(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0143139
(43) 공개일자 2014년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12M 1/36* (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
*G01N 37/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7023987
(22) 출원일자(국제) 2013년01월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년08월27일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2013/050652
(87) 국제공개번호 WO 2013/132891
국제공개일자 2013년09월12일
(30) 우선권주장
JP-P-2012-052322 2012년03월08일 일본(JP)

(71) 출원인
**소니 주식회사**
일본국 도쿄도 미나토쿠 코난 1-7-1
(72) 발명자
**마츠모토 마사히로**
일본 1080075 도쿄도 미나토쿠 코난 1-7-1 소니 주식회사 내
**사토 마사키**
일본 1080075 도쿄도 미나토쿠 코난 1-7-1 소니 주식회사 내
**와타나베 히데토시**
일본 1080075 도쿄도 미나토쿠 코난 1-7-1 소니 주식회사 내
(74) 대리인
**장수길, 이중희**

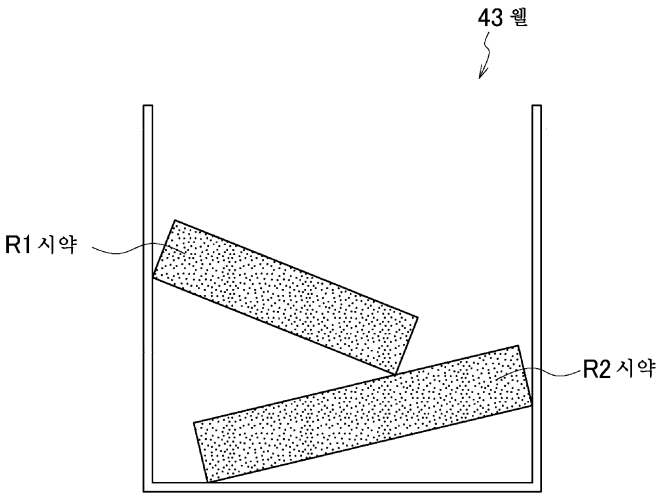
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법**

## (57) 요 약

본원 발명은, 간편하면서 정밀도가 높은 분석이 가능한 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법을 제공한다. 핵산 증폭 반응에 필요한 물질 중 적어도 일부를 포함하는 시약액을 건조시키는 고화 공정과, 고화된 상기 물질을 포함하는 시약을 핵산 증폭 반응의 반응장인 웰에 배치하는 수용 공정을 포함하는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법을 제공한다. 이 제조 방법에 의해 제조된 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩에서는, 핵산 증폭 반응에 필요한 물질이 고화된 상태로 수용되어 있음으로써, 핵산 증폭 반응에 있어서 비특이적 증폭이 억제되어, 높은 정밀도로 분석을 행하는 것이 가능하다.

*대 표 도* - 도2



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

핵산 증폭 반응에 필요한 물질 중, 적어도 일부를 포함하는 시약액을 건조시키는 고화 공정과,

고화된 상기 시약액을 핵산 증폭 반응의 반응장인 웰에 배치하는 수용 공정을 포함하는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 고화 공정은, 상기 시약액을 동결 건조하는 공정을 포함하는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 고화 공정 전에, 조성이 상이한 복수의 상기 시약액을 준비하는 제조 공정을 포함하고,

상기 시약액에는, 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하고 효소를 포함하지 않는 제1 시약액과,

효소를 포함하고 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하지 않는 제2 시약액이 포함되는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 고화 공정은, 상기 제1 시약액과 상기 제2 시약액을 별개로 동결 건조하는 공정을 포함하는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 수용 공정은, 복수의 상기 웰의 각각에, 고화된, 2종류 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하는 상기 제1 시약액을 수용하는 공정을 포함하는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

### 청구항 6

제3항에 있어서,

상기 제1 시약액과 상기 제2 시약액 중, 어느 하나의 시약액을 상기 고화 공정에 의해 고화하고,

상기 수용 공정 전에, 상기 고화 공정에 사용하지 않은 시약액을 상기 웰에 적하하여, 상기 웰 내에서 건조시키는 고착화 공정을 포함하는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 고착화 공정은, 상기 시약액을 진공 건조하는 공정을 포함하는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

## 명 세 서

### 기 술 분 야

[0001] 본 기술은, 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 핵산 증폭 반응의 반응장으로 되는 웰 내에, 반응에 필요한 1종류 이상의 물질을 포함하는 고화된 시약이 수용된 핵산 증폭 반응용

마이크로 칩에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0002] 최근, 반도체 산업에 있어서의 미세 가공 기술을 응용하여, 실리콘이나 유리제의 기판 상에 화학적 및 생물학적 분석을 행하기 위한 웰이나 유로를 형성한 마이크로 칩이 개발되어 오고 있다. 이들 마이크로 칩은, 예를 들면 액체 크로마토그래피의 전기 화학 검출기나 의료 현장에 있어서의 소형의 전기 화학 센서 등에 이용되기 시작하고 있다.

[0003] 이와 같은 마이크로 칩을 사용한 분석 시스템은, μ-TAS(micro-Total-Analysis System)나 랩·온·칩, 바이오칩 등이라 칭해지고, 화학적 및 생물학적 분석의 고속화나 고효율화, 집적화, 혹은, 분석 장치의 소형화를 가능하게 하는 기술로서 주목받고 있다. μ-TAS는, 소량의 시료로 분석이 가능한 점과, 마이크로 칩의 디스포저블 유즈(1회용)가 가능한 점으로부터, 특히 귀중한 미량 시료나 다수의 검체를 취급하는 생물학적 분석에의 응용이 기대되고 있다.

[0004] μ-TAS의 응용예로서, 마이크로 칩 상에 배치된 복수의 영역 내에 물질을 도입하고, 상기 물질을 화학적으로 검출하는 광학 검출 장치가 있다. 이와 같은 광학 검출 장치로서는, 예를 들면 마이크로 칩 상의 웰 내에서 핵산 증폭 반응 등의 복수의 물질간의 반응을 진행시켜, 생성하는 물질을 광학적으로 검출하는 반응 장치(예를 들면 리얼타임 PCR 장치) 등이 있다.

[0005] 종래, 마이크로 칩형 핵산 증폭 장치에서는, 핵산 증폭 반응에 필요한 시약 및 주형 DNA를 미리 모두 혼합하고, 이 혼합액을 마이크로 칩에 배치된 복수의 웰 내에 도입하여 반응을 행하는 방법이 취해지고 있다. 그러나, 이 방법에서는, 웰 내에 혼합액이 도입될 때까지 일정한 시간이 필요하기 때문에, 그 동안에 혼합액 내에서 반응이 진행되어, 비특이적인 핵산 증폭을 용이하게 하여, 정량성을 저하시켜 버리는 문제가 발생하고 있었다.

[0006] 전술한 문제에 대하여, 예를 들면 특허문헌 1에는, 웰에 핵산 증폭 반응에 필요한 복수의 시약이 소정의 순서로 적층되어 고착화된 마이크로 칩이 개시되어 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 일본 특허 공개 제2011-160728호 공보

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 기술은, 간편하면서 정밀도가 높은 분석이 가능한 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법을 제공하는 것을 주된 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제 해결을 위해서, 본 기술은, 핵산 증폭 반응에 필요한 물질 중, 적어도 일부를 포함하는 시약액을 건조시키는 고화 공정과, 고화된 상기 시약액을 핵산 증폭 반응의 반응장인 웰에 배치하는 수용 공정을 포함하는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법을 제공한다.

[0010] 상기 고화 공정은, 상기 시약액을 동결 건조하는 공정을 포함하는 것이 바람직하다.

[0011] 상기 고화 공정 전에, 조성이 상이한 복수의 상기 시약액을 준비하는 제조 공정을 포함하고, 상기 시약액에는, 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하고 효소를 포함하지 않는 제1 시약액과, 효소를 포함하고 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하지 않는 제2 시약액이 포함되어 있어도 된다.

[0012] 또한, 상기 고화 공정은, 상기 제1 시약액과 상기 제2 시약액을 별개로 동결 건조하는 공정을 포함하고 있어도 된다.

[0013] 또한, 상기 수용 공정은, 복수의 상기 웰의 각각에, 고화된, 2종류 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함

하는 상기 제1 시약액을 수용하는 공정을 포함하고 있어도 된다.

[0014] 본 기술은 또한, 상기 제1 시약액과 상기 제2 시약액 중, 어느 하나의 시약액을 상기 고화 공정에 의해 고화하고, 상기 수용 공정 전에, 상기 고화 공정에 사용하지 않은 시약액을 상기 웰에 적하하여, 상기 웰 내에서 건조시키는 고착화 공정을 포함하는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법을 제공한다.

[0015] 상기 고착화 공정은, 상기 시약액을 진공 건조하는 공정을 포함하는 것이 바람직하다.

