



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0022570
 (43) 공개일자 2011년03월07일

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01) C12S 3/20 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7026724

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년05월25일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년11월29일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/056268

(87) 국제공개번호 WO 2009/144182

국제공개일자 2009년12월03일

(30) 우선권주장

10 2008 026 058.4 2008년05월30일 독일(DE)

(71) 출원인

키아겐 게엠베하

독일 데-40724 힐덴 키아겐 슈트라쎄 1

(72) 발명자

파비스, 롤란트

독일 51375 레버쿠젠 아이데흐젠베크 9

호만-비신스키, 앙케

독일 40764 랑엔펠트 퇴네스브루허 펠트 20

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

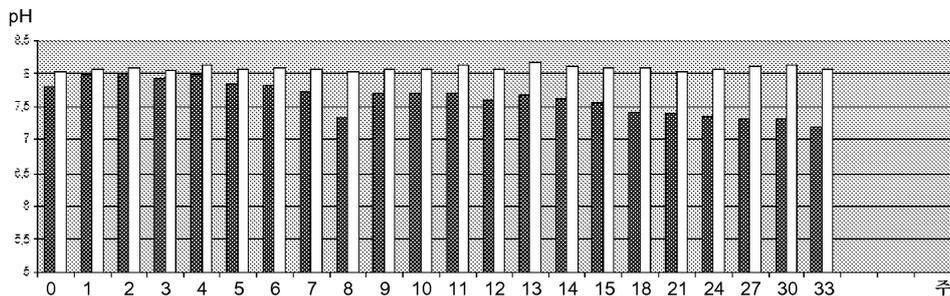
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 용균, 결합 및/또는 세척 시약

(57) 요약

본 발명은 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 용균, 결합 및/또는 세척 시약, 및 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

포스, 토르스텐

독일 51377 레버쿠젠 운터 댐 쉴드헨 22

한젤레, 토마스

독일 40723 힐덴 쉬첸스트라쎄 132 아

특허청구의 범위

청구항 1

- 적어도 하나의 카오트로픽(chaotropic) 화합물,
- 바람직하게는, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄, N-(트리(히드록시메틸)메틸)글리신, N,N-비스(2-히드록시에틸)글리신, 3-(N-모르폴리노)프로판술폰산, N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산), 피페라진-1,4-비스(2-에탄술폰산), N-시클로헥실-2-아미노에탄술폰산, 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산, 및/또는 포스페이트 완충제를 포함하는 군에서 선택되는, 적어도 하나의 완충제 화합물, 및
- 시약의 총 부피를 기준으로 하여 8 중량/부피% 이상 내지 50 중량/부피% 이하의 범위의, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는, 적어도 하나의 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제를 포함하는, 용균, 결합 및/또는 세척 시약.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르가 6 내지 22개 탄소 원자를 가진 지방 알콜 성분을 포함하고, 2 내지 150개 (CH₂CH₂O) 단위를 가진 폴리옥시에틸렌 성분을 포함하며, 여기에서 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르가 바람직하게는 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르, 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함하는 군에서 선택됨을 특징으로 하는 용균, 결합 및/또는 세척 시약.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르가 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르가 아님을 특징으로 하는 용균, 결합 및/또는 세척 시약.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리옥시에틸렌 알킬 페닐 에테르가 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 이소옥틸페닐 에테르를 포함한 군에서 선택됨을 특징으로 하는 용균, 결합 및/또는 세척 시약.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 용균, 결합 및/또는 세척 시약이 시약의 총 부피를 기준으로 하여 9 중량/부피% 이상 내지 40 중량/부피% 이하의 범위, 바람직하게는 10 중량/부피% 이상 내지 30 중량/부피% 이하의 범위, 우선적으로 15 중량/부피% 이상 내지 20 중량/부피% 이하의 범위의 비-이온성 계면활성제를 포함함을 특징으로 하는 용균, 결합 및/또는 세척 시약.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 카오트로픽 화합물이, 바람직하게는 요오드화나트륨, 과염소산나트륨, 구아니디늄 히드로클로라이드, 구아니디늄 티오시아네이트, 구아니디늄 이소티오시아네이트, 및/또는 그의 2 이상의 염의 혼합물로부터 선택되는 소듐 염 또는 구아니디늄 염임을 특징으로 하는 용균, 결합 및/또는 세척 시약.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 시약이 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올, 바람직하게는 1 내지 5 개 탄소 원자를 가진 분지쇄 또는 비분지쇄 알콜, 바람직하게는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, n-프로판올, n-부탄올, 분지쇄 또는 비분지쇄 부탄올 또는 펜탄올, 및/또는 이들의 혼합물을 포함한 군에서 바람직하게 선택되는 알콜을 포함함을 특징으로 하는 용균, 결합 및/또는 세척 시약.

청구항 8

핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 용균, 결합 및/또는 세척 시약의 용도.

청구항 9

a) 생물학적 시료를 용균시키는 단계,
 b) 카오토로픽 화합물 및/또는 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올의 존재 하에서 하나 이상의 산화규소 화합물(들)을 기제로 한 기질 위에 방출된 핵산(들)을 고정화하는 단계,
 c) 임의로, 기질 위에 고정화된 핵산(들)을 세척하는 단계,
 d) 임의로, 결합된 핵산을 제거하는 단계

를 포함하고, 여기에서

- 적어도 하나의 카오토로픽 화합물, 및
- 조성물의 총 부피를 기준으로 하여, 0.1 중량/부피% 이상 내지 50 중량/부피% 이하의 범위의, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 적어도 하나의 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제

를 포함하는 용균 및/또는 결합 조성물의 존재 하에서 용균 및/또는 고정화를 수행하는 것인, 핵산-함유 생물학적 시료로부터 핵산을 단리 및/또는 정제하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르가 6 내지 22개 탄소 원자를 가진 지방 알콜 성분을 포함하고, 2 내지 150개 (CH₂CH₂O) 단위를 가진 폴리옥시에틸렌 성분을 포함하며, 여기에서 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르가 바람직하게는 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르, 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함하는 군에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르가 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르가 아님을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 용균 및/또는 결합 조성물이 조성물의 총 부피를 기준으로 하여 0.2 중량/부피% 이상 내지 30 중량/부피% 이하의 범위, 바람직하게는 3 중량/부피% 이상 내지 10 중량/부피% 이하의 범위, 우선적으로 3.2 중량/부피% 이상 내지 8 중량/부피% 이하의 범위의 비-이온성 계면활성제를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 용균, 결합 및/또는 세척 시약을 포함하는, 핵산-함유 생물학적 시료로부터 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 키트.

청구항 14

폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제, 바람직하게는 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르의, 생물학적 시료의 지질을 용해시키기 위한 용도.

청구항 15

폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제, 바람직하게는 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르의, 저장-안정성 결합, 용균 및/또는 세척 시약을 제조하기 위한 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 용균, 결합 및/또는 세척 시약, 및 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 방법에 관한 것이다. 상기 용균, 결합 및/또는 세척 시약 및 방법은 분자 진단학에서 사용하기 위해 특히 적절하다.

배경기술

[0002] 선행 기술은 세포, 세포 배양물 또는 바이러스 배양물로부터 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA)과 같은 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 다수의 방법을 개시하고 있다.

[0003] 본 명세서에서, 핵산을 단리하기 위한 "전통적인" 방법은, 대부분 수동으로 수행되고, 수성 완충액 및 유기 추출물의 첨가 후에 추출을 수행하는 것을 포함하는 1-단계 방법을 기초로 한다. 핵산은 수성 상에 유지되고, 바람직하지 못한 동반 물질을 함유하는 유기 상을 제거한 후에 단리할 수도 있다.

[0004] 이러한 방법은 보통 먼저 클로로포름 또는 페놀과 같은 유해한 유기 추출물을 사용하고, 두 번째로 수용성 오염물이 핵산을 함유하는 수성 상에 유지되며 추가의 정제 단계에서 제거할 필요가 있다.

[0005] 그 결과, 고체, 대부분 이산화규소와 같은 광물 지지체에 핵산을 선택적으로 흡착시키는 것을 기초로 하는 대안적인 방법이 선행 기술에서 중요하게 여겨졌다. 결합 원리는 "카오트로픽(chaotropic)" 염 및/또는 알콜의 영향 하에서 이산화규소 표면으로 핵산의 가역적인 결합을 기초로 한다. 다-단계 방법에서, 다양한 용액 또는 혼합물, 보통 용균, 결합, 세척 및/또는 용출 용액 또는 혼합물을 핵산-함유 시료에 첨가하고, 마지막 방법 단계에서, 마지막에 결합 단계에서 첨가된 지지체로부터 정제된 핵산을 용출시킨다.

[0006] 양쪽 방법의 기본적인 원리는 세포, 특히 식물, 동물, 인간, 세균 또는 바이러스 세포를 기초로 하고, 첫 번째 단계에서 용균시킨다. 이를 위하여, 세포를 먼저 세포를 붕괴시키는 용균 완충액으로 배양한다.

[0007] 선행 기술은 생물학적 시료의 세포 물질을 용균시키기 위한 완충액 및 방법을 개시하고 있다. 공지된 용균 완충액은 종종 계면활성제 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트 (트윈® 20)를 함유한다. 핵산으로부터 오염을 제거하기 위하여 세포 용균 동안에 오염을 가용성 또는 안정화 상태로 전환시키기 위해 계면활성제를 사용한다.

[0008] 불리하게는, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트 (트윈® 20)을 함유하는 용균 완충액은 저장 동안에 안정하지 않다. 예를 들어, pH가 저하된다. 특별한 단점은, 용균 완충액이 사용될 때 단리된 핵산의 수율이 저장 후에 감소된다는 사실이다. 다른 단점은, 핵산을 함유하는 용출물이 불투명하다는 사실이고, 이것은 오염의 존재가 단리된 핵산의 추가의 사용을 방해할 수 있음을 나타낸다.

