

발간등록번호

11-1543000-000178-01

농 · 축 · 수산물 위해 화학물질 신속 다중 검출시스템 개발

(Development of rapid multi-detection system for hazardous chemicals in agricultural, livestock or fishery products for human consumption)

호서대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농·축·수산물 위해화학물질 신속 다중 검출시스템 개발에 관한 연구”
과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 7 월 29 일

주관연구기관명 : 호서대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 정 상 희

세부연구책임자 : 정 상 희

연 구 원 : 김 정 한 외 4

협동연구기관명 : (주) 중검

협동연구책임자 : 임 명 운

협동연구기관명 : (주) 비전과학서울

협동연구책임자 : 정 창 민

요 약 문

I. 제 목

농·축·수산물 위해화학물질 신속 다중 검출시스템 개발

II. 연구개발의 목적

1. 연구목적

가. 농축수산물 및 가공식품에 존재하는 위해화학물질에 대한 고감도 신속·다중 검출기술을 개발한다. 이를 위해 다종의 식품 및 화학적 위해요소에 대하여 현장에서 적용 가능하며 신속·간편한 시료 전처리법을 확립한다. 기존의 검사방법의 문제점을 해결하면서 신속성·용이성·정확성을 보장하는 검사·제어시스템의 개발을 위해 새로운 바이오리셉터를 개발하고 이를 활용하여 현장에서의 신속한 검사방법을 확립하여 위해화학물질에 대한 상시적 검사체계를 구축한다.

나. 개발된 새로운 바이오 나노센싱물질을 활용한 휴대용 검사장비의 시제품을 제작하여 개발기술의 산업화를 모색하고, 또한 고효율 검사시스템 개발을 통하여 넓은 시장성 확보를 목표로 한다.

2. 연구의 필요성

무분별한 항생제의 남용과 그로 인한 내성균의 출현, 그리고 산업의 발전에 의한 우리 환경의 오염 등 우리 주변의 모든 환경이 위해화학물질들에 노출되어 있다. 이로 인해, 우리의 먹거리가 안전하지 않으며 우리의 건강도 위협받고 있다. 특히 우리의 주된 먹거리인 농축수산물의 위해화학물질들에 대한 피해는 날로 증가하고 있는 추세다. 이를 방지하기 위해 위해화학물질들을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 검출시스템의 개발이 절실히 요구된다. 위해화학물질들에 대한 검사시스템의 개발은 우리의 삶과 직접적으로 연결되어 있는 중요한 수단이며 목적이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 농축수산물 식품 내 위해물질 검출을 위한 바이오마커 개발[주관기관 호서대학교 산학협력단]

가. 농축수산물식품별 화학적 위해요소 위해성 평가 및 검출대상물질의 선정

나. 식품별/위해물질별 최적 전처리 조건을 개발

다. 검출대상 위해물질에 대한 바이오리셉터(압타머)의 개발

라. 개발된 바이오리셉터(압타머)의 구조적 특성 및 검출물질에 대한 결합력과 특이도를 분석

마. 농축수산물 식품에 대한 최적화된 전처리법과 검출물질별 특이 압타머를 이용한 위해물질 검출시스템을 개발

바. 개발된 검출시스템의 농축수산물 식품에 대한 현장 적용성을 확인하고 그 적합성을 평가
사. 현장 적용 가능한 위해물질 검출시스템의 프로토콜을 확립

2. 자성나노 복합체를 활용한 위해화학물질 신속 다중 바이오센싱 시스템 개발[제1협동기관 (주) 중검]

- 가. 농·축·수산식품 유래의 위해 화학물질 검출 특이 바이오 리셉터 및 디텍터 개발
- 나. 바이오리셉터(BT-화학물질 특이성), 자성나노입자(NT-화학물질 농축을 통한 민감성), 자동화 장비(IT-사용의 편리성, 신호의 정량화) 기술을 접목한 검출시스템 개발
- 다. 농·축·수산식품 생산 및 유통과정 단계별 체계적 위해물질 중점관리 매뉴얼 개발(현장 적용)
- 라. 개발된 제품의 현장시범적용 및 평가

3. 현장 적용성 자동화 Magnetic bead Processor 및 Fluorescence Detector 개발[제2협동기관 (주) 비전과학서울]

- 가. 자성나노입자 기반 자동화 장비 기본 설계
- 나. 자동화장비 시제품 제작 및 평가
- 다. 자동화 장비 현장평가와 사용자 중심의 시제품 제작 및 개선

IV. 연구개발결과

1. 농축수산물 식품 내 위해물질 검출을 위한 바이오마커 개발[주관기관 호서대학교 산학협력단]

- 가. 위해물질 위해성 평가·대상물질 선정
 - (1) Tetracyclines (tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline)
 - (2) Enrofloxacin, ciprofloxacin
 - (3) Sulfamethazine, sulfamerazine, sulfaclozine sodium
 - (4) Malachite green
- 나. 식품별/위해물질별 최적 전처리조건 확립
 - (1) 우유-Tetracyclines
 - (2) 닭고기-Enrofloxacin, ciprofloxacin
 - (3) 돼지고기-Sulfamethazine, sulfamerazine, sulfaclozine sodium
 - (4) 광어-Malachite green
- 다. 위해물질 특이 고감도 바이오리셉터(압타머) 선별 및 특성분석을 완료
 - (1) Magnetic bead를 이용한 SELEX법과 선별된 압타머: Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Ethoprophos, Malachite green, Leucomalachite green 특이 압타머 선별과 특성분석
 - (2) Enzyme Linked Aptamer Assay (ELAA)를 통해 선별된 압타머: Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Ethoprophos, Malachite green, Leucomalachite green, Sulfamerazine 특이 압타머 선별과 특성분석
 - (3) 새로운 SELEX 과정에 의해 선별된 압타머: Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Malachite green, Enrofloxacin 특이 압타머 선별과 특성분석
- 라. 개발된 검출시스템의 검출물질들에 대한 높은 검출 감도와 적합성을 확인
 - (1) Tetracycline 특이 압타머(TC2)의 우유에 대한 검출감도: LOD 14.9 ug/L, LOQ 74.2

ug/L로 우유에서의 최대잔류허용기준(MRLs, 100 ug/L)을 만족

(2) Oxytetracycline 특이 압타머(OTC3)의 우유에 대한 검출감도: LOD 12.3 ug/L, LOQ 49.8 ug/L로 우유에서의 최대잔류허용기준(MRLs, 100 ug/L)을 만족

(3) Chlortetracycline 특이 압타머(CTC8)의 우유에 대한 검출감도: LOD 16.5 ug/L, LOQ 90.7 ug/L로 우유에서의 최대잔류허용기준(MRLs, 100 ug/L)을 만족

(4) Enrofloxacin 특이 압타머(EF3)의 닭고기에 대한 검출감도: LOD 11.1 ug/L, LOQ 60.8 ug/L로 닭고기에서의 최대잔류허용기준(MRLs, 100 ug/L)을 만족

(5) Malachite green 특이 압타머(MG4)의 광어에 대한 검출감도: LOD 0.6 ug/L, LOQ 1.7 ug/L로 광어에서의 최저정량한계(LOD, 2 ug/L)를 만족

마. 농축수산물 식품에 대한 개발된 위해화학물질 검출시스템의 현장 적용성을 확인

(1) Indirect competitive assay-based aptasensor의 현장 적용성

(가) 우유에서 tetracyclines에 대한 검출시스템의 현장 적용성을 확인

(나) 닭고기에서 enrofloxacin와 ciprofloxacin에 대한 검출시스템의 현장 적용성을 확인

(2) 자성나노입자 기반 바이오센서의 현장 적용성

(가) 돼지고기에서 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfaclozine sodium에 대한 검출시스템의 현장 적용성을 확인

(나) 광어에서 malachite green에 대한 검출시스템의 현장 적용성을 확인

바. 현장 적용 가능한 위해화학물질 검출시스템의 프로토콜을 제작(총 4건)

(1) Indirect competitive assay-based aptasensor를 이용한 위해물질 검출시스템

(가) 우유에서 tetracyclines의 검출에 대한 표준매뉴얼 작성

(나) 닭고기에서 enrofloxacin와 ciprofloxacin의 검출에 대한 표준매뉴얼 작성

(2) 자성나노입자 기반 바이오센서를 이용한 위해물질 검출시스템

(가) 돼지고기에서 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfaclozine sodium의 검출시스템에 대한 표준매뉴얼 작성

(나) 광어에서 malachite green의 검출시스템에 대한 표준매뉴얼 작성

2. 자성나노복합체를 활용한 위해화학물질 신속 다중 바이오센싱 시스템 개발[제1협동기관 (주) 중검]

가. 주요 위해 화학물질에 대한 단클론 항체 개발(shigatoxin, aflatoxin, sulfamethazine)

나. 나노 바이오 리셉터 및 디텍터 개발

(1) Streptavidin-GFP (RFP)

(2) 나노 항체 개발: anti-GFP, anti-M13 bacteriophage

(3) 나노항체-형광단백질(GFP, RFP) 복합체

다. 검출시스템에 적용할 복합체 구성성분 개발

(1) multi-protein G/A 개발, 재조합 multi-protein G 발현 및 정제조건 최적화

(2) 자성나노입자의 개발, 자성나노입자 성장 최적화 및 위해 화학물질-nano particle 복합체 완성

라. 위해화학물질 검출시스템 평가 및 구축

3. 현장 적용성 자동화 Magnetic bead Processor 및 Fluorescence Detector 개발[제2협동기관
(주) 비전과학서울]

- 가. 자성나노입자 기반 자동화 장비 기본 설계 및 형광 장비 개발 완료: 각각 1대씩 제작
- 나. 자동화장비 시제품 제작 및 평가를 수행: 기존 식품 전처리는 한 물질에 대해 최소 4시간 이상의 시간이 소요됨. 그러나 본 장비는 6개의 물질을 동시에 처리할 수 있으며, 2시간이내에 전처리가 가능함
- 다. 자동화 장비 현장평가와 사용자 중심의 시제품 제작완료

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 특허(총9건 출원)

- 가. 바이ורי셉터(압타머와 단클론 항체)에 대한 특허 출원 6건
- 나. 바이오디렉터(단일 도메인 항체)에 대한 특허 출원 2건
- 다. 자성나노입자를 이용한 자동 분리 농축 처리장치에 대한 특허 출원 1건

2. 논문(총2편 출판 완료, 5편 출판 예정)

- 가. 비SCI 1편 출판
- 나. SCI 5편 출판 예정(SCI 1편: Accept, SCI 2편: Under review, SCI 2편: submitted)

3. 성과활용 계획

- 가. 위해화학물질 검출 바이오마커, 신속진단키트 및 자동화장비의 분야별 상품화
- 나. 다른 연구자들의 연구결과물의 적용성 확보를 통한 활용도 제고 및 국내·외 시장 확대
- 다. 농축수산물 생산/유통 단계별 효율적 위해요소 중점관리체계 구축

SUMMARY

1. Development of bio-marker for detection of hazardous chemicals in agricultural, livestock or fishery products by hoseo university team

Antibiotics are widely used to prevent bacterial infections in livestock and increase their growth rate. Abuse of antibiotics in farm animals can cause accumulation of antibiotics in food products, including meat, milk and chicken eggs. Ultimately, this accumulation is likely to have serious implications for human health. In particular, the antibiotic residues in milk can trigger the emergence of antibiotic-resistant bacteria. Hence, many countries have set maximum residue limits (MRLs) for many food products, and extensive efforts have been made to develop sensing system for the detection of antibiotics in contaminated food products.

Traditionally, the chromatography methods including high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) have been utilized for detection of antibiotics in this field. Although these methods provide simultaneous and accurate detection of antibiotics, they demand expensive equipment, tedious sample extraction procedures, and expert techniques. Also, immunochemical methods by antibody have been using due to simplicity and effectiveness of cost in their detection procedure with high sensitivity and specificity, but an antibody as probes for the detection has drawbacks in stability and production.

Aptamers are short single-stranded oligonucleotides that show high affinity binding and high-specificity target recognition because of their 3-dimensional structure. They have a number of advantages over antibodies as they can in principle be raised against any type of target, including toxic compounds or poor immunogenic targets. Moreover, aptamers are smaller than antibodies, can be reproducibly synthesized, and very stabilized. In addition, a variety of derivatives such as labeled molecules can be conveniently attached at the 3' or 5' end of an aptamer without affecting the target-binding site. In recent years, many biosensors using ssDNA aptamers selected by the Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) process have been reported for various small molecular targets. Aptamers for several antibiotics belonging to the tetracycline (TC) class have been used for the development of biosensors for the detection of TCs in many food products from animals. From among these, electrochemical aptasensor presented a lower limit of detection (LOD, 1 ng/mL) and short detection time. However, this sensing system is required a special instrument for signal detection, and the immobilization procedure of the aptamers on an electrodes is still time consuming. The other aptasensor, colorimetric aptasensor was suggested as a type of on-site detection system due to simple operation and easy detection of signal with naked eye. Even if the aptasensor has convenience with high specificity and sensitivity, it has not yet been applied to the detection of OTC in real food samples. Also, an observed LOD (5 μ M) by naked eyes was very higher than the

LOD (25 nM) by UV/vis spectrophotometer analysis for oxytetracycline detection.

In this study, we report an indirect competitive enzyme-linked aptamer assay using a biotin-labeled aptamer for the detection of antibiotics in food samples. With high sensitivity and specificity, the selected aptamer and the established method will provide a simple screening tool for on-site monitoring of level of antibiotics in agricultural, livestock or fishery products.

2. Development of rapid multi-detection system for hazardous chemicals using magnetic nanocomposites by joongkyeom, Inc.

A. Contents and scope of R & D

- a. Development of specific bio-receptors and bio-detectors for the detection of harmful chemicals derived from the agriculture/livestock/fishery products
- b. Development of detection system that combines bio-receptors (BT-chemical specificity), magnetic nanoparticles (NT-sensitivity to chemicals), and automation equipment (IT-ease of use) technology
- c. Development of systemic management manual for control harmful chemicals in production and distribution process

B. Results

- a. Development of monoclonal antibodies for major harmful chemicals (shigatoxin, aflatoxin, sulfamethazine)
- b. Development of bio-receptors and bio-detectors: Streptavidin-GFP (RFP), Nanobody: anti-GFP, anti-M13 bacteriophage, Nanobody-fluorescence protein complex
- c. Development of complex components to apply detection system: Development of multi-protein G/A, optimizing expression and purification conditions of recombinant multi-protein G, the development of magnetic nanoparticles, magnetic nanoparticles optimization, and chemical-nano particle complex
- d. Evaluation and setting of the detection system for major harmful chemicals

C. Plans to take advantage of research results and achievement

- a. Domestic and international patents: application and registration domestic/international patents of developing bio-receptors and bio-detectors
- b. Activation of related research on nanobiosensor complex using magnetic nanoparticles
- c. Establishment of effective control system for harmful chemicals in agriculture, livestock and fishery products

3. Development of magnetic bead processor for automation field applicability and fluorescence detector by vision scientific seoul, Inc.

A. Design of magnetic nanoparticle-based automation equipment

B. Prototyping production and assessment of automation equipment

C. Evaluation of automation equipment in on-site, and user centered prototyping production

CONTENTS

Chapter 1	Introduction	
Section 1	The Purpose for Research and Development	11
Section 2	The Need for Research and Development	11
Chapter 2	Technology Development Status	
Section 1	Technology Development Status	13
1.	Domestic production and market status	13
2.	Foreign production and market status	14
Section 2	Distinction between Different Technologies	14
1.	Industrialization of Kits	14
2.	Industrialization of Automation Equipment	15
Chapter 3	Research and Result	
Section 1	Research and Result	17
Chapter 4	The Achievements and Contributions	
Section 1	The Level of Achievements	254
Section 2	Contributions	257
Chapter 5	Products and Application Plans	
Section 1	Products	258
1.	Paper	258
2.	Patent	259
Section 2	Application Plans	260
1.	Patent	260
2.	Research Article	260
3.	Commercialization of biomarkers, rapid diagnostic kits and automated equipment	260
4.	Utilization improvement and expand of domestic and foreign markets	260
5.	Produce of agricultural products, livestock and marine products/Build effective HACCP for distribution stage	260
Chapter 6	International Scientific and Technical Information	
Section 1	Aptamer-based biosensor	261
Section 2	Monoclonal antibody-based biosensor	261
Chapter 7	Research Facilities and Equipment Status	262
Chapter 8	Reference	263

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	
제 1 절	연구개발의 최종목표	11
제 2 절	연구개발의 필요성	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황	
제 1 절	국내외 기술개발 현황	13
1.	국내 제품생산 및 시장 현황	13
2.	국외 제품생산 및 시장 현황	14
제 2 절	개발 핵심 기술의 국내외 기술과의 차별성	14
1.	검출키트의 산업화	14
2.	자동화 장비의 산업화	15
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	
제 1 절	연구개발수행 내용 및 결과	17
1.	세부연구 호서대학교 산학협력단	17
2.	제1협동연구 (주) 중검	122
3.	제2협동연구 (주) 비전과학서울	228
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	
제 1 절	연구개발목표의 달성도	254
1.	세부연구 호서대학교 산학협력단	254
2.	제1협동연구 (주) 중검	255
3.	제2협동연구 (주) 비전과학서울	256
제 2 절	관련분야에서의 기여도	257
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	
제 1 절	연구 개발 성과	258
1.	논문게재 성과	258
2.	특허 성과	259
제 2 절	성과활용 계획	260
1.	국내외 특허 확보	260
2.	국내외 논문 게재	260
3.	위해화학물질 검출 바이오마커, 신속진단키트 및 자동화장비의 분야별 상품화	260
4.	다른 연구자들의 연구결과물의 적용성 확보를 통한 활용도 제고 및 국내·외 시장 확대	260
5.	농축수산물 생산/유통 단계별 효율적 위해요소 중점관리체계 구축	260

제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	
제 1 절	압타머 기반 바이오센서	261
제 2 절	단클론 항체 기반 바이오센서	261
제 7 장	연구시설·장비 현황	262
제 8 장	참고문헌	263

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 최종 목표

본 사업의 최종목표는 농축수산물 및 가공식품에 잔류하는 여러 위해화학물질들을 신속하고 정확하게 검사할 수 있는 검사시스템의 개발에 있다. 최근 들어 더욱 다양한 위해화학물질들이 우리의 먹거리를 위협하고 있다. 이를 방지하고 바른 먹거리를 통해 우리사회와 인류의 건강에 기여하고자 호서대학교 연구진은 (주) 중검과 (주) 비전과학서울과 협동하여 농축수산물에 잔류된 여러 위해화학물질들을 동시에 검출 할 수 있는 현장 적용성을 가진 검출시스템의 개발을 목표로 다음의 사항들을 연구개발의 최종목표로 삼았다.

1. 한국인 건강을 위협하는 농·축·수산식품 유래 고독성 다노출 화학적 위해화학물질 조사·위험도 평가·리스트화
2. 농·축·수산식품 유래 위해화학물질(발암물질, 항생제 등)에 대한 물질별 계열별 고감도 바이오나노센서 개발
3. 바이오나노센서(BT·IT·NT 첨단 융복합기술)를 이용한 식품전처리 기술 및 위해화학물질의 신속 분리·정제·신호증폭기술 개발
4. 위해화학물질에 대한 고감도 신속 동시검출 바이오 나노센싱시스템 개발
5. 농·축·수산식품의 위해화학물질 바이오나노센서-장비 시제품 제작, 메뉴얼 개발 및 현장 적용성 구현

제 2 절 연구개발의 필요성

축산용으로 사용되는 항생물질은 2003년을 기준으로 세계적으로 200,000톤 정도인 것으로 알려져 있으며, 국내에서는 2002년부터 2006년까지 축산용 항생물질 사용량이 연간 평균 1,400톤에 달하는 것으로 보고되었다. 국내의 용도별 축산 항생제 사용량은 2006년 기준으로 배합사료 제조용 43%, 자가치료 예방용 51%로 이는 전체의 94%에 달하며 수의사 처방용은 6% 수준에 머물러 진료 또는 처방이 없이 무분별하게 사용되는 양이 매우 많은 것으로 조사되었다. 특히 국내 항생물질 중 tetracycline 계열의 종류별 사용량은 2004년 이후에 연간 600~700톤으로 전체사용량의 40~50% 정도를 차지할 정도로 많이 사용되고 있다. 그 밖의 다른 항생제들도 사용량이 점차 늘어가는 추세에 있다. 수의사 처방에 의해서만 항생제 사용이 가능한 일본, EU, 등과 달리 현재 우리나라는 축산농가에서 항생제를 쉽게 구입할 수 있어 항생제의 오남용을 할 수 있는 가능성이 많다. 그로인해 국내 가축과 그 가공품에서의 항생제 검출이 늘어나고 있으며 그에 따는 문제점들이 지속적으로 나타나고 있기 때문에 항생제의 오남용을 방지하기 위한 대책마련이 매우 시급한 상태다.

현재 세계적으로 농축수산물에 대한 항생제의 무분별한 사용이 늘어나고 있으며 이로 인해 항생제 내성이 강한 내성균의 발생 빈도가 증가하고 있다. 우리나라에서도 항생제 잔류 허용기준을 초과한 육류를 지속적으로 섭취하게 되면 인체에 약물 저항성이 증가된 내성균이 출현

하게 되고 이 때문에 질병치료가 제대로 되지 않는 등 부작용이 발생할 수 있다고 한국소비자 보호원에서 지적한 바 있다(연합뉴스 2006. 8). 최근에 이러한 현상은 더욱 많은 농축수산물 및 가공품에서 발생하고 있으며 우리의 건강은 치명적인 위협아래 노출되어 있다.

우리나라와 많은 나라들이 항생제 남용과 그로 인해 발생하는 많은 위험요소들을 미연에 방지하고자 항생제를 비롯한 여러 위해화학물질들에 대한 최대잔류허용기준을 농축수산물에 정하고 있으며 이를 철저히 감시하고 있다. 특히, FTA와 각종 수입 자유화로 인해 국내의 수입 농축산물의 종류가 날로 증가하고 있고 그 양도 해마다 늘어나고 있는 현 상황에서 위해화학물질의 감시는 우리 국민의 건강한 삶의 질과 연결된다. 그러기 때문에 위해화학물질들에 대한 검사시스템의 개발은 우리의 삶과 직접적으로 연결되어 있는 중요한 수단이며 목적이다.

전통적으로 기존의 잔류항생제 검출방법은 잔류 항생제가 녹아있는 성분에 따라 각기 다른 시험용액을 조제하여 잔류항생제를 추출, 정제하여 액체크로마토그래피로 정량하는 방법이었다. 검출물에 대한 높은 검출감도와 함께 특이성을 가지고 있으나 검사방법의 복잡성, 분석장비의 비효율성과 비경제성, 그리고 전문인력의 필요성 때문에 신속성과 편리성이 떨어지는 단점을 가지고 있다. 이에 본 연구진은 현장에서 농축수산물에 잔류되어 있는 위해화학물질들을 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 검사시스템을 개발하였다. 본 연구를 통해 개발된 검출시스템은 농축수산물에 잔류된 위해화학물질들의 분석을 쉽게 진행할 수 있는 방법을 제시 할 것이며 나아가 국민의 건강을 보호할 수 있는 기초를 제공할 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

자성나노입자 및 multi-protein G 또는 A, 그리고 바이오마커의 삼중합체를 이용한 특이적 위해화학물질 검출 기술은 국내에서 개발된 바가 없어서 현재 국내시장 형성이 되어 있지 않아 제품 생산 및 시장의 현황을 제기할 수가 없다.

또한, HPLC, GC, GC-mass 등 기존 검출방법에 사용되는 장비들 모두 국내에서의 생산은 거의 무시할 정도의 미미한 수준이고 전량 선진 외국에서 수입하여 사용하고 있는 실정이다.

한국 무역협회에서 매년 발표하는 이와 관련된 장비와 관련 소모품의 수입량은 아래 보는 바와 같이 매년 증가하고 있는 실정이다. 급기야 최근에는 연간 1천 억원을 상회하고 있다. 물론 이들 장비와 소모품이 식품과 관련된 유해물질 분석 분야에만 사용되지는 않을 것으로 추정되지만 그럼에도 불구하고 식품안전에 대한 국민들의 불신이 줄고 있지는 않다. 실제 이들 제품들의 수입이 현재보다 훨씬 더 증가할 추세인 것만은 분명하나 본 과제의 결과물들이 이들 제품들과 상호 연동되어 비용 감소, 인력 수요 감소, 그리고 신뢰도 증가라는 일련의 효과를 거둘 수 있을 것으로 판단된다.

년도	금액	증감 (%)	원화	년도	금액	증감 (%)	원화
1978	\$976,156	-	1,122,579,400	1994	\$42,373,685	18	48,729,737,750
1979	\$2,414,573	147	2,776,758,950	1995	\$53,650,749	27	61,698,361,350
1980	\$1,664,388	-31	1,914,046,200	1996	\$73,017,431	36	83,970,045,650
1981	\$1,860,866	12	2,139,995,900	1997	\$60,266,961	-18	69,307,005,150
1982	\$3,052,344	64	3,510,195,600	1998	\$27,332,949	-55	31,432,891,350
1983	\$3,694,862	21	4,249,091,300	1999	\$30,610,121	12	35,201,639,150
1984	\$5,012,372	36	5,764,227,800	2000	\$46,749,742	53	53,762,203,300
1985	\$5,825,388	16	6,699,138,700	2001	\$47,171,740	1	54,247,501,000
1986	\$7,916,035	36	9,103,440,250	2002	\$48,898,506	4	56,233,281,900
1987	\$12,173,625	54	13,999,668,750	2003	\$52,329,226	7	60,178,609,900
1988	\$16,488,839	36	18,962,164,850	2004	\$59,133,994	13	68,004,093,100
1989	\$25,051,585	52	28,809,322,750	2005	\$76,204,674	29	87,635,375,100
1990	\$27,404,898	9	31,515,632,700	2006	\$80,727,199	6	92,836,278,850
1991	\$39,238,560	43	45,124,344,000	2007	\$91,276,225	13	104,967,658,750
1992	\$36,655,401	-7	42,153,711,150	2008	\$90,060,667	-1	103,569,767,050
1993	\$36,014,641	-2	41,416,837,150	2009	\$78,443,640	-13	90,210,186,000

참고자료: 유해물질 분석 및 검출 관련 장비 및 소모품 수입 추이(한국무역협회, 2009)

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

국내의 경우와 마찬가지로 자성나노입자 및 multi-protein G 또는 A, 그리고 바이오마커의 삼중합체를 이용한 특이적 위해화학물질 검출 기술은 국내에서 개발된 바가 없어서 현재 세계 시장 형성이 되어 있지 않아 제품 생산 및 시장의 현황을 제기할 수가 없다. 다만 앞서 언급한 바와 같이 기존 검사방법과 관련된 제품들의 국내 시장만 1천 억원을 상회하고 있고, 가까운 일본만 하더라도 우리나라보다 14배의 시장을 형성하고 있는 것으로 추정된다. 따라서 본 과제를 통한 결과물들의 해외 시장 확보도 어렵지 않을 것으로 판단한다.

제 2 절 개발 핵심 기술의 국내외 기술과의 차별성

1. 검출키트의 산업화

가. 자성나노입자-multi protein G

기존에 개발된 protein G-자성나노입자 복합체는 monomer protein G만을 기반으로 한 것으로서 단위 나노입자 당 결합시킬 수 있는 항체의 양이 제한적인 문제가 있다. protein G는 한 분자 당 두 분자의 항체를 결합시킬 수 있으므로 dimer, trimer, tetramer 등으로 확장될 때마다 2배씩의 항체 결합력이 커지기 때문에 소량의 자성나노입자만으로도 충분한 양의 항체 결합력을 확보할 수 있어 검출키트 중 자성나노입자의 소모량을 줄임으로써 경제성 및 분석 과정의 간편함을 추가로 확보할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 항체를 직접 나노입자에 결합시키려면 각각의 항체를 순수 분리 정제하여야 할 뿐만 아니라 결합 시에도 항체의 constant region이 아닌 variable region이 붙을 수 있어 항체의 기능성을 약화시킬 수 있다는 점도 간과할 수 없다. 따라서 항체의 정제비용을 감소시켜 역시 경제성 확보에 획기적으로 기여할 것으로 기대된다. 그리고 다른 연구자들의 결과물 즉, 본 과제를 통해서 개발된 바이오 마커 이외의 새로운 바이오 마커를 본 검출시스템에 적용할 경우에도, 사용자가 직접 제작하였거나 획득한 항체를 손쉽게 결합시킬 수 있음으로 해서 사용의 호환성 및 적용성의 극대화를 통한 시장성 확대가 기대된다. 항체의 경우 제작된 실험동물의 종류에 따라 protein G 혹은 protein A에 편향적으로 잘 결합하는 특성을 보인다. 따라서 본 연구과제에서는 multi-protein G 뿐만 아니라 multi-protein A를 제작하여 다양한 항체에 대한 대응력을 확보하였으며, 앞으로 multi-protein G & A heteromer들의 제작 및 생산을 아울러 진행함으로써 국내 및 국외에서 광범위하게 개발 생산되고 있는 항체들에 대한 본 시스템 적용성을 극대화할 계획이다. 이러한 장점은 국내외 시장의 확대뿐만 아니라 새로운 검출체계(다양한 항체들의 최적의 조합을 통한 다양한 특이도와 높은 민감도의 복합적 분석 가능 tool 제공)의 발전에 상당히 기여할 것이다.

나. 특이적 바이오 마커(압타머, 단클론 항체)

각각의 위해화학물질에 대한 압타머와 단클론 항체들을 각기 별도 제품화하여 사용자의 선택의 폭을 넓힘으로써 농산물, 축산물, 그리고 수산물 등 각 분야별 분석 수요자의 요구에 능동적으로 대응할 수 있을 것으로 기대된다.

압타머는 크기가 작은 올리고뉴클레오타이드로서 표적물질에 특이적으로 결합할 수 있는 능력이 있다. SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 기술이 소개

된 이후로 압타머의 개발은 더욱 가속화 되었고 많은 압타머들이 단백질과 같은 고분자에서부터 저분자 화학물질까지 그 표적대상물질의 폭을 넓혀가고 있다. 최근 저분자를 표적대상으로 하여 새로운 SELEX 기술들이 개발되면서 다양한 표적분자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 압타머는 화학적 대량생산이 가능하고 인체에 대한 면역반응이 없으며, 여러 가지 형태로 변형이 가능한 장점과 더불어 매우 안정하다. 이로 인해 과거 진단 및 치료에 사용되던 항체의 수요가 현재는 압타머와 같은 저분자 고효율 물질로 대체되어가고 있는 실정이다.

단클론 항체의 검체에 대한 높은 특이성고 민감도는 이 연구과제를 통해 다시 한 번 확인하였으며, 개발된 단클론 항체를 통해 신속하고 경제적인 검사키트가 생산될 것이다. 해외시장 확보 통한 경제적 효과가 기대된다.

다. Streptavidin-multi fluorescence

앞서 Detector 개발에서 기술하였듯이 표적물질의 검출 및 정량화에 있어 형광의 발광 정도를 전기적 신호로 전환하는 기술의 개발이 매우 효과적이라고 판단하였다. 현재까지 세계적으로 streptavidin과 GFP의 fusion protein은 다수 개발된 바 있으나, GFP의 multimerization이 수행된 바는 없다. 한 분자의 biotin과 streptavidin의 결합 시에 다수의 GFP가 관여될 수 있도록 함으로써 역시 상당한 민감도의 향상을 기대한다. 물론 RFP가 화학적, 물리적 안정성에 있어서 GFP에 비하여 우수한 것으로 보고되고 있어 최종 사용자의 선택성 확보 차원에서도 바람직하며, 좀 더 우수한 detector의 개발에 있어서도 큰 의미가 있다고 판단된다. 뿐만 아니라 shiga toxin의 검출에 있어서 앞서 논의한 바와 같이, shiga toxin I과 II가 각기 한 가지씩 혹은 두 가지 동시에 검출될 수 있기 때문에 이러한 경우 dual detection이 필수적일 것으로 판단된다. excitation 파장 및 emission 파장이 두 가지 detector에서 서로 상이하기 때문이며, 향후 최종 사용자 혹은 타 연구자들에 의해 dual detection의 필요성이 생길 경우에도 충분한 대응성이 확보될 것으로 기대한다.

2. 자동화 장비의 산업화

가. Magnetic bead Processor



상기 장비는 본사 연구소에서 선진국의 장비를 분석하여 거의 동일한 버전의 장비를 제작한 것이다. 자성나노입자를 생명공학관련 연구 및 분석 등에 활용할 수 있는 장비는 선진국을 중심으로 외국 관련 업체들에서 최근 5년 동안 활발히 개발하여 시판하고 있다. 그러나 이러한 장비들을 실제 확보하여 그 기본 사양 및 활용 분야에 대한 관련 조사를 진행한 결과, 대부분

이 DNA와 RNA 같은 유전자의 순수 분리 및 정제를 수행하여 유전자의 클로닝이나 사람 혹은 동물들의 질환 진단 분야에 있어서의 효율성을 높이고자 하는 것으로 구성되어 있는 것으로 분석되었다. 이러한 자성나노입자를 활용한 분야 외에 기존의 유전자 분리/정제 관련 소모품 내지는 장비에 있어서 활발한 개발 및 연구가 진행되어온 것은 사실이나 대개, 연구자의 손으로 일일이 이루어지던 실험의 전반적인 과정을 장비가 대신해주는 경우이며, 이 또한 resin 등의 column을 이용하는 것이 대부분이라, 과정이 복잡하고 자동화 장비를 사용함에도 시간의 소요가 많아 많은 검체의 분석이나 보다 신속한 유전자의 추출이 필요할 시에는 한계가 있어왔다. 그러나 자성나노입자 기반의 유전자 추출 관련 시약과 장비 시스템은 다수의 샘플을 신속히 추출할 뿐만 아니라 기존의 column 체계가 가지고 있는 세척기능을 수반하고 있어 stool 과 같은 초기 샘플에서 PCR 억제 성분의 세척도 가능하므로 장점이 있어 시장을 확대해 나가는 추세라고 분석된다. 따라서 연구 계획에서 기술한 대로 washing 과정 등의 일련의 반응과정이 자동화되고 검체 및 시료의 적용량에 있어서도 50mL cornical tube 등이 적용될 수 있게 되면, 기존의 유전자 분리 및 농축 관련 시장은 물론 보건복지 분야에 있어서의 대량의 환자 검체 처리 및 환경 오염물질 분석에 응용될 수도 있을 뿐만 아니라 본 연구의 목적인 농축수산물에서의 위해화학물질 분석 등 광범위한 시장을 확대할 수 있을 것으로 보인다. 또한 분야별 분석 대상이 되는 검체의 수와 volume 등이 매우 다양하여 이에 대한 융통성 있는 기능을 확보하는 것이 결국 시장성 확보의 관건이 될 것이라고 판단하였다. 따라서 제1협동과제 연구진들에 의해 개발된 관련 검출키트 및 소모품과 본 과제인 제2협동과제에서 개발되어야 하는 자동화장비의 연계성을 최대한 확보하면서 목표한 장비의 개발이 이루어진다면, 기존 관련 장비들과는 차별화된 시장 개척이 가능할 것으로 판단된다.

나. Fluorescence Detector

광범위하게 사용되어온 GFP detector에 비하여 RFP의 경우 기개발 되지 않아 detection probe에 대한 신규 개발이 필요할 뿐만 아니라, 하나의 장비에서도 서로 다른 파장대의 형광신호를 전기신호로 전환하는 장비의 개념적용이 필요하다. Probe의 경우 excitation 파장 및 emission 파장을 선택적으로 발산하고 인지하는 기능이 필요하기 때문에 이에 따른 선택적 필터의 적용으로 소귀의 목적을 달성할 것으로 판단되며, 이들을 소량의 용액 내에 적용하여 측정이 될 수 있도록 소형화하는 연구가 면밀히 진행되어야 할 것으로 생각된다. 현재 현장에서 적용될 수 있는 스크린용 정량장비는 개발되어 있지 않은 상황이며, 이에 따라 본 장비의 활용도 및 적용성은 신규 시장 개척이라 평가할 수 있을 만큼 클 것으로 추정된다. 앞서 언급된 바와 같이 GMO 식물체의 검출용 GFP detector의 경우, 현재 상용화되어 시판되고 있으며, 대개의 경우 800 유로 내외(한화 약 120만원)의 가격을 형성하고 있어 국내에서 자체 개발할 뿐만 아니라 두 가지 이상의 probe를 탑재하는 등의 향상된 버전을 갖게 하더라도 이보다 저비용의 장비 개발이 가능할 것으로 보이며, 이는 현장 적용성 및 시장 확대에 있어서 적절한 장점을 확보하게 되는 근거가 될 것으로 판단한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용 및 결과

1. 농축수산물 식품 내 위해화학물질 검출을 위한 바이오 마커 개발[세부연구 호서대학교 산학협력단]

가. 농축수산물별 화학적 위해요소 위해성 평가 및 검출대상물질의 선정

(1) 위해물질 위해성 평가·대상물질 선정을 위한 위험도 인자 결정

위해요소	위해성 결정인자	노출결정인자	직접 위해성 인자	참고인자
농약	독성, 발암성, 규제적 중요도 (사용금지 여부) , 작물 및 생체내 동태, ADI, TDI	잔류성, 식품소비량, 농약사용량 , 휴약기간	고도 민감군, 과거 잔류위반율 , 잔류허용기준	잔류정보 제한 정도, 독성정보 제한 정도
동물용의약품	독성, 내성유발성 , 생체내 동태, 발암성, 규제적 중요도, ADI	잔류성, 약품 사용량 , 축수산식품 소비량, 휴약기간	고도 민감군, 과거 잔류위반율 , 잔류허용기준	잔류정보 제한 정도, 독성정보 제한 정도
환경오염물질	독성, 발암성, 작물 및 생체내 동태, TDI	환경 중 노출량, 식품 중 함유량, 잔류성, 식품소비량, 식품 중 안정성, 환경 중 안정성, 위해량 초과 섭취율	고도 민감군, 과거 잔류위반율 , 잔류허용기준	잔류정보 제한정도, 독성정보 제한정도

(가) 농식품중 농약의 위험평가 및 바이오마커 개발 대상 농약 선정

① 국내 농산물중 농약 잔류현황 조사

순위 (부적합률)	품목명	부적합률 (2009)	검출횟수 (2009)	ADI (mg/kg bw/day)	국내 생산량 (2008)	출하량 (2008)	비고
1	Diniconazole	51.5	101	0.002	1,080	933	
2	Tebupirimfos	43.4	53	0.0002	—	—	
3	Ethoprophos/Ethoprop	34.1	88	0.0004	85,154	116,255	
4	Tebufos	20.5	44	0.0006	190,124	141,556	
5	EPN	19.4	237	0.0014	173,075	186,116	2011금지
6	Cadusafos	17.3	98	0.0003	—	—	
7	Diazinon	12.0	450	0.002	87,698	92,924	
8	Endosulfan(total)	11.1	2325	0.006	251,084	256,728	2011금지
9	Carbofuran	11.1	243	0.002	538,121	574,134	
10	Fludioxonil	11.1	171	0.4	—	—	
11	Metalaxyl	9.0	122	0.08	18,360	27,864	
12	Fenitrothion/MEP	8.4	356	0.005	252,379	237,254	
13	Tebufenozide	7.9	127	0.03	15,904	15,827	
14	Methidathion	7.7	261	0.001	120,705	133,452	
15	Flufenoxuron	7.5	332	0.02	3,637	3,577	
16	Diethofencarb	7.0	256	0.004	—	—	
17	Chlorpyrifos	6.8	1335	0.01	94,854	103,738	
18	Pyridalyl	6.8	251	0.028	—	—	
19	Phenothoate/PAP	6.6	167	0.003	—	—	
20	Carbendazim	6.5	2373	0.03	17,719	30,517	
21	Pyraclostrobin	6.4	516	0.034	—	—	
22	Triflumizole	6.2	161	0.005	—	—	
23	Iprodione	5.7	530	0.06	—	—	
24	Lufenuron	5.7	1009	0.02	—	—	
25	Fenarimol	5.6	126	0.01	1,599	2,231	
26	Fenpropathrin	5.1	196	0.03	—	—	
27	Pyridaben	4.9	453	0.005	—	—	
28	Thiacloprid	4.6	130	0.01	—	—	
29	Fluquinconazole	4.4	273	0.005	—	—	
30	Iprobenfos/IBP	4.3	232	0.003	—	—	

② 위험성에 근거한 사용금지 농약 조사

품목명	등록규격	상표명	용도	비고
디클로르보스 유제 (Dichlorofos)	50%	디디브이피, 스킨, 옥구슬	잎말이나방(과수 등)	2011년 재평가
메토밀 수화제 (Methomyl)	45%	메소밀, 란네이트, 작살탄	진딧물, 담배나방 (고추, 사과 등)	2011년 재평가
메토밀 액제 (Methomyl)	24.1%	메소밀, 란네이트, 작살탄	진딧물, 담배나방 (고추, 사과)	2011년 재평가
메티다티온 유제 (Methidathione)	40%	수프라사이드, 메치온, 명궁 등	진딧물, 나방 등 (감귤, 사과, 가지 등)	2011년 재평가
데메톤-에스-메틸 유제 (Methyl demeton)	25%	메타, 프리건 등	진딧물 (사과)	등록취소
메타미도포스 액제 (Methamidophos)	40%	일번지, 살충탄	배추흰나비 (배추)	등록취소
모노크로토포스 액제 (Monochrotophos)	24%	모노포, 독무대, 데킬라, 아조드린	진딧물, 나방, 솔잎혹파리 등 (감귤, 국화, 소나무 등)	2011년 재평가
벤퓨라카브 유제 (Benfuracarb)	30%	온쿨	진딧물 (감귤)	2011년 재평가
트리아조포스 유제 (Triazophos)	40%	호스타치온	응애, 깍지벌레 (감귤)	등록취소
오메토에이트 액제 (Omethoate)	50%	호리마트, 신무기	진딧물, 응애 (사과)	2011년 재평가
이피엔 유제 (EPN)	45%	이피엔, 무궁탄	진딧물, 나방 등 (사과, 배, 담배)	2011년 재평가
엔도설판 유제 (Endosulfan)	35%	지오릭스	담배나방 (담배)	2011년 재평가

③ 국내 농약의 생산량 및 출하량 조사

순위	품목명	2008 생산량 (kg)	2008 출하량 (kg)
1	만코제브	1,498,431	1,738,089
2	카보퓨란	538,121	574,134
3	포스파미돈	548,669	471,175
4	이프로벤보스	415,881	421,596
5	티오파네이트메틸	346,062	296,120
6	클로로탈로닐	325,956	370,363
7	디클로르보스	273,603	321,896
8	프로피네브	223,833	297,845
9	엔도설판	251,084	256,728
10	페노뷰카브	181,437	294,874
11	페니트로티온	213,448	197,821
12	베노밀	213,761	183,098
13	카답하이드로클로라이드	160,036	221,282
14	이피엔	173,075	186,116
15	터부포스	190,124	141,556
16	아이소프로티올레인	184,328	146,082
17	메티다티온	120,705	133,452
18	포레이트	121,473	121,024
19	트리사이클라졸	110,075	128,789
20	다조멧	68,590	169,481
21	페림존.트리사이클졸	117,235	104,313
22	뷰프로페진.페노뷰카브	120,490	94,535
23	카답하이드로클로라이드	87,694	113,421
24	에토프로포스	85,154	116,255
25	트리클로르폰	104,040	80,807
26	디티아논	95,625	84,755
27	만코제브.마이클로뷰타닐	90,892	84,686
28	사이퍼메트린	70,648	103,433
29	아세페이트	69,381	91,214
30	메토밀	71,222	88,396

(나) 축산물중 동물용의약품의 위험평가 및 바이오마커 개발 대상 동물용의약품 선정

① 국내 항생제 계열별 사용현황 조사

축산용으로 사용되는 항생물질은 2003년을 기준으로 세계적으로 200,000톤 정도인 것으

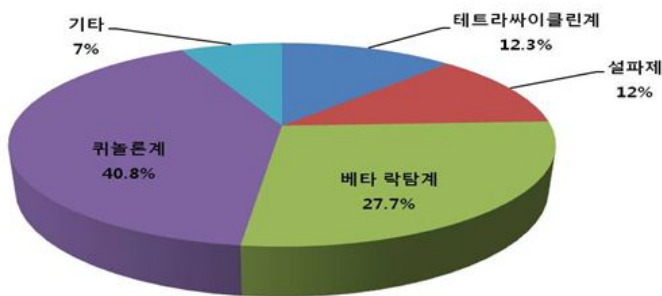
로 알려져 있으며, 국내에서는 2002년부터 2006년까지 축산용 항생물질 사용량이 연간 평균 1,400톤에 달하는 것으로 보고되었다. 국내의 용도별 축산 항생제 사용량은 2006년 기준으로 배합사료제조용 43%, 자가치료 예방용 51%로 이는 전체의 94%에 달하며 수의사 처방용은 6% 수준에 머물러 진료 또는 처방이 없이 무분별하게 사용되는 양이 매우 많은 것으로 조사되었다. 국내 항생물질의 종류별 사용량은 2004년 이후에 tetracycline 계열이 연간 600~700톤으로 전체사용량의 40~50% 정도를 차지하고 있으며 sulfonamide 및 penicillins 계열이 2006년도 기준으로 각각 184톤 및 225톤 사용되는 것으로 조사되었다.

<항생제 계열별 사용현황>

항생제 (계열)	연도별 항생제 사용량(Kg)				
	2009년	2008년	2007년	2006년	2005년
Tetracyclines	287,712	470,946	624,236	629,984	723,476
Penicillins	150,589	170,721	266,968	225,089	229,462
Polypeptides	96,532	43,581	38,889	35,198	34,133
Sulfonamides	92,122	157,455	183,209	184,259	200,010
Macrolides	88,124	68,556	75,342	74,486	55,325
Phenicols	54,543	35,892	34,367	28,268	24,918
Ionophores	51,366	46,947	58,744	51,192	63,056
Aminoglycosides	51,209	73,188	93,727	82,130	71,863
Quinolones	37,418	51,257	56,585	47,637	52,854
Pleuromutilins	35,025	20,015	21,195	22,648	18,170
Streptogramins	8,164	5,081	4,942	4,522	4,926
Lincosamides	5,674	12,048	16,373	18,084	14,433
Orthosomycins	5,566	5,203	5,429	4,660	4,039
Quinoxalines	4,601	18,008	13,070	9,987	15,592
Cephems	3,163	2,694	1,962	3,297	2,169
Glycolipid	2,469	1,971	2,341	2,407	2,980
Nitrofurans	0	0	0	0	0
Others	23,890	27,053	29,334	33,960	36,076
계	998,167	1,210,616	1,526,713	1,457,808	1,553,482

② 국내 축산물중 기준초과 항생제 계열별 분포율 조사

기준초과 항생제 계열분포율



항생물질별 위반현황



③ 국내 가축 축종별 항생제 내성 대장균 발생현황 조사 (%)

항생제	소		돼지		닭	
	2008 (n=125)	2009 (n=184)	2008 (n=116)	2009 (n=185)	2008 (n=106)	2009 (n=97)
테트라사이클린	44.0	44.0	87.9	85.4	86.8	86.6
클로람페니콜	13.6	18.0	75.0	60.0	31.1	16.5
플로르페니콜	6.4	14.0	69.0	41.1	23.6	2.1
트리메토프림 /설파메톡사졸	20.8	14.1	70.7	48.1	35.8	59.8
시프로플록사신	8.0	4.3	29.3	24.3	48.1	68.0
날리딕스산	22.4	8.2	61.2	43.2	79.2	86.6
암피실린	34.4	27.2	84.5	73.5	48.1	66.0
아목사실린 /클라벤닉산	0.8	0.5	1.7	2.7	1.9	3.1
스트렙토마이신	50.4	40.0	75.9	83.0	61.3	68.0
네오마이신	23.2	22.8	64.7	50.8	17.9	8.2
겐타마이신	4.0	3.8	30.2	26.0	9.4	13.4
세팔로틴	9.6	4.3	18.1	16.2	11.3	13.4
세파졸린	4.8	0.5	0.9	2.7	2.8	4.1
세프티오퍼	0.0	0.5	0.0	2.2	2.8	3.1
콜리스틴	2.4	0.5	0	2.2	0	0

④ 축산물중 동물용의약품 위험도 관여인자 등급화 및 위험도 산출

등급	위해성 직접인자		위해성 결정인자			노출도 결정인자			참고인자
	과거잔류 위반율	축산식품 섭취율 반영 위반율조정	독성 (ADI, mg/kg bw)	잔류허용 기준 이론치	내성유발 가능성	잔류성 (휴약기간)	약품 사용량	축산식품 섭취량	잔류검사정보 제한정도
5	1%~	0.15%~	금지 (완전발암)	불검출 (금지)	내성유발	30 일이상	10 % ~	과거잔류 위반율 조정시 반영	-
4	0.5~1	0.076~0.15	< 0.001	~9 ppb	인체장내 정상세균총 영향	15~29일	1~10 %		과거5년간 검사정보 부재
3	0.1~0.5	0.01~0.075	0.001~0.01	10~99	인체장내 정상세균총 의심	8~14일	0.1~1 %		과거3년간 검사정보 부재
2	0.01~0.1	0.001~0.01	0.01~0.1	100~999	과학적 자료 부재	1~7일	0.01~0.1 %		과거3년간 검사정보있으나 시료수 제한 (300시료 미만)
1	~0.01	~0.001	0.1 <	1000 ~	인체장내 정상세균총 영향없음	0일	~0.01 %		과거3년간 검사정보있으며 시료수 충분 (300시료 이상)
0	0 %	0 %	-	불필요	-	-	-	-	

위험도 = 직접 위해성 (과거 잔류위반율) 또는 추정 위해성
 \times (내성 유발성 + 3 \times 독성) / 4
 \times (1 + (정보 제한 정도 - 1) \times 0.06667)
 (Maximum: 30; Minimum: 0.75)
 추정 위해성 = (잔류허용기준 \times 3 + 휴약기간 \times 2 + 사용량) \times 0.16667

⑤ 축산물중 동물용의약품 위험도 순위 산출

물질 (245종)	직접위해성		위해성 결정인자			추정 위해성	위해 인자		잔류검사 정보 제한정도	위해도
	과거잔류 위반율	축산식품 섭취율 반영 위반율조정	MRL 이론치	휴약 기간	약품 사용량		내성유발 가능성	독성		
Malachite green	5	5	5	2	0<1>	3.33	2	5	2	22.67
Carbadox	0	0	5	5	0<1>	4.33	4	5	2	21.94
Hygromycin B	0	0	5	4	0<1>	3.83	4	5	3	20.61
Avoparcin	-	-	5	2	0<1>	3.17	5	5	4	19.02
Dimetridazole	-	-	5	5	0<1>	3.33	4	5	4	18.98
Chloramphenicol	2	2	5	2	2	3.50	5	5	2	18.67
Enrofloxacin	5	5	2	5	3	3.17	5	3	2	18.67
Metronidazole	-	-	5	3	0<1>	3.5	2	5	4	17.85
Nitrofurans	0	0	5	3	0<1>	3.5	4	5	2	17.73
Sulfathiazole	0	0	2	5	4	3.33	4	5	2	16.89
Olaquinox	0	0	3	4	0<1>	2.83	4	5	4	16.13
Sulfadimidine	5	3	2	4	2	2.67	4	2	<4>	15.00
Sulfamethoxypyridazine	5	5	2	4	2	2.67	4	2	2	13.33
Sulfadiazine	4	3	2	4	3	2.83	4	2	2	10.67
Sulfamerazine	4	5	4	4	2	3.67	4	2	2	10.67
Sulfamethazine	4	4	3	4	2	3.17	4	2	2	10.67
Sulfamethoxazole	4	3	2	4	3	2.83	4	2	2	10.67
Chlortetracycline	5	5	2	4	5	3.17	4	2	2	8.44
Oxytetracycline	3	3	2	4	5	3.17	4	2	2	8.44
Tetracycline	2	2	2	5	2	3	4	2	2	8.00

(다) 농식품 중 환경오염물질의 위험평가 및 바이오마커 개발 대상 환경오염물질 선정

① 환경오염물질의 위험도 관여인자 등급화 및 위험도 산출

등급	위해성 결정인자			노출도 결정인자			위해성 직접인자		참고인자	
	독성	MRL	노출위해성	축적계수	환경잔류성	전이율	위해량초과 섭취율	과거잔류 위반율	식품 섭취율 반영 위반율조정	잔류검사정보 제한정도
5	완전발암물질, 인체발암물질	MRL≤1 ppb	MOE < 10,000	-	-	> 100	MDI/TDI≥1	> 0.5%	> 0.08%	-
4	내분비계교란물질 또는 발암가능물질 또는 RfD (TDI): < 0.001 mg/kg	1<MRL≤10	10,000≤MOE<100,000	7<Log Ko/w	사료, 음용수 유래, 환경중 반감기: > 30 days	100 ~ 10	0.8≤MDI/TDI<1	0.25~0.5	0.035~0.08	과거5년간 검사정보 부재
3	유전독성물질 또는 RfD (TDI): 0.001~0.01	10<MRL≤50	100,000≤MOE<1,000,000	5<Log Ko/w≤7	비특이적환경유래, 환경중 반감기: 7-30 days	10 ~ 1	0.3≤MDI/TDI<0.8	0.07~0.24	0.003~0.034	과거3년간 검사정보 부재
2	RfD (TDI): 0.01~0.1	50<MRL≤100	1,000,000≤MOE	2<Log Ko/w≤5	제한된 오염지역 유래, 환경중 반감기: 1-7 days	1 ~ 0.01	0.1≤MDI/TDI<0.3	0.01~0.07	0.0004~0.003	과거3년간 검사정보있으나 시료수 제한 (300시료 미만)
1	RfD (TDI): > 0.1	100<MRL	-	Log Ko/w ≤2	환경중 반감기: <1 days	< 0.01	MDI/TDI<0.1	< 0.01	< 0.0004	과거3년간 검사정보있으며 시료수 충분 (300시료 이상)

위험도 = {직접 위해성 (과거 잔류 위반율×5.8) 또는 추정 위해성} + (노출위해성×2 + 독성×3)/2
x [1 + (정보 제한 정도 - 1) x 0.06667]
(Maximum: 47; Minimum: 9)
추정 위해성 = (잔류허용기준×3 + 위해량 초과 섭취율×2 + 생체 축적성)

② 환경오염물질의 위험도 순위 산출

물질 (29종)	직접 위해성	추정위해성				독성	노출 위해성	잔류검사 정보 제한정도	위해도
	과거잔류 위반율	MRL	위해량초과 섭취율	생체 축적성	추정 위해성				
Dioxins (PCDDs/PCDFs)	1 (국내 소, 돼지, 닭; 수입 닭) 3 (수입 소) 4 (수입 돼지)	5	4	4	27	5	5	2	40.33
Acrylamide	-	4	5	1	23	5	5	4	38.00
AFM1	-	5	5	1	26	4	4	3	37.33
AFB1, G1	-	3	5	1	20	5	5	3	34.17
Hexachlorobenzene	-	4	3	3	21	4	3	4	31.80
Phthaltes	-	3	5	2	21	4	3	4	31.80
PAHs	-	3	3	3	18	5	4	3	31.03
Vinyl chloride	-	4	1	1	15	5	5	4	30.00
As	-	3	3	1	16	5	4	4	29.80
Ochratoxin A	-	4	2	2	18	4	3	4	28.80
T2 toxin	-	4	2	2	18	3	3	4	27.00
Pb	-	3	3	1	16	4	3	3	26.20
DON	-	2	5	1	17	3	3	4	26.00
PBDEs	-	3	1	4	15	4	4	2	25.67
PCP	-	2	3	3	15	4	2	4	24.60
Acrylonitrile	-	3	1	1	12	4	3	4	22.80

(라) 농식품 중 화학적 위해요소 위험도 평가 결과에 따른 바이오마커 개발 대상 물질 최종 선정

물질	End point	NOAEL (mg/kg bw/day)	ADI (mg/kg bw/day)	MRL (mg/kg)		
Ethoprophos	Cholinesterase 활성 억제	0.04	0.0004	쌀, 메밀, 보리, 수수	0.005	
				감자, 마늘, 상추, 포도, 멜론 등	0.02	
Endosulfan	체중감소	0.6	0.006	메밀, 밤, 수수 등	0.05	
				가지, 고추, 수박, 마늘 등	0.01	
				말기 배추	0.2	
				포유류 고기, 유	0.1	
Tetracyclines	장내 미생물에 대한 항균작용	2	0.03	소, 돼지, 닭, 염소, 양, 사슴, 토끼, 칠면조	근육	0.2
					간	0.6
					신장	1.2
				어류, 전복, 갑각류	0.2	
				알	0.4	
				유	0.1	
				별꽃(OTC)	0.3	
Sulfonamides (14종)	갑상선세포세포 과증식	5	0.01 ~ 0.05	소, 돼지, 닭, 오리, 양, 말, 사슴, 칠면조, 토끼	간, 근육, 지방, 신장	0.1
				우유, 어류	0.1	
				알	불검출	

물질	End point	NOAEL (mg/kg bw/day)	ADI (mg/kg bw/day)	MRL (mg/kg)		
Enrofloxacin /ciprofloxacin	인체장내정상세균총 영향	0.000125	0.002	소, 돼지, 가금, 양, 염소, 토끼	근육	0.1
					간	0.2~0.3
					신장	0.2~0.3
					지방	0.1
				어류, 갑각류	0.1	
유	0.05					
알	불검출					
Chloramphenicol	혈액독성	75	설정 불가	불검출(가축 사용금지)		
Malachite green/ Leucomalachite green	갑상선세포세포 선종 또는 암종 유선 선종 또는 암종	7 6	설정불가	불검출 (식품 생산 동물, 식품 어류 사용금지)		
Ractopamine	급성 심장 반응	0.067	0.001	소, 돼지	근육	0.01
					지방	0.01
					간	0.04
					신장	0.09
Aflatoxin	간독성 간 암종	설정불가	설정불가	곡류, 두류, 땅콩, 견과류, 된장, 고추장, 고춧가루, 메주, 옥수수가공품	0.015	
Dioxins	발생독성	0.000016	4 pg-TEQ/kg/day	돼지고기	2.0pg/TEQ g/fat	
				닭고기	3.0 pg/TEQ g/fat	
				소고기	4.0 pg/TEQ g/fat	
Shiga toxin	용혈성 요독증후군 (Hemolytic uremic syndrome)	-	설정불가	불검출		

(마) 선정된 위해요소별 특성 및 위험성 조사

① Tetracyclines

㉞ 특성 및 용도

Tetracycline계 항생제는 미생물의 30S 리보솜에 작용하여 aminoacyl-tRNA의 결합을 차단하여 단백질 합성을 억제하는 광범위 항생제로 그람양성균, 그람음성균, Mycoplasma에도 작용하여 장내세균 감염증, 호흡기 질병, 아나플라즈마 감염증 등의 치료제 뿐만 아니라 각

중 질병을 예방하고 사료효율 개선을 목적으로 사료첨가제로 사용되고 있다. 2004년 이후 tetracycline 계열이 연간 600~700톤으로 전체 항생제 사용량의 40~50% 정도를 차지하고 있으며, chlortetracycline과 oxytetracycline이 가장 많이 사용되고 있다.

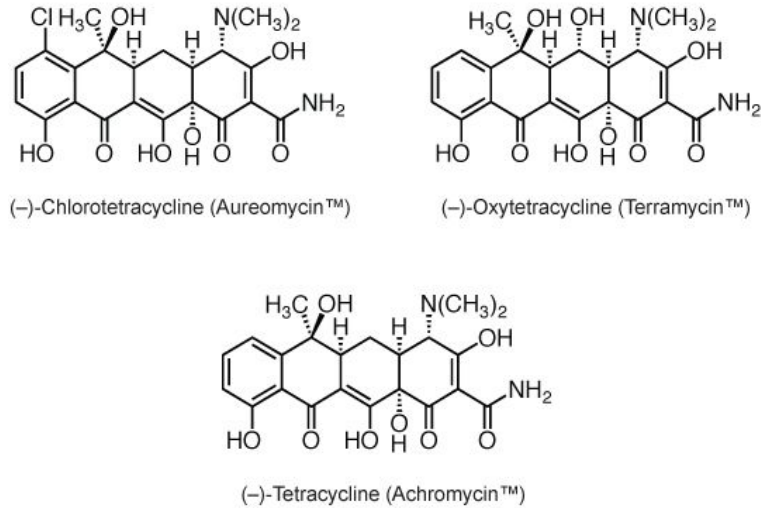


그림 1. Tetracyclines 화학구조식

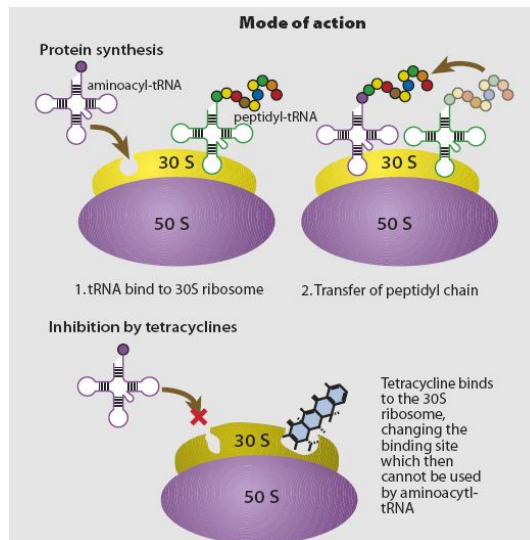


그림 2. Tetracyclines 작용기전

㉠ 체내 동태

Tetracycline과 oxytetracycline은 경구 투여 시 60~80%가 장관계를 통하여 흡수된 반면 chlortetracycline의 흡수율은 30%로 낮다. 이러한 낮은 흡수율 때문에, 장내 농도가 대체로 높게 나와 1일 치료 48시간 이내에 장내 미생물군을 교란시킨다. 다양한 적용경로를 통하여 흡수된 이들 항생제는 신장, 간에 높은 농도로 분포하며 간에서 소량 대사되거나 대사가 이루어지지 않고, 반감기는 8.5~9.5 시간이다. tetracycline과 oxytetracycline은 주로 소변으로 배출되며, chlortetracycline은 소변과 분변으로 배출된다. 소변이나 분변으로 배출시 활성형

이나 microbiologically inactive form으로 배설된다.

㉔ 독성

Tetracycline과 chlortetracyclined은 마우스와 랫드에서 LD₅₀ 2150 ~ >5000mg/kg bw 을 나타내어 독성이 매우 낮은 것으로 확인되었으며, 생식독성, 발생독성, 발암성, 유전독성에 대한 증거가 없다. 그러나 장기간 고용량 경구 투여 시 위장관 자극, 체중감소, 간세포 변성, 골수 세포 위축, 백혈구 감소 등의 독성 등을 유발 할 수 있다.

㉕ 일일섭취허용량 (Acceptable Daily Intake : ADI)

장내 미생물에 대한 항균 활성이 tetracycline 계 항생제의 ADI 결정에 가장 민감한 종말점으로, 이들 그룹의 ADI 0~0.003 mg/kg bw/day 은 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 클로로-테트라사이클린 각각에 대하여 혹은 그 유사한 항균활성으로 인해 조합하여 구축하였다. 이 ADI는 36차 회의에서 검토한 옥시-테트라사이클린의 인체 작용에 대한 연구에서 결정된 NOEL 1인당 1일 2 mg을 기준으로 하였다. 위원회는 개를 대상으로 한 클로로-테트라사이클린의 독성학적 작용에 대한 최저 NOEL 1일 100 mg/kg bw와 비교하였을 때 적절한 안전 허용범위라고 하였다.

ADI	한국	CODEX	미국	EU	일본
	30µg/kg bw	30µg/kg bw	25µg/kg bw	3µg/kg bw	-

㉖ 잔류 허용 기준(MRL) : Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline의 합

국가	대상 품목	MRL (mg/kg)	비고	
한국	소, 돼지, 닭, 염소, 양, 사슴, 토끼, 칠면조	근육	0.2	-
		간	0.6	-
		신장	1.2	-
	어류, 갑각류, 전복	0.2	-	
	알	0.4	-	
	유	0.1	-	
	벌꿀	0.3	Oxytetracycline	
CODEX	소, 돼지, 가금, 양	근육	0.2	-
		간	0.6	-
		신장	1.2	-
	어류, 대하 근육	0.2	Oxytetracycline	
	알	0.4	-	
우유(소, 양)	0.1	-		
미국	육우, non-lactating 젖소, 돼지, 양, 닭, 칠면조, 오리	근육	2	-
		간	6	-
		신장, 지방	12	-
	난류	0.4	-	

	유		0.3	-
EU	모든 식용 품종	근육	0.1	-
		간	0.3	-
		신장	0.6	-
	모든 식용 품종 난류		0.2	-
	모든 식용 품종 우유		0.1	-
일본	소, 돼지, 양, 닭, 오리, 칠면조	근육	0.2	-
		간	0.6	-
		신장	1.2	-
	소, 돼지, 닭, 양	지방	0.2	잠정
	소, 돼지, 닭, 양	식용부분	0.6	잠정
	기타 육류 포유류	근육	0.1	잠정
		간	0.3	잠정
		신장	0.6	잠정
		식용부분	0.3	잠정
		지방	0.3	잠정
	알		0.4	-
	유		0.1	-
	꿀		0.3	-

② Sulfonamides

㉠ 특성 및 용도

설펜아마이드(sulfonamide) 작용기를 가진 합성 살균제로, 세균의 핵산 합성에 필요한 엽산의 전구체인 PABA(para-aminobenzoic acid)와 구조적으로 유사하여 경쟁적으로 작용하여 세균의 엽산 합성을 차단하여 항균 효과를 나타낸다. 그람양성균(포도상구균·연쇄상구균·폐렴균 등)과 그람음성균(임균·수막염균·적리균 등) 및 일부 음성간균에 유효하다. 설펜아마이드계 동물용의약품은 주로 감수성세균에 의해 발병되는 유방성균증, 콕시듐증, 유방염, 자궁근층염, 대장균증, 다발관절염, 호흡기감염증 및 톡소플라스마증의 치료나 예방에 사용되고 있으며, 임상적 적용을 기준으로 하여 전신성 투여제, 비뇨기감염증치료제, 소장감염증치료제용, 디아미노피리미딘류와 배합된 복합제, 국소성 적용제의 5형으로 구분하기도 한다..

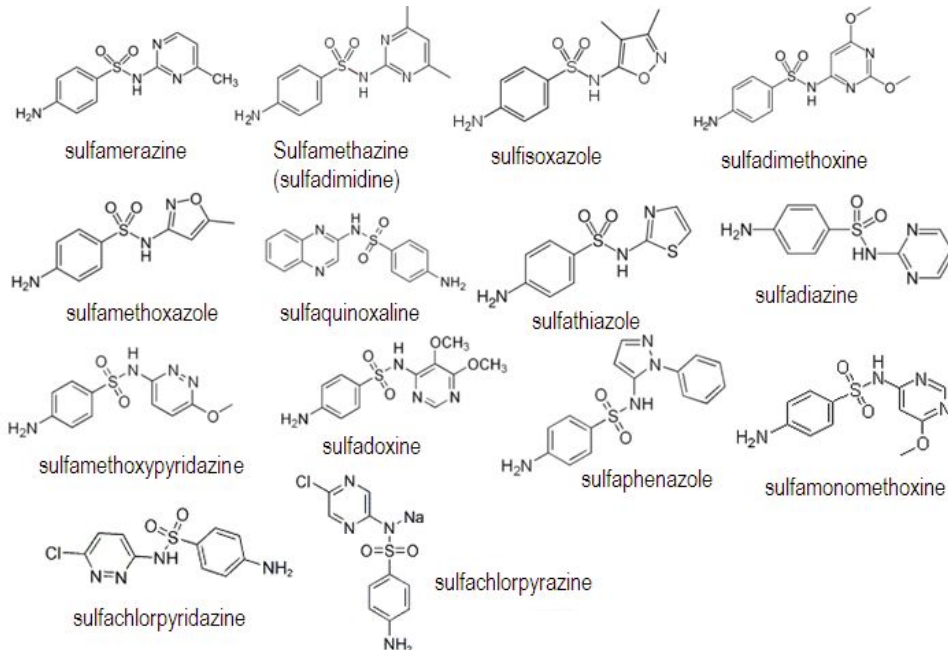


그림 3. 14종의 Sulfoamides 화학 구조식

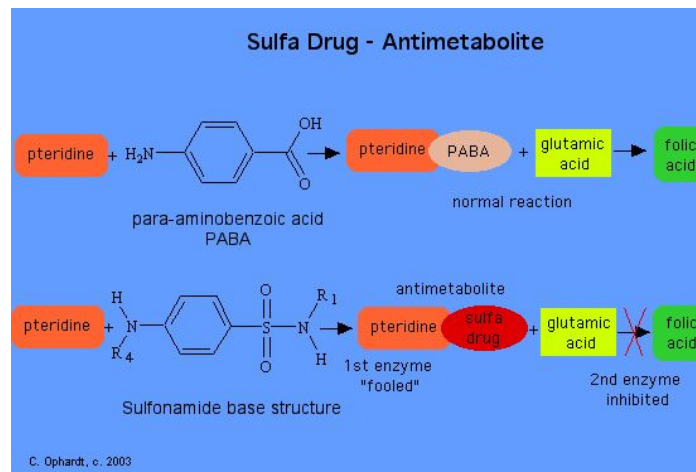


그림 4. Sulfonamides 작용기전

㉔ 체내 동태

Sulfamethoxyipyridazine와 같은 long-acting compounds을 제외한 대부분의 Sulfoamide 계 항생제들은 organic acid로 장관계를 통하여 흡수가 잘 이루어진다. sulfonamides는 뇌척수액, 관절의 활액, 뇨, 담즙, 우유 등을 통하여 전신에 분포한다. 그러나 각각의 sulfonamides의 분포 양상은 pKa 값, 이온화 정도, 적용부위의 혈관분포도, 지질성, 혈장단백질 결합력, 동물 종에 따라 달라진다. sulfonamides의 대사는 주로 간에서 이루어지지만 신장, 폐, 뇌, 부신, 혈액, 뉴런, 피부, 장관계 등 다른 장기에서도 대사가 이루어질 수 있다. 대부분의 설파제는 N4-acetylation에 의해 대사되며, N4-acetyl 대사체는 항균활성이 없으며, 혈장 단백질인 알부민에 잘 결합하고 용해도가 낮다. 또한 aromatic hydroxylation,

glucorconidation, O-dealkylation, deamination, sulfation 등에 의해 대사가 이루어진다. 대부분의 sulfonamides와 대사체들은 신장의 사구체여과를 통하여 배설된다. sulfonamides의 반감기는 동물 종과 사용하는 설파제의 종류에 따라 달라지는데, sulfadimethoxine의 반감기는 소에서 12.6h, 돼지에서 15.5h, 염소에서 8.6h인 반면 sulfamethazine은 소에서 8~11h, 돼지에서 9~16시간, 염소에서 3~8h, 닭에서 7~10h 이다.

㉔ 독성

일반적으로 sulfonamides는 부작용이 낮은 것으로 알려져 있으며, 인체에서 안전한 치료제로 오랫동안 사용되고 있다. sulfonamides의 급성독성 효과는 거의 보고되지 않고 있다. 쥐를 대상으로 한 최기성 시험에서 쥐들은 0, 540, 680, 860 mg/kg의 농도로 sulfadimidine을 경구 투여하였다. 그 결과 구개열과 내장의 기형이 고농도 그룹 2개에서 증가되었고, 여기서 결정된 NOEL은 1일 540 mg/kg bw이다. 토끼를 대상으로 한 유사한 실험에서 1,800 mg/kg bw까지의 농도로 인한 기형은 관찰되지 않았으나, 농도와 비례한 태아의 사망률 증가가 관찰되었다. 태아독성에 관한 NOEL은 1,200 mg/kg bw이다. 생체 실험과 시험관 연구 유전독성 시험결과는 전반적으로 음성이었다. 실험동물에서 sulfonamides의 독성의 가장 민감한 지표와 장기는 갑상선으로 지속적인 설파제 항생제 투여 시 갑상선여포세포의 과증식이 일어나 갑상선세포 선종이나 암종을 유발할수 있다. 쥐에게 sulfadimidine을 600 mg/kg bw으로 경구 투여했을 때, 갑상선 무게는 증가했고, 혈청의 갑상선 호르몬인 T3, T4, TSH의 농도가 증가하는 것이 관찰되었다. 이러한 변화들은 갑상선 난포 세포의 비대와 과 생성과 동시에 진행되었다. 이 연구에서 전체적인 NOEL은 1일 5 mg/kg bw이다. 돼지에게 sulfadimidine을 0, 5, 10, 20, 40 mg/kg bw의 농도로 포함한 먹이를 4주 동안 경구 투여했을 때, 비슷한 효과가 관찰되었고, 이 실험에서의 NOEL은 5 mg/kg bw이다. 원숭이에게 sulfadimidine을 0, 30, 100, 300 mg/kg bw으로 경구투여 하였을 때에는 갑상선 분비샘에 특별한 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 위원회는 갑상선 분비샘에 sulfadimidine이 미치는 독성 효과를 보여주는 적절하고 예민한 실험을 고려했을 때, sulfadimidine을 고농도로 섭취한 그룹에서 발생되었던 종양은, 비록 sulfadimidine이 직접적으로 TSH 농도를 증가시키지는 않았지만, sulfadimidine으로 인해 갑상선 호르몬 분비 자극이 증가되었기 때문이라고 보았다.

㉕ 일일섭취허용량 (Acceptable Daily Intake : ADI)

Sulfonamides	NOEL	safety factor	ADI
sulfamethazine	5 mg/kg bw/day (thyroid follicular cell hyperplasia)	100	0.05 mg/kg bw/day
sulfadiazine	37.5 mg/kg bw/day (foetotoxicity)	2000	0.02 mg/kg bw/day
sulfadoxine	50 mg/kg bw/day	1000	0.05 mg/kg bw/day
sulfaquinoxaline	1.0 mg/kg bw/day	100	0.01 mg/kg bw/day

㉞ 잔류허용기준(MRL)

Sulfonamides	대상 품목		MRL(mg/kg)				
			한국	CODEX	미국	EU	일본
sulfoanamides(14종) ^a	소, 돼지, 양, 염소, 가금, 말, 사슴, 토끼	근육	0.1	-	-	-	-
		간	0.1	-	-	-	-
		신장	0.1	-	-	-	-
		지방	0.1	-	-	-	-
	우유		0.1	-	-	-	-
	어류		0.1	-	-	-	-
	알		불검출	-	-	-	-
sulfadimethoxine	소, 가금, 연어유, 메기,		-	-	0.1	-	-
	우유		-	-	0.01	-	-
sulfamerazine	송어 가용부위		-	-	0	-	-
sulfamethazine (sulfadimidine)	식용동물	근육	-	0.1	-	-	-
		간	-	0.1	-	-	-
		신장	-	0.1	-	-	-
		지방	-	0.1	-	-	-
	소, 돼지, 닭, 칠면조 가용부위		-	-	0.1	-	-
	소, 돼지, 닭, 오리, 칠면조, 양, 말,	근육	-	-	-	-	0.1
		간	-	-	-	-	0.1
		지방	-	-	-	-	0.1
		신장	-	-	-	-	0.1
	가금 알		-	-	-	-	0.01
우유		-	0.025	0.025	-	0.025	
sulfamonomethoxine	소 근육		-	-	0.1	-	-
sulfaquinoxaline	송아지, 소, 닭, 칠면조 가용부위		-	-	0.1	-	-
sulfachloropyrazine	가금 근육		-	-	0	-	-
sulfachloropyridazine	송아지 돼지 가용 부위		-	-	0.1	-	-
sulfathiazole	돼지 가용부위		-	-	0.1	-	-

a : Sulfachlorpyridazine, Sulfadiazine, Sulfadimethoxine, Sulfamethoxypyridazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine(Sulfadimidine), Sulfamethoxazole, Sulfathiazole, Sulfamonomethoxine, Sulfaquinoxaline, Sulfadoxine, Sulfapenazole, Sulfisoxazole, Sulfaclozine(Sulfachlorpyrazine)의 14종의 총합

③ Chloramphenicol

㉞ 특성 및 용도

Chloramphenicol은 방선균인 Streptomyces venezuela가 생산하는 항생제로 50S 리보솜소단

위에 가역적으로 결합하여 aminoacyl tRNA의 아미노말단이 50S 리보솜 소단위의 수용체 부위와 결합하는 것을 방해하여 peptidyl transferase와 아미노산 기질간의 상호작용이 일어나지 못하게 하여 펩티드 결합 형성을 억제하여 세균의 단백질합성을 저해하며 항균활성을 나타낸다. chloramphenicol은 그람 음성균 및 그람 양성균, 박테리아, 리케치아, 클라미디아 및 Mycoplasm에 대하여 뛰어난 항균작용이 있으며, 특히 장티푸스 ·파라티푸스를 비롯하여 각종 세균 감염증 ·리케차증(털진드기病) ·바이러스 폐렴 ·트라코마 등에 널리 쓰인다. 사람에게서 재생불량성 빈혈, 골수암 등을 유발함이 보고되면서 식품생산동물에서 사용금지 물질로 관리되고 있다.

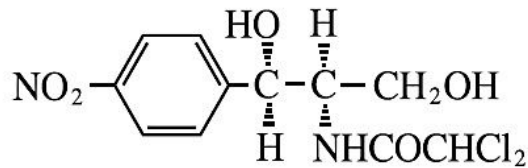


그림 5. Chloramphenicol 화학구조식

㉔ 체내 동태

클로람페니콜은 경구 투여 시 빠르게 흡수된다. 클로람페니콜은 투여방법에 따라 조직에서 농도가 달라지기는 하지만 투여 경로와 관계없이 심장, 간, 신장, 폐, 비장, 부신 피질, 췌장, 갑상선, 골 근육 등 광범위한 조직에 분포한다. 클로람페니콜 정맥 투여 후 이들 조직에서의 농도는 투여 후 8시간 동안 혈액보다 높게 유지되지만 골수에서의 클로람페니콜 농도는 혈청의 농도보다 낮게 분포하였다. 또한 클로람페니콜은 사람의 태반을 통과할 수 있어 태아에게 영향을 미칠 수 있는 가능성이 존재한다. 랫드에서 경구 투여 된 클로람페니콜은 간세포에 의해 유리 클로람페니콜과 글루코나이드 결합체로 대사되고, 개에서는 클로람페니콜, 클로람페니콜 염기와 클로람페니콜 글루코나이드 결합체로 대사된다. 염소와 돼지에서 클로람페니콜은 글루코나이드 결합체로 대사되지만 양과 소에서 글루쿠론산 전이활성(glucuronyl transfer activity)이 낮게 나타난 것으로 보아 이들 동물에서는 글루코니화가 덜 중요하게 작용함을 알 수 있다. 사람에게 경구 투여한 클로람페니콜의 93%가 24시간 이내에 소변으로 배설되며, 배출된 클로람페니콜의 약 48%가 글루코나이드 결합체이며, 단지 6%만이 모체화합물이다. 클로람페니콜과 간대사에 의해 형성된 불활성 글루코나이드 대사체들은 신장 사구체의 여과 및 분비를 통해 뇨로 배설된다. 또한 클로람페니콜의 적용경로에 따라 우유와 같은 체액으로 배설되기도 한다.

㉕ 독성

클로람페니콜은 원핵세포의 리보솜과 유사한 진핵세포의 미토콘드리아의 막 단백질 합성을 억제하여 미토콘드리아 기능을 저해하고 결국 세포증식을 중단시킨다. 이러한 유사한 기전으로 인해 가역적인 골수 기능 억제가 유발될 수 있다. in vitro에서 사람의 간에서 클로람페니콜의 환원에 의해 생성될 수 있고, 사람 골수세포에 독성이 있다고 알려진 니트로소-클로람페니콜은 재생불량성 빈혈에 관련이 있다. 니트로소-클로람페니콜은 in vivo에서 생쥐에 골수독성을 나타내지 않지만 in vitro에서 DNA 사슬 손상을 일으키고 DNA 합성을

억제한다. 클로람페니콜은 in vivo에서 생쥐의 골수세포 분열의 S-상을 감소시키고 개에서는 적혈구의 억압과 과립구의 비율감소를 유발한다.

- 유전독성물질: 인체섬유아세포 및 랫드 간장세포에서 DNA 손상유발
- 인체발암가능물질: Group2A (Probably Carcinogen in Human)
 - 사람에서 발암성에 대한 제한적인 증거 있음
 - 실험동물에서는 발암성에 대한 증거 불충분
- 인체에서 재생불량성 빈혈유발
 - 유전자 결손이 있는 환자에서 관찰 (발생율: 1/24,000-40,000명)
 - 재생불량성 빈혈 발생 후 일부환자에서 백혈병으로 진행

㉞ 일일섭취허용량 (Acceptable Daily Intake : ADI)

- 동물용 의약품 위해평가를 담당하는 국제기구인 JECFA에서는 62차 회의(2004년)에서 발암성과 생식독성을 평가할 수 있는 자료가 부족하고 각종 연구결과가 유전독성을 유발할 수 있다는 평가가 있어 최종적으로 일일섭취허용량(ADI) 설정 불가 물질로 평가하였다.
- CODEX에서는 FAO/WHO 합동 식품첨가물전문가위원회(JECFA)의 권고에 따라 일일섭취허용량 및 잔류허용기준 설정불가물질로 분류하고 있다.

㉟ 잔류허용기준(MRL)

- 클로람페니콜은 『동물용의약품등취급규칙(농림부령)』에 의거한 “안전성 및 유효성 문제 성분 함유제제 등에 관한 규정(국립수의과학검역원고시 제2007-7호, 2006.11.30)”에 등재된 동물용의약품으로는 사용 금지된 물질이다.
- 『동물용 의약품등의 취급규칙』에서의 사용금지 규정에 따라 식품공전에서 클로람페니콜은 식품 중 잔류되어서는 아니 되는 “불검출” 기준으로 관리하고 있다.
- 미국, EU, 호주, 일본 등 대부분의 국가에서 클로람페니콜은 가축에서의 사용을 금지하고 있으며 잔류허용기준도 “불검출” 기준으로 관리하고 있다.

국가	MRL (mg/kg)	정량한계 (LOQ, MRPL)	비고
한국	불검출	-	-
미국	불검출	0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	LC/MS/MS시험법
EU	불검출	0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 계란 우유, 뇨, 수산물, 벌꿀	LC/MS/MS시험법
일본	불검출	로얄제리 : 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 꿀, 기타 식품 : 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	LC/MS/MS시험법

④ Enrofloxacin

㉠ 특성 및 용도

플루오로퀴놀론계 항균제로서 주로 그람음성세균에 유효하다. 세균의 DNA-gyrase활성 억제에 의하여 DNA 합성차단 및 세균사멸 효과를 나타낸다. 소, 돼지, 가금, 토끼, 어류에서 소화기, 호흡기, 뇨도 감염증의 치료제로 사용되고 있으나, 미국에서는 2005년도부터 가금에서 내성 캄필로박터 발현으로 가금에서의 사용은 금지하고 있다.

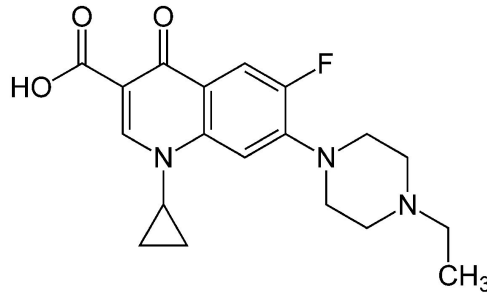


그림 6. Enrofloxacin 구조식

㉡ 체내 동태

Enrofloxacin은 경구 투여시 빠르게 흡수되고, 대부분의 enrofloxacin과 그 대사물질인 ciprofloxacin는 담즙과 뇨를 통하여 빠르게 배출된다. 식품생산 동물에서 Ciprofloxacin는 enrofloxacin의 대사물질로 조직 및 배설물에서 검출된다. 또한 ciprofloxacin은 사람에게 경구 투여시 십이지장과 공장을 통하여 빠르게 흡수되어 투여후 1~2시간에 혈장에서 최고 농도에 도달하고, 반감기는 3.5~4.5 시간이다. ciprofloxacin을 경구 투여 한 후 24시간 이내에 경구 투여량의 30~50%가 소변으로 배출되고, 상당량이 대변으로도 배설된다.

㉢ 독성

Enrofloxacin은 낮은 급성독성을 가지고 있으며, 랫드에 13주 동안 $\leq 7500\text{mg/kg}$ 을 사료급여 시 고용량군에서 체중 증체가 감소하였으며 관절에 조직학적 변화가 발생하였으며, 수컷 래스에서 부고환과 정세관에서 타원형의 세포가 관찰되는데 이는 “cap phase” 정자세포의 피사나 변성으로 여겨진다. 그러나 10 mg/kg bw/day 투여군의 90일 실험에서는 비정상적인 정자가 부고환이나 정세관에서 발견되지 않았다. 이는 고환에 대한 enrofloxacin의 작용이 가역적임을 보여준다. 송아지, 새끼돼지, 강아지처럼 미성숙동물의 관절연골의 퇴행적인 변화를 유발한다. 태아기형, 유전독성, 발암성 등은 유발하지 않는다.

- 위장관 장애 : 오심, 구토, 설사, 복통, 소화불량
- 중추신경계 증상 : 두통, 현훈, 불면증
- 피부증상 : 피진, 소양증, 광과민증
- 반수치사량(LD₅₀) : 4,336~5,000 mg/kg bw(마우스, 경구)
- 관절(성장판)변성 및 성장장애: 무독성량 3mg/kg bw/day
- foetotoxicity : NOEL 50 mg/kg bw/day(랫드)
- 정관이완, 정소중량 증가 및 형태학적 이상: 무독성량 1.2 mg/kg bw

㉔) 일일섭취허용량(Acceptable Daily Intake : ADI)

- 가장 민감한 독성은 인체장내정상세균총 영향이며 이때의 무독성량은 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 임
- 플루오르퀴놀론계 내성 캄필로박터에 의한 인체 내성균 유발 가능성이 의심되고 있음
- 인체장내정상세균총에 대한 영향을 근거로 일일섭취허용량 0~0.002 mg/kg bw/일이 설정되어 있음

㉕) 각국별 사용현황

미 국	E U	한 국
○ 소, 돼지에 사용 - 가금, 착유소투약금지	○ 소, 양, 돼지, 가금, 토끼에 사용 - 산란가금, 착유양투약금지	○ 소, 돼지, 양, 염소, 토끼, 가금, 어류에서 사용 - 산란가금 투약금지

㉖) 잔류허용기준(MRL)

국가	대상 품목	기준 (mg/kg)	비고	
한국	가금, 돼지, 토끼	근육	0.1	Enrofloxacin, Ciprofloxacin의 합
		간	0.2	
		신장	0.3	
		지방	0.1	
	소, 양, 염소	근육	0.1	
		간	0.3	
		신장	0.2	
		지방	0.1	
어류, 갑각류		0.1		
유		0.05		
알		불검출		
CODEX	-	-	-	
미국	소 간	0.1	desethylene ciprofloxacin (marker residue) 잔류량 기준	
EU	돼지, 토끼	근육	0.1	Enrofloxacin, Ciprofloxacin의 합
		간	0.2	
		신장	0.3	
		지방	0.1	
	소, 양, 염소	근육	0.1	
		간	0.3	
		신장	0.2	
		지방	0.1	
	가금	근육	0.1	
		간	0.2	
		신장	0.3	
		껍질, 지방	0.1	
	소, 양, 염소, 돼지, 토끼 가금류 제외 한 모든 식육 품종	근육	0.1	
		간	0.2	
신장		0.2		
지방		0.1		
소, 양, 염소 우유		0.1		

⑤ Malachite green

㉠ 특성 및 용도

Malachite green은 밝은 청록색의 염기성 염료로서 트리페닐메탄계 염료의 일종으로 물, 알코올에 녹는다. 말라카이트그린은 벤즈알데하이드를 염산 또는 황산 존재 하에서 다이메테인아닐린과 축합하여 p, p'-다이아미노트리페닐메테인을 만들고 이것을 이산화납과 산으로 산화하면 생긴다. 말라카이트그린은 진균과 그람양성균에 효과가 있으며 양식장에서 물에 사는 곰팡이로 생선의 알이나 어린 물고기를 죽이는 물곰팡이속을 제거하는데 사용된다.

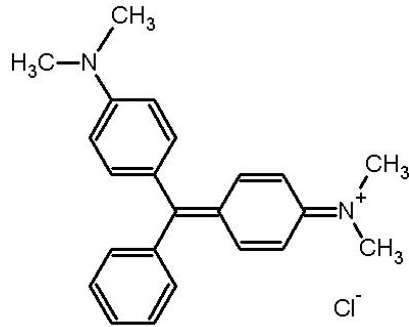


그림 7. Malachite green 구조식

㉡ 체내 동태

말라카이트그린은 염색약의 형태인 chromatic form으로 주로 존재하지만, 말라카이트그린이 체내에 흡수되면 대사되어 carbinol form으로 변화하며, 이 형태는 세포막을 빠르게 통과하고 세포내에서 leucomalachite green으로 대사되어 체내에 오래 저류함으로써 독성을 유발한다.

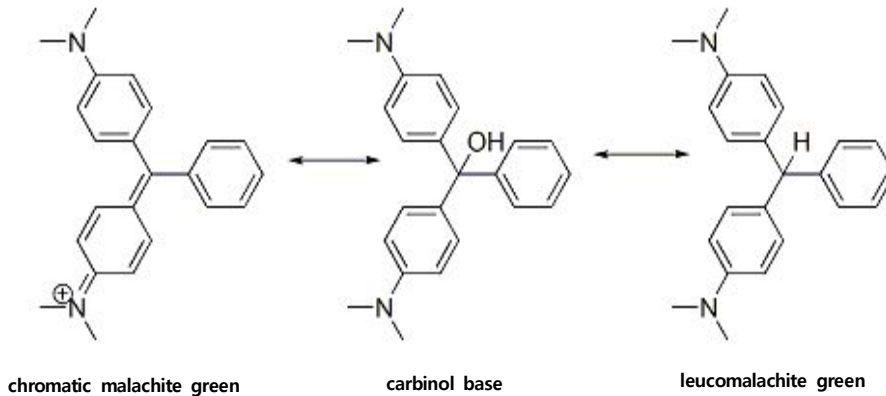


그림 8. Malachite green의 3가지 형태

㉢ 독성

단회 독성 시험 결과 랫드와 마우스에 말라카이트그린을 경구 투여하였을 때 각각 LD₅₀ 275 mg/kg bw, 50 mg/kg bw로 나타났다. 말라카이트그린은 어류에 대한 독성은 매우 높은 것으로 알려져 있다. 말라카이트그린이나 류코말라카이트그린을 투여한 랫드에서 간세포의 공포

화가 나왔으며, 류코말라카이트그린을 투여한 랫드에서 apoptosis에 의한 갑상선 낭포의 상피세포의 병변을 나타냈으며, 류코말라카이트그린을 투여한 수컷 랫드에서 티록신(thyroxin) 수준의 감소와 갑상선자극호르몬 수준의 증가가 관찰되었다. 말라카이트그린의 랫드와 마우스의 발암성 연구 결과 발암작용에 대한 명확한 증거는 확인되지 않았으나, 류코말라카이트그린의 마우스에 대한 발암성 실험에서는 일부 발암작용의 증거가 확인되었다. 말라카이트그린과 류코말라카이트그린에 대한 유전독성시험결과 전반적으로 음성의 결과를 나타내었다.

○ 말라카이트그린의 인체에 대한 발암성 및 기준 설정

- 말라카이트그린은 핵산염기와 친화성을 갖는 물질로서 발암성이 예상되지만 현재 일본과 FAO/WHO 합동식품첨가물 전문가회의(JECFA)에서도 독성평가는 되어있지 않으며, 또한 국제기준도 설정되어 있지 않다.
- 영국에서는 동물시험에서 발암성 및 변이원성을 확인하였고 인체에서는 확실한 근거를 잡지 못했지만 인체에 유전학적으로 발암성물질로 간주하는 것이 신중한 결정이라고 결론을 내렸다.
- 여러 연구 조사결과 말라카이트그린은 사람의 세포에 유독하게 작용하며, 동물에서는 간암의 형성과 촉진에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 물질이 사람의 건강에 영향을 미칠 수 있다는 잠재성으로 인하여 미국FDA에서는 말라카이트그린을 유독성 및 발암가능성 검사대상 화학약품으로 지정하고 있다.

㉔ 일일섭취허용량 (Acceptable Daily Intake : ADI)

말라카이트그린이 함유된 어류가 인체에 미치는 영향은 현재 상황에서 영향 평가를 할 수 있는 일일내성섭취량(TDI, Tolerable daily intake), 일일섭취허용량(ADI, Accetable daily intake), 주간잠정섭취허용량(PWI, Provisional tolerable weekly intake)등이 전혀 설정되어 있지 않음.

㉕ 잔류허용기준(MRL)

- 식품생산동물에서 말라카이트그린의 잔류허용기준이 설정되어 있지 않음.

국가	MRL (mg/kg)	정량한계 (LOQ, MRPL)	비고
한국	불검출	0.2 μ g/kg	-
CODEX	-	-	-
미국	-	-	-
EU	-	-	-
일본	-	-	-

㉖ 국내·외 규제 현황

- 안전성 문제로미국(1991년), 영국(2002년), 일본(2003년) 등에서 말라카이트그린의 사용을 금지 하였다.
- 동물용의약품으로 허가: 말라카이트그린은 『동물용의약품등취급규칙』 [농림부 2령 제1372호, 2000. 11. 7]에 의하여 동물용의약품으로 허가되어 있어 말라카이트그린에 대하여 감

수성이 있는 각종 곰팡이성 질환, 세균성 질환 및 백점충 등의 외부 기생충성 질환의 예방 및 치료의 목적으로 사용되며, 식용어류에는 사용을 절대 금지하고 관상어에만 사용하도록 되어있다.

⑥ Ethoprophos

㉠ 특성 및 용도

‘모캡(Mocap)’ ‘프로포스(Prophos)’라는 이름으로 개발된 디티오유기인계 살충제로서 한국에서는 ‘에토프’라는 품목명으로 고시되어 있다. 투명한 담황색 액체로서 물에는 750 mg/l 정도 녹으나 대부분의 유기용매에는 잘 녹으며 100℃까지의 물에는 안정하나 알칼리(25℃)에는 급격히 가수분해된다. 비침투성이며 비혼중성 선충방제제로서 또는 토양살충제로서의 효과를 보이며 한국에서는 벼의 심고선충·흰등밀구·벼멸구 방제약제로 쓰이고 있다.

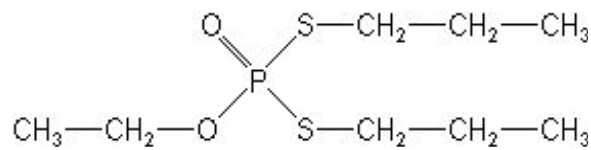


그림 9. Ethoprophos 구조식

㉡ 체내 동태

랫드에서 Ethoprophos 경구 투여 시 약 80%가 빠르게 흡수되며, 혈중 최고농도는 투여 후 1시간 이내에 나타난다. Ethoprophos의 40~60%가 소변을 통하여 배출되고, 약 15%가 호흡으로, 10~30%가 대변으로, 약 8%가 담즙으로 배출된다. 간, 신장, 폐, 지방, 부신, 갑상선, 소장엔 잔류하는 농도가 낮다. Ethoprophos는 dealkylation에 의해 주로 대사되며, hydroxylation conjugation에 의해서도 대사된다.

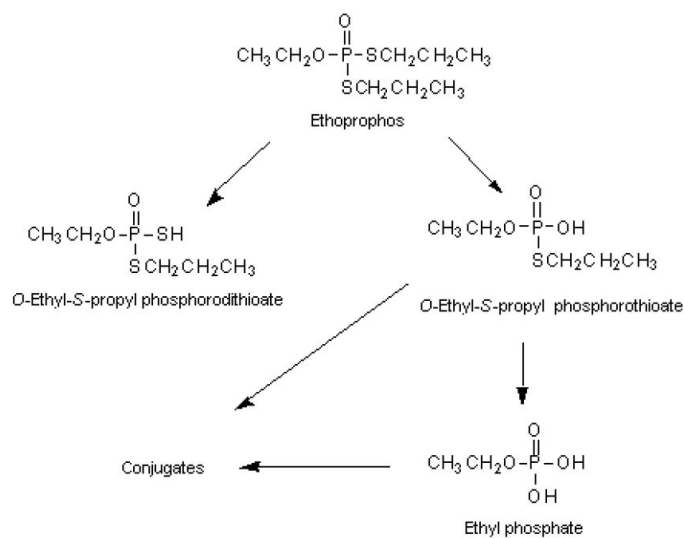


그림 10. 랫드에서 ethoprophos의 대사 기전

㉔ 독성

랫드에 대한 급성 경구 독성 LD₅₀은 47 mg/kg, 마우스의 급성 경구 독성 LD₅₀ 31 mg/kg이며, 독성작용으로 콜린에스테라아제(cholinesterase) 억제 증상이 나타난다. 토끼에 대한 급성 경피 독성 LD₅₀은 7.9 mg/kg 이고, 랫드에서 급성 흡입독성은 LC50 0.12 mg/L로 피부와 호흡기를 통한 독성이 크게 작용한다. 또한 포유동물에 대한 독성은 다소 높은 편이며 어패류에 대한 독성도 매우 강하므로 양어장이라든가 또는 하천에 이 약액이 흘러들어가지 않도록 주의하여야 한다. 모든 종에서 ethoprophos의 민감한 독성 종말점은 콜린에스테라아제 억제이다. 90일 비글견 실험에서 ethoprophos를 경구 적용시 NOAEL 0.1 mg/kg bw/day로 나타났다. Ethoprophos은 유전독성을 유발하지 않는다. 또한 랫드와 마우스 만성독성 실험결과 NOAEL 0.04 mg/kg bw/day(랫드), 0.3 mg/kg bw/day(마우스)로 나타났다. 마우스에서 발암을 유발한다는 증거는 없지만, 랫드에서 고농도로 ethoprophos를 투여했을 때 수컷에서 갑상선 C-세포 종양이 약간 증가하였으며, 암컷에서는 자궁종양과 폴립이 증가하였다. 이는 사람에서 종양이 발생할 수 있다는 제한적 정보로 여겨진다. Ethoprophos의 생식독성과 최기형성, 신경독성은 나타나지 않았다.

사람에서 노출경로는 증기흡입, 눈, 피부접촉임. 눈, 피부에 자극적이며 피부염을 일으키거나 화상을 입을 수 있다. 유기인산계 물질의 독성(organophosphate poisoning)인 무스카린 증상(muscarinic effect), 니코틴 증상(nicotinic effect), 중추신경 증상(central effect)을 일으킨다. 노출 시 두통, 현기증, 메스꺼움, 피로, 구토, 설사, 발한 등의 증상이 나타나며, 중독되면 동공 축소, 기관지경련, 기관지루(氣管支漏), 유연증(流涎症), 근육경련, 호흡장애, 중추신경장애, 정신장애, 혼수(昏睡) 등을 일으킨다. 접촉, 흡입 또는 섭취에 의한 증상은 시간이 경과한 후에 나타날 수 있다.

㉕ 일일섭취허용량 (Acceptable Daily Intake : ADI)

- 랫드의 2년 독성 시험의 NOAEL 0.04mg/kg bw/day에 안전계수 100을 적용한 결과 ethoprophos의 일일섭취허용량(ADI)을 0.004 mg/kg bw/day로 설정하였음.

㉖ 잔류허용기준(MRL)

국가	대상 품목	MRL (mg/kg)	비고
한국	귀리, 메밀, 밀, 보리, 수수, 쌀, 조, 호밀	0.005	
	감자, 고구마, 고추, 대두, 딸기, 땅콩, 마늘, 멜론, 무(뿌리), 바나나, 상추, 시금치, 양배추, 양상추, 오이, 양파, 옥수수, 토마토, 파인애플, 포도, 피망	0.02	
CODEX	감자, peppers (sweet), 고구마	0.05	
	바나나, 딸기, sugar cane, sugar ane fodder, turnip (Garden), 멜론	0.02	
	cucumber, 토마토	0.01	
	Meat(from mammals other than marine mammals)	0.01	

	Edible offal (mammalian)		
	Milks	0.01	
미국	Banana, bean(lima), bean(snap), cabbage, corn(forage), corn(grain), corn(stover), corn(sweet), cucumber, peanut, peanut(hay), pineapple, potato, sugarcane, sweet potato(roots)	0.02	
일본	가지, 감, 곤약(이모), 구아바, 그레이프후츠, 기타곡류, 기타 감귤류, 기타 두류, 기타 미나리과 야채, 기타 베리류 과일, 기타 참외과 야채, 마늘, 망고, 밥, 배추, 사과, 쌀, 수박 등	0.005	
	감자, 고구마, 기타 가지과 야채, 기과 과일, 기타 야채 땅콩, 딸기, 메론류 과일, 사탕무, 사탕수수, 양파, 옥수수 등	0.02	
	- 기타 육상포유류에 속한 동물의 간, 근육, 식용부위, 신장, 지방 - 돼지 간, 근육, 신장, 식용부위, 지방 - 소 간, 근육, 신장, 식용부위, 지방	0.01	

⑦ Endosulfan

㉞ 특성 및 용도

유기염소계 살충제로서 티오단(Thiodan), 시클로단(Cyclodan), 말릭스(Malix), 지오릭스(Thiolix) 등 여러 상품명으로 알려져 있으나 한국에서는 지오릭스분제, 유제 등의 상품명으로 유통되며 작물 뿐 아니라 목재의 보존제로 사용하기도 한다. 냄새는 이산화황과 유사하며 갈색의 결정성 분말로서 초기에는 집파리를 비롯한 가정용 살충제로 쓰이다가 농업용 살충제로 사용이 확대된 물질이다. 엔도설판은 물에 잘 녹지 않지만, 유기용매에는 잘 녹으며 빛에는 안정하나 산이나 알칼리 조건에서 서서히 가수분해 되어 디올 화합물과 이산화황을 생성한다. 수중에서는 부유물질과 침적토에 흡착되며 광분해가 되지 않아 토양에서의 반감기는 최소 9개월에서 6년까지 장시간 소요되므로 살포 후 토양에 잔류된 미량의 엔도설판이 지하수 및 식수원으로 유입되어 문제를 야기할 수 있다.

