



- (51) 국제특허분류:
B01L 7/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/014420
- (22) 국제출원일: 2016년 12월 9일 (09.12.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0188179 2015년 12월 29일 (29.12.2015) KR
- (71) 출원인: 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동), Gwangju (KR). 주식회사 인지바이오 (INGIBIO, LTD.) [KR/KR]; 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, 206 (오룡동), Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 김민곤 (KIM, Min Gon); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, 광주과학기술원 화학과(오룡동), Gwangju (KR). 정효암 (JOUNG, Hyou Arm); 61005 광

주시 북구 첨단과기로 123, 광주과학기술원 광공학응용물리학과 (오룡동), Gwangju (KR). 석영웅 (SEOK, Youngung); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, 광주과학기술원 화학과 (오룡동), Gwangju (KR).

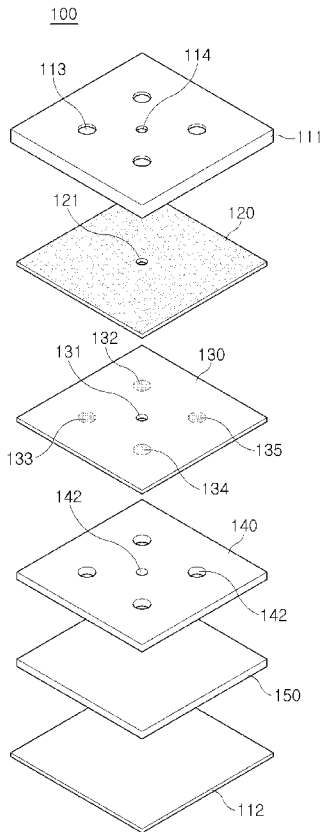
- (74) 대리인: 신용현 (SHIN, Yong Hyun) 등; 06158 서울특별시 강남구 테헤란로 437 삼성빌딩 9층 이-버드 국제특허법률사무소(삼성동), Seoul (KR).

- (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.

[다음 쪽 계속]

- (54) Title: CHIP STRUCTURE FOR MULTIPLE MOLECULAR DIAGNOSES

- (54) 발명의 명칭 : 다중 분자진단을 위한 칩 구조



(57) Abstract: A multiple molecular diagnosis chip structure according to one embodiment of the present invention comprises: a reaction pad having a sample passage hole formed therethrough and a plurality of reaction patterns formed thereon, wherein an injected sample to be diagnosed can pass through the sample passage hole, and a reaction solution that includes an isothermal amplification primer for a specific nucleic acid to be diagnosed, an amplification enzyme, and an indicator having fluorescence varying depending on amplification exists in the reaction patterns; a channel pad disposed on the lower surface of the reaction pad, the channel pad having a first sample passage channel corresponding to the reaction patterns; and a transfer pad disposed on the lower surface of the channel pad to transfer a sample, which is injected from the sample passage hole and transferred through the first sample passage channel, to the reaction patterns through the second sample passage channel.

(57) 요약서: 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 분자진단 칩 구조는 주입되는 진단대상 시료가 통과할 수 있는 시료통과홀이 형성되고 진단 대상의 특정 핵산에 대한 등온증폭반응 프라이머, 증폭반응효소 및 증폭반응에 따라 형광이 변화하는 지시약을 포함하는 반응용액이 존재하는 복수의 반응 패턴이 형성되어 있는 반응패드, 상기 반응패드의 하면에 배치되며 상기 시료통과홀과 대응되는 위치에 제 1 시료통과채널이 형성되고 상기 반응 패턴과 대응되는 제 2 시료통과채널이 형성되어 있는 채널패드 및 상기 채널패드 하면에 배치되며, 상기 시료통과홀로부터 주입되어 상기 제 1 시료통과채널을 통하여 이송되는 시료를 상기 제 2 시료통과채널을 통하여 상기 반응 패턴에 이송하는 이송패드를 포함한다.



(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:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 다중 분자진단을 위한 칩 구조

기술분야

- [1] 본 발명은 다중 분자진단을 위한 칩 구조에 관한 것으로, 보다 상세하게는 한번의 시료 주입만으로 분자 진단의 모든 과정을 수행할 수 있는 다중 분자진단을 위한 칩 구조에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 분자진단(Molecular Diagnosis) 또는 분자진단검사(Molecular Diagnostics)는 분자생물학적 기술을 이용하여 생체표지물질(특히 DNA 또는 RNA)을 검출하거나 분석하는 진단분야 혹은 기법을 의미하며 특히 핵산진단과 유사한 의미로 사용하고 있다. 특히 1985년 중합효소연쇄반응이 개발된 이래로 사람을 비롯한 각종 감염균의 유전자 지도가 완성 되는 등의 기술적 진보가 확립된 이래도 분자진단검사 기술이 비약적으로 발전하고 있다.
- [4] 현재 바이러스 검출을 위해 주로 사용되는 방법은 분자진단방법으로 질병의 원인이 되는 박테리아, 바이러스 등의 핵산(Nucleic acid: DNA와 RNA 또는 그들의 변형체)을 검출하여 병의 원인 및 감염 여부를 검출하는 방법이다. 분자진단방법은 체액으로부터 샘플을 채취, 채취된 샘플의 유전자 추출, 중합효소연쇄반응을 이용한 증폭 및 분석에 이르는 4가지 단계로 구성된다. 분자진단법은 유전자 증폭과정을 거치기 때문에 극미량의 병원체에 대해서도 매우 높은 민감도 및 특이성을 갖는 정확한 진단이 가능하다. 하지만, 기존의 진단법의 수행을 위해서는 PCR 및 전기영동 등 고가의 분석 장비 및 시약을 사용하기 때문에 비용이 많이 들고, 복잡하고 전문적인 기술이 필요하기 때문에 숙련된 기술자에 의해서만 수행이 가능하다. 또한 분석 장비의 거대함으로 인해 각 생물 반응 단계의 통합이 어려와 분자 진단 과정에 샘플 오염의 가능성을 항상 내포하고 있으며, 분석 시간이 오래 걸리기 때문에 현장에서 유전자 진단을 하는데 한계를 보이고 있다.
- [5] 따라서 기존의 유전자 진단 기법의 단점을 극복하고 현장에서 유전자 진단이 가능한 고효율, 고감도의 새로운 병원체 유전자 분석 시스템이 요구되고 있으며 그 대안으로 랩온어칩(Lab-on-a-chip, LOC) 기술이 각광을 받고 있다. 랩온어칩 기술은 NT, IT, BT의 융합기술의 대표적인 예로 MEMS나 NEMS와 같은 기술을 이용하여 시료의 회석, 혼합, 반응, 분리, 정량 등 시료의 모든 전처리 및 분석 단계를 하나의 칩 위에서 수행하도록 하는 기술을 말한다. 이처럼 손바닥만한 칩 위에서 모든 반응을 자동화시키고 빠르게 수행할 수 있다는 특징 때문에 샘플 전처리, PCR, 분석 시스템을 소형화시킨 연구들이 다년간 많이 진행되어 왔고, 이를 통합시킨 유전자 분석 시스템에 대한 연구도 상당히 진행되어 왔다.