발명의 내용

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 선행 기술의 상기 언급된 단점의 적어도 하나를 극복하는 수단 및 가능하다면 양호하거나 더욱 양호한 용균, 결합 및/또는 세척 성질을 가진 방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 목적은 본 발명의 제1항에 따른 용균, 결합 및/또는 세척 시약에 의해 달성된다. 따라서,

[0011] - 적어도 하나의 카오트로픽 화합물,

[0012] - 바람직하게는, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (TRIS), N-(트리(히드록시메틸)메틸)글리신 (트리신), N,N-비스(2-히드록시에틸)글리신 (BICINE), N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산) (HEPES), 피페라진-1,4-비스(2-에탄술폰산) (PIPES), N-시클로헥실-2-아미노에탄술폰산 (CHES), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 (MES), 3-(N-모르폴리노)프로판술폰산 (MOPS) 및/또는 포스페이트 완충제를 포함한 군에서 선택되는, 적어도 하나의 완충

제 화합물, 및

[0013] - 시약의 총 부피를 기준으로 하여 8 중량/부피% 이상 내지 50 중량/부피% 이하의 범위의, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는, 적어도 하나의 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제

[0014] 를 포함하는, 용균, 결합 및/또는 세척 시약이 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 용어 "용균, 결합 및/또는 세척 시약"은, 본 발명의 목적을 위하여, 용균 시약, 결합 시약 또는 세척 시약인 시약, 및 용균 시약 및 결합 시약 및 세척 시약으로서 작용할 수 있는 시약을 의미한다. 더욱 특별하게는, 용어 "용균, 결합 및/또는 세척 시약"은, 본 발명의 목적을 위하여, 본 발명의 용균 시약, 결합 시약 및/또는 세척 시약의 혼합물을 의미한다.

[0016] 용어 "시약"은, 본 발명의 목적을 위하여, 용균, 결합 및/또는 세척 시약을 의미한다.

[0017] 용어 "카오토로픽 화합물"은, 본 발명의 목적을 위하여, 단백질에서 변성 방식으로 작용하고 특히 수소 결합의 형성을 기초로 하는 액체 물의 규칙적 구조를 파괴하는 화합물을 의미한다.

[0018] 용어 "완충제 화합물"은, 본 발명의 목적을 위하여, 수용액의 완충 또는 pH 안정화를 제공할 수도 있는 본 발명의 화합물을 의미한다.

[0019] 용어 "포스페이트 완충제"은 본 발명의 목적을 위하여, 포스페이트 염, 예컨대 인산이수소염, 예를 들어 인산이수소칼륨 (KH₂PO₄) 또는 인산이수소나트륨 (NaH₂PO₄) 및 인산수소염, 예를 들어 인산수소이나트륨 이수화물 (Na₂HPO₄ · 2H₂O) 또는 인산수소이칼륨을 의미한다. 포스페이트 염의 혼합물을 마찬가지로 사용할 수도 있다. 다른 통상적인 포스페이트 완충제는 염화나트륨, Na₂HPO₄, 염화칼륨, 및 KH₂PO₄를 함유하는 PBS (포스페이트 완충 염수)이다.

[0020] 용어 "핵산"은, 본 발명의 목적을 위하여, 이에 한정되지 않지만 천연, 바람직하게는 단리된 직쇄, 분지쇄 또는 원형 핵산, 예컨대 RNA, 특히 mRNA, siRNA, miRNA, snRNA, tRNA, hnRNA 또는 리보자임, DNA, 플라스미드 DNA 등, 합성 또는 변형 핵산, 시험관내 전사물, 예를 들어 올리고뉴클레오티드, 더욱 특별하게는 프라이머, 프로브 또는 PCR을 위해 사용가능한 표준, 디옥시시게닌, 비오틴 또는 형광 염료로 표지화된 핵산, 메틸화 핵산 또는 "PNA" ("펩티드 핵산")을 의미한다.

[0021] 용어 "계면활성제"는, 본 발명의 목적을 위하여, 계면-활성 및/또는 표면-활성 물질을 의미한다.

[0022] 용어 "지방 알콜"은, 본 발명의 목적을 위하여, 6 내지 22개 탄소 원자, 바람직하게는 8 내지 20개 탄소 원자, 바람직하게는 10 내지 18개 탄소 원자, 특히 바람직하게는 12 내지 18개 탄소 원자의 사슬 길이를 가진 알콜을 의미한다. 특히, 12, 14, 16 또는 18개 탄소 원자를 가진 알콜이 바람직하다. 지방 알콜이 단일 또는 다중불포화될 수도 있긴 하지만, 이것은 바람직하게는 포화 지방 알콜이다.

[0023] "폴리옥시에틸렌"은, 본 발명의 목적을 위하여, HO-(CH₂CH₂O)_n 단위를 의미하고, 여기에서, n은 2 내지 150의 정수, 바람직하게는 4 내지 120의 정수, 더욱 바람직하게는 8 내지 80, 가장 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 및 150에서 선택된 정수이다.

[0024] "폴리옥시프로필렌"은, 본 발명의 목적을 위하여, HO-(CH₂CH₂CH₂O)_n 단위를 의미하고, 여기에서 n은 바람직하게는 10 내지 90의 정수, 더욱 바람직하게는 20 내지 80의 정수, 더욱더 바람직하게는 30 내지 70의 정수, 가장 바람직하게는 n은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80,

81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 및 90에서 선택된 정수이다.

- [0025] 정보 "중량/부피%", "% (중량/부피)" 또는 "% (w/v)"는 본 발명의 목적을 위하여 예를 들어 시약 또는 조성물 100 ml 당 계면활성제의 그램의 정보를 의미한다.
- [0026] 놀랍게도, 본 발명의 용균, 결합 및/또는 세척 시약은 저장 동안에 개선된 안정성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 예를 들어, 본 발명의 용균, 결합 및/또는 세척 시약은 실온에서 3 개월, 바람직하게는 6 개월, 더욱 바람직하게는 8 개월 이상의 저장 동안에 안정한 pH를 가질 수도 있다. 더욱 특별하게는, 본 발명의 용균, 결합 및/또는 세척 시약은 승온, 예를 들어 50 °C에서 수 주일, 바람직하게는 수 개월 동안 저장 시에 안정한 pH를 가질 수도 있다.
- [0027] pH 불안정성이 단리 후에 수득된 핵산을 함유하는 용출물에서의 오염의 발생과 관련되는 것으로 의심되기 때문에, 이것은 용균, 결합 및/또는 세척 시약을 위해 유리한 것으로 밝혀졌다.
- [0028] 본 발명에 따라 바람직한 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르이다.
- [0029] 적절한 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르의 예는 단독으로 또는 혼합물로 사용될 수 있는 폴리옥시화 라우릴, 세틸, 올레일, 또는 스테아릴 알콜이다.
- [0030] 본 발명의 바람직한 구현양태에 따르면, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르는 6 내지 22개 탄소 원자를 가진 지방 알콜 성분 및 2 내지 150개 (CH₂CH₂O) 단위를 가진 폴리옥시에틸렌 성분을 포함한다.
- [0031] 본 발명의 특히 바람직한 구현양태에 따르면, 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르, 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함하는 군에서 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르가 선택된다.
- [0032] 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제, 특히 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르가 본 발명 내에서 넓은 범위의 응용을 위해 유리한 것으로 판명되었다. 특히 바람직하게는 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (TRIS), N-(트리(히드록시메틸)메틸)글리신 (트리신), N,N-비스(2-히드록시에틸)글리신 (BICINE), N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산) (HEPES), 피페라진-1,4-비스(2-에탄술폰산) (PIPES), N-시클로헥실-2-아미노에탄술폰산 (CHES), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 (MES), 3-(N-모르폴리노)프로판술폰산 (MOPS), 및/또는 포스페이트 완충제를 포함하는 군에서 선택되는 완충제 화합물을 포함한 용균, 결합 및/또는 세척 시약에서 저장 동안에 개선된 안정성이 관찰될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 용균, 결합 및/또는 세척 시약은, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르, 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제를, 용균, 결합 및/또는 세척 시약의 총 부피를 기준으로 하여 8% (중량/부피) 이상 내지 50% (중량/부피) 이하 범위의 함량을 가질 때 유리한 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다.
- [0034] 계면활성제의 혼합물이 사용된다면, 농도 정보는 바람직하게는 시약의 총 부피를 기준으로 하여 예를 들어 8% (중량/부피) 이상 내지 50% (중량/부피) 이하의 범위의 총 계면활성제 함량이다.
- [0035] 이것은 본 발명 내에서 용균 시약을 위해 특히 유리한 것으로 판명되었다.
- [0036] 바람직한 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르는 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함한 군에서 선택되는 에톡시화 라우릴, 세틸, 올레일 또는 스테아릴 알콜이다.
- [0037] 바람직한 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르는, 폴리옥시에틸렌(4) 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌(23) 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌(2) 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌(10) 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌(20) 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌(2) 스테아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌(10) 스테아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌(20) 스테아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌(2) 올레일 에테르, 폴리옥시에틸렌(10) 올레일 에테르, 폴리옥시에틸렌(20) 올레일 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌(100) 스테아릴 에테르를 포함한 군에서 선택된다. 여기에서 수는 에틸렌 옥사이드 단위의 평균 수를 나타낸다.
- [0038] 본 발명에 따라 특히 적절한 것은 예를 들어 ICI 서팩턴츠(Surfactants)로부터 상표명 Brij®로 시판되는 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르이다.
- [0039] 적절한 폴리옥시에틸렌 라우릴, 폴리옥시에틸렌 세틸, 폴리옥시에틸렌 올레일 또는 폴리옥시에틸렌 스테아릴 알

콜 에테르의 예는 바람직하게는 폴리옥시에틸렌(4) 라우릴 에테르(Brij® 30), 폴리옥시에틸렌(23) 라우릴 에테르(Brij® 35), 폴리옥시에틸렌(2) 세틸 에테르(Brij® 52), 폴리옥시에틸렌(10) 세틸 에테르(Brij® 56), 폴리옥시에틸렌(20) 세틸 에테르(Brij® 58), 폴리옥시에틸렌(2) 스테아릴 에테르(Brij® 72), 폴리옥시에틸렌(10) 스테아릴 에테르(Brij® 76), 폴리옥시에틸렌(20) 스테아릴 에테르(Brij® 78), 폴리옥시에틸렌(2) 올레일 에테르(Brij® 92), 폴리옥시에틸렌(10) 올레일 에테르(Brij® 97), 폴리옥시에틸렌(20) 올레일 에테르(Brij® 98) 및/또는 폴리옥시에틸렌(100) 스테아릴 에테르(Brij® 700)를 포함한 군에서 바람직하게 선택된다.

[0040] 적절한 폴리옥시에틸렌 라우릴, 폴리옥시에틸렌 세틸, 폴리옥시에틸렌 올레일 또는 폴리옥시에틸렌 스테아릴 알콜 에테르가 분말, 예를 들어 폴리옥시에틸렌(21) 스테아릴 에테르 분말 (Brij® 721P)로서 사용될 수도 있다.

