

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 8월 31일 (31.08.2017)

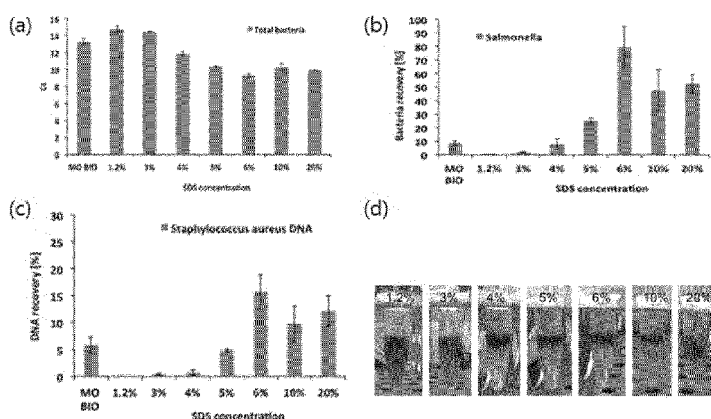


(10) 국제공개번호
WO 2017/146532 A1

- (51) 국제특허분류: C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)
 - (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/002088
 - (22) 국제출원일: 2017년 2월 24일 (24.02.2017)
 - (25) 출원언어: 한국어
 - (26) 공개언어: 한국어
 - (30) 우선권정보: 10-2016-0023251 2016년 2월 26일 (26.02.2016) KR
10-2017-0023193 2017년 2월 21일 (21.02.2017) KR
 - (71) 출원인: 중앙대학교 산학협력단 (CHUNG-ANG UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06974 서울시 동작구 흑석로 84, Seoul (KR).
 - (72) 발명자: 민준홍 (MIN, Jun Hong); 13463 경기도 성남시 분당구 산운로 48번길 13, Gyeonggi-do (KR). 백창윤 (BAEK, Chang Yoon); 06058 서울시 강남구 학동로 43길 37, 301호, Seoul (KR).
 - (74) 대리인: 특허법인 피씨알 (PCR INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06194 서울시 강남구 선릉로 90길 70 인텔빌딩 6층, 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 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD FOR EXTRACTING NUCLEIC ACIDS FROM BIOLOGICAL SAMPLE

(54) 발명의 명칭: 생물학적 시료로부터 핵산 추출 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for extracting nucleic acids from a biological sample, wherein the extraction method presents a novel method for effectively extracting nucleic acids. When nucleic acids are extracted from conventional biological samples, the purification rate is low since various impurities present in the biological samples have not been properly removed. However, according to the present invention, provided is a method for extracting nucleic acids from a biological sample of which the recovery rates of bacteria and nucleic acids are enhanced, by adding a surfactant and a sodium sulfate (Na₂SO₄) solution in a biological sample disruption step and a purification step, thereby enabling pathogens to be detected with greater sensitivity and accuracy.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2017/146532 A1

본 발명은 생물학적 시료로부터 핵산을 추출하는 방법에 관한 것으로서, 상기 추출 방법은 효율적으로 핵산을 추출하기 위한 새로운 방법을 제시한다. 종래 생물학적 시료로부터 핵산을 추출할 경우, 생물학적 시료에 존재하는 다양한 불순물을 제대로 제거하지 못하여 정제율이 낮았으나, 본 발명에 의하면 생물학적 시료를 파쇄하는 단계 및 정제하는 단계에서 계면활성제 및 황산나트륨(Na_2SO_4) 용액을 첨가함으로써, 박테리아 회수율 및 핵산 회수율이 향상된 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법을 제공하여, 보다 민감하고 정확하게 병원균을 검출할 수 있도록 한다.

명세서

발명의 명칭: 생물학적 시료로부터 핵산 추출 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 기존의 상업적인 생물학적 시료를 이용한 핵산 추출방법과 차별화되는 방법으로 복잡한 환경 및 생물학적 시료로부터 불순물을 효과적으로 제거하여 핵산 회수율을 향상시킨 핵산 추출 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 최근 선택적배지 방법(selective media method), 특정 항체 또는 항원을 이용한 특이적 반응법, 또는 핵산 증폭법과 같은 방법과 같이 민감하고 정확하게 병원균을 검출하는 다양한 방법이 개발되어 왔다. 상기 방법들의 검출 한계점은 나노 파티클(Nano particle), 효소(Enzyme), 화학발광시약(chemiluminescent reagent), 또는 리포솜 (Liposome)과 같은 몇몇의 생물학적 또는 화학적 재료들을 이용한 검출 신호 증폭의 도입에 의하여 급격하게 발전되어왔으며, 이 중에서 몇몇 개의 방법은 이미 상업화 되고 있다.
- [4] 그러나 샘플 전처리 과정(농축, 정제)은 계속 긴 시간을 필요로 하기 때문에, 여전히 시료로부터의 병원균 검출 방법에서 신호 증폭법의 개발과 검출 시간의 단축은 중요한 발전 과제로 남아있다.
- [5] 항체를 이용한 검사법 또는 효소반응과 같은 생물학적 검출 방법은 시료의 복잡한 성분들 때문에 전처리 과정 없이 이루어지기 어려우며, 게다가 이러한 농축 프로세스는 노로바이러스(Norovirus)와 같이 배양이 불가능한 타겟의 경우 적용하기 어렵다.
- [6] 식수와 과일, 야채와 같은 간단한 음식 샘플에 내재되어 있는 병원균의 물리적, 화학적 또는 생물학적 농축 방법은 원심분리법, 폴리에틸렌글리콜 (polyethylene glycol; PEG)을 이용한 퇴적법, 전하를 띤 필터를 이용한 농축법, NaCl을 이용한 이온세기 증가를 통한 흡착법, 2가 양이온(Ca^{2+} , Mg^{2+})을 이용한 농축법 및 항체를 이용한 분리법과 같이 다양하게 개발되고 있다.
- [7] 그러나 현장에서 박테리아 또는 바이러스를 빠르고 생산성 있게 검출하기 위해서는 긴 전처리 시간의 단축과 저농도에서의 검출 효율 증가라는 두 가지 중요한 문제점이 남아있다. 따라서, 과학적으로나 상업적으로 간단하게 병원균을 농축 및 파괴하는 방법이 지속적으로 요구되고 있다.
- [8] 생물학적 시료가 변인 경우, 기존의 상업화된 공정은 변 시료를 분리하는 과정에서 변을 침전시켜 핵산과 분리하는 방법을 많이 사용하고 있다. 예를 들면, MoBio Laboratories Inc.(Carlsbad, USA)에서는 알루미늄(Aluminum)과 같은 3가 양이온을 이용하여 불순물을 응집(flocculation) 시키는데, 붓

테크놀러지(Boom technology)를 이용하여 DNA를 농축/정제하는데 있어 중요 특징은 Al^{3+} , NH_4^+ 를 이용하여 침전시키는 방법 등에 있으며, 변 또는 흡과 같은 복잡한 시료에 매우 효과적이며 현존하는 기술 중 가장 높은 효율을 보이고 있으나, 회수율이 1% 미만에 그친다. 퀴아젠(Qiagen, Hilden, Germany)에서는 탄수화물계 흡착 매트릭스(Carbohydrate based adsorptive matrix)를 사용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 저해하는 물질을 흡착시켜 제거하는데, 이는 변 시료와 같은 복잡한 시료를 정제하는데 매우 효과적이지만, 회수율이 0.1% 미만이다. 또한, Zymo Research Corp.(Irvine, USA)에서는 $500\mu m$ 비드를 이용하여 물리적인 힘을 가함으로써 변 내에 존재하는 핵산을 추출하는 방법을 제안하고 있으나, 변 시료에 존재하는 다양한 불순물을 제거하지 못하여 정제율이 낮다는 한계점을 가지고 있다.

