



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2007-0083545
C12Q 1/68 (2006.01) (43) 공개일자 2007년08월24일

(21) 출원번호	10-2007-7005367	(87) 국제공개번호	WO 2006/025703
(22) 출원일자	2007년03월07일	국제공개일자	2006년03월09일
심사청구일자	없음		
번역문 제출일자	2007년03월07일		
(86) 국제출원번호	PCT/KR2005/002899		
국제출원일자	2005년09월01일		

(30) 우선권주장 1020040069866 2004년09월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인 (주)바이오니아
대전광역시 대덕구 문평동 49-3

(72) 발명자 박한오
대전 유성구 전민동 엑스포아파트 208동 610호
박한이
대전 유성구 전민동 엑스포아파트 205동 1107호
백종수
대전 유성구 송강동 한마을아파트 113동 307호

(74) 대리인 서근복

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 소형 실시간 모니터링 장치

(57) 요약

본 발명은 DNA와 같은 생화학 시료를 연속적으로 반응시키면서, 그 반응 생성물을 실시간으로 모니터링 하기 위한 연속식 정량 반응의 실시간 모니터링 장치에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 생화학 시료가 이동하는 모세관(100)과; 모세관이 순차적으로 수회 감겨 있으며 모세관 내부로 흐르는 시료를 냉각 또는 가열하기 위해 서로 다른 온도로 유지되는 다수개의 온도 조절 블록으로 이루어진 열전달 블록(120)과, 상기 온도 조절 블록의 온도를 조절하기 위한 온도 제어기; 모세관 내부로 흐르는 시료에 광을 조사하기 위한 광 조사부(130); 및 모세관에서 나오는 형광을 수광하여 측정하는 수광부(140)를 포함하는, 생화학 시료의 반응을 실시간 모니터링 하기 위한 초소형 장치에 대한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1.

모세관 내부로 흐르는 시료를 냉각 또는 가열하기 위해 서로 다른 온도로 유지되는 다수개의 온도 조절 블록들로 이루어진 열전달블록(120)과; 열전달블록(120)에 감겨있는 생화학 시료가 흐르는 모세관(100); 상기 온도 조절 블록의 온도를 조절하기 위한 온도 제어기; 모세관 내부로 흐르는 시료에 선형 광속을 조사하는 광 조사부(130); 및 모세관에서 나오는 형광을 수광하여 측정하는 선형 어레이 감지기를 포함하는 수광부(140)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 생화학 시료 반응의 실시간 연속 모니터링 장치.

청구항 2.

제1항의 장치에 있어서, 생화학 반응 시료가 상기 열전달블록에 이르기 전에 시료의 전처리 반응을 진행시키기 위한 전처리블록(180)을 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 실시간 연속 모니터링 장치.

청구항 3.

제1항의 장치에 있어서, 열전달블록에 이르기 이전에 반응 시료를 미리 가열하기 위한 가열블록(170)을 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 실시간 연속 모니터링 장치.

청구항 4.

제1항의 장치에 있어서, 상기 열전달블록(120)이, 변성블록과 어닐링블록의 2개의 온도블록과 각 온도블록을 서로 결합시켜주는 단열재(127)로 이루어진 것임을 특징으로 하는 실시간 연속 모니터링 장치.

청구항 5.

제1항의 장치에 있어서, 상기 열전달블록(120)은 변성블록과, 어닐링블록과, 신장블록의 3개의 온도블록으로 이루어진 것임을 특징으로 하는 실시간 연속 모니터링 장치.

청구항 6.

제1항의 장치에 있어서, 상기 모세관은 열전달블록(120)에 10회 내지 45회 감겨있는 것을 특징으로 하는 실시간 연속 모니터링 장치.

청구항 7.

제2항 또는 제3항의 장치에 있어서, 상기 가열블록(170)과 전처리블록(180)의 크기와 상기 각 블록에 감긴 모세관의 감긴 횟수에 의해서 각 블록에서의 반응시간이 조절되는 것을 특징으로 하는 실시간 연속 모니터링 장치.

청구항 8.

제1항의 장치에 있어서, 다양한 종류의 생화학 반응 시료를 모세관을 통하여 순차적으로 이송하기 위한 다중 채널 밸브가 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 실시간 연속 모니터링 장치.

청구항 9.

제1항의 장치에 있어서, 상기 수광부는 다수의 반응 횃수에 해당하는 모세관(100) 다발의 형광을 동시에 측정하기 위해서 선형 고체 촬상센서(linear CCD)로 이루어진 것임을 특징으로 하는 실시간 연속 모니터링 장치.

청구항 10.

제1항에 있어서, 상기 수광부는 다수의 반응 횃수에 해당하는 모세관(100) 다발의 형광을 동시에 측정하기 위해 선형 포토 다이오드어레이(photo diode array) 센서로 이루어진 것을 특징으로 하는 실시간 연속 모니터링 장치.

청구항 11.

시료가 내부로 흘러 이동하는 모세관(100)과; 모세관이 순차적으로 수회 감겨 있으며, 시료를 냉각 및 가열하기 위해 서로 다른 온도를 유지하는 온도블록으로 이루어진 열전달블록(120)과, 여기에서 시료의 반응횃수는 열전달블록에 감긴 모세관의 감긴 횃수에 의해서 조절되며; 상기 열전달블록의 온도를 조절하기 위한 온도제어기; 및 모세관내의 반응시료에 광을 조사하기 위한 조사부(130)와 모세관에서 나오는 형광을 수광하기 위한 수광부(140)로 이루어진 연속식 정량 반응 모니터링 장치의 모세관 내부로 일정시간 간격으로 다수의 시료를 자동적으로 공급하는 단계; 상기 시료를 열전달블록에 감겨있는 모세관 내를 이동시켜 서로 다른 온도를 지나게 함으로써 반응을 진행시키는 단계; 그리고 모세관내의 시료로부터 발생하는 형광을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 하나의 모세관을 이용하여 다수의 생화학적 시료의 반응을 일정시간 간격으로 정량적으로 모니터링 하기 위한 방법.

청구항 12.

