

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2017년 11월 23일 (23.11.2017) WIPO | PCT

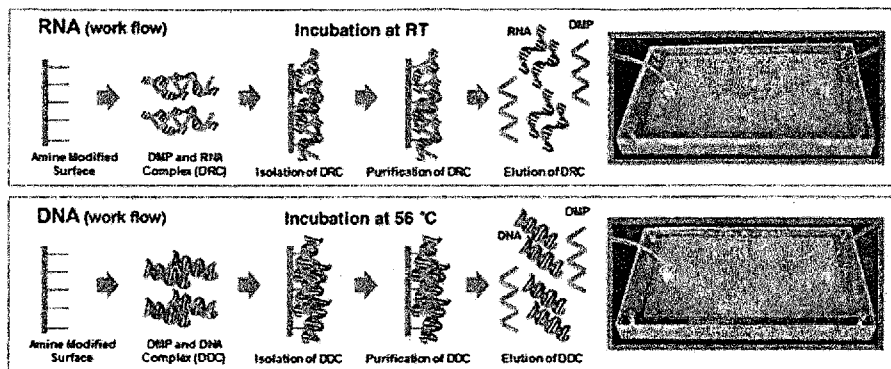
WO 2017/200249 A1

- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/68* (2006.01) *B01L 3/00* (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/005019
- (22) 국제출원일: 2017년 5월 15일 (15.05.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0060310 2016년 5월 17일 (17.05.2016) KR
10-2016-0175710 2016년 12월 21일 (21.12.2016) 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 올림픽로 43길 88, 아산생명과학연구원 융합연구관 6층, Seoul (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, 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.
- (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

(54) Title: NUCLEIC ACID EXTRACTION METHOD USING SOLID SUBJECT

(54) 발명의 명칭: 고형상 대상물을 이용한 핵산 추출방법

[도 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a nucleic acid extraction method using a solid subject. By forming a complex between a nucleic acid sample and an imidoester compound within the subject, it is possible to separate nucleic acids in a large amount and in high purity more simply and at a lower cost than conventional nucleic acid extraction methods. In particular, a thin film device, used for extracting a nucleic acid, has improved hydrophilic properties compared to conventional silicon substrates, and thus can extract the nucleic acid more efficiently.

(57) 요약서: 본 발명은 고형상 대상물을 이용한 핵산 추출방법에 관한 것으로서, 상기 대상물 내에서 핵산 시료와 이미도에스터(imidoesters) 화합물 간의 복합체를 형성시킴으로써 종래 핵산 추출방법에 비해 보다 간단하면서도 저비용으로 많은 양과 높은 순도의 핵산을 분리할 수 있으며, 특히 핵산을 추출하는데 이용하는 박막장치는 종래 실리콘 기판에 비해 친수성이 향상됨으로써 보다 효율적으로 핵산을 추출할 수 있다.

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 고품상 대상물을 이용한 핵산 추출방법

기술분야

- [1] 본 발명은 고품상 대상물을 이용한 핵산 추출방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 다양한 진핵 세포, 박테리아 세포, 바이러스 세포, 또는 체액(body fluids)을 포함한 핵산 공급원으로부터 간편한 방법으로 핵산을 추출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 핵산은 질병 상태를 확인하기 위한 중요한 분석 수단이며, DNA 생체표지자(biomarker) 예를 들어, 단일염기다형성(SNP), 돌연변이 또는 DNA 메틸화는 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 성분들에 비해 매우 낮은 생리적 농도로 존재하기 때문에(예를 들어, 전혈 마이크로리터당 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 경우에는, 이러한 문제는 더욱 중요하다.
- [4] DNA 메틸화(DNA methylation)는 정상적인 진핵 세포(eukaryotic cells) 내에서 유전자 발현 및 염색질 조직화를 조절하는 데 결정적 역할을 한다. DNA 메틸화는 시토신(cytosine) 고리의 5-탄소 상에 메틸기를 공유 첨가함으로써, 발생하게 되고, 5-메틸시토신을 생성한다. 이러한 메틸기들은 DNA의 주홈(major groove)으로 돌출되어 전사를 효과적으로 저해한다.
- [5] 포유동물 DNA에서, 5-메틸시토신은 게놈성 DNA(genomic DNA)의 약 4 %에서, 주로 시토신-구아노신 디뉴클레오타이드들(CpGs)에서 발견된다. 그러한 CpG 부위는 인간 게놈을 통틀어 예상되는 빈도보다 더 낮게 발생하나, CpG 섬으로 지칭되는 작은 길이의 DNA에서는 더 빈번하게 발견된다.
- [6] 이러한 섬들은 전사가 시작되는 곳인, 유전자의 프로모터 부위 내 또는 근처에서 전형적으로 발견된다. 대부분 CpG 부위가 많이 메틸화된 게놈성 DNA와는 달리, 생식 세포 계열 조직(germ-line tissue)에서 및 정상적인 체세포의 프로모터에서의 CpG 섬들은 비메틸화된 채로 남아있어서, 유전자 발현이 일어나게 한다.
- [7] DNA 메틸화는 매우 연관된 DNA 메틸트랜스퍼라제 효소(DNMT) 군에 의해서 중재되며, 이들은 메틸기를 S-아데노실-L-메티오닌으로부터 CpG 디뉴클레오타이드내의 시토신으로 전달한다. DNMT들에 의해 확립된 메틸-시토신들은 메틸-CpG 결합 도메인 (MBD) 단백질 MeCP2, MBD에 대한

결합 부위로 작용한다.

- [8] 히스톤 디아세틸라제, 히스톤 메틸 트랜스퍼라제, 및 ATP-의존성 염색질 리모형화 효소 (chromatin remodeling enzyme)들과의 상호작용을 통해서, MBD들은 전사에 억압적인 콤팩트화된 염색질 환경으로 메틸화된 DNA를 번역한다. 특히, MBD는 MeCP2 단백질의 메틸 CpG 결합 도메인이고, 이는 임의의 서열로 있는 대칭적으로 메틸화된 CpGs에 결합하며, 메틸화 의존성 전사 억제를 중재하는 데 참여한다. 비록 MeCP2가 생체 내에서 독점적으로 메틸화된 DNA 단편물에 결합한다는 강력한 증거가 있지만, 시험관에서, MeCP2의 DNA 메틸화-독립적 결합 활성이 또한 일치적으로 문서에 설명되어 있고, 이는 일반적인 시험관 내 DNA 분석에 적절하게 사용될 수 있다.
- [9] 최근 들어 생명공학을 비롯한 진단의학, 약물의학, 대사의학 등 다양한 분야에서 고순도로 정제된 핵산의 사용량이 늘어남에 따라 다양한 생물시료로부터 보다 신속하고 순수하게 핵산을 분리하고자 하는 노력이 계속되고 있다.
- [10] 그러나 현재까지 핵산의 분리 방법에 있어 가장 크게 발전한 부분은 유전체 DNA, 플라스미드 DNA, 메신저 RNA, 단백질, 세포 잔해 입자등 세포 용해 용액내에 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.
- [11] 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

- [12] 본 발명의 목적은, 종래 방식인 큐아젠을 포함한 핵산 추출시 대형 장비 (원심분리기 및 자석 등)가 필요한 모든 상업화 키트를 이용한 핵산 추출방법에 비해 간단하면서도 저비용으로 다양한 핵산 공급원으로부터 많은 양과 높은 순도의 핵산을 추출할 수 있는 추출 방법 및 장치를 제공하는 데에 목적이 있다.

과제 해결 수단

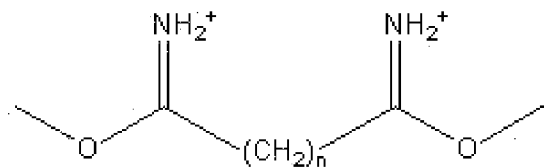
- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 단계(제1단계); 상기 개질된 대상물 상에 핵산 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 주입하고 핵산과 상기 화합물 간의 복합체를 형성시키는 단계(제2단계); 및 상기 복합체가 형성된 대상물에 용출 완충액을 처리하여 핵산을 추출하는 단계(제3단계)를 포함하는, 핵산 추출방법을 제공한다.
- [14] 또한 본 발명은, 입구홀과 출구홀이 각각 관통 형성된 상부박막; 상기 상부박막으로부터 이격 배치된 하부박막; 그 입구단 및 출구단이 상기 상부박막의 입구홀 및 출구홀에 각각 대응하여 연통하는 마이크로 채널이

내측에 패턴 형성되고, 상기 마이크로 채널의 입구부와 연통하는 주입로가 상기 입구단에 인접하도록 형성되며, 상기 상부박막과 하부박막 사이에 배치되는 마이크로 채널챔버; 및 상기 상부박막 및 하부박막의 각 측부를 밀봉하여 상기 마이크로 채널챔버를 밀봉시키는 밀봉수단을 포함하는 핵산 추출용 박막장치를 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 핵산 추출 효율 증진용 조성물을 제공한다.

[16] [화학식 1]

[17]



[18] 상기 식에서, n은 5 내지 7의 정수임.

발명의 효과

[19] 본 발명에 따른 핵산 추출방법을 이용하면 다양한 진핵 세포, 박테리아 및 바이러스 세포, 또는 체액(body fluids)을 포함한 핵산 공급원으로부터 간편하면서도 신속하게 핵산을 추출할 수 있을 뿐 아니라, 핵산 추출 시 박막장치를 이용할 경우 종래 실리콘 기판에 비해 친수성이 향상됨으로써 보다 효율적으로 핵산을 추출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 박막을 이용한 핵산 추출용 동형2기능성 이미도에스터[homobifunctional imidoesters(HIs) for nucleic acids extraction using thin films; HINT] 시스템의 원리를 나타내는 모식도이다.

[21] 도 2는 박막 장치의 구성을 나타낸 분해도이다.

[22] 도 3은 디메틸 수베르이미데이트(Dimethyl suberimide; DMS) 농도 변화에 따른 DNA 추출 효율을 나타낸 도면이다.

[23] 도 4는 지방암 세포를 이용하여 종래의 큐아젠 키트와 본 발명에 따른 DTS 분석, 그리고 DTS 분석 시 사용되는 DMS와 유사한 화합물인 디메틸 아디프이미데이트(dimethyl adipimide; DMA)를 이용한 분석에 따른 DNA 추출 효율을 나타낸 도면이다.

