(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0066712
(43) 공개일자 2020년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6806 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6806 (2018.05)
C12Q 2525/186 (2019.08)
(21) 출원번호 10-2020-7014135
(22) 출원일자(국제) 2018년10월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년05월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/056598
(87) 국제공개번호 WO 2019/079656
국제공개일자 2019년04월25일
(30) 우선권주장
62/573,720 2017년10월18일 미국(US)

(71) 출원인
데이 제로 다이아그노스틱스, 인크.
미국 02134 매사추세츠주 보스턴 웨스턴 애비뉴 127 하버드 라이프 랩
(72) 발명자
추이, 치아하오
미국 02143 매사추세츠주 서머빌 라인 스트리트 72 유닛 2
아나타, 멜리스, 엔.
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 23 아파트먼트 205
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

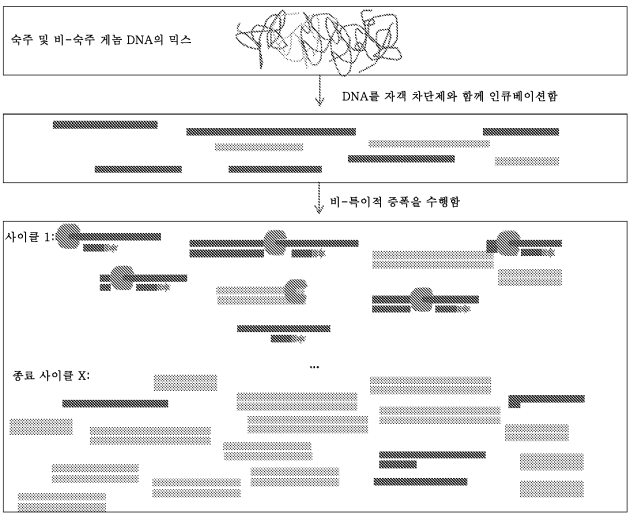
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 **DNA 증폭의 표적화된 억제를 통한 혼합된 DNA 샘플에서의 DNA의 집단의 선택적 풍부화**

(57) 요 약

본 개시내용은 DNA의 다수의 집단을 포함하는 혼합된 샘플에서의 DNA의 한 집단의 선택적 풍부화를 위한 방법 및 생성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 감염된 개체로부터의 임상적 샘플에서 특히 포유동물 숙주 DNA와 혼합된 병원성 미생물 DNA를 비롯한 미생물 DNA 및 포유동물 숙주 DNA의 1개 이상의 집단을 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2537/159 (2013.01)
(72) 발명자
매클로린, 더갈
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 시드니 스트리트 23 아파트먼트 205
헌틀리, 미리암, 에이치.
미국 02138 매사추세츠주 캠브리지 엘러리 스트리트 49
브루스터, 제프리, 디.
미국 19038 펜실베니아주 글렌사이드 크레센트 애비뉴 577

명 세 서

청구범위

청구항 1

제1 집단 및 제2 집단을 포함하는 DNA의 혼합된 샘플의 증폭에 의한 DNA의 집단의 풍부화를 위한 개선된 방법이며, 개선이

(a) DNA의 혼합된 샘플을 DNA의 제1 집단에서의 복수의 올리고뉴클레오티드 서열에 특이적으로 결합하는 복수의 차단 올리고뉴클레오티드와 접촉시키고;

(b) 상기 DNA의 혼합된 샘플을 증폭시켜 DNA의 증폭된 혼합된 샘플을 생성하는 것

을 포함하며;

상기 차단 올리고뉴클레오티드가 DNA의 제1 집단의 증폭을 억제하고, 그에 의해 증폭된 혼합된 샘플에서 DNA의 제1 집단에 비해 DNA의 제2 집단을 풍부화하는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

(a) 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각이 적어도 50의 DNA의 제2 집단에 비한 DNA의 제1 집단에서의 상대 발생을 갖는 6 내지 50개의 뉴클레오티드의 서열을 포함하고;

(b) 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각이 적어도 2의 DNA의 제2 집단에 비한 DNA의 제1 집단에서의 상대 발생을 갖는 적어도 6 내지 25개의 뉴클레오티드의 3' 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각이 적어도 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오티드의 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각이 50, 45, 40, 35, 30 또는 25개의 뉴클레오티드 미만의 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각의 3' 서열이 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각의 3' 서열이 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11 또는 10개 미만의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각이 적어도 75, 100, 150, 200 또는 250의 DNA의 제2 집단에 비한 DNA의 제1 집단에서의 상대 발생을 갖는 것인 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각의 3' 서열이 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10의 DNA의 제2 집단에 비한 DNA의 제1 집단에서의 상대 발생을 갖는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드가 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 75 또는 100개의 상이한 차단 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드가 적어도 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 또는 10^8개의 상이한 차단 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 차단 올리고뉴클레오티드의 제1 집단에 상보적인 게놈 서열 사이의 최대 거리가 2G/N, 3G/N, 4G/N 또는 5G/N이고, 여기서, G가 제1 집단에 상응하는 게놈 DNA의 크기이고, N이 복수의 차단 올리고뉴클레오티드에서의 상이한 차단 올리고뉴클레오티드의 수인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각이 차단 올리고뉴클레오티드를 DNA의 제1 집단에 가교시키는 가닥간 가교제를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 가교제가 광활성화된 것인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 가교제가 소랄렌인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각이 DNA 폴리머라제가 주형-의존성 DNA 합성에 의해 올리고뉴클레오티드를 연장시키는 것을 방지하는 3' 말단에서의 스페이서를 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 각각의 스페이서가 상응하는 차단 올리고뉴클레오티드의 3' OH에 결합된 지방족 분자를 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각이 날개형 차단제인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 날개형 차단제가 DNA의 제1 집단에서의 서열에 상보적인 40 내지 60개의 뉴클레오티드의 상보적 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 날개형 차단제가 상보적 뉴클레오티드 서열의 각각의 말단에 10 내지 100개의 뉴클레오티드의 날개 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하고, 날개 올리고뉴클레오티드 서열이 DNA의 제1 집단에서의 플랭킹 서열에 상보적이지 않은 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 증폭이 가닥-대체 폴리머라제를 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 증폭이 phi29 폴리머라제를 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 혼합된 샘플이 혈액, 객담, 소변, 점액, 타액, 조직 농양, 상처 배액, 대변, 림프, 세척, 뇌척수액, 또는 인간 및/또는 다른 진핵생물 기원의 임의의 유체 흡인물 또는 조직 추출물로부터 수득되거나 유래된 것인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 혼합된 샘플이 인간 대상체로부터 수득되거나 유래된 것인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 집단이 포유동물 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 집단이 인간 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 집단이 미생물 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 집단이 제1 유형의 미생물 DNA를 포함하고, 제2 집단이 제2 유형의 미생물 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 미생물 DNA가 *스타필로코쿠스 아우레우스* (*Staphylococcus aureus*), *스타필로코쿠스 에피더미디스* (*Staphylococcus epidermidis*), *스트렙토코쿠스 아갈락티아에* (*Streptococcus agalactiae*), *엔테로코쿠스 파에칼리스* (*Enterococcus faecalis*), *엔테로코쿠스 파에시움* (*Enterococcus faecium*), *에스케리키아 콜라이* (*Escherichia coli*), *클레브시엘라 뉴모니아에* (*Klebsiella pneumoniae*), 또는 박테리아혈증과 연관된 임의의 다른 박테리아 종으로부터의 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 혼합된 샘플에서의 미생물 DNA가 10개 미만의 미생물 게놈에 상응하는 것인 방법.

청구항 30

제26항에 있어서, 제1 집단이 포유동물 DNA를 포함하고, 제2 집단이 미생물 DNA를 포함하고, 포유동물 DNA 대 미생물 DNA의 비가 적어도 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 또는 10^8인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 증폭된 샘플에서의 미생물 DNA가 혼합된 샘플에 비해 10배 내지 100배 풍부화되는 것인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 혼합된 샘플에서의 포유동물 DNA가 감소되는 것인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, DNA의 제1 집단이 포유동물 미토콘드리아 DNA를 포함하고, 제2 집단이 미생물 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 차단 올리고뉴클레오티드 중 적어도 1개가 서열식별번호 (SEQ ID NO): 1 내지 16으로부터 선

택되는 것인 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 차단 올리고뉴클레오티드 중 적어도 1개가 서열식별번호: 17 내지 32로부터 선택되는 서열에 결합하는 것인 방법.

청구항 36

(a) 각각의 차단 뉴클레오티드가 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10의 박테리아 DNA의 샘플에 비한 포유동물 DNA의 샘플 내의 상대 발생을 갖는 서열에 상보적인 적어도 6 내지 25개의 연속적 뉴클레오티드를 포함하고;

(b) 각각 상보적 서열에 가교하는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 차단하는

복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 37

제36항에 있어서, 포유동물 DNA의 샘플이 포유동물 핵 DNA인 복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 38

제36항에 있어서, 포유동물 DNA의 샘플이 포유동물 미토콘드리아 DNA인 복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아 DNA의 샘플이 *스타필로코쿠스 아우레우스*, *스타필로코쿠스 에피더미디스*, *스트렙토코쿠스 아갈락티아에*, *엔테로코쿠스 파에칼리스*, *엔테로코쿠스 파에시움*, *에스케리키아 콜라이*, 및 *클레브시엘라 뉴모니아에* 게놈 DNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 게놈 DNA인 복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 40

제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 차단 올리고뉴클레오티드가 차단 올리고뉴클레오티드를 DNA의 제1 집단에 가교시키는 가닥간 가교제를 더 포함하는 것인 복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 41

제40항에 있어서, 가교제가 광활성화된 것인 복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 42

제41항에 있어서, 가교제가 소랄렌인 복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 43

제36항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각이 DNA 폴리머라제가 주형-의존성 DNA 합성에 의해 올리고뉴클레오티드를 연장시키는 것을 방지하는 3' 말단에서의 스페이서를 포함하는 것인 복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 44

제43항에 있어서, 각각의 스페이서가 상응하는 차단 올리고뉴클레오티드의 3' OH에 결합된 지방족 분자를 포함하는 것인 복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 45

제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 차단 올리고뉴클레오티드의 각각이 날개형 차단제인 복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 46

제45항에 있어서, 날개형 차단제가 DNA의 제1 집단에서의 서열에 상보적인 40 내지 60개의 뉴클레오티드의 상보적 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 47

제45항에 있어서, 날개형 차단제가 상보적 뉴클레오티드 서열의 각각의 말단에 10 내지 100개의 뉴클레오티드의 날개 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하고, 날개 올리고뉴클레오티드 서열이 DNA의 제1 집단에서의 플랭킹 서열에 상보적이지 않은 것인 복수의 차단 올리고뉴클레오티드.

청구항 48

제36항 내지 제47항 중 어느 한 항의 복수의 차단 올리고뉴클레오티드; 및

가닥-대체 폴리머라제

를 포함하는 키트.

청구항 49

제48항에 있어서, 가닥-대체 폴리머라제가 phi29 폴리머라제인 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] 포유동물 조직에서의 병원성 미생물로의 감염은 주요한 건강관리 문제이다. 박테리아혈증으로 공지된 혈액의 박테리아 감염은 일반적으로 항생제로 치료될 수 있지만, 때때로 전체 신체가 염증화되어, 비치료된 채 방치될 경우 다중-기관 붕괴 및 결국 사망을 초래하는 생명을 위협하는 질병인 패혈증을 초래한다. 박테리아 감염의 치료는 항미생물 저항성의 증가로 훨씬 더 도전적이 되고 있다. 미국에서만, 연간 약 2,000,000명의 환자가 항미생물 저항성 유기체로의 박테리아 감염을 가지며, 그들 환자 중 대략 100,000명은 감염의 결과로서 사망할 것이다. 병원에서 진단된 감염의 거의 절반은 이제 적어도 1종의 통상적인 항미생물 약물에 대해 저항성이며, 사망의 위험은 약물-저항성 감염의 경우 배가될 수 있다. 감염에 관여하는 병원체(들) 및 그의 항미생물 감수성 패턴의 신속하고 정확한 확인은 영구적 손상 또는 사망을 회피하기 위해 중요할 수 있다.

[0002] 병원체 및 그의 항미생물 감수성 패턴의 신속하고 포괄적인 확인에 대한 주요한 도전은 병원체가 전형적으로 생물학적 샘플의 매우 작은 분획이라는 것이다. 예를 들어, 혈액의 임상적으로 관련된 샘플에서, 혈액의 밀리리터 당 10개 미만의 병원성 세포가 있을 수 있다. 동시에, 수십억 개의 인간 세포가 있을 수 있으며, 이들의 각각은 대략 1,000배 더 많은 게놈 물질을 보유하고, 이는 진단, 특히 핵산 기재 진단에 대한 위압적인 도전을 제공한다. 이 도전을 극복하기 위한 전통적 방법은 시편을 성장-허용 환경 (예를 들어, 박테리아 또는 진균에 대해 영양분-풍부 브로쓰 또는 바이러스에 대해 허용적 세포주)에서 배양함으로써 병원체의 보다 큰 집단을 생성하는 것이었다. 병원체를 배양하는 것은 병원체:인간 DNA 비를 적어도 100만배 증가시킬 수 있지만, 이는 시간 소비적이며, 종종 성공적인 결과를 생성하는 데 실패할 수 있다.

[0003] 예를 들어, 혈액으로부터의 박테리아 배양은 순수한 콜로니를 생성하는데 적어도 36시간이 걸릴 수 있으며, 중증 패혈증 사례의 거의 절반에서 병원성 미생물을 배양하는 데 실패한다 (Martin *et al.* (2003), *New Eng. J. Med.*, 348:1546-1554). 또한, 항생제의 존재 하에서 박테리아를 배양하는 것은 포괄적 항생제 감수성 시험(AST)에 대한 금 표준으로 남아 있지만, 이 프로세스는 배양하기 곤란한 병원체, 예컨대 *미코박테리움 투베르쿨로시스* (*Mycobacterium tuberculosis*)의 경우 3주 이상이 아니라면, 적어도 수 일이 걸린다. 이 지연은 그의 중증 혈류 감염에서의 사망의 위험이 시간 당 8% 증가할 수 있는 환자에 대해 치명적일 수 있다. 기다리기 보다는, 의사는 감염을 "융단 폭격"하도록 설계된 강력한, 넓은-스펙트럼 항생제를 채용하는 경험적 요법을 사용하여 치료한다. 이 접근법은 고비용이고, 환자를 상당한 약물 독성에 노출시키며, 항생제 저항성의 확산을 장려한다. 가장 중요한 경험적 요법은 다중-약물 저항성 병원성 미생물의 위험으로 인해 점점 더 덜 효과적이 되고 있다.

[0004] 진단까지의 시간을 감소시키기 위해, 핵산 기재 진단이 종종 채용된다. 현재의 검정은 주로 병원체 게놈의 짧은 (<1 킬로베이스), 미리-선택된 영역을 배경 인간 DNA 수준 초과의 검출가능한 수준으로 선택적으로 증폭시키는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)의 형태의 표적화된 핵산 증폭에 의존한다. PCR-기재 진단은 신속할 수 있지만, 표적화된 프로브에 대한 그들의 의존은 그들을 표적의 유한한 수에 제한하며, 이는 그들이 수 천이 있는 공지된 병원체 종을 포괄적으로 확인하는 것을 방지하고, 적어도 1,600 PCR-기재 진단이 있는 공지된 항미생물 저항성 유전자는 또한 복잡한, 다형성-기재 저항성을 측정하는 데 있어서 항상 정확하지는 않다. 또한, 표적화된 증폭은 다균성 박테리아 감염과 같은 사례에 대해 결정적인 항미생물 저항성 (AMR) 유전자의 유전적 맥락, 오염물 (예를 들어, *스타필로코쿠스 에피더미디스* (*Staphylococcal epidermidis*) 운반 mecA)의 존재 및 유전자 위치가 중요한 경우를 보지 못한다.

[0005] 병원체의 포괄적 확인을 허용하고, 널리 공지된 및 널리 특징규명된 저항성 유전자, 뿐만 아니라 저항성의 보다 복잡한 메커니즘을 확인하기 위해, 전체-게놈 시퀀싱 (WGS)이 병원체 확인 및 항미생물 감수성 둘 다를 위한 유망한 새로운 진단 방법으로서 과거 수 년에 출현하였다. 전체 게놈 증폭 (WGA) 후의 병원성 미생물의 전체 게놈을 시퀀싱하는 것은 전통적 배양과 연관된 일부 문제를 해결할 수 있다. 예를 들어, 세포 배양물에서의 생체내 복제 대신 DNA 서열을 증폭시키는 시험관내 효소 활성을 사용하는 것은 미생물 유전 물질의 사용가능한 양을 생성하는 데 요구되는 시간을 수 일에서 수 시간으로 극적으로 감소시킬 수 있다. 또한, 세포 배양을 회피하는 것은 또한 심지어 현대 배양 방법으로도 비배양가능한 병원성 미생물 종을 비롯한 미생물로부터의 DNA의 증폭을 가능하게 한다 (예를 들어, 문헌 [Kvist *et al.* (2007), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(4):926-935]; [Huang *et al.* (2015), *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 16:79-102]). 그러나, 숙주 DNA 또는 오염 DNA가 관심의 DNA보다 8 내지 9 로그만큼 더 풍부할 수 있는 경우 효율적으로 전체 게놈 서열을 성공적으로 생성하는 개선된 방법에 대한 관련 기술분야의 필요가 남아 있다. 비편향된 방법에서 미생물 및 포유동물 핵산의 혼합물을 포함하는 생물학적 샘플에서 병원성 미생물 DNA를 비롯한 핵산의 하위세트를 선택적으로 또는 우선적으로 증폭시키고 풍부화하는 것은 WGA를 사용한 고 민감도 진단을 가능하게 할 수 있다.

발명의 내용

[0006] 발명의 요약

[0007] 본 발명은 부분적으로, 핵산의 적어도 제1 집단 및 제2 집단을 포함하는 혼합된 샘플의 증폭에 의해 생성된 DNA의 증폭된 샘플에서의 미생물 핵산의 풍부화를 위한 개선된 방법의 개발에 의존한다. 또한, 본 발명은 바람직하지 않은 서열의 증폭을 감소시키고, 결과적으로, 비표적화된 증폭 반응을 수행하는 경우 (예를 들어, 등온 증폭 동안 랜덤 육량체의 사용) 바람직한 핵산에 대한 샘플을 풍부화할 수 있는 개선된 차단 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0008] 한 측면에서, 본 발명은 개선이 증폭의 단계 동안 핵산의 적어도 제1 집단 및 제2 집단의 혼합된 샘플에서 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물 또는 숙주 서열)에서의 특정 서열의 증폭을 억제하는 것을 포함하는, 핵산의 적어도 제1 집단 및 제2 집단을 포함하는 혼합된 샘플의 증폭에 의해 생성된 DNA의 증폭된 샘플에서 핵산 (예를 들어, 미생물 또는 비-숙주 핵산)의 집단의 풍부화를 위한 개선된 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 제1 집단 (예를 들어, 포유동물 또는 숙주 DNA)의 특정 서열의 증폭은 혼합된 샘플에서 핵산의 제1 집단에서의 적어도 1개의 DNA 서열에 특이적으로 결합하고, 그 결합된 DNA 서열의 증폭을 억제하는 적어도 1개의 차단 올리고뉴클레오티드를 혼합된 샘플에 첨가함으로써 억제된다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 세트에 실질적으로 상보적인 핵산의 제1 집단에 존재하는 DNA 서열의 세트의 증폭을 억제하는 차단 올리고뉴클레오티드의 세트가 채용된다.

[0009] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 게놈)에서보다 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 게놈)에서 보다 빈번하게 발생하는 서열에 상보적인 6 내지 23개의 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열은 핵산의 제2 집단에서보다 핵산의 제1 집단에서 2 내지 50배 더 빈번하게 발생한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 미생물 게놈은 *스타필로코쿠스 아우레우스* (*Staphylococcus aureus*), *스타필로코쿠스 에피더미디스*, *스트렙토코쿠스 아갈락티아에* (*Streptococcus agalactiae*), *엔테로코쿠스 파에칼리스* (*Enterococcus faecalis*), *엔테로코쿠스 파에시움* (*Enterococcus faecium*), *에스케리키아 콜라이* (*Escherichia coli*), *클레브시엘라 뉴모니아에* (*Klebsiella pneumoniae*), 또는 박테리아혈증과 연관된 임의의 다른 박테리아 종이다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 차단 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호 (SEQ ID NO): 1 내지 16으로부터 선택된

다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 차단 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 17 내지 32로부터 선택되는 서열에 결합한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 차단 올리고뉴클레오티드의 세트는 DNA의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물 핵 또는 미토콘드리아 게놈)에 걸쳐 분포된 상보적 서열에 결합한다. 일부 실시양태에서, N개의 차단 올리고뉴클레오티드의 세트는 DNA의 제1 집단에 걸쳐 분포된 상보적 서열에 결합한다. 바람직하게는, 상보적 서열은 집단에 걸쳐 고르게 분포되지만, 이는 통계적으로 가능성있지 않다. 따라서, 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 제1 집단에 상보적인 게놈 서열 사이의 최대 거리는 2G/N, 3G/N, 4G/N 또는 5G/N이며, 여기서, G는 제1 집단에 상응하는 게놈 DNA의 크기이고, N은 복수의 차단 올리고뉴클레오티드에서의 상이한 차단 올리고뉴클레오티드의 수이다.

