

휴대형 농·축산품 잔류 항생제 검출 시스템 개발 (Development of Portable Biosensor-Based On-Spot Antibiotic Detection Test in Stock Farm Products)

농·축산품 중 잔류 항생제 검출을 위한 Lab-on-a-film 및 계측기 개발
(Lab-on-a-film based monitoring system for the detection of antibiotics in farm
stock animal meats)-1세부과제

농·축산품 중 잔류 항생제 추출을 위한 시료 전처리 기술 개발
(Method for extracting residual antibiotics in farm stock animal meats)-협동과제1

농·축산품 중 잔류 항생제 측정을 위한 전기화학 및 형광측정 센서시스템 개발
(Electrochemical and spectroscopic sensor systems for the detection of antibiotics
in farm stock animal meats)-협동과제2

항생제 인식 바이ורי셉터 탐색 및 생체분자 고정화 기술 개발
(Development of antibiotics recognizing bioreceptors and their immobilization
methods)-협동과제3

(주)아이센스

농림수산식품자료실



0017960

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “휴대형 농·축산품 잔류 항생제 검출 시스템 개발에 관한 연구” 과제(세부 과제 “농·축산품 중 잔류 항생제 검출을 위한 Lab-on-a-film 및 계측기 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2010 년 5 월 28 일

주관연구기관명 : (주)아이센스
주관연구책임자 : 남 학 현
세부연구책임자 : (주)아이센스
연 구 원 : 최문희 외 9명
협동연구기관명 : 한경대학교
협동연구책임자 : 김 태 완
협동연구기관명 : 부산대학교
협동연구책임자 : 심 윤 보
협동연구기관명 : 한림대학교
협동연구책임자 : 김 태 선

요 약 문

I. 제 목

휴대형 농·축산품 잔류 항생제 검출 시스템 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

FTA와 각종 수입 자유화를 향한 국제 협약의 추세에 따라 국내에 수입되는 농·축산품의 종류가 날이 갈수록 다양해지고 있으며 이들에 잔류해 있을지 모를 다양한 종류의 항생제에 대한 신속하고 정확한 검사가 요구되고 있다.

항생제의 사용 목적은 병원성 세균의 활동을 저해하거나 화학물질로써 사멸 또는 대사 경로에 이상을 일으키거나 발육에 필요한 단백질 합성 등을 저해하여 질병을 치료하거나 예방하는 작용을 지닌다. 축산환경에 항생제의 급여는 유해미생물이 배제된 분변을 유도하여 축사의 환경오염을 방지하고 인수공통 전염 병원지를 청결케하며 축산물의 보다 청결하게 생산되도록 도울 수 있는 효과가 있다. 그렇지만 항생제 오남용은 큰 부작용을 낳고 있는데 가축의 병원성 균에 대한 내성균 생성으로 축산물 잔류와 인간으로의 전이 등이다. 축산물의 생산성을 증대하고 질병을 치료하기 위해 사료첨가제로 사용되는 항생제가 반추가축의 반추위내 미생물 성상에 변화를 주고, 세포내에 침착되어 축산물로 잔류되며 이를 다시 인간이 섭취함으로써 인수공통전염병의 감염율이 높아지고 각종 부작용(구토, 두통, 발진, 쇼크, 청각장애, 신장 기능 약화, 간 장애, 위장관 출혈 및 위궤양 등)의 위험에 노출됨으로써 인간의 건강에도 위협을 주게 되었다.

유럽연합(European Union)의회는 1998년 사료 첨가물에 관한 유럽의회규정(Council Directive)을 개정하여 그 동안 사료 첨가용으로 허용되어 광범위하게 사용되었던 항생제 중 일부의 사용을 금지하였다. 이는 기존에 사용되어 오던 항생제에 대한 재평가의 필요성이 제기 되었으며 항생제 내성의 심각성과 약품개발과 대량생산에 있어서의 문제점, 항생제 자체의 화학물질이 체내 유전자에 미치는 영향이나 잔류등의 문제가 심각하다는 것을 시사하는 것이다. 이는 보다 안전하고 검증된 항생제의 개발을 요구하며 기존에 사용되어 오던 항생제들을 재평가하고 아울러 화학적으로 조성된 항생제를 대체할 또 다른 천연 물질의 필요성을 제기함으로써 축산식품 및 인간에 대한 안전성을 확보해야 함을 강조하는 것이다.

안전하고 신뢰받는 농·축산품이 유통되기 위해서는 농·축산품에 잔류되어 있는 항생제를 현장에서 분석하고 판별하는 시스템이 필요하며 국가적 감시체계에서 벗어나 다양한 시민 단체 및 소비자 수준에서도 식품에 함유된 복잡한 유해물질 검사를 쉽게 행할 수 있도록 함으로써 국민의 건강을 보호할 필요가 있다. 이를 위해서는 간단히 사용할 수 있는 검사 시스템이 필요하며 본 연구 개발을 통해 개발된 시스템이 이를 충족해 줄 수 있을 것이라 생각한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구진은 농·축산품에 함유된 항생제를 현장에서 검사할 수 있는 검출시스템을 개발하기 위하여 여러 가지 방법으로 접근하였다. 항생제를 검출하기 위해 보편적으로 사용되는 방법

은 microbial inhibition test, 크로마토 그래피 등이 있다. 이러한 방법들은 정교한 신호를 낼 수 있는 반면 검출하는데 있어서 대형 기계를 사용하므로 휴대가 불가능하고 시간이 많이 걸리며 비용이 많이 든다는 단점이 있다. 이러한 이유로 항생제 검출 역시 바이오센서로의 적용을 시도하였고 간편하고 빠른 시간 내에 검출할 수 있는 방법으로 전기화학, 광학 등의 민감한 기법들을 사용하였다. 외부적인 표식(labeling)을 하지 않고도 검출이 가능한 방법도 시도하였으며 항체를 대체할 수 있는 aptamer 개발도 진행하여 대량 생산 시 항체의 고질적인 성능 변화 문제를 해결할 수 있도록 하였다.

[세부기관 (주)아이센스 연구개발 내용]

- 연구목표 : 항생제 검출 센서(Lab-on-a-film 타입) 및 측정기 개발
- 분석방법 : 경쟁적 효소 면역분석법
- 제작방법 : 반도체 제작에 사용되는 광식각 기술 이용(PET/Dry photoresist(DPR))
- 측정방법 : 전기화학측정법

Lab-on-a-film은 스크린 프린팅을 이용한 전극 형성 기술과 반도체 제작 공정의 일부인 광식각법을 이용하여 미세유로를 형성시킨 기술로 보다 쉽고 빠르게 미세유로형 칩을 제작할 수 있고 필름 칩 위에서 별도의 조작없이 모세관 현상만으로 시료가 이동되며 한 번의 시료주입으로 면역반응, 세척, 전기화학 측정까지 가능한 기술이다. Lab-on-a-film에 구비된 전극을 항생제 검출 센서로 사용하였으며 전극에 각각의 항생제 항체를 고정화시키고 효소 conjugate 저장소 및 기질 저장소에 시약을 분주하여 항생제 검출용 센서를 완성하였다. 항생제 시료가 주입되면 경쟁적 효소면역반응이 진행되고 항생제의 농도에 따라 전극위에 효소량의 차이가 생겨 신호 분리를 가능케 하는 것이다. 다량 제작으로 제품화 가능성을 확인하였다.

[협동기관 환경대학교 연구개발 내용]

- 연구목표 : 항생제 추출을 위한 시료 전처리 기술 개발
- 잔류 항생제 추출방법에 대해 기존 전처리 방법을 개선하여 현장에서 도입이 가능한 속성 전처리 추출방법을 고안하여, 소고기, 돼지고기, 닭고기에 잔류한 tetracycline, sulfadimethoxine, chloramphenicol에 대한 속성 전처리 방법을 개발 완료하였다. 또한 속성 전처리와 바이오센서와의 적합성 실험을 통하여 현장검출(on-site detection)의 실행 가능성을 확인하였다. 전처리 개발 고안에 앞서 각 항생제에 대한 HPLC, LC/MS의 검출 타당성(method validation) 분석을 완료하였다.

[협동기관 부산대학교 연구개발 내용(위탁기관 포항공과대학교 내용 포함)]

- 연구목표 : 축산용 항생제에 대한 전기화학적 센싱시스템 및 항생제 aptamer 개발
- 분석방법 : 바이오센서 및 면역센서를 이용한 전기화학적 분석법과 colorimetry
- 개발방법 : 간이전처리기, 바이오센서 및 마이크로플루이딕 칩이 결합된 전기화학적 분석법 및 자성비드 분리법/친화성 크로마토그래피 분리법을 응용한 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)
- 측정방법 : 바이오센서를 이용한 전기화학적 검출시스템 및 금나노입자를 이용한 colorimetry

축산 시료 중에 포함된 항생제 5종(테트라사이클린계 4종, 클로르암페니콜)의 간편 분석을 위해, 간이전처리기를 개발하였으며 이를 이용하여 항생제들을 간편하게 추출하였다. 추출한 항생제 혼합용액을 glass etching을 이용하여 제작한 다중채널 마이크로플루이딕 칩에 주입하여 농축과 분리를 수행하였으며, 분리되는 항생제들을 고감도 바이오센서 및 면역세서를 이용하여 칩위에서 전기화학적으로 검출하였다. 압타머는 표적물질에 특이적으로 결합하는 능력을 가진 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)로 화학적 대량 합성이 가능하고 인체에 대한 면역반응이 없으며 화학적 변형이 가능하여 항체를 대체할 수 있는 바이오물질로 대두되고 있다. 압타머를 개발하기 위해 자석을 이용해 분리가 쉬운 자성비드 분리법과 많은 양의 표적분자를 고정화할 수 있는 친화성 크로마토그래피법을 응용한 SELEX를 수행하였으며 표적분자인 항생제, Kanamycin에 결합하는 21mer의 압타머를 개발하였다. T_m 값 측정을 통해 kanamycin과 압타머의 결합을 확인하였고, 금나노입자(Gold nanoparticle)를 이용한 colorimetry 방법을 통해 kanamycin을 검출할 수 있는 시스템을 개발하였다. 또한 다른 항생제(ampicillin, sulfadimethoxine)에 대한 압타머도 개발 중에 있다.

[협동기관 한림대학교 연구개발 내용]

- 연구목표 : 항생제 인식 바이오리셉터 탐색 및 생체분자 고정화 기술개발
- 분석방법 : 경쟁적 형광 면역분석법
- 제작방법 : 분석물질 + 결합체 제작기술 및 용액상 경쟁반응과 결과 확인을 위한 anchoring 기술은 유전자 칩 제작에 사용되는 유전자-유전자 결합기술 이용
- 측정방법 : 형광 분석법

설파다아미메톡신(SDM)등의 항생제를 선택적으로 인식하는 항체를 이용하여 효소면역분석법(ELISA)으로 항생제의 농도를 측정하는 방식은 전통적으로 사용되어 왔지만 실제로 간편한 형태로 만들기 어려워 ELISA 측정법을 형광 부착된 항체를 이용하여 형광분석법으로 현장에서 직접 측정 가능한 기술을 개발하였다. 이 기술을 이용하여 portable한 제품 개발은 많이 시도되어 왔지만 실제로 원하는 민감도를 얻지 못하였다. 이 민감도는 결합된 항생제-항체 결합체를 고체기질 즉 바이오칩에 어떤 방식으로 정량적으로 결합이 가능한가가 전체 측정 기술의 감도를 결정하게 된다. 현재까지 사용된 SDM-BSA 결합체와 BSA항체의 결합 등의 단백질을 이용한 방식이 대부분 민감도 확보에 실패하였으나 최적의 결합이 가능한 SDM-DNA 결합체를 이용하여 원하는 형광감도를 충족하는 스트립 형태의 시제품 개발에 성공하였다. 본 기술은 다양한 항생제 등의 유해물질 분석을 간편하게 제작하는 기반기술로 적용될 수 있을 것이다. 이러한 기술은 압타머가 결합된 생체분자들의 고정화에서도 탁월한 민감도를 발휘하는 것을 확인하였다. 동시에 이러한 스트립을 형광 측정하는 소형 분석기의 시제품을 확보하였다. 그리고 SELEX를 통한 항생제(테트라사이클린 및 카나마이신)-특이 압타머의 발굴하고 이를 이용한 압타머 고정화 칩을 제조하였다. 카나마이신-특이 압타머의 염기서열을 분석하여 공통된 카나마이신 결합부위의 2차 구조를 결정하고 카나마이신에 대한 결합력을 확인하였다.

IV. 연구개발결과

본 연구진은 농·축산품에 함유된 항생제를 현장에서 검사할 수 있는 검출시스템을 개발하였다. 소고기, 돼지고기, 닭고기 및 달걀, 우유등에 함유된 Tetracycline 계열(Tetracycline, Chlorotetracycline, Oxytetracycline, Doxytetracycline), Chloramphenicol,

Sulfadimethoxine 등을 검출할 수 있는 센서와 계측기 및 시료전처리 키트를 개발하였는데, 의료기기 진단 센서로 널리 이용되는 바이오센서를 항생제 측정 시스템에도 적용하였다. 대량 생산형에 맞춘 전기화학 분석용 Lab-on-a-film 타입 칩과 형광 분석용 래피드 테스트 칩이 개발 완료되었으며 이 칩을 측정할 수 있는 계측기 또한 시제품화 하였다. 소고기, 돼지고기, 닭고기 등의 시료에서 항생제를 추출하기 위해 실험실이 아닌 현장에서도 사용할 수 있는 시료 전처리키트도 개발 완료되었으며, 간이전처리 키트와 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)을 이용한 microfluidic 칩이 일체화 되어 항생제 검출이 가능한 칩 또한 개발 완료되었다. 칩을 제작하는데 필요한 원료로는 항체, 효소 및 형광물질 conjugate가 주로 사용되었지만 cellulose-dsDNA로도 검출 가능함을 확인하였고, 압타머 개발을 통해 항체 대체 물질로의 적용 가능성을 확인함으로써 대량 생산 적용 시 항체 성능의 변화로 칩 자체의 성능 변화를 줄일 수 있는 가능성을 확인하였다.

[세부기관 (주)아이센스 연구개발 결과]

- 연구결과 : (주)아이센스의 독특한 기술인 Lab-on-a-film 타입에서 전기화학분석법과 경쟁적 효소면역분석법을 이용하여 항생제 검출 센서 및 계측기 개발 완료
- 시료 : 시료 전처리 키트를 통해 추출된 항생제 시료
- 시료량 : 50uL
- 측정시간 : 10분 이내
- 검출 감도 : Tetracycline(TC) 250ppb, Chloramphenicol(CAP) 0ppb(No detection), Sulfadimethoxine(SDM) 100ppb

[협동기관 한경대학교 연구개발 결과]

- 연구결과 : 현장에서 적용 가능한 항생제 추출 전처리 kit 개발 완료
- 시료 : 소고기, 돼지고기, 닭고기
- kit 사용 전처리 방법
 - Tetracycline : 추출(handy shaking)→filter→SPE clean up(syringe+ connector사용)→분석
 - Sulfadimethoxine, chloramphenicol : 추출(handy shaking)→filter→액-액추출→분석
- 전처리시간 : 최대 약 10분

[협동기관 부산대학교 연구개발 결과(위탁기관 포항공과대학교 내용 포함)]

- 연구결과 : 휴대형 간이전처리기, 고감도 바이오센서 및 다중채널 마이크로플루이드 칩으로 구성된 전기화학적 항생제 분석시스템과 다양한 방법을 응용한 SELEX 기술을 통해 항생제의 압타머 개발 및 검출 방법 개발
- 대상항생제 : 테트라사이클린계 2종 및 클로르암페니콜 검출 및 Kanamycin 항생제 aptamer
- 검출방법 : 전기화학적 전류측정 및 금나노입자를 이용한 colorimetry 법
- 검출농도 : 전기화학적 검출 ~ 1.5 nM, 분광학적 검출 Kanamycin 0.06 uM ~ 0.14 uM
- 검출내용 : 축산 시료 중에 포함된 5종의 항생제들을 마이크로플루이드 칩으로 분리한 다음 바이오센서를 이용하여 선택적으로 항생제들을 검출하고 NaCl 농도에 따른 금나노 입자의 색깔 변화를 통한 kanamycin과 압타머의 결합을 관찰하였음

농·축산품 항생제 측정을 위한 전기화학 센싱시스템 및 새로운 aptamer 합성과 분광측정 분석법을 개발하였다. 전기화학적 센싱시스템은 간이전처리기, 전기화학적 바이오센서 및 면역센서, 다중채널 마이크로플루이딕 칩으로 구성되어 있다. 바이오리셉터(cellulose-dsDNA, 항체)가 고정된 전기화학적 바이오센서는 nM 수준의 극미량을 검출 할 수 있으며, 시료의 주입, 농축/분리부가 하나의 칩위에 설치된 마이크로플루이딕 칩은 항생제 시료의 농축효과와 항생제 혼합물에 대한 분리 능력이 매우 우수하였다. 축산시료의 간편 전처리를 위해 sonicator와 필터가 내장된 주사기를 이용하여 간이전처리를 개발하였다. 다양한 방법을 응용한 SELEX 방법을 통해 항생제의 압타머를 개발하였고, 또한 개발 중에 있다. 항생제와 같은 저분자 물질의 압타머를 개발하기 위해 많은 양의 표적분자를 고정화할 수 있는 친화성 크로마토그래피법을 이용하였고, 결합되는 압타머 라이브러리를 쉽게 분리하기 위해 자성비드를 이용하였다. 또한 개발된 압타머를 이용해 금나노입자 colorimetry 방법으로 항생제를 검출 할 수 있는 시스템을 개발하였다.

[협동기관 한림대학교 연구개발 결과]

- 연구결과 : 항생제 인식 멤베레인형 디바이스 칩 개발과 카나마이신-특이 압타머 고정화 칩 제조
- 시료 : sulfadimethoxine
- 시료량 : 10ul
- 측정시간 : 20분
- 검출 감도 : 1ppm ~ 100ppb

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 특허 : Lab-on-a-film 칩 특허 출원 2건, 간이전처리기 관련 1건(국내 출원 예정), 압타머 관련 1건(국내 출원 예정)
- 논문 : 논문 6편(부산대 4편, 한림대 2편)
- 성과활용 계획 : 제작된 검출 시스템을 기존의 방법들과 비교하여 현장에서 적용해보는 검증을 거친 후 항생제 측정 칩, 계측기, 시료 전처리기를 포함한 패키지를 주관기관인 (주)아이센스에서 사업화할 예정이다. 또한 부산대에서 개발한 전기화학적 항생제 센싱시스템은 전처리와 분석시간이 기존의 방법에 비해 획기적으로 감소하였으며, 항생제에 대한 감도가 우수하였다. 이들 특성을 이용하면 항생제의 간편 분석과 조기검출을 통하여 유해성분 조기 검출 시스템 구성에 활용이 가능할 것으로 판단된다. 그리고 다양한 방법을 응용한 SELEX 방법을 통하여 개발된 항생제 압타머를 통해 여러 가지 표적분자의 압타머를 개발할 수 있으므로 이를 바이오센서 시스템에 활용할 예정이다.

SUMMARY

Project by i-SENS, Inc.

Antibiotics are widely used in stock farm animals for prevention and control of infectious disease by bacteria. Widespread use of antibiotics in animal husbandry, however, greatly increase the risk in human health due to the residual antibiotics left in meats. European Union and several developed countries around the world have set ever tightened acceptable maximum residue limits (MRLs) for various antibiotics to minimize the health risk by increased antimicrobial resistance or the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The new trend in tightening regulations demands accurate and fast analytical techniques with high specificity, sensitivity and simplicity for on-site analysis.

A novel microfluidic electrochemical enzyme immunoassay chip for the sensitive detection of tetracycline (TC), chloramphenicol (CAP) and sulfadimethoxine (SDM) are described in detail in this report. In this work, lab-on-a-film (LOAF) chips with microfluidic channels were formed using photolithography and wet etching of dry photoresist film laminated on the poly-ethylene terephthalate (PET) substrate. The electrochemical detection system was made by printing carbon paste electrode on the substrate, immobilizing the antibody (Ab) for antibiotics on the carbon working electrode, and dispensing and drying alkaline phosphatase enzyme (ALP)-antigen (Ag) conjugate and the substrate on the path of microfluidic channel, respectively. The sample applied to the LOAF flows through the two divided fluidic channels; sample in one path carries the ALP-Ag conjugate on its way to the electrode (sample flow) and sample in another path (wash flow) subsequently carries the substrate for electrochemical enzymatic reaction while washes off the unreacted ALP-Ag conjugate from the electrode. This system determines the concentration of antibiotics through competitive immunoassay and a chronoamperometric means. The electrochemical detection could be made within 1 minute and total assay time was about 10 minutes. The LOAF could detect residual antibiotics in meats in MRL range with sufficiently high sensitivity. This LOAF chip-based method can be used to develop "easy-to-use" on-site antibiotic determination kit in food samples.

Codevelopment project by Hankyong University team

The present work describes the development of a simple and rapid sample extraction method and the design of sampling kit for determination of antibiotics (tetracycline, sulfadimethoxine and chloramphenicol) in meats including beef, pork and chicken. A simplified method described here includes the eliminations of homogenization, centrifugation and evaporation steps replaced by filter, syringe, and connector, respectively. The simplified method is validated by comparing the recovery rate of

conventional method using high-performance liquid chromatography. Covariance(CV) values for all the examined tetracycline, sulfadimethoxine and chloramphenicol were lower than 5.0 % and all values of accuracy for tetracycline, sulfadimethoxine and chloramphenicol were within $\pm 10\%$. Tetracycline, sulfadimethoxine and chloramphenicol were recovered by 70 to 120% from all kind of matrices and standard deviations of this recovery tests were below 10%. The recoveries of tetracycline and sulfadimethoxine were 70 to 120% similar to results from the previous methods. Simple sample extraction kit that can be used in the field without much training was designed and applied for the quantitative determination of antibiotics in meats using the LOAF chip.

Codevelopment project by Pusan University/POSTECH team

Electrochemical sensing system, a new aptamer synthesis and spectral analysis method for measuring antibiotics were developed. Electrochemical sensing system was composed of the pretreatment apparatus, electrochemical biosensor, immunosensor and multi channel microfluidic chip. We also developed SELEX systems using magnetic bead and affinity chromatography for in vitro selection of small molecules as well as large molecules. Through these systems, we searched new aptamers for kanamycin.

Codevelopment project by Hallym University team

The advantages of DDI (DNA-Directed Immobilization) method are combined with unique properties of 9G DNA membrane enabled quantitative detection of free SDM with high sensitivity and reproducibility in few minutes. A model system comprising SDM-DNA conjugate (sulfadimethoxine) and secondary Cy5-modified SDM antibody is firstly mixed in solution phase which contains free SDM then loaded on the 9G DNA Membrane to demonstrate proof-of-concept. The detection of free SDM in water is relied on competing with SDM-DNA conjugate, which plays the role as bridge between secondary Cy5-modified (SDM) antibody with oligonucleotide probe on 9G membrane, quantitative data are obtained by recording the optical responses of the test zone with a portable strip reader. In conventional method, SDM was immobilized by using protein-SDM conjugate (such as BSA), it exposed some disadvantages due to unstable properties of protein. However DNA surfaces are robust and stable, and also easy to be fabricated compared to protein surfaces. DNA-directed immobilization also allows us to avoid long-term storage and harsh incubation and spotting processes of unstable proteins on various assay surfaces. Furthermore, 9G DNA membrane in which oligonucleotide probes are immobilized on self-assembled monolayer of supramolecular modified glass fiber (9G membrane) by recognizing consecutive 9Guanine bases of probe sequence forms vertical space between probes that enabled DNA target to hybridize with excellent efficiency(80% within 10min). The responds of introduced biosensor (SDM Membrane Test Kit) showed linear over the range of

1-1000ng/ml(SDM concentration) with a detection limit of 0.1ng/ml. By comparing with previous reports or similar products the sensor shows great promise of application for point-of-care or in-field detection of biotic molecules as well as proteins.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction

Section 1 The Purpose for Research and Development

Section 2 The Need for Research and Development

1. The Problem of Antibiotics
2. The Need for Portable Biosensor-based On-spot Detection of Antibiotics in Stock Farm Products

Chapter 2 Technology Development Status

Section 1 Technology Development Status

1. Biochip
2. Bio-MEMS

Section 2 Distinction between Different Technologies

1. Lab-on-a-film Chip
2. Microfluidic Chip Using Capillary Electrophoresis
3. Immunochromatography
4. Aptamer

Chapter 3 Research and Result

Section 1 Research and Result

Chapter 4 The Achievements and Contributions

Section 1 The Level of Achievements

Section 2 Contributions

Chapter 5 Products and Application Plans

Section 1 Products

1. Paper
2. Patent
3. Support of Human Resource

Section 2 Application Plans

1. Commercialization
2. Research Articles and Patent
3. Additional Researches

Chapter 6 International Scientific and Technical Information

Chapter 7 Reference

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
 - 제 1 절 연구개발의 최종 목표
 - 제 2 절 연구개발의 필요성
 - 1. 항생제 남용의 심각성
 - 2. 휴대형 농·축산물 잔류 항생제 검출 시스템의 필요성

- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
 - 제 1 절 국내외 기술개발 현황
 - 1. 바이오칩
 - 2. 바이오멤스
 - 제 2 절 개발 핵심 기술의 국내외 기술과의 차별성
 - 1. Lab-on-a-film 칩
 - 2. 전기영동을 이용한 마이크로플루이딕 칩
 - 3. 면역크로마토그래피
 - 4. 압타머

- 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과
 - 제 1 절 연구개발 수행 내용 및 결과
 - 1. 세부연구 (주)아이센스
 - 2. 협동연구 한경대학교
 - 3. 협동연구 부산대학교
 - 4. 협동연구 한림대학교

- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
 - 제 1 절 연구개발 목표의 달성도
 - 1. 세부연구 (주)아이센스
 - 2. 협동연구 한경대학교
 - 3. 협동연구 부산대학교
 - 4. 협동연구 한림대학교
 - 제 2 절 관련분야에의 기여도
 - 1. 세부연구 (주)아이센스
 - 2. 협동연구 한경대학교
 - 3. 협동연구 부산대학교
 - 4. 협동연구 한림대학교

- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
 - 제 1 절 연구 개발 성과
 - 1. 논문게재 성과

2. 특허 성과

3. 인력 지원 성과

제 2 절 성과 활용 계획

1. 실용화·산업화 계획

2. 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

3. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 최종 목표

본 사업의 최종 목표는 농·축산품에 잔류하는 항생제 검출 시스템의 개발에 있다. 무엇보다도 안심하고 사먹을 수 없는 요즘 유기농제품, 친환경제품 등 농약이나 항생제 없이 재배되고 길러진 먹을거리들이 최근 들어 공급되고 있기는 하지만 소비자들 입장에서는 가격적인 면이 부담일 수 밖에 없다. 농·축산품 뿐 아니라 많은 제품 내에 잔류하는 유해물질들을 다양한 시민 단체 및 소비자 수준에서도 검사를 쉽게 행할 수 있게 한다면 식품 판매자 및 유통업자들에게 경각심을 일으켜 항생제를 남용하거나 유해물질을 첨가하는 행위는 많이 줄어들 것이라 생각한다. 인간의 건강이 삶의 가장 중요한 조건으로 대두되고 있는 요즘 농·축산품에 잔류하는 항생제 검출 시스템의 개발은 가장 시급하게 진행되어야 할 부분이라고 생각한다. 이러한 시대적 요구에 맞게 (주)아이센스는 한경대학교, 부산대학교, 한림대학교와 협동하여 현장에서도 검출 가능한 농·축산품에 잔류하는 항생제 검출 시스템의 개발을 최종 목표로 삼았다. 농·축산품은 소고기, 돼지고기, 닭고기등의 육류 제품과 우유 및 달걀 등의 제품으로 제한을 두었으며 검출하고자 하는 항생제는 전체 항생제 사용의 65% 이상을 차지할 정도로 많이 쓰이는 물질이면서 내성율도 높은 tetracycline 계열(Tetracycline, Chlorotetracycline, Oxytetracycline, Doxytetracycline)과 전세계 대부분 국가에서 식용 동물에게 사용하지 못하도록 규제하고 있지만 그럼에도 불구하고 농·축산품 및 어패류, 식품등에서 검출되고 있는 chloramphenicol(클로람페니콜)과 합성 항균제로 가축에 널리 쓰이는 설폰아마이드 계열 중 sulfadimethoxine(설마디메톡신)으로 제한을 두었다. 이러한 항생제를 검출하기 위해 현재 사용되고 있는 방법은 효소결합면역분석법(ELISA)이나 GC/MS 등으로 감도가 높긴 하지만 이러한 방법들은 검출하는데 비용이 많이 들고 전문가의 기술로도 시간이 많이 걸린다는 단점이 있다. 따라서 키트형 검사 시스템과 같은 적은 시료를 가지고도 짧은 시간 내에 정확한 분석 값을 줄 수 있는 휴대용 간이 분석방법의 개발이 요구되고 있으며, 이에 부합하기 위해 (주)아이센스 및 부산대학교의 기술로 항생제 검출용 전기화학 면역센서와 한림대학교의 기술로 면역크로마토그래피 센서, 그리고 한경대학교의 기술로 항생제 시료 전처리 키트를 제작하여 시제품화 하는 것이 본 사업의 최종 목표이다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 항생제 남용의 심각성

지난 2000년 의약분업 이후로 항생제가 전문의약품으로 지정되어 무분별한 복용을 자제시키고 있다. 또한 보건복지부가 지난 2006년 2월 9일 전국 병·의원의 항생제 처방률을 공개하는 등 사회적으로도 관심이 고조되고 있으며 현재 정부 차원에서도 정책적으로 항생제 사용 저감화를 위한 노력을 다각적으로 기울이고 있다. 그러나 동물약품은 아직까지 이러한 규제가 없어 수의사가 아닌 일반인도 쉽게 항생제를 구입하고 있는 실정이다. 즉, 수의사의 처방에 의해서만 항생제 사용이 가능한 일본, EU 등과 달리 현재 우리나라는 축산농가에서 항생제를 쉽게 구입할 수 있어 축산농가에서 항생제를 오남용할 수 있는 분위기에 노출되어 있다. 따라서

시중에 유통되는 일부 육류에서 허용 기준의 최고 5배가 넘는 항생제가 검출되었다는 보고(매일경제 2006.8)등 그에 따른 문제점이 속출되고 있기에 항생제의 오남용을 방지하기 위한 대책 마련은 매우 시급하다. 현재 세계적으로도 농·축산품에서의 무분별한 항생제 사용이 심각한 내성을 유발한다고 끊임없이 보고되고 있으며 우리나라에서도 항생제 잔류 허용 기준을 초과한 육류를 지속적으로 섭취하게 되면 인체에 약물 저항성이 증가된 내성 세균이 출현해 질병 치료가 제대로 되지 않는 등 부작용이 발생할 수 있다고 한국소비자보호원에서 지적한 바 있다(연합뉴스 2006. 8). 또한 최근 한국소비자보호원에서 서울, 부산, 대전, 광주 4개 도시의 백화점, 할인점, 음식점 등에서 판매하는 소고기, 돼지고기, 닭고기 222점을 수거해 항생제 등 잔류 물질 검사를 실시한 결과 소고기, 돼지고기 닭고기 각각 1개 제품에서 잔류 허용 기준치를 초과하는 항생제가 검출됐다고 밝혔다. 한국소비자보호원에 따르면 부산 T마트의 닭고기 1개 제품에서는 합성항균제인 엔로프록사신이 기준치(0.1ppm)를 5.1배 초과하는 0.512ppm이 검출되었으며, 광주 L마트의 삼겹살에서는 oxytetracycline(옥시테트라사이클린)이 기준치(0.1ppm)보다 1.7배 많은 0.169ppm이 나왔고 이밖에 소고기, 돼지고기, 닭고기 각 3개 제품씩 9개 제품에서는 허용 기준 이내이지만 항생제가 일부 검출되었다고 한다(한국일보 2006. 8).[1]

또한 농림부 국립수의과학검역원이 공개한 식육 중 잔류물질 위반농가 현황을 보면 매달 20곳 안팎의 소·돼지 축산 농가들이 tetracycline(테트라사이클린), penicillin(페니실린) 등의 항생제와 설파메타진 등의 합성항균제가 법정 기준치 이상으로 들어 있는 소·돼지를 출하하다 적발되는 것으로 나타났다. 현행 축산물가공처리법에 합성항균제나 항생제, 호르몬제가 기준치 이상 들어있는 소·돼지고기를 유통·판매하지 못하도록 하고 있으나 농림부는 도축장에서 검사 시료를 채취해 검사 결과가 나오기까지 길게는 1주일까지 걸리기 때문에 문제가 되는 축산물을 제때 회수하기 어려워 모두 유통시키고 있다고 밝혔다. 잔류 물질 종류별로는 tetracycline 기준 위반이 24건으로 가장 많고 oxytetracycline 16건, penicillin 7건, 설파메타진 5건, chloramphenicol 3건, 겐타마이신 2건, 타이로신과 sulfadimethoxine 각 1건 등의 차례로 나타났다(한겨레 2003. 7).[2]

식품의약품안전청이 2005년 12월 발표한 ‘식품중 식중독균 항생제 내성 모니터링’보고서에 따르면 육류에서 검출된 대장균이 항생제에 90%가 넘는 내성률을 보이는 것으로 나타났다. 육류에서 검출된 황색포도상구균의 경우 페니실린에 71.7%의 내성률을 나타냈으며, 장구균의 경우도 tetracycline에 90% 내성을 보였다. 이렇게 항생제 잔류허용기준을 초과한 농·축산품을 지속적으로 먹을 경우 인체에 내성이 생겨 제대로 질병 치료가 되지 않는 등의 부작용이 생길 수 있다.[1]

2. 휴대형 농·축산품 잔류 항생제 검출 시스템의 필요성

FTA와 각종 수입 자유화를 향한 국제 협약의 추세에 따라 국내에 수입되는 농·축산품의 종류가 날이 갈수록 다양해지고 있으며 이들에 잔류해 있을지 모를 다양한 종류의 항생제에 대한 신속하고 정확한 검사가 요구되고 있다.