## 발명의 효과

[0016] 본 기술에 의해, 간편하고 정밀도가 높은 분석을 가능하게 하는 핵산 증폭용 마이크로 칩이 제공된다.

## 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 기술의 제1 실시 형태에 따른 마이크로 칩(1a)의 구성을 설명하기 위한 모식도이다.

도 2는 마이크로 칩(1a)의 웰(43) 내의 구성을 설명하기 위한 모식도이다.

도 3은 마이크로 칩(1a)의 제조 방법을 설명하기 위한 흐름도이다.

도 4는 마이크로 칩(1a)의 변형 실시 형태의 구성을 설명하기 위한 모식도이다.

도 5는 본 기술의 제2 실시 형태에 따른 마이크로 칩(1b)의 웰(43) 내의 구성을 설명하기 위한 모식도이다.

도 6은 마이크로 칩(1b)의 제조 방법을 설명하기 위한 흐름도이다.

도 7은 본 기술의 제3 실시 형태에 따른 마이크로 칩(1c)의 웰(43) 내의 구성을 설명하기 위한 모식도이다.

도 8은 본 기술에 따른 마이크로 칩에 있어서의 핵산 증폭의 개시 시각을 나타내는 도면 대용 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 기술을 실시하기 위한 적합한 형태에 대하여 설명한다. 또한, 이하에 설명하는 실시 형태는, 본 기술의 대표적인 실시 형태를 나타낸 것이며, 이에 의해 본 기술의 범위가 좁게 해석되는 일은 없다. 설명은 이하의 순서로 행한다.

[0019] 1. 본 기술의 제1 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 구성

[0020] 2. 본 기술의 제1 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법

[0021] (1) 기판층의 성형

[0022] (2) 시약액의 제조

[0023] (3) 시약액의 고화

[0024] (4) 시약의 수용

[0025] (5) 기판층의 접합

[0026] 3. 제1 실시 형태의 변형 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 구성

[0027] 4. 본 기술의 제2 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 구성

[0028] 5. 본 기술의 제2 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법

[0029] (1) 시약액의 고착화

[0030] (2) 시약의 수용

[0031] 6. 본 기술의 제3 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 구성

[0032] 1. 본 기술의 제1 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 구성

[0033] 도 1은 본 기술의 제1 실시 형태에 따른 마이크로 칩(1a)의 구성을 설명하는 모식도이다. 도 1의 A는 상면 모식도이고, 도 1의 B는 도 1의 A의 P-P 단면에 대응하는 단면 모식도이다.

[0034] 도면 중 부호 1a로 나타내는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩(이하, 「마이크로 칩」이라고도 칭함)에는, 시료 용

액이 도입되는 영역으로서, 외부로부터 샘플 등의 액체가 도입되는 도입부(2)와, 핵산 증폭 반응의 반응장으로 되는 웰(41 내지 45)과, 도입부(2)와 각 웰을 접속하는 유로(31 내지 35)가 형성되어 있다. 또한, 웰(41 내지 45)에는, 후술하는 바와 같이, 핵산 증폭 반응에 필요한 물질의 적어도 일부를 포함하는 시약(R1, R2)이 수용되어 있다(도 1의 B에 있어서, 시약(R1, R2), 도시 생략). 도 1 및 그 설명에 있어서는, 유로(31)에 의해 시료 용액이 공급되는 5개의 웰을 모두 웰(41)이라 하고, 마찬가지로 유로(32, 33, 34, 35)에 의해 시료 용액의 공급을 받는 각각의 5개의 웰을, 웰(42, 43, 44, 45)이라 하여 설명한다. 또한, 시료 용액이란, 핵산 증폭 반응에 있어서 증폭의 대상으로 되는 주형 핵산인 DNA나 RNA 등의 핵산을 포함하는 용액을 가리킨다.

[0035] 본 기술에 따른 마이크로 칩을 사용하여 행하는 「핵산 증폭 반응」에 대해서는, 온도 사이클을 실시하는 종래의 PCR(Polymerase Chain Reaction)법이나, 온도 사이클을 수반하지 않는 각종 등온 증폭법이 포함된다. 등온 증폭법으로서는, 예를 들면 LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)법, SMAP(SMart Amplification Process)법, NASBA(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)법, ICAN(Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids)법(등록 상표), TRC(Transcription-Reverse transcription Concerted)법, SDA(Strand Displacement Amplification)법, TMA(Transcription-Mediated Amplification)법, RCA(Rolling Circle Amplification)법 등을 들 수 있다. 이 밖에, 「핵산 증폭 반응」에는 핵산의 증폭을 목적으로 하는, 변온 혹은 등온에 의한 핵산 증폭 반응이 넓게 포함되는 것으로 한다. 또한, 이들 핵산 증폭 반응에는, 리얼타임 PCR법 등의 증폭 핵산의 정량을 수반하는 반응도 포함된다.

[0036] 마이크로 칩(1a)은, 도입부(2), 유로(31 내지 35) 및 웰(41 내지 45)이 형성된 기판층(12)에 기판층(11)이 접합되고, 또한 기판층(11)에 기판층(13)이 접합됨으로써 구성되어 있다(도 1의 B 참조). 마이크로 칩(1a)에서는, 기판층(11)과 기판층(12)의 접합을 대기압에 대하여 부압 하에서 행한 경우, 도입부(2), 유로(31 내지 35), 웰(41 내지 45)의 내부를 대기압에 대하여 부압(1/100 기압)으로 되도록 기밀하게 밀봉할 수 있다. 마이크로 칩(1a)에 있어서, 시료 용액이 도입되는 영역을 대기압에 대하여 부압으로 함으로써, 시료 용액의 도입 시에 마이크로 칩 내부의 부압에 의해 시료 용액이 흡인되어, 미세한 유로 구조가 형성된 마이크로 칩(1a)의 내부로의 시료 용액의 도입을, 보다 단시간에 행할 수 있게 된다.

[0037] 기판층(11, 12, 13)의 재료는, 유리나 각종 플라스틱류로 할 수 있다. 바람직하게는, 기판층(12, 13)을 가스 불투과성을 구비하는 재료로 구성한다. 마이크로 칩(1a)의 외면을 구성하는 기판층(12, 13)을 PC 등의 가스 불투과성을 구비하는 재료로 함으로써, 웰(41 내지 45) 내에 도입된 시료 용액이, 핵산 증폭 반응에 있어서의 가열에 의해 기화되어, 기판층(11)을 투과하여 소실(누액)되는 것을 방지할 수 있다. 또한, 마이크로 칩(1a)의 시료 용액이 도입되는 영역을, 대기압에 대하여 부압으로 하여 기밀하게 밀봉한 경우에는, 마이크로 칩(1a) 밖으로부터의 공기의 침투를 방지하여 내부의 부압을 유지하기 위해서도, 기판층(12, 13)을 가스 불투과성을 구비하는 재료로 구성하는 것이 바람직하다.

[0038] 가스 불투과성을 구비하는 기판층의 재료는, 유리, 플라스틱류, 금속류 및 세라믹류 등을 채용할 수 있다. 플라스틱류로서는, PMMA(폴리메틸메타크릴레이트 : 아크릴 수지), PC(폴리카르보네이트), PS(폴리스티렌), PP(폴리프로필렌), PE(폴리에틸렌), PET(폴리에틸렌테레프탈레이트), 디에틸렌글리콜비스아릴카르보네이트, SAN 수지(스티렌-아크릴로니트릴 공중합체), MS 수지(MMA-스티렌 공중합체), TPX(폴리(4-메틸펜텐-1)), 폴리올레핀, SiMA(실록사닐메타크릴레이트 단량체)-MMA 공중합체, SiMA-불소 함유 단량체 공중합체, 실리콘 매크로머(A)-HFBuMA(헵타플루오로부틸메타크릴레이트)-MMA 3원 공중합체, 디치환 폴리아세틸렌계 중합체 등을 들 수 있다. 금속류로서는, 알루미늄, 구리, 스테인리스(SUS), 규소, 티타늄, 텅스텐 등을 들 수 있다. 세라믹류로서는, 알루미나($Al_2O_3$), 질화알루미늄(AlN), 탄화규소(SiC), 산화티타늄($TiO_2$), 산화지르코니아($ZrO_2$), 석영 등을 들 수 있다.

[0039] 기판층(11)은, 탄성을 갖는 재료로 구성되는 것이 바람직하다. 마이크로 칩(1a)에 있어서, 도입부(2)를 밀봉하는 기판층(11)을, 탄성을 갖는 재료로 함으로써, 바늘 등의 천자 부재의 일부를 마이크로 칩(1a) 외부로부터 도입부(2)에 천통(穿通)하는 것이 가능하게 된다. 바늘을 접속한 시린지 등에 미리 시료 용액을 충전해 두고, 기판층(11)을 그 바늘로 천통하면, 밀봉되어 있던 도입부(2)가 시린지 내부와만 접속되어, 기포를 발생시키지 않고 시료 용액의 마이크로 칩(1a) 내에의 도입이 가능하게 된다.