[9] 따라서, 상기 변과 같은 복잡한 시료에 존재하는 다양한 불순물을 제거하여 핵산 추출률을 높일 수 있는 방법에 대한 개발이 필요한 실정이다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명은 생물학적 시료로부터 효과적으로 핵산을 추출하기 위하여 계면활성제 및 코스모트로픽 염(Kosmotropic salt)을 사용함으로써, 박테리아 및 핵산 회수율을 향상시킬 수 있는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법을 제공한다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 본 발명의 일 양상은 (a) 생물학적 시료에 완충용액(buffer solution); 계면활성제; 및 비드(bead)를 첨가하여 제조된 생물학적 시료-비드 용액을 비드 비팅(bead beating)을 통하여 생물학적 시료를 파쇄하는 단계; (b) 상기 파쇄된 생물학적 시료-비드 용액을 분리하는 단계; (c) 상기 정제된 용액에 코스모트로픽 염(Kosmotropic salt) 용액을 첨가하여 재정제하는 단계; 및 (d) 상기 재정제된 용액으로부터 핵산을 추출하는 단계를 포함하는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법을 제공한다.

[14] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 계면활성제는 음이온성 계면활성제일 수 있다.

[15] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 계면활성제는 상기 생물학적 시료의 총중량을 기준으로 1 내지 20%(v/v)일 수 있다.

[16] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 (a)는 상기 생물학적 시료-비드 용액을 10 내지 80Hz 조건으로 비드 비팅하여 생물학적 시료를 파쇄하는 것일 수 있다.

[17] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 정제는 원심분리 또는 여과를 통하여

수행되는 것일 수 있다.

- [18] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 재정제는 원심분리 또는 열 처리를 통하여 수행되는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 열 처리는 50 내지 90°C에서 수행될 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 코스모트로픽 염 용액은 황산나트륨(Na_2SO_4) 용액인 것일 수 있다.
- [20] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 코스모트로픽 염 용액은 1.0 내지 5.0M의 용액일 수 있다.
- [21] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 변, 혈액 및 흙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.
- [22] 본 발명의 일 양상은 (a) 생물학적 시료에 완충용액; 계면활성제; 및 비드를 첨가하여 제조된 생물학적 시료-비드 용액을 비드 비팅함으로써 생물학적 시료를 파쇄하는 단계; (b) 상기 생물학적 시료가 파쇄된 생물학적 시료-비드 용액을 원심분리하여 정제하는 단계; (c) 상기 정제된 용액에 코스모트로픽 염 용액을 첨가하고 원심분리하여 재정제하는 단계; 및 (d) 상기 재정제된 용액으로부터 핵산을 추출하는 단계를 포함하는, 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법을 제공한다.
- [23] 본 발명의 또다른 일 양상은 (a) 생물학적 시료에 완충용액; 계면활성제; 및 비드를 첨가하여 제조된 생물학적 시료-비드 용액을 비드 비팅함으로써 생물학적 시료를 파쇄하는 단계; (b) 상기 생물학적 시료가 파쇄된 생물학적 시료-비드 용액을 여과하여 정제하는 단계; (c) 상기 정제된 용액에 코스모트로픽 염 용액을 첨가하여 고 열처리하여 재정제하는 단계; 및 (d) 상기 재정제된 용액으로부터 핵산을 추출하는 단계를 포함하는, 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법을 제공한다.

[24]

발명의 효과

- [25] 본 발명에 따르면, 생물학적 시료를 파쇄하는 단계 및 정제하는 단계에서 각각 계면활성제 및 코스모트로픽 염용액을 첨가함으로써, 시료 중의 불순물을 효과적으로 제거하여 박테리아 및 핵산 회수율이 향상되고, 이로써 보다 민감하고 정확하게 병원균을 검출할 수 있게 하는 효과를 나타낸다.

[26]

도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 계면활성제 농도에 따른 전체 박테리아 회수, 박테리아 회수율, 핵산 회수율, 및 변 분리를 나타낸다.
- [28] 도 2는 황산나트륨(Na_2SO_4) 농도에 따른 전체 박테리아 회수, 및 변 분리를 나타낸다.
- [29] 도 3은 열처리에 따른 전체 박테리아 회수, 박테리아 회수율, 및 핵산 회수율을

나타낸다.

- [30] 도 4는 원심분리 세기에 따른 전체 박테리아 회수, 박테리아 회수율, 핵산 회수율, 및 변 분리를 나타낸다.
- [31] 도 5는 변 시료 종류에 따른 전체 박테리아 회수, 박테리아 회수율, 및 핵산 회수율을 나타낸다.
- [32] 도 6은 변 시료 양에 따른 개(상단) 및 인간(하단) 변 시료의 분리 및 정제 결과를 나타낸다.
- [33] 도 7은 시료 양에 따른 인간 혈액 시료의 분리 및 정제 결과(a) 및 본 발명 및 시판 키트(퀴아젠(Qiagen)사)에 따른 바이러스 회수율 및 그람 양성 박테리아의 회수율(b)을 나타낸다.
- [34] 도 8은 흙 시료의 분리 및 정제 결과(a) 및 흙 시료에서의 그람 양성 박테리아의 회수율(b)을 나타낸다.
- [35] 도 9는 다양한 비드 크기에 따른 변 시료로부터 핵산 추출물(a), 및 다양한 비드 크기에 따른 스타필로코커스 아우레우스 핵산 회수율(b)을 나타낸다.
- [36] 도 10은 여과 및 원심분리를 이용한 변 시료 분리 및 정제 결과를 나타낸다.
- [37] 도 11은 열처리를 통하여 변 시료(a) 및 혈액 시료(b)를 재정제한 결과 및 변 시료에서의 핵산 회수율(c)을 나타낸다.
- [38] 도 12는 정제 단계를 여과를 통하여, 재정제 단계를 열처리를 통하여 수행한, 비원심분리 방법을 이용한 변 시료 분리 및 정제 결과를 나타낸다.

[39]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [40] 본 발명의 일 양상은 (a) 생물학적 시료에 완충용액(buffer solution); 계면활성제; 및 비드(bead)를 첨가하여 제조된 생물학적 시료-비드 용액을 비드 비팅(bead beating)을 통하여 생물학적 시료를 파쇄하는 단계; (b) 상기 파쇄된 생물학적 시료-비드 용액을 분리하는 단계; (c) 상기 정제된 용액에 코스모트로픽 염(Kosmotropic salt) 용액을 첨가하여 재정제하는 단계; 및 (d) 상기 재정제된 용액으로부터 핵산을 추출하는 단계를 포함하는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법을 제공한다.

[41]

발명의 실시를 위한 형태

- [42] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [43] 본 발명의 발명자들은 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법을 연구 개발하던 중, 생물학적 시료를 파쇄하는 단계 및 정제하는 단계에서 각각 계면활성제 및 코스모트로픽 염을 첨가하는 경우, 불순물을 침전시키는 대신 상부로 띄움으로써 전체 박테리아 회수, 박테리아 회수율 및 핵산 회수율이 향상되어 보다 민감하고 정확하게 병원균을 검출할 수 있음을 밝혀내었는바, 이에 본 발명을 완성하였다.

