



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0022603
(43) 공개일자 2025년02월17일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12Q 1/6851</i> (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C12Q 1/6851</i> (2018.05)
<i>C12Q 2537/161</i> (2019.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-0091025</p> <p>(22) 출원일자 2024년07월10일
심사청구일자 2024년07월10일</p> <p>(30) 우선권주장
1020230102912 2023년08월07일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
이창수
대전광역시 유성구 대학로 99, 충남대학교 공과대학 1호관 258호(궁동)</p> <p>레야 강굴리
대전광역시 유성구 대학로 99, 충남대학교 공과대학 1호관 149호(궁동)</p> <p>(74) 대리인
김원준</p> |
|---|---|

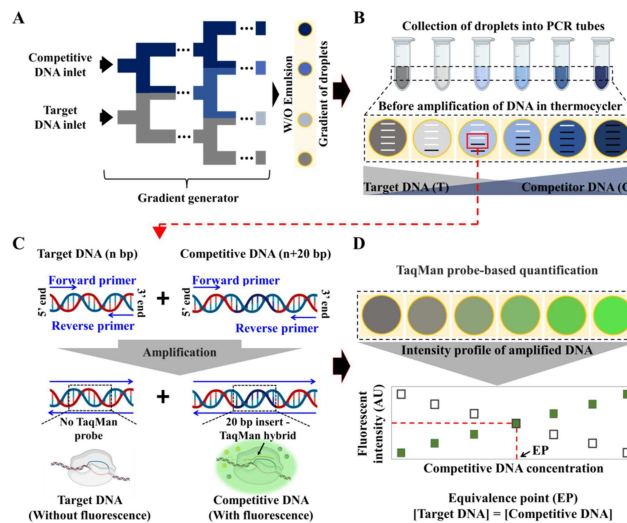
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 미세액적 기반 핵산의 정량 방법

(57) 요약

본 발명은 정밀한 방법에 의해 시료 내 미량의 표적 핵산에 대해 절대량을 정량화할 수 있는 미세액적 기반 핵산의 정량 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (A) 경합 DNA를 설계하고 제작하는 단계; (B) 경합 DNA와 표적 DNA가 교차 농도구배를 갖는 PCR 시료 용액을 포함하는 미세액적의 분산액을 각각 생성하는 단계; (C) 상기 각 미세액적 분산액을 시료로 각각 PCR 증폭을 수행하는 단계; (D) 증폭 산물로부터 경합 DNA의 농도를 각각 측정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세액적 기반 핵산 정량 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2545/107 (2013.01)

C12Q 2561/101 (2019.08)

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2563/159 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180964
과제번호	2021R1A5A8032895
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	생체시계 기반 항노화 융합연구 센터
과제수행기관명	고려대학교세종캠퍼스
연구기간	2021.06.01 ~ 2028.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711185991
과제번호	2021R1A2C3004936
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	노화기전 분석/ 제어를 위한 고속 단일세포 스크리닝 및 생체분자구조 분석 시스템
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2026.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- (A) 경합 DNA를 설계하고 제작하는 단계;
- (B) 경합 DNA와 표적 DNA의 PCR 시료 용액을 포함하며, 경합 DNA와 표적 DNA 중 적어도 하나의 선형 농도구배가 형성되어 있는 미세액적 분산액의 세트를 제조하는 단계;
- (C) 상기 미세액적 분산액의 세트를 구성하는 각 미세액적 분산액을 시료로 각각 PCR 증폭을 수행하는 단계;
- (D) 각 증폭 산물에서 경합 DNA의 증폭량을 측정하는 단계; 및
- (E) 경합 DNA 증폭량이 표적 DNA를 포함하지 않는 대조군의 50%가 되는 경합 DNA의 농도를 표적 DNA의 농도로 결정하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세액적 기반 핵산 정량 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 경합 DNA는 5'-말단측 및 3'-말단측의 서열이 표적 DNA의 5'-말단측 및 3'-말단측의 서열과 각각 동일하고, 표적 DNA의 서열과 무관한 인서트 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세액적 기반 핵산 정량 방법,

이때 말단측은 PCR 증폭 시 각 프라이머와의 결합부위를 칭함.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 (B) 단계에서, 이때 각 채널에서 생성된 미세액적에는 경합 DNA와 표적 DNA의 교차 농도구배가 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 미세액적 기반 핵산 정량 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 (B) 단계는 농도구배 영역을 포함하는 미세유체 장치에 의해 복수의 채널에서 농도구배를 갖는 단분산성의 미세액적이 생성되는 것을 특징으로 하는 미세액적 기반 핵산 정량 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 (C) 단계의 PCR 증폭은 PDMS 플러그가 장착된 PCR 튜브 내에서 수행되는 것을 특징으로 하는 미세액적 기반 핵산 정량 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 (B) 단계에서 상기 분산액을 이루는 연속상은 끓는점이 120℃ 이상인 오일상인 것을 특징으로 하는 미세액적 기반 핵산 정량 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,

상기 (D) 단계는,

(a) 상기 증폭산물이 함유된 미세액적 분산액으로부터 수층을 분리하는 단계;

(b) 수층 시료를 전기영동하는 단계; 및

(c) 전기영동 결과물로부터 해당 증폭산물을 정량하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세액적 기반 핵산 정량 방법.

청구항 8

청구항 2에 있어서,

상기 (A) 단계에서 경합 DNA는 상기 인서트 서열과 상보적인 서열을 갖는 TaqMan 프로브와의 하이브리드 형태인 것을 특징으로 하는 미세액적 기반 핵산 정량 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 (D) 단계는,

미세액적 분산액 그 상태로 미세액적의 형광강도를 분석하는 것을 특징으로 하는 미세액적 기반 핵산 정량 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 정밀한 방법에 의해 시료 내 미량의 표적 핵산에 대해 절대량을 정량화할 수 있는 미세액적 기반 핵산의 정량 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 의학 유전학, 바이러스학, 법의학, 산업, 연구 및 진단과 같은 광범위한 응용 분야에서 생물학적 시료 중의 핵산의 양을 정확하게 측정하는 것은 필수적이다. 종래의 중합효소 연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)은 복잡한 생물학적 시스템에서 미량의 핵산을 검출하는 강력한 도구이지만, 최종 증폭산물의 양이 시료내 표적 핵산의 농도를 반영하는 것이 아니므로 정량에 사용하기는 어렵다. 그 주된 이유로는 PCR의 기하급수적인 증폭 특성으로 인한 정체가 생성을 들 수 있다. 즉, 반응이 진행됨에 따라 PCR 증폭산물 양에 영향을 미치는 구성 요소의 소비로 인한 기질이나 프라이머의 고갈, 중합효소의 활성 저하, 반응 부산물에 의한 합성 반응의 저해, 생성된 DNA 가닥의 재결합 등 여러 요인으로 인해 증폭산물의 생성량은 정체기에 도달한다. 따라서 지속적으로 증폭산물이 생성되는 조건을 찾아내고, PCR 증폭산물을 전기영동에서 검출할 수 있는 생성량 범위 내에서 정량하는 경우에만 유의미한 정량이 이루어질 수 있으나, 실제 시료 중 다양한 농도의 주형들에 대해 상기 조건을 충족시키는 것은 쉽지 않다.

[0003] 이러한 문제를 해결하기 위하여 정량분석이 가능한 PCR 방법들이 제안되었다. Real-Time PCR은 형광 리포터를 이용하여 사이클마다 실시간으로 PCR 증폭산물의 양을 측정한다. 형광 리포터로는 dsDNA에 결합하여 형광을 나

타내는 시약 또는, 일말단에 형광물질이, 타 말단에 켄처가 수식되며 주형에 혼성화되었다가 증폭에 의해 분해되어 형광을 발하는 TaqManTM 프로브, 또는 헤어핀 이차구조로 혼성화 시 형광을 발하며 증폭 시 유리되어 형광을 발하지 않는 올리고뉴클레오 프로브(Molecular Beacon) 등이 사용된다. 상기 방법에서는 지수적으로 증폭산물이 생성되는 구간에서 일정 증폭산물량이 되는 사이클 수(임계 사이클 C_T)로부터 정량 정보를 얻는 것에 의해 종래 PCR의 정체가 생성으로 인한 문제를 해결하였다. 그러나 초기 주형의 농도가 최종 증폭수율에 영향을 미칠 뿐 아니라 튜브간 증폭 효율의 편차로 인하여 C_T 값을 활용한 정량화 정확도에 한계가 있다. 대조 유전자와 공동 증폭하는 경우 튜브 간 증폭 효율의 편차를 보정할 수 있으나, 대조 유전자가 표적 유전자와 다른 수준에서 증폭되는 경우 지수적 증폭 단계에서 데이터를 얻는 것이 어려울 수 있다.

[0004] 경합 PCR(competitive PCR)에 의하면 Real-Time PCR(qPCR)의 한계를 극복할 수 있다. 상기 방법에서는 표적 핵산과 동일한 프라이머에 의해 증폭될 수 있는 경합자(competitor)를 시료 중에서 동시에 증폭하는 것에 의해 프라이머와 결합을 위해 표적과 경합자가 경합하도록 하면, 증폭산물의 비율은 시료 중 경합자와 표적의 비율을 반영한다는 것을 이용한다. 시료 중 경합자와 표적의 양이 같은 경우, 증폭산물에서도 경합자 및 표적에 의해 생성된 증폭산물의 양이 같아지므로 이로부터 시료 중 표적 핵산의 양을 정량할 수 있다. 그러나 PCR 증폭 후 경합자 및 표적에 의한 증폭산물을 제한효소 처리 단편의 크기로 구분하기 때문에 본 방법은 전기영동을 기반으로 증폭산물을 분석한다. 전기영동 기반 검출 및 분석은 처리량이 낮고 헤테로이합체(경합자/표적 하이브리드) 분석에 효과적이지 않다. 일반적으로 아가로스 겔 전기영동 후 염색된 겔에서 DNA 밴드를 정량화하기 위하여 겔 밀도계(gel densitometer)를 사용하는 데, 겔 밀도계는 정확성에도 불구하고 몇 가지 주요 문제로 인해 밀도 측정에서 잘못된 결과가 나올 수 있다. 특히 아가로스 겔 농도와 두께는 겔 염색과 이미지 품질에 영향을 미칠 수 있으며, 염색된 겔은 결합되지 않은 염료로 인해 불균일한 배경 노이즈를 생성할 수도 있다. 또한 겔에서 염색된 DNA 밴드의 강도는 자외선 조명에 의해 손상되어 시간이 지남에 따라 감소한다. 이로 인해, PCR 단계의 경쟁력에도 불구하고 정확한 정량 결과를 얻을 수 없다는 문제가 있다.

[0005] 디지털 PCR(dPCR, digital PCR)은 포와송(Poisson) 통계에 기반하여 표적 서열의 정량을 가능하게 하는 새로운 핵산 검출방법이다. 이 중에서도 반응액을 에멀전의 형태로서 수천~수십만개의 미세 액적으로 분할하는 방법을 ddPCR(droplet digital PCR)이라 한다. 반응액이 분할된 액적에서 표적 유전자의 증폭이 검출되면 1, 표적 유전자의 증폭이 검출되지 않는다면 0으로 계수한다. 상기 계수값으로부터 푸아송 분포를 통해 표적 유전자의 복제 수를 계산하여, 시료 중 표적 핵산의 농도를 확인할 수 있다. ddPCR은 각 액적을 양성 또는 음성으로 식별하기 위해 단순히 0 또는 1의 값을 사용하므로, 복잡한 혼합물 상태에서도 PCR 효율의 차이로 인한 오차와 무관하게 표적 유전자를 용이하게 분석할 수 있다. 그러나 통계에 기반한 정량이기 때문에, 분석 대상 액적의 수에 정확도가 의존하며 실제로는 모든 반응 대상 액적을 분석하지 않는 한 절대적인 핵산 농도를 측정할 수 없다.

