(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 1 월 23 일 (23.01.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/014268 A1

(51) 국제특허분류:
G01N 27/26 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01) *G01N 27/30* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/006387

(22) 국제출원일: 2013 년 7 월 17 일 (17.07.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0077900 2012 년 7 월 17 일 (17.07.2012) KR

(71) 출원인: **나노바이오시스(주) (NANOBIOSYS INC.)** [KR/KR]; 153-712 서울시 금천구 디지털로 9 길 47 1206 호, Seoul (KR). **한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [KR/KR]; 305-701 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

(72) 발명자: **김성우 (KIM, Sung Woo)**; 122-904 서울시 은평구 갈현로 7 길 22, Seoul (KR). **박현규 (PARK, Hyun Gyu)**; 305-701 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원(KAIST) 생명화학공학과, Daejeon (KR). **이정환 (LEE, Jung Hwan)**; 426-863 경기도 안산시 상록구 이동 693-5 302 호, Gyeonggi-do (KR). **이유진 (LEE, Yu Jin)**; 331-789 충청남도 천안시 서북구 쌍용동 용암마을아파트 103 동 604 호, Chungcheongnam-do (KR). **김덕중 (KIM, Duck Joong)**; 431-746 경기도 안양시 동안구 관평로 138 번길 35, Gyeonggi-do (KR). **원병연 (WON, Byoung Yeon)**; 305-701 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원(KAIST) 생명화학공학과, Daejeon (KR). **백송이 (BAEK, Song Yi)**; 305-701 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원(KAIST) 생명화학공학과, Daejeon (KR).

(74) 대리인: **김웅 (KIM, Woong)**; 135-924 서울시 강남구 테헤란로 22 길 15 9 층 (역삼동, 에이엔씨빌딩), Seoul (KR).

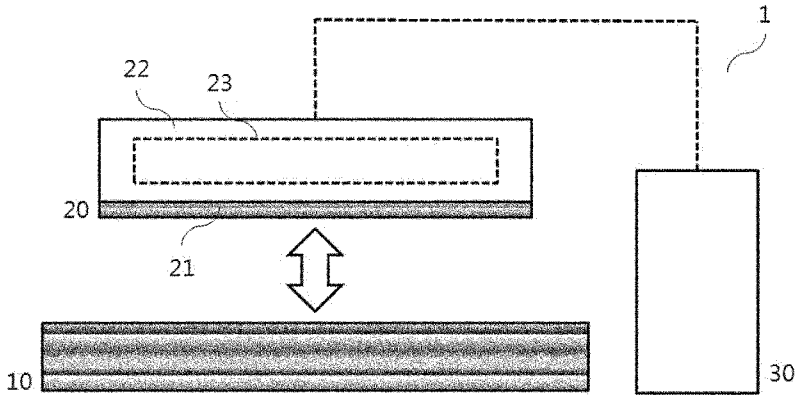
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, 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, 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, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION APPARATUS FOR DETECTING ELECTROCHEMICAL SIGNAL USING METALLIC NANO PARTICLES

(54) **발명의 명칭** : 금속 나노입자를 이용하여 전기화학적 신호를 검출하는 실시간 ＰＣＲ 장치



(57) **Abstract**: An embodiment of the present invention relates to a real-time polymerase chain reaction (PCR) apparatus and method. According to the apparatus and method, through a PCR chip having a dual block and plate shape, not only can a plurality of samples be analyzed at the same time at an ultrahigh speed, but a simple module capable of easily detecting sequential electrochemical signals generated during a nucleic acid amplification process can be embodied, thereby allowing microminiaturization and portability of products.

(57) **요약서**: 본 발명의 일 실시예는 실시간 PCR 장치 및 방법에 관한 것으로서, 이에 따르면, 듀얼(dual) 열 블록 및 판 형상의 PCR 칩을 통해 다수의 샘플을 동시에 초고속으로 분석할 수 있을 뿐만 아니라, 핵산 증폭 과정에서 발생하는 연속적인 전기화학적 신호를 쉽게 검출할 수 있는 단순한 모듈 구현을 통해 제품의 극-소형화 및 휴대화에 상당히 기여할 수 있다.

WO 2014/014268 A1

MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 금속 나노입자를 이용하여 전기화학적 신호를 검출하는 실시간 P C R 장치

기술분야

[1] 본 발명의 일 실시예는 실시간 PCR 장치 및 이를 이용한 실시간 PCR 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 중합효소 연쇄 반응, 즉 PCR(Polymerase Chain Reaction)은 주형 핵산의 특정 표적 핵산 부위를 반복적으로 가열 또는 냉각하여 상기 특정 표적 핵산 부위를 연쇄적으로 복제하여 그 특정 표적 핵산 부위를 갖는 핵산을 기하급수적으로 증폭하는 기술로써, 생명과학, 유전공학 및 의료 분야 등에서 분석 및 진단 목적으로 널리 사용되고 있다. 최근 PCR을 수행하기 위한 다양한 PCR 장치가 개발되고 있다. 종래 PCR 장치의 일 예는 하나의 반응 챔버에 주형 핵산을 포함하는 샘플 용액을 포함하는 용기를 장착하고, 상기 용기를 반복적으로 가열 및 냉각하여 PCR 반응을 수행한다. 그러나, 상기 PCR 장치는 하나의 반응 챔버를 구비하기 때문에 전체적인 구조가 복잡하진 않지만, 정확한 온도 제어를 위해 복잡한 회로를 구비해야 하고, 하나의 반응 챔버에 대한 반복적인 가열 또는 냉각으로 인해 전체 PCR 수행 시간이 길어지는 문제점이 있다. 또한 상기 PCR 장치는 PCR 최종 산물의 확인을 위해 별도의 검출 장치를 사용해야 하기 때문에 작업 시간이 지연되고 PCR 최종 산물의 오염에 항시 노출되어 있다. 또한, 종래 PCR 장치의 다른 예는 PCR 진행 온도를 갖는 복수 개의 반응 챔버를 장착하고, 이들 반응 챔버를 통과하는 하나의 채널을 통해 핵산을 포함하는 샘플 용액을 흐르게 하여 PCR을 수행한다. 그러나, 상기 PCR 장치는 복수 개의 반응 챔버를 이용하기 때문에 정확한 온도 제어를 위한 복잡한 회로구조가 요구되진 않지만, 고온 및 저온의 반응 챔버를 통과하기 위한 긴 유로가 필요하므로 구조가 복잡하고, 상기 반응 챔버를 통과하는 채널에 흐르는 핵산을 포함하는 샘플 용액의 유속을 제어하기 위한 별도의 제어 장치가 요구된다. 한편, 최근 PCR 장치는 PCR 최종 산물의 수율을 높이기 위한 노력뿐만 아니라 PCR 과정을 실시간으로 파악하기 위한 방법도 개발하고 있다. 이와 같이 PCR 진행 과정을 실시간으로 파악하는 기술을 소위 "실시간 PCR(real-time PCR)"이라고 하는데, 실시간 PCR 장치는 PCR 챔버에 형광 물질을 투입하여 증폭 산물과의 결합으로 발생하는 광신호를 측정하는 기술이 적용된다. 그러나, 이 경우 상기 실시간 PCR 장치는 형광물질로부터 광신호를 활성화하기 위한 별도의 광원 모듈, 증폭 핵산으로부터 획득된 광신호를 검출하기 위한 광검출 모듈, 및 기타 광 경로를 조절하기 위한 반사경 등 복잡한 구조를 반드시 채용해야 하는 바, 기기의 소형화가 어렵고, 휴대용 장치를 개발하는데 많은 어려움이 있다.

[3] 따라서, 다수의 시료에 대한 PCR 시간을 줄임과 동시에 신뢰할 수 있는 PCR 수율을 얻을 수 있고, 더 나아가 제품의 소형화 및 휴대화가 가능한 실시간 PCR 장치의 필요성이 부각되고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[4] 위와 같은 배경기술의 문제점을 해결하고자, 본 발명의 일 실시예는 다수의 시료에 대한 PCR 시간 및 수율을 합리적으로 개선하고, 더 나아가 제품의 소형화 및 휴대화가 가능한 실시간 PCR 장치 및 이를 이용한 실시간 PCR 방법을 제안하고자 한다.

과제 해결 수단

[5] 본 발명의 제1 실시예는 1 이상의 열 블록; 상기 1 이상의 열 블록과 접촉하는 열 블록 접촉 영역을 구비하는 하우징, 상기 하우징 내부에 형성된 반응 챔버, 상기 반응 챔버 내부의 일 영역에 배치되되 증폭 표적 핵산의 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 포획 프로브가 표면 처리된 고정 층, 및 상기 반응 챔버 내부의 다른 일 영역에 배치되되 전기화학적 신호를 검출하도록 구현된 전극을 구비하는 것으로서, 금속 나노입자 및 상기 금속 나노입자에 연결되되 상기 증폭 표적 핵산의 다른 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 신호 프로브를 구비하는 복합체가 수용된, PCR 용기; 및 상기 PCR 용기의 전극과 전기적으로 연결되어 상기 PCR 용기의 반응 챔버 내부에서 발생하는 전기화학적 신호를 실시간으로 측정하도록 구현된 전기화학적 신호 측정 모듈을 포함하는, 실시간 PCR 장치를 제공한다.

[6]

[7] 본 발명의 제1 실시예에 있어서,

[8] 상기 금속 나노입자는 아연(Zn), 카드뮴(Cd), 납(Pb), 구리(Cu), 갈륨(Ga), 인듐(In), 금(Au), 및 은(Ag)으로 구성된 군으로부터 1 이상 선택될 수 있다.

[9] 또한, 상기 전기화학적 신호는 상기 증폭 표적 핵산이 상기 포획 프로브 및 상기 복합체의 신호 프로브와 상보적으로 결합함에 따라 발생하는 전류 변화에 기인할 수 있다.

[10] 또한, 상기 전극은 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀(graphene), 및 탄소(Carbon)로 구성된 군으로부터 1 이상 선택될 수 있다.

[11] 또한, 상기 증폭 표적 핵산, 상기 포획 프로브, 및 상기 신호 프로브는 단일 가닥 DNA일 수 있다.

[12] 또한, 상기 전기화학적 신호 측정 모듈은 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 및

임피던스계(impedance)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[13]

[14] 본 발명의 제2 실시예는 기판 상부에 이격 배치된 제1 열 블록 및 제2 열 블록; 양 말단에 유입부 및 유출부가 구현된 1 이상의 반응 채널, 상기 반응 채널 내부의 일 영역에 배치되되 증폭 표적 핵산의 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 포획 프로브가 표면 처리된 고정 층, 및 상기 반응 채널 내부의 다른 일 영역에 배치되되 전기화학적 신호를 검출하도록 구현된 전극을 구비하는 것으로서, 금속 나노입자 및 상기 금속 나노입자에 연결되되 상기 증폭 표적 핵산의 다른 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 신호 프로브를 구비하는 복합체를 포함하는, 판 형상의 PCR 칩; 상기 PCR 칩이 장착되되 상기 PCR 칩의 전극 말단과 전기적으로 연결되도록 구현된 연결 포트를 구비하는 칩 홀더; 상기 PCR 칩이 장착된 칩 홀더를 상하 또는 좌우로 이동하여 상기 PCR 칩이 상기 제1 열 블록 또는 상기 제2 열 블록에 열 접촉할 수 있도록 구현된 구동 수단; 및 상기 칩 홀더의 연결 포트와 전기적으로 연결되어 상기 PCR 칩의 반응 채널 내부에서 발생하는 전기화학적 신호를 실시간으로 측정하도록 구현된 전기화학적 신호 측정 모듈을 포함하는 실시간 PCR 장치를 제공한다.

[15]

[16] 본 발명의 제2 실시예에 있어서,

[17] 상기 금속 나노입자는 아연(Zn), 카드뮴(Cd), 납(Pb), 구리(Cu), 갈륨(Ga), 인듐(In), 금(Au), 및 은(Ag)으로 구성된 군으로부터 1 이상 선택될 수 있다.

[18] 또한, 상기 전기화학적 신호는 상기 증폭 표적 핵산이 상기 포획 프로브 및 상기 복합체의 신호 프로브와 상보적으로 결합함에 따라 발생하는 전류 변화에 기인할 수 있다.

[19] 또한, 상기 전극은 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀(graphene), 및 탄소(Carbon)로 구성된 군으로부터 1 이상 선택될 수 있다.

[20] 또한, 상기 전극은 산화 또는 환원 반응이 일어나는 지시 전극(working electrode) 및 산화 또는 환원 반응이 일어나지 않는 기준 전극(reference electrode)을 구비하는 2-전극 모듈, 또는 상기 지시 전극, 상기 기준 전극, 및 상기 지시 전극으로부터 발생하는 전자 밸런스를 조절하는 카운터 전극(counter electrode)을 구비하는 3-전극 모듈로 구현될 수 있다.

[21] 또한, 상기 전기화학적 신호 측정 모듈은 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 및 임피던스계(impedance)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[22] 또한, 상기 제1 열 블록 및 제2 열 블록은 상기 제1 열 블록 및 제2 열 블록의 온도를 전체적으로 일정하게 유지하기 위해 각 열 블록의 중심점을 기준으로

상하 및/또는 좌우 방향으로 대칭되도록 내부에 열선이 배치될 수 있다.

[23] 또한, 상기 제1 열 블록 및 상기 제2 열 블록 중 어느 하나는 PCR의 변성 단계 온도를 유지하고, 다른 하나는 PCR의 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계 온도를 유지하도록 구현될 수 있다.

[24] 또한, 상기 변성 단계 온도는 90℃ 내지 100℃이고, 상기 연장 (혹은 증폭) 단계 온도는 55℃ 내지 75℃일 수 있다.

[25] 또한, 상기 제1 열 블록과 제2 열 블록은 상호 열 교환이 일어나지 않도록 미리 결정된 거리로 이격 배치될 수 있다.

[26] 또한, 상기 구동 수단은 좌우 방향으로 연장된 레일, 및 상기 레일을 통해 좌우 방향으로 슬라이딩 이동가능하게 배치되고 상하 방향으로 슬라이딩 이동 가능한 연결 부재를 포함하고, 상기 연결 부재의 일 말단에는 상기 칩 홀더가 배치될 수 있다.

