



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년10월12일
 (11) 등록번호 10-1785074
 (24) 등록일자 2017년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 B01L 7/00 (2006.01) B01J 19/00 (2006.01)
 B01L 3/00 (2006.01) C12N 15/00 (2017.01)
 (52) CPC특허분류
 B01L 7/52 (2013.01)
 B01J 19/0046 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2016-0010784
 (22) 출원일자 2016년01월28일
 심사청구일자 2016년01월28일
 (65) 공개번호 10-2016-0092954
 (43) 공개일자 2016년08월05일
 (30) 우선권주장
 1020150013422 2015년01월28일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 Optofluidic in situ maskless lithography of charge selective nanoporous hydrogel for DNA preconcentration(Hyoki Kim, Biofluidics 4, 2010)*
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
 (72) 발명자
 천홍구
 서울특별시 송파구 올림픽로 435, 214동 502호 (신천동, 파크리오)
 (74) 대리인
 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 인치현

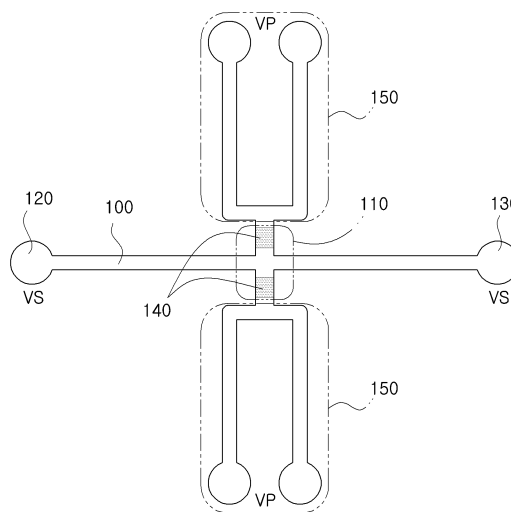
(54) 발명의 명칭 DNA 합성용 마이크로 칩 및 이를 이용한 DNA 합성방법

(57) 요약

본 발명은 DNA 합성용 마이크로 칩 및 이를 이용한 DNA 합성방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩을 이용하여 DNA를 합성하게 되면, 긴 염기서열을 갖는 DNA 합성시 발생하는 합성의 오류율을 현저히 낮출 수 있다. 이는 본 발명에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩에 포함된 유체 채널의 한정된 공간에서 DNA 단편 및 DNA 리가아제(ligase)를 고농도로 농축시킴으로써 가능하게 된다. 또한 저농도의 시료를 사용하는 경우에도 고농도로 농축하여 DNA 합성이 가능하기 때문에 고가인 생/화학 시료의 사용량을 줄일 수 있어 종래 기술에 비해 경제성이 현저히 우수하다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

B01L 3/502753 (2013.01)
C12N 15/00 (2013.01)
 B01J 2219/00722 (2013.01)
 B01L 2300/0681 (2013.01)
 B01L 2400/0415 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

마이크로 혼합기와 반응기로 구성된 DNA 결찰용 바
 이오칩에 관한 연구(강도형, 대한기계학회논문집,
 2008)*

KR1020150143002 A
 KR1020150104308 A
 KR101523174 B1
 KR1020080019573 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2011-00318866
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 글로벌프론티어연구개발사업
 연구과제명 바이오헬스 분석 시스템
 기 여 율 1/2
 주관기관 고려대학교 산학협력단
 연구기간 2011.09.29 ~ 2020.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012-00095556
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 미래유망융합기술파이오니어사업
 연구과제명 극소부피 DNA 리액터(reactor) 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 고려대학교 산학협력단
 연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