[0006] 이에 간단하고 정밀한 방법에 의해 시료 내 핵산의 양을 정량화할 수 있는 경쟁력 있는 방법이 여전히 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-2036609

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Proceedings of the National Academy of Sciences. 96, 9236-9241 (1999).

(비특허문헌 0002) Journal of clinical microbiology. 46, 1897-1900 (2008).

(비특허문헌 0003) Clinical microbiology and infection. 10, 190-212 (2004).

(비특허문헌 0004) Biotechniques. 13, 444-449 (1992).

(비특허문헌 0005) Nucleic acid research. 17, 9437-9446 (1989).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 미세액적을 기반으로 시료 내 미량의 표적 핵산의 절대량을 정량할 수 있는 간단하고 정밀한 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 상기에 언급되어 있지 않더라도, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다. 또한, 발명을 설명함에 있어서 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 (A) 경합 DNA를 설계하고 제작하는 단계; (B) 경합 DNA와 표적 DNA의 PCR 시료 용액을 포함하며, 경합 DNA와 표적 DNA 중 적어도 하나의 선형 농도구배가 형성되어 있는 미세액적 분산액의 세트를 제조하는 단계; (C) 상기 미세액적 분산액의 세트를 구성하는 각 미세액적 분산액을 시료로 각각 PCR 증폭을 수행하는 단계; (D) 각 증폭 산물에서 경합 DNA의 증폭량을 측정하는 단계; 및 (E) 경합 DNA 증폭량이 표적 DNA를 포함하지 않는 대조군의 50%가 되는 경합 DNA의 농도를 표적 DNA의 농도로 결정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세액적 기반 핵산 정량 방법에 관한 것이다.

[0012] 즉, 본 발명은 종래기술에 의한 경합 PCR을 미세액적 기반으로 실시하는 것에 특징이 있다. 종래 미세액적 기반 PCR의 ddPCR은 임계 값을 기준으로 단순히 0 또는 1로 액적 내 표적의 증폭을 판단하고, 푸와송 통계에 의존하기 때문에 모든 반응 대상 액적을 분석하지 않는 한 절대적인 핵산 농도를 측정할 수 없다는 한계가 있다. 그러나 본 발명은 경합 PCR을 미세액적에서 구현하기 때문에 핵산의 절대 정량이 가능하게 된다. 또한 하나 하나의 미세액적이 하나의 반응 시스템으로 작용하므로, 수백~수십만개의 미세액적이 분산된 분산액의 증폭 후 이를 분석하면 수백~수십만회 반복 시험한 것과 동일한 효과를 나타내어 정밀한 시험이 가능하다.

[0013] 본 발명은 경합 PCR을 접목한 것이므로, 상기 (A) 단계의 경합 DNA는 경합 PCR에서의 경합자와 동일한 조건을 만족하도록 설계하여 제작할 수 있다. 즉, 상기 경합 DNA는 (i) 표적 DNA와 같은 프라이머로 증폭할 수 있어야 하고, (ii) PCR 증폭 후 표적 DNA와 구분할 수 있어야 하며, (iii) 시험에 사용하는 경합 DNA의 양(농도)을 측정할 수 있어야 한다. 당업자라면 종래 기술의 경합 PCR 방법에 의거하여 경합 DNA를 설계하고 제작하는 것은 용이할 것이다.

[0014] 상기 (i)의 조건을 만족하기 위해서는 경합 DNA는 표적 DNA와 5'-말단측 및 3'-말단측의 서열이 동일하여야 한다. '말단측'이라 함은 PCR 증폭에 사용하는 프라이머가 결합하는 부위의 서열을 의미한다. 동시에 (ii)의 조건을 만족하기 위해서 경합 DNA는 표적 DNA와는 서열 특성이 상이하여야 하므로, 표적 DNA의 서열과 무관한 인서트 서열을 포함하여야 한다. 또한 경합 DNA와 표적 DNA의 증폭 시 동역학적 차이가 크지 않기 위해서는 전체 크기 및 서열의 차가 크지 않은 것이 바람직하다. 따라서 경합 DNA와 표적 DNA의 크기는 동일하거나 혹은 5% 내의 차이를 갖고, 상기 인서트 서열을 제외한 서열은 표적 서열과 동일한 것이 더욱 바람직하다. 상기 인서트 서열은 경합 DNA를 표적 DNA와 구분되게 할 수 있는 정도면 충분하므로 10~30 bp 크기인 것이 바람직하다.

[0015] 상기 (B) 단계는 경합 DNA와 표적 DNA의 PCR 시료 용액을 포함하며, 경합 DNA와 표적 DNA 중 적어도 하나의 농도구배가 형성되어 있는 미세액적 분산액의 세트를 제조하는 단계이다. 즉, (B) 단계에서는 경합 DNA 및/또는 표적 DNA의 농도가 상이한 미세액적 분산액의 세트가 형성된다. 도 10을 예를 들면, 미세액적 중 표적 DNA와 경합 DNA의 농도가 상이한 8가지의 서로 다른 조성을 갖는 미세액적 분산액으로 이루어진 C1~C8의 미세액적 분산액 세트가 형성된다. 상기 미세액적 분산액 세트에서 미세액적 분산액 간 미세액적에는 경합 DNA와 표적 DNA 중 적어도 하나의 농도구배가 형성되어 있다. 도 10에서는 경합 DNA와 표적 DNA 모두의 농도구배가 형성된 예를 보여준다. 도 10과 같이 경합 DNA와 표적 DNA 모두의 농도구배가 형성된 경우에는, 교차 농도구배가 형성되어 있는 것이 바람직하다. "교차 농도구배"를 갖는다고 하는 것은 두 개의 미세액적 분산액을 비교하였을 때, 분산액을 구성하는 미세액적에서 경합 DNA의 농도가 증가하는 경우 반대로 표적 DNA의 농도는 감소함을 의미한다. 상기 미세액적은 PCR 시료 용액으로 구성되어 하나의 미세액적이 하나의 PCR 반응액으로 작용한다. 따라서 상기 미세액적에는 경합 DNA 및/또는 표적 DNA 뿐 아니라 프라이머 쌍이나 폴리머라제, 기질 등 PCR 증폭을 위해 필요한 물질들이 모두 포함되어 있어야 함은 당연하다.

[0016] 상기 미세액적은 미세유체 장치에 의해 생산되는 단분산성 미세액적인 것이 바람직하다. 단분산성 미세액적에

서 반응이 진행됨에 따라, 각 미세액적당 PCR 증폭 환경의 편차를 최소화할 수 있다. 미세액적을 미세유체 장치에 의해 생산하는 경우, 상기 미세유체 장치는 농도구배 영역을 포함하는 것이 더욱 바람직하다. 농도구배 영역을 포함하는 장치를 사용하는 경우, 1회의 조작만으로도 경합 DNA와 표적 DNA가 교차 농도구배를 갖는 단분산성 미세액적의 분산액을 각각 생성할 수 있다. 예를 들면, 실시예에 기재한 구조를 비롯하여 미세유체 장치의 농도구배 영역은 종래 기술에 의해 구체적인 구조들이 개시되어 있으므로 상세한 설명은 생략한다. 상기 미세유체 장치는 구체적으로 한 쌍의 주입구; 상기 주입구로 주입된 유체가 농도구배를 갖는 복수의 채널로 분기되는 농도구배 영역; 오일 주입구; 주입된 오일이 상기 복수의 채널과 연결된 유로에 각각 분배되어 합류하는 흐름-집중 구조; 및 상기 각 흐름-집중 구조에서 생성된 미세액적이 배출되는 배출구;를 포함하도록 구성될 수 있다.

[0017] 상기 (C) 단계는 각 미세액적 분산액을 시료로 각각 PCR 증폭을 수행하는 단계이다. 미세액적 분산액은 예를 들면, 미세유체 장치의 배출구로부터 PCR 튜브로 수집되어 PCR 반응을 수행할 수 있으며, 혹은 상기 배출구에 연결되어 형성된 챔버에서 PCR 증폭 반응을 수행할 수 있도록 PCR 증폭 반응기와 일체형으로 구성할 수도 있다. PCR 튜브에서의 PCR 증폭 시에는 PCR 튜브 내에 PDMS 플러그를 장착한 후 증폭하는 것에 의해 고온 처리에 따른 미세액적의 파괴 변화를 최소화할 수 있다. 또한 미세액적의 분산액을 이루는 연속상은 증폭과정에서 연속상 자체가 증발하지 않도록 끓는 점이 적어도 100℃ 이상, 바람직하게는 120℃ 이상이어야 한다.

[0018] 상기 (D) 단계는 각 증폭 산물에서 경합 DNA의 증폭량을 결정하는 단계이다. 본 단계는 통상의 경합 PCR의 분석과 마찬가지로 전기영동에 의해 실시할 수도 있다. 이 경우, 상기 (D) 단계는 (a) 상기 증폭산물이 함유된 미세액적 분산액으로부터 수층을 분리하는 단계; (b) 수층 시료를 전기영동하는 단계; 및 (c) 전기영동 결과물로부터 해당 증폭산물을 정량하는 단계;를 포함한다. 전기영동 결과물로부터 PCR 산물을 정량화하는 것은 예를 들어, 통상의 방법에 따라 에티디움 브로마이드로 염색된 겔을 겔 밀도계로 측정하거나, 혹은 SYBR Green으로 처리하고 형광강도를 측정하는 것에 의해 수행될 수 있다. 이 경우, 경합 DNA의 증폭량만을 분석하거나, 혹은 추가로 표적 DNA의 증폭량을 함께 분석할 수도 있다. 경합 DNA와 표적 DNA의 증폭량을 모두 분석하는 경우에는 하기 (E) 단계에서 경합 DNA 증폭량이 표적 DNA를 포함하지 않는 대조군의 50%가 되는 경합 DNA의 농도를 표적 DNA의 농도로 결정하는 방법 외에 표적 DNA와 경합 DNA의 측정값이 같아지는 등가점의 경합 DNA 농도를 표적 DNA 농도로 결정할 수도 있다.

[0019] 전기영동은 PCR 후 절차가 번거롭고 많은 시간이 소요되며, 표적 DNA와 경합 DNA에 유래한 밴드들의 강도 차이가 10배 이상인 경우 강도가 약한 밴드의 정량화 값이 부정확하게 되는 문제가 있다. 또한 SYBR Green은 모든 이중 가닥 DNA를 검출하는 것으로 부산물에도 비특이적 반응 생성물을 생성하므로 정량값에 오차를 야기할 수 있다. 이의 대안으로 TaqMan 프로브를 이용하여 표적 DNA를 정량할 수 있다. 이를 위하여는 상기 (A) 단계에서의 경합 DNA는 상기 인서트 서열과 상보적인 서열을 갖는 TaqMan 프로브와의 하이브리드 형태이어야 한다. PCR 증폭이 이루어짐에 따라 TaqMan 프로브는 분해되어 형광기와 퀀처가 분리됨에 따라 반응액이 형광을 나타낸다. 따라서 형광강도를 측정하는 것에 의해 경합 DNA를 정량할 수 있다.

[0020] 도 1은 TaqMan 프로브를 사용하여 본 발명에 의한 미세액적에서의 경합 PCR을 기반으로 하는 DNA 정량 방법을 도면으로 설명한 것이다. 미세액적에서 경합 PCR을 수행하기 위하여, 연속적으로 분기된 미세채널을 갖는 피라이드 형상의 농도구배 영역을 갖는 미세유체 장치를 사용하여 표적 DNA와 경합 DNA의 농도 구배를 형성하도록 하였다(도 1의 A). 각 채널의 배출구는 액적 생성 정선으로 이어져 미세액적을 생성한다. 도 1의 B에 도시된 바와 같이 생성된 미세액적은 증폭을 위하여 PCR 튜브로 수집된다. 경합 PCR에서 표적 DNA와 경합 DNA의 농도는 증폭과정 동안 일정하게 유지되며, 따라서 증폭 산물의 비율은 미세액적의 농도 구배에 따라 선형 관계를 나타낸다. 도 1의 C는 액적 내에서 PCR 증폭산물을 정량하기 위한 기본 메카니즘으로 TaqMan 프로브-기반의 기술을 설명하며, 도 1의 D는 투입된 경합 DNA의 양에 따른 형광강도의 형태로 증폭된 경합 DNA 산물을 정량할 수 있음을 보여준다. 경합 DNA/표적 DNA의 비율이 1에 해당하는 등가점(EP)에서 형광강도는 경합 DNA만을 포함하는 시료의 50%가 되며, 따라서 형광강도가 50인 지점에서의 경합 DNA의 양에 의해 표적 DNA의 양을 산출할 수 있다. 이때 미세액적 분산액의 세트를 구성하는 미세액적 분산액의 종류가 많을수록(즉, 미세유체 장치의 채널 수가 많을수록) 등가점을 정확하게 예측할 수 있다.