[27] 또한, 상기 PCR 칩은 상기 칩 홀더에 탈착 가능하게 구현될 수 있다.

[28] 또한, 상기 PCR 칩은 상기 전극이 구비된 제1 판; 상기 제1 판 상에 배치되되 상기 1 이상의 반응 채널이 구비된 제2 판; 및 상기 제2 판 상에 배치되되 상기 유입부 및 유출부, 및 상기 포획 프로브가 표면 처리된 고정 층이 구비된 제3 판을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[29] 본 발명의 일 실시예에 따른 실시간 PCR 장치 및 방법에 따르면, 듀얼(dual) 열 블록 및 판 형상의 PCR 칩을 통해 다수의 샘플을 동시에 초고속으로 분석할 수 있을 뿐만 아니라, 핵산 증폭 과정에서 발생하는 연속적인 전기화학적 신호를 쉽게 검출할 수 있는 단순한 모듈 구현을 통해 제품의 극-소형화 및 휴대화에 상당히 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[30] 도 1 내지 2는 본 발명의 제1 실시예에 따른 실시간 PCR 장치의 개략도이다.

[31] 도 3은 본 발명의 제1 실시예에 따른 실시간 PCR 장치의 반응 챔버 내에서 일어나는 포획 프로브 및 신호 프로브와 증폭 표적 핵산 간의 결합을 도시한다.

[32] 도 4는 본 발명의 제1 실시예에 따른 실시간 PCR 장치의 전기화학적 신호 발생 과정을 도시한다.

[33] 도 5는 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치를 도시한다.

[34] 도 6은 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치의 구동원리를 도시한다.

[35] 도 7 내지 10은 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩을 도시한다.

[36] 도 11은 본 발명의 제2 실시예에 따른 칩 홀더를 도시한다.

[37] 도 12는 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치의 전기화학적 신호 측정 모듈의 배치도이다.

[38] 도 13은 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치를 이용하여 실시간 PCR을 수행하는 과정을 도시한다.

[39] 도 14 내지 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 실시간 PCR 방법을 수행한 결과를 나타내는 다양한 유형의 그래프를 도시한다.

[40] 도 17 내지 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 실시간 PCR 방법을 수행한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

발명의 실시를 위한 형태

[41] 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.

[42]

[43] 도 1 내지 2는 본 발명의 제1 실시예에 따른 실시간 PCR 장치의 개략도를 도시한다.

[44] 도 1 내지 2에 따르면, 상기 실시간 PCR 장치(1)는 1 이상의 열 블록(10); 상기 1 이상의 열 블록(10)과 접촉하는 열 블록 접촉 영역(21)을 구비하는 하우징(22), 상기 하우징(22) 내부에 형성된 반응 챔버(23), 상기 반응 챔버(23) 내부의 일 영역에 배치되되 증폭 표적 핵산(2)의 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 포획 프로브(24)가 표면 처리된 고정 층(25), 및 상기 반응 챔버(23) 내부의 다른 일 영역에 배치되되 전기화학적 신호를 검출하도록 구현된 전극(26)을 구비하는 것으로서, 금속 나노입자(27) 및 상기 금속 나노입자(27)에 연결되되 상기 증폭 표적 핵산의 다른 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 신호 프로브(28)를 구비하는 복합체(29)가 수용된, PCR 용기(20); 및 상기 PCR 용기(20)의 전극(26)과 전기적으로 연결되어 상기 PCR 용기(20)의 반응 챔버(23) 내부에서 발생하는 전기화학적 신호를 실시간으로 측정하도록 구현된 전기화학적 신호 측정 모듈(30)을 포함한다.

[45] 본 명세서에 있어서, PCR 장치란 특정 염기 서열을 갖는 핵산을 증폭하는 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 사용하는 장치를 말한다. 예를 들어, 특정 염기 서열을 갖는 DNA(deoxyribonucleic acid)를 증폭하기 위해 PCR 장치는 주형 핵산인 이중 가닥의 DNA를 포함하는 PCR 시료 및 시약을 포함하는 용액을 특정 온도, 예를 들어 약 95℃로 가열하여 상기 이중 가닥의 DNA를 단일 가닥의 DNA로 분리하는 변성 단계(denaturing step), 증폭하고자 하는 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 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. 경우에 따라, 상기 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 발명의 일 구체예에 따른 실시간 PCR 장치(1)는 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.

[46] 상기 열 블록(10)은 핵산을 증폭하기 위하여 변성 단계, 어닐링 단계 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하기 위한 온도를 유지하는 모듈이다. 따라서 상기 열 블록(10)은 상기 각 단계들에 요구되는 온도를 상기 PCR 용기(20)에 제공하기 위한 다양한 모듈을 포함하거나 또는 그러한 모듈과 구동가능하게 연결될 수 있다. 또한, 상기 열 블록(10)은 그 내부에 열선(도시되지 않음)이 배치될 수 있고, 상기 열선은 상기 변성 단계, 어닐링 단계 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하기 위한 온도를 유지하는 다양한 열원과 연결될 수 있으며, 상기 열선의 온도를 모니터하기 위한 다양한 온도 센서와 연결되어 구동될 수 있다. 상기 열선은 상기 열 블록(10)의 내부 온도를 전체적으로 일정하게 유지하기 위해 그 표면의 중심점을 기준으로 상하 및/또는 좌우 방향으로 대칭 배치될 수 있다. 또한, 상기 열 블록(10)은 그 내부에 박막 히터(thin film heater, 도시되지 않음)가 배치될 수 있다. 상기 박막 히터는 상기 열 블록(10)의 내부 온도를 전체적으로 일정하게 유지하기 위해 그 표면의 중심점을 기준으로 상하 및/또는 좌우 방향으로 일정한 간격으로 이격 배치될 수 있다. 상기 열 블록(10)은 PCR 용기(20)에 동일 면적의 고른 열 분포 및 신속한 열 전달을 위해 판 형상으로 구현될 수 있고, 금속 재질, 예를 들어 알루미늄 재질로 구현될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 열 블록(10)은 상기 변성 단계 또는 상기 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하기 위한 적정 온도를 유지한다. 예를 들어, 상기 열 블록(10)은 상기 변성 단계를 수행하기 위해 50℃ 내지 100℃, 바람직하게는 90℃ 내지 100℃, 더 바람직하게는 95℃를 유지할 수 있고, 상기 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하기 위해 55℃ 내지 75℃, 바람직하게는 72℃를 유지할 수 있다. 한편, 상기 열 블록(10)은 2 이상으로 구현될 수 있고, 후술할 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치는 상기 열 블록(10)이 2개로 구현된다.

[47] 상기 PCR 용기(20)는 상기 열 블록(10)과 접촉하는 열 블록 접촉 영역(21)을 구비하는 하우징(22), 및 상기 하우징(22) 내부에 형성된 반응 챔버(23), 상기 반응 챔버(23) 내부의 일 영역에 배치되되 증폭 표적 핵산(2)의 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 포획 프로브(24)가 표면 처리된 고정 층(25), 및 상기 반응 챔버(23) 내부의 다른 일 영역에 배치되되 전기화학적 신호를 검출하도록 구현된 전극(26)을 구비하고, 상기 반응 챔버(23)에 금속 나노입자(27) 및 상기 금속 나노입자(27)에 연결되되 상기 증폭 표적 핵산의 다른 일 영역과

상보적으로 결합할 수 있는 신호 프로브(28)를 구비하는 복합체(29)를 포함한다.

[48] 상기 하우징(22)은 상기 PCR 용기(20)의 본체로서, 다양한 재질, 예를 들어 플라스틱, 금속, 유리, 실리콘 등으로 제작될 수 있다. 한편, 상기 하우징(22)은 비록 도 1에는 도시되지 않았지만, PCR 시료 및 시약을 도입하거나, 또는 PCR 최종 산물 또는 폐기물 등을 배출하기 위한 별개의 유입구 또는 유출구를 구비하거나, 유입구 및 유출구 역할을 동시에 수행하는 단일의 개구부를 구비할 수도 있다. 한편, 상기 열 블록 접촉 영역(21)은 상기 1 이상의 열 블록(10)과 열 접촉하여 상기 열 블록(10)으로부터 열을 제공받아 상기 반응 챔버(23) 내부로 열을 전달하게 하는 영역을 말한다. 상기 열 블록 접촉 영역(21)은 상기 하우징(22) 또는 상기 열 블록(10)의 형상 및 구조에 따라 다양한 형상 및 구조로 구현될 수 있다.

[49] 상기 반응 챔버(23)는 PCR 시료 및 시약에 의해 PCR이 수행되는 공간으로서, 상기 하우징(22) 내부에 형성된다. 상기 반응 챔버(23)는 빈 원기둥 형상, 바(bar) 형상, 사각기둥 형상 등 다양한 형상 및 구조로 구현될 수 있다. 구체적으로, 도 2는 본 발명의 제1 실시예에 따른 실시간 PCR 장치(1)의 반응 챔버(23) 및 이에 수용된 복합체(29)에 관한 상세도이다. 상기 반응 챔버(23)는 그 내부의 일 영역에 배치되되 증폭 표적 핵산(2)의 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 포획 프로브(24)가 표면 처리된 고정 층(25), 및 그 내부의 다른 일 영역에 배치되되 전기화학적 신호를 검출하도록 구현된 전극(26)을 구비하는데, 상기 고정 층(25)과 상기 전극(26)은 상기 반응 챔버(23) 내부에서 다양한 위치에 배치될 수 있으나, 도 2와 같이 서로 마주보도록 배치되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 반응 챔버(23)는 그 내부에 금속 나노입자(27) 및 상기 금속 나노입자(27)에 연결되되 상기 증폭 표적 핵산의 다른 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 신호 프로브(28)를 구비하는 복합체(29)를 수용한다. 이 경우 상기 복합체(29)는 주형 핵산 등을 포함하는 PCR 시료 도입 전 본 발명의 제1 실시예에 따른 실시간 PCR 장치에 미리 수용될 수 있고, 프라이머, 중합효소 등을 포함하는 PCR 시약에 포함된 상태로 상기 반응 챔버(23)에 함께 도입될 수도 있다. 상기 고정 층(25)은 그 일 면에 포획 프로브(24)가 증착되어 노출될 수 있도록 다양한 재질, 예를 들어 실리콘, 플라스틱, 유리, 금속 재질 등으로 구현된다. 이 경우 상기 고정 층(25)의 표면은 예를 들어, 포획 프로브(24) 증착 전 아민 NH_3^+, 알데하이드 COH, 카르복실기 COOH 등과 같은 물질이 먼저 표면 처리될 수 있다. 상기 포획 프로브(24)는 상기 증폭 표적 핵산의 일 부위(영역)와 상보적으로 결합할 수 있도록 구현되고, 금속 나노입자(27)와 결합하여 복합체(29)를 형성한다. 상기 금속 나노입자(27)는 다양할 수 있으나, 아연(Zn), 카드뮴(Cd), 납(Pb), 구리(Cu), 갈륨(Ga), 인듐(In), 금(Au), 및 은(Ag)으로 구성된 군으로부터 1 이상 선택될 수 있다. 상기 신호 프로브(28)는 상기 증폭 표적 핵산의 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있도록 구현되는데, 이 경우 상기 증폭 표적 핵산에 있어서, 상기 신호 프로브(28)의 상보적 결합 영역은 상기 포획 프로브(24)의 상보적 결합 영역과

상이하다. 따라서, 상기 포획 프로브(24) 및 신호 프로브(28)는 증폭 표적 핵산에 함께 상보적으로 결합할 수 있다(도 3 참조). 도 3을 참조하면, 좌측 그림은 PCR 수행 전, 즉 증폭 표적 핵산이 존재하지 않는 경우이고, 우측 그림은 PCR 수행 후, 즉 증폭 표적 핵산이 존재하는 경우인데, PCR이 진행되면서 상기 반응 챔버(23) 내부에서 표적 핵산이 증폭되면 상기 우측 그림과 같이 증폭 표적 핵산(2)은 상기 고정 층(25)에 표면 처리된 포획 프로브(24)와 상보적으로 결합하고, 아울러 금속 나노입자(27)에 연결된 신호 프로브(28)와 상보적으로 결합하여 상기 금속 나노입자(27)를 상기 고정 층(25)에 근접한 영역에 집중시킨다. 그 결과, 상기 금속 나노입자(27)는 상기 전극(26)에 도달하지 못하게 되어 상기 금속 나노입자(27)와 상기 전극(26) 간의 전류 변화(감소)를 야기하여 표적 핵산(2)의 증폭에 따른 검출 가능한 전기화학적 신호가 발생하게 된다. 한편, 상기 증폭 표적 핵산(2), 상기 포획 프로브(24), 및 상기 신호 프로브(28)는 단일 가닥 DNA일 수 있다.

[50] 상기 전극(26)은 상기 반응 챔버(23)의 적어도 일 영역에 배치되되 상기 반응 챔버(23) 내부에서 발생하는 전기화학적 신호를 검출하도록 구현된다. 상기 전극(26)은 위와 같은 기능을 수행하기 위하여 다양한 재질로 구현될 수 있지만, 예를 들어 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀(graphene), 및 탄소(Carbon)로 구성된 군으로부터 1 이상 선택될 수 있다. 또한, 상기 전극(26)은 상기 반응 챔버(23) 내부에서 발생하는 전기화학적 신호를 효율적으로 검출하기 위해 다양한 형상 및 구조로 구현될 수 있지만, 예를 들어 도 2과 같이 상기 반응 챔버(921) 내부 표면에 따라 배치되는 금속 재질의 판 형상으로 구현될 수 있다.

