

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 4월 25일 (25.04.2019) WIPO | PCT

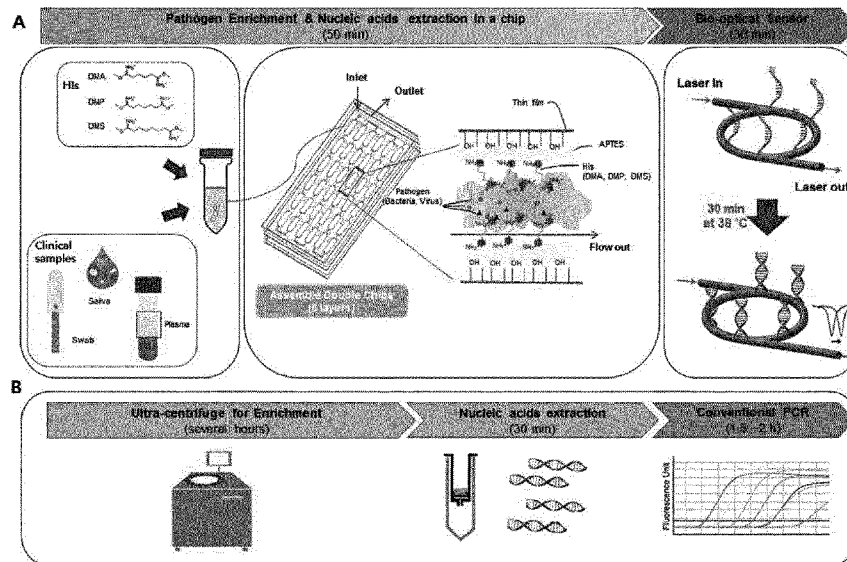


(10) 국제공개번호
WO 2019/078638 A2

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/6806 (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/012337
- (22) 국제출원일: 2018년 10월 18일 (18.10.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0135265 2017년 10월 18일 (18.10.2017) KR
10-2018-0124183 2018년 10월 18일 (18.10.2018) KR
- (71) 출원인: 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 신용 (SHIN, Yong); 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, 아산생명과학연구원 융합연구관 6층, Seoul (KR). 진충은 (JIN, Choong Eun); 16707 경기도 수원시 영통구 청명로 132, 336동 204호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로151 이노플렉스1차 601호, 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, JO, 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,

(54) Title: METHOD FOR ENRICHING PATHOGEN, USING HOMOBIFUNCTIONAL IMIDOESTER

(54) 발명의 명칭: 동형2기능성 이미도에스터를 이용한 병원체 농축 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for enriching pathogens, using a homobifunctional imidoester group. A pathogen-enriching method and a nucleic acid isolation method using a homobifunctional imidoester compound (DMA, DMP, DMS) according to the present invention can rapidly extract a low amount of pathogens contained in a sample without using a particular device and can be thus utilized as an in-situ diagnostic method. Being capable of concurrent pathogen enrichment and nucleic acid extraction in one tube or chip, the method has advantages over conventional methods in terms of high efficiency, excellent time and cost saving, and convenient usage.

(57) 요약서: 본 발명은 동형2 기능성 이미도에스테르기를 이용한 병원체 농축 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 동형2 기능성 이미도에스터 화합물 (DMA, DMP, DMS) 을 이용한 병원체 농축 및 핵산 추출 방법은 시료에 함유되어 있는 적은 양의 병원체를 특별한 장비의 사용 없이 신속하게 추출할 수 있어 현장 진단 방법으로 활용이 가능하며, 하나의 튜브 (tube) 또는 칩 (chip) 에서 동시에 병원체 농축 및 핵산 추출이 가능하므로 종래 방법보다 효율성이 높고, 시간 및 비용 절감이 우수하며, 간편하게 사용할 수 있는 이점이 있다.



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 역
내 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), 유
럽 (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:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별
도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 동형2기능성 이미도에스터를 이용한 병원체 농축 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 동형2기능성 이미도에스터 (homobifunctional imidoester; HI) 화합물을 이용한 병원체 농축 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 디메틸 아디프이미데이트 (Dimethyl adipimidate; DMA), 디메틸 피멜리미데이트 (Dimethyl pimelimidate; DMP) 또는 디메틸 수베르이미데이트 (Dimethyl suberimidate; DMS)를 이용하여 병원체를 농축하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 핵산은 질병 상태를 확인하기 위한 중요한 분석 수단이며, DNA 생체표지자 (biomarker) 예를 들어, 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism; SNP), 돌연변이 또는 DNA 메틸화 (DNA methylation)는 연구자가 암의 원인을 찾도록 돕고 질병의 초기 단계 동안 질병의 상태를 진단하고 관찰하는 것은 물론 예후와 감시에 대한 큰 기회를 제공하는 데 중요한 실마리를 제공한다.
- [3] DNA와 같은 핵산은 단백질과 같은 다른 성분에 비해 매우 낮은 생리적 농도로 존재하기 때문에 (예를 들어, 전혈 마이크로리터 당 수십 나노그램의 DNA 대 수십 마이크로그램의 단백질), 임상 시료로부터 DNA를 효과적으로 추출하고 예비 농축하는 것은 증폭 및 검출과 같은 이후의 공정에 매우 중요하다. 메틸화된 DNA (methylated DNA)의 경우, 이러한 문제는 더욱 중요하다.
- [4] 기존의 미생물 검출을 위한 방법들은 환자 샘플에서 전체 용액을 다 이용하지 못하고, 그 중 일부만을 이용해서 핵산을 추출하고 이를 이용한 검출을 진행해 왔다. 많은 양의 미생물의 경우에는 큰 문제가 없지만, 적은 양의 미생물의 경우, 정확한 검출이 되지 못해서 추가적 감염병에 대한 조절에 문제가 생기는데, 샘플에서 최대한 모든 미생물을 이용하기 위한 농축 방법에 대한 연구가 필요하다.
- [5] 또한, 최근 들어 생명공학을 비롯한 진단의학, 약물의학, 대사의학 등 다양한 분야에서 고순도로 정제된 핵산의 사용량이 늘어남에 따라 다양한 생물 시료로부터 보다 신속하고 순수하게 핵산을 분리하고자 하는 노력이 계속되고 있다.
- [6] 그러나 현재까지 핵산의 분리 방법에 있어 가장 크게 발전한 부분은 유전체 DNA, 플라스미드 DNA, 메신저 RNA, 단백질, 세포 잔해 입자 등 세포 용해 용액 내에 포함된 여러 종류의 물질들로부터 특이적으로 핵산만을 흡착시키는 담체에 관한 기술 등 거의 모든 연구의 초점은 핵산을 흡착시키는 물질에 관한 연구와 개발에 집중되어 있는 한계가 있었다.
- [7] 이에, 보다 신속하고 순수하게 핵산을 분리하기 위하여 무엇보다 세포 잔해

입자와 단백질 변성 응집물, 기타 다양한 세포 분해 물질들로부터 신속하게 원하는 핵산만을 분리할 수 있는 기술의 개발이 절실한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

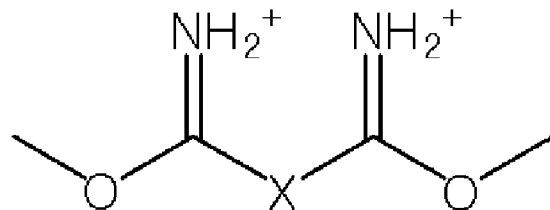
- [8] 본 발명의 목적은 동형2기능성 이미도에스터 화합물을 포함하는 병원체 농축용 조성물, 이를 이용한 병원체 농축 방법 및 키트; 동형2기능성 이미도에스터 화합물을 포함하는 병원체 농축 및 핵산 추출용 조성물, 이를 이용한 병원체 농축 및 핵산 추출 방법, 및 키트;를 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 병원체 농축용 조성물을 제공한다.