[24] 도 5는 본 발명에 따른 DTS 분석, DTS 분석 시 사용되는 DMS와 유사한 DMA를 이용한 분석에 따라 추출된 DNA의 PCR 증폭효율을 나타낸 도면이다.

[25] 도 6은 마이크로 유체 챔버를 구체적으로 나타낸 도면이다.

[26] 도 7은 HINT 시스템에 적용하여 RNA 및 DNA 추출한 결과를 나타낸다.

HIs[디메틸 수베르이미데이트(Dimethyl suberimide; DMS) 및 디메틸 피멜리미데이트(dimethyl pimelimide; DMP)] 유무에 따른 주입 DNA(1μg의

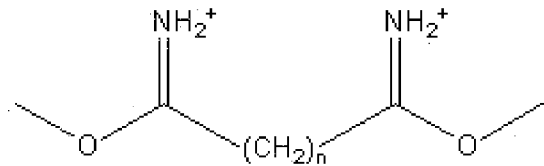
인간 게노믹 DNA)의 회수율을 측정 결과(A), DMS 농도(100, 50, 20, and 10 mg/ml)를 달리하여, 암세포로부터 추출한 DNA의 양(B) 및 순도(C), 시스템으로부터 추출된 2가지 농도(1×10^3 및 1×10^6)의 RNA로 18S 유전자 증폭을 수행한 결과(D), DMS 농도(50-250 mg/ml)에 따라, 시스템으로부터 추출된 DNA로 Actin 유전자 증폭을 수행한 결과(E). L: DNA size marker, Q: Qiagen kit으로 추출한 RNA, N: 음성 대조군.

- [27] 도 8은 암세포의 RNA 추출에 HINT 시스템을 적용한 결과를 나타낸다. (A) AGS (위암 세포주), (B) HCT116 (대장암 세포주) 및 (C) MCF7 (유방암 세포주) 결과이다. (D) 추출된 RNA로부터 18S 유전자를 PCR 증폭한 결과이다. (E) 단일 단계 역전사 RT-PCR에 있어서, HCT116 세포의 농도에 따른 사이클 수(cycle number; C_T)를 확인한 결과이다.
- [28] 도 9는 암세포의 DNA 추출에 HINT 시스템을 적용한 결과를 나타낸다. (A) AGS (위암 세포주) 및 (B) HCT116 (대장암 세포주) 결과이다. (C) HCT116 세포의 농도에 따라, DMS를 적용하여 HINT 시스템으로부터 추출된 DNA의 RT-PCR 사이클 수를 확인한 결과이다. (D) *E. coli* 농도를 달리하여, HINT 시스템으로부터 추출된 DNA의 RT-PCR 분석 결과를 나타낸다.
- [29] 도 10은 HINT 시스템에 임상 샘플을 적용한 결과를 나타낸다. (A) 중증열성 혈소판감소증후군 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS) 환자의 혈장으로부터 바이러스 RNA를 추출한 결과. (B) 쯔쯔가무시병(scrub typhus; ST) 환자의 혈청으로부터 박테리아 DNA를 추출한 결과.
- [30] 도 11은 HINT 시스템에 DMA, DMP 또는 DMS를 적용시, DNA 증폭 효율을 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [32] 본 발명의 발명자들은 핵산 시료로부터 핵산을 분리 및 추출할 수 있는 추출방법을 개발하여, 핵산 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 간의 복합체를 형성시킴으로써 종래 핵산 추출방법에 비해 보다 간단하면서도 저비용으로 많은 양과 높은 순도의 핵산을 분리할 수 있으며, 대형장비를 사용하지 않고도 현장 즉시형 진단이 가능함을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.
- [33]
- [34] 본 발명은 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 단계(제1단계); 상기 개질된 대상물 상에 핵산 시료와 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 주입하고 핵산과 상기 화합물 간의 복합체를 형성시키는 단계(제2단계); 및 상기 복합체가 형성된 대상물에 용출 완충액을 처리하여 핵산을 추출하는 단계(제3단계)를 포함하는, 핵산 추출방법을 제공한다.
- [35] [화학식 1]

[36]



[37] 상기 식에서, n은 5 내지 10의 정수임.

[38] 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에서 n은 5 내지 7의 정수임.

[39]

[40] 상기 대상물은 박막장치, 자성 비드(magnetic bead) 또는 나노입자(nanoparticle) 중 어느 하나 일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[41] 상기 핵산은 DNA 또는 RNA 중 어느 하나를 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[42] 상기 핵산은 메틸화된 DNA를 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[43] 상기 개질은 대상물 내 실란 화합물은 유입시켜 개질할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[44] 상기 실란 화합물은

3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane; APTES)일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[45] 상기 제1단계 이전에 대상물에 플라즈마 처리를 통해 세척하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[46] 상기 제2단계 및 제3단계 사이에 상기 복합체가 형성된 대상물을 세척하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[47] 상기 핵산 시료는 진핵세포, 박테리아 세포, 바이러스 세포, 전혈 또는 소변 유래 시료일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[48] 상기 제2단계에서 개질된 대상물 상에 단백질 분해효소 및 용출 완충액을 더 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[49]

[50] 또한 본 발명은, 입구홀과 출구홀이 각각 관통 형성된 상부박막; 상기 상부박막으로부터 이격 배치된 하부박막; 그 입구단 및 출구단이 상기 상부박막의 입구홀 및 출구홀에 각각 대응하여 연통하는 마이크로 채널이 내측에 패턴 형성되고, 상기 마이크로 채널의 입구부와 연통하는 주입로가 상기 입구단에 인접하도록 형성되며, 상기 상부박막과 하부박막 사이에 배치되는 마이크로 채널챔버; 및 상기 상부박막 및 하부박막의 각 측부를 밀봉하여 상기 마이크로 채널챔버를 밀봉시키는 밀봉수단을 포함하는 핵산 추출용 박막장치를 제공한다.

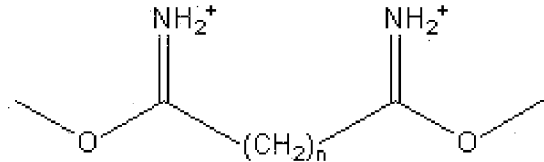
[51] 상기 상부박막의 입구홀과 상기 마이크로채널의 입구단을 연통하는 제1튜빙어댑터; 및 상기 상부박막의 출구홀과 상기 마이크로채널의 출구단을

연통하는 제2튜브어댑터를 더 포함할 수 있다.

- [52] 상기 상부박막의 입구홀을 통해 상기 마이크로 채널의 입구단으로는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 주입하고, 상기 마이크로 챔버의 주입로를 통해 핵산 샘플을 주입할 수 있다.

[53] [화학식 1]

[54]



- [55] 상기 식에서, n 은 5 내지 10의 정수임.

- [56] 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에서 n 은 5 내지 7의 정수임.

[57]

- [58] 상기 마이크로 채널은 복수회 절곡되도록 패턴 될 수 있다.

- [59] 상기 마이크로 채널은 확장된 단면을 갖는 복수의 확장부와, 상기 확장부보다 축소된 단면을 갖는 복수의 축소부를 포함하되, 상기 확장부와 축소부는 교번하도록 배치될 수 있다.

[60]

- [61] 이하, 본 발명의 도면을 근거로 하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

- [62] 본 발명에 따른 핵산 분석은 박막 장치 내에서 DMS를 이용한 핵산 분석인 DTS(Dimethyl suberimidate/Thin film Sample) 분석으로서, 시료 용출/배양, 세척 및 용출의 세 단계를 포함하고 있으며, 원심분리하지 않고 수행한다. 예를 들어, 실란 화합물로서 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane; APTES)을 통해 박막 장치를 개질하고, 이러한 개질로 인하여 소수성인 박막 장치를 친수성으로 전환시킨다.

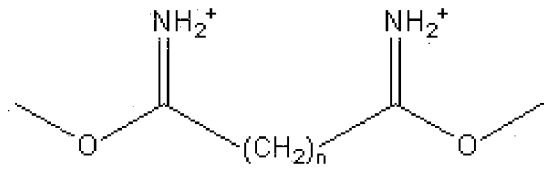
- [63] 상기 개질된 박막 장치 상에 핵산시료, 및 용출 완충액과 DMS 용액을 주입한다. 상기 핵산의 아미노기와 DMS의 이-기능성 아민 반응기와의 상호작용에 의한 핵산과 DMS 사이에 가교 메카니즘을 이용하여 핵산과 DMS 간의 복합체를 형성시키고 시료에서 DNA를 추출할 수 있다.

[64]

- [65] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 핵산 추출 효율 증진용 조성물을 제공한다.

[66] [화학식 1]

[67]



[68] 상기 식에서, n은 5 내지 10의 정수임.

[69] 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에서 n은 5 내지 7의 정수임.

[70]

[71] 상기 조성물은 단백질 분해효소 및 용출 완충액을 더 포함할 수 있으며, 상기 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[72]

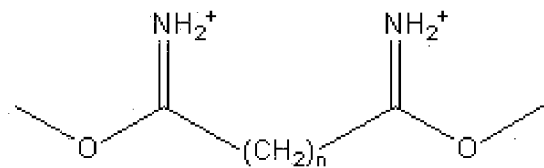
[73] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 핵산 추출 효율 증진용 키트를 제공한다.

[74]

[75] 한편, 본 발명에서 사용된 화학식 1로 표시되는 화합물은 이-기능성 이미도에스터(imidoesters)를 포함하고 있기 때문에, 본 명세서에서는 동형2기능성 이미도에스터(homobifunctional imidoesters; HIs)라고도 명명하였으며, 상기 HIs는 핵산과 빠르고 강하게 상호 결합하여 복합체를 형성하며, 아민 반응성기로 개질된 대상물의 표면에 포획되어 고효율의 핵산 추출이 가능하다.

[76] [화학식 1]

[77]



[78] 상기 식에서, n은 5 내지 10의 정수임.

[79] 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에서 n은 5 내지 7의 정수임.

[80]

[81] 본 발명에서 사용한 HIs은 디메틸 피멜리미데이트(dimethyl pimelimidate; DMP) 및 디메틸 수베르이미데이트(Dimethyl suberimidate; DMS)이며, 이와 화학 구조가 유사한 화합물인 디메틸 아디프이미데이트(dimethyl adipimidate; DMA)를 사용하여 비교 실험을 수행하였다. DMP(화학식 2), DMS(화학식 3) 및 DMA(화학식 4)의 화학 구조는 다음과 같다.