[0012] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 세트는 2 내지 10^8개의 상이한 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 세트는 2 내지 10^3개의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 세트는 10^3 내지 10^5개의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 세트는 10^5 내지 10^7개의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 세트는 10^7 내지 10^8개의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 차단 올리고뉴클레오티드를 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서의 상보적 서열에 가교시키는 가닥간 가교제를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 가교제는 광활성화가능하다. 일부 실시양태에서, 가교제는 소랄렌이다. 일부 실시양태에서, 가교제는 시스플라틴, 포름알데히드, 질소 머스타드, 또는 미토마이신 C이다.

[0014] 일부 실시양태에서, 핵산의 제2 집단은 미생물 핵산이다. 일부 실시양태에서, 미생물 핵산은 박테리아, 바이러스, 진균, 또는 원생생물 DNA이다.

[0015] 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 DNA) 및 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 DNA)의 혼합된 샘플은 혈액, 객담, 소변, 점액, 타액, 조직 농양, 상처 배액, 대변, 림프, 세척, 뇌척수액, 또는 인간 및/또는 다른 진핵생물 기원의 임의의 유체 흡인물 또는 조직 추출물로부터 수득되거나 유래된다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 인간 대상체로부터 수득되거나 유래된다.

[0016] 일부 실시양태에서, 증폭은 가닥-대체 폴리머라제를 사용하여 수행된다. 일부 실시양태에서, 증폭은 phi29 폴리머라제; Bst DNA 폴리머라제, 거대 단편™ (뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs), 미국 매사추세츠주 입스위치); Bsu DNA 폴리머라제, 거대 단편™ (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치); 딥 벤트 (Deep Vent) DNA 폴리머라제® (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치); 딥 벤트 (엑소) DNA 폴리머라제® (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치); 클레나우 단편 (Klenow Fragment); DNA 폴리머라제 I, 거대 단편; M-MuLV 역전사효소; 써미네이터 (Therminator) DNA 폴리머라제™ (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치); 벤트 (Vent) DNA 폴리머라제® (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치); 벤트 (엑소) DNA 폴리머라제® (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치); 및 SD 폴리머라제를 포함하는 군으로부터 선택되는 가닥-대체 폴리머라제에 의해서이다. 일부 실시양태에서, 증폭은 phi29 폴리머라제에 의해서이다.

[0017] 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 밀리리터 당 10^6개 미만의 미생물 게놈으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 밀리리터 당 10개 미만의 미생물 게놈으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플에 밀리리터 당 10 내지 10^6개의 미생물 게놈으로부터의 DNA가 있다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플에 밀리리터 당 10 내지 10^3개의 미생물 게놈으로부터의 DNA가 있다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플에 밀리리터 당 10^3 내지 10^5개의 미생물 게놈으로부터의 DNA가 있다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플에 밀리리터 당 10^5 내지 10^6개의 미생물 게놈으로부터의 DNA가 있다.

[0018] 일부 실시양태에서, 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 DNA)의 증폭은 개선된 방법

으로 처리되지 않은 샘플에 비해 10배 내지 100배 증가된다.

[0019] 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플이 본원에서 제공된 개선된 방법으로 처리되는 경우 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 DNA)의 증폭의 적어도 50% 감소가 있다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플이 본원에서 제공된 개선된 방법으로 처리되는 경우 핵산의 제1 집단의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 감소가 있다.

[0020] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 3' 말단에 스페이서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 6 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0021] 일부 측면에서, 본 발명은 (a) 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 DNA)에 비해 킬로베이스 당 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 DNA) 내에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 상보적인 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드 및 (b) 상보적 서열에 가교하는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 차단 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0022] 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 DNA이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 DNA는 포유동물 미토콘드리아 DNA이다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제2 집단은 미생물 DNA이다. 일부 실시양태에서, 미생물 DNA는 박테리아 DNA이다. 일부 실시양태에서, 박테리아 DNA는 *스타필로코쿠스 아우레우스*, *스타필로코쿠스 에피더미디스*, *스트렙토코쿠스 아갈락티아에*, *엔테로코쿠스 파에칼리스*, *엔테로코쿠스 파에시움*, *에스케리키아 콜라이*, *클레브시엘라 뉴모니아에*, 또는 박테리아혈증과 연관된 임의의 다른 박테리아 종으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 광활성화된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 소랄렌이다. 일부 실시양태에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 차단 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 있다.

[0023] 일부 측면에서, 본 발명은 핵산의 제1 집단 (예를 들어 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주)에서의 단일-가닥 DNA 분자에 특이적으로 결합하는 적어도 1개의 차단 올리고뉴클레오티드 및 차단 올리고뉴클레오티드에 공유적으로 결합된 가닥간 가교제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 차단 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 결합된 스페이서를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, DNA의 제1 집단은 포유동물 DNA이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 DNA는 포유동물 미토콘드리아 DNA, 임의로 인간 미토콘드리아 DNA이다. 일부 실시양태에서, 가교제는 소랄렌이다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 C3 스페이서이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 6 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 2 내지 10^8개의 차단 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0024] 일부 측면에서, 본 발명은 조성물 및 가닥 대체 폴리머라제를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 가닥-대체 폴리머라제는 phi29 폴리머라제이다.

[0025] 일부 실시양태에서, 핵산의 제2 집단은 적어도 1개의 미생물 게놈으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 미생물 게놈은 *스타필로코쿠스 아우레우스*, *스타필로코쿠스 에피더미디스*, *스트렙토코쿠스 아갈락티아에*, *엔테로코쿠스 파에칼리스*, *엔테로코쿠스 파에시움*, *에스케리키아 콜라이*, *클레브시엘라 뉴모니아에*, 또는 박테리아혈증과 연관된 임의의 다른 박테리아 종이다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 차단 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 1 내지 16으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 차단 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 17 내지 32로부터 선택되는 서열에 결합한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 차단 올리고뉴클레오티드의 세트는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주)에 걸쳐 대략 동등하게 분포된다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 세트는 2 내지 10^8개의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0027] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 차단 올리고뉴클레오티드를 DNA의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 DNA)에서의 상보적 서열에 가교시키는 가닥간 가교제를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 가교제는 광활성화가능하다. 일부 실시양태에서, 가교제는 소랄렌이다. 일부 실시양태에서, 소랄렌은 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 있다.

[0028] 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 밀리리터 당 10개 미만의 미생물 DNA 분자로부터의 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 밀리리터 당 10 내지 10^6개의 미생물 게놈으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플에 밀리리터 당 10 내지 10^3개의 미생물 게놈으로부터의 DNA가 있다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플에 밀리리터 당 10^3 내지 10^5개의 미생물 게놈으로부터의 DNA가 있다. 일부 실시양태

에서, 혼합된 샘플에 밀리리터 당 10^5 내지 10^6개의 미생물 게놈으로부터의 DNA가 있다.

[0029] 일부 실시양태에서, 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주)의 증폭은 개선된 방법으로 처리되지 않은 샘플에 비해 10배 내지 100배 증가된다.

[0030] 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플이 본원에서 제공된 개선된 방법으로 처리되는 경우 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 DNA)의 증폭의 적어도 50% 감소가 있다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플이 본원에서 제공된 개선된 방법으로 처리되는 경우 핵산의 제1 집단의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 감소가 있다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 3' 말단에 스페이서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 6 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0031] 일부 측면에서, 본 발명은 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 DNA)에서의 단일-가닥 DNA 분자에 특이적으로 결합하는 적어도 1개의 차단 올리고뉴클레오티드 및 차단 올리고뉴클레오티드에 공유적으로 결합된 가닥간 가교제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 차단 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 결합된 스페이서를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 DNA이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 DNA는 인간 DNA이다. 일부 실시양태에서, 가교제는 소랄렌이다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 C3 스페이서이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 6 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 2 내지 10^8개의 차단 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0032] 일부 측면에서, 본 발명은 조성물 및 가닥 대체 폴리머라제를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 가닥-대체 폴리머라제는 phi29 폴리머라제이다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 증폭 반응에 대한 자객 차단제 (Assassin Blocker) DNA 올리고뉴클레오티드의 적용을 나타낸다. 숙주 (예를 들어, 핵 및 인간 미토콘드리아) 및 비-숙주 (예를 들어, 미생물) DNA의 혼합물을 포함하는 샘플을 크기로 1 내지 100 kb 범위의 단편으로 단편화한다. 숙주 및 비-숙주 DNA 단편을 숙주 DNA 단편의 하위세트에 선택적으로 결합하는 1개 이상의 자객 차단제 DNA 올리고뉴클레오티드와 함께 인큐베이션한다. 그 후, 자객 차단제 올리고뉴클레오티드를 UV 활성화를 통해 숙주 DNA 단편의 하위세트에 가교시킨다. 그 후, 숙주 및 비-숙주 DNA의 비-특이적 PCR 증폭을 가닥-대체 폴리머라제를 사용하여 수행한다. 자객 차단제 DNA 올리고뉴클레오티드는 가닥-대체 폴리머라제의 활성을 차단함으로써, 자객 차단제 올리고뉴클레오티드에 의해 결합된 숙주 DNA의 하위세트의 증폭을 차단한다. 비-특이적 PCR의 결과는 비-숙주 DNA에 대해 풍부화된 혼합물이다.

도 2는 숙주 (예를 들어, 인간 미토콘드리아) DNA (하부 가닥)에 결합된 자객 차단제 DNA 올리고뉴클레오티드 (상부 가닥)의 예시이다. 자객 차단제 올리고뉴클레오티드는 3' 말단에서 소랄렌 기에 이어진 스페이서로 변형된다. 소랄렌 기는 UV 조사의 존재 하에서 숙주 DNA에의 가닥간 가교를 형성한다. 이 가닥간 가교는 가닥-대체 폴리머라제, 예컨대 phi29의 행렬을 차단한다.

도 3은 60개의 뉴클레오티드 (60mer) 표적 올리고뉴클레오티드에 상보적인 25개의 뉴클레오티드 (25mer) 올리고뉴클레오티드를 사용하여 자객 차단제 올리고뉴클레오티드를 표적 올리고뉴클레오티드에 가교시키는 것의 효과를 나타낸다. 90mer 오프-표적 올리고뉴클레오티드를 레인 3 및 5에서 자객 차단제의 비-특이적 결합을 평가하기 위한 음성 대조군으로서 사용하였다. 레인 1은 UV 광에 노출된 25mer 자객 차단제 올리고뉴클레오티드 및 60mer 표적 올리고뉴클레오티드를 포함하는 샘플이고; 레인 2는 UV 광에 노출되지 않은 25mer 자객 차단제 올리고뉴클레오티드 및 60mer 표적 올리고뉴클레오티드를 포함하는 샘플이고; 레인 3은 UV 광에 노출된 25mer 자객 차단제 올리고뉴클레오티드 및 90mer 오프-표적 올리고뉴클레오티드를 포함하는 샘플이고; 레인 4는 UV 광에 노출된 60mer 표적 올리고뉴클레오티드를 포함하는 샘플이고; 레인 5는 UV 광에 노출된 90mer 오프-표적 올리고뉴클레오티드이다. 표적 올리고뉴클레오티드와의 자객 차단제 올리고뉴클레오티드의 안정한 상호작용은 가교를 형성하기 위해 UV 광을 요구한다 (레인 1 대 2). 가교된 자객 차단제 올리고뉴클레오티드:표적 올리고뉴클레오티드 복합체는 자객 차단제 올리고뉴클레오티드 또는 표적 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나 단독보다 겔을 통해 더 느리게 이동한다 (레인 1 대 레인 4 및 6). 자객 차단제 올리고뉴클레오티드는 표적 올리고뉴클레오티드에 특이적으로 결합하고, 오프-표적 올리고뉴클레오티드에는 그렇지 않다 (레인 3 대 5).

도 4는 자객 차단제 올리고뉴클레오티드가 이용된 경우 숙주 (예를 들어, 인간 미토콘드리아) DNA의 감소를 나

타낸다. 퍼센트 감소는 자객 차단제 올리고뉴클레오티드가 이용되지 않은 경우 숙주 DNA로 정규화된다.

도 5는 자객 차단제 올리고뉴클레오티드로 처리된 샘플 (흑색) 또는 자객 차단제 올리고뉴클레오티드로 처리되지 않은 샘플 (회색)로부터의 포유동물 미토콘드리아 DNA 서열의 16,569 염기 쌍에 걸친 리드의 수 (리드의 깊이)를 나타낸다.

도 6은 날개형 숙주 DNA 차단에 대한 제조 프로세스이다. 단계 1: 게놈 전반에 걸쳐 분포된 2개의 상이한 회문식 제한 부위, 부위 X 및 Y의 위치를 갖는 이중-가닥 숙주 DNA. 단계 2: 숙주 게놈 DNA를 이중 제한 효소 소화를 사용하여 단편으로 파단시킨다. 일부 단편은 둘 다의 말단에 X 부위를 갖고, 일부 말단은 둘 다의 말단에 Y 부위를 가지며, 각각의 경우 본원에서 "동종 단편"으로 지칭된다. 대조적으로, 일부 단편은 한 말단에 X 부위 및 다른 말단에 Y 부위를 가지며, 본원에서 "이종 단편"으로 지칭된다. 단계 3: "h-어댑터"를 숙주 DNA 단편에 라이게이션한다. 2개의 h-어댑터가 있다. 어댑터 1은 X 제한 부위에 매칭하는 3' 오버행 및 점착성 말단을 갖는다. 어댑터 2는 Y 제한 부위에 매칭하는 5' 오버행 및 점착성 말단을 갖는다. 단계 4: 라이게이션된 h-어댑터를 갖는 단편을 h-어댑터에 매칭하는 프라이머를 사용하여 PCR 반응에서 증폭시킨다. 프라이머 중 하나는 5' 포스페이트 기를 가질 수 있고, 다른 프라이머는 5'비오틴 또는 상이한 포획 기 (예를 들어, His 태그)를 가질 수 있다. 이 배열에서, 단지 증폭된 단편은 한 말단에 X 제한 부위 및 다른 말단에 Y 제한 부위를 갖는 것들, 즉, 이종 단편이다. 단계 5: 람다 단일-가닥 엑소뉴클레아제를 사용하여 인산화된 가닥을 소화시켜 (해중합시켜), 본 발명자들이 "차단 프로브" 또는 "차단 프라이머"로 지칭하는 단일-가닥 DNA 단편을 남긴다. 단일-가닥 DNA를 수득하는 대안적 방법, 예컨대 비오티닐화된 가닥을 선택적으로 허무는 스트렙타비딘을 사용하는 것이 사용될 수 있다.

도 7은 증폭 반응에 대한 숙주 날개형 DNA 차단제의 적용을 나타낸다. 단계 1: 출발 샘플은 숙주 및 비-숙주 DNA의 믹스를 함유한다. 단계 2: DNA를 크기로 1 내지 15 kb의 단편으로 단편화한다. 단계 3: 단편을 숙주 DNA 단편에 선택적으로 결합하는 차단 프로브와 함께 인큐베이션한다. 단계 4: 비-특이적 PCR 또는 다른 증폭을 비-가닥-대체 폴리머라제를 사용하여 수행한다. 폴리머라제가 차단 단편에 도달하는 경우, 이는 더 진행할 수 없으며, 따라서 숙주 DNA의 증폭은 진행할 수 없다. 차단 프로브 자체는 프라이머로서 작용하지 않음이 중요하다. "날개", 즉, 3' h-어댑터에 상응하는 서열은, 이들이 숙주 DNA에 혼성화하지 않기 때문에, 차단 프로브의 연장을 방지한다. 숙주 DNA의 증폭이 차단되기 때문에, 결과는 비-숙주 DNA에 대해 풍부화된 혼합물이다.

도 8은 M13 파지 차단제를 사용한 *이. 콜라이* (*E. coli*) DNA의 존재 하에서의 M13 파지 앰플리콘 증폭의 억제를 나타낸다. 개념 증명 실험에서, M13 파지 DNA 게놈의 절편의 증폭은 M13 파지에 대한 제조된 차단제를 사용하여 *이. 콜라이* DNA의 존재 하에서 차단된다. 모든 실험 조건은 *이. 콜라이* 및 M13 파지 DNA 둘 다를 함유하였다.

도 9는 M13 차단제를 사용한 M13 파지 앰플리콘 억제의 정량화를 나타낸다. 도 7에 예시된 밴드로부터의 형광 강도 프로파일을 이미지제이 (ImageJ) 소프트웨어를 사용하여 정량화한다.

도 10은 M13 차단제를 사용한 M13 파지 앰플리콘 억제의 분석을 나타낸다. 겔 밴드에 걸친 평균 원 형광 강도를 도 8에서 측정된 프로파일에 기초하여 정량화하였다. 그 후, 순 밴드 형광 강도를 평균 원 형광 강도로부터 평균 배경 형광를 뺌으로써 계산하였다. 차단제의 효과를 차단제 첨가 전 및 후의 순 밴드 형광 강도를 비교함으로써 계산하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 발명의 상세한 설명

[0035] 정의.

[0036] 본원에 사용된 모든 과학 및 기술 용어는 하기에 달리 정의되지 않는다면 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 임의의 충돌의 경우, 정의를 포함하여 본 명세서가 지배할 것이다. 본원에 채용된 기법에 대한 언급은 그들 기법에 대한 변형 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 등가물 또는 이후에 개발된 기법의 치환을 비롯한 관련 기술분야에서 통상적으로 이해되는 바와 같은 기법을 지칭한다. 본 발명인 요지를 보다 명확하게 및 간결하게 설명하기 위해, 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 특정 용어에 대해 하기 정의가 제공된다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "미생물"은 가시화하기 위해 현미경을 요구하는 미생물을 의미한다. 미생물의 비-제한적 예로는 박테리아, 고세균, 진균, 원생생물, 바이러스, 및 현미경적 동물을 들 수 있다. 병원성 미생

물은 숙주 유기체에서 질병을 유발할 수 있다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "올리고뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 염기를 포함하는 중합체이다. 뉴클레오티드 염기는 DNA 뉴클레오티드 (예를 들어, A, C, G, T), RNA 뉴클레오티드 (예를 들어, A, C, G, U), 또는 DNA 뉴클레오티드 및 RNA 뉴클레오티드의 혼합물로 구성될 수 있다. 뉴클레오티드 염기는 변형될 수 있다 (예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오티드, 펩티드 핵산 (PNA), 잠금된 핵산 (LNA), 모르폴리노, 2'-플루오로-데옥시리보뉴클레오티드, 또는 브릿지된 뉴클레오티드, 예컨대 잠금된 핵산 (LNA), 또는 구속된 에틸 뉴클레오티드 (cEt)).

[0039] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "박테리아"는 원핵생물 (*Prokaryota*) 계의 단세포 미생물을 의미한다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "포유동물"은 털 (hair) 또는 털 (fur)의 소유, 새끼를 키우기 위해 암컷에 의한 유액의 분비, 및 살아있는 새끼의 출산에 의해 구별되는 온혈 척추동물 진핵생물을 의미한다.

[0041] 본원에 사용된 바와 같은 "풍부화"는 DNA의 적어도 2개의 집단을 포함하는 혼합된 샘플에서 제2 집단 (예를 들어, 포유동물 DNA)에 비한 DNA의 한 집단 (예를 들어, 미생물 DNA)의 증가를 지칭한다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같은 "증폭"은 핵산의 집단을 증가시키는 프로세스를 지칭한다. 핵산의 집단은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR), 가닥 대체 증폭 (SDA), 또는 전사 매개 증폭 (TMA)을 비롯한 몇몇 방식 중 하나에서 확장된다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭은 등온 가닥-대체 증폭, PCR, qPCR, RT-PCR, 축퇴성 올리고뉴클레오티드 PCR, 또는 프라이머 연장 사전-증폭이다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같은 "혼합된 샘플"은 적어도 2개의 공급원으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 핵산의 제1 집단 및 제2 집단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 DNA이고, 핵산의 제2 집단은 미생물 DNA이다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 미토콘드리아 DNA이고, 핵산의 제2 집단은 박테리아 DNA이다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 숙주 DNA이고, 핵산의 제2 집단은 비-숙주 DNA이다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단 및 제2 집단은 둘 다 미생물 DNA이다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단 및 제2 집단은 둘 다 박테리아 DNA이다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상대 발생"은 DNA의 제2 집단에 비한 DNA의 제1 집단에서의 뉴클레오티드 서열의 상대 발생을 지칭한다. 상대 발생은 (a) 제1 집단에서의 뉴클레오티드 서열의 발생을 (b) 제2 집단에서의 뉴클레오티드 서열의 발생으로 나눔으로써 계산될 수 있다. 각각의 집단에서의 뉴클레오티드 서열의 발생은 (a) 뉴클레오티드 서열 (중복 카피를 포함함)에 상응하는 집단에서의 DNA의 양 (예를 들어, bp의 수)을 (b) 집단에서의 DNA의 총량 (예를 들어, bp의 수)으로 나눔으로서 추정될 수 있다. 상대 발생은 전체 또는 부분적 게놈 서열의 지식에 기초하여 또는 실험적으로 근사될 수 있다. 예를 들어, G bp의 게놈에서 Y 카피에서 발생하는 X bp의 뉴클레오티드 서열은 XY/G의 발생을 가질 것이다.

