



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2011년10월27일  
(11) 등록번호 10-1077603  
(24) 등록일자 2011년10월21일

(51) Int. Cl.

*C12N 15/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-0005503

(22) 출원일자 2004년01월28일

심사청구일자 2008년12월26일

(65) 공개번호 10-2005-0077608

(43) 공개일자 2005년08월03일

(56) 선행기술조사문헌

US6534262 B1\*

US20030194707 A1

US5646263 A1

US20030129614 A1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

삼성전자주식회사

경기도 수원시 영통구 매탄동 416

(72) 발명자

김준호

경기도성남시분당구정자동정든마을신화5단지아파트504-1204

조윤경

경기도수원시팔달구영통동1053-2황골마을신명아파트203동1605호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인, 이해영

전체 청구항 수 : 총 6 항

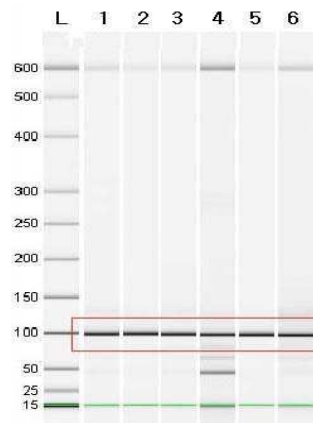
심사관 : 김윤경

**(54) 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 고체상 물질을 이용한 핵산의 증폭 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 핵산을 함유하는 시료 및 염 용액의 혼합물을 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 고체상 물질에 접촉시키는 단계; 세척 버퍼를 사용하여 상기 핵산과 고체상 물질의 복합체를 세척하는 단계; 및 상기 핵산과 고체상 물질의 복합체에 핵산 증폭 반응액을 첨가하고, 증폭 반응을 수행하는 단계를 포함하는, 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 고체상 물질을 이용한 핵산의 증폭 방법을 제공한다.

**대표도** - 도6



(72) 발명자

**황정주**

경기도수원시팔달구영통동태영아파트935동305호

**임근배**

경기도수원시팔달구영통동황골마을풍림아파트232  
동1205호

**이정건**

경기도군포시산본1동삼성아파트10-405

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

핵산을 함유하는 시료 및 염 용액의 혼합물을 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 고체상 물질에 접촉시키는 단계;

세척 버퍼를 사용하여 상기 핵산과 고체상 물질의 복합체를 세척하는 단계; 및

상기 핵산과 고체상 물질의 복합체에 핵산 증폭 반응액을 첨가하고, 증폭 반응을 수행하는 단계를 포함하는, 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 고체상 물질을 이용한 핵산의 증폭 방법으로서, 상기 고체상 물질은 유리, 실리콘, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트 또는 폴리우레탄이고, 상기 핵산 증폭반응은 PCR인 것인 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 핵산을 함유하는 시료는 생물학적 물질인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 염은 NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, CaCl<sub>2</sub> 및 그의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 것임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 상기 염의 농도는 0.5 ~5 M인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

제1항에 있어서, 에탄올과 EDTA를 포함하는 세척 버퍼로 세척하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 7**

제1항 내지 제4항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산을 함유하는 시료 및 염 용액의 혼합물은 0~40%의 PEG를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 8**

삭제

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

[0008] 본 발명은 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 고체상 물질을 이용하여 핵산을 증폭하는 방법에 관한 것이다.

[0009] 종래 고상 물질을 이용한 핵산의 정제 방법이 알려져 있었다. 예를 들면, 붐 (Boom)의 미국특허 제5,234,809호에는 핵산에 결합하는 고상물질을 이용한 핵산의 정제 방법이 개시되어 있다. 구체적으로, 카오트로픽 물질 (chaotropic material), 핵산을 포함하고 있는 출발 물질 및 핵산 결합 고상물질을 혼합하여, 핵산과 고상물질의 복합체를 형성시킨 다음, 결합된 핵산을 용출함으로써 핵산을 분리하는 방법이다. 또한, 핵산과 고상물질의 복합체에 핵산을 증폭시킬 수 있는 성분을 포함하는 혼합물을 첨가하여, 핵산을 고상물질로부터 용액 상으로 녹여낸 다음, 핵산을 증폭하는 방법이 개시되어 있다. 상기 카오트로픽 물질(chaotropic material)은 예를 들면,

구아니디늄 염, 소듐 아이오다이드, 소듐 티오시아네이트 및 요소 등이 포함된다. 고상 물질로는 실리카 또는 폴리스티렌 라텍스가 사용될 수 있는 것으로 개시되어 있다.

[0010] 그러나, 상기 방법에 의하면 반드시 카오토로픽 물질을 사용하여야 하는 문제점이 있었다. 즉, 상기 카오토로픽 물질을 사용하지 않는 경우에는 고상 물질에 핵산이 결합하지 않는다. 또한, 상기 카오토로픽 물질은 인체 유해한 물질이어서, 정제과정 중 또는 정제가 완료된 다음 정제된 핵산으로부터 제거하여야 한다.

