



- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/003392
- (22) 국제출원일: 2017년 3월 29일 (29.03.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0038413 2016년 3월 30일 (30.03.2016) KR
10-2017-0039414 2017년 3월 28일 (28.03.2017) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 최낙원 (CHOI, Nakwon); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 이수현 (LEE, Soo Hyun); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 강지윤 (KANG, Ji Yoon); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 최웅선 (CHOI, Woongsun); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김순영 (KIM, Sun-young); 03151 서울시 종로구 종로 5길 58 석단회관빌딩 10층, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

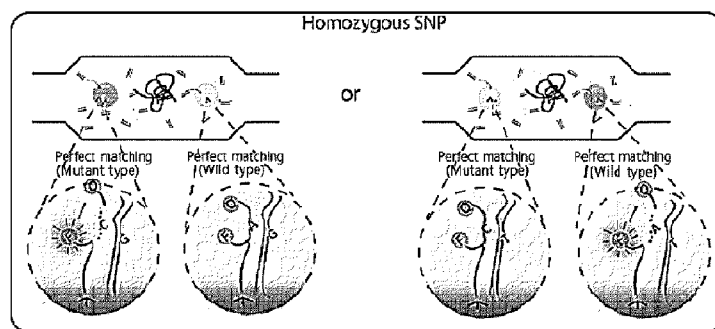
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, 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:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: HYDROGEL-BASED SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHIC GENETIC TRAIT ANALYSIS METHOD AND APPARATUS THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 하이드로겔 기반 단일염기 다형성 유전형질 분석 방법 및 장치



(57) Abstract: The present invention relates to a single nucleotide polymorphic genetic trait analysis apparatus and an analysis method therefor using a PCR reaction chip which comprises a plurality of hydrogel porous microparticles in which an anchored double-labeled probe (ADP) comprising a double label nucleotide consisting of sequences complementary to a single nucleotide polymorphism (SNP) nucleotide sequence of a gene to be analyzed or a double label nucleotide consisting of sequences complementary to a wild type gene to be analyzed is immobilized. The present invention allows for a quick and easy analysis because PCR reaction and single nucleotide polymorphism detection are performed simultaneously, and exhibits excellent selectivity and sensitivity. In addition, SNPs of various kinds of genes can be detected simultaneously and in multiples.

(57) 요약서: 본 발명은 분석대상 유전자의 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열에 상보적인 서열로 이루어진 이중 라벨 뉴클레오타이드 또는 분석대상 야생 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 이중-라벨 뉴클레오타이드를 포함하는 ADP(Anchored Double-labeled Probe)이 고정된 복수 개의 하이드로겔 다공성 미세입자를 포함하는 PCR 반응칩을 이용한 단일 염기 다형성 유전형질 분석 장치 및 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명은 PCR 반응 및 단일염기 다형성 검출이 동시에 수행되므로 분석이 신속하고 간편하며, 우수한 선택성과 민감도를 나타낸다. 또한, 여러 가지 종류의 유전자의 SNP를 동시에 다중으로 검출할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 하이드로젤 기반 단일염기 다형성 유전형질 분석 방법 및 장치

기술분야

- [1] 본 명세서에는 단일염기 다형성 유전형질 분석을 위한 장치 및 방법이 개시된다.

배경기술

- [2] 단일염기 다형성 (SNPs)은 인간 게놈의 특정 좌위에서의 염기 변형으로, 일반적으로 평균 1000 bp당 하나의 비율로 발견된다. 단일염기 다형성은 질병 민감도, 약물 민감도에 있어서 유전학적, 의학적으로 바이오 마커로써 매우 중요한 의미를 갖기 때문에, 단일염기 다형성 유전형질 분석을 위한 방법들이 많이 연구되어 왔다.
- [3] 특히, 하이드로젤을 기반으로 하는 단일 염기 다형성 검출은 검출 환경을 2차원에서 3차원 매트릭스 내에서 이루어지게 하므로, 프로브 밀도를 증가시킴과 동시에, 검출의 민감도를 증가시킬 수 있다. 하이드로젤을 기반으로 한 바이오에세이 기술은 10년전을 기점으로 활발하게 이루어지고 있고, 하이드로젤의 광가교 (photocrosslinking)을 통해 여러 가지 종류의 바이오마커들 중 DNA 조각, miRNA, 단백질을 형광으로 다중 검출하여 생물학적 정량 분석에 응용하고 있다.
- [4] 하이드로젤을 이용한 단일염기 다형성 방법에는 크게 온도-의존적 검출법과 pH-의존적 검출법이 있다. 온도-의존적 검출법은 프로브와 결합한 두 대립유전자의 열역학적 차이를 이용하여 검출해 내는 방법으로, 특정온도에서는 변이 유전자만 프로브와 결합을 하여 형광을 발색하고, 반대로 야생 유전자는 프로브와 결합하지 못하여 형광을 띄지 못하는 점을 이용한다. (Jung, Yun Kyung, Jungkyu Kim, and Richard A. Mathies. "Microfluidic hydrogel arrays for direct genotyping of clinical samples." *Biosensors and Bioelectronics* 79 (2016): 371-378) pH-의존적 방법 또한 마찬가지로 변이 유전자와 야생 유전자의 특정 프로브와 결합이 pH 환경에 따라 달라지는 점을 이용한다. (Zhang, Huaibin, et al. "Genotyping by alkaline dehybridization using graphically encoded particles." *Chemistry-A European Journal* 17.10 (2011): 2867-2873) 하지만, 상기 두 방법은 공통적으로 온도 및 pH의 최적화가 필요하다. 즉, 야생 유전자와 변이 유전자가 구별이 가능한 특정 온도 및 pH를 유전자마다 특이적으로 찾아주어야 하는 불편함이 있으며, 이는 곧 동시다중 검출에서 한계가 있음을 의미한다. 또한, 상기 두 방법은 민감도를 높이기 위해 검출 전에 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction)을 통하여 검출하려는 유전자를 증폭시키지만, 중합효소연쇄반응에서 발생하는 비특이적 결합에 의한 잘못된 산물, 혹은 반응

산물을 분리하는 과정에서 수반되는 오염의 발생은 차후의 단일염기 다형성 검출에서 잘못된 정보를 발생시키는 원인이 될 수 있다.

- [5] 따라서, 상술한 하이드로젤을 이용한 단일염기 다형성 검출 방법의 문제점을 극복하고 기술적인 면 그리고 비용적인 면에서 보다 효과적인 방법이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 하이드로젤을 이용하여 동시다중으로 여러 종류의 유전자에 대한 단일염기 다형성 검출이 가능한 장치 및 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명의 일 관점은 복수 개의 하이드로젤 다공성 미세입자를 포함하는 PCR(Polymerase chain reaction) 반응칩을 포함하고, 하나 이상의 상기 하이드로젤 다공성 미세입자에는 분석대상 유전자의 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열에 상보적인 서열로 이루어진 이중 라벨 뉴클레오타이드(double-labeled nucleotide)를 포함하는 제 1 ADP(Anchored Double-labeled Probe)가 고정되어 있고, 다른 하나 이상의 상기 하이드로젤 다공성 미세입자에는 형광 발색제, 소광제 및 분석대상 야생 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 이중-라벨 뉴클레오타이드를 포함하는 제 2 ADP가 고정되어 있으며, 상기 각 이중 라벨 뉴클레오타이드의 5'말단에는 형광 발색제(Fluorophore), 3'말단에는 소광제(Quencher)가 연결되어 있는, 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치를 제공한다.
- [8] 본 발명의 다른 일 관점은 상기 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치를 이용한 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [9] 본 발명의 분석 장치 및 방법은 PCR 반응 및 단일염기 다형성(SNP) 검출이 동시에 수행되므로 기존 방법들에 비해 분석이 신속하고 간편하며, 오염에 의한 잘못된 정보를 최소화할 수 있다. 본 발명은 상기 서로 다른 이중 라벨 뉴클레오타이드를 포함하는 프로브(제 1 ADP 및 제 2 ADP)를 이용하여 분석대상 유전자의 SNP 포함여부를 형광신호의 On/Off로써 간단히 구분 가능할 수 있어 기존의 CYBR green 등의 dsDNA-바인딩 염료를 사용한 형광검출 이용 분석법에 비하여 현저히 우수한 선택성을 나타내며, PCR을 기반으로 하여 기존 다른 분석법보다 개선된 민감도를 나타낸다. 또한, 프로브 디자인에 따라 어닐링 온도를 비슷하게 맞춰줌으로써 여러 종류의 유전자를 동시에 같은 온도에서 검출할 수 있다. 일 실시예로서 복수 개의 하이드로젤 다공성 미세입자를 이용할 경우 별도의 인코딩(encoding)/디코딩(decoding) 기술 없이도 여러 가지 종류의 유전자의 SNP를 동시에 다중으로 검출할 수 있다. 상기 하이드로젤 다공성 미세입자의 사용으로 기존의 2차원적인 분석을 3차원적으로 분석할 수 있기 때문에 더욱 개선된 프로브의 밀도와 민감도를 나타내며, 하이드로젤이