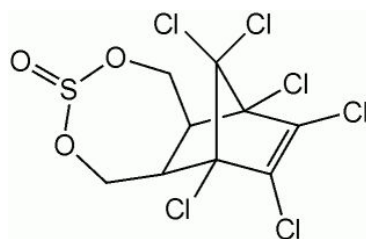


그림 11. Endosulfan 구조식

㉞ 체내 동태

Alpha형과 beta형 두 가지 이성체의 혼합물로 이루어져 있는 엔도설판은 섭취, 흡입, 피부 접촉 등의 경로로 흡수되며 경구나 정맥투여 시 소변과 변으로 배설된다. 일시적인 급성노출에도 혈중농도가 급격히 감소된다. 엔도설판은 endosulfan sulfate와 endosulfan diol, endosulfan ether, endosulfan hydroxyether, endosulfan lactone로 대사된다. 생쥐체내에서 엔

도설판의 대사기작은 엔도설판이 먼저 CO 결합부위에서 sulfur 잔기의 회전으로인한 α -endosulfan이 β -endosulfan으로 되는 대사, 가수분해 반응을 통한 α -endosulfan이 endosulfan diol로 되는 대사, 산화적인 기작을 통하여 α -endosulfan과 β -endosulfan이 endosulfan sulfate로 되는 대사, Epoxidation 반응에 따라서 endosulfan diol이endosulfan hydroxyether 또는 endosulfan ether로 되는 대사 등이 이루어지는것으로 알려졌다. 식품을 통하여 섭취된 엔도설판은 쉽게 대사되고 배출되며 체내 축적성은 크지 않다. 흰쥐에 alpha-endosulfan을 경구투여하면 5일 뒤 투여량의 75%가 변으로, 13%가 소변으로 배출된다. beta-endosulfan은 68%가 변으로, 18.5%가 소변으로 배출 된다. 엔도설판의 최대 잔류량은 신장에 3 mg/kg, 간에 1mg/kg으로 알려져 있다.

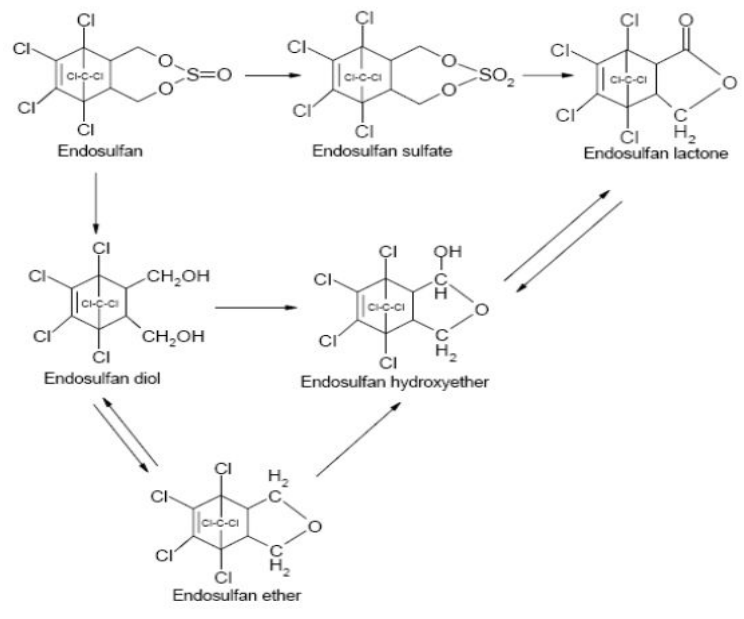


그림 12. Endosulfan 대사 기전

㉔ 독성

엔도설판은 신경세포에서 칼슘과 나트륨 채널의 미세한 균형을 깨트려 칼슘과 나트륨의 농도변화를 유발시켜 impulse transmission에 영향을 주며, 특발성 근육경련을 일으키게 한다. 엔도설판은 주로 식품섭취에 의하여 사람에게 노출되며 체내로 흡입되면 구토, 설사, 현기증, 경련 및 호흡곤란을 일으키고 중추신경계를 자극하여 국부적인 마비를 초래하게 된다. 엔도설판은 유전독성과 발암성은 음성으로 평가되었다. 엔도설판의 생식독성 실험결과 생식현상에 대하여 악영향을 미치지 못했지만, 생식기관에 심각한 손상을 가하는 것으로 나타나 잠재적으로 인간에게 생식독성이 있다고 판단 할 수 있다. 엔도설판은 급성독성이 강한 고독성 농약으로 어독성이 매우 큰 어독성 1급 농약이며, 급성독성 반수치사약량(LD₅₀)은 경구 28mg 경피의 경우 1.063mg/kg이다. 쥐에 대한 급성경구독성 LD₅₀이 70~240mg/kg, 토끼에 대한 급성경피독성이 359mg/kg으로서 포유동물에 대한 독성이 다소 높은 편이며 어패류, 야생 동물 및 꿀벌에 대한 독성도 비교적 높은 편이므로 사용에 주의하여야 한다.

㉕ 일일섭취허용량 (Acceptable Daily Intake : ADI)

- FAO/WHO(1989)에 엔도설판의 일일섭취허용량을 0.006 mg/kg bw/day로 설정하였음

㉔ 잔류허용기준(MRL) : α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan sulfate의 총 합

국가	대상 품목	MRL (mg/kg)	비고	
한국	가지, 고추, 레몬, 마늘, 망고, 무(뿌리, 잎), 바나나, 살구, 수박, 아보카도, 아스파라거스	0.1		
	귀리, 메밀, 쌀, 수수, 아몬드, 피칸, 호도, 호밀	0.05		
	딸기, 배추	0.2		
	포유류 고기, 유	0.1		
CODEX	아보카도, 브로콜리, broad bean(green pods), Cauliflower, common bean, cotton seed oil, crude, cucumber, custard apple, 멜론	0.5		
	broccoli	3		
	Cabbage, Savoy, Celery, Cherries	2		
	Cabbage, Head, Cherries, cotton seed, 포도 케일,	1		
	Cacao beans, coffee beans	0.1		
	Cacao beans, 당근, coffee beans	0.2		
	Cotton seed, 계란	0.3		
	고기(포유류)	0.1, 0.2		
	우유	0.004		
유지방	0.1			
미국	알파파, forage, 아몬드, Barley, grain, 블루베리 등	0.3		
	알파파, hay, 아몬드, hulls, 사과, 토마토 등	1		
	apricot, bean, brussels sprouts, 딸기, 배, 복숭아 등	2		
	브로콜리	3		
	cabbage	4		
	당근, roots	0.2		
	소, 양 염소, 말	지방	13	
		간	5	
		근육	2	
		meat byproducts(간제외)	1	
Milk, fat	2			
EU	vine leaves, bread fruits, Carambola, Chicory roots, durian, jambolan 등	0.05		
	Honey	0.01		
	loquart, medlar	0.3		
	flowers, leaves, roots, jasmine flowers, lime 등	0.5		
	coffee bean, bark, cocoa, buds, Carob, aril 등	0.1		
	Horse, assess mulse, hinnies, other farm animals	0.05		
	가금류 알	0.05		
	seeds	1		
fruits, berries	5			
일본	가지, 감, 기타 스파이스(건조), 고구마, 구아바, 기타 가지과 야채, 기타 감귤류 과일, 기타 과일, 기타 너트류, 매실, 망고, 마늘, 배추, 면실유, 부추, 브로콜리, 블루베리 등	0.5		
	사과, 비파, 버찌, 서양배, 자두, 포도 등	1		
	호두, 호프, 카카오콩, 커피콩, 옥수수 등	0.1		
	어패류	0.004		

닭 간, 닭 근육, 닭 신장, 닭 식용부위, 돼지 근육, 돼지 지방, 소 지방, 소 근육,	0.1	
돼지 간, 돼지 신장, 돼지 식용부위, 소 신장, 소 간, 소 식용부위	0.2	
달걀	0.08	

㉞ 국내 사용현황

엔도살판의 2006년 국내 생산량은 229톤이며(작물보호협회,2007), 2006년 출하량은 원제 기준으로 506톤이다(농약연보, 2007). 2004년 12월 농약관리법상 식용작물에 전면 사용금지 되었으며, 환경부의 유해화학물질관리법에 의해 제조, 수입 또는 사용금지물질로 지정관리하고 있다. 하지만 여전히 전국적인 모니터링 결과 아직까지 엔도살판은 검출되고 있다.

㉟ 국제 규제 현황

잔류성유기오염물질(POPs)에 관한 스톡홀름협약 제5차 당사국 총회에서 엔도살판을 부속서 A(금지물질)에 등재하기로 합의하였으며, 협약서 개정안은 2012년 하반기 발효된다.

⑧ Ractopamine

㉠ 특성 및 용도

Ractopamine은 β -adrenoceptor agonist에 속하는 약물로서 식품생산동물의 체중을 증가시키고 사료 효율성을 향상시키며 체조성 개선을 위하여 돼지와 소의 사료에 섞어서 사용한다.

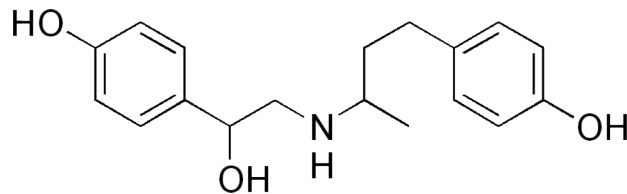


그림 13. Ractopamine 구조식

㉡ 체내 동태

Racopamine은 많은 동물들에게 잘 흡수되고, 주요 배설경로인 소변을 통해 빠르게 배설된다. Ractopamine의 닭즙 배설은 쥐의 닭즙에 주입된 용량이 가장 높게 발견되는 등 종마다 다르게 나타난다. 경구 투여한 ractopamine는 넓은 범위에서, 또는 빠르게 흡수 되며, 모체 약물이 체내 조직에 낮은 농도로 존재한다. 소변 중 대사물질은 단일 글루코노이드와 단일 황산염의 결합체이다. 실험동물에서는 혈청 반감기는 대략 4~7시간 범위이다. 방사성 ractopamine의 식이 투여 후 흡수는 주입된 용량의 $\geq 80\%$ 이었다. 이 측정치는 10일까지 쥐, 개, 원숭이, 돼지와 소의 소변과 배설물에서 발견된 수치이다. 소변에서 방사성의 작은 부분만이 모체 ractopamine이다. 더 많은 모체 약물은 ¹⁴C-ractopamine을 경구 투여보다 피하 주사로 투여 받았을 때 나타났다. 이는 경구 투여 이후로 위장과 간에 중요한 대사과정의 첫 경로가 일어났음을 의미한다. Ractopamine의 3개 주요 단일 글루쿠로나이드(monoglucuronide) 대사물질에 이

어 대사물질 A, B와 C로 표기했을 때 4번째 대사물질인 D는 쥐, 개, 돼지와 소의 소변, 간과 신장에 있는 ractopamine의 글루쿠론산 diconjugate으로 보인다. 두 개의 작은 대사물질은 E와 F로 표기되는데, 모든 종에서 발견되며 아직은 규명되지 않았다.

㉔ 독성

마우스에서 급성 경구 독성은 LD50 2545~3547 mg/kg bw 이고 랫드에서는 367~474 mg/kg bw 으로 나타났다. 독성과 발암성에 대한 장기간 연구에서 ractopamine이 직접적인 발암 원인 물질이 아니며, 평활근종의 유도 현상은 역치를 가진 유전 독성이 없는 현상이며, 생쥐와 쥐에 실행한 장기간 연구에서 보여진 모든 치료 관련 효과는 ractopamine의 β -adrenergic 활성화에 기인한다는 결론을 지었다.

㉕ 일일섭취허용량 (Acceptable Daily Intake : ADI)

위원회는 사람에게 Ractopamine의 급성 심장 반응은 ADI를 측정하기 위한 가장 적절한 기준으로 판단하였다. 합쳐진 최대무작용량인 67 μ g/kg bw는 electromechanical systole, 왼쪽 심실 방출 시간과 circumferential fibre가 짧아지는 현상의 최대 속도를 토대로 정해졌다. ractopamine의 ADI는 최대무작용량 67 μ g/kg bw 에 안전계수 50을 적용하여 0~0.001 mg/kg bw/day로 설정하였다.

㉖ 잔류허용기준(MRL)

식품		MRL (mg/kg)				
		한국	EU	미국	일본	CODEX (8단계)
소, 돼지	근육	0.01	불검출	0.03(소) 0.05(돼지)	0.01	0.01
	간	0.04	불검출	0.09(소) 0.15(돼지)	0.04	0.04
	신장	0.09	불검출	-	0.09	0.09
	지방	0.01	불검출	-	0.01	0.01
	폐장 (돼지)	0.09			0.04 (부산물)	

㉗ Aflatoxine

㉘ 특성

아플라톡신은 온도가 24~35℃, 수분이 7% 이상일 때 Aspergillus flavus와 Aspergillus parasiticus에 의해 생성되는 2차 대사산물로 주요 오염식품은 쌀, 옥수수, 견과류, 땅콩, 칠리 고추, 무화과, 건조과실류와 향신료 등이다. 순수한 Aflatoxin B1은 흰색에서 노란색을 띠는 결정체로 냄새가 없다. Aflatoxin B1, B2, G1, M1, M2의 분자량은 310~330이고, B1, B2는 푸른색 형광을 띠며, G1, G2는 Blue-Green 형광을 M1, M2는 Blue-Violet 형광을 띤다.

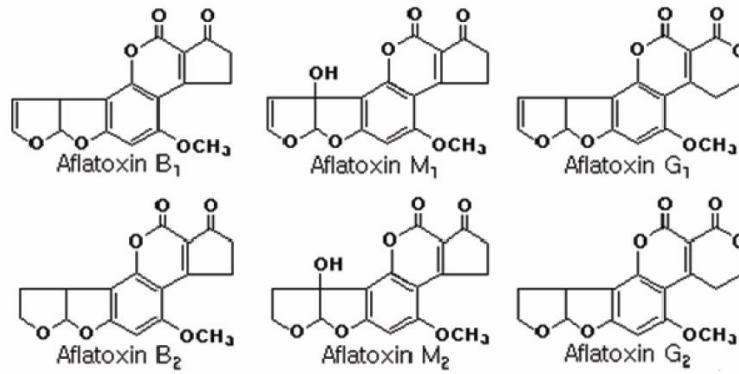


그림 14. Aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, M2 구조식

㉔ 체내 동태

아플라톡신 B1, B2, G1, G2는 소장외의 점막을 통하여 빠르게 흡수되고, 아플라톡신 대부분은 알부민과 비공유적으로 결합된 형태로 간의 아세포 부위에서 마이크로솜이 가장 높게 분포하고 있다. 아플라톡신 B1은 투여부위에서 혈액을 통하여 간과 아세포 그리고 핵 내부로 비공유적 결합형태로 수송된다. 아플라톡신 B1은 강력한 간독성 및 간암을 일으키는 물질로 독성을 나타내기 위해서는 aflatoxin B1-8,9-epoxide로 활성화되어야 한다. Epoxidation microsomal mONOELOxygenase는 아플라톡신 B1을 덜 유독한 대사체인 M1과 Q1으로 전환시킨다. 폐는 아플라톡신 B1의 흡입 및 순환시 위험이 크다.

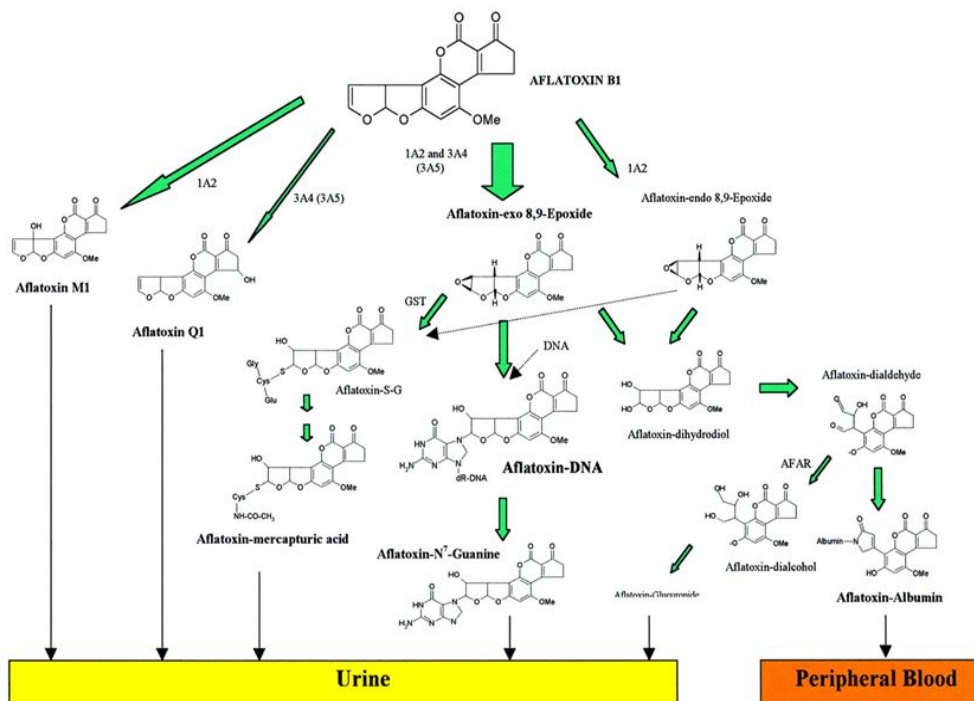


그림 15. 아플라톡신 B1의 대사 기전

㉔ 독성

아플라톡신 중 B1, B2, G1, G2가 주요 독소이고, 아플라톡신 B1이 가장 흔히 발견되고 가장 강력한 독성을 가지고 있다. 아플라톡신 B1은 간에서 cytochrome P450(CYP)에 의해 활성화되고, 신장에서 peroxidase에 의해 아플라톡신 B1 8,9-epoxide로 변화하여 DNA에 결합하여 강력한 발암작용을 나타낸다. 아플라톡신 B1은 실험동물에서는 돌연변이, 발암 및 기형 등을 일으키며 사람에게서는 간암을 일으키는 물질중의 하나로 알려져 있다. 아플라톡신 B1의 LD50은 대부분의 동물에서 10mg/kg으로 나타나는데 특히 토끼, 새끼오리, 고양이 등의 경우 LD50이 1mg/kg 이하로서 이들에 대한 아플라톡신 B1의 독성이 강함을 알 수 있으며, 이에 비해 닭, 쥐 등의 LD50은 6.5~7.9mg/kg으로 상대적으로 독성이 낮음을 알 수 있다. 아플라톡신 B1의 주요 독성 아플라톡신 B1의 대사물인 M1은 아플라톡신에 오염된 사료를 섭취한 동물의 유즙과 유제품에서 발견되고, 아플라톡신 B1보다 독성은 낮으나 간독성 및 발암성을 보인다.

- 아플라톡신에 의한 주요 손상 장기: 간
- 급성 독성과 사망
 - 심각한 아플라톡신감염 증상: 간의 출혈괴사, 담관 증식, 부종과 줄음을 동반
 - 성인은 아플라톡신에 대해 높은 내성을 가진다고 보고 되어있으며 보통 어린이 들은 사망에 이르기도 한다.
- 발암성
 - 인체 발암을 일으키는 Group 1 발암물질로 정의
 - 아플라톡신은 messenger-RNA 합성을 억제하며, DNA합성에도 영향을 준다.
 - RNA에 대한 작용부위는 주로 핵으로서 전구물질이 RNA와 결합하는 것을 방해한다.
 - DNA-의존 RNA polymerase의 활성을 억제한 결과 세포질의 RNA도 변화한다.
 - Messenger-RNA 합성의 억제는 단백질 합성이 억제되며 이와 관련된 지방의 이동능력 감소는 이 독소에 감염된 동물의 간장에서 주로 볼 수 있는 초기의 병변이다.
 - 사람에게 대해서는 간암을 일으키는 물질이다.
 - 역학조사결과: B형 간염환자가 그렇지 않은 개체보다 아플라톡신에 더 민감함.

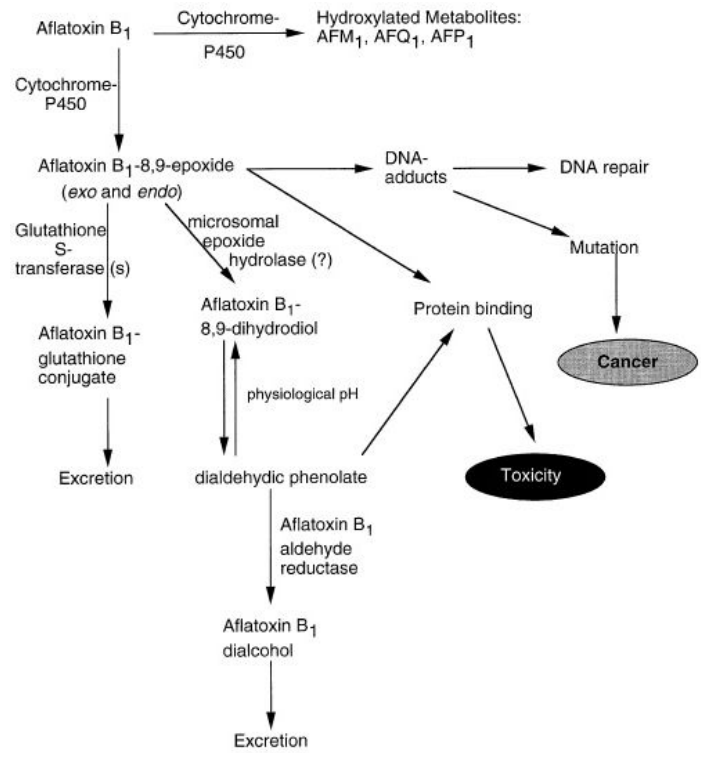


그림 16. 아플라톡신 독성 작용기전

㉔ 일일섭취허용량 (Acceptable Daily Intake : ADI)
 - 완전발암물질로서 설정 불가

㉕ 잔류허용기준(MRL)

국가	대상독소	대상물질	기준(μg/kg)
한국	Aflatoxin (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	곡류, 두류, 땅콩, 견과류 및 그 단순가공식품 (분쇄, 절단 등)	15 (단, B ₁ 으로 10)
		메주, 땅콩 및 견과류가공품	
		과자류(땅콩 또는 견과류 함유식품)	
		된장, 고추장, 고춧가루	
		팜콘용옥수수가공품	
	기타 식품류(찜쌀)		
Aflatoxin M ₁	제조, 가공 직전의 원유 및 우유류	0.5	
CODEX	Aflatoxin (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	아몬드, 헤즐넛, 피스타치오넛(가공)	10
		아몬드, 헤즐넛, 피스타치오넛(비가공)	15
		땅콩(가공하지 아니한 것)	15
	Aflatoxin M ₁	우유	0.5
미국	Aflatoxin (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	브라질넛, 식품, 땅콩과 그 가공품, 피스타치오	20

	Aflatoxin M ₁	우유	0.5
EU	Aflatoxin B ₁	땅콩(섭취 또는 식품의 원재료로 사용하기 위하여 선별이나 물리적 처리가 필요한 것)	8.0
		견과류(섭취 또는 식품의 원재료로 사용하기 위하여 선별이나 물리적 처리가 필요한 것)	5.0
		땅콩, 견과류 및 그 가공품 (직접 섭취되거나 식품의 원재료로 사용되는 것)	2.0
		건조과실류(섭취 또는 식품의 원재료로 사용하기 위하여 선별이나 물리적 처리가 필요한 것)	5.0
		건조과실류 및 그 가공품 (직접 섭취되거나 식품의 원재료로 사용되는 것)	2.0
		곡류 및 그 가공품(옥수수 및 영유아용제품 제외)	2.0
		옥수수(섭취 또는 식품의 원재료로 사용하기 위하여 선별이나 물리적 처리가 필요한 것)	5.0
		향신료(고추속, 후추속, 육두구, 생강, 심황)	5.0
		영유아용 곡류가공품 및 이유식	0.1
	Aflatoxin B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	땅콩(섭취 또는 식품의 원재료로 사용하기 위하여 선별이나 물리적 처리가 필요한 것)	15.0
		견과류(섭취 또는 식품의 원재료로 사용하기 위하여 선별이나 물리적 처리가 필요한 것)	10.0
		땅콩, 견과류 및 그 가공품 (직접 섭취되거나 식품의 원재료로 사용되는 것)	4.0
		건조과실류(섭취 또는 식품의 원재료로 사용하기 위하여 선별이나 물리적 처리가 필요한 것)	10.0
		건조과실류 및 그 가공품(직접 섭취되거나 식품의 원재료로 사용되는 것)	4.0
		곡류 및 그 가공품(옥수수 및 영유아용제품 제외)	4.0
		옥수수(섭취 또는 식품의 원재료로 사용하기 위하여 선별이나 물리적 처리가 필요한 것)	10.0
		향신료(고추속, 후추속, 육두구, 생강, 심황)	10.0
		Aflatoxin M ₁	원유, 시유 및 유제품제조용 우유
	영아용 조제식 및 성장기용 조제식(영아용 조제유 및 성장기용 조제유 포함)		0.025
	영아용 특수의료용도식품		0.025

일본	Aflatoxin B ₁	땅콩 및 그 가공품	10
		피스타치오, 아몬드, 브라질넛, 케슈너트, 헤즐넛 마카다미아 호두, 옥수수	10
호주	Aflatoxin (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	땅콩 및 그 가공품	15

⑩ Dioxin

㉠ 특성

다이옥신이란 고리가 세개인 방향족 화합물에 여러개의 염소가 붙어 있는 화합물로, PCDD/F (Poly chlorinated dibenzo dioxins/furans)을 일컫는다. 보통 다이옥신류라하여 PCDD와 퓨란계 PCDF (Poly chlorinated Dibenzo Furan), Coplanar-PCB(Coplana-Poly chlorinated biphenyl)를 통칭한다. 염소의 위치에 따라 여러 개의 이성질체가 존재할 수 있다. 구조적으로 매우 안정하여 상온에서 색깔이 없는 결정으로 존재하며 극성이 없어 물에 잘 녹지 않고 지방에 잘 녹기 때문에 몸속에 들어가면 오줌으로 배설되지 않고 지방조직에 축적된다.

97%~98% 대부분의 다이옥신은 음식에 포함되어 흡수하게 되며 약 3% 이하만 호흡기를 통해 흡수한다. 가장 일반적인 흡수 경로는 쇠고기, 돼지고기나 닭고기, 우유 등에 들어 있는 지방에서 흡수하는 것이다. 호흡기를 통해 흡수하는 경우에는 담배연기가 가장 일반적이다.

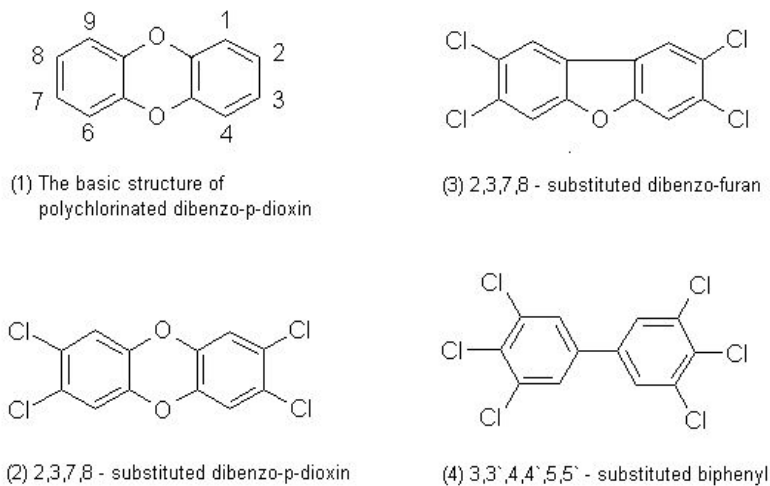


그림 17. Dioxins 구조식

㉡ 체내 동태

a) 흡수

TCDD의 위장의 흡수에 대해서는 각 이성체의 lipophilicity에 따라 차이가 나기는 하지만 일반적으로 설치류의 경우 60%의 흡수율을 나타내는 것으로 보고되고 있으며, OCDD의 경우 20%이하로 보고되고 있다.

b) 분포

한번 흡수된 다이옥신은 chylomicrons에 포함되어 빠르게 혈액을 통하여 adipose tissue, 간, 피부, 근육 등으로 빠르게 이동하는 것으로 보고되고 있다. 분포에 걸리는 시간은 제거에 필요한 시간에 비하여 상대적으로 짧은 것으로 나타나고 있다.

c) 대사

최근에 들어 TCDD가 극성 대사산물로 천천히 변한다는 보고가 있다. 주 대사산물은 쥐의 hepatocyte를 이용하한 in vitro 실험에서 1-hydroxy-2,3,7,8-TCDD와 8-hydroxy-2,3,4-TCDD를 형성하는 것으로 보고되었다.

d) 제거

TCDD의 생체내 반감기는 rat의 경우 20일, mice의 경우 12일, guinea pig의 경우 90일, 인간의 경우 6~11년으로 보고되고 있다. 실제로 이러한 반감기에 영향을 주는 인자로는 지방의 함량과 관계가 있다고 보고되고 있으며, 모유 수유시 생체내 다이옥신의 함량이 감소하는 경향이 나타나는 것으로 보고되고 있다.

㉔ 독성

TCDD에 의한 생물학적 영향으로는 aryl hydrocarbon receptor (AhR; ligand-dependent transcription factor)에 결합하여 독성 작용을 일으킨다. 다이옥신 이성질체 중에서 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD)이 독성이 가장 강하다. 독성의 정도는 2,3,7,8-TCDD의 독성을 1로 보고 다른 이성체에 대한 상대적인 독성등가계수(Toxic Equivalency Factor, TEQ)를 이용하여 TEQ(독성등가량)의 개념으로 표시한다.

급성노출에 높은 독성을 나타낸다. 구장 LD₅₀(기니아피그에서)은 1ug/kg이고, 실험동물에서 간 손상, porphyria, 기형적 효과, 면역기능억제, 종양발생이 증가 등이 나타난다. 사람의 경우에는 chloracne, porphyria, 간손상 및 polyneuropathies(다종의 신경병)이 일어난다. 다이옥신은 폐암, 간암, 임파선암, 혈액암, 유방암, 고환암, 전립선 암 등 암 발생률을 높인다. 다이옥신은 주로 몸속의 에스트로겐 관련 내분비계에 작용하여 독성을 나타내기 때문에 내분비계교란물질로 분류된다. 면역계의 손상으로 여러 가지 전염성 질환에 잘 걸릴 수도 있고, 또 호르몬의 조절기능에 손상이 일으킬 수도 있다. 그 외에 간장·신장의 파손, 당뇨 및 갑상선 질환, 피부병, 기형아, 유전자 이상, 성격이상, 정서 불안 등을 일으키거나 고환 크기의 감소, 당 조절 능력의 변화, 자궁내막증, 정자 수 감소, 남성호르몬 감소 등이 올 수 있다고 한다.

㉕ 각국의 허용섭취량

국가		허용섭취량 (pg-TEQ/kg/day)
한국		4
WHO		4
미국	EPA	0.01 (최종 기대치)
	FDA	13
일본		4
독일		10

스웨덴	5
덴마크	1
캐나다	10
네델란드	4
벨기에	5

㉔ 잔류허용기준(MRL)

국가	대상 품목	기준	비고
한국	닭고기	3.0 pg TEQ/g fat	
	돼지고기	2.0 pg TEQ/g fa	
	소고기	4.0 pg TEQ/g fa	
EU	육류 및 육류제품(식용부산물 포함) - 소과의 동물 및 양	3.0 pg/g fat	
	가금류	2.0 pg/g fat	
	돼지	1.0 pg/g fat	
	상기 동물간의 간 및 그 제품들	6.0 pg/g fat	
	어류육 및 장어를 포함한 어류제품들(새우, 갈색육, 랍스터 및 이와 비슷한 크기의 갑각류의 머리, 홍부고기 제외)	4.0 pg/g wet weight	
	장어(Anguilla anguilla)육류 및 제품	4.0 pg/g wet weight	
	Raw milk, 유제품(버터지방 포함)	3.0 pg/g fat	
	계란 및 알가공품	3.0 pg/g fat	
	소과의 동물 및 양의 지방	3.0 pg/g fat	
	가금류	2.0 pg/g fat	
	돼지	1.0 pg/g fat	
	혼합된 동물지방	2.0 pg/g fat	
	채소류 유지 및 지방	0.75 pg/g fat	
	어류유지(fish body oil, 어류간유 및 인간이 소비할 수 있는 모든 해산물의 oil)	2.0 pg/g fat	

㉕ Siga toxin

단일 A subunit과 5개의 B subunits 이 결합된 전형적인 AB5 독소형에 속하며, 60S ribosome의 depurination을 유발하여 불활화함으로써, 단백질합성을 저해하여 세포사멸을 유도한다. 가장 강력한 세균독소의 일종으로 특히 신장에 다수의 독소 리셉터가 존재하여 치명적인 전신질환을 유도하고, 유효한 치료제가 없는 실정이다.

(2) 농축수산물 식품 위해물질 중 최종 검출대상물질의 선정

물질명	적용식품	선정근거	비고 (기준 등)
Tetracyclines	우유	다빈도검출	0.1 ppm
Sulfamethazine	식육(돼지고기)	다빈도검출	0.1 ppm
Enrofloxacin	식육(닭고기)	다빈도검출	0.1 ppm
Malachite green	수산물(광어)	금지물질(발암물질)	불검출

나. 식품별/위해화학물질별 전처리조건 확립

(1) 농·축수산 식품 내 합성 항균제 및 잔류농약 분석을 위한 최적 전처리 조건

(가) 과일, 야채 등 비지방성 식품

- ① 잔류농약이나 항생제 분해를 막기 위하여 시료를 냉동시켜 분쇄기로 균질화 시킨다.
- ② 균질화 된 시료를 칭량하여 50 ml 원심분리관에 분쇄된 시료를 15g 칭량한 후 1% glacial acetic acid 함유 acetonitrile 15 ml를 첨가한다.
- ③ 뚜껑을 닫고 손으로 1분간 격렬히 진탕한다.
- ④ 6 g의 anhydrous $MgSO_4$ 와 1.5 g의 anhydrous NaOAc를 첨가한다.
- ⑤ 뚜껑을 닫고 손으로 1분간 격렬히 진탕한다.
- ⑥ 3500 rpm에서 3분간 원심분리한다.
- ⑦ 2 ml 원심분리관에 1 ml 상정액을 떠서 옮기고 150 mg anhydrous $MgSO_4$, 50 mg PSA, 50 mg C_{18} 을 넣고 30초간 vortex mixer를 이용하여 진탕한다.
- ⑧ 3500 rpm에서 3분간 원심분리한다.
- ⑨ 상층액을 2 ml 유리바이알에 보관하여 사용한다.

(나) 곡류, 콩류, 종실류, 견과류 등 지방성 식품

- ① 곡류 및 콩류는 물 30 ml에 2시간 정치 한 후 분쇄기로 균질화 시킨다.
- ② 균질화 된 시료 50 g에 메탄올 100 ml를 첨가하여 균질기로 2~3분간 균질화 시키고 이를 여과지가 깔려있는 부호너깔때기로 감압 여과한다.
- ③ 여과액을 1 l 분액깔때기로 옮기고 포화염화나트륨 용액 50 ml, 물 100 ml 및 디클로로메탄 50 mL를 가하고 진탕한 후 층이 완전히 분리 될 때까지 정치하고 디클로로메탄층을 취한다.
- ④ 다시 디클로로메탄 50 ml로 상기의 과정을 되풀이 하여 여액을 합하고 무수황산나트륨에 통과시켜 탈수한다.
- ⑤ 탈수한 용액을 40°C이하의 수욕 중에서 감압 농축하여 용매를 제거한다.
- ⑥ 잔류물에 미리 메탄올로 포화시킨 헥산 30 ml를 건조물에 가하여 녹인 후 250 ml 용량의 분액깔때기에 옮기고 미리 헥산으로 포화시킨 메탄올 30 ml씩으로 2회 분배 추출하여 지방을 제거한다.
- ⑦ 2회 추출된 메탄올 층을 합친 후 40°C에서 감압 농축하고 잔사를 1% 메탄올 함유 디클로로메탄 4 ml에 완전히 녹인다.

(다) 식육 및 어육

- ① C_{18} 분말 2g, 균질화 시킨 식육시료 0.5 g(수산시료 0.05 g), 무수황산나트륨 0.03 g를 혼합하여 균질화 시킨다.
- ② 여과지(whatman No 1)를 2장을 10 ml 주사기에 넣고 혼합물을 옮겨 담은 후 이용하여 여과지 1장을 덮는다.
- ③ 부피가 4 ml이 될 때까지 압축 한 후 헥산 8 ml 를 가하여 유출시킨다.

- ④ 주사기를 vaccum manifold로 옮긴 후 음압하에서 헥산을 제거한다.
- ⑤ 에틸아세테이트 8 ml로 유출 시킨 후 주사기를 음압하에서 완전건조 시킨다.
- ⑥ 메탄올 13 ml 용출 후 질소 농축하고 이동상 0.5 ml를 가하여 10분간 초음파 한 후 6000G에서 10분간(4℃) 원심분리 한 후 상층액을 취하여 필터로 여과시켜 사용한다.

(2) 식품별/위해물질별 최적 전처리 조건

(가) 아플라톡신 B1

- ① 곡류, 두류, 땅콩, 견과류 및 그 가공품, 된장, 고추장, 고춧가루 등의 검체를 분쇄하여 균질화 시킨 시료 50 g을 정밀히 측정한다.
- ② 메탄올 200 ml를 가하고 균질기로 5분간 고속으로 균질화 한 후 이를 여과하여 여액 100 mL를 분액깔때기에 옮겨 1% 염화나트륨 용액 100 ml를 넣어 섞고 헥산 100 ml를 넣어 진탕한 후 헥산층을 버린다.
- ③ 메탄올·물층에 클로로포름 50 ml를 넣고 5분간 진탕한 후 클로로포름층을 분취한다.
- ④ 다시 클로로포름 50 ml를 넣어 앞의 조작을 반복한다.
- ⑤ 클로로포름층을 합하여 무수황산나트륨으로 탈수하고 감압하에서 약 20 ml까지 농축하여 추출액으로 한다.

(나) 다이옥신

- ① 식육(소고기, 닭고기, 돼지고기)를 분쇄하여 균질화 한 시료 15~20 g을 막자사발에 취하여 적당량의 무수황산나트륨을 가하여 수분을 제거한다.
- ② 속실텐추출장치용 원통여과지로 옮기고 따로 시료를 넣지 않은 원통여과지에 각각 회수율 측정용 표준물질을 첨가 한 다음 비등석이 첨가된 속실텐추출장치에 추출용매(예: 클로로메탄·헥산 = 3:1, v/v) 300 ml를 넣어 18시간 이상 추출한다.

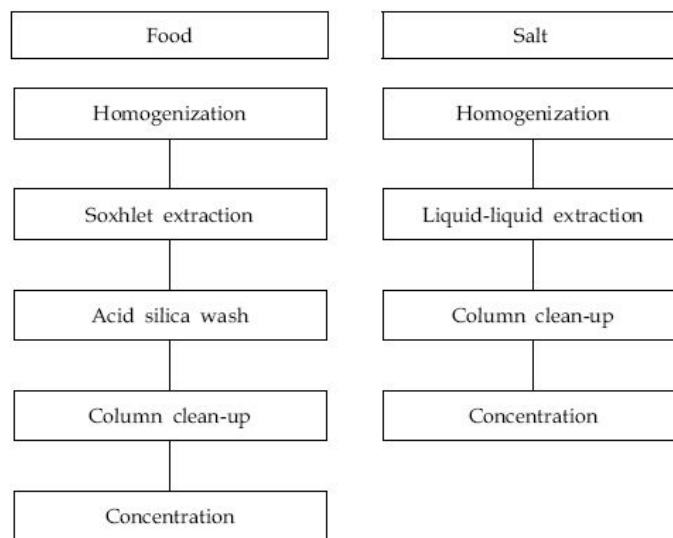


그림 18. 시료별 전처리 조건

(다) 말라카이트그린 및 류코말라카이트그린

- ① 균질화 된 검체(수산물) 20 g을 500 ml 원심관에 담은 후 McIlvaine 용액(pH 3.0) 10 ml, 1M 1-Hexanesulfonic acid 400 μ l, TMB 용액 200 μ l, 아세토나이트릴 30 ml를 가하고 5 분간 균질화 한다.
- ② 이를 3400 rpm(15 $^{\circ}$ C)에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 500 ml 분액깔때기로 옮기고 남은 잔사는 액 McIlvain 용액(pH 6.0) 10 ml와 아세토나이트릴 30 ml를 각각 넣고 동일한 조건으로 균질화 및 원심분리한 한 후 상층액을 합한다.
- ③ 회수한 용액에 증류수 100 ml, 포화식염수 40 ml, 디클로로메탄 60 ml를 가하여 5분간 진탕한 후 정지한 후 층을 분리시키고, 클로로메탄 층을 회수한다.
- ④ 디클로로메탄층을 합하여 40 $^{\circ}$ C 수욕상에서 감압 농축한 후 메탄올 2 ml에 녹여 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 이를 시험 용액으로 사용한다.

(라) 시금치-Ethoprophos 간이 전처리 조건

① 전처리법 (변형 QuEChERS법)

1. 잔류농약의 분해를 막기 위하여 시료를 냉동시켜 분쇄기로 균질화.
2. 균질화된 시료를 10g 칭량, 50ml conical tube에 넣은 후 냉장 보관
3. 균질화 된 시료에 Sodium Citrate 1g, Sodium Hydrogencitrate Sesquihydrate 0.5g, MgSO₄ 4g, NaCl 1g를 넣고 강하게 흔들어서 섞음
4. Acetonitrile을 10 mL 첨가, vortex
5. 원심분리, 상등액 취함
6. Primary secondary amine 150mg과 MgSO₄ 900mg을 넣고 강하게 흔들어서 줌.
7. 원심분리, Blow down
8. Acetone에 재용해
9. 검량선액 준비: 적정량의 ethoprophos(에토프로포스)를 칭량하여 MeOH에 용해
10. GC분석

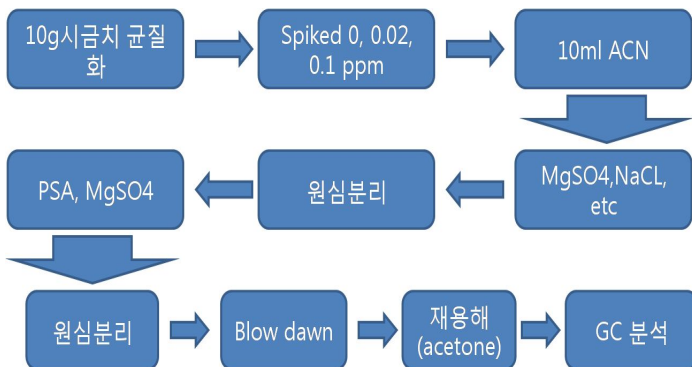


그림 19. Sample preparation procedures

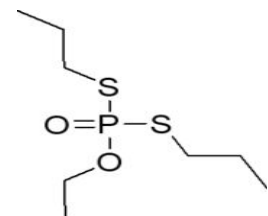


그림 20. Molecular structures of Ethoprophos

② Ethoprophos 기기 분석 조건

Instrument: GC (Agilent 7890A (USA))

Column: Capillary column (DB-17)

type Capillary column

length 145 m

inner diameter 530 μm

Film thickness 1.0 μm

Temp inlet: 240 $^{\circ}\text{C}$, Detector: 250 $^{\circ}\text{C}$,

Oven 160 $^{\circ}\text{C}$ (2min) \rightarrow 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 280 $^{\circ}\text{C}$ (6min hold)

Gas flow: Nitrogen

Column flow: 1.5 mL/min, Make-up flow: 60 mL/min

Inlet: Mode: split (ratio= 1:1)

Detector: FPD

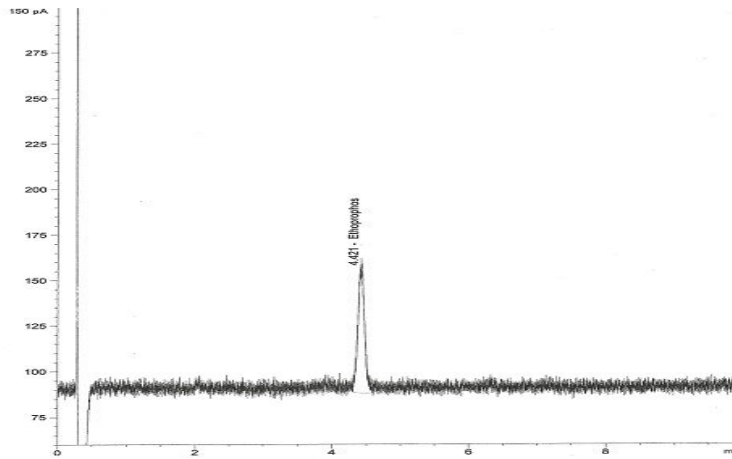


그림 21. Chromatograms for Ethoprophos (0.1 ppm)

③ 전처리법 및 기기분석법 결과

Ethoprophos 표준품 10mg을 Methanol 10ml에 녹여 1 mg/mL의 stock soln.을 만들었다. stock soln.을 methanol로 희석하여 0.01, 0.02, 0.05 0.1 및 0.2 ug/ml의 표준용액으로 만든 후 일정량(10 μL)을 GC에 주입하여 나타난 chromatogram상의 peak 높이를 기준으로 검량 선을 작성하였다. 시금치에 spiked된 농도는 0.02, 0.5 ppm 이며 표준용액과 동일한 양을 주입하여 peak를 관찰하였다. 각각 검량선을 기본으로 표준용액과 비교하여 회수율(%),을 구했으며 검출 한계를 구하였다.

표 1. 에토프로포스의 전처리법 및 분석결과

첨가량 (ppm)	회수율			검출한계(ppm)	정량한계(ppm)	R ²
	반복1	반복2	평균			
0	-	-	-	0.02	0.06	0.999

0.02	101	120	110.5±9.5			(y=642.0x + 2.769)
0.1	112	102	107.0±5.0			

(마) 계란-설파메라진 간이 전처리 조건

① 전처리법

1. 계란을 노른자와 흰자가 골고루 섞이게 잘 혼합하여 균질화
2. 10ml씩 부피를 측정한 후 50ml conical tube에 넣어준 후 냉장 보관
3. Acetonitrile을 동량 첨가한 후 voltex를 한다.
4. 균질화 된 시료에 Sodium Citrate 1g, Sodium Hydrogencitrate Sesquihydrate 0.5g, MgSO₄ 4g, NaCl 1g를 넣고 강하게 흔들어 섞어준다.
5. 원심분리 후 일정량의 상등액을 취하여 15 ml conica tube에 넣어준다.
6. Primary secondary amine 150mg, C18 150mg, MgSO₄ 900mg 정량 넣어주고 강하게 흔듬.
7. 상등액을 취하여 test tube에 옮기고 blow down 시킨 후 이동상 용매에 재용해후 HPLC 분석.
8. 감량선 용액 준비: 적정량의 sulfamerazine(설파메라진)을 칭량하여 MeOH에 용해, standard 농도에 맞게 준비한다.

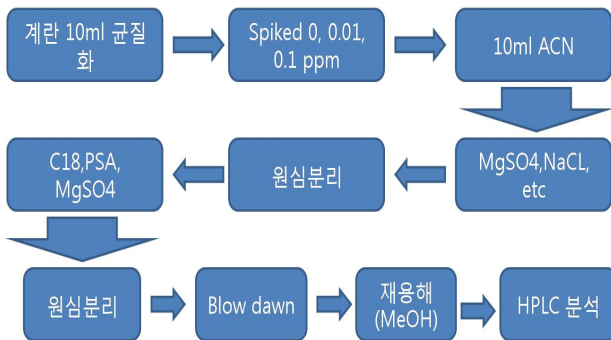


그림 22. Sample preparation procedures

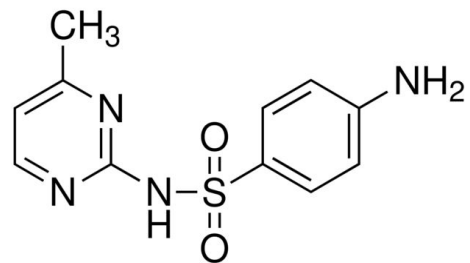


그림 23. Molecular structures of sulfamerazine

② Sulfamerazine의 기기 분석 조건

Instrument : HPLC Agilent 1200

Column : Cadenza 5CD-C₁₈(Imtakt, Japan)

type	C ₁₈
length	250 mm
inner diameter	4.6 mm
particle size	5 μm

Mobile phase: Methanol : 5mM Potassium dihydrogen phosphate (20:80 %)

Flow rate 1.0 mL/min
 Injection Vol. 20 µL
 Detector UV 270 nm

* 위 조건에서 Ethoprophos의 retention time은 약 12.2, 12.5, 12.8 min 이었음.

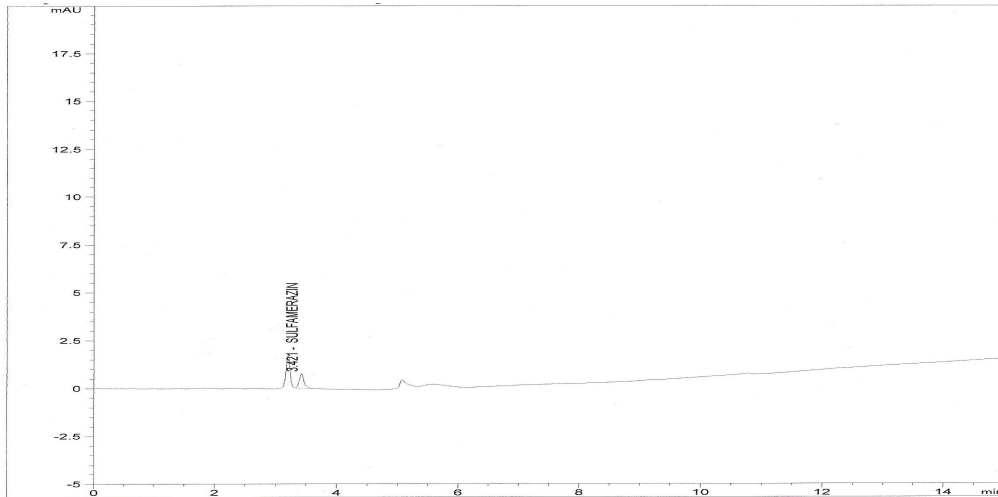


그림 24. Chromatograms for sulfamerazine (0.01 ppm)

③ 전처리법 및 기기분석법 결과

Sulfamerazine 표준품 10mg을 Methanol 10ml에 녹여 1 mg/mL의 stock soln.을 만들었다. stock soln.을 methanol로 희석하여 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.2 ug/ml의 표준용액으로 만든 후 일정량(10 µL)을 HPLC /DAD(UV 270 nm)에 주입하여 나타난 chromatogram상의 peak 높이를 기준으로 검량선을 작성하였다. 시료에 spiked된 농도는 0.01, 0.1 ppm 이며 표준용액과 동일한 양을 주입하여 peak를 관찰하였다. 각각의 물질들의 회수율(%)은 검량선을 기본으로 표준용액과 비교하여 구했으며 그에 따른 평균값과 검출 한계를 구하였다.

표 2. 설파메라진의 전처리법 및 분석결과

첨가량 (ppm)	회수율			검출한계(ppm)	정량한계(ppm)	R ²
	반복1	반복2	평균			
0	-	-	-	0.1	0.3	0.999 (y=3.940x -0.060)
0.01	76.3	79.1	77.7±1.4			
0.1	75.1	77.6	76.4±1.3			

(바) 고기,우유-엔로플록사신 전처리 조건

① 전처리법

1. 우유 또는 고기를 각각 잘 혼합하여 균질화를 시켜준다.

2. 우유는 10ml씩 그리고 고기는 2g에 물을 8ml 첨가하여 50ml conical tube에 넣어준 후 냉장보관.
3. Acetonitrile을 동량(10ml) 첨가한 후 vortex를 한다.
4. 균질화 된 시료에 Sodium Citrate 1g, Sodium Hydrogencitrate Sesquihydrate 0.5g, MgSO₄ 4g, NaCl 1g를 넣고 강하게 흔들어서 섞어준다.
5. 원심분리 후 일정량의 상등액을 취하여 15ml conical tube에 넣어준다.
6. C18 150 mg, MgSO₄ 900mg를 넣고 강하게 흔들어서 섞어준다.
7. 상등액을 일정량 취하여 test tube에 옮기고 blow down 시킨 후 이동상 용매에 재용해 해준 후 HPLC 분석준비를 한다.
8. 검량선 용액 준비: 적정량의 enrofloxacin(엔로플록사신)을 칭량하여 MeOH에 용해하여 sample에 처리 할 수준의 농도와 standard 농도에 맞게 각각 준비한다.

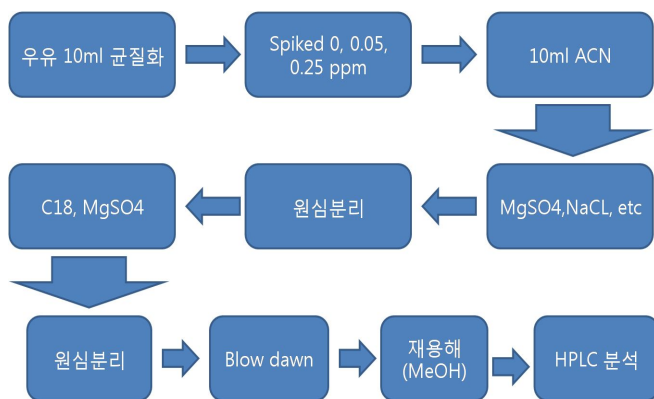


그림 25. Sample preparation procedures of enrofloxacin

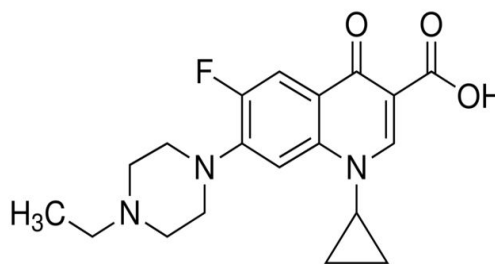


그림 26. Molecular structures of enrofloxacin

② 분석기기 및 분석조건

Column brand	Cadenza 5CD-C ₁₈ (Imtakt, Japan)		
type	C ₁₈		
length	250 mm		
inner diameter	4.6 mm		
particle size	5 μm		
Mobile phase	0.4%Triethylamine,	0.4% phosphoric acid	혼합액 :
	acetonitrile, Tetrahydrofuran (80:20, v/v)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection Vol.	10 μL		
Detector	DAD(UV 270 nm)		

* 위 조건에서 enrofloxacin의 retention time은 약 6min이었음.

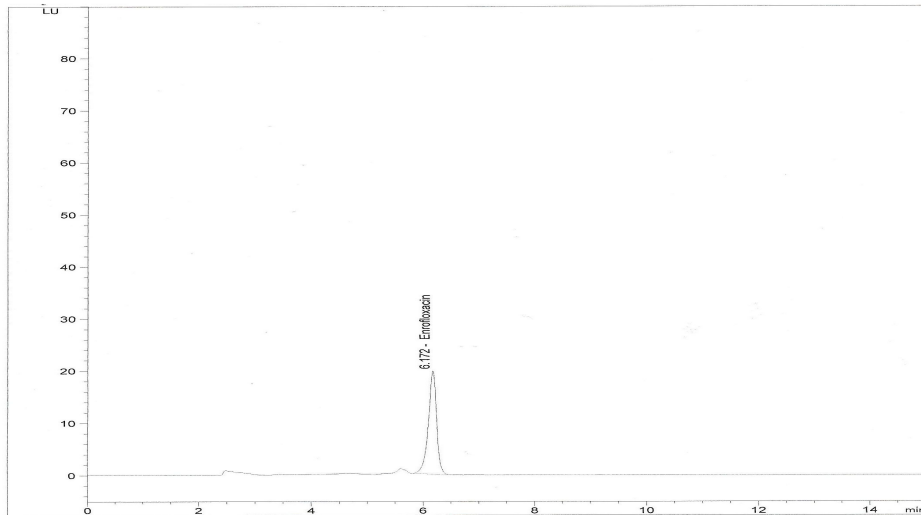


그림 27. Chromatograms for enrofloxacin (Beef 0.05 ppm)

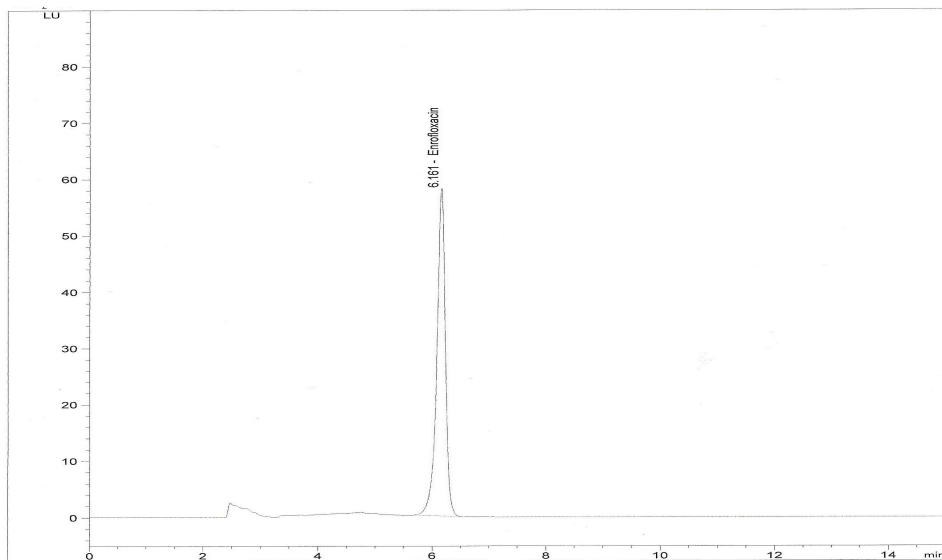


그림 28. Chromatograms for enrofloxacin (Milk 0.1 ppm)

③ 전처리법 및 기기분석법 결과

Enrofloxacin 표준품 10mg을 Methanol 10ml에 녹여 1 mg/mL의 stock soln.을 만들었다. stock soln.을 Methanol로 희석하여 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 및 10.0 mg/L의 표준용액으로 만든 후 일정량(10 μ L)을 HPLC /DAD(UV 270 nm)에 주입하여 나타난 chromatogram상의 peak 높이를 기준으로 검량선을 작성하였다.

시료에 spiked된 농도는 고기의 경우 0, 0.1, 0.5 이며 우유의 경우에는 0.05, 0.25 ppm 이며 표준용액과 동일한 양을 주입하여 peak를 관찰하였다. 각각의 물질들의 회수율(%)은 검량선을 기본으로 표준용액과 비교하여 구했으며 그에 따른 평균값과 검출 한계를 구하였다.

표 3. 엔로플록사신의 전처리법 및 분석결과

시료	첨가량 (ppm)	회수율			검출한계 (ppm)	정량한계 (ppm)	R ²
		0	반복2	평균			
고기	0	-	-	-	0.01	0.03	0.9997 (y=4.06446x -0.17499)
	0.1	75.1	75.9	75.5±0.6			
	0.5	69.7	71.3	70.5±1.1			
우유	0	-	-	-	0.01	0.03	
	0.05	93.0	92.7	92.9±0.2			
	0.25	77.4	78.3	77.9±0.6			

다. 식품별/위해물질별 최적 전처리 조건을 개발

(1) 우유-Tetracyclines (Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline)의 전처리조건

(가) 전처리법

- ① Trifluoroacetic acid (TFA) 1%를 포함한 McIlvaine's buffer 용액, 5 mL과 동량의 우유 (5 mL)를 넣고 2분간 vortex로 균질화 하였다.
- ② 균질화된 시료를 8,000 rpm에서 20분 동안 4 °C에서 원심분리 하였다.
- ③ 원심분리된 상층액, 3 mL을 취하여 질소농축기로 농축하였다.
- ④ 농축된 용액을 methanol 3 mL로 용해한 다음, syringe filter (0.45 µm)로 여과 하였다.
- ⑤ 여과된 용액은 HPLC를 통해 분석되었다.

(나) 표준검량선 작성 및 회수율 분석

① Tetracycline (TC), Oxytetracycline (OTC), Chlortetracycline (CTC) 기기 분석 조건

Column brand	Agilent
type	Eclipse XDB-C18
length	150 mm
inner diameter	4.6 mm
particle size	5 µm
Mobile phase	(min) Acetonitrile : 50mM oxalic acid (20:80 %)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection Vol.	20 µL
Detector	UV 365 nm

* 위 조건에서 TC, OTC, CTC의 retention time은 약 3.3, 2.6, 8.0 min 이었음.

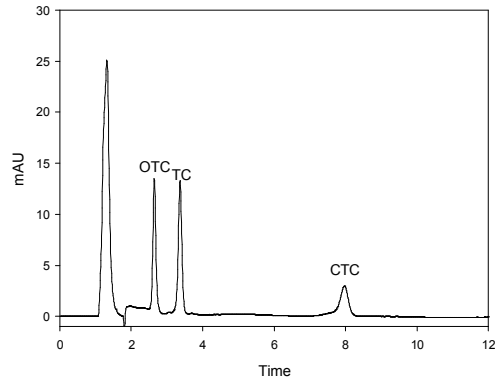


그림 29. TC, OTC 그리고 CTC에 대한 HPLC 분석 결과 chromatogram.

② 검량선 작성과 기기분석 결과

Tetracycline 표준품 10 mg을 methanol 10 mL에 녹여 1 mg/mL의 stock soln.을 만들었다. 제작된 stock soln.을 methanol로 희석하여 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 ug/mL 농도의 표준용액을 만든 후, 일정량(20 µL)을 HPLC에 주입하여 나타난 chromatogram상의 peak 면적을 기준으로 검량선을 작성하였다. 0.1 ppm과 0.5 ppm의 농도로 우유에 tetracycline를 spiking 하였고 표준용액과 동일한 양을 주입하였다. 검량선을 기준으로 표준용액과 비교하였고 그 결과, 표 1과 같은 회수율(%)과 검출 한계를 구하였다.

표 4. Tetracycline의 기기분석결과

첨가량 (ppm)	회수율			검출한계 (ppm)	정량한계 (ppm)	R ²
	반복1	반복2	평균			
0	-	-	-	0.1	0.3	0.9782
0.1	91.3	90.1	90.7±1.4			
0.5	85.1	92.6	88.6±1.3			

(2) 돼지고기-Sulfamethazine 간이 전처리 조건

(가) 전처리법

- ① 돼지고기의 근육부위 20 g을 칭량하고 homogenizer를 이용하여 균질화 하였다.
- ② 균질화된 시료에서 다시 5 g을 칭량하여 50 mL tube에 넣었다.
- ③ 시료가 들어있는 50 mL tube에 10 mL의 methanol을 넣고 5분간 vortex 후, filter paper를 이용하여 혼합물을 걸러주었다.
- ④ 걸러진 여과액을 질소농축기로 농축한 다음, 이동상 용액 1 mL을 가하여 시험용액으로 사용하였다.

(나) 표준검량선 작성 및 회수율 분석

- ① Sulfamethazine (SMZ), sulfamerazine (SMR), sulfaclozine sodium (SCS) 기기 분석 조

건

Column : Cadenza 5CD-C₁₈ (Imtakt, Japan)

type C₁₈
 length 250 mm
 inner diameter 4.6 mm
 particle size 5 μm

Mobile phase: Methanol : 5mM Potassium dihydrogen phosphate (20:80 %)

Flow rate 1.0 mL/min

Injection Vol. 20 μL

Detector UV 270 nm

* 위 조건에서 SMZ, SMR, SCS의 retention time은 약 12.2, 12.5, 12.8 min 이었음.

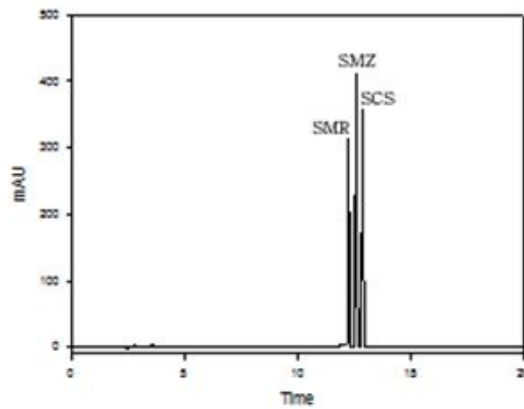


그림 30. SMZ, SMR, SCS에 대한 HPLC 분석 결과 chromatogram.

② 검량선 작성과 기기분석 결과

Sulfamethazine 표준품 10 mg을 methanol 10 mL에 녹여 1 mg/mL의 stock soln.을 만들었다. Stock soln.을 methanol로 희석하여 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 ug/mL 농도의 표준용액을 만든 후, 일정량(20 μL)을 HPLC에 주입하여 나타난 chromatogram상의 peak 면적을 기준으로 검량선을 작성하였다. 0.1 ppm과 0.5 ppm의 농도로 돼지고기에 sulfamethazine를 spiking 하였고 표준용액과 동일한 양을 주입하여 peak를 관찰하였다. Sulfamethazine의 회수율(%)은 검량선을 기본으로 표준용액과 비교하여 구했으며, 그에 따른 평균값과 검출 한계를 구하였다.

표 5. Sulfamethazine의 기기분석결과

첨가량 (ppm)	회수율			검출한계(ppm)	정량한계(ppm)	R ²
	반복1	반복2	평균			
0	-	-	-	0.1	0.3	0.9893
0.1	85.3	94.1	89.7±3.4			
0.5	91.1	89.6	90.4±2.7			

(3) 닭고기-Enrofloxacin 전처리 조건

(가) 전처리법

- ① 닭고기 20 g를 칭량하고 homogenizer를 사용하여 균질화 하였다.
- ② 균질화 된 시료에서 1 g를 칭량하여 15 mL tube에 넣었다.
- ③ 0.1M EDTA 100 uL와 methanol:water (7:3) 혼합액 3 mL을 혼합하였다.
- ④ 위와 같이 준비된 용액을 시료가 담긴 15 mL tube에 넣고 2분간 vortex 하였다.
- ⑤ 혼합액이 섞인 시료를 4 °C, 7,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후, 상등액 2 mL을 취하여 질소농축 하였다.
- ⑥ 농축된 시료는 이동상 용액 1 mL을 가하여 시험용액으로 사용되었다.

(나) 표준검량선 작성 및 회수율 분석

① Enrofloxacin (EF) 기기 분석 조건

Column	brand	Cadenza 5CD-C ₁₈ (Imtakt, Japan)		
	type	C ₁₈		
	length	250 mm		
	inner diameter	4.6 mm		
	particle size	5 μm		
Mobile phase	0.4% Triethylamine, 0.4% phosphoric acid혼합액	:		acetonitrile, Tetrahydrofuran (80:20, v/v)
Flow rate	1.0 mL/min			
Injection Vol.	10 μL			
Detector	DAD (UV 270 nm)			

* 위 조건에서 EF의 retention time은 약 6 min이었음.

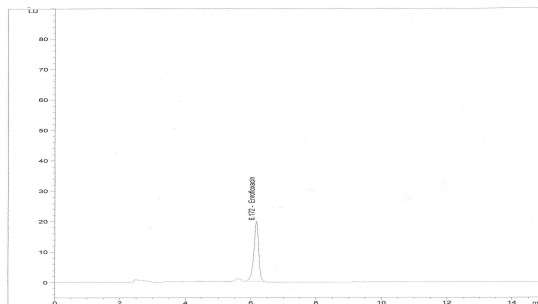


그림 31. EF 대한 HPLC 분석 결과 chromatogram.

② 검량선 작성과 기기분석 결과

Enrofloxacin 표준품 10 mg을 acetonitril 10 mL에 녹여 1 mg/mL의 stock soln.을 만들었다. Stock soln.을 0.1% formic acid가 포함된 acetonitril로 희석하여 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 ug/mL 농도의 표준용액을 만든 후, 일정량(20 μL)을 HPLC에 주입하여 나타난 chromatogram상의

peak 면적을 기준으로 검량선을 작성하였다. 닭고기에 spiked된 enrofloxacin의 농도는 0.1 ppm과 0.5 ppm이었으며, 표준용액과 동일한 양을 주입하여 peak를 관찰하였다. Enrofloxacin의 회수율(%)은 검량선을 기본으로 표준용액과 비교하여 구했으며, 그에 따른 평균값과 검출한계를 구하였다.

표 6. Enrofloxacin의 기기 분석결과

첨가량 (ppm)	회수율			검출한계(ppm)	정량한계(ppm)	R ²
	반복1	반복2	평균			
0	-	-	-	0.1	0.3	0.9893
0.1	89.7	93.4	91.6±4.1			
0.5	95.4	90.2	92.8±3.2			

(3) 광어-Malachite green 전처리 조건

(가) 전처리법

- ① 광어 20 g을 칭량하고 homogenizer를 사용하여 균질화 하였다.
- ② 균질화 된 시료에서 2 g을 칭량하여 15 mL tube에 넣었다.
- ③ McIlvaine's buffer 1 mL, 1M 1-hexanesulfonic acid 40 uL, TMB 용액 20 uL과 acetonitrile 3 mL을 혼합하여 5분간 균질화 하였다.
- ④ 균질화된 시료는 15°C, 3,500 rpm에서 5분간 원심분리 되었다.
- ⑤ 분리된 층의 상등액을 취하고, 여기에 증류수 10 mL, 포화식염수 4 mL과 dichloromethane 6 mL을 가하여 5분간 vortex 하였다.
- ⑥ 혼합시료로부터 dichloromethane층을 질소농축기로 농축하였다.
- ⑦ 농축된 시료에 methanol 2 mL을 가하여 시험용액으로 사용하였다.

(나) 표준검량선 작성 및 회수율 분석

① Malachite green (MG), Leucomalachite green (LMG) 기기 분석 조건

Column brand	Luna (phenomenex, U.S.A)		
type	C ₁₈		
length	250 mm		
inner diameter	4.6 mm		
particle size	5 μm		
Mobile phase	(min)	Acetonitrile : 0.1% phosphoric acid	
	0	20	: 80
	2	30	: 70
	3	40	: 60

5 80 : 20
 12 80 : 20
 15 20 : 80

Flow rate 1.0 mL/min
 Injection Vol. 20 μ L
 Detector UV 210 nm

* 위 조건에서 MG, LMG의 retention time은 약 6.9, 6.0 min 이었음

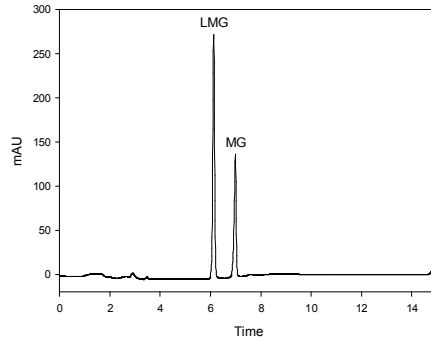


그림 32. MG, LMG에 대한 HPLC 분석 결과 chromatogram.

② 검량선 작성과 기기분석 결과

Malachite green 표준품 10 mg을 methanol 10 mL에 녹여 1 mg/mL의 stock soln.을 만들었다. Stock soln.을 이동상으로 희석하여 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 ug/mL 농도의 표준용액을 만든 후, 일정량(20 μ L)을 HPLC에 주입하여 나타난 chromatogram상의 peak 면적을 기준으로 검량선을 작성하였다. 0.05 ppm과 0.2 ppm의 농도로 광어에 malachite green를 spiking 하였고 표준용액과 동일한 양을 주입하여 peak를 관찰하였다. Malachite green의 회수율(%)은 검량선을 기본으로 표준용액과 비교하여 구했으며, 그에 따른 평균값과 검출 한계를 구하였다.

표 7. Malachite green의 기기 분석결과

첨가량 (ppm)	회수율			검출한계(ppm)	정량한계(ppm)	R ²
	반복1	반복2	평균			
0	-	-	-	0.05	0.2	0.9775
0.05	73.5	81.3	77.4 \pm 3.8			
0.2	82.5	77.8	80.2 \pm 5.4			

다. 위해물질 특이 고감도 바이오리셉터(압타머) 개발 및 특성분석

(1) SELEX를 이용한 위해물질의 압타머 개발

(가) Magnetic bead를 이용한 SELEX법과 선별된 압타머의 특성분석

① In-vitro에서의 압타머 선별

무작위 압타머 라이브러리를 구축하기 위해 (주)바이오니아(Bioneer Inc., Korea)에서

5'-CGTACGGAATTCGCTAGCN(40mer)GGATCCGAGCTCCACGTG-3', 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCN(40mer)GGATCCGAGCTCCACGTG-3', 5'-CTTCTGCCCCGCTCCTTCC(40mer)GGAGACGAGATAGGCGGA CACT-3', 그리고 5'-AGCAGCACAGAGGTCAGATG(40mer)TTCAGCGTAGCACGCATAGG-3' 3개의 ssDNA 라이브러리 합성을 의뢰하였다. 3개의 ssDNA 라이브러리는 PAGE정제된 시료를 사용하였으며, 무작위 압타머의 불변부위에 대한 PCR을 위한 primer는 APT1Ff: 5' fluorescein-CGTACGGAATTCGCTAGC-3', APT1R: 5'-CACGTGGAGCTCGGATCC-3', APT2Ff: 5' fluorescein-CTTCTGCCCCGCTCCTTCC-3', APT2R: 5'-GTGTCCGCCTATCTCGTCTCC-3', APT3Ff: 5' fluorescein-AGCAGCACAG AGGTCAGATG-3', AP T3R: 5'-CCTATGCGTGCTACGCTCAA-3'를 (주)바이오니아(Bioneer Inc., Korea)에서 합성 의뢰하여 사용하였다

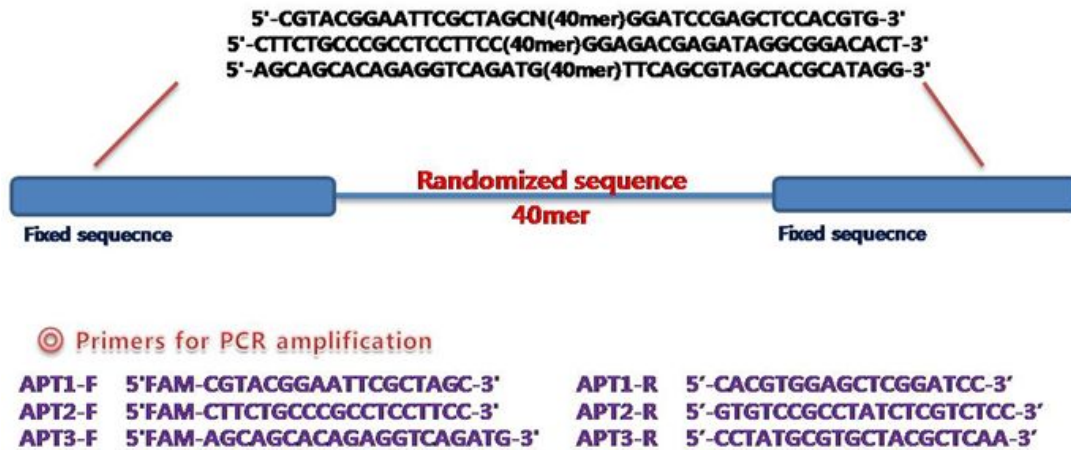


그림 33. 무작위 SELEX DNA 라이브러리

압타머를 선별하기 위한 방법으로는 Counter-SELEX 방법을 사용하였다. 1990년 콜로라도 대학의 Larry Gold 연구팀에 의해 SELEX 라고 하는 기술이 최초로 개발된 이후, 이를 변형한 방법 중 하나인 Counter-SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment)방법은 표적물질과 유사한 구조를 가지는 물질에 대해 친화성을 가지는 압타머를 제거함으로써 표적 특이성을 높이는 방법으로 미리 준비된 Binding buffer(100mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 0.02 Tween 20, pH 7.6)에 11.25ug molecules가 되도록 ssDNA를 첨가한 후 90℃에서 10분, 4℃에서 15분 그리고 25℃에서 8분간 반응된 시료를 사용하였다. 그리고 그와 동시에 표적물질을 위한 beads를 준비하였다.

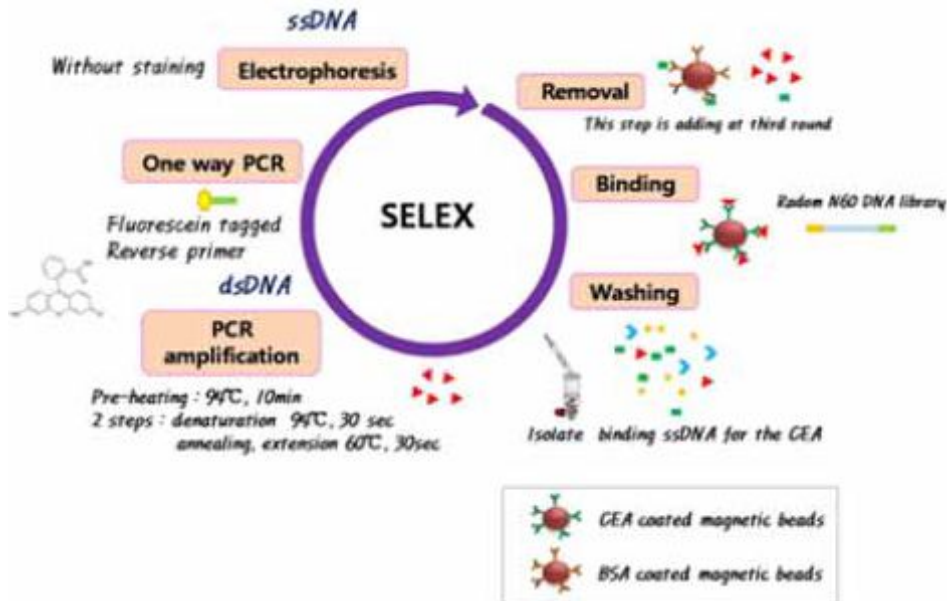


그림 34. 표적물질 압타머 선별 모식도

전처리 과정은 표적물질이 결합된 M-280 tosylactivated magnetic beads를 Bio magnetic processor(Vision scientific, Korea)에 장착하여 상층액을 제거하고 1ml Binding buffer(100mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 0.02 Tween 20, pH 7.6)를 이용하여 5회 세척 후 처음 부피의 binding buffer를 첨가하여 처리하였다. 전처리된 무작위 DNA pool과 tosylactivated magnetic beads를 혼합하여 상온(25°C)에서 30분 동안 반응 후 Bio magnetic processor(Vision scientific, Korea)에 장착하여 상층액을 제거하였다. 이 과정 또한 1mL Binding buffer를 이용하여 5회 세척 후 200uL Elution buffer(40mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 3.5M urea, 0.02% Tween 20, pH 8.0)를 첨가하고 80°C에서 10분 동안 반응 시켰다. 반응 후 Bio magnetic processor(Vision scientific, Korea)에 장착하여 상층액을 제거하고 다시 Elution buffer를 첨가하였다. 이 과정을 4회 반복하였다.

용출된 올리고뉴클레오티드(Oligonucleotides)를 농축하기 위하여 에탄올 침전법을 이용하였다. 용출된 올리고뉴클레오티드의 0.1배의 3M sodium acetate buffer(pH 5.2), 5ul glycogen(20%), 2.5배의 Absolute Ethanol(Duk-san reagents Inc., Korea)를 첨가하고 -80°C에서 90분 반응 하였다. 12,000rpm에서 10분간 원심분리 후 1mL 70% Ethanol을 첨가하여 재 현탁시키고 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 완전히 건조된 후 50ul 10mM Tris-HCl(pH 8.5)을 첨가하여 녹인 후 다음 단계를 진행하였다. 회수된 올리고뉴클레오티드의 농도를 측정하기 위해 Nano-Drop(ACTGene ASP-2680 spectrophotometer, USA)을 이용하였다.

표적물질의 압타머 선별을 위한 ssDNA를 증폭하기 위해서 50uL AccuPower HotStart PCR PreMix(Bioneer Inc., Korea)를 사용하였으며, 각각10uM primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. Template DNA의 농도는 100~500ng으로 맞추었으며 PCR 조건은 94°C에서 5분

동안 initial heat activation step, 94°C에서 1분 동안 35cycles, 47°C 1분, 72°C 1분 그리고 72°C에서 10분 동안 extension step으로 진행하였다. PCR 반응물에 대한 확인을 하기 위해 2.0% agarose gel을 이용하여 전기영동을 수행하였다. 정제는 AccuPrep Gel Purification Kit(Bioneer Inc., Korea)를 사용하였다.

다음 단계를 수행하기 위해서 PCR 반응물로부터 정제된 ssDNA가 필요하기 때문에 denaturing PAGE를 수행하였다. PAGE를 수행하기 위해서 12% acrylamide, 7M urea, 20% formamide를 TBE buffer에 녹인 후 사용하였다. PCR 반응물로부터 정제된 시료는 95°C에서 10분 동안 열처리하여 변성시킨 후 12% acrylamide gel에 주입하였다. 이때 시료에는 형광으로 표지되어 있어서 UV transilluminator에서 확인이 용이하였다. UV상에서 DNA 단편(형광표지된 단편)을 잘라낸 후 Maxim Gilbert 용액(0.5M Ammonium acetate, 10mM Magnesium acetate, 1mM EDTA, 0.1% SDS)을 gel무게의 2배양을 첨가하였다. 65°C에서 30마다 vortexing 하면서 4시간 동안 처리 후 37°C에서 12시간동안 반응시켰다. 반응 완료 후 13,000rpm에서 1분간 원심분리 후 상층액을 whatman GF/C filter를 이용하여 여과하였다. 상층액의 양을 측정 후 0.1배의 3M sodium acetate buffer(pH 5.2), 5ul glycogen(20%), 2.5배의 Absolute Ethanol(Duk-san reagents Inc., Korea)를 첨가하고 -80°C에서 90분 반응 하였다. 12,000rpm에서 10분간 원심분리 후 1mL 70% Ethanol을 첨가하여 재 현탁시키고 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 완전히 건조된 후 50ul 10mM Tris-HCl(pH 8.5)을 첨가하여 녹인 후 다음 단계를 진행하였다. 회수된 ssDNA 혹은 dsDNA의 농도를 측정하기 위해 Nano-Drop (ACTGene ASP-2680 spectrophotometer, USA)을 이용하였다.

1번째 SELEX 후 회수된 DNA 전체를 DNA pool로 사용하여 2번째 SELEX를 수행하였다. 이러한 방법을 12번 반복함으로써 표적 특이성을 가지는 압타머를 선별하였으며 3, 6, 9 SELEX 단계에서는 표적물질과 유사한 구조를 가지는 다른 물질을 이용하여 표적 특이성을 가지지 못하는 압타머들을 제거함으로써 표적 선택성을 높였다.

② 압타머 후보물질의 클로닝

11번째 SELEX 후 12번째 SELEX에서 ssDNA의 회수율을 확인 후 클로닝을 위한 PCR을 수행하였다. 이 때 사용된 Primer는 아무것도 붙어있지 않은 것을 사용하였으며 클로닝을 위해서는 T&A cloning Vector Kit(RBC Bioscience Corp., Taiwan)를 사용하였다. 반응 완료 후 X-Gal/IPTG/Amp이 함유된 한천배지에 하루 동안 배양 후 양성반응을 나타낸 콜로니만 새로운 배지에 배양 하였다. 배양된 클론들을 Ampicilline이 함유된 LB(Luria-Bertani broth, Difco, USA)배지에 배양한 후 Miniprep kit(Solgent Co. Ltd., Korea)를 사용하여 DNA를 정제 하였다.

선별된 압타머의 2차구조를 분석하기 위해서 Michael Zuker가 개발한 Internet-tool Mfold(<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form.cgi>)를 이용하였다.

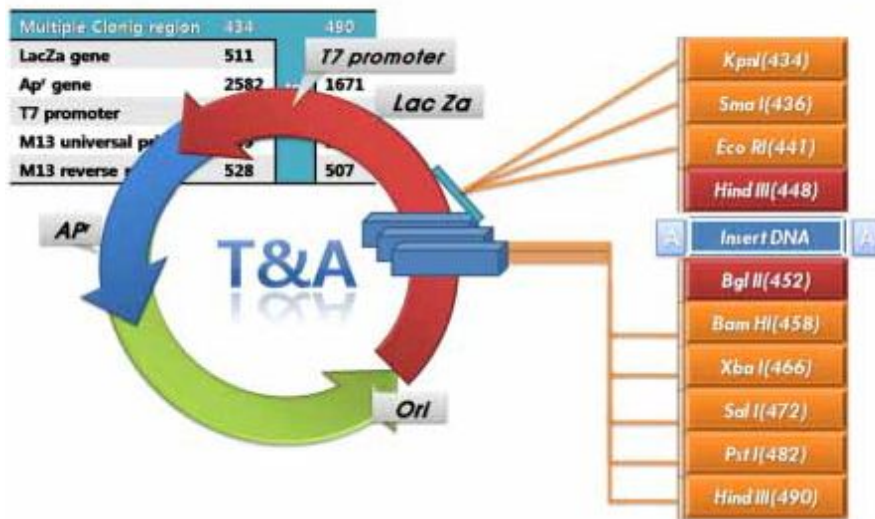


그림 35. 압타머 후보물질의 T&A Clonig Kit

③ 압타머 후보물질과 표적물질의 1차 선별

클로닝을 통하여 선별된 압타머 후보물질과 표적물질의 효율적인 선별을 하기 위하여 96well immunoplate(SPL life science, Korea)를 이용한 효소결합면역흡착검사(ELISA)를 이용하였다. 항원물질을 만들기 위해서 25% Glutaraldehyde(Sigma-Aldrich Inc., USA)를 이용하여 BSA(Bovin Serum Albumin, Sigma-Aldrich Inc., USA)와 표적물질을 결합하였으며, 항체역할을 하기 위한 물질은 Biotin이 결합된 primer를 이용한 PCR반응을 수행 한 후 이용하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분 동안 initial heat activation step, 94℃에서 1분 동안 20cycles, 47℃ 1분, 72℃ 1분 그리고 72℃에서 10분 동안 extension step으로 진행하였다. 표적물질과 BSA가 결합된 물질과 압타머 후보물질을 coating buffer(15mM Na₂CO₃, 35mM Na₂CO₃, pH9.6)에 2uL 표적물질-BSA 결합 물질을 첨가하여 4℃에서 96well immunoplate(SPL life science, Korea)에 하루 동안 반응 후 코팅된 물질을 완전히 제거 후 37℃에서 2시간 이상 방치하여 완전 건조 하였다. 코팅되지 않은 나머지 부분을 막기 위해서 200uL 0.5% skim milk(Difco, USA)를 첨가 하고 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 200uL PBST(0.05% Tween)를 이용하여 3회 세척 후 100uL 압타머-Biotin을 37℃에서 1시간 반응하고 200uL PBST(0.05% Tween)를 이용하여 3회 세척하였다. 100uL Streptavidin-HRP(5000배 희석)를 37℃에서 40분 동안 반응 후 발색확인을 하였다. 발색시약으로는 OPD(o-phenyldiamine, Sigma-Aldrich Inc., USA)를 0.5M Phosphate-citrate buffer(0.05M citric acid, 0.1M Na₂HPO₄, pH 5.0)에 녹인 후 100uL 사용하였다. 반응 정지액으로는 100uL 1M H₂SO₄를 사용하였다.

④ 압타머 후보물질과 표적물질의 2차 선별과 염기서열 분석

1차로 선별된 압타머 후보물질을 Ampicilline이 함유된 LB(Luria -Bertani broth, Difco, USA)배지에 배양한 후 Miniprep kit(Solgent Co. Ltd., Korea)를 사용하여 DNA를 정제 하

였다. 정제된 DNA 시료의 염기서열분석을 하기 위해서 마크로젠(Macrogen Inc., Korea)에 의뢰하였다.

표 8. 압타머 후보물질과 표적물질의 1차 선별조건

	Parameters	Conditions
Reagents	Coating Antigen	Aptamer-BSA conjugate
	Working Solution	10% MeOH/PBS(pH 7.4)
	Substrate	OPD
	Stopping solution	1M H ₂ SO ₄
	Washing solution	PBS containing 0.05% Tween 20
Reaction	Coating of Ag	Overnight at 4°C
	Incubation time	40min at 37°C
	Color developing step	30min at RT

⑤ 압타머 후보물질과 표적물질과의 친화도 확인

염기서열을 통해 분석된 압타머 후보물질에 대한 표적물질과의 친화도를 알아보기 위하여 (주)바이오니아(Bioneer Inc., Korea)로부터 합성하였다. 실제적으로 2×10^9 의 beads를 0.1M borate buffer(pH 9.5)에 6종의 항생물질이 10mM이 되도록 첨가하여 37°C에서 overnight하여 반응하였다. 반응 완료된 beads를 Bio magnetic processor(Vision scientific Inc., Korea)에 장착 하여 상층액이 투명해질 때까지 정치하고 새로운 튜브로 옮긴 후 표적물질과 M-280 tosylactivated magnetic beads의 결합력을 측정하기 위하여 GC/LC 분석 및 UV spectrophotometer(Molecular devices Corp., Spetra-max PLUS 384, USA)를 이용하였다. 1X PBS buffer(pH 7.4)를 첨가한 후 다시 Bio magnetic processor(Vision scientific, Korea)를 이용하여 상층액을 제거하는 일련의 반복과정을 통해 결합되지 않은 항생제를 제거하였다. 마지막으로 1mL 1M ethanolamine(pH 8.0)을 첨가하여 37°C에서 6시간 반응하였다. 반응 완료 후 1mL 1X PBS buffer(pH 7.4)를 첨가하고 Bio magnetic processor(Vision scientific, Korea)에 장착하여 상층액이 투명해질 때까지 정치 후 제거하였다. 이 과정 또한 일련의 반복과정을 통해 결합되지 않은 항생제를 제거하였다. 마지막으로 1mL 1X PBS 용액(pH 7.4)을 첨가하여 재 부유시켜 사용하였다. 미리 준비된 200uL Binding buffer(100mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 0.02 Tween 20, pH 7.6)에 합성된 압타머 후보물질을 5ug 첨가한 후 90°C에서 10분, 4°C에서 15분 그리고 25°C에서 8분간 반응된 시료를 사용하였다. 그리고 그와 동시에 표적물질을 위한 beads를 준비하였다. 전처리 과정은 표적물질이 결합된 M-280 tosylactivated magnetic beads를 Bio magnetic processor(Vision scientific, Korea)에 장착하여 상층액을 제거하고 1ml Binding buffer(100mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 0.02 Tween 20, pH 7.6)를 이용하여 5회 세척 후 200uL binding buffer를 첨가하여 처리하였다. 전처리된 무작위 DNA pool과 tosylactivated magnetic beads를 혼합하여 상온(25°C)에서 30분 동안 반응 후 Bio magnetic processor(Vision scientific, Korea)에 장착하여 상층액을 제거하였다. 1ml Binding buffer를 이용하여 3회 반복함으로서 표적물질과 결합되지 않은 압타머 후보물질을 제거하였다. 그리고 마지막으로 200uL Elution buffer(40mM Tris-HCl, 10mM

EDTA, 3.5M urea, 0.02% Tween 20, pH 8.0)를 첨가하고 80℃에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 후 Bio magnetic processor(Vision scientific, Korea)에 장착하여 상층액을 회수한 후 Nano-Drop(ATGene APS280 Spectro -photometer, USA)를 이용하여 ssDNA의 농도를 확인하였다.

⑥ 표적물질과 M-280 tosylactivated bead 간 결합력 측정

우선 표적물질과 M-280 tosylactivated magnetic beads의 결합력을 측정하기 위하여 Tetracycline, Chlortetracycline, Oxytetracycline, Malachite green, Leucomalachite green, Sulfonamides계열, Chloramphenicol은 HPLC 기기분석을 통하여 시료의 반응전과 반응후의 농도를 정량하여 결합력을 측정하였다. Ethoprophos의 경우 UV spectrophotometer를 이용하여 표준곡선을 그린 후 230nm에서 absorbance (OD) 값을 측정하였다(그림 26, 27, 28, 29, 30). 그 결과 Tetracycline 71%, Oxytetracycline 90%, Chlortetracycline 85%, Malachite green 72%, Leucomalachite green 62%, Ethopropose 75%의 결합력을 나타냈다(표 2). 그러나 sulfonamides 계열인 sulfathiazole, sulfamethazine, sulfamethoxazole과 Chloramphenicol은 10% 미만의 결합력을 나타내었다.

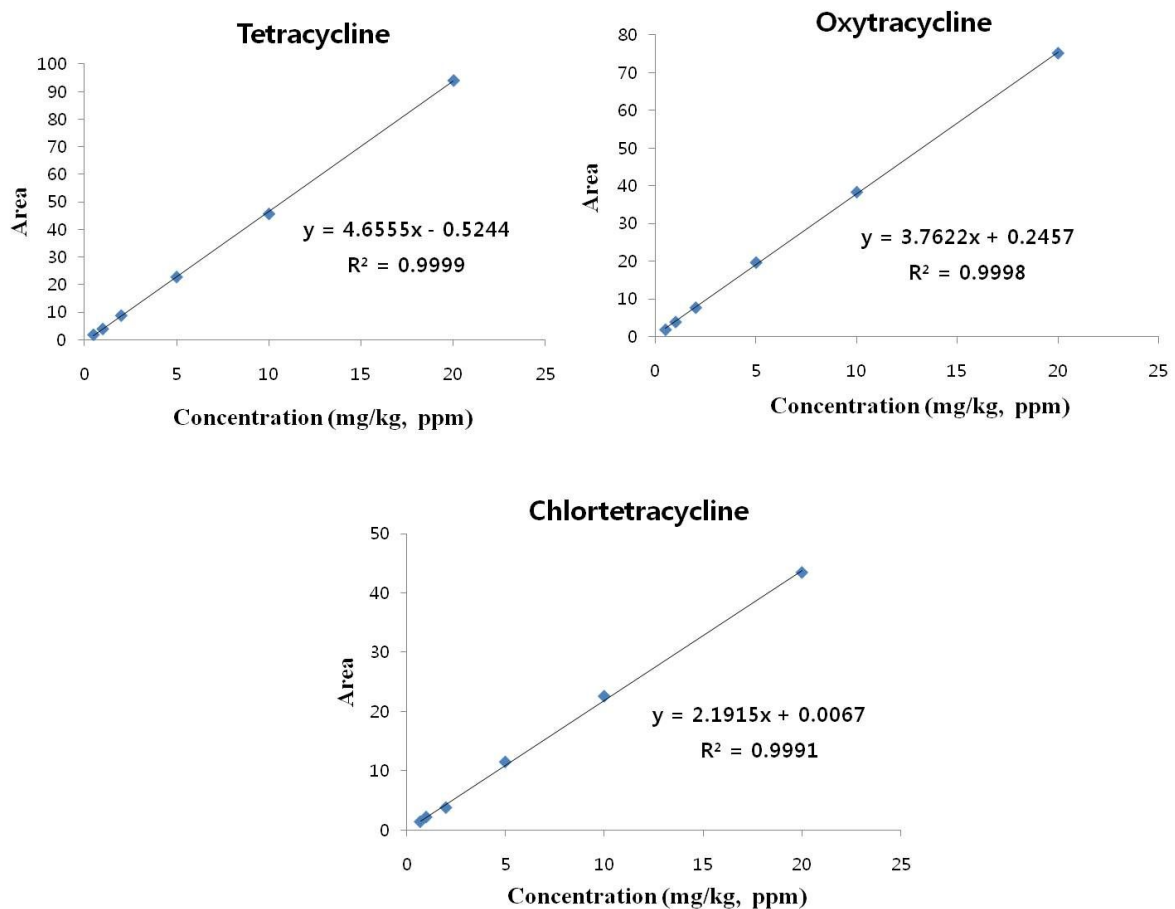


그림 36. Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline 표준곡선

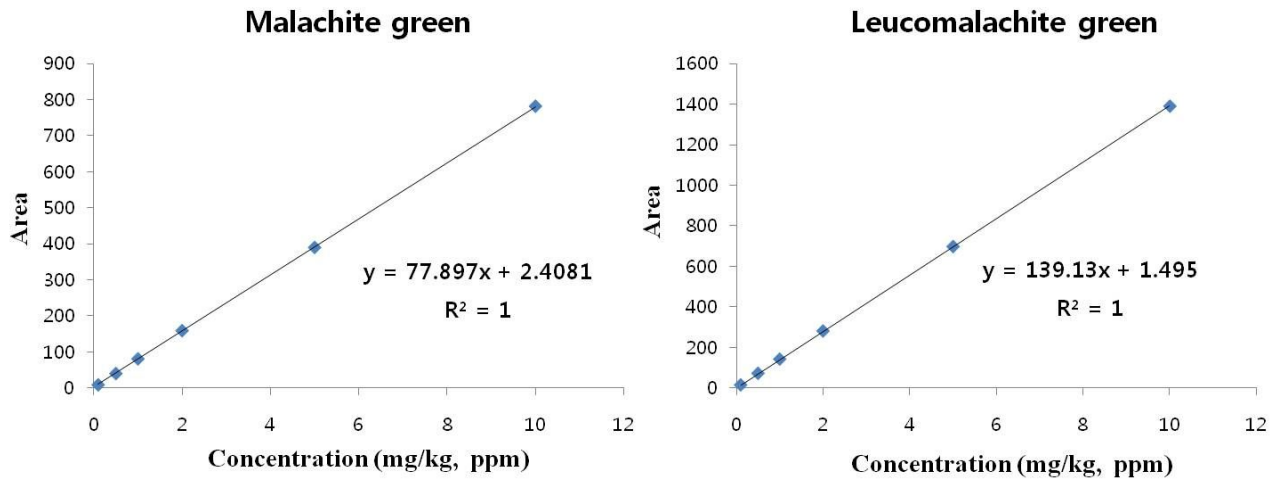


그림 37. Malachite green, Leucomalachite green 표준곡선

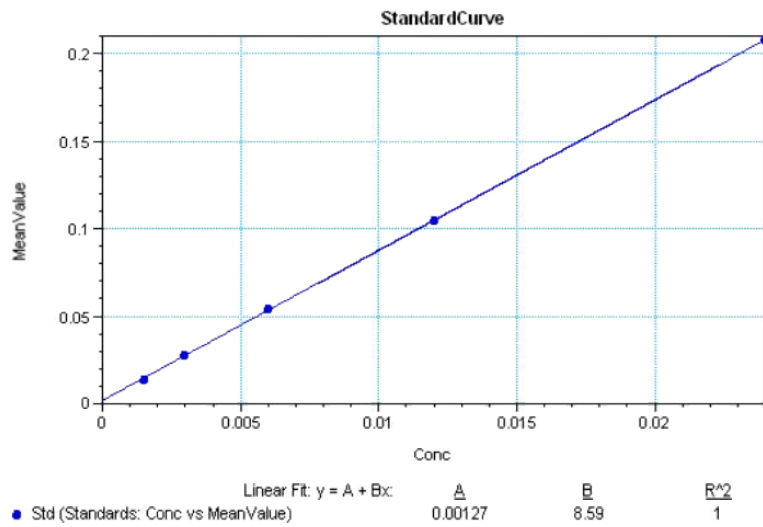


그림 38. Ethoprophos 표준곡선

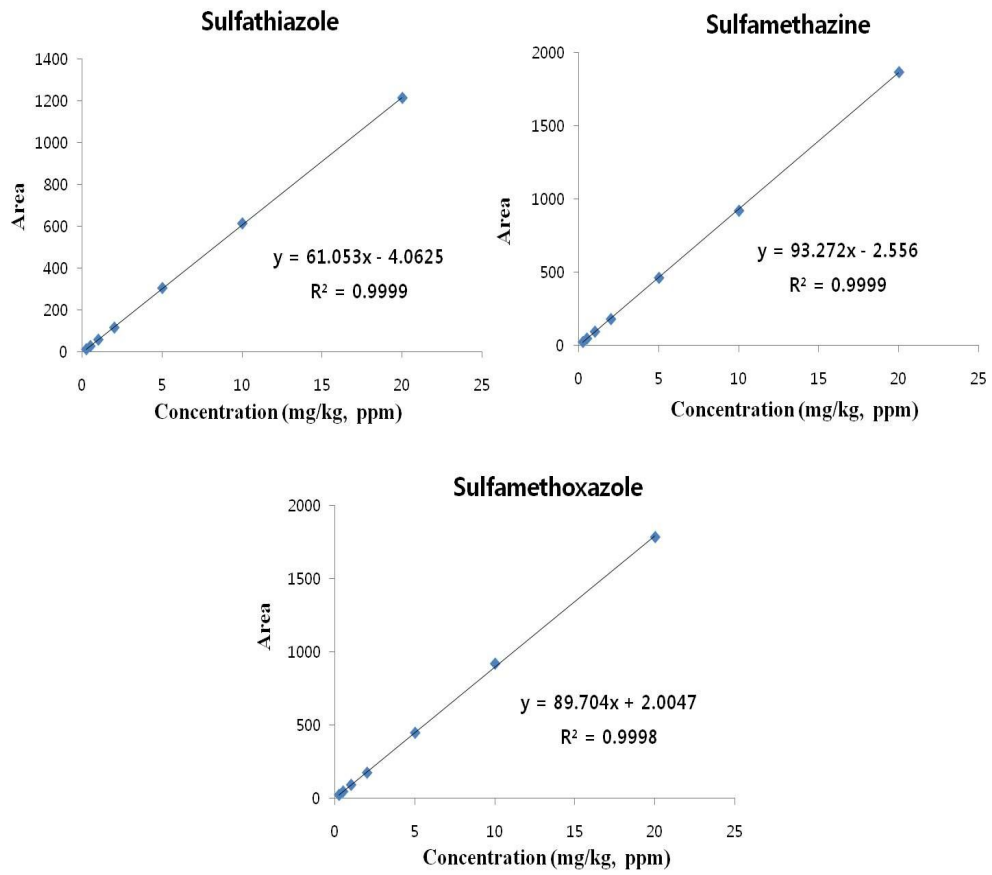


그림 39. Sulfonamides 계 표준곡선

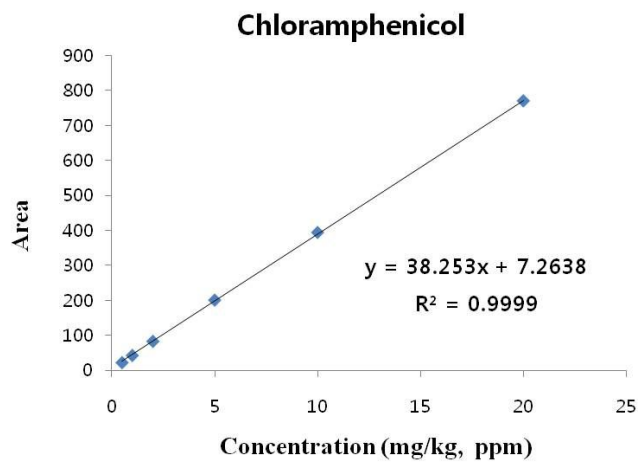


그림 40. Chloramphenicol 표준곡선

표 9. 표적물질과 M-280 tosylactivated bead 간 결합력 측정

표적물질	초기 반응 농도 (mg/kg)	Unbound 농도 (mg/kg)	Bind (%)
Tetracycline	4140.75	2880.81	71
Oxytetracycline	23446.02	2346.27	90
Chlortetracycline	5659.93	763.55	86
Malachite green	378.43	10.6	71.9
Leucomalachite green	96.29	41.54	56.8
Ethoprophos	2112	512	75
Sulfathiazole	2832.56	2577.04	9.02
Sulfamethazine	2772.41	2514.08	9.32
Sulfamethoxazole	2433.70	2251.57	7.2
Chloramphenicol	6178.03	6049.80	2

⑦ 압타머 후보물질 탐색

M-280 tosylactivated bead에 결합력이 큰 Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Ethoprophos, Malachite green, Leucomalachite green, Tetracycline계열에 대한 압타머를 탐색하기 위하여 Counter-SELEX 방법으로 진행하였다(그림 24.).

