



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0091026
(43) 공개일자 2013년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01) *C12M 1/38* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0012220

(22) 출원일자 2012년02월07일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

나노바이오시스 주식회사

서울특별시 금천구 디지털로9길 47, 한신it타워
2차 1004호 (가산동)

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

인광호

서울특별시 강남구 압구정동 한양아파트 42-601

김원기

서울특별시 강남구 압구정동 미성아파트 2-905

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김웅

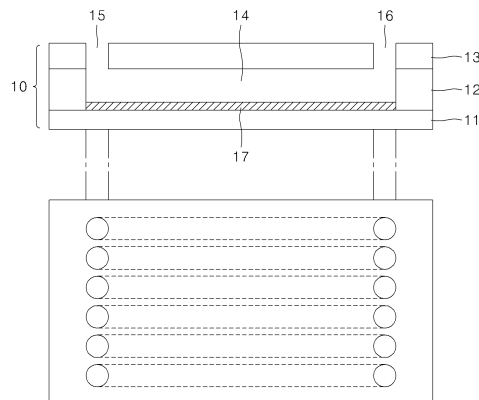
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **감염 결핵균 검출을 위한 P C R 장치 및 이를 이용한 감염 결핵균 검출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 결핵균 검출을 위한 PCR 장치 및 이를 이용한 결핵균 검출 방법에 관한 것으로서, 이에 따르면 결핵균 감염 여부를 저렴한 비용으로 정확하게 신속하게 확인할 수 있어서 결핵균 감염 확산을 예방하고 이에 신속한 대응 조치를 취하는데에 크게 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김성우

서울특별시 은평구 역촌동 228-2 로얄빌라 104호

김선진

서울특별시 서대문구 홍제1동 330-81 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10038655

부처명 지식경제부

연구사업명 산업융합기술산업원천기술개발사업(나노기반)

연구과제명 호흡기 감염성 질환 치료 전처리 및 통합 시스템 개발

주관기관 나노바이오시스(주), 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.12.01 ~ 2014.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기 서열 중 15개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 프라이머 및 서열번호 2의 염기 서열 중 15개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) 게놈 내에 삽입되는 IS6110 유전자를 검출하기 위한, 결핵균 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

제1 판;

상기 제1 판 상에 배치되고, 1 이상의 반응 채널을 구비하는 제2 판; 및

상기 제2 판 상에 배치되고, 상기 1 이상의 반응 채널의 양 말단과 연결되되 개폐 가능하도록 구현된 유입부 및 유출부를 구비하는 제3 판을 포함하는 것으로서,

상기 1 이상의 반응 채널 내에 제1항에 따른 프라이머 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 PCR(Polymerase Chain Reaction) 칩.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 제1 판 및 제3 판은 폴리디메틸실옥산(polydimethylsiloxane, PDMS), 사이클로올레핀코폴리머(cycloolefin copolymer, COC), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리프로필렌카보네이트(polypropylene carbonate, PPC), 폴리에테르설폰(polyether sulfone, PES), 및 폴리에틸렌테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 및 그의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 재질을 포함하고,

상기 제2 판은 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 사이클로올레핀 코폴리머(cycloolefin copolymer, COC), 폴리아미드(polyamide, PA), 폴리에틸렌(polyethylene, PE), 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리페닐렌 에테르(polyphenylene ether, PPE), 폴리스티렌(polystyrene, PS), 폴리옥시메틸렌(polyoxymethylene, POM), 폴리에테르에테르케톤(polyetheretherketone, PEEK), 폴리테트라프로오르에틸렌(polytetrafluoroethylene, PTFE), 폴리비닐클로라이드(polyvinylchloride, PVC), 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride, PVDF), 폴리부틸렌테레프탈레이트(polybutyleneterephthalate, PBT), 불소화에틸렌프로필렌(fluorinated ethylenepropylene, FEP), 퍼플로로알콕시알칸(perfluoroalkoxyalkane, PFA), 및 그의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 열 가소성 수지 또는 열 경화성 수지 재질을 포함하는 것을 특징으로 하는 PCR 칩.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 PCR 칩은 플라스틱 재질로 구현되되, 광 투과성을 갖도록 구현된 것을 특징으로 하는 PCR 칩.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 1 이상의 반응 채널 내에 dATP, dCTP, dGTP, 및 dTTP를 포함하는 혼합물, DNA 중합효소 및 검출 가능한 표지를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 PCR 칩.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 검출 가능한 표지는 Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa

Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Cy2, Cy3.18, Cy3.5, Cy3, Cy5.18, Cy5.5, Cy5, Cy7, Oregon Green, Oregon Green 488-X, Oregon Green, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, SYTO 11, SYTO 12, SYTO 13, SYTO 14, SYTO 15, SYTO 16, SYTO 17, SYTO 18, SYTO 20, SYTO 21, SYTO 22, SYTO 23, SYTO 24, SYTO 25, SYTO 40, SYTO 41, SYTO 42, SYTO 43, SYTO 44, SYTO 45, SYTO 59, SYTO 60, SYTO 61, SYTO 62, SYTO 63, SYTO 64, SYTO 80, SYTO 81, SYTO 82, SYTO 83, SYTO 84, SYTO 85, SYTOX Blue, SYTOX Green, SYTOX Orange, SYBR Green, YO-PRO-1, YO-PRO-3, YOYO-1, YOYO-3 및 티아졸 오렌지(thiazole orange)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 PCR 칩.

청구항 7

기관 상에 배치된 제1 열 블록;

상기 기관 상에 상기 제1 열 블록과 이격 배치된 제2 열 블록; 및

상기 제1 열 블록 및 제2 열 블록 위로 구동 수단에 의해 좌우 및/또는 상하 이동 가능하고, 제2행 내지 제6행 중 어느 한 행에 따른 PCR 칩이 장착된 칩 홀더;

를 포함하는 PCR 장치.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 제1 열 블록과 제2 열 블록 사이에 광원이 더 배치되고, 상기 칩 홀더 위에 상기 광원으로부터 방출되는 광을 검출하기 위한 광 검출부가 더 배치되거나, 또는 상기 제1 열 블록과 제2 열 블록 사이에 광원으로부터 방출되는 광을 검출하기 위한 광 검출부가 더 배치되고, 상기 칩 홀더 위에 광원이 더 배치되는 것을 특징으로 하는 PCR 장치.

청구항 9

기관, 상기 기관 상에 배치된 도전성 나노 입자를 포함하는 발열층, 상기 발열층 상에 배치된 절연 보호층 및 상기 발열층과 연결 배치된 전극을 구비하되, 광투과성을 갖도록 구현된 광투과성 열 블록; 및

상기 광투과성 열 블록의 상부 면에 접촉 가능하도록 배치된, 제2행 내지 제6행 중 어느 한 행에 따른 PCR 칩;

을 포함하는 PCR 장치.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 기관은 광 투과성 유리 또는 플라스틱 재질이고, 상기 발열층에 포함된 도전성 나노 입자는 산화물 반도체 물질 또는 상기 산화물 반도체 물질에 In, Sb, Al, Ga, C 및 Sn로 구성된 군으로부터 선택된 불순물이 첨가된 물질이고, 상기 절연 보호층은 유전체 산화물, 페릴린, 나노 입자 및 고분자 필름으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이고, 상기 전극은 금속 물질, 전도성 에폭시, 전도성 페이스트, 솔더 및 전도성 필름으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 PCR 장치.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 광투과성 열 블록의 기관의 하부 면은 흡광 물질이 포함된 흡광층이 접촉 배치되거나, 또는 상기 광투과성 열 블록의 절연 보호층의 상부 면은 광반사 방지 물질이 포함된 광반사방지층이 접촉 배치된 것을 특징으로 하는 PCR 장치.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 PCR 장치는 상기 칩 접촉부에 배치되는 PCR 칩에 광을 제공하도록 구동가능하게 배치된 광 제공부 및 상기

칩 접촉부에 배치되는 PCR 칩으로부터 방출되는 광을 수용하도록 구동가능하게 배치된 광 검출부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 PCR 장치.

청구항 13

1 이상의 히터를 구비하는 히터 군, 상기 히터 군을 2 이상 구비하고 상기 2 이상의 히터 군은 상호 열 교환이 일어나지 않도록 이격 배치된 히터 유닛이 2 이상 반복 배치된 것으로서, 적어도 일 면에 표적 샘플이 수용되는 PCR 칩의 접촉 면을 구비하는 열 블록;

상기 열 블록에 구비된 히터들에 전력을 공급하도록 연결된 전극을 구비하는 전극부; 및

상기 열 블록에 구비된 1 이상의 히터들과 열 교환이 가능하도록 상기 열 블록 상에 접촉가능하도록 배치된, 제 2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 PCR 칩;

을 포함하는 PCR 장치.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 열 블록은 2개 내지 4개의 히터 군을 구비하는 것을 특징으로 하는 PCR 장치.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 열 블록은 2개의 히터 군을 구비하고, 상기 제1 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 어닐링/연장 단계 온도를 유지하거나, 또는 상기 제1 히터 군은 PCR 어닐링/연장 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하는 것을 특징으로 하는 PCR 장치.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 열 블록은 3개의 히터 군을 구비하고, 상기 제1 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 어닐링 단계 온도를 유지하고 상기 제3 히터 군은 PCR 연장 단계 온도를 유지하거나, 또는 상기 제1 히터 군은 PCR 어닐링 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 연장 단계 온도를 유지하고 상기 제3 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하거나, 또는 상기 제1 히터 군은 PCR 연장 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하고 상기 제3 히터 군은 PCR 어닐링 단계 온도를 유지하는 것을 특징으로 하는 PCR 장치.

청구항 17

제13항에 있어서,

상기 열 블록은 광 투과성을 갖도록 구현된 것을 특징을 하는 PCR 장치.

청구항 18

제13항에 있어서,

상기 열 블록에 구비된 히터는 광 투과성 발열소자를 포함하는 것을 특징으로 하는 PCR 장치.

청구항 19

제13항에 있어서,

상기 전극부에 전력을 공급하기 위한 전력 공급부 및 상기 1 이상의 반응 채널 내에서 유동하는 유체의 유량 및 유속을 제어하기 위해 양압 또는 음압을 제공하도록 배치된 펌프를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 PCR 장치.

청구항 20

제13항에 있어서,

상기 제1 히터 및 상기 제2 히터 사이에 광원이 배치되고, 상기 전극부에 전력을 공급하기 위한 전력 공급부,

상기 1 이상의 반응 채널 내에서 유동하는 유체의 유량 및 유속을 제어하기 위해 양압 또는 음압을 제공하도록 배치된 펌프, 및 상기 광원으로부터 방출되는 광을 검출하기 위한 광 검출부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 PCR 장치.

청구항 21

제13항에 있어서,

상기 전극부에 전력을 공급하기 위한 전력 공급부, 상기 1 이상의 반응 채널 내에서 유동하는 유체의 유량 및 유속을 제어하기 위해 양압 또는 음압을 제공하도록 배치된 펌프, 상기 PCR 칩에 광을 제공하도록 배치된 광 공급부, 및 상기 PCR 칩으로부터 방출되는 광을 수용하도록 배치된 광 검출부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 PCR 장치.

청구항 22

결핵균 감염이 의심되는 대상 시료를 제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 PCR 칩의 상기 1 이상의 반응 채널에 도입하여 PCR을 수행하는 단계; 및

상기 PCR 결과로부터 상기 대상 시료 중에 결핵균의 존재 유무를 확인하는 단계;

를 포함하는 결핵균 검출 방법.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 PCR 수행 단계는 제7항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 PCR 장치, 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 PCR 장치, 및 제13항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 PCR 장치로 구성된 군으로부터 선택된 PCR 장치에서 수행되는 것을 특징으로 하는 결핵균 검출 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)을 검출하기 위한 장치 및 이를 이용하여 결핵균 감염 여부를 검출하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 감염에 의해 생기는 감염성 질환을 말한다. 결핵은 먼저 결핵에 걸린 환자가 기침과 재채기 등을 할 때 결핵균이 포함된 객담 비말이 공기 중에 노출되면서 다른 사람의 말초 기도의 폐까지 흡입됨으로써 발병한다. 그러나 비말 핵인 결핵균을 흡입하더라도 대부분의 경우 숙주의 면역 방어 기전으로 인해 자연 치유되지만 그 중의 일부는 결핵균이 폐문부의 임파절로 확장되어 일차복합체를 이루거나, 늑막삼출로 늑막염을 유발하던지 속립결핵, 결핵성 뇌막염, 골결핵, 장결핵 등 전신감염을 일으키는 경우도 있다. 초감염 결핵은 대부분 일차복합체가 치유되면 휴면상태에 들어가게 되며, 이 감염환자의 약 10%에서는 체내의 면역이 결핍하게 되면 결과적으로 병변이 재활성화되어 균이 다시 자라게 되는데 이는 내인성 원인에 의한 것으로 생각된다. 특히, 성인에서의 결핵은 주로 폐의 상부에 잘 생기고 폐 조직의 괴사성 파괴가 심하여 공동을 형성하여 결핵균이 자라기 좋은 조건이 되는 경우가 많다. 한편, 최근 AIDS의 확산과 다제 약제 내성 결핵균이 확산되어 후진국이나 개발도상국에서 문제시되던 것이 선진국까지 문제가 확산되고 있는 추세이다. 그리하여 세계보건기구는 결핵 퇴치에 큰 관심을 가지게 되었다. 이미 다제 약제 내성 결핵균이 등장함으로써 기존의 결핵예방을 위한 백신이나 항생제는 결핵퇴치에 큰 효과를 나타내지 못하는 실정으므로, 초기에 결핵을 진단하여 치료하는 것이 급선무인 상황하에 놓여있다. 현재 시행되고 있는 결핵을 진단하기 위한 방법으로서, 피부반응 검사, 도말염색 표본 현미경 검사, 균 분리배양 검사, 흉부 X 선 검사 등이 있는데, 이들 진단 방법은 환자의 가검물이나 피부를 통해 진단하는 것이므로 비용이나 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 이러한 단점을 해결하기 위해 환자의 혈액에서 결핵균이나 그 구성성분(항원)을 검출하여 항원-항체반응을 이용한 검출 방법이 개발되고 있다. 그 중 항원-항체반응법은 단시간 내에 이루어지며 특수한 장비나 시설이 필요하지 않고 특이도나 민감도 등이 우수하여 널리 사용될 수 있는 것이다. 이에 따라서 몇몇 진단 키트가 개발되었으나, 민감도가 60에서 85%로 낮은 수준이고, 특이도는 85에서 96%정도이므로 대부분이 실험실 수준에서 결핵균을 검출할 수 있는 정도

에 불과하다. 또한 이러한 극소의 진단 키트들은 사람의 혈액 중 하나의 구성성분인 혈청만을 따로 원심분리시켜 사용하여야 하는 번거로움이 있으므로, 시간적, 장비적 제한을 받고 있다. 그러므로, 이러한 단점을 해결하여 직접 전혈을 이용하여 보다 사용이 용이하고 편리하며, 특이도와 민감도가 우수하고, 환자로부터 단시간 내에 정확한 결핵균을 검출할 수 있는 진단 키트의 개발이 당업계에서 요구되고 있는 실정이다. 이러한 단점을 개선하기 위하여, PCR 방법을 이용한 각종 질병 진단 키트들이 연구 개발되기 시작하였다. PCR 방법을 이용한 진단 키트들은 높은 정확성과 간편성, 신속성 때문에 각종 분야에서 날로 그 수요가 증가하고 있다. 특히, 최근 많이 사용되고 있는 실시간 PCR 방법은 PCR 증폭 산물의 증가를 PCR의 매 주기마다 실시간으로 관찰하는 방법으로, PCR 증폭 산물과 반응하는 형광 물질의 검출과 정량으로 해석하는 방법이다. 이 방법은 기존의 PCR 방법이 최종 단계를 마치고 겔 상에서 염색하여 전기 영동 후 PCR 증폭 산물을 확인하는 것에 비해, 전기 영동의 추가 작업이 필요 없고, 정확도 및 민감도가 뛰어나며, 재현율이 높고, 자동화가 가능하며, 결과를 수치화할 수 있고, 신속하고 간편하며, EtBr(Ethidium Bromide)과 같은 염색제에 의한 오염 및 자외선 조사 등의 유해문제에 따른 생물학적 안전성이 뛰어나고, 자동으로 특이 유전자의 증폭 유무를 확인할 수 있다는 장점이 있다. 따라서, 실시간 PCR 방법을 통해 PCR 또는 항원/항체와 같은 정성적인 결과가 아닌 높은 특이도를 갖는 정량적인 결과를 확인할 수 있다. 또한 형광 표지 인자로 표지된 프로브를 이용하기 때문에 DNA 칩이나 항원/항체 반응에 사용되는 시료의 양 보다 적은 양의 시료로도 결과를 확인할 수 있다. 따라서, 대상 시료 내의 결핵균의 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단하기 위해 실시간 PCR 방법을 이용한 결핵균 검출 장치 및 이를 이용하는 결핵균 검출 방법의 필요성이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0003] 본 발명의 일 실시예들은 결핵균에 관한 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 일련의 결핵균 검출 장치 및 검출 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0004] 본 발명의 제1 실시예는 서열번호 1의 염기 서열 중 15개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 프라이머 및 서열번호 2의 염기 서열 중 15개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) 계통 내에 삽입되는 IS6110 유전자를 검출하기 위한, 결핵균 검출용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0005] 본 발명의 제2 실시예는 제1 판; 상기 제1 판 상에 배치되고, 1 이상의 반응 채널을 구비하는 제2 판; 및 상기 제2 판 상에 배치되고, 상기 1 이상의 반응 채널의 양 말단과 연결되되 개폐 가능하도록 구현된 유입부 및 유출부를 구비하는 제3 판을 포함하는 것으로서, 상기 1 이상의 반응 채널 내에 본 발명의 제1 실시예에 따른 프라이머 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 PCR(Polymerase Chain Reaction) 칩을 제공한다. 본 발명의 제2 실시예에 있어서, 상기 제1 판 및 제3 판은 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane, PDMS), 사이클로올레핀코폴리머(cycle olefin copolymer, COC), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리프로필렌카보네이트(polypropylene carbonate, PPC), 폴리에테르설폰(polyether sulfone, PES), 및 폴리에틸렌테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 및 그의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 재질을 포함하고, 상기 제2 판은 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 사이클로올레핀 코폴리머(cycloolefin copolymer, COC), 폴리아미드(polyamide, PA), 폴리에틸렌(polyethylene, PE), 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리페닐렌 에테르(polyphenylene ether, PPE), 폴리스티렌(polystyrene, PS), 폴리옥시메틸렌(polyoxymethylene, POM), 폴리에테르에테르케톤(polyetheretherketone, PEEK), 폴리테트라프로오르에틸렌(polytetrafluoroethylene, PTFE), 폴리비닐클로라이드(polyvinylchloride, PVC), 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride, PVDF), 폴리부틸렌테레프탈레이트(polybutyleneterephthalate, PBT), 불소화에틸렌프로필렌(fluorinated ethylenepropylene, FEP), 퍼플로로알콕시알칸(perfluoralkoxyalkane, PFA), 및 그의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 열 가소성 수지 또는 열 경화성 수지 재질을 포함할 수 있다. 또한, 상기 PCR 칩은 플라스틱 재질로 구현되되, 광 투과성을 갖도록 구현될 수 있다. 또한, 상기 PCR 칩은 상기 1 이상의 반응 채널 내에 dATP, dCTP, dGTP, 및 dTTP를 포함하는 혼합물, DNA 증합효소 및 검출 가능한 표지를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 검출 가능한 표지는 Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor

680, Cy2, Cy3.18, Cy3.5, Cy3, Cy5.18, Cy5.5, Cy5, Cy7, Oregon Green, Oregon Green 488-X, Oregon Green, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, SYTO 11, SYTO 12, SYTO 13, SYTO 14, SYTO 15, SYTO 16, SYTO 17, SYTO 18, SYTO 20, SYTO 21, SYTO 22, SYTO 23, SYTO 24, SYTO 25, SYTO 40, SYTO 41, SYTO 42, SYTO 43, SYTO 44, SYTO 45, SYTO 59, SYTO 60, SYTO 61, SYTO 62, SYTO 63, SYTO 64, SYTO 80, SYTO 81, SYTO 82, SYTO 83, SYTO 84, SYTO 85, SYTOX Blue, SYTOX Green, SYTOX Orange, SYBR Green, YO-PRO-1, YO-PRO-3, YOYO-1, YOYO-3 및 티아졸 오렌지(thiazole orange)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0006] 본 발명의 제3 실시예는 기관 상에 배치된 제1 열 블록; 상기 기관 상에 상기 제1 열 블록과 이격 배치된 제2 열 블록; 및 상기 제1 열 블록 및 제2 열 블록 위로 구동 수단에 의해 좌우 및/또는 상하 이동 가능하고, 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩이 장착된 칩 홀더를 포함하는 PCR 장치를 제공한다. 본 발명의 제3 실시예에 있어서, 상기 제1 열 블록과 제2 열 블록 사이에 광원이 더 배치되고, 상기 칩 홀더 위에 상기 광원으로부터 방출되는 광을 검출하기 위한 광 검출부가 더 배치되거나, 또는 상기 제1 열 블록과 제2 열 블록 사이에 광원으로부터 방출되는 광을 검출하기 위한 광 검출부가 더 배치되고, 상기 칩 홀더 위에 광원이 더 배치될 수 있다.

