



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

(45) 공고일자 2018년10월22일  
 (11) 등록번호 10-1909460  
 (24) 등록일자 2018년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/68* (2018.01)  
 (52) CPC특허분류  
*C12Q 1/686* (2018.05)  
*C12Q 2525/204* (2013.01)  
 (21) 출원번호 10-2016-0155100  
 (22) 출원일자 2016년11월21일  
 심사청구일자 2016년11월21일  
 (65) 공개번호 10-2018-0057022  
 (43) 공개일자 2018년05월30일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR101670232 B1\*  
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
 한국과학기술연구원  
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)  
 (72) 발명자  
 김상경  
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5  
 김준선  
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5  
 (74) 대리인  
 김영철, 김 순 영

전체 청구항 수 : 총 11 항

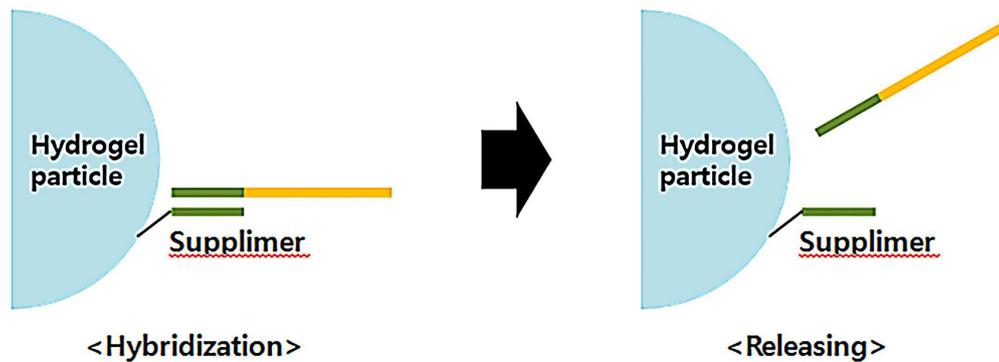
심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 **프라이머가 고정된 하이드로겔 미세입자 및 이를 이용한 핵산 증폭 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 하이드로겔 미세입자에 "서플라이머(supplimer)"를 도입함으로써 양쪽 방향 프라이머 또는 프로브까지 모두 입자에 고정시켜 프라이머 이중체의 생성을 방지함과 동시에, 핵산 증폭시 특정 온도범위에서 서플라이머와 프라이머, 프로브가 분리되므로, 핵산 증폭시에는 입자에 한 방향의 프라이머만을 고정하고 반대 방향 프라이머를 용액 상에 넣어 준 것과 동일한 증폭 효율을 나타낼 수 있다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2527/101 (2013.01)  
C12Q 2561/101 (2013.01)  
C12Q 2563/107 (2013.01)  
C12Q 2563/149 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20070148639 A1\*  
Scientific Reports, 6:22975 (2016.03.11.)  
Nucleic Acid Research, 28(20):e87 (2000)  
European Polymer Journal, 62:281-293 (2015)  
US20150368705 A1  
KR1020160032723 A

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711043776  
부처명 미래창조과학부  
연구관리전문기관 한국연구재단  
연구사업명 개인연구지원  
연구과제명 다중유전마커 진단용 solid-liquid 하이브리드 어레이 핵산분석 기술개발  
기여율 1/1  
주관기관 한국과학기술연구원  
연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31  
공지예외적용 : 있음

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

중합효소 연쇄반응(PCR) 프라이머로서 표적(target) 핵산의 전방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)가 고정된 하이드로겔 미세입자로,

상기 하이드로겔 미세입자는 공극을 포함하는 다공성 구조이고,

상기 하이드로겔 미세입자는 상기 입자에 고정된 서플라이머(supplimer)를 포함하고, 상기 전방향 프라이머 및 역방향 프라이머 중 하나 이상은 상기 서플라이머와 혼성화(hybridization)되어 상기 하이드로겔 미세입자의 공극 내부에 고정되며,

상기 서플라이머는 상기 전방향 프라이머 또는 역방향 프라이머의 염기서열 일부 또는 전부와 상보적인 8 내지 20개의 연속 DNA 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드이며,

상기 서플라이머의 염기서열 3'말단에 서플라이머의 증폭반응 방지 작용기를 더 포함하며,

상기 서플라이머는 30 내지 95℃의 온도에서 상기 혼성화된 전방향 프라이머 또는 역방향 프라이머와 분리되는, 하이드로겔 미세입자.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 서플라이머의 염기서열 5'말단에 하이드로겔 미세입자 고정화 작용기를 더 포함하는, 하이드로겔 미세입자.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 서플라이머의 증폭반응 방지 작용기는 인산기 또는 메틸기를 포함하는, 하이드로겔 미세입자.

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

제1항에 있어서, 프로브(probe)와 혼성화되어 입자에 고정된 서플라이머를 더 포함하는, 하이드로겔 미세입자.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 프로브는 선택적 형광 프로브인, 하이드로겔 미세입자.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 선택적 형광 프로브는 택맨 프로브(TaqMan probe)인, 하이드로겔 미세입자.

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

하나 이상의 제1항, 제2항, 제4항 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 하이드로겔 미세입자; 및  
 상기 하이드로겔 미세입자가 배열되는 반응 챔버(chamber);  
 를 포함하는 핵산 증폭장치.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 상기 핵산 증폭장치는 서로 다른 표적 핵산에 대한 프라이머를 각각 포함하는 복수 개의 하이드로겔 미세입자를 포함하는 핵산 증폭장치.

**청구항 13**

핵산 증폭 방법으로서,  
 하나 이상의 제1항, 제2항, 제4항 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 하이드로겔 미세입자를 반응 챔버(chamber)에 주입하는 단계;  
 하나 이상의 표적(target) 핵산을 포함하는 용액을 상기 반응 챔버(chamber)에 주입하는 단계; 및  
 상기 표적 핵산을 중합효소 연쇄반응(PCR)시켜 표적 핵산을 증폭시키는 단계;  
 를 포함하는 핵산 증폭 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 하나 이상의 상기 하이드로겔 미세입자는 서로 다른 프라이머를 각각 포함하는 핵산 증폭 방법.

