

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 7월 18일 (18.07.2024)



WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/150939 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

B01L 3/00 (2006.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/020425

(22) 국제출원일:

2023년 12월 12일 (12.12.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0005511 2023년 1월 13일 (13.01.2023) KR

(71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 임성갑 (LIM, Sung Gap); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 김성은 (KIM, Seonge-un); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 박나현 (PARK, Nahyun); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 정부석 (JEONG, Booseok); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 송윤성 (SONG, Younseong); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 이경균

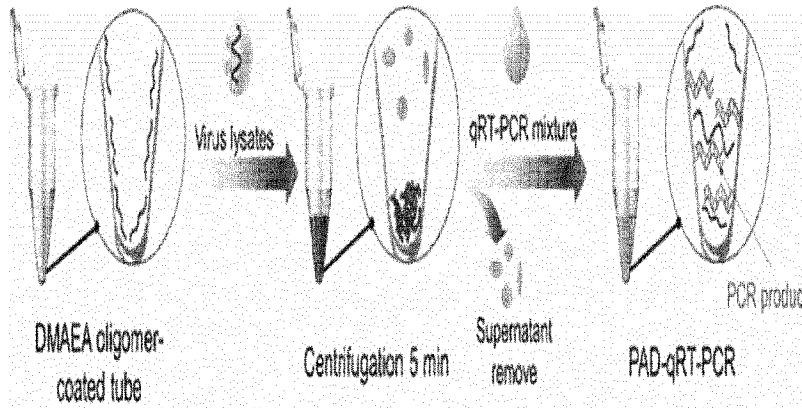
(LEE, Kyoung Gun); 34140 대전광역시 유성구 어은로 57, 127동 604호, Daejeon (KR). 박유민 (PARK, Yu Min); 28330 충청북도 청주시 청원구 울봉로159번길 10, 304동 802호, Chungcheongbuk-do (KR). 조다애 (JO, Da Ae); 39179 경상북도 구미시 홍안로 46, 109동 301호, Gyeongsangbuk-do (KR). 강태준 (KANG, Tae Joon); 34140 대전광역시 유성구 어은로 57, 132동 806호, Daejeon (KR). 송자연 (SONG, Ja Yeon); 34140 대전광역시 유성구 어은로 57, 137동 1005호, Daejeon (KR). 장효원 (JANG, Hyo Won); 35233 대전광역시 서구 대덕대로 246, A동 1208호, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 박영우 (PARK, Young-Woo); 06224 서울특별시 강남구 논현로 414, 세일빌딩 5-6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: NUCLEIC ACID EXTRACTION VESSEL PROVIDED WITH POSITIVELY CHARGED POLYMER THIN FILM, AND SINGLE-POT NUCLEIC ACID DETECTION METHOD USING CHARGE TRANSFER POLYPLEX

(54) 발명의 명칭: 양전하 중합체 박막을 갖는 핵산 추출용 용기 및 전하 이동 폴리플렉스를 활용한 단일 포트 핵산 검출 방법



(57) Abstract: A nucleic acid detection method comprises the steps of: inputting a sample containing nucleic acids into a vessel coated with a thin film comprising a cationic polymer having a hydrolyzable side chain; forming a polymer-nucleic acid complex by binding the nucleic acids to the cationic polymer which has been dissolved from the thin film; releasing the nucleic acids from the polymer-nucleic acid complex by hydrolyzing the cationic polymer; and amplifying the nucleic acids or other nucleic acids synthesized from said nucleic acids. The nucleic acid detection method may be carried out in a single pot, may reduce the detection time, and may improve detection accuracy.

(57) 요약서: 핵산 검출 방법은, 가수분해 가능한 측쇄를 갖는 양이온성 중합체를 포함하는 박막이 코팅된 용기 내에 핵산을 포함하는 시료를 투입하는 단계, 상기 박막으로부터 용해된 양이온성 중합체와 상기 핵산을 결합시켜 중합체-핵산 복합체를 형성하는 단계, 상기 양이온성 중합체를 가수분해하여 상기 중합체-핵산 복합체로부터 상기 핵산을 방출하는 단계 및 상기 핵산 또는 상기 핵산으로부터 합성된 다른 핵산을 증폭하는 단계를 포함한다. 상기 핵산 검출 방법은 단일 포트에서 수행이 가능하며, 검출 시간을 단축시킬 수 있고, 검출 정확도를 향상시킬 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2024/150939 A1

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 양전하 중합체 박막을 갖는 핵산 추출용 용기 및 전하 이동 폴리플렉스를 활용한 단일 포트 핵산 검출 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 핵산 추출에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 양전하 중합체 박막을 갖는 핵산 추출용 용기 및 전하 이동 폴리플렉스를 활용한 단일 포트 핵산 검출 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 높은 전염성과 독성을 가진 전염병의 확산으로 인해 세계 건강과 경제가 위협받고 있다. 이에 따라, 전염병 확산을 막고 피해를 줄이기 위해 질병을 빠르고 정확하게 진단하는 기술에 대한 수요가 급증하였다. 바이러스로 인해 일어나는 질병의 경우, 돌연변이가 자주 일어나는 바이러스의 특성으로 인해 변종이 많이 생기므로, 빠른 진단이 더욱 필수적인 요소이다. 현재 진단방법으로는 Reverse transcription quantitative PCR(RT-qPCR)이 자주 사용되는데 코로나 바이러스 뿐만 아니라 다양한 병원체 유전자를 증폭할 수 있어 다양한 질병 진단이 가능하다.
- [3] 분자 진단 과정은 샘플 채취, 유전자 추출, 유전자 증폭 및 검출 과정으로 구성된다. 특히 유전자 추출 과정은 복잡하여(바이러스 용해, 고상 매트릭스로 바이러스 유전자 포집, 세척 및 유전자 방출), 시간 및 시약이 많이 소모된다. 유전자 추출 과정에서 중요한 단계는 유전자 포집 및 방출(용출)이다. 정확하고 신속한 진단을 위해서는 증폭 단계 전에 높은 효율로 유전자를 포집하고 방출하는 것이 필요하다. 현재 알려진 실리카, 자성비드 등을 이용한 유전자 포집 방법은 비교적 높은 포집 효율을 달성할 수 있으나, 용출 효율이 낮다. 유전자의 용출 효율을 높이기 위한 방법으로, 수소 결합 억제 시약(chaotropic reagents)를 사용하거나 pH 또는 온도를 높이는 전략이 사용되고 있으나, 이러한 방법들은 후속 증폭 과정의 효율에 악영향을 미칠 수 있으며 호환성이 낮다.

[4] [선행기술문헌]

[5] [특허문헌]

[6] (1) 대한민국특허공개 10-2020-0092691호

[7] [비특허문헌]

[8] (1) Song, Younseong, et al. "All-in-One DNA Extraction Tube for Facilitated Real-Time Detection of Infectious Pathogens." Advanced Healthcare Materials 10.14 (2021): 2100430.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 일 과제는, 높은 효율로 핵산(DNA 또는 RNA)을 포집 및 방출 가능한 중합체 박막을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 과제는 상기 중합체 박막을 이용한 핵산 추출 방법을 제공하는 것이다.
- [11] 다만, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 상기 언급된 과제에 한정되는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위에서 다양하게 확장될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 상술한 본 발명의 일 과제를 달성하기 위한 본 발명의 예시적인 실시예들에 따른 핵산 추출 용기는, 시료를 수용하는 몸체 및 상기 몸체의 내면에 코팅된 중합체 박막을 포함한다. 상기 중합체 박막은, 가수분해 가능한 측쇄를 갖는 양이온성 중합체를 포함하며, 표면 전위가 1mV 내지 50mV이고, 상기 양이온성 중합체의 가수분해효율은 50°C에서 1시간 반응시 30%이상이다.
- [13] 일 실시예에 따르면, 상기 가수분해 가능한 측쇄는 가수분해성 양이온성 에스터(hydrolytic cationic ester)를 포함한다.
- [14] 일 실시예에 따르면, 상기 양이온성 중합체는, 2-(디메틸아미노)에틸 아크릴레이트(DMAEA), 2-(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트(DMAEMA) 및 2-(디에틸아미노)에틸 메타크릴레이트(DEAEMA) 중 적어도 하나를 포함하는 단량체로부터 중합된 반복단위를 포함한다.
- [15] 일 실시예에 따르면, 상기 양이온성 중합체는 DMAEA로부터 중합된 반복단위를 포함한다.
- [16] 일 실시예에 따르면, 상기 양이온성 중합체는 선형 중합체이다.
- [17] 일 실시예에 따르면, 상기 양이온성 중합체의 수평균분자량은 1,000g/mol 내지 3,000g/mol이다.
- [18] 일 실시예에 따른 핵산 추출 용기는, 수용 공간을 갖는 몸체 및 상기 수용 공간에 접하도록 상기 몸체에 코팅된 중합체 박막을 포함한다. 상기 중합체 박막은, 가수분해성 양이온성 에스터를 포함하는 측쇄를 가지며 수평균분자량은 1,000g/mol 내지 3,000g/mol인 양이온성 중합체를 포함한다.
- [19] 본 발명의 예시적인 실시예들에 따른 핵산 검출 방법은, 가수분해 가능한 측쇄를 갖는 양이온성 중합체를 포함하는 박막이 코팅된 용기 내에 핵산을 포함하는 시료를 투입하는 단계, 상기 박막으로부터 용해된 양이온성 중합체와 상기 핵산을 결합시켜 중합체-핵산 복합체를 형성하는 단계, 상기 양이온성 중합체를 가수분해하여 상기 중합체-핵산 복합체로부터 상기 핵산을 방출하는 단계 및 상기 핵산 또는 상기 핵산으로부터 합성된 다른 핵산을 증폭하는 단계를 포함한다.
- [20] 일 실시예에 따르면, 상기 핵산을 방출하기 위한 가수분해는 30°C 내지 60°C에서 수행된다.
- [21] 일 실시예에 따르면, 상기 핵산은 RNA를 포함한다.

- [22] 일 실시예에 따르면, 역전사 반응을 통해 상기 RNA의 상보적 DNA(cDNA)를 합성하는 단계를 더 포함하고, 상기 핵산을 증폭하는 단계는 상기 cDNA를 증폭한다.
- [23] 일 실시예에 따르면, 상기 핵산의 방출은 상기 cDNA를 합성하는 단계에서 수행된다.
- [24] 일 실시예에 따르면, 상기 양이온성 중합체는 DMAEA로부터 중합된 반복단위를 포함하며, 상기 양이온성 중합체의 수평균분자량은 1,000g/mol 내지 3,000g/mol이다.
- [25] 일 실시예에 따르면, 상기 중합체-핵산 복합체를 형성하는 단계, 상기 핵산을 방출하는 단계 및 상기 핵산을 증폭하는 단계는 동일한 용기 내에서 수행된다.

발명의 효과

- [26] 상술한 바와 같이 본 발명의 예시적인 실시예들에 따르면, 핵산 추출 용기는 양이온성 중합체의 박막을 가지며, 용해된 양이온성 중합체를 이용하여 3차원적으로 핵산을 포집함으로써, 중합체-핵산 간 상호작용을 위한 영역을 확장할 수 있다. 따라서, 핵산 포집 속도 및 효율을 향상시킬 수 있다.
- [27] 또한, 상기 중합체의 자기축매화 가수분해를 이용하여 발생된 중합체-핵산 간의 정전기적 척력에 의해 핵산을 방출할 수 있다. 따라서, 증폭 단계에 영향을 줄 수 있는 조건의 변화 (pH 10, 95도 또는 chaotropic reagent 첨가 등) 없이, 종래의 핵산 방출 방법보다 낮은 온도에서 더 많은 핵산을 방출할 수 있다.
- [28] 또한, 상기 중합체는 핵산 추출 단계에 이어지는 증폭 단계에서 안정성을 갖는다.
- [29] 이를 통해, 단일 용기에서 핵산 추출 및 증폭을 모두 수행하는 단일 포트 핵산 검출 방법을 구현할 수 있다.
- [30] 또한, 상기 용기를 이용한 핵산 검출 방법은, 빠른 시간에 핵산을 포집함으로써, qRT-PCR 등과 같은 핵산 검출 방법의 검출 시간을 단축시킬 수 있다.
- [31] 또한, 상기 용기를 이용한 핵산 검출 방법은, 높은 핵산 추출 효율로 검사의 정확도를 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 중합체 박막을 포함하는 핵산 추출용 용기의 측면도이다.
- [33] 도 2a, 2b, 2c 및 2d는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 용기를 이용한 핵산 추출 방법을 설명하기 위한 모식도들이다.
- [34] 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 검출 방법을 설명하기 위한 순서도이다. 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 검출 방법을 설명하기 위한 모식도이다.
- [35] 도 4는 합성에 1의 DMAEA 중합체(pDMAEA)와 단량체(DMAEA)의 FTIR(Fourier transform infrared) 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

- [36] 도 5는 합성에 1의 DMAEA 중합체의 분자량을 GPC(Gel permeation chromatography) 분석 결과를 보여주는 그래프이다.
- [37] 도 6은 합성에 1의 DMAEA 중합체를 pH 8.0, 25°C 및 50°C에서 가수분해를 진행하여 시간에 따른(5분 간격) 가수분해효율(%)을 도시한 그래프이다.
- [38] 도 7은 합성에 1의 DMAEA 중합체의 가수분해 진행 전과 후의 zeta-potential 을 보여주는 그래프이다.
- [39] 도 8은 합성에 1의 DMAEA 중합체와 RNA의 비율(N(nitrogen)/P(phosphate) ratio)에 따른 zeta-potential을 보여주는 그래프이다.
- [40] 도 9는 합성에 1의 DMAEA 중합체와 RNA의 비율(N(nitrogen)/P(phosphate) ratio)에 따른 average hydrodynamic diameter(Z-average)를 보여주는 그래프이다.
- [41] 도 10은 합성에 1의 DMAEA 중합체가 코팅된 튜브를 이용한 핵산 포집 실험에서 포집 효율, 포집 양, 회수율 및 추출율을 도시한 그래프들이다.
- [42] 도 11은 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)을 이용한 H1N1의 검출 결과를 보여준다.
- [43] 도 12는 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)을 이용하여 임상 샘플(인플루엔자 바이러스)을 분석한 결과를 보여준다.
- [44] 도 13은 SARS-CoV-2의 모식도 및 검출 실험 결과를 보여준다.
- [45] 도 14는 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR) 및 종래의 검출 방법(pRT=PCR)을 이용하여 임상 샘플(SARS-CoV-2)을 분석한 결과를 보여준다.
- [46] 도 15는 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)을 이용하여 임상 샘플(SARS-CoV-2 변이)을 분석한 결과를 보여준다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

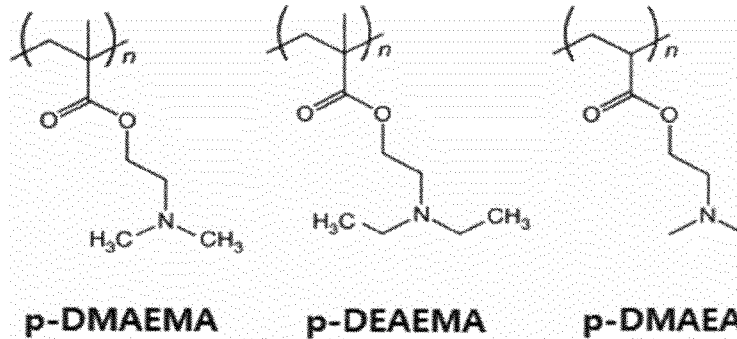
- [47] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들에 따른 핵산 추출 용기 및 이를 이용한 단일 포트 핵산 추출 방법에 대하여 상세히 설명한다. 본 발명은 다양한 변형을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 예시하고 본문에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변형, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 첨부된 도면에 있어서, 구조물들의 치수는 본 발명의 명확성을 기하기 위하여 실제보다 확대하여 도시한 것이다.
- [48] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

- [49] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [50] 핵산 추출용 용기 및 핵산 추출 방법
- [51] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 중합체 박막을 포함하는 핵산 추출용 용기의 측면도이다.
- [52] 도 1을 참조하면, 상기 핵산 추출용 용기(100)는 일 측이 개구된 튜브 형상을 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산 추출용 용기(100)는 시료를 수용하며 튜브 형상을 갖는 몸체(110) 및 캡(130)을 포함할 수 있다. 상기 캡(130)은 상부의 개구를 닫아 용기를 밀봉할 수 있다.
- [53] 본 발명의 실시예들에 따른 핵산 추출용 용기는 캡을 갖는 튜브에 한정되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 실시예들에 따른 핵산 추출용 용기는 캡이 없는 튜브 형태를 갖거나, 웰 플레이트 등과 같이 시료를 수용할 수 있는 다양한 형태를 가질 수 있다.
- [54] 일 실시예에 따르면, 상기 몸체(110)의 표면에는 중합체 박막이 코팅된다. 따라서, 상기 몸체(110)는 상기 중합체 박막을 지지하는 기판 역할을 할 수 있다. 예를 들어, 상기 중합체 박막은 상기 몸체(110)의 내면 상에 코팅될 수 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 중합체 박막은 상기 몸체(110)의 내면을 전체적으로 커버할 수 있다. 그러나, 본 발명의 실시예들은 이에 한정되지 않으며, 상기 중합체 박막은 상기 몸체(110)의 내면의 일부, 예를 들어, 바닥면 상에 배치될 수도 있다.
- [55] 예를 들어, 상기 몸체(110)는 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리에틸렌(polyethylene, PE), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride, PVC), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리에스터(polyester), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리에틸렌테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 폴리우레탄(polyurethane, PU), 실리콘, 유리, 퀴츠, 세라믹, 테플론 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [56] 상기 중합체 박막은, 중합체를 포함한다. 상기 중합체는, 올리고머 및/또는 올리고머보다 큰 분자량을 갖는 고분자를 포함하는 것으로 정의될 수 있다. 상기 중합체는 동일한 반복단위를 갖는 호모중합체이거나, 서로 다른 둘 이상의 반복단위를 갖는 공중합체일 수 있다.
- [57] 상기 중합체 박막은 양이온성 중합체를 포함하며, 표면이 양전위를 갖는다. 예를 들어, 상기 중합체 박막의 표면 전위는 1mV 내지 50mV일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게 10mV 이상, 예를 들어, 10mV 내지 40mV일 수 있다.