생체적합성을 가지므로 생물학적 분석에 적합하다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 PCR 반응칩 내부에 포함된 2가지 종류의 하이드로젤 다공성 미세입자에 대한 예시도이다.
- [11] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 PCR 반응 초기에 유전자 증폭물들이 생성되어 하이드로젤 다공성 미세입자 내부에 확산되어 들어와 각 ADP에 결합하는 모습을 나타낸 도이다.
- [12] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 PCR 반응 중후기에 중, 동형 접합체 유전자(Homozygous SNP)의 경우 두 종류 중 한 종류의 ADP와 완전 상보적 결합(Perfect matching)하여 형광발색제(F)에서 발광되는 것을 나타낸 도이다.
- [13] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 PCR 반응 중후기에 이형 접합체 유전자(Heterozygous SNP)가 변이 유전자와 야생 유전자를 동시에 갖는 경우 두 종류의 ADP 모두 형광발색제(F)에서 발광되는 것을 나타낸 도이다.
- [14] 도 5는 본 발명의 일 실시예로서 T-spacer의 길이가 12T인 ADP를 포함하는 하이드로젤 다공성 미세입자를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 실시한 결과 형광 발색여부를 확인한 도이다. SNP target (+)는 실시간 중합효소연쇄반응의 PCR 용액에 상기 ADP의 타겟 유전자를 넣어준 경우를 의미하고, SNP target (-)는 상기 ADP의 타겟 유전자를 넣어주지 않은 경우를 의미한다.
- [15] 도 6은 본 발명의 일 실시예로서 T-spacer의 길이가 30T인 ADP를 포함하는 하이드로젤 다공성 미세입자(SNP target (+))를 포함하는 PCR 반응칩을 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 실시한 결과 형광 발색여부를 확인한 도이다.
- [16] 도 7은 상기 도 5와 도 6에서 확인한 T-spacer의 길이에 따른 형광 강도를 비교하여 그래프로 나타낸 것이다.
- [17] 도 8A 내지 도 8C는 본 발명의 일 실시예로서 하이드로젤 다공성 미세입자 제조시 기공유도중합체의 분자량 크기와 ADP가 포함하는 연결부의 종류에 따른 형광 강도를 비교하여 그래프로 나타낸 것으로, 도 8A는 기공유도중합체의 분자량 크기가 600, 도 8B는 기공유도중합체의 분자량 크기가 4000, 도 8C는 기공유도중합체의 분자량 크기가 6000인 경우의 그래프이다.
- [18] 도 9는 본 발명의 일 실시예로서 PCR의 어닐링(annealing) 단계의 조건에 따른 증폭 효율을 비교하여 나타낸 것으로, Condition #1은 60°C 및 15 sec, Condition #2는 60°C 및 25 sec, Condition #3은 55°C 및 15 sec, Condition #4는 55°C 및 25 sec인 경우를 의미하며, post는 하이드로젤 다공성 미세입자, sol은 용액상태의 기존 qPCR을 의미한다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [19] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [20] 본 발명의 일 실시예는 복수 개의 하이드로젤 다공성 미세입자를 포함하는

PCR(Polymerase chain reaction) 반응칩을 포함하는 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치를 제공한다.

- [21] 일 실시예로서 상기 PCR 반응칩에 포함되는 하나 이상의 상기 하이드로젤 다공성 미세입자에는 분석대상 유전자의 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열에 상보적인 서열로 이루어진 이중 라벨 뉴클레오타이드(double-labeled nucleotide)를 포함하는 제 1 ADP(Anchored Double-labeled Probe)가 고정되어 있고, 다른 하나 이상의 상기 하이드로젤 다공성 미세입자에는 분석대상 야생 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 이중-라벨 뉴클레오타이드를 포함하는 제 2 ADP가 고정될 수 있다.
- [22] 또한, 일 실시예로서, 상기 제 1 ADP 및 제 2 ADP의 각 이중 라벨 뉴클레오타이드의 5'말단에는 형광 발색제, 3'말단에는 소광제가 연결될 수 있다. 구체적으로, 일 실시예에 따른 상기 형광 발색제는 6-FAM(6-carboxyfluorescein), TET(tetrachlorofluorescein) 및 6-HEX(6-carboxy-2,4,4,5,7,7-hexachlorofluorescein succinimidyl ester) 등으로 이루어진 군에서 선택된 염료를 포함할 수 있고, 상기 소광제는 TAMRA(tetramethylrhodamine), Iowa Black™ FQ, 및 BHQ™ 등으로 이루어진 군에서 선택된 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [23] 일 실시예로서 상기 분석대상 유전자는 DNA와 같은 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 보다 구체적으로는 인간 게놈 DNA일 수 있다. 상기 분석대상 유전자는 일 실시예로서 유전체의 특성에 따라 동형 접합체 또는 이형 접합체일 수 있다.
- [24] 또한, 일 실시예로서 상기 제 1 ADP 및 제 2 ADP는 1 내지 72개의 T 염기 또는 1 내지 50개의 A 염기로 이루어진 연결부를 포함하고, 상기 연결부가 하이드로젤 다공성 미세입자에 고정된 것일 수 있다. 상기 연결부는 보다 구체적으로 12 내지 50개의 T 염기 또는 A 염기로 이루어질 수 있다. 상기 연결부는 상기 하이드로젤 다공성 미세입자에 고정된 제 1 ADP 및 제 2 ADP가 분석대상 유전자와 상보적 결합을 하기에 용이하도록 자유도(Degree of Freedom)를 제공한다. 본 명세서에서 상기 T 염기로 이루어진 연결부는 티민 스페이서(Thymine spacer) 또는 T-스페이서(T-spacer), 상기 A 염기로 이루어진 연결부는 아데닌 스페이서(Adenine spacer) 또는 A-스페이서(A-spacer)라고도 한다. 일 실시예로서 상기 연결부에 포함된 T 또는 A 염기가 12 개 미만이면 분석대상 유전자와 결합하기에 용이하지 않으며, 상기 T 염기가 72개, 상기 A 염기가 50개 초과이면 하이드로젤 다공성 미세입자의 기공(pore) 크기보다 더 긴 ADP가 합성되어 반응이 원활하게 이루어지지 않거나, ADP 합성이 불가능하다는 문제가 있다.
- [25] 일 실시예로서 상기 제 1 ADP 및 제 2 ADP는 상기 하이드로젤 다공성 미세입자에 물리 화학적으로 고정된 것일 수 있다. 예를 들면 아크릴레이트 작용기, 아비딘-비오틴(Avidin-Biotin) 결합 또는 티올-엔(Thiol-Ene) 결합에 의해 화학적으로 고정된 것일 수 있으나, 상기 ADP가 상기 미세입자에 고정될 수

있다면 이에 제한되지 않는다.

- [26] 상기 단일 염기 다형성 유전형질 분석 장치를 도 1을 참조로 하여 구체적으로 살펴보면 다음과 같다. 일 실시예로서 PCR 반응칩은 2가지 종류의 하이드로젤 다공성 미세입자(Hydrogel scaffold)를 포함할 수 있으며, 각 미세입자는 분석대상 유전자(Human DNA)의 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열에 상보적인 서열(Mutant-specific sequence)로 이루어진 이중 라벨 뉴클레오타이드를 포함하는 제 1 ADP와 분석대상 야생 유전자에 상보적인 서열(Wild-specific sequence)로 이루어진 이중-라벨 뉴클레오타이드를 포함하는 제 2 ADP가 고정화되어 있다. 상기 제 1 ADP 및 제 2 ADP의 5' 말단이 하이드로젤 다공성 미세입자에 고정화되어 있으며(Gel-Bound DNA Probe), 상기 고정화된 ADP는 연결부(T-spacer)를 포함하여 보다 자유로운 움직임을 가질 수 있다. PCR 반응 전의 상기 각 이중-라벨 뉴클레오타이드에 연결된 형광 발색제(Fluorophore)와 소광제(Quencher)는 서로 가까운 거리에 위치하고 있기 때문에 FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer) 현상에 의해 형광발색제의 발광이 억제되어 형광을 내지 않는다. 그러나, PCR 반응 후에는, 일 실시예로서 상기 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을 포함하면 상기 제 1 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와 완전 상보적 결합하여 형광 발색되고, 상기 제 2 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와는 불완전 상보적 결합하여 형광이 발색되지 않는다. 또한, 일 실시예로서 상기 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을 포함하지 않는 야생 유전자이면 상기 제 1 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와 불완전 상보적 결합하여 형광이 발색되지 않고, 상기 제 2 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와 완전 상보적 결합하여 형광이 발색된다.
- [27] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 하이드로젤 다공성 미세입자는 3차원의 구조체라면 제한되지 않으며, 예를 들면 디스크와 같은 판상형(Plate type), 기둥형(post type), 구형(spherical type), 반구형(hemispherical type) 등의 형태일 수 있다. 또한, 일 실시예로서 상기 하이드로젤 다공성 미세입자는 예를 들어 평균 10 μm 내지 5000 μm 의 입경크기를 가질 수 있으며, 보다 구체적으로는 평균 100 μm 내지 3000 μm 의 입경을 가질 수 있다. 하이드로젤 다공성 미세입자의 재료는 고형화가 가능한 폴리머(pre-polymer)라면 제한없이 사용할 수 있으며, 구체적으로 폴리에틸렌 글리콜-디아크릴레이트(Polyethylene Glycol-Diacrylate, PEG-DA) 또는 폴리아크릴아마이드(Polyacrylamide, PAAM)와 같은 친수성 폴리머를 사용할 수 있다.
- [28] 일 실시예로서, 상기 하이드로젤 다공성 미세입자는 공극을 포함하는 다공성(porous) 구조체일 수 있다. 일 실시예로서, 상기 미세입자의 공극율은 미세입자 총 부피에 대하여 10부피% 내지 80부피%, 보다 구체적으로는 20부피% 내지 70부피%일 수 있다. 상기 범위를 벗어날 경우 다공성이 떨어지거나 미세입자의 안정도가 불안정해질 수 있다.
- [29] 본 발명의 일 실시예로서 상기과 같은 하이드로젤 다공성 미세입자는

프레폴리머(pre-polymer), 기공유도중합체(porogen), 광개시제 및 정제수를 혼합하여 프레폴리머 용액을 제조하는 단계; 상기 프레폴리머 용액과 상기 제 1 ADP 또는 제 2 ADP를 포함하는 용액을 혼합하는 단계; 및 상기 혼합된 용액을 PCR 반응칩안에 로딩한 후, 상기 혼합된 용액을 목적하는 형상으로 성형하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조될 수 있다. 이때, 상기 프레폴리머 용액과 핵산 프라이머를 포함하는 용액의 부피비는 20 내지 5 : 1일 수 있다. 본 명세서에서 상기 "프레폴리머(pre-polymer)"란 폴리머의 성형가공을 용이하게 하기 위해 중합 또는 중축합 반응을 적당한 단계에서 정지한 예비 중합물을 의미하는 것으로, 본 발명의 경우 고형화되기 이전의 성형가공이 용이한 상태의 폴리머를 의미한다. 일 실시예로서 상기 제 1 ADP 또는 제 2 ADP를 포함하는 용액은 제 1 ADP 또는 제 2 ADP는 연결부(T-spacer) 및/또는 상기 각 ADP를 미세입자에 고정화하기 위한 작용기를 더 포함할 수 있다.