- [6] 유전자 분석에 있어 PCR을 통한 DNA의 증폭은 극미량의 샘플로부터 유전자를 증폭시켜 높은 민감도 및 특이성을 갖게 하기 때문에 핵산 분석에 필수적이다. Thermal cycling PCR법은 변성, 접합 신장의 세 가지의 온도 단계를 정확하게 맞춰 이루어지는 일련의 반응이기 때문에 정확한 온도 구배를 위해서는 고가의 장비가 필요하다. 이를 극복하기 위해 등온 PCR법이 개발되었는데, 등온 PCR법은 thermal cycling법과 달리 일정한 온도에서 변성, 접합 신장이 가능하기 때문에 증폭시간을 단축할 수 있으며, 등온 유지가 가능한 저가의 장비에서도 수행할 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서, 장비의 소형화에 유리하며 연구실이나 검출 현장 등의 장소에 구애받지 않고 적용될 수 있다.
- [7] 최근 랩온어칩(LOC) 또는 미세종합분석시스템 기술로 등온 PCR을 마이크로 칩상에서 구현하려는 연구들이 많이 진행되고 있다. 이러한 등온 PCR법은 현장검사(POC test)에서 분자진단을 가능하게 하는 방법이라고 할 수 있다. 등온 PCR을 이용한 현장진단 센서가 개발되고 있으나, 소형화, 비용절감, 단순한 구조의 실현 등 다양한 문제가 있다. 현장진단 검사에서 사용되는 진단 센서는 보다 간단하고 휴대성이 높아야 하므로 보다 소형화되고 간단한 분자진단이 가능한 진단센서가 필요한 실정이다.
- [8]
- [9] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명은 이러한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 보다 간단한 구성으로 현장에서 등온 PCR방법을 이용하여 바로 진단이 가능한 다중 분자진단을 위한 페이퍼칩 구조를 제공하는 데 있다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 위 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 분자진단 칩 구조는 주입되는 진단대상 시료가 통과할 수 있는 시료통과홀이 형성되고 진단 대상의 특정 핵산에 대한 등온증폭반응 프라이머, 증폭반응효소 및 증폭반응에 따라 형광이 변화하는 지시약을 포함하는 반응용액이 존재하는 복수의 반응 패턴이 형성되어 있는 반응패드, 상기 반응패드의 하면에 배치되며 상기 시료통과홀과 대응되는 위치에 제1시료통과채널이 형성되고 상기 반응 패턴과 대응되는 제2시료통과채널이 형성되어 있는 채널패드 및 상기 채널패드 하면에 배치되며, 상기 시료통과홀로부터 주입되어 상기 제1시료통과채널을 통하여

이송되는 시료를 상기 제2시료통과채널을 통하여 상기 반응 패턴에 이송하는 이송패드를 포함한다.

- [14] 상기 반응용액은 PVA를 더 포함할 수 있다.
- [15] 상기 반응 패드 상면에 배치되며, 상기 시료통과홀과 대응되는 위치에 시료주입구가 형성되는 커버를 더 포함할 수 있다.
- [16] 상기 반응 패턴은 샘플투입여부를 확인할 수 있는 비교패턴과 진단대상 시료에 포함된 특정 DNA를 검출할 수 있는 검출패턴이 둘 이상 형성되고,
- [17] 상기 검출패턴에는 각각 별도의 특정 DNA에 대한 등온증폭반응 프라이머 및 증폭반응효소가 존재하는 것일 수 있다.
- [18] 상기 반응패드의 상부에 형성되며 상기 시료통과홀과 대응되는 시료투입부 및 상기 반응패턴과 대응되는 위치에 형성되는 패턴확인부가 형성된 상부케이스 및 상기 이송패드 하부에 형성되며 상기 상부케이스와 결합되는 하부케이스를 더 포함할 수 있다.
- [19] 상기 반응패드는 다공성의 유리 멤브레인(glass membrane)일 수 있다.
- [20] 상기 채널패드는 니트로셀룰로오스 또는 폴리에테르술폰 멤브레인일 수 있다.
- [21] 상기 이송패드는 하부 방향으로 기공 크기가 작아지는 비대칭 구조를 가지는 멤브레인일 수 있다.
- [22] 상기 지시약은 HNB(Hydroxynaphthol Blue)를 포함할 수 있다.
- [23]

발명의 효과

- [24] 본 발명에 의한 다중 분자진단을 위한 페이퍼칩 구조에 따르면 보다 간단한 구성으로 분자 진단이 가능하므로 현장에서 보다 간편하게 분자진단이 가능하며, 한번의 시료의 주입만으로도 분자 진단의 모든 과정이 수행될 수 있어 휴대성이 강화되며, 한번의 시료로 여러 가지 분자 진단을 동시에 진행할 수 있다.
- [25]

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 분자진단을 위한 칩 구조를 나타낸 사시도이다.
- [27] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 분자진단을 위한 칩 구조를 나타낸 분해사시도이다.
- [28] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 분자진단을 위한 칩 구조를 나타낸 단면도이다.
- [29] 도 4는 본 발명에서 사용되는 HNB(Hydroxynaphthol Blue)의 반응을 나타내는 그림이다.
- [30] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 분자진단을 위한 칩 구조의 시료 이동을 나타낸 도면이다.

- [31] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 자중 분자진단을 위한 칩 구조를 이용한 실험결과를 나타낸 도면이다.
- [32] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 자중 분자진단을 위한 칩 구조를 이용한 실험결과를 나타낸 사진이다.
- [33] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 자중 분자진단을 위한 칩 구조를 이용한 실험결과를 나타낸 그래프이다.

[34]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [35] 여기서 사용되는 전문용어는 단지 특정 실시예를 언급하기 위한 것이며, 본 발명을 한정하는 것을 의도하지 않는다. 여기서 사용되는 단수 형태들은 문구들이 이와 명백히 반대의 의미를 나타내지 않는 한 복수 형태들도 포함한다. 명세서에서 사용되는 "포함하는"의 의미는 특정 특성, 영역, 정수, 단계, 동작, 요소 및/또는 성분을 구체화하며, 다른 특정 특성, 영역, 정수, 단계, 동작, 요소, 성분 및/또는 군의 존재나 부가를 제외시키는 것은 아니다.
- [36] 다르게 정의하지는 않았지만, 여기에 사용되는 기술용어 및 과학용어를 포함하는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 의미와 동일한 의미를 가진다. 보통 사용되는 사전에 정의된 용어들은 관련기술문헌과 현재 개시된 내용에 부합하는 의미를 가지는 것으로 추가 해석되고, 정의되지 않는 한 이상적이거나 매우 공식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [37] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예에 의한 다중 분자진단 칩 구조에 대하여 설명하기로 한다.
- [38] 본 발명은 진단대상이 되는 시료속에 포함되어 있는 DNA 또는 RNA 등의 핵산을 등온증폭방법(LAMP)을 통하여 병원균, 바이러스 등의 검출할 수 있는 진단장비에 사용되는 분자진단 칩 구조에 관한 것이다. 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 분자진단을 위한 칩 구조를 나타낸 사시도이다. 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 분자진단을 위한 칩 구조를 나타낸 분해사시도이다. 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 분자진단을 위한 칩 구조를 나타낸 단면도이다. 도 1 내지 도 3을 참조하여 본 발명에 대해서 설명하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 분자진단 칩 구조(100)는 크게 상부케이스(111), 하부케이스(112), 커버(120), 반응패드(130), 채널패드(140), 이송패드(150)를 포함할 수 있다.
- [39] 본 발명에서 핵심적인 구성은 반응패드(130), 채널패드(140), 이송패드(150)를 적층한 구조이다. 반응패드(120)는 진단 대상이 되는 시료의 등온증폭반응이 이루어지며, 채널패드(130)는 반응패드에서 등온증폭반응을 일으키는 진단대상 시료를 반응패드(120)에 분리하여 이송하며, 이송패드(140)는 안정적으로 반응패드에 진단대상 시료를 전달하는 역할을 한다.