내부 표면이 음전하로 대전되거나 또는 음전하를 띠는 유체 채널;
 상기 유체 채널의 중간에 위치하면서 양이온만을 선택적으로 통과시키는 여과 구조물; 및
 상기 유체 채널의 양 말단에 시료 주입부 및 시료 유출부;
 을 포함하고,
 상기 여과 구조물은 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머를 포함하는 것을 특징으로 하며,
 상기 시료 주입부를 통해 주입되는 시료는 제1 DNA 단편 그룹, 상기 제1 DNA 단편에 상보적 염기서열을 포함하는 제2 DNA 단편 그룹 및 DNA 리가아제(ligase)를 포함하는 것을 특징으로 하고,
 상기 여과 구조물의 상단 또는 하단에 연결된 폐기물 유출부를 더 포함하며,
 상기 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머는 poly-AMPS(poly-(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)) 또는 poly-SS(poly-(styrene sulfonate))이며,
 상기 여과 구조물을 중심으로 시료 주입부 방향의 유체 채널에서는 DNA 합성이 이루어지며,
 상기 제1 DNA 단편 그룹은 복수개의 동일하거나 상이한 염기서열인 제1 DNA 단편의 집합이며,
 상기 제2 DNA 단편 그룹은 제1 DNA 단편에 상보적 염기서열을 포함하면서 복수개의 동일하거나 상이한 염기서열인 제2 DNA 단편의 집합인 것을 특징으로 하고,
 상기 유체 채널은 시료 주입부 방향과 시료 유출부 방향 간의 전압 차이가 형성되도록 전압을 인가하여 시료 주입부에서 시료 유출부 방향으로 시료의 흐름을 유도하되, 상기 여과 구조물에서 양이온을 선택적으로 통과시키며,
 상기 여과 구조물의 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머를 통과한 양이온은 폐기물 유출부를 통해 배출되며,
 상기 여과 구조물은 양이온을 선택적으로 통과시키며, 상기 여과 구조물을 중심으로 시료 주입부 방향의 유체 채널에서는 음이온인 복수개의 제1 DNA 단편 및 복수개의 제2 DNA 단편이 농축되며, 상기 농축된 복수개의 제1 DNA 단편 및 복수개의 제2 DNA 단편은 DNA 리가아제(ligase)로 인한 DNA 라이게이션(ligation)으로 DNA 합성이 이루어지는 것을 특징으로 하는 DNA 합성용 마이크로 칩.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩을 이용한 DNA 합성방법은

1) 시료 주입부에 시료를 주입하는 단계;

2) 시료내 포함된 양이온 또는 양전하는 여과 구조물을 통과하는 단계; 및

3) 시료내 복수개의 제1 DNA 단편, 상기 제1 DNA 단편에 상보적인 염기서열을 포함하는 제2 DNA 단편 및 DNA 리가아제(ligase)를 여과 구조물을 중심으로 시료 주입부 방향의 유체 채널에 농축시키면서 DNA 리가아제에 의해 DNA를 합성하는 단계;

를 포함하는 DNA 합성용 마이크로 칩을 이용한 DNA 합성방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 DNA 합성용 마이크로 칩 및 이를 이용한 DNA 합성방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] DNA(Deoxyribonucleic acid)는 핵산의 일종으로서, 주로 세포의 핵 안에서 생물의 유전 정보를 저장하는 물질이다. DNA는 나선 구조를 이루는 뼈대(Backbone chain)와 핵염기(Nucleobase)로 구성되어 있으며, 핵염기에 의해 구분되는 네 종류의 뉴클레오타이드가 중합되어 이중 나선 구조를 이룬다.

[0003] 이러한 DNA의 연구에 있어서, 가장 기초적이고 중요한 것은 필요한 유전 정보를 가진 DNA를 효율적으로 합성하는 것이고, 현재 올리고뉴클레오타이드(Oligonucleotide)와 DNA 중합효소를 이용해 DNA를 합성하는 방법이 주로 이용되고 있다.

[0004] 이렇게 유전자 합성 기술을 통해 만들어진 합성 유전자는 합성 유전자 및 합성 게놈을 이용한 형질변환(transformation), 형질변환된 세포를 이용한 셀룰로스 공급 원료(cellulosic feedstock)의 바이오 연료로의 변환, 바이러스 게놈의 합성을 통한 백신의 개발, 유전자 클러스터의 디자인 및 합성을 통한 새로운 약 분자 생산 기술의 개발, 유전자 디자인 알고리즘과 유전자 합성 기술을 이용한 최적화된 항체(antibody) 합성 등과 같은 다양한 분야에 활용될 수 있으며, 수천 베이스 페어(Kbp) 이상의 긴 DNA를 합성하는 기술은 현재 각광받고 있는 합성 생물학 분야를 주도할 기반 기술이 될 것으로 전망되고 있다.

[0005] 그러나 종래 유전자 합성 방법은 염기쌍(base pair)형태로 존재하는 DNA의 특성을 이용하여 끝 부분의 염기만 겹치게 되도록 만든 올리고뉴클레오타이드를 DNA 중합효소(DNA Polymerase)를 사용해서 부족한 부분을 합성하는 방법이고, 따라서 DNA 합성 과정의 통제가 불가능하기 때문에 한번에 1-2 kb의 크기를 갖는 유전자를 합성하게 되면 실질적으로 오류 없는 유전자를 만드는 것이 불가능한 것으로 알려져 있다.

[0006] 종래 유전자 합성에서 가장 큰 문제점은 화학적 합성으로 만들어진 올리고가 대략 1 error/100 bp으로 오류율을 갖는다는 점인데, 이에, 유전자 합성의 오류율을 줄이기 위한 다양한 연구가 진행되었으나, 현재까지 나와 있는 기존의 유전자 합성법은 여전히 오랜 시간을 필요로 하고, 많은 노력과 비용이 들며, 합성된 유전자들 역시 높

은 오류율을 가지고 있다. 특히, 단편 DNA들을 포함하는 시료를 사용하여 긴 DNA를 합성하는 경우, 고가의 시료를 복수 회에 걸쳐서 반복적으로 투입하여야 하는 관계로 매우 고비용이 소모된다는 단점이 있다.