**청구항 15**

제13항에 있어서, 상기 하나 이상의 각 하이드로겔 미세입자 내에서 중합되는 핵산을 분석하는 단계를 더 포함하는 핵산 증폭 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 명세서에는 신규 핵산공급소재가 도입되어 프라이머가 고정된 하이드로겔 미세입자 및 이를 이용한 핵산 증폭 방법 및 핵산 증폭 장치가 개시된다.

**배경 기술**

[0002] 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR) 방법은 핵산의 염기서열을 복제하여 증폭시키는 기술이다. 중합효소 연쇄반응은 미량의 염기서열을 증폭하여 이용하는 분야에서 다양하게 널리 쓰이고 있다. 특히, 여러 표적을 증폭하여 감별검출하면 정밀성을 높이면서 비용과 시간을 절감할 수 있어서 여러 표적을 동시에 증폭하는 방식이 제안되기도 하였다. 그런데 많은 표적 핵산을 한 채널에서 동시에 분석하고자 할 때, 서로 다른 표적 핵산의 프라이머 또는 프로브가 용액 상에 섞여 있으면, 그 프라이머들이 서로 비특이적 결합인 프라이머 이중체(primer dimer)를 형성하여 증폭 신호를 방해한다는 고질적인 문제가 있다.

[0003] 중합효소 연쇄반응을 핵산의 분석 기술로는 크게 endpoint PCR과 real-time PCR이 있다. 종래에는 endpoint PCR을 많이 사용하였으나 이 방법은 PCR 반응이 완전히 완료된 이후에 증폭된 핵산의 양을 검출하거나 정량 할 수 있어, 실험 이후 전기영동과 같은 별도의 결과분석단계와 장치가 필요하고, 2시간의 이상의 긴 시간이 요구되며, 실시간으로 증폭되는 핵산을 검출하고 정량 할 수 없다는 문제가 있었다. 예를 들면 최초의 핵산의 양을 정량 하려면 반응이 완료된 PCR 산물의 양으로부터 정량 해야 하는데, 형광염색 등을 통해 정량을 하더라도 이러한 방법은 분석에 영향을 미치는 여러 인자들로 인해 정확한 분석이 어렵다. 정확한 핵산의 양을 측정하려면 지수기(exponential phase)에서 측정해야 하지만, endpoint PCR로는 실시간으로 측정할 수가 없으므로 이를 분석하기가 어렵다는 문제가 있다.

[0004] 이에 반해 real-time PCR은 증폭되는 핵산의 양이 각 사이클에서 측정되고, 특히 증폭이 일어나는 구간인 지수기(exponential phase)에서의 반응을 실시간으로 확인할 수 있으므로 표적핵산의 최초의 양을 정확하게 정량할 수 있다는 장점이 있다. 특히 실시간 다중 핵산 증폭방법(Multiplex real-time PCR)은 다양한 바이오 마커들을 한 챔버(chamber) 내에서 한번의 실험으로 확인이 가능하고 실시간으로 정량적 분석이 가능하므로, 질병의 진단 분야에서 많이 쓰이고 있다.

[0005] 그러나, 다중 핵산 증폭을 위해 가장 보편적으로 사용되는 방법인 프로브(probe)의 색과 프라이머(primer)의 녹는점을 이용하는 방법은 측정하고자 하는 표적(target)의 개수가 늘어날 경우 서로간의 간섭이 커져 정확한 측정이 힘들다. 따라서, 현장현시검사(Point-of-care technology, POCT)와 같이 서로 다른 여러 종류의 핵산을 동시에 신속하게 분석하여 질병의 정확한 진단을 요하는 분야에는 사용하기는 어렵다.

[0006] 이에 대한민국공개특허 제10-2015-0048964호는 입자를 기반으로 한 핵산 증폭 기술로서 프라이머를 입자에 고정하여 사용하는 기술을 개발하였지만, 한 방향의 프라이머만을 고정한 경우와 비교하여 양쪽 방향 프라이머 모두 입자에 고정된 경우 증폭반응의 효율이 떨어진다는 문제가 있다. *Zaheer Khan et al., "Enhanced solid phase PCR: mechanisms to increase priming by solid support primers", Analytical Biochemistry 375 (2008) 391-393* 및 *Celine Adessi et al., "Solid phase DNA amplification: characterization of primer attachment and amplification mechanisms", Nucleic Acids Research, 2000, Vol.28, No.20e87* 역시 고체상에 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머가 모두 고정된 경우 핵산 증폭 효율이 매우 낮아져, 높은 효율이 필요한 실시간 증폭 반응에는 사용 할 수 없음을 게시하고 있다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2015-0048964호(2015.05.11)

**비특허문헌**

[0008] (비특허문헌 0001) *Zaheer Khan et al., "Enhanced solid phase PCR: mechanisms to increase priming by solid support primers", Analytical Biochemistry 375 (2008) 391-393*

(비특허문헌 0002) *Celine Adessi et al., "Solid phase DNA amplification: characterization of primer attachment and amplification mechanisms", Nucleic Acids Research, 2000, Vol.28, No.20e87*

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 일 측면에서, 본 발명은 프라이머 이중체의 생성을 방지하면서도 표적 핵산의 증폭 반응에 필요한 프라이머를 해당 입자에만 공급할 수 있는 신규 하이드로겔 미세입자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

[0010] 상기와 같은 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 관점은 중합효소 연쇄반응(PCR) 프라이머로서 표적(target) 핵산의 전방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)가 고정된 하이드로겔 미세입자로, 상기 하이드로겔 미세입자는 상기 입자에 고정된 서플라이머(supplimer)를 포함하고, 상기 전방향 프라이머 및 역방향 프라이머 중 하나 이상은 상기 서플라이머와 혼성화(hybridization)되어 상기 하이드로겔 미세입자에 고정되며, 상기 서플라이머는 상기 전방향 프라이머 또는 역방향 프라이머의 염기서열 일부 또는 전부와 상보적인 8 내지 20개의 연속 DNA 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드인, 하이드로겔 미세입자를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명의 일 관점은 하나 이상의 상기 하이드로겔 미세입자를 포함하는 핵산 증폭장치를 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 관점은 핵산 증폭 방법으로, 하나 이상의 하이드로겔 미세입자를 반응 챔버(chamber)에 주입하는

단계; 하나 이상의 표적(target) 핵산을 포함하는 용액을 상기 반응 챔버(chamber)에 주입하는 단계; 및 상기 표적 핵산을 중합효소 연쇄반응(PCR)시켜 표적 핵산을 증폭시키는 단계를 포함하는 핵산 증폭 방법을 제공한다.