- [30] 일 실시예로서 상기 프레폴리머 용액의 제조단계는 용액에 포함된 기공유도중합체의 분자량을 변형시킴으로써 미세입자내에 형성되는 기공의 크기를 조절하는 것을 더 포함할 수 있다. 이때 상기 기공유도중합체는 예를 들어 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol; PEG)을 사용할 수 있으며, 구체적으로 PEG200, PEG300, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG1500, PEG2000, PEG3000, PEG3350, PEG4000, PEG6000, PEG8000, PEG10000, PEG12000, PEG20000, PEG35000, PEG40000 등(제조사: Sigma Aldrich)을 사용할 수 있다. 상기 기공유도중합체의 분자량에 따라 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석효율이 변할 수 있다.
- [31] 일 실시예로서 상기 제조방법은 상기 성형된 하이드로겔 다공성 미세입자를 세정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 세정 단계는 세정을 통하여 상기 다공성 구조의 기공 내부에 고정되지 않은 ADP를 제거하는 것을 포함할 수 있으며, 기공유도중합체를 제거하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [32] 상기 혼합된 용액을 목적하는 형상으로 성형하는 단계는 일 실시예로서 마스크 또는 형틀(mold)을 통해 목적하는 형상으로 성형하거나, 액적(droplet) 형태로 성형하여 광가교시키는 단계를 포함할 수 있으며, 이를 통해 다양한 형태 및 크기의 입자로 제조할 수 있다.
- [33] 또한, 본 발명은 일 실시예로서 상기 하이드로겔 다공성 미세입자의 제조시 분석대상 유전자의 종류에 따라 제 1 ADP 및 제 2 ADP의 종류를 달리하여 주입한 복수개의 하이드로겔 다공성 미세입자를 제조할 수 있으며, 이들의 PCR 반응칩내 위치를 달리하여 구분함으로써 한 반응칩내에서 별도의 표지없이도 2종 이상의 서로 다른 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질을 분석할 수 있는 분석장치를 제공할 수 있다. 또는, 일 실시예로서 상기 분석대상 유전자의 종류에 따라 제 1 ADP 및 제 2 ADP의 종류를 달리하여 주입한 복수개의 하이드로겔 다공성 미세입자를 각 미세입자의 색상을 양자점(Quantum dot) 등을 이용하여 달리하여 제조함으로써 한 반응칩내에서 2종 이상의 서로 다른 단일

- 염기 다형성(SNP) 유전형질을 분석할 수 있는 분석장치를 제공할 수 있다.
- [34] 본 발명의 일 실시예는 상술된 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치를 이용한 단일 염기 다형성 유전형질 분석방법을 제공할 수 있다. 구체적으로, 상기 방법은 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치의 PCR 반응칩에 분석대상 유전자, 전방향 프라이머(forward primer), 역방향 프라이머(reverse primer)를 포함하는 PCR 용액을 주입하는 단계; 상기 PCR 용액에 포함된 전방향 프라이머 및 역방향 프라이머가 상기 분석대상 유전자를 증폭시켜 유전자 증폭물(amplicon)을 생성하는 PCR 단계; 상기 유전자 증폭물이 상기 하이드로젤 다공성 미세입자 내부로 확산되어 들어가 제 1 ADP 또는 제 2 ADP와 결합하는 단계; 및 PCR 완료후 상기 PCR 반응칩에 포함된 하이드로젤 다공성 미세입자의 형광 발색 여부를 확인하는 단계를 포함할 수 있다.
- [35] 일 실시예로서 상기 전방향 프라이머 또는 역방향 프라이머는 10 내지 50 개의 연속 DNA 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드일 수 있으나, 프라이머의 서열종류와 서열길이는 분석대상 유전자에 따라 제한 없이 변형이 가능하다. 일 실시예로서 상기 유전자 증폭물(amplicon)은 DNA 또는 RNA와 같은 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 등의 PCR 증폭물을 의미한다. 상기 유전자 증폭물은 유전자 증폭 횟수에 제한되지 않고 유전자의 증폭물이라면 모두 포함되는 최광의이며, 예를 들어 약 100-200 bp의 크기를 가질 수 있다. 또한, 일 실시예로서 상기 PCR(중합효소 연쇄반응)은 정량 중합효소 연쇄반응(qPCR), 다중 중합효소 연쇄반응(Multiplex PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(Real time PCR), 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(Real time qPCR) 및 실시간 다중 중합효소 연쇄반응(Real time multiplex PCR) 중 하나 이상일 수 있다.
- [36] 상기 단일 염기 다형성 유전형질 분석 방법을 도 2 내지 도 4를 참조로 하여 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.
- [37] 도 2는 실시간 다중 중합효소 연쇄반응의 초기 싸이클의 예시도로서, PCR 반응칩 내에서 상기 PCR 용액에 포함된 전방향 프라이머 및 역방향 프라이머가 상기 분석대상 유전자의 특정 단일염기 다형성 주변의 염기서열을 증폭시켜 유전자 증폭물(amplicon)을 생성할 수 있다. 이때 상기 증폭물은 수백 염기쌍(base pair), 수 nm크기의 비교적 짧은 염기서열을 가지므로 하이드로젤 다공성 미세입자 내부로 확산되어 들어갈 수 있다. 확산되어 들어간 절편들은 유전체의 특성에 따라 동형 접합체(Homozygous)라면 야생 유전자 또는 변이 유전자(SNP)의 서열을 가질 수 있다. 또한, 만일 이형 접합체(Heterozygous)라면 야생 유전자와 변이 유전자의 서열을 동시에 갖는다. 상기 미세입자에 확산되어 들어간 절편들은 상보적인 염기서열에 따라 제 1 ADP 또는 제 2 ADP와 상보적으로 결합된다. 또한, 상기 전방향 프라이머는 상기 유전자 증폭물과도 상보적으로 결합하여, Taq DNA 중합효소의 도움을 받아 단일 가닥 절편에 상보적인 복제 가닥을 중합할 수 있다.

- [38] 도 3은 동형접합체 유전자의 경우 실시간 다중 중합효소 연쇄반응 중후기 사이클의 예시도이다. 상기 도 2에서 복제된 절편들, 즉 증폭물들은 변이 유전자의 염기서열 또는 야생 유전자의 염기서열 중 하나의 서열을 가지므로, 본 발명의 일 실시예에 따른 두 종류의 하이드로젤 다공성 미세입자에 각각 포함된 제 1 ADP 또는 제 2 ADP 중 한 종류의 ADP와만 완전결합(Perfect matching)할 수 있다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 유전자 증폭물이 상기 하이드로젤 다공성 미세입자 내부로 확산되어 들어가 제 1 ADP 또는 제 2 ADP와 결합하는 단계는 상기 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을 포함하면 상기 제 1 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와 완전 상보적 결합하고, 상기 제 2 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와는 불완전 상보적 결합하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 일 실시예로서 상기 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을 포함하지 않는 야생 유전자이면 상기 제 1 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와 불완전 상보적 결합하고, 상기 제 2 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와 완전 상보적 결합하는 것을 포함할 수 있다.
- [39] 일 실시예로서 상기 유전자 증폭물과 완전 상보적 결합을 한 ADP는 모든 염기서열이 각각 매칭(matching)되므로, 전방향 프라이머가 증폭함과 동시에 ADP는 분리된다. 구체적으로, 전방향 프라이머가 단일가닥 절편을 형광으로 이중가닥 절편을 형성하는 연쇄중합반응에서 Taq DNA 중합효소의 5'-3' 핵산말단가수분해효소활동(Exonuclease activity)에 따라 조각나게 된다. 이 과정에서 형광발색제와 소광제의 거리가 멀어지게 되므로 FRET(fluorescent resonance energy transfer) 현상이 더 이상 발생하지 않기 때문에 형광 발색제의 형광이 발색될 수 있다. 이 때, 상기 형광발색제는 연결부 즉, 티민 스페이서와 연결되어 있기 때문에 하이드로젤 다공성 미세입자내에 머물게 된다. 반면, 상기 완전 상보적 결합을 하는 ADP가 아닌 불완전 상보적 결합(mismatching)하는 ADP, 즉 부정합 ADP의 경우에는 전방향 프라이머가 증폭됨에 따라 ADP가 Taq DNA 중합효소에 의해 분해되지 않으므로 발광하지 않는다.
- [40] 상기 관점에서, 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 형광 발색 여부를 확인하는 단계는 본 발명의 하이드로젤 다공성 미세입자에서 형광이 나타나는지에 따라 완전 상보적 결합 또는 불완전 상보적 결합여부를 구별할 수 있다. 이를 이용하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 형광 발색 여부를 확인하는 단계는 상기 제 1 ADP가 고정된 하이드로젤 다공성 미세입자에 형광 발색이 나타나면 상기 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을 포함하고, 상기 제 2 ADP가 고정된 하이드로젤 다공성 미세입자에 형광 발색이 나타나면 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을 포함하지 않는 야생 유전자인 것으로 판단하는 단계를 포함할 수 있다.
- [41] 도 4는 이형접합체 유전자의 경우 실시간 다중 중합효소 연쇄반응 중후기 사이클의 예시도이다. 이형 접합체의 경우 분석대상 유전자가 변이 유전자와 야생 유전자를 동시에 가질 수 있기 때문에 분석대상 유전자의 SNP 염기서열에

상보적인 서열로 이루어진 이중 라벨 뉴클레오타이드를 포함하는 제 1 ADP와 분석대상 야생 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 이중-라벨 뉴클레오타이드를 포함하는 제 2 ADP를 포함하는 두 종류의 하이드로젤 다공성 미세입자 모두에서 형광이 발색될 수 있다.