표 10. 압타머 개발 현황

유해물질	ssDNA aptamer	바이오센서
Ethopropose	진행 중	압타머자성나노
Endosulfan	진행 중	ELISA
Chloramphenicol	진행 중	ELISA
Tetracyclines(3종)	개발	압타머자성나노
Enrofloxacin	진행 중	ELISA
Sulfonamides(14종)	진행 중	ELISA
Ractopamine	진행 중	ELISA
Malachite green(2종)	개발	압타머자성나노
8 계열		

모든 표적물질에 대한 압타머를 선별하기 위하여 ssDNA를 분리하였다. 이를 위해서 PCR 수행 후 2.0% agarose gel을 전기영동 후 DNA를 확인하였다(그림 31). PCR purification Kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 정제 후 12% acrylamide gel denatured PAGE를 수행하였다. 이 때 5' 부분에 형광물질이 표지되어 있어 UV상에 쉽게 확인하였다(그림 32.)

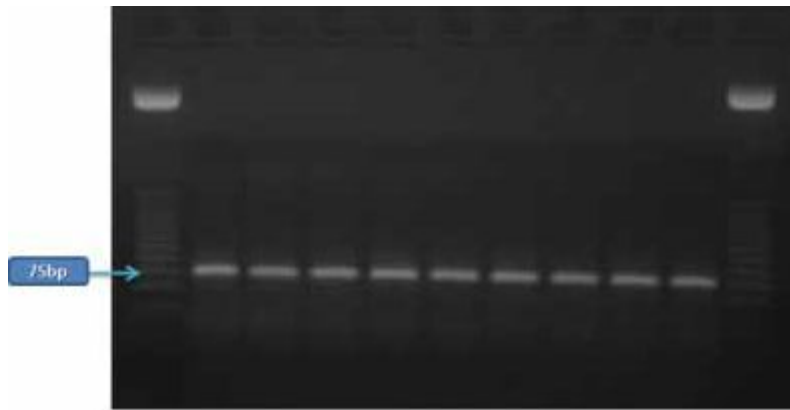


그림 41. 2.0% agarose gel 전기영동 후 DNA 확인

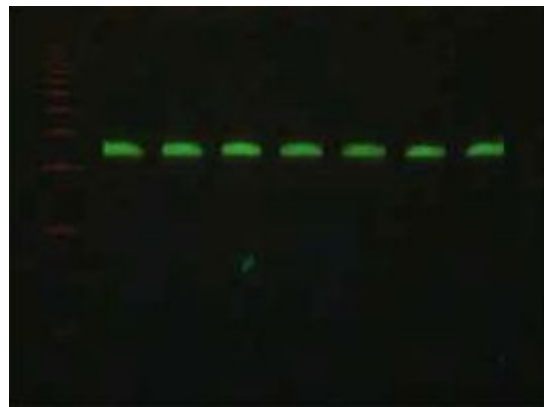


그림 42. 12% acrylamide gel denatured PAGE 후 ssDNA 확인

Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline에 대한 압타머를 탐색하기 위하여 12번의 SELEX를 수행하였다. Tetracycline의 경우 3번째 SELEX에서는 Ethanolamine을 이용하여 Counter-SELEX를 수행하였고, 6번째 SELEX에서는 Oxytetracycline, 9번째 SELEX에서는 Chlortetracycline으로 Counter-SELEX를 수행하였다(그림 33). Oxytetracycline의 경우 3번째 SELEX에서는 Ethanolamine을 이용하여 Counter-SELEX를 수행하였고, 6번째 SELEX에서는 tetracycline, 9번째 SELEX에서는 Chlortetracycline으로 Counter-SELEX를 수행하였다(그림 34). Chlortetracycline의 경우 3번째 SELEX에서는 Ethanolamine을 이용하여 Counter-SELEX를 수행하였고, 6번째 SELEX에서는 Oxytetracycline, 9번째 SELEX에서는 Chlortetracycline으로 Counter-SELEX를 수행하였다(그림 35). 그리고 이 세 가지 물질을 동시에 검출할 수 있는 압타머를 탐색하기 위해서 각각의 표적물질과 결합된 M-280 tosylactivated magnetic beads를 1:1:1의 비율로 혼합 후 실험을 진행하였다(그림 36).

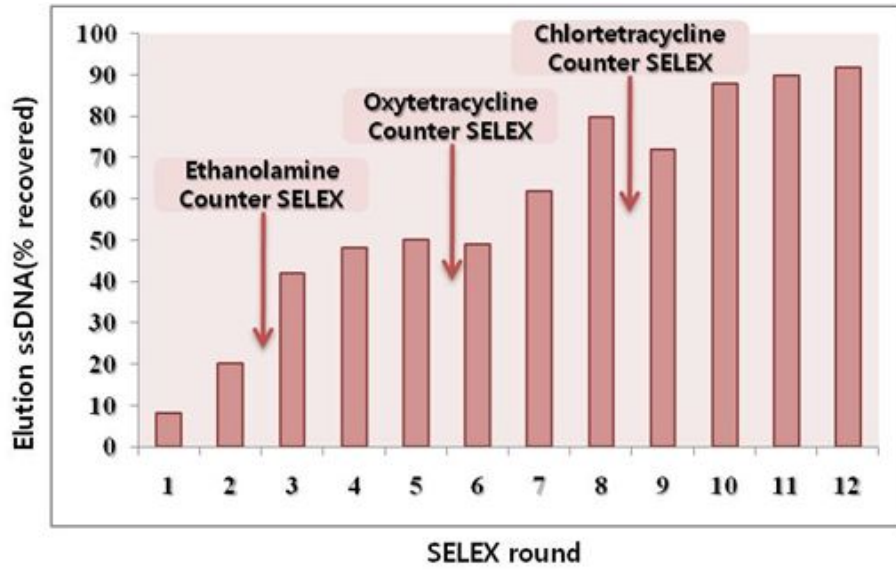


그림 43. Tetracycline aptamer를 위한 ssDNA 회수율

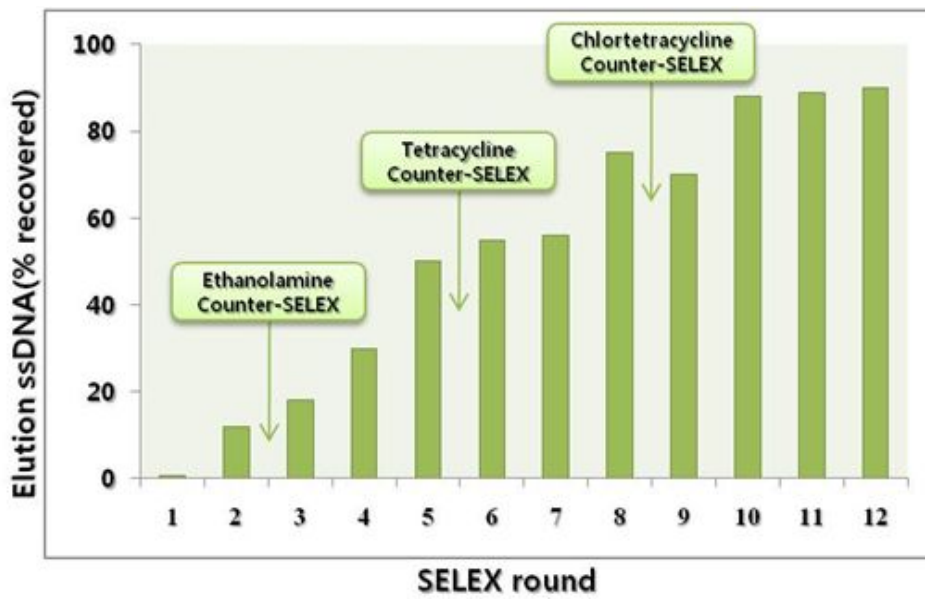


그림 44. Oxytetracycline aptamer를 위한 ssDNA 회수율

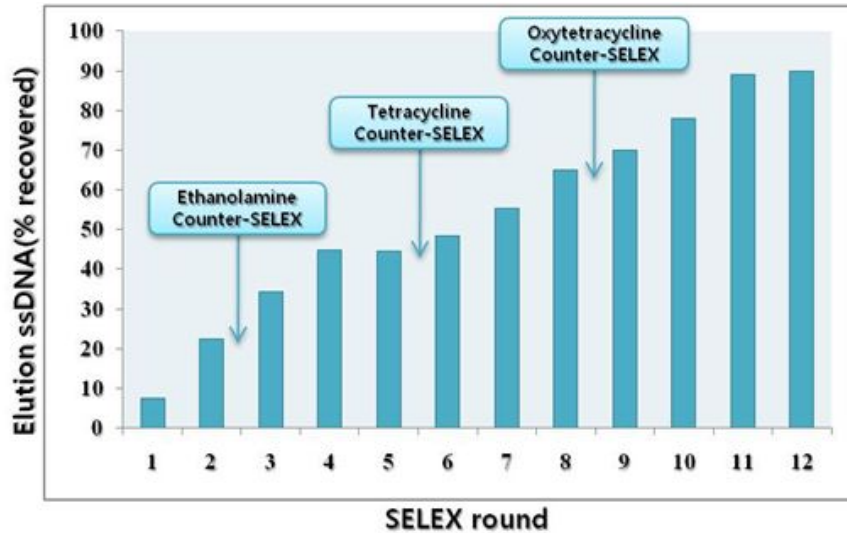


그림 45. Chlrtetracycline 압타머를 위한 ssDNA 회수율

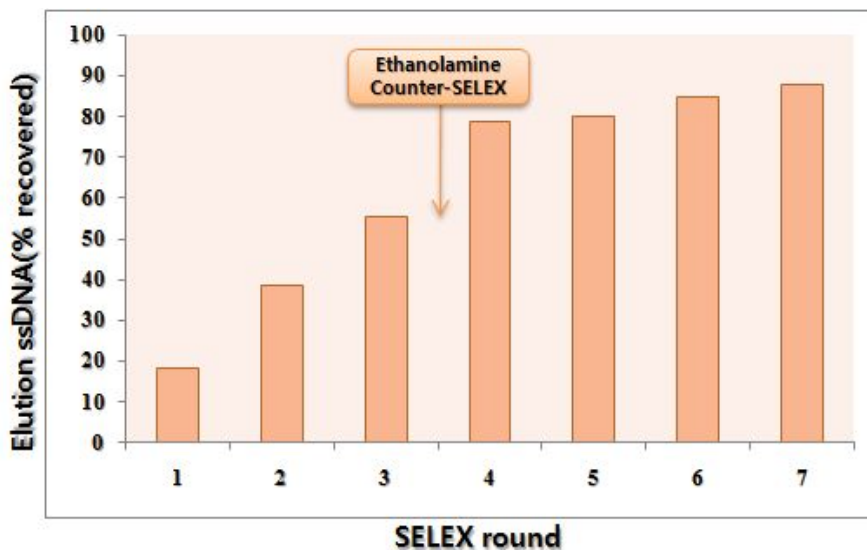


그림 46. TCs 압타머를 위한 ssDNA 회수율

Malachite green과 Leucomalachite green에 대한 압타머를 탐색하기 위하여 7번의 SELEX를 수행하였다. 이 두가지 물질에 대한 압타머를 선별하는데 있어서 각각의 압타머를 탐색하지 않았고 이 두가지 물질을 동시에 검출할 수 있는 압타머를 찾기 위한 실험을 수행하였다. Counter-SELEX는 3번째 SELEX단계에서 수행하였다(그림 37). Ethoprophos에 대한 압타머를 탐색하기 위하여 이것 역시 7번의 SELEX를 수행하였다. Counter-SELEX는 3번째 SELEX단계에서 수행하였다(그림 38).

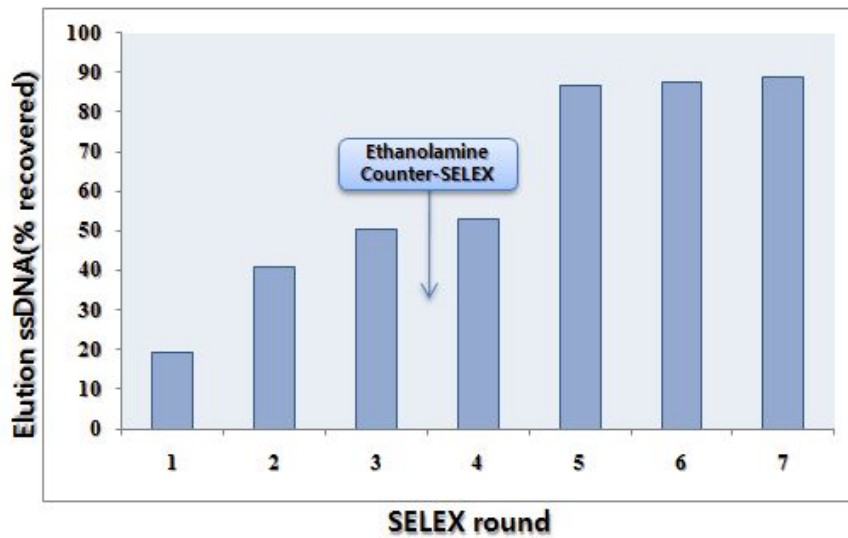


그림 47. Malachite green과 Leucomalachite green 압타머를 위한 ssDNA 회수율

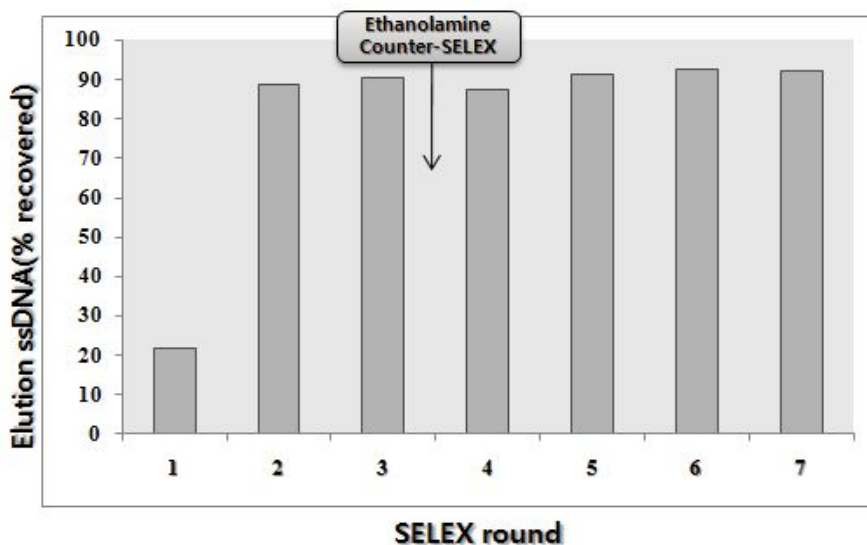


그림 48. Ethoprophos 압타머를 위한 ssDNA 회수율

⑧ 압타머 후보물질의 클로닝 및 압타머 선별

Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Ethoprophos, Malachite green, Leucomalachite green, Tetracycline계열(TCs)에 대한 압타머를 획득하였다. Tetracycline에 대한 압타머는 12개를 획득하였으며, 이 중 2개(No. 5, 18)의 압타머가 표적물질인 Tetracycline과 강한 결합력을 나타냈다. 하지만 다른 2개의 압타머(No. 3, 12)의 경우는 매우 약한 결합력을 나타냈다. 그리고 약한 결합을 나타내는 압타머의 경우 대부분의 염기서열이 비슷하였다(표 4). 친화력을 갖는 서열의 2차구조는 그림 39에 나타내었다. 서열과 구

조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, 앵타머 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 앵타머 역시 일반적으로 스템, 루프, 벌지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다.

표 11. Tetracycline 앵타머 Sequences

Aptamer	Variable sequences of N40 region
No.5	C A G C A T A T C C T T G T G C A G C C T C C A A A C A C C G G T C C G A G G A
No.18	A C C G G G G A C A A G T T A G C C G A T G A G A C T G A G G G G C A C G G G C

Aptamer	Variable sequences of N40 region
No.3	C C A C A C G G G C C A G T A T T C G T A C A A G C A C C C G G C T A A C T G C
No.12	C C A C A C A G G C C A T T A C C A A T A C C A C G C C A G G C T A A A C A G A

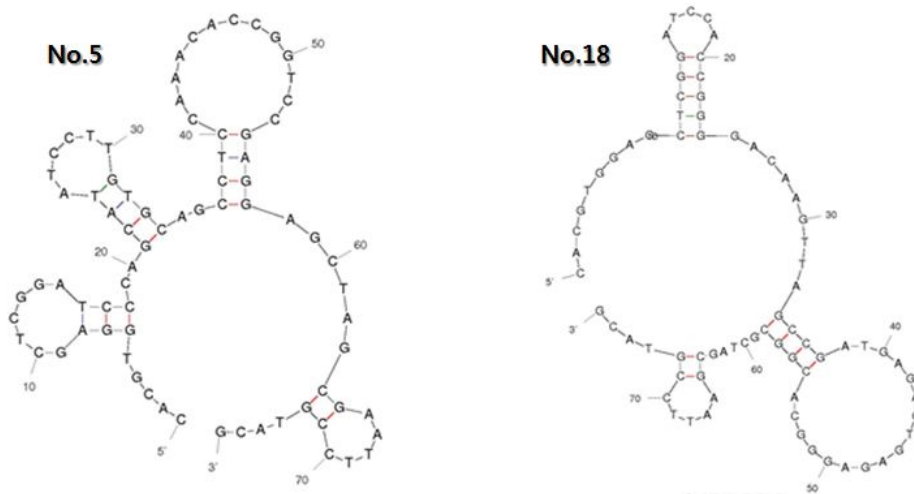


그림 49. Tetracycline 앵타머 2차 구조

Oxytetracycline에 대한 앵타머는 12개를 획득하였으며, 이 중 2개(No.9, 16)의 앵타머가 표적물질인 Oxytetracycline과 강한 결합력을 나타냈다. 하지만 다른 2개의 앵타머(No.3, 12)의 경우는 매우 약한 결합력을 나타냈다. 그리고 약한 결합을 나타내는 앵타머의 경우 대부분의 염기서열이 비슷하였다. 특히 No. 3, 12는 거의 모든 부분이 유사하였다(표 5). 친화력을 갖는 서열의 2차구조는 그림 40에 나타내었다. 서열과 구조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, 앵타머 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 앵타머 역시 일반적으로 스템, 루프, 벌지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다.

표 12. Oxytetracycline 앵타머 Sequences

Aptamer	Variable sequences of N40 region
No.9	C A T A C C C C C G A C A T T A A C C T A C A G G G C G A T G G T T T G A C C
No.16	C G A T C C A C C A A C T C A C T G C C C A C G C T T C T C T T A T C C C G T G

Aptamer	Variable sequences of N40 region
No.3	C C A C A C A T A C C A G T A C C C G T A C C C G C A C C C G G C T A A C T G C
No.12	C C A C A C A T A C C A G T A C C C G T A C C G C G C C C G G C T C A A C G G A

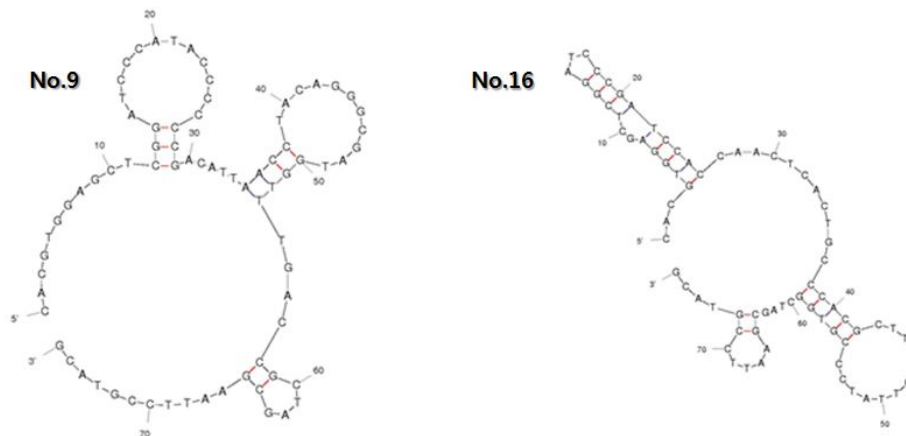


그림 50. Oxytetracycline aptamer 2차 구조

Chlortetracycline에 대한 aptamer는 8개를 획득하였으며, 이 중 5개(No. 1, 2, 6, 11, 12)의 aptamer가 표적물질인 Tetracycline과 강한 결합력을 나타냈다. 하지만 다른 5개의 aptamer(No.5, 10, 14)의 경우는 매우 약한 결합력을 나타냈다. 그리고 약한 결합을 나타내는 aptamer의 경우 대부분의 염기서열이 비슷하였다. 특히 No. 5, 10, 14는 거의 모든 부분이 유사하였다. 반면에 강한 결합력을 나타내는 aptamer의 경우 부분적으로만 같고 많은 부분이 동일하지 않는 특성을 나타냈다(표 6). 친화력을 갖는 서열의 2차 구조는 그림 41에 나타내었다. 서열과 구조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, aptamer 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 aptamer 역시 일반적으로 스템, 루프, 벌지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다.

표 13. Chlortetracycline aptamer Sequences

Aptamer	Variable sequence of N40 region from 19 th to 58 th position in 76bp aptamers(5' to 3')
No.1	CCACACACACCCAGTACCCGTA CTGCGCCCAGCTCAACTCG
No.2	ATACAGCATAACGGGTGGCCAAACCATATTTTCGAGTCCGCT
No.6	CAGCATATCCTTGTGCAGCCTCCAAACACCGGTCCGAGGA
No.11	AGTGC GGAACATCAGGCACACTGCGGACGCACTCATTGCG
No.12	ACCGGGGACAAGTTAGCCGATGAGACTGAGAGGGGCACGGC
Aptamer	Variable sequence of N40 region from 19 th to 58 th position in 76bp aptamers(5' to 3')
No.5	CCAGGACTACCCATAACCTCAAGCCGTCCTTTAGTTGGCT
No.10	CCACACATAACAGTACCCGTAACCGCGCCC GGCTCAACTCG
No.14	CAACAGATAGCAGAACCGGTACCGCGCCC GGCTCAACTCG

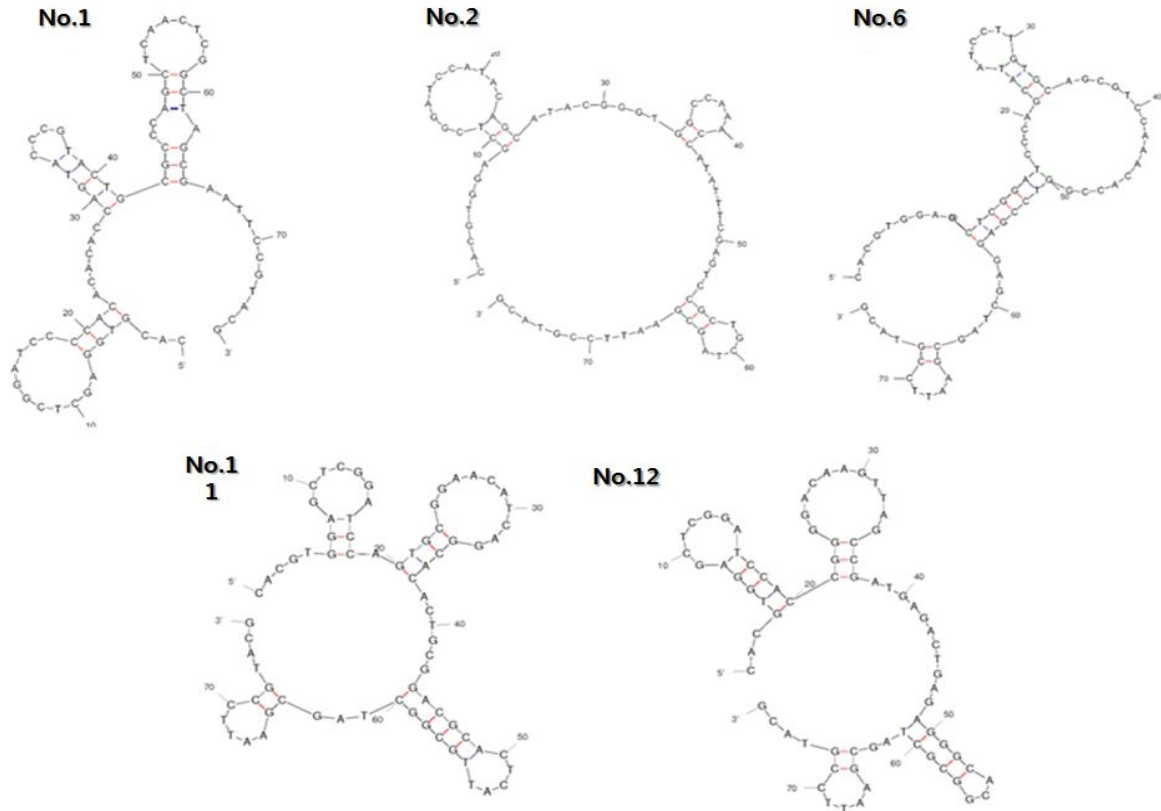


그림 51. Chlortetracycline aptamer 2차 구조

Tetracycline계열(TCs)에 대한 aptamer는 8개를 획득하였으며, 이 중 5개(No. 2, 6, 7, 8, 10)의 aptamer가 표적물질인 Tetracycline계열(TCs)과 강한 결합력을 나타냈다. 하지만 다른 3개의 aptamer(No.3, 9, 11)의 경우는 매우 약한 결합력을 나타냈다(표 7). 친화력을 갖는 서열의 2차구조는 그림 42에 나타내었다. 서열과 구조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, aptamer 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 aptamer 역시 일반적으로 스템, 루프, 벌지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다.

표 14. Tetracycline계열(TCs) aptamer Sequences

Aptamer	Variable sequence of N40 region from 19 th to 58 th position in 76bp aptamers(5' to 3')
No.2	A C A G C T A G C C C T G T A C T T C A C G A C G G C A C G C A C C C C G C C C
No.6	G G G G T G C C A T T A A T A C A C A G T T G C A C C G A T G T G C G T C T G T
No.7	C A T A C C C G C C G A C A T A A A C C T A C A G G G C G A T A G T T T G A C C
No.8	C G C C G T G C A G C C T G C C T T G T A G C C G C G T G T T A C C C A C A C C
No.10	C A T A C C C C C C G A C A T T A A C C T A C A G G G C G A T G G T T T G A C C

Aptamer	Variable sequence of N40 region from 19 th to 58 th position in 76bp aptamers(5' to 3')
No.3	C C A C A C A T A T C A G T A C C C G T A C C G C G C C C G G C T C A A C T C G
No.9	C G G C G C G C G A G C A C T G T A T G A C G A C G A G C C A T C T G T C G G G
No.11	C C A G G C T G C C A G C A G T A C C C G T A C C C G G C C C A A C T C G A T G

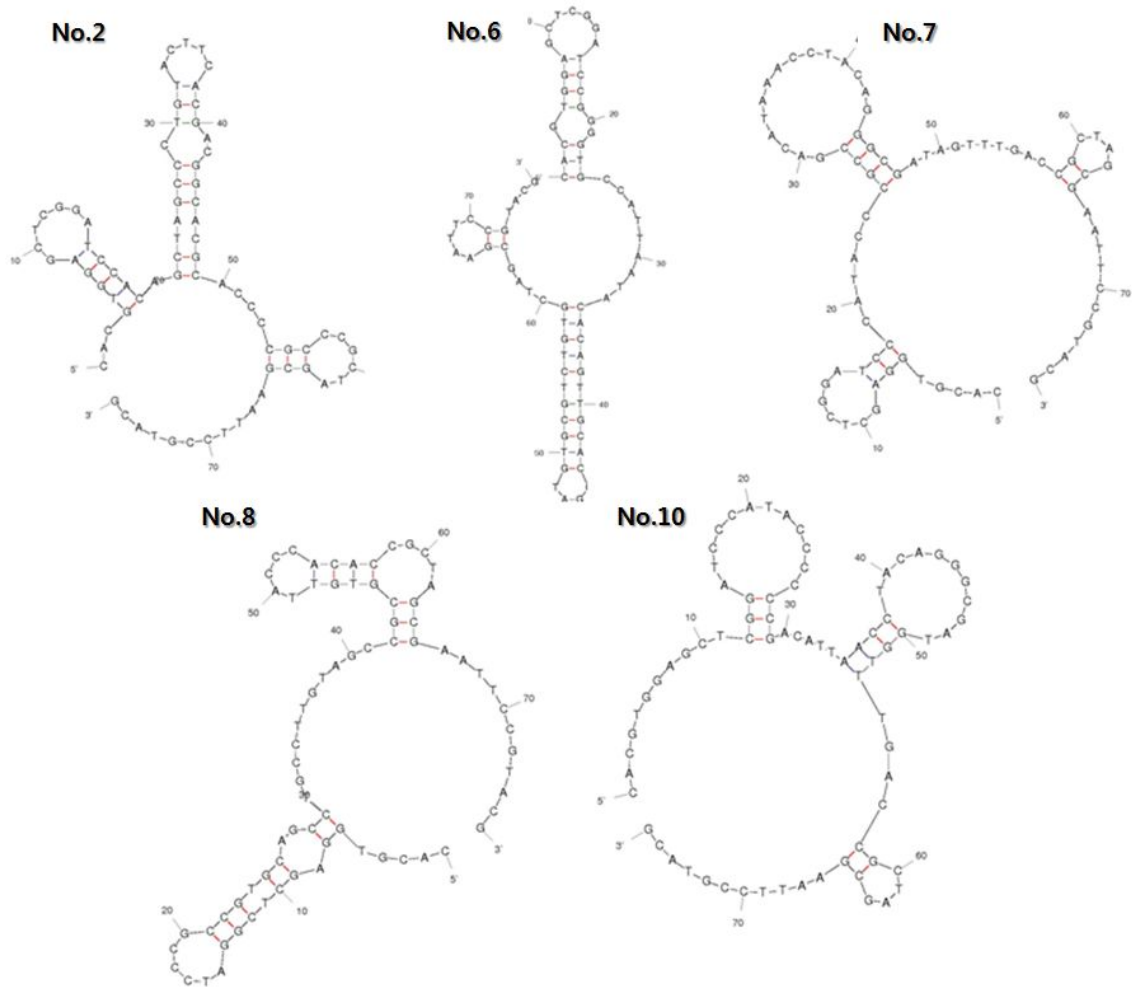


그림 52. Tetracycline 계열(TCs) 압타머 2차 구조

Ethoprophos에 대한 압타머는 8개를 획득하였으며, 이 중 5개(No. 2, 6, 8, 9, 10)의 압타머가 표적물질인 Ethoprophos와 강한 결합력을 나타냈다. 하지만 다른 3개의 압타머(No.3, 9, 11)의 경우는 매우 약한 결합력을 나타냈다(표 8). 친화력을 갖는 서열의 2차구조는 그림 43 에 나타내었다. 서열과 구조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, 압타머 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 압타머 역시 일반적으로 스템, 루프, 벌지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다.

표 15. Ethoprophos 압타머 Sequences

Aptamer	Variable sequences of N40 region
No.2	CCGTGTTAATGCTCTGATGCCAGGCCAGTTTCACATCCCTGC
No.6	ACAGACAGTGTACTGCAGTGGGCACCCAACGACCGACCGG
No.8	TGCGTAGGTACACGGACCAGGTAGTAGGGGTAGGCCGTGC
No.9	GCATGCCCGACGTGGCGATACTGGGGAAACCAGGTGCGTAG
No.10	AGGAGCTGGCGGCTGCCTGGGCCCATCGTTACCGCAGGGG

Aptamer	Variable sequences of N40 region
No.3	TGCGCAGCGTCCCATAACGGAGAGAGCGAACACCCTGTGCC
No.12	CACTGCATGCACAGGGAGGCTGCACTACACGTCACCAGCC
No.16	CAGCCAAGACTATGTGGGGGGAGCAGTACGACTGTGGTGG

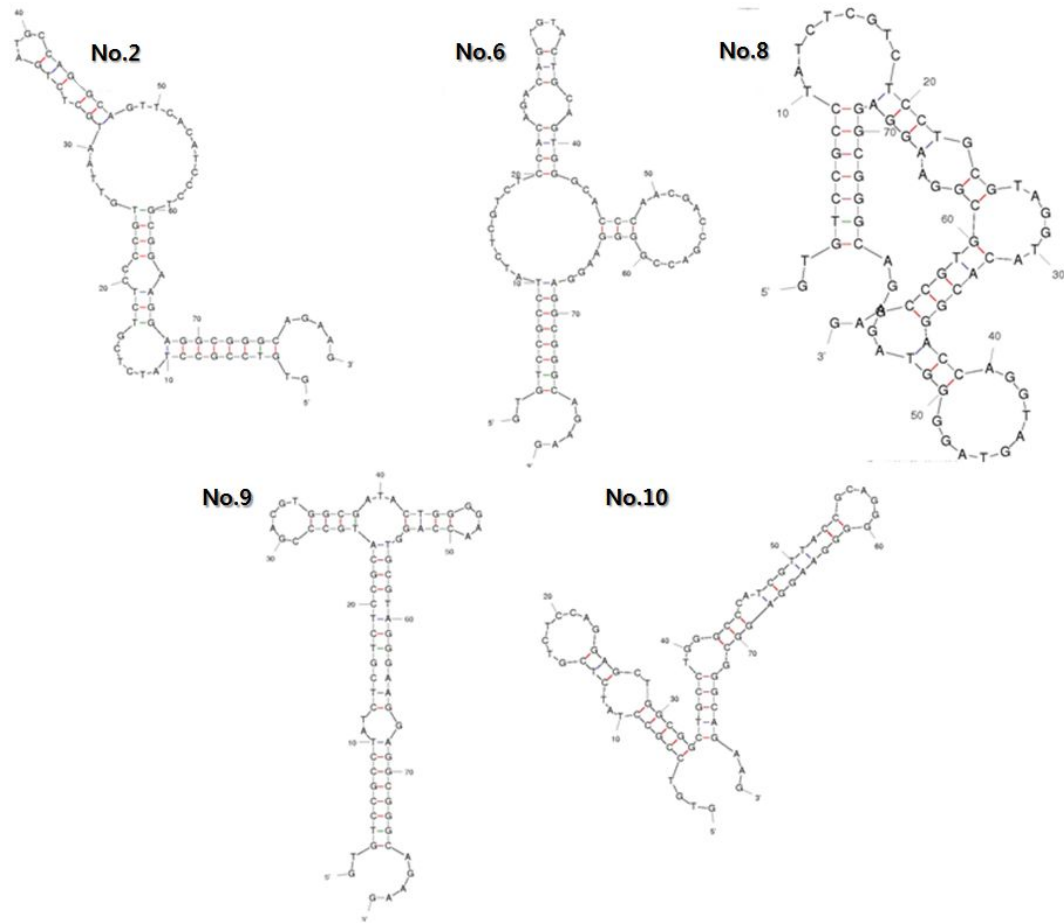


그림 53. Ethoprophose aptamer 2차 구조

Malachite green과 Leucomalachite green 대한 aptamer는 5개를 획득하였으며, 이 중 3개 (No. 2, 6, 8)의 aptamer가 표적물질인 Ethoprophos와 강한 결합력을 나타냈다. 하지만 다른 3개의 aptamer(No.3, 12)의 경우는 매우 약한 결합력을 나타냈다(표 9). 친화력을 갖는 서열의 2차구조는 그림 44 에 나타내었다. 서열과 구조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, aptamer 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 aptamer 역시 일반적으로 스템, 루프, 벌지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다.

표 16. Ethoprophos aptamer Sequences

Aptamer	Variable sequences of N40 region
No.2	CGATAGGATTGAAGACAGAGCGATGAGTGCAGACTCAGGC
No.6	TACCCTGCACCACGCTGCACTACAATGGCCCTATCAATGC
No.8	GCGTATTACGCCGTAGCGAGGGTAGGGATGTGCTATCGTC
Aptamer	Variable sequences of N40 region
No.3	TCTTGCGGGGCGCGCAGTGTGCATGTGTGACTCCGGGG
No.12	GCCGCACCGGGATAGCAACCAGAGACCGATATCAGAGGGG

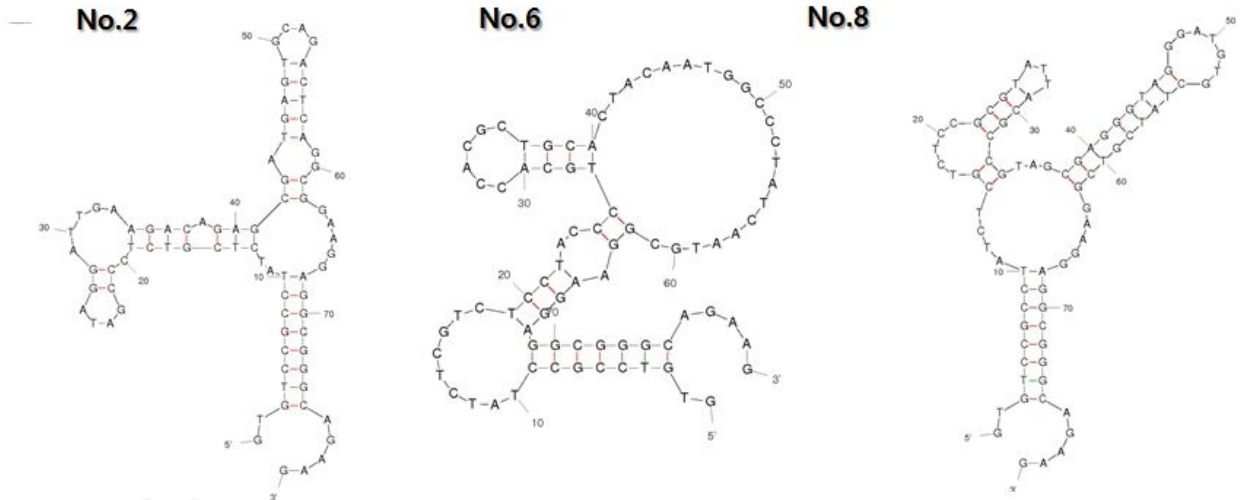


그림 54. Malachite green과 Leucomalachite green 압타머 2차 구조

(나) 압타머 선별방법 개선법(ELAA법) 확립

Magnetic bead를 이용하여 표적 항생물질에 대한 압타머 선별 방법인 Counter SELEX는 표적 선택성을 높이는 장점이 있지만 비용과 시간이 많이 든다는 단점이 있다. 이에 antibiotic-BSA conjugate를 microplate에 고정하여 이것을 이용한 새로운 SELEX법을 개발하였다. 이 방법은 magnetic bead 대신 저렴한 matrix를 사용하여 SELEX를 진행 할 수 있고, Conuter SELEX에서 압타머 선별 필요 과정인 agarose 전기영동과 변성 polyacroamide gel 전기영동 단계가 생략되어 비용과 시간을 단축할 수 있다. 또한, 동시에 여러 표적 물질에 대한 압타머를 선별할 수 있는 장점이 있다.

① 표적물질들과 BSA 결합

표적물질들과 BSA (bovin serum albumin) 결합은 1.4 dioxan, 25% 표적물질들과 BSA(Bovin Serum Albumin) 결합은 1.4 dioxan, 25% glutaraldehyde, 1× PBS buffer (pH 7.4)를 이용하여 결합 시킨 후 하루에 2번 buffer change를 통해 3일간 투석하여 결합되지 않는 표적물질, BSA, 1.4 dioxan, 25% glutaraldehyde를 제거하였다.

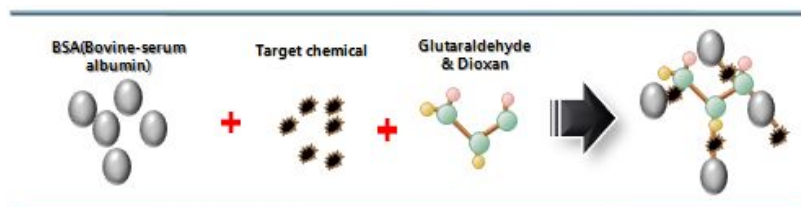


그림 55. 항생물질과 BSA conjugation 모식도.

② Enzyme Linked Aptamer Assay (ELAA)를 통한 압타머 선별 과정

BSA 결합된 화학물질을 coating buffer를 이용하여 96well immunoplate (Nuck)에 첨가하여 4°C에서 overnight 한 후 37°C에서 2시간동안 건조시켰다. 그 후 5% skim milk를 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 0.05% Tween 20이 함유된 PBS (PBST)를 이용하여 세척하여 사용하기 전까지 4°C에 보관하였다. ELAA법을 이용한 SELEX를 들어가기 전 BSA에 결합하는 ssDNA를 제거하기 위하여 40개 무작위 염기를 가지고 있는 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCN(40mer)GGATCCGAGCTCCACGTG-3' ssDNA pool 11.25 ug molecules을 Bindinbuffer(100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 0.02 Tween 20, pH 7.6)에 첨가하여 95°C에서 10분, 4°C에서 5분 동안 반응시키고 BSA 만 coating 된 well에 분주하여 BSA에 결합된 ssDNA를 제거하였다. 표적 화학물질이 coating 된 well에 분주하여 37°C에서 1 시간 반응시키고, 표적 화학물질에 결합되지 않는 ssDNA를 제거하기 위하여 PBST로 3회 세척하였다. 화학물질에 결합 된 ssDNA를 용출하기 위하여 Elution buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 3.5 M urea, 0.02% Tween 20, pH 8.0)를 첨가하고 80°C에서 10분 동안 반응시킨 후 상층액을 회수하였으며, 이 과정을 3 회 반복하였다.

용출된 올리고뉴클레오티드(Oligonucleotides)를 농축하기 위하여 에탄올 침전법을 이용하였다. 용출된 올리고뉴클레오티드의 0.1배의 3 M sodium acetate buffer(pH 5.2), 5 uL glycogen(20%), 2.5배의 Absolute Ethanol(Duk-san reagents Inc., Korea)를 첨가하고 -80 °C에서 90분 반응 하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 1 mL 70% Ethanol 을 첨가하여 현탁시키고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 완전히 건조된 후 50 uL 10 mM Tris-HCl (pH 8.5)을 첨가하여 녹인 후 다음 단계를 진행하였다. 회수된 올리고 뉴클레오티드의 농도를 측정하기 위해 Nano-Drop (ACTGene, ASP-2680) spectrophotometer, USA)을 이용하였다.

표적물질의 압타머 선별을 위한 ssDNA를 증폭하기 위해서 50 uL AccuPower HotStart PCR PreMix(Bioneer Inc., Korea)를 사용하였으며, 각각 10uM primer 즉 APT1Fb: 5'biotin-CGTACGGAATTCGCTAGC-3', APT1R: 5'-CACGTGGAGCTCGGATCC-3' 를 사용하여 PCR을 수행하였다. Template DNA의 농도는 100~500 ng으로 맞추었으며 PCR 조건은 94°C에서 5분 동안 변성시키고, 94°C에서 1분, 47°C 1분, 72°C 1분 (35cycles), 72°C에서 7분 동안 extension step으로 진행하였다. 1번째 SELEX 후 회수된 DNA 전체를 DNA pool로 사용하여 2번째 SELEX를 수행하였다. 이러한 방법을 12번 반복함으로써 표적 특이성을 가지는 압타머를 선별하였으며 3 round 후 표적물질과 유사한 구조를 가지는 다른 물질을 이용하여 표적 특이성을 가지지 못하는 압타머들을 제거함으로써 표적 선택성을 높였다.

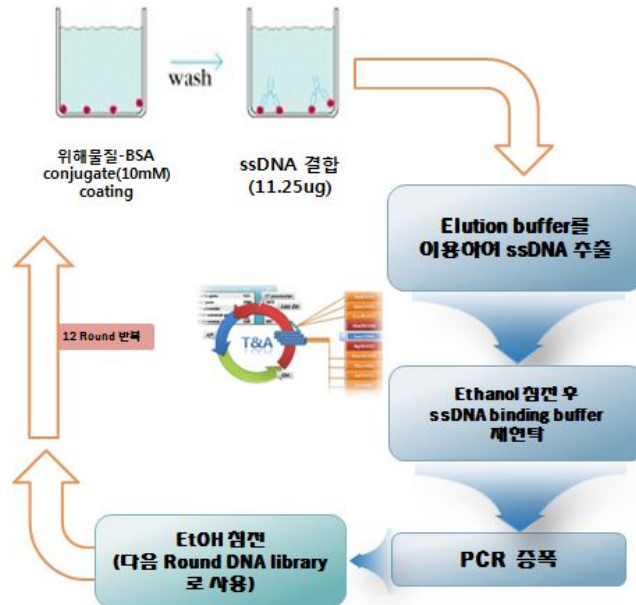


그림 56. ELAA법을 이용한 SELEX 과정

③ 압타머 후보물질의 클로닝

11번째 SELEX 후 12번째 SELEX에서 ssDNA의 회수율을 확인 후 클로닝을 위한 PCR을 수행하였다. T&A cloning Vector Kit(RBC Bioscience Corp., Taiwan)를 사용하여 클로닝을 실시하였으며, 반응 완료 후 X-Gal/IPTG/Amp이 함유된 한천배지에 하루 동안 배양 후 양성반응을 나타낸 콜로니만 새로운 배지에 배양하였다. 배양된 콜로니들을 Ampicilline이 함유된 LB(Luria -Bertani broth, Difco, USA)배지에 배양한 후 Miniprep kit(Solgent Co. Ltd., Korea)를 사용하여 DNA를 정제 하였다.

④ 압타머 후보물질의 affinity 측정 및 선별

표적물질에 대한 압타머 후보물질 선별을 하기 위하여 ELAA법을 응용하여 affinity를 측정하여 실시하였다. 클로닝을 통하여 배양된 colony를 이용하여 PCR 반응을 수행하였으며, biotin이 결합된 primer를 이용하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분, 94℃에서 1분, 51℃ 1분, 72℃ 1분 (30 cycles), 72℃에서 10분 동안 진행하였다. PCR 반응산물에 50 uL binding buffer를 첨가하여 95℃에서 10분, 4℃에서 5분간 반응시키고, 표적물질이 결합된 tosylactivated magentic bead에 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 표적 화학물질에 결합되지 않은 압타머를 제거하기 위하여 binding buffer로 3회 세척하고, 100 uL streptavidin-HRP를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 PBS buffer로 3회 세척하고 100 uL 발색시약을 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 100 uL 반응정지액 (0.1 M H₂SO₄) 을 첨가하여 발색반응을 멈춘 후 UV spectrophotometer를 이용하여 495 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

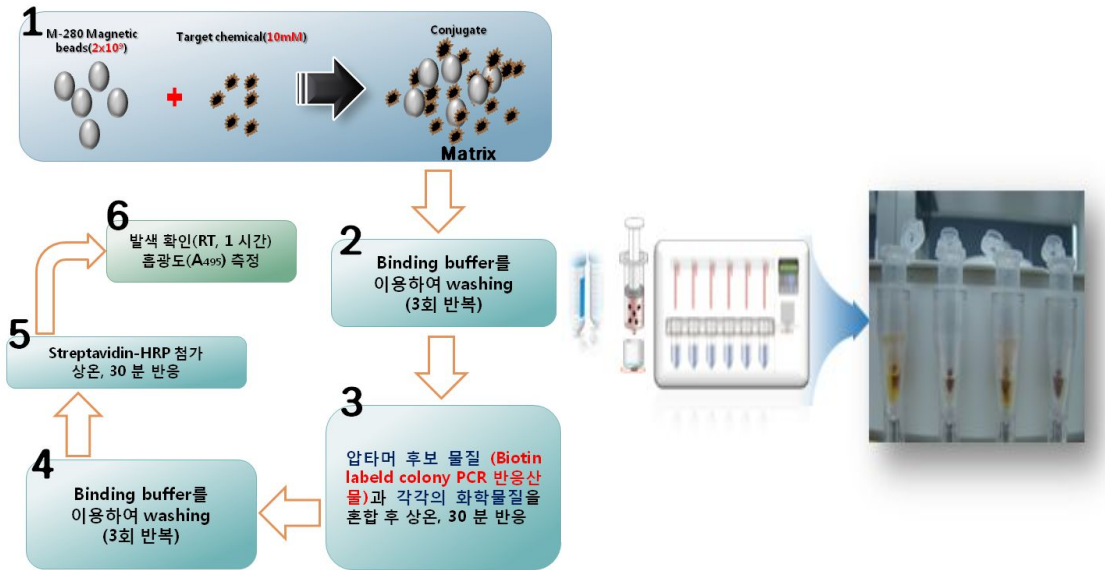


그림 57. Magnetic bead를 이용한 aptamer affinity 측정 및 선별

BSA에 결합된 표적 화학물질이 coating 된 plate에 95°C에서 10분 변성시키고, 4°C에서 5분간 안정화 시킨 colony PCR 증폭산물인 aptamer-Biotin을 100 uL 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시키고, 표적화학물질에 결합하지 않은 aptamer를 제거하기 위하여 200 uL PBST(0.05% Tween)를 이용하여 3회 세척하였다. 100 uL Streptavidin-HRP를 첨가하여 37°C에서 40분 동안 반응시키고 0.5 M Phosphate-citrate buffer(0.05M citric acid, 0.1M Na₂HPO₄, pH 5.0)에 녹인 OPD(o-phenyldiamine, Sigma-Aldrich Inc., USA) 100 uL를 첨가하여 발색반응을 확인하였다. 반응 정지액인 100uL 0.1M H₂SO₄를 첨가하여 발색반응을 멈춘 후 UV spectrophotometer를 이용하여 495 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

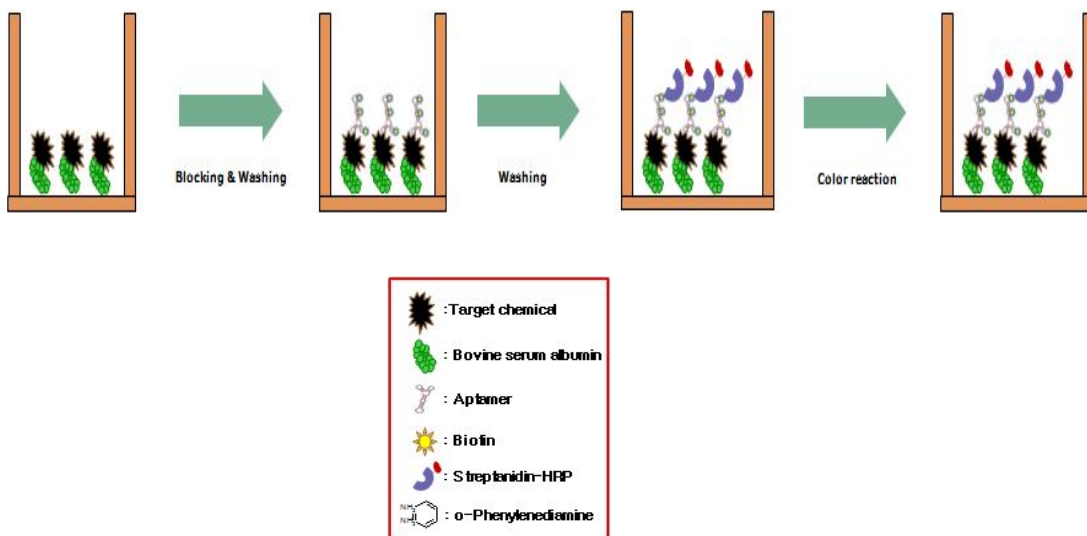


그림 58. ELAA법을 이용한 aptamer affinity 측정 및 선별

⑤ 압타머 후보물질의 염기서열 및 2차 구조 분석

표적 화학물질에 친화력이 높게 나타나는 압타머 후보물질을 ampicilline이 함유된 LB(Luria -Bertani broth, Difco, USA)배지에 배양한 후 Miniprep kit(Solgent Co. Ltd., Korea)를 사용하여 DNA를 정제 하였다. 정제된 DNA 시료의 염기서열분석을 하기 위해서 솔젠트(Solgent Inc., Korea)에 의뢰하였다. 선별된 압타머의 2차구조를 분석하기 위해서 Michael Zuker가 개발한 Internet-tool Mfold (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form.cgi>)를 이용하였다.

⑥ 압타머 후보물질과 표적물질과의 결합력 확인

표적 화학물질과 압타머 후보물질의 결합력을 알아보기 위하여 압타머를 (주)바이오니아 (Bioneer Inc., Korea)로부터 합성하였다. 친화력이 높게 나타나는 각 화학물질의 압타머를 binding buffer로 0, 0.1 ng, 1 ng, 100 ng, 1000 ng 으로 농도로 조정하고, 100 μ M 농도의 표적 화학물질에 첨가하여 상온에서 30 분간 반응시켰다. 그 후 혼합물을 YM10 Microcon filter columns(Amicon)에 분주하여 12000 g에서 8분간 원심분리하였으며, 여과된 용액에서 압타머와 결합되지 않는 각 화학물질의 농도를 UV spectrophotometer를 이용하여 측정 한 후 초기 반응농도와 비교하여 화학물질에 대한 압타머의 결합력을 측정하였다.

(다) ELAA법에 의한 압타머 선별 및 SELEX방법에 의한 압타머와 특성비교

① Tetracycline 압타머 비교

Tetracycline에 대한 압타머 SELEX 과정은 ELAA법으로 실시하였으며, magnetic bead를 이용하여 tetracycline에 압타머의 affinity를 측정하였다. 그 결과 tetracycline에 대한 압타머는 9개를 획득하였으며, 이 중 3개(clone 5, 30, 34)의 압타머가 표적물질인 tetracycline과 강한 affinity 를 보였으며, 이들 압타머의 서열의 변이가 다양함을 확인하였다 (표 1). Counter SELEX를 통해 선별된 tetracycline에 대해 강한 affinity 를 나타내는 압타머가 적은 반면 ELAA법을 이용하여 선별된 tetracycline에 대한 압타머는 강한 affinity를 보인 압타머가 더 많이 존재함을 확인하였다. 강한 친화력을 갖는 서열의 2 차 구조는 그림 16에 나타내었다. 서열과 구조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, 압타머 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 압타머 역시 일반적으로 스템, 루프, 별지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다. Tetracycline에 강한 친화력을 나타내는 압타머를 이용하여 압타머 농도에 따른 tetracycline의 결합력을 측정한 결과 압타머의 농도가 증가할수록 tetracycline의 결합력이 증가됨을 확인하였다.

표 17. ELAA법으로 선별 된 Tetracycline aptamer Sequences

Aptamer	Variable N40 sequences from 19th to 58th position (5'–3')																																							
Position	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
TC-05	G	G	A	G	G	G	G	A	A	C	T	G	G	G	T	G	G	T	A	A	G	C	G	C	C	G	R	G	G	C	T	A	T	G	T	C	G	G	T	G
TC-30	C	C	A	A	C	C	A	T	A	G	T	C	A	C	A	T	C	G	C	C	T	T	A	T	C	A	T	G	C	C	A	T	G	G	G	C	G	C	G	G
TC-34	A	C	A	C	A	C	T	C	A	C	C	C	C	A	T	G	A	G	A	C	T	A	C	T	C	C	C	G	C	G	C	T	C	C	C	A	C	C	G	T
TC-03	C	C	A	G	T	G	C	A	G	G	T	C	A	G	C	A	T	G	C	G	A	A	G	A	C	T	G	G	G	A	G	C	T	A	G	G	G	G	C	C
TC-07	A	C	A	G	T	C	G	T	G	A	C	C	T	C	T	T	C	C	G	T	T	G	A	G	C	T	C	C	T	C	C	C	G	A	A	C	T	G	G	T
TC-10	C	C	A	T	G	G	A	G	G	G	G	T	G	A	T	G	T	G	G	A	T	T	A	C	C	G	G	T	C	A	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T
TC-14	C	C	A	C	C	C	G	T	G	G	A	A	C	T	C	G	T	C	C	A	G	C	A	C	A	G	T	T	C	C	G	C	G	T	C	T	C	G	A	T

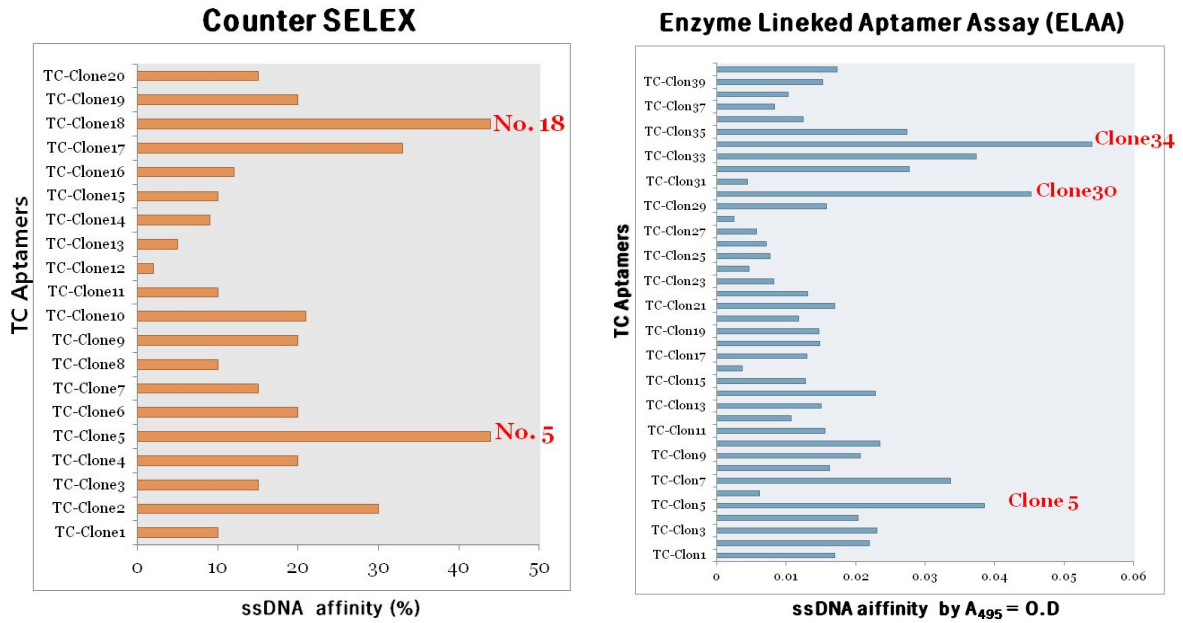


그림 59. Counter SELEX 와 ELAA법으로 선별된 aptamer의 affinity 비교

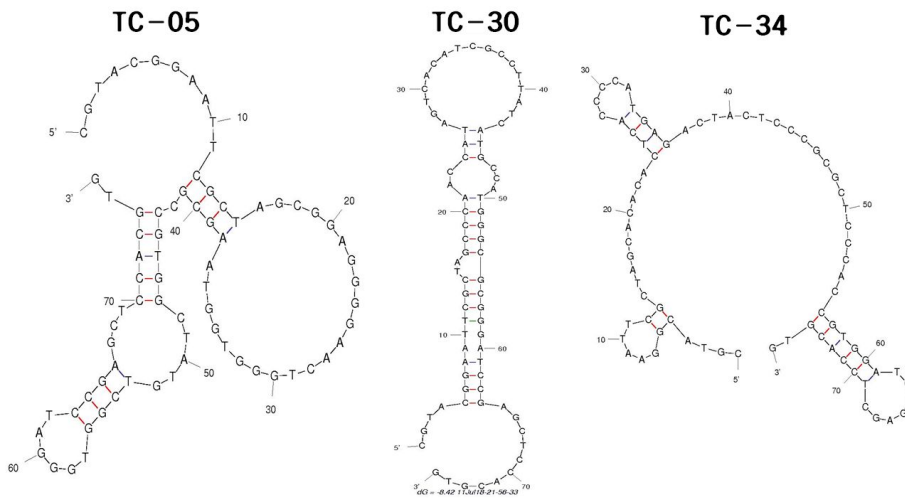


그림 60. Tetracycline aptamer 2차 구조

표 18. aptamer 농도에 따른 tetracycline 결합력

Aptamer No.	Aptamer Concentration (ng)	Tetracycline Initial concentration (mg/mL)	Tetracycline Unbound concentration (mg/mL)	difference concentraion (mg/mL)	Bind (%)
TC-05	1000	0.001332	0.000710	0.000622	46.73
	100	0.001332	0.000755	0.000577	43.31
	10	0.001332	0.000768	0.000564	42.37
	1	0.001332	0.000809	0.000523	39.26
	0.1	0.001332	0.000817	0.000515	38.63
TC-30	1000	0.001332	0.000693	0.000639	47.98
	100	0.001332	0.000780	0.000552	41.44
	10	0.001332	0.000693	0.000639	47.98
	1	0.001332	0.000743	0.000589	44.24
	0.1	0.001332	0.000834	0.000498	37.39
TC-34	1000	0.001332	0.000635	0.000697	52.34
	100	0.001332	0.000651	0.000681	51.09
	10	0.001332	0.000676	0.000656	49.22
	1	0.001332	0.000776	0.000556	41.75
	0.1	0.001332	0.000813	0.000519	38.94

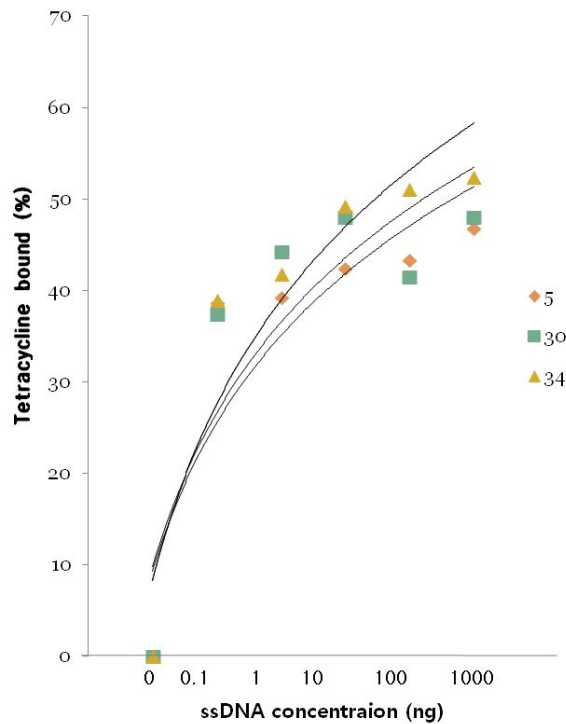


그림 61. Tetracycline에 대한 ssDNA Binding assay

② Oxytetracycline 압타머 비교

Oxytetracycline에 대한 압타머 SELEX 과정은 ELAA법으로 실시하였으며, magnetic bead를 이용하여 oxytetracycline에 압타머의 affinity를 측정하였다. 그 결과 oxytetracycline에 대한 압타머는 8개를 획득하였으며, 이 중 3개 (clone 4, 5, 7)의 압타머가 표적물질인 oxytetracycline과 강한 affinity를 보였으며, 이들 압타머의 서열의 변이가 다양함을 확인하였다 (표 3). Counter SELEX를 통해 선별된 oxytetracycline에 대해 강한 affinity를 나타내는 압타머가 적은 반면 ELAA법을 이용하여 선별된 oxytetracycline에 대한 압타머는 강한 친화력을 보인 압타머가 더 많이 존재함을 확인하였다. 강한 affinity를 갖는 서열의 2차 구조는 그림 19에 나타내었다. 서열과 구조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, 압타머 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 압타머 역시 일반적으로 스텝, 루프, 벌지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다. Oxytetracycline에 강한 affinity를 나타내는 압타머를 이용하여 압타머 농도에 따른 oxytetracycline의 결합력을 측정한 결과 압타머의 농도가 증가할수록 oxytetracycline의 결합력이 증가됨을 확인하였다.

표 19. ELAA법으로 선별된 oxytetracycline 압타머 sequences

Aptamer	Variable N40 sequences from 19th to 58th position (5'→3')																																																									
Position	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																		
OTC-04	G	G	C	C	C	G	C	G	G	T	A	G	A	A	A	G	T	A	G	C	A	C	C	A	G	T	C	G	G	G	G	C	C	C	C	C	C	G	T	C	C																	
OTC-05	A	G	G	G	T	C	A	A	G	C	G	T	G	T	C	T	A	T	G	T	G	C	A	G	A	C	T	G	G	T	C	A	A	C	G	T	G	T	G	G																		
OTC-07	A	C	A	T	G	A	G	C	T	A	A	C	G	G	C	T	G	C	T	T	G	T	C	A	T	G	T	T	C	G	T	G	T	T	C	C	T	G	G																			
OTC-03	A	C	A	C	C	A	A	G	C	T	G	A	A	G	C	G	C	C	A	A	G	G	A	T	C	A	C	G	G	T	G	T	C	C	C	G	T	T	C	G																		
OTC-09	C	G	A	G	T	T	G	A	G	C	C	G	G	G	C	G	C	G	G	T	A	C	G	G	G	T	G	C	T	G	G	T	A	T	G	T	G	T	G	G																		
OTC-17	C	C	C	A	C	A	C	G	C	C	T	C	C	G	A	T	T	A	G	C	G	T	T	G	T	C	T	C	T	G	T	C	C	T	G	T	C	C	T	G	G	T																
OTC-18	C	G	A	G	T	T	G	A	G	C	C	G	G	G	C	G	C	G	G	T	A	C	G	G	G	T	G	C	T	G	G	T	A	T	G	T	G	T	G	G																		

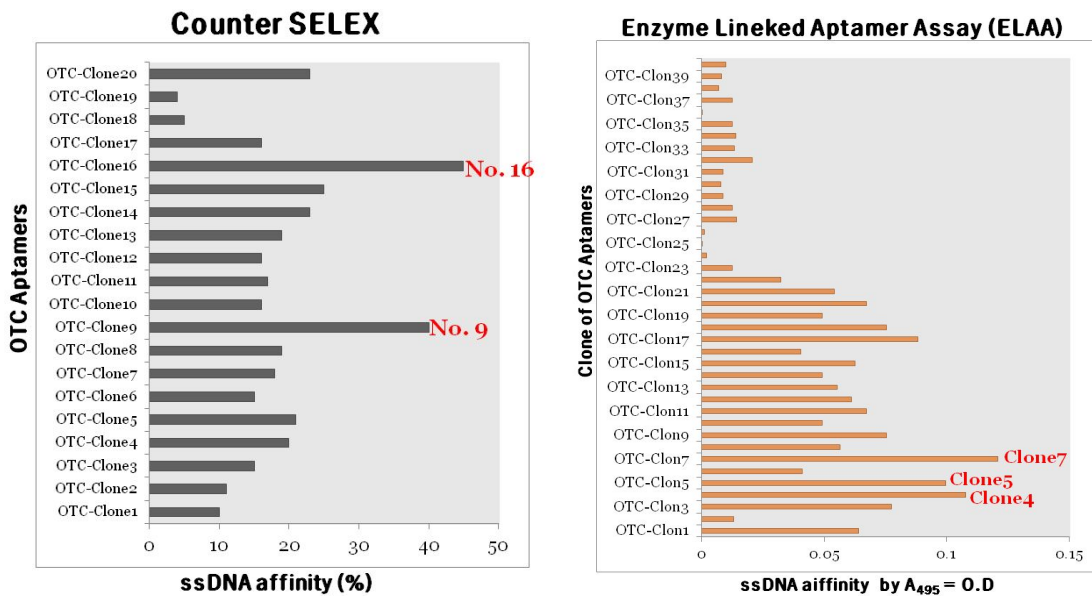


그림 62. Counter SELEX 와 ELAA법으로 선별된 압타머의 affinity 비교

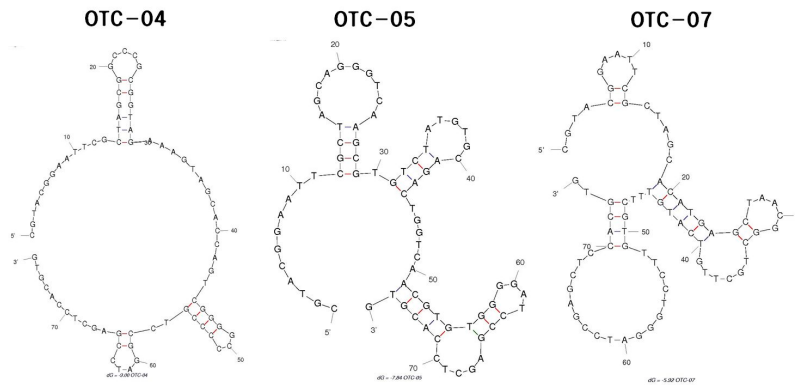


그림 63. Oxytetracycline aptamer 2차 구조

표 20. aptamer 농도에 따른 oxytetracycline 결합력

Aptamer No.	Aptamer Concentration (ng)	Oxytetracycline Initial concentration (mg/mL)	Oxytetracycline Unbound concentration (mg/mL)	Difference concentration (mg/mL)	Bind (%)
OTC-04	1000	0.000135	0.000057	0.0000780	57.78
	100	0.000135	0.0000715	0.0000635	47.04
	10	0.000135	0.0000573	0.0000777	57.56
	1	0.000135	0.0000723	0.0000627	46.44
	0.1	0.000135	0.0000763	0.0000587	43.48
OTC-05	1000	0.000135	0.0000709	0.0000641	47.48
	100	0.000135	0.0000785	0.0000565	41.85
	10	0.000135	0.0000572	0.0000778	57.63
	1	0.000135	0.0000737	0.0000613	45.41
	0.1	0.000135	0.0000733	0.0000617	45.70
OTC-07	1000	0.000135	0.0000589	0.0000761	56.37
	100	0.000135	0.0000569	0.0000781	57.85
	10	0.000135	0.0000609	0.0000741	54.89
	1	0.000135	0.0000619	0.0000731	54.15
	0.1	0.000135	0.0000623	0.0000727	53.85

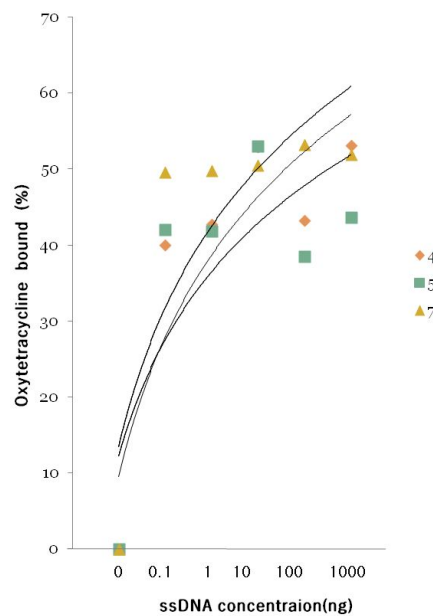


그림 64. Oxytetracycline에 대한 ssDNA Binding assay

③ Chlortetracycline 압타머 비교

Chlortetracycline에 대한 압타머 SELEX 과정은 ELAA법으로 실시하였으며, magnetic bead를 이용하여 chlortetracycline에 압타머의 affinity를 측정하였다. Tetracycline 계통의 다른 항생제와는 달리 ELAA법을 이용하여 chlortetracycline에 대한 압타머를 선별한 결과 Counter SELEX 방법에 의해 획득한 압타머보다 적게 획득되었다(그림 21). ELAA법에 의해 선별된 압타머 중 clone 29, 30이 chlortetracycline에 강한 affinity를 보였으며, 이들 압타머의 서열의 변이가 다양함을 확인하였다 (표 5). Chlortetracycline에 강한 affinity를 갖는 압타머 서열의 2 차 구조는 그림 22에 나타내었다. 서열과 구조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, 압타머 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 압타머 역시 일반적으로 스템, 루프, 벌지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다. Oxytetracycline에 강한 affinity를 나타내는 압타머를 이용하여 압타머 농도에 따른 oxytetracycline의 결합력을 측정한 결과 압타머의 농도가 증가할수록 chlortetracycline의 결합력이 증가됨을 확인하였다.

표 21. ELAA법으로 선별 된 Chlortetracycline 압타머 Sequences

Aptamer	Variable N40 sequences from 19th to 58th position (5'→3')																																							
Position	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
CTC-29	C	G	A	G	T	T	G	A	G	C	C	G	G	G	C	G	C	G	G	T	A	C	G	G	G	T	A	C	T	G	G	T	A	T	G	T	G	T	G	G
CTC-30	A	C	A	A	C	C	G	C	A	G	C	A	C	C	C	G	T	C	A	C	G	T	C	C	C	A	C	C	A	T	C	C	C	C	T	A	C	G	G	
CTC-03	C	G	C	C	A	G	A	A	T	A	C	T	G	C	T	A	G	T	G	G	C	A	C	A	T	T	G	A	T	G	T	C	T	T	G	C	T	T	G	G
CTC-11	A	C	A	C	C	G	G	T	C	A	T	T	C	C	C	T	C	C	G	C	A	G	G	T	T	A	A	A	A	G	G	G	C	T	T	G	T	T	T	

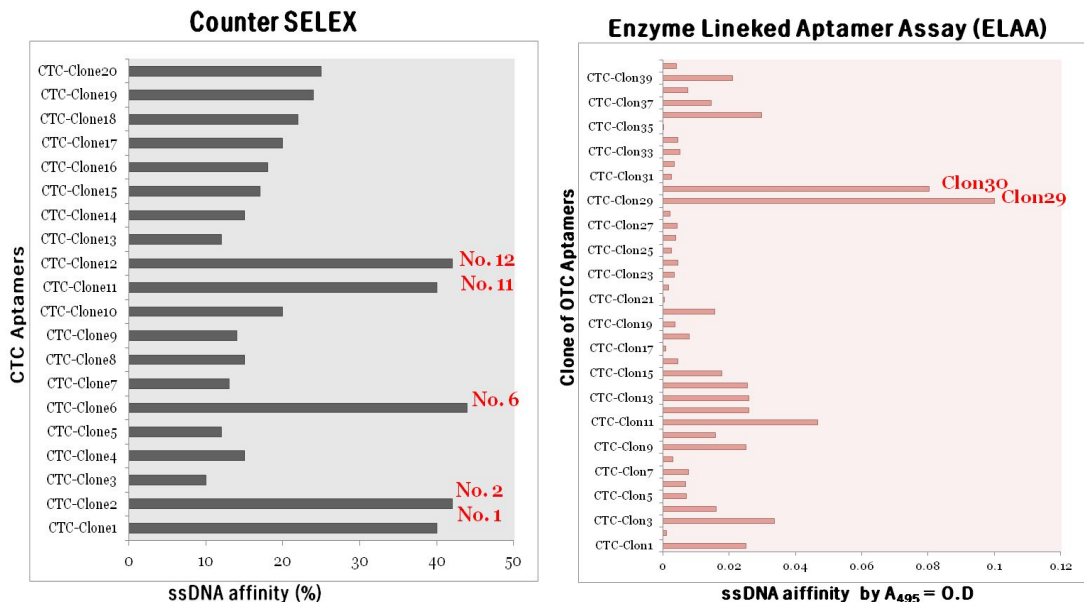


그림 65. Counter SELEX 와 ELAA법으로 선별된 압타머의 affinity 비교

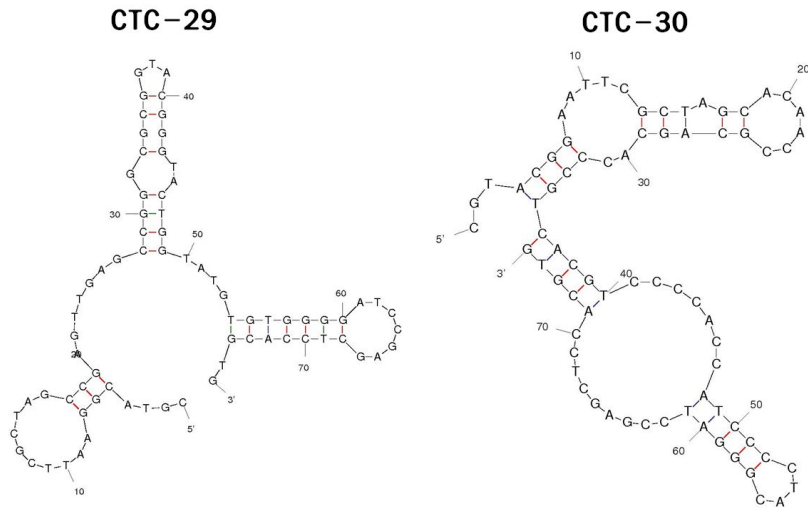


그림 66. Chlortetracycline aptamer 2차 구조

표 22. aptamer 농도에 따른 chlortetracycline 결합력

Aptamer No.	Aptamer Concentration (ng)	Chlortetracycline Initial concentration (mg/mL)	Chlortetracycline Unbound concentration (mg/mL)	Difference concentraion (mg/mL)	Bind (%)
CTC-29	1000	0.0001468	0.0000672	0.0000796	54.24
	100	0.0001468	0.0000746	0.0000721	49.15
	10	0.0001468	0.0000896	0.0000572	38.98
	1	0.0001468	0.0000945	0.0000522	35.59
	0.1	0.0001468	0.0001020	0.0000448	30.51
CTC-30	1000	0.0001468	0.0000746	0.0000721	49.15
	100	0.0001468	0.0000896	0.0000572	38.98
	10	0.0001468	0.0000970	0.0000498	33.90
	1	0.0001468	0.0000871	0.0000597	40.68
	0.1	0.0001468	0.0001119	0.0000348	23.73

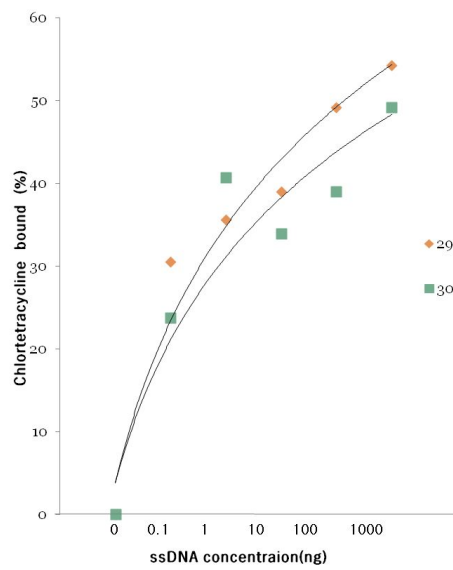
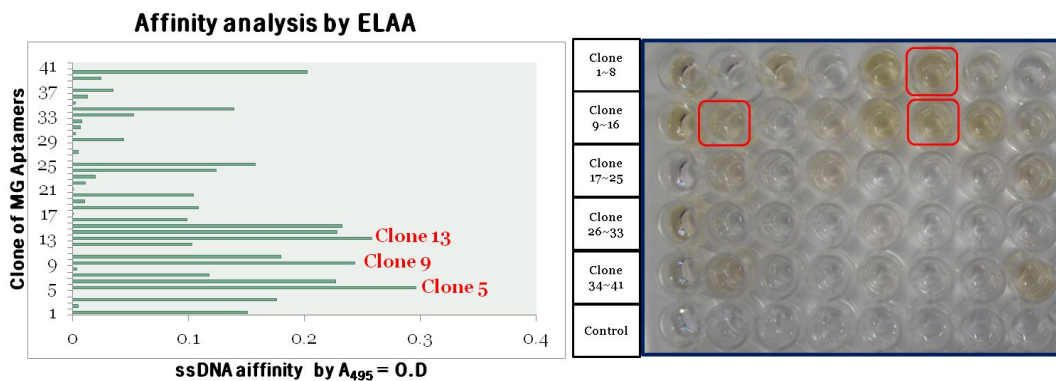
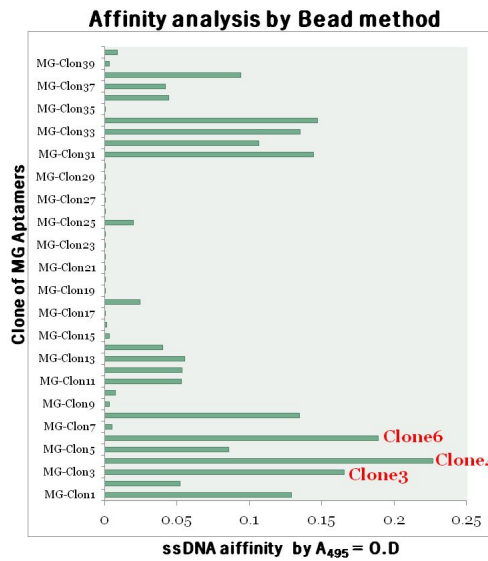


그림 67. Chlortetracycline에 대한 ssDNA Binding assay

④ Malachite green aptamer 비교

Malachite green 에 대한 aptamer SELEX 과정은 ELAA법으로 실시하였으며, aptamer의 malachite green에 대한 affinity 측정은 magnetic bead와 ELAA법으로 실시하였다. 그 결과 malachite green에 대한 13 개의 aptamer를 획득하였으며, magnetic bead와 ELAA법으로 aptamer의 malachite green에 대한 affinity를 측정한 결과 6 개 (clone 3, 4, 5, 6, 9, 13) 의 aptamer에서 강한 affinity 가 나타났다(그림 24). Malachite green에 대한 affinity가 높은 이들 aptamer의 서열의 변이가 다양함을 확인하였으며(표 7), aptamer 서열의 2차 구조는 그림 25에 나타내었다. 서열과 구조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, aptamer 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 aptamer 역시 일반적으로 스템, 루프, 벌지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다.



	Absorbance of the aptamers for malachite green at 495 nm							
Clone 1~8	0.2007	0.0545	0.2259	0.0483	0.346(5)	0.2769	0.1677	0.0534
Clone 9~16	0.2933(9)	0.2294	0.0466	0.1528	0.3081(13)	0.2779	0.2825	0.1486
Clone 17~25	0.0502	0.1586	0.0603	0.1539	0.0501	0.0608	0.0695	0.1735
Clone 26~33	0.2074	0.047	0.0548	0.0491	0.0938	0.0523	0.0565	0.0579
Clone 34~41	0.1027	0.1891	0.0519	0.0627	0.0845	0.0498	0.074	0.2525
Control	0.0498	0.0546	0.0548	0.0512	0.0593	0.0583	0.0563	0.0564

* () : Number of clone

그림 68. Malachite green에 대한 aptamer의 affinity 측정

표 23. ELAA법으로 선별 된 Malachite green 압타머 Sequences

Aptamer	Variable N40 sequences from 19th to 58th position (5'→3')																																															
Position	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								
MG-03	G	G	T	T	T	G	G	G	C	G	T	C	T	G	G	G	A	G	C	C	A	G	C	A	A	T	T	C	T	C	C	C	C	T	C	T	T	A	G	G								
MG-04	C	C	A	C	G	A	C	G	C	T	A	T	C	A	T	G	C	C	C	G	C	T	G	A	G	G	C	C	T	C	T	C	T	C	C	T	G	C	C	G								
MG-06	A	C	A	A	G	G	G	C	A	G	A	C	C	A	T	A	G	G	G	A	T	G	A	G	G	T	C	G	C	C	C	C	G	A	G	T	A	G	C									

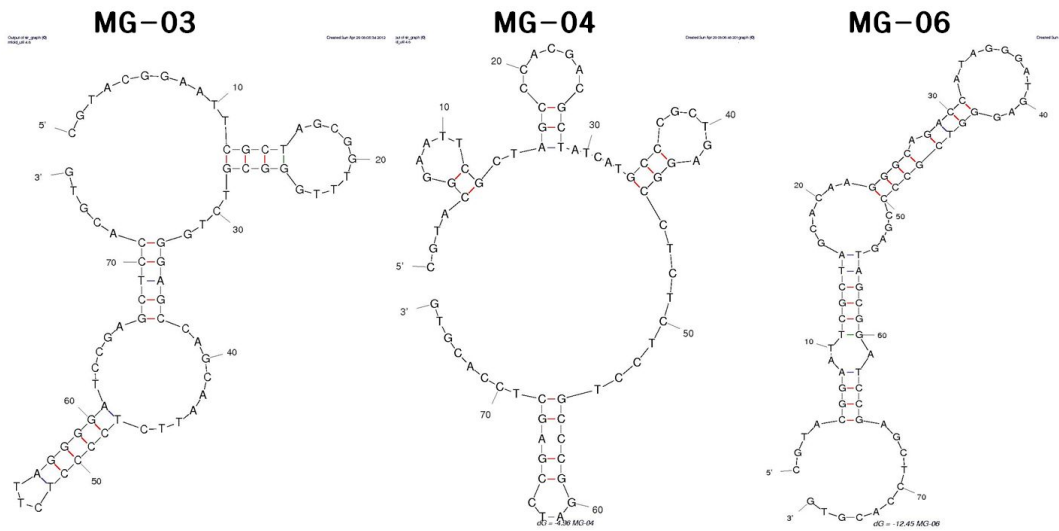
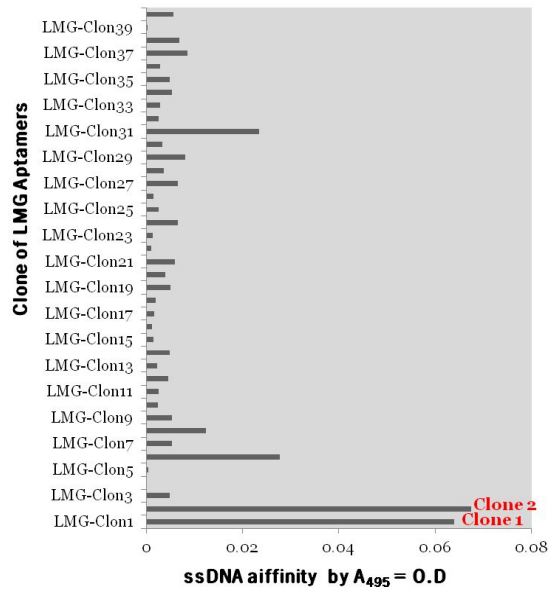


그림 69. Malachite green에 대한 압타머 2차 구조

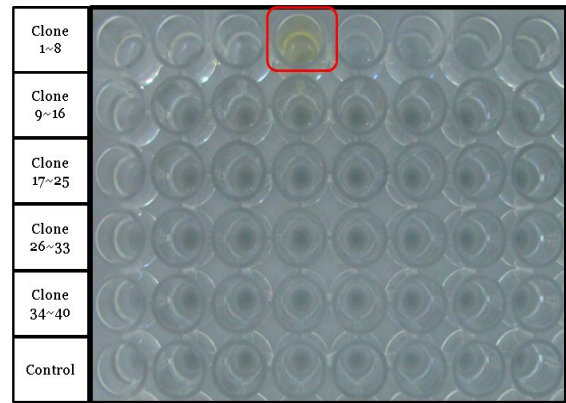
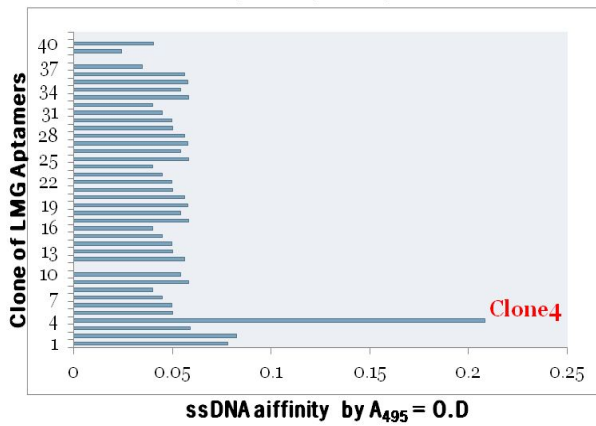
⑤ Leucomalachite green 압타머 비교

Leucomalachite green 에 대한 압타머 SELEX 과정은 ELAA법으로 실시하였으며, leucomalachite green에 대한 압타머의 affinity 측정은 magnetic bead와 ELAA법으로 실시하였다. 그 결과 leucomalachite green에 대한 5개의 압타머를 획득하였으며, magentic bead 와 ELAA법으로 압타머의 leucomalachite green에 대한 affinity를 측정 한 결과 3개 (clone 1, 2, 4) 의 압타머에서 강한 affinity 가 나타났다(그림 26). Leucomalachite green에 대한 affinity가 높은 이들 압타머의 서열의 변이가 다양함을 확인하였으며(표 8), 압타머 서열의 2차 구조는 그림 27에 나타내었다. 서열과 구조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, 압타머 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 압타머 역시 일반적으로 스템, 루프, 벌지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다.

Affinity analysis by Bead method



Affinity analysis by ELAA



	Absorbance of the aptamers for leucomalachite green at 495 nm							
Clone 1~8	0.0781	0.0824	0.0592	0.2084(4)	0.0441	0.0498	0.0448	0.0402
Clone 9~16	0.0583	0.0542	0.0485	0.0564	0.0501	0.0475	0.0501	0.0452
Clone 17~25	0.0552	0.0542	0.0579	0.0564	0.0512	0.0498	0.0412	0.0499
Clone 26~33	0.0541	0.047	0.0548	0.0491	0.0632	0.0523	0.0405	0.0488
Clone 34~40	0.0405	0.0485	0.0602	0.0504	0.0701	0.0498	0.0512	0.0521
Control	0.05	0.0498	0.0448	0.0402	0.0583	0.0542	0.0555	0.0501

* () : Number of clone

그림 70. Leucomalachite green에 대한 aptamer의 affinity 측정

표 24. ELAA법으로 선별 된 Leucomalachite green 압타머 Sequences

Aptamer	Variable N40 sequences from 19th to 58th position (5'→3')																																															
Position	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								
LMG-01	C	G	G	G	G	G	A	T	G	T	C	C	C	A	G	C	G	G	G	A	C	C	G	T	C	T	T	C	G	G	T	G	T	G	G	G	T	G	G									
LMG-02	A	C	A	G	T	A	C	T	G	A	G	G	G	A	C	C	G	G	G	G	C	T	A	T	A	A	T	G	T	C	A	C	G	C	A	T	G	C	T	C								

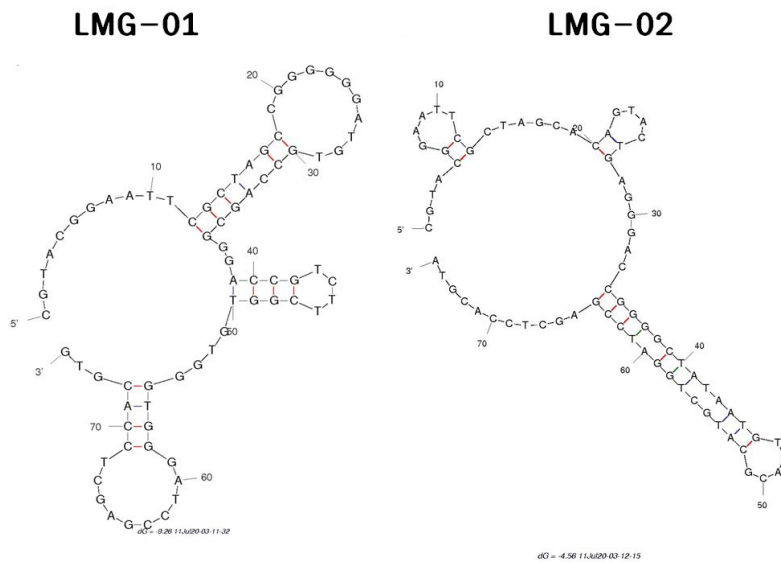
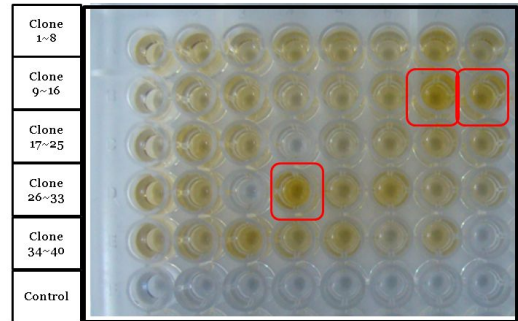
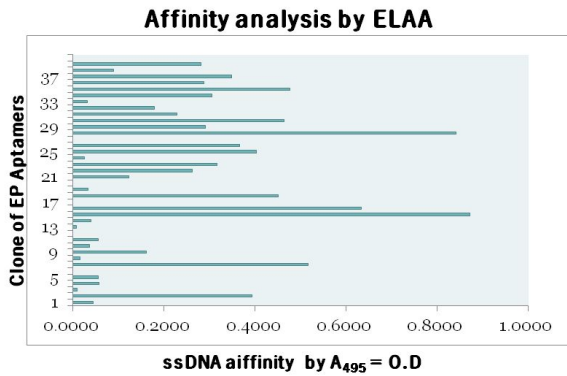
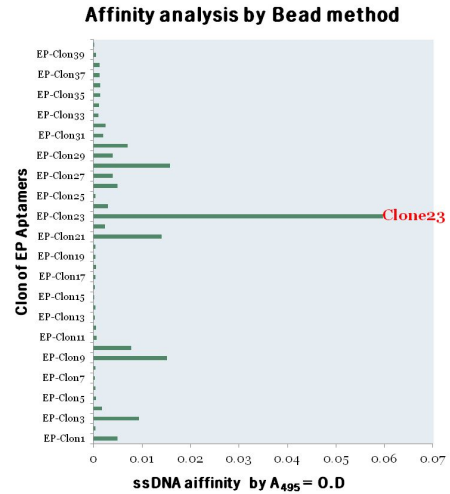
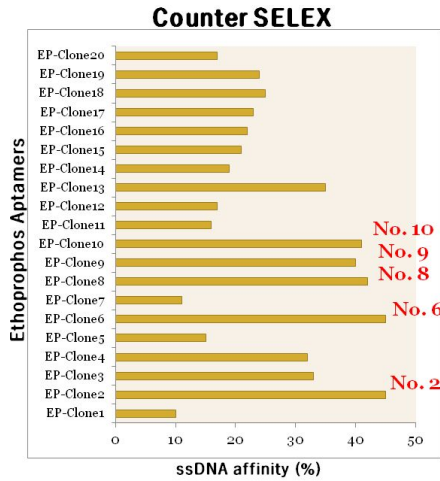


그림 71. Leucomalachite green에 대한 압타머 2차 구조

⑥ Ethoprophos 압타머 비교

Ethoprophos 에 대한 압타머 SELEX 과정은 ELAA법으로 실시하였으며, Ethoprophos 에 대한 압타머의 affinity 측정은 magnetic bead와 ELAA법으로 실시하였다. 그 결과 Ethoprophos에 대한 10개의 압타머를 획득하였으며, 이는 Counter SELEX에 의해 선별한 압타머보다 많았다. magnetic bead와 ELAA법으로 압타머의 Ethoprophos에 대한 affinity를 측정한 결과 4개 (clone 15, 16, 23, 28) 의 압타머에서 강한 affinity 가 나타났다(그림 28). Ethoprophos 에 대한 affinity가 높은 압타머의 서열과 2차 구조는 표 9와 그림 29 에 나타내었다. 서열과 구조간의 관계는 명확히 규명될 수 없으나, 압타머 간의 동일성과 차이 정도는 자료를 통해 확인할 수 있었다. 다른 압타머 역시 일반적으로 스템, 루프, 벌지로 구성되어 있었으며, 기본적으로 2개 이상의 루프를 형성하였다.



Clone	Absorbance of the aptamers for leucomalachite green at 495 nm							
	0.1502	0.5003	0.1153	0.1642	0.1624	0.1063	0.6234	0.1211
Clone 1~8	0.1502	0.5003	0.1153	0.1642	0.1624	0.1063	0.6234	0.1211
Clone 9~16	0.2679	0.1427	0.1615	0.0999	0.1132	0.1463	0.9795 (15)	0.7393 (16)
Clone 17~25	0.1049	0.5568	0.1398	0.0593	0.2294	0.3685	0.4228	0.1311
Clone 26~33	0.5098	0.4721	0.0190	0.9486 (28)	0.3980	0.5697	0.3347	0.2845
Clone 34~40	0.1370	0.4122	0.5825	0.3946	0.4555	0.1952	0.3883	0.0082
Control	0.0611	0.0538	0.0505	0.0617	0.0679	0.0729	0.0624	0.0545

* () : Number of clone

그림 72. Ethoprophos 에 대한 aptamer 의 affinity 측정

표 25. ELAA법으로 선별 된 Ethoprophos aptamer Sequences

Aptamer	Variable N40 sequences from 19th to 58th position (5'→3')																																							
Position	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
EP-15	G	G	G	C	G	G	C	A	A	A	G	C	G	G	G	T	G	C	C	A	A	T	G	T	T	G	C	G	T	G	T	C	T	G	T	G	C	G	G	
EP-16	A	C	C	A	C	C	A	A	A	G	C	C	G	A	A	C	A	A	C	C	C	G	C	T	C	C	G	C	T	C	T	C	C	T	C	T	G	G	T	
EP-23	G	G	A	C	C	T	C	G	C	C	C	A	A	G	A	G	A	T	C	G	C	C	C	A	G	C	A	C	T	C	C	A	G	C	C	C	C	G	T	
EP-28	C	G	A	G	T	T	G	A	G	C	C	G	G	C	G	C	G	G	T	A	C	G	G	G	T	A	C	T	G	G	T	A	T	G	T	G	T	G	G	

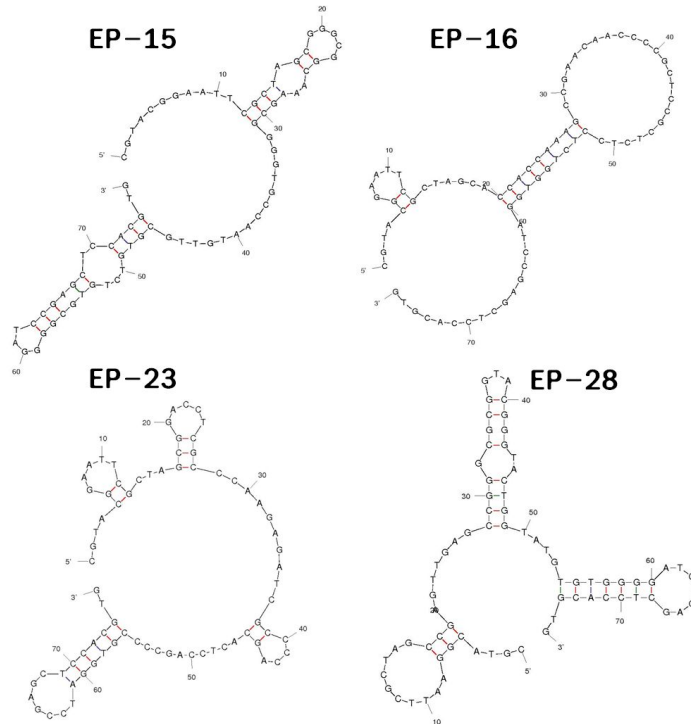


그림 73. Ethoprophos 에 대한 압타머 2차 구조

⑦ Sulfamerazine 압타머 비교

Sulfamerazine과 M-280 tosylactivated bead 간 결합력 측정을 한 결과 bead를 이용한 SELEX 방법으로는 압타머 선별이 힘들 것으로 예상되었고 ELAA 법을 이용하여 압타머의 선별을 하였다. 그 결과 선별한 압타머 후보물질을 T&A cloning을 통하여 얻은 클론들을 4°C 조건으로 보관하였다. 압타머 후보물질의 T&A cloning이 잘 되었는지 확인하기 위해 클론들 중 일부를 선택하여 M13 Primer를 이용한 PCR을 진행한 결과 총 14개의 클론들 중 8개의 클론들은 클로닝이 제대로 이루어 지지 않은 것을 확인 할 수 있으며, 이에 반해 5, 7, 10, 12, 14 번의 클론들의 밴드가 일치함을 확인할 수 있었고, 또 다른 하나의 13번은 유일하게 PCR 산물이 다른 산물들 보다 위쪽에 위치함을 확인하였다. 이에 따라서 ELLA 방법을 이용하여 확인이 된 PCR 산물들에 대한 압타머를 최종선별 한 결과 동일한 위치에 자리 하였던 클론들에 대해서는 발색이 이루어지지 않았으며 유일하게 좀 더 위쪽에 위치하였던 13번에 대해서 발색을 확인 할 수 있었다.

