(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0166207
(43) 공개일자 2024년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1013 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0063699
(22) 출원일자 2023년05월17일
심사청구일자 2023년05월17일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
신세현
서울시 서초구 서운로 62 래미안리더스원 106동 503호
(74) 대리인
최훈식

전체 청구항 수 : 총 9 항

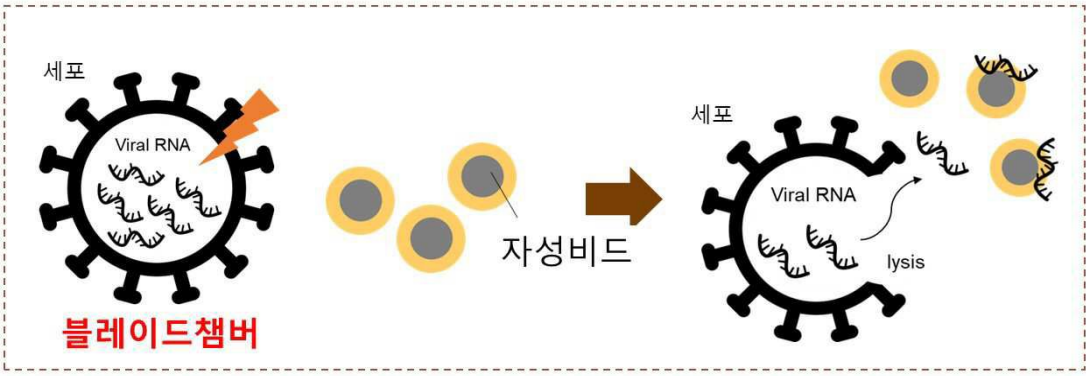
(54) 발명의 명칭 **생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법**

(57) 요 약

본 발명은 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 생체시료에 포함된 생물학적 물질의 막을 신속하게 용해하고, 생체물질로부터 방출되는 핵산을 즉각적으로 추출하여 분리함으로써 핵산의 절단이나 파괴를 최소화할 수 있도록 하는 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 생체물질이 회전하는 블레이드에 의해 파쇄되도록 적당한 챔버와 블레이드가 구성되었을 때, 고속으로 회전하는 블레이드에 의하여 수 분 이내에 대부분의 생체물질의 막이 파쇄되어 세포 내부의 물질을 용이하게 추출할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도3



명 세 서

청구범위

청구항 1

생체시료에 포함된 생체물질의 파쇄와 추출 물질의 흡착을 위한 추출방법으로서,

상기 생체물질이 함유된 생체시료를 준비하는 제1단계와;

상기 생체시료와 자성비드를 블레이드 챔버(100)에 투입하는 제2단계와;

정해진 회전수와 시간 동안 블레이드(114)를 회전시키는 제3단계와;

상기 블레이드(114)의 회전이 완료되면, 상기 생체시료를 분리 장치로 이동시키고, 상기 자성비드의 표면에 흡착된 추출 물질을 분리하는 제4단계;를 포함하는, 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생체물질에서 추출되는 물질은 DNA 또는 RNA를 포함하는 핵산, 단백질 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제3단계에서 상기 블레이드(114)의 회전으로 발생하는 물리력이 상기 생체물질의 멤브레인을 파쇄하는 것을 특징으로 하는, 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 제3단계에서 상기 생체물질에서 방출된 추출 물질이 상기 자성비드의 표면에 흡착되는 것을 특징으로 하는, 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제3단계에서 상기 블레이드(114)의 회전수는 300 rpm 내지 5000 rpm인 것을 특징으로 하는, 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 자성비드의 표면에는 실리카 물질이 적용되어 상기 추출 물질이 흡착되는 것을 특징으로 하는, 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 자성비드의 표면이 아민기로 기능화되어 상기 생체시료에 포함된 이미도에스터기 물질(DMA, DMS, DTBP)과 결합하는 것을 특징으로 하는, 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 자성비드의 표면이 다가 양이온 물질에 의해 개질화되어 상기 추출 물질이 흡착되는 것을 특징으로 하는, 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법.

청구항 9

생체시료에 포함된 생체물질의 파쇄와 핵산의 흡착을 위한 추출방법으로서,

상기 생체물질이 함유된 생체시료를 준비하는 제1단계와;

상기 생체시료와 자성비드를 혼합하는 제2단계와;

상기 생체시료와 상기 자성비드의 혼합용액을 블레이드 챔버(100)에 투입하는 제3단계와;

정해진 회전수와 시간 동안 블레이드(114)를 회전시키는 제4단계와;

상기 블레이드(114)의 회전이 완료되면, 상기 생체시료를 분리 장치로 이동시키고, 상기 자성비드의 표면에 흡착된 핵산을 분리하는 제5단계;를 포함하는, 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 생체시료에 포함된 생물학적 물질의 막을 신속하게 용해하고, 생체물질로부터 방출되는 핵산을 즉각적으로 추출하여 분리함으로써 핵산의 절단이나 파괴를 최소화할 수 있도록 하는 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 의료 분야에 있어서 맞춤 의학을 구현하기 위한 효율적 진단 및 치료방법이 활발하게 개발되고 있는데, 핵산과 같은 타겟 물질의 추출 및 정제 과정은 생명공학, 분자 생물학, 생화학, 진단 검사 의학 등의 검사에서 핵심이 되는 과정이다.

[0003] 근래에 비침습적인 액체생체검사가 높은 검출 정확도와 조기 발견 표지자로서의 가능성이 입증되어 기존의 조직 생검의 실질적인 대안으로 주목받고 있는 가운데, 혈액 또는 기타 체액으로부터 cfDNA(cell free DNA), 엑소좀, CTC (Circulating Tumor Cell) 등의 분리 및 정제 기술의 수요가 늘어나고 있다.

[0004] 막 구조로 되어 있는 세포나 바이러스를 파쇄하여 내부에 있는 미세물질을 추출하는 기술이 개시되고 있는데, 기존 멤브레인 용해는 화학적 시약을 통해서 용해하는 방법이 주로 사용되었으나, 최근에는 열이나 전기를 멤브레인에 인가하여 막을 용해시키는 방법도 개발되고 있다. 또한 열적 Lysis 기술은 초음파, nano-plsamonic 현상 등에 의한 발열 히팅 방법 등이 적용되기도 한다.

