 반응으로부터 수직 축 상의 실시간 형광(임의 단위) 대 수평 축 상의 시간(각 '주기'는 30초를 나타냄)의 대표적인 곡선을 나타낸다. 그런 다음 검정의 평가변수 결정을 기반으로 한 PROBIT 분석에 의해 검정 감도(검출의 한계, 50% 및 95% 확률)가 추정되었다.

유기체	표적	속도 (분)	LoD_{95} (cp/rxn)	LoD_{50} (cp/rxn)
H. 사피엔스	*tbc1d3*	6.5-18	112	11.5

[0191]

[0192] **6.8.5. 실시예 5: 루프-드-루프 증폭을 위한 건조된 프라이머 혼합물**

[0193] 동결 건조된 시약으로의 제형화는 5-단계 동결 건조 프로토콜을 사용하여 인-하우스 동결건조 시험으로 수행되었다. *나이세리아 고노루애*를 검출하도록 설계된 루프-드-루프 LAMP 반응 혼합물을 튜브당 25μL 부피로 준비하고 각 튜브 안으로 분취했다. 동결건조된 혼합물은 다음 시약을 함유했다: 1.4mM dNTP, 무-글리세롤 제형으로 0.32U/μL *Bst* 2.0 WarmStart® 중합효소, 1.6μM에서 FIP 및 BIP가 있는 프라이머(서열번호: 1-4, 6-8), 0.4μM에서 LF 및 LF-LdL, 0.8μM에서 LB, 0.2μM에서 F3 및 B3, 5% 트레할로스 및 물(반응당 최대 25μL). 튜브 뚜껑은 동결건조를 위해 제거되었다. 튜브 스트립은 제약 및 생명공학 산업에서 표준 장비 시편인 가열된 선반

동결건조기 장치에서 금속 선반 상에 배치되었다. 동결건조기는 5단계로 작동하도록 프로그래밍되었다. 단계 1: 콘덴서 온, 진공 오프, 선반 및 시약을 41°F로 30분 냉각한다. 콘덴서 온, 진공 오프, 선반 및 시약을 23°F로 30분 냉각한다. 단계 3: 콘덴서 온, 진공 오프, 선반 및 시약을 -23°F로 2시간 냉각한다. 단계 4: 콘덴서 온, 진공 오프, 선반 및 시약을 -23°F로 10시간 유지한다. 단계 5: 콘덴서 온, 진공 오프, 선반 및 시약을 77°F로 5시간 가열한다. 이 과정이 완료되면 튜브를 제거하고 캡을 씌워 도 7에 도시된 생성물을 생성했다. 동결-건조된 검정의 활성은 일정 기간에 걸쳐 다양한 환경 조건에서 인큐베이션한 후 시험되었다. 도 8은 재수화된 반응의 대표적인 실시간 루프-드-루프 LAMP 검정 활성을 나타낸다. 재수화 프로토콜은 건조된 시약에 24 μL의 재수화 완충액을 1 μL의 *나이세리아 고노루애* 표적 게놈 DNA와 함께 추가하는 것으로 구성되었다. 재수화 완충액은 20mM Tris-HCL, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 50mM KCl, 8mM $MgSO_4$, 0.1% Tween® 20 및 20℃에서 8.8로 조정된 pH를 갖는 물로 구성되었다. 완충액을 튜브에 첨가한 다음 재-밀봉하고 와류 또는 혼합 없이 실시간 qPCR 기계 안으로 직접적으로 배치했다. 반응의 온도는 65℃였고, 루프-드-루프 프라이머에 의해 발산되는 FAM 형광을 통해 반응을 모니터링하였다. 실시간 PCR 기계를 사용하여 반응을 가열하고 실시간으로 형광을 측정하는 둘 모두를 했다. 반응을 60분 동안 실행하였다. 도 8에 도시된 데이터는 게놈 DNA 표적의 10-배수 희석에 대한 *나이세리아 고노루애*에 대한 루프-드-루프 LAMP 반응으로부터 수직 축 상의 실시간 형광(임의 단위) 대 수평 축 상의 시간(각 '주기'는 30초를 나타냄)의 대표적인 곡선을 나타낸다. 동결건조된 루프-드-루프 검정 속도, 감도 및 특이성은 새롭게 제형화된 검정 속도, 감도 및 특이성과 다르지 않은 것으로 밝혀졌다. 더욱이, 형광의 크기는 건조 및 재수화에 의해 영향을 받지 않았으며, 이는 루프-드-루프 방법이 병원체 검출을 위한 저장-안정성 시험관내 진단 키트를 제공할 수 있음을 나타낸다.

[0194] **6.8.6. 실시예 6: 루프-드-루프 증폭을 위한 온도**

[0195] 하나는 ORF1ab 프라이머 세트를 포함하고 다른 하나는 POP7b 프라이머 세트를 포함하는, 루프-드-루프 LAMP 반응 혼합물을 상기 논의된 바와 같이 제조하였다. ORF1ab 프라이머 세트는 단일 가닥의 양성 센스 RNA 게놈을 가지고 있는 SARS-CoV-2 바이러스에 특이적이다. POP7b 프라이머 세트는 DNA 주형으로 자연적으로 발생하지 않는 인간 RNA 표적에 특이적이다; 따라서 이 프라이머 세트는 샘플에서 인간 RNA의 특정 지표로 유용하다. 두 경우 모두에서, 루프-드-루프를 사용하여 LAMP에 사용된 6개 구성 프라이머 중 하나를 변형하여 일곱 번째 루프형 프라이머를 생성했다. 루프형 프라이머는 형광단과 소광제 쌍을 활용하여 관찰가능한 신호를 생성했다. 이 실험을 위해, 각 프라이머 세트에 대한 RNA 표적의 것에 상응하는 그 양성 센스 가닥 상에 서열을 함유하는 적당하게 높은 농도의 합성 이중 가닥의 DNA 주형을 LAMP 반응 온도 최적화를 위한 표적으로 활용하여 역전사 단계 또는 희석 표적으로 발생하는 확률론적 노이즈에 기인한 가변성을 최소화했다. 표적 DNA 희석액을 384-웰 플레이트 내의 혼합물에 첨가했다. 그것은 55 내지 70℃의 범위인 다양한 온도에서 인큐베이션되었고, 반응은 루프-드-루프 프라이머에 의해 발산되는 FAM 형광을 통해 모니터링되었다. 실시간 PCR 기계를 사용하여 반응을 가열하고 실시간으로 형광을 측정하는 둘 모두를 했다. 반응을 60분 동안 실행하였다. 실험은 중첩하는 온도 범위(1차 테스트 및 제2 테스트)에 대해 2번 수행되었고 데이터는 도 9a 및 9b에 도시되어 있다. 도면은 검출을 위한 충분한 신호를 얻는 데 필요한 시간을 나타낸다. 결과는 프라이머 세트가 광범위한 온도에 걸쳐서 활성임을 나타낸다. 예를 들어, 약 57-70℃는 POP7b 및 ORF1ab 프라이머 세트 둘 모두에 대해 허용가능한 범위였다. 최적의 성능은 60℃와 68℃ 사이에서 달성되었다.

[0196] **6.8.7. 실시예 7: 정제된 표적과 조 표본에서 표적 둘 모두를 검출하기 위한 다중화된 루프-드-루프 반응**

[0197] **도 14a, 14b 및 14c**는 각각 SARS-CoV-2 및 ORF1ab와 POP7b LdL 프라이머 세트를 갖는 인간 표적 서열의 루프-드-루프 증폭으로부터 2개 형광 신호를 나타낸다. SARS-CoV-2 ORF1ab(FAM) 및 POP7b 인간 내부 대조군(Cy5)으로부터의 신호가 도시된다. 3가지 유형의 샘플이 사용되었다 - 임의의 표적 서열이 없는 대조군 샘플(무 주형 대조군)(도 14a), 인간 비강 면봉(도 14b) 및 열-불활성화된 바이러스의 형태에서 SARS-CoV-2 표적 서열과 조합된 인간 비강 면봉(도 14c). 인간 비강 면봉은 지원자로부터 자체-수집되었고 샘플 처리 또는 핵산 추출 없이 반응에 직접적으로 추가되었다. 면봉을 몇 초 동안 비틀어서 반응 혼합물 안으로 용리시켰다. SARS-CoV-2 표적 서열은 SARS-CoV-2-양성 반응물 안으로 온전한 열-불활성화된 바이러스(ATCC VR-1986HK)가 스파이크되면서 반응물 안으로 도입되었다. ORF1ab LdL-FAM 및 POP7b LdL-Cy5 프라이머 세트는 복제 반응 부피에서 1:1 비율로 이중화되었다. 두 프라이머 세트 모두 비표지된 프라이머 유사체(25% 강도)에 비해 1:3 비율로 LdL 프라이머를 활용했다. 반응물은 역전사효소, 가닥 치환 중합효소 및 RNase 억제제를 함유했다. 실시간 PCR 기계(Bio-Rad CFX-384®)를 사용하여 섭씨 55.6도에서 2.5분 동안 반응물을 인큐베이션한 다음 FAM 및 Cy5에 대한 형광 측정을 기록하면서 섭씨 63.5도에서 60분 동안 반응물을 인큐베이션했다. 예상대로 무 주형 대조군 복제물은 60분에 걸쳐 동안 루프-드-루프 형광 신호를 나타내지 않았다. COVID-19 음성 비강 면봉 샘플을 함유하는 반응물은 Cy5 형광

의 증가로 입증되는 바와 같이 POP7b 신호의 증폭을 나타낸 반면 ORF1ab 신호는 평평하게 유지되었다(음성). 열-불활성화된 바이러스로 스파이크된 샘플은 단일 반응 용기에서 두 RNA 표적 모두의 스펙트럼으로 이중화된 검출을 보여주었다. 결과는 루프-드-루프 RT-LAMP가 SARS-CoV-2와 인간 표적의 단일-튜브 스펙트럼 다중화를 허용한다는 것을 나타낸다.

[0198] ORF1ab LdL 프라이머 세트로 SARS-CoV-2에 대한 다중화된 루프-드-루프 시험은 PCR 시험만큼 민감했고 추출을 요하지 않았는데, 그 이유는 조 샘플과의 반응이 아래 표에 제공된 바와 같이 양호한 결과를 제공했기 때문이다. POP7b LdL 프라이머 세트를 내부 대조군으로 사용했다. 온전한 열-불활성화된 SARS-CoV-2 바이러스(ATCC VR-1986HK)의 일련의 희석액을 이중화된 루프-드-루프 반응물에 추가하고 실시간 신호 발생을 모니터링했다. 검정에 대한 검출의 한계는 테스트 키트의 특정 형식에 대해 LoD95 = 400cp/swab = $2.7x10^{3}$cp/mL로 추정되었다.

[0199]

카피 / 반응 또는 카피 / 면봉	양성 / 총
512	2/2
372	7/8
256	1/2
128	0/2

[0200] 삼중화된 루프-드-루프 반응이 또한 단일 튜브에서 시험되었다. 그것은 3개 표적의 특정 증폭을 보여 결과에 대한 빠른 시간을 유지했다. SARS-CoV-2 바이러스 RNA에 대한 2개 별도의 표적이 FAM 형광단으로 표지된 2개 루프-드-루프 프라이머 세트를 사용하여 검출되었다. Cy5로 표지된 인간 내부 대조군 루프-드-루프 프라이머 세트가 제3 RNA 표적을 검출했다. 내부 Cy5 형광단은 5' Iowa Black® RQ 소광제와 쌍을 이루었다. 반응물은 조 비강 면봉 용리액을 함유하였고 열-불활성화된 SARS-CoV-2로 스파이크되었다.

[0201] 추가의 루프형 프라이머가 또한 POP7b 인간 내부 대조군을 위한 루프-드-루프 프라이머 세트에 사용하기 위해 시험되었다. 한 경우에는 제2 센서 분자인 내부 TAMRA 형광단이 제1 센서 분자인 5' Iowa Black® FQ 소광제와 쌍을 이루었다. 또 다른 경우에는 제1 센서 분자인 5' Yakima Yellow®(Epoch Biosciences)가 제2 센서 분자인 내부 Zen™(Integrated DNA Technologies) 소광제와 쌍을 이루었다. Yakima Yellow 및 Zen 구성의 경우 루프형 프라이머의 3가지 변형이 생성되었고 시험되었다. 제1 변형에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드와 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 완벽하게 상보적이었고 각각 6개 염기 길이였다. 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 13개 염기 길이였다. 제2 변형에서, 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드는 그 5' 말단에 추가 염기를 특징으로 하여 제1 클램핑 올리고뉴클레오티드는 7개 염기 길이이고 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드는 6개 염기 길이였다. 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드 사이에는 6개 상보적 염기가 있었다. 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 13개 염기 길이였다. 제3 변형에서 제1 및 제2 클램핑 올리고뉴클레오티드 둘 모두는 7개 염기 길이였으며 서열은 완벽하게 상보적이었다. 스페이싱 올리고뉴클레오티드는 10개 염기 길이였다.