항생제의 사용 목적은 병원성 세균의 활동을 저해하거나 화학물질로써 사멸 또는 대사 경로에 이상을 일으키거나 발육에 필요한 단백질 합성 등을 저해하여 질병을 치료하거나 예방하는 작용을 지닌다. 축산환경에 항생제의 급여는 유해미생물이 배제된 분변을 유도하여 축사의 환경오염을 방지하고 인수공통 전염 병원지를 청결케하며 축산물의 보다 청결하게 생산되도록 도울 수 있는 효과가 있다. 그렇지만 항생제 오남용은 큰 부작용을 낳고 있는데 가축의 병원성

균에 대한 내성균 생성으로 축산물 잔류와 인간으로의 전이 등이다. 축산물의 생산성을 증대하고 질병을 치료하기 위해 사료첨가제로 사용되는 항생제가 반추가축의 반추위내 미생물 성장에 변화를 주고, 세포내에 침착되어 축산물로 잔류되며 이를 다시 인간이 섭취함으로써 인수공통전염병의 감염율이 높아지고 각종 부작용(구토, 두통, 발진, 쇼크, 청각장애, 신장 기능 약화, 간 장애, 위장관 출혈 및 위궤양 등)의 위험에 노출됨으로써 인가의 건강에도 위협을 주게 되었다.

유럽연합(European Union)의회는 1998년 사료 첨가물에 관한 유럽의회규정(Council Directive)을 개정하여 그 동안 사료 첨가용으로 허용되어 광범위하게 사용되었던 항생제 중 일부의 사용을 금지하였다. 이는 기존에 사용되어 오던 항생제에 대한 재평가의 필요성이 제기되었으며 항생제 내성의 심각성과 약품개발과 대량생산에 있어서의 문제점, 항생제 자체의 화학물질이 체내 유전자에 미치는 영향이나 잔류등의 문제가 심각하다는 것을 시사하는 것이다. 이는 보다 안전하고 검증된 항생제의 개발을 요구하며 기존에 사용되어 오던 항생제들을 재평가하고 아울러 화학적으로 조성된 항생제를 대체할 또 다른 천연 물질의 필요성을 제기함으로써 축산식품 및 인간에 대한 안전성을 확보해야 함을 강조하는 것이다.

안전하고 신뢰받는 농·축산품이 유통되기 위해서는 농·축산품에 잔류되어 있는 항생제를 현장에서 분석하고 판별하는 시스템이 필요하며 국가적 감시체계에서 벗어나 다양한 시민 단체 및 소비자 수준에서도 식품에 함유된 복잡한 유해물질 검사를 쉽게 행할 수 있도록 함으로써 국민의 건강을 보호할 필요가 있다. 이를 위해서는 간단히 사용할 수 있는 검사 시스템이 필요하며 본 연구 개발을 통해 개발된 시스템이 이를 충족해 줄 수 있을 것이라 생각한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

1. 바이오칩(Biochip)

바이오칩이란 DNA나 protein과 같은 생체물질을 유리, 실리콘, 고분자등의 재질로 된 고체 기질 위에 고밀도로 집적화한 것으로, 유전자 발현 양상, 유전자 결합, 단백질 분포 등의 생물학적 정보를 얻거나 생화학적 공정 및 반응 속도 또는 정보 처리 속도를 높이는 도구나 장치를 말한다. 바이오칩 기술은 1970년대 이후 생물이나 생체분자가 가진 기억 기능, 조직체 형성 기능 또는 병렬 처리 기능 등을 응용하여 물리적 한계를 드러내고 있는 반도체 소자 기술을 극복하고 지식정보처리 지향의 컴퓨터 개발에 응용하고자 하는 목적으로 출발하게 되었다. 이러한 바이오칩은 과학 기술 연구 및 신약 개발 프로세스, 임상 진단등의 분야에 혁신적 변화를 일으킬 것으로 주목되어 빠르게 성장할 것으로 예측된다.

바이오칩은 크게 마이크로어레이(microarray) 칩과 마이크로플루이딕(microfluidics) 칩으로 구분할 수 있다. 마이크로어레이는 수천 혹은 수만 개의 DNA, 단백질, 탄수화물, 펩타이드 등을 일정 간격으로 배열하여 붙이고 분석 대상 물질을 처리하여 결합 양상을 분석할 수 있는 칩(DNA 칩, 단백질 칩, Cell 칩, Neuron 칩)이고, 마이크로플루이딕 칩은 Lab-on-a-Chip(랩온어칩)으로 미량의 분석 대상 물질을 흘려보내면서 칩에 집적화되어 있는 각종 생물 분자 혹은 센서와 반응하는 양상을 분석할 수 있는 칩이다. 마이크로어레이의 대표 칩인 DNA 칩은 실리콘, 유리, 폴리프로필렌, 활성화 폴리아크릴아마이드와 같은 고체 기판 위에 염기 서열을 이미 알고 있는 탐침을 올리고 핵산을 정해진 위치에 부착시켜 고집적화 된 배열을 만든 것을 말한다. DNA 칩 기술의 개발은 1990년대 중반부터 수행되어 왔는데 반도체 기술과 분자생물학을 융합한 기술로 분석 시스템의 소형화를 가져오게 된 획기적인 기술로 평가되고 있다. 휴먼게놈프로젝트의 완성과 더불어 대량의 유전정보에 대한 초고속 정보처리 장치가 필요하게 되었고 기존의 분석 기기들이 차지하는 많은 공간 및 분석시간을 단축시키기 위해서 칩 센서의 연구개발이 이루어졌다. 현재 DNA 센서 칩 제조 기술을 보유하고 있는 해외 유명 기업으로는 Affymetrix, Nanogen, CMS-모토로라사 등이 있다. 2004년 독일 Infineon사와 Max-Planck 연구소는 CMOS 칩에 내장하는 상용화 DNA 칩과 생체분자 검출 칩을 개발 발표하고 생산 중에 있다. 마이크로플루이딕 칩인 Lab-on-a-chip은 반도체 제작에 사용되는 식각기술을 이용하여 유리, 실리콘, 또는 플라스틱으로 된 수 cm^2 크기의 chip 위에 분석에 필요한 여러 가지 장치들을 마이크로 머시닝 기술을 이용하여 집적시킨 화학 마이크로프로세서로 고속, 고효율, 저비용의 자동화된 분석이 가능하다. Lab-on-a-chip 기술은 1990년대 초 Harrison 등이 개발한 모세관 전기영동을 이용한 방법에 기초를 두고 있다. 이들은 용액이 채워진 미세한 채널 양단에 전압을 걸어 용액의 흐름을 만드는 모세관 전기삼투현상을 이용하여 별도의 펌프나 밸브 없이 용액의 흐름을 제어할 수 있고, 모세관 전기영동을 이용하여 분리분석을 할 수 있어 작은 실험실을 chip 위에 제작하는 것이 가능하다는 것을 보였다.

현재 바이오칩은 과학 기술의 발전과 유전자 연구 및 신약 개발 프로세스, 임상진단 등의 분야에 혁신적인 변화를 가져올 것으로 커다란 주목을 받고 있다. 임상분야에서는 암, 에이즈, 감염, 말라리아 등과 관련된 유전자 돌연변이를 검출하여 진단할 수 있는 바이오칩이 개발되어

판매중이다.

분야별로 바이오칩이 어떻게 응용될 수 있는지 좀 더 자세히 살펴보면 다음과 같다.

표 1. 바이오칩 기술의 응용 분야

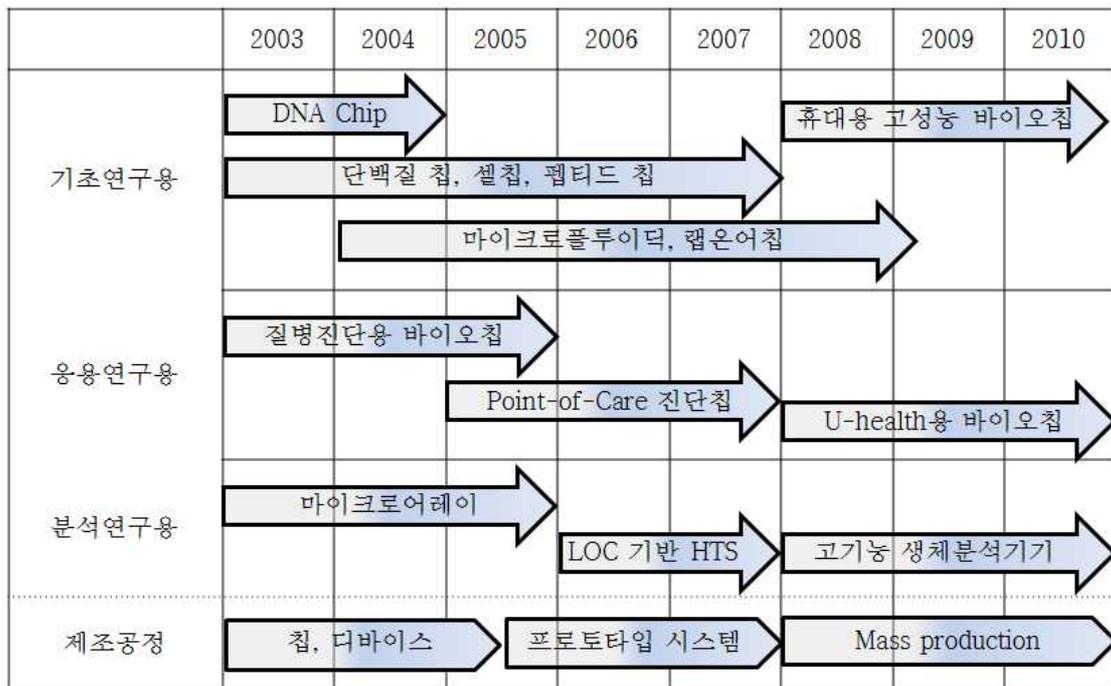
응용분야	응용 예
정보가전	가전 응용, 개인식별/보안시스템, 가상현실 시스템, 생물전자소재, 바이오 컴퓨터 등
식품 및 생물공정	식품/안정성 검사, 동식물 질병 진단, 육류/농산물의 품질관리, 생물공정, 계측 및 제어, 생물생산 시스템
정밀화학	생리활성 의약품 개발(항생제, 항암제, 백신), 화장품 제조, 효소 및 생화학 시약, 농약 제조 및 분석, High Throughput Screening (신약개발 탐색, HTS)
환경분야	BOD 센서, 수질 및 해양오염 감시, 오염물질 검출 및 분석, 중금속, 독성 폐기물 검출, 위험물/생화학 무기 검출
보건의료	혈액검사, 유전자 분석, 자기진단(당뇨, 간염, 말라리아), 임상용 진단 시약, 실험 동물 대체용 독성시험, 의료기기

바이오칩은 제약·의료 등의 헬스 케어 분야에서 개발되기 시작하였다. 헬스케어 분야는 바이오칩에 대한 수요가 다른 분야에 비해서 많고 제품 개발도 많이 진전된 편으로, 전자 진단 분석기기 및 치료용 약물 로봇, 원격 진료를 위한 모바일 의료기기 등에 대한 응용이 추진되고 있다. 장기적으로는 바이오칩 기술을 통해 인공 망막, 인공 신경 등 인공 장기의 개발도 가능할 것으로 기대되고 있다. 환경·에너지 분야에서는 수질오염 감시, 오염 물질이나 위험물의 검출 및 분석을 위한 바이오센서가 오래 전부터 개발되어 왔다. 또한 생체 물질을 동력원으로 하는 미니 전지의 개발에도 바이오칩 기술을 접목시킨 연구가 진행 중에 있다. 한편 식품의 안전성 검사, 동식물의 질병 진단, 육류 및 농산물의 품질 관리에 있어서도 바이오칩 기술이 활용되고 있다. 국내 연구진이 발표한 ‘나노 DNA 바코드’와 같은 제품이 이에 적합한 사례라고 할 수 있다. 정보·전자 분야에서는 개인 식별/보안을 위한 생체 인식 시스템, 가상 현실 시스템, DNA 컴퓨터와 같은 바이오컴퓨터가 바이오칩 기술을 응용한 제품들이다. 또한 바이오칩을 이용하면 가상현실 시스템을 이용한 영화라든지 비디오 게임 등이 등장하여 쌍방향 엔터테인먼트도 가능할 것으로 보인다. 그러나 현재까지 바이오칩의 활용범위는 매우 제한적으로 제품화에 성공했다고 할 수 있는 분야는 신약 연구 개발용 칩, 환경 오염물질 검출용 바이오센서 등에 국한되어 있는 실정이다.[3]

2. 바이오멤스(Bio-MEMS; Bio Micro Electro Mechanical System)

바이오멤스 기술은 마이크로어레이칩과 마이크로플루이딕칩의 바이오칩과 바이오센서 개발을 위한 핵심 도구로 인식되고 있다. 주로 미국과 유럽에서 연구되고 있는 바이오멤스 기술은 실리콘이나 수정, 유리등을 가공해 초고밀도 집적회로와 머리카락 절반 두께의 초소형 기어, 손톱 크기의 하드디스크 등과 같은 초미세 기계구조물을 만들어 인체에 삽입함으로써 암을 제거하는 용도의 로봇으로 사용할 수 있다. 바이오멤스 기술은 여러 가지 센서를 회로와 함께 하

나의 칩으로 통합하여 초소형, 고감도를 달성하는 데 그 목적을 두고 있는 것으로 랩온어칩이나 μ -TAS(micro-total analysis system) 형태로 유리, 실리콘, 또는 플라스틱으로 된 수 cm^2 크기의 칩 위에 분석에 필요한 여러 가지 장치들을 마이크로머시닝 기술을 이용하여 집적시킨 것을 말한다. 랩온어칩이 연구되어 온 배경을 보면, DNA나 RNA 혹은 단백질을 세포로부터 추출하고 처리하는 전처리 과정이 복잡하여 심각한 수준의 오차를 일으킬 수 있기 때문에 이와 같은 복잡한 전처리과정을 자동화하고 소형화하여 하나의 칩 위에서 모든 정제, 증폭과정들이 이루어질 수 있게 만든 것이 랩온어칩 개념으로 발전되어 온 것이다. 랩온어칩을 구현하기 위해서는 바이오멤스, 미세유체 기술과 같은 첨단 공학 분야의 기술 개발이 필수적이다. 바이오멤스 공정 기술은 크게 실리콘, 유리 공정과 플라스틱 금속 공정으로 구분할 수 있다. 실리콘, 유리 공정으로 David Sarnoff Research Center의 유리 접합 기술과 구멍 밀봉 기술과 전기도판 형성 방법 및 University of California의 필터 형태의 반응기 형태 및 실리콘 나노체 제작 방법 등이 있으며, 플라스틱 금속 공정으로는 David Sarnoff Research Center의 마이크로 크기의 진동형 박막제조 공정, Caliper Technologies사의 PMMA(polymethyl metacrylate)를 이용한 유체 시스템 제작 기술 등이 있다. 미국의 Caliper Technologies는 기존의 분석 장치에 많이 도입된 FIA(flow injection analysis) 기술을 시스템화하는데 필수적인 시료의 전처리와 관련된 유체제어 키트를 개발하였다. HP, STMicroelectronics, Infineon, Hitachi, Toshiba 등 기존의 거대 전자업체들이 기존의 반도체 사업을 바탕으로 바이오칩 검출, 분석 기술개발을 수행하고 있다.



참고자료: LG경제연구원 '국내 Bio-IT 산업의 현황과 과제' (2005.9) 원출처: 전자부품연구원

그림 1. 국내의 바이오멤스 연구 경향 분류표.

국내에서의 바이오멤스 연구 분야는 그림 1과 같이 기초연구, 응용연구, 분석연구, 제조공정으로 나누어 진행되고 있다. 최종 부품으로 휴대용 바이오칩, U-헬스용 바이오칩 등이 있으며, 고기능 생체분석기기를 목표로 하는 세부 연구 개발에는 마이크로/나노 반도체 사진공정 기술, 표면개질 기술, 패키징 기술, 마이크로 펌프 및 밸브등의 미세유체제어 디바이스 기술, 나노진

동자를 제조하는 식각 기술과 바이오펜을 패터닝하는 기술들이 포함된다. 그림 1에 있는 다양한 바이오멤스의 연구용 및 응용분야에서 핵심 기술로 고려되고 있는 마이크로 유체 분야는 화학 합성 및 바이오 분석, 광학, 정보 기술에 이르기까지 강력한 영향력을 가지고 있다. 마이크로 유체 기술은 아직 개발의 여지가 많이 남아있다. 최근 광학 시스템과 마이크로 유체 시스템의 융합을 이용한 광유체 기술(Optofluidic technology)의 개발은 마이크로 유체 기술이 타 기술과의 융합으로 바이오멤스의 응용 범위를 확대시킬 수 있음을 보여주고 있다. 광유체 기술은 환경 분석, 의료 진단, 화학 무기 검출을 마이크로 유체 시스템과 광학 요소를 결합하여 휴대성과 감도를 증가시킬 수 있는 방법이다.

국내 기술 현황을 살펴보면, 생명공학연구원 등은 DNA 칩을 제작하는데 기존의 기술을 사용함으로써 고가의 관련 장비구입, 막대한 시약 비용 및 인력 비용, 시간 손실을 감내하고 있는 실정이며, 본격적인 연구 개발을 위한 조직의 구성 및 지원 등의 기반은 아직 취약한 상태이다. LG 전자 기술연구원, 삼성종합기술원을 선두로 한 국내 대기업과 전자통신연구원, 생명공학연구원 등 국가출연연구원 및 바이오 중소벤처기업 등에서는 일부 바이오센서와 칩 설계 부분에서 소프트웨어를 자체 개발하고 있으나, 앞으로 주 기술로 예측되는 반도체 기반 바이오센서 구현 기술력은 바이오 기술에 반도체 기술, 전기화학 기술 등의 접목 협력 체제 부족 또는 후진성 등으로 인해 극히 미미한 실정에 있다.

제 2 절 개발 핵심 기술의 국내외 기술과의 차별성

식품위생 안전 확보 차원에서 식품 중에 존재하는 항생제를 정확히 확인하고 평가하기 위하여 재현성 있는 분석방법의 확립이 무엇보다 우선적으로 선행되어야 한다.

현재 tetracycline 계열의 항생제 확인 및 정량 분석에는 감수성 세균을 이용한 미생물학적 검사법, 박충크로마토그래피법, 방사능 동위원소를 이용한 charm II 시험법, 효소면역분석법 및 HPLC를 이용한 기기분석법 등이 보고되고 있다. 이러한 검사법들은 실험실 내에서 검출 가능한 방법으로 본 연구진들은 위에서 설명한 마이크로플루이드 기술과 바이오센서 기술, 효소면역분석법등을 복합적으로 적용하여 현장에서 측정 가능한 항생제 측정용 바이오 칩을 개발 완료하였다. 바이오칩의 타입은 (주)아이센스만의 독창적 기술인 Lab-on-a-film 칩과 전기영동을 이용한 마이크로플루이드 칩 그리고 면역크로마토그래피로 개발하였다.

1. Lab-on-a-film 칩

지금까지 국내 연구 기관이나 기업들이 시도한 마이크로플루이드 회로를 이용한 랩온어칩 연구는 주로 유리나 단결정 실리콘, 연질 실리콘 또는 경질 플라스틱 기판을 주로 사용하였으며 이러한 기술들은 이미 모두 특허로 출원/등록되어 있다. 상기 재료들은 전자 기술 산업을 기반으로 하는 여러 가지 기술로 모세관을 미세하게 형성하기는 좋으나 생물학적 활성 물질(Biological materials)을 재료로 이용하여야 하는 바이오센서 관점에서는 대량 생산에 많은 문제점을 가지고 있다. 대부분의 랩온어칩 응용이 일회용 센서라는 점에서 상기 재료들을 대량으로 값싸게 생산하기에는 어렵다. 물론 이들 중 상업화에 성공한 대표적 기술이 있는데 진단 의료 기기 제조업체인 바이오사이트(Biosite)사의 Triage meter로 플라스틱 기판에 미세 채널을 구성하고 모세관 현상을 이용하여 측정 챔버에 시료를 이송한 후 형광 표식인자로 시료 내 분석물

질의 농도를 측정하는 시스템이다. 본 과제가 추구하는 전기화학적 효소면역 분석법을 이용하여 일회용 칩을 개발 완료한 업체는 i-STAT사가 있는데 본 사가 이용한 모세관 현상으로 시료를 이송하는 방식대신 펌프와 밸브 시스템을 사용하여 비싸고 복잡하게 제작되었다. 따라서 본 사가 개발 완료한 Lab-on-a-film 칩은 스크린 프린팅 기술과 박막 필름 광식각 기술만을 이용하여 미세 유로를 형성시킨 독자적인 기술로 아무리 복잡한 구조의 채널도 간단하게 제작할 수 있으며, 측정 원리 또한 우리만의 기술로 한 번의 시료주입으로 면역반응, 세척, 측정까지 이루어지는 신기술이라 할 수 있겠다. 이와 관련된 특허는 국내에 등록, 전세계, 미국, 일본, 중국, 유럽에 출원항 상태이다.

2. 전기영동을 이용한 마이크로플루이딕 칩

현재 농축산물 항생제 분석 표준방법은 고가의 장비를 사용하여, 관련 분야의 전문가가 반드시 필요하고 시료채취 후 전처리와 분석에 많은 시간과 비용이 소요되고 있다. 따라서 신속 정확하게 항생제들은 분석하는 새로운 분석틀이 필요하며, 이와 관련하여 마이크로플루이딕칩을 이용한 분석법이 유망할 것으로 판단된다. 마이크로플루이딕칩은 시료량을 최소화하면서 하나의 칩 위에서 분리와 분석이 이루어지는 센싱플랫폼으로 현재 개발되고 있다. 기존에 연구되고 있는 마이크로플루이딕칩 연구경향은 칩의 특정기능의 향상과 새로운 메커니즘의 구현과 같은 실험실 수준의 연구에 중점을 두고 있어, 실제 시료분석에 대한 전처리, 농축, 분리 및 검출을 동시에 수행하는 칩 시스템 개발과 실용적인 측면에서 응용분야에 적합한 시제품 개발에 대한 연구 결과가 부족하다. 본 연구에서는 축산시료에 들어 있는 다양한 종류의 항생제들은 간편하게 고감도로 분석할 수 있는 간이전처리기 및 전처리방법, 칩제조 기술, 극미량 시료성분의 농축 및 분리기술과 고감도 바이오센서와 면역센서를 동시에 개발하고, 이들을 일체화하여 항생제의 분리 및 분석에 대한 시간 및 비용을 절감하였다. 그리고 축산시료의 항생제 분석에 대한 분석법을 최적화하여 실제시료 분석에 대한 기본적인 자료를 구축하여 실용화의 기반을 확보하였다.

3. 면역크로마토그래피

SDM 등의 항생제 혹은 유해물질을 분석하는데 항생제를 선택적으로 인식하는 항체를 용액이 전개되는 스트립상에서 고정화 하여 분석물질이 형광부착된 항체와 결합된 것을 직접(직접 면역크로마토그래피법) 혹은 분석용액상에 있는 분석물질과 경쟁적으로 반응하여 농도측정을 할 수 있는 항생제-항체 등의 결합체를 제조하여 분석하는 법(경쟁적 면역크로마토그래피법) 등이 사용되어 왔다. 이러한 방법 중에 항생제-항체 결합체를 대신하는 기술로 항생제-BSA 결합체와 BSA항체 결합체 등의 단백질 결합을 이용하여 개발되었는데 이러한 단백질-단백질 결합법은 민감도가 단백질의 활성에 따라 변화가 심하여 최근에 다양한 결합방법이 개발되어 적용되고 있다. 현재 가장 널리 주목받는 방법이 유전자-유전자 결합을 이용하는 방식이며 이 방식으로 높은 민감도를 확보하려면 horizontal spacing을 유지하는 유전자 칩 기술이 필수적으로 요구되고 있다. 본 면역크로마토그래피법에는 horizontal spacing 기술이 적용되어 다양한 농도대의 분석이 가능한 면역크로마토그래피 신기술이 적용되었다. 현재까지 사용된 SDM-BSA 결합체와 BSA항체의 결합 등의 단백질을 이용한 방식이 대부분 민감도 확보에 실패하였으나 최적의 결합이 가능한 SDM-DNA 결합체를 이용하여 원하는 형광감도를 충족하는 스트립 형태의 시제품 개발에 성공하였다. 본 기술은 다양한 항생제 등의 유해물질 분석을 간편하게 제작하는

기본기술로 적용될 수 있을 것이다.

4. 압타머

압타머(aptamer)는 표적분자에 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 갖는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)로 1990년 Larry Gold 연구팀에 의해 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 압타머 개발 기술이 소개된 이후, 많은 압타머들이 개발되었다.[4] 특히 단백질과 같은 고분자에 그 초점이 맞춰져 있었지만 최근 저분자를 표적분자로 하여 새로운 SELEX 기술이 개발되기 시작하면서 다양한 표적분자에 대한 연구가 이루어지고 있다. 기존에 바이오센서 및 신약 등에 이용하는 바이오물질로는 항체가 대부분이었지만 압타머는 화학적 대량 합성이 가능하고, 인체에 대한 면역반응이 없으며, 화학적 변형이 가능하여 항체의 단점을 극복하는 새로운 바이오물질로 대두되고 있다. 특히 농,축산품에 있는 항생제 검출에 대한 기존 검사는 시료를 전처리하여 HPLC로 분리하고 mass로 분석하기 때문에 많은 시간이 걸렸는데 압타머를 이용한 바이오센서가 개발된다면 손쉽게 항생제의 유무 및 기준치 이상의 항생제 검출에 용이하게 사용될 것이다. 이에 본 과제기간 중 항생제에 대한 압타머를 개발하였으며 이를 이용해 실질적으로 항생제의 검출이 가능한지 측정하였다. 본 연구진이 사용한 금나노입자를 이용한 검출 방법은 빠르고, 육안으로도 관찰이 가능하다는 장점이 있기 때문에 현장에서 직접 측정하는 바이오센서로의 기능을 할 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용 및 결과

1. 세부연구 (주)아이센스

가. Lab-on-a-film 칩에 적용되는 바이오센서용 전극의 개발

(1) 스크린 프린팅 기술을 이용한 전극의 제작

본 사업에 제작된 바이오센서용 전극은 스크린 프린팅 기술을 이용하여 PET(poly-ethylene terephthalate) 기판위에 탄소반죽으로 제작하였다. 스크린 프린팅 기술에 사용되는 기판은 세라믹, 유리판, PVC(Polyvinyl chloride), PC(Polycarbonate), PET가 주로 사용된다. 하지만 PVC나 PC는 경화시 문제점 때문에 고온에서도 안정한 PET를 사용하였다. 또한 스크린 프린팅에 사용되는 물질은 은 에폭시, 팔라듐, 구리, 금, 백금, 이리듐, 은/염화은, 탄소 및 기타 첨가제가 보강된 변형된 탄소가 주로 이용되는데 본 연구에서는 작동전극으로는 탄소 반죽을, 기준전극으로는 은/염화은 반죽을 사용해 제작하기로 결정하였다. 전극은 항체를 고정화시킴과 동시에 전기화학 신호를 읽어 분석하고자 하는 물질의 농도를 알려주는 중요한 부분이다. 전극을 형성시키는 제재(금속 반죽, 금속 파티클 등)부터 전극의 크기, 배치 등이 센서의 성능을 결정하기 때문에 여러 방법과 조건으로 테스트를 진행하였다. 금과 탄소 금속을 진공 상태에서 증착시켜 제작한 스파터링 전극이나 시중에 판매되고 있는 탄소나노튜브 스크린 프린팅 전극(Carbon nanotube modified screen printed carbon electrode), 금나노파티클 스크린 프린팅 전극(Gold nanoparticle modified screen printed carbon electrode)등을 사용해 보았지만 대량 생산과 성능 비교를 통해 그림 2와 같은 하판 전극부를 제작 완료하였다. 그림 2에서 보는 것처럼 1sheet에 36개의 칩을 제작할 수 있다.

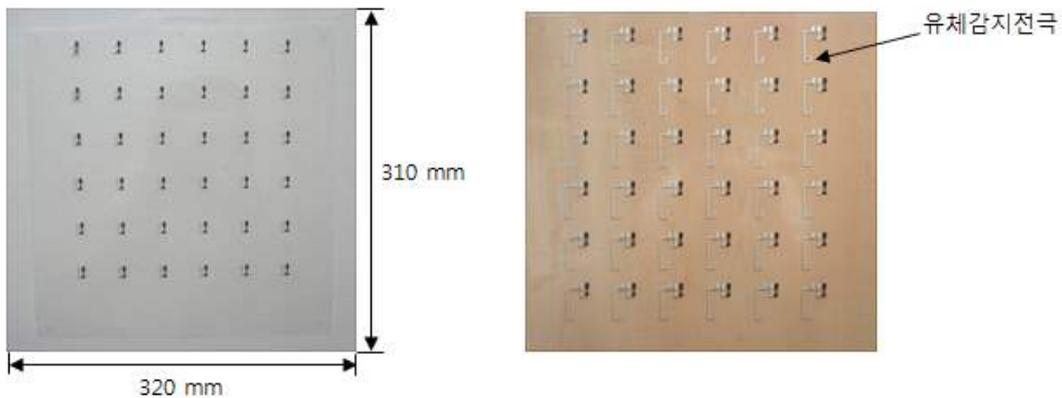


그림 2. Lab-on-a-film 칩 하판 전극부.

(2) 전기화학 검출법을 이용한 효소면역분석법의 구현

(가) 분광학적 검출법을 이용한 경쟁적 효소면역분석법

항생제 검출에 이용되는 효소면역분석법은 분자량이 큰 진단단백질과 다르게 경쟁적 효소면역분석법의 원리에 의해 작동된다. 경쟁적 효소면역분석법은 전극에 고정화되어 있는 항체에 대해 항생제와 항생제-효소 접합체(효소 conjugate)가 경쟁하게 되는데 항생제의 농도가 높을

수록 전극 위의 항체에 결합하는 항생제-효소 접합체의 양이 줄어들어 신호는 작게 나오며 반대로 항생제의 농도가 낮으면 전극 위의 항체에 결합하는 항생제-효소 접합체의 양은 증가하여 신호는 크게 나오는 것이다. 그림 3에 항생제 검출에 이용되는 경쟁적 효소면역분석법의 원리를 도식화 하였다.

