(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0044621
(43) 공개일자 2021년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*B01L 3/00* (2006.01) *C12Q 1/686* (2018.01)
(52) CPC특허분류
*B01L 3/5082* (2013.01)
*C12Q 1/686* (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0128026
(22) 출원일자 2019년10월15일
심사청구일자 2019년10월15일

(71) 출원인
**한국과학기술원**
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
**이경균**
대전광역시 유성구 대학로 233-1, 301호
**임성갑**
대전광역시 유성구 대학로 291, 응용공학동 6114호(구성동, 한국과학기술원)
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인인벤싱크**

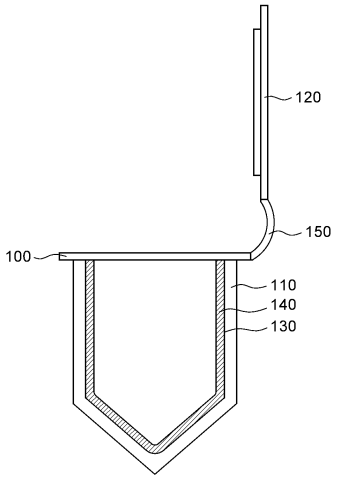
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 추출 튜브 및 이를 이용한 핵산 검출 방법**

## (57) 요 약

본 명세서에서는 시료를 수용하도록 구성된 바디부의 내벽부 상에 배치되는 양이온성 고분자 물질로 이루어진 양전하층을 포함하는 핵산 추출 튜브 및 이를 이용한 핵산 검출 방법이 제공된다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*B01L 2200/0647* (2013.01)
*B01L 2300/0832* (2013.01)
*B01L 2300/12* (2013.01)
*B01L 2300/16* (2013.01)
*C12Q 2527/101* (2019.08)

(72) 발명자
**송윤성**
대전광역시 서구 청사로 254, 106동 803호(둔산동, 둥지아파트)

**배남호**
대전광역시 유성구 반석서로 98, 609동 1504호(반석동, 반석마을6단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 2018R1C1B3001553 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 신진연구자사업 |
| 연구과제명 | 전염성 병원체 포획용 나노트랩을 이용한 디지털 유전자분석 기술 개발 |
| 기 여 율 | 40/100 |
| 과제수행기관명 | 나노종합기술원 |
| 연구기간 | 2019.03.01 ~ 2020.02.29 |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | COI1912M001 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 나노종합기술원 |
| 연구사업명 | 나노 Open Innovation Lab 협력사업 |
| 연구과제명 | (공공R&D성과) 기능성 고분자 증착 공정플랫폼을 활용한 현장진단형 분자진단칩 개발 |
| 기 여 율 | 40/100 |
| 과제수행기관명 | 나노종합기술원 |
| 연구기간 | 2019.01.01 ~ 2019.12.31 |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 2017R1A2B3007806 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 이공분야기초연구사업 |
| 연구과제명 | 다기능성 초박막형 이온성 고분자 플랫폼 개발 및 소자 응용 |
| 기 여 율 | 20/100 |
| 과제수행기관명 | 한국과학기술원 |
| 연구기간 | 2019.03.01 ~ 2020.12.31 |

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

시료를 수용하도록 구성된 바디부; 및

상기 바디부의 내벽부 상에 배치되는 양이온성 고분자 물질로 이루어진 양전하층을 포함하는, 핵산 추출 튜브.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 양전하층의 두께는,

1 내지 1000nm인, 핵산 추출 튜브.

### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 양이온성 고분자 물질은,

폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트(pDMAEMA), 폴리(2-디메틸아미노메틸 스티렌)(pDMAMS), 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP), 폴리 다이에틸아미노에틸아크릴레이트(pDEAEA), 폴리 다이메틸아미노에틸아크릴레이트(pDMAEA) 및 폴리 다이에틸아미노에틸메타크릴레이트(pDEAMA) 중 적어도 하나를 포함하는, 핵산 추출 튜브.

### 청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 양이온성 고분자 물질은,

측쇄 말단에 양전하의 질소가 튜브의 내부로 향하여 배치된, 핵산 추출 튜브.

### 청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 양이온성 고분자 물질은,

상기 폴리(2-디메틸아미노메틸 스티렌)(pDMAMS)인, 핵산 추출 튜브.

### 청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 튜브는,

$10^3$ 내지 $10^6$ 까지의 검출 한계(LOD)를 가지는, 핵산 추출 튜브.

### 청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 튜브는,

폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리에틸렌 (polyethylene, PE), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride, PVC), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리에스테르(polyester), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리에틸렌테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 폴리우레탄(polyurethane, PU), 실리콘, 유리, 세라믹 및 테플론 중 적어도 하나의 소재로 이루어진, 핵산 추출 튜브.

청구항 8

핵산을 포함하는 시료를 용해 완충액과 함께 제 1항 내지 제7항 중 하나에 기재된 핵산 추출 튜브에 넣어 혼합하는 단계;

상기 핵산 추출 튜브 내의 부유물을 제거하는 단계;

부유물이 제거된 상기 핵산 추출 튜브에 세척 완충액을 첨가하여 세척하는 단계;

세척된 상기 핵산 추출 튜브에 PCR 혼합제를 투입하는 단계;

PCR 혼합제를 넣어준 상기 핵산 추출 튜브 내의 시료에 대한 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하는 단계; 및

상기 PCR 과정에서 또는 완료된 상기 핵산 추출 튜브 내의 시료를 인-시튜(in situ)로 검출하는 단계를 포함하는, 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

세포 용리를 위해 상기 핵산 추출 튜브를 55 내지 95 ℃에서 적어도 10분 동안 인큐베이팅시키는 단계를 더 포함하는, 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서,

핵산 바인딩을 위해 상기 핵산 추출 튜브를 20 내지 30 ℃에서 적어도 10분 동안 인큐베이팅시키는 단계를 더 포함하는, 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법.

청구항 11

제 8항에 있어서,

상기 혼합하는 단계 내지 PCR 혼합제를 넣어주는 단계는,

60분 내지 80분 동안 수행되는, 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법.

청구항 12

제 8항에 있어서,

상기 핵산을 포함하는 시료는,

E. coli O157:H7, 살모넬라속균(Salmonella choleraesuis, Salmonella bongori, Salmonella typhimurium), 황색포도상구균, 리스테리아속균(Listeria monocytogenes, Listeria denitrificans, Listeria grayi, Listeria murrayi), 콜레라균, 적리균, 백일해균, 디프테리아균, 장티푸스균, 페스트균, 용혈성 연쇄구균 및 스타필로코커스 아우레우스 중 적어도 하나를 포함하는, 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법.

청구항 13

제 8항에 있어서,

상기 핵산을 포함하는 시료는,

인플루엔자 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, G형 간염 바이러스, HIV 바이러스, 황열 바이러스, 뎅기 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 진드기-매개 뇌염 바이러스, 누수투 또는 웨스트 나일 바이러스, 리프트 계곡 열 또는 토스카나 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 호흡기 합포체 바이러스, 로시오 바이러스, 홍역 바이러스, 머레이 뇌염 바이러스, 베셀스브론 바이러스, 지카(Zika) 바이러스, 림프구 무도수막염(lymphocytic choreomeningitis) 바이러스, 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 크리미아-콩고 출혈 열 바이러스, 리사 바이러스, 주닌(Junin) 바이러스, 마추포(Machupo) 바이러스, 사비아(Sabia) 바이러스, 구아나리토(Guanarito) 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 광견병 바이러스, 루벨라(rubella) 바이러스, 수두 대상 포진 바이러스, 단순 포진 1형 바이러스 및 단순 포진 2형 바이러스 중 적어도

하나를 포함하는, 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법.

**청구항 14**

제 8항에 있어서,

상기 핵산 추출 튜브의 검출력은,

일반 (bare) 튜브에 비하여 10 내지 30배 높은, 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 핵산 추출 튜브 및 이를 이용한 핵산 검출 방법에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 여름철 집단적으로 발병하는 식중독의 원인이 되는 식품 매개성 병원균들에 대한 피해를 최소하기 위해서는 병원균에 대한 신속하고 정확한 검출이 중요하다. 종래의 진단 기술은 식품이나 생체 시료, 스왑 시료 또는 환경 중의 존재하는 미생물을 분석하기 위하여 평판 배양법 등을 포함한다. 그러나, 평판 배양법은 결과가 얻어질 때까지 2일 내지 1개월 정도의 긴 시간을 요구한다.

[0003] 이에, 평판 배양법보다 비교적 짧은 시간 내에 검출이 가능한 분자 진단법이 주로 이용되고 있다. 분자진단법으로 병원균의 DNA를 검출하는 방법으로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)이 이용되며, PCR은 단일 수준의 유전자분석을 통하여 다른 체외 진단 법들에 비해 높은 재현성, 고감도 및 신속성 등의 특징을 보이고 있다. 그러나, 표적 DNA를 시료로부터 검출하기 위하여 세포에서 DNA를 추출, 농축 및 정제 등의 복잡한 전처리 기술이 필수적으로 선행되어야 한다. 나아가, 이러한 검출 과정에서 페놀, 클로로포름, 구아니디늄 티오시아네이트 등과 같은 용매를 이용하여 세포의 DNA를 용해시킨다. 이러한 용매들은 독성 화학 물질이므로, 시험자의 안전을 위한 숙련된 기술이 요구된다.

[0004] 이에, 분자진단법에서는 보다 간편하고 용이한 전처리 기술 및 이와 연계된 PCR의 개발에 대한 요구가 높아지고 있다.

[0005] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

### *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0006] 종래의 핵산 추출에서 원심 분리기를 이용하는 스핀 컬럼(spin column) 방식의 전처리 키트가 많이 이용되고 있으나, 키트를 이용하더라도 다양한 시약 및 소모품이 요구되며, 원심 분리 및 기타 장비등을 이용해야 한다. 따라서, 스핀 컬럼 방식은 장소 및 전문성이 요구되는 대한 한계가 있다.

[0007] 이에, 상기의 문제점들을 보완하기위해 Lab-on-a-chip 상에서 전처리 및 진단을 한번에 구현하고자 하는 다양한 시도들이 이루어지고 있다. 그러나, PCR을 위해서 제작한 칩에 맞춘 열순환 장비를 추가로 제작해야 한다는 점과 상용화된 분자진단 장비들과 호환성 및 범용성이 떨어지는 한계가 있다.

[0008] 한편, 본 발명의 발명자들은, 상기와 같은 핵산 추출의 한계를 극복하기 위해, 보다 간편하여 누구나 다룰 수 있으며, 신속하게 핵산을 검출할 수 있는 방법의 필요성에 대하여 인지할 수 있었다.

[0009] 이에, 본 발명의 발명자들은 여러 장비가 요구되는 PCR 전처리 과정을 특별한 장비 없이도 한번에 수행할 수 있으며, 종래의 PCR 장치에 호환가능한 핵산 추출 튜브 및 이를 이용한 핵산 검출 방법에 대하여 연구개발하였다.