- [44] 본 발명의 일 양상은 (a) 생물학적 시료에 완충용액; 계면활성제; 및 비드를 첨가하여 제조된 생물학적 시료-비드 용액을 비드 비팅함으로써 생물학적 시료를 파쇄하는 단계; (b) 상기 생물학적 시료가 파쇄된 생물학적 시료-비드 용액을 정제하는 단계; (c) 상기 정제된 용액에 코스모트로픽 염 용액을 첨가하여 재정제하는 단계; 및 (d) 상기 재정제된 용액으로부터 핵산을 추출하는 단계를 포함하는, 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법을 제공한다.
- [45] 본 명세서에 사용되는 용어 "생물학적 시료"는 생물로부터 수득가능한 시료뿐만 아니라, 핵산을 함유할 소지가 있는 모든 시료를 지칭한다. 구체적으로는 인간 및 동물의 혈액, 식물의 체액, 인간 및 동물의 배설물, 미생물 배양액, 세포 배양액, 바이러스 배양액, 생검 배양액, 흙, 공기 등을 포함하며, 바람직하게는 변, 혈액, 흙을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [46] 본 명세서에서 사용되는 용어 "완충용액"은 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 그 예로 트리스 완충용액, 인산나트륨(Sodium phosphate) 완충용액 또는 인산칼륨(Potassium phosphate) 완충용액일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 트리스-염산(tris-HCl) 용액이며, 보다 바람직하게는 5 내지 15 mM의 트리스-염산용액이다.
- [47] 본 명세서에서 사용되는 용어 "계면활성제"는 음이온성, 양이온성, 양쪽성 또는 비이온성 계면활성제일 수 있으나, 음이온성 계면활성제인 것이 보다 바람직하다. 음이온성 계면활성제는, 예를 들어, 소듐 도데실 설페이트(SDS), 소듐 옥틸벤젠 설포네이트(NaOBS), 소듐 도데실 벤젠 설포네이트(SDBS), 소듐 도데실 설포네이트(SDSA), 소듐 도데실 벤젠 설포네이트, 소듐 부틸벤조에이트(NaBBS), 암모늄 라우릴 설페이트, 소듐 테옥시콜레이트, 소듐 라우릴 에테르 설페이트 (SLES), 소듐 미레쓰 설페이트(SMES), 디옥틸 나트륨 설포석시네이트, 퍼플루오로옥탄설포네이트(PFOS), 퍼플루오로부탄설포네이트, 소듐 스테아레이트, 소듐 라우로일 사르코시네이트, 퍼플루오로노나노에이트 및 퍼플루오로옥타네이트(PFOA 또는 PFO) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 소듐 도데실 설페이트이다. 본 발명에서 계면활성제를 첨가하는 이유는 시료 내 타겟 물질 파괴 효과를 증대시킬 수 있으며 불순물에 의한 핵산 분리 저해를 방지하기 위함이다. 본 발명에서 상기 계면활성제는 생물학적 시료의 총중량을 기준으로 1 내지 20%(v/v)일 수 있는데, 1% 미만이거나 20% 초과인 경우에는 핵산 회수율이 저해될 수 있다.
- [48] 본 명세서에서 사용되는 용어 "비드 비팅"은 시료 중의 고체 물질을 물리적인 힘으로 파쇄하는 방법으로서, 비드가 포함된 시료 용액을 손으로 흔들거나 자동진동기를 이용하여 수행한다. 본 발명에서는 자동진동 방법으로 비드를 진동시키는 방법을 사용하였다. 상기 "비드"의 소재는 제한이 없으나, 바람직하게는 글라스 비드가 사용될 수 있다. 상기 비드의 직경은 0.03 내지 2mm,

바람직하게는 0.1mm 내지 0.5mm 크기의 비드 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 시료 용액 중에 포함되는 비드의 양은 10 내지 200mg이 바람직하며, 보다 바람직하게는 생물학적 시료-비드 용액의 1 내지 25중량%일 수 있다. 본 발명에서 있어서, 생물학적 시료-비드 용액을 10 내지 80Hz 조건으로 비드 비팅을 통하여 생물학적 시료를 파쇄할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 비드 비팅은 3 내지 10분 동안 수행되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [49] 본 명세서에서의 정제 단계는 입자의 크기가 큰 불순물을 헥산이 포함된 액상 물질로부터 1차적으로 분리하는 과정을 의미하며, 이는 원심분리 또는 여과를 통하여 수행될 수 있다. 원심분리를 통하여 정제하는 경우, 바람직하게는, 상기 파쇄된 생물학적 시료-비드 용액을 6000 내지 9000rpm에서 30 내지 90초 동안 원심분리하여 그 상층액만을 고체 불순물로부터 분리할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [50] 본 명세서의 재정제 단계는 상기 정제된 용액에 코스모트로픽 염 용액을 첨가함으로써 입자의 크기가 작은 불순물을 헥산이 포함된 액상 물질의 상부로 띄움으로써 2차적으로 분리하는 과정을 의미하며, 이는 원심분리 또는 열처리를 통하여 수행될 수 있다.
- [51] 본 명세서에서 사용되는 용어 "코스모트로픽 염"은 SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , OH^- , F^- , HCOO^- , CH_3COO^- 또는 Cl^- 와 양이온으로 이루어진 염을 의미한다. 다만, 상기 양이온으로서 Mg^{2+} 는 상기 코스모트로픽 음이온과 결합하는 경우, 예외적으로 코스모트로픽 특성을 가지지 않으므로, Mg^{2+} 는 제외한다. 상기 양이온은 NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Ca^{2+} 또는 Ba^{2+} 일 수 있다. 상기 코스모트로픽 염은 바람직하게는, 황산나트륨(Na_2SO_4), 염화나트륨(NaCl), 황산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 아세트산나트륨(NaOAc)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 황산나트륨이 가장 바람직하다. 상기 황산나트륨 용액의 농도는 1.0 내지 5.0M인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 코스모트로픽 염 용액을 첨가하는 이유는 헥산과 불순물을 분리하기 위함이다. 코스모트로픽 염 용액을 첨가한 후, 이 혼합물을 원심분리 또는 열처리함으로써 상부로 분리되는 불순물을 한 번 더 제거할 수 있다. 상기 원심분리는 6000 내지 9000rpm에서 30 내지 90초 동안 원심분리함으로써 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 열처리는 50 내지 90°C에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [52] 본 명세서에서 사용되는 용어 "헥산 추출"은 당업계에 공지된 방법에 의하여 수행될 수 있으며, 구체적으로는 문헌[미국 특허등록 제5234809호]을 참조한다.
- [53] 상기 정제 단계와 재정제 단계는 상기 개시된 방법을 임의로 선택함으로써 수행할 수 있다. 바람직하게는 i) 정제 단계와 재정제 단계를 모두 원심분리를 통하여 수행할 수 있으며, 또는 ii) 정제 단계는 여과를 통하여 수행하고 재정제 단계는 열처리를 통하여 수행할 수 있다. 특히, i)의 방법은 키트화 방식에 ii)의

방법을 이용하는 경우에는 기기자동화 방식에 적용하기에 적합하다.