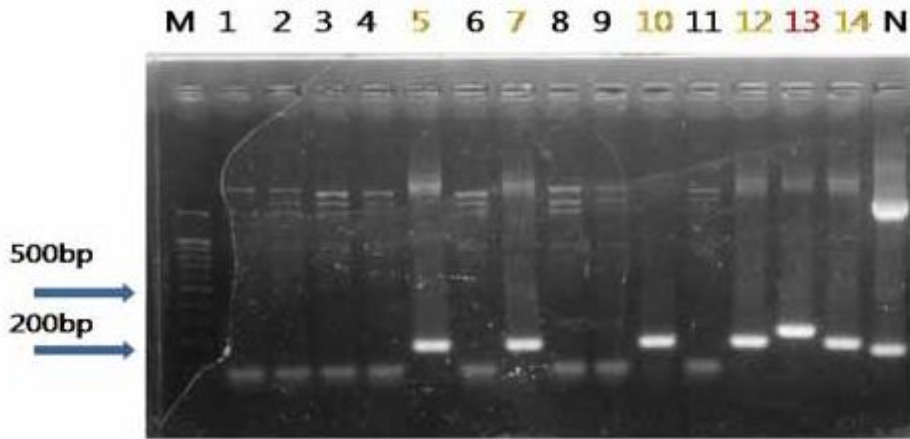


그림. 74 sulfamerazine에 대한 압타머의 클로닝 확인

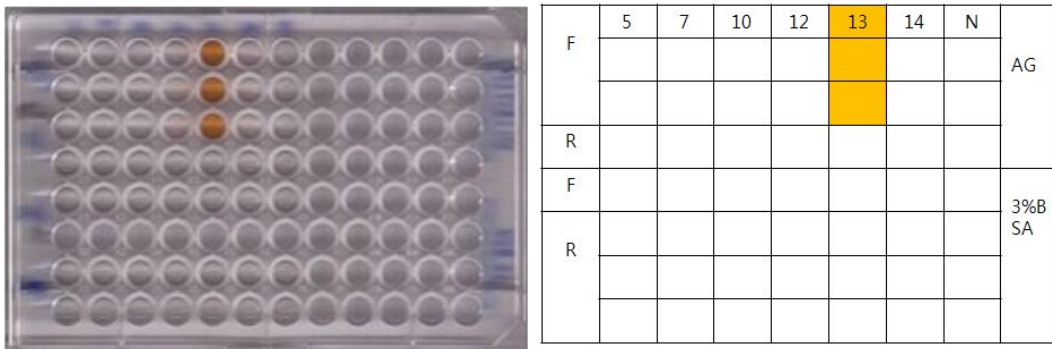


그림. 75 ELLA 방법을 이용한 sulfamerazine 압타머의 확인

(라) Counter-SELEX 법의 개선방법을 이용한 나머지 표적물질들의 새로운 SELEX 전략
 현재 압타머의 SELEX 방법에 있어서 ELAA법이 추가되어 지속적인 선별이 이루어지고 있는 가운데 이와 함께 이용할 새로운 방법을 연구하고 있는 중이다. 이 방법은 기존의 Counter-SELEX 법을 개선한 방법으로서 ELAA법의 여러 가지 장점에도 불구하고 앞서 보여진 Counter-SELEX방법과 ELAA방법에서 보여진 여러 가지 결과와 같이 magnetic bead만이 보여주고 있는 친화도와 표적 선택성 역시 커다란 장점이란 것은 부정할 수 없는 사실이다. 그리하여 이와 같은 장점을 좀 더 이용하고자 다른 종류의 magnetic bead를 이용한 새로운 Counter-SELEX 방법을 시도하였다.

가장 큰 차이점은 기존의 방법이 M-280 tosylactivated magnetic beads를 사용하여 표적 물질을 직접적으로 고정화 시키는 형태라면 이번에는 bead에 streptavidin이 미리 코팅된 bead를 사용함에 따라 bead에 표적물질이 간접적으로 결합된 형태를 유지하게 된다. 즉 앞서 두 가지 SELEX가 힘들다고 판단되어지는 또는 불확실하다고 보여지는 표적물질에 bitotin을 우선 처리를 하여 잘 알려진 biotin과 streptavidin의 강한 비공유 결합력을 이용하는 것이다. 그리고 이 방법은 기존에 이용했던 Counter-SELEX법과 실험을 하는데 있어서 큰 차이를 보이지 않아 실험하는데 어려움이 없으며 이것으로 아직 표적물질에 대한 압타머

의 확인이 진행되고 있지 않은 물질들에 대해서 또는 기존에 밝혀낸 압타머들의 친화도 와 재확인을 하는데 있어서 중요한 역할을 할 것이며 두 가지 방법을 응용하여 이용하면 좀 더 효율적으로 연구가 진행되어질것으로 예상되어진다.

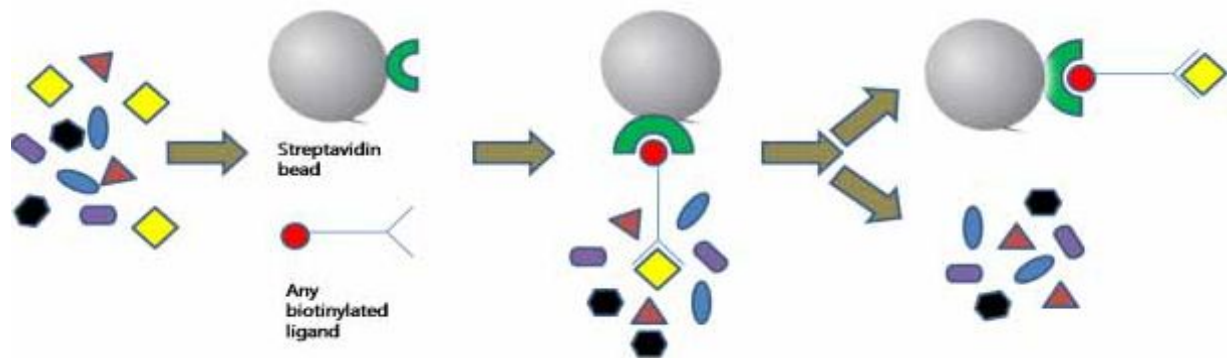


그림 76. Streptavidin bead를 이용한 SELEX 과정

(마) 새로운 SELEX 과정에 의한 위해물질 특이 압타머 선별

위해화학물질(표적물질)에 대한 압타머는 그림 .의 SELEX 진행과정에 따라 선별되었다. 먼저, BSA와 표적물질-BSA 결합물질을 96well immunoplate well (Nuck)에 고정시킨 후, well에 결합되지 않은 표적물질들은 0.05% Tween 20이 함유된 PBS (PBST)를 이용하여 세척되었다. ① BSA에 비특이적으로 결합하는 핵산을 제거하기 위하여 BSA가 결합된 well에 단일가닥 핵산 라이브러리[5'-CGTACGGAATTCGCTAGC-N₄₀-GGATCCGAGCTCCACGTG-3'ssDNA]를 첨가하였고, ② 일정시간 반응 후, BSA에 결합되지 않은 단일가닥 핵산 라이브러리를 표적물질-BSA가 고정된 well에 첨가하여 반응시켰다. ③ 비특이적 핵산들을 제거하기 위해서 세 번의 세척과정을 거친 후, 표적물질에 결합된 핵산들을 20 mM NaOH를 이용하여 분리하였다. ④ 분리된 핵산은 그 농도가 매우 적기 때문에 PCR 방법을 통해 증폭과정을 거쳤다. 이 때, 한 쪽 가닥은 biotin이 결합된 primer을 사용하였다. 마지막 과정으로 ⑤ 압타머로서 사용할 수 있는 단일 가닥의 핵산을 만들기 위해서 Dynabeads streptavidin M-280 bead를 이용하여 증폭된 두 가닥의 핵산들로부터 한 가닥의 핵산을 정제하였다. ①번 과정에서 ⑤번 과정을 9회에서 12회 반복하였다.

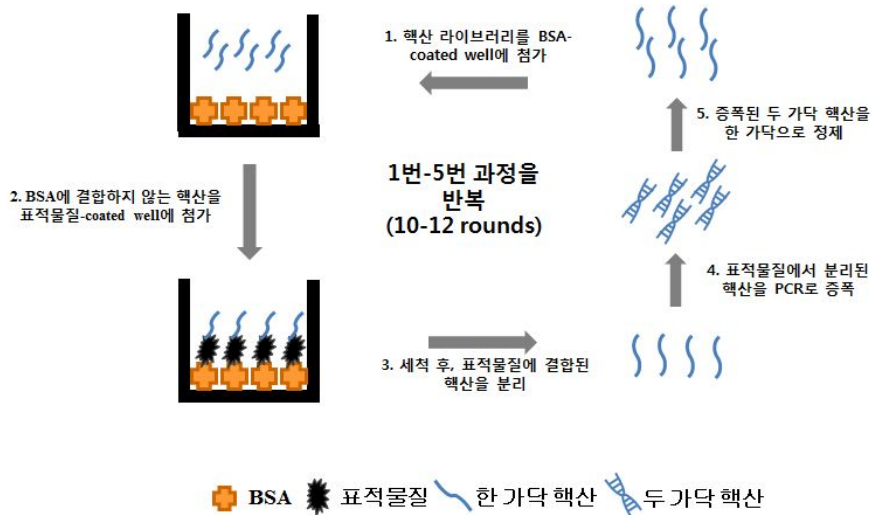


그림 77. 표적물질-BSA conjugate를 이용한 SELEX 진행과정 모식도.

(바) 압타머 후보물질들의 클로닝과 합성

9회에서 12회 SELEX 후 마지막 SELEX round에서 단일 핵산의 회수율을 확인 후 클로닝을 위한 PCR을 수행하였다. T&A cloning Vector Kit(RBC Bioscience Corp., Taiwan)를 사용하여 클로닝을 실시하고, 그 염기서열을 확인 하였다. 확인 된 핵산의 염기서열을 이용하여 biotin label된 단일 핵산, 압타머들은 (주)바이오니아에 의뢰하여 합성되었고, 합성된 압타머들의 표적물질에 대한 결합력은 Enzyme Linked Aptamer Assay (ELAA)를 통하여 확인되었다.

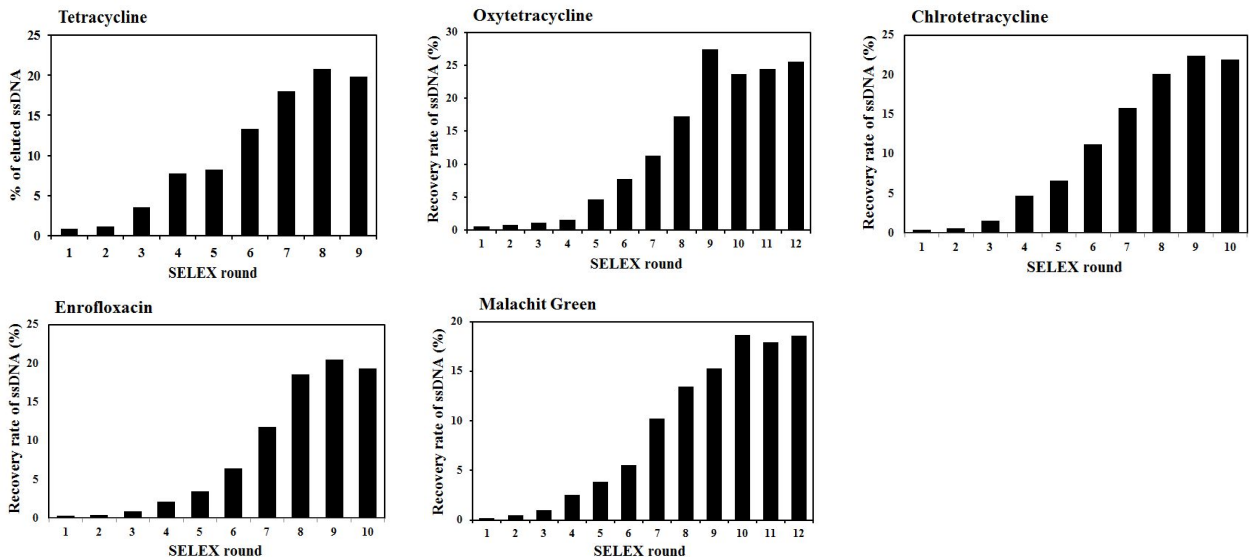


그림 78. 각각의 표적물질들에 대한 압타머의 결합력(%). SELEX round에서의 결합력(%) = (각 표적분자-BSA 고정된 well에서 분리된 핵산의 양) / (각 표적분자-BSA 고정된 well에 첨가된 핵산의 양) × 100.

(사) 압타머 후보물질들의 affinity 측정 및 선별

SELEX 방법을 이용하여 표적물질들에 결합하는 핵산들을 클로닝을 한 후, 핵산 염기서열 분석을 통해 얻은 결과를 바탕으로 bioin과 결합된 압타머들을 합성하였다. 합성된 biotin labelled 압타머들은 표적물질들에 대한 특이 압타머의 선별을 위하여 ELAA법에 이용되었고, 그림.에서 보는 것과 같이 표적물질들에 대해 가장 높은 특이성과 결합력을 가진 압타머들이 선별되었다. 표적물질 중, tetracycline (TC)에 대해서 압타머 TC2, oxytetracycline (OTC)에 대한 압타머 OTC3, chlortetracycline (CTC)에 대한 압타머 CTC8, enrofloxacin (EF)에 대한 압타머 EF3, 그리고 malachite green (MG)에 대한 압타머 MG4가 선별되었다.

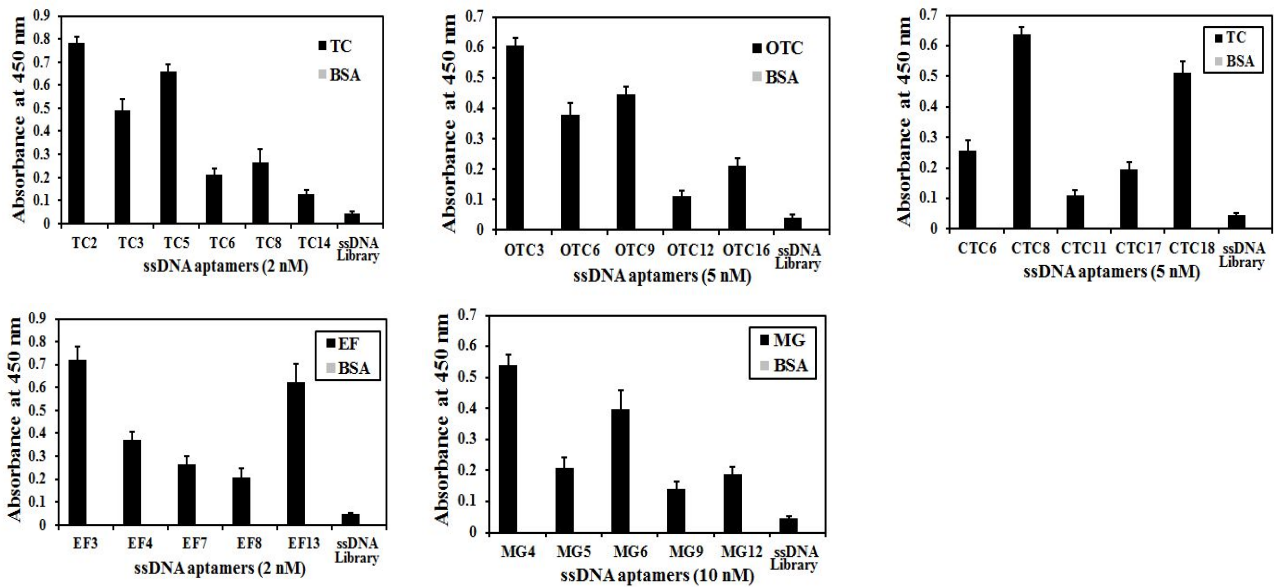


그림 79. 각각의 표적물질들에 대한 선별된 압타머들의 결합력 분석.

표적물질들에 대한 선별된 압타머들의 결합력을 측정하기 위해서 압타머들의 농도를 점차 증가하여 표적물질들에 대한 압타머들의 포화농도를 측정하였다. SELEX를 통해 선별된 압타머의 표적물질에 대한 결합력은 해리상수(dissociation constants, K_d)에 의해 결정되었다. TC2는 tetracycline에 대하여 3.1 nM, OTC3는 oxytetracycline에 대하여 4.7 nM, CTC8은 chlortetracycline에 대하여 4.2 nM, EF3는 enrofloxacin에 대하여 8.3 nM, 그리고 MG4는 malachite green에 대하여 11.3 nM의 K_d 값을 나타내었다. 위에 소개된 각각의 표적물질 특이 압타머들은 다른 선별된 압타머들과 비교해 볼 때, 각각의 해당하는 표적물질을 강하게 인식하는 것을 알 수 있다.

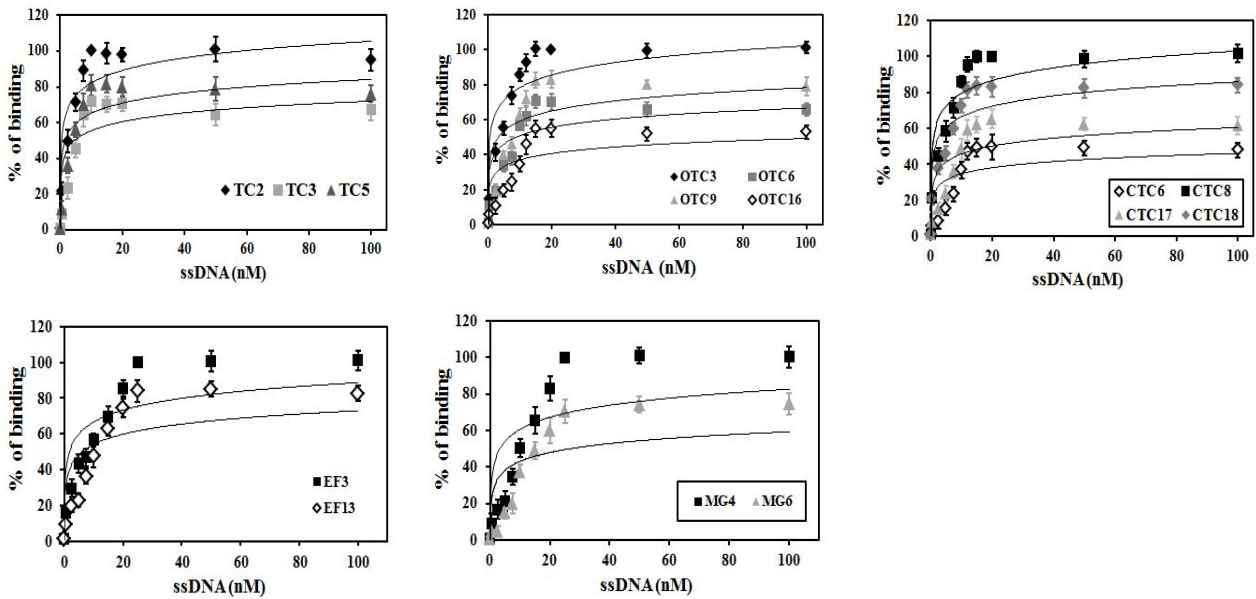


그림 80. 표적물질들에 대해 선별된 압타머들의 포화곡선.

(아) 선별된 압타머들의 염기서열 및 2차 구조 분석

SELEX 방법을 이용하여 표적물질들에 결합하는 압타머들을 클로닝 하였고, 얻어진 재조합 플라스미드에 삽입된 압타머들의 염기서열분석은 (주)솔젠트에 의뢰되었다. 또한, 선별된 압타머의 2차구조는 Michael Zuker가 개발한 Internet-tool Mfold (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form.cgi>)를 이용하여 분석되었다.

Aptamers	Sequences 5'→3'
TC2	GGCGCGGCAAGGTGTGGACTCCAGGCGGTAGGGATGTGCT
OTC3	CGACGCACAGTCGCTGGTGCGTACCTGGTTGCCGTTGTGT
CTC8	CCACACCACCATGCGTTACAGTGGCCAGTGTGCCCGTTGT
EF3	CACAATGAGGGCGGGGTTGTAAGTAGTACCGTTGTGTCTG
MG4	GGCAGGGGGCAGATAGGGGTGGGCTAAGCGGCAACGGCGT

그림 24. 표적물질 특이 압타머들의 N₄₀염기서열.

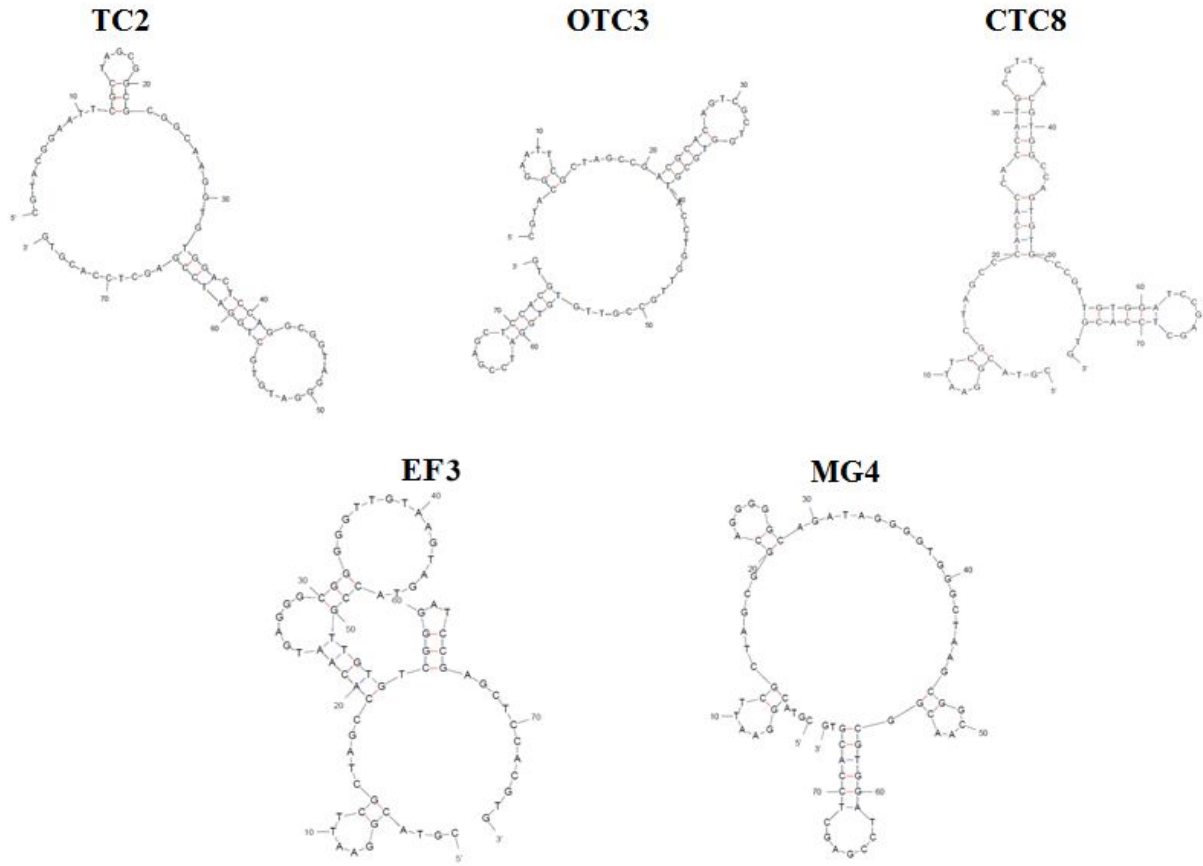


그림 81. 선별된 표적물질 특이 압타머들의 2차 구조들.

출원번호통지서		출원번호통지서		출원번호통지서	
출원 일자	2013.05.10	출원 일자	2013.05.10	출원 일자	2013.05.10
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)	특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)	특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)
출원 번호	10-2013-0053035 (접수번호 1-1-2013-0414216-40)	출원 번호	10-2013-0053040 (접수번호 1-1-2013-0414247-55)	출원 번호	10-2013-0053046 (접수번호 1-1-2013-0414267-68)
출원인 명칭	호서대학교 산학협력단(2-2005-025735-0)	출원인 명칭	호서대학교 산학협력단(2-2005-025735-0)	출원인 명칭	호서대학교 산학협력단(2-2005-025735-0)
대리인 성명	김순웅(9-2006-000534-4)	대리인 성명	김순웅(9-2006-000534-4)	대리인 성명	김순웅(9-2006-000534-4)
발명자 성명	정상희 김정환 이훈표 민정란 임영운	발명자 성명	정상희 김정환 이훈표 민정란 임영운	발명자 성명	정상희 김정환 이훈표 민정란 임영운
발명의 명칭	테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머	발명의 명칭	옥시테트라사이클린에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머	발명의 명칭	클로르테트라사이클린에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머
특 허 청 장		특 허 청 장		특 허 청 장	
출원번호통지서		출원번호통지서		출원번호통지서	
출원 일자	2013.06.28	출원 일자	2013.06.28	출원 일자	2013.06.28
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)	특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)	특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)
출원 번호	10-2013-0075583 (접수번호 1-1-2013-0583765-13)	출원 번호	10-2013-0075618 (접수번호 1-1-2013-0583955-81)	출원 번호	10-2013-0075618 (접수번호 1-1-2013-0583955-81)
출원인 명칭	호서대학교 산학협력단(2-2005-025735-0)	출원인 명칭	호서대학교 산학협력단(2-2005-025735-0)	출원인 명칭	호서대학교 산학협력단(2-2005-025735-0)
대리인 성명	김순웅(9-2006-000534-4)	대리인 성명	김순웅(9-2006-000534-4)	대리인 성명	김순웅(9-2006-000534-4)
발명자 성명	정상희 김정환 이훈표 민정란 임영운	발명자 성명	정상희 김정환 이훈표 민정란 임영운	발명자 성명	정상희 김정환 이훈표 민정란 임영운
발명의 명칭	인로플록사신 또는 시프로플록사신에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머	발명의 명칭	말라카이트 그린에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머	발명의 명칭	말라카이트 그린에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머
특 허 청 장		특 허 청 장		특 허 청 장	

그림 82. 선별된 표적물질 특이 압타머들의 특허출원.

(자) 개발된 검출시스템을 활용한 검출물질별 특이성 조사

① Indirect competitive ELAA를 이용한 검출시스템

표적물질들과 각각의 표적물질들에 대한 특이 압타머들의 결합력을 알아보기 위하여 indirect competitive ELAA를 수행하였다. 표적물질-BSA 결합을 96 well plate에 고정시킨 후, 선별된 표적물질 특이 압타머들과 여러 표적물질들, 그리고 streptavidin-HRP를 이용하여 표적물질들에 대한 압타머들의 결합 특이성을 확인 하였다. 본 실험은 고정된 표적물질들과 고정되지 않은 표적물질들의 압타머에 대한 경쟁적 결합력을 측정하여, 그 결과로서 검출물질에 대한 감도를 측정하는 것으로, 이를 실현하기 위해서는 여러 요인들이 최적화되어야 한다. 우선, well에 고정된 표적물질-BSA의 농도와 biotin label된 압타머의 농도를 여러 농도로 실험하였다. 그리고 두 번째로, streptavidin-HRP의 반응 농도를 조절하였고, 마지막으로 발색반응에 이용되는 TMB 용액의 양을 조절하였다. 그 결과, 고정된 표적물질-BSA의 농도는 5 ug/mL에서, biotin label된 압타머의 농도는 1 nM - 5 nM 사이의 농도에서 높은 감도를 나타냈으며, streptavidin-HRP는 0.5 ug/mL에서 신뢰성 있는 감도를 확인할 수 있었다. 그러나 TMB 용액의 양은 450 nm에서의 흡광도 값에 커다란 영향을 주지는 않았다. 압타머와 표적물질의 결합력은 UV spectrophotometer를 이용하여 450 nm에서 측정되었다. 신뢰성 있는 결과 값을 얻기 위해서 동일한 실험을 3번 이상 수행하였다.

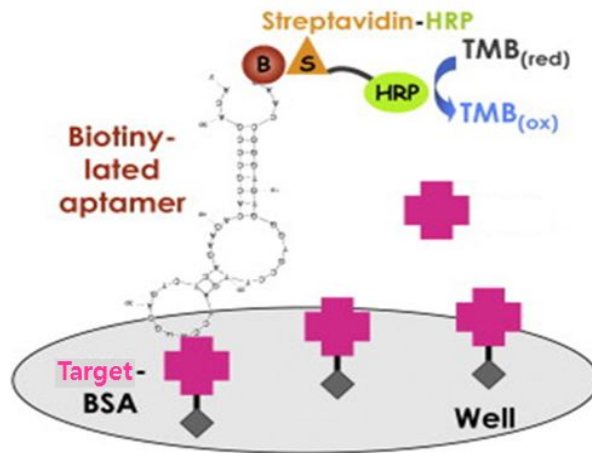


그림 85. Indirect competitive enzyme linked aptamer assay의 모식도.

최적화된 조건으로 indirect competitive ELAA를 수행한 결과, 그림.에서 보는 것처럼 선별된 압타머들은 오히려 낮은 농도에서 표적물질에 대하여 더욱 민감한 감도를 보였다. Tetracycline에 대한 특이 압타머 TC2는 1 nM, oxytetracycline 특이 압타머 OTC3는 2 nM에서 높은 감도를 보였으며, chlortetracycline 특이 압타머 CTC8, enrofloxacin 특이 압타머 EF3와 malachite green 특이 압타머 MG4는 5 nM에서 좋은 감도를 보였다. 이러한 결과들은 ochratoxin에 대한 압타머에서도 이전에 확인 된 바 있다[1]. 아마도 낮은 농도의 압타머에서 표적물질에 대한 경쟁적 관계가 더욱 잘 형성되는 것으로 보인다. 이러한 결과들을 종합해서, 본 연구진은 tetracycline에 대해서 가장 강한 결합력을 가지고 있는 TC2를, enrofloxacin에 대해서는 EF3을, malachite green에 대해서는 MG4를 각각의 검출물질에 대한 개발된 검출시스

템의 probe로서 이용하려고 한다.

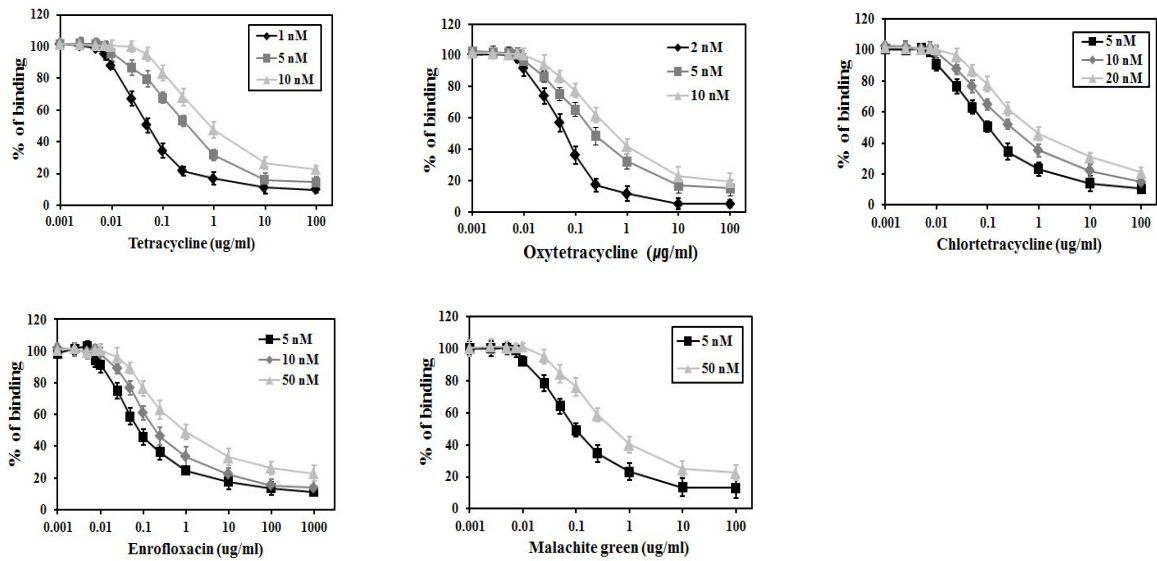


그림 86. 표적물질 특이 압타머들의 표적물질들에 대한 결합 특이성 분석.

(차) 기존 진단방법과 신규 개발된 진단법의 비교 분석

- ① 실제 시료에 대한 개발된 indirect competitive assay-based aptasensor의 성능평가
- ② 우유에서 tetracycline에 대한 검출시스템의 검출감도 및 회수율 측정

우유로부터 tetracycline의 검출은 개발된 indirect competitive ELAA에 의해서 수행되었고, 우유의 전처리는 앞서 소개된 최적화된 전처리 방법이 이용되었다. 개발된 검출시스템의 검출감도의 민감도는 전처리된 우유에서 선별된 압타머 TC2를 이용하여 측정되었으며, buffer를 표준용액으로 하여 비교 하였다. 그 결과, 이 검출시스템은 buffer와 우유에서 유사한 감도를 보였고, 표.에서 제시된 바와 같이 낮은 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)를 보였다. 이 결과 값은 우유에서의 tetracycline의 MRLs (100 ug/L)를 충분히 만족한다.

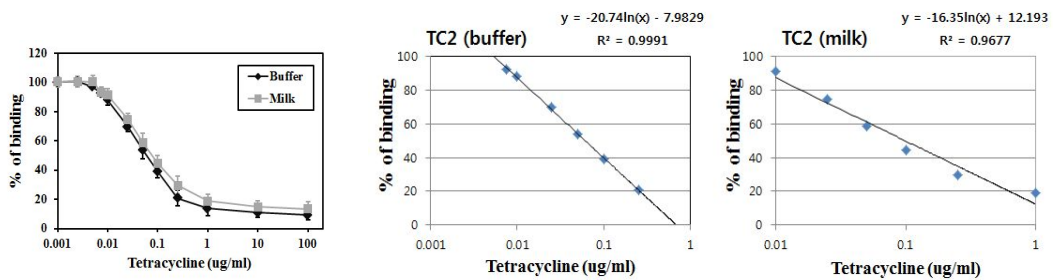


그림 87. Indirect competitive ELAA에서 얻어진 tetracycline에 대한 정량곡선.

표 25. Buffer와 우유에서 분석된 압타머 TC2의 tetracycline에 대한 검출감도.

Matrix	LOD (ug/L)	LOQ (ug/L)	SD (mean)	Linearity, R ²	MRLs
Buffer	9.1	27.3	3.4	0.9991	100 ug/L
우유	11.1	74.2	4.6	0.9677	

개발된 검출시스템인 indirect competitive ELAA를 이용하여 MRLs 농도(100 ug/L)와 MRLs 보다 높은 농도(400 ug/L)의 tetracycline으로 spiking된 우유에서 회수율을 구하였고, HPLC를 이용하여 이 검출시스템을 평가하였다. 그 결과, 두 방법 모두 낮은 농도와 높은 농도에서 90% 이상의 회수율을 나타냈다. 이 검출시스템은 좋은 신뢰도와 함께 높은 검출감도를 갖는 것을 확인 할 수 있다.

표 26. 우유에서의 tetracycline 회수율.

Methods	Spiked concentration (ug/L)	Measured concentration (ug/L, mean±S.D.)	Recovery (% , mean±S.D.)
Indirect competitive ELAA	100	99.5±1.3	99.5±1.3
	400	405.2±7.2	101.3±1.8
HPLC-UV	100	90.4±1.3	90.4±1.3
	400	369.4±4.6	92.4±1.2

㉔ 닭고기에서 enrofloxacin에 대한 검출시스템의 검출감도 및 회수율 측정

닭고기로부터 enrofloxacin의 검출은 개발된 indirect competitive ELAA에 의해서 수행되었고, 닭고기의 전처리하는 앞서 소개된 최적화된 전처리 방법이 이용되었다. 개발된 검출시스템의 검출감도의 민감도는 전처리된 닭고기에서 선별된 압타머 EF3를 이용하여 측정되었으며, buffer를 표준용액으로 하여 비교 하였다. 그 결과, 이 검출시스템은 buffer와 닭고기에서 유사한 감도를 보였고, 표.에서 제시된 바와 같이 낮은 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)를 보였다. 이 결과 값은 닭고기에서의 enrofloxacin의 MRLs (100 ug/L)를 충분히 만족한다.

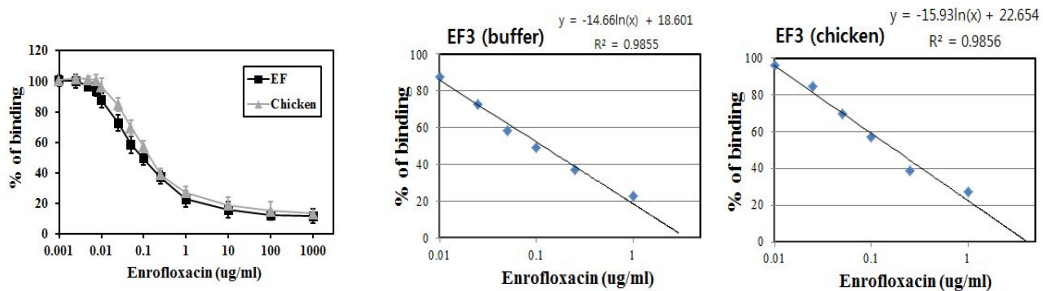


그림 88. Indirect competitive ELAA에서 얻어진 enrofloxacin에 대한 정량곡선.

표 27. Buffer와 닭고기에서 분석된 압타머 EF3의 enrofloxacin에 대한 검출감도.

Matrix	LOD (ug/L)	LOQ (ug/L)	SD (mean)	Linearity, R ²	MRLs
Buffer	10.1	67.2	4.3	0.9855	100 ug/L
닭고기	16.6	90.7	3.9	0.9756	

개발된 검출시스템인 indirect competitive ELAA를 이용하여 MRLs 농도(100 ug/L)와 MRLs 보다 높은 농도(400 ug/L)의 enrofloxacin으로 spiking된 닭고기에서 회수율을 구하였고, HPLC를 이용하여 이 검출시스템을 평가하였다. 그 결과, 두 방법 모두 낮은 농도와 높은 농도에서 90% 이상의 회수율을 나타냈다. 이 검출시스템은 좋은 신뢰도와 함께 높은 검출감도를 갖는 것을 확인 할 수 있다.

표 28. 닭고기에서의 enrofloxacin 회수율.

Methods	Spiked concentration (ug/L)	Measured concentration (ug/L, mean±S.D.)	Recovery (% , mean±S.D.)
Indirect competitive ELAA	100	92.3±3.4	92.3±3.4
	400	362.2±11.3	90.5±2.8
HPLC-UV	100	93.1±2.7	93.1±2.7
	400	368.8±7.6	92.2±1.9

㉔ 광어에서 malachite green에 대한 검출시스템의 검출감도 및 회수율 측정

광어로부터 malachite green의 검출은 개발된 indirect competitive ELAA에 의해서 수행되었고, 광어의 전처리는 앞서 소개된 최적화된 전처리 방법이 이용되었다. 개발된 검출시스템의 검출감도의 민감도는 전처리된 광어에서 선별된 압타머 MG4를 이용하여 측정되었으며, buffer를 표준용액으로 하여 비교 하였다. 그 결과, 이 검출시스템은 buffer와 광어에서 유사한 감도를 보였고, 표.에서 제시된 바와 같이 낮은 정량한계(LOQ)를 보였다.

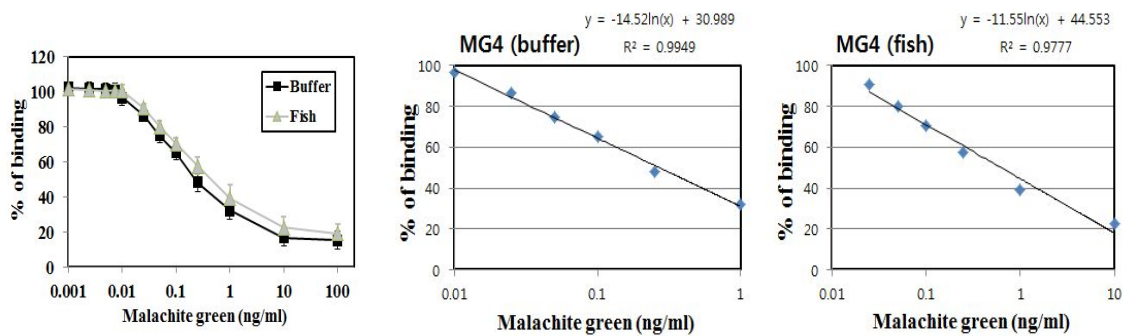


그림 89. Indirect competitive ELAA에서 얻어진 malachite green에 대한 정량곡선.

표 29. Buffer와 광어에서 분석된 압타머 MG4의 malachite green에 대한 검출감도.

Matrix	LOD (ug/L)	LOQ (ug/L)	SD (mean)	Linearity, R ²	LOQ
Buffer	0.4	1.4	4.1	0.9699	2 ug/L
광어	0.6	1.7	3.5	0.9756	

개발된 검출시스템인 indirect competitive ELAA를 이용하여 LOQ 농도(2 ug/L)와 LOQ 보다 높은 농도(10 ug/L)의 malachite green으로 spiking된 광어에서 회수율을 구하였고, HPLC를 이용하여 이 검출시스템을 평가하였다. 그 결과, 낮은 농도 및 높은 농도에서 각각 75 - 85% 및 82.5 - 83.6% 범위의 회수율을 나타냈다. 이 검출시스템은 좋은 신뢰도와 함께 분석법이 적합한 것으로 나타났다.

표 30. 광어에서의 malachite green 회수율.

Methods	Spiked concentration (ng/L)	Measured concentration (ng/L, mean±S.D.)	Recovery (% , mean±S.D.)
Indirect competitive ELAA	10	8.25±0.64	82.5±6.4
	200	154.8±4.1	77.4±2.1
HPLC-UV	10	8.63±0.47	86.3±4.7
	200	162.9±3.3	81.5±1.6

(2) 기존 진단방법과 신규 개발된 진단법의 비교

기존에 tetracycline의 검출은 HPLC 및 mass 분석기기를 이용하거나 항체를 사용한 효소결합면역분석법(ELISA)을 통해서 많이 이루어졌다. HPLC 또는 mass를 이용한 분석방법은 매우 정확하고 소량의 시료(LOD < 1 ug/L)도 검출 가능한 뛰어난 민감도를 자랑한다. 그러나 시료의 전처리과정의 복잡함과 고가장비 사용의 고비용, 그리고 숙련된 인력의 필요가 요구된다. 또한 분석시간도 많이 걸리는 단점이 있다. 항체를 사용하는 ELISA 검사법은 이런 단점들을 보완하면서 편리성과 함께 높은 민감도를 나타낸다. 하나, probe로서 사용되는 항체의 제작에 여러 문제점이 있으며, 항체는 압타머에 비해 안정성이 크게 떨어지는 단점이 있다. 이런 이유로 ELISA 검사제품은 장기간 보관이 어렵다. 이러한 검사방법들의 단점들을 극복하면서 쉽고 빠르게 tetracycline을 검사할 수 있는 검사법이 바로, 압타머를 이용한 ELAA법이다. 비록 아직까지 위해서 제시된 검사방법들에 비해 낮은 민감도를 보이고 있지만, 검출방법의 편리성과 저렴한 비용 등의 경제적인 측면과 함께 MRLs를 만족할 수 있는 높은 민감도를 가지고 있다. 이 분석법은 현장에서 직접 사용할 수 있는 현장 검사시스템에 적용 가능 할 것이다.

바. 개발된 시스템의 현장 적용성 검토

(1) 농축수산물에 대한 개발시스템의 현장 적용성 검증

(가) Indirect competitive assay-based aptasensor의 현장 적용성

본 사업의 최종 목표는 농축수산물에 잔류된 위해화학물질을 현장에서 간편하고 신속하게 검사 하는 것이다. 이를 위해서 본 연구진은 최적화된 식품 전처리 방법과 개발된 검사시스템을 활용하여 현장에서 위해화학물질을 검사할 수 있는 검사시스템의 현장 적용성을, 다음의 식품을 대상으로 분석하려고 한다.

① 우유에서 tetracyclines (TCs)에 대한 검출시스템의 현장 적용성

우유에 존재하는 TCs를 검출하기 위해서는 크게 두 가지 과정이 필요한데, 그 처음 과정이 우유에 대한 전처리과정이고 그 다음 과정이 우유에 잔류하는 항생제의 검출 과정이다. 처음

과정인, 우유의 전처리는 앞서 개발된 최적화된 전처리 방법을 사용하였다. 그러나 현장에서는 질소농축기의 사용이 어렵기 때문에, 이러한 문제를 해결하고자 시료의 농축과정을 생략하고 바로 검출시스템에 적용하는 방법을 고안 하였다. TFA 1%를 포함한 McIlvaine's buffer로 균질화 시킨 우유를 원심분리 후, 두 배로 희석된 전처리 시료를 1M NaOH로 중화시키고 마지막 단계로 syringe filter를 사용하여 여과하였다. 이 방법은 시료의 농축과정이 필요 없는 신속하고 간편한 방법이다. 이렇게 얻어진 전처리 시료를 가지고 개발된 검사시스템에 적용 하였다. 그 결과, TCs (tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline)에 대해 높은 검출감도를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

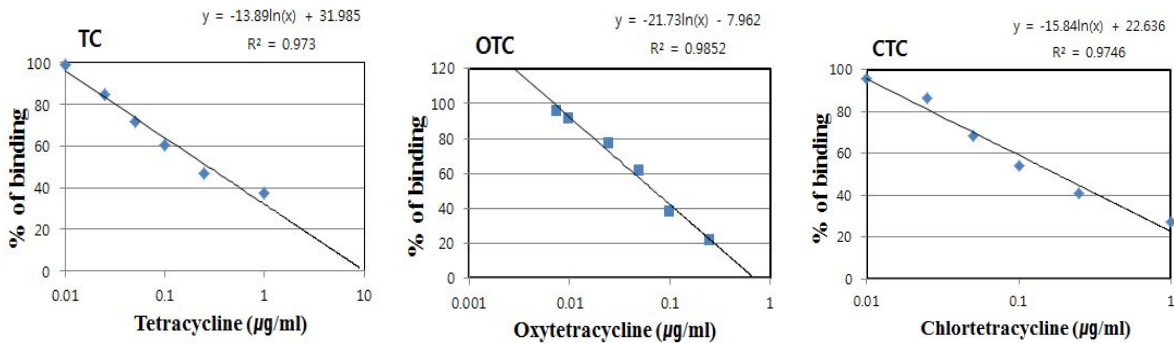


그림 90. 개발된 시료 전처리와 검사시스템을 통해 얻은 TC, OTC, CTC의 정량곡선.

표 31. TC, OTC, CTC의 검출 한계와 정량 한계.

Targets	LOD (ug/L)	LOQ (ug/L)	SD (mean)	Linearity, R ²	MRLs
TC	14.9	64.8	3.5	0.9730	100 ug/L
OTC	12.3	49.8	4.2	0.9852	
CTC	16.5	90.7	4.0	0.9746	

② 닭고기에서 enrofloxacin (EF)와 ciprofloxacin (CF)에 대한 검출시스템의 현장 적용성

닭고기에 존재하는 EF와 CF를 검출하기 위해서는 크게 두 가지 과정이 필요한데, 그 처음 과정이 닭고기에 대한 전처리과정이고 그 다음 과정이 닭고기에 잔류하는 항생제의 검출 과정이다. 닭고기의 전처리 과정은 앞서 개발된 최적화된 전처리 방법을 사용하였다. 고기에서 항생제를 추출하기 위해서는 추출용매인 methanol이 사용되는데 이를 검사시스템에 도입하기 위해서는 시료의 농축과정이 반드시 필요하다. 유기용매에 큰 영향을 받는 압타머의 경우에는 더 더욱 필요한 과정이다. 이를 위해서 전처리과정에 질소농축기를 이용한 시료의 농축과정이 있는데, 실제로 현장에서 질소농축기를 사용하기는 어려운 실정이다. 이러한 문제를 해결하고자, 본 연구진은 실험용 고온반응기(heating block)를 이용하여 유기용매가 포함된 시료에 일정한 온도를 일정시간 가하여 시료의 농축을 시도하였고, 이렇게 얻어진 전처리 시료를 가지고 개발된 검사시스템에 적용 하였다. 그 결과, EF와 CF에 대해 높은 검출감도를 나타내었다. 이러한 결과로부터 본 연구진은 이 검사시스템이 현장 적용에 부합됨을 확인 할 수 있었다.

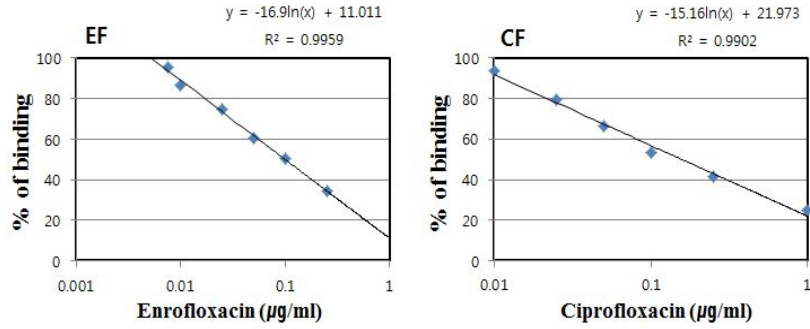


그림 91. 개발된 시료 전처리와 검사시스템을 통해 얻은 EF와 CF의 정량곡선.

표 32. EF와 CF의 검출 한계와 정량 한계.

Targets	LOD (ug/L)	LOQ (ug/L)	SD (mean)	Linearity, R ²	MRLs
EF	11.1	60.8	4.2	0.9959	100 ug/L
CF	13.6	95.3	4.4	0.9902	

③ 광어에서 malachite green (MG)에 대한 검출시스템의 현장 적용성

광어에 존재하는 MG를 검출하기 위해서는 크게 두 가지 과정이 필요한데, 그 처음 과정이 광어에 대한 전처리과정이고 그 다음 과정이 광어에 잔류하는 항생제의 검출 과정이다. 광어의 전처리 과정은 앞서 개발된 최적화된 전처리 방법을 사용하였다. 수산물에서 항생제를 추출하기 위해서는 추출용매인 dichloromethane이 사용되는데 이를 검사시스템에 도입하기 위해서는 시료의 농축과정이 반드시 필요하다. 유기용매에 큰 영향을 받는 압타머의 경우에는 더더욱 필요한 과정이다. 이를 위해서 전처리과정에 질소농축기를 이용한 시료의 농축과정이 있는데, 실제로 현장에서 질소농축기를 사용하기는 어려운 실정이다. 이러한 문제를 해결하고자, 본 연구진은 실험용 고온반응기(heating block)를 이용하여 유기용매가 포함된 시료에 일정한 온도를 일정시간 가하여 시료의 농축을 시도하였고, 이렇게 얻어진 전처리 시료를 가지고 개발된 검사시스템에 적용 하였다. 그러나 MG에 대한 검출감도는 정량한계(2 ug/L)를 넘는 결과 값을 보였으며, 아마도 이러한 결과는 완전히 농축이 일어나지 않은 추출용 유기용매의 영향인 것으로 생각된다.

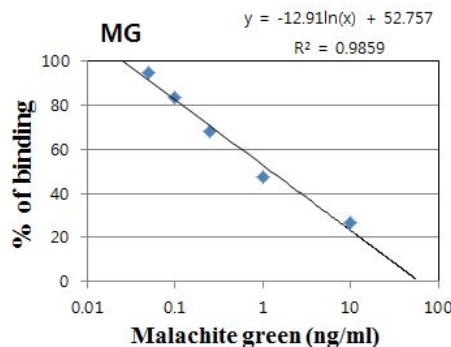


그림 92. 개발된 시료 전처리와 검사시스템을 통해 얻은 MG의 정량곡선.

표 33. MG의 검출 한계와 정량 한계.

Targets	LOD (ug/L)	LOQ (ug/L)	SD (mean)	Linearity, R ²	LOQ
MG	1.1	4.8	6.3	0.9859	2 ug/L

(나) 자성나노입자 기반 바이오센서의 현장 적용성

본 사업의 최종 목표는 농축수산물에 잔류된 위해화학물질을 현장에서 간편하고 신속하게 검사 하는 것이다. 이를 위해서 본 연구진은 최적화된 식품 전처리 방법과 (주) 중검에서 개발된 자성 나노입자 기반 검사시스템을 활용하여 현장에서 위해화학물질을 검사할 수 있는 검사시스템의 현장 적용성을, 다음의 식품을 대상으로 분석하려고 한다.

① 돼지고기에서 sulfamethazine (SMZ), sulfamerazine (SMR), sulfaclozine sodium (SCS)에 대한 검출시스템의 현장 적용성

돼지고기에 존재하는 SMZ, SMR 그리고 SCS을 검출하기 위해서는 크게 두 가지 과정이 필요한데, 그 처음 과정이 돼지고기에 대한 전처리과정이고 그 다음 과정이 돼지고기에 잔류하는 항생제의 검출 과정이다. 돼지고기의 전처리 과정은 앞서 개발된 최적화된 전처리 방법을 사용하였다. 고기에서 항생제를 추출하기 위해서는 추출용매인 methanol이 사용되는데 이를 검사시스템에 도입하기 위해서는 시료의 농축과정이 반드시 필요하다. 이 검사시스템의 probe로서 사용되는 sulfamethazine 단클론 항체는 유기용매에 영향을 받을 것이다. 이를 최소화시키기 위해서 전처리과정에 질소농축기를 이용한 시료의 농축과정이 있는데, 실제로 현장에서 질소농축기를 사용하기는 어려운 실정이다. 이러한 문제를 해결하고자, 본 연구진은 실험용 고온반응기(heating block)를 이용하여 유기용매가 포함된 시료에 일정한 온도를 일정시간 가하여 시료의 농축을 시도하였고, 이렇게 얻어진 전처리 시료를 가지고 개발된 검사시스템에 적용하였다. 그 결과, 세 종류의 sulfonamide 계열의 살균제에 대해 최대잔류허용량(100 ug/L) 이하의 높은 검출감도를 나타내는 것을 확인 하였다. 이러한 결과로부터 본 연구진은 이 검사시스템이 현장 적용에 부합됨을 확인 할 수 있었다.

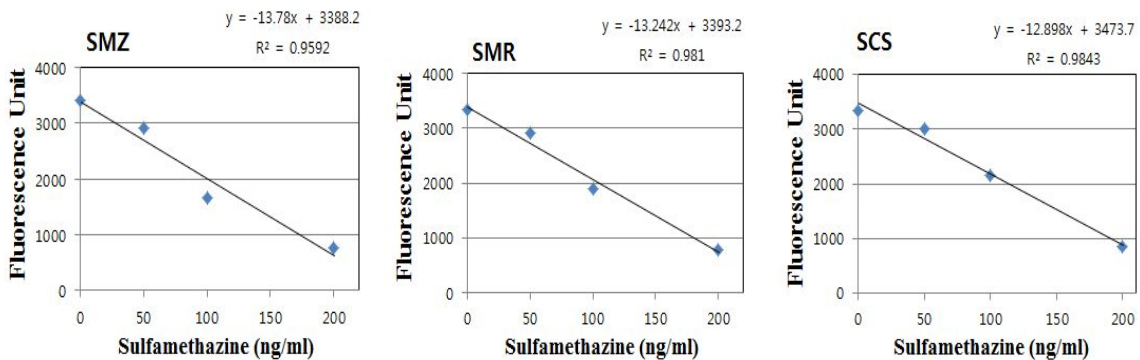


그림 93. 개발된 시료 전처리와 검사시스템을 통해 얻은 SMZ, SMR, SCS의 정량곡선.

표 34. SMZ, SMR, SCS의 검출 한계와 정량 한계.

Targets	LOD (ug/L)	LOQ (ug/L)	SD (mean)	Linearity, R ²	MRLs
SMZ	19.6	67.2	4.6	0.9592	100 ug/L
SMR	22.2	74.5	6.6	0.9810	
SCS	33.8	99.5	5.2	0.9843	

② 광어에서 malachite green (MG)에 대한 검출시스템의 현장 적용성

광어에 존재하는 MG를 검출하기 위해서는 크게 두 가지 과정이 필요한데, 그 처음 과정이 광어에 대한 전처리과정이고 그 다음 과정이 광어에 잔류하는 항생제의 검출 과정이다. 광어의 전처리 과정은 앞서 개발된 최적화된 전처리 방법을 사용하였다. 수산물에서 항생제를 추출하기 위해서는 추출용매인 dichloromethane이 사용되는데 이를 검사시스템에 도입하기 위해서는 시료의 농축과정이 반드시 필요하다. 유기용매에 큰 영향을 받는 압타머의 경우에는 더더욱 필요한 과정이다. 이를 위해서 전처리과정에 질소농축기를 이용한 시료의 농축과정이 있는데, 실제로 현장에서 질소농축기를 사용하기는 어려운 실정이다. 이러한 문제를 해결하고자, 본 연구진은 실험용 고온반응기(heating block)를 이용하여 유기용매가 포함된 시료에 일정한 온도를 일정시간 가하여 시료의 농축을 시도하였고, 이렇게 얻어진 전처리 시료를 가지고 개발된 검사시스템에 적용 하였다. 그 결과, indirect competitive ELAA를 기반으로 하는 검사시스템에 비해 더 낮은 정량한계값을 갖는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 본 연구진은 이 검사시스템이 현장 적용에 부합됨을 확인할 수 있었다.

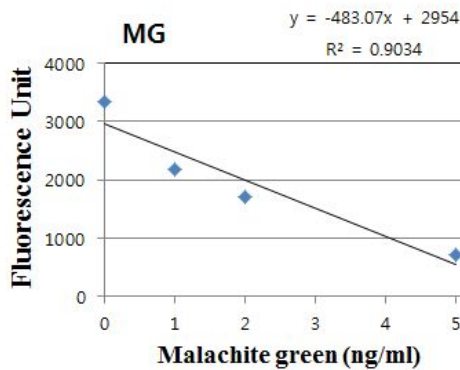


그림 94. 개발된 시료 전처리와 검사시스템을 통해 얻은 MG의 정량곡선.

표 35. MG의 검출 한계와 정량 한계.

Targets	LOD (ug/L)	LOQ (ug/L)	SD (mean)	Linearity, R ²	LOQ
MG	0.04	1.8	0.15	0.9859	2 ug/L

사. 분석결과를 토대로 검출시스템의 보완

본 연구진은 농축수산물에 잔류된 위해화학물질을 현장에서 간편하고 신속하게 검사하기 위해서 개발된 indirect competitive assay-based aptasensor와 자성나노입자 기반 바이오센서를

활용하여 우유, 닭고기, 돼지고기 그리고 광어로부터 위해화학물질들을 검사 하였고, 그 검사시스템의 현장 적용성을 평가하였다. 그 결과, 두 검사시스템 모두에서 신뢰 할 수 있는 검출 감도를 얻을 수 있었다. 그러나 고기류의 전처리 시, 이용되는 유기용매의 농축과정은 검출감도에 여러 가지 영향을 줄 수 있는 것으로 확인되었다. 향후, 유기용매의 농축을 위한 효과적인 기기의 개발과 더불어 유기용매를 대체할 수 있는 전처리법 개발이 필요할 것으로 사료된다.

아. 개발 시스템 별 표준매뉴얼 개발

(1) 우유에서 tetracyclines (TCs)의 검출에 대한 표준매뉴얼(Indirect competitive ELAA-based aptasensor)

- ① Trifluoroacetic acid (TFA) 1%를 포함한 McIlvaine's buffer 용액, 5 mL과 동량의 우유 (5 mL)를 넣고 2분간 vortex로 균질화 한다.
- ② 균질화된 시료를 8,000 rpm에서 20분 동안 4 °C에서 원심분리 한다.
- ③ 원심분리된 상층액, 3 mL을 취하여 1M NaOH로 중화(pH=7.4)한다.
- ④ 중화된 시료를 syringe filter (0.45 um)로 여과한다.
- ⑤ 5 ug/mL의 tetracycline-BSA로 코팅된 96 well immunoplate에 blocking buffer (binding buffer에 1% skim milk 첨가) 200 uL을 첨가하고 37 °C에서 30분 반응한다.
- ⑥ Binding buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.2) 50 uL에 들어있는 2 nM의 biotin label된 aptamer TC2와 전처리 시료 50 uL을 실온에서 30분간 반응한다.
- ⑦ Blocking buffer를 제거하고 binding buffer 200 uL로 세 번 세척 후, ⑥번의 반응 시료 100 uL를 96 well immunoplate well 첨가하여 37 °C에서 1시간 반응한다.
- ⑧ 반응 후, PBST (0.01% Tween-20 첨가) 200 uL로 세 번 세척한다.
- ⑨ Streptavidin-HRP (0.5 ug/ml) 100 uL을 각각의 well에 첨가하고 37 °C에서 30분간 반응한다.
- ⑩ 반응 후, PBST (0.01% Tween-20 첨가) 200 uL로 세 번 세척한다.
- ⑪ TMB solution 10 mL과 3 uL의 H₂O₂를 혼합한 후, 세척된 각각의 well에 100 uL씩 첨가하고 암조건에서 30분간 반응한다.
- ⑫ 반응 후, 1N H₂SO₄ 100 uL를 첨가하여 반응을 종료한다.
- ⑬ 각각의 시료 200 uL를 cuvette (200 uL용)에 넣고 휴대용 흡광장비를 이용하여 450 nm 파장에서 측정한다.

※ 일정 농도로 희석된 표준용액(tetracycline)을 처리하여 얻어진 흡광도 값들과 전처리 시료로부터 얻어진 흡광도 값을 비교하여 잔류물질의 농도를 분석한다.

(2) 닭고기에서 enrofloxacin(EF)와 ciprofloxacin(CF)의 검출에 대한 표준매뉴얼(Indirect competitive ELAA-based aptasensor)

- ① 닭고기 20 g를 칭량하고 homogenizer를 사용하여 균질화 한다.
- ② 균질화 된 시료에서 1 g를 칭량하여 15 mL tube에 넣는다.
- ③ 0.1M EDTA 100 uL와 methanol:water (7:3) 혼합액 3 mL을 혼합한다.

- ④ 위와 같이 준비된 용액을 시료가 담긴 15 mL tube에 넣고 2분간 voltex로 균질화 한다.
 - ⑤ 혼합액이 섞인 시료를 4 °C, 7,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후, 상등액 2 mL을 취하여 40 °C로 설정된 실험용 고온반응기(heating block)에 넣고 건조시킨다.
 - ⑥ 건조된 시료에 binding buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.2) 1 mL을 첨가한다.
 - ⑦ 5 ug/mL의 enrofloxacin-BSA로 코팅된 96 well immunoplate에 blocking buffer (binding buffer에 1% skim milk 첨가) 200 uL을 첨가하고 37 °C에서 30분 반응한다.
 - ⑧ 전처리 시료 100 uL에 biotin label된 압타머 EF3를 5nM의 농도로 첨가하고 실온에서 30분간 반응한다.
 - ⑨ Blocking buffer를 제거하고 binding buffer 200 uL로 세 번 세척 후, ⑧의 반응 시료 100 uL를 96 well immunoplate well 첨가하여 37 °C에서 1시간 반응한다.
 - ⑩ 반응 후, PBST (0.01% Tween-20 첨가) 200 uL로 세 번 세척한다.
 - ⑪ Streptavidin-HRP (0.5 ug/ml) 100 uL을 각각의 well에 첨가하고 37 °C에서 30분간 반응한다.
 - ⑫ 반응 후, PBST (0.01% Tween-20 첨가) 200 uL로 세 번 세척한다.
 - ⑬ TMB solution 10 mL과 3 uL의 H₂O₂를 혼합한 후, 세척된 각각의 well에 100 uL씩 첨가하고 암조건에서 30분간 반응한다.
 - ⑭ 반응 후, 1N H₂SO₄ 100 uL를 첨가하여 반응을 종료한다.
 - ⑮ 각각의 시료 200 uL를 cuvette (200 uL용)에 넣고 휴대용 흡광장비를 이용하여 450 nm 파장에서 측정한다.
- ※ 일정 농도로 희석된 표준용액(enrofloxacin, ciprofloxacin)을 처리하여 얻어진 흡광도 값들과 전처리 시료로부터 얻어진 흡광도 값을 비교하여 잔류물질의 농도를 분석한다.

(3) 돼지고기에서 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfaclozine sodium의 검출시스템에 대한 표준 매뉴얼(자성나노입자 기반 바이오센서)

- ① 돼지고기의 근육부위 20 g을 칭량하고 homogenizer를 이용하여 균질화 한다.
- ② 균질화된 시료에서 다시 5 g을 칭량하여 50 mL tube에 넣는다.
- ③ 시료가 들어있는 50 mL tube에 10 mL의 methanol을 넣고 5분간 vortex 후, filter paper를 이용하여 혼합물을 걸러준다.
- ④ 여과된 5 mL의 시료를 취하여 40 °C로 설정된 실험용 고온반응기(heating block)에 넣고 건조시킨다.
- ⑤ 건조된 시료에 PBS 1 mL을 첨가한다.
- ⑥ Biotin label된 sulfamethazine mAb 500 ug를 첨가한 후, 실온에서 30분 반응한다.
- ⑦ Sulfamethazine 코팅된 자성비드 3.3 ug을 혼합한 후, 실온에서 1시간 반응한다.
- ⑧ 반응 후, PBS 5 mL로 한 번 세척한다.
- ⑨ Streptavidin/M13 bacteriophage (10¹⁰) 2 mL를 첨가 한 후, 1시간 반응한다.
- ⑩ 반응 후, PBS 5 mL로 한 번 세척한다.
- ⑪ Nanobody-GFP (0.1 mg/mL) 2 mL를 첨가한 후, 1시간 반응한다.
- ⑫ PBS 5 mL로 한 번 세척 후, PBS 1 mL을 첨가하고 70 °C, 5분간 열처리 한다.

⑬ 열처리 후, 자성비드를 제외한 상등액 500 uL을 취하고 휴대용 형광장비를 이용하여 형광값을 측정한다.

※ 일정 농도로 희석된 표준용액(sulfamethazine, sulfamerazine, sulfaclozine sodium)을 처리하여 얻어진 형광값들과 전처리 시료로부터 얻어진 형광값을 비교하여 잔류물질의 농도를 분석한다.

(4) 광어에서 malachite green의 검출시스템에 대한 표준매뉴얼(자성나노입자 기반 바이오센서)

① 광어 20 g을 칭량하고 homogenizer를 사용하여 균질화 한다.

② 균질화 된 시료에서 2 g을 칭량하여 15 mL tube에 넣는다

③ McIlvaine's buffer 1 mL, 1M 1-hexanesulfonic acid 40 uL, TMB 용액 20 uL과 acetonitrile 3 mL을 혼합하여 vortex로 5분간 균질화 한다.

④ 균질화된 시료는 15℃, 3,500 rpm에서 5분간 원심분리 한다.

⑤ 분리된 층의 상등액을 취하고, 여기에 증류수 10 mL, 포화식염수 4 mL과 dichloromethane 6 mL을 가하여 5분간 vortex 한다.

⑥ 혼합시료로부터 dichloromethane층을 취하여 40 ℃로 설정된 실험용 고온반응기(heating block)에 넣고 건조시킨다.

⑦ 건조된 시료에 binding buffer 1 mL을 첨가한다.

⑧ 50 nM biotin label된 압타머 MG4 첨가한 후, 실온에서 30분 반응한다.

⑨ malachite green 코팅된 자성비드 3.3 ug을 혼합한 후, 실온에서 1시간 반응한다.

⑩ 반응 후, PBS 5 mL로 한 번 세척한다.

⑪ Streptavidin/M13 bacteriophage (10^{10}) 2 mL를 첨가 한 후, 1시간 반응한다.

⑫ 반응 후, PBS 5 mL로 한 번 세척한다.

⑬ Nanobody-GFP (0.1 mg/mL) 2 mL를 첨가한 후, 1시간 반응한다.

⑭ PBS 5 mL로 한 번 세척 후, PBS 1 mL을 첨가하고 70 ℃, 5분간 열처리 한다.

⑮ 열처리 후, 자성비드를 제외한 상등액 500 uL을 취하고 휴대용 형광장비를 이용하여 형광값을 측정한다.

※ 일정 농도로 희석된 표준용액(malachite green)을 처리하여 얻어진 형광값들과 전처리 시료로부터 얻어진 형광값을 비교하여 잔류물질의 농도를 분석한다.

자. Indirect competitive ELAA-based aptasensor의 매뉴얼 모식도 및 검사키트 시제품

(1) 현장매뉴얼 모식도

단계	사진	설명
1		<p>우유 또는 닭고기와 알맞은 추출 용매를 넣어 혼합</p>
2		<p>Vortex를 이용하여 시료 균질화</p>
3		<p>원심분리 후 고온반응기(heating block)를 이용한 건조 (우유는 건조 과정 제외)</p>
4		<p>Indirect competitive ELAA 시행</p>
5		<p>기질 첨가 발색 및 반응종료</p>
6		<p>휴대용 흡광장치를 이용한 흡광도 측정</p>





(2) 검사키트의 시제품






그림 95. Indirect competitive ELAA-based aptasensor 검출키트의 시제품.

차. 자성나노입자 기반 바이오센서의 매뉴얼 모식도 및 검사키트 시제품

(1) 현장매뉴얼 모식도

단계	사진	설명
1		<p>돼지고기 또는 광어와 알맞은 추출용매를 넣어 혼합</p>
2		<p>Vortex와 여과</p>
3		<p>광어는 원심분리 후 고온반응기(heating block)를 이용한 건조 (돼지고기는 원심분리 제외)</p>
4		<p>버퍼와 비드를 혼합 후 자성나노입자 기반 바이오센서 시행</p>

5		<p>자동화 장비를 통한 세척 및 형광복합체 반응</p>
6		<p>비드와 형광복합체의 분리를 위한 열처리</p>
7		<p>휴대용 형광장치를 이용한 형광측정</p>

(2) 검사키트의 시제품

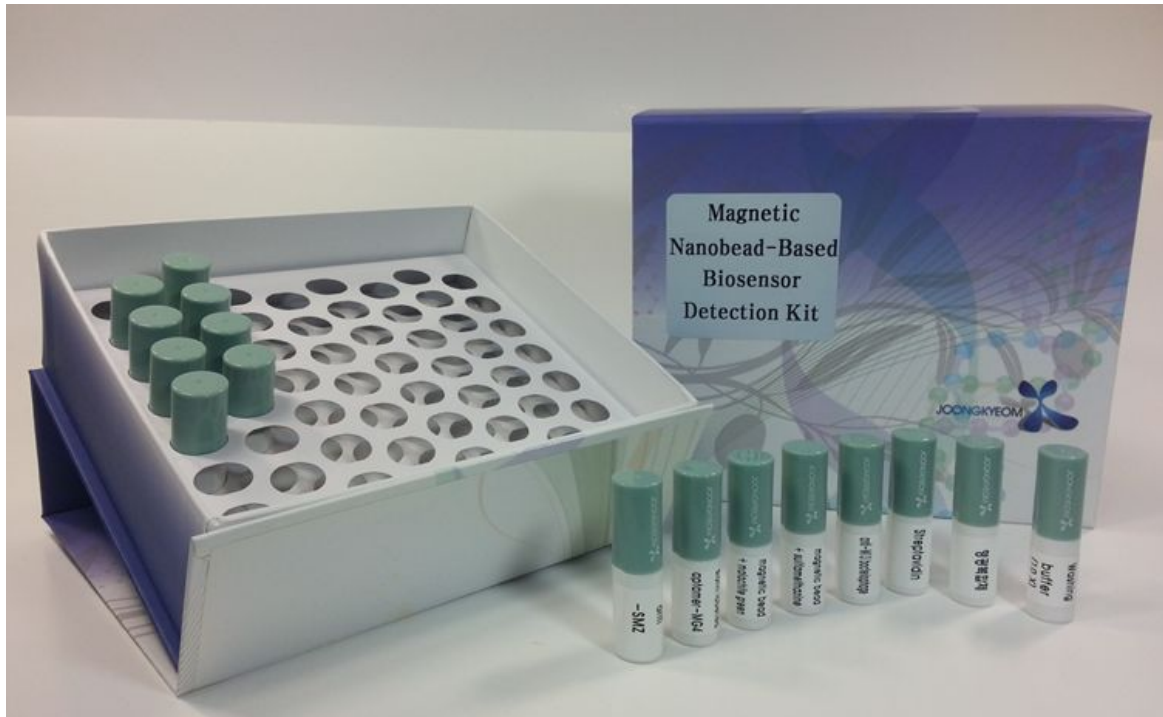


그림 96. 자성나노입자 기반 바이오센서 검출키트의 시제품.

2. 자성나노복합체를 활용한 위해화학물질 신속 다중 바이오센싱 시스템 개발[제1협동연구 (주 중검)]

가. 위해물질 특이 고감도 바이오리셉터 (단클론항체) 개발

(1) Shiga toxin 1, 2에 대한 단클론 항체 개발

장출혈성 감염증을 유발하는 대장균이 분비하는 Shiga toxin에는 1, 2 두 종류가 있으며 이들을 발현하는 유전자는 각기 stx1과 stx2가 있다. 또한 이들 각각의 유전자는 subunit A와 B로 나누어져 있다. 따라서 재조합단백질을 만들기 위한 유전자는 총 4가지로서 이들을 대장균 재조합 단백질 발현 시스템을 활용하여 발현하였으며, 발현된 재조합 단백질의 고순도 정제물을 항원으로 활용하여 단클론 항체를 제작하였으며, 제작된 단클론 항체는 실제 Shiga toxin 1, 2에 대하여 특이성을 평가함으로써 각기 교차반응 없는 특이적 단클론 항체의 제작을 성공적으로 수행하였다. 다만, 아래 peptide alignment 결과에서 보듯 Shiga toxin 1, 2는 서로 70% 이상의 유사성을 보이기 때문에 생산된 단클론 항체가 서로 교차반응 없는 특이성을 가졌는가에 대한 평가를 검토하였다.

(가) 재조합 단백질의 발현

아래와 같은 모식도의 개념으로 표적유전자의 클로닝을 진행하였으며, 관련 결과는 다음과 같다.

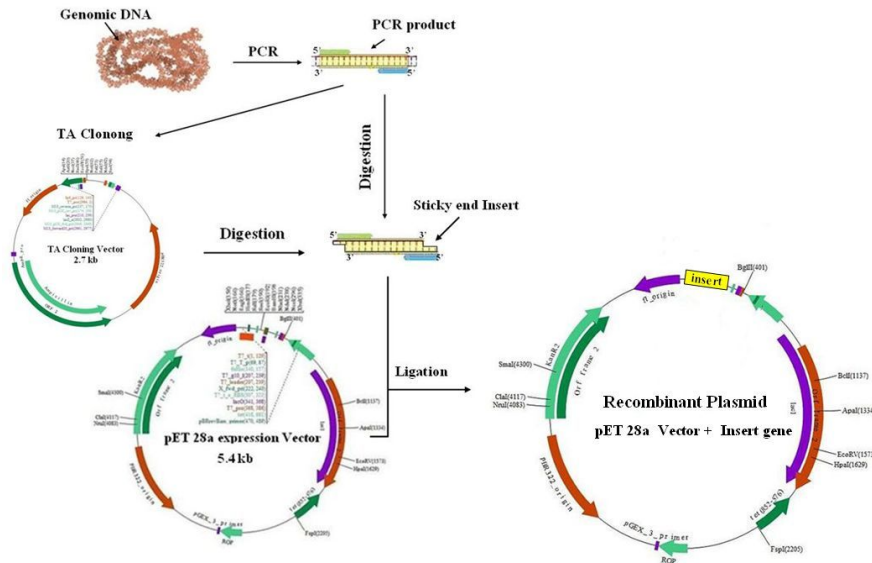


그림 1. 재조합단백질 제작을 위한 유전자 클로닝 모식도

Stx 1/2 subunit A 염기서열 alignment 결과

Identity 53% (positive rate 71%)

```

Stx1-A : MKIILIFRRLITFFEVIFSVNVVAKKEFTLDFSTAKTYVYSLNVIRSAITGTPLOITISSCCTSLMLMIDSGSGDNI FAVDVRGIE : 80
Stx2-A : MKCILFRFVLLCLLLGFSVSVSYSREFTIDFSTQQSYVSSLNSIRTEILSTPLEFISQCTTSVSVINHTPPGSSYFAVDIRGLE : 80

Stx1-A : PEEGRFNNLRLIVERNNLYVTCFVNRTNNVYRFADFSHVTFEPTTAVTILSDSSYITLQRVACTSRTGMQINRHSLSITS : 160
Stx2-A : VYCARFDFELRLIIEQNNLYVACFVNRTANNIFYRFSDFTHISVPEVITTVSMTDSSYITLQRVAALERSGMQISRHSLSVSS : 160

Stx1-A : VLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVITVAFALRFQIQRCFFITLDDLSGRSIVVMTAEVDVITLNWGRISVLPDVFHCQDS : 240
Stx2-A : VLAALMSESGNITMTRDASRAVLRVFTVITAFALRFQIQRFQALSETAPVYVMTPEGDVDTLNWGRISNVLDFRGEDE : 239

Stx1-A : VRVGRISFSGINAILGSAVLLNCHHHASRVARMASTEFPSMCPADGRVRCITHNKILWDSSTLGAITLRR-----IISS : 315
Stx2-A : VRVGRISFNNTSAILGTVAVILNCHHQGARSVAVNEESQPEQITGDRPVKINNTLWESNTAAABLNRRSQFLYITGK : 319
    
```

Stx 1/2 subunit B 염기서열 alignment 결과

Identity 53% (positive rate 74%)

```

Stx1-B : MKKTLITAAASLSEFSSASLALTEPCVITCKVEYTKYNDDDTFTVKVQDKEHFTNRWNLCSTLISAQITGMTVTIKTNACHNGGCFSEVIER-- : 89
Stx2-B : --KRMEMAVLEALVSVNAMA--DCARGKIEFSKYNDDDTFTVKVQDKEYVITSRWNLCSTLISAQITGMTVTIKSSTICESSESGFAEVQBNND : 88
    
```

그림 2. Shiga toxin 1, 2 유전자 alignment

유전자의 분리를 위하여 각각의 shiga toxin을 분비하는 enterohemorrhagic *E. coli* 균주를 PCR을 하기 위한 template로 사용하였다. 증폭을 위한 primer는 다음과 같이 디자인하였다. 증폭된 DNA fragment는 TA-vector에 cloning 한 후 sequencing하여 삽입된 insert의 서열이 본래의 서열과 일치함을 확인하였다.

표 1. Stx1, 2 표적유전자의 PCR증폭을 위한 primer sequence

stxIA	Forward	5'-AGT TGA CAT ATG AAA ATA ATT ATT-3'
	Reverse	5'-AGT CTC GAG TCA ACT GCT AAT AGT-3'
stxIB	Forward	5'-AGT TGA CAT ATG AAG AAG ATA TTT-3'
	Reverse	5'-AGT CTC GAG TCA GTC ATT ATT AAA-3'

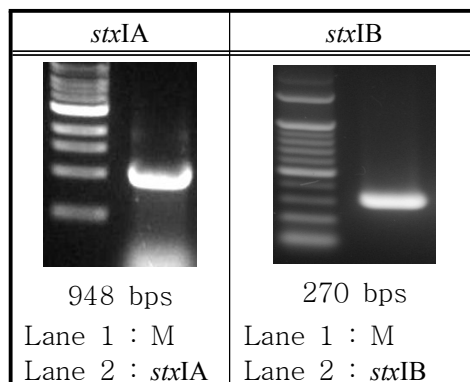


그림 3. Stx1, 2 표적 유전자의 PCR 결과

클로닝이 완료된 벡터를 발현 균주에 형질전환한 후 목표한 재조합 단백질의 발현을 유도하여

아래와 같이 정제 후 단클론 항체를 제작하기 위한 항원으로 활용하였다.

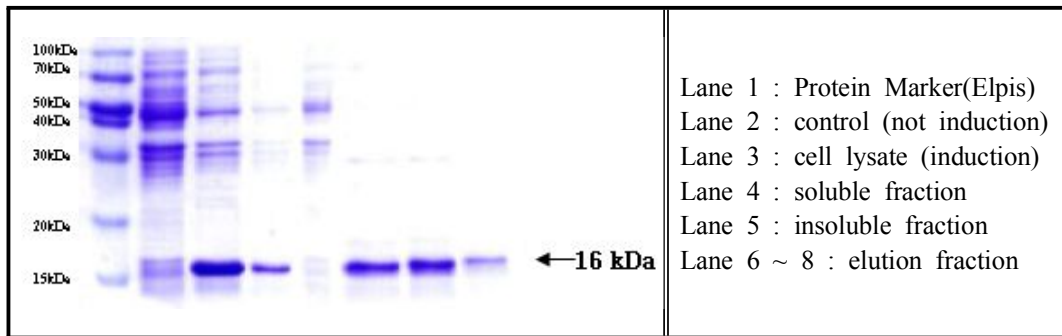


그림 4. STXB 재조합 단백질의 정제물 확인 SDS-PAGE.

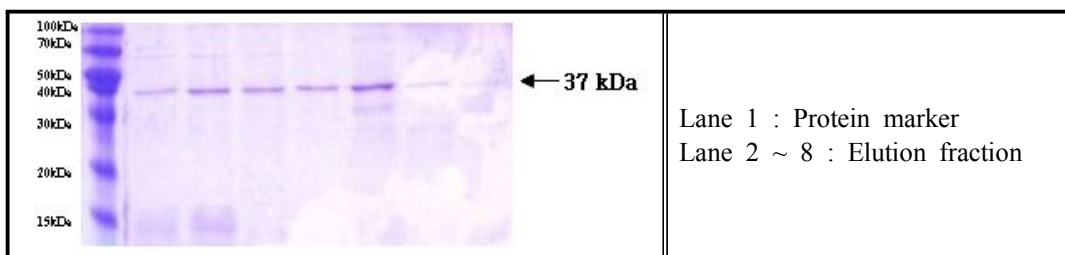
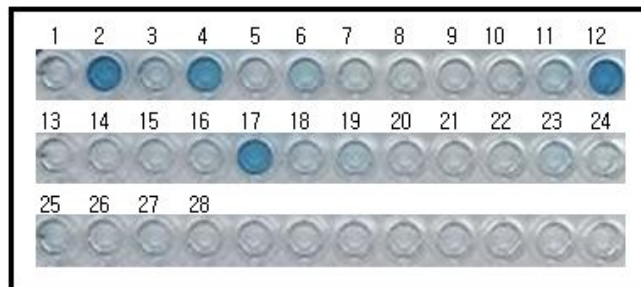


그림 5. STXA 재조합 단백질의 정제물 확인 SDS-PAGE

(나) 단클론 항체의 제작 및 평가



Coated
SIA Purified Protein (5ug/ml)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.196	2.84	0.226	1.971	0.119	0.443	0.095	0.108	0.099	0.107	0.299	2.723
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0.123	0.101	0.142	0.113	2.24	0.121	0.249	0.096	0.091	0.105	0.26	0.141
25	26	27	28								
0.21	0.102	0.138	0.071	0.06	0.042	0.044	0.049	0.058	0.044	0.045	0.046

그림 6. stx1 subunit A 단클론 항체 ELISA 결과

1st Ab Reaction

- | | | |
|--------------|---------------|---------------|
| 1 : SIA 7F4 | 11 : SIA 15A8 | 21 : SIA 18E4 |
| 2 : SIA 4H5 | 12 : SIA 1D9 | 22 : SIA 12C1 |
| 3 : SIA 5H2 | 13 : SIA 5F8 | 23 : SIA 16H3 |
| 4 : SIA 2D4 | 14 : SIA 14F2 | 24 : SIA 11A3 |
| 5 : SIA 14H4 | 15 : SIA 2A7 | 25 : SIA 12G8 |
| 6 : SIA 11H3 | 16 : SIA 17H3 | 26 : SIA 10H7 |
| 7 : SIA 3B2 | 17 : SIA 1B3 | 27 : SIA 19B5 |
| 8 : SIA 9B2 | 18 : SIA 1D2 | 28 : SIA 4C2 |
| 9 : SIA 13A6 | 19 : SIA 11A8 | |
| 10 : SIA 8E2 | 20 : SIA 17C3 | |

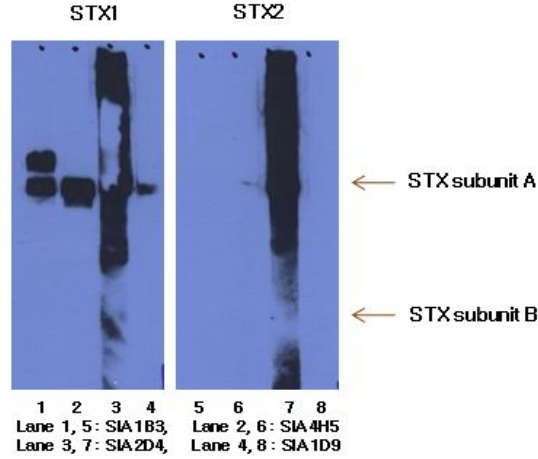
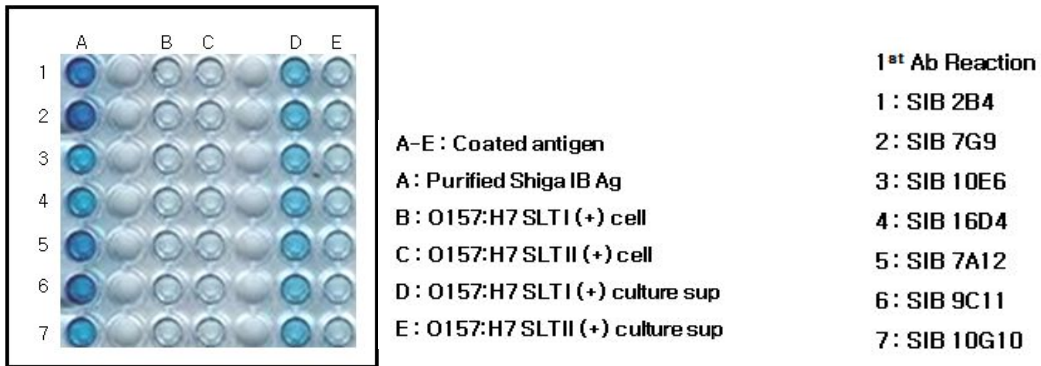


그림 7. Stx1 subunit A 단클론 항체 western blotting 결과



	A	B	C	D	E
1	2.615	0.138	0.129	0.824	0.229
2	2.545	0.144	0.131	0.823	0.218
3	1.336	0.133	0.137	0.715	0.209
4	1.257	0.13	0.135	0.74	0.232
5	1.973	0.137	0.127	0.791	0.232
6	1.842	0.135	0.134	0.761	0.216
7	1.494	0.135	0.122	0.789	0.216

그림 8. Stx1 subunit B 단클론 항체 ELISA 결과

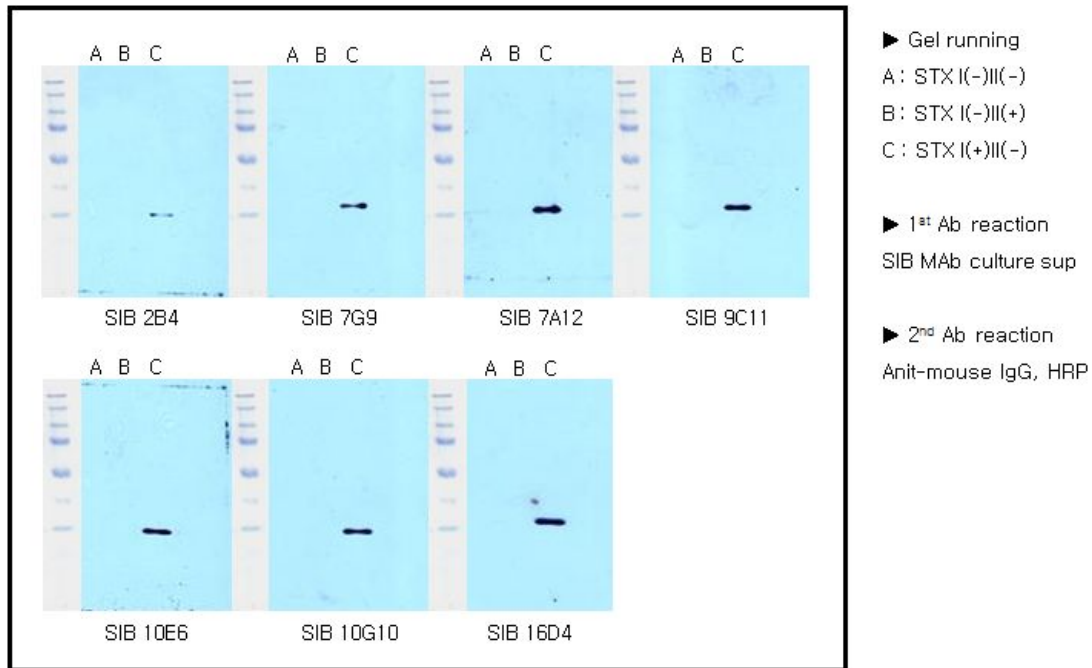


그림 9. Stx1 subunit B 단클론 항체 western blotting 결과

상기와 같이 shiga toxin 1의 각각의 subunit에 대한 특이적 단클론 항체의 개발을 완료하였으며 SIA4H5, SIB2B4, SIIX4G2의 하이브리도마 세포주에서 생산된 항체는 OBRIMA system을 위해 사용되었다.

(2) Aflatoxin B1 단일클론항체 제작

(가) Aflatoxin B1 conjugation 제작

AFB1(aflatoxin B1)에 항원성을 부여하기 위하여 carrier protein BSA와 OA과 conjugation을 하였다. AFB1 4mg과 carboxymethoxylamine 6.36mg을 3.2ml의 mixture solution (pyridine : water : methanol = 1:1:4, v/v/v)에 녹인 후 60℃에서 3시간동안 반응시켰다. 그 상기 solution은 상온의 어두운 곳에서 overnight 방치한 후에 vacuum 증류하여 농축시켰다. 그 후 10ml의 0.1N NaOH에 녹인 후 5ml의 dichloromethane과 함께 세척 한 후에 HCl을 추가 하여 pH 2.0으로 적정하였다. 그리고 10ml의 ethylacetate로 3회 추출하였다. 추출한 ethylacetate는 filter후에 vacuum의 조건에서 말렸다. 이때 만들어진 AFB1-oxime을 3ml의 0℃ dichloromethane에 녹인 후 5.4mg의 NHS (N-hydroxysuccinimide), 9.6mg의 DCC (1,3-dicyclohexylcarbodiimide) 그리고 5mg의 DMAP (4-(dimethylamino)pyridine)을 추가 하였다. 그 혼합액은 overnight동안 교반한 후 filtering 후에 그 용매를 vacuum으로 증발시켰다. Dry된 peplet은 0.6ml의 DMF(dimethylformamide)에 녹인 후 BSA와 OA의 conjugation에 사용되었다.

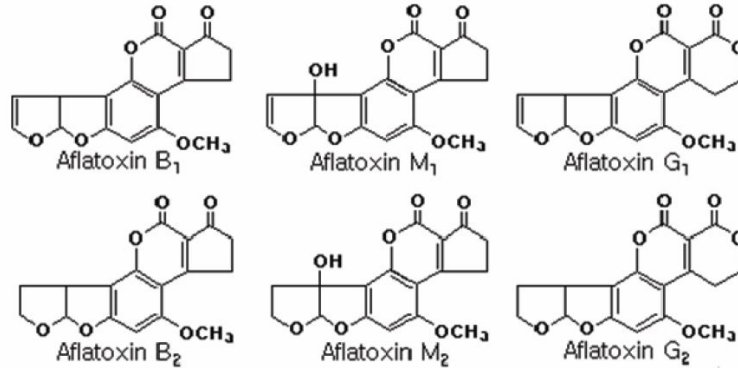


그림 10. Aflatoxin 6종의 화학구조식

(나) Aflatoxin B1에 대한 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조

① 항체 생성 세포 유도

AFB1-BSA를 항원으로 이용하기 위하여, PBS로 농도가 0.2mg/ml이 되도록 희석한 후, 같은 양의 complete Freund's adjuvant와 혼합하여 에멀전을 제조하였다. 상기 에멀전을 6주령 암컷 BALB/C 마우스 6마리의 복강 내에 각각 0.5ml씩 주사하였다. 상기 에멀전은 1차 투여에만 사용되었으며, 2차 투여부터는 AFB1-BSA 결합체를 incomplete Freund's adjuvant와 혼합하여 2주 간격으로 총 4차례 마우스의 복강에 주입하여 항체 생성을 유도하였다. 세포 융합 5일 전에 마우스의 꼬리 정맥에 0.1mg/100 μ l의 항원을 재차 주사하였다.

② 하이브리도마 세포의 제조

세포 융합 하루 전 6주령 마우스의 복강에 11.3% sucrose solution 10 ml를 주입하고, 오염이 되지 않도록 조심스럽게 복막을 흔들어 주입되었던 용액을 다시 주시기를 이용해 feeder cell을 채취하였다. 채취된 feeder cell은 1500rpm에서 5분간 두 번 무혈청 배지를 사용하여 세척하였다. 세척된 feeder cell을 세포융합배지(10% fetal bovine serum RPMI-1640 배지, 1% penicillin-streptomycin, 1X HAT-hypoxanthine-aminopterin-thymidine) 100ml에 현탁 시키고, 96 well plate에 well당 100 μ l씩 분주하고 37 °C, 5 % 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 1일 후, 항원투여가 진행되었던 마우스에서 비장을 채취하고, 무혈청 배지가 들어있는 petridish에 넣고 세포를 하나씩 분리시킬 만큼 잘게 분리한 후 50ml의 무혈청 배지에 넣었다. 또한 세포 융합에 사용할 암세포주인 SP2/O 세포를 50ml 튜브에 넣고 1500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후 상층액을 모두 버리고 단일 세포 수준까지 현탁된 비장세포를 무혈청 배지 50ml에 넣고, 0.45 μ m의 mesh를 통과시켜 SP2/O 세포가 들어있는 50ml 튜브로 옮겼다. mesh를 제거하고 1500rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 다시 한번 1500 rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 50ml 튜브에 남아있는 무혈청 배지를 피펫을 사용해 제거하고, 37°C water bath에서 1분간 1ml의 PEG 용액을 주입한 후 잘 저어주었다. 1분 후 37°C에서 준비된 무혈청 배지를 조금씩 넣으며 튜브를 흔들어주었다. 무혈청 배지를 40ml까지 넣어주고 1200rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 37°C에 준비해 두었던 세포융합배지 100 ml에 현탁한 후, 전날 준비해 두었던 feeder cell이 들어있는 96well plate에 100 μ l씩 분주한 후 37°C 이산화탄소 배양기에서 7일에서 14일동안 배양하였다.

③ 하이브리도마 세포의 선별 및 분리

AFB1 하이브리도마 세포의 선별을 위하여 배양 상층액을 취득하여 aflatoxin B1-OA에 대하여 ELISA을 통해 선별하였다. 96 well plate에 각 well 당 100 μ l씩 분주하여 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C 항온기에 보관하였다. 1시간 후 플레이트 내의 수분을 제거하고 1시간 40분 동안 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 건조시켰다. 이후 blocking buffer(5% Skim milk in PBS)를 well 당 200 μ l씩 분주하고 1시간 30분 동안 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 보관하였다. 이 후 하이브리도마 배양 상층액을 well 당 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 1시간 동안 보관하였다. 플레이트에 남아있는 배양 상층액을 털어 버리고 0.05 % PBST (0.05% Tween-20 in PBS)를 well 당 200 μ l씩 분주하고 5분간 정치 후 털어버리는 작업을 3회 반복하였다. 이 후, 미리 준비해둔 anti-IgG HRP (horse raddish peroxidase)를 PBS에 1:10000 비율로 희석하여 well 당 100 μ l씩 분주 후 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 40분간 보관하였다. 플레이트에 남아있는 항체를 제거하고 다시 0.05% PBST를 well 당 200 μ l씩 분주하고 5분간 정치 후 털어버리는 작업을 3 회 반복하고, OPD(o-phenylenediamine dihydrochloride)를 발색기질로 활용한 발색반응을 수행하여 양성 하이브리도마 세포를 분리하였다. 또한 정확한 선별을 위해 aflatoxin B1-BSA, aflatoxin B1-OA, BSA, OA에 대한 ELISA를 진행하였다.

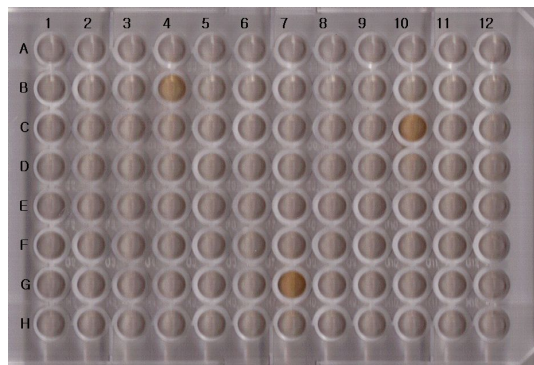


그림 11. AFB1-OA에 특이적인 단클론항체 screening 결과

상기 결과와 같이 AFB13B4, AFB13C10, AFB13G7의 하이브리도마 세포주에서 나온 항체가 양성반응을 나타내었다.

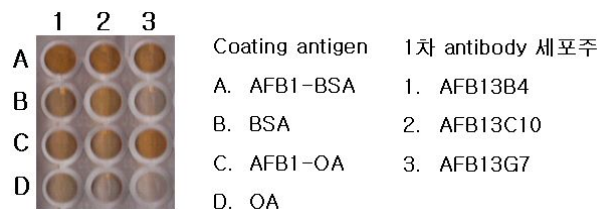


그림 12. AFB1에 특이적인 단클론항체 screening 결과

보다 정확한 선별을 위한 ELISA 결과로 인해 BSA와 OA에서 발색이 되지않은 AFB13G7만을 AFB1에 특이적인 단클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포로 선별하였다.

④ 단일클론항체 생산 및 분리

AFB1에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 생산하는 AFB13G7 하이브리도마 세포를 이용하여 마우스 복강 배양액을 제조하고, 이로부터 항체를 분리하였다. 먼저 항체 ascites을 얻기 위해, pristane을 미리 복강 내에 투여하여 처리한 BALB/C 마우스의 복강 내에 항체를 생산하는 세포를 주사하였다. 2 내지 3 주 후에 마우스의 복부가 부풀어 오른 것을 확인한 후, 주사기를 활용하여 각 마우스의 복수를 추출하였다. 상기 복수액을 단백질 G 친화성 컬럼 (GE health care, HiTrap protein G HP)을 이용하여 정제하였다. 단백질 G 친화성 컬럼에 2 배 부피의 세척 완충액 (wash buffer, 20 mM NaH₂PO₄, pH 7.0) 를 1 ml/분의 속도로 통과시켜 균질화 시킨 후 복수액을 통과시켰다. 복수액 통과 후 용출 완충액 (elution buffer, 100mM glycine HCl, pH 2.7)로 결합된 항체를 용출시켜 분리하여, 최종적으로 단일클론항체의 정제를 완료하였다.

(3) Sulfamethazine에 대한 단일클론항체

(가) Sulfamethazine(SMZ)과 SMA 31A6의 특이 반응을 위한 Ag 제조

Sulfonamide계열 14종(표 9.) 중 sulfamethazine(SMZ)과 특이 반응하는 단클론 항체를 개발하였다. 이는 SMZ 31A6 라 명명하였으며, 이를 확인하기 위하여 면역흡착효소반응(ELISA)를 이용하고자 하였다. 이 실험을 실시하기 전 Sulfonamide계열 14종에 대한 BSA 결합 반응을 수행하였다. 결합 반응은 25% glutaraldehyde를 이용하였다. 이 결합 반응을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 수행하였다.

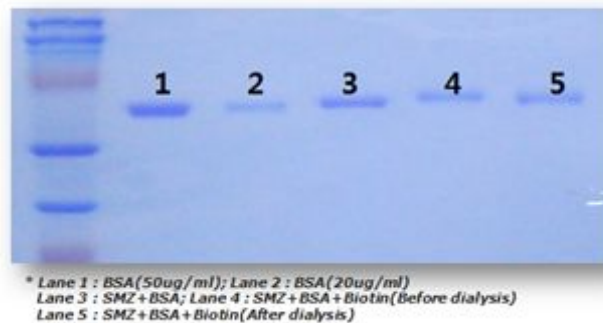


그림 13. SDS-PAGE

(나) Sulfamethazine(SMZ)과 SMA 31A6의 특이 반응을 위한 Ag 제조 확인

Sulfonamide 계열 14종과 BSA를 결합 시킨 후 Biotin을 다시 결합하여 면역흡착효소반응(ELISA)을 수행하였다. Negative control 인 BSA를 포함하여 총 15가지 물질에 대한 실험을 수행하였고 이에 대한 결과 모든 sulfonamide 계열에 BSA가 결합된 것을 확인 하였다.

No.	Name	Concentration
1	Sulfamethoxypyridazine	0.2ng
2	Sulfisoxazole	0.2ng
3	Sulfaquinoxaline	0.2ng
4	Sulfadimethoxine	0.2ng
5	Sulfadoxin	0.2ng
6	Sulfamethazine	0.2ng
7	Sulfadiazine	0.2ng
8	sulfathiazole sodium salt	0.2ng
9	Sulfamethoxazole	0.2ng
10	Sulfamerazine	0.2ng
11	Sulfaquinoxaline	0.2ng
12	Sulfaclozine sodium	0.2ng
13	Sulfamethoxazine	0.2ng
14	Sulfamonomethoxine	0.2ng
15	BSA	0.2ng

표 2. 실험에 사용한 Sulfonamide 계열 및 대조군 (BSA)

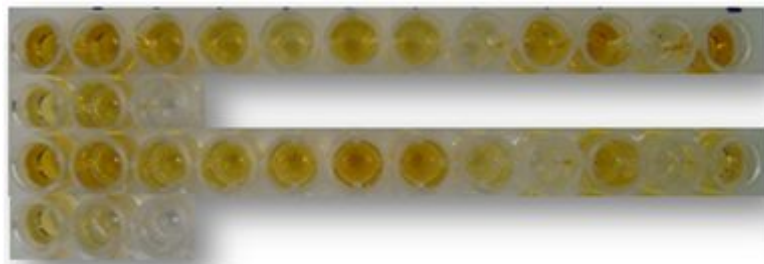


그림 14. Sulfonamide 계열의 BSA 결합 확인

(다) Sulfamethazine(SMZ)과 SMA 31A6 (특이 단클론 항체를 분비하는 세포주)의 특이 반응 확인을 위한 단클론 항체의 최적 농도 탐색

Sulfamethazine(SMZ)와 단클론 항체의 최적 반응농도를 알아보기 위하여 sulfamethazine 2ug 코팅한 후 SMZ 31A6를 단계희석(10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560) 하여 1차 Ab로 사용하였고, 2차 Ab로 Anti IgG-HRP 100ul 사용하여 발색반응을 확인하였다. 그 결과 SMZ 31A6 20배 희석액이 50%의 검출감도를 나타내는 것을 확인하였다.