[0010] 그 결과, 본 발명의 발명자들은, 양이온성 고분자 물질을 PCR 튜브에 코팅하였을 경우, PCR 튜브 내에서 시료의 핵산이 포획되어 간편히 PCR에 대한 전처리 과정이 수행될 수 있다는 것을 발견하기에 이르렀다.

[0011] 보다 구체적으로, 본 발명의 발명자들은 양이온성 고분자 물질이 기상 증착 공정에 의하여 PCR 튜브 내의 표면

상에 균일하게 증착된 경우, 독성 용매를 사용하거나 원심 분리와 같은 특별한 과정이 없이도 시료 내의 핵산을 포획할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0012] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 시료를 수용하도록 구성된 바디부의 내벽부 상에 배치되는 양이온성 고분자 물질로 이루어진 양전하층을 포함하는 핵산 추출 튜브를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는, 전술한 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

## *과제의 해결 수단*

[0015] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브는 시료를 수용하도록 구성된 바디부 및 바디부의 내벽부 상에 배치되는 양이온성 고분자 물질로 이루어진 양전하층을 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 특징에 따르면, 양전하층의 두께는 1 내지 1000nm일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 양이온성 고분자 물질은, 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트(pDMAEMA), 폴리(2-디메틸아미노메틸 스티렌) (pDMAMS), 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP), 폴리 다이에틸아미노에틸아크릴레이트 (pDEAEA), 폴리 다이메틸아미노에틸아크릴레이트(pDMAEA) 및 폴리 다이에틸아미노에틸메타크릴레이트(pDEAMA) 중 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 전술한 양이온성 고분자 물질은, 측쇄 말단에 양전하의 질소가 튜브의 내부로 향하게 배치될 수 있다. 이때, 양이온성 고분자 물질은 폴리(2-디메틸아미노메틸 스티렌)(pDMAMS)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 튜브는, $10^3$ 내지 $10^6$ 까지의 검출 한계(limit of detection, LOD)를 가질 수 있으며, 폴리프로필렌(PP), 폴리에틸렌 (PE), 폴리염화비닐(PVC), 폴리카보네이트(PC), 폴리에스테르, 폴리메틸메타크릴레이트 (PMMA), 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET), 폴리우레탄(PU), 실리콘, 유리, 세라믹 및 테플론 중 적어도 하나의 소재로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법은, 핵산을 포함하는 시료를 용해 완충액과 함께 전술한 핵산 추출 튜브에 넣어 혼합하는 단계, 핵산 추출 튜브 내의 부유물을 제거하는 단계, 부유물이 제거된 핵산 추출 튜브에 세척 완충액을 첨가하여 세척하는 단계, 세척된 핵산 추출 튜브에 PCR 혼합제를 투입하는 단계, PCR 혼합제를 넣어준 핵산 추출 튜브 내의 시료에 대한 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 수행하는 단계 및 PCR 과정 또는 PCR 과정이 완료된 핵산 추출 튜브 내의 시료를 인-시튜(in situ)로 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 특징에 따르면, 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법은, 세포 용리를 위해 일정량의 세포 ($10^0$ 내지 $10^6$ 세포 수)가 들어있는 핵산 추출 튜브를 55 내지 95 ℃에서 적어도 10분 동안 인큐베이팅시키는 단계 및/또는 핵산 바인딩을 위해 핵산 추출 튜브를 20 내지 30 ℃에서 적어도 10분 동안 인큐베이팅시키는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 전술한 혼합하는 단계 내지 PCR 혼합제를 넣어주는 단계는, 60분 내지 80분 동안 수행될 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 핵산을 포함하는 시료는, E. coli O157:H7, 살모넬라속균(Salmonella choleraesuis, Salmonella bongori, Salmonella typhimurium), 황색포도상구균, 리스테리아속균(Listeria monocytogenes, Listeria denitrificans, Listeria grayi, Listeria murrayi), 콜레라균, 적리균, 백일해균, 디프테리아균, 장티푸스균, 페스트균, 용혈성 연쇄구균 및 스타필로코커스 아우레우스 중 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 또한, 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 핵산을 포함하는 시료는, 인플루엔자 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, G형 간염 바이러스, HIV 바이러스, 황열 바이러스, 뎅기 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 진드기-매개 뇌염 바이러스, 누수투 또는 웨스트 나일 바이러스, 리프트 계곡 열 또는 토스카나 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 호흡기 합포체 바이러스, 로시오 바이러스, 홍역 바이러스, 머레이 뇌염 바이러스, 베셀스브론 바이러스, 지카(Zika) 바이러스, 림프구 무도수막염(lymphocytic choreomeningitis) 바이러스, 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 크리미아-콩고 출혈 열 바이러스, 리사

바이러스, 주닌(Junin) 바이러스, 마추포(Machupo) 바이러스, 사비아(Sabia) 바이러스, 구아나리토(Guanarito) 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 광견병 바이러스, 루벨라(rubella) 바이러스, 수두 대상 포진 바이러스, 단순 포진 1형 바이러스 및 단순 포진 2형 바이러스 중 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 핵산 추출 튜브의 회수액으로부터의 핵산 포획 효율은, 일반 튜브의 3 %에 비하여 높은 55 %일 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 핵산 추출 튜브로부터 포획된 핵산 포획 효율은, 일반 튜브의 0.08%에 비하여 높은 43%일 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 핵산 추출 튜브의 검출력은, 일반 튜브에 비하여 10 내지 30배 높을 수 있으며, 바람직하게는 26배 높을 수 있다.

[0027] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

## *발명의 효과*

[0028] 본 발명은, 특정 고분자를 PCR 전용 튜브의 표면에 균일하게 증착시켜 핵산을 추출하기 위한 튜브 및 이를 이용하는 방법으로서, 시료에 대한 핵산을 추출 및 정제하는 종래의 방법에 비하여 보다 안전할 수 있다.

[0029] 나아가, 핵산 추출 과정의 단계가 종래의 추출 방법에 비하여 줄어듬으로서 비전문가 손쉽게 핵산을 추출할 수 있으며, 사람 개개인 별 핸들링에 의한 실험적 오차를 줄일 수 있는 효과가 있다.

[0030] 더 나아가, 원심 분리 및 볼텍싱 등과 같은 실험 과정이 요구되지 않음에 따라, 어느곳에서나 핵산 추출이 가능하여 실시간 현장진단 및 환경 모니터링 등과 같은 다양한 분야에서 보다 빠르게 진단될 수 있다.

[0031] 보다 구체적으로, 기존 전처리에 15분 내지 40분에 더하여 별도 PCR에 1시간이 소요되었던 것에 비하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브를 이용하면, 전처리에 30분에 더하여, PCR에 별도 1시간이 소요된다.

[0032] 관련하여, 일반 전처리 키트를 이용하는 것과 비교시 비슷한 공정시간 및 효율을 보이지만, 공정 과정이 대폭 감소하여 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브를 이용하면 보다 간편하고 용이하게 PCR을 수행할 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

## *도면의 간단한 설명*

[0034] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 단면도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 양전하층을 설명하기 위한 예시적인 확대도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 제조 방법을 도시한 개략도들이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법의 흐름도이다.

도 5a 내지 5c는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법을 예시적으로 도시한 개략도들이다.

도 6a 내지 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브가 PCR 과정에서 방해작용을 하는지에 대한 비교 결과를 도시한 것이다.

도 7 내지 8b는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 포획능에 대한 결과를 도시한 것이다.

도 9a 내지 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 검출 한계에 대한 결과를 도시한 것이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0035] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서

로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0036] 명세서 전체에 걸쳐 동일 참조 부호는 동일 구성 요소를 지칭한다.

[0037] 본 발명의 실시예를 설명하기 위한 도면에 개시된 형상, 크기, 비율, 각도, 개수 등은 예시적인 것이므로 본 발명이 도시된 사항에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명은 생략한다. 본 명세서 상에서 언급된 '포함한다', '갖는다', '이루어진다' 등이 사용되는 경우, '~만'이 사용되지 않는 이상 다른 부분이 추가될 수 있다. 구성요소를 단수로 표현한 경우에 특별히 명시적인 기재 사항이 없는 한 복수를 포함하는 경우를 포함한다.

[0038] 구성요소를 해석함에 있어서, 별도의 명시적 기재가 없더라도 오차 범위를 포함하는 것으로 해석한다.

[0039] 본 발명의 여러 실시예들의 각각 특징들이 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하며, 당업자가 충분히 이해할 수 있듯이 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 실시예들이 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시 가능할 수도 있다.

[0040] 본 명세서의 해석의 명확함을 위해, 이하에서는 본 명세서에서 사용되는 용어들을 정의하기로 한다.

[0041] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 핵산 "은 유기 염기(사이토신, 티미딘 및 우라실과 같은 치환된 피리미딘이거나, 아덴 및 구아닌과 같은 치환된 퓨린)에 연결된 당으로 이루어지는 적어도 하나의 뉴클레오티드를 의미할 수 있다. 보다 구체적으로, 핵산은 리보핵산(RNA), 디옥시리보핵산(DNA), 메틸포스포네이트 핵산, S-올리고, c-DNA, miRNA 및 압타머(aptamer) 등을 포함할 수 있으며, 천연적으로 발생하거나 인공적으로 합성된 것 모두를 포함할 수 있다. 그러나, 바람직하게는 RNA 및 DNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 양이온성 폴리머 "는 수용액 상의 적정 pH에서 양성자화 성질을 가지는 폴리머 및 고체상에서 양성자 성질을 가지는 폴리머를 말한다.

[0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 용해 완충액 (lysis buffer) "은 25 ℃에서 약 6 내지 9 pH값을 유지할 수 있는 용액을 의미할 수 있다. 보다 구체적으로, 완충액은 전형적으로 효소 활성의 기능과 조화되고, 생물학적 분자의 정상적인 생리적 및 생화학적 기능을 유지할 수 있도록 생리학적으로 조화 가능한(physiologically compatible) 완충액을 의미할 수 있다. 용해 완충액은 염이나 pH 버퍼 등을 사용하지 않고 정제수가 이용될 수 있다. 이하에서 설명되는 용해 완충액은 모두 정제수만이 사용되었다. 그러나 이에 제한되지 않고, 용해 완충액에 사용될 수 있는 성분으로는 4- (2- 하이드록시에틸) -1- 피페 라진 에탄 술폰산(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES), 3-(N-모르폴리노)-프로판설폰산(3-morpholino propanesulfonic acid, MOPS), N-트리스-(히드록시메틸)-메틸글리신산(N-Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl Glycine, Tricine), 트리스-(히드록시메틸)-메틸아민산(tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, Tris), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산)(piperazine-N,N′ acid), PIPES), 아세테이트 및 포스페이트 함유 버퍼(K2HPO4, KH2PO4, Na2HPO4 및 NaH2PO4) 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 나아가, 용해 완충액은 프로테나아제 K, 트립신, 키모트립신, 엘라스타아제 및 스트렙토그리신 등과 같이 핵산 추출을 위하여 사용되는 프로테아제를 더 포함할 수 있다. 또한, 용해 완충액 내 버퍼 성분의 농도는 3 내지 30 mM 범위 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 프라이머 (primer) "는 상보적 스트랜드의 합성이 폴리머라아제에 의하여 촉매화되는 조건 하에 있는 경우, 상보적 스트랜드를 따라 핵산의 합성 또는 복제 초기 지점으로 작용할 수 있는 합성 또는 천연 올리고뉴클레오티드를 의미할 수 있다.