[0007] 본 발명의 제4 실시예는 기관, 상기 기관 상에 배치된 도전성 나노 입자를 포함하는 발열층, 상기 발열층 상에 배치된 절연 보호층 및 상기 발열층과 연결 배치된 전극을 구비하되, 광투과성을 갖도록 구현된 광투과성 열 블록; 및 상기 광투과성 열 블록의 상부 면에 접촉 가능하도록 배치된, 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩을 포함하는 PCR 장치를 제공한다. 본 발명의 제4 실시예에 있어서, 상기 기관은 광 투과성 유리 또는 플라스틱 재질이고, 상기 발열층에 포함된 도전성 나노 입자는 산화물 반도체 물질 또는 상기 산화물 반도체 물질에 In, Sb, Al, Ga, C 및 Sn로 구성된 군으로부터 선택된 불순물이 첨가된 물질이고, 상기 절연 보호층은 유전체 산화물, 페릴린, 나노 입자 및 고분자 필름으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이고, 상기 전극은 금속 물질, 전도성 에폭시, 전도성 페이스트, 솔더 및 전도성 필름으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 또한, 상기 광투과성 열 블록의 기관의 하부 면은 흡광 물질이 포함된 흡광층이 접촉 배치되거나, 또는 상기 광투과성 열 블록의 절연 보호층의 상부 면은 광반사 방지 물질이 포함된 광반사방지층이 접촉 배치될 수 있다. 또한, 상기 PCR 장치는 상기 칩 접촉부에 배치되는 PCR 칩에 광을 제공하도록 구동가능하게 배치된 광 제공부 및 상기 칩 접촉부에 배치되는 PCR 칩으로부터 방출되는 광을 수용하도록 구동가능하게 배치된 광 검출부를 더 포함할 수 있다.

[0008] 본 발명의 제5 실시예는 1 이상의 히터를 구비하는 히터 군, 상기 히터 군을 2 이상 구비하고 상기 2 이상의 히터 군은 상호 열 교환이 일어나지 않도록 이격 배치된 히터 유닛이 2 이상 반복 배치된 것으로서, 적어도 일 면에 표적 샘플이 수용되는 PCR 칩의 접촉 면을 구비하는 열 블록; 상기 열 블록에 구비된 히터들에 전력을 공급하도록 연결된 전극을 구비하는 전극부; 및 상기 열 블록에 구비된 1 이상의 히터들과 열 교환이 가능하도록 상기 열 블록 상에 접촉가능하도록 배치된, 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩을 포함하는 PCR 장치를 제공한다. 본 발명의 제5 실시예에 있어서, 상기 열 블록은 2개 내지 4개의 히터 군을 구비할 수 있다. 또한, 상기 열 블록은 2개의 히터 군을 구비하고, 상기 제1 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 어닐링/연장 단계 온도를 유지하거나, 또는 상기 제1 히터 군은 PCR 어닐링/연장 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지할 수 있다. 또한, 상기 열 블록은 3개의 히터 군을 구비하고, 상기 제1 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 어닐링 단계 온도를 유지하고 상기 제3 히터 군은 PCR 연장 단계 온도를 유지하거나, 또는 상기 제1 히터 군은 PCR 어닐링 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 연장 단계 온도를 유지하고 상기 제3 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하거나, 또는 상기 제1 히터 군은 PCR 연장 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하고 상기 제3 히터 군은 PCR 어닐링 단계 온도를 유지할 수 있다. 또한, 상기 열 블록은 광 투과성을 갖도록 구현될 수 있다. 또한, 상기 열 블록에 구비된 히터는 광 투과성 발열소자를 포함할 수 있다. 또한, 상기 전극부에 전력을 공급하기 위한 전력 공급부 및 상기 1 이상의 반응 채널 내에서 유동하는 유체의 유량 및 유속을 제어하기 위해 양압 또는 음압을 제공하도록 배치된 펌프를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 제1 히터 및 상기 제2 히터 사이에 광원이 배치되고, 상기 전극부에 전력을 공급하기 위한 전력 공급부, 상기 1 이상의 반응 채널 내에서 유동하는 유체의 유량 및 유속을 제어하기 위해 양압 또는 음압을 제공하도록 배치된 펌프, 및 상기 광원으로부터 방출되는 광을 검출하기 위한 광 검출부를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 전극부에 전력을 공급하기 위한 전력 공급부, 상기 1 이상의 반응 채널 내에서 유동하는 유체의 유량 및 유속을 제어하기 위해 양압 또는 음압을 제공하도록 배치된 펌프, 상기 PCR 칩에 광을 제공하도록 배치된 광 제공부, 및 상기 PCR 칩으로부터 방출되는 광을 수용하도록 배치된 광 검출부를 더 포함할 수 있다.

[0009] 본 발명의 제6 실시예는 결핵균 감염이 의심되는 대상 시료를 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩의 상기 1 이상의 반응 채널에 도입하여 PCR을 수행하는 단계; 및 상기 PCR 결과로부터 상기 대상 시료 중에 결핵균의 존재

유무를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균 검출 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 제6 실시예에 있어서, 상기 PCR 수행 단계는 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치, 본 발명의 제4 실시예에 따른 PCR 장치, 및 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치로 구성된 군으로부터 선택된 PCR 장치에서 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 일 실시예들에 따른 결핵균에 관한 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 세트, 이를 포함하는 PCR 칩, 이를 포함하는 PCR 장치, 및 이를 이용하는 결핵균 검출 방법에 따르면, 결핵균 감염 여부를 저렴한 비용으로 정확하고 신속하게 확인할 수 있어서 결핵균 확산을 예방하고 이에 신속한 대응 조치를 취하는데 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩에 관한 도면이다.

도 2는 양면 접착제 또는 열 가소성 수지 또는 열 경화성 수지가 처리된 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩에 관한 도면이다.

도 3a 내지 도 3c는 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치에 관한 도면이다.

도 4a 내지 도 4i는 본 발명의 제4 실시예에 따른 PCR 장치에 관한 도면이다.

도 5a 내지 도 5h는 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치에 관한 도면이다.

도 6a 내지 도 6c는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) IS6110 유전자를 검출하기 위한 결핵균 검출용 프라이머 세트 및 타사의 PCR 장치를 이용하여 시료를 대상으로 하는 테스트 1(TEST 1) 내지 테스트 3(TEST 3)의 실시간 PCR 결과를 나타내는 전기영동 사진이다(1: 음성 대조군, 2: MTB 양성인자, 3: MTB 임상 샘플).

도 7a 내지 도 7c는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) IS6110 유전자를 검출하기 위한 결핵균 검출용 프라이머 세트 및 타사의 PCR 장치를 이용하여 시료를 대상으로 하는 테스트 1(TEST 1) 내지 테스트 3(TEST 3)의 실시간 PCR 결과를 나타내는 그래프이다(1: 음성 대조군, 2: MTB 양성인자, 3: MTB 임상 샘플).

도 8a 내지 도 8c는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) IS6110 유전자를 검출하기 위한 결핵균 검출용 프라이머 세트 및 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치를 이용하여 시료를 대상으로 하는 테스트 1(TEST 1) 내지 테스트 3(TEST 3)의 실시간 PCR 결과를 나타내는 전기영동 사진이다(1: 음성 대조군, 2: 양성 대조군(pSC-HA: plasmid DNA, 3: MTB 임상 샘플).

도 9a 내지 도 9c는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) IS6110 유전자를 검출하기 위한 결핵균 검출용 프라이머 세트 및 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치를 이용하여 시료를 대상으로 하는 테스트 1(TEST 1) 내지 테스트 3(TEST 3)의 실시간 PCR 결과를 나타내는 그래프이다(1: 음성 대조군, 2: 양성 대조군(pSC-HA: plasmid DNA, 3: MTB 임상 샘플).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 첨부 도면을 참조하여 본 발명에 따른 실시예들을 상세하게 설명한다. 이하 설명은 본 발명에 따른 일 실시예들을 용이하게 이해하기 위한 것일 뿐이며, 보호범위를 제한하기 위한 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 제1 실시예에 따른 결핵균 검출용 프라이머 세트는 서열번호 1의 염기 서열 중 15개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 프라이머 및 서열번호 2의 염기 서열 중 15개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) 게놈 내에 삽입되는 IS6110 유전자를 검출하기 위한 결핵균 검출용 프라이머 세트; 및 서열번호 3의 염기 서열 중 15개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 프라이머 및 서열번호 4의 염기 서열 중 15개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) 게놈 내에 삽입되는 IS6110 유

전자를 검출하기 위한 결핵균 검출용 프라이머 세트의 구성된 군으로 하나 이상 선택된다.

[0015] 상기 프라이머(primer)는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합 반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일 가닥의 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 인자, 예를 들어, 온도와 프라이머의 용도에 따라 차이가 있지만 전형적으로 15 내지 30개의 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머는 주형과 충분히 안정된 혼성화 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구할 수 있다. 이 경우, 전방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)는 중합 효소 연쇄 반응에 의해 증폭되는 주형의 일정한 부위의 3' 말단 및 5' 말단에 각각 결합하는 프라이머를 의미한다. 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 족하다. 따라서, 본 발명의 제1 실시예에 따른 프라이머 세트는 주형인 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 족한 것이다. 이러한 프라이머의 설계는 주형이 되는 폴리뉴클레오타이드의 염기 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예를 들어, 프라이머 설계용 프로그램(예를 들어, PRIMER 3, VectorNTI 프로그램)을 이용하여 할 수 있다. 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시되어 있다. 예를 들면, 상기 프라이머는 상기 서열 번호 1 및 서열 번호 2 중 어느 하나의 염기 서열 내의 15개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 상기 프라이머는 상기 서열 번호 1 및 서열 번호 2 중 어느 하나의 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 제1 실시예에 따른 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트의 PCR 산물의 크기는 167 bp(base pair)로 설계되었다.

[0016] 상기 대상 유전자는 마이코박테리움 튜버큘로시스(*Mycobacterium Tuberculosis*) IS6110 유전자(GenBank ID number: CP000611, AE000516, CP001658)는 결핵균 계놈 내에 삽입되는 삽입 서열(insertion sequence)로서, 계놈 당 1-20 카피(copy)가 존재하여 결핵 검출에 유용하다. 상기 프라이머 세트를 이용하여 결핵균을 검출하는 방법은 다음과 같다. 먼저, 결핵균 감염이 의심되는 대상 시료를 이하 상세하게 설명될 PCR 칩의 상기 1 이상의 반응 채널에 도입하여 PCR을 수행한다. 대상 시료라 함은 결핵균에 감염되었을 것으로 예상되는 개체의 시료(샘플 또는 샘플 용액)를 의미하고, 예를 들어 배양된 세포, 혈액, 타액 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이 경우 결핵균 감염이 의심되는 대상 시료는 상기 시료로부터 DNA를 추출하는 단계를 포함할 수 있다. 그 후, 상기 추출된 DNA를 PCR 칩에 도입하여 실시간 PCR을 수행한다. 따라서, 상기 PCR 결과로부터 상기 대상 시료 중에 결핵균의 존재 유무를 확인할 수 있다. 이 경우 상기 PCR 수행 단계는 이하 상세하게 설명될 일련의 PCR 장치에서 수행될 수 있고, 더 나아가 실시간 PCR 장치를 이용할 경우 PCR 과정에서 증폭 산물에 표지된 형광 표지 인자를 감지하여 나타나는 곡선으로부터, PCR 증폭 산물이 일정량 증폭되었을 때의 사이클 수인 Ct 값(Ct value)을 계산함으로써 확인할 수 있다. 상기 Ct 값의 계산은 실시간 PCR 장치에 설치된 프로그램에 의해 자동으로 수행될 수 있음은 물론이다.

[0017] 도 1에 따르면, 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩은 제1 판(11); 상기 제1 판(11) 상에 배치되고, 1 이상의 반응 채널(14)을 구비하는 제2 판(12); 및 상기 제2 판(12) 상에 배치되고, 상기 1 이상의 반응 채널(14)의 양 말단과 연결되되 개폐 가능하도록 구현된 유입부(15) 및 유출부(16)를 구비하는 제3 판(13)을 포함하는 것으로서, 상기 1 이상의 반응 채널(14) 내에 본 발명의 제1 실시예에 따른 프라이머 세트를 포함한다.

[0018] 상기 PCR 칩(10)의 반응 채널(14) 내에는 상기 본 발명의 제1 실시예에 따른 프라이머 세트 이외에 삼인산화데옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide triphosphates, dNTP), 구체적으로 dATP, dCTP, dGTP, 및 dTTP를 포함하는 혼합물, DNA 중합효소, 검출 가능한 표지, 및 PCR 완충액(PCR buffer)를 더 포함할 수 있다. 상기 DNA 중합 효소는 예를 들어, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합 효소일 수 있다. 상기 검출 가능한 표지는 Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Cy2, Cy3.18, Cy3.5, Cy3, Cy5.18, Cy5.5, Cy5, Cy7, Oregon Green, Oregon Green 488-X, Oregon Green, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, SYTO 11, SYTO 12, SYTO 13,

SYTO 14, SYTO 15, SYTO 16, SYTO 17, SYTO 18, SYTO 20, SYTO 21, SYTO 22, SYTO 23, SYTO 24, SYTO 25, SYTO 40, SYTO 41, SYTO 42, SYTO 43, SYTO 44, SYTO 45, SYTO 59, SYTO 60, SYTO 61, SYTO 62, SYTO 63, SYTO 64, SYTO 80, SYTO 81, SYTO 82, SYTO 83, SYTO 84, SYTO 85, SYTOX Blue, SYTOX Green, SYTOX Orange, SYBR Green, YO-PRO-1, YO-PRO-3, YOYO-1, YOYO-3 및 티아졸 오렌지(thiazole orange)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 PCR 완충액은 증폭 반응의 pH를 조절함으로써 증폭 반응의 하나 이상의 구성 요소의 안정성, 활성, 및/또는 수명을 변형시키는 증폭 반응에 첨가되는 화합물로서, 이러한 완충액들은 알려져 있으며, 예를 들어, Tris, Tricine, MOPS, 또는 HEPES일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 PCR 칩(10)은 상기 샘플 용액을 도입하기 위한 유입부(15), 핵산 증폭 반응을 완료한 샘플 용액을 배출하기 위한 유출부(16) 및 증폭하고자 하는 핵산을 포함하는 샘플 용액이 수용된 1 이상의 반응 채널(14)을 포함할 수 있다. 상기 PCR 칩(10)이 PCR 장치의 열 블록에 접촉하는 경우 상기 열 블록에서 발생하는 열은 상기 PCR 칩(10)에 전달되고, 상기 PCR 칩(10)의 반응 채널(14)에 포함된 샘플 용액은 가열되거나 냉각되어 일정 온도가 유지될 수 있다. 또한, 상기 PCR 칩(10)은 전체적으로 평면 형상을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 PCR 칩(10)은 PCR 장치의 칩 홀더에 장착된 상태로 상기 열 블록에 접촉 배치될 수도 있다. 따라서, 상기 PCR 칩(10)이 상기 열 블록의 일 면에 배치된다는 것은 상기 PCR 칩(10)이 상기 칩 홀더에 장착된 상태로 상기 열 블록에 접촉 배치되는 것을 포함한다. 또한, 상기 PCR 칩(10)은 플라스틱 재질로 구현되되, 광 투과성을 갖도록 구현될 수 있다. 상기 PCR 칩(10)은 플라스틱 재질을 사용하여, 플라스틱 두께 조절만으로 열 전달 효율을 증대시킬 수 있고, 제작 공정이 단순하여 제조 비용을 절감할 수 있다. 또한 상기 PCR 칩(10)은 전체적으로 광 투과성을 구비할 수 있기 때문에 상기 열 블록의 일 면에 배치된 상태에서 직접적으로 광 조사가 가능하여 실시간으로 핵산 증폭 여부 및 증폭 정도를 측정 및 분석할 수 있다.

[0019] 상기 제1 판(11)은 상기 제2 판(12) 하부 면에 배치된다. 상기 제1 판(11)이 상기 제2 판(12)의 하부 면에 접촉 배치됨으로써 상기 1 이상의 반응 채널(14)은 일종의 PCR 반응 챔버를 형성한다. 또한, 상기 제1 판(11)은 다양한 재질로 구현될 수 있으나, 바람직하게는 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane, PDMS), 사이클로올레핀코폴리머(cycle olefin copolymer, COC), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리프로필렌카보네이트(polypropylene carbonate, PPC), 폴리에테르설폰(polyether sulfone, PES), 및 폴리에틸렌테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 및 그의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 재질일 수 있다. 또한, 상기 제1 판(11)의 상단 면은 친수성 물질(17)이 처리되어 PCR을 원활하게 수행할 수 있다. 상기 친수성 물질(17)의 처리에 의해 상기 제1 판(11) 상에 친수성 물질(17)을 포함하는 단일 층이 형성될 수 있다. 상기 친수성 물질은 다양한 물질일 수 있으나, 바람직하게는 카복시기(-COOH), 아민기(-NH₂), 히드록시기(-OH), 및 술폰기(-SH)로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 상기 친수성 물질의 처리는 당 업계에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다.

[0020] 상기 제2 판(12)은 상기 제1 판(11) 상부 면에 배치된다. 상기 제2 판(12)은 1 이상의 반응 채널(14)을 포함한다. 상기 반응 채널(14)은 상기 제3 판(13)에 형성된 유입부(15)와 유출부(16)에 대응되는 부분과 연결되어 일종의 PCR 반응 챔버를 형성한다. 따라서, 상기 반응 채널(12)에 증폭하고자 하는 샘플 용액이 도입된 후 PCR이 진행된다. 또한, 상기 반응 채널(14)은 PCR 장치의 사용 목적 및 범위에 따라 2 이상 존재할 수 있고, 도 1에 따르면, 6개의 반응 채널(14)이 예시되고 있다. 또한, 상기 제2 판(12)은 다양한 재질로 구현될 수 있으나, 바람직하게는 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 사이클로올레핀 코폴리머(cycloolefin copolymer, COC), 폴리아미드(polyamide, PA), 폴리에틸렌(polyethylene, PE), 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리페닐렌 에테르(polyphenylene ether, PPE), 폴리스티렌(polystyrene, PS), 폴리옥시메틸렌(polyoxymethylene, POM), 폴리에테르에테르케톤(polyetheretherketone, PEEK), 폴리테트라프로오르에틸렌(polytetrafluoroethylene, PTFE), 폴리비닐클로라이드(polyvinylchloride, PVC), 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride, PVDF), 폴리부틸렌테레프탈레이트(polybutyleneterephthalate, PBT), 불소화에틸렌프로필렌(fluorinated ethylenepropylene, FEP), 퍼플로로알콕시알칸(perfluoroalkoxyalkane, PFA), 및 그의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 열 가소성 수지 또는 열경화성 수지 재질일 수 있다. 또한, 상기 제2 판(12)의 두께는 다양할 수 있으나, 100 μ m 내지 200 μ m에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 반응 채널(14)의 폭과 길이는 다양할 수 있으나, 바람직하게는 상기 반응 채널(14)의 폭은 0.5 mm 내지 3 mm에서 선택되고, 상기 관통 개구 채널(14)의 길이는 20 mm 내지 40 mm에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 제2 판(12) 내벽은 DNA, 단백질(protein) 흡착을 방지하기 위해 실란(silane) 계열, 보바인 시럼 알부민(Bovine Serum Albumin, BSA) 등의 물질로 코팅할 수 있고, 상기 물질의 처리는 당 업계에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있다.

[0021] 상기 제3 판(13)은 상기 제2 판(12) 상에 배치된다. 상기 제3 판(13)은 상기 제2 판(12)에 형성된 1 이상의 반

응 채널(921) 상의 일 영역에 형성된 유입부(15) 및 다른 일 영역에 형성된 유출부(16)를 구비한다. 상기 유입부(15)는 증폭하고자 하는 핵산을 포함하는 샘플 용액 등이 유입되는 부분이다. 상기 유출부(16)는 PCR이 종료된 후 샘플 용액 등이 유출되는 부분이다. 따라서, 상기 제3 판(13)은 이하 언급할 제2 판(12)에 형성된 1 이상의 반응 채널(14)을 커버하되, 상기 유입부(15) 및 유출부(16)는 상기 반응 채널(14)의 유입부 및 유출부 역할을 수행하게 된다. 또한, 상기 제3 판(13)은 다양한 재질로 구현될 수 있지만, 바람직하게는 폴리디메틸실옥산(polydimethylsiloxane, PDMS), 사이클로올레핀코폴리머(cycle olefin copolymer, COC), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리프로필렌카보네이트(polypropylene carbonate, PPC), 폴리에테르설폰(polyether sulfone, PES), 및 폴리에틸렌테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 및 그의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 재질일 수 있다. 또한, 상기 유입부(15)는 다양한 크기를 구비할 수 있으나, 바람직하게는 지름 1.0 mm 내지 3.0 mm에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 유출부(16)는 다양한 크기를 구비할 수 있으나, 바람직하게는 지름 1.0 mm 내지 1.5 mm에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 유입부(15) 및 유출부(16)는 별도의 커버 수단(도시되지 않음)을 구비하여, 상기 반응 채널(14) 내에서 샘플 용액에 대한 PCR이 진행될 때 샘플 용액이 누출되는 것을 방지할 수 있다. 상기 커버 수단은 다양한 형상, 크기 또는 재질로서 구현될 수 있다. 또한, 상기 제3 판의 두께는 다양할 수 있으나, 바람직하게는 0.1 mm 내지 2.0 mm에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 유입부(15) 및 유출부(16)는 2 이상 존재할 수 있다.