[82]

[83] [화학식 2]

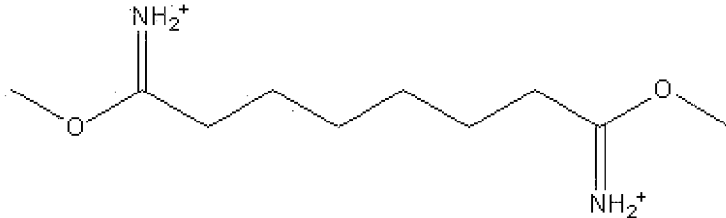
[84]



[85]

[화학식 3]

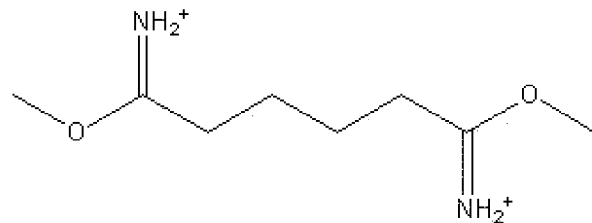
[86]



[87]

[화학식 4]

[88]



발명의 실시를 위한 형태

[89] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[90]

[91] <실시예 1> 박막 장치 제작 및 전처리

[92] 1. 박막 장치 제작

[93] 레이저 커팅 기기(Universal Laser Systems, Scottsdale, USA)를 이용하여 쉽고 빠르게 본 발명의 박막 장치를 제작하였다[도 2 참조]. 먼저, 상기 박막 장치는 상부 박막과 하부 박막, 그리고 상부 박막과 하부 박막 사이에 삽입된 마이크로 유체 챔버로 구성되며, 상기 마이크로 유체 챔버는 핵산 공급원으로부터 DNA를 추출하기 위해 챔버 내의 유로에 의해 서로 연결된 다수의 슬롯-형 마이크로 웰로 이루어져 있다.

[94] 상기 마이크로 유체 챔버를 제작하기 위해, 300 μm 두께의 양면테이프(100 μm 두께의 양면테이프 사이에 끼워진 100 μm 두께의 폴리에스터 막)에 마이크로 유체 챔버 디자인을 레이저 커팅 기기로 절단하여 마이크로 유체 챔버를 제작하였다. 박막(상부 및 하부)은 레이저 커팅 기기를 이용하여 마이크로 유체 챔버와 동일한 치수로 절단하였다.

[95] 상기 상부 박막에 관통 구멍인 입구(inlet)와 출구(outlet)를 제작하였다. 레이저

컷팅 마이크로 유체 챔버의 상부 및 하부의 표면에 영구 접착제를 이용하여 각각 레이저 컷팅 박막(상부 및 하부)을 접착시켰다. 상기 마이크로 유체 챔버의 높이는 약 300 μm 이며, 총 부피는 300 μl 이었다(300 μl 양, 8.4 cm $\times$ 3.7 cm).

[96] 핵산 공급원을 주입하기 위한 튜빙 어댑터는 3 mm 두께를 갖는 캐스트 아크릴 시트(MARGA CIPTA, Indonesia)를 양면테이프 한쪽 면에 부착하였고, 레이저 컷팅 기기로 절단 및 천공하여 제조하였다. 상기 제조된 튜빙 어댑터는 마이크로 유체 챔버의 유입구와 배출구에 각각 부착하였다. 이 후 미리 절단된 타이콘 튜빙(AAC02548; Cole-Parmer, Vernon Hills, USA)을 어댑터의 구멍에 위치시킨 후 에폭시를 사용하여 밀봉하였다.

[97] 이렇게 제작된 박막 장치는 다양한 용량의 핵산 시료들(100 μl , 300 μl , 및 500 μl)을 처리할 수 있는 장점이 있다.

[98] 2. 박막 장치 전처리

[99] 상기 박막 장치를 이용한 DNA 분석을 위하여, 박막 장치 내부를 10분 동안 산소 플라즈마로 처리한 후 상기 플라즈마 처리된 박막 장치를 65°C에서 10 내지 60분 동안 2% 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane; APTES)을 함유한 수용액에 침지시킨 후 탈이온수로 완전히 세정하였다. 세정 후, 박막 장치를 경화(cure)시키기 위해, 상기 세정된 박막 장치를 신속하게 질소 기류 하에서 건조시켜 박막 장치를 아민으로 개질하였다.

[100] Drop Shape Analyzer(DSA100, KRUSS, Germany)을 이용한 아민-개질된 박막 장치의 물 접촉각 측정을 통해 온도 및 배양시간에 따라 박막 장치의 친수성이 상당히 변화하였음을 알 수 있었다. 65 °C에서 10분 동안 상기 박막 장치를 APTES로 실란화(silanization)한 후, 상기 박막 표면 친수성은 증가하였다(약 30 내지 40°C).

[101]

[102] <실시예 2> DTS(Dimethyl suberimidate/Thin film Sample) 분석

[103] 본 발명에서는 앞서 제작된 박막 장치에 디메틸 수베리이미데이트(DMS)를 적용한 핵산 분석법을 DTS로 명명하였으며, 이하 실험에서 DTS 분석을 수행하였다.

[104] 즉, 앞서 아민으로 개질된 박막 장치(300 μl 양, 8.4 cm $\times$ 3.7 cm)을 이용하여 DNA를 추출하기 위해 먼저 최적화된 분석 용액을 준비하였다. 상기 최적화된 분석 용액은 100 mM 트리스-염산 (pH 8.0)을 함유하는 용출 완충액, 10mM의 EDTA, 1% SDS, 10%의 트리톤 X-100을 DMS(50 mg/mL)와 혼합하여 준비한 후, 핵산 분석 시료로서 세포, 박테리아, 혈액 또는 소변 유래 각 시료 100 μl 를 상기 분석 용액 200 μl 와 혼합하였다.

[105] 상기 혼합된 핵산 분석 시료와 분석 용액이 혼합된 혼합액을 아민으로 개질된 박막 장치의 상부 기관 입구로 유입시키고, 마이크로 유체 챔버 내로 상기 혼합액이 이동하면서 DMS의 2개의 아민기와 DNA가 결합하며 또한 박막 장치 내 개질된 아민기와 DNA가 결합하여 복합체를 형성하여 DNA를 분리할 수

있었다. 이때, 박막 장치는 핵산 분석 시료로부터 DNA를 충분히 추출하기 위하여 20분 동안 항온(56°C)을 유지한 배양기 또는 컨트롤러(Alpha Omega Instruments)를 포함한 열전냉각기(thermoelectric cooler; TEC) 중 어느 하나에 놓아 두었다.

[106] DMS-DNA 복합체 중 이물질 제거하기 위해 PBS 완충액으로 세척한 후, 용출 완충액(10mM의 중탄산나트륨, pH 10.6)을 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 양과 순도를 측정한 후 Enspire Multimode Plate Reader(PerkinElmer)를 이용하여 260 nm (DNA) 및 280 nm (단백질)에서의 시료의 광학 밀도 비율을 결정하였다. 종래 DNA 추출법과 본 발명의 DTS 분석을 비교하기 위해, 알려진 방법(Qiagen, Hilden, Germany)에 따라 QIAmp DNA mini kit를 사용하여 분석하였다.

[107] 도 3과 같이, DMS 농도 별로 DNA 결합력을 확인할 결과, DMS 농도가 50-100 mg/ml일 때 DNA 결합 효율이 가장 높은 것으로 확인되었다.

[108]

[109] <실시예 3> DTS 분석을 이용한 진핵세포로부터의 DNA 추출

[110] 5% CO₂ 분위기, 37°C 습한 배양기에서 10 % 태아우아혈청(fetal calf serum(FCS))을 보충한 고 글루코오스 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified eagle medium; DMEM, DMEM Life Technology)의 플라스틱 배양 플레이트에서 여섯 개의 진핵 세포(MCF-7(유방), NCI-H1975(폐), CaCo-2(대장), T24(방광), U937(림프구) 및 Jurkat(말초 혈액))를 각각 배양한 후, 실시예 2와 동일한 방법으로 진핵세포로부터 DNA를 추출하되, 게놈성 DNA를 추출하기 위하여 단백질 분해효소인 프로테아제 K를 처리하였다. 그리고, 비교를 위하여, QIAmp DNA 미니 키트를 이용하여 진핵세포로부터 DNA를 추출하였다.

[111] DNA의 양과 순도를 확인하기 위해 End-point PCR 및 실시간 PCR(real time-PCR)을 수행하였다. 일부 유전자(HRAS, Actin 및 RAR β)의 정방향 및 역방향 프라이머를 약 24 염기쌍의 정상 길이로 합성하였다. End-point PCR은 15분 동안 95°C에서 초기 변성 단계; 95°C, 45초, 59°C, 45초(RAR β), 및 72°C, 45초의 45 사이클; 및 72°C, 10분 동안 최종 연장 단계로 이루어져 있다. 5 내지 10 μ l의 DNA를 1 $\times$ PCR 완충액(Qiagen), 2.5 mM 염화마그네슘(MgCl₂), 0.25 mM 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(deoxynucleotide triphosphate), 25 pmol의 각 프라이머, 및 Taq DNA 중합효소 1 유닛을 포함하는 총 부피 25 μ l에서 증폭하였다. 실시간 PCR(real time-PCR) 분석을 위해, 다음 단계가 LightCycler 2.0(로슈 다이어그노스틱스)에서 제공된 방법을 하기와 같이 변형하였다. 5 내지 10 μ l의 DNA를 4 μ l의 LightCycler FastStart DNA Master 믹스, 25 pmol의 각 프라이머, 1 $\times$ PCR 완충액 2 μ l(큐아젠), 2.5 mM 염화마그네슘(MgCl₂), 0.25 mM 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(deoxynucleotide triphosphate), 및 증류수를 포함하는 총 부피 20 μ l에서 증폭하였다. 95°C에서 10분 동안 처음 예비 처리한 후 95°C, 10초, 58°C, 30초,(HRAS 및 액틴 유전자에 대하여), 및 10초 동안 72°C를

50 사이클을 수행하고, 30초 동안 40°C에서 냉각 단계를 거쳤다. SYBR 녹색 신호를 가진 증폭된 생성물은 LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics)에서 수행하였다.