[0005] 한국특허 제10-1471920호 "조작이 간편한 휴대용 세포 파쇄 유전자 추출기"는 생체물질을 화학적으로 파쇄하기 위한 세포 파쇄용 시약과 물리적으로 파쇄하기 위한 분쇄용 비드(bead)가 포함되어 가해지는 외부 섭동에 의한 세포 파쇄 기술을 개시하고 있다.

[0006] 이를 위해 세포 파쇄기의 분쇄용기에 세라믹, 유리, 폴리머, 금속 등으로 이루어진 비드(bead)와 세포 파쇄용 시약을 함께 투입하여, 반복적으로 사용자가 분쇄용기에 힘을 가하여 비드에 의한 물리적 파쇄와 시약에 의한 화학적 파쇄가 동시에 진행될 수 있도록 하는 기술을 적용하였다.

[0007] 또한 한국특허 제10-2249506호 "동형2기능성 이미도에스터를 이용한 액체생검 유래 생체물질의 추출 방법"과 한국특허 제10-2136696호 "동형2기능성 이미도에스터를 이용한 병원체 농축 방법"은 생체시료에 이미도에스터기를 포함한 물질을 주입하고, 핵산을 포획할 고체표면에는 아민기를 기능화시켜서 핵산을 포집하는 방법을 개시하고 있다. 여기서는 디메틸 수베르이미데이트(Dimethyl suberimidate; DMS), 디메틸 아디프이미데이트(Dimethyl adipimidate; DMA), 디메틸 디티오비스프로피온이미데이트(Ditertbutyl peroxide; DTBP) 등이 대표적인 이미도에스터기 물질로 사용되었다.

[0008] 도 1은 종래기술에 따른 세포 파쇄 및 핵산 추출 공정을 나타낸 개념도이며, 도 2는 종래기술에 따른 세포 파쇄 및 핵산 추출 공정의 과정을 나타낸 순서도이다.

[0009] 기존 기술에서는 막 구조로 되어 있는 세포나 바이러스, 세포외 소포체, 박테리아 등의 생체물질에 회전력이나 전단력, 충격 등의 물리력을 인가하여 막 구조를 파쇄하고, 내부에 포함된 RNA와 핵산이 외부로 배출되도록 하였다.

[0010] 먼저 파쇄 대상이 되는 생체물질이 함유된 생체시료를 준비한다.(S102)

[0011] 그리고 물리력을 인가할 수 있는 구조가 적용된 제1챔버에 생체시료를 투입한다.(S104) 제1챔버에서는 회전력이나 전단력 등의 물리력을 생체물질에 인가하여 막 구조로 된 생체물질을 파쇄한다.(S106)

[0012] 제1챔버 내에서 물리력으로 막 구조를 파쇄하여 핵산을 배출시키고, 세포내 물질이 배출된 추출용액을 제2챔버에 투입한다.(S108) 그리고 제2챔버에 비드를 투입하여 핵산을 비드의 표면에 흡착한다.(S110) 일반적으로 핵산의 흡착이 용이한 폴리머 비드나 자력에 의해 핵산을 고정시키는 자성비드를 사용한다.

[0013] 마지막으로 비드의 표면에 흡착된 핵산은 별도의 용해 과정을 거쳐서 분리시킨다.(S112)

[0014] 그러나 기존의 열적 lysis 방법들은 다소 복잡한 장비를 구비하거나 특정의 조건을 만족시켜야 하는 문제점들이 있었다. 또한 기존의 화학적 lysis 방법은 추가적인 화학적 용해 버퍼를 추가하고, 용해 후에 이를 제거해야 하는 복잡성을 지니고 있었으며, 용해되어 빠져나오는 핵산을 별도로 추출하는 공정이 필요한 문제가 있었다.

[0015] 이러한 추가적인 추출 공정을 위한 다양한 방법들이 제시되고 있으나, 복잡하고 오랜 과정과 시간이 소요되는 기존의 용해 및 핵산 추출의 공정을 개선하기 위한 새롭고 혁신적인 방법이 필요하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0016] (특허문헌 0001) KR 10-2019-0119495 A

(특허문헌 0002) KR 10-2019-0122120 A

(특허문헌 0003) KR 10-2014-0068490 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 전술한 문제점을 해결하기 위한 본 발명은 생체시료에 포함된 생물학적 막으로 구성된 생체물질을 고속회전하는 블레이드가 내장된 블레이드 챔버에 투입하고, 블레이드의 물리력으로 막을 파쇄하는 과정과 막의 파쇄를 통해 빠져나오는 핵산을 자성비드를 통해 흡착하는 과정이 동시에 이루어지도록 함으로써 생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행할 수 있도록 하는 추출방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0018] 전술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 본 발명은 생체시료에 포함된 생체물질의 파쇄와 추출 물질의 흡착을 위한 추출방법으로서, 상기 생체물질이 함유된 생체시료를 준비하는 제1단계와; 상기 생체시료와 자성비드를 블레이드 챔버(100)에 투입하는 제2단계와; 정해진 회전수와 시간 동안 블레이드(114)를 회전시키는 제3단계와; 상기 블레이드(114)의 회전이 완료되면, 상기 생체시료를 분리 장치로 이동시키고, 상기 자성비드의 표면에 흡착된 추출 물질을 분리하는 제4단계;를 포함한다.

[0019] 상기 생체물질에서 추출되는 물질은 DNA 또는 RNA를 포함하는 핵산, 단백질 중 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

[0020] 상기 제3단계에서 상기 블레이드(114)의 회전으로 발생하는 물리력이 상기 생체물질의 멤브레인을 파쇄하는 것을 특징으로 한다.

[0021] 상기 제3단계에서 상기 생체물질에서 방출된 추출 물질이 상기 자성비드의 표면에 흡착되는 것을 특징으로 한다.

[0022] 상기 제3단계에서 상기 블레이드(114)의 회전수는 300 rpm 내지 5000 rpm인 것을 특징으로 한다.

[0023] 상기 자성비드의 표면에는 실리카 물질이 적용되어 상기 추출 물질이 흡착되는 것을 특징으로 한다.