[0011] 또한, 엑스트라 (Xtra) 사의 미국특허 제6,291,166호에는 고상 매트릭스를 이용한 핵산의 집적 (archiving) 방법이 개시되어 있다. 구체적으로, 상기 방법은 고상 매트릭스(matrix)에 핵산을 비가역적으로 결합시키는 것을 특징으로 하는데, 상기 고상 매트릭스는 양전하성 물질 (electropositive material)이 친수성으로 되어 있어야 한다. 이러한 고상 매트릭스는 실리콘(Si), 붕소(B) 및 알루미늄(Al)이 될 수 있다. 양전하성 물질을 친수성으로 변화시키는 것은 NaOH와 같은 염기성 용액을 사용함으로써 이루어질 수 있다. 상기 엑스트라 사의 특허는 고상 매트릭스에 비가역적으로 결합된 핵산을 이용하여, PCR, SDA, NASBA 등과 같은 핵산의 증폭 반응에 이용될 수 있다.

[0012] 상기 방법에 의하면, 핵산이 고상 물질에 비가역적으로 결합되어 있기 때문에, 핵산이 고상물질에 결합된 상태에서 증폭된다. 그러나, 핵산이 증폭되기 위하여는, 단일 가닥으로 해리되어야 한다. 따라서, 상기 방법에 의하면, 고상 물질에 비가역적으로 결합되어 있기 때문에, 증폭의 효율이 낮다는 문제점이 있다.

[0013] 본 발명의 발명자들은 상기와 같은 종래 기술을 바탕으로 핵산의 정제 방법을 연구하던 중 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 표면을 갖는 기관으로부터 핵산을 가역적으로 결합시킬 수 있는 방법을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

[0014] 따라서, 본 발명의 목적은 핵산을 효율적으로 정제할 수 있는 고체상 물질을 이용한 핵산의 정제방법을 제공하는 것이다.

[0015] 또한, 본 발명의 목적은 핵산의 정제에 사용된 기관과 동일한 물질 상에서 핵산을 증폭하는 방법을 제공하는 것이다.

**발명의 구성 및 작용**

[0016] 본 발명은 핵산을 함유하는 시료 및 염 용액의 혼합물을 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 고체상 물질에 접촉시키는 단계;

[0017] 세척 버퍼를 사용하여 상기 핵산과 고체상 물질의 복합체를 세척하는 단계; 및

[0018] 상기 핵산과 고체상 물질의 복합체에 핵산 증폭 반응액을 첨가하고, 증폭 반응을 수행하는 단계를 포함하는, 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 고체상 물질을 이용한 핵산의 증폭 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명에 있어서, 핵산을 함유하는 시료는 핵산을 함유하는 생물학적 물질일 수 있다. 상기 생물학적 시료에는 예를 들면, 혈액, 혈청, 버피 코트(buffy coat), 노, 대변 (feces), 뇌척수액, 정자, 타액, 조직, 세포 배양물 등이 포함된다. 핵산을 함유하는 시료는 또한, 핵산을 함유하는 비생물학적 물질이 될 수 있다. 생물학적 시료를 사용하는 경우, 세포벽, 세포막 및 엔벨로프 등과 같은 장벽에 의하여 핵산과 상기 카르복실기나 아민기로 코팅된 고체상 물질 표면의 직접적인 접촉이 되기 어려운 경우에는 전처리를 수행할 수 있다. 이러한 전처리는 예를 들면, 계면활성제 (detergent) 및 유기 용매와 같은 세포를 파괴하는 물질이 될 수 있다. 예를 들면, NaOH를 사용하여 세포를 파쇄한 다음 중성으로 한 다음, NaCl와 같은 본 발명에서 사용되는 염 용액으로 대체하여 정제할수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서, 염 용액은 바람직하게는, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, CaCl<sub>2</sub> 및 그의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 염을 포함하는 용액이다. 상기 염은 바람직하게는, 0.5 M 내지 5 M의 농도로 포함되는 것이다.

[0021] 본 발명에 있어서, 고체상 물질은 그 표면이 카르복실기 또는 아미노기에 의하여 코팅되어 있는 것이면 어느 것이 포함된다. 예를 들면, 상기 고체상 물질은 유리, 실리콘, 및 폴리에틸렌, 폴리 프로필렌, 폴리아크릴아미드와 같은 플라스틱 물질이 될 수 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 고체상 물질은 유리이다. 본 발명에서 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 고체상 물질은 예를 들면, 슬라이드 글라스에 GAPA (감

마-아미노프로필트리에톡시 실란)을 딥핑(dipping) 법에 의하여 코팅하여 아미노기로 코팅된 기판을 얻고, 여기에 숙산산 무수물(succinic anhydride)을 동일한 방법으로 처리함으로써 카르복실기가 코팅된 기판을 제조할 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 세척단계는 에탄올과 EDTA를 포함하는 세척 버퍼로 세척함으로써 수행될 수 있다. 바람직하게는, 상기 세척 버퍼는 70 % 에탄올 및 10 mM EDTA를 포함하는 수성 용액이다.

[0023] 또한, 본 발명의 핵산 증폭 방법에 있어서, 증폭 반응은 당업계에서 알려진 다양한 증폭 방법이 이용될 수 있다. 증폭 방법의 예는, PCR, LCR, 및 NASBA 등이 포함될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, PCR이다. PCR이란 폴리머라제 연쇄 반응을 의미하는 것으로 당업자에게 잘 알려져 있다. 일반적으로, PCR은 프라이머 쌍, 주형, 폴리머라제, 및 dNTP를 포함하는 반응 용액 중에서, 어닐링 온도에서 어닐링에 의하여 프라이머를 주형에 상보적 결합시키고, 중합 반응 온도에서 결합된 프라이머를 시발점으로 하여 중합하고, 중합된 이중 가닥 핵산을 변성 온도에서 변성하는 과정을 반복함으로써, 핵산을 증폭하는 방법을 말한다. 또한, 증폭 반응 용액은 증폭에 사용되는 증폭 반응의 종류에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 중합 효소에 의하여 핵산의 중합 반응이 이루어질 수 있는 조건이면 어느 것이나 될 수 있다. 본 발명의 특정한 예에서, 이러한 증폭 반응 용액은 당업계에서 사용되고 있는 PCR 반응 용액이다.