- [40] 이하 각각의 구성에 대하여 보다 자세하게 설명한다.
- [41] 본 발명에서 상부 케이스(111)와 하부 케이스(112)는 커버(120), 반응패드(130), 채널패드(140), 이송패드(150)의 적층구조를 가지는 칩의 형태를 유지하고, 이를 외부로부터 보호하는 역할을 한다. 커버(120) 및 각 패드(130, 140, 150)들은 멤브레인 소재를 사용하기 때문에 형태를 유지하기 위해서는 상부케이스(111) 및 하부케이스(112)를 필요로 한다. 이러한 상부 케이스(111) 및 하부 케이스(112)는 칩의 구조를 유지하기 위한 것으로서 생략되어도 칩의 진단기능을 수행할 수 있다. 상부 케이스(111)는 시료를 투입할 수 있는 있는 시료투입부(114)가 중앙에 형성될 수 있다. 또한 반응패드(130)에서 등온증폭반응의 결과를 확인할 수 있는 패턴확인부(113)가 형성될 수 있다. 패턴확인부(113)는 반응패드(130)의 반응패턴(132, 133, 134, 135)이 노출될 수 있는 개구 형태도 가능하고, 내부의 색의 변화를 확인할 수 있도록 투명창이 형성될 수도 있다. 시료투입부(114)는 하부에 적층되는 커버(120)의 시료투입구(131)와 대응되는 위치에 형성될 수 있다. 상부케이스(111)와 하부케이스(112)는 다양한 소재가 사용될 수 있으나, 가벼운 플라스틱 소재가 바람직하다.
- [42] 상부 케이스(111)의 하부에는 커버(120)가 형성될 수 있다. 커버(120)는 투입되는 진단시료와 반응패드(130)의 반응패턴(132, 133, 134, 135)에 존재하는 반응용액이 증발하는 것을 방지하기 위해 설치된다. 또한 반응패턴(132, 133, 134, 135)에서 증폭반응여부를 확인할 수 있도록 투명소재로 사용하는 것이 바람직하다. 커버(120)의 중앙에는 상부케이스(111)의 시료투입부(114)와 반응패드(130)의 시료통과홀(131)에 대응되는 위치에 시료투입구(121)가 형성된다. 본 실시예에서는 실험용으로 판매되는 ELISA tape을 적당한 크기로 잘라서 사용할 수 있다.
- [43] 반응패드(130)는 등온증폭반응이 가능하고 형광염료의 형광이 잘 나타날 수 있는 다수의 기공이 형성되어 있는 멤브레인을 사용하는 것이 바람직하다. 일례로 유리재질의 글래스 멤브레인(glass membrane)을 사용할 수 있다. 반응패드(130)에는 중앙에 진단 대상 시료가 통과할 수 있도록 시료통과홀(131)이 형성되어 있으며, 진단 대상의 특정 핵산에 대한 등온증폭반응 프라이머 및 증폭반응에 따라 형광이 변화하는 지시약을 포함하는 반응용액이 존재하는 복수의 반응 패턴(132, 133, 134, 135)이 형성될 수 있다. 본 실시예에서는 총 4개의 반응 패턴이 형성되어 있다. 비교패턴(132)는 시료의 도달여부를 확인할 수 있도록 지시약 만이 존재할 수 있다. 제1 검출패턴(133), 제2 검출패턴(134), 제3 검출패턴(135)은 각각 별도의 핵산 서열에 반응하는 등온증폭반응 프라이머, 증폭반응효소 및 증폭반응에 따라 형광이 변화하는 지시약을 포함하는 반응용액이 존재할 수 있다. 또한, 증폭반응효소와 지시약의 안정을 위해 미반응성 첨가물이 더 포함될 수 있다. 이러한 미반응성 첨가물로는 PVA가 바람직하다.

- [44] 따라서, 본 발명의 실시예에서와 같이 4개의 반응 패턴이 존재하는 경우에는 3가지의 특정 핵산에 대하여 증폭반응을 통하여 3가지 분자진단을 동시에 수행할 수 있다. 반응패턴의 수를 조절하여 동시에 진단할 수 있는 종류를 조절하는 것이 가능하다.
- [45] 반응용액에 사용되는 지시약은 HNB(Hydroxynaphthol Blue)일 수 있다. 도 4는 본 발명에서 사용되는 HNB의 반응을 나타내는 그림이다. 도 4에 도시된 바와 같이 HNB는 증폭반응이 있는 경우 형광이 감소되는 지시약이다. 따라서, 진단 대상이 되는 시료가 존재하는 경우 증폭반응이 발생하게 되고 HNB의 형광이 감소함으로써 진단대상 시료의 존재를 알 수 있다.
- [46] 반응패드(130) 하부에는 채널패드(140)가 형성된다. 채널패드(140)는 투입되는 시료를 이송패드(150)를 통하여 반응패드(130)의 반응패턴(132, 133, 134, 135)에 전달할 수 있는 역할을 수행하게 된다. 채널패드(140)에는 상부케이스(111)의 시료투입부(114), 커버(120)의 시료투입구(121), 반응패드(130)의 시료통과홀(131)과 대응되는 위치에 시료가 통과할 수 있도록 제1시료통과채널(141)이 형성되며, 반응패드(130)의 반응패턴(132, 133, 134, 135)과 대응되는 위치에 이송패드(150)로부터 시료가 통과될 수 있도록 제2시료통과채널(142)이 형성된다. 각각의 시료통과채널을 형성하기 쉽도록 패턴이 쉽고 반응을 저해하지 않는 멤브레인을 왁스로 패터닝 해서 사용하는 것이 바람직하다. 본 실시예에서는 니트로셀룰로오스 또는 폴리에테르술폰 멤브레인 등을 사용할 수 있다.
- [47] 채널패드(140) 하부에는 주입되는 진단 대상 시료를 균일하게 퍼뜨리고 반응패드(130)의 반응패턴(132, 133, 134, 135)에 시료를 공급할 수 있도록 이송패드(150)가 설치된다. 이송패드(150)는 투입된 시료가 전체적으로 잘 퍼질 수 있도록 하부 방향으로 기공크기가 작아지는 비대칭 멤브레인을 사용할 수 있다. 투입되는 시료가 기공이 작은 쪽으로 퍼지게 되어 전체적으로 골고루 이송패드(150)에 퍼질 수 있다.
- [48] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 다중 분자진단을 위한 칩 구조의 시료 이동을 나타낸 도면이다. 최초 상부케이스(111)의 시료투입부(114)를 통하여 시료가 투입되면 커버(120)의 시료투입구(121), 반응패드(130)의 시료통과홀(131), 채널패드(140)의 제1시료통과채널(141)을 통하여 이송패드(150)로 이동하게 된다. 이때 이송패드(150)를 충분하게 적셔주게 되면 이송패드(150)를 통하여 시료가 채널패드(140)의 제2시료통과채널(142)을 통하여 반응패드(130)의 반응패턴(132, 133, 134, 135)에 도달되게 된다. 채널패드(140)를 통하여 시료를 독립적으로 각각 반응패턴(132, 133, 134, 135)에 도달하게 함으로써 한 번의 시료투입으로 다중진단이 가능하게 된다.
- [49]
- [50] 이하 실험예를 통하여 보다 자세하게 설명한다.
- [51]