[112] 추출된 DNA로부터 RAR β 의 후성학적 변이를 조사하기 위해, 상기 DNA를 단일 반응 튜브에서 20분 동안 37°C에서 MspI 또는 HpaII 용액(150 μ l) 중 어느 하나와 혼합하여 DNA를 분해하였다. 상기 분해 공정 후, 제한 효소의 불활성화를 위해 상기 단일 반응 튜브를 10분 동안 80°C로 방치 하였다. 상기 불활성화 공정에 따라, 상기 분해된 DNA는 종래 PCR을 사용하여 양 분석에서 얻은 RAR β 유전자의 후성학적 분석을 위해 주형(template)으로 사용하였다.

[113] 한편, 유방암 세포를 이용하여 종래의 큐아젠 키트와 본 발명에 따른 DTS 분석, 그리고 DTS 분석 시 사용되는 DMS와 유사한 화합물인 DMA를 이용한 분석에 따른 DNA 추출 효율을 비교 분석한 결과, 도 4와 같이, DMS를 이용한 분석에서는 DNA와 결합하여 유방암 세포로부터 DNA를 추출할 수 있었던 반면, DMA(dimethyl adipimidate)를 이용한 분석에서는 유방암 세포로부터 DNA를 추출할 수 없었다.

[114] 그리고, 도 5와 같이, DMS를 이용하여 추출한 DNA를 PCR 증폭한 결과, DMA를 이용한 분석에 비해 증폭 효율이 25% 향상하였다.

[115]

[116] <실시예 4> DTS 분석을 이용한 박테리아 세포로부터의 DNA 추출

[117] 박테리아 세포에서 DTS 분석 성능을 확인하기 위해, DTS 분석을 이용하여 추출된 DNA를 사용하여 PCR 기반 DNA 증폭을 실시하였다. 모든 프라이머는 대장균 (*Escherichia coli*), 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*), 마이코박테리움 고르도니에(*Mycobacterium gordonae*) 및 살모넬라 균주(*Salmonella Strains*) (살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella Typhimurium*), 살모넬라 뉴폴트(*Salmonella Newport*), 및 살모넬라 세인트폴(*Salmonella Saintpaul*))의 상용 프라이머를 사용하였다.

[118] 최적화 반응을 위해, 100 mM 트리스-염산 (pH 8.0)을 함유하는 용출 완충액, 10mM의 EDTA, 1% SDS, 10%의 트리톤 X-100 및 리소자임 20 mg/mL을 DMS(50 mg/mL)와 혼합하였다. 본 발명의 DTS 방법의 유효성을 검증하기 위해 일반적인 PCR을 수행하였다. 대장균(*E. coli*) XL1 블루 균주를 50 μ g/ml의 테트라사이클린(tetracycline)과 Luria-Bertani(LB) 배지에 접종하고, 웨이킹 상태(shaking condition)로 37°C에서 하루 동안 배양하였고, $10^3 \sim 10^7$ 의 콜로니 형성 단위(colony forming unit; CFU)의 시료를 시험을 위해 사용하였다. DTS 분석 및 큐아젠 키트 분석에서 사용하기 위해 배양시킨 대장균(*Escherichia coli*), 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*), 마이코박테리움 고르도니에(*Mycobacterium gordonae*) 및 살모넬라 균주(*Salmonella Strains*)(살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella Typhimurium*), 살모넬라 뉴폴트(*Salmonella Newport*), 및 살모넬라 세인트폴(*Salmonella Saintpaul*))에서

박테리아 DNA를 추출하였다.

- [119] 박테리아 유전자의 유전학적 분석을 위해, DTS 분석 및 큐아젠 키트 분석에서 추출된 DNA 2 μ l를 1 $\times$ PCR 완충액(큐아젠, 힐덴, 독일), 2.5 mM 염화마그네슘(MgCl₂), 0.25 mM 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(deoxynucleotide triphosphate), 각 프라이머 25 pmol, 및 Taq DNA 중합효소 1 유닛을 포함하는 총 부피 25 μ l를 사용하여 15분 동안 95°C에서 증폭하였다; 95°C, 30초, 60°C, 30초 (마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*), 마이코박테리움 고르도니에(*Mycobacterium gordonae*) 및 살모넬라 균주(*Salmonella Strains*)) 및 72°C, 30초의 45 사이클; 및 72°C, 7분 동안 최종 연장 단계. PCR 증폭물들은 PCR 생성물을 에티딘 브로마이드(EtBr)(시그마-알드리치)를 함유한 2% 아가로스 젤 상에서 분리하는 젤 전기영동법으로 가시화되었다. 상기 젤은 Gel Doc System(Bio-Rad)을 사용하여 가시화되었다. DNA 농도 및 순도의 측정은 UV 분광분석기(Perkin-Elmer)로 수행되었다.

[120]

[121] <실시예 5> DTS 분석을 이용한 인간 체액로부터의 DNA 추출

- [122] 인간의 체액으로 DTS 분석 능력을 검증하기 위해, 체액 시료 200 μ l(전혈 및 소변)을 상기 박막 장치에 유입하여 DNA를 추출하였다. 먼저, 앞서 제작된 박막 장치 내로 프로테이나제 K와 DMS를 포함한 용출 완충액과 체액 시료를 각각 유입한 후, 마이크로 채널 챔버로 이동시켜 체액 시료 내 DNA와 DMA 간의 복합체를 형성시킨 후, 실시예 2와 동일한 방법으로 DNA를 추출하였다. 이때, 용출 완충액과 체액 시료는 시린지 펌프(KD Scientific, MA)를 사용하여 2개의 다른 입구에 각각 1.5 ml/hr의 유속으로 10분간 유입시켰으며, DNA의 추출 및 정제를 위하여, 카트리지를 20분 동안 56°C에서 배양하였다. 그리고, 시린지 펌프에 의한 PBS 완충액 유입을 위한 입구의 유속은 4 ml/hr으로 10분간 증가시켰다. 마지막으로, 추출된 DNA를 100 μ l의 용출 완충액으로 용출하였다. 또한, 비교를 위해 QIAmp DNA 미니 키트(힐덴, 독일)를 사용한 게놈성 DNA 추출에 200 μ l의 전혈 또는 소변을 사용하였다. 모든 추출된 DNA는 UV 분광 광도계(Perkin-Elmer)에 의해 DNA 농도 및 순도가 결정되었다.

[123]

[124] <실시예 6> 박막 미세유체 플랫폼을 이용한 핵산 추출에 있어 동형2기능성(homobifunctional) 이미도에스터(imidoesters)의 적용(HINT 전략)

- [125] 본 발명자들은 앞선 실시예를 통해, 박막 장치 내에서 DMS를 이용한 핵산 분석인 DTS(Dimethyl suberimidate/Thin film Sample) 분석을 통해, 진핵세포 또는 원핵세포를 포함하는 다양한 시료로부터 DNA를 추출하여 분석하였다.
- [126] 또한, 본 발명자들은 박막-기반의 미세유체 플랫폼을 사용하여 RNA 및 DNA를 모두 추출할 수 있는, 박막을 이용한 핵산 추출용 동형2기능성 이미도에스터[h omobifunctional i midoesters(HIs) for n ucleic acids extraction using t hin films; HINT]

시스템을 개발하였다(도 6). 동형2기능성 이미도에스터(homobifunctional imidoesters; HIs)로는 디메틸 수베르이미데이트(Dimethyl suberimidate; DMS) 및 디메틸 피멜리미데이트(dimethyl pimelimidate; DMP)가 사용되었으며, 메틸렌기 및 2기능성 이미도에스터기로 이루어져있다(도 6A). 박막-기반의 미세유체 플랫폼에서는 단일 채널 상에서 샘플 용해(lysis), 세척 및 용출이 이루어졌다. HINT 시스템을 이용하여 샘플로부터 RNA 및 DNA를 추출하기 위해, 샘플 혼합액, 용해 완충액 및 HIs(DMS 또는 DMP)를 피펫으로 시스템에 주입하였는데, 상기 시스템은 핵산 및 HIs 복합체를 포획하기 위해서, 표면을 아민 반응성기로 미리 활성화시켜 사용하였다(도 6B). 그 후, RNA 추출을 위해서는 상온에서 10-20분 반응시켰고, DNA 추출을 위해서는 56°C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응 후, 세척 및 용출 과정을 통해 핵산(RNA 또는 DNA)을 추출할 수 있었다.

- [127] 한편, HINT 시스템이 핵산(RNA 및 DNA) 추출에 유용하게 사용될 수 있는지 확인하기 위해서, 여러 암세포주 및 박테리아 세포주에서 시스템의 기본적인 특성을 확인하였다. 도 7A에서는 HIs (DMS 및 DMP) 유무에 따른 주입 DNA(1 μ g의 인간 게놈 DNA)의 회수율을 측정하였다. DMS(검은색) 및 DMP(회색)가 포함된 실험군 모두에서는 95% 이상의 DNA가 회수되었고, HIs가 포함되지 않은 실험군에서는 <50% DNA가 회수되었다(도 7A). 인간 게놈 DNA 및 RNA 추출을 위한 시스템 프로토콜을 최적화하기 위해, 암세포주[1 $\times$ 10⁶ cells의 유방암 세포주(MCF7) 또는 대장암 세포주(HCT116)]를 사용하였다. 고품질 및 고용량의 핵산을 추출하기 위한 최적화 방법으로, DMS 농도(100, 50, 20, and 10 mg/ml)를 달리하여, 암세포로부터 추출한 DNA의 양(도 7B) 및 순도(도 7C)를 측정하였다. DNA 추출과 달리, RNA는 분해가 쉽게 일어나므로 일반적으로 RNA 추출이 더 어렵다. 2가지 농도의 암세포(1 $\times$ 10³ 및 1 $\times$ 10⁶)에서 RNA를 추출하기 위하여, DMS 또는 DMP를 HINT 시스템에 적용하였다. PCR 비교 실험을 위해, 시스템으로부터 추출된 2가지 농도의 RNA로 18S 유전자 증폭을 수행하였는데, 단일 단계 역전사 end-point PCR 및 단일 단계 역전사 RT-PCR을 진행하였다. 18S 유전자는 10⁶ (C_T: 18.42 $\pm$ 0.46 in DMS, C_T: 17.86 $\pm$ 0.32 in DMP) 및 10³ (C_T: 32.15 $\pm$ 0.09 in DMS, C_T: 31.60 $\pm$ 0.2 in DMP) 세포 농도에서 모두 강하게 증폭되었다(도 7D). 또한, HINT 시스템을 이용한 DNA 추출을 위해, 여러 농도의 DMS(50-250 mg/ml)와 함께, 2가지 농도의 암세포(1 $\times$ 10³ 및 1 $\times$ 10⁶)를 사용하였다. PCR 비교 실험을 위해, 시스템으로부터 추출된 2가지 농도의 DNA로 Actin 유전자 증폭을 수행하였는데, end-point PCR 및 RT-PCR을 진행하였다(도 7E). Actin 유전자는 1 $\times$ 10⁶ cells (C_T: 22.11 $\pm$ 0.31; 도 7E) 및 1 $\times$ 10³ cells (C_T: 31.73 $\pm$ 0.01)에서 모두 증폭되었고, 모든 농도의 DMS 조건에서도 모두 증폭되었다.