[0041] 본 발명의 용균, 결합 및/또는 세척 시약의 다른 장점은, 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위해 사용될 때, 실온에서 또는 승온, 예를 들어 50 °C 이하에서 수 주일 또는 수 개월 동안 용균, 결합 및/또는 세척 시약을 저장할 때라도, 단리된 핵산의 지속적으로 양호한 수율을 나타내는 용균, 결합 및/또는 세척 시약에 의해 제공될 수도 있는 반면, 선행 기술 완충액, 특히 트윈® 20을 함유하는 완충액은 저장 후에 핵산의 낮은 수율을 나타낸다.

[0042] 본 발명의 용균, 결합 및/또는 세척 시약을 사용하는 특별한 장점은, 수 주일 또는 수 개월의 저장 후에라도, 핵산을 함유하는 용출물이 불투명하지 않거나 단지 약간 불투명하다는 사실이다. 따라서, 용출물은 오염물을 함유하지 않을 수도 있거나 적어도 뚜렷이 거의 적은 오염물을 함유한다는 것이 장점이며, 이에 의해 핵산의 수율을 감소시키는 추가의 시간-소모 정제 단계를 없앨 수도 있기 때문에 핵산을 함유하는 용출물을 추가로 사용하는 것이 실질적으로 더욱 유리해진다.

[0043] 폴리옥시에틸렌의 라우릴 알콜 에테르, 예를 들어 폴리옥시에틸렌(4) 라우릴 에테르 (Brij® 30) 또는 폴리옥시에틸렌(23) 라우릴 에테르 (Brij® 35)를 포함하는 용균, 결합 및/또는 세척 시약이 덜 바람직하다. 따라서, 바람직한 구현양태에서, 용균, 결합 및/또는 세척 시약은 이러한 물질을 함유하지 않는다. 특히 바람직한 구현양태에서, 용균, 결합 및/또는 세척 시약의 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르는 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르가 아니다.

[0044] 본 발명의 바람직한 구현양태에서, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르는 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함한 군에서 선택된다.

[0045] 폴리옥시에틸렌(10) 세틸 에테르 (Brij® 56), 폴리옥시에틸렌(20) 세틸 에테르 (Brij® 58), 폴리옥시에틸렌(20) 스테아릴 에테르(Brij® 78) 및/또는 폴리옥시에틸렌(20) 올레일 에테르(Brij® 98)를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌 세틸, 폴리옥시에틸렌 올레일 또는 폴리옥시에틸렌 스테아릴 알콜 에테르가 바람직하다.

[0046] 바람직하게는, 폴리옥시에틸렌(10) 세틸 에테르 (Brij® 56), 폴리옥시에틸렌(20) 세틸 에테르 (Brij® 58) 및/또는 폴리옥시에틸렌(20) 올레일 에테르 (Brij® 98)를 포함하는 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌 세틸 또는 폴리옥시에틸렌 올레일 알콜 에테르가 특히 바람직하다.

[0047] 더욱 특별하게는, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 특히 폴리옥시에틸렌 세틸 또는 폴리옥시에틸렌 올레일 알콜 에테르를 포함하는 본 발명에 따른 용균, 결합 및/또는 세척 시약은 단리된 핵산, 특히 바이러스 DNA의 특히 양호한 수율에 의해 비교로서 표시된다. 더욱 특별하게는, 놀랍게도, 폴리옥시에틸렌 세틸 알콜 에테르를 함유하는 새로 제조된 용균 및/또는 결합 시약의 사용, 및 B형 간염 바이러스(HBV)의 DNA를 단리하기 위하여 50 °C에서 수 주일, 특히 수 개월 저장 후의 사용 양쪽 모두가, 트윈® 20을 함유하는 용균 완충액과 비교 시에 바이러스 DNA의 수율을 현저히 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 이것은 B형 간염 바이러스(HBV)가 용균시키기 어려운 것으로 알려져 있기 때문에 본 발명의 용균 및/또는 결합 시약의 특별한 장점을 제공할 수도 있다. 본 발명의 용균 시약은 바이러스 DNA를 단리하기 위해 특히 적절하다.

[0048] 예를 들어 INCI 명칭 라우레트, 세테트, 스테아레트 또는 올레트로 입수가 가능한 폴리에톡시화 라우릴, 세틸, 스테아릴 또는 올레일 알콜이 더욱 적절하다.

[0049] 추가의 적절한 에톡시화 도데실, 라우릴, 세틸, 스테아릴 또는 올레일 알콜의 예는 라우레트-9, 라우레트-4, 라

우레트-23, 세테트-2, 세테트-20, 스테아레트-2, 스테아레트-10, 스테아레트-20, 올레트-2, 올레트-10 및/또는 올레트-20을 포함한 군에서 선택되는 명칭으로 입수가 가능하다.

[0050] 추가의 바람직한 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르이다. 5 내지 15개 탄소 원자, 바람직하게는 6 내지 10개 탄소 원자를 함유하는 알킬 기를 가진 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르가 바람직하다. 또한, 분지쇄 또는 비분지쇄 C₇- 내지 C₁₀-알킬 기, 더욱 특별하게는 분지쇄 또는 비분지쇄 C₈- 및 C₉-알킬 기, 특히 바람직하게는 이소옥틸 기 및 노닐 기가 바람직하다.

[0051] 본 발명의 바람직한 구현양태에서, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르는 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 이소옥틸페닐 에테르를 포함한 군에서 선택된다. 적절한 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르 및 폴리옥시에틸렌 이소옥틸페닐 에테르는 예를 들어 BASF로부터의 상표명 아이게팔(Igepal)[®]로 입수가 가능하다.

[0052] 적절한 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르 및 폴리옥시에틸렌 이소옥틸페닐 에테르의 예는 바람직하게는 폴리옥시에틸렌(2) 노닐페닐 에테르 (아이게팔[®] CO-210), 폴리옥시에틸렌(2) 이소옥틸페닐 에테르 (아이게팔[®] CA-210), 폴리옥시에틸렌(5) 노닐페닐 에테르 (아이게팔[®] CO-520), 폴리옥시에틸렌(5) 이소옥틸페닐 에테르 (아이게팔[®] CA-520), 폴리옥시에틸렌(9) 노닐페닐 에테르 (아이게팔[®] CO-630), 폴리옥시에틸렌(9) 이소옥틸페닐 에테르 (아이게팔[®] CA-630), 폴리옥시에틸렌(12) 노닐페닐 에테르 (아이게팔[®] CO-720), 폴리옥시에틸렌(12) 이소옥틸페닐 에테르 (아이게팔[®] CA-720) 및/또는 폴리옥시에틸렌(100) 노닐페닐 에테르 (아이게팔[®] CO-990)를 포함하는 군에서 선택된다.

[0053] 추가의 바람직한 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체이다. 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체가 "폴록사머"로 언급된다. 화학식 HO(C₂H₄O)_a(C₃H₆O)_b(C₂H₄O)_aH의 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체가 바람직하다 (상기 식에서, "a"는 폴리옥시에틸렌 단위의 수를 가리키고, "b"는 폴리옥시프로필렌 단위의 수를 가리키고, a/b 중량비는 바람직하게는 0.1 내지 3의 범위이다).

[0054] "a"는 더욱 특별하게는 2 내지 150, 바람직하게는 4 내지 120, 더욱 바람직하게는 8 내지 80의 범위이고, 더욱 더 바람직하게는 "a"는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 및 150으로부터 선택되는 정수이고, 가장 바람직하게는 "a"는 2, 4, 10, 20, 23, 40, 55, 70 및 100으로부터 선택되는 정수이다.

[0055] "b"는 더욱 특별하게는 10 내지 90, 바람직하게는 20 내지 80, 더욱 바람직하게는 30 내지 70의 범위이고, 더욱 더 바람직하게는 "b"는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 및 90으로부터 선택되는 정수이고, 가장 바람직하게는 "b"는 15, 18, 23, 40, 55, 67 및 75로부터 선택되는 정수이다.

[0056] 상이한 길이의 폴리옥시에틸렌 및 폴리옥시프로필렌 블록을 가진 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체가 더욱 바람직하고, 여기에서 15 내지 67개 폴리프로필렌 단위를 가진 폴리옥시프로필렌 블록은 서로 독립적으로 각각의 경우에 2 내지 130개 폴리에틸렌 단위를 가진 2개의 폴리옥시에틸렌 블록에 의해 둘러싸인다.

[0057] 적절한 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체는 예를 들어 BASF로부터 상표명 플루로닉(Pluronic)[®] 또는 신페로닉(Synperonic)[®]로 입수가 가능하다.

[0058] 적절한 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체의 예는 바람직하게는 플루로닉[®] PE 6200, 플루로닉[®] PE 6400, 플루로닉[®] PE 6800, 플루로닉[®] PE 10300, 플루로닉[®] PE 10500, 플루로닉[®] F127, 플루로닉[®] F108,

신페로닉® F108, 신페로닉® F127 및/또는 신페로닉® F68을 포함한 군에서 선택된다.