[10] [화학식 1]

[11]



- [12] 상기 식에서, X는 $(CH_2)_n$ 이며,

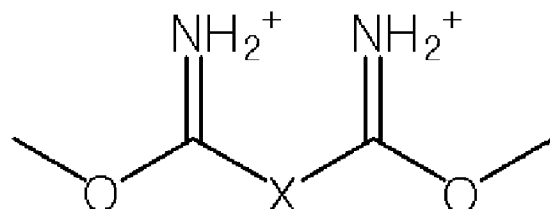
[13] n은 4 내지 10의 정수임.

[14] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원체 농축용 키트를 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계; 및 상기 개질된 대상물 상에 병원체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 접촉시키는 제 2단계;를 포함하는 병원체 농축 방법을 제공한다.

[16] [화학식 1]

[17]



- [18] 상기 식에서, X는 $(CH_2)_n$ 이며,

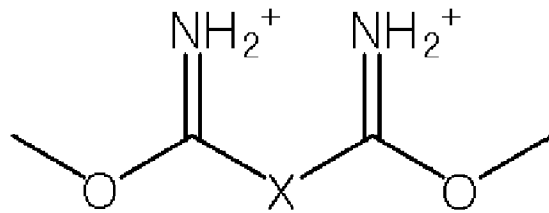
[19] n은 4 내지 10의 정수임.

[20] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 병원체 농축 및

hexan 추출용 조성물을 제공한다.

[21] [화학식 1]

[22]



[23] 상기 식에서, X는 $(CH_2)_n$ 이며,

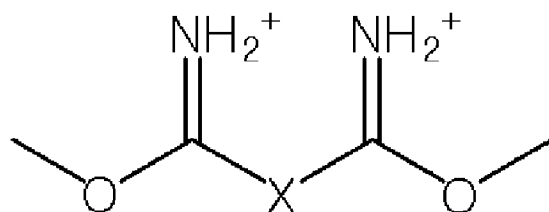
[24] n은 4 내지 10의 정수임.

[25] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원체 농축 및 hexan 추출용 키트를 제공한다.

[26] 또한, 본 발명은 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계; 상기 개질된 대상물 상에 병원체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 접촉시켜 병원체를 농축시키는 제 2단계; 상기 농축된 병원체로부터 hexan을 분리하는 제 3단계; 상기 분리된 hexan과 상기 화합물 간의 복합체를 형성시키는 제 4단계; 및 상기 복합체가 형성된 대상물에 용출 완충액을 처리하여 hexan을 추출하는 제 5단계;를 포함하는 병원체 농축과 동시에 상기 농축된 병원체로부터 hexan을 추출하는 방법을 제공한다.

[27] [화학식 1]

[28]



[29] 상기 식에서, X는 $(CH_2)_n$ 이며,

[30] n은 4 내지 10의 정수임.

발명의 효과

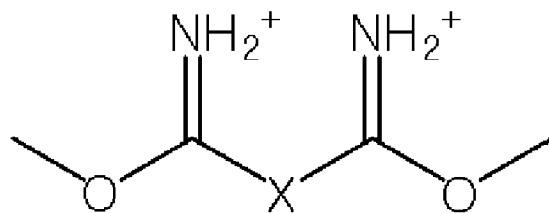
[31] 본 발명에 따른 동형2기능성 이미도에스터 화합물 (DMA, DMP, DMS)을 이용한 병원체 농축 및 hexan 추출 방법은 시료에 함유되어 있는 적은 양의 병원체를 특별한 장비의 사용 없이 신속하게 추출할 수 있어 현장 진단 방법으로 활용이 가능하며, 하나의 튜브 (tube) 또는 칩 (chip)에서 동시에 병원체 농축 및 hexan 추출이 가능하므로 종래 방법보다 효율성이 높고, 시간 및 비용 절감이 우수하며, 간편하게 사용할 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 동형2기능성 이미도에스터 화합물을 이용하여 병원체 농축 및 핵산을 추출하기 위한 본 발명의 박막 장치, 및 병원체 농축 및 핵산 시료 분석의 개략적인 모식도를 나타낸 것이다.
- [33] 도 2는 동형2기능성 이미도에스터 화합물을 이용하여 (A) 병원체 (대장균) 농축 및 핵산 추출, (B) 병원체 포획 효율, (C) 병원체 농도에 따른 농축 및 핵산 추출, (D) 원-스텝 병원체 농축 및 핵산 추출 결과를 나타낸 것이다.
- [34] 도 3은 동형2기능성 이미도에스터 화합물을 이용하여 (A) 파라인플루엔자 감염 환자의 시료에서 병원체 농축 및 핵산 추출, (B) 대상포진 감염 환자 시료에서 병원체 농축 및 핵산 추출 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [35] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [36] 본 발명의 발명자들은 시료에 함유되어 있는 적은 양의 병원체를 농축하고, 농축된 병원체로부터 핵산을 추출하는 방법을 개발하였으며, 본 발명의 병원체 농축 및 핵산 추출 방법은 종래 방법에 비해 보다 간편하면서도 저비용으로 동시에 병원체 농축 및 핵산 추출을 가능하며, 또한, 대형 장비를 사용하지 않고도 현장 즉시형 진단이 가능함을 밝혀내며 본 발명을 완성하였다.
- [37]
- [38] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 병원체 농축용 조성물을 제공한다.
- [39] [화학식 1]
- [40]

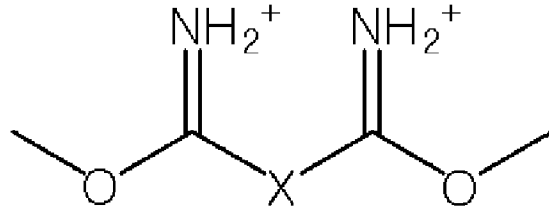


- [41] 상기 식에서, X는 $(CH_2)_n$ 이며,
- [42] n은 4 내지 10의 정수임.
- [43]
- [44] 상기 병원체는 미생물이며, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [45]
- [46] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원체 농축용 키트를 제공한다.
- [47]
- [48] 또한, 본 발명은 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계; 및 상기

개질된 대상물 상에 병원체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 접촉시키는 제 2단계;를 포함하는 병원체 농축 방법을 제공한다.

[49] [화학식 1]

[50]



[51] 상기 식에서, X는 $(CH_2)_n$ 이며,

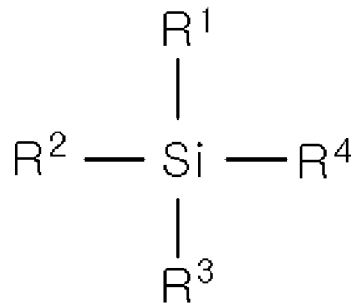
[52] n은 4 내지 10의 정수임.