[0021] 도 10과 도 12에 경합 DNA와 표적 DNA 중 어느 시료의 농도구배를 형성하는 지에 따라 형광강도로부터 표적 DNA의 농도를 측정하는 그래프를 나타내었다. 어느 시료에 대해 농도구배를 형성하는 지와 무관하게 대조군(즉, 표적 DNA 시료를 포함하지 않는 시료)의 형광강도를 100이라 하였을 때, 형광강도가 50인 지점의 경합 DNA 농도(C_{eq})로부터 표적 DNA 농도를 계산할 수 있다.

[0022] 1) 경합 DNA와 표적 DNA가 교차 선형 농도구배되는 경우(도 10)

[0023] 경합 DNA와 표적 DNA가 각각 $0 \sim C_i$, $T_i \sim 0$ 의 농도로 교차 선형 농도구배되는 경우, 경합 DNA의 농도가 증가하는 순서로 미세액적 분산액 세트의 경합 DNA와 표적 DNA의 농도를 표시한(예를 들어, 도 10의 그래프에서의 x축인 채널 아웃렛 순서와 같이) 그래프에서 경합 DNA의 농도와 표적 DNA의 농도 C와 T는 각각 다음과 같이 표시된다. 이하에서는, 설명의 단순화를 위해 미세유체 장치의 채널을 예를 들어 설명한다.

[0024] $C = ax = kC_i x$

[0025] $T = T_i - bx = T_i - kT_i x = (1 - kx) T_i$

[0026] $C1 \sim Cn$ 의 미세유체 채널을 갖는 미세유체 장치에서 $k=1/(n-1)$ 이며, $x=(n-1)$ 이다. 따라서 실제로 x는 $0 \sim (n-1)$ 까지의 정수이지만, 선형 농도구배가 이루어지므로 임의의 농도를 갖는 정수가 아닌 x값을 구할 수 있다. 이는 추후 등가점에서의 농도 환산에 사용된다.

[0027] 형광강도가 50인 지점(등가점)에서의 경합 DNA 농도(C_{eq})는 해당 지점에서 표적 DNA의 농도(T_{eq})와 동일하므로,

[0028] $T_i = C_{eq} / (1 - C_{eq}/C_i)$

[0029] 에 의해 시료 중 표적 DNA의 농도를 계산할 수 있다.

[0030] 2) 표적 DNA만 선형 농도구배되고, 경합 DNA의 농도는 일정한 경우(도 12의 A)

[0031] 경합 DNA의 농도는 일정하게 유지되기 때문에, 등가점에서의 표적 DNA의 농도로부터 시료 중 표적 DNA의 농도를 계산하여야 한다. 등가점에서의 표적 DNA의 농도($T_{eq}=C$)와 등가점의 위치(x_{eq})를 알고 있으므로,

[0032] $T_{eq} = C = (1 - kx_{eq}) T_i$

[0033] 의 수식을 이용하여, T_i 를 계산할 수 있다.

[0034] 3) 경합 DNA만 선형 농도구배되고, 표적 DNA의 농도는 일정한 경우(도 12의 B)

[0035] 표적 DNA의 농도는 일정하게 유지되기 때문에, 등가점에서의 경합 DNA의 농도는 시료 중 표적 DNA의 농도와 같다. 따라서 하기 수식과 같이 등가점의 위치(x_{eq})로부터 계산된 C_{eq} 값을 표적 DNA의 농도로 산출할 수 있다.

[0036] $C_{eq} = kC_i x_{eq} = T_i$

[0037] 실시예에 기재된 바와 같이, 표적 DNA와 경합 DNA의 교차 농도구배가 형성된 경우에는 시료 중 표적 DNA 농도와 경합 DNA 농도의 상대적인 크기와 상관없이 표적 DNA의 농도를 한번의 실험에서 계산할 수 있으나, 표적 DNA 또는 경합 DNA 하나에 대해서만 농도구배를 형성하는 경우에는 각각 $C \geq T$ 또는 $C \leq T$ 인 경우에만 표적 DNA의 농도를 계산할 수 있다. 따라서 시료 중 표적 DNA의 농도에 대한 정보가 전혀 없는 경우에는 표적 DNA와 경합 DNA의 교차 농도구배를 이용하는 것이 더욱 바람직하다.

발명의 효과

[0038] 이상과 같이 본 발명의 미세액적 기반 핵산 정량 방법에 의하면, 경합자에 의해 표적 핵산의 양을 정량하므로 PCR 수율과 무관하게 절대 정량이 가능하며, 하나의 미세액적이 하나의 반응액에 해당하며 한번의 조작에 의해 수백~수십만개의 반응을 반복실험한 것과 동일한 효과를 얻을 수 있으므로 보다 신뢰성 높은 핵산 정량이 가능하다.

[0039] 특히 경합자를 TaqMan 프로브와 결합된 하이브리드 형태로 사용하여 PCR 증폭 후 미세액적에서 TaqMan 프로브 유래의 형광강도를 측정하여 정량하는 경우, 미량의 표적 핵산에 대해서도 간단하고 정밀하게 정량할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 본 발명에 의한 미세액적 기반 핵산의 정량 방법을 설명하는 개요도이다.

도 2는 미세액적 기반 핵산 정량을 위한 미세액적 생성 장치 및 그에 의한 농도구배를 보여주는 도면이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 의한 미세유체 장치의 농도구배 영역에서 농도구배가 선형적으로 이루어짐을 보여

주는 도면이다.

도 4는 PCR을 위한 미세액적의 생성 조건 및 PCR 최적화 과정을 보여주는 도면이다.

도 5는 표적 DNA 및 경합 DNA의 제작을 설명하는 도면이다.

도 6은 벌크 시스템에서의 경합 PCR 결과를 보여주는 이미지 및 그래프이다.

도 7은 농도구배를 갖는 미세액적 기반의 PCR 결과를 보여주는 도면이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 의한 미세유체 장치에서 DNA의 교차 농도구배가 형성됨을 보여주는 이미지 및 그래프이다.

도 9는 TaqMan 프로브의 혼성화를 보여주는 개요도 및 혼성화에 필요한 TaqMan 프로브의 양을 나타내는 그래프이다.

도 10은 미세액적 기반 경합 PCR에 의한 시료 분석을 보여주는 이미지 및 그래프이다.

도 11은 미세액적 기반 경합 PCR 후 전기영동에 의한 분석 결과를 보여주는 이미지이다.

도 12는 미세액적 기반 경합 PCR에 의한 시료 분석을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0042] [실시예]

[0043] 실시예 1 : 미세유체 장치의 제작

[0044] 도 2의 A는 경합 PCR을 수행하기 위하여 농도구배를 갖는 액적을 생성하기 위한 미세유체 장치의 모식도로, 본 미세유체 장치는 농도구배 영역과 미세액적 생성영역을 포함한다.

[0045] 미세유체 장치(1)는 통상의 광식각 및 소프트 식각 기술을 사용하여 제작하였다. 미세유체 장치의 기판은 3인치 실리콘 웨이퍼 상에 마스크 얼라이너(MDA-400M)를 통해 네가티브형 포토리지스트 상에 UV를 조사하여 식각하는 것에 의해 제조하였다. 구체적으로 SU-8 3050을 실리콘 웨이퍼 상에 2789 rpm 또는 778 rpm으로 30초간 농도구배 영역 또는 오일 분배 채널의 높이에 해당하는 50 μm 또는 200 μm 두께가 될 때까지 각각 스핀코팅하였다. SU-8 현상액으로 마스터를 현상하고, 소프트 식각 동안 폴리디메틸실록산(PDMS, polydimethylsiloxane; Sylgard 184, Dow Corning)에 부착되는 것을 방지하기 위하여 (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl)-1-trichlorosilane으로 표면을 처리하였다.

[0046] 복제 몰드 제조를 위하여 PDMS 베이스와 경화제(10 : 1 w/w)를 혼합하여 몰드에 부어준 후 진공 챔버에서 내부의 가스를 제거하고 65°C에서 12시간 경화하였다. 경화된 PDMS를 마스터 몰드로부터 분리하고 편치를 사용하여 오일 주입구(13)를 형성하였다. 오일 분배 채널을 위한 두 번째 PDMS 층을 플라즈마 처리(Plasma cleaner, PDC-002 (230V); Harrick plasma)하여 오일 주입구 상에 정렬하였다. 마지막으로 구멍을 뚫어 모든 다른 주입구와 배출구를 형성하였다. PDMS가 코팅된 유리 슬라이드의 표면과 미세유체 장치의 표면을 모두 플라즈마로 처리하고 부착시켰다. 실험 전 미세유체 장치의 가스를 제거하고 튜브에 연결하였다.

[0047] 본 실시예의 농도구배 영역(10)에서는 농도구배를 위하여 2개의 주입구(제1 주입구(11) 및 제2 주입구(12))와 9개의 배출구(31)를 갖는 미세유체 채널(50 μm 높이)을 사용하였다. 여기서 분지형 시스템 내의 모든 구불구불한 채널을 연결하는 수평채널(L_h)의 길이는 수직채널(L_v)의 길이보다 짧기 때문에 수평채널의 유체저항은 수직채널의 유체저항에 비해 무시할 수 있다.

[0048] 먼저 노란색과 파란색 염료를 사용하여 농도구배 영역에서 농도구배가 구현되는 것을 확인하였다. 유체는 농도구배 영역을 이동함에 따라 반복적으로 분할, 혼합 및 재결합되며, 최종 분기점인 일곱 번째 분기에 있는 채널의 확대된 현미경 이미지로부터 농도구배가 성공적으로 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 미세유체 채널의 이미지는 CCD 카메라(Coolsnap, Photometrics, Tucson, AZ)가 장착된 역상 형광 현미경(TE2000, Nikon, Japa

n)으로 관찰하였다.

[0049] 농도구배 영역을 지난 유체가 미세액적 생성영역(20)에서 비혼화성 유체(HFE 7500 오일)인 연속상과 함께 액적을 형성하도록 흐름-집중 구조(22)를 통합하여, 하나의 장치에서 농도구배를 갖는 액적을 빠르게 생성할 수 있도록 하였다. 이를 위하여 오일 분배채널(200 μm 높이)을 PDMS 상단에 도입하여 하단 층의 9개의 모든 채널에 연속상이 공급될 수 있도록 하였다. 오일 분배채널(21)에 오일이 채워지면, 도 2의 B에서 확인할 수 있듯이 흐름-집중 구조에서 농도구배 구간을 지난 유체는 가운데 채널로, 오일은 바깥쪽의 양쪽 채널로 흘러 연속상에서 액적을 생성하며, 이어 배출구로 배출된다. 배출된 액적은 도 2의 C 및 D에서 확인할 수 있듯이 단분산성을 나타내었으며, 각 배출구에서 배출되는 미세액적은 도 2의 E에 도시된 바와 같이 농도구배가 생성되었음을 확인할 수 있다.