[0007] 본 발명과 관련한 선행기술로는 대한민국 등록번호 제10-0519895호(특허문헌 1)가 개시되어 있으며, 상기 특허문헌 1에서는 유전자공학분야에서 유용한 DNA 합성반응촉진제 등을 활용한 DNA 합성방법에 관한 기술이 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 등록번호 제10-0519895호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 종래 긴 염기서열을 갖는 DNA의 합성시, 오류율이 높고 고비용이 소모되는 문제점을 해결하여 저렴한 비용으로도 합성의 정확도를 높일 수 있는 DNA 합성용 마이크로 칩 및 이를 이용한 DNA 합성방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩은

[0011] 내부 표면이 음전하로 대전되거나 또는 음전하를 띄는 유체 채널;

[0012] 상기 유체 채널의 중간에 위치하면서 양이온만을 선택적으로 통과시키는 여과 구조물; 및

[0013] 상기 유체 채널의 양 말단에 시료 주입부 및 시료 유출부;

[0014] 을 포함하고,

[0015] 상기 여과 구조물은 상기 유체 채널의 다른 채널 부분보다 좁은 직경을 갖는 채널 부위이면서, 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머인 것을 특징으로 하며,

[0016] 상기 시료 주입부를 통해 주입되는 시료는 제1 DNA 단편 그룹, 상기 제1 DNA 단편에 상보적 염기서열을 포함하는 제2 DNA 단편 그룹 및 DNA 리가아제(ligase)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 DNA 합성방법은 본 발명에 따른 상기 DNA 합성용 마이크로 칩을 이용하는 것이다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩을 이용하여 DNA를 합성하게 되면, 긴 염기서열을 갖는 DNA 합성시 발생하는 합성의 오류율을 현저히 낮출 수 있다. 이는 본 발명에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩에 포함된 유체 채널의 한정된 공간에서 DNA 단편 및 DNA 리가아제(ligase)를 고농도로 농축시킴으로써 가능하게 된다. 또한 저농도의 시료를 사용하는 경우에도 고농도로 농축하여 DNA 합성이 가능하기 때문에 고가인 생/화학 시료의 사용량을 줄일 수 있어 종래 기술에 비해 경제성이 현저히 우수하다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩을 나타내는 그림이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩에 포함된 여과 구조물을 나타내는 사진이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩 내에서의 음전하를 띄는 DNA 단편 및 DNA 리가아제(ligase)의 농축 과정을 보여주는 그림이다.
- 도 4는 음전하 시료들의 농축 결과를 보여주는 사진이다.
- 도 5는 도 5는 DNA 단편들을 농축시켜 DNA를 합성하는 과정의 예시를 도식화한 그림이다.
- 도 6은 농축 후 DNA 합성의 과정을 나타내는 그림이다.
- 도 7은 농축 후 DNA 합성 효과를 보여주는 전기영동 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이에 본 발명자들은 DNA 합성시 오류율을 현저히 낮출 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과 본 발명에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩 및 이를 이용한 DNA 합성방법을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 구체적으로 본 발명에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩은
- [0022] 내부 표면이 음전하로 대전되거나 또는 음전하를 띄는 유체 채널(100);
- [0023] 상기 유체 채널의 중간에 위치하면서 양이온만을 선택적으로 통과시키는 여과 구조물(110); 및
- [0024] 상기 유체 채널의 양 말단에 시료 주입부(120) 및 시료 유출부(130);
- [0025] 을 포함하고,
- [0026] 상기 여과 구조물은 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머(140)를 포함하는 것을 특징으로 하며,
- [0027] 상기 시료 주입부를 통해 주입되는 시료는 제1 DNA 단편 그룹, 상기 제1 DNA 단편에 상보적 염기서열을 포함하는 제2 DNA 단편 그룹 및 DNA 리가아제(ligase)를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 본 발명에 따른 상기 DNA 합성용 마이크로 칩을 이용하여 DNA를 합성하게 되면, 종래 기술에 의해 DNA 합성시 발생하는 오류율을 현저히 낮출 수 있게 된다. 또한 기존 DNA의 합성에 사용되는 시료가 고가이면서 저농도임에도, 종래 기술에 의하는 경우 시료를 반복적으로 투입할 수 밖에 없어 DNA 합성시 제조 단가가 높아질 수 밖에 없었는데, 본 발명은 고가이면서 저농도인 시료를 고농도로 농축한 후 이를 가지고 DNA를 합성하기 때문에 시료 사용량이 현저히 줄어들면서 제조 단가도 현저히 절감되는 효과가 있다. 또한 본 발명은 DNA 단편 및 DNA 리가아제(ligase)를 고농도로 농축한 후 단기간에 DNA를 합성하는 기술이기 때문에 DNA의 제조 시간을 대폭 단축할 수 있다.
- [0029] 이렇게 본 발명에 따른 DNA 합성용 마이크로 칩이 시료에 포함된 제1 DNA 단편 그룹, 제2 DNA 단편 그룹 및 DNA 리가아제(ligase)를 고농도로 농축하는 것이 가능한 이유는 상기 여과 구조물이 양이온만을 선택적으로 투과시키고 음이온에 해당하는 DNA 단편 및 DNA 리가아제(ligase)는 투과시키지 않는 선택투과성을 나타내기 때문이다.
- [0030] 한편, 본 발명에서 상기 유체 채널은 내부 표면이 음전하로 대전되거나 또는 음전하를 띄는 유체 채널일 수 있으며, 음전하로의 대전은 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 음전하를 코팅하는 방법으로 대전할 수 있다. 또한 음전하를 띄는 유체 채널이라면 모두 이에 포함될 수 있으며, 바람직하게는 음전하를 띄는 유리 등이 이에 해당할 수 있다.
- [0031] 한편, 상기 여과 구조물은 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 바람직하게는 유속을 향상시키기 위해 상기 유체 채널의 다른 채널 부분보다 좁은 직경을 갖는 채널 부위일 수 있다. 또한 상기 여과 구조물은 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머로 이루어지거나 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머를 일부분으로 포함하는 것일 수 있다. 이렇게 상기 여과 구조물이 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머이거나, 이를 포함하기 때문에 음이온인 DNA 단편 및 DNA 리가아제(ligase)는 투과시키지 않고 양이온만을 선택적으로 투과시키게 된다. 또한 상기 여과