[0045] 본원에 사용된 바와 같은 "박테리아혈증"은 혈액에서의 박테리아의 존재를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 혈액에 존재하는 박테리아는 숙주에서 질환을 유발하는 감염성 박테리아이다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같은 "상보적"은 또다른 폴리뉴클레오티드 서열에 선택적으로 결합하거나 어닐링하는 폴리뉴클레오티드 서열의 능력을 지칭한다. 본 발명의 차단 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 자객 차단제 또는 날개형 차단제 올리고뉴클레오티드)는 혼합된 샘플에서 DNA의 한 집단의 서열에 상보적이다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같은 "차단 올리고뉴클레오티드"는 상보적 뉴클레오티드 서열에 결합하거나 그의 증폭을 억제하는 뉴클레오티드 염기의 중합체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 자객 차단제 및 상보적 뉴클레오티드 서열 사이의 가닥간 가교의 형성으로 인해 상보적 뉴클레오티드 서열에 결합하고, 그의 증폭을 억제하는 자객 차단제이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 날개형 차단제의 5' 및 3' 말단에서의 결합의 결여로 인해 상보적 뉴클레오티드 서열에 결합하고, 그의 증폭을 억제하는 날개형 차단제이다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같은 "가닥간 가교"는 DNA 이중-나선의 대향 가닥 상의 DNA 염기 사이의 공유 연결을 지칭한다. 이들 가교는 매우 안정하고, DNA 증폭을 차단하여, 증폭을 계속하기 위해 가교된 뉴클레오티드의 절제를 요구한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 자객 차단제 올리고뉴클레오티드는 포유동물 미토콘드리아 DNA에 가교됨으로써, 증폭을 차단한다. 일부 실시양태에서, 가닥간 가교는 소랄렌 화학기를 포함하는 변형된 뉴클레오티드 염기 및 포유동물 미토콘드리아 DNA에서의 상보적 뉴클레오티드 염기 사이에 형성된다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같은 "소랄렌"은 5'-AT 서열에서 DNA 내로 개재시킴으로써 DNA 가닥간 가교를 형성하는 천연 화합물을 지칭하며, 여기서, 소랄렌은 UVA 조사의 존재 하에서 티미딘 뉴클레오티드와 결합하고, 티미딘 부

가물을 형성한다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "스페이서"는 3' 위치가 또다른 뉴클레오티드의 5' 포스페이트와 반응하여 뉴클레오티드 사이에 5'->3' 포스포디에스테르 결합을 형성하는 데 이용가능하지 않도록 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에서 뉴클레오티드의 데옥시리보스 3' 위치에 공유적으로 결합될 수 있는 화학 모이어티를 의미한다. 따라서, 스페이서는 DNA 폴리머라제가 주형-의존성 DNA 합성에 의해 올리고뉴클레오티드를 연장하는 것을 방지하고, 올리고뉴클레오티드가 DNA 합성 또는 증폭을 위한 프라이머로서 기능하는 것을 방지한다. 적합한 스페이서는 전형적으로 올리고뉴클레오티드의 3' OH와 반응할 수 있는 저분자량 지방족 모이어티이고, 다양한 형태로 시판되며 (예를 들어, 미국 일리노이주 스토키의 인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지즈 (Integrated DNA Technologies)로부터의 3' 아미노 모디파이어 (3' Amino Modifier)™, C3 스페이서 (C3 Spacer) ™, 스페이서 (Spacer) 9™, 스페이서 18™, d스페이서 (dSpacer)™), 그의 가장 단순한 것은 형태 $-(CH_2)n-R$의 것이다 (상기 식에서, n은 2 내지 10이고, R은 -H, -OH, -SH, -NH2일 수 있음). 스페이서는 또한 시클릭 지방족 모이어티, 예컨대 3' 데옥시리보스일 수 있다.

[0051] 본 발명의 원리.

[0052] 본 발명은 부분적으로, 혼합된 샘플에 존재하는 병원성 미생물을 비롯한 미생물의 신속하고 효율적인 확인을 보조하기 위해, 핵산의 적어도 2개의 집단을 포함하는 혼합된 임상적 샘플에서, 핵산의 집단 (예를 들어, 병원성 미생물 DNA를 비롯한 미생물 핵산)을 선택적으로 또는 우선적으로 증폭시키는 개선된 방법의 개발에 의존한다. 일부 실시양태에서, 방법은 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)의 특정 서열에 가교된 차단 올리고뉴클레오티드를 채용하여 그 핵산의 제1 집단의 증폭을 억제하고, 그에 의해 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아 또는 비-숙주 핵산)의 풍부화를 향상시킨다. 다른 실시양태에서, 방법은 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 DNA)의 특정 서열에 결합하고, 그의 증폭을 억제하는 날개형 나선 도메인을 포함하는 차단 올리고뉴클레오티드를 채용하여 그 핵산의 제1 집단의 증폭을 억제하고, 그에 의해 핵산의 제2 집단의 풍부화를 향상시킨다.

[0053] 한 측면에서, 본 발명은 유리하게 증폭으로부터 차단될 수 있는 DNA의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물 DNA)으로부터의 DNA 서열을 선택하여 바람직한 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 핵산)의 풍부화를 향상시키는 방법을 제공한다. 자객 차단제 서열을 위한 적합한 후보 ("후보 차단 서열")는 자객 차단제가 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 DNA)에 비해 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 DNA)을 우선적으로 증폭시키도록 선택된다. 후보 차단 서열은 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 DNA)에 비해 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 DNA)에서 보다 빈번하게 나타나야 한다. 예를 들어, 후보 차단 서열의 최초 6개의 뉴클레오티드는 핵산의 제2 집단에 비해 핵산의 제1 집단에서 2 내지 50배 더 빈번해야 한다. 더욱이, 후보 차단 올리고뉴클레오티드 서열의 최초 23개의 뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 DNA)에 존재하고, 핵산의 제1 집단에 비해, 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 DNA)에는 부재하거나 매우 드물어야 한다. 후보 차단 서열은 또한 혼성화를 위한 합당한 온도 (예를 들어, 25 내지 50 ℃)에서 상보적 서열에 어닐링할 수 있어야 한다. 후보 차단 서열은 또한 가교제에 의한 가교를 용이하게 하기 위해 특정 모티프 (예를 들어 소랄렌에 대해 특정 말단에서 A 및 T)를 함유할 필요가 있을 수 있다. 후보 차단제 서열의 세트는 핵산의 전체 집단이 그의 증폭에서 억제되어야 하는 경우, 이들이 핵산의 집단의 큰 영역을 차단하게 될 방식으로 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 게놈)에 걸쳐 전체적으로 이격되어야 한다. 혼합된 샘플에서 차단되는 핵산의 각각의 집단은, 핵산의 한 집단에 적합한 차단 서열이 핵산의 또다른 집단으로 연장되지 않을 수 있기 때문에, 개별적으로 조사되어야 한다. 단지 소수의 자객 차단제가 적용에 바람직하고, 핵산의 제1 집단이 큰 경우, 후보 차단 서열이 핵산의 제1 집단에서 차단할 영역의 수는 또한 알고리듬에 의해 정량화되고, 보다 많은 영역을 차단하는 서열이 바람직하다.

[0054] 따라서, 본 발명에 채용되는 차단 올리고뉴클레오티드는 증폭되지 않거나, 혼합된 샘플에서 핵산 서열의 다른 집단보다 더 적은 정도로 증폭되는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주) DNA 서열의 차단된 세트를 한정한다. 결과는 가능한 병원성 미생물 감염의 진단을 보조하는 병원성 미생물 DNA를 비롯한, DNA의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 DNA)에 대해 풍부화된 DNA의 증폭된 샘플이다.

[0055] 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 미토콘드리아 DNA 서열을 포함한다. 포유동물 세포는 많은 미토콘드리아를 포함하기 때문에, 및 미토콘드리아는 전형적으로 미토콘드리아 게놈의 다수의 카피를 함유하기 때

문에, 포유동물 세포 당 미토콘드리아 게놈의 카피 수는 꽤 높을 수 있다. 예를 들어, mtDNA 카피 수는 세포 당 수 백 내지 수 천의 카피의 범위인 것으로 추정되었다 (Hosgood et al. (2010), "Mitochondrial DNA copy number and lung cancer risk in a prospective cohort study," *Carcinogenesis*, 31(5):847-849). 그러나, 일부 미토콘드리아 서열은 병원성 미생물 서열과 실질적으로 유사하다. 따라서, 이러한 병원성 미생물 서열이 또한 차단될 것이기 때문에, 모든 미토콘드리아 서열이 차단된 서열의 제1 집단에 포함되어야 하는 것은 아니다.

[0056] 유사하게, 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 DNA 서열을 포함한다. 그러나, 일부 포유동물 서열은 병원성 미생물 서열과 실질적으로 유사하다. 따라서, 이러한 병원성 미생물 서열이 또한 차단될 것이기 때문에, 모든 포유동물 서열이 핵산의 제1 집단에 포함되어야 하는 것은 아니다.

[0057] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50%는 포유동물 미토콘드리아 DNA 서열을 차단할 것이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80% 미만은 포유동물 미토콘드리아 DNA 서열을 차단할 것이다.

[0058] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50%는 포유동물 DNA 서열을 차단할 것이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80% 미만은 포유동물 DNA 서열을 차단할 것이다.

[0059] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50%는 포유동물 미토콘드리아 DNA 서열 및/또는 포유동물 DNA 서열을 차단할 것이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 또는 80% 미만은 포유동물 미토콘드리아 DNA 서열 및/또는 포유동물 DNA 서열을 차단할 것이다.

[0060] 병원성 미생물.

[0061] 일부 측면에서, 본 발명은 핵산의 적어도 2개의 집단을 포함하는 혼합된 샘플의 증폭에 의해 생성된 DNA의 증폭된 샘플에서의 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주) DNA의 풍부화를 위한 개선된 방법을 제공한다.

[0062] 본 발명의 일부 실시양태에서, 미생물은 박테리아이다. 박테리아는 건강한 포유동물에 정상적으로 존재하지만, 박테리아 및 포유동물 숙주 사이의 정상적 균형의 파괴, 또는 숙주 내의 비정상적 또는 병원성 박테리아의 존재는 감염을 초래할 수 있다.

[0063] *스타필로코쿠스 아우레우스 (에스. 아우레우스 (S. aureus))*는 인간 신체에 정상적으로 존재하며, 코, 호흡관에서, 및 피부 상에서 빈번하게 발견되는 박테리아이다. *에스. 아우레우스*는 항상 병원성이지는 않지만, 이는 농양, 호흡기 감염, 및 식품 중독을 비롯한 피부 감염의 통상적인 원인이다. *에스. 아우레우스* 감염을 치료하는 통상적인 방법은 항생제를 사용하는 것이지만, *에스. 아우레우스*의 항생제-저항성 균주, 예컨대 메티실린-저항성 *에스. 아우레우스* (MRSA) 및 반코마이신-저항성 *에스. 아우레우스* (VRSA)의 출현은 전세계적인 임상 보건 도전이 되었다.

[0064] *스타필로코쿠스 에피더미디스 (에스. 에피더미디스 (S. epidermidis))*는 인간 신체에 정상적으로 존재하는 박테리아이며, 이는 피부 상에서 빈번하게 발견된다. *에스. 에피더미디스*는 일반적으로 병원성이 아니지만, 손상된 면역계를 갖는 대상체는 *에스. 에피더미디스* 감염을 발달시킬 위험이 있으며, *에스. 에피더미디스*는, 그것이 플라스틱 표면 상에서 성장하고, 인간 신체에 확산될 수 있기 때문에, 외과적 삽입물을 갖는 대상체에게 특히 위협을 제기한다. *에스. 에피더미디스* 균주는 종종 리파마이신, 플루오로퀴놀론, 겐타미신, 테트라시클린, 클린다마이신, 및 술폰아미드를 비롯한 항생제에 대해 저항성이다.

[0065] *스트렙토코쿠스 아갈락티아에 (에스. 아갈락티아에 (S. agalactiae))*는 일반적으로 병원성이지 않으며, 인간의 30% 이하에서 위장관 및 비뇨생식관에서 발견될 수 있는 박테리아이다. *에스. 아갈락티아에*로 인한 병원성 감염은 신생아 및 면역손상된 개체에 대해 문제이다. 성인에서 *에스. 아갈락티아에* 감염은 생명을 위협할 수 있으며, 박테리아혈증, 연조직 감염, 골수염, 심내막염, 및 수막염을 포함한다. *에스. 아갈락티아에*는 클린다마이신 및 에리트로마이신에 대해 더욱 저항성이다.

[0066] *엔테로코쿠스 파에칼리스 (이. 파에칼리스 (E. faecalis))*는 인간 및 다른 포유동물의 위장관에 서식하는 박테리아이다. 그러나, *이. 파에칼리스*는 심내막염, 패혈증, 요로 감염, 및 수막염을 유발할 수 있다. *이. 파에칼리스* 감염은 특히 *이. 파에칼리스*가 겐타미신 및 반코마이신으로의 치료에 대해 저항성인 경우 생명을 위협할

수 있다.

[0067] *엔테로코쿠스 파에시움 (이. 파에시움 (E. faecium))*은 인간 및 다른 포유동물의 위장관에 서식하는 박테리아이지만, 이는 또한 병원성일 수 있어, 수막염 및 심내막염과 같은 질환을 초래할 수 있다. *이. 파에시움* 감염은 특히 *이. 파에시움*이 반코마이신으로의 치료에 대해 저항성인 경우 생명을 위협할 수 있다.

[0068] *에스케리키아 콜라이 (이. 콜라이)*는 인간 및 다른 포유동물의 위장관에 서식하는 박테리아이지만, 이는 또한 병원성일 수 있어, 위장염, 요로 감염, 신생아 수막염, 출혈성 결장염, 및 박테리아혈증과 같은 상태를 초래할 수 있다. *이. 콜라이*는 플루오로퀴놀론, 세팔로스포린, 및 카르바페넴을 비롯한 다수의 항생제에 대해 더욱 저항성이다.

[0069] *클레브시엘라 뉴모니아에 (케이. 뉴모니아에 (K. pneumoniae))*는 인간 및 다른 포유동물의 입, 피부, 및 장에서 정상적으로 발견되는 박테리아이다. 그러나, 이는 특히 폐포에 흡입되는 경우 인간 및 포유동물 폐에 파괴적 변화를 유발할 수 있다. *케이. 뉴모니아에* 감염은 당뇨병, 알콜중독, 암, 간 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환, 글루코코르티코이드 요법, 및 신부전을 갖는 대상체를 비롯한 손상된 면역계를 갖는 대상체에서 일반적으로 나타난다. *케이. 뉴모니아에*는 플루오로퀴놀론, 세팔로스포린, 테트라시클린, 클로람페니콜, 카르바페넴, 및 트리페토프림/술파메톡사졸을 비롯한 다수의 항생제에 대해 더욱 저항성이다.

[0070] 일부 실시양태에서, 미생물은 병원성 미생물이다. 일부 실시양태에서, 미생물은 박테리아이다. 일부 실시양태에서, 박테리아는 박테리아혈증과 연관된다. 일부 실시양태에서, 박테리아는 *에스. 아우레우스, 에스. 에피더미디스, 에스. 아갈락티아에, 이. 파에칼리스, 이. 파에시움, 이. 콜라이, 케이. 뉴모니아에* 또는 임상적 감염과 연관된 임의의 다른 박테리아 종이다.

[0071] 포유동물 DNA.

[0072] 박테리아 및 포유동물 DNA의 물리적 조성은 별개이지만, 둘 다는 동일한 기본적 유전 암호를 이용한다. 예를 들어, 박테리아 DNA는 핵 또는 미토콘드리아 내에서라기 보다는 세포의 세포질에서 자유롭게 부유하는 것으로 발견되고, 히스톤 단백질에 의해 결합되지 않고, 반복 서열을 거의 함유하지 않으며, 형상에 있어서 선형이라기 보다는 원형이다. 이들 및 다른 차이는 박테리아 DNA를 포유동물 DNA로부터 구별하는 데 이용될 수 있다.

[0073] 포유동물 세포는 "포유동물 미토콘드리아 DNA"로 공지된 핵 DNA와는 별개인 추가의 게놈을 포함한다. 미토콘드리아 DNA는 다수의 미토콘드리아 단백질을 코딩하는 유전자를 갖는 미토콘드리아에서의 작은, 원형, 이중-가닥 DNA 분자이다. 미토콘드리아 DNA는 포유동물 핵 및 박테리아 DNA 둘 다와 별개이며, 박테리아보다 더 많은 반복 서열을 갖지만, 포유동물 핵 DNA보다는 적다. 각각의 포유동물 세포는 염색체의 단지 2 내지 4개의 완전한 세트에 비해 약 100개의 미토콘드리아 DNA 분자를 함유한다.

[0074] 일부 실시양태에서, 본 발명의 개선된 방법으로 처리된 혼합된 샘플에서 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주)의 적어도 50% 감소가 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 개선된 방법으로 처리된 혼합된 샘플에서 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주)의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.99% 감소가 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 개선된 방법으로 처리된 샘플에서 미토콘드리아 DNA의 90% 내지 99.99% 감소가 있다. 일부 실시양태에서, 미토콘드리아 DNA의 적어도 90% 감소가 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 개선된 방법으로 처리된 샘플에서 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주)의 90% 감소, 90.5% 감소, 91% 감소, 91.5% 감소, 92% 감소, 92.5% 감소, 93% 감소, 93.5% 감소, 94% 감소, 94.5% 감소, 95% 감소, 95.5% 감소, 96% 감소, 96.5% 감소, 97% 감소, 97.5% 감소, 98% 감소, 98.5% 감소, 99% 감소, 또는 99.5% 감소가 있다.

[0075] 혼합된 샘플.

[0076] 일부 측면에서, 본 발명은 핵산의 적어도 2개의 집단의 혼합된 샘플에서 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 DNA)의 풍부화를 위한 개선된 방법을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같은 "풍부화"는 DNA의 적어도 2개의 집단을 포함하는 혼합된 샘플에서 제2 집단 (예를 들어, 포유동물 DNA)에 비한 DNA의 한 집단 (예를 들어, 미생물 DNA)의 증가를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "혼합된 샘플"은 적어도 2개의 별개의 공급원으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주) 및 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주)을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "숙주 DNA"는 포유동물로부터 유래된 DNA를 지칭하고, "비-숙주 DNA"는 미생물로부터 유래된 DNA를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 포유동물 및 비-포유동물 DNA를 포함한다. 일부

실시양태에서, 혼합된 샘플은 포유동물 미토콘드리아 DNA 및 미생물 DNA를 포함한다.

[0077] 적어도 1개의 미생물 DNA 집단 및 적어도 1개의 포유동물 DNA 집단을 포함하는 혼합된 샘플은 감염을 갖는 대상체로부터 수득된다. 혼합된 샘플에 존재하는 미생물 종의 신속한 확인은 적절한 항미생물로 감염을 치료하는 데 중요하다. 이는 최근 출현한 항생제-저항성 박테리아 균주의 수 때문에 박테리아 감염에 특히 결정적이다. 존재하는 미생물 종의 확인 및 적절한 항미생물로의 치료는 감염의 기간 및 중증도를 줄이고, 가능하게는 사망을 방지할 수 있다.

[0078] 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주) 및 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주)의 혼합된 샘플은 혈액, 객담, 소변, 점액, 타액, 조직 농양, 상처 배액, 대변 림프, 세척, 뇌척수액, 또는 인간 및/또는 다른 진핵생물 기원의 임의의 유체 흡인물 또는 조직 추출물로부터 수득되거나 유래된다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 미생물 및 포유동물 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 미생물 및 포유동물 DNA의 혼합된 샘플은 혈액이다.

[0079] 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 밀리리터 당 10 내지 10^8개의 미생물 게놈으로부터의 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플에 밀리리터 당 10 내지 10^3개의 미생물 게놈으로부터의 DNA가 있다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플에 밀리리터 당 10^3 내지 10^5개의 미생물 게놈으로부터의 DNA가 있다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플에 밀리리터 당 10^5 내지 10^6개의 미생물 게놈으로부터의 DNA가 있다.

[0080] 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 인간 대상체로부터 수득되거나 유래된다.

[0081] 핵산 증폭.

[0082] 본 발명은 핵산 집단을 증폭시키는 방법을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같은 "증폭"은 핵산의 집단을 증가시키는 프로세스를 지칭한다. 핵산 집단의 증폭은 일반적으로 핵산의 공급원 (예를 들어, 포유동물 DNA, 미생물 DNA)의 확인 전에 수행된다. 관련 기술분야에 공지된 핵산 증폭 기법의 비-제한적 예로는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR), 정량적 PCR (qPCR), 역전사효소 PCR (RT-PCR), 축퇴성 올리고뉴클레오티드 PCR, 프라이머 연장 사전-증폭, 가닥 대체 증폭 (SDA), 또는 전사 매개 증폭 (TMA)을 들 수 있다.