[0045] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 삽입 염료 (intercalating dye) "는 증폭 과정에서 핵산, 특히 DNA 이중 스트랜드의 주된 홈(major groove)에 결합하는 성질을 갖는 염료를 의미할 수 있으며, 증폭이 완료된 후 삽입 염료의 형광 검출에 따른 강도(intensity)를 측정함으로써 증폭 정도를 확인할 수 있다. 이때, 삽입 염료로는 STYBR green, Pico green, Hoechst 시리즈, BOBO, TOTO, YOYO, JOJO, POPO, LOLO, PO-PRO, BO-PRO, YO-PRO, TO-PRO, JO-PRO, LO- PRO 및 SYTO 시리즈 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 프로브 (probe) "는 실시간 PCR(real-time PCR) 등의 전기 화학적 검출 방식에서 이용되는 전자 방출능을 갖는 인터칼레이터(intercalator)를 의미할 수 있다. 이때, 인터칼레이터는 이중 스트랜드의 핵산에 끼어들 수 있는 임의의 물질로서, 스트렙마이신 설페이트, 젠타마이신 설페이트, 다우노루비

신 하이드로크로라이신, 노갈라마이신, 독소루비신, 헤다마이신, 미토산트론, 틸로론, 퀴나크린 및 아크리딘오렌지 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0047] 이와 관련하여, 프로브 즉, TaqMan 프로브 등의 형광을 이용한 검출 방법은 5'-말단은 형광체(FAM, JOE, TET, HEX, VIC 등)로, 3'-말단은 소광제(TAMRA, DABCYL, ROX, BHQ 등)로 수식한 올리고뉴클레오타이드를 증폭 용액에 첨가하는 방법이다. TaqMan 프로브는 어닐링 단계에서는 주형 핵산에 특이적으로 혼성화되지만 프로브 상의 소광제에 의하여 형광 발색이 억제된다. 연장 반응 시, Taq DNA 중합효소가 갖는 5' →3' 핵산말단분해효소(exonuclease)의 활성으로 주형에 혼성화된 TaqMan 프로브가 분해됨에 따라 형광 색소가 프로브로부터 유리되면서 소광제에 의한 억제가 해제되어 형광을 나타낸다.

[0048] 나아가, 프로브는 증폭 용액에 첨가하여 사용되는데, 증폭에 앞서 첨가할 경우에는 프라이머가 핵산과 결합함에 있어서 프로브와 경쟁적 관계를 형성할 수 있다. 보다 구체적으로, 프로브와 표적 핵산의 혼성화에 의하여 비특이적(non-specific) 결합이 증가할 수 있다. 따라서 과량으로 사용할 경우에는 증폭 반응의 저해제로 작용될 수 있다. 반면, 프로브의 양이 일정 수준 미만인 경우에는 증폭된핵산에 비하여 불충분한 형광특성으로 인하여 원하는 검출 효과를 기대하기 어렵게 된다. 결국, 증폭 방식을 고려하여 프로브의 사용량, 기타 반응 조건을 실험적으로 적절히 조절하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 문제 가능성을 해소하기 위하여, 예를 들면, 증폭 반응 시간을 증가시킴으로써 프로브 첨가가 증폭 반응에 미치는 영향을 억제하면서 프로브의 최대 한계 사용량을 증가시킬 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 형광 (fluorescence) "은 전자기적 여기에 의하여 짧은 시간 동안 생성되는 발광 타입을 의미할 수 있다. 보다 구체적으로, 형광은 특정 물질이 짧은 파장에서 광 에너지를 흡수한 후에 보다 긴 파장에서 광 에너지를 방출할 때 생성되는 현상을 의미할 수 있으며, 흡수와 방출 간의 시간 길이는 통상적으로 비교적 짧은데, 예를 들어 약 $10^{-9}$ 내지 $10^{-8}$ 초 범위 내의 수준일 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 중합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR) "은 가열 및 냉각이 교대로 이루어지는 사이클 프로세스에 의하여 하나의 최초 주형으로부터 다량의 동일한 DNA 스트랜드가 형성되는 반응을 의미할 수 있다.

[0051] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 증폭 (amplification) "은 주형(template)으로서 핵산 분자 중 적어도 하나를 이용하여 핵산 분자에 대한 복수의 복제물 또는 핵산 분자에 상보적인 복수의 복제물을 형성하는 것을 의미할 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 고정 (immobilization) "은 임의의 물질 또는 생활성제가 튜브의 벽면에 공유적 또는 비공유적으로 직접 또는 간접 방식에 의하여 부착되는 것을 의미할 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 기재 "는 표면 위에 특정 물질이 부착(고정), 코팅(도포) 및 증착 가능한 표면을 제공할 수 있는 구조 또는 구조물을 의미할 수 있으며, 바람직하게는 시료를 수용할 수 있는 튜브 형태의 구조물을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 용어 " 상에 " 및 " 위에 "라는 표현은, 상대적인 위치 개념을 언급하기 위하여 사용되는 것을 의미할 수 있다. 따라서, 언급된 층에 다른 구성 요소 또는 층이 직접적으로 존재하는 경우뿐만 아니라, 그 사이에 다른층(중간층) 및 다른 구성요소가 개재되거나 존재할 수 있다.

[0055] 이하에서는, 도 1 내지 2를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브에 대하여 설명한다.

[0056] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 단면도이다.

[0057] 도 1을 참조하면, 핵산 추출 튜브(100)은 핵산을 포함하는 시료 내의 핵산을 측정하기 위한 구조물로서, 시료를 수용할 수 있는 바디부(110), 일정한 바디부의 개구부를 개폐하는 캡(120) 및 바디부의 내벽부(130) 상에 배치되는 양이온성 고분자 물질로 이루어진 양전하층(140)을 포함한다. 이때, 바디부(110) 및 캡(120)은 연결부(150)로 인하여 연결된 것으로 도시되지만, 이에 제한되지 않고, 연결부(150)를 포함하지 않으며, 연결부(150)에 의하여 바디부(110) 및 캡(120)이 연결되지 않고 각각 존재하는 형태 또한 포함할 수 있다.

[0058] 핵산 추출 튜브(100)를 구성하는 소재는, 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리에틸렌 (polyethylene, PE), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride, PVC), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리에스테르(polyester), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리에틸렌테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 폴리우레탄(polyurethane, PU), 실리콘, 유리, 세라믹 및 테플론 중 적어도 하나의 소재로 이루어질 수

있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 이때, 플라스틱에 의한 습기 흡수가 문제가 되지 않을 경우, 바람직하게 구성되는 플라스틱류는 ABS, 아세탈(acetal), 아크릴섬유(acrylic), 아크릴로니트릴(acrylonitrile), 셀룰로오스 아세테이트(cellulose acetate), 에틸 셀룰로오스(ethyl cellulose), 알킬비닐 알코올(alkylvinylalcohol), 폴리아릴에테르에톤(polyaryletherketone), 폴리에테르에테르케톤(polyetheretherketone), 폴리에테르케톤(polyetherketone), 멜라민 포름알데히드(melamine formaldehyde), 페놀 포름알데히드(phenolic formaldehyde), 폴리아미드(polyamide, 예를 들면: 나일론6, 나일론 66, 나일론 12), 폴리아미드-이미드(polyamide-imide), 폴리디시클로펜타디엔(polydicyclopentadiene), 폴리에테르-이미드(polyether-imide), 폴리에테르술폰(polyethersulfone), 폴리이미드(polyimide), 폴리페닐렌옥사이드(polyphenyleneoxide), 폴리프탈아미드(polyphthalamide), 메틸메타크릴레이트(methylmethacrylate), 폴리우레탄(polyurethan), 폴리설폰(polysulfone), 폴리에테르설폰(polyethersulfone) 및 비닐 포말(vinyl formal)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 또한, 습기 흡수가 문제가 될 경우, 바람직하게 구성되는 플라스틱류는 폴리스틸렌(polystyrene), 폴리프로필렌(polypropylene), 폴리부타디엔(polybutadiene), 폴리부틸렌(polybutylene), 에폭시(epoxy), 테플론(Teflon), PAN(peroxyacetylnitrate), PET(polyethylene terephthalate), PTFE(polytetrafluoroethylene), 클로로-플루오로에틸렌(chloro-fluoroethylene), 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride), 액정 중합체(liquid crystal polymer), 폴리에스테르(polyester), LDPE(low-density polyethylene), HDPE(high density polyethylene), 폴리메틸펜틴(polymethylpentene), 폴리페닐렌 설파이드(polyphenylene sulfide), 폴리올페핀(polyolefin), PVC(polyvinyl chloride) 및 염소화 PVC를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 핵산 추출 튜브(100)가 수용할 수 있는 시료의 용적은, 1 내지 50,000㎕의 범위 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 사용자의 목적에 따라 다양한 크기로 형성되어 보다 다양한 범위를 가질 수 있다.

[0062] 핵산 추출 튜브(100)의 바디부(110)는 다양한 형태로 형성될 수 있다. 보다 구체적으로, 도 1에서는 하부의 모양이 반 고깔모양으로 도시되어 있지만, 이에 제한되지 것은 아니며, 사용자의 목적에 따라 하부의 모양이 원호형 및 사각형 등 다양한 형태로 형성될 수 있다.

[0063] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브(100)는 다양한 형태, 용적 및 모양을 갖는 바디부(110)를 포함함으로써, 사용자의 목적에 따라 적합한 튜브를 제공할 수 있다.

[0064] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 양전하층을 설명하기 위한 예시적인 확대도이다.

[0065] 도 2를 참조하면, 핵산 추출 튜브(100)의 양전하층(140)은 내벽부(130) 상에 배치될 수 있다. 보다 구체적으로, 양전하층(140)은 고분자 반복 단위의 측쇄 말단에 양전하의 질소를 갖는 1차 아민, 2차 아민, 또는 3차 아민을 함유하는 양이온성 고분자 물질로 이루어질 수 있다. 이때, 양전하의 질소를 갖는 3차 아민을 함유하는 고분자의 핵산에 대한 고정능이 보다 우수하기 때문에, 바람직하게, 양전하층(140)은 고분자 반복 단위의 측쇄 말단에 양전하의 질소(141)를 갖는 3차 아민을 함유하는 양이온성 고분자 물질로 이루어질 수 있다. 이러한, 양이온성 고분자로는, 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트(pDMAEMA), 폴리(2-디메틸아미노메틸 스티렌) (pDMAMS), 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP), 폴리 다이에틸아미노에틸아크릴레이트 (pDEAEA), 폴리 다이메틸아미노에틸아크릴레이트(pDMAEA) 및 폴리 다이에틸아미노에틸메타크릴레이트(pDEAMA) 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 이때, 양전하층(140)을 이루는 양이온성 고분자 물질로는 바람직하게, 폴리(2-디메틸아미노메틸 스티렌)(pDMAMS)일 수 있다. pDMAMS는 측쇄 상에 3차 아민기를 함유하고 있으며, pH 8.5 미만에서 양성자화가 된다. 이와 같은, 양이온성 고분자 물질은 양전하의 질소 원자를 포함하고, 측쇄 말단에 양전하의 질소(141)가 핵산 추출 튜브(100)의 내부(160)로 향하여 배치된다. 이에, 핵산 추출 튜브(100)의 내벽부(130)는 양전하(+)를 띄게 된다.