- [0059] 본 발명의 바람직한 구현양태에 따르면, 용균, 결합 및/또는 세척 시약은 시약의 총 부피를 기준으로 하여 9% (중량/부피) 이상 내지 40% (중량/부피) 이하의 범위, 바람직하게는 10% (중량/부피) 이상 내지 30% (중량/부피) 이하의 범위, 우선적으로 15% (중량/부피) 이상 내지 20% (중량/부피) 이하의 범위의 비-이온성 계면활성제를 포함한다.
- [0060] 본 발명의 바람직한 구현양태에 따르면, 카오토로픽 화합물은 바람직하게는 요오드화나트륨, 과염소산나트륨, 구아니디늄 히드로클로라이드, 구아니디늄 티오시아네이트, 구아니디늄 이소티오시아네이트, 및/또는 2 이상의 염의 혼합물로부터 선택되는 소듐 염 또는 구아니디늄 염이다. 카오토로픽 화합물은 바람직하게는 구아니디늄 히드로클로라이드, 구아니디늄 티오시아네이트 및/또는 구아니디늄 이소티오시아네이트를 포함한 군에서 선택되는 구아니디늄 염이다.
- [0061] 특히, 상기 언급된 카오토로픽 화합물 및 폴리옥시에틸렌-기계 비-이온성 계면활성제의 조합은, 바이러스 세포를 용균시키고 바이러스 세포로부터 핵산을 단리하기 위해 유리한 것으로 판명되었다.
- [0062] 카오토로픽 화합물의 적절한 농도 및 양은 시료의 종류 또는 용균 매개변수에 의존하여 다양하게 변하고, 시약의 총 부피를 기준으로 하여 0.1M 이상 내지 10M 이하의 카오토로픽 화합물의 농도가 일반적으로 유리하다. 용균, 결합 및/또는 세척 시약의 카오토로픽 화합물의 농도가 0.5M 이상 내지 8M 이하의 범위, 바람직하게는 0.9M 이상 내지 6M 이하의 범위인 것이 바람직하다.
- [0063] 용균 시약의 카오토로픽 화합물의 농도는 바람직하게는 3M 이상 내지 7M 이하의 범위, 특히 바람직하게는 4M 이상 내지 6M 이하의 범위이다. 결합 시약의 카오토로픽 화합물의 농도는 바람직하게는 0.5M 이상 내지 7M 이하의 범위, 특히 바람직하게는 1M 이상 내지 6M 이하의 범위이다. 세척 시약의 카오토로픽 화합물의 농도는 바람직하게는 0.5M 이상 내지 3.5M 이하의 범위, 특히 바람직하게는 0.9M 이상 내지 3M 이하의 범위이다.
- [0064] 다른 바람직한 구현양태에 따르면, 용균, 결합 및/또는 세척 시약은 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (TRIS), N-(2-히드록시-에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산) (HEPES), 3-(N-모르폴리노)프로판술폰산 (MOPS) 및/또는 포스페이트 완충제를 포함한 군에서 선택되는 적어도 하나의 완충제 화합물을 포함한다.
- [0065] 특히 바람직한 구현양태에 따르면, 용균, 결합 및/또는 세척 시약은 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (TRIS) 및/또는 N-(2-히드록시-에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산) (HEPES)을 포함한 군에서 선택되는 적어도 하나의 완충제 화합물을 포함한다.
- [0066] 용균, 결합 및/또는 세척 시약은 바람직하게는 수용액이다.
- [0067] 추가의 바람직한 구현양태에 따르면, 용균, 결합 및/또는 세척 시약은 4 이상 내지 12 이하의 범위, 더욱 특히 6 이상 내지 11 이하의 범위, 바람직하게는 7 이상 내지 10 이하의 범위, 특히 바람직하게는 8 이상 내지 9 이하의 범위의 pH를 갖는다.
- [0068] 바람직한 구현양태에서, 용균, 결합 및/또는 세척 시약, 특히 용균 시약은 효소, 예를 들어 용균 효소, 특히 예를 들어 프로테아제 K, 프로테아제 (예를 들어, QIAGEN 프로테아제), 자이몰라제, 라이티카제, 아크로모펩티다제, 리소스타핀, 리소자임을 더욱 가질 수도 있고, 용도에 의존하여 뉴클레아제, 예를 들어 DNase 및/또는 RNase를 가질 수도 있다.
- [0069] 본 발명의 용균, 결합 및/또는 세척 시약은 본 발명의 용균 시약, 결합 시약 또는 세척 시약, 또는 용균 시약, 결합 시약 및/또는 세척 시약의 혼합물일 수도 있다.
- [0070] 핵산은 바람직하게는 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올의 존재 하에서 카오토로픽 화합물의 존재 하에 하나 이상의 산화규소 화합물을 기재로 한 기질에 고정화된다. 따라서, 적어도 하나의 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올을 포함하는 결합 시약이 바람직하다.
- [0071] 1 내지 5개 탄소 원자를 가진 단쇄 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올이 바람직하게 사용된다. 본 발명의 바람직한 구현양태에 따르면, 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올은 1 내지 5개 탄소 원자를 가진 알콜, 바람직하게는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, n-프로판올, 분지쇄 또는 비분지쇄 부탄올 또는 펜탄올, 및/또는 이들의 혼합물을 포함하는 군에서 선택되는 알콜이다.
- [0072] 달리 언급되지 않는 한, 정의 "분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올", 특히 프로판올, 부탄올 및 펜탄올은 특별한 라디칼의 소비가능한 이성질체 형태를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 분지쇄 또는 비분지쇄 프로판올은 n-프로판올

및 이소프로판올을 포함하고, 분지쇄 또는 비분지쇄 부탄올은 이소부탄올, sec-부탄올 및 tert-부탄올을 포함하고, 분지쇄 또는 비분지쇄 펜탄올은 예를 들어 n-펜탄올 및 이소펜탄올을 포함한다. 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 및/또는 이들의 혼합물을 포함하는 군에서 선택되는 알콜을 사용하는 것이 바람직하고, 에탄올, 이소프로판올 및/또는 이들의 혼합물을 포함한 군에서 선택되는 알콜을 사용하는 것이 특히 바람직하다.

- [0073] 본 발명의 바람직한 구현양태에 따르면, 결합 시약은 결합 시약의 총 부피를 기준으로 하여 20 부피% 이상 내지 80 부피% 이하의 범위, 우선적으로 40 부피% 이상 내지 70 부피% 이하의 범위, 바람직하게는 50 부피% 이상 내지 60 부피% 이하의 범위의 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올을 포함한다.
- [0074] 부피 및/또는 중량 함량이 규정된다면, 개개의 성분들의 상기 부피 및/또는 중량 함량은 성분들의 총 부피 또는 총 중량이 100 부피% 또는 100 중량%를 초과하지 않도록 선택되는 것이 당업자에게 자명하다.
- [0075] 본 발명은 또한, 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 본 발명의 용균, 결합 및/또는 세척 시약의 용도에 관한 것이다.
- [0076] 본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는 핵산-함유 생물학적 시료로부터 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 방법에 관한 것이다:
 - [0077] a) 생물학적 시료를 용균시키고,
 - [0078] b) 카오토픽 화합물 및/또는 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올의 존재 하에서 하나 이상의 산화규소 화합물(들)을 기재로 한 기질 위에 방출된 핵산(들)을 고정화하고,
 - [0079] c) 임의로, 기질 위에 고정화된 핵산(들)을 세척하고,
 - [0080] d) 임의로, 결합된 핵산을 제거하고,
 - [0081] 여기에서
 - [0082] - 적어도 하나의 카오토픽 화합물, 및
 - [0083] - 조성물의 총 부피를 기준으로 하여 0.1 중량/부피% 이상 내지 50 중량/부피% 이하의 범위의, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 적어도 하나의 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제
 - [0084] 를 포함하는 용균 및/또는 결합 조성물의 존재 하에서 용균 및/또는 고정화를 수행한다.
 - [0085] 용어 "조성물"은 본 발명의 목적을 위하여 용균 및/또는 결합 조성물을 의미한다.
 - [0086] 방법의 바람직한 구현양태에서, 시료를 용균시키기 위하여 본 발명의 용균 시약이 사용된다. 용균 시약을 용균 시키고자 하는 생물학적 시료와 접촉시킨다. 하나 이상의 효소를 다양한 시점에서 용도에 의존하여 서로 독립적으로 첨가할 수도 있다. 시료는 예를 들어 액체 임상 시료의 경우에 액체 형태일 수도 있다. 고체 성분을 함유하는 임상 시료, 예컨대 대변 시료 또는 면봉 시료를 추가의 분석에 앞서서 적절한 수용액에 현탁시킨다. 세포 배양액을 용균 전에 배양 배지로부터 보통 제거하지만, 대부분의 경우에 시료를 완전히 건조시키는 것을 피한다. 완전히 건조된 시료, 예를 들어 동결건조물의 경우에, 시료, 예를 들어 바이러스 표준의 동결건조물을 추가의 처리 이전에 수용액에 재구성한다. 따라서, 용균된 시료는 보통 일부 액체를 함유한다. 시료에 존재하는 액체를 용균 시약과 접촉시킨다. 이러한 측면에서, 시료로부터 핵산을 단리 및/또는 정제하는 방법은 보통 용균 시약 및 시료 또는 시료에 이미 첨가된 용액의 다른 액체를 함유하는 용균 조성물을 포함한다.
 - [0087] 용어 "용균 및/또는 결합 조성물"은 본 발명의 목적을 위하여 시료로부터 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 방법에서 사용되는 용균 및/또는 결합 시약을 가리키고, 용균, 결합 및/또는 세척 시약에 추가로 추가의 액체를 함유할 수도 있다. 용균 및/또는 결합 조성물은 바람직하게는 본 발명의 용균 및/또는 결합 시약을 포함할 수도 있다.
 - [0088] 본 방법의 추가의 바람직한 구현양태에 따르면, 방출된 핵산을 본 발명의 결합 조성물의 존재 하에서 하나 이상의 산화규소 화합물을 기재로 한 기질 위에 고정화시킨다.
 - [0089] 본 발명의 용균 및/또는 결합 시약을 용균된 시료와 접촉시키는 것이 바람직하다. 시료를 결합 시약과 접촉시키기 전에, 용균을 수행한 용균 조성물 또는 다른 용액을 제거할 수도 있다. 용균 조성물을 제거하지 않는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 결합 시약을 용균 조성물을 포함한 시료와 접촉시킨다.