[0083] 이전에 언급된 방법 중 임의의 것에 의한 핵산의 한 집단의 증폭은 프라이머 및 폴리머라제를 요구한다. 본원에 사용된 바와 같은 "프라이머"는 증폭되는 핵산의 집단에서의 서열에 상보적인 올리고뉴클레오티드이다. 본원에 사용된 바와 같은 "상보적"은 또다른 뉴클레오티드 서열과 염기-쌍형성하는 뉴클레오티드 서열의 능력을 지칭한다. 염기-쌍형성은 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 염기 쌍형성, 후그스틴 (Hoogsteen) 염기 쌍형성, 또는 관련 기술분야에 공지된 염기-쌍형성의 임의의 다른 방법에 의해서일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "폴리머라제"는 프라이머를 연장시킴으로써, DNA 및 RNA를 비롯한 핵산의 긴 스트레치를 합성하는 효소이다. 폴리머라제는 기존의 핵산 가닥을 핵산 합성의 주형으로서 이용하고, 전형적으로 왓슨-크릭 염기 쌍형성을 채용하여 성장하는 핵산 가닥에 첨가하기 위한 정확한 뉴클레오티드를 선택하며, 여기서, 아데닌 (A)은 티민 (T)과 쌍형성하고, A는 우라실 (U)과 쌍형성하고, 시토신 (C)은 구아노신 (G)과 쌍형성한다. 폴리머라제의 비-제한적 예로는 진핵생물 폴리머라제, 예컨대 폴리머라제 알파, 폴리머라제 델타, 및 폴리머라제 엡실론을 들 수 있고; 박테리아 폴리머라제로는 *테르무스 아쿠아티쿠스* (*Thermus aquaticus*) (Taq), 딥 벤트, 및 써미네이터; RNA 폴리머라제, 예컨대 RNA 폴리머라제 I 및 RNA 폴리머라제 II; 및 가닥-대체 폴리머라제를 들 수 있다.

[0084] 본원에 사용된 바와 같은 "가닥-대체 폴리머라제"는, 그것이 프라이머 주형을 연장시키기 때문에, DNA 이중 나선의 가닥을 분리하는 효소를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 가닥 대체 폴리머라제는 phi29 폴리머라제; Bst DNA 폴리머라제, 거대 단편™; Bsu DNA 폴리머라제, 거대 단편™; 딥 벤트 DNA 폴리머라제®; 딥 벤트 (엑소) DNA 폴리머라제®; 클레나우 단편; DNA 폴리머라제 I, 거대 단편; M-MuLV 역전사효소; 써미네이터 DNA 폴리머라제®; 벤트 DNA 폴리머라제®; 벤트 (엑소) DNA 폴리머라제®; 및 SD 폴리머라제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원에 사용된 바와 같은 "phi29"는 *바실루스 서브틸리스* (*Bacillus subtilis*) 파지 phi29로부터의 복제성 폴리머라제를 지칭한다. phi29 폴리머라제는 이례적인 가닥 대체 및 진행적 합성 특성, 뿐만 아니라 고유한 3'→5' 엑소뉴클레아제 교정 능력을 갖는다.

[0085] 일부 측면에서, 본 발명은 혼합된 샘플에서 핵산의 한 집단의 선택적 증폭을 위한 방법을 제공한다. "선택적 증폭"은 핵산의 또다른 집단에 비한 핵산의 한 집단의 증폭을 지칭한다. 혼합된 샘플에서의 선택적 핵산 증폭

의 비-제한적 방법으로는 뉴클레아제로의 DNA 샘플의 소화 및 핵산의 한 집단의 증폭의 억제를 들 수 있다.

[0086] 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플에서의 핵산의 한 집단의 선택적 증폭은 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 DNA)에 비해 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 DNA)에서 보다 빈번하게 발견되는 서열을 이용한다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 DNA 서열을 포함한다. 이들 포유동물 DNA 서열은 핵 및/또는 미토콘드리아 DNA 서열일 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유동물 DNA 서열은 포유동물 미토콘드리아 DNA에서 발견된다. 일부 실시양태에서, 포유동물 DNA 서열은 포유동물 핵 DNA에서 발견된다.

[0087] 일부 측면에서, 본 발명은 핵산의 적어도 2개의 집단을 포함하는 혼합된 샘플에서 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주)을 증폭시키는 개선된 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 DNA이고, 핵산의 제2 집단은 미생물 DNA이다. 일부 실시양태에서, 미생물 DNA의 증폭은 본 발명의 개선된 방법으로 처리되지 않은 샘플에 비해 10배 내지 100배 증가된다. 일부 실시양태에서, 미생물 DNA의 증폭은 본 발명의 개선된 방법으로 처리되지 않은 샘플에 비해 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 55배, 60배, 65배, 70배, 75배, 80배, 85배, 90배, 95배, 또는 100배 증가된다. 일부 실시양태에서, 미생물 DNA의 증폭은 본 발명의 개선된 방법으로 처리되지 않은 샘플에 비해 적어도 10배 증가된다. 일부 실시양태에서, 미생물 DNA의 증폭은 본 발명의 개선된 방법으로 처리되지 않은 샘플에 비해 100배 미만 증가된다.

[0088] 일부 실시양태에서, 증폭은 phi29 폴리머라제; Bst 폴리머라제, 거대 단편™; Bsu DNA 폴리머라제, 거대 단편™; 딥 벤트 DNA 폴리머라제®; 딥 벤트 (엑소) DNA 폴리머라제®; 클레나우 단편; DNA 폴리머라제 I, 거대 단편; M-MuLV 역전사효소; 써미네이터 DNA 폴리머라제®; 벤트 DNA 폴리머라제®; 벤트 (엑소) DNA 폴리머라제®, 및 SD 폴리머라제를 포함하는 군으로부터 선택되는 가닥-대체 폴리머라제를 사용하여 수행된다. 일부 실시양태에서, 증폭은 phi29 폴리머라제에 의해서이다.

[0089] 일부 실시양태에서, 핵산 증폭은 전체 게놈 증폭 (WGA)이다. 축퇴성 올리고뉴클레오티드 프라임드-폴리머라제 연쇄 반응 (DOP-PCR), 다중 대체 증폭 (MDA), 및 다중 어닐링 및 루핑-기재 증폭 사이클 (MALBAC)을 비롯한 WGA에 대한 상이하고 신규한 접근법은 1992년에 그의 개시 이래로 개발되었다 [3]. phi29 DNA 폴리머라제에 의한 MDA는, 그것이 phi29 가닥이 그것이 DNA 합성 동안 대면하는 이중 가닥 DNA를 대체하는 등온 증폭을 이용하기 때문에, 바람직한 방법이 되었다.

[0090] phi29에 의한 WGA의 핵심적 측면은 모든 가능한 게놈 서열을 증폭시키기 위한 랜덤 육량체 올리고뉴클레오티드의 사용이다. 이는 비편향된 DNA 증폭 접근법을 위해 결정적이지만, 랜덤 육량체의 사용은 바람직하지 않은 인간 핵산 오염물로 인한 인간 생물학적 샘플로부터 단리된 병원성 미생물 DNA의 샘플을 다루는 경우 문제가 된다. 인간 게놈은 평균 미생물 게놈보다 대략 1,000배 더 크며, 이는 인간 세포보다 대단히 수적으로 열세인 병원성 미생물을 시퀀싱하는 경우 위압적인 도전을 제공한다. 물리적 및 화학적 접근법은 인간 염색체 DNA를 고갈시키는 데 있어서 부분적으로 유효하지만, 인간 미토콘드리아 DNA (mtDNA) 오염은 제거하기가 보다 곤란한 것으로 입증되었다 [4]. 미토콘드리아 DNA 오염은 원형 성질 및 세포 당 mtDNA의 높은 카피 수 때문에 시퀀싱되는 모든 리드의 30%만큼을 나타낼 수 있다. MDA 동안 생물학적 샘플로부터의 mtDNA 증폭의 방지는 병원성 미생물 시퀀싱의 효율을 개선시키며, 이는 임상적으로 중요하다.

[0091] 차단 올리고뉴클레오티드.

[0092] 일부 실시양태에서, 본 발명은 핵산의 제2 집단에 비해 핵산의 제1 집단에서 보다 빈번하게 발생하는 서열을 포함하는 6 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제2 집단에 비한 핵산의 제1 집단에서의 서열의 상대 발생은 적어도 50이다. 본원에 사용된 바와 같은 "상대 발생"은 서열이 또다른 것에 비해 핵산의 한 집단에서 발생하는 빈도를 지칭한다.

[0093] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 차단 올리고뉴클레오티드이다. 본원에 사용된 바와 같은 "차단 올리고뉴클레오티드"는 상보적 뉴클레오티드 서열에 특이적으로 결합하고, 그의 증폭을 억제하는 뉴클레오티드 염기의 중합체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 자객 차단제 및 상보적 뉴클레오티드 서열 사이의 가닥간 가교의 형성으로 인해 상보적 뉴클레오티드 서열에 결합하고, 그의 증폭을 억제하는 자객 차단제 올리고뉴클레오티드이다.

[0094] 일부 실시양태에서, 자객 차단제 올리고뉴클레오티드 서열은 핵산의 제1 집단에 상보적이다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 DNA 서열로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 자객 차단제 올리고뉴클레오티

드는 포유동물 핵 DNA 서열에 상보적이다. 일부 실시양태에서, 자객 차단제 올리고뉴클레오티드는 포유동물 미토콘드리아 DNA 서열에 상보적이다.

[0095] 본원에 사용된 바와 같은 "가닥간 가교"는 DNA 이중-나선의 대향 가닥 상의 DNA 염기 사이의 공유 연결을 지칭한다. 이들 가교는 안정하며, DNA 가닥의 분리를 차단함으로써, 가교된 뉴클레오티드가 절제될 때까지 증폭을 차단한다. 가교제의 비-제한적 예로는 소랄렌, 시스플라틴, 미토마이신 C, 알데히드, 아질산, 및 반응성 산소 종을 들 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 자객 차단제 올리고뉴클레오티드는 DNA의 표적화된 집단에 가교됨으로써, 증폭을 차단한다. 일부 실시양태에서, 가닥간 가교는 소랄렌 화학기를 포함하는 변형된 뉴클레오티드 염기 및 DNA의 표적화된 집단에서의 상보적 뉴클레오티드 염기 사이에 형성된다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같은 "소랄렌"은 5'-AT 서열에서 DNA 내로 개재함으로써 DNA 가닥간 가교를 형성하는 천연 화합물을 지칭하며, 그에 의해 소랄렌은 UVA 조사의 존재 하에서 티미딘 뉴클레오티드와 결합하고, 티미딘 부가물을 형성한다. DNA 가닥간 가교제로서, 소랄렌 더하기 UVA (PUVA) 요법은 건선 및 특정 유형의 피부암을 비롯한 과다증식성 피부 장애를 치료하는 데 이용된다.

[0097] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 상보적 뉴클레오티드 서열에 결합하고, 그의 증폭을 억제하는 날개형 차단제이다. 본원에 사용된 바와 같은 "날개형 차단제"는 날개형 차단제의 5' 및 3' 말단에서의 결합의 결여로 인해 상보적 DNA에 결합하고, 그의 증폭을 차단하는 올리고뉴클레오티드이다. 이 5' 및 3' 말단 상의 결합의 결여는 폴리머라제가 2개의 핵산 가닥을 결합시키고 분리하는 것을 방지함으로써, 증폭을 차단한다.

[0098] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 스페이서를 포함한다. 스페이서는 폴리머라제 결합을 방지하며, 따라서 상보적 핵산 가닥의 증폭을 차단한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 C2, C3, C4, C5, C6,C7, C8, C9, C10, C11, 또는 C12 스페이서를 포함한다. 자객 차단제 올리고뉴클레오티드의 스페이서는 차단 올리고뉴클레오티드의 3' 말단으로부터의 DNA 합성을 방지한다.

[0099] 일부 측면에서, 본 발명은 (a) 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아 또는 비-숙주)에 비해 킬로베이스당 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주) 내에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 상보적인 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드 및 (b) 상보적 서열에 가교하는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 차단 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0100] 일부 실시양태에서, 포유동물 게놈은 미토콘드리아 게놈이다. 일부 실시양태에서, 박테리아 게놈은 *스타필로코쿠스 아우레우스, 스타필로코쿠스 에피더미디스, 스트렙토코쿠스 아갈락티아에, 엔테로코쿠스 파에칼리스,* 엔테로코쿠스 파에시움, *에스케리키아 콜라이,* 및 *클레브시엘라 뉴모니아에*이다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 5' 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 소랄렌 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서 변형된 뉴클레오티드는 5' 변형된 뉴클레오티드이다.

[0101] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주)에 비해 킬로베이스 당 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주) 내에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 상보적인 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주)에 비해 킬로베이스 당 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주) 내에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 상보적인 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개, 적어도 25개, 적어도 26개, 적어도 27개, 적어도 28개, 적어도 29개, 적어도 30개, 적어도 31개, 적어도 32개, 적어도 33개, 적어도 34개, 또는 적어도 35개의 인접한 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 DNA이고, 핵산의 제2 집단은 미생물 DNA이다.

[0102] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 적어도 15개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 적어도 16개의 뉴클레오티드, 적어도 17개의 뉴클레오티드, 적어도 18개의 뉴클레오티드, 적어도 19개의 뉴클레오티드, 적어도 20개의 뉴클레오티드, 적어도 21개의 뉴클레오티드, 적어도 22개의 뉴클레오티드, 적어도 23개의 뉴클레오티드, 적어도 24개의 뉴클레오티드, 적어도 25개의 뉴클레오티드, 적어도 26개의 뉴클레오티드, 적어도 27개의 뉴클레오티드, 적어도 28개의 뉴클레오티드, 적어도 29개의 뉴클레오티드, 적어도 30개의 뉴클레오티드, 적어도 31개의 뉴클레오티드, 적어도 32개의 뉴클레오티드, 적어도 33개의 뉴클레오티드, 적어도 34개의 뉴클레오티드, 적어도 35개의 뉴클레오티드, 적어도 36개의 뉴클레오티드, 적어도 37개의 뉴클레오티드, 적어도 38개의 뉴클레오티드, 적어도 39개의 뉴클레오티드, 적어도 40개의 뉴클레오티드, 적어도 41개의 뉴클레오티드, 적어도 42개의 뉴클레오티드, 적어도 43개의 뉴클레오티드, 적어도 44개의 뉴클레오

티드, 적어도 45개의 뉴클레오티드, 적어도 46개의 뉴클레오티드, 적어도 47개의 뉴클레오티드, 적어도 48개의 뉴클레오티드, 적어도 49개의 뉴클레오티드, 또는 적어도 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 15 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 20 내지 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 15 내지 35개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 15 내지 25개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0103] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 적어도 50% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 적어도 55% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 적어도 60% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 적어도 65% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 적어도 70% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 적어도 75% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 적어도 80% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 적어도 85% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 적어도 90% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 적어도 95% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 핵산)에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 적어도 99% 상보적이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 1 내지 16에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 17 내지 32에 제시된 바와 같은 서열에 상보적이다.

[0105] 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 5' 말단에 날개형 차단제를 포함한다. 일부 실시양태에서 차단 올리고뉴클레오티드는 3' 말단에 날개형 차단제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드는 5' 말단 및 3' 말단에 날개형 차단제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 날개형 차단제는 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주 게놈)에 상보적이지 않은 5 내지 15개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 날개형 차단제는 5개의 뉴클레오티드, 6개의 뉴클레오티드, 7개의 뉴클레오티드, 8개의 뉴클레오티드, 9개의 뉴클레오티드, 10개의 뉴클레오티드, 11개의 뉴클레오티드, 12개의 뉴클레오티드, 13개의 뉴클레오티드, 14개의 뉴클레오티드, 또는 15개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 날개형 차단제는 8 내지 15개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 날개형 차단제는 5 내지 10개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0106] 일부 실시양태에서, 변형된 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드를 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주)에 가교시키는 가닥간 가교제를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 가교제는 광활성화된다. 일부 실시양태에서, 가교제는 소랄렌이다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 DNA이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 DNA는 미토콘드리아 DNA이다.

[0107] 일부 실시양태에서, 본 발명은 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주) 및 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주)의 혼합된 샘플의 증폭에 의해 생성된 DNA의 증폭된 샘플에서 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주 DNA)의 풍부화를 위한 개선된 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산의 제1 집단은 포유동물 DNA이고, 핵산의 제2 집단은 미생물 DNA이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 DNA의 증폭은 혼합된 샘플에서 적어도 1개의 포유동물 DNA에 특이적으로 결합하고, 포유동물 DNA의 증폭을 억제하는 적어도 1개의 차단 올리고뉴클레오티드를 혼합된 샘플에 첨가함으로써 억제된다. 일부 실시양태에서, 개선된 방법은 적어도 2개의 차단 올리고뉴클레오티드의 세트를 포유동물 게놈에 걸쳐 대략 동등하게 분포되는 혼합된 샘플에 첨가하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단 올리고뉴클레오티드의 세

트는 2 내지 10^8개의 차단 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포유동물 DNA는 포유동물 미토콘드리아 DNA이다.

[0108] 일부 측면에서, 본 발명은 a) 핵산의 제2 집단 (예를 들어, 미생물, 박테리아, 또는 비-숙주)에 비해 킬로베이스 당 핵산의 제1 집단 (예를 들어, 포유동물, 미토콘드리아, 또는 숙주) 내에서 보다 빈번하게 관찰되는 서열에 상보적인 적어도 15개의 인접한 뉴클레오티드 및 (b) 상보적 서열 및 가닥간 가교제에 가교하는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 적어도 1개의 차단 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 2 내지 10^8개의 차단 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0109] 일부 측면에서, 본 발명은 조성물 및 가닥-대체 폴리머라제를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 가닥-대체 폴리머라제는 phi29 폴리머라제이다.

[0110] 의학적 상태 및 치료.

[0111] 본 발명의 방법 및 올리고뉴클레오티드는 병원성 미생물에 의한 감염을 비롯한 의학적 상태의 진단 및 치료에 사용될 수 있다.

[0112] 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법 및 올리고뉴클레오티드는 대상체에서 감염을 유발하는 병원성 미생물(들)을 확인하는 데 사용된다. 병원성 미생물(들)은 박테리아, 바이러스, 진균, 원생생물, 또는 효모일 수 있다. 본 발명의 방법은 혼합된 샘플에서 포유동물 DNA의 증폭의 억제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 혼합된 샘플은 대상체로부터의 임상적 샘플이며, 임의로 임상적 샘플은 혈액, 객담, 혈액, 객담, 소변, 점액, 타액, 조직 농양, 상처 배액, 대변, 림프, 세척, 뇌척수액, 또는 인간 및/또는 다른 진핵생물 기원의 임의의 유체 흡인물 또는 조직 추출물이다.