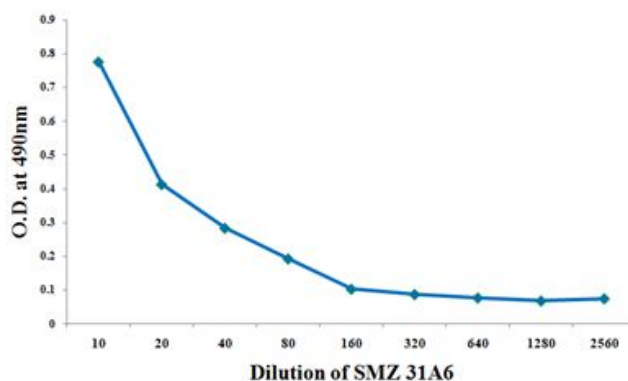
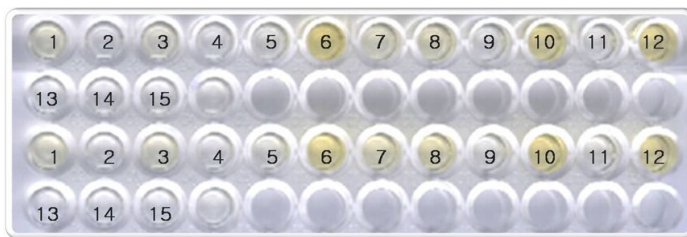


그림 15. Sulfamethazine(SMZ)과 SMA 31A6의 Cross-reactivity

(라) Sulfamethazine(SMZ)과 SMA 31A6의 특이 반응 확인

Sulfonamide 계열 14종과 BSA를 결합 한 표적물질을 Ag으로 사용하였고, 1차 항체로는 SMZ 31A6(20배 희석액)를 반응 한 후 2차 항체인 Anti-Mouse IgG-HRP(X10,000 희석액)를 반응시켜 발색반응을 확인하였다. BSA conjugated Sulfa계 항생제를coating 후 SMZ monoclonal Ab 반응 확인을 실시하였다. Sulfonamide계 항생제와 BSA conjugate(1mg/ml)2ul 과 coating buffer 100ul를 혼합하여 immunoplate에 분주한 후 4℃, overnight 로 coating 하였다. Coating 되지 않는 항원을 1X PBS buffer(pH 7.4)를 이용하여 제거하고, 37℃에서 2시간동안 완전히 건조시켰다. 5% skim milk 1X PBS 녹인 용액 200ul를 분주하고 37℃에서 2시간동안 blocking 하였다. Blocking 하는 동안 Sulfonamide 계열을 PBS로 계단희석하고, SMZ 31A6를 50배, 100배 희석하였다. 항생제와 항체를 100ul씩 혼합한 후 37℃에서 40min 반응시켰다. Blocking이 완료 된 plate에 4)번의 반응액 200ul를 분주하고 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.05% PBST 200ul로 2회 washing 하였다. Anti IgG-HRP 100ul를 PBS 10ml에 10000배 희석한 후 100ul씩 분주하고, 37℃에서 40분간 반응시켰다. 1차 항체에 결합하지 않은 2차 항체를 제거하고, 0.05% PBST 200ul로 3회 washing 하였다. OPD buffer 100ul씩 분주하고 발색반응을 관찰하였다. 관찰 후 492nm에서 OD값을 측정하였다.

그 결과 No. 6, 10, 12번의 반응이 가장 강하게 나타났으며, 이 중 No. 6번(Sulfamethazine)이 가장 강한 흡광도를 나타냈으며 SMZ 31A6가 sulfamethazine과 특이 반응을 나타나는 것으로 확인 되었다. 반면에 negative control인 No. 15는 BSA 이며, No. 16은 1X PBS와 비교했을 때 아무런 반응이 없는 것으로 확인되었다.



No.	Name	Concentration
1	Sulfamethoxyypyridazine	0.2ng
2	Sulfisoxazole	0.2ng
3	Sulfaquinolaxine	0.2ng
4	Sulfadimethoxine	0.2ng
5	Sulfadoxin	0.2ng
6	Sulfamethazine	0.2ng
7	Sulfadiazine	0.2ng
8	sulfathiazole sodium salt	0.2ng
9	Sulfamethoxazole	0.2ng
10	Sulfamerazinee	0.2ng
11	Sulfaquinolaxine	0.2ng
12	Sulfaclozine sodium	0.2ng
13	Sulfamethoxazine	0.2ng
14	Sulfamonomethoxine	0.2ng
15	BSA	0.2ng

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.164	0.098	0.101	0.112	0.098	0.553	0.098	0.089	0.105	0.489	0.12	0.512
13	14	15	16								
0.075	0.071	0.074	0.072								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.141	0.087	0.1	0.102	0.087	0.513	0.098	0.087	0.1	0.477	0.145	0.498
13	14	15	16								
0.074	0.07	0.073	0.072								

그림 16. SMZ31A6 하이브리도마 세포의 항체와 설파계열 항생물질과의 ELISA 결과

SMZ31A6 하이브리도마 세포주에서 생산된 항체는 OBRIMA system을 위해 사용되었으며 이상의 내용 중 ‘설파메타진에 특이적인 단일클론항체 및 이를 생산하는 하이브리도마 세포’에 대한 특허 출원을 하였다.

출원번호통지서

출원일자 2012.04.27
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2012-0044645 (접수번호 1-1-2012-0339572-51)
출원인명칭 주식회사 중경(1-2007-016086-5)
대리인성명 김순용(9-2006-000534-4)
발명자성명 임명운 정상희
발명의명칭 설파메타진에 특이적인 단일클론항체 및 이를 생산하는 하이브리도마 세포

특 허 청 장

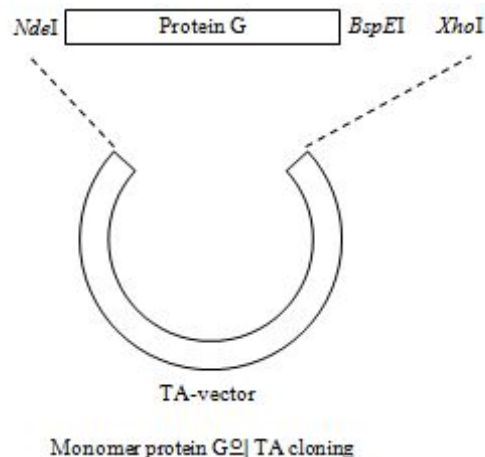
나. 자성나노입자 기반 Bio-linker 개발

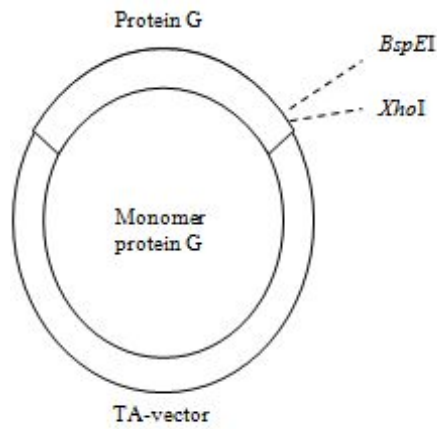
(1) 재조합 multi-protein G 및 A 발현 및 정제조건 최적화

(본 연구소에서 기개발하여 다양한 진단제제의 개발에 활용 중)

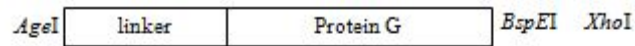
본 연구소는 아래와 같이 protein G homo-multimer 및 protein A homo-multimer, 그리고 protein G/A hetero-multimer를 기 제작하였으며, 그 과정 및 결과는 다음에 기술한 바와 같다.

아래 그림은 protein G monomer, dimer, trimer 등 multimer의 제작과정을 도시한 것이다 (protein A homo-multimer 및 G/A hetero-multimer의 제작과정도 동일함).



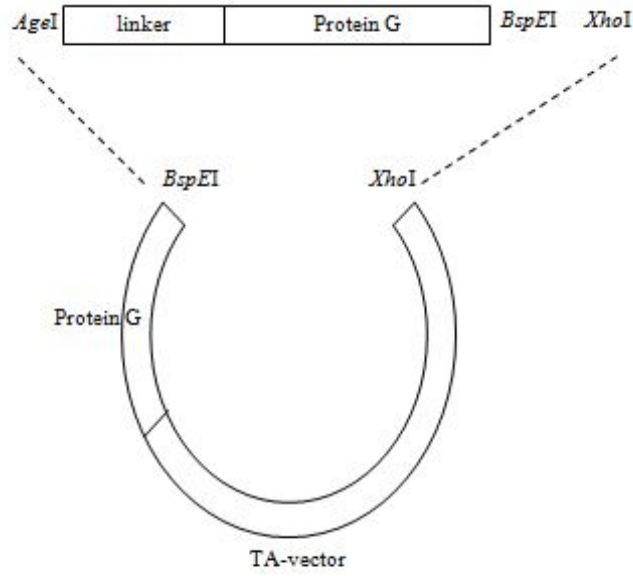


Monomer protein G/TA vector

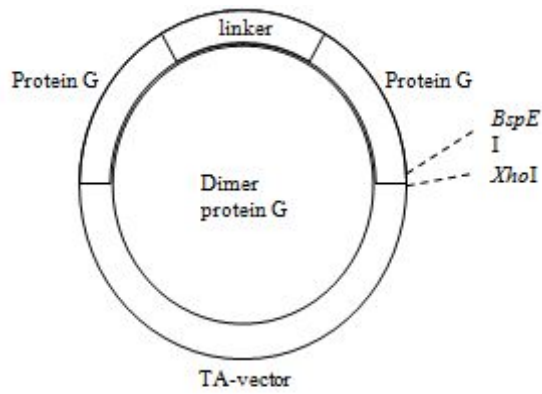


PCR에 의해 linker가 만들어진
protein G





*BspEI*과 *XhoI*으로 처리한 monomer protein G/TA vector와 linker-protein G와 ligation시켜 protein G dimer 형성



Dimer protein G/TAvector



Expression vector or recycling

그림 17. multimer recombinant protein 제작과정 도식

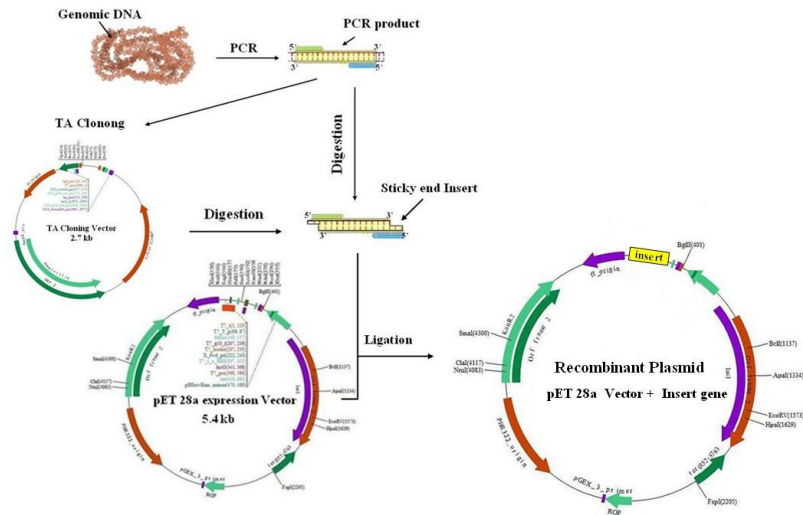


그림 18. protein G multimer 제작과정 (pET28a vector 활용)

상기와 같은 제작과정을 거쳐 아래 그림과 같은 multimer를 제작하였다.

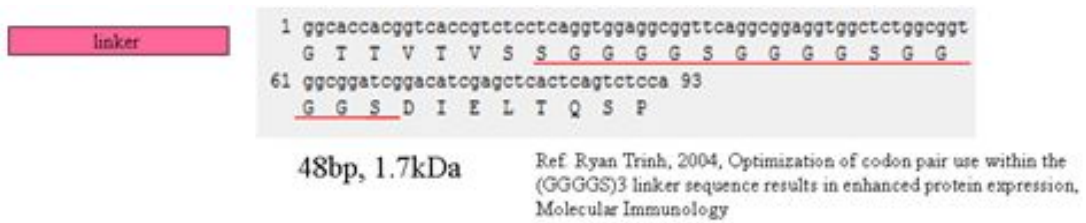
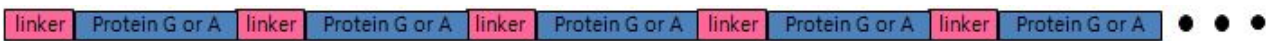
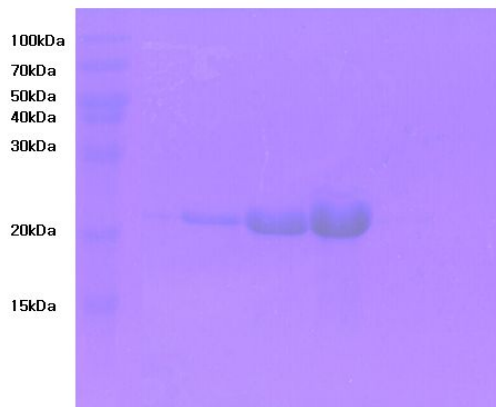


그림 19. protein A/G multimer의 모식도 및 사용된 linker 서열

▶ protein G monomer 발현 및 정제조건

Protein G homomonomer/pET28a/BL21 DE3



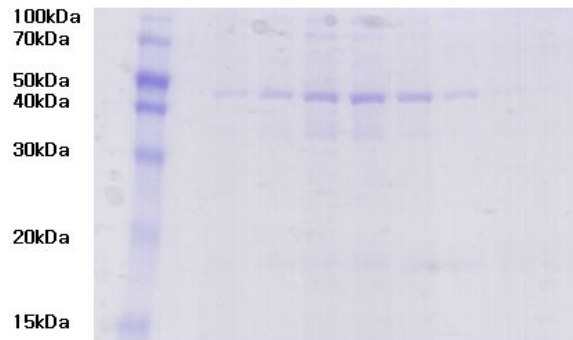
purification	Native condition		
IPTG conc	0.5mM	Temperature	37°C
Induction time	4hrs	RPM	250

Cell lysis	French press	
Purification	Lysis buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM imidazole pH8.0
	Wash buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 50mM imidazole pH8.0
	Elution buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM imidazole pH8.0

그림 20. protein G monomer 발현 및 정제조건

- ▶ protein G dimer 발현 및 정제조건

Protein G homodimer/pET28a/BL21 DE3



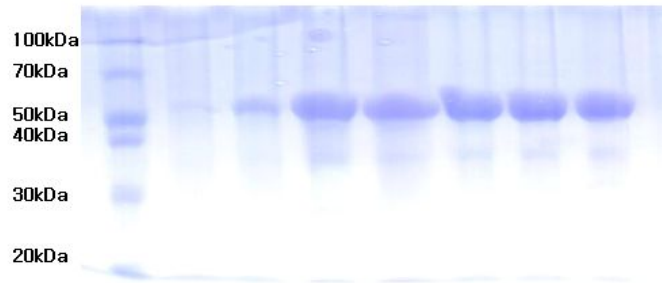
purification	Native condition		
IPTG conc	0.5mM	Temperature	37°C
Induction time	4hrs	RPM	250

Cell lysis	French press	
Purification	Lysis buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM imidazole pH8.0
	Wash buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 50mM imidazole pH8.0
	Elution buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM imidazole pH8.0

그림 21. protein G dimer 발현 및 정제조건

- ▶ protein G trimer 발현 및 정제조건

Protein G homotrimer/pET28a/BL21 DE3



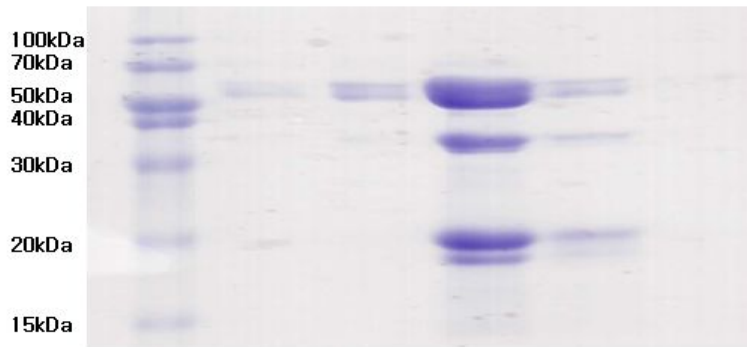
purification	Native condition		
IPTG conc	0.5mM	Temperature	37°C
Induction time	4hrs	RPM	250

Cell lysis	French press	
Purification	Lysis buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM imidazole pH8.0
	Wash buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 50mM imidazole pH8.0
	Elution buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM imidazole pH8.0

그림 22. protein G trimer 발현 및 정제조건

▶ protein G tetramer 발현 및 정제조건

Protein G homtetramer/pET28a/BL21 DE3



Purification	Native condition		
IPTG conc	0.5mM	Temperature	37°C
Induction time	4hrs	RPM	250

Cell lysis	French press	
Purification	Lysis buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM imidazole pH 8.0
	Wash buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 50mM imidazole pH 8.0
	Elution buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM imidazole pH 8.0

그림 23. protein G tetramer 발현 및 정제조건

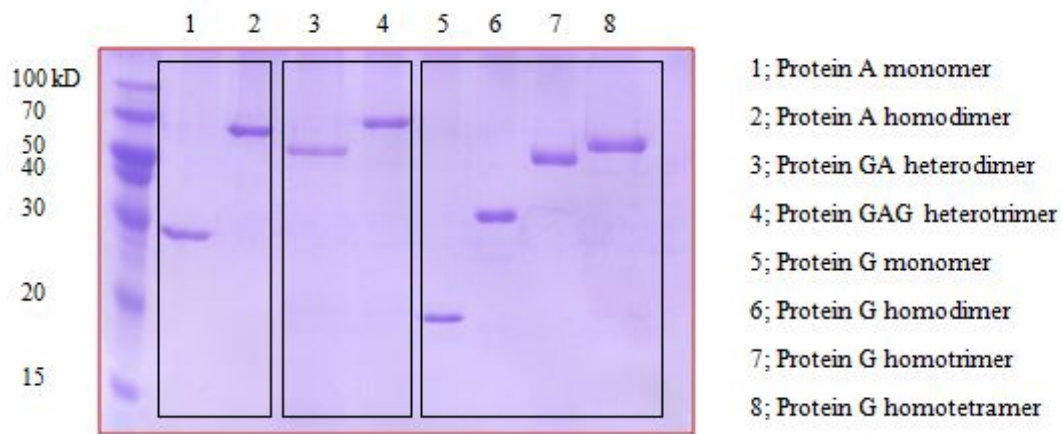


그림 24. protein A/G multimer의 발현 SDS-PAGE 결과

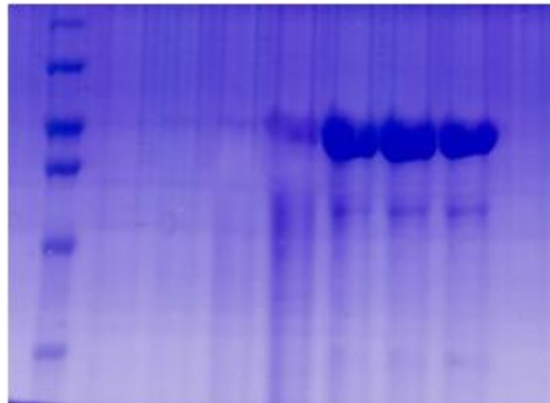
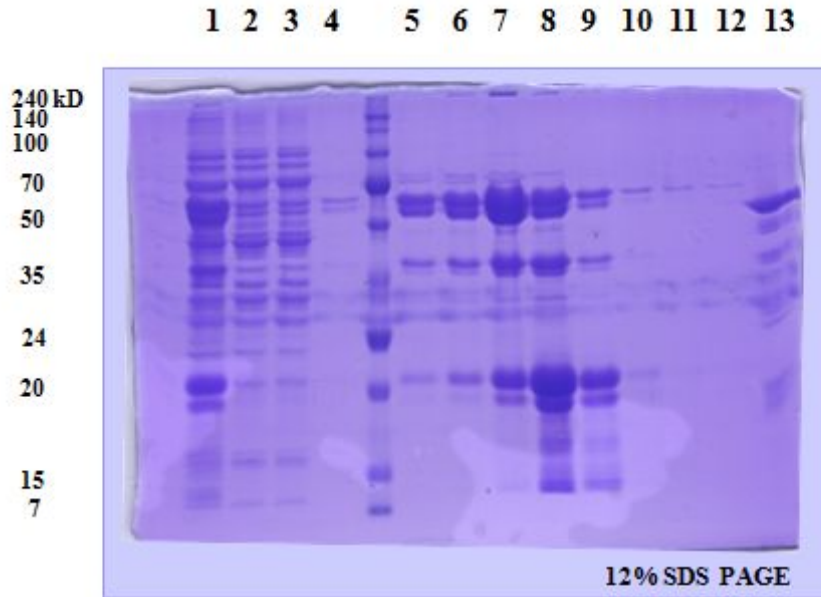


그림 25. protein G trimer의 정제후 SDS-PAGE결과

위 그림 20에서 확인할 수 있듯이 protein G trimer까지는 고순도의 재조합 단백질의 정제가 용이하게 이루어 졌으나 아래 그림 11와 같이 protein G tetramer의 정제 후 결과는 재조합 단백질이 잘라지는 현상이 발견되어 사용하기에 문제가 있는 것으로 판단되었다.



- 1; Cell extract supematant(souble)
- 2; Loading
- 3; Washing(20mM Imidazole, 50mM Sodium phosphate buffer, pH8.0)
- 4; Washing(50mM Imidazole, 50mM Sodium phosphate buffer, pH8.0)
- 5~12; Elution(250mM Imidazole, 50mM Sodium phosphate buffer, pH8.0)
- 13; TrimerPG

그림 26. BL21DE3 (tetramer protein G (cystein) pET 발현 및 정제 SDS-PAGE결과

그러나 이러한 연구결과에도 불구하고 아래 그림 13에서 확인할 수 있듯이, 재조합 단백질의 N-terminal에는 His tag이 배치되어 정제과정에서의 표지로 작용하고 아미노기로 치환된 실리카나노입자와의 결합에는 가교결합시약인 sulfo-SMCC에 의해 재조합 단백질의 C-terminal에 위치한 의도적 장치인 cystein의 sulfhydryl group이 사용되므로 multimer의 중간 부위가 잘리더라도 1단계 His tag에 의한 정제와 2단계 cystein에 의한 자성나노입자와의 결합을 통해 잘린 재조합 단백질은 최종적으로 자성나노입자에 결합하지 않을 것이라고 판단하였으나 tetramer의 자성나노입자 결합성은 현저히 떨어지는 것으로 나타나 이후 평가를 중지하였다.

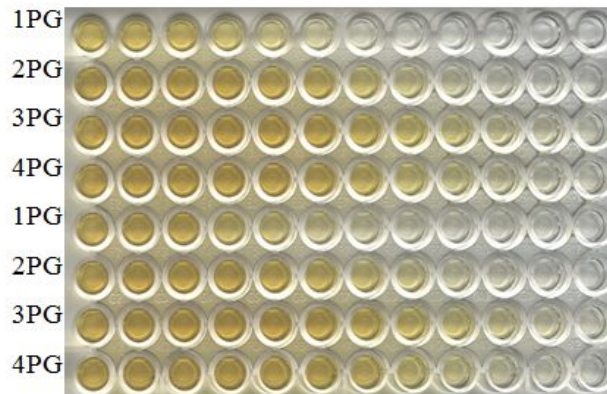


그림 27. protein A/G multimer에서의 His tag과 cystein 배치도

또한 protein G monomer, dimer, trimer, tetramer의 각기 마우스 혹은 토끼 항체의 결합량을 비교환산하기 위해 다음과 같은 공식을 활용하여 단위 개수 (동일 개수)의 protein G monomer, dimer, trimer, tetramer의 재조합 단백질을 ELISA plate에 코팅한 후 마우스 단클론 항체 및 토끼 다클론 항체를 농도별로 희석하여 1차 항체로 활용하고 그 값을 비교하였다. 1kDa protein 1kg이 1mol로 정의되므로 각 protein G의 1nmol은 아래와 같이 환산될 수 있다.

Protein G monomer	MW 19kDa	1mg = 52.6 nmol,	1nmol = 19.01ug
Protein G dimer	MW 35kDa	1mg = 28.57 nmol,	1nmol = 35.00ug
Protein G trimer	MW 51kDa	1mg = 19.22 nmol,	1nmol = 52.02ug
Protein G tetramer	MW 67kDa	1mg = 14.928 nmol,	1nmol = 66.99ug

ELISA 항원 코팅 시 각 재조합 단백질은 37.6 pmol/100ul (최적의 조건으로 예비실험을 통해 결정함)에서 시작하여 2배씩 단계 희석하여 진행하였다. 또한 아래 그림과 같이 동일한 시험을 동일한 plate 상에서 2회 실시하였다.



0.901	0.736	0.755	0.5	0.398	0.193	0.099	0.069	0.065	0.058	0.051	0.051
0.958	0.901	0.958	0.869	0.773	0.653	0.412	0.265	0.153	0.103	0.077	0.074
1.039	0.987	0.947	0.927	0.959	0.806	0.656	0.472	0.354	0.19	0.133	0.104
1.018	1.006	0.945	0.859	0.841	0.838	0.702	0.421	0.251	0.16	0.102	0.104
0.794	0.751	0.748	0.481	0.377	0.219	0.125	0.088	0.066	0.066	0.059	0.058
0.969	0.934	1.024	0.961	0.815	0.688	0.481	0.299	0.162	0.113	0.083	0.065
1.004	0.947	0.998	1.024	1.017	0.964	0.787	0.595	0.438	0.273	0.174	0.12
0.939	1.015	0.968	0.941	0.886	0.833	0.684	0.482	0.285	0.174	0.111	0.083

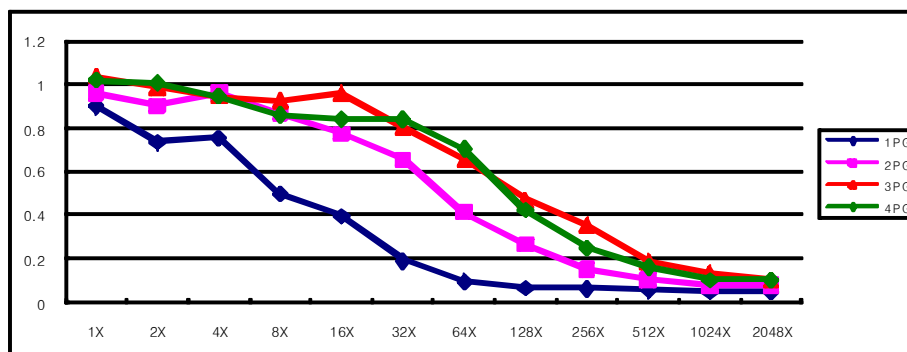
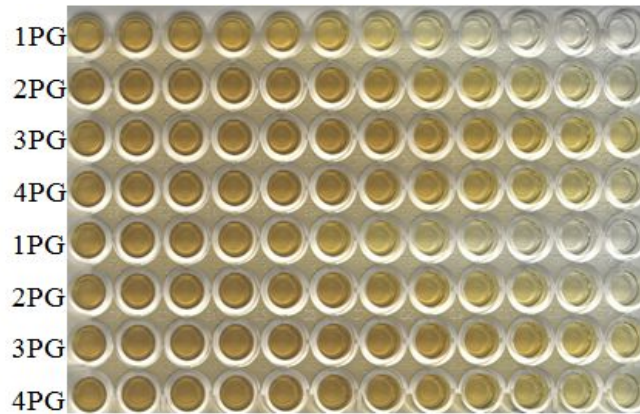


그림 28. 마우스 단클론 항체를 활용한 각 protein G 별 단계희석에 따른 ELISA 결과
 1PG : protein G monomer
 2PG : protein G dimer
 3PG : protein G trimer

4PG : protein G tetramer



1.354	1.48	1.439	1.409	1.292	0.96	0.549	0.335	0.193	0.112	0.084	0.07
1.513	1.482	1.441	1.624	1.369	1.518	1.291	1.066	0.729	0.523	0.346	0.172
1.529	1.435	1.457	1.563	1.473	1.524	1.344	1.355	1.153	0.928	0.716	0.52
1.433	1.308	1.363	1.234	1.422	1.314	1.365	1.219	0.847	0.663	0.4	0.262
1.482	1.35	1.329	1.24	1.255	1.079	0.684	0.371	0.195	0.129	0.101	0.077
1.388	1.424	1.322	1.148	1.448	1.319	1.31	1.021	0.706	0.481	0.331	0.178
1.461	1.597	1.38	1.378	1.405	1.473	1.289	1.371	1.148	0.972	0.743	0.467
1.444	1.483	1.521	1.38	1.432	1.462	1.393	1.207	0.965	0.711	0.519	0.287

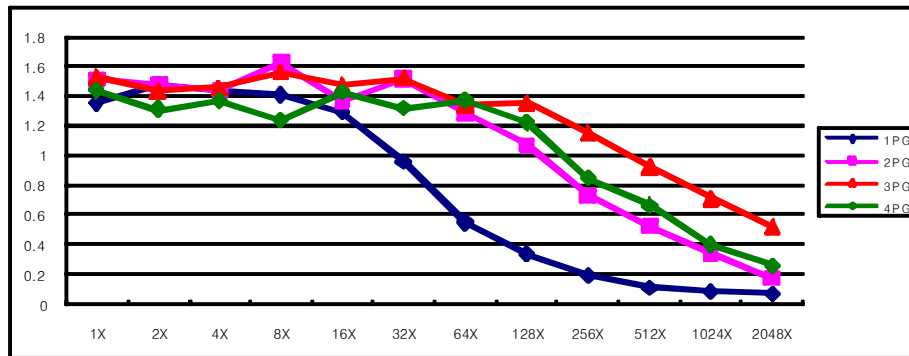


그림 29. 토끼 다클론 항체를 활용한 각 protein G 별 단계희석에 따른 ELISA 결과

1PG : protein G monomer

2PG : protein G dimer

3PG : protein G trimer

4PG : protein G tetramer

상기 ELISA 결과에서 볼 수 있듯이 마우스 다클론 항체와 토끼 다클론 항체 모두에 있어서 protein G monomer 보다는 dimer가 또한 이보다 trimer가 높은 항체결합량을 확인할 수 있었으나 tetramer의 경우 dimer보다는 높으나 trimer보다 낮은 결과를 얻을 수 있었다. 이는 제조합 단백질의 tetramer가 잘리는 현상으로 기인한 것으로 판단되며 따라서 protein G trimer를

활용하여 자성나노입자와 복합체를 형성시키는 것이 가장 바람직한 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단하였다.

또한 이와 아울러, protein A monomer와 dimer의 정제 및 정량을 완료한 후, 앞서 언급한 protein G multimer와 함께 제차 아래와 같이 토끼 및 마우스 항체의 결합량을 비교 분석하였다.

<protein A,G rabbit antibody ELISA test>

<plate1>

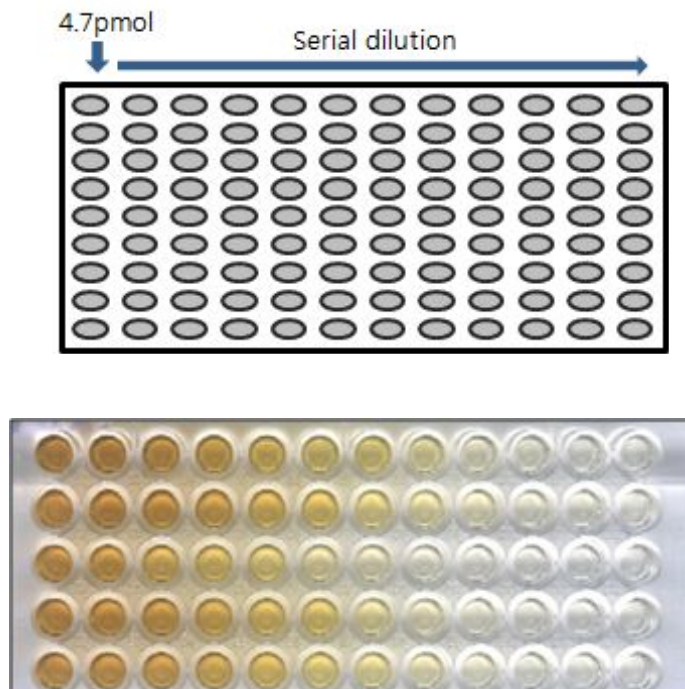
PA	1.815	1.779	1.578	1.408	1.006	0.721	0.469	0.291	0.201	0.152	0.13	0.12
P2A	1.982	1.921	1.677	1.548	1.319	0.884	0.593	0.326	0.203	0.153	0.121	0.101
PG	1.796	1.498	1.217	0.829	0.484	0.283	0.179	0.121	0.095	0.085	0.08	0.08
P2G	1.84	1.759	1.548	1.348	0.918	0.577	0.337	0.219	0.137	0.122	0.112	0.093
P3G	1.85	1.704	1.686	1.484	1.057	0.656	0.401	0.236	0.177	0.142	0.118	0.098

<plate2>

PA	1.907	1.984	1.843	1.501	1.097	0.72	0.451	0.368	0.186	0.142	0.115	0.109
P2A	2.094	2.014	1.84	1.716	1.252	0.978	0.557	0.356	0.223	0.154	0.127	0.126
PG	1.879	1.716	1.215	0.925	0.695	0.318	0.198	0.13	0.104	0.095	0.085	0.097
P2G	2.103	1.887	1.803	1.462	1.017	0.663	0.379	0.218	0.14	0.12	0.09	0.105
P3G	2.022	2	1.758	1.521	1.163	0.808	0.476	0.289	0.177	0.135	0.113	0.108

<average>

PA	1.861	1.8815	1.7105	1.4545	1.0515	0.7205	0.46	0.3295	0.1935	0.147	0.1225	0.1145
P2A	2.038	1.9675	1.7585	1.632	1.2855	0.931	0.575	0.341	0.213	0.1535	0.124	0.1135
PG	1.8375	1.607	1.216	0.877	0.5895	0.3005	0.1885	0.1255	0.0995	0.09	0.0825	0.0885
P2G	1.9715	1.823	1.6755	1.405	0.9675	0.62	0.358	0.2185	0.1385	0.121	0.101	0.099
P3G	1.936	1.852	1.722	1.5025	1.11	0.732	0.4385	0.2625	0.177	0.1385	0.1155	0.103



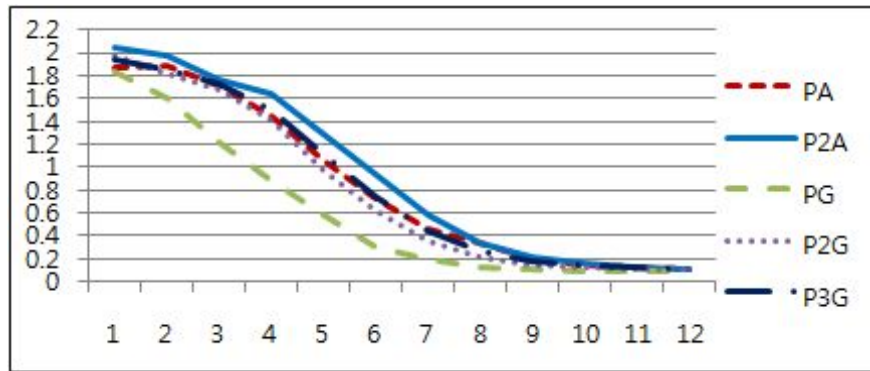


그림 30. 각 재조합 단백질의 토끼 다클론 항체와의 결합력 비교결과

위 그림에서 확인할 수 있듯이, 토끼 다클론 항체의 경우 protein A dimer의 결합력이 가장 우수한 것으로 나타났다. 또한 아래 그림에서 확인할 수 있듯이 마우스 단클론 항체의 경우에도 여타 다른 재조합 단백질들에 비해 protein A dimer의 결합력이 가장 우수한 것으로 나타났다. 다만, protein G trimer의 발현 및 정제가 가장 빨리 끝난 이유로 인하여 자성나노입자와의 복합체 형성시험이 조기에 이루어질 수 있어서 다음과 같은 복합체를 완성할 수 있었으며, protein A dimer와의 복합체 형성 실험 및 이에 대한 평가는 지속적으로 이루어질 예정이다.

<protein A/G mouse antibody ELISA test>

	mole 농도	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.563	0.781	0.391	0.195	0.098	0.049	0.024	0.012	0.006	0.003
protein 종류	PA	1.571	1.543	1.564	1.583	1.447	1.514	1.473	1.434	1.368	1.131	0.89	0.639	0.449	0.224	0.148	0.122	0.1
	P2A	1.579	1.587	1.602	1.522	1.489	1.492	1.52	1.489	1.442	1.204	0.945	0.701	0.501	0.274	0.171	0.11	0.096
	PG	1.573	1.49	1.424	1.532	1.417	1.379	1.156	0.885	0.586	0.368	0.244	0.15	0.116	0.09	0.079	0.08	0.076
	P2G	1.547	1.62	1.501	1.53	1.522	1.512	1.498	1.378	1.237	0.94	0.659	0.411	0.292	0.19	0.117	0.088	0.085
	P3G	1.558	1.558	1.484	1.491	1.497	1.512	1.515	1.406	1.288	1.143	0.814	0.54	0.403	0.273	0.148	0.106	0.092

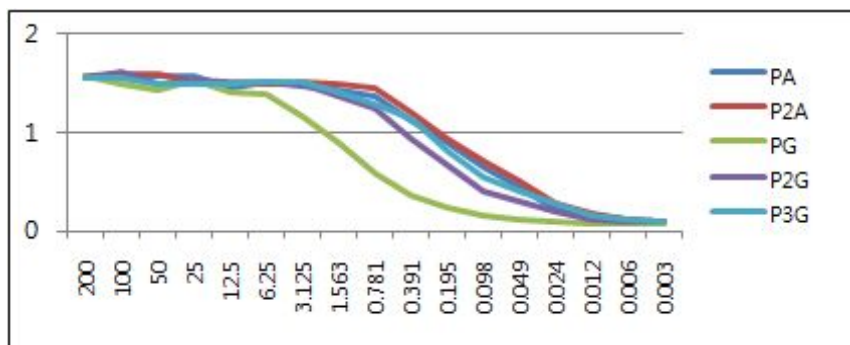
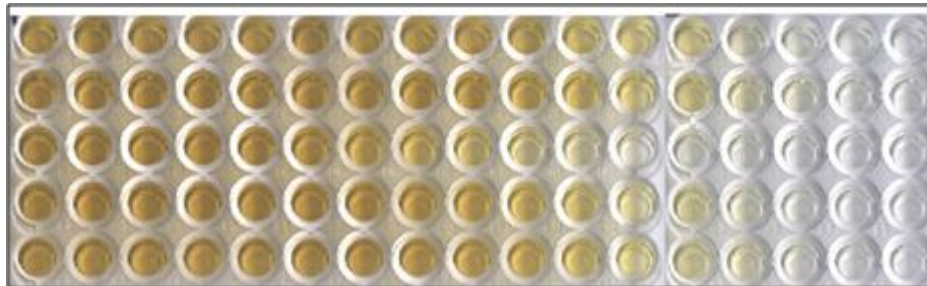


그림 31. 각 재조합 단백질의 마우스 단클론 항체와의 결합력 비교결과

(2) 자성나노입자 성장 최적화 및 pG-nano particle-Ab 복합체 완성

(가) protein G multimer가 고정된 Fe₃@SiO₂ 입자제작

아미노그룹이 발현된 실리카코팅 자성나노입자의 제작과정은 아래 그림과 같다.

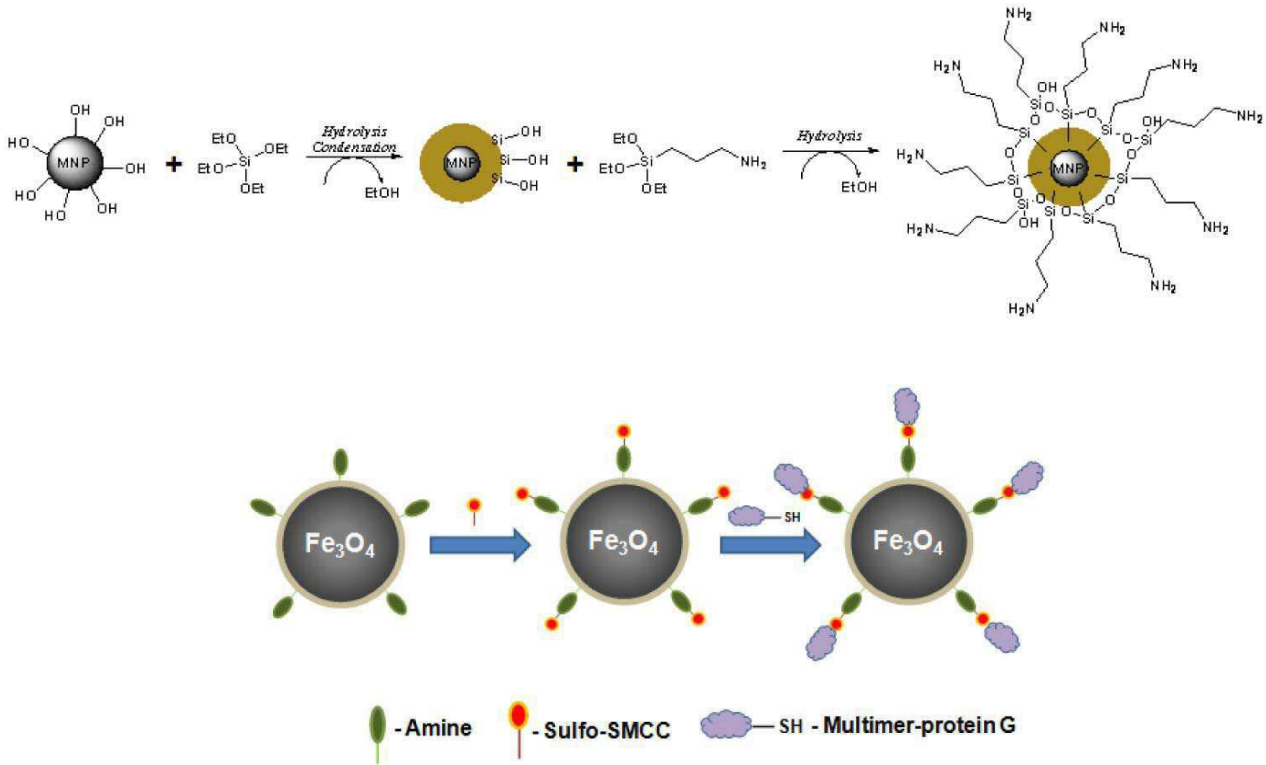


그림 32. 자성나노입자의 제작과정 도시

자성실리카 나노입자는 중심핵 (core)으로 나노자성체 산화물에 실리카 코팅된 자성실리카 나노입자의 표면에 아미노그룹이 도출되어 치환시킨 후, 아미노그룹이 치환된 자성나노입자의 표면을 쌍방결합시약 (cross linking reagent)에 침지시켜 아미노그룹에 아마이드결합을 형성하고, 아마이드결합이 형성된 자성실리카 나노입자의 아미노그룹에 protein G multimer를 결합시켜 수행하였다.

나노자성체는 자철광(magnetite; Fe₃O₄ , 헤마타이트(hematite; α-Fe₂O₃), 마그헤마이트 (maghemite; γ-Fe₂O₃), 니켈, 코발트 및 그들의 화합물로부터 이루어진 군에서 자성에 반응하는 물질이면 어느 것을 사용하여도 좋으나 본 연구과제에서는 자철광을 사용하였으며, 100nm의 지름을 가지도록 설계하였다. 또한 쌍방결합시약으로는

- SPDP; N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate,
- SMPT; succinimidyl-oxycarbonyl-α-methyl-α-(2-pyridyldithio)toluene,
- Sulfo-LC-SMPT; Sulfosuccinimidyl-6-[α-methyl-α-(2-pyridyldithio) toluamido] hexanoate,
- Sulfo-SMCC; Succinimidyl-4-(Nmaleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate,
- MBS; m-Maleimidobenzoyl-Nhydroxy-succinimide ester,
- SIAB; N-succinimidyl(4-iodoacetyl)-aminobenzoate,
- SMPB; Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate,

GMBS; N-γ-Maleimidobutyryl-oxysuccinimide ester,

SIAX; Succinimidyl-6-[6(((iodoacetyl)amino)-hexanoyl)amino]hexanoate,

NPIA; p-Nitrophenyl iodoacetate 등으로 이루어진 군에서 어느 것을 사용해도 무방하나 본 과제에서는 Sulfo-SMCC를 선택하여 사용하였다.

쌍방가교시약에 protein G multimer가 결합할 수 있게 하려면 재조합 단백질의 말단에 cystein을 장착하여 설피히드릴기 (sulfhydryl group)이 발현되도록 하였다.

구체적인 제작 방법은 아래와 같다.

자성 나노입자를 제작하기 위하여 계면활성제인 Igepal CO-520 0.22g을 사이클로헥산 4.5ml에 녹인 용액을 준비한 후, magnetite와 oleic acid를 사이클로헥산 용액에 넣고 1시간 가량 초음파 처리를 하여 분산시킨 후 기 준비된 Igepal이 들어 있는 사이클로 헥산 용액에 넣고 교반시켰다. 이때 수산화암모늄, APTEOS를 첨가한 후 추가적으로 20분 동안 더 교반시킨 후 메탄올을 넣어서 세척하여 최종적으로 아미노기가 치환된 실리카 코팅 자철광나노입자를 확보하였다.

이후 아미노치환 Fe₃@SiO₂를 200mM 염화나트륨 (pH7.2)과 100mM 인산염완충액으로 이루어진 용액 1.5ml에 넣어 10초간 교반시킨 후, 30분간 초음파분산기를 이용하여 분산을 시켰다. 자석을 이용하여 자성나노입자를 분리해 낸 후, 아미노기로 기능화된 자성나노입자와 sulfo-SMCC가 잘 결합하기 위해 계면활성제로 사용한 0.1% Tween-20을 포함한 분산용 완충액 160ul를 이용하여 자성나노입자를 풀어주었다. 가교결합시약인 50mM sulfo-SMCC 시약을 DMSA (dimethylsulfoxide) 용매에 용해시킨 후 40ul를 분산된 자성나노입자 용액에 첨가하였다. 약 10초간 혼합된 혼합물을 교반한 후, 상온에서 한 시간 동안 흔들어주면서 반응시켰다.

아미노치환 Fe₃@SiO₂의 활성화동안 말단에 cystein이 결합된 protein G multimer (30mM)를 상온에서 30분간 10.91mM DTT로 sulfhydryl group이 반응할 수 있도록 환원시켰다. 환원된 protein G multimer는 탈염 스피ن 컬럼을 사용하여 완충액을 활용하여 정제하였다. 자성을 띤 활성화된 아미노치환 Fe₃@SiO₂는 10mM PBS 완충액으로 5회 세척한 다음 상기 환원된 protein G multimer를 최종농도 100ug/ml이 되도록 추가하여 0.1% Tween-20을 최종농도로 하여 10mM PBS 완충액으로 재현탁하였다. 이를 교반하고 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 자석을 이용하여 protein G multimer가 고정된 Fe₃@SiO₂ 입자를 정제하고 10mM PBS 완충액을 활용하여 3회 세척함으로써 완성하였다.

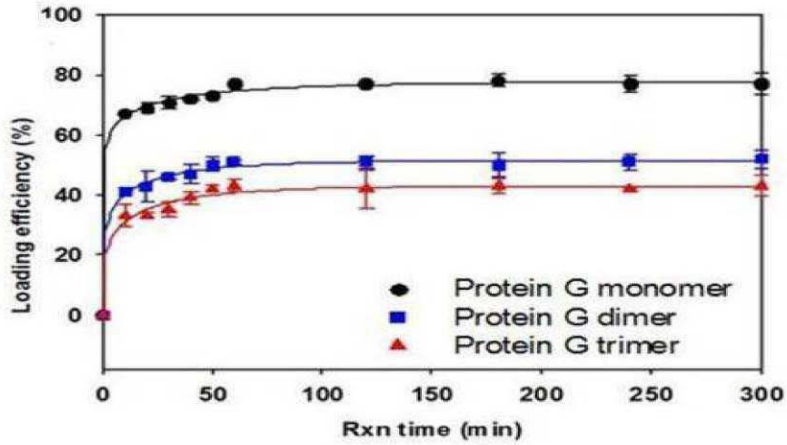


그림 33. protein G monomer, dimer, trimer의 각 농도에 따른 결합효율

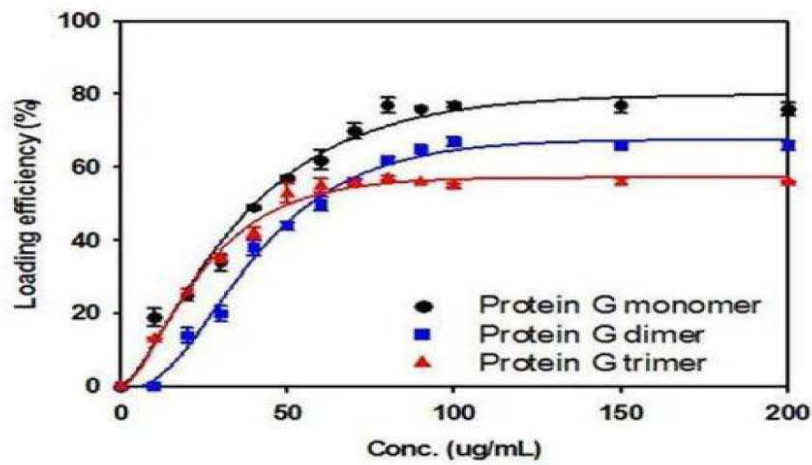


그림 34. protein G monomer, dimer, trimer와 아미노그룹으로 표면치환된 실리카코팅 자성입자와의 반응시간에 따른 결합효율

(나) 마우스항체와 protein G multimer가 고정된 Fe₃@SiO₂ 입자의 결합

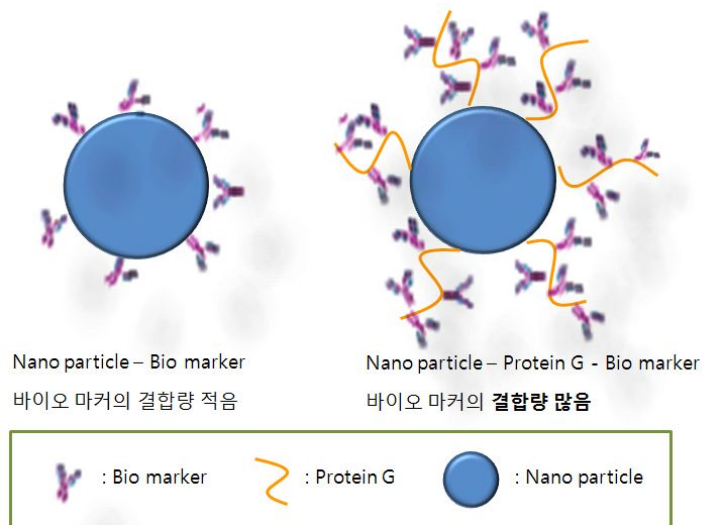


그림 35. 삼중복합체의 모식도

마우스 면역글로블린 G의 최종농도를 200ug/ml이 되도록 0.1% Tween-20이 들어 있는 10mM PBS 완충액을 이용한 희석한 후 protein G multimer가 고정된 Fe₃@SiO₂ 입자에 200ul를 첨가하여 상온에서 2시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 이러한 혼합물을 자석을 이용하여 분리한 후, 10mM PBS 완충액을 이용하여 3회 세척하였다.

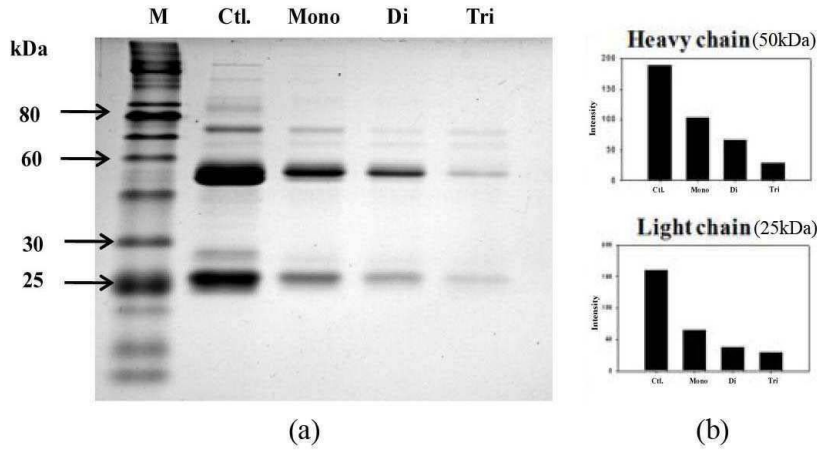


그림 36. Protein G monomer, dimer, trimer와 mouse IgG와의 결합 효율의 SDS-PAGE 결과

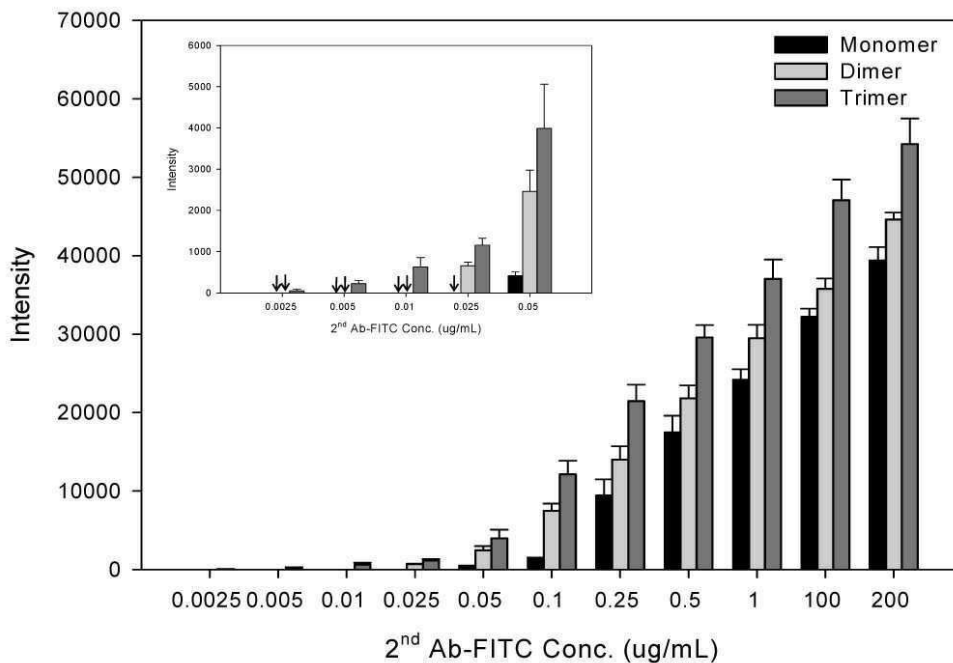


그림 37. 최적 조건에 의해 결합된 protein G multimer를 통해 결합된 mouse IgG와 결합한 anti-mouse FITC Ab 농도에 따른 형광값

다. 자성나노입자 기반 Bio-detector 개발

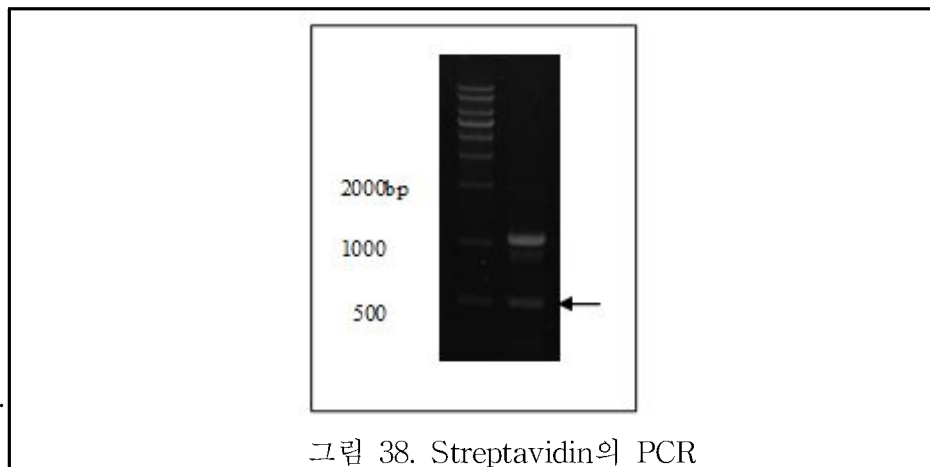
(1) Streptavidin의 제작

여러 가지 환경 조건 (유기용매, 변성제, 세정제, proteolytic enzymes, 온도, pH)에 저항성을 가진 biotin-streptavidin complex의 특성을 이용하기 위해 재조합 유전자 기법을 활용하여 streptavidin을 다음과 같이 제작하였다.

(가) Monomer streptavidin의 제작

① Monomer streptavidin의 PCR 및 TA cloning

Streptavidin은 *Streptomyces avidinii*에서 유래된 것으로 이를 증폭하기 위해서 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 *S. avidinii* (KCTC9757)를 구입하여 사용하였다. 우선 *S. avidinii*를 YM broth (Yeast extract 3g, Malt extract 3g, Peptone 5g, Dextrose 10g, DW 1 l)에서 배양한 후 (30°C, 48시간) 균체를 수거 하였다. 수거한 균체는 액체 질소를 이용해서 고르게 파쇄한 후 genomic DNA extraction kit (INTRON Biotechnology, Inc.)를 이용해서 genomic DNA를 확보하였다. 확보된 DNA는 F-NotI STR primer(5'-TGCGGCCGCATGGACCCGTCCAAGGAC-3'), R-STR BspEI XhoI(1) primer(5'-ACCTCGAGACCGCCTCCGGATTGCTGAACAGCGTCTAG-3')를 사용하여 PCR [94°C(1분), 58°C(30초), 72°C(1분), 30 cycles]한 후 약 500 bp의 PCR product를 획득하였다.



획득한 PCR product를 TA cloning (RBC Bioscience) 하였고 이의 모식도는 그림 3과 같다. 그리고 streptavidin이 맞는지 sequencing 분석을 통해 확인한 결과 streptavidin으로 확인되었다.

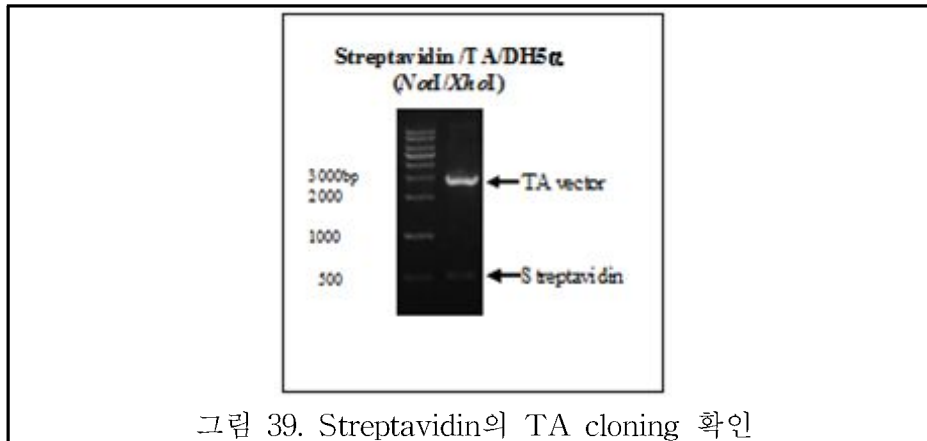


그림 39. Streptavidin의 TA cloning 확인

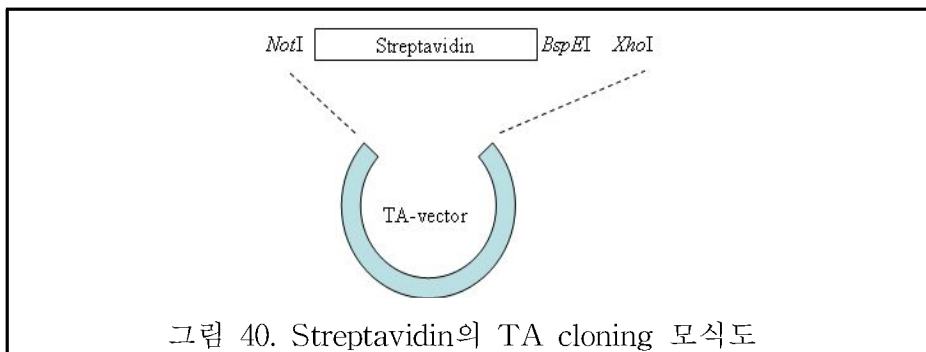


그림 40. Streptavidin의 TA cloning 모식도

```

GCGGCCGCATGGACCCGTCCTCAAGGACTCGAAGGCCCAAGGCTCTCGGCCGCCGAGGCCGGCATCACCGGCACCTGGTACAACCAAGCTCGGCTCGACC 87
NotI M D P S K D S K A Q V S A A E A G I T G T W Y N Q L G S T
TTCATCGTGACCGCGGGCGCGACGGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGACC 174
F I V T A G A D G A L T G T Y E S A V G N A E S R Y V L T G
GGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCC 261
R Y D D S A P A T D G S G T A L G W T V A W K N N Y R N A
CACTCCGCGACCACTGGAGCGGCCAGTACGTCGGCGCGCCGAGGCCGAGGATCAACACCCAGTGGCTGCTGACCTCCGGCACCCACC 348
H S A T T W S G Q Y V G G A E A R I N T Q W L L T S G T T
GAGGCCAACGCTGGAAGTCCACGCTGGTCGGCCACGACACCTTACCACAGGTGAAGCCGTCGGCCGCTCCATCGACGCGCGGAAG 435
E A N A W K S T L V G H D T F T K V K P S A A S I D A A K
AAGCCGGCGTCAACAACGGCAACCGCTAGACGCTGTCAGCAATCCGGAGGCGGTCTCGAG 480
K A G V N N G N P L D A V Q Q BspEI XhoI

```

그림 41. Streptavidin의 sequence

② Streptavidin의 pET-28a cloning 및 발현

TA vector와 cloning이 확인된 streptavidin 염기서열을 가진 plasmid DNA를 제한효소 *NotI/XhoI* 으로 처리하여 획득한 fragment (약 0.5kb)와 제한효소 *NotI/XhoI*이 처리된 pET-28a vector와 ligation(16°C, 12시간)하여 *Escherichia coli* DH5α에 transformation하고 kanamycin (50μg/ml)이 함유된 LB agar 배지에서 배양하였다 (37°C, 24시간). Kanamycin 배지에서 성장한 각각의 colony들은 T7F, T7R primer를 사용하여 colony PCR하였고 해당 크기의 fragment DNA (약 0.5kb)를 가진 colony들을 확보한 후 해당 colony의 plasmid DNA에 제한효소 *NotI/XhoI*을 처리하여 최종적으로 insert와 pET-28a vector와의 cloning을 확인하였다.

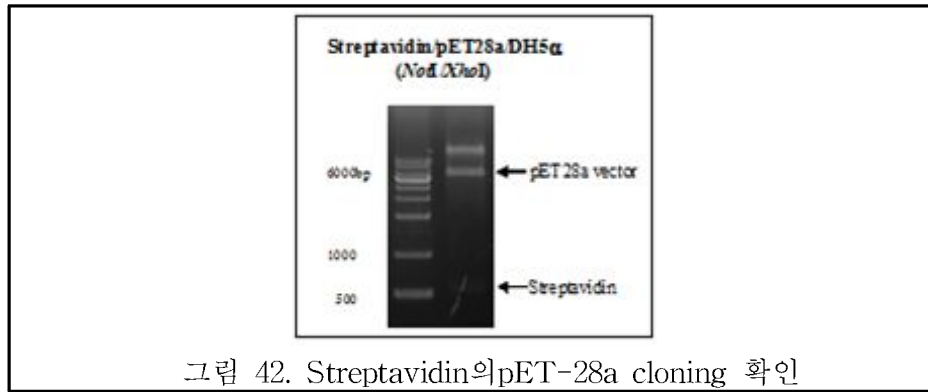


그림 42. Streptavidin의 pET-28a cloning 확인

streptavidin의 발현을 위해 pET-28a vector와 cloning된 streptavidin의 plasmid DNA를 단 백질 발현용 *E. coli* strain인 BL21 DE3, BL21 DE3 pLysS, Rosseta2 DE3, Rosseta2 DE3 pLysS에 각각 transformation하여 kanamycin($50\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 LB agar 배지에서 37°C , 20시간 배양하여 성장한 colony를 선별하여 single colony를 획득한 후 LB broth[kanamycin ($50\mu\text{g}/\text{ml}$)]에 접종하였다. 접종한 LB broth의 혼탁 정도가 ODA600=0.4~0.6일 때 1mM IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 37°C 에서 3시간~4시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 후 1×PBS buffer (8g NaCl, 0.21g KCl, 1.42 g Na_2HPO_4 , 0.27 g KH_2PO_4 / 1ℓ, pH 7.4)에 현탁 하였고 이후 2×sample buffer[2.5ml 0.5M Tris buffer(pH 6.8), 4% SDS, 20% Glycerol, 0.2% Bromophenol Blue, 10% β -mercaptoethanol/10ml]와 잘 혼합한 후 열처리 ($80\sim 90^\circ\text{C}$, 5분)하고 12% SDS PAGE상에서 streptavidin의 발현을 발현용 *E. coli*인 BL21DE3pLysS를 제외한 streptavidin/pET28a/BL21DE3, streptavidin/pET28a/Rosseta2DE3, streptavidin/pET28a/Rosseta2DE3pLysS에서 확인하였다.

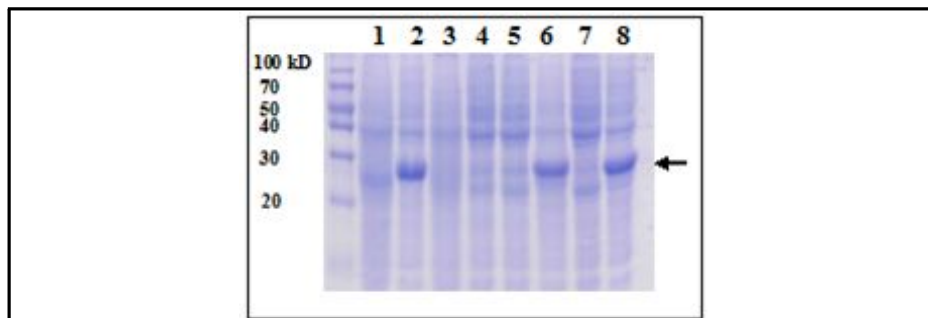


그림 43. Streptavidin의 발현

- 1; Streptavidin/pET28a/BL21DE3, non-induction
- 2; Streptavidin/pET28a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C , 4hr
- 3; Streptavidin/pET28a/BL21DE3pLysS, non-induction
- 4; Streptavidin/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C , 4hr
- 5; Streptavidin/pET28a/Rosseta2DE3, non-induction
- 6; Streptavidin/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C , 4hr
- 7; Streptavidin/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 8; Streptavidin/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C , 4hr

③ Streptavidin의 정제

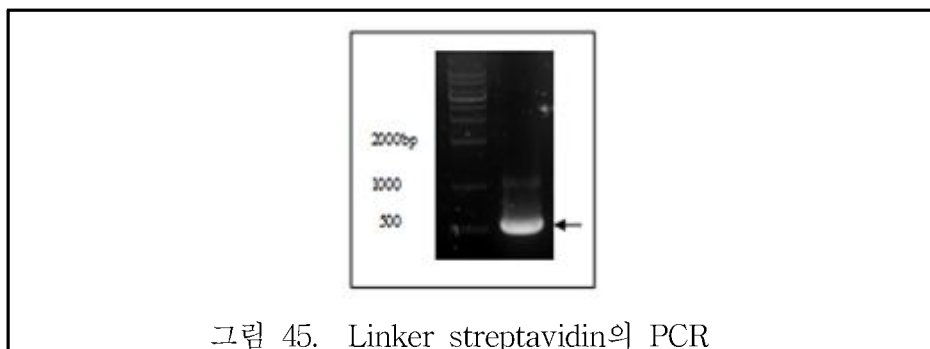
Streptavidin 단백질 (약 22 KD)을 정제하기 위해 streptavidin/pET28a/BL21DE3 균주를 LB broth [kanamycin (50 μ g/ml)]에 접종하여 OD_{A600}=0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 20 $^{\circ}$ C, 36시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다(8000rpm, 20분). 수거한 cell은 denative buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 8M Urea)에 현탁 하여 파쇄한 후 Ni-NTA column에서 washing buffer (50mM Imidazole, 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 8M Urea)로 2회 washing 한 후 elution buffer (250mM Imidazole, 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 8M Urea)로 정제하였다.



(나) Dimer streptavidin의 제작

① Linker streptavidin의 제작

Dimer streptavidin 제작을 위해 monomer streptavidin clone을 template으로 하여 Linker STR(XmaI) primer (5'-ATCCCGGGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGATGGACCCGTCCAAGGAC-3')와 R-STR BspEI XhoI primer (5'-ACCTCGAGACCGCCTCCGGATTGCTGAACAGCGTCTAG-3')를 사용하여 PCR [94 $^{\circ}$ C(1분), 58 $^{\circ}$ C(30초), 72 $^{\circ}$ C(1분), 30 cycles]한 후 약 550 bp의 linker streptavidin PCR product를 획득하였고 TA cloning을 통해 획득한 plasmid DNA로 sequencing 분석을 하여 linker streptavidin이 제대로 PCR 되었는지 sequence를 통해 linker streptavidin을 확인하였다.



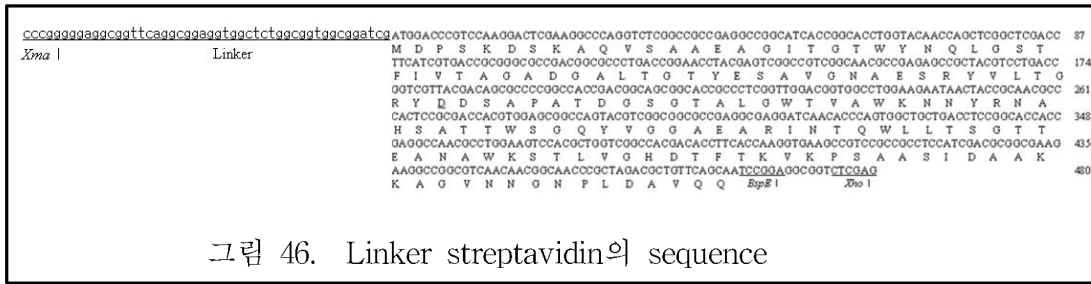


그림 46. Linker streptavidin의 sequence

② Dimer streptavidin의 TA cloning과 pET-28a cloning 및 발현

Monomer streptavidin 염기서열을 가진 plasmid DNA를 제한효소 *BspEI*과 *XhoI*로 처리하여 나온 약 0.5 kb의 fragmen와 TA-vector에 cloning 되어 있는 linker streptavidin에 제한효소 *XmaI*과 *XhoI*을 처리하여 나온 약 0.55kb fragment를 16°C에서 ligation 하여 ampicilin (100µg/ml)이 함유된 LB agar 배지에서 배양한 colony들은 M13F, M13R primer를 사용하여 PCR [94°C (1분), 58°C (30초), 72°C (1분), 30 cycles]한 후 해당 크기의 fragment DNA를 가진 colony들을 확보한 후 (약 1.05kb) 해당 colony의 plasmid DNA에 제한효소 *NotI/XhoI*을 각각 처리하여 최종적으로 dimer streptavidin (약 1.05kb)과 TA vector와의 cloning 확인을 하였다.

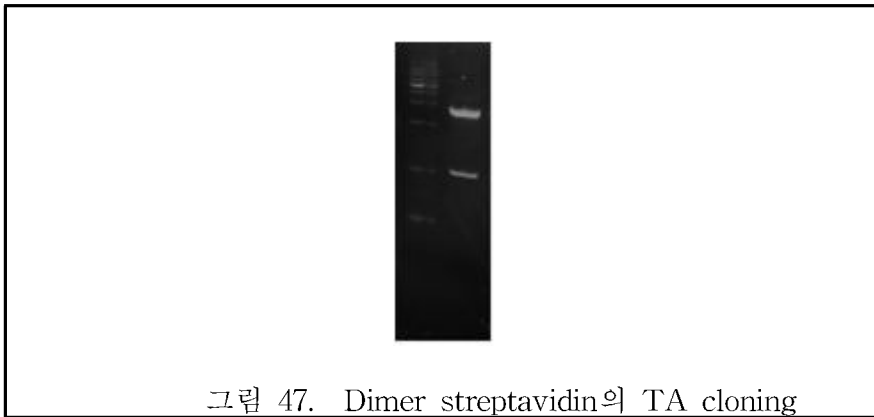


그림 47. Dimer streptavidin의 TA cloning

이렇게 확인된 dimer streptavidin은 *NotI/XhoII*이 처리된 pET-28a vector와 ligation (16°C, 12 시간)하여 최종적으로 insert와 pET-28a vector와의 cloning을 확인하였다.

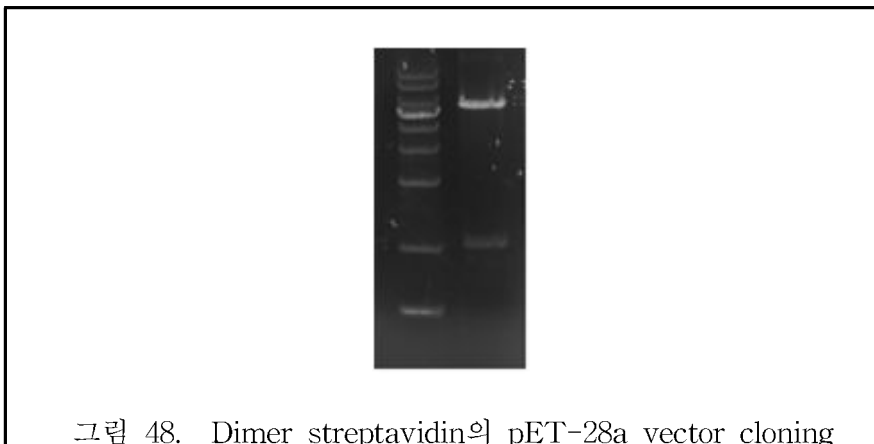
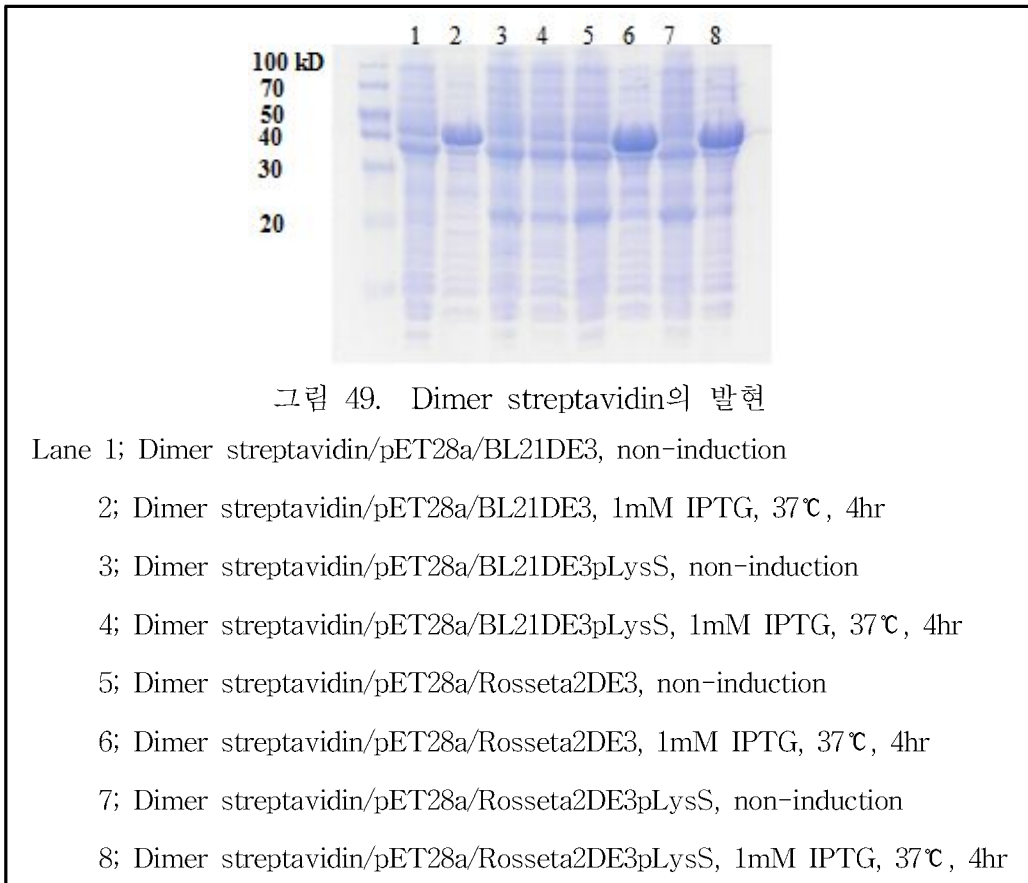


그림 48. Dimer streptavidin의 pET-28a vector cloning

그리고 dimer streptavidin의 발현을 위해 plasmid DNA를 단백질 발현용 *E. coli* strain인

BL21DE3, BL21DE3pLysS, Rosseta2DE3, Rosseta2DE3pLysS에 각각 transformation하여 나온 single colony를 LB broth[kanamycin(50 μ g/ml)]에 접종한 후 접종한 LB broth의 혼탁 정도가 OD_{A600}=0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간~4시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 후 1 \times PBS buffer에 현탁 하였고 이후 2 \times sample buffer와 잘 혼합한 후 열처리하고 12% SDS PAGE상에서 dimer streptavidin의 발현 (약 44 KD)을 dimer streptavidin/pET28a/BL21DE3, dimer streptavidin/pET28a/Rosseta2DE3, dimer streptavidin/pET28a/Rosseta2DE3pLysS에서 확인하였다.



(2) 재조합 형광단백질의 제작

(가) GFP (green fluorescence protein)의 제작

① GFP의 PCR 및 TA cloning

GFP의 제작을 위해 경상대학교 김진우 교수님으로부터 mini-Tn7gfp2/ DH5 α 균주를 분양받아 이를 template으로 하였고, F-NheI GFP primer (5'-ACGCTAGCATGAGTAAAGGAGAAGAA-3')와 R-GFP BspEI XhoI primer (5'-ACCTCGAGACCGCCTCCGGATTTGTATAGTTCATCCAT-3')를 사용하여 PCR[94 $^{\circ}$ C (1분), 58 $^{\circ}$ C (30초), 72 $^{\circ}$ C (1분), 30 cycles]하여 700pb의 product를 획득하였다.

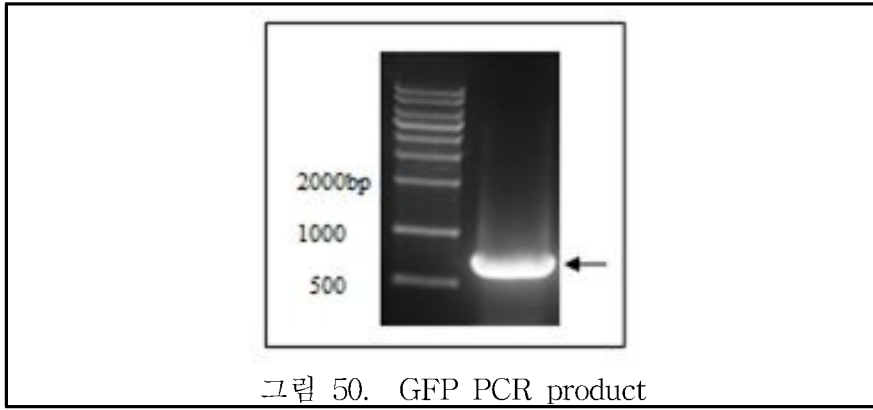


그림 50. GFP PCR product

획득한 PCR product를 TA cloning 하였고 GFP가 맞는지 sequencing 분석을 통해 확인한 결과 GFP sequence로 확인되었다.

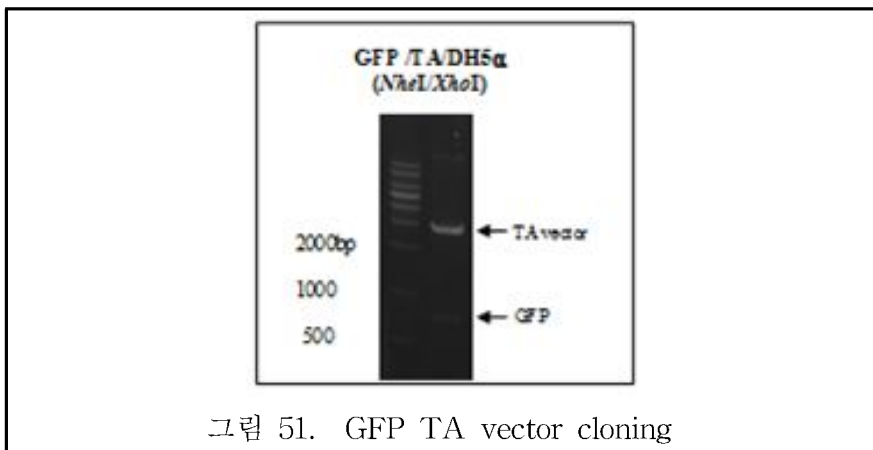


그림 51. GFP TA vector cloning

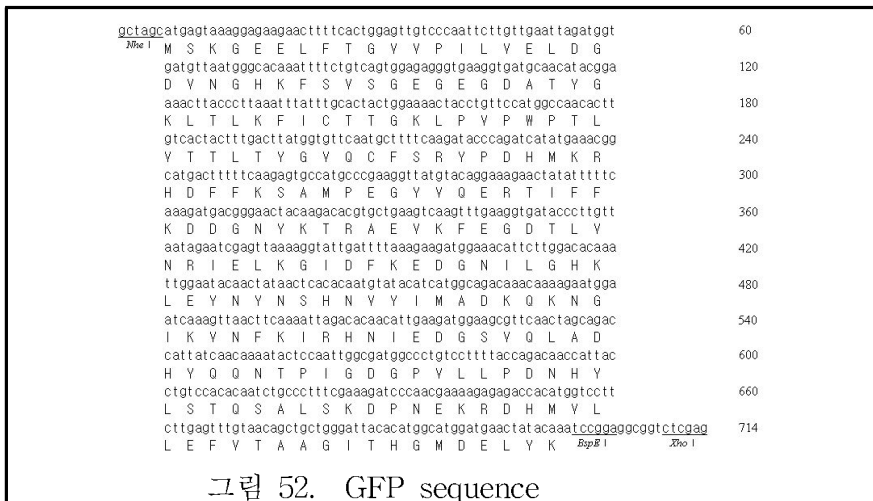
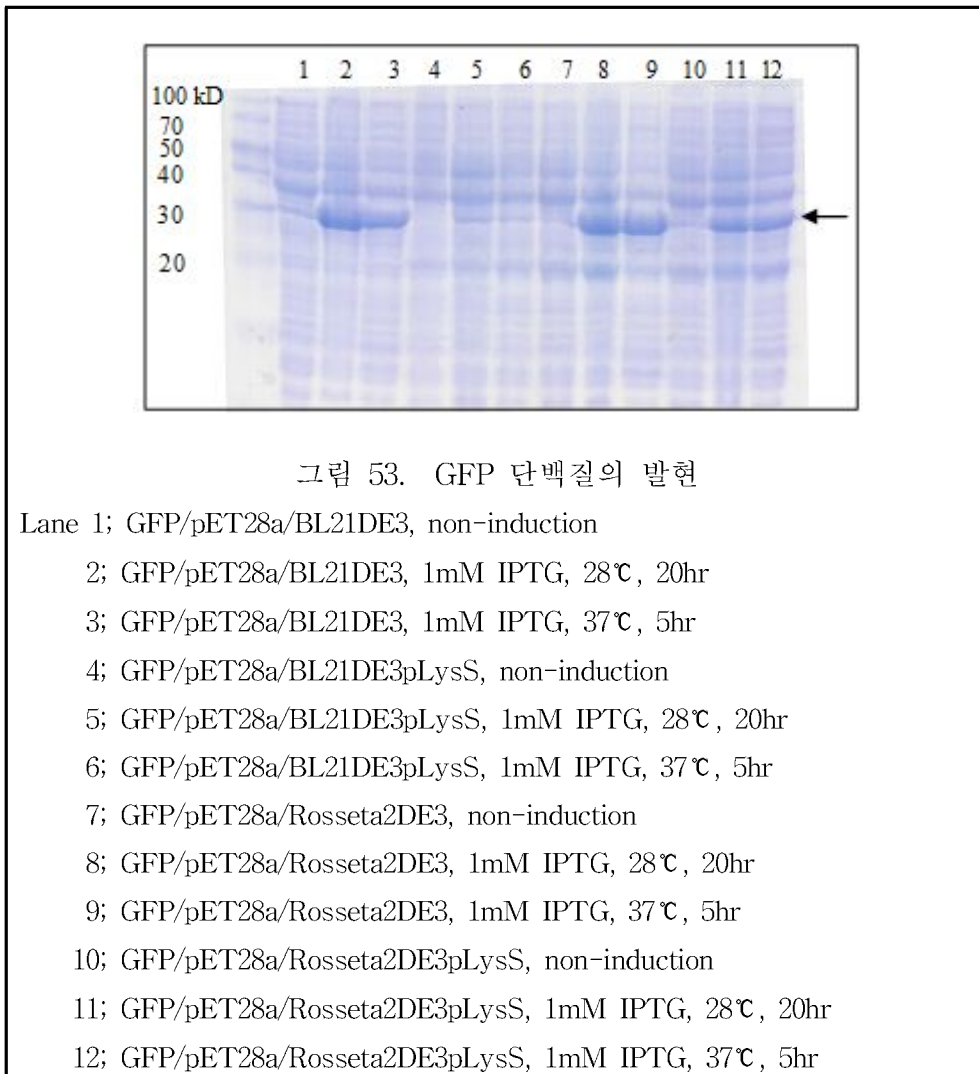


그림 52. GFP sequence

② GFP의 pET-28a cloning 및 발현

Sequence가 확인된 GFP는 *NheI/XhoII*이 처리된 pET-28a vector와 ligation (16°C, 12시간)하여 최종적으로 insert와 pET-28a vector와의 cloning을 확인하였고 이 GFP의 단백질 발현을 위해 단백질 발현용 *E. coli* strain인 BL21DE3, BL21DE3pLysS, Rosseta2DE3,

Rosetta2DE3pLysS에 각각 transformation하여 나온 single colony를 LB broth [kanamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)]에 접종한 후 $\text{OD}_{\text{A}600}=0.4\sim 0.6$ 일 때 1mM IPTG를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5시간, 28 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다(8000rpm, 20분). 수거한 후 1 \times PBS buffer에 현탁 하였고 이후 2 \times sample buffer와 잘 혼합한 후 열처리하고 12% SDS PAGE상에서 GFP의 발현을 GFP/pET28a/BL21DE3, GFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, GFP/pET28a/Rosseta2DE3, GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS에서 확인하였는데 GFP/pET28a/BL21DE3pLysS에서의 발현량은 다른 *E. coli*에서보다 낮아 GFP의 발현, 정제에는 제외하기로 하였다. 그리고 형광 단백질로서의 발현 유무를 관찰하기 위해서 1mM IPTG가 첨가된 LB agar [kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)]에 접종하여 28 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 각각 형광 유무를 관찰하였다. 그 결과 28 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 모두 GFP 단백질이 발현되는 것을 관찰 할 수 있었으나 GFP 형광단백질은 28 $^{\circ}\text{C}$ 에서 더 잘 관찰되어 GFP의 발현 및 정제 조건에서는 28 $^{\circ}\text{C}$ 에서 발현하는 것이 더 유리할 것으로 생각되어 28 $^{\circ}\text{C}$ 에서 발현 시키기로 하였다.



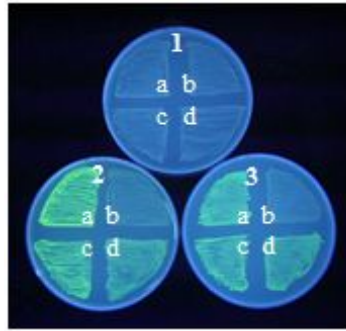


그림 54. 평판배지상에서 GFP 단백질의 발현

- 1, a: GFP/pET28a/BL21DE3, non-induction
 b: GFP/pET28a/BL21DE3pLysS, non-induction
 c: GFP/pET28a/Rosseta2DE3, non-induction
 d: GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 2, a: GFP/pET28a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 b: GFP/pET28a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 c: GFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 d: GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 3, a: GFP/pET28a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
 b: GFP/pET28a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
 c: GFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
 d: GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 20hr

③ GFP의 정제

GFP 형광 단백질 (약 27 KD)을 정제하기 위해 GFP/pET28a/BL21DE3 균주를 LB broth[kanamycin (50 μ g/ml)]에 접종하여 OD_{A600} ≈ 0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 28°C, 20시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 cell은 native buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl)에 현탁 하여 파쇄한 후 Ni-NTA column에서 washing buffer (50mM Imidazole, 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl)로 3회 washing 한 후 elution buffer (500mM Imidazole, 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl)로 정제한 후 UV light에서 형광을 관찰 하였다.

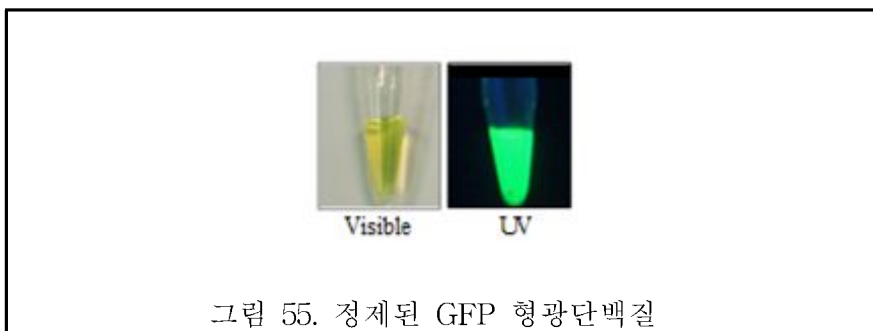
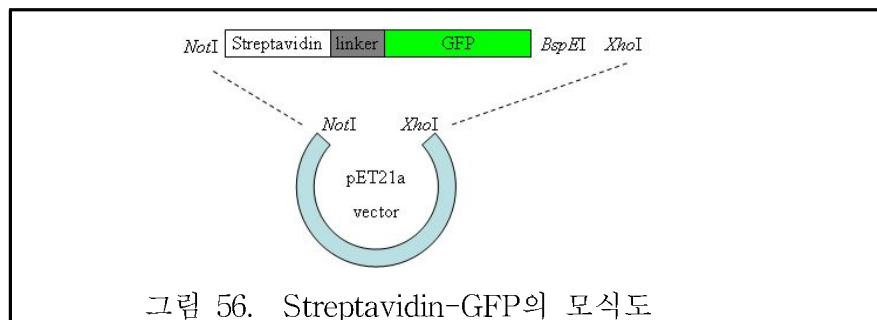


그림 55. 정제된 GFP 형광단백질

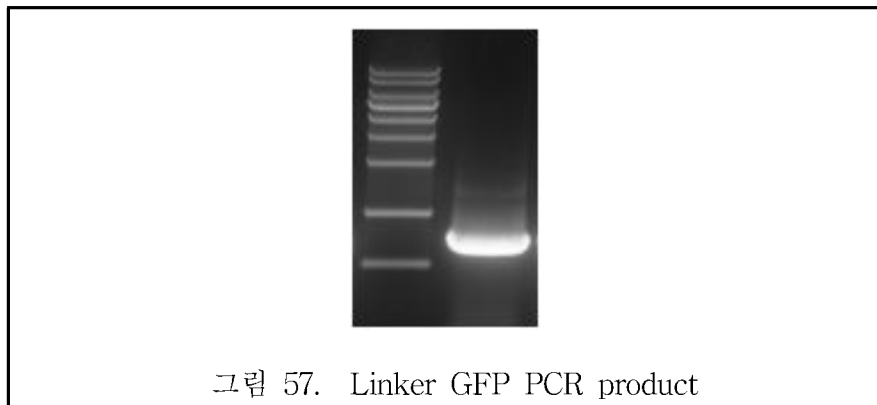
(나) Streptavidin-GFP 제작

Streptavidin-GFP 제작을 위한 전체적인 모식도는 아래 그림과 같다.



① Linker GFP 제작

Streptavidin-GFP 제작을 위해 GFP clone을 template으로 하여 F-Linker GFP primer (5'-ATACCGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGA TGAGTAAAGGAGAAGAA-3')와 R-GFP BspEI XhoI primer (5'-ACCTCGAGACCGCCTCC GGATTTGTATAGTTCATCCAT-3')를 사용하여 PCR (95°C 1분, 58°C 30초, 72°C 1분, 30 cycles)하여 약 750 bp의 PCR product를 획득하였고 TA cloning을 통해 획득한 plasmid DNA로 sequencing 분석을 하여 linker GFP가 제대로 PCR 되었는지 확인하였다.



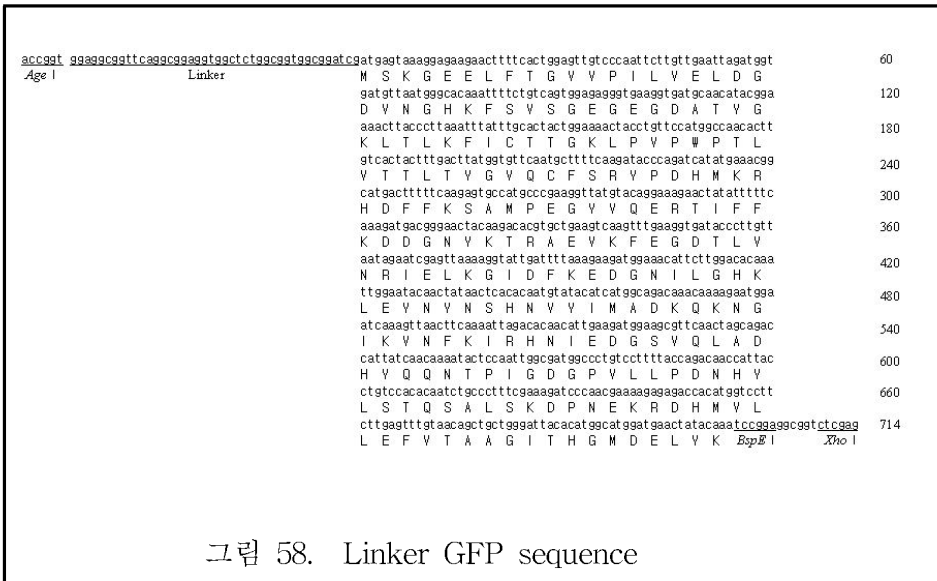


그림 58. Linker GFP sequence

② Streptavidin-GFP의 TA cloning과 pET-21a cloning 및 발현

Streptavidin 염기서열을 가진 plasmid DNA를 제한효소 *BspEI*과 *XhoI*로 처리하여 나온 약 0.5 kb의 fragmen와 TA-vector에 cloning 되어 있는 linker GFP에 제한효소 *AgeI*과 *XhoI*을 처리하여 나온 약 0.75kb fragment를 16°C에서 ligation 시킨 후 *E. coli* DH5a에 transformation하여 ampicilin (100µg/ml)이 함유된 LB agar 배지에서 성장하는 colony들 중에서 colony PCR를 통해 해당 크기의 fragment DNA를 가진 colony들을 확보한 후 (약 1.25kb) 해당 colony의 plasmid DNA에 제한효소 *NotI/XhoI*을 처리하여 최종적으로 insert [약 1.25kb = streptavidin (0.5kb) + linker GFP (0.75kb)]와 TA vector와의 cloning 확인을 하였다.

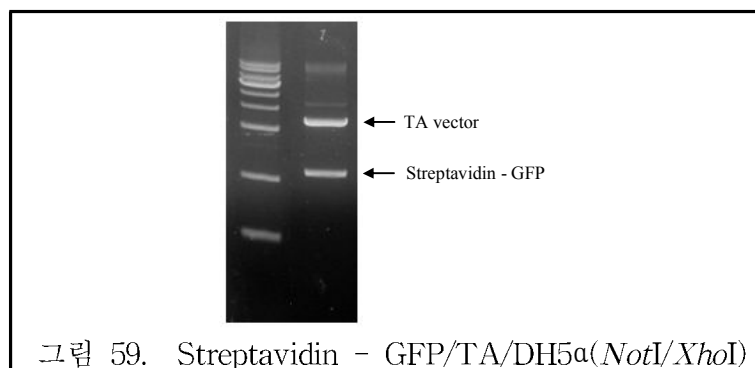


그림 59. Streptavidin - GFP/TA/DH5a(*NotI/XhoI*)

확인된 streptavidin-GFP는 *NotI/XhoII*이 처리된 pET-28a vector와 ligation (16°C, 12시간) 하여 최종적으로 insert와 pET-28a vector와의 cloning을 확인하였고 이 streptavidin-GFP의 단백질 발현을 위해 단백질 발현용 *E. coli* strain인 BL21DE3, BL21DE3pLysS, Rosseta2DE3, Rosseta2DE3pLysS에 각각 transformation하여 나온 single colony를 LB broth [kanamycin (50µg/ml)]에 접종한 후 접종한 LB broth의 혼탁 정도가 OD_{A600}=0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 37°C에서 5시간, 28°C에서 20시간, 20°C에서 36시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였

다 (8000rpm, 20분). 수거한 후 1×PBS buffer에 현탁 하였고 이후 2×sample buffer와 잘 혼합한 후 열처리하고 12% SDS PAGE상에서 dimer streptavidin의 발현을 확인하였다. 그리고 형광 단백질로서의 발현 유무를 관찰하기 위해서 1mM IPTG가 첨가된 LB agar [kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)]에 접종하여 37°C, 28°C, 20°C의 온도조건에서 각각 형광 유무를 관찰하였다. 그 결과 streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS 균주에서 streptavidin-GFP 단백질 (약 48 KD)이 발현되는 것을 관찰 할 수 있었으며 UV light에서 형광은 37°C, 28°C에서는 관찰되지 않았고 20°C에서만 관찰되어 streptavidin-GFP 단백질의 발현, 정제에는 20°C에서 배양시켜야 형광 단백질이 발현됨을 확인하였다.

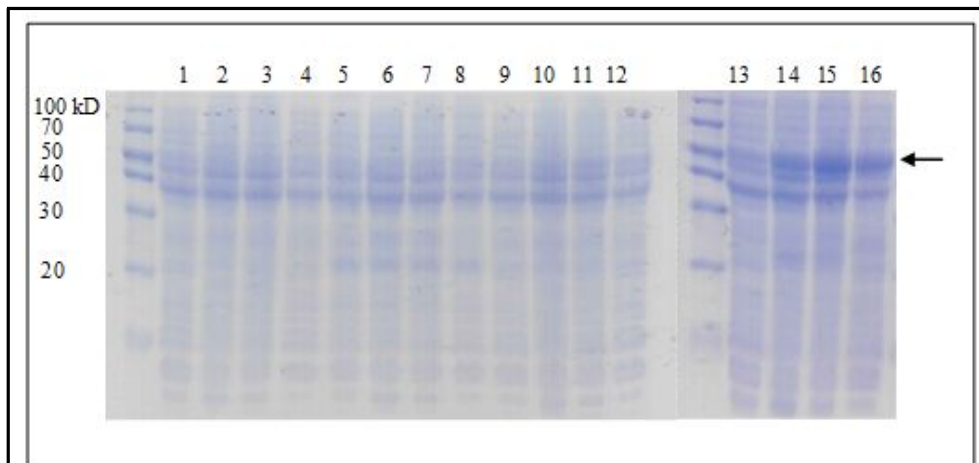


그림 60. Streptavidin-GFP 단백질의 발현

- 1; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3, non-induction
- 2; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 5; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, non-induction
- 6; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 7; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 8; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 9; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3, non-induction
- 10; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 11; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 12; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 13; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 14; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 15; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 16; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr

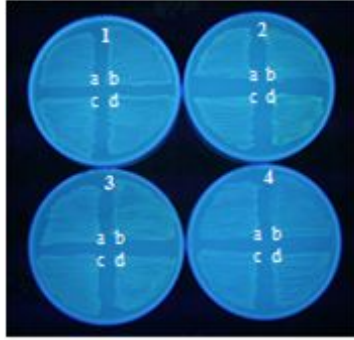


그림 61. 평판배지상에서 Streptavidin-GFP 단백질의 발현

- 1, a; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3, non-induction
 b; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, non-induction
 c; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3, non-induction
 d; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 2, a; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 b; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 c; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 d; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3, a; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 b; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 c; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 d; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4, a; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
 b; Streptavidin-GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
 c; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
 d; Streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 20hr

③ Streptavidin-GFP의 정제

Streptavidin-GFP 형광 단백질을 정제하기 위해 streptavidin-GFP/pET21a/Rosseta2 DE3pLysS 균주를 LB broth [ampicilin (100 μ g/ml)]에 접종하여 $OD_{A600}=0.4\sim0.6$ 일 때 1mM IPTG를 첨가하여 20°C, 36시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 cell은 native buffer에 현탁 하여 파쇄한 후 Ni-NTA column에서 washing buffer로 3회 washing 한 후 elution buffer로 정제한 후 UV light에서 형광을 관찰 하였다.