[0022] 도 2에 따르면, 상기 PCR 칩(10)은 기계적 가공을 통해 유입부(15) 및 유출부(16)를 형성하여 제3 판(13)을 제공하는 단계; 상기 제3 판(13)의 하부면과 대응되는 크기를 갖는 판재에 상기 제3 판(13)의 유입부(15)와 대응되는 부분으로부터 상기 제3 판(13)의 유출부(16)에 대응되는 부분까지 기계적 가공을 통해 1 이상의 반응 채널(14)을 형성하여 제2 판(12)을 제공하는 단계; 상기 제2 판(12)의 하부면과 대응되는 크기를 갖는 판재의 상부면에 표면 처리 가공을 통해 친수성 물질(17)로 구현된 표면을 형성하여 제1 판(11)을 제공하는 단계; 및 상기 제3 판(13)의 하부면을 상기 제2 판(12)의 상부면에 접합 공정을 통해 접합하고, 상기 제2 판(12)의 하부면을 상기 제1 판(11)의 상부면에 접합 공정을 통해 접합하는 단계를 포함하는 방법에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 상기 제3 판(13)의 유입부(15) 및 유출부(16), 및 상기 제2 판(12)의 반응 채널(14)은 사출성형, 핫-엠보싱(hot-embossing), 캐스팅(casting), 및 레이저 어블레이션(laser ablation)으로 구성된 군으로부터 선택되는 가공 방법에 의해 형성될 수 있다. 또한, 상기 제1 판(11) 표면의 친수성 물질(17)은 산소 및 아르곤 플라즈마 처리, 코로나 방전 처리, 및 계면 활성제 도포로 구성된 군으로부터 선택되는 방법에 의해 처리될 수 있고 당 업계에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있다. 또한, 상기 제3 판(13)의 하부 면과 상기 제2 판(12)의 상부면, 및 상기 제2 판(12)의 하부 면과 상기 제1 판(11)의 상부면은 열 접합, 초음파 용착, 용매 접합 공정에 의해 접착될 수 있고 당 업계에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 제3 판(13)과 제2 판(12) 사이 및 상기 제2 판(12)과 제3 판(13) 사이에는 양면 접착제 또는 열가소성 수지 또는 열 경화성 수지(18)가 처리될 수 있다.

[0023] 이하, 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩이 구동되는 PCR 장치에 관하여 설명한다. PCR 장치라 함은 특정 염기 서열을 갖는 핵산을 증폭하는 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 사용하기 위한 장치이다. 예를 들어, 특정 염기 서열을 갖는 DNA(deoxyribonucleic acid)를 증폭하기 위한 PCR 장치는 이중 가닥의 DNA를 포함하는 샘플 용액을 특정 온도, 예를 들어 약 95℃로 가열하여 상기 이중 가닥의 DNA를 단일 가닥의 DNA로 분리하는 변성 단계(denaturing step), 상기 샘플 용액에 증폭하고자 하는 특정 염기 서열과 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프라이머를 제공하고, 상기 분리된 단일 가닥의 DNA와 함께 특정 온도, 예를 들어 55℃로 냉각하여 상기 단일 가닥의 DNA의 특정 염기 서열에 상기 프라이머를 결합시켜 부분적인 DNA-프라이머 복합체를 형성하는 어닐링 단계(annealing step), 및 상기 어닐링 단계 이후 상기 샘플 용액을 적정 온도, 예를 들어 72℃로 유지하여 DNA 중합효소(polymerase)에 의해 상기 부분적인 DNA-프라이머 복합체의 프라이머를 기초로 이중 가닥의 DNA를 형성하는 연장 (혹은 증폭) 단계(extension step)를 수행하고, 상기 3 단계를 예를 들어, 20회 내지 40회로 반복함으로써 상기 특정 염기 서열을 갖는 DNA를 기하급수적으로 증폭할 수 있다. 또한, 경우에 따라, PCR 장치는 상기 어닐링 단계와 상기 연장 (혹은 증폭) 단계를 동시에 수행할 수 있고, 이 경우 PCR 장치는 상기 연장 단계와 상기 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계로 구성된 2 단계를 수행함으로써, 제1 순환을 완성할 수도 있다. 따라서, 본 명세서에 있어서, PCR 장치는 상기 단계들을 수행하기 위한 모듈들을 포함하는 장치를 말하며, 본 명세서에 기재되지 아니한 세부적인 모듈들은 PCR을 수행하기 위한 종래 기술 중 개시되고 자명한 범위에서 모두 구비하고 있는 것을 전제로 한다.

- [0024] 도 3a 내지 도 3c에 따르면, 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치가 상세하게 설명된다.
- [0025] 도 3a에 따르면, 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치는 기관(400a) 상에 배치된 제1 열 블록(100a); 상기 기관(400a) 상에 상기 제1 열 블록(100a)과 이격 배치된 제2 열 블록(200a); 및 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a) 위로 구동 수단(500a)에 의해 좌우 및/또는 상하 이동 가능하고, 상기 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)를 포함한다.
- [0026] 상기 기관(400a)은 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a)의 가열 및 온도 유지로 인해 그 물리적 및/또는 화학적 성질이 변하지 않고, 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a) 사이에서 상호 열 교환이 일어나지 않도록 하는 재질을 갖는 모든 물질을 포함한다. 예를 들어, 상기 기관(400a)은 플라스틱 등의 재질을 포함하거나 그러한 재질로 구성될 수 있다.
- [0027] 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a)은 핵산을 증폭하기 위한 변성 단계, 어닐링 단계 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하기 위한 온도를 유지하기 위한 것이다. 따라서 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a)은 상기 각 단계들에 요구되는 필요한 온도를 제공하고, 이를 유지하기 위한 다양한 모듈을 포함하거나 또는 그러한 모듈과 구동가능하게 연결될 수 있다. 따라서, 상기 PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)가 상기 각 열 블록(100a, 200a)의 일 면에 접촉되는 경우 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a)은 상기 PCR 칩(10)과의 접촉면을 전체적으로 가열 및 온도 유지할 수 있어서, 상기 PCR 칩(10) 내의 샘플 용액을 균일하게 가열 및 온도 유지할 수 있다. 종래 단일 열 블록을 사용하는 PCR 장치는 상기 단일 열 블록에서의 온도 변화율이 초당 3 내지 7℃ 범위 내에서 이루어지는데 반해, 본 발명의 제3 실시예에 따른 2개의 열 블록을 포함하는 PCR 장치는 각각의 열 블록(100a, 200a)에서의 온도 변화율이 초당 20 내지 40℃ 범위 내에서 이루어져 PCR 진행 시간을 크게 단축시킬 수 있다.
- [0028] 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a)은 그 내부에 열선(도시되지 않음)이 배치될 수 있다. 상기 열선은 상기 변성 단계, 어닐링 단계 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하기 위한 온도를 유지하도록 다양한 열원과 구동가능하게 연결될 수 있고, 상기 열선의 온도를 모니터링하기 위한 다양한 온도 센서와 구동가능하게 연결될 수 있다. 상기 열선은 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a) 내부 온도를 전체적으로 일정하게 유지하기 위해 각각의 열 블록(100a, 200a) 면의 중심점을 기준으로 상하 및/또는 좌우 방향으로 대칭되도록 배치될 수 있다. 상기 상하 및/또는 좌우 방향으로 대칭된 열선의 배치는 다양할 수 있다. 또한, 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a)은 그 내부에 박막 히터(thin film heater, 도시되지 않음)가 배치될 수도 있다. 상기 박막 히터는 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a) 내부 온도를 전체적으로 일정하게 유지하기 위해 각각의 열 블록(100a, 200a) 면의 중심점을 기준으로 상하 및/또는 좌우 방향으로 일정한 간격으로 이격 배치될 수 있다. 상기 상하 및/또는 좌우 방향으로 일정한 박막 히터의 배치는 다양할 수 있다.
- [0029] 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a)은 동일한 면적에 대한 고른 열 분포 및 신속한 열 전달을 위해 금속 재질, 예를 들어 알루미늄 재질을 포함하거나 또는 알루미늄 재질로 구성될 수 있다.
- [0030] 상기 제1 열 블록(100a)은 상기 변성 단계, 또는 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하기 위한 적정 온도를 유지하도록 구현될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치의 제1 열 블록(100a)은 50℃ 내지 100℃를 유지할 수 있고, 바람직하게는 상기 제1 열 블록(100a)에서 상기 변성 단계를 수행하는 경우 90℃ 내지 100℃를 유지할 수 있고, 바람직하게는 95℃를 유지할 수 있으며, 상기 제1 열 블록(100a)에서 상기 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하는 경우에는 55℃ 내지 75℃를 유지할 수 있고, 바람직하게는 72℃를 유지할 수 있다. 다만, 상기 변성 단계, 또는 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행할 수 있는 온도라면 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 제2 열 블록(200a)은 상기 변성 단계, 또는 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하기 위한 적정 온도를 유지하도록 구현될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치의 제2 열 블록(200a)은 상기 제2 열 블록(200a)에서 상기 변성 단계를 수행하는 경우 90℃ 내지 100℃를 유지할 수 있고, 바람직하게는 95℃를 유지할 수 있으며, 상기 제2 열 블록에서 상기 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하는 경우에는 55℃ 내지 75℃를 유지할 수 있고, 바람직하게는 72℃를 유지할 수 있다. 다만, 상기 변성 단계, 또는 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행할 수 있는 온도라면 이에 제한되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명의 제3 실시예에 따르면, 상기 제1 열 블록(100a)은 PCR의 변성 단계 온도 (denaturing temperature)를 유지할 수 있으며, 변성 단계 온도가 90℃보다 낮으면 PCR의 주형이 되는 핵산의 변성이 일어나 효율이 떨어져 PCR 효율이 떨어지거나 반응이 일어나지 않을 수 있고, 변성 단계 온도가 100℃보다 높아지면 PCR에 이용되는 효소가 활성을 잃게 되므로, 상기 변성 단계 온도는 90℃ 내지 100℃일 수 있고, 바람직하게는 95℃일 수 있다.

또한, 본 발명의 제3 실시예에 따르면, 상기 제2 열 블록(200a)은 PCR의 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계 온도 (annealing/extension temperature)를 유지할 수 있다. 연장 (혹은 증폭) 단계 온도가 55℃보다 낮으면 PCR 산물의 특이성(specificity)이 떨어질 수 있고, 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계 온도가 74℃보다 높으면 프라이머에 의한 연장이 일어나지 않을 수 있기 때문에 PCR 효율이 떨어지게 되므로 상기 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계 온도는 55℃ 내지 75℃일 수 있고, 바람직하게는 72℃일 수 있다.

[0031] 상기 제1 열 블록(100a)과 제2 열 블록(200a)은 상호 열 교환이 일어나지 않도록 미리 결정된 거리로 이격 배치될 수 있다. 이에 따라, 상기 제1 열 블록(100a)과 제2 열 블록(200a) 사이에서 열 교환이 일어나지 않기 때문에, 미세한 온도 변화에 의해서도 중대한 영향을 받을 수 있는 핵산 증폭 반응에 있어서, 상기 변성 단계와 상기 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계의 정확한 온도 제어가 가능하다.

[0032] 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치는 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a) 위로 구동 수단(500a)에 의해 좌우 및/또는 상하 이동 가능하고, PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)를 포함한다. 상기 칩 홀더(300a)는 상기 PCR 칩(10)이 상기 PCR 장치에 장착되는 모듈이다. 상기 칩 홀더(300a)의 내벽은 상기 PCR 장치에 의해 핵산 증폭 반응이 수행되는 경우 상기 PCR 칩(10)이 상기 칩 홀더(300a)로부터 이탈하지 않도록 상기 PCR 칩(10)의 외벽과 고정 장착되기 위한 형상 및 구조를 가질 수 있다. 상기 칩 홀더(300a)는 상기 구동 수단(500a)에 구동가능하게 연결된다. 또한, 상기 PCR 칩(10)은 상기 칩 홀더(300a)에 착탈 가능할 수 있다.

[0033] 상기 구동 수단(500a)은 상기 PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)를 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a) 위로 좌우 및/또는 상하 이동 가능하게 하는 모든 수단을 포함한다. 상기 구동 수단(500a)의 좌우 이동에 의해, 상기 PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)는 상기 제1 열 블록(100a)과 제2 열 블록(200a) 사이에서 왕복 운동이 가능하고, 상기 구동 수단(500a)의 상하 이동에 의해, 상기 PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)는 상기 제1 열 블록(100a)과 제2 열 블록(200a)에 접촉 및 분리될 수 있다. 도 3a에 도시된 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치의 구동 수단(500a)은 좌우 방향으로 연장된 레일(510a), 및 상기 레일(510a)을 통해 좌우 방향으로 슬라이딩 이동가능하게 배치되고, 상하 방향으로 슬라이딩 이동 가능한 연결 부재(520a)를 포함하고, 상기 연결 부재(520a)의 일 말단은 상기 칩 홀더가 배치된다. 상기 구동 수단(500a)의 좌우 및/또는 상하 이동은 상기 PCR 장치의 내부 또는 외부에 구동가능하게 배치된 제어 수단(도시되지 않음)에 의해 제어될 수 있고, 상기 제어 수단은 PCR의 변성 단계와 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 위한 상기 PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)와 상기 제1 열 블록(100a) 및 제2 열 블록(200a) 사이의 접촉 및 분리를 제어할 수 있다.

[0034] 도 3b는 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치의 칩 홀더의 이동에 의한 핵산 증폭 반응의 각 단계를 도시한다. 상기 PCR 장치에 의한 핵산 증폭 반응은 하기 단계에 의한다. 먼저, 상기 PCR 칩(10)에 핵산, 예를 들어 이중 가닥 DNA, 증폭하고자 하는 특정 염기 서열과 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머, DNA 중합효소, 삼인산화데옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide triphosphates, dNTP), PCR 완충액(PCR buffer)를 포함하는 샘플 용액을 도입하고, 상기 PCR 칩(10)을 상기 칩 홀더(300a)에 장착하는 단계를 수행한다. 그 후 또는 이와 동시에 상기 제1 열 블록(100a)을 변성 단계를 위한 온도, 예를 들어, 90℃ 내지 100℃로 가열 및 유지하고, 바람직하게는 95℃로 가열 및 유지하는 단계를 수행한다. 상기 제2 열 블록(200)을 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 위한 온도, 예를 들어, 55℃ 내지 75℃로 가열 및 유지하고, 바람직하게는 72℃로 가열 및 유지하는 단계를 수행한다. 그 후, 상기 구동 수단(500a)의 연결 부재(520a)를 제어하여 상기 PCR 칩(10)을 하향 이동시켜, 상기 PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)를 상기 제1 열 블록(100a)에 접촉시켜 PCR의 제1 변성 단계를 수행한다(x 단계). 그 후, 상기 구동 수단(500a)의 연결 부재(520a)를 제어하여 상기 PCR 칩(10)을 상향 이동시켜, 상기 PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)를 상기 제1 열 블록(100a)으로부터 분리시켜 PCR의 제1 변성 단계를 종료하고, 상기 구동 수단(500a)의 연결 부재(520a)를 제어하여 상기 PCR 칩(10)을 제2 열 블록(200a)의 위로 이동시키는 단계를 수행한다(y 단계). 그 후, 상기 구동 수단(500a)의 연결 부재(520a)를 제어하여 상기 PCR 칩(10)을 하향 이동시켜, 상기 PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)를 상기 제2 열 블록(100a)에 접촉시켜 PCR의 제1 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행한다(z 단계). 마지막으로, 상기 구동 수단(500a)의 연결 부재(520a)를 제어하여 상기 PCR 칩(10)을 상향 이동시켜, 상기 PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)를 상기 제2 열 블록(100a)으로부터 분리시켜 PCR의 제1 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 종료하고, 상기 구동 수단(500a)의 연결 부재(520a)를 제어하여 상기 PCR 칩(10)을 제1 열 블록(100a)의 위로 이동시킨 후 상기 x, y, z 단계를 반복함으로써, 핵산 증폭 반응을 수행한다(순환 단계).

- [0035] 도 3c는 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치를 이용하여 실시간으로 핵산 증폭 반응을 관찰하는 단계를 도시한다. 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치는 상기 제1 열 블록(100a)과 제2 열 블록(200a) 사이에 광원(700a)이 더 배치되고, 상기 칩 홀더(300a) 위에 상기 광원(700a)으로부터 방출되는 광을 검출하기 위한 광 검출부(800a)가 더 배치되거나, 또는 상기 제1 열 블록(100a)과 제2 열 블록(200a) 사이에 광원(700a)으로부터 방출되는 광을 검출하기 위한 광 검출부(800a)가 더 배치되고, 상기 칩 홀더(300a) 위에 광원(700a)이 더 배치될 수 있다. 또한, 상기 광 검출부(800a)는 상기 구동 수단(500a) 위에 배치되고, 상기 구동 수단(900a)은 상기 광원(700a)으로부터 방출되는 광을 통과시키기 위한 관통부(530a)가 배치될 수 있다. 또한, 상기 PCR 칩(10)은 광 투과성 재질, 구체적으로 광투과성 플라스틱 재질일 수 있다.
- [0036] 상기 광원(700a) 및 광 검출부(800a)의 배치에 의해, 상기 PCR 장치(1)에 의한 핵산 증폭 반응시 상기 PCR 칩(10) 내에서 핵산이 증폭되는 정도를 실시간으로 검출할 수 있도록 한다. 상기 PCR 칩(10) 내에서 핵산이 증폭되는 정도를 검출하기 위해서는 상기 PCR 칩(10)에 도입되는 샘플 용액에 별도의 형광 물질을 더 첨가할 수 있다. 상기 광원(700a)은 상기 제1 열 블록(100a)과 제2 열 블록(200a) 사이의 이격된 공간에 가능한 넓게 분포하도록 배치되고, 가능한 동일한 광을 방출하도록 배치된다. 상기 광원(700a)은 상기 광원(700a)으로부터 방출되는 광을 포집하는 렌즈(도시되지 않음) 및 특정 파장대의 광을 여과하는 광 필터(도시되지 않음)와 구동가능하게 연결 배치될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치에 의한 핵산 증폭 반응시 상기 PCR 칩(10) 내에서 핵산이 증폭되는 정도를 실시간으로 검출하는 단계는 하기 단계에 의한다. 상기 PCR의 제1 변성 단계의 종료 후 상기 구동 수단(500a)의 연결 부재(520a)를 제어하여 상기 PCR 칩(10)을 제1 열 블록(100a)의 위로부터 제2 열 블록(200a)의 위로 이동시키거나, 또는 상기 PCR의 제1 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계의 종료 후 상기 구동 수단(500a)의 연결 부재(520a)를 제어하여 상기 PCR 칩(10)을 제2 열 블록(200a)의 위로부터 제1 열 블록(100a)의 위로 이동시키는 경우, 상기 PCR 칩(10)이 장착된 칩 홀더(300a)를 상기 구동 수단(500a)의 연결 부재(520a)를 제어하여 상기 제1 열 블록(100a)과 제2 열 블록(200a) 사이의 이격된 공간 상에 정지시키는 단계를 수행한다. 그 후, 상기 광원(700a)으로부터 광을 방출시키고, 상기 방출된 광은 상기 광투과성 PCR 칩(10), 구체적으로 상기 PCR 칩(10)의 반응 채널)를 통과하고, 이 경우 상기 반응 채널) 내의 핵산의 증폭에 의해 발생하는 광 신호를 상기 광 검출부(800a)가 검출한다. 이 경우 상기 광투과성 PCR 칩(10)을 통과한 광은 상기 구동 수단(500a), 구체적으로 상기 레일(510a)에 배치된 관통부(530a)를 통과하여 상기 광출부(800a)에 도달할 수 있다. 따라서, 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치에 따르면, 상기 PCR의 각 순환 단계가 진행되는 동안 상기 반응 채널 내에서 (형광 물질이 결합된) 핵산의 증폭에 의한 반응 결과를 실시간으로 모니터링함으로써 초기 반응 샘플에 포함되어 있는 표적 핵산의 양을 실시간으로 측정 및 분석할 수 있다.
- [0038] 도 4a 내지 도 4i는 본 발명의 제4 실시예에 따른 PCR 장치에 관한 도면이다.
- [0039] 도 4a는 본 발명의 제4 실시예에 따른 PCR 장치에 포함된 광 투과성 열 블록(100b)을 도시한다. 상기 PCR 장치는 기관(10b), 상기 기관(10b) 상에 배치된 도전성 나노 입자를 포함하는 발열층(20b), 상기 발열층 상에 배치된 절연 보호층(30b) 및 상기 발열층과 연결 배치된 전극(40b)을 구비하되, 광 투과성을 갖도록 구현된 광투과성 열 블록(100b); 및 상기 광투과성 열 블록(100b)의 상부 면에 접촉 가능하도록 배치된, 본 발명의 제2 구체예에 따른 PCR 칩(10)을 포함한다.
- [0040] 상기 기관(10b)은 광 투과성 재질의 판재로서, 광 투과성 유리 또는 광 투과성 플라스틱 재질일 수 있다. 상기 발열층(20b)은 PCR의 변성 단계, 어닐링 단계 및 연장(또는 증폭) 단계를 수행하기 위한 상기 광 투과성 열 블록(100b)의 열원 역할을 수행한다. 상기 도전성 나노 입자는 산화물 반도체 물질 또는 상기 산화물 반도체 물질에 In, Sb, Al, Ga, C 및 Sn로 구성된 군으로부터 선택된 불순물이 첨가된 물질일 수 있다. 또한, 상기 발열층(20)은 상기 도전성 나노 입자가 물리적으로 연계(necking)된 성긴 조직(loose texture) 구조를 가질 수 있고, 제조 공정의 열 처리 조건에 따라 치밀한 조직(close-packed texture)을 가질 수 있으며, 또한 완전한 막 상태로 구현될 수도 있다. 또한, 상기 도전성 나노 입자는 용매에 분산된 상태로 존재하므로, 상기 기관(10b) 상에 용이하게 적층할 수 있기 때문에, 그 적층 수를 조절하여 상기 발열층(20b)의 두께 조절을 용이하게 할 수 있다. 또한, 상기 도전성 나노 입자를 포함하는 분산액의 농도를 조절함으로써 상기 발열층(20b)의 도전성을 용이하게 조절할 수도 있다. 또한, 상기 발열층(20b)을 상기 기관(10b)에 강하게 고정하기 위하여 상기 기관(10b)과 발열층(20b) 사이에 접착력 강화층(도시되지 않음)이 형성될 수 있다. 상기 접착력 강화층은 실리카 또는 폴리머로 형성될 수 있고, 도전성 나노 입자를 포함할 수 있어 발열층과 동일한 역할을 또한 수행할 수도 있다.