- [42] 본 발명의 일 실시예에 따른 분석방법에서 상기 PCR 단계는 변성(denaturation) 단계, 어닐링(annealing) 단계 및 신장(elongation) 단계를 포함할 수 있으며, 구체적으로 상기 어닐링 단계는 높은 PCR 증폭효율을 얻기 위하여 50 내지 70°C에서 10 내지 60초 동안 이루어지는 것일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [43] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[44]

[45] [실시예 1]

[46] 기둥 형태의 하이드로젤 다공성 미세입자를 포함하는 PCR 반응칩 제조

[47] 본 발명의 일 실시예로서, 복수개의 하이드로젤 다공성 미세입자를 위치를 구별하여 로딩시킨 PCR 반응칩을 제조하였다.

[48] 먼저, PEG 700DA (poly(ethylene glycol) diacrylate; Mn 700) : PEG 600 (poly(ethylene glycol); Mn 600) : DNase-free water : Irgacure 1173 을 부피비 20 : 40 : 35 : 5 비율로 섞어준 프레폴리머 용액에 100 μ M의 CYP2C9 mutant-specific ADP를 9:1 부피비로 혼합하여 ADP-프레폴리머 혼합용액을 제조하였다.

[49] 다른 일 실시예들로서, ADP를 각각 CYP2C9 wild-specific ADP, VKORC1 mutant-specific ADP 및 VKORC1 wild-specific ADP를 사용한 것을 제외하고는 상기 방법과 동일한 방법으로 ADP-프레폴리머 혼합용액을 제조하였다.

[50] 이때, 상기 각 ADP에 포함되는 이중 라벨 뉴클레오타이드(double-labeled nucleotide)는 IDT(Integrated DNA Technologies)사에서 구입하였다. 상기 각 이중 라벨 뉴클레오타이드의 5'말단에는 형광 발색제(Fluorophore)로 i6 FAMK, 3'말단에는 소광제(Quencher)로 Iowa Boack™ FQ를 사용하였으며, 연결부로 50개의 A염기를 갖는 A-spacer, 고정부로 아크리다이트(Acrydite)를 포함하고 있다.

[51] 그 다음, 상기 서로 다른 4종의 ADP 가 섞여 있는 ADP-프레폴리머 혼합용액을 각각 PCR 반응칩 안에 위치를 달리하여 로딩하였다. 그리고 상기 PCR 반응칩을 마스크를 통해 UV (365 nm, 728 mW/cm²) 를 100 ms 조사하여 광가교시켰다. 이후, 광가교 되지 않은 용액 상태의 ADP를 DNase-free water를 주입하여 세척하여, 총 4가지 종류의 ADP를 가지고 있는 4개의 기둥(post) 형태 하이드로젤 다공성 미세입자를 포함하는 PCR 반응칩을 제조하였다.

[52]

[53] 기둥 형태의 하이드로젤 다공성 미세입자 기반 단일염기 다형성 동시다중 실시간 중합효소연쇄반응

[54] 상기 제조된 PCR 반응칩에 용액상태의 DNA 1 μ L, 20 μ M 농도의 CYP2C9 specific 전방향 프라이머 0.8 μ L, 20 μ M 농도의 CYP2C9 specific 역방향 프라이머 0.8 μ L, 20 μ M 농도의 VKORC1 specific 전방향 프라이머 0.8 μ L, 20 μ M 농도의 VKORC1 specific 역방향 프라이머 0.8 μ L, DNase-free water 3.8 μ L, TaqMan master mix 8 μ L를 넣어주었다. 이때 상기 용액에 포함된 DNA는 일반인에서 추출한 gDNA를 사용하였으며, 상기 각 프라이머는 IDT(Integrated DNA Technologies)사에서 구입하였다.

[55] PCR 조건은, 제1변성(predenaturation; 95°C, 8 sec) 이후, 제2변성(denaturation; 95°C, 3 sec), 어닐링 및 신장(annealing 및 elongation; 60°C, 15 sec)을 40 사이클 반복하도록 하였다.

[56]

[57] [실시예 2]

[58] 본 발명의 일 실시예로서, 복수개의 하이드로젤 다공성 미세입자를 서로 다른 색상을 띠도록 제조하여 이를 로딩시킨 PCR 반응칩을 제조하였다.

[59] 디스크 형태의 하이드로젤 다공성 미세입자 프레폴리머의 제조

[60] 먼저, 상기 [실시예 1]에서 사용된 ADP와 동일한 것으로서 각각 100 μ M의 CYP2C9 mutant-specific ADP, CYP2C9 wild-specific ADP, VKORC1 mutant-specific ADP 및 VKORC1 wild-specific ADP, 총 4종의 ADP 용액을 준비하였다.

[61] 그 다음, 상기 각 ADP 용액과 1:9의 부피비를 갖고, 각각 4가지 다른 색상을 갖는 프레폴리머 혼합용액을 준비하였으며, 이때 혼합되는 각 성분의 비율은 다음과 같다.

[62] 구체적으로, 무색 코드의 미세입자를 위한 프레폴리머 혼합용액은 PEG 700DA : PEG 600 : DNase-free water : Irgacure 1173 을 부피비 20 : 40 : 35 : 5로 혼합하여 준비하였다. 다른 일 실시예들로서 빨간색, 초록색 코드의 미세입자를 위한 프레폴리머 혼합용액은 PEG 700DA : PEG 600 : acrylated-quantum dot : DNase-free water : Irgacure 1173 = 40 : 20 : 27.5 : 7.5 : 5의 부피비로 혼합하여 준비하였다. 파란색 코드의 미세입자를 위한 프레폴리머 혼합용액은 PEG 700DA : PEG 600 : acrylated-quantum dot : DNase-free water : Irgacure 1173 : blue foodcoloring = 40 : 20 : 27.5 : 6.5 : 5 : 1의 부피비로 혼합하여 준비하였다.

[63]

[64] SFL(stop flow lithography)를 이용한 디스크 형태의 하이드로젤 다공성 미세입자의 제조

[65] PDMS(polydimethylsilane) 코팅된 유리기판과 7-way PDMS 몰드(mold)를 O₂ 플라즈마 결합(plasma bonding)시키고, 첫 번째부터 여섯 번째 7-way PDMS

주입구(inlet)까지는 상기 제조된 무색, 빨간색, 초록색, 파란색 코드의 프레폴리머 용액이 담긴 튜브를 각각 연결하였다. 마지막 일곱 번째 투입구는 상기 4종의 ADP 용액 중 하나가 담긴 튜브를 연결하고, PDMS 채널의 배출구(outlet)는 1X TET(Tris-EDTA-Tween) 용액이 담긴 수집 튜브(collection tube)를 연결하였다. 상기 색상 코드 프레폴리머 용액이 연결된 6개의 주입구 중 하나와 ADP 용액이 연결된 주입구를 약 1:3 비율로 압력을 가해 이동시켰다. 압력 조절기(Pressure actuator)에서 이동시간(flow time)과 정지시간(stop time)을 약 500 ms로 설정하였다. PDMS 채널의 폭에 맞춰 마스크 사이즈를 설정한 후, 노출시간(exposure time)을 100 ms, 유지시간(hold time)은 200 ms로 설정하였다.

- [66] 그 다음, SFL(stop flow lithography)을 통하여 각각 상기 4가지 색상을 갖는 디스크 형태의 하이드로젤 다공성 미세입자를 제조한 후, 4°C에서 보관하였다. 이때, CYP2C9 mutant-specific ADP는 무색 코드, CYP2C9 wild-specific ADP는 빨간색 코드, VKORC1 mutant-specific ADP는 초록색 코드, VKORC1 wild-specific ADP는 파란색 코드를 갖도록 하였다.

[67]

- [68] 디스크 형태의 하이드로젤 다공성 미세입자 기반 단일염기 다형성 동시다중 실시간 중합효소연쇄반응

- [69] 상기 제조된 PCR 반응칩에 용액상태의 DNA 1 μ L, 20 μ M 농도의 CYP2C9 specific 업스트림 프라이머 0.8 μ L, 20 μ M 농도의 CYP2C9 specific 다운스트림 프라이머 0.8 μ L, 20 μ M 농도의 VKORC1 specific 업스트림 프라이머 0.8 μ L, 20 μ M 농도의 VKORC1specific 다운스트림 프라이머 0.8 μ L, DNase-free water 3.8 μ L, TaqMan master mix 8 μ L를 넣어주었다. 이때, 상기 용액에 포함된 DNA와 각 프라이머의 서열정보는 상기 [실시예 1]에 기재된 것과 동일하다.

- [70] PCR 조건은, 제1변성(predenaturation; 95°C, 8 sec) 이후, 제2변성(denaturation; 95°C, 3 sec), 어닐링 및 신장(annealing 및 elongation; 60°C, 15 sec)을 40 사이클 반복하도록 하였다.

[71]

- [72] [시험예 1]

- [73] 본 발명의 일 실시예로서 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치의 하이드로젤 다공성 미세입자에서 각 ADP가 포함하는 연결부, 즉 T-spacer의 길이에 따른 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 효율을 비교하였다.

- [74] 먼저, 상기 [실시예 1]과 동일한 방법으로 준비한 PCR 반응칩을 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 이때 상기 PCR 반응칩은 2종의 하이드로젤 다공성 미세입자들을 포함하였으며, 상기 2종의 미세입자들은 다음의 염기서열을 갖는 이중 라벨 뉴클레오타이드를 포함하는 ADP를 포함하였다.