- [58] 예를 들어, 상기 중합체는, 측쇄에 양전하의 질소를 갖는 반복단위를 포함할 수 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 중합체는 측쇄 말단에 3차 아민을 갖는 반복단위를 적어도 포함할 수 있다.
- [59] 상기 중합체 박막은 가수 분해 가능한 중합체를 포함한다. 예를 들어, 상기 중합체는 가수 분해 가능한 측쇄를 가질 수 있다. 상기 중합체의 가수분해효율(%)은, 중합체 전체의 반복단위에 대하여 가수분해된 반복단위의 비율로 정의될 수 있으며, 50°C에서 1시간 반응시 30%이상일 수 있다. 상기 가수분해효율이 높을수록, 상기 중합체의 핵산 방출 효율이 증가할 수 있으며, 가수분해 시간이 짧을수록 핵산 추출에 소요되는 시간을 감소시킬 수 있다. 바람직하게, 상기 중합체의 가수분해효율은 50°C에서 30분 반응시 30% 내지 100%일 수 있으며, 보다 바람직하게, 50°C에서 5분 반응시 30%이상일 수 있다. 예를 들어, 상기 가수분해효율은 약 pH 8에서 측정된 것일 수 있다. 상기 pH 조건은 가수분해효율 측정을 위한 일 기준을 제공하기 위한 것이며, 이에 의해 본 발명의 수행 조건이 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 중합체는 다양한 pH 범위에서 가수분해 가능하다.
- [60] 상기 중합체의 가수분해효율은, 중합체의 구조, 중합체의 분자량, 측쇄의 화학적 성질, 측쇄에 의한 입체 장애 등에 따라 달라질 수 있다.
- [61] 일 실시예에 따르면, 상기 중합체는 선형의 중합체일 수 있다. 선형의 중합체는 용해도가 높고 가수 분해 가능한 측쇄가 많으므로, 핵산의 포집-방출 효율을 높일 수 있다. 다른 실시예에 따르면, 상기 중합체는 분지 구조 또는 가교된 구조를 가질 수도 있다. 상기 중합체가 분지 구조를 또는 가교된 구조를 갖는 경우, 분자량이 증가하고 원심분리 단계에서 침전 속도가 증가하여 전체 핵산 추출 시간을 감소시킬 수 있다.
- [62] 예를 들어, 상기 중합체의 수평균 분자량은 1,000 내지 3,000일 수 있다. 상기 중합체의 분자량이 과도하게 작은 경우, 상기 중합체가 핵산과 결합하여 형성된 복합체(폴리플렉스, polyplex)의 크기가 너무 작아서 분리 및 정제가 어려울 수 있다. 또한, 상기 중합체의 분자량이 과도하게 큰 경우, 용해도가 증가하고 가수분해효율이 감소하여 핵산의 포집-방출 효율이 감소할 수 있다. 상기 중합체가 분지 구조 또는 가교된 구조를 갖는 경우, 선형의 중합체보다 큰 분자량을 가질 수 있다. 예를 들어, 선형 중합체의 수평균 분자량은 1,000 내지 2,000일 수 있으며, 분지 구조 또는 가교된 구조를 갖는 중합체의 수평균 분자량은 1,500 내지 3,000일 수 있다. 그러나, 본 발명의 실시예들은 이에 한정되지 않으며, 적정 가수분해효율을 달성 가능한 범위에서 다양한 범위의 분자량을 가질 수 있다.
- [63] 일 실시예에 따르면, 상기 중합체는 가수분해성 양이온성 에스터(hydrolytic cationic ester)기를 측쇄로 포함할 수 있다. 상기 가수분해성 양이온성 에스터기는 양이온성기(예를 들어, 디알킬아미노기)와 에스터 카르보닐기의 분자내 상호작용에 의한 자기 촉매 가수분해(self-catalyzed hydrolysis)가 가능하다.
- [64] 예를 들어, 상기 중합체는 폴리[2-(디메틸아미노)에틸 아크릴레이트](poly[2-(dimethylamino)ethyl acrylate], p-DMAEA), 폴리[2-(디메틸아미노)에틸 메타크

릴레이트)(poly[2-(dimethylamino)-ethyl methacrylate], p-DMAEMA), 폴리[2-(디에틸아미노)에틸 메타크릴레이트(poly[2-(diethylamino)ethyl methacrylate], p-DEAEMA) 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 중합체는 아래의 반복단위를 포함할 수 있다.

[65]



[66] 일 실시예에 따르면, 가수분해효율 면에서, 상기 중합체는 p-DMAEA를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. p-DMAEA의 3차 아민기(디알킬아미노기)는 상대적으로 작은 크기의 알킬기를 가지며, 주쇄에 결합된 메틸기에 의한 입체 장애가 없어 에스터 카르보닐기와의 상호 작용이 용이할 수 있다.

[67] 예를 들어, 상기 중합체가 공중합체인 경우, 가수분해성 양이온성 에스터를 측쇄로 갖는 제1 단량체 및 제1 단량체와 다른 제2 단량체의 공중합으로 얻어질 수 있다.

[68] 예를 들어, 상기 제1 단량체는 DMAEA, DMAEMA, DEAEMA 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[69] 상기 제2 단량체는, 친핵체 단량체, 가교결합성 단량체 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 친핵체 단량체는 비닐기, 아크릴기 또는 메타크릴기와 3차 아민기를 포함할 수 있다. 상기 가교결합성 단량체는, 비닐기, 아크릴기 또는 메타크릴기를 적어도 둘 이상 포함하거나, 비닐기, 아크릴기 또는 메타크릴기와 알킬 할라이드기를 포함할 수 있다.

[70] 예를 들어, 상기 제2 단량체는 4-비닐피리딘(4-vinylpyridine, 4VP), 비닐이미다졸(vinylimidazole, VIDZ), 디메틸아미노메틸스티렌(dimethylaminomethylstyrene, DMAMS), 비닐벤질클로라이드(vinylbenzylchloride, VBC), 클로로에틸아크릴레이트(chloroethylacrylate, CEA), 디비닐벤젠(divinylbenzene, DVB), 글리시딜메타크릴레이트(glycidylmethacrylate, GMA), 디(에틸렌글리콜)디비닐에테르(di(ethylene glycol)divinylether, DEGDVE), 에틸렌글리콜디메타크릴레이트(ethyleneglycoldimethacrylate, EGDMA), 에틸렌글리콜디아크릴레이트(ethyleneglycoldiacrylate, EGDA), 1,4-부타디엔디올디아크릴레이트(1,4-butanedioldiacrylate, BDDA), 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐시클로테트라실록산(2,4,6,8-Tetramethyl-2,4,6,8-tetravinylcyclotetrasiloxane, V4D4), 1,3,5-트리메틸-1,3,5-트리비닐시클로트리실록산(1,3,5-trimethyl-1,3,5-trivinyl-cyclotrisiloxane, V3D3), 시클로헥실메타크릴레이트(cyclohexyl methacrylate, CHMA) 또는 이들

의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 제2 단량체가, 비닐벤질클로라이드, 클로로에틸아크릴레이트, 디비닐벤젠, 글리시딜메타크릴레이트, 디(에틸렌글리콜)디비닐에테르, 에틸렌글리콜디메타크릴레이트, 에틸렌글리콜디아크릴레이트, 1,4-부타디엔디올디아크릴레이트, 2,4,6,8-테트라메틸-2,4,6,8-테트라비닐시클로테트라실록산, 1,3,5-트리메틸-1,3,5-트리비닐시클로트리실록산 등과 같은 가교결합성 단량체를 포함하는 경우, 상기 공중합체는 가교 구조를 가질 수 있다.

- [71] 예를 들어, 상기 공중합체 내에서 상기 제1 단량체에서 유래한 제1 반복단위와 상기 제2 단량체에서 유래한 제2 반복단위의 몰비는 1:0.1 내지 1:0.3일 수 있다. 상기 제2 단량체의 비율이 과도하게 높을 경우, 가수분해효율이 감소하여 핵산 방출 효율이 저하될 수 있다.
- [72] 예를 들어, 상기 중합체 박막의 두께는 1nm 내지 1,000nm, 또는 10nm 내지 500nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 용도, 시료의 종류 등에 따라 조절될 수 있다.
- [73] 예를 들어, 상기 중합체 박막은 화학 기상 증착법에 의해 기판 상에서 형성될 수 있다. 예를 들어, 기화된 단량체가 반응기 내에서 활성화 되어 중합반응이 진행될 수 있으며, 이에 따라 상기 기판 상에 중합체 박막이 코팅될 수 있다. 예를 들어, 상기 기판은 상기 몸체(110)일 수 있다. 그러나, 본 발명의 실시예들은 이에 한정되지 않으며, 상기 중합체 박막은 별도의 기판 위에 코팅된 후, 상기 기판과 함께 상기 몸체(110) 내에 배치될 수도 있다.
- [74] 일 실시예에 따르면, 상기 중합체 박막은 개시제를 이용한 화학 기상 증착법 (initiated chemical vapor deposition, iCVD)에 의해 형성될 수 있다. iCVD에 따르면, 기화된 개시제 및 단량체가 기판의 표면에 흡착된다. 상기 개시제는 필라멘트에 의한 가열 또는 자외선에 의해 활성화될 수 있다. 활성화된 개시제에 의해 생성된 자유 라디칼에 의해 연쇄 중합 반응이 개시된다. 따라서, 기판 상에 중합체 박막이 형성될 수 있다. 상기 방법은 용매 등을 이용하지 않으며, 합성과 코팅이 하나의 공정에서 수행된다. 따라서, 중합체의 균일성을 증가시킬 수 있으며, 공정 변수를 조절하여 원하는 두께의 박막을 형성할 수 있다.
- [75] 예를 들어, 상기 개시제로는 tert-부틸퍼옥사이드(tert-butyl peroxide, TBPO)와 같은 과산화물이 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명의 실시예들은 이에 한정되지 않으며, UV에 의해 활성화될 수 있는 벤조페논(benzophenone)계 개시제가 사용될 수도 있다.
- [76] 본 발명의 실시예들에 따른 중합체 박막은 양이온성 고분자를 포함하며, 물에 대한 용해도가 높다. 따라서, 상기 중합체는 핵산 추출 과정에서 용해된 상태에서 핵산을 포집할 수 있다. 따라서, 포집 면적을 크게 증가시킬 수 있으며, 이에 따라, 포집 효율을 증가시키고 포집 시간을 단축시킬 수 있다.

- [77] 또한, 상기 중합체는 자기축매화에 의해 가수분해될 수 있다. 따라서, 종래의 가열에 의한 핵산 방출 방법 보다 낮은 온도에서 더 많은 양의 핵산을 방출할 수 있다.
- [78] 예를 들어, 상기 중합체 박막을 갖는 핵산 추출 용기는, PCR(polymerase chain reaction)의 핵산 추출 단계 및 증폭 단계를 위한 용기로 사용될 수 있다.
- [79] 상기 중합체의 핵산 포집-방출 메카니즘은 이하에서 구체적으로 설명하기로 한다. 도 2a, 2b, 2c 및 2d는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 추출 용기를 이용한 핵산 추출 방법을 설명하기 위한 모식도들이다.
- [80] 도 2a 및 도 2b를 참조하면, 핵산 추출 용기(100) 내에 핵산(10)을 포함하는 시료가 제공된다. 상기 핵산 추출 용기는, 내부에 배치된 중합체 박막(120)을 포함한다. 상기 중합체 박막(120)은 양이온성 중합체를 포함하며 양의 표면 전위를 갖는다. 상기 중합체는 물 등에 의해 쉽게 용해될 수 있다. 상기 중합체 박막(120)으로부터 용해된 중합체(20)는 양전하를 가지며, 상기 핵산(10)은 음전하를 갖는다. 따라서, 상기 용해된 중합체(20)는 정전기적 인력에 의해 상기 핵산(10)을 포집할 수 있다. 상기 용해된 중합체(20)는 정전기적 인력에 의해 핵산(10)과 결합하여 중합체-핵산 복합체(30, 폴리플렉스)를 형성할 수 있다.
- [81] 본 발명의 실시예들에 따르면, 중합체와 핵산의 정전기적 결합이 일어나는 영역이 중합체 박막(120)의 2차원 표면에 한정되지 않으며, 용해된 중합체들(20)과 시료의 3차원 계면으로 확장된다. 따라서, 핵산의 포집 효율 및 포집 속도가 크게 증가할 수 있다.
- [82] 예를 들어, 상기 핵산(10)은, 리보핵산(RNA), 디옥시리보핵산(DNA), 메틸포스포네이트 핵산, S-올리고(phosphorothioate oligonucleotide), c-DNA, miRNA 및 압타머(aptamer) 등을 포함할 수 있다.
- [83] 상기 핵산(10)을 포함하는 시료는 생물학적 유기체(biological organism)로부터 유래할 수 있다. 예를 들어, 상기 시료는 생물학적 유체(fluid)를 포함할 수 있다. 상기 생물학적 유체는 뇨, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 정액, 대변, 가래, 뇌척수액, 눈물, 점액, 양수 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 시료는 인간, 동물, 식물, 세균, 진균 및 바이러스의 생물학적 조직, 이의 세포 또는 이의 세포 내 물질을 포함할 수 있다. 또한, 상기 시료는, 식수, 음식물 등과 같은 환경 시료(environmental sample)를 포함할 수도 있다.
- [84] 예를 들어, 상기 중합체는 상기 시료에 의해 용해될 수 있다. 그러나, 본 발명의 실시예들은 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 상기 중합체는 핵산을 용해하기 위한 완충액(buffer) 또는 상기 완충액과 혼합된 시료에 의해 용해될 수 있다.
- [85] 상기 중합체 박막(120)은 전체적으로 또는 부분적으로 용해될 수 있다. 이예를 들어, 중합체 박막의 일부는 상기 추출 용기의 몸체(110) 상에 잔류할 수도 있다.
- [86] 상기에서 설명된 핵산 포집 단계는 상온에서 진행될 수 있다. 예를 들어, 상기 단계들은 10°C 이상 30°C 미만에서 진행될 수 있으며, 바람직하게 20°C 이상 30°C

미만에서 진행될 수 있다. 핵산 포집 단계의 온도가 과도하게 높을 경우, 상기 중합체의 가수분해가 진행되어 핵산 포집 효율이 감소할 수 있다.