[0024] 상기 자성비드의 표면이 아민기로 기능화되어 상기 생체시료에 포함된 이미도에스터기 물질(DMA, DMS, DTBP)과 결합하는 것을 특징으로 한다.

[0025] 상기 자성비드의 표면이 다가 양이온 물질에 의해 개질화되어 상기 추출 물질이 흡착되는 것을 특징으로 한다.

[0026] 다른 실시예에 따른 본 발명은 생체시료에 포함된 생체물질의 파쇄와 핵산의 흡착을 위한 추출방법으로서, 상기 생체물질이 함유된 생체시료를 준비하는 제1단계와; 상기 생체시료와 자성비드를 혼합하는 제2단계와; 상기 생체시료와 상기 자성비드의 혼합용액을 블레이드 챔버(100)에 투입하는 제3단계와; 정해진 회전수와 시간 동안 블레이드(114)를 회전시키는 제4단계와; 상기 블레이드(114)의 회전이 완료되면, 상기 생체시료를 분리 장치로 이동시키고, 상기 자성비드의 표면에 흡착된 핵산을 분리하는 제5단계;를 포함한다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따르면, 생체물질이 회전하는 블레이드에 의해 파쇄되도록 적당한 챔버와 블레이드가 구성되었을 때, 고속으로 회전하는 블레이드에 의하여 수 분 이내에 대부분의 생체물질의 막이 파쇄되어 세포 내부의 물질을 용이하게 추출할 수 있는 효과가 있다.

[0028] 또한 고속회전 블레이드를 통한 멤브레인 파쇄와 동시에 자성비드의 핵산 흡착을 통한 핵산의 보호 기능이 결합되어 이전에 복잡한 lysis의 공정과 핵산추출의 공정이 하나로 통합되며, 파쇄 및 추출 시간과 효율의 혁신적인 개선을 얻는 효과를 얻을 수 있게 되었다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 종래기술에 따른 세포 파쇄 및 핵산 추출 공정을 나타낸 개념도.

도 2는 종래기술에 따른 세포 파쇄 및 핵산 추출 공정의 과정을 나타낸 순서도.

도 3은 본 발명의 실시예에 따른 세포 파쇄 및 핵산 추출 공정을 나타낸 개념도.

도 4는 본 발명의 실시예에 따른 세포 파쇄 및 핵산 추출 공정의 과정을 나타낸 순서도.

도 5는 블레이드 챔버의 구조를 나타낸 사시도.

도 6은 블레이드 챔버의 내부 구조를 나타낸 단면도.

도 7은 자성비드의 투입과 미투입 상태에 따른 핵산 발현 결과를 나타낸 그래프.

도 8은 자성비드의 투입과 미투입 상태에 따른 추출 농도 결과를 나타낸 그래프.

도 9는 블레이드 동작 시간에 따른 핵산 발현 결과를 나타낸 그래프.

도 10은 블레이드 동작 시간에 따른 추출 농도 결과를 나타낸 그래프.

도 11은 자성비드의 투입량에 따른 추출 결과를 나타낸 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하에서 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 따른 "생체물질의 파쇄와 핵산 흡착을 동시에 수행하는 추출방법"(이하, '추출방법'이라 함)을 설명한다.

[0031] 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 세포 파쇄 및 핵산 추출 공정을 나타낸 개념도이며, 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 세포 파쇄 및 핵산 추출 공정의 과정을 나타낸 순서도이다.

[0032] 본 발명에서는 종래기술에서와는 달리, 물리력을 인가하는 챔버 내에 블레이드의 회전을 통해 생체물질의 막을 파쇄시키는 과정과 동시에 비드의 표면에 핵산이 흡착되도록 하는 과정이 동시에 이루어지도록 한다. 특히 본 발명에서는 자기력을 가진 물질로 제작된 자성비드(Magnetic beads)를 사용함으로써 핵산의 흡착이 용이하고 견고하게 이루어질 수 있도록 구성한다.

[0033] 본 발명에서 추출대상이 되는 물질은 DNA 또는 RNA를 포함하는 핵산, CTC(Circulating Tumor Cell)를 포함하는 세포, 엑소좀(Exosome)을 포함하는 세포외 소포체(Extracellular vesicles), 단백질 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0034] 막 구조의 파쇄로 인해 외부로 배출된 핵산은 챔버의 이동 없이 바로 자성비드의 표면에 흡착되며, 이로 인해 블레이드의 물리력에 의한 추가적인 핵산의 절단없이 그 상태가 그대로 보존된다. 즉, 자성비드의 표면 흡착으로 인해 핵산이 파손되지 않은 상태로 막 구조의 파쇄 과정이 끝날 수 있다.

[0035] 본 발명에서는 고속으로 회전하면서 생체물질의 막 구조를 파쇄하는 블레이드가 장착된 추출장치를 블레이드 챔버(100)라고 정의한다.

[0036] 도 5는 블레이드 챔버의 구조를 나타낸 사시도이며, 도 6은 블레이드 챔버의 내부 구조를 나타낸 단면도이다.

[0037] 블레이드 챔버(100)는 일정한 크기의 수용공간을 내부에 갖는 용기(102), 용기(102)의 상단부 또는 일측면에 형성된 투입구를 개폐하는 뚜껑(104), 용기(102)의 하단부 또는 일측면에 연결되어 회전력을 발생시키는 회전력발생부(106)로 이루어진다. 일반적으로 용기(102)의 상단부에 투입구가 형성되고, 용기(102)의 하단부에 회전력발생부(106)가 연결되지만, 다른 위치에 구비될 수도 있다.

[0038] 뚜껑(104)은 블레이드(114)의 회전으로 발생하는 원심력에 의해 생체시료가 비산하면서 발생되는 손실을 막아준다.

[0039] 용기(102)와 회전력발생부(106) 사이에는 연결부(108)가 형성되는데, 연결부(108)의 내부에는 회전력을 전달하는 구조가 설치될 수 있다.

[0040] 회전력발생부(106)의 외부에는 조절버튼(110)이 설치될 수 있는데, 경우에 따라서는 용기(102)나 뚜껑(104)의 표면에 설치될 수도 있다.