- [128] RNA 추출 분석에 있어 HINT 시스템을 좀 더 검증하기 위해서, AGS (위암 세포주), HCT116 (대장암 세포주) 및 MCF7 (유방암 세포주)를 포함하는 3

종류의 암세포주로부터 RNA를 추출하여 분석하였는데, 연속적인 희석을 통해 1×10^1 내지 1×10^5 cells를 사용하였다. HINT 시스템을 통해 추출된 RNA의 양은 세포수에 의존적인 것을 확인할 수 있었다(도 8A 내지 도 8C). 추출된 RNA로부터 18S 유전자를 PCR 증폭한 결과, 3종류의 암세포주에서 추출된 RNA에서 모두 강하게 증폭되는 것을 확인하였다(도 8D). 도 8E는 단일 단계 역전사 RT-PCR에 있어서, HCT116 세포의 농도에 따른 사이클 수(cycle number; C_T)를 확인한 결과이다. C_T 및 세포 농도 사이에는 높은 직선도($R^2=0.9907$)를 나타냈다.

- [129] DNA 추출 분석에 있어 HINT 시스템을 좀 더 검증하기 위해서, MCF7, AGS 및 HCT116 세포로부터 DNA를 추출하여 PCR 분석을 수행하였다. 동일한 농도의 세포수(1×10^6)를 사용하여 HINT 시스템을 Qiagen kit와 비교하였다. AGS 및 HCT116 세포와, DMS 또는 DMP를 사용하여 HINT 시스템으로부터 추출된 DNA는 Qiagen kit로부터 추출된 DNA의 증폭 효율과 동등한 수준이었다(도 9A 및 도 9B). 또한, RT-PCR에 있어서, DMS 또는 DMP를 사용하여 HINT 시스템으로부터 추출된 DNA는 세포 수에 의존적인 것으로 나타났다. DMS를 사용하여 실험한 결과는 도 9C에 나타났다. 한편, 다양한 샘플에서 본 시스템의 적용 가능성을 확인하기 위해서, *E. coli*로부터 박테리아 DNA를 추출하여 분석하였는데, 세포 농도 범위는 1×10^3 내지 1×10^8 CFUs 범위로 사용하였다. 연속적으로 희석된 샘플로부터 추출된 DNAs에서는 *E. coli* 유전자가 강하게 증폭되었다. HINT 시스템으로부터 추출된 DNA는 Qiagen kit로부터 추출된 DNA의 증폭 효율과 동등한 수준이었다(도 9D).
- [130] 또한, 중증열성 혈소판감소증후군(Severe fever with thrombocytopenia syndrome; SFTS) 및 쯔쯔가무시병(scrub typhus; ST)과 같은 진드기-매개 질병 샘플에서 바이러스 또는 박테리아 핵산(DNA 및 RNA)을 추출하는데 있어서도, HINT 시스템을 적용할 수 있는지 확인하였다. Qiagen kit 및 HINT 시스템(DMS 사용)을 이용하여, SFTS 환자의 혈장으로부터 바이러스 RNA를 추출하였다. HINT 시스템의 RT-PCR 증폭 효율은 Qiagen kit와 크게 차이 나지 않았다(도 10A). 또한, Qiagen kit 및 HINT 시스템(DMS 및 DMP 사용)을 이용하여, ST 환자의 혈장으로부터 박테리아 DNA를 추출하여 분석한 결과, HINT 시스템의 RT-PCR 증폭 효율은 Qiagen kit와 동등한 수준인 것으로 나타났다(도 10B).
- [131] 한편, 본 발명에 사용한 DMS 및 DMP와 유사한 화합물인 DMA와의 비교 실험을 수행하였다. HCT116 암세포주를 이용하여, DMA, DMS 및 DMP를 각각 첨가하여 HINT 시스템을 통해 DNA 추출하고, 추출된 DNA의 증폭 효율을 비교하였다. 도 11에 나타낸 바와 같이, DMA에 비해서, DMS 및 DMP의 증폭 효율이 2 cycles 가량 빠르게 진행되는 것을 도 11(A) 에서 확인하였고, 2 cycles 차이에 대한 효율을 확인했을 때, PCR 에서는 이론상 증폭 산물이 1 cycle 마다 2배씩 증가하게 되므로, 발현량을 비교할 경우에 C_t 값 차이를 2의 제곱승을 구하면 되는데, 이렇게 계산하면 DMA에 비해 DMP와 DMS를 사용할 경우 약

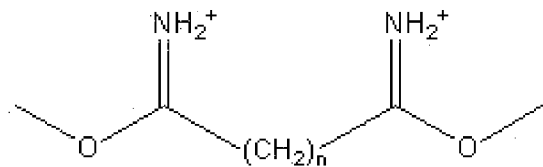
4배 가량 효율이 높음을 확인하였다(도 11B).

[132]

[133] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

청구범위

- [청구항 1] 대상물에 아민기를 도입하여 개질하는 단계(제1단계);
 상기 개질된 대상물 상에 핵산 시료와 하기 화학식 1로 표시되는
 화합물을 주입하고 핵산과 상기 화합물 간의 복합체를 형성시키는
 단계(제2단계); 및
 상기 복합체가 형성된 대상물에 용출 완충액을 처리하여 핵산을
 추출하는 단계(제3단계)를 포함하는, 핵산 추출방법.
 [화학식 1]



- 상기 식에서, n은 5 내지 10의 정수임.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에서 n은 5 내지 7의 정수인 것을 특징으로 하는 핵산 추출방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 대상물은 박막장치, 자성 비드(magnetic bead) 또는 나노입자(nanoparticle) 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 핵산 추출방법.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 핵산은 DNA 또는 RNA인 것을 특징으로 하는 핵산 추출방법.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 핵산은 메틸화된 DNA인 것을 특징으로 하는 핵산 추출방법.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 개질은 대상물 내 실란 화합물은 유입시켜 개질하는 것을 특징으로 하는 핵산 추출방법.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 실란 화합물은 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane; APTES)인 것을 특징으로 하는 핵산 추출방법.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 제1단계 이전에 대상물에 플라즈마 처리를 통해 세척하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 추출방법.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 핵산 시료는 진핵세포, 박테리아 세포, 바이러스 세포, 전혈 또는 소변 유래 시료인 것을 특징으로 하는 핵산 추출방법.
- [청구항 10] 청구항 1에 있어서, 상기 제2단계에서 개질된 대상물 상에 단백질 분해효소 및 용출 완충액을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 추출방법.
- [청구항 11] 입구홀과 출구홀이 각각 관통 형성된 상부박막;
 상기 상부박막으로부터 이격 배치된 하부박막;

그 입구단 및 출구단이 상기 상부박막의 입구홀 및 출구홀에 각각 대응하여 연통하는 마이크로 채널이 내측에 패턴 형성되고, 상기 마이크로 채널의 입구부와 연통하는 주입로가 상기 입구단에 인접하도록 형성되며, 상기 상부박막과 하부박막 사이에 배치되는 마이크로 채널챔버; 및

상기 상부박막 및 하부박막의 각 측부를 밀봉하여 상기 마이크로 채널챔버를 밀봉시키는 밀봉수단을 포함하는 핵산 추출용 박막장치.

[청구항 12]

청구항 11에 있어서,

상기 상부박막의 입구홀과 상기 마이크로채널의 입구단을 연통하는 제1튜브어댑터; 및

상기 상부박막의 출구홀과 상기 마이크로채널의 출구단을 연통하는 제2튜브어댑터를 더 포함하는 핵산 추출용 박막장치.

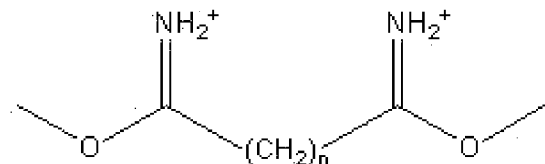
[청구항 13]

청구항 11에 있어서,

상기 상부박막의 입구홀을 통해 상기 마이크로 채널의 입구단으로는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 주입하고,

상기 마이크로 챔버의 주입로를 통해 핵산 샘플을 주입하는 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 박막장치.

[화학식 1]



상기 식에서, n은 5 내지 10의 정수임.

[청구항 14]

청구항 13에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에서 n은 5 내지 7의 정수인 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 박막장치.

[청구항 15]

청구항 11 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

상기 마이크로 채널은 복수회 절곡되도록 패턴된 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 박막장치.

[청구항 16]

청구항 15에 있어서,

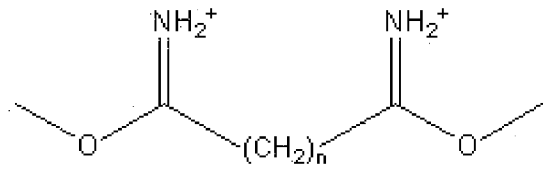
상기 마이크로 채널은 확장된 단면을 갖는 복수의 확장부와, 상기 확장부보다 축소된 단면을 갖는 복수의 축소부를 포함하되,

상기 확장부와 축소부는 교번하도록 배치된 것을 특징으로 하는 핵산 추출용 박막장치.

[청구항 17]

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 핵산 추출 효율 증진용 조성물.