- [0090] 본 방법의 특히 바람직한 구현양태에 따르면, 용균 조성물의 존재 하에서 용균을 수행하고, 결합 조성물의 존재 하에서 고정화를 수행한다. 따라서, 용균 조성물 및 결합 조성물의 혼합물의 존재 하에서 고정화를 바람직하게 수행한다.
- [0091] 임의로, 용균 시약을 동시에 결합 시약으로서 사용할 수도 있다. 추가로 임의로, 결합 시약을 용균 시약으로서 사용할 수도 있다. 또한 임의로, 결합 시약을 세척 시약으로서 사용할 수도 있다.
- [0092] 용균 및/또는 결합 조성물은 적어도 하나의 카오트로픽 화합물 및 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 적어도 하나의 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제를 조성물의 총 부피를 기준으로 하여 0.1% (중량/부피) 이상 내지 50% (중량/부피) 이하의 범위로 포함한다. 계면활성제의 혼합물이 사용된다면, 바람직하게는 총 계면활성제 함량은 예를 들어 조성물의 총 부피를 기준으로 하여 0.1% (중량/부피) 이상 내지 50% (중량/부피) 이하의 범위이다.
- [0093] 핵산-함유 생물학적 시료로부터 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 방법의 장점은, 예를 들어 적어도 하나의 카오트로픽 화합물 및 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 적어도 하나의 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제를 조성물의 총 부피를 기준으로 하여 0.1% (중량/부피) 이상 내지 50% (중량/부피) 이하의 범위로 포함하는 용균 및/또는 결합 조성물이 사용될 때, 실온에서 또는 승온에서, 예를 들어 50 °C에서 심지어 수 주 일 또는 수 개월의 저장 후에, 핵산을 함유하는 용출물이 불투명하지 않거나 단지 약간 불투명하다는 것이다. 따라서, 유리하게는, 용출물은 오염물을 함유하지 않거나 적어도 뚜렷히 적은 오염물을 함유할 수도 있다. 이것은, 핵산의 수율을 감소시키는 추가의 시간-소모 정제 단계를 없앨 수도 있기 때문에, 핵산을 함유하는 용출물을 사용하는 것을 실질적으로 더욱 유리하게 만든다.
- [0094] 예를 들어, 핵산-함유 생물학적 시료로부터 핵산을 단리 및/또는 정제하는 방법의 다른 장점은, 단리된 핵산, 특히 바이러스 DNA, 예를 들어 B형 간염 바이러스(HBV)의 DNA의 특히 양호한 수율을 가능하게 하는 것이다.
- [0095] "생물학적 시료"는 입상 또는 분자 기준으로서 물질, 특히 바이러스, 파지 및 세포, 예컨대 세균 세포, 효모 또는 곰팡이 세포 또는 인간, 동물 또는 식물 세포를 의미하는 것으로 이해될 수 있다. 방법은 특히 인간 또는 동물 기원의 시료 물질, 예를 들어 혈액, 혈장, 혈청, 입, 목구멍 및 코 행균액, 기관지폐포 세척액, 뇨, 뇌척수액, 가래, 타액, 변, 호흡물, 도말/면봉, 예를 들어 코 도말/면봉, 구강 도말/면봉, 경부 도말/면봉, 질내 도말/면봉, 요도 도말/면봉, 인두 도말/면봉, 회음부 도말/면봉, 및 직장 도말/면봉, 변, 호흡물, 상피 도말/면봉, 생검, 및 기타 조직 또는 골수 시료, 및 적절한 영양 배지에서 시료 물질의 배양물로부터 DNA 또는 RNA와 같은 핵산을 단리하기 위해 적절하다.
- [0096] 시료는 또한, 예를 들어 세균 배양물, 효모 또는 진균 배양물, 바이러스 배양물, 파지 용균물 또는 증폭 과정, 예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)의 생성물로부터 환경 분석, 식품 분석 또는 분자 생물학적 연구 분야로부터 비롯될 수도 있다.
- [0097] 본 발명의 방법은 바람직하게는 게놈 DNA, 미토콘드리아 DNA, 플라스미드 DNA, 바이러스 DNA 및 바이러스 RNA를 단리 및/또는 정제하기 위해, 그리고 전 혈액으로부터 세포내 RNA를 단리 및 정제하기 위해, 예를 들어 역 전사 폴리머라제 연쇄 반응 (RT-PCR)을 위하여, 그리고 무-세포 시료 물질에 존재하는 자유 순환 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위해 적절하다. 본 발명의 방법은 바이러스 DNA를 단리 및/또는 정제하기 위해 특히 적절하다.
- [0098] 생물학적 시료를 방법의 단계 a)에서 용균시킨다. 원칙적으로, 적절한 시약 또는 완충액 중에서 이온성 및 비-이온발생성 계면활성제, 예를 들어 소듐 도데실 설페이트(SDS), 리튬 도데실 설페이트(LiDS) 또는 소듐 라우로일 사르코시네이트 (사르코실)의 도움을 받은 용균, 카오트로픽 염의 사용, 예를 들어 초음파, "프렌치 프레스", 유리 볼, 세라믹 볼 또는 금속 입자와 같은 입자로의 분쇄에 의한 기계적 인열, 또는 액체 질소, 동결 및 해동 주기 반복, 또는 비등, 효소적 용균, 동결건조에 의한 용균, 삼투압 충격에 의한 용균, 마이크로파 및/또는 온도 처리, 및/또는 이들의 조합을 포함한 군에서 선택되는 하기 기재된 방법이 생물학적 시료를 용균시키기 위해 적절하다. 용균은 바람직하게는 카오트로픽 염의 존재 하에서 수행된다.
- [0099] 적어도 하나의 카오트로픽 화합물 및 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 적어도 하나의 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제를 용균 조성물의 총 부피를 기준으로 하여 0.1% (중량/부피) 이상 내지 50% (중량/부피) 이하의 범위로 포함하는 용균 조성물의 존재 하에서 생물학적 시료를 용균시키는 것이 바람직하다.

- [0100] 더욱 특별하게는, 카오트로픽 제 및 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제의 조합이 바이러스 세포의 용균에서 특히 효과적이다.
- [0101] 용균 및/또는 결합 조성물은 적어도 하나의 카오트로픽 화합물 및 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 적어도 하나의 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제를 포함한다.
- [0102] 여기에서, 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제에 관해 상기 설명의 전체 내용을 참조한다.
- [0103] 적절한 에톡시화 지방 알콜의 예는 단독으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있는 에톡시화 도데실, 라우릴, 세틸, 올레일 또는 스테아릴 알콜이다. 바람직한 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르는 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함한 군에서 선택되는 에톡시화 라우릴, 세틸, 올레일 또는 스테아릴 알콜이다.
- [0104] 바람직한 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르는 폴리옥시에틸렌(4) 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌(23) 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌(2) 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌(10) 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌(20) 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌(2) 스테아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌(10) 스테아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌(20) 스테아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌(2) 올레일 에테르, 폴리옥시에틸렌(10) 올레일 에테르, 폴리옥시에틸렌(20) 올레일 에테르, 및/또는 폴리옥시에틸렌(100) 스테아릴 에테르를 포함한 군에서 선택된다. 여기에서 수는 에틸렌 옥사이드 단위의 평균 수를 나타낸다.
- [0105] 적절한 폴리옥시에틸렌 라우릴, 폴리옥시에틸렌 세틸, 폴리옥시에틸렌 올레일 또는 폴리옥시에틸렌 스테아릴 알콜 에테르의 예는 바람직하게는 폴리옥시에틸렌(4) 라우릴 에테르 (Brij® 30) 또는 폴리옥시에틸렌(23) 라우릴 에테르 (Brij® 35), 폴리옥시에틸렌(2) 세틸 에테르 (Brij® 52), 폴리옥시에틸렌(10) 세틸 에테르 (Brij® 56), 폴리옥시에틸렌(20) 세틸 에테르 (Brij® 58), 폴리옥시에틸렌(2) 스테아릴 에테르 (Brij® 72), 폴리옥시에틸렌(10) 스테아릴 에테르 (Brij® 76), 폴리옥시에틸렌(20) 스테아릴 에테르 (Brij® 78), 폴리옥시에틸렌(2) 올레일 에테르 (Brij® 92), 폴리옥시에틸렌(10) 올레일 에테르 (Brij® 97), 폴리옥시에틸렌(20) 올레일 에테르 (Brij® 98), 및/또는 폴리옥시에틸렌(100) 스테아릴 에테르 (Brij® 700)를 포함한 군에서 선택된다.
- [0106] 본 발명의 바람직한 구현양태에 따르면, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르는 6 내지 22개 탄소 원자를 가진 지방 알콜 성분 및 2 내지 150개 (CH₂CH₂O) 단위를 함유하는 폴리옥시에틸렌 성분을 포함한다.
- [0107] 방법의 특히 바람직한 구현양태에서, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르는 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함한 군에서 선택된다.
- [0108] 방법의 바람직한 구현양태에서, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르는 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함한 군에서 선택된다. 이러한 구현양태에서, 폴리옥시에틸렌의 라우릴 알콜 에테르, 예를 들어 폴리옥시에틸렌(4) 라우릴 에테르 (Brij® 30) 또는 폴리옥시에틸렌(23) 라우릴 에테르 (Brij® 35)를 포함하는 용균 및/또는 결합 조성물이 덜 바람직하다. 따라서, 이러한 물질의 어느 것도 함유하지 않는 용균 및/또는 결합 조성물이 바람직하다. 특히 바람직한 구현양태에서, 용균 및/또는 결합 조성물의 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르는 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르가 아니다.
- [0109] 바람직하게는 폴리옥시에틸렌(10) 세틸 에테르 (Brij® 56), 폴리옥시에틸렌(20) 세틸 에테르 (Brij® 58), 폴리옥시에틸렌(20) 스테아릴 에테르 (Brij® 78) 및/또는 폴리옥시에틸렌(20) 올레일 에테르 (Brij® 98)를 포함한 군에서 선택되는, 폴리옥시에틸렌 세틸, 폴리옥시에틸렌 올레일 또는 폴리옥시에틸렌 스테아릴 알콜 에테르가 바람직하다. 바람직하게는 폴리옥시에틸렌(10) 세틸 에테르 (Brij® 56), 폴리옥시에틸렌(20) 세틸 에테르 (Brij® 58) 및/또는 폴리옥시에틸렌(20) 올레일 에테르 (Brij® 98)를 포함한 군에서 선택되는, 폴리옥시에틸렌 세틸 또는 폴리옥시에틸렌 올레일 알콜 에테르가 특히 바람직하다.
- [0110] 또한, 예를 들어 INCI 명칭 라우레트, 세테트, 스테아레트 또는 올레트로 입수가 가능한 폴리에톡시화 라우릴, 세

틸, 스테아릴 또는 올레일 알콜이 적절하다.

