

(19)대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12M 1/00 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)		(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년07월18일 10-0601974 2006년07월10일
(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-2004-0097601 2004년11월25일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	10-2006-0058528 2006년05월30일
(73) 특허권자	삼성전자주식회사 경기도 수원시 영통구 매탄동 416		
(72) 발명자	이정건 서울 서초구 서초2동 무지개아파트 10동 805호 권영남 경기 군포시 재궁동 무궁화주공아파트 104동 306호 이묘용 경기 수원시 영통구 망포동 LG 자이아파트 306-1102 유신이 경기 군포시 당동 쌍용아파트 101-2102 조연자 서울 동대문구 전농3동 1-132 김영아 경기 수원시 영통구 영통동 황골마을쌍용아파트 245동 1804호		
(74) 대리인	리앤목특허법인 이해영		
(56) 선행기술조사문헌	US20030096429 A1 US6133436 A * 심사관에 의하여 인용된 문헌		
		US5324809 A US6156576 A	

심사관 : 정재철

(54) 비드의 상이한 레이저 흡수에 의한 핵산의 정제 장치 및방법

요약

본 발명은 시료 도입구가 형성되어 있어 상기 시료 도입구를 통해 시료, 자성 비드 및 고상 지지체를 수용하는 세포 용해 모세관; 상기 모세관에 부착되어 있고, 상기 모세관 내에서 상기 혼합물을 혼합하는 진동기(vibrator); 상기 모세관에 부착

되어 있고, 상기 모세관에 레이저를 공급하는 레이저 발생부; 상기 모세관에 부착되어 있고, 자성 비드를 모세관 벽에 고정시키는 자기력 발생부; 상기 모세관에 부착되어 있고, 용해액을 방출하는 배수 챔버; 상기 모세관에 부착되어 있고, 핵산이 결합된 고상 지지체로부터 핵산을 용출시키는 용출 버퍼를 공급하는 용출 버퍼 챔버; 및 상기 모세관에 부착되어 있고, 상기 용출된 핵산 용액을 중화시키는 중화 버퍼를 공급하는 중화 버퍼 챔버를 포함하는 세포 또는 바이러스의 핵산 정제 장치 및 이를 이용하여 세포 또는 바이러스의 핵산을 정제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, PCR 저해제를 제거하여 PCR 수율을 높일 수 있으며, 실리콘 기판 또는 실리카 비드를 이용하여 핵산 정제가 가능하므로, 랩온어칩 제작에 응용할 수 있다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 레이저 및 자성 비드를 이용하여 세포 용해 후 PCR 저해제들이 부착된 자성 비드층과 핵산이 결합된 고상 지지체 층이 분리된 시스템의 일 구체예를 나타내는 모식도이다.

도 2a는 베타인이 코팅된 실리카 비드에 핵산이 결합된 것을 나타낸 모식도이며, 도 2b는 베타인이 코팅된 기둥 구조의 실리콘 기판에 핵산이 결합된 것을 나타낸 모식도이다.

도 3은 DNA 정제 방법에 따른 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 DNA 정제 방법에 따라 증폭된 PCR 산물의 농도를 나타낸 것이다.

도 5는 PCR 결과 생성된 이합체(dimer)의 농도를 나타낸 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 비드의 상이한 레이저 흡수에 의한 핵산의 정제 장치 및 방법에 관한 것이다.

세포에서 DNA의 효율적인 추출은 많은 적용에서 필요하고, 분자학적 진단, 특히 병원균 동정 및 정량화에 본질적이다. 분자학적 진단은 일반적으로 DNA 추출 단계 후에 DNA 증폭에 의해 수행된다. DNA 증폭에는 중합효소 연쇄반응(PCR), 리가제 연쇄반응(Ligase Chain Reaction), 가닥 이동 증폭(stranded-displacement amplification), 핵산 기재 증폭, 복구 연쇄반응(repair chain reaction), 헬리카제 연쇄반응, QB 복제효소 증폭, 및 연결 활성화된 전사가 포함된다.

세포로부터 DNA의 분리 방법은 DNA를 결합하는 경향을 갖는 물질을 이용하여 수행되었다. DNA의 분리를 위한 물질의 예는 실리카, 유리섬유, 음이온교환수지, 및 자성 비드이다(Rudi, K. 등, *Biotechniques* 22, 506-511 (1997); 및 Deggerdal, A. 등, *Biotechniques* 22, 554-557 (1997)). 수작업 단계를 피하고, 작업자 오차를 제거하기 위해, 몇 가지 자동화 기계가 대량 DNA 추출을 위해 개발되었다.

세포 용해는 통상적으로 기계적, 화학적, 열적, 전기적, 초음파 및 마이크로웨이브 방법으로 수행된다 (Michael T. Taylor 등, *Anal.Chem.*, 73, 492-496 (2001)).

레이저는 세포를 파괴하는데 많은 장점을 가지며, LOC에 잘 적용될 수 있다 (Huaina Li 등, *Anal Chem*, 73, 4625-4631 (2001)).

미국 특허 공개공보 2003/96429 A1에는 레이저 유도된 세포 용해 시스템이 기재되어 있다. 레이저만을 이용했을 때 세포를 효과적으로 용해하지 못하였다. 투명도가 높은 용액에 대장균을 넣고 실험한 결과, 레이저만을 조사한 경우에 낮은

세포 용해 효율을 보이고 있음을 확인하였는데, 150초 동안 레이저를 조사한 후의 DNA 농도는 $3.77\text{ng}/\mu\text{l}$ 이었는데, 이는 레이저 에너지가 효과적으로 세포에 전달되지 않았기 때문이다. 통상적인 가열방법으로 95°C 에서 5분 동안 끓인 후의 DNA 농도는 $6.15\text{ng}/\mu\text{l}$ 이었다.

미국 특허 제 6,685,730 호에는 증가된 조직 복구를 위한 광학적으로 흡수하는 나노입자가 기재되어 있다. 이 방법은 하나 이상의 파장에서 빛을 흡수하는 1 내지 1000 나노미터 크기의 나노입자를 연결될 조직에 전달하고, 상기 나노입자를 나노입자에 의해 흡수된 하나 이상의 파장의 빛에 노출하는 것을 포함하는 조직을 연결하는 방법에 대한 것이다. 이 방법은 레이저와 나노입자를 이용하여 세포의 기능만 잃게 하는 방법이며, 세포와 입자가 포함된 용액을 진동(vibration)시켜 세포를 파괴하는 방법에 대한 언급은 없다.

종래 고상 물질을 이용한 핵산의 정제 방법이 알려져 있었다. 예를 들면, 미국특허 제 5,234,809호에는 핵산에 결합하는 고상물질을 이용한 핵산의 정제 방법이 개시되어 있다. 구체적으로, 상기 방법은 출발물질, 카오트로픽 물질 (chaotropic material), 및 핵산 결합 고상물질을 혼합하는 단계, 상기 결합된 핵산을 갖는 상기 고상물질을 액체로부터 분리하는 단계 및 상기 고상물질 핵산 복합체를 세척하는 단계를 포함한다.