[0113] 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법 및 올리고뉴클레오티드는 *아크로모박터* (*Achromobacter*) 종, *아시네토박터 칼코아세티쿠스* (*Acinetobacter calcoaceticus*)/*바우만니이* (*baumannii*) *콤플렉스* (*complex*), *아시네토박터 헤몰리티쿠스* (*Acinetobacter haemolyticus*), *아시네토박터 주니이* (*Acinetobacter junii*), *아시네토박터 라디오레시스텐스* (*Acinetobacter radioresistens*), *아시네토박터 우르신기이* (*Acinetobacter ursingii*), *아시네토박터 루피이* (*Acinetobacter lwoffii*), *악티노미세스 이스라엘리이* (*Actinomyces israelii*), *악티노미세스 마이에리* (*Actinomyces meyeri*), *악티노미세스 나에슬룬디이* (*Actinomyces naeslundii*), *악티노미세스 네우이이* (*Actinomyces neuii*), *악티노미세스 오돈톨리티쿠스* (*Actinomyces odontolyticus*), *악티노미세스 피오게네스* (*Actinomyces pyogenes*), *악티노미세스 비스코수스* (*Actinomyces viscosus*), *아에로코쿠스 우리나에* (*Aerococcus urinae*), *아에로코쿠스 비리단스* (*Aerococcus viridans*), *아에로모나스* (*Aeromonas*) 종, *알칼리게네스 파에칼리스* (*Alcaligenes faecalis*), *알칼리게네스 크실로속시단스* (*Alcaligenes xylosoxidans*), *알파 용혈성 스트렙토코쿠스* (*Alpha hemolytic streptococcus*), *아르카노박테리움 하에몰리티쿰* (*Arcanobacterium haemolyticum*), *아스페르길루스* (*Aspergillus*) 종, *바실루스* (*Bacillus*) 종, *박테리오데스 프라길리스* (*Bacteriodes fragilis*), *바르토넬라 퀸타나* (*Bartonella Quintana*), *블라스토시스티스 호미니스* (*Blastocystis hominis*), *보르데텔라* (*Bordetella*) 종, *보렐리아* (*Borrelia*) 종, *브레분디모나스 디미누타* (*Brevundimonas diminuta*), *브레분디모나스 베시쿨라리스* (*Brevundimonas vesicularis*) *브루셀라* (*Brucella*) 종, *부르크홀데리아* (*Burkholderia*) 종, *부르크홀데리아 세파시아* (*Burkholderia cepacia*), *부르크홀데리아 세파시아 콤플렉스* (*Burkholderia cepacia complex*), *부르크홀데리아 글라디올리* (*Burkholderia gladioli*), *부르크홀데리아 물티보란스* (*Burkholderia multivorans*), *부르크홀데리아 슈도말레이* (*Burkholderia pseudomallei*), *부르크홀데리아 비에트나미엔시스* (*Burkholderia vietnamiensis*), *캄필로박터* (*Campylobacter*) 종, *세데세아 다비사에* (*Cedecea davisae*), *클라미디아 뉴모니아에* (*Chlamydia pneumoniae*), *클라미디아 프시타시* (*Chlamydia psittaci*), *클라미디아 트라코마티스* (*Chlamydia trachomatis*), *크리세오박테리움 인돌로게네스* (*Chryseobacterium indologenes*), *시트로박터* (*Citrobacter*) 종, *시트로박터 아말로나티쿠스* (*Citrobacter amalonaticus*), *시트로박터 파르머* (*Citrobacter farmer*), *시트로박터 프레운디이 콤플렉스* (*Citrobacter freundii complex*), *시트로박터 코세리* (*Citrobacter koseri*), *시트로박터 세드라키이* (*Citrobacter sedlakii*), *클로스트리디움 보툴리눔* (*Clostridium botulinum*), *클로스트리디움 디피실레* (*Clostridium difficile*), *클로스트리디움 페르프린겐스* (*Clostridium perfringens*), *클로스트리디움 테타니* (*Clostridium tetani*), *코아귤라제 음성 스타필로코쿠스* (*Coagulase negative staphylococcus*), *코리네박테리움 디프테리아에* (*Corynebacterium diphtheriae*), *코리네박테리움 슈도투베르쿨로시스* (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), *코리네박테리움 울세란스* (*Corynebacterium ulcerans*), *콕시엘라* (*Coxiella*) 종, *크로노박터 사카자키이* (*Cronobacter sakazakii*), *델프티아 아시도보란스* (*Delftia acidovorans*), *데르마박터 호미니*

스 (*Dermabacter hominis*), 에드워드시엘라 타르다 (*Edwardsiella tarda*), 에를리키아 (*Ehrlichia*) 종, 에이케넬라 코로덴스 (*Eikenella corrodens*), 엔테로박터 (*Enterobacter*) 종, 엔테로박터 아에로게네스 (*Enterobacter aerogenes*), 엔테로박터 칸세로게누스 (*Enterobacter cancerogenus*), 엔테로박터 클로아카에 콤플렉스 (*Enterobacter cloacae complex*), 엔테로비우스 베르미쿨라리스 (*Enterobius vermicularis*), 엔테로코쿠스 (*Enterococcus*) 종, 엔테로코쿠스 아비움 (*Enterococcus avium*), 엔테로코쿠스 카셀리플라부스 (*Enterococcus casseliflavus*), 엔테로코쿠스 두란스 (*Enterococcus durans*), 엔테로코쿠스 파에칼리스, 엔테로코쿠스 파에시움, 엔테로코쿠스 갈리나룸 (*Enterococcus gallinarum*), 엔테로코쿠스 히라에 (*Enterococcus hirae*), 엔테로코쿠스 라피노수스 (*Enterococcus raffinosus*), 에스케리키아 콜라이, 프란시셀라 (*Francisella*) 종, 푸사리움 (*Fusarium*) 종, 게멜라 (*Gemella*) 종, 그라눌리카텔라 아디아센스 (*Granulicatella adiacens*), 군 A 스트렙토코쿠스 (*streptococcus*), 군 B 살모넬라 (*salmonella*), 군 B 스트렙토코쿠스, 군 C1 살모넬라, 군 C2 살모넬라, 군 C 스트렙토코쿠스, 군 D 살모넬라, 군 G 살모넬라, 군 G 스트렙토코쿠스, 헤모필루스 인플루엔자 (*Haemophilus influenza*), 헤모필루스 파라인플루엔자에 (*Haemophilus parainfluenzae*), 하프니아 알베이 (*Hafnia alvei*), 헬리코박터 (*Helicobacter*) 종, 킨겔라 킨가에 (*Kingella kingae*), 클레브시엘라 (*Klebsiella*) 종, 클레브시엘라 그라눌로마티스 (*Klebsiella granulomatis*), 클레브시엘라 옥시토카 (*Klebsiella oxytoca*), 클레브시엘라 뉴모니아에, 클루이베라 (*Kluyvera*) 종, 코쿠리아 크리스티나에 (*Kocuria kristinae*), 락토바실루스 (*Lactobacillus*) 종, 레클레르시아 아데카르복실라타 (*Leclercia adecarboxylata*), 레지오넬라 뉴모필라 (*Legionella pneumophila*), 리슈마니아 (*Leishmania*) 종, 렙토스피라 (*Leptospira*) 종, 류코노스톡 슈도메센테로이데스 (*Leuconostoc pseudomesenteroides*), 리스테리아 모노시토게네스 (*Listeria monocytogenes*), 미크로코쿠스 루테우스 (*Micrococcus luteus*), 모락셀라 카타랄리스 (*Moraxella catarrhalis*), 모르가넬라 모르가니이 (*Morganella morganii*), 미코박테리움 압세수스 (*Mycobacterium abscessus*), 미코박테리움 키마에라 (*Mycobacterium chimaera*), 미코박테리움 포르투이툼 (*Mycobacterium fortuitum*), 미코박테리움 레프라에 (*Mycobacterium leprae*), 미코박테리움 투베르쿨로시스, 미코플라스마 게니탈리움 (*Mycoplasma genitalium*), 미코플라스마 뉴모니아에 (*Mycoplasma pneumoniae*), 네이세리아 메닌기티디스 (*Neisseria meningitidis*), 네이세리아 고노레아에 (*Neisseria gonorrhoeae*), 노카르디아 (*Nocardia*) 종, 오크로박트룸 안트로피크 (*Ochrobactrum anthropic*), 오리엔티아 츠츠가무시 (*Orientia tsutsugamushi*), 판도라에아 (*Pandoraea*) 종, 판토에아 (*Pantoea*) 종, 판토에아 아글로메란스 (*Pantoea agglomerans*), 파라코쿠스 이에에이 (*Paracoccus yeei*), 파스테우렐라 카니스 (*Pasteurella canis*), 파스테우렐라 물토시다 (*Pasteurella multocida*), 페디오코쿠스 (*Pediococcus*), 펩토스트렙토코쿠스 (*Peptostreptococcus*), 플레시오모나스 시겔로이데스 (*Plesiomonas shigelloides*), 프레보텔라 (*Prevotella*) 종, 프로피오니박테리움 (*Propionibacterium*) 종, 프로피오니박테리움 아크네스 (*Propionibacterium acnes*), 프로테우스 (*Proteus*) 종, 프로테우스 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*), 프로테우스 펜네리 (*Proteus penneri*), 프로테우스 불가리스 (*Proteus vulgaris*), 프로비덴시아 레트게리 (*Providencia rettgeri*), 프로비덴시아 스투아르티이 (*Providencia stuartii*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 종, 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 플루오레센스 (*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 스투체리 (*Pseudomonas stutzeri*), 라넬라 아쿠아틸리스 (*Rahnella aquatilis*), 랄스토니아 (*Ralstonia*) 종, 라오울텔라 (*Raoultella*) 종, 라오울텔라 오르니티놀리티카 (*Raoultella ornithinolytica*), 라오울텔라 플란티콜라 (*Raoultella planticola*), 리케치아 프로와제키이 (*Rickettsia prowazekii*), 리케치아 티피 (*Rickettsia typhi*), 로세오모나스 길라르디이 (*Roseomonas gilardii*), 로티아 무실라기노사 (*Rothia mucilaginosa*), 살모넬라 (*Salmonella*) 종, 세도스포리움 (*Scedosporium*) 종, 세라티아 (*Serratia*) 종, 세라티아 폰티콜라 (*Serratia fonticola*), 세라티아 리케파시엔스 (*Serratia liquefaciens*), 세라티아 마르세센스 (*Serratia marcescens*), 시겔라 플렉스네리 (*Shigella flexneri*), 시겔라 손네이 (*Shigella sonnei*), 스핑고박테리움 (*Sphingobacterium*) 종, 스타필로코쿠스 아우레우스, 스타필로코쿠스 아우리쿨라리스 (*Staphylococcus auricularis*), 스타필로코쿠스 카피티스 (*Staphylococcus capitis*), 스타필로코쿠스 카프라에 (*Staphylococcus caprae*), 스타필로코쿠스 코니이 (*Staphylococcus cohnii*), 스타필로코쿠스 에피더미디스, 스타필로코쿠스 헤몰리티쿠스 (*Staphylococcus haemolyticus*), 스타필로코쿠스 호미니스 (*Staphylococcus hominis*), 스타필로코쿠스 인테르메디우스 (*Staphylococcus intermedius*), 스타필로코쿠스 루그두넨시스 (*Staphylococcus lugdunensis*), 스타필로코쿠스 파스테우리 (*Staphylococcus pasteuri*), 스타필로코쿠스 사카롤리티쿠스 (*Staphylococcus saccharolyticus*), 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스 (*Staphylococcus saprophyticus*), 스타필로코쿠스 슐라이페리 (*Staphylococcus schleiferi*), 스타필로코쿠스 시뮬란스 (*Staphylococcus simulans*), 스타필로코쿠스 와르네리 (*Staphylococcus warneri*), 스테노트로포모나스 말토필리아 (*Stenotrophomonas maltophilia*), 스트렙토코쿠스 (*Streptococcus*)

종, 스트렙토코쿠스 아갈락티아에, 스트렙토코쿠스 안지노수스 (*Streptococcus anginosus*), 스트렙토코쿠스 카니스 (*Streptococcus canis*), 스트렙토코쿠스 콘스텔라투스 (*Streptococcus constellatus*), 스트렙토코쿠스 디스갈락티아에 (*Streptococcus dysgalactiae*), 스트렙토코쿠스 인테르메디우스 (*Streptococcus intermedius*), 스트렙토코쿠스 파라산구이니스 (*Streptococcus parasanguinis*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 (*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코쿠스 슈도뉴모니아에 (*Streptococcus pseudopneumoniae*), 스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코쿠스 살리바리우스 (*Streptococcus salivarius*), 스트렙토코쿠스 산구이니스 (*Streptococcus sanguinis*), 스트렙토코쿠스 베스티불라리스 (*Streptococcus vestibularis*), 트레포네마 (*Treponema*) 종, 트리코피톤 (*Trichophyton*) 종, 트리코스포론 아사히이 (*Trichosporon asahii*), 트루에페렐라 베르나르디아에 (*Trueperella bernardiae*), 츠카무렐라 티로시노솔벤스 (*Tsukamurella tyrosinosolvens*), 우레아플라스마 (*Ureaplasma*) 종, 비브리오 콜레라에 (*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스 (*Vibrio parahaemolyticus*), 웨이셀라 콘푸세 (*Weissella confuse*), 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*), 예르시니아 페스티스 (*Yersinia pestis*), 예르시니아 슈도투베르쿨로시스 (*Yersinia pseudotuberculosis*), 요케넬라 레겐스부르게이 (*Yokenella regensburgei*), 아스페르길루스 푸미가투스 (*Aspergillus fumigatus*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 칸디다 아우리스 (*Candida auris*), 칸디다 두블리엔시스 (*Candida dubliniensis*), 칸디다 글라브라타 (*Candida glabrata*), 칸디다 크루세이 (*Candida krusei*), 칸디다 루시타니아에 (*Candida lusitaniae*), 칸디다 파라프실로시스 (*Candida parapsilosis*), 칸디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*), 크립토코쿠스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*), 뉴모시스티스 (*Pneumocystis*), 페니실륨 (*Penicillium*), 푸사리움 (*Fusarium*), 미크로스포룸 (*Microsporum*) 종, 무코르미코시스 (*Mucormycosis*), 히스토플라스마 (*Histoplasma*), 블라스토미세스 (*Blastomyces*), 콕시디오이데스 (*Coccidioides*), 트리코피톤 (*Trichophyton*), 트리코스포론 (*Trichosporon*) 종, 미크로스포룸 (*Microsporum*), 뉴모시스티스 지로베시 (*Pneumocystis jiroveci*), 에피더모피톤 (*Epidermophyton*), 쿠르불라리아 (*Curvularia*), 사카로미세스 (*Saccharomyces*), 스포로트릭스 (*Sporothrix*), 미크로스포리디아 (*Microsporidia*), 아데노바이러스, 알파바이러스, 아르보바이러스, 아스트로바이러스, 보카바이러스, 분야비리다에, 치쿤구니야 바이러스, 코로나바이러스, 콕사키바이러스, 시토메갈로바이러스, 뎅기, 에코바이러스, 에볼라, 엔테로바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, 플라비비리다에, 구제역 바이러스, 한타바이러스, A형 간염, B형 간염, C형 간염, E형 간염, 단순 포진 바이러스, 인간 시토메갈로바이러스, 인간 헤르페스바이러스 6, 인간 헤르페스바이러스 7, 인간 헤르페스바이러스 8, 인간 면역결핍 바이러스, 인간 유두종바이러스, 인간 폴리오마바이러스, 인간 T-세포 림프구친화성 바이러스, 인플루엔자, 라사 바이러스, 마르부르크 바이러스, 홍역 바이러스, 메타뉴모바이러스, 몰루시폭스바이러스, 모르빌리바이러스, 볼거리, 니파 바이러스, 노로바이러스, 파라인플루엔자, 파레코바이러스, 파르보바이러스 B19, 폴리오바이러스, 폴리오마바이러스, 폭스바이러스, 광견병 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 리노바이러스, 로타바이러스, 풍진 바이러스, 루비바이러스, 사포바이러스, 토가비리다에, 진드기-매개 뇌염 바이러스, 우수투 바이러스, 우두 바이러스, 수두 대상포진 바이러스, 천연두 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 황열 바이러스, 및 지카 바이러스로부터 선택되는 병원성 미생물을 확인하는 데 사용된다.

[0114] 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법 및 올리고뉴클레오티드는 병원성 미생물 감염의 적절한 치료를 선택하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 임상적 샘플은 병원성 미생물 감염을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, 감염은 박테리아혈증이다. 일부 실시양태에서, 적절한 치료는 항생제로의 치료이다. 항생제의 비-제한적 예로는 반코마이신, 박테리아, 메티실린, 세프토비프롤, 세프타롤린, 달바칸신, 답토마이신, 푸시드산, 리네졸리드, 뮤피로신, 오리타반신, 테드졸리드, 텔라반신, 테트라시클린, 아목시실린, 페니실린, 독시시클린, 세팔렉신, 시프로플록사신, 클린다마이신, 메트로니다졸, 아지트로마이신, 술파메톡사졸/트리메토프림, 및 레보플록사신을 들 수 있다. 일부 실시양태에서, 감염은 바이러스 감염이다. 일부 실시양태에서, 적절한 치료는 항바이러스제이다. 항바이러스제의 비-제한적 예로는 아바카비르, 아시클로비르, 발라비르, 시도포비르, 다루나비르, 엔테카비르, 팜시클로비르, 간시클로비르, 오스텔라미비르, 펜시클로비르, 및 잘시타빈을 들 수 있다. 일부 실시양태에서, 감염은 진균 감염이다. 일부 실시양태에서, 적절한 치료는 항진균제이다. 항진균제의 비-제한적 예로는 암포테리신 B, 칸디시딘, 필리핀, 하마이신, 나타마이신, 니스타틴, 리모시딘, 비포나졸, 부토코나졸, 클로트리마졸, 에코나졸, 펜티코나졸, 이소코나졸, 및 아니둘라푼긴을 들 수 있다.

[0115] 실시예

[0116] 하기 실시예는 본 발명의 특정 실시양태를 입증한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 예시적 목적을 위한 것이며, 본 발명의 상태 및 범주에 대해 전적으로 확정적인 것으로 의도되지도 않고, 그러한 것으로 해석되어서도 안 된

다. 실시예는 달리 상세히 기재되는 경우를 제외하고는, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되거 통상적인 표준 기법을 사용하여 수행되었다.

[0117] 실시예 1

[0118] 자객 차단제 DNA 올리고뉴클레오티드 서열의 설계.

[0119] 포유동물 DNA 서열을 포함하는 DNA 분자의 제1 집단의 증폭을 억제하기 위해, 자객 차단제 올리고뉴클레오티드를 미생물 DNA 집단에서보다 포유동물 DNA 집단에서 보다 빈번하게 발생한 DNA 서열에 상보적이도록 설계하였다. 선택된 포유동물 서열은 제1 집단에 고유하며, 증폭되는 DNA의 제2 집단과 최소 중첩을 갖는다.

[0120] 인간 미토콘드리아 게놈은 작으며 (약 16.6 kb), 둘 다 인간 핵 게놈 및 박테리아 게놈으로부터 고유한 플러스 가닥 및 마이너스 가닥 상에 분포된 서열을 포함한다. 자객 차단제 올리고뉴클레오티드의 서열을 박테리아, 진균, 및 바이러스 게놈에 비해 미토콘드리아 게놈에서 킬로베이스 (kb) 당 보다 높은 빈도를 가진 서열에 상보적이도록 설계하였다. 박테리아, 진균, 및 바이러스 게놈의 비-제한적 예로는 *아크로모박터 종, 아시네토박터 칼코아세티쿠스/바우만니이 콤플렉스, 아시네토박터 헤몰리티쿠스, 아시네토박터 주니이, 아시네토박터 라디오레시스텐스, 아시네토박터 우르신기이, 아시네토박터 루피이, 악티노미세스 이스라엘리이, 악티노미세스 마이에리, 악티노미세스 나에슬룬디이, 악티노미세스 네우이이, 악티노미세스 오돈톨리티쿠스, 악티노미세스 피오게네스, 악티노미세스 비스코수스, 아에로코쿠스 우리나에, 아에로코쿠스 비리단스, 아에로모나스 종, 알칼리게네스 파에칼리스, 알칼리게네스 크실로속시단스, 알파 용혈성 스트렙토코쿠스, 아르카노박테리움 하에몰리티쿰, 아스페르길루스 종, 바실루스 종, 박테리오데스 프라길리스, 바르토넬라 퀸타나, 블라스토시스티스 호미니스, 보르데텔라 종, 보렐리아 종, 브레분디모나스 디미누타, 브레분디모나스 베시쿨라리스 브루셀라 종, 부르크홀데리아 종, 부르크홀데리아 세파시아, 부르크홀데리아 세파시아 콤플렉스, 부르크홀데리아 글라디올리, 부르크홀데리아 물티보란스, 부르크홀데리아 슈도말레이, 부르크홀데리아 비에트나미엔시스, 캄필로박터 종, 세데세아 다비사에, 클라미디아 뉴모니아에, 클라미디아 프시타시, 클라미디아 트라코마티스 , 크리세오박테리움 인돌로게네스, 시트로박터 종, 시트로박터 아말로나티쿠스, 시트로박터 파르머, 시트로박터 프레운디이 콤플렉스, 시트로박터 코세리, 시트로박터 세드라키이, 클로스트리디움 보툴리눔, 클로스트리디움 디피실레, 클로스트리디움 페르프린겐스, 클로스트리디움 테타니, 코아귤라제 음성 스타필로코쿠스, 코리네박테리움 디프테리아에, 코리네박테리움 슈도투베르쿨로시스, 코리네박테리움 울세란스, 콕시엘라 종, 크로노박터 사카자키이, 델프티아 아시도보란스, 데르마박터 호미니스, 에드워드시엘라 타르다, 에를리키아 종, 에이케넬라 코로덴스, 엔테로박터 종, 엔테로박터 아에로게네스, 엔테로박터 칸세로게누스, 엔테로박터 클로아카에 콤플렉스, 엔테로비우스 베르미쿨라리스, 엔테로코쿠스 종, 엔테로코쿠스 아비움, 엔테로코쿠스 카셀리플라부스, 엔테로코쿠스 두란스, 엔테로코쿠스 파에칼리스, 엔테로코쿠스 파에시움, 엔테로코쿠스 갈리나룸, 엔테로코쿠스 히라에, 엔테로코쿠스 라피노수스, 에스케리키아 콜라이, 프란시셀라 종, 푸사리움 종, 게멜라 종, 그라눌리카텔라 아디아센스, 군 A 스트렙토코쿠스, 군 B 살모넬라, 군 B 스트렙토코쿠스, 군 C1 살모넬라, 군 C2 살모넬라, 군 C 스트렙토코쿠스, 군 D 살모넬라, 군 G 살모넬라, 군 G 스트렙토코쿠스, 헤모필루스 인플루엔자, 헤모필루스 파라인플루엔자에, 하프니아 알베이, 헬리코박터 종, 킨겔라 킨가에, 클레브시엘라 종, 클레브시엘라 그라눌로마티스, 클레브시엘라 옥시토카, 클레브시엘라 뉴모니아에, 클루이베라 종, 코쿠리아 크리스티나에, 락토바실루스 종, 레클레르시아 아데카르복실라타, 레지오넬라 뉴모필라, 리슈마니아 종, 렙토스피라 종, 류코노스톡 슈도메센테로이데스, 리스테리아 모노시토게네스, 미크로코쿠스 루테우스, 모락셀라 카타랄리스, 모르가넬라 모르가니이, 미코박테리움 압세수스, 미코박테리움 키마에라, 미코박테리움 포르투이튬, 미코박테리움 레프라에, 미코박테리움 투베르쿨로시스, 미코플라스마 게니탈리움, 미코플라스마 뉴모니아에, 네이세리아 메닌기티디스, 네이세리아 고노레아에, 노카르디아 종, 오크로박트룸 안트로피크, 오리엔티아 츠츠가무시, 판도라에아 종, 판토에아 종, 판토에아 아글로메란스, 파라코쿠스 이에에이, 파스테우렐라 카니스, 파스테우렐라 물토시다, 페디오코쿠스, 펩토스트렙토코쿠스, 플레시오모나스 시겔로이데스, 프레보텔라 종, 프로피오니박테리움 종, 프로피오니박테리움 아크네스, 프로테우스 종, 프로테우스 미라빌리스, 프로테우스 펜네리, 프로테우스 불가리스, 프로비덴시아 레트게리, 프로비덴시아 스투아르티이, 슈도모나스 종, 슈도모나스 아에루기노사, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 푸티다, 슈도모나스 스투체리, 라넬라 아쿠아틸리스, 랄스토니아 종, 라오울텔라 종, 라오울텔라 오르니티놀리티카, 라오울텔라 플란티콜라, 리케치아 프로와제키이, 리케치아 티피, 로세오모나스 길라르디이, 로티아 무실라기노사, 살모넬라 종, 세도스포리움 종, 세라티아 종, 세라티아 폰티콜라, 세라티아 리쿼파시엔스, 세라티아 마르세센스, 시겔라 플렉스네리, 시겔라 손네이, 스핑고박테리움 종, 스타필로코쿠스 아우레우스, 스타필로코쿠스 아우리쿨라리스, 스타필로코쿠스 카피티스, 스타필로코쿠스 카프라에, 스타필로코쿠스 코니이, 스타필로코쿠스 에피더미디스, 스타필로코쿠스 헤몰리티쿠스, 스타필로코쿠스 호미니스, 스타필로코쿠스 인테르메디우*