또한, 상기 발열층(20b)은 투명할 수 있다. 예를 들어, 가시광선의 파장은 400 내지 700 nm이고, 도전성 나노 입자를 포함하는 발열층을 이러한 파장의 1/4 이하의 두께, 예를 들어 약 100 nm 이하가 되도록 형성하는 경우 광 투과성을 획득할 수 있다. 상기 절연 보호층(30b)은 상기 발열층(20b)을 물리적 및/또는 전기적으로 보호하기 위한 것으로서, 절연성 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 절연성 물질은 유전체 산화물, 페릴린, 나노 입자 및 고분자 필름으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 한편, 상기 절연 보호층(30b)은 투명할 수 있다. 상기 전극(40b)은 상기 발열층(20b)과 직접 또는 간접적으로 연결 배치되어 상기 발열층(20b)에 전력을 공급하는 것이다. 상기 전극(40b)은 전력을 공급할 수 있는 다양한 물질이 사용될 수 있고, 예를 들어 금속 물질, 전도성 에폭시, 전도성 페이스트, 솔더 및 전도성 필름으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 도 4a에 따르면, 상기 전극(40b)은 상기 발열층(20b)의 양 측면에 연결 배치되지만, 상기 발열층(20b)에 전력을 공급할 수 있다면 다양하게 작동가능한 위치에서 연결 배치될 수 있다. 또한, 상기 전극(40b)은 상기 PCR 장치에 포함되거나 또는 외부 배치된 전원과 전기적으로 연결될 수도 있다. 예를 들어, 상기 전극(40b)은 상기 발열층(20b)에 직접 접촉하고, 배선(도시되지 않음)을 통해 외부 회로(도시되지 않음)에 상기 발열층(20b)을 연결하며, 상기 배선이 전극(40b)에 안정적으로 고정되도록 단자가 배치될 수 있다.

[0041] 상기 광 투과성 열 블록(100b)은 그 상부 면의 적어도 일부 영역에 PCR 칩(도시되지 않음)이 접촉하는 칩 접촉부(50b)를 포함한다. 상기 PCR 칩(10)은 상기 칩 접촉부(50b)에 접촉함으로써, 상기 광 투과성 열 블록(100b)의 열 공급 또는 회수에 따라 가열 또는 냉각되어 PCR의 각 단계를 수행할 수 있다. 또한, 상기 PCR 칩(10)은 상기 칩 접촉부(50b)에 직접 또는 간접적으로 접촉할 수 있다. 상기 광 투과성 열 블록(100b)을 포함하는 PCR 장치는 종래 기존 석열 히터, 세라믹 히터 또는 금속 히터를 열 블록으로 이용하는 PCR 장치에 비해 많은 장점을 갖는다. 먼저, 열원으로서 도전성 나노 입자를 이용하기 때문에 발열층의 단선의 우려가 없고, 상기 도전성 나노 입자를 직접적으로 가열하기 때문에 높은 열 효율 및 낮은 소비 전력을 획득할 수 있으며(예를 들어, 상기 광투과성 열 블록이 약 2X2 cm의 규격일 경우 약 12V의 전압으로 발열이 가능함), 금속 재질이 아니므로 산화, 부식이 거의 일어나지 않아 내구성이 뛰어나다. 또한, 상기 기관(10b), 발열층(20b) 및 절연 보호층(30b)의 제조시 광 투과성을 획득할 수 있기 때문에, 이하 설명될 광 제공부 및 광 검출부와 함께 구현될 경우 샘플 용액에 포함된 형광 물질에 의한 PCR의 실시간 모니터링이 가능하다. 또한, 상기 기관(10b), 발열층(20b) 및 절연 보호층(30b)의 제조시 그 두께 조절이 용이하기 때문에 상기 광 투과성 열 블록(100b)의 슬림(slim)화가 가능하여 상기 광 투과성 열 블록(100b)을 포함하는 PCR 장치의 소형화가 가능하다. 또한, 상기 도전성 나노 입자가 상기 발열층(20b)에 균일하게 분포되어 상기 광 투과성 열 블록(100b)의 균일한 열 분포 및 신속한 온도 제어가 가능하기 때문에 PCR 결과의 검출 효율이 높고, PCR 결과를 신속하게 얻을 수 있다. 상기 광 투과성 열 블록(100b)의 열 분포의 균일성 및 온도 제어의 신속성은 도 2에 따른 실험 결과로서 확인할 수 있다. 도 4b는 본 발명의 제4 실시예에 따른 PCR 장치에 포함된 광 투과성 열 블록(100b)의 시간에 따른 온도 변화를 도시한다. 기존 PCR 장치에서 열 블록으로 사용된 석열 히터, 세라믹 히터 또는 금속 히터에 전력을 인가하여 온도 분포를 관찰하고, 상기 광 투과성 열 블록(100b)에 상기 전극(40b)을 통해 전력을 인가하여 온도 분포를 관찰하였다. 그 결과, 기존 히터 상의 온도 분포는 히터 표면 전체에 걸쳐서 균일하지 않지만, 상기 광 투과성 열 블록(100b) 상의 온도 분포는 상기 기존 히터에 비해 전체적으로 균일한 것으로 관찰되었다. 또한, 상기 광 투과성 열 블록(100b)에 상기 전극(40b)을 통해 전력을 인가하여 시간에 따른 상기 광 투과성 열 블록(100b)의 온도 변화를 관찰하였다. 그 결과, 온도 상승 폭은 최대 17 °C/sec으로 나타났고, 이는 대표적인 기존 히터들(예를 들어, Bio-Rad사의 CFX96)의 온도 상승 폭이 최대 5 °C/sec인 것에 비해 상당히 높은 수치임을 확인할 수 있다.

[0042] 도 4c는 기관(10b) 하부 면에 흡광층(60b)이 접촉 배치된 본 발명의 제4 실시예에 따른 PCR 장치에 포함된 광 투과성 열 블록(100b)을 도시하고, 도 4d는 절연 보호층(30b) 상부 면에 광반사방지층(70b)이 접촉 배치된 본 발명의 제4 실시예에 따른 PCR 장치에 포함된 광 투과성 열 블록(100b)을 도시하고, 도 4e는 기관(10b) 하부면에 흡광층(60b)이 접촉 배치되고, 외부 공기층과 절연보호층(30b)의 접촉에 의한 광 반사를 방지하기 위한 광반사방지층(70b)이 상기 절연보호층(30b)의 상부에 접촉 배치된 본 발명의 제4 실시예에 따른 PCR 장치에 포함된 광 투과성 열 블록(100b)을 도시한다.

[0043] 일반적으로, PCR을 수행함과 동시에 형광물질을 이용하여 PCR 산물의 발생 유무 및 정도를 실시간으로 측정 및 분석할 수 있다. 이와 같은 PCR을 소위 실시간 중합효소 연쇄반응(Real time PCR)이라고 한다. 상기 반응은 PCR 칩에 PCR 반응에 필요한 시약뿐만 아니라 형광물질이 첨가되고, PCR 산물의 생성에 따라 상기 형광물질이 특정 파장의 광에 의해 발광함으로써 측정 및 분석 가능한 광 신호를 유발하게 된다. 따라서, 실시간으로 PCR 산물을 정확하게 모니터링하기 위해서는 상기 광 신호의 센싱 효율을 가능한 높힐 필요가 있다. 상기 광 투과성 열 블

록(100b)은 전체적으로 광 투과성을 갖기 때문에 광원으로부터 유래된 여기 광을 대부분 그대로 투과시켜 상기 광 신호의 센싱 효율을 높일 수 있다. 그러나, 상기 여기 광의 일부는 상기 광 투과성 열 블록(100b) 상에서 반사되거나 또는 상기 광 투과성 열 블록(100b)을 통과한 후 반사되어 광 신호의 노이즈(noise)로서 작용할 수 있다. 따라서, 바람직하게는, 상기 광 투과성 열 블록(100b)의 하부 면에 흡광 물질을 처리하여 센싱 효율을 더욱 높일 수 있다. 도 4c에 따르면, 흡광층(60b)이 상기 기판(10b)의 하부 면에 접촉 배치되고, 상기 흡광층(60b)은 흡광 물질을 포함한다. 상기 흡광 물질은 예를 들어, 운모(mica)일 수 있으나, 광을 흡수하는 성질을 갖는 물질이라면 제한되지 않는다. 따라서, 광원으로부터 유래된 광의 일부를 상기 흡광층(60b)이 흡수하여, 광 신호의 노이즈로 작용하는 반사 광의 발생을 최대한 억제할 수 있다. 또한, 대안적으로, 상기 광 투과성 열 블록(100b)의 상부 면에 광반사방지 물질을 처리하여 센싱 효율을 더욱 높일 수 있다. 도 4d에 따르면, 광반사방지층(70b)이 상기 절연 보호층(30b)의 상부 면에 접촉 배치되고, 상기 광반사방지층(70b)은 절연보호층(30b)과 조합하여 절연보호 기능 및 광반사방지 기능을 수행하며, 광반사방지 물질을 포함한다. 상기 광반사방지 물질은 예를 들어, MgF₂와 같은 불화물, SiO₂, Al₂O₃와 같은 산화물일 수 있으나, 광반사를 방지할 수 있는 성질을 갖는 물질이라면 제한되지 않는다. 또한, 더 바람직하게는, 상기 광 투과성 열 블록(100b)의 하부 면에 흡광 물질을 처리하고, 동시에 상기 광 투과성 열 블록(100b)의 상부 면에 광반사방지 물질을 처리하여 센싱 효율을 더욱 높일 수 있다. 즉, 효과적인 실시간 PCR의 모니터링을 위하여 상기 노이즈 대비 광 신호 비율은 가능한 최대값을 가져야 하고, 상기 노이즈 대비 광 신호 비율은 상기 PCR 칩으로부터 여기 광의 반사율이 낮을수록 향상될 수 있다. 예를 들어, 일반적인 금속성 재질의 기존 히터들의 여기 광의 반사율은 약 20 내지 80 %이지만, 상기 도 4c 또는 도 4d에 따른 흡광층(60b) 또는 광반사방지층(70b)을 포함하는 광 투과성 열 블록(100b)을 사용하는 경우 광 반사율을 0.2% 내지 4% 이내로 줄일 수 있고, 상기 도 4e에 따른 흡광층(60b) 및 광반사방지층(70b)을 포함하는 본 발명에 따른 광 투과성 열 블록(100b)을 사용하는 경우 광 반사율을 0.2% 이하로 줄일 수 있다.

[0044] 도 4f는 광 제공부 및 광 검출부를 포함하는 본 발명의 제4 실시예에 따른 PCR 장치의 광 투과성 열 블록(100b) 상에 PCR 칩(10)이 배치된 것을 도시한다. 도 4f에 따르면, 상기 PCR 장치는 상기 칩 접촉부(50b)에 배치되는 PCR 칩(10)에 광을 제공하도록 구동가능하게 배치된 광 제공부(200b) 및 상기 칩 접촉부(50b)에 배치되는 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 광을 수용하도록 구동가능하게 배치된 광 검출부(300b)를 더 포함한다. 상기 광 제공부(200b)는 상기 PCR 칩(10)에 광을 제공하기 위한 모듈이고, 상기 광 검출부(300b)는 상기 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 광을 수용하여 상기 PCR 칩(10)에서 수행되는 PCR 반응을 측정하기 위한 모듈이다. 상기 광 제공부(200b)로부터 광이 방출되고, 상기 방출된 광은 상기 PCR 칩(10), 구체적으로 상기 PCR 칩(10)의 반응 채널(도시되지 않음)을 통과하거나 반사하고, 이 경우 상기 반응 채널 내의 핵산 증폭에 의해 발생하는 광 신호를 상기 광 검출부(300b)가 검출한다. 따라서, 본 발명의 제4 실시예에 따른 PCR 장치에 따르면, 상기 PCR 칩(10)에서 상기 PCR의 각 순환 단계가 진행되는 동안 상기 반응 채널 내에서 (형광 물질이 결합된) 핵산의 증폭에 의한 반응 결과를 실시간으로 모니터링함으로써 초기 샘플 용액에 포함되어 있는 표적 핵산의 증폭 여부 및 증폭 정도를 실시간으로 측정 및 분석할 수 있다. 또한, 상기 광 제공부(200b) 및 광 검출부(300b)는 상기 광 투과성 열 블록(100b)을 중심으로 위 또는 아래에 모두 배치되거나 각각 배치될 수 있다. 다만, 상기 광 제공부(200b) 및 광 검출부(300b)의 배치는 최적의 구현을 위하여 다른 모듈과의 배치 관계를 고려하여 다양할 수 있으며, 바람직하게는 도 4f에 따라, 상기 광 제공부(200b) 및 광 검출부(300b)는 상기 광 투과성 열 블록의 상부에 배치될 수 있다.

[0045] 한편, 도 4d에 따르면, 상기 광 제공부(200b)는 LED(Light Emitting Diode) 광원 또는 레이저 광원(210b), 상기 광원으로부터 방출되는 광에서 미리 결정된 파장을 갖는 광을 선택하는 제1 광 여과기(230b), 및 상기 제1 광 여과기로부터 방출되는 광을 포집하는 제1 광 렌즈(240b)를 포함하고, 상기 광원(210b)과 상기 제1 광 여과기(230b) 사이에 빛을 퍼지게 하도록 배치된 제1 비구면 렌즈(220b)를 더 포함한다. 상기 광원(210b)은 광을 방출할 수 있는 모든 광원을 포함하며, LED(Light Emitting Diode) 광원 또는 레이저 광원을 포함한다. 상기 제1 광 여과기(230b)는 다양한 파장대를 갖는 입사광 중 특정 파장의 광을 선택하여 방출하는 것으로, 미리 결정된 상기 광원(210b)에 따라 다양하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 광 여과기(230b)는 상기 광원(210b)으로부터 방출되는 광 중 500 nm 이하 파장대의 광만을 통과시킬 수 있다. 상기 제1 광 렌즈(240b)는 그 입사광을 포집하여 그 방출광의 강도를 증가시키는 역할을 수행하는 것으로, 상기 광 투과성 열 블록(100b)을 통해 PCR 칩(10)에 조사되는 광의 강도를 증가시킬 수 있다. 또한, 상기 광 제공부(200b)는 상기 광원(210b)과 상기 제1 광 여과기(230b) 사이에 빛을 퍼지게 하도록 배치된 제1 비구면 렌즈(220b)를 더 포함한다. 상기 제1 비구면 렌

즈(220b)의 배치 방향을 조정함으로써, 상기 광원(210b)으로부터 방출되는 광 범위를 확장하여 측정 가능한 영역에 도달하게 한다.

[0046] 도 4h에 따르면, 상기 광 검출부(300b)는 상기 칩 접촉부(50b)에 배치되는 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 광을 포집하는 제2 광 렌즈(310b), 상기 제2 광 렌즈로부터 방출되는 광에서 미리 결정된 파장을 갖는 광을 선택하는 제2 광 여과기(320b), 및 상기 제2 광 여과기(320b)로부터 방출되는 광으로부터 광 신호를 검출하는 광 분석기(350b)를 포함하고, 상기 제2 광 여과기(320b)와 상기 광 분석기(350b) 사이에 상기 제2 광 여과기(320b)로부터 방출되는 광을 집적하도록 배치된 제2 비구면 렌즈(330b)를 더 포함하며, 상기 제2 비구면 렌즈(330b)와 상기 광 분석기(350b) 사이에 상기 제2 비구면 렌즈(330b)로부터 방출되는 광의 노이즈(noise)를 제거하고 상기 제2 비구면 렌즈(330b)로부터 방출되는 광을 증폭하도록 배치된 광다이오드 집적소자(photodiode integrated circuit, PDIC)(340b)를 더 포함한다. 상기 제2 광 렌즈(310b)는 그 입사광을 포집하여 그 방출광의 강도를 증가시키는 역할을 수행하는 것으로, 상기 광 투과성 열 블록(100b)을 통해 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 광의 강도를 증가시켜 광 신호 검출을 용이하게 한다. 상기 제2 광 여과기(320b)는 다양한 파장대를 갖는 입사광 중 특정 파장의 광을 선택하여 방출하는 것으로, 상기 광 투과성 열 블록(100b)을 통해 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 미리 결정된 광의 파장에 따라 다양하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 제2 광 여과기(320b)는 상기 광 투과성 열 블록(100b)을 통해 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 미리 결정된 광 중 500 nm 이하 파장대의 광만을 통과시킬 수 있다. 상기 광 분석기(350b)는 상기 제2 광 여과기(320b)로부터 방출되는 광으로부터 광 신호를 검출하는 모듈로서, 샘플 용액으로부터 발현 형광된 광을 전기 신호로 전환하여 정성 및 정량적인 측정이 가능하도록 한다. 또한, 상기 광 검출부(300b)는 상기 제2 광 여과기(320b)와 상기 광 분석기(350b) 사이에 상기 제2 광 여과기(320b)로부터 방출되는 광을 집적하도록 배치된 제2 비구면 렌즈(330b)를 더 포함할 수 있다. 상기 제2 비구면 렌즈(330b)의 배치 방향을 조정함으로써, 상기 제2 광 여과기(320b)로부터 방출되는 광 범위를 확장하여 측정 가능한 영역에 도달하게 한다. 또한, 상기 광 검출부(300b)는 상기 제2 비구면 렌즈(330b)와 상기 광 분석기(350b) 사이에 상기 제2 비구면 렌즈(330b)로부터 방출되는 광의 노이즈(noise)를 제거하고, 상기 제2 비구면 렌즈(330b)로부터 방출되는 광을 증폭하도록 배치된 광다이오드 집적소자(photodiode integrated circuit, PDIC)(340b)를 더 포함할 수 있다. 상기 광다이오드 집적소자(340b)를 사용함으로써, PCR 장치의 소형화가 더욱 가능하고, 노이즈를 최소화하여 신뢰 가능한 광 신호를 측정할 수 있다.

[0047] 도 4i에 따르면, 상기 PCR 장치는 상기 광 제공부(200b)로부터 방출된 광이 광 검출부(300b)까지 도달할 수 있도록 광의 진행 방향을 조절하고, 미리 결정된 파장을 갖는 광을 분리하기 위한 하나 이상의 이색성 필터(400x, 400y)를 더 포함한다. 상기 이색성 필터(dichroic filter)(400x, 400y)는 광을 파장에 따라 선택적으로 투과 또는 선택적으로 조절된 각도로 반사시키는 모듈이다. 도 4k에 따르면, 이색성 필터(400x)는 광 제공부(200b)로부터 방출되는 광의 광축에 대하여 약 45도 각도로 경사지게 배치되고, 상기 광을 그 파장에 따라 선택적으로 단파장 성분을 투과시키고 장파장 성분을 직각으로 반사시켜 상기 광 투과성 열 블록(100b) 상에 배치된 PCR 칩(10)에 도달하게 한다. 또한, 이색성 필터(400y)는 상기 PCR 칩(10) 및 광 투과성 열 블록(100b)으로부터 반사된 광의 광축에 대하여 약 45도 각도로 경사지게 배치되고, 상기 광을 그 파장에 따라 선택적으로 단파장 성분을 투과시키고 장파장 성분을 직각으로 반사시켜 상기 광 검출부(300b)에 도달하게 한다. 상기 광 검출부(300b)에 도달한 광은 광 분석기에서 전기 신호로 전환되어 핵산 증폭 여부 및 증폭 정도를 나타내게 된다.

[0048] 도 5a 내지 도 5i는 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치에 관한 도면이다.

[0049] 도 5a 내지 도 5i에 따른 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치는 1 이상의 히터를 구비하는 히터 군, 상기 히터 군을 2 이상 구비하고 상기 2 이상의 히터 군은 상호 열 교환이 일어나지 않도록 이격 배치된 히터 유닛이 2 이상 반복 배치된 것으로서, 적어도 일 면에 표적 샘플이 수용되는 PCR 칩의 접촉 면을 구비하는 열 블록; 상기 열 블록에 구비된 히터들에 전력을 공급하도록 연결된 전극을 구비하는 전극부; 및 상기 열 블록에 구비된 1 이상의 히터들과 열 교환이 가능하도록 상기 열 블록 상에 접촉가능하도록 배치된, 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩(10)을 포함한다.

