(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 12 월 30 일 (30.12.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/199423 A9

(51) 국제특허분류:
C12N 15/10 (2006.01) *G01N 33/553* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/006388

(22) 국제출원일: 2015 년 6 월 23 일 (23.06.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0077697 2014 년 6 월 24 일 (24.06.2014) KR

(71) 출원인: **(주)바이오니아 (BIONEER CORPORATION)** [KR/KR]; 306-220 대전시 대덕구 문평서로 8-11, Daejeon (KR).

(72) 발명자: **박한오 (PARK, Han Oh)**; 305-761 대전시 유성구 엑스포로 448, 208-601, Daejeon (KR). **정소선 (CHUNG, So Sun)**; 306-803 대전시 대덕구 덕암로 265 번길 81, 716 호, Daejeon (KR). **맹준호 (MAENG, Joon Ho)**; 306-506 대전시 유성구 봉산로 20 번길 15, 301 호, Daejeon (KR).

(74) 대리인: **이처영 (LEE, Cheo Young)** 등; 135-748 서울시 강남구 테헤란로 123 11 층, 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, 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, KN, KP, 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))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING NUCLEIC ACID USING MAGNETIC PARTICLE

(54) 발명의 명칭 : 자성 입자를 이용한 핵산 분리 방법

[Fig. 1]

(57) Abstract: The present invention relates to a method for isolating and purifying a nucleic acid using a magnetic particle and, more specifically, to a method for isolating a nucleic acid from a biological sample using a magnetic particle comprising the steps of: (a) adding a magnetic particle having an average particle size of 50nm - 1μm to a biological sample including a nucleic acid to thereby combine an insoluble aggregate or a nucleic acid molecule with the magnetic particle; and (b) isolating the magnetic particle combined with the insoluble aggregate or the nucleic acid molecule using a magnetic field to thereby obtain the nucleic acid. The method for isolating a nucleic acid using a magnetic particle of the present invention can dramatically reduce the time required to isolate a nucleic acid compared to a prior method and completes purification in a short time using a silica magnetic particle even in a process after a nucleic acid or protein has been isolated, thereby having an advantage of being capable of completing the whole process in a much faster time compared to centrifugation or gravity separation, etc. and also improving the yield.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2015/199423 A9

— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(48) 본 정정판 공개일: 2016 년 4 월 21 일

(15) 정정사항에 관한 정보:
2016 년 4 월 21 일 자 공지 참조

본 발명은 자성 입자를 이용한 핵산 분리 정제 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 (a) 핵산을 포함하는 생체 시료에 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm 인 자성 입자를 첨가하여, 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 상기 자성 입자를 결합시키는 단계; 및 (b) 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 결합한 상기 자성 입자를 자기장을 이용하여 분리하여 , 핵산을 수득하는 단계를 포함하는 자성 입자를 이용하여 생체 시료로부터 핵산 분리하는 방법에 관한 것이다 . 본 발명의 자성 입자를 이용한 핵산 분리방법은 종래 방법보다 핵산 분리 시간을 획기적으로 단축시킬 수 있으며 , 핵산 또는 단백질 분리 이후 과정에서도 실리카 자성 입자를 이용하여 빠른 시간 내에 정제를 완료함으로써 원심분리법이나 중력분리법 등에 비해 월등하게 빠른 시간 내에 전체 과정을 완료할 수 있으며, 수득율 또한 향상시킬 수 있는 장점이 있다.

명세서

발명의 명칭: 자성 입자를 이용한 핵산 분리 방법

기술분야

[1] 본 발명은 자성 입자, 바람직하게는 소수성 자성 입자 또는 실리카 자성 입자를 이용한 핵산 분리 정제 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 (a) 핵산을 포함하는 생체 시료에 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 자성 입자를 첨가하여, 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 상기 자성 입자를 결합시키는 단계; 및 (b) 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 결합한 상기 자성 입자를 자기장을 이용하여 분리하여, 핵산을 수득하는 단계; 를 포함하는 자성 입자를 이용하여 생체 시료로부터 핵산 분리하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 생물학적 물질에서 신속하고 빠르게 고순도의 핵산 또는 단백질을 분리, 정제하는 방법은 생화학 연구 및 진단 프로세스에 있어서 무엇보다 중요하다. 이를 위해 세포 용해 용액내에 포함된 여러 종류의 물질들로부터 핵산 또는 단백질만을 선택적으로 효과적이고 재현성 있는 분리 방법에 대한 다양한 연구가 이루어져 왔다.

[4] 최근에는 자성 입자를 이용하여 세포 혼합물에서 핵산 또는 단백질을 분리하는 연구가 활발히 진행중이다. 자성 입자를 이용한 방법은 세포 혼합물에 자성 입자를 첨가해줌으로써, 핵산 또는 단백질과 자성 입자 사이에 결합을 유도하여 결합체를 형성시킨 후 외부 자기장을 이용하여 자성 입자와 결합된 핵산 또는 단백질만을 선택적으로 분리시키는 방법이다. 일반적으로 핵산 또는 단백질만을 선택적으로 분리 정제하는데 사용되는 자성 입자의 입자크기는 500 내지 2000nm 정도가 적당하다고 알려져 있다.

[5] 미국 특허 5665554호에서는 게놈 DNA 물질에서 플라스미드 DNA를 분리시키는 방법으로 자성 비드와 자석을 이용하는 방법을 제시하고 있다. 상세하게는 플라스미드 DNA와 결합하는 자성 비드를 첨가하여 자성 비드와 플라스미드 DNA를 결합시켜 침전시키고 자석을 이용해 자성 비드와 플라스미드 DNA결합을 제외한 상층액을 제거하여 플라스미드 DNA만을 분리하는 방법이다.

[6] 미국 특허 6027945호에서는 실리카 자성 입자를 이용하여 생물학적 타겟 물질과 실리카 자성 입자의 결합체를 형성시킨 후 자기장을 제공해 줌으로써 타겟 물질을 분리하는 방법에 대해 제시하고 있으며, 실리카 자성 입자 1mg에 적어도 2ug의 타겟 물질이 결합되며 60%이상의 수득율을 제시하고 있다.

[7] 미국 특허 7078224호에서는 1 ~ 15μm 사이즈의 자성 입자를 이용하는데, 상기 자성 입자는 pH 의존성 이온 교환 입자, 실리카 산화물로 코팅된 실리카 자성

입자를 이용하여 분리하는 방법을 제시하고 있다. 그러나, 이러한 실리카 코팅 자성 입자는 제조 과정이 복합하고, 입자 크기 분포를 균일하게 제어하기 어려운 문제점이 있다.

[8] 본 발명자들은 보다 쉽게 실리카 자성 입자를 제조하고, 입자크기를 균일하게 제어할 수 있는 새로운 제조방법을 개발하였으며(한국 등록특허 10-1053023호), 상기 방법에 의해 제조되는 실리카 자성 입자는 표면에 기능기를 갖으며 구형의 형태로 입자 크기 분포가 균일한 장점이 있으며. 그 입자 크기 또한 1 내지 20 μm로 제조된다.

[9] 생물학적 시료에서 자성 입자와 결합된 핵산 또는 단백질만을 신속하게 분리하기 위해 외부에서 자기장을 보다 손쉽게 제공해주기 위한 다양한 제품도 다양하게 출시되고 있다. 일 예로 *Maglisto*(바이오니아사)는 생물학적 시료를 주입할 수 있는 튜브와 튜브가 고정되는 튜브고정부가 있으며, 튜브와 상응하는 외부 위치에서 자기장을 제공할 수 있는 자석고정부를 제공하고 있다. 이 때 제공되는 자석고정부도 튜브고정부와 용이하게 자석으로 탈부착이 가능하게 설계되어 있어, 사용자가 손쉽게 생물학적 물질에서 핵산 또는 단백질을 분리할 수 있는 장점이 있다.

[10] 그러나, 상기 방법들에서 사용되는 자성 입자는 비용해성 응집물 또는 타겟핵산과의 결합력이 충분하지 않아, 결합물질에 대한 결합력을 향상시킨 자성 입자의 개발이 요구되고 있다.

[11] 이에, 본 발명자들은 자성 입자, 바람직하게는 소수성 자성 입자 또는 실리카 자성 입자를 이용하여 핵산을 분리하는 경우, 단백질 변성 응집물을 포함한 비용해성 응집물 또는 핵산분자를 보다 신속하고 효율적으로 분리할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[12]

[13] 발명의 요약

[14] 본 발명의 목적은 생체 시료로부터 비용해성 응집물 또는 타겟핵산을 보다 신속하고 효율적으로 분리할 수 있는 자성 입자를 이용하여 생체 시료로부터 핵산 분리하는 방법을 제공하는데 있다.

[15] 본 발명의 다른 목적은 상기 자성 입자를 이용한 생체 시료로부터 핵산을 전자동으로 분리하는 전자동 핵산 분리 장치를 제공하는데 있다.

[16] 본 발명의 또다른 목적은 상기 자성 입자를 이용한 생체 시료로부터 핵산을 전자동으로 분리하는 전자동 핵산 분리 장치를 이용한 전자동 핵산 분리 방법을 제공하는데 있다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 평균 입경 크기가 50 nm ~ 1μm인 자성 입자를 포함하는 생체시료로부터 핵산 분리 정제용 키트를 제공하는데 있다.

[18]

[19] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 핵산을 포함하는 생체 시료에 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 자성 입자를 첨가하여, 비용해성 응집물 또는

핵산분자와 상기 자성 입자를 결합시키는 단계; 및 (b) 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 결합한 상기 자성 입자를 자기장을 이용하여 분리하여, 핵산을 수득하는 단계;를 포함하는 자성 입자를 이용하여 생체 시료로부터 핵산 분리하는 방법을 제공한다.

[20] 본 발명은 또한, 수평방향 및 수직방향으로 이동 가능하게 설치되며, 다수의 피펫을 분리 가능하도록 장착하기 위한 피펫블록; 및 멀티웰 플레이트의 특정 단위 웰에 자기장을 인가 및 해제하기 위한 자기장 인가부;를 포함하고, 상기 멀티웰 플레이트에 생체시료와 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 자성 입자가 첨가되는 것을 특징으로 하는 생체 시료로부터 핵산을 전자동으로 분리하는 전자동 핵산 분리 장치를 제공한다.

[21] 본 발명은 또한, 상기 전자동 핵산 분리 장치를 이용하여 생물학적 시료로부터 타겟핵산을 분리하는 방법으로서,

[22] 1) 자성 입자를 멀티 웰 플레이트의 특정 단위 웰에 첨가하여 타겟핵산을 제외한 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 자성 입자를 결합시키는 단계;

[23] 2) 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 결합된 자성 입자를 제외한 타겟핵산을 함유한 혼합물을 수득하는 단계;

[24] 3) 상기 수득된 혼합물에 친수성 자성 입자를 첨가하여 타겟핵산과 결합시키는 단계;

[25] 4) 타겟핵산이 결합된 친수성 자성 입자를 제외한 혼합물을 제거하는 단계; 및

[26] 5) 타겟핵산과 결합된 친수성 자성 입자에서 타겟핵산을 분리시키는 단계;

[27] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 전자동 핵산 분리 방법을 제공한다.

[28] 본 발명은 또한, 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 자성 입자를 포함하는 생체시료로부터 핵산 분리정제용 키트 및 장치를 제공한다.

[29]

도면의 간단한 설명

[30] 도 1은 본 발명의 자성 입자를 사용하여 대장균 세포로부터 분리한 플라스미드 DNA를 제한효소 처리 후 아가로스 젤에 전기 영동한 결과를 나타낸 도이다.

[31] 도 2는 본 발명의 방법을 이용하여 혈액에서 핵산 DNA을 추출하여 아가로스젤에 전기 영동한 결과를 나타낸 도이다.

[32] 도 3은 본 발명의 방법을 이용하여 박테리아 배양액에서 핵산 DNA을 추출하여 아가로스젤에 전기 영동한 결과를 나타낸 도이다.

[33] 도 4는 본 발명의 방법을 이용하여 배양된 세포에서 핵산 DNA을 추출하여 아가로스젤에 전기 영동한 결과를 나타낸 도이다.

[34] 도 5는 본 발명의 방법을 이용하여 동물조직세포에서 핵산DNA을 추출하여 아가로스젤에 전기 영동한 결과를 나타낸 도이다.