[0067] 나아가, 양전하층(140)의 두께는, 증착 시간에 따라 변화할 수 있으며, 약 1 내지 1,000 nm, 바람직하게는 약 10 내지 500 nm, 보다 바람직하게는 약 100 내지 300 nm 범위일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브(100)는 측쇄 말단에 양전하의 질소를 포함하는 양이온성 고분자 물질로 이루어진 양전하층을 포함함으로써, 전하 상호작용을 이용하여 음전하(-)의 표적 물질을 고정 및 포획할 수 있는 튜브를 제공할 수 있다.

[0069] **핵산 추출 튜브의 제조**

[0070] 이하에서는, 도 3을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 제조 과정에 대하여 설명한다.

[0071] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 제조 방법을 도시한 개략도들이다.

[0072] 도 3을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 제조 과정이 도시된다. 보다 구체적으로, 핵산 추출 튜브(100)에 양이온성 고분자 물질인 아민 작용성 중합체가 기상 증착 공정에 의하여, 핵산 추출 튜브(100)의 내벽부(130)에 증착될 수 있다. 또한, 증착된 양이온성 고분자 물질에 포함된 측쇄 말단에 양전하의 질소(141)은 핵산 추출 튜브(100)의 내부로 향하여 배치될 수 있다.

[0073] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 핵산 추출 튜브(100)는 1개의 바디부(110)를 가진 형태로 도시되었으나, 이에 제한되는 것은 아니며 사용자의 용도에 따라 다양하게 구현될 수 있다. 예를 들어, 복수의 바디부(110)가 일렬로 연결되어 있는 형태의 스트립 튜브(200) 및 복수의 바디부(110)가 플레이트 형태로 연결되어 있는 플레이트 튜브(300) 등 다양한 형태의 튜브를 포함할 수 있다.

[0074] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 핵산 추출 튜브에 양이온성 고분자 물질을 증착시키는 기상 증착 공정은 일반적으로 기체화된 소스를 기재의 표면에 코팅 또는 부착하는 공정을 의미할 수 있다. 이러한, 기상 증착 공정은 고순도의 코팅층 형성, 계면 특성의 제어 용이성 등과 같은 장점을 제공할 수 있다. 예를 들어, 고분자 코팅을 위하여 화학 기상 증착법이 (chemical vapor depositon, CVD) 적용될 수 있다. 고분자의 코팅 또는 부착을 위한 화학 기상 증착법은 액상 유기 합성 반응을 기상 반응 공정에 적용한 것으로서, 기화된 모너머가 기상 반응기 내에서 활성화되어 고분자 중합반응이 이루어짐에 따라, 기재 표면 상에 고분자 코팅층이 형성될 수 있다. 이에, 고분자 중합반응 및 코팅 층의 부착이 하나의 공정에서 동시에 이루어 질 수 있다. 따라서, 본 발명의 실시예에 따른 핵산 추출 튜브(100)는 기상 증착 공정, 즉, 화학 기상 증착 공정을 이용하여 양이온성 고분자 물질로 이루어진 양전하층이 형성될 수 있다.

[0075] 이때, 화학 기상 증착 공정은 일반적으로 진공 분위기 하에서 가스 상 반응물의 화학적 반응을 이용하여 필름 또는 파우더 형태의 고상 물질을 형성하는 원리가 이용된다. 화학 기상 증착 공정은 종래의 용액-기반의 표면 코팅 기술보다 기재 또는 기판의 마이크로 스케일 및 나노 스케일 구조를 완전히 보전할 수 있고, 유기 용매로 인하여 발생되는 각종 손상을 방지할 수 있고, 복잡한 기하학적 형상을 갖는 기재에 대하여도 균일하게 코팅할 수 있으며, 코팅 두께를 용이하게 조절할 수 있는 장점을 갖는다. 특히, 화학 기상 증착 공정은 다양한 형상 및 재질의 기재에 대하여 적용될 수 있으며, 비교적 저온(예를 들면, 약 200℃ 이하, 바람직하게는 100℃ 이하, 더 바람직하게는 50℃ 이하의 온도)에서 수행이 가능하다.

[0076] 이러한, 화학 기상 증착 공정으로는 플라즈마 화학 증착법(plasma enhanced chemical vapor deposition, PECVD) 및 개시제를 이용한 화학 기상 증착법(initiated chemical vapor deposition, iCVD) 등이 이용될 수 있다.

[0077] 개시제를 이용한 화학 기상 증착법은 자유 라디칼을 이용한 연쇄 중합 반응을 이용하며, 개시제 및 모노머를 기화하여 기상에서 고분자 반응이 이루어지게 함으로써, 고분자 코팅을 기재 표면에 부착하는 공정이다. 이때, 개시제 및 모노머에 의한 연쇄 중합 반응은 단순히 혼합 상태에서 일어나지 않고, 고온에 의하여 일어날 수 있다. 보다 구체적으로, 먼저, 연쇄 중합 반응은 기상 반응기 내에 위치한 필라멘트에 의하여 고온이 발생하고, 발생한 고온으로 의하여 개시제가 분화되면서 자유 라디칼이 생성되고, 생성된 자유 라디칼에 의하여 모노머가 활성되어 일어난다.

[0078] 나아가, 고분자 중합 반응에 사용되는 구동력은 오직 필라멘트의 고온뿐이며, 이러한 필라멘트의 온도에서는 모노머에 대한 화학적 손상이 없기 때문에, 고분자 코팅 층 역시 모노머가 갖고 있는 다양한 관능성 그룹을 그대로 유지한 채, 고분자 코팅 층으로 전환시킬 수 있다.

[0079] 다만, 전술한 플라즈마 화학 증착법의 경우, 높은 에너지 유입으로 인하여 분자 및 가교 정도가 높은 고분자 코팅 구조가 형성될 수 있고, 경우에 따라서는 공정 중에 원하는 관능기가 아닌 비특이적 관능기가 생성될 가능성이 있다. 따라서, 화학 기상 증착 공정 중 개시제를 이용한 화학 기상 증착법을 적용하는 것이 보다 유리할 수 있다. 이에 바람직하게는, 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브(100)의 양이온성 고분자 물질로 이루어지는 양전하층은 개시제를 이용한 화학 기상 증착법에 의하여 형성될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 전술한 방법과 같은 다양한 화학 기상 증착법에 의하여 형성될 수 있다.

[0080] **핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법**

[0081] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브를 이용한 핵산 검출 방법의 흐름도이다. 이하에서는, 설명

의 편의를 위하여 도 5a 내지 5c를 참조하여 설명한다.

[0082] 도 4를 참조하면, 먼저, 핵산을 포함하는 시료를 용해 완충액(lysis buffer)과 함께 핵산 추출 튜브에 넣어 혼합한다(S110). 예를 들어, 도 5a의 (a)를 참조하면, 핵산(511)을 포함하는 시료(510)가 용해 완충액(520)과 함께 핵산 추출 튜브(100)에 넣어 혼합되고, 용해 완충액(520)에 의하여 시료(510)가 용해(lysis)된다. 이때, 시료(510)가 용해되는 과정은 효소의 종류 등이 고려되어, 약 30 내지 95 ℃의 범위, 바람직하게는 약 55 내지 72 ℃의 온도 범위에서 적어도 10분 동안의 조건에서 인큐베이팅(incubating)되는 단계가 포함될 수 있다.

[0083] 동시에, 도 5a의 (b)를 참조하면, 핵산 추출 튜브(100)의 내벽부(130) 상에 배치된 양전하층(140)에 의하여 시료(510)의 핵산(511)이 포획된다. 보다 구체적으로, 핵산(511)은 음전하(-)를 띄는 산소원자를 가진 인산(phosphate)로 구성되어 있어, 핵산의 인산-당 주쇄는 전체적으로 음전하(-)를 갖는다. 이에, 측쇄 말단에 양전하의 질소(141)를 가진 양이온성 고분자 물질로 이루어진 양전하층(140)에 핵산이 접촉할 경우, 전하 상호작용(charge interaction)에 의하여 서로 바인딩되어, 핵산(511)이 핵산 추출 튜브(100)의 양전하층(140)에 포획될 수 있다. 나아가, 핵산(511)이 포획되는 과정은 약 10 내지 30 ℃의 범위, 바람직하게는 약 20 내지 30 ℃의 온도 범위에서 적어도 10분 동안의 조건에서 인큐베이팅되는 단계가 포함될 수 있다.

[0084] 이때, 핵산을 포함하는 시료는 생물학적 유기체(biologigal organism)로부터 유래하는 물질을 의미할 수 있다. 나아가, 핵산을 함유할 수 있는 한, 특정 종류 또는 형태로 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 생물학적 유체(fluid) 또는 생물학적 조직일 수 있다. 생물학적 유체로는 뇨, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 정액, 대변, 가래, 뇌척수액, 눈물, 점액, 양수 등을 포함할 수 있으며, 생물학적 조직으로는 세포의 집합으로서, 인간, 동물, 식물, 세균, 진균 및 바이러스의 구조적 물질의 하나를 형성하는 세포 내 물질을 의미하며, 장기, 종양, 림프절, 동맥 및 개별적인 세포 등을 포함할 수 있다. 나아가, 식수 및 음식물 등과 같은 환경 시료(environmental sample) 또한 포함될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0085] 더 나아가, 세균 및 진균 동식물의 생체에 침입하여 기생하면서 병을 일으키거나 위해를 주는 모든 미생물인 병원체 또는 병원성 세균을 의미할 수 있다. 보다 구체적으로, E. coli O157:H7, 살모넬라속균(Salmonella choleraesuis, Salmonella bongori, Salmonella typhimurium), 황색포도상구균, 리스테리아속균(Listeria monocytogenes, Listeria denitrificans, Listeria grayi, Listeria murrayi), 콜레라균, 적리균, 백일해균, 디프테리아균, 장티푸스균, 페스트균, 용혈성 연쇄구균 및 스타필로코커스 아우레우스 중 적어도 하나가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0086] 더 나아가, 바이러스로는 인플루엔자 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, G형 간염 바이러스, HIV 바이러스, 황열 바이러스, 뎅기 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 진드기-매개 뇌염 바이러스, 누수투 또는 웨스트 나일 바이러스, 리프트 계곡 열 또는 토스카나 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 호흡기 합포체 바이러스, 로시오 바이러스, 홍역 바이러스, 머레이 뇌염 바이러스, 베셀스브론 바이러스, 지카(Zika) 바이러스, 림프구 무도수막염(lymphocytic choreomeningitis) 바이러스, 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 크리미아-콩고 출혈 열 바이러스, 리사 바이러스, 주닌(Junin) 바이러스, 마추포(Machupo) 바이러스, 사비아(Sabia) 바이러스, 구아나리토(Guanarito) 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 광견병 바이러스, 루벨라(rubella) 바이러스, 수두 대상 포진 바이러스, 단순 포진 1형 바이러스 및 단순 포진 2형 바이러스 중 적어도 하나가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0087] 그 다음, 핵산 추출 튜브 내의 부유물을 제거하고(S120), 부유물이 제거된 핵산 추출 튜브에 세척 완충액(washing buffer) 을 첨가하여 핵산 추출 튜브를 세척한다(S130). 보다 구체적으로, 도 5b의 (a)를 참조하면, 핵산(511) 추출이 완료된 핵산 추출 튜브(100) 내의 부유물 즉, 세포막, 세포 소기관, 세포 파편 및 세포의 핵산이 용해된 용해액(530)이 제거되고, 세척 완충액(540)을 첨가하여 남은 부유물들이 제거된다. 이때, 도 5b의 (b)를 참조하면, 시료로부터 용해된 핵산(511)은 핵산 추출 튜브(100)의 내벽부(130)상에 배치된 양전하층(140) 상에 존재하는 양전하와 전하 간의 상호작용에 의하여 포획되어 있으므로, 용해액 제거 및 세척의 과정에도 포획된 핵산(512)은 유실되지 않는다.