구조물을 이루거나 포함되는 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머는 양이온만을 선택적으로 투과시키는 나노다공성 폴리머라면 특별한 제한 없이 모두 포함될 수 있으나, 바람직하게는 poly-AMPS(poly-(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)) 또는 poly-SS(poly-(styrene sulfonate)) 일 수 있다. 한편, 전술한 바와 같이 유체 채널의 내부 표면은 음전하로 코팅되어 있으므로, 상대적으로 음전하가 매우 밀집한 좁은 통로가 형성되고, 결과적으로 DNA 단편 또는 DNA 리가아제(ligase) 및 DNA 중합효소(polymerase)와 같은 음전하성 물질들은 상기 여과 구조물을 통과할 수 없게 되는 반면, 양전하 물질들만이 선택적으로 상기 여과 구조물을 통과하게 된다. 이를 보다 구체적으로 살펴보면, 양이온(또는 양전하)과 시료의 일부는 여과 구조물의 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머를 통과하여 폐기물 유출부(150)를 통해 배출될 수 있다. 또한 음이온, 양이온(또는 양전하) 등을 제외한 나머지 시료는 유체 채널 및 여과 구조물을 그대로 통과하여 시료 유출부를 통해 배출되게 된다. 또한 여과 구조물에 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머가 포함되는 구조일 경우, 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 여과 구조물 내 유체 채널의 상단 또는 하단이 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머로 이루어질 수 있다. 또한 이렇게 유체 채널의 상단 또는 하단이 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머로 이루어지게 되면, 상기 상단 또는 하단의 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머와 폐기물 유출부가 연결될 수 있다.

[0032] 한편, 시료 주입부로 주입되는 상기 시료에는 제1 DNA 단편 그룹, 제2 DNA 단편 그룹 및 DNA 리가아제(ligase)를 포함할 수 있으며, 상기 제2 DNA 단편 그룹은 상기 제1 DNA 단편에 상보적 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 특히 상기 제1 DNA 단편 그룹은 복수개의 동일하거나 상이한 염기서열인 제1 DNA 단편의 집합일 수 있다. 또한 상기 제2 DNA 단편 그룹은 제1 DNA 단편에 상보적 염기서열을 포함하면서 복수개의 동일하거나 상이한 염기서열인 제2 DNA 단편의 집합일 수 있다. 또한 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 상기 제1 DNA 단편 또는 제2 DNA 단편은 10 bp 이상 길이의 동일하거나 상이한 염기서열일 수 있다.