**발명의 효과**

[0013] 본 발명의 하이드로겔 미세입자는 온도 감응형 신규 물질인 "서플라이머(supplimer)"를 도입함으로써 양쪽 방향 프라이머 또는 프로브까지 모두 입자에 고정시켜 표적 핵산의 증폭 반응에 필요한 프라이머를 해당 입자에만 공급함으로써 프라이머 이중체의 생성을 방지 할 수 있다. 이와 동시에, 핵산 증폭시 특정 온도범위에서 서플라이머와 프라이머, 프로브가 분리되므로, 핵산 증폭시에는 입자에 한 방향의 프라이머 만을 고정하고, 반대 방향 프라이머를 용액 상에 넣어 준 것과 동일한 증폭 효율을 나타낼 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0014] 도 1은 본 발명의 일 실시예로서 하이드로겔 미세입자(hydrogel particle)에 고정되어 프라이머 또는 프로브와 혼성화(hybridization) 결합된 상기 서플라이머(좌) 및 상기 혼성화된 전방향 프라이머 또는 역방향 프라이머, 또는 프로브와 분리(releasing)된 서플라이머(우)를 개략적으로 도시한 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예로서 하이드로겔 미세입자에 고정된 서플라이머의 염기서열 3'말단에 서플라이머의 증폭반응 방지(blocking) 작용기가 포함된 모습을 개략적으로 도시한 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예로서 하이드로겔 미세입자에 고정된 서플라이머에 표적 핵산의 프라이머가 혼성화되었는지 여부를 확인한 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예로서 서플라이머에 혼성화된 표적 핵산의 프라이머가 핵산 증폭반응의 온도 조건 변화에 의해 서플라이머로부터 분리됨을 확인한 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예로서 서플라이머에 혼성화된 표적 핵산의 프라이머가 핵산 증폭반응의 온도 조건 변화에 의해 서플라이머로부터 분리된 결과를 사이클수에 대한 형광강도 그래프로 나타낸 도이다.

도 6은 고농도 및 저농도의 표적핵산을 각각 사용하여 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 미세입자를 이용하여 핵산 증폭 반응을 실시한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 고농도 및 저농도의 표적핵산을 각각 사용하여 본 발명의 일 실시예에 따른 하이드로겔 미세입자를 이용하여 핵산 증폭 반응을 실시한 결과를 사이클 수에 대한 형광강도 그래프로 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예(Supplimer immobilization)와 비교예(Pair primer immobilization)의 PCR 효율을 비교한 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0015] 이하에서는, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있도록 하기 위하여, 본 발명의 바람직한 실시예들에 관하여 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명의 일 실시예는 중합효소 연쇄반응(PCR) 프라이머로서 표적(target) 핵산의 전방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)가 고정된 하이드로겔 미세입자로, 상기 하이드로겔 미세입자는 상기 입자에 고정된 서플라이머(supplimer)를 포함하고, 상기 전방향 프라이머 및 역방향 프라이머 중 하나 이상은 상기 서플라이머와 혼성화(hybridization)되어 상기 하이드로겔 미세입자에 고정된 하이드로겔 미세입자를 제공한다.

[0018] 본 명세서에서, "서플라이머(Supplimer)"는 전방향 프라이머, 역방향 프라이머 또는 프로브 등의 폴리뉴클레오티드의 염기서열 일부 또는 전부와 상보적인 8 내지 20개의 연속 DNA 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 도 1을 참조로 하여 설명하면, 일 실시예로서 상기 서플라이머는 온도감응성을 가질 수 있다. 구체적으로, 하이드로겔 미세입자(hydrogel particle)에 고정되어 20±5℃의 상온에서 용액 상에 존재하는 프라이머 또는 프로브를 선택적으로 인식하여 혼성화(hybridization) 결합할 수 있다(도 1의 왼쪽 도면). 또한 상기 서플라이머는 30 내지 95℃의 온도에서 상기 혼성화된 전방향 프라이머 또는 역방향 프라이머, 또는 프로브와 분리(releasing)되어, 상기 분리된 프라이머 또는 프로브는 하이드로겔 미세입자의 내부 또는 외부에서 자유롭게 이동할 수 있어 반응성을 향상시킬 수 있다.

[0019] 예를 들어, 표적 핵산의 한쪽 방향 프라이머의 염기서열이 5'-ATGCAACGTTAGACTCCGAG-3'인 경우, 서플라이머는

이 서열 전부 또는 일부에서 선정된 연속하는 임의의 8 내지 20개의 연속 DNA 염기서열에 대한 상보적인 서열로 구성된 것일 수 있다. 즉, 상기 프라이머 염기서열의 3'영역 5'-GACTCCGAG-3'의 9개의 염기쌍(base pair)을 선정할 경우, 상기 프라이머에 대한 서플라이머는 상기 선정된 염기서열의 상보적인 염기서열인 5'-CTCGGAGTC-3'이다. 상기 표적 핵산의 한쪽 방향 프라이머의 염기서열 중 8 내지 20개의 연속 DNA 염기서열의 선정은 제한되지 않으나, 서플라이머의 상온 안정성 및 핵산 증폭 반응성에 따라 조절될 수 있으며, 최적화된 서플라이머는 프라이머별로 모두 길이가 다를 수 있다.

[0020] 일 실시예로서 상기 전방향 프라이머 또는 역방향 프라이머는 10 내지 50 개의 연속 DNA 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드일 수 있으나, 프라이머의 서열종류와 서열길이는 표적핵산에 따라 제한 없이 변형이 가능하다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 하이드로겔 미세입자는 예를 들어 평균 10 μm 내지 500 μm의 입경크기를 가질 수 있으며, 보다 구체적으로는 평균 100 μm 내지 300 μm의 입경을 가질 수 있다. 형태는 3차원의 구조체라면 제한되지 않으며, 보다 구체적으로는 구형을 예로 들 수 있다. 하이드로겔 미세입자의 재료는 고형화가 가능한 폴리머(pre-polymer)라면 제한없이 사용할 수 있으며, 구체적으로 폴리에틸렌 글리콜-디아크릴레이트 (Polyethylene Glycol-Diacrylate, PEG-DA) 또는 폴리아크릴아마이드(Polyacrylamide, PA)와 같은 친수성 폴리머를 사용할 수 있다.