시료가 내부로 흘러 이동되는 모세관(100)과; 모세관이 순차적으로 수회 감겨 있으며, 시료의 온도를 냉각 및 가열하기 위해 서로 다른 온도를 갖는 온도블록으로 이루어진 열전달블록(120)과, 여기에서 시료의 반응횃수는 열전달블록에 감긴 모세관의 감긴 횃수에 의해서 조절되며; 상기 열전달블록의 온도를 조절하기 위한 온도제어기; 및 모세관내의 반응시료에 광을 조사하기 위한 조사부(130)와 모세관에서 나오는 형광을 수광하기 위한 수광부(140)로 이루어진 연속식 정량 반응 모니터링 장치의 모세관 내부로 한 종류의 시료를 자동적으로 일정량 공급하는 단계; 상기 시료를 열전달블록(120)에 감겨있는 모세관 내를 이동시켜 서로 다른 온도를 지나게 함으로써 반응을 진행시키는 단계; 열전달블록에 감겨있는 다수의 모세관 다발로부터 각 반응횃수의 반응정도를 동시에 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생화학적 시료 반응의 연속식 정량 모니터링 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 DNA와 같은 생화학 시료를 연속적으로 반응시키면서, 그 반응 생성물을 실시간으로 모니터링 하기 위한 연속식 정량 반응의 실시간 모니터링 장치에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 생화학 시료가 이동하는 모세관(100)과; 모세관이 순차적으로 수회 감겨 있으며 모세관 내부로 흐르는 시료를 냉각 또는 가열하기 위해 서로 다른 온도로 유지되는 다수개의 온도 조절블록으로 이루어진 열전달 블록(120)과, 상기 온도 조절 블록의 온도를 조절하기 위한 온도 제어기; 모세관 내부로 흐르는 시료에 광을 조사하기 위한 광조사부(130); 및 모세관에서 나오는 형광을 수광하여 측정하는 수광부(140)를 포함하는, 생화학 시료의 반응을 실시간 모니터링 하기 위한 초소형 장치에 대한 것이다.

배경기술

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 DNA의 일정 부위를 특이적으로 반복 합성하여 DNA를 증폭시키는 방법으로서, 아주 적은 양의 DNA로 부터 복제하여 동일한 DNA를 대량으로 생성시키는 방법이다.

이러한 중합효소 연쇄반응을 통해서, 게놈 DNA와 같이 아주 큰 DNA로부터 원하는 DNA 특정 부분만을 선택적으로 증폭시킬 수도 있다. 이러한 중합효소 연쇄반응은 다음의 세 단계로 이루어진다.

1) DNA의 변성(denaturation)

DNA를 90℃ ~ 96℃로 가열하여 이중가닥 DNA(ds DNA)를 단일가닥 DNA(ssDNA)로 분리시킨다. 높은 온도로 가열할수록 단일 가닥으로(ssDNA)로 분리되지만 내열성 중합효소(Taq DNA polymerase)도 온도가 아주 높은 상태에서는 활성이 낮아질 수 있으므로, 보통 94℃에서 변성시키는 것이 적합하다.

2) Primer의 결합(annealing)

단일가닥으로 분리된 DNA가 프라이머와 결합하는 과정으로서 통상 50℃ ~ 65℃에서 진행된다. 비특이 중합효소연쇄반응 산물이 많이 생성될 우려가 있는 경우에는, 이러한 결합 온도를 상승시킴으로써 비특이 생성물을 줄이는데 도움이 되는 수가 있다.

3) DNA의 복제(polymerization, extension)

복제 반응은 내열성 중합효소의 작용에 의하여 70℃ ~ 74℃에서 이루어진다. 증폭을 필요로 하는 DNA의 크기가 크거나, 주형 DNA의 농도가 낮을 때에는 복제 시간을 연장시키는 것이 좋다. 내열성 중합효소(Taq DNA polymerase)는 보통 1분에 2,000~4,000 염기 길이의 DNA를 합성할 수 있으므로, 복제하고자 하는 DNA의 크기 1 kb마다 1분 정도의 시간을 배당하면 복제 반응이 충분히 일어날 수 있다. 복제 반응 사이클이 반복되면서 효소 활성이 감소할 수 있으므로 반응시간을 조금씩 연장하며, 마지막 사이클에는 반응 시간을 충분히(10분) 부여하여 효소의 활성이 충분히 발휘되도록 한다. 위 과정을 계속 반복하여 진행시키면(보통 25 ~ 35회) 필요로 하는 DNA 부위를 증폭시킨다.

중합효소 연쇄반응과 유사한 반응인 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)은 메신저 리보핵산(messenger ribonucleic acid, 이하 mRNA)을 증폭하기 위한 방법이다. 이 반응은 mRNA를 이용하여 상보(complimentary DNA, cDNA)로 복제한 다음, 이것을 중합효소연쇄반응을 이용하여 증폭시키는 것이다. 이 방법은 DNA로는 검출이 불가능하고 RNA의 증폭에 의해서만 검출 가능한 특정 유전자를 찾는 데 이용된다.

최근에는 실시간 중합효소 연쇄반응이 일반에 알려지고 있다. 실시간 중합효소 연쇄반응이란, 연쇄 반응의 결과물을 젤에서 분리하지 아니한 채로 반응튜브 안에서 매번의 반응 사이클의 진행을 나타내는 형광의 강도를 측정하여 연쇄반응의 진행과 동시에 실시간으로 반응의 진행을 모니터링 할 수 있는 기술이다. 여기에 사용되는 실시간 중합효소 연쇄반응 기기는 중합효소 연쇄반응을 위한 열 사이클러(thermal cycler)와 반응물의 검출을 위한 형광검출기(fluorometer)를 합체한 기기이다. 종래의 실시간(real-time) 중합효소 연쇄반응 기기의 구성은 열전소자와 시료가 함유되어 있는 반응 튜브에 열을 전달하기 위한 열전달 블록과 튜브 내부의 시료에 광을 조사하기 위한 조사광원 그리고 시료에서 발생하는 형광을 수광하기 위한 수광부로 구성되어 있다. 상기 중합효소 연쇄반응 실시간 모니터링 기술 원리는 튜브 안의 시료를 반응시키기 위해 열전 소자를 이용하여 냉각 및 가열 사이클을 반복적으로 실행하면서 매 사이클이 끝날 때 마다 조사광원과 수광부를 이용해 시료에 광을 조사하고, 시료로부터 발광하는 형광량을 측정하여 연쇄 중합반응의 진행의 정도를 실시간으로 나타내게 한다.

그러나 이제까지 일반에 알려진 중합효소 연쇄반응 실시간 모니터링 장치는 다수의 시료는 처리할 수 있으나, 일정한 시간 간격에 따라 시료를 연속적으로 반응시키는 것은 불가능하며, 장치에 처음 장착된 시료의 반응이 완료되기 전까지는 반응 중에 다른 시료를 반응튜브에 장착하는 것은 거의 불가능하다는 문제점이 있었다. 또한, 종래의 실시간 모니터링 장치는 하나의 반응 사이클이 진행될 때마다 반응 튜브에서 나타나는 형광량을 측정하여야 했고 시료의 수가 증가하게 되면 형광을 측정하기 위해 소요되는 시간이 증가하게 되어 반응의 진행 정도 측정시에는 그 정확도가 떨어진다.