[53] 상기 제 1단계의 대상물은 고형물 또는 고형지지체일 수 있으며, 예로 박막장치, 자성 비드 (magnetic bead), 링 공진기 (ring resonator) 또는 나노입자 (nanoparticle) 중 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[54] 상기 제 1단계의 대상물은 실란 화합물로 개질될 수 있다. 바람직하게는, 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[55] [화학식 2]

[56]



[57] 상기 식에서, R¹ 내지 R³는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의 알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R⁴는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노](C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

[58] 보다 바람직하게는, 상기 실란 화합물은

(3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),

(3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),

(1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),

(2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),

(4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),

(5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),

(6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),
 3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane;
 APDMS),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylene
 diamine),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine),
 [3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및
 3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3-[(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

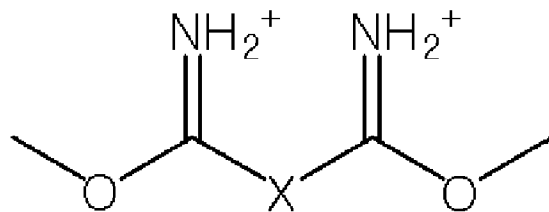
[59] 상기 병원체가 함유된 시료는 병원체에 감염된 것으로 의심되는 객체의 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및 조직으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[60]

[61] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 병원체 농축 및 핵산 추출용 조성물을 제공한다.

[62] [화학식 1]

[63]



[64] 상기 식에서, X는 (CH₂)_n이며,

[65] n은 4 내지 10의 정수임.

[66] 상기 병원체는 미생물이며, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[67] 상기 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다.

[68]

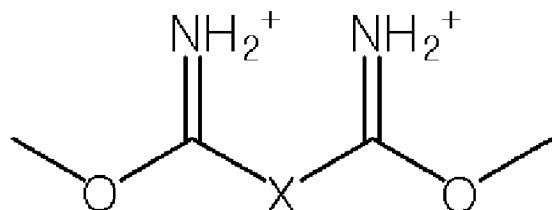
[69] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 병원체 농축 및 핵산 추출용 키트를 제공한다. 상기 키트는 효과적인 핵산 추출에 필요한 완충액 등이 추가적으로 포함될 수 있다.

[70]

[71] 또한, 본 발명은 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계; 상기 개질된 대상물 상에 병원체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 접촉시켜 병원체를 농축시키는 제 2단계; 상기 농축된 병원체로부터 핵산을 분리하는 제 3단계; 상기 분리된 핵산과 상기 화합물 간의 복합체를 형성시키는 제 4단계; 및 상기 복합체가 형성된 대상물에 용출 완충액을 처리하여 핵산을 추출하는 제 5단계;를 포함하는 병원체 농축과 동시에 상기 농축된 병원체로부터 핵산을 추출하는 방법을 제공한다.

[72] [화학식 1]

[73]

[74] 상기 식에서, X는 $(CH_2)_n$ 이며,

[75] n은 4 내지 10의 정수임.

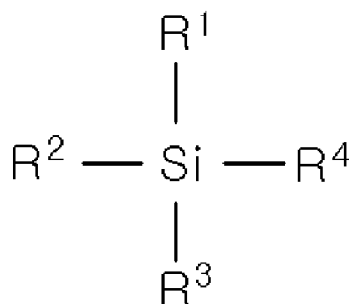
[76] 상기 병원체는 미생물이며, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[77] 상기 제 1단계의 대상물은 박막장치, 자성 비드 (magnetic bead), 링 공진기 (ring resonator) 또는 나노입자 (nanoparticle) 중 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[78] 상기 제 1단계의 대상물은 실란 화합물로 개질될 수 있다. 바람직하게는, 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[79] [화학식 2]

[80]



[81] 상기 식에서, R^1 내지 R^3 는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의 알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R^4 는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1

- 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.
- [82] 보다 바람직하게는, 상기 실란 화합물은
 (3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),
 (3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),
 (1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),
 (2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),
 (4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),
 (5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),
 (6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),
 3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane; APDMS),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylene diamine),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine),
 [3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및
 3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3-[(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [83] 상기 병원체가 함유된 시료는 병원체에 감염된 것으로 의심되는 객체의 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및 조직으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- 발명의 실시를 위한 형태**
- [84] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [85]
- [86] 도 1은 본 발명의 박막 장치 내에서 동형2기능성 이미도에스터 (HI; DMA, DMP, DMS) 화합물을 이용한 병원체 농축 및 핵산 추출 방법을 나타낸 것으로, 시료 배양, 세정 및 용출의 세 단계를 포함한다. 아민계 관련 용액을 이용하여 박막 장치의 표면을 아민으로 개질하고, 상기 개질에 의하여 소수성 박막 장치는 친수성으로 개질된다.
- [87] 상기 개질된 박막 장치 상에 핵산 시료, 용출 완충액 및 HI 용액 (DMA, DMP,

DMS)을 주입하면, 핵산의 아미노기와 HI의 2기능성 아민 반응기와의 상호작용에 의해 핵산과 HI 사이의 가교 메커니즘이 일어나고, 핵산과 HI 간의 복합체를 형성시켜 시료에서 DNA를 추출할 수 있다.

[88]

[89] 실시예 1: 동형2기능성 이미도에스터 (HI) 기반 박막 장치 제작 및 전처리

[90] 1) 박막 장치 제작

[91] CO₂ 레이저 절단기 (VLS3.50 (610 x 305 mm); Universal Laser Systems, Scottsdale, AZ)를 이용하여 마이크로 유체 장치 (패쇄형 장치)로 사용하기 위한 저비용 박막 장치를 제작하였다. 상기 박막 장치는 상부 박막과 하부 박막, 그리고 상부 박막과 하부 박막 사이에 삽입된 마이크로 유체 챔버로 구성되며, 상기 박막 장치는 병원체 농축을 위해, 동형2기능성 이미도에스터 (homobifunctional imidoester; HI)와 결합된 단일 마이크로 채널의 마이크로 유체 챔버로 구성된다.

[92] Qiagen 키트 (개방형 장치)와는 대조적으로, 상기 장치의 마이크로 유체 챔버는 개방형 장치에 의해 야기되는 오염을 방지하기 위하여, 패쇄형 장치를 기반으로 한다. 세정 및 용출 단계 동안, 반응 시료는 밀폐된 장치의 마이크로 유체 챔버에 남아있어 오염을 줄일 수 있다. 유동 단면적에서 반복되는 급격한 팽창 및 수축은 액체 시료 주입에 있어서 미세와류 (microvortices)를 생성할 수 있다.

[93] 시료로부터 병원체를 농축하기 위해 챔버의 36개 슬롯-형 마이크로 웰 (well)은 각각 1:5.6 및 5.6:1의 팽창 및 수축 비율로 연결하였다. 마이크로 유체 칩은 AutoCAD (Autodesk, Inc., San Rafael, CA)를 이용하여 설계하였고, 저렴한 비용, 단순성 및 신속성의 이점을 가지는 프로토타이핑 (prototyping) 장치 제작에 사용되는 레이저 절단기로 인쇄하였다.