[0041] 회전력발생부(106)에는 회전축(112)이 연결되며, 회전축(112)은 용기(102)의 내부로 연장된다. 그리고 회전축(112)의 말단에는 블레이드(114)가 설치된다. 회전축(112)의 타단에는 모터(116)가 설치된다. 따라서 모터(116)의 회전력이 회전축(112)을 회전시키고, 이로 인해 블레이드(114)가 용기(102) 내부에서 회전하게 된다. 블레이드(114)는 용액 상태의 생체시료에 잠긴 상태에서 회전하도록 높이와 크기를 형성하는 것이 바람직하다.

[0042] 생체시료에 포함된 생체물질이 블레이드(114)의 회전으로 인한 전단력에 의해 멤브레인이 쉽게 파쇄되도록 하기 위해 블레이드 챔버(100)의 높이와 깊이, 내부 공간의 직경 그리고 회전하는 블레이드(114)의 모양과 회전수(RPM) 등을 최적화할 필요가 있다.

[0043] 본원발명의 최적의 전단파쇄 조건에서는 바이러스나 세포외 소포체(Extracellular vesicles) 등의 100 nm 크기의 생체물질을 비롯하여 마이크로미터 크기의 박테리아나 진균, 그보다 더 큰 세포 등의 파쇄에도 효과적으로 적용할 수 있음을 확인하였다.

[0044] 본원발명의 시험을 위해 제작된 블레이드 챔버(100)의 용기(102)의 직경은 10 ㎜, 높이는 8 ㎜으로 구성하였고, 용기(102) 내에 일측 날개의 길이가 8 ㎜인 블레이드(114)를 설치하였다. 또한 블레이드(114)의 회전수는 4000 rpm으로 설정하고, 회전 시간은 1분, 5분, 10분 등의 다양한 회전시간을 적용하여 실험을 하였다.

[0045] 블레이드(114)의 회전수의 경우에도 300, 500, 1000, 2000, 4000, 5000 rpm 등에 대하여 각각 시험하였고, 이중에서 최적의 회전수가 4000 rpm인 것을 확인하였다.

[0046] 그러나 추출 대상물과 생체물질의 종류에 따라서 용기(102) 및 블레이드(114)의 크기, 회전수, 회전시간 등은 달라질 수 있다.

[0047] 이와 같은 블레이드 챔버(100)를 이용한 통합적인 추출방법을 단계별로 설명한다.

[0048] 먼저 파쇄 대상이 되는 생체물질이 함유된 생체시료를 준비한다.(S202)

[0049] 그리고 블레이드 챔버(100)에 생체시료를 투입한다.(S204) 블레이드 챔버(100)는 종래기술에서와 동일하게 블레이드(114)의 회전에 의해 발생한 전단력 등의 물리력을 생체물질에 인가하여 막 구조로 된 생체물질을 파쇄한다.

[0050] 그리고 블레이드(114)를 회전시키기 전에 자성비드를 적절한 농도로 생체시료에 투입한다.(S206) 자성비드는 생체물질에 포함된 핵산이 외부로 노출되는 즉시 표면에 핵산을 흡착하는 역할을 한다.

[0051] 본 발명에서는 블레이드 챔버(100)에 생체시료를 투입한 후, 추가적으로 자성비드를 블레이드 챔버(100)에 투입하는 것으로 설명하지만, 자성비드를 먼저 투입한 후에 생체시료를 투입할 수도 있다.

[0052] 그리고 경우에 따라서는 별도의 용기에 생체시료와 자성비드를 투입하여 혼합한 후, 혼합 용액을 블레이드 챔버

(100)에 투입할 수도 있을 것이다.

[0053] 생체시료의 투입과 자성비드의 추가 순서, 생체시료와 자성비드가 혼합되는 공간은 당업자에 의해 다양하게 선택될 수 있다.

[0054] 그리고 정해진 회전수와 시간 동안 블레이드(114)를 회전시킨다.(S208)

[0055] 이와 같은 과정을 통해 생체물질의 막 구조의 파쇄와 함께 핵산이 자성비드의 표면에 흡착되는 과정이 동시에 진행된다.

[0056] 정해진 시간 동안 블레이드(114)가 회전하면, 블레이드(114)의 회전을 정지한 후 생체시료를 분리 장치로 이동시키고, 비드의 표면에 흡착된 핵산을 별도의 용해 과정을 거쳐서 분리시킨다.(S210)

[0057] 자성비드와 핵산의 분리는 종래 기술에 따른 방법이 적용될 수 있으며, 자성비드를 용출 용액으로 세척하거나, 원심분리장치에서 분리될 수 있다. 그리고 이 외에도 다양한 방식이 적용될 수 있다.

[0058] 블레이드 챔버(100) 내부에 저장된 생체시료에는 핵산이 추출되면 바로 흡착할 수 있는 자성비드를 적당한 농도로 투입한다. 자성비드의 농도도 다양한 값들에 대한 시험을 통하여 최적화될 수 있다. 본원발명에서 사용되는 자성비드는 기존 기술에서 사용된 비드와는 다른 역할을 한다. 즉, 기존 기술에서는 생체시료에 투입되는 비드가 충격 등 물리력을 발생하여 생체물질을 파괴하는 beater로서의 역할을 어느 정도 하지만, 본원발명에서는 자성비드가 이러한 물리력 발생의 역할은 크게 하지 않으며, 핵산 물질의 흡착 기능만을 주로 수행한다.

[0059] 전술한 바와 같이, 블레이드(114)의 고속회전 인가를 먼저 가한 후에 자성비드를 생체시료에 투입하여 핵산을 추출한 경우, 핵산의 증폭률이 현저히 감소하는 것을 발견하였다. 이는 고속회전에 핵산이 세포 밖으로 나온 상태에서 블레이드(114)의 물리력에 직접 노출되면서 긴 핵산이 절단된 결과로 분석되었다. 따라서, 본원발명이 추구하는 높은 효율의 추출 효과를 얻기 위해서는 핵산을 흡착하도록 표면이 기능화된 자성비드가 포함된 생체시료를 고속회전 블레이드(114)의 전단력에 노출시키는 것이 바람직하다. 즉, 세포 막이 블레이드(114)의 물리력에 의해 파쇄되면서 유출되는 핵산이 블레이드(114)에 의해 다시 절단되기 전에 즉시 자성비드에 흡착되도록 한다. 자성비드의 표면에 흡착된 핵산은 블레이드(114)의 고속 회전 전단력이 가해지더라도 자성비드의 구조적인 견고함으로 인해 보호되면서 추가적인 절단이 일어나지 않는다.