[0050] 실시예 2 : PCR 적용을 위한 조건 최적화

[0051] 1) 농도구배의 선형성

[0052] 실시예 1에서 제작한 미세유체 장치에서 농도구배가 최대 선형성을 나타낼 수 있는 최적 유속을 결정하기 위하여 동일 규격의 농도구배 구간을 갖고, 배출구가 하나로 모아진 도 3의 A에 도시된 미세유체 장치를 제작하였다. 해당 장치에서 100 μM 농도의 FITC(Fluorescein isothiocyanate) 용액과 DI수를 사용하여 10~100 $\mu\text{L/hr}$ 로 유속을 달리하며 농도구배를 형성하고, 배출구에서의 역상 형광 현미경 이미지를 Image J 소프트웨어로 분석하였다. 이때, FITC 용액과 DI 수의 주입 속도는 동일하게 유지하였다. 도 3의 B는 각 유속에 대한 배출구 단면의 역상 형광 현미경 이미지이고, 도 3의 C는 이를 그래프로 나타낸 것으로 모든 유속에서 측정된 FITC의 농도 프로파일은 선형성을 나타내었다. 최대 선형성은 10 $\mu\text{L/hr}$ 유량에서 얻어졌으며 99% 선형 회귀를 나타내었다.

[0053] 이에 실시예 1에서 제작한 장비를 사용하여 분산상의 속도를 10 $\mu\text{L/hr}$, 연속상의 속도를 500 $\mu\text{L/hr}$ 로 조절하여 농도구배를 갖는 미세액적을 생성하였다. 액적을 이미지화하기 위하여 각 배출구로부터 10 μL 의 액적 로딩 챔버를 갖는 VE cell counting slides(NanoEntek; Cat no.: ATG-EVS-050)에 미세액적을 각각 수집하였다. CCD 카메라가 장착된 역상 형광 현미경으로 액적을 관찰하였으며, Image J (National Institute of Health, Maryland) 및 Image-Pro (Media Cybernetics, City, MD) 소프트웨어를 사용하여 미세액적의 이미지를 분석하여 형광강도를 측정하였다. 구체적으로 먼저 약 300개 미세액적의 형광 이미지를 Image J 소프트웨어를 사용하여 흑백으로 변환하고, 결과 이미지의 경계를 'watershed' 기능을 사용하여 채워주었다. 이미지를 적절한 스케일로 조절한 후 'Analyze particle' 기능을 사용하여 미세액적을 분석하고, 형광강도를 계산하였다. 300 미세액적의 평균 값을 최종 측정치로 사용하였으며, 이하 별도의 언급이 없는 한 미세액적의 분석은 동일한 방법에 의해 실시하였다. 도 4의 A는 상기 방법에 의해 분석된 각 채널에서 얻어진 미세액적의 형광강도로, 채널에 따른 형광강도는 선형성을 나타내었으며, 선형회귀는 99%였다.

[0054] 2) 미세액적의 부피

[0055] 분산상의 유속(Q_{dp})에 대한 연속상의 유속(Q_{cp}) 비, $R=Q_{cp}/Q_{dp}$ 에 따라 생성된 미세액적의 부피 변화를 측정하였다. 각 유속 비에서 미세액적을 역상 현미경으로 이미지화한, Image J 소프트웨어의 'Analyze particle' 기능으로부터 측정된 액적 면적과 직경을 사용하여 부피를 계산하였다. 도 4의 B는 그 결과를 보여주는 것으로 유속 비가 2.5~10의 영역에서는 미세액적의 부피가 유속 비에 크게 의존하였으며, 유속 비가 10 이상에서는 유속 비에 따른 부피 차이가 거의 없었다.

[0056] 3) 고온에서의 미세액적의 부피 변화

[0057] 디지털 PCR 분석에서 미세액적의 증발은 주요한 관심사이다. 따라서 PCR의 증폭 조건(98℃)에서 추가적인 구성의 도입에 의해 액적 부피의 변화를 억제할 수 있는 지 확인하였다.

[0058] 이를 위하여 상기 미세유체 장치를 사용하여 HFE 7500 연속상 내에 FITC를 함유하는 미세액적이 분산된 분산액을 PCR 튜브에 담았다. HFE 7500은 끓는점이 130℃, 밀도 1.559 g/mL이다. PCR 튜브의 상층에 미네랄 오일(끓는점 300℃, 밀도 0.827~0.890 g/mL), FC-40(끓는점 150~200℃, 밀도 1.85 g/mL)을 첨가하거나, PDMS 플러그로 덮어주었다(도 4의 C 참조). PDMS 플러그는 PDMS 중합 후 PCR 튜브의 직경에 맞도록 잘라서 사용하였다. 이후 PCR 증폭 시의 온도에 해당하는 98℃ 30초와 98℃ 10초, 55℃ 30초, 72℃ 15초로 이루어진 사이클을 35회 반복한 후 다시 이미지를 분석하여 부피의 변화를 측정하였다. 도 4의 C와 D에서 (a)는 PCR 사이클 전, (b)는 수집된 상태 그대로 PCR 사이클 진행, (c)~(e)는 각각 미네랄 오일, FC-40 및 PDMS 플러그와 함께 PCR 사이클을

진행한 후의 결과이다. 도 4의 C는 각 시료에 대해 측정된 부피를 그래프로 나타낸 것이고 D는 해당 역상 현미경 이미지이다. 도면으로부터 PDMS 플러그의 적용 시 부피의 변화가 가장 적을 뿐 아니라, 액적이 안정하게 유지되어 액적 간 부피 편차 역시 최소화할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0059] 실시예 3 : 표적 및 경합 주형 DNA의 구축

[0060] 1) 표적 DNA의 제작

[0061] 미세액적 내에서 경합 PCR을 수행하기 위하여, *Bacillus subtilis*의 16S rDNA로부터 표적 DNA를 제작하였다.

[0062] 먼저 *Bacillus subtilis*(ATCC 6051)의 배양액을 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 배양 세포를 수집하였다. 수집된 *Bacillus subtilis*로부터 게놈 DNA(gDNA)를 분리하고, MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification kit (Lucigen, Cat. no.: MC89010)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 정제하여 사용하였다. 추출된 gDNA를 아가로스 겔 전기영동하고, SYBR Green으로 염색하여 도 5의 A에 도시하였다. 이하, 별도의 언급이 없는 한 전기영동 결과물은 SYBR Green으로 염색하여 분석하였다.

[0063] *Bacillus subtilis*의 16S rDNA 서열(GenBank: CP034484.1)로부터 추출된 gDNA로부터 16S rDNA를 증폭할 수 있는 프라이머의 서열을 하기 표 1과 같이 디자인하고, 마크로젠에 의뢰하여 합성하였다. 이하, 모든 실시예에서 자체 디자인한 모든 프라이머와 프로브는 마크로젠에 의뢰하여 합성하였다. 디자인된 프라이머의 유용성을 확인하기 위하여 1 µl gDNA, 1 µl(100 pmol/µl)의 Fe 및 Re 각 프라이머, 25 µl PCR 마스터 믹스(Axen H TaqPCR Master Mix (2X) (Macrogen; Cat no.: MG-E- 005-5))를 4℃에서 PCR 튜브에 넣고 DNase를 포함하지 않는 정제수를 가하여 총 반응액의 부피가 50 µl가 되도록 하였다. 이후 Bio-Rad T100 Thermal Cycler PCR Machine을 사용하여 증폭(98℃ 30초와 98℃ 10초, 55℃ 30초, 72℃ 15초로 이루어진 사이클을 35회 반복)하였으며, 이하 별도의 언급이 없는 한 PCR 증폭은 상기와 동일한 조건에서 수행하였다. 증폭 산물을 전기영동하여 619 bp의 증폭산물이 생성된 것을 확인하였다(도 5의 B). 추가로 Gel elution kit(MEGAquick-spin plus Fragment DNA Purification kit; iNtRON Biotechnology)를 사용하여 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 전기영동 겔 상의 해당 DNA 밴드를 용출하고 마크로젠에 의뢰하여 서열을 분석하였으며, 알려진 16S rDNA 서열과 일치함을 확인하였다.

표 1

	서열(5'-3')	서열번호
Fe	5'- GGCTCAACCGGGGAG-3'	서열번호 1
Re	5'- GCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAG- 3'	서열번호 2

[0065] 2) 경합 DNA의 제작

[0066] 경합 DNA를 구축하기 위해 하기 표적 서열의 28번째 및 29번째 서열 사이에 인서트가 삽입될 수 있도록 표 2의 프라이머 서열을 추가로 디자인하였다. 도 5의 C에 도시된 바와 같이 Fi 프라이머 서열과 Ri 프라이머 서열은 각각 서로 상보적이면서 표적 DNA와는 관련없는 20 nt 길이의 서열을 각각 포함한다.

[0067] 도 5의 D는 경합 DNA의 제작과정을 도시한 개념도이다. Fe-Ri 프라이머쌍과 Fi-Re 프라이머쌍을 각각 사용하여 표적 DNA의 증폭과 동일한 조건에서 PCR 증폭을 수행하였다. 증폭 산물을 1:1의 비율로 혼합하여 95℃에서 1분간 변성시킨 후, 10분에 걸쳐 50℃로 온도를 낮추고 50℃에서 2분, 72℃ 5분간 어닐링하여 헤테로듀플렉스(heteroduplex)를 생성시켰다. 이어서 헤테로듀플렉스를 Fe-Re 프라이머쌍을 사용하여 표적 DNA의 증폭과 동일한 조건에서 PCR 증폭을 수행하였다. 전기영동(도 5의 E) 및 서열 분석을 통하여 경합 DNA에 20 nt 인서트가 성공적으로 삽입된 것을 확인하였다. 본 실시예에 의해 제조된 경합 DNA는 표적 DNA와의 길이 차이가 약 3% 수준으로 표적 DNA와 동일한 동역학에 따라 증폭될 수 있을 것으로 기대된다.

표 2

	서열(5'-3')	서열번호
Fi	5'- GTCGACGGATCCCTGCAGGTGGAATTCCACGTGTA GCGG-3'	서열번호 3
Ri	5'- ACCTGCAGGGATCCGTCGACACTCTCCTCTTCTGCA CTCAAG-3'	서열번호 4

[0068]

[0069]

3) 벌크 시스템에서의 경합 PCR에 의한 검증

[0070]

표적 DNA(T)는 10^6 copies/ μ l에서 10^2 copies/ μ l로 10 배씩 희석되는 반면, 경합 DNA(C)는 10^4 copies/ μ l에서 10^8 copies/ μ l로 10 배씩 농도가 증가하도록 교차 농도구배를 형성하여 도 6의 B에 기재된 것과 같은 혼합 조성물을 제조하였다. 경합 PCR 조성은 상기에서 제조된 혼합 조성물 1 μ l와 Fe-Re 프라이머쌍을 사용하여 전술한 것과 동일한 조건에서 각각 PCR 증폭을 실시하고, 10 μ l 반응액을 사용하여 전기영동하였다. 도 6의 A는 전기영동 후의 역상 형광현미경 이미지로 4~8 레인이 경합 PCR 증폭 결과에 해당한다. 대조군으로 표적 DNA만을 포함하거나(C-/T+), 경합 DNA만을 포함하거나(C+/T-), 표적 DNA와 경합 DNA를 고농도 또는 저농도로 함께 포함하는(C+/T+) 시료에 대해서도 동일 조건에서 PCR 증폭을 실시하였으며, 각각 2, 10, 3 및 9번 레인에서 그 결과를 확인할 수 있다.

[0071]

전기영동 결과로부터 Image J 프로그램을 사용하여 표적 DNA 및 경합 DNA의 형광강도를 정량하여 도 6의 B에 그 그래프로 도시하였다. 경합 DNA 및 표적 DNA의 농도와 형광강도의 상관계수는 각각 0.93 및 0.98이었다. 이 결과는 표적 DNA와 경합 DNA가 동일한 프라이머로 증폭될 수 있으며, 경합 PCR에 사용될 수 있음을 보여준다.