[0024] 본 발명은 또한, 상기 혼합 단계에서 0~40 %의 PEG를 더 포함하여 혼합시킬 수 있다.

[0025] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 실시예

[0027] 실시예 1 : 핵산 정제 실험

[0028] 본 실시예에서는 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 고체상 물질을 사용하여 DNA를 함유하는 시료부터 DNA를 정제하였다. 고체상 물질로서, 평범한 유리, 아미노기로 코팅된 유리, 및 카르복실기로 코팅된 유리를 사용하였다. 또한, 사용된 DNA는 pBR322 플라스미드 DNA (약 4.3kb, Promega 사)이었다. 실험과정은 다음과 같았다.

[0029] 1. 먼저, pBR322 플라스미드 DNA를 증류수에 녹였다.

[0030] 2. DNA 증류수 용액 100 $\mu$ l (DNA 1 $\mu$ g)를 20% PEG을 함유한 2.5M NaCl 용액 100  $\mu$ l와 혼합하였다.

[0031] 3. 상기 혼합물 180  $\mu$ l를 중합체 챔버 (polymer chamber) 내에 포함된 표면이 카르복실기 또는 아민기로 코팅된 유리 기판에 주입하였다. 상기 챔버는 시료 유입구와 출구를 가지며 1.6 mm x 1.6 mm x 0.4 mm의 공간을 갖는 것으로서, 상기 기판 상에 부착함으로써 제작하였다.

[0032] 4. 상기 DNA 함유 혼합물을 주입한 후, 실온에서 5 분 동안 배양한 다음, 중합체 챔버로부터 시료 용액을 제거하였다.

[0033] 5. 70 % 에탄올 및 10 mM EDTA 용액을 챔버에 주입하고, 3 회 세척하였다.

[0034] 6. 증류수 180  $\mu$ l를 챔버에 주입하여 결합된 DNA를 용출한 다음, 용출액을 수집하였다.

[0035] 7. 정제된 DNA를 아가로스 겔에서 전기영동으로 DNA의 유무를 확인하였다.

[0036] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 있어서, 1 및 2번 레인은 평범한 유리, 3 및 4번 레인은 아미노기(NH<sub>2</sub>) 코팅된 유리, 5 및 6번 레인은 카르복실기(COOH)로 코팅된 유리, 7 및 8번 레인은 상용으로 판매하는 카르복실기로 코팅된 자성 입자 (magnetic particle) (DynaL Biotech 사, 상품명 Dynabead™)을 이용한 결과이다. 10 ng 및 100 ng으로 표시된 레인은 양성 대조군이다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 모든 기판에 대해서 정성적으로 DNA를 정제 할 수 있음을 확인하였다.

[0037] 실시예 2 : 플라스미드 HBV DNA의 정제

[0038] 본 실시예에서는 기판 표면의 성질에 따른 차이를 확인하기 위하여 플라스미드 DNA를 정제한 다음, 그 정제 산물을 주형으로 하여 실시간 PCR을 수행하여, 기판 표면의 성질에 따른 정제 수율을 상대적으로 비교하였다.

[0039] 고체상 물질로서, 평범한 유리, 아미노기로 코팅된 유리 및 카르복실기로 코팅된 유리를 사용하였다. 또한, 사용된 DNA는 HBV 플라스미드 DNA (약 7.3kb, ATCC No. 45020D)이었다. 실험과정은 다음과 같았다.

- [0040] 1. 먼저, HBV 플라스미드 DNA를 증류수에 녹인 다음, DNA 증류수 용액 100  $\mu\text{l}$  (DNA 1 $\mu\text{g}$ )를 20% PEG을 함유한 2.5 M NaCl용액 100  $\mu\text{l}$ 와 혼합하였다.
- [0041] 2. 상기 혼합물 180  $\mu\text{l}$ 를 중합체 챔버 (polymer chamber)에 주입하여 중합체 챔버 내에 포함된 표면이 카르복실기와 아민기로 코팅된 유리 기판에 접촉시켰다(도 5의 (a) 참조). 상기 챔버는 시료 유입구와 출구를 가지며 1.6 mm x 1.6 mm x 0.4 mm의 공간을 갖는 것으로서, 상기 기판 상에 부착함으로써 제작하였다.
- [0042] 3. 상기 DNA 함유 혼합물을 주입한 후, 실온에서 5 분 동안 배양하였다.
- [0043] 4. 상기 중합체 챔버로부터 시료 용액을 제거하였다.
- [0044] 5. 70% 에탄올 및 10mM EDTA용액을 챔버에 주입하고, 3 회 세척하였다.
- [0045] 6. 증류수 180  $\mu\text{l}$ 를 챔버에 주입하여 결합된 DNA를 용출한 다음, 용출액을 수집하였다.
- [0046] 7. 상기 용출액 10  $\mu\text{l}$ 을 주형으로 하고, 서열번호 1과 2의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 실시간 PCR (ABI7000)을 수행하였다.
- [0047] 8. PCR이 완료된 후 PCR 산물을 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent 사) 전기영동 장치를 이용하여 분석하였다.
- [0048] 실시간 PCR 결과를 도 2a와 2b에 나타내었다. 도 2a와 2b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 핵산 정제 방법에 의하여 정제된 산물을 그대로 PCR의 주형으로 사용하여도 PCR 산물을 얻을 수 있다는 것을 알 수 있다. 도 2a 및 2b는 초기 HBV 플라스미드 DNA의 농도가 각각  $10^7$  카피/ $\mu\text{l}$  및  $10^5$  카피/ $\mu\text{l}$ 이었을 때, 그 정제 산물의 PCR 결과로서, 카르복실기로 코팅된 유리 기판을 이용한 경우가 증폭 효율이 가장 우수하였다. 실시간 PCR 완료 후의 PCR 산물의 농도는 하기 표 1과 같다. 표 1에 나타낸 바와 같이, 카르복실기로 코팅된 유리 기판의 경우가 PCR 산물의 농도가 가장 높았다.