[0050] 상기 열 블록(100c)은 PCR을 수행하기 위해 표적 샘플에 특정 온도로 열을 공급하도록 구현된 모듈로서, 적어도 일 면에 표적 샘플이 수용되는 PCR 칩(10)의 접촉 면을 구비하고, 상기 PCR 칩(10)의 일 면에 접촉하여, 1

이상의 반응 채널 내에 존재하는 표적 샘플에 열을 공급하여 PCR을 수행하도록 한다. 상기 열 블록(100c)은 기판을 기반으로 한다. 상기 기판은 상기 기판 내에 배치된 히터의 가열 및 온도 유지로 인해 그 물리적 및/또는 화학적 성질이 변하지 않고, 상기 기판 내에 이격 배치된 2 이상의 히터 사이에서 상호 열 교환이 일어나지 않도록 하는 모든 재질로 구현될 수 있다. 예를 들어, 상기 기판은 플라스틱, 유리, 실리콘 등의 재질로서, 투명 또는 반투명하게 구현될 수 있으나, 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치에 실시간(real-time) PCR 용도로 사용될 경우 광 투과성 재질로 구현되는 것이 바람직하다. 상기 열 블록(100c)은 전체적으로 평면 형상을 구비할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 열 블록(100c)은 1 이상의 히터를 구비하는 히터 군, 상기 히터 군을 2 이상 구비하고 상기 2 이상의 히터 군은 상호 열 교환이 일어나지 않도록 이격 배치된 히터 유닛이 2 이상 반복 배치된다. 또한, 상기 PCR 칩(10)의 접촉 면은 상기 열 블록(100c)의 적어도 일 면에 구현되고, 표적 샘플이 수용된 PCR 칩(10)에 효율적으로 열을 공급하기 위한 다양한 형상으로 구현될 수 있으나, 접촉 면의 표면적이 넓도록 평면 형상 또는 필러(pillar) 형상이 바람직하다. 상기 히터(111c, 112c, 121c, 122c, 131c, 132c)는 발열 소자로서, 그 내부에 열선(도시되지 않음)이 배치될 수 있다. 상기 열선은 일정 온도를 유지하도록 다양한 열원과 구동가능하게 연결될 수 있고, 상기 열선의 온도를 모니터링하기 위한 다양한 온도 센서와 구동가능하게 연결될 수 있다. 상기 열선은 상기 히터의 내부 온도를 전체적으로 일정하게 유지하기 위해 상기 히터의 표면 중심점을 기준으로 상하 및/또는 좌우 방향으로 대칭되도록 배치될 수 있다. 또한, 상기 히터는 그 내부에 박막 히터(thin film heater, 도시되지 않음)가 배치될 수도 있다. 상기 박막 히터는 상기 히터의 내부 온도를 전체적으로 일정하게 유지하기 위해 상기 히터 표면의 중심점을 기준으로 상하 및/또는 좌우 방향으로 일정한 간격으로 배치될 수 있다. 또한, 상기 히터는 발열 소자로서, 동일한 면적에 대한 고른 열 분포 및 신속한 열 전달을 위한 그 자체로 금속 재질, 예를 들어 크롬, 알루미늄, 구리, 철, 은 등일 수 있다. 또한, 상기 히터는 광 투과성 발열 소자, 예를 들어 산화물 반도체 물질 또는 상기 산화물 반도체 물질에 In, Sb, Al, Ga, C 및 Sn로 구성된 군으로부터 선택된 불순물이 첨가된 물질을 포함하는 도전성 나노 입자, 인듐 주석 산화물, 전도성 고분자 물질, 탄소 나노 튜브, 및 그래핀(graphene)이 포함된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다. 만약 상기 PCR 장치가 실시간(real-time) PCR 용도로 사용될 경우 상기 히터는 광 투과성 발열 소자인 것이 바람직하다. 상기 히터 군(110c, 120c, 130c)은 상기 1 이상의 히터를 포함하는 단위로서, PCR 수행을 위한 변성 단계, 어닐링 단계 및/또는 연장 단계를 수행하기 위한 온도를 유지하는 영역이다. 상기 히터 군은 상기 열 블록(100c)에 2 이상 배치되고, 상기 2 이상의 히터 군은 상호 열 교환이 일어나지 않도록 이격 배치된다. 상기 히터 군은 상기 열 블록(100c)에 2개 내지 4개 포함될 수 있다. 즉, 상기 열 블록은 2개의 히터 군을 구비하고, 상기 제1 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 어닐링/연장 단계 온도를 유지하거나, 또는 상기 제1 히터 군은 PCR 어닐링/연장 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지할 수 있다. 또한, 상기 열 블록은 3개의 히터 군을 구비하고, 상기 제1 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 어닐링 단계 온도를 유지하고 상기 제3 히터 군은 PCR 연장 단계 온도를 유지하거나, 또는 상기 제1 히터 군은 PCR 어닐링 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하거나, 또는 상기 제1 히터 군은 PCR 연장 단계 온도를 유지하고 상기 제2 히터 군은 PCR 변성 단계 온도를 유지하고 상기 제3 히터 군은 PCR 어닐링 단계 온도를 유지할 수 있다. 바람직하게는 상기 히터 군은 상기 열 블록(100c)에 3회 배치되어 PCR 수행을 위한 3 단계, 즉 변성 단계, 어닐링 단계 및 연장 단계를 수행하기 위한 온도를 각각 유지할 수 있고, 더 바람직하게는 상기 히터 군은 상기 열 블록(100c)에 2회 배치되어 PCR 수행을 위한 2 단계, 즉 변성 단계 및 어닐링/연장 단계를 수행하기 위한 온도를 각각 유지할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 히터 군은 상기 열 블록(100c)에 2회 배치되어 PCR 수행을 위한 2 단계, 즉 변성 단계 및 어닐링/연장 단계를 수행할 경우 PCR 수행을 위한 3 단계, 즉 변성 단계, 어닐링 단계 및 연장 단계를 수행하는 것보다 반응 시간을 단축시킬 수 있고, 히터의 수를 줄임으로써 구조를 단순화시키는 이점이 있다. 이 경우 PCR 수행을 위한 3 단계에 있어서, 변성 단계를 수행하기 위한 온도는 85℃ 내지 105℃, 바람직하게는 95℃이고, 어닐링 단계를 수행하기 위한 온도는 40℃ 내지 60℃, 바람직하게는 50℃이고, 연장 단계를 수행하기 위한 온도는 50℃ 내지 80℃, 바람직하게는 72℃이고, PCR 수행을 위한 2 단계에 있어서, 변성 단계를 수행하기 위한 온도는 85℃ 내지 105℃, 바람직하게는 95℃이고, 어닐링/연장 단계를 수행하기 위한 온도는 50℃ 내지 80℃, 바람직하게는 72℃이다. 다만, 상기 PCR 수행을 위한 특정된 온도 및 온도 범위는 PCR을 수행함에 있어서 실현 가능한 범위 내에서 조절 가능하다. 한편, 상기 히터 군은 온도 완충 역할을 수행하는 히터를 더 포함할 수 있다. 상기 히터 유닛(10c, 20c)은 상기 1 이상의 히터를 포함하는 상기 2 이상의 히터 군을 포함하는 단위로서, PCR 수행을 위한 변성 단계, 어닐링 단계 및/또는 연장 단계를 포함하는 1 순환이 완료되는 영역이다. 상기 히터 유닛은 상기 열 블록(100c)에 2 이상 반복 배치된다. 바람직하게는 상기 히터 유닛은 상기 열 블록(100c)에 10회, 20회, 30회 또는 40회로 반복 배치될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0051] 도 5a에 따르면, 상기 열 블록(100c)은 반복 배치된 히터 유닛(10c, 20c), 그에 각각 포함된 2개의 히터 군(110c, 120c), 및 그에 각각 포함된 1개의 히터(111c, 121c)를 구비함으로써, PCR 수행을 위한 2 단계 온도, 즉 변성 단계의 1 온도 및 어닐링/연장 단계의 1 온도를 순차적으로 반복 제공한다. 예를 들어, 제1 히터(111c)는 85℃ 내지 105℃ 범위 중 1 온도, 바람직하게는 95℃를 유지하여 상기 제1 히터 군(110c)은 변성 단계를 수행하기 위한 온도를 제공하고, 제2 히터(121c)는 50℃ 내지 80℃ 범위 중 1 온도, 바람직하게는 72℃를 유지하여 상기 제2 히터 군(120c)은 어닐링/연장 단계를 수행하기 위한 온도를 제공함으로써, 상기 열 블록(100c)은 제1 히터 유닛(10c) 및 제2 히터 유닛(20c)에서 PCR 수행을 위한 2 단계 온도를 순차적으로 반복 제공한다.
- [0052] 도 5b에 따르면, 상기 열 블록(100c)은 반복 배치된 히터 유닛(10c, 20c), 그에 각각 포함된 2개의 히터 군(110c, 120c), 및 그에 각각 포함된 2개의 히터(111c, 112c, 121c, 122c)를 구비함으로써, PCR 수행을 위한 2 단계 온도, 즉 변성 단계의 2 온도 및 어닐링/연장 단계의 2 온도를 순차적으로 반복 제공한다. 예를 들어, 제1 히터(111c)는 85℃ 내지 105℃ 범위 중 1 온도, 제2 히터(112c)는 85℃ 내지 105℃ 범위 중 상기 제1 히터(111c)의 온도와 동일한 또는 상이한 1 온도를 유지하여 상기 제1 히터 군(110c)은 변성 단계를 수행하기 위한 온도를 제공하고, 제3 히터(121c)는 50℃ 내지 80℃ 범위 중 1 온도, 제4 히터(122c)는 50℃ 내지 80℃ 범위 중 상기 제3 히터(121c)의 온도와 동일한 또는 상이한 1 온도를 유지하여 상기 제2 히터 군(120c)은 어닐링/연장 단계를 수행하기 위한 온도를 제공함으로써, 상기 열 블록(100c)은 제1 히터 유닛(10c) 및 제2 히터 유닛(20c)에서 PCR 수행을 위한 2 단계 온도를 순차적으로 반복 제공한다.
- [0053] 도 5c에 따르면, 상기 열 블록(100c)은 반복 배치된 히터 유닛(10c, 20c), 그에 각각 포함된 3개의 히터 군(110c, 120c, 130c), 및 그에 각각 포함된 1개의 히터(111c, 121c, 131c)를 구비함으로써, PCR 수행을 위한 3 단계 온도, 즉 변성 단계의 1 온도, 어닐링 단계의 1 온도, 및 연장 단계의 1 온도를 순차적으로 반복 제공한다. 예를 들어, 제1 히터(111c)는 85℃ 내지 105℃ 범위 중 1 온도, 바람직하게는 95℃를 유지하여 상기 제1 히터 군(110c)은 변성 단계를 수행하기 위한 온도를 제공하고, 제2 히터(121c)는 40℃ 내지 60℃ 범위 중 1 온도, 바람직하게는 50℃를 유지하여 상기 제2 히터 군(120c)은 어닐링 단계를 수행하기 위한 온도를 제공하고, 제3 히터(131c)는 50℃ 내지 80℃ 범위 중 1 온도, 바람직하게는 72℃를 유지하여 상기 제3 히터 군(130c)은 연장 단계를 수행하기 위한 온도를 제공함으로써, 상기 열 블록(100c)은 제1 히터 유닛(10c) 및 제2 히터 유닛(20c)에서 PCR 수행을 위한 3 단계 온도를 순차적으로 반복 제공한다.
- [0054] 도 5d에 따르면, 반복 배치된 히터 유닛(10c, 20c), 그에 각각 포함된 3개의 히터 군(110c, 120c, 130c), 및 그에 각각 포함된 2개의 히터(111c, 112c, 121c, 122c, 131c, 132c)를 구비함으로써, PCR 수행을 위한 3 단계 온도, 즉 변성 단계의 2 온도, 어닐링 단계의 2 온도, 및 연장 단계의 2 온도를 순차적으로 반복 제공한다. 예를 들어, 제1 히터(111c)는 85℃ 내지 105℃ 범위 중 1 온도, 제2 히터(112c)는 85℃ 내지 105℃ 범위 중 상기 제1 히터(111c)의 온도와 동일한 또는 상이한 1 온도를 유지하여 상기 제1 히터 군(110c)은 변성 단계를 수행하기 위한 온도를 제공하고, 제3 히터(121c)는 40℃ 내지 60℃ 범위 중 1 온도, 제4 히터(122c)는 40℃ 내지 60℃ 범위 중 상기 제3 히터(121c)의 온도와 동일한 또는 상이한 1 온도를 유지하여 제2 히터 군(120c)은 어닐링 단계를 수행하기 위한 온도를 제공하고, 제5 히터(131c)는 50℃ 내지 80℃ 범위 중 1 온도, 제6 히터(132c)는 50℃ 내지 80℃ 범위 중 상기 제5 히터(131c)의 온도와 동일한 또는 상이한 1 온도를 유지하여 상기 제3 히터 군(130c)은 연장 단계를 수행하기 위한 온도를 제공함으로써, 상기 열 블록(100c)은 제1 히터 유닛(10c) 및 제2 히터 유닛(20c)에서 PCR 수행을 위한 3 단계 온도를 순차적으로 반복 제공한다.
- [0055] 도 5a 내지 도 5d와 같이, 일정 온도를 유지하는 2 이상의 히터를 반복 배치함으로써 온도 변화율을 크게 개선할 수 있다. 예를 들어, 종래 하나의 히터만을 채택하는 단일 히터 방식에 의하면, 온도 변화율이 초당 3℃ 내지 7℃ 범위 내에서 이루어지는데 반해, 본 발명의 제5 실시예에 따른 반복 히터 배치 방식에 의하면, 상기 히터들 간의 온도 변화율이 초당 20℃ 내지 40℃ 범위 내에서 이루어져 반응 시간을 크게 단축할 수 있다. 상기 히터들은 상호 열 교환이 일어나지 않도록 이격 배치되어 있고, 그 결과, 미세한 온도 변화에 의해서도 큰 영향을 받을 수 있는 핵산 증폭 반응에 있어서, 상기 변성 단계, 어닐링 단계 및 연장 단계(또는 상기 변성 단계 및 어닐링/변성 단계)의 정확한 온도 제어가 가능하고, 상기 히터들로부터 열을 공급받는 부위에서만 원하는 온도 또는 온도 범위를 유지하는 것이 가능하다. 또한, 상기 열 블록(100c)에는 상기 히터 유닛이 2 이상 반복 배치되어 있고, 상기 히터 유닛(10c, 20c)의 반복 배치 수는 PCR을 수행하고자 하는 사용자 또는 표적 샘플의 종류

에 따라 다양할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치를 순환 주기 10회로 하는 PCR에 적용하고자 하는 경우 상기 히터 유닛을 10회 반복 배치할 수 있다. 즉, PCR을 수행하고자 하는 사용자 또는 표적 샘플의 종류에 따라 PCR 순환 주기를 고려하여 상기 히터 유닛을 10회, 20회, 30회, 40회, 50회 등으로 반복 배치할 수 있고, 이는 특별히 제한되는 것은 아니다. 한편, 상기 히터 유닛을 미리 결정된 PCR 순환 주기의 절반의 수로 반복 배치할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에 따른 PCR 장치를 순환 주기 20회로 하는 PCR에 적용하고자 하는 경우 상기 히터 유닛을 10회 반복 배치할 수 있다. 이 경우 표적 샘플 용액은 이하 상세하게 설명될 핵산 증폭 반응부(300c) 내에 배치된 반응 채널(303c) 내에서 유입부(304c)로부터 유출부(305c) 방향으로 PCR 순환 주기를 10회 반복 실행하되, 뒤이어 반대로 유출부(305c)로부터 유입부(304c) 방향으로 PCR 순환 주기를 10회 반복 실행할 수 있다.

[0056] 도 5e는 상기 PCR 칩(10)을 포함하는 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치의 구조를 도시한다. 구체적으로, 도 5e의 상단은 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 칩(10) 및 PCR 장치의 열 블록(100c)의 측 방향 단면도를 도시하고, 도 5e의 하단은 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 칩(10) 및 PCR 장치의 열 블록(100c)의 상 방향 평면도를 도시한다.

[0057] 도 5e에 따르면, 상기 열 블록(100c)은 10회 반복 배치된 히터 유닛을 포함하고, 상기 히터 유닛은 제1 히터 군 및 제2 히터 군을 포함하며, 상기 제1 히터 군 및 제2 히터 군은 각각 1개의 히터, 즉 제1 히터(110c) 및 제2 히터(120c)를 포함한다. 도 5e에 따른 히터, 히터 군, 히터 유닛 및 열 블록에 관해서는 상기 설명된 것과 같다.

[0058] 상기 전극부(200c)는 전력 공급부(도시되지 않음)로부터 전력을 공급받아 상기 열 블록(100c)이 발열되도록 전력을 공급하는 모듈로서, 상기 열 블록(100c)에 구비된 히터들에 전력을 공급하도록 연결된 전극(210c, 220c)을 포함한다. 도 5e에 따르면, 상기 열 블록(100c)의 상기 제1 전극(210c)은 상기 제1 히터(110c)에 전력을 공급하도록 연결되고, 상기 제2 전극(220c)은 상기 제2 히터(120c)에 전력을 공급하도록 연결되어 있으나, 이에 제한되지 않고 상기 전극부(200c)는 상기 열 블록(100c)의 외부에 구동가능하게 배치될 수도 있다. 만약 상기 제1 히터(110c)가 PCR 변성 단계 온도, 예를 들어 85℃ 내지 105℃를 유지하고 상기 제2 히터(120c)가 PCR 어닐링/연장 단계 온도, 예를 들어 50℃ 내지 80℃를 유지하는 경우 상기 제1 전극(210c)은 전력 공급부로부터 PCR 변성 단계 온도 유지를 위한 전력을 공급받고, 상기 제2 전극(220c)은 전력 공급부로부터 PCR 어닐링/연장 단계 온도 유지를 위한 전력을 공급받을 수 있다. 상기 제1 전극(210c) 및 상기 제2 전극(220c)은 상기 열 블록(100c)에 반복 배치된 제1 히터(110c) 및 2 이상의 제2 히터(120c)에 각각 연결될 수 있다. 상기 제1 전극(210c) 및 상기 제2 전극(220c)은 금, 은, 구리 등 전도성 재질일 수 있고, 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0059] 상기 PCR 칩(10)은 상기 열 블록(100c)과 열 교환이 가능하도록 상기 열 블록(100c) 상에 접촉하여 상기 제1 히터(110c) 및 상기 제2 히터(120c)로부터 열을 공급받을 수 있다. 또한, 상기 PCR 칩(10)은 상기 제1 히터(110c)의 상측 대응 부분(301c) 및 상기 제2 히터(120c)의 상측 대응 부분(302c)을 길이 방향으로 통과하도록 연장 배치된 1 이상의 반응 채널(14)을 구비할 수 있다. 도 5e의 상단에 따르면, 상기 반응 채널(14)은 상기 열 블록(100c)에 배치된 상기 제1 히터(110c)의 상측 대응 부분(301c)과 상기 제2 히터(120c)의 상측 대응 부분(302c)이 유체 소통가능하게 연결되어 길이 방향으로 통과하도록 연장되어 있다. 상기 반응 채널(14)의 상기 제1 히터(110c)의 상측 대응 부분(301c)은 표적 샘플 내에 존재하는 핵산의 PCR 변성 반응이 일어나는 영역이고, 상기 제2 히터(120c)의 상측 대응 부분(302c)은 표적 샘플 내에 존재하는 핵산의 PCR 어닐링/연장 반응이 일어나는 영역일 수 있다. 즉, 상기 반응 채널(14)을 유동하는 표적 샘플이 상기 제1 히터(110c)의 상측 대응 부분(301c) 및 상기 제2 히터(120c)의 상측 대응 부분(302c)을 연이어 통과하면서 PCR이 수행될 수 있다. 또한, 상기 PCR 칩(10)은 상기 1 이상의 반응 채널(14)의 양 말단에 각각 유입부(15) 및 유출부(16)를 포함할 수 있다. 한편, 도 5e의 하단과 같이, 상기 1 이상의 반응 채널(14)은 상기 히터 유닛 중 최선 배치된 제1 히터(110c)의 상측 대응 부분(301c)과 최후 배치된 제2 히터(120c)의 상측 대응 부분(302c)을 직선 길이 방향으로 통과하도록 연장 배치되는 것이 바람직하다. 따라서 상기 유입부(15)를 통해 유입된 표적 샘플은 상기 반응 채널(14)을 길이 방향으로 통과하면서 상기 제1 히터(110c)의 상측 대응 부분(301c) 및 상기 제2 히터(120c)의 상측 대응 부분(302c)에서 각각 PCR 변성 단계 및 PCR 어닐링/연장 단계를 반복 수행하며 상기 유출부를 통해 외부로 배출될 수 있다. 한편, 상기 PCR 칩(10)은 전체적으로 평면 형상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 한편, 상기 PCR 칩(10)은 광 투과성 재질로 구현될 수 있고, 만약 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치가 실시간(real-time) PCR 용도로 사용될 경우 상기 PCR 칩(10)은 광 투과성 재질로 구현되는 것이 바람직하다.