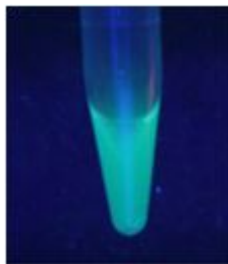
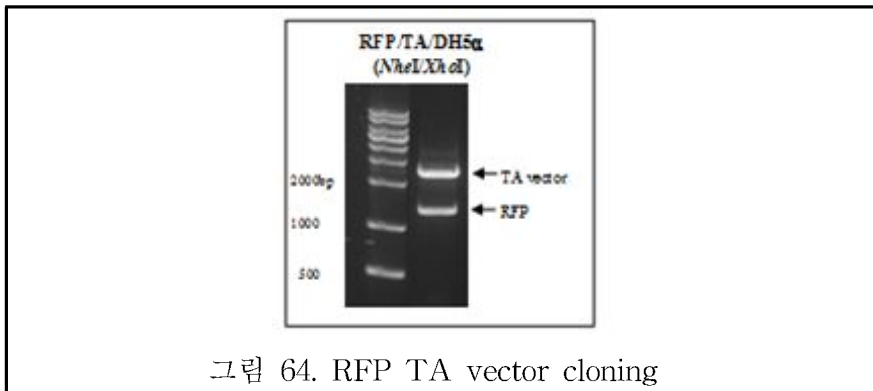
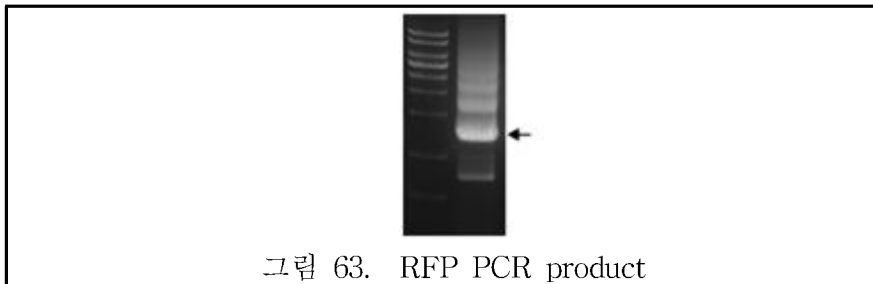


그림 62. 정제된 streptavidin-GFP 형광단백질

(다) RFP (red fluorescence protein)의 제작

① RFP의 PCR 및 TA cloning

RFP의 제작을 위해 Clontech으로부터 pCMV-tdTomato DNA를 구입하여 이를 template으로 하고, F-NheI Tomato primer (5'-ACGCTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3')와 R-Tomato BspEI XhoI primer (5'-ACCTCGAGACCGCCTCCGGACTTGTACAGCTCGTCCAT-3')를 사용하여 PCR[94°C(1분), 58°C(30초), 72°C(1분), 30 cycles]하여 약 1.4kb의 product를 획득하였고 획득한 PCR product를 TA cloning 하였고 RFP가 맞는지 sequencing 분석을 통해 확인하였다.



```

actagcatggtgagcaaggcaggaagtcataaaagttcatgcgcttcaagtgccatgag 60
NheI M V S K G E E V I K E F M R F K V R M E
ggtccatgaaaggccacaggtcgaatcgaggagcagggcagggcccccctacgag 120
G S M N G H E F E I E G E G E G R P Y E
ggcaccagaccgcacactgaaagtgaccagagcggccctccctccactgaggac 180
G T O T A K L K V T K G S P L P F A W D
atcctgtcccaggtcctgtacgactcgaagcgtacgtgaaagaccgccgacatc 240
I L S P O F M Y G S K A Y V K H P A D I
cccgattacaagaagctgtctcccgaagcctcaagtggagcgcgtgatgaattc 300
P D Y K K L S F P E G F K W E R V M N F
gaggacggcgtctgtgaccgtgaccagagctcctccctgagagcggcactgatc 360
E D G G L V T V T Q D S S L O D G T L I
tacaaggtgaagtgcgagcaccactccccccgagcggccgtaatgcaagaagaag 420
Y K V K M R G T N F P P D G P V M Q K K
acatggctggagacgtccaccagcactgtaccggcggcggcgtgctgaaggac 480
T M G W E A S T E R L Y P R D G V L K G
gagatccaccagccctgaaagtgaagcagcggcaccactcctggtgaaagttcaagacc 540
E I H Q A L K L K D G G H Y L V E F K T
atctacatgccaagaagccgtgcaactgcccagcactactactgagaccacactg 600
I Y M A K K P V Q L P G Y Y Y V D T K L
gacatcacctccacaaaggactacacatcgtgaaacagtagagcgtccgaggac 660
D I T S H N E D Y T I V E Q Y E R S E G
cggccaccctctcctggagcatggaccggcaccagcggcggcggcctccggacc 720
R H H L F L L G H G T G S T G S G S S G T
gcctctcggagacaaacatgacgtcatcaaaagttcactcctcgaagtagcc 780
A S S E D N N M A V I K E F M R F K V R
atggaagctcctgaaagcggcaggtcgaagtcgaggcggaggcggaggcggccccc 840
M E G S M N G H E F E I E G E G E G R P
tacgagggcaccagaccgcaagctgaaagtgaaccagggcggccctgacctgccc 900
Y E G T O T A K L K V T K G G P L P F A
tgggacatcctgtccccaggtcctgtacgctcgaagcgtacgtgaagaccggcc 960
W D I L S P O F M Y G S K A Y V K H P A
gacatccccgatacaagaagctcctcccgaagcctcaagtggagcgcgtgatg 1020
D I P D Y K K L S F P E G F K W E R V M
aacttcgagagcggcgtctgtagcgtgaccagagcctcctccctgagagcggcag 1080
N F E D G G L V T V T Q D S S L O D G T
ctgactacaagtgaaagtggcggcaccactccccccgagcggccctaatgcaag 1140
L I Y K V K M R G T N F P P D G P V M Q
aagaagaccatggctggagacgtccaccagcgtctaccggcggcggcggcggcggc 1200
K K T M G W E A S T E R L Y P R D G V L
aagggcggatccaccagcctgaaagcggagcggcggcggcggcggcggcggcggc 1260
K G E I H Q A L K L K D G G H Y L V E F
aagaccatcactgaccagaagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 1320
K T I Y M A K K P V Q L P G Y Y Y V D T
aagctggacatcacctccacaaaggactacacatcgtgaaacagtagagcgtccc 1380
K L D I T S H N E D Y T I V E Q Y E R S
gagggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgg 1428
E G R H H L F L Y G M D E L Y K BspEI XhoI

```

그림 65. RFP sequence

② RFP의 pET-28a cloning 및 발현

Sequence가 확인된 RFP는 *NheI/XhoII*이 처리된 pET-28a vector와 ligation (16°C, 12시간)하여 최종적으로 insert와 pET-28a vector와의 cloning을 확인하였고 이 RFP의 단백질 발현을 위해 단백질 발현용 *E. coli* strain인 BL21DE3, BL21DE3pLysS, Rosseta2DE3, Rosseta2DE3pLysS에 각각 transformation하여 나온 single colony를 LB broth [kanamycin(50 µg/ml)]에 접종한 후 접종한 LB broth의 혼탁 정도가 OD_{A600}=0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 37°C에서 5시간, 28°C에서 20시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 후 1×PBS buffer에 현탁 하였고 이후 2×sample buffer와 잘 혼합한 후 열처리하고 12% SDS PAGE상에서 RFP의 발현(약 51KD)을 확인하였다. 그리고 형광 단백질로서의 발현 유무를 관찰하기 위해서 1mM IPTG가 첨가된 LB agar [kanamycin (50µg/ml)]에 접종하여 37°C와 28°C에서 각각 형광 유무를 관찰하였으며 RFP는 RFP/pET28a/BL21DE3, RFP/pET28a/BL21DE3pLysS, RFP/pET28a/Rosseta2DE3, RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS 균주들에서 모두 발현이 되었으나 특히 RFP/pET28a/Rosseta2DE3, RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS에서 더 발현이 잘되었으며 37°C에서 보다 RFP 형광단백질은 28°C에서 더 잘 관찰되었다.

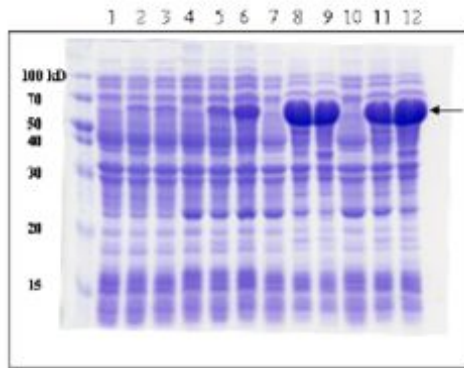


그림 66. RFP 단백질의 발현

Lane 1; RFP/pET28a/BL21DE3, non-induction

2; RFP/pET28a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

3; RFP/pET28a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr

4; RFP/pET28a/BL21DE3pLysS, non-induction

5; RFP/pET28a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

6; RFP/pET28a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr

7; RFP/pET28a/Rosseta2DE3, non-induction

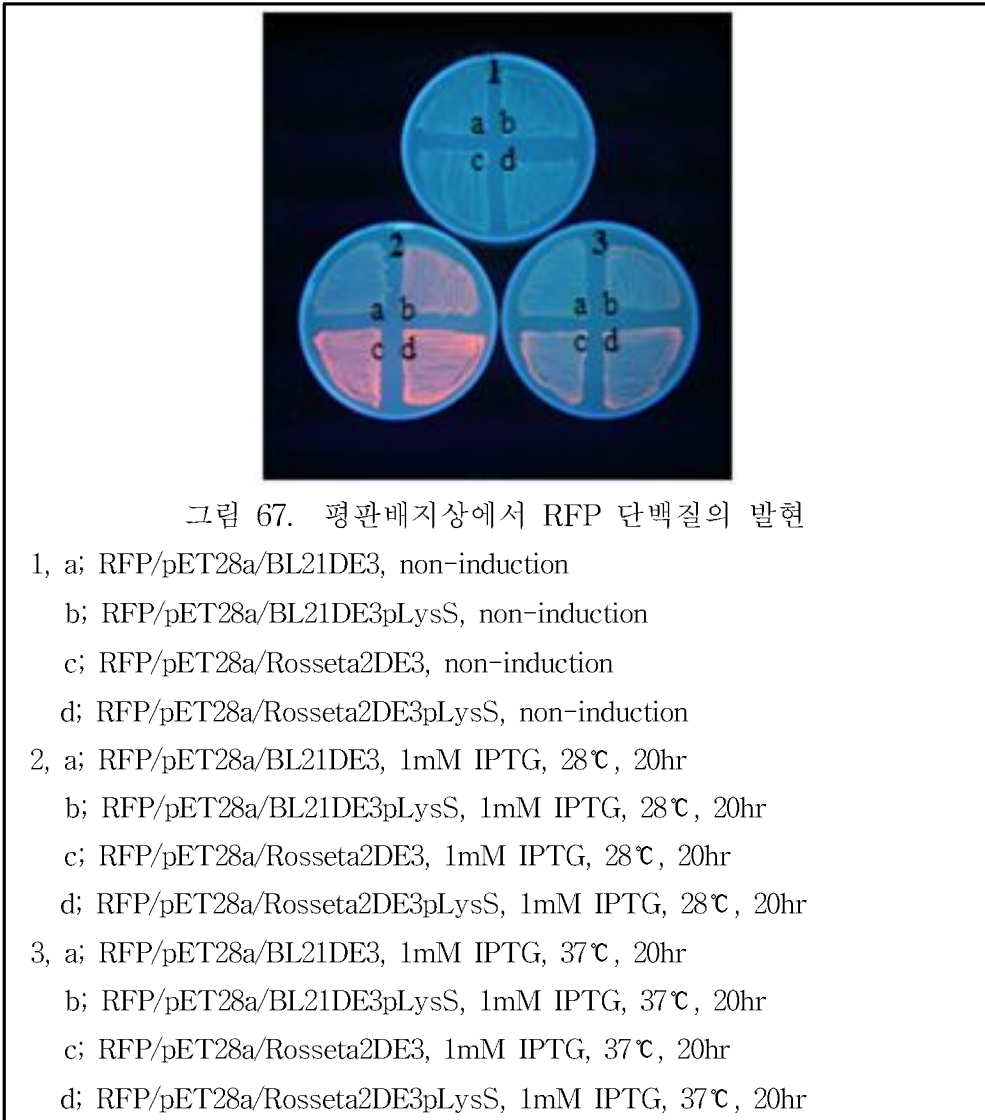
8; RFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

9; RFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr

10; RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction

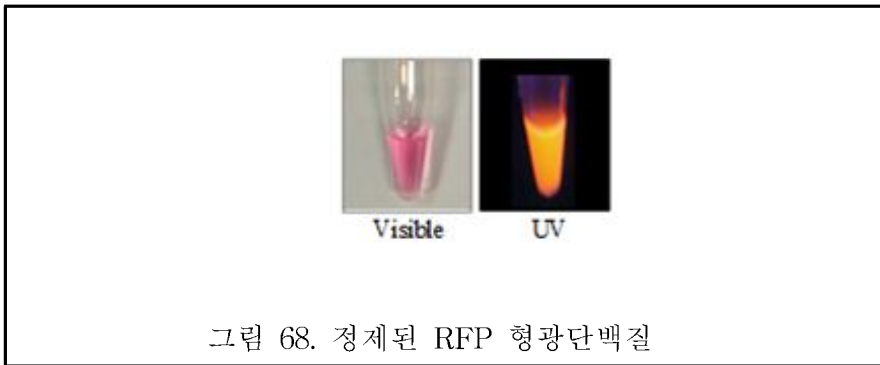
11; RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

12; RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr



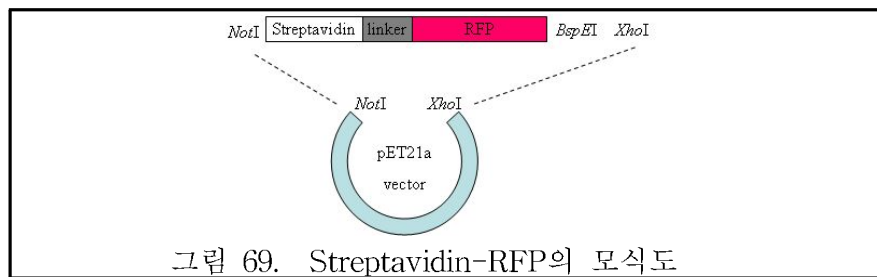
③ RFP의 정제

RFP 형광 단백질을 정제하기 위해 RFP/pET28a/Rosseta2DE3 균주를 LB broth [ampicilin (100 μ g/ml)]에 접종하여 OD_{A600}=0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 28℃, 20시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 cell은 native buffer에 현탁 하여 파쇄한 후 Ni-NTA column에서 washing buffer로 3회 washing 한 후 elution buffer로 정제 한 후 UV light에서 형광을 관찰하였다.



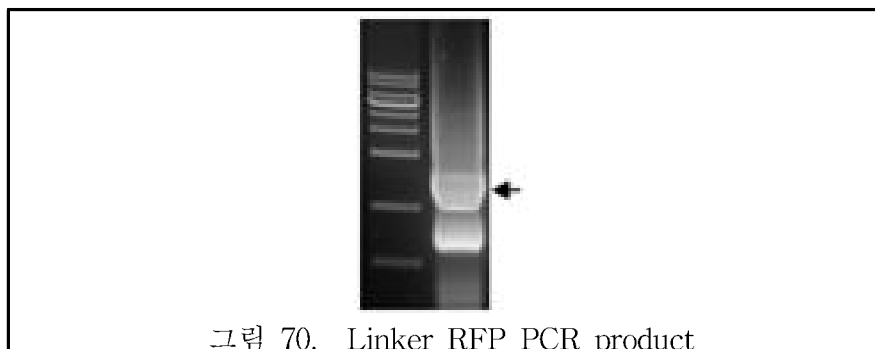
(라) Streptavidin-RFP 제작

Streptavidin-RFP 제작을 위한 전체적인 모식도는 아래 그림과 같다.



① Linker RFP 제작

Streptavidin-RFP 제작을 위해 RFP clone을 template으로 하여 F-Linker Tomato primer (5'-ATACCGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGA TGGTGAGCAAGGGCGAG-3')와 R-Tomato BspEI XhoI primer (5'-ACCTCGAGACCGC CTCCGGACTTGTACAGCTCGTCCAT-3')를 사용하여 PCR (95°C 1분, 58°C 30초, 72°C 1분, 30 cycles)하여 약 1.45kb의 PCR product를 획득하였고 TA cloning을 통해 획득한 plasmid DNA로 sequencing 분석을 하여 linker RFP가 제대로 PCR 되었는지 확인하였다.



accggt gaggcagttcaagcgaagatggtctgacgagtgagcagtcg	atggtgagcaaggcgaaggagtcacaaaggttcacgcttcaagstgcgcacgag	60
Age I	Linker	M V S K G E E V I K E F M R F K V R M E
		ggctccatgaacgcccacagttcgagatcgaggcgaaggcgaaggccgcccctacgag
		G S M N G H E F E I E G E G E G R P Y E
		ggcaccagaccgccaaagctgaaagtgaacaaaggcggcccctgcccttcgctggagc
		G T O T A K L K V T K G G P L P F A W D
		atcctgtccccagttcatgtacggctccaaggctacgtgaagcaccgccgacatc
		I L S P Q F M Y G S K A Y V K H P A D I
		cccgatataagaagctgtcctccccgaaggctcaagtggaagcgcgtgatgaactc
		P D Y K K L S F P E G F K W E R V M N F
		gagagcggcgtctgtagcgtgaccagagctcctcctcgaagcggcaccgtgatc
		E D G G L V T V T Q D S S L O D G T L I
		tacaagtgaaagtgcggcaccactccccggcggcccgtaatgcagaagaag
		Y K V K M R G T N F P P D G P V M O K K
		accatggctgggaagcctccaccgagcctgtaccggcgaagcggcgtgctgaaggc
		T M G W E A S T E R L Y P R D G V L K G
		gagatccaccagccctgaagctgaaggcggcggcactacctggtgaagttcaagacc
		E I H Q A L K L K D G G H Y L V E F K T
		atctacatgaccagaagccgtgcaactgcccggctactactacgtgaacccaagctg
		I Y M A K K P V Q L P G Y Y V V D T K L
		gacatcacctccacagcgaagctacaccatcgtggaacagtagcggcctcgaaggc
		D I T S H N E D Y T I V E Q Y E R S E G
		cgcaccacctgttctggggcagcggcaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
		R H H L F L G H G T G S T G S G S S G T
		ggctctccgaagcacaacatggcgtcatcaaaagttcatgcttcaagstgcgcacg
		A S S E D N N M A V I K E F M R F K V R
		atggaaggctccatgaacggcagagttcgagatcgaggcgaaggcgaaggccgccc
		M E G S M N G H E F E I E G E G E G R P
		tacgaaggaccagaccgcaagctgaaagtgaacaaaggcggcccctgcccttcgcc
		Y E G T O T A K L K V T K G G P L P F A
		ggagcatcctgtccccagttcatgtacggctccaaggctacgtgaagcaccggc
		W D I L S P Q F M Y G S K A Y V K H P A
		gacatccccgatataagaagctgtcctccccgaaggctcaagtggaagcgcgtgatg
		D I P D Y K K L S F P E G F K W E R V M
		aactcgaagcggcgtctgtagcgtgaccagagctcctcctcgaagcggcaccg
		N F E D G G L V T V T O D S S L O D G T
		ctgactcaagtgaaagtgcggcaccactccccggcggcccgtaatgcag
		L I Y K V K M R G T N F P P D G P V M O
		aagaagaccatggctgggaagcctccaccgagcctgtaccggcggcggcggcggcggcggc
		K K T M G W E A S T E R L Y P R D G V L
		aaggcgaagatccaccagcctgaagctgaaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
		K G E I H Q A L K L K D G G H Y L V E F
		aagaccatctacatgcccagaagccgtgcaactgcccggctactactacgtgaacac
		K T I Y M A K K P V Q L P G Y Y V V D T
		agtgtagcatcacctccacagcgaagctacaccatcgtggaacagtagcggcctc
		K L D I T S H N E D Y T I V E Q Y E R S
		gaggccaccaccaccttctgtacggcatggaagctgtaccagttccgaagcggctccgag
		E G R H H L F L Y G M D E L Y K BspEI XhoI

그림 71. Linker RFP sequence

② Streptavidin-RFP의 TA cloning과 pET-21a cloning 및 발현

Streptavidin 염기서열을 가진 plasmid DNA를 제한효소 *BspEI*과 *XhoI*로 처리하여 나온 약 0.5 kb의 fragmen와 TA-vector에 cloning 되어 있는 linker RFP에 제한효소 *AgeI*과 *XhoI*을 처리하여 나온 약 1.45kb fragment를 16°C에서 ligation 시킨 후 *E. coli* DH5a에 transformation하여 ampicilin (100µg/ml)이 함유된 LB agar 배지에서 성장하는 colony들 중에서 colony PCR를 통해 해당 크기의 fragment DNA를 가진 colony들을 확보한 후 (약 1.95kb) 해당 colony의 plasmid DNA에 제한효소 *NotI/XhoI*을 처리하여 최종적으로 insert[약 1.95kb = streptavidin (0.5kb) + linker RFP (1.45kb)]와 TA vector와의 cloning 확인을 하였다.

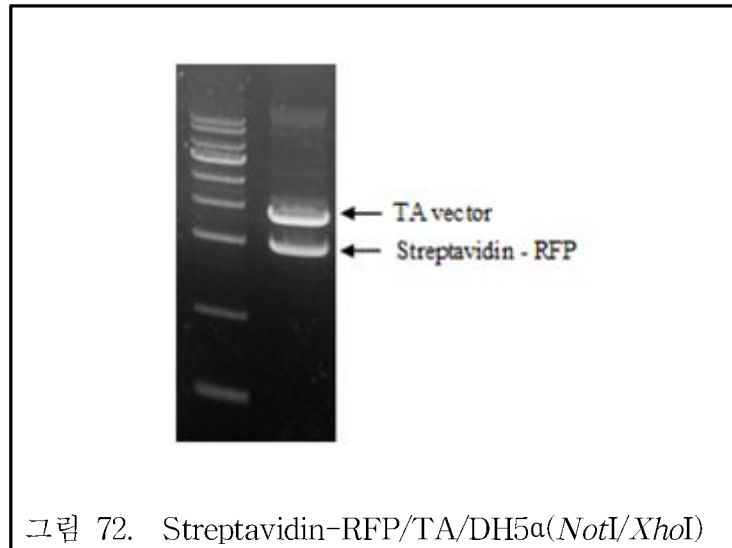


그림 72. Streptavidin-RFP/TA/DH5α(*NotI/XhoI*)

확인된 streptavidin-RFP는 *NotI/XhoII*이 처리된 pET-28a vector와 ligation (16°C, 12시간)하여 최종적으로 insert와 pET-28a vector와의 cloning을 확인하였고 이 streptavidin-RFP의 단백질 발현을 위해 단백질 발현용 *E. coli* strain인 BL21DE3, BL21DE3pLysS, Rosseta2DE3, Rosseta2DE3pLysS에 각각 transformation하여 나온 single colony를 LB broth [kanamycin(50 µg/ml)]에 접종한 후 접종한 LB broth의 혼탁 정도가 OD_{A600}=0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 37°C에서 5시간, 28°C에서 20시간, 20°C에서 36시간 각각 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 후 1×PBS buffer에 현탁 하였고 이후 2×sample buffer와 잘 혼합한 후 열처리하고 12% SDS PAGE상에서 streptavidin-RFP의 발현 (약 72 KD)을 확인하였는데 Streptavidin-RFP/pET21a/BL21DE3pLysS에서만 streptavidin-RFP의 발현이 확인되었다. 그리고 형광 단백질로서의 발현 유무를 관찰하기 위해서 1mM IPTG가 첨가된 LB agar [kanamycin(50µg/ml)]에 접종하여 37°C, 28°C, 20°C에서 각각 형광 유무를 관찰하였다. 그 결과 28°C, 20°C에서 형광이 관찰되었으나 20°C에서 형광의 정도가 강해 앞으로의 streptavidin-RFP 단백질 발현 및 정제의 온도 조건으로서는 20°C가 최적인 것으로 생각된다.

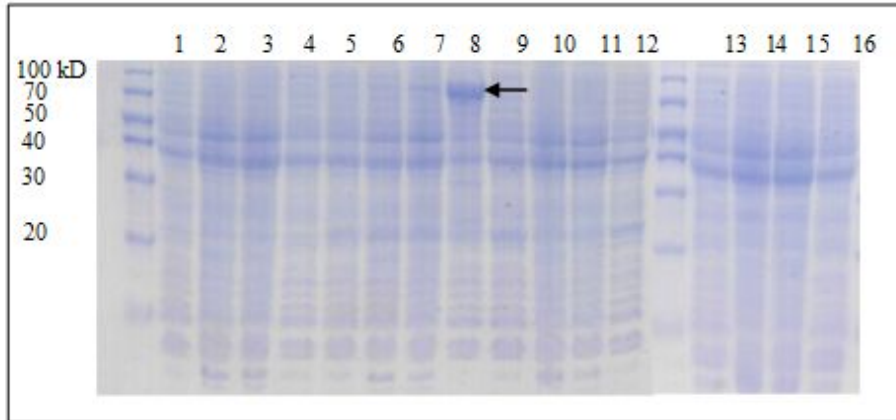


그림 73. Streptavidin-RFP 단백질의 발현

Lane 1; Streptavidin-RFP/pET21a/BL21DE3, non-induction

2; Streptavidin-RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 20℃, 36hr

3; Streptavidin-RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

4; Streptavidin-RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr

5; Streptavidin-RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, non-induction

6; Streptavidin-RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20℃, 36hr

7; Streptavidin-RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

8; Streptavidin-RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr

9; Streptavidin-RFP/pET21a/Rosseta2DE3, non-induction

10; Streptavidin-RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20℃, 36hr

11; Streptavidin-RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

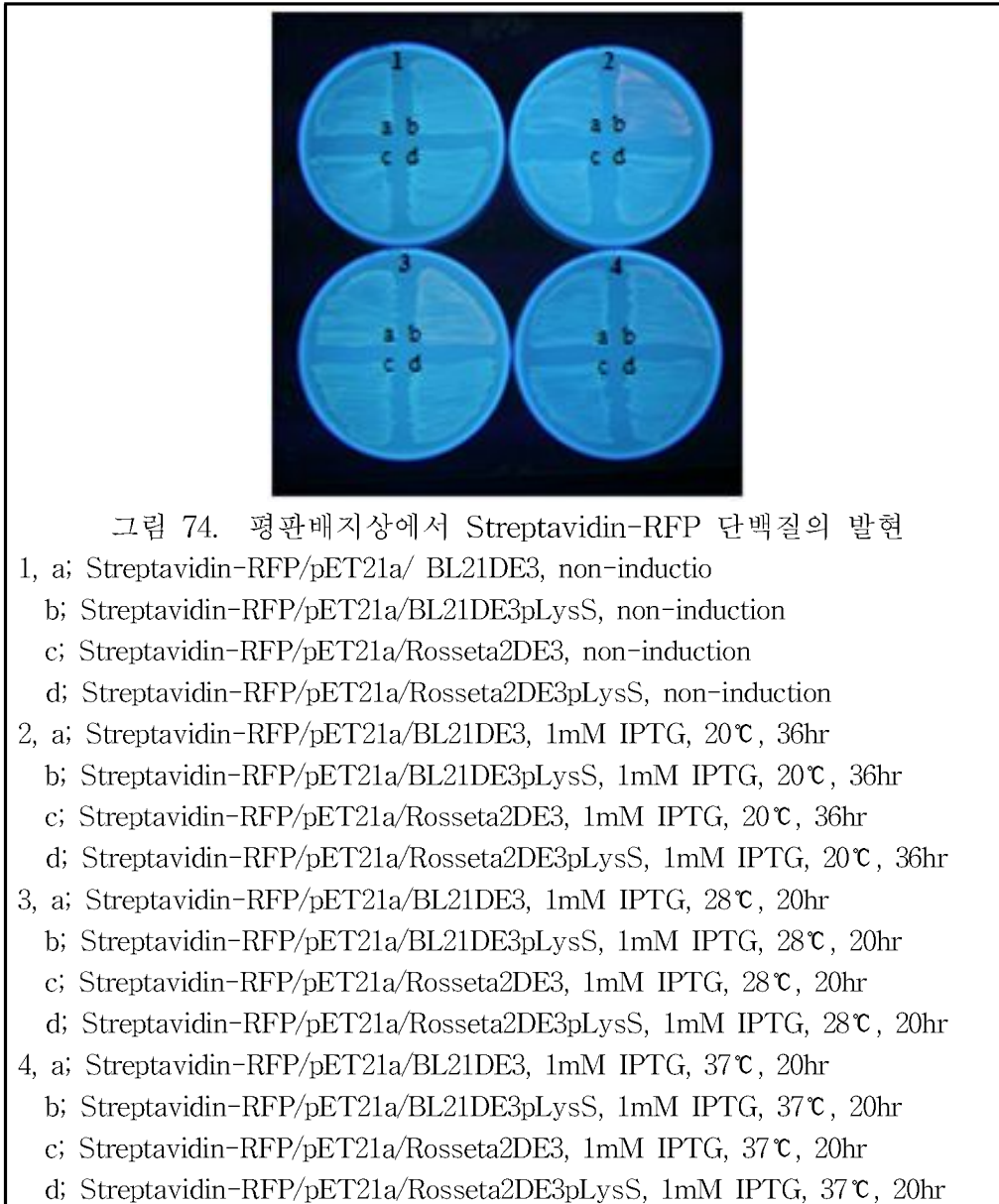
12; Streptavidin-RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr

13; Streptavidin-RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction

14; Streptavidin-RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20℃, 36hr

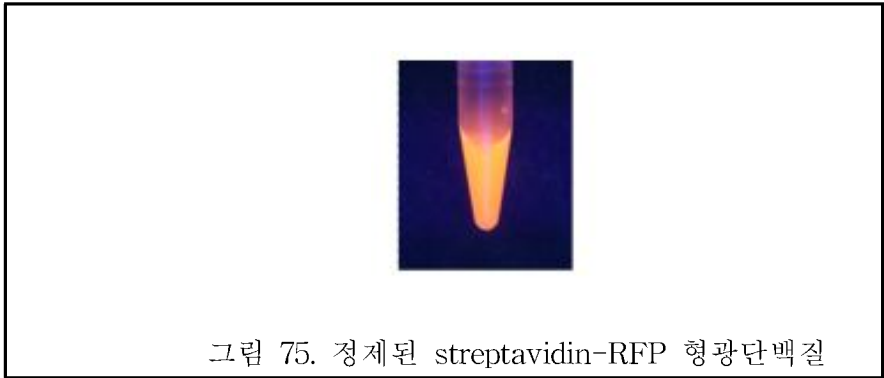
15; Streptavidin-RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

16; Streptavidin-RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr



③ Streptavidin-RFP의 정제

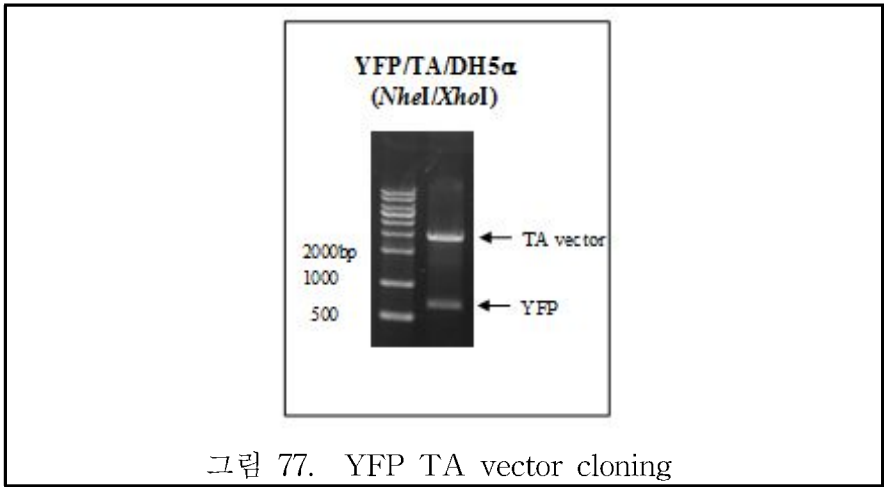
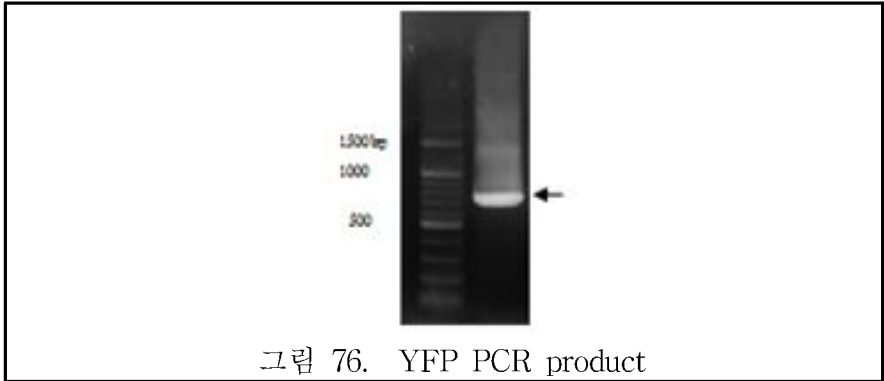
Streptavidin-GFP 형광 단백질을 정제하기 위해 streptavidin-RFP/pET21a/BL21DE3pLysS 균주를 LB broth [ampicilin (100 μ g/ml)]에 접종하여 OD_{A600}=0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 20℃, 36시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 cell은 native buffer 에 현탁하여 파쇄한 후 Ni-NTA column에서 washing buffer로 3회 washing 한 후 elution buffer로 정제한 후 UV light에서 형광을 관찰하였다.



(마) YFP (yellow fluorescence protein)의 제작

① YFP의 PCR 및 TA cloning

RFP의 제작을 위해 EVROGEN으로부터 pPhi-Yellow-B DNA를 구입하여 이를 template 으로 하고, F-NheI PhiY primer (5'-ACGCTAGCATGAGAGGATCGGGATCC-3')와 R-PhiY BspEI XhoI primer (5'-ACCTCGAGACCGCCTCCGGACATGTAGGTCTTGC GGCA-3')를 사용하여 PCR [94°C(1분), 58°C(30초), 72°C(1분), 30 cycles]하여 0.7kb의 product를 획득 하였고 획득한 PCR product를 TA cloning 하였으며 YFP가 맞는지 sequencing 분석을 통해 확인 하였다.



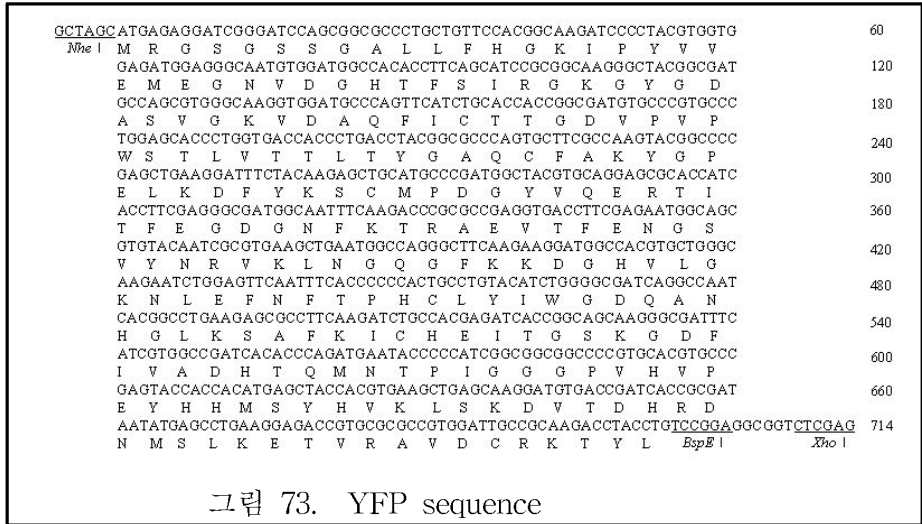


그림 73. YFP sequence

② YFP의 pET-28a cloning 및 발현

Sequence가 확인된 YFP는 *Nhe*I/*Xho*II이 처리된 pET-28a vector와 ligation (16°C, 12시간)하여 최종적으로 insert와 pET-28a vector와의 cloning을 확인하였고 이 YFP의 단백질 발현을 위해 단백질 발현용 *E. coli* strain인 BL21DE3, BL21DE3pLysS, Rosseta2DE3, Rosseta2DE3pLysS에 각각 transformation하여 나온 single colony를 LB broth [kanamycin (50µg/ml)]에 접종한 후 접종한 LB broth의 혼탁 정도가 OD_{A600}=0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 37°C에서 5시간, 28°C에서 20시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다(8000rpm, 20분). 수거한 후 1×PBS buffer에 현탁 하였고 이후 2×sample buffer와 잘 혼합한 후 열처리(80~90°C, 5분)하고 12% SDS PAGE상에서 YFP의 발현 (약 27KD)을 YFP/pET28a/BL21DE3, YFP/pET28a/BL21DE3pLysS, YFP/pET28a/Rosseta2DE3, YFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS에서 모두 확인 하였다. 그리고 형광 단백질로서의 발현 유무를 관찰하기 위해서 1mM IPTG가 첨가된 LB agar [kanamycin (50µg/ml)]에 접종하여 37°C와 28°C 형광 유무를 관찰한 결과 28°C에서 배양했을 때 형광 단백질이 더 잘 관찰되었다.

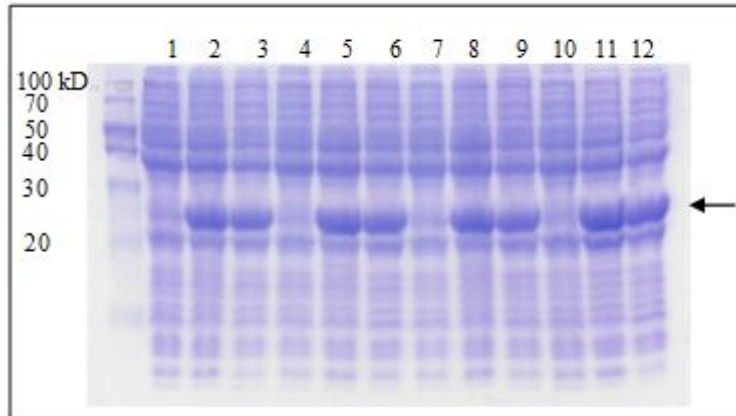


그림 79. YFP 단백질의 발현

Lane 1; YFP/pET28a/BL21DE3, non-induction

2; YFP/pET28a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

3; YFP/pET28a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr

4; YFP/pET28a/BL21DE3pLysS, non-induction

5; YFP/pET28a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

6; YFP/pET28a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr

7; YFP/pET28a/Rosseta2DE3, non-induction

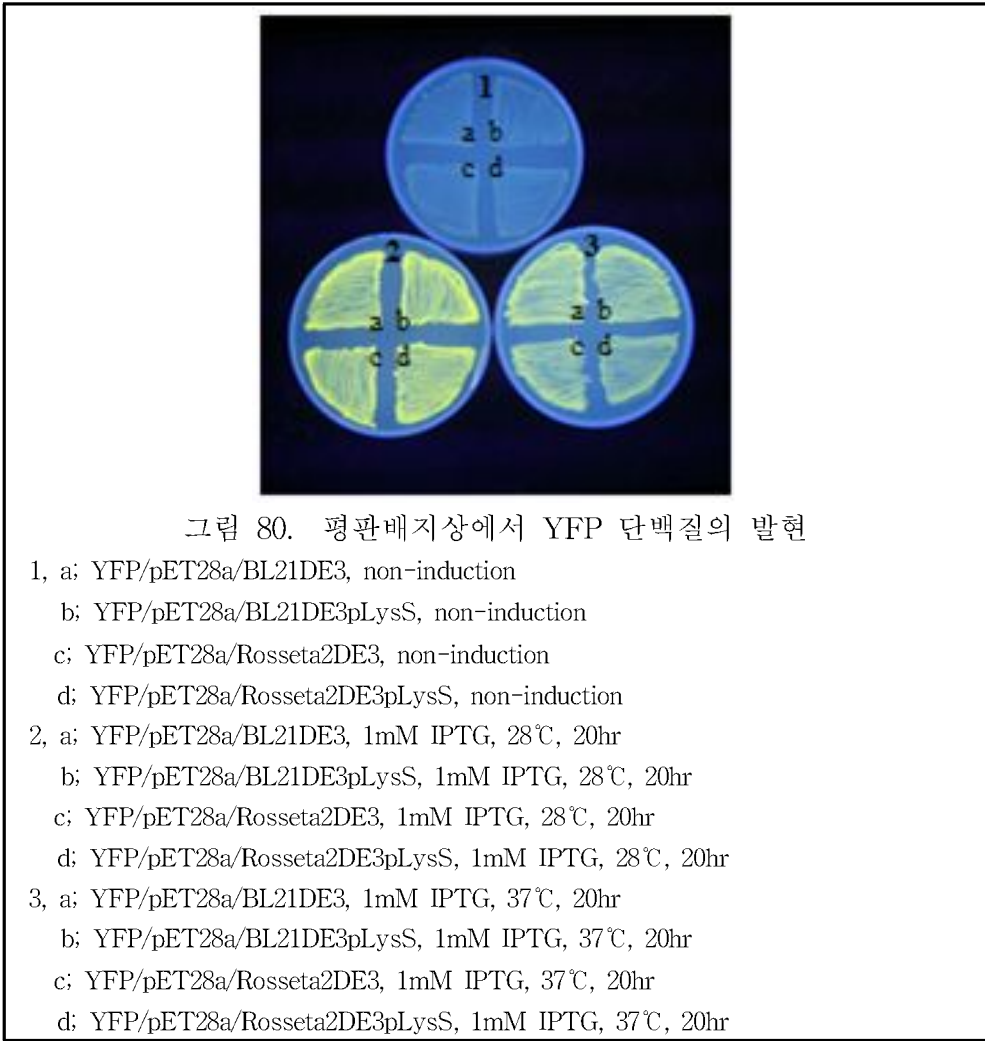
8; YFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

9; YFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr

10; YFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction

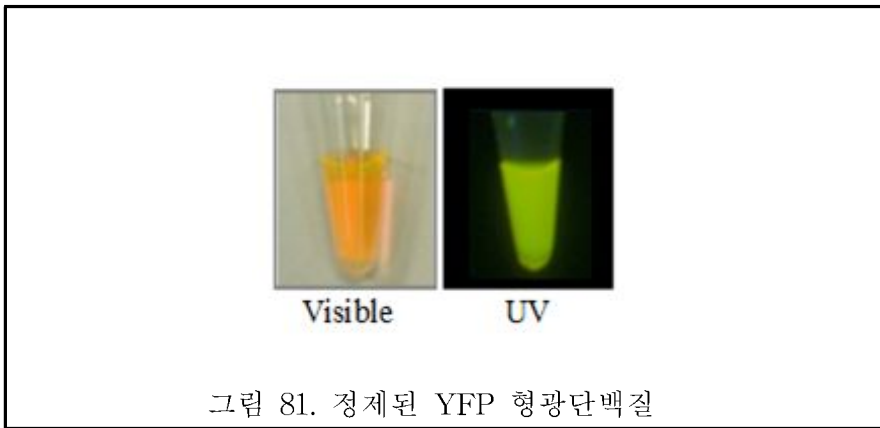
11; YFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr

12; YFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr



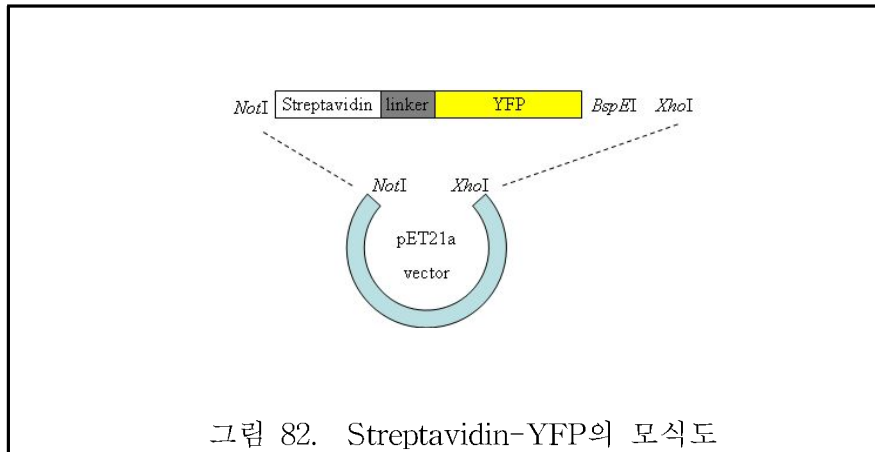
③ YFP의 정제

YFP 형광 단백질을 정제하기 위해 YFP/pET28a/BL21DE3pLysS 균주를 LB broth [ampicilin (100 μ g/ml)]에 접종하여 OD_{A600}=0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 28°C, 20시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다(8000rpm, 20분). 수거한 cell은 native buffer에 현탁 하여 파쇄한 후 Ni-NTA column에서 washing buffer로 3회 washing 한 후 elution buffer로 정제 한 후 UV light에서 형광을 관찰하였다.



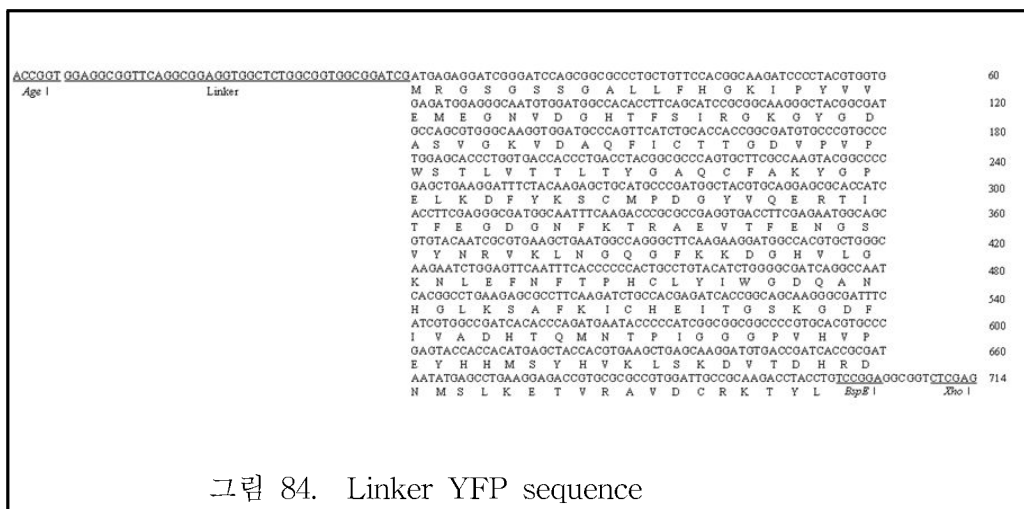
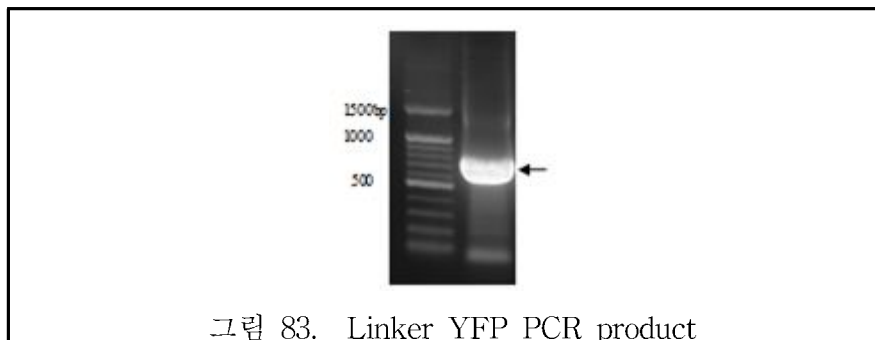
(바) Streptavidin-YFP 제작

Streptavidin-YFP 제작을 위한 전체적인 모식도는 아래 그림과 같다.



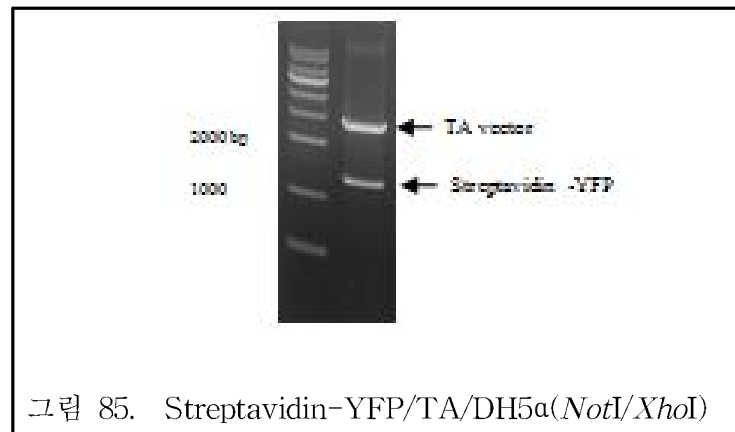
① Linker YFP 제작

Streptavidin-YFP 제작을 위해 YFP clone을 template으로 하여 F-Linker PhiY primer (5'-ATACCGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG ATGAGAGGATCGGGATCC-3')와 R-PhiY BspEI XhoI primer (5'-ACCTCGAGACCGCC TCCGGACATGTAGGTCTTGC GGCA-3')를 사용하여 PCR [94°C(1분), 58°C(30초), 72°C(1분), 30 cycles]하여 약 0.75kb의 PCR product를 획득하였고 TA cloning을 통해 획득한 plasmid DNA로 sequencing 분석을 하여 linker YFP가 제대로 PCR 되었는지 확인하였다.



② Streptavidin-YFP의 TA cloning과 pET-21a cloning 및 발현

Streptavidin 염기서열을 가진 plasmid DNA를 제한효소 *BspEI*과 *XhoI*로 처리하여 나온 약 0.5 kb의 fragmen와 TA-vector에 cloning 되어 있는 linker YFP에 제한효소 *AgeI*과 *XhoI*을 처리하여 나온 약 0.75kb fragment를 16°C에서 ligation 시킨 후 *E. coli* DH5a에 transformation하여 ampicilin (100µg/ml)이 함유된 LB agar 배지에서 성장하는 colony들 중에서 colony PCR를 통해 해당 크기의 fragment DNA를 가진 colony들을 확보한 후 (약 1.25kb) 해당 colony의 plasmid DNA에 제한효소 *NotI/XhoI*을 처리하여 최종적으로 insert [약 1.25kb = streptavidin (0.5kb) + linker YFP (0.75kb)]와 TA vector와의 cloning 확인을 하였다.



확인된 streptavidin-YFP는 *NotI/XhoII*이 처리된 pET-28a vector와 ligation (16°C, 12시간)하여 최종적으로 insert와 pET-28a vector와의 cloning을 확인하였고 이 streptavidin-YFP의 단백질 발현을 위해 단백질 발현용 *E. coli* strain인 BL21 DE3, BL21 DE3 pLysS, Rosseta2 DE3, Rosseta2 DE3 pLysS에 각각 transformation하여 나온 single colony를 LB broth [kanamycin (50µg/ml)]에 접종한 후 접종한 LB broth의 혼탁 정도가 OD_{A600} ≒ 0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 37°C에서 5시간, 28°C에서 20시간, 20°C에서 36시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 후 1×PBS buffer에 현탁하였고 이후 2×sample buffer와 잘 혼합한 후 열처리하고 12% SDS PAGE상에서 streptavidin-YFP의 발현 (약 46 KD)을 streptavidin-YFP/pET21a/BL21DE3, streptavidin-YFP/pET21a/Rosseta2DE3, streptavidin-YFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS에서 확인하였다. 그리고 형광 단백질로서의 발현 유무를 관찰하기 위해서 1mM IPTG가 첨가된 LB agar[kanamycin (50µg/ml)]에 접종하여 37°C, 28°C, 20°C에서 각각 형광 유무를 관찰한 결과 단백질은 37°C에서 가장 발현이 좋았으나 형광의 정도는 20°C에서 배양한 것이 가장 우수함을 알 수 있었다.

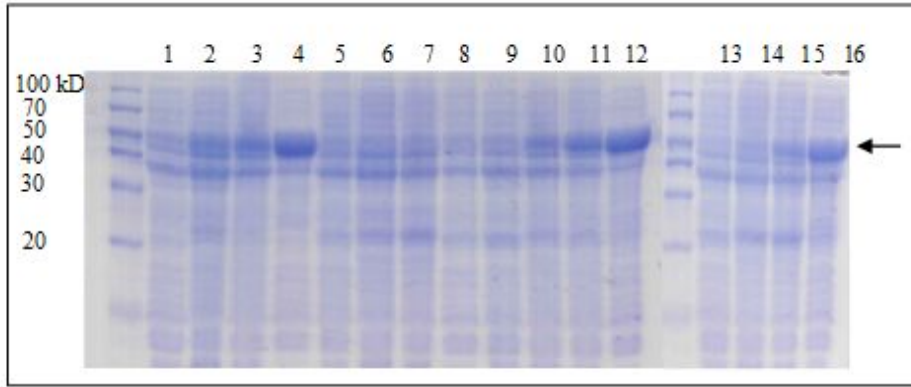
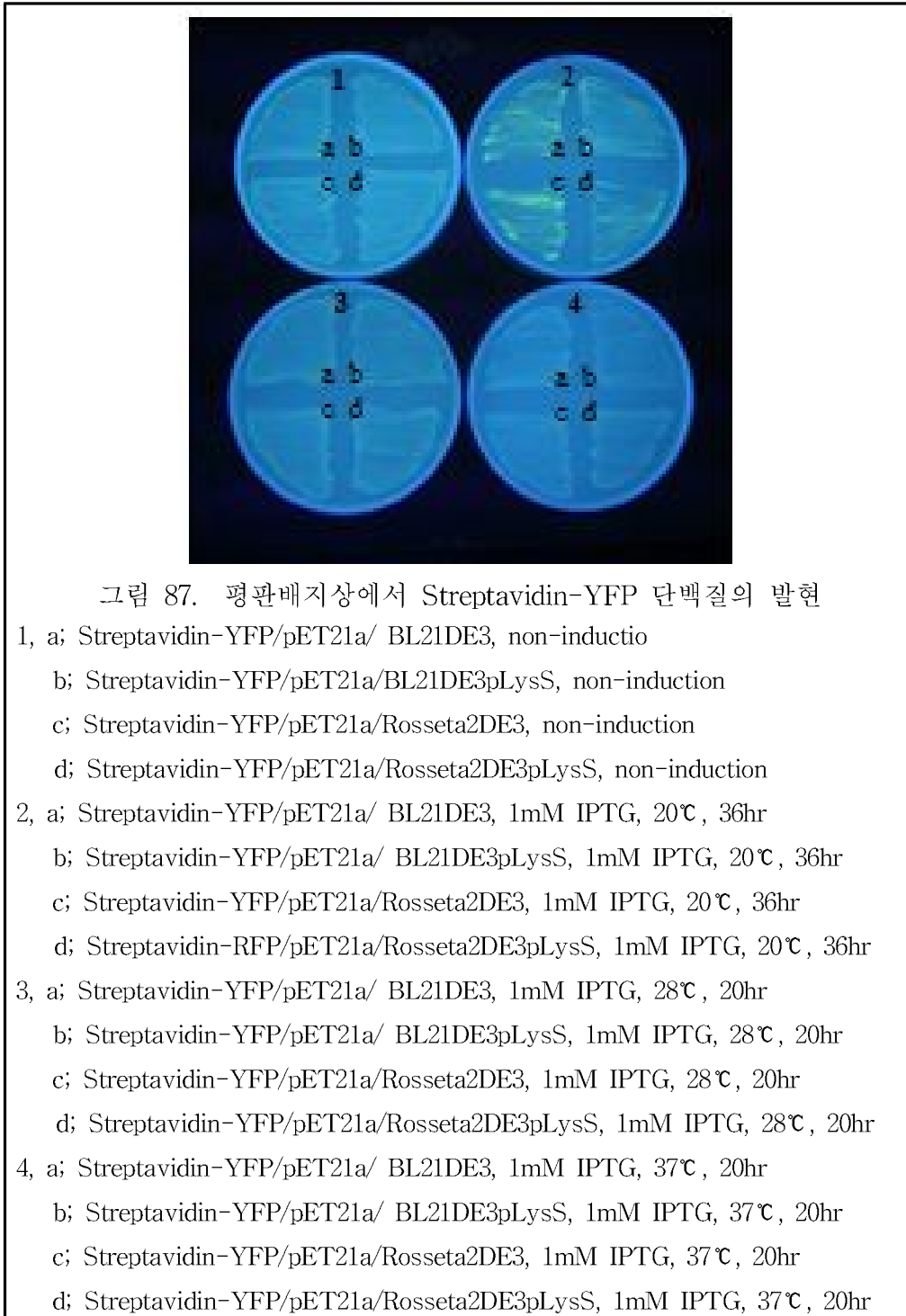


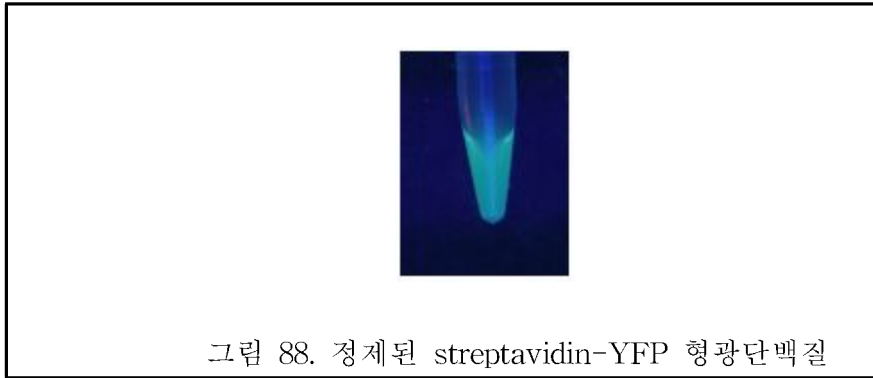
그림 86. Streptavidin-YFP 단백질의 발현

- Lane 1; Streptavidin-YFP/pET21a/BL21DE3, non-induction
 2; Streptavidin-YFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
 3; Streptavidin-YFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
 4; Streptavidin-YFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr
 5; Streptavidin-YFP/pET21a/BL21DE3pLysS, non-induction
 6; Streptavidin-YFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
 7; Streptavidin-YFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
 8; Streptavidin-YFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr
 9; Streptavidin-YFP/pET21a/Rosseta2DE3, non-induction
 10; Streptavidin-YFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
 11; Streptavidin-YFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
 12; Streptavidin-YFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr
 13; Streptavidin-YFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
 14; Streptavidin-YFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
 15; Streptavidin-YFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
 16; Streptavidin-YFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr



③ Streptavidin-YFP의 정제

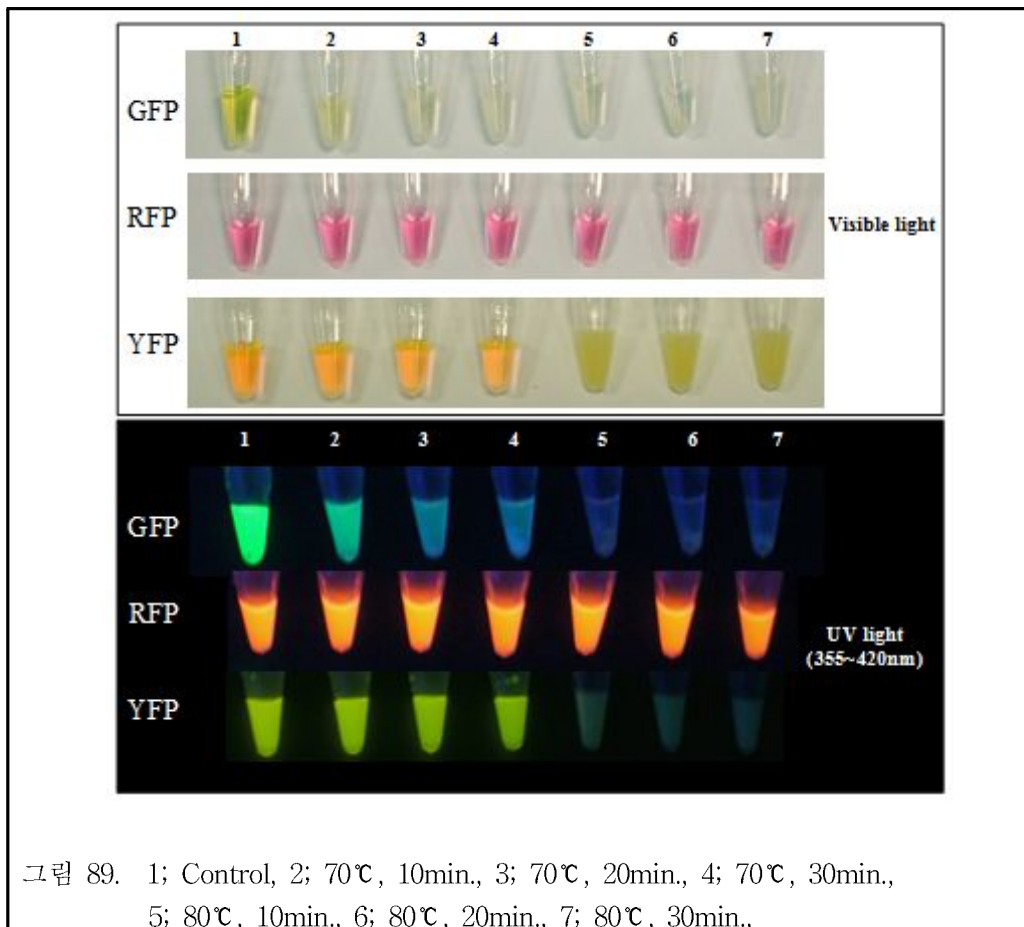
Streptavidin-YFP 형광 단백질을 정제하기 위해 streptavidin-YFP/pET21a/BL21DE3 균주를 LB broth [ampicilin (100 μ g/ml)]에 접종하여 OD_{A600} = 0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 20℃, 36시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 cell은 native buffer에 현탁하여 파쇄한 후 Ni-NTA column에서 washing buffer로 3회 washing 한 후 elution buffer로 정제한 후 UV light에서 형광을 관찰 하였다.



(3) 형광 단백질의 평가

(가) GFP, RFP 와 YFP의 열 내성 검정

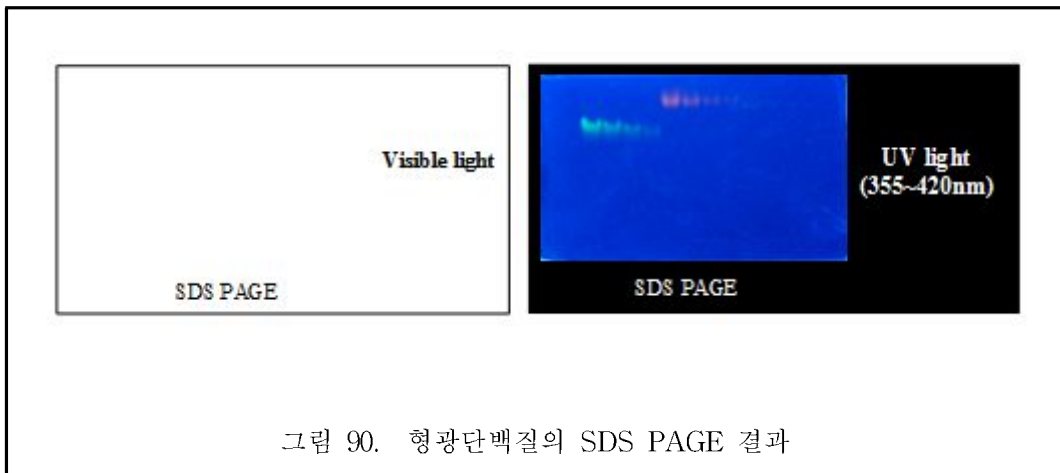
정제된 각각의 형광단백질을 1mg/ml로 농도를 일정하게 맞추후 70℃, 80℃에서 10분, 20분, 30분간 처리하여 각 형광단백질이 열에 견디는 내성을 검정한 결과 RFP를 제외한 GFP, YFP는 열에 안정적이지 않은 것으로 판단되었다.



(나) GFP, RFP 와 YFP의 SDS-PAGE 검정

정제된 각각의 형광단백질을 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.125mg/ml, 0.075mg/ml로 농도를 일정하게

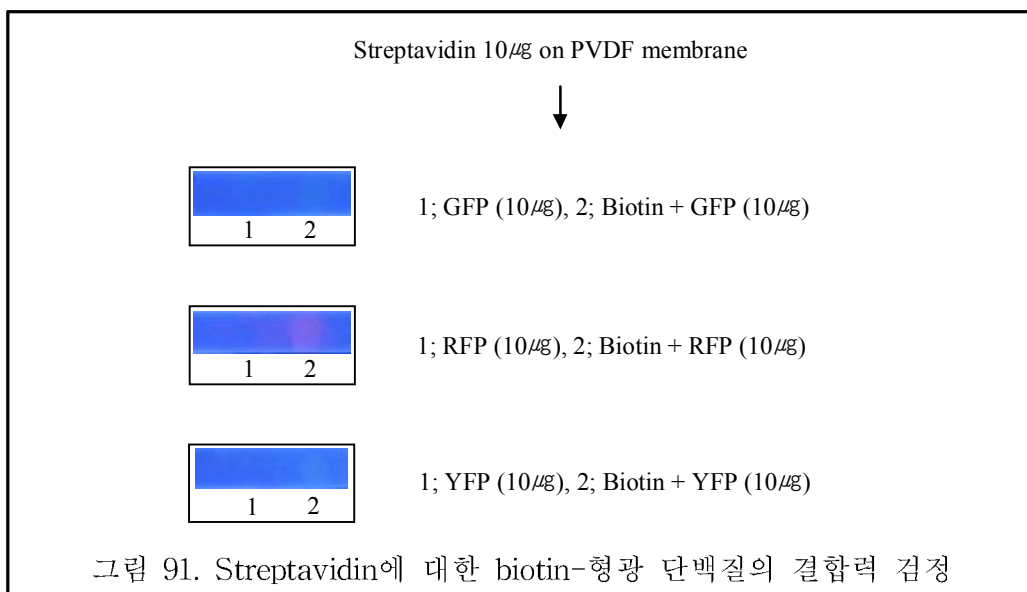
맞춘 후 2×sample buffer와 잘 혼합한 후 12% SDS PAGE상에서 각각의 형광단백질의 형광을 관찰하였는데 YFP를 제외한 GFP와 RFP는 SDS PAGE상에서 육안 및 UV 하에서 형광이 잘 관찰되었다.



(다) Biotin과 streptavidin-GFP, RFP, YFP의 결합력 검정

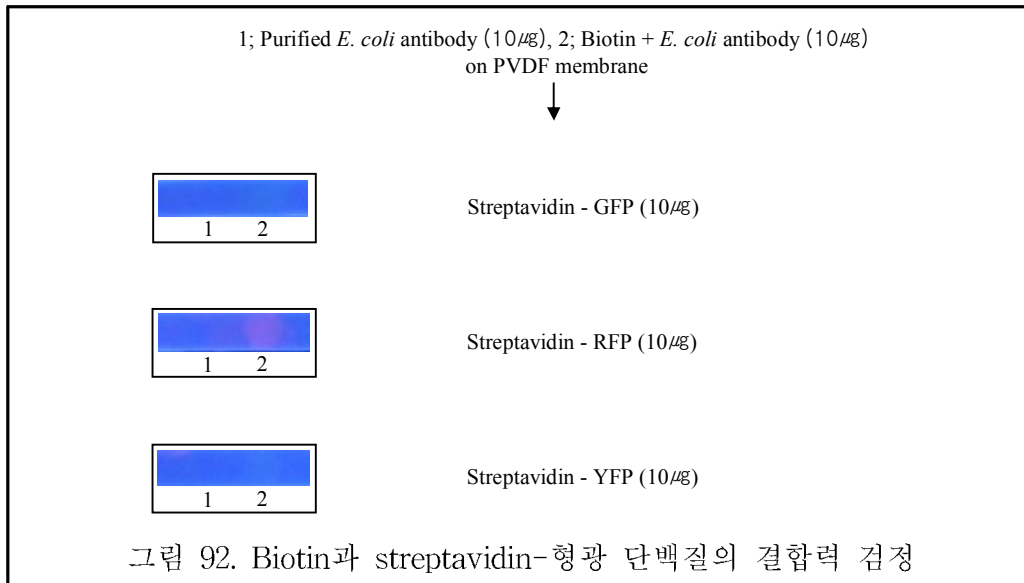
① Streptavidin과 biotin-형광 단백질의 결합력 검정

PVDF membrane에 정제된 streptavidin을 10 μ g 떨어뜨린 후 약 5분간 건조 후 5% skim milk로 1시간 blocking 한 후에 PBST (PBS + tween 0.5%) buffer로 washing 하고 biotin이 붙은 GFP, RFP, YFP 단백질을 각각 10 μ g 떨어뜨리고 (control로 biotin이 결합되지 않은 GFP, RFP, YFP 이용) 약 5분 간 건조 후 다시 PBST로 washing하여 UV 하에서 관찰하였다. 그 결과 biotin과 RFP의 결합력이 제일 우수한 것을 관찰 할 수 있었다.



② Biotin과 streptavidin-GFP, RFP, YFP의 결합력 검증

PVDF membrane에 정제하여 biotin이 결합된 *E. coli* 항체 (control로 biotin이 결합되지 않은 *E. coli* 항체 사용)를 10 μ g 떨어뜨린 후 약 5분간 건조 후 5% skim milk로 1시간 blocking 한 후에 PBST (PBS + tween 0.5%) buffer로 washing 하고 streptavidin-GFP, RFP, YFP 단백질을 각각 10 μ g 떨어뜨리고 약 5분 간 건조 후 다시 PBST로 washing하여 UV 하에서 관찰하였다. 그 결과 위의 결과와 마찬가지로 biotin과 streptavidin-RFP의 결합력이 제일 우수한 것을 관찰 할 수 있었다.



(4) Single domain antibody

(가) Single domain antibody의 정의

1993년 Hamers Casterman등에 의해 최초 보고된 항체로 지구상에 존재하는 척추동물의 항체 중 낙타과 (라마, 단봉낙타, 쌍봉낙타)와 상어에 유일하게 존재하는 항체이며 기존의 항체와 달리 heavy chain으로만 구성되어 있으며 항원과 결합하는 부위 (VHH region)를 유전자 재조합 기술등으로 활용하여 제작한 최소단위 (15kDa)의 유전자 재조합 항체를 single domain antibody라고 한다.

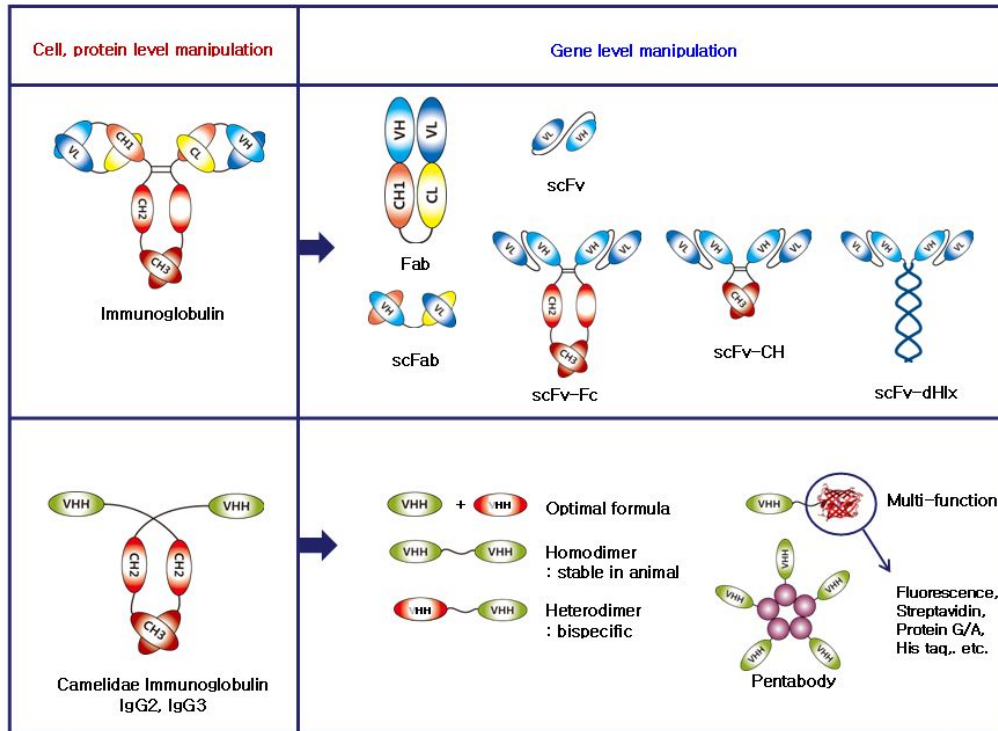


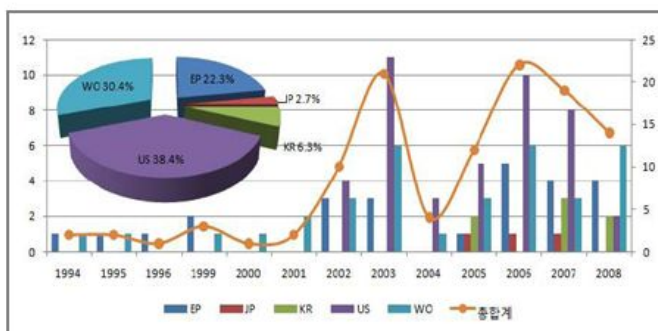
그림 93. Conventional antibody와 single domain antibody의 구조 모식도 및 활용 모식도

위 그림에서 확인할 수 있듯이 기존 항체 (conventional antibody)의 경우 heavy chain과 light chain이 함께 항원결합부위를 구성하므로 이를 활용한 재조합 항체의 제작은 heavy chain과 light chain의 항원결합부위 (FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4, FR: frame region, CDR: complementarity determining region)를 각기 유전자 증폭하여 재차 융합시키는 복잡한 과정을 통해 이루어진다. 그러나 상기와 같은 유전자 재조합 항체들의 제작 과정은 상당히 복잡하고, 광범위한 유전자 라이브러리 구축이 매우 어려우며, 다양한 기능성 단백질 유전자와의 유전자 수준에서의 융합이 또한 매우 복잡하다는 단점이 있으며 single domain antibody의 경우 15 kDa 정도로 매우 작은 크기를 가지는데 반해 기존의 항체는 35 kDa 이상의 크기를 가져 손쉽게 다루기가 불편하다. 이런 점을 근거로 아래의 표에 single domain antibody의 특징들을 정리하였다.

표 3. Single domain antibody의 특징

장점	분자적 배경
유전자 조작 통한 제작 용이성	single domain으로만 구성
big size gene library 활용성	VH domain만 필요 (VL domain 제외)
multivalent format 제작 용이	VH domain만 필요하여 확장적 linker 설계 가능
높은 물리/화학적 안정성	pH, 온도에 극단적으로 안정하여 다양한 환경 적용 가능. 다양한 분해효소에 대한 높은 저항성
높은 수용성, 단분자 행동성 (상호간 응집 없음)	매우 높은 친수성을 지님
hidden antigenic site에 대한 높은 인식력	크기가 작고, CDR3의 높은 유연성
빠른 조직 투과 및 제거	작은 크기 (15kDa), 기존항체 (150kDa) 1/10, scFv (30 kDa) 1/2
높은 발현성	대장균 및 yeast 등에서 다량 발현됨. 최근 담배식물인 <i>Nicotiana benthamiana</i> 에서도 다량 발현 보고

따라서 낙타과 동물에서 유래된 single domain antibody의 경우 heavy chain의 단일도메인만으로 구성되어 기존의 항체와 같은 특이도와 민감도를 가지면서 다양한 기능성 단백질들과의 융합이 매우 용이하여 다양한 제품군의 제작이 가능할 것으로 기대되며 이런 특징들로 인해 전 세계적으로 관련 특허출원이 급증하고 있으나 아래의 그림과 같이 선진국 및 다국적 제약 회사들에 의한 독점 현상이 두드러진 상황이라 임상 분야 쪽에서 활용도가 높고 농림수산식품 분야에서의 적용 예가 거의 없는 실정이다. 따라서 본 과제에서 수행하여 나온 single domain antibody는 이 분야의 세계적 선도적인 역할을 할 수 있을 것으로 생각되며 아래와 같은 방법으로 수행되었다.



순위	출원인	출원 개수	출원 비율
1	Ablynx N. V	45	40.2
2	Unilever N. V	8	7.1
3	Erasmus Universiteit Rotterdam	6	5.4
4	Genesis Research and Development Co., Ltd	6	5.4
5	Institut Pasteur	5	4.5

그림 94. Single domain antibody를 이용한 세계적인 특허 분석도

(나) M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody 제작

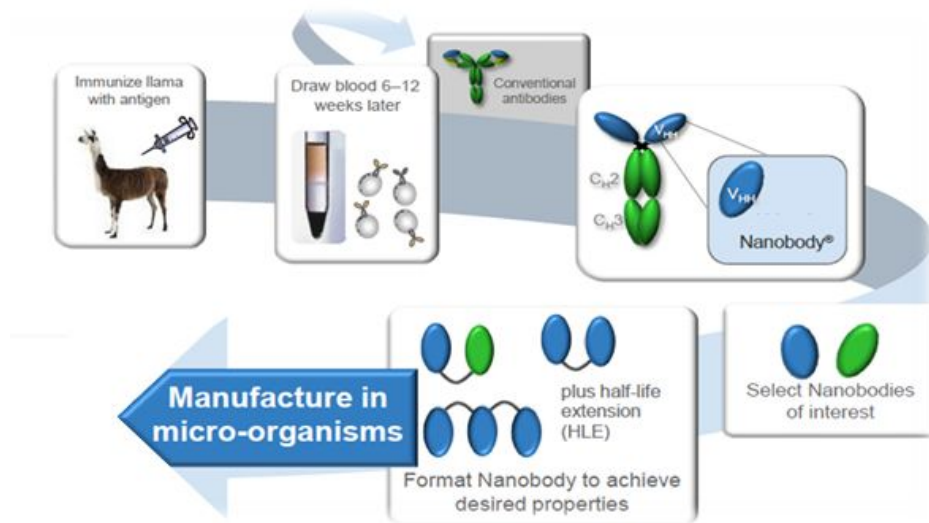


그림 95. Single domain antibody의 제작과정 모식도

① 면역용 M13K07 bacteriophage 항원의 제조

M13K07 phage는 New England Biolabs Inc.에서 구입하여 *E. coli* TG1에 감염시켜 증폭시킨 후 (4×10^{14} pfu/ml) PBS로 투석하여 항원으로서의 처리를 수행하였고 추가 투여를 위해 이를 냉동 보관 하였다.

② *Camelus bacterianus*의 면역화

현재 동북아시아 지역에서 낙타과 동물을 활용한 실험을 수행하기 위해서는 몽골의 사막 지역에 분포하는 쌍봉낙타를 활용하는 것이 가장 현실적인 대안이라 판단되어 1차년도 하절기에 현지실험을 수행하였다.

준비된 M13K07 phage 1ml (4×10^{14} pfu/ml)을 동등한 볼륨의 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 안정된 emulsion을 만들어 몽골에서 사육중인 낙타에 2~4군데 분산하여 피하투여 하였다. 그 후 2주 간격으로 3차례 같은 양의 항원을 동등한 볼륨의 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 같은 방법으로 투여하였다. 최종 투여 1주일 후에 anti-coagulated blood가 들어있는 팩에 혈액을 채취하였다. 혈액은 Ficoll-Paque PLUS를 이용하여 백혈구를 분리하였다.

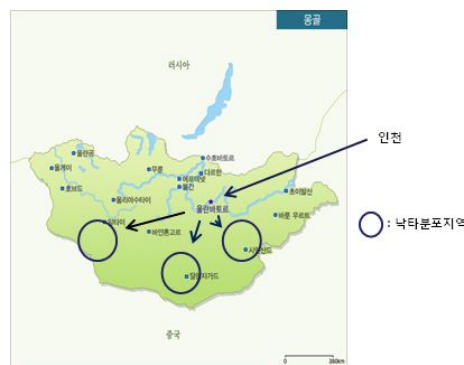


그림 96. 몽골의 낙타 분포지역



그림 97. 몽골 내 현지 낙타 실험 사진

③ 백혈구로부터 cDNA 합성 및 single domain antibody의 library construction

백혈구로부터 trizol (AccuZol™, Bioneer)을 이용하여 RNA를 추출한 후 specific reverse primer (RT-R; 5'- GGT ACG TGC TGT TGA ACT GTT CC -3')를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA로부터 증폭될 nanobody의 Fv region은 합성된 cDNA로부터 증폭될 단일 도메인 항체의 Fv 부분은 framework-1과 framework-4에 결합하는 primer (Camel_2st_F, Camel_2st_R)를 이용하여 PCR [94℃(1분), 58℃(30초), 72℃(1분), 25 회]을 진행하여 약 350~400bps의 증폭된 DNA 밴드를 획득하였다.

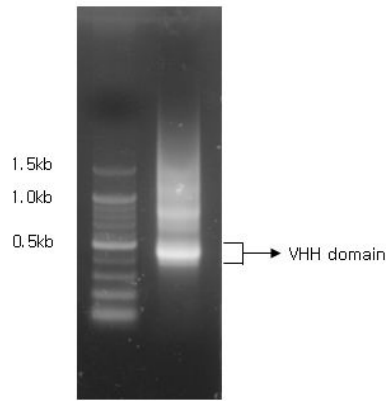


그림 98. VHH Fv region의 증폭을 위한PCR 전기영동 사진

PCR 증폭 과정을 거친 DNA 밴드는 *Sfi*I과 *Not*I의 제한효소로 절단하였고 같은 제한효소로 절단된 pCANTAB5E vector에 결합시켰으며 pCANTAB5E vector의 map은 다음과 같다.

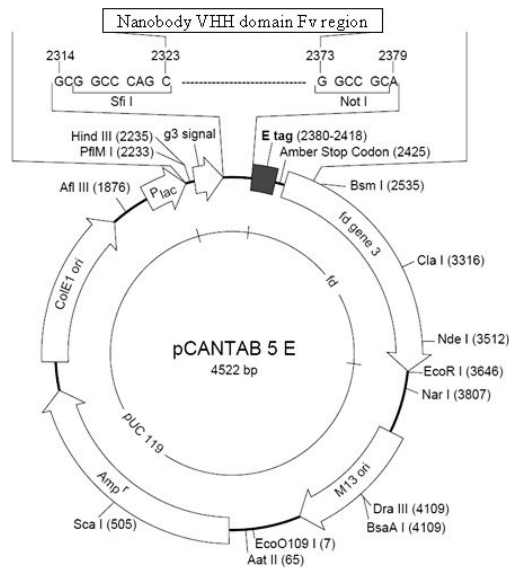


그림 99 . pCANTAB5E vector의 모식도

재조합된 vector는 *E. coli* TG1 cells에 electroporation (25uF, 2.5kV, 200 ohms)의 방법으로 형질전환 하였다. 형질전환된 TG1은 도말하여 무작위로 colony를 선택한 후 colony PCR한 결과 nanobody가 결합된 양성 colony의 비율을 확인한 결과 아래와 같이 88%이었다. 형질전환된 TG1 cells는 앞으로의 panning 진행에 사용하였다.

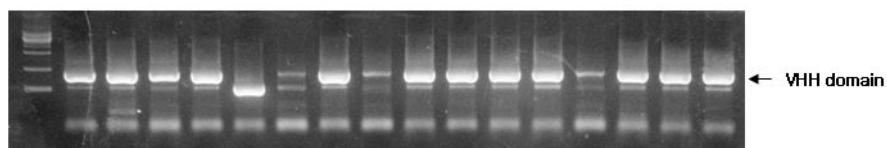


그림 100. 형질전환된 TG1의 colony PCR 전기영동 사진

④ Panning에 의한 specific antibody selection

형질 전환된 *E. coli* TG1은 M13K07 helper phage(4×10^{10} pfu)에 감염시키고 하루 배양 후 그 상등액은 polyethylene glycol/NaCl 침전법에 의해서 phage를 침전시켰다. 그 후 2-Bromoethylamine hydrobromide (BEA)로 불활화 시킨 M13K07 phage가 코팅되어 있는 T25 flask를 이용하여 phage를 결합시키고 PBS-T (0.5% Tween20)를 이용하여 10회 세척하였다. 그 후 대수기에 있는 *E. coli* TG1을 넣어 T25 flask에 남아있는 phage를 재감염 시키고 배양하였다. 이와 같은 과정을 반복함으로써 M13K07 phage에 specific하게 결합하는 phage를 증가 시켰다.

⑤ 단일 콜로니의 ELISA 분석

각 단계별 panning 후 phage에 감염된 *E. coli* TG1을 ampicillin($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 SOBAG 평판 배지 (Bacto tryptone 20g, Bacto yeast extract 5g, NaCl 0.5g, 1M MgCl₂ 10ml, 2M Glucose 55.6ml, Bacto agar 15g/L)에 도말하였다. 배양된 single colony를 무작위로 선별하여 새로운 phage에 감염 시킨 후 배양하여 그 상등액으로 ELISA분석을 시행하였다. 96well immuno plate는 well당 $100 \mu\text{l}$ 의 항원용 M13K07 phage(BEA 처리하여 불활화 된 것) 현탁액을 coating하고 5% powder skim milk로 blocking하였다. 그 후 개별 colony에서 배양된 phage를 1차적으로 plate에 붙이고 2차로는 anti-M13-HRP를 사용하여 발색함으로써 phage가 항원으로 사용된 각 균주들과의 결합 유무를 판단하였다. 그 결과 총 98개의 양성 clone들을 확보하였으며 이 양성 clone들에 대해 pCANTAB5E vector primer (F_pCANTAB5_R1; 5'-CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC-3', R_pCANTAB5_R2; 5'-CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC-3')를 사용하여 colony PCR [94°C(1분), 58°C(30초), 72°C(1분), 30 회]한 결과 100%의 양성 클론결과를 얻었다.

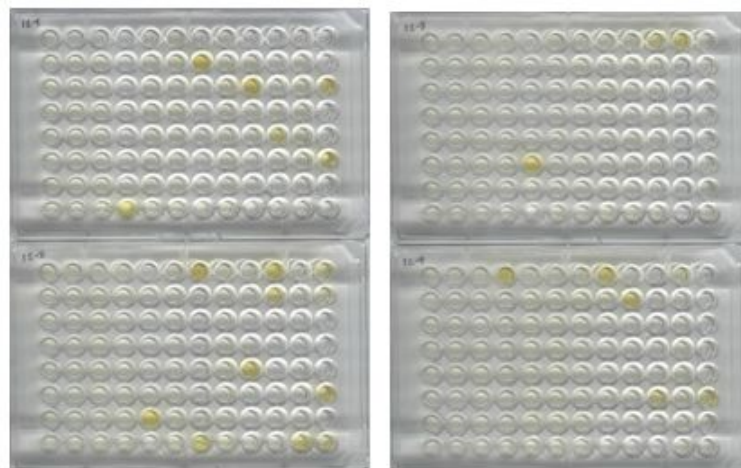


그림 101. M13K07 bacteriophage에 특이적인 single domain antibody screening 결과

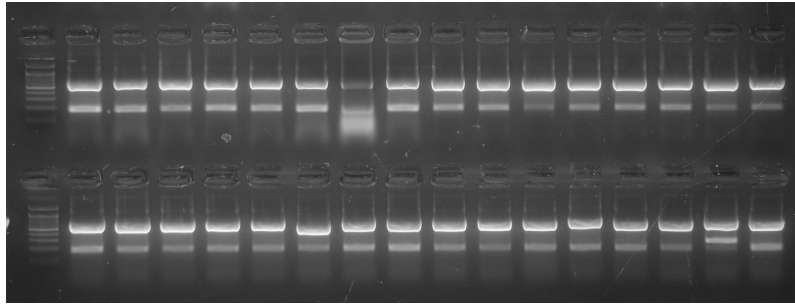


그림 102. ELISA 결과 양성 반응주들의 colony PCR 결과 [positive colonies; 100% (32/32)]

M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody를 확인하기 위해서 총 98개의 single domain antibody중에서 single domain antibody를 가지는 플라스미드를 확보한 후 이들의 염기서열을 sequencing하고 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 blast 검색을 하여 낙타에서 유래한 단일 도메인 항체들임을 확인하였으며 이들 항체들 간의 비교를 위해서 ClustalW2 program으로 서열들을 alignment 하였다. 확보된 단일 도메인 항체 중 10개를 sequence를 alignment한 결과 아래의 그림과 같이 5개의 다른 아미노산 서열을 가진 단일 도메인 항체로 분류가 되었다.

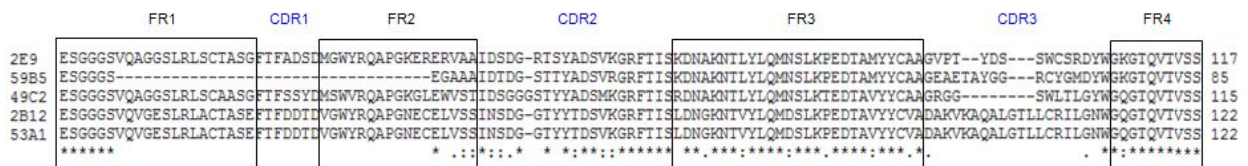


그림 103. M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibodies의 sequence alignment

(5) Single domain antibody-형광단백질의 제작

여느 다른 항체들보다 항원과의 결합력이 우수한 single domain antibody 특징을 이용해서 현장에서 신속하게 해당 항원을 검출하기 위해 single domain antibody와 형광단백질을 연결하여 신호증폭을 확대하고 서로 다른 excitation/emmission 파장대의 유기적인 활용과 형광단백질의 온도 저항성 등을 증대시키고자 한다.

(가) M13K07 bacteriophage에서 display되는 streptavidin의 제작

① 재조합 streptavidin의 제작

Streptavidin은 1차년도 연구에서 개발한 것을 이용하여 PCR [94°C(1분), 58°C(30초), 72°C(1분), 30 cycles]한 후 약 500 bp의 PCR product를 획득하였고 TA cloning하였으며 sequence 분석을 통해 streptavidin을 확인하였다.

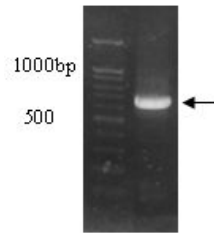


그림 104. 재조합 streptavidin의 PCR 결과

확인된 streptavidin은 pCANTAB5E와 ligation 되어 아래의 그림과 같이 cloning되었다.

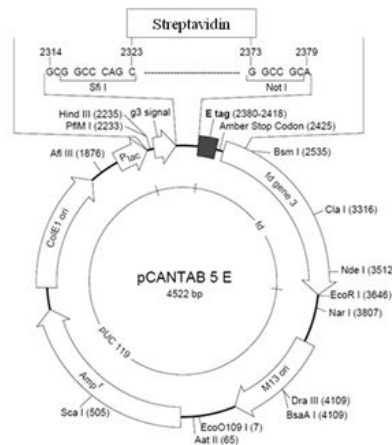


그림 105. Streptavidin/pCANTAB5E의 모식도

재조합된 vector는 *E. coli* TG1 cells에 형질전환 하였고 형질전환된 *E. coli* TG1은 M13K07 helper phage (4×10^{10} pfu)에 감염시키고 하루 배양 후 그 상등액을 polyethylene glycol/NaCl 침전법에 의거 phage를 침전시켰으며 PBS로 투석한 후 이를 냉동 보관 하면서 다음의 실험에 사용하였다.

② Streptavidin의 기능 확인

M13K07 bacteriophage에서 display되는 streptavidin의 효능 평가는 ELISA로 확인을 하였다. 우선 96well immuno plate에 1차년도 연구에서 획득한 RFP, biotin - RFP, biotin - *E. coli* 항체를 well당 $100 \mu\text{l}$ 로 coating하고 5% powder skim milk로 blocking하였다. 그리고 1차 antibody로 위에서 준비한 phage(streptavidin/pCANTAB5E/M13K07 phage)를 사용하였으며 2차 antibody는 anti-M13-HRP를 사용하여 발색함으로써 streptavidin의 효능을 평가하였다. 그 결과 biotin과 결합된 단백질 (biotin - RFP, biotin - *E. coli* 항체)에서는 모두 양성의 반응을 보여 streptavidin/pCANTAB5E/M13K07 phage에서도 대장균에서 발현, 정제한 streptavidin과 동일한 기능을 하는 것을 확인 할 수 있었다.

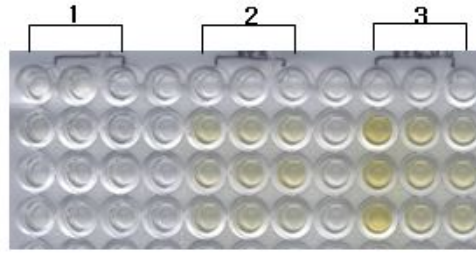


그림 106. ELISA를 통한 M13K07 bacteriophage에서 display되는 streptavidin의 기능 확인(1; RFP를 항원으로 사용, 2; biotin + RFP를 항원으로 사용, 3; biotin-*E. coli* 항체를 항원으로 사용)

(나) 재조합 M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody의 제작

기존의 확보된 M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody들의 DNA를 template으로 하여 다음의 조건으로 PCR [2nd-F-NotI primer(5'-GATGTGCAGGCGGCCGCATGGAGTCTGGRGGAGGCT-3'), 2nd-R-BspEI XhoI (5'-AGATTAGTCTCGAGACCGCCTCCGGATGAGGAGACGGTGACCTGGGT-3'), PCR condition (95°C 1분, 58°C 30초, 72°C 1분, 30 cycles)]하여 약 450bp의 PCR product를 얻었으며 sequence 확인을 통해 해당 single domain antibody의 sequence와 동일한지 확인하였다.

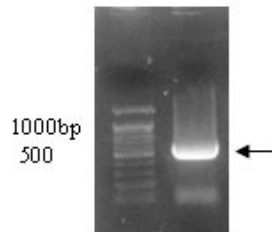


그림 107. 재조합 M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody의 PCR product

(다) M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - GFP의 제작

M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - GFP의 제작은 아래 그림과 같이 제작되었다.

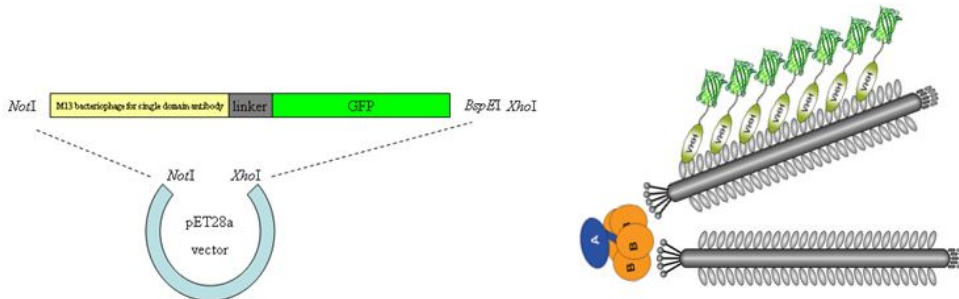


그림 108. Single domain antibody와 연결된 GFP의 모식도 및 M13K07 bacteriophage 반복서열에 의한 signal amplification effect

① 형광단백질의 준비; Linker GFP

Linker GFP는 1차년도 연구에서 개발한 것을 사용하였다.

② TA cloning과 pET-28a cloning, 발현 및 정제

이상에서 제작한 M13K07 phage에 대한 single domain antibody 염기서열을 가진 plasmid DNA를 제한효소 *BspEI*과 *XhoI*로 처리하여 나온 약 0.45 kb의 fragment와 TA-vector에 cloning 되어 있는 linker GFP에 제한효소 *AgeI*과 *XhoI*을 처리하여 나온 약 0.75kb fragment를 16°C에서 ligation 시킨 후 *E. coli* DH5α에 transformation하였고 ampicilin(100μg/ml)이 함유된 LB agar 배지에서 성장하는 colony들 중에서 colony PCR를 통해 해당 크기의 fragment DNA를 가진 colony들을 확보한 후(약 1.2kb) 해당 colony의 plasmid DNA에 제한효소 *NotI/XhoI*을 처리하여 최종적으로 insert[약 1.2kb = single domain antibody (0.45kb) + linker RFP (0.75kb)]와 TA vector와의 cloning 확인을 하였다.

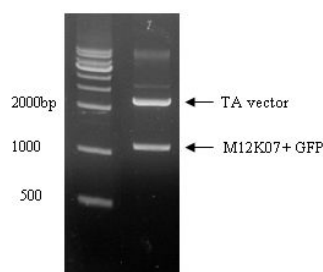


그림 109. M13K07 phage에 대한 single domain antibody+GFP/TA/DH5α(*NotI/XhoI*)

확인된 M13K07 phage에 대한 single domain antibody+GFP는 *NotI/XhoII*이 처리된 pET-28a vector와 ligation (16°C, 12시간)하여 최종적으로 insert와 pET-28a vector와의 cloning을 확인하였고 이 single domain antibody-GFP의 단백질 발현을 위해 단백질 발현용 *E. coli* strain인 BL21 DE3, BL21 DE3 pLysS, Rosseta2 DE3, Rosseta2 DE3 pLysS에 각각 transformation하여 나온 single colony를 1mM IPTG가 첨가된 LB agar[kanamycin(50μg/ml)]에 접종한 후 OD_{A600}=0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 37°C에서 5시간, 28°C에서 20시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다(8000rpm, 20분). 수거한 후 1×PBS buffer에 현탁 하였고 이 후 2×sample buffer와 잘 혼합한 후 열처리하고 12% SDS PAGE상에서 single domain antibody (2B12, 2E9, 53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/BL21DE3, single domain antibody (2B12, 2E9, 53A1)/pET28a/BL21DE3pLysS, single domain antibody (2B12, 2E9, 53A1)/pET28a/Rosseta2DE3, single domain antibody (2B12, 2E9, 53A1)/pET28a/Rosseta2DE3pLysS의 발현을 확인하였다. 그리고 형광 단백질로서의 발현 유무를 관찰하기 위해서 1mM IPTG가 첨가된 LB agar[kanamycin (50μg/ml)]에 접종하여 20°C, 28°C, 37°C에서 각각 형광 유무를 관찰하였다. 그 결과 아래의 그림과 같이 single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/BL21DE3는 20°C, 28°C에서 모두 발현되는 것을 관찰 할 수 있었으나 single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP 형광단백질의 발현 및 정제는 20°C에서 발현하는 것이 더 유리할 것으로 생각되어 20°C에서 발현시키

기로 하였다. 그리고 single domain antibody (2E9) for M13K07 phage + GFP/pET28a/BL21DE3는 20℃, 28℃에서 모두 발현되는 것을 관찰 할 수 있었으나 single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP 형광단백질은 20℃에서 더 잘 관찰되어 single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP 형광단백질의 발현 및 정제는 20℃에서 발현하는 것이 더 유리할 것으로 생각되어 20℃에서 발현시키기로 하였으며 single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS는 20℃, 28℃에서 모두 발현되는 것을 관찰 할 수 있었으나 single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP 형광단백질은 20℃에서 더 잘 관찰되어 single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP 형광단백질의 발현 및 정제는 20℃에서 발현하는 것이 더 유리할 것으로 생각되어 20℃에서 발현시키기로 하였다.

M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - GFP 형광 단백질을 정제하기 위해 각각의 균주를 LB broth [kanamycin (50 μ g/ml)]에 접종하여 OD_{A600} ≒ 0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 20℃, 36시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 cell은 native buffer에 현탁 하여 파쇄한 후 Ni-NTA column에서 washing buffer로 5회 washing한 후 elution buffer로 정제하여 실험에 사용하였다.