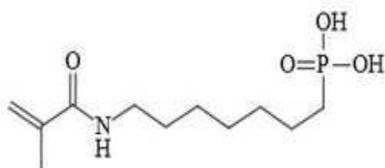
[0022] 일 실시예로서, 상기 하이드로겔 미세입자는 공극을 포함하는 다공성(porous) 구조체일 수 있다. 또한, 일 실시예로서 상기 전방향 프라이머 및 역방향 프라이머는 상기 하이드로겔 미세입자의 외부, 또는 상기 공극 내부에 고정되는 것일 수 있다.

[0023] 일 실시예로서, 상기 하이드로겔 미세입자가 공극을 포함하는 다공성 구조체인 경우, 상기 미세입자의 공극율은 미세입자 총 부피에 대하여 10부피% 내지 80부피%, 보다 구체적으로 20부피% 내지 70부피%일 수 있다. 상기 범위를 벗어날 경우 다공성이 떨어지거나 구조체의 안정도가 불안정해질 수 있다.

[0024] 일 실시예로서 상기 서플라이머는 염기서열 5'말단 혹은 3' 말단에 하이드로겔하이드로겔 미세 입자 고정화 작용기를 포함함으로써 하이드로겔 미세입자의 외부 또는 공극 내부에 고정될 수 있다. 일 실시예로서 상기 작용기는 하이드로겔 모노머와 공유결합으로 연결 될 수 있는 작용기를 포함할 수 있으며, 아크리다이트(acrydite)를 예로 들 수 있다. 다른 일 실시예로서, 상기 작용기는 하이드로겔과 펩타이드 결합으로 연결될 수 있는 작용기를 포함할 수 있으며, 아민기, 카르복실기 등을 예로 들 수 있다.

[0025] 예를 들어 아크리다이트(acrydite)는 하기 화학식 1의 구조를 가질 수 있다.

[0026] [화학식 1]



[0027]

[0028] 일 실시예로서 전방향 프라이머 및 역방향 프라이머 중 하나가 상기 서플라이머와 혼성화 되어 하이드로겔 미세입자에 고정된 경우, 상기 서플라이머와 혼성화된 한쪽 방향의 프라이머의 남은 다른 한쪽 방향의 프라이머는 하이드로겔 미세입자에 고정될 수 있으며, 상기 서플라이머와 마찬가지로 상기 다른 한쪽 방향 프라이머의 염기서열 5'말단에 하이드로겔 미세 입자 고정화 작용기를 더 포함함으로써 하이드로겔 미세입자의 외부 또는 공극 내부에 고정될 수 있다. 상기 하이드로겔 미세 입자 고정화 작용기로는 상기 서플라이머가 포함할 수 있는 하이드로겔 미세 입자 고정화 작용기가 사용될 수 있다. 예를 들어 5' 말단에 아크리다이트 작용기를 수식한 서플라이머는 상기 하이드로겔 미세입자의 제조시 하이드로겔 모노머가 폴리머로 변환(conversion) 될 때 하이드로겔에 고정될 수 있다.

[0029] 또한, 상기 서플라이머는 일 실시예로서 염기서열 3'말단에 서플라이머의 증폭반응 방지(blocking) 작용기를 더 포함할 수 있다. 도 2를 참고로 설명하면, 상기 서플라이머 역시 8 내지 20개의 연속 DNA 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드이므로, 핵산 증폭 과정 중 서플라이머에 의한 교란 증폭 반응이 발생할 가능성이 있는데, 도 2에 도시된 바와 같이 상기 서플라이머의 염기서열 3'말단에 특정 작용기를 더 포함할 경우 서플라이머의 증폭반응, 즉 상기 서플라이머의 3'영역이 더 이상 신장(extension)되는 것을 방지(blocking)하여, 표적 핵산의 핵

산 증폭 반응이 보다 안정적으로 이루어지도록 할 수 있다. 상기 증폭반응 방지 작용기는 서플라이머의 상기 반응을 방지할 수 있는 것이라면 모두 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들면 상기 서플라이머의 염기서열 3'말단에 인산기 또는 메틸기를 포함하는 것일 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 일 실시예로서 상기 하이드로겔 미세입자는 프로브(probe)와 혼성화되어 입자에 고정된 서플라이머를 더 포함할 수 있다. 일 실시예로서 상기 프로브는 선택적 형광 프로브일 수 있다. 상기 형광 프로브는 표적핵산에 결합하여 형광 시그널을 제공하여 표적 핵산을 실시간으로 검출할 수 있게 한다. 일 실시예로서 상기 하이드로겔 미세입자에 서플라이머를 통해 고정될 경우, 상기 표적핵산이 중합효소 연쇄반응에 의해 증폭되면서 상기 형광강도도 함께 증가하게 되므로, 형광강도를 검출함으로써 증폭되는 표적핵산을 정량할 수 있다. 상기 형광 프로브는 표적 핵산에 상보적으로 결합하여 형광성을 나타내는 것이면 종류에 한정되지 않고 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택적 형광 프로브는 택맨 프로브(TaqMan probe) 등을 포함할 수 있다. 일 실시예로서 상기 택맨 프로브(TaqMan probe)는 5'말단을 형광물질(FAM 등)로, 3'말단을 퀘ن처(quencher) 물질(BHQ 등)로 수식한 핵산으로, 어닐링 단계(annealing step)에서 주형 DNA에 특이적으로 혼성화 결합하지만, 프로브상에 퀘ن처(quencher)에 의해 형광 발생이 억제되고, 신장(Extension) 반응시에 Taq DNA 폴리머레이즈가 갖는 5'→3' 엑소뉴클레아제(exonuclease) 활성으로 주형에 혼성화 결합한 택맨 프로브가 분해되어 형광색소가 프로브에서 유리됨으로서 퀘ن처에 의한 억제가 해제되어 형광을 발현된다.

[0031] 본 발명의 일 실시예는 하나 이상의 상기 하이드로겔 미세입자를 포함하는 핵산 증폭장치를 제공할 수 있다. 일 실시예로서 상기 핵산 증폭장치는 서로 다른 표적 핵산에 대한 프라이머를 각각 포함하는 복수 개의 하이드로겔 미세입자를 포함할 수 있다.