- [75] -CYP2C9 allele 2-mutant-specific ADP (서열번호 1): 5'-GAGCATTGAGGACCGTGTTCAAGAGGA-3'

- [76] 또한, 상기 각 ADP들은 각각 12개 또는 30개의 T 염기로 이루어진 연결부를 포함하도록 하였다(T-spacer의 길이: 12T, 30T).
- [77] 상기 실시간 중합효소연쇄반응에 포함된 PCR 용액의 프라이머 서열정보는 다음과 같다.
- [78] -전방향 프라이머 (서열번호 2): 5'-GGA ATT GTT TTC AGC AAT GGA AAG-3'
- [79] -역방향 프라이머(서열번호 3): 5'-GGT CAG TGA TAT GGA GTA GGG TCA-3'
- [80] 도 5는 T-spacer의 길이가 12T인 하이드로젤 다공성 미세입자의 실시간 중합효소연쇄반응 결과를 나타낸 것이다(ADP sequence: 5Acryd/12T/i6 FAMK/probe(27nt)/3BHQ_1). 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이 실시간 중합효소연쇄반응의 PCR 용액에 상기 ADP의 타겟 유전자를 넣어준 경우(SNP target (+)) 하이드로젤 다공성 미세입자에서 형광이 발색이 되었으며, 타겟 유전자를 넣지 않은 경우(SNP target (-))에는 하이드로젤 다공성 미세입자에서 형광이 발색되지 않았다.
- [81] 도 6은 T-spacer의 길이가 30T인 하이드로젤 다공성 미세입자의 실시간 중합효소연쇄반응 결과를 나타낸 것이다(ADP sequence: 5Acryd/30T/i6 FAMK/probe(27nt)/3IABkFQ). 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이 실시간 중합효소연쇄반응의 PCR 용액에 상기 ADP의 타겟 유전자를 넣어준 경우 하이드로젤 다공성 미세입자에서 형광이 발색이 되었다.
- [82] 도 7은 상기 도 5와 도 6에서 확인한 T-spacer의 길이에 따른 형광 강도를 비교하여 그래프로 나타낸 것으로, 30T의 길이를 갖는 경우 형광 발색이 더 뚜렷하게 나타나 분석효율이 우수함을 알 수 있다.
- [83]
- [84] [시험예 2]
- [85] 본 발명의 일 실시예로서 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치의 하이드로젤 다공성 미세입자의 기공크기 및 ADP가 포함하는 연결부의 길이에 따른 다른 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 효율을 비교하였다.
- [86] 도 8A는 PEG 700DA : PEG 600 : DNase-free water : Irgacure 1173 을 부피비 20 : 40 : 35 : 5(v/v)로 혼합한 프레폴리머 혼합용액을 사용하고, ADP가 포함하는 연결부가 각각 30T, 50A, 50T, 72T인 것을 제외하고는 상기 [시험예 1]과 동일한 방법으로 준비한 PCR 반응칩을 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 실시한 결과를 나타낸 것이다. 이때 상기 30T는 30개의 T염기로 이루어진 연결부, 50A는 50개의 A염기로 이루어진 연결부, 50T는 50개의 T염기로 이루어진 연결부, 72T는 72개의 T염기로 이루어진 연결부를 의미한다.
- [87] 도 8B는 PEG 700DA : PEG4000(50%w/v) : DNase-free water : Irgacure 1173 을 부피비 20 : 65 : 10 : 5 (v/v)로 혼합한 프레폴리머 혼합용액을 사용하고, ADP가 포함하는 연결부가 각각 30T, 50A, 50T, 72T인 것을 제외하고는 상기 [시험예 1]과 동일한 방법으로 준비한 PCR 반응칩을 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 실시한 결과를 나타낸 것이다.

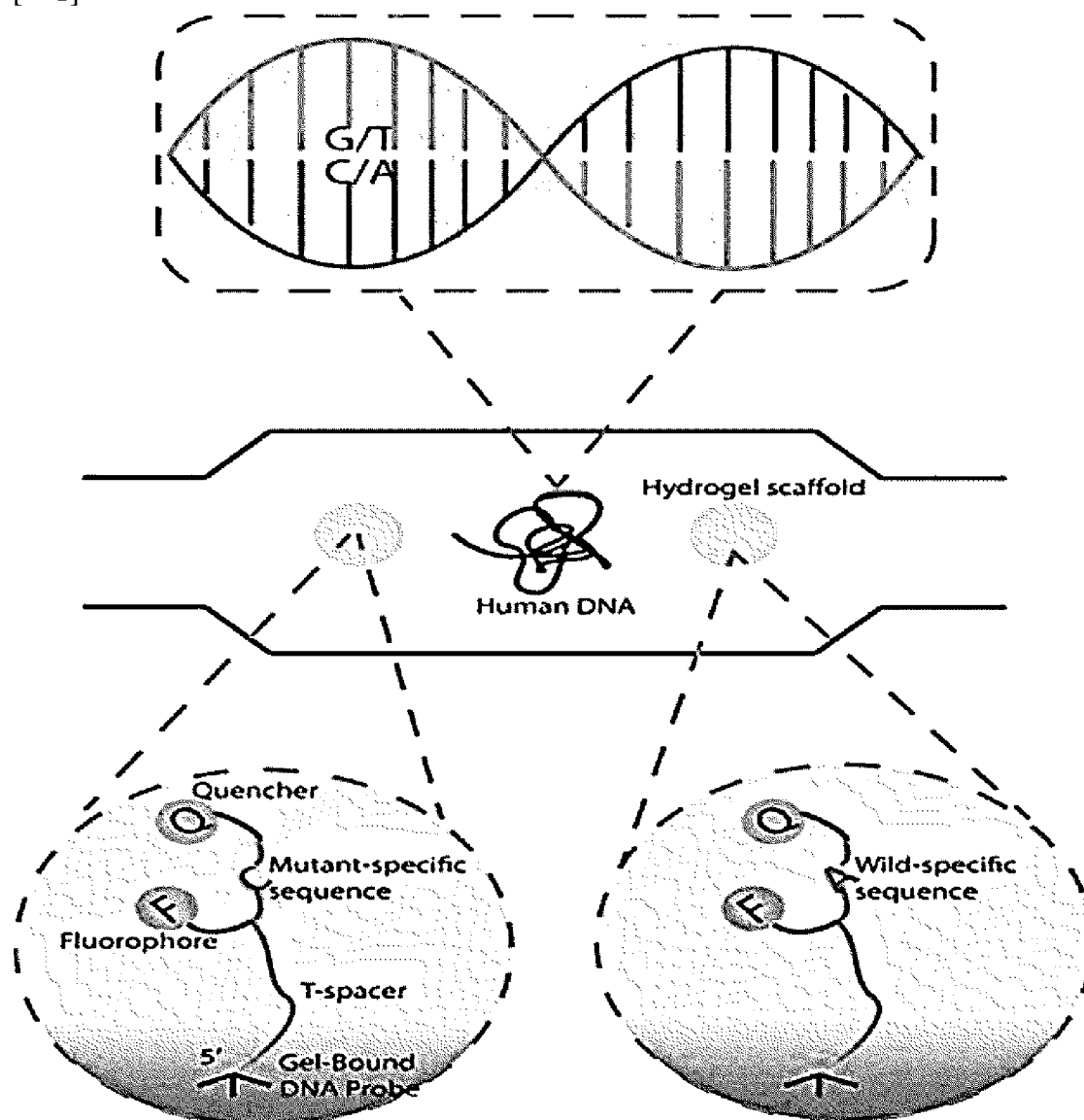
- [88] 도 8C는 PEG 700DA : PEG6000(50%w/v) : DNase-free water : Irgacure 1173 을 부피비 18 : 58 : 19 : 5 (v/v)로 혼합한 프레폴리머 혼합용액을 사용하고, ADP가 포함하는 연결부가 각각 30T, 50A, 50T, 72T인 것을 제외하고는 상기 [시험예 1]과 동일한 방법으로 준비한 PCR 반응칩을 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 실시한 결과를 나타낸 것이다.
- [89] 그 결과, 기공유도중합체의 분자량이 증가할수록 mutant-specific ADP를 포함하는 하이드로젤 다공성 미세입자에서의 형광 발색이 증가하여 단일 염기 다형성(SNP) 검출 효율도 증가하였다. 또한, ADP가 포함하는 연결부의 길이가 길어질수록 광가교된 프라이머의 자유도가 증가하여 단일 염기 다형성(SNP) 검출 효율이 증가하였으며, T염기 개수가 일정 개수 이상이 되면 효율차이는 크지 않았다.
- [90]
- [91] [시험예 3]
- [92] 본 발명의 일 실시예로서 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석시 PCR 조건 변화에 따른 PCR 증폭 효율을 비교하였다.
- [93] 도 9는 어닐링 및 신장 조건이 각각 60°C 및 15 sec(Condition #1), 60°C 및 25 sec(Condition #2), 55°C 및 15 sec(Condition #3), 55°C 및 25 sec(Condition #4)인 것을 제외하고는 상기 [시험예 1]과 동일한 방법으로 실시간 중합효소연쇄반응을 실시한 결과를 나타낸 것이다. 도 9에서 post는 하이드로젤 다공성 미세입자를 사용한 경우이며, sol은 비교예로서 용액상태의 기존 qPCR을 사용하여 상기 어닐링 및 신장 조건에서 실험한 결과를 의미한다.
- [94] 그 결과 어닐링 및 신장 조건이 60°C 및 15 sec(Condition #1)인 경우 가장 PCR 증폭 효율이 우수함을 확인할 수 있다.