[54]

[55] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[56]

[57] 실시예 1. 변 시료의 분리 및 정제

[58] 변 시료 200mg에 완충용액으로서 10mM의 트리스-염산(pH 8 이상) 400 μ l 및 계면활성제인 소듐 도데실 설페이트(SDS, AMRESCO) 완충용액 부피 기준의 농도가 6%(v/v)가 되도록 첨가하고, 변 시료 및 검측대상 파쇄를 위하여 100 μ m 유리 비드 0.4g(대한과학)을 투입한 후, 50Hz의 조건에서 5분 동안 비드 비팅(Scientific Industries)을 수행하였다. 이후, 8,000rpm에서 1분 동안 원심분리(LABOGENE)하여 상층액을 옮겨 담고, 분리된 상층액에 2.5M의 황산나트륨(Na_2SO_4 , Sigma-Aldrich) 용액을 첨가하여 고루 혼합되도록 교반시킨 후, 다시 8,000rpm에서 1분 동안 원심분리하였다. 1분 후, 액체 상단에 불순물이 띄워지면 하단의 용액만을 새로운 튜브에 옮겼다. 옮겨진 용액은 붐 테크놀로지(Boom technology)를 이용하여 핵산을 추출하였다(문헌[US005234809A] 참고).

[59]

[60] 실시예 2. 계면활성제 농도에 따른 변 시료로부터의 박테리아 및 핵산의 회수율 확인

[61] 2.1. 계면활성제의 농도를 달리하여 변 시료를 분리 및 정제

[62] 변 시료에서 SDS 농도에 따른 박테리아 및 핵산의 회수율을 확인하기 위하여, 변 시료 200mg에 10⁶cfu/ml의 농도로 준비된 살모넬라(salmonella, ATCC) 또는 10⁶ cfu/ml의 농도에서 추출한 황색포도상구균(staphylococcus aureus, ATCC)의 DNA를 추가하고, SDS를 완충용액 부피를 기준의 각 농도가 1.2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 10%, 20%가 되도록 첨가하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 같은 전체 공정을 수행하였다(도 1의 (d) 참조).

[63]

[64] 2.2. 분리된 시료로부터 전체 박테리아 양, 박테리아 회수율, 핵산 회수율의 측정

[65] 핵산 추출은 붐 테크놀로지를 이용하였고 핵산을 추출하였고, 분리된 핵산은 전체 박테리아 양을 측정하기 위해서 유니버설 박테리아 프라이머(Universal Bacteria primer)를 이용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행하여 그 양을 비교하였고, 박테리아 및 핵산 회수율은((추출된 박테리아 또는 핵산의 농도)/(초기 첨가된 박테리아 또는 핵산의 농도)*100(%))을 이용하여 계산하였다.

[66]

실험 결과, SDS가 6%의 농도로 첨가된 경우에 있어 전체 박테리아 양 측정(도 1의 (a) 참조), 박테리아 회수율(도 1의 (b) 참조), 핵산 회수율(도 1의 (c) 참조)이

가장 우수한 효과를 나타내었다. 또한 변 시료 추출에 있어 가장 많이 사용되는 MO BIO사에서 판매하는 키트와 비교했을 때에도 전체 완충용액 부피 기준의 6%의 SDS를 사용하였을 때 가장 회수율이 높게 측정되는 것을 확인하였다.

[67]

[68] 실시예 3. 황산나트륨 용액의 농도에 따른 변 시료로부터의 박테리아 회수량 확인

[69] **3.1. 황산나트륨 용액의 농도를 달리하여 변 시료를 분리 및 정제**

[70] 효과적으로 변 시료를 분리하면서 핵산을 추출할 수 있는 황산나트륨(Na_2SO_4) 용액의 농도를 확인하기 위하여, 황산나트륨 용액의 농도별(0.25M(0.1X), 1.25M(0.5X), 및 2.5M(1X))로 달리하여 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 같은 전체 공정을 수행하였다(도 2의 (b) 참조).

[71]

[72] **3.2. 분리된 시료로부터 전체 박테리아 양의 측정**

[73] 상기 실시예 2.2.에 기재된 방법으로 전체 박테리아 회수량을 측정한 결과, 2.5M(최종 농도 0.7M)의 황산나트륨 용액을 사용한 경우의 전체 박테리아 회수량이 가장 높게 나타났으며(도 2의 (a) 참조), 2.5M의 경우에만 변 시료가 용액 상단으로 뜨는 결과를 나타내었다(도 2의 (b) 참조).

[74]

[75] **실시예 4. 열처리에 따른 핵산 추출량의 확인**

[76] 정제 단계 전 변 시료에 열처리가 필요한지 여부를 확인하기 위하여 (뚜껑이 저절로 열리지 않는) 40°C의 조건에서 시간별(처리하지 않음, 5분, 10분 및 20분)로 열처리를 수행하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1 및 2와 같은 전체 공정을 수행하여 핵산 추출량을 확인하였다.

[77]

실험 결과, 현재 변을 분리 하는 과정에서 변 시료를 열처리를 하여 핵산 추출을 수행하는 상업화된 키트 중 퀴아젠사의 키트와 달리, 변 시료에 열처리를 하지 않는 것(O분)이 핵산 추출량, 박테리아 회수율 및 DNA 회수율이 높게 측정되는 것을 확인하였다(도 3의 (a) 내지 (c) 참조).

[78]

[79] **실시예 5. 원심분리 세기에 따른 핵산 추출량의 확인**

[80] 변 시료를 분리하기 위한 효과적인 원심분리 세기를 확인하기 위하여, 원심분리를 수행하는 세기를 2,000rpm, 4,000rpm, 6,000rpm 및 8,000rpm의 조건으로 달리하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1 및 2와 같은 전체 공정을 수행하였다.

[81]

실험 결과, 원심 분리의 세기를 8,000rpm의 조건으로 원심분리를 수행할 경우, Ct(Threshold of Cycle) 값이 가장 낮게 나타났으며(도 4의 (a)참조), 가장 많은 양의 핵산이 존재함을 확인하였다.

[82]