[0202] 이들 추가 루프형 프라이머는 LAMP 반응에 사용된다. 반응은 표적 서열의 특정 증폭 신호를 제공한다.

[0203] **6.8.8. 실시예 8: 루프-드-루프 증폭에 의한 인간 샘플에서 SARS-CoV-2의 검출**

[0204] 루프-드-루프 LAMP 반응 혼합물을 준비하여, 처리되지 않은 인간 타액으로부터 SARS-CoV-2를 검출하였다. 동결건조된 효소, dNTP 및 올리고뉴클레오티드 프라이머 혼합물을 pH 완충 염 용액에서 인간 타액의 10%vol/vol 혼합물로 재수화하여 PCR 튜브에서 반응물을 준비했다. 동결건조된 프라이머 혼합물은 SARS-CoV-2 및 인간 내부 대조군 RNA 서열에 대한 프라이머 세트를 포함했다. 타액 샘플로 재수화되면, 바이러스 용해, RNase 억제 및 역전사를 촉진하기 위해 사전가열 온도에서 정의된 시간 동안 반응물을 인큐베이션한 다음, LAMP DNA 증폭을 위해 더 높은 반응 온도에서 인큐베이션했다. 온도 제어 및 실시간 형광 데이터는 맞춤형 기기를 사용하여 수집되었다.

[0205] 열 불활성화된 SARS-CoV-2를 익명의 기증자로부터 수집된 신선한 타액의 풀에 첨가했다. 타액에 3-배수 일련의 희석액을 준비했다. 루프-드-루프 증폭 방법을 사용하여 20개 샘플을 시험했다. 모바일 앱, 눈 또는 실시간 곡선-검사에 의한 판독값은 아래에 요약되어 있다. 결과는 LoD가 약 2,500cp/mL임을 나타낸다.

전체 바이러스 (게놈 카피/mL 타액)	모바일 앱에 의한 양성 검출	눈에 의한 양성 (혼탁)	실시간 곡선-검사에 의한 양성
$1.77x10^6$ cp/mL	3/3	3/3	3/3
$5.90x10^5$ cp/mL	3/3	3/3	3/3
$1.97x10^5$ cp/mL	3/3	3/3	3/3
$6.56x10^4$ cp/mL	23/23	23/23	23/23
$2.19x10^4$ cp/mL	2/3	2/3	2/3
0 cp/mL (음성 타액)	0	0	0

[0206]

[0207] 자원자 대상체로부터 자체-수집된 비강 면봉을 얻었고 10회 비틀어서 반응 혼합물에 직접적으로 첨가하였다. 도 16은 이후 PCR 검사에 의해 COVID에 대해 양성으로 확인된 유증상 자원자로부터 얻은 비강 면봉으로부터의 증폭 결과를 나타낸다. 양성/음성 대조군 샘플로부터의 결과도 제공된다. 결과는 샘플(1x 면봉)이 루프-드-루프 검정으로 양성 샘플을 검출하는 데 필요한 것보다 365배 더 농축되었음을 나타낸다. LoD는 약 2,500cp/mL인 것으로 추정되기 때문에 특정 샘플에는 약 $9.1x10^5$cp/mL의 SARS-CoV-2 바이러스 RNA가 함유된 것으로 추정되었다.

[0208] 도 17은 음성 지원자로부터 얻은 비강 면봉으로부터의 증폭 결과를 나타낸다. 환자는 루프-드-루프 반응과 PCR 테스트 둘 모두에 의해 음성으로 검출되었다.

[0209] SARS-CoV-2를 검출하기 위한 반응 혼합물을 1:1 비율에서 인간 게놈 서열을 검출하기 위한 프라이머와 다중화하였다. 다중화된 증폭 결과는 도 18에 제공된다. 결과는 교차 반응성 없이 두 표적 서열의 특이적이고 민감한 검출을 나타낸다.

[0210] **6.8.9. 실시예 9: 루프-드-루프 증폭에 의한 인간 샘플에서 *클라미디아 트라코마티스* 및 *나이세리아 고노루애*의 검출**

[0211] 3개 질 면봉(BD BBL 배양 면봉, 미주리주 소재의 Lee Biosolutions에서 구입한 폴리우레탄 폼 선단의 면봉, 고유한 개별 공여체로부터 공급됨)은 30초, 1 Hz 돌리기 방법(Panpradist et al., 2016)을 사용하여 1,294 µL의 재수화 완충액(면봉당 431 µL) 안으로 용리되었다. 면봉에 대해 약간의 유체의 손실 후, 1095 µL의 풀링된 질 면봉 용리액이 얻어졌다. 유체 회수율은 85%였다. 이 면봉 용리액은 루프-드-루프 LAMP용 동결건조 반응 혼합물(Ct용 하나, Ng용 하나, 인간 공정 대조군용 하나)을 함유하는 사출 성형된 원형 일회용품 안으로 피펫팅되었다.

[0212] 각 반응은 다음으로 재수화되었다:

[0213] • 18 µL의 면봉 용리액(면봉은 재수화 완충액 안으로 돌려짐);

[0214] • 1 µL의 재수화 완충액에 현탁된 전체 Ct 병원균

[0215] • 1 µL의 재수화 완충액에 현탁된 전체 Ng 병원체

[0216] Ct 및 Ng 병원체 샘플은 일회용품의 각 반응 챔버에 있었다. 따라서, 예를 들어 Ct 검정은 Ng와 인간 표적의 동시적 존재에서 뿐만 아니라 면봉 샘플에 존재하는 모든 박테리아 환경에서 Ct를 검출하는 것으로 수행되었다.

[0217] 증폭 결과는 도 19-22에 제공된다. 도 19는 높은 Ct(반응당 10,000 카피 당량) 및 높은 Ng(반응당 10,000 카피 당량)를 함유하는 샘플로부터 형광 신호를 나타낸다. 도 20은 음성 대조군 - 면봉 단독 대조군(왼쪽 두 패널) 또는 완충액 단독 대조군(오른쪽 두 패널)으로부터 신호를 나타낸다. 면봉 단독 대조군에서는 Ct 또는 Ng 증폭이 없었지만 인간 게놈 서열은 예상대로 증폭되었다. 완충액 단독 대조군에서, Ct 또는 Ng 증폭은 없었다. *H. 사피엔스* 증폭은, 지연된 신호가 주어지면 의사 증폭으로 인해, 하나의 완충액 단독 반응(테스트 20)에서 늦게 검출되었다.

[0218] 이들 결과는 검정이 반응당 약 100 카피에서 Ct 및 반응당 약 >1,000 카피에서 Ng를 검출하는 데 민감하였다는 것을 나타낸다.

[0219] 7. 서열

	명칭	서열
서열번호: 1	Ng F3	CCATTGATCCTTGGGACAG
서열번호: 2	Ng B3	CAGACCGGCATAATACACAT
서열번호: 3	Ng FIP	GGGAATCGTAACGCACGGAAATAATGTGGCTTCGCAATTG
서열번호: 4	Ng BIP	AGCGGCAGCATTCAATTTGTTCCTGATTACTTTCCAGCGTG
서열번호: 5	Ng BIP-LdL	/5IABkFQ/GCAGGC ATATATATATATA GCCTGC/i6-FAMK/AGCGGCAGCATTCAATTTGTTCCTGATTACTTTCCAGCGTG
서열번호: 6	Ng LF	ATACCGTCGTGGCGTTTG
서열번호: 7	Ng LF-LdL	/5IABkFQ/GCAGGC ATATATATATATA GCCTGC/i6-FAMK/ATACCGTCGTGGCGTTTG
서열번호: 8	Ng LB	CGCCTATACGCCTGCTAC
서열번호: 9	Ct F3	AATATCATCTTTGCGGTTGC
서열번호: 10	Ct B3	TCTACAAGAGTACATCGGTCA
서열번호: 11	Ct FIP	TCGAGCAACCGCTGTGACGACCTTCATTATGTCGGAGTC
서열번호: 12	Ct BIP	GCAGCTTGTAGTCCTGCTTGAGTCTTCGTAACTCGCTCC
서열번호: 13	Ct LF	TACAAACGCCTAGGGTGC
서열번호: 14	Ct LB	CGGGCGATTTGCCTTAAC
서열번호: 15	Ct LF-LdL	/5IABkFQ/GCAGGC ATATATATATATA GCCTGC/i6-FAMK/ACAAACGCCTAGGGTGC
서열번호: 16	Hs_F3	TCCCTTGTACGCTCGATCT
서열번호: 17	Hs B3	AGTCCTGGGAAGGGAGAC
서열번호: 18	Hs FIP	TGGTCCTCACTGGGGTCACCGAGCTGTGGGCAGAAAACG
서열번호: 19	Hs BIP	GCCCGGGGATTCTGGAAATTGTGTCCCAGCTTGATCTCACC
서열번호: 20	Hs LF	GTGGCCTGTGACACCAGAT
서열번호: 21	Hs LB	TTGGCCCCATGATTCCTCAGT
서열번호: 22	Hs LF-LdL	/5IABkFQ/GCAGGCATATATATATATAGCCTGC/i6-FAMK/GTGGCCTGTGACACCAGAT

[0220]

[0221] 8. 참조에 의한 통합

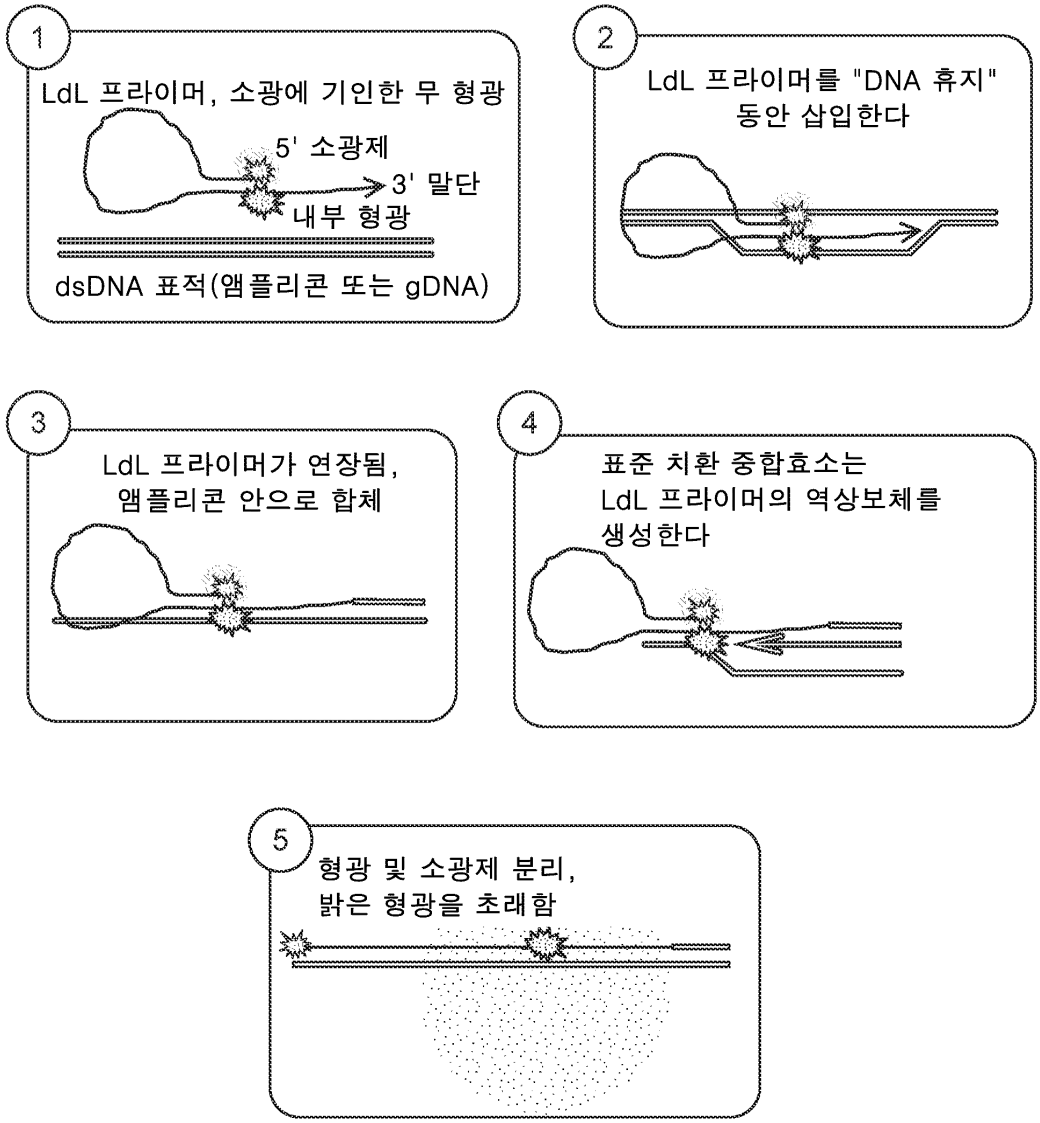
[0222] 본 출원에 인용된 모든 간행물, 특허, 특허 출원 및 기타 문서는 각각의 개별 간행물, 특허, 특허 출원 또는 기타 문서가 모든 목적을 위해 참조로 통합되는 것으로 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 통합된다.