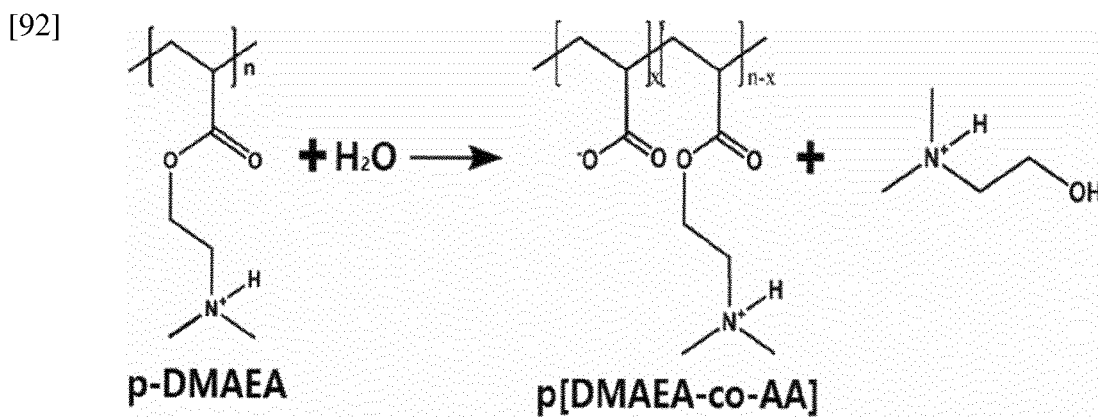
[87] 도 2c를 참조하면, 중합체-핵산 복합체(30)를 침전시킨다. 상기 중합체-핵산 복합체(30)를 침전시키기 위하여 원심분리가 수행될 수 있다. 예를 들어, 인접하는 중합체-핵산 복합체(30)들이 응집함에 따라, 응집된 중합체-핵산 복합체들에 의한 침전물(40)이 형성될 수 있다.

[88] 예를 들어, 상기 중합체-핵산 복합체(30)의 침전 이후에, 부유물 등과 같은 이물질을 제거하기 위하여 상층액이 제거될 수 있다. 상기 상층액을 제거한 후, 상기 이물질을 더 제거하기 위하여 세척 완충액, 정제수 등을 이용하여 상기 침전물(40)을 다시 세척할 수 있다. 바람직하게, 상기 중합체-핵산 복합체(30)의 침전 및 세척은 상기 핵산 추출 용기 내에서 in-situ로 수행될 수 있다.

[89] 도 2d를 참조하면, 상기 침전된 중합체-핵산 복합체로부터 핵산(10)을 방출한다. 본 발명의 실시예들에 따르면, 상기 핵산(10)을 방출하기 위하여 가수분해가 이용될 수 있다.

[90] 상기 중합체는 자기 촉매화에 의해 가수분해될 수 있다. 예를 들어, 상기 중합체의 반복단위는 가수분해성 양이온성 에스테르기를 측쇄로 가질 수 있다. 양이온성기(예를 들어, 디알킬아미노기)와 에스터 카르보닐기의 분자내 상호작용에 의한 자기 촉매 가수분해(self-catalyzed hydrolysis)가 진행될 수 있다. 예를 들어, 상기 중합체가 p-DMAEA인 경우, 다음과 같이 가수분해되어 DMAEA와 AA(아크릴산)의 공중합체로 변환될 수 있으며, 반응 부산물로서 디메틸아미노에탄올이 생성될 수 있다.

[91] <p-DMAEA의 가수분해반응>



[93] (n 및 x는 자연수일 수 있으며, x는 n보다 작다.)

[94] 상기 가수분해된 중합체(20')는 아크릴산 반복단위의 $-\text{COO}^-$ 에 의한 음전하를 갖는다. 따라서, 가수분해가 진행되면, 음전하를 갖는 핵산(10)과 음전하를 갖게 된 중합체(20') 사이의 정전기적 척력에 의해 핵산(10)이 방출될 수 있다.

[95] 상기 가수분해는 열에 의해 촉진될 수 있다. 그러나, 상기 가수분해는, 종래의 핵산 방출에 필요한 열처리 보다 훨씬 낮은 온도에서 수행될 수 있으며, 더 빠른

속도로 더 많은 양의 핵산을 방출할 수 있다. 따라서, 핵산 추출 단계 및 이를 포함하는 검출 방법의 속도, 효율 및 정확도를 향상시킬 수 있다.

- [96] 예를 들어, 상기 가수분해에 의한 핵산 방출 단계는 30°C 내지 60°C 또는 40°C 내지 60°C에서 수행될 수 있다. 상기 가수분해의 온도가 과도하게 증가할 경우, 이후에 이어지는 증폭 단계 등에 영향을 줄 수 있으며, 온도가 과도하게 낮은 경우 가수분해효율 및 가수분해속도가 크게 낮아질 수 있다.
- [97] 일 실시예에 따르면, 상기 핵산 방출 단계는 핵산 검출을 위한 증폭 단계(또는 역전사 단계)와 in-situ로 이어질 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산 방출 단계는 상기 핵산 추출 용기에 PCR 혼합제를 투입한 후에 수행될 수 있다. 상기 중합체는 증폭 과정 또는 역전사 과정에 실질적으로 영향을 주지 않는다. 따라서, 중합체를 분리하기 위한 과정 없이 핵산 방출 단계와 증폭 단계를 연속적으로 또는 동시에 수행하는 것이 가능하다. 그러나, 본 발명의 실시예들은 이에 한정되지 않으며, 상기 핵산 방출 단계는 별도의 완충액을 이용하여 수행되고, 핵산을 방출한 중합체를 제거한 후 증폭 단계를 수행할 수 있다.
- [98] 예를 들어, 상기 PCR 혼합제는 프라이머, 프로브, dATP, dTTP, dGTP 및 dCTP의 혼합물인 dNTP(deoxynucleoside triphosphate), 역전사효소 등을 포함할 수 있다.
- [99] 예를 들어, 상기 핵산 방출 단계는 pH 6 내지 9 또는 pH 7.5 내지 8.5의 환경에서 수행될 수 있으며, 1분 내지 수시간 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 중합체의 가수분해효율(%)은, 50°C에서 1시간 반응시 30% 내지 100%일 수 있으며, 바람직하게, 50°C에서 30분 반응시 30%이상일 수 있으며, 보다 바람직하게, 50°C에서 5분 반응시 30%이상일 수 있다.
- [100] 상기 핵산 방출 단계 이후에, in-situ로 중합 효소 연쇄 반응을 수행할 수 있다. 예를 들어, 상기 증폭 단계를 위한 PCR은 어셈블리-PCR, 비대칭(asymmetric) PCR, 디지털 PCR, 종점(endpoint) PCR, 인버스(inverse) PCR, 메틸화-특이성 PCR, 정성(qualitative) PCR, 정량적(quantitative) PCR, 실시간(realtime) PCR 및 정량적 역전사(quantitative reverse transcription, qRT)-PCR 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 본 발명의 실시예들은 이에 한정되지 않으며, PCR 외에 핵산을 증폭할 수 있는 다른 기술과도 결합될 수 있다.
- [101] 다음으로, 증폭된 생성물을 분석하여 표적 핵산을 검출한다. 예를 들어, 상기 표적 핵산의 검출을 위하여, 상기 증폭된 생성물로부터 유래된 형광을 측정할 수 있다.
- [102] 본 발명의 실시예들에 따르면, 용해된 양이온성 중합체를 이용하여 핵산을 포집함으로써, 중합체-핵산 간 상호작용을 위한 영역을 확장할 수 있다. 따라서, 핵산 포집 효율을 향상시킬 수 있으며, 핵산 포집에 소요되는 시간은 크게 단축시킬 수 있다.
- [103] 또한, 상기 중합체의 자기축매화 가수분해를 이용하여 발생된 중합체-핵산 간의 정전기적 척력에 의해 핵산을 방출할 수 있다. 따라서, 증폭 단계에 영향을 줄

수 있는 조건의 변화 없이, 종래의 핵산 방출 방법보다 낮은 온도에서 더 많은 핵산을 방출할 수 있다.

[104] 또한, 상기 중합체는 핵산 추출 단계에 이어지는 증폭 단계에서 안정성을 갖는다. 따라서, 핵산 추출 단계와 증폭 단계를 연속적으로 수행하는 단일 포트 검출 시스템을 구현할 수 있다.

[105] 핵산 검출 방법

[106] 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 검출 방법을 설명하기 위한 순서도이다. 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 검출 방법을 설명하기 위한 모식도이다.

[107] 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 검출 방법에 따르면, 먼저 양이온성 중합체 박막을 갖는 추출 용기에 핵산을 포함하는 시료를 로딩한다(S10).

[108] 상기 양이온성 중합체 박막 및 상기 추출 용기는 기설명된 것들과 동일할 수 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 시료는 바이러스 용해물(virus lysates)을 포함할 수 있으며, 상기 핵산은 호흡기 바이러스의 RNA를 포함할 수 있다.

[109] 예를 들어, 상기 호흡기 바이러스는, 코로나 바이러스 229E(Corona Virus 229E), 코로나 바이러스 OC43(Corona Virus OC43), 코로나 바이러스 NL63(Corona Virus NL63), 인플루엔자 A 바이러스(Influenza A Virus), 인플루엔자 B 바이러스(Influenza B Virus), 파라인플루엔자 바이러스 1(Parainfluenza Virus 1), 파라인플루엔자 바이러스 2(Parainfluenza Virus 2), 파라인플루엔자 바이러스 3(Parainfluenza Virus 3), Rs 바이러스 A(Respiratory Syncytial Virus A), Rs 바이러스 B(Respiratory Syncytial Virus B), 아데노 바이러스(Adeno Virus), 라이노 바이러스 A, B, C(Rhino Virus A, B, C), 메타뉴모바이러스(Metapneumovirus), 보카바이러스(Boca Virus) 등을 포함할 수 있다.

[110] 다음으로, 상기 양이온성 중합체 박막을 이용하여, 상기 핵산을 포집한다(S20). 구체적으로, 상기 양이온성 중합체 박막으로부터 용해된 양이온성 중합체가 상기 핵산과 정전기적 인력으로 결합하여 폴리플렉스를 형성할 수 있다. 폴리플렉스들은 서로 응집하여 침전될 수 있다.

[111] 상기 핵산 포집 및 침전은 원심분리를 통해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 원심분리는 약 1분 내지 30분 동안 수행될 수 있다.

[112] 다음으로, 상기 양이온성 중합체의 자가가수분해를 통해 포집된 RNA를 방출한다(S30). 또한, 역전사 반응을 통해 상기 RNA로부터 cDNA(complementary DNA)를 합성한다(S40). 상기 RNA 방출 단계와 역전사 단계는 동시에 수행될 수 있다. 상기 양이온성 중합체의 자가가수분해는 통상의 가수분해보다 낮은 온도에서 일어날 수 있으며, 상기 양이온성 중합체는 역전사 과정에 영향을 주지 않는다. 따라서, 역전사 수행을 위한 온도에서 상기 RNA가 방출되고 동시에 역전사 반응이 진행될 수 있다. 예를 들어, 상기 RNA 방출 및 역전사는 30°C 내지 60°C 또는 40°C 내지 60°C에서 수행될 수 있다.

- [113] 상기 RNA 방출 단계와 역전사 단계 전에, 상기 용기의 상층액(supernatant)을 제거한 후, PCR 혼합제를 상기 용기에 투입할 수 있다. 예를 들어, 상기 PCR 혼합제는, 역전사 효소, dNTP(기질) 및 프라이머를 포함할 수 있다. 또한, 상기 PCR 혼합제는 DNA 중합 효소 및 프로브를 더 포함할 수 있다.
- [114] 상기 프라이머는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3'hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(DNA 중합효소 또는 역전사 효소) 및 dNTP의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [115] 필요에 따라, 상기 프라이머는 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소, 방사성 동위원소, 형광성 분자 등이 사용될 수 있다.
- [116] 상기 프로브는, 상보적인 염기서열과 특이적 결합을 이룰 수 있으며, 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 염기서열의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태를 가질 수 있다.
- [117] 상기 역전사 단계 이후에 증폭이 수행될 수 있다(S50). 증폭 단계에서 상기 cDNA가 증폭될 수 있다. 상기 증폭 단계는 상기 RNA 방출 및 역전사 단계 이어서 동일 용기 내에서 수행될 수 있다. 상기 증폭 단계는 상기 역전사 단계 보다 높은 온도에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 증폭 단계는 70°C 내지 90°C에서 수행될 수 있다.
- [118] 다음으로, 증폭 산물(S60)을 분석한다. 이에 따라, 검출 대상의 존재 여부 및 양에 대한 정보를 얻을 수 있다.
- [119] 본 발명의 핵산 검출 방법은, 핵산 추출 단계 및 증폭 단계(역전사 포함)가 동일 용기에서 수행될 수 있으며, 실질적으로 종래의 qRT-PCR과 동일한 과정 및 동일한 조건에서 수행될 수 있다. 따라서, 상업적으로 이용되고 있는 증폭 키트 등을 이용 가능하며, 기존의 검출 방법을 쉽게 대체할 수 있다.
- [120] 이하에서는, 구체적인 실험예들에 통해 예시적인 실시예들에 따른 중합체 박막의 합성 및 효과에 대해 상세히 설명한다. 그러나, 상기 실험예들은 단지 예시적으로 제공되는 것이며, 본 발명의 범위가 상기 실험예에 제공된 내용으로 한정되는 것은 아니다.
- [121] 합성예 1
- [122] iCVD 챔버의 기관 위에 상업용 PCR 튜브(Bio-Rad Laboratories, Inc., 미국)를 위치시키고, 기관의 온도를 30°C로 유지하였다. 다음으로, DMAEA와 개시제인 TBPO를 각각 35°C 및 25°C로 온도를 유지해주면서 80:30 mtorr의 비율(Feed ratio)로 기화시켜 화학기상증착기 챔버로 이송하였다. 챔버내 압력은 150 mTorr 진공

상태를 유지하여 주며, 동시에 필라멘트를 140°C로 가열하여 상기 기관에 흡착된 단량체들을 라디칼 중합시켜 DMAEA 호모중합체를 제조하였다(박막 두께: 약 350nm).