[0033] 한편, 상기 여과 구조물을 중심으로 시료 주입부 방향의 유체 채널에서는 DNA 합성이 이루어진다. 보다 구체적으로는 상기 여과 구조물(특히 여과 구조물 내의 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머)은 양이온을 선택적으로 투과시키며, 상기 여과 구조물을 중심으로 시료 주입부 방향의 유체 채널에서는 음이온인 복수개의 제1 DNA 단편 및 복수개의 제2 DNA 단편이 농축되며, 상기 농축된 복수개의 제1 DNA 단편 및 복수개의 제2 DNA 단편은 DNA 리가아제(ligase)로 인한 DNA 라이게이션(ligation)으로 DNA 합성이 이루어질 수 있다. 또한 상기 유체 채널은 시료 주입부 방향과 시료 유출부 방향 간의 전압 차이가 형성되도록 전압을 인가하여 시료 주입부에서 시료 유출부 방향으로 시료의 흐름을 유도하되, 상기 여과 구조물(특히 여과 구조물 내의 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머)에서 양이온을 선택적으로 투과시키는 것일 수 있다. 또한 상기 DNA 합성은 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 바람직하게는 제1 DNA 단편 또는 제2 DNA 단편의 5' 말단을 인산화시킨 후, DNA 리가아제(ligase)를 이용한 DNA 라이게이션으로 DNA 합성이 이루어질 수 있다.

[0034] 한편, 상기 여과 구조물의 상단 또는 하단에 연결된 폐기물 유출부를 더 포함할 수 있다. 또한 상기 여과 구조물의 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머를 통과한 양이온은 폐기물 유출부를 통해 배출되는 것일 수 있다.

[0035] 한편, 본 발명의 또 다른 특징에 따른 DNA 합성방법은 본 발명에 따른 상기 DNA 합성용 마이크로 칩을 이용한 DNA 합성방법이다. 이러한 DNA 합성방법은 종래 기술에 비해 합성의 오류율을 현저히 개선하는 것이다.

[0036] 구체적으로 상기 DNA 합성용 마이크로 칩을 이용한 DNA 합성방법은

[0037] 1) 시료 주입부에 시료를 주입하는 단계;

[0038] 2) 시료내 포함된 양이온 또는 양전하는 여과 구조물을 통과하는 단계; 및

[0039] 3) 시료내 복수개의 제1 DNA 단편, 상기 제1 DNA 단편에 상보적인 염기서열을 포함하는 제2 DNA 단편 및 DNA 리가아제(ligase)를 여과 구조물을 중심으로 시료 주입부 방향의 유체 채널에 농축시키면서 DNA 리가아제에 의해 DNA를 합성하는 단계;

[0040] 를 포함한다.

[0041] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에 서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 실시예

[0043] <DNA 합성용 마이크로 칩의 제작>

[0044] 먼저 하기 도 1((a)는 단면도, (b)는 입체도)과 같은 구조의 DNA 합성용 마이크로 칩을 제조하였다. 이러한 DNA 합성용 마이크로 칩은 11.6 μm 의 깊이를 가진 마이크로 플루이딕스 기반의 유리 칩으로서, 유체 채널의 내부는 음전하를 띄는 유리로 이루어져 있다. 특히 상기 DNA 합성용 마이크로 칩에서 여과 구조물은 유체 채널의 상하에 양이온 선택투과성을 가진 나노다공성 폴리머로 이루어져 있어서 양이온만을 선택적으로 투과시킨다. 이러한 여과 구조물을 형성하는 과정을 보다 자세히 살펴보면, 먼저 상기 여과 구조물을 제외한 나머지 부위를 먼저 만든 다음, 나노 크기의 구멍들을 가진 중합체를 교차로의 위와 아래 통로에 만들어주었다. 이를 위해 중합체와 유리가 공유결합 할 수 있게끔 Trimethylsilyl metacrylate(TMSMA)를 이용하여 먼저 코팅 하였다. 그 후 단량체인 2-Acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid (AMPS)와 광개시제, 가교제를 먼저 채널에 채우고, 마스크를 이용하여 목표 위치를 제외한 나머지 부분을 가림. 노광장비를 이용하여 자외선 파장대의 빛을 쬐주어 여과 구조물을(본 발명자들은 이를 'poly-AMPS' 로 칭함)가 형성하였다(하기 도 2 참조).

[0045] <DNA 합성용 마이크로 칩에 시료 주입>

[0046] 이러한 DNA 합성용 마이크로 칩의 시료 주입부에 시료로서 제1 DNA 단편들로 구성된 제1 DNA 단편 그룹, 이의 상보적 염기서열인 제2 DNA 단편들로 구성된 제2 DNA 단편 그룹, 그리고 DNA 리가아제(ligase)가 포함된 시료를 주입하였다. 여기서 DNA 리가아제는 New England Biolabs 사의 M0202S를 사용하였으며, 버퍼는 동일 회사의 B0202S를 사용하였다. 그리고 유체 채널에는 전압의 차이를 형성하여 시료의 흐름을 유도하게 된다.