[94] 세 개의 층 (three layers)으로 구성되는 3D 일회용 칩을 제작하기 위해, 레이저 절단기 (10 W 내지 50 W의 전력 범위의 10.6 μ CO₂ 레이저 소스)를 이용하여 내부 층으로 300 μ m 두께의 양면테이프 (Adhesive 300LSE-9495LE, 3M, U.S.A.) 및 외부 층으로 100 μ m 두께의 얇은 막 (Kemafoil hydrophilic film, HNW-100, COVEME, Italy) 2개로 구성되는 세 개의 층을 제작하였다. 외부 층은 HI 반응을 위한 3D 일회용 칩을 생성하기 위해, 내부 층의 상부 및 하부의 영구 접착면에 부착하였다. 마이크로 유체 챔버의 높이는 약 300 μ m이며, 전체 부피는 300 μ l로 설정하였다.

[95] 마이크로 채널에서 시료 흐름을 제어하기 위해, 튜빙 어댑터는 3 mm 두께를 갖는 캐스트 아크릴 시트 (cast acrylic sheet, MARGA CIPTA, Indonesia)를 양면 테이프 한쪽 면에 부착하였고, 레이저 절단기로 절단 및 천공하여 제조하였다. 제작된 어댑터는 3D 일회용 칩의 유입구 (inlet) 및 배출구 (outlet)에 각각 부착하였다. 이후, 미리 절단된 타이곤 튜빙 (Tygon® tubing, AAC02548; Cole-Parmer, Vernon Hills, IL)을 어댑터 구멍에 위치시킨 후, 120°C에서 열적으로 안정한 에폭시를 사용하여 밀봉하였다.

[96]

[97] 2) 박막 장치 전처리

[98] 핵산 추출을 위한 박막 장치의 사용을 용이하게 하기 위해, 레이저 절단기를 이용하여 플라스틱 카트리지 (plastic cartridge)를 제작하였다. 플라스틱 카트리지 (위 및 아래 부분)는 분석 중 3D 일회용 칩을 잡는 역할을 한다; 길이 105 mm, 폭 60 mm, 높이 10 mm. 각 플라스틱 구성요소의 레이아웃은 AutoCAD를 이용하여 설계하였다. 밀링 (milling) 기기를 이용하여 투명 아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌 (acrylonitrile butadiene styrene; ABS) 시트에 구조를 패터닝하였다. 하부 플라스틱 부분에 칩을 장착한 후, 4개의 렌치 볼트 (wrench bolt)를 사용하여 상부 플라스틱 부분과 조립하여 장치를 구축하였다.

[99] 마지막으로 병원체 농축을 위한 박막 장치와 비-카오트로픽 (non-chaotropic) 시약으로 HI를 사용하기 위해, 표면 개질 프로토콜을 수행하였다. 간략하게, 3D 일회용 칩의 내부 표면에 아민기를 생성시키기 위해, 내부 표면을 먼저 산소 플라즈마 (Covance Model, Femtoscience)로 10분 동안 처리하여 내부 표면의 특성을 소수성에서 친수성으로 변화시켰으며, 상기 플라즈마 처리된 박막 장치를 65°C에서 60분 동안 2% 3-아미노프로필 트리에톡시실란 (3-aminopropyl triethoxysilane; APTES, Sigma-Aldrich) 수용액에 침지시킨 후, 탈이온수로 완전히 세정하였다. 세정 후, 박막 장치를 경화시키기 위해, 상기 세정된 박막 장치를 신속하게 질소 기류 하에서 건조시켜 박막 장치를 아민으로 개질하였다.

[100] Drop Shape Analyzer (DSA100, KRUSS, Germany)를 이용한 아민-개질된 박막 장치의 물 접촉각 측정을 통해 온도 및 배양시간에 따라 박막 장치의 친수성이 상당히 변화하였음을 알 수 있었다. 65°C에서 60분 동안 상기 박막 장치를 APTES로 실란화 (silanization) 시킨 후, 상기 박막 표면의 친수성이 증가하였다 (약 30 내지 40°C). 상기 장치는 사용하기 전까지 상온에서 보관이 가능하다.

[101]

[102] **실시예 2 : HI/박막 시료 분석**

[103] 본 발명의 박막 장치(simple and label-free pathogen enrichment via homobifunctional imidoesters using a microfluidic; SLIM)를 이용하여 병원체를 농축하기 위한 분석 조건 및 반응을 최적화하였다. HI는 박막 표면에 복합체 형성을 통해 핵산을 포획할 수 있으므로, 병원체 결합능을 비교하기 위해, 디메틸 아디프이미데이트 (Dimethyl adipimidate; DMA), 디메틸 피멜리미데이트 (Dimethyl pimelimidate; DMP), 디메틸 수베르이미데이트 (Dimethyl suberimidate; DMS)와 같은 다양한 HI를 이용하여 실험을 수행하였다. 모든 HI 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

[104] 상기 반응을 수행하기 위해, 중증 열성 혈소판 감소증 증후군 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome; SFTS) 환자의 시료 2 ml를 swab 법으로 채취한 시료와 대장균 (E.coli) 배양 시료 1 ml를 사용하였고, 100 mg/ml 농도의 HI 용액 300 μ l과 각각 혼합한 다음 펌프 (KD Scientific, MA) 주사기를 이용하여 100

μl /분의 속도로 장치에 주입하였으며, 장치는 시료로부터 병원체를 포획하기 위해, 상온에서 10분 동안 방치하였다. 용출 완충액 (elution buffer; 10 mM 중탄산나트륨, $\text{pH} < 10.6$, 유속: $50 \mu\text{l}/\text{분}$)을 이용하여 HI (DMA, DMP, DMS)에 의해 농축된 병원체를 수 분 안에 수집하였다.