- [0111] 더욱 바람직한 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르이다. 5 내지 15 개 탄소 원자, 바람직하게는 6 내지 10개 탄소 원자를 함유하는 알킬 기를 가진 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르가 바람직하다. 분지쇄 또는 비분지쇄 C₇- 내지 C₁₀-알킬 기, 더욱 특별하게는 분지쇄 또는 비분지쇄 C₈- 및 C₉-알킬 기, 특히 바람직하게는 이소옥틸 기 및 노닐 기가 더욱 바람직하다. 방법의 바람직한 구현양태에서, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르는 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 이소옥틸페닐 에테르를 포함한 군에서 선택된다. 적절한 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르 및 폴리옥시에틸렌 이소옥틸페닐 에테르가 예를 들어 BASF로부터 상표명 아이게팔®로 수득가능하다.
- [0112] 더욱 바람직한 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체이다. 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체는 또한 "폴록사머"로 일컬어진다. 화학식 HO(C₂H₄O)_a(C₃H₆O)_b(C₂H₄O)_aH의 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체가 바람직하다 (상기 식에서, "a"는 폴리옥시에틸렌 단위의 수를 가리키고, "b"는 폴리옥시프로필렌 단위의 수를 가리키고, a/b 중량비는 바람직하게는 0.1 내지 3의 범위이다).
- [0113] "a"는 더욱 특별하게는 2 내지 150, 바람직하게는 4 내지 120, 더욱 바람직하게는 8 내지 80의 범위이고, 더욱 바람직하게는 "a"는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 및 150으로부터 선택된 정수이고, 가장 바람직하게는 "a"는 2, 4, 10, 20, 23, 40, 55, 70 및 100으로부터 선택된 정수이다.
- [0114] "b"는 더욱 특별하게는 10 내지 90, 바람직하게는 20 내지 80, 더욱 바람직하게는 30 내지 70의 범위이고, 더욱 더 바람직하게는 "b"는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 및 90로부터 선택된 정수이고, 가장 바람직하게는 "b"는 15, 18, 23, 40, 55, 67 및 75로부터 선택된 정수이다.
- [0115] 상이한 길이의 폴리옥시에틸렌 및 폴리옥시프로필렌 블록을 가진 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체가 더욱 바람직하고, 여기에서 15 내지 67개 폴리프로필렌 단위를 가진 폴리옥시프로필렌 블록은 서로 독립적으로 각각의 경우에 2 내지 130개 폴리에틸렌 단위를 가진 2개의 폴리옥시에틸렌 블록으로 둘러싸인다.
- [0116] 적절한 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체는 예를 들어 BASF로부터 상표명 플루로닉® 또는 신펜로닉®로 수득가능하다.
- [0117] 방법의 바람직한 구현양태에 따르면, 용균 및/또는 결합 조성물은 조성물의 총 부피를 기준으로 하여 0.2% (중량/부피) 이상 내지 30% (중량/부피) 이하의 범위, 바람직하게는 3% (중량/부피) 이상 내지 10% (중량/부피) 이하의 범위, 우선적으로 3.2% (중량/부피) 이상 내지 8% (중량/부피) 이하의 범위의 비-이온성 계면활성제를 포함한다.
- [0118] 이것은 용균 조성물을 위해, 그리고 용균 및 결합 조성물의 혼합물을 위해 특히 유리한 것으로 판명되었다.
- [0119] 방법의 바람직한 구현양태에 따르면, 용균 및/또는 결합 조성물의 카오트로픽 화합물은 소듐 염 또는 구아니디늄 염이고, 바람직하게는 요오드화나트륨, 과염소산나트륨, 구아니디늄 히드로클로라이드, 구아니디늄 티오시아네이트, 구아니디늄 이소티오시아네이트, 및/또는 2 이상의 염의 혼합물을 포함한 군에서 선택된다. 카오트로픽 화합물은 바람직하게는 우선적으로 구아니디늄 히드로클로라이드, 구아니디늄 티오시아네이트, 및/또는 구아니디늄 이소티오시아네이트를 포함한 군에서 선택되는 구아니디늄 염이다.
- [0120] 특히, 상기 언급된 카오트로픽 화합물 및 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제의 조합은 바이러스 세포를

용균시키고 바이러스 세포로부터 핵산을 단리하기 위해 유리한 것으로 판명되었다.

- [0121] 0.1M 이상 내지 10M 이하의 범위의 용균 및/또는 결합 조성물의 카오토로픽 화합물의 농도가 유리한 것으로 판명되었다. 1M 이상 내지 8M 이하, 바람직하게는 3M 이상 내지 7M 이하, 특히 바람직하게는 4M 이상 내지 6M 이하 범위의 카오토로픽 화합물의 농도가 바람직하다.
- [0122] 방법의 바람직한 구현양태에 따르면, 용균 및/또는 결합 조성물은 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (TRIS), N-(트리(히드록시메틸)메틸)글리신 (트리신), N,N-비스(2-히드록시에틸)글리신 (BICINE), N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산) (HEPES), 피페라진-1,4-비스(2-에탄술폰산) (PIPES), N-시클로헥실-2-아미노에탄술폰산 (CHES), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 (MES), 3-(N-모르폴리노)프로판술폰산 (MOPS) 및/또는 포스페이트 완충제를 포함하는 군에서 선택되는 적어도 하나의 완충제 화합물을 포함한다.
- [0123] 방법의 바람직한 구현양태에 따르면, 용균 및/또는 결합 조성물은 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (TRIS), N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산) (HEPES) 및/또는 포스페이트 완충제를 포함하는 군에서 선택된 적어도 하나의 완충제 화합물을 포함한다. 방법의 또 다른 바람직한 구현양태에 따르면, 용균 및/또는 결합 조성물은 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (TRIS) 및/또는 N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산) (HEPES) 을 포함한 군에서 선택되는 적어도 하나의 완충제 화합물을 포함한다.
- [0124] 생물학적 시료를 실온에서, 예를 들어 15 °C 내지 25 °C에서, 또는 승온, 예를 들어 37 °C 이상 내지 75 °C 이하의 범위의 온도에서 용균시킬 수도 있다.
- [0125] 바람직한 구현양태에서, 용균 조성물은 효소, 예를 들어 프로테아제 K, 프로테아제 (예를 들어, QIAGEN 프로테아제), 자이몰라제, 라이티카제, 아크로모펩티다제, 리소스타핀, 라이소자임 및 용도에 따라 뉴클레아제, 예를 들어 DNase 및/또는 RNase를 가질 수도 있다.
- [0126] 방출된 핵산(들)은 카오토로픽 화합물 및/또는 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올의 존재 하에서 하나 이상의 산화규소 화합물을 기재로 한 기질 위에 고정화된다.
- [0127] 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올을 포함하는 결합 조성물이 바람직하다. 바람직한 구현양태에 따르면, 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올은 1 내지 5개 탄소 원자를 가진 알콜, 바람직하게는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, n-프로판올, n-부탄올, 이소부탄올, sec-부탄올, tert-부탄올, n-펜탄올, 이소펜탄올 및/또는 이들의 혼합물을 포함한 군에서 선택되는 알콜이다.
- [0128] 바람직한 구현양태에 따르면, 결합 조성물은 결합 조성물의 총 부피를 기준으로 하여 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올을 1 부피% 이상 내지 80 부피% 이하의 범위, 우선적으로 5 부피% 이상 내지 70 부피% 이하의 범위, 바람직하게는 10 부피% 이상 내지 60 부피% 이하의 범위, 더욱더 바람직하게는 15 부피% 이상 내지 50 부피% 이하의 범위로 포함한다.
- [0129] 본 발명의 바람직한 구현양태에 따르면, 결합 조성물의 혼합물은 용균 시약 및 임의로 하나 이상의 추가의 첨가제, 바람직하게는 분지쇄 또는 비분지쇄 알칸올을 혼합물의 총 부피를 기준으로 하여 1 부피% 이상 내지 80 부피% 이하의 범위, 우선적으로 5 부피% 이상 내지 70 부피% 이하의 범위, 바람직하게는 15 부피% 이상 내지 50 부피% 이하의 범위로 포함한다.
- [0130] 핵산은 시료를 하나 이상의 산화규소 화합물을 기재로 한 기질, 예컨대 이산화규소 (실리카), 실리케이트, 유리 및/또는 실리카 겔과 접촉시키고 이것을 결합을 위해 충분히 오랫동안 배양함으로써 단리된다. 기질은 선행 기술로부터 공지된 일상적인 구조, 예를 들어 입자의 형태, 막 또는 필터일 수도 있다. 이들의 제거를 촉진하기 위하여, 자성 성질을 가진 입자가 바람직하다. 핵산을 위하여 10초 내지 30분의 배양 시간이 편리할 수도 있다. 1분 내지 20분 범위의 배양 시간, 특히 대략 10분이 유리한 것으로 판명되었다.
- [0131] 바람직하게는 젤라틴성 실리카 코팅물을 가진 자성 입자를 사용함으로써 핵산을 단리한다. 바람직하게는, 젤라틴성 실리카 코팅을 갖고 1 μm 이상 내지 25 μm 이하의 범위, 우선적으로 5 μm 이상 내지 15 μm 이하의 범위, 특히 바람직하게는 6 μm 이상 내지 10 μm 이하의 범위, 우선적으로 좁은 크기 분포의 평균 입자 크기를 가진 자성 입자를 사용함으로써 핵산을 단리한다. 더욱 바람직하게는, 젤라틴성 실리카 코팅을 갖고 1 μm 이상 내지 5 μm 이상의 범위의 평균 입자 크기, 바람직하게는 좁은 크기 분포를 가진 자성 입자를 사용함으로써 핵산을 단리시킨다.
- [0132] 더욱 바람직한 구현양태에서, 자성 또는 자성 인력 입자는 산화철을 기재로 하는 자성 코어를 갖는 입자, 바람

직하계는 마그네타이트 (Fe_3O_4), 마그헤마이트 ($\gamma-Fe_2O_3$) 및/또는 페라이트를 포함한 군에서 선택되는 입자이다.