스, 스타필로코쿠스 루그두넨시스, 스타필로코쿠스 파스테우리, 스타필로코쿠스 사카롤리티쿠스, 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스, 스타필로코쿠스 슐라이페리, 스타필로코쿠스 시뮬란스, 스타필로코쿠스 와르네리, 스테노트로포모나스 말토필리아, 스트렙토코쿠스 종, 스트렙토코쿠스 아갈락티아에, 스트렙토코쿠스 안지노수스, 스트렙토코쿠스 카니스, 스트렙토코쿠스 콘스텔라투스, 스트렙토코쿠스 디스갈락티아에, 스트렙토코쿠스 인테르메디우스, 스트렙토코쿠스 파라산구이니스, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에, 스트렙토코쿠스 슈도뉴모니아에, 스트렙토코쿠스 피오게네스, 스트렙토코쿠스 살리바리우스, 스트렙토코쿠스 산구이니스, 스트렙토코쿠스 베스티불라리스, 트레포네마 종, 트리코피톤 종, 트리코스포론 아사히이, 트루에페렐라 베르나르디아에, 츠카무렐라 티로시노솔벤스, 우레아플라스마 종, 비브리오 콜레라에, 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 웨이셀라 콘푸세, 예르시니아 엔테로콜리티카, 예르시니아 페스티스, 예르시니아 슈도투베르쿨로시스, 요케넬라 레겐스부르게이, 아스페르길루스 푸미가투스, 칸디다 알비칸스, 칸디다 아우리스, 칸디다 두블리엔시스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 루시타니아에, 칸디다 파라프실로시스, 칸디다 트로피칼리스, 크립토코쿠스 네오포르만스, 뉴모시스티스, 페니실륨, 푸사리움, 미크로스포룸 종, 무코르미코시스, 히스토플라스마, 블라스토미세스, 콕시디오이데스, 트리코피톤, 트리코스포론 종, 미크로스포룸, 뉴모시스티스 지로베시, 에피더모피톤, 쿠르불라리아, 사카로미세스, 스포로트릭스, 미크로스포리디아, 아데노바이러스, 알파바이러스, 아르보바이러스, 아스트로바이러스, 보카바이러스, 분야비리다에, 치쿤구니야 바이러스, 코로나바이러스, 콕사키바이러스, 시토메갈로바이러스, 뎅기, 에코바이러스, 에볼라, 엔테로바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, 플라비비리다에, 구제역 바이러스, 한타바이러스, A형 간염, B형 간염, C형 간염, E형 간염, 단순 포진 바이러스, 인간 시토메갈로바이러스, 인간 헤르페스바이러스 6, 인간 헤르페스바이러스 7, 인간 헤르페스바이러스 8, 인간 면역결핍 바이러스, 인간 유두종바이러스, 인간 폴리오마바이러스, 인간 T-세포 림프구친화성 바이러스, 인플루엔자, 라사 바이러스, 마르부르크 바이러스, 홍역 바이러스, 메타뉴모바이러스, 몰루시폭스바이러스, 모르빌리바이러스, 볼거리, 니파 바이러스, 노로바이러스, 파라인플루엔자, 파레코바이러스, 파르보바이러스 B19, 폴리오바이러스, 폴리오마바이러스, 폭스바이러스, 광견병 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 리노바이러스, 로타바이러스, 풍진 바이러스, 루비바이러스, 사포바이러스, 토가비리다에, 진드기-매개 뇌염 바이러스, 우수투바이러스, 우두 바이러스, 수두 대상포진 바이러스, 천연두 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 황열 바이러스, 및 지카 바이러스를 들 수 있다. 서열은 미토콘드리아 게놈의 플러스 및 마이너스 가닥 둘 다로부터 1 내지 2 킬로베이스마다 선택되었다. 다수의 자객 차단제 올리고뉴클레오티드는 또한 인간 미토콘드리아 DNA 증폭을 차단하는 유효성을 최대화하기 위해 미토콘드리아 게놈에 걸쳐 대략 동등하게 분포된 서열에 상보적이도록 이용될 수 있다. 자객 차단제 올리고뉴클레오티드 서열은 또한 가교를 용이하게 하기 위해 3' 말단에서 TATA 또는 ATAT에서 종결된다 (하기 실시예 2 참조).

[0121] *인간 미토콘드리아 서열 상대 발생의 계산*

[0122] 증폭으로부터 차단되는 인간 미토콘드리아 DNA 서열에의 결합에 대한 주어진 올리고뉴클레오티드의 선호도는 미생물 게놈 (제2 집단)에 비한 미토콘드리아 게놈 (제1 집단)에서의 상보적 서열의 상대 발생의 관점에서 정량화될 수 있다. 이 계산에서, TATA 또는 ATAT에서 종결되는 23개의 뉴클레오티드 염기 (23mer)를 포함하는 인간 미토콘드리아 게놈에서의 모든 가능한 올리고뉴클레오티드가 분석된다. 23mer의 3' 말단에서의 마지막 8개의 뉴클레오티드 (8mer)는 분석에 사용된다. 23개의 뉴클레오티드 서열은 미생물 DNA 게놈에 비해 포유동물 미토콘드리아 DNA 게놈에 고유하다. 8개의 뉴클레오티드 서열은 포유동물 미토콘드리아 DNA 게놈에 대하여 미생물 DNA 게놈에서 덜 빈번하다. 주어진 차단 올리고뉴클레오티드에 대한 인간 미토콘드리아 서열 선호도 또는 상대 발생은 하기 식을 사용하여 계산된다:

[0123] 상대 발생 = [(인간 미토콘드리아 게놈에서 8mer가 나타난 횟수)/(인간 미토콘드리아 게놈의 길이)]/[(참조 박테리아 게놈에서 8mer가 나타난 횟수)/(참조 박테리아 게놈의 길이)]

[0124] 이 실시예에서, 특이적 게놈은 인간 미토콘드리아 DNA (제1 집단)이었다. 상대 발생을 최고 내지 최저 값으로 분류하고, 2 초과의 인간 미토콘드리아 상대 발생 값을 갖는 고유한 올리고뉴클레오티드 서열을 선택하였다. 인간 미토콘드리아 게놈에서 2 킬로베이스마다 분포된 서열에 상보적인 올리고뉴클레오티드 서열의 세트를 추가의 연구에 이용하였다. 예시적인 자객 차단제 올리고뉴클레오티드 서열을 **표 1**에 열거한다.

23mer 서열 (3'→5')	SEQ ID NO:	미토콘드리아 위치	8mer 평균 미토콘드리아 상대 발생	8mer 중위 미토콘드리아 상대 발생
TATAGGCGATAGAAATTGAAACC	1	1743	11.6	10.1
TATACCCTTCCCGTACTAATTAA	2	4452	7.24	6.4
TATACTAATAATCCTTATAGAAAT	3	5495	25.18	8.0
TATACTACTAACAGACCGCAACC	4	6524	31.5	16
TATACTACGGTCAATGCTCTGAA	5	8157	31.5	16
TATACTAGCATTTACCATCTCAC	6	10493	40.3	9.1
TATAGCACTCGAATAATTCTTCT	7	13600	10.4	8.4
TATACCCTAGCCAACCCCTTAAA	8	15512	7.24	6.4
23mer 서열 (5'→3')		미토콘드리아 위치	**8mer 평균** 미토콘드리아 상대 발생	**8mer 중위** 미토콘드리아 상대 발생
CACCACCTCTTGCTCAGCCTATA	9	1236	13.9	12.8
ATAGAAGAACTAATGTTAGTATA	10	2286	25.2	8.0
CTAATAATCGGTGCCCCCGATAT	11	6156	7.0	4.0
CACACATTCGAAGAACCCGTATA	12	7410	10.5	10.1
ATAGGGCCCGTATTTACCCTATA	13	8426	28.1	25.1
TCACTTCTAGGAATACTAGTATA	14	10512	40.3	9.1
TACCTCCCTGACAAGCGCCTATA	15	13581	11.6	10.1
AATGGGCCTGTCCTTGTAGTATA	16	15879	31.5	16.0

[0125]

[0126] >서열식별번호: 17 (서열식별번호: 1의 역 상보체)

[0127] GGTTTCAATTTCTATCGCCTATA

[0128] >서열식별번호: 18 (서열식별번호: 2의 역 상보체)

[0129] TTAATTAGTACGGGAAGGGTATA

[0130] >서열식별번호: 19 (서열식별번호: 3의 역 상보체)

[0131] ATTTCTATAAGGATTATTAGTATA

[0132] >서열식별번호: 20 (서열식별번호: 4의 역 상보체)

[0133] GGTTGCGGTCTGTTAGTAGTATA

[0134] >서열식별번호: 21 (서열식별번호: 5의 역 상보체)

[0135] TTCAGAGCATTGACCGTAGTATA

[0136] >서열식별번호: 22 (서열식별번호: 6의 역 상보체)

[0137] GTGAGATGGTAAATGCTAGTATA

[0138] >서열식별번호: 23 (서열식별번호: 7의 역 상보체)

[0139] AGAAGAATTATTCGAGTGCTATA

[0140] >서열식별번호: 24 (서열식별번호: 8의 역 상보체)

[0141] TTTAAGGGGTTGGCTAGGGTATA

[0142] >서열식별번호: 25 (서열식별번호: 9의 역 상보체)

[0143] CACCACCTCTTGCTCAGCCTATA

[0144] >서열식별번호: 26 (서열식별번호: 10의 역 상보체)

[0145] TATACTAACATTAGTTCTTCTAT

[0146] >서열식별번호: 27 (서열식별번호: 11의 역 상보체)

[0147] ATATCGGGGGCACCGATTATTAG

[0148] >서열식별번호: 28 (서열식별번호: 12의 역 상보체)

[0149] TATACGGGTTCTTCGAATGTGTG

[0150] >서열식별번호: 29 (서열식별번호: 13의 역 상보체)

[0151] TATAGGGTAAATACGGGCCCTAT

[0152] >서열식별번호: 30 (서열식별번호: 14의 역 상보체)

[0153] TATACTAGTATTCCTAGAAGTGA

[0154] >서열식별번호: 31 (서열식별번호: 15의 역 상보체)

[0155] TATAGGCGCTTGTCAGGGAGGTA

[0156] >서열식별번호: 32 (서열식별번호: 16의 역 상보체)

[0157] TATACTACAAGGACAGGCCCATT

[0158] 실시예 2

[0159] 상보적 서열에의 자객 차단제의 가교

[0160] DNA의 제1 집단의 증폭은 실시예 1에서 설계된 자객 차단제 올리고뉴클레오티드를 인간 미토콘드리아 DNA의 제1 집단에서의 그의 상보적 서열에 가교시킴으로써 차단될 수 있다. 이 가교는 가닥-대체 폴리머라제, 예컨대 phi29에 의한 서열의 전체 게놈 증폭을 차단한다 (**도 2**).

[0161] 변형된 3' 아미노 기를 갖는 동결건조된 자객 차단제 올리고뉴클레오티드를 실시예 1에서와 같이 설계하고, 구입하였다 (인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지즈, 미국 아이오와주 코랄빌). 동결건조된 올리고뉴클레오티드를 포스페이트 완충 염수 (1X PBS)에 재현탁시키고, NHS-SPB (숙신이미딜-[4-(소랄렌-8-일옥시)]-부티레이트, "소랄렌") 분자 (써모피셔 (ThermoFisher), 미국 매사추세츠주 월섬)와 접합시켰다. 접합 반응을 트리스 (Tris)-HCl로 켄칭하고, 과량의 소랄렌을 탈염 컬럼 (써모피셔, 미국 매사추세츠주 월섬)으로 제거하였다. 접합된 소랄렌 기를 UVA 처리를 통해 활성화시켜 자객 차단제 올리고뉴클레오티드 및 상보적 인간 미토콘드리아 DNA 서열 사이에 가닥간 가교를 생성하였다.

[0162] 실시예 3

[0163] 표적 DNA에의 자객 차단제의 서열-특이적 공유 가교의 입증

[0164] 표적 DNA에의 자객 차단제 올리고뉴클레오티드의 서열-특이적 공유 가교를 입증하기 위해, 3' 말단에 접합된 소랄렌을 갖는 다양한 자객 차단제 올리고뉴클레오티드, 표적 올리고뉴클레오티드, 및 오프-표적 올리고뉴클레오티드의 반응 혼합물을 0.5 μM에서의 40 mM 트리스 HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 및 10 mM $MgCl_2$로 이루어진 어닐링 완충제에 첨가하였다. 반응 혼합물을 94℃로 5분 동안 가열하고, 16℃로 15분에 걸쳐 냉각시켰다. 그 후, 반응 혼합물을 350 nm 자외 (UV) 광으로 20분 동안 처리하였다. 반응 혼합물 생성물을 1X TBE 완충제 중 10% 트리스-보레이트-EDTA (TBE)-우레아 겔 상에서 분리하였다. 겔을 SYBR-골드 (써모피셔, 미국 매사추세츠주 월섬)로 염색하고, E-겔 이미저 (E-gel Imager) (써모피셔, 미국 매사추세츠주 월섬) 상에서 가시화하였다. (**도 3**).

[0165] 인간 미토콘드리아 DNA의 감소를 *이. 콜라이*로부터 유래된 미생물 DNA와 함께 인간 핵 및 미토콘드리아 DNA를 포함하는 혼합된 샘플로부터 입증하였다 (**도 5**). 혼합된 샘플에서의 세포를 REPLI-g 싱글 셀 (REPLI-g Single Cell) 키트 (퀴아젠 (Qiagen), 독일 힐덴)에 의해 기재된 바와 같이 알칼리성 용해 완충제로 용해시킨 후, 65℃로 가열하였다. 1 μL의 자객 차단제 올리고뉴클레오티드를 인간 미토콘드리아 DNA를 표적화하는 1 μM 농도 (자객 차단제 +)에서 첨가하거나, TBE 완충제 (자객 차단제 -)를 용해된 샘플에 첨가하고, 350 nm UV 광으로 20분 동안 처리하였다. 샘플을 REPLI-g 싱글 셀 키트 (퀴아젠, 독일 힐덴)에 의해 기재된 바와 같이 증폭시키고,

민이온 (MinION) 시퀀싱 (옥스포드 나노포어 테크놀로지즈 (Oxford Nanopore Technologies), 영국 옥스포드)에 의해 시퀀싱하였다. 자객 차단제 + 및 자객 차단제 - 샘플 둘 다로부터의 리드를 인간 미토콘드리아 DNA에 대해 지도화하였으며, 인간 미토콘드리아 리드의 깊이를 그래프적으로 제시한다.

[0166] **도 5**에 나타난 바와 같이, 자객 차단제 올리고뉴클레오티드로의 처리는 인간 핵, 인간 미토콘드리아, 및 *이. 콜라이* 핵산을 포함하는 혼합된 샘플로부터의 전체 인간 미토콘드리아 게놈에 걸쳐 시퀀싱 리드의 유의한 감소를 초래한다.

[0167] 실시예 4

[0168] 자객 차단제 올리고뉴클레오티드는 인간 미토콘드리아 DNA 증폭을 감소시킨다

[0169] 자객 차단제 올리고뉴클레오티드의 사용을 통한 인간 핵산 집단 및 박테리아 핵산 집단을 포함하는 혼합된 샘플에서의 인간 미토콘드리아 DNA 증폭의 감소를 조사하였다. 인간 대상체로부터의 임상적 혈액 샘플 (n=4)을 박테리아 (예를 들어, *에스케리키아 콜라이, 스타필로코쿠스 아우레우스*, 또는 *클레브시엘라 뉴모니아에*)로 100 콜로니 형성 단위/밀리리터 (100 CFU/mL) 또는 10 CFU/mL 중 어느 하나로 스파이킹하였다. UV 광에 의해 활성화되는 경우 자객 차단 올리고뉴클레오티드의 사용은 UV 광으로 가교되지 않은 대조군 샘플에 비한 총 리드의 백분율로서 시퀀싱된 인간 미토콘드리아 DNA의 90% 초과의 감소를 초래하였다 (**도 4**). 자객 차단제 올리고뉴클레오티드가 상보적 인간 미토콘드리아 서열에 가교된 경우 인간 미토콘드리아 DNA 증폭의 퍼센트 감소는 자객 차단제 올리고뉴클레오티드가 가교되지 않은 대조군 샘플에 비해 90% 초과였다.

[0170] 실시예 5

[0171] 날개형 차단제 DNA 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법

[0172] 그의 증폭이 바람직하지 않은 종의 전체 게놈을 차단하는 날개형 차단제 올리고뉴클레오티드를 생성하기 위해, 여기에 예시된 하기 단계를 사용하였다 (**도 6**):

[0173] 1.) 농축된 숙주 (예를 들어, 포유동물 미토콘드리아) 게놈 DNA (gDNA)를 상이한 4-mer 커팅 활성을 갖는 2가지 제한 효소 (예를 들어, MspI 및 MseI)를 사용하여 소화시킨다.

[0174] 2.) 100 bp 미만의 소화된 gDNA 단편을 제거한다.

[0175] 3.) 제한 효소에 의해 생성된 블런트 오버행을 보완하도록 설계된 날개형 차단제 올리고뉴클레오티드를 소화된 gDNA 단편에 리가제를 사용하여 라이게이션한다.

[0176] 4.) 프라이머-라이게이션된 숙주 gDNA를 전방향 프라이머의 5' 말단이 인산화되고, 역방향 프라이머의 5' 말단이 비오티닐화된 (또는 람다 엑소뉴클레아제 소화를 방지하기 위한 또다른 벌크 변형을 함유하는) 주문 설계된 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시킨다.

[0177] 5.) 프라이머-적응된 숙주 DNA를 소화시켜 5' 인산화된 가닥을 람다 엑소뉴클레아제를 사용하여 분해한다.

[0178] 이는 5' 및 3' 말단 둘 다 상에 20 내지 50 염기 쌍 "날개" (숙주 gDNA에 비-상보적인 영역)에 의해 플랭킹된 숙주 gDNA의 부분을 함유하는 단일-가닥 차단제의 라이브러리를 초래한다. 이들 차단제는 전체 숙주 게놈에 걸친다.

[0179] 숙주 게놈을 페놀:클로로포름:이소아밀 알콜 침전을 이용하여 숙주 세포로부터 정제하였지만, 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법이 이용될 수 있다. 이상적으로, DNA를 고분자량 염색체 단편을 보유하고, 5,000 염기 쌍 미만의 DNA 단편을 생성하는 과량의 전단을 회피하는 방식으로 추출한다. 다음으로, DNA를 MspI (R0106S, 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치) 및 MseI (R0525L, 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치)로의 이중 제한 효소 소화를 사용하여 소화시킨다. 예를 들어, 0.5 μg의 게놈 DNA를 5 μL의 10X 최적화된 완충제 및 38.5 μL의 DNA-무함유 및 뉴클레아제 무함유 물과 혼합한다. 이 혼합물에, 0.5 μL의 MspI 및 1 μL의 MseI 제한 효소를 첨가하고, 피펫팅하여 혼합한다. 37℃에서 5 내지 15분 동안 인큐베이션한 후, 제한 효소 및 길이로 20 염기 쌍 미만의 생성된 단편을 소화된 게놈 DNA로부터 크기 배제 스핀 컬럼을 사용하여 제거한다. 필터-기재 컬럼은, 이들이 소화된 DNA 생성물의 유의한 소실을 초래하기 때문에, 사용되지 않아야 한다.