그러나, 상기 방법은 시간이 오래 소요되기 때문에 복잡하며, 랩온어칩에 부적합하다. 또한, 상기 방법은 반드시 카오트로픽 물질을 사용하여야 하는 문제점이 있었다. 즉, 상기 카오트로픽 물질을 사용하지 않는 경우에는 고상 물질에 핵산이 결합하지 않는다. 또한, 상기 카오트로픽 물질은 인체 유해한 물질이므로 주의하여 다루어야 하며, PCR 등의 후속 공정에 방해 물질로 작용하므로, 정제과정 중 또는 정제가 완료된 다음 정제된 핵산으로부터 제거하여야 한다.

랩온어칩의 구현을 위해 효율적인 PCR 증폭을 하기 위해서는 세포 용해 후 핵산의 정제 과정이 필요하다. 그러나, 기존의 핵산 정제 과정은 시간이 많이 필요하며, 별도의 화학 물질을 사용해야 하는 문제점이 있었다. 따라서, 별도의 화학 물질을 이용하지 않고, 빠른 시간 내에 핵산을 효율적으로 정제하는 방법의 필요성이 요구된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 상기 종래 기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 비드간의 레이저 흡수도 차이를 이용함으로써 레이저 흡수도가 높은 자성 비드는 세포 용해에 이용하고, 레이저 흡수도가 낮은 실리콘 비드 또는 실리콘 기판은 핵산 분리에 이용하는 경우, 핵산을 효율적으로 정제할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 비드의 상이한 레이저 흡수에 의한 핵산의 정제 장치 및 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

시료 도입구가 형성되어 있어 상기 시료 도입구를 통해 시료, 자성 비드 및 고상 지지체를 수용하는 세포 용해 모세관;

상기 모세관에 부착되어 있고, 상기 모세관 내에서 상기 혼합물을 혼합하는 진동기(vibrator);

상기 모세관에 부착되어 있고, 상기 모세관에 레이저를 공급하는 레이저 발생부;

상기 모세관에 부착되어 있고, 자성 비드를 모세관 벽에 고정시키는 자기력 발생부;

상기 모세관에 부착되어 있고, 용해액을 방출하는 배수 챔버;

상기 모세관에 부착되어 있고, 핵산이 결합된 고상 지지체로부터 핵산을 용출시키는 용출 버퍼를 공급하는 용출 버퍼 챔버; 및

상기 모세관에 부착되어 있고, 상기 용출된 핵산 용액을 중화시키는 중화 버퍼를 공급하는 중화 버퍼 챔버를 포함하는 세포 또는 바이러스의 핵산 정제 장치에 관한 것이다.

비드의 종류에 따라서 레이저를 흡수하는 능력에 차이가 있는데, 자성 비드는 레이저를 흡수하지만, 실리카 비드 또는 실리콘 기관등의 고상 지지체는 근적외선 파장의 레이저를 흡수하지 않고 통과시킨다. 따라서, 두 비드간의 레이저 흡수도 차이가 생기며, 이로 인해 열 흡수도 차이가 생기므로 자성 비드는 세포 용해에 이용하고, 실리카 비드 또는 실리콘 기관등의 고상 지지체는 핵산 정제에 이용하는 것이다.

본 발명의 장치에서, 세포 용해 모세관은 시료 도입구를 통해 투입된 시료와 자성 비드 및 핵산 결합을 위한 고상 지지체가 혼합되며, 여기에 레이저를 조사하면 세포가 용해된다. 세포 용해 모세관은 레이저의 파장을 충분히 통과시킬 수 있는 재질로 되어 있거나 상기 재질로 된 윈도우를 가질 수 있다. 상기 모세관은 직경과 길이의 비율이 1:2 ~ 1:50 일 수 있으며, 모세관의 직경은 1mm ~ 5mm 일 수 있다. 또한, 상기 모세관은 자성 비드가 잘 고정화할 수 있는 재질이어야 하며, 예를 들면, 중합체, 유기 물질, 규소, 유리 및 금속일 수 있다.

진동기는 세포 용해 모세관 내의 시료, 자성 비드 및 고상 지지체를 혼합하는 장치로서, 진동을 일으킬 수 있는 것이면 어느 것이라도 가능하다.

레이저 발생부는 상기 세포 용해 모세관에 레이저를 공급하는 장치로서, 특정한 한 종류의 파장의 빛을 낼 수도 있고, 두 가지 이상의 파장의 빛을 낼 수도 있다. 너무 낮은 레이저 출력에서는 효율적으로 레이저 어블레이션 현상을 일으킬 수 없으며, 레이저 출력은 연속파동(CW)의 경우 10mW~300W, 펄스 레이저의 경우 1mJ/펄스~1J/펄스를 전달해 주어야 한다. 바람직하게는 상기 펄스 레이저가 32mJ/펄스~1J/펄스이고, 연속파동 레이저가 10W~300W의 출력을 가진다. 이는 연속파동의 경우 10mW 미만이고, 펄스 레이저의 경우 1mJ/펄스 미만이면 세포를 파괴하는 충분한 에너지 전달이 되지 않는 문제가 발생하며, 연속파동의 경우 300W 초과이고, 펄스 레이저의 경우 1J/펄스 초과이면 DNA의 손상의 문제가 발생하기 때문이다.

자기력 발생부는 PCR 저해제들이 결합된 자성 비드가 자발적으로 모세관 벽에 부착되지만, 일부 자성 비드는 부착이 어려울 수 있기 때문에 이러한 자성 비드를 확실히 모세관 벽에 고정시키기 위해 자기력을 공급하는 장치이다.

배수 챔버는 PCR 저해제들이 자성 비드에 결합하고, 핵산이 고상 지지체에 결합한 후, 세포 용해 모세관 내에 존재하는 세포 용해액을 방출하는 챔버이다. 상기 세포 용해액 중에는 여전히 PCR 증폭을 방해하는 물질들이 많이 존재할 수 있기 때문에 이를 제거하기 위해 배수 챔버를 통해 방출하는 것이다.

용출 버퍼 챔버는 배수 챔버를 통해 세포 용해액이 방출되면 모세관 하단에는 핵산이 결합된 고상 지지체가 남게 되는데, 상기 핵산이 결합된 고상 지지체로부터 핵산을 분리하기 위해 용출 버퍼를 공급하는 챔버이다. 용출 버퍼로는 예를 들면, NaOH 와 같은 용액을 이용할 수 있다.