[0088] 그 다음, 세척된 핵산 추출 튜브에 PCR 혼합제를 투입한다(S140). 보다 구체적으로, 도 5c의 (a)를 참조하면, 핵산이 고정 또는 포획된 핵산 추출 튜브(100)는 증폭용 혼합물 즉, PCR 혼합제(550) 내에 침지(immersion)시킨다. 이때, PCR 혼합제(550)에는 프라이머, 삽입 염료, 프로브, dATP, dTTP, dGTP 및 dCTP의 혼합물인 dNTP 및 역전사효소 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 삽입 염료의 첨가량은 각 제품의 특성 등이 고려되어 약 0.1 내지 20 μM 중량 %의 범위, 바람직하게는 약 1 내지 5 μM 중량 %의 범위 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0089] 그 다음, PCR 혼합제를 넣어준 핵상 추출 튜브 내의 시료에 대한 중합 효소 연쇄반응을 수행한다(S150). 보다 구체적으로, 도 5c의 (b)를 참조하면, 측쇄 말단에 양전하의 질소(141)를 가진 양이온성 고분자 물질로 이루어진 양전하층(140)에 의하여 포획된 핵산(512)은 PCR에 의한 증폭 과정 중 고온에 노출되어 이중 스트랜드가 분리되고, 유전 서열은 복제 준비 상태에 있게 되고, 분리된 각각의 주형 스트랜드는 프라이머에 의하여 복제된다. 나아가, 증폭 생성물에 대한 내 핵산(511)은 다시 양전하층(140)에 의해 고정된다. 따라서, 증폭 생성물로부터 침지된 기재를 꺼내어 검출 수단을 통하여 간편하게 진단할 수 있다.

[0090] 이때, 증폭 반응을 위한 PCR은, 어셈블리-PCR, 비대칭(asymmertric) PCR, 디지털 PCR, 종점(endpoint) PCR, 인버스(inverse) PCR, 메틸화-특이성 PCR, 정성(qualitative) PCR, 정량화(quantitative) PCR, 실시간(real-time) PCR 및 RT(reverse transcription)- PCR 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 마지막으로, PCR이 완료된 핵산 추출 튜브 내의 시료를 인-시튜(in-situ)로 검출한다(S160). 보다 구체적으로, 도 5c의 (c)를 참조하면, 인-시튜 검출은 증폭 생성물로부터 유래된 형광의 측정을 의미할 수 있으며, 형광의 유무 및 강도를 고려하여 표적 핵산의 존재 여부 및 농도를 분석할 수 있다. 이때, 형광 측정에 이용될 수 있는 검출 수단은 공초점 현미경(confocal microscope), 형광 현미경(fluorescence microscope), 형광계(fluorometer), 형광 스캐너(fluorescence scanner), 플로우사이토메터(flow cytometer), QuantaMaster PTI, sepctrofluorimeter(PTI), 및 SPEX fluorolog 3(ISA) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0092] **실시예 1: 핵산 추출 튜브의 PCR 검출 영향 검증**

[0093] 도 6a 내지 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브가 PCR 과정에서 방해작용을 하는지에 대한 비교 결과를 도시한 것이다.

[0094] 도 6a를 참조하면, 대조군(no template control NTC), 10 ng/μl 및 50 ng/μl 농도의 실시간 PCR 실험조건에서 나타난 일반 튜브 및 핵산 추출 튜브에 대한 형광 증폭 곡선(fluoreascent amplification curves)이 도시된다. 보다 구체적으로, 도 6a의 (a)를 참조하면, 일반 튜브에서의 대조군은 형광 발현을 나타내지 않았으며, 10 ng/μl 실험군은 15 내지 20 cycles 부터 형광 발현이 나타나기 시작하여 최종점(end point)의 RFU(relative fluorescence units)는 약 5,000 내지 6,000 범위 내의 수준을 갖는 것으로 나타나며, 50 ng/μl 실험군에서는 15 내지 20 cycles 부터 형광 발현이 나타나기 시작하여 최종점의 RFU는 약 6,000 내지 7,000 범위 내의 수준을 갖는 것으로 나타난다. 이와 마찬가지로, 도 6a의 (b)를 참조하면, 핵산 추출 튜브에서의 대조군은 형광 발현을 나타내지 않았으며, 10 ng/μl 실험군은 15 내지 20 cycles 부터 형광 발현이 나타나기 시작하여 최종점의 RFU는 약 5,000 내지 6,000 범위 내의 수준을 갖는 것으로 나타나며, 50 ng/μl 실험군에서는 20 cycles 부터 형광 발현이 나타나기 시작하여 최종점의 RFU는 약 6,000 내지 7,000 범위 내의 수준을 갖는 것으로 나타난다.

[0095] 나아가, 도 6b를 참조하면, 실시간 PCR의 정량 분석을 통해 도출된 일반 튜브 및 핵산 추출 튜브에 대한 CT 값 결과를 도시한 것이다. 이때, CT 값은 도 6a의 형광 증폭 곡선에서 최소의 역가(threshold)와 만나는 지점의 cycle number를 의미하며, CT 값이 작으면 핵산의 양이 많다는 것을 의미하며, CT 값이 크면 핵산의 양이 적다는 것을 의미할 수 있다. 보다 구체적으로, 대조군에서는 일반 튜브 및 핵산 추출 튜브 모두에서 CT 값이 나타나지 않았으며, 10 ng/μl 및 50 ng/μl 실험군에서는 일반 튜브 및 핵산 추출 튜브 모두에서 약 15 내지 20 범위 내의 동일한 CT 값을 가지는 것으로 나타난다.

[0096] 이상의 실시예 1의 결과에 따라, 일반 튜브 및 핵산 추출 튜브의 실시간 PCR 결과는 차이가 없는 것으로 나타나며, 이에, 핵산 추출 튜브에 증착된 양이온성 고분자 물질이 PCR 과정에 억제제(inhibitor)로서 영향을 주지 않고, 일반 튜브와 비슷한 PCR 결과를 도출할 수 있다.

[0097] **실시예 2: 핵산 추출 튜브의 DNA 포획 효율 검증**

[0098] 도 7 내지 8b는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 포획능에 대한 결과를 도시한 것이다.

[0099] 먼저, 도 7을 참조하면, 핵산 추출 튜브의 포획 효율 측정을 위한 과정이 도시된다. 보다 구체적으로, 도 7의 (a)를 참조하면, 먼저 1 ng/μl의 농도를 가진 시료를 일반 튜브 및 핵산 추출 튜브 각각에 약 1시간 동안 방치한 뒤, 각각의 튜브 내의 시료가 용해되고 남은 용액 즉, 회수액(560)에 대한 PCR을 진행하였다.

[0100] 또한, 도 7의 (b)를 참조하면, 회수액(560)이 제거된 각각의 튜브를 세척 완충액(540)으로 세척한 뒤, 각각의 튜브 상에 포획된 핵산(512)을 PCR 혼합제(550) 내에 침지시켜, PCR을 진행하였다.

[0101] 이에, 도 8a를 참조하면, 상기 과정에 의한 PCR 결과가 도시된다. 먼저, 회수액 내의 핵산에 대한 포획 효율은

핵산 추출 튜브에서 초기 농도 대비 54.5 % 로 일반 튜브의 초기 농도 대비 3.17 %보다 높은 것으로 나타난다. 나아가, 튜브 상에 포획된 핵산에 대한 포획 효율은 핵산 추출 튜브에서 42.9 % 이며, 일반 튜브에서는 핵산에 대한 포획 효율이 나타나지 않았다. 이는, 핵산 추출 튜브가 일반 튜브에 비하여 높은 포집 효율을 갖는 것을 의미한다. 따라서, 핵산 추출 튜브는 원심 분리 및 다른 과정 없이 인큐베이팅만으로도 높은 핵산에 대한 포획력을 가짐으로써, 간편하게 PCR 전처리를 수행할 수 있다.

[0102] 나아가, 도 8b를 참조하면, PCR 증폭 효율에 대한 결과가 도시된다. 이때, PCR 증폭 효율은 회수액 내의 핵산에 대한 포획 효율에 대한 튜브 상에 포획된 핵산에 대한 포획 효율, 즉, 검출력을 의미할 수 있으며, 아래의 수학식 1에 의하여 산출되었다.

[0103] [수학식 1]

[0104] PCR efficiency (%) = captured DNA / recovered DNA * 100

[0105] PCR 증폭 효율은 핵산 추출 튜브에서 78.9 % 로 일반 튜브의 3.06 % 보다 높은 것으로 나타난다. 이는, 핵산 추출 튜브는 일반 튜브에 비하여 높은 PCR 증폭 효율을 갖는 것을 의미한다. 따라서, 핵산 추출 튜브의 검출력은 일반 튜브에 비하여 10 내지 30배 높을 수 있으며, 바람직하게는 26배 높을 수 있다.

[0106] 이상의 실시예 2의 결과로, 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브는, 핵산 이외의 성분을 제거하기 위한 부가 단계인 원심 분리, 세정, 세척 및 용해물 정제 등을 거치지 않고, 인-시튜로 핵산을 추출할 수 있으므로, 누구나 손쉽게 유전학적 분석이 가능하도록 제공될 수 있다.

[0107] **실시예 3: 박테리아 세포 수에 따른 민감도 측정**

[0108] 도 9a 내지 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 튜브의 검출 한계에 대한 결과를 도시한 것이다. 이때, 검출 한계에 이용되는 시료는 식품성 매개 병원성 박테리아로서 E. Coli 0157:H7가 사용되었다.

[0109] 도 9a의 (a)를 참조하면, 박테리아 세포 수에 따른 핵산 추출 튜브 상에 출된 핵산의 형광 증폭 곡선이 도시된다. 보다 구체적으로, $1 * 10^1$ 내지 $1 * 10^6$ 범위의 박테리아 세포 수 모두에서 형광 발현이 나타났다. 나아가, 도 9a의 (b)를 참조하면, 이를 바탕으로 산출된 CT 값 결과를 도시한 것이다. $1 * 10^6$ 박테리아 세포 수를 가진 실험군에서 가장 낮은 CT 값을 나타냈으며, 대조군에서는 CT 값이 나타나지 않았지만, $1 * 10^1$ 박테리아 세포 수를 가진 실험군에서 CT 값을 나타냄에 따라, 검출이 유효한 것으로 나타난다.