이러한 종래 기술의 문제점을 극복하기 위하여, 다양한 형태의 중합효소 연쇄반응 실시간 모니터링 기술이 제시되고 있다. 그들중에서, 본 발명의 장치와 가장 유사한 형태의 것을 도 4에 나타내었다.

도 4는, 모세관을 이용한 종래(USP 6,033,880) 기술에 따른 중합효소 연쇄반응 장치에 대한 도면이다. 열전달 블록(300)은 4개의 다른 항온블록(302, 303, 304등)으로 구성되어 있으며, 모세관(351)에 용액공급 장치(350)를 이용하여 시료 및 시약을 공급하거나 제거한다. 중합효소 연쇄반응을 진행하기 위해 열전달 블록을 회전시키면서 모세관에 전달되는 온도를 변화시켜 중합효소 연쇄반응을 수행한다. 이러한 형태의 구성을 갖는 기술들의 일반적인 문제점은 중합효소 연쇄반응을 위해 열전달 블록을 회전시켜야 하고, 회전시 각 모세관이 열전달 블록과의 접촉정도에 따라 중합효소 연쇄반응 정도의 차이가 발생할 수 있어서 연쇄 반응의 재현성이 부족하게 된다는 점이다.

또한, 이러한 형태의 장치를 사용하는 경우, 시간 간격을 두고 연속적으로 중합효소 연쇄반응을 진행시키는 것은 불가능하다. 또한, 중합효소 연쇄반응이 완료된 후에만 반응의 진행 정도를 측정할 수 있는 장치로 구성되어 있기 때문에 반응이 완료되기 전에는 진행 정도를 알 수 없다는 문제점이 있다..

이러한 선행 기술들의 문제점을 획기적으로 개선하는 새로운 방식의 중합효소 연쇄반응 실시간 모니터링 방법이 소개된 바 있다. 한국의 포항공대의 J. H. Hahn 등은 모세관과 원형의 열 블록으로 이루어진 연속식 흐름식 중합효소 연쇄반응용 온도순환 장치를 제안하였다(2004년 2월 4일자, 대한민국 특허출원 제10-2004-0006740).

이 장치는, 변성(melting), 어닐링(annealing), 연장(extension) 온도 구역으로 나뉘어진 직경 30mm의 구리 블록에 길이 3.5m의 모세관을 33회 감아서 제작되었다. 모세관 내부로 흐르는 PCR 반응 혼합물은 구리로 이루어진 열 블록을 한번씩 회전함으로써 PCR 반응의 각 사이클이 수행된다(Nokyong Park, Suhyeon Kim and Jong Hoon Hahn, Cylindrical Compact Thermal-Cycling Device for Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction, Anal Chem, 75, 6029-6033).

Hahn등의 방법에서는, 중합효소 연쇄반응 시료가 흐르는 모세관을 가열 블록에 감고, 스캐너에 장착된 광 조사 장치를 사용하여 가열 블록에 감긴 모세관에 광선을 조사하며 모세관에서 발생하는 형광량을 측정하기 위한 수단으로서 형광 검출기가 장착된 스캔장치를 사용하여 모세관을 스캔하게 된다.

이 방법에서는 가열 블록에 감긴 모세관에 광을 조사하기 위한 광 조사장치와 모세관에서 발생하는 형광을 측정하기 위한 센서를 이동장치(moving stage)에 장착하여 스캐너를 선형으로 구동시켜 스캐너의 이동에 따라 모세관에 광을 순차적으로 조사하고, 또한 모세관에서 발생하는 형광을 스캐너의 이동에 따라 순차적으로 측정하게 된다.

Hahn등의 상기 특허에서는, 특정 파장의 광선을 발생시키는 레이저 또는 램프와 PMT 또는 다이오드와 같은 형광 검출 장치가 모세관이 감겨 있는 가열 블록 위를 일정 속도로 이동하면서 스캔하는 장비를 기재하고 있다. 이러한 광조사 장치와 형광 검출 센서들이 스캐너에 장착된 채 모세관이 감긴 가열 블록의 중심축과 평행하는 축 방향 또는 이를 가로지르는 축 방향을 따라 이동하면서 모세관에 광을 조사하거나 형광을 측정한다.

이렇게 조사광원, 형광 측정부를 이동식 장치에 장착하고 일정속도로 이동시키며 발생하는 형광을 스캔하여 연속적으로 검출하기 위하여는 필연적으로 스테핑 모터와 선형 이송 수단과 같이 이들을 이송하는 이송장치, 이송 가이드 장치, 이송 장치에 동력을 제공하는 구동수단등이 구비되어야 한다. 다수의 광학 렌즈로 구성되는 광 발생 및 조사 장치는 대물렌즈와 같은 고가격의 렌즈를 포함할 뿐만 아니라 광경로의 정확한 조정과 조절 변경을 위하여 정교한 배치 장치의 사용이 요구된다. 이러한 광 발생 및 광 경로의 통제와 조절에 사용되는 광학 장치들은 가격이 비쌀 뿐만 아니라 상당한 공간을 차지하여야 한다. 이러한 구동수단, 동력 전달 수단, 이송 장치등은 효소중합 연쇄반응 장비의 부피를 매우 크게해야 하는 문제점을 발생시킨다. 이들 기계적 장치와 리니어 모터 장치들은 효소반응 연쇄반응 실시간 모니터링 장치의 크기를 크게할 뿐만 아니라 빈번한 고장과 오작동의 원인이 된다.

또한 광원의 이동에 따라 상대적으로 위치가 변하는 모세관에 광선을 조사하기 위하여는 대물렌즈를 포함하여 가격이 비싼 다수개의 광학 렌즈를 사용하여야 한다. 다수개의 광학 렌즈의 조합 배치에는 광학 렌즈의 가격이 비싸다는 문제점 이외에도 이들의 설치 고정 역시 정교한 기계적 가공을 필요로 하기 때문에 중합효소 연쇄반응 장치의 제작비용이 크게 증가된다는 문제점을 야기한다.

Hahn등의 장치에서는 이러한 이동식 광원 및 형광 측정부 그리고 다수개의 고가의 광학 렌즈 장치를 정교하게 조립 배치된 스캐너를 사용하여 다수의 모세관을 스캔함으로써 스캔 할 때마다 한번씩 중합효소 연쇄반응을 모니터링 하게 된다.