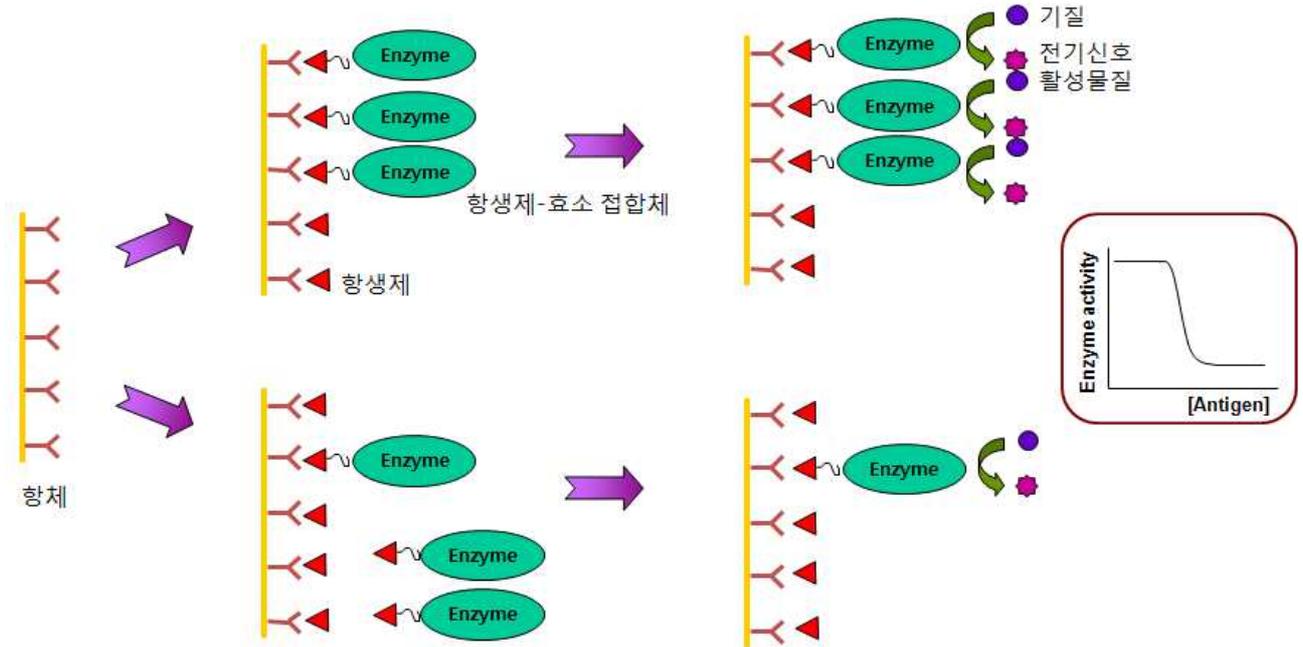


그림 3. 항생제 검출에 이용되는 경쟁적 효소면역분석법의 원리.

위의 그림 3에서 보는 것처럼 항생제 검출에는 전극에 고정시키는 항체, 항생제-효소 접합체, 효소와 반응하는 기질로 이루어져 있다. 이러한 시약들이 칩 성능에 매우 중요한 역할을 하기 때문에 시중에 판매되고 있는 다양한 종류의 항체와 항생제-효소 접합체를 구입하여 스크리닝 해보았으며 그 중 항생제에 대한 결합력이 높으며 일정한 성능을 유지하는 pair를 결정하였다. 시중에 판매되고 있는 항생제-효소 접합체의 경우 효소를 HRP(Horse Radish Peroxidase)를 사용하는데 다양한 효소(ALP(Alkaline phosphatase), GOD(Glucose oxidase) 등)를 사용해보고자 직접 효소 접합체를 제조해서 사용하기도 하였다. HRP를 이용한 ELISA 결과는 그림 4와 같다.

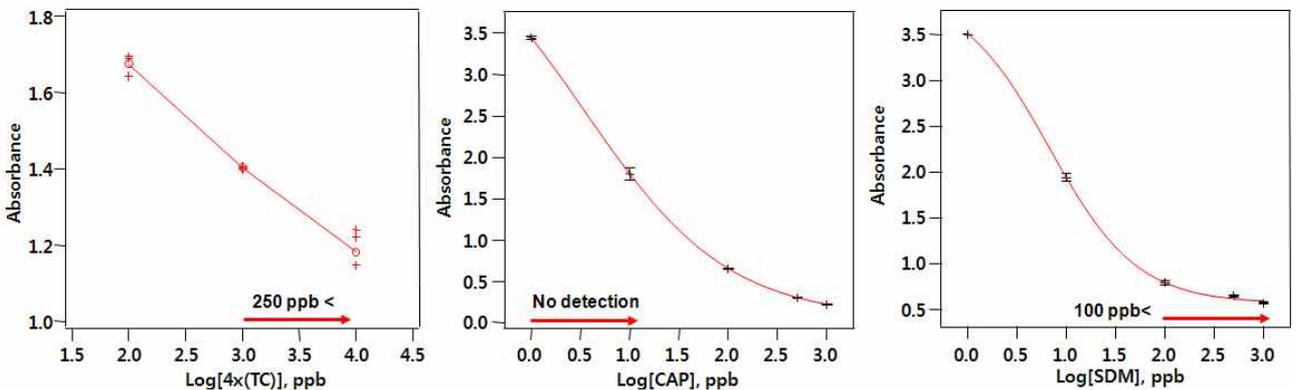


그림 4. 분광학적 경쟁적 효소면역분석법(그림 3)을 이용한 Tetracycline(TC), Chloramphenicol(CAP), Sulfadimethoxine(SDM)의 정량곡선.

항생제 검출에는 그림 5와 같이 항생제를 직접 표면에 고정화시킨 후 표면에 고정화된 항생제와 시료 내에 존재하는 항생제를 경쟁시켜 검출할 수도 있다. 이런 방법을 사용하면 원하는 효소를 항체에 접합시킬 수 있다는 장점이 있다. 시중에 판매되고 있는 항생제-효소접합체는 HRP를 사용하고 있는데 기질로 사용되고 있는 과산화수소와 TMB가 불안정하기 때문에 제품 수명에 문제를 일으킬 수 있다. 그렇기 때문에 본 연구진은 아래와 같은 방법으로도 검출할 수 있도록 항체-효소접합체를 직접 제조하였다. 효소는 ALP를 사용하였으며 기질은 분광학적 검출에는 pNPP(p-Nitrophosphate)를, 전기화학 검출에는 pAPP(p-aminpphosphate)를 사용하였다. ALP는 여러 제조사의 제품을 구입하여 activity를 측정하였으며 스크리닝 결과 B사의 제품을 사용하기로 결정하였다.

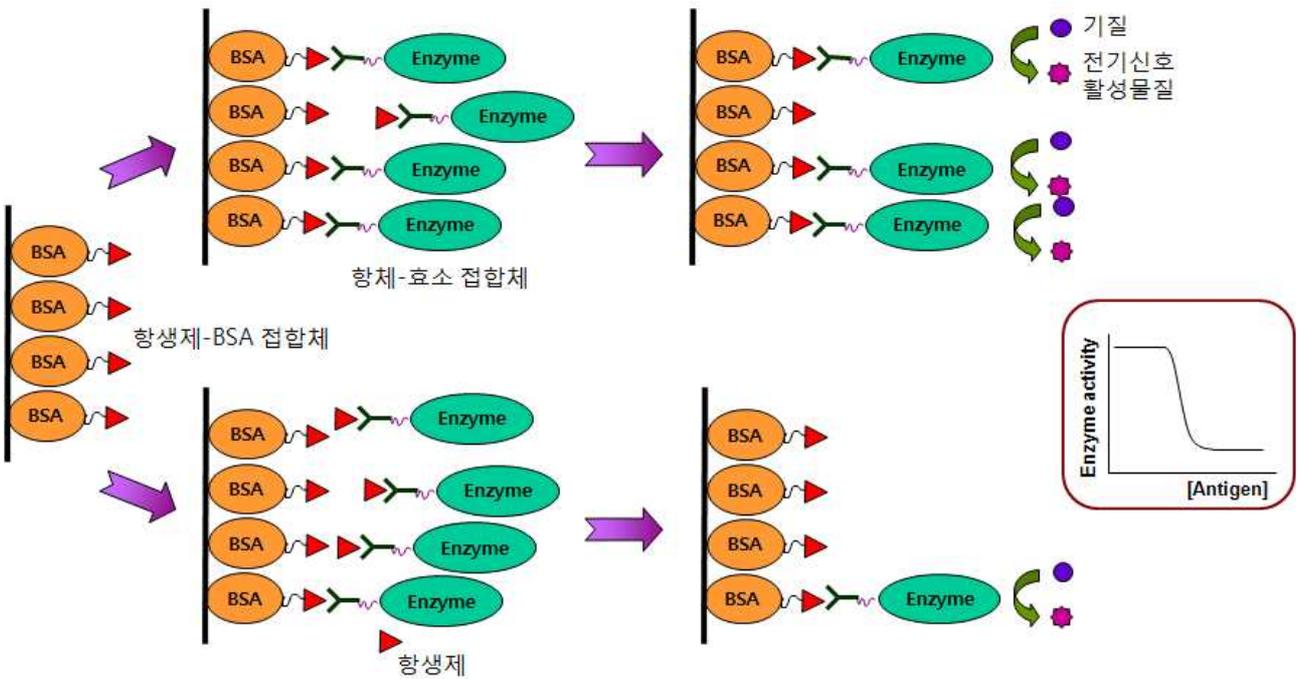


그림 5. 항생제 검출에 이용되는 경쟁적 효소면역분석법의 원리.

위에서 설명한 면역반응과 ALP를 사용하여 그림 6과 같은 ELISA 데이터를 얻을 수 있었다.

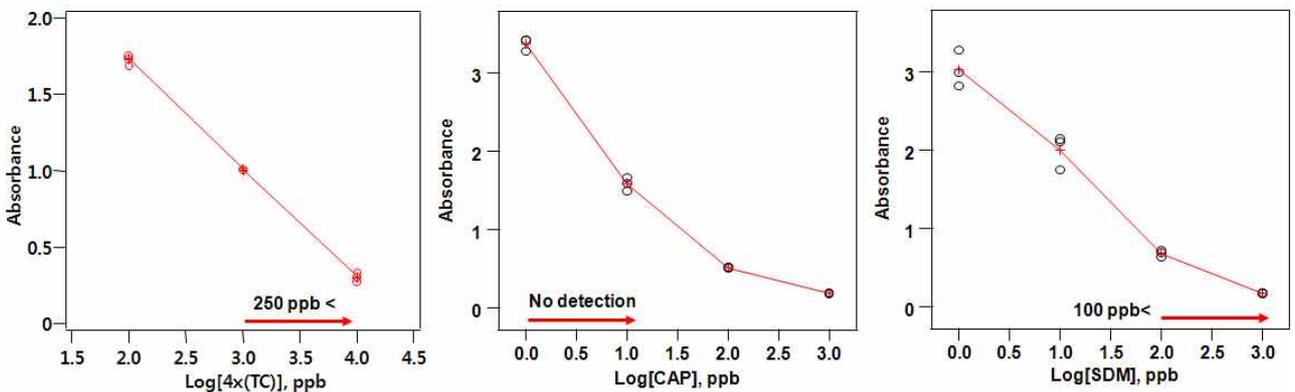


그림 6. 분광학적 경쟁적 효소면역분석법(그림 5)을 이용한 Tetracycline(TC), Chloramphenicol(CAP), Sulfadimethoxine(SDM)의 정량곡선.

최근 여러 시약회사를 통해 시판되고 있는 항체-효소접합체 제조를 위한 시약을 구입하여 그 효율성과 경제성 면에서 가장 적합한 방법을 선택하고자 하였다. 첫째, glutaraldehyde를 이용한 항체-효소접합체 제조 방법이 glutaraldehyde는 항체의 carbohydrate기에 효소를 접합시키기 위해 사용되어지며 저렴한 시약값과 시약 반응 단계가 간편하여 항체를 대량으로 생산할 수 있지만 접합체 생성 효율성이 낮다. 둘째, 2-mercaptoethylamine·HCl (2-MEA)을 이용한 항체-효소접합체 제조 방법이다. 이것은 항체의 disulfide bonds(S-S)를 끊어 SH기를 만들어 효소를 접합시키는 방법이다. ELISA 실험 결과 다음에 소개되는 SATA를 이용하여 만든 효소접합체와 비교하여 그 specificity가 떨어짐을 알게 되었다. 셋째는 N-succinimidyl S-acetylthioacetate(SATA)를 이용한 효소접합체 제조 방법이다. SATA는 항체의 NH₂(primary amines)기에 효소를 접합시키기 위해 사용되어진다. SATA는 수분에 민감하여 공기 접촉시 그 활성이 떨어지고 가격면에서 glutaraldehyde에 비해 비싸지만 생성 효율성이 높아 최종적으로 효소접합체 제조 방법으로 결정하였으며 제조 과정은 그림 7에 나타내었다.

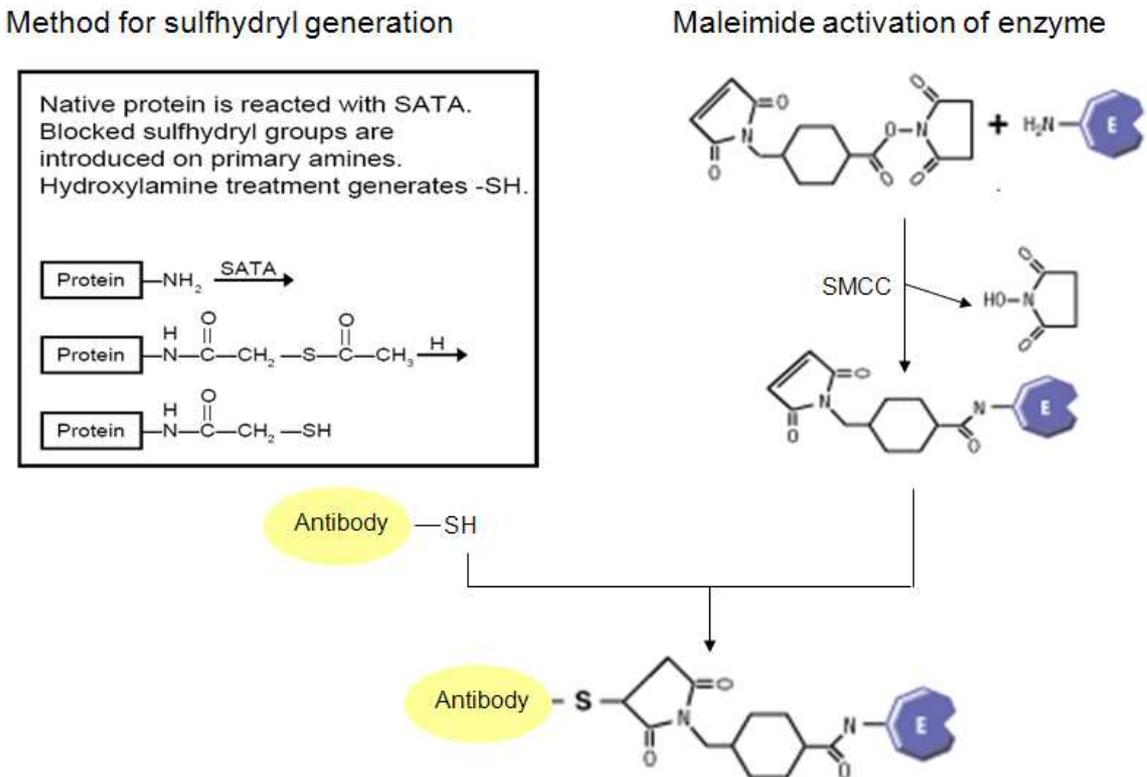


그림 7. SATA를 사용한 항체-효소접합체 제조 과정.

이런 방법으로 만들어진 항체-효소접합체는 효소 자체의 활성도를 파악한 후 SDS-PAGE를 통해 접합체 비율을 확인하고 마지막으로 ELISA 방법으로 최종적인 사용 유무를 판단하게 된다. 이러한 점검 방법으로 통과된 항체-효소접합체는 칩에 적용시켜 사용하게 된다.

(나) 전기화학 검출법을 이용한 경쟁적 효소면역분석법-전극테스트

위에서 준비된 전극과 시약들을 이용하여 Lab-on-a-film 칩에 적용하기에 앞서 전극에서 항생제 검출이 가능한지 테스트해보았다. 작동전극위에 tetracycline(TC) 항체를 일정량 올려

건조시키고 반응용기에 농도별로 희석한 TC와 TC-HRP 접합체를 채운 후 항체가 건조된 전극을 담귀 10분간 면역반응을 준 후 일정 시간 세척해 주고 기질인 H₂O₂와 TMB를 첨가하여 전위를 가한 후 측정해 보았다 (그림 8). TC 농도별 정량 데이터를 얻기 위해 항체의 농도, TC-HRP 접합체의 농도, 기질의 농도를 최적화하는 과정을 진행하였으며 분광학적 검출법을 이용한 TC 정량 곡선과 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 전극 개발이 완료된 후 Lab-on-a-film 칩에 전극을 적용하였다

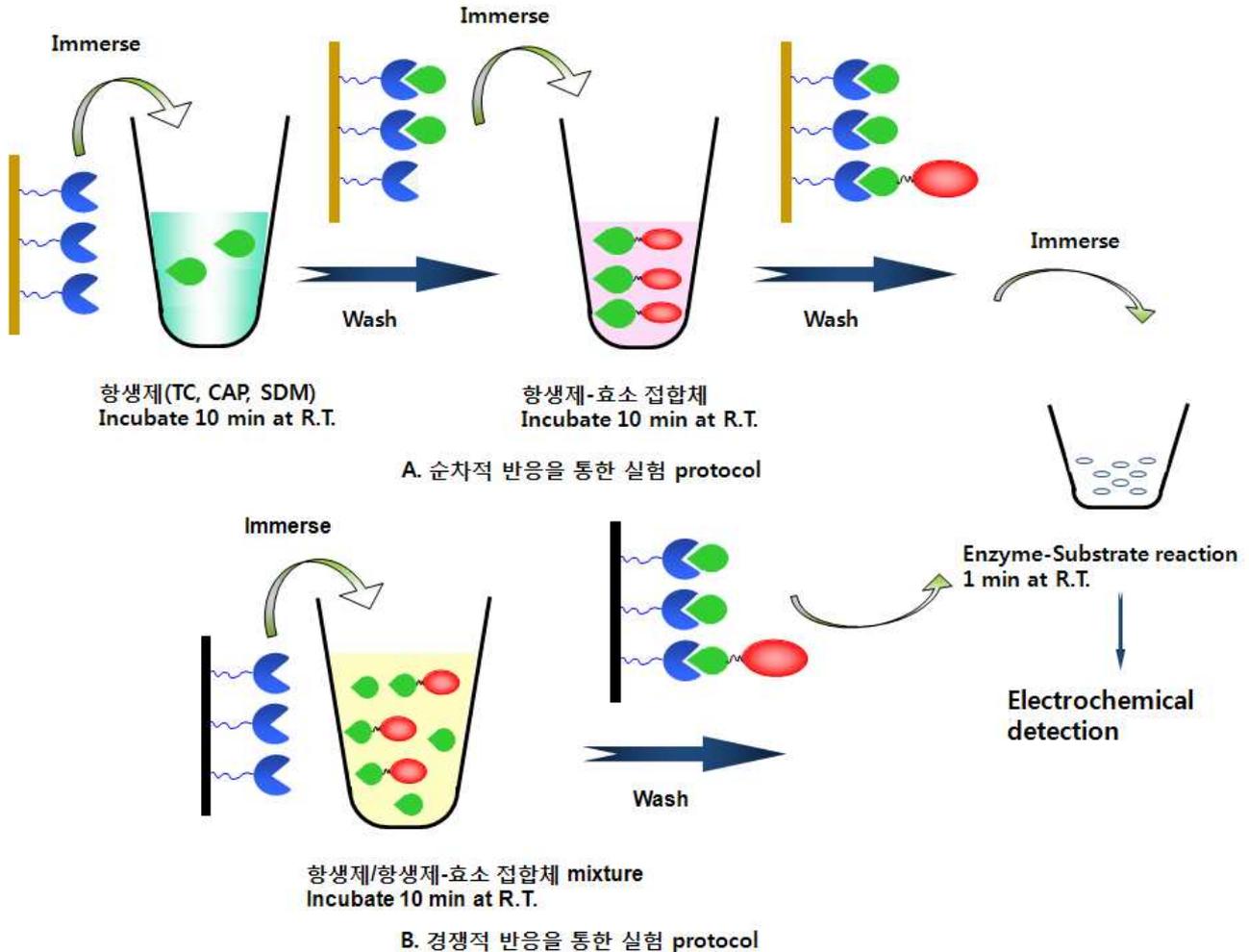


그림 8. 전극에서의 면역반응 실험과정.

나. 항생제 측정용 Lab-on-a-film 칩 개발

(1) Lab-on-a-film 칩 개발 및 pilot plant 시스템 확립

Lab-on-a-film 칩 제작은 다음과 같다. 하판 위에 전극(작동전극, 기준전극 및 전극연결부)이 형성되며, 시료가 시료주입구로부터 전극을 지나 흡수부에 이르도록 구성된 미세유로를 포함하는 중판이 하판 위에 적층된 구조로 이루어지며, 마지막으로 상판(또는 커버)이 그 위에 적층된 구조로 Lab-on-a-film 칩 제작이 완성된다. 하판은 전극이 형성된 기판으로 그림 2를 통해 설명하였다. 미세유로를 포함하는 중판은 하판 재료에 프레스를 이용한 성형을 통해 형성할 수 있으며, 유기 고분자 재료로 만들어진 양면테이프에 프레스 금형을 이용하여 형성할 수도 있고, 본 연구진이 선택한 감광제(dry photoresist) 필름을 사용하고 광식각법을 이용하여 도

노광 작업과 에칭 작업을 거쳐 하판과 중판이 조립된 Lab-on-a-film 칩이 완성되면 시약을 분주하게 된다. 전극부에는 항체를, 효소접합체저장소에 효소접합체를, 기질저장소에 기질을 도포하여 건조시킨 후 사용한다. 아래 그림 11은 2차년도 연구기자재로 구입한 디스펜서로 각각의 시약을 원하는 곳에 분주할 수 있도록 제작되었다.



그림 11. Lab-on-a-film 칩 시약 분주 장비; 디스펜서.

시약 분주 과정이 끝나고 나면 마지막 단계인 상판 커버데이프를 부착시키게 된다. 상판은 모세관 현상을 유도할 수 있는 유로를 형성할 수 있게 하는 커버이며 유로 형성하는 방법에 따라 상부기판의 종류는 달라질 수 있다. 감광제 필름을 사용하여 중판을 제작할 경우 상판은 중판과 적층될 면이 점착제로 처리된 유기 고분자 재료를 사용할 수 있다. 모세관 현상을 유도할 수 있게 유체가 주입되는 시료주입구와 흡수부의 유로가 끝나는 부분은 통기부를 만들어 주어야 함으로 상판은 통기부를 제외하고 적층된다. 이러한 기술은 복잡한 패턴도 얇은 필름 위에 정밀하게 형성시킬 수 있으며 매우 빠른 속도로 칩을 생산할 수 있다. 그림 12에서 나타난 조립기로 상판을 자동 조립을 한 후 커팅기를 이용하여 타발하였다. 타발에 사용되는 레이저 커팅기는 1차년도 연구기자재 구입비로 구입하였다.



그림 12. Lab-on-a-film 칩 조립 및 커팅 장비.

하판, 중판, 상판으로 이루어진 Lab-on-a-film 칩은 그림 13과 같고 실제 완성된 항생제 측정용 Lab-on-a-film 칩이 그림 14와 같다. 이렇게 제작된 칩은 시료주입구를 통해 모세관 현상만으로 시료가 이동되며 도포되어 있는 효소접합체를 용해시켜 면역반응을 일으키고 작동전극에 고정되어 있는 항체와도 반응하여 분석물질의 농도에 따라 전극표면의 효소접합체 농도가 달

라지게 된다. 그 후 용해된 기질이 전극부로 주입되는데 이때 전압을 걸어주고 전류 값을 측정하게 된다. 결국 분석물질의 농도별로 다른 전류값을 얻을 수 있으며 이 전류값을 농도로 전환하면 한 번의 시료 주입으로 측정하고자 하는 시료의 농도를 알 수 있게 된다.

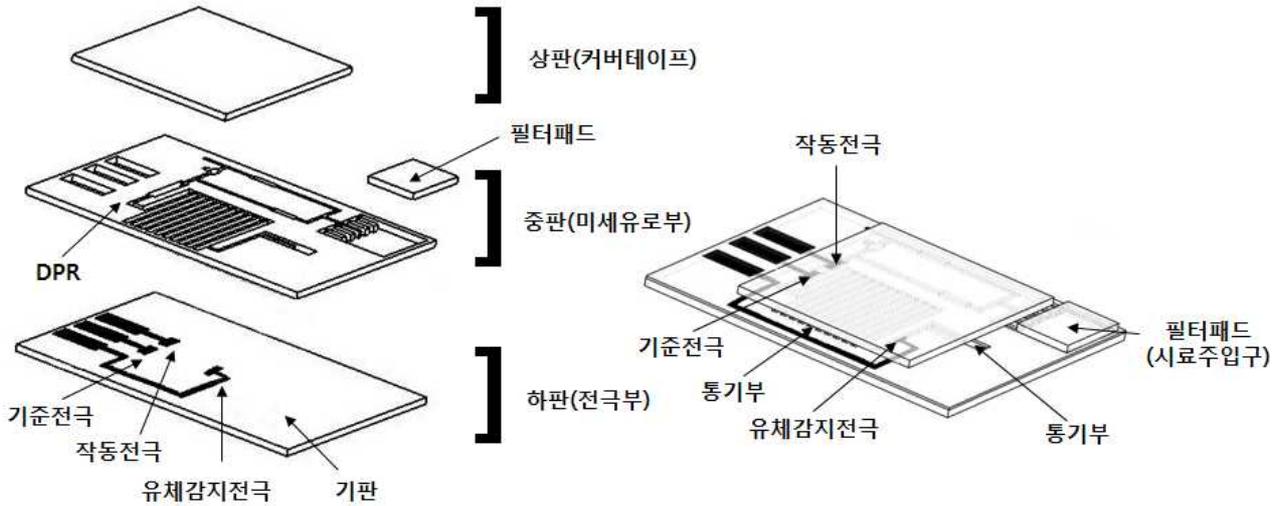


그림 13. Lab-on-a-film 칩 분해사시도 및 조립도.

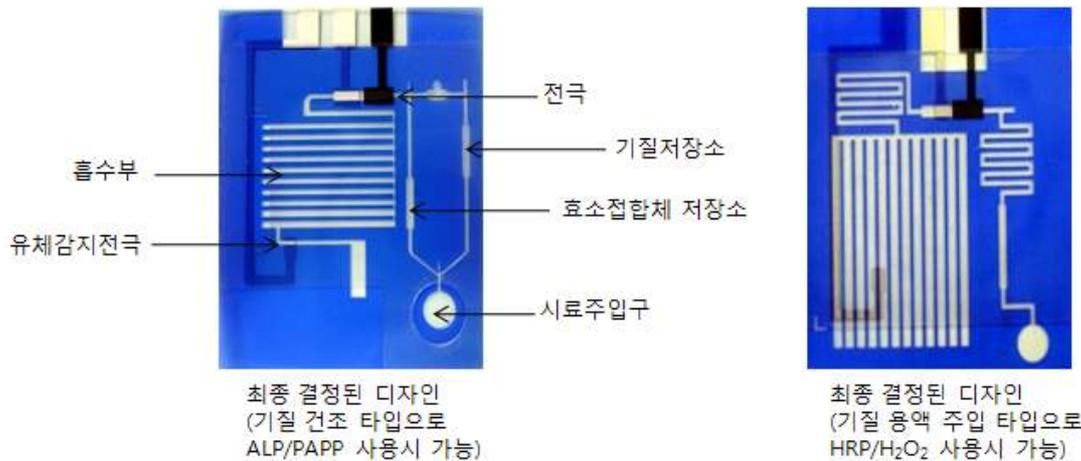


그림 14. 항생제 측정용 Lab-on-a-film 칩.

(2) 항생제 측정용 Lab-on-a-film 칩 테스트

(가) 항생제 측정용 Lab-on-a-film 칩 최적화

실제 제작된 칩을 이용하여 tetracycline(TC), chloramphenicol(CAP), sulfadimethoxine(SDM) 정량 검출이 가능한지 성능테스트를 진행해 보았다. 시료가 미세관 현상만을 통해 시료주입구에서 흡수부까지 이동되어야 하며 미세유로내에 있는 효소접합체 저장소의 효소접합체를 용해시키며 작동전극의 고정되어 있는 항체와 면역반응을 통해 분석물질의 농도별로 작동전극의 효소활성도를 다르게 만들어줘야 한다. 흡수부로의 시료 이동은 계속 진행되고 이렇게 들어오는 시료는 면역반응에 관여하지 못한 효소접합체를 흡수부로 이동시키면서 세척 효과를 증대시키게 된다. 미세유로 길이 및 폭은 각각의 역할을 수행하기 위해 중요한 요소로 작용하기 때문에 반복적인 테스트를 통해 항생제 측정용 Lab-on-a-film 칩을 완성하게 되었다. 우선은 각

각의 제제 농도를 결정하는 것이 중요하다. 전극에 고정화 된 항체의 농도에 따라 반응신호가 어떻게 달라지는지를 파악하여 전극에 최적농도의 항체를 분주하게 된다. 항체의 농도가 검출 한계를 결정하기 때문에 이 과정은 중요한 과정이다. 항체의 농도가 결정되면 효소접합체의 농도에 따른 반응신호를 측정하게 된다. 효소접합체의 농도는 신호의 크기 및 바탕신호를 결정하게 된다. 불필요하게 많은 양을 사용하게 되면 바탕신호 및 비특이적 흡착반응이 증가하게 되고 적은 양을 사용하게 되면 고농도 신호가 작아지기 때문에 최적의 농도를 결정할 수 있도록 디자인해야한다. HRP 접합체 및 ALP 접합체 농도는 항생제 별로 최적화된 농도를 선택하였으며 HRP는 기질로 H₂O₂와 mediator인 TMB(Tetramehtylbenzidine)를 사용하였고 ALP는 PAPP(p-aminophenyl phosphate)를 사용하였다. 항생제 별 Lab-on-a-film 칩은 각각의 항체와 효소 접합체를 분주하여 건조하여 제작하였고 항생제를 농도별로 칩에 주입하여 성능 평가를 진행하였다. 시료를 Lab-on-a-film 칩 시료주입구에 주입하면 모세관 현상을 통해 유로를 따라 이동하게 된다. 이렇게 이동한 시료는 효소접합체 저장소에 건조된 효소접합체를 용해시키면서 전극까지 이동하게 되고 전극에 고정화되어 있는 항체와 반응한다. 흡수부에 의해 지속적인 flow가 유지되면서 면역반응에 참여하지 않은 효소접합체는 흡수부로 흘러들어가 전극표면의 세척을 유도하게 된다. 효소접합체 유로로 시료가 주입됨과 동시에 T자형으로 갈라진 기질 저장소 유로도 시료가 주입된다. 이때 약간의 유속차가 생겨 효소접합체 유로의 유체가 교차 채널 지점에 도달하여 중간지점에 공기가 차게 된다. 이로 인해 기질 유로는 유체 흐름을 막게 되어 용해된 기질은 정지하게 되고 용해된 효소접합체는 항체가 고정되어 있는 전극으로 계속 흘러들어가게 되는 것이다. 시료가 흡수부의 유체감지전극에 도달했을 때 공기배출구에 물리적으로 구멍을 만들어 수화된 기질이 전극으로 유입될 수 있도록 한다. 그 후 각 전극을 EZ 정전압 프로그램(potentiostat program)으로 전압을 걸어주어 60초 동안 전류값을 측정하였다. 아래 그림 15는 위에서 설명한 Lab-on-a-film 칩의 작동 원리를 나타내었다.

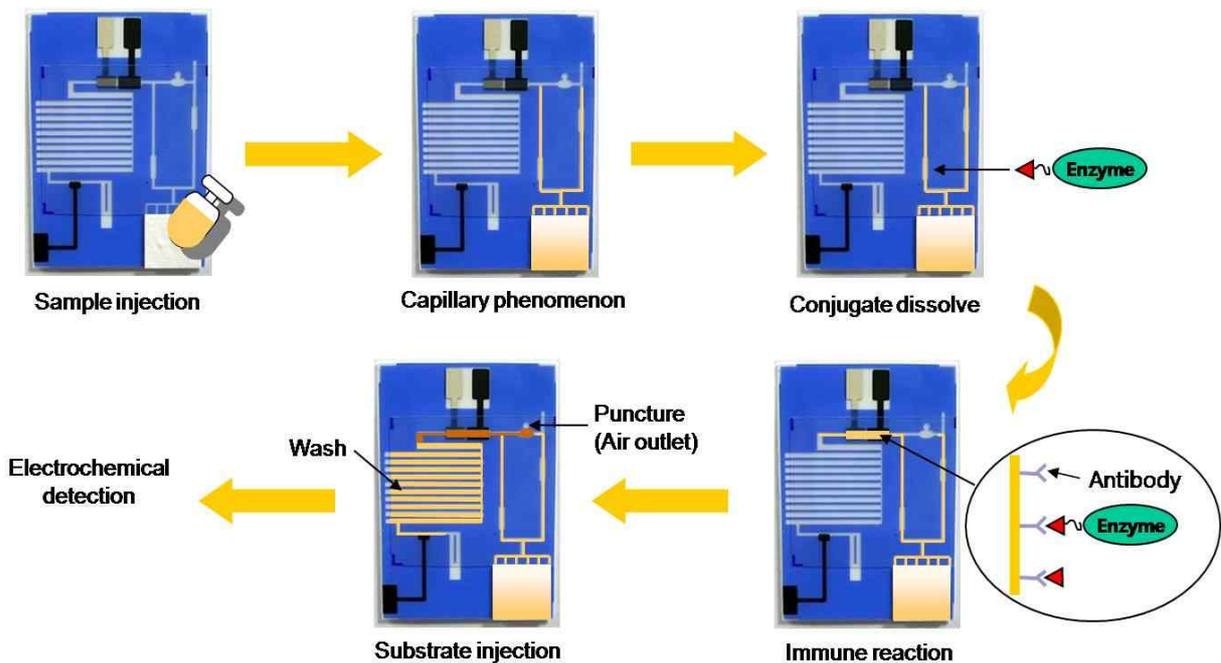


그림 15. Lab-on-a-film 칩 작동 원리.