- [123] 도 4는 합성에 1의 DMAEA 중합체(pDMAEA)와 단량체(DMAEA)의 FTIR(Fourier transform infrared) 분석 결과를 보여주는 그래프이다.
- [124] 도 4를 참조하면, 비닐(vinyl)기를 나타내는 1626 cm^{-1} 피크가 단량체(DMAEA)와 비교하여 중합체(pDMAEA)에서 작아졌다. 따라서, 중합체가 잘 합성된 것을 확인할 수 있다(중합이 진행되면 단량체의 비닐기가 사라짐).
- [125] 도 5는 합성에 1의 DMAEA 중합체의 분자량을 GPC(Gel permeation chromatography) 분석 결과를 보여주는 그래프이다. 도 4를 참조하면, 합성에 1의 DMAEA 중합체의 수평균분자량(M_n)은 약 $1,300\text{ g/mol}$ 이었다.
- [126] 가수분해 실험
- [127] 합성에 1의 DMAEA 중합체를 pH 8.0, 25°C 및 50°C에서 가수분해를 진행하여 시간에 따른(5분 간격) 가수분해효율을 계산하였다. 구체적으로, NMR(Nuclear magnetic resonance) 분광을 이용하여 가수분해되지 않은 측쇄 그룹에 대응되는 CH_2O -메틸렌 신호의 합과 반응 부산물에 대응되는 알코올의 신호의 합을 비교하여 가수분해효율을 계산하였다.
- [128] 도 6은 합성에 1의 DMAEA 중합체를 pH 8.0, 25°C 및 50°C에서 가수분해를 진행하여 시간에 따른(5분 간격) 가수분해효율(%)을 도시한 그래프이다. 도 6을 참조하면, 합성에 1의 DMAEA 중합체의 가수분해는 30°C 이상의 온도에서 활발하게 진행될 수 있음을 알 수 있으며, 50°C에서 25분이 지나면 가수분해효율이 80% 이상인 것을 확인하였다. 특히, 50°C에서는 5분 안에 45% 이상의 가수분해가 진행되는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 역전사 단계에서 RNA의 방출이 빠르게 진행 가능함을 알 수 있다.
- [129] 도 7은 합성에 1의 DMAEA 중합체의 가수분해 진행 전과 후의 zeta-potential을 보여주는 그래프이다. 도 7을 참조하면, 합성에 1의 DMAEA 중합체의 zeta-potential은 가수 분해전 20mV이었으나, 가수 분해 후 -25mV로 변화하였으며, 이는 가수분해에 의해 음전하를 갖는 AA 그룹의 증가로 인한 것일 수 있다.
- [130] 도 8은 합성에 1의 DMAEA 중합체와 RNA의 비율(N(nitrogen)/P(phosphate) ratio)에 따른 zeta-potential을 보여주는 그래프이다. 도 8을 참조하면, DMAEA 중합체의 비율이 높아질수록 zeta-potential 값이 높아지며, N/P ratio가 1일 때, zeta-potential 값이 급격하게 변하여 양의 값(+)을 갖는 것을 확인할 수 있다.
- [131] 도 9는 합성에 1의 DMAEA 중합체와 RNA의 비율(N(nitrogen)/P(phosphate) ratio)에 따른 average hydrodynamic diameter(Z-average)를 보여주는 그래프이다. 도 9를 참조하면, N/P ratio가 2일 때, Z-average 값이 255 nm로 급격하게 감소하였으며, 이를 통해 polyplex가 형성된 것을 확인할 수 있다.
- [132] 핵산 포집 실험

- [133] 모델 RNA로서, 한국생명공학연구원(KRIBB)에서 제공된 인플루엔자 바이러스를 선택하였다. HINI 바이러스 RNA는, 제조사의 프로토콜에 따라 G-스핀 게놈 RNA 추출 키트(iNtRON 바이오테크놀로지, 한국)을 이용하여 준비되었다. 추출된 RNA의 농도는 NanoDrop™ 1000 분광계(Thermo Fisher Scientific, 미국)으로 결정되었다. 포집된 RNA의 양을 측정하기 위하여, 합성예 1에서 얻어진 중합체가 코팅된 튜브에 3 uL (농도: 50, 20, 10, 1ng/uL)의 RNA 용액을 투입하였다. 5분 동안 상온에서 원심분리를 진행한 후, 포집되지 않은 RNA를 회수하였다. 포집되지 않은 RNA의 농도는 qRT-PCR을 통해 측정하였다.
- [134] 사용된 PCR 혼합제는, 포집되지 않은 RNA 용액(상등액, 1 μ l), 프라이머 세트(각 0.6 μ M), QIAGEN 원스텝 RT-PCR 버퍼(Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 12.5 mM MgCl₂, DTT, pH 8.7), QIAGEN 원스텝 RT-PCR 효소 혼합물(1 μ l) 및 dNTP 혼합물(400 μ M))을 포함하였다. PCR 증폭은 CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad, 미국)을 이용하여, 50°C에서 30분간 역전사, 95°C에서 5분간 초기 변성, 95°C에서 30초간, 60°C에서 60초간, 그리고 72°C에서 30초간 40회 열 사이클, 그리고 72°C에서 5분간 최종 연장의 조건으로 수행하였다. 포집된 RNA의 양은 주입된 RNA의 양에서 포집되지 않은 RNA의 양을 감하여 얻었다.
- [135] 이하의 실험에서 사용된 프라이머의 시퀀스는 아래의 표 1에 나타내었다.
- [136] [표1]

	Name	Position	Sequence (5' → 3')a
ORF1 gene	FP	13342-13362	CCC TGT GGG TTT TAC ACT TAA
	Probe	13377-13404	FAM - CCG TCT GCG GTA TGT GGA AAG GTT ATG G - BHQ1
	RP	13442-13460	ACG ATT GTG CAT CAG CTG A
N gene	FP	29125-29144	AAA TTT TGG GGA CCA GGA AC
	Probe	29222-29241	FAM - ATG TCG CGC ATT GGC ATG GA - BHQ1
	RP	29263-29282	TGG CAG CTG TGT AGG TCA AC
S gene	FP	3064-3083	ATY AGR GCT GCW GAA ATC AG
	Probe	3201-3220	FAM - ATG AGG TGC TGA CTG AGG GA - BHQ1
	RP	3281-3300	CCW TCA TGA CAA ATD GCW GG
Delta gene	FP	22928-22952	CCT TTT GAG AGA GAT ATT TCA ACT G
	Probe	22960-22980	FAM - TCA GGC CGG TAG CAA ACC TTG - BHQ1
	RP	23056-23079	AGT ACT ACT ACT CTG TAT GGT TGG
Omicron gene	FP	26503-26521	TGG CAG GTT CCA ACG GTA C
	Probe	26454-26568	FAM - AGC TCC TTG AAG AAT GGA ACC TAG - BHQ1
	RP	26579-26604	GAA GAC AAA TCC ATG TAA GGA ATA GG
Influenza A gene	FP	49-68	TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA
	Probe	72-93	FAM - CGC GCA GAG ACT GGA AAG TGT C - BHQ1
	RP	188-207	GGG CAC GGT GAG CGT GAA CA
Influenza B gene	FP	591-614	AGG GGA AGA CCA AAT TAC TGT TTG
	Probe	629-656	FAM - ATA ACA AAA CCC AAA TGA AGA GCC TCT A- BHQ1
	RP	676-697	CAT TAG CAG ATG AGG TGA ACT T

[137] * FAM: 6-carboxyfluorescein; BHQ-1: Black Hole Quencher-1

[138] * FP: 정방향 프라이머; RP: 역방향 프라이머

[139] 도 10은 합성에 1의 DMAEA 중합체가 코팅된 튜브를 이용한 핵산 포집 실험에서 포집 효율, 포집 양, 회수율 및 추출율을 도시한 그래프들이다. (a)는 원심분리 시간에 따른 포집 효율{(포집된 RNA/투입 RNA) × 100}을 도시한 그래프이고, (b)는 투입된 RNA 양에 따른 포집 효율(원심분리: 5분)을 도시한 그래프이고, (c)는 투입된 RNA 양에 따른 투입량을 도시한 그래프이다.

- [140] (a)를 참조하면, 최종적으로 99%의 RNA가 포집되었으며, 93%의 RNA는 5분의 원심분리에 의해 포집되었다. 이러한 빠른 RNA 포집 특성은 튜브 표면에서 중합체(올리고머)가 빠르게 용해된 것에서 기인할 수 있다.
- [141] 또한, (b)를 참조하면, 다양한 투입 RNA 양(3, 30, 60 및 150 ng)에 대해서도 높은 포집 효율이 유지되었으며, (c)를 참조하면, 투입 RNA의 양에 따라 포집량이 선형적으로 증가하였으며, 이를 통해 DMAEA 중합체가 코팅된 튜브의 효과적인 RNA 포집 능력을 확인할 수 있다.
- [142] 상기 DMAEA 중합체가 코팅된 튜브를 단일 포트 유전자 분석에 활용하기 위해서는, qRT-PCR의 초기 단계에 폴리플렉스로부터 RNA가 빠르게 방출될 필요가 있다. 폴리플렉스로부터 방출되는 RNA의 양을 검사하기 위하여, DMAEA 중합체가 코팅된 튜브 내에 샘플을 로딩하고, 원심분리를 수행하고, 상층액을 제거한 후, 상기 튜브 내에서 qRT-PCR(위와 동일한 조건)을 수행하였다. 도 10에서 (d)는 투입된 RNA 양에 따른 회수율 $\{(\text{정량화 RNA}/\text{포집 RNA}) \times 100\}$ 을 도시한 그래프이고, (e)는 투입된 RNA 양에 따른 추출율 $\{(\text{정량화 RNA}/\text{투입 RNA}) \times 100\}$ 을 도시한 그래프이다.
- [143] (d) 및 (e)를 참조하면, DMAEA 중합체가 코팅된 튜브의 회수율은 약 85%였으며, 추출율은 80% 이상이었다. 시판되는 스핀 컬럼 추출키트의 회수율이 20% 내외임을 감안하면, 본 발명의 튜브를 이용하여 높은 효율과 정확도로 RNA를 검출할 수 있으며, 또한, 별도의 화학적 처리나 조건 변화 없이 일반적인 qRT-PCR에 적용할 수 있음을 알 수 있다.
- [144] 바이러스 검출 실험: 인플루엔자
- [145] 본 발명의 실시예에 따른 검출 방법(폴리플렉스 보조 직접(polyplex-assisted direct, PAD) qRT-PCR)을 테스트하기 위하여, 핵산 포집 실험과 동일한 방법으로 인플루엔자 A 바이러스(H1N1)를 검출하였다.
- [146] 도 11은 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)을 이용한 H1N1의 검출 결과를 보여준다. 도 11에서 (a)는 다양한 농도의 H1N1에 대한 증폭 커브를 보여주며, (b)는 10에서 10^4 까지 플라크형성단위(PFU/ml)의 동적 검출 범위를 보여주는 H1N1의 함수로 표시된 대응하는 C_t 값들을 도시한다.
- [147] 도 11을 참조하면, 선형 회귀선의 상관계수(R^2)는 0.9983으로서, 본 발명의 검출 방법을 이용하여 H1N1의 정량화가 가능함을 확인할 수 있다. 본 발명의 검출 방법에서 H1N1의 검출 감도는 3.29 PFU/mL_h 계산되었으며, 이는 임상 수요 범위에서 H1N1 검출을 위한 가능성을 지지하는, H1N1의 최소 감염 용량(minimal infective dose, MID, $10^{0.5-1.5}$ PFU)과 비교할만하거나 이보다 훨씬 낮다.
- [148] 바이러스 검출 실험: 인플루엔자 - 임상 진단
- [149] 단일 포트 PAD-qRT-PCR의 추가 실험을 위하여 임상 샘플의 인플루엔자 바이러스의 검출하였다. 구체적으로, 세브란스 병원 연세대학교 검진 센터에서 진단된 샘플(코로나 팬데믹 전 채취 및 진단, 이후 -70°C에서 보관, H1N1: 11개, IBV:

9개, 음성: 15개)을 얻은 후, 각 샘플 10 μ l와 라이시스 버퍼 90 μ l(proteinase K(0.8 U/reaction) 및 RNase 억제제(10 U/reaction) 포함)를 조합한 후, 15초간 pulse-vortex 혼합하고, 10분 동안 상온에서 인큐베이팅하였다. 상기 용해물 용액 3 μ l를 합성 에 1의 튜브에 넣고, 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 다음으로 PCR 혼합제를 투입하고, PCR을 수행하였다.

[150] 사용된 PCR 혼합제는, 25 μ l 용액이며, 프라이머 세트(각 0.6 μ M), QIAGEN 원스텝 RT-PCR 버퍼, QIAGEN 원스텝 RT-PCR 효소 혼합물(1 μ l) 및 dNTP 혼합물(400 μ M))을 포함하였다. PCR 증폭은, 50°C에서 20분간 역전사, 95°C에서 15분간 초기 변성을 거친 후, 95°C에서 10초간, 60°C에서 20초간, 그리고 72°C에서 30초간 40회 사이클로 수행하였다.

[151] 아래의 표 2는 PAD-qRT-PCR로 진단한 결과를 보여준다

[152] [표2]

	H1N1 Positive	IBV Positive	Negative
PAD-qRT-PCR Positive	11	9	0
PAD-qRT-PCR Negative	0	0	15
Agreement	PPA: 20 of 20 = 100%	PPA: 20 of 20 = 100%	NPA: 15 of 15 = 100%

[153] 표 2를 참조하면, PAD-qRT-PCR로 진단한 결과는 임상 병원에서의 진단 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있다.

[154] 도 12는 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)을 이용하여 임상 샘플(인플루엔자 바이러스)을 분석한 결과를 보여준다. 도 12에서 (a)는 각 샘플에 대한 C_t 값을 도시한 그래프이며, (b)는 병원에서 제공한 C_t 값들에 대하여 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)을 이용하여 얻어진 C_t 값의 산포도이다.

[155] 도 12를 참조하면, 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)으로 얻어진 C_t 값이, 병원에서 제공한 값보다 높았으나, 이는 측정 시기의 차이(3-4년)에서 기인한 것이며, 장기간 보관된 샘플을 통해서도 정확한 진단이 가능한 수준으로 검출하였음을 확인할 수 있다.

[156] 바이러스 검출 실험: SARS-CoV-2

[157] 본 발명의 실시예에 따른 검출 방법(PAD-qRT-PCR)을 테스트하기 위하여, 스파이크(S) 유전자 프라이머(표 1)를 사용하여 코로나 바이러스(SARS-CoV-2)를 검출하였다.

[158] 구체적으로, 바이러스 샘플 90 μ l를 TCEP(tris(2-carboxyethyl) phosphine)/EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)(각 최종 농도 100 및 1mM) 10 μ l로 처리한

후, 50°C에서 5분간, 64°C에서 5분간 가열하여 SARS-CoV-2 바이러스 용해물을 준비하였다. 바이러스 용해물 100 μ l를 proteinase K(0.8 U/reaction) 및 RNase 억제제(10 U/reaction) 포함)로 처리한 후, 15초간 pulse-vortex 혼합하고, 10분 동안 상온에서 인큐베이팅하였다. 상기 용해물 용액 3 μ l를 합성에 1의 튜브에 넣고, 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 다음으로 PCR 혼합제를 투입하고, PCR을 수행하였다.

- [159] 사용된 PCR 혼합제는, 25 μ l 용액이며, 프라이머 세트(각 0.6 μ M), QIAGEN 원스텝 RT-PCR 버퍼, QIAGEN 원스텝 RT-PCR 효소 혼합물(1 μ l) 및 dNTP 혼합물(400 μ M))을 포함하였다. PCR 증폭은, 95°C에서 2분간 가열한 후, 95°C에서 10초간, 55°C에서 15초간, 그리고 72°C에서 35초간 40회 사이클로 수행하였다.
- [160] 도 13은 SARS-CoV-2의 모식도 및 검출 실험 결과를 보여준다. 도 13의 (b)를 참조하면, SARS-CoV-2(10^5 PFU/mL)가 존재할 때, 형광 신호가 증가한 반면, 바이러스가 존재하지 않을 때 신호가 검출되지 않았다. 본 발명의 특정성을 검사하기 위하여 다른 호흡기 바이러스들(인플루엔자 A 바이러스의 서브타입 H1N1, H3N2, H5N2, H1N2 및 H3H8, RSV A)을 이용하여 검사하였으며, (c)를 참조하면, 다른 바이러스들에서는 C_t 값이 얻어지지 않았음을 확인하였다.
- [161] SARS-CoV-2 타겟 유전자를 open reading frame 1 유전자(ORF1 gene)와 뉴클레오타이드 유전자(N gene)로 확장하여 실험을 진행하였다. 도 13의 (d), (e) 및 (f)는 각 유전자에 대한 C_t 값을 도시한 그래프들이다. 각 그래프에서 C_t 값들은 바이러스 농도가 증가함에 따라 감소하였으며, 10^1 에서 10^4 PFU/ml 범위에서 우수한 선형 관계(ORF1, N 및 S 유전자에 대하여 $R^2=0.9801$, 0.9997 및 0.9932)를 갖는 것을 확인하였다. 또한, 검출 한계(LOD)는 ORF1, N 및 S 유전자에 대하여 각각 3.58 PFU/ml, 3.25 PFU/ml 및 2.96 PFU/ml로 계산되었다.
- [162] 또한, SARS-CoV-2의 변종(델타 및 오미크론)의 검출을 테스트하기 위하여, 델타 및 오미크론 변이체에 대한 스파이크 유전자(S gene) 프라이머를 이용하여 실험을 진행하였다. 도 13의 (g) 및 (h)는 델타 및 오미크론에 대한 C_t 값을 도시한 그래프들이다. 도 13의 (g) 및 (h)를 참조하면, 델타에 대한 $R^2=0.9937$, 오미크론에 대한 $R^2=0.9947$ 이었으며, 검출 한계(LOD)는 2.35 PFU/ml(델타) 및 2.75 PFU/ml(오미크론)이었다. 이를 통해 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)은 SARS-CoV-2의 변종의 식별에 사용 가능함을 확인할 수 있다.
- [163] 바이러스 검출 실험: SARS-CoV-2 - 임상 진단
- [164] 경상대학교 의과대학 및 세브란스 병원 연세대학교 검진 센터에서 제공받은 임상 샘플 135건을 위에서 설명한 것과 동일한 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)으로 분석하였다. 또한, 비교예로서, 동일한 임상 샘플에 대하여 스핀 컬럼 기반의 추출 방법을 이용하는 종래의 qRT-PCR로 분석을 진행하였다.
- [165] 도 14는 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR) 및 종래의 검출 방법(pRT=PCR)을 이용하여 임상 샘플(SARS-CoV-2)을 분석한 결과를 보여준다. 도 14에서, (a)

는 각 샘플에 대한 C_t 값을 도시한 그래프이며, (b)는 종래의 검출 방법(pRT-PCR)에서 얻어진 C_t 값에 대한 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)에서 얻어진 C_t 값의 산포도이고, (c)는 병원에서 RdRP, E 및 N 유전자를 타겟으로 얻어진 평균 값에 대하여 N, S 및 ORF1a 유전자를 타겟으로 한 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)에서 얻어진 C_t 값의 산포도이고, (d)는 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)에서 얻어진 환자 샘플 데이터의 ROC(receiver operating characteristic) 커브이다.