- [0133] 유리한 방식으로 사용될 수 있는 자성 실리카 입자는 예를 들어 국제 출원 WO 01/71732 (그의 전체 내용이 여기에서 참고문헌으로 포함된다)에 기재되어 있다.
- [0134] 바람직한 구현양태에서, 실리카 표면을 가진 자성 또는 자성 인력 입자의 형태로 하나 이상의 산화규소 화합물을 기재로 한 기질이 사용될 수 있다.
- [0135] 15 °C 이상 내지 75 °C 이하의 범위, 바람직하게는 20 °C 이상 내지 70 °C 이하의 범위, 특히 바람직하게는 46 °C 이상 내지 65 °C 이하의 범위, 가장 바람직하게는 50 °C 이상 내지 60 °C 이하의 범위의 온도에서 결합을 수행하는 것이 바람직하다. 실온, 예를 들어 15 °C 이상 내지 28 °C 이하에서 결합을 수행할 수도 있다.
- [0136] 배양 후에, 하나 이상의 산화규소 화합물을 기재로 한 화합물에 결합된 핵산을 용균 및/또는 결합 조성물로부터 제거한다. 자성 실리카 입자를 사용할 때, 이것은 자기장의 도움을 받아 달성될 수도 있다. 예를 들어, 자성 입자가 용기의 벽으로 끌어당겨지고, 여기에서 배양이 수행되고 자기장을 적용함으로써 적절한 피펫 팁에 수집되거나 플라스틱 코팅에 의해 보호된 자성 막대 위에 고정화된다. 용균 및/또는 결합 조성물을 제거하기 위해 적절한 방법 단계의 예는 액체를 피펫팅 또는 흡출하거나 자성 입자를 피펫 팁 또는 자성 막대로 들어올리거나, 또는 용균 및/또는 결합 혼합물을 동일한 수준으로 유지되는 분리된 자성 입자로 낮춤으로써 제거하는 것이다.
- [0137] 임의로, 기질 위에 고정화된 핵산(들)을 제거에 앞서서 세척할 수도 있다. 세척 단계는 세척 용액을 부하된 입자와 함께 배양하고, 예를 들어 진탕 또는 자기장의 적용에 의하여 바람직하게는 상기 입자의 재현탁을 수행함으로써 수행된다. 결합 후에 남아있는 용균 및/또는 결합 조성물, 특히 용균 조성물 및/또는 결합 조성물의 혼합물에서와 같이, 오염된 세척 용액을 바람직하게 제거한다.
- [0138] 사용된 세척 시약은 통상적인 세척 완충액 또는 기타 적절한 매질일 수도 있다. 일반적으로, 저 내지 중 이온 강도를 가진 세척 시약, 예를 들어 10 mM 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (TRIS)의 용액이 바람직하다. 비교적 높은 염 농도를 가진 세척 완충액, 예를 들어 4-6M 구아니디늄 히드로클로라이드의 용액이 또한 유용하다. 상기 기재된 본 발명의 세척 시약이 마찬가지로 적절한 세척 시약이다.
- [0139] 또한, 알코올-함유 세척 시약, 예를 들어 1 내지 5개 탄소 원자를 가진 알코올의 수용액, 바람직하게는 에탄올의 수용액, 특히 50 내지 100% 농도 에탄올의 수용액이 사용될 수도 있다.
- [0140] 기질 위에 고정화된 핵산(들)을 여러 번, 예를 들어 2 내지 4회, 바람직하게는 상이한 세척 시약으로 세척하는 것이 바람직하다. 바람직한 구현양태에서, 저 내지 중 이온 강도를 가진 세척 시약으로 먼저 세척을 수행한 다음, 수성 에탄올의 70 내지 100% 농도 용액으로 세척을 수행한다.
- [0141] 더욱 구체적으로, 자성 입자를 사용하는 것은 입자의 자기 응집에 기인하여 분리 및/또는 세척 단계를 쉽게 수행할 수 있도록 한다.
- [0142] 마지막 세척 단계 또는 물 행굼에 이어서 바람직하게는 자성 입자의 건조 단계를 예를 들어 진공 하에서 수행할 수도 있거나 또는 액체를 증발시키거나 액체가 증발되도록 할 수도 있다.
- [0143] 방법의 단계 d)에 따르면, 결합된 핵산을 기질로부터 제거할 수도 있다. 핵산의 제거를 용출이라고 언급한다.
- [0144] 제거 단계 없이, 예를 들어 PCR 또는 기타 증폭 방법, DNA 검출 방법 또는 DNA 확인 방법을 위하여, 기질, 특히 자성 입자에 결합된 핵산을 사용하는 것이 바람직할 수도 있다.
- [0145] 낮은 염 함량을 가진 용출 시약에 의하여 입자로부터 결합된 핵산을 제거할 수도 있다. 더욱 특별하게는, 0.1 몰/l 미만의 염 함량을 가진 시약을 낮은 염 함량을 가진 용출 시약으로서 사용할 수도 있다. 완충제 화합물 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 (TRIS)을 함유하는 용출 시약이 특히 바람직하다. 임의로 하나 이상의 첨가제, 예를 들어 착물화제, 예컨대 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 아지드 및/또는 완충제 화합물, 예를 들어 트리스(히드록시메틸)아미노메탄(TRIS)을 함유하는 탈염수가 용출을 위해 특히 적절하다.
- [0146] 특히, 용균 및/또는 결합 조성물을 사용하면 생물학적 시료로부터 핵산을 단리하기 위해, 특히 바이러스 DNA를 단리하기 위해 특히 유리한 방법이 얻어진다.
- [0147] 특히, 심지어 용균 및/또는 결합 시약의 저장 후에도, 달성가능한 양호한 수율로부터 장점이 비롯된다.

- [0148] 본 발명은 또한 본 발명의 용균, 결합 및/또는 세척 시약을 포함하는 핵산-함유 생물학적 시료로부터 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 키트에 관한 것이다.
- [0149] 바람직한 구현양태에서, 키트는 또한 하나 이상의 산화규소 화합물을 기재로 한 기질, 특히 실리카 표면을 가진 자성 또는 자성 인력 입자의 형태로 하나 이상의 산화규소 화합물을 기재로 한 기질을 함유할 수도 있다. 상기 키트에 바람직하게 함유된 자성 실리카 입자의 예는 국제 출원 WO 01/71732 (그의 전체 내용이 여기에서 참고문헌으로 포함된다)에 기재되어 있다.
- [0150] 추가의 바람직한 구현양태에서, 키트는 적절한 세척 및/또는 용출 시약, 특히 본 발명에 따른 세척 시약을 더욱 함유할 수도 있다.
- [0151] 다른 바람직한 구현양태에서, 키트는 자성 실리카 입자 이외의 실란화 지지체 물질, 바람직하게는 실리카 막을 가진 원심분리 컬럼을 함유할 수도 있다.
- [0152] 본 발명은 또한, 생물학적 시료의 기질을 용해시키기 위한, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제, 특히 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르의 용도에 관한 것이다.
- [0153] 용어 "기질"은 본 발명의 목적을 위하여 수-불용성 또는 적어도 거의 수-불용성 천연 물질을 의미한다. 용어 "기질"은 본 발명의 목적을 위하여 지방산, 유지, 왁스, 인지질, 스펅고리피드, 리포사카라이드를 포함하는 트리글리세리드의 군, 및 스테로이드 및 카로테노이드를 포함한 이소프레노이드의 군을 포함한다. 더욱 구체적으로, 용어 "기질"은 유기체의 세포 막의 기질 성분 또는 구조 성분, 예컨대 인지질 및 스펅고리피드를 의미한다.
- [0154] 핵산-함유 생물학적 시료로부터 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 방법에서 생물학적 시료의 기질을 용해시키기 위하여 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0155] 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제에 관하여 상기 전체 설명을 참조할 수 있다.
- [0156] 핵산-함유 생물학적 시료로부터 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 방법에서 생물학적 시료의 기질을 용해시키기 위하여 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르를 사용하는 것이 특히 바람직하다.
- [0157] 하나 이상의 산화규소 화합물, 바람직하게는 실리카 표면을 가진 자성 또는 자성 인력 입자의 형태의 산화규소 화합물을 기재로 한 기질을 사용하여 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 방법에서 생물학적 시료의 기질을 용해시키기 위하여, 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제, 특히 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르를 사용하는 것이 특히 바람직하다.
- [0158] 유리하게는, 하나 이상의 산화규소 화합물, 바람직하게는 실리카 표면을 가진 자성 또는 자성 인력 입자의 형태의 산화규소 화합물을 기재로 한 기질을 사용하여 핵산을 단리 및/또는 정제하기 위한 방법에서 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제, 특히 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르를 사용할 때, 용출물은 오염물을 함유하지 않거나 오염물을 적어도 뚜렷이 적게 함유하는 것으로 밝혀졌다.
- [0159] 추가로, 본 발명은 저장-안정성 결합, 용균 및/또는 세척 시약을 제조하기 위한, 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 알킬페닐 에테르, 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제, 바람직하게는 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르 및/또는 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르를 포함한 군에서 선택되는 폴리옥시에틸렌 지방 알콜 에테르의 용도에 관한 것이다.
- [0160] 폴리옥시에틸렌-기재 비-이온성 계면활성제에 관하여 상기 전체 설명을 참조할 수 있다.
- [0161] 여기에서 "저장 안정성"은, 본 발명의 목적을 위하여, 특별한 사용을 위해 관련된 용균, 결합 또는 세척 시약의 성질이 3개월의 기간, 바람직하게는 6개월, 더욱 바람직하게는 8개월 이상에 걸쳐 저장하는 동안 실질적으로 상기 용도를 손상시키는 방식으로 변하지 않음을 의미한다. 바람직한 구현양태에서, 저장 안정성이 실온에서, 더

육 바람직하게는 50 ℃의 높은 저장 온도에서 나타낸다.