- [0060] 도 5f는 PCR 칩, 전력 공급부 및 펌프를 포함하는 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치를 도시한다.
- [0061] 도 5f에 따르면, 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치는 PCR 칩(10), 전력 공급부(400c) 및 펌프(500c)를 포함한다. 구체적으로, 상기 PCR 칩(10)은 상기 열 블록 상에 접촉 배치되어 있다. 상기 PCR 칩(10) 및 이에 포함된 구성요소에 관해서는 이미 설명된 것과 같다. 상기 전력 공급부(400c)는 상기 전극부(200c)에 전력을 공급하기 위한 모듈로서, 상기 전극부(200c)의 제1 전극(210c) 및 제2 전극(220c)과 각각 연결될 수 있다. 예를 들어, 상기 PCR 칩(10)이 PCR 수행을 위해 상기 열 블록 상에 접촉 배치되면, 상기 전력 공급부(400c)의 제1 전력 포트(도시되지 않음)는 상기 제1 전극(210c)과 전기적으로 연결되고, 상기 전력 공급부(400c)의 제2 전력 포트(도시되지 않음)는 상기 제2 전극(220c)과 전기적으로 연결된다. 뒤이어, PCR 수행을 위한 사용자 지시가 있는 경우 상기 전력 공급부(400c)는 상기 제1 전극(210c) 및 상기 제2 전극(220c)에 각각 전력을 공급하여 상기 열 블록의 제1 히터(110c) 및 제2 히터(120c)를 신속히 가열할 수 있고, 각 히터들(110c, 120c)이 미리 결정된 온도에 도달하게 되면 전력 공급량을 제어하여 상기 미리 결정된 온도를 유지하도록 한다. 예를 들어, 상기 미리 결정된 온도는 상기 제1 히터(110c)에서는 PCR 변성 단계 온도(85℃ 내지 105℃, 바람직하게는 95℃) 및 상기 제2 히터(120c)에서는 PCR 어닐링/연장 단계 온도(50℃ 내지 80℃, 바람직하게는 72℃)이거나, 또는 상기 제1 히터(110c)에서는 PCR 어닐링/연장 단계 온도(50℃ 내지 80℃, 바람직하게는 72℃) 및 상기 제2 히터(120c)에서는 PCR 변성 단계 온도(85℃ 내지 105℃, 바람직하게는 95℃)일 수 있다.
- [0062] 상기 펌프(500c)는 상기 PCR 칩(10)의 1 이상의 반응 채널(14) 내에서 유동하는 유체의 유량 및 유속을 제어하기 위한 모듈로서, 양압 펌프 또는 음압 펌프일 수 있고, 예를 들어 실린지(syringe) 펌프일 수 있다. 상기 펌프(500c)는 상기 반응 채널(14)의 일 부분에 구동가능하게 배치될 수 있으나, 바람직하게는 상기 반응 채널(303c)의 양 말단에 형성된 유입부(15) 및/또는 유출부(16)에 연결 배치된다. 상기 펌프(500c)가 상기 유입부(15) 및/또는 유출부(16)에 연결 배치된 경우 펌프 역할을 수행할 뿐만 아니라 상기 유입부(15) 및/또는 유출부(16)를 통해 표적 샘플 용액이 새어 나오는 것을 방지하는 마개 역할을 수행할 수도 있다. 또한, 상기 반응 채널(14) 내에서 유동하는 유체, 즉 표적 샘플 용액의 유량 및 유속을 일 방향으로 제어하고자 하는 경우 상기 펌프(500c)는 상기 유입부(15) 및 상기 유출부(16) 중 어느 하나에만 연결 배치되고, 남은 하나에는 일반적인 마개가 밀봉 연결될 수 있고, 상기 반응 채널(14) 내에서 유동하는 유체, 즉 표적 샘플 용액의 유량 및 유속을 양 방향으로 제어하고자 하는 경우에는 상기 펌프(500c)는 상기 유입부(15) 및 상기 유출부(16) 모두에 연결 배치될 수 있다.
- [0063] 상기 PCR 칩(10), 상기 전력 공급부(400c) 및 상기 펌프(500c)를 포함하는 PCR 장치 내에서 표적 샘플의 핵산 증폭 반응은 일 실시예로서, 아래와 같은 단계를 통해 수행될 수 있다.
- [0064] 1. 원하는 이중 가닥 표적 DNA, 증폭하고자 하는 특정 염기 서열과 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머, DNA 중합효소, 삼인산화데옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide triphosphates, dNTP), PCR 반응 완충액(PCR reaction buffer)를 포함하는 표적 샘플 용액을 준비한다.
- [0065] 2. 상기 표적 샘플 용액을 PCR 칩(10)에 도입한다. 이 경우 상기 표적 샘플 용액은 상기 유입부(15)를 통해 PCR 칩(10) 내부의 반응 채널(13)에 배치된다.
- [0066] 3. 상기 전극부(200c), 구체적으로 제1 전극(210c) 및 제2 전극(220c)이 상기 전력 공급부(400c)와 각각 연결되도록 하고, 상기 PCR 칩(10)의 상기 유입부(14) 및 상기 유출부(15)를 펌프(500c)와 밀봉 연결한다.
- [0067] 4. 상기 전력 공급부(400c)에 전력 공급 지시를 하여 상기 제1 전극(210c) 및 상기 제2 전극(220c)을 통해 상기 제1 히터(110c) 및 상기 제2 히터(120c)를 발열시키고, 특정 온도, 예를 들어 제1 히터(110c)의 경우 PCR 변성 단계 온도(95℃) 및 제2 히터(120c)의 경우 PCR 어닐링/연장 단계 온도(72℃)를 유지한다.
- [0068] 5. 상기 유입부(15)와 연결된 펌프(500c)에 의해 양압이 제공되거나 또는 상기 유출부(16)와 연결된 펌프(500c)에 의해 음압이 제공되면 상기 표적 샘플 용액은 상기 반응 채널(14) 내부에서 수평 방향으로 유동하도록 한다. 이 경우 상기 표적 샘플 용액의 유량 및 유속은 상기 펌프(500c)에 의해 제공되는 양압 또는 음압의 세기를 조절하여 제어될 수 있다.
- [0069] 상기 단계들을 수행함으로써, 상기 표적 샘플 용액은 상기 반응 채널(14)의 유입부(15) 말단으로부터 유출부(16) 말단까지 상기 제1 히터(110c)의 상측 대응 부분(301c) 및 상기 제2 히터(120c)의 상측 대응 부분(302c)을 길이 방향으로 이동하면서 PCR을 수행한다. 도 5e에 따르면, 상기 표적 샘플 용액은 상기 제1 히터(110c) 및 상

기 제2 히터(120c)를 포함하는 히터 유닛이 10회 반복 배치된 열 블록(100c)으로부터 열을 공급받아 상기 제1 히터(110c)의 상측 대응 부분(301c)에서 PCR 변성 단계 및 상기 제2 히터(120c)의 상측 대응 부분(302c)에서 PCR 어닐링/연장 단계를 거치면서 10회 PCR 순환 주기를 완료하게 된다. 뒤이어, 선택적으로, 상기 표적 샘플 용액은 상기 반응 채널(14)의 유출부(16) 말단으로부터 유입부(15) 말단까지 상기 제1 히터(110c)의 상측 대응 부분(301c) 및 상기 제2 히터(120c)의 상측 대응 부분(302c)을 길이 방향으로 역 이동하면서 PCR을 재수행할 수 있다.

[0070] 도 5g는 광 투과성 재질의 PCR 칩 및 이를 포함하되 제1 히터 및 제2 히터 사이에 광원이 배치된 열 블록, 전력 공급부, 펌프 및 광 검출부를 포함하는 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치를 도시한다.

[0071] 도 5g에 따르면, 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치는 광 투과성 재질의 PCR 칩(10) 및 이를 포함하되 제1 히터(110c) 및 제2 히터(120c) 사이에 광원(150c)이 배치된 열 블록(100c), 전력 공급부(400c), 펌프(500c) 및 광 검출부(600c)를 포함한다. 상기 전력 공급부 및 상기 펌프에 관해서는 이미 설명된 것과 같다.

[0072] 도 5g에 따른 PCR 칩(10)은 광 투과성 재질로 구현되고, 상기 열 블록(100c)의 제1 히터(110c) 및 제2 히터(120c) 사이에 광원(150c)이 배치되는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 PCR 장치는 상기 광원(150c)으로부터 방출되는 광을 검출하기 위한 광 검출부(600c)를 더 포함한다. 따라서, 도 5g에 따른 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치는 PCR 수행시 핵산 증폭 과정을 실시간(real-time)으로 측정 및 분석할 수 있다. 이 경우 상기 표적 샘플 용액은 별도의 형광 물질이 더 첨가될 수 있고, 이는 PCR 산물의 생성에 따라 특정 파장의 광에 의해 발광함으로써 측정 및 분석 가능한 광 신호를 유발하게 된다. 상기 광원(150c)은 상기 제1 히터(110c) 및 제2 히터(120c) 사이의 이격 공간에 배치되고, 동일한 광을 방출할 수 있다. 상기 광원(150c)은 상기 광원(150c)으로부터 방출되는 광을 포집하는 렌즈(도시되지 않음) 및 특정 파장 대의 광을 여과하는 광 필터(도시되지 않음)와 구동가능하게 연결 배치될 수 있다.

[0073] 도 5g에 따르면, 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치에 의해 핵산 증폭 반응이 실시간(real-time)으로 측정되는 단계를 확인할 수 있다. 예를 들어, 표적 샘플 용액은 상기 반응 채널(14) 내에서 상기 제1 히터(110c)의 상측 대응 부분(301c) 및 상기 제2 히터(120c)의 상측 대응 부분(302c)을 연이어 통과하면서 PCR 변성 단계 및 PCR 어닐링/연장 단계를 수행하는데, 이 경우 표적 샘플 용액은 상기 제1 히터(110c)와 상기 제2 히터(120c) 사이, 및 상기 제1 히터(110c)와 상기 제2 히터(120c)를 포함하는 히터 유닛 사이에서 상기 광원(150c)의 상측 대응 부분을 통과하게 된다. 표적 샘플 용액이 상기 광원(150c)의 상측 대응 부분을 통과할 때 유체 제어를 통해 상기 표적 샘플 용액의 유속을 느리게 하거나 잠시 정지 상태로 유지한 후 상기 광원(150c)으로부터 광을 방출시키고, 상기 방출된 광은 상기 광 투과성 PCR 칩(10), 구체적으로 상기 반응 채널(14)을 통과하고, 상기 반응 채널(14) 내의 핵산 증폭에 의해 발생하는 광 신호를 상기 광 검출부(600c)가 측정 및 분석할 수 있다. 따라서, PCR 각 순환 주기가 진행되는 동안 상기 반응 채널(14) 내에서 (형광 물질이 결합된) 핵산의 증폭에 의한 반응 결과를 실시간(real-time)으로 모니터링함으로써 표적 핵산의 양을 실시간(real-time)으로 측정 및 분석할 수 있다.

[0074] 도 5h는 광 투과성 재질의 열 블록 및 PCR 칩, 전력 공급부, 펌프, 광 제공부 및 광 검출부를 포함하는 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치를 도시한다.

[0075] 도 5h에 따르면, 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치는 광 투과성 재질의 열 블록(100c) 및 PCR 칩(10), 전력 공급부(400c), 펌프(500c), 광 제공부(700c), 및 광 검출부(800c)를 포함한다. 상기 전력 공급부(400c) 및 상기 펌프(500c)는 이미 설명된 바와 같다.

[0076] 도 5h에 따른 PCR 장치는 열 블록(100c) 및 PCR 칩(10)이 광 투과성 재질로 구현되는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 PCR 장치는 상기 PCR 칩(10)에 광을 제공하도록 배치된 광 제공부(700c) 및 상기 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 광을 수용하도록 배치된 광 검출부(800c)를 더 포함한다. 따라서, 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치는 PCR 수행시 핵산 증폭 과정을 실시간(real-time)으로 측정 및 분석할 수 있다. 이 경우 상기 표적 샘플 용액은 별도의 형광 물질이 더 첨가될 수 있고, 이는 PCR 산물의 생성에 따라 특정 파장의 광에 의해 발광함으로써 측정 및 분석 가능한 광 신호를 유발하게 된다.

[0077] 실시간(real-time) PCR에 있어서, PCR 산물을 실시간(real-time)으로 정확하게 모니터링하기 위해서는 상기 광 신호의 센싱 효율을 가능한 높힐 필요가 있다. 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c)은 전체적으로 광 투과성을

갖기 때문에 광원으로부터 유래된 여기 광을 대부분 그대로 투과시켜 상기 광 신호의 센싱 효율을 높힐 수 있다. 그러나, 상기 여기 광의 일부는 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100) 상에서 반사되거나 또는 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c)을 통과한 후 반사되어 광 신호의 노이즈(noise)로서 작용할 수 있다. 따라서, 바람직하게는, 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c)의 하부 면에 흡광 물질을 처리하여 흡광층(도시되지 않음)을 형성하여 센싱 효율을 더욱 높힐 수 있다. 상기 흡광 물질은 예를 들어, 운모(mica)일 수 있으나, 광을 흡수하는 성질을 갖는 물질이라면 제한되지 않는다. 따라서, 광원으로부터 유래된 광의 일부를 상기 흡광층이 흡수하여, 광 신호의 노이즈로 작용하는 반사 광의 발생을 최대한 억제할 수 있다. 또한, 대안적으로, 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c)의 상부 면에 광 반사 방지 물질을 처리하여 광 반사 방지층(도시되지 않음)을 형성하여 센싱 효율을 더욱 높힐 수 있다. 상기 광 반사 방지 물질은 예를 들어, MgF₂와 같은 불화물, SiO₂, Al₂O₃와 같은 산화물일 수 있으나, 광 반사를 방지할 수 있는 성질을 갖는 물질이라면 제한되지 않는다. 또한, 더 바람직하게는, 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c)의 하부 면에 흡광 물질을 처리하고, 동시에 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c)의 상부 면에 광 반사 방지 물질을 처리하여 센싱 효율을 더욱 높힐 수 있다. 즉, 효과적인 실시간(real-time) PCR의 모니터링을 위하여 상기 노이즈 대비 광 신호 비율은 가능한 최대값을 가져야 하고, 상기 노이즈 대비 광 신호 비율은 상기 PCR 칩으로부터 여기 광의 반사율이 낮을수록 향상될 수 있다. 예를 들어, 일반적인 금속성 재질의 기존 히터들의 여기 광의 반사율은 약 20 % 내지 80 %이지만, 상기 흡광층 또는 광 반사 방지층을 포함하는 광 투과성 재질의 열 블록(100c)을 사용하는 경우 광 반사율을 0.2% 내지 4% 이내로 줄일 수 있고, 상기 흡광층 및 광 반사 방지층을 포함하는 광 투과성 재질의 열 블록(100c)을 사용하는 경우 광 반사율을 0.2% 이하로 줄일 수 있다.

[0078] 상기 광 제공부(700c)는 상기 광 투과성 재질의 PCR 칩(10)에 광을 제공하기 위한 모듈이고, 상기 광 검출부(800c)는 상기 광 투과성 재질의 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 광을 수용하여 상기 광 투과성 재질의 PCR 칩(10)에서 수행되는 PCR 진행 과정을 측정하기 위한 모듈이다. 상기 광 제공부(700c)로부터 광이 방출되고, 상기 방출된 광은 상기 광 투과성 재질의 PCR 칩(10), 구체적으로 상기 반응 채널(14)을 통과하거나 반사하고, 이 경우 상기 반응 채널(14) 내의 핵산 증폭에 의해 발생하는 광 신호를 상기 광 검출부(800c)가 측정 및 분석한다. 따라서, 상기 광 투과성 재질의 PCR 칩(10)에서 상기 PCR의 각 순환 주기가 진행되는 동안 상기 반응 채널(14) 내에서 (형광 물질이 결합된) 핵산의 증폭에 의한 반응 결과를 실시간(real-time)으로 모니터링함으로써 표적 핵산의 증폭 여부 및 증폭 정도를 실시간(real-time)으로 측정 및 분석할 수 있다. 또한, 상기 광 제공부(700c) 및 광 검출부(800c)는 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c)을 중심으로 위 또는 아래에 모두 배치되거나 각각 배치될 수 있다. 다만, 상기 광 제공부(700c) 및 광 검출부(800c)의 배치는 PCR 장치의 최적 구현을 위해 다른 모듈과의 배치 관계를 고려하여 다양할 수 있으며, 바람직하게는 상기 광 제공부(700c) 및 광 검출부(800c)은 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c)의 상부에 배치될 수 있다. 상기 광 제공부(700c)는 LED(Light Emitting Diode) 광원 또는 레이저 광원, 상기 광원으로부터 방출되는 광에서 미리 결정된 파장을 갖는 광을 선택하는 제1 광 여과기, 및 상기 제1 광 여과기로부터 방출되는 광을 포집하는 제1 광 렌즈를 포함하고, 상기 광원과 상기 제1 광 여과기 사이에 빛을 퍼지게 하도록 배치된 제1 비구면 렌즈를 더 포함할 수 있다. 상기 광원은 광을 방출할 수 있는 모든 광원을 포함하며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, LED(Light Emitting Diode) 광원 또는 레이저 광원을 포함한다. 상기 제1 광 여과기는 다양한 파장대를 갖는 입사광 중 특정 파장의 광을 선택하여 방출하는 것으로, 미리 결정된 상기 광원에 따라 다양하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 광 여과기는 상기 광원으로부터 방출되는 광 중 500 nm 이하 파장대의 광만을 통과시킬 수 있다. 상기 제1 광 렌즈는 그 입사광을 포집하여 그 방출광의 강도를 증가시키는 역할을 수행하는 것으로, 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c)을 통해 광 투과성 재질의 PCR 칩(10)에 조사되는 광의 강도를 증가시킬 수 있다. 또한, 상기 광 제공부는 상기 광원과 상기 제1 광 여과기 사이에 빛을 퍼지게 하도록 배치된 제1 비구면 렌즈를 더 포함한다. 상기 제1 비구면 렌즈의 배치 방향을 조정함으로써, 상기 광원으로부터 방출되는 광 범위를 확장하여 측정 가능한 영역에 도달하게 한다.

[0079] 상기 광 검출부(800c)는 상기 광 투과성 재질의 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 광을 포집하는 제2 광 렌즈, 상기 제2 광 렌즈로부터 방출되는 광에서 미리 결정된 파장을 갖는 광을 선택하는 제2 광 여과기, 및 상기 제2 광 여과기로부터 방출되는 광으로부터 광 신호를 검출하는 광 분석기를 포함하고, 상기 제2 광 여과기와 상기 광 분석기 사이에 상기 제2 광 여과기로부터 방출되는 광을 집적하도록 배치된 제2 비구면 렌즈를 더 포함하며, 상기 제2 비구면 렌즈와 상기 광 분석기 사이에 상기 제2 비구면 렌즈로부터 방출되는 광의 노이즈(noise)를 제거하고 상기 제2 비구면 렌즈로부터 방출되는 광을 증폭하도록 배치된 광다이오드 집적소자(photodiode integrated circuit, PDIC)(도시되지 않음)를 더 포함할 수 있다. 상기 제2 광 렌즈는 그 입사광을 포집하여 그 방출광의 강도를 증가시키는 역할을 수행하는 것으로, 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c)을 통해 상기 광 투과성 재질

의 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 광의 강도를 증가시켜 광 신호 검출을 용이하게 한다. 상기 제2 광 여과기는 다양한 파장대를 갖는 입사광 중 특정 파장의 광을 선택하여 방출하는 것으로, 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c)을 통해 상기 광 투과성 재질의 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 미리 결정된 광의 파장에 따라 다양하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 제2 광 여과기는 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100)을 통해 상기 광 투과성 재질의 PCR 칩(10)으로부터 방출되는 미리 결정된 광 중 500 nm 이하 파장대의 광만을 통과시킬 수 있다. 상기 광 분석기는 상기 제2 광 여과기로부터 방출되는 광으로부터 광 신호를 검출하는 모듈로서, 표적 샘플 용액으로부터 발현 형광된 광을 전기 신호로 전환하여 정성 및 정량적인 측정이 가능하도록 한다. 또한, 상기 광 검출부(800c)는 상기 제2 광 여과기와 상기 광 분석기 사이에 상기 제2 광 여과기로부터 방출되는 광을 집적하도록 배치된 제2 비구면 렌즈를 더 포함할 수 있다. 상기 제2 비구면 렌즈의 배치 방향을 조정함으로써, 상기 제2 광 여과기로부터 방출되는 광 범위를 확장하여 측정 가능한 영역에 도달하게 한다. 또한, 상기 광 검출부(800c)는 상기 제2 비구면 렌즈와 상기 광 분석기 사이에 상기 제2 비구면 렌즈로부터 방출되는 광의 노이즈(noise)를 제거하고, 상기 제2 비구면 렌즈로부터 방출되는 광을 증폭하도록 배치된 광다이오드 집적소자(photodiode integrated circuit, PDIC)를 더 포함할 수 있다. 상기 광다이오드 집적소자를 사용함으로써, 상기 PCR 장치의 소형화가 더욱 가능하고, 노이즈를 최소화하여 신뢰 가능한 광 신호를 측정할 수 있다.

[0080] 상기 PCR 장치는 상기 광 제공부(700c)로부터 방출된 광이 광 검출부(800c)까지 도달할 수 있도록 광의 진행 방향을 조절하고, 미리 결정된 파장을 갖는 광을 분리하기 위한 하나 이상의 이색성 필터(750x, 750y)를 더 포함한다. 상기 이색성 필터(dichroic filter)(750x, 750y)는 광을 파장에 따라 선택적으로 투과 또는 선택적으로 조절된 각도로 반사시키는 모듈이다. 이색성 필터(750x)는 광 제공부(700c)으로부터 방출되는 광의 광축에 대하여 약 45도 각도로 경사지게 배치되고, 상기 광을 그 파장에 따라 선택적으로 단파장 성분을 투과시키고 장파장 성분을 직각으로 반사시켜 상기 광 투과성 재질의 열 블록(100c) 상에 배치된 상기 광 투과성 재질의 PCR 칩(10)에 도달하게 한다. 또한, 이색성 필터(750y)는 상기 PCR 칩(10) 및 광 투과성 재질의 열 블록(100c)으로부터 반사된 광의 광축에 대하여 약 45도 각도로 경사지게 배치되고, 상기 광을 그 파장에 따라 선택적으로 단파장 성분을 투과시키고 장파장 성분을 직각으로 반사시켜 상기 광 검출부(800c)에 도달하게 한다. 상기 광 검출부(800c)에 도달한 광은 광 분석기에서 전기 신호로 전환되어 핵산 증폭 여부 및 증폭 정도를 나타내게 된다.

[0081] 도 5h에 따르면, 본 발명의 제5 실시예에 따른 PCR 장치에 의해 핵산 증폭 반응이 실시간(real-time)으로 측정되는 단계를 확인할 수 있다. 예를 들어, 표적 샘플 용액은 상기 반응 채널(14) 내에서 상기 제1 히터(110c)의 상측 대응 부분(301c) 및 상기 제2 히터(120c)의 상측 대응 부분(302c)을 연이어 통과하면서 PCR 변성 단계 및 PCR 어닐링/연장 단계를 수행한다. 이 경우 표적 샘플 용액이 상기 반응 채널(14) 내의 임의의 위치를 통과할 때 유체 제어를 통해 상기 표적 샘플 용액의 유속을 느리게 하거나 잠시 정지 상태로 유지한 후 상기 광 제공부(700c)로부터 상기 반응 채널(14) 내의 임의의 위치에 광을 제공하고, 상기 반응 채널(14) 내에서 표적 핵산의 증폭 반응에 의해 방출되는 광을 상기 광 검출부(800c)가 수용하여 광 신호를 측정 및 분석할 수 있다. 도 5h에 따르면, 상기 광 제공부(700c) 및 상기 광 검출부(800c)는 한 쌍으로 배치되어 있지만, 상기 반응 채널(14) 내의 임의의 위치에서 발생하는 복수의 광 신호를 측정 및 분석하기 위하여 적절한 위치에 여러 쌍으로 배치될 수 있다. 따라서, PCR 각 순환 주기가 진행되는 동안 상기 반응 채널(14) 내에서 (형광 물질이 결합된) 핵산의 증폭에 의한 반응 결과를 실시간(real-time)으로 모니터링함으로써 표적 핵산의 양을 실시간(real-time)으로 측정 및 분석할 수 있다.