[0040] 또한, 시료 용액이 도입되는 영역을, 대기압에 대하여 부압으로 하여 기밀하게 밀봉한 경우에는, 바늘의 끝이 도입부(2)에 도달한 시점에서, 마이크로 칩(1a) 외부와 도입부(2)의 압력차에 의해, 시린지 내의 시료 용액은 도입부(2)에 자동으로 흡인된다.

[0041] 기판층(11)을 탄성을 갖는 재료에 의해 형성해 둠으로써, 시료 용액 도입 후, 바늘을 도입부(2)로부터 뺐을 때,

기판층(11)의 자기 밀봉성에 의해 천자 개소가 자연스럽게 밀봉되도록 할 수 있다. 본 기술에 있어서는, 기판층의 탄성 변형에 의한 바늘의 천자 개소의 자연 밀봉을, 기판층의 「자기 밀봉성」이라 정의하는 것이다.

[0042] 탄성을 갖는 기판층의 재료로서는, 폴리디메틸실록산(PDMS) 등의 실리콘계 엘라스토머 외에, 아크릴계 엘라스토머, 우레탄계 엘라스토머, 불소계 엘라스토머, 스티렌계 엘라스토머, 에폭시계 엘라스토머, 천연 고무 등을 들 수 있다.

[0043] 또한, 본 기술에 따른 마이크로 칩(1a)의 각 웰에 유지된 물질을, 광학적으로 분석하는 경우에 있어서는, 각 기판층의 재질에는, 광투과성을 갖고 자가 형광이 적고 파장 분산이 작음으로써 광학 오차가 적은 재료를 선택하는 것이 바람직하다.

[0044] 다음에, 마이크로 칩(1a)의 웰에 수용된 시약에 대하여 설명한다. 도 2에서는, 마이크로 칩(1a)의 각 웰을 대표하여, 웰(43)에 대하여 모식적으로 도시한다. 웰(43)에는, 고형 시약(R1, R2)이 수용되어 있다. 시약(R1, R2)에는, 핵산 증폭 반응에 있어서 증폭 핵산쇄를 얻기 위해서 필요한 물질의 적어도 일부가 포함되어 있다. 구체적으로는, 증폭의 대상인 DNA, RNA 등의 염기 배열의 적어도 일부에 상보적인 올리고뉴클레오티드 프라이머(이하 「프라이머」라고도 칭함), 핵산 단량체(dNTPs), 효소, 반응 완충액에 포함되는 성분 등이다. 또한, 핵산 증폭 반응에 직접 필요하지는 않지만, 증폭한 핵산쇄를 검출하기 위한 형광 표식 등의 표식을 구비한 프로브나, 이중쇄의 핵산에 인터칼레이트하는 검출용 시약 등도, 증폭 핵산쇄의 검출에 필요한 물질로서, 시약(R1, R2)에 포함되는 성분으로 할 수 있다.

[0045] 시약(R1)과 시약(R2)에 포함되는 핵산 증폭 반응에 필요한 성분은, 각각 상이한 조성이어도 된다. 예를 들면, 시약(R1)을, 프라이머를 포함하고 효소를 포함하지 않는 시약액(제1 시약액)으로 하고, 시약(R2)을, 효소를 포함하고 프라이머를 포함하지 않는 시약액(제2 시약액)으로 할 수도 있다. 이와 같이 프라이머가 포함되는 시약(R1)에 효소가 포함되지 않고, 효소가 포함되는 시약(R2)에 프라이머가 포함되지 않음으로써, 시료 용액이 웰 내에 도입될 때까지 프라이머와 효소가 혼합되지 않아, 프라이머 이량체의 발생이 억제된다. 시약(R1)을, 효소를 포함하고 프라이머를 포함하지 않는 시약액(제2 시약액)으로 하고, 시약(R2)을, 프라이머를 포함하고 효소를 포함하지 않는 시약액(제1 시약액)으로 해도 되고, 시약(R1, R2)의 조성은 임의로 할 수 있다. 또한, 시약(R1, R2)은, 도 2에 도시된 형상에는 한정되지 않고, 웰(43) 내에 수용 가능한 체적이면, 어느 형상이어도 된다. 또한, 마이크로 칩(1a)에 형성된 복수의 웰에 동일한 조성의 시약(R1, R2)이 수용되어 있어도 되고, 상이한 조성의 시약(R1, R2)이 각 웰에 수용되어 있어도 된다.

[0046] 2. 본 기술의 제1 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법

[0047] 마이크로 칩(1a)의 제조 방법에 대하여, 도 3에 도시한 흐름도를 참조하여 설명한다.

[0048] (1) 기판층의 성형

[0049] 도 3 중, 부호 S1은 기판층의 성형 공정이다. 본 공정에서는, 기판층(12)에, 도입부(2), 유로(31 내지 35), 웰(41 내지 45)을 성형한다. 기판층(12)에의 도입부(2) 등의 성형은 공지의 방법에 의해 행할 수 있다. 예를 들면, 유리제 기판층의 웨트 에칭 또는 드라이 에칭에 의해, 혹은 플라스틱제 기판층의 나노임프린트, 사출 성형 또는 절삭 가공이다. 또한, 도입부(2) 등은, 기판층(11)에 성형되어도 되고, 혹은 기판층(11)에 일부를, 기판층(12)에 나머지 부분을 성형시켜도 된다.

[0050] (2) 시약액의 제조

[0051] 도 3 중, 부호 S2는 시약액의 제조 공정이다. 본 공정에서는, 마이크로 칩(1a)에 수용하는 시약(R1, R2)의 조성에 맞추어, 액상 또는 겔상의 시약액을 제조한다. 시약액에는, 핵산 증폭 반응에 필요한 물질 중 적어도 일부가 포함되어 있으면 되고, 그 조성은 임의로 할 수 있다. 예를 들면, 프라이머만이 포함되는 시약(R1)과, 효소만이 포함되는 시약(R2)을 준비해도 된다. 또한, 제조하는 시약액의 종류는 2종류에는 한정되지 않고, 하나의 시약액에 포함되는 핵산 증폭 반응에 필요한 물질은, 1종류이어도, 수종류이어도 된다.

[0052] 제조 공정에서 준비되는 시약액에 프라이머가 포함되는 경우, 프라이머는 1종류이어도, 복수 종류이어도 된다. 본 기술에 따른 마이크로 칩(1a)의 제조 방법에 있어서는, 어떤 염기 배열을 포함하는 프라이머에 대하여, 상이한 염기 배열을 포함하는 프라이머는, 다른 종류의 프라이머라 정의한다. 즉, 증폭 대상인 표적 핵산쇄에 대하여, 하나의 핵산쇄의 염기 배열에 대하여 디자인된 프라이머와, 그 상보쇄의 염기 배열에 대하여 디자인된 프라이머를 합한 한 쌍의 프라이머 세트는, 2종류의 프라이머를 포함하는 것이라 정의한다. 이 프라이머의 종류에 대한 정의는, 후술하는 제2 실시 형태 및 제3 실시 형태에 있어서도 마찬가지이다.

[0053] 시약액의 조성에 대해서는, 예를 들면 프라이머를 포함하고 효소를 포함하지 않는 시약액과, 효소를 포함하고 프라이머가 포함되지 않는 시약액을 제조한 경우, 핵산 증폭 반응 개시시에 도입된 시료 용액이 웰에 도달할 때까지, 프라이머와 효소가 혼합되지 않아, 프라이머 이량체에 의한 핵산의 비특이적인 증폭이 억제되어, 적합하다. 또한 프라이머를 포함하는 시약액에는, 2종류 이상의 프라이머가 포함되어 있는 것이 바람직하다.

[0054] 시약액의 제조 공정 S2에 있어서, 시약액이나, 거기에 가해지는 프라이머 용액이나 효소 용액은 냉온으로 유지되는 것이 바람직하다. 시약액 등의 냉온에서의 유지는, 빙상에 시약액 등이 들어 있는 용기를 두거나, 알루미늄 블록 등의 튜브를 유지하는 기구를 미리 냉동고 등에 넣어, 냉각된 상태에서 사용함으로써 가능하다.

[0055] (3) 시약액의 고화

[0056] 도 3 중, 부호 S3a는 시약액의 고화 공정이다. 본 공정에서는, 제조 공정 S2에서 준비된 복수의 시약액을 고화한다. 즉, 시약액을 건조시켜, 고상 상태의 시약(R1, R2)을 제작하는 공정이다. 고화 공정 S3a에 대해서는, 도 3에 도시한 바와 같이 2단계로 나누어, 「시약액의 적하」의 공정 S3a-1, 「동결 건조」의 공정 S3a-2의 순으로 설명한다. 또한, 도 3은 제조 공정 S2에서 준비된 시약액이 2종류인 경우의 흐름도이다.