[0049] 표 1. 정제 산물을 주형으로 한 실시간 PCR 산물의 농도

기판	결합 버퍼	초기 HBV 플라스미드 DNA 농도(카피/ $\mu\text{l}$ ), 사용 부피	PCR 산물의 농도 (50 회)(ng/ $\mu\text{l}$ )
유리	20% PEG + 2.5M NaCl, 100 $\mu\text{l}$	$10^5$ , 100 $\mu\text{l}$	10
아미노기로 코팅된 유리	20% PEG + 2.5M NaCl, 100 $\mu\text{l}$	$10^5$ , 100 $\mu\text{l}$	20
카르복실기로 코팅된 유리	20% PEG + 2.5M NaCl, 100 $\mu\text{l}$	$10^5$ , 100 $\mu\text{l}$	25

- [0051] 실시예 3 : PEG와 초기 DNA 농도가 플라스미드 HBV DNA 정제에 미치는 영향
- [0052] 실시예 1 및 2로부터, 카르복실기로 코팅된 기판이 가장 우수한 정제 효율을 갖는 것으로 밝혀졌다. 본 실시예에서는 카르복실기로 코팅된 기판을 사용하여 결합 버퍼 (binding buffer) 중의 PEG의 농도와 초기 DNA 농도가 핵산의 정제에 미치는 영향을 조사하였다.
- [0053] 고체상 물질으로서, 카르복실기로 코팅된 유리를 사용하였다. 또한, 사용된 DNA는 HBV 플라스미드 DNA (약 7.3kb, ATCC No. 45020D)이었다. 실험과정은 다음과 같았다.
- [0054] 1. 먼저, HBV 플라스미드 DNA를 증류수에 녹이고, DNA 증류수 용액 100 $\mu\text{l}$  (DNA 1 $\mu\text{g}$ )를 20% PEG을 함유한 2.5 M NaCl용액 100 $\mu\text{l}$ 와 혼합하였다.
- [0055] 2. 상기 혼합물 180  $\mu\text{l}$ 를 중합체 챔버 (polymer chamber)에 주입하여 중합체 챔버 내에 포함된 카르복실기로 코팅된 유리 기판에 주입하였다. 상기 챔버는 시료 유입구와 출구를 가지며 1.6 mm x 1.6 mm x 0.4 mm의 공간을 갖는 것으로서, 상기 기판 상에 부착함으로써 제작하였다 (도 5의 (a) 참조).
- [0056] 3. 상기 DNA 함유 혼합물을 주입한 후, 실온에서 5 분 동안 배양한 다음, 상기 중합체 챔버로부터 시료 용액을 제거하였다.
- [0057] 4. 70% 에탄올 및 10 mM EDTA 용액을 챔버에 주입하고, 3 회 세척하였다.
- [0058] 5. 증류수 180  $\mu\text{l}$ 를 챔버에 주입하여 결합된 DNA를 용출한 다음, 용출액을 수집하였다.