[52] **1. 다중 분자진단 칩의 제조**

[53] 도 1 내지 도 3과 같은 형태로 다중 분자진단 칩을 제조하였다. 우선 Merck Millipore의 G028 Glass conjugated pad를 사용하여 반응 패드를 제조하였다. 가운데에 홀을 형성하고 4군대에 반응패턴을 형성하였다. 각각 진단을 원하는 타겟 1, 2, 3 각각의 LAMP 프라이머를 준비하였다. 타겟 1은 *Streptococcus agalactiae*이며, 타겟 2는 *Streptococcus pneumonia*, 타겟 3은 *Staphylococcus aureus*으로 선정하였다. 예를 들면 타겟1, 2, 3에 해당하는 DNA 프라이머의 예시를 하기 표1에 도시하였다. *Streptococcus pneumonia*에 해당하는 프라이머를 F3 / B3 / FIP / BIP / LF / LB 를 순서대로 1 : 1 : 8 : 8 : 4 : 4 로 혼합하였다.

[54]

[55] [Table 1]

타겟	프라이머	시퀀스
S.agalactiae(타겟 1)	F3	GGAACTCTAGTGGCTGGT
	B3	CAATCACATCTGTTAAGGCT
	FIP	GCCATTTGCTGGGCTTGATTGCTGTATTAGAAGTACA TGCTG
	BIP	TGAGGCTATTACTAGCGTGGAATCTACACGACTACC AATAGA
	LF	ACTTGTGGAGTTGTCACCTGA
	LB	AGACTTCATTGCGTGCCA
S.pneumoniae (타겟 2)	F3	AACTGATTGAAAGCCATTCA
	B3	GTCAACGTGGTCTGAGTG
	FIP	CCTGCTTCATCTGCTAGATTGCAAAGAAGAGTTCAT GACGGAC
	BIP	TGCCGAAAACGCTTGATACATGTTTGGTTGGTTATTC GTG
	LF	GTAAGAGTTTCGATATAAAGGCGGT
	LB	GGAGTTTAGCTGGAATTAACGCA
S.aureus(타겟 3)	F3	AGAAGTGATTCTGAAGATCCAAC
	B3	TATCAGTTCTTTGACCTTTGTCA
	FIP	TAACCGTATCACCATCAATCGAGTATACAGTGCAAC TTCAACT
	BIP	GTCAAACAATGACATTCAGACTGGACCATATTTCTCT ACACCTTT
	LF	TTAATTAATGTCGCAGGTTCTT
	LB	GATACACCTGAAACAAAGCATC

[56]

[57] 이와 같이 각 타겟에 필요한 LAMP 프라이머를 준비하고 이를 하기 표 2에
나타낸 반응용액을 제조하였다.

[58]

[59] [Table 2]

	PVA (10kDa)	Primer	Polymerase	HNB	Water
최종 농도	3% (w/v)	4 uM	0.32 U/uL	240 uM	-
Stock 농도	20%	100uM	8 U/uL	1.2m M	-
Volume	7.5 uL	2.6 uL	2 uL	10 uL	27.9 uL
비고	Sigma	F3, B3, FIP, BIP,LF, LB의 혼합물	Wako Chemical	Sigma	DNA-free water 사용 Total 50uL로

[60]

[61] 반응 용액을 표2와 같이 약 3.5 μ L를 반응패드의 반응패턴에 투입한 후 약 37의
오븐에서 약 20분간 건조시켰다.

[62] Sterlitech의 PES802005 8.0 μ m 멤브레인 필터를 사용하여 표면에 왁스 프린터를
통하여 시료통과채널이 형성될 수 있도록 패턴을 형성하여 채널패드를
제조하였다. 커버로 Excel Scientific의 SealPlate를 반응패드와 채널패드와 겹쳐
각각 시료투입구, 시료통과홀, 제1시료통과채널이 형성되도록 하였다.

[63] 이송패널로 Vivid GF 비대칭 멤브레인을 사용하여 적층한 후 상부 케이스 하부
케이스를 적층하여 다중 분자진단 칩을 제조하였다.

[64]

[65] 2. 다중 분자 진단 반응 수행

[66] 진단하려고 하는 타겟 1, 2, 3 균의 DNA가 포함된 샘플을 준비하였다. 이를
하기 표 3에 도시된 버퍼용액과 샘플을 혼합하였다.

[67]

[68] [Table 3]

	Tris-HCl	KCl	MgSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	Tween 20	Betaine	dNTPs
최종 농도	20mM	10mM	8mM	10mM	0.1%	0.8M	2.8mM each
Stock 농도	1.5M	1M	100mM	1M	100%	5M	100mM each

[69]

[70] 샘플과 버퍼용액을 혼합한 후에 상부케이스의 시료주입부를 통하여 약
70~100 μ L를 주입하고 케이스를 약 63의 온도로 약 1시간동안 유지시킨후

분자진단 결과를 확인하였다. (Non은 버퍼용액만을 투입한 경우, Target 1은 타겟 1 샘플만, Target 1,2는 타겟 1, 2 샘플, Target 1, 2, 3은 타겟 1, 2, 3을 각각 투입한 경우이다. 도6 참조)