- [105] 상기 실험에서 농축 능력을 비교하기 위해, QIAamp® DNA mini kit 또는 QIAamp® viral RNA mini kit (Qiagen, Germany)로 핵산을 추출하였으며, 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 실험을 수행하였다.
- [106] 또한, 본 발명의 박막 장치를 이용하여 병원체 농축 및 핵산 추출을 수행하기 위해, 이전에 보고된 논문 (Scientific reports, 5, 14127., Analytical Chemistry, 89(14), 7502-7510.)을 참고하여 핵산을 추출하였다.
- [107] 용출된 핵산 시료는 프로테이나제 K (proteinase K) $10 \mu\text{l}$, DNase (RNA만 해당) $10 \mu\text{l}$, 자체 용해 완충액 (100 mM Tris-HCl ($\text{pH} 8.0$), 10 mM 에틸렌디아민테트라아세트산, 1% 로릴 황산 나트륨, 및 10% Triton X-100) $100 \mu\text{l}$ 및 HI (100 mg/ml) $100 \mu\text{l}$ 와 혼합하였다. 56°C (DNA의 경우) 또는 상온 (RNA의 경우)에서 20분 동안 장치를 배양한 후, 시료의 잔해물을 제거하기 위해, PBS로 장치를 세척하였다. 용출 완충액 ($\text{pH} > 10.6$)을 이용하여 핵산을 수 분 안에 추출하였다. 추출된 핵산의 양 및 순도는 Nano Drop (Thermo Fisher Scientific, USA)을 이용하여 260 nm 및 280 nm에서 시료의 광학 밀도의 비율을 측정하여 분석하였다.
- [108]
- [109] 실시예 3 : HI를 이용한 병원체 (대장균) 농축 및 핵산 추출
- [110] 박막 장치를 이용한 병원체의 농축 여부를 확인하기 위해, 대장균 (Escherichia coli, ATCC 25922) 배양 시료에서 상기 장치의 기본 특성을 분석하였다. 대장균의 콜로니 형성 단위 (colony formation unit; CFU)는 표준 한천 배지 (plate count agar, PCA; BD difco)를 이용하여 계산하였고, 대장균 시료 (10^4 CFU ml^{-1}) 1 ml 을 사용하여 최적의 HI 시약 (DMA, DMP, DMS)을 평가하였다.
- [111] Qiagen 키트 및 박막 장치를 이용하여 추출된 DNA에서 rodA 유전자를 증폭시켰다. PCR 조건은 95°C 에서 15분의 초기 변성 (denaturation) 단계; 95°C 에서 30초, 60°C 에서 30초, 72°C 에서 30초, 40 사이클; 72°C 에서 7분의 최종 신장 (elongation) 단계로 이루어진다. $5 \mu\text{l}$ 의 DNA를 10X PCR 완충액 (Qiagen), 5 mM MgCl_2 , 0.25 mM 디옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트, 25 pmol 각 프라이머 및 1 unit Taq DNA 폴리머라제 (Qiagen)를 함유하는 $25 \mu\text{l}$ 의 총 부피로 증폭시켰다.
- [112] 실시간 PCR은 AriaMx real-time PCR 기기 프로토콜 (Agilent technologies)을 참조하여 수행하였다. PCR 조건은 95°C 에서 15분; 95°C 에서 10초, 60°C 에서 20초, 72°C 에서 20초, 40 사이클; 40°C 에서 30초의 냉각 단계;로 이루어진다. $5 \mu\text{l}$ 의 DNA를 $10 \mu\text{l}$ 2X Brilliant III SYBR Green qPCR master mix, 25 pmol 각 프라이머 및 DI water가 들어있는 $20 \mu\text{l}$ 의 총 부피로 증폭시켰다. 증폭된 산물의

SYBR Green 신호는 AriaMx real-time PCR (Agilent technologies)을 이용하여 획득하였으며, 프라이머 세트의 상세한 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

[113]

[114] [표 1]

Targets	Sequence (5' → 3')	Product size (bp)
<i>rodA</i> (<i>E. coli</i>)	F: GCAAAC CAC CTT TGG TCG	195
	R: CTG TGG GTG TGG ATT GAC AT	
S segment (SFTS)	F: CAG CCA CTT TAC CCG AAC AT	150
	R: GGC CTA CTC TCT GTG GCA AG	

[115]

[116] 도 2A 및 2B를 참조하여 보면, 병원체를 농축시키기 위하여, 대장균 시료 1 ml을 HI 용액 (100 mg ml⁻¹) 300 μ l와 함께 혼합한 다음 장치에 주입하였으며, 100 μ l/분의 유속으로 상온에서 농축시켰다. 농축된 시료는 Qiagen DNA 키트를 이용하여 DNA를 추출한 후, 실시간 PCR (real-time PCR)을 수행하여 병원체 농축 효율을 비교하였다. 그 결과, HI (DMA, DMS, DMP)를 이용하여 병원체를 농축하는 경우, 기존 Qiagen 키트 방법으로 농축 단계 없이 핵산을 추출하는 경우보다 Ct 값이 감소하여 검출 민감도가 향상되었으며, HI 중에서도 DMP의 병원체 농축 효율이 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다. 병원체 농축을 위해 HI 시약 농도 (100 mg ml⁻¹), HI 시약 종류 (DMP), 배양 시간 (20분)을 최적화하였다.

[117]

[118] 병원체 농축을 위한 조건을 최적화 한 후, 대장균 시료 (10¹~10⁴ CFU ml⁻¹) 1 ml을 이용하여 본 발명의 박막 장치 (SLIM)에 의한 병원체 농축 및 핵산 추출 효율을 분석하였다. 그 결과, 도 2C를 참조하여 보면, 농축된 대장균으로부터 DNA가 증폭되고 연속 희석에 따라 Ct 값이 증가하는 것을 확인하였다. 본 발명의 박막 장치를 사용하는 경우, 모든 농도의 대장균 시료에서 기존 Qiagen 키트보다 감소된 Ct 값을 나타내었으며, 이는 DNA 농축 효율이 우수함을 보여준다. 검출 한계 또한 기존 Qiagen 키트보다 10배 우수한 것을 확인하였다.

[119]

[120] 다음으로 본 발명의 박막 장치가 동일한 플랫폼에서 동시에 병원체 농축 및 핵산 추출이 가능한지를 분석하였다. one-step 공정 (하나의 칩에서 병원체 농축 및 핵산 추출) 및 two-step 공정 (두 개의 개별 칩에서 각각 병원체 농축 및 핵산 추출)으로 기존 Qiagen 키트와 비교하였다. 그 결과, 도 2D를 참조하여 보면, one-step 공정에서 Ct 값이 감소하여 검출 민감도가 향상되고, 하나의 칩 (또는 튜브)에서 병원체 농축 및 추출이 동시에 가능함을 확인할 수 있었다.

[121]

[122] 실시예 4 : SFTS 환자 시료를 이용한 병원체 (바이러스) 농축 및 핵산 추출

- [123] SFTS 환자로부터 총 5개의 swab 시료를 제공 받았고, 비인두 swab/흡입제는 임상 시험의 일부로 사용하였다. 바이러스성 운반 배지를 미리 바른 Dacron swabs은 환자 또는 의료 종사자가 자주 만지는 표면을 무균적으로 닦는데 사용하였다. swab 법으로 채취한 시료 2 ml에서 QIAamp Viral RNA 미니 키트를 이용하는 경우 140 μ l를 사용하였고, 박막 장치를 이용하는 경우 2 ml 전체 시료를 사용하여 바이러스성 RNA를 추출하였다. 시료는 용출 완충액 60 μ l를 이용하여 용출하고, 용출된 DNA는 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.
- [124] 다음으로 Qiagen 키트 및 박막 장치를 이용하여 용출된 RNA로부터 SFTS 바이러스의 S 부분을 증폭시켰다. 원-스텝 역전사 PCR (One-step reverse transcript (RT) PCR)은 50°C에서 30분의 초기 변성 (denaturation) 단계; 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초, 50 사이클; 72°C에서 10분의 최종 신장 (elongation) 단계로 이루어진다.
- [125] 5 μ l의 RNA를 5X OneStep RT-PCR 완충액 (Qiagen), 0.25 mM 디옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트, 25 pmol 각 프라이머 및 1 unit OneStep RT-PCR Enzyme mix (Qiagen)를 함유하는 25 μ l의 총 부피로 증폭시켰다. 정량적 RT-PCR은 AriaMx real-time PCR 기기 프로토콜 (Agilent technologies)을 참조하여 수행하였다.
- [126] 5 μ l의 RNA를 10 μ l 2X Brilliant III SYBR Green qPCR master mix, 25 pmol 각 프라이머 및 DI water가 들어있는 20 μ l의 총 부피로 증폭시켰다. PCR 조건은 50°C에서 30분, 95°C에서 10분; 95°C에서 10초, 60°C에서 20초, 72°C에서 20초, 50 사이클; 40°C에서 30초의 냉각 단계;로 이루어진다. 증폭된 산물의 SYBR Green 신호는 AriaMx 실시간 PCR (Agilent technologies)을 이용하여 획득하였으며, 프라이머 세트의 상세한 서열은 상기 표 1에 나타내었다.
- [127]