[0047] <DNA 합성용 마이크로 칩에서의 시료 농축>

[0048] 하기 도 3은 DNA 합성용 마이크로 칩 내에서의 음전하를 띄는 DNA 단편 및 DNA 리가아제(ligase)의 농축 과정을 보여주는 그림이다. 하기 도 3을 보다 구체적으로 살펴보면 도 3의 (a)에서 왼쪽 시료 주입구 부위에 60V, 오른쪽 시료 배출부 부위에 45V를 건다. 위와 아래 폐기물 유출부 부위에는 전압을 걸지 않는다. 이때에 전기삼투 효과에 의해서 유체가 오른쪽으로 흐른다. 도 3의 (b)에서 위와 아래 폐기물 유출부쪽 저수지에 0V를 걸어준다. poly-AMPS(여과 구조물)는 음전하를 띤 중합체이므로, 양이온만을 선택적으로 통과시킨다. 양이온과 양전하를 띤 시료만이 폐기물 유출부로 들어간다. 도 3의 (c)에서 위와 아래쪽 poly-AMPS(여과 구조물) 쪽으로 양이온들이 빨려가듯이 시료 유출부로 유입되면, 전기장이 생성되고, 이온 고갈 지역이 생기게 된다. 도 3의 (d)에서 강해진 전기장에 의해, 음전하 시료들은 시료 주입부 방향으로 전기영동적 힘을 받을 받아, 이온 고갈 지역 왼쪽으로 음전하 시료들(제1 DNA 단편, 제2 DNA 단편 및 DNA 리가아제(ligase))이 고농도로 축적되게 된다.

[0049] 한편, 하기 도 4는 이러한 음전하 시료들의 농축 결과를 보여주는 사진이다(10 mM phosphate buffer, 100 μM fluorescein을 사용. 시료 주입부에 100V, 배수 유출부에 63V 전압을 인가).

[0050] <농축된 음전하 시료에서의 DNA 합성>

[0051] 제1 DNA 단편 그룹(S1, S2, ..., Sn-1, Sn) 및 상보적인 제2 DNA 단편 그룹(NS1, NS2, ..., NSn-1, NSn)이 음전하로서 여과 구조물을 기준으로 유체 채널의 좌측에서 충분히 고농도로 농축하게 되면 이를 가지고 긴 사슬의 DNA를 합성하였다. 이의 과정은 먼저, DNA 절편의 5' 말단에 인산화를 시키고, 모두 섞어주면, sticky end 형태로 절편들이 서로 붙게 되어 원래 원하는 모양의 이중나선 DNA 형태가 되었다. 그 후, DNA 리가아제(ligase)를 이용하여 양 옆에 위치한 DNA를 공유결합 시켜서, 이중나선 DNA를 완성하였다.

[0052] 이러한 인산화 및 라이게이션 과정을 보다 상세히 살펴보면 DNA 절편 인산화를 위한 시약으로 T4 Polynucleotide Kinase(T4 PNK buffer) 완충액과 10 mM ATP, Nuclease free water를 섞어 사용하였다. 효소는 T4 PNK를 사용하였다. 이에 DNA 100 μM 씩을 넣어 각각 따로 반응시켰다. 인산화된 DNA 절편들을 한데 모았다. 합쳐진 DNA 절편들을 라이게이션 하기 위해, 인산화시킨 DNA 절편들과 T4 리가아제 완충액, T4 리가아제, 그리고 Nuclease free water를 섞은 혼합물을 섞었다.

[0053] 하기 도 5는 이러한 DNA 단편들을 농축시켜 DNA를 합성하는 과정의 예시를 도식화한 그림이다(인산화를 시킨 S1, S2, S3, NS1, NS2를 섞어주면, 반만큼 상보적인 DNA 절편들을 이용하였기 때문에 이중나선 형태로 정렬됨. 이에 리가아제를 이용하여 라이게이션 시켜주면 DNA 합성이 완성됨). 또한 도 6은 DNA 합성용 마이크로 칩 내에서 농축 후 DNA 합성의 과정을 나타내는 그림이다.