- [71] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 자중 분자진단을 위한 칩 구조를 이용한 실험결과를 나타낸 사진이다. 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 자중 분자진단을 위한 칩 구조를 이용한 실험결과를 나타낸 그래프이다. 도 6 및 도 7에 도시된 바와 같이, 아무 샘플도 없는 경우(Non)에는 등온증폭반응이 이루어지지 않아 각 영역 모두 형광물질이 존재하는 것을 확일 할 수 있다. Target 1의 경우 타겟 1의 샘플이 존재하고 T1의 형광이 감소하는 것을 알 수 있다. Target 2의 경우 타겟 1, 2의 샘플이 존재하고 T1, T2의 형광이 감소하는 것을 알 수 있다. Target 3의 경우 타겟 1, 2, 3의 샘플이 존재하고 T1, T2, T3의 형광이 감소하는 것을 알 수 있다.
- [72] 이와 같이 본 발명을 통하여 간단한 장치를 통하여 3가지 분자 진단을 동시에 할 수 있는 것을 알 수 있다.
- [73] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다.
- [74] 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변경된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [75]
- [76] [부호의 설명]
- [77] 111: 상부 케이스 112: 하부케이스 120: 커버
- [78] 130: 반응패드 140: 채널패드 150: 이송패드
- [79]

청구범위

- [청구항 1] 주입되는 진단대상 시료가 통과할 수 있는 시료통과홀이 형성되고 진단 대상의 특정 핵산에 대한 등온증폭반응 프라이머, 증폭반응효소 및 증폭반응에 따라 형광이 변화하는 지시약을 포함하는 반응용액이 존재하는 복수의 반응 패턴이 형성되어 있는 반응패드;
- 상기 반응패드의 하면에 배치되며 상기 시료통과홀과 대응되는 위치에 제1시료통과채널이 형성되고 상기 반응 패턴과 대응되는 제2시료통과채널이 형성되어 있는 채널패드; 및
- 상기 채널패드 하면에 배치되며, 상기 시료통과홀로부터 주입되어 상기 제1시료통과채널을 통하여 이송되는 시료를 상기 제2시료통과채널을 통하여 상기 반응 패턴에 이송하는 이송패드;를 포함하는 다중 분자진단 칩 구조.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
- 상기 반응용액은 PVA를 더 포함하는 다중 분자진단 칩 구조.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
- 상기 반응 패드 상면에 배치되며, 상기 시료통과홀과 대응되는 위치에 시료주입구가 형성되는 커버를 더 포함하는 다중 분자진단 칩 구조.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
- 상기 반응 패턴은 샘플투입여부를 확인할 수 있는 비교패턴과 진단대상 시료에 포함된 특정 DNA를 검출할 수 있는 검출패턴이 둘 이상 형성되고,
- 상기 검출패턴에는 각각 별도의 특정 DNA에 대한 등온증폭반응 프라이머 및 증폭반응효소가 존재하는 것을 특징으로 하는 다중 분자진단 칩 구조.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
- 상기 반응패드의 상부에 형성되며 상기 시료통과홀과 대응되는 시료투입부 및 상기 반응패턴과 대응되는 위치에 형성되는 패턴확인부가 형성된 상부케이스 및 상기 이송패드 하부에 형성되며 상기 상부케이스와 결합되는 하부케이스를 더 포함하는 다중 분자진단 칩 구조.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,
- 상기 반응패드는 다공성의 유리 멤브레인(glass membrane)인 것을 특징으로 하는 다중 분자진단 칩 구조.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서,
- 상기 채널패드는 니트로셀룰로오스 또는 폴리에테르술폰

멤브레인 인 것을 특징으로 하는 다중 분자진단 칩 구조.

[청구항 8]

청구항 1에 있어서,

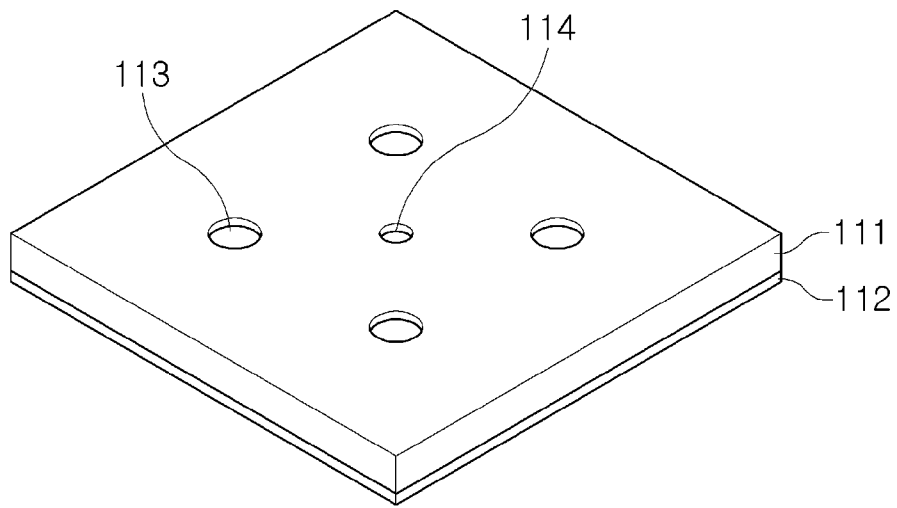
상기 이송패드는 하부 방향으로 기공 크기가 작아지는 비대칭 구조를 가지는 멤브레인인 것을 특징으로 하는 다중 분자진단 칩 구조.

[청구항 9]

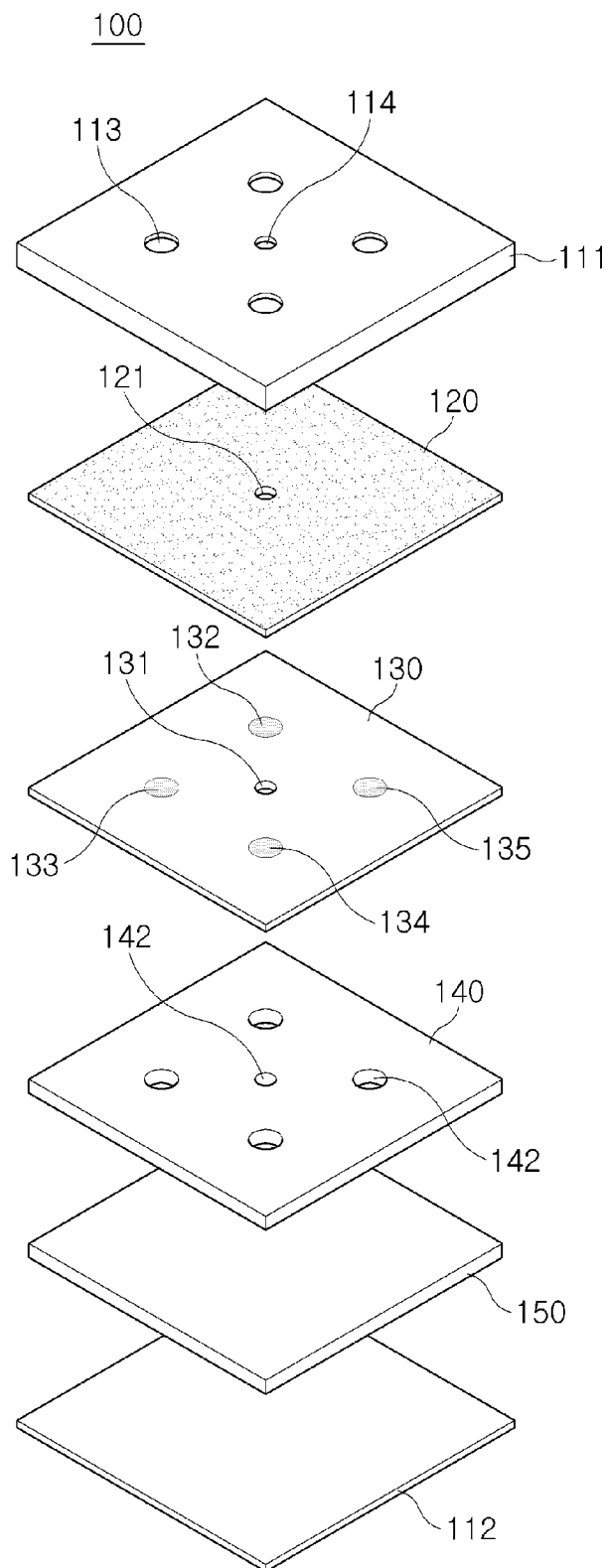
청구항 1에 있어서,

상기 지시약은 HNB(Hydroxynaphthol Blue)를 포함하는 다중 분자진단 칩 구조.