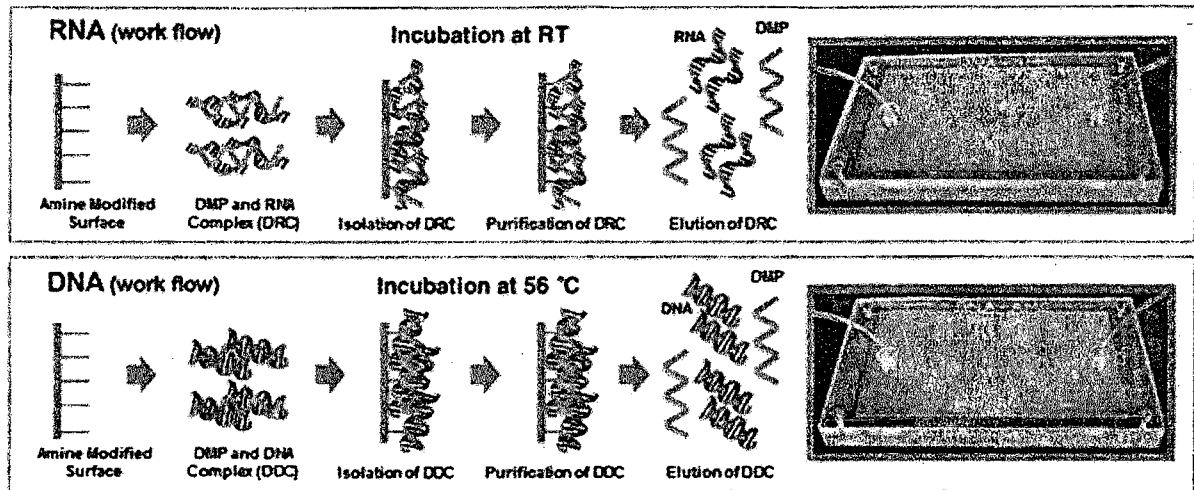
[화학식 1]



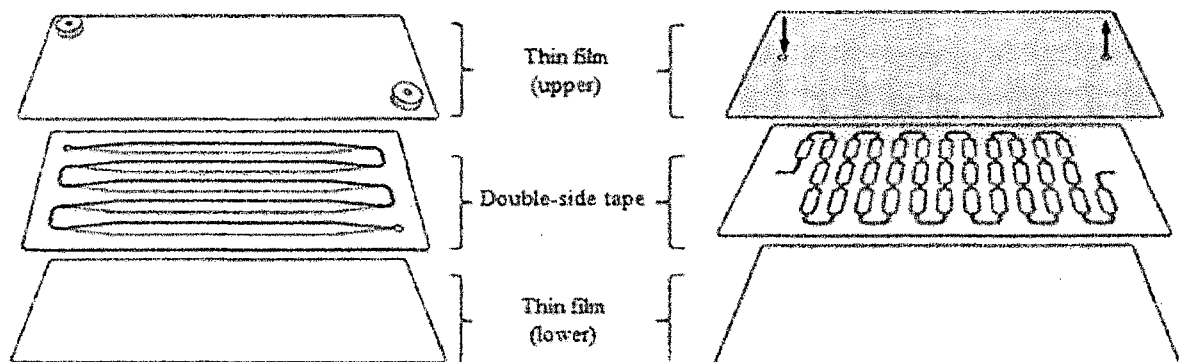
상기 식에서, n 은 5 내지 10의 정수임.

- [청구항 18] 청구항 17에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에서 n 은 5 내지 7의 정수인 것을 특징으로 하는 핵산 추출 효율 증진용 조성물.
- [청구항 19] 청구항 17에 있어서, 상기 조성물은 단백질 분해효소 및 용출 완충액을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 추출 효율 증진용 조성물.
- [청구항 20] 청구항 17에 있어서, 상기 핵산은 DNA 또는 RNA인 것을 특징으로 하는 핵산 추출 효율 증진용 조성물.
- [청구항 21] 청구항 17 내지 청구항 20 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 핵산 추출 효율 증진용 키트.

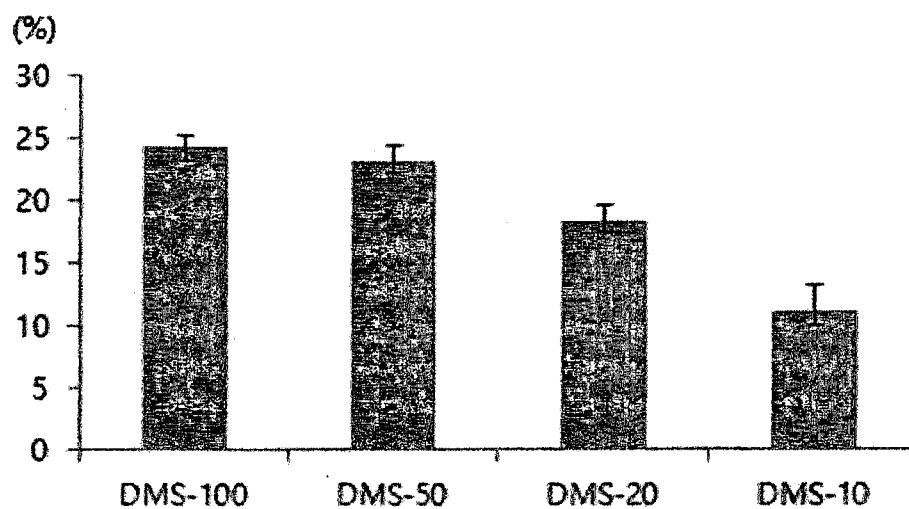
[도 1]



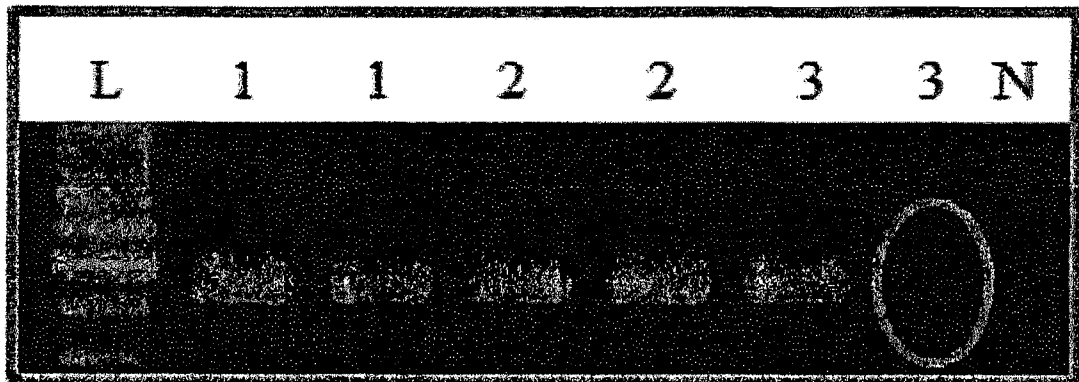
[도 2]



[도 3]



[도 4]



1: Qiagen kit #1 (ratio: 2.04)

1: Qiagen kit #2 (ratio: 1.94)

2: DMS #1 (ratio: 1.72)

2: DMS #2 (ratio: 1.76)

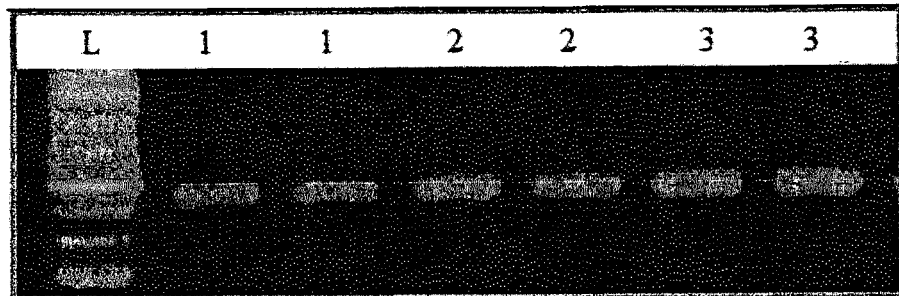
3: DMA #1 (ratio: 1.79)

3: DMA #2

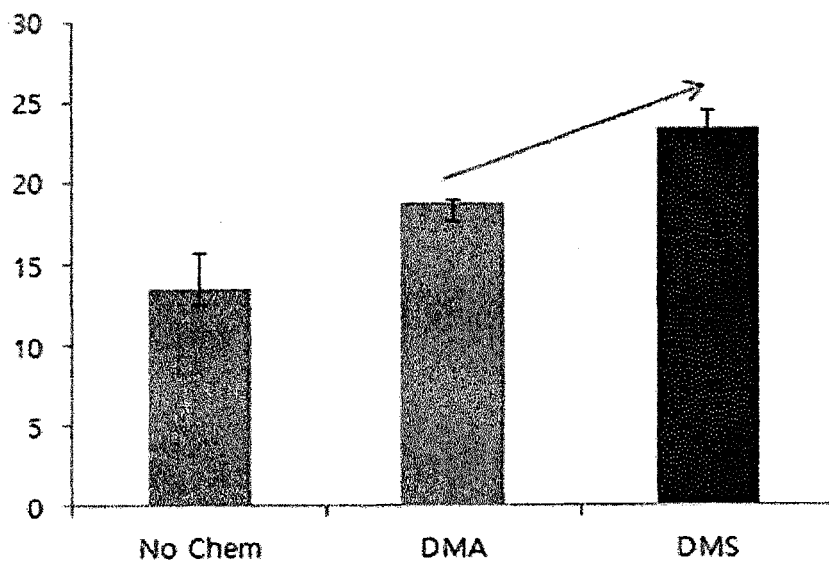
N: negative

↑
missing

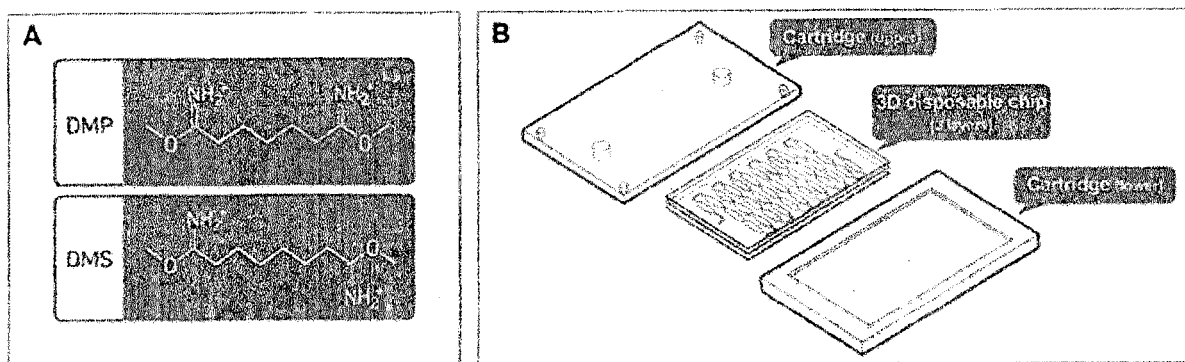
[도 5]