- [166] 도 14를 참조하면, 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)에서 얻어진 C_t 값에 따르면, 75개중 74개의 양성 예측이 일치하고, 60개중 59개의 음성 예측이 일치하였다(10번 및 76번 샘플은 각각 위음성 및 위양성을 나타내었다). 또한, 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)에서 얻어진 C_t 값은 종래의 검출 방법(pRT-PCR)에서 얻어진 C_t 값과 전체적으로 일치하였다($p=0.97192$). 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)은 종래의 검출 방법(pRT-PCR) 보다 평균적으로 1.35 낮은 C_t 값을 제공하였으며, 이는 폴리플렉스-기반 어레이가 종래의 RNA 추출 키트의 RNA 추출 효율(20% 내지 60%) 보다 높은 RNA 추출 효율(약 80%)을 갖기 때문으로 생각된다. 두 분석법의 증폭 효율이 모두 100%라고 가정하면, 1.35의 C_t 값 차이는 2.5배 더 많은 양의 RNA를 정량화했음을 의미한다. 또한, 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)에서 얻어진 C_t 값은 병원에서 얻어진 값과 높은 상관관계가 있으며($p=0.93645$), ROC 분석 결과에 따른 AUC(area under curve) 값은 0.989로서, 환자의 임상 상태에 대한 정확도가 높음을 확인하였다.

- [167] 바이러스 검출 실험: SARS-CoV-2 변이 - 임상 진단

- [168] SARS-CoV-2 환자로부터 델타 변이 샘플 및 오미크론 샘플을 수집하였으며, 델타 변이 출현 이전에 수집된 샘플을 음성 대조군으로 채택하여, 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)에 대한 실험(위와 동일한 방법)을 진행하였다.

- [169] 도 15는 본 발명의 검출 방법(PAD-qRT-PCR)을 이용하여 임상 샘플(SARS-CoV-2 변이)을 분석한 결과를 보여준다. 도 15에서, (a)는 델타 변이 샘플(음성 대조군 포함)에 대한 C_t 값을 도시한 그래프이며, (b)는 델타 변이 임상 결과에서 얻은 ROC 커브이고, (c)는 오미크론 변이 샘플(음성 대조군 포함)에 대한 C_t 값을 도시한 그래프이며, (d)는 오미크론 변이 임상 결과에서 얻은 ROC 커브이다.

- [170] 도 15를 참조하면, 델타 변이에 대한 양성 예측 일치(60/60) 및 음성 예측 일치(10/10)이 모두 100%로 병원 결과와 높은 상관관계를 갖는 것을 확인하였으며, AUC 값은 1.0으로 정확도가 높았다. 또한, 오미크론 변이에 대한 양성 예측 일치(10/10) 및 음성 예측 일치(10/10)이 모두 100%로 병원 결과와 높은 상관관계를 갖는 것을 확인하였으며, AUC 값은 1.0으로 정확도가 높았다.

- [171] 상술한 바와 같이 본 발명의 예시적인 실시예들을 참조하여 설명하였지만 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 하기의 특허 청구 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

산업상 이용가능성

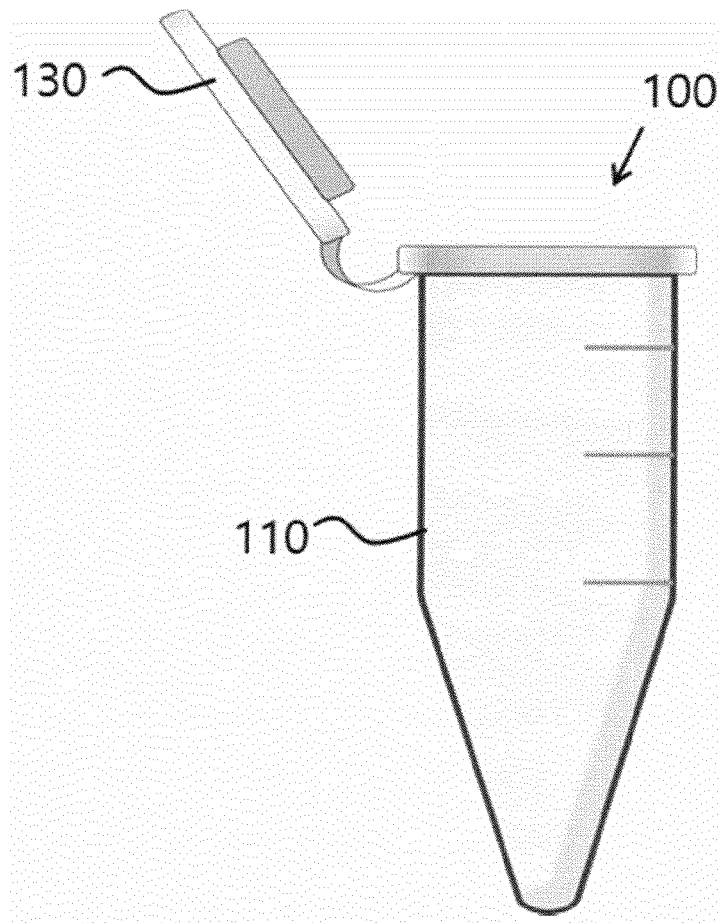
- [172] 본 발명의 예시적인 실시예들은 핵산을 이용하는 다양한 핵산 추출 방법 및 이를 이용한 표적 검출, 분자 진단 등에 이용될 수 있다. 예를 들어, 바이러스, 세균 등과 같은 병원체의 검출 및 정량화, 식품 재료의 원산지 조사, 질병의 진단 및 모니터링 등을 위하여 이용될 수 있다.
- [173] <부호의 설명>
- [174] 10: 핵산
- [175] 20: 용해된 중합체
- [176] 30: 중합체-핵산 복합체(폴리플렉스)
- [177] 100: 핵산 추출용 용기
- [178] 110: 몸체
- [179] 120: 중합체 박막

청구범위

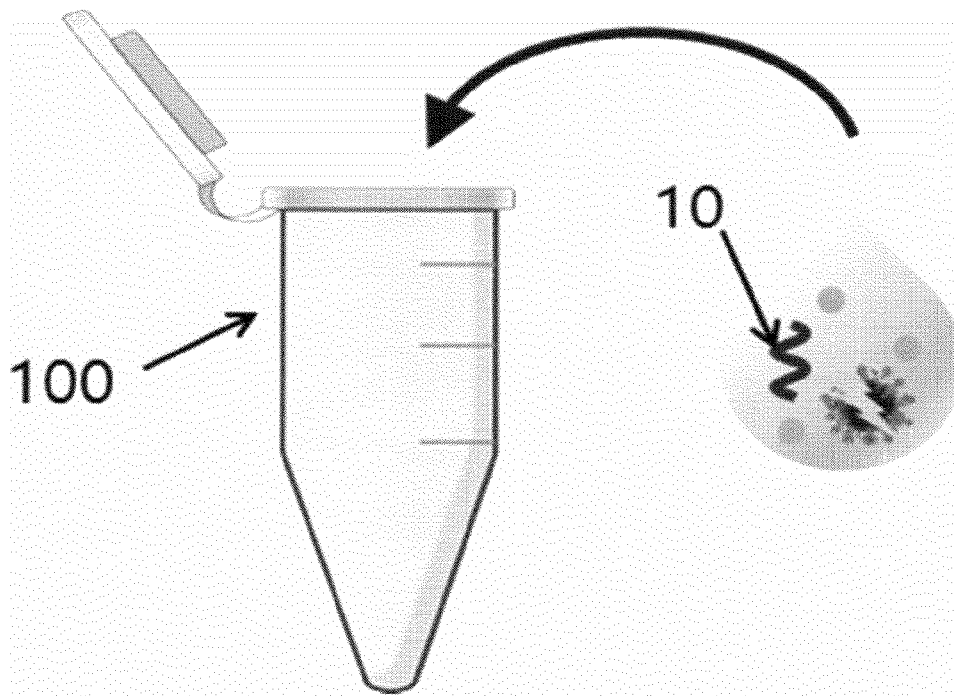
- [청구항 1] 시료를 수용하는 몸체; 및
상기 몸체의 내면에 코팅된 중합체 박막을 포함하며,
상기 중합체 박막은, 가수분해 가능한 측쇄를 갖는 양이온성 중합체를 포함하며, 표면 전위가 1mV 내지 50mV이고, 상기 양이온성 중합체의 가수분해효율은 50°C에서 1시간 반응시 30%이상인, 핵산 추출용 용기.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 가수분해 가능한 측쇄는 가수분해성 양이온성 에스터(hydrolytic cationic ester)를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 용기.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 양이온성 중합체는, 2-(디메틸아미노)에틸 아크릴레이트(DMAEA), 2-(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트(DMAEMA) 및 2-(디에틸아미노)에틸 메타크릴레이트(DEAEMA) 중 적어도 하나를 포함하는 단량체로부터 중합된 반복단위를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 용기.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 양이온성 중합체는 DMAEA로부터 중합된 반복단위를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 용기.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 양이온성 중합체는 선형 중합체인 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 용기.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 양이온성 중합체의 수평균분자량은 1,000g/mol 내지 2,000g/mol인 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 용기.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 양이온성 중합체의 수평균분자량은 1,000g/mol 내지 3,000g/mol인 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 용기.
- [청구항 8] 수용 공간을 갖는 몸체; 및
상기 수용 공간에 접하도록 상기 몸체에 코팅된 중합체 박막을 포함하며,
상기 중합체 박막은, 가수분해성 양이온성 에스터를 포함하는 측쇄를 가지며 수평균분자량은 1,000g/mol 내지 3,000g/mol인 양이온성 중합체를 포함하는, 핵산 추출용 용기.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 양이온성 중합체는, 2-(디메틸아미노)에틸 아크릴레이트(DMAEA), 2-(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트(DMAEMA) 및 2-(디에틸아미노)에틸 메타크릴레이트(DEAEMA) 중 적어도 하나를 포함하는 단량체로부터 중합된 반복단위를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 용기.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 양이온성 중합체는 DMAEA로부터 중합된 반복단위를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 용기.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 양이온성 중합체는 선형 중합체이며, 수평균분자량은 1,000g/mol 내지 2,000g/mol인 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 용기.

- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 몸체는 튜브 형상을 갖는 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 용기.
- [청구항 13] 제8항에 있어서, 상기 중합체 박막의 두께는 1nm 내지 1,000nm인 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 용기.
- [청구항 14] 가수분해 가능한 측쇄를 갖는 양이온성 중합체를 포함하는 박막이 코팅된 용기 내에 핵산을 포함하는 시료를 투입하는 단계;
상기 박막으로부터 용해된 양이온성 중합체와 상기 핵산을 결합시켜 중합체-핵산 복합체를 형성하는 단계;
상기 양이온성 중합체를 가수분해하여 상기 중합체-핵산 복합체로부터 상기 핵산을 방출하는 단계; 및
상기 핵산 또는 상기 핵산으로부터 합성된 다른 핵산을 증폭하는 단계를 포함하는 핵산 검출 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 핵산을 방출하기 위한 가수분해는 30°C 내지 60°C에서 수행되는 것을 특징으로 하는 핵산 검출 방법.
- [청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 핵산은 RNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 검출 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 역전사 반응을 통해 상기 RNA의 상보적 DNA(cDNA)를 합성하는 단계를 더 포함하고, 상기 핵산을 증폭하는 단계는 상기 cDNA를 증폭하는 것을 특징으로 하는 핵산 검출 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 핵산의 방출은 상기 cDNA를 합성하는 단계에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 핵산 검출 방법.
- [청구항 19] 제14항에 있어서, 상기 양이온성 중합체는 DMAEA로부터 중합된 반복단위를 포함하며, 상기 양이온성 중합체의 수평균분자량은 1,000g/mol 내지 3,000g/mol인 것을 특징으로 하는 핵산 검출 방법.
- [청구항 20] 제14항에 있어서, 상기 중합체-핵산 복합체를 형성하는 단계, 상기 핵산을 방출하는 단계 및 상기 핵산을 증폭하는 단계는 동일한 용기 내에서 수행되는 것을 특징으로 하는 핵산 검출 방법.