중화 버퍼 챔버는 상기 용출된 핵산이 용출 버퍼의 높은 pH로 인해 변성되어 불안정하기 때문에 이를 안정화시키기 위해 중화 버퍼를 공급하는 챔버이다. 중화 버퍼로는 예를 들면, 트리스 버퍼와 같은 버퍼를 이용할 수 있다.

도 1은 레이저 및 자성 비드를 이용하여 세포 용해 후 PCR 저해제들이 부착된 자성 비드층과 핵산이 결합된 고상 지지체층이 분리된 시스템의 일 구체예를 나타내는 모식도이다. 도 1에서 보여주는 바와 같이, 세포가 용해된 후, PCR 저해제들이 부착된 자성 비드는 레이저 흡수로 인해 끊어 올라 모세관 상단에 부착하게 되며, 레이저를 통과시키는 실리카 비드 또는 실리콘 기관과 같은 고상 지지체는 세포 용해물로부터 분리된 핵산을 결합한 후 모세관 하단에 위치함으로써 층 분리가 일어남을 알 수 있다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 진동기는 초음파세척기, 자기장을 이용한 진동기, 전기장을 이용한 진동기, 볼텍스 등 기계적 진동기 또는 압전물질을 포함할 수 있다. 진동기는 세포 용해 모세관에 부착되어 있으며, 세포 또는 바이러스, 자성 비드 및 고상 지지체의 혼합 용액을 진동시킬 수 있으면 어느 장치라도 가능하다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 자기력 발생부가 레이저 통과 지역 상단에 위치하며, 상기 세포 용해 모세관내의 자성 비드가 비등할 때 전원이 켜지는 전자석인 것이 바람직하다. 도 1에 보여준 바와 같이, 상기 전자석은 레이저 통과 지역 상단에 위치해야 하는데, 이는 레이저 통과 지역내에 위치하면 자성 비드가 PCR 저해제를 흡착하기 전에 전자석에 부착되어 PCR 저해제 흡착의 효과가 감소되기 때문이다. 또한, 세포 용해 모세관내의 자성 비드가 비등할 때 전원이 켜지는 전자석인 것이 바람직한데, 이는 자성 비드가 비등하기 전에는 전원이 켜져 있어도 자성 비드와 전자석은 공간적으로 분리되어 있어 자기력이 미치지 않아 자성 비드를 부착할 수 없기 때문이다. 아울러, 전자석으로 제거할 수 있기 위해서는 비드가 반드시 자성을 가져야 한다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 세포 용해 모세관과 채널을 통해서 연결되어 있고, 상기 채널은 밸브에 의하여 개폐되는 DNA 증폭 챔버를 추가로 포함할 수 있다. LOC 구현을 위해서는 정제된 DNA 를 증폭하는 시스템이 필요하다. 정제된 DNA 를 검출하는 방법은 분광광도계를 이용하는 방법, 마이크로 자성비드를 이용하는 방법, 전기화학적 방법, 전기화학 발광 방법, 방사선 및 형광표지를 이용하는 방법, 실시간 PCR 방법 등이 있을 수 있다. 원하는 DNA를 충분히 증폭하기 위해서는 PCR 방법이 가장 적합하다. 기타 다른 DNA 증폭 방법도 적용될 수 있으며, 실시간 PCR 법 등을 통해 직접 검출도 가능하다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 세포 용해 모세관과 상기 DNA 증폭 챔버 사이의 채널내에 위치하며, 상기 고상 지지체를 여과하는 막을 추가로 포함할 수 있다. 핵산을 결합하기 위해 사용된 고상 지지체가 용출 버퍼에 의해 핵산을 방출한 후에는, 핵산만 DNA 증폭 챔버로 이동하고 고상 지지체는 제거되어야 한다. 따라서, 핵산이 용출된 고상 지지체는 DNA 증폭 챔버로 이동하지 못하고, 용출된 핵산만 이동하기 위해 고상 지지체를 여과하는 막이 필요한 것이다. 상기 막은 핵산은 통과시키고, 고상 지지체를 여과할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 모세관에 부착되어, 핵산이 결합된 고상 지지체를 세정하는 세정 버퍼를 공급하는 세정 버퍼 챔버를 추가로 포함할 수 있다. 세포 또는 바이러스가 용해된 후에, DNA 증폭을 방해하는 물질의 일부는 자성 비드에 결합되어 자기력 발생부에 부착되어 제거되고, 핵산은 고상 지지체에 부착된다. 이어서, 배수 챔버를 통해 세포 용해액을 방출한 후, 남아 있는 핵산이 결합된 고상 지지체를 세정하여 핵산이 결합된 고상 지지체에 남아 있을 수 있는 불순물을 제거하는 과정이 필요하다. 상기 과정을 거치면 핵산은 더욱 정제된 형태가 되어 DNA 증폭 효율이 증가하는 것이다. 세정 버퍼는 고상 지지체로부터 결합된 핵산을 용출하지 않고, 불순물을 제거할 수 있는 인산염 버퍼(PBS) 버퍼와 같은 세정 버퍼를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여,

본 발명은 상기 핵산 정제 장치를 이용하여 핵산을 정제하는 방법으로서,

세포 또는 바이러스를 포함하는 용액을 자성 비드 및 고상 지지체가 포함된 모세관 형상의 용기에 주입하는 단계;

상기 진동기를 작동하여 상기 용액, 자성 비드 및 고상 지지체를 혼합하는 단계;

상기 자성 비드에 레이저를 조사하여 세포 또는 바이러스를 파괴하고, 세포 또는 바이러스 용해액 중의 PCR 저해 물질을 상기 자성 비드에 흡착시키고, 용액 중의 핵산을 고상 지지체에 결합시키는 단계;

상기 세포 또는 바이러스 용해액 중의 PCR 저해 물질이 흡착된 자성 비드를 자기력 발생부를 통하여 용해 모세관 벽에 고정하는 단계;

자성 비드가 제거된 상기 용해액을 방출하는 단계; 및

상기 용해액 중의 핵산이 결합된 고상 지지체로부터 핵산을 용출시키고 증화하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 방법은 비드의 종류에 따라서 레이저를 흡수하는 능력의 차이를 이용한 것으로서, 자성 비드는 레이저를 흡수하지만, 실리카 비드 또는 실리콘 기판등의 고상 지지체는 근적외선 파장의 레이저를 흡수하지 않고 통과시킨다. 따라서, 두 비드간의 레이저 흡수도 차이가 생기므로 자성 비드는 세포 용해에 이용하고, 실리카 비드 또는 실리콘 기판등의 고상 지지체는 핵산 정제에 이용하는 것이다.