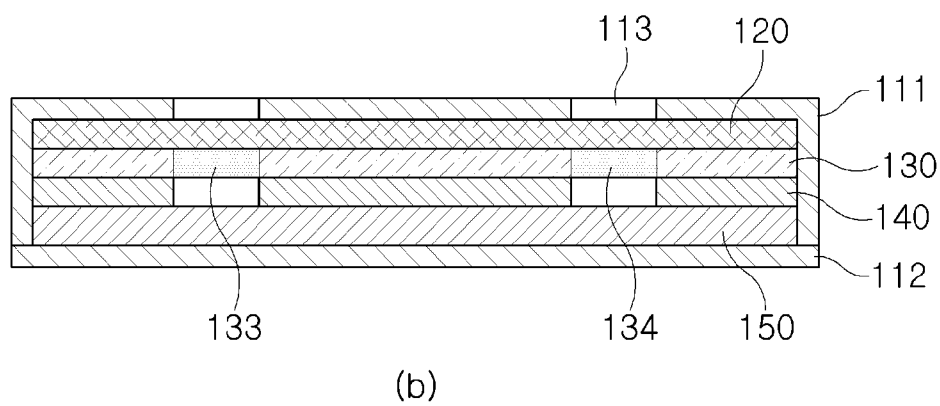
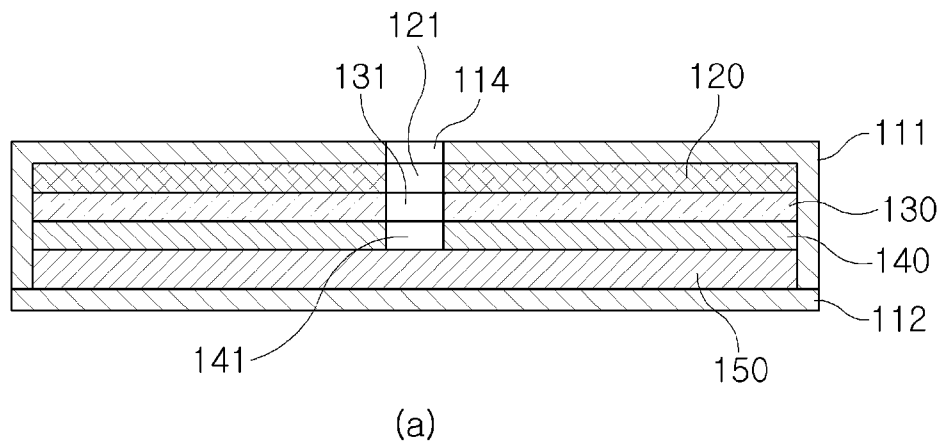
[Fig. 1]

100

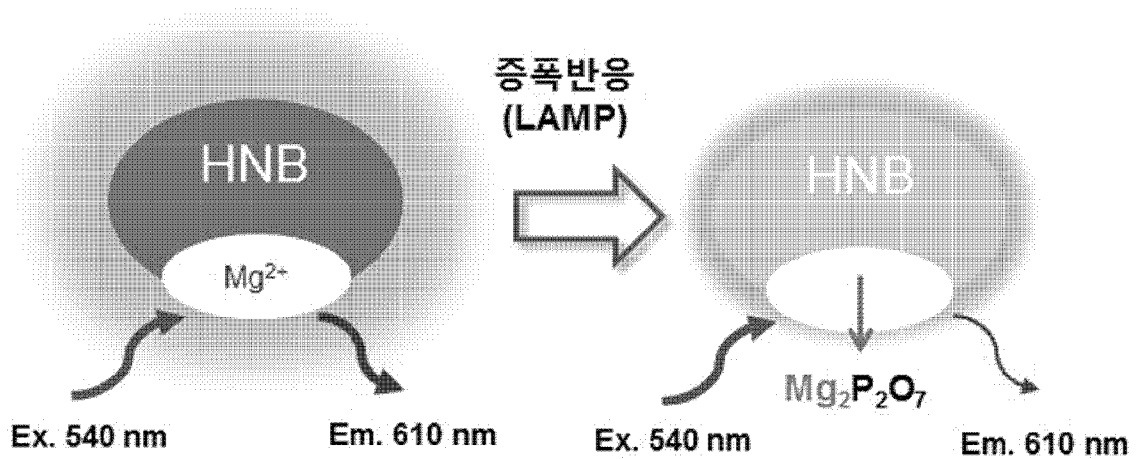
[Fig. 2]



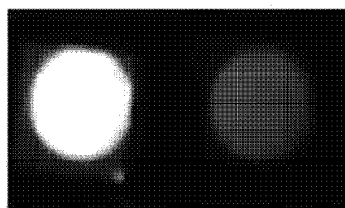
[Fig. 3]



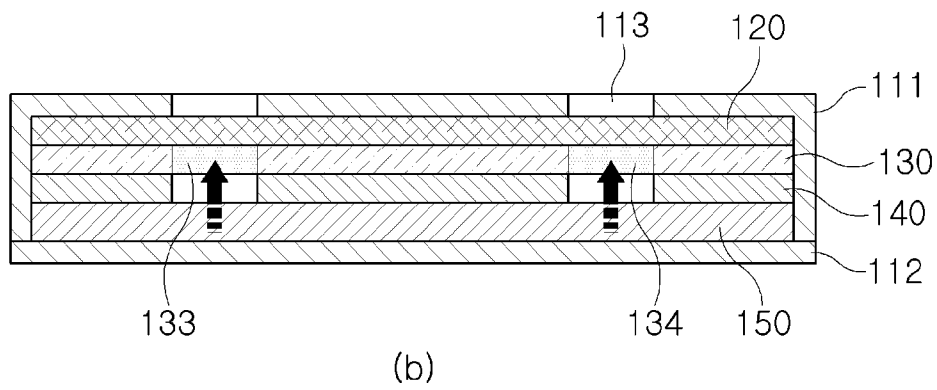
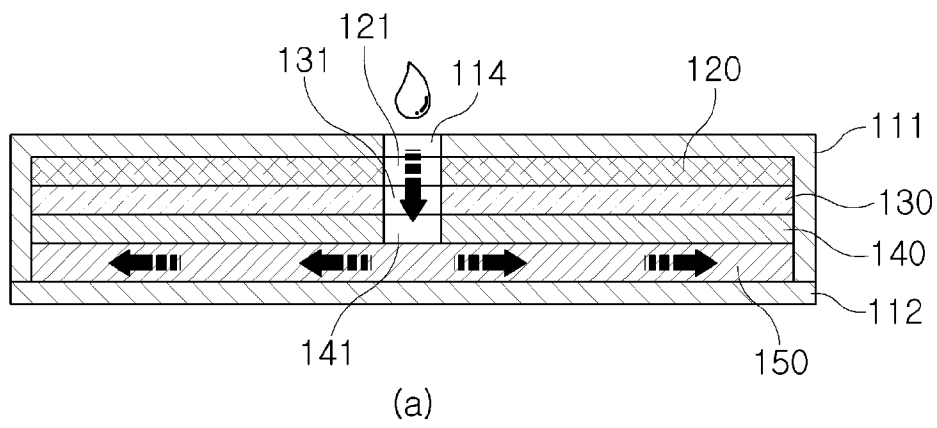
[Fig. 4]