[51] 상기 전기화학적 신호 측정 모듈(30)은 상기 PCR 용기(20)의 전극(26)과 전기적으로 연결되어 상기 PCR 용기(20)의 반응 챔버(23) 내부에서 발생하는 전기화학적 신호를 실시간으로 측정할 수 있도록 구현된다. 상기 전기화학적 신호 측정 모듈(800)은 다양할 수 있으나, 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 및 임피던스계(impedance)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 전기화학적 신호는 상기 증폭 표적 핵산이 상기 포획 프로브(24) 및 신호 프로브(28)와 상보적으로 결합함에 따라 발생하는 전류 변화에 기인할 수 있다. 도 4는 본 발명의 제1 실시예에 따른 실시간 PCR 장치의 전기화학적 신호 발생 과정을 도시한다. 도 4에 따르면, S1 단계는 PCR 개시 전으로서, 고정 층(25, Gold matrix)에 표면 처리된 포획 프로브(24, Capture probe)과 신호 프로브(28) 및 금속 나노입자(27)를 포함하는 복합체(29, Signaling probe-AuNP)의 원 상태를 나타내고, S2 단계는 상기 전극(26, GC electrode)과 금속 나노입자(27, 노란색 입자) 간의 환원 또는 산화에 의해 발생하는 전류 변화(신호, Signal)를 나타내고,

S3 단계는 PCR 개시 후로서, 증폭 표적 핵산(2, H1N1 DNA)이 상기 포획 프로브(24, Capture probe) 및 상기 복합체(29, Signaling probe-AuNP)의 신호 프로브(28, Signaling probe)와 결합하여 전류 변화의 감소(신호 감소)를 야기하는 과정을 나타낸다. 구체적으로, 상기 복합체(29, Signaling probe-AuNP)의 금속 나노입자(27, AuNP)에 환원 전압이 가해지면, 상기 금속 나노입자(27, AuNP)는 상기 전극(26, GC electrode)의 근접 표면에 모여 축적 층을 형성하면서 환원되고(Accumulation of AuNP), 뒤이어 상기 전극(26, GC electrode)에 전압을 인가하면 상기 환원 금속 나노입자(27, AuNP)가 산화되면서(Stripping) 전류 변화, 즉 신호가 발생하고(Signal), 상기 전류 변화는 산화 전류 피크가 나타내는 전압 값으로 쉽게 측정할 수 있다(S2). 이 경우 상기 반응 챔버(23) 내부에서 전류 변화값, 즉 전기화학적 신호는 최대값을 나타낸다. 또한, 상기 전류 변화는 금속 나노입자(27, AuNP)의 종류마다 상이하기 때문에 2 이상의 금속 나노입자(27, AuNP)를 사용하는 경우 2 이상의 시료에 대한 동시 신호 검출도 가능하다. 그 후 PCR이 진행되면, 주형 핵산으로부터 표적 핵산(2, H1N1 DNA)이 증폭되고, 상기 증폭 표적 핵산(2, H1N1 DNA)은 상기 포획 프로브(24, Capture probe) 및 상기 복합체(29, Signaling probe-AuNP)의 신호 프로브(28, Signaling probe)와 상보적으로 결합(Hybridized target DNA)함으로써 위와 같이 상기 복합체(29, Signaling probe-AuNP)의 금속 나노입자(27, AuNP)의 전극 표면 축적(Accumulation of AuNP)을 방해하고, 상기 전류 값을 감소시키고, 더 나아가 PCR 주기가 진행될수록 증폭 표적 핵산(2, H1N1 DNA)의 양이 증가하면서 상기 포획 프로브(24, Capture probe) 및 상기 복합체(29, Signaling probe-AuNP)의 신호 프로브(28, Signaling probe)와의 상보적으로 결합(Hybridized target DNA) 또한 증가하여 상기 전류 값(신호)은 더욱 감소한다. 따라서, 위와 같은 전류 감소 현상, 즉 전기화학적 신호를 검출 및 측정함으로써 실시간 PCR 구현이 가능하다.

[52]

[53] 도 5는 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치를 도시한다.

[54] 도 5에 따르면, 상기 실시간 PCR 장치(1)는 기판(400) 상부에 이격 배치된 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200); 양 말단에 유입부 및 유출부가 구현된 1 이상의 반응 채널, 상기 반응 채널 내부의 일 영역에 배치되되 증폭 표적 핵산의 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 포획 프로브가 표면 처리된 고정 층, 및 상기 반응 채널 내부의 다른 일 영역에 배치되되 전기화학적 신호를 검출하도록 구현된 전극을 구비하는 것으로서, 금속 나노입자 및 상기 금속 나노입자에 연결되되 상기 증폭 표적 핵산의 다른 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 신호 프로브를 구비하는 복합체를 포함하는, 판 형상의 PCR 칩(900); 상기 PCR 칩(900)이 장착되되 상기 PCR 칩(900)의 전극(950) 말단과 전기적으로 연결되도록 구현된 연결 포트(310)를 구비하는 칩 홀더(300); 상기 PCR 칩(900)이 장착된 칩 홀더(300)를 상하 또는 좌우로 이동하여 상기 PCR 칩(900)이 상기 제1 열 블록(100) 또는 상기 제2 열 블록(200)에 열 접촉할 수 있도록 구현된 구동

수단(500, 510, 520); 및 상기 칩 홀더(300)의 연결 포트(310)와 전기적으로 연결되어 상기 PCR 칩(900)의 반응 채널(921) 내부에서 발생하는 전기화학적 신호를 실시간으로 측정하도록 구현된 전기화학적 신호 측정 모듈(800)을 포함한다.

[55] 본 발명의 일 실시예에 따른 실시간 PCR 장치(1)는 기판(400) 상부에 배치된 제1 열 블록(100) 및 상기 기판(400) 상부에 상기 제1 열 블록(100)과 이격 배치된 제2 열 블록(200)을 포함한다. 상기 기판(400)은 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200)의 가열로 인해 그 물리적 또는 화학적 성질이 변하지 않고, 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200) 간에 열 교환이 일어나지 않도록 하는 재질을 갖는 물질로 구현될 수 있다. 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200)은 핵산을 증폭하기 위한 변성 단계, 어닐링 단계 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하기 위한 온도를 유지할 수 있다. 따라서 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200)은 상기 각 단계들에 요구되는 온도를 제공하고, 이를 유지하기 위한 다양한 모듈을 포함하거나 또는 그러한 모듈과 구동가능하게 연결될 수 있다. 따라서, 상기 칩 홀더(300)에 장착된 PCR 칩(900)이 상기 각 열 블록(100, 200)의 일 면에 접촉하면 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200)은 상기 PCR 칩(900)과의 접촉 면을 전체적으로 가열할 수 있어서, 상기 PCR 칩(900) 내부에 수용된 용액을 균일하게 가열 또는 온도 유지할 수 있다. 기존의 단일 열 블록을 채용했던 실시간 PCR 장치는 단일 열 블록에서의 온도 변화율이 초당 3 내지 7℃ 범위 내에서 이루어지는데 반해, 본 발명의 일 실시예에 따른 2개의 열 블록을 포함하는 실시간 PCR 장치(1)는 각각의 열 블록(100, 200)에서의 온도 변화율이 초당 20 내지 40℃ 범위 내에서 이루어져 PCR 수행 시간을 상당히 단축할 수 있다. 또한, 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200)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 모니터하기 위한 다양한 온도 센서와 구동가능하게 연결될 수 있다. 상기 열선은 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200) 내부 온도를 전체적으로 일정하게 유지하기 위해 각각의 열 블록(100, 200) 면의 중심점을 기준으로 상하 및/또는 좌우 방향으로 대칭되도록 배치될 수 있다. 또한, 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200)은 그 내부에 박막 히터(thin film heater, 도시되지 않음)가 배치될 수 있다. 상기 박막 히터는 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200) 내부 온도를 전체적으로 일정하게 유지하기 위해 각각의 열 블록(100, 200) 면의 중심점을 기준으로 상하 및/또는 좌우 방향으로 일정한 간격으로 이격 배치될 수 있다. 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200)은 상기 PCR 칩(900)에 동일 면적의 고른 열 분포 및 신속한 열 전달을 위해 판 형상으로 구현되고, 금속 재질, 예를 들어 알루미늄 재질을 포함하거나 또는 알루미늄 재질로 구성될 수 있다. 상기 제1 열 블록(100)은 상기 변성 단계, 또는 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하기 위한 적정 온도를 유지하도록 구현될 수 있다.

예를 들어, 상기 실시간 PCR 장치(1)의 제1 열 블록(100)은 50℃ 내지 100℃를 유지할 수 있고, 바람직하게는 상기 제1 열 블록(100)에서 상기 변성 단계를 수행하는 경우 90℃ 내지 100℃를 유지할 수 있고, 바람직하게는 95℃를 유지할 수 있으며, 상기 제1 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 특정 온도 및 범위는 상기 변성 단계, 또는 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행할 수 있는 온도라면 제한되는 것은 아니다. 상기 제2 열 블록(200)은 상기 변성 단계, 또는 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행하기 위한 적정 온도를 유지하도록 구현될 수 있다. 예를 들어, 상기 실시간 PCR 장치(1)의 제2 열 블록(200)은 상기 제2 열 블록에서 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 특정 온도 및 범위는 상기 변성 단계, 또는 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행할 수 있는 온도라면 제한되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명의 제2 실시예에 따르면, 상기 제1 열 블록(100)은 PCR의 변성 단계 온도(denaturing temperature)를 유지할 수 있으며, 변성 단계 온도가 90℃보다 낮으면 주형 핵산의 변성이 일어나 수율이 떨어지거나 반응이 일어나지 않을 수도 있고, 변성 단계 온도가 100℃보다 높아지면 PCR에 사용되는 효소의 활성이 감소하거나 사라져서, 상기 변성 단계 온도는 90℃ 내지 100℃일 수 있고, 바람직하게는 95℃일 수 있다. 또한, 상기 제2 열 블록(200)은 PCR 반응의 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계 온도(annealing/extension temperature)를 유지할 수 있다. 연장 (혹은 증폭) 단계 온도가 55℃보다 낮으면 PCR 반응 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. 상기 제1 열 블록(100)과 제2 열 블록(200)은 상호 열 교환이 일어나지 않도록 미리 결정된 거리로 이격 배치된다. 이에 따라, 상기 제1 열 블록(100)과 제2 열 블록(200) 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.

[56] 상기 구동 수단(500)은 상기 PCR 칩(900)이 장착된 칩 홀더(300)를 상하 또는 좌우로 이동하여 상기 PCR 칩(900)이 상기 제1 열 블록(100) 또는 상기 제2 열 블록(200)에 각각 열 접촉할 수 있도록 구현된다. 상기 구동 수단(500)에 의해, 상기 PCR 칩(900)이 장착된 칩 홀더(300)는 상기 제1 열 블록(100)과 제2 열 블록(200) 사이에서 좌우로 왕복 운동이 가능하고, 상기 구동 수단(500)에 의해, 상기 PCR 칩(900)이 장착된 칩 홀더(300)는 상기 제1 열 블록(100)과 제2 열

블록(200)에 상하로 접촉 또는 분리될 수 있다. 도 5에 따르면, 상기 구동 수단(500)은 좌우 방향으로 연장된 레일(510), 및 상기 레일(510)을 통해 좌우 방향으로 슬라이딩 이동 가능하게 배치되고, 상하 방향으로 슬라이딩 이동 가능한 연결 부재(520)를 포함하고, 상기 연결 부재(520)의 일 말단에 상기 칩 홀더(300)가 연결 배치된다. 상기 구동 수단(500)의 좌우 및/또는 상하 이동은 상기 실시간 PCR 장치(1)의 내부 또는 외부에 구동가능하게 배치된 제어 수단(도시되지 않음)에 의해 제어될 수 있다.

[57]

[58] 실시간 PCR 장치(1)는 PCR 시료 및 시약을 수용하는 판 형상의 PCR 칩(900) 및 칩 홀더(300)를 포함하고, 상기 PCR 칩(900)은 상기 칩 홀더(300)에 탈착 가능하게 구현된다, 상기 PCR 칩(900) 및 칩 홀더(300)에 관한 상세사항은 후술한다.

[59]

[60] 도 6은 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치(1)의 구동원리를 도시한다.

[61] 도 6에 따르면, 상기 실시간 PCR 장치(1)를 이용한 핵산 증폭 반응은 아래와 같이 구현된다. 먼저, 상기 PCR 칩(900)에 예를 들어, 주형 핵산(예를 들어, 이중 가닥 DNA), 증폭하고자 하는 특정 염기 서열과 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 프라이머, DNA 중합효소, 삼인산화데옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotide triphosphates, dNTP), PCR 완충액(PCR buffer)를 포함하는 PCR 시료 및 시약을 포함하는 용액을 도입한 후, 상기 PCR 칩(900)을 상기 칩 홀더(300)에 장착한다. 뒤이어, 상기 제1 열 블록(100)을 변성 단계 온도, 예를 들어, 90℃ 내지 100℃, 바람직하게는 95℃로 가열 및 유지한다. 뒤이어 또는 이와 동시에, 상기 제2 열 블록(200)을 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 위한 온도, 예를 들어, 55℃ 내지 75℃, 바람직하게는 72℃로 가열 및 유지한다. 그 후, 상기 구동 수단(500)의 연결 부재(520)를 제어하여 상기 PCR 칩(900)을 하향 이동시켜, 상기 칩 홀더(300)에 장착된 PCR 칩(900)을 상기 제1 열 블록(100)에 접촉시켜 PCR 제1 변성 단계를 수행한다(x 단계). 뒤이어, 상기 구동 수단(500)의 연결 부재(520)를 제어하여 상기 PCR 칩(900)을 상향 이동시켜, 상기 칩 홀더(300)에 장착된 PCR 칩(900)을 상기 제1 열 블록(100)으로부터 분리시켜 PCR 제1 변성 단계를 종료하고, 상기 구동 수단(500)의 레일(510) 및 연결 부재(520)를 제어하여 상기 PCR 칩(900)을 제2 열 블록(200)의 위로 이동시킨다(y 단계). 그 후, 상기 구동 수단(500)의 연결 부재(520)를 제어하여 상기 PCR 칩(900)을 하향 이동시켜, 상기 칩 홀더(300)에 장착된 PCR 칩(900)을 상기 제2 열 블록(100)에 접촉시켜 PCR 제1 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 수행한다(z 단계). 뒤이어, 상기 구동 수단(500)의 연결 부재(520)를 제어하여 상기 PCR 칩(900)을 상향 이동시켜, 상기 칩 홀더(300)에 장착된 PCR 칩(900)을 상기 제2 열 블록(100)으로부터 분리시켜 PCR의 제1

어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계를 종료하고, 상기 구동 수단(500)의 레일(510) 및 연결 부재(520)를 제어하여 상기 PCR 칩(900)을 제1 열 블록(200)의 위로 이동시킨 후 상기 x, y, z 단계를 반복함으로써, 일정 주기로 핵산 증폭 반응을 수행한다(순환 단계).