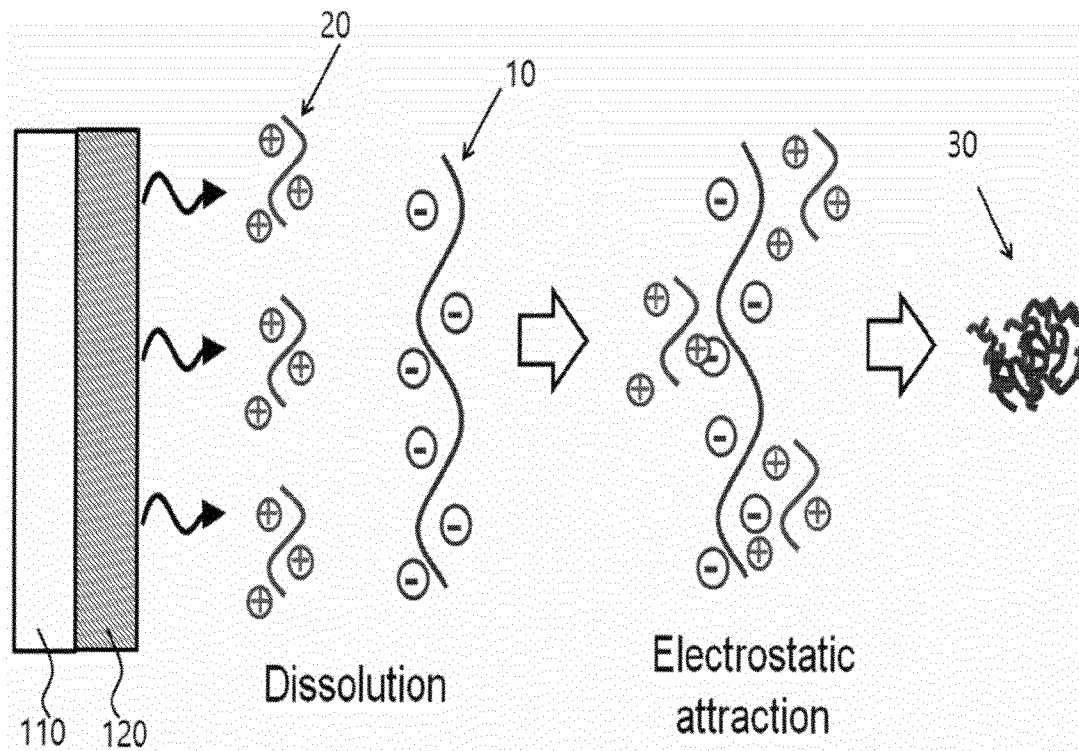
[도 1]



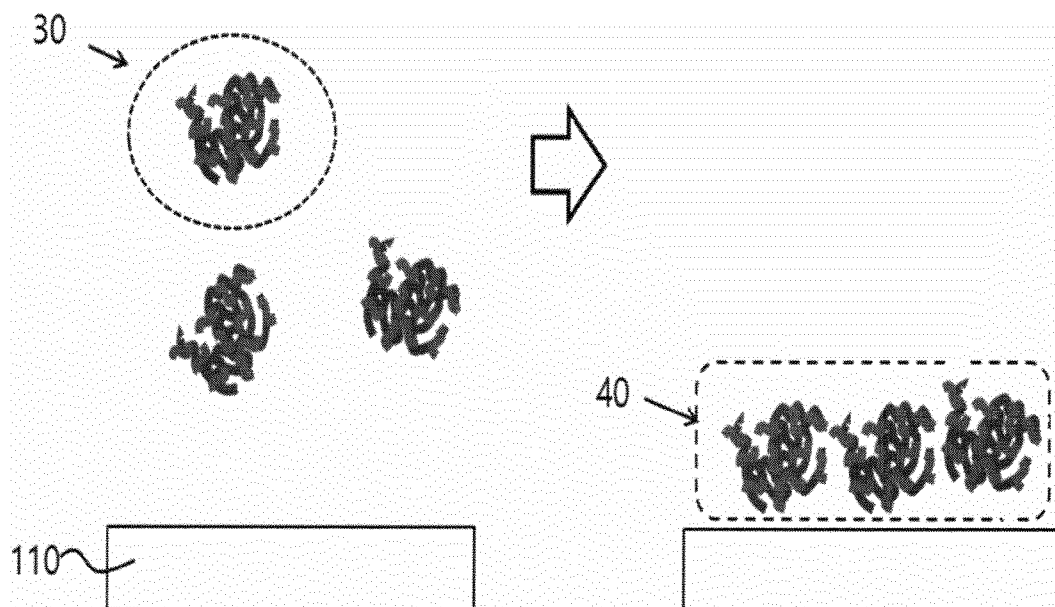
[도2a]



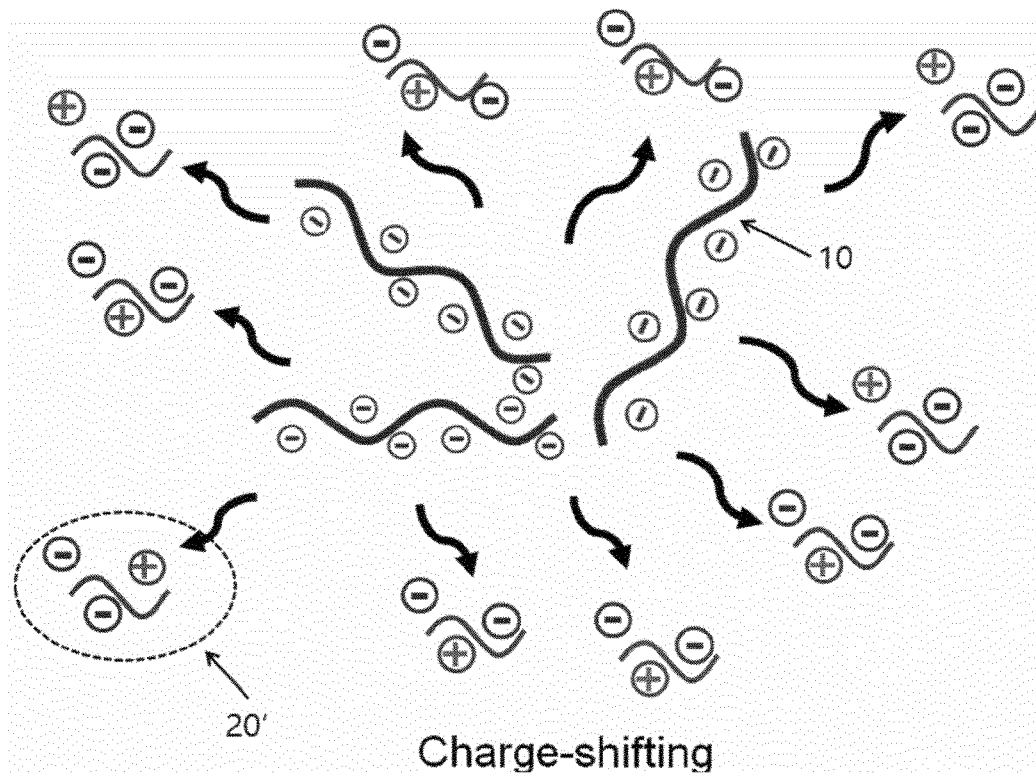
[도2b]



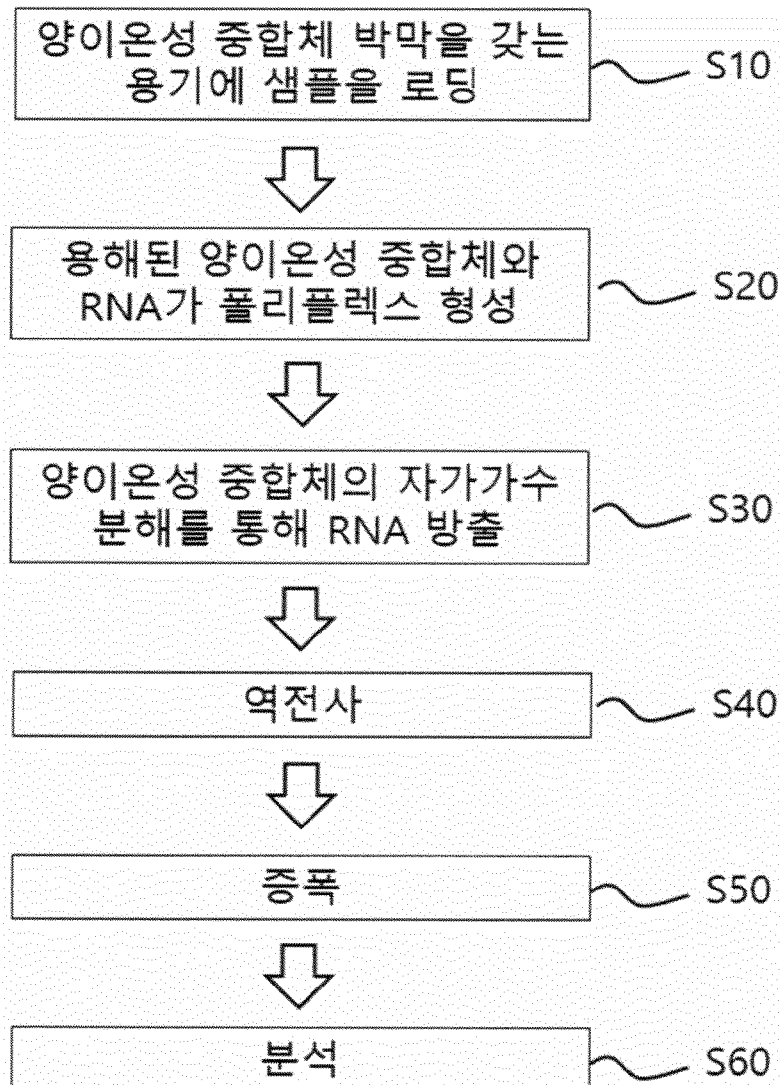
[도2c]



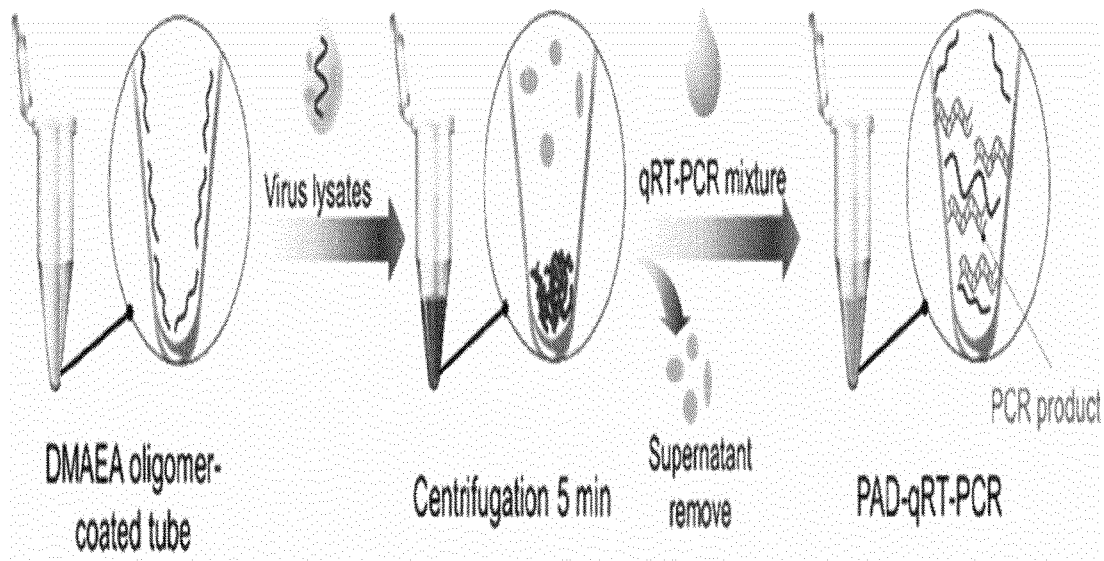
[도2d]



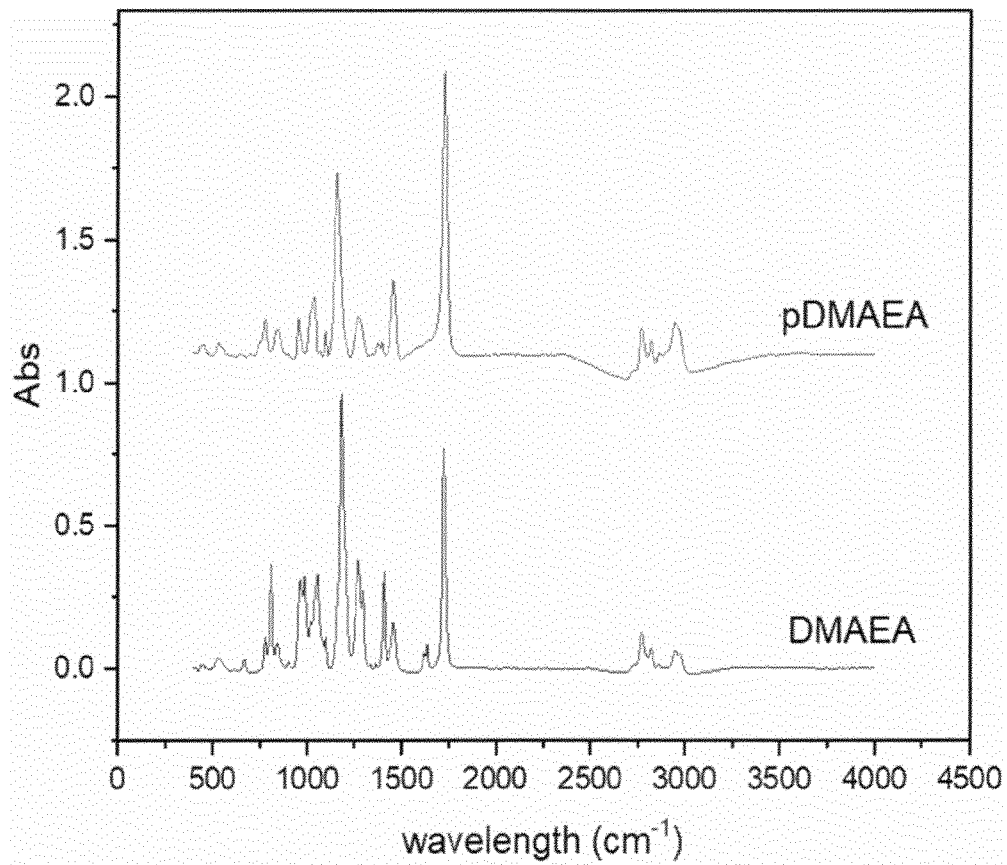
[도3a]



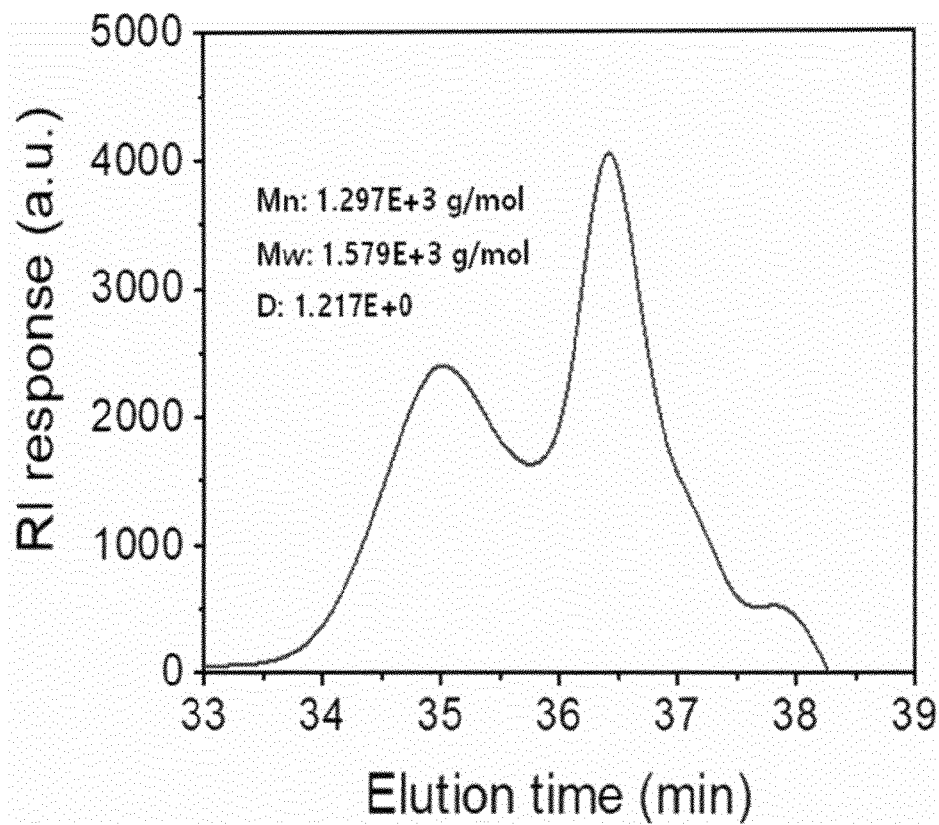
[도3b]



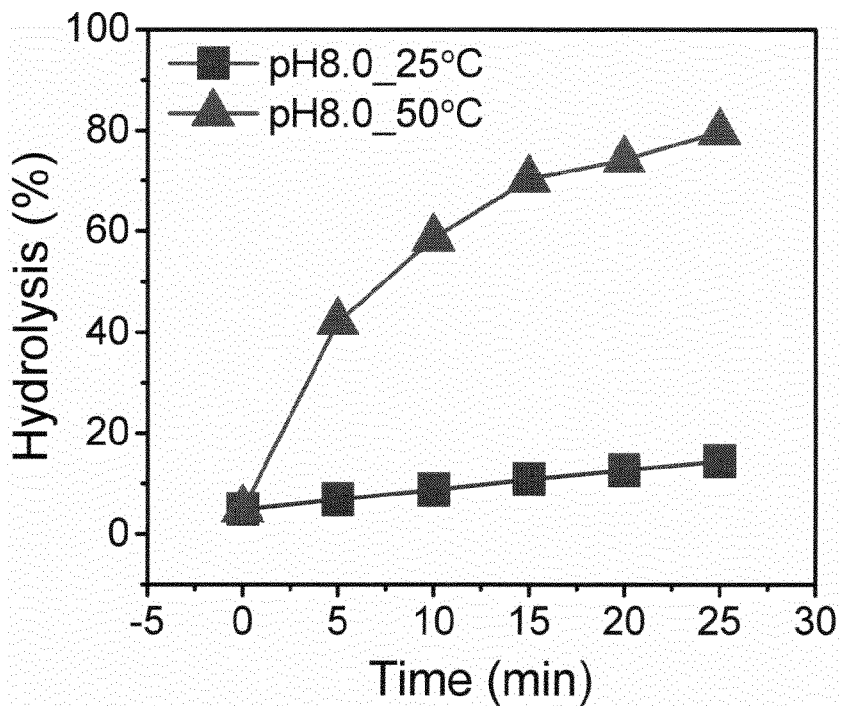
[도4]