[35] 도 6은 본 발명의 방법을 이용하여 식물조직세포에서 핵산DNA을 추출하여 아가로스젤에 전기 영동한 결과를 나타낸 도이다.

[36] 도 7은 본 발명의 방법을 이용하여 배양된 다양한 세포에서 핵산 RNA을 추출하여 아가로스젤에 전기 영동한 결과를 나타낸 도이다.

[37] 도 8은 자동정제장치의 개략도이다.

[38] 도 9는 베이스 플레이트 사용 상태도이다.

[39] 도 10은 베이스 플레이트에 튜브랙이 장착된 상태도이다.

[40] 도 11은 베이스 플레이트 사용 상태도이다.

[41] 도 12는 본 발명의 실시예 5의 방법이 적용된 자성 입자를 분리하기 위한 자석부재장치이다.

[42] 도 13은 베이스 플레이트에 자석부재가 배치된 사용 상태도이다.

[43] 도 14는 자석부재가 배치된 베이스 플레이트에 멀티 웰 플레이트가 삽입배치된 단면도이다.

[44] 도 15는 자기장 인가부가 구비된 자석장착부에 대한 사시도이다.

[45] 도 16은 자성 입자를 이용한 타겟핵산 분리 방법에 대한 흐름도이다.

[46] 도 17은 같은 시료를 여러 개를 실시예 2와 같은 방법이 적용된 전자동 핵산추출장비로 추출을 진행하여 추출된 플라스미드를 아가로스 겔에 전기영동한 결과이다.

[47] 도 18은 플라스미드 핵산을 추출하고 삽입된 목적 유전자 주위의 특정 염기서열을 분리할 수 있는 제한효소로 처리하였을 때 목적 유전자의 크기만큼 적절히 절단되어 전기영동 상에서 확인한 결과이다.

[48]

[49] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[50] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[51]

[52] 본 발명은 일 관점에서, (a) 핵산을 포함하는 생체 시료에 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 자성 입자를 첨가하여, 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 상기 자성 입자를 결합시키는 단계; 및 (b) 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 결합한 상기 자성 입자를 자기장을 이용하여 분리하여, 핵산을 수득하는 단계;를 포함하는 자성 입자를 이용하여 생체 시료로부터 핵산 분리하는 방법에 관한 것이다.

[53] 또한, 상기 단계 이후에

[54] (c) (b) 단계에서 수득된 혼합물에 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 친수성 자성 입자를 첨가하여 타겟핵산과 친수성 자성 입자를 결합시키는 단계; 및

[55] (d) 타겟핵산과 결합한 친수성 자성 입자를 자기장을 이용하여 분리하여 타겟핵산을 수득하는 단계를 추가적으로 포함하여 생체시료로부터 핵산을 분리하는 방법에 관한 것이다.

[56] 상기 핵산은 DNA(deoxyribonucleic acid) 또는 RNA(ribonucleic acid)가 바람직하며, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 파지 DNA, 유전자 재조합 DNA, mRNA, rRNA, tRNA, 유전자 재조합 RNA, micro RNA 등이 예시될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 수득되는 최종 타겟핵산은 바람직하게는 플라스미드 DNA, 박테리아의 게놈 DNA, 혈액 및 동식물 조직 DNA, 동물 세포주의 DNA 및 RNA로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[57] 본 발명에서 핵산 분리 방법은 원심 분리법, 진공 분리법(vacuum manifold type), 필터 분리법, 중력 분리법 또는 크로마토그래피법, 자기장을 이용한 분리법이 다양하게 적용될 수 있다. 이는 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 자명한 사항으로 상세한 설명은 생략하기로 한다.

[58]

[59] 본 발명에 있어서, 상기 자성 입자는 소수성 자성 나노입자 또는 실리카 자성 나노입자 인 것을 특징으로 할 수 있다.

[60] 상기 자성 입자는 철, 코발트, 니켈 및 그 산화물 또는 합금 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 물질로 제조될 수 있으며, 평균 크기는 50 nm ~ 1μm, 바람직하게는 50 ~ 700 nm, 가장 바람직하게는 200 ~ 500 nm로 제조되어 사용될 수 있다.

[61] 자성 입자의 직경이 1μm 이상이 되면 자성 입자의 침강속도가 빨라져 사용상 불편함을 초래하기 때문에 바람직하지 못하다. 또한, 직경이 50nm이하일 경우, 자성이 약해서 목적하는 물질과의 분리에 문제가 생길 수 있다. 입자의 형태는 원형, 사각형, 침형 등 다양한 형태의 입자 모두 사용 가능하다.

[62] 본 발명에 있어서, 사용되는 친수성 자성 입자는 상기 자성 입자를 실리카 코팅하여 사용할 수 있다. 또한, 바이오니아에서 제조되는 AccuNanoBeadTM을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 평균 크기는 50 nm ~ 1μm, 바람직하게는 50 ~ 700 nm, 가장 바람직하게는 200 ~ 500 nm로 사용될 수 있으며, 통상의 기술자들이 핵산을 분리, 정제하기 위해 사용하는 자성 입자를 광범위하게 사용할 수 있다.

[63]

[64] 상기 자성 입자는 그 자체로 사용하거나, 수용액에 분산되어 사용할 수 있으나, 수용액에 분산되어 사용하는 것이 자성 입자의 응집을 줄일 수 있을 뿐 아니라 실험 편의성 측면에서 보다 바람직하다. 이 때 수분산액은 자성 입자 자체의 응집 및 침강을 방지하기 위하여, 분산제를 더 함유하여 보관 및 사용될 수 있으며, 상기 분산제로는 글리세롤, 알콕실레이트, 알칸올아미드, 에스테르, 아민 옥사이드, 알킬 폴리길리코사이드, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌아민, 폴리비닐아민, 베타인, 글리시네이트 및 이미다졸린 및 글리세롤로 이루어진 군에서 선택된 1종이상의 분산제를 사용할 수 있다.

[65] 상기 자성 입자를 제공하는 단계는

[66] i) 생체 시료에 직접 제공하는 단계

[67] ii) 생체 시료를 보전 처리하는 보전용액에 함께 섞어 제공하는 단계

[68] iii) 생체 시료를 보전 처리하는 보전용액을 처리한 후 제공하는 단계

[69] iv) 생체 시료 용해를 위해 완충용액에 함께 섞어 제공하는 단계

[70] v) 생체 시료 용해를 위해 완충용액을 처리한 후 제공하는 단계

[71] vi) 용해된 생체 시료에 단백질 변성 응집물을 형성시키기 위한 완충용액에 함께 섞어 제공하는 단계

[72] vii) 단백질 변성 응집물이 형성된 용액에 제공하는 단계

[73] 에서 선택되는 어느 하나 이상의 단계에서 선택적으로 첨가되어 사용될 수 있으며, ii) 생체 시료를 보전 처리하는 보전용액에 함께 섞어 제공하는 것이 자성 입자가 비용해성 응집물에 고르게 분포하여 핵산과의 분리 효과적인 측면에서 가장 바람직하다.

[74] 또한, 상기 자성 입자를 첨가하는 단계를 응용함에 있어서, 본 발명에 따를 자성 입자를 포함하여 이루어지는 핵산 또는 단백질 추출용 키트에 적용하여 사용될 수 있다.

[75] 또한, 본 발명은 자성 입자와 결합된 비용해성 단백질 변성 응집물 및 세포 잔해 입자들과 핵산을 분리 분리시키는 방법에 있어서 자기장을 갖는 물질을 이용하는 방법을 제공하는 것이다. 이는 자성 입자가 갖는 자성의 성질을 이용하는 방법으로 비용해성 단백질 변성 응집물 및 세포 잔해 입자들과 결합된 자성 입자의 외부에 자기장을 제공해 줌으로써, 용이하게 응집물을 분리시킬 수 있는 장점을 갖는다.

[76] 다른 관점에서, 본 발명은 수평방향 및 수직방향으로 이동 가능하게 설치되며, 다수의 피펫을 분리 가능하도록 장착하기 위한 피펫블록; 및 멀티웰 플레이트의 특정 단위 웰에 자기장을 인가 및 해제하기 위한 자기장 인가부;를 포함하고, 상기 멀티웰 플레이트에 생체시료와 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 소수성 자성 입자가 첨가되는 것을 특징으로 하는 생체 시료로부터 핵산을 전자동으로 분리하는 전자동 핵산 분리 장치에 관한 것이다.

[77] 본 발명은 생물학적 시료로부터 핵산 또는 단백질을 분리, 정제하는데 있어 전자동 시스템인 자동정제장치를 이용하여 자동적으로 분리, 정제 할 수 있다. 상기 자동정제장치는 한국등록특허 제10-25135호, 한국공개특허 제2011-0121588호, 한국등록특허 제14-00675호에 기재된 장치 또는 바이오니아사에서 제조되는 Exiprep / Exiprogen을 사용할 수 있지만(도 8 내지 도 15 참조), 이에 한정되는 것은 아니며, 통상적으로 핵산 또는 단백질 등을 분리 정제할 수 있는 자동화 또는 반자동화 시스템에 제한없이 적용가능하다.

[78] 상기 자동정제장치는 수평방향 및 수직방향으로 이동 가능하게 설치되며, 유동성 물질이 흡입 및 토출되는 다수의 피펫을 분리 가능하도록 장착하기 위한 피펫블록; 베이스플레이트에 탑재되어 상기 피펫블록의 하방에 위치하는 멀티웰플레이트의 특정 단위 웰에 자기장을 인가 및 해제하기 위한 자기장

인가부를 포함하는 것을 특징으로 하는 자기장 인가부를 구비한 생물학적 시료 자동정제장치에 관한 것이다.

[79] 본 발명은 상기 멀티웰플레이트의 상기 특정 단위 웰을 가열하기 위한 히팅부를 추가로 포함할 수 있고, 상기 자기장 인가부는, 자석이 장착되며 상기 멀티웰플레이트의 특정 단위 웰 하방에 위치하는 자석장착부; 상기 멀티웰플레이트의 특정 단위 웰에 자기장을 인가 및 해제하기 위하여 상기 자석장착부를 상승 및 하강시키는 승강부; 를 포함하고, 상기 히팅부는 상기 자석장착부에 설치될 수 있고, 상기 히팅부는 상기 자석장착부에 접촉 설치된 발열 필름일 수 있다.

[80] 본 발명은 상기 피펫블록을 지지하는 고정몸체; 상기 고정몸체에 설치된 용액 받이대 이동수단에 의하여 수평방향으로 이동 가능하도록 설치되어 상기 피펫블록의 수평방향 이동시 상기 피펫블록에 장착된 상기 다수의 피펫 하방에 위치하는 용액 받이대; 를 포함할 수 있고, 상기 다수의 피펫 중 상기 타겟핵산을 포함한 용액에 적셔진 부분들이 외부와 차단되도록, 상기 다수의 피펫 하방에 위치한 상기 용액 받이대와 밀착되어 상기 다수의 피펫 중 상기 타겟핵산을 포함한 용액에 적셔진 부분들을 감싸도록 형성된 에어로졸방지대를 포함할 수 있다.

[81] 본 발명에 있어서, 상기 베이스플레이트에는 상기 피펫블록에 장착되기 위한 다수의 피펫이 삽착 수용되는 피펫랙, 분리된 상기 타겟핵산을 수용하기 위한 다수의 타겟핵산 보관용 튜브가 삽착 수용되는 제1 튜브랙 및 상기 피펫블록에 장착된 다수의 피펫으로부터 버려지는 폐액을 수용하기 위한 폐액통이 탑재될 수 있고, 상기 베이스플레이트에는 상기 제1 튜브랙을 냉각하기 위한 냉각블록이 탑재될 수 있다.

[82] 상기 자기장인가부는 자석봉이 장착된 자석부재가 추가적으로 포함될 수 있다. 상기 자석부재는 멀티웰 플레이트의 특정 단위 웰 하부에 장착할 수 있음으로써, 멀티웰 플레이트의 특정 단위 웰에서 형성된 자성 입자와 결합된 혼합물을 응집시켜 분리할 수 있게 한다.

[83] 상기 자동정제장치는 목적에 맞게 제조된 멀티 웰 플레이트를 사용하는 것을 특징으로 한다. 상기 멀티 웰 플레이트는 핵산 분리 정제를 위한 용액, 즉, DEPC 증류수, 세포 용해용액, 발현용액, 자성 입자 현탁액, 세척용액, 단백질 분해효소 등에서 선택되는 하나 이상의 용액을 포함하여 제조된다. 상기 핵산 분리 정제를 위한 용액들은 이에 한정된 것은 아니고 통상의 기술자들이 핵산 분리 정제를 위해 사용하는 광범위하게 모두 포함될 수 있다.