상기 방법은 시료, 자성 비드 및 고상 지지체를 세포 용해 모세관에 주입하고, 진동기를 이용하여 혼합하면서 레이저를 조사한다. 이 때 자성 비드는 레이저를 흡수하여 세포 또는 바이러스를 파괴하게 된다. 레이저에 의해 끊어 오른 자성 비드는 PCR 저해 물질을 결합하며, 자발적으로 모세관 벽에 부착되거나 자기력 발생부에 의해 모세관 벽에 부착되고, 세포 용해액 중의 핵산은 실리카 비드 또는 실리콘 기판과 같은 고상 지지체에 결합되어 모세관 하단에 위치하게 된다. 이어서, 핵산이 결합된 고상 지지체만을 세포 용해 모세관 내에 남긴 채 배수 챔버를 통해 용액을 방출한 후, 핵산이 결합된 고상 지지체를 세정 버퍼를 이용하여 세정함으로써 PCR 저해제들을 한번 더 제거한다. 이어서, 고상 지지체에 결합된 핵산을 용출 버퍼를 이용하여 용출한 후, 증화 버퍼를 이용하여 변성된 핵산을 증화시켜 더욱 정제된 핵산 용액을 PCR 증폭 챔버로 이동하여 핵산을 증폭한다.

자성 비드가 포함된 용액에 레이저를 조사하면, 자성 비드가 레이저에 의해 어블레이션 현상을 일으킴으로써, 충격파, 증기압 및 열을 세포 표면에 전달하는데, 이 때 물리적 충격이 동시에 가해진다. 레이저 어블레이션이란 레이저 빔에 노출된 소재에 발생하는 현상을 총칭한다. 레이저 어블레이션에 의해 소재 표면의 온도는 수백에서 수천도까지 급속히 상승하며 소재 표면의 온도가 증발점 이상으로 상승하면 액체 상태 재료의 증발과 함께 표면에서의 포화증기압도 급속히 상승한다.

레이저에 의해 가열된 자성 비드는 수용액의 온도를 올리며, 뜨거워진 자성 비드가 세포를 직접 파괴한다. 수용액 중의 자성 비드는 단순한 열 전달체로 존재하는 것이 아닌 열적, 기계적, 물리학적 영향을 세포 표면에 전달하고 이를 이용하여 세포 표면을 효과적으로 파괴하는 것이다. 파괴된 세포 또는 바이러스의 용해액은 PCR 증폭을 방해하는 화합물을 포함한다. 따라서, PCR 을 효율적으로 수행하기 위해서는 상기 용해액으로부터 PCR 저해제를 제거하는 과정이 필요하다. PCR 저해제를 제거하기 위해서는 일반적으로 별도의 단계가 필요한데, 이는 랩온어칩을 효율적으로 구현하는데 적합하지 않게 한다. 따라서, 본 발명의 방법은 PCR 저해제가 부착되는 자성 비드를 자기력 발생부를 통하여 용해 모세관 벽에 고정하고, 핵산은 특이적으로 고상 지지체에 결합시키는 과정을 통해 핵산을 더욱 정제함으로써 PCR 을 용이하게 할 수 있는 것이다.

구체적으로, 변성된 단백질과 세포 찌꺼기 등의 PCR 저해제들이 부착된 자성 비드가 레이저에 의해 끊어 오르게 되고, PCR 저해제가 부착된 자성 비드는 용기 벽에 부착되므로, 용기 하부에는 자성 비드가 없는 핵산이 결합된 고상 지지체층이 존재하게 되고, 용기 상부에는 PCR 저해제가 부착된 대부분의 자성 비드가 유리 벽에 부착되므로, PCR 저해제가 용이하게 제거될 수 있게 되는 것이다. 이러한 작용은 직경이 제한된 모세관에서 더욱 효율적으로 일어나며, 분리된 층을 좀 더 확실히 고정하는 동시에 고정화 영역을 지정하기 위해서는 고정된 전자석 또는 영구자석을 이용할 수 있다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여,

상기 핵산 정제 장치를 이용하여 핵산의 정제 및 증폭을 연속적으로 수행하는 방법으로서,

세포 또는 바이러스를 포함하는 용액을 자성 비드 및 고상 지지체가 포함된 모세관 형상의 용기에 주입하는 단계;

상기 진동기를 작동하여 상기 용액, 자성 비드 및 고상 지지체를 혼합하는 단계;

상기 자성 비드에 레이저를 조사하여 세포 또는 바이러스를 파괴하고, 세포 또는 바이러스 용해액 중의 PCR 저해 물질을 상기 자성 비드에 흡착시키고, 용액 중의 핵산을 고상 지지체에 결합시키는 단계;

상기 세포 또는 바이러스 용해액 중의 PCR 저해 물질이 흡착된 자성 비드를 자기력 발생부를 통하여 용해 모세관 벽에 고정하는 단계;

자성 비드가 제거된 상기 용해액을 방출하는 단계;

상기 용해액 중의 핵산이 결합된 고상 지지체로부터 핵산을 용출시키고 중화하는 단계; 및

상기 자성 비드 및 상기 고상 지지체가 제거된 용액을 얻고, 상기 용액을 상기 용기와 증폭 챔버를 연결하는 채널을 통하여 증폭 챔버로 이송하여 증폭을 수행하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

랩온어칩을 구현하기 위해서는, 핵산의 분리, 정제 및 증폭을 연속해서 수행할 필요가 있다. 따라서, 상기 정제된 DNA 용액을 상기 모세관 형상의 용기와 증폭 챔버를 연결하는 채널을 통하여 증폭 챔버로 바로 이송하여 핵산을 증폭하면 상기 목적을 달성할 수 있는 것이다. 핵산의 증폭 챔버로의 이송은 전기적, 기계적 힘을 이용한 펌프 등에 의해 수행될 수 있다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 레이저는 펄스 레이저 또는 연속파동 레이저를 포함할 수 있다.