청구범위

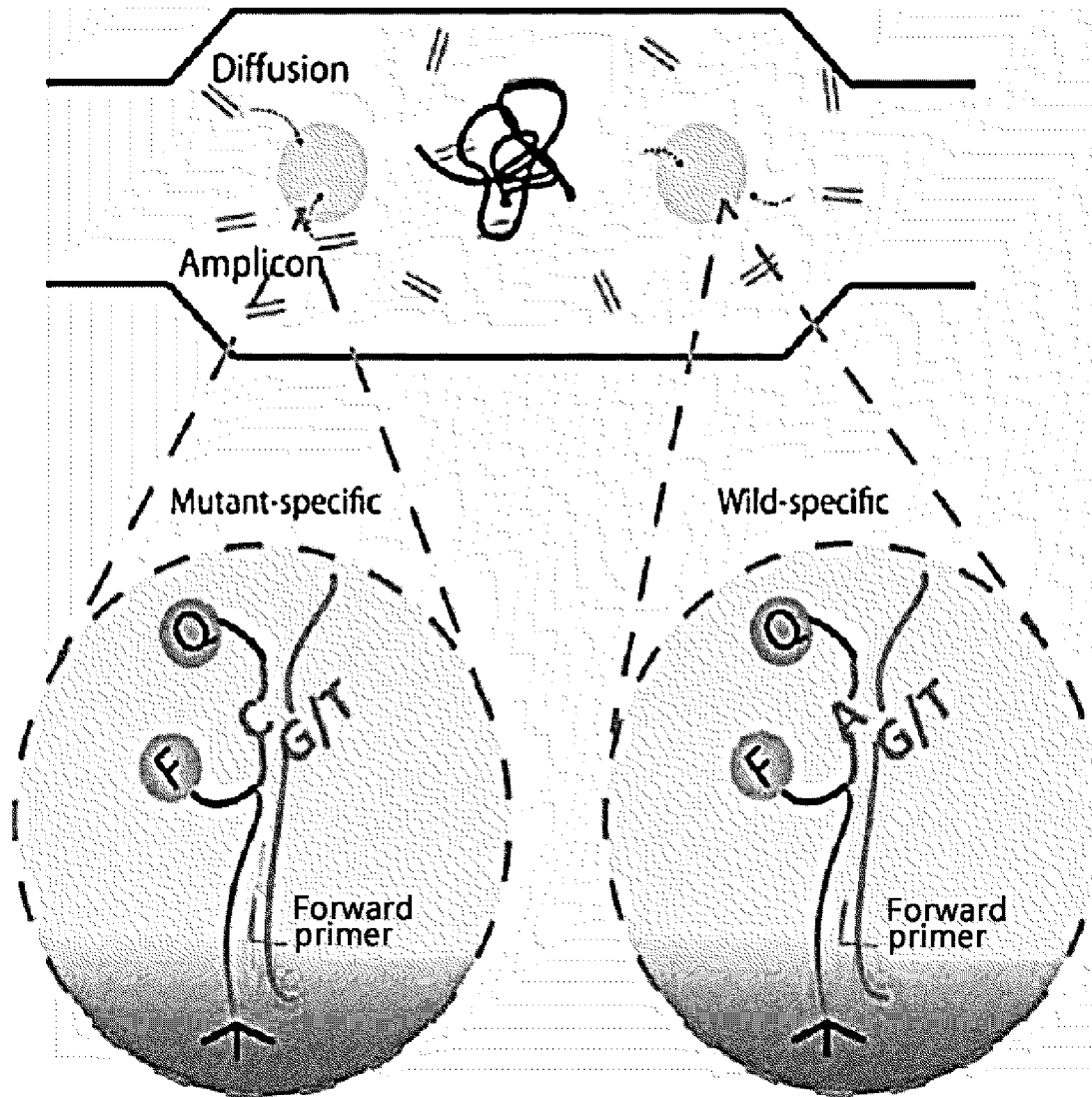
- [청구항 1] 복수 개의 하이드로젤 다공성 미세입자를 포함하는 PCR(Polymerase chain reaction) 반응칩을 포함하고,
하나 이상의 상기 하이드로젤 다공성 미세입자에는 분석대상 유전자의 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열에 상보적인 서열로 이루어진 이중 라벨 뉴클레오타이드(double-labeled nucleotide)를 포함하는 제 1 ADP(Anchored Double-labeled Probe)가 고정되어 있고, 다른 하나 이상의 상기 하이드로젤 다공성 미세입자에는 형광 발색제, 소광제 및 분석대상 야생 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 이중-라벨 뉴클레오타이드를 포함하는 제 2 ADP가 고정되어 있으며,
상기 각 이중 라벨 뉴클레오타이드의 5'말단에는 형광 발색제(Fluorophore), 3'말단에는 소광제(Quencher)가 연결되어 있는, 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제 1 ADP 및 제 2 ADP는 1 내지 72개의 T 염기 또는 1 내지 50개의 A 염기로 이루어진 연결부를 포함하고, 상기 연결부가 하이드로젤 다공성 미세입자에 고정된 것인, 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 제 1 ADP 및 제 2 ADP는 아크릴레이트 작용기, 아비딘-비오틴(Avidin-Biotin) 결합 또는 티올-엔(Thiol-Ene) 결합에 의해 화학적으로 하이드로젤 다공성 미세입자에 고정된 것인, 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 형광 발색제는 6-FAM(6-carboxyfluorescein), TET(tetrachlorofluorescein) 및 6-HEX(6-carboxy-2,4,4,5,7,7-hexachlorofluorescein succinimidyl ester)로 이루어진 군에서 선택된 것인, 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 소광제는 TAMRA(tetramethylrhodamine), Iowa Black™ FQ, 및 BHQ™로 이루어진 군에서 선택된 것인, 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을 포함하면 상기 제 1 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와 완전 상보적 결합하여 형광 발색되고, 상기 제 2 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와는 불완전 상보적 결합하여 형광이 발색되지 않는 것인, 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을 포함하지 않는 야생 유전자이면 상기 제 1 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와 불완전 상보적 결합하여 형광이 발색되지 않고, 상기

- 제 2 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와 완전 상보적 결합하여 형광이 발색되는 것인, 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석 장치의 PCR 반응칩에 분석대상 유전자, 전방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 포함하는 PCR 용액을 주입하는 단계;
 상기 PCR 용액에 포함된 전방향 프라이머 및 역방향 프라이머가 상기 분석대상 유전자를 증폭시켜 유전자 증폭물을 생성하는 PCR 단계;
 상기 유전자 증폭물이 상기 하이드로젤 다공성 미세입자 내부로 확산되어 들어가 제 1 ADP 또는 제 2 ADP와 결합하는 단계; 및
 PCR 완료후 상기 PCR 반응칩에 포함된 하이드로젤 다공성 미세입자의 형광 발색 여부를 확인하는 단계;
 를 포함하는 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 유전자 증폭물이 상기 하이드로젤 다공성 미세입자 내부로 확산되어 들어가 제 1 ADP 또는 제 2 ADP와 결합하는 단계는
 상기 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을 포함하면
 상기 제 1 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와 완전 상보적 결합하고,
 상기 제 2 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와는 불완전 상보적 결합하는
 것을 포함하는 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석방법.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 유전자 증폭물이 상기 하이드로젤 다공성 미세입자 내부로 확산되어 들어가 제 1 ADP 또는 제 2 ADP와 결합하는 단계는
 상기 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을 포함하지
 않는 야생 유전자이면 상기 제 1 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와
 불완전 상보적 결합하고, 상기 제 2 ADP의 이중 라벨 뉴클레오타이드와
 완전 상보적 결합하는 것을 포함하는 단일 염기 다형성(SNP) 유전형질
 분석방법.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 형광 발색 여부를 확인하는 단계는,
 상기 제 1 ADP가 고정된 하이드로젤 다공성 미세입자에 형광 발색이
 나타나면 상기 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을
 포함하고, 상기 제 2 ADP가 고정된 하이드로젤 다공성 미세입자에 형광
 발색이 나타나면 분석대상 유전자가 단일 염기 다형성(SNP) 염기서열을
 포함하지 않는 야생 유전자인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 단일
 염기 다형성(SNP) 유전형질 분석방법.

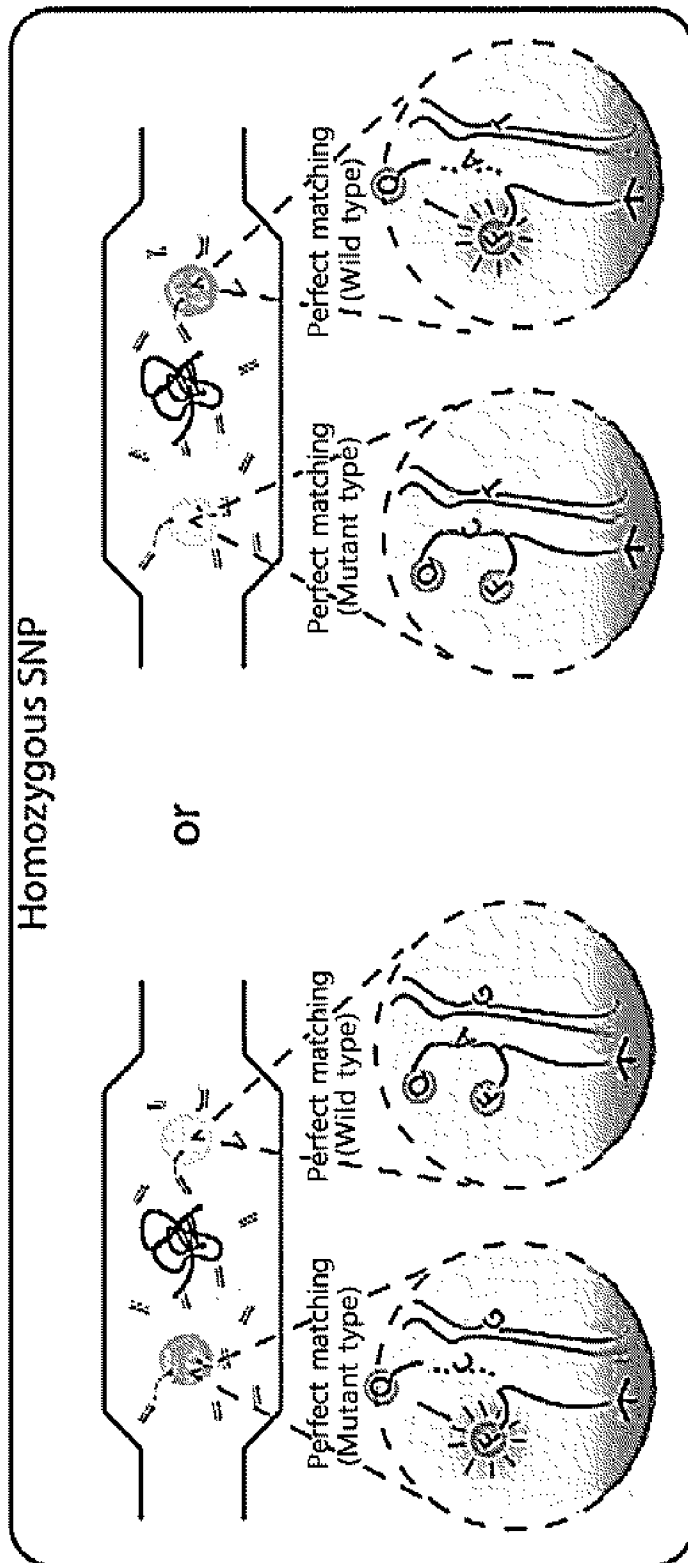
[도1]