- [0059] 6. 상기 용출액 10  $\mu$ l를 주형으로 하고, 서열번호 1과 2의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 실시간 PCR (ABI7000)을 수행하였다.
- [0060] 7. PCR이 완료된 후 PCR 산물을 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent 사) 전기영동 장치를 이용하여 분석하였다.
- [0061] 도 3은 결합 버퍼 (binding buffer) 중의 초기 HBV 플라스미드 DNA의 농도를 각각  $10^5$  카피/ $\mu$ l 및  $10^7$  카피/ $\mu$ l로 하고, PEG를 포함하지 않은 경우와 20% PEG를 포함 경우로 나누어 정제한 다음, 그 정제 산물을 주형으로 하여 PCR 수행하고 얻어진 PCR 산물의 농도를 나타낸 것이다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 결합 버퍼에 PEG를 포함하는 경우가 그렇지 않는 경우에 비하여 결과가 우수하였다.
- [0062] 도 4a와 4b는 초기 DNA의 농도를 각각  $10^3$ ,  $10^5$  및  $10^7$  카피/ $\mu$ l로 하여 정제한 다음, 그 정제 산물을 주형으로 하여 실시간 PCR을 수행하여 얻어진 결과를 나타낸 것이다. 도 4a는 실시간 PCR의 결과를 나타낸 것이고, 도 4b는 도 4a로부터 구해진 초기 DNA 농도에 따른 역치 사이클 (threshold cycle) (역치 값으로 설정한 검출 신호의 값을 초과하는 신호가 발생하는 PCR 회수를 의미한다)을 나타낸 것이다. 도 4b에 나타낸 바와 같이, 초기 DNA의 농도를 각각  $10^3$ ,  $10^5$  및  $10^7$  카피/ $\mu$ l로 한 경우, 각각 평균 33.1, 27.3 및 20.8 사이클이었다. 따라서, 역치 사이클은 주어진 농도 조건에 따라 약 6.7 사이클의 차이를 나타내었다. 통상 실시간 PCR에서 PCR의 주형으로 사용된 DNA의 초기 농도의 차이가 10 배일 경우, 역치 사이클의 차이는 이론상 3.3 사이클인 것으로 알려져 있다. 본 실시예에서 얻어진 역치 사이클은 약 6.7이므로, 초기 농도가 약 100 배의 차이가 남을 추정할 수 있다. 이는 본 발명의 방법에 따라 정제하였을 경우, 초기 DNA 농도에 따라 최종 정제 산물 중의 DNA 농도도 비례한다는 것을 나타내는 것으로, 정제 효율이 일정하다는 것을 암시하는 것이다.
- [0063] 실시예 4 : 카르복실기로 코팅된 유리 기판 상에서의 PCR
- [0064] 본 실시예에서는 카르복실기로 코팅된 유리 기판 상에 핵산을 첨가한 후, 동일한 기판 상에서 핵산증폭 반응 (PCR)을 수행하여, 카르복실기로 코팅된 유리 기판에서 PCR이 가능한지를 조사하였다.
- [0065] 고체상 물질으로서, 카르복실기로 코팅된 유리를 사용하였다. 상기 유리 기판 상에, 시료 유입구와 출구를 가지며 1.6 mm x 1.6 mm x 0.4 mm의 공간을 갖는 폴리 챔버를 기판 상에 부착하여 중합 반응 챔버로서 사용하였다. 또한, 사용된 DNA는 HBV 플라스미드 DNA(약 7.3kb, ATCC No. 45020D)이었다. 실험과정은 다음과 같았다.
- [0066] 1. 먼저, HBV 플라스미드 DNA를 증류수에 녹였다.
- [0067] 2. DNA 증류수 용액 100 $\mu$ l를 서열번호 1과 2의 올리고 뉴클레오티드 프라이머를 포함한 PCR에 필요한 버퍼 용액 100  $\mu$ l와 혼합하였다.
- [0068] 3. 상기 혼합물 180  $\mu$ l를 중합체 챔버(polymer chamber)에 주입하여 중합체 챔버 내에 포함된 카르복실기로 코팅된 유리 기판과 접촉시켰다. 상기 챔버는 시료 유입구와 출구를 가지며 1.6 mm x 1.6 mm x 0.4 mm의 공간을 갖는 것으로서, 상기 기판 상에 부착함으로써 제작하였다(도 5 참조).
- [0069] 4. 상기 DNA 함유 혼합물을 주입한 후, 시료 유입구와 출구를 중합체 커버 (polymer cover)를 이용하여 닫았다.
- [0070] 5. DNA 시료와 PCR 혼합물을 포함하는 중합체 챔버가 구비된 기판을 PCR 장치의 가열판 (heating block) 상에 뒤집어서 적재하였다(도 5 참조).
- [0071] 본 명세서에서 사용된 중합체 챔버에 대하여 도 5를 참조하여 간단하게 설명하면 다음과 같다. 유리 기판(6) 상에 1.6 mm x 1.6 mm x 0.4 mm의 공간을 가지고, 유체의 주입구와 출구가 구비되어 있는 중합체 챔버 하우징 (polymer chamber housing)(4)을 부착시켰다. 이렇게 형성된 중합 챔버(8)를 DNA의 정제 및 중합반응 챔버로 이용하였다(도 5 (a) 참조). 도 5에서 DNA를 포함하는 시료는 마이크로피펫(2)로 시료 주입구를 통하여 중합반응 챔버(8)에 주입한다. 도 5의 (a)는 중합체 챔버 하우징(4)이 상기 기판(6)에 부착된 상태를 나타내는 평면 투시도이다. 도 5의 (b)는 이렇게 준비된 중합체 챔버가 가열판 (heating block)로 연결되어 있어, PCR을 수행할 수 있도록 되어 있는 상태를 나타내는 단면도이다. 도 5의 (b)에서, 상기 중합체 챔버는 광학적 테이프 (ABI 사) (12)를 통하여 가열판 (10)에 연결되어 있다. 그 결과, 가열판(10)을 통하여 열을 중합체 챔버(8) 내로 전달할 수 있기 때문에, 열 순환(thermal cycling)이 이루어질 수 있다.
- [0072] 6. MJResearch PTC-100 장치를 사용하여 서열번호 1과 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하여 PCR 조건은 95  $^{\circ}$ C 20초, 58  $^{\circ}$ C 30초, 72  $^{\circ}$ C 40초의 온도 조건으로 40회 수행하였다.

[0073] 7. PCR이 완료된 후 PCR 산물 (약 100 bp)을 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent 사) 전기영동 장치를 이용하여 분석하였다.

[0074] PCR 산물을 전기 영동한 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타난 바와 같이, 카르복실기로 코팅된 유리 기판 상에서 PCR 반응이 수행될 수 있음을 알 수 있다. 도 6의 각 레인은 동일한 조건에서 반복 실험한 결과로서, 본 실험에 의하여 크기가 100 bp 정도인 원하는 PCR 산물이 재현성 있게 얻어졌다.