[0057] [시약액의 적하 공정 S3a-1]

[0058] 본 공정에서는, 전술한, 시약액의 제조 공정 S2에 있어서 제조된 시약액을, 고화 공정 S3a에서 사용하는 고화용 용기에 적하한다. 복수 종류의 시약액을 제조 공정 S2에서 준비한 경우에는, 시약액을 각각 별도의 고화용 용기에 적하하고, 별개로 고화시킨다. 또한, 마이크로 칩(1a)의 복수의 웰(41 내지 45)에, 동일한 조성의 시약(R1)을 수용하는 경우도, 웰의 수에 따른 수의 고화용 용기를 준비하고, 각각의 고화용 용기에 시약액을 적하한다. 고화용 용기는, 어느 재질이어도 되지만, 다음의 동결 건조의 공정 S3a-2에서 설정하는 온도나 기압에 내성을 갖는 것이 바람직하다.

[0059] [동결 건조의 공정 S3a-2]

[0060] 본 공정에서는, 전술한, 용기에 적하된 시약액을 건조하여 고화한다. 건조 방법으로서는, 예를 들면, 동결 건조가 적합하다. 또한, 동결 건조에는, 예비 동결, 1차 건조(승화 동결), 2차 건조(결합수의 제거)의 각 공정을 포함하는 것이 바람직하다. 예비 동결에 있어서는, 동결 온도는 공정점(시약액이 동결하는 온도) 이하이면 되지만, 효소의 실활 방지나 시약액을 완전히 동결시킬 목적을 위해서 -40℃ 정도에서 동결시키는 것이 바람직하다. 1차 건조에 있어서는, 예비 동결 공정에서 동결시킨 시약액을 건조시킨다. 이때, 시약액을 공정점 이하에서 건조시킴으로써, 건조 도중에서의 용해가 방지되어, 시약액에 포함되는 수분을 승화시키는 것이 가능해진다. 1차 건조에 있어서의 진공도는, 예를 들면 100Pa 이하인 것이 바람직하다. 100Pa에 있어서의 물의 비점은 약 -20℃이기 때문에, 상술한 시약액의 공정점에 가까워, 건조 도중의 시약액의 용해가 방지된다. 1차 건조의 진공도는, 제조한 시약액의 공정점에 따라서, 적절한 값을 선택하면 된다. 2차 건조에서는, 1차 건조 후의 시약액에 포함되는 성분에 부착되어 있는 분자 상태의 물을 제거한다. 시약액에 포함되는 성분의 실활, 변성 등이 일어나지 않을 정도의 온도까지 가열하여, 시약액의 건조도를 높여도 된다. 또한, 본 기술에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법에 있어서, 고화 공정 S3a의 건조 방법은 동결 건조에 한정되지 않는다.

[0061] (4) 시약의 수용

[0062] 도 3 중, 부호 S4는 시약(R1, R2)의 수용 공정이다. 본 공정에서는, 전술한 시약액의 고화 공정 S3a에 의해 고화용 용기 내에 제작된 고형상의 시약(R1, R2)을 고화용 용기로부터 취출하여, 기판층의 성형 공정 S1에 의해 어느 하나의 기판층에 형성된 웰에 수용한다. 기판층(12)에 형성된 복수의 웰에 있어서, 시약(R1, R2)을 수용하는 웰은 어느 것이어도 되고, 하나이어도 복수이어도 된다. 또한, 하나의 웰에 수용하는 시약(R1, R2)의 수나 종류는 임의로 할 수 있고, 복수의 웰에, 동일한 조성을 포함하는 시약(R1, R2)을 수용해도 되고, 상이한 조성을 포함하는 시약(R1, R2)을 수용해도 된다. 시약(R1), 또는 시약(R2)에 프라이머가 포함되는 경우에는, 하나의 시약에 포함되는 프라이머의 종류는 2종류 이상인 것이 바람직하다. 예를 들면, 함유하는 프라이머가 각각 상이한 시약(R1)과 시약(R2)을 준비하고, 마이크로 칩(1a)에 형성된 복수의 웰에, 시약(R1)과 시약(R2)이 다른 웰에 배치되도록 수용한다. 이 경우, 1회의 핵산 증폭 반응에 의해, 복수의 염기배열이 상이한 핵산쇄의 증폭에 대하여 해석하는 것이 가능하게 되어, 마이크로 칩(1a)을 사용한 해석이 보다 간편해진다.

[0063] (5) 기판층의 접합

[0064] 도 3 중, 부호 S5는 기판층의 접합 공정이다. 본 공정에서는, 시약(R1, R2)이 수용된 어느 하나의 기판층에, 다른 기판층을 접합한다. 기판층(11, 12, 13)의 접합에는, 예를 들면 열 융착, 접착제, 양극 접합, 점착 시트

를 사용한 접합, 플라즈마 활성화 결합, 초음파 접합 등의 공지의 방법에 의해 행할 수 있다. 또한, 기판층(11, 12, 13)의 접합을, 대기압에 대하여 부압 하에서 행함으로써, 시료 용액이 도입되는, 도입부(2), 유로(31 내지 35), 웰(41 내지 45)의 각 영역을 대기압에 대하여 부압(예를 들면 1/100 기압)으로 할 수 있다. 웰(41 내지 45)을 밀봉하는 기판층(11)에, PDMS 등의 탄성 외에 가스 투과성을 갖는 재료를 사용한 경우에는, 기판층(11, 12)을 접합한 후, 부압(진공) 하에 정치하면, 도입부(2) 등의 각 영역에 존재하는 공기가 기판층(11)을 투과하여 배출되기 때문에, 마이크로 칩(1a) 내부를 대기압에 대하여 부압(진공)으로 할 수 있다. 또한, 마이크로 칩(1a)의 내부를 대기압에 대하여 부압으로 하는 공정은, 본 기술에 따른 마이크로 칩의 제조 방법에 있어서 필수는 아니다.

[0065] 본 기술에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩(1a)에 있어서는, 핵산 증폭 반응에 필요한 물질의 일부를 포함하는 시약(R1, R2)이, 분석장인 웰(41 내지 45) 내에 미리 수용되어 있다. 이 때문에, 핵산 증폭 반응에 필요한 나머지 물질과 표적 핵산쇄를 포함하는 시료 용액을 웰(41 내지 45) 내에 공급하는 것만으로 핵산 증폭 반응을 개시할 수 있다. 또한, 복수의 고형상의 시약(R1, R2)을 웰(41 내지 45) 내에 수용함으로써, 핵산 증폭 반응에 필요한 복수의 물질을, 해석 개시시까지 분리된 상태로 마이크로 칩(1a) 내에 유지할 수 있다. 이 때문에, 마이크로 칩(1a)을 사용한 핵산 증폭 반응에 있어서는, 프라이머끼리가 어닐링되어 프라이머 이량체 등을 발생하는 것이 억제되어, 핵산의 비특이적 증폭이 저감된다. 또한, 시약(R1, R2)의 제조를 각각 고화용 용기에서 행함으로써, 핵산 증폭 반응에 사용하는 물질을 나누어 고화하는 것이 용이하다. 이 때문에, 본 기술에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법에 의해, 간편하면서 정밀도가 높은 분석이 가능한 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조가 가능해진다.

[0066] 3. 제1 실시 형태의 변형 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 구성

[0067] 도 4에, 제1 실시 형태의 변형 실시 형태에 따른 마이크로 칩(1a-2)의 웰에 수용된 시약(R)에 대하여, 웰(43)을 대표로 하여 모식적으로 도시한다. 마이크로 칩(1a-2)은, 웰(43) 등의 각 웰에 수용되어 있는 시약(R) 이외의 구성에 대해서는, 제1 실시 형태와 동일하다. 제1 실시 형태와 동일한 구성에 대해서는, 동일한 부호를 붙이고 설명에 대해서는 생략한다. 또한, 마이크로 칩(1a-2)을 구성하는 기판층(11, 12, 13)의 재료는, 마이크로 칩(1a)에 있어서 동일한 부호를 붙인 기판층과 동일하다.

[0068] 마이크로 칩(1a-2)의 웰(43)에는 1종류의 시약(R)이 수용되어 있다. 마이크로 칩(1a-2)의 제조 공정은, 시약액의 제조 공정 S2에 있어서, 제조되는 시약액의 종류 이외는 도 3에 도시한 흐름도와 동일하여, 제조 공정의 설명은 생략한다. 도 4의 웰(43)에 나타내는 바와 같이, 마이크로 칩(1a-2)에 수용되는 시약(R)은 1종류이어도 된다. 예를 들면, 효소를 포함하는 시약(R)을 웰(43)에 수용하고, 핵산 증폭 반응 개시시에, 프라이머 등, 다른 핵산 증폭 반응에 필요한 성분을 시료 용액과 혼합하여 마이크로 칩(1a-2)에 도입해도 된다.