최적화된 항생제 칩을 이용하여 항생제 농도별 테스트를 진행하였다. 농림부에 고시되어 있는 농·축산품에 잔류하는 항생제 기준치는 표 2와 같다. 65 % 이상으로 가장 많이 사용되는 항생제는 테트라사이클린으로써 소고기, 돼지고기, 닭고기에서 250 ppb 기준치를 가지며 클로람페니콜은 불검출이라는 기준치를 가져 인체에 들어오면 큰 영향을 미침을 알 수 있다. 또한 눈에 악 영향을 미치는 설파디메톡신은 100 ppb 기준치를 갖고, 암피실린은 10 ppb 기준치를 갖는다.

표 2. 농·축산품의 잔류허용기준(농림부 고시)

테트라사이클린(Tetracycline)		
소고기 0.25 mg/kg(250 ppb)	돼지고기 0.25 mg/kg	양고기 0.25 mg/kg
닭고기 0.25 mg/kg	칠면조고기 0.25 mg/kg	
설파디메톡신(Sulfadimethoxine)		
소고기 0.1 mg/kg(100 ppb)	돼지고기 0.1 mg/kg	닭고기 0.1 mg/kg
칠면조 고기 0.1 mg/kg	오리고기 0.1 mg/kg	우유 0.01 mg/kg
클로람페니콜(Chloramphenicol)		
소고기 불검출	돼지고기 불검출	닭고기 불검출
어류 불검출	갑각류 불검출	
암피실린(Ampicillin)		
소고기 0.01 mg/kg(10 ppb)	돼지고기 0.01 mg/kg	

이러한 잔류허용 기준치를 정보로 하여 Lab-on-a-film 칩에서 측정 가능하도록 칩을 최적화 하였으며 이렇게 최적화 된 칩에서 항생제 농도별로 측정한 결과 그림 16과 같은 직선성 있는 정량곡선을 얻을 수 있었다.

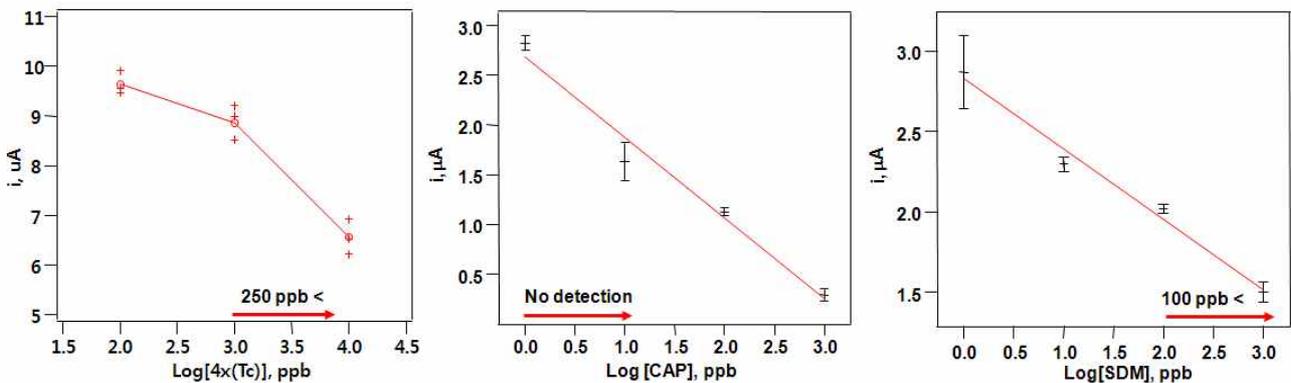


그림 16. Lab-on-a-film 칩에서의 TC, CAP, SDM 정량 곡선.

(나) 실제 시료를 적용한 Lab-on-a-film 칩의 성능 평가

버퍼를 표준용액으로 하여 제조된 항생제가 우리가 제작한 Lab-on-a-film 칩에서 측정이 가능함을 확인하였다. 이러한 조건을 바탕으로 실제 시료를 적용하여 테스트를 진행해 보았다. 실제 시료는 한경대학교가 제공하였으며 한경대학교가 개발한 시료 전처리 방법을 통해 제조된 시료이다. 실제 시료를 적용하게 되면 칩의 성능이 버퍼와 달라지므로 다시 최적화를 진행

하였으며 여러 조건의 변경을 통해 최적화 된 칩으로 그림 17과 같은 데이터를 얻을 수 있었다.

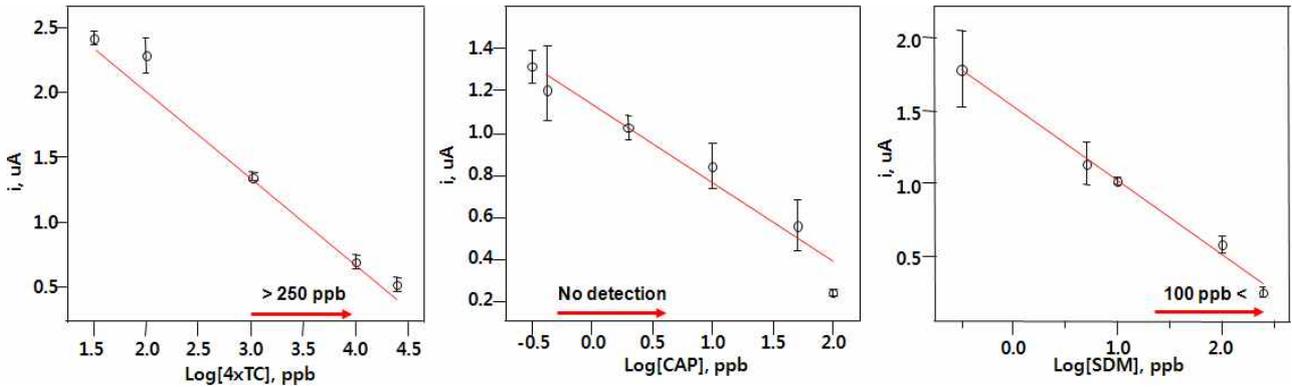


그림 17. 실제 시료 전처리를 통해 얻은 Lab-on-a-film 칩에서의 TC, CAP, SDM 정량 곡선.

본 사업의 최종 목표는 농·축산품에 잔류된 항생제를 현장에서 간편하고 신속하게 검사하는 것이므로 고기에서 항생제를 추출할 수 있는 간이 시료전처리 키트와 현장측정용 센서가 필요하다. 기존에 사용된 추출방법은 단계가 복잡하여 시간이 오래 걸리고, 큰 기기 때문에 현장에서는 사용할 수 없다는 단점을 갖고 있다. 이러한 단점을 극복하고자 휴대용이 간편한 간이 시료 전처리 키트를 협동연구기관인 환경대학교에서 개발하였다. 시중에 판매하는 소고기, 돼지고기, 닭고기를 구입하여 세절하지 않은 고기 2 g을 추출 용매와 섞어주고, 그 추출액을 syringe filter로 걸러 용매 층을 센서에 도입하여 분석하였다. 그러나 실제 시료인 고기에서 항생제를 추출하기 위해서는 추출용매인 Acetonitrile과 methanol이 사용되는데 이를 바이오센서에 도입하기 위한 용매의 영향을 최소화시켜야 하는 문제점이 발생하기도 하였다. 이러한 문제점을 해결하고자 추출의 수율은 크면서도 센서에 적당하게 도입하기 위한 최적화 과정을 환경대학교와 협력하여 테스트를 진행하였다. 그 결과, 용매(Acetonitrile, methanol)와 pH 7.4 phosphate buffer를 10 : 90 의 비율로 최적화 하였다. 이렇게 Lab-on-a-film 칩 최적화 뿐만 아니라 유기 용매가 다량 필요한 시료 전처리 키트 역시 칩에 적용하기 위해 최적화 과정이 필요하였으며, 최종적으로 시료 전처리 키트를 통해 추출된 시료로부터 그림 18과 같은 정량 곡선을 얻을 수 있었다.

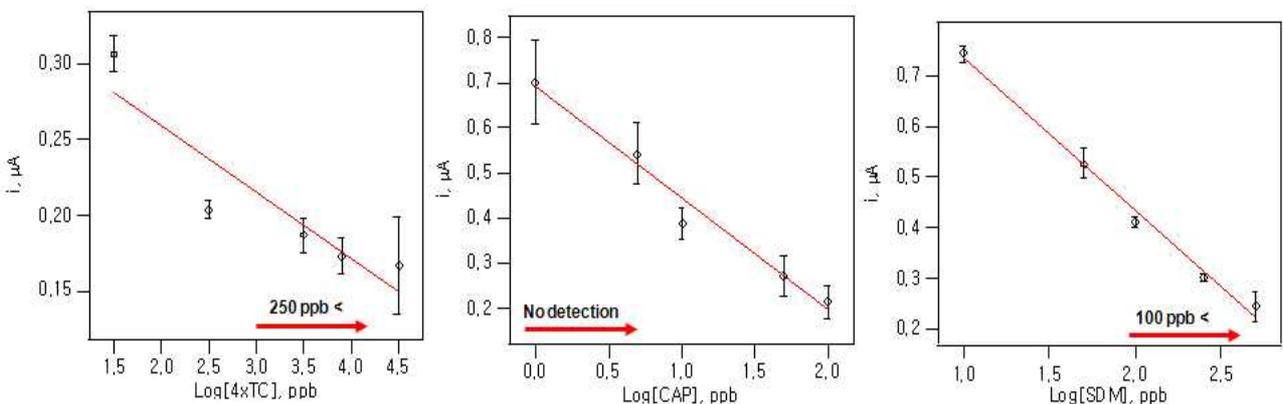


그림 18. 최적화된 간이 시료 전처리 키트로부터 얻은 TC, CAP, SDM의 정량곡선.

일정농도의 향생제를 고기에 투여하여 얼마만큼의 회수율을 얻을 수 있는지에 대한 recovery test도 진행 하였는데, 간이 시료 전처리 키트의 효과적인 회수율과 칩에서의 성능을 확인하였다. 그림 19는 소고기에 일정량의 향생제를 투여하여 재 추출한 용액을 Lab-on-a-film 칩에 적용하여 얻은 검정곡선의 결과를 나타내었다.

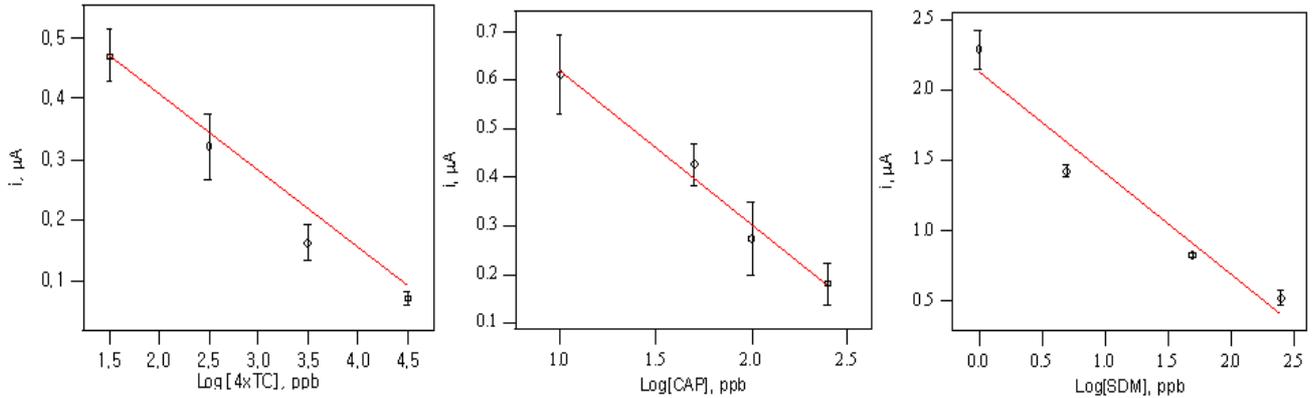


그림 19. Lab-on-a-film 칩 센서를 이용한 소고기에서의 recovery test

최종적으로 본 연구진은 기존의 추출방법인 GC/MS를 통해서 실제 시료에서의 잔류 향생제를 측정된 값과 간이 시료전처리 키트를 이용하여 얻은 잔류 향생제를 Lab-on-a-film 칩 휴대용 센서에 적용했을 때의 측정값을 비교한 결과 그 값의 차이가 미비함을 확인하였다. 결과적으로 간이 시료 전처리 키트를 이용하여 추출한 실제 시료를 적용시킨 잔류 향생제용 Lab-on-a-film 칩의 성능이 우수함을 확인하였다.

다. Lab-on-a-film 칩 케이스 및 프로토타입 디바이스 제작

(1) Lab-on-a-film 칩 케이스 제작

Lab-on-a-film 칩은 실험실 수준에서 테스트할 경우 케이스 없이 사용 가능하지만 제품화 하기 위해서는 케이스가 필요하다고 생각되어 케이스를 제작하였다. 칩을 케이스 없이 판매할 경우 숙련되지 않은 조작자들은 시료 주입구 및 시료가 이송되는 유로를 손으로 만지거나 누름으로써 오염 혹은 유로를 막을 수 있는 등 사용상의 부주의로 인한 신호 값의 에러가 많이 발생할 수 있기 때문에 케이스에 넣는 것이 더 바람직하다고 판단하였다. 금형을 제작하기에 앞서 플라스틱 조각을 통해 여러 케이스를 제작해 보았으며 최종 선택된 디자인을 2차년도 시제품 제작비를 이용하여 금형 제작하였으며 그림 20과 같이 완성하였다.

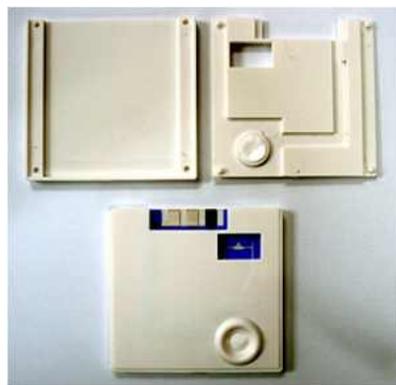


그림 20. Lab-on-a-film 칩 케이스.

(2) 프로토타입 디바이스 제작

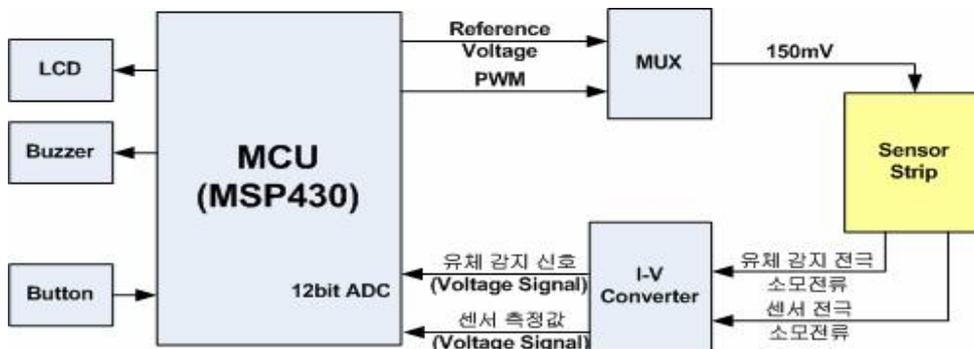
(가) i-LOC Device 제작

센서에서 얻어지는 전류값을 측정하여 화면에 표시하는 장치를 개발하였다. 센서는 유입된 시료에 따라 다른 전기저항 특성을 갖기 때문에, 여기에 전압을 인가하여 발생하는 전류값을 측정하면 센서에 유입되는 시료의 특성을 파악할 수 있게 된다.

(나) 사양

- Sensor Bias voltage: +150mV
- Measuring Current Range: 20nA ~ 10uA
- Display or Alarm Interface: LCD, Buzzer
- Command Interface: 2 Buttons - Power, Continue

(다) 하드웨어 구성



하드웨어는 다음과 같이 크게 세 부분으로 구성된다.

① 입출력장치(LCD, Buzzer, Button)

사용자는 Button을 눌러 장치를 켜고 측정과정을 진행시키거나 종료시킬 수 있다. 기기의 동작과정은 LCD에 의해 표시되고 각 측정단계가 끝날 때 마다 Buzzer를 울려 사용자에게 알린다.

② MCU(Micro Controller Unit)

입출력 및 전류측정회로를 제어하고 정해진 프로세스를 진행한다.

③ 전류측정회로(MUX, I-V Converter, MCU 12bit ADC)

MUX는 150mV에 가까운Reference Voltage와 PWM신호를 이용하여 정확한 +150mV 신호를 발생한다. +150mV 전원은 센서의 센서전극 및 유체감지 전극에 인가되고 각 전극에서 발생하는 소모전류는 i-V Converter에서 전압값으로 변환되어 MCU ADC(Analog-Digital Converter)에서 읽혀진다.

(라) 소프트웨어 프로그램

소프트웨어는 다음 플로우 차트와 같은 순서로 동작한다. 기질을 센서에 넣고 측정장치에 삽입한다. 전원버튼을 눌러 기기를 동작시키면 자동으로 유체감지 전극에 +150mV 전원이 인가

되며 20nA이상의 전류가 흐르는지 확인한다. 유체가 유체감지 전극에 닿으면 20nA이상의 전류가 발생하고 알람이 울어 사용자가 확인할 수 있도록 한다. 사용자가 센서에 구멍을 뚫고 다시 진행버튼을 누르면 센서 전극에 +150mV가 인가되고 60초 후 센서의 소모전류를 측정하여 화면에 표시한다. 그림 21은 위에서 설명한 사양과 하드웨어로 구성되면 작동되는 실제 제작된 항생제 측정용 Lab-on-a-film 칩 성능 평가 측정기이다.



그림 21. Lab-on-a-film 칩 성능 평가용 프로토타입 디바이스.

2. 협동연구 한경대학교

가. Tetracycline 정량기준 설정 및 전처리 키트 개발

(1) 표준품 및 시약

실험에 사용된 tetracycline hydrochloride (+96 %) 항생제 표준품은 Sigma (USA)에서 구입하였다. 또한, trichloroacetic acid와 citric acid monohydrate는 Sigma (USA)에서, disodium hydrogenphosphate dihydrate와 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Showa (Japan)에서, Oxalic acid는 Yakur (Japan)에서 구입하여 사용하였다. Methanol, Acetonitile 등의 용매는 HPLC grade로 Fisher (USA) 제품을 이용하였다.

(2) 시험용액의 조제

HPLC 분석에 사용된 이동상인 0.01M oxalic acid 용액은 Oxalic acid 1.26 g을 증류수 1L에 용해시킨 후 0.45 μ m filter로 여과하여 이동상으로 사용하며, 추출용매로 사용된 McIlvaine buffer는 Citric acid monohydrate 11.8 g, disodium hydrgenphosphate dihydrate 13.72 g, EDTA 33.62 g을 1 L 증류수에 용해시킨 후 0.45 μ m filter로 여과하여 추출용매로 사용하였다.

(3) 회수율 분석 및 표준검량선 작성

(가) 표준검량선 작성

표준물질 10 mg을 정확히 칭량하여 methanol에 용해하여 100 mL 정용하였다.(100 ppm) 이 액 10 mL을 정확히 취하여 mathanol 100 mL로 정용한 뒤 표준용액으로 사용하였다 (10 ppm). 이 표준용액을 단계적으로 희석하여 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1 ppm 용액을 제조한 후 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준 검량선을 작성하였다.

(나) 회수율 분석

① 기본분석방법

세절된 시료 10 g에 20 % TCA 2 mL를 넣고 흔든 후 McIlvaine buffer 20 mL[5]를 넣고 2 분가량 더 흔든 후 3500 rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액만 취하였다. HLB cartridge (200 mg, 6 CC)에 methanol과 water로 활성화시키고 시료를 loading한 뒤, 5% methanol/water 2 mL로 씻어내고 methanol 3 mL로 용출시켰다. 용출액을 질소농축기로 농축하고 methanol 1mL로 재 용해 한 다음 syringe filter로 여과한 후 HPLC를 이용하여 분석하였다.

② 회수율 실험

낮은 농도를 LOD의 10배, 높은 농도를 50배로 하여 기기분석 상 1 ppm과 5 ppm이 되게 확인해 보았으며 전처리 과정에서 시료가 10배 농축되므로 농축배수를 계산하여 시료 당 0.1 ppm과 0.5 ppm이 되도록 tetracycline을 micro-syringe를 사용하여 육류(소, 돼지고기, 닭)의 육질 부분에 injection 하여 spiking 하였다. 실험 결과 전체적인 회수율이 낮은 농도 및 높은 농도에서는 각각 77 - 117 % 및 72 - 99 %의 범위로 분석법이 적합한 것으로 나타났다 (표 3, 그림 22).

표 3. tetracycline의 회수율 실험 결과

Sample	Concentration (ppm)			Recovery (%)		
	Control	Low (0.1ppm)	High (0.5ppm)	Control	Low	High
소	0.000	0.095	0.397	0.00	94.92	79.40
돼지	0.000	0.108	0.364	0.00	107.74	72.81
닭	0.000	0.097	0.244	0.00	96.56	72.22
우유	0.000	0.111	0.498	0.00	111.27	99.59
계란	0.000	0.077	0.361	0.00	77.24	72.11

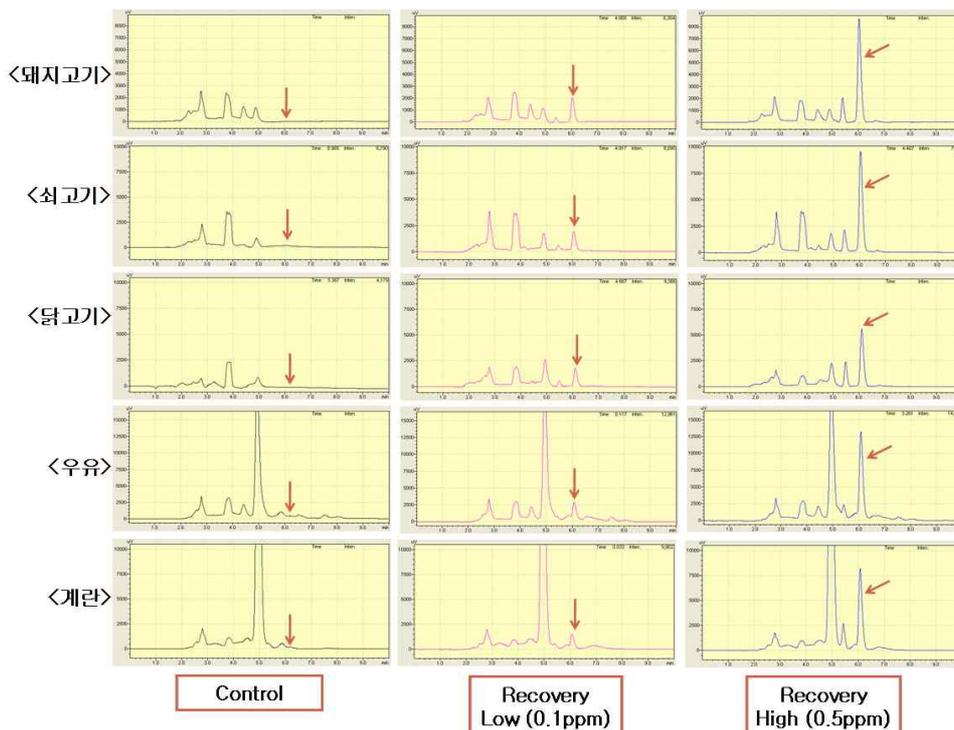


그림 22. tetracycline의 회수율 실험 결과 chromatogram.

(4) method validation

분석시험이 의도한 목적에 따라 일정하게 수행되는가를 보증하기 위해 문서화된 증거를 확립하는 것으로 검출할 수 있지만 정량 할 필요는 없을 수 있는 분석물질의 최소량을 분석하는 검출한계 (detection limit), 분석물질의 농도에 직접적으로 비례하는 결과를 얻을 수 있는 값을 분석하는 직선성 (linearity), 반복 분석 시 일정하게 분석 가능한 기기적 시스템의 조건을 확인하는 시스템 적합성 (system suitability), 실제값 (actual value)와 측정값 (measured value)간의 일치되는 정도를 분석하는 정확성(Accuracy), 분석시험 중 얻어진 측정시간의 일치되는 정도를 분석하는 정밀성(Precision)의 분석으로 검량하였다.[6]

(가) 검출한계(detection limit)

최소검출한계는 분석 peak의 signal/noise 값이 3이상 이 되는 농도를 확인하여 결정하였으며, 본 실험의 경우 0.1 ppm (2 ng)을 최소검출한계로 설정하였다.(표 4, 그림 23)

표 4. tetracycline의 검출한계 분석 결과

Replicates	Peak area (0.1 µg/mL)	Signal/Noise
1	252.0	3.16
2	245.0	3.18
3	270.0	4.45
4	253.0	3.53
5	274.0	3.32
6	258.0	4.06
Mean	258.7	
SD	11.2	
CV(%)	4.33	

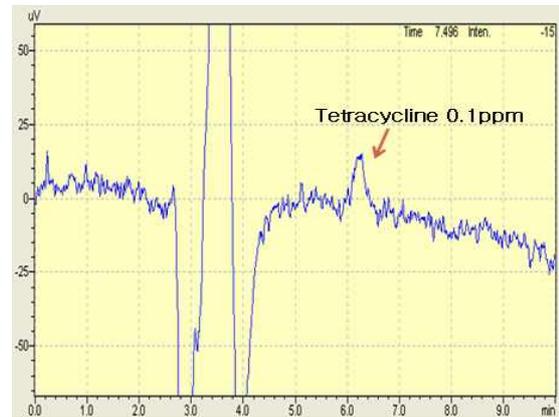


그림 23. tetractline의 검출한계 분석 결과 chromatogram.

(나) 직선성(linearity)

tetracycline을 단계별 희석하여 검량선을 작성하고 직선성을 확인해 보았다. 세 번 반복 확인한 결과 유사한 직선식을 구할 수 있었고 0.99이상의 상관계수를 확인할 수 있었다(표 5, 그림 24).

표 5. tetracycline의 직선성 분석 결과

Replicates	Back-calculated concentration (µg/mL)						calibration curve	r ²
	Concentration level (µg/mL)							
	0.10	0.50	1.00	2.00	5.00	10.00		
No. 1	0.31	0.53	0.94	1.88	4.82	10.11	23656x-7035	0.998
No. 2	0.28	0.47	0.91	1.73	5.28	9.92	22823x-6208	0.997
No. 3	0.31	0.48	0.86	1.83	5.14	9.98	23877x-7071	0.998

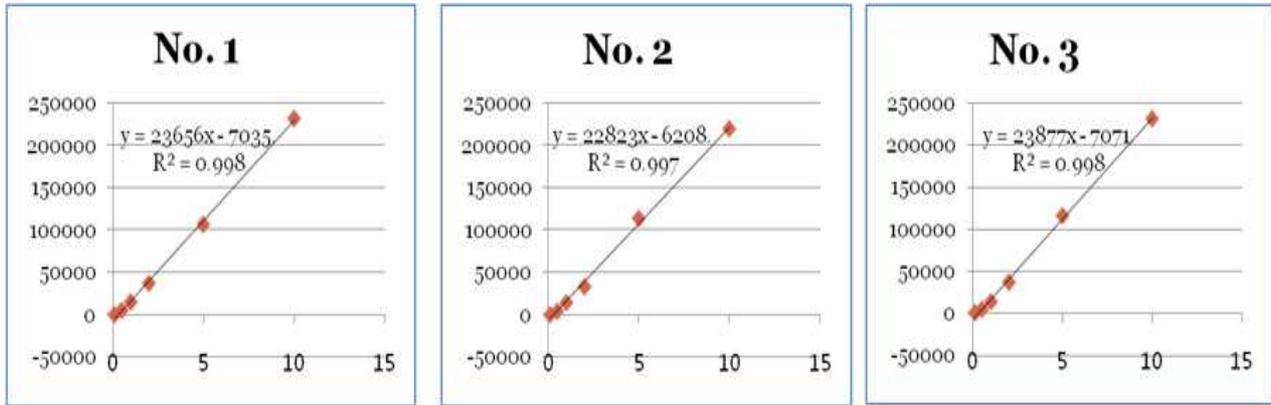


그림 24. tetracycline의 직선성 분석 결과 chromatogram.

(다) 시스템 적합성 (system suitability)

세 개의 다른 vial에 같은 농도의 시료를 담고 각각 6회씩 기기에 injection을 하여 system suitability를 확인해 보았다. 검출된 각 peak를 적분하여 검량한 농도로 precision을 확인해 본 결과 모두 5 %이하였다(표 6). 밑의 3가지 chromatogram은 각 vial마다 6회씩 반복 분석한 chromatogram을 겹쳐 보인 그림이다(그림 25).

표 6. tetracycline의 시스템 적합성 분석 결과

Replicates	Hole 1	Hole 2	Hole 3
1	4.928	4.914	4.922
2	4.925	4.901	4.936
3	4.916	4.881	4.469
4	4.631	4.855	4.481
5	4.864	4.826	4.556
6	4.880	4.771	4.507
Mean	4.857	4.858	4.645
SD	0.114	0.053	0.222
CV	2.344	1.094	4.777
Mean	4.787		
CV	2.563		
SD	0.123		

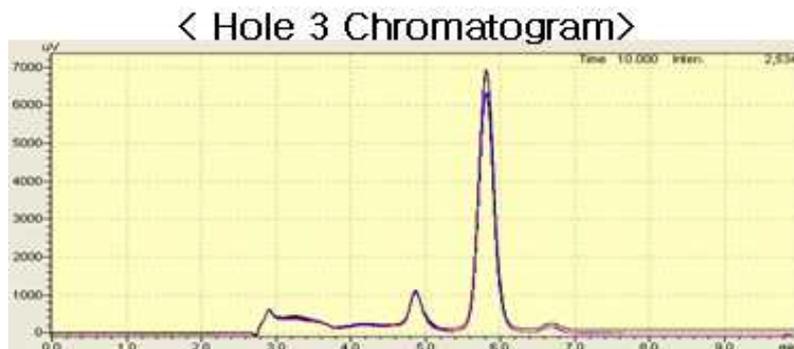


그림 25. Tetracycline의 시스템 적합성 분석 결과 chromatogram.

(라) 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) (1day)

분석의 정확도와 정밀도를 확인하기 위해 검량 범위 (0.1 ppm-10 ppm) 사이의 세 농도 (1, 2, 5 ppm)을 설정하고 각각 6회씩 반복 분석하였다. 앞서 수행했던 분석과 같은 방법으로 적분 검량하여 확인한 결과 accuracy는 모두 10 % 이하였고 precision은 5 % 이하로 분석에 적합함을 알 수 있었다(표 7).

표 7. Tetracycline의 정확성 및 정밀성 (1day) 분석 결과

replicates	Observed concentration (µg/mL)			Accuracy (%)		
	LoQC	MiQC	HiQC	LoQC	MiQC	HiQC
1	1.014	1.995	5.009	1.400	-0.250	0.180
2	1.000	1.812	4.975	0.000	-9.400	-0.500
3	1.041	1.989	4.972	4.100	-0.550	-0.560
4	1.055	1.919	4.845	5.500	-4.050	-3.100
5	1.075	2.000	4.850	7.500	0.000	-3.000
6	1.049	1.976	5.134	4.900	-1.200	2.680
Mean	1.039	1.949	4.964	3.900	-2.575	-0.717
SD	0.028	0.073	0.108			
precision(%)	2.65	3.75	2.17			

(마) 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) (2day)

accuracy와 precision을 확인하는 방법과 같은 방법으로 다른 날짜에 분석을 수행하였다. 이 날의 분석 결과 역시 accuracy는 모두 10 % 이하였고 precision은 5 % 이하로 분석에 적합함을 알 수 있었다(표 8).