[62]

[63] 도 7 내지 10은 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 칩(900)의 상세도이다.

[64] 상기 PCR 칩(900)은 판 형상으로서, 양 말단에 유입부(931) 및 유출부(932)가 구현된 1 이상의 반응 채널(921)로 구현되고, 상기 반응 채널(921) 내부의 일 영역에 배치되되 증폭 표적 핵산의 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 포획 프로브가 표면 처리된 고정 층(940), 및 상기 반응 채널(921) 내부의 다른 일 영역에 배치되되 전기화학적 신호를 검출하도록 구현된 전극(950)을 구비하고, 금속 나노입자 및 상기 금속 나노입자에 연결되되 상기 증폭 표적 핵산의 다른 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 신호 프로브를 구비하는 복합체를 수용한다. 이 경우 상기 반응 채널(921)은 본 발명의 제1 실시예에 따른 반응 챔버(23)의 일종으로 이해되어야 할 것이고, 상기 반응 채널(921) 내부의 일 영역에 배치되되 증폭 표적 핵산의 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 포획 프로브가 표면 처리된 고정 층(940), 및 금속 나노입자 및 상기 금속 나노입자에 연결되되 상기 증폭 표적 핵산의 다른 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 신호 프로브를 구비하는 복합체는 상술한 본 발명의 제1 실시예에서 설명한 바와 같다 할 것이다.

[65] 상기 PCR 칩(900)은 핵산, 예를 들어 PCR 시료인 주형 핵산 이중 가닥 DNA, PCR 시약인 증폭하고자 하는 특정 염기 서열과 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 프라이머, DNA 중합효소, 삼인산화데옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotide triphosphates, dNTP), PCR 완충액 (PCR reaction buffer)을 포함하는 용액을 수용할 수 있다. 상기 PCR 칩(900)은 상기 시료 및 시약을 도입하기 위한 유입부(931), 핵산 증폭 반응을 완료한 용액을 배출하기 위한 유출부(932) 및 상기 시료 및 시약의 핵산 증폭 반응이 수행되는 반응 채널(921)을 구비한다. 상기 PCR 칩(900)의 일 표면이 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200)에 열 접촉하면 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200)으로부터 열을 제공받고, 상기 PCR 칩(900)의 반응 채널(921)에 포함된 PCR 시료 및 시약은 가열 및 유지될 수 있다. 또한, 상기 PCR 칩(900)은 열 전도율을 높이고 2 이상의 반응 채널(921)을 구비할 수 있도록 전체적으로 판 형상으로 구현된다. 또한, 상기 PCR 칩(900)의 외부 구조는 상기 칩 홀더(300)로부터 이탈되지 않도록 상기 칩 홀더(300)의 내부 공간에 고정 장착되도록 구현된다. 또한, 상기 PCR 칩(900)은 투명 또는 불투명 재질의 플라스틱 재질로 구현될 수 있는데, 플라스틱 재질의 특성상 두께 조절이 용이하여 두께 조절만으로 열 전달 효율을 증대시킬 수 있고, 제작 공정이 단순하여 칩 제조 비용을 절감할 수 있다.

[66] 상기 전극(950)은 상기 반응 채널(921)의 적어도 일 영역에 배치되되 상기 반응 채널(921) 내부에서 발생하는 전기화학적 신호를 검출하도록 구현된다. 상기 전극(950)은 위와 같은 기능을 수행하기 위하여 다양한 재질로 구현될 수 있지만, 예를 들어 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀(graphene), 및 탄소(Carbon)로 구성된 군으로부터 1 이상 선택될 수 있다. 또한, 상기 전극(950)은 위와 같은 기능을 수행하기 위하여 다양한 형상 또는 구조로 구현될 수 있지만, 예를 들어 도 7과 같이 상기 반응 채널(921)의 중심 영역의 바닥에 배치되고, 그 말단이 상기 PCR 칩의 테두리 경계까지 연장되는 선 형상으로 구현될 수 있고, 더 나아가 도 8과 같이 산화 또는 환원 반응이 일어나는 지시 전극(working electrode)(950a) 및 산화 또는 환원 반응이 일어나지 않는 기준 전극(reference electrode)(950b)을 구비하는 2-전극 모듈(도 8의 우측), 또는 상기 지시 전극(950a), 상기 기준 전극(950b), 및 상기 지시 전극으로부터 발생하는 전자 밸런스를 조절하는 카운터 전극(counter electrode)(950c)을 구비하는 3-전극 모듈(도 8의 좌측)로 구현될 수 있다. 이와 같이, 상기 전극(950)의 구조가 도 8과 같이 다-전극 모듈 방식으로 구현되면, 상기 반응 채널(921) 내부에서 발생하는 전기화학적 신호의 감도를 높일 수 있을 뿐만 아니라, 발생 신호의 검출 및 측정을 용이하게 수행할 수 있다.

[67] 한편, 도 9 내지 10에 따르면, 상기 PCR 칩(900)은 수직 단면도를 기준으로 크게 3개의 층(layer)으로 구분될 수 있다. 도 9 내지 10에 따르면, 상기 PCR 칩(900)은 상기 전극(950)이 구비된 제1 판(910); 상기 제1 판(910) 상에 배치되되 상기 1 이상의 반응 채널(921)이 구비된 제2 판(920); 및 상기 제2 판(920) 상에 배치되되 상기 유입부(931) 및 유출부(932), 및 상기 포획 프로브가 표면 처리된 고정층(940)이 구비된 제3 판(930)을 포함할 수 있다.

[68] 상기 전극(950)이 구비된 제1 판(910)의 상부 면은 상기 제2 판(920)의 하부 면에 접착 배치된다. 상기 제1 판(910)이 상기 반응 채널(921)을 구비하는 제2 판(920)에 접착 배치됨으로써 상기 반응 채널(921)에 관한 공간이 확보되고, 더 나아가 상기 반응 채널(921)의 적어도 일 영역(표면)에 상기 전극(950)이 배치된다. 한편, 상기 제1 판(910)은 다양한 재질로 구현될 수 있으나, 바람직하게는 폴리디메틸실옥산(polydimethylsiloxane, PDMS), 사이클로올레핀코폴리머(cycle olefin copolymer, COC), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmetharcylate, PMMA), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리프로필렌카보네이트(polypropylene carbonate, PPC), 폴리에테르설폰(polyether sulfone, PES), 및 폴리에틸렌텔레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 및 그의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 재질일 수 있다. 또한, 상기 제1 판(910)의 상부 면은 친수성 물질(도시되지 않음)이 처리되어 PCR을 원활하게 수행할 수 있다. 상기 친수성 물질 처리에 의해 상기 제1 판(910) 상에 친수성 물질을 포함하는 단일층이 형성될 수 있다. 상기 친수성 물질은 다양한 물질일 수 있으나,

바람직하게는 카르복시기(-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.

[69] 상기 1 이상의 반응 채널(921)이 구비된 제2 판(920)의 상부 면은 상기 제3 판(930)의 하부 면과 접촉 배치된다. 상기 제2 판(920)은 상기 반응 채널(921)을 포함한다. 상기 반응 채널(921)은 상기 제3 판(910)에 형성된 유입부(931)와 유출부(932)에 대응되는 부분과 연결되어 양 말단에 유입부(931) 및 유출부(932)가 구현된 1 이상의 반응 채널(921)을 완성한다. 따라서, 상기 반응 채널(921)에 PCR 시료 및 시약이 도입된 후 PCR이 진행된다. 또한, 상기 반응 채널(921)은 본 발명의 일 실시예에 따른 PCR 장치(1)의 사용 목적 및 범위에 따라 2 이상 존재할 수 있고, 도 3에 따르면, 2개의 반응 채널(921)이 예시되고 있다. 또한, 상기 제2 판(920)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 플로라이드(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 재질일 수 있다. 또한, 상기 제2 판(920)의 두께는 다양할 수 있으나, 100 ㎛ 내지 200 ㎛에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 반응 채널(921)의 폭과 길이는 다양할 수 있으나, 바람직하게는 상기 반응 채널(921)의 폭은 0.5 mm 내지 3 mm에서 선택되고, 상기 반응 채널(921)의 길이는 20 mm 내지 40 mm에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 제2 판(920) 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.

[70] 상기 유입부(931) 및 유출부(932), 및 상기 포획 프로브가 표면 처리된 고정층(940)이 구비된 제3 판(930)의 하부 면은 상기 제2 판(920)의 상부 면에 배치된다. 상기 제3 판(930)은 상기 제2 판(920)에 형성된 반응 채널(921) 상의 일 영역에 형성된 유입부(931) 및 다른 일 영역에 형성된 유출부(932)를 구비한다. 상기 유입부(931)는 PCR 시료 및 시약이 유입되는 부분이다. 상기 유출부(932)는 PCR이 종료된 후 PCR 산물이 유출되는 부분이다. 따라서, 상기 제3 판(930)은

상기 제2 판(920)에 형성된 반응 채널(921)을 커버하되 상기 유입부(931) 및 유출부(932)는 상기 반응 채널(921)의 유입부 및 유출부 역할을 수행하게 된다. 또한, 상기 고정 층(940)의 상기 반응 채널(921)의 일 영역에 형성된다. 이 경우 상기 고정 층(940)은 상기 제1 판(910)의 전극(950)과 서로 마주보도록 배치되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 제3 판(930)은 다양한 재질로 구현될 수 있지만, 바람직하게는 폴리디메틸실옥산(polydimethylsiloxane, PDMS), 사이클로올레핀코폴리머(cycle olefin copolymer, COC), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmetharcylate, PMMA), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리프로필렌카보네이트(polypropylene carbonate, PPC), 폴리에테르설폰(polyether sulfone, PES), 및 폴리에틸렌텔레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 및 그의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 재질일 수 있다. 또한, 상기 유입부(931)은 다양한 크기를 구비할 수 있으나, 바람직하게는 지름 1.0 mm 내지 3.0 mm에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 유출부(932)는 다양한 크기를 구비할 수 있으나, 바람직하게는 지름 1.0 mm 내지 1.5 mm에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 유입부(931) 및 유출부(932)는 별도의 커버 수단(도시되지 않음)을 구비하여, 상기 반응 채널(921) 내에서 PCR 시료 및 시약에 대한 PCR이 진행될 때 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(931) 및 상기 유출부(932)는 2 이상 존재할 수 있다.

[71] 한편, 상기 PCR 칩(900)은 기계적 가공을 통해 유입부(931) 및 유출부(932)를 형성하여 제3 판(930)을 제공하는 단계; 상기 제3 판(930)의 하부 면과 대응되는 크기를 갖는 판재에 상기 제3 판(930)의 유입부(931)와 대응되는 부분으로부터 상기 제3 판(930)의 유출부(932)에 대응되는 부분까지 기계적 가공을 통해 반응 채널(921)을 형성하여 제2 판(920)을 제공하는 단계; 상기 제2 판(920)의 하부 면과 대응되는 크기를 갖는 판재의 상부 면에 표면 처리 가공을 통해 친수성 물질(922)로 구현된 표면을 형성하여 제1 판(910)을 제공하는 단계; 및 상기 제3 판(930)의 하부 면을 상기 제2 판(920)의 상부 면에 접합 공정을 통해 접합하고, 상기 제2 판(920)의 하부 면을 상기 제1 판(910)의 상부 면에 접합 공정을 통해 접합하는 단계를 포함하는 방법에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 상기 제3 판(930)의 유입부(931) 및 유출부(932), 및 상기 제2 판(920)의 반응 채널(921)은 사출성형, 핫-엠보싱(hot-embossing), 캐스팅(casting), 및 레이저 어블레이션(laser ablation)으로 구성된 군으로부터 선택되는 가공 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한, 상기 제1 판(910) 표면의 친수성 물질(922)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(930)의 하부 면과 상기 제2 판(920)의 상부 면, 및 상기 제2 판(920)의

하부 면과 상기 제1 판(910)의 상부 면은 열 접합, 초음파 융착, 용매 접합 공정에 의해 접착될 수 있고 당 업계에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 제3 판(930)과 제2 판(920) 사이 및 상기 제2 판(920)과 제3 판(910) 사이에는 양면 접착제 또는 열가소성 수지 또는 열 경화성 수지(500)가 처리될 수 있다.

[72]

[73] 도 11은 본 발명의 제2 실시예에 따른 칩 홀더를 도시한다.

[74] 도 11에 따르면, 상기 칩 홀더(300)는 상기 PCR 칩(900)이 장착되되 상기 PCR 칩(900)의 전극(950) 말단과 전기적으로 연결되도록 구현된 연결 포트(310)를 구비한다. 상기 칩 홀더(300)는 상기 PCR 칩(900)이 상기 PCR 장치(1)에 장착되는 부분이다. 상기 칩 홀더(300)의 내벽은 판 형상을 갖는 PCR 칩(900)이 상기 칩 홀더(300)로부터 이탈하지 않도록 상기 PCR 칩(900)의 외벽과 고정 장착되기 위한 형상 및 구조를 가질 수 있다. 즉, 상기 PCR 칩(900)이 상기 칩 홀더(300)에 장착되는 경우 상기 PCR 칩(900)의 전극(950) 말단은 상기 칩 홀더(300)의 연결 포트(310)와 전기적으로 연결되어 상기 PCR 칩(900)의 반응 채널(921) 내부에서 증폭 표적 핵산과 포획 프로브 및 신호 프로브와의 결합으로 인해 발생하는 전기화학적 신호가 전기화학적 신호 측정 모듈(800)로 전달된다. 한편, 상기 PCR 칩(900)은 상기 칩 홀더(300)와 탈착 가능하다. 또한, 상기 칩 홀더(300)는 상기 구동 수단(500), 구체적으로 상기 연결 부재(520)의 말단에 연결되어 상기 실시간 PCR 장치(1) 내부에서 상하 또는 좌우로 이동할 수 있다.