이러한 스캔 방식대로 광을 시료에 조사하고 나타나는 형광을 측정하게되면, 스캔하는 순간 광이 조사되거나 형광 측정기가 지나가는 순간의 모세관 내부의 반응만이 모니터링되며, 스캐너가 작용하지 아니하는 영역의 모세관에서 진행되는 반응은 모니터링되지 아니한다는 문제점을 발생시킨다..

따라서, 당업계에는 이러한 Hahn등의 실시간 모니터링 장치의 고질적인 문제점을 극복하고, 보다 작고 가격이 저렴하며 실시간 모니터링 역시 연속적으로 이루어 질 수 있는 실용적이면서도 모니터링 효과가 우수한 새로운 형태의 중합효소 연쇄반응 실시간 모니터링 장비의 개발에 대한 필요성이 대두되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

따라서 본 발명의 목적은 생화학 시료를 연속적으로 반응시키면서, 그 반응의 진행의 정도를 실시간으로 측정하기 위한 모니터링 장치로서 매우 소형화되고 형광 변화의 측정이 연속적이며, 제작비가 저렴하고, 고장이나 오작동의 가능성이 낮은 새로운 형태의 중합효소 연쇄반응 실시간 모니터링 장치를 제공하는 것이다.

보다 구체적으로는, 본 발명은 생화학 시료가 이동하는 모세관(100)과; 모세관이 순차적으로 수회 감겨 있으며 모세관 내부로 흐르는 시료를 냉각 또는 가열하기 위해 서로 다른 온도로 유지되는 다수개의 온도 조절 블록으로 이루어진 열 전달 블록(120)과, 상기 온도 조절 블록의 온도를 조절하기 위한 온도 제어기; 모세관 내부로 흐르는 시료에 광을 조사하기 위한 광 조사부(130); 및 모세관에서 나오는 형광을 수광하여 측정하는 수광부(140)를 포함하는 장치에 있어서, 상기 모세관에 조사되는 광속의 단면이 선형임으로써 다수개의 모세관에 동시에 광이 조사될 수 있게 하며, 발생하는 형광을 측정하는 센서가 열전달 블록과 동축상으로 선형으로 배치된, 중합효소 연쇄반응의 실시간 모니터링 장치를 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한, 본 발명은 다종의 시료의 연속적인 반응의 진행을 모니터링할 때에는 각각의 시료를 분리하여 연속적으로 모세관 내부로 통과시킴으로써, 다종의 시료에 대해 동시에 반응 진행 정도를 측정할 수 있는 연속식 실시간 모니터링 장치를 제공하는 것을 목적으로 한다.

기술적 해결방법

본 발명자들은, 모세관에 연속적으로 흐르는 시료에 광을 주기적으로 조사하고 발생하는 형광량을 주기적으로 측정하는 방법인 선행 기술과는 달리, 시료에 광을 연속적으로 조사하고, 발생하는 형광을 측함에 있어서도 연속적으로 측정하는 새로운 방식을 착상하여 소형화되고, 제작비가 저렴하며, 고장이 적은 중합효소 연쇄반응 실시간 모니터링 장치의 구체화가 가능하다는 사실을 확인하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

본 발명의 장치에서는, 시료가 열전달 블록(120)에서 증폭되기 이전에 시료전처리 블록(180)을 거치도록 함으로써 역전사 중합효소 연쇄반응에 대한 실시간 모니터링도 가능하도록 하였다. 이러한 역전사 중합효소 연쇄반응의 실시간 모니터링을 위해서는 반응 시약(151)에 역전사 반응용 시약을 투여하고 전처리 블록(180)에서 일정 시간동안 일정온도(보통 42℃)로 유지하여 반응을시키면 역전사 중합효소연쇄반응이 진행된다. 본 발명의 장치를 역전사 반응의 모니터링에 사용하지 않을 때에는 전처리 블록(180)의 온도를 가열블록(170)과 같이 동일한 온도(94℃)로 설정하여 사용한다.

보다 구체적으로는, 본 발명의 장치는, 생화학 시료가 이동하는 모세관(100)과; 모세관이 순차적으로 수회 감겨 있으며 모세관 내부로 흐르는 시료를 냉각 또는 가열하기 위해 서로 다른 온도로 유지되는 다수개의 온도 조절 블록으로 이루어진 열 전달 블록(120)과, 상기 온도 조절 블록의 온도를 조절하기 위한 온도 제어기; 모세관 내부로 흐르는 시료에 광을 조사하기 위한 광 조사부(130); 및 모세관에서 나오는 형광을 수광하여 측정하는 수광부(140)를 포함한다.

본 발명의 기술적 특징은, 광 조사부(130)로서 선광원(Linear-Facet Light Source)이 사용되거나 일반 광원에서 나오는 광을 선광원으로 변환시켜 사용한다는 점이다. 본 발명의 장치에서는 선행기술들과 달리 광속의 단면이 원형이 아니라 길다란 선형 형태의 단면을 갖는 광을 사용하여, 원통형상의 길다란 열전달 블록의 중심축에 평행하는 축 방향과 일치하는 선형 광을 촘촘하게 감긴 모세관 전부에 동시에 조사한다. 선형 광의 길이를 모세관이 촘촘하게 감겨있는 원통형상의 열전달 블록의 길이와 일치시키면 하나의 선형광을 사용하여 모든 모세관에 광을 조사할 수 있으므로 광 조사 장치를 스캐너에 장착하여 이동시킬 필요가 없게 한다. 즉, 본 발명의 장치는 선형 광속의 길이를 광을 조사하고자 하는 모세관이 감긴 열전달 블록의 길이와 일치시켜 각 모세관에 동시에 동일한 광을 조사할 수 있도록한다는 점을 기술적 특징으로 한다.

본 발명의 장치의 또 다른 특징은 형광 검출 장치 역시 리니어 CCD와 같이 직선형 지지대에 다수개의 검출센서가 선형으로 배치된 선형 어레이 검출기를 사용한다는 점이다. 선형 어레이 센서의 길이를 모세관이 촘촘하게 감겨있는 원통형상의 열전달 블록의 길이와 일치시키고, 열전달 블록의 중심축과 평행하는 축을 따라 선형 어레이 센서를 배치 고정시키면, 형광 검출 센서를 스캐너에 장착하여 스캐닝하지 아니하고도 각 모세관에서 발생하는 형광을 동시에 검출할 수 있다.