너무 낮은 레이저 출력에서는 효율적으로 레이저 어블레이션 현상을 일으킬 수 없으며, 레이저 출력은 연속파동(CW)의 경우 10mW~300W, 펄스 레이저의 경우 1mJ/펄스~1J/펄스를 전달해 주어야 한다. 바람직하게는 상기 펄스 레이저가 32mJ/펄스~1J/펄스이고, 연속파동 레이저가 10W~300W의 출력을 가진다. 이는 연속파동의 경우 10mW 미만이고, 펄스 레이저의 경우 1mJ/펄스 미만이면 세포를 파괴하는 충분한 에너지 전달이 되지 않는 문제가 발생하며, 연속파동의 경우 300W 초과이고, 펄스 레이저의 경우 1J/펄스 초과이면 DNA의 손상의 문제가 발생하기 때문이다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 레이저는 자성 비드가 흡수하는 특정 파장대에서 발생하는 것이어야 한다. 상기 레이저는 750nm 이상의 파장대에서 발생하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 상기 레이저는 750nm ~ 5000nm의 파장대에서 발생하는 것이 바람직하다. 이는 750nm 미만의 파장에서는 실리카 비드가 레이저를 많이 흡수하게 되는 문제가 있고, 5000nm를 초과하면 수용액이 직접 레이저를 흡수하는 것이 많아져서 효과적인 레이저 흡수 차이를 주기 어려운 문제가 있기 때문이다. 또한, 상기 레이저는 하나 이상의 파장대에서 발생할 수 있다. 즉, 레이저는 상기 파장 범위내의 하나의 파장일 수도 있고, 파장이 서로 상이한 2 이상의 파장일 수도 있다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 자성 비드의 크기가 50nm ~ 1,000 μ m인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는, 상기 자성 비드의 크기는 1 μ m ~ 50 μ m이다. 이는 자성 비드의 크기가 50nm 미만이면 불충분한 물리적, 기계적 충격의 문제가 있고, 1,000 μ m를 초과하면 랩온어칩(LOC)에 효과적인 크기 제한의 문제가 생기기 때문이다. 또한, 상기 자성 비드는 2 가지 이상의 크기를 갖는 비드로 혼합된 것일 수 있다. 즉, 상기 자성 비드는 동일한 크기일 수도 있고, 서로 상이한 크기의 혼합물일 수도 있다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 모세관 형상의 용기는 직경과 길이의 비율이 1:2 ~ 1:50 일 수 있으며, 직경은 1mm ~ 5mm 일 수 있다. 비드가 포함된 층은 유리 벽 표면에 비특이적으로 결합하게 되는데, 이러한 작용은 직경이 제한된 모세관에서 더욱 효율적으로 일어난다. 따라서, 상기 범위를 벗어난 용기의 경우에는 층 분리가 어렵게 되어 정제 효과가 떨어진다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 용기의 재질은 중합체, 유기 물질, 규소, 유리 및 금속으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 용기는 비드가 잘 고정화될 수 있는 재질이면 어느 것이라도 가능하다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 자성 비드가 자성을 띠는 것이면 어느 것이라도 가능하다. 특히, 강자성을 띠는 Fe, Ni, Cr의 금속 및 이의 산화물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상의 물질을 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 자성 비드가 중합체, 유기 물질, 규소, 또는 유리에 강자성을 띠는 금속으로 코팅될 수 있다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 자성 비드의 표면이 DNA가 붙지 않는 구조인 음전하를 띠는 구조로 되어 있는 것이 바람직하다. 상기 음전하는 예를 들면, COO⁻ 등일 수 있다. 이는 DNA가 음전하를 띠고 있어, 자성 비드의 표면이 음전하를 띠면 반발력에 의해 DNA가 붙지 않기 때문이다. 또한, 자성 비드의 표면에 DNA가 붙으면 세포가 파괴된 후에 DNA와 자성 비드의 분리가 어려워 DNA의 정제를 어렵게 한다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 용액이 타액, 소변, 혈액, 혈청 및 세포 배양액으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 용액은 동물세포, 식물세포, 박테리아, 바이러스, 파아지 등 핵산을 가지고 있는 것이면 가능하다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 고상 지지체는 실리카 비드, 실리콘 기판, 게르마늄, 다이아몬드, 수정, 실리콘 등을 포함할 수 있다. 상기 고상 지지체는 근적외선 파장의 레이저를 흡수하지 않거나 적게 흡수해야 하며, 핵산을 결합할 수 있는 것이면 어느 것이라도 가능하다. 실리카 비드 또는 실리콘 기판이 바람직하게 사용된다. 또한, 상기 실리카 비드의 크기는 50nm ~ 1,000 μ m 일 수 있으며, 바람직하게는 1 μ m ~ 50 μ m이다. 이는 실리카 비드의 크기가 50nm 미만이면 제작 비용 증가의 문제가 있고, 1,000 μ m를 초과하면 LOC에 효과적인 크기 제한의 문제가 생기기 때문이다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 실리카 비드가 2 가지 이상의 크기를 갖는 비드로 혼합될 수 있다. 즉, 상기 실리카 비드는 동일한 크기일 수도 있고, 서로 상이한 크기의 혼합물일 수도 있다. 또한, 실리카 비드의 표면은 양전하를 띠는 물질로 코팅될 수 있다. 이는 핵산이 음전하를 띠고 있기 때문에 정전기적 상호작용에 의해 핵산을 고상 지지체에 결합시키기 위한 것이다. 양전하를 띠는 물질은 예를 들면, 베타인(betaine), 아미노기 등일 수 있다. 도 2a는 베타인이 코팅된 실리카 비드에 핵산이 결합된 것을 나타낸 모식도이다.

본 발명의 하나의 구현예에서, 상기 실리콘 기판은 예를 들면, 기둥(pillar) 구조 또는 실리카 비드가 고정화되어 있는 구조일 수 있다. 이 구조는 통상의 실리콘 기판보다 표면적이 증가하므로 더 많은 양의 핵산을 결합할 수 있는 장점이 있다. 도 2b는 베타인이 코팅된 기둥 구조의 실리콘 기판에 핵산이 결합된 것을 나타낸 모식도이다. 실리콘 기판을 작은 조각으로 제조하여 실리카 비드를 대신하거나, 모세관 벽을 실리콘 기판으로 제조할 수도 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

실시예

실시예 1: 본 발명의 장치 및 방법을 이용한 핵산의 정제

본 발명의 핵산 정제 장치 및 방법을 이용하여 재조합 인간 간염 바이러스 (rHBV)로부터 핵산을 정제하였다. 구체적으로, 도 1에 보여준 바와 같이, 재조합 인간 간염 바이러스 (rHBV)(30 μ l), 혈청(5 μ l), PBS(25 μ l), 베타인 실란화된 실리카 비드(30 μ l), 및 마이크로 자성 비드 (30 μ l, Dynabeads[®] M-270 Carboxylic Acid, DYNAL, 노르웨이)를 Lightcycler 모세관 (내경: 2.42mm, 높이: 35.40mm, 내경:높이 비율=1:14.63)내에서 혼합하였다. 모세관을 볼텍싱(vortexing)으로 교반하면서, 바이러스를 파괴하기 위해 15초 동안 808 nm, 21.1W (HLU25F100-808, LIMO, 독일)의 고출력 레이저 빔을 적용하였다. 바이러스 용해 후에, 바이러스 용해액을 배수 펌프를 통해 배수하고, 0.1M PBS 버퍼 120 μ l로 핵산이 결합된 실리카 비드를 세정하였다. 이어서, 0.1N NaOH 30 μ l를 이용하여 실리카 비드로부터 핵산을 용출시키고, 1M 트리스 버퍼/pH 7.0 1 μ l로 용출된 핵산을 중화시킨 후, PCR 증폭에 이용하였다.