[0110] 또한, 도 9b의 (a)를 참조하면, 박테리아 세포 수에 따른 핵산 추출 튜브 상에 증폭된 핵산의 형광 밴드 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, $1 * 10^3$ 내지 $1 * 10^6$ 범위 모두에서 형광 밴드가 나타났다. 나아가, 도 9b의 (b)를 참조하면, 박테리아 세포 수에 따른 표준 곡선이 도시된다. 보다 구체적으로, $1 * 10^3$ 내지 $1 * 10^6$ 범위에서의 상관 계수(correlation coefficient, $R^2$)값은 0.993로 표준 곡선과 매우 대응되는 결과를 나타낸다. 또한, $1 * 10^3$ 내지 $1 * 10^6$ 범위에서의 직선 기울기는 -3.89으로 100 %의 반응 효율 및 PCR 효율을 의미하는 -3.32 대비 약 80 %의 효율을 갖는 것으로 나타난다. 따라서, 핵산 추출 튜브는 $1 * 10^3$까지의 박테리아 세포 수에 대하여 약 80 %의 반응 효율 및 PCR 효율을 갖는 것으로 의미할 수 있다

[0111] 이상의 실시예 3의 결과에 따라, 핵산 추출 튜브는 가장 낮은 박테리아 수인 $1 * 10^1$까지 검출할 수 있으므로, $1 * 10^1$까지의 검출 한계를 가질 수 있으며, 보다 바람직하게는, $1 * 10^3$ 까지의 검출 한계를 가질 수 있다. 이에, 핵산 추출 튜브는 저 농도로 존재하는 시료까지 80 % 이상의 높은 효율로 핵산을 추출할 수 있는 효과가 있다.

[0112] 이에, 양이온성 고분자 물질로 이루어진 양전하층을 포함하는 본 발명의 핵산 추출 튜브는, 누구나 손쉽게 반복성 및 재현성 있는 유전자 진단을 할 수 있으며, 원심 분리 및 추가적인 장비에 구애를 받지 않음으로서 현장 진료 테스트 분야에서도 적용될 수 있다.

[0113] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시 예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시 예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서

기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

*부호의 설명*

[0114] 100 : 핵산 추출 튜브

110 : 바디부

120 : 캡

130 : 내벽부

140 : 양전하층

141 : 측쇄 말단에 양전하의 질소

150 : 연결부

160 : 핵산 추출 튜브의 내부

200 : 스트립 튜브

300 : 플레이트 튜브

510 : 핵산을 포함하는 시료

511 : 핵산

512 : 포획된 핵산

520 : 용해 완충액

530 : 용해액

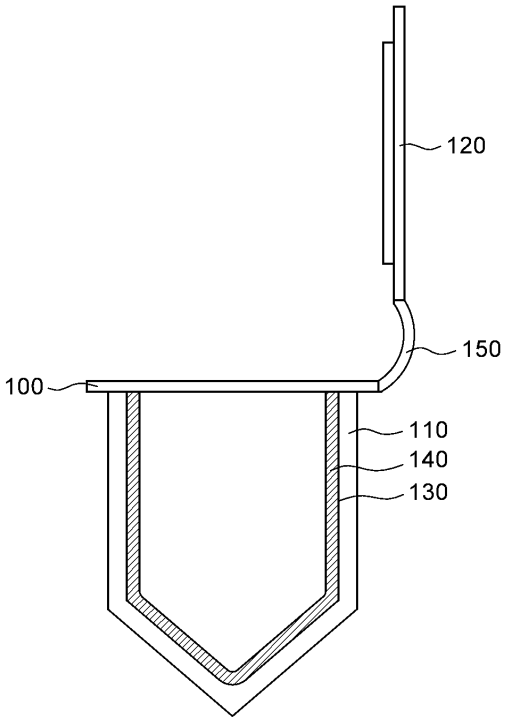
540 : 세척 완충액

550 : PCR 혼합제

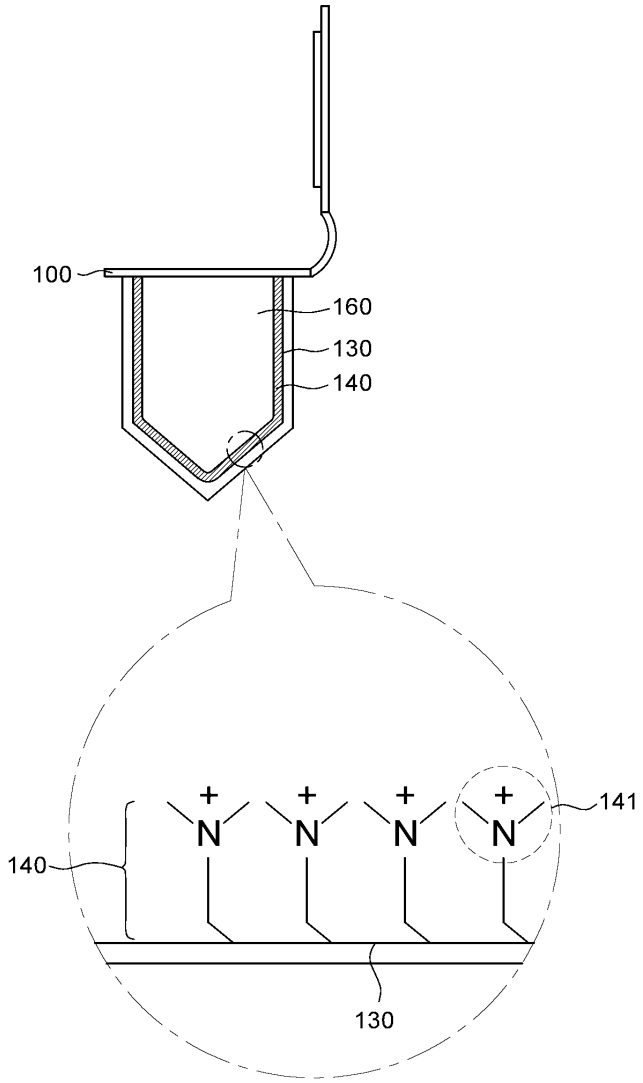
560 : 회수액

도면

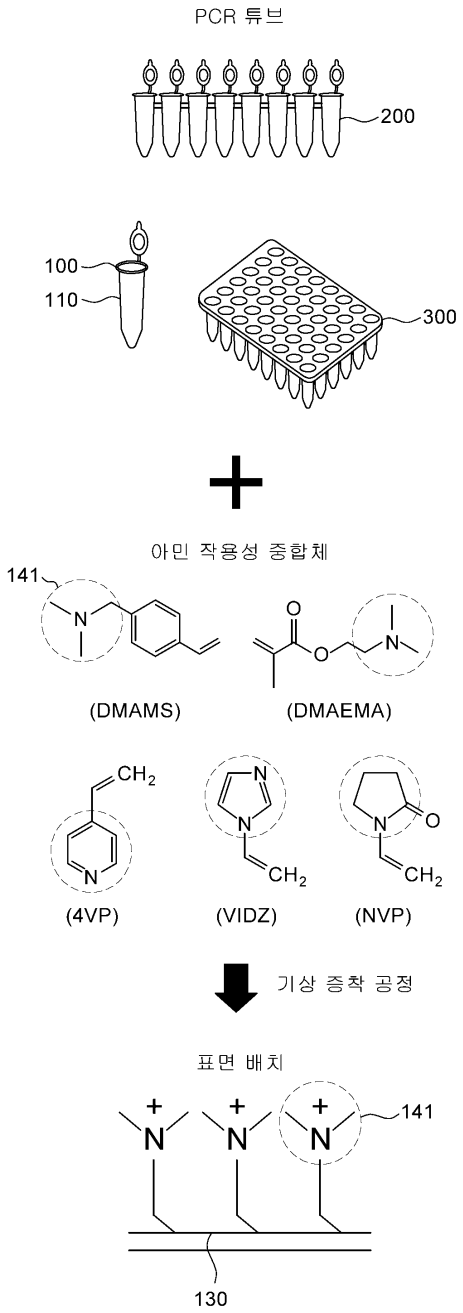
도면1



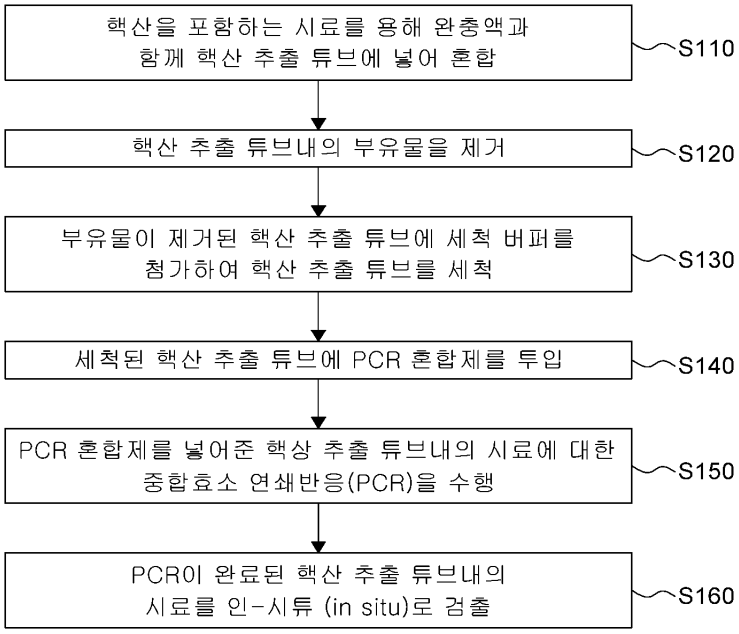
도면2



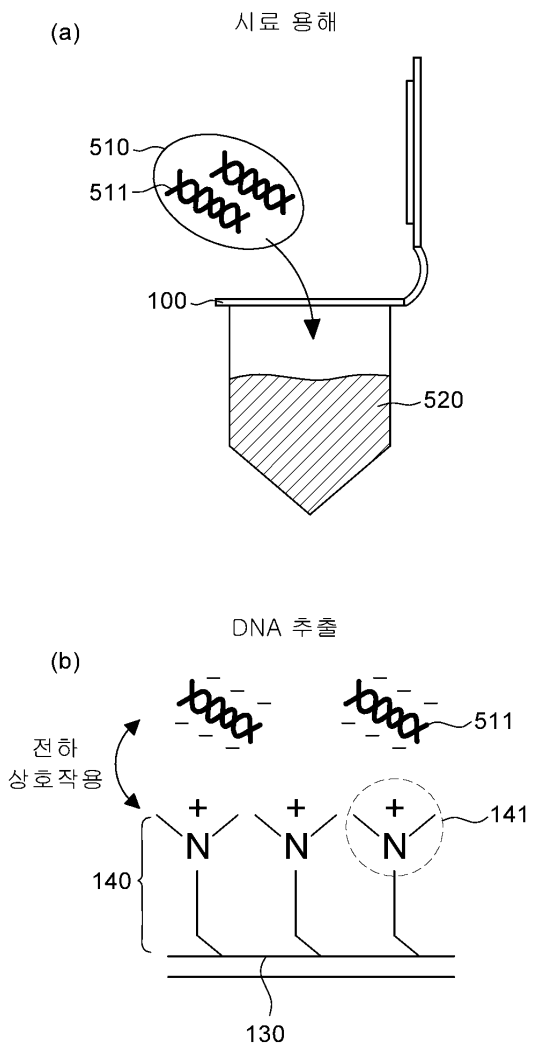
도면3


PCR 튜브
200
100
110
300
아민 작용성 중합체
141
(DMAMS)
(DMAEMA)
(4VP)
(VIDZ)
(NVP)
기상 증착 공정
표면 배치
141
130