[0032] 일 실시예로서, 상기 장치는 반응 챔버(chamber)를 더 포함할 수 있으며, 상기 반응 챔버는 상기 하이드로겔 미세입자가 배열되는 어레이(array) 또는 튜브(tube)를 포함할 수 있다. 일 실시예에 따른 어레이(array)의 재질은 유리, 플라스틱, 폴리머, 실리콘 등 핵산증폭반응의 온도 조건을 적용 할 수 있다면 물질 종류에 제한되지 않는다.

[0033] 또한, 본 발명의 일 실시예는 하나 이상의 상기 하이드로겔 미세입자를 반응 챔버(chamber)에 주입하는 단계; 하나 이상의 표적(target) 핵산을 포함하는 용액을 상기 챔버에 주입하는 단계; 및 상기 표적 핵산을 중합효소 연쇄반응(PCR)시켜 표적 핵산을 증폭시키는 단계를 포함하는 핵산 증폭 방법을 제공할 수 있다.

[0034] 일 실시예로서 상기 하나 이상의 상기 하이드로겔 미세입자는 서로 다른 프라이머를 각각 포함할 수 있다. 상기 표적 핵산을 포함하는 용액은 일 실시예로서 3'-locked nucleic acid primer와 같은 LNA(Locked nucleic acid)를 포함하는 프라이머, Taq 폴리머라제 등을 더 포함할 수 있다. 일 실시예로서 상기 반응 챔버는 상기 하이드로겔 미세입자가 배열되는 어레이(array) 또는 튜브(tube)를 포함할 수 있다.

[0035] 일 실시예로서 상기 방법은 상기 하나 이상의 각 하이드로겔 미세입자 내에서 중합되는 핵산을 분석하는 단계를 더 포함할 수 있다. 다른 일 실시예로서, 상기 방법은 상기 중합효소 연쇄반응시키는 단계와 동시에 중합되는 상기 하나 이상의 각 하이드로겔 미세입자 내에서 중합되는 핵산을 실시간으로 정량적 분석하는 단계를 더 포함하여, 상기와 같이 각기 다른 종류의 표적 핵산들을 동시에 증폭시키면서 실시간으로 검출하고 정량적으로 분석할 수 있다.

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0039] [실시예 1] 프라이머(Primer) 및 서플라이머(Supplimer)가 고정된 하이드로겔 미세입자의 제조

[0041] 먼저, 표적 핵산은 5'-CCTGGCACCCAGCACAAATGAAGATCAAGATCATTTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCGGC-3' (서열번호 1)으로 하였다. 본 실시예에서는 전방향 프라이머를 가교적으로 고정하고, 나머지 역방향 프라이머 및 프로브를 각각 역방향 서플라이머 및 프로브 서플라이머를 이용하여 고정하였으므로, 하기의 구성으로 가교 프라이머 믹스를 준비하였다.

[0042] 가교 프라이머 믹스는 전방향 프라이머, 역방향 서플라이머 및 프로브 서플라이머로 구성된다. 이때, 상기 역방향 및 프로브 서플라이머는 상기 역방향 프라이머 및 Taqman probe의 일부 서열에 대한 상보적인 서열을 포함하며, 구체적으로 아래와 같다.

[0043] - 전방향 프라이머(Forward primer): (5'Acryd)-(CCTGGCACCCAGCACAAAT)-3' (서열번호 2)