표 8. Tetracycline의 정확성 및 정밀성(2day) 분석 결과

replicates	Observed concentration (µg/mL)			Accuracy (%)		
	LoQC	MiQC	HiQC	LoQC	MiQC	HiQC
1	1.094	2.000	5.022	9.400	0.000	0.440
2	1.055	1.889	5.076	5.500	-5.550	1.520
3	1.065	1.926	5.072	6.500	-3.700	1.440
4	1.000	1.951	4.750	0.000	-2.450	-5.000
5	1.097	1.954	4.703	9.700	-2.300	-5.940
6	1.072	1.915	5.272	7.200	-4.250	5.440
Mean	1.064	1.939	4.983	6.383	-3.042	-0.350
SD	0.035	0.038	0.216			
precision(%)	3.32	1.98	4.34			

(바) 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) (inter day)

앞서 이틀간 확인한 accuracy와 precision을 모두 같이 확인하여, 날짜 간 분석의 accuracy와 precision을 확인해 보았다. 역시 모든 결과값에서 accuracy는 10 % 이하였고 precision은 5 % 이하로 분석에 적합함을 알 수 있었다(표 9).

표 9. Tetracycline의 정확성 및 정밀성(inter day)분석 결과

replicates	Observed concentration (µg/mL)			Accuracy (%)		
	LoQC	MiQC	HiQC	LoQC	MiQC	HiQC
1	1.014	1.995	5.009	1.400	-0.250	0.180
2	1.000	1.812	4.975	0.000	-9.400	-0.500
3	1.041	1.989	4.972	4.100	-0.550	-0.560
4	1.055	1.919	4.845	5.500	-4.050	-3.100
5	1.075	2.000	4.850	7.500	0.000	-3.000
6	1.049	1.976	5.134	4.900	-1.200	2.680
1	1.094	2.000	5.022	9.400	0.000	0.440
2	1.055	1.889	5.076	5.500	-5.550	1.520
3	1.065	1.926	5.072	6.500	-3.700	1.440
4	1.000	1.951	4.750	0.000	-2.450	-5.000
5	1.097	1.954	4.703	9.700	-2.300	-5.940
6	1.072	1.915	5.272	7.200	-4.250	5.440
Mean	1.051	1.944	4.973	5.142	-2.808	-0.533
SD	0.033	0.056	0.163			
precision(%)	3.13	2.87	3.28			

(5) 속성전처리 실험방법

(가) 속성 전처리 분석방법

세절하지 않은 시료 10 g 에 20 % TCA 2 mL 와 McIlvaine buffer 20 mL 를 넣고 2분간 가랑 흔든 후 syringe filter (PTFE 0.45 µm, 25 mm)를 이용하여 filter하였다. SPE정제시, manifold와 pump를 이용하지 않고 syringe와 connector를 이용하여 정제하였다. HLB cartridge (200 mg, 6 CC)를 methanol와 water로 활성화시키고 시료를 loading한 뒤, 5 % methanol/water 2 mL로 씻어내고 methanol 3 mL로 용출시켰다. Syringe와 connector를 이용한 정제에 이어 마지막 용출 시 methanol를 1 mL씩 두 번 나누어 받은 후 시료를 HPLC에 주입하여 분석하였다 (표 10).

표 10. Tetracycline의 속성 전처리 방법에 의한 회수율 결과

Fraction	Concentration (ppm)		Recovery (%)		
	1	2	1	2	1+2
소 (0.1ppm)	0.085	0.029	84.98	28.86	113.84
돼지 (0.1ppm)	0.068	0.051	67.79	51.39	119.18
닭 (0.1ppm)	0.071	0.049	71.34	49.28	120.62

(6) 속성전처리 kit 제작

(가) kit set 예상 모형

Syringe filter 시 피스톤을 분리하는 불편함을 없애기 위해 피스톤에 뚜껑을 제작하여 고기와 추출 용매를 넣어 바로 추출하여 filter 할 수 있도록 하였다. 추출하는 동안에 용매가 빠지지 않게 하기 위해 코르크를 부착하였으며, 또한 filter 쪽으로 sample이 빠지는 것을 방지하기 위해 net 를 제작하여 넣었다. SPE 정제 시 용매 변경을 위해 syringe를 분리하는 번거로움을 없애기 위해 앞에서와 같이 피스톤에 뚜껑을 제작하였다. 마지막 용매 용출시 chip에 적용할 수 있도록 받아지는 vial에 PBS buffer를 넣어 희석한 뒤에 희석액을 chip으로 분석하였다(그림 26).

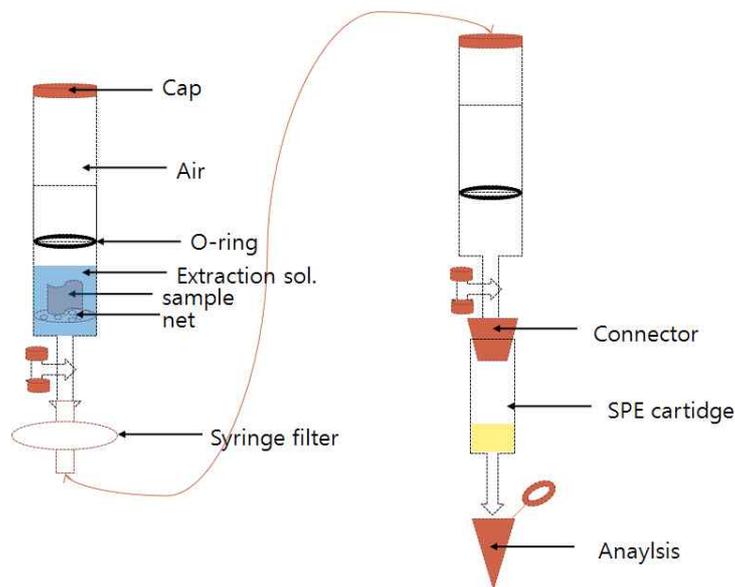


그림 26. Tetracycline의 kit set 예상 모형.

(나) 실제 kit set 제작

위의 kit 예상 모형을 바탕으로 실제 kit를 제작 하였다(그림 27).



(a)

(b)

그림 27. Tetracycline의 실제 kit set 제작 (a)보완전의 kit set, (b)보완후의 kit set.

(7) HPLC 분석조건

- Instrument : Shimadzu LC-20A series HPLC (Shimadzu, Japan)

- Detector : UV
- Column : C18 (250mm × 4.6mm, 5 micron, Agilent)
- Mobile phase : isocratic 0.01M Oxalic acid / ACN / MeOH (72.5 / 17.5 / 10, v/v)
- Sample size : 20 μ l
- Flow rate : 1 mL/min
- UV wavelength : 360 nm

나. Sulfadimethoxine 정량기준 설정 및 전처리 키트 개발

(1) 사용된 시약

실험에 사용된 항생제는 SIGMA-ALDRICH에서 구입하였다. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)는 kokusan (Japan)에서 구입, 사용하였으며, Phosphoric acid는 DaeJung (Korea), Dihydrogen phosphate는 Jusei (Japan) 에서 구입, 사용하였다. Methanol, Acetonitrile 등의 용매는 HPLC grade로 Fisher(USA) 제품을 사용하였다.

(2) 시험용액의 조제

이동상으로 사용된 0.05M Dihydrogen phosphate는 0.695g을 증류수 1L 에 용해시킨 후 0.45 μ m filter 로 여과하여 이동상으로 사용하였다.

(3) 회수율 분석 및 표준검량선 작성

(가) 표준검량선 작성

표준물질 10mg 을 칭량하여 methanol에 용해하여 100ml 정용하였다.(100ppm) 이 액 10ml을 정확히 취하여 methanol 100ml 로 정용한뒤 표준용액으로 사용하였다(10ppm). 이 표준용액을 단계적으로 희석하여 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05ppm 용액을 제조하여 각각 20 μ l씩 HPLC에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준검량선을 작성하였다.

(나) 회수율 분석

① 기본 분석방법

세절된 시료 2 g에 1% Phosphoric acid 로 pH 1~2 로 pH를 낮춘 Acetonitrile 5 mL와 Ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)[7][8] 1 mL을 넣고 10분간 sonicate 하여 추출한 뒤 3500 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액만 취한 후 농축하였다. HLB cartridge (200 mg, 6 CC)에 methanol과 water로 활성화시키고 시료를 loading한 뒤, 5% methanol, water 2 mL로 씻어내고 methanol 3 mL로 용출시켰다. 용출액을 질소농축기로 농축하고 methanol 1mL로 재용해 한 다음 syringe filter로 여과한 후 HPLC를 이용하여 분석하였다.

② 회수율 실험

낮은 농도를 LOD의 10배, 높은 농도를 50배로 하여 기기분석상 0.5ppm과 2.5ppm이 되게 확인해 보았으며 전처리 과정에서 시료가 2배 농축되므로 농축배수를 계산하여 1ppm과 5ppm 이 되도록 sulfadimethoxine을 micro-syringe를 사용하여 육류(소,돼지,닭)의 육질 부분에 injection 하여 spiking 하였다. (표 11, 그림 28).

표 11. Sulfadimethoxine의 회수율 실험 결과

Sample	Concentration (ppm)			Recovery (%)		
	Control	Low (1ppm)	High (5ppm)	Control	Low	High
소	0	0.92	4.65	0	92.2	93.5
돼지	0	1.00	5.25	0	100.2	105.3
닭	0	1.09	4.85	0	109.4	97.8
우유	0	1.10	4.35	0	110.0	87.0
계란	0	0.98	5.10	0	98.2	102.4

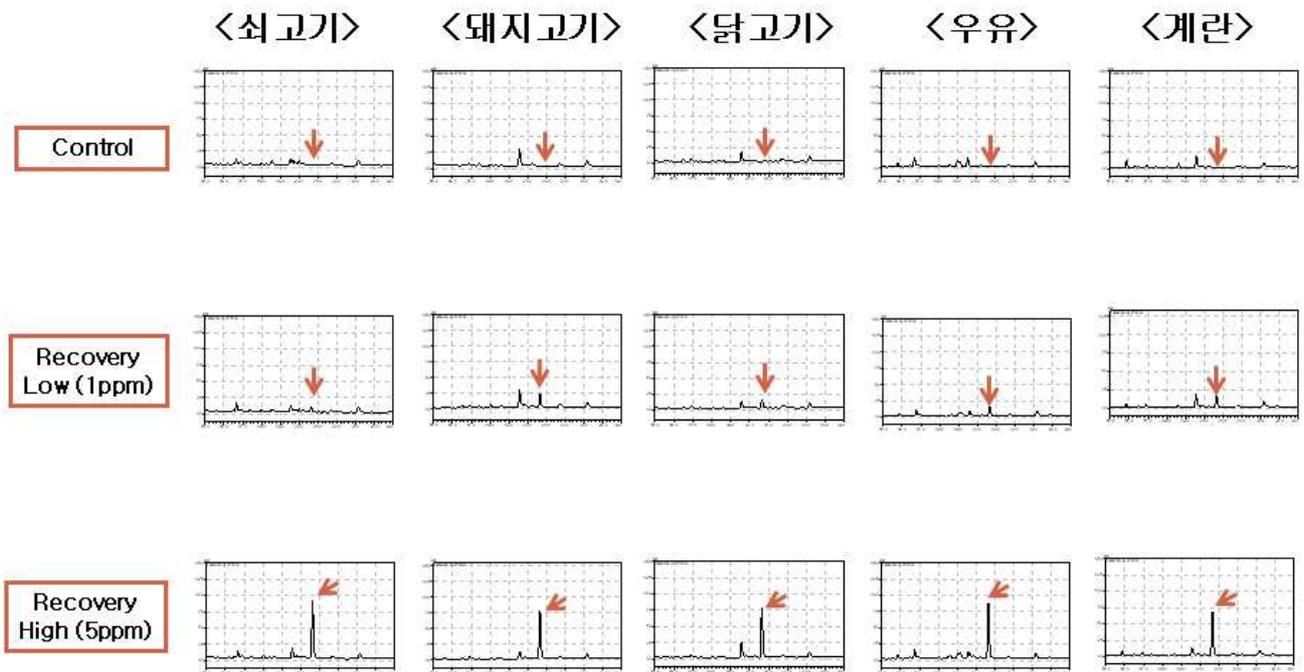


그림 28. Sulfadimethoxine의 회수율 실험 결과 chromatogram.

(4) method validation

분석시험이 의도한 목적에 따라 일정하게 수행되는가를 보증하기 위해 문서화된 증거를 확립하는 것으로 검출할 수 있지만 정량 할 필요는 없을 수 있는 분석물질의 최소량을 분석하는 검출한계(detection limit), 분석물질의 농도에 직접적으로 비례하는 결과를 얻을 수 있는 값을 분석하는 직선성(linearity), 반복 분석 시 일정하게 분석 가능한 기기적 시스템의 조건을 확인하는 시스템 적합성(system suitability), 실제값(actual value)와 측정값(measured value)간의 일치되는 정도를 분석하는 정확성(Accuracy), 분석시험중 얻어진 측정시간의 일치되는 정도를 분석하는 정밀성(Precision)의 분석으로 검량하였다.

(가) 검출한계(detection limit)

최소검출한계는 분석 peak의 signal/noise 값이 3이상인 농도를 확인하여 결정하였으며, 본 실험의 경우 0.05ppm (1ng)을 최소검출한계로 설정하였다(표 12, 그림 29).

표 12. Sulfadimethoxine의 검출한계 분석 결과

Replicates	Peak area (0.05 µg/mL)	Signal/Noise
1	2887.0	4.27
2	3011.0	3.91
3	3117.0	4.04
4	2971.0	3.92
5	3142.0	4.05
6	3107.0	4.15
Mean	3039.2	
SD	99.8	
CV(%)	3.28	

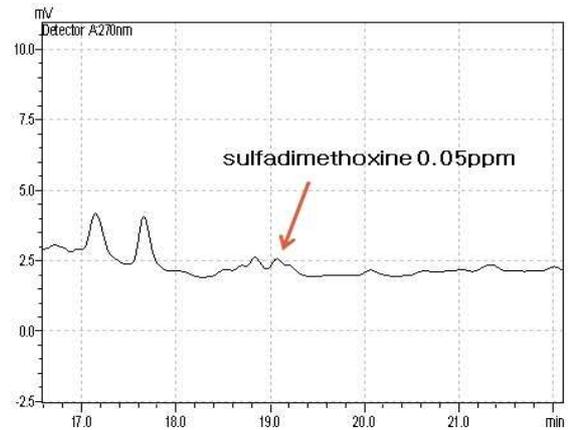


그림 29. tetractcline의 검출한계 분석 결과 chromatogram.

(나) 직선성(linearity)

sulfadimethoxine을 단계별 희석하여 검량선을 작성하고 직선성을 확인해 보았다. 세 번 반복 확인한 결과 유사한 직선식을 구할 수 있었고 0.99이상의 상관계수를 확인할 수 있었다(표 13, 그림 30).

표 13. Sulfadimethoxine의 직선성 분석 결과

Replicates	Back-calculated concentration (µg/mL)							calibration curve	r ²
	Concentration level (µg/mL)								
	0.05	0.10	0.50	1.00	2.00	5.00	10.00		
No. 1	0.08	0.13	0.50	1.00	1.99	4.96	10.02	87993x-3906	0.999
No. 2	0.07	0.10	0.50	0.99	2.00	4.98	10.00	86972x-3317	0.999
No. 3	0.03	0.09	0.54	0.96	1.98	5.01	9.99	87135x-501.3	0.999

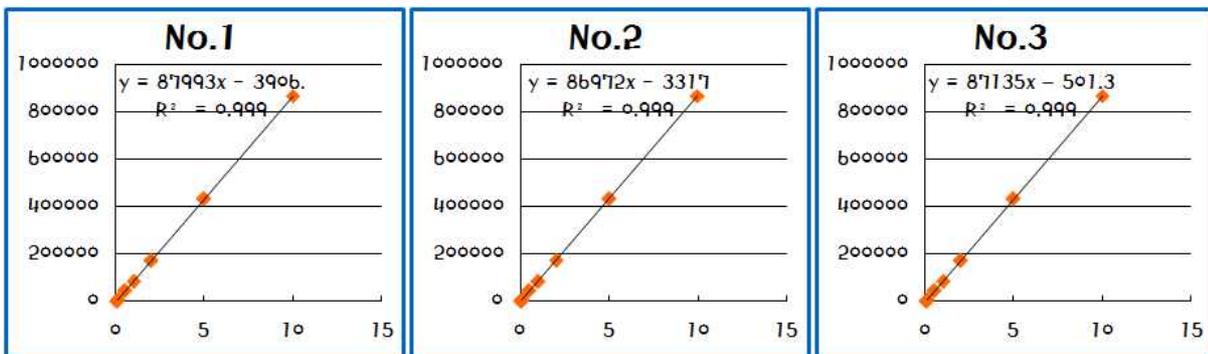


그림 30. Sulfadimethoxine의 직선성 분석 결과 chromatogram.

(다) 시스템 적합성 (system suitability)

세 개의 다른 vial에 같은 농도의 시료를 담고 각각 6회씩 기기에 injection을 하여 system suitability를 확인해 보았다. 검출된 각 peak를 적분하여 검량한 농도로 precision을 확인해 본 결과 모두 5 %이하였다(표 14). 밑의 3가지 chromatogram은 각 vial마다 6회씩 반복 분석한

chromatogram을 겹쳐 보인 그림이다(그림 31).

표 14. Sulfadimethoxine의 시스템 적합성 분석 결과

Replicates	Hole 1	Hole 2	Hole 3
1	4.853	5.032	5.084
2	4.840	5.000	5.165
3	4.850	5.037	5.211
4	4.920	5.064	5.280
5	4.930	5.039	5.308
6	4.997	5.080	5.431
Mean	4.898	5.042	5.247
SD	0.062	0.028	0.121
CV	1.259	0.549	2.307
Mean	5.062		
CV	3.456		
SD	0.175		

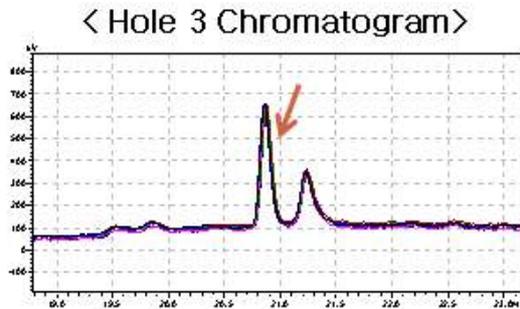


그림 31. Sulfadimethoxine의 시스템 적합성 분석 결과 chromatogram.

(라) 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) (1day)

분석의 정확도와 정밀도를 확인하기 위해 검량 범위 (0.05 ppm-10 ppm) 사이의 세 농도 (1, 2, 5 ppm)을 설정하고 각각 6회씩 반복 분석하였다. 앞서 수행했던 분석과 같은 방법으로 적분 검량하여 확인한 결과 accuracy는 모두 10 % 이하였고 precision은 5 % 이하로 분석에 적합함을 알 수 있었다(표 15).

표 15. Sulfadimethoxine의 정확성 및 정밀성 (1day) 분석 결과

replicates	Observed concentration (µg/mL)			Accuracy (%)		
	LoQC	MiQC	HiQC	LoQC	MiQC	HiQC
1	1.010	1.832	5.098	0.958	-8.417	1.953
2	0.950	1.991	5.045	-5.008	-0.441	0.894
3	0.935	2.050	5.048	-6.494	2.481	0.952
4	0.982	2.002	5.053	-1.756	0.103	1.069
5	0.987	2.013	5.062	-1.340	0.672	1.242
6	0.986	2.000	5.072	-1.430	0.021	1.437
Mean	0.975	1.981	5.063	-2.512	-0.930	1.258
SD	0.027	0.076	0.020			
precision(%)	2.800	3.843	0.389			

(마) 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) (2day)

accuracy와 precision을 확인하는 방법과 같은 방법으로 다른 날짜에 분석을 수행하였다. 이 날의 분석 결과 역시 accuracy는 모두 10 % 이하였고 precision은 5 % 이하로 분석에 적합함을 알 수 있었다(표 16).

표 16. Sulfadimethoxine의 정확성 및 정밀성(2day) 분석 결과

replicates	Observed concentration (µg/mL)			Accuracy (%)		
	LoQC	MiQC	HiQC	LoQC	MiQC	HiQC
1	1.023	2.172	5.291	2.263	8.578	5.825
2	1.006	2.000	5.100	0.627	0.021	2.003
3	0.976	2.108	5.069	-2.383	5.378	1.380
4	1.026	2.080	5.105	2.566	4.002	2.106
5	1.023	2.050	5.090	2.265	2.511	1.810
6	1.030	2.042	5.120	3.035	2.084	2.409
Mean	1.014	2.075	5.129	1.396	3.763	2.589
SD	0.020	0.059	0.081			
precision(%)	1.994	2.867	1.581			

(바) 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) (inter day)

앞서 이틀간 확인한 accuracy와 precision을 모두 같이 확인하여, 날짜 간 분석의 accuracy와 precision을 확인해 보았다. 역시 모든 결과 값에서 accuracy는 10 % 이하였고 precision은 5 % 이하로 분석에 적합함을 알 수 있었다(표 17).

표 17. Sulfadimethoxine의 정확성 및 정밀성(inter day)분석 결과

replicates	Observed concentration (µg/mL)			Accuracy (%)		
	LoQC	MiQC	HiQC	LoQC	MiQC	HiQC
1	1.010	1.832	5.098	0.958	-8.417	1.953
2	0.950	1.991	5.045	-5.008	-0.441	0.894
3	0.935	2.050	5.048	-6.494	2.481	0.952
4	0.982	2.002	5.053	-1.756	0.103	1.069
5	0.987	2.013	5.062	-1.340	0.672	1.242
6	0.986	2.000	5.072	-1.430	0.021	1.437
1	1.023	2.172	5.291	2.263	8.578	5.825
2	1.006	2.000	5.100	0.627	0.021	2.003
3	0.976	2.108	5.069	-2.383	5.378	1.380
4	1.026	2.080	5.105	2.566	4.002	2.106
5	1.023	2.050	5.090	2.265	2.511	1.810
6	1.030	2.042	5.120	3.035	2.084	2.409
Mean	0.994	2.028	5.096	-0.558	1.416	1.923
SD	0.031	0.082	0.066			
precision(%)	3.084	4.019	1.298			

(5) 속성전처리 실험방법

(가) 속성 전처리 분석방법

세절하지 않은 시료 2 g에 Acetonitrile 5 mL와 Ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA) 1 mL를 넣고, handy shaking하여 추출한 뒤 syringe filter (PTFE 0.45 um, 25 mm)를 이용하여 filter하였다. 추출액에 hexane 10ml을 넣어 충분히 흔든 뒤, 두 층으로 나뉘는 뒤 밑에 층을 받아 HPLC를 이용하여 분석하였다(표 18).

표 18. Sulfadimethoxine의 속성 전처리 방법에 의한 회수율 결과

	Concentration (ppm)		Recovery (%)	
	Control	Recovery	Control	Recovery
소 (0.1ppm)	0	0.87	0	87.3
돼지 (0.1ppm)	0	1.09	0	109.5
닭 (0.1ppm)	0	0.95	0	95.0

(6) 속성전처리 kit 제작

(가) kit set 예상 모형

Syringe filter 사용 시 피스톤을 분리하는 불편함을 없애기 위해 피스톤에 뚜껑을 제작하여 고기와 추출 용매를 넣어 바로 추출하여 filter 할 수 있도록 하였다. 추출하는 동안에 용매가 빠지지 않게 하기 위해 콕크를 부착하였으며, 또한 filter쪽으로 sample이 빠지는 것을 방지하기 위해 net 를 제작하였다. 액액 분리시 low 층의 용매 분석의 용이를 위해 콕크를 부착하였다(그림 32).

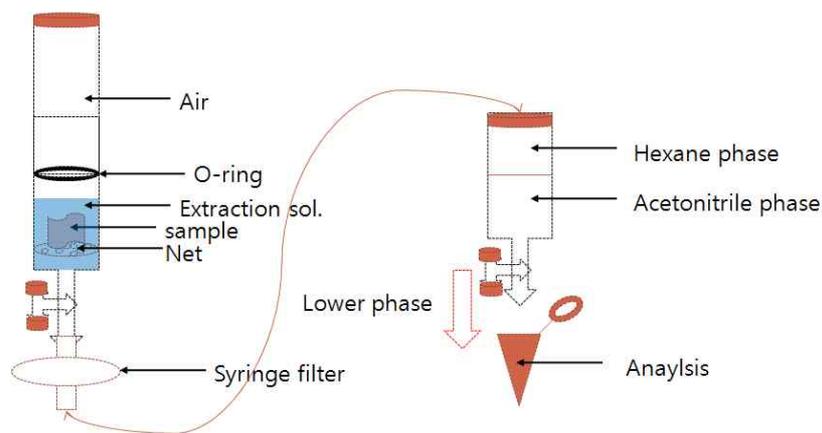


그림 32. Sulfadimethoxine의 kit set 예상 모형.

(나) 실제 kit set 제작

위의 kit 예상 모형을 바탕으로 실제 kit를 제작 하였다(그림 33).

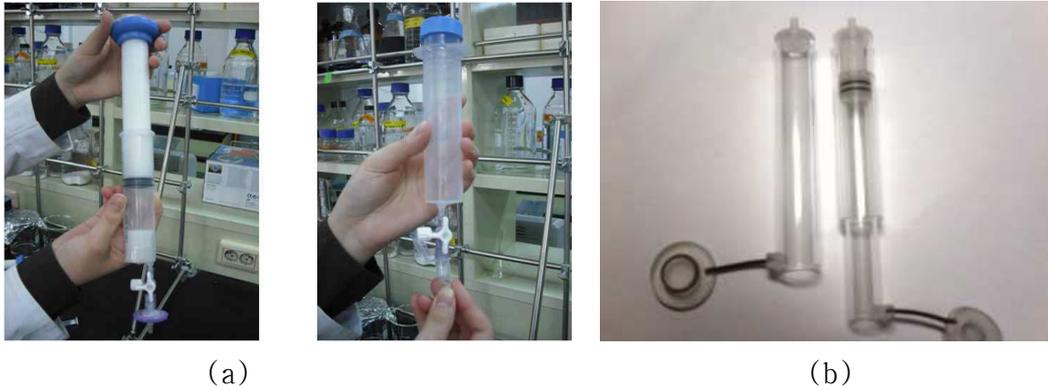


그림 33. Sulfadimethoxine의 실제 kit set 제작 (a)보완전의 kit set, (b)보완후의 kit set.

(7) HPLC 분석조건

- Instrument : Shimadzu LC-20AD series HPLC (Shimadzu, Japan)
- Detector : UV
- Column : C18 (250mm × 4.6mm, 5 micron, Agilent)
- Mobile phase : Gradient (5mM KH_2PO_4 /Acetonitrile) 0 min (B conc. = 0%) → 5min (B conc. = 50%) → 15 min (B conc. = 70%) → 25 min (B conc. = 0%) → 35 min (B conc. = 0%)
- Sample size : 20 μl
- Flow rate : 1 mL/min
- UV wavelength : 270 nm

다. Chloramphenicol 정량기준 설정 및 전처리 키트 개발

(1) 사용된 시약

실험에 사용된 항생제는 Fluka에서 구입하였다. Ammonium acetate($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)는 Duksan(Korea)에서 Acetic acid(CH_3COOH)는 Kanto(Japan)에서 구입, 사용하였다. Methanol, Acetone 등의 용매는 HPLC grade로 Fisher(USA) 제품을 사용하였다.

(2) 시험용액의 조제

(가) 표준용액

표준물질 10 mg 을 칭량하여 methanol에 용해하여 100 mL 정용하였다.(100 ppm) 이 액 10 mL을 정확히 취하여 methanol 100 mL 로 정용한 뒤 표준용액으로 사용하였다(10 ppm).

(나) 실험용액

HPLC/MS 분석에 사용된 이동상인 Water(0.1% CH_3COOH , 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 용액은 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.77 g, CH_3COOH 1 mL 을 1L 증류수에 용해시킨 후 0.45 μm filter로 여과하여 이동상으로 사용하였다.

(3) 회수율 분석 및 표준검량선 작성

(가) 표준검량선 작성

표준물질 10mg 을 칭량하여 Acetonitrile에 용해하여 100ml 정용하였다.(100ppm) 이 액 10ml을 정확히 취하여 Acetonitrile 100ml 로 정용한뒤 표준용액으로 사용하였다(10ppm). 이 표준용액을 단계적으로 희석하여 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01ppm 용액을 제조하여 각각 5 μl 씩

LC/MS에 주입하여 chromatogram 상에 나타난 peak area를 기준으로 표준검량선을 작성하였다.

(나) 회수율 분석

① 기본 분석방법

세절된 시료 5 g 에 20 mL Ethyl acetate를 넣고 10 min 간 흔든 뒤 4000rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상등액을 감압농축 하였다. 잔사물을 2 mL MeOH 에 녹인후 20 mL 20% NaCl , 20 mL Hexane을 넣고 흔든 뒤 4000 rpm에서 5분간 원심분리 하고 Hexane 층을 제거한 후 물 층에 15 mL Ethyl acetate를 넣고 흔든 뒤 4000 rpm에서 5분간 원심분리 후 Ethyl acetate 층을 질소농축 한 뒤 잔사에 1 mL 50% MeOH로 재용해 한 후 HPLC/MS/MS 로 분석하였다.[9]

② 회수율 실험

전처리 과정에서 시료가 5배 농축되므로 농축배수를 계산하여 0.1ppm이 되도록 chloramphenicol을 micro-syringe를 사용하여 육류(소, 돼지, 닭)의 육질 부분과, 계란, 우유에 injection 하여 spiking 하였다(표 19, 그림 34).

표 19. Chloramphenicol의 회수율 실험 결과

Sample	Concentration (0.1ppm)		Recovery (%)	
	Control	recovery	Control	recovery
소	0	0.112	0	112.0
돼지	0	0.096	0	96.0
닭	0	0.102	0	102.0
우유	0	0.117	0	117.0
계란	0	0.104	0	104.0

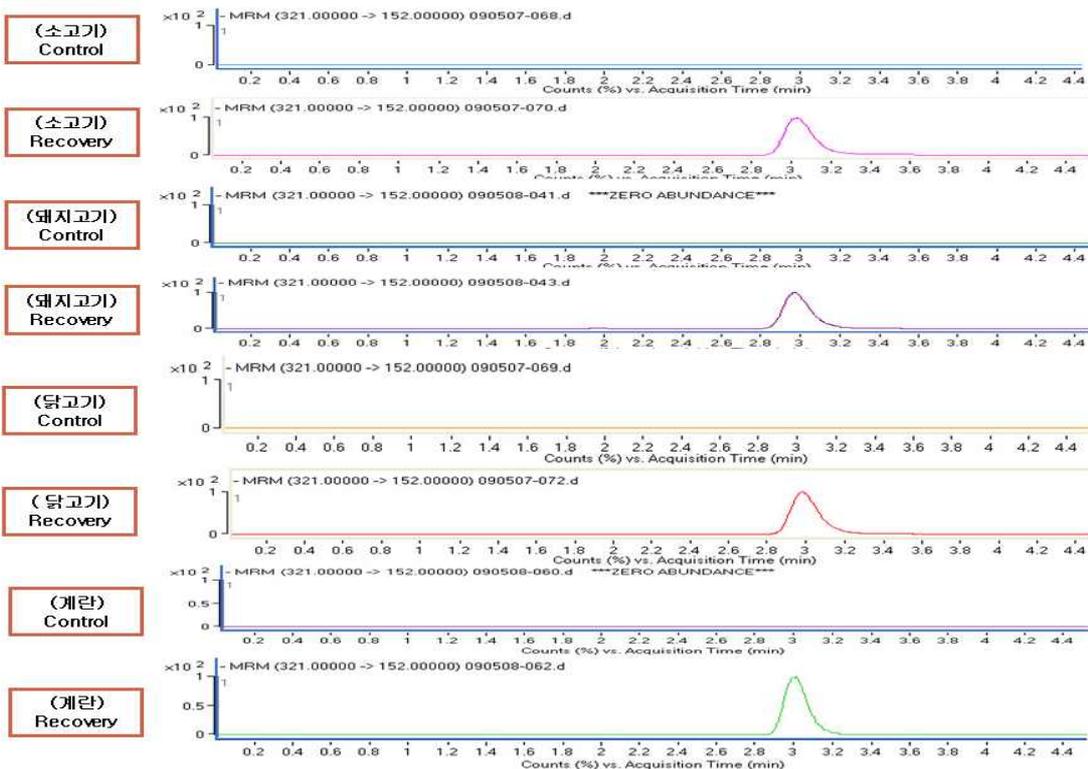


그림 34. Chloramphenicol의 회수율 실험 결과 chromatogram.