[0072]

실시예 4 : 미세액적 기반의 경합 PCR

[0073]

1) 미세액적에서의 농도구배 형성에 의한 PCR 결과 확인

[0074]

미세액적에서 경합 PCR을 실시하기 전에, 먼저 미세액적에서 표적 DNA의 농도구배가 형성되는 것을 관찰하였다. 이를 위하여 한쪽 주입구로 FITC 대신 0.4 ng/ μ l의 표적 DNA, Fe-Re 프라이머쌍 및 PCR 마스터 믹스를 포함하는 PCR 혼합물을 주입하고, 다른 주입구로는 표적 DNA를 포함하지 않는 PCR 혼합물을 주입하여 농도구배를 갖는 미세액적을 생성하고, 각 배출구로부터 PCR 튜브에 미세액적을 각각 수집하였다. 이후 PCR 튜브에 PDMS 플러그를 장착하고 PCR 증폭을 실시하였다.

[0075]

미세액적으로부터 증폭된 산물을 확인하기 위하여 과량의 오일을 제거하고 Tris-EDTA(TE) 완충액 20 μ l와 클로로폼 70 μ l를 첨가하였다. 용액을 볼텍스로 1분간 균질화하고 13000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 분리한 10 μ l의 수층을 사용하여 전기영동하였다. 도 7의 A는 분석과정을 도시한 도면이며, B는 전기영동 결과 이미지, C는 형광강도에 의해 이를 정량화한 그래프이다. 도 7의 C에서 실험결과는 95%의 선형성을 나타내었다.

[0076]

2) 미세액적에서의 교차 농도구배 형성 확인

[0077]

경합 PCR에서 필수적인 교차 농도구배에 의해 정량화의 유용성을 확인하기 위하여, 경합 DNA의 인서트 서열에 해당하는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단을 CY5 또는 FAM으로 표지한 DNA-CY5(붉은색)와 DNA-FAM(녹색)(마크로젠 의뢰 제작)을 사용하여 교차 농도구배를 형성하였다. 도 8은 그 결과를 보여주는 것으로 각 DNA 농도가 99% 선형성을 갖도록 교차 농도구배되어 미세액적 시스템에서 경합 PCR 수행에 적합함을 나타내었다.

[0078]

3) 경합-TaqMan 하이브리드 DNA의 제작

[0079]

SYBR green을 사용한 액적 내 증폭산물의 정량은 비특이적 반응으로 인하여 정량의 정확도가 낮기 때문에, 먼저 경합 DNA의 20 nt 인서트에 상보적인 서열을 포함하는 프라이머(서열번호 5, 5'-TCGACGGATCCCTGCAGGTAGCA-3')의 5'-말단에 형광을 내는 FAM이 수식되고, 3'-말단에 쉐커인 BHQ1이 수식된 TaqMan 프로브를 마크로젠에 의뢰하여 제작하였다.

[0080]

경합 DNA 서열 내의 20 nt 인서트(insert)로 TaqMan 프로브를 어닐링하기 위하여, 먼저 분광 광도계(NanoDrop, Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 경합 DNA를 정량하였다. 경합 DNA(100 ng/ μ l)와 TaqMan 프로브(0~300ng/ μ l)를 PCR 튜브에 넣고 총 반응액 부피가 50 μ l가 되도록 어닐링 버퍼(10mM Tris, pH 7.5~8.0, 50mM

NaCl 및 1mM EDTA)와 혼합하였다. 이후, 95℃ 2분, 25℃ 45분으로 처리하여 어닐링하였으며, 어닐링 결과 생성된 경합-TaqMan 하이브리드 DNA는 4℃에서 보관하며 사용하였다. 도 9의 A는 경합-TaqMan 하이브리드 DNA의 제작 및 이의 PCR 증폭 시 형광을 발하는 원리를 보여주는 모식도이다.

[0081] 도 9의 B는 혼성화에 사용된 TaqMan 프로브의 농도에 대한 경합-TaqMan 하이브리드 DNA의 형광강도를 나타낸 것으로 100 ng/ μ l 경합 DNA에 대해 250 ng/ μ l 농도의 TaqMan 프로브를 사용하여야 충분한 혼성화가 이루어짐을 확인할 수 있다.

[0082] 4) 미세액적 기반의 경합 PCR에 의한 핵산의 정량

[0083] 표적 DNA와 경합 TaqMan 하이브리드 DNA가 함유된 액적에서 PCR 증폭을 수행하면, 표적 DNA의 증폭에서는 형광의 변화가 없는 반면 경합 TaqMan 하이브리드 DNA의 증폭 시에는 도 9의 A에서 설명한 바와 같이 TaqMan 프로브가 분해되어 형광이 유발된다. 이를 이용하여, 경합 TaqMan 하이브리드 DNA(이하, '경합 DNA'로 약칭함)의 농도구배를 형성하여 형광을 측정하는 것에 의해 표적 DNA의 정량이 가능하다. 표적 DNA는 선택적으로 농도구배를 형성할 수 있다. 하기에서는 각 경우에 대해 설명한다.

[0084] (1) 경합 DNA와 표적 DNA 모두의 농도구배를 이용

[0085] 경합 DNA와 표적 DNA가 미세유체 장치 내에서 교차 농도구배를 갖도록 주입하면, 각각은 각 채널에서 선형적으로 농도가 증가하거나 감소한다. 경합 DNA에 의한 형광강도는 (경합 DNA의 농도)/(경합 DNA의 농도 + 표적 DNA의 농도)에 비례한다. 형광강도의 그래프는 주입된 경합 DNA 용액에서 경합 DNA의 농도(C)와 표적 DNA 용액에서 표적 DNA의 농도(T)에 따라 그 형상이 다르며, 이는 도 10의 B에서 확인할 수 있다. 즉, C>T인 경우에는 위로 볼록한 모양의 그래프가, C<T인 경우에는 직선 그래프가, C=T인 경우에는 아래로 오목한 모양의 그래프가 얻어진다. 그래프의 형상에 상관없이, 표적 DNA의 농도는 형광강도가 50인 경합 DNA의 농도로부터 계산될 수 있다.

[0086] 실제 장치에서 해당 결과를 확인하기 위하여, 실시예 1에서 제작한 미세유체 장치에 0.4 ng/ μ l 농도의 표적 DNA 또는 경합 TaqMan 하이브리드 DNA를 포함하는 PCR 용액을 두 개의 주입구로 각각 주입하였다. 이에 의해 생성된 표적 DNA와 경합 TaqMan 하이브리드 DNA가 교차 농도구배를 갖는 PCR 혼합물 미세액적을 수집하여 PDMS 플러그를 장착시킨 상태로 PCR 증폭하였다. 이후 50 μ l의 증폭된 산물을 OPTIPLATE-96/50B(PerkinElmer; Cat no.-DW0-6005270)로 옮기고 Perkin Elmer(HTS Multi-Label Reader(Perkin Elmer LAS 모델))로 형광강도를 정량하였다. 도 10의 A는 역상 형광현미경(여기 파장 495 nm/발광 파장 520 nm)으로 액적을 관측한 결과 이미지이며, 도 10의 C는 이로부터 형광강도를 계산하여 도시한 그래프로, 도 10의 B에서 선형성이 예측된 바와 같이 98%의 선형성을 나타내었다. 도 10의 B에서 경합 TaqMan 하이브리드 DNA의 형광강도가 50 a.u.인 농도가 표적 DNA의 농도에 해당한다.

[0087] 도 11은 경합 PCR에 의한 증폭산물을 겔 전기영동에 의해 분석한 결과를 보여주는 이미지이다. 상기 결과에서 C2에서 C8로 이동함에 따라 DNA 밴드가 619bp에서 639bp 위치로 점차 이동하여 경합 DNA가 증폭되었음을 나타내었다. 그러나 미세액적 기반의 시험에서는 미량의 시료만을 사용하기 때문에 시료의 농도가 낮아 전기영동에 의한 신호 강도로부터 정량을 실시하기는 어려웠다.

[0088] (2) 표적 DNA 용액의 농도구배를 이용

[0089] 미세유체 장치에서 경합 DNA는 모든 채널에서 동일 농도를 유지한 채 표적 DNA의 농도구배만을 형성하도록 할 수 있다. 도 12의 A는 표적 DNA만의 농도구배 시 C와 T의 상대적인 농도에 따른 대표적인 예시 그래프를 보여주는 것이다.

[0090] 도 12의 A에서 확인할 수 있듯이, C=T이거나 C<T인 경우에는, 형광강도가 50인 지점의 경합 DNA 농도로부터 표적 DNA의 농도를 계산할 수 있다. 그러나, C>T인 경우에는 형광강도가 50인 지점을 얻을 수 없으며, 따라서 정확한 표적 DNA의 농도를 계산하기 어렵다.

[0091] (3) 경합 DNA 용액의 농도구배를 이용

[0092] 미세유체 장치에서 표적 DNA는 모든 채널에서 동일 농도를 유지한 채 경합 DNA의 농도구배만을 형성하도록 할 수 있다. 도 12의 B는 경합 DNA만의 농도구배 시 C와 T의 상대적인 농도에 따른 대표적인 예시 그래프를 보여주는 것이다. 본 방법의 경우에는, 표적 DNA를 포함하지 않고 경합 DNA만이 존재하는 채널이 없기 때문에 측정된 형광강도를 보정(normalization)하기 위한 대조군 실험을 요한다.

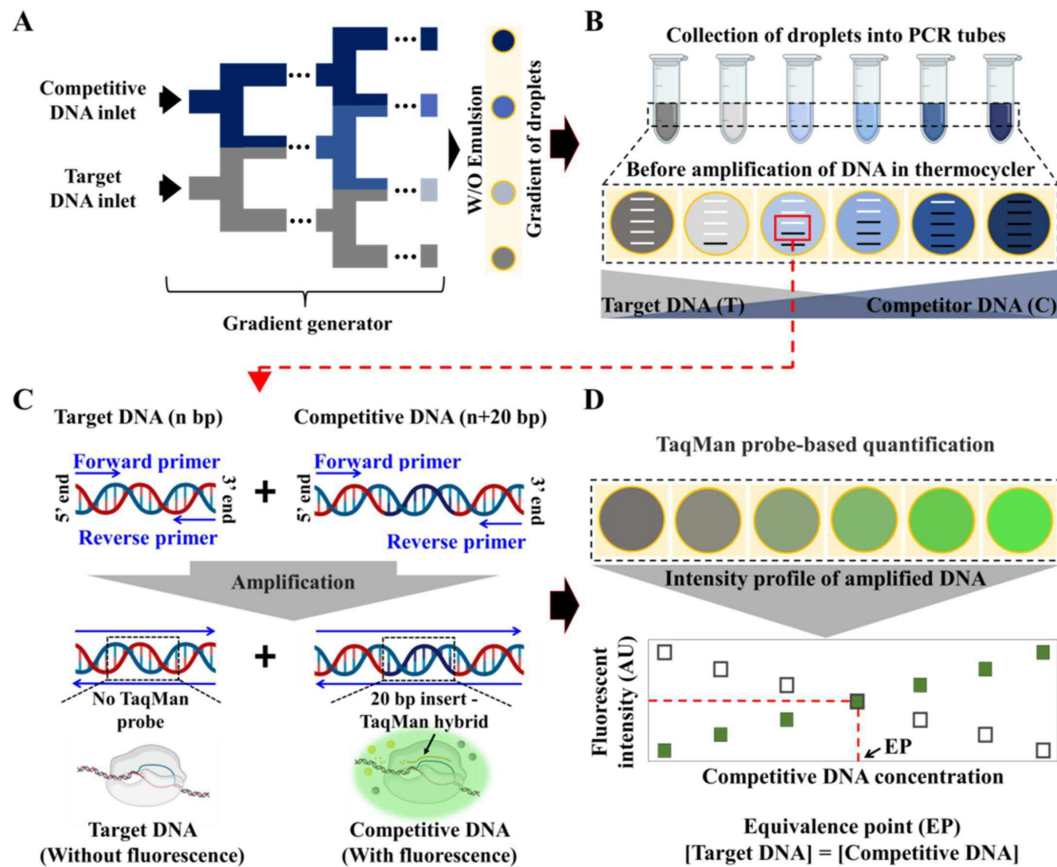
[0093] 도 12의 B에서 확인할 수 있듯이, C=T이거나 C>T인 경우에는, 형광강도가 50인 지점의 경합 DNA 농도로부터 표적 DNA의 농도를 계산할 수 있다. 그러나, C<T인 경우에는 형광강도가 50인 지점을 얻을 수 없으며, 따라서 정확한 표적 DNA의 농도를 계산하기 어렵다.