[0082] 실험예 1. 결핵균 게놈 DNA의 추출

[0083] 결핵을 유발하는 마이코박테리움 튜버큘로시스(Mycobacterium Tuberculosis)를 획득한 후, QiaAmp DNA 정제 키트(QIAGEN)를 사용하여 결핵균 게놈 DNA를 추출하였다.

[0084] 실험예 2. 결핵균 검출용 프라이머 세트 제작 및 합성

[0085] 결핵균 검출을 위해 사용되는 본 발명의 제1 실시예에 따른 프라이머는 GC%를 40 내지 60%가 되도록 하고, T_m 값 65 내지 75℃ 조건이 되도록 하여 Primer 3를 통해 제작하고, 제작한 프라이머를 제노텍(주)에 의뢰하여 합성하였다. 결핵균에서 특이적으로 증폭되는 유전자는 마이코박테리움 튜버큘로시스(Mycobacterium Tuberculosis)에 삽입되는 IS6110 유전자로서, 마이코박테리움 튜버큘로시스(Mycobacterium Tuberculosis) H37Ra(GenBank ID number: CP000611), 마이코박테리움 튜버큘로시스(Mycobacterium Tuberculosis)

CDC1551(GenBank ID number: AE000516), 및 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis)KZN 1435(GenBank ID number: CP001658)에서 찾아 alignment를 진행하였다. 서열번호 1 및 서열번호 2에 따른 프라이머 세트(primer name: NBS-MTB-2)의 염기 서열 및 산물 크기(bp)는 아래 표 1과 같다.

표 1

[0086]	결핵균	유전자 이름	염기서열 (5'→3')	산물 크기(bp)
	Mycobacterium Tuberculosis	IS6110 transposase	GCA GTA CTG GTA GAG GCG GCG ATG (서열번호 1) GAG CGG TCG GAA GCT CCT ATG ACA (서열번호 2)	167 bp

[0087] 결핵균에 대한 프라이머의 특이적 검출의 확인을 위해, 상기 실시예 1에서 획득한 결핵균 게놈 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 하기 표 2 및 표 3에 상기 PCR 반응에 사용한 PCR 반응액의 조성 및 수행한 PCR 조건을 나타내었다. 각각의 PCR 반응액은 하기 조성에 증류수를 첨가하여 총 부피 50 ul가 되도록 하였다.

표 2

[0088]	항목	농도
	10X PCR 완충액(코스모진텍)	1X
	10mM dNTPs	1 mM
	주형 (genome DNA)	1 ng
	프라이머(정방향/역방향)	1 uM
	Taq 중합효소(코스모진텍)	1 U

표 3

[0089]	반응 온도	반응 시간
	95 (denaturation)	10초
	72 (annealing & extention)	10초

[0090] (2 step, 30 cycle)

[0091] PCR이 끝난 후, 각각의 반응액 중 3 ul를 1% 아가로스 겔에 전기영동하여 PCR 반응 산물을 확인함으로써, 상기 표 1의 프라이머 세트들에 의해 각각의 결핵균에 존재하는 특이적 유전자가 검출됨을 확인하였으며, 나머지 47 ul를 1% 아가로스 겔에 전기 영동한 후, gel extraction kit(Invitrogen)를 사용하여 상기 PCR 반응 산물의 DNA 절편을 추출하였다. 추출된 각각의 DNA 절편들은 StrataClone PCR cloning Kit(Stratagene)로 클로닝하였다. 상기 클로닝한 벡터를 각각 *E. coli*에 형질전환시킨 후 암피실린/X-gal/IPTG가 포함된 LB 플레이트에 도말하여 37℃에서 배양하였다. 이후, 상기 PCR 증폭 산물이 포함되도록 클로닝된 벡터를 포함하는 콜로니만을 선별하여 LB 배지에서 배양 한 후, plasmid DNA miniprep 키트(Qiagen)를 사용하여 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출한 플라스미드 DNA는 코스모진텍(주)에 의뢰하여 클로닝된 유전자의 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 각각의 염기서열이 증폭하고자 하는 유전자의 염기서열과 일치함을 확인할 수 있었다.

[0092] 실험예 3. NBS-MTB-2 및 타사의 PCR 장치를 이용한 실시간 PCR

[0093] 상기 실시예 1에서 획득한 결핵균의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 표 1에 기재된 프라이머 세트(서열번호 1 및 서열번호 2, NBS-MTB-2) 및 타사(Light cycler)의 PCR 장치를 이용하여 실시간 PCR을 수행하였다. 타사(Light cycler)의 PCR 장치를 이용하여 실시간 PCR을 수행함에 있어서, 실시간 PCR을 위한 반응액의 조성 및 실시간 PCR의 반응 조건은 하기 표 4 및 표 5에 기재하였다.

표 4

[0094]

조성	부피($\mu\ell$)	최종 농도
NBS SYBR Green I Real-time PCR mixture(2X)	10	1×
정방향 프라이머(10 μM)	2	2 μM
역방향 프라이머(10 μM)	2	2 μM
주형 DNA	3	
증류수(D.W.)	3	
총(total)	20	

표 5

[0095]

단계	온도($^{\circ}\text{C}$)	시간	사이클(cycles)
Pre-denaturation	95	2 min	1
Denaturation	95	10 sec	30
Annealing&Extension	72	10 sec	

[0096]

도 6a 내지 도 6c는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) IS6110 유전자를 검출하기 위한 결핵균 검출용 프라이머 세트 및 타사의 PCR 장치를 이용하여 시료를 대상으로 하는 테스트 1(TEST 1) 내지 테스트 3(TEST 3)의 실시간 PCR 결과를 나타내는 전기영동 사진이다(1: 음성 대조군, 2: MTB 양성인자, 3: MTB 임상 샘플). 도 6a 내지 도 6b에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트 및 PCR 장치를 이용하여 결핵균 유전자가 특이적으로 검출되었음을 확인할 수 있었다.

[0097]

또한, 도 7a 내지 도 7c는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) IS6110 유전자를 검출하기 위한 결핵균 검출용 프라이머 세트 및 타사의 PCR 장치를 이용하여 시료를 대상으로 하는 테스트 1(TEST 1) 내지 테스트 3(TEST 3)의 실시간 PCR 결과를 나타내는 그래프이다(1: 음성 대조군, 2: MTB 양성인자, 3: MTB 임상 샘플). 도 7a 내지 도 7b에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트 및 PCR 장치를 이용하여 결핵균을 실시간으로 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다(아래 표 6, 표 7, 표 8은 테스트 1 내지 테스트 3의 실시간 PCR의 Ct 값을 보여준다).

표 6

[0098]

항목	임상 샘플	Ct 값
1	음성 대조군(Non template)	
2	양성 대조군(positive control)	>25
3	MTB sample-1	21.94

표 7

[0099]

항목	임상 샘플	Ct 값
1	음성 대조군(Non template)	
2	양성 대조군(positive control)	>25
3	MTB sample-2	>25

표 8

[0100]

항목	임상 샘플	Ct 값
1	음성 대조군(Non template)	
2	양성 대조군(positive control)	
3	MTB sample-3	>25

[0101] 실험예 4. NBS MTB-2 및 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치를 이용한 실시간 PCR

[0102] 상기 실시예 1에서 획득한 결핵균의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 표 1에 기재된 결핵균을 검출할 수 있는 프라이머 세트(서열번호 1 및 서열번호 2, NBS-MTB-2) 및 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치를 이용하여 실시간 PCR을 수행하였다. 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치를 이용하여 실시간 PCR을 수행함에 있어서, 실시간 PCR을 위한 반응액의 조성 및 실시간 PCR의 반응 조건은 하기 표 9 및 표 10에 기재하였다.

표 9

조성	부피(μ l)	최종 농도
NBS SYBR Green I Real-time PCR mixture(2X)	8	1×
정방향 프라이머(10 μ M)	1.6	2 μ M
역방향 프라이머(10 μ M)	1.6	2 μ M
주형 DNA	2.4	
증류수(D.W.)	2.4	
총(total)	16	

표 10

단계	온도($^{\circ}$ C)	시간	사이클(cycles)
Pre-denaturation	106	5 min	1
Denaturation	108	7 sec	40
Annealing&Extension	60	13 sec	

[0105] 도 8a 내지 도 8c는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) IS6110 유전자를 검출하기 위한 결핵균 검출용 프라이머 세트 및 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치를 이용하여 시료를 대상으로 하는 테스트 1(TEST 1) 내지 테스트 3(TEST 3)의 실시간 PCR 결과를 나타내는 전기영동 사진이다(1: 음성 대조군, 2: 양성 대조군(pSC-HA: plasmid DNA, 3: MTB 임상 샘플). 도 8a 내지 도 8c에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트 및 PCR 장치를 이용하여 결핵균 유전자가 특이적으로 검출되었음을 확인할 수 있었다.

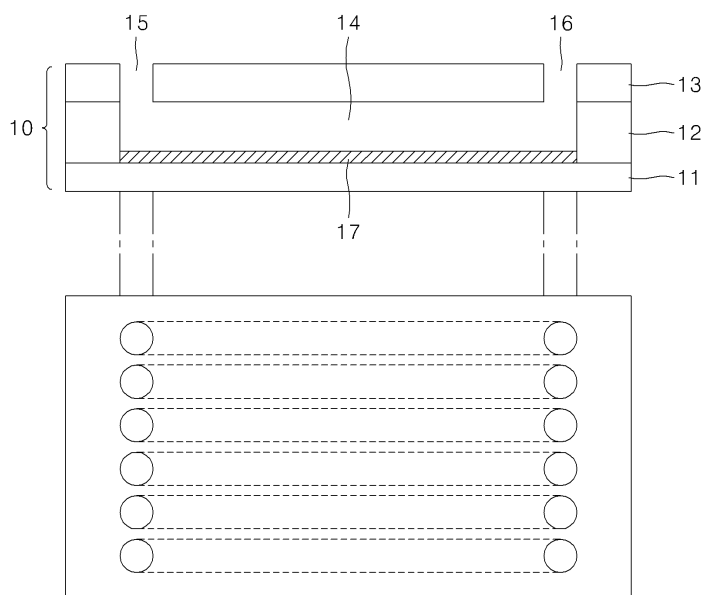
[0106] 또한, 도 9a 내지 도 9c는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머로 이루어진 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium Tuberculosis) IS6110 유전자를 검출하기 위한 결핵균 검출용 프라이머 세트 및 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치를 이용하여 시료를 대상으로 하는 테스트 1(TEST 1) 내지 테스트 3(TEST 3)의 실시간 PCR 결과를 나타내는 그래프이다(1: 음성 대조군, 2: 양성 대조군(pSC-HA: plasmid DNA, 3: MTB 임상 샘플). 도 9a 내지 도 9c에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트 및 PCR 장치를 이용하여 결핵균을 실시간으로 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다(아래 표 11은 MTB 샘플 1 내지 3에 대한 타사의 PCR 장치 및 본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치를 이용하여 실시간 PCR을 수행한 Ct 값을 비교하여 보여준다).

표 11

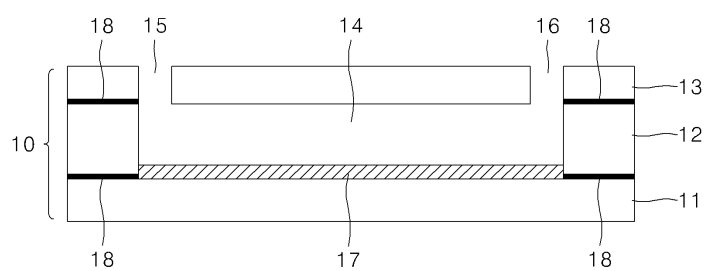
항목	샘플명	타사의 PCR 장치(Ct 값)	본 발명의 제3 실시예에 따른 PCR 장치(Ct 값)
1	MTB 샘플-1	21.94	23.25
2	MTB 샘플-2	>25	30.00
3	MTB 샘플-3	>25	23.40