[0069] 본 기술에 따른 마이크로 칩(1a-2)에 있어서는, 일부의 핵산 증폭 반응에 필요한 성분을, 미리 웰(41 내지 45) 내에 수용함으로써, 웰 내에 시료 용액이 도입될 때까지, 웰 내의 시약(R)에 포함되는 성분과 다른 성분을 분리해 두는 것이 가능하다. 이 때문에, 핵산 증폭 반응이 개시될 때까지, 예를 들면 효소와 프라이머를 나누어 둘 수 있어, 프라이머 이량체 등에 의한 비특이적인 핵산 증폭이 억제되어, 마이크로 칩(1a-2)을 사용하여, 정밀도가 높은 분석이 가능해진다.

[0070] 4. 본 기술의 제2 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 구성

[0071] 도 5에, 본 기술의 제2 실시 형태에 따른 마이크로 칩(1b)의 웰에 수용된 시약(R1, R2)에 대하여, 웰(43)을 대표로 하여 모식적으로 도시한다. 마이크로 칩(1b)은, 웰(43) 등의 각 웰에 수용되어 있는 시약(R1, R2)의 형상 이외의 구성에 대해서는 제1 실시 형태와 동일하다. 제1 실시 형태와 동일한 구성에 대해서는, 동일한 부호를 붙이고 설명에 대해서는 생략한다. 또한, 마이크로 칩(1b)을 구성하는 기판층(11, 12, 13)의 재료는, 마이크로 칩(1a)에 있어서 동일한 부호를 붙인 기판층과 동일하다.

[0072] 도 5에 도시한 시약(R1, R2)은, 마이크로 칩(1a)에 수용된 시약과 마찬가지로, 고형 시약이며, 핵산 증폭 반응에 있어서 증폭 핵산쇄를 얻기 위해서 필요한 물질의 적어도 일부가 포함되어 있다. 시약(R1, R2)의 조성에 대해서는, 마이크로 칩(1a)에 수용되어 있는 시약(R1, R2)과 동일하기 때문에, 설명은 생략한다. 마이크로 칩(1b)에 수용된 시약(R1, R2)에 대하여, 마이크로 칩(1a)에 있어서의 시약(R1, R2)과 상이한 점은, 웰(43)에 수용된 시약 중 일부가, 웰(43) 내에 고착되어 있는 것이다(도 5 참조).

[0073] 5. 본 기술의 제2 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법

[0074] 마이크로 칩(1b)의 제조 방법에 대하여, 도 6에 도시한 흐름도를 참조하여 설명한다. 기판층의 성형 공정 S1,

시약액의 제조 공정 S2, 기판층의 접합 공정 S5의 각 공정에 대해서는, 제1 실시 형태와 동일하기 때문에, 설명은 생략하고, 시약액의 고착화 공정 S3b 및 시약의 수용 공정 S4에 대하여 설명한다.

[0075] (1) 시약액의 고착화

[0076] 도 6 중, 부호 S3b는 시약액의 고착화 공정이다. 본 공정에서는, 제조 공정 S2에서 준비된 복수 종류의 시약액 중, 1종류의 시약액을 웰(43) 내에 고착화한다. 즉, 시약액을 웰(43) 내에서 건조시켜, 건조 상태로 된 시약액이 웰 내에 고착된 상태로 하는 공정이다. 고착화 공정 S3b에 대해서는, 도 6에 도시한 바와 같이 「 시약액의 적하」의 공정 S3b-1, 「진공 건조」의 공정 S3b-2의 순으로 설명한다. 또한, 마이크로 칩(1b)의 제조에 있어서는, 시약액의 고착화 공정 S3b에 사용하지 않는 다른 시약액은, 제1 실시 형태와 마찬가지로 시약액의 고화 공정 S3a에 의해 고형상으로 한다.

[0077] [시약액(R2)의 적하의 공정 S3b-1]

[0078] 본 공정에서는, 전술한, 시약액의 제조 공정 S2에 있어서 제조된 시약액 중, 1종류의 시약액을, 기판층의 성형 공정 S1에 있어서 기판층(12) 등에 형성된 각 웰에 적하한다. 이때, 웰이 형성된 기판층(12)은 냉각되어 있는 것이 바람직하다.

[0079] [진공 건조의 공정 S3b-2]

[0080] 본 공정에서는, 전술한 시약액이 적하된 기판층(12)을 진공 하(600-1000Pa)에 두고, 시약액을 건조시킨다. 제1 실시 형태에 있어서의 시약액의 고화 공정 S3a와 달리, 본 공정에서는 기판층(12)을 변형시키지 않는 건조 방법을 선택할 필요가 있고, 예를 들면 진공 건조가 적합하다. 건조 방법에 대해서는, 그 밖에, 시약액에 포함되는 물질의 성질에 맞추어, 풍건으로 하는 것도 가능하다.

[0081] (2) 시약의 수용

[0082] 도 6 중, 부호 S4는 시약의 수용 공정이다. 전술한 시약액의 고착화 공정 S3b의 결과, 제1 실시 형태와는 달리, 마이크로 칩(1b)에 있어서는 시약(R2)이 웰(43) 내에 존재한다. 본 공정에서는, 이 시약(R2)이 미리 고착화된 웰에, 별도로, 시약액의 고화 공정 S3a에 의해 준비한 시약(R1)을 수용한다. 마이크로 칩(1b)에 수용하는 고화된 시약(R1)은, 1종류에는 한정되지 않고, 임의로 할 수 있다.

[0083] 본 기술에 따른 마이크로 칩(1b)에서는, 핵산 증폭 반응에 필요한 물질의 일부를 포함하는 시약(R1, R2)이, 분석장인 웰(41 내지 45) 내에 미리 유지되어 있다. 이 때문에, 마이크로 칩(1a)과 마찬가지로, 마이크로 칩(1b)을 사용하여 핵산 증폭 반응을 행할 때는, 핵산 증폭 반응에 필요한 나머지 물질과 표적 핵산쇄를 포함하는 시료 용액만을 웰(41 내지 45) 내에 도입하면 되어, 간편하게 핵산 증폭 반응을 행할 수 있다. 또한, 웰(41 내지 45) 내에 유지된 조성이 상이한 복수의 고형상의 시약(R1, R2)에 포함되는 성분은, 핵산 증폭 반응의 개시시까지 분리된 상태가 유지된다. 이 때문에, 예를 들면 효소와 프라이머를, 각각 시약(R1)과 시약(R2)에 포함되는 성분으로 함으로써, 프라이머 이량체 등의 발생에 의한 핵산의 비특이적 증폭의 억제가 가능해진다.

[0084] 6. 본 기술의 제3 실시 형태에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 구성

[0085] 도 7에, 제3 실시 형태에 따른 마이크로 칩(1c)의 웰에 수용된 시약(R)에 대하여, 웰(43)을 대표로 하여 모식적으로 도시한다. 마이크로 칩(1c)은, 웰(43) 등의 각 웰에 수용되어 있는 시약(R) 이외의 구성에 대해서는 제1 실시 형태와 동일하다. 제1 실시 형태와 동일한 구성에 대해서는, 동일한 부호를 붙이고 설명에 대해서는 생략한다. 또한, 마이크로 칩(1c)을 구성하는 기판층(11, 12, 13)의 재료는, 마이크로 칩(1a)에 있어서 동일한 부호를 붙인 기판층과 동일하다.

[0086] 마이크로 칩(1c)의 웰(43)에는, 핵산 증폭 반응에 있어서 증폭 핵산쇄를 얻기 위해서 필요한 물질의 적어도 일부가 포함되어 있는 시약(R)이 고착되어 있다(도 7). 시약 R에 포함되는 핵산 증폭 반응에 필요한 성분은, 1종류이어도 되고, 복수 종류이어도 된다.

[0087] 마이크로 칩(1c)의 제조 공정에서는, 기판층의 성형 공정 S1, 시약액의 제조 공정 S2 및 기판층의 접합 공정 S5에 대해서는, 제1 실시 형태와 마찬가지이며, 설명은 생략한다. 시약액을 웰(43)에 고착화시키는 공정에 대해서는, 제2 실시 형태의, 시약액의 고착화 공정 S3b와 마찬가지로, 소정의 조성으로 제조된 시약액을 기판층(12)에 형성된 각 웰에 적하하고, 진공 건조 등에 의해 시약액을 웰(43) 내에 고착화시킨다.

[0088] 시약액의 적하 시, 제조된 시약액은, 냉온으로 보존되어 있는 것이 바람직하다. 또한, 각 웰이 형성된 기판층(12)도 냉온으로 보존되는 것이 바람직하다. 예를 들면, 미리 알루미늄 블록 등의 기판층(12)을 유지하는 기구

를 냉동고에서 차게 해 두고, 냉각된 기구 위에 기판층(12)을 놓고, 시약액의 적하를 행해도 된다. 마이크로칩(1c)에 있어서, 웰(43) 등에 고착화되는 시약(R)은, 1종류이어도 되고, 조성이 상이한 시약(R1, R2)으로 해도 된다. 복수의 시약(R1, R2)을 웰(43) 내에 고착화시키는 경우에는, 어느 하나의 시약액을 웰(43) 내에 적하하고, 진공 건조 등에 의해 고착화시키고, 그 고착화된 시약(R1) 위에 다음의 시약액을 적하하여 건조시키고, 이 적하와 건조의 공정을 반복해도 된다.