- [0162] pH는 사용에 관련된 시약의 성질의 하나임이 판명되었다. 따라서, 우선적으로, 전자는 시약의 저장 동안에 실질적으로 변하지 않으며, pH는 시약의 저장 동안에 1 미만씩 바람직하게 저하된다.
- [0163] 본 발명의 추가의 세부사항, 특징 및 장점은 청구항 및 첨부된 도면의 상세한 설명 및 본 발명의 일례의 구현양태를 예증하는 실시예에서 찾아볼 수 있다.
- [0164] **<도면의 간단한 설명>**
- [0165] 도 1a, 도 1b는 25 ℃ (도 1a) 및 50 ℃ (도 1b)에서 33주의 저장 동안에, 비어있는 막대로 나타낸 본 발명의 용균 시약 B의 pH 변화 및 채워진 막대로 나타낸 트윈[®] 20-함유 용균 시약 A의 pH 변화를 나타낸다.
- [0166] 도 2는 본 발명의 용균 시약 B 및 트윈[®] 20-함유 용균 시약 A로 바이러스 DNA의 제조를 수행한 후에 HBV-DNA의 HBV-특이적 실시간 PCR 후의 CT 값 평균을 나타낸다.
- [0167] 도 3은 50 ℃에서 10주의 저장 후에 본 발명의 용균 시약 B 및 트윈[®] 20-함유 용균 시약 A로 바이러스 DNA의 제조를 수행한 후에 HBV-DNA의 HBV-특이적 실시간 PCR 후의 CT 값 평균을 나타낸다. 여기에서, 약 4주 동안 실온에서 저장된 용균 시약 A를 대조로서 사용하였다. 각각의 경우에, 6 μ l 및 24 μ l의 용출물을 실시간 PCR을 위해 사용하였으며, 6 μ l의 용출물에 대한 결과를 빈 막대로서 나타내고 24 μ l의 용출물에 대한 결과를 채워진 막대로서 나타낸다.
- [0168] 본 발명은 실시예를 기초로 하여 이하에 예증될 것이다. 실시예는 단지 예증을 위한 것으로 간주되어야 하고 본 발명을 제한해서는 안된다는 것을 이해해야 한다.
- [0169] **실시예 1: 안정성 시험**
- [0170] 20% (w/v) 트윈[®] 20 (플루카), 구아니디늄 이소티오시아네이트 및 트리스(히드록시메틸)아미노메탄을 함유하는 용균 시약 A 및 트윈[®] 20을 20% (w/v) Brij[®] 58 (시그마)로 대체한 용균 시약 B를 이중-중류 수에서 새로 제조하고, 밀봉된 용기에서 25 ℃ 및 50 ℃에서 33 주일 동안 각각 보관하였다.
- [0171] 보관 시작 시 및 주 간격으로, 20 ℃ 내지 28 ℃의 범위의 온도에서 pH 측정기 (Metrohm)의 도움을 받아 각각의 용액의 pH를 결정하였다.
- [0172] 도 1a에 나타낸 막대 차트는, 용균 시약 A의 pH가 25 ℃에서 33주의 저장 동안에 대략 pH 7.8로부터 pH 7.2로 약간 저하함을 나타내는 반면, 도 1b에 나타낸 것과 같이 50 ℃에서 33주의 저장 동안에 pH가 대략 pH 7.8로부터 대략 pH 5.9로 저하되었다. 반대로, 용균 시약 B의 pH는 25 ℃ 및 50 ℃에서 33주의 저장 동안에 대략 pH 8에서 안정하게 유지되었다.
- [0173] **실시예 2: 바이러스 DNA의 추출**
- [0174] 음성, 즉 HBV 무-바이러스 인간 혈장을 10⁴ sgU/ml B형 간염 바이러스(HBV)와 혼합하였다. 각각의 경우에, 혈장 시료로부터 바이러스 핵산을 정제하기 위해 자동화 프로토콜에 의하여, 통상적으로 입수가능한 자동화 플랫폼 QIA심포니[®] (Qiagen)를 사용하여 1000 μ l의 혈장 시료로부터 바이러스 DNA를 추출하였다.
- [0175] 사용된 프로토콜에 따라서, 시료를 구아니디늄 이소티오시아네이트, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 및 20% (w/v) Brij[®] 58 (Sigma) 및 프로테이나제 K를 함유하는 프로토콜-한정된 부피의 용균 시약 B, 및 담체 RNA를 함유하는 용액 AVE에 노출시켰다. 이어서, 시료를 용균시키기 위하여 65 ℃에서 배양시켰다. 이어서, 시료 혼합물에 구아니디늄 이소티오시아네이트, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 및 9% (w/v) Brij[®] 58 (시그마) 및 이소프로판올을 함유하는 프로토콜-한정된 부피의 결합 시약 C를 첨가하였다. 추가의 3분의 배양 후에, 자성 이산화규소 입자를 함유하는 맥어트랙트(MagAttract) 현탁액을 첨가하고, 프로토콜에 규정된 바와 같이 혼합하였다. 이 시간 동안에, 핵산이 산화규소 입자에 결합된다. 이어서, 자성 산화규소 입자를 분리시키고 액체 상을 제거한다. 산화규소 입자에 구아니디늄 티오시아네이트 및 에탄올을 함유하는 프로토콜-한정된 부피의 세척 용액을 첨가하고, 입자를 세척 용액에 현탁시켰다. 상층액을 다시 제거하고, 트리스, NaCl 및 에탄올을 함유하는 세척 용액의 프로토콜-한정된 부피를 첨가하고 두 번째 세척 단계를 수행하였다. 액체 상을 분리 및 제거한 후에, 입자를 프로토콜-한정된 부피의 수성 80% 농도 에탄올로 세척하였다. 입자를 분리한 후에, 상층액을 제

거하고 입자를 공기 중에서 8분 동안 건조시켰다. DNA를 용출시키기 위하여, 프로토콜-한정된 부피의 용출 용액 E를 첨가하고, 입자를 여기에 3분 동안 현탁시켰다. 입자를 제거하고, 용출물을 수득하였다.

[0176] 상기 프로토콜에 따라서, 20% (w/v) 트윈® 20 (플루카)를 함유하는 용균 시약 A 및 9% (w/v) 트윈® 20 (플루카)를 함유하는 결합 시약 D를 사용한 변형에 의하여, 바이러스 DNA를 추가의 1000 µl의 혈장 시료로부터 추출하였다.

[0177] 수득된 용출물을 각각의 경우에 HBV-특이적 실시간(RT-) PCR로 처리하고, 각각의 경우에 24 µl의 용출물을 사용한다. 형광이 대수적으로 증가하기 시작하는 주기를 설명하는 CT 값 (역치 주기)의 도 2에 나타낸 평균은, 본 발명의 용균 시약 B 및 결합 시약 C를 사용하는 추출이 높은 수율을 달성하였음을 보여주었다.

[0178] **실시예 3: 용균 시약의 저장 후 바이러스 DNA의 추출**

[0179] 구아니디늄 이소티오시아네이트, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 및 20% (w/v) Brij® 58 (시그마)를 함유하는 용균 시약 B, 및 Brij® 58을 20% (w/v) 트윈® 20 (플루카)로 대체한 용균 시약 A를 각각 50 °C에서 10주 동안 밀봉된 용기에 저장하였다.

[0180] 이어서, 혈장 시료로부터 바이러스 핵산을 정제하기 위해 자동화 프로토콜에 의하여, 통상적으로 입수가 가능한 자동화 플랫폼 QIA심포니® (Qiagen)를 사용하여 바이러스 핵산을 추출하였다.

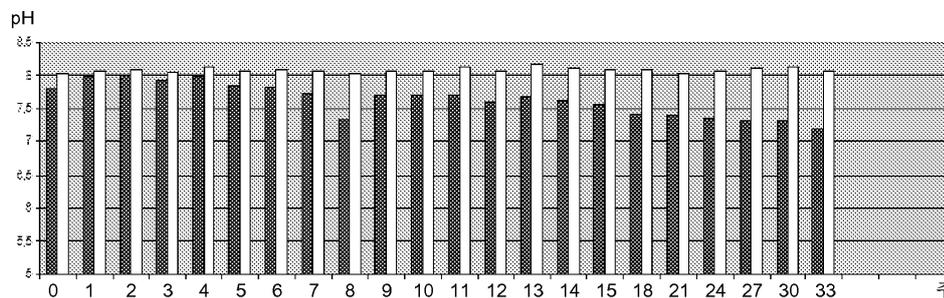
[0181] 실시예 2에 기재된 프로토콜에 따라서, 통상적으로 입수가 가능한 자동화 플랫폼 QIA심포니® (Qiagen)를 사용하여, 상이한 혼합물에 대해, 각각의 경우에 50 °C에서 10주 동안 저장된 구아니디늄 이소티오시아네이트, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄 및 20% (w/v) Brij® 58 (시그마)를 함유하는 용균 시약 B 및 Brij® 58을 20% (w/v) 트윈® 20 (플루카)로 대체한 용균 시약 A로, 각각의 경우에 1000 µl의 혈장 시료로부터 바이러스 DNA를 추출하였다. 사용된 대조는 실온에서 약 4주 동안 보관된 용균 시약 A이었다.

[0182] 본 발명자들은, 50 °C에서 저장된 용균 시약 A를 사용하여 수득된 용출물이 매우 불투명한 반면, 용균 시약 B를 사용하여 수득된 용출물이 투명함을 알아내었다.

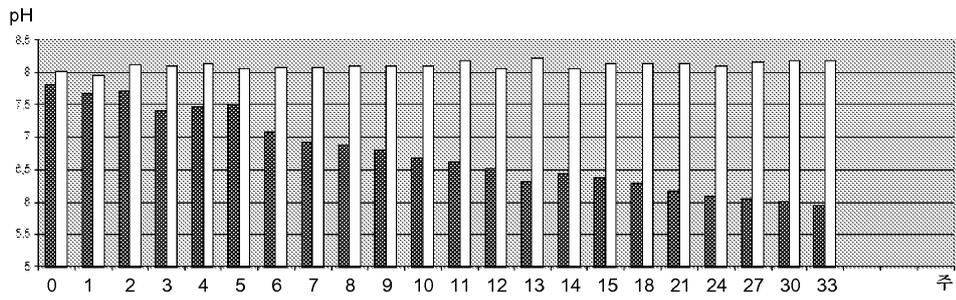
[0183] 각각의 경우에, 수득된 용출물 6 µl 및 24 µl를 HBV-특이적 실시간(RT-) PCR로 처리하였다. 도 3에 나타낸 CT 값의 평균은, 본 발명의 용균 시약 B 및 결합 시약 C를 사용한 추출이 높은 수율을 달성함을 보여주었다.

도면

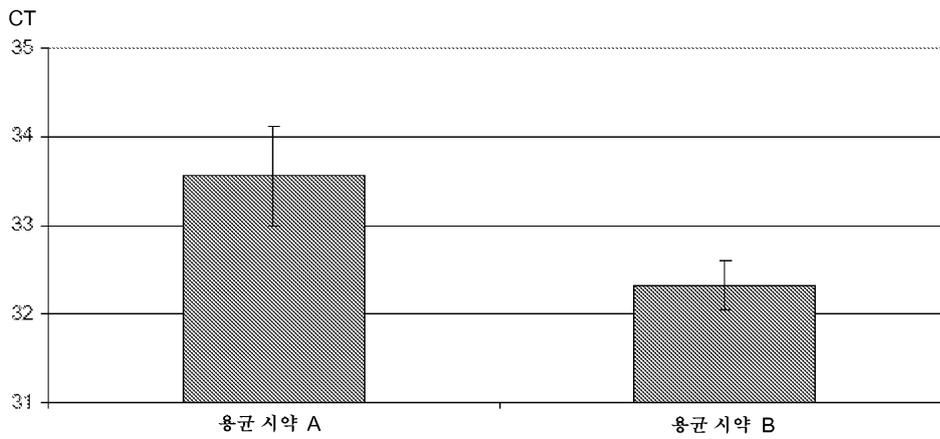
도면1a



도면1b



도면2



도면3