[0180] 개별적으로, GC-말단 어댑터 및 AT-말단 어댑터를 동등한 부피의 짧은 및 긴 프라이머를 함께 100 μM 농도로 혼합하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션함으로써 제조한다. 0.02 pmol에서의 소화된 DNA 1 μL를 0.5 pmol에

서의 GC-말단 어댑터 1 μL, 0.5 pmol에서의 AT-말단 어댑터 1 μL, 물 2 μL, 및 5개의 2x 인스탄트 점착성-말단 리가제 마스터 믹스 (Instant Sticky-end Ligase Master Mix) (M0370, 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치) 5 μL와 혼합한다. 피펫팅에 의해 10배 혼합한 후, 말단-적응된 단편화된 게놈 DNA를 얼음 상에 정치하고, 크기 배제 스핀 컬럼으로 다시 세정한다. 이중-날개형 생성물이 바람직한 경우, 세정된 생성물을 66℃의 어닐링 온도를 갖는 30 내지 35 사이클 동안 P1 및 P2 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시키고, 비-혼입된 프라이머를 크기 배제 스핀 컬럼으로 제거한다. 단일-날개형 생성물이 바람직한 경우, 세정된 생성물을 효소적으로-절단된 단편 내에 놓인 것으로 컴퓨터적으로 측정된, 바람직하게는 PCR 생성물의 길이를 최대화하도록 설계된 특이적 서열에 결합하는 특수하게 설계된 프라이머와 조합으로 P1 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시킨다.

[0181] **예시적인 어댑터 서열:**

[0182] 긴어댑터_GC: /5Phos/CGCTTAGCGACGTTCTGTCCCTCTGACCACATACG

[0183] 짧은어댑터_GC: CGTCGCTAAG

[0184] 긴어댑터_AT: AAGCACCATCTAGGTGTAGCCTGATGCCAGAT

[0185] 짧은어댑터_AT : /5Phos/TAATCTGGCATCA

[0186] 그들의 h-형상 이외에, 이들 어댑터 서열에 관한 특수한 것은 없음을 주목하는 것이 중요하다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 여기에 기재된 것들과 유사한 임의의 h-형상 어댑터 서열이 본 발명의 방법에 따라 사용될 수 있음을 인식할 것이다.

[0187] **예시적인 증폭 프라이머 서열:**

[0188] P1: 5' - CGTATGTGGTCAGAGGGACAGAA - 3'

[0189] P2: 5' - AAGCACCATCTAGGTGTAGCCT - 3'

[0190] **대안적인 예시적인 프라이머 서열로는**

[0191] 긴 어댑터 GC: 5' - CGTCTCGCCTTCGGACTGTTAGCACGGCCAGA - 3'

[0192] 짧은 어댑터 GC: 5' - GAAGGCGAGA - 3'

[0193] 짧은 어댑터 AT: 5' - TAGCATACGTGC - 3'

[0194] 긴 어댑터 AT: 5' - GGTGCAGAGAACGAGACCTGGGCACGTATGC - 3'rev

[0195] P1: 5' - 5 TCTGGCCGTGCTAACAGTCC - 3'

[0196] P2: 5' - GGTGCAGAGAACGAGACCTGG - 3'

[0197] 를 들 수 있다.

[0198] 생성된 이중-가닥 PCR 생성물은 그 후 단일 가닥 생성물로 전환되어야 한다. 단일-가닥 생성물은 상보적인 과다-제시된 DNA 가닥에 결합하는 차단제이다. 이중-가닥의 단일-가닥 DNA로의 전환은 바람직한 가닥을 선택적으로 증폭시키기 위한 비대칭 PCR, 바람직하지 않은 가닥의 람다 엑소뉴클레아제 소화, 가닥의 스트렙타비딘 비드 분리, 및 시험관내 전사를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다수의 프로세스를 사용하여 달성될 수 있다 (Murgha *et al.*, PLoS One, 2014). 첫번째 3가지 방법을 여기에 기재한다.

[0199] A) 비대칭 PCR을 사용하는 경우 증폭 프라이머 서열

[0200] 비대칭 PCR은 단일 가닥의 증폭을 선호하는 비동등한 농도이 프라이머를 사용한다. 차단제가 **도 6** 단계 4에 나타내어진 바와 같이 P1 및 P2 프라이머를 사용하여 증폭되는 이 실시예의 단계 4에 기재된 PCR 반응은 P1:P2 프라이머 투입물의 비가 1:10 내지 1:50이도록 변형된다. PCR 사이클의 수는 비-특이적 증폭을 회피하기 위해 15 내지 20 사이클로 감소되어야 한다. 생성된 비대칭 PCR 생성물은 길이로 20 염기 쌍 미만의 단편을 제거하는 동일한 크기 배제 스핀 컬럼을 사용하여 정제된다.

[0201] B) 람다 엑소뉴클레아제 소화를 사용하는 경우 증폭 프라이머 서열

[0202] 대안적 접근법은 바람직하지 않은 DNA 가닥을 우선적으로 분해하는 람다 엑소뉴클레아제 효소를 사용한다. 람다 엑소뉴클레아제는 5'-인산화된 이중 가닥 DNA의 바람직한 기질을 가지며, 5' 내지 3' 방향에서 작용한다. 그의 고도의 진행성은 전체 가닥이 DNA 단편 내에서 분해되는 것을 보장한다. 람다 엑소뉴클레아제 소화에 적

합한 이중-가닥 DNA를 제조하기 위해, P1 증폭 프라이머는 5' 포스페이트 기로 변형되어야 하며, 이는 상업적 제조자, 예컨대 인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지즈, 인크. (미국 아이오와주 코랄빌)로부터 수득될 수 있다. 그 후, 5'-인산화된 P1 증폭 프라이머는 비인산화된 P2 증폭 프라이머와 함께 기재된 PCR 반응에 사용된다. 증폭의 30 내지 35 사이클 및 크기-기재 컬럼 정제 후, 3 μL의 정제된 생성물을 0.5 μL의 람다 엑소뉴클레아제 (M0262, 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치), 1 μL의 10X 엑소뉴클레아제 I 완충제, 및 5.5 μL의 DNA 및 뉴클레아제-무함유 물과 함께 37℃에서 60분 동안 인큐베이션한다. 생성물은 크기-배제 컬럼 (예를 들어 센트리스핀 (CentriSpin) 20, 프린스톤 세퍼레이션즈, 인크. (Princeton Separations, Inc.), 미국 뉴저지주 프리홀드)으로 세정되고, 이로부터 날개형 차단제 프로브로서 사용될 수 있다.

[0203] C) 스트렙타비딘 비드 분리를 사용하는 경우 증폭 프라이머 서열

[0204] 하기 단계는 스트렙타비딘-코팅된 자성 비드 (예를 들어 다이나비즈 (Dynabeads)™ 마이원 (MyOne)™ 스트렙타비딘 C1, 써모피셔, 미국 매사추세츠주 월섬)를 사용하여 바람직한 차단제를 그의 상보적 가닥으로부터 분리한다. 스트렙타비딘 비드 분리에 적합한 이중-가닥 DNA를 제조하기 위해, P1 증폭 프라이머는 5' 비오틴 기로 변형되어야 하며, 이는 상업적 제조자, 예컨대 인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지즈, 인크. (미국 아이오와주 코랄빌)로부터 수득될 수 있다. 그 후, 5'-비오티닐화된 P1 증폭 프라이머는 비비오티닐화된 P2 증폭 프라이머와 함께 **도 6**, 단계 4에 나타내어지고, 실시예 5, 단계 4에 기재된 PCR 반응에 사용되며, 이어서 증폭의 30 내지 35 사이클 및 크기-기재 컬럼 정제된다. 자성 비드를 제조자의 지시서에 따라 세척한 후, PCR 증폭 생성물을 15 내지 30분 동안 세척된 비드와 함께 실온에서 부드러운 교반과 함께 인큐베이션한다. 그 후, 비드-DNA 혼합물을 자석에 2 내지 3분 동안 정치하고, 상청액을 버리고, 비드를 세척 완충제에서 3 내지 4회 세척한다. 그 후, 바람직한 차단제 가닥을 실온에서 2분 동안 40 μL의 0.125 M 수산화나트륨과의 50 μL의 비드-DNA 혼합물의 2회 계열 인큐베이션에 의해 자성 비드에 결합된 상보적 가닥으로부터 변성시킨다 (Murgha *et al.*, PLoS One, 2014). 세척의 상청액 (총 약 80 μL)을 합하고, 12 μL의 1 M HCl 및 8 μL의 1 M 트리스-HCl pH 8로 중화시킨다. 생성물은 크기-배제 컬럼 (예를 들어, 센트리스핀 20, 프린스톤 세퍼레이션즈, 인크., 미국 뉴저지주 프리홀드)으로 세정되고, 이로부터 차단제 프로브로서 사용될 수 있다.

[0205] 실시예 6

[0206] H-어댑터를 사용하여 단일-가닥 날개형 차단제를 제조하는 방법

[0207] 여기에 본 발명자들은 인간 게놈 DNA로부터의 폴리머라제에 의한 연장을 차단하는 날개를 갖는 단일-가닥 차단제를 제조하는 방법을 기재한다. 먼저, 인간 DNA의 확정적 단편을, 인간 세포로부터 추출된 DNA를 오버행을 갖는 상이한 회문식 부위를 소화시키는 2가지 제한 효소로 소화시킴으로써 제조한다. 부위는 본원에서 '부위 A' 및 '부위 B'로 지칭된다. 그 후, 본 발명자들은 'h-어댑터' 및 DNA 리가제와 함께 인큐베이션한다. 각각 부위 A 및 부위 B에 매칭하는 2가지 h-어댑터, A 및 B가 있다. h-어댑터는 각각 예를 들어, 6 내지 30개의 뉴클레오티드를 함유하는 상보적 올리고뉴클레오티드의 쌍을 포함한다. 쌍의 한 가닥은 다른 것보다 더 길다. A h-어댑터는 A 제한 부위에 라이게이션하고, B h-어댑터는 B 어댑터에 라이게이션한다. 그 후, 혼합물을 긴 A 어댑터 가닥에 상보적인 하나의 PCR 프라이머 (프라이머 A), 및 B 어댑터 가닥과 동일한 배향의 하나의 프라이머 (프라이머 B)를 사용하여 증폭시킨다. 단지 각각의 제한 부위 중 하나를 함유하는 단편이 증폭될 수 있다. 증폭 후, 각각의 이중-가닥 앰플리콘은 각각의 경우 5' 말단 상에, 프라이머 A를 함유하는 하나의 가닥 및 프라이머 B를 함유하는 하나의 가닥을 정확하게 갖는다. 이들은 한 가닥 또는 다른 가닥을 우선적으로 헐거나 파괴하여 단일-가닥 DNA를 남기는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 5' 포스페이트 기는 프라이머 A, 및 인산화된 DNA를 파괴하는 효소로 소화된 앰플리콘에 첨가될 수 있다. 이 프로세스를 **도 6**에 개략적으로 나타낸다. 대안적으로, 단지 단일 제한 소화를 수행하는 경우, 이는 그들의 말단 단독에 기초하여 2개의 가닥을 구별불가능하게 만드는 대칭성을 갖는 단편을 생성할 것이다. 유사하게, 이중-소화를 수행하지만, 그 후 전체 이중-가닥 어댑터로 라이게이션하는 경우, 생성된 단편은 구별가능할 것이지만, PCR은 모든 3개의 조합의 증폭을 생성할 것이다 (**도 6** 참조).

[0208] 실시예 7

[0209] 날개형 차단제를 사용하여 과다-제시된 집단의 핵산의 증폭을 방지하는 방법

[0210] 날개형 차단제를 적용하여 과다-제시된 집단의 게놈 핵산의 증폭을 방지하기 위해, DNA 차단제의 경우에 대해 예시된 하기 단계를 사용하였다 (**도 7**):

[0211] 1. 과다-제시된 및 과소-제시된 집단으로부터의 게놈 DNA의 혼합물을 1,000 내지 15,000 염기 쌍의 단편으로 단

편화한다.

[0212] 2. 단편화된 gDNA를 실시예 5에서 제조된 과다-제시된 집단의 DNA 차단제와 함께 5분 동안 내지 밤새 실온 내지 70℃에서 인큐베이션한다.

[0213] 3. 단편화된 gDNA, 랜덤 육량체 프라이머, 및 긴 앰플리콘에 대해 최적화된 고-충실도 폴리머라제 (예를 들어 롱앰프 택 (LongAmp Taq), 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치)를 사용하여 PCR 증폭을 수행한다.

[0214] PCR 반응은 임의의 비-가닥-대체 폴리머라제로 수행될 수 있다. 예를 들어, 25 μL 반응 부피를 갖는 푸션 고 충실도 (Phusion High Fidelity) 폴리머라제 (M0530, 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치)를 사용하는 경우, 마스터 믹스는 5 μL의 5x 푸션 고 충실도 완충제 (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치), 10mM에서의 0.5 μL dNTP, 0.75 μL DMSO, 및 0.25μL 푸션 폴리머라제 (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치)를 함유한다. 6.5 μL의 마스터 믹스 (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치)를 혼합된 게놈 DNA 용액 및 단일 가닥 차단제와 합할 수 있다. 예를 들어, **도 8**은 6.5 μL 마스터 믹스, 1 ng/μL에서의 1 μL의 *이. 콜라이* DNA (대략 200,000개의 *이. 콜라이* 게놈 카피와 등가임), 0.05 ng/μL에서의 1 μL의 M13mp18 RF I 박테리오파지 DNA (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치) (대략 650만개의 게놈 카피와 등가임)를, 박테리아 16S 리보솜 RNA 유전자 서열에 대해 특이적인 전방향 및 역방향 프라이머, 및 M13 박테리오파지 게놈에 대해 특이적인 전방향 및 역방향 프라이머와 함께 또는 없이 합함으로써 생성되었다. 반응 부피를 실시예 5에 의해 제조된 단일-가닥 M13 박테리오파지 차단제로 25 μL가 되게 하였다. 혼합물을 약간 변형된 PCR 증폭 절차를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 제1 변형은 M13 박테리오파지 차단제 농도가 심지어 관심의 유전자 영역의 지수적 증폭 후에도 적당한 차단을 제공하는 데 충분함을 보장하도록 수행된 증폭의 단지 20 사이클이었다. 제2 변형은 연장 온도를 68℃로 감소시켜 폴리머라제의 진행성을 손상시키지 않고 차단제 앰플리콘 혼성화의 열역학적 안정성을 최적화하는 것이었다. PCR 프로그램은 98℃에서 30초 동안 초기 변성, 이어서 98℃에서 10초 동안의 변성, 65℃에서 20초 동안 어닐링, 68℃에서 30초 동안 연장, 및 72℃에서 10분 동안 최종 연장의 20 사이클을 사용하였다. 그 후, 생성물을 1.2% 아가로스 겔 상에 구동시키고, 이미지제이 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

[0215] 실시예 8

[0216] *이. 콜라이* 게놈 DNA의 존재 하에서 M13 파지 DNA를 억제하기 위한 날개형 차단제의 적용

[0217] 개념 증명 실험에서, 본 발명자들은 M13 파지에 대해 본 발명자들의 제조된 차단제를 사용하여 *이. 콜라이* DNA의 존재 하에서 M13 파지 DNA 게놈의 절편의 증폭을 차단하였다 (**도 8**). 이 경우의 차단 프로브는 이들 차단제가 실시예 5에 기재된 이중 날개 대신, 3' 말단 상에 단지 단일 날개를 갖는 것을 제외하고는, 실시예 5에 기재된 프로세스를 사용하여 제조되었다 (또한 **도 6 및 7** 참조). 이 실험은 단일 날개 차단제가 과량의 *이. 콜라이* 게놈 DNA의 존재 하에서 M13 앰플리콘의 증폭을 감소시킬 수 있음을 나타내며, 이는 무손상으로 남겨진 박테리아 16S rRNA 유전자 밴드의 그것에 비해 M13 밴드의 감소된 휘도에 의해 입증된다. *이. 콜라이* 및 M13 파지 DNA는 모든 웰에 함유되었다. 밴드의 각각의 영역에서의 형광 강도를 이미지제이 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

[0218] M13 밴드 및 16S 밴드의 형광 강도 프로파일을 **도 9**에 나타낸다. M13 밴드를 M13 프라이머 플러스 및 마이너스 차단제로 정량화하고; M13 및 16S 프라이머 플러스 및 마이너스 차단제 둘 다를 가진 반응 (차단제가 유니버셜 증폭 프라이머 P1 및 M13-특이적 역방향 프라이머 387R을 사용하여 단일 날개로 제조된 경우)과 비교하였다. 겔에 걸친 평균 배경 형광 강도를 빼서 각각의 밴드에 대한 수정된 평균 강도를 계산하였다. M13 차단제의 존재 하에서의 M13 앰플리콘 증폭의 감소는 42 내지 68%였으며, 아마도 PCR 자원에 대한 경쟁에 기인한 *이. 콜라이* 앰플리콘 증폭의 존재 하에서 더 낮은 효율을 가졌다. M13 차단제의 존재 하에서의 *이. 콜라이* 앰플리콘 증폭의 감소는 13%였으며 (**도 9**), 이는 다시 또한 PCR 자원에 대한 경쟁에 기인할 가능성이 있다.

[0219] 실시예 9

[0220] 혼합된 미생물 DNA 샘플에서 *클라미디아 트라코마티스*에 대해 풍부화하기 위한 *락토바실루스 크리스파투스* (*Lactobacillus crispatus*)에 대한 자객 차단제 또는 날개형 차단제의 설계.

[0221] 여성 생식관 샘플은 종종 *락토바실루스* 종, 가장 빈번히 *락토바실루스 크리스파투스*로 우세하게 구성되며, 생식기 병원체, 예컨대 *클라미디아 트라코마티스*, *네이세리아 고노레아에*, *트리코모나스 바기날리스* (*Trichomonas vaginalis*), HSV-2, 또는 HIV는 일반적으로 천연 질 박테리아 균총보다 훨씬 더 낮은 풍부도로 발견된다. 생식

기 시편, 예컨대 질 스왑으로부터의 병원체의 게놈을 시퀀싱하는 데 관심이 있는 경우, 병원체 확인 및 특징규명 목적을 위해, 병원체의 게놈에 대한 시퀀싱 결과의 민감도는 자객 차단제 또는 날개형 차단제의 사용을 통해 락토바실루스, 예를 들어 *락토바실루스 크리스파투스*의 증폭을 선택적으로 억제함으로써 증가될 수 있다.

[0222] **표 2**는 고유한 23mer이며, 또한 관심의 잠재적 감염성 유기체, *클라미디아 트라코마티스*와 비교할 경우 8mer로서 *락토바실루스 크리스파투스*에서 보다 빈번한 자객 차단제를 열거한다. **표 2**는 *엘. 크리스파투스* (*L. crispatus*) 게놈의 최초 20 kb에 대한 자객 차단제 올리고뉴클레오티드를 열거하지만, 자객 차단제 올리고뉴클레오티드 서열은 또한 2,000,000 염기 쌍 게놈의 나머지에 대해 확인될 것이다. 이들 자객 차단제는 실시예 2 및 3에 상세화된 바와 같이, 생식기 시편, 예컨대 질 스왑으로부터 추출된 DNA에 적용되어, 우세한 유기체, *엘. 크리스파투스*의 증폭을 억제하고, *씨. 트라코마티스* (*C. trachomatis*) 게놈의 보다 깊은 시퀀싱을 허용할 것이다. *엘. 크리스파투스*에 대한 자객 차단제를 사용하여, *씨. 트라코마티스* 내지 *엘. 크리스파투스*의 시퀀싱 리드의 비는 1:1000 내지 1:10 또는 심지어 1:1로 증가됨으로써, 표준 차세대 시퀀싱 방법으로 *씨. 트라코마티스* 게놈의 우수한 커버리지를 가능하게 할 것이다 (예를 들어, 샘플 당 100만개 리드, 및 150 염기 쌍, 쌍형성된-말단 리드).