[0075] 따라서, 상기와 같은 본 발명의 실시예에 의하여 카르복실기로 코팅된 동일한 유리 기판을 이용하여 핵산의 정제와 증폭 반응이 수행될 수 있음을 알 수 있었다.

**발명의 효과**

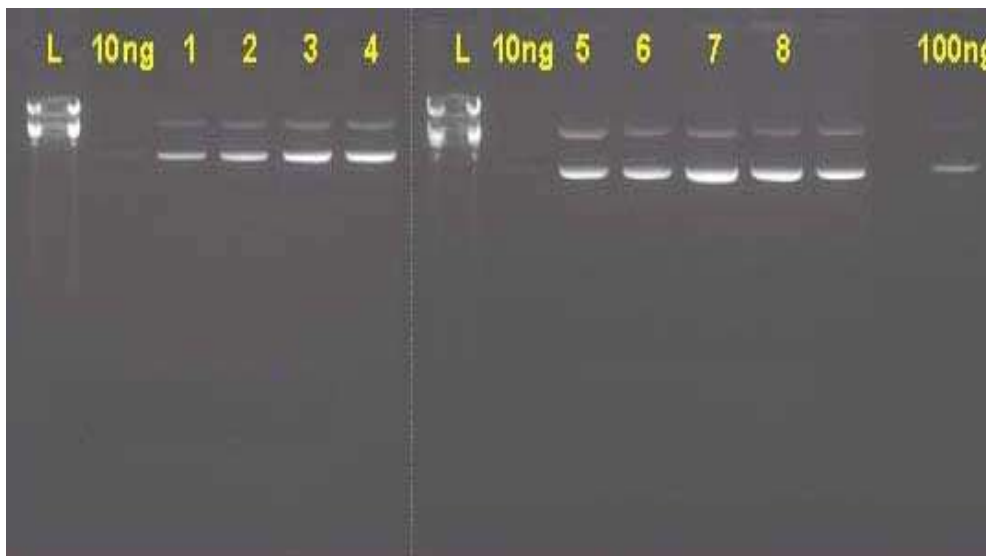
[0076] 본 발명의 핵산 증폭 방법에 따르면, 카르복실기 또는 아미노기로 코팅된 기판을 이용하여 인체에 유해한 카오토로픽 물질을 사용하지 않고서도 핵산을 정제하고 동일한 기판 상에서 핵산을 증폭할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0001] 도 1은 본 발명의 방법에 따라 정제된 DNA의 전기영동 결과를 나타내는 것이다.
- [0002] 도 2a와 2b는 본 발명의 방법에 따라 정제된 HBV 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 실시간 PCR한 결과를 나타내는 것이다.
- [0003] 도 3은 결합 버퍼 중에 포함된 PEG가 본 발명의 방법에 따른 DNA의 정제에 미치는 영향을 나타내는 도면이다.
- [0004] 도 4a는 초기 DNA의 농도를 각각  $10^3$ ,  $10^5$  및  $10^7$  카피/ $\mu$ l로 하여 정제한 다음, 그 정제 산물을 주형으로 하여 실시간 PCR을 수행하여 얻어진 결과를 나타낸 것이다.
- [0005] 도 4b는 도 4a로부터 구해진 초기 DNA 농도에 따른 역치 사이클(threshold cycle)을 나타낸 것이다.
- [0006] 도 5는 본 발명에 사용된 중합체 챔버와 PCR 장치에 적재하는 과정을 나타낸 모식도이다.
- [0007] 도 6은 카르복실기로 코팅된 유리 기판 상에서 PCR하여 얻어진 PCR 산물을 전기영동한 결과이다.

