



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0098702
(43) 공개일자 2016년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G09B 23/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G09B 23/00 (2013.01)
C12Q 1/68 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0020616
(22) 출원일자 2015년02월11일
심사청구일자 2015년02월11일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
유영빈
부산광역시 사하구 장평로41번길 19 벽산마마아파트 2동 1406호
구상호
부산광역시 동래구 충렬대로 180-3
(74) 대리인
김대영

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 분자생물학 실습용 키트를 이용한 유전자 확인 방법

(57) 요약

본 발명은 유전자 추출 및 유전자 증폭을 위한 시약, 장치 및 메뉴얼로 구성된 분자생물학 실습용 키트로 유전자 추출과 증폭에 대한 시약을 하나로 제품으로 구성하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1

Component	Qty	Storage Condition
Fine gDNA-Master ePrep Kit	EMN-1100E	
Spin Column mini	100 ea	RT
Collection Tube	300 ea	RT
Lysis Buffer	60 ml	RT
Binding Buffer	45 ml	RT
Washing Buffer I	80 ml	RT
Washing Buffer II	100 ml	RT
Elution Buffer	30 ml	RT
Proteinase K	48 mg	4°C or -20°C
Proteinase Storage Buffer	4 ml	RT or 4°C
Cotton Swab Stick	100 ea	RT
Manual	1 ea	
Primer/PC/IPC Set I	EPC-1001E	
PC Mixture	100 ul	-20°C
IPC I	100 ul	
IPC II	250 ul	
Primer Mixtures	250 ul	
PCR Grade Water	1 ml	
DNA Staining Dye (10,000X)	50 ul	
100 bp Ladder	100 ul	
Fine PCR Taq ePremix (2X)	ETP-1001E	
Fine PCR Taq ePremix (2X)	96 ea	-20°C

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-B-7252-010112

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 LINC산학공동기술개발지원사업

연구과제명 분자생물 PCR 교육 키트 및 교육 자료 개발

기 여 율 1/1

주관기관 건양대학교산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

유전자 추출 및 유전자 증폭을 위한 시약, 장치 및 메뉴얼로 구성된 분자생물학 실습용 키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 유전자 추출은 단백질 분해효소, Lysis buffer, Binding buffer, washing buffer, Elution buffer, 단백질 보관 버퍼(Proteinase storage buffer)의 구성이 포함되는 것을 특징으로 하는 분자생물학 실습용 키트.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 유전자 증폭은 유전자 증합효소, 로딩염색약, 완충용액, 프라이머, 내부 기준 컨트롤 물질(IPC, internal positive control), 음성 컨트롤(NTC: no template control) 및 양성 컨트롤(PC: positive control)의 구성이 포함되는 것을 특징으로 하는 분자생물학 실습용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생명과학 기술의 핵심이자 기초 기술인 유전자 추출 및 유전자 증폭 기술을 체계적이고 전문적으로 제공하기 위한 제품 구성에 관한 것으로, 유전자 추출 및 유전자 증폭 기술을 바탕으로 차별화된 학업능력과 업무능력에 대한 이해도를 높이기 위한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이러스의 전과정로를 차단하기 위해서는 바이러스의 유무를 빠른 시간 내에 정확히 판별하는 것이 필요하다. 이런 필요성에 따라 바이러스 검출에 관한 많은 연구가 활발히 진행되어 왔으며 그 검출방법으로는 세포배양법으로부터 시작하여 현재는 분자생물학적 방법인 증합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)에 의한 방법이 실시되고 있다. 더 나아가 배양시간을 3~4일로 단축시키고 증합효소 연쇄반응의 단점인 활성이 없는 바이러스도 검출이 되는 점을 극복할 수 있는 세포배양연계 증합효소 연쇄반응법(Integrated Cell Culture-Polymerase chain reaction, ICC-PCR)이 연구되어지고 있다. 또한, 최근에는 분자생물학의 발전에 따라 증합효소 연쇄반응을 기초로 한 실시간 역전사 증합효소 연쇄반응법(Real-time Reverse-Transcription Chain Reaction, Real-Time RT PCR)을 사용함으로써, 바이러스가 증폭되는 과정에서 곧바로 바이러스 존재여부를 판단할 수 있는 방법도 연구되어지고 있다.