[84] 또 다른 관점에서, 본 발명은 전자동 핵산 분리 장치를 이용하여 생물학적 시료로부터 타겟핵산을 분리하는 방법으로서,

[85] 1) 자성 입자를 멀티 웰 플레이트의 특정 단위 웰에 첨가하여 타겟핵산을 제외한 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 소수성 자성 입자를 결합시키는 단계;

[86] 2) 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 결합된 자성 입자를 제외한 타겟핵산을

함유한 혼합물을 수득하는 단계;

[87] 3) 상기 수득된 혼합물에 친수성 자성 입자를 첨가하여 타겟핵산과 결합시키는 단계;

[88] 4) 타겟핵산이 결합된 친수성 자성 입자를 제외한 혼합물을 제거하는 단계; 및

[89] 5) 타겟핵산과 결합된 친수성 자성 입자에서 타겟핵산을 분리시키는 단계;

[90] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 전자동 핵산 분리 방법에 관한 것이다.

[91] 상기 2)단계 또는 4)단계에서 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 결합된 자성 입자 또는 타겟핵산과 결합된 친수성 자성 입자는 자동정제장치에 포함된 자기장 인가부에 의해 멀티 웰 플레이트 하부에 응집되어 분리될 수 있다.

[92] 또 다른 관점에서, 본 발명은 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 자성 입자, 바람직하게는 소수성 자성 임자 또는 실리카 자성 입자를 포함하는 생체시료로부터 핵산 분리정제용 키트에 관한 것이다.

[93]

[94] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[95]

[96] 실시예 1: 소수성 자성 입자 및 친수성 자성 입자의 제조

[97] 본발명에서 사용한 소수성 자성 입자는 평균 400nm 정도의 제품(코스모신소재, SMT-01S)을 구입하여 사용하였다. 상기 자성 입자의 특성은 표면적 7.87 m^2/g, 기공체적 0.01608 cm^3/g, 기공크기 8.17nm을 갖는다.

[98] 본발명에서 사용한 친수성 자성 입자는 평균 400nm 정도의 실리카 코팅 자성 입자 제품(바이오니아, AccuNanoBead™ TA-1010)을 구입하여 사용하였다. 상기 친수성 자성 입자의 특성은 표면적 15.50 m^2/g, 기공체적 0.02277 cm^3/g, 기공크기 5.87nm을 갖는다.

[99]

[100] 실시예 2: 소수성 자성 입자를 이용한 핵산 추출

[101] 생체 시료로부터 핵산을 분리하기 위해 실시예 1의 소수성 자성 입자와 함께 단백질 변성 응집물과 세포 잔해 입자 및 크로모조멀 DNA(chromosomal DNA) 를 응집시킨 후 자석을 이용하여 핵산을 분리하고 이후 실리카 자성 입자와 자석을 이용하여 플라스미드 DNA를 정제한 후 흡광도 측정을 통해 수율과 순도를 확인하였다.

[102] 생체 시료로는 암피실린 저항성 유전자가 삽입된 3.0kb의 pGEM-B1 vector (Bioneer, 한국)가 도입된 DH5α 대장균주를 사용하였다. 100㎍/ml의 암피실린이 포함된 LB 액체배지에 접종한 후 37℃에서 16시간 정도 진탕 배양하여 O.D600 값이 2.0이 되도록 배양하였다. 배양된 대장균 배양액 2ml을 원심분리하여 배양액과 대장균 세포를 분리하고 상등액을 제거하여 대장균 세포만

획득하였다.

[103] 획득된 각각의 대장균 세포에 소수성 자성 입자와 RNase A가 포함된 보전 처리용 완충용액을 넣고 세포를 잘 풀어준 후 세포 용해용 완충용액을 넣고 잘 섞어 주었다. 마지막으로 중화용 완충용액을 넣고 잘 섞어 준 후 자석을 이용하여 용액과 비용해성 응집물을 분리하였다.

[104] 분리된 용액에 구아니딘 염산과 실리카 자성 입자를 첨가하여 섞어준 후 자석을 이용하여 상등액만 제거 한 후 에탄올을 이용해 다시 한번 씻어 주었다. 열풍기, 건열 건조기나 자연건조를 통해 남아있는 에탄올을 모두 제거한 후 물이나 TE 버퍼에 녹여 핵산을 회수하였다.

[105] 회수된 핵산은 분광광도계를 이용하여 DNA 수율과 순도를 확인하고 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[106]

[107] 표 1

[Table 1]

	핵산 농도 (ng/ul)	OD260/OD280	OD260/OD230
시료 1	207.4	1.96	2.18
시료 2	195.5	2.03	2.33

[108]

[109] 일반적으로 정제가 잘 된 깨끗한 상태의 핵산은 OD260nm/280nm가 1.8 이상이고 OD260nm/230nm가 2.0 이상일 때를 말한다.

[110] 도 1과 표 1에 나타난 바와 같이, 소수성 자성 입자와 실리카 자성 입자를 이용하는 방법으로 실험하였을 때 모든 시료에서 OD260nm/280nm값은 1.8 이상이고 OD260nm/230nm 값은 2.0 이상을 유지하여 핵산이 깨끗하게 정제되었음을 확인하였다.

[111]

[112] 실시예 3: 소수성 자성 입자를 이용한 핵산분리와 필터를 이용한 핵산분리방법의 비교

[113] 소수성 자성 입자를 처리하여 핵산을 분리하는 방법과 소수성 자성 입자를 사용하지 않은 핵산분리방법의 전체 실험 소요 시간을 비교하였다.

[114] 실시예 2에 따라 2ml의 대장균 세포를 준비하고, 동일하게 실험한 후 전체 소요시간을 계산하여 일반적으로 많이 사용하는 필터방식과 비교하였다.

[115]

[116] 표 2

[Table 2]

	본 발명	필터 분리법
생체 시료 용해 및 응집, 핵산과 분리 과정 소요시간	2분	11분
정제 과정 소요시간	2분	4분
핵산 회수 소요시간	2분	2분
전체 소요시간	6분	17분

[117]

[118] 또한 생물시료를 용해 및 응집시켜 핵산과 분리하는 과정은 원심분리로 이루어지며 10분가량 원심분리를 해야 분리되기 때문에 이 과정에서 많은 시간이 소요된다.

[119] 반면 소수성 자성 입자를 사용하는 방법에서는 생물시료를 용해 및 응집시켜 핵산과 분리하는 과정이 자석을 이용해 짧은 시간 (1분 이내)에 완료 되고 정제 과정에서도 기계 사용 없이 자석을 이용하여 빠르게 과정을 완료할 수 있다.

[120] 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 핵산 분리과정은 필터 분리법에 비해 소요시간이 약 1/3로 줄어드는 효과를 나타내었다.

[121]

[122] 실시예 4: 소수성 자성 입자가 처리된 실험 방법을 이용하여 생물시료로부터 분리된 핵산의 효소활성 저해여부 확인

[123] 실시예 2에서 분리된 플라스미드 1㎍을 바이오니아로부터 구입한 *Eco*RI 으로 37℃에서 1시간 동안 절단하고 1.0% 아가로스 젤에서 전기영동을 통해 제한효소에 의해 절단된 플라스미드 DNA의 크기가 3.0kb가 맞는지 확인하고, 실시예 1에서 제조된 소수성 자성 입자가 포함된 핵산 분리 방법에 의한 결과물이 효소 활성 저해요인을 포함하고 있는지 확인하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[124] 도 1의 M레인은 사이즈 마커(size marker, 바이오니아사, 1kb ladder)이고, 레인 1~ 3은 본 발명에 의한 방법으로 분리한 플라스미드 DNA를 제한효소 (EcoRI) 처리한 실험구이다.

[125] 도 1의 전기영동 사진에서 볼 수 있듯이 본 발명에 의한 방법으로 분리된 플라스미드 DNA는 효소 활성에 아무런 저해 요소를 갖고 있지 않음을 알 수 있었다.

[126]

[127] 실시예 5: 실리카 자성 나노 입자를 이용한 혈액 샘플의 핵산 추출 방법

[128] 상기 실시예 2 방법을 동물의 혈액 샘플에서 다음과 같이 간편한 방법으로 응용하였다.

[129] 획득된 혈액 샘플에 구아니딘 염산과 계면활성제, 완충용액 혼합액을 넣고 잘 섞어준다. 다음에 프로티나아제 K를 넣고 60℃에서 10분간 단백질 분해 반응을 거친다. 다음에 용액에 에탄올을 첨가하여 섞고 실리카 자성 나노 입자까지 첨가하여 섞어준 후 자석을 이용하여 상등액만 제거 한 후 구아니딘 염산과 에탄올 혼합액, 염화나트륨과 에탄올 혼합액, 에탄올을 순차적으로 사용하여 실리카 자성입자를 씻어 준다. 열풍기, 건열 건조기나 자연건조를 통해 남아있는 에탄올을 모두 제거한 후 물이나 Tris 완충용액에 녹여 핵산을 회수하였다.

[130] 도 2의 M은 바이오니아로부터 구입한 1kb ladder 제품으로 사이즈 마커(size marker)이고, 레인 1~ 4은 본 발명에 의한 방법으로 분리한 핵산 DNA를 전기영동하여 핵산의 농도 및 순도가 일정함을 확인하였다.

[131]

[132] 실시예 6: 실리카 자성 나노 입자를 이용한 배양된 박테리아 샘플의 핵산 추출 방법

[133] 상기 실시예 2 방법을 배양시킨 박테리아 샘플에서 다음과 같이 응용하였다.

[134] 배양시킨 박테리아가 있는 배양액 샘플을 고속으로 원심분리하여 박테리아 침전물을 얻는다. 이는 실시예2 방법 중 생체시료에서 대장균 세포를 얻는 과정과 유사하다. 얻어진 침전물은 박테리아 종류 중 그람양성의 경우 라이소자임 효소와 그람양성 전용 완충액과 을 섞어 37℃에서 30분간 반응시키고 프로티나아제 K 와 구아니딘 염산과 계면활성제, 완충용액 혼합액을 첨가하여 60℃에서 30분간 반응시킨다. 박테리아중 그람음성은 침전물에서 세포분해용 완충액을 넣고 잘 섞는다. 다음에 프로티나아제 K를 넣고 60℃에서 10분간 단백질 분해 반응을 거친다. 다음에 용액에 구아니딘 염산과 계면활성제, 완충용액 혼합액을 넣어 섞는다. 이후 박테리아 그람 양성, 음성 모두 같은 방법으로, 에탄올을 첨가하여 섞은 다음 실리카 자성 나노 입자까지 첨가하여 섞어준 후 자석을 이용하여 상등액만 제거 한 후 구아니딘 염산과 에탄올 혼합액, 염화나트륨과 에탄올 혼합액, 에탄올을 순차적으로 사용하여 실리카 자성입자를 씻어 준다. 열풍기, 건열 건조기나 자연건조를 통해 남아있는 에탄올을 모두 제거한 후 물이나 Tris 완충용액에 녹여 핵산을 회수하였다.

[135] 도 3의 M은 바이오니아로부터 구입한 1kb ladder 제품으로 사이즈 마커(size marker)이고, 레인 1~ 2은 본 발명에 의한 방법으로 분리한 핵산 DNA를 전기영동하여 핵산의 농도 및 순도가 일정함을 확인하였다.

[136]

[137] 실시예 7: 실리카 자성 나노 입자를 이용한 배양 세포의 핵산 추출 방법

[138] 상기 실시예 2 방법을 배양된 세포 샘플에서 다음과 같은 방법으로 응용하였다.

[139] 배양된 세포와 배양액이 섞인 샘플을 10분간 중력가속도의 3000배 정도의 속도로 원심분리하여 상층액을 모두 제거하고 인산완충액(PBS)를 넣어 재부유시킨다. 프로티나아제 K 와 구아니딘 염산과 계면활성제, 완충용액

혼합액을 첨가하여 60℃에서 10분간 단백질 분해 반응을 거친다. 다음에 용액에 에탄올을 첨가하여 섞고 실리카 자성 나노 입자까지 첨가하여 섞어준 후 자석을 이용하여 상등액만 제거 한 후 구아니딘 염산과 에탄올 혼합액, 염화나트륨과 에탄올 혼합액, 에탄올을 순차적으로 사용하여 실리카 자성입자를 씻어 준다. 열풍기, 건열 건조기나 자연건조를 통해 남아있는 에탄올을 모두 제거한 후 물이나 Tris 완충용액에 녹여 핵산을 회수하였다.