[0054] 실험예

[0055] <DNA 합성용 마이크로 칩을 이용한 DNA 합성 효율 측정>

[0056] 농축 칩을 이용하여 라이게이션 효율 향상을 확인하기 위해, 실험군으로 인산화된 DNA 절편들을 농축과 동시에 라이게이션 시킨 시료를 사용하고, 대조군으로는 시료 주입부에 위치한 저수지에서 뽑아낸 비농축성 반응으로 라이게이션 시킨 시료를 사용하였다. 이를 Polymerase chain reaction(PCR) 실험을 통해 S1, S2, S3가 이어진 주형 DNA를 증폭시켰으며, 총 16사이클을 돌렸다. PCR에 사용된 시료로는, AccuPower® PCR PreMix를 사용하였다. 이 PreMix는 Top DNA 폴리머라아제, dNTP, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, 그리고 미량의 안정제와 전기영동에서 사용되는 추적 염료가 들어있다. 하기 도 7은 이의 결과를 나타내는 사진이다. 하기 도 7에서 1번 레인은 DNA ladder(사진 왼쪽에, 200과 400 base 표시함)이다. 하기 도 7에서 2번 레인은 Control(S(1), S(2), S(3)이 연결된 것)이다. 또한 하기 도 7에서 3번 레인은 0.1X 농도로 시작하여 농축을 시키고 그것을 OUT으로 뽑아내서 확인한 것이다. 또한 하기 도 7에서 4번 레인은 0.1X 농도로 만들어 IN에 넣었던 시료이다. 하기 도 7에서와 같이 농축의 결과물인 3번 레인에서는 S(1), S(2), S(3)이 연결된 것이 나왔으나, 4번 레인에서는 발견되지 않았다. 따라서, 본 발명에 의한 농축된 시료에 의한 경우(하기 도 7의 3번 레인)에도 DNA 합성이 가능함을 알 수 있다.

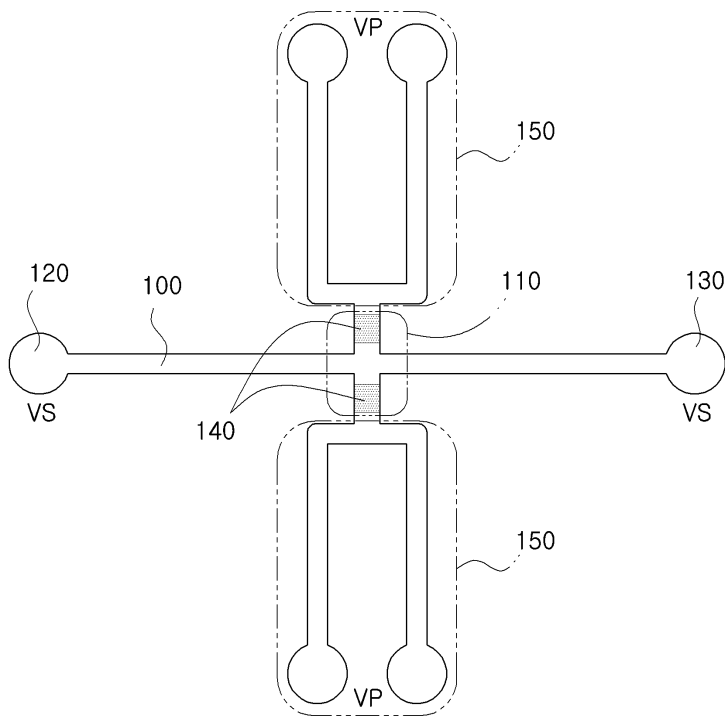
[0057] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

부호의 설명

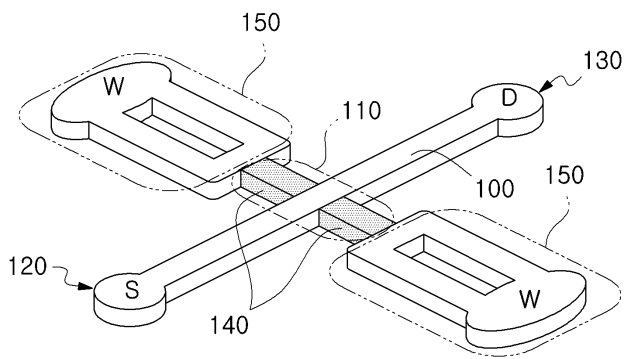
- [0058] 100: 유체 채널
- 110: 여과 구조물
- 120: 시료 주입부
- 130: 시료 유출부
- 140: 양이온 선택투과성 나노다공성 폴리머
- 150: 폐기물 유출부

도면

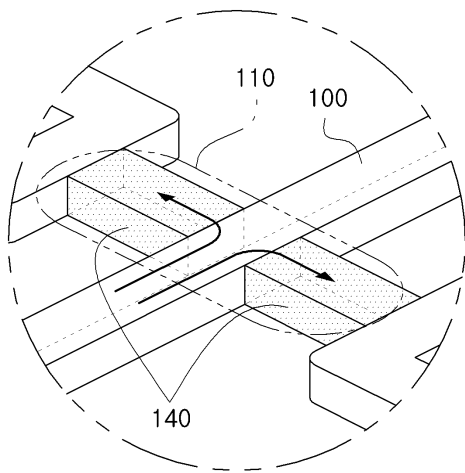
도면1a



도면1b



(a)