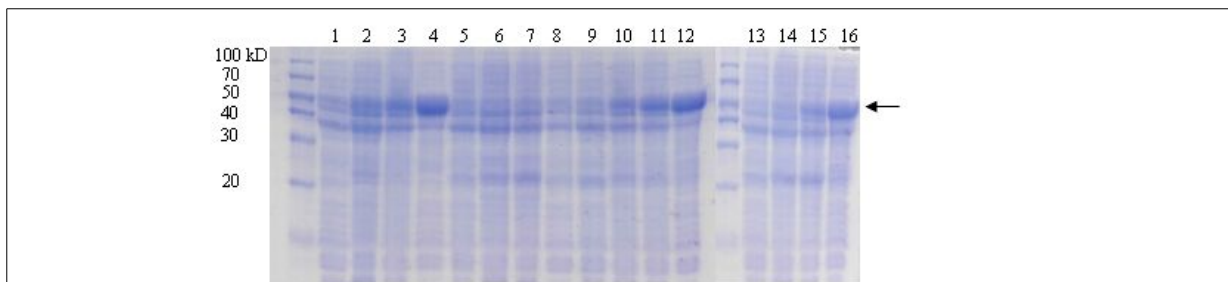


그림 110. Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP 단백질의 발현

- 1; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3, non-induction
- 2; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
- 3; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
- 4; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr
- 5; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, non-induction
- 6; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
- 7; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
- 8; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr
- 9; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3, non-induction
- 10; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
- 11; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
- 12; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr
- 13; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 14; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
- 15; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
- 16; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr

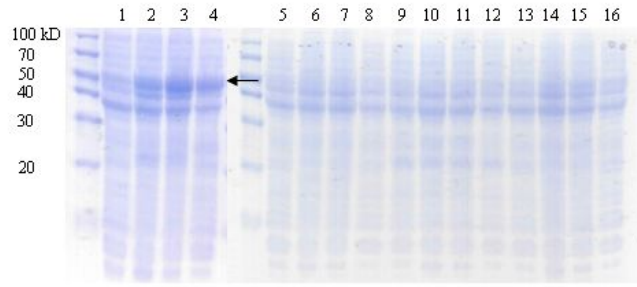


그림 111. Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP 단백질의 발현

- 1: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3, non-induction
- 2: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 5: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, non-induction
- 6: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 7: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 8: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 9: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, non-induction
- 10: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 11: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 12: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 13: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 14: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 15: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 16: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr

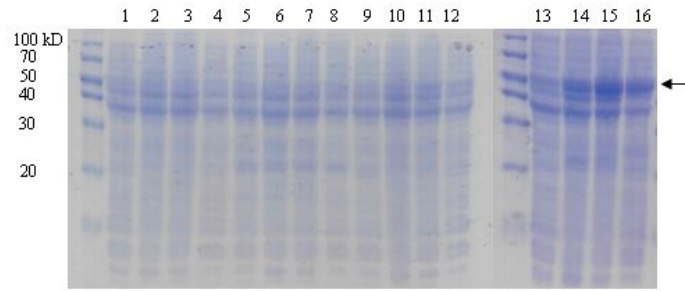


그림 112. Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP 단백질의 발현

- 1; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3, non-induction
- 2; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 5; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, non-induction
- 6; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 7; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 8; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 9; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3, non-induction
- 10; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 11; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 12; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 13; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 14; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 15; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 16; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr

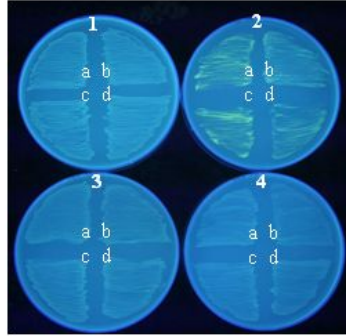


그림 113. 평판배지 상에서 M13K07 phage (2B12)에 대한 single domain antibody - GFP 단백질의 발현

- 1, a: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/BL21DE3, non-induction
 b: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/BL21DE3pLysS, non-induction
 c: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, non-induction
 d: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 2, a: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 b: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 c: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 d: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3, a: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 b: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 c: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 d: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4, a: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
 b: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
 c: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
 d: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr

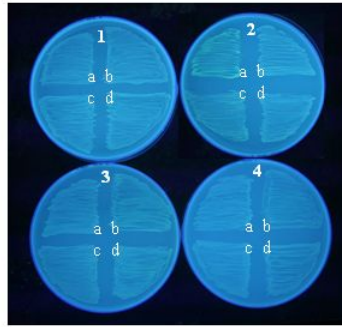


그림 114. 평판배지상에서 M13K07 phage (2E9)에 대한 single domain antibody - GFP 단백질의 발현

- 1, a: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3, non-induction
- b: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/BL21DE3pLysS, non-induction
- c: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, non-induction
- d: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 2, a: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- b: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- c: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- d: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3, a: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- b: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- c: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- d: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4, a: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
- b: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- c: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- d: Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr

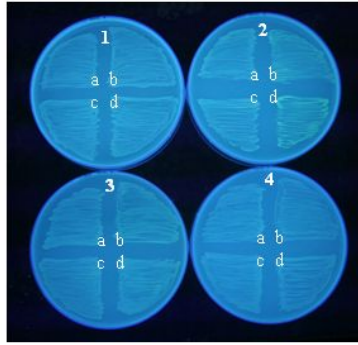


그림 115. 평판배지 상에서 M13K07 phage (53A1)에 대한 single domain antibody - GFP 단백질의 발현

- 1, a: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3, non-induction
- b: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/BL21DE3pLysS, non-induction
- c: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, non-induction
- d: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 2, a: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- b: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- c: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- d: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3, a: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- b: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- c: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- d: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4, a: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
- b: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- c: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- d: Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - GFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr

(라) M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - RFP의 제작

M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - RFP의 제작은 아래의 그림과 같이 제작되었다.

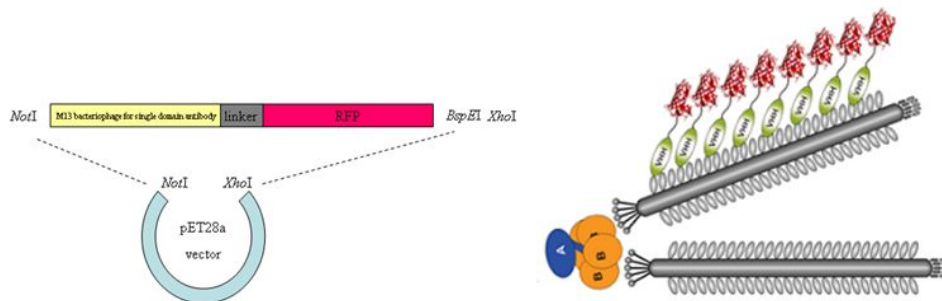


그림 116. Single domain antibody와 연결된 RFP의 모식도 및 M13K07 bacteriophage 반복 서열에 의한 signal amplification effect

① 형광단백질의 준비; Linker RFP

Linker RFP는 1차년도 연구에서 개발한 것을 사용하였다.

② TA cloning과 pET-28a cloning, 발현 및 정제

이상에서 제작한 M13K07 phage에 대한 single domain antibody 염기서열을 가진 plasmid DNA를 제한효소 *BspEI*과 *XhoI*로 처리하여 나온 약 0.45 kb의 fragmen와 TA-vector에 cloning 되어 있는 linker RFP에 제한효소 *AgeI*과 *XhoI*을 처리하여 나온 약 1.45kb fragment를 16°C에서 ligation 시킨 후 *E. coli* DH5α에 transformation하였고 ampicilin(100μg/ml)이 함유된 LB agar 배지에서 성장하는 colony들 중에서 colony PCR를 통해 해당 크기의 fragment DNA를 가진 colony들을 확보한 후(약 1.9kb) 해당 colony의 plasmid DNA에 제한효소 *NotI/XhoI*을 처리하여 최종적으로 insert[약 1.95kb = single domain antibody (0.45kb) + linker RFP (1.45kb)]와 TA vector와의 cloning 확인을 하였다.

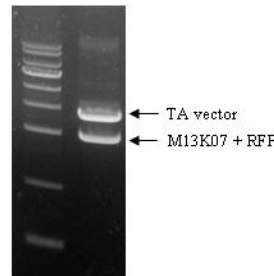


그림 117. M13K07 phage에 대한 single domain antibody-RFP/TA/DH5α(*NotI/XhoI*)

확인된 M13K07 phage에 대한 single domain antibody-RFP는 *NotI/XhoI*이 처리된 pET-28a vector와 ligation (16°C, 12시간)하여 최종적으로 insert와 pET-28a vector와의 cloning을 확인하였고 이 single domain antibody-RFP의 단백질 발현을 위해 단백질 발현용 *E. coli* strain인 BL21DE3, BL21DE3pLysS, Rosseta2DE3, Rosseta2DE3pLysS에 각각 transformation하여 나온 single colony를 1mM IPTG가 첨가된 LB agar [kanamycin(50μg/ml)]에 접종한 후 OD_{A600}=0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 37°C에서 5시간, 28°C에서 20시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다(8000rpm, 20분). 수거한 후 1×PBS buffer에 현탁 하였고 이후 2×sample buffer와 잘 혼합한 후 열처리하고 12% SDS PAGE상에서 single domain antibody (2B12, 2E9, 53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/BL21DE3, single domain antibody (2B12, 2E9, 53A1)/pET28a/BL21DE3pLysS, single domain antibody (2B12, 2E9, 53A1)/pET28a/Rosseta2DE3, single domain antibody (2B12, 2E9, 53A1)/pET28a/Rosseta2DE3pLysS의 발현을 확인하였다. 그리고 형광 단백질로서의 발현 유무를 관찰하기 위해서 1mM IPTG가 첨가된 LB agar[kanamycin (50μg/ml)]에 접종하여 20°C, 28°C, 37°C에서 각각 형광 유무를 관찰하였다. 그 결과 아래의 그림과 같이 single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3는 20°C, 28°C에서 모두 발현되는 것을 관찰 할 수 있었으나 single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP 형광단백질의 발현 및 정제는 20°C에서 발현하는 것이 더 유리할 것으로 생각되어 20°C에서 발현시키기로 하였다. 그리고 single domain antibody (M13-2) for M13K07 phage -

RFP/pET28a/BL21DE3는 20℃, 28℃에서 모두 발현되는 것을 관찰 할 수 있었으나 single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP 형광단백질은 20℃에서 더 잘 관찰되어 single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP 형광단백질의 발현 및 정제는 20℃에서 발현하는 것이 더 유리할 것으로 생각되어 20℃에서 발현시키기로 하였으며 single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/BL21DE3는 20℃, 28℃에서 모두 발현되는 것을 관찰 할 수 있었으나 single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP 형광단백질은 20℃에서 더 잘 관찰되어 single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP 형광단백질의 발현 및 정제는 20℃에서 발현하는 것이 더 유리할 것으로 생각되어 20℃에서 발현시키기로 하였다.

M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - RFP 형광 단백질을 정제하기 위해 각각의 균주를 LB broth [kanamycin (50μg/ml)]에 접종하여 OD_{A600} ≒ 0.4~0.6일 때 1mM IPTG를 첨가하여 20℃, 36시간 배양하고 난 후 cell을 수거하였다 (8000rpm, 20분). 수거한 cell은 native buffer에 현탁 하여 파쇄한 후 Ni-NTA column에서 washing buffer로 5회 washing한 후 elution buffer로 정제하여 실험에 사용하였다.

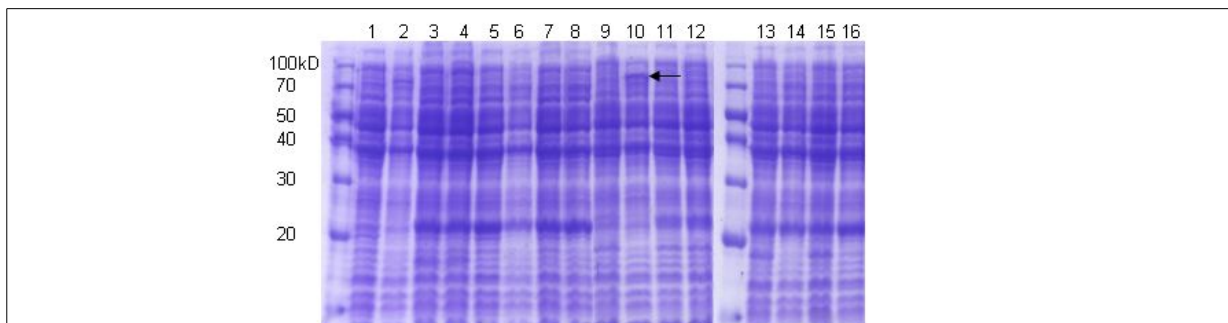


그림 118. Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP 단백질의 발현

- 1; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, non-induction
- 2; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
- 3; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
- 4; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr
- 5; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, non-induction
- 6; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
- 7; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
- 8; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr
- 9; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, non-induction
- 10; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
- 11; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
- 12; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37℃, 5hr
- 13; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 14; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20℃, 36hr
- 15; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28℃, 20hr
- 16; Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37℃, 5hr

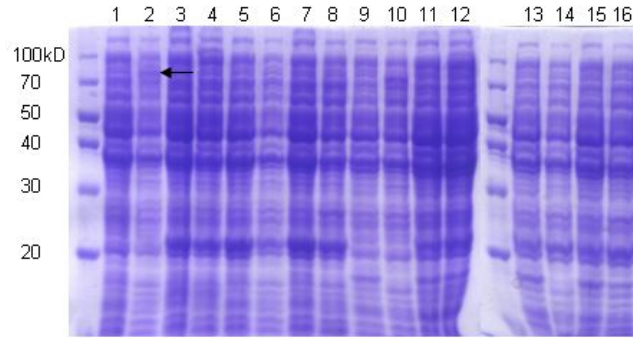


그림 119. Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP 단백질의 발현

- 1; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, non-induction
- 2; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 5; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, non-induction
- 6; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 7; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 8; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 9; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, non-induction
- 10; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 11; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 12; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 13; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 14; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 15; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 16; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr

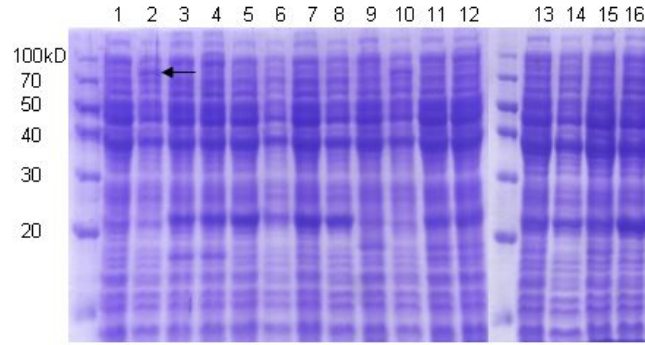


그림 120. Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP 단백질의 발현

- 1; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, non-induction
- 2; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 5; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, non-induction
- 6; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 7; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 8; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 9; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, non-induction
- 10; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 11; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 12; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- 13; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 14; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 15; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 16; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET21a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr

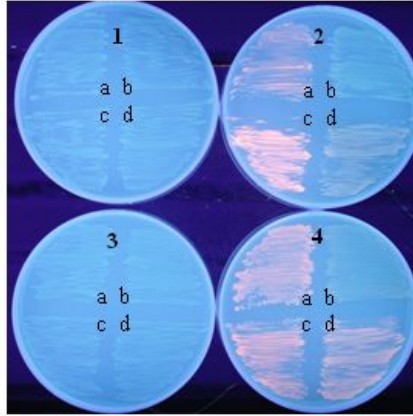


그림 121. 평판배지 상에서 M13K07 bacteriophage (2B12)에 대한 single domain antibody - RFP 단백질의 발현

- 1, a: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/BL21DE3, non-induction
 b: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/BL21DE3pLysS, non-induction
 c: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, non-induction
 d: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 2, a: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 b: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 c: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 d: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3, a: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 b: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 c: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 d: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4, a: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
 b: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
 c: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
 d: Single domain antibody (2B12) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr

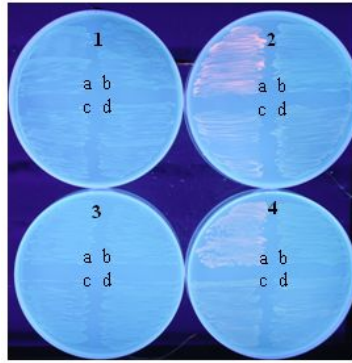


그림 122. 평판배지상에서 M13K07 bacteriophage (2E9)에 대한 single domain antibody - RFP 단백질의 발현

- 1, a; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3, non-induction
 b; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/BL21DE3pLysS, non-induction
 c; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, non-induction
 d; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 2, a; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 b; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 c; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
 d; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage + RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3, a; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 b; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 c; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
 d; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4, a; Single domain antibody (2E9) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
 b; Single domain antibody (M13-2) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
 c; Single domain antibody (M13-2) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
 d; Single domain antibody (M13-2) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr

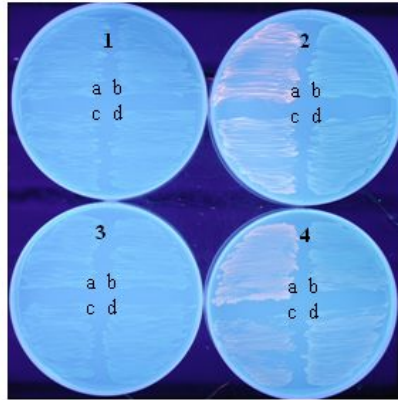


그림 123. 평판배지 상에서 M13K07 bacteriophage (53A1) 에 대한 single domain antibody - RFP 단백질의 발현

- 1, a; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3, non-induction
- b; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/BL21DE3pLysS, non-induction
- c; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, non-induction
- d; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, non-induction
- 2, a; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- b; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- c; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- d; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 20°C, 36hr
- 3, a; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- b; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- c; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- d; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 28°C, 20hr
- 4, a; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3, 1mM IPTG, 37°C, 20hr
- b; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/ BL21DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- c; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3, 1mM IPTG, 37°C, 5hr
- d; Single domain antibody (53A1) for M13K07 phage - RFP/pET28a/Rosseta2DE3pLysS, 1mM IPTG, 37°C, 5hr

(6) GFP에 대한 single domain antibody 제작

(가) 면역용 GFP 항원의 제조

GFP는 1차년도 연구에서 개발한 것을 대장균에서 발현, 정제하여 사용하였으며 1mg/ml 으로 분주한 후 초저온냉동고 (-70°C)에 보관하면서 사용하였다.

(나) *Camelus bacterianus*의 면역화

정제된 GFP 정제된 GFP 1mg/ml을 동등한 볼륨의 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 안정된 emulsion을 만들어 낙타에 2~4군데 분산하여 피하투여 하였다. 그 후 2주 간격으로 4 차례 같은 양의 재조합 단백질을 동등한 볼륨의 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 같은 방법으로 투여하였다. 최종 투여 1주일 후에 항응고제가 들어있는 수혈팩에 혈액을 채취하였다. 혈액은 Ficoll-Paque PLUS를 이용하여 백혈구를 분리하였다.

(다) 백혈구로부터 cDNA 합성 및 single domain antibody의 library construction

백혈구로부터 trizol (AccuZol™, Bioneer)을 이용하여 RNA를 추출한 후 specific reverse primer를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA로부터 증폭될 nanobody의 Fv region은 합성된 cDNA로부터 증폭될 단일 도메인 항체의 Fv 부분은 framework-1과 framework-4에 결합하는 primer (Camel_2st_F, Camel_2st_R3')를 이용하여 PCR [94℃(1분), 58℃(30초), 72℃(1분), 25 회]을 진행하여 약 350~400bps의 증폭된 DNA 밴드를 획득하였다.

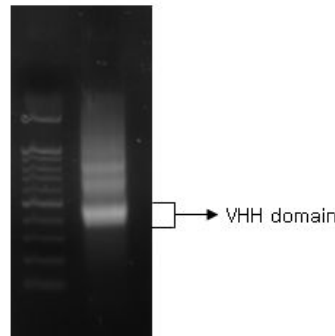


그림 124. VHH Fv region의 증폭을 위한PCR 전기영동 사진

PCR 증폭 과정을 거친 DNA 밴드는 *Sfi*I과 *Not*I의 제한효소로 절단하였고 같은 제한효소로 절단된 pCANTAB5E vector에 결합시켰으며 재조합된 vector는 *E. coli* TG1 cells에 electroporation으로 형질전환 하였다. 형질전환된 TG1은 앞으로의 panning 진행에 사용하였다.

(라) Panning에 의한 specific antibody selection

형질 전환된 *E. coli* TG1은 M13K07 helper phage (4×10^{10} pfu)에 감염시키고 하루 배양 후 그 상등액은 polyethylene glycol/NaCl 침전법에 의해서 phage를 침전시켰다. 그 후 정제된 GFP가 코팅되어 있는 T25 flask를 이용하여 phage를 결합시키고 PBS-T (0.5% Tween20)를 이용하여 10회 세척하였다. 그 후 대수기에 있는 *E. coli* TG1을 넣어 T25 flask에 남아있는 phage를 재감염 시키고 배양하였다. 이와 같은 과정을 반복함으로써 항원에 특이적으로 결합하는 phage를 증가 시켰다.

(마) ELISA를 통한 양성 clone의 선별 및 양성 clone들의 YFP, RFP에 대한 특이도 검정

각 단계별 panning 후 phage에 감염된 대장균 TG1을 일부 SOBAG 평판배지 (Bacto tryptone 20g, Bacto yeast extract 5g, NaCl 0.5g, 1M MgCl₂ 10ml, 2M Glucose 55.6ml, Bacto agar 15g/L)에 도말하였다. 배양된 single colony를 무작위 선별하여 새로운 파지에 감염 시킨 후 배양하여 그 상등액으로 ELISA를 시행하였다.

96well immunoplate는 well당 2μg의 항원용 GFP를 coating하고 blocking buffer (5% skim milk in PBS)로 blocking하였다. 그 후 single colony에서 배양된 파지를 1차적으로 immunoplate에 붙이고 2차로는 anti-M13-HRP를 사용하여 발색하는 것을 관찰함으로써 파지가 GFP와 결합하는지 판단하였다. 그리고 다른 형광 단백질 종류인 RFP와 YFP에 대해서 특이 결합 반응을 살펴보기 위해 RFP와 YFP를 항원으로 하여 위와 동일한 방법으로 ELISA를 실시하였다. 그 결과 총 52개의 양성 clone들을 확보하였으며 이 양성 clone들에 대해

pCANTAB5E vector primer (F_pCANTAB5_R1; 5'- CCATGATTACGCCAAGCTTTGGA GCC-3',R_pCANTAB5_R2; 5'-CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC-3')를 사용하여 colony PCR [94°C(1분), 58°C(30초), 72°C(1분), 30 회]한 결과 95%의 양성 클론 결과를 얻었다.

그리고 이 52개의 양성클론들을 다른 형광단백질인 RFP와 YFP의 결합 여부를 효소결합 면역흡착 분석법 (ELISA)를 통해 살펴보았는데 14개의 클론들에 대해서만 YFP에 대해 양성 결합 반응 결과를 보였고 RFP에 대해서는 양성 반응이 관찰되지 않았다. 이는 형광단백질들 간의 유사도와 깊은 연관이 있는 것으로 생각된다. 실제로 GFP와 YFP의 아미노산 서열은 약 55% 유사하며 GFP와 RFP간에는 약 28%의 아미노산 유사도가 있다. 따라서 아래 그림과 같이 GFP와 YFP는 일정 부위의 서열 유사성이 존재하여 교차반응성 있는 single domain antibody 가 유도된 것으로 생각된다.

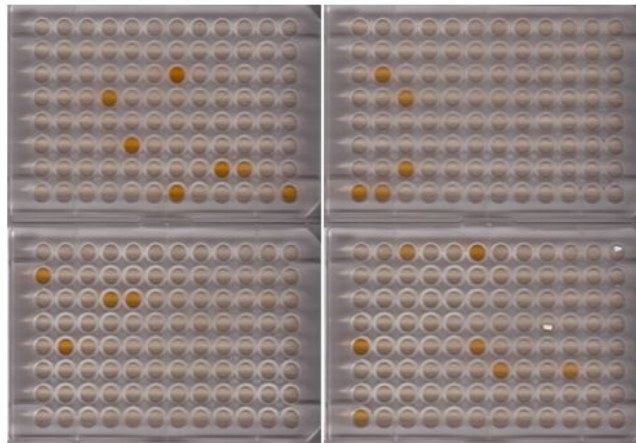


그림 125. M13K07 bacteriophage에 특이적인 single domain antibody screening 결과

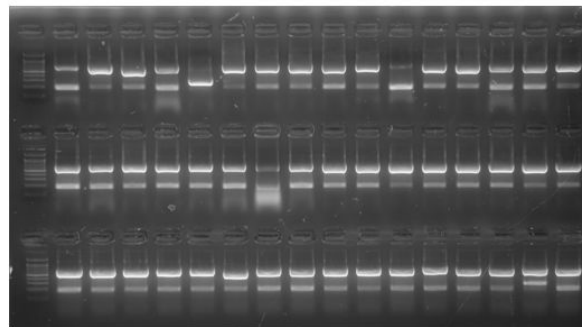


그림 126. ELISA 결과 양성 반응주들의 colony PCR 결과 [positive colonies; 95% (46/48)]

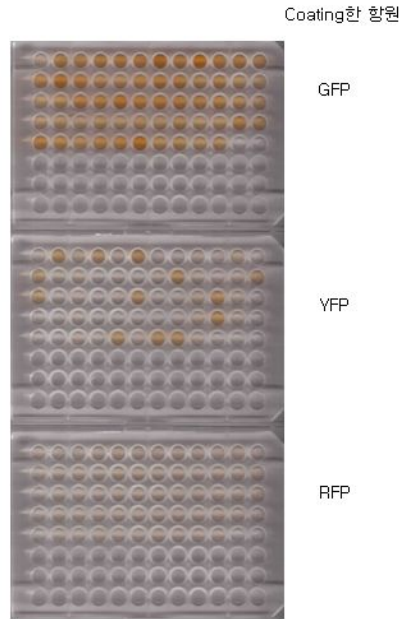


그림 127. GFP에 특이적으로 결합하는 single domain antibody의 RFP, YFP 항원에 대한 결합 반응의 결과

GFP	---MSKGEELFTGVVPEILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTILKFCITGKLPVP	56
YFP	MRGSGSSGALLFHGKIPYVVEMEGNVDGHTFSIRKGYGDASVGVKVAQFCITGDVPEP	60
	* * * * * : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
GFP	WPTLVITLTYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNVYKTRAEVKEFG	116
YFP	WSILVITLTYGAQCFAYGPELK--DFYKSCMPDGYVQERTIIFEGDGNFKRAEVTFEN	118
	* : * * * * * * * * * * * : * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
GFP	DTLVNRIELKSIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNIVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIE--DG	174
YFP	GSVYNRVKLNGQGFKKDGHVILGNLEFNFTPHCLYIWDQANHGLSAFKICHEITGSKG	178
	.. : * : * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
GFP	SVQLADHYQQNPIFGDGFVLLPDNHYLSTQSALSDFNEKRDRHMLLEFVTAAGITHGMD	234
YFP	DFIVADHTQMNTPIGGGPFVHVEYHHMSYHVKLSKDVTDHRDMSLKETVRAVDCKR---	235
	.. : * * * * * * * * * * * : * : * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
GFP	ELYK	238
YFP	-TYL	238
	*	

그림 128. GFP와 YFP의 아미노산 sequence alignment

(바) GFP에 대한 single domain antibody 확인

① Sequence 분석을 통한 GFP에 대한 single domain antibody 확인

GFP에 대한 단일 도메인 항체를 확인하기 위해서 상기의 방법으로 single domain antibody를 가지는 플라스미드를 확보한 후 이들의 염기서열을 sequencing하고 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 blast 검색을 하여 낙타에서 유래한 single domain antibody임을 확인하였으며 이들 항체들간의 비교를 위해서 ClustalW2 program으로 서열들을 alignment하였다. 확보된 GFP에 대한 single domain antibody 52개 sequence를 alignment한 결과 아래의 그림과 같이 12개의 다른 아미노산 서열을 가진 single domain antibody로 분류가 되었다.

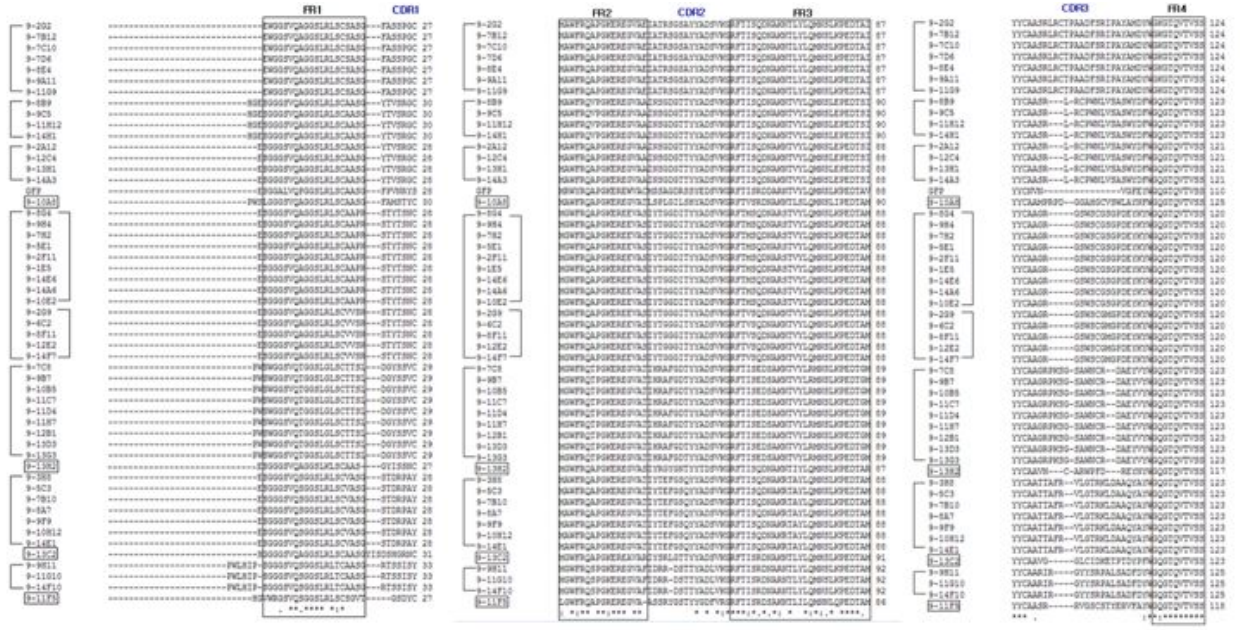


그림 129. M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibodies의 sequence alignment

② Western blot을 통한 GFP에 대한 single domain antibody 확인

항원용 GFP를 SDS-PAGE 한 후 이를 PVDF membrane에 전이시키고 bloking buffer (5% skim milk in PBS)로 blocking 하고 난 뒤 총 52개의 GFP에 대한 single domain antibody들 중에서 sequence 분석을 통해 나온 12가지의 다른 아미노산 서열을 가진 single domain antibody (2A12, 2G2, 2G9, 3H8, 7C8, 8B9, 8G4, 9H11, 10A8, 11F5, 13C2, 13H2)를 가지는 균주를 M13K07 helper phage (4×10^{10} pfu/ml)에 감염시키고 하루 배양 후 나온 그 상등액을 1차 항체로 사용하였고 2차로는 anti-M13-HRP를 사용하여 ECL plus western blotting detection reagents를 사용하여 필름을 감광시켜 나오는 밴드를 관찰함으로써 single domain antibody를 전시하는 phage가 GFP와 결합하는지 판단하였다. 그리고 이렇게 분류된 12개의 단일 도메인 항체들을 확인하기 위해 western blot한 결과 10개의 단일 도메인 항체들에서만 양성 결과가 나왔는데 이는 phage에서 전시되어 나오는 single domain antibody의 단백질 성질의 folding 및 구조적 특징 때문인 것으로 생각된다.

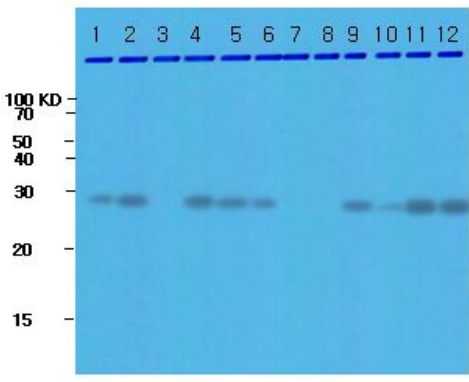


그림 130. 12개의 다른 아미노산 sequence를 가지는 GFP에 대한 single domain antibody의 western blotting 확인 결과 (1; 2A12, 2; 2G2, 3; 2G9, 4; 3H8, 5; 7C8, 6; 8B9, 7; 8G4, 8; 9H11, 9; 10A8, 10; 11F5, 11; 13C2, 12; 13H2)

(사) GFP에 대한 single domain antibody를 이용한 열 안정성 검정

12가지의 GFP에 대한 single domain antibody의 효능을 검정하기 위해 GFP의 가장 큰 단점인 열에 대한 안정성을 살펴보고자 4가지의 single domain antibody (2A12, 2G2, 2G9, 10A8)를 무작위로 선별하여 해당 항체를 가지는 균주를 M13K07 helper phage (4×10^{10} pfu)에 감염시키고 하루 배양 후 나온 그 상등액을 single domain antibody로 사용하였다. 이 각각의 상등액 $100 \mu\text{l}$ 와 정제된 GFP $100 \mu\text{l}$ (1mg/ml)를 고르게 잘 혼합하고 상온에서 5분간 방치 후 PCR 기기를 사용하여 70°C 에서 10분, 20분, 30분간 처리한 후 UV plate하에서 관찰하고 fluorometer (SpectraMax M2E 384, Molecular Devices) 에서 형광수치를 395nm의 excitation 파장대, 509nm의 emission 파장대에서 측정하였다. 그리고 single domain antibody 복합 처리는 위와 동일한 방법으로 실시하였으나 phage 상등액은 단독 처리와 동일 양의 single domain antibody를 처리하기 위해 각각 $50 \mu\text{l}$ 를 사용하여 총 $100 \mu\text{l}$ 에 맞추어서 사용하였다. 그 결과는 single domain antibody를 display하지 않는 phage와 열처리한 GFP보다 single domain antibody를 display하는 phage를 단독으로 처리한 혼합균에서 높은 열 안정성을 보였으며 single domain antibody를 display하는 phage를 복합으로 처리한 경우에는 열처리를 하지 않은 GFP와 유사한 형광의 정도 및 수치를 얻을 정도로 높은 열 안정성을 관찰 할 수 있었다. 따라서 개발된 GFP에 대한 single domain antibody가 GFP와 특이적으로 결합하여 GFP를 안정화시키는 것을 확인하였다

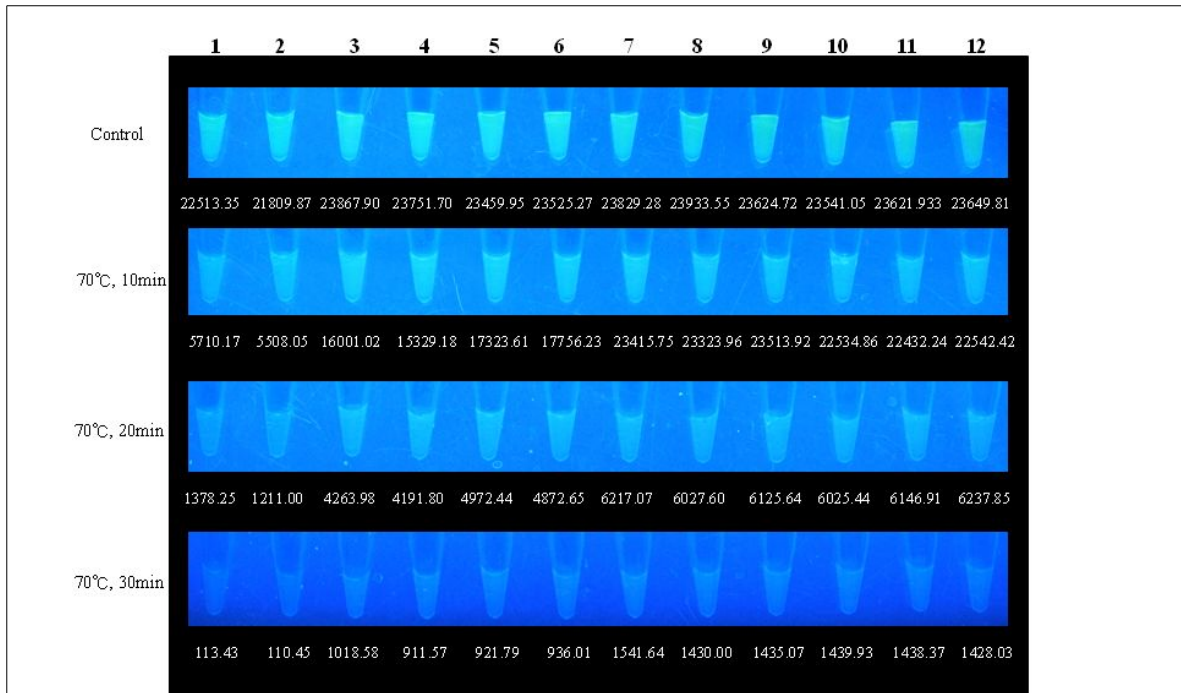


그림 131. GFP에 대한 single domain antibody를 단독, 복합으로 GFP와 혼합하여 열처리한 결과(1)

- 1; GFP + 2x-YT 배지
- 2; GFP + GFP와 결합하지 않는 single domain antibody negative control
- 3; GFP + GFP에 대한 single domain antibody 2A12 (1x)
- 4; GFP + GFP에 대한 single domain antibody 2G2 (1x)
- 5; GFP + GFP에 대한 single domain antibody 2G9 (1x)
- 6; GFP + GFP에 대한 single domain antibody 10A8 (1x)
- 7; GFP + GFP에 대한 single domain antibody 2A12 + GFP에 대한 single domain antibody 2G2 (1x)
- 8; GFP + GFP에 대한 single domain antibody 2A12 + GFP에 대한 single domain antibody 2G9 (1x)
- 9; GFP + GFP에 대한 single domain antibody 2A12 + GFP에 대한 single domain antibody 10A8 (1x)
- 10; GFP + GFP에 대한 single domain antibody 2G2 + GFP에 대한 single domain antibody 2G9 (1x)
- 11; GFP + GFP에 대한 single domain antibody 2G2 + GFP에 대한 single domain antibody 10A8 (1x)
- 12; GFP + GFP에 대한 single domain antibody 2G9 + GFP에 대한 single domain antibody 10A8 (1x)

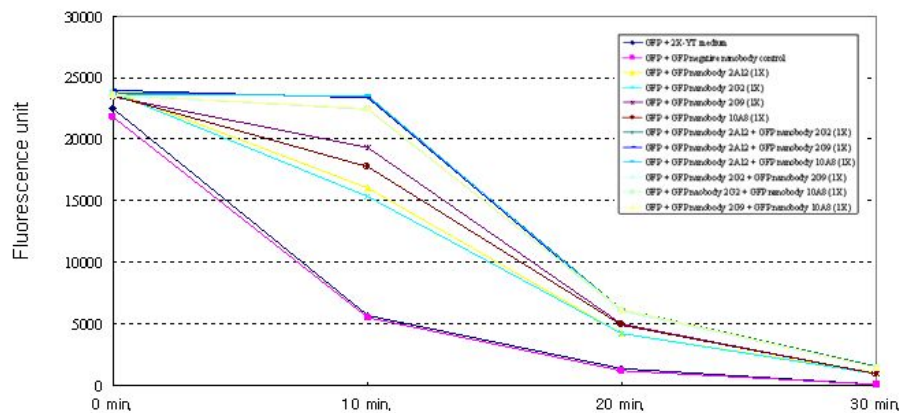


그림 132. GFP에 대한 single domain antibody를 단독, 복합으로 GFP와 혼합하여 열처리한 결과 (2)

이상의 내용을 종합하여 'GFP 특이적 단일 도메인 항체'에 대한 특허 출원을 하였다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2012.04.27
특기사항 심사청구(무) 공개신청(유)
출원번호 10-2012-0044780 (접수번호 1-1-2012-0340328-52)
출원인명칭 주식회사 종경(1-2007-016086-5)
대리인성명 김순웅(9-2006-000534-4)
발명자성명 임명운 정상희
발명의명칭 GFP 특이적 단일 도메인 항체

(7) 형광증폭 체계의 효율성 검증

(가) M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - GFP 단백질의 효능평가

M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - GFP에 대한 반응도를 살펴보기 위해 ELISA를 실시하였다. 우선 96well immunoplate (black)에 M13K07 bacteriophage에서 display되는 streptavidin을 well당 100 μ l씩 coating하고 5% powder skim milk로 blocking 하였다. 그 후 PBST (PBS + tween 0.05%) buffer로 washing 한 후 정제된 각각의 단백질을 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 4 μ g/ml, 8 μ g/ml, 12 μ g/ml, 16 μ g/ml 농도로 1시간 처리를 하였다 {a; Biotin - GFP, b; M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - GFP 단백질, c; M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - GFP 단백질, d; M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - GFP, e; [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - GFP 단백질] + [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - GFP 단백질], f; [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - GFP 단백질] + [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - GFP 단백질], g; [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - GFP 단백질] + [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - GFP 단백질], h; [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - GFP 단백질] + [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - GFP 단백질] + [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - GFP 단백질]}그리고 PBST로 washing한 후 형광 측정기 GFPIII filter fluorometer로 그 형광수치를 측정하여 그래프로 나타내었다. Control로 biotin - GFP를 이용하였다. 그 결과 1 μ g/ml을 처리한 것에서는 negative control인 PBS와 별 차이가 없는 형광수치가 나왔으며 4 μ g/ml이상의 처리구 부터 확연하게

형광수치가 차이가 났다. 특히 biontin - GFP가 처리된 것보다 M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody - GFP 단백질이 처리된 것에서 형광수치가 더 6배 이상 형광수치가 높았는데 각각의 M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody - GFP를 처리한 것은 biotin - GFP 보다 약 6배, 두 가지 M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody - GFP 단백질을 처리한 것에서는 biontin - GFP 처리구보다 약 8배, 세 가지 M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody - GFP 단백질을 처리한 것에서는 biontin - GFP 처리구보다 약 12배 이상 형광 수치가 높았다. 이 특징은 bacteriophage에 의한 signal amplication이 된 것으로 streptavidin에 대해서 biotin - GFP보다 M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody - GFP가 보다 효율적 이용이 가능한 것을 알 수 있었다.

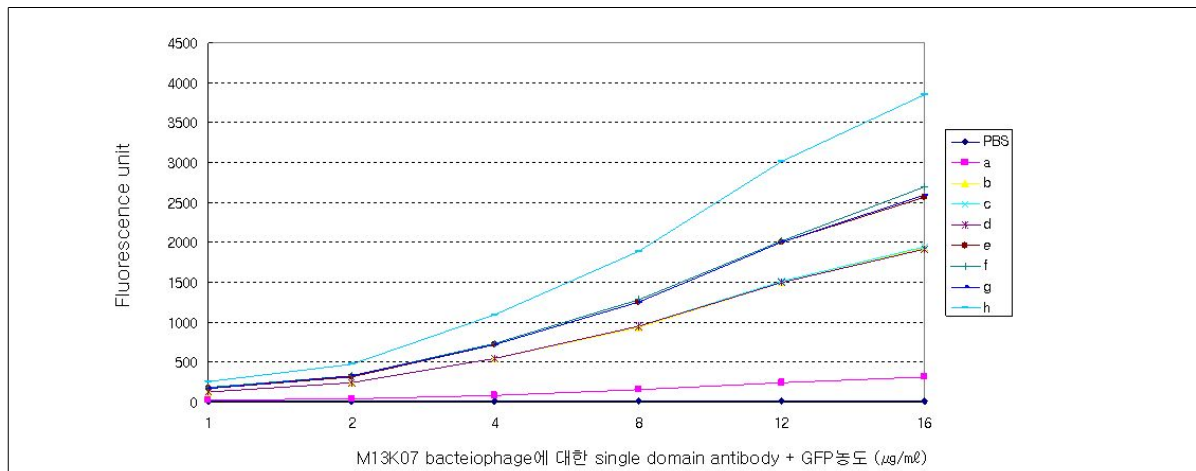


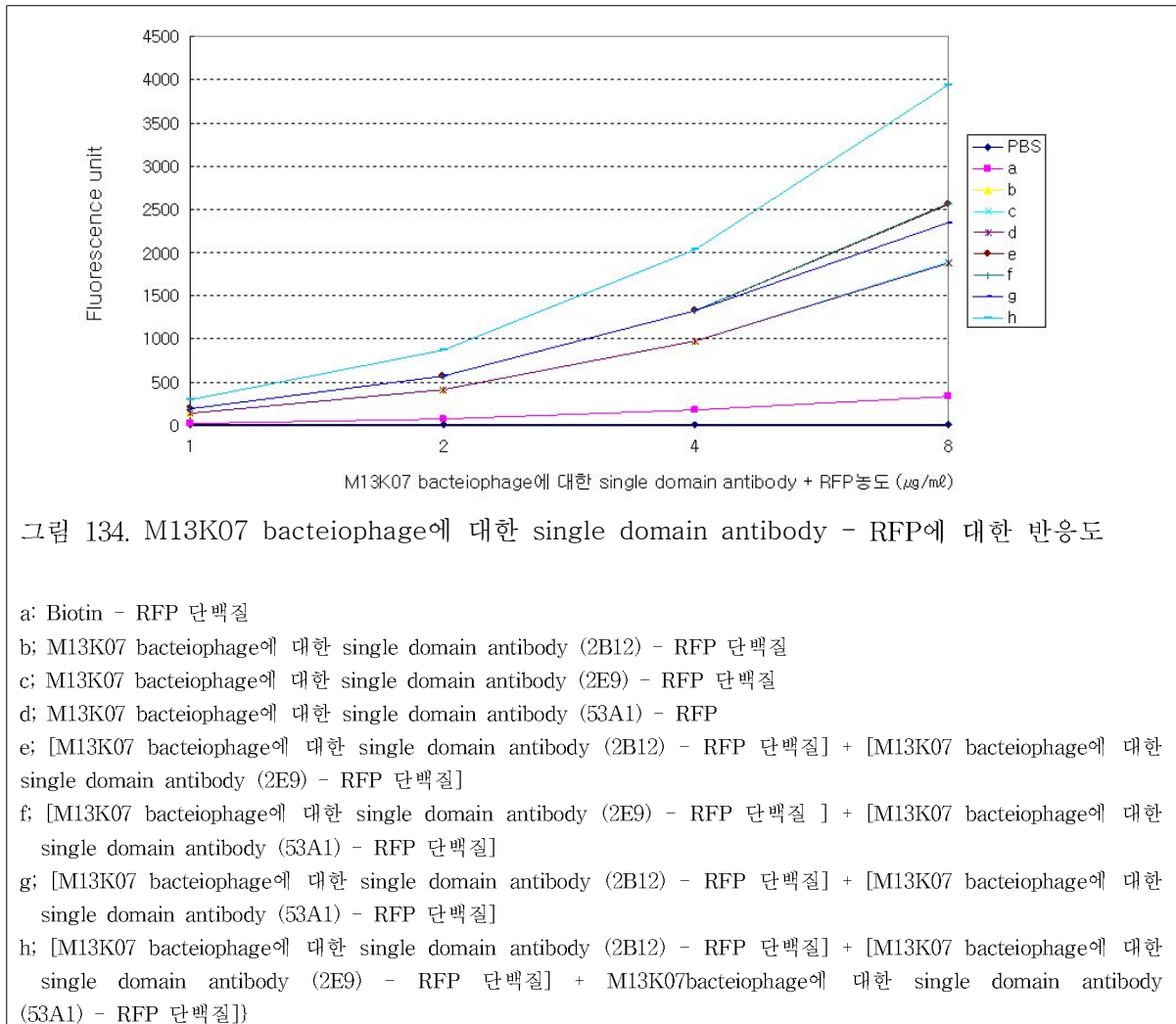
그림 133. M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody - GFP에 대한 반응도

- a: Biotin - GFP 단백질
- b: M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (2B12) - GFP 단백질
- c: M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (2E9) - GFP 단백질
- d: M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP
- e: [M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (2B12) - GFP 단백질] + [M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (2E9) - GFP 단백질]
- f: [M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (2E9) - GFP 단백질] + [M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP 단백질]
- g: [M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (2B12) - GFP 단백질] + [M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (53A1) - GFP 단백질]
- h: [M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (2B12) - GFP 단백질] + [M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (2E9) - GFP 단백질] + [M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody (53A1) - GFP 단백질]

(나) M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody - RFP 단백질의 효능평가

M13K07 bacteiphage에 대한 single domain antibody - RFP에 대한 효능을 살펴보기 위해 ELISA를 실시하였다. 우선 96well immunoplate (black)에 M13K07 bacteriophage에서 display되는 streptavidin을 well당 100μl씩 coating하고 5% powder skim milk로 blocking하였다. 그 후 PBST (PBS + tween 0.05%) buffer로 washing 한 후 정제된 각각의 단백질을 1μg/ml, 2μg/ml, 4μg/ml, 8μg/ml, 12μg/ml 농도로 1시간 처리를 하였다 {a; Biotin - RFP, b; M13K07

bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP 단백질, c; M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP 단백질, d; M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP, e; [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP 단백질] + [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP 단백질], f; [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP 단백질] + [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP 단백질], g; [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP 단백질] + [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP 단백질], h; [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP 단백질] + [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP 단백질] + [M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP 단백질]} 그리고 PBST로 washing한 후 형광 측정기 GFPIII filter fluorometer로 그 형광수치를 측정하여 그래프로 나타내었다. Control로 대장균에서 발현, 정제된 streptavidin과 streptavidin - RFP를 이용하였다. 그 결과 $1\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 것에서는 negative control인 PBS와 별 차이가 없는 형광수치가 나왔으며 $2\mu\text{g/ml}$ 이상의 처리구 부터 확연하게 형광수치가 차이가 났다. 특히 biontin - RFP가 처리된 것보다 각각의 M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - RFP를 처리한 것이 약 5.5배, 두 가지 M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - GFP 단백질을 처리한 것에서는 biontin - GFP 처리구보다 약 7.5배, 세 가지 M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - GFP 단백질을 처리한 것에서는 biontin - GFP 처리구보다 약 11배 이상 형광 수치가 높았다. 이 결과는 위 M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - GFP 단백질의 효능평가와 일치하는 것으로서 bacteriophage에 의한 signal amplification에 의해 형광 단백질의 이용이 효율적임을 알 수 있었다.



(다) M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody - RFP 단백질의 효율성

M13 bacteriophage의 반복서열에 의한 signal amplification effect를 평가하기 위해 위의 1)에서 제작된 M13K07 bacteriophage에서 display되는 streptavidin을 PVDF membrane에 10 μg 떨어뜨린 후 약 5분간 건조 하고 5% skim milk buffer로 1시간 blocking 한 후에 PBST (PBS + tween 0.05%) buffer로 washing 한 후 정제된 각각의 M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP 단백질, M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP 단백질, M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP는 10μg씩, [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP 단백질] + [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP 단백질], [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP 단백질] + [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP 단백질], [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP 단백질] + [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP 단백질]은 각각 0.5μg씩, [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP 단백질] + [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP 단백질] + [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP 단백질]은 0.33μg씩 떨어뜨리고 (control로 streptavidin 단백질과 biotin이 labelling된 RFP를 사용하여 비교실험 함) 약 5분 간

건조 후 다시 PBST로 washing하여 UV 하에서 관찰하였다. 그 결과 단독으로 처리한 M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP, M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP, M13K07 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP 단백질 처리한 것에서는 대장균에서 발현, 정제하여 biotin - RFP 단백질을 처리한 실험구에서와 비슷한 형광을 관찰할 수 있었으나 2가지의 M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody - RFP 복합체를 처리한 것 (2B12 + 2E9, 2B12 + 53A1, 2E9 + 53A1)에서는 조금 더 밝은 형광이 3가지 M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody - RFP 복합체를 처리한 것 (2B12 + 2E9 + 53A1)에서는 눈에 띄게 밝은 형광을 관찰할 수 있었다. 이는 특정부위와 결합하는 single domain antibody의 특징을 잘 나타낸 것으로 한 곳의 특정부위와 결합하는 single domain antibody를 여러 개 사용함으로써 단독처리의 한계를 잘 극복할 수 있는 실험 방법을 제시하였다고 볼 수 있다.



그림 135. M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody - RFP 단백질의 기능 확인

1. 대장균에서 발현, 정제한 streptavidin처리 후 RFP처리
2. 대장균에서 발현, 정제한 streptavidin처리 후 biotin - RFP 처리
3. Streptavidin/pCATAB5E/M13K07 bacteriophage처리 후 RFP처리
4. Streptavidin/pCATAB5E/M13K07 bacteriophage처리 후 M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP 처리
5. Streptavidin/pCATAB5E/M13K07 bacteriophage처리 후 M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP 처리
6. Streptavidin/pCATAB5E/M13K07 bacteriophage처리 후 M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP 처리
7. Streptavidin/pCATAB5E/M13K07 bacteriophage처리 후 [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP] + [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP] 처리
8. Streptavidin/pCATAB5E/M13K07 bacteriophage처리 후 [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP] + [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP] 처리
9. Streptavidin/pCATAB5E/M13K07 bacteriophage처리 후 [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP] + [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP] 처리
10. Streptavidin/pCATAB5E/M13K07 bacteriophage처리 후 [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2B12) - RFP] + [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (2E9) - RFP] + [M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody (53A1) - RFP] 처리

이상의 내용과 M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody의 DNA 및 아미노산 서열을 종합하여 'M13 박테리오파지에 대한 단일 도메인 항체 및 이를 포함하는 면역센서 융합 단백질'로 특허출원하였다.

출원번호통지서

출원일자 2013.06.27
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2013-0074548 (접수번호 1-1-2013-0577875-30)
출원인명칭 주식회사 중검(1-2007-016086-5)
대리인성명 김순웅(9-2006-000534-4)
발명자성명 임명운 정상희
발명의명칭 M13 박테리오파지에 대한 단일 도메인 항체 및 이를 포함하는 면역센서 융합 단백질

특 허 청 장

라. 자성나노입자-바이오마커 복합체 제작 및 효과 검증

(1) Competitive 자성나노입자-바이오마커 복합체

Competitive OBRIMA는 시료에 toxin을 분석하는 system으로 toxin이 없을 때는 형광이 검출되며, toxin이 있을 때에는 형광이 검출되지 않는다. 상세히 설명하면 시료에 toxin이 없으면 바이오틴이 labeling된 앵타머 혹은 항체들은 자성비드에 있는 toxin과 결합하게 되고 그 앵타머 혹은 항체들의 labeling되어있는 바이오틴에 streptavidin-M13 phage가 결합하게 되고 M13 phage에는 phage의 반복 peptide에 결합하는 anti-M13 phage Nanobody-GFP로 인하여 형광의 증폭이 극대화 된다. 반면에 toxin이 있는 시료에서는 바이오틴이 labeling된 앵타머 혹은 항체들을 섞어줌으로써 toxin과 먼저 결합하게 되고 toxin이 conjugation되어있는 자성입자를 후에 넣어주면 자성입자에 있는 toxin과 결합하는 앵타머 혹은 항체들은 없게 된다. 따라서 자력을 이용하여 자성비드를 모은 후 그것을 형광측정했을시에 검출이 되질 않는다.

앞서 개발한 sulfamethazine, aflatoxinB1 그리고 STX1, 2의 각 subunitA, B에 대한 단클론항체를 리셉터로 사용하여 competitive OBRIMA의 시험에 사용되었다.

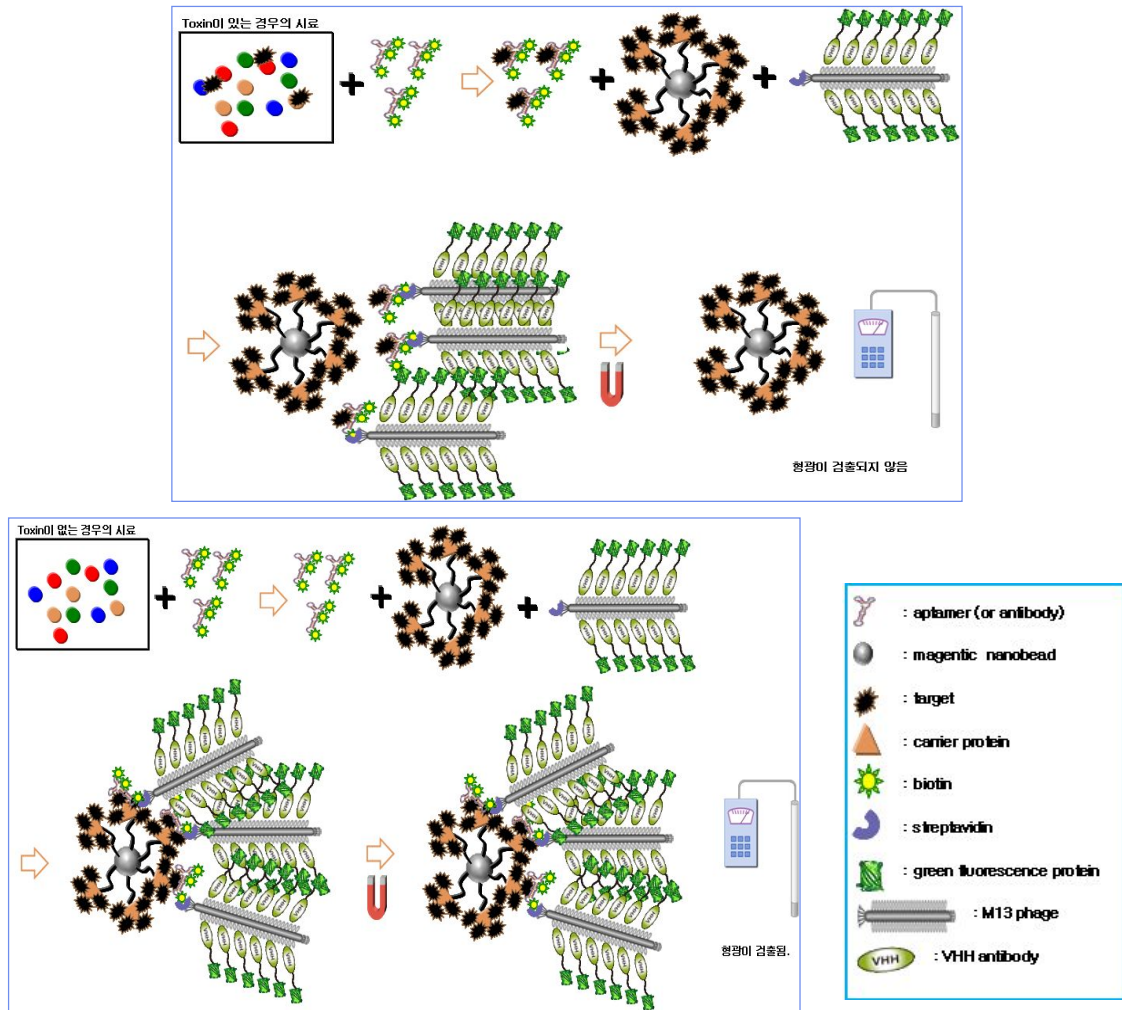


그림 136. Competitive OBLIMA 모식도

(2) 효과 검증

(가) Aflatoxin B1에 대한 효과 검증

자성나노입자-바이오마커 복합체에 대한 aflatoxin B1의 검출 효능을 살펴보기 위해 aflatoxin B1을 $0\mu\text{g/ml}$, $0.001\mu\text{g/ml}$, $0.01\mu\text{g/ml}$, $0.1\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 실험을 실시하였다. 우선 각 농도별 aflatoxin B1을 바이오틴이 labeling된 항체(10mg, 위 aflatoxin B1 단일클론항체 제작 참조)와 반응을 시키고 난 다음에 aflatoxin B1과 결합된 자성비드와 streptavidin-M13 phage, anti-M13 phage Nanobody-GFP를 반응 시킨 후 GFPIII filter fluorometer로 형광 측정하여 그래프로 나타내었다. 그 결과 아래의 그림과 같은 결과를 보였는데 $0.01\mu\text{g/ml}$ 까지 검출이 가능하며 $0.1\mu\text{g/ml}$ 이상일 경우는 시료에 aflatoxin B1이 잔류한다고 사료된다.

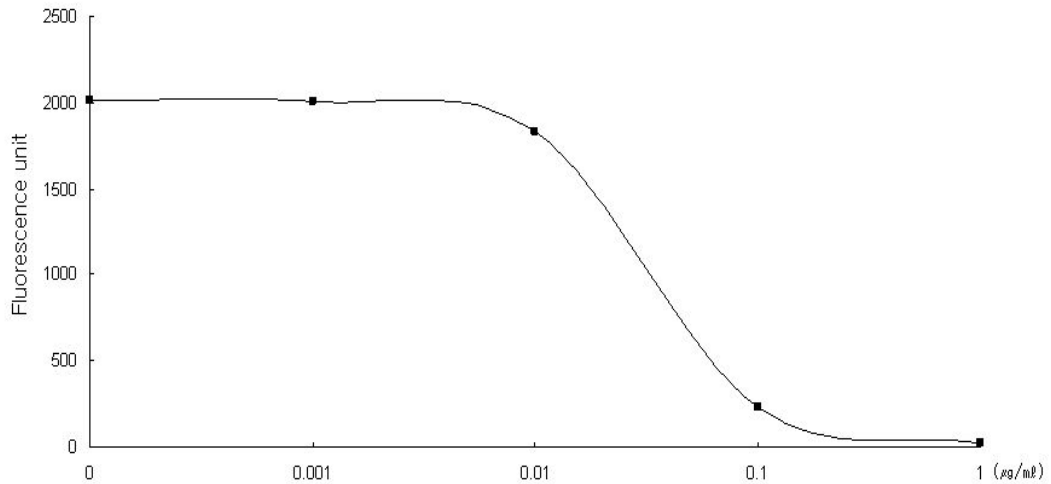


그림 137. Aflatoxin B1에 대한 자성나노입자-바이오마커 복합체의 효능

(나) Sulfamethazine에 대한 효과 검증

자성나노입자-바이오마커 복합체에 대한 sulfamethazine의 검출 효능을 살펴보기 위해 sulfamethazine을 0μg/ml, 0.001μg/ml, 0.01μg/ml, 0.1μg/ml, 1μg/ml의 농도로 실험을 실시하였다. 우선 각 농도별 sulfamethazine을 바이오틴이 labeling된 SMZ31A6 세포주로부터 생산된 항체 (10mg)와 반응을 시키고 난 다음에 sulfamethazine과 결합된 자성비드와 streptavidin-M13 phage, anti-M13 phage Nanobody-GFP를 반응 시킨 후 GFPIII filter fluorometer로 형광 측정하여 그래프로 나타내었다. 그 결과 아래의 그림과 같은 결과를 보였는데 0.01μg/ml까지 검출이 가능하며 0.1μg/ml 이상일 경우는 시료에 sulfamethazine이 잔류한다고 사료된다.

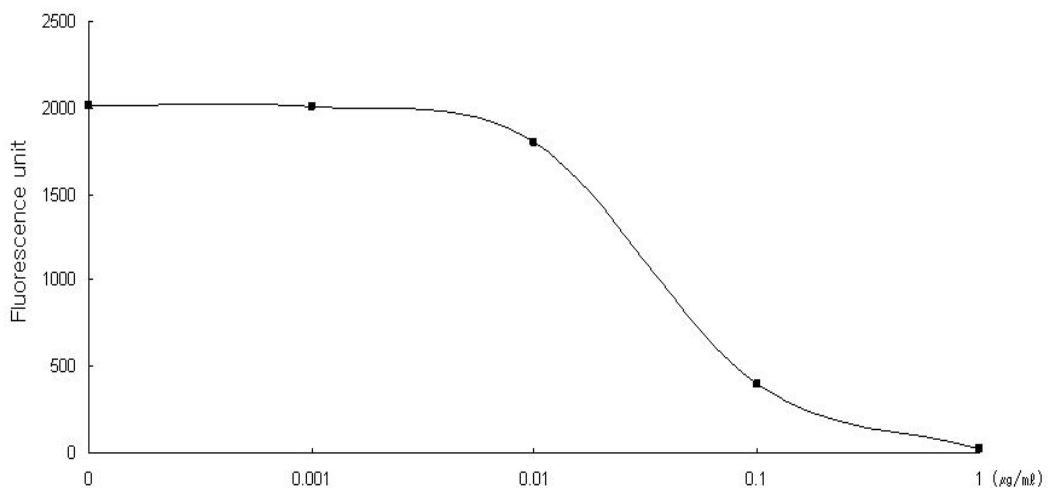


그림 138. Sulfamethazine에 대한 자성나노입자-바이오마커 복합체의 효능

(다) Shiga toxin에 대한 효과 검증

자성나노입자-바이오마커 복합체에 대한 shiga toxin 1, 2의 검출 효능을 살펴보기 위해 shiga toxin 1, 2를 0μg/ml, 0.001μg/ml, 0.01μg/ml, 0.1μg/ml, 1μg/ml의 농도로 실험을 실시하였다. 우선 각 농도별 shiga topxin 1, 2를 바이오틴이 labeling된 SIA4H5, SIB2B4, SIIX4G2 세포주로부터

생산된 각 항체(10mg)와 반응을 시키고 난 다음에 shiga toxin 1, 2와 결합된 자성비드와 streptavidin-M13 phage, anti-M13 phage Nanobody-GFP를 반응 시킨 후 GFPIII filter fluorometer로 형광 측정하여 그래프로 나타내었다.

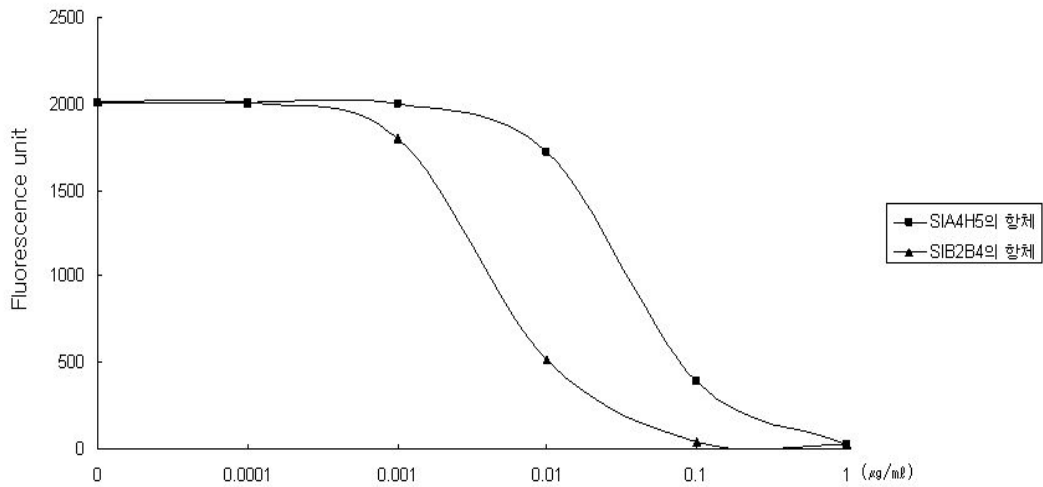


그림 139. Shiga toxin 1에 대한 자성나노입자-바이오마커 복합체의 효능

그 결과 상기의 그림과 같은 결과를 보였는데 shiga toxin 1 subunit A의 항체는 0.01μg/ml까지 검출이 가능한 반면 shiga toxin 1 subunit B의 항체는 그 보다 더 낮은 toxin의 농도에서도 검출이 되는 것을 보여주었다. 이는 shiga toxin 1의 항원이 subunit A 와 subunit B이 1 : 4의 비율로 존재하기 때문일 것으로 사료된다.

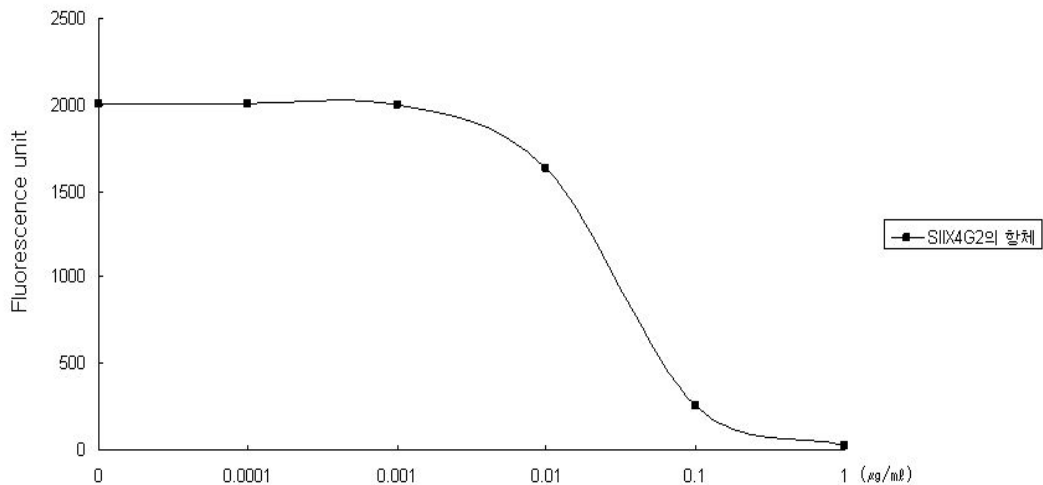


그림 140. Shiga toxin 2에 대한 자성나노입자-바이오마커 복합체의 효능

Shiga toxin 2의 항체는 0.01μg/ml까지 검출이 되는 것을 보여주었다.

마. OBLIMA 구성요소들의 최적화 및 실용화

OBLIMA 구성요소들인 나노입자, 형광복합체등은 본 연구 과제 수행에 따라 생산 완료하였다. 첫 번째의 구성요소인 나노입자-protein A/G 복합체는 아미노그룹으로 표면 치환된 실리카 코팅 자성입자와 대장균에서 발현, 정제된 protein G monomer, dimer, trimer의 복합체 생산을 완료하였으며 두 번째 구성요소인 나노항체-형광복합체의 경우 어느 다른 항체들보다 항원과의 결합력이 우수한 M13 bacteriophage에 대한 single domain antibody를 5개 확보하여 이 중 3개의 single domain antibody와 GFP, RFP를 연결한 형광단백질 복합체를 완성하여 대장균에서 발현, 정제하여 생산 완료하였고 세 번째 구성요소인 streptavidin-형광복합체는 여러 가지 환경 조건 (유기용매, 변성제, 세정제, proteolytic enzymes, 온도, pH)에 저항성을 가지는 biotin-streptavidin complex의 특성을 이용하기 위해 재조합 유전자 기법을 활용하여 streptavidin과 형광단백질 (GFP, RFP, YFP) 복합체 생산을 완료하여 대장균에서 발현, 정제하여 생산 완료 하였다.

바. 제1세부과제 생산 aptamer 및 위해화학물질 복합체에 대한 단클론 항체 실용화

(1) Tetracycline에 대한 aptamer TC2와 나노항체-형광복합체와 streptavidin-형광복합체의 효능 검증

제1세부과제에서 생산된 tetracycline에 대한 aptamer TC2 (biotin이 lagelling 되어 있음)와 형광복합체와의 효능 검증을 위해 다음의 실험을 실시하였다. 우선 96well immunoplate (black)에 BSA와 conjugation된 tetracycline을 well당 2 μ g씩 coating하고 (이때 negative control로 BSA만 coating함) 5% powder skim milk로 blocking하였다. 그 후 PBST (PBS + tween 0.05%) buffer로 washing 한 후 TC2를 처리하였다. 그 후 M13 bacteriophage에서 display 되는 streptavidin을 (10^{10} pfu/ml) 100 μ l, 1시간 처리를 하고 PBST buffer로 washing 후 M13 bacteriophage에 대한 nanobody (2B12, 2E9, 53A1) - GFP, RFP 단백질 (0.1mg/ml)을 처리하였다. 그리고 PBST로 washing한 후 형광 측정기로 그 형광수치를 측정하여 그래프로 나타내었다. 그리고 streptavidin - GFP, RFP 처리는 위의 실험 과정중 M13 bacteriophage에서 display 되는 streptavidin 처리 과정을 제외하고 바로 streptavidin - GFP, RFP 단백질 (0.1mg/ml)을 처리하였다. Control로 대장균에서 발현, 정제한 GFP와 RFP 단백질을 사용하였다. 그 결과 아래 그림과 같이 TC2와 형광복합체 간에 binding이 되는 것을 확인할 수 있었는데 특히, streptavidin - 형광 단백질을 처리한 것 보다 M13 bacteriophage에 대한 nanobody - 형광 단백질을 처리한 실험구에서 더 높은 형광 수치를 관찰 할 수 있었으며 M13 bacteriophage에 대한 nanobody - 형광 단백질의 단독 처리구 보다 3개의 복합체를 혼합 처리한 것의 형광 수치가 확연하게 차이가 나는 것을 관찰 할 수 있었다. 이 결과로 실제 표적물질의 검출시에는 M13 bacteriophage에 대한 nanobody - 형광 단백질의 3가지 종류를 모두 혼합하여 사용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

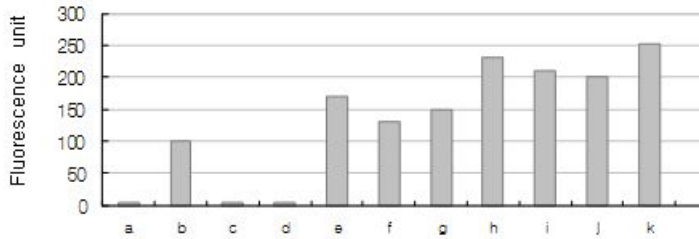


그림 141. Tetracycline에 대한 aptamer TC2와 나노항체 - GFP 단백질과 streptavidin - GFP 단백질의 효능 확인 및 비교 [a; BSA→TC2→GFP, b; TC2→Streptavidin+GFP, c; RFP→Streptavidin - GFP, d; RFP→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - GFP, e; TC29→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - GFP, f; TC29→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - GFP, g; TC29→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - GFP, h; TC29→Streptavidin/M13 phage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - GFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - GFP), i; TC29→Streptavidin/M13 bacteriophage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - GFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - GFP), j; TC29→Streptavidin/M13 bacteriophage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - GFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - GFP), k; TC29→Streptavidin/M13 bacteriophage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - GFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - GFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - GFP)]

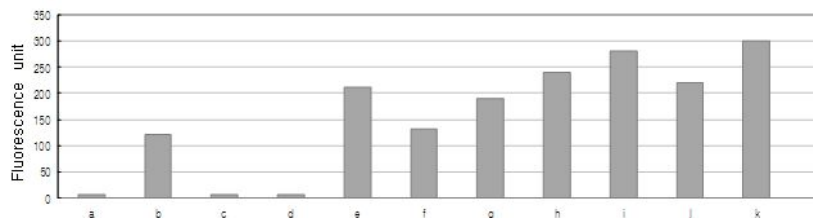


그림 142. Tetracycline에 대한 aptamer TC2와 나노항체 - RFP 단백질과 streptavidin - RFP 단백질의 효능 확인 및 비교 [a; BSA→TC2→RFP, b; TC2→Streptavidin+RFP, c; GFP→Streptavidin - RFP, d; GFP→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - RFP, e; TC29→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - RFP, f; TC29→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - RFP, g; TC29→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - RFP, h; TC29→Streptavidin/M13 phage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - RFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9+RFP), i; TC29→Streptavidin/M13 bacteriophage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - RFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - RFP), j; TC29→Streptavidin/M13 bacteriophage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - RFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - RFP), k; TC29→Streptavidin/M13 bacteriophage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - RFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - GFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - RFP)]

(2) Sulfamethazine에 대한 단클론 항체 (31A6)와 나노항체-형광복합체와 streptavidin - 형광복합체의 효능 검증

본 연구과제 수행시 제작 완료된 단클론 항체 SMZ 31A6과 형광복합체와의 효능 검증을 위해 ELISA 실험을 실시하였다. 우선 96well immunoplate (black)에 BSA와 conjugation된 sulfamethazine을 well당 2 μ g씩 coating하고 (이때 negative control로 BSA만 coating함) 5% powder skim milk로 blocking하였다. 그 후 PBST (PBS + tween 0.05%) buffer로 washing 한 후 biontin과 conjugation된 SMZ 31A6 항체를 처리하였다. 그 후 M13 bacteriophage에서 display 되는 streptavidin을 (10^{10} pfu/ml) 100 μ l, 1시간 처리를 하고 PBST buffer로 washing 후 M13 bacteriophage에 대한 nanobody (2B12, 2E9, 53A1) - GFP, RFP 단백질을 (0.1mg/ml)을 처리하였다. 그리고 PBST로 washing한 후 형광 측정기로 그 형광수치를 측정하여 그래프로 나타내었다. 그리고 streptavidin - GFP, RFP 처리는 위의 실험 과정중 M13 bacteriophage에서 display 되는 streptavidin 처리 과정을 제외하고 바로 streptavidin - GFP, RFP 단백질 (0.1mg/ml)을 처리하였다. Control로 대장균에서 발현, 정제한 GFP와 RFP 단백질을 사용하였다. 그 결과 아래 그림과 같이 sulfamethazine에 대한 단클론 항체 SMZ 31A6과 형광복합체 간에 binding이 되는 것을 확인할 수 있었는데 특히, streptavidin - 형광 단백질을 처리한 것 보다 M13 bacteriophage에 대한 nanobody - 형광 단백질을 처리한 실험구에서 더 높은 형광 수치를 관찰 할 수 있었으며 M13 bacteriophage에 대한 nanobody - 형광 단백질의 단독 처리 구 보다 3개의 복합체를 혼합 처리한 것의 형광 수치가 확연하게 차이가 나는 것을 관찰 할 수 있었다. 이 결과는 tetracycline aptamer TC29를 처리한 것과 유사한 결과이다.

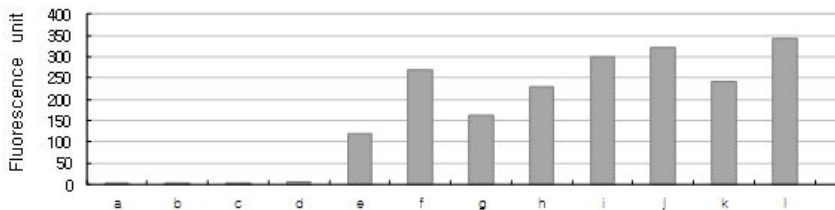


그림 143. Sulfamethazine에 대한 단클론 항체 31A6와 나노항체 - GFP 단백질과 streptavidin - GFP 단백질의 효능 확인 및 비교 [a; BSA→biotin - SMZ 31A6→GFP, b; RFP→Streptavidin - GFP, c; RFP→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - GFP, d; biotin - SMZ 31A6→GFP, e; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin - GFP, f; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - GFP, g; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - GFP, h; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - GFP, i; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 bacteriophage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - GFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9+GFP), j; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 bacteriophage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - GFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - GFP), k; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 bacteriophage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - GFP)+(M13

bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - GFP), l; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 bacteriophage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - GFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - GFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - GFP)]

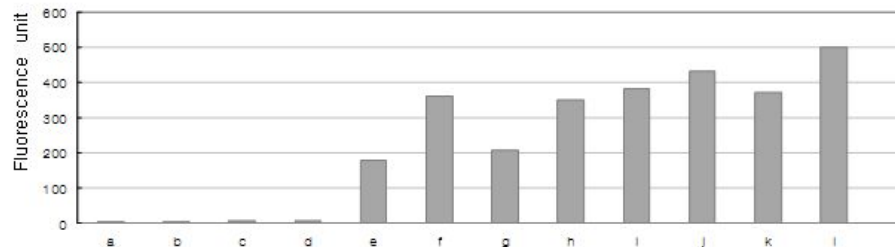


그림 144. Sulfamethazine에 대한 단클론 항체 31A6와 나노항체 - RFP 단백질과 streptavidin - RFP 단백질의 효능 확인 및 비교 [a; BSA→biotin - SMZ 31A6→RFP, b; GFP→Streptavidin - RFP, c; GFP→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - RFP, d; biotin - SMZ 31A6→RFP, e; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin+RFP, f; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - RFP, g; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - RFP, h; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 phage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - RFP, i; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 bacteriophage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - RFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - RFP), j; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 bacteriophage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - RFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - RFP), k; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 bacteriophage→M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - RFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - RFP), l; biotin - SMZ 31A6→Streptavidin/M13 bacteriophage→(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2B12 - RFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 2E9 - RFP)+(M13 bacteriophage에 대한 nanobody 53A1 - RFP)]

사. 검출 표적별 최적의 검출체제 선택 및 실용화

(1) 표준물질의 검출 시스템 연계성 평가

개발된 자성나노입자-바이오마커 복합체를 사용하여 위해화학물질의 용이한 검출을 위해 competitive OBRIMA system을 사용하여 toxin이 없을 때 형광이 검출되고 toxin이 있을 때 형광이 검출되지 않는 특성을 이용하였다. 이 특징을 이용하기 위해 BSA와 conjugation된 화학물질 (tetracycline, enrofloxacin, sulfamethazine, malachite green)을 자성 나노 bead와 결합시켜 다음의 실험을 실시하였다.

(가) 자성 비드의 준비

Competitive OBRIMA system에 사용되는 자성비드는 SH기를 치환시켜 BSA의 SH기와

disulfide 결합하는 원리로 준비를 하였으며 전체 모식도는 아래 그림과 같다.

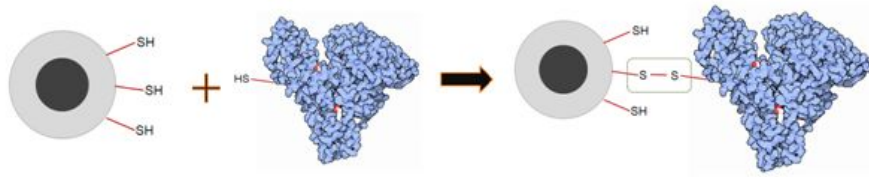


그림 145 . Competitive OBRIMA system에 사용되는 자성 비드의 모식도

(나) Sulfamethazine이 결합된 bead 사용을 통한 competitive OBRIMA system

우선 sulfamethazine이 결합된 자성 나노 bead 실험에서는 SMZ 31A6 (+biotin) 항체와 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfaclozine sodium을 각각 0, 50, 100, 200, 400, 5000ppb 농도로 혼합 처리한 후 자성 나노 bead를 처리하였다; 본 실험에 사용한 biotin과 conjugation된 sulfamethazine에 대한 단클론 항체 31A6는 streptavidin-HRP를 사용하여 확인하였다. 그 후 M13 bacteriophage에서 display 되는 streptavidin을 (10^{10} pfu/ml) $500\mu\text{l}$, 1시간 처리를 하고 PBS buffer로 washing 후 M13 bacteriophage에 대한 nanobody (2B12, 2E9, 53A1) - GFP 단백질 (0.1mg/ml)을 처리하였다. 그리고 PBST로 washing한 후 형광 측정기로 그 형광수치를 측정하여 그래프로 나타내었다. 그 결과 아래 그림과 같이 sulfamethazine에 대한 단클론 항체 SMZ 31A6과 형광복합체 간에 binding이 우수하여 0ppb와 100ppb 비교시 약 2000정도의 형광수치가 차이가 나는 것으로 보아 이 검출 시스템이 효율적으로 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다. 특히나 이 결과는 실제 위해화학물질의 잔류 허용기준 (MRL)이 되는 100ppb에서도 용이하게 sulfamethazine이 검출 될 수 있음을 보여주고 있다. 그러나 sulfamethazine의 검출 효율이 높은 반면 같은 sulfonamide 계열인 sulfamerazine, sulfaclozine sodium은 형광수치가 0ppb와 100ppb 비교시 약 500정도 차이가 나는 것을 보였는데 이는 sulfamethazine에 특이적인 단클론 항체의 특성 때문인 것으로 생각된다. 따라서 해당 시료에서 이 검출 시스템을 적용하면 효율적으로 신속, 정확하게 해당 위해물질을 검출할 수 있을 것으로 생각된다.

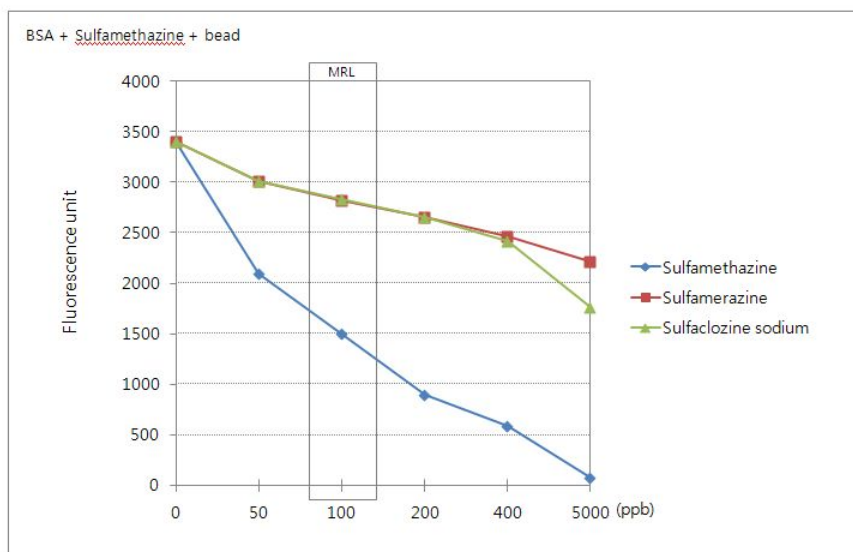


그림 146. Sulfamethazine에 대한 단클론 항체 SMZ 31A6를 이용한 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfaclozine sodium의 검출 효과

(다) Tetracycline이 결합된 bead 사용을 통한 competitive OBRIMA system

우선 tetracycline이 결합된 자성 나노 bead 실험에서는 제1세부과제에서 생산한 tetracycline에 대한 aptamer인 TC2와 tetracycline, oxytetracycline, chlorotetracycline을 각각 0, 50, 100, 200, 400, 5000ppb 농도로 혼합 처리한 후 자성 나노 bead를 처리하였다. 그 후 M13 bacteriophage에서 display 되는 streptavidin을 (10^{10} pfu/ml) $500\mu\text{l}$, 1시간 처리를 하고 PBS buffer로 washing 후 M13 bacteriophage에 대한 nanobody (2B12, 2E9, 53A1) - GFP 단백질 (0.1mg/ml)을 처리하였다. 그리고 PBST로 washing한 후 형광 측정기로 그 형광수치를 측정하여 그래프로 나타내었다. 그 결과 아래 그림과 같이 tetracycline, oxytetracycline, chlorotetracycline에 대한 aptamer인 TC2와 형광복합체 간에 binding이 우수하여 0ppb와 100ppb 비교시 약 1000정도의 형광수치가 차이가 나는 것으로 보아 이 검출 시스템이 효율적으로 이용될 수 있음을 확인하였으며 이 실험 결과로 여러 가지 시료에서 tetracycline, oxytetracycline, chlorotetracycline을 검출할 시에 TC2 aptamer를 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

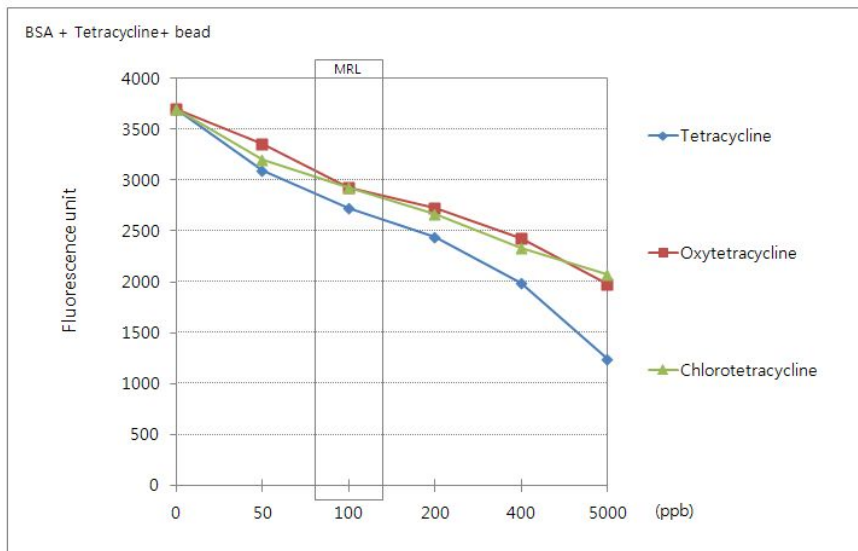


그림 147. Tetracycline에 대한 aptamer TC2를 이용한 tetracycline, oxytetracycline, chlorotetracycline의 검출 효과

(라) Enrofloxacin이 결합된 bead 사용을 통한 competitive OBRIMA system

우선 enrofloxacin이 결합된 자성 나노 bead 실험에서는 제1세부과제에서 생산한 enrofloxacin에 대한 aptamer EF3와 enrofloxacin, ciprofloxacin을 각각 0, 50, 100, 200, 400, 5000ppb 농도로 혼합 처리한 후 자성 나노 bead를 처리하였다. 그 후 M13 bacteriophage에서 display 되는 streptavidin을 (10^{10} pfu/ml) $500\mu\text{l}$, 1시간 처리를 하고 PBS buffer로 washing 후 M13 bacteriophage에 대한 nanobody (2B12, 2E9, 53A1) - GFP 단백질 (0.1mg/ml)을 처리하였다. 그리고 PBST로 washing한 후 형광 측정기로 그 형광수치를 측정하여 그래프로 나타내었다. 그 결과 아래 그림과 같이 enrofloxacin, ciprofloxacin에 대한 aptamer와 형광복합체 간에 binding이 우수하여 0ppb와 100ppb 비교시 약 800정도의 형광수치가 차이가 나는 것을 확인하

였다. 따라서 해당 시료에서 이 검출 시스템을 적용하면 효율적으로 해당 위해물질을 신속하게 검출할 수 있을 것으로 생각된다.

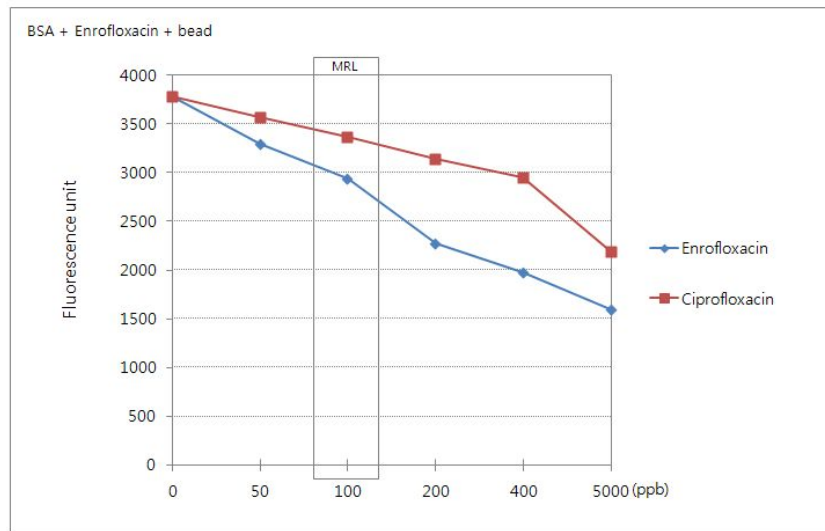


그림 148. Enrofloxacin에 대한 aptamer EF3를 이용한 enrofloxacin, ciprofloxacin의 검출 효과

(마) Malachite green이 결합된 bead 사용을 통한 competitive OBRIMA system

우선 malachite green이 결합된 자성 나노 bead 실험에서는 제1세부과제에서 생산한 malachite green에 대한 aptamer MG4와 malachite green을 각각 0, 50, 100, 200, 400, 5000ppb 농도로 혼합 처리한 후 자성 나노 bead를 처리하였다. 그 후 M13 bacteriophage에서 display 되는 streptavidin을 (10^{10} pfu/ml) $500\mu\text{l}$, 1시간 처리를 하고 PBS buffer로 washing 후 M13 bacteriophage에 대한 nanobody (2B12, 2E9, 53A1) - GFP 단백질 (0.1mg/ml)을 처리하였다. 그리고 PBST로 washing한 후 형광 측정기로 그 형광수치를 측정하여 그래프로 나타내었다. 그 결과 아래 그림과 같이 malachite green에 대한 aptamer와 형광복합체 간에 binding이 우수하여 0ppb와 100ppb 비교시 약 1300정도의 형광수치가 차이가 나는 것을 확인하였는데 이는 위의 세 가지 결과와 일치하는 것으로 competitive OBRIMA system이 위해 화학물질 검출 system으로 유용하게 사용될 수 있음을 보여주는 결과들이라고 생각된다.

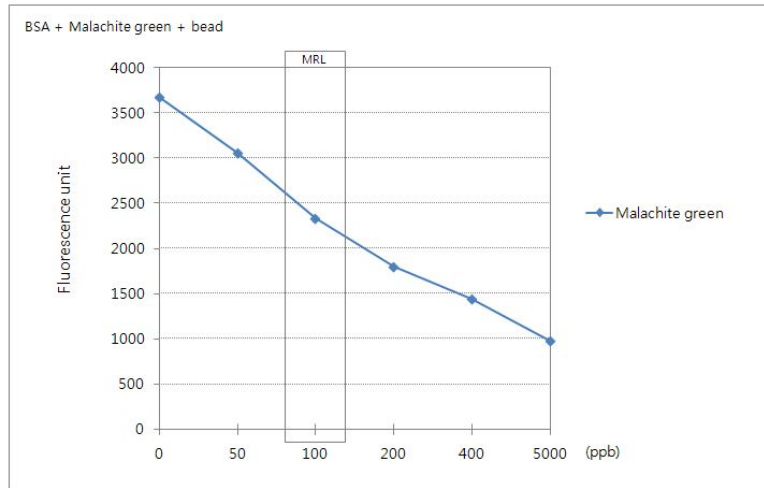


그림 149. Malachite green에 대한 aptamer MG4를 이용한 malachite green의 검출 효과

(2) 표준 구동매뉴얼 작성 및 현장 평가

위해 화학물질의 검출을 신속, 정확하게 할 수 있는 competitive OBRIMA system의 구동매뉴얼을 작성 나노 bead와 aptamer, 단클론 항체, 나노항체, 나노항체-형광단백질간의 반응 조건 및 반응 시간들을 고려하여 다음과 같이 표준화 하였다.

(가) 표준 구동매뉴얼 작성

- ① 상기에 기술된 위해 물질별 최적의 전처리를 과정을 통해 시료를 준비한다.
- ② 해당 위해 화학물질 단클론 항체 및 aptamer를 30분간 상온에서 처리 한다; 이때 사용되는 aptamer 및 단클론 항체에는 biotin이 conjugation 되어 있다.
- ③ BSA와 toxin이 conjugation되어 처리된 자성 bead와 위 혼합물은 상온에서 1시간 반응시킨다.
- ④ PBS buffer로 3회 washing한다.
- ⑤ Streptavidin/M13 bacteriophage (10^{10} pfu/ml)를 상온에서 1시간 처리한다.
- ⑥ PBS buffer로 1회 washing한다.
- ⑦ M13 bacteriophage에 대한 nanobody - GFP를 상온에서 1시간 처리한다.
- ⑧ PBS buffer로 2회 washing한다.
- ⑨ 위 반응물을 70°C에서 5분간 열처리한 후 상등액만을 취해 형광 측정기에서 형광 수치를 측정 한다; 이때 시료를 넣지 않고 위 반응을 시킨 대조구의 형광 수치를 비교 한다.

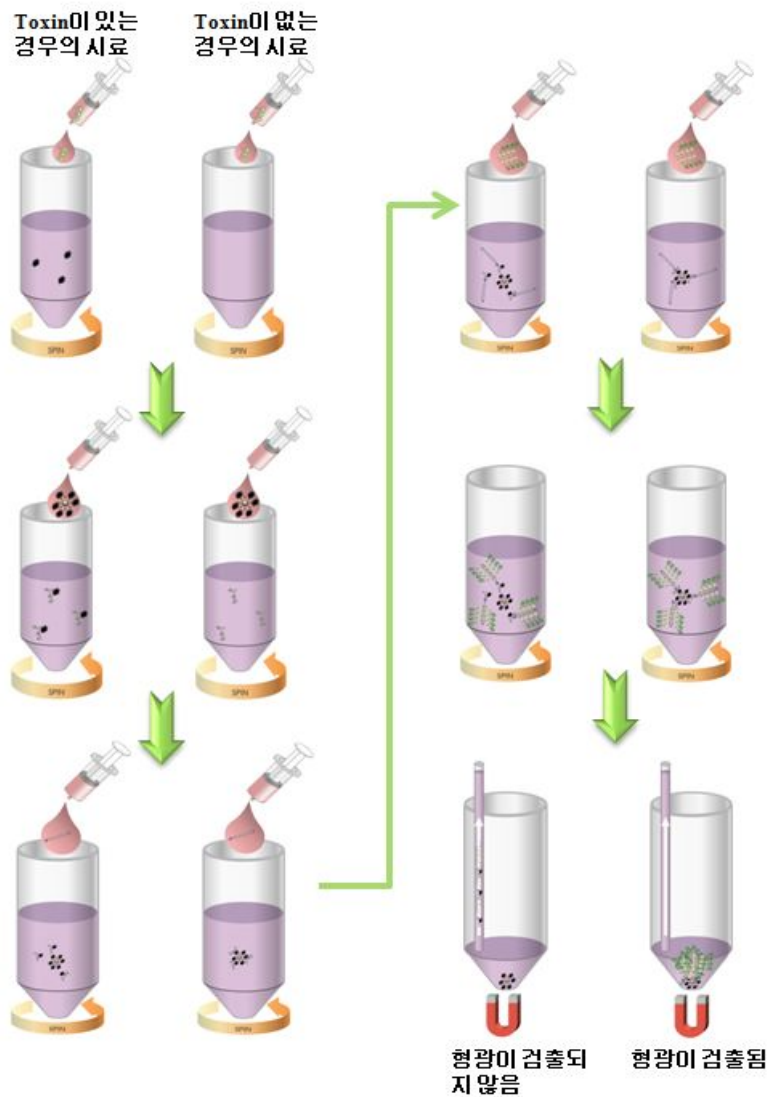
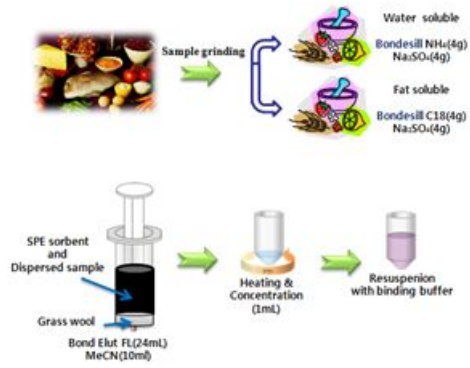
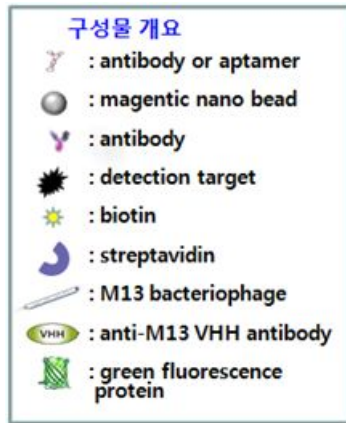


그림 150. Competitive OBRIMA system을 이용한 위해 화학물질의 검출 방법

3. 현장 적용성 자동화 Magnetic bead Processor 및 Fluorescence Detector 개발 [제2협동연구 (주) 비전과학서울]

가. 자성나노입자 기반 자동화장비 기본 설계

(1) 식품위해물질 검출 자동화장비의 기본설계 및 자성나노기반 복합체와의 상호구동성 분석

(가) 기본설계

본 자동화장비는 자성나노입자와 protein G multimer 및 목표 위해물질에 대한 단/다클론 항체의 삼중 복합체를 이용하여 식품위해독성 물질을 신속하게 검출하기 위한 장비로 특정 세포에 활성화되는 자성나노입자와 검출물을 용기에 투입한 후 적절한 속도와 회전방법으로 고르게 섞이게 하고 자력판을 접근시켜 한곳으로 모이게 한 후 완충액을 배출시키고 다시 채우는 세척작업을 수행 한 후 최종적으로 자성나노입자와 결합된 특정 화학물을 농축하는 일련의 과정을 자동화하는 방법 및 그 장비에 관한 것이다. 양적으로는 식품검체의 구동에 적합한 50ml 코니칼튜브를 사용하고 6개의 검체를 동시에 처리할 수 있도록 규격을 결정하였다.

상기한 목적을 달성하기 위하여 본 자동화장비는

자성나노입자와 검체를 투입한 용기를 고정시키기 위한 고정 수단(a),

다수의 고정수단을 일정간격으로 배열하여 동시에 회전시키는 혼합장치수단(b),

이를 회전시키는 모터장치(c)

혼합된 액체에서 자성나노입자만을 모으게 하는 자력판수단(d),

자력판을 구동시키는 자력판 구동수단(e)

용기의 버퍼만을 흡입하는 흡입배출기(f)

흡입배출기를 구동하기 위한 펌프(g)

새로운 버퍼를 공급하는 버퍼공급기(h)

버퍼공급기를 구동하기 위한 펌프 (i)

위상수단을 상하로 구동하는 모터수단(j)

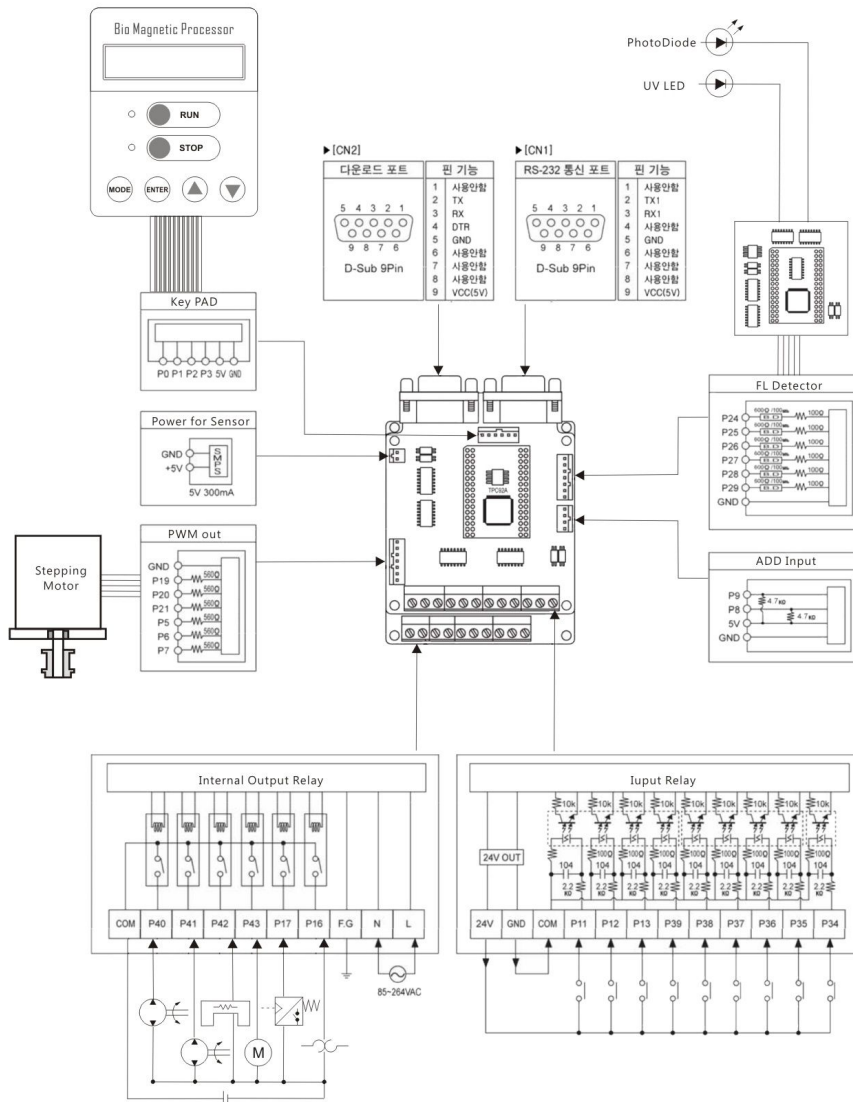
구동부의 모든 동작을 제어하는 마이크로프로세서를 내장한 제어부(k),

제어부를 조절하는 제어판넬(l),

형광농도를 Detection하기 위한 검출장치(m),

각 구동수단을 설치하고 구동부에서 발생하는 열기를 외부로 방출하도록 다수의 방출구가 형성된 외장케이스(n) 및 를 구비하는 것을 특징으로 하도록 설계하였다.