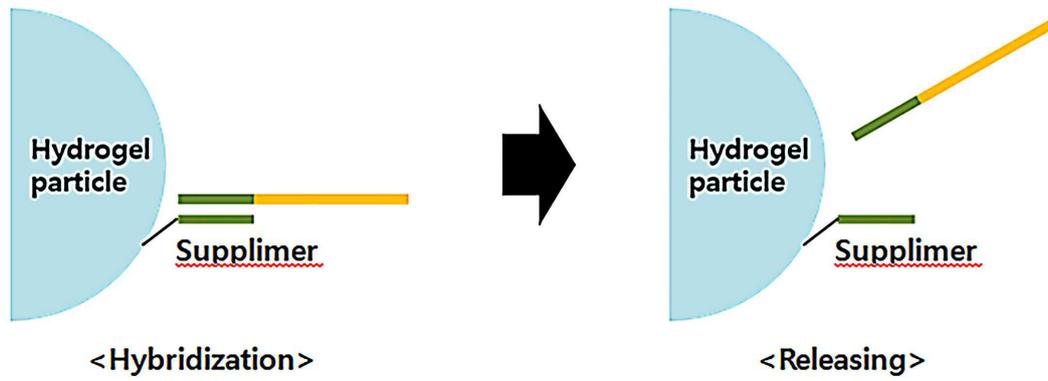
- [0044] - 역방향 서플라이머(Reverse supplimer): (5'Acryd)-(AGTACTCCGT)-(3'Phos) (서열번호 3)
- [0045] - 프로브 서플라이머(Probe supplimer): (5'Acryd)-(GCGCTCAG)-(3'Phos) (서열번호 4)
- [0047] 하이드로겔 용액 총 부피에 대하여, UV-광가교성 폴리(에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트 (PEGDA, Sigma-Aldrich, MW700) 20% v/v, 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG, Sigma-Aldrich, MW600) 40% v/v 및 광개시제 2-하이드록시-2-메틸 프로피오페논 (Sigma-Aldrich) 5% v/v 및 버퍼(PBS 등) 35%를 섞어 pre-polymer solution을 제작한다. 그 후, pre-polymer solution 및 가교 프라이머 믹스(primer 및 supplimer의 mix)를 9:1로 혼합하여 총 100  $\mu$ L의 하이드로겔 용액을 제조하였다. 상기 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG, Sigma-Aldrich, MW600)은 하이드로겔 미세입자의 공극율을 증가시키기 위하여 사용하였다.
- [0048] 제트 시스템(jetting system; Arrayer 2000, Advanced Technology Inc., Korea)을 이용하여 상기 하이드로겔 용액을 PDMS 표면상에 스팟팅(spottting) 후, 1분간 UV 노출(360 nm wavelength, 35 mJ/cm<sup>2</sup>)하여 하이드로겔 미세입자를 제조하였다. 상기 광가교된 하이드로겔 미세입자들은 가벼운 교반에 의해 PDMS 표면으로부터 방출되며, 0.05% Tween-20를 포함하는 TE 버퍼에 의해 워싱되어 가교되지 않은 나머지 PEGDA, 프라이머 및 PEG와 같은 화합물들을 제거하였다.
- [0050] [실시에 2] 정방향 프라이머, 역방향 서플라이머(Supplimer), 프로브 서플라이머가 고정된 하이드로겔 미세입자에 역방향 프라이머 및 프로브 혼성화 방법
- [0052] 상기 실시예 1에서 제조한 정방향 프라이머, 역방향 서플라이머 및 프로브 서플라이머가 고정된 하이드로겔 입자에 고정된 역방향 서플라이머 및 프로브 서플라이머에 각각 역방향 프라이머 및 프로브를 혼성화 하였다. 역방향 프라이머 및 프로브는 하기의 서열과 같으며, 이때 프로브는 TaqMan<sup>TM</sup> 프로브를 사용하였다.
- [0053] - 역방향 프라이머(Reverse primer): 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'(서열번호 5),
- [0054] - 프로브(TaqMan<sup>TM</sup> probe): 5'(FAM)-ATCAAGATCATTGCTCCTCTGAGCGC-(BHQ1)3'(서열번호 6).
- [0056] 구체적으로, 상기 역방향 프라이머 및 프로브를 모두 10  $\mu$ M 농도로 100  $\mu$ L 준비하여 실시예 1에서 만든 입자와 섞어주었다. 혼성화 결합을 이용한 고정은 증폭반응과 같은 고온 반응에서 쉽게 떨어지게 설계 되어 있으므로, 혼성화 과정을 상온 이하(20 $^{\circ}$ C 이하)에서 30분 진행하였다. 이때 볼텍싱(vortexing) 등의 물리적 혼합(mixing)은 역방향 프라이머 및 프로브가 하이드로겔 입자로 잘 침투 할 수 있도록 도와준다. 혼성화 반응이 끝난 입자는 상온 이하(20 $^{\circ}$ C 이하)의 버퍼(PBS)에 담가, 혼성화 되지 않은 역방향 프라이머 및 프로브를 제거하였다.
- [0058] [실험예 1]
- [0059] 본 발명의 일 실시예에 따른 서플라이머가 상온에서 표적 핵산의 프라이머와 실제로 혼성화되어 하이드로겔 미세입자에 고정되는지 여부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1 및 2의 하이드로겔 미세입자를 사용하여 아래의 실험을 실시하였다.
- [0060] 이때, 서플라이머와 프라이머 간의 혼성화 결합이 되었다는 것을 증명하기 위하여, 상기 실시예 1 및 2의 각 프라이머 5'말단에 FAM 형광 분자를 결합시켰다.
- [0061] 그 결과, 상온에서 실시예 1의 프라이머와 혼성화되지 않은 서플라이머가 고정된 하이드로겔 미세입자는 도 3의 왼쪽 사진에 나타난 바와 같이 입자에 형광이 나타나지 않지만, 실시예 2의 프라이머와 혼성화된 서플라이머가 고정된 하이드로겔 미세입자는 도 3의 오른쪽 사진에 나타난 바와 같이 입자에 형광이 나타났다. 이는 상온에서 서플라이머가 상보적인 염기 서열을 지닌 프라이머와 잘 결합하여 혼성화 형태가 되었음을 의미한다.
- [0063] [실험예 2]
- [0064] 본 발명의 일 실시예에 따른 표적 핵산의 프라이머와 혼성화된 서플라이머가 특정 온도 조건에서 표적 핵산의 프라이머와 분리되는지 여부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2의 하이드로겔 미세입자를 사용하여 아래의 실험을 실시하였다.
- [0065] 실시예 2의 하이드로겔 미세입자를 채널에 넣어놓은 뒤, 순수한 물을 채워 넣었다. 그 후, PCR 온도조건(Cycle 당 95 $^{\circ}$ C 4초, 60 $^{\circ}$ C 30초 / 총 40 cycle 실시)을 적용하며 입자의 형광을 관찰 하였다. 입자의 형광이 감소 한다는 것은, 서플라이머에 혼성화 되어 있던 프라이머가 하이드로겔 미세입자 밖으로 빠져나감을 의미한다.
- [0066] 그 결과, 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이 핵산 증폭 반응 온도조건에서 시간이 지날수록(cycle을 거듭

할수록) 형광 세기가 감소하였다. 이는 상기 서플라이머와 혼성화 결합되어 있던 한쪽 방향 프라이머가 핵산 증폭 반응 조건인 50 내지 95℃의 온도조건에서 결합력이 약해지면서 자유롭게 떨어져 증폭반응에 참여 할 수 있음을 의미한다.