[140] 도 4의 M은 바이오니아로부터 구입한 1kb ladder 제품으로 사이즈 마커(size marker)이고, 레인 1~ 4은 본 발명에 의한 방법으로 분리한 핵산 DNA를 전기영동하여 핵산의 농도 및 순도가 일정함을 확인하였다.

[141]

[142] 실시예 8: 실리카 자성 나노 입자를 이용한 동물조직의 핵산 추출 방법

[143] 상기 실시예 2 방법을 채취된 동물조직 샘플에서 다음과 같은 방법으로 응용하였다.

[144] 채취된 동물조직 샘플을 액체질소로 급속냉동시켜 조직파쇄기, 믹서를 사용하여 최대한 가루가 되도록 파쇄시킨다. 가루가 된 조직 샘플 20mg을 프로티나아제 K 와 조직용해액을 첨가하여 60℃에서 10분간 단백질 분해 반응을 거친다. 다음에 용액에 구아니딘 염산과 계면활성제, 완충용액 혼합액을 첨가하여 최대한 골고루 섞고 에탄올을 첨가하여 섞은 다음 실리카 자성 나노 입자까지 첨가하여 섞어준 후 자석을 이용하여 상등액만 제거 한 후 구아니딘 염산과 에탄올 혼합액, 염화나트륨과 에탄올 혼합액, 에탄올을 순차적으로 사용하여 실리카 자성입자를 씻어 준다. 열풍기, 건열 건조기나 자연건조를 통해 남아있는 에탄올을 모두 제거한 후 물이나 Tris 완충용액에 녹여 핵산을 회수하였다.

[145] 도 5의 M은 바이오니아로부터 구입한 1kb ladder 제품으로 사이즈 마커(size marker)이고, 레인 1~ 4은 본 발명에 의한 방법으로 분리한 핵산 DNA를 전기영동하여 핵산의 농도 및 순도가 일정함을 확인하였다.

[146]

[147] 실시예 9: 실리카 자성 나노 입자를 이용한 식물조직의 핵산 추출 방법

[148] 상기 실시예 2 방법을 채취된 식물조직 샘플에서 다음과 같은 방법으로 응용하였다.

[149] 채취된 식물조직 샘플을 액체질소로 급속냉동시켜 조직파쇄기, 믹서를 사용하여 최대한 가루가 되도록 파쇄시킨다. 가루가 된 조직 샘플 100mg을 프로티나아제 K 와 계면활성제가 첨가된 조직용해액을 첨가하여 60℃에서 10분간 단백질 분해 반응을 거친다. 다음에 용액에 초산과 완충용액 혼합액을 첨가하여 최대한 골고루 섞고 10분간 얼음에 둔 후, 고속으로 원심분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮긴다. 상층액에 구아니딘 염산과 에탄올 혼합액을 첨가하여 섞은 다음 실리카 자성 나노 입자까지 첨가하여 섞어준 후 자석을 이용하여 상등액만 제거 한 후 구아니딘 염산과 에탄올 혼합액, 염화나트륨과

에탄올 혼합액, 에탄올을 순차적으로 사용하여 실리카 자성입자를 씻어 준다. 열풍기, 건열 건조기나 자연건조를 통해 남아있는 에탄올을 모두 제거한 후 물이나 Tris 완충용액에 녹여 핵산을 회수하였다.

[150] 도 6의 M은 바이오니아로부터 구입한 1kb ladder 제품으로 사이즈 마커(size marker)이고, 레인 1~ 4은 본 발명에 의한 방법으로 분리한 핵산 DNA를 전기영동하여 핵산의 농도 및 순도가 일정함을 확인하였다.

[151]

[152] 실시예 10: 실리카 자성 나노 입자를 이용한 배양 세포의 핵산 RNA 추출 방법

[153] 상기 실시예 2 방법을 배양된 세포 샘플에서 다음과 같은 방법으로 응용하였다.

[154] 배양된 세포와 배양액이 섞인 샘플을 모두 수집하여 5분간 중력가속도의 300배 정도의 속도로 원심분리하여 상층액을 모두 제거하고 구아니딘 염산과 계면활성제, 완충용액 혼합액을 첨가하고 1분 이상 골고루 섞어 세포파쇄과정을 거친다. 다음에 용액에 에탄올을 첨가하여 섞고 실리카 자성 나노 입자까지 첨가하여 섞어준 후 자석을 이용하여 상등액만 제거 한 후 구아니딘 염산과 에탄올 혼합액, 염화나트륨과 에탄올 혼합액, 에탄올을 순차적으로 사용하여 실리카 자성입자를 씻어 준다. 열풍기, 건열 건조기나 자연건조를 통해 남아있는 에탄올을 모두 제거한 후 물이나 Tris 완충용액에 녹여 핵산을 회수하였다.

[155] 도 7의 레인 1~ 4은 본 발명에 의한 방법으로 분리한 배양된 다양한 세포의 핵산 RNA를 전기영동하여 핵산의 농도 및 순도가 일정함을 확인하였다.

[156]

[157] 실시예 11: 실리카 자성 나노 입자 처리를 이용한 다양한 샘플의 핵산 추출 방법

[158] 상기 실시예 2 방법을 다양한 샘플의 핵산 추출 방법에 보다 간편한 방법으로 응용하였다.

[159] 획득한 혈액 샘플, 액체 배지에서 배양된 동물 세포주, 동물조직 및 식물조직 등에 전처리용 세포 용해용 완충용액을 넣고 잘 섞어준다. 이 때, 동식물의 조직세포들은 완충용액 외에도 프로티나아제 등의 단백질 분해 단계를 진행할 수 있다. 그 다음, 용액에 구아니딘 염산과 실리카 자성 나노 입자, 에탄올을 첨가하여 섞어준 후 자석을 이용하여 상등액만 제거 한 후 구아니딘 염산과 에탄올 혼합액, 염화나트륨과 에탄올 혼합액, 에탄올을 순차적으로 사용하여 실리카 자성입자를 씻어 주었다. 열풍기, 건열 건조기나 자연건조를 통해 남아있는 에탄올을 모두 제거한 후 물이나 Tris 완충용액에 녹여 핵산을 회수하였다.

[160] 핵산 분리 방법에 의한 결과물이 불순물 없이 잘 추출되었는지에 대해 아가로즈 젤 전기영동을 통해 확인한 결과, 도 2 내지 7에 개시된 바와 같이 불순물 없이 잘 추출된 것을 확인할 수 있었다. 도 2 내지 7의 M레인은 사이즈 마커(size marker, 바이오니아사, 1kb ladder)이고, 레인 번호는 본 발명에 의한 방법으로 추출한 샘플 DNA이다.

[161]

[162] 실시예 12: 소수성 자성 입자 및 실리카 자성 입자 처리를 이용한 추출 방법을 핵산추출 장비에 적용한 전자동화

[163] 실시예 2의 핵산추출 방법을 핵산추출장비를 사용하여 전자동화시켰다.

[164] 단백질 합성 정제 및 핵산추출용 장비 *ExiProgen*(바이오니아사, 한국공개특허 제2011-0041126호 및 제2011-0085824호 등에 사용되는 전용 키트의 샘플 주입칸에 넣고 가동시키면 상기 실시예 2의 핵산추출 방법의 모든 절차가 전자동으로 장비 내에서 실행된다.

[165] 핵산추출용 장비 *ExiProgen*은 도 8~15에 그 개략도 및 상태도를 나타내었다.

[166] 첫 번째 세포 용해용 완충용액을 제외한 모든 용액이 따로 전용키트에 각각 들어있으며 1개 샘플에서부터 최대 16개 샘플까지 동시에 용액을 이동 및 혼합을 하여 실험을 진행할 수 있다.

[167] 상기 실시예1 방법으로 획득된 각각의 대장균 세포를 RNase A가 포함된 보전 처리용 완충용액을 넣고 세포를 잘 풀어준 후 세포 용해용 완충용액을 넣고 잘 섞어 전용키트에 샘플을 주입하고 장비를 가동한다. 장비내부에서 중화용 완충용액과 소수성 자성 입자까지 섞인 용액을 장비내 설치된 자석장치를 이용하여 비용해성 응집물을 키트 일부 웰에 붙이고 용액을 분리하였다. 설치된 자석장치는 도 6과 같은 구조로 *ExiProgen* 장비 내에 장착되어 있다.

[168] 분리된 용액에 구아니딘 염산과 실리카 자성 입자를 첨가하여 섞어준 후 장비내 구동하는 자기장 인가부를 이용하여 상등액만 제거한 후 에탄올을 이용해 다시 한번 씻어 주었다. 에탄올을 자기장 인가부의 히팅 장치로 모두 제거한 후 물이나 TE 버퍼에 녹여 핵산을 회수하였다.

[169] 회수된 핵산은 분광광도계를 이용하여 DNA 수율과 순도를 확인하고 그 결과를 표 3에 나타내었다.

[170]

[171] 표 3

[Table 3]

	핵산 농도 (ng/ul)	OD260/OD280	OD260/OD230
시료 1	95.5	1.92	2.23
시료 2	94.6	1.88	2.2
시료 3	108.9	2	2.46
시료 4	81.2	1.99	2.43
시료 5	73.2	1.97	2.45
시료 6	73.3	2.02	2.46
시료 7	106.9	2	2.43
시료 8	78.6	1.82	2.4

[172]

[173] 일반적으로 정제가 잘 된 깨끗한 상태의 핵산은 OD260nm/280nm가 1.8 이상이고 OD 260nm/230nm가 2.0 이상 일 때를 말한다.

[174] 자성 입자, 상세하게는 소수성 자성 입자 또는 실리카 자성 나노입자와 실리카 자성 입자를 이용하는 방법을 단백질 합성 정제 및 핵산추출용 장비 *ExiProgen* (바이오니아사, 한국공개특허 제2011-0041126호 및 제2011-0085824호)를 이용하여 자동화시켜 장비 내에서 모든 작업이 이루어지면 최대 16개까지 같이 동시에 작동할 수 있고 표 3과 도 17에 나타난 바와 같이 거의 일정한 농도와 모든 시료에서 OD 260nm/280nm값은 1.8 이상이고 OD 260nm/230nm값은 2.0 이상을 유지하여 핵산이 깨끗하게 정제 되었음을 확인하였다.

[175] 표 3의 분리된 핵산을 1.0% 아가로스 젤에서 전기영동 한 결과 전자동화장치 내에서 정제된 핵산 중 플라스미드 DNA가 깨끗하게 정제되었음을 확인할 수 있었다. 도 17의 M레인은 사이즈 마커(size marker, 바이오니아사, 1kb ladder)이고, 1 내지 8 레인은 표 3에서 회수한 핵산 시료이다.

[176]

[177] 실시예 13: 전자동화 장치를 이용하여 생물시료로부터 분리된 핵산의 효소활성 저해여부 확인

[178] 실시예 12에서 분리된 플라스미드 1㎍을 바이오니아로부터 구입한 EcoRI 으로 37℃에서 1시간 동안 절단하고 1.0% 아가로스 젤에서 전기영동을 통해 제한효소에 의해 절단된 플라스미드 DNA의 크기가 3.0kb가 맞는지 확인하고, 전자동화 장치에 의해 분리된 결과물을 도 18에 나타내었다.