회로구성 및 I/O위치도



Automatic Magnetic Processor Scheme

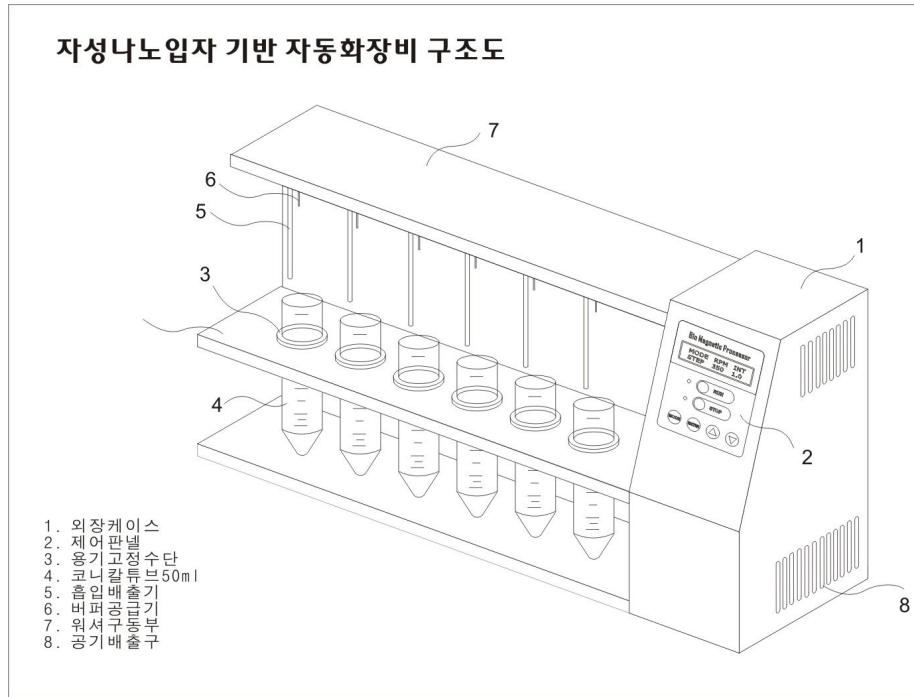


그림 1. 자동화 장비의 개괄적 모식도

(나) 구동방법

본 자동화장비의 구동방법은 상기의 목적을 달성하기 위하여

- ① 용기를 고정장치에 결합시키는 단계
- ② 용기에 자성나노입자와 검체를 주입 하는 단계
- ③ 혼합장치를 회전시켜 자성나노입자와 검체를 혼합시키는 단계
- ④ 혼합장치를 정지시키고, 자력판을 구동시켜 자성나노입자만을 모으는 단계
- ⑤ 워싱조절부를 흡입배출하기 위해 하강시키는 단계
- ⑥ 흡입배출기의 펌프를 가동하여 용액을 흡입배출하는 단계
- ⑦ 버퍼공급기의 펌프를 가동하여 새로운 버퍼를 공급하는 단계
- ⑧ 워싱조절부의 위치를 원위치로 보내기 위하여 상승시키는 단계
- ⑨ 필요에 따라서 (다) 에서 (바)의 단계를 반복하는 단계
- ⑩ 자성나노입자를 회수하는 단계
- ⑪ (카) 튜브를 가열하여 형광단백질을 분리하는 단계를 포함하도록 하였다

(2) 자동화단계별 요구, 충족 조건 설정

(가) 모터구동장치를 기반으로 동작하기에 메인프레임의 정밀성과 치밀한 작동을 보장하기 위하여 AL플레이트를 정밀m가공하여 메인드라이브유닛을 설계하였다.

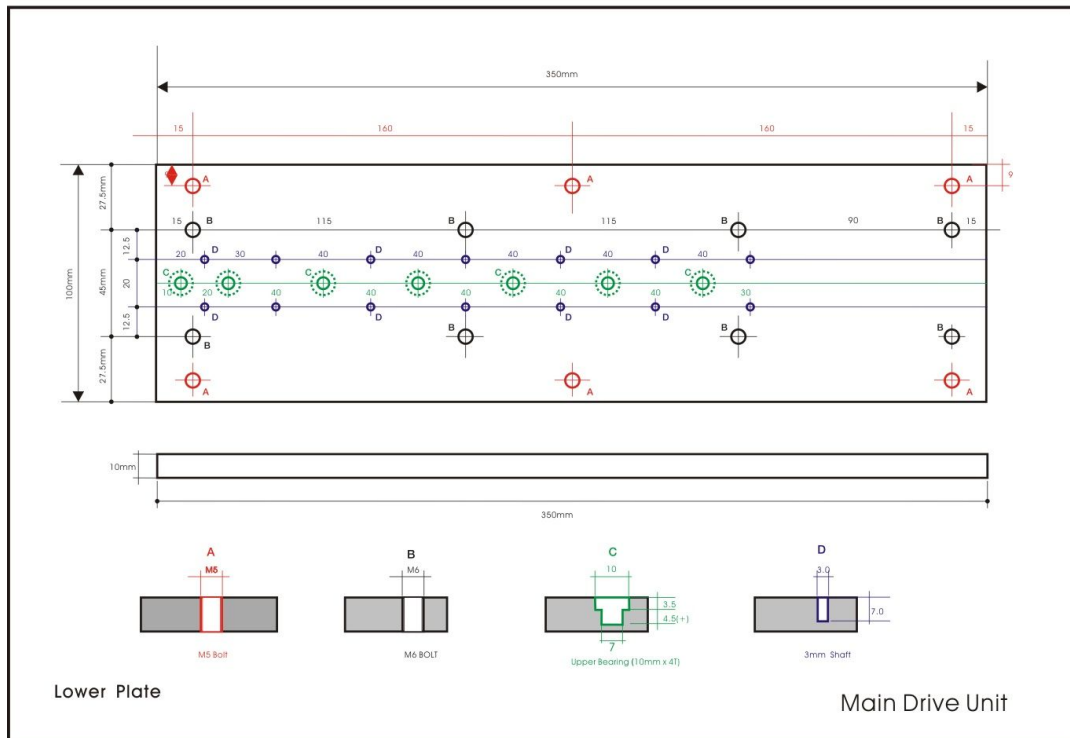
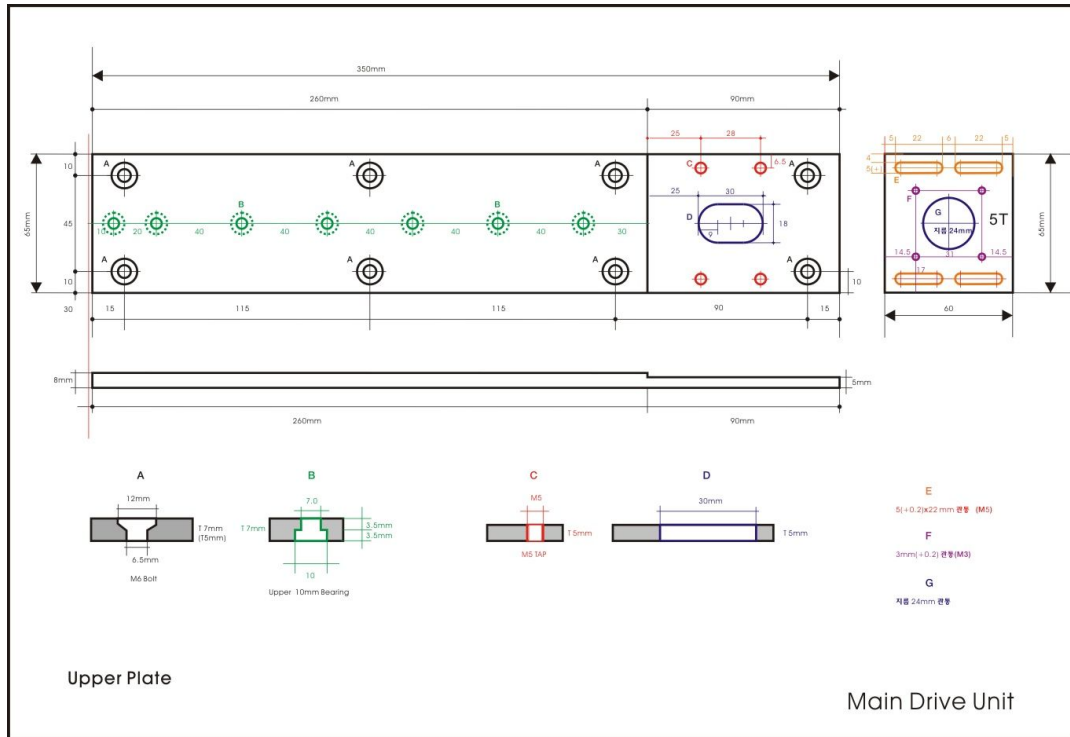


그림 2. Main Drive Unit Lay out

(나) 용기 고정 장치는 용기가 삽입되는 개구부에서 아래쪽으로 소정의 각도를 유지하여 용기가 중 간에 걸리는 형태로, 여러 개의 용기의 높이가 일정하게 유지되며, 용기가 가볍게 고정된다. 재질은 아세탈 재질을 가공하여 제작했다.

(다) 혼합장치수단은 6개의 용기를 한 개의 모터로 동시에 회전시키기 위하여 우레탄 벨트와 풀리를 사용하며 미끄러짐을 최소화시키고 회전방법은 최적의 혼합결과를 얻기 위하여 한 방

향으로 계속 회전하는 연속회전, 회전과 정지를 반복하는 스텝회전, 시계방향과 반시계방향으로 방향을 바꾸어 회전하는 왕복회전등 세 가지 방법 중 하나를 선택 할 수 있으며 스텝회전, 왕복회전의 경우 각각의 정지 지연 시간을 0에서 5초까지 0.5초단위로 지정할 수 있으며 회전 속도를 100에서 500RPM까지 가변 할 수 있고 회전 시간을 지정 할 수 있도록 고안하였다.

혼합장치 수단은 고정장치 하단부에 타이밍기어 홈을 두어 미끄러짐을 방지하고 적은 장력으로도 원활한 회전이 가능하도록 설계하였으며 혼합장치수단은 6개의 용기를 동시에 회전시키는 형태로 구성하였다.

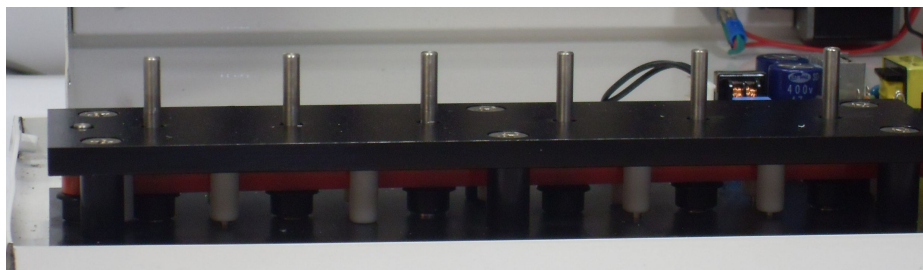
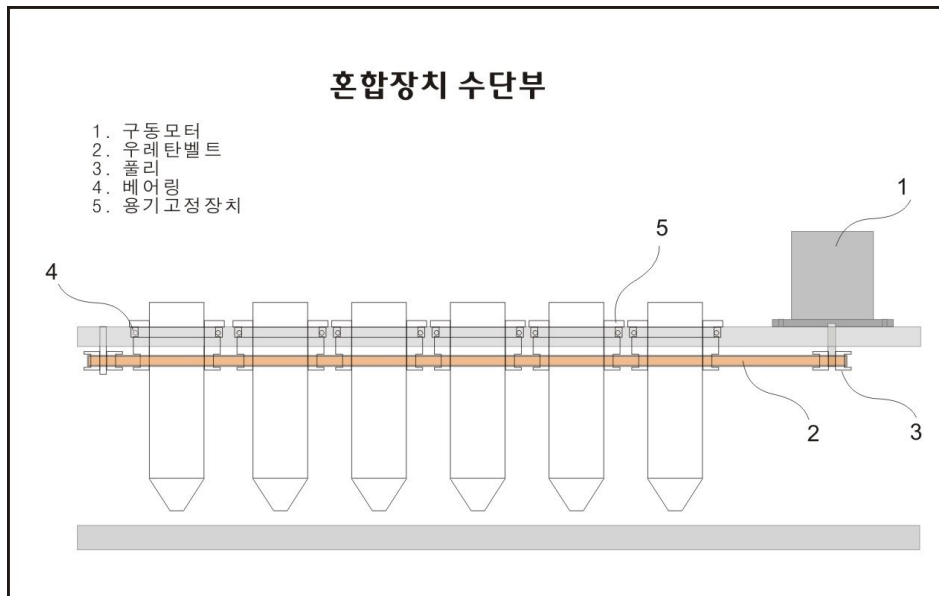


그림 3. 혼합장치 수단부 설계 및 시제품 모듈

(라) 자력판 장치수단은 영구자석을 일정간격으로 배열한 자력판을 용기하단부에 접촉하거나 용기로부터 자력판을 이격시키는 구동을 하여 자성나노입자를 모으거나 확산시킬 수 있다. 위의 변환작동은 전기모터를 기반으로 구동하도록 하였다.

자력판 장치수단의 구동은 회전운동을 직선운동으로 변환하기 위하여 타이밍벨트와 풀리를 이용하여 독자적으로 설계하였으며 신속하게 동작하고 자기유지성이 좋아 적합한 성능을 나타내는 것으로 시제품 모듈에서 확인되었다.

장비의 현장성과 자기밀도의 영향을 최소화 하여야 하지만 코니칼튜브 속에 부유하고 있는 자성나노입자를 모으려면 대단히 강력한 자기특성이 필요하므로 40x20x10T의 N45급 이상의 ND-FE-B 희토류 자석으로 선정하였다.

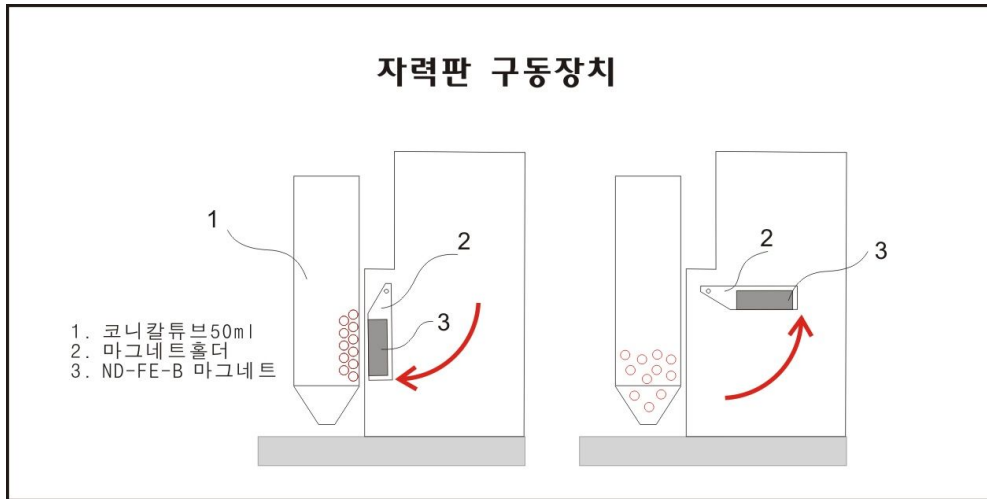


그림 4. 자력판 구동장치 작동 모식도 및 시제품 모듈

(마) 워싱장치 수단부는 전기적모터를 사용하여 하강하여 흡입장치의 펌프를 이용하여 용기 내부의 액체를 흡입하여 튜브를 통해 배수통으로 배출되도록 하였으며 버퍼공급기는 펌프를 통해 용기에 버퍼를 공급한다. 제어장치를 통하여 워싱의 횟수를 설정할 수 있으며 용기의 수위를 감시할 수 있는 센서를 장착할 예정이다. 흡입튜브의 경우는 오염의 우려가 있기 때문에 경제성과 가공성을 고려하여 SUS파이프와 glass Tubing을 선정하여 disposable 혹은 가압멸균 (autoclave)이 가능하도록 설계하였다.

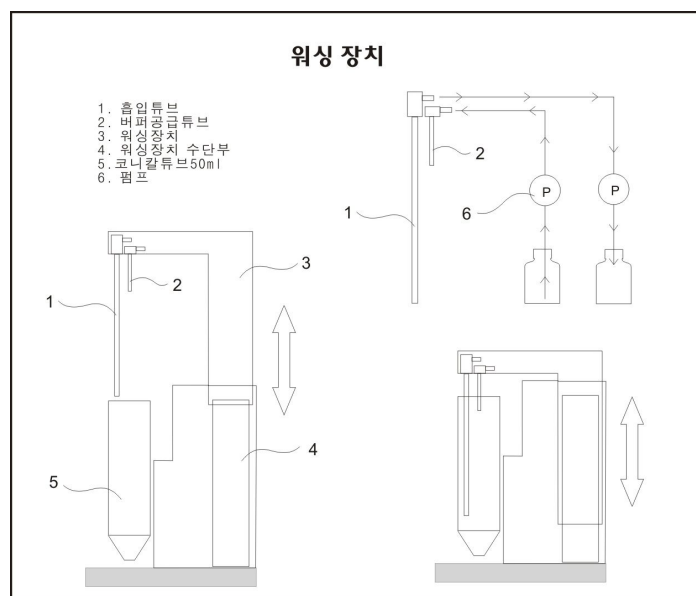


그림 5. 워싱장치 모식도

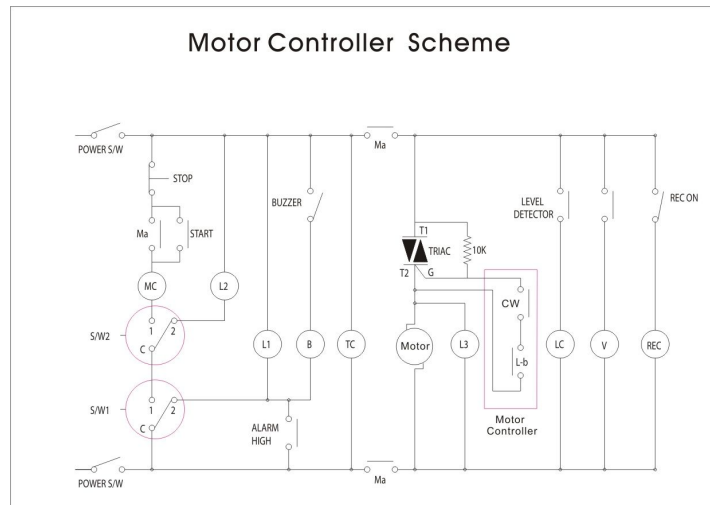


그림 6. Motor Drive Schem

(3) 단계별 사양 설비 및 규격설정 및 시제품 제작

(가) 상기내용을 검토하여 다음과 같이 규격을 설정하고 시제품을 제작하였다.

규격을 설정하고 설계하는데 해결해야할 몇 가지 문제점이 (흡입튜브사용의 불편, 제품크기 및 소비 전력량의 증가 등)있는 바 이는 현장평가를 실시하면서 수정하고 지속적으로 보완할 예정이다.

(나) 제품 규격

품명 : 자성나노입자기반 위해물질 자동검출장치

** Specification

Main control: Microprocessor based Automatic controller

Tube Capacity: 50ml Cornical Tube x 6Tubes

Drive Motor: Stepping Motor 4phase

Motion Control: -RPM : 0 - 500RPM

-Mode : Continous, Step, Receiprocal

-Interval : 0.05,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0

Magnet Field: 6EA, Up to 3,250G

Inlet Pump: 1.2Liter/min

Outlet Pump: 1.2Liter/min

GFP Detector: - Light Source : Solid state LED

- Wavelength : 470nm, 525nm, 554nm

- Detector : PIN Diode

Heat Block: Up to 90°C

Cabinet: Stainless steel with coating

Dimension: 460 x 220 x 360(H)mm

Power: AC220V , 60Hz,



그림 7. 자성나노입자 기반 위해물질 자동검출장치

나. 자동화장비 시제품 제작 및 평가

(1) 자동화장비 시제품의 제작

(가) 자성나노입자 처리장치의 기본설계

본 자성나노입자 처리장치는 일차년도 연구결과를 바탕으로, 자성나노입자와 protein G multimer 및 목표 위해물질에 대한 단/다클론 항체의 삼중 복합체를 이용하여 식품위해독성 물질을 신속하게 검출하기 위한 장비로 특정 세포에 활성화되는 자성나노입자와 검출물을 용기에 투입한 후 적절한 속도와 회전방법으로 고르게 섞이게 하고 자력판을 접근시켜 한곳으로 모이게 한 후, 완충액을 배출시키고 다시 채우는 세척작업을 수행 한 후 최종적으로 자성나노입자와 결합된 특정 화학물을 농축한 후 GFP의 분리를 위한 가열장치를 작동시키는 일련의 과정을 자동화하는 방법 및 그 장비에 관한 것이다. 양적으로는 식품검체의 구동에 적합한 50ml 코니칼튜브를 사용하고 6개의 검체를 동시에 처리할 수 있도록 규격을 결정하였다.

(나) 형광측정장치의 기본설계

형광 측정장치는 자성나노입자와 결합된 GFP의 농도를 확인하여 독성물질의 잔류를 정량적으로 확인하기 위한 장치로 다양한 파장에 대응하고, 측정감도 및 반응시간이 우수하여야 하며, 사용자가 간단하게 사용할 수 있어야 한다. 특히 자성나노입자 처리장치와 연계하여 활용하여야 하므로 코니칼튜브에 직접사용이 가능하도록 광섬유 프로브를 사용하여 수중에서 직접 사용할 수 있도록 설계를 결정 하였다.

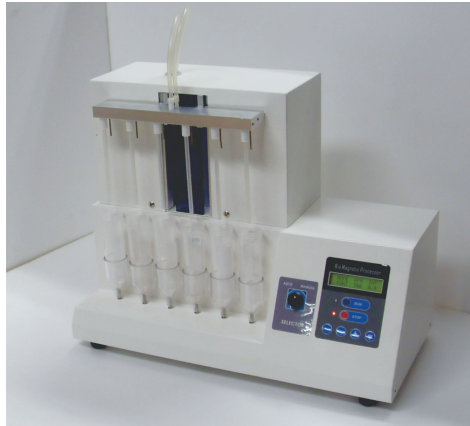


그림 8. 자성나노입자처리장치



그림 9. 형광측정장치

(2) 자성나노기반 복합체와의 상호 구동성 평가 및 개선

(가) 자성나노입자 처리장치

본 자동화장비는 다음과 같은 구성부분을 가지며 각 기능의 특징은 다음과 같다.

① 제어부

자동화 처리구간을 총괄하는 시스템의 두뇌역할을 하는 곳으로 마이크로프로세서를 사용하여 모든 작업이 자동으로 처리되게 한다. 메인보드와 릴레이보드를 개발기능서를 바탕으로 아트웍작업을 통해 PCB를 제작하고 프로그램을 입력하였다.

② 콘트롤 패널

기본적으로 10개의 키와 6개의 LED 를 사용하여 사용자거 쉽고 간단하게 사용할 수 있도록 설계했으며 MCU는 ATMEGA128 Chip을 사용하고,터치식 키패드와 Back-lit LCD로 구성되어 있다.

- 3개의 메모리기능이 있어 설정내용을 저장하고 불러낼 수 있다.
- Step, Reciprocal, Continuos 세가지 모드로 동작가능하다.
- 속도는 100 - 500RPM까지 50RPM단위로 설정가능하다.

- 인터벌은 0-5초까지 0.5초 단위로 설정
- 시간은 99분50초까지 10초단위로 설정가능
- 반복회수는 9회까지 가능
- 전자동 모드 및 수동모드 모두 선택하여 사용가능

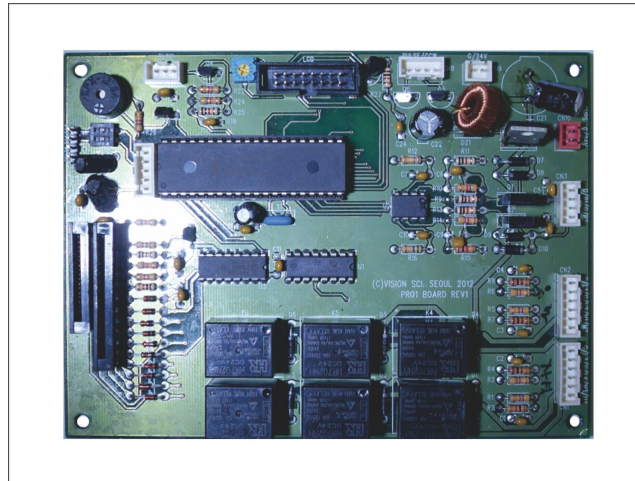


그림 10. Mian PCB

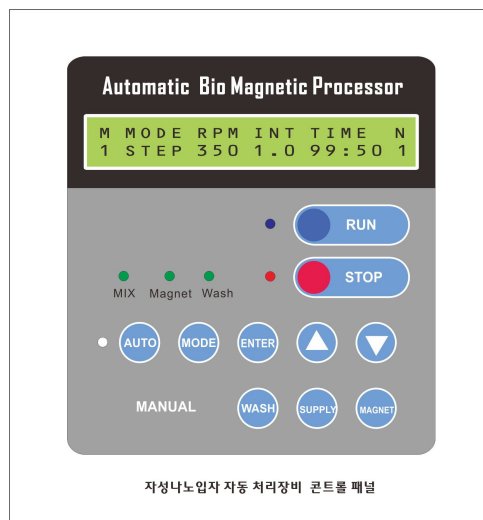


그림 11. 콘트롤패널 시안

㉞ 안전기능

4개의 리미트 스위치가 정상 동작을 확인 하고 기기의 오동작을 방지한다. 자력판장치의 정상 동작여부, 워싱장치의 상하 이동을 확인하는 기능을 하며 워싱 장치의 물 공급 펌프에는 유량센서를 부착하여 주입되는 버퍼의 양을 조절하여 오버플로우를 방지한다.

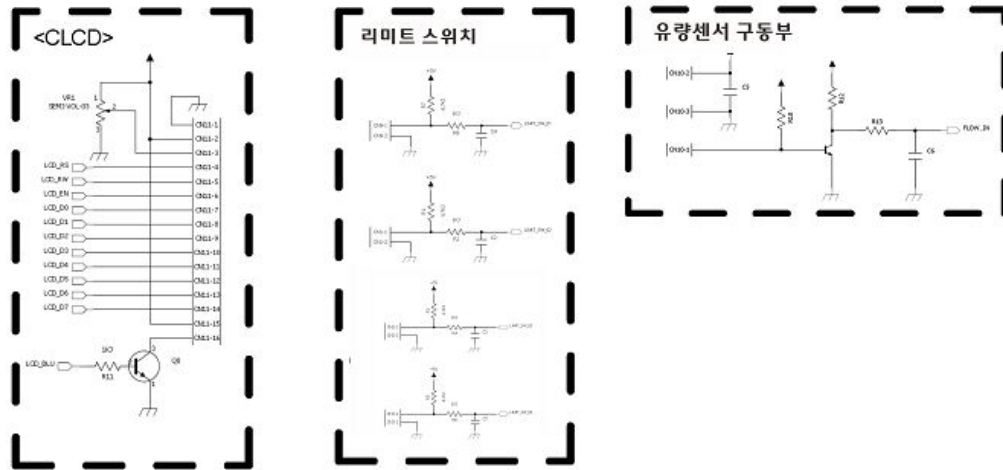


그림 12. 리미트 스위치 및 유량센서 구동부

㉔ 모터 및 펌프 동작제어

본 장비에는 1개의 스테핑모터와, 2개의 기어드 모터, 2개의 펌프가 내장되며 제어부에서는 각 모터 및 펌프의 구동 속도, 시간, 방향 등을 제어하여 전체적인 동작을 제어한다.

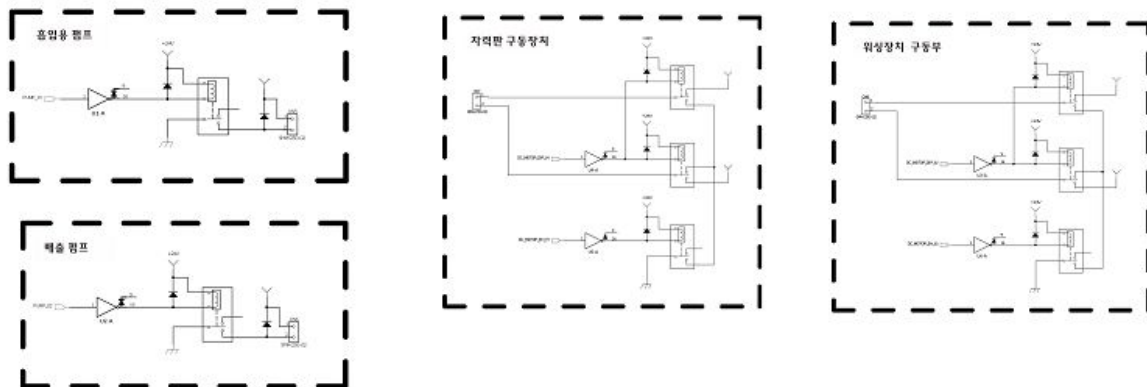


그림 13. 모터 및 펌프의 구동회로

② 혼합장치 수단부

자성나노입자와 검체를 투입한 용기를 고정시키고, 회전시키는 혼합장치로 6개의 용기를 한 개의 모터로 동시에 회전시키기 위하여 우레탄 벨트와 풀리를 사용하며 미끄러짐을 최소화시키고 회전방법은 최적의 혼합결과를 얻기 위하여 한 방향으로 계속 회전하는 연속회전, 회전과 정지를 반복하는 스텝회전, 시계방향과 반시계방향으로 방향을 바꾸어 회전하는 왕복회전 등 세 가지 방법 중 하나를 선택 할 수 있으며 스텝회전, 왕복회전의 경우 각각의 정지 지연 시간을 0에서 5초까지 0.5초단위로 지정할 수 있으며 회전속도를 100에서 500RPM까지 가변 할 수 있고 회전 시간을 지정 할 수 있도록 제작하였다.



그림 14. 혼합장치 수단부

③ 자력판 구동장치

자력판 장치수단은 영구자석을 일정간격으로 배열한 자력판을 용기하단부에 접촉하거나 용기로부터 자력판을 이격시키는 구동을 하여 자성나노입자를 모으거나, 확산시키는 기능을 하며 전기모터를 기반으로 구동하도록 하였다. 자력판 장치수단의 구동은 회전운동을 직선운동으로 변환하기 위하여 타이밍벨트와 풀리를 이용하여 독자적으로 설계하여 신속하게 조용하게 동작하며 사용자석은 강력한 자기특성이 필요하므로 3250가우스(G) 이상의 ND-FE-B 희토류 자석으로 선정하였다.

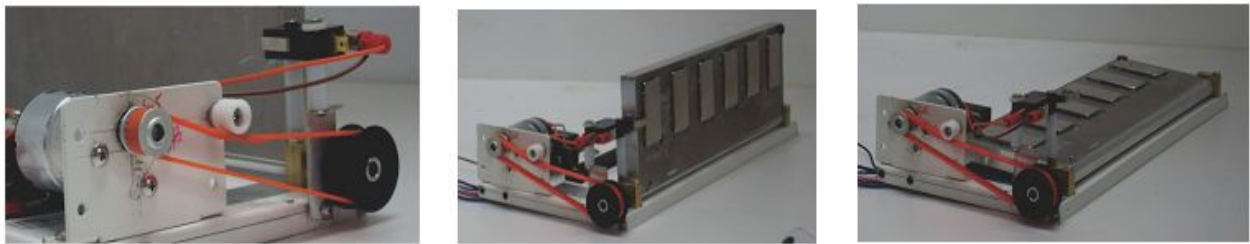


그림 15. 자력판장치 구동부분 -상세도, 자력판 가동시, 해제시 (좌측부터)

④ 워싱장치

워싱장치 수단부는 전기적모터를 사용하여 하강하여 흡입장치의 펌프를 이용하여 용기내부의 액체를 흡입하여 튜브를 통해 배수통으로 배출되도록 하였으며 버퍼공급기는 펌프를 통해 용기에 버퍼를 공급 하며 유량센서를 부착하여 오버플로우를 방지한다. 제어장치를 통하여 워싱의 회수제어가 가능하하다. 흡입튜브의 경우는 오염의 우려가 있기 때문에 경제성과 가공성을 고려하여 SUS파이프로 제작하였으며 disposable 혹은 가압멸균 (autoclave)이 가능하도록 설계하였다.



그림 16. 워싱장치 구동부분

⑤ 가열장치

시료혼합 후 결합된 GFP를 분리하기 위한 가열장치로 최대 100도까지 온도를 올릴 수 있다.

휴대형 현장장비란 측면을 고려해 단 1개의 코니칼 튜브를 사용할 수 있는 소형으로 설계된 알루미늄 히팅블록을 사용하였다. 세라믹 발열체를 사용하여 신속하게 온도상승이 이루어지며 과열방지장치가 내장되었다.

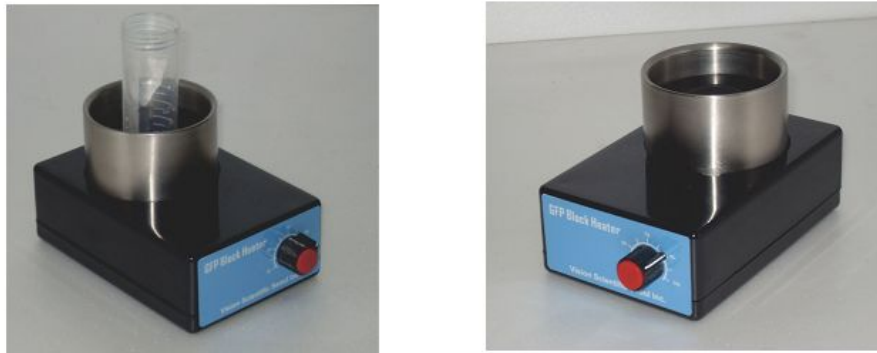


그림 17. 가열장치

(나) 형광측정장치

형광측정장치는 시료에 특정파장의 빛(470nm, 530nm등)을 쏘아 이에 반응하는 GFP의 형광량을 측정하여 이를 정량화 하기 위한 장비로 미세량의 형광을 측정하여야 하기 때문에 감도와 정밀도가 우수하여야 한다. 다양한 파장에 대응하기 위하여 광원 부 및 수광부를 교체하여 사용하도록 설계했고 본체에 광원부와 수광부를 배열하여 센서부위를 내장하고 광섬유 프로브를 결합하여 시료와 접촉할 수 있도록 설계하였다.

① 제어부

Dual FEP OP-Amp를 이용한 증폭회로를 설계하여 감도능력을 높이고 효율과 재현성을 높여 0.000-19.99mW/cm의 분해능, 광원은 적합한 파장의 LED 를 사용하고 Bandpass Filter 를 사용해 정확성을 높였다. 조작은 전원스위치와 조작버튼, 분해능조절을 위한 셀렉터로 구성된다.

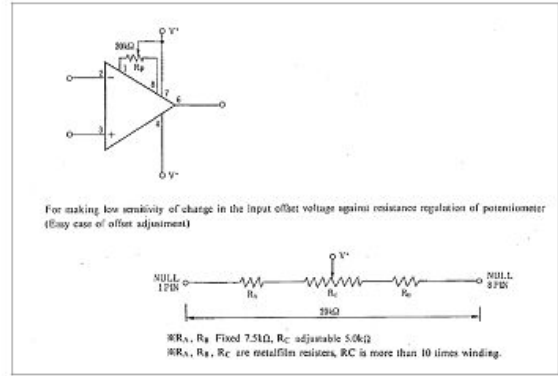


그림 18. 형광측정장치

표 1. 형광단백질의 반응 파장대

	Excitation Max(nm)	Emission Max(nm)
GFP	395, 470	509
RFP	554	581
PhiYFP	525	537

② 프로브

50ml 코니컬 튜브에 직접 투입하여야 하므로 두께 및 방수가 고려되어야 하고 열에 대한 안정성도 고려하여야 하므로 광섬유 프로브를 사용하였다. 광섬유는 저항이 극히적고 적당히 휘어지는 성질도 있어 Probe로 이상적이다. 용도에 따라 300도까지 견딜수 있으며, PE재질의 피복에 Composer Glass재질을 사용하였다.

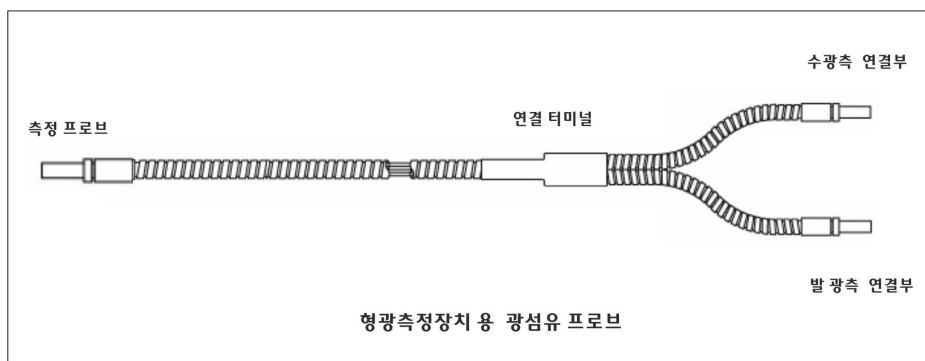


그림 19. Fiber Optic Probe설계도



그림 20. 광섬유 프로브



그림 21. 발광부와 수광부

③ GFP와 RFP의 농도별 형광 측정

정제된 GFP와 RFP를 $0.1\mu\text{g/ml}$, $0.2\mu\text{g/ml}$, $0.4\mu\text{g/ml}$, $0.8\mu\text{g/ml}$, $1.2\mu\text{g/ml}$, $1.6\mu\text{g/ml}$, $1.8\mu\text{g/ml}$, $2.0\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석하여 (PBS 사용) 상기 기기로서 그 형광수치를 측정하고 그래프로 나타내었다. 우선 GFP의 경우 아래 그림과 같이 negative control이 8인데 비해 $0.1\mu\text{g/ml}$ 일 경우 83, $0.2\mu\text{g/ml}$ 일 경우 245, $0.4\mu\text{g/ml}$ 일 경우 548, $0.8\mu\text{g/ml}$ 일 경우 945, $1.2\mu\text{g/ml}$ 일 경우 1508, $1.6\mu\text{g/ml}$ 일 경우 1930의 형광 수치가 나왔으며 그 이상의 농도에서는 측정불가였다. 따라서 상기 기기는 GFP의 경우 $0.1\mu\text{g/ml}$ 까지 측정이 되는 것으로 확인이 되었다.

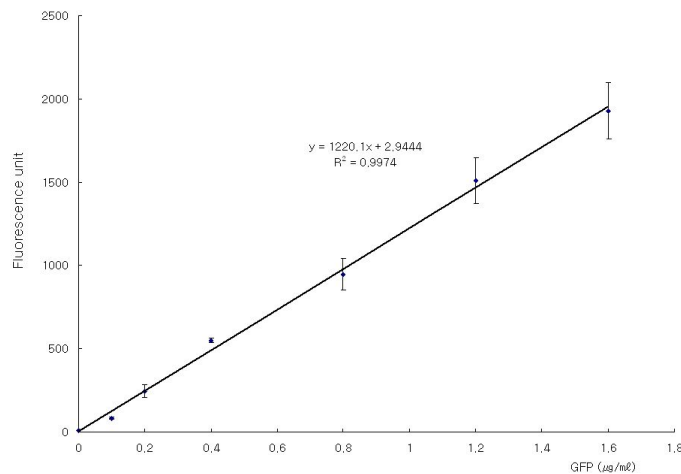


그림 22. GFP의 농도별 형광 수치

그리고 RFP는 아래 그림과 같은 결과가 나왔는데 각 농도별 형광수치는 GFP에 비해서 높은 형광 수치를 나타냈다. 최저 농도인 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 155의 형광수치가 나왔으며 $1.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서는 형광 수치가 불가능 하였다. 따라서 상기 기기로 GFP의 경우와 마찬가지로 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 측정이 되는 것을 확인하였다. 이 수치 결과만 해석해보면 GFP보다 RFP의 형광의 정도가 더 높은 것을 알 수 있었으나 상기 기기에서는 아래 그림과 같이 형광수치가 평균선을 벗어난 그래프를 보여 GFP보다는 불안정적인 측정이 될 것으로 생각된다.

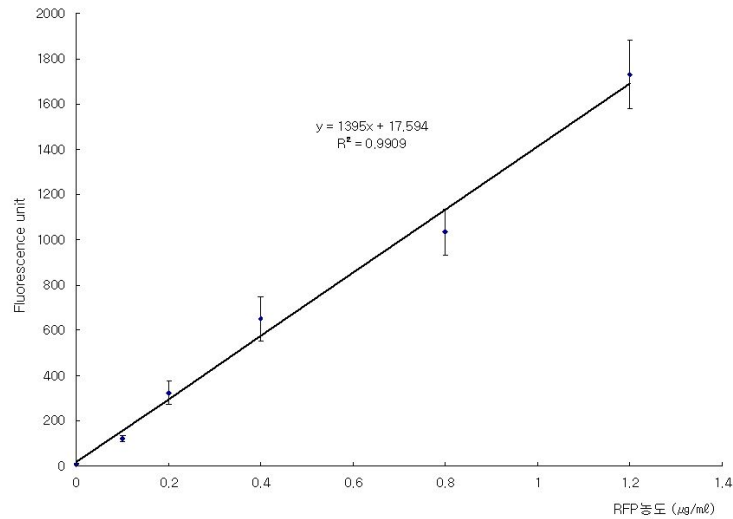


그림 23. RFP의 농도별 형광 수치

(다) 식품검체를 통한 종합평가
제 1 세부, 협동과제에서 수행함.

(라) 종합 구동성 평가결과 기반 완성품제작



그림 24. 형광측정장치, 자성나노입자처리장치, 가열장치 완성품 (좌측부터)

- ① 자성나노입자처리장치의 프로그램 완성
 - ㉠ 50ml코니컬 튜브에 시료 및 자성나노입자 투입
 - ㉡ 장치의 오토 버튼을 누른다.
 - ㉢ 설정된 모드, 속도, 시간 동안 시료와 자성나노입자를 믹스
 - ㉣ 설정시간 경과 후 혼합장치 정지
 - ㉤ 자력판 구동장치 작동, 30초간 유지
 - ㉥ 워싱장치 하강, 워싱작업실시
 - ㉦ 워싱장치 상승
 - ㉧ 사이클이 끝남, (설정에 따라 9회까지 반복가능)
 - 이후 가열장치 및 광측정장치로

다. Magnetic bead Processor와 Fliforescence detector의 융합모델개발

(1) 자성나노입자 자동화장비의 개발완료

본 자성나노입자 처리장치는 그동안의 연구결과를 바탕으로 자성나노입자와 protein G multimer 및 목표 위해물질에 대한 단/다클론 항체의 삼중 복합체를 이용하여 식품위해독성 물질을 신속하게 검출하기 위한 장비로 다음과 같이 개발 완료 하였으며 개발된 자성나노입자 자동화장비의 명칭을 “ 자성나노입자를 이용한 자동 분리 농축 처리장치 (Automatic separation enrichment processing unit using magnetic nano-particles)”로 정하고 상품명으로는 “자성나노입자 자동 처리기 (Automatic Micro Magnetic-bead Processor)”로 결정하였다.

(가) 자성나노입자 자동처리기의 개발

① 배 경

자성나노입자 자동처리기는 자성나노입자를 이용한 자동 분리 농축 처리장치에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 시료 속의 목표 위해물질을 농축 또는 분리하는 일련의 과정을 자동화하는 자성나노입자를 이용한 자동 분리 농축 처리장치에 관한 것이다.

일반적으로 자성나노입자는 진단, 약물 또는 유전자 전달, 암세포 특이적 살상, 세포 융합 등 생체용으로 이용되고 있다. 이에 따라 최근에는 자성나노입자를 이미징, 약물 전달 시스템, 바이오 물질 분리, 바이오 센서 등에 응용하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

특히 자성나노입자를 이용한 미생물 및 화학물의 농축에 관한 연구가 이루어지고 있다.

이러한 자성나노입자를 이용한 미생물 및 화학물의 농축과정은 특정 화학물이나 미생물 등에 반응하는 항체나 단백질 등이 코팅된 자성나노입자를 시험관 등의 용기에 시료와 혼합하고 자석을 이용하여 자성나노입자를 한곳에 모은 후 자성나노입자에 결합된 특정 화학물 및 미생물을 검출하거나 시료로부터 제거하는 용도로 사용되고 있다.

더욱이 자성나노입자를 생명공학관련 연구 및 분석에 활용할 수 있는 장비는 최근 활발하게 발전하는 분야로 이를 응용하여 DNA나 RNA같은 유전자의 순수 분리 및 정제를 수행하여 유전자의 클로닝이나 질병질환의 진단분야에서의 효율성을 높이거나 다양한 단백질 및 특정세포의 순수분리 및 농축을 위해 사용되어 지고 있다.

현재 특정세포의 순수분리 및 농축을 위해 사용되는 장비는 시험관 거치대에 자석을 붙이는 간단한 기구부터 자석봉을 이용하거나, 전자석을 이용하는 자동 장비 등이 사용되고 있으며 어느 제품이던지 자성나노입자를 분리하는데 자력을 이용한다는 공통점이 있다.

이 중 시험관 거치대에 자석을 붙이는 수동 방법은 자성나노입자와 시료를 담은 시험관을 혼합기로 혼합하여 고루 섞이게 하고 자석을 시험관에 밀착시켜 자성나노입자를 자석 쪽으로 모이게 한 후 파이펫을 이용하여 시료를 분석하는 용도로 사용되어지나 다수의 시료를 처리하기에는 매우 번거로운 작업이 될 뿐만 아니라 작업에 소요되는 시간으로 인하여 다수의 시료분석에는 제약이 있고 실험 오차가 발생 할 우려가 있으며 정량적으로 분석하기에는 한계가 있는 문제점이 있었다.

반면 자석봉이나 전자석을 이용하는 자동화 장비들은 재현성의 구현에는 문제가 없으나 한 번에 처리하는 시료의 수가 한 두개로 적으며 처리되는 시료의 양도 5ml 이하의 소량을 분석하는 장비이며 특별히 디자인된 전용 용기 및 소모품을 사용하게 되어 있어 처리비용이 고가이고 특정 영역에서만 사용되도록 디자인 되어 있는 문제점이 있었다.

따라서 자성나노입자를 이용한 분리 농축과정을 자성나노입자와 시료를 혼합하는 과정, 자석을 이용하여 자성나노입자를 분리하는 과정, 시료를 세척하는 과정 등 세 개의 과정을 자동으로 처리하도록 개선된 형태의 자성나노입자를 이용한 자동 분리농축 장치의 개발이 필요하다.

② 자성나노입자 자동처리기의 개발 효과

자성나노입자 자동 처리기에 따르면, 혼합부에 의해 자성나노입자와 시료를 혼합하는 과정, 영구자석을 이용하여 자성나노입자를 분리하는 과정, 세척부에 의해 시료를 세척하는 과정을 자동으로 처리하는 효과가 있다.

이에 따라 자성나노입자를 활용하는 공정을 단시간에 용이하게 할 수 있고 다량의 시료를 한

번에 처리할 수 있어 많은 시료를 처리하기에 유리하며, 대용량을 처리할 수 있어 유전자 연구에서부터 식품 등의 진단까지 다방면에 활용이 가능한 장점이 있다.

즉, 자성나노입자와 시료를 시험관에 투입한 후 적절한 속도와 회전방법으로 고르게 섞이게 하고 자력판을 접근시켜 한곳으로 모이게 한 후 시료를 배출시키고 다시 채우는 세척작업을 수행한 후, 최종적으로 자성나노입자와 결합된 시료 속의 특정 화학물 및 미생물 등을 농축 또는 분리하는 일련의 과정을 자동화하게 된다.

③ 자성나노입자 자동처리기의 특징

상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 자성나노입자 자동처리기는 다음과 같은 특징을 갖는다.

㉠ 본체는 상기 본체에 설치되며 다수의 시험관이 배열되어 자성나노입자와 시료를 혼합하는 혼합부 및 상기 시험관의 자성나노입자를 모으는 자력판 구동부를 포함하는 것을 특징으로 한다.

㉡ 상기 혼합부는 몸체와 상기 몸체에 설치되는 구동모터와 상기 구동모터에 결합되는 구동풀리와 상기 구동풀리와 고무벨트에 의해 연결되며 상기 몸체에 설치되는 종동풀리와 상기 고무벨트에 의해 회전하며 시험관이 삽입되도록 상기 몸체에 설치되는 시험관 회전대 및 상기 시험관 회전대와 몸체 사이에 설치되는 베어링으로 구성되는 것을 특징으로 한다.

㉢ 상기 자력판 구동부는 상기 본체에 결합되어 회전하는 자력판 및 상기 자력판에 부착되는 영구자석으로 구성되는 것을 특징으로 한다.

㉣ 상기 시험관의 시료를 흡입하거나 시험관에 세척액을 주입 및 흡입하는 세척부가 더 구비되는 것을 특징으로 한다.

㉤ 상기 세척부는 상기 시험관의 내부의 시료 또는 세척액을 흡입하는 흡입노즐과 상기 흡입노즐과 흡입튜브에 의해 연결되는 흡입펌프와 상기 시험관의 내부로 세척액을 주입하는 주입노즐 및 상기 주입노즐과 주입튜브에 의해 연결되는 주입펌프로 구성되는 것을 특징으로 한다.

㉥ 상기 흡입펌프와 주입펌프에는 폐수통과 세척액통이 각각 연결되는 것을 특징으로 한다.

㉦ 상기 주입튜브에는 플로우 센서가 구비되는 것을 특징으로 한다.

㉧ 상기 세척부를 시험관을 향해 상하로 이동시키는 승강부가 더 구비되는 것을 특징으로 한다.

㉨ 상기 승강부는, 구동력을 발생시키는 승강모터 및 상기 승강모터의 구동축에 설치된 상하이동풀리 및 상기 상하이동풀리와 세척부를 연결하는 이동벨트로 구성되는 것을 특징으로 한다.

㉩ 상기 자동 분리농축 장치의 동작을 통합적으로 제어하는 마이크로프로세서가 내장된 제어판넬이 더 구비되는 것을 특징으로 한다.

④ 자성나노입자 자동처리기의 사양

이하 자성나노입자 자동처리기의 사양을 도면을 참조하여 상세하게 설명한다.

자성나노입자 자동처리기는 본체(500)와 상기 본체(500)에 설치되며 다수의 시험관(900)이 배열되어 자성나노입자(910)와 시료를 혼합하는 혼합부(100) 및 상기 시험관(900)의 자성나노입

자(910)를 시험관(900)의 벽면으로 모으는 자력관 구동부(410)로 구성된다.

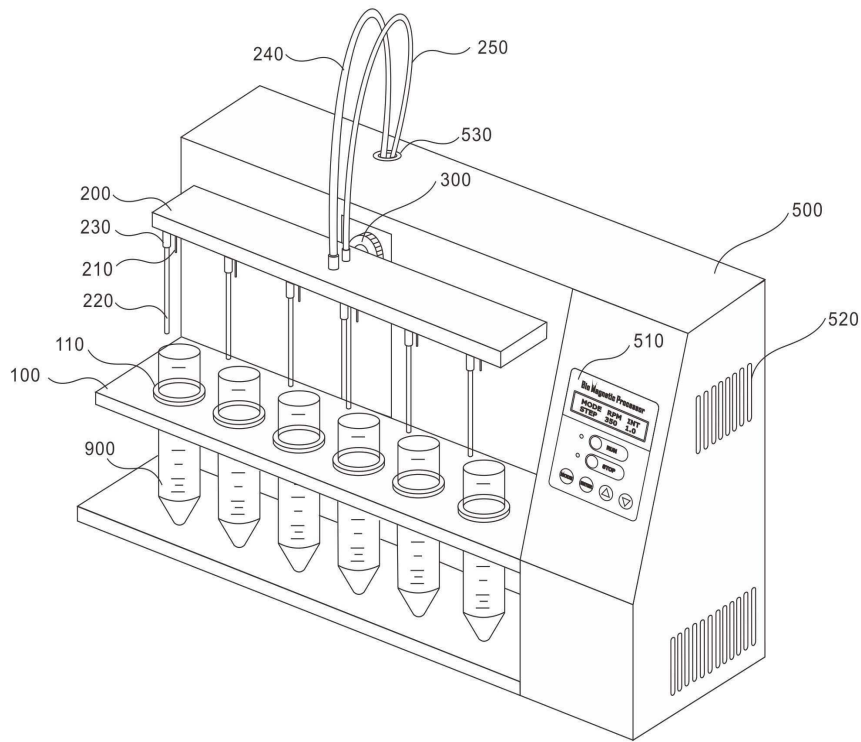


그림 25. 자성나노입자 자동처리기의 사시도 (100 : 혼합부, 110 : 시험관 회전대, 120 : 몸체, 200 : 세척부, 210 : 주입노즐, 220 : 흡입노즐, 230 : 흡입노즐 결합부, 240 : 흡입튜브, 250 : 주입튜브, 300 : 승강부, 500 : 본체, 510 : 제어판넬, 520 : 통풍구, 530 : 튜브공, 900 : 시험관)

먼저 상기 본체(500)는 자성나노입자 자동처리기의 외형을 형성하며, 전술한 구성 및 후술한 구성이 설치되는 베이스의 역할을 담당하게 된다.

또한 상기 본체(500)에는 후술될 흡입튜브(240) 및 주입튜브(150)가 통과하는 튜브통(530)과 상기 본체(500) 내부의 열기 및 공기를 배출하는 다수의 방출구(520)가 형성된다.

그리고 상기 본체(500)의 전면에는 본 발명의 자동 분리 농축 처리장치의 동작을 제어하는 마이크로프로세서가 내장된 제어판넬(510)이 더 구비된다.

혼합부(100)는 몸체(120)와 상기 몸체(120)에 설치되는 구동모터(170)와 상기 구동모터(170)에 결합되는 구동폴리(150)와 상기 구동폴리(150)와 고무벨트(160)에 의해 연결되며 상기 몸체(120)에 설치되는 종동폴리(140)와 상기 고무벨트(160)에 의해 회전하며 시험관(900)이 삽입되도록 상기 몸체(120)에 설치되는 시험관 회전대(110) 및 상기 시험관 회전대(110)와 몸체(120) 사이에 설치되는 베어링(130)으로 구성된다.

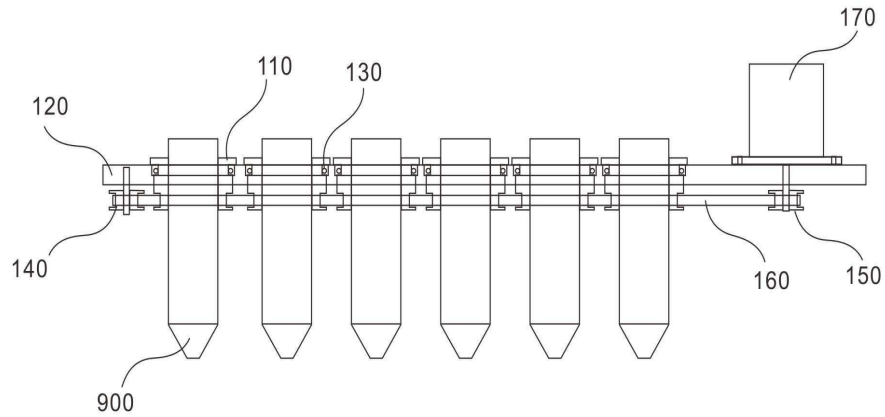


그림 26. 혼합 부의 단면도 (110 : 시험관 회전대, 120 : 몸체, 130 : 베어링, 140 : 종동폴리, 150 : 구동폴리, 160 : 고무벨트, 170 : 구동모터, 900 : 시험관)

상기 몸체(120)는 알루미늄으로 형성되며 상기 시험관 회전대(110)는 원통형으로 가공되며 그 내경이 기울기를 가지게 가공하여 시험관(900)을 끼워 고정할 때에 시험관 상단 부분이 자연스럽게 걸려서 고정된다.

더욱이 상기 시험관 회전대(110)는 사용되는 시험관(900)의 용량에 따라 크기가 다르게 가공되어 교체하여 사용할 수 있게 된다.

또한 상기 몸체(120)와 시험관 회전대(110)는 전술한 바와 같이 베어링(130)이 개재되어 원활한 회전이 이루어지게 된다.

이에 따라 상기 구동모터(170)의 회전에 의해 시험관 회전대(110)와 시험관(900)은 회전하여 시험관(900) 내부의 자성나노입자(910)와 시료가 고르게 섞이게 된다.

여기서, 상기 구동모터(170)는 제어판넬(510)에 의해 회전 속도, 회전시간, 회전방법 등 세 가지 조건을 임의로 설정할 수 있어, 자성나노입자와 시료가 고르게 섞이는 최적의 조건을 선택하여 사용하게 된다. 이때 회전속도는 50 ~ 500RPM의 범위로 설정할 수 있어 설정된 속도로 회전하게 되며, 회전시간은 0 ~ 59분 59초의 범위로 설정할 수 있어 설정된 시간만큼 회전하게 된다.

더욱이 상기 구동모터(170)의 회전방법은 세 가지 조건으로 설정할 수 있는데 하나는 연속회전으로 한 방향으로 계속 회전하는 조건이다.

다른 하나는 스텝회전으로 한 방향으로 일정시간 회전하고, 일정시간 회전을 중지하고 이렇게 회전과 정지를 반복적으로 구동하는 조건으로 이때 정지시간을 0 ~ 5초의 범위를 0.5초단위로 설정할 수 있게 된다.

또 다른 하나는 왕복회전으로 한 방향으로 회전하고 일정시간 회전을 중지하고 반대방향으로 회전하고 일정시간을 중지하고, 이렇게 회전과 정지를 반복적으로 구동하면서 구동방향을 반대로 바꿔가며 회전하는 조건으로 이때 정지시간을 0 ~ 5초의 범위를 0.5초단위로 설정할 수 있게 된다.

자력판 구동부(410)는 상기 본체(500)에 힌지결합되어 회전하는 자력판(430) 및 상기 자력판

(430)에 부착되는 영구자석(420)으로 구성된다.

이때 상기 자력관(430)은 모터, 솔레노이드 등의 다양한 형태의 액츄에이터의 회전력을 전달받아 회전이 이루어지게 된다. 그리고 상기 자력관(430)은 시험관 회전대(110)와 동일한 간격 및 수량으로 배열된다. 이에 따라, 영구자석(420)을 구비한 자력관(430)은 액츄에이터를 이용하여 90도로 움직이도록 구성되어 필요시에 시험관(900)에 자력을 가하거나, 자력을 제거할 수 있게 된다.

한편 상기 자력관(430)에 의해 시험관(900)에 자력을 가하는 시간은 제어판넬(510)을 통해 이루어지며, 시험관(900)에 자력을 가하는 시간을 0 ~ 5분의 범위를 10초단위로 설정할 수 있어 시험관(900) 속에서 섞인 자성나노입자(910)와 시료를 분리하기 위한 최적의 시간을 선택할 수 있게 된다.

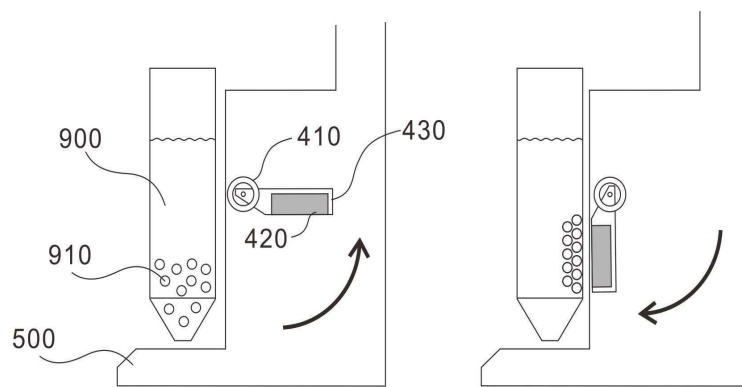


그림 27. 자력관 구동부의 측면도 (410 : 자력관 구동부, 420 : 자석, 430 : 자력관, 500 : 본체, 900 : 시험관, 910 : 자성나노입자)

세척부(200)는 시험관(900)의 시료를 흡입하거나 시험관(900)에 세척액을 주입 및 흡입하는 기능을 한다. 구체적으로 상기 세척부(200)는 상기 시험관(900)의 내부의 시료 또는 세척액을 흡입하는 흡입노즐(220)과 상기 흡입노즐(220)과 흡입튜브(240)에 의해 연결되는 흡입펌프(260)와, 상기 시험관(900)의 내부로 세척액을 주입하는 주입노즐(210) 및 상기 주입노즐(210)과 주입튜브(250)에 의해 연결되는 주입펌프(270)로 구성된다.

그리고 상기 흡입펌프(260)와 주입펌프(270)에는 폐수통(930)과 세척액 통(920)이 각각 연결된다. 한편, 상기 주입튜브(250)에는 플로우 센서(280)가 더 구비된다.

이에 따라 상기 세척부(200)에 의해 시험관(900) 속의 시료를 흡입하여 배출하고 세척액을 주입 또는 흡입하여 시험관(900)의 세척기능을 수행하게 된다.

구체적으로 흡입노즐(220)은 흡입펌프(260)에 의해 시험관(900)의 시료를 폐액통(930)으로 배출하게 된다. 여기서 제어판넬(500)을 통해 흡입펌프(260)의 작동시간을 10 ~ 120초의 범위로 설정할 수 있어 사용되는 시험관(900)의 크기 또는 시료의 양에 따라 작동시간을 설정할 수 있게 된다.

그리고 시료의 배출이 완료되면, 주입펌프(270)를 통해 세척액통(920)의 세척액을 주입노즐(210)을 통해 시험관(900)에 주입하게 된다.

여기서 제어판넬(500)을 통해 주입되는 세척액의 양을 플로우 센서(280)를 통하여 0 ~ 100ml의 범위로 설정 할 수 있어 원하는 양의 세척액을 주입 할 수 있게 된다. 한편 시험관(900)에 주입된 세척액은 흡입노즐(220)로 흡입 배출하게 된다. 또한, 상기 흡입노즐(220)은 세척부(200)에 고정되는 흡입노즐 결합부(230)에 연결되며 실험시 마다 교체가 가능하여 반복 실험에 따른 흡입노즐(220)의 오염을 방지하게 된다.

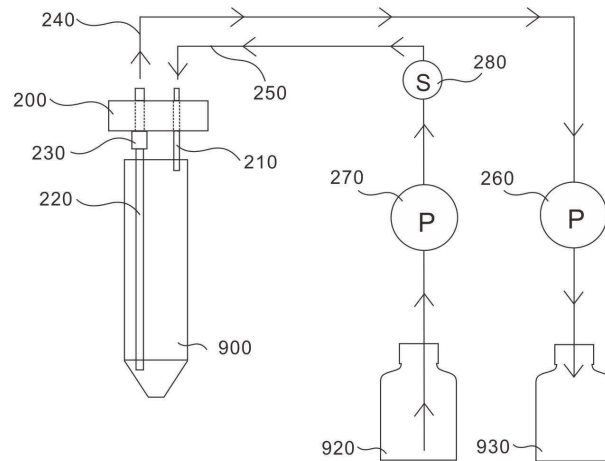


그림 28. 세척부의 개략도 (200 : 세척부, 210 : 주입노즐, 220 : 흡입노즐, 230 : 흡입노즐 결합부, 240 : 흡입튜브, 250 : 주입튜브, 260 : 흡입펌프, 270 : 주입펌프, 280 : 플로우 센서, 900 : 시험관, 920 : 세척액 통, 930 : 폐액 통)



그림 29. 세척부와 승강부

그리고, 상기 세척부(200)를 시험관(900)을 향해 상하로 이동시키는 승강부(300)가 더 구비된다. 구체적으로 상기 승강부(300)는 구동력을 발생시키는 승강모터(330) 및 상기 승강모터(330)의 구동축에 설치된 상하이동폴리(310) 및 상기 상하이동폴리(310)와 세척부(200)를 연결하는 이동벨트(320)로 구성된다.

이에 따라 상기 승강모터(330)가 시계반대 방향으로 구동하여 상하이동폴리(310)에 세척부(200)와 연결된 이동벨트(320)가 감기면서 세척부(200)는 상승하게 되고 상기 승강모터(330)가 시계방향으로 구동하여 상하이동폴리(310)에 감겨있던 이동벨트(320)가 풀리면서 세척부(200)

의 자체 무게로 하강하게 된다.

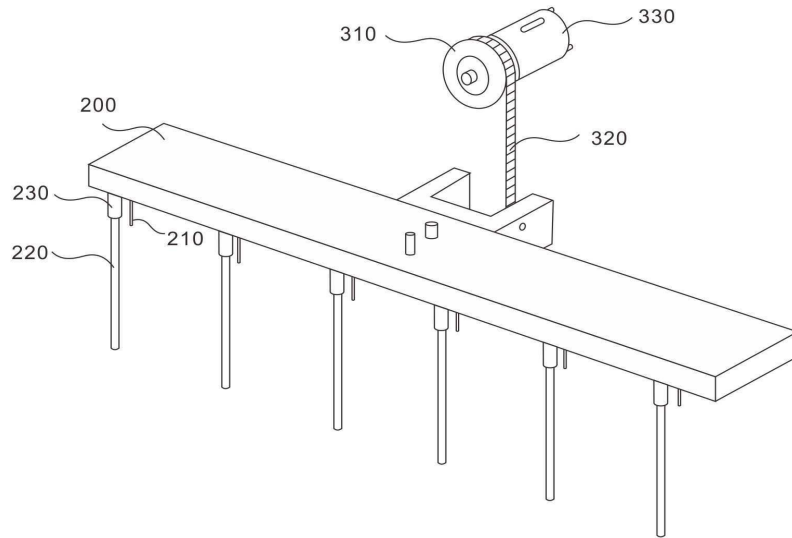


그림 30. 승강부의 사시도 (200 : 세척부, 210 : 주입노즐, 220 : 흡입노즐, 230 : 흡입노즐 결합부, 310 : 상하이동풀리, 320 : 이동벨트, 330 : 승강동모터)

자성나노입자 자동처리기는 혼합부(100)에 의해 자성나노입자(910)와 시료를 혼합하는 과정, 영구자석(420)을 이용하여 자성나노입자(910)를 분리하는 과정, 세척부(200)에 의해 시험관(900)의 시료를 배출하고 세척하는 과정을 자동으로 처리하는 효과가 있다.

이에 따라 자성나노입자(910)를 활용하는 공정을 단시간에 용이하게 할 수 있고 다량의 시료를 한번에 처리할 수 있어 많은 시료를 처리하기에 유리하며 대용량을 처리할 수 있어 유전자 연구에서부터 식품 등의 진단까지 다방면에 활용이 가능한 장점이 있다.

즉, 자성나노입자(910)와 시료를 시험관(900)에 투입한 후 적절한 속도와 회전방법으로 고르게 섞이게 하고, 자력판(430)을 접근시켜 한곳으로 모이게 한 후 시료를 배출시키고 다시 채우는 세척작업을 수행 한 후 최종적으로 자성나노입자와 결합된 시료 속의 특정 화학물 및 미생물 등을 농축 또는 분리하는 일련의 과정을 자동화하게 된다.

⑤ 자성나노입자 자동처리기의 동작 설명

자성나노입자 자동처리기의 사용 순서와 작동원리를 예시해 보면 다음과 같다.

먼저 제어판넬(510)을 조작하여, 사용조건을 설정한다. 여기서 일반적으로 사용되어지는 기본조건은 사전에 설정되어 메모리 등에 저장되어 있다. 예를 들면, 50ml 용량의 시험관(900)을 사용하는 것을 가정하여 자력판 구동부(410)의 자력을 가하는 시간은 1분으로 시험관(900)의 시료를 배출하기 위한 흡입펌프(260)가 작동하는 시간은 15초로, 세척액을 주입하기 위한 주입펌프(270)의 주입 양은 35ml로 설정되어 있어 매번 작동할 때마다 조건을 입력하지 않아도 되며 필요시에 이 조건들을 임의로 변경할 수 있음은 물론이다.

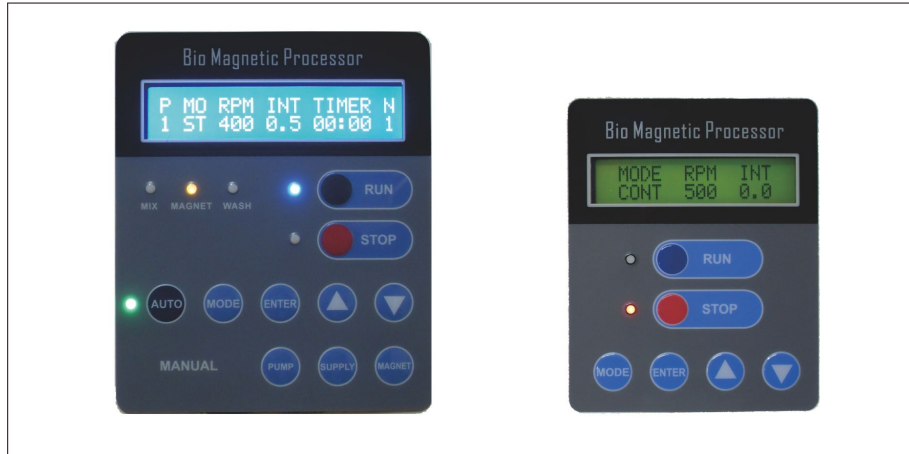


그림 31. 개선된 제어판넬과 구모델

따라서 일반적인 사용에서는 회전 속도, 회전 시간, 회전조건, 세척 횟수만 을 순서대로 설정한다. 이후 김출하고자 하는 미생물 또는 화합물과 반응하는 자성나노입자(910)와 식품검체를 시험관(900)에 넣고 시험관(900)을 시험관 회전대(110)에 끼운다.

다음 상기 제어판넬(510)의 시작버튼을 누르면 구동모터(170)가 작동하여 설정된 속도, 설정된 조건으로 설정된 시간 만큼 시험관(900)이 회전하게 되고 시험관(900) 속의 자성나노입자(910)와 시료가 고르게 섞이며 이때 시료에 자성나노입자(910)와 반응하는 유해 미생물 또는 화합물 등이 존재 한다면 자성나노입자(910)와 결합하게 된다.

설정된 회전시간이 경과 되면 자력판 구동부(410)가 구동하여 자력판(430)이 몸체부(500)의 내부에서 시험관(900)과 밀착하게 되어 직접 자력의 영향을 주게 된다.

이 상태로 설정된 시간만큼 유지하면 시험관(900) 속의 부유하던 자성나노입자(910)가 자력의 영향을 받는 시험관(900)의 벽면으로 이동하여 붙게 된다.

그리고, 설정된 자력판(430)의 유지시간이 경과하면 승강부(300)가 구동하여 세척부(200)가 시험관 향해 이동하고 흡입펌프(260)가 구동하여 시험관(900) 속의 시료만을 흡입하여 폐액통(930)으로 배출하게 된다. 이때 자성나노입자(910)는 자력판(430)에 의해 시험관(900)의 벽 쪽에 붙어있기 때문에 배출되지 않는다.

시험관(900) 속의 시료의 배출이 완료되면 세척수 주입펌프(270)가 구동하여 세척액 주입노즐(210)을 통하여 설정된 양만큼 시험관(900)으로 주입한다.

이후 세척액이 시험관(900)에 채워지면 세척부 승강모터(330)가 구동하여 세척부(200)가 상승하게 되고 상승이 완료되면 1회의 사이클이 종료된 것이다.

만일 세척횟수를 1회로 설정하였다면 여기서 기기는 작동이 종료되고 알람이 울려 작동이 완료됐음을 표시하게 된다. 그러나 세척횟수를 2회 이상으로 설정하였을 때는 상기한 일련의 과정을 설정한 횟수 만큼 반복하게 된다.

자성나노입자 자동 처리기의 또 하나의 작용은 주요기능인 혼합부의 기능, 자력판 기능, 세척 기능 등을 각 필요한 기능만 독립적으로도 사용이 가능하여 필요 시 원하는 기능만을 사용할 수도 있다.

이렇게 자성나노입자 자동 처리기는 자성나노입자와 시료를 혼합하는 과정에서 다양하고 독특한 조건으로 혼합할 수 있는 수단을 제공하며, 이어서 이를 세척하는 과정, 이어서 자성나노입

자만을 분리하는 일련의 과정을 자동으로 처리하여 주는 기능을 제공하여 자성나노입자를 활용하는 보다 향상된 기능을 갖도록 한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구개발목표의 달성도

1. 세부연구 호서대학교 산학협력단

	목 표	평가의 착안점	자체평가	달성도 (%)
1 차 년 도	위해화학물질 위해성 평가·대상물질 선정	농축수산물 유래 고독성 다노출 위해화학물질의 조사 및 위험도 평가	식품에 잔류 또는 오염되어 인체에 위해를 일으킬 수 있는 물질 중 위험도 우선순위를 평가 및 리스트화 하였음.	100
	식품별/위해화학물질별 최적 전처리 조건 확립	위해화학물질별 최적 전처리조건 확립 및 평가	식품별(돼지고기-sulfamethazine, 우유-tetracycline, 광어-malachite green 닭고기-enrofloxacin) 최적 전처리 프로토콜을 확립 하였고 HPLC를 통해 분석한 결과, 그 적합성이 확인.	100
	위해화학물질 특이 고감도 바이오리셉터(압타머) 개발	SELEX를 통한 검출물질별 압타머들의 선별	새로운 SELEX법을 이용하여 개별 위해화학물질(tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, malachite green, enrofloxacin, ciprofloxacin) 특이 압타머를 선별하였고 그 염기서열을 분석함.	100
2 차 년 도	개발된 바이오리셉터에 대한 특성분석	바이오리셉터의 검출물질에 대한 결합력과 특성분석	선별된 압타머의 2차구조와 결합력을 분석하였고 검출물질에 대한 특이도를 분석.	100
	개발시스템에서 검출물질별 특이성 조사	검출물질별 검출감도 및 정량한계	식품별/농도별 시료를 준비하고 확립된 시료전처리 프로토콜에 따라 위해화학물질을 추출 하였고 선별된 압타머의 검출물질에 대한 검출감도를 분석한 결과, 낮은 검출한계와 정량한계를 확인.	100
3 차 년 도	기존 진단방법과 신규 개발된 진단법의 비교분석	개발된 검출시스템의 민감도 및 적합성	기존의 HPLC 방법과 새로 개발된 indirect competitive enzyme linked aptamer assay의 검출감도를 비교하여 개발된 검출시스템의 적합성을 확인.	100
	시스템 현장 적용성 검토	현장적용 가능성 검증 및 표준 메뉴얼의 적합성	개발시스템의 농축수산물에 대한 현장 적용성을 분석하여 적합성을 확인 하였고 분석 결과로 토대로 시스템을 보완하였으며 개발 시스템 별 표준메뉴얼을 제작.	100

2. 제1협동연구 (주) 중점

	목 표	평가의 착안점	자체평가	달성도 (%)
1 차 년 도	위해물질 특이 고감도 바이오 리셉터(단클론 항체) 개발	위해물질에 대한 단클론항체의 확보	시가특신 stx 1 A subunit, stx 1 B suunit, stx 2에 대한 단클론 항체를 제작하였고 이를 평가하여 각 위해물질에 대한 특이성을 평가하였음	100
	자성나노입자 기반 Bio-linkier 및 Bio-detector 개발	자성나노입자와 연계할 bio-linker 및 bio-detector의 확보	자성나노입자와 연계될 bio-linker로서 multi protein G와 multi protein A를 linker를 사용하여 protein G는 tetramer까지, protein A는 dimer까지 개발하여 대장균에서 대량 생산 가능한 체계로 완료하였고 bio-detector로서 사용될 streptavidin-GFP, streptavidin-RFP, streptavidin-YFP 또한 대장균에서 대량 생산 가능한 체계로 완료 한 후 biotin과의 결합 기능에 대해서 평가하였음	100
2 차 년 도	자성 나노입자 기반 bio-linker 및 bio-detector 개발	자성나노입자와 연계할 bio-linker 및 bio-detector의 확보	자성나노입자와 연계할 나노항체-형광단백질 복합체 개발을 위해 phage display를 이용하여 anti-M13 bacteriophage 나노항체를 개발하였고 개발된 anti-M13 bacteriophage 나노항체는 M13 bacteriophage의 반복 서열에 의한 signal amplication effect를 얻기 위해 M13 bacteriophage 나노항체에 linker GFP, linker RFP를 연결하여 anti-M13 bacteriophage 나노항체 + 형광단백질 복합체를 제작하여 이들의 기능을 평가하였음	100
	자성 나노입자와 바이오마커 복합에 제작 및 최적화	자성나노입자와 바이오마커 복합체 최적화 구성 요소 확보	형광 신호 증폭 체계시 사용되는 기능성 단백질들과의 연계 효과를 극대화하기 위해 competitive 특성을 이용하여 자성나노입자와 바이오마커 복합체의 효능 및 최적화를 검증하였음	100
	위해물질 특이 고감도 바이오 리셉터 (단클론 항체)개발	위해물질에 대한 단클론항체의 확보	위해화학물질들인 sulfamethazine, aflatoxin등에 대한 단클론 항체를 개발하였으며 이를 평가하여 각 위해물질에 대한 특이성을 평가하였음	100

3 차 년 도	OBLIMA 구성 요소들의 최적화 및 실용화	자성나노입자와 바이오마커 복합체의 실용화를 위한 최적의 구성 요소 확보	대장균에서 발현되는 streptavidin-형광복합체 및 나노항체-형광복합체 생산 체계를 정립하여 OBLIMA 구성에 최적화 할 수 있는 단백질로 생산하여 자성 나노 입자 형광복합체 구성을 최적화 함	100
	제1세부과제 생산 aptamer 및 위해 화학물질 복합체에 대한 단클론 항체 실용화	위해 화학물질에 대한 aptamer 및 단클론 항체의 특이성	Tetracycline aptamer (TC2)와 나노항체-형광복합체와 streptavidin-형광복합체의 효능과 Sulfamethazine에 대한 단클론 항체 (31A6)와 나노항체-형광복합체와 streptavidin-형광복합체의 효능을 검증하여 competitive OBLIMA system의 실용화에 최적화 시킴	100
	검출 표적별 최적의 검출체제 선택 및 실용화 검증	위해화학물질 검출체제의 확립	각 표적별 검출체제의 최적화를 위해 표준 위해화학물질과 검출시스템의 연계성을 위해 현장에서 손쉽게 적용할 수 있는 검출 표적별 표준 구동매뉴얼을 작성하고 방법론을 정립함	100

3. 제2협동연구 (주) 비전과학서울

	목 표	평가의 착안점	자체평가	달성도 (%)
1 차 년 도	자성나노입자 기반 자동화 장비 기본설계	자성나노입자 기반 자동화 장비 기본설계	자동화 장비 설계에 따른 분석과 자동화 단계별 요구조건 설정 및 단계별 사양 설비, 그리고 규격설정을 하였고 시제품을 제작.	100
2 차 년 도	자동화장비 시제품 제작 및 평가	자동화장비 시제품 제작 및 평가	자성나노기반 복합체와의 상호 구동성평가 및 개선과 식품 검체를 통한 종합평가를 수행.	100
3 차 년 도	자동화 장비 현장평가 및 사용자 중심의 시제품 제작 및 개선	자동화 장비 현장평가 및 사용자 중심의 시제품 제작 및 개선	현장평가 후 magnetic bead processor와 fluorescence detector 융합모델 개발 및 시제품 제작.	100

제 2 절 관련분야에서의 기여도

1. 농축수산물식품 유래 화학적 위해요소에 대한 효율적 관리시스템 확보에 따른 식품안전성 제고
가. 농축수산물식품별 화학적 위해요소 위해성 평가에 의한 고위험도 중점관리대상물질 리스트를 확보하였고 신속한 검사시스템의 도입으로 농축수산물식품의 안전성 및 신뢰도를 높일 것으로 사료됨.
2. 농축수산물식품 유래 화학적 위해요소에 대한 특이 바이오리셉터, 센서 제조 등 원천기술 확보
가. 식품위해사고 예측 시, 즉각적인 바이오리셉터 제조 및 키트화를 위한 원천기술을 확보할 수 있으며 화학적 위해요소 검사용 바이오나노센서의 기술력 확보에 의한 국가의 기술 경쟁력을 높일 것으로 예상됨.
3. 고위험 위해요소에 대한 고감도 신속특이검사 시스템의 현장적용으로 식품위해사고 사전 차단
가. 대량의 식품검체의 신속검사에 의한 식품 소비 전 단계에서 위해식품을 차단할 수 있을 것이며 식품위해사고의 사전 예방을 통한 국가적 비용 절감 효과를 가져 올 것이고 농축수산물식품 품목별/종류별 검사 항목의 표준화를 통해서 검사체계를 효율화 할 것임.
4. 고감도 신속 동시검출 바이오나노센서에 의한 식품검사의 경제성 및 효율성 증대
가. 검출 방법이 쉽고 편리하기 때문에 기존 검사방법의 고비용 및 전문인력의 의존성이 해결 될 수 있을 것이고 검사키트 및 검사장비의 국산화를 통한 수입 의존성 검사물품의 대체 효과 및 경제적 효율성이 고려됨.
5. 농축수산물 생산/유통 단계별 효율적 위해요소 중점관리체계 구축
가. 위해도에 대한 상시적 현황파악을 통한 효율적인 HACCP 현장 적용성을 확보 할 수 있을 것으로 사료됨.
나. 바이오리셉터, 자성나노입자, 자동화 장비(IT-사용의 편리성, 신호의 정량화) 기술을 접목한 검출시스템이 확대되어 농·축·수산물식품의 생산, 유통 단계별 효율적 위해요소 중점관리체계가 구축 될 것으로 기대됨.
다. 다수의 식품 검체에 대한 단시간 검사시스템 확보에 의한 식품위해사고 시 신속조기대응 체계 구축 될 것으로 예상됨.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구 개발 성과

1. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자	학술지명	Vol. (No.)	국내 외 구분	SCI 구분	비고
2010	Risk assessment of Growth hormones and Antimicrobial Resiudes in meat	정상희	Toxicological Research	26(4)	국내	비SCI	
2013	An indirect competitive assay-based aptasensor for detection of oxytetracycline in milk	정상희 외 4명	Biosensors and Bioelectronics		국외	SCI	Accept
	Selection and validation of single-stranded DNA aptamers for chlor-tetracycline detection	정상희 외 4명	Analytical Biochemistry		국외	SCI	Under review
	Development of aptasensor for detection of tetracycline using indirect competitive assay	정상희 외 4명	BMB Reports		국내	SCI	Under review
	Selection and characterization of ssDNA aptamers for recognition of enrofloxacin	정상희 외 4명	Bioorganic & Medical Chemistry		국외	SCI	Submitted
	Selection of high-sensitive malachit green-specific aptamers	정상희 외 4명	The Scientific World Journal		국외	SCI	Submitted

2. 특허 성과

출원연도	특허명	등록인/출원인	등록국/출원국	등록번호/ 출원번호	등록/ 출원	비고
2012	GFP 특이적 단일 도메인 항체	(주) 중검	대한민국	10-2012-00 44780	출원	
	설파메타진에 특이적인 단일클론 항체 및 이를 생산하는 하이브리도마 세포	(주) 중검	대한민국	10-2012-00 44645	출원	
2013	테트라사이클린계 화합물에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타 머	호서대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-00 53035	출원	
	옥시테트라사이클린에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머	호서대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-00 53040	출원	
	클로르테트라사이클린에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머	호서대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-00 53046	출원	
	엔로플록사신 또는 시프로플록사신에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머	호서대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-00 75583	출원	
	말라카이트 그린에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머	호서대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-00 75618	출원	
	M13 박테리오파지에 대한 단일 도메인 항체 및 이를 포함하는 면역센서 융합 단백질	(주) 중검	대한민국	10-2013-00 74548	출원	
	자성나노입자를 이용한 자동 분리 농축 처리장치	(주) 비전과학서울	대한민국	10-2013-00 88771	출원	

제 2 절 성과활용 계획

1. 국내외 특허 확보

가. 본 연구 과제를 통해 제작된 물질별 특이 바이오리셉터 및 자성나노비드는 총 8건의 국내 특허를 출원하였으며 향후 추가 연구 수행을 통해 등록할 예정이다.

2. 국내외 논문 게재

가. 대상 검출물질별 바이오리셉터 제작 및 적용에 관한 논문을 발표할 예정이며 위해화학 물질 신속진단키트의 개발 및 이의 적용에 관련된 논문도 발표 할 예정이다.

3. 위해화학물질 검출 바이오마커, 신속진단키트 및 자동화장비의 분야별 상품화

가. 본 연구 과제를 통해 개발된 바이오리셉터의 상품화를 추진 할 계획이며 이를 이용한 신속 진단키트와 검출시스템의 자동화 장비 및 소형형광장비를 상품화 할 예정이다.

4. 다른 연구자들의 연구결과물의 적용성 확보를 통한 활용도 제고 및 국내·외 시장 확대

가. 국내 및 해외 기존 연구를 통해 기개발 되었거나 개발될 바이오리셉터들의 본 시스템 적용 가능성을 확인 할 예정이며, 이를 통해 식품 품목별/검출대상 물질별에 따른 효과적인 대응력을 확보 할 계획임.

나. 향후 문제가 될 새로운 위해화학물질이 나타날 경우, 바이오리셉터 개발만을 통해서 바로 적용 가능한 검출시스템 구축을 계획 중.

5. 농축수산물 생산/유통 단계별 효율적 위해요소 중점관리체계 구축

가. 바이오리셉터, 자성나노입자, 그리고 자동화 장비(IT-사용의 편리성, 신호의 정량화)의 기술을 접목 시킨 검출시스템에 대한 확대된 연구를 통해 농축수산식품의 생산과 유통 단계별에서의 위해요소 감시가 가능한 현장 중심의 효율적 위해요소 관리체계에 대한 모델을 제시할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절 압타머 기반 바이오센서

최근 들어 항체의 장점을 수용하며, 또한 항체에 비해 여러 장점을 지닌 핵산 바이오분자인 압타머의 개발이 많이 진행되고 있다. 특히 2004년 최초의 압타머 치료제인 Macugen [2]이 FDA 승인을 받으면서 압타머 기반 진단 및 치료제 개발이 전 세계적으로 활발하게 이루어지고 있다. 이런 가운데, 2010년에 핵심원천특허가 만료된 표적분자에 대해 압타머를 선별하는 기술인 SELEX 기술과 나노기술을 적용한 신규 압타머 선별기술은 앞으로 더욱 활발히 진행될 예정이다. 압타머는 주로 질병의 진단과 치료에 관해 많은 연구가 이루어지고 있다. 최근에는 항생제 남용과 여러 위해화학물질들의 위협에 대처하고자 식품 또는 자연환경에 존재하는 위해화학물질들의 검출에 대한 연구가 전 세계적으로 많이 늘어나고 있는 추세다. 최근 발표된 SELEX 기술 중 microplate screening 기술[3]은 본 연구진에서 개발한 SELEX 방법과 매우 유사한 방법으로 동시에 여러 위해화학물질에 대한 압타머 선별이 가능하다. 그러나 아직까지 위에서 제시된 SELEX 방법을 통해 여러 위해화학물질들로부터 다수의 압타머를 선별한 예는 아직까지 보고되고 있지 않다. 그 외, 전기화학적 방식을 이용한 다양한 형태의 압타머 기반 바이오센서가 보고 되어왔고[4, 5], 또한 형광을 이용한 다양한 방식의 바이오센서[6, 7, 8]들의 개발이 보고되고 있는 상황이다. 본 과제의 시작 시점으로부터 지금까지 바이오센서의 개발은 크게 늘었으나 특별히 달라진 동향을 파악하지는 못하였다.

제 2절 단클론 항체 기반 바이오센서

현재까지 가장 성공적인 표적 지향적 바이오분자 치료제로는 단일클론항체를 들 수 있다. 항체는 표적 단백질과 결합하여 단백질-단백질 상호작용을 저해함으로써 원치 않는 신호의 전달을 방해하는 역할을 주로 수행한다 [9]. 단일클론항체를 이용한 항암제 중 하나로 현재 시판되고 있는 Herceptin 은 유방암과 난소암 등에서 과발현 되는 HER2 수용체 단백질에 결합함으로써, HER2 수용체에 의하여 전달되는 성장인자 신호전달체계를 방해하여 유방암 세포의 성장을 선택적으로 저해한다 [10]. 표적 단백질에 대한 높은 특이성과 결합력을 지닌 단일클론 항체는 표적 지향적 분자치료제로서 이상적인 물질로 현재 다수의 단일클론항체가 치료제로 사용 중이며 또한 많은 항체 치료제 후보 물질들이 현재 임상시험 중에 있다. 그러나 진단용 항체의 경우, 항체가 가지고 있는 본질적 단점인 생산의 복잡성과 안정성의 문제로 인하여 다른 대체 물질들의 개발이 늘어나고 있는 추세에 있다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항없음.

제 8 장 참고문헌

- [1] Barthelmebs, L., Jonca, J., Hayat, A., Prieto-Simon, B., Marty, J-L., 2011. Food control 22, 737-743
- [2] Doggrell, S.,A. 2005. Expert Opinion on Pharmacotherapy 6, 1421-1423.
- [3] Gong, S., Ren, H.L., Tian, R.Y., Lin, C., Hu, P., Li, Y.S., Liu, Z.S., Song, J., Tang, F., Zhou, Y., Li, Z.H., Zhang, Y.Y., Lu, S.Y. 2013. Biosensors and Bioelectronics 15, 547-554.
- [4] Kim, Y.S., Kim, J.H., Kim, I.A., Lee, S.J., Jurng, J., Gu, M.B., 2010. Biosensors and Bioelectronics 26, 1644-1649.
- [5] Zhang, J., Zhang, B., Wu, Y., Jia, S., Fan, T., Zhang, Z., Zhang, C., 2010. Analyst 135, 2706-2710.
- [6] Song, K.M., Jeong, E., Jeon, W., Jo, H., Ban, C., 2012. Biosensors and Bioelectronics 33, 113-119.
- [7] Limmer, K., Aschenbrenner, D., Gaub, H.E. 2013. Nucleic Acids Research 41, e69.
- [8] Förster, U., Weigand, J.E., Trojanowski, P., Suess, B., Wachtveitl, J. 2011. Nucleic Acids Research 40, 1807-1817.
- [9] Yang, J.C., Haworth, L., Sherry, R.M., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Steinberg, S.M., Chen, H.X., Rosenberg, S.A. 2003. The New England Journal of Medicine 349, 427-434.
- [10] Piccart-Gebhart, M.J. et al. 2005. The New England Journal of Medicine 353, 1659-1672.

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 농·축·수산물 위해화학물질 신속 다중 검출시스템 개발				
	(영문) Development of rapid multi-detection system for hazardous chemicals in agricultural, livestock or fishery products for human consumption				
주관연구기관	호서대학교 산학협력단	주 관 연 구	(소속) 호서대학교		
참 여 기 업	(주) 중검, (주) 비전과학서울	책 임 자	(성명) 정 상 희		
총연구개발비 (1,600,000 천원)	계	1,600,000,000	총 연 구 기 간	2010. 7. 1 ~ 2013. 6. 30 (3년)	
	정부출연 연구개발비	1,200,000,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	21
	기업부담금	400,000,000		내부인원	21
	연구기관부담금			외부인원	0

○ 연구개발 목표 및 내용

1. 연구목표
 농축수산물 및 가공식품에 존재하는 위해화학물질에 대한 고감도 신속 다중 검출기술을 개발한다 이를 위해 다종의 식품 및 화학적 위해요소에 대하여 현장에서 적용 가능하며 신속·간편한 시료 전처리법을 확립한다. 기존의 검사방법의 문제점을 해결하면서 신속성·용이성·정확성을 보장하는 검사 제어 시스템의 개발을 위해 새로운 바이오리셉터를 개발하고 이를 활용하여 현장에서의 신속한 검사방법을 확립하여 위해화학물질에 대한 상시적 검사체계를 구축한다.

2. 연구내용
 가. 농축수산물 식품 내 위해화학물질 검출을 위한 바이오마커 개발
 나. 자성나노복합체를 활용한 위해화학물질 신속 다중 바이오센싱 시스템 개발
 다. 현장 적용성 자동화 Magnetic bead Processor 및 Fluorescence Detector 개발

○ 연구결과

1. 농축수산물 식품 내 위해화학물질 검출을 위한 바이오마커 개발 : 위해화학물질에 대한 압타머 선별과 식품전처리법 개발, 이를 활용한 위해화학물질 검출시스템의 개발과 현장 적용성을 확인하였으며, 이를 바탕으로 현장에서의 위해화학물질 검출 프로토콜을 제작

2. 자성나노복합체를 활용한 위해화학물질 신속 다중 바이오센싱 시스템 개발 : 위해화학물질에 대한 단클론 항체, 나노 바이오 리셉터 및 디텍터의 개발과 나노항체-형광 단백질 복합체를 개발하여 위해화학물질 검출시스템에 적용

3. 현장 적용성 자동화 Magnetic bead Processor 및 Fluorescence Detector 개발 : 사용자 중심의 위해화학물질 검출용 자동화 장비 및 형광 장비를 개발

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 특허: 바이오리셉터(압타머와 단클론 항체)에 대한 특허 출원 6건, 바이오디렉터(단일 도메인 항체)에 대한 특허 출원 2건과 자성나노입자를 이용한 자동 분리 농축 처리장치에 대한 특허 출원 1건

2. 논문: 비SCI 1편 출판과 SCI 5편 출판 예정(SCI 1편: Accept, SCI 2편: Under review, SCI 2편: submitted)

3. 성과활용 계획:
 가. 위해화학물질 검출 바이오마커, 신속진단키트 및 자동화장비의 분야별 상품화
 나. 다른 연구자들의 연구결과물의 적용성 확보를 통한 활용도 제고 및 국내·외 시장 확대
 다. 농축수산물 생산/유통 단계별 효율적 위해요소 중점관리체계 구축

[별첨 2]

자체평가 의견서

연구개발분야	융복합 / BT·NT·IT / 바이오 칩/센서	과제구분	<input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제 <input type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	310007-3
연구과제명	농·축·수산물 위해화학물질 신속 다중 검출시스템 개발				
주관연구기관	호서대학교 산학협력단				
연구담당자	주관연구책임자	정 상 희			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)	(주) 중검	성명	임명운
		기관(부서)	(주) 비전과학서울	성명	정창민
		기관(부서)		성명	
		기관(부서)		성명	
연구기간	총기간	2010. 7. 1 ~ 2013. 6. 30	당해년도기간	2012. 7. 1 ~ 2013. 6. 30	
연구비(천원)	총규모	1,600,000	당해년도규모	534,000	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행
 계획대로 진행
 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음
 어느 정도 얻음
 얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

공헌했음
 현재로서 불투명함
 그렇지 않음

4. 경제적인 측면에서 농림어가의 소득증대에 공헌했다고 보는가?

- 공헌했음 현재로서 불투명함 그렇지 않음

5. 얻어진 성과와 발표상황

5-1 경제적 효과

- 기술료 등 수익 수 익 :
- 기업 등예의 기술이전 기업명 :
- 기술지도 등 기업명 :

5-2 산업·지식재산권 등

- 국내출원/등록 출원 9 건, 등록 건
- 해외출원/등록 출원 건, 등록 건

5-3 논문게재·발표 등

- 국내 학술지 게재 1건
- 해외 학술지 게재 2건
- 국내 학·협회 발표 5건
- 국내 세미나 발표 1건
- 기 타 1건

5-4 인력양성효과

- 석 사 명
- 박 사 명
- 기 타 명

5-5 수상 등

- 있 다 상 명칭 및 일시 :
- 없 다

5-6 마스크롬 등의 PR

- 있 다 건
- 없 다

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다 약간 감소되었다 크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다 약간 조정필요 전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족 보통 미흡

(근거: 새로운 바이오센서의 개발이 기업에 폭 넓은 연구방향을 제시)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

- 충분 고려 중 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

- 확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	호서대학교 산학협력단	교수	정 상 희 (인)
참여기업대표	(주) 중검	대표이사	임 명 운 (인)
참여기업대표	(주) 비전과학서울	부장	정 창 민 (인)

[별첨 3]

연구결과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	융복합 / BT·NT·IT / 바이오 칩/센서	
연구과제명	농·축·수산물 위해화학물질 신속 다중 검출시스템 개발			
주관연구기관	호서대학교 산학협력단	주관연구책임자	정 상 희	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	1,200,000,000	400,000,000		1,600,000,000
연구개발기간	2010. 7. 1 ~ 2013. 6. 30 (3년)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 농축수산물 식품에 대한 최적화된 전처리법 개발	우유, 닭고기, 돼지고기와 광어에 대한 최적화된 전처리법을 개발함.
② 검출대상 위해물질에 대한 바이오리셉터와 디텍터의 개발	검출시스템에 사용될 위해화학물질 특이 압타머, 단클론 항체가 개발 되었고 검출감도를 높이기 위한 나노 바이오리셉터 및 디텍터가 개발됨.
③ 농축수산물 식품에 대한 위해화학물질 검출시스템을 개발	개발된 압타머와 자성나노복합체를 이용하여 위해화학물질들을 농축수산물 식품에서 신속하게 검사할 수 있는 검출시스템을 개발함.
④ 개발된 검출시스템의 농축수산물 식품에 대한 현장 적용성	농축수산물 식품에 대한 개발된 위해물질 검출시스템의 현장 적용성을 확인함. 개발된 두 검출시스템이 모두 적합한 것으로 확인됨.
⑤ 현장 적용 가능한 위해물질 검출시스템의 프로토콜을 확립	농축수산물 식품에 대한 최적화된 전처리 방법과 개발된 바이오리셉터(압타머, 단클론 항체) 및 자성나노복합체를 이용한 검출시스템의 현장 적용 가능한 위해화학물질 검사 프로토콜이 제작됨.
⑥ 현장 적용성 자동화 Magnetic bead Processor 및 Fluorescence Detector 개발	위해화학물질 검출시스템에 개발된 Magnetic bead Processor와 Fluorescence Detector가 활용되었고 현장 적용 가능한 장비임이 확인됨.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	농축수산물 식품에 대한 식품 전처리 기술
②	위해화학물질들에 대한 특이 압타머 선별기술
③	농축수산물식품에 대한 위해화학물질 검출시스템 제작기술
④	Sulfametnazine에 특이적인 항원성 인자에 대한 단클론 항체 제작기술
⑤	M13 bacteriophage의 반복 서열에 의한 signal amplication effect 를 얻기 위한 anti-M13 bacteriophage에 대한 나노항체 개발 기술
⑥	개발된 M13 bacteriophage에 대한 나노 항체와 형광 단백질 (GFP, RFP)을 연결한 형광 나노 복합체를 제작하는 기술
⑦	Competitive OBRIMA system을 통한 위해화학물질 검출시스템 개발
⑧	현장 적용성 자동화 Magnetic bead Processor 개발
⑨	현장 적용성 Fluorescence Detector 개발

4. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술					v					
②의 기술		v			v	v				
③의 기술		v			v	v				
④의 기술					v	v				
⑤의 기술					v	v				
⑥의 기술					v	v				
⑦의 기술					v					
⑧의 기술					v					
⑨의 기술					v					

* 각 해당란에 v 표시

5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	신속한 전처리기술을 통해 대량의 식품검체를 신속하게 검사할 수 있는 방법을 제공할 것으로 기대됨.
②의 기술	식품위해사고 예측 시, 즉각적인 바이오리셉터 제조 및 키트화를 위한 원천기술을 확보할 수 있을 것으로 기대됨.
③의 기술	고위험 위해요소에 대한 고감도 신속특이검사 시스템의 현장적용이 가능할 것이며 이로 인해 식품위해사고를 사전에 차단할 수 있을 것으로 예상됨.
④의 기술	농축수산물 식품에서 sulfamethazine에 대한 보다 신속하고 정확한 검출이 가능하게 됨.
⑤의 기술	여러 가지 기능성 단백질과의 융합을 가능하게 하여 활용범위가 매우 넓어질 것으로 기대됨.
⑥의 기술	Signal amplification effect로 인해 환경적으로 안정한 형광 나노 복합체를 다양한 곳에서 활용 가능 할 것으로 기대됨.
⑦의 기술	비전문가에 의한 위해화학물질 검출 기반기술의 적용이 가능해져 보다 넓은 시장의 확보가 가능해짐.
⑧의 기술	검사장비의 국산화를 통한 수입 의존성 검사물품의 대체 효과 및 경제적 효율성이 기대됨.
⑨의 기술	검사장비의 국산화를 통한 수입 의존성 검사물품의 대체 효과 및 경제적 효율성이 기대됨.

6. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)