(4) method validation

분석시험이 의도한 목적에 따라 일정하게 수행되는가를 보증하기 위해 문서화된 증거를 확립하는 것으로 검출할 수 있지만 정량 할 필요는 없을 수 있는 분석물질의 최소량을 분석하는 검출한계(detection limit), 분석물질의 농도에 직접적으로 비례하는 결과를 얻을 수 있는 값을 분석하는 직선성(linearity), 반복 분석 시 일정하게 분석 가능한 기기적 시스템의 조건을 확인하는 시스템 적합성(system suitability), 실제값(actual value)와 측정값(measured value)간의 일치되는 정도를 분석하는 정확성(Accuracy), 분석시험중 얻어진 측정시간의 일치되는 정도를 분석하는 정밀성(Precision)의 분석으로 검량하였다.

(가) 검출한계(detection limit)

본 실험의 경우 0.01ppm을 최소검출한계로 설정하였다(표 20, 그림 35).

표 20. Chloramphenicol의 검출한계 분석 결과

Replicates	Peak area (0.01 µg/mL)
1	0.01
2	0.01
3	0.01
4	0.02
5	0.01
6	0.01
Mean	0.01
SD	0.001
CV(%)	10.73

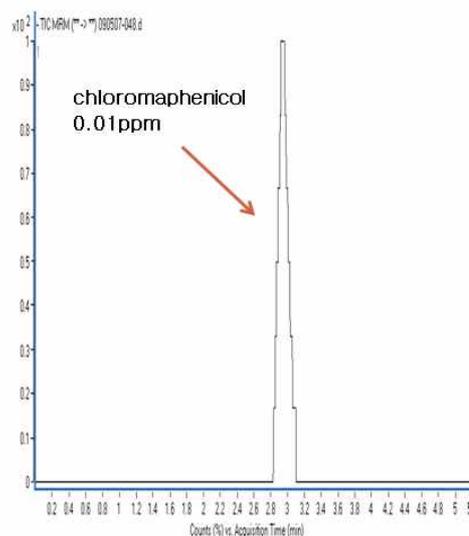


그림 35. Chloramphenicol의 검출한계 분석 결과 chromatogram.

(나) 직선성(linearity)

sulfadimethoxine을 단계별 희석하여 검량선을 작성하고 직선성을 확인해 보았다. 세 번 반복 확인한 결과 유사한 직선식을 구할 수 있었고 0.99이상의 상관계수를 확인할 수 있었다(표 21, 그림 36).

표 21. Chloramphenicol의 직선성 분석 결과

Replicates	Back-calculated concentration (µg/mL)							calibration curve	r ²
	Concentration level (µg/mL)								
	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2	5		
No. 1	0.01	0.09	0.19	0.64	1.21	2.02	4.93	2886x+447.7	0.994
No. 2	0.01	0.11	0.21	0.67	1.22	2.02	4.92	2797x+501.2	0.993
No. 3	0.01	0.09	0.19	0.64	1.21	2.02	4.93	2886x+455.0	0.994

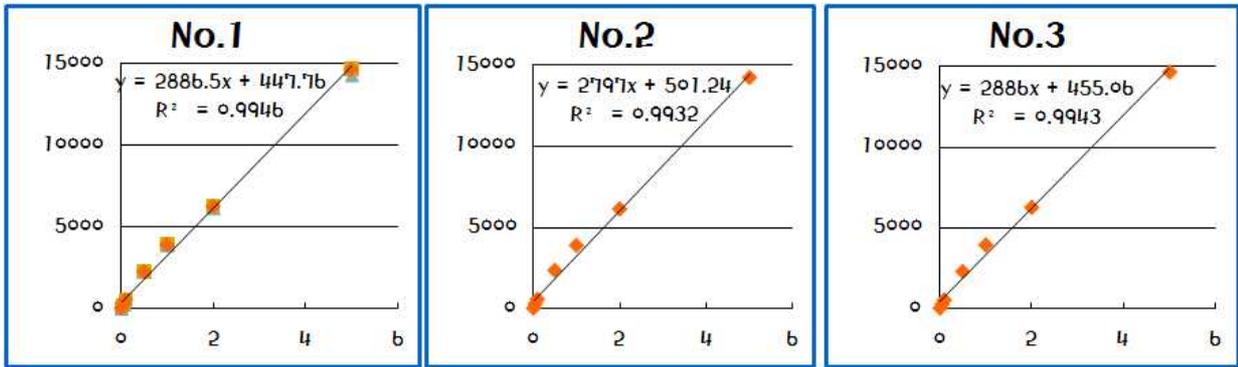


그림 36. Chloramphenicol의 직선성 분석 결과 chromatogram.

(다) 시스템 적합성 (system suitability)

세 개의 다른 vial에 같은 농도의 시료를 담고 각각 6회씩 기기에 injection을 하여 system suitability를 확인해 보았다. 검출된 각 peak를 적분하여 검량한 농도로 precision을 확인해 본 결과 모두 5 %이하였다(표 22). 밑의 3가지 chromatogram은 각 vial마다 6회씩 반복 분석한 chromatogram을 겹쳐 보인 그림이다(그림 37).

표 22. Chloramphenicol의 시스템 적합성 분석 결과

Replicates	Hole 1	Hole 2	Hole 3
1	4.112	4.128	4.193
2	4.123	4.130	4.205
3	4.144	4.212	4.240
4	4.117	4.225	4.366
5	4.144	4.228	4.453
6	4.148	4.185	4.441
Mean	4.131	4.185	4.316
SD	0.015	0.045	0.118
CV	0.384	1.088	2.740
Mean	4.211		
CV	2.513		
SD	0.105		

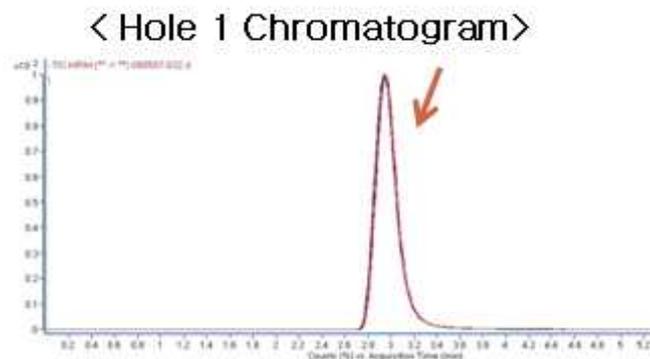


그림 37. Chloramphenicol의 시스템 적합성 분석 결과 chromatogram.

(라) 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) (1day)

분석의 정확도와 정밀도를 확인하기 위해 검량 범위 (0.01 ppm-5 ppm) 사이의 세 농도 (1, 2, 5 ppm)을 설정하고 각각 6회씩 반복 분석하였다. 앞서 수행했던 분석과 같은 방법으로 적분 검량하여 확인한 결과 accuracy는 모두 10 % 이하였고 precision은 5 % 이하로 분석에 적합함을 알 수 있었다(표 23).

표 23. Chloramphenicol의 정확성 및 정밀성 (1day) 분석 결과

replicates	Observed concentration (µg/mL)			Accuracy (%)		
	LoQC	MiQC	HiQC	LoQC	MiQC	HiQC
1	1.000	2.021	4.556	0.00	1.00	-8.80
2	1.018	2.019	4.481	1.00	0.50	-10.40
3	1.052	2.002	4.612	2.00	0.00	-7.80
4	1.027	2.016	4.551	1.00	0.50	9.00
5	1.043	2.033	4.528	4.00	1.50	9.40
6	1.003	2.007	5.000	0.00	0.00	0.00
Mean	1.013	2.011	4.621	1.33	0.58	-7.56
SD	0.013	0.010	0.173			
precision(%)	1.356	0.530	3.754			

(마) 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) (2day)

accuracy와 precision을 확인하는 방법과 같은 방법으로 다른 날짜에 분석을 수행하였다. 이 날의 분석 결과 역시 accuracy는 모두 10 % 이하였고 precision은 5 % 이하로 분석에 적합함을 알 수 있었다(표 24).

표 24. Chloramphenicol의 정확성 및 정밀성(2day) 분석 결과

replicates	Observed concentration (µg/mL)			Accuracy (%)		
	LoQC	MiQC	HiQC	LoQC	MiQC	HiQC
1	0.932	1.963	4.974	-7.00	-2.00	-0.60
2	1.000	2.000	4.993	0.00	0.00	-0.20
3	1.011	1.994	4.985	1.00	-0.50	-0.40
4	0.998	1.987	4.985	0.00	-0.50	-0.40
5	1.045	1.993	5.000	5.00	-0.50	0.00
6	1.006	1.983	4.978	1.00	-1.00	-0.60
Mean	1.000	1.985	4.982	0.00	-0.750	-0.367
SD	0.035	0.012	0.010			
precision(%)	3.559	0.633	0.214			

(바) 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) (inter day)

앞서 이틀간 확인한 accuracy와 precision을 모두 같이 확인하여, 날짜 간 분석의 accuracy

와 precision을 확인해 보았다. 역시 모든 결과 값에서 accuracy는 10 % 이하였고 precision은 5 % 이하로 분석에 적합함을 알 수 있었다(표 25).

표 25. Chloramphenicol의 정확성 및 정밀성(inter day)분석 결과

replicates	Observed concentration (µg/mL)			Accuracy (%)		
	LoQC	MiQC	HiQC	LoQC	MiQC	HiQC
1	1.000	2.021	4.556	0.00	1.00	-8.80
2	1.018	2.019	4.481	1.00	0.50	-10.40
3	1.052	2.002	4.612	2.00	0.00	-7.80
4	1.027	2.016	4.551	1.00	0.50	9.00
5	1.043	2.033	4.528	4.00	1.50	9.40
6	1.003	2.007	5.000	0.00	0.00	0.00
1	0.932	1.963	4.974	-7.00	-2.00	-0.60
2	1.000	2.000	4.993	0.00	0.00	-0.20
3	1.011	1.994	4.985	1.00	-0.50	-0.40
4	0.998	1.987	4.985	0.00	-0.50	-0.40
5	1.045	1.993	5.000	5.00	-0.50	0.00
6	1.006	1.983	4.978	1.00	-1.00	-0.60
Mean	1.010	2.000	4.800	1.00	-0.08	-3.97
SD	0.029	0.018	0.227			
precision(%)	2.883	0.926	4.741			

(5) 속성전처리 실험방법

(가) 속성 전처리 분석방법

세절하지 않은 시료 2 g에 Acetonitrile 5 mL와 Ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA) 1 mL를 넣고, handy shaking하여 추출한 뒤 syringe filter (PTFE 0.45 µm, 25 mm)를 이용하여 filter하였다. 추출액에 hexane 10ml을 넣어 충분히 흔든 뒤, 두 층으로 나뉘는 뒤 밑에 층을 받아 LC/MS를 이용하여 분석하였다(표 26).

표 26. Chloramphenicol의 속성 전처리 방법에 의한 회수율 결과

	Concentration (ppm)		Recovery (%)	
	Control	Recovery	Control	Recovery
소 (0.05ppm)	0	0.044	0	89.35
돼지 (0.05ppm)	0	0.043	0	87.65
닭 (0.05ppm)	0	0.039	0	79.41

(6) 속성전처리 kit 제작

(가) kit set 예상 모형

Syringe filter 사용 시 피스톤을 분리하는 불편함을 없애기 위해 피스톤에 뚜껑을 제작하여

고기와 추출 용매를 넣어 바로 추출하여 filter 할 수 있도록 하였다. 추출하는 동안에 용매가 빠지지 않게 하기 위해 콕크를 부착하였으며, 또한 filter 쪽으로 sample이 빠지는 것을 방지하기 위해 net 를 제작하였다. 액액 분리시 low 층의 용매 분석의 용이를 위해 콕크를 부착하였다(그림 38).

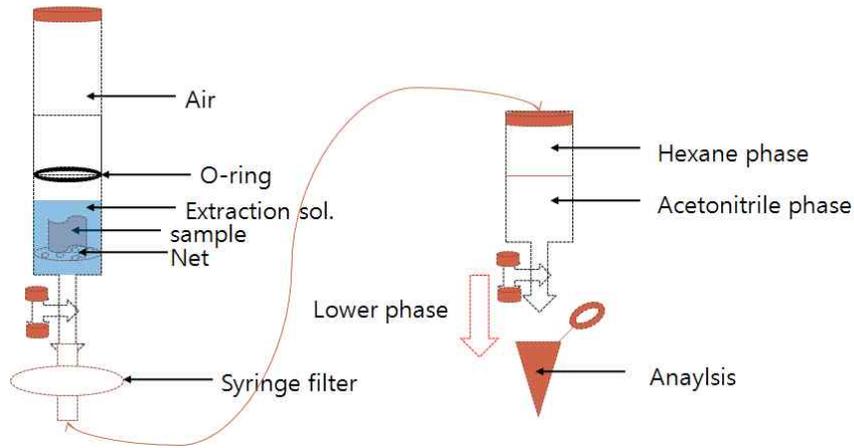


그림 38. chloramphenicol의 kit set 예상 모형.

(나) 실제 kit set 제작

위의 kit 예상 모형을 바탕으로 실제 kit를 제작 하였다(그림 39).

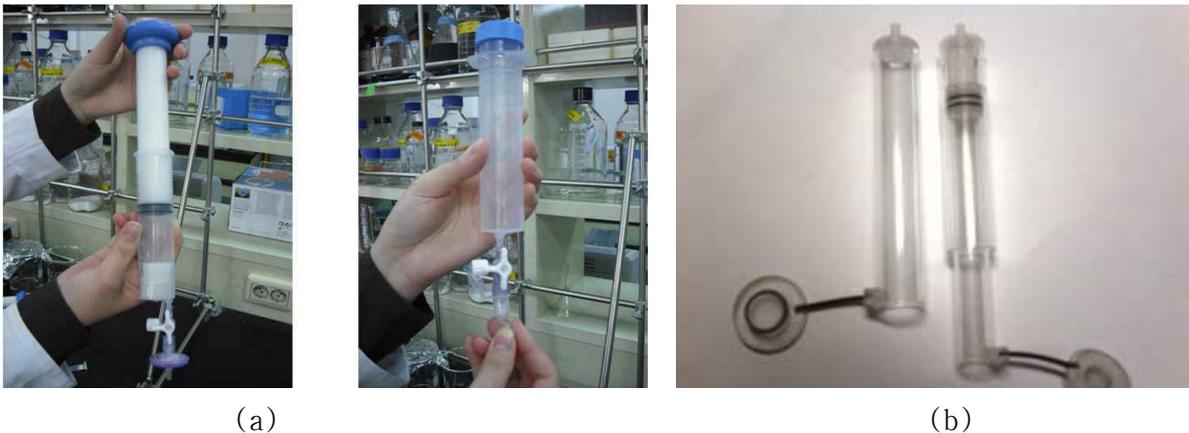


그림 39. Chloramphenicol의 실제 kit set 제작 (a)보완전의 kit set, (b)보완후의 kit set.

(7) 분석조건

(가) HPLC 분석조건

- Instrument : Agilent HPLC 1200 series
- Column : Luna C18 (150mm × 4.6mm, 5micron, Agilent)
- Mobile phase A : Water(0.1% CH₃COOH, 10 mM CH₃COONH₄)
- Mobile phase B : Acetonitrile (5% mobile phase A)
- Gradient : 0min(B conc. : 30%) - 2min(50%) - 5min(90%) - 6min(90%) - 6.1min(30%) - 8min(30%)

- Column temperature : 40 C
- Injection volume : 5 μ l
- Flow rate : 0.8 mL/min

(나) MS 분석조건

- Mass spectrometer Agilent 6410 MS/MS
- Ionization Electrospray ionization (ESI)
- Ion mode Negative-ion mode
- Capillary voltage 4.0 kV
- Capillary temperature 350 C
- Collision gas Nitrogen
- Collision gas pressure 1.5 mTorr
- Collision energy 5 V

- Multiple-reaction monitoring (MRM)

Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)
321	257, 194, 176, 152*
*quantification ion	

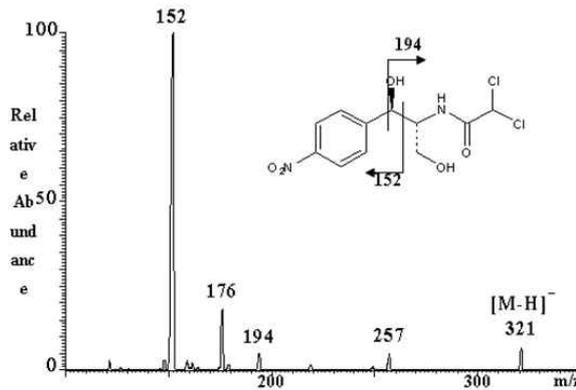


그림 40. LS/MS spectrum of chloramphenicol in negative-ion mode.

3. 협동기관 부산대학교

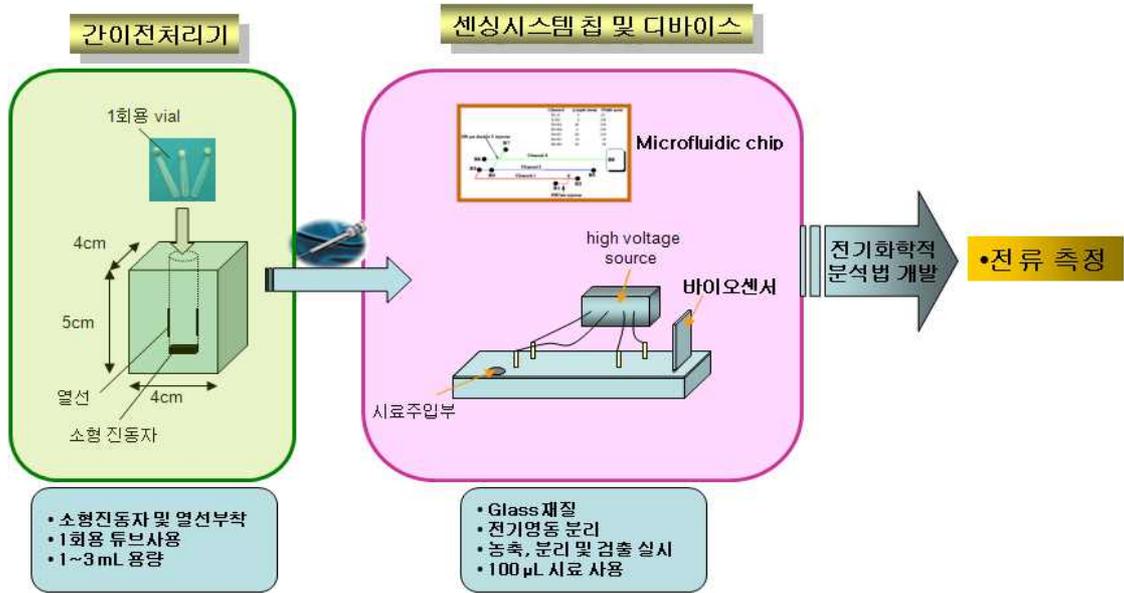
가. 협동기관 부산대학교

(1) 축산품 중 잔류 항생제 측정을 위한 전기화학 센싱시스템 개발

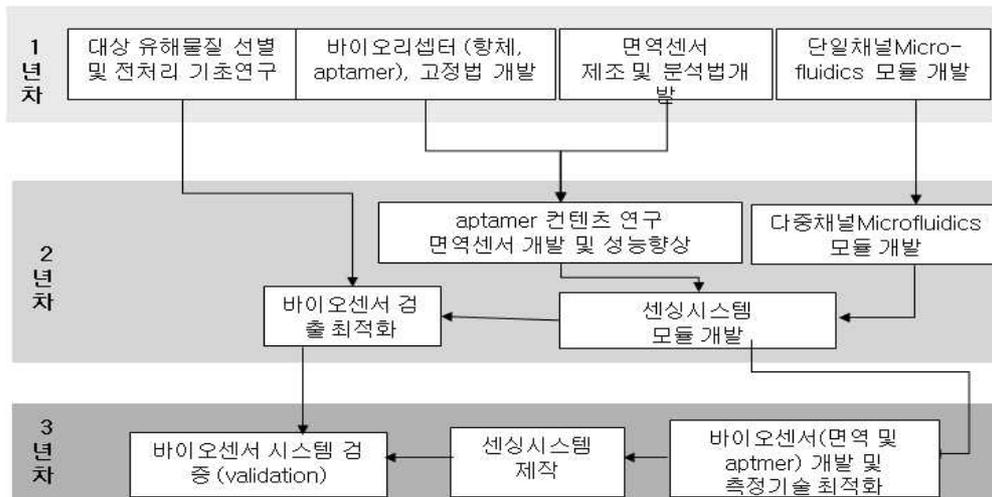
(가) 연구개발 목표 및 추진체계

① 연구개발 목표 및 센싱시스템 구성도

- 항생제와 선택적으로 감응하는 항체, 효소, aptamer 등의 바이오 리셉터 개발.
- 바이オリ셉터가 고정된 전기화학적 바이오센서 개발.
- 시료의 주입, 분리부로 구성된 마이크로플루이딕 칩과 전기화학적 바이오센서로 구성된 센싱시스템 개발.
- 축산품에 포함된 항생제를 간편하게 추출할 수 있는 소형 전처리기 개발.



(나) 연차별 추진체계



(2) 대상항생제

1-3차 년도에 선택한 대상 항생제는 TC, CTC, OTC, DTC, 등 테트라사이클린계 4종과 클로르암페니콜(CAP) 등 총 5종의 항생제를 선택하여 전기화학적인 검출법을 연구 하였음.

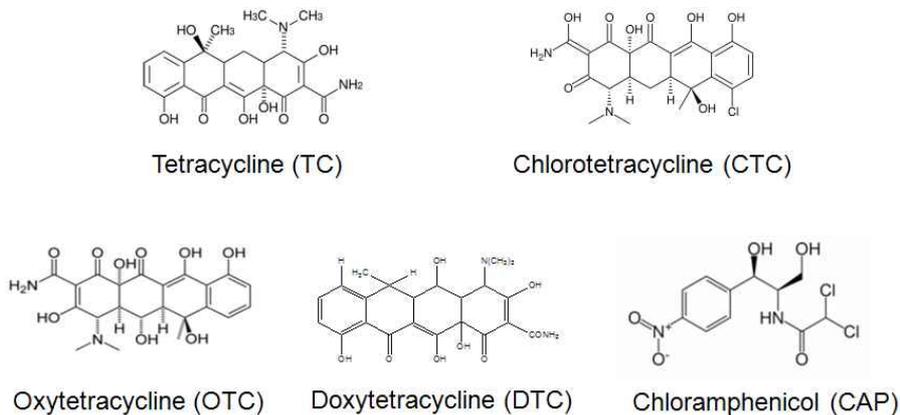


그림 41. 선택한 대상 항생제.

(3) 항생제 검출을 위한 바이오센서 개발

(가) 테트라사이클린계 분석을 위한 cellulose-dsDNA 바이오센서 제작

- 테트라사이클린계 4종의 검출을 위해 바이오센서 제작
- 항생제의 -OH 작용기와 강하게 상호작용을 하는 dsDNA를 사용하여 바이오센서 제작
- 불용성 DNA를 감응물질로 사용하기 위해 cellulose와 결합된 이중나선 DNA (cellulose-dsDNA)를 적당한 비율로 탄소가루 및 미네랄오일과 혼합하여 탄소반죽 제조
- 제조된 탄소반죽을 지름 1mm의 모세관에 채워 넣어 탄소반죽 전극 (carbon paste electrode, CPE) 제작

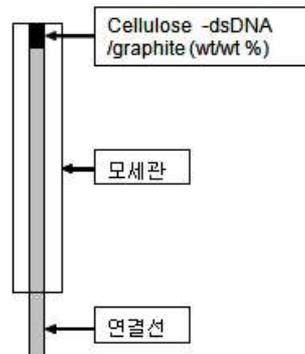


그림 42. 탄소반죽전극의 구조.

(나) CAP 분석을 위한 면역센서 제작

- 나노크기의 금입자를 GCE 표면에 입힌 후 전기화학적으로 기능성 전기전도성고분자를 형성시킴
- 전기전도성고분자의 작용기와 CAP항체(CAP-Ab)를 공유결합 시킴
- CAP-Ab에 hydrazine가 label된 CAP 항원(CAP-Ag)를 반응시켜 면역센서 probe를 제작

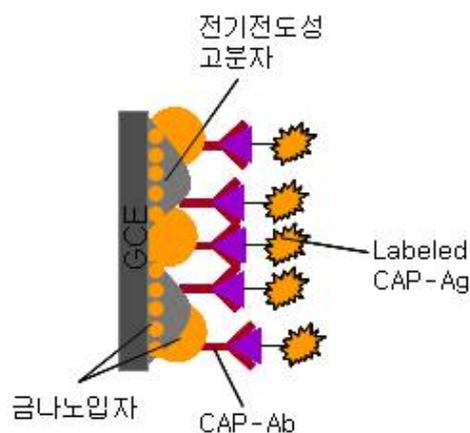


그림 43. 면역센서 표면 구조.

(4) 간이전처리기 제작 및 간이전처리법 개발

(가) 간이전처리기 제작

- 재질: 아세탈 수지
- 전원: 220 V
- 크기: 지름 5cm, 높이: 10cm

- sonicator내장
- 1회용 vial을 사용하여 시료별 전처리를 간편하게 할 수 있음
- 전 처리된 용액 주입 시 필터가 부착된 주사기를 사용하여 분석 chip에 용액을 바로 주입



그림 44. 전처리 및 용액주입기.

(나) 간이전처리법 개발

- 대상검체 : 식육류소고기, 돼지고기 닭고기에 들어있는 테트라사이클린계 항생제 중 테트라사이클린 (Tetracycline), 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline), 클로르테트라 사이클린(Chlortetracycline) 및 독시테트라사이클린(Doxytetracycline) 4 가지 및 CAP를 대상 검체에 주입한 후, 분리 검출 및 회수율 조사
- 간이 전처리 방법 : 메탄올 함유 수산에 시료를 녹여 sonication 한 후 Sep-pak(C-18) 카트리지를 통과시켜 흡착 시켜 0.01 M 메탄올성 수산용액(methanolic oxalic acid)로 용출시켜 측정

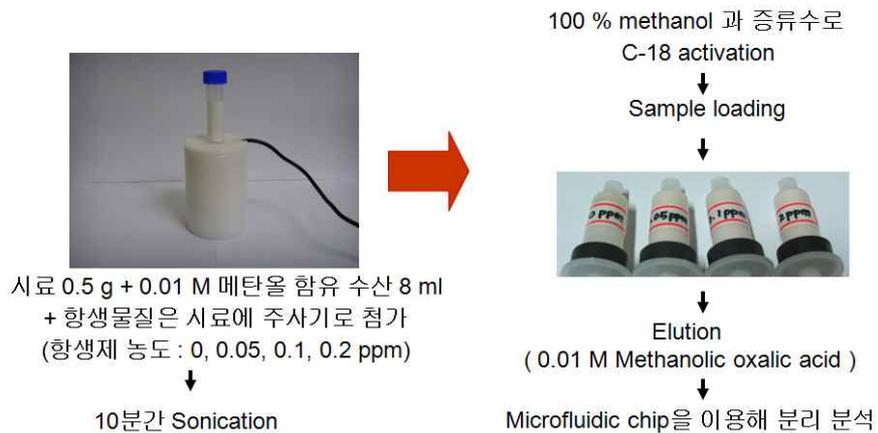
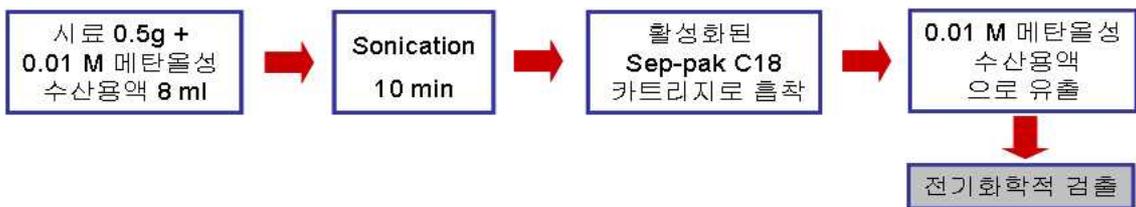


그림 45. 간이전처리법 과정.

(5) Microfluidic chip 제작 및 항생제유사 혼합물을 이용한 분리/검출 특성연구

(가) Microfluidic chip 제작

- Borosilicate 유리를 애칭하여 제작하였다
- 시료용액, 완충용액 주입부 및 폐액배출부 설치 : 시료용액 주입부를 통하여 간이전처리 된시료 용액을 도입하고, 완충용액 주입부를 통하여 을 분리/시험채널 내로 이동시킨다.
- 1차 년도에는 단일채널을 2,3차 년도에는 다중채널(3채널) microchip을 제작하였다.

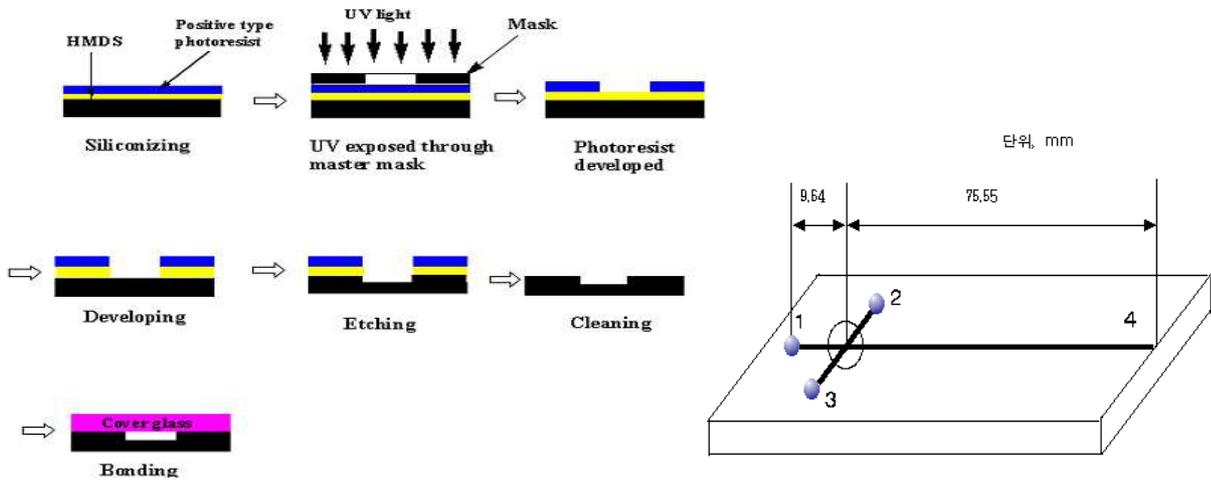


그림 46. Microfluidic chip (glass chip) 제작과정 및 단일채널 chip 구조.

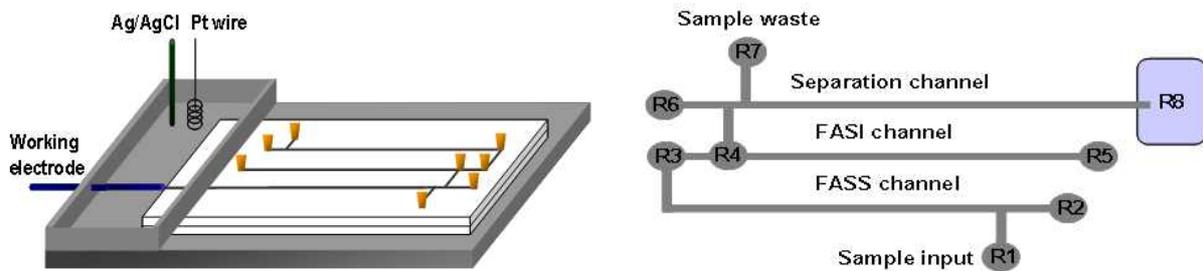


그림 47. 다중채널(3채널) chip 구조.

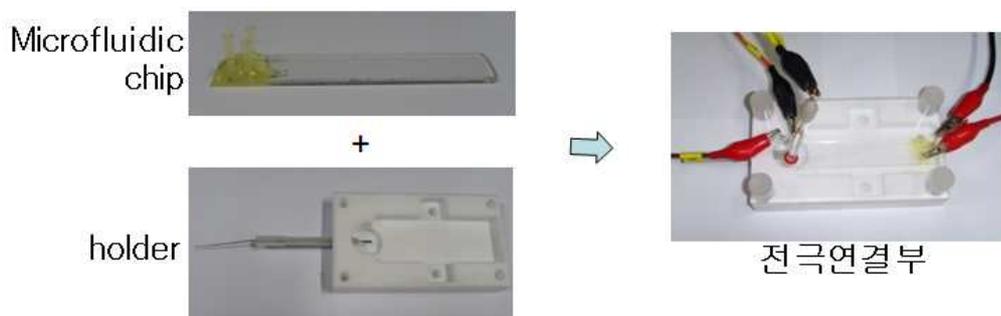


그림 48. microfluidic chip, chip holder 및 전극연결.



그림 49. microfluidic chip 시스템 및 간이전처리기 결합도.