[83] **실시예 6. 대상 시료의 종류에 따른 박테리아 및 핵산 회수율의 확인**

- [84] 개의 변과 인간의 변에 따른 박테리아 및 핵산의 회수율을 확인하기 위하여, 각 시료에 대하여 상기 실시예 1 및 2와 동일한 실험을 수행하는 한편, 시료의 종류에 상관 없이 가장 많이 사용되는 MO BIO사의 키트로 동일한 결과 내용을 측정하였다.
- [85] 실험 결과, MO BIO사의 키트와 비교했을 때, 전체 박테리아 회수량, 박테리아 회수율 및 핵산 회수율 부분에서 모두 우수한 성능을 나타내는 것을 확인하였다.
- [86]
- [87] **실시예 7. 시료의 양에 따른 박테리아 및 핵산 회수율의 확인**
- [88] 현재 상업화된 키트는 약 200 내지 250mg의 시료를 사용하도록 요구하고 있으나, 보다 적은 양의 시료에서도 핵산 추출이 가능함을 확인하기 위하여, 개와 인간의 변 2종의 시료의 양을 달리하는 것, 즉, 10mg(변 10mg + 증류수 190 μ l), 20mg(변 20mg + 증류수 180 μ l), 50mg(변 50mg + 증류수 150 μ l), 100mg(변 100mg + 증류수 100 μ l), 150mg(변 150mg + 증류수 50 μ l), 200mg(변 200mg) 및 250mg(변 250mg)의 시료를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1 및 2와 같은 전체 공정을 수행하여, 전체 박테리아 회수량, 박테리아 회수율 및 핵산 회수율을 비교하였다.
- [89] 실험 결과, 개의 변 시료는 50mg 이상, 인간의 변 시료는 100mg 이상이 포함된 경우 불순물 분리가 가능하였으며, 이는 모두 기존에 판매되고 있는 상업 키트가 요구하는 시료인 양보다 현저히 적은 시료의 양만으로 핵산의 검출이 가능함을 나타내고, 변의 양에 상관 없이 모두 우수한 성능을 나타내는 것을 확인하였다(도 6 참조).
- [90]
- [91] **실시예 8. 혈액 시료의 분리 및 정제 관찰**
- [92] 상기 변 시료의 분리에 이용되었던 방법을 복잡한 시료 중의 하나인 혈액(전혈) 시료에도 적용하여 불순물 제거를 확인하였다. 상업화된 키트에서 권장하는 혈액 시료의 양은 200 μ l이기 때문에, 시료의 부피를 200 μ l를 기준으로 하여 실험을 진행하였다.
- [93] 인간의 전혈을 이용하여, 각각 20 μ l(전혈 20 μ l + 증류수 180 μ l), 50 μ l(전혈 50 μ l + 증류수 150 μ l), 100 μ l(전혈 100 μ l + 증류수 100 μ l) 및 200 μ l(전혈 200 μ l)을 준비하였다. 상기 준비된 시료를 상기 실시예 1에 기재된 방법으로 불순물을 분리 및 정제하였다. 실험 결과, 전혈이 100 μ l 이상 포함된 시료에서 불순물이 분리 및 정제되는 것을 확인하였다(도 7의 (a) 참조).
- [94] 혈액 100 μ l 시료를 이용하여 상기 실시예 2에 기재된 방법을 이용하여 핵산 회수율을 확인하였다. 실험 결과, 아데노바이러스는 퀴아젠 사의 DNA 미니 키트 대비 70%의 회수율을 보였고, 그람 양성 박테리아의 경우에는 퀴아젠 사의 DNA 미니 키트를 기준으로 약 40배의 회수율을 나타내었다(도 7의 (b) 참조).
- [95]
- [96] **실시예 9. 흙 시료의 분리 및 정제 관찰**

- [97] 상기 변 시료의 분리에 이용되었던 방법을 또다른 복잡한 시료 중의 하나인 흙 시료에도 적용하여 불순물 제거를 확인하였다. 먼저, 각기 다른 장소에서 채취한 2종의 흙 시료 250mg에 증류수를 100 μ l 첨가한 시료를 준비하고, 상기 실시예 1에 기재된 방법으로 불순물을 분리 및 정제하였다. 실험 결과, 2종의 흙 모두에서 불순물의 분리 및 정제가 수행되었음을 확인하였다(도 8의 (a) 참조).
- [98] 흙 250mg 시료를 이용하여 상기 실시예 2에 기재된 방법을 이용하여 핵산 회수율을 확인하였다. 실험 결과, 2종의 흙 시료 모두에서 그람 양성 박테리아 중 하나인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대하여 MO BIO사의 키트를 기준으로 약 2배의 회수율을 나타내었다(도 8의 (b) 참조).
- [99]
- [100] 실시예 10. 비드 크기에 따른 변 시료로부터 핵산 추출 확인
- [101] 유리 비드를 이용한 변 시료 파쇄 단계에서 다양한 비드 크기에 따른 변 시료로부터 핵산 추출율을 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- [102] 직경 2mm, 0.5mm 및 0.1mm의 비드와 이들 비드의 2mm + 0.5mm, 2mm + 0.1mm, 0.5mm + 0.1mm 혼합물을 각각 동량 첨가하고, 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)를 동일한 농도로 넣은 변을 파쇄한 뒤 변에 존재하는 핵산 추출율과 스태필로코커스 아우레우스 핵산 회수율을 확인하였다(도 9 참조).
- [103] 실험 결과, 직경 2mm의 비드에서는 변의 파쇄가 부분적으로 잘 수행되지 않은 것을 확인할 수 있었고 이는 핵산 추출율에서도 다른 크기의 비드에 비해 낮은 효율을 보였다. 따라서, 핵산 회수 효율이 우수한 비드의 크기는 직경 0.1mm 내지 0.5mm 크기의 비드 또는 이들의 혼합물임을 확인하였다.
- [104]
- [105] 실시예 11. 여과 및 열처리에 의한 핵산 추출 확인
- [106] 11.1. 여과에 의한 시료의 정제
- [107] 기존 복잡시료를 분리하는 방법에서, 변 시료 및 복잡시료를 파쇄한 후 이루어지는 원심분리를 이용한 첫번째 정제 과정을 비원심분리 방법을 이용하여 정제할 수 있다. 첫 번째 정제과정이 여과로 대체될 수 있는지를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- [108] 상기 실시예 1에서 원심분리 대신 여과를 사용하는 방법을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다. 실시예 1에 기재한 방법으로 변 시료 및 복잡시료 대상을 파쇄한 후, 비드 및 큰 불순물이 빠져 나가지 않는 틈이 있는 물체를 통과시켜 1차 정제된 용액을 수득하였다. 상기 정제된 용액을 기존의 원심분리를 이용하여 재정제를 과정을 거치고, 재정제된 용액으로부터 핵산 회수를 수행하였다.
- [109] 3가지 다른 모양 및 형태를 가진 종류의 변 시료를 이용하여 실험한 결과, 핵산 회수율에서 원심분리 방법에 비해 유의한 차이를 나타나지 않았으므로, 대체 가능한 공정임을 확인하였다(도 10 참조).

[110]

[111] **11.2. 열에 의한 시료의 재정제**

[112] 상기 복잡시료를 분리하는 방법에는 원심분리를 이용하여 재정제하지만, 원심분리를 이용하지 않고 열처리를 함으로써 불순물을 재정제하였다.

[113] 변 시료 200mg을 pH가 8 이상인 완충제와 6%(v/v)의 계면활성제 SDS와 변시료 파괴 및 검측대상 파괴를 위한 70 내지 100 μ m의 유리 비드 0.4g를 튜브에 넣고 5분 동안 비드 비팅을 수행하였다. 이후 원심분리를 이용하여 큰 불순물과 유리 비드를 제외한 용액을 새로운 튜브에 옮겨 담고, 2.5M의 Na₂SO₄ 용액을 첨가하여 열처리를 각각 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C 및 95°C에서 5분 또는 10분 동안 수행한 후, 원심분리를 이용하여 재정제한 결과와 비교 관찰하였다. 또한, 상기 온도들로 10분 동안 처리한 변 시료에 PCR을 수행하여 핵산 추출 농도(Total bacteria)를 측정하여 원심분리에 의한 시료와 비교하였다.

[114] 실험 결과, 다양한 온도의 조건에서도 변의 분리가 성공적으로 이루어지는 것을 확인할 수 있었으며, 그 차이는 원심분리에 의한 것과 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 11의 (a) 참조). 동일한 방법을 혈액 시료에도 적용한 결과 원심분리 대신 열처리에 의해 불순물이 성공적으로 분리되는 것을 확인하였다(도 11의 (b) 참조). 또한, 변 시료에 대하여 PCR을 수행한 결과, 온도에 영향 없이 모든 온도에서 원심분리와 유사한 Ct 값을 나타냄을 확인하였다(도 11의 (c) 참조).