[179] 도 18의 M레인은 사이즈 마커(size marker, 바이오니아사, 1kb ladder)이고, U레인은 제한효소에 의해 절단하지 않은 플라스미드 DNA이고, C 레인은 플라스미드 DNA를 제한효소 (EcoRI) 처리한 실험구이다. 전기영동 결과에서 볼 수 있듯이, 플라스미드 핵산에 삽입된 목적 유전자 주위의 특정 염기서열을 분리할 수 있는 제한효소로 처리하였을 때 목적 유전자의 크기만큼 적절히 절단되어 전기영동상에서 뚜렷하게 나타나는 것을 확인하였다

[180]

[181] 이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[182]

[183] 부호의 설명

[184] 120 : 피스톤 130 : 피스톤 안내부

[185] 140 : 피펫부 141 : 제1열 피펫 142 : 제2열 피펫

[186] 150 : 피스톤 안내부 지지판

[187] 200 : 고정몸체

[188] 231 : 상하 이동모터 232 : 상하 이동벨트
[189] 233 : 상하 이동스크류 241 : 전후 이동 슬라이더
[190] 300 : 케이싱
[191] 310 : 전후 이동 지지봉 311 : 전후 안내가이더
[192] 320 : 전후 이동모터 330: 전후 이동벨트
[193] 340 : 멸균을 위한 자외선 램프
[194] 400 : 베이스플레이트 401 : 손잡이
[195] 420 : 멀티웰플레이트 420' : 멀티웰플레이트
[196] 430 : 피펫랙 440 : 시료보관용 튜브랙
[197] 440-1 : 타겟핵산 보관용 튜브삽착공 440-3 : 타겟핵산 진단용 튜브삽착공
[198] 442-1 : 타겟핵산 보관용 튜브 442-3 : 타겟핵산 진단용 튜브
[199] 450 : 폐액통 460 : 고온반응블럭
[200] 472 : 생물학적 시료용 튜브
[201] 700 : 자기장 인가부
[202] 710 : 자석장착부 711 : 자석
[203] 713 : 단위 웰 인입홈
[204] 720 : 자석장착부 지지대 730 : 가이드봉
[205] 740 : 가이드 블럭 750 : 인장 스프링
[206] 760 : 승강부 761 : 승강모터
[207] 762 : 제1 승강축 763 : 승강캠
[208] 764 : 제2 승강축
[209] 770 : 센싱부 장착판
[210] 780 : 높이 감지 센서
[211] 781 : 센싱부 782 : 센싱 타겟부
[212] 810 : 히팅부 812 : 히팅부 고정판
[213]

산업상 이용가능성

[214] 본 발명의 자성 입자, 바람직하게는 소수성 자성 입자 또는 실리카 자성 입자를 이용한 핵산 분리방법은 종래 방법보다 핵산 분리 시간을 획기적으로 단축시킬 수 있으며, 핵산 또는 단백질 분리 이후 과정에서도 실리카 나노 자성 입자를 이용하여 빠른 시간 내에 정제를 완료함으로써 원심분리법이나 중력분리법 등에 비해 월등하게 빠른 시간 내에 전체 과정을 완료할 수 있으며, 수득율 또한 향상시킬 수 있는 장점이 있다.

청구범위

[청구항 1] 다음 단계를 포함하는 자성 입자를 이용하여 생체 시료로부터 핵산을 분리하는 방법으로
(a) 핵산을 포함하는 생체 시료에 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 자성 입자를 첨가하여, 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 상기 입자를 결합시키는 단계; 및
(b) 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 결합한 상기 자성 입자를 자기장을 이용하여 분리하여, 타겟핵산을 수득하는 단계;
를 포함하는 것을 특징으로 한는 핵산 분리 방법

[청구항 2] 제1항에 있어서,
(c) (b) 단계에서 수득된 혼합물에 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 친수성 자성 입자를 첨가하여 타겟핵산과 친수성 자성 입자를 결합시키는 단계; 및
(d) 타겟핵산과 결합한 친수성 자성 입자를 자기장을 이용하여 분리하여 타겟핵산을 수득하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 분리 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 자성 입자는 소수정 자성 나노입자 또는 실리카 자성 나노입자인 것을 특징으로 하는 핵산의 분리 방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 자성 입자의 평균 입경이 50nm ~ 700nm인 것을 특징으로 하는 핵산의 분리 방법.

[청구항 5] 제2항에 있어서,
상기 친수성 자성 입자의 평균 입경이 50nm ~ 700nm인 것을 특징으로 하는 핵산의 분리 방법.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 자성 입자는 철, 코발트, 니켈 및 그 산화물 또는 합금에서 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 분리 방법.

[청구항 7] 제2항에 있어서,
상기 친수성 자성 입자는 실리카 코팅된 자성 입자인 것을 특징으로 하는 핵산 분리 방법.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 자성 입자를 첨가하는 단계는
i) 생체 시료에 직접 제공하는 단계;
ii) 생체 시료를 보전 처리하는 보전용액에 함께 섞어 제공하는 단계;
iii) 생체 시료를 보전 처리하는 보전용액을 처리한 후 제공하는

단계;
iv) 생체 시료 용해를 위해 완충용액에 함께 섞어 제공하는 단계;
v) 생체 시료 용해를 위해 완충용액을 처리한 후 제공하는 단계;
vi) 용해된 생체 시료에 단백질 변성 응집물을 형성시키기 위한 완충용액에 함께 섞어 제공하는 단계; 및
vii) 단백질 변성 응집물이 형성된 용액에 제공하는 단계;
에서 선택되는 단계에 첨가되는 것을 특징으로 하는 핵산의 분리 방법.

[청구항 9] 제1항 내지 제2항에 있어서 분리되는 타겟 핵산은 플라스미드 DNA, 박테리아의 게놈 DNA, 혈액 및 동식물 조직 DNA, 동물 세포주의 DNA 및 RNA로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 분리 방법.

[청구항 10] 수평방향 및 수직방향으로 이동 가능하게 설치되며, 다수의 피펫을 분리 가능하도록 장착하기 위한 피펫블록; 및
멀티 웰 플레이트의 특정 단위 웰에 자기장을 인가 및 해제하기 위한 자기장 인가부;
를 포함하고, 상기 멀티웰 플레이트에 생체시료와 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 자성 입자가 첨가되는 것을 특징으로 하는 생체 시료로부터 핵산을 전자동으로 분리하는 전자동 핵산 분리 장치.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 자기장 인가부는 상기 멀티웰플레이트의 특정단위 웰 하방에 위치하는 자석장착부; 및
상기 자석장착부를 상승 및 하강시키기 위한 승강부;
를 포함하는 것을 특징으로 하는 전자동 핵산 분리 장치.

[청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 자성 입자를 분리하기 위해 자석부재를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 전자동 핵산 분리 장치.

[청구항 13] 제10항에 있어서,
상기 멀티웰플레이트의 특정 단위 웰을 가열하기 위한 히팅부를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 전자동 핵산 분리 장치.

[청구항 14] 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항의 전자동 핵산 분리 장치를 이용하여 생물학적 시료로부터 타겟핵산을 분리하는 방법으로서,
1) 자성 입자를 멀티 웰 플레이트의 특정 단위 웰에 첨가하여 타겟핵산을 제외한 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 자성 입자를 결합시키는 단계;
2) 비용해성 응집물 또는 핵산분자와 결합된 자성 입자를 제외한 타겟핵산을 함유한 혼합물을 수득하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 전자동 핵산 분리 방법.

[청구항 15] 제14항에 있어서,

3) 2) 단계에서 수득된 혼합물에 친수성 자성 입자를 첨가하여 타겟핵산과 결합시키는 단계;

4) 타겟핵산과 결합된 친수성 자성 입자를 제외한 혼합물을 제거하는 단계; 및

5) 타겟핵산과 결합된 친수성 자성 입자에서 타겟핵산을 분리시키는 단계;

를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 전자동 핵산 분리 방법.

[청구항 16] 제14항 또는 제15항에 있어서,

2) 단계 또는 4) 단계의 자성 입자와 결합된 물질을 분리함에 있어서, 자기장 인가부를 이용하여 상기 멀티 웰 플레이트의 특정 단위 웰 하부의 내벽에 부착시켜 분리하는 것을 특징으로 하는 전자동 핵산 분리 방법.

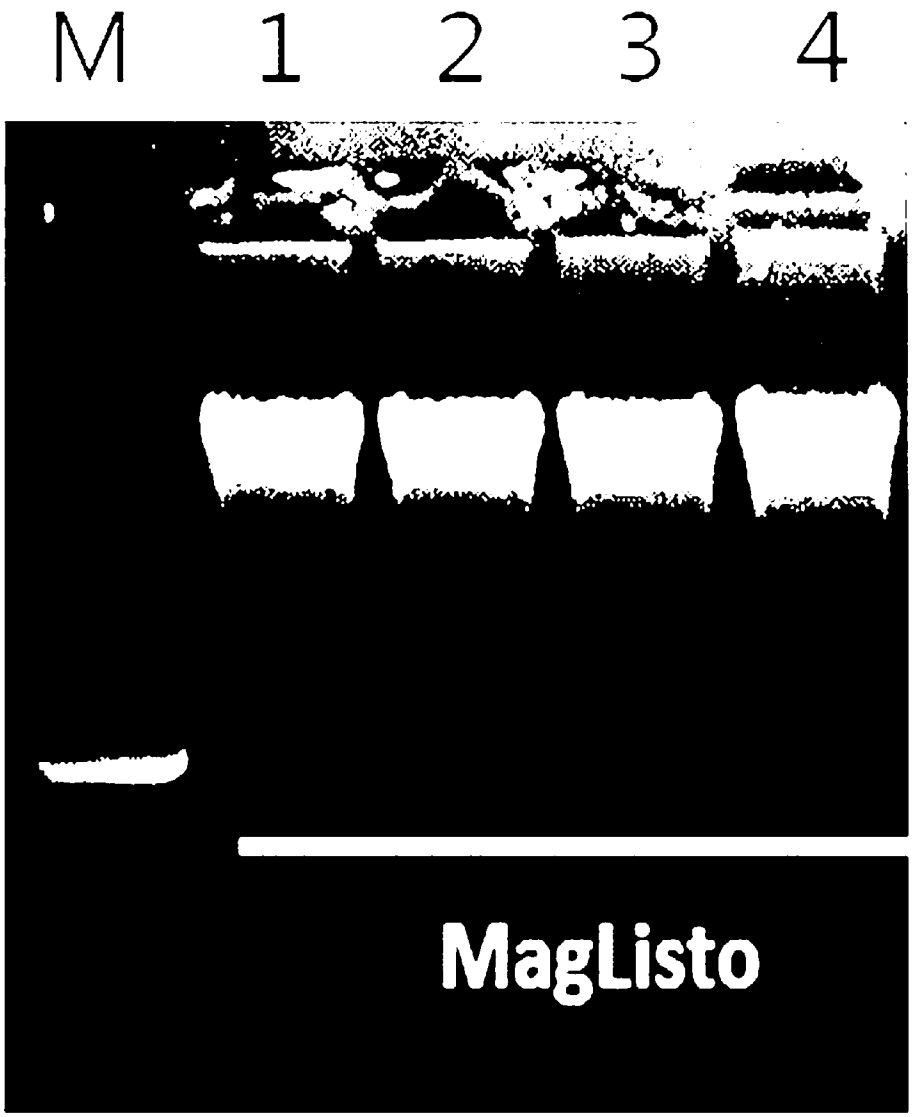
[청구항 17] 제14항 또는 제15항에 있어서,

분리되는 타겟 핵산은 플라스미드 DNA, 박테리아의 게놈 DNA, 혈액 및 동식물 조직 DNA, 동물 세포주의 DNA 및 RNA로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 분리 방법.