[75]

[76] 도 12는 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치의 전기화학적 신호 측정 모듈의 배치도이다.

[77] 도 12에 따르면, 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치(1)는 상기 칩 홀더(300)의 연결 포트(310)와 전기적으로 연결되어 상기 PCR 칩(900)의 반응 채널(921) 내부에서 발생하는 전기화학적 신호를 실시간으로 측정하도록 구현된 전기화학적 신호 측정 모듈(800)을 포함한다. 상기 전기화학적 신호 측정 모듈(800)은 상기 칩 홀더(300)의 연결 포트(310)와 전기적 연결 수단(700), 예를 들어 리드 전선을 통해 전기 소통가능하게 연결될 수 있다. 따라서, 상기 PCR 칩(900)의 반응 채널(921) 내부에서 발생된 전기화학적 신호는 상기 PCR 칩(900)의 전극(950)을 통해 검출되고, 상기 검출된 신호는 상기 칩 홀더(300)의 연결 포트(310)와 상기 전기적 연결 수단(700)을 경유하여 상기 전기화학적 신호 측정 모듈(800)에서 측정되고 더 나아가 가공 또는 분석될 수 있다. 상기 전기화학적 신호 측정 모듈(800)은 다양할 수 있으나, 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 및 임피던스계(impedance)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[78]

[79] 도 13은 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치를 이용하여 실시간 PCR을 수행하는 방법을 각 단계별로 도시한다.

[80] 도 13에 따르면, 상기 실시간 PCR 방법은 상술한 실시간 PCR 장치(1)를 제공하는 단계; 주형 핵산을 포함하는 PCR 시료 및 상기 활성물질을 포함하는 PCR 시약을 상기 PCR 칩(900)의 반응 채널(921)에 주입하는 단계; 상기 PCR 칩(900)의 전극(950) 말단이 상기 연결 포트(310)에 전기적으로 연결되도록 상기 PCR 시료 및 PCR 시약이 주입된 PCR 칩(900)을 상기 칩 홀더(300)에 장착하는 단계; 상기 구동 수단(500)을 가동하여 상기 칩 홀더(300)에 장착된 PCR 칩(900)이 PCR의 변성 단계 온도 및 PCR의 어닐링 및 연장(혹은 증폭) 단계 온도를 각각 유지하는 상기 제1 열 블록(100) 및 상기 제2 열 블록(200)에 반복적으로 열 접촉하여 PCR을 수행하는 단계; 및 상기 PCR 수행 중 상기 PCR 칩(900) 내부에서 증폭 표적 핵산과 상기 포획 프로브 및 신호 프로브와의 결합으로 인해 발생하는 전기화학적 신호를 실시간으로 검출 및 측정하는 단계를 포함한다.

[81] 실시간 PCR 장치 제공 단계(S1)는 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치(1)를 준비하는 단계이다. 따라서, 이하 상기 실시간 PCR 방법은 본 발명의 제2 실시예에 따른 실시간 PCR 장치(1)의 구동을 전제로 한다. 이 경우 금속 나노입자와 신호 프로브를 포함하는 복합체(metal-probe)는 이미 상기 실시간 PCR 장치(1)의 반응 챔버(921)에 수용된 상태일 수 있다.

[82] 시료 및 시약 주입 단계(S2)는 상기 PCR 칩(900)에 PCR 시료 및 시약를 주입하는 단계이다. 이 경우 상기 S1 단계에서 상기 복합체(metal-probe)가 상기 실시간 PCR 장치(1)의 반응 챔버(921)에 수용되지 않았다면, 본 단계에서 금속 나노입자와 신호 프로브를 포함하는 복합체(metal-probe)를 본 단계에서 상기 실시간 PCR 장치(1)의 반응 챔버(921)에 수용할 수 있음은 물론이다.

[83] PCR 칩 장착 단계(S3)는 상기 PCR 시료 및 시약이 수용된 PCR 칩(900)을 상기 실시간 PCR 장치(1)의 칩 홀더(300)에 장착하는 단계이다. 이 경우 전기화학적 신호 검출을 위해 상기 PCR 칩(900)의 전극(950)이 상기 칩 홀더(300)의 연결 포트(310)와 전기적으로 연결되어야 한다.

[84] PCR 단계(S4)는 상기 제1 열 블록(100) 및 제2 열 블록(200)을 가열 유지하고, 상기 구동 수단(500)을 가동하여 상기 PCR 칩(900)의 반응 채널(921)에서 PCR이 수행되는 단계이다. 이 경우 상기 반응 채널(921) 내부에서 주형 핵산을 기초로 표적 핵산 부위가 증폭되고, 표적 핵산 부위의 연속적인 증폭에 따라 증폭 표적 핵산과 포획 프로브 및 신호 프로브 간의 결합이 증가하면서 전류 값 변화에 의한 전기화학적 신호가 발생한다.

[85] 전기화학적 신호 검출 및 측정 단계(S5)는 상기 S4 단계에서 핵산의 연속적인 증폭에 의해 발생한 전기화학적 신호(전류값 변화)를 상기 PCR 칩(900)의 전극(950), 상기 칩 홀더(300)의 연결 포트(310), 상기 전기적 연결 수단(700), 및

상기 전기화학적 신호 측정 모듈(800)을 통해 검출 및 측정하는 단계이다. 이 경우 상기 전기화학적 신호 검출 및 측정 시점은 다양할 수 있으나, 핵산이 증폭되는 시점에 맞춰 상기 칩 홀더(300)에 장착된 PCR 칩(900)이 PCR의 연장 (혹은 증폭) 단계 온도를 유지하는 열 블록(제1 열 블록 또는 제2 열 블록)과 열 접촉하는 시점 또는 열 접촉 직후 시점이 바람직하다. 이 경우 열 접촉 직후 시점이라 함은 상기 칩 홀더(300)에 장착된 PCR 칩(900)이 PCR의 연장 (혹은 증폭) 단계 온도를 유지하는 열 블록에 열 접촉한 후 상기 구동 수단(500)을 통해 다른 열 블록으로 이동하는 시점뿐만 아니라 상기 칩 홀더(300)에 장착된 PCR 칩(900)이 PCR의 연장 (혹은 증폭) 단계 온도를 유지하는 열 블록에 열 접촉한 상태에서 그 열 블록의 온도가 하강하는 시점, 예를 들어 72℃에서 60℃로 하강하는 시점일 수 있다. 따라서, 본 단계에서 증폭 핵산의 실시간 확인이 가능하게 된다.

[86]

[87] 실시예

[88] 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 장치(1)를 사용하여 핵산 증폭 반응을 수행하였다. 본 발명의 제2 실시예에 따른 PCR 장치(1)에 있어서, 상기 PCR 칩(900)은 플라스틱 재질의 판 형상으로 3개의 반응 채널(921) 및 이의 말단에 각각 연결된 전극(950)을 구비하되, 상기 전극(950)은 탄소 나노튜브(carbon nanotube) 및 은(Ag)을 이용하여 제작하였고, 상기 전기화학적 신호 측정 모듈(800)은 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV)를 채용하였으며, 상기 금속 나노물질로서 금(Au)을 사용했다. 한편, 상기 양극 벗김 전압전류계의 전기화학적 신호의 검출 조건을 아래와 같이 전제하였다.

[89] - Preconcentration step : accumulation at -0.5 V 50초

[90] - Stripping step : - 0.5 V → 0.5 V, step potential of 2 mV, amplitude of 25 mV, and frequency of 25 Hz

[91]

[92] PCR 시료로서 신종플루 바이러스의 이중 가닥 주형 DNA(template ds-DNA) 0.1 ng/㎕을 준비하고, PCR 시약으로서 상기 주형 DNA에 상보적으로 결합할 수 있는 프라이머 쌍, 구체적으로 포워드 프라이머(forward primer, 0.125 ㎕, 1pmole), 리버스 프라이머(reverse primer, 0.125 ㎕, 1pmole), dNTP 0.2 ㎖, 중합효소(i-starmax II polymerase, iNtRON Biotechnology) 0.2 ㎖, PCR 버퍼(pH 9, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 30 mM salt) 등을 준비한 후, 상기 PCR 시료 및 시약 용액을 상기 PCR 칩(900)에 도입하고, 상기 PCR 칩(900)을 상기 칩 홀더(300)에 장착하였다. 한편, 상기 제1 열 블록(100)을 95℃, 즉 허용 온도 범위는 90℃ 내지 100℃로 가열 및 온도 유지하고, 상기 제2 열 블록(200)을 72℃, 즉 허용 온도 범위는 55℃ 내지 75℃로 가열 및 온도 유지하였다. 그 후 40 순환(cycle)의 PCR을 수행하기 위해 PCR 장치(1)를 구동하였다(Pre-denaturation, 95 ℃, 30 sec, 1회; Denaturation 95 ℃, 4 sec, 40회; Annealing & Extension 72 ℃, 30

sec, 40회). 상기 PCR 장치(1)가 구동됨에 따라 1 순환 단계마다 핵산 증폭 여부를 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV)로 측정하였다. 그 결과, 핵산 증폭 단계에 따라 전류의 피크 값 변화(감소)가 감지되었고, PCR 완료 후 최종 산물을 전기영동 한 결과, 반응 채널(921) 모두에서 증폭 표적 핵산을 확인할 수 있었다. 도 14 내지 16은 상기 실시간 PCR 방법을 수행한 결과 그래프이고, 도 17 내지 18은 상기 실시간 PCR 방법을 수행한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다. 구체적으로, 도 14는 PCR 주기에 따른 금(Au) 나노입자에 의한 ASV peak 신호 변화에 관한 실측 그래프이고, 도 15 내지 16은 도 14를 순차 개념 및 증폭 개념으로 각각 정량화한 가공 그래프이다.

청구범위

[청구항 1] 1 이상의 열 블록;
상기 1 이상의 열 블록과 접촉하는 열 블록 접촉 영역을 구비하는 하우징, 상기 하우징 내부에 형성된 반응 챔버, 상기 반응 챔버 내부의 일 영역에 배치되되 증폭 표적 핵산의 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 포획 프로브가 표면 처리된 고정 층, 및 상기 반응 챔버 내부의 다른 일 영역에 배치되되 전기화학적 신호를 검출하도록 구현된 전극을 구비하는 것으로서, 금속 나노입자 및 상기 금속 나노입자에 연결되되 상기 증폭 표적 핵산의 다른 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 신호 프로브를 구비하는 복합체가 수용된, PCR 용기; 및
상기 PCR 용기의 전극과 전기적으로 연결되어 상기 PCR 용기의 반응 챔버 내부에서 발생하는 전기화학적 신호를 실시간으로 측정하도록 구현된 전기화학적 신호 측정 모듈;
을 포함하는, 실시간 PCR 장치.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 금속 나노입자는 아연(Zn), 카드뮴(Cd), 납(Pb), 구리(Cu), 갈륨(Ga), 인듐(In), 금(Au), 및 은(Ag)으로 구성된 군으로부터 1 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 전기화학적 신호는 상기 증폭 표적 핵산이 상기 포획 프로브 및 상기 복합체의 신호 프로브와 상보적으로 결합함에 따라 발생하는 전류 변화에 기인하는 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 전극은 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀(graphene), 및 탄소(Carbon)로 구성된 군으로부터 1 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 증폭 표적 핵산, 상기 포획 프로브, 및 상기 신호 프로브는 단일 가닥 DNA인 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 전기화학적 신호 측정 모듈은 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 펄스

전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 및
임피던스계(impedance)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을
특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 7] 기판 상부에 이격 배치된 제1 열 블록 및 제2 열 블록;
양 말단에 유입부 및 유출부가 구현된 1 이상의 반응 채널, 상기 반응 채널 내부의 일 영역에 배치되되 증폭 표적 핵산의 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 포획 프로브가 표면 처리된 고정 층, 및 상기 반응 채널 내부의 다른 일 영역에 배치되되 전기화학적 신호를 검출하도록 구현된 전극을 구비하는 것으로서, 금속 나노입자 및 상기 금속 나노입자에 연결되되 상기 증폭 표적 핵산의 다른 일 영역과 상보적으로 결합할 수 있는 신호 프로브를 구비하는 복합체를 포함하는, 판 형상의 PCR 칩;
상기 PCR 칩이 장착되되 상기 PCR 칩의 전극 말단과 전기적으로 연결되도록 구현된 연결 포트를 구비하는 칩 홀더;
상기 PCR 칩이 장착된 칩 홀더를 상하 또는 좌우로 이동하여 상기 PCR 칩이 상기 제1 열 블록 또는 상기 제2 열 블록에 열 접촉할 수 있도록 구현된 구동 수단; 및
상기 칩 홀더의 연결 포트와 전기적으로 연결되어 상기 PCR 칩의 반응 채널 내부에서 발생하는 전기화학적 신호를 실시간으로 측정하도록 구현된 전기화학적 신호 측정 모듈;
을 포함하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 금속 나노입자는 아연(Zn), 카드뮴(Cd), 납(Pb), 구리(Cu), 갈륨(Ga), 인듐(In), 금(Au), 및 은(Ag)으로 구성된 군으로부터 1 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 전기화학적 신호는 상기 증폭 표적 핵산이 상기 포획 프로브 및 상기 복합체의 신호 프로브와 상보적으로 결합함에 따라 발생하는 전류 변화에 기인하는 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 전극은 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀(graphene), 및 탄소(Carbon)로 구성된 군으로부터 1 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 11] 제7항에 있어서,
상기 전극은 산화 또는 환원 반응이 일어나는 지시 전극(working electrode) 및 산화 또는 환원 반응이 일어나지 않는 기준