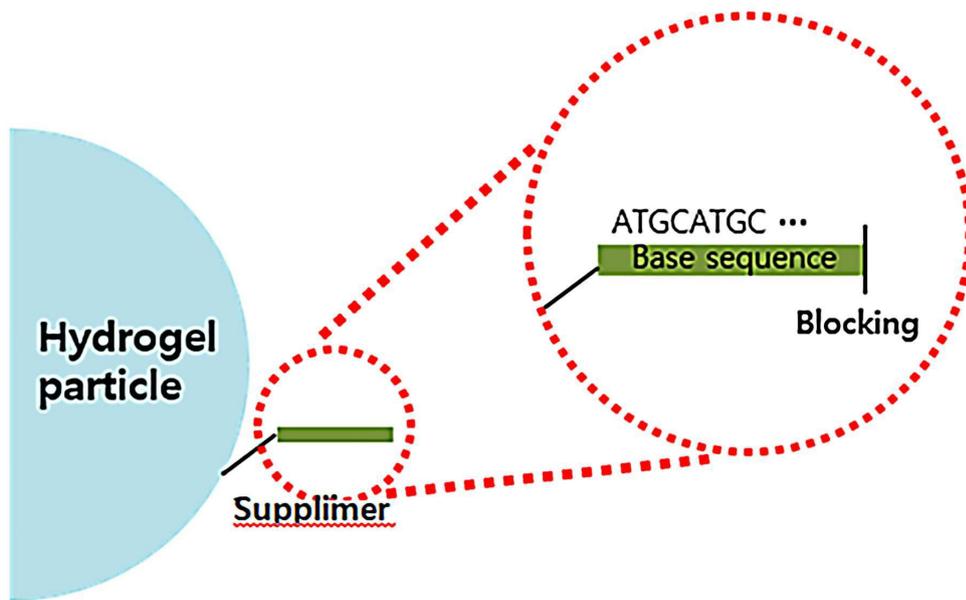
- [0068] [실험예 3]
- [0069] 본 발명의 일 실시예에 따른 표적 핵산의 프라이머와 혼성화된 서플라이머가 고정된 하이드로겔 미세입자의 핵산 증폭 효율을 확인하기 위하여, 상기 실시예 2의 하이드로겔 미세입자를 사용하여 아래의 실험을 실시하였다.
- [0070] 1) 실시예 2의 하이드로겔 미세입자를 채널에 넣는다.
- [0071] 2) 분석하고자 하는 시료(핵산 주형)를 농도 별로 준비하여, PCR mastermix(효소, 버퍼, dNTP, Mg<sup>2+</sup> 등이 포함된 시약)과 함께 섞어 채널에 넣는다.
- [0072] 3) PCR을 실시한다.
- [0074] 그 결과, 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, 고농도(10<sup>8</sup> copies/μl)의 표적 핵산 주형을 넣은 경우와 저농도(10<sup>5</sup> copies/μl)의 표적 핵산 주형을 넣은 경우 모두 핵산 증폭 반응이 안정적으로 균일하게 잘 나타났으며, TaqMan probe에 의한 형광 표지도 안정적으로 잘 반응함을 확인할 수 있다.
- [0076] [실험예 4]
- [0077] 본 발명의 서플라이머를 도입한 하이드로겔 입자의 PCR효율을 확인하기 위하여 하기의 실험을 실시하였다.
- [0078] 본 발명의 일 실시예로는 실시예 2에서 제조한 서플라이머를 도입한 하이드로겔 입자를 사용하였다.
- [0079] 비교예로는 역방향 서플라이머 및 프로브 서플라이머를 고정시키지 않은 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 하이드로겔 입자를 사용하되, 상기 입자에 서열번호 5로 표시되는 염기서열을 갖는 역방향 프라이머 및 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 갖는 프로브도 고정시켰다.
- [0080] 그리고 상기 실시예 2 및 비교예의 각 하이드로겔 입자로 상기 실험예 3에 기재된 방법에 따라 PCR을 수행하였다. 이때 상기 실시예 2 및 비교예에 각각 주입된 핵산 주형의 농도는 동일하였다.
- [0081] 도 8은 상기 실험결과를 나타낸 것으로, 도 8의 Supprimer immobilization은 상기 실시예 2의 PCR 결과를 의미하며, Pair primer immobilization은 상기 비교예의 PCR 결과를 의미한다. 도 8에 나타난 바와 같이 서플라이머가 적용된 하이드로겔 입자의 경우 형광 신호도 높고 대수기(exponential phase)가 뚜렷하며 Ct value도 앞쪽에 나타났다. 반면, 전방향 및 역방향 프라이머를 단순히 고정된 하이드로겔 입자의 경우 같은 농도의 주형 핵산을 넣었더라도 50 cycle이 되어도 그 밝기가 매우 낮았으며, 대수기(exponential phase)를 관찰하기 힘들고, Ct value도 매우 늦게 나타났다. 동일한 주형 핵산 농도에 대하여 Ct value가 뒤로 밀려서 나타난다는 것은 그만큼 증폭 효율이 떨어진다는 것을 의미한다. 이를 PCR 효율로 계산하면, 실시예 2은 93%의 효율을 가지며, 비교예는 12%의 효율을 갖는 것이다.
- [0082] 이는 본 발명이 서플라이머를 사용하여 하나 이상의 프라이머를 자유로운 상태로 공급함으로써, 하이드로겔내 전방향, 역방향 프라이머가 모두 고정된 입자보다 현저히 우수한 PCR 효율을 가짐을 의미한다.