본 발명에 의하면 연속적으로 생물학적 시료를 중합효소연쇄반응을 시키기 위해, 도 1에 나타낸 바와 같이, 서로 상이한 온도를 갖는 온도블록으로 이루어진 열전달블록(120)에 모세관을 다수회 감아 정량펌프를 이용하여 일정시간 간격으로 모세관 안으로 반응시약과 시료를 밀어 넣어주면, 시료는 열전달블록에 감긴 모세관을 따라 한 방향으로 진행됨으로써, 서로 다른 온도블록(121, 122)을 수회 반복하여 지나가면서 중합효소연쇄반응을 수행하게 된다. 즉 모세관 안의 시료는 열전달블록(120)에 감겨있는 모세관을 한바퀴 돌면 중합효소연쇄반응이 한 사이클 수행되게 된다.

열전달블록에 모세관이 다수회 감겨있게 되면 반응 사이클(reaction cycle)은 감긴 횟수 만큼 늘어나게 된다. 모세관을 열전달블록(120)에 코일 형태로 감았기 때문에 모세관 자체의 이동은 없게 되므로 반응시 열전달의 차이에 의한 반응 오차의 발생은 없게 된다.

또한, 본 발명의 장치에서는 중합효소 연쇄반응의 시작 순간 반응이 잘되도록 94℃에서 시료를 수분간 가열한 후 반응이 시작되는데 본 발명에서는 가열블록(170)을 따로 설치해 별도로 반응시킬 필요가 없이, 사람의 조작 없이 자동으로 반응이 효율적으로 진행될 수 있도록 하였고, 역전사 반응 등, 특이한 반응을 위해 열전달블록(120) 전단에 별도로 전처리 블록(180)을 두어 중합효소 연쇄반응과 별개로 역전사 반응을 수행할 수 있도록 하였다.

본 발명의 장치에서 각 가열블록(170), 전처리 블록(180)에서의 시료의 반응시간은 각 블록에 감긴 모세관의 횟수와 블록의 크기에 의해서 결정 된다.

또한, 본 발명에서는 조사부(130) 및 수광부(140)를 구비하여 연속적으로 반응되는 시료에서 나오는 형광을 반응과 동시에 측정하여 중합효소연쇄반응 반응 정도를 실시간으로, 정량적으로 측정할 수 있도록 하였다.

또한, 본 발명은 하나의 모세관을 이용하여 다수의 생화학적 시료의 반응을 동시에 정량적으로 모니터링 하기 위한 방법으로서, 시료가 내부로 흘러 이동하는 모세관(100)과; 모세관이 순차적으로 수회 감겨 있으며, 시료를 냉각 및 가열하기 위해 서로 다른 온도를 유지하는 온도블록으로 이루어진 열전달블록(120)과, 여기에서 시료의 반응횟수는 열전달블록에 감긴 모세관의 감긴 횟수에 의해서 조절되며; 상기 열전달블록의 온도를 조절하기 위한 온도제어기; 및 모세관내의 반응시료에 광을 조사하기 위한 조사부(130)와 모세관에서 나오는 형광을 수광하기 위한 수광부(140)로 이루어진 연속식 정량 반응 모니터링 장치의 모세관 내부로 일정시간 간격으로 다수의 시료를 자동적으로 공급하는 단계; 상기 시료를 열전달블록에 감겨있는 모세관 내를 이동시켜 서로 다른 온도를 지나게 함으로써 반응을 진행시키는 단계; 모세관내의 시료로부터 발생되는 형광을 측정하는 단계로 이루어지는 다수의 생화학 시료들의 반응을 실시간으로 연속 모니터링하는 방법을 제공한다.

본 발명은 하나의 모세관을 이용하여 생화학적 시료의 반응을 정량적으로 모니터링 하기 위한 방법으로서, 시료가 내부로 흘러 이동되는 모세관(100)과; 모세관이 순차적으로 수회 감겨 있으며, 시료의 온도를 냉각 및 가열하기 위해 서로 다른 온도를 갖는 온도블록으로 이루어진 열전달블록(120)과, 여기에서 시료의 반응횟수는 열전달블록에 감긴 모세관의 감긴 횟수에 의해서 조절되며; 상기 열전달블록의 온도를 조절하기 위한 온도제어기; 및 모세관내의 반응시료에 광을 조사하기 위한 조사부(130)와 모세관에서 나오는 형광을 수광하기 위한 수광부(140)로 이루어진 연속식 정량 반응 모니터링 장치의 모세관 내부로 한 종류의 시료를 자동적으로 일정량 공급하는 단계; 상기 시료를 열전달블록(120)에 감겨있는 모세관 내를 이동시켜 서로 다른 온도를 지나게 함으로써 반응을 진행시키는 단계; 열전달블록에 감겨있는 다수의 모세관 다발로부터 각 반응 횟수의 반응 정도를 동시에 측정하는 단계로 이루어지는 생화학 시료의 연속식 정량 반응 모니터링 방법을 제공한다.

유리한 효과

본 발명에 따른 장치에서는 시료를 일정 시간 간격을 두고 연속적으로 모세관 내를 이동시키게 함으로써 각 모세관의 형광을 측정하여 매 사이클마다 반응정도를 동시에 측정할 수 있도록 하였다.

본 발명은 대기 중의 병원성 미생물의 검출, 수질 오염 모니터링, 생물학적 테러의 탐지 및 식별 등과 같이 연속적으로 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 측정하여야만 하는 분야에서 효과적으로 사용될 수 있는 장치이다. 일정시간 간격으로 연속적으로 시료를 반응시키는 것이 불가능하였던 종래 기술을 획기적으로 개선하였으므로 상기의 산업 분야에서 효과적으로 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 모세관 안으로 이송되는 반응시료의 양이 적어 반응에 필요한 시간을 최대한 단축할 수 있으며, 모세관을 열전달블록(120)에 순차적으로 감는 형태를 취하여 기존 장치의 문제점인 열전달블록과 반응용기와의 접촉 정도에 따라 온도전달 정도가 차이 나는 것이 개선되어 실험의 재현성을 높였고 안정성을 확보하였다.

또한, 가열블록(170)과 전처리 블록(180)을 별도로 설치하여 반응시간 및 반응성의 개선 및 전처리 반응 등 특수한 반응의 구현도 가능하게 하였고, 직선형(linear) 구조의 센서를 사용하여 다수의 모세관에서 나오는 형광을 동시에 측정할 수 있게 됨으로써 다수 시료의 반응정도를 한번에 측정 할 수 있고, 여러 반응사이클을 한번에 측정할 수 있다.

또한, 본 발명의 장치를 사용하여, 다수의 시료를 측정할 시에는 각 시료를 분리하여 연속적으로 모세관 내부로 흘러줌으로써 각 시료에 대해 동시에 반응정도를 관찰할 수 있다.