[0223] 9. 등가물

[0224] 본 개시내용은 *특히* 칸나비노이드의 조성물 및 주변 조성물을 제공한다. 본 개시내용은 또한 칸나비노이드 및 주변 조성물을 투여함에 의해 신경퇴행성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 다양한 특정 실시형태가 예시되고 기술되었지만, 상기 명세서는 제한적이지 않다. 발명(들)의 사상 및 범주를 벗어나지 않고 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 본 명세서의 검토시 많은 변형이 당업자에게 명백해질 것이다.

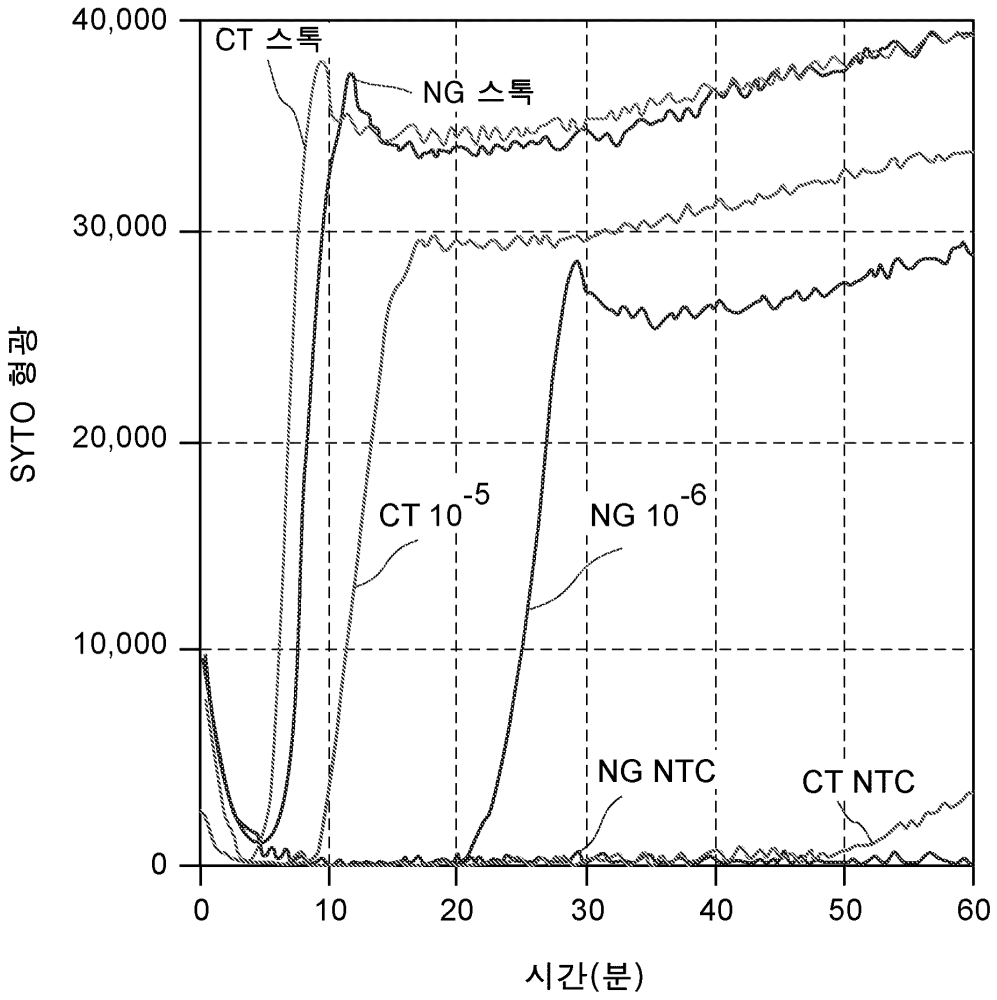
도면

도면1

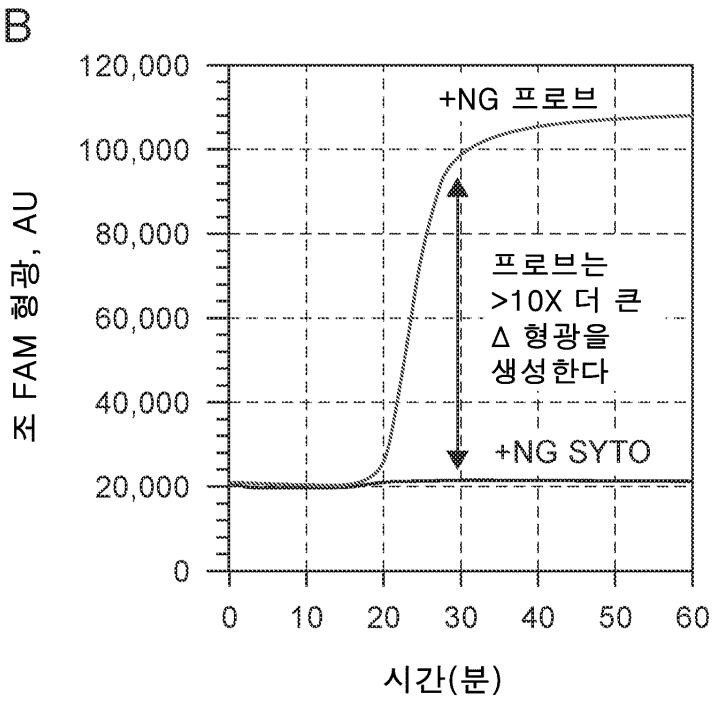

1
LdL 프라이머, 소광에 기인한 무 형광
5' 소광제
3' 말단
내부 형광
dsDNA 표적(앰플리콘 또는 gDNA)
2
LdL 프라이머를 "DNA 휴지"
동안 삽입한다
3
LdL 프라이머가 연장됨,
앰플리콘 안으로 합체
4
표준 치환 중합효소는
LdL 프라이머의 역상보체를
생성한다
5
형광 및 소광제 분리,
밝은 형광을 초래함

도면2a

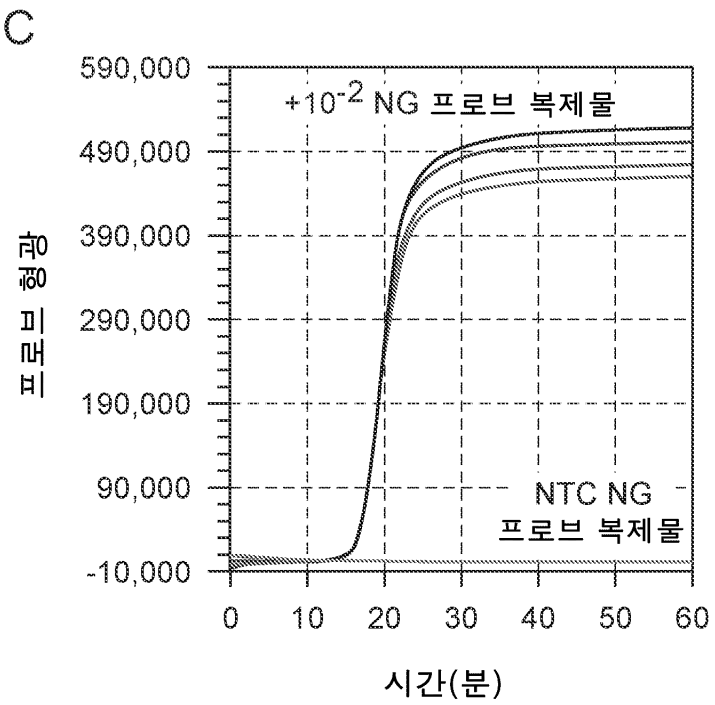
A


40,000
30,000
20,000
10,000
0
SYTO 형광
CT 스톡
NG 스톡
CT 10-5
NG 10-6
NG NTC
CT NTC
0
10
20
30
40
50
60
시간(분)

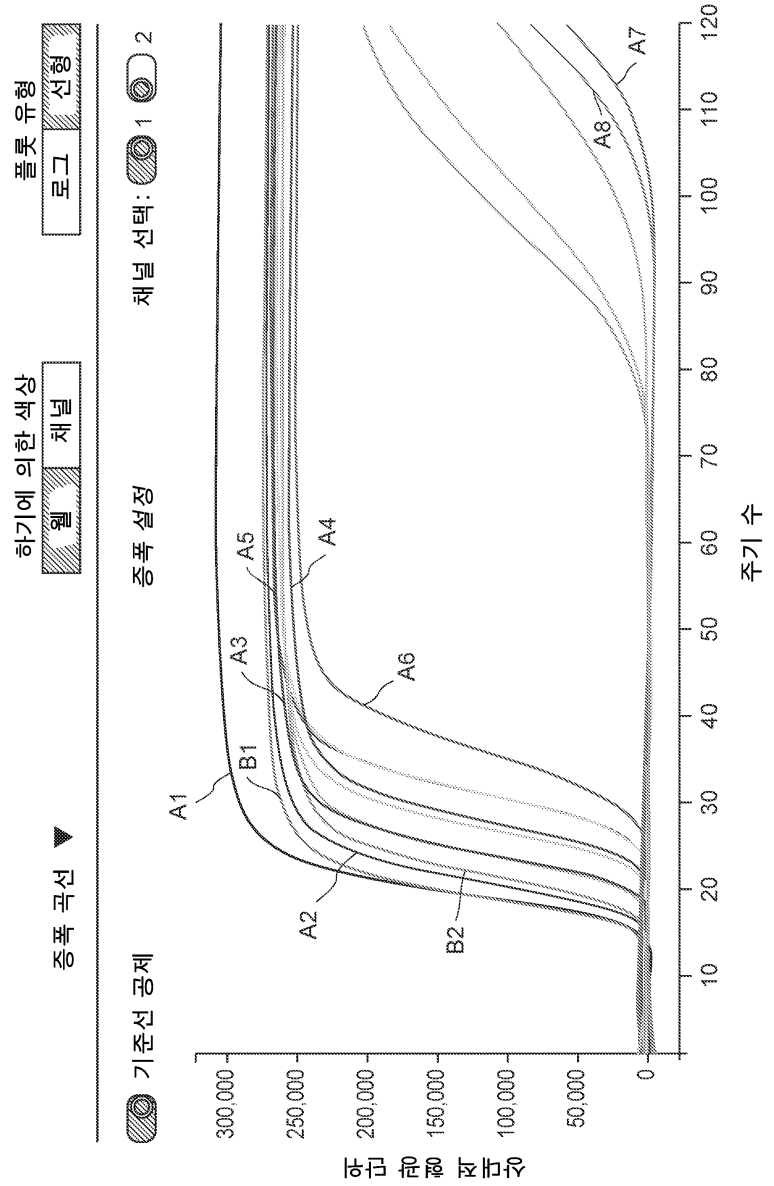
도면2b


B
120,000
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
정 FAM 형광, AU
+NG 프로브
프로브는
>10X 더 큰
Δ 형광을
생성한다
+NG SYTO
0
10
20
30
40
50
60
시간(분)

도면2c


C
590,000
490,000
390,000
290,000
190,000
90,000
-10,000
프로브 형광
+10-2 NG 프로브 복제물
NTC NG
프로브 복제물
0
10
20
30
40
50
60
시간(분)