전극(reference electrode)을 구비하는 2-전극 모듈, 또는 상기 지시 전극, 상기 기준 전극, 및 상기 지시 전극으로부터 발생하는 전자 밸런스를 조절하는 카운터 전극(counter electrode)을 구비하는 3-전극 모듈로 구현되는 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 전기화학적 신호 측정 모듈은 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 및 임피던스계(impedance)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 13] 제7항에 있어서,
상기 제1 열 블록 및 제2 열 블록은 상기 제1 열 블록 및 제2 열 블록의 온도를 전체적으로 일정하게 유지하기 위해 각 열 블록의 중심점을 기준으로 상하 및/또는 좌우 방향으로 대칭되도록 내부에 열선이 배치된 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 14] 제7항에 있어서,
상기 제1 열 블록 및 상기 제2 열 블록 중 어느 하나는 PCR의 변성 단계 온도를 유지하고, 다른 하나는 PCR의 어닐링 및 연장 (혹은 증폭) 단계 온도를 유지하도록 구현된 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 변성 단계 온도는 90℃ 내지 100℃이고, 상기 연장 (혹은 증폭) 단계 온도는 55℃ 내지 75℃인 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 16] 제7항에 있어서,
상기 제1 열 블록과 제2 열 블록은 상호 열 교환이 일어나지 않도록 미리 결정된 거리로 이격 배치된 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

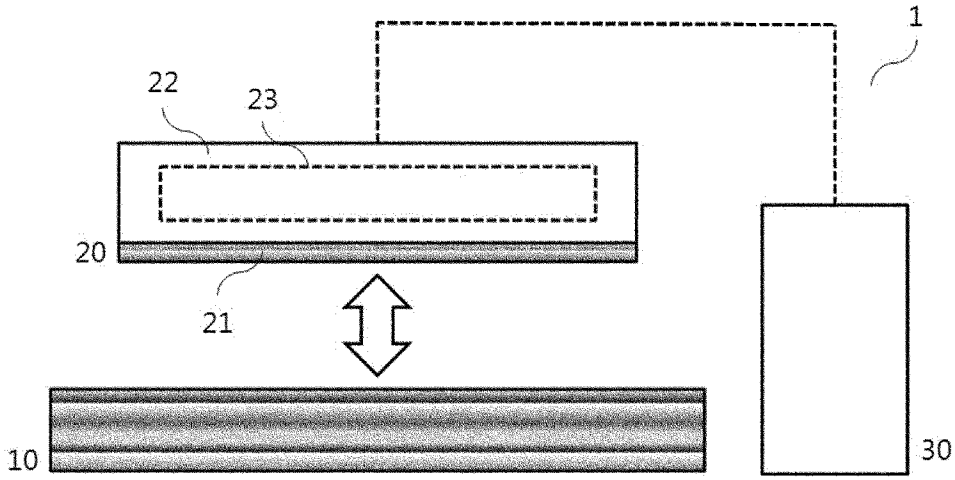
[청구항 17] 제7항에 있어서,
상기 구동 수단은 좌우 방향으로 연장된 레일, 및 상기 레일을 통해 좌우 방향으로 슬라이딩 이동가능하게 배치되고 상하 방향으로 슬라이딩 이동 가능한 연결 부재를 포함하고, 상기 연결 부재의 일 말단에는 상기 칩 홀더가 배치된 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 18] 제7항에 있어서,
상기 PCR 칩은 상기 칩 홀더에 탈착 가능하게 구현된 것을

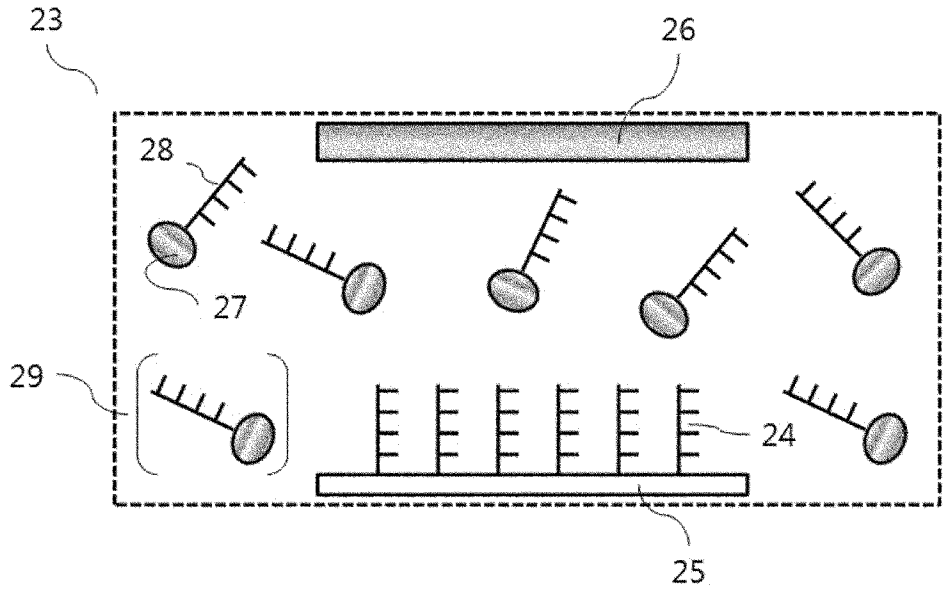
특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

[청구항 19] 제7항에 있어서,
상기 PCR 칩은 상기 전극이 구비된 제1 판; 상기 제1 판 상에 배치되되 상기 1 이상의 반응 채널이 구비된 제2 판; 및 상기 제2 판 상에 배치되되 상기 유입부 및 유출부, 및 상기 포획 프로브가 표면 처리된 고정 층이 구비된 제3 판을 포함하는 것을 특징으로 하는 실시간 PCR 장치.

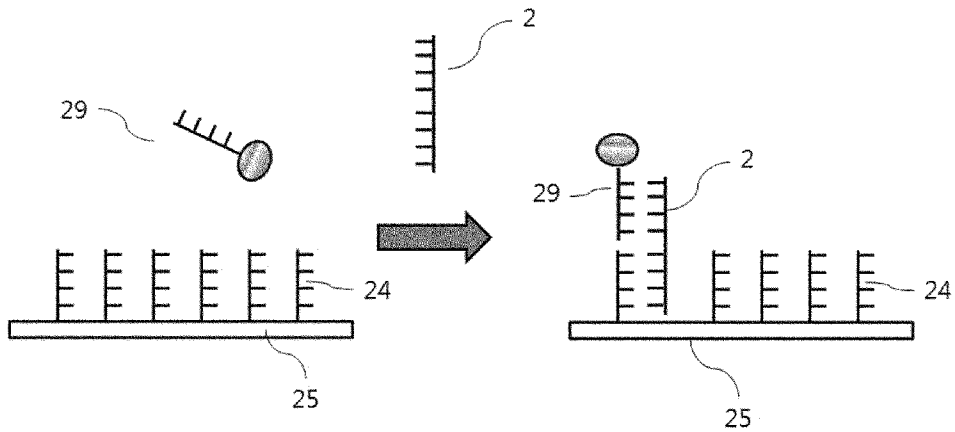
[Fig. 1]



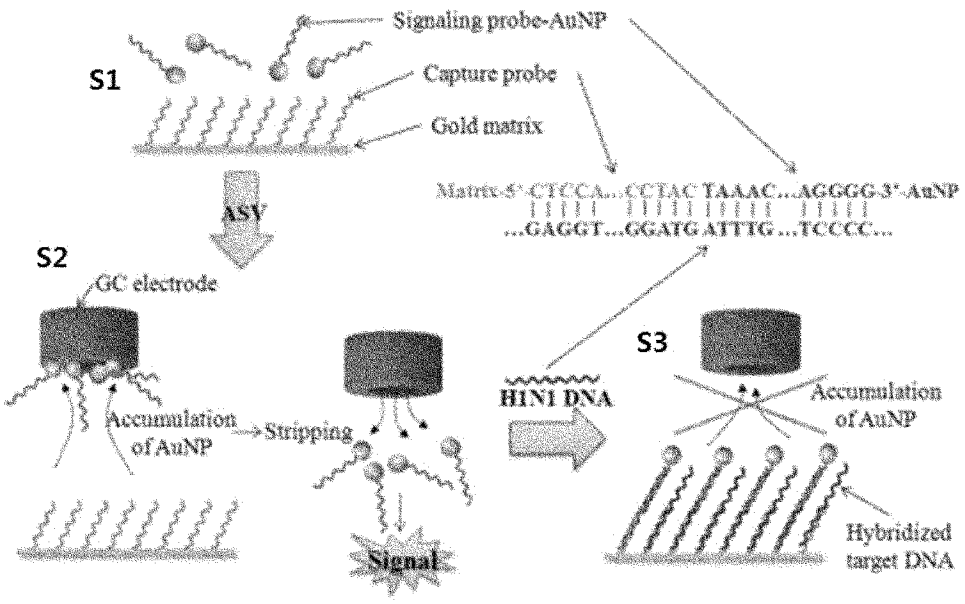
[Fig. 2]



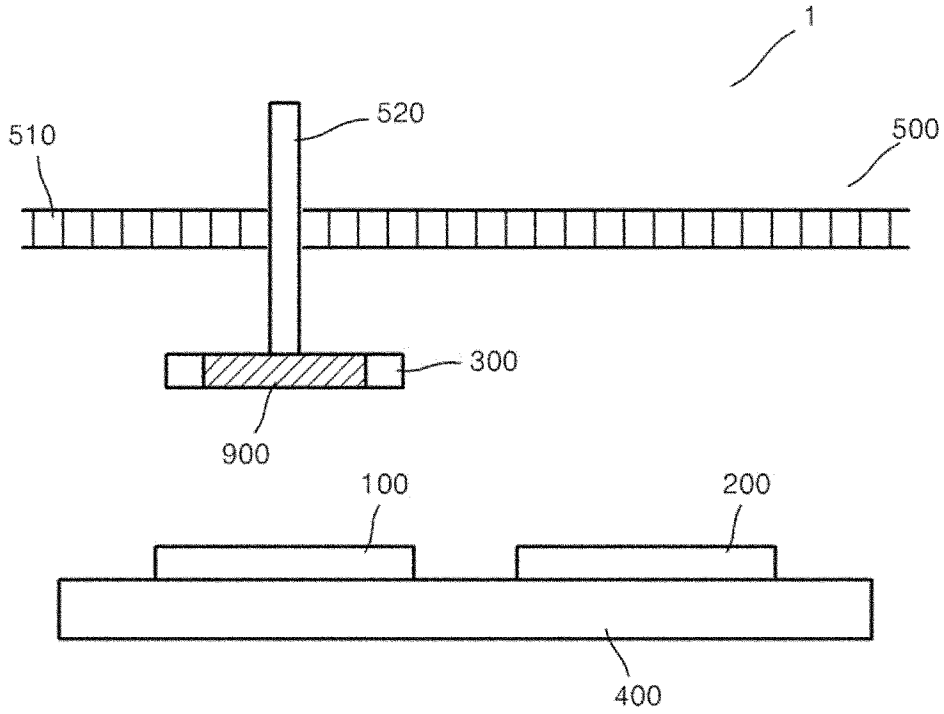
[Fig. 3]



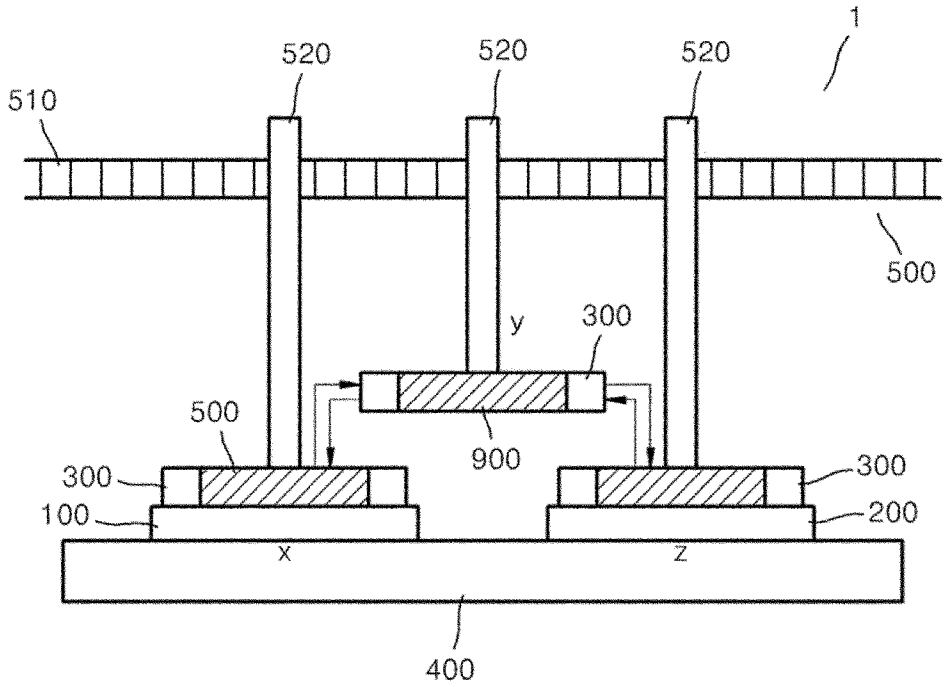
[Fig. 4]


Signaling probe-AuNP
S1
Capture probe
Gold matrix
Matrix-5'-CTCCA…CCTAC TAAAC…AGGGG-3'-AuNP
…GAGGT…GGATG ATTTG …TCCCC…
ASV
S2
GC electrode
Accumulation of AuNP
Stripping
Signal
H1N1 DNA
S3
Accumulation of AuNP
Hybridized target DNA