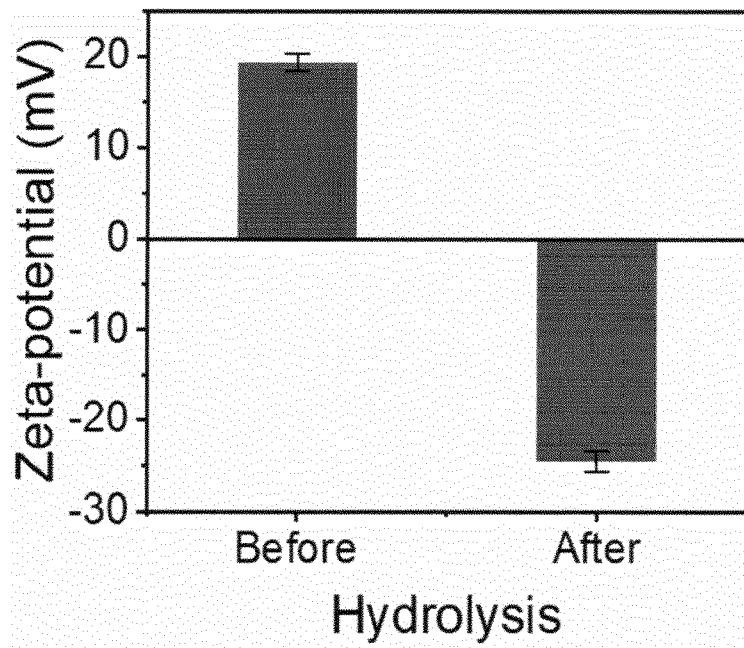
[도5]



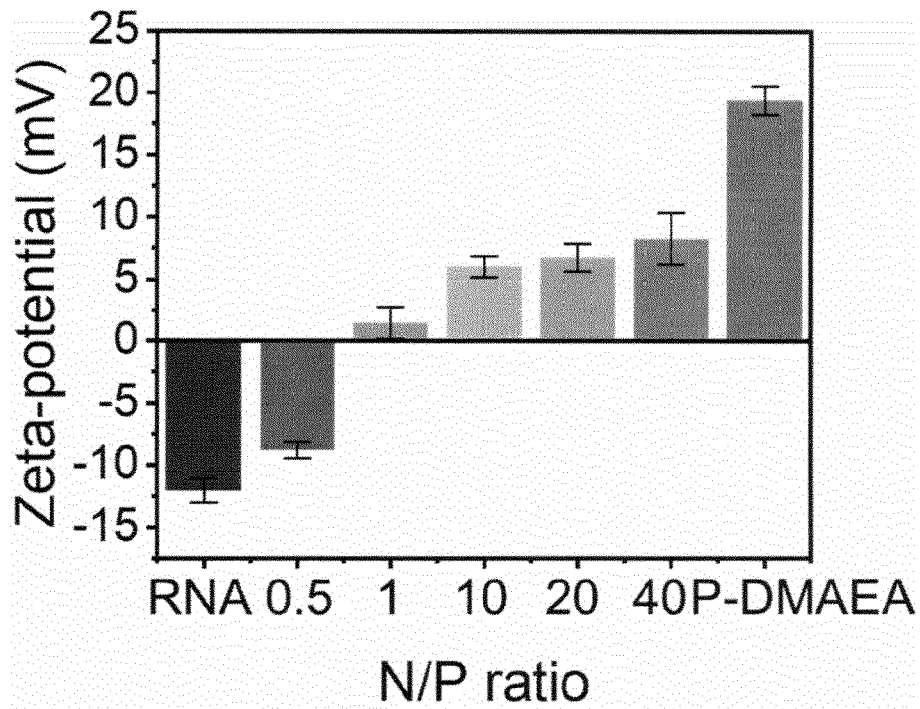
[도6]



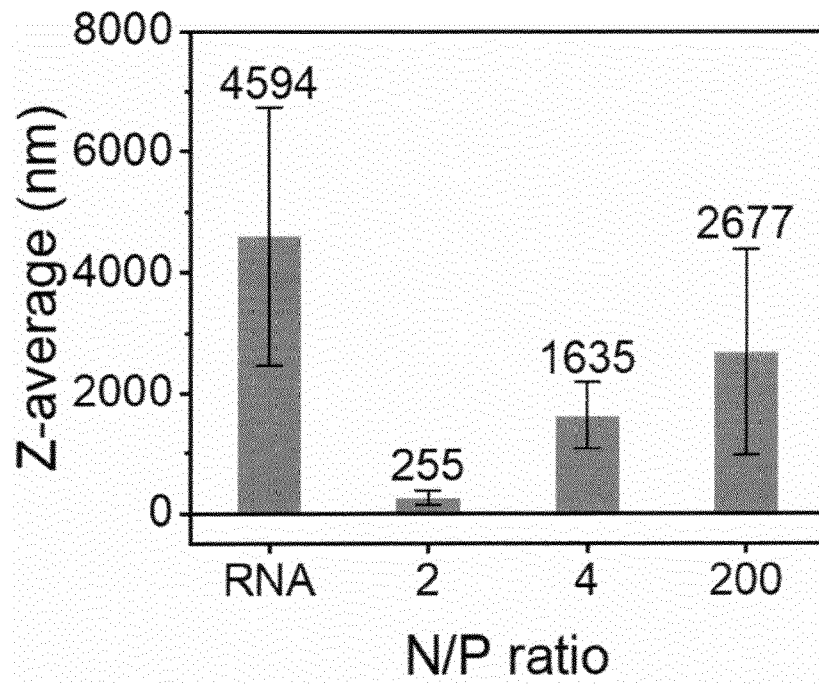
[도7]



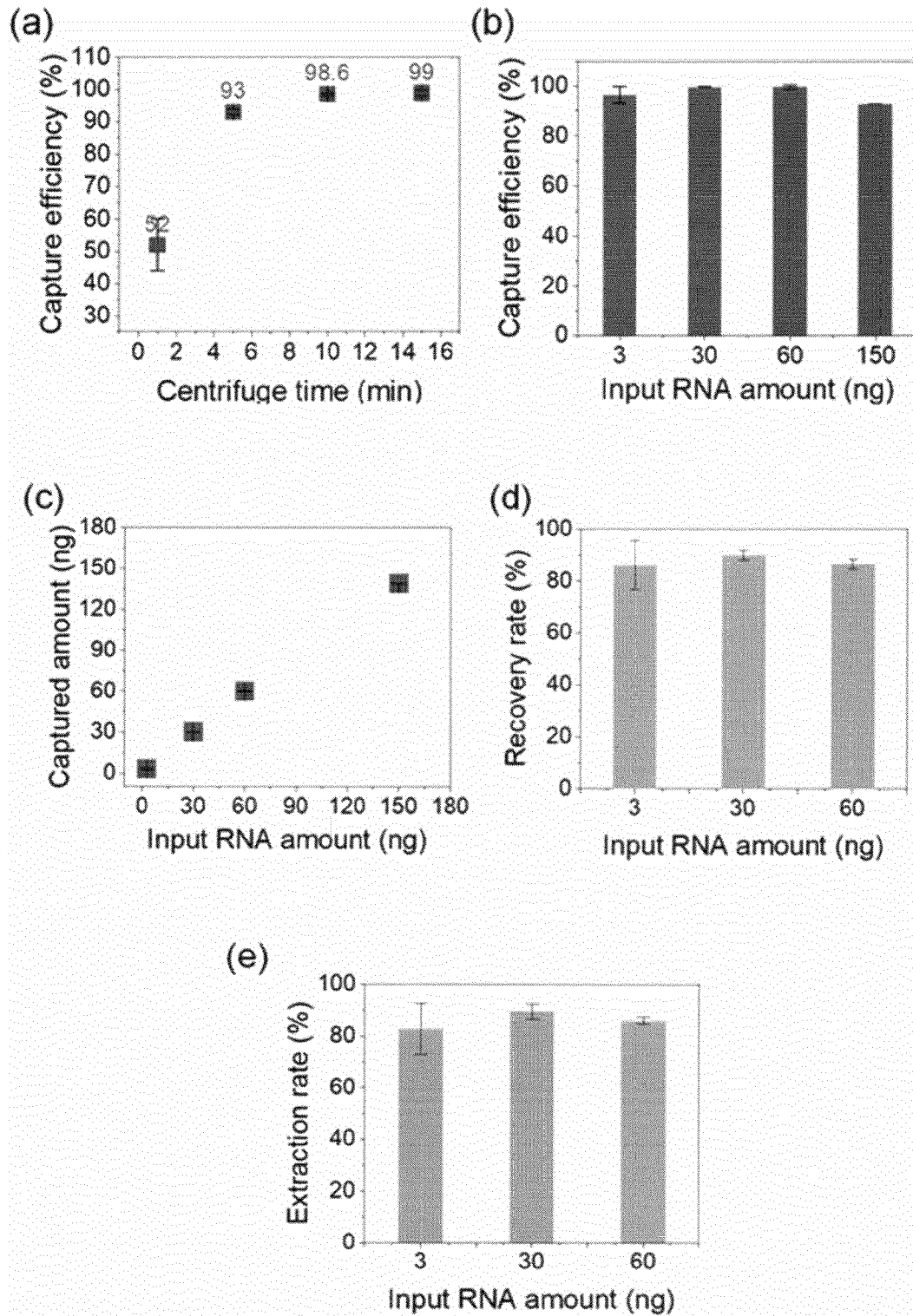
[도8]



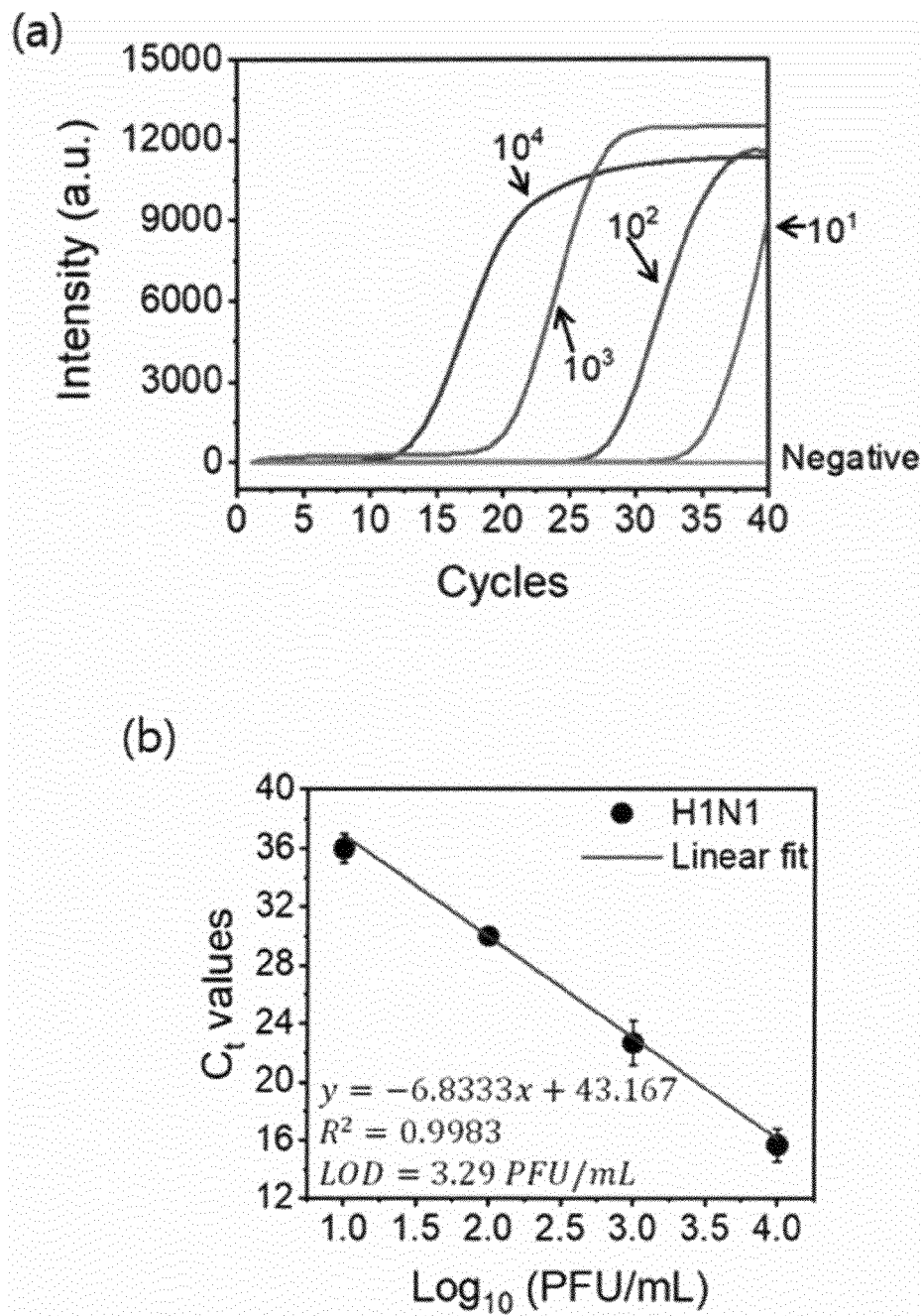
[도9]



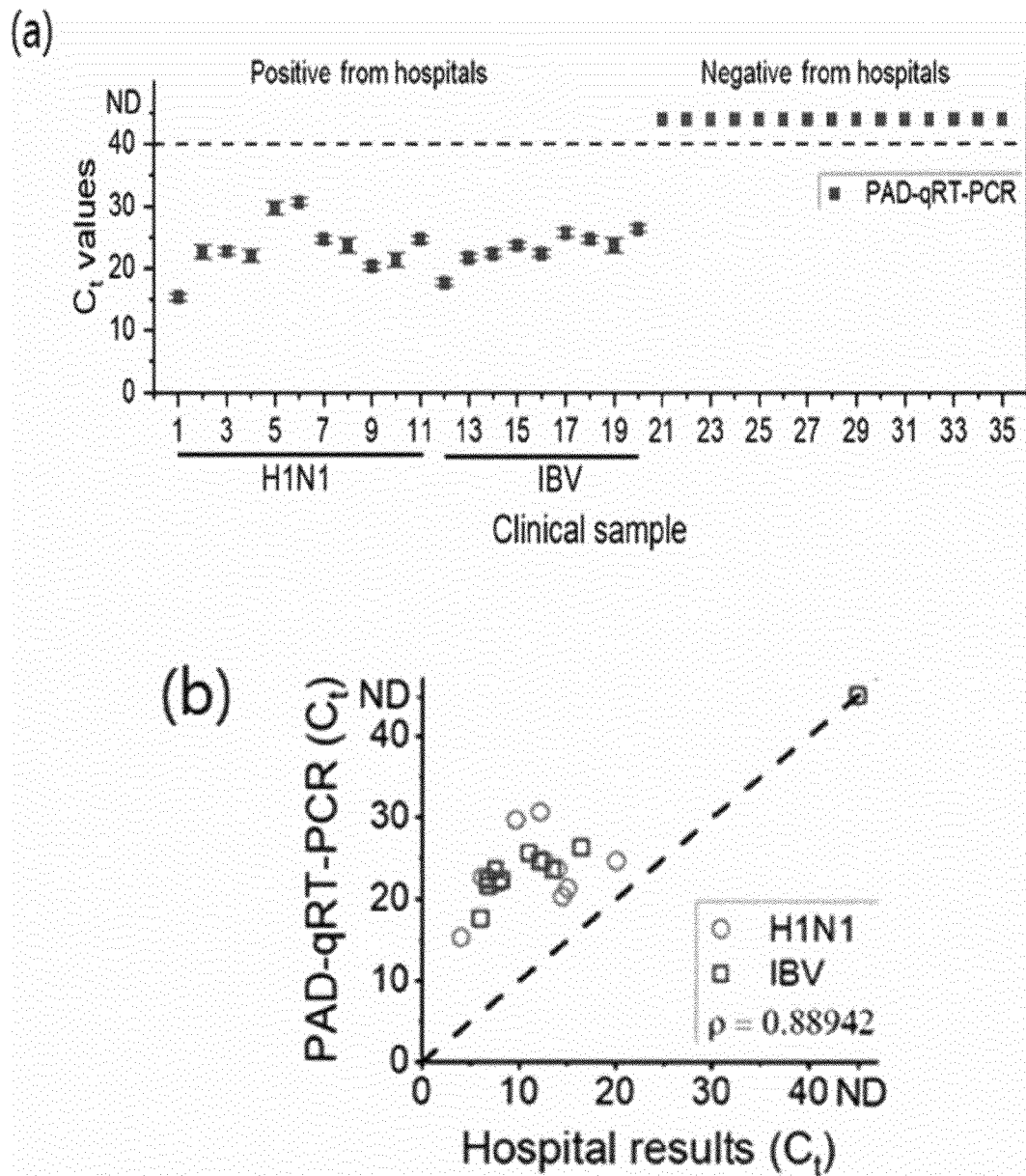
[도 10]