[115]

[116] **11.3. 여과 및 열처리에 의한 변 시료의 분리 및 정제**

[117] 3가지 다른 모양 및 형태를 가진 변에 대하여, 상기 실시예 1에서 1차 원심분리 대신 여과를, 2차 원심분리 대신 열처리를 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

[118] 실험 결과, 정제 및 재정제 단계를 모두 원심분리를 사용한 것과 유사한 결과를 나타냄을 확인하였으며, 따라서 비 원심분리를 이용한 복잡 시료 분리 및 정제가 가능함을 확인하였다(도 12 참조).

[119]

[120] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 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.

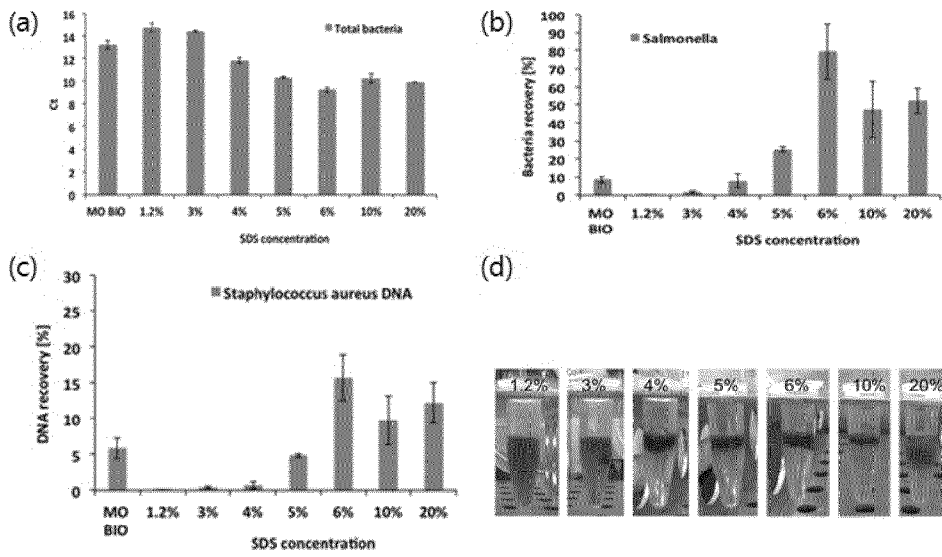
청구범위

- [청구항 1] (a) 생물학적 시료에 완충용액(buffer solution); 계면활성제; 및 비드(bead)를 첨가하여 제조된 생물학적 시료-비드 용액을 비드 비팅(bead beating)함으로써 생물학적 시료를 파쇄하는 단계;
 (b) 상기 생물학적 시료가 파쇄된 생물학적 시료-비드 용액을 정제하는 단계;
 (c) 상기 정제된 용액에 코스모트로픽 염(Kosmotropic salt) 용액을 첨가하여 재정제하는 단계; 및
 (d) 상기 재정제된 용액으로부터 핵산을 추출하는 단계를 포함하는, 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
 상기 계면활성제는 음이온성 계면활성제인 것을 특징으로 하는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
 상기 계면활성제는 상기 생물학적 시료의 총중량을 기준으로 1 내지 20%(v/v)인 것을 특징으로 하는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서,
 상기 단계 (a)는 상기 생물학적 시료-비드 용액을 10 내지 80Hz조건으로 비드 비팅하여 생물학적 시료를 파쇄하는 것을 특징으로 하는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
 상기 정제는 원심분리 또는 여과를 통하여 수행되는 것을 특징으로 하는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,
 상기 재정제는 원심분리 또는 열 처리를 통하여 수행되는 것을 특징으로 하는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서,
 상기 열 처리는 50 내지 90°C에서 수행되는 것을 특징으로 하는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,
 상기 코스모트로픽 염 용액은 황산나트륨(Na_2SO_4) 용액인 것을 특징으로 하는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서,
 상기 코스모트로픽 염 용액은 1.0 내지 5.0M의 용액인 것을 특징으로 하는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.
- [청구항 10] 청구항 1에 있어서,
 상기 생물학적 시료는 변, 혈액 및 흙으로 이루어진 균으로부터

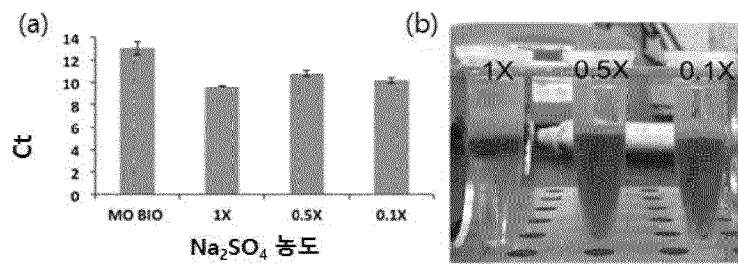
선택되는어느 하나인 것을 특징으로 하는 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.

- [청구항 11] (a) 생물학적 시료에 완충용액; 계면활성제; 및 비드를 첨가하여 제조된 생물학적 시료-비드 용액을 비드 비팅함으로써 생물학적 시료를 파쇄하는 단계;
- (b) 상기 생물학적 시료가 파쇄된 생물학적 시료-비드 용액을 원심분리하여 정제하는 단계;
- (c) 상기 정제된 용액에 코스모트로픽 염 용액을 첨가하고 원심분리하여 재정제하는 단계; 및
- (d) 상기 재정제된 용액으로부터 핵산을 추출하는 단계를 포함하는, 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.
- [청구항 12] (a) 생물학적 시료에 완충용액; 계면활성제; 및 비드를 첨가하여 제조된 생물학적 시료-비드 용액을 비드 비팅함으로써 생물학적 시료를 파쇄하는 단계;
- (b) 상기 생물학적 시료가 파쇄된 생물학적 시료-비드 용액을 여과하여 정제하는 단계;
- (c) 상기 정제된 용액에 코스모트로픽 염 용액을 첨가하고 열처리하여 재정제하는 단계; 및
- (d) 상기 재정제된 용액으로부터 핵산을 추출하는 단계를 포함하는, 생물학적 시료로부터의 핵산 추출 방법.