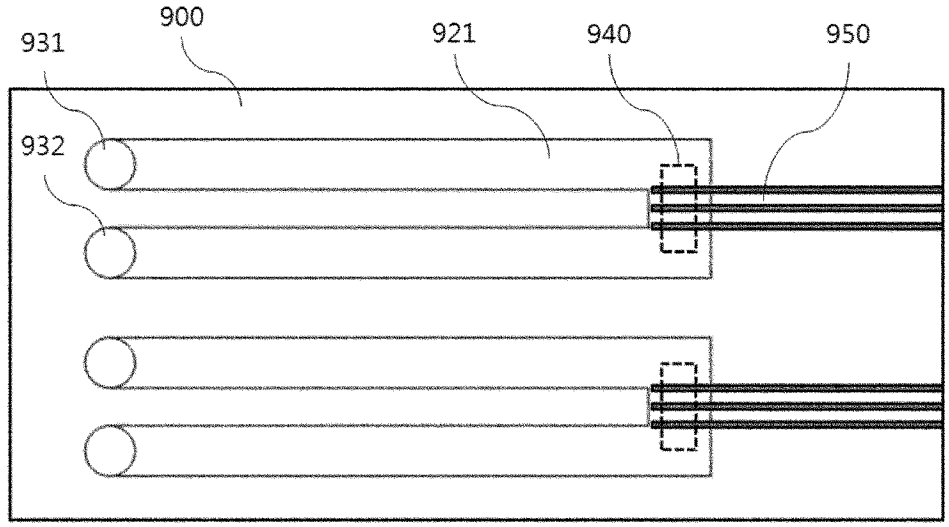
[Fig. 5]


1
510
520
500
300
900
100
200
400

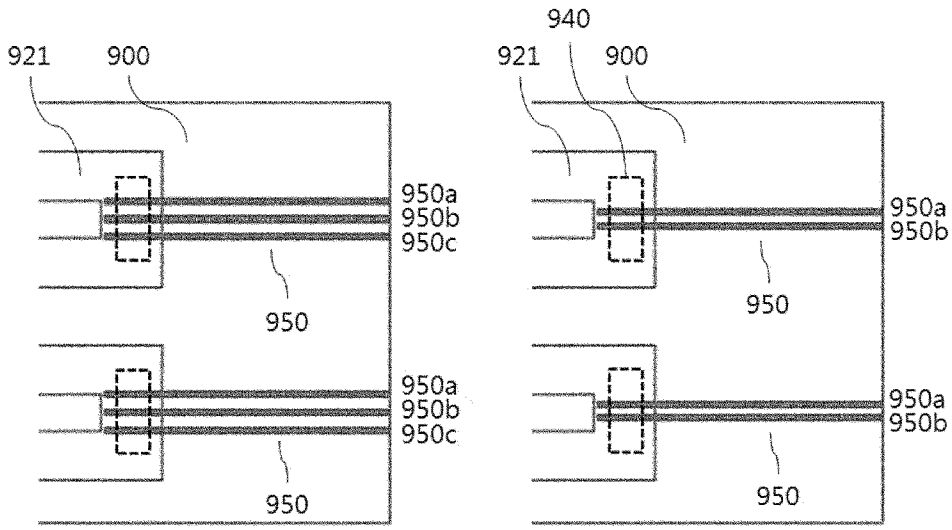
[Fig. 6]



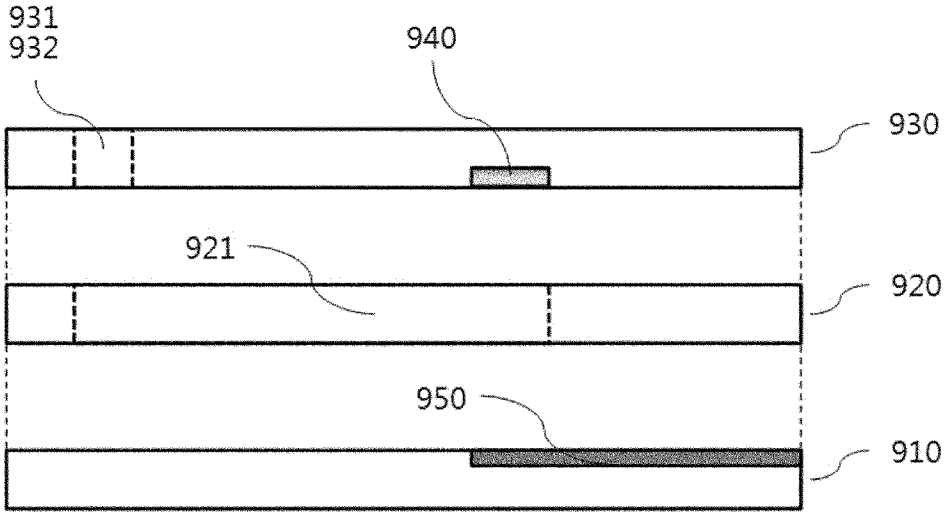
[Fig. 7]



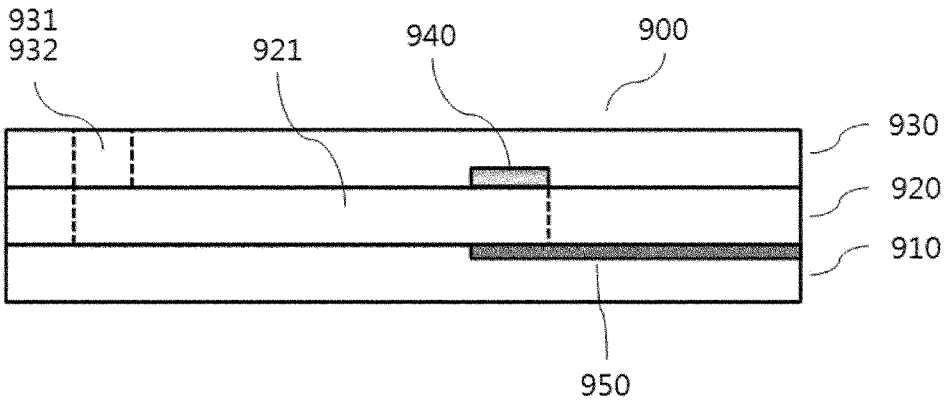
[Fig. 8]



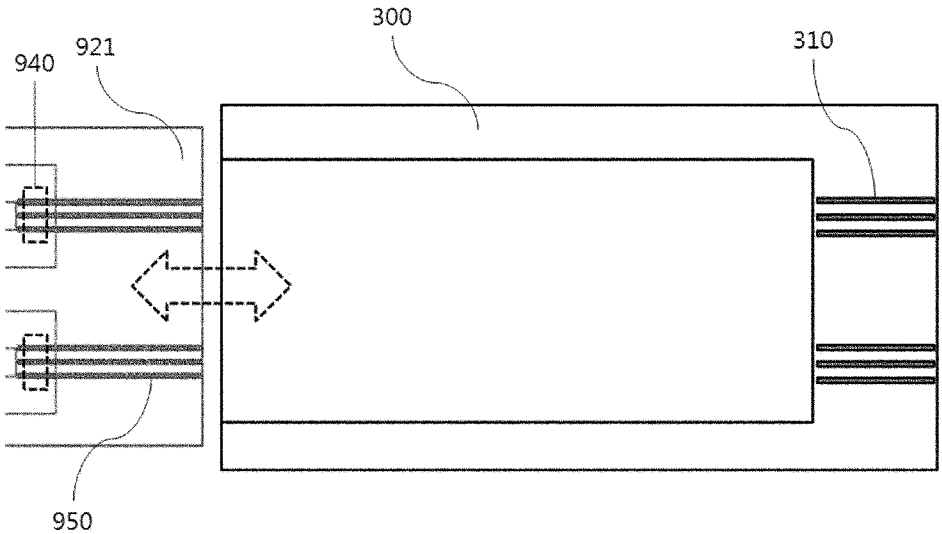
[Fig. 9]



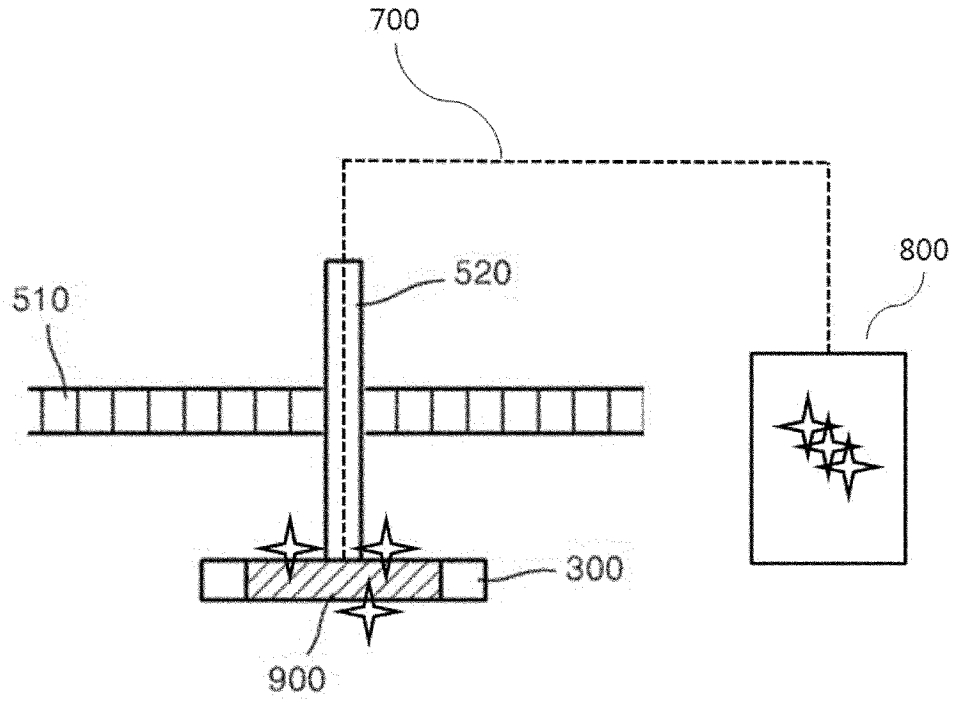
[Fig. 10]



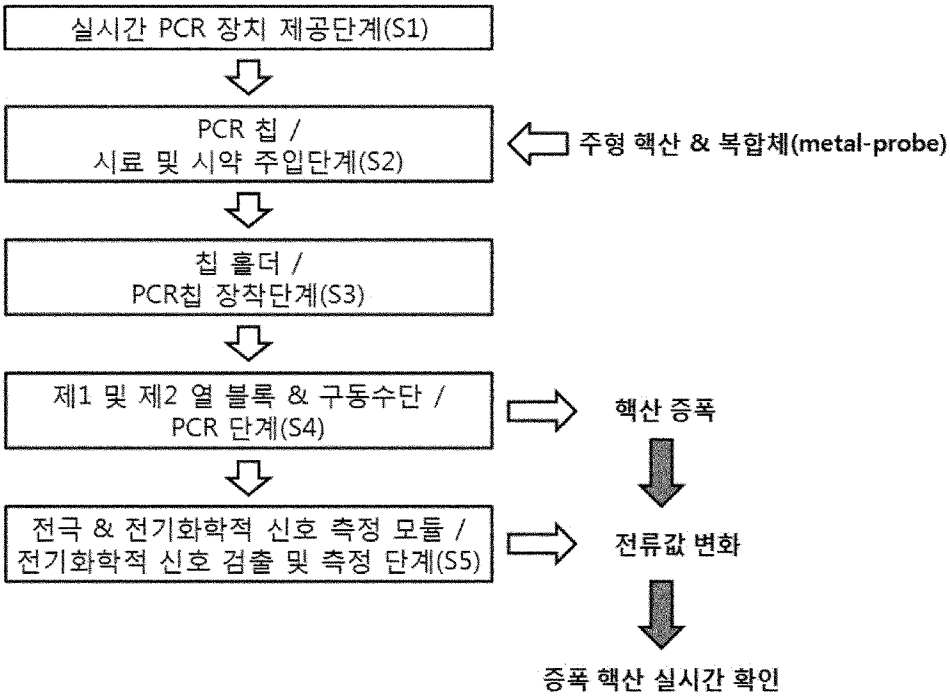
[Fig. 11]



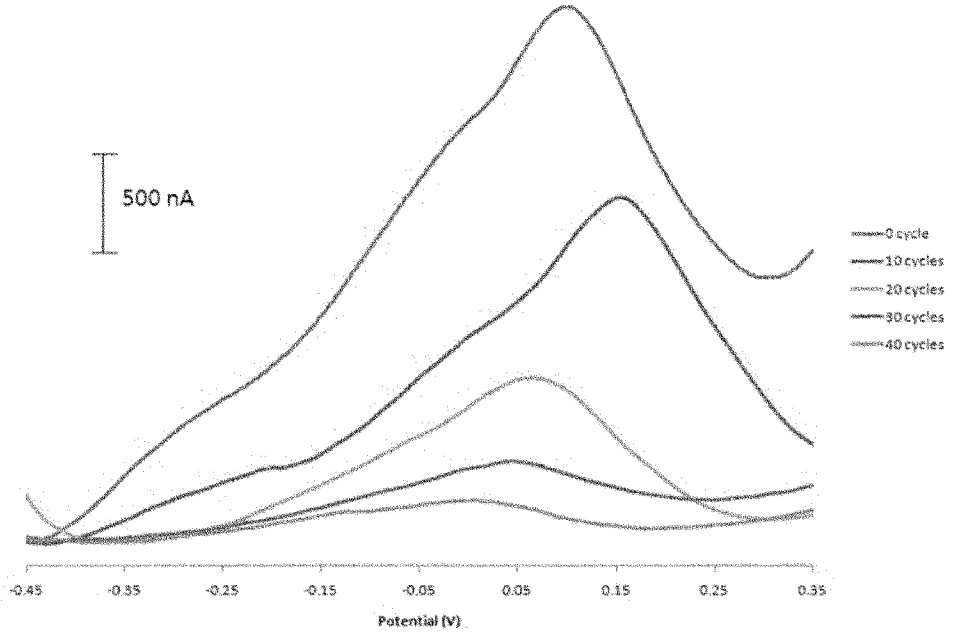
[Fig. 12]