산업상 이용 가능성

본 발명의 연속식 정량 반응 장치는 PCR반응, 시퀀싱 반응, real-time PCR반응에 사용되기에 적합하다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 연속식 실시간 정량 모니터링 장치에 관한 전체 구성도이다.

도 2는 본 발명의 연속식 실시간 정량 모니터링 장치에서 열전달 블록에 관한 상세도(정면도 및 평면도)이다.

도 3은 본 발명의 연속식 실시간 정량 모니터링 장치에서 도 1의 조사부와 수광부에 대한 상세도이다.

도 4는 종래 기술에 따른 장치로서 다수의 모세관을 이용한 핵산증폭반응 장치를 나타낸 도면이다.

도 5는 한 종류의 시료를 수회 반응시켜 반응이 완료된 후 각 반응 횟수별 시료의 형광량을 표현한 그래프이다.

도 6은 다수의 시료를 동시에 반응시키면서 각 시료의 각 반응 횟수에서 발생하는 형광을 반응 횟수별로 표현한 그래프이다.

〈도면의 주요부분에 대한 간단한 설명〉

160: 다중채널 밸브, 110, 111, 112, 113, 114: 정량펌프,

120: 열전달블록, 121: 변성 블록,

122: 결합블록, 123, 125, 171, 181: 파이프히터,

124, 126, 172, 182: 온도제어기, 127: 단열재,

140: 수광부, 130: 조사부,

170: 가열블록, 151: 반응시약,

152: 미네랄오일, 153: 증류수,

154: 세정액, 155: 반응시료 플레이트,

156: 폐액병, 180: 전처리 블록

143: 수광센서, 141: 수광렌즈,

100: 모세관 다발, 131: 조사렌즈,

132, 142: 밴드패스필터, 133: 발광다이오드어레이 기관

발명의 실시를 위한 최선의 형태

이하, 본 발명의 바람직한 구체예를 첨부된 도면과 함께 설명하나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 장치는 생화학 시료의 반응을 실시간 정량 모니터링하는 장치로서 도 1에 도시한 바와 같이, 반응시약, 모세관 세정액 및 시료반응에 필요한 용액이 담긴 저장용기(151~154), 분석할 시료를 담은 저장용기(155), 시료를 이송하기 위한 정량 펌프(110~114), 여러 가지 용액을 순차적으로, 반복적으로 모세관으로 이송하기 위한 다중채널 밸브(160), 시료를 가열 및 냉각하기 위하여 서로 다른 온도를 유지하는 복수의 온도블록으로 이루어진 열전달블록(120), 시료에서 형광이 발생토록 여기광을 조사하는 조사부(130), 시료로부터 발생하는 형광을 동시에 측정하기 위한 수광부(140), 시료의 전처리하기 위해서 가열하기 위한 가열블록(170), 선택적으로 시료를 전처리 반응시키기 위한 전처리 블록(180), 반응이 종료된 시료가 배출되는 폐액병(156) 등으로 구성되어 있다.

열전달블록(120)은 여러 개의 다른 온도를 유지하는 개별적인 온도블록으로 구성되어 있으며, 각 개별블록은 단열재(127)에 의해 서로 결합되어 원형의 봉의 형태를 이룬다. 본 발명의 장치에서는 가장 대표적인 실시태양으로서, 90~94℃, 특히 94℃를 유지하는 변성(denaturation) 블록과 50~65℃, 특히 55℃를 유지하는 결합(annealing) 블록(122)으로 구성되어 있으며, 반응시료의 상태 및 실험조건 등에 따라 온도제어기(124, 126) 및 파워프히터(123, 125)를 이용하여 각 블록의 온도를 가변하여 설정할 수 있다.

개별 블록의 개수는 실험조건 및 시료의 상태에 따라 더 구비할 수 있는데, 예를들면 70~75℃를 유지하는 신장(extension) 블록을 더 구비할 수 있다. 또한 각 개별 블록들은 단열재(127)에 의해 결합되어 최종적으로 열전달블록(120)과 같은 원형의 형태가 완성된다.

도 3은 조사부 및 수광부를 좀 더 자세히 표현한 그림이다. 모세관(100) 안의 반응시료가 형광을 발하기 위해 필요한 에너지를 발생시키기 위한 광원을 만들기 위한 발광다이오드어레이 기관(133)과 이곳에서 나온 여기광을 특정 파장대의 빛만을 선택적으로 통과시키기 위한 밴드패스필터(132)를 통과시켜 단색광으로 만든 다음 조사렌즈(131)를 통해 집광하여 모세관(100)에 입사시킨다.

모세관 안의 반응시료는 에너지를 받아 여기되어 형광을 발하면 그 형광을 효과적으로 센서에 전달하기 위해 수광렌즈(141)로 집광한 후 여기광은 제거하고 형광만 선택적으로 투과시키는 밴드패스필터(142)를 통과시켜 수광센서(143)로 입사시켜 형광량을 측정한다. 여기서 수광센서는 직선(linear)형 센서로 photodiode array나 linear CCD를 사용한다.

발명의 실시를 위한 형태

이하 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 작용, 기능을 보다 더 구체적으로 설명하고자 한다.

(실시예 1)

본 발명의 장치를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 수행할 시, 한 종의 시료에 대해 매 사이클 마다 형광을 측정하지 않고 반응이 완료된 후 한꺼번에 매 사이클의 반응정도를 측정할 수 있는 구성 및 작동원리를 살펴보면 다음과 같다.

먼저, 모세관을 세척하기 위해 세정액(154)을 정량펌프(113)를 이용하여 모세관 안으로 이송시킨다. 다음 세척을 위해 증류수(153)에 연결된 정량펌프(112)를 가동시켜 모세관 안으로 증류수를 밀어 넣어 폐액병(156)에 도달될 때까지 작동시키면, 모세관 내부의 세척이 완료된다.

다음, 반응시약(151)과 반응시료(155)를 정량펌프(110과 114)를 교대로 작동시켜 일정한 양 만큼 모세관 안으로 투입한다. 이때 그 양은 열전달블록(120)에 감겨있는 모세관중 수광부(140)의 수광센서가 감지할 수 있는 모세관 다발의 개수 만큼으로 한정한다. 그 후 미네랄오일(152)을 정량펌프(111)를 이용하여 모세관 안으로 계속 넣어주면 먼저 투입된 시료 및 시약이 열전달블록(120)의 변성(denaturation) 블록(121)과 결합(annealing)블록(122)사이를 순환하면서 중합효소연쇄반응이 진행된다. 먼저 투입된 시료는 열전달블록(120)을 계속 돌아 폐액병(156) 직전까지 오면 반응이 끝난 것이다.