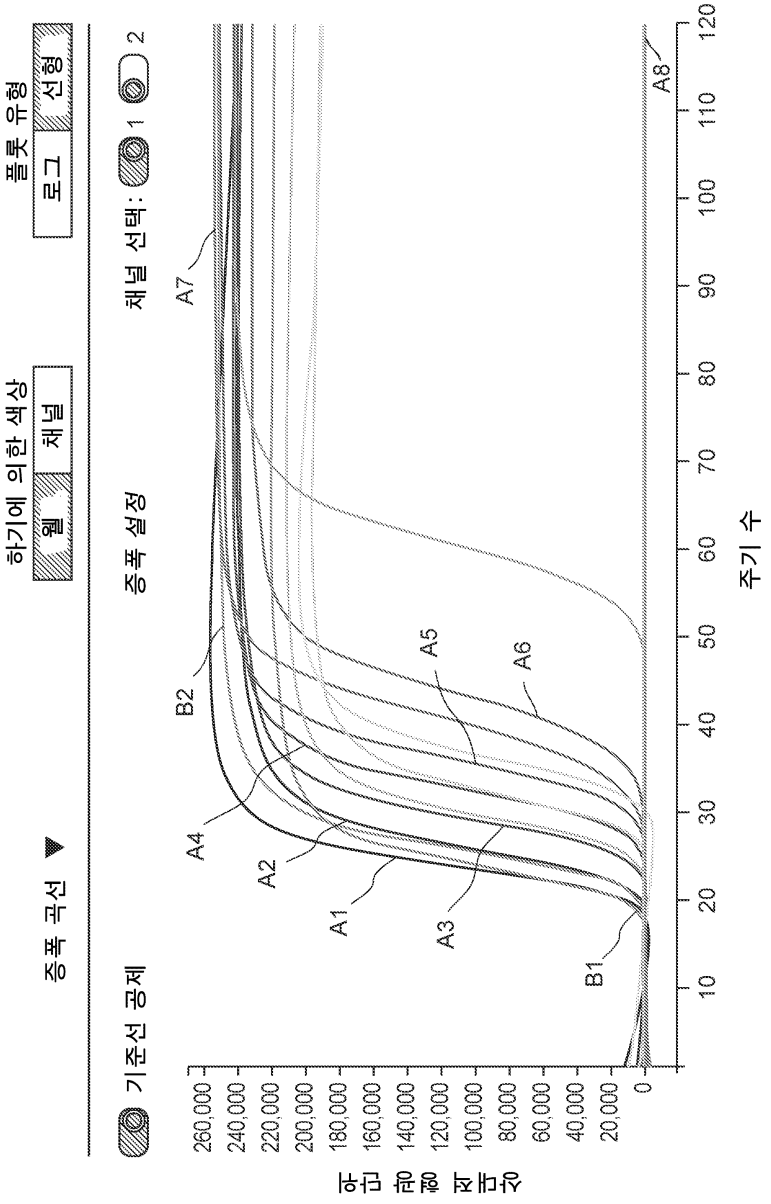
도면3a


플롯 유형
선형
로그
하기에 의한 색상
채널
웰
증폭 곡선
기준선 공제
증폭 설정
채널 선택: 1 2
A1
B1
A3
A5
A4
A6
A2
B2
A8
A7
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
주기 수

도면3b

웰	샘플 명칭	Cq Ch1
A1	Ct gDNA 10E-01 희석	16.18
A2	Ct gDNA 10E-02 희석	17.21
A3	Ct gDNA 10E-03 희석	20.48
A4	Ct gDNA 10E-04 희석	23.90
A5	Ct gDNA 10E-05 희석	26.75
A6	Ct gDNA 10E-06 희석	30.08
A7	Ct gDNA 10E-07 희석	108.83
A8	NTC	105.88
B1	Ct gDNA 10E-01 희석	15.87
B2	Ct gDNA 10E-02 희석	17.78

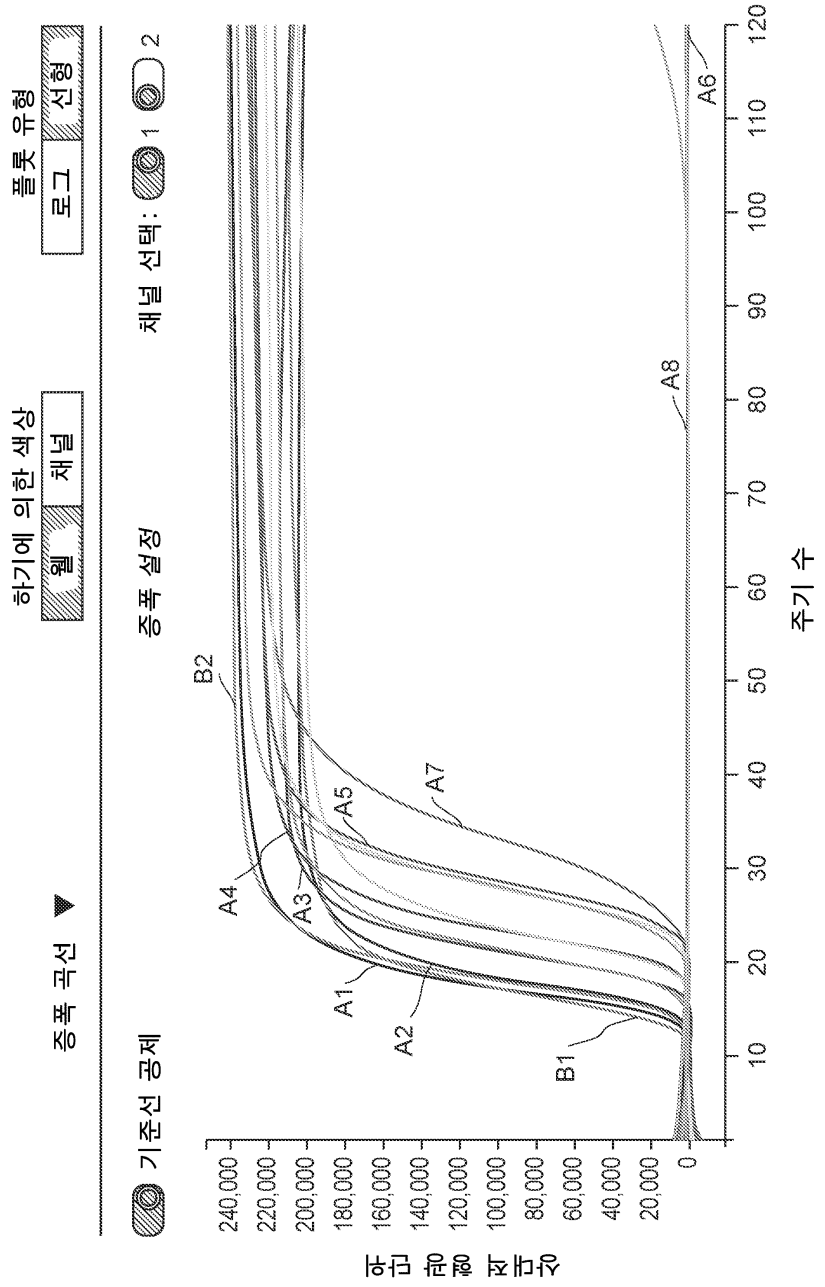
도면4a


증폭 곡선
하기에 의한 색상
웰
채널
플롯 유형
로그
선형
기준선 공제
증폭 설정
채널 선택: 1 2
A1
A2
A3
A4
A5
A6
A7
A8
B1
B2
형광 단위
주기 수

도면4b

웰	샘플 명칭	Cq Ch1
A1	10E-01 gDNA ATCC 5	20.85
A2	10E-02 gDNA ATCC 5	22.16
A3	10E-03 gDNA ATCC 5	25.36
A4	10E-04 gDNA ATCC 5	28.35
A5	10E-05 gDNA ATCC 5	31.41
A6	10E-06 gDNA ATCC 5	37.56
A7	10E-07 gDNA ATCC 5	34.64
A8	NTC	
B1	10E-01 gDNA ATCC 5	20.30
B2	10E-02 gDNA ATCC 5	21.95

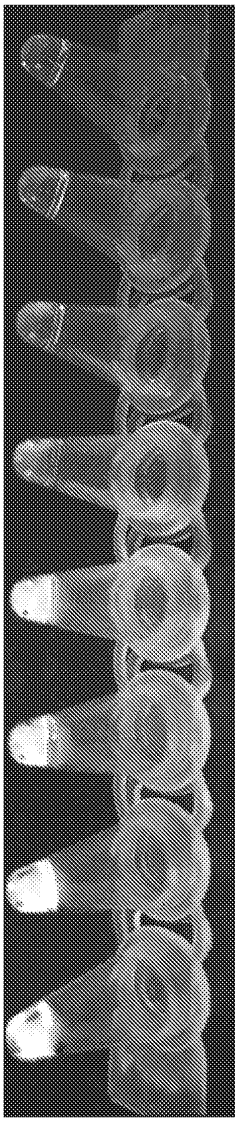
도면5a


증폭 곡선
기준선 공제
하기에 의한 색상
웰
채널
증폭 설정
플롯 유형
로그
선형
채널 선택: 1 2
형광 단위
주기 수
A1
A2
A3
A4
A5
A6
A7
A8
B1
B2

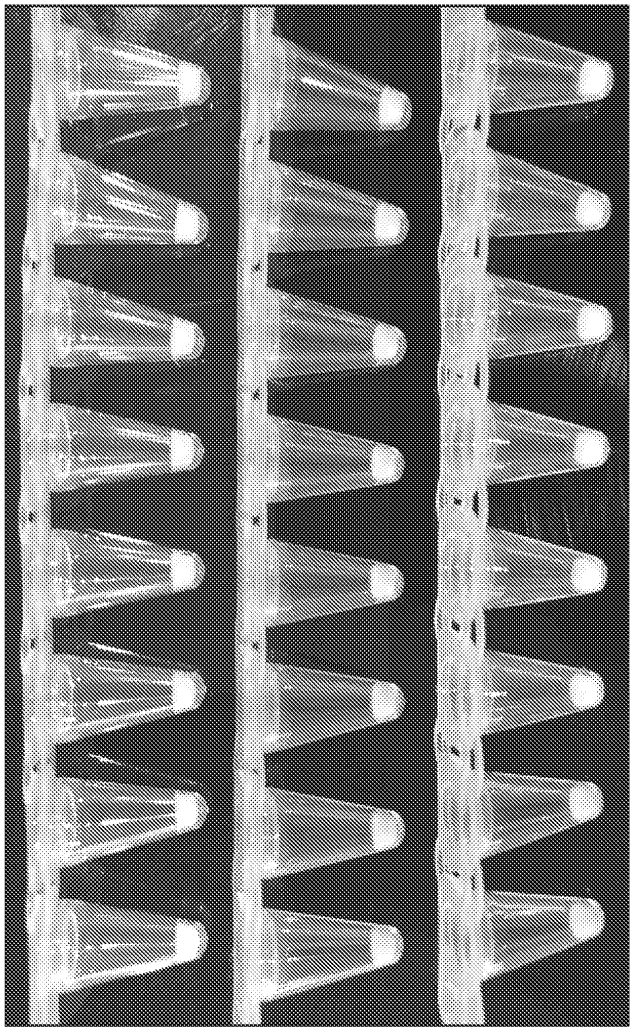
도면5b

웰	샘플 명칭	Cq Ch1
A1	10E0 (스톡) gDNA	13.71
A2	10E-1 gDNA RPMI 8	14.84
A3	10E-2 gDNA RPMI 8	17.49
A4	10E-3 gDNA RPMI	19.50
A5	10E-4 gDNA RPMI 8	23.94
A6	10E-5 gDNA RPMI 8	
A7	10E-6 gDNA RPMI 8	25.77
A8	10E-7 gDNA RPMI 8	
B1	10E0 (stock) gDNA	12.95
B2	10E-1 gDNA RPMI 8	14.51