부호의 설명

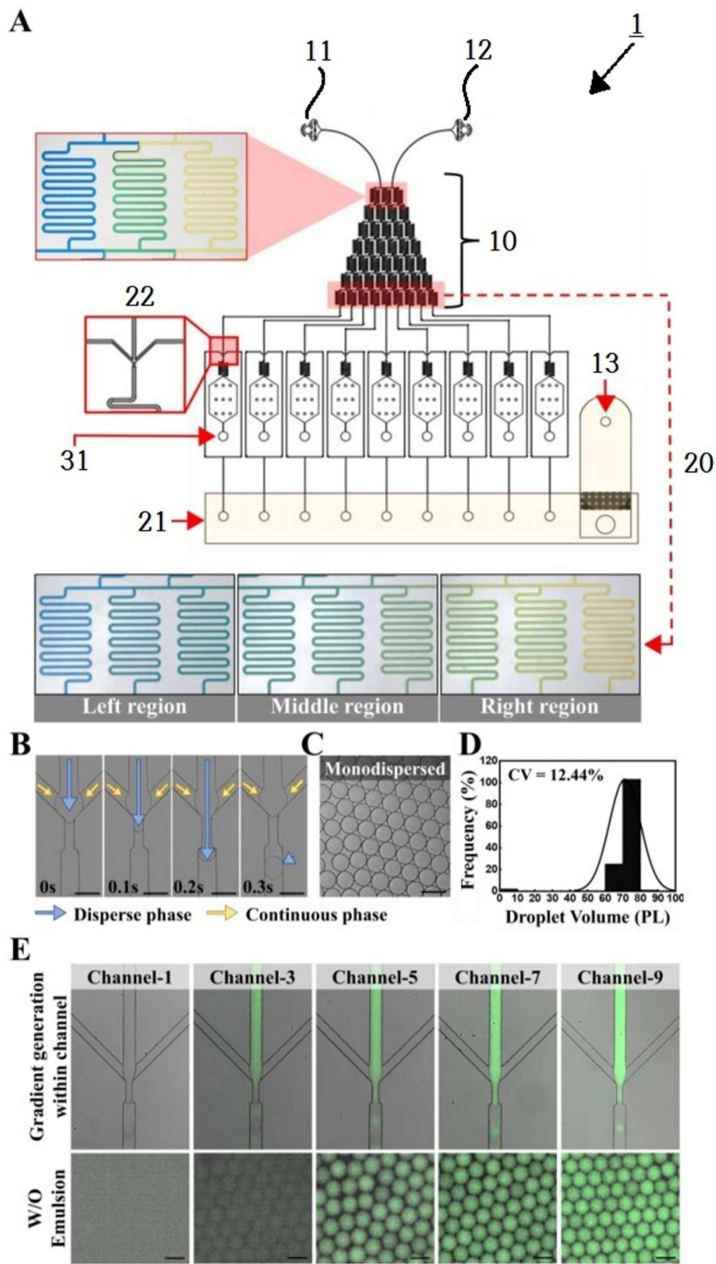
[0094]	1	미세유체 장치		
	10	농도구배 영역	20	미세액적 생성영역
	11	제1 주입구	12	제2 주입구
	13	오일 주입구	21	오일 분배채널
	22	흐름-집중 구조	31	배출구