(나) capillary electrophoresis(CE) 시스템을 이용한 분리법 개발

① 분리법 : 항생제 유사 혼합물의 정성 및 정량분석을 위한 CE 시스템은 high voltage power source, microfluidic device로 구성되어 있으며 개략도는 그림과 같다. High voltage power source는 모세관의 양 끝에 고전압을 가하여 모세관내에서 시료들의 하전 크기에 따른 이동도의 차이를 이용하여 성분들을 분리하는데 사용된다. microfluidic device는 전기화학검출 (electrochemical detection, EC) 센서와의 연결을 위해 끝 부분을 cutting 하였으며, pipett tip을 이용하여 washing reservoir, sample reservoir 및 waste reservoir를 부착하였다.

다. Microfluidic chip을 이용한 항생제 유사혼합물 분리 및 전기화학적 검출

② 대상물질: 항생제와 유사한 구조를 가지는 Brilliant blue FCF (B1), indigo carmine (B2), fast green FCF (G3), Amaranth (R2), erythrosine (R3), allura Red (R40), tartrazine (Y4), and sunset yellow FCF (Y5) 등 8종의 유기화합물

③ 센서 : 원통형 유리질탄소전극 (glassy carbon electrode, 직경 3mm)

④ 검출조건

- 검출전압 : Microfluidic chip의 분리채널에서 분리 되어져 나오는 물질들의 검출전압은 모든물질의 산화가 일어나는 전위인 950 mV 로 정하였다(순환전압전류법으로 확인)

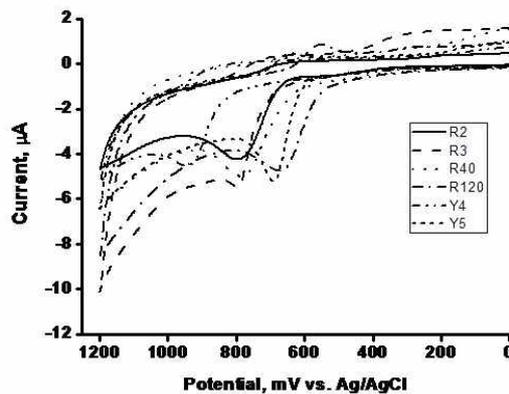


그림 50. 염료 8종의 전압전류곡선.

- 분리용액: 2% Sodium dodecyl sulfate + 20 mM acetate buffer (pH2.1)
- 검출용액 : 10 mM Phosphate buffer (pH 7.0)
- 분리전압: -200 V/cm
- 시료주입 시간 및 전압: 5초, -100 V/cm
- 시료양 : 100 μ L

⑤ 단일채널 microfluidic chip을 이용한 분리 및 전기화학적 검출 결과

- 8종을 혼합한 용액을 microfluidic chip에 주입하고, 센서에 산화전위를 가하여 전류법으로 검출함
- 8종 혼합물의 각 화합물의 농도는 5 nM 임
- 시료 주입 후 100초 이내에 8종의 혼합물 모두가 성공적으로 분리, 검출됨
- 검출한계는 1.25 nM 임

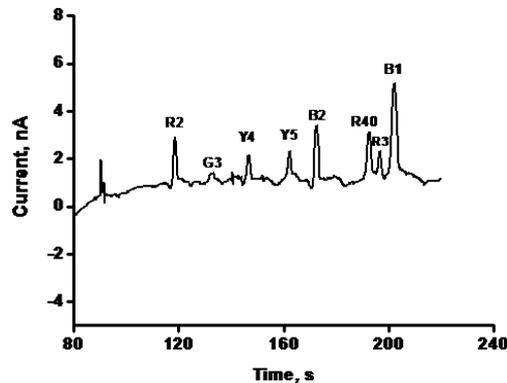


그림 51. 8 종의 혼합물에 대한 Electrophoregram.

(6) 다중채널 microfluidic chip을 이용한 테트라사이클린계 항생제의 전기화학적 분석법 개발

(가) 테트라사이클린계 항생제의 산화전위

- cellulose-dsDNA와 탄소가루가 혼합된 CPE(40% (w/w))를 센서로 사용
- TC, CTC, OTC 및 DTC의 농도를 0.1 mM로 조절(pH 7.0 phosphate buffer)
- 700 ~ 800 mV 범위에서 4종의 항생제의 산화전류가 흐름

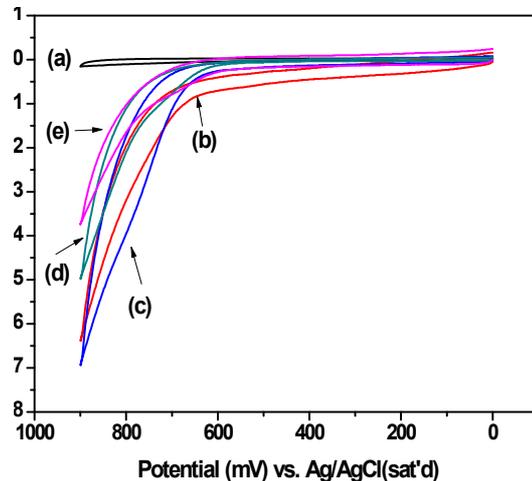


그림 52. 테트라사이클린계 4종의 전압전류곡선.

(나) 농축 및 분리메커니즘

- 전처리된 시료의 주입, 농축 및 분리가 하나의 칩 위에서 이루어 질 수 있도록 3개의 채널을 설치.
- 시료용액, 완충용액 주입부 및 폐액배출부 설치 : 시료용액 주입부를 통하여 간이전처리 된시료 용액을 도입하고, 완충용액 주입부를 통하여 을 분리/시험채널 내로 이동시킨다.
- 항생제 혼합물의 정성 및 정량분석을 위해 **capillary electrophoresis(CE)** 시스템을 사용하며 모세관의 양 끝에 고전압을 가하여 모세관내에서 시료들의 하전 크기에 따른 이동도의 차이를 이용하여 성분들을 분리함.
- 전기화학검출 (electrochemical detection, EC)을 위해 바이오센서를 분리채널의 끝부분에 설치하여 분리되어져 나오는 항생들은 전기화학적으로 검출.

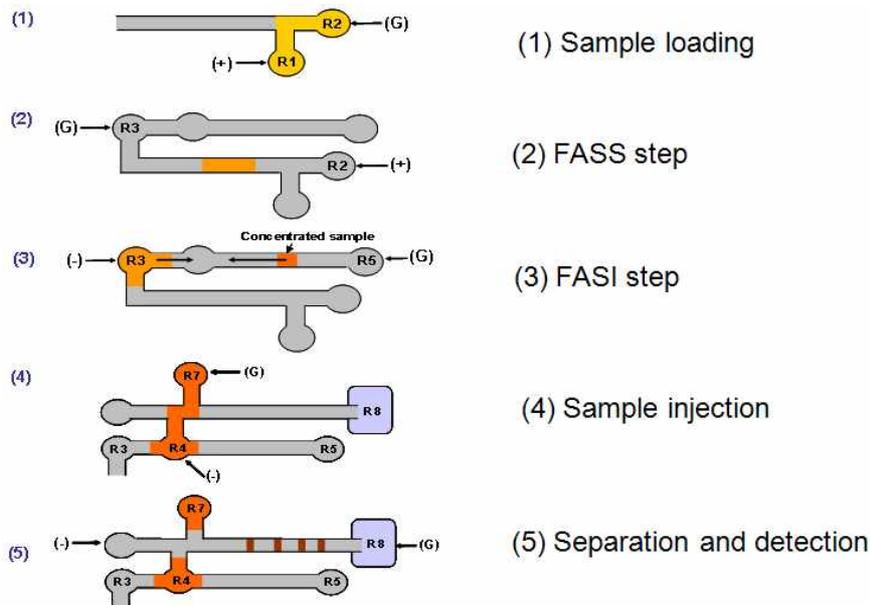
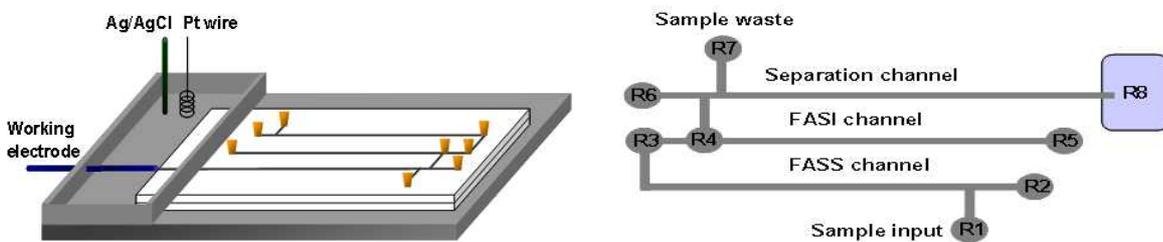


그림 53. 다중채널(3채널) 칩을 이용한 항생제 농축 및 분리과정.

(다) microfluidic chip의 분리 특성

- ds-DNA가 들어있는 바이오센서와 ds-DNA가 들어있지 않는 bare CPE를 비교.
- OTC, CTC, TC 및 DTC의 농도는 6×10^{-7} M 임.
- 분리전압: 2kV, 시료주입시간: 5초, running buffer: 10 mM acetate with 10 mM SDS (pH 4.2) detection buffer 10 mM acetate buffer (pH 4.2). 시료 주입량: 100 μ L, 검출

전압: 0.9V

- ds-DNA가 들어있지 않는 bare CPE는 항생제 검출 불가.
- ds-DNA가 들어있는 바이오센서는 검출이 가능하며, 200 초 이내에 4종의 항생제 분리 검출이 완료됨.
- 각 항생제별 migration time, half-peak width 및 N(이론단수)는 표와 같음.

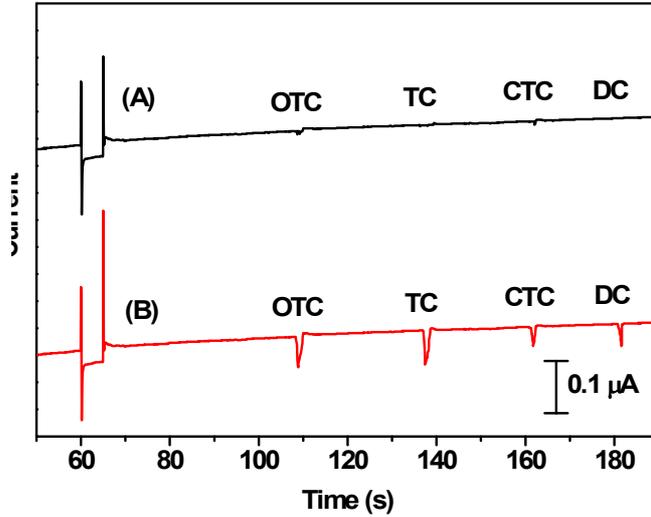


그림 54. 항생제의 Electrophoretogram.

표 27. 항생제 분리 특성

Analyte	Migration time (T_R , s)	Half-peak width ($W_{1/2}^a$, s)	N^b
Tetracycline	40 ± 0.5	1.6 ± 0.3	~ 4300
Oxytetracycline	70 ± 0.6	1.44 ± 0.5	~ 31162
Chlortetarycline	100 ± 0.9	1.3 ± 0.5	~ 30190
Doxycycline	120 ± 1.1	1.76 ± 0.4	~ 24062

(라) 다중채널 chip을 이용한 농축효율 향상 및 농축최적 조건 연구

① FASS와 FASI 단계 도입을 통한 농축효율 향상

- 기존의 방법은 MEKC 방법을 사용함(A).
- FASS와 FASI 단계를 수행하는 2개의 채널을 사용하여 항생제의 농축효과 조사(B).
- Separation buffer, acetate buffer containing 10.0 mM SDS (pH 4.2) ; separation field strength, -300 V/cm; injection time, 5 s at -250 V/cm; and DP, $+0.9$ V vs Ag/AgCl.
- FASS와 FASI 단계를 수행하는 2개의 채널을 사용할 경우 10,900배의 감도 향상.

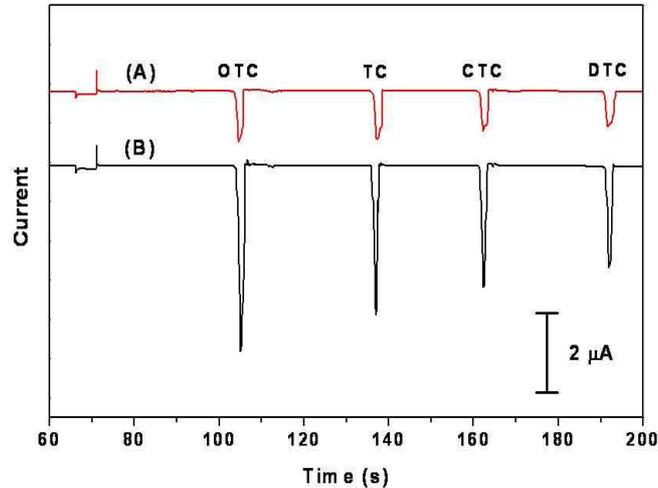


그림 55. FASS와 FASI 단계에서의 Electrophoregram.

(A) FASI step : Sample concentration 1 μM

(B) FASS and FASI steps : Sample concentration 8.5 nM

② 농축효율 향상을 위한 FASS와 FASI 단계 최적화

- PBS 완충용액의 농도 변화에 따른 감도 변화를 조사한 결과, 완충용액의 농도가 100 mM에서 최대의 감도를 나타냄.
- water flug의 길이가 60 mm 일 때 최대의 감도를 나타냄.
- 농축시간의 영향을 조사한 결과, 65초 농축시간에서 최대의 감도를 나타냄.

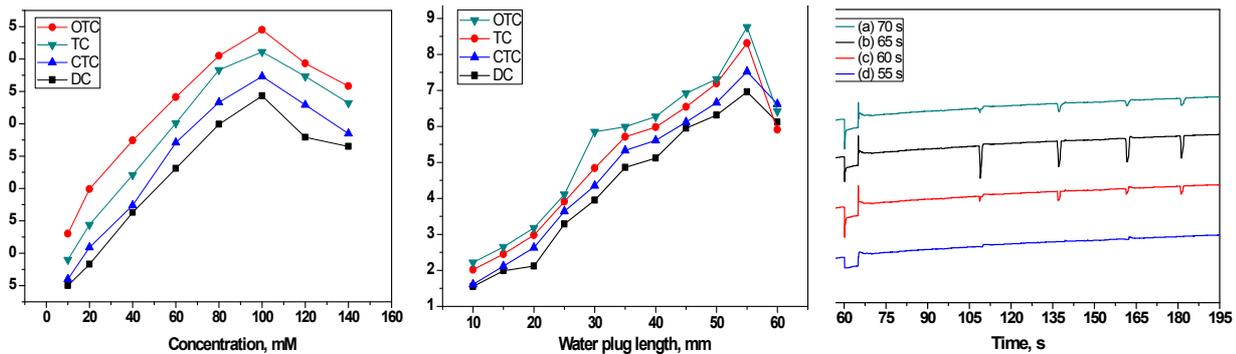


그림 56. 농축 최적조건.

(바) 항생제 표준시료를 이용한 검량선 및 검출한계 연구

① 최적분석 조건

- Detection potential : 0.9 V (vs. Ag/AgCl)
- FASS buffer : 100 mM PBS (pH 9.0)
- FASI buffer : 100 mM acetate buffer (pH 2.5)
- Separation buffer : 10 mM acetate with 10 mM SDS (pH 4.2)
- Detection buffer : 10 mM acetate buffer (pH 7.0)
- Runnig Voltage : -2 kV

- Sample injection time, voltage : 5s, -2kV
- Amount of sample : 100 μ L
- Electrode : 40 % Cellulose-dsDNA modified Carbon paste electrode

② 검량선 및 검출한계

- 최적분석 조건에서 전류법으로 분리되어져 나오는 항생제들을 검출
- 직선감응 범위 및 검출한계는 표와 같음.

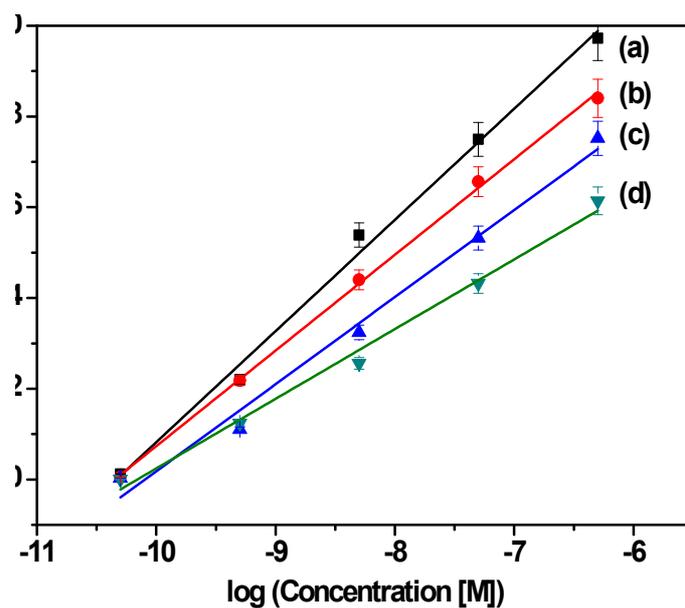


그림 57. 항생제 4종의 검량선.

표 28. 검량선 특성 및 검출한계

analytes	response precision (%RSD, n=5)	dynamic range (nM)	detection limit ¹ (nM)
Tetracycline	6.3	8.2 - 500	~ 4.3
Oxytetracycline	5.8	7.5 - 500	~ 1.5
Chlortetracycline	6.1	9.1 - 500	~ 1.9
Doxycycline	5.2	10.3 - 380	~ 2.1

1. The LOD was determined when the S/N was 3.

(사) 실제시료 분석 및 회수율 연구

① 실제시료(쇠고기) 분석

- 식품공전법 및 간이전처리를 이용하여 쇠고기 시료에 들어 있는 테트라사이클린계 4종의 항생제를 검출
- 시료에 항생제 표준용액을 0.05, 0.20, 0.50 ppm을 주입하여 표준물 첨가법으로 쇠고기

시료의 항생제 검출.

- 분리 및 검출 최적조건에서 측정
- 쇠고기에서 테트라사이클린계 4종의 항체제를 검출되지 않음.

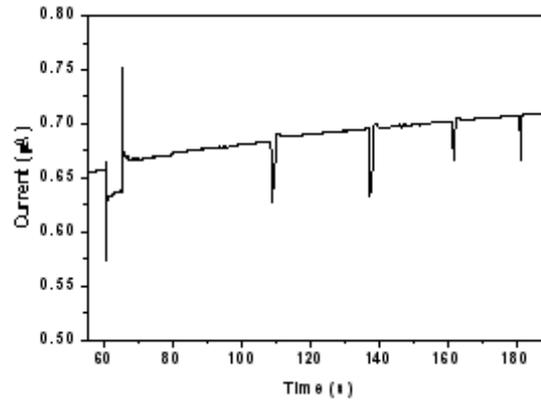


그림 58. 식품공전법에 의한 쇠고기 시료 분석

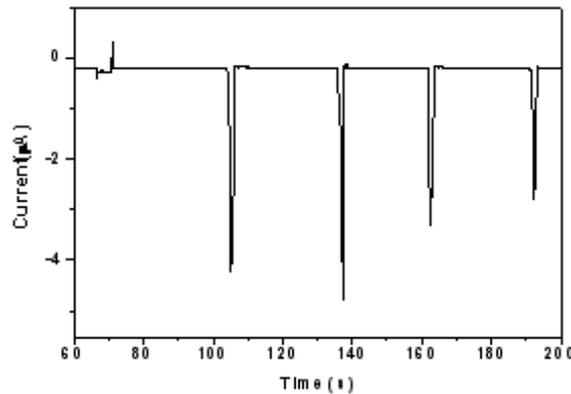


그림 59. 간이전처리법에 의한 쇠고기 시료 분석

② 회수율 연구

- 식품공전법 및 간이전처리를 이용하여 쇠고기 시료에 들어 있는 테트라사이클린계 4종의 항체제를 검출
- 시료에 항생제 표준용액을 0.05, 0.20, 0.50 ppm을 주입하여 표준물 첨가법으로 쇠고기 시료의 항생제 검출
- PBS에 녹인 항생제표준용액의 신호를 100으로 함.
- microfluidic chip을 이용하여 검출
- 간이전처리법의 회수율 및 재현성이 식품공전법 전처리보다 우수 함.

표 29. 식품공전법 전처리 회수율

Sample	Spiked (mg/kg)	TC		OTC		CTC		DC	
		Rev ¹	CV ²						
Beef	0.05	70	15	73	14	69	16	68	15
	0.2	73	14	75	13	70	16	69	11
	0.5	72	14	75	13	74	13	70	13

표 30. 간이전처리법 회수율

Sample	Spiked (mg/kg)	TC		OTC		CTC		DC	
		Rev ¹	CV ²						
Beef	0.05	85	15	86	15	83	12	80	11
	0.2	86	11	89	12	89	15	80	12
	0.5	89	12	93	13	90	13	82	13

(7) 고감도 면역센서를 이용한 클로르암페니콜(CAP)의 전기화학적 분석법 개발

(가) 측정원리

- 측정대상 항생제인 클로르암페니콜(Free CAP-Ag)이 포함된 용액에 면역센서를 넣으면, 경쟁반응에 의해 Free CAP-Ag이 면역센서와 결합함.
- label CAP-Ag에서 발생하는 과산화수소의 환원전류가 줄어듦.
- 전류 감소로부터 Free CAP-Ag의 농도를 분석 함

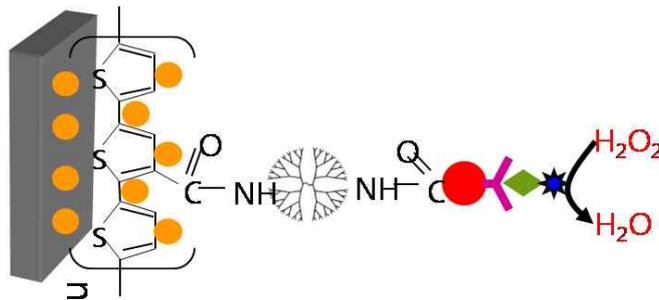


그림 60. 면역센서의 표면구조.

(나) 전류법을 이용한 면역센서의 감응특성

- pH 6.0 완충용액에 0.4 mM의 H₂O₂를 연속적으로 첨가하여 면역센서의 H₂O₂의 농도에 따른 전류변화를 관찰 함.
- 측정전압은 -0.35V 임.
- H₂O₂ 농도가 증가하면 전류가 직선적으로 증가됨.
- 90% 신호 도달에 걸리는 시간은 40초.
- label 된 hydrazine에 의해 과산화수소의 환원이 정상적으로 일어남을 확인.

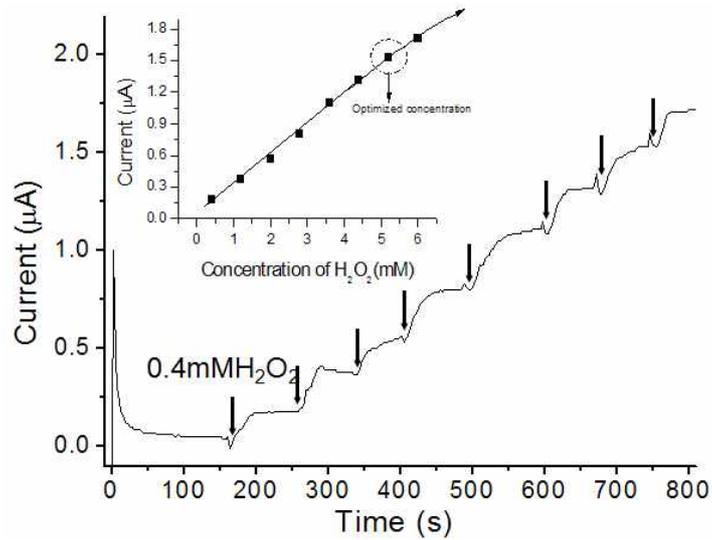


그림 61. H₂O₂의 농도에 따른 면역센서의 전류변화.

(다) QCM을 이용한 면역센서 각 성분의 흡착 및 고정량 조사

- Quartz crystal microbalance(QCM)을 이용하여 면역센서 제조시 각 성분의 흡착량을 조사
- Dnedrimer, Q-dot 및 항체의 흡착량은 각각 437.47, 149.49, 192.35 ng/cm³ 이었으며, 안정적으로 센서표면에 고정 됨을 확인.

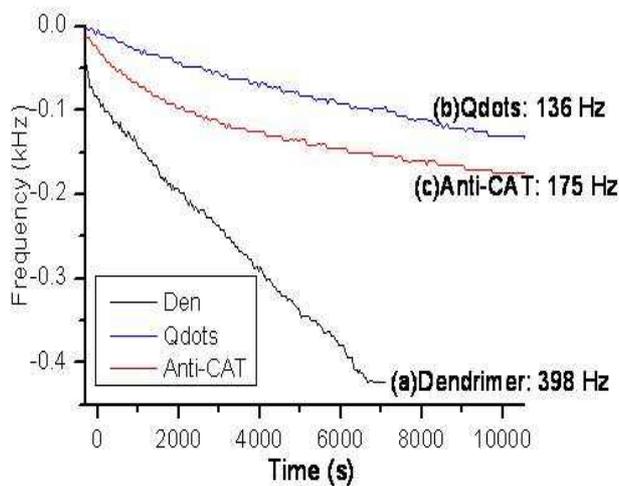


그림 62. QCM을 이용한 흡착량 조사.

(라) 검량선 작성

- 검출한계: 45 pg/L
- 직선 검출범위: 50 ~ 950 pg/mL

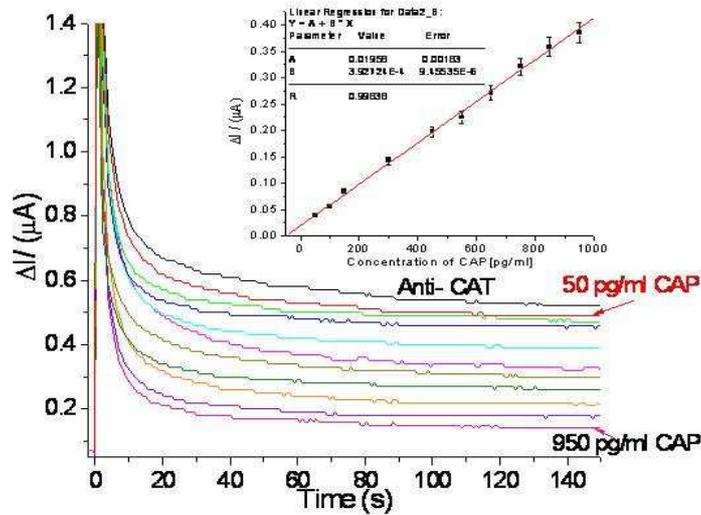
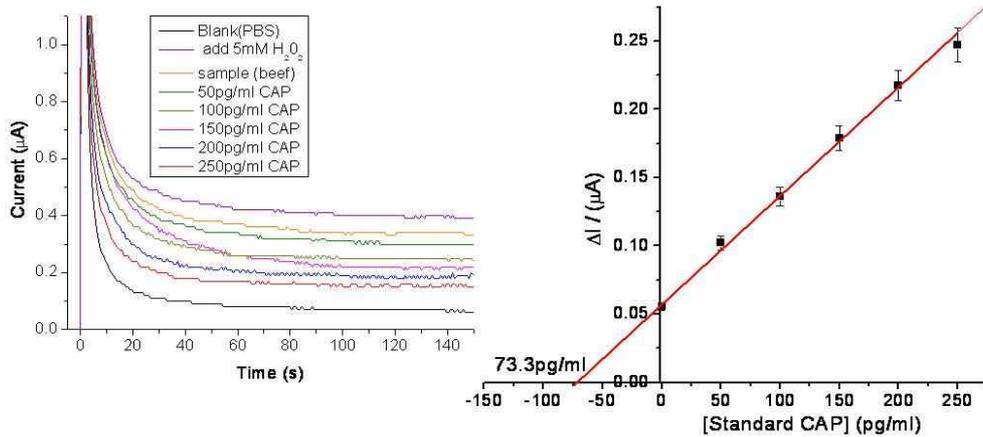


그림 63. 면역센서를 이용한 클로르암페니콜 검량선.

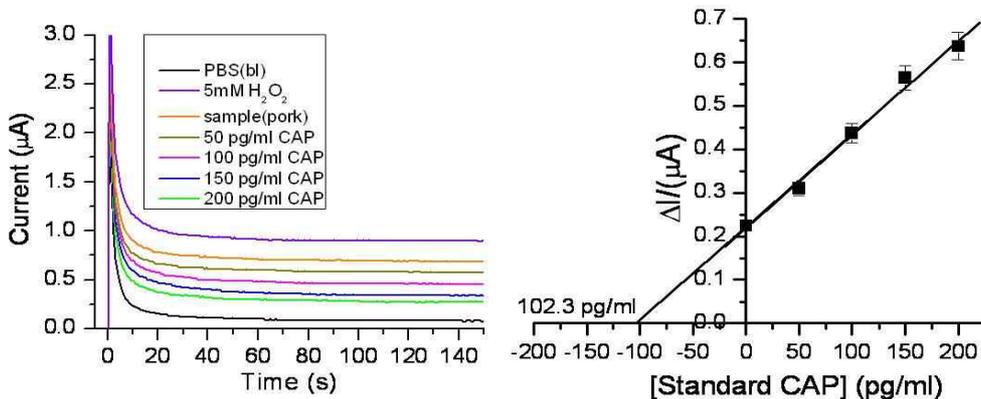
(마) 실제시료 분석

- 간이전처리를 이용하여 쇠고기, 돼지고기 및 닭에 들어 있는 클로르암페니콜 분석.
- 시료에 항생제 표준용액을 주입하여 표준물 첨가법으로 실제시료의 클로르암페니콜 검출.
- 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기에서 1.10262, ng/g, 2.046 ng/g, 3.092 ng/g 클로르암페니콜 검출.

소고기



돼지고기



닭고기

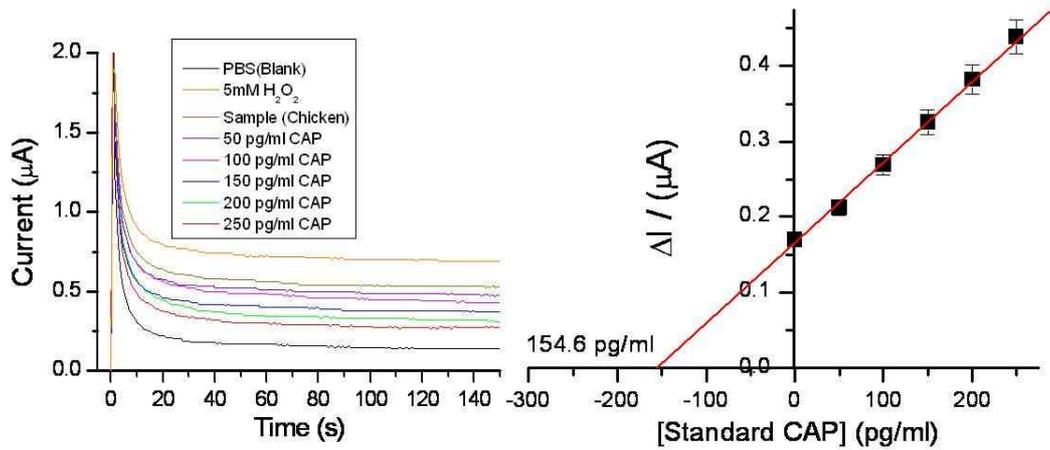


그림 64. 면역센서를 이용한 실제시료의 클로르암페니콜 농도측정.

(바) 분석시스템의 평가

- 전 처리한 실제시료(쇠고기, 돼지고기 및 닭고기)를 LC로 분석하여, 면역센서로 측정된 결과값과 비교.
- 클로르암페니콜 표준용액 1, 2, 3, 5, 10 ppb 용액으로 LC를 이용하여 검량선 작성
- $r = 0.99698$, $y = 16.3567 * x + 2.8928$

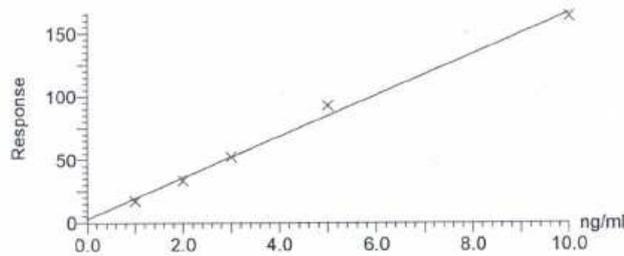


그림 65. LC를 이용하여 작성한 검량선.

- 쇠고기 및 닭고기의 경우 LC 가 면역센서보다 결과 값이 조금 크게 나오고, 돼지고기는 비슷한 값을 나타냄.
- LC 결과와 비교해 볼 때, 개발한 면역센서의 측정값은 크게 차이가 나지 않으며 따라서 클로르암페니콜의 새로운 간편 분석법으로 활용 가능.