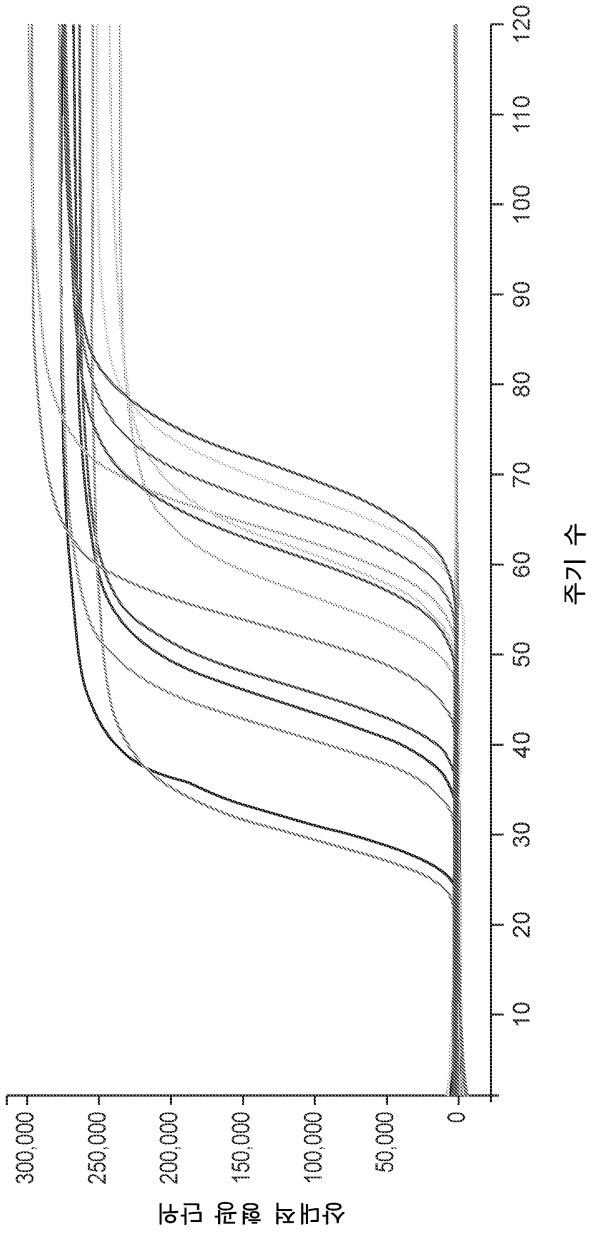
도면6



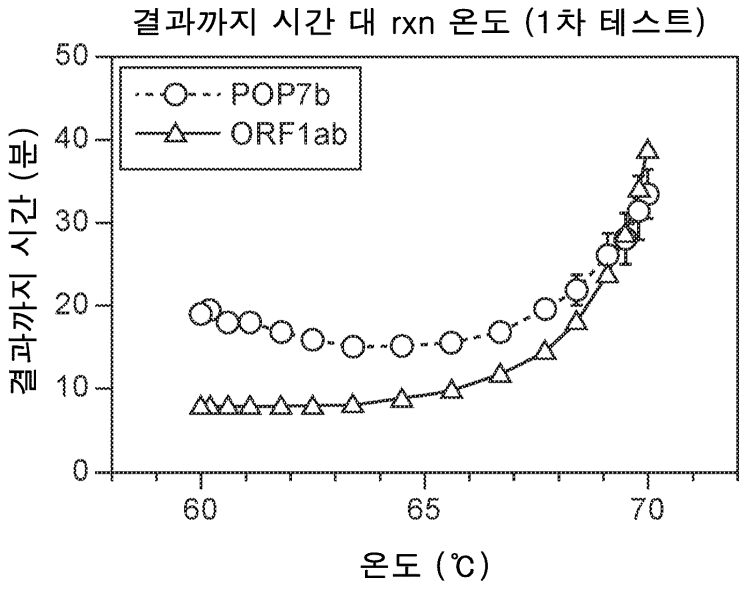
도면7



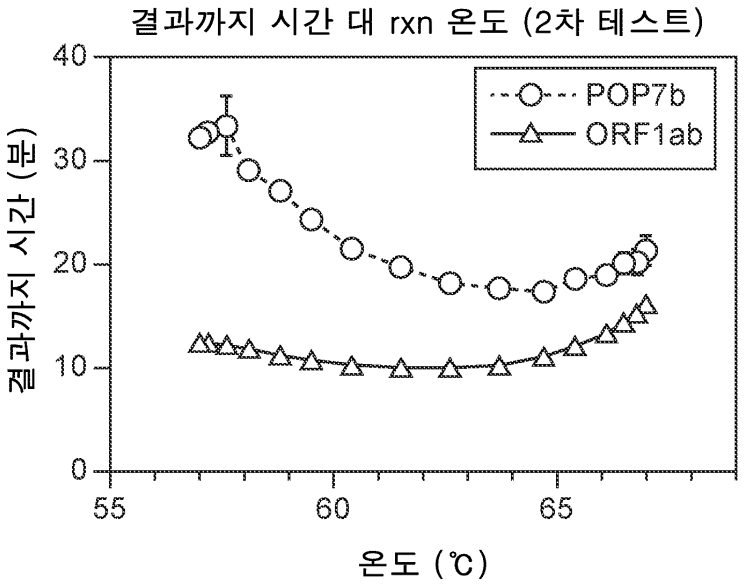
도면8


300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
상대적 형광 단위
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
주기 수

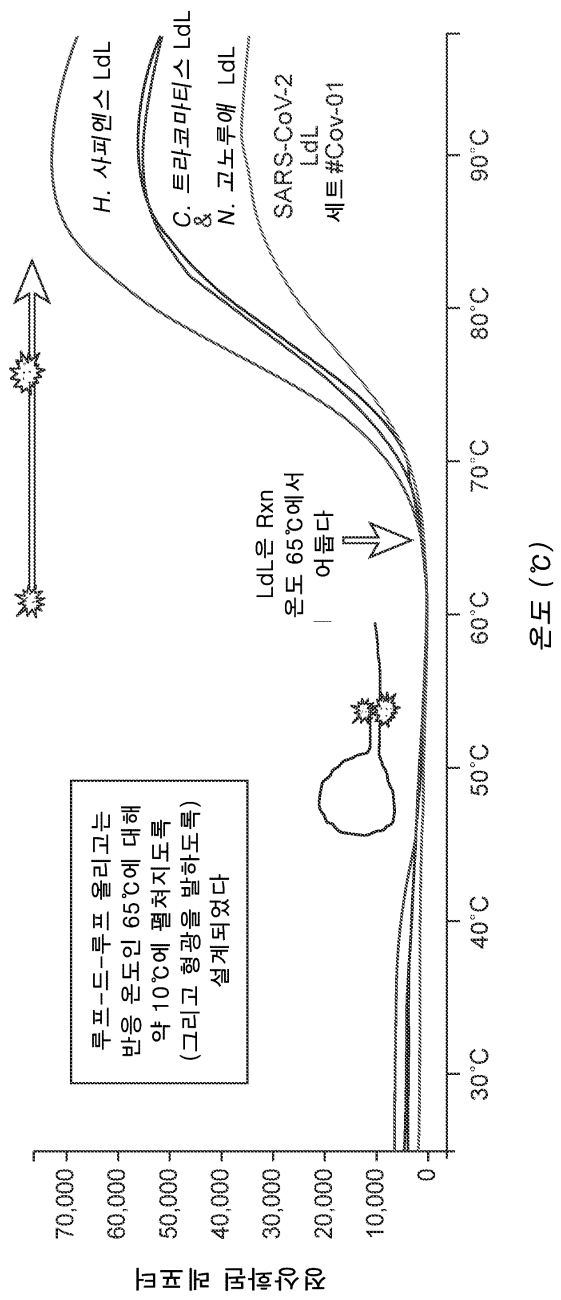
도면9a


결과까지 시간 대 rxn 온도 (1차 테스트)
POP7b
ORF1ab
결과까지 시간 (분)
50
40
30
20
10
0
60
65
70
온도 (℃)

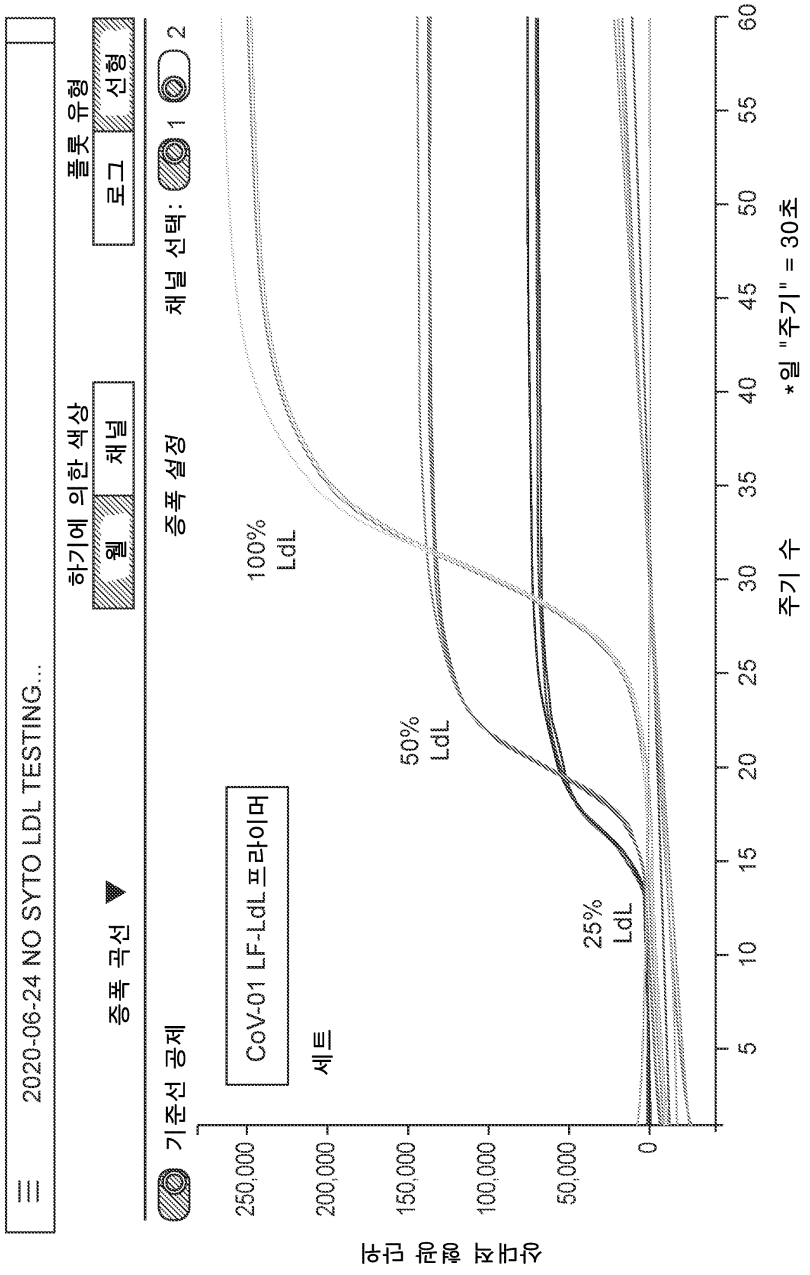
도면9b


결과까지 시간 대 rxn 온도 (2차 테스트)
POP7b
ORF1ab
결과까지 시간 (분)
40
30
20
10
0
55
60
65
온도 (℃)

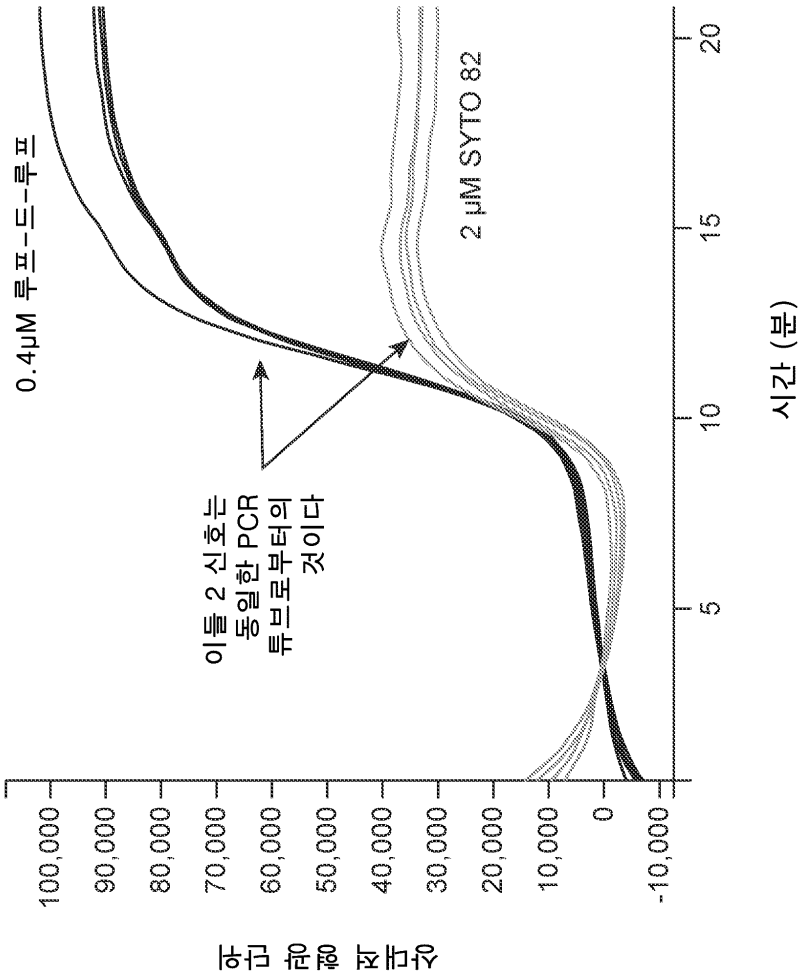
도면10


H. 사피엔스 LdL
C. 트라코마티스 LdL
&
N. 고노루애 LdL
SARS-CoV-2
LdL
세트 #Cov-01
LdL은 Rxn
온도 65℃에서
어둡다
루프-드-루프 올리고는
반응 온도인 65℃에 대해
약 10℃에 펼쳐지도록
(그리고 형광을 발하도록)
설계되었다
정상화된 피포터
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
30°C
40°C
50°C
60°C
70°C
80°C
90°C
온도 (℃)