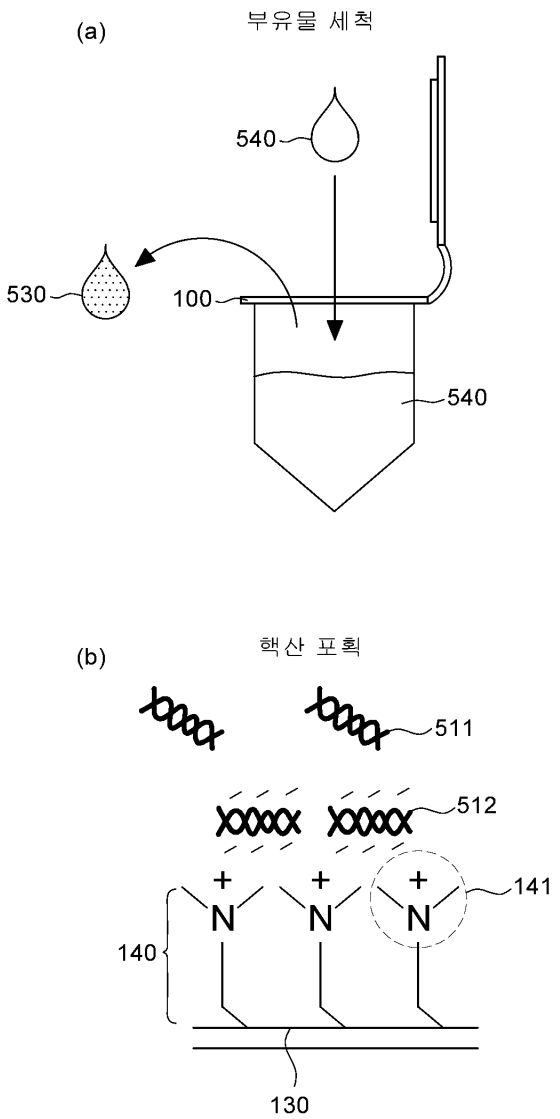
도면4


핵산을 포함하는 시료를 용해 완충액과 함께 핵산 추출 튜브에 넣어 혼합
S110
핵산 추출 튜브내의 부유물을 제거
S120
부유물이 제거된 핵산 추출 튜브에 세척 버퍼를 첨가하여 핵산 추출 튜브를 세척
S130
세척된 핵산 추출 튜브에 PCR 혼합제를 투입
S140
PCR 혼합제를 넣어준 핵상 추출 튜브내의 시료에 대한 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행
S150
PCR이 완료된 핵산 추출 튜브내의 시료를 인-시튜 (in situ)로 검출
S160

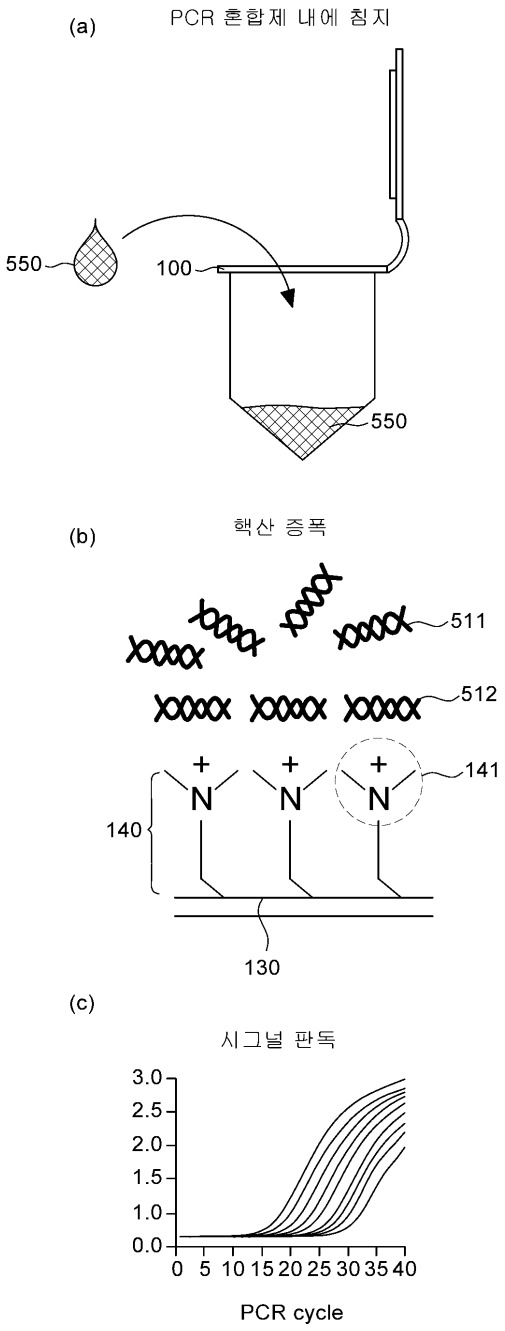
도면5a



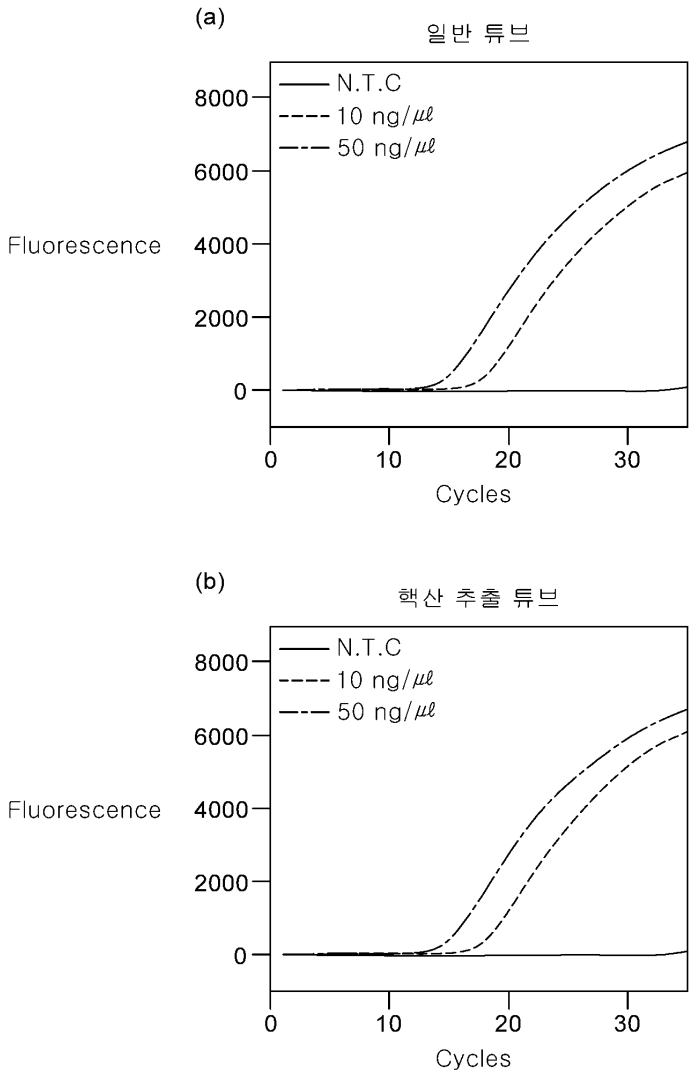
도면5b



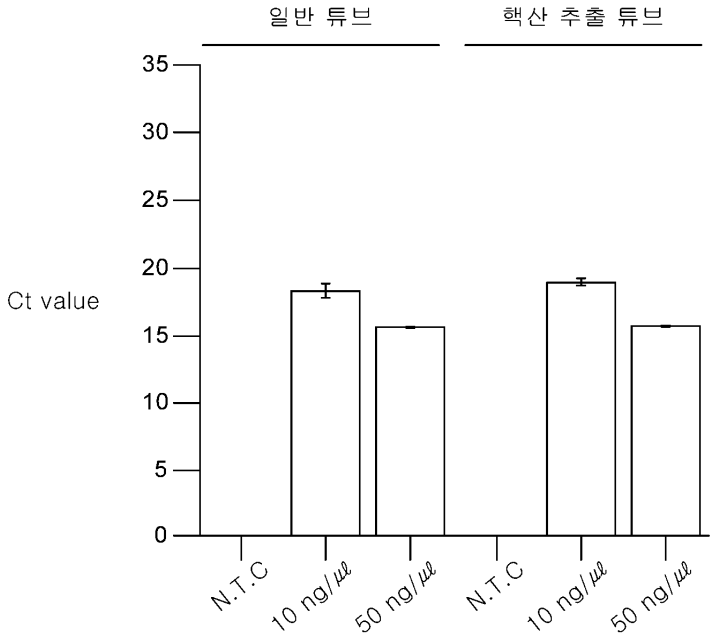
도면5c


(a)
PCR 혼합제 내에 침지
550
100
550
(b)
핵산 증폭
511
512
141
140
130
(c)
시그널 판독
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
PCR cycle