[128] [표2]

No.	시료			C _T
1	SFTS 환자	시료1	Qiagen (140 $\mu\ell$)	-
2			DMP enrich (2 m ℓ)	39.81
3		시료2	Qiagen (140 $\mu\ell$)	-
4			DMP enrich (2 m ℓ)	-
5		시료3	Qiagen (140 $\mu\ell$)	43.26
6			DMP enrich (2 m ℓ)	39.24
7		시료4	Qiagen (140 $\mu\ell$)	-
8			DMP enrich (2 m ℓ)	40.9
9		시료5	Qiagen (140 $\mu\ell$)	-
10			DMP enrich (10 m ℓ)	39.14

[129]

[130] 상기 표 2를 참조하여 보면, 종래 Qiagen 방법으로는 SFTS 환자의 시료 (시료 1, 4, 5)에서 바이러스를 검출하지 못한 반면, 본 발명의 박막 장치를 이용하는 경우, 시료에 포함되어 있는 바이러스의 농축 및 핵산 추출이 동시에 가능하여 바이러스 검출에 활용이 가능함을 확인할 수 있었다.

[131]

[132] 실시예 5 : 파라인플루엔자 (hPIV-3) 환자 및 대상포진 (herpes zoster; HZ) 환자 시료를 이용한 병원체 (바이러스) 농축 및 핵산 추출

[133] 2016년 5월과 6월 사이 파라인플루엔자 (hPIV-3) 발생 동안 환자와 접촉하는

표면에서 채취한 swab 시료를 제공 받았다. swab 법으로 채취한 시료 2 ml에서 QIAamp Viral RNA 미니 키트를 이용하는 경우 140 μ l를 사용하였고, 박막 장치를 이용하는 경우 2 ml 전체 시료를 사용하여 바이러스성 RNA를 추출하였다. 시료는 용출 완충액 60 μ l를 이용하여 용출하고, 용출된 DNA는 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

- [134] 다음으로 Qiagen 키트 및 박막 장치를 이용하여 용출된 RNA로부터 SFTS 바이러스의 S 부분을 증폭시켰다. 원-스텝 역전사 PCR (One-step reverse transcript (RT) PCR)은 50°C에서 30분의 초기 변성 (denaturation) 단계; 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초, 50 사이클; 72°C에서 10분의 최종 신장 (elongation) 단계로 이루어진다.
- [135] 5 μ l의 RNA를 5X OneStep RT-PCR 완충액 (Qiagen), 0.25 mM 디옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트, 25 pmol 각 프라이머 및 1 unit OneStep RT-PCR Enzyme mix (Qiagen)를 함유하는 25 μ l의 총 부피로 증폭시켰다. 정량적 RT-PCR은 AriaMx real-time PCR 기기 프로토콜 (Agilent technologies)을 참조하여 수행하였다.
- [136] 5 μ l의 RNA를 10 μ l 2X Brilliant III SYBR Green qPCR master mix, 25 pmol 각 프라이머 및 DI water가 들어있는 20 μ l의 총 부피로 증폭시켰다. PCR 조건은 50°C에서 30분, 95°C에서 10분; 95°C에서 10초, 60°C에서 20초, 72°C에서 20초, 50 사이클; 40°C에서 30초의 냉각 단계;로 이루어진다. 증폭된 산물의 SYBR Green 신호는 AriaMx 실시간 PCR (Agilent technologies)을 이용하여 획득하였으며, 프라이머 세트의 상세한 서열은 상기 표 1에 나타내었다.
- [137] 그 결과, 도 3A를 참조하여 보면, 종래 Qiagen 방법으로는 일부 hPIV-3 환자의 시료 (S4, S5, S10, S12)에서 바이러스를 검출하지 못한 반면, 본 발명의 박막 장치를 이용하는 경우, 시료에 포함되어 있는 바이러스의 농축 및 핵산 추출이 동시에 가능하여 바이러스 검출에 활용이 가능함을 확인할 수 있었다.
- [138]
- [139] 다음으로 대상포진 (herpes zoster; HZ) 환자의 타액 시료에 본 발명의 박막 장치를 적용하였다. 수두와 HZ는 대상 포진 바이러스 (varicella-zoster; VZV)에 의해 유발되는 것으로 알려져 있으며, HZ의 발진은 일반적으로 임상 진단에 충분하다고 여겨지고 있으나 단순 포진 바이러스 (herpes simplex virus)와 같은 HZ 및 HZ 모방 질병을 구별하기 위해서는 타액 및 혈장 시료에 대한 분석이 필요하다. 한편, VZV 검출에 있어서 타액 DNA (88%)가 혈장 DNA (28%)보다 PCR 분석 민감도가 훨씬 높은 것으로 보고된 바 있으나 HZ 환자로부터 혈장 시료보다 타액 시료를 채취하는 것이 고통스러운 단점이 있다.
- [140] 이에, 본 발명에서는 타액 및 혈장 시료를 이용하여 두 시료의 농축 효율을 분석하고자 박막 장치를 적용하였다. 먼저, VZV 농축 및 바이러스성 DNA를 추출하기 위해 1 ml의 타액 시료를 사용하였으며, 실시간 PCR을 수행하여 10개의 타액 양성 시료를 선별하였다. VZV의 ORF62 영역을 사용하여 확인된

모든 양성 시료는 초기 Ct 값을 나타내었다. 반면, 음성 시료 중 어느 것도 본 발명의 박막 장치에 의해 양성 결과를 나타내지 않는 것을 확인하였다. 이는 타액 시료가 VZV 검출에 더 유용함을 입증한 이전 연구 결과와 일치한다.

[141]

[142] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[143] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[144]

[145]

[146]

[147]

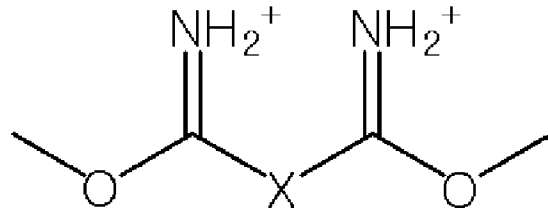
[148]

[149]

[150]

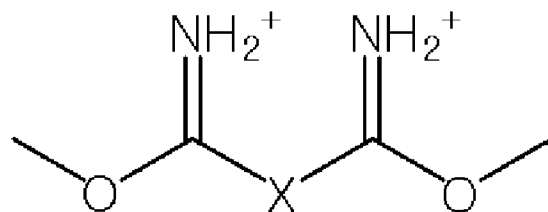
청구범위

- [청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 병원체 농축용 조성물:
[화학식 1]



상기 식에서, X는 $(\text{CH}_2)_n$ 이며,
n은 4 내지 10의 정수임.

- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 병원체는 미생물인 것을 특징으로 하는 병원체 농축용 조성물.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타인 것을 특징으로 하는 병원체 농축용 조성물.
- [청구항 4] 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 병원체 농축용 키트.
- [청구항 5] 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계; 및
상기 개질된 대상물 상에 병원체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 접촉시키는 제 2단계;
를 포함하는 병원체 농축 방법:
[화학식 1]



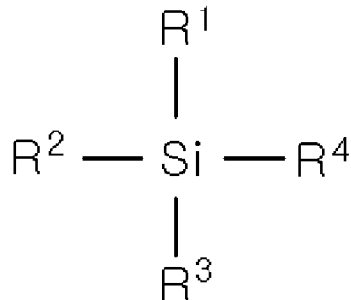
상기 식에서, X는 $(\text{CH}_2)_n$ 이며,
n은 4 내지 10의 정수임.

- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 상기 제 1단계의 대상물은 박막장치, 자성 비드 (magnetic bead), 링 공진기 (ring resonator) 또는 나노입자 (nanoparticle) 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 방법.
- [청구항 7] 제 5항에 있어서, 상기 제 1단계의 대상물은 실란 화합물로 개질된 것을

특징으로 하는 병원체 농축 방법.

[청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 방법:

[화학식 2]



상기 식에서, R¹ 내지 R³는 각각 같거나 다를 수 있으며, C1 내지 C4의 알킬 또는 C1 내지 C4의 알콕시 중 어느 하나이고, R⁴는 아미노(C1 내지 C10)알킬, 3-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C1 내지 C4)알킬아미노)(C1 내지 C4)알킬아미노](C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

[청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 실란 화합물은

(3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),
(3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),
(1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),
(2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),
(4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),
(5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),
(6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),
3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane; APDMS),

N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine),

N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine),

[3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)propyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및

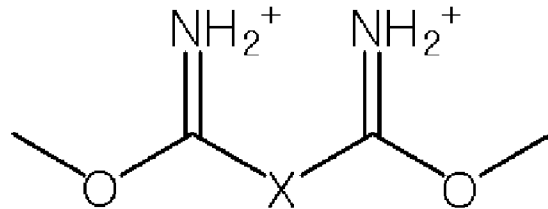
3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3-[(trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 방법.

[청구항 10] 제 5항에 있어서, 상기 병원체가 함유된 시료는 병원체에 감염된 것으로 의심되는 객체의 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의

외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및 조직으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 방법.

[청구항 11] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 병원체 농축 및 핵산 추출용 조성물:

[화학식 1]



상기 식에서, X는 (CH₂)_n이며,
n은 4 내지 10의 정수임.

[청구항 12] 제 11항에 있어서, 상기 병원체는 미생물인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 핵산 추출용 조성물.

[청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 핵산 추출용 조성물.

[청구항 14] 제 11항에 있어서, 상기 핵산은 DNA 또는 RNA인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 핵산 추출용 조성물.

[청구항 15] 제 11항 내지 제 14항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 병원체 농축 및 핵산 추출용 키트.

[청구항 16] 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 제 1단계;

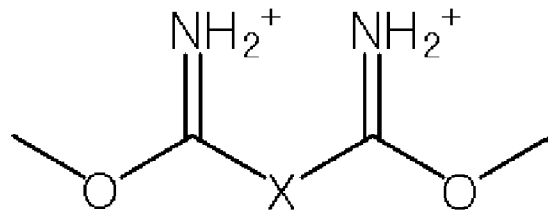
상기 개질된 대상물 상에 병원체가 함유된 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 접촉시켜 병원체를 농축시키는 제 2단계;

상기 농축된 병원체로부터 핵산을 분리하는 제 3단계;

상기 분리된 핵산과 상기 화합물 간의 복합체를 형성시키는 제 4단계; 및
상기 복합체가 형성된 대상물에 용출 완충액을 처리하여 핵산을 추출하는 제 5단계;

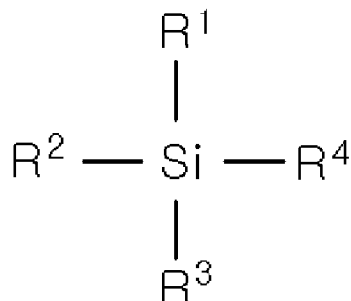
를 포함하는 병원체 농축과 동시에 상기 농축된 병원체로부터 핵산을 추출하는 방법:

[화학식 1]



상기 식에서, X는 $(CH_2)_n$ 이며,
n은 4 내지 10의 정수임.

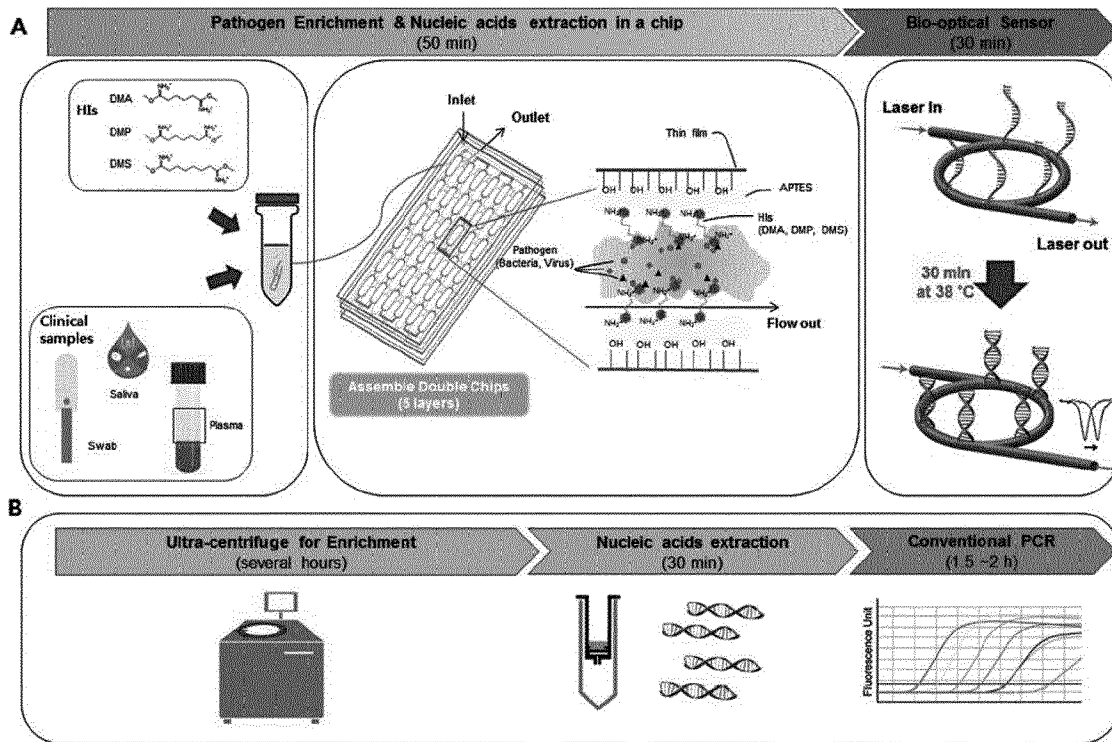
- [청구항 17] 제 16항에 있어서, 상기 병원체는 미생물인 것을 특징으로 하는 병원체 농축과 동시에 상기 농축된 병원체로부터 핵산을 추출하는 방법.
- [청구항 18] 제 17항에 있어서, 상기 미생물은 바이러스, 세균, 진균, 원충, 리케차 또는 스피로헤타인 것을 특징으로 하는 병원체 농축과 동시에 상기 농축된 병원체로부터 핵산을 추출하는 방법.
- [청구항 19] 제 16항에 있어서, 상기 제 1단계의 대상물은 박막장치, 자성 비드 (magnetic bead), 링 공진기 (ring resonator) 또는 나노입자 (nanoparticle) 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 병원체 농축과 동시에 상기 농축된 병원체로부터 핵산을 추출하는 방법.
- [청구항 20] 제 16항에 있어서, 상기 제 1단계의 대상물은 실란 화합물로 개질된 것을 특징으로 하는 병원체 농축과 동시에 상기 농축된 병원체로부터 핵산을 추출하는 방법.
- [청구항 21] 제 20항에 있어서, 상기 실란 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 병원체 농축과 동시에 상기 농축된 병원체로부터 핵산을 추출하는 방법:
- [화학식 2]