[0089] 시약액의 제조 공정부터 시약액의 건조 공정의 개시까지, 시약액을 저온으로 유지함으로써, 시약액에 포함되는 핵산 증폭 반응에 필요한 성분에 있어서, 물질의 결합이나 효소의 활성이 억제된다. 이 때문에, 프라이머 이량체 등의 발생이 억제되어, 핵산의 비특이적 증폭이 저감된다.

[0090] 또한 본 기술은 이하와 같은 구성도 취할 수 있다.

[0091] (1) 핵산 증폭 반응에 필요한 물질 중, 적어도 일부를 포함하는 시약액을 건조시키는 고화 공정과, 고화된 상기 시약액을 핵산 증폭 반응의 반응장인 웰에 배치하는 수용 공정을 포함하는 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

[0092] (2) 상기 고화 공정은, 상기 시약액을 동결 건조하는 공정을 포함하는 상기 (1)에 기재된 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

[0093] (3) 상기 고화 공정 전에, 조성이 상이한 복수의 상기 시약액을 준비하는 제조 공정을 포함하고, 상기 시약액에는, 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하고 효소를 포함하지 않는 제1 시약액과, 효소를 포함하고 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하지 않는 제2 시약액이 포함되는 상기 (1) 또는 (2)에 기재된 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

[0094] (4) 상기 고화 공정은, 상기 제1 시약액과 상기 제2 시약액을 별개로 동결 건조하는 공정을 포함하는 상기 (3)에 기재된 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

[0095] (5) 상기 수용 공정은, 복수의 상기 웰의 각각에, 고화된, 2종류 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하는 상기 제1 시약액을 수용하는 공정을 포함하는 상기 (3) 또는 (4)에 기재된 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

[0096] (6) 상기 제1 시약액과 상기 제2 시약액 중, 어느 하나의 시약액을 상기 고화 공정에 의해 고화하고, 상기 수용 공정 전에, 상기 고화 공정에 사용하지 않은 시약액을 상기 웰에 적하하여, 상기 웰 내에서 건조시키는 고착화 공정을 포함하는 상기 (3)에 기재된 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 제조 방법.

[0097] (7) 상기 고착화 공정은, 상기 시약액을 진공 건조하는 공정을 포함하는 상기 (6)에 기재된 핵산 증폭 반응용 매크로 칩의 제조 방법.

[0098] 실시예

[0099] <실시예 1>

[0100] 1. 핵산 증폭 반응에 있어서의 비특이적 증폭의 검출

[0101] 본 기술에 따른 마이크로 칩을 사용한 핵산 증폭 반응에 있어서의, 핵산쇄의 비특이적 증폭의 억제에 대하여 검증하였다.

[0102] [재료 및 방법]

[0103] 1. 마이크로 칩의 제조

[0104] 본 실시예에 사용한 마이크로 칩은, 내부에 수용되는 시약의 제작 방법 등이 상이한 4종류의 마이크로 칩이다. 4종류의 어느 마이크로 칩에 대해서도, PDMS제 및 유리제의 기판을 재료로 사용하였다. 또한, 본 실시예에서 행하는 핵산 증폭 반응에 필요한 시약으로서, 인플루엔자 A형의 증폭에 사용하는 4종류의 프라이머, Bst DNA 폴리메라아제, dNTPs, 반응 완충액을 준비하였다. 시약액의 제조 공정부터 수용 공정까지는 각각의 마이크로 칩마다 하기에 설명한다.

[0105] <1> 마이크로 칩 1

[0106] 본 기술에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩의 비교예로서, 마이크로 칩 1(이하, M1이라 칭함)을 제조하였다. M1의 제조에 있어서는, 4종류의 프라이머, Bst DNA 폴리메라아제, dNTPs 및 반응 완충액을 포함하는 시약액을

제조하였다. 기판층에 성형된 웰 내에 1.2μl의 시약액을 적하하고, 약 2시간의 진공 건조(약 1000Pa) 처리에 의해 웰 내에 시약액을 고착화시켰다.

[0107] <2> 마이크로 칩 2

[0108] 마이크로 칩 2(이하, M2라 칭함)는 고화된 시약이 웰 내에 수용된 마이크로 칩이다. M2의 제조에 있어서는, 4종류의 프라이머, Bst DNA 폴리메라아제, dNTPs 및 반응 완충액을 포함하는 시약액의 제조는, 빙상에 고화용 용기를 두고 냉각하면서 행하였다. 1.2μl의 시약액이 들어 있는 고화용 용기를, -40℃에 6시간 이상 두어, 시약액을 동결시켰다. 시약액이 동결된 후, 고화용 용기를, 동결 건조기(FDU-2200, EYELA)에 세트하였다. 시약액의 동결 상태를 유지한 채로, 진공 하(약 6 내지 8Pa)에서, 시약액의 건조를 12시간 이상 행하였다. 그 후, 드라이 챔버의 온도를 30℃로 설정하고, 시약액의 건조를 다시 6시간 이상 행하였다. 동결 건조에 의해 고화된 시약은, 고화용 용기로부터 취출하여, 기판층에 성형된 웰에 수용하였다.

[0109] <3> 마이크로 칩 3

[0110] 마이크로 칩 3(이하, M3이라 칭함)은, 함유하는 물질이 상이한 복수의 고화된 시약이 웰 내에 수용된 마이크로 칩이다. M3의 제조에 있어서는, 4종류의 프라이머, Bst DNA 폴리메라아제, dNTPs 및 반응 완충액의 핵산 증폭 반응에 필요한 성분 중, 프라이머를 포함하는 시약액(이하, FluA라 칭함)을 냉각하면서 제조하였다. 또한, Bst DNA 폴리메라아제, dNTPs 및 반응 완충액을 포함하는 시약액(이하, RM이라 칭함)에 대해서도 냉각하면서 제조하였다. 제조한 시약액을, FluA에 대해서는 0.4μl, RM에 대해서는 0.8μl, 다른 고화용 용기에 적하하였다. 고화용 용기에 넣은 각각의 시약액을, M2와 마찬가지로, 동결 건조에 의해 고화하였다. 고화된 FluA 및 RM을, 고화용 용기로부터 취출하고, 하나의 웰에 양쪽이 수용되도록, 각각 기판층에 성형된 웰에 수용하였다.

[0111] <4> 마이크로 칩 4

[0112] 마이크로 칩 4(이하, M4라 칭함)는, 복수회로 나누어, 함유하는 성분이 상이한 시약액이 웰 내에 고착화된 마이크로 칩이다. M4의 제조에 있어서는, M2와 마찬가지로, 시약액 FluA와 시약액 RM을 제조하였다. 0.4μl의 FluA를 웰 내에 적하하고, M1과 마찬가지로 진공 건조에 의해 웰 내에 고착시켰다. FluA가 고착된 웰을 갖는 기판층을 냉각하고, 저온으로 유지한 상태에서, FluA가 고착된 웰에 0.8μl의 RM을 적하하였다. 다시, M1과 마찬가지로 진공 건조를 행하여, RM을 웰 내에 고착시켰다.

[0113] 이상 4종류의, 시약이 수용, 또는 고착화된 웰을 갖는 기판층에 대해서는, 웰을 밀봉하기 위해서, 다른 기판층을 접합하였다. 산소 플라즈마 조사($O_2$ : 10cc, RF 출력 : 100W, RF 조사 시간 : 30초)에 의해, 각 기판층의 표면을 처리하고, 진공 하에서 접합하여, 마이크로 칩 M1 내지 M4를 완성시켰다.

[0114] 2. 핵산 증폭 반응

[0115] 상기 공정에 의해 제조된 마이크로 칩 M1 내지 M4를 사용하여, 핵산 증폭 반응을 행하였다. 핵산 증폭에는 LAMP법을 사용하였다. M1 내지 M4에 시료 용액을 도입하고, 63℃에 있어서 핵산 증폭 반응을 행하였다. 시료 용액에는, A형 인플루엔자 양성 검체(포지티브 컨트롤, 이하, PC라 칭함)와, A형 인플루엔자 음성 검체(네거티브 컨트롤, 이하, NC라 칭함)와, 물(논템플레이트 컨트롤, 이하, NTC라 칭함)을 사용하였다. 증폭 핵산쇄의 검출은 형광 검출에 의해 행하고, 검출용 시약으로서 SYBR Green을 사용하였다.