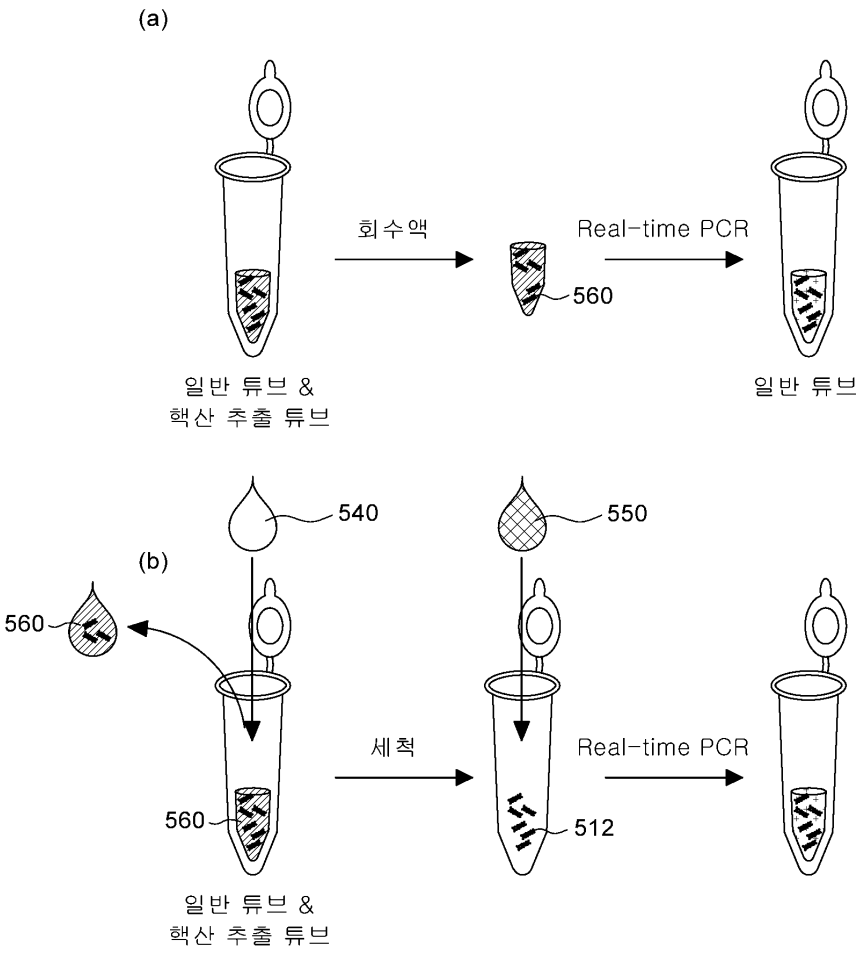
도면6a


(a)
일반 튜브
N.T.C
10 ng/㎕
50 ng/㎕
Fluorescence
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
Cycles
(b)
핵산 추출 튜브
N.T.C
10 ng/㎕
50 ng/㎕
Fluorescence
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
Cycles

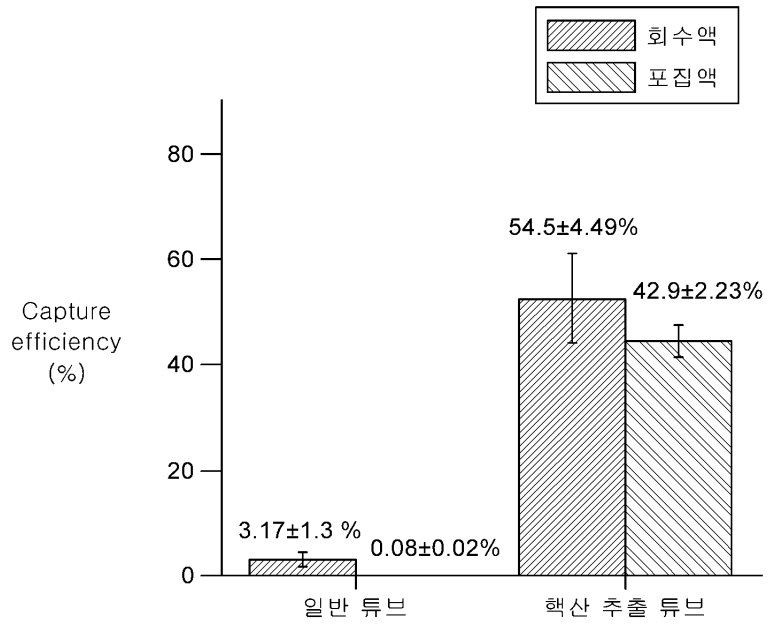
도면6b


일반 튜브
핵산 추출 튜브
Ct value
35
30
25
20
15
10
5
0
N.T.C
10 ng/㎕
50 ng/㎕
N.T.C
10 ng/㎕
50 ng/㎕

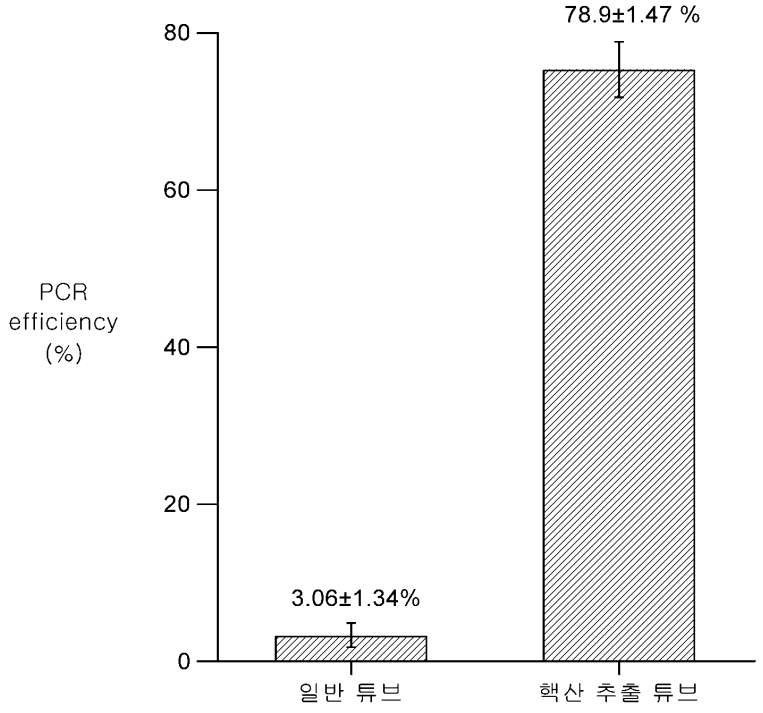
도면7


(a)
회수액
Real-time PCR
560
일반 튜브 &
핵산 추출 튜브
일반 튜브
540
550
(b)
560
세척
Real-time PCR
560
512
일반 튜브 &
핵산 추출 튜브

도면8a

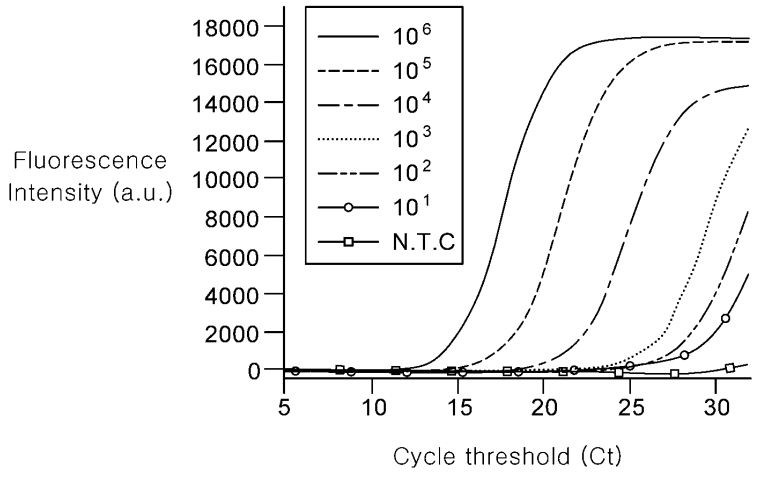

회수액
포집액
Capture efficiency (%)
80
60
40
20
0
54.5±4.49%
42.9±2.23%
3.17±1.3 %
0.08±0.02%
일반 튜브
핵산 추출 튜브

도면8b

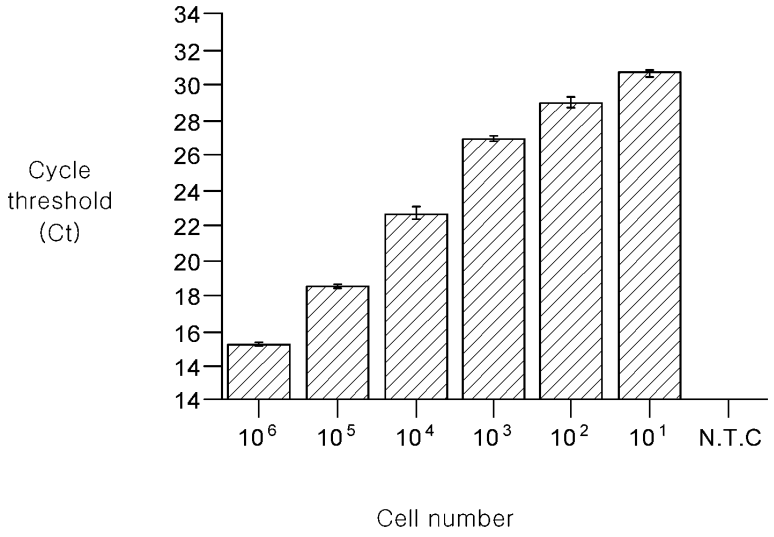

PCR efficiency (%)
80
60
40
20
0
78.9±1.47 %
3.06±1.34%
일반 튜브
핵산 추출 튜브

도면9a

(a)

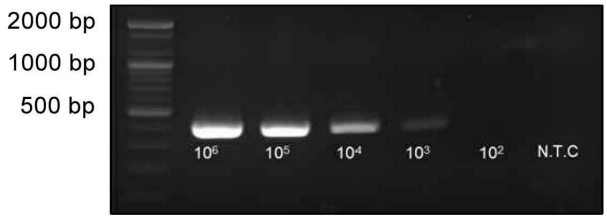

Fluorescence Intensity (a.u.)
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
5
10
15
20
25
30
Cycle threshold (Ct)
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
N.T.C

(b)

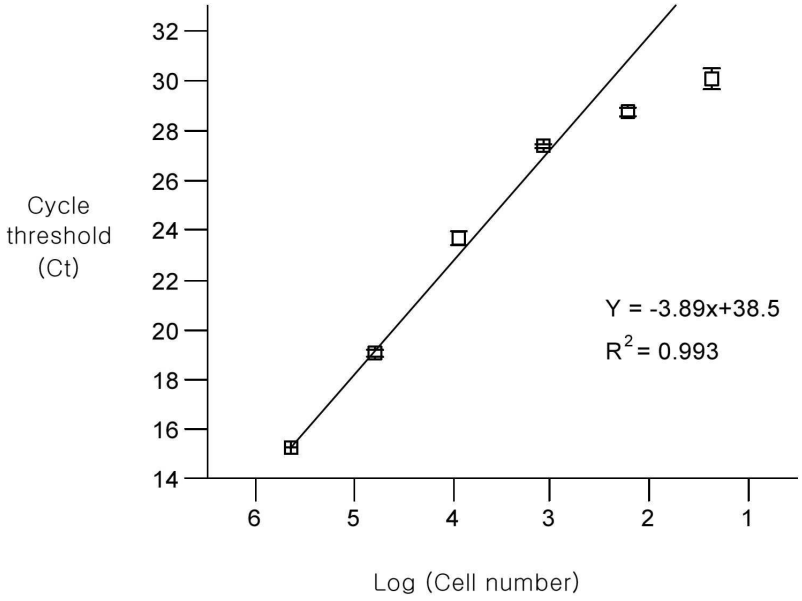

Cycle threshold (Ct)
34
32
30
28
26
24
22
20
18
16
14
14
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
N.T.C
Cell number

도면9b

(a)


2000 bp
1000 bp
500 bp
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
N.T.C

(b)


Cycle threshold (Ct)
32
30
28
26
24
22
20
18
16
14
6
5
4
3
2
1
Log (Cell number)
Y = -3.89x+38.5
R² = 0.993