23mer 서열 (3'→5')	**SEQ ID NO:**	***엘. 크리스파투스* 위치**	**8mer *엘. 크리스파투스* 상대 발생**
TATAATTACTAATAAAGAAAAAT	33	1492	4.28
TATAATTATATAGGTATAAAGCG	34	2864	4.28
TATAATTATATAGGTATAAAGCG	35	4099	4.28
ATATTACTTGGATCACCAAGAAG	36	7282	3.61
ATATTACTGAAAAGAATGGTCCT	37	8451	3.61
ATATTAATGGTAATGATAGAGCA	38	10808	3.35
ATATATTAAATCCTATAATTTGG	39	12146	4.26
TATACTAATGTTCATGCCAAATT	40	15441	2.95
ATATAATACGAATAATATTTACA	41	16962	4.16
TATAATATATCAGTTAAAATAGA	42	18087	4.76
TATAATATATCAGTTAAAATAGA	43	20143	3.61
23mer 서열 (5'→3')		***엘. 크리스파투스* 위치**	**8mer *엘. 크리스파투스* 상대 발생**
CCTACTACTACTAATTAATTATA	44	1471	4.28
GGTTGAAAACTAATATAATTATA	45	2851	4.28
CAAAGTGCGCTACTTAATTATAT	46	4100	3.31
GTTGTTCGCGCCAAAACCAATAT	47	6950	2.37
AAATTAGAAATTGCGAGTAATAT	48	8833	3.61
CAAGATAACACACAATACTTATA	49	11984	6.02
AAAATAATTTAGGCGTAATATAT	50	13514	4.26
AAAGAAGCTACTAAGGGTAATAT	51	15168	3.47
GCGATTAATGATATTAATAATAT	52	16036	3.28
TTCTTTTTGTTTCTATATAATAT	53	18072	4.76
GATGGCAATCGTACCATCAATAT	54	20622	3.17

[0223]

[0224] 날개형 차단제는 또한 *락토바실루스 크리스파투스*에 대해 제조될 수 있다. *락토바실루스 크리스파투스*의 정제된 배양물을 용해시키고, 게놈 DNA를 단리하고, 세정하고, 이 게놈 DNA를 실시예 5에 상세화된 프로세스를 사용하여 *엘. 크리스파투스* 날개형 차단제를 제조하는 데 사용할 것이다. 그 후, *엘. 크리스파투스* 날개형 차단제를 실시예 7에 상세화된 바와 같이 생식기 시편, 예컨대 질 스왑으로부터 추출된 DNA에 적용하여, 우세한 유기

체, *엘. 크리스파투스*의 증폭을 억제하고, *씨. 트라코마티스* 게놈의 보다 깊은 시퀀싱을 허용할 것이다.

[0225] 본 발명의 일부 실시양태를 예시에 의해 설명하였지만, 본 발명은 본 발명의 정신으로부터 벗어나거나 청구항의 범위로부터 초과하지 않고, 많은 변형, 변경 및 적응으로, 및 관련 기술분야의 통상의 기술자의 범위 내인 다수의 등가물 또는 대안적 해법의 사용으로 실시될 수 있음이 명백할 것이다.

[0226] 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 각각의 개별적 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 그 전문이 참조로 포함되는 것으로 지시된 것과 동일한 정도로 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

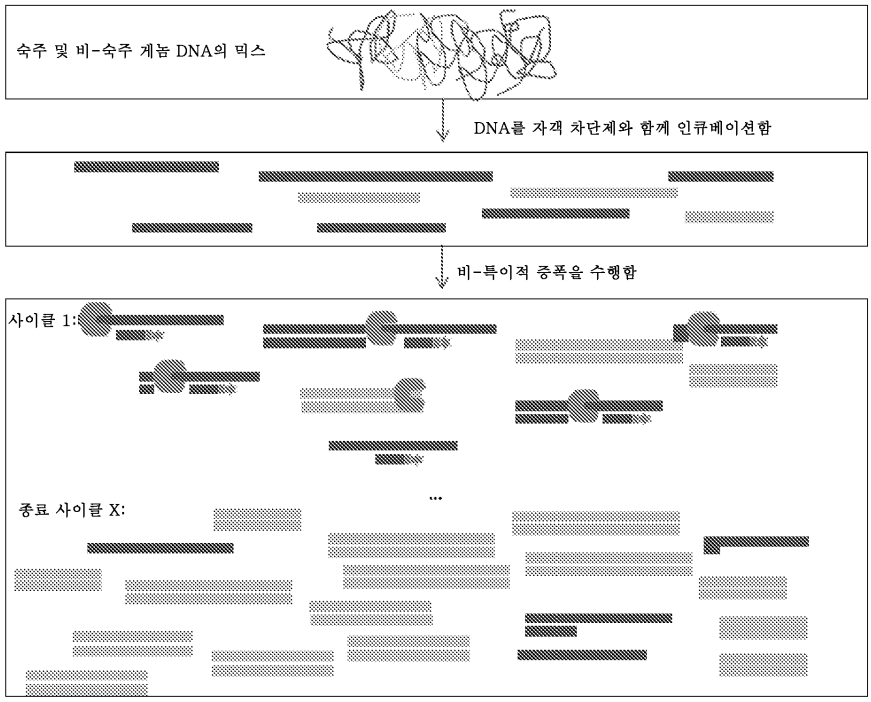
[0227] 참고문헌

1. Martin, G.S., et al., "The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000," *New England Journal of Medicine*, 2003, 348: 1546-1554.
2. Kvist, T., et al., "Specific single-cell isolation and genomic amplification of uncultured microorganisms," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 74(4): 926-935.
3. Huang, L., et al., "Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications," *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, 2015, 16: 79-102.
4. Boardman, A.K., et al., "Rapid Microbial Sample Preparation from Blood Using a Novel Concentration Device," *PLoS One,* 2015, 10(2): e0116837.
5. Kolodney, M.S., et al., "Selective Amplification of Minority Mutations Using Primer Blocking High-Affinity Oligonucleotides," *US 2010/0009355*, 2010.
6. Ecker, D.J., et al., "Targeted Whole Genome Amplification Method for Identification of Pathogens," *US 2010/0035232*, 2010.

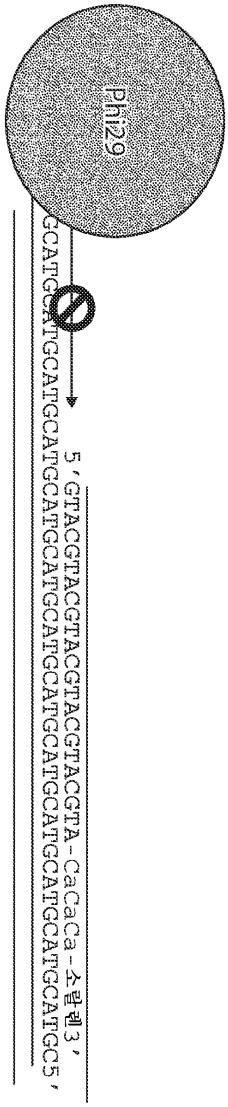
[0228]

도면

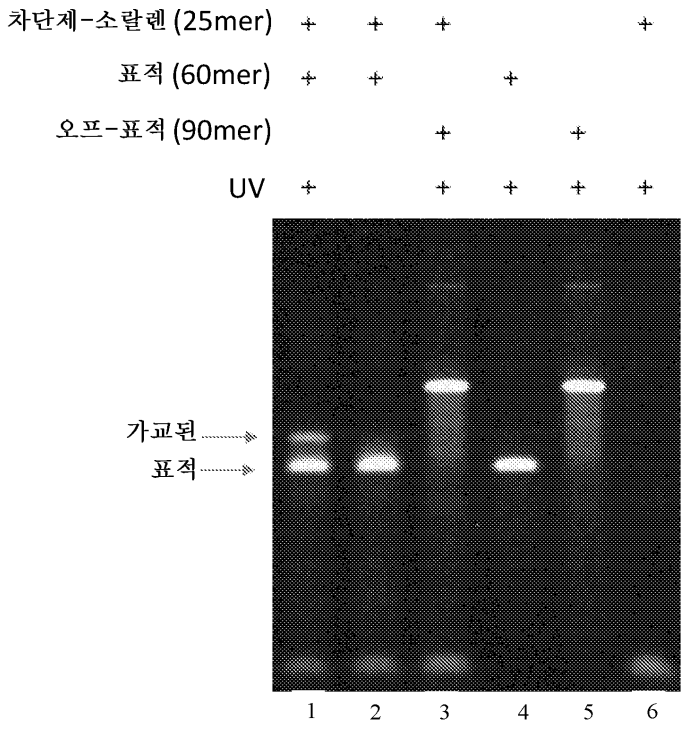
도면1



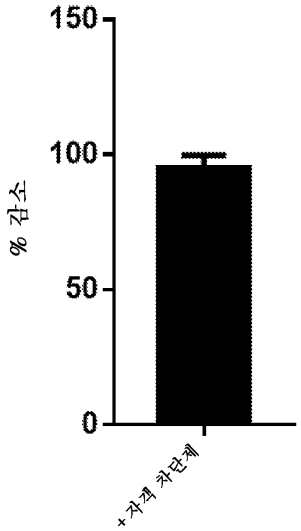
도면2


Phi29
5'GTACGTACGTACGTACGTACGTA-CaCaCa-소광렌3'
GCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC5'

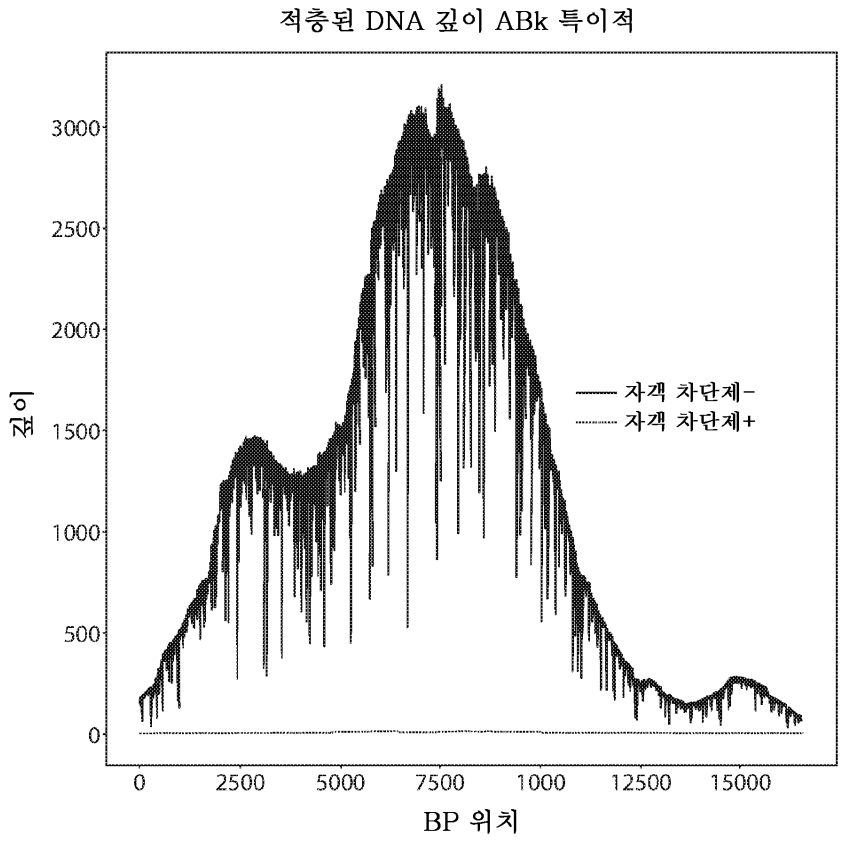
도면3


차단제-소랄렌 (25mer)
표적 (60mer)
오프-표적 (90mer)
UV
가교된
표적
1
2
3
4
5
6

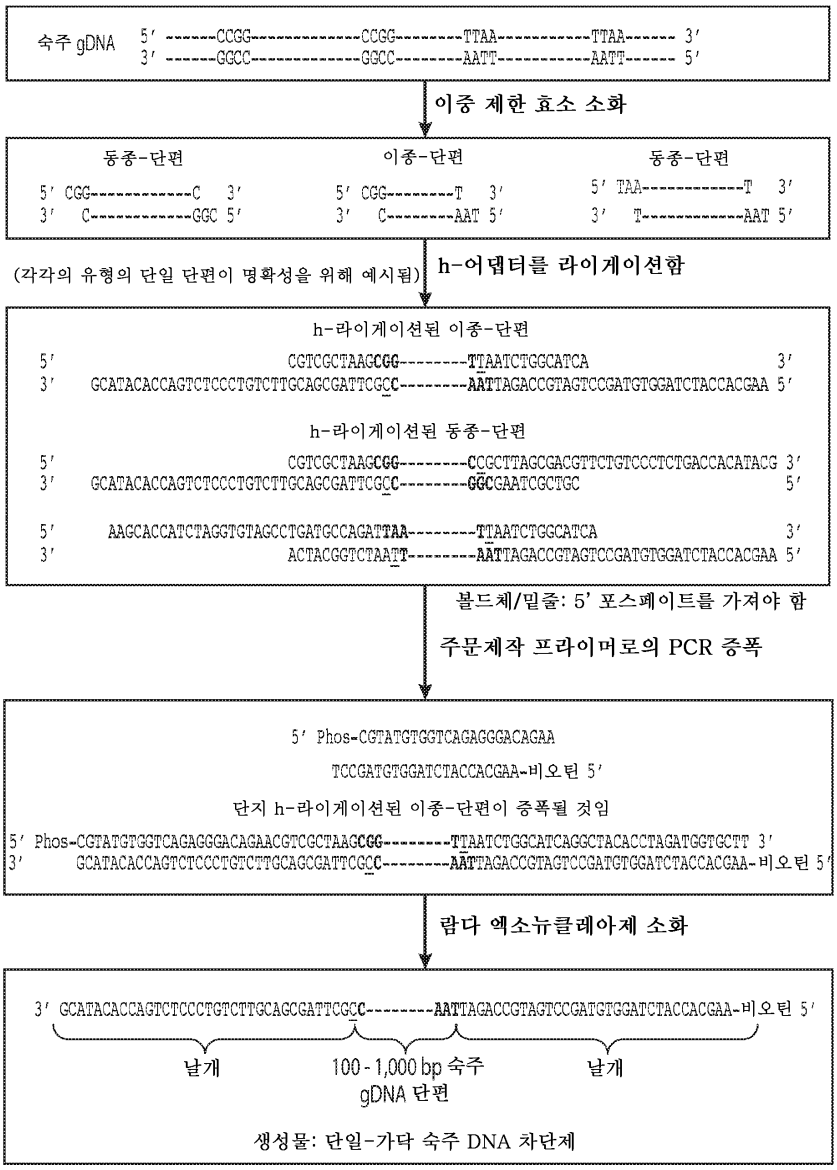
도면4


150
100
50
0
% 감소
+차폐 차단제

도면5


적층된 DNA 깊이 ABk 특이적
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
깊이
0
2500
5000
7500
1000
12500
15000
BP 위치
자객 차단제-
자객 차단제+

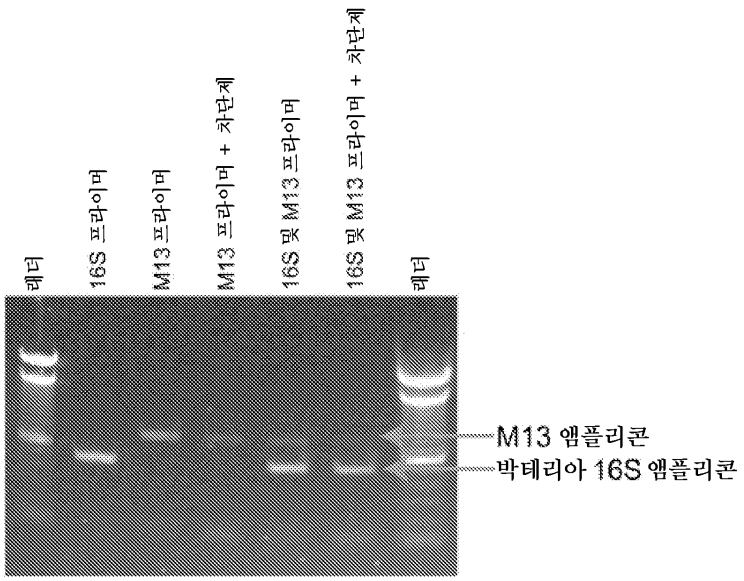
도면6


숙주 gDNA
이중 제한 효소 소화
동종-단편
이종-단편
동종-단편
(각각의 유형의 단일 단편이 명확성을 위해 예시됨)
h-어댑터를 라이게이션함
h-라이게이션된 이종-단편
h-라이게이션된 동종-단편
볼드체/밑줄: 5' 포스페이트를 가져야 함
주문제작 프라이머로의 PCR 증폭
5' Phos-CGTATGTGGTCAGAGGGACAGAA
TCCGATGTGGATCTACCACGAA-비오틴 5'
단지 h-라이게이션된 이종-단편이 증폭될 것임
람다 엑소뉴클레아제 소화
날개
100 - 1,000 bp 숙주 gDNA 단편
날개
생성물: 단일-가닥 숙주 DNA 차단제

도면7

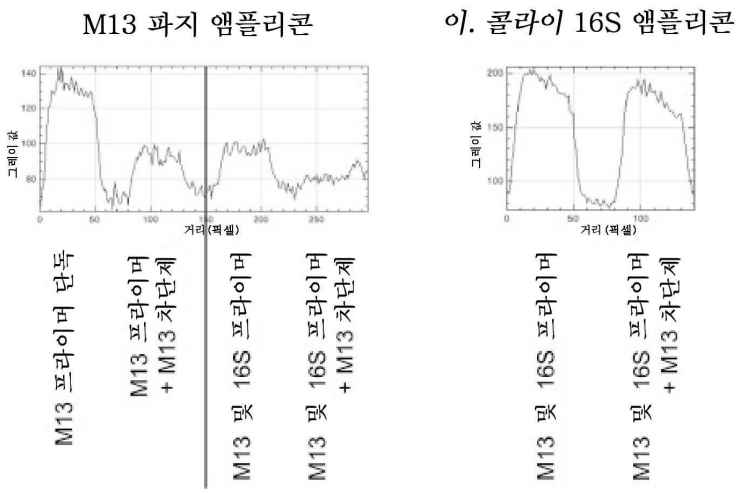

숙주 및 비-숙주 게놈 DNA의 믹스
1 내지 15 kb의 단편으로 단편화
단편화된 gDNA를
숙주 DNA 차단제와 함께 인큐베이션함
비-특이적 PCR 증폭을 수행함 (예를 들어
랜덤 육량체 프라이머 또는 라이게이션된
어댑터를 사용함)
사이클 1:
종료 사이클 X:

도면8


래더
16S 프라이머
M13 프라이머
M13 프라이머 + 차단제
16S 및 M13 프라이머
16S 및 M13 프라이머 + 차단제
래더
M13 앰플리콘
박테리아 16S 앰플리콘

도면9

형광 강도 프로파일



도면10

		M13 밴드 정량화		이. 콜라이 밴드 정량화	
		형광 강도 (배경을 뺌)	차단제로의 M13 증폭의 감소	형광 강도 (배경을 뺌)	차단제로의 이. 콜라이 증폭의 감소
PCR 조건	M13 프라이머 단독	153			
	M13 프라이머 + 차단제	49	68%		
	M13 + 이. 콜라이 프라이머 단독	127		32	
	M13 + 이. 콜라이 프라이머 + 차단제	73	43%	28	13%

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Day Zero Diagnostics, Inc.

Tsui, Chiahao

Anahtar, Melis N

Maclaurin, Dougal

Huntley, Miriam H

Brewster, Jeffrey D

<120> SELECTIVE ENRICHMENT OF A POPULATION OF DNA IN A MIXED DNA SAMPLE THROUGH TARGETED SUPPRESSION OF DNA AMPLIFICATION

<130> D0819.70000WO00

<140> Not Yet Assigned

<141> 2018-10-18

<150> US 62/573,720

<151> 2017-10-18

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210 > 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

tataggcgat agaaattgaa acc 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

tatacccttc ccgtactaat taa 23

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

tatactaata atccttatag aaat 24

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

tatactacta acagaccgca acc 23

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

tatactacgg tcaatgctct gaa 23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

tatactagca tttaccatct cac 23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

tatagcactc gaataattct tct 23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

tataccctag ccaacccctt aaa 23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

caccacctct tgctcagcct ata 23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

atagaagaac taatgttagt ata 23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> SEQ ID NO: 12

<400> 11

ctaataatcg gtgcccccga tat 23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 12

atagggcccg tatttaccct ata 23

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 13

cacacattcg aagaacccgt ata 23

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 14

tcacttctag gaatactagt ata 23

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 15

tacctccctg acaagcgcct ata 23

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

aatgggcctg tccttgtagt ata 23

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 17

ggtttcaatt tctatcgcct ata 23

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 18

ttaattagta cgggaagggt ata 23

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Human

<400> 19

atttctataa ggattattag tata 24

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 20

ggttgcggtc tgttagtagt ata 23

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 21

ttcagagcat tgaccgtagt ata 23

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 22

gtgagatggt aaatgctagt ata 23

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 23

agaagaatta ttcgagtgct ata 23

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 24

tttaaggggt tggctagggt ata 23

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 25

caccacctct tgctcagcct ata 23

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 26

tatactaaca ttagttcttc tat 23

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 27

atatcggggg caccgattat tag 23

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 28

tatacgggtt cttcgaatgt gtg 23

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 29

tatagggtaa atacgggccc tat 23

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 30

tatactagta ttcctagaag tga 23

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 31

tataggcgct tgtcagggag gta 23

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Human

<400> 32

tatactacaa ggacaggccc att 23