[0003] 분자 생물 관련 기술의 발전에 따라 관련 인력의 필요성 증가에 따라 전문 인력을 양성하기 위한 방법은 대부분 실험실 및 유사 학과를 통해 별도의 과정으로 배워야 하는 난이도 높은 숙련도를 요구한다. 하지만 이러한 숙련도의 요구와는 달리, 유전자증폭 및 추출 교육 키트에 대한 교육용 제품은 별도로 찾기 어려워, 대부분은 일부 회사의 장비와 제품을 조합하여 대학에서 시범적으로 교육을 실시는 것으로 전문성이 떨어지는 실정이다. 또한, 이와 같은 교육 과정을 마련하기 위해 각각의 제품들을 개별적으로 구매해야 하기 때문에 경제적인 비용문제와 시간 소모 등의 문제점이 발생한다.

[0004] 무엇보다 교육 과정에 있어서도 체계적이고 전문화된 교육제품이 없기 때문에 기존의 연구 결과를 이용하여 일부 대학의 관련 학과에서 자체적으로 교육을 하고 있기 때문에, 실험 결과의 유의성과 준비 과정의 어려움에 따른 결과의 이질성이 문제가 될 수 있다.

[0005] 현재, 분자생물 관련 기술의 요구가 점차 높아지고 있는 추세로 대학 이상의 교육기관에서 시행되던 과정들이 점차 고등학교 및 그 이하에서도 실시되고 있으며, 이에 따른 정형화된 교육 키트 제품에 대한 요구에 적합한

제품의 구성이 필요한 실정이다.

- [0006] 종래의 기술로 유전자 추출 및 유전자 증폭이 가능한 분자생물 키트는 아니지만, 등록특허 제10-0522929호(2005.10.13)에서는 동충하초 등 미생물의 배양을 초등, 중등, 고등학생 등의 실습자들이 간단하면서 편리하게 확인 실습을 할 수 있도록 하는 미생물 배양키트에 관해 기재되어져 있으며, 공개특허 제10-2013-0125533호(2013.11.19)에서는 c-Kit 유전자 엑손 17의 코돈 816 부위의 야생형과 특이적으로 결합할 수 있는 PNA(Peptide Nucleic Acid) 프로브를 이용하여 야생형의 증폭을 억제함으로써 돌연변이만을 선택적으로 검출할 수 있는 키트에 관해 기재되어져 있다. 하지만 종래의 기술에는 유전자 추출 및 유전자 증폭을 보다 쉽게 접할 수 있도록 구성되어진 키트에 관한 기술이 없어 이에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-0522929호(2005.10.13)
(특허문헌 0002) 공개특허 제10-2013-0125533호(2013.11.19)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 첫 번째 목적은 유전자 추출 및 유전자 증폭의 분자 생물학적 기술에 대하여 일반 비전공자(초등, 중등, 고등학생 및 관련 업무 종사자 등)가 간단하고 편리하게 실습할 수 있는 분자생물학 실습용 키트를 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 분자생물학 실습용 키트를 통해 학업능력과 업무능력에 대한 이해도를 높이기 위함이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 유전자 추출 및 유전자 증폭을 위한 시약, 장치 및 메뉴얼로 구성된 분자생물학 실습용 키트를 제공한다.
- [0011] 일 실시예로 상기 유전자 추출은 단백질 분해효소, Lysis buffer, Binding buffer, washing buffer, Elution buffer, 단백질 보관 버퍼(Proteinase storage buffer)의 구성이 포함될 수 있다.
- [0012] 일 실시예로 유전자 증폭은 유전자 증합효소, 로딩염색약, 완충용액, 프라이머, 내부 기준 컨트롤 물질(IPC, internal positive control), (NTC: no template control) 및 양성 컨트롤(PC: positive control)의 구성이 포함될 수 있다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 의하면, 본 발명에서는 일반 비전공자(초등, 중등, 고등학생 및 관련 업무 종사자 등), 생명과학 및 임상병리 등 관련학과 전공자가 유전자 추출 및 유전자 증폭에 대한 실습을 편리하게 실시함으로써 분자 생물학에 관해 효과적이고 실질적인 교육을 할 수 있는 효과 및 실습 준비의 부담을 덜어주고 편리하고 신속하게 실습을 완료할 수 있는 효과가 있다.
- [0014] 또한, 본 발명의 분자 생물학 실습용 키트는 유전자 추출 및 유전자 증폭에 관련된 시약 및 장비가 구성되어 제공됨으로써 보다 간편한 방법을 통해 유전자를 확인할 수 있는 효과가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 본 발명의 생물학 실습용 키트의 구성을 나타낸 것이다.
도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 전기영동을 통해 분석된 유전자 물질 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게

실시할 수 있는 바람직한 실시예를 포함한 발명의 구성을 상세히 설명한다.