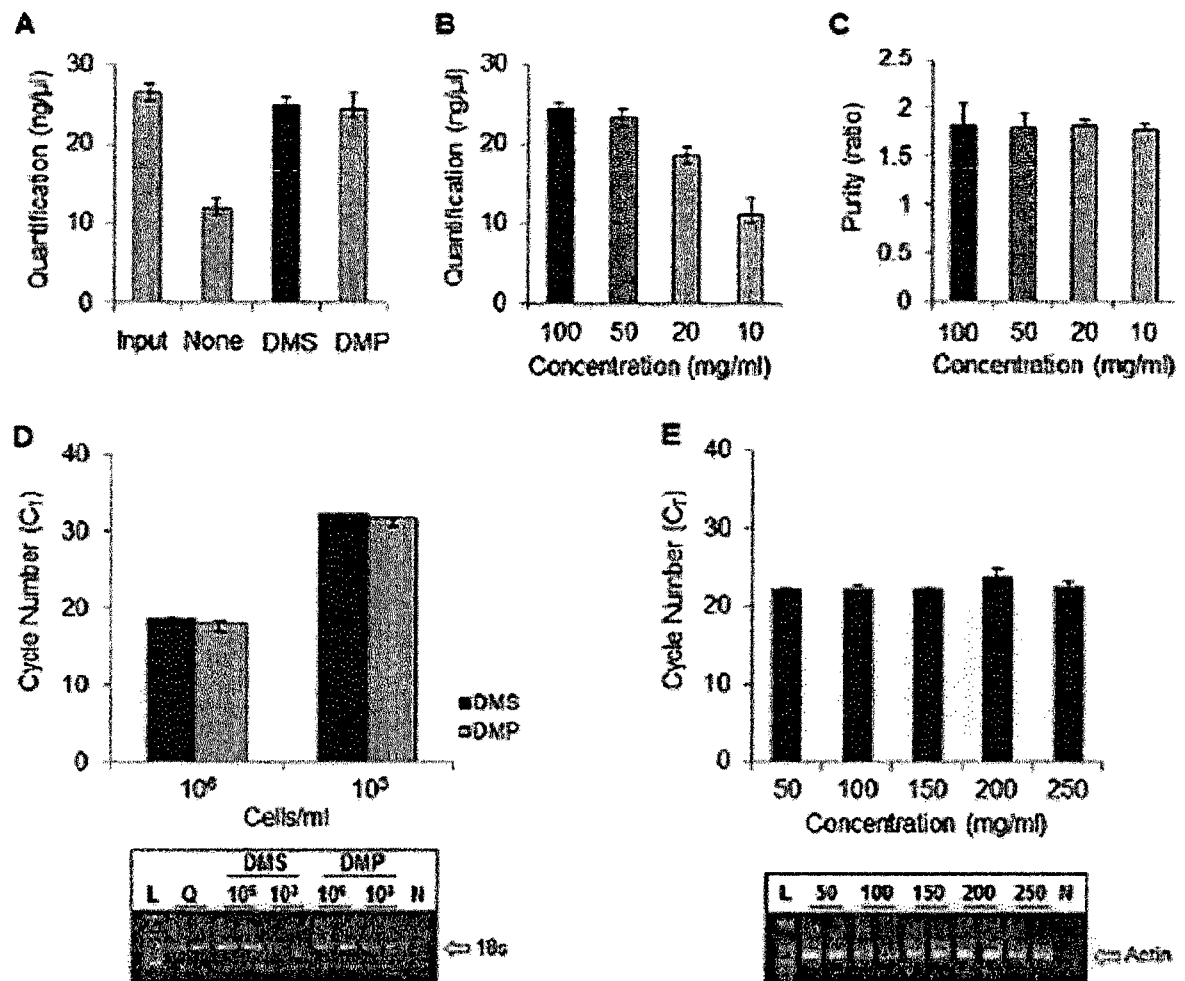
1: No Chem #1; 1: No Chem #2
 2: DMA #1; 2: DMA #2
 3: DMS #1; 3: DMS #2



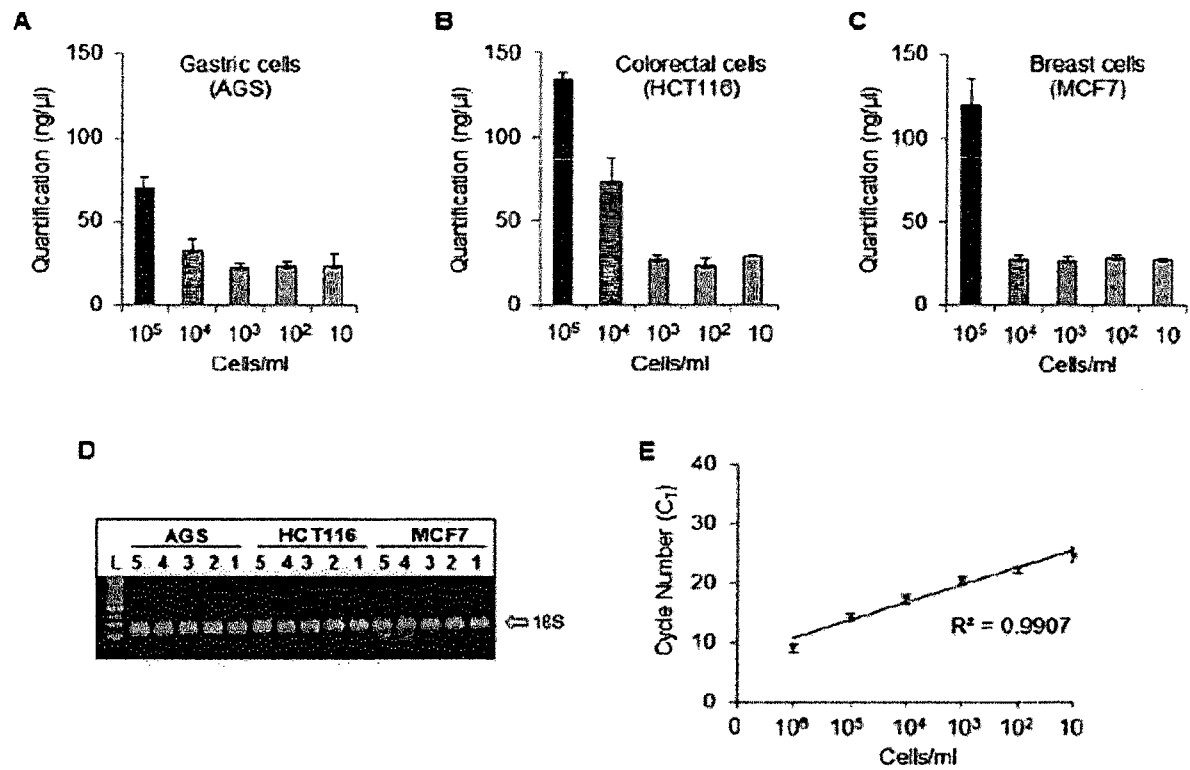
[도 6]



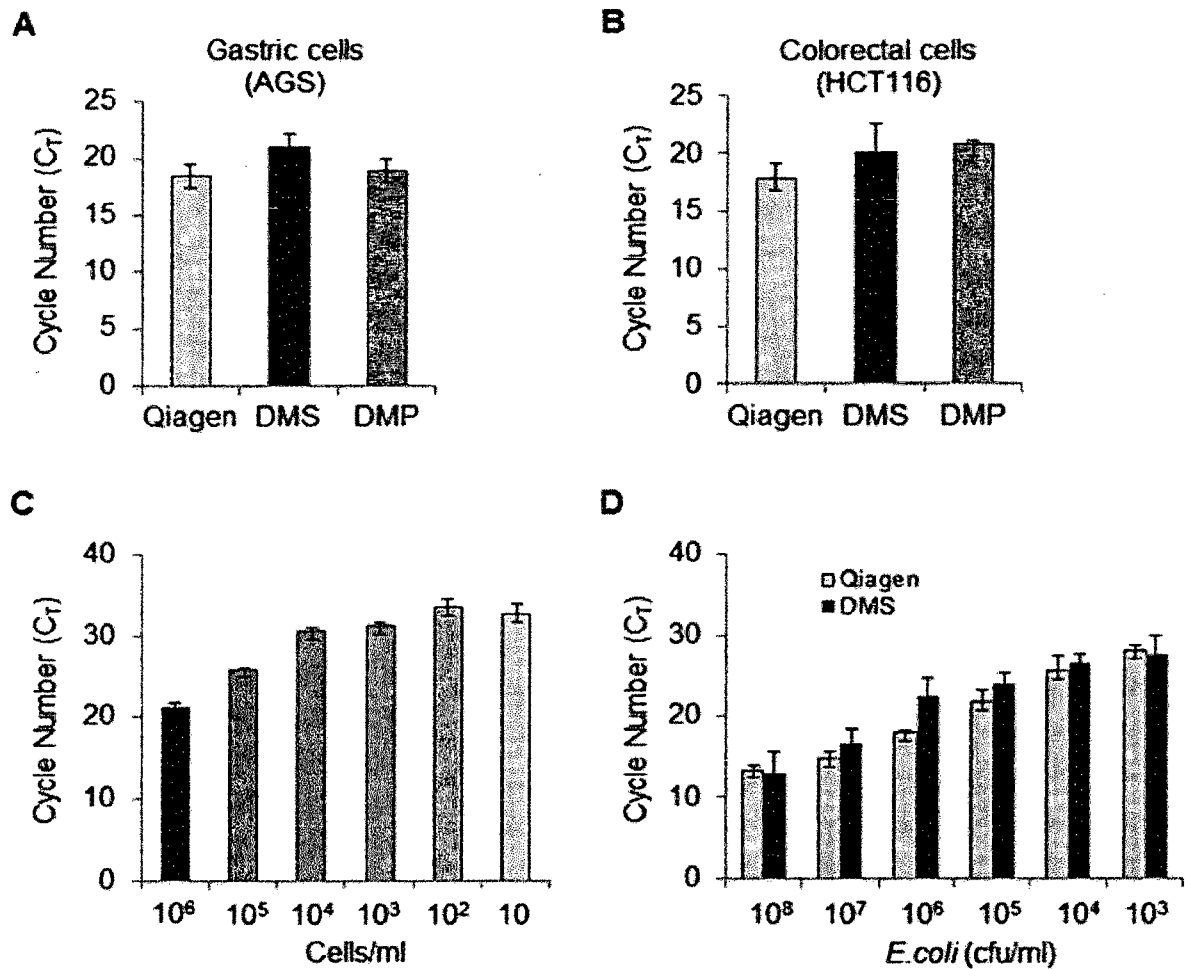
[도 7]