도면

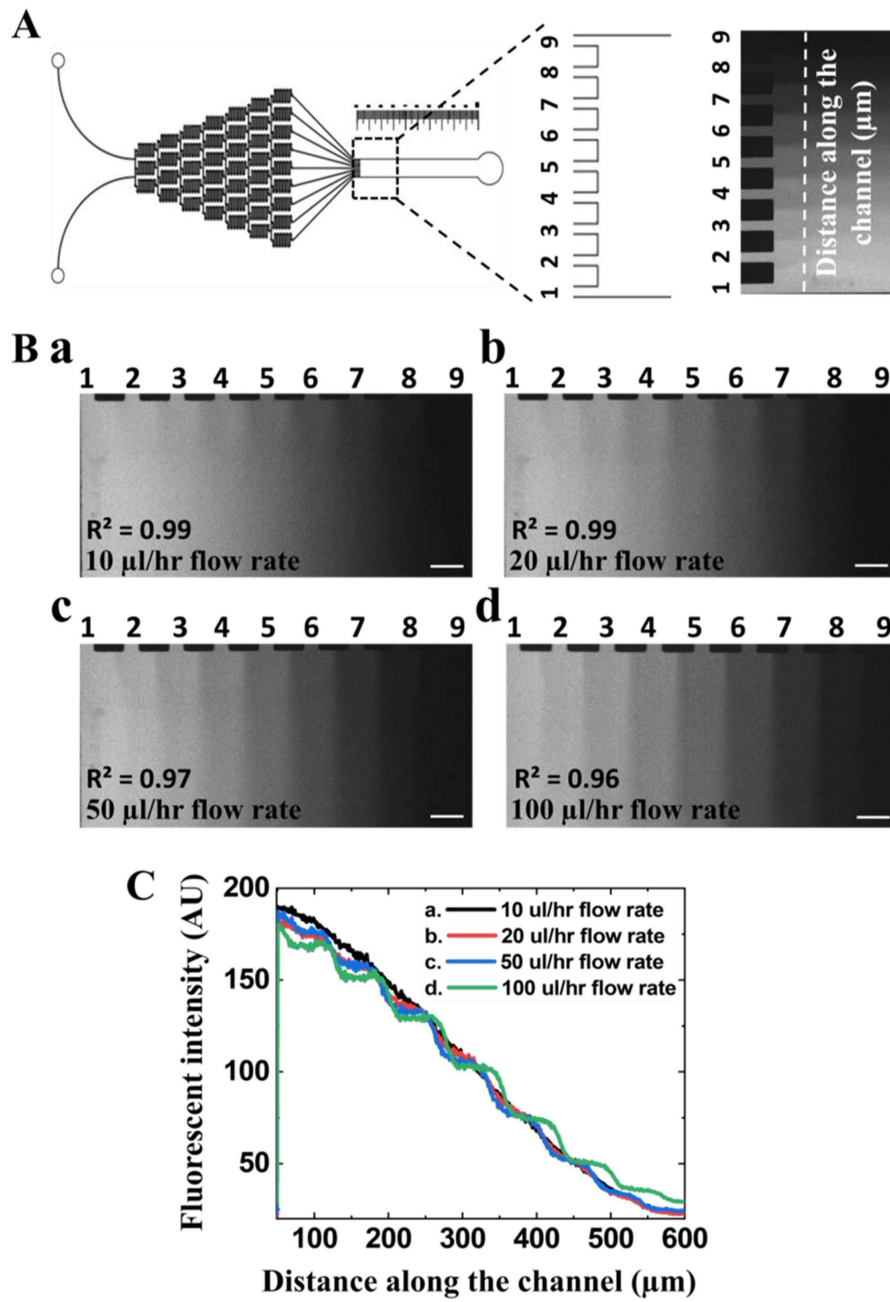
도면1



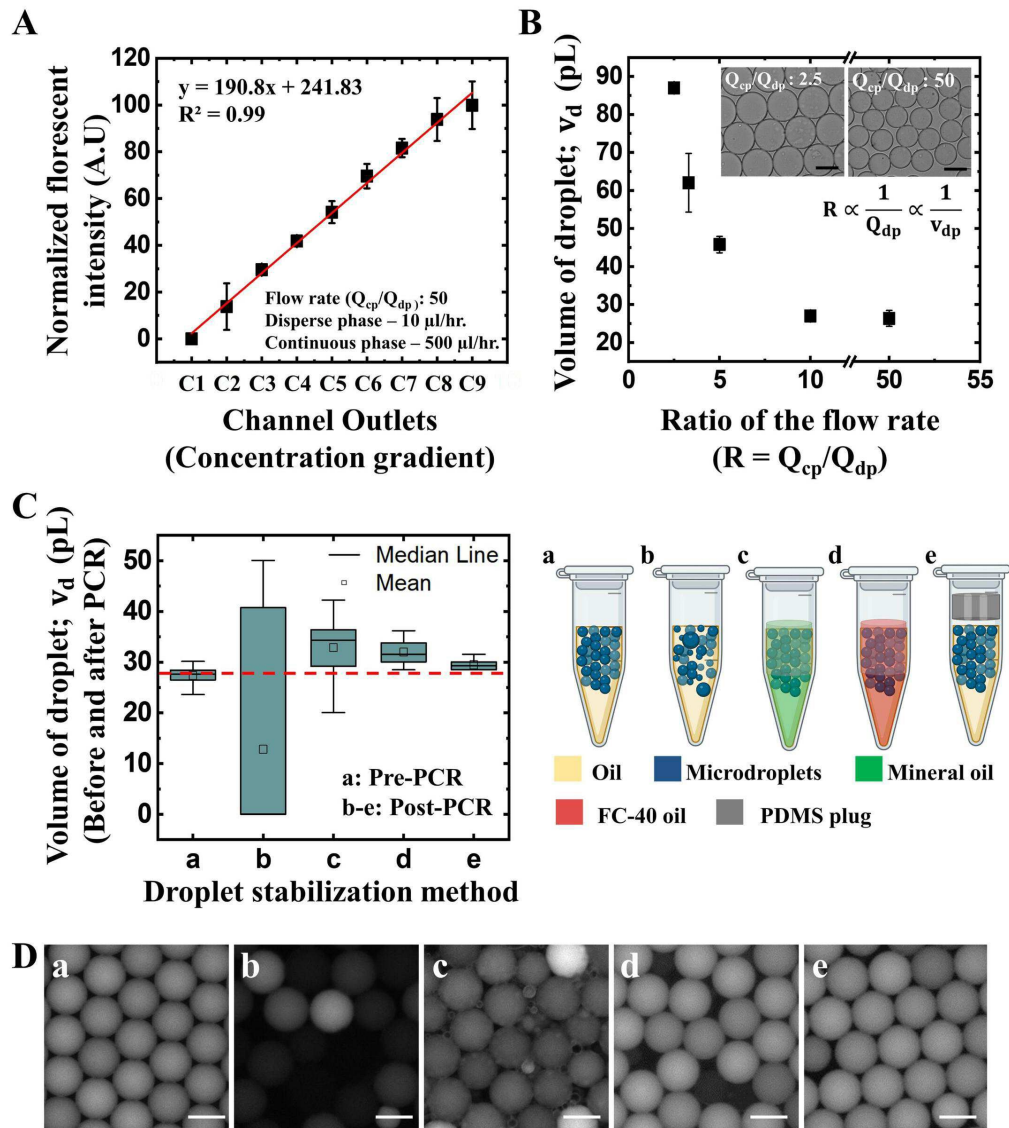
도면2



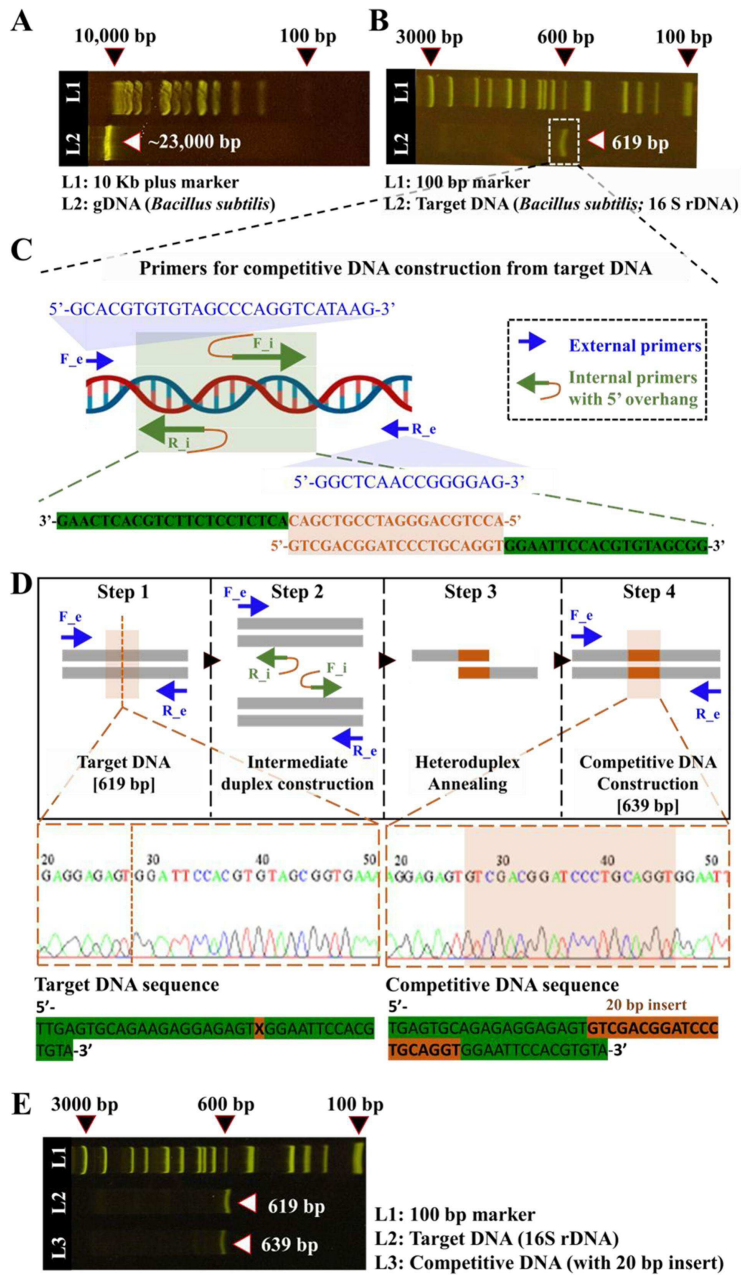
도면3



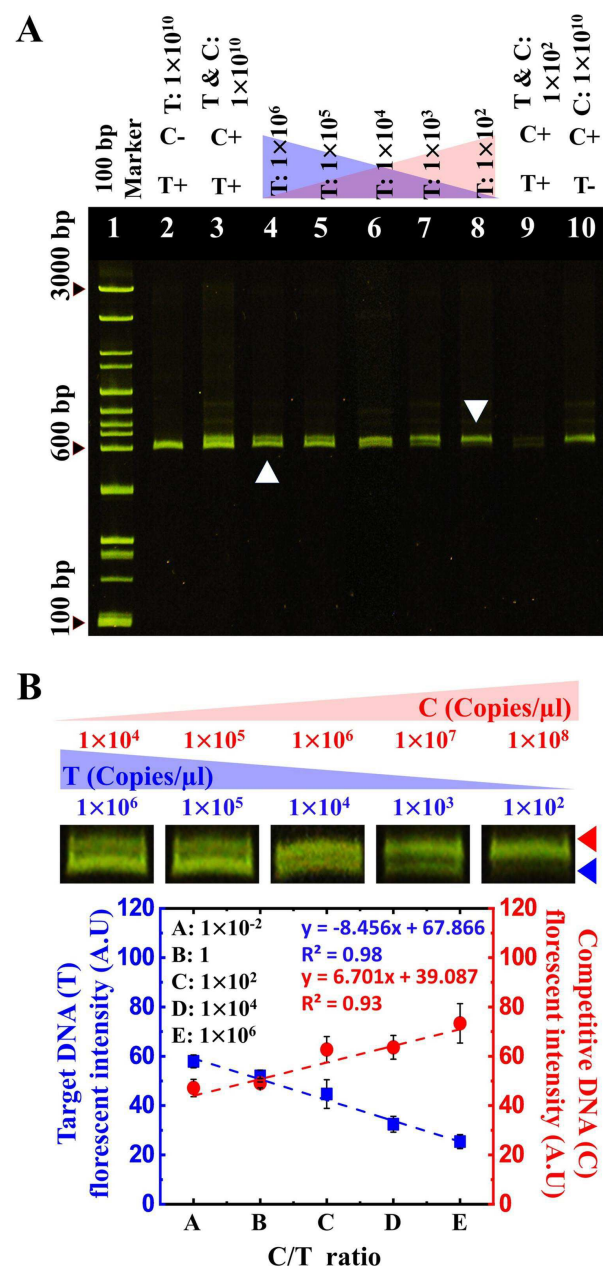
도면4



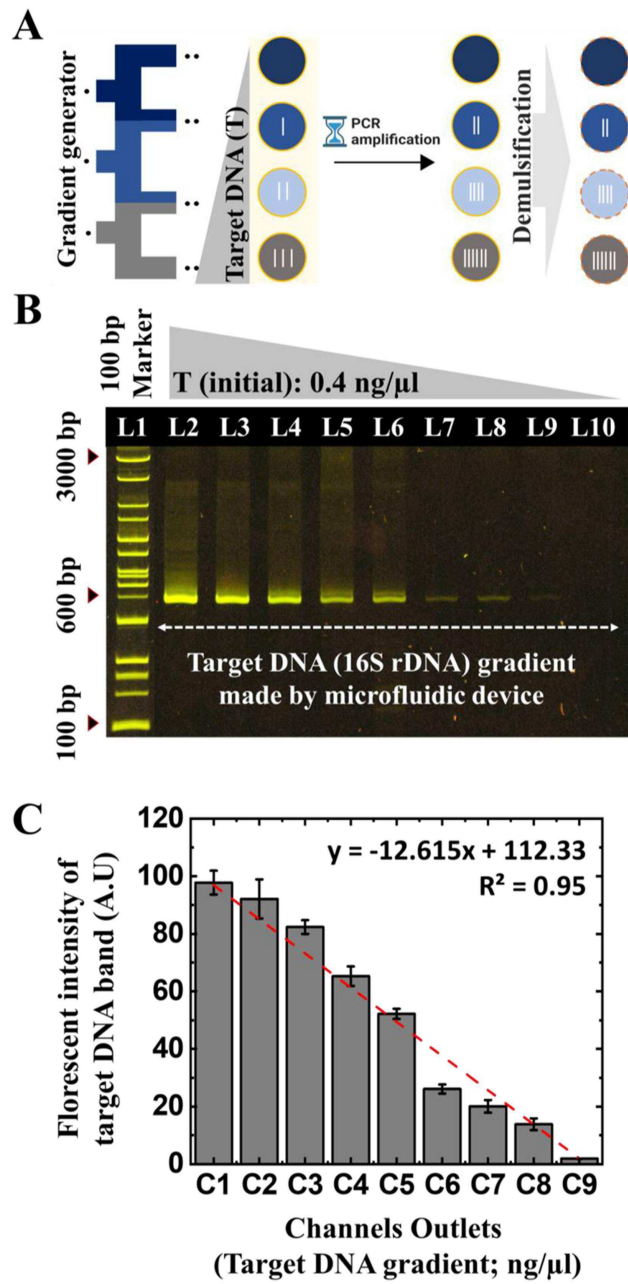
도면5



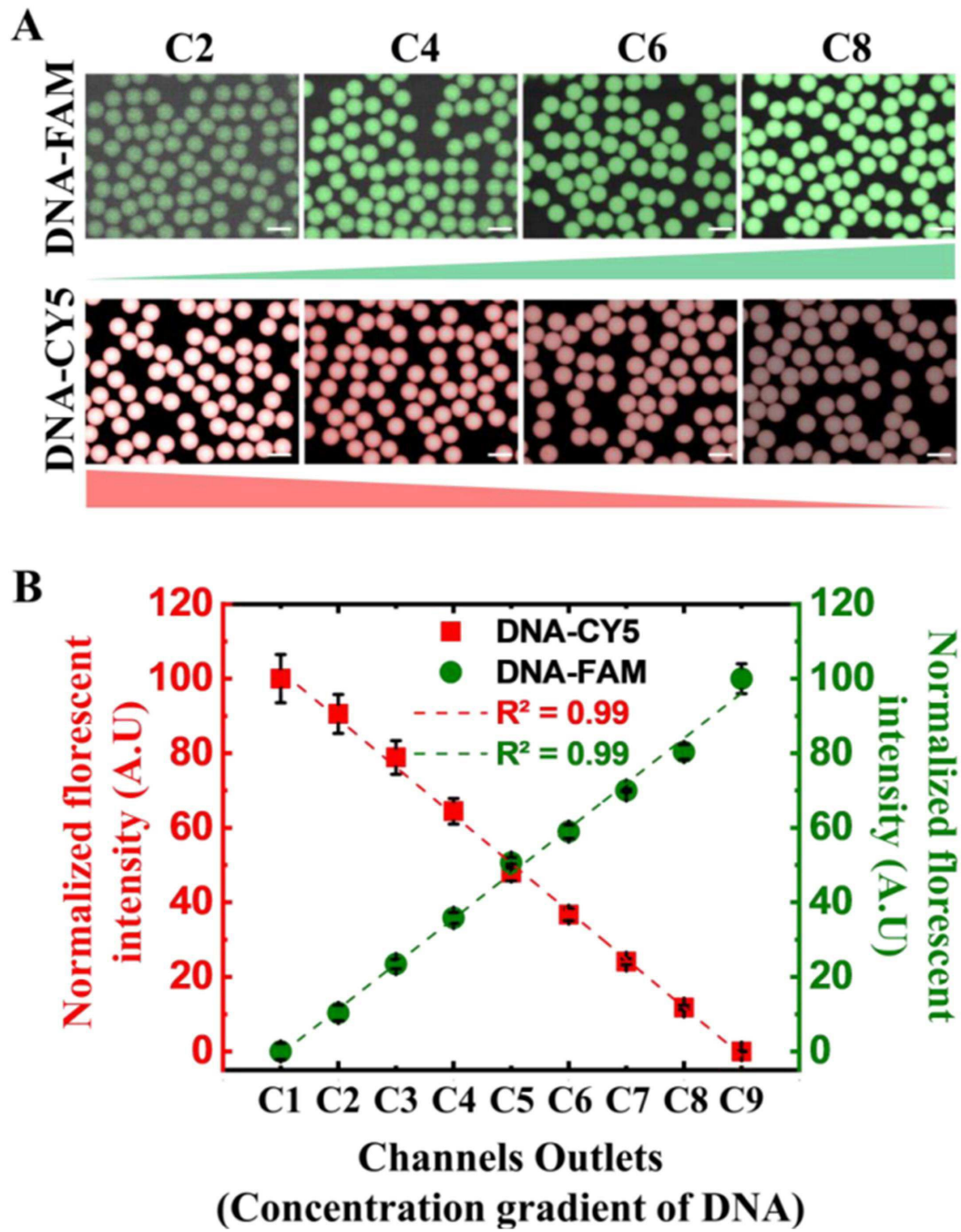
도면6



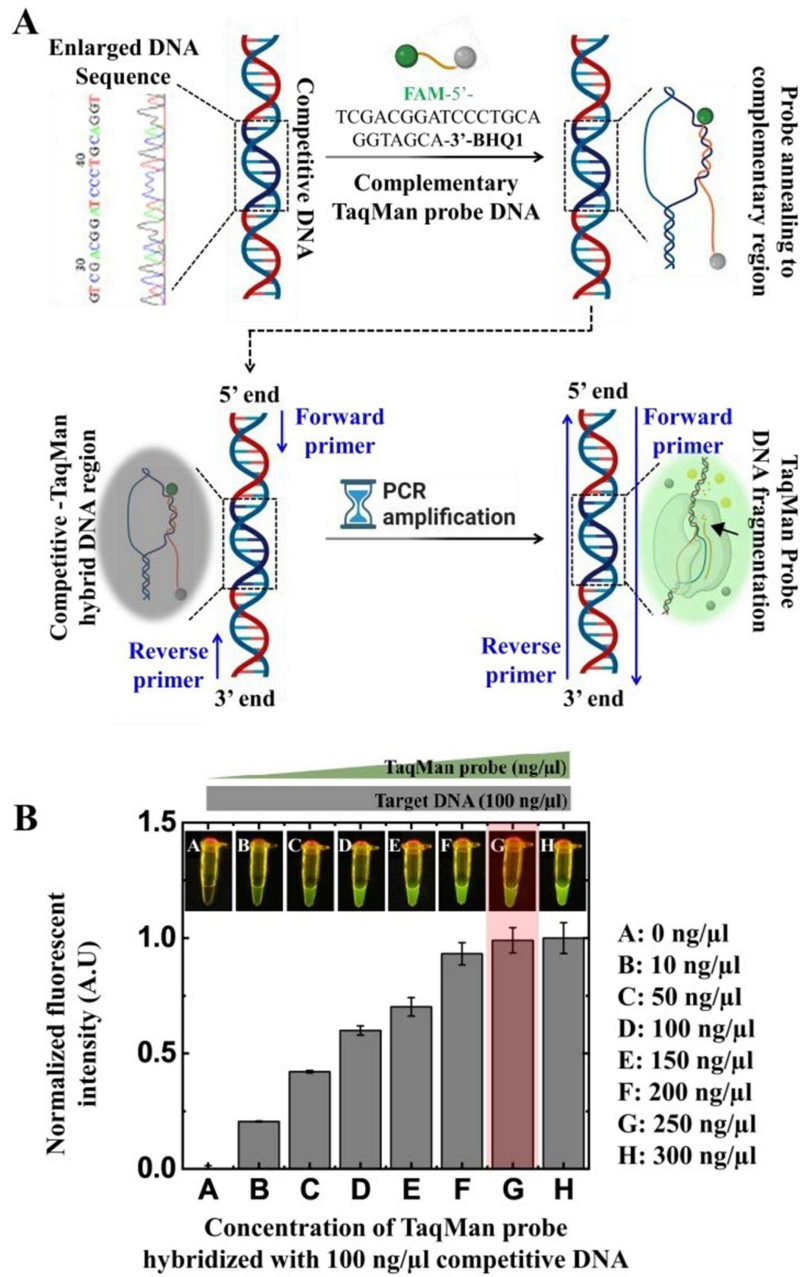
도면7