[0060] 자성비드의 표면에 흡착력을 강화하기 위해 핵산을 포획할 수 있는 다양한 종류의 물질들이 자성비드에 적용될 수 있는데, 대표적으로는 염다리(Salt bridge)를 통해 핵산이 흡착되는 실리카 물질이 적용된다.

[0061] 또한 생체시료에 이미도에스터기 물질(DMA, DMS, DTBP)이 포함되어 있고, 자성비드의 표면은 아민기로 기능화되었을 경우, 이온 하전결합(charge boding)과 공유결합(covalent bonding)을 통해 흡착될 수 있다.

[0062] 또한 자성비드의 표면에 특정 전하를 갖는 물질이 부착된 형태로 제작되는 경우, 핵산이 물질의 표면에 전하에 의해 결합될 수 있다. 통상적으로 핵산은 음의 하전 특성을 가지므로, 자성비드의 표면에는 양의 하전 특성을 가지는 다가 양이온 물질로 개질화하는 것이 바람직하다.

[0063] 자성비드의 표면 개질화에 사용되는 다가 양이온 물질은 폴리라이신, 프로타민, 폴리아르기닌, 폴리히스티딘, 양이온성 덱스트란, 양이온성 덴드리머, 양이온성 폴리사카라이드, 폴리아미도아민, 폴리에틸렌이민, 폴리쿼터늄, 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트(PDMAEMA), 폴리-2-다이메틸아미노메틸 스티렌(PDMAMS), 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP), 폴리 다이에틸아미노에틸 아크릴레이트(pDEAEA), 폴리 다이메틸아미노에틸 아크릴레이트(pDMAEA), 폴리 다이에틸아미노에틸 메타크릴레이트(pDEAMA), 리포폴리아민(lipopolyamines), 4급 암모늄(quaternary ammoniums), 구아니딘(guanidine), 이미다졸(imidazole), 폴리아닐린(polyaniline), 폴리피롤(polypyrrol) 및 키토산(chitosan) 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0064] 도 7은 자성비드의 투입과 미투입 상태에 따른 핵산 발현 결과를 나타낸 그래프이며, 도 8은 자성비드의 투입과 미투입 상태에 따른 추출 농도 결과를 나타낸 그래프이다.

[0065] 도 7과 도 8의 결과는 독감 바이러스의 하나인 "Influenza Virus culture media_H3N2"를 대상으로 하였다. 대조군(Control)은 화학적 Lysis 방식을 적용하였으며, 실험군1(Protocol A)은 자성비드를 생체시료에 함께 투입한 상태에서 회전시킨 결과이다. 실험군2(Protocol B)는 자성비드를 투입하지 않은 상태에서 회전시키고, 별도의 챔버에서 자성비드에 흡착된 핵산을 분리한 결과값이다. 실험군1과 실험군2는 모두 4000 rpm의 회전수로 블레이드(114)를 회전시켰다.

[0066] 본 실험에 적용된 블레이드 챔버(100)의 용기(102)의 직경은 10 ㎜, 높이는 8 ㎜ 이었으며, 챔버 내에는 8 ㎜

크기의 블레이드(114)가 사용되었으며, 도 9와 도 10에 도시된 실험 결과 역시 동일한 챔버를 사용하여 도출된 결과값이다.

[0067] 이를 통해 자성비드를 함께 투입한 실험군1의 결과가 화학적 Lysis 방식으로 진행한 대조군의 결과와 거의 동일하고, 자성비드 없이 파쇄를 진행한 실험군2에 비하여 핵산 검출 효율이 더 높음을 알 수 있다. 즉, 전술한 바와 같이, 자성비드의 표면에 흡착된 핵산이 더 잘 보호된다는 것을 확인할 수 있다.

[0068] 도 9는 블레이드 동작 시간에 따른 핵산 발현 결과를 나타낸 그래프이며, 도 10은 블레이드 동작 시간에 따른 추출 농도 결과를 나타낸 그래프이다.

[0069] 도 9와 도 10의 대조군(Control)은 앞선 실험과 동일하게 화학적 Lysis 방식을 적용한 결과값이다. 그리고 네 개의 실험군은 각각 자성비드 투입 후 회전시간을 1분과 3분, 5분, 15분 동안 각각 진행한 후의 결과값이다. 본 실험을 통해 블레이드(114)의 회전시간을 1분과 3분, 5분, 그리고 15분으로 변화시켜도 ΔCt 값의 변화가 1 미만임을 알 수 있다. 또한 추출되는 핵산의 단위질량당 수 역시 큰 변화가 없으며, 시간이 짧아도 충분한 양이 추출되는 것을 알 수 있다. 이러한 결과로부터 1분의 회전으로도 바이러스의 Lysis가 이미 충분히 완료되었음을 유추할 수 있으며, 블레이드(114)의 회전 시간은 큰 변수가 되지 않는 것으로 볼 수 있다.

[0070] 도 11은 자성비드의 투입량에 따른 추출 결과를 나타낸 그래프이다.

[0071] 실험군1은 자성비드를 16㎕ 투입했을 때의 결과값이며, 실험군2는 120㎕ 투입했을 때의 결과값이다. 본 실험 결과를 통해 자성비드의 양을 작게 투입했을 때, ΔCt가 일정 정도 증가한다는 것을 확인할 수 있다. 따라서 파쇄를 통해 배출된 핵산이 자성비드의 표면에 신속하게 흡착될 수 있을 정도로 충분한 자성비드를 투입하는 것이 효과적이라는 점을 알 수 있다.

[0072] 이상과 같은 구성과 실험 결과를 토대로 생체물질의 파쇄와 자성비드의 흡착이 동시에 일어날 수 있도록 블레이드 챔버(100)에 자성비드와 생체시료를 동시에 투입한 상태에서 블레이드(114)에 의한 파쇄를 진행하는 것이 훨씬 효과적이라는 점을 확인할 수 있었다.