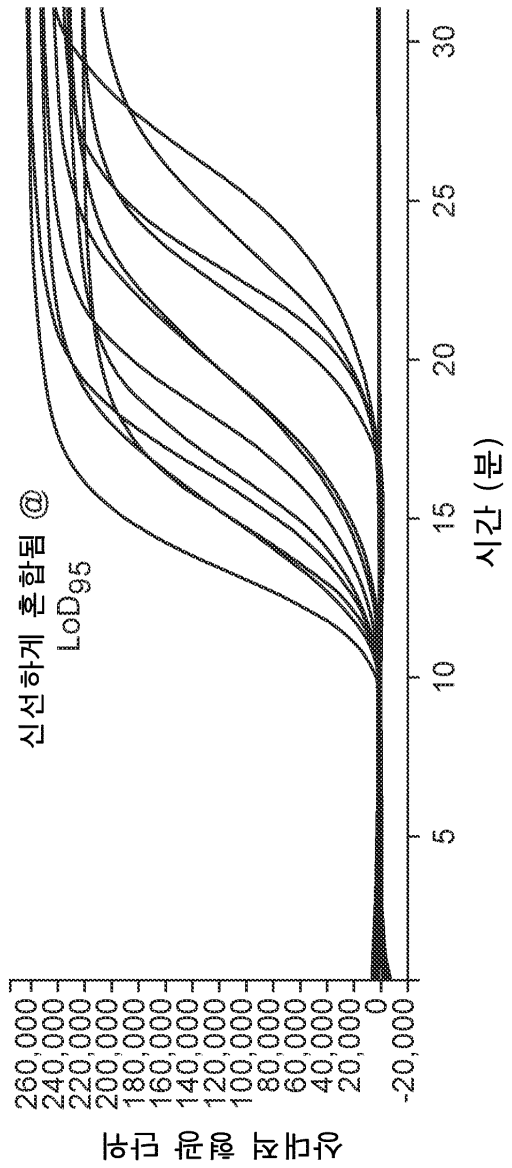
도면11


2020-06-24 NO SYTO LDL TESTING...
증폭 곡선
하기에 의한 색상
웰
채널
플롯 유형
로그
선형
기준선 공제
증폭 설정
채널 선택: 1 2
CoV-01 LF-LdL 프라이머
세트
100% LdL
50% LdL
25% LdL
상대적 형광 단위
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
주기 수
*일 "주기" = 30초

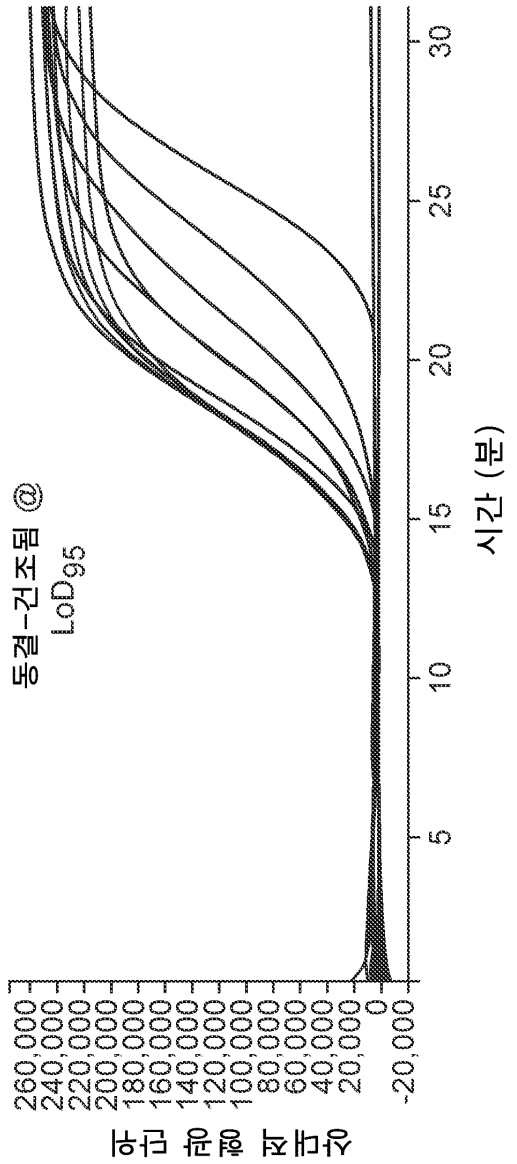
도면12


0.4μM 루프-드-루프
2 μM SYTO 82
이들 2 신호는
동일한 PCR
튜브로부터의
것이다
100,000
90,000
80,000
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
-10,000
5
10
15
20
시간 (분)
상대적 형광 단위

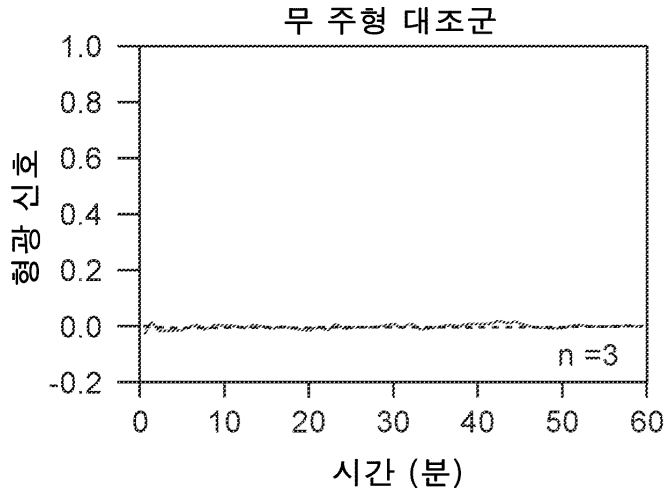
도면13a


260,000
240,000
220,000
200,000
180,000
160,000
140,000
120,000
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
-20,000
상대적 형광 단위
5
10
15
20
25
30
시간 (분)
신선하게 혼합됨 @
LoD95

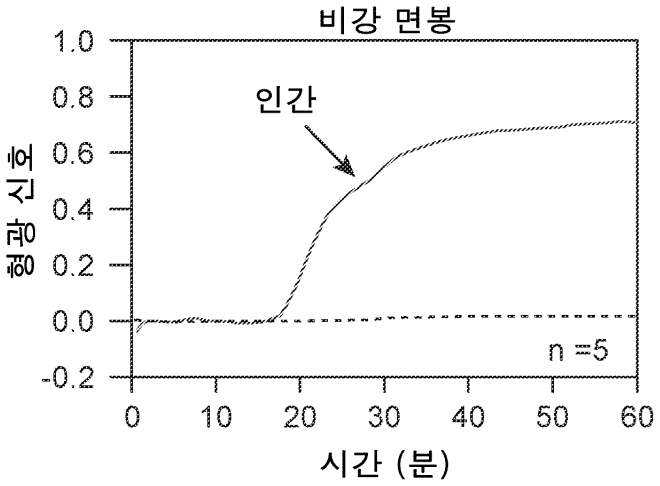
도면13b


동결-건조됨 @
LoD95
시간 (분)
상대적 형광 단위
260,000
240,000
220,000
200,000
180,000
160,000
140,000
120,000
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
-20,000
5
10
15
20
25
30

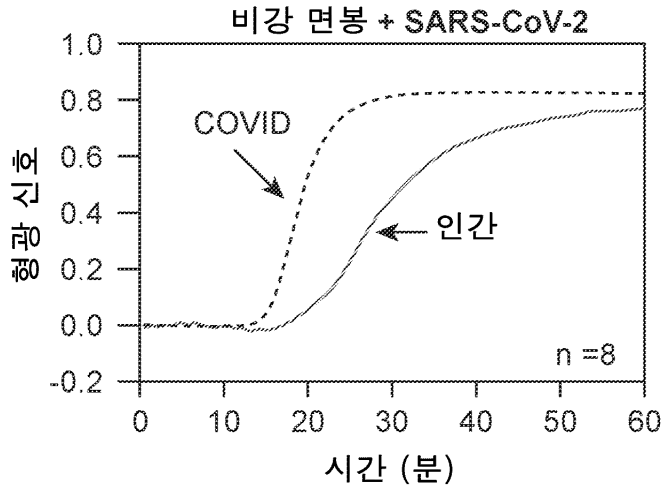
도면14a


무 주형 대조군
형광 신호
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
n =3
0
10
20
30
40
50
60
시간 (분)

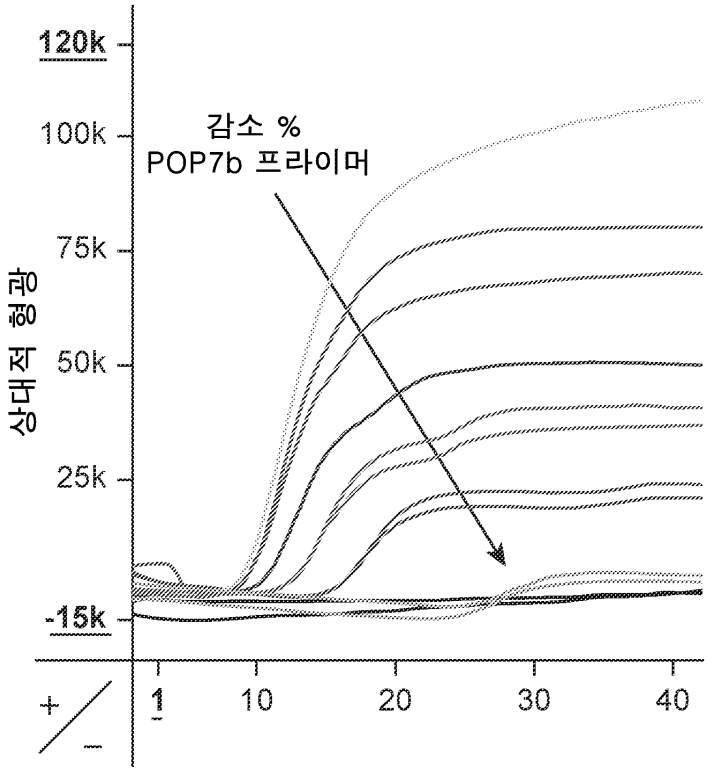
도면14b


비강 면봉
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
형광 신호
인간
n =5
0
10
20
30
40
50
60
시간 (분)

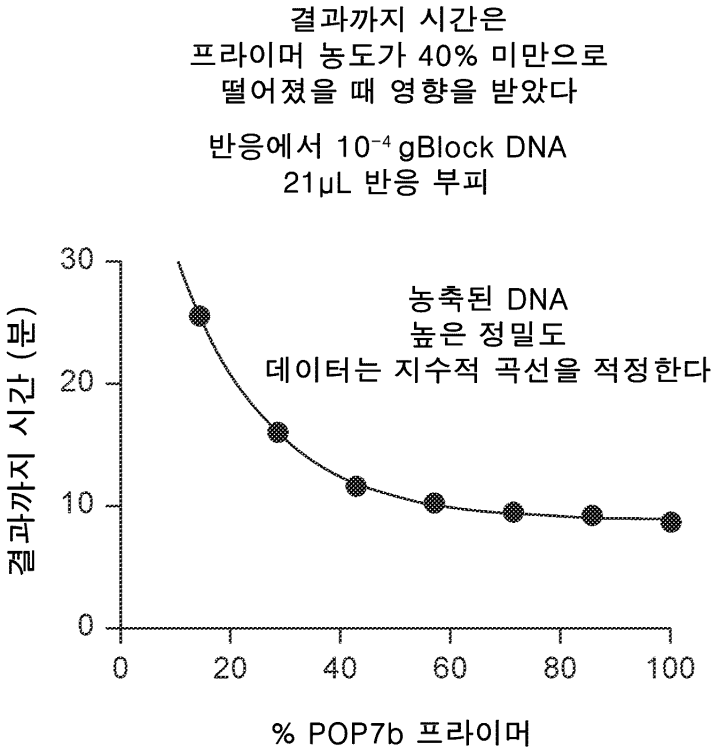
도면14c


비강 면봉 + SARS-CoV-2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
형광 신호
COVID
인간
n =8
0
10
20
30
40
50
60
시간 (분)