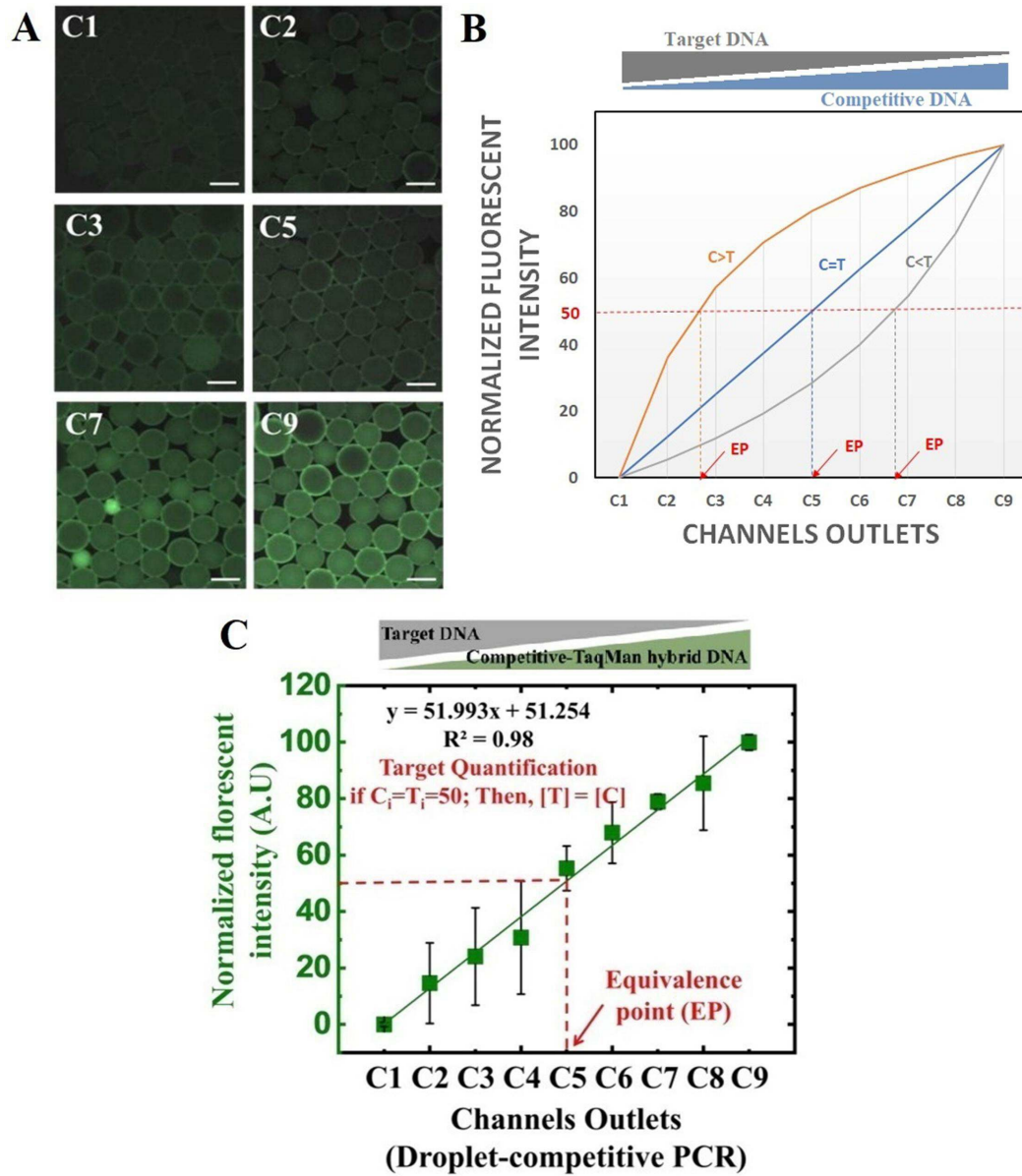
도면8



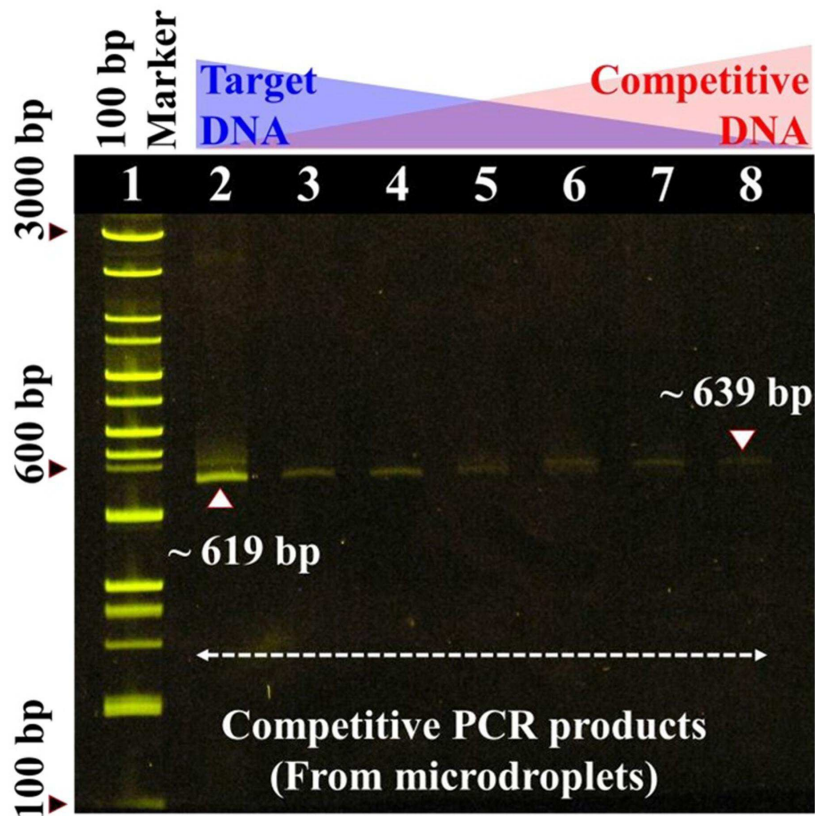
도면9



도면10

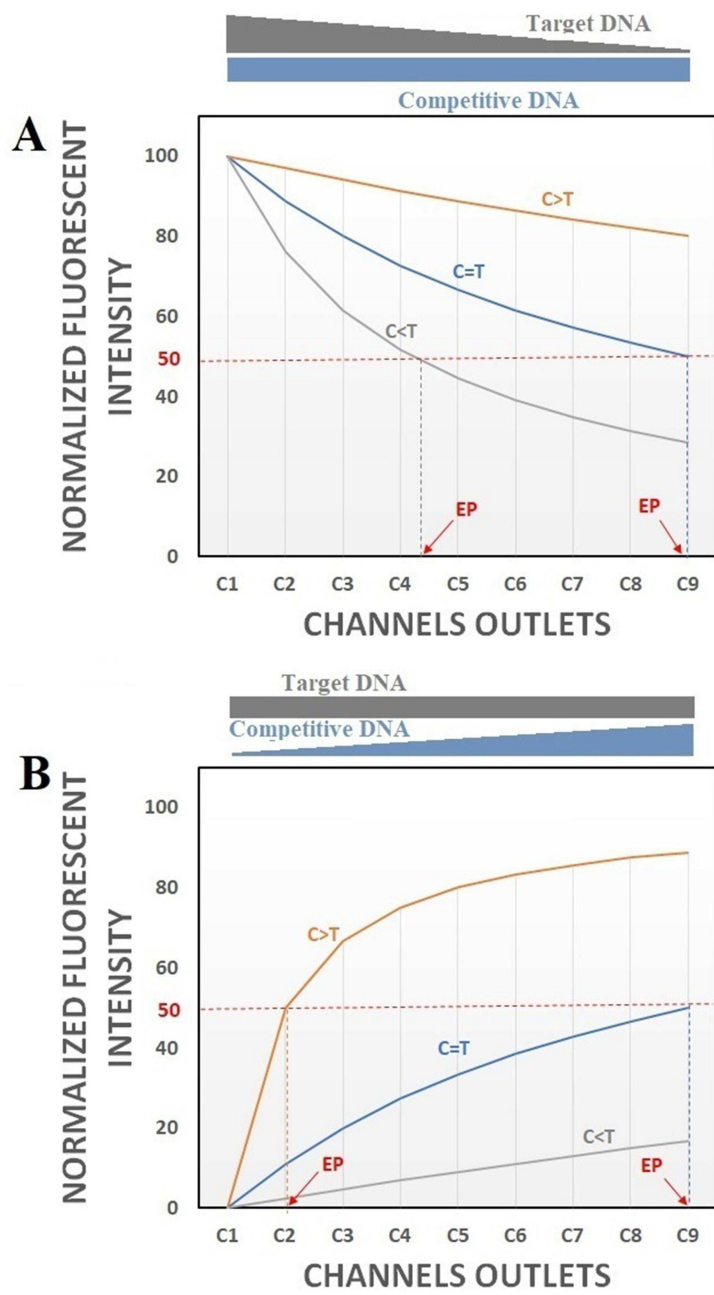


도면11



L1: 100 bp marker
 L2: C2
 L3: C3
 L4: C4
 L5: C5
 L6: C6
 L7: C7
 L8: C8
 L2-L8: DNA extract from droplets
 from C2 to C8 channels, respectively

도면12



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.