PCR에 이용된 프라이머는 하기와 같다: 프라이머 TMP5-F (서열번호 1); 및 프라이머 TMP5-R (서열번호 2). 이 프라이머 쌍은 인간 간염 바이러스 (HBV) 게놈의 2,269~2,387 뉴클레오타이드에 해당하는 부위이다. PCR 증폭은 Taq 중합효소 (Takara, 한국)를 이용하여 40 사이클(50℃에서 10분, 95℃에서 1분 동안 예비변성, 95℃에서 5초 동안 변성, 62℃에서 15초 동안 어닐링 및 신장)동안 수행하였다. 증폭된 DNA를 시판되는 DNA 500 분석 규모의 시약 세트를 이용하여 Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)에서 분석하였다.

도 3은 DNA 정제 방법에 따른 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다. 상단 화살표는 원하는 PCR 산물에 해당하는 밴드를 나타내며, 하단 화살표는 PCR 부산물로서 생성되는 PCR 프라이머의 이합체를 나타낸 것이다. 레인 1 및 2는 본 발명의 방법에 의해 핵산을 정제한 후 PCR 한 것이고, 레인 3 내지 5는 PCR 양성 대조군으로서, Qiagen Ultrasense 키트를 이용하여 핵산을 정제한 후 PCR 한 것이며, 시료 6은 PCR 음성 대조군으로서, 증류수만을 이용하여 PCR을 한 것이다. 각 시료의 조성은 하기 표와 같다.

시료	혈청 (μ l)	PBS (μ l)	베타인 실란화된 실리카 비드 (μ l)	마이크로 자성 비드 (μ l)	rHBV (μ l)
1	5	25	30	30	30
2	5	25	30	30	30
3	200	700	-	-	100
4	200	700	-	-	100
5	200	700	-	-	100
6	증류수				

도 3에서 알 수 있는 바와 같이, 음성 대조군(레인 6)에는 예상한 바와 같이 PCR 산물이 관찰되지 않았으나, 본 발명의 경우(레인 1 및 2)에는 원하는 위치(100bp)에 PCR 산물이 관찰됨을 알 수 있으며, 또한 Qiagen Ultrasense 키트를 이용하여 핵산을 정제한 후 PCR한 경우(레인 3 내지 5)에도 PCR 산물이 관찰됨을 알 수 있었다. 이로부터, 정제에 시간과 단계가 많이 요구되는 양성 대조군인 Qiagen Ultrasense 키트를 이용하여 DNA를 정제한 경우와 본 발명의 방법은 비슷한 PCR 증폭 효율을 보인다는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 DNA 정제에 통상적으로 이용되는 Qiagen 방법에 비해 더욱 단시간 및 적은 단계를 거치면서도 PCR 저해 효과 없이 PCR이 잘 수행되므로 랩온어칩에 유용하게 적용될 수 있음을 알 수 있다.

도 4는 DNA 정제 방법에 따라 증폭된 PCR 산물의 농도를 나타낸 것이다. 막대기는 증폭된 DNA 농도(ng/ μ l)를 나타낸다. PCR 산물의 양은 Agilent BioAnalyzer 2100의 사용으로 정량화되었다. 시료 1 및 2는 본 발명의 방법에 의해 핵산을 정제한 후 PCR한 것이고, 시료 3 내지 5는 PCR 양성 대조군으로서, Qiagen Ultrasense 키트를 이용하여 핵산을 정제한 후 PCR한 것이며, 시료 6은 PCR 음성 대조군으로서, 증류수만을 이용하여 PCR을 한 것이다. 각 시료의 조성은 상기 표와 같다. 도 4에서 보여주는 바와 같이, 본 발명의 방법을 이용한 PCR 결과는 Qiagen Ultrasense 키트를 이용한 결과와 비슷하거나 오히려 우수함을 알 수 있다.

도 5는 PCR 결과 생성된 이합체(dimer)의 농도를 나타낸 것이다. 막대기는 이합체 농도($\text{ng}/\mu\text{l}$)를 나타낸다. PCR 산물의 양은 Agilent BioAnalyzer 2100 의 사용으로 정량화되었다. 각 시료 번호는 상기 도 4의 것과 동일하다. 이합체는 PCR 을 수행한 결과 생성되는 부산물로서, 일반적으로 PCR 결과가 좋으면 원하는 PCR 산물의 농도는 증가하고, 이합체의 농도는 감소하는 반면, PCR 결과가 좋지 않으면 원하는 PCR 산물의 농도는 감소하고, 이합체의 농도는 증가하는 것이다. 따라서, 주형 DNA 가 정제될수록 원하는 PCR 산물의 농도는 증가하고 이합체의 농도는 감소하는 것이다. 도 5에서 보여주는 바와 같이, 본 발명의 방법(시료 1 및 2)은 Qiagen 방법(시료 3 내지 5)에 비해 이합체 양이 상대적으로 적은 것을 알 수 있다. 이는 본 발명의 방법이 Qiagen 방법에 비해 PCR 증폭용 주형 DNA 가 더욱 정제된 것임을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법의 최적화시에 더욱 양호한 PCR 수율이 예상된다.

발명의 효과

이상 설명한 바와 같이, 본 발명의 방법에 따르면 PCR 저해제를 제거하여 PCR 수율을 높일 수 있으며, 실리콘 기관 또는 실리카 비드를 이용하여 핵산 정제가 가능하므로, 랩온어칩 제작에 응용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기를 포함하는 세포 또는 바이러스의 핵산 정제 장치:

시료 도입구가 형성되어 있어 상기 시료 도입구를 통해 시료, 자성 비드 및 고상 지지체를 수용하는 세포 용해 모세관;

상기 모세관에 부착되어 있고, 상기 모세관 내에서 상기 혼합물을 혼합하는 진동기(vibrator);

상기 모세관에 부착되어 있고, 상기 모세관에 레이저를 공급하는 레이저 발생부;

상기 모세관에 부착되어 있고, 자성 비드를 모세관 벽에 고정시키는 자기력 발생부;

상기 모세관에 부착되어 있고, 용해액을 방출하는 배수 챔버;

상기 모세관에 부착되어 있고, 핵산이 결합된 고상 지지체로부터 핵산을 용출시키는 용출 버퍼를 공급하는 용출 버퍼 챔버; 및

상기 모세관에 부착되어 있고, 상기 용출된 핵산 용액을 중화시키는 중화 버퍼를 공급하는 중화 버퍼 챔버.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 진동기는 초음파발생기, 자기장을 이용한 진동기, 전기장을 이용한 진동기 및 기계적 진동기로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 자기력 발생부가 레이저 통과 지역 상단에 위치하며, 상기 세포 용해 모세관내의 자성 비드가 비등할 때 전원이 켜지는 전자석인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 상기 세포 용해 모세관과 채널을 통해서 연결되어 있고, 상기 채널은 밸브에 의하여 개폐되는 DNA 증폭 챔버를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 상기 세포 용해 모세관과 상기 DNA 증폭 챔버 사이의 채널내에 위치하며, 상기 고상 지지체를 여과하는 막을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 상기 모세관에 부착되어, 핵산이 결합된 고상 지지체를 세정하는 세정 버퍼를 공급하는 세정 버퍼 챔버를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 7.