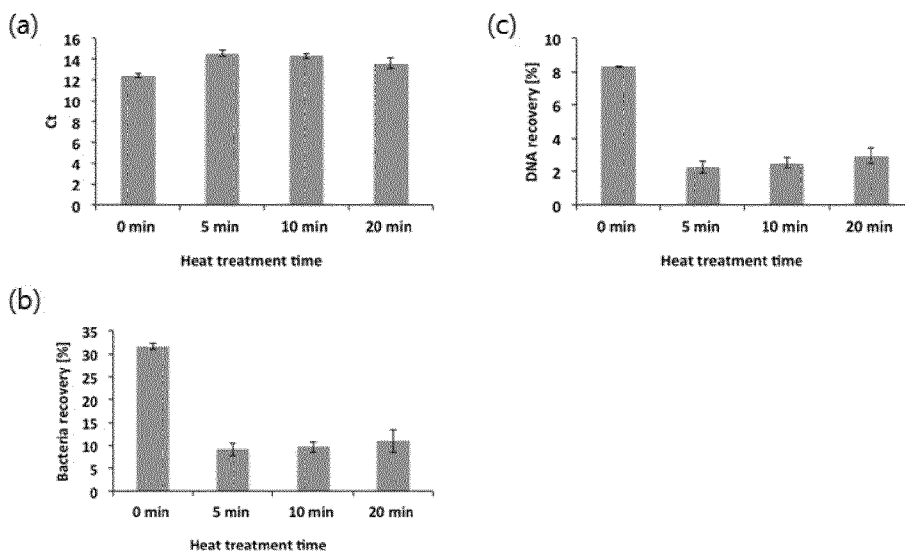
[도1]



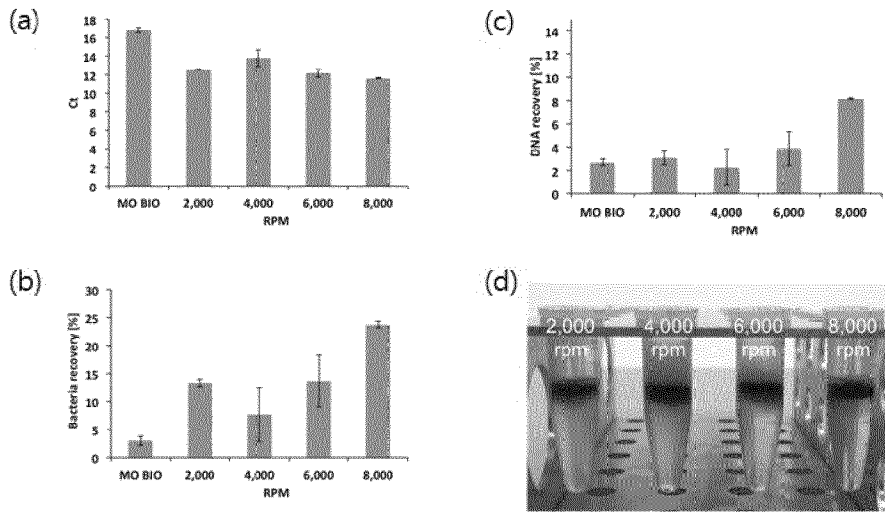
[도2]



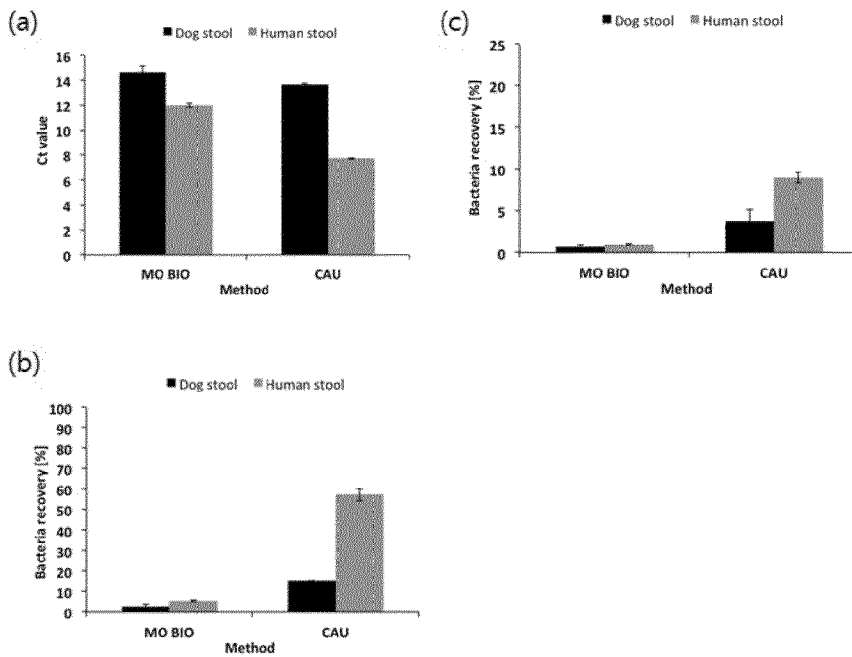
[도3]



[도4]



[도5]

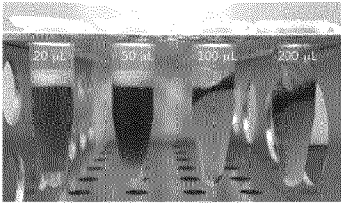


[도6]

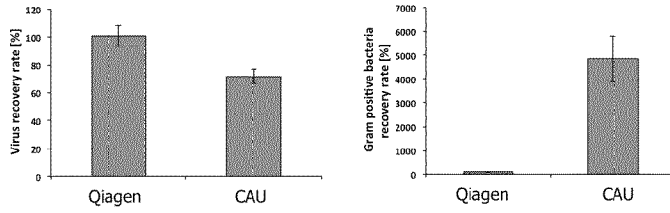
	10mg	20mg	50mg	100mg	150mg	200mg	250mg
개							
인간							

[도7]

(a)

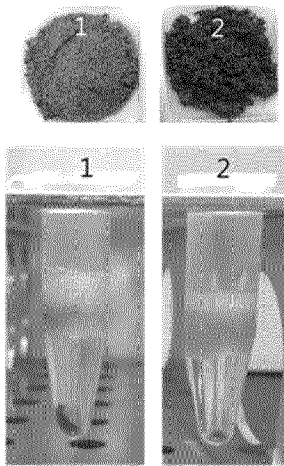


(b)

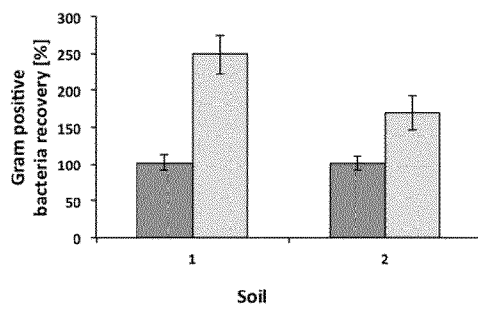


[도8]

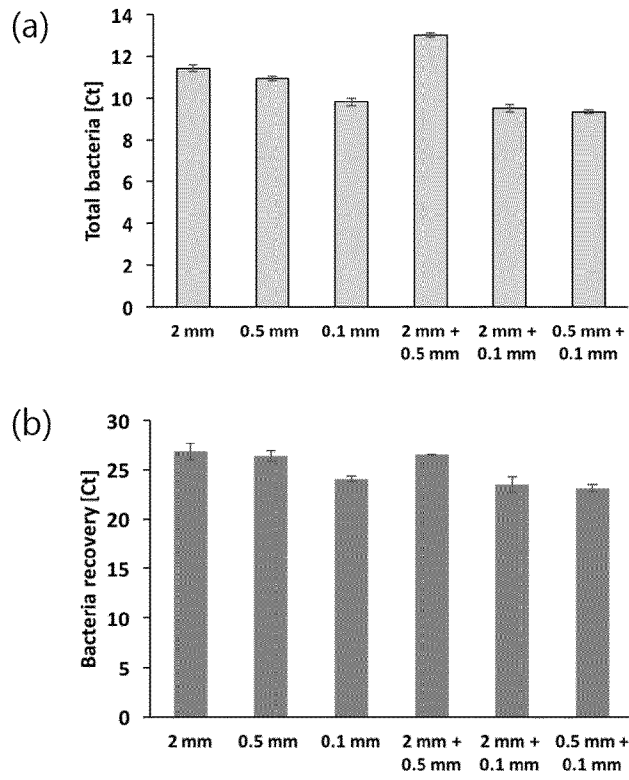
(a)