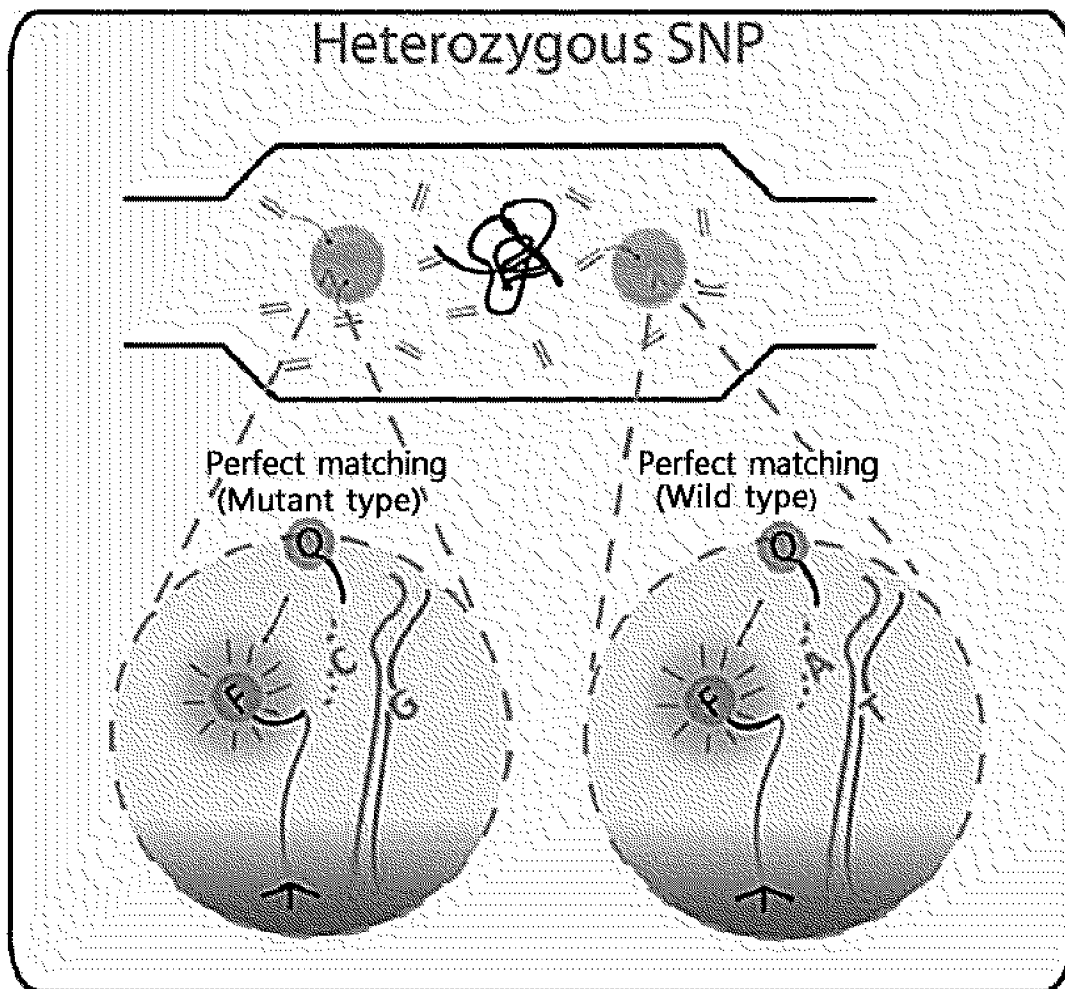
[도2]



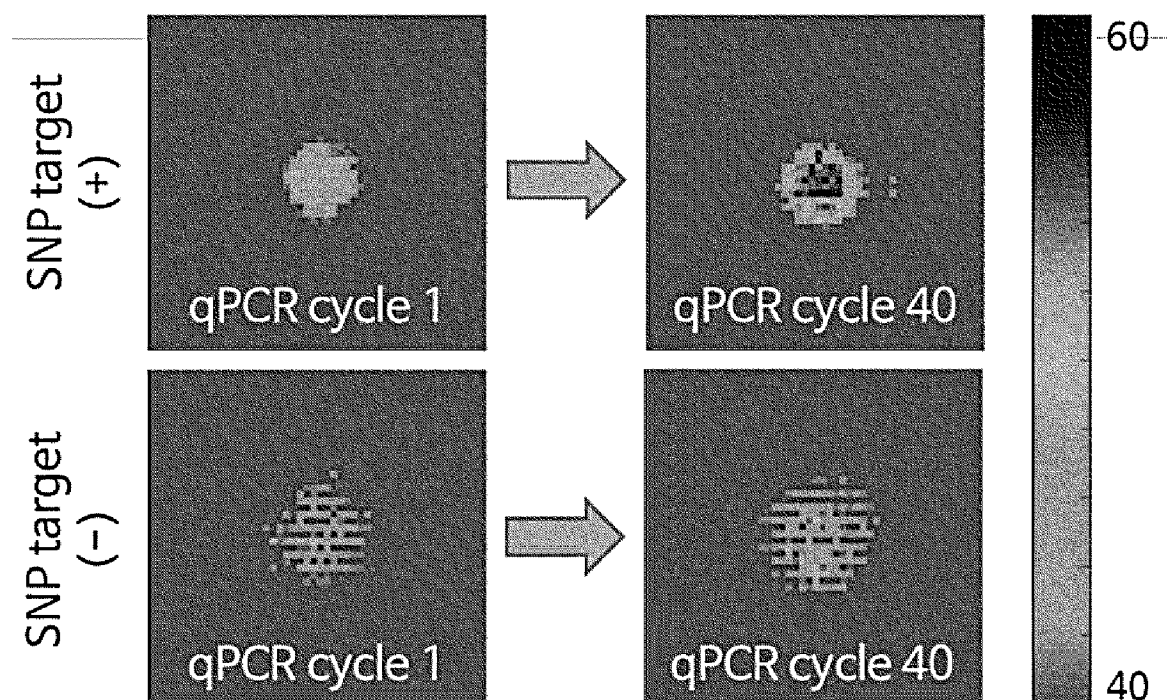
[도3]



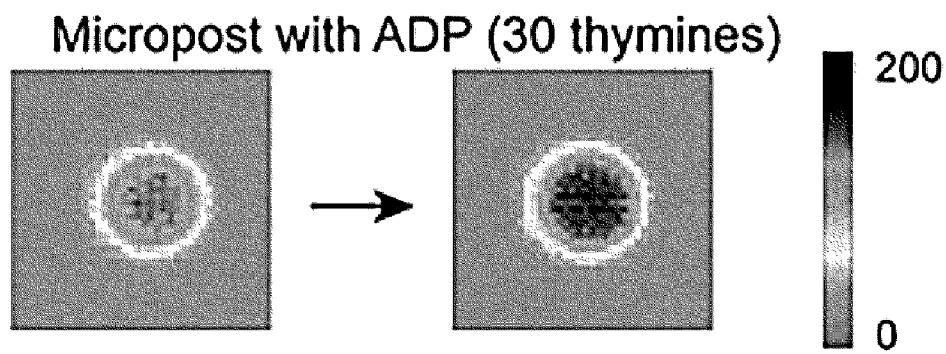
[도4]



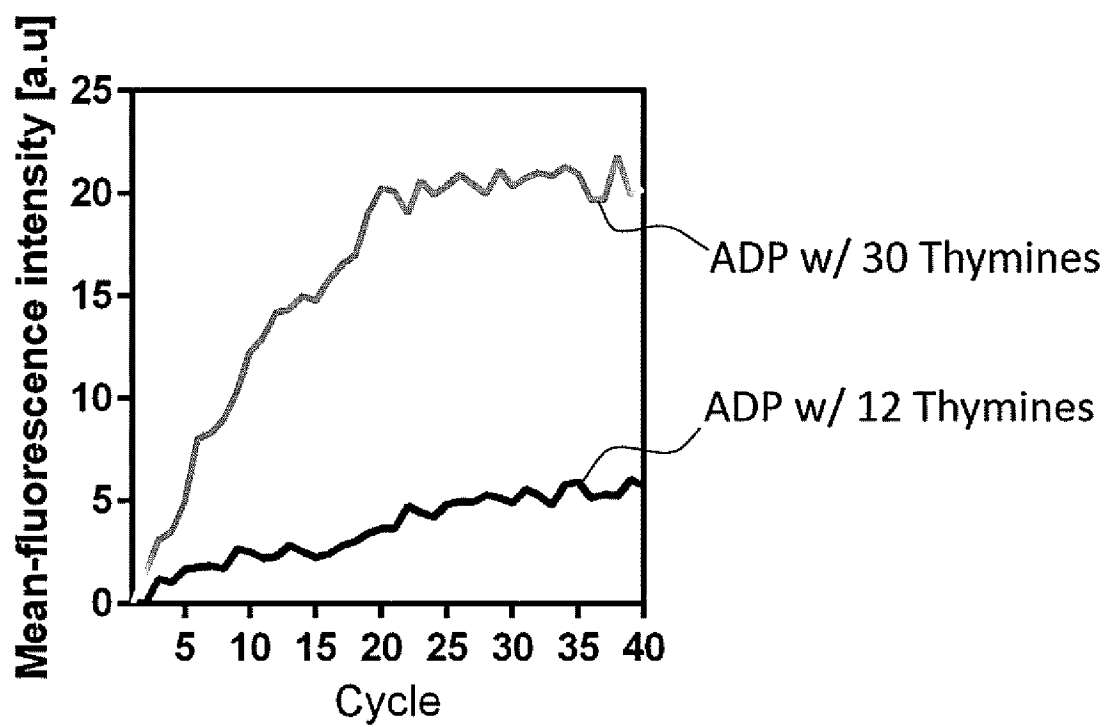
[도5]