[0116] [결과]

[0117] 도 8에 본 실시예의 결과를 도시한다. 도 8은 M1 내지 M4의 각 마이크로 칩에 있어서, 핵산 증폭의 개시를, 시료 용액마다 나타낸다. 핵산 증폭의 개시 시각은, SYBR Green에 의해 얻어진 형광 강도를 플롯한 증폭 곡선이, 상승하여 소정의 임계값에 도달하였을 때라고 정의하였다. 또한, 도 8에 도시한 M1'는, M1과 동일한 제조 공정에 의해 제조된 마이크로 칩이며, M1과 마찬가지로 핵산 증폭 반응에 사용하였다.

[0118] 핵산 증폭 반응의 결과, M1 내지 M4의 마이크로 칩(M1에 대해서는, M1'를 참조)에 있어서, PC를 도입한 웰에서의 핵산 증폭이 검출되었다. 즉, 웰에 수용된 시약은, 핵산 증폭 반응에 사용 가능한 상태로 보존되어 있는 것이 나타났다. 한편, NC 및 NTC가 도입된 M1 내지 M4의 마이크로 칩 웰에 있어서도, 핵산의 증폭이 관찰되었다. 이것은, 마이크로 칩 M1 내지 M4의 웰 내에서 핵산쇄의 비특이적 증폭이 일어난 것을 나타내고 있다. 본 실시예에서 행한 핵산 증폭 반응에 있어서, 핵산의 주형 핵산쇄에 특이적인 증폭은, 핵산 증폭 반응 개시 후 30분 이내에 검출되고 있다(도 8). 그 때문에, 본래, 핵산 증폭이 발생할 리 없는 NC 및 NTC가 도입된 웰에 있어서, 반응 개시 후 30분 이내에 핵산 증폭이 발생하는 것은, 마이크로 칩을 사용하여 행하는 해석에 지장을

초래한다.

[0119] 도 8에 도시한 바와 같이, M3에 있어서의 비특이적인 핵산 증폭의 개시는, 핵산 증폭 반응 개시 후 50분 이후이었다. 한편, 비교예인 M1에 있어서의 비특이적인 핵산 증폭의 개시는, 반응 개시 후 20분 정도부터 검출되고 있다. 이 결과로부터, M3을 사용한 핵산 증폭 반응에서는, 비특이적 핵산 증폭이 억제되고 있는 것이 나타났다.

[0120] M2와 M4에 있어서의, 비특이적인 핵산 증폭의 개시는, 일부의 웰에 있어서는 30분이 지났을 때쯤이었다. M3의 결과에 비해, M2 및 M4의 결과에서는, 비특이적인 핵산 증폭의 개시 시각이 일렀다. 그러나, 핵산 증폭 반응 개시 후 30분 이내에, NTC 및 NC에 있어서 핵산 증폭은 보이지 않았다. 이 결과로부터, M2 및 M4에서는, M1(비교예)에 비해, 비특이적인 핵산 증폭은 억제되고 있는 것이 나타났다. 또한, M2 및 M4에 있어서의 비특이적인 핵산 증폭의 억제 효과는 동일 정도이었다.

[0121] 본 실시예의 결과로부터, 핵산 증폭 반응에 필요한 물질을 포함하는 시약이 웰에 수용된 마이크로 칩을 사용함으로써, 핵산 증폭 반응에 있어서 비특이적인 핵산 증폭의 억제가 확인되었다. 특히, 프라이머를 포함하고 효소를 포함하지 않는 시약액과, 효소를 포함하고 프라이머를 포함하지 않는 시약액이, 각각 고화되어 웰에 밀봉되어 있는 마이크로 칩(M3)에 있어서는, 비특이적인 핵산 증폭이 크게 억제되었다. 즉, 본 기술에 따른 마이크로 칩의 제조법에 의해 제조된 마이크로 칩에서는, 비특이적인 핵산 증폭이 저감되어, 분석의 정밀도가 향상되었다.

[0122] 또한, 효소와 프라이머를 포함하는 고상 상태의 시약이 수용된 마이크로 칩(M2)이나, 프라이머를 포함하는 시약이 고착화된 웰에 효소를 포함하는 시약액이 적하되어 제작된 마이크로 칩(M4)에 있어서도, 비교예(M1)에 비해, 비특이적인 핵산 증폭 반응이 억제되고 있는 것이 관찰되었다. 이것은, 마이크로 칩의 제조 공정에 있어서, 냉각 상태의 효소와 프라이머가 혼합된 후에 건조된 시약을 사용하여 행하는 핵산 증폭 반응에 있어서, 비특이적인 핵산 증폭 반응이 억제된 것을 나타내고 있다. 이상으로부터, 본 기술에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩은, 시료 용액 등을 도입하는 것만으로 간편하게 분석을 행할 수 있고, 또한 비특이적인 핵산 증폭이 억제되기 때문에, 정밀도가 높은 분석이 가능한 것이 확인되었다.

## *산업상 이용가능성*

[0123] 본 기술에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩에 의하면, 간편하면서 고정밀도로 핵산 증폭에 의한 분석을 할 수 있다. 그 때문에, 임상에 있어서의 유전자형 판정이나 감염 병원체 판정 등을 위한 핵산 증폭을 행하는 장치로서, 본 기술에 따른 핵산 증폭 반응용 마이크로 칩은 사용될 수 있다.