[0073] 또한, 자성비드의 흡착 기능이 배제된 상태에서 생체물질의 멤브레인이 파쇄됨과 동시에 블레이드(114)의 고속 회전이 이루어지면, 생체물질의 용해 후 유출된 핵산은 전단력에 의한 절단이 추가적으로 이루어져 증폭효율이 매우 저하되는 부작용을 초래함을 확인할 수 있었다.

[0074] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 설명하였지만, 상술한 본 발명의 기술적 구성은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자가 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해되어야 하고, 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

부호의 설명

[0075] 100 : 블레이드 챔버 102 : 용기

104 : 뚜껑 106 : 회전력발생부

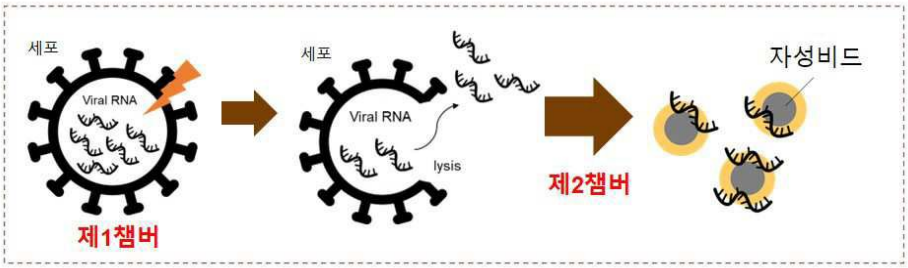
108 : 연결부 110 : 조절버튼

112 : 회전축 114 : 블레이드

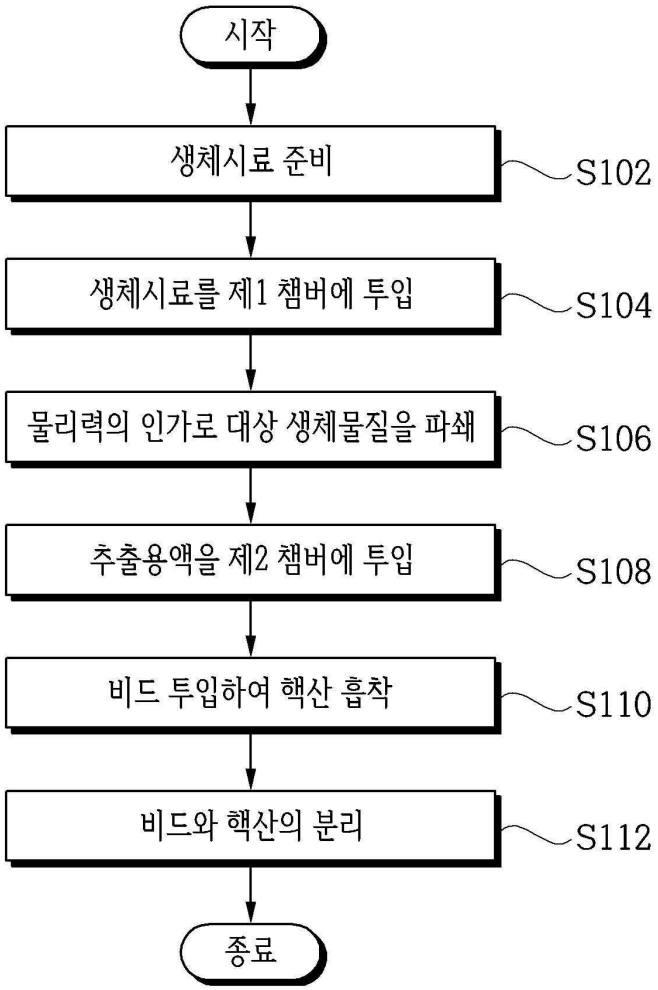
116 : 모터

도면

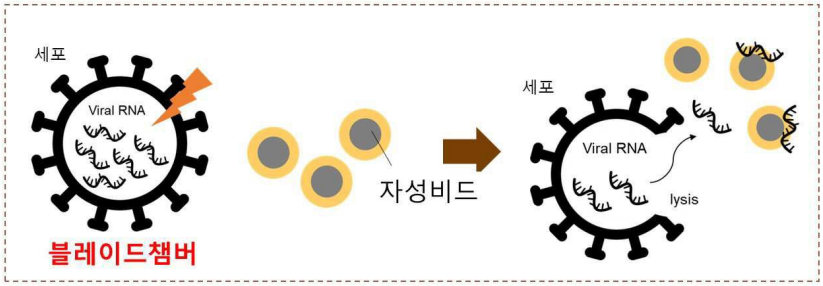
도면1


세포
Viral RNA
제1챔버
세포
Viral RNA
lysis
제2챔버
자성비드

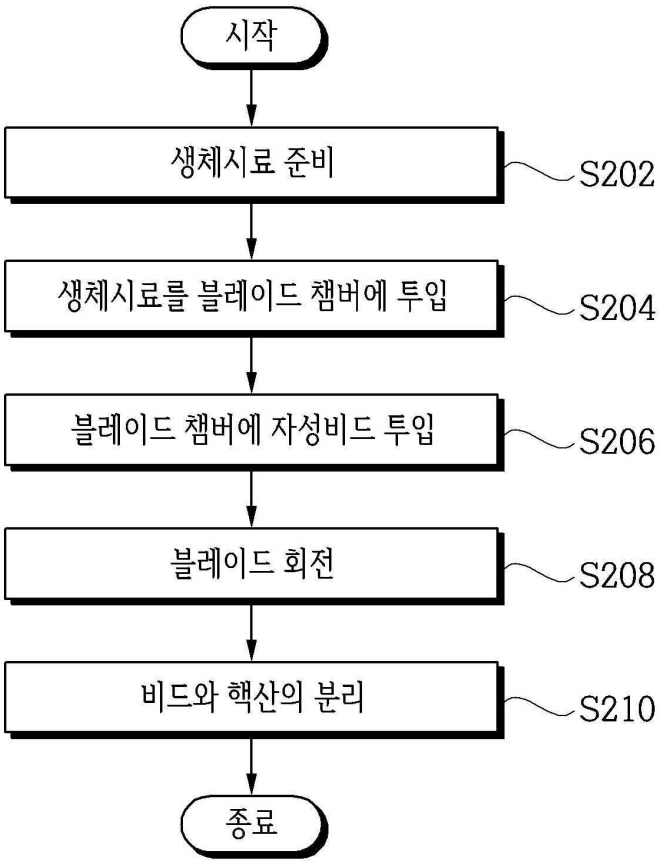
도면2


시작
생체시료 준비
S102
생체시료를 제1 챔버에 투입
S104
물리력의 인가로 대상 생체물질을 파쇄
S106
추출용액을 제2 챔버에 투입
S108
비드 투입하여 핵산 흡착
S110
비드와 핵산의 분리
S112
종료