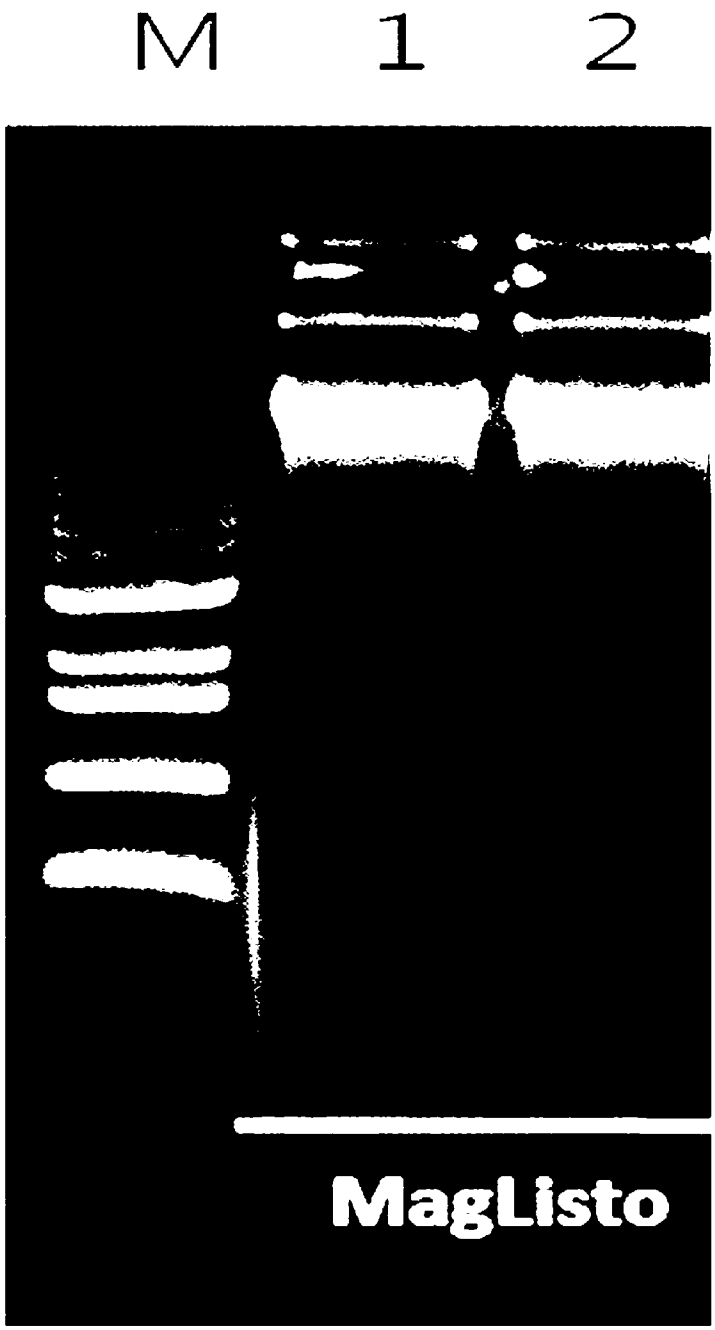
[청구항 18] 평균 입경 크기가 50nm ~ 1μm인 자성 입자를 포함하는 생체시료로 부터 핵산 분리정제용 키트.

[Fig. 1]

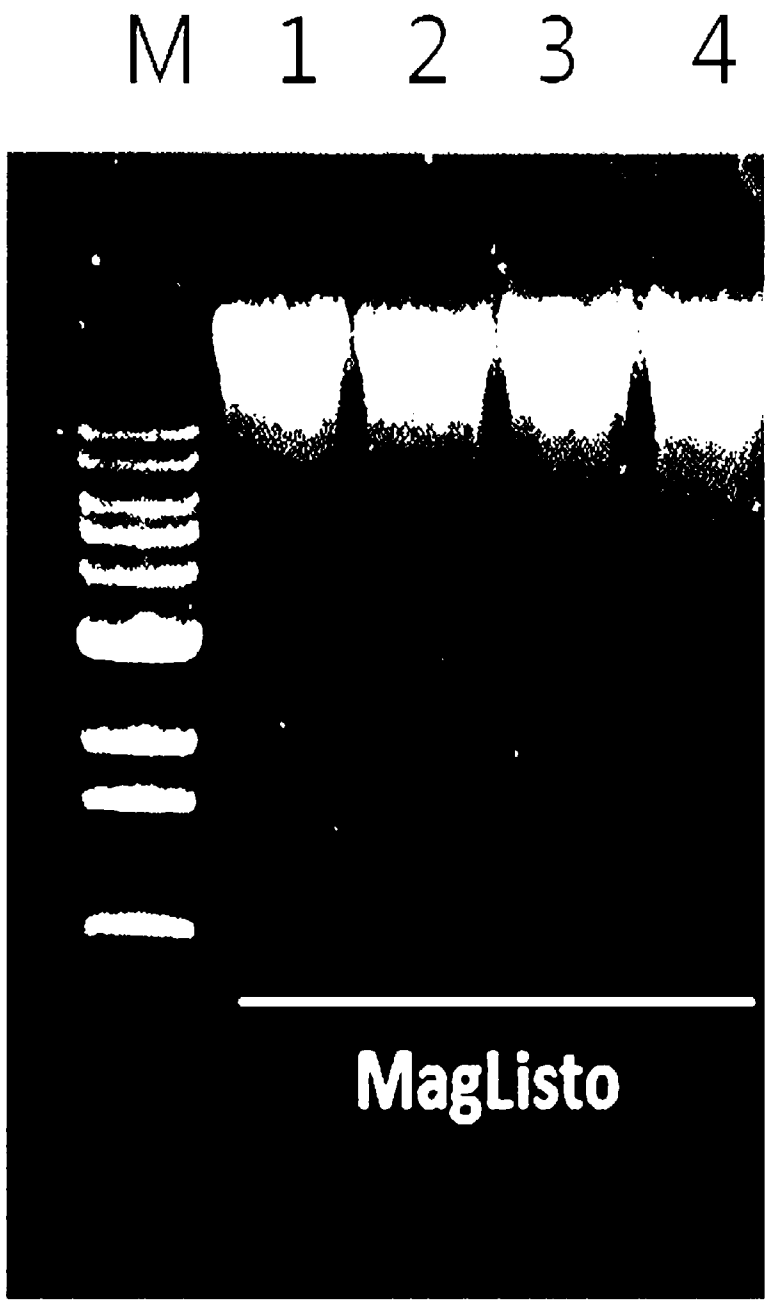
[Fig. 2]



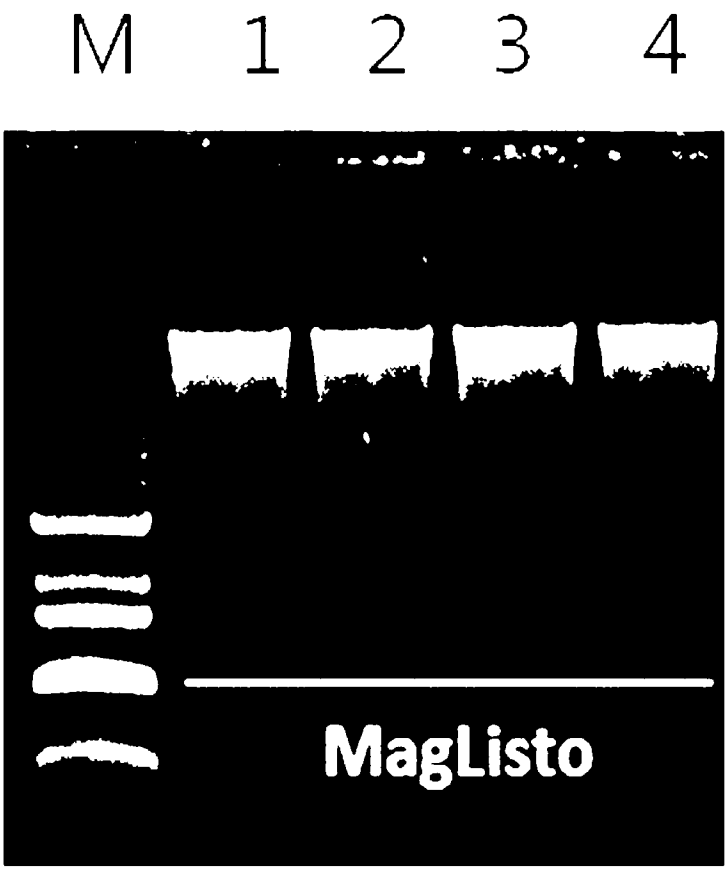
[Fig. 3]



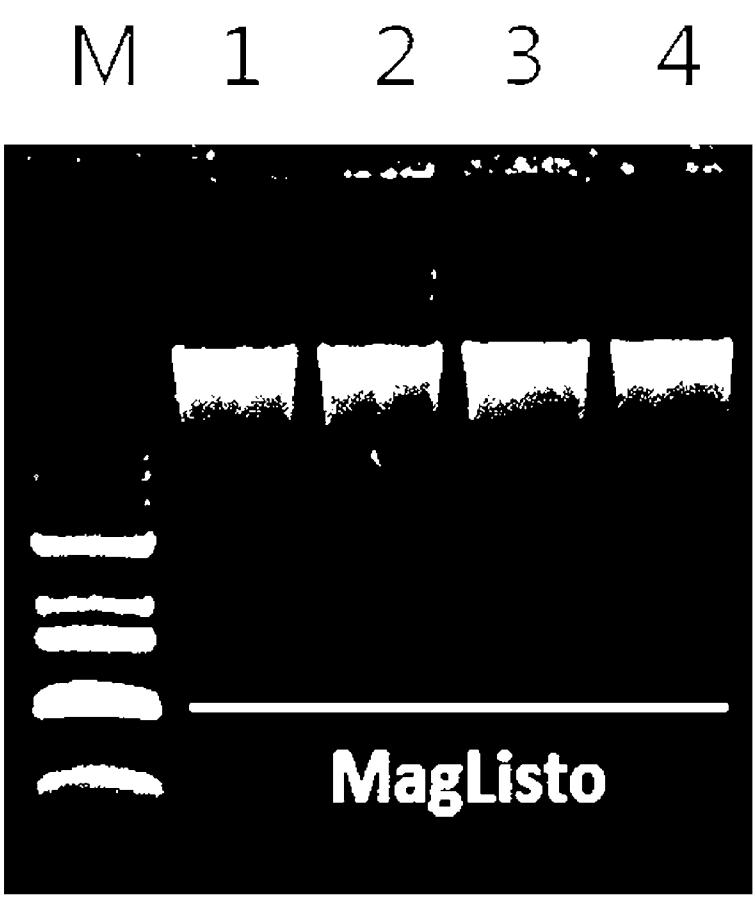
[Fig. 4]



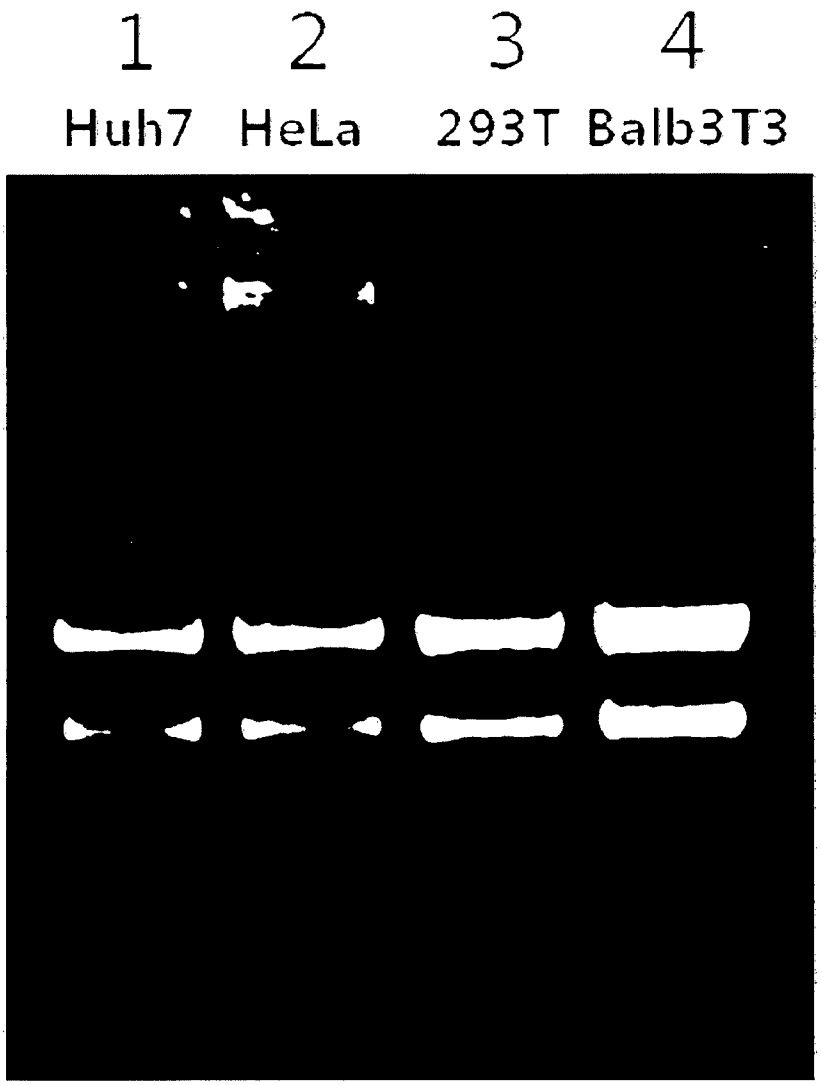
[Fig. 5]