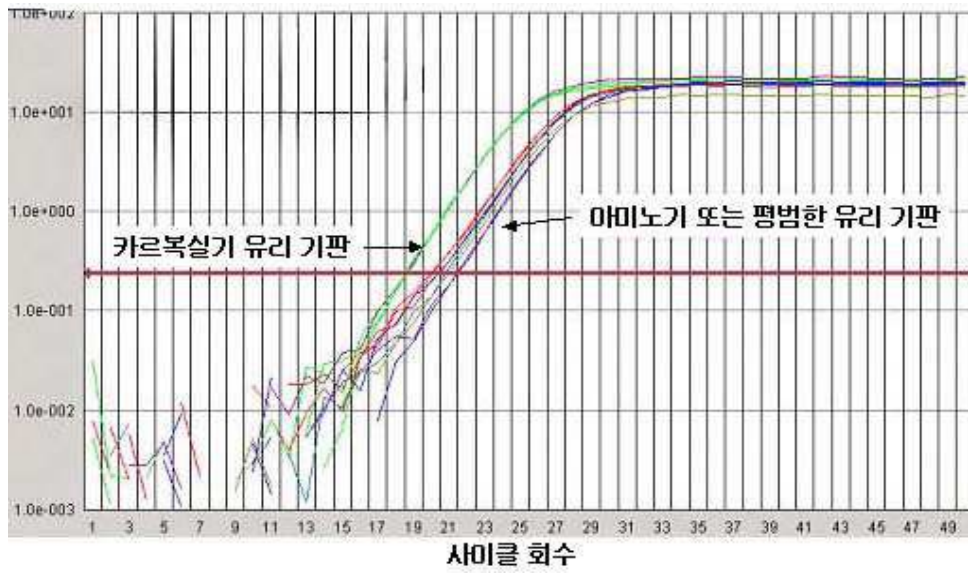
**도면**

**도면1**

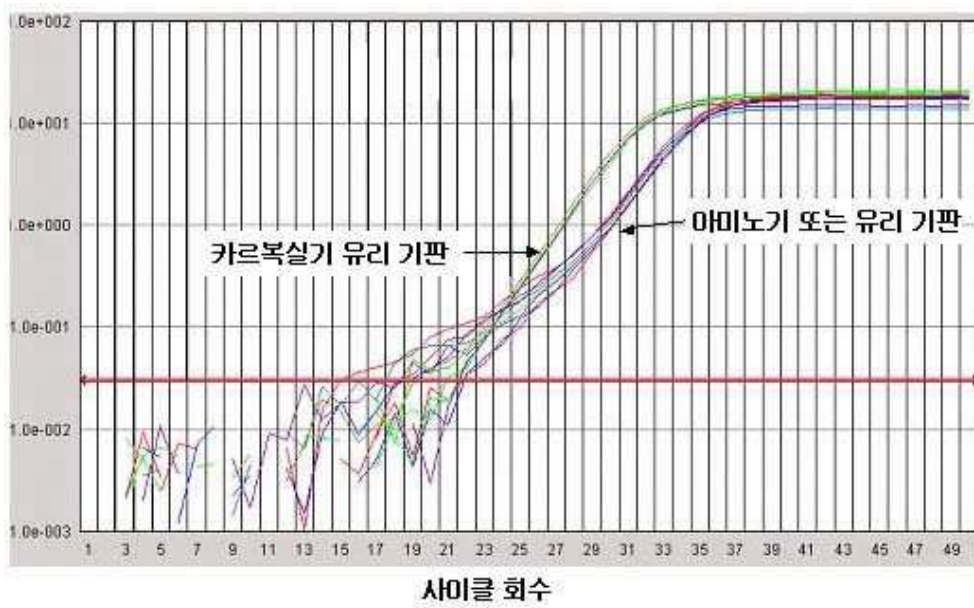




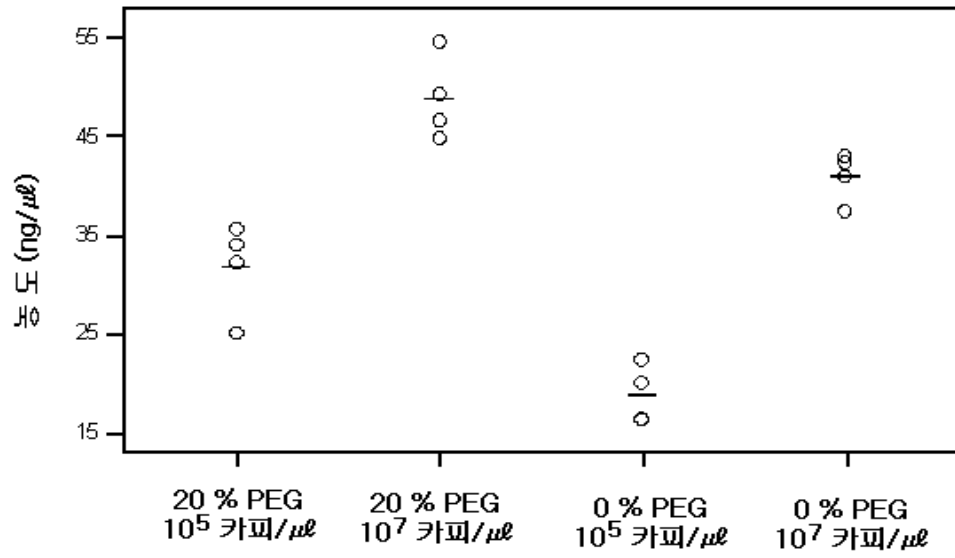
도면2a



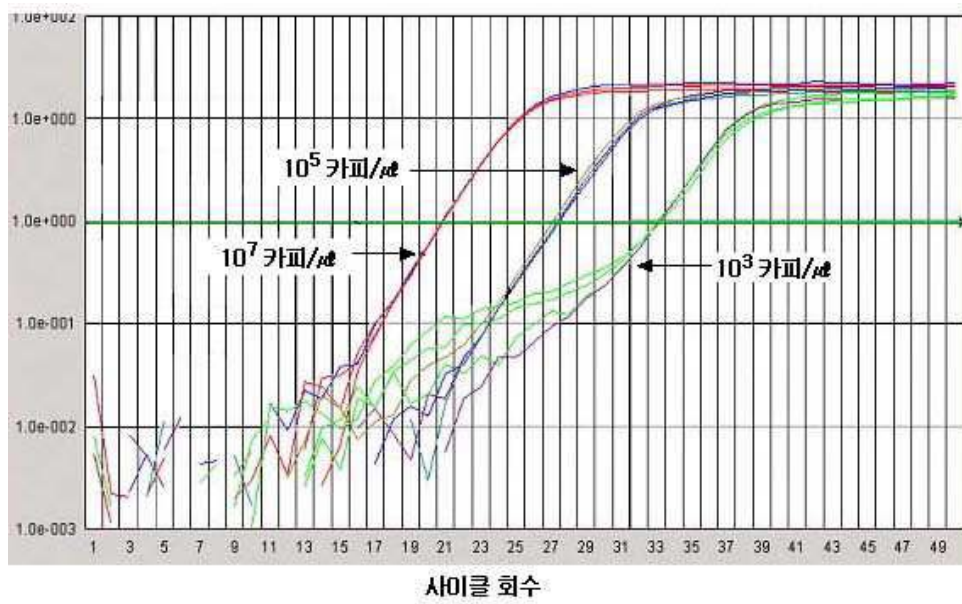
도면2b



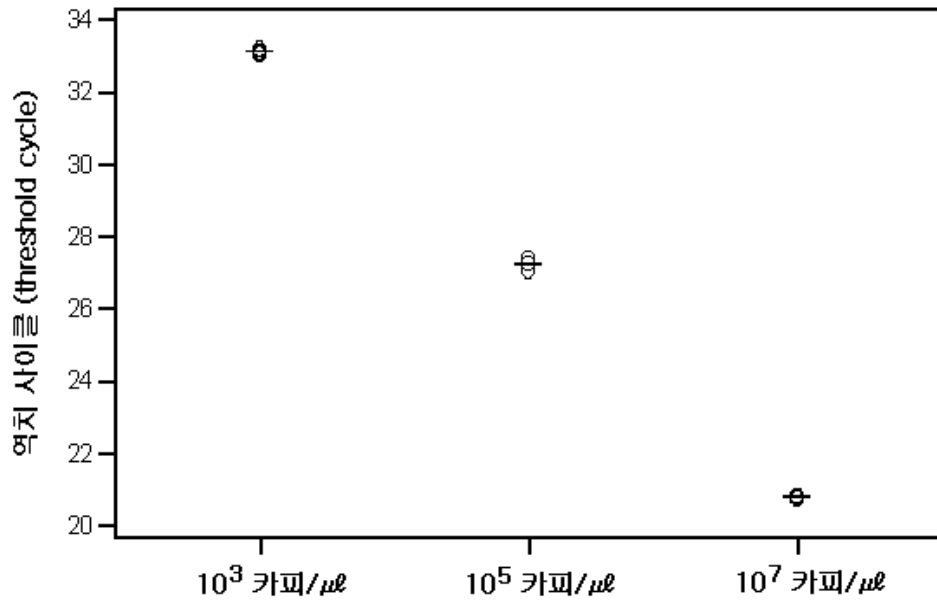
도면3



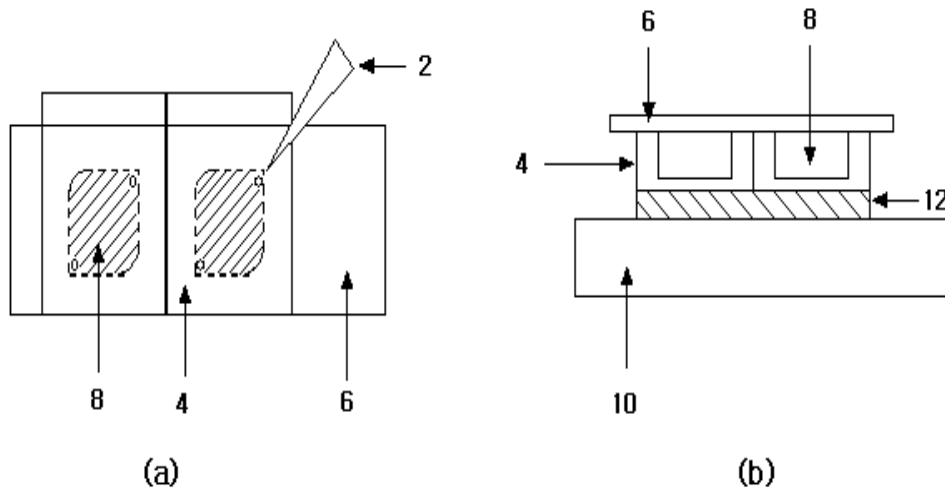
도면4a



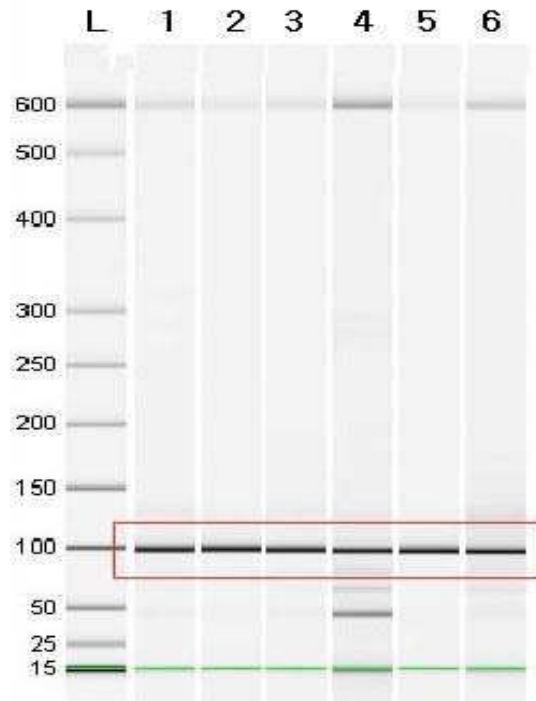
도면4b



도면5



도면6



서열목록

- <110> Samsung Electronics Co. Ltd.
- <120> A method for amplifying a nucleic acid using a solid phase material coated with a carboxyl group or amino group
- <130> PN051791
- <160> 2
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> forward primer
- <400> 1
- gctttggggc atggacattg acc 23
- <210> 2
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
  
- <223> reverse primer
- <400> 2
- agcagaggcg gtgtcgagga gat 23