도 2는 열전달블록(120)의 정면도 및 평면도이다. 왼쪽의 정면도에서 맨 아래 모세관이 중합효소연쇄반응이 N회 진행되었다면 바로 위의 모세관은 중합효소연쇄반응이 N-1회 진행된 상태이다. 따라서 수광부의 센서(143)를 이용하여 형광을 측정하면 N, N-1, N-2, N-3..등 반응의 매 사이클의 형광을 동시에 측정할 수 있다.

도 5는 실시예 1에 대한 형광량 증가 패턴이다. 그래프의 형태는 반응시료의 상태나 반응시약의 농도에 따라 달라질 수 있다. 15 반응회수(cycle)부터 미약하게 형광이 검출되며, 매 반응 사이클이 진행될 때마다 형광량은 이론적으로는 2ⁿ배로 증가하여야 하나 실제 약 1.7ⁿ배로 증가한다. 또한 반응이 계속하여 매 사이클마다 1.7배씩 증가하는 것이 아니라 일정 사이클이 되면 반응시약의 한계로 더 이상 증폭되지 않고 광량은 포화 된다. 도 5에서는 30사이클 정도에서 포화되어 더 이상 광량이 증가하지 않는다.

(실시예 2)

다음은 본 발명을 이용하여 다수의 시료에 대해 시간 차이를 두고 연속적으로 반응 정도를 측정할 수 있는 구성 및 작동원리를 살펴보면 다음과 같다.

모세관을 세척하는 방법은 실시예 1과 같다. 세척 후 반응시약(151)과 반응시료(155)를 정량펌프(110과 114)를 교대로 작동시켜 일정한 양 만큼 모세관 안으로 투입한다. 이때 투입량의 범위는 최소 수광부(140)의 수광센서가 감지할 수 영역 이상, 최대 열전달블록(120)에 감겨있는 모세관의 1회전 분량 이하로 만들어 주면 된다. 나머지는 미네랄 오일(152)로 채워 열전달블록(120)에 감겨있는 모세관의 1회전에 해당하는 분량을 만든 후, 반복적으로 다른 시료를 동일하게 위와 같은 방법으로 모세관 내로 주입시켜, 채워 넣는다.

실시간 중합효소 연쇄반응에서는 보통 15 사이클 이후부터 형광이 측정된다. 따라서 수광 센서가 열전달블록(120)에 감겨진 모세관 전체를 감지할 필요는 없고, 약 15 반응회수(cycle) 이후부터 측정하면 된다. 여기서는 전체 40회가 감겨 있고 그 중 수광 센서가 15~40회를 감지한다.

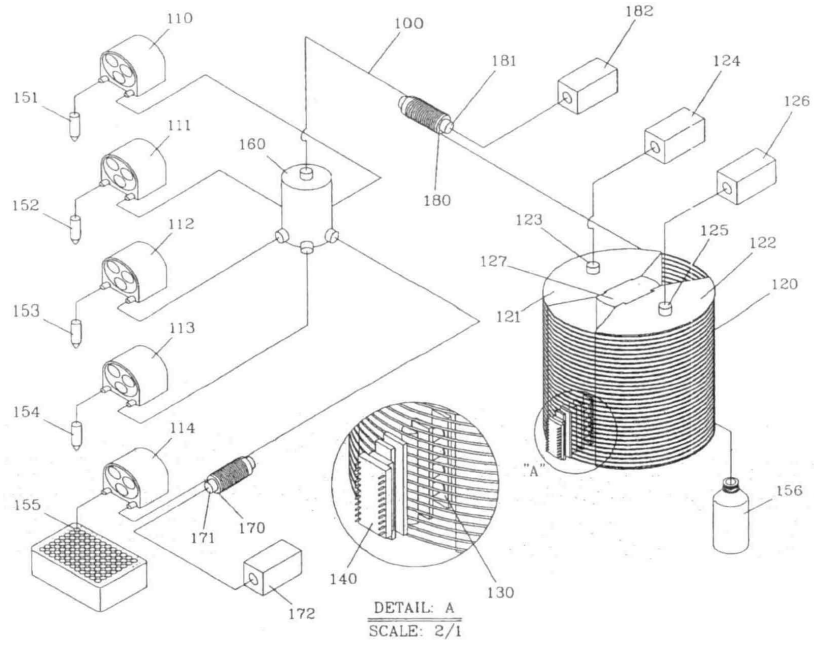
모세관에 채워진 시료가 열전달블록(120)에 감겨진 모세관을 통해 폐액병쪽으로 흘러가면서 중합효소연쇄반응 사이클이 진행되어 나간다. 이때 매회전시마다 수광부의 센서(142)를 이용하여 형광을 측정하면 40개의 시료에 대해 각각 15회~40회 반응회수의 중합효소연쇄반응 매 사이클에 해당하는 정량 측정 데이터를 연속적으로 얻을 수 있다.

도 6은 실시예 2에 대한 형광량 증가 패턴이다. 15회 반응 사이클을 진행시킨 후 형광을 측정하면 첫 번째 투입된 시료의 형광만 나온다. 19회 반응 사이클을 진행시킨 후의 그래프에서는 맨 처음 투입된 시료는 모세관 19번에서 가장 강한 광량으로 측정된다. 이것은 15회 반응 사이클 그래프에서 15번 모세관 안의 시료인데 반응이 4회 더 진행되어 19번째 모세관에서 관측되는 것이다. 동 그림에서 19번 모세관은 첫 번째로 투입된 시료, 18번 모세관은 두 번째로 투입된 시료, 17번 모세관은 세 번째로 투입된 시료이며, 15번 모세관은 다섯번째로 투입된 시료이다. 마지막 그래프는 30회 중합효소연쇄반응을 수행한 후의 광량 값이다.