도면

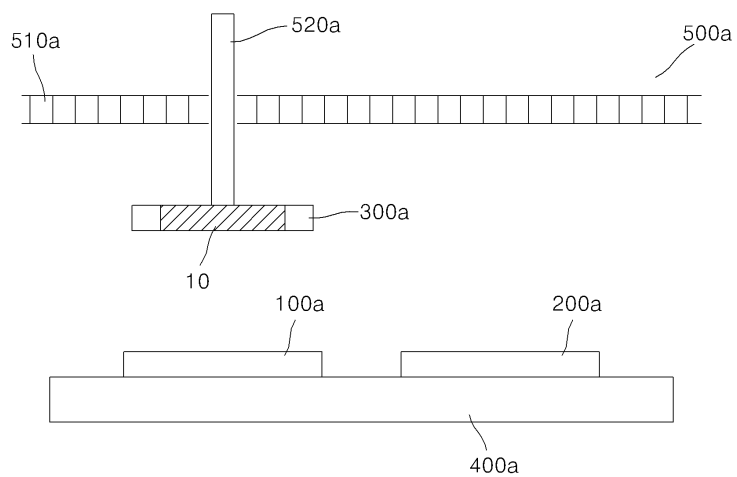
도면1



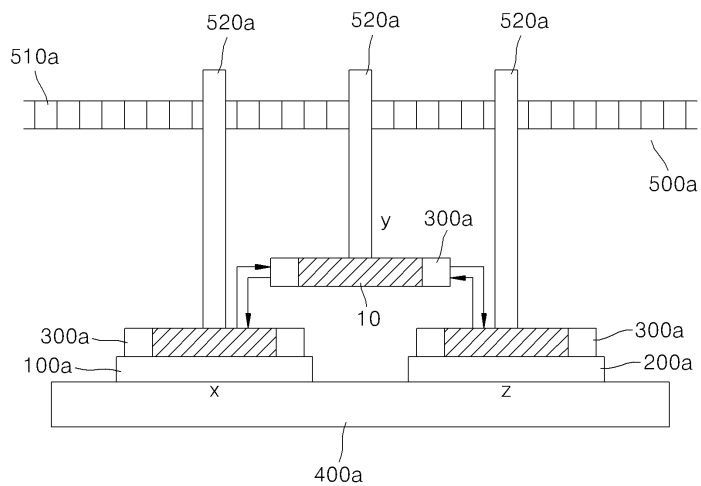
도면2



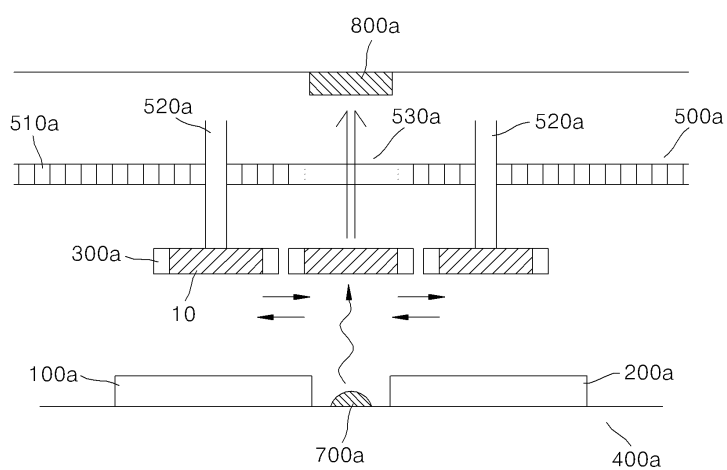
도면3a



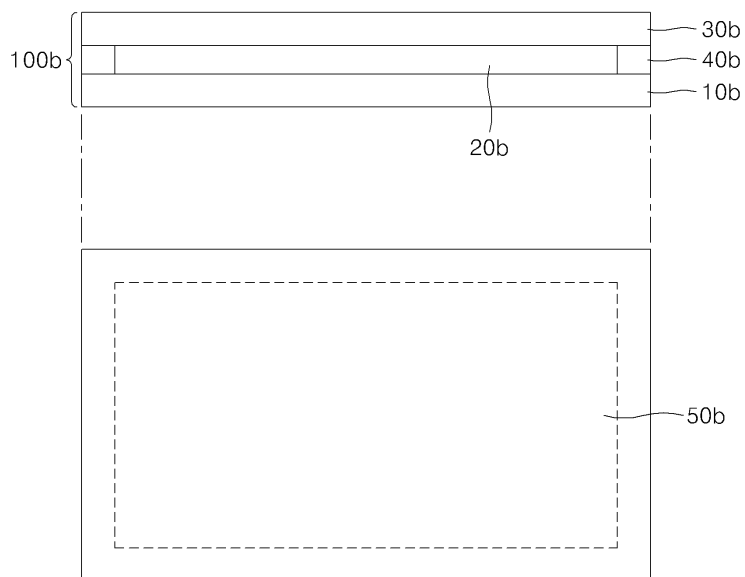
도면3b



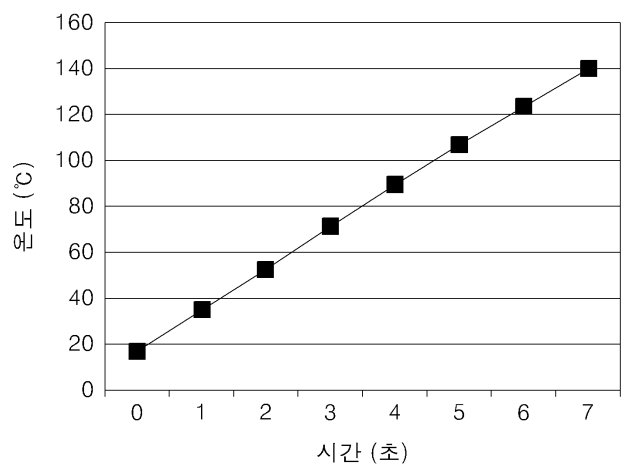
도면3c



도면4a



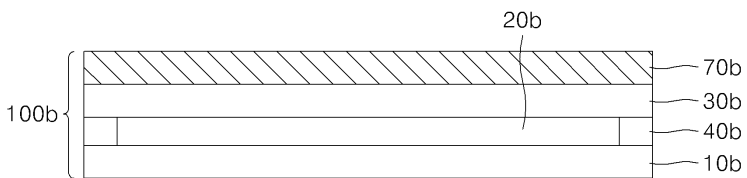
도면4b



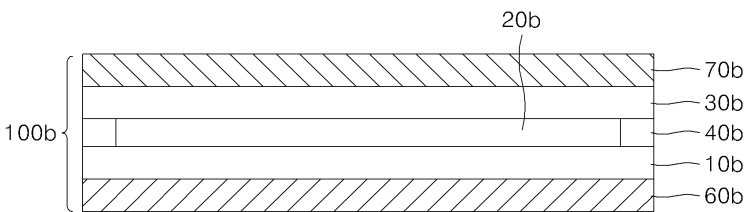
도면4c



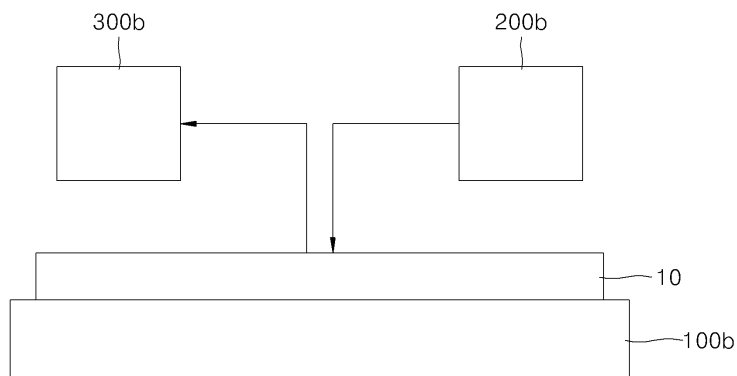
도면4d



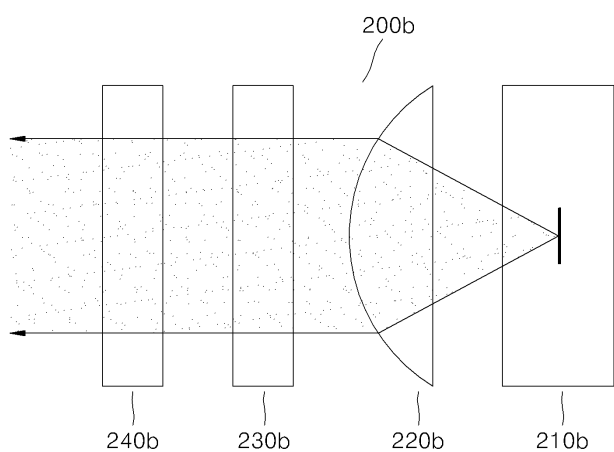
도면4e



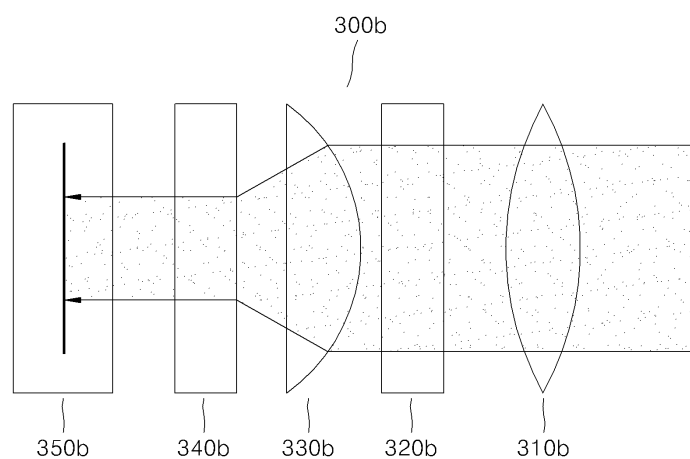
도면4f



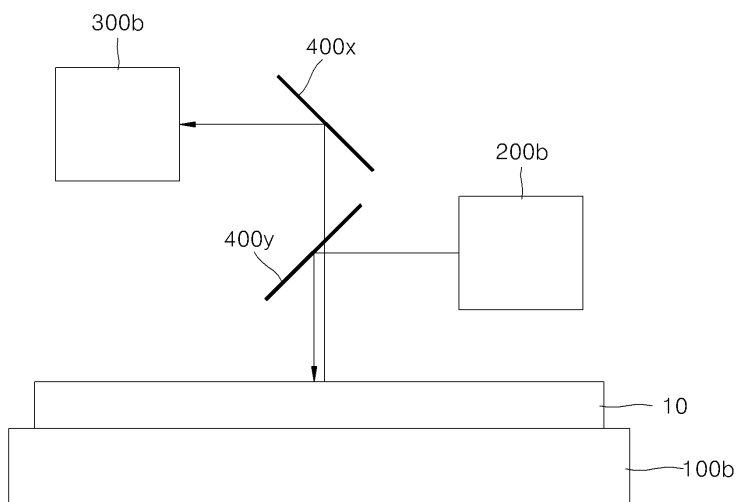
도면4g



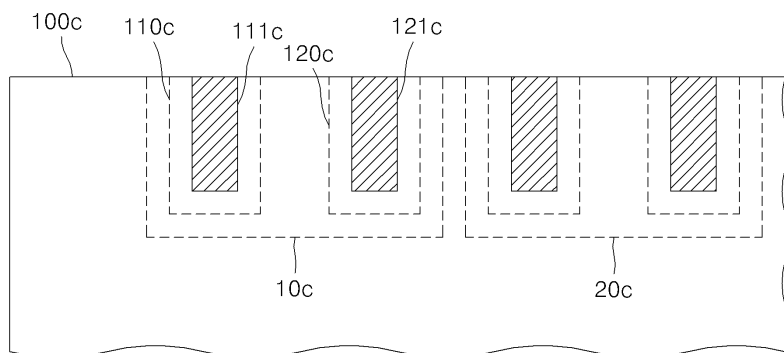
도면4h



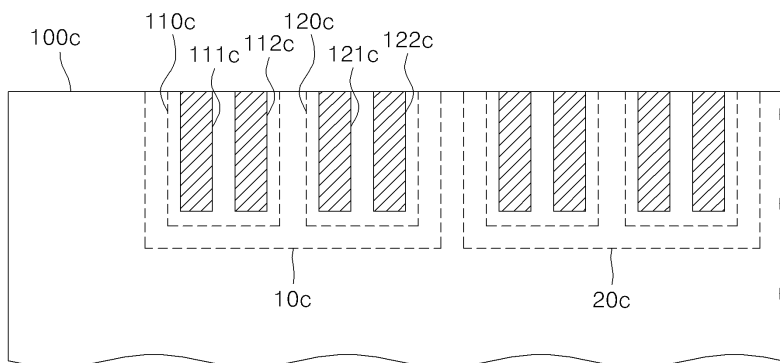
도면4i



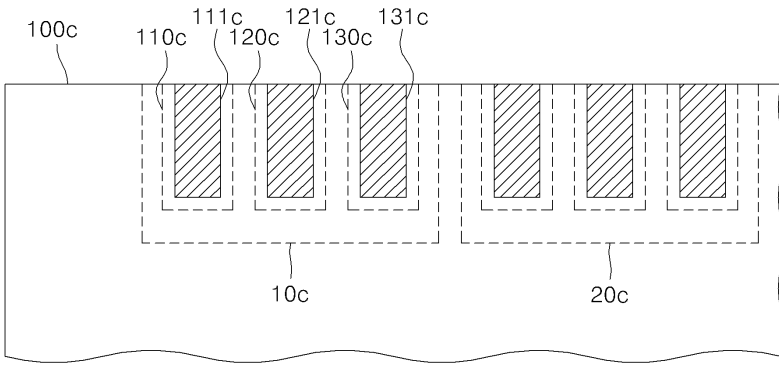
도면5a



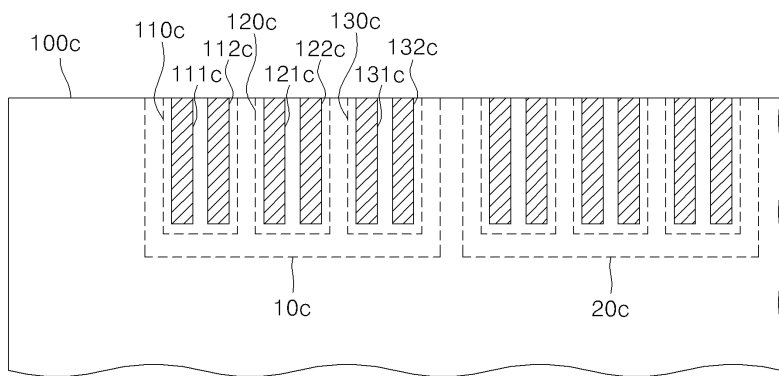
도면5b



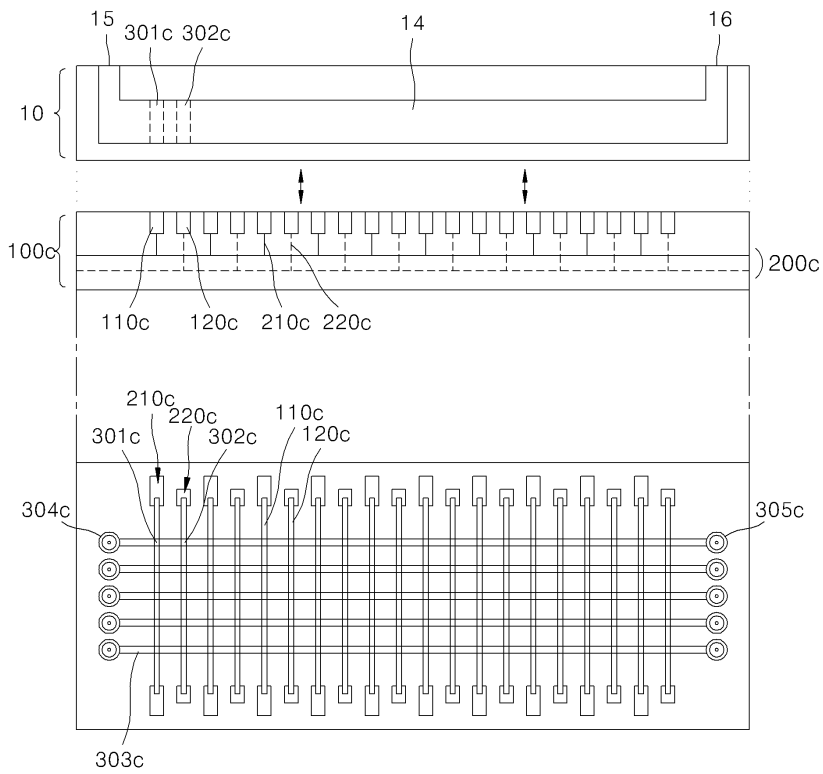
도면5c



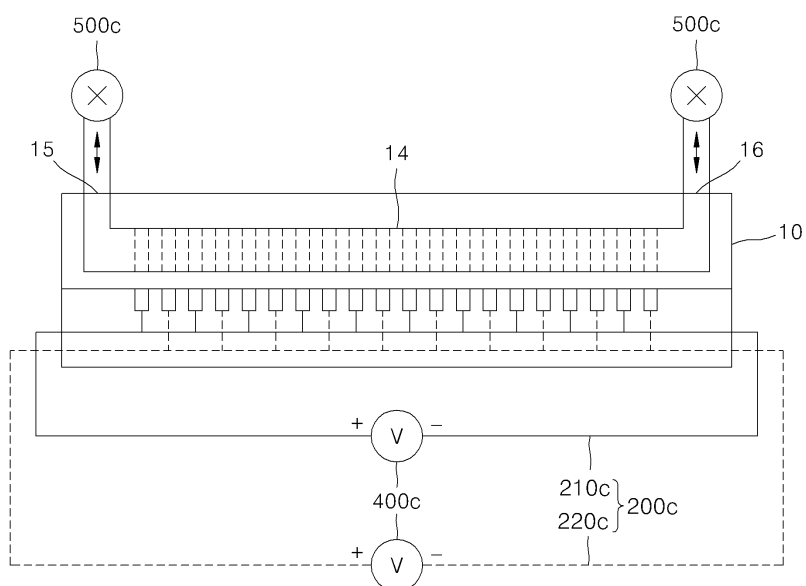
도면5d



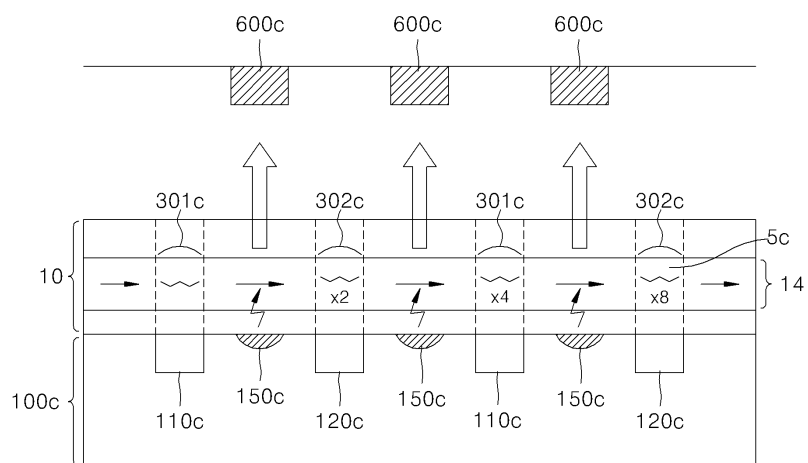
도면5e



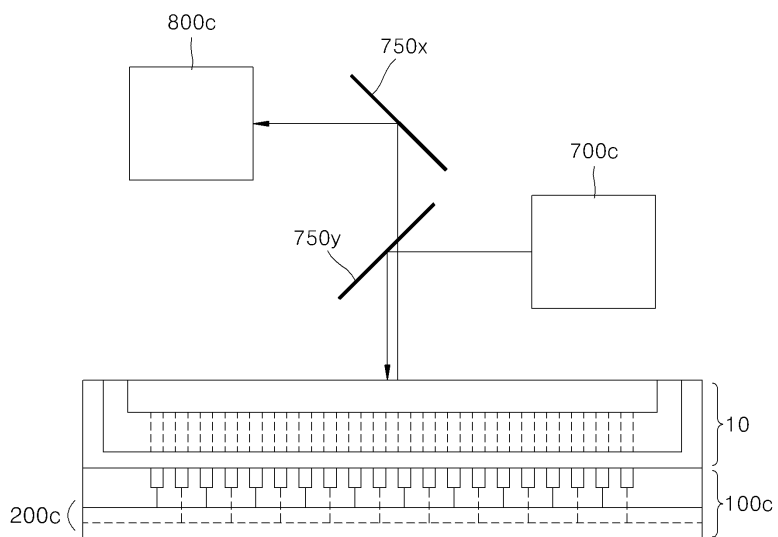
도면5f



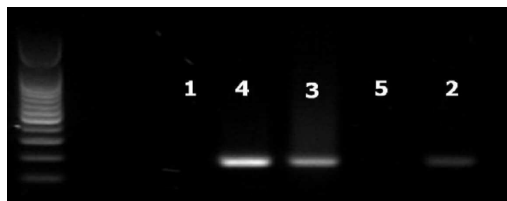
도면5g



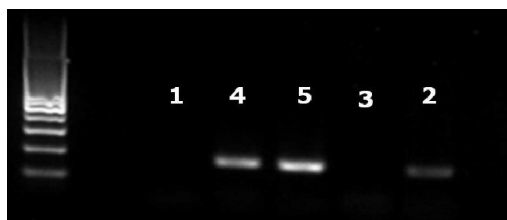
도면5h



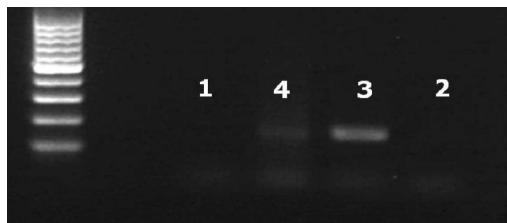
도면6a



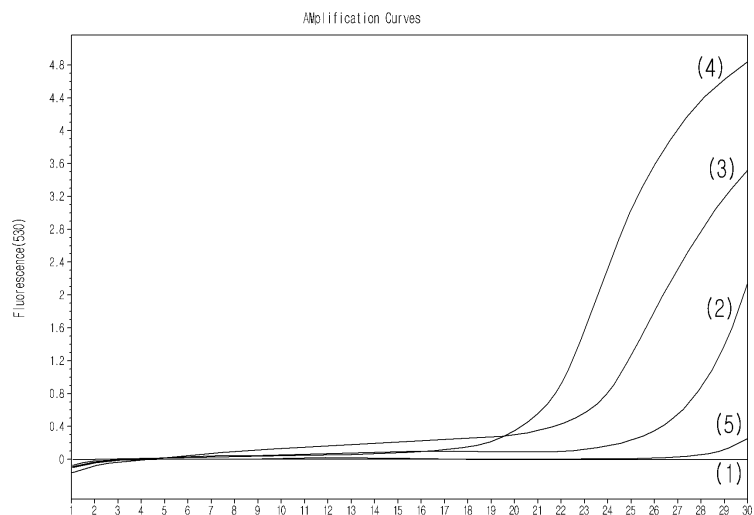
도면6b



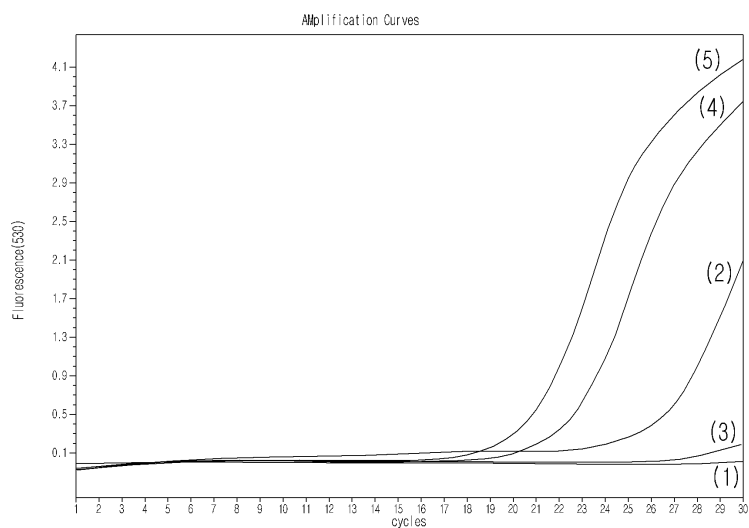
도면6c



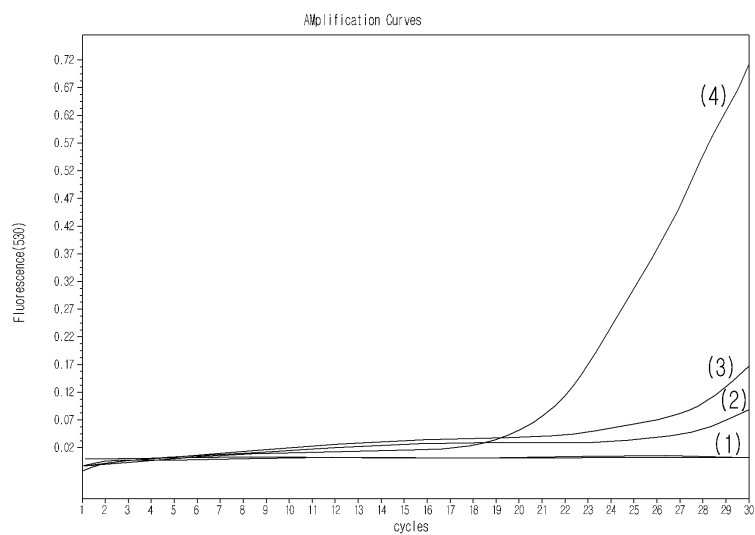
도면7a



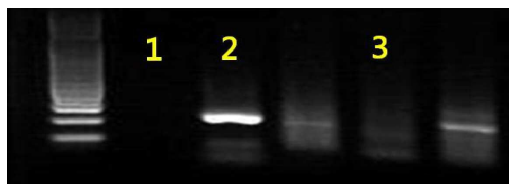
도면7b



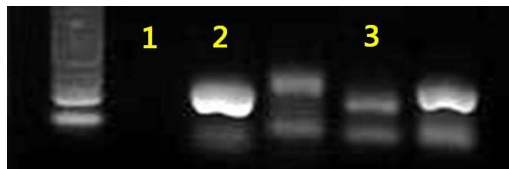
도면7c



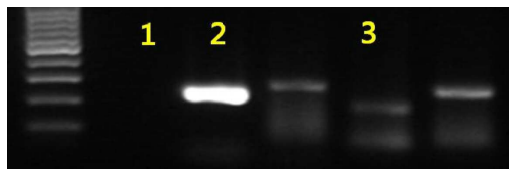
도면8a



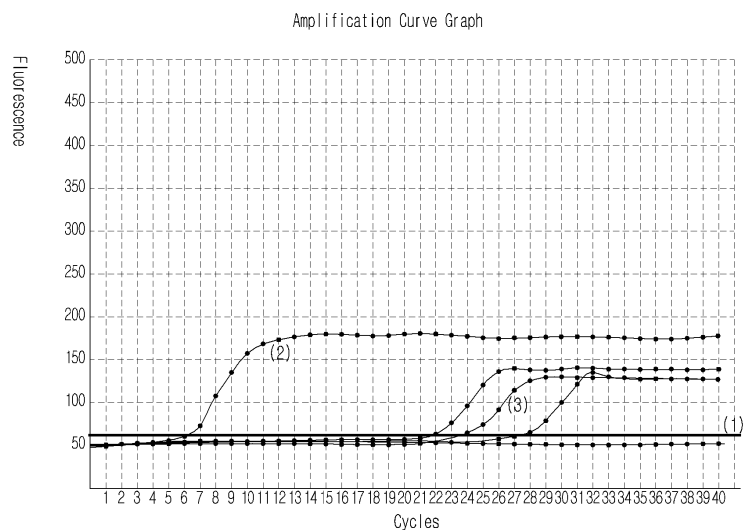
도면8b



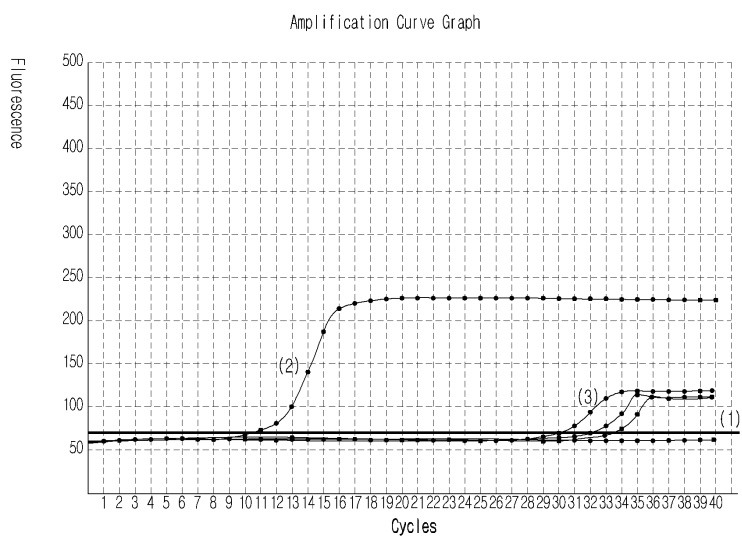
도면8c



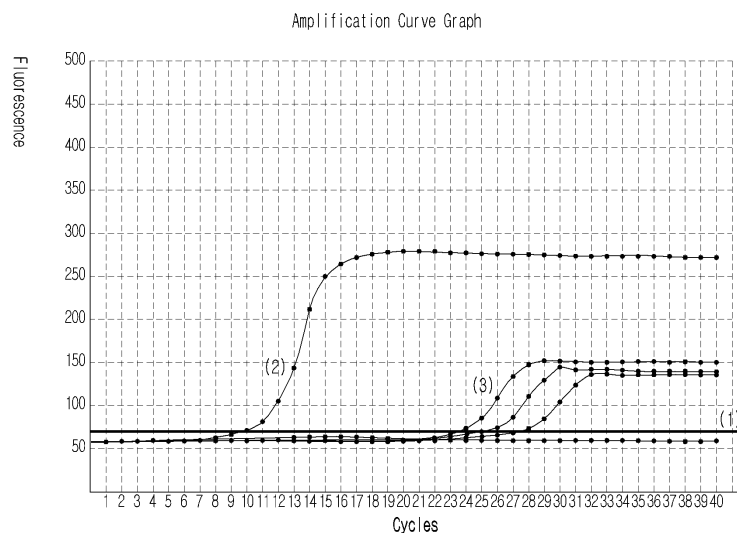
도면9a



도면9b



도면9c



서열목록

<110> NANOBIOSYS Inc.

Korea University Research and Business Foundation

<120> PCR device for detecting Mycobacterium tuberculosis, and method
for detecting Mycobacterium tuberculosis using the same

<130> WPN12008

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial forward primer

<400> 1

gcagtactgg tagaggcggc gatg

24

<210> 2

<211

> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial reverse primer

<400> 2

gagcggtcgg aagctcctat gaca

24