- [0017] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정 해석되지 아니하며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0018] 본 발명은 유전자 추출 및 유전자 증폭을 위한 시약 및 장치로 구성된 분자생물학 실습용 키트를 제공한다. 도 1은 분자 생물학 실습용 키트의 구성 및 이의 함량을 나타낸 것으로, 함량 및 수량은 약 30 내지 40의 학생이 1 내지 2회 실습을 진행할 수 있도록 하였으며, 저장 상태에 표기된 온도는 최적의 보관 조건을 나타낸 것이다.
- [0019] 상기 유전자 추출을 위해 스핀 컬럼(미니), 컬렉션 튜브(collection tube), 단백질 분해효소, Lysis buffer, Binding buffer, washing buffer, Elution buffer, 단백질 보관 버퍼(Proteinase storage buffer), 면봉, 매뉴얼이 포함된 구성일 수 있다.
- [0020] 여기서, washing buffer은 유기용매를 사용할 수 있으며, 제한되지 않는다. 바람직하게는 ethanol을 사용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 에탄올, 70% 에탄올을 washing buffer로 하여 2회 이상 세척할 수 있다.
- [0021] 상기 유전자 추출에 있어서, 유전자 추출 방법에는 여러 가지 방법이 있으며 세포조직 및 DNA 구조에 따라 추출 방법이 달라질 수 있다. 본 발명에서는 유전자 추출방법에 있어서 제한하지는 않으나 바람직하게는 구강상피세포로부터 유전자 DNA를 면봉을 이용하여 추가 시약을 사용하지 않고 본 키트에 제공되는 시약으로 간단하게 추출할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 유전자 증폭은 유전자 증합효소, 로딩염색약, 완충용액, 프라이머, 내부 기준 컨트롤(IPC, internal positive control), 음성 컨트롤(NTC: no template control) 및 양성 컨트롤(PC: positive control)의 구성일 수 있다.
- [0023] 여기서, 음성컨트롤은 Template DNA를 넣지 않고 PCR을 수행하여 외부 DNA template(Carry-over 또는 Cross-over contamination)에 의한 오염이 발생하였는지 혹은 primer dimer 발생 유무를 확인할 수 있다.
- [0024] 또한, 내부 기준 컨트롤은 exogenous DNA를 사용하여 증폭함으로써 PCR inhibitor가 PCR reaction에 포함되어 있는지를 확인할 수 있으며, 즉 기준 컨트롤 물질이 잘 증폭 된다는 것은 PCR reaction에 추출 및 PCR 시약에 포함된 PCR inhibitor로 인한 PCR의 방해가 없다는 의미이다.
- [0025] 또한, 양성 컨트롤은 target DNA를 성공적으로 추출하고 증폭 시에 예상되는 표준 결과를 나타냄으로써, 보다 정확한 결과를 확인할 수 있도록 도움을 주는 역할을 할 수 있다.
- [0026] 이때, 내부 기준 컨트롤과 양성 컨트롤을 함께 사용하는 경우도, target DNA를 성공적으로 추출하고 증폭 시에 예상되는 표준 결과를 나타냄으로써, 보다 정확한 결과를 확인할 수 있도록 도움을 주는 역할을 할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 유전자 증폭은 PCR(Polymerase chain reaction)을 이용하여 증폭하는 방법으로, PCR은 일반적으로 DNA 또는 RNA의 특정영역을 시험관에서 대량으로 증폭하는 기술이다. 보다 자세하게는 PCR은 특정 DNA sequence의 copy 수를 기하급수적으로 증폭시킴으로써 증폭된 DNA를 여러 가지 실험에 이용할 수 있고, 실험결과를 토대로 순수 분자생물학 분야 이외에도 의학, 이학, 농학, 수의학, 식품과학, 환경과학 등의 다양한 분야에서 그 활용범위가 넓다.
- [0028] 이하 실시예를 통해 보다 자세하게 설명한다.
- [0029]
- [0030] (실시예)
- [0031] 실시예 1. 유전자 추출
- [0032] 동결건조 한 Proteinase K 48 mg에 2.4 ml Proteinase Storage Buffer를 혼합 후 Vortexing을 이용해 3분 동안 섞는다. 이후, 56℃ Water Bath에서 Incubation 하여 발생하는 침전물까지 완전히 녹여 단백질 용해제를