## *부호의 설명*

[0124] R, R1, R2 : 시약

1a, 1a-2, 1b, 1c : 마이크로 칩

11, 12, 13 : 기판층

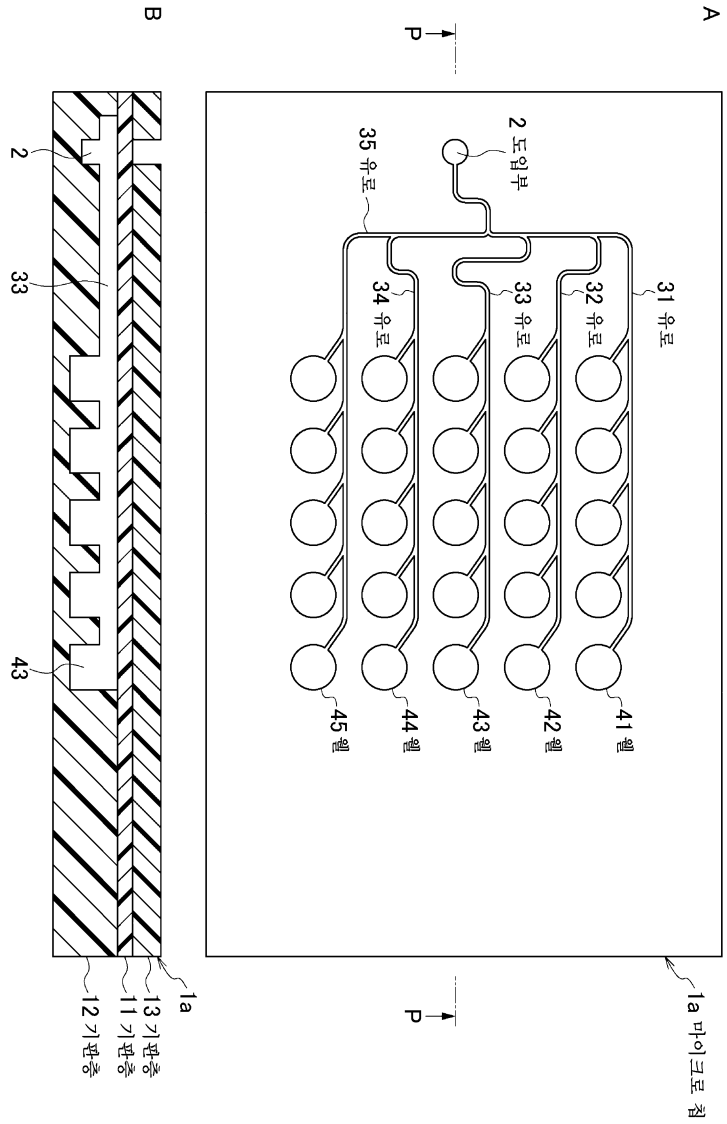
2 : 도입부

31, 32, 33, 34, 35 : 유로

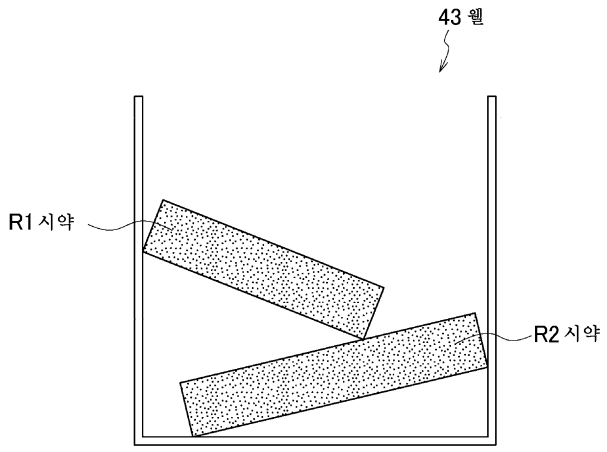
41, 42, 43, 44, 45 : 웰

## 도면

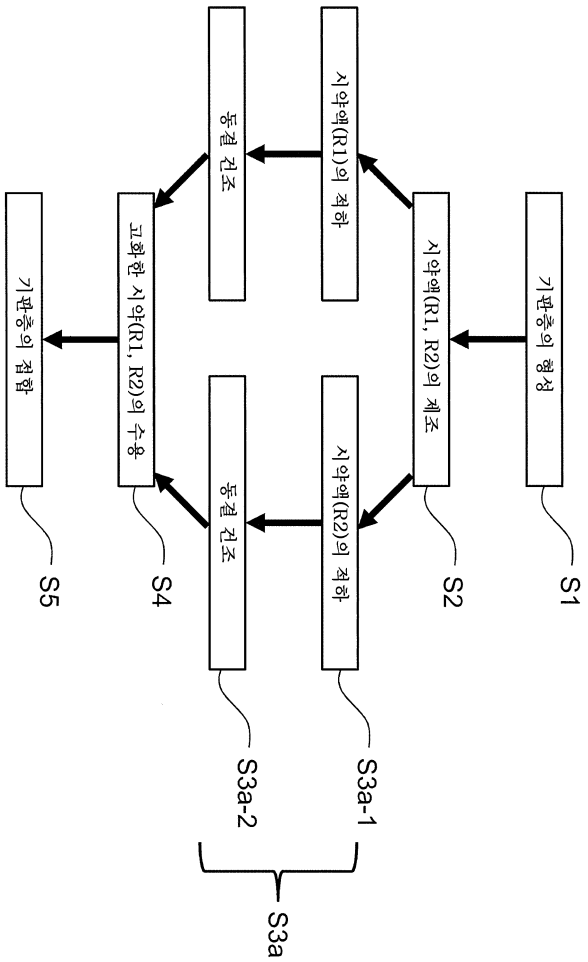
### 도면1


A
B
P
P
2 도입부
35 유로
31 유로
32 유로
33 유로
34 유로
41 웰
42 웰
43 웰
44 웰
45 웰
2
33
43
1a
1a 마이크로 칩
12 기판층
11 기판층
13 기판층

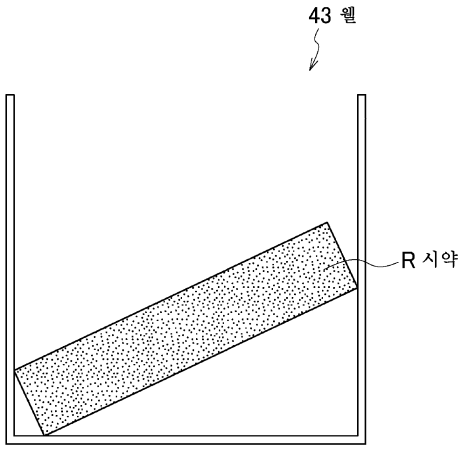
### 도면2


43 웰
R1 시약
R2 시약

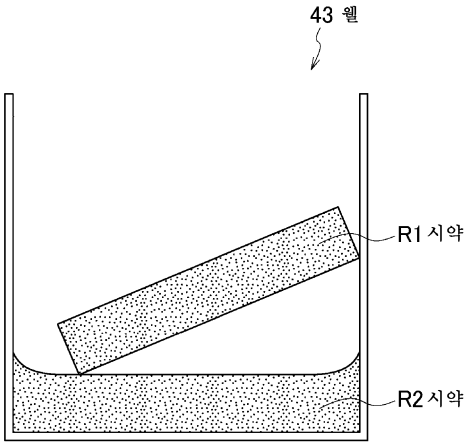
도면3


기판층의 형성
시약액(R1, R2)의 제조
시약액(R1)의 적하
동결 건조
시약액(R2)의 적하
동결 건조
고화한 시약(R1, R2)의 수용
기판층의 접합
S1
S2
S3a-1
S3a-2
S3a
S4
S5

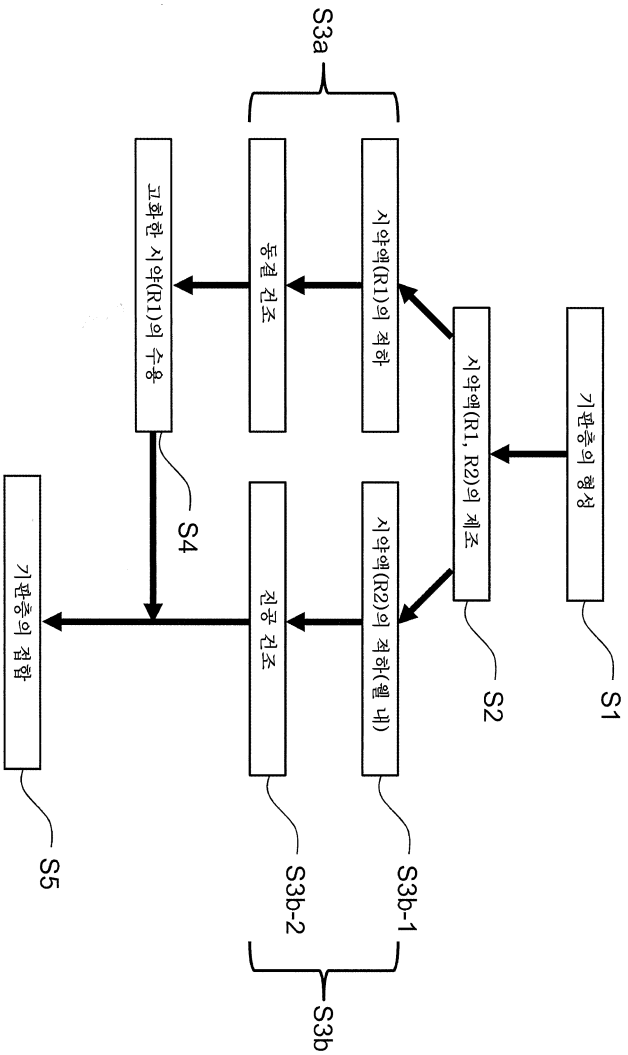
도면4


43 웰
R 시약

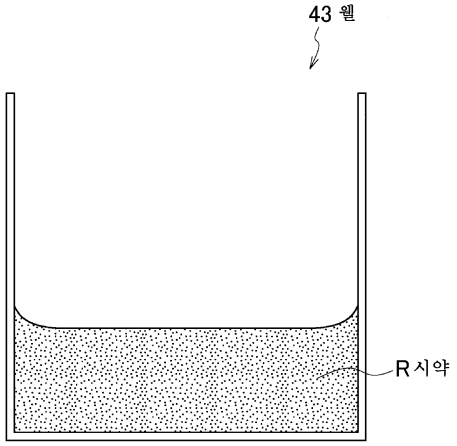
도면5


43 웰
R1 시약
R2 시약

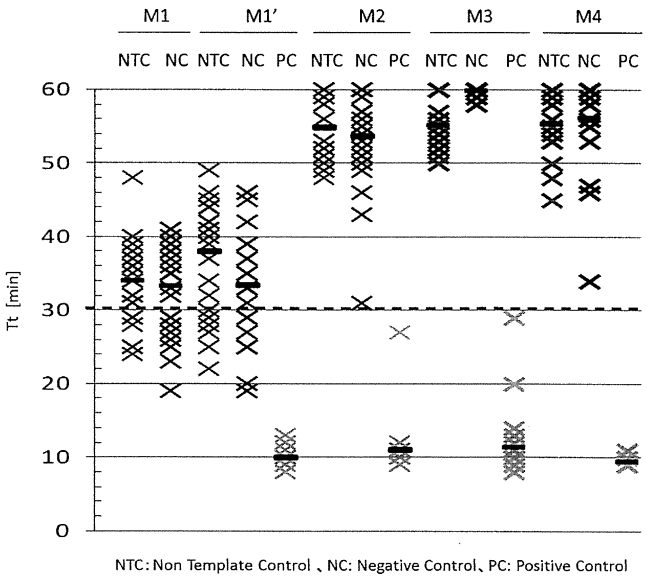
도면6


S3a
고화한 시약(R1)의 수용
동결 건조
시약액(R1)의 적하
시약액(R1, R2)의 제조
기판층의 형성
S4
기판층의 접합
진공 건조
시약액(R2)의 적하(웰 내)
S2
S1
S5
S3b-2
S3b-1
S3b

도면7


43 웰
R시약

도면8


M1
M1'
M2
M3
M4
NTC NC NTC NC PC NTC NC PC NTC NC PC NTC NC PC
60
50
40
30
20
10
0
Tt [min]
NTC: Non Template Control 、NC: Negative Control、PC: Positive Control