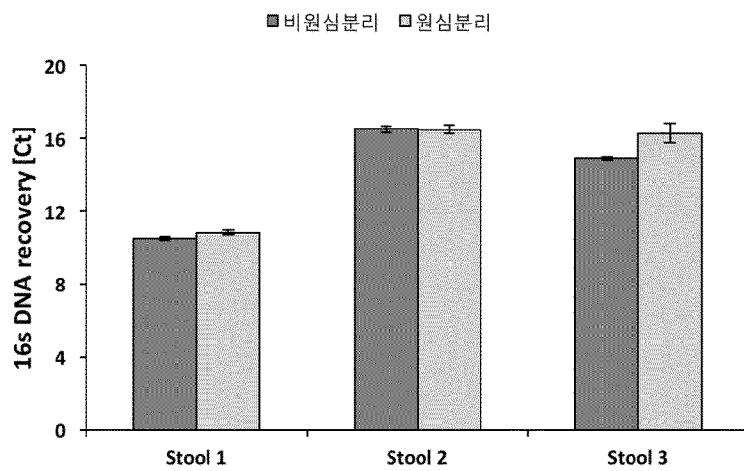
(b)



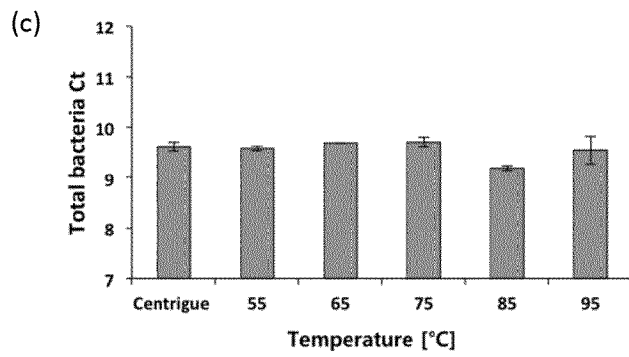
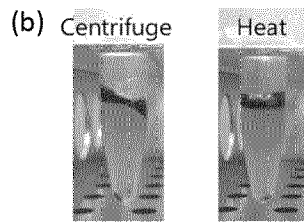
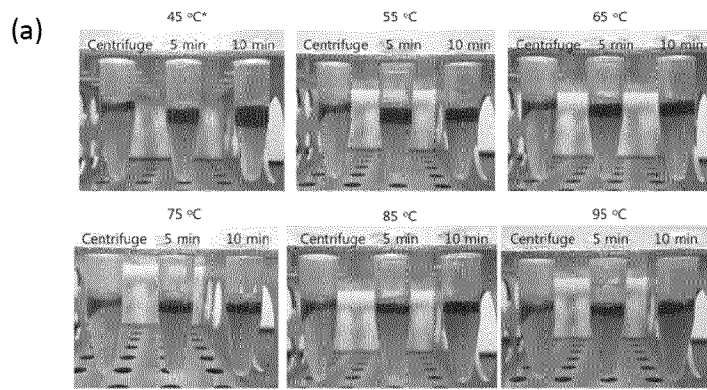
[도9]



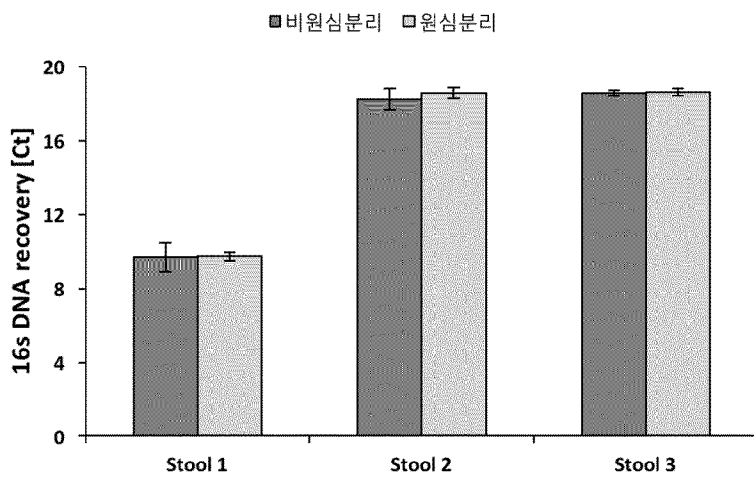
[도10]



[도 11]



[도 12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/002088

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/10(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; C12Q 1/02; C12N 15/10

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: sample, buffer solution, surfactant, bead, bead beating, kosmotropic salt, centrifugation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YU et al., "Improved Extraction of PCR-quality Community DNA from Digesta and Fecal Samples", Biotechniques, vol. 36, no. 5, pages 808-812 (2004) See abstract; table 1.	1-12
A	WHITNEY et al., "Enhanced Retrieval of DNA from Human Fecal Samples Results in Improved Performance of Colorectal Cancer Screening Test", The Journal of Molecular Diagnostics, vol. 6, no. 4, pages 386-395 (2004) See the entire document.	1-12
A	HILL et al., "Development of a Nucleic Acid Extraction Procedure for Simultaneous Recovery of DNA and RNA from Diverse Microbes in Water", Pathogens, vol. 4, pages 335-354 (2015) See the entire document.	1-12
A	BOLANO et al., "Rapid Methods to Extract DNA and RNA from Cryptococcus Neoformans", FEMS Yeast Research, vol. 1, pages 221-224 (2001) See the entire document.	1-12
A	KR 10-2014-0140317 A (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 09 December 2014 See the entire document.	1-12



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

12 JUNE 2017 (12.06.2017)

Date of mailing of the international search report

12 JUNE 2017 (12.06.2017)

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


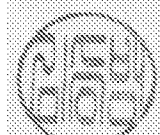
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/002088

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0140317 A	09/12/2014	KR 10-1497525 B1	02/03/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/68; C12Q 1/02; C12N 15/10 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: 시료, 완충용액, 계면활성제, 비드, 비드 비팅, 코스모트로픽 염, 원심분리		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	YU 등, 'Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples' Biotechniques, Vol.36, No.5, pages 808-812 (2004) 요약; 표 1 참조.	1-12
A	WHITNEY 등, 'Enhanced retrieval of DNA from human fecal samples results in improved performance of colorectal cancer screening test' The Journal of Molecular Diagnostics, Vol.6, No.4, pages 386-395 (2004) 전체 문헌 참조.	1-12
A	HILL 등, 'Development of a nucleic acid extraction procedure for simultaneous recovery of DNA and RNA from diverse microbes in water' Pathogens, Vol.4, pages 335-354 (2015) 전체 문헌 참조.	1-12
A	BOLANO 등, 'Rapid methods to extract DNA and RNA from Cryptococcus neoformans' FEMS Yeast Research, Vol.1, pages 221-224 (2001) 전체 문헌 참조.	1-12
A	KR 10-2014-0140317 A (부경대학교 산학협력단) 2014.12.09 전체 문헌 참조.	1-12
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2017년 06월 12일 (12.06.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 06월 12일 (12.06.2017)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0140317 A	2014/12/09	KR 10-1497525 B1	2015/03/02