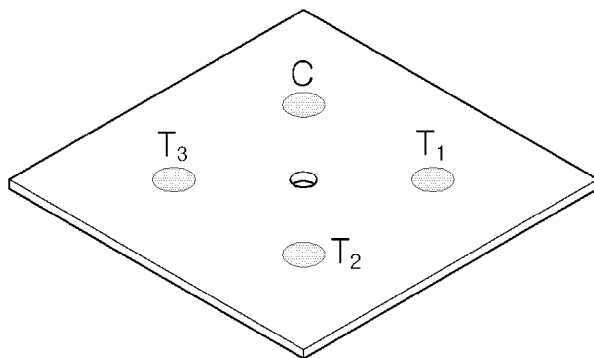
Negative Positive



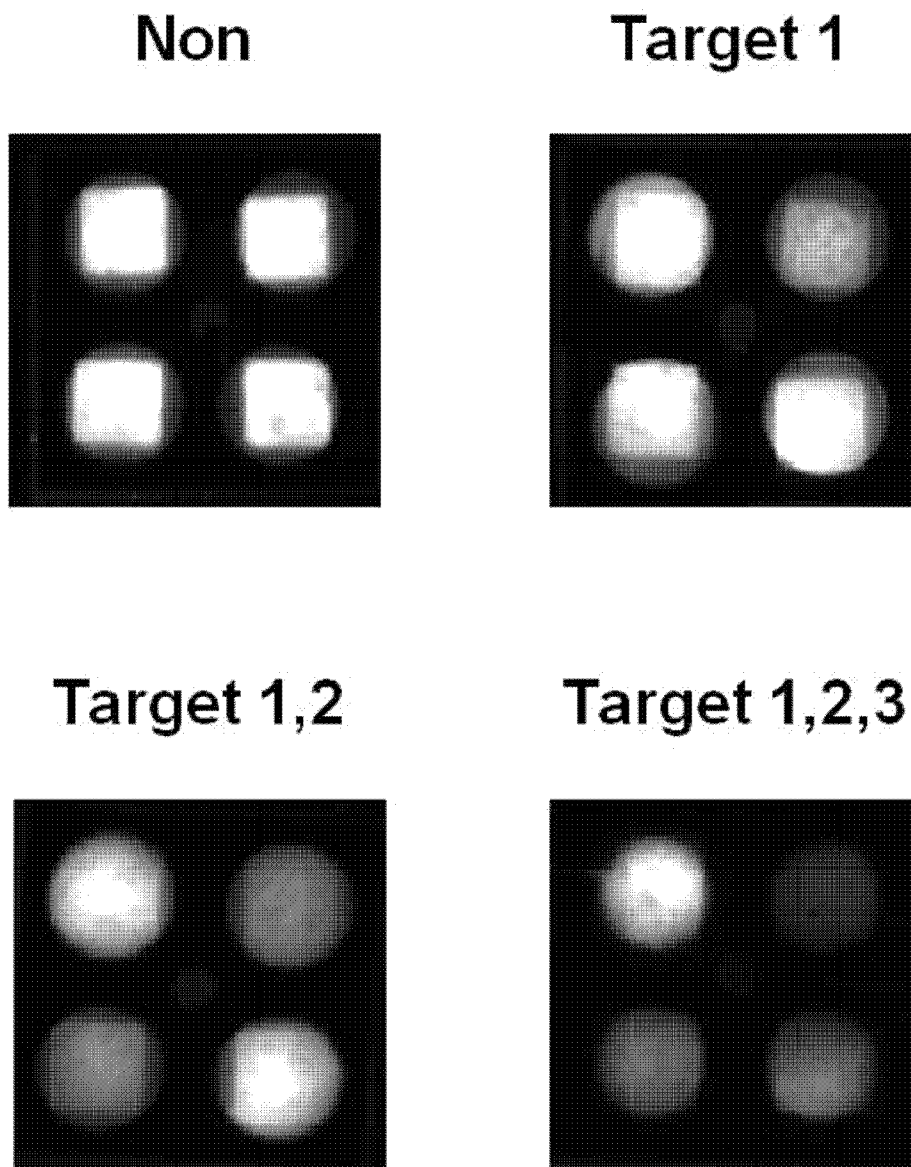
[Fig. 5]



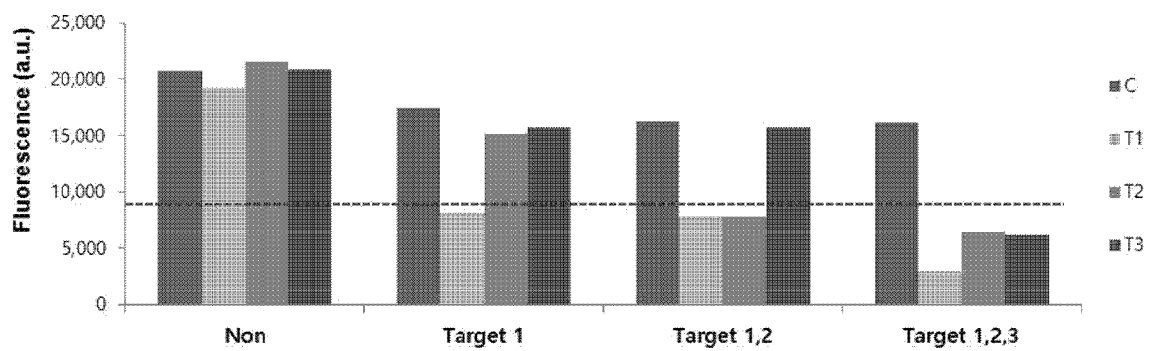
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/014420**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****B01L 7/00(2006.01)i, B01L 3/00(2006.01)i, C12Q 1/68(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)