700
800
520
510
300
900

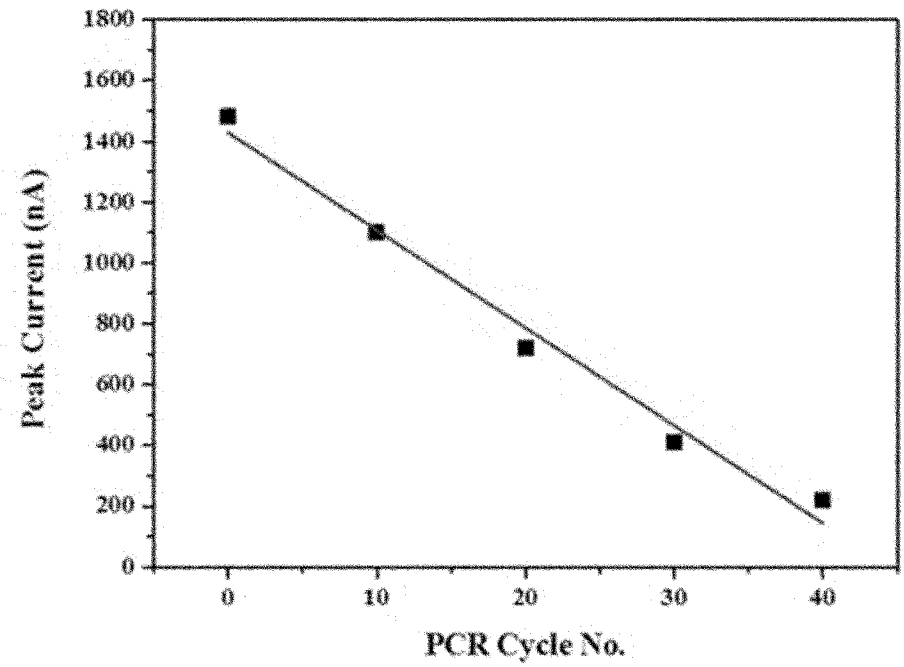
[Fig. 13]


실시간 PCR 장치 제공단계(S1)
PCR 칩 /
시료 및 시약 주입단계(S2)
주형 핵산 & 복합체(metal-probe)
칩 홀더 /
PCR칩 장착단계(S3)
제1 및 제2 열 블록 & 구동수단 /
PCR 단계(S4)
핵산 증폭
전극 & 전기화학적 신호 측정 모듈 /
전기화학적 신호 검출 및 측정 단계(S5)
전류값 변화
증폭 핵산 실시간 확인

[Fig. 14]

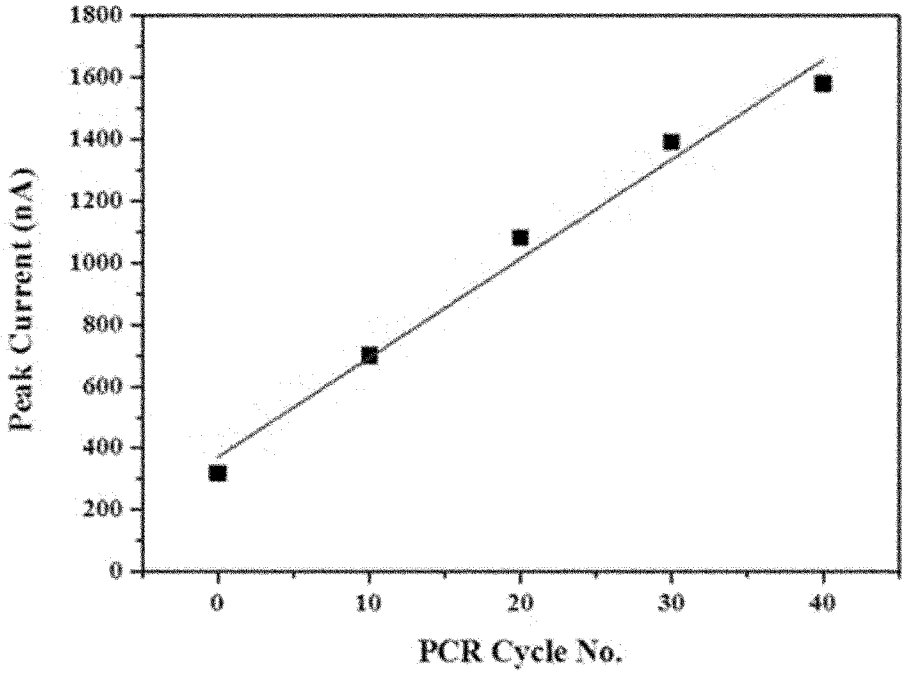


[Fig. 15]



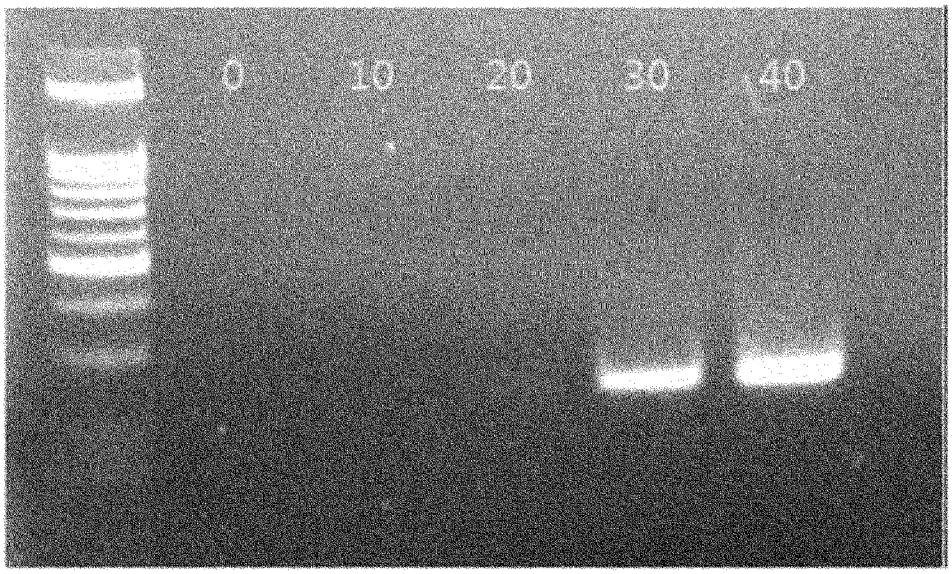
Cycle	0	10	20	30	40
Current(nA)	1480	1100	720	410	220

[Fig. 16]

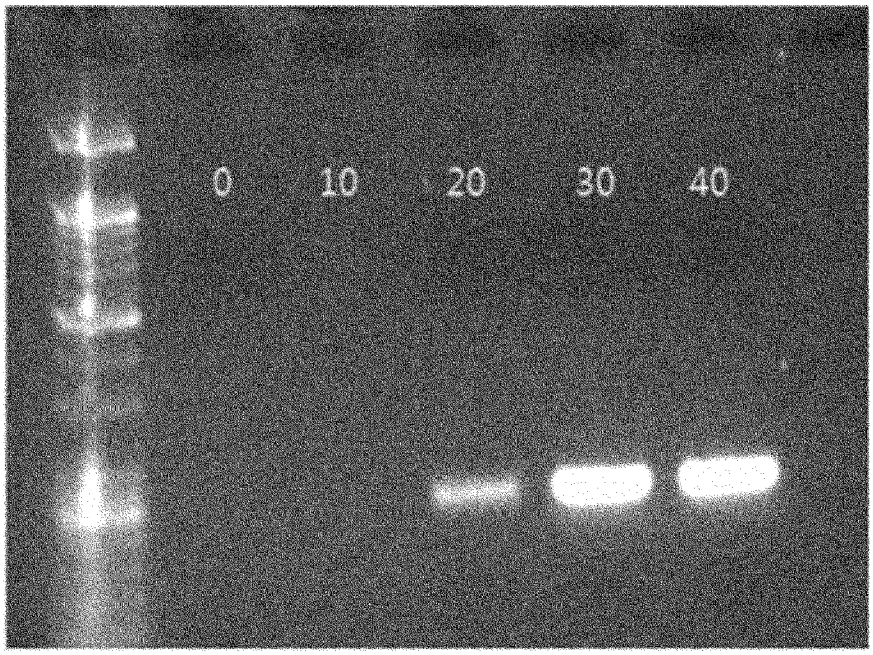


Cycle	0	10	20	30	40
Current(nA)	320	700	1080	1390	1580

[Fig. 17]



[Fig. 18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/006387

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 27/26(2006.01)i, C12M 3/00(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 27/30(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 27/26; C12M 1/00; C12N 15/10; G06F 19/20; C12Q 1/68; C12M 1/34; C12M 3/00; G01N 27/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: PCR, template nucleic acid, electrode, capture probe, signal probe, measurement module

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-0668320 B1 (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) 12 January 2007 See abstract, pages 4-6, claims 1, 6 and 22 and figures 1-8.	1-19
A	KR 10-1091906 B1 (SAMSUNG TECHWIN CO.,LTD.) 08 December 2011 See paragraphs [0022]-[0031] and claim 1.	1-19
A	KR 10-0488281 B1 (AHRAM BIOSYSTEMS INC.) 10 May 2005 See abstract, page 5, line 24 - page 6, line 8 and figures 1, 2a-2b and 3a-3b.	1-19
A	US 2002-0072054 A1 (MILES, Robin R. et al.) 13 June 2002 See abstract, paragraphs [0015]-[0020] and figure 1.	1-19
A	KR 10-2003-0073255 A (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) 19 September 2003 See abstract, page 2, line 51 - page 3, line 28 and figures 1-2.	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 OCTOBER 2013 (23.10.2013)	**24 OCTOBER 2013 (24.10.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2013/006387

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0668320 B1	12/01/2007	EP 1541237 A2	15/06/2005
		EP 1541237 A3	01/02/2006
		US 2005-0130183 A1	16/06/2005
		US 2005-0164281 A1	28/07/2005
		US 2010-0311070 A1	09/12/2010
		US 7767439 B2	03/08/2010
		US 7799557 B2	21/09/2010
KR 10-1091906 B1	08/12/2011	KR 2007-0037525 A	05/04/2007
KR 10-0488281 B1	10/05/2005	CN 101003825 A	25/07/2007
		CN 101003825 B	22/08/2012
		CN 1571849 A	26/01/2005
		EP 1434880 A1	07/07/2004
		EP 1434880 B1	03/01/2007
		JP 2005-516588 A	09/06/2005
		JP 2009-100761 A	14/05/2009
		US 2004-0152122 A1	05/08/2004
		US 2004-0191830 A1	30/09/2004
		US 2010-0086975 A1	08/04/2010
		US 2010-0285536 A1	11/11/2010
		US 2012-0021463 A1	26/01/2012
		US 7488595 B2	10/02/2009
		US 7628961 B2	08/12/2009
		US 8053215 B2	08/11/2011
		WO 03-025226 A1	27/03/2003
		WO 03-038127 A1	08/05/2003
US 2002-0072054 A1	13/06/2002	US 2005-0136466 A1	23/06/2005
		US 7157232 B2	02/01/2007
KR 10-2003-0073255 A	19/09/2003	AU 2002-367763 A1	22/09/2003
		CN 1511194 A	07/07/2004
		EP 1483402 A1	08/12/2004
		JP 2005-518825 A	30/06/2005
		US 2005-0112754 A1	26/05/2005
		WO 03-076661 A1	18/09/2003

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/006387

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 27/26(2006.01)i, C12M 3/00(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 27/30(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 27/26; C12M 1/00; C12N 15/10; G06F 19/20; C12Q 1/68; C12M 1/34; C12M 3/00; G01N 27/30

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: PCR, 주형 핵산, 전극, 포획 프로브, 신호 프로브, 측정 모듈

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-0668320 B1 (삼성전자주식회사) 2007.01.12 요약, 페이지 4-6, 청구항 1,6,22 및 도면 1-8 참조.	1-19
A	KR 10-1091906 B1 (삼성테크윈 주식회사) 2011.12.08 문단 [0022]-[0031] 및 청구항 1 참조.	1-19
A	KR 10-0488281 B1 (아람 바이오시스템 주식회사) 2005.05.10 요약, 페이지 5, 라인 24 - 페이지 6, 라인 8 및 도면 1,2a-2b,3a-3b 참조.	1-19
A	US 2002-0072054 A1 (ROBIN R. MILES 외 2명) 2002.06.13 요약, 문단 [0015]-[0020] 및 도면 1 참조.	1-19
A	KR 10-2003-0073255 A (삼성전자주식회사) 2003.09.19 요약, 페이지 2, 라인 51 - 페이지 3, 라인 28 및 도면 1-2 참조.	1-19

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 10월 23일 (23.10.2013)	2013년 10월 24일 (24.10.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김진호
전화번호 +82-42-481-8699

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/006387

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0668320 B1	2007/01/12	EP 1541237 A2	2005/06/15
		EP 1541237 A3	2006/02/01
		US 2005-0130183 A1	2005/06/16
		US 2005-0164281 A1	2005/07/28
		US 2010-0311070 A1	2010/12/09
		US 7767439 B2	2010/08/03
		US 7799557 B2	2010/09/21
KR 10-1091906 B1	2011/12/08	KR 2007-0037525 A	2007/04/05
KR 10-0488281 B1	2005/05/10	CN 101003825 A	2007/07/25
		CN 101003825 B	2012/08/22
		CN 1571849 A	2005/01/26
		EP 1434880 A1	2004/07/07
		EP 1434880 B1	2007/01/03
		JP 2005-516588 A	2005/06/09
		JP 2009-100761 A	2009/05/14
		US 2004-0152122 A1	2004/08/05
		US 2004-0191830 A1	2004/09/30
		US 2010-0086975 A1	2010/04/08
		US 2010-0285536 A1	2010/11/11
		US 2012-0021463 A1	2012/01/26
		US 7488595 B2	2009/02/10
		US 7628961 B2	2009/12/08
		US 8053215 B2	2011/11/08
		WO 03-025226 A1	2003/03/27
		WO 03-038127 A1	2003/05/08
US 2002-0072054 A1	2002/06/13	US 2005-0136466 A1	2005/06/23
		US 7157232 B2	2007/01/02
KR 10-2003-0073255 A	2003/09/19	AU 2002-367763 A1	2003/09/22
		CN 1511194 A	2004/07/07
		EP 1483402 A1	2004/12/08
		JP 2005-518825 A	2005/06/30
		US 2005-0112754 A1	2005/05/26
		WO 03-076661 A1	2003/09/18