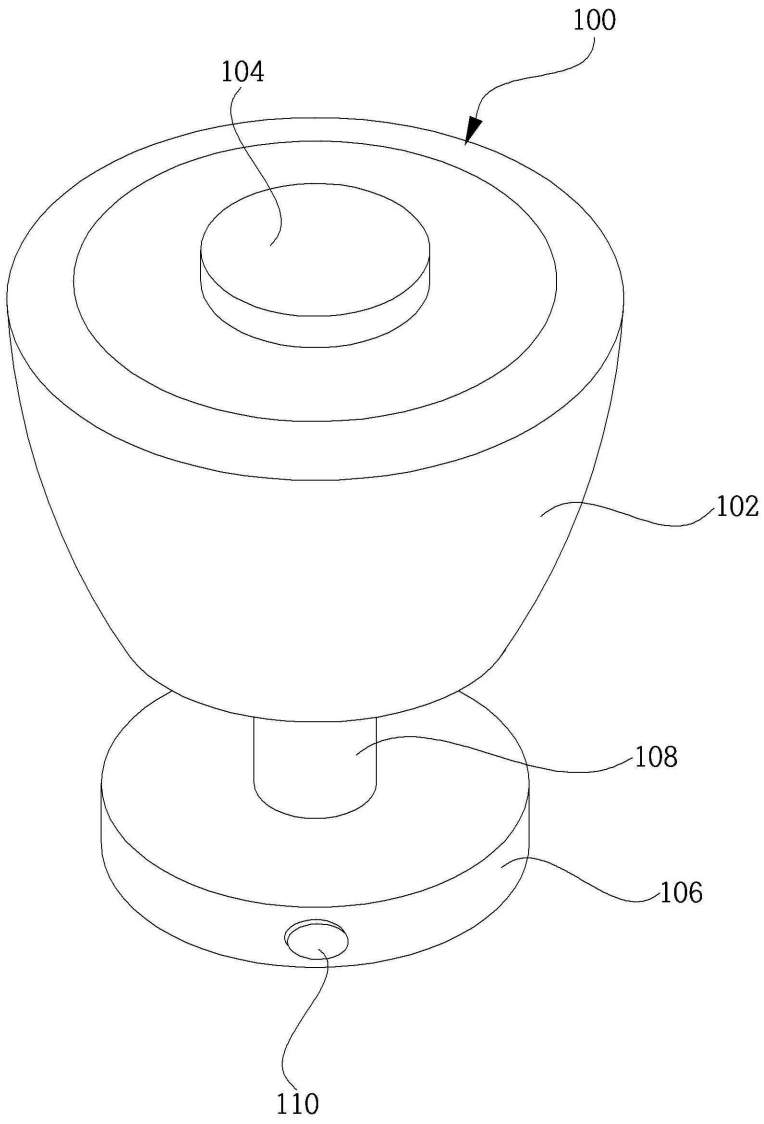
도면3


세포
Viral RNA
블레이드챔버
자성비드
세포
Viral RNA
lysis

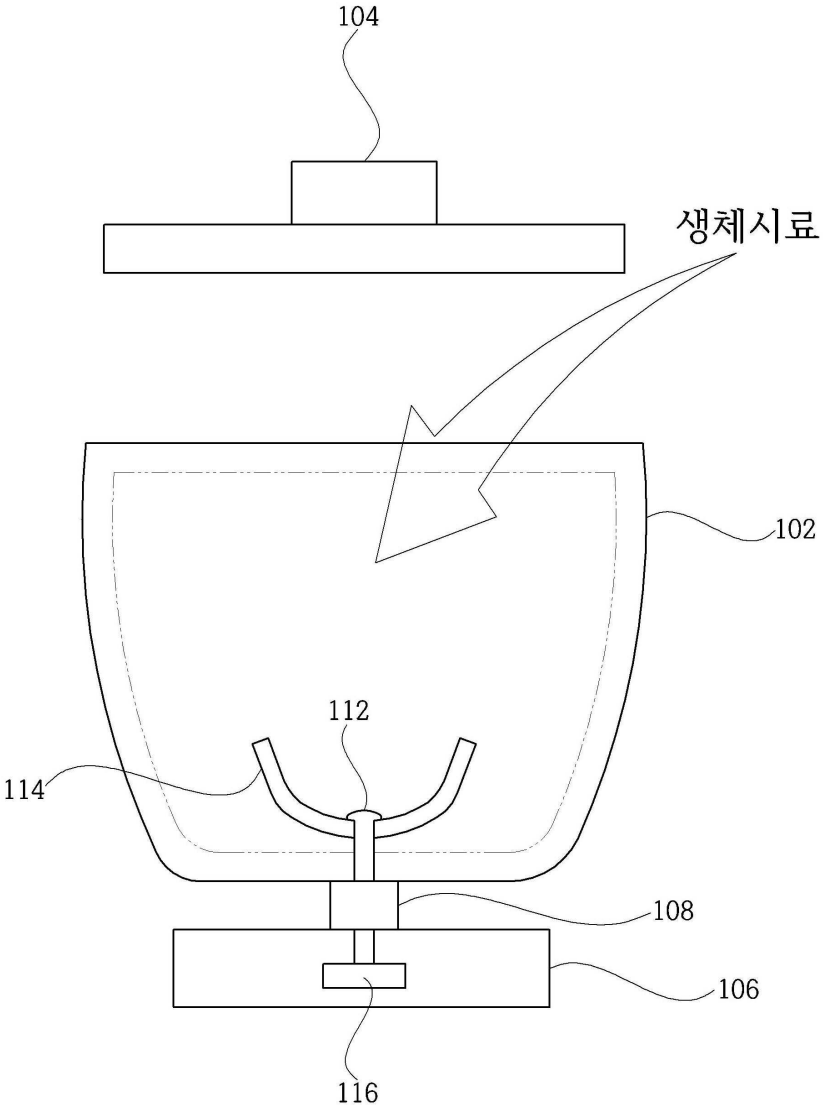
도면4


시작
생체시료 준비
S202
생체시료를 블레이드 챔버에 투입
S204
블레이드 챔버에 자성비드 투입
S206
블레이드 회전
S208
비드와 핵산의 분리
S210
종료