B01L 7/00; C12M 1/00; C12Q 1/02; G01N 21/25; B41M 1/04; C12N 15/09; B01L 3/00; B41M 3/00; C12Q 1/68; C12M 1/34

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, isothermal amplification reaction, primer, phosphor, indicator, reactive pad, channel pad, transfer pad, molecular diagnosis, chip, PVA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2012-0099486 A (TEKNOLOGIAN TUTKIMUSKESKUS VTT OY.) 10 September 2012 See paragraphs [0024], [0033], [0037], [0042]; claim 13; and figure 1.	1-9
Y	JP 2000-236876 A (JAPAN ADVANCED INST. OF SCIENCE & TECHNOLOGY HOKURIKU) 05 September 2000 See paragraph [0009]; claims 1, 7; and figures 1, 5.	1-9
Y	JP 2008-245612 A (HITACHI LTD.) 16 October 2008 See claim 6.	2
A	KR 10-1080087 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, DANKOOK UNIVERSITY) 04 November 2011 See claim 1; and figures 1, 2.	1-9
A	KR 10-1257975 B1 (GENERAL ELECTRIC COMPANY) 30 April 2013 See paragraphs [0023]-[0025], [0139], [0233].	1-9



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

13 MARCH 2017 (13.03.2017)

Date of mailing of the international search report

13 MARCH 2017 (13.03.2017)

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/KR2016/014420

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0099486 A	10/09/2012	BR 112012014662 A2	05/04/2016
		CN 102781676 A	14/11/2012
		CN 102781676 B	25/11/2015
		DK 2512813 T3	04/01/2016
		EP 2512813 A1	24/10/2012
		EP 2512813 A4	08/01/2014
		EP 2512813 B1	21/10/2015
		JP 2013-513492 A	22/04/2013
		JP 5651707 B2	14/01/2015
		US 2013-0004665 A1	03/01/2013
		US 9393824 B2	19/07/2016
		WO 2011-073519 A1	23/06/2011
JP 2000-236876 A	05/09/2000	JP 3041423 B1	15/05/2000
JP 2008-245612 A	16/10/2008	CN 101275164 A	01/10/2008
		CN 101275164 B	26/01/2011
		US 2008-0241841 A1	02/10/2008
KR 10-1080087 B1	04/11/2011	KR 10-2010-0119127 A	09/11/2010
KR 10-1257975 B1	30/04/2013	AT 457452 T	15/02/2010
		AU 2006-306384 A1	03/05/2007
		AU 2006-306384 B2	14/06/2012
		BR P10619273 A2	20/09/2011
		CA 2625547 A1	03/05/2007
		CA 2625547 C	21/06/2016
		CN 101297189 A	29/10/2008
		CN 101297189 B	24/06/2015
		EP 1943499 A2	16/07/2008
		EP 1943499 B1	10/02/2010
		ES 2338165 T3	04/05/2010
		JP 2009-513978 A	02/04/2009
		JP 4943445 B2	30/05/2012
		KR 10-2008-0069209 A	25/07/2008
		MY 152491 A	15/10/2014
		NZ 567587 A	26/11/2010
		TW 1432713 B	01/04/2014
		US 2007-0092407 A1	26/04/2007
		US 2007-0092411 A1	26/04/2007
		US 2007-0092972 A1	26/04/2007
		US 2007-0092975 A1	26/04/2007
		US 2010-0178208 A1	15/07/2010
		US 7723120 B2	25/05/2010
		US 8105552 B2	31/01/2012
		US 8133741 B2	13/03/2012
		US 8226907 B2	24/07/2012
		WO 2007-050539 A2	03/05/2007
		WO 2007-050539 A3	30/08/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

B01L 7/00(2006.01)i, B01L 3/00(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

B01L 7/00; C12M 1/00; C12Q 1/02; G01N 21/25; B41M 1/04; C12N 15/09; B01L 3/00; B41M 3/00; C12Q 1/68; C12M 1/34

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, 등온증폭반응, 프라이머, 형광, 지시약, 반응패드, 채널패드, 이송패드, 분자진단, 칩, PVA

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2012-0099486 A (테크놀로지안 투트키무스케스쿠스 브이티티) 2012.09.10 단락 [0024], [0033], [0037], [0042]; 청구항 13; 및 도면 1 참조.	1-9
Y	JP 2000-236876 A (JAPAN ADVANCED INST OF SCIENCE & TECHNOLOGY HOKURIKU) 2000.09.05 단락 [0009]; 청구항 1, 7; 및 도면 1, 5 참조.	1-9
Y	JP 2008-245612 A (HITACHI LTD.) 2008.10.16 청구항 6 참조.	2
A	KR 10-1080087 B1 (단국대학교 산학협력단) 2011.11.04 청구항 1; 및 도면 1, 2 참조.	1-9
A	KR 10-1257975 B1 (제너럴 일렉트릭 캄파니) 2013.04.30 단락 [0023]-[0025], [0139], [0233] 참조.	1-9

☐ 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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 03월 13일 (13.03.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 03월 13일 (13.03.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0099486 A	2012/09/10	BR 112012014662 A2 CN 102781676 A CN 102781676 B DK 2512813 T3 EP 2512813 A1 EP 2512813 A4 EP 2512813 B1 JP 2013-513492 A JP 5651707 B2 US 2013-0004665 A1 US 9393824 B2 WO 2011-073519 A1	2016/04/05 2012/11/14 2015/11/25 2016/01/04 2012/10/24 2014/01/08 2015/10/21 2013/04/22 2015/01/14 2013/01/03 2016/07/19 2011/06/23
JP 2000-236876 A	2000/09/05	JP 3041423 B1	2000/05/15
JP 2008-245612 A	2008/10/16	CN 101275164 A CN 101275164 B US 2008-0241841 A1	2008/10/01 2011/01/26 2008/10/02
KR 10-1080087 B1	2011/11/04	KR 10-2010-0119127 A	2010/11/09
KR 10-1257975 B1	2013/04/30	AT 457452 T AU 2006-306384 A1 AU 2006-306384 B2 BR PI0619273 A2 CA 2625547 A1 CA 2625547 C CN 101297189 A CN 101297189 B EP 1943499 A2 EP 1943499 B1 ES 2338165 T3 JP 2009-513978 A JP 4943445 B2 KR 10-2008-0069209 A MY 152491 A NZ 567587 A TW 1432713 B US 2007-0092407 A1 US 2007-0092411 A1 US 2007-0092972 A1 US 2007-0092975 A1 US 2010-0178208 A1 US 7723120 B2 US 8105552 B2 US 8133741 B2 US 8226907 B2 WO 2007-050539 A2 WO 2007-050539 A3	2010/02/15 2007/05/03 2012/06/14 2011/09/20 2007/05/03 2016/06/21 2008/10/29 2015/06/24 2008/07/16 2010/02/10 2010/05/04 2009/04/02 2012/05/30 2008/07/25 2014/10/15 2010/11/26 2014/04/01 2007/04/26 2007/04/26 2007/04/26 2007/04/26 2010/07/15 2010/05/25 2012/01/31 2012/03/13 2012/07/24 2007/05/03 2007/08/30