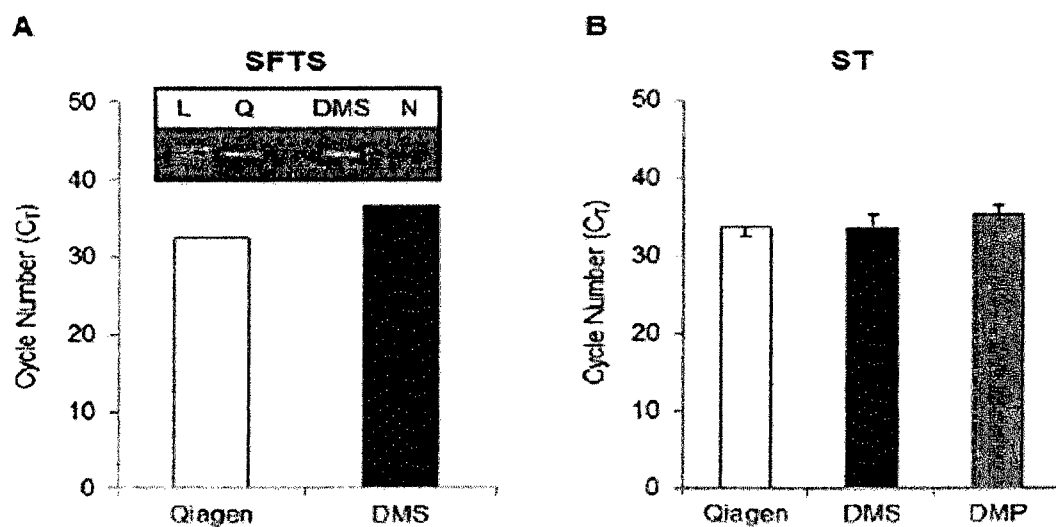
[도 8]



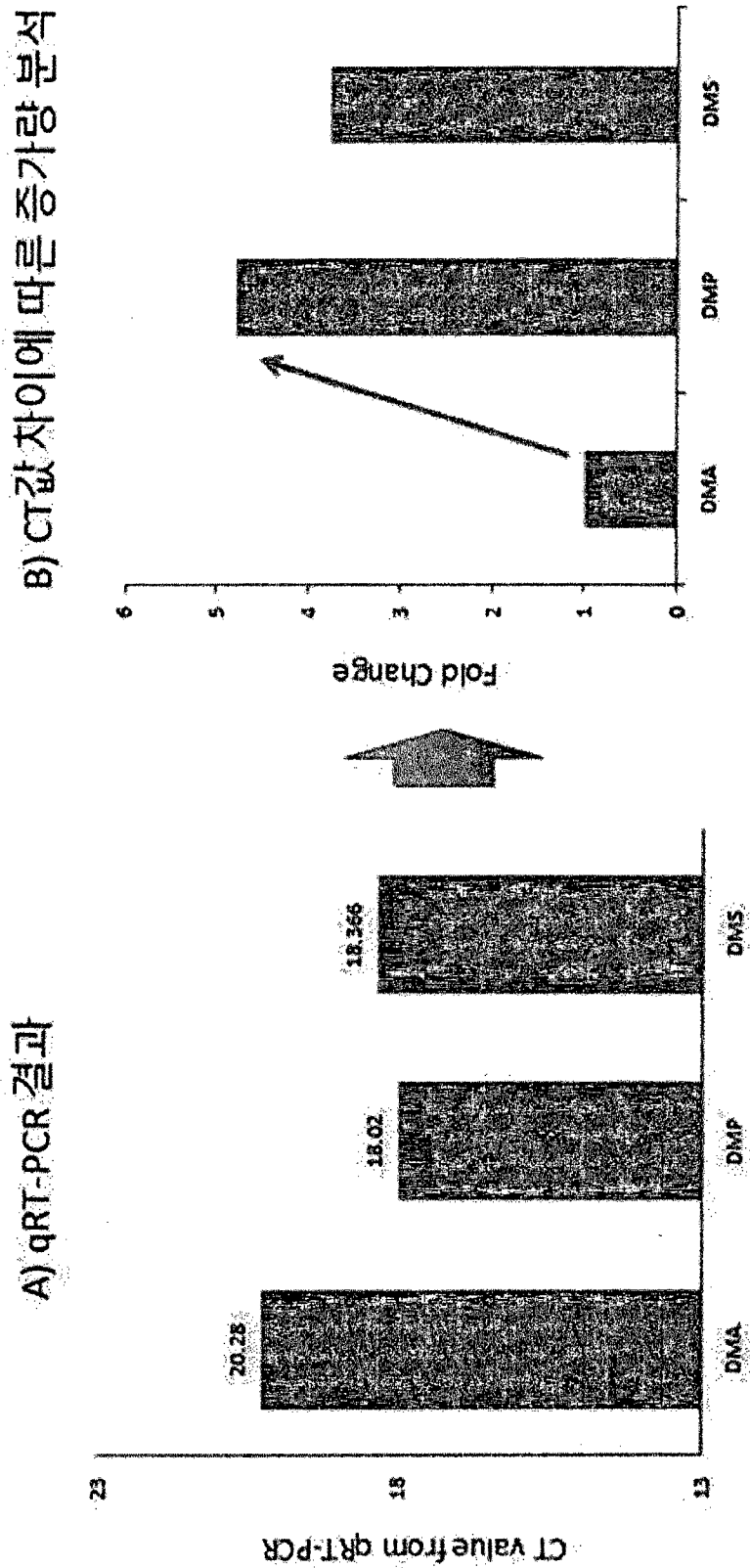
[도 9]



[도 10]



[도 11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/005019

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i, B01L 3/00(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)

C12Q 1/68; C12N 15/10; C12M 3/00; B01L 3/00

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: nucleotide extraction, thin film, chamber, imidoester, dimethyl pimelimidate, dimethyl adipimidate, dimethyl suberimidate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHIN, Y. et al., "Dimethyl Adipimidate/Thin Film Sample processing (DTS); A Simple, Low-cost, and Versatile Nucleic Acid Extraction Assay for Downstream Analysis", Scientific Reports, 2015, vol. 5, article no. 14127, internal pages 1-11 See abstract; internal pages 7-9; and figures 1, 2, 5.	1-21
X	SHIN, Y. et al., "Solid Phase Nucleic Acid extraction Technique in a Microfluidic Chip Using a Novel Non-chaotropic Agent: Dimethyl Adipimidate", Lab on a Chip, 2014, vol. 14, no. 2, pages 359-368 See abstract; pages 360-363; and figure 1.	1-10,17-21
X	SUTER, J. D. et al., "Label-free DNA Methylation Analysis using Opto-fluidic Resonators", Biosensors and Bioelectronics, 2010, vol. 26, no. 3, pages 1016-1020 See abstract; pages 1017, 1018; and figure 1.	1-10,17-21
X	KR 10-2015-0096444 A (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 24 August 2015 See abstract; and claims 1-21; and figures 1-3.	1-10,17-21
A	US 2007-0196833 A1 (GJERDE, D. T.) 23 August 2007 See the entire document.	1-21



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

08 AUGUST 2017 (08.08.2017)

Date of mailing of the international search report

08 AUGUST 2017 (08.08.2017)

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/005019

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0096444 A	24/08/2015	CN 104968803 A EP 2931921 A1 JP 2016-501028 A SG 11201504388 A US 2015-0322486 A1 WO 2014-092653 A1	07/10/2015 21/10/2015 18/01/2016 30/07/2015 12/11/2015 19/06/2014
US 2007-0196833 A1	23/08/2007	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i, B01L 3/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; C12N 15/10; C12M 3/00; B01L 3/00

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: 핵산 추출, 박막, 챔버, 이미도에스터, 디메틸피멜리미데이트, 디메틸아디프이미데이트, 디메틸수베르이미데이트

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SHIN, Y. 등, "Dimethyl adipimidate/Thin film Sample processing (DTS); A simple, low-cost, and versatile nucleic acid extraction assay for downstream analysis", Scientific Reports, 2015, 5권, 아티클 넘버 14127, 내부 페이지 1-11 초록; 내부 페이지 7-9; 및 도면 1, 2, 5 참조.	1-21
X	SHIN, Y. 등, "Solid phase nucleic acid extraction technique in a microfluidic chip using a novel non-chaotropic agent: dimethyl adipimidate", Lab on a Chip, 2014, 14권, 2호, 페이지 359-368 초록; 페이지 360-363; 및 도면 1 참조.	1-10, 17-21
X	SUTER, J. D. 등, "Label-free DNA methylation analysis using opto-fluidic ring resonators", Biosensors and Bioelectronics, 2010, 26권, 3호, 페이지 1016-1020 초록; 페이지 1017, 1018; 및 도면 1 참조.	1-10, 17-21
X	KR 10-2015-0096444 A (에이전시 포 사이언스, 테크놀로지 앤드 리서치) 2015.08.24 요약; 및 청구항 1-21; 및 도면 1-3 참조.	1-10, 17-21
A	US 2007-0196833 A1 (GJERDE, D. T.) 2007.08.23 전문 참조.	1-21

☐ 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 08월 08일 (08.08.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 08월 08일 (08.08.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0096444 A	2015/08/24	CN 104968803 A EP 2931921 A1 JP 2016-501028 A SG 11201504388 A US 2015-0322486 A1 WO 2014-092653 A1	2015/10/07 2015/10/21 2016/01/18 2015/07/30 2015/11/12 2014/06/19
US 2007-0196833 A1	2007/08/23	없음	