제 1 항에 따른 핵산 정제 장치를 이용하여 핵산을 정제하는 방법으로서,

세포 또는 바이러스를 포함하는 용액을 자성 비드 및 고상 지지체가 포함된 모세관 형상의 용기에 주입하는 단계;

상기 진동기를 작동하여 상기 용액, 자성 비드 및 고상 지지체를 혼합하는 단계;

상기 자성 비드에 레이저를 조사하여 세포 또는 바이러스를 파괴하고, 세포 또는 바이러스 용해액 중의 PCR 저해 물질을 상기 자성 비드에 흡착시키고, 용액 중의 핵산을 고상 지지체에 결합시키는 단계;

상기 세포 또는 바이러스 용해액 중의 PCR 저해 물질이 흡착된 자성 비드를 자기력 발생부를 통하여 용해 모세관 벽에 고정하는 단계;

자성 비드가 제거된 상기 용해액을 방출하는 단계; 및

상기 용해액 중의 핵산이 결합된 고상 지지체로부터 핵산을 용출시키고 중화하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 8.

제 4 항에 따른 핵산 정제 장치를 이용하여 핵산의 정제 및 증폭을 연속적으로 수행하는 방법으로서,

세포 또는 바이러스를 포함하는 용액을 자성 비드 및 고상 지지체가 포함된 모세관 형상의 용기에 주입하는 단계;

상기 진동기를 작동하여 상기 용액, 자성 비드 및 고상 지지체를 혼합하는 단계;

상기 자성 비드에 레이저를 조사하여 세포 또는 바이러스를 파괴하고, 세포 또는 바이러스 용해액 중의 PCR 저해 물질을 상기 자성 비드에 흡착시키고, 용액 중의 핵산을 고상 지지체에 결합시키는 단계;

상기 세포 또는 바이러스 용해액 중의 PCR 저해 물질이 흡착된 자성 비드를 자기력 발생부를 통하여 용해 모세관 벽에 고정하는 단계;

자성 비드가 제거된 상기 용해액을 방출하는 단계;

상기 용해액 중의 핵산이 결합된 고상 지지체로부터 핵산을 용출시키고 중화하는 단계; 및

상기 자성 비드 및 상기 고상 지지체가 제거된 용액을 얻고, 상기 용액을 상기 용기와 증폭 챔버를 연결하는 채널을 통하여 증폭 챔버로 이송하여 증폭을 수행하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 용해액 방출 단계 후에, 상기 핵산이 결합된 고상 지지체를 세정하고, 세정액을 방출하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 레이저가 펄스 레이저 또는 연속파동 레이저를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 상기 펄스 레이저가 1mJ/펄스~1J/펄스이고, 연속파동 레이저가 10mW~300W의 출력을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 레이저는 750nm ~ 5000nm의 파장대에서 발생하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

제 12 항에 있어서, 상기 레이저는 하나 이상의 파장대에서 발생하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 자성 비드의 크기가 50nm ~ 1,000 μ m인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제 14 항에 있어서, 상기 자성 비드가 2 가지 이상의 크기를 갖는 비드로 혼합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 모세관 형상의 용기는 직경과 길이의 비율이 1:2 ~ 1:50 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제 16 항에 있어서, 상기 용기는 직경이 1mm ~ 5mm 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 용기의 재질은 중합체, 유기 물질, 규소, 유리 및 금속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 자성 비드가 강자성을 띠는 Fe, Ni, Cr 의 금속 및 이의 산화물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상의 물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 자성 비드가 중합체, 유기 물질, 규소, 또는 유리에 강자성을 띠는 금속으로 코팅되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 자성 비드의 표면이 음전하를 띠는 구조로 되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 용액이 타액, 소변, 혈액, 혈청 및 세포 배양액으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 고상 지지체는 실리카 비드, 실리콘 기판, 게르마늄, 다이아몬드, 수정 및 실리콘으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24.

제 23 항에 있어서, 상기 실리카 비드의 크기가 50nm ~ 1,000 μ m인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.

제 24 항에 있어서, 상기 실리카 비드가 2 가지 이상의 크기를 갖는 비드로 혼합된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26.

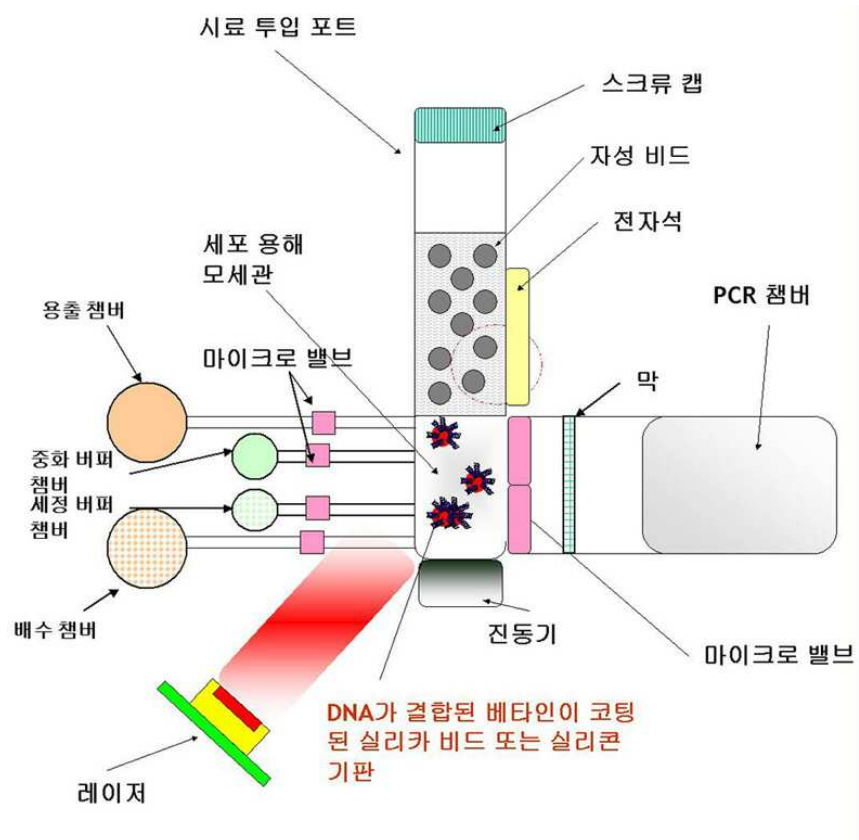
제 24 항에 있어서, 상기 실리카 비드의 표면은 양전하를 띠는 물질로 코팅되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.