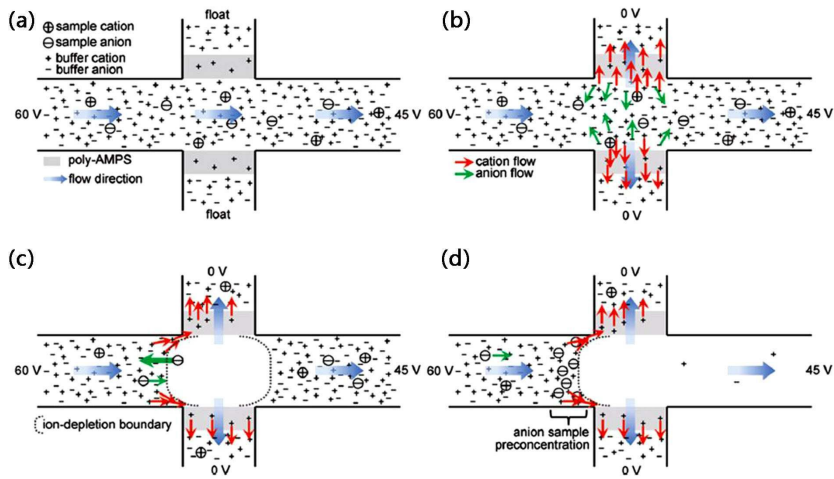


(b)

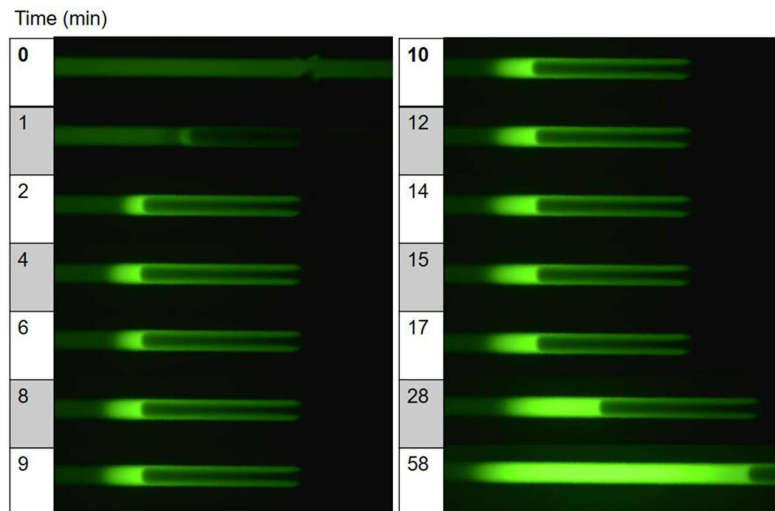
도면2



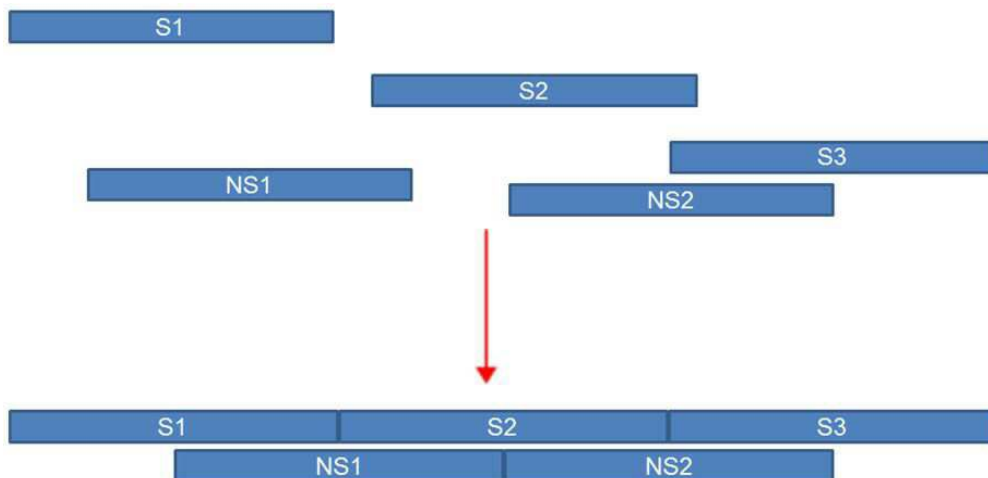
도면3



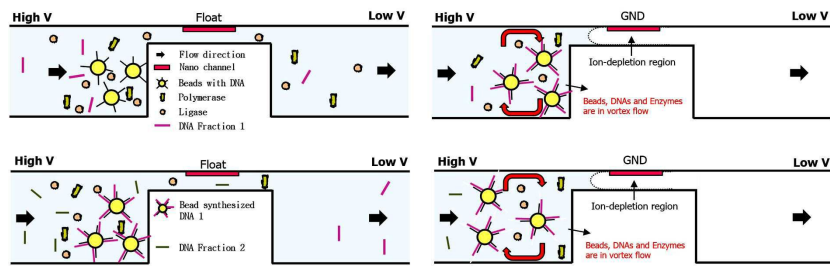
도면4



도면5



도면6



도면7