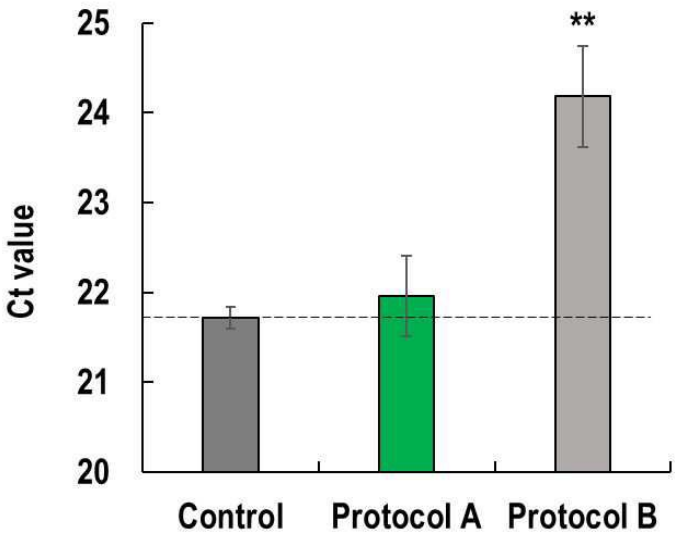
도면5



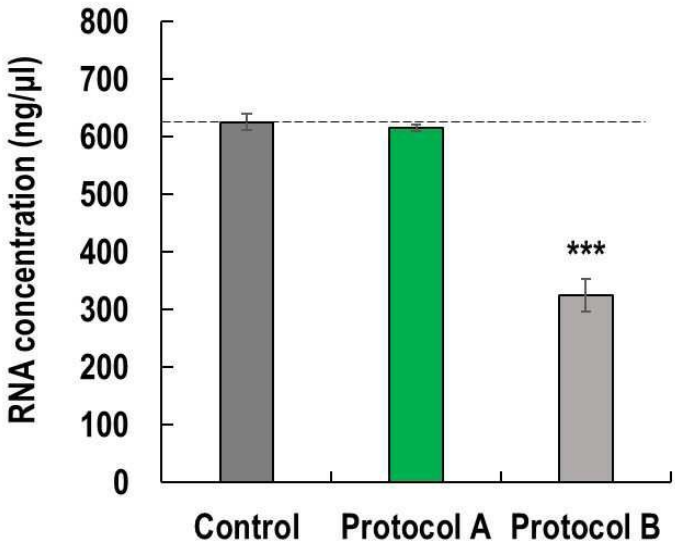
도면6



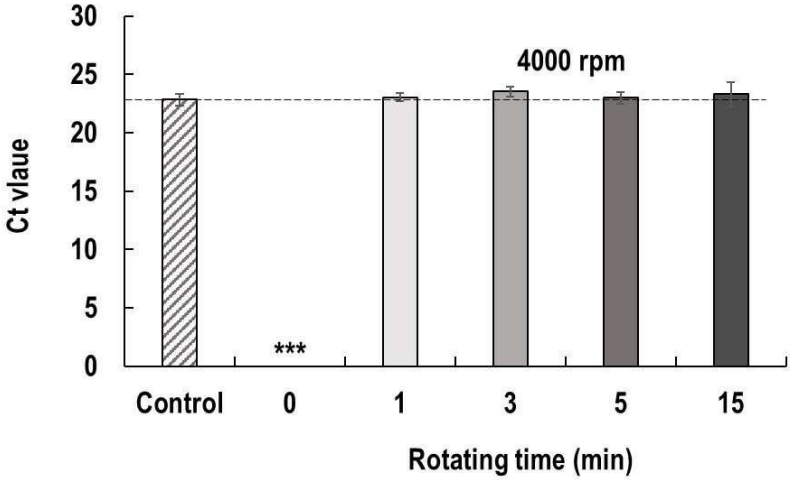
도면7


25
24
23
22
21
20
Ct value
**
Control
Protocol A
Protocol B

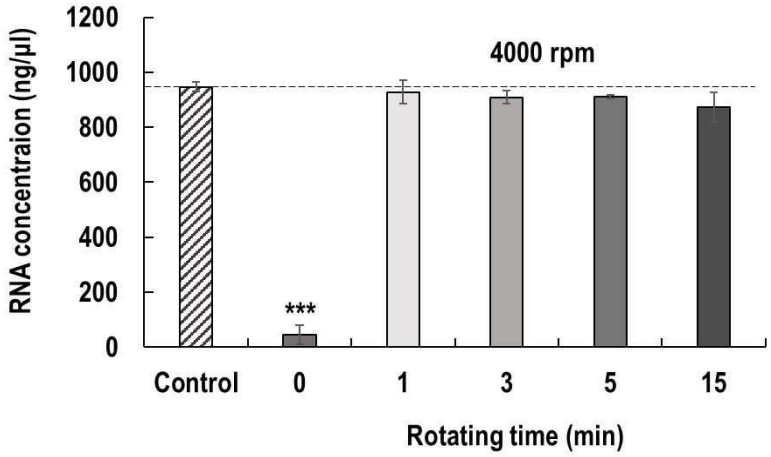
도면8


800
700
600
500
400
300
200
100
0
RNA concentration (ng/μl)
***
Control
Protocol A
Protocol B

도면9



도면10



도면11