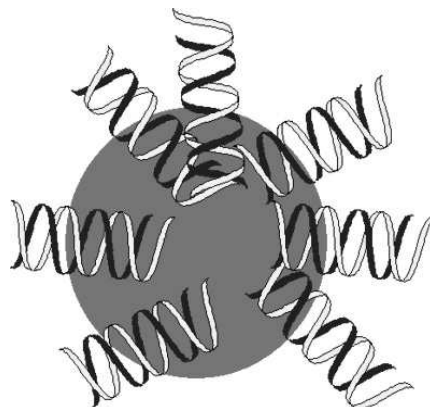
제 23 항에 있어서, 상기 실리콘 기판은 기둥(pillar) 구조 또는 실리카 비드가 고정화되어 있는 구조인 것을 특징으로 하는 방법.

도면

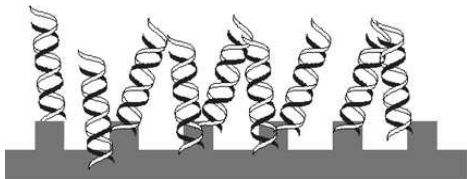
도면1



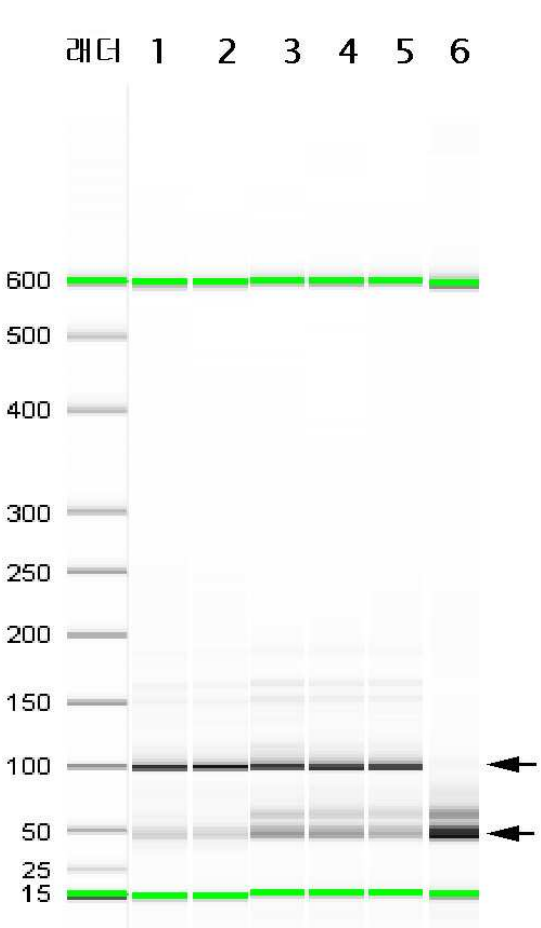
도면2a



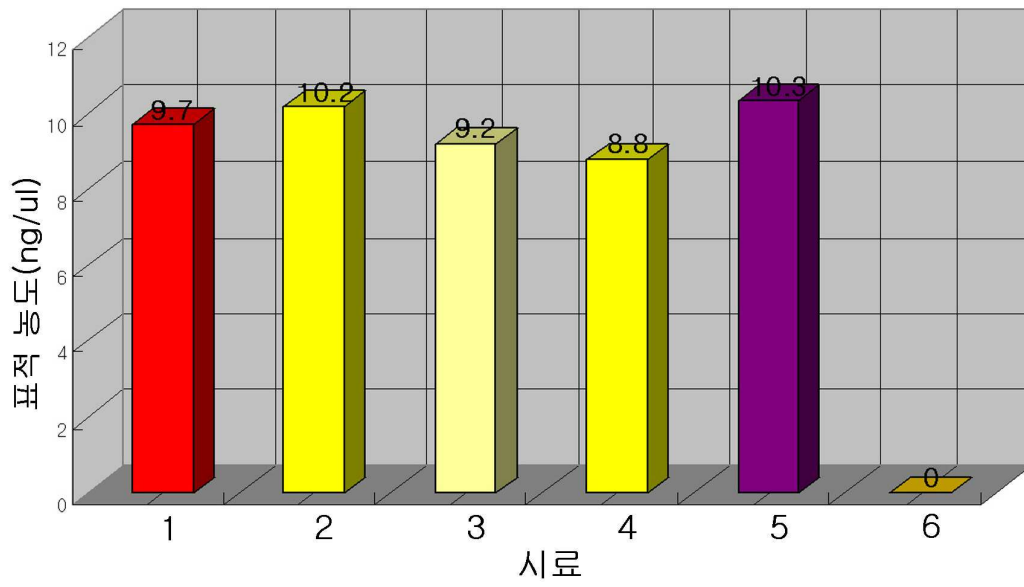
도면2b



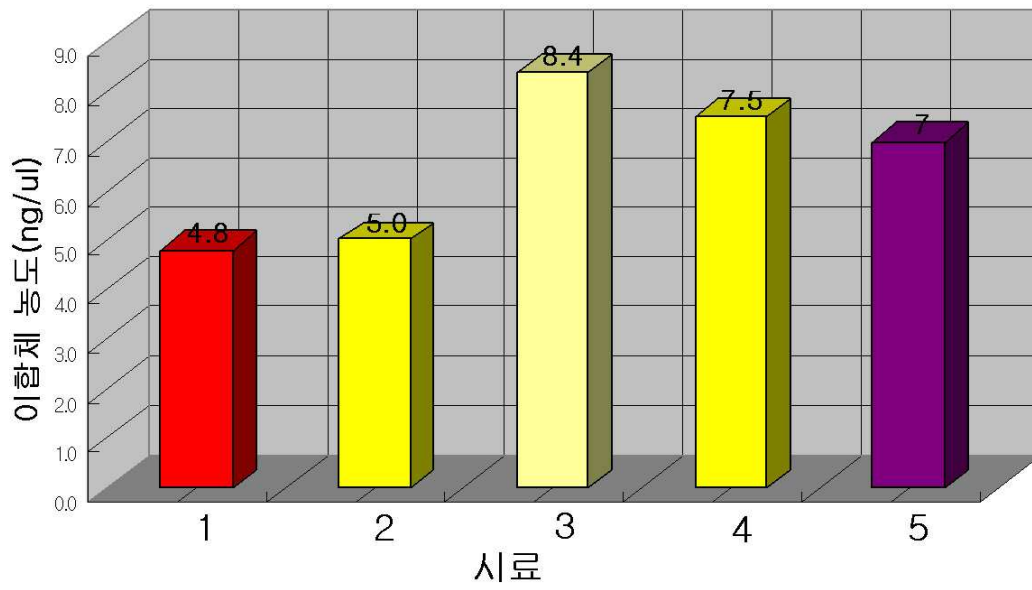
도면3



도면4



도면5



서열목록

서열목록 전자파일 첨부