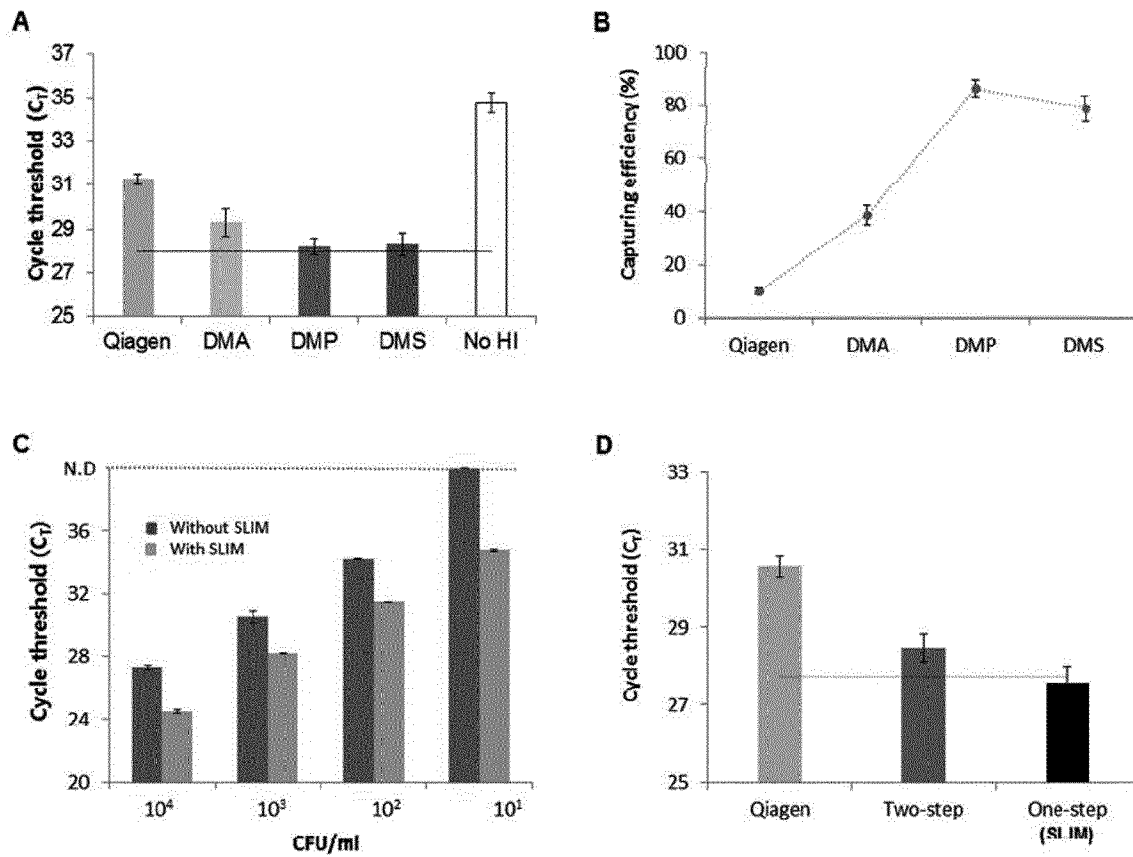
상기 식에서, R^1 내지 R^3 는 각각 같거나 다를 수 있으며, C_1 내지 C_4 의 알킬 또는 C_1 내지 C_4 의 알콕시 중 어느 하나이고, R^4 는 아미노(C_1 내지 C_{10})알킬, 3-(2-아미노(C_1 내지 C_4)알킬아미노)(C_1 내지 C_4)알킬 또는 3-[2-(2-아미노(C_1 내지 C_4)알킬아미노)(C_1 내지 C_4)알킬아미노](C_1 내지 C_4)알킬 중 어느 하나임.

- [청구항 22] 제 21항에 있어서, 상기 실란 화합물은
 (3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane; APTES),
 (3-아미노프로필)트리메톡시실란((3-aminopropyl)trimethoxysilane),
 (1-아미노메틸)트리에톡시실란((1-aminomethyl)triethoxysilane),
 (2-아미노에틸)트리에톡시실란((2-aminoethyl)triethoxysilane),
 (4-아미노부틸)트리에톡시실란((4-aminobutyl)triethoxysilane),
 (5-아미노펜틸)트리에톡시실란((5-aminopentyl)triethoxysilane),
 (6-아미노헥실)트리에톡시실란((6-aminohexyl)triethoxysilane),
 3-아미노프로필(디에톡시)메틸실란(3-aminopropyl(diethoxy)methylsilane;
 APDMS),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]에틸렌디아민(N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]
 ethylenediamine),
 N-[3-(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(N-[3-(trimethoxysilyl)pro
 pyl]diethylenetriamine),
 [3-(2-아미노에틸아미노)프로필]트리메톡시실란([3-(2-aminoethylamino)pr
 opyl]trimethoxysilane; AEAPTMS) 및
 3-[(트리메톡시실릴)프로필]디에틸렌트리아민(3-[(trimethoxysilyl)propyl]d
 iethylenetriamine; TMPTA)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인
 것을 특징으로 하는 병원체 농축과 동시에 상기 농축된 병원체로부터
 핵산을 추출하는 방법.
- [청구항 23] 제 16항에 있어서, 상기 병원체가 함유된 시료는 병원체에 감염된 것으로
 의심되는 객체의 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의
 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청,
 혈액, 척수액, 림프액, 체액 및 조직으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느
 하나인 것을 특징으로 하는 병원체 농축과 동시에 상기 농축된
 병원체로부터 핵산을 추출하는 방법.

[도1]



[도2]



[도3]