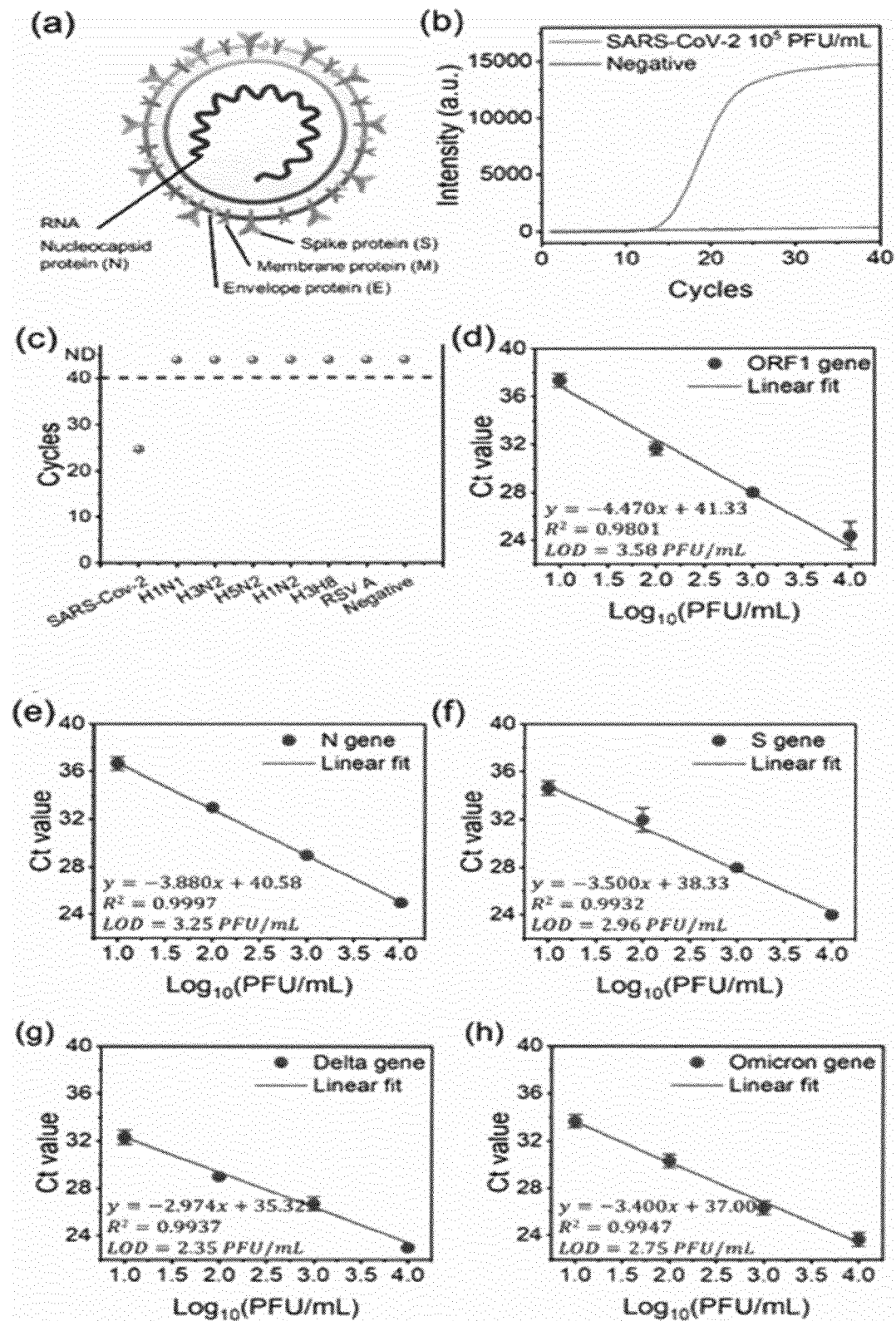
[도11]



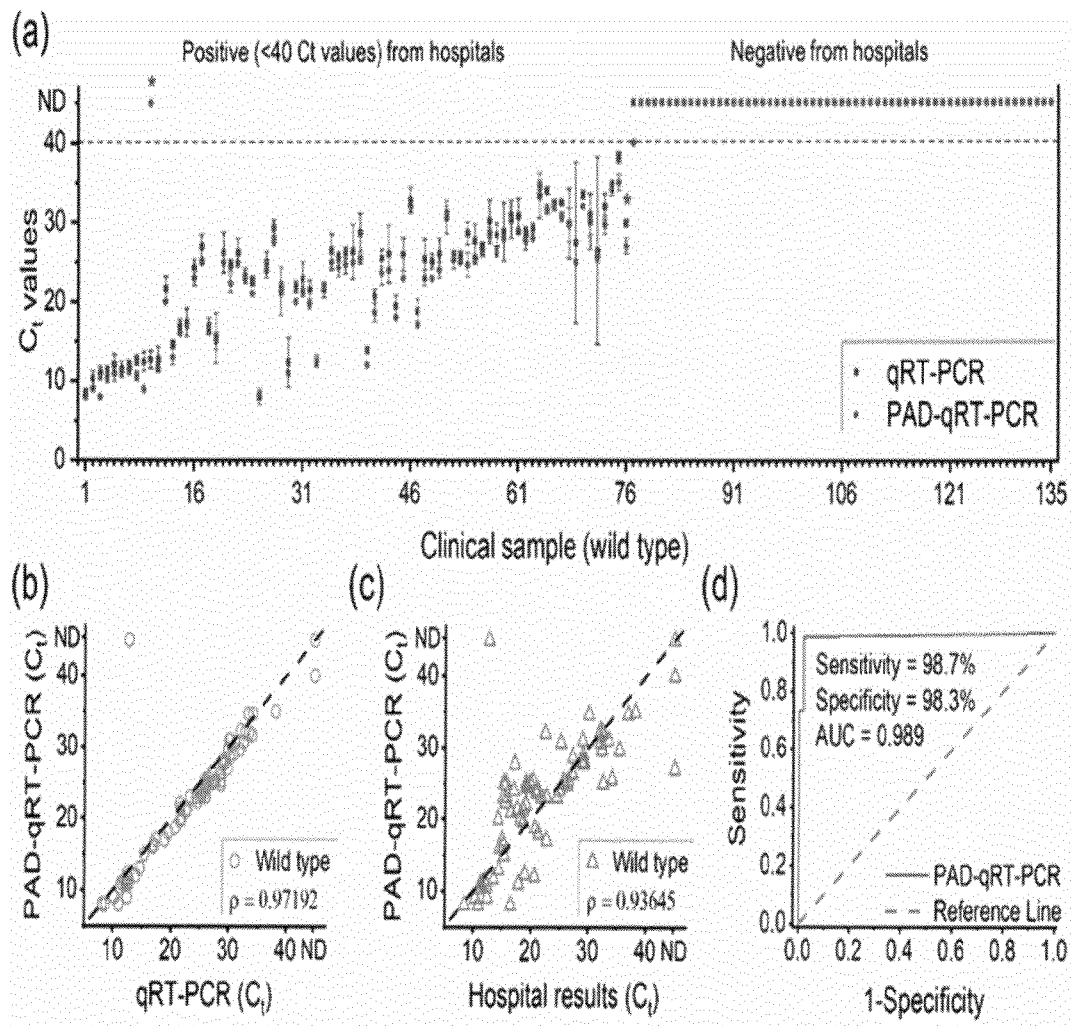
[도 12]



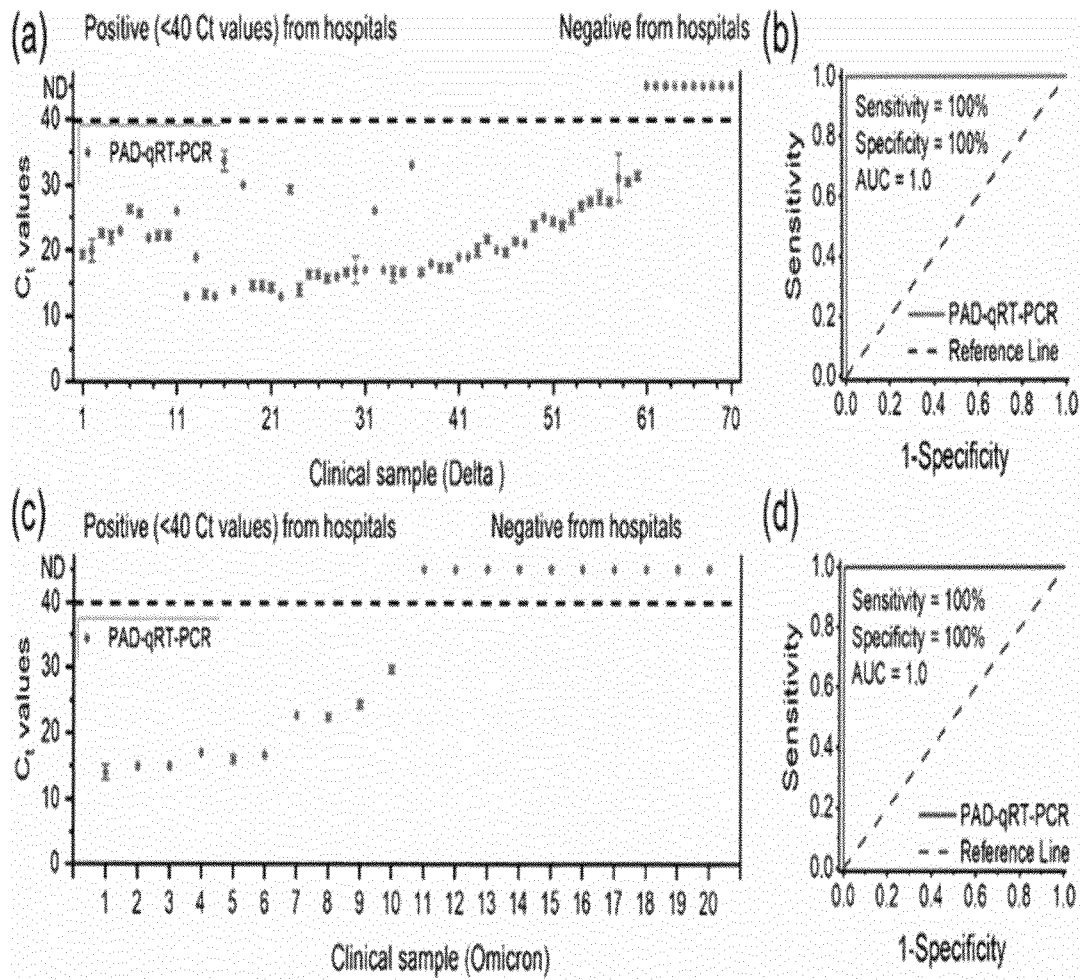
[도13]



[도 14]



[도 15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/020425

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/10(2006.01)i; B01L 3/00(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/10(2006.01); B01L 3/00(2006.01); C08G 83/00(2006.01); C12N 15/00(2006.01); C12Q 1/68(2006.01);
C12Q 1/6806(2018.01); C12Q 1/686(2018.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 양이온성 중합체(cationic polymer), 핵산(nucleic acid), 박막(thin film), 가수분해(hydrolysis), 양이온성 에스터(cationic ester), 표면 전위(surface potential), 복합체(complex)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2021-0044621 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 23 April 2021 (2021-04-23) See abstract; and claims 1-14.	1-20
A	KR 10-2020-0092691 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 04 August 2020 (2020-08-04) See entire document.	1-20
A	JP 2018-517005 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 28 June 2018 (2018-06-28) See entire document.	1-20
A	KR 10-2018-0119928 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 05 November 2018 (2018-11-05) See entire document.	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 March 2024

Date of mailing of the international search report

26 March 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/020425

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2022-0150637 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 11 November 2022 (2022-11-11) See entire document.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/020425

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2021-0044621	A	23 April 2021	KR	10-2287745	B1	09 August 2021
KR	10-2020-0092691	A	04 August 2020	None			
JP	2018-517005	A	28 June 2018	CN	107660220	A	02 February 2018
				EP	3277743	A1	07 February 2018
				EP	3277743	B1	28 December 2022
				EP	4163322	A1	12 April 2023
				JP	6905469	B2	21 July 2021
				US	11590234	B2	28 February 2023
				US	2018-0021441	A1	25 January 2018
				US	2023-0120244	A1	20 April 2023
				WO	2016-161345	A1	06 October 2016
KR	10-2018-0119928	A	05 November 2018	KR	10-1964242	B1	01 April 2019
KR	10-2022-0150637	A	11 November 2022	KR	10-2579800	B1	18 September 2023

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/10(2006.01)i; B01L 3/00(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/10(2006.01); B01L 3/00(2006.01); C08G 83/00(2006.01); C12N 15/00(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6806(2018.01); C12Q 1/686(2018.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 양이온성 중합체(cationic polymer), 핵산(nucleic acid), 박막(thin film), 가수분해(hydrolysis), 양이온성 에스터(cationic ester), 표면 전위(surface potential), 복합체(complex)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2021-0044621 A (한국과학기술원) 2021.04.23 요약; 청구항 1-14	1-20
A	KR 10-2020-0092691 A (한국과학기술원) 2020.08.04 전체 문헌	1-20
A	JP 2018-517005 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 2018.06.28 전체 문헌	1-20
A	KR 10-2018-0119928 A (한국과학기술원 등) 2018.11.05 전체 문헌	1-20
A	KR 10-2022-0150637 A (한국과학기술원) 2022.11.11 전체 문헌	1-20
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년03월26일(26.03.2024)	국제조사보고서 발송일 2024년03월26일(26.03.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2021-0044621 A	2021/04/23	KR 10-2287745 B1	2021/08/09
KR 10-2020-0092691 A	2020/08/04	없음	
JP 2018-517005 A	2018/06/28	CN 107660220 A	2018/02/02
		EP 3277743 A1	2018/02/07
		EP 3277743 B1	2022/12/28
		EP 4163322 A1	2023/04/12
		JP 6905469 B2	2021/07/21
		US 11590234 B2	2023/02/28
		US 2018-0021441 A1	2018/01/25
		US 2023-0120244 A1	2023/04/20
		WO 2016-161345 A1	2016/10/06
KR 10-2018-0119928 A	2018/11/05	KR 10-1964242 B1	2019/04/01
KR 10-2022-0150637 A	2022/11/11	KR 10-2579800 B1	2023/09/18