도면

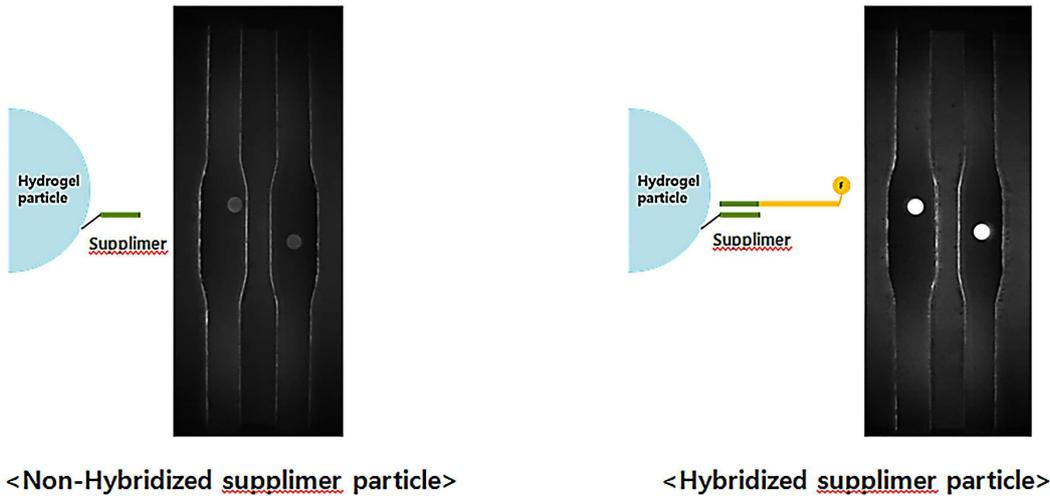
도면1



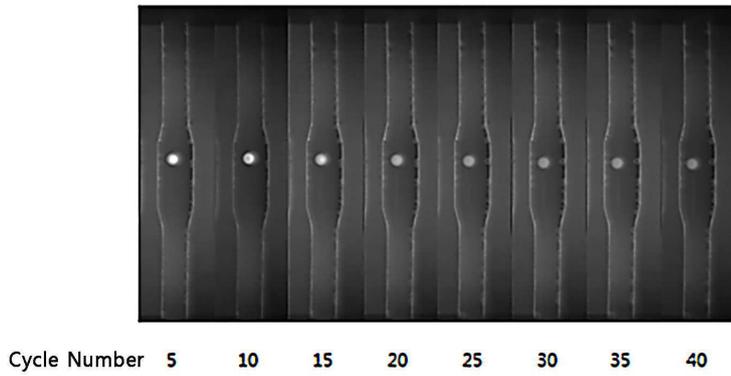
도면2



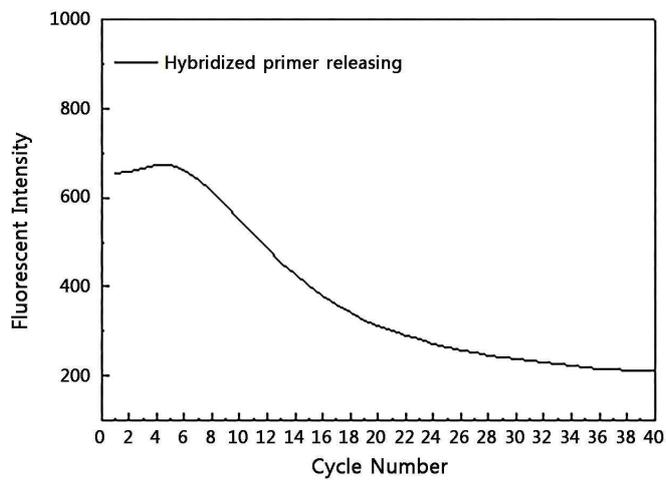
도면3



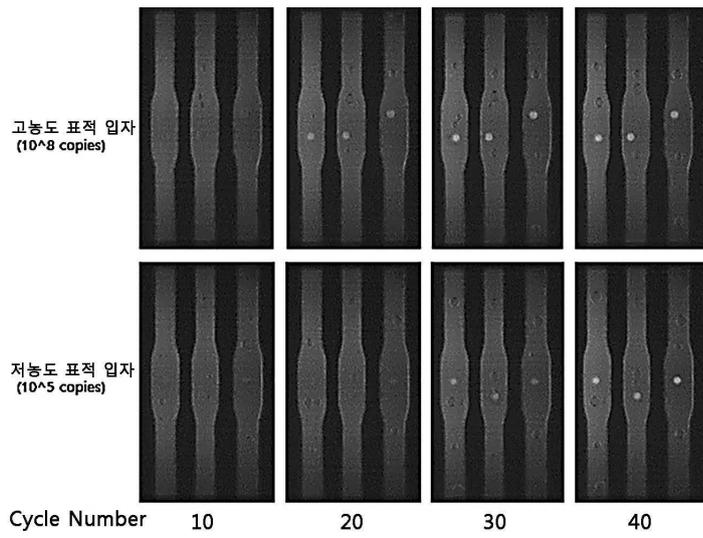
도면4



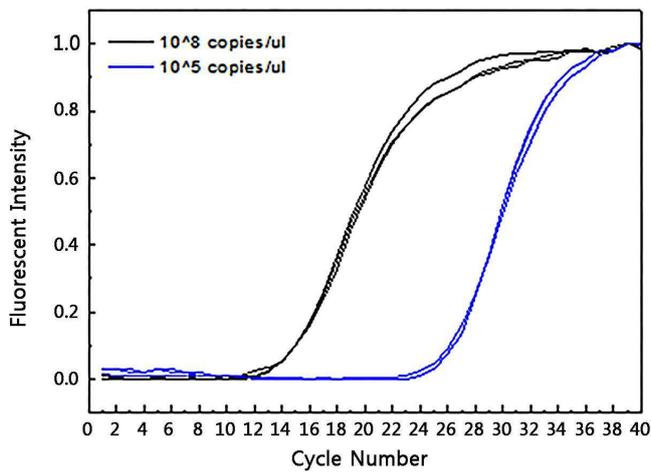
도면5



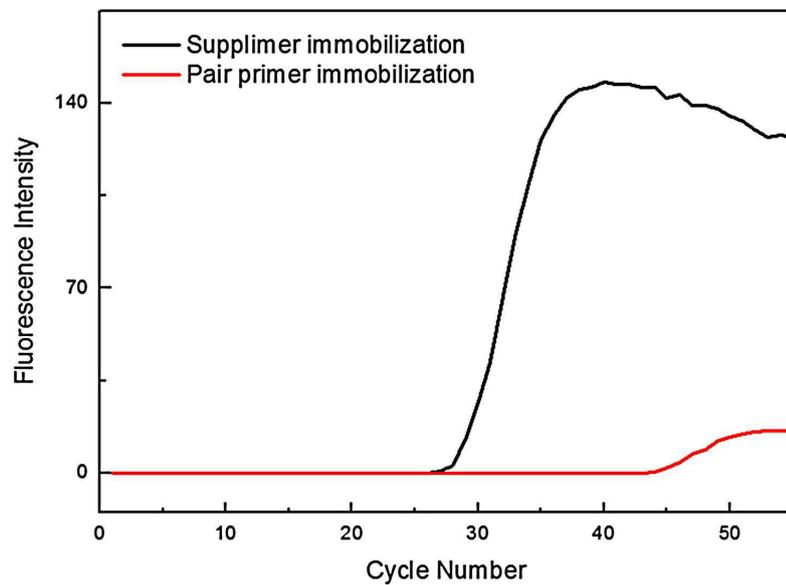
도면6



도면7



도면8



서열목록

<110> Korea Institute of Science and Technology  
 <120> Primer-immobilized hydrogel microparticle and method for  
 amplifying nucleic acid using same  
 <130> 16P324/IND  
 <160> 6  
 <170> KopatentIn 2.0  
 <210> 1  
 <211> 70  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> target DNA  
 <400> 1  
 cctggcacc agcacaatga agatcaagat cattgctcct cctgagcgca agtactccgt 60  
 gtggatcggc 70  
 <210> 2  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Forward primer  
 <400> 2  
 cctggcacc agcacaat 18  
 <210> 3  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Reverse supplimer  
 <400> 3  
 agtactccgt 10  
 <210> 4  
 <211> 8  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Probe supplimer

<400>	4	
gcgctcag		8
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer	
<400>	5	
gccgatccac acggagtact		20
<210>	6	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TaqMan probe	
<400>	6	
atcaagatca ttgctcctcc tgagcgc		27