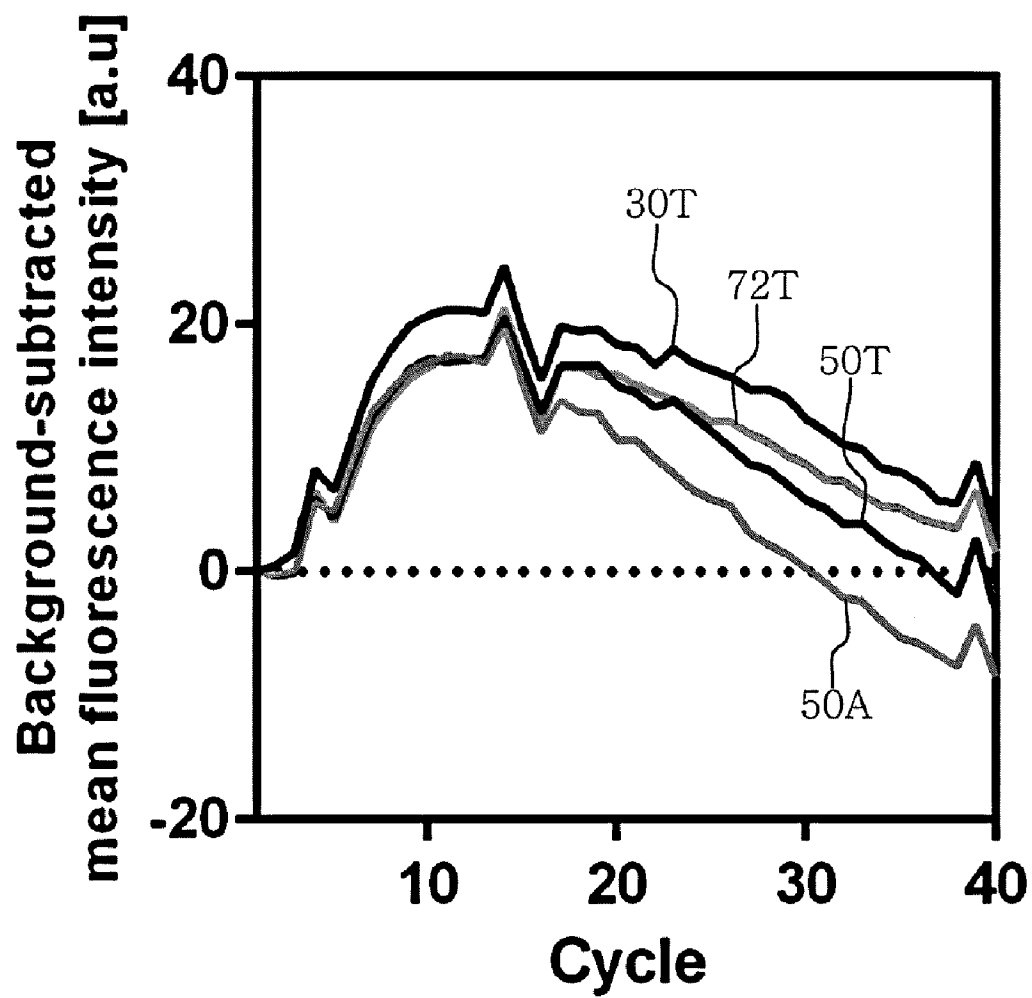
[도6]



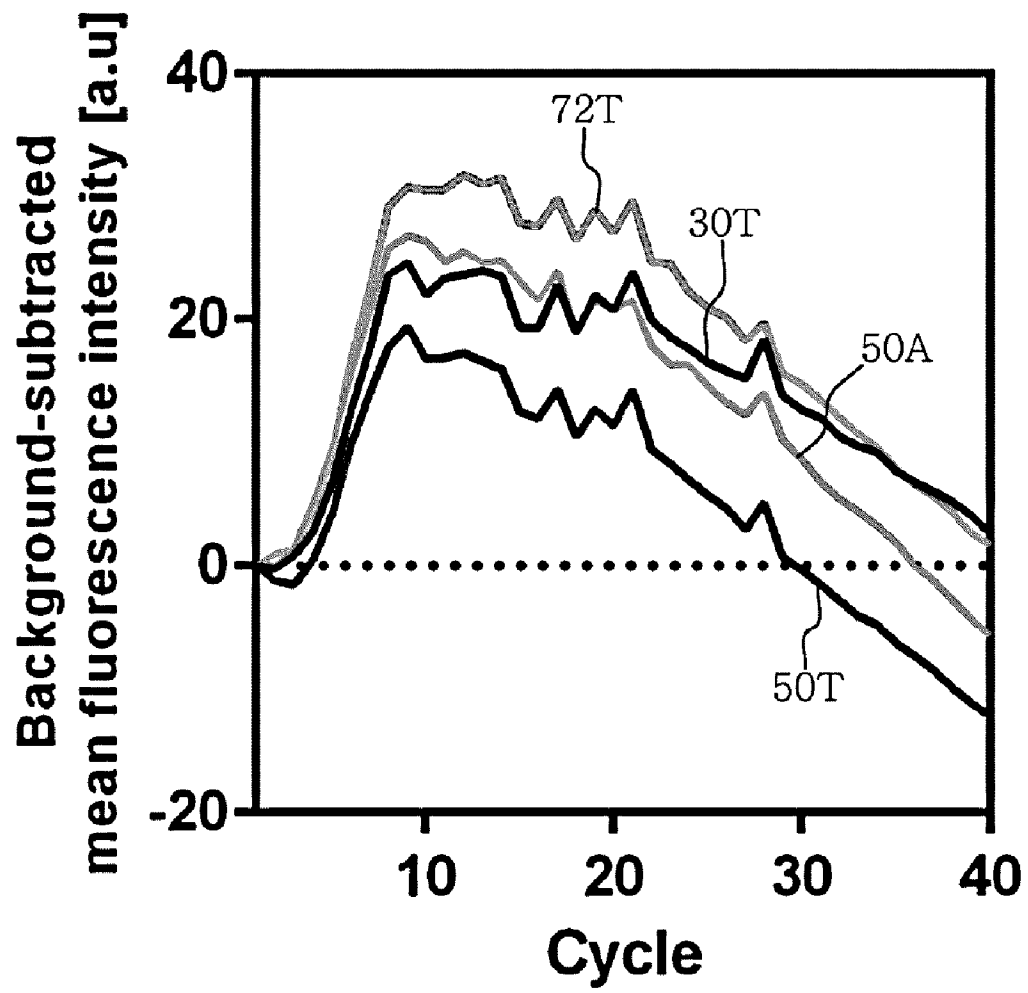
[도7]



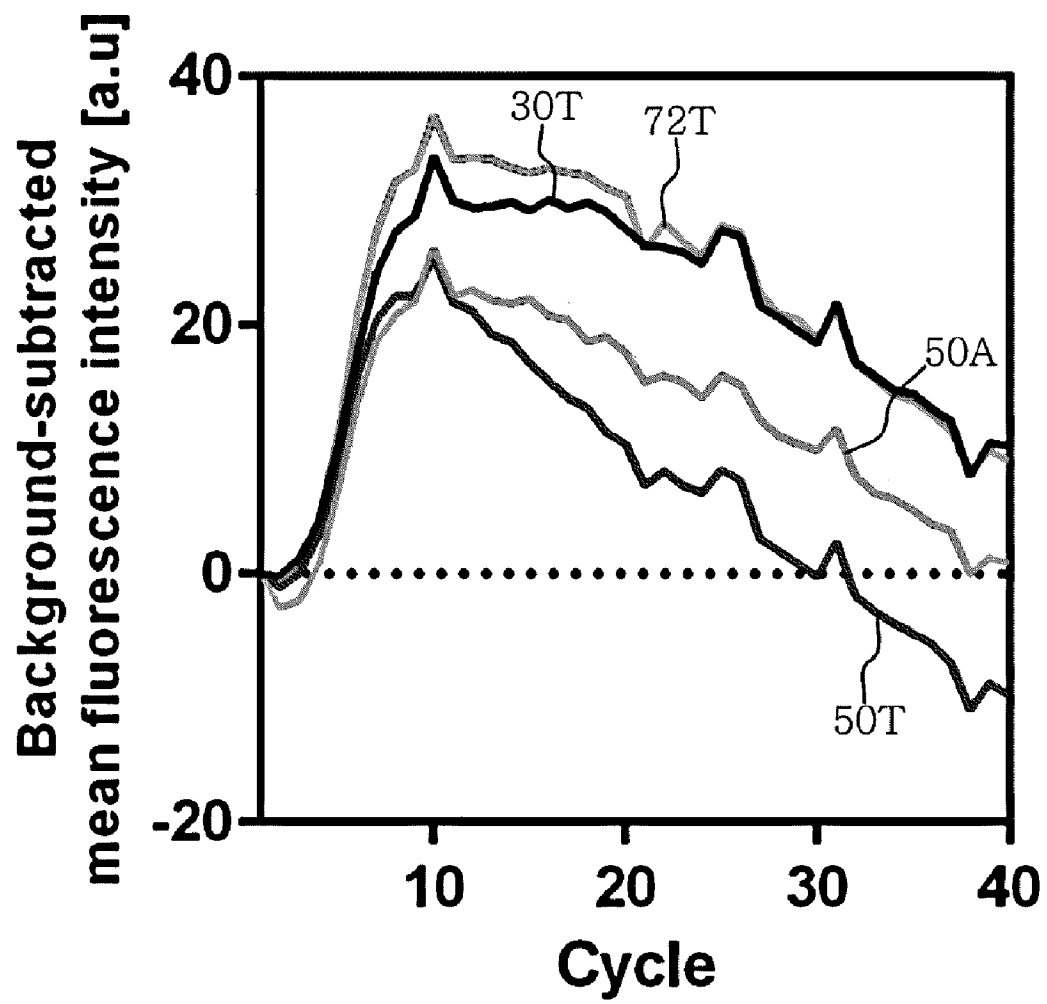
[도8a]



[도8b]



[도8c]



[도9]