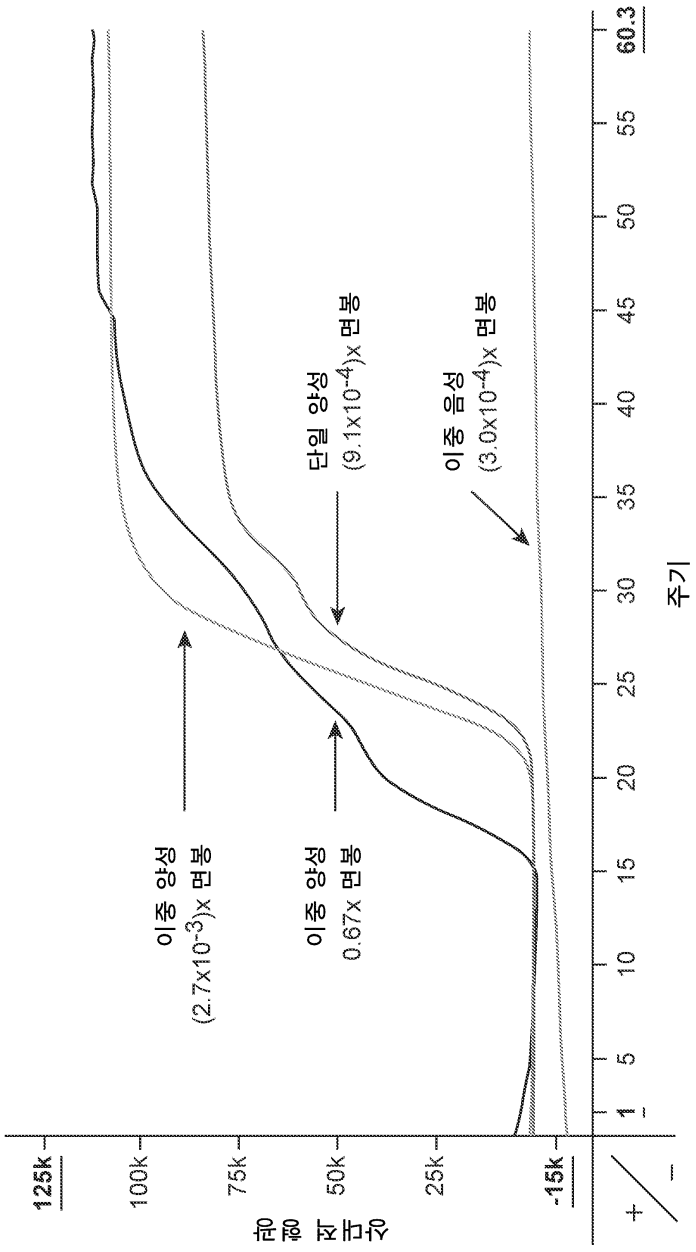
도면15a


120k
100k
75k
50k
25k
-15k
상대적 형광
감소 %
POP7b 프라이머
+
–
1
10
20
30
40

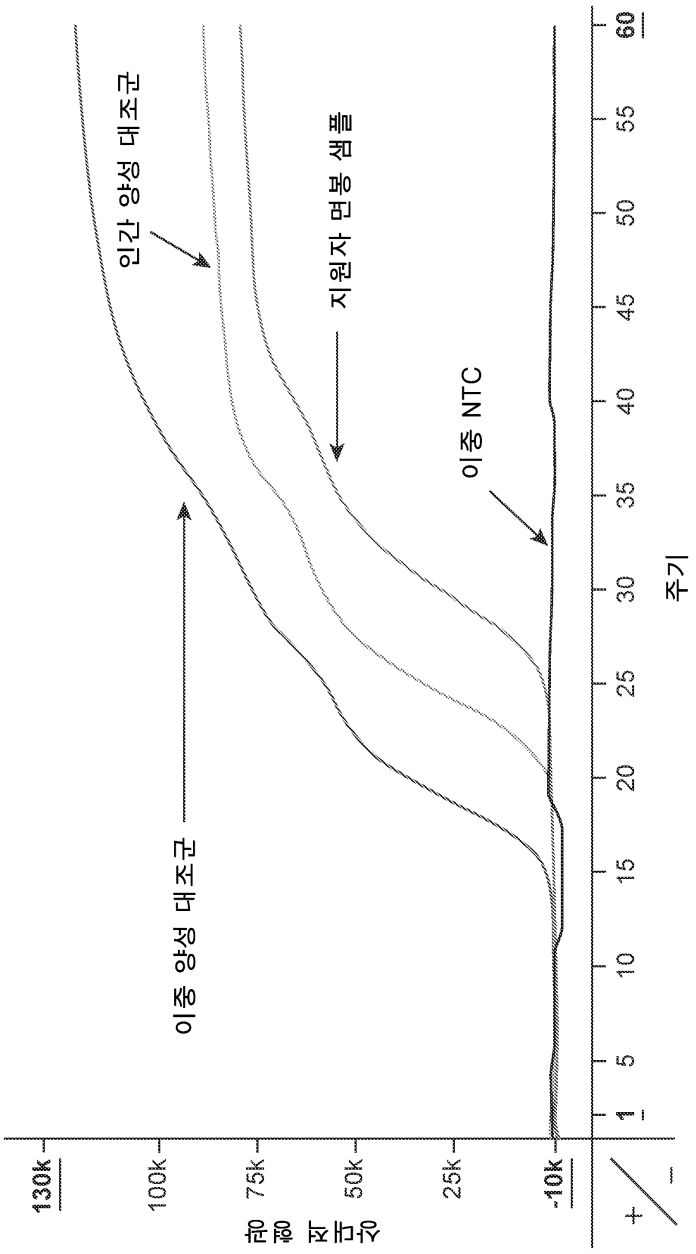
도면15b


결과까지 시간은
프라이머 농도가 40% 미만으로
떨어졌을 때 영향을 받았다
반응에서 10⁻⁴ gBlock DNA
21µL 반응 부피
30
20
10
0
결과까지 시간 (분)
농축된 DNA
높은 정밀도
데이터는 지수적 곡선을 적정한다
0
20
40
60
80
100
% POP7b 프라이머

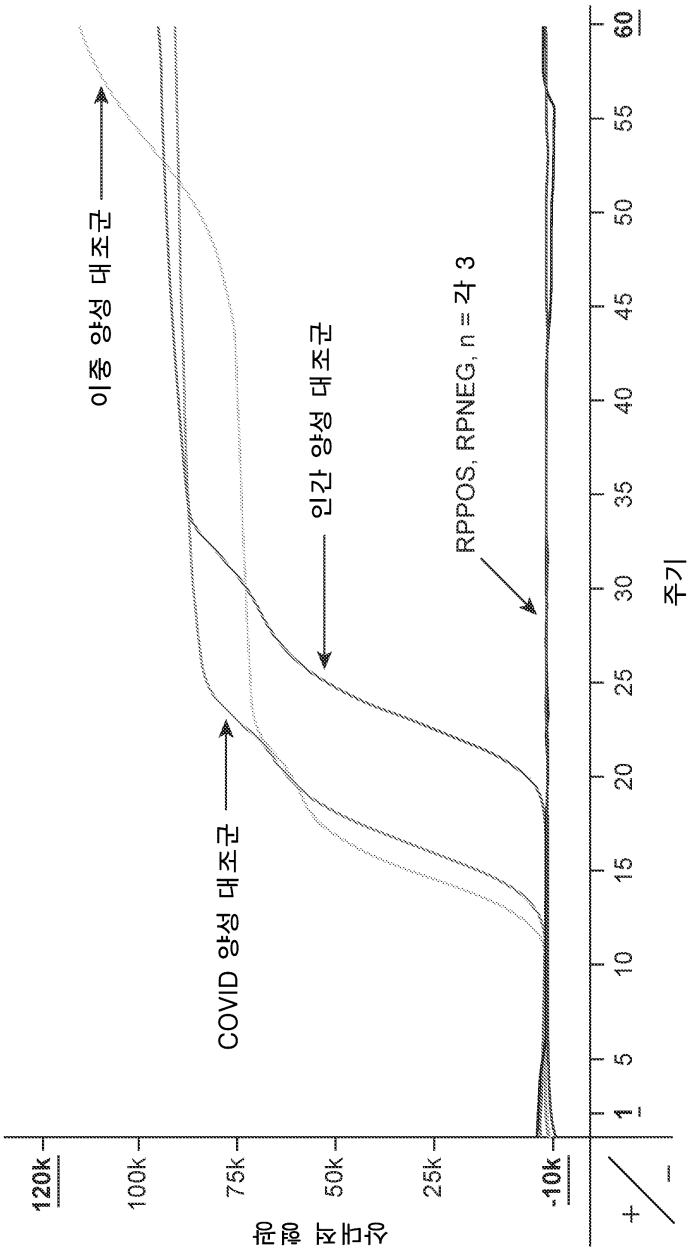
도면16


125k
100k
75k
50k
25k
-15k
상대적 형광
+
-
1
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60.3
주기
이중 양성
(2.7x10-3)x 면봉
이중 양성
0.67x 면봉
단일 양성
(9.1x10-4)x 면봉
이중 음성
(3.0x10-4)x 면봉

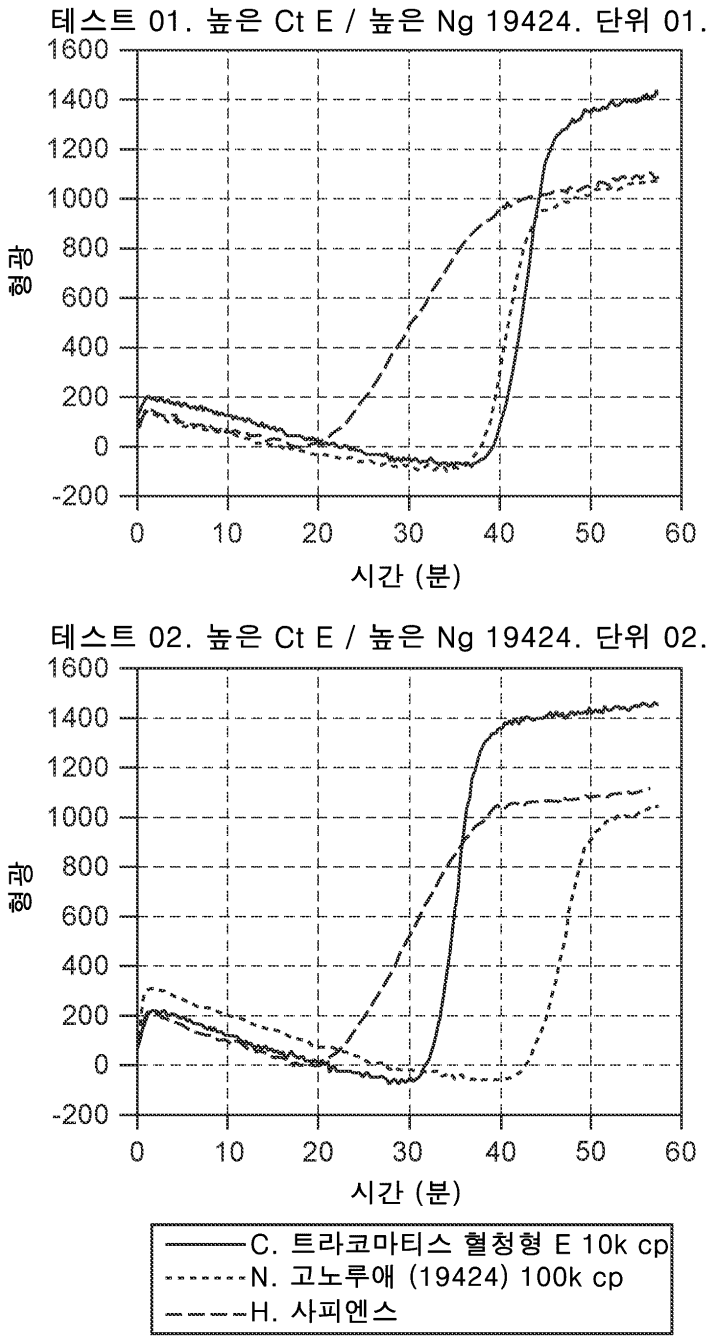
도면17


130k
100k
75k
50k
25k
-10k
+
—
1
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
주기
생존곡선 확률
이중 양성 대조군
인간 양성 대조군
지원자 면봉 샘플
이중 NTC