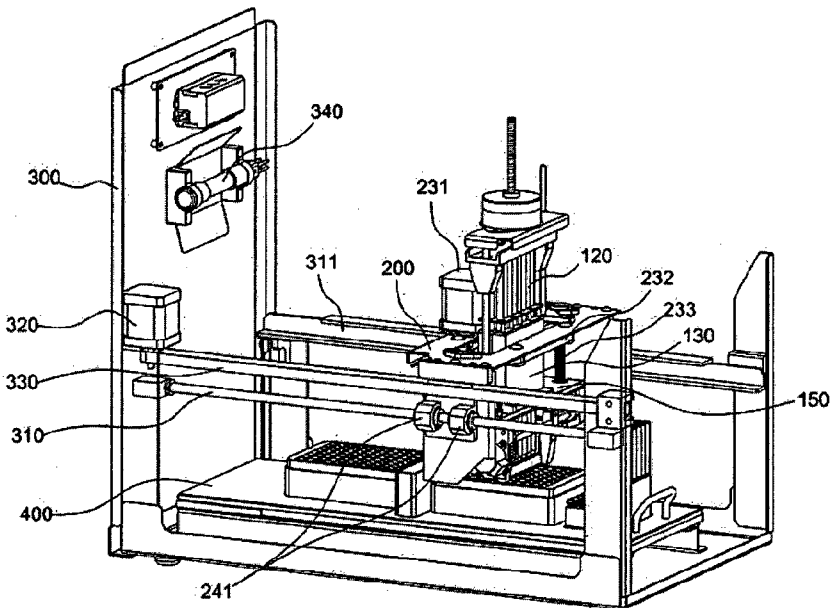
[Fig. 6]



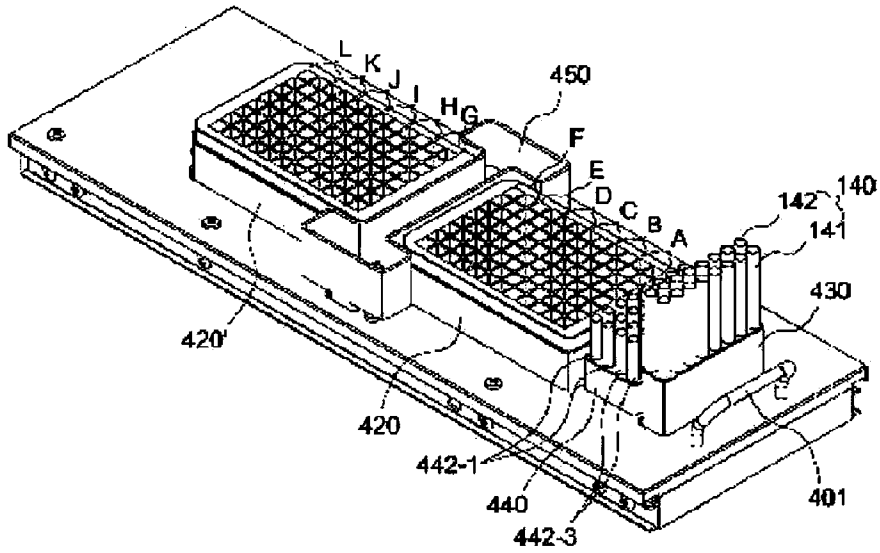
[Fig. 7]


1
2
3
4
Huh7
HeLa
293T
Balb3T3

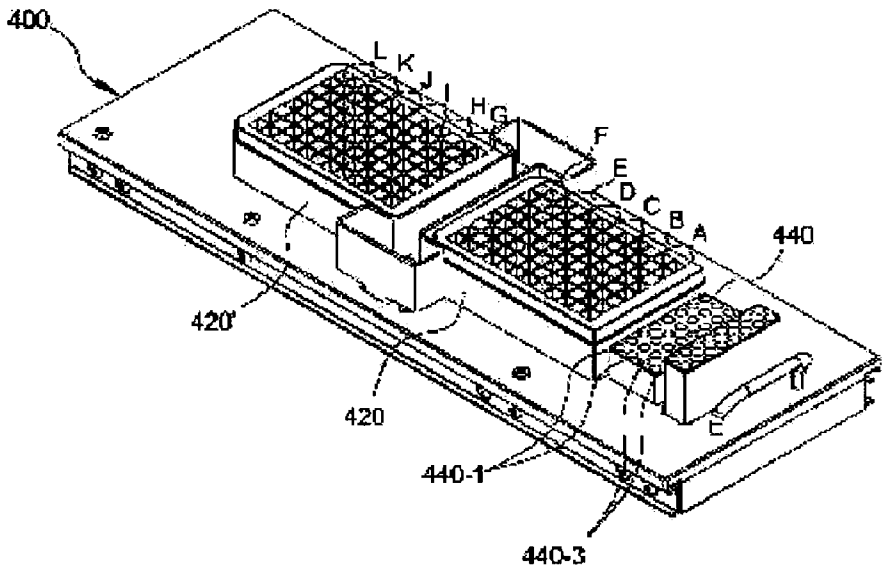
[Fig. 8]


340
300
231
311
200
120
232
233
130
320
330
150
310
400
241

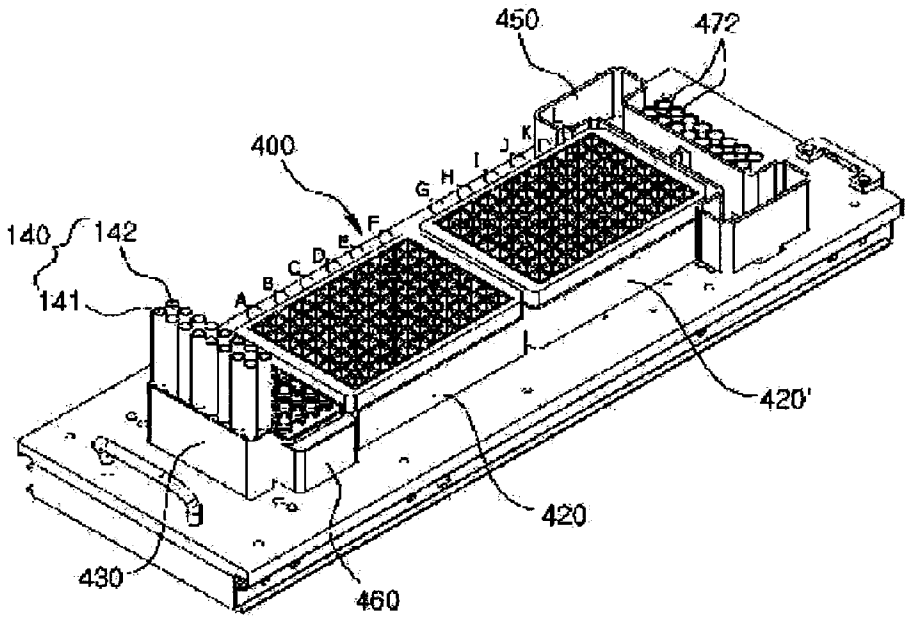
[Fig. 9]


L
K
J
I
H
G
450
F
E
D
C
B
A
142
140
141
430
420'
420
442-1
440
442-3
401

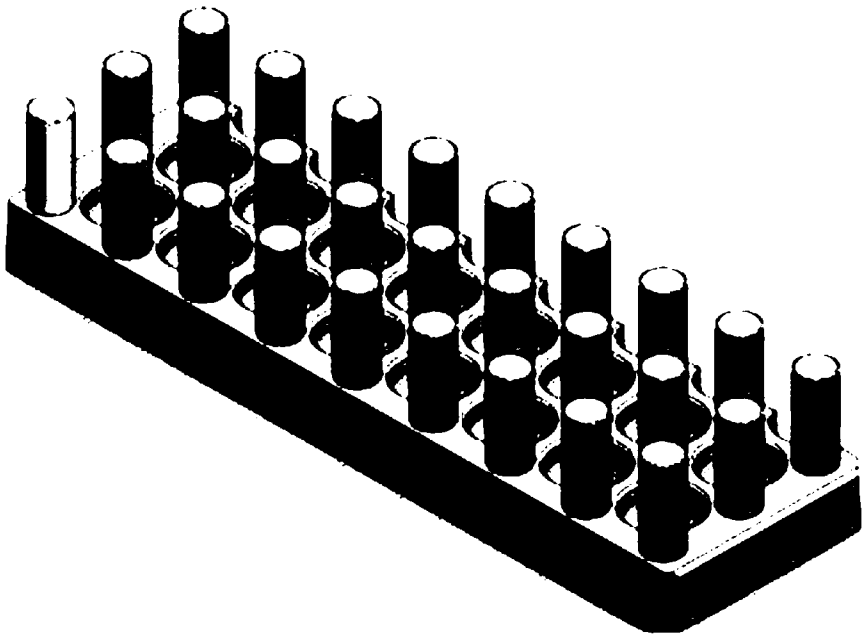
[Fig. 10]


400
L
K
J
I
H
G
F
E
D
C
B
A
440
420'
420
440-1
440-3

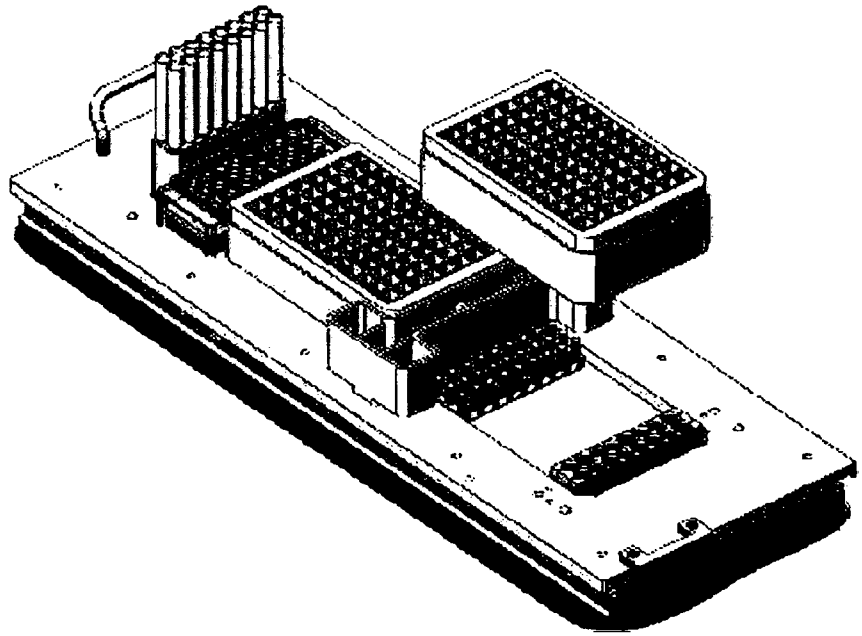
[Fig. 11]



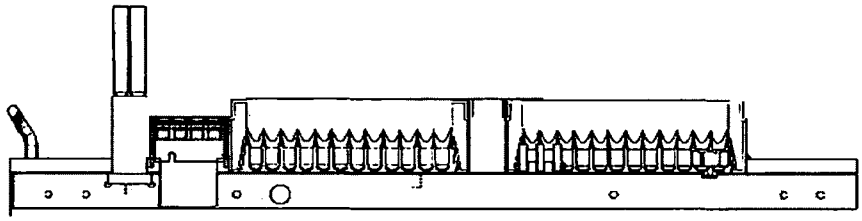
[Fig. 12]