얻는다.

- [0033] 멸균된 면봉으로 입안 볼 면을 10회 문질러 라이시스(Lysis buffer) 500 ul에 넣고 면봉에 붙어있는 조직을 떼어낸 후, 그 중 400 ul를 새 튜브에 옮겨 담는다.
- [0034] 바인딩 용액(Binding Buffer) 400 ul에 상기 얻어진 단백질 용해제 20 ul를 넣고 56 ℃의 온도에서 10분간 세포벽과 단백질을 녹이고, 그 후 실리카 비드가 붙어 있는 컬럼 멤브레인을 통과 시켜 유전자를 멤브레인에 붙인다. 이 후 세척 용액으로 세척 후, 50 ul의 증류수로 멤브레인에 붙어 있는 유전자를 떼어낸다.
- [0035] 실시예 2. 유전자 증폭
- [0036] 유전자 추출을 통해 얻어진 유전자 5 ul과 프라이머 용액 2 ul 내부 기준 커트콜 물질(IPC; internal positive control) 2 ul 및 증류수 1 ul를 연쇄반응용 튜브에 혼합 후, 로딩시약 및 완충용액과 미리 섞여있는 유전자증합효소 믹스 10 ul를 투입하여 반응한다.
- [0037] (비교예)
- [0038] 비교예 1.
- [0039] 상기 실시예와 동일하게 실시하되, 실시예 1에서 멸균된 면봉으로 입안 볼 면을 10회 문지르는 대신 멸균된 면봉만을 사용하여 실시한다.
- [0040] 실험예
- [0041] 샘플 A는 주형이 들어가지 않은 음성 컨트롤(NTC: no template control; 외부 유전자 오염 모니터링이 가능), 실험 시 기대되는 양성 컨트롤(PC: positive control) 및 실시예를 통해 최종적으로 얻어진 검체조직을 넣고 각각 2회씩 전기영동을 통해 분자진단을 한다.
- [0042] 본 발명의 도 2는 유전자 추출 및 유전자 증폭 후, 전기영동 방법(Marker: 100 bp ladders)을 통해 증폭 DNA의 유무 및 특이적 증폭 DNA의 유무를 확인할 수 있다. 도 2에서 1. Marker, 2. NTC, 3. IPC(700 bp), 4. IPC(700 bp), PC (500 bp), 5. Blank, 6. 양성검체(실시예), 7. 양성검체(실시예), 8. 음성검체(비교예), 9. 음성검체(비교예)의 전기영동 분석 결과이다.

도면

도면1

Component	Qt'y	Storage Condition
Fine gDNA-Master ePrep Kit	EMN-1100E	
Spin Column mini	100 ea	RT
Collection Tube	300 ea	RT
Lysis Buffer	60 ml	RT
Binding Buffer	45 ml	RT
Washing Buffer I	80 ml	RT
Washing Buffer II	100 ml	RT
Elution Buffer	30 ml	RT
Proteinase K	48 mg	4°C or -20°C
Proteinase Storage Buffer	4 ml	RT or 4°C
Cotton Swab Stick	100 ea	RT
Manual	1 ea	
Primer/PC/IPC Set I	EPC-1001E	
PC Mixture	100 ul	-20°C
IPC I	100 ul	
IPC II	250 ul	
Primer Mixtures	250 ul	
PCR Grade Water	1 ml	
DNA Staining Dye (10,000X)	50 ul	
100 bp Ladder	100 ul	
Fine PCR Taq ePremix (2X)	ETP-1001E	
Fine PCR Taq ePremix (2X)	96 ea	-20°C

도면2