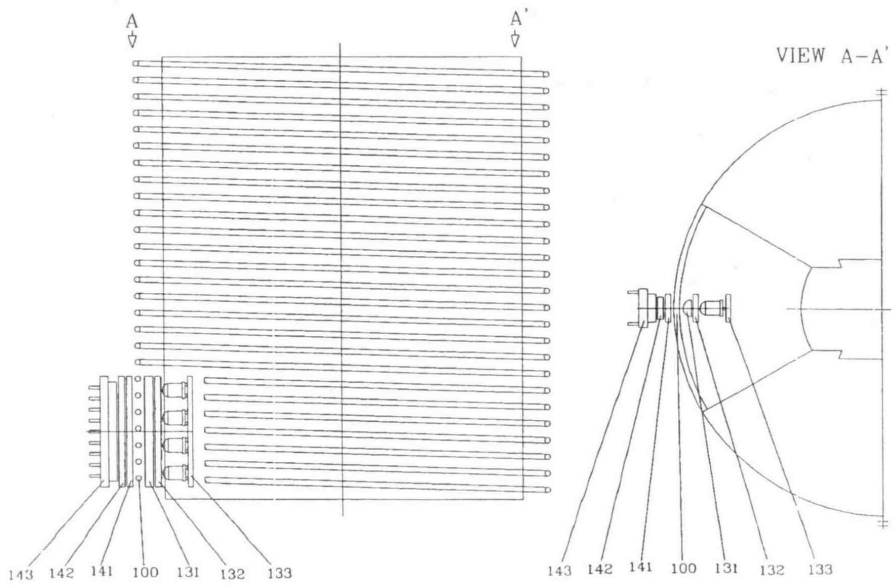
맨 처음 투입된 시료는 30번 모세관에서 관측되며 광량은 포화되어 있다. 15번 모세관부터 40번 모세관까지 총 16개의 시료에 대해 광량을 동시에 얻을 수 있다.

도면

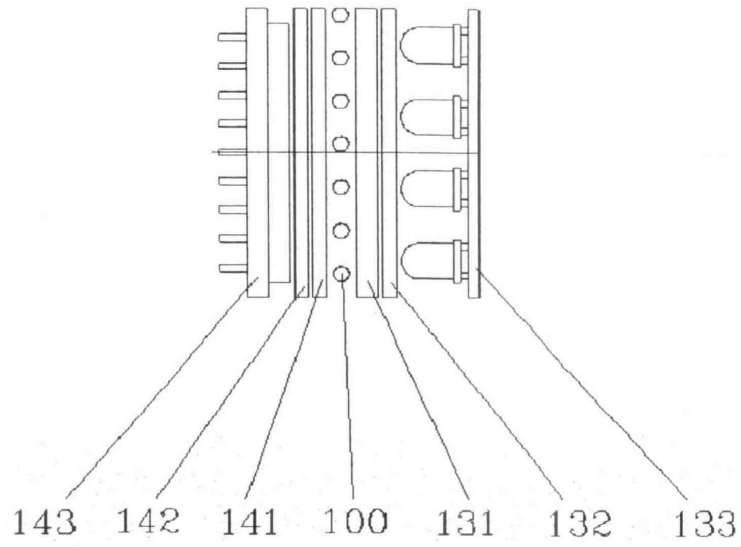
도면1



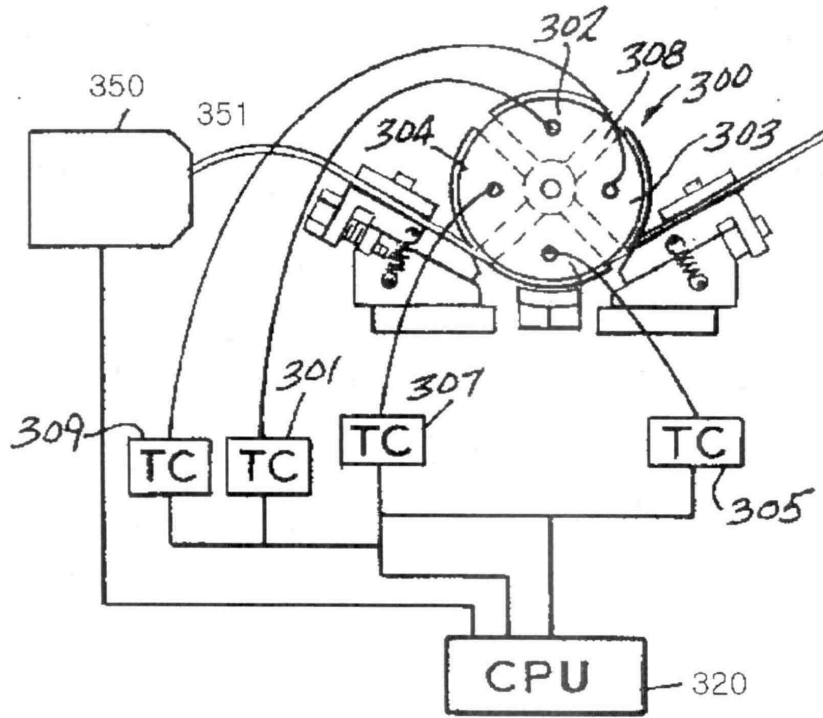
도면2



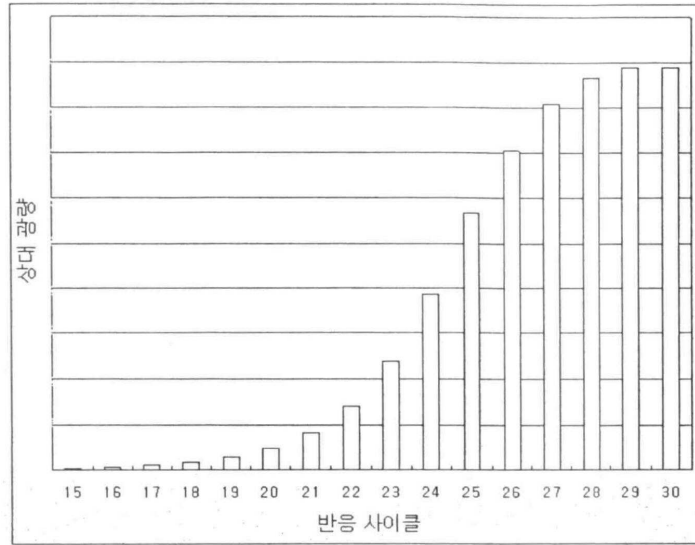
도면3



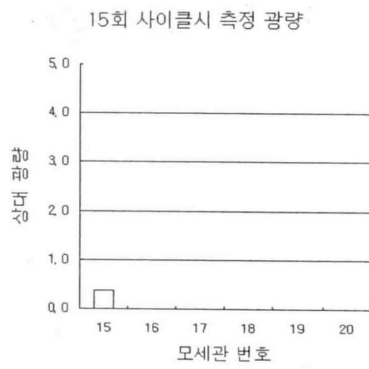
도면4



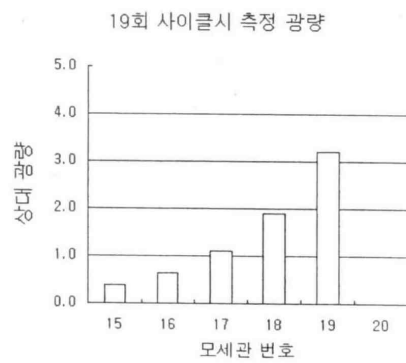
도면5



도면6



도면7



도면8