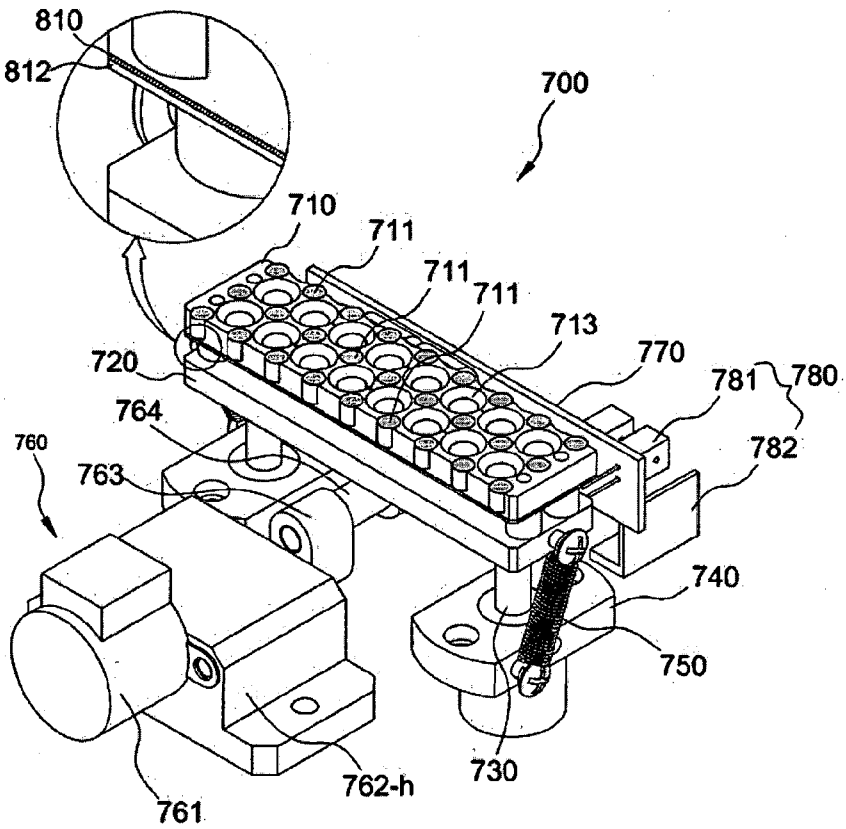
[Fig. 13]



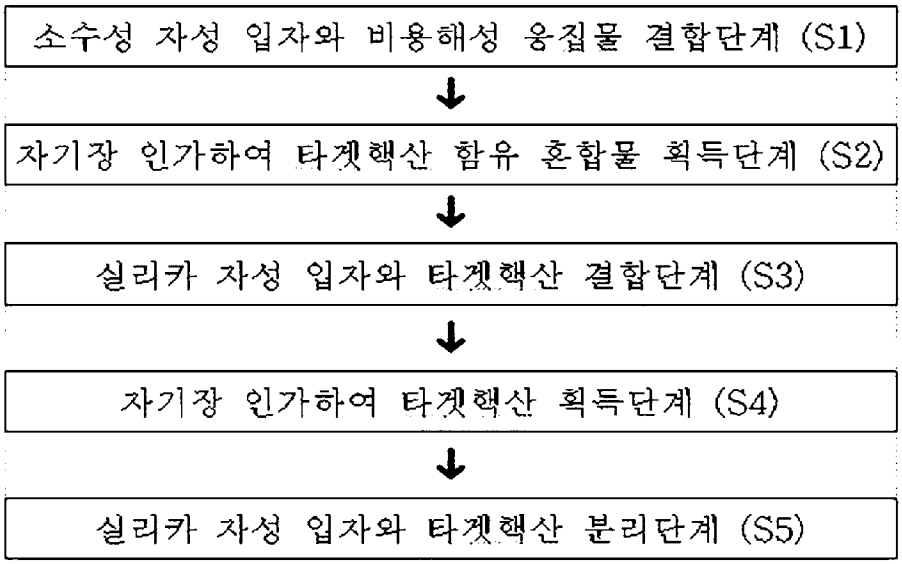
[Fig. 14]



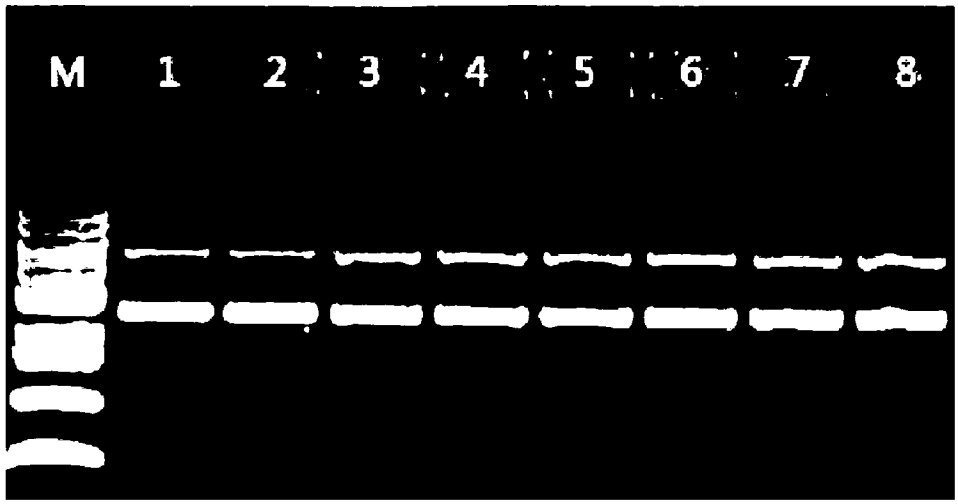
[Fig. 15]



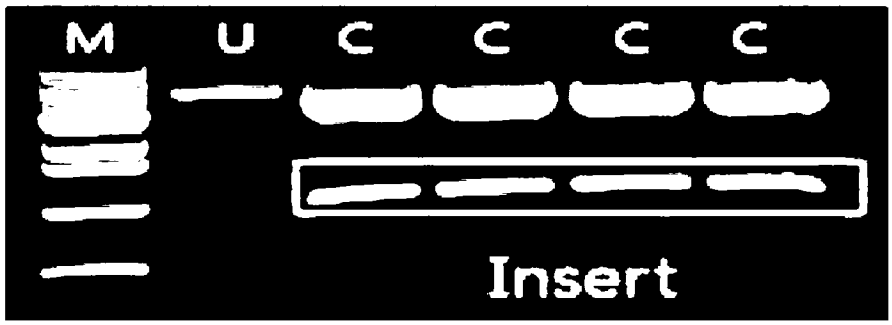
[Fig. 16]



[Fig. 17]



[Fig. 18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/006388

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/10(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/553(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)

C12N 15/10; B82B 1/00; B82B 3/00; C04B 35/26; B82Y 25/00; C12M 1/18; C12Q 1/68; G01N 33/553; C12M 1/42

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: magnetic particle, nanoparticles, diameter, nucleic acid, hydrophobic property, hydrophicity, silica, magnetic field

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003-0096987 A1 (UEMATSU, H. et al.) 22 May 2003 See claims 1-8 and 15; paragraphs [0050] and [0063].	18
Y		10-13
A		1-8,14-15
Y	KR 10-2011-0121588 A (BIONEER CORPORATION) 07 November 2011 See claims 1-7 and 12-17; figures 26-34.	10-13
X	KR 10-2006-0061494 A (KOREA INSTITUTE OF CERAMIC ENGINEERING & TECHNOLOGY) 08 June 2006 See abstract; claims 1-8; page 6, lines 1-4 and 27-31.	18
Y		10-13
X	KR 10-2007-0018501 A (KOREA INSTITUTE OF CERAMIC ENGINEERING & TECHNOLOGY et al.) 14 February 2007 See abstract; claims 1-4; page 7, lines 1-30; figures 1-2.	18
Y		10-13
A	US 6027945 A (SMITH, C. E. et al.) 22 February 2000 See claims 1-7; column 8, lines 30-45.	1-8,10-15,18

☐ 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	Date of mailing of the international search report
22 SEPTEMBER 2015 (22.09.2015)	**22 SEPTEMBER 2015 (22.09.2015)**
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. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/006388

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: **9, 16-17**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/KR2015/006388

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2003-0096987 A1	22/05/2003	EP 0757106 A2	05/02/1997
		EP 0757106 A3	21/05/1997
		EP 1260595 A2	27/11/2002
		EP 1260595 A3	18/12/2002
		EP 1260595 B1	13/09/2006
		JP 02965131 B2	18/10/1999
		JP 09-019292 A	21/01/1997
		US 5945525 A	31/08/1999
		US 7119194 B2	10/10/2006
KR 10-2011-0121588 A	07/11/2011	EP 2565260 A2	06/03/2013
		US 2013-0043191 A1	21/02/2013
		WO 2011-136624 A2	03/11/2011
		WO 2011-136624 A3	01/03/2012
KR 10-2006-0061494 A	08/06/2006	NONE	
KR 10-2007-0018501 A	14/02/2007	NONE	
US 6027945 A	22/02/2000	AU 2000-67895 A1	19/03/2001
		AU 2000-67895 B2	17/03/2005
		CA 2379503 A1	01/03/2001
		CN 1370230 A	18/09/2002
		EP 0895546 A1	27/08/2003
		EP 1204741 A2	15/05/2002
		EP 1204741 B1	20/10/2004
		EP 1367137 A1	03/12/2003
		EP 1367137 B1	10/03/2010
		EP 1510578 A2	02/03/2005
		EP 1510578 A3	16/03/2005
		JP 03253638 B2	04/02/2002
		JP 04425513 B2	03/03/2010
		JP 11-509742 A	31/08/1999
		JP 2003-507049 A	25/02/2003
		US 2002-0086326 A1	04/07/2002
		US 2004-0086930 A1	06/05/2004
		US 2005-0287583 A1	29/12/2005
		US 6368800 B1	09/04/2002
		US 6673631 B1	06/01/2004
		WO 01-14590 A2	01/03/2001
		WO 01-14590 A3	11/10/2001
		WO 98-31840 A1	23/07/1998

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/006388

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/10(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/553(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/10; B82B 1/00; B82B 3/00; C04B 35/26; B82Y 25/00; C12M 1/18; C12Q 1/68; G01N 33/553; C12M 1/42

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: 자성 입자, 나노입자, 입경, 핵산, 소수성, 친수성, 실리카, 자기장

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2003-0096987 A1 (UEMATSU, H. 등) 2003.05.22 청구항 1-8 및 15; 단락 [0050] 및 [0063] 참조.	18
Y		10-13
A		1-8,14-15
Y	KR 10-2011-0121588 A ((주)바이오니아) 2011.11.07 청구항 1-7 및 12-17; 도면 26-34 참조.	10-13
X	KR 10-2006-0061494 A (요업기술원) 2006.06.08 요약; 청구항 1-8; 페이지 6, 라인 1-4 및 27-31 참조.	18
Y		10-13
X	KR 10-2007-0018501 A (요업기술원 등) 2007.02.14 요약; 청구항 1-4; 페이지 7, 라인 1-30; 도면 1-2 참조.	18
Y		10-13
A	US 6027945 A (SMITH, C. E. 등) 2000.02.22 청구항 1-7; 칼럼 8, 라인 30-45 참조.	1-8,10-15,18

☐ 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

"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	국제조사보고서 발송일
2015년 09월 22일 (22.09.2015)	2015년 09월 22일 (22.09.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/006388

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☒ 청구항: 9, 16-17
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/006388

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2003-0096987 A1	2003/05/22	EP 0757106 A2	1997/02/05
		EP 0757106 A3	1997/05/21
		EP 1260595 A2	2002/11/27
		EP 1260595 A3	2002/12/18
		EP 1260595 B1	2006/09/13
		JP 02965131 B2	1999/10/18
		JP 09-019292 A	1997/01/21
		US 5945525 A	1999/08/31
		US 7119194 B2	2006/10/10
KR 10-2011-0121588 A	2011/11/07	EP 2565260 A2	2013/03/06
		US 2013-0043191 A1	2013/02/21
		WO 2011-136624 A2	2011/11/03
		WO 2011-136624 A3	2012/03/01
KR 10-2006-0061494 A	2006/06/08	없음	
KR 10-2007-0018501 A	2007/02/14	없음	
US 6027945 A	2000/02/22	AU 2000-67895 A1	2001/03/19
		AU 2000-67895 B2	2005/03/17
		CA 2379503 A1	2001/03/01
		CN 1370230 A	2002/09/18
		EP 0895546 A1	2003/08/27
		EP 1204741 A2	2002/05/15
		EP 1204741 B1	2004/10/20
		EP 1367137 A1	2003/12/03
		EP 1367137 B1	2010/03/10
		EP 1510578 A2	2005/03/02
		EP 1510578 A3	2005/03/16
		JP 03253638 B2	2002/02/04
		JP 04425513 B2	2010/03/03
		JP 11-509742 A	1999/08/31
		JP 2003-507049 A	2003/02/25
		US 2002-0086326 A1	2002/07/04
		US 2004-0086930 A1	2004/05/06
		US 2005-0287583 A1	2005/12/29
		US 6368800 B1	2002/04/09
		US 6673631 B1	2004/01/06
		WO 01-14590 A2	2001/03/01
		WO 01-14590 A3	2001/10/11
		WO 98-31840 A1	1998/07/23