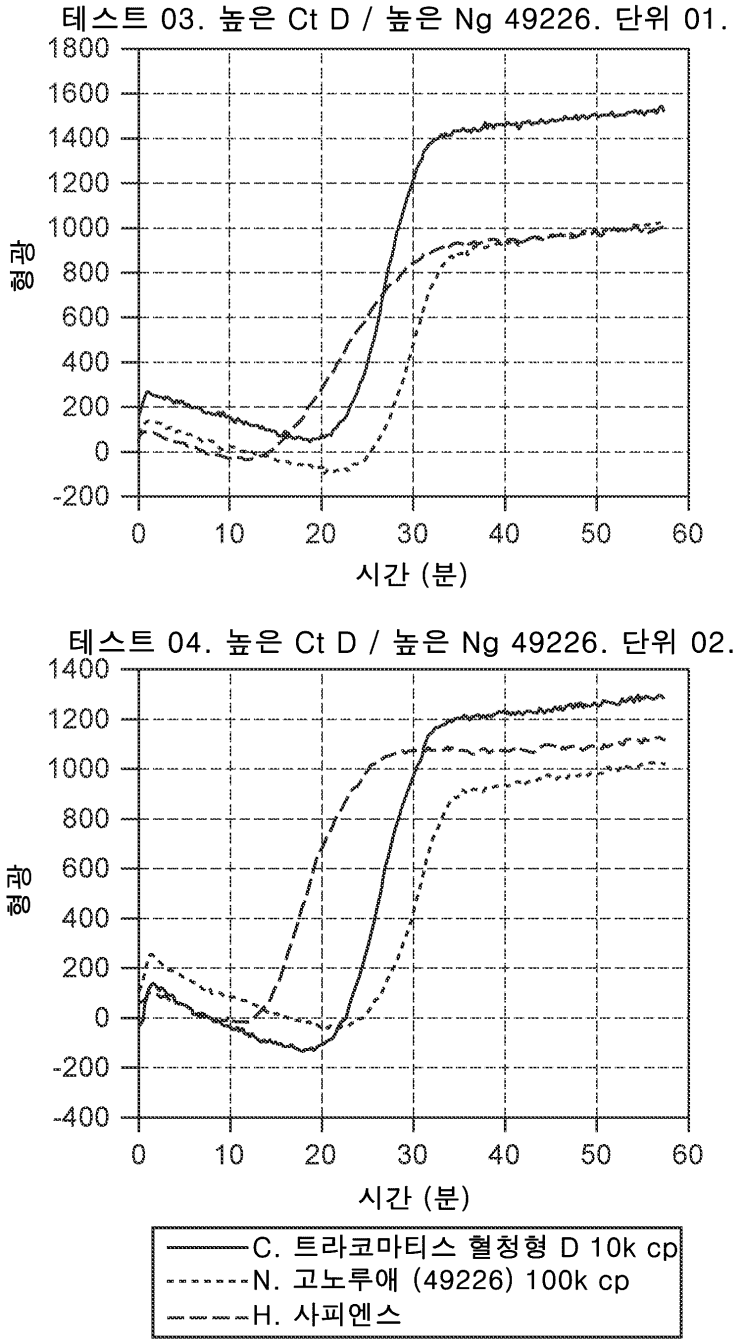
도면18


이중 양성 대조군
인간 양성 대조군
COVID 양성 대조군
RPPOS, RPNEG, n = 각 3
상대적 형광
120k
100k
75k
50k
25k
-10k
+
-
1
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
주기

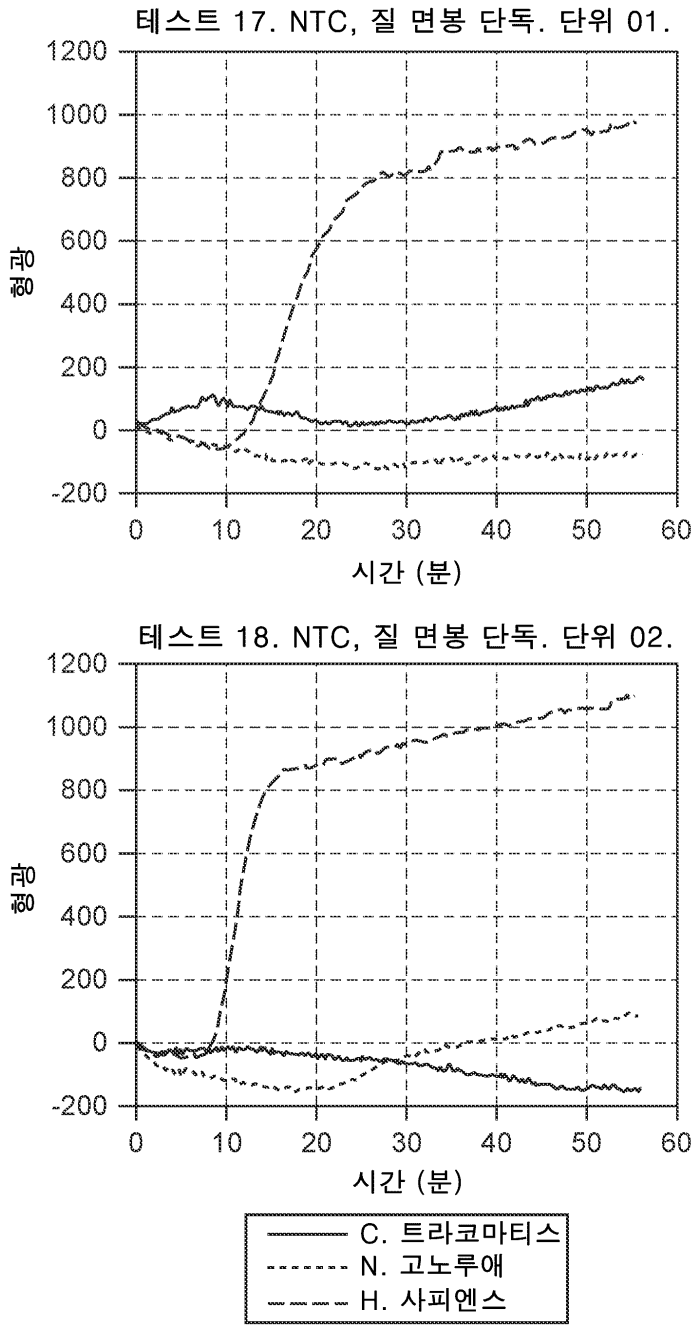
도면19a


테스트 01. 높은 Ct E / 높은 Ng 19424. 단위 01.
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
0
10
20
30
40
50
60
시간 (분)
테스트 02. 높은 Ct E / 높은 Ng 19424. 단위 02.
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
0
10
20
30
40
50
60
시간 (분)
C. 트라코마티스 혈청형 E 10k cp
N. 고노루애 (19424) 100k cp
H. 사피엔스

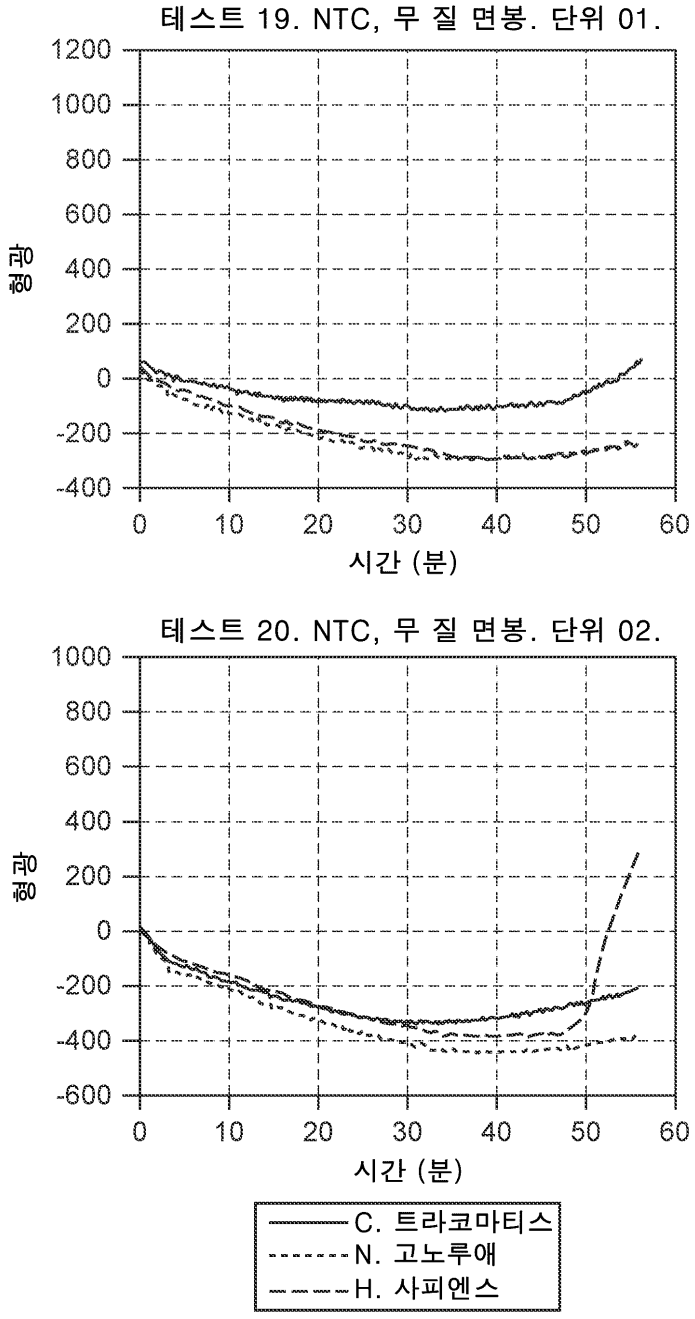
도면19b


테스트 03. 높은 Ct D / 높은 Ng 49226. 단위 01.
형광
시간 (분)
테스트 04. 높은 Ct D / 높은 Ng 49226. 단위 02.
형광
시간 (분)
C. 트라코마티스 혈청형 D 10k cp
N. 고노루애 (49226) 100k cp
H. 사피엔스

도면20a


테스트 17. NTC, 질 면봉 단독. 단위 01.
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
형광
0
10
20
30
40
50
60
시간 (분)
테스트 18. NTC, 질 면봉 단독. 단위 02.
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
형광
0
10
20
30
40
50
60
시간 (분)
C. 트라코마티스
N. 고노루애
H. 사피엔스

도면20b



서 열 목 록

<110> UH-OH LABS INC.

<120> LOOPED PRIMER AND LOOP-DE-LOOP METHOD FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACID

<130> 36460-48397/WO

<140> PCT/US2021/022192

<141> 2021-03-12

<150> 62/989,140

<151> 2020-03-13

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

ccattgatcc ttgggacag 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

cagaccggca taatacacat 20

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

gggaatcgta acgcacggaa ataatgtggc ttcgcaattg 40

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

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

<400> 4

agcggcagca ttcaatttgt tcctgattac tttccagcgt g 41

<210> 5

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

gcaggcatat atatatatag cctgctagcg gcagcattca atttgttcct gattactttc 60

cagcgtg 67

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

ataccgtcgt ggcgtttg 18

<210> 7

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

gcaggcatat atatatatag cctgctatac cgtcgtggcg tttg 44

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 8

cgcctatacg cctgctac 18

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 9

aatatcatct ttgcggttgc 20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 10

tctacaagag tacatcggtc a 21

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

tcgagcaacc gctgtgacga ccttcattat gtcggagtc 39

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

gcagcttgta gtcctgcttg agtcttcgta actcgctcc 39

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

tacaaacgcc tagggtgc 18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

cgggcgattt gccttaac 18

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 15

gcaggcatat atatatatag cctgctacaa acgcctaggg tgc 43

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

tcccttgtac gctcgatct 19

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 17

agtcctggga agggagac 18

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 18

tggtcctcac tggggtcacc gagctgtggg cagaaaacg 39

<210> 19

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 19

gcccggggat tctggaaatt gtgtcccagc ttgatctcac c 41

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 20

gtggcctgtg acaccagat 19

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 21

ttggccccat gattcctcag t 21

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

gcaggcatat atatatatag cctgctgtgg cctgtgacac cagat 45