표 31. 면역센서 및 LC를 이용한 클로르암페니콜 분석 결과

검체	면역센서(ppb)	LC(ppb)
쇠고기	1.03	6.85
돼지고기	2.05	2.34
닭고기	3.09	6.65

(8) 센서시스템의 최종 사양 및 특성

- 구성: 휴대형 전 처리기, CE microfluidic chip 및 디바이스, 면역센서
- 센서 : cellulose-dsDNA 변성 바이오센서 및 항체가 고정된 전기화학적 면역센서
- 축산시료: 쇠고기, 돼지기, 닭고기
- 전처리시간: 10분
- 분리및검출시간(부피) : 10분(100μL)
- 검체량: 0.25 ~ 0.5 g
- 검출한계 : ~ 0.05 ppb

나. 위탁기관 포항공과대학교

(1) SELEX를 이용한 항생제의 압타머 개발

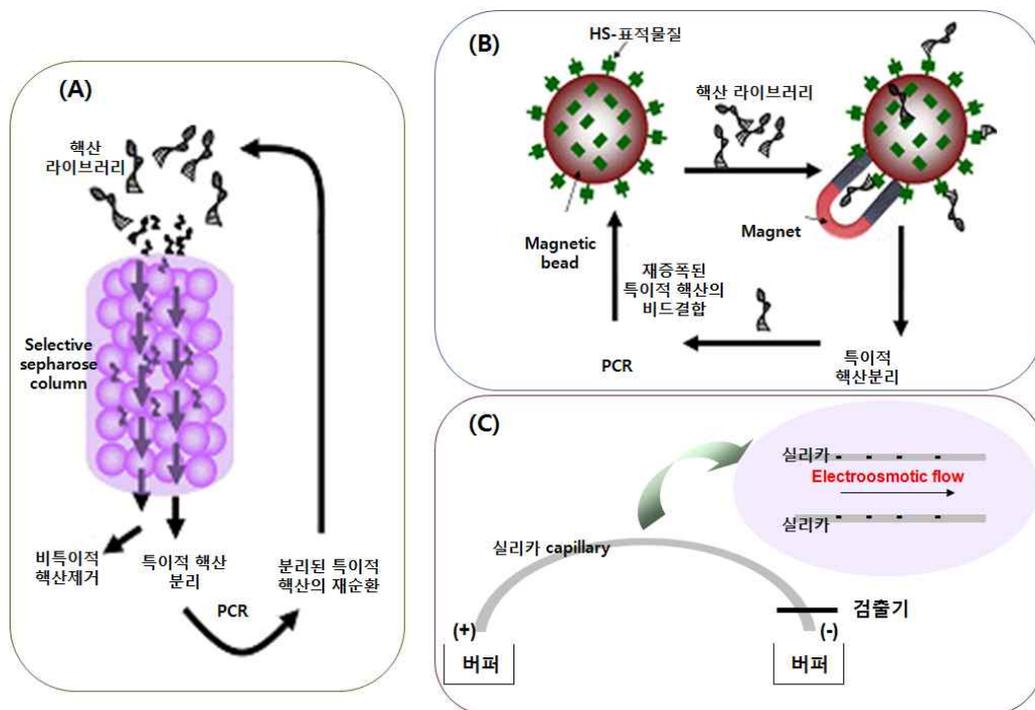


그림 66. 여러 가지 방법을 응용한 SELEX 모식도.

다양한 염기서열을 가진 ($>10^{15}$ 이상의 다양한 서열을 가진) 핵산 라이브러리로부터 표적 분자와 높은 결합력을 갖는 서열의 핵산, 즉 압타머를 찾아내는 실험 기술을 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), 또는 in vitro selection이라 한다. SELEX 기술은 [① 핵산 라이브러리와 표적 분자인 항생제의 결합 - ② 결합된 핵산 라이브러리와 결합하지 않은 핵산 라이브러리 분리 - ③ 분리된 핵산 라이브러리의 증폭]의 과정을 되풀이하여 가장 결합력이 높은 핵산, 즉 압타머를 분리하게 되는 기술이다. 본 연구진은 저분자인 항생제의 압타머를 찾기 위해 위의 그림과 같이 세 가지 방법을 디자인하여 SELEX를 진행하였다. 높은 농도로 표적 분자를 고정화하기 위해 sepharose 비드에 항생제를 고정화하여 친화성 크로마토그래피법을 이용하였고(A), 결합된 핵산 라이브러리를 쉽고 빠르게 분리하기 위해 자성비드에 항생제를 고정화하여 자성의 성질을 이용하였으며(B), 동일한 과정을 반복하는 스텝을 줄이고 항생제의 고정화 과정이 필요없는 CE (Capillary Electrophoresis) 방법을 이용하였다(C).

다음은 항생제 (kanamycin, ampicillin, sulfadimethoxine)를 표적 분자로 분리한 핵산에 대하여 얻은 % 결합력 (% binding)을 그래프로 나타낸 것이다. 여기서 % 결합력은 [결합한 핵산 라이브러리]/ [처음 사용한 핵산 라이브러리] * 100의 값이다.

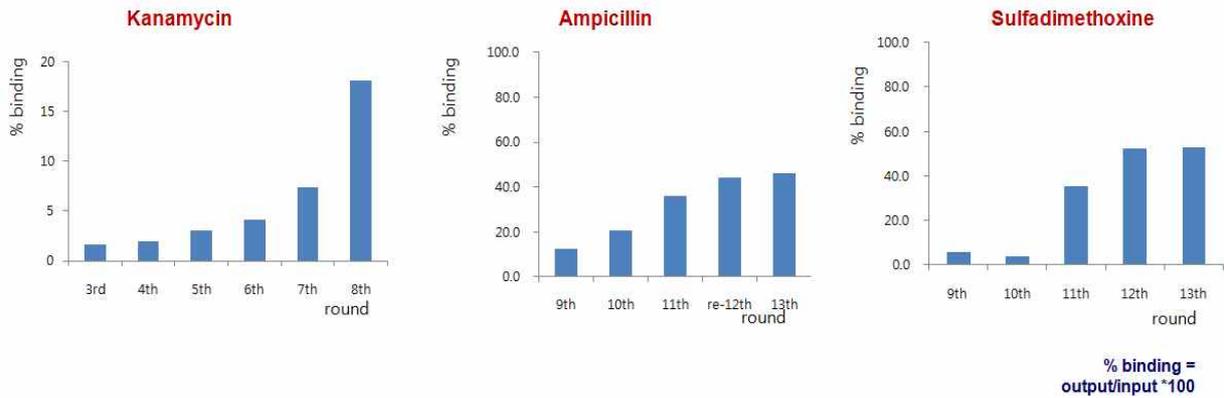


그림 67. 각 표적 분자 (kanamycin, ampicillin, sulfadimethoxine)에 대한 % 결합력.

분리한 핵산 라이브러리는 염기 서열을 분석하고 2차 구조를 예측하여 실제로 항생제와의 결합을 확인하였다. 이 과정을 통해 개발한 kanamycin의 압타머는 21mer로 다음과 같은 염기서열로 이루어져 있으며, stem과 loop 부분으로 구조를 이룰 것이라 예측되었다.



그림 68. Kanamycin의 압타머 염기서열 및 예측된 2차 구조.

또한 ampicillin과 sulfadimethoxine 역시 클로닝을 통해 염기 서열을 분석하였고, 항생제와 결합할 것이라고 생각되는 motif를 예측하였다. 항생제와의 결합력을 확인하고 있으며 이는 압타머로 개발되어 각 항생제를 검출하는 바이오물질로 응용될 것이다.

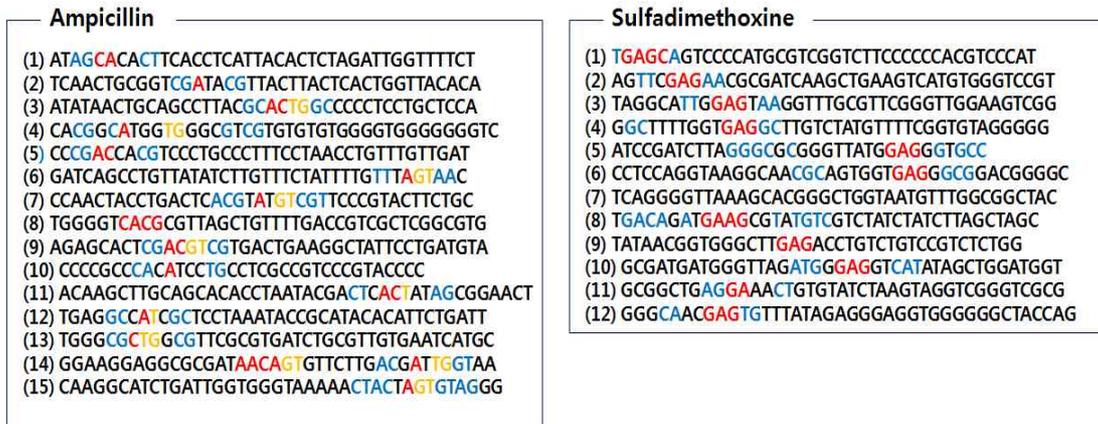


그림 69. 각 표적 분자 (ampicillin, sulfadimethoxine)에 대한 aptamer 예측 motif.

(2) aptamer를 이용한 항생제의 검출

개발한 kanamycin의 aptamer를 이용해 실제적인 검출 바이오센서로의 응용 가능성을 연구하였다. 우선 aptamer만의 T_m 값에 비해 kanamycin-aptamer의 T_m 값이 높아진 것을 통해 kanamycin이 aptamer에 결합하며 그 구조를 더 안정화시킨다는 것을 확인하였다.

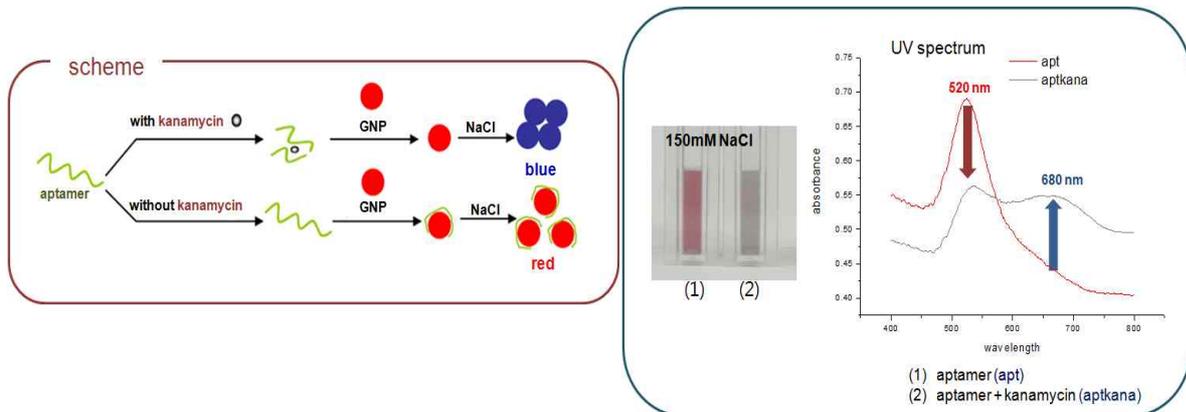


그림 70. 항생제 검출을 위한 scheme(좌)과 kanamycin-aptamer 검출실험 결과.

다음은 위의 scheme과 같이 금나노입자를 이용한 colorimetry 방법으로 표적 분자인 kanamycin의 검출을 시도하였다. 그 결과 150 mM NaCl의 조건에서 aptamer만 존재하는 금나노입자(1)에 비해 kanamycin이 함께 존재하는 금나노입자(2)가 색변화를 일으켰음을 관찰하였고, 이를 UV spectrum을 통해서도 측정하였다. 그 외에도 다른 항생제 (streptomycin, ampicillin, sulfadimethoxine)와 비교했을 때 kanamycin 만 특이적으로 반응하는 것을 확인하였고, 특히 aptamer의 stem 부분과 loop 부분의 염기서열을 바꾸어 실험하였을 때 loop 부분을 변형한 경우에만 반응이 일어나지 않아 이 부분이 kanamycin과의 결합에 관여하는 부분임을 확인하였다. 이러한 NaCl의 농도에 따른 금나노입자의 뭉침 현상을 이용한 colorimetry 방법은 빠르고 쉬우며, 육안으로 관찰이 가능하다는 장점이 있다. 이러한 장점을 이용한 바이오센서의 개발은 시료의 전처리를 거쳐 HPLC 분리, mass 분석을 해야하는 현재의 검출 시스템보다 더 효율적으로 항생제를 검출하는 시스템이 될 것이라 기대된다.

4. 협동기관 한림대학교

가. 테트라사이클린(TC) 항체 고정화 및 경쟁반응에 의한 유해물질 농도분석

본 과제에서 사용된 단백질 고정화는 아래의 그림과 같이 초분자 고정화된 기판 제작 후 단백질을 도포하여 자발적인 단백질 고정화를 이용하여 진행되었다. 사용된 초분자는 캘릭스크라운 등의 캘릭스아렌에 기반한 초분자(supramolecules)를 이용하였으며 각각의 초분자에는 아민 기질에 고정화되는데 최적화된 알데히드 작용기를 1-2개 정도 부착하여 화학결합에 의한 자기조립단분자층을 제조하였다. 단백질의 고정화는 100-400 mM 수준의 양이온이 포함된 완충용액에서 진행되었으며 고정화는 주로 30분-1시간 정도에 완성되는 것을 확인하였다.

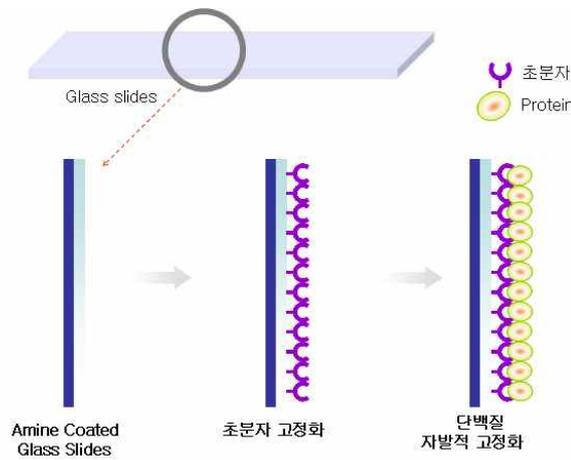
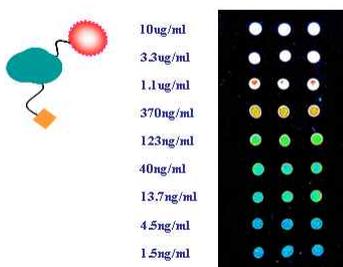


그림 71. 유리섬유 변성과정 모식도.

결합반응 혹은 항생물질, 유해물질 등과 경쟁반응에 사용될 물질들은 제조된 유리슬라이드 상에 도포한 뒤 말려서 형광감도를 분석한 결과와 그 단백질과 결합되는데 최적의 항체 등을 고정화한 단분자층에 결합되게 하여 고정화된 단백질의 활성분석등을 진행하여 실제로 최종적으로 진행할 portable한 측정기기에 사용가능한 선형 단백질칩 등에서 나타날 결과를 예측하여 단백질 고정화 균일도 및 결과 재현성 등을 확인하였다. 그중 TC 와 경쟁반응에 이용되는 TC-BSA에 형광을 부착하여 경쟁반응의 결과분석에 사용된 Cy5-BSA-TC 물질의 형광감도 및 결합된 형광물질의 양을 분석한 결과는 다음과 같다.

Cy5-BSA-TC 1ul dry spot



1차년도에는 유해물질중 TC의 농도를 분석하는 방법을 확인하는 연구를 진행하였으며 동시에 그 결과를 portable 한 기기에서 직접 형광분석을 진행하는 스트립 제작을 진행하여 스트립을 이용한 농도분석이 가능하다는 결과를 확보하였다.



TC-형광분석기

이와 같은 portable 한 형광분석 기기에 사용이 가능한 선형 단백질 칩 제작을 위하여 가공성이 뛰어난 유리섬유에 단백질 고정화가 가능하게 초분자고정화를 진행하였으며 여기에 항체 단백질 고정화를 진행하여 나타나는 형광감도를 측정하여 결과를 분석하였다.

선형 단백질칩상 단백질 고정화는 두가지 단계를 거쳐 확인하여 형광분석용 선형 칩을 이용한 유해물질 농도분석이 가능하다는 것을 증명하였다. 이를 위해 아래 그림 72와 같은 Anti IgG 단백질을 고정화 시키고 이 단백질에 결합되는 형광 부착된 CRP항체를 농도별로 흘려보내서 결과를 측정하였다.

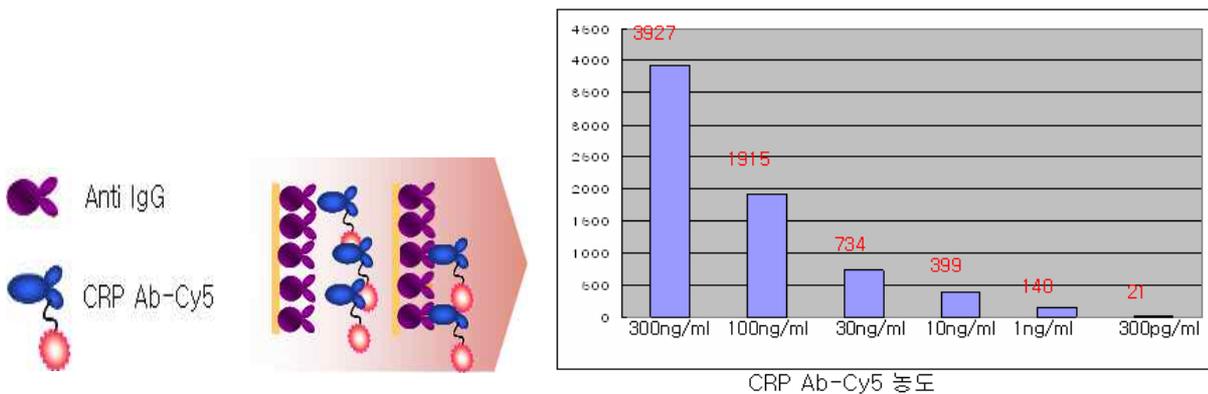
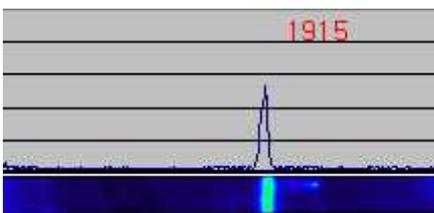


그림 72. 선형 단백질 칩상 CRP Ab-Cy5를 이용한 농도 측정.

실제 결과는 일반적으로 항체의 농도를 측정하는 300ng/ml에서 0.3ng/mL 사이의 결과를 측정하였으며 각각의 결과를 조합하면 그림 72와 같이 형광 부착된 항체농도가 감소함에 따라 감소되는 농도에 비례하여 형광감도의 절대치가 감소되는 결과를 확보하였다. 아래 그림은 100ng/mL에서 얻어진 실제 선형 단백질 칩을 portable 형광기기를 이용하여 스캔한 결과를 보여주고 있다.



이 결과에 기반하여 아래 그림 73과 같이 1. TC 항체를 유리섬유에 고정화하고, 2. 여기에 Cy5-BSA-TC conjugate 의 농도를 일정하게 하면서 TC의 농도를 변화시켜 항체와 결합반응을 수행한 뒤 3. 각각의 스트립상에서 나타난 형광감도를 확인하였다.

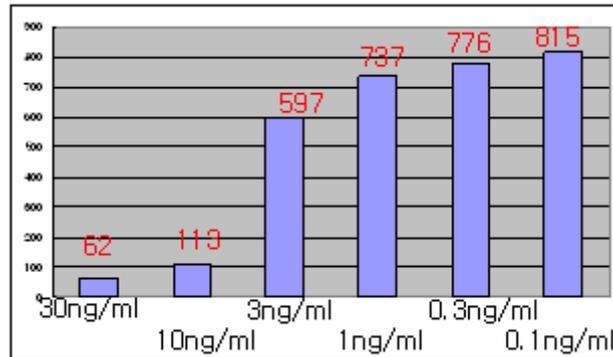
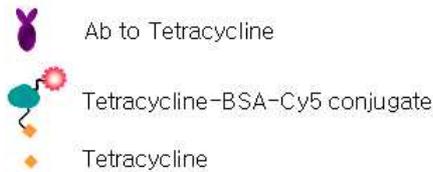
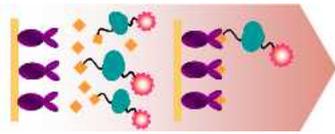


그림 73. TC 농도에 따른 항체 결합반응 그래프.

결과는 free TC (즉 유해물질)의 농도가 증가함에 따라 결합되는 Cy5-BSA-TC conjugate의 농도가 감소되는 결과를 보여주고 있다. 특히 저농도의 TC 가 존재하여 TC-BSA-Cy5 가 결합 되는데 영향을 미치지 못하는 저농도에서는 거의 700-800정도의 형광감도가 나타나 제조된 분석용 칩상의 단백질이 균일하게 고정화되고 재현성 있는 활성을 보이는 것과 같은 결과를 확보하였다.

나. 설파디메톡신(SDM)-BSA 결합체를 이용한 유해물질(SDM)에 대한 농도분석

합성항균제중 설펜아마이드계의 하나인 Sulfadimethoxine(SDM)의 농도를 분석하는 방법을 확인하는 연구를 진행하였으며 동시에 그 결과를 portable 한 기기를 이용하여 형광분석을 확인하기 위하여 스트립 제작을 진행하였으며 스트립을 이용하여도 농도분석이 가능하다는 결과를 확보하였다.

(1) SDM(sulfadimethoxine) 검출을 위한 SDM-BSA 결합체 제조

현재 사용되는 유해 잔류물질 분석방법으로 HPLC, GC, HPLC/MS/MS, 비색법, ELISA, TLC 등이 있으나 대부분이 고가의 장비를 필요로 하는 기기분석으로 사용이 복잡하다는 단점을 지니고 있다.[10] 본 과제에서 1)설파디메톡신(sulfadimethoxine: SDM)을 분석하기 위하여 형광표지 물질로서 항 설파디메톡신(anti sulfadimethoxine Ab)항체에 형광(Cy5-dye)을 결합하여 anti SDM Ab-Cy5 형광 결합체를 만들어 사용하였으며 2)설파디메톡신의 고정화를 위하여 BSA 단백질에 설파디메톡신이 결합된 BSA-SDM 결합체를 합성하여 설파디메톡신 검출을 진행하였다. anti SDM Ab-Cy5 형광결합체는 anti SDM Ab에 bis functional Cy5-NHS 와 반응하여 합성한 후에 이를 sephadex G50 column 을 이용하여 반응 후에 남아있는 free Cy5-dye 와 anti SDM Ab-Cy5를 분리하였다. 그리고 BSA-SDM 결합체는 BSA와 SMCC 를 반응하여 얻은 BSA-SMCC 와 SDM과 2-Iminothiolane 을 반응하여 얻은 SDM-SH 를 반응하여 SDM-BSA 결합

체를 합성하였다. 합성된 anti SDM Ab-Cy5 형광결합체 및 SDM-BSA 단백질 결합체의 농도는 Nanodrop(ND1000)을 이용하여 측정하였다.

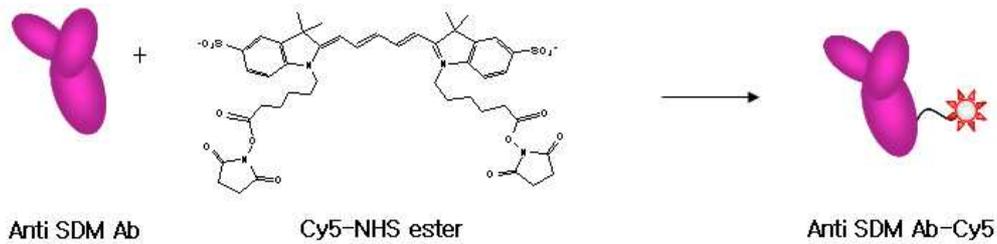


그림 74. anti SDM Ab 와 bis Cy5-NHS ester 반응.

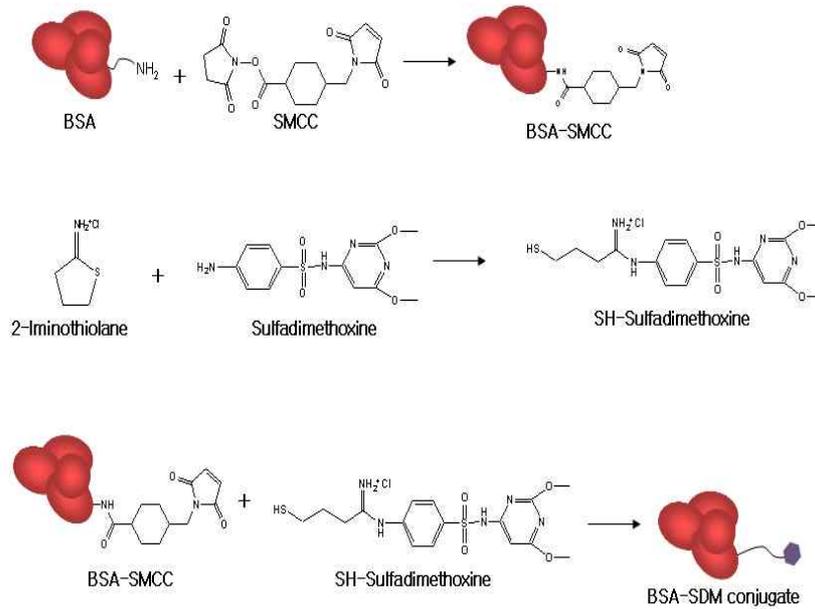


그림 75. BSA-SDM 결합체 제조 과정.

(2) 항체고정화용 칩 기관제조

항체 고정화용 기관제조를 위하여 유리기질의 변성에 사용되는 초분자는 켈릭스크라운 등의 켈릭스아렌에 기반한 초분자(supramolecules)를 이용하였으며 각각의 초분자에는 아민 기질과 반응할 수 있는 최적화된 알데히드 작용기를 1-2개 정도 부착하여 화학결합에 의한 자기조립단분자층을 제조하였다. 제조된 초분자 단분자층 위에 BSA-SDM 결합체가 자발적으로 고정화 될 수 있는데 100mM ~ 400 mM 수준의 양이온이 포함된 완충용액 상에서 진행하였으며 고정화는 1시간 정도에 완성되는 것을 확인하였다. 이렇게 BSA-SDM 결합체가 고정화 된 칩 (SDM chip)에는 anti SDM Ab-Cy5 결합체가 결합반응을 하게 되는데 이 때 free한 SDM 이 농도별로 포함되게 하여 칩상 고정화된 SDM 과 free SDM 이 anti SDM-Cy5 와 경쟁적으로 반응하기 때문에 free SDM 이 포함되지 않는 경우와 free SDM 이 농도에 따라서 포함되게 될 때 anti SDM-Cy5와 칩상 SDM의 반응은 점차 감소하게 되어 형광감도는 SDM 이 많이 포함 될수록 감소하게 된다. 반응 후에 나타나는 형광감도는 Laser scanner 를 이용하여 측정하여 분석하였다. SDM과 경쟁반응 결과분석에 사용된 anti SDM-Cy5 결합체의 형광감도 및 형광물질의 양을 농도별로 칩상에 건조하여 분석에 이용하였다. 경쟁반응에 포함되는 SDM 의 농도를 0, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1ug/ml, 10ug/ml 로 30분 동안 칩 위에서 경쟁 반응을 진행하여 분

석하였다.

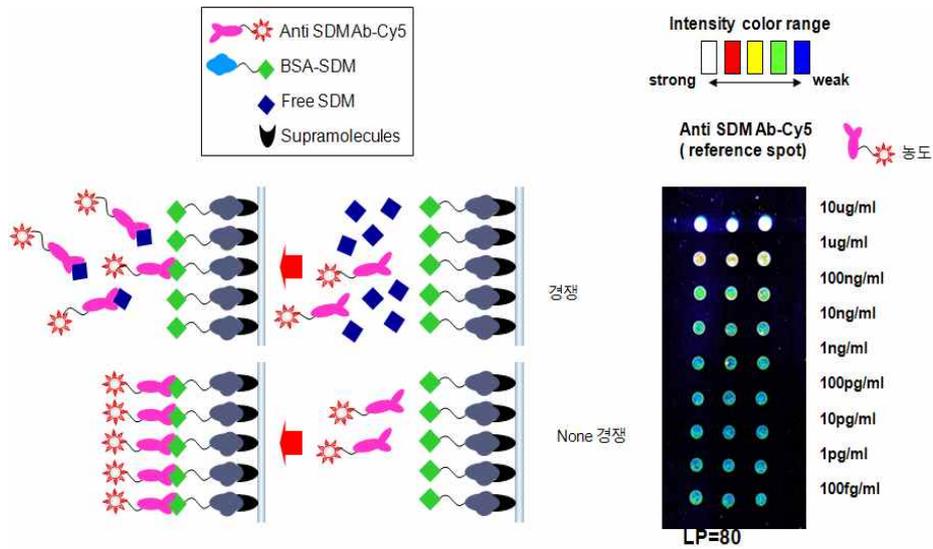


그림 76. 경쟁반응에 의한 SDM 분석 모식도 및 anti SDM Ab-Cy5 형광이미지.

왼쪽은 설파디메톡신(SDM)을 칩상에 고정화 하여 항체와 경쟁적 결합반응을 통하여 free 항생제 즉 SDM의 농도를 측정하려는 연구목적을 달성하기 위하여 칩상에 고정화가 정량적으로 가능하지 않은 SDM분자를 칩 상에 고정화를 오랜기간 연구해온 BSA 단백질에 결합한 결합체를 제조하고 이 SDM-BSA 결합체를 알려진 고정화 농도를 이용하여 칩 상에 고정화 하여 SDM chip을 제조하여 이를 보여주는 모식도이다. 이 SDM-BSA 결합체가 고정화된 칩에 형광물질이 부착된 SDM 항체와 free한 SDM을 넣어 SDM의 농도가 높으면 형광이 나타나지 않고 SDM이 없으면 형광이 나타나는 과정을 보여주는 모식도이다. 그리고 오른쪽은 형광감도에 따라 색을 이용하여 감도차이를 보여주는 표준 슬라이드이다. 실제 물질을 이용하여 진행된 실험 결과는 위 그림 중간에 위치한 농도가 표기되어 있는 슬라이드 모양으로 얻어진 결과를 이미 지대로 나타낸 결과와 각각의 반응위치에서 얻어진 형광감도를 수치로(table)그리고 이 수치를 농도와 병행하여 그래프로 나타나 있다.

(3) SDM-BSA 결합체 고정화된 칩상 경쟁반응 결과

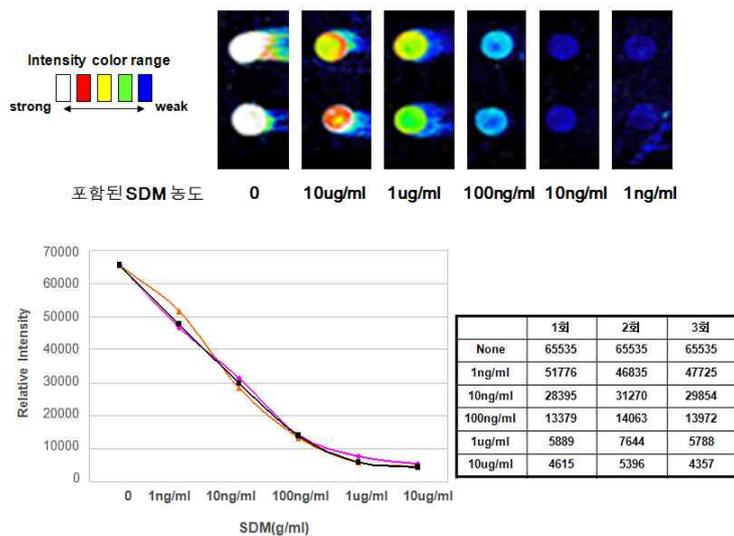


그림 77. SDM-BSA 결합체를 이용한 경쟁반응 결과.

SDM이 포함되지 않는 경쟁이 없는 경우에는 칩 상 고정화된 SDM 과 anti SDM Ab-Cy5 의 형광강도가 최고수치(65000)로 나타나며 free 한 SDM의 양이 많이 포함 될 수록 형광강도가 감소하는 것을 알 수 있다. 이것은 포함되는 SDM의 양에 비례하여 경쟁반응이 잘 나타나는 것을 알 수 있는데 free SDM의 양이 없는 경우인 0과 비교해 보면 SDM 농도가 가장 적게 포함된 농도인 1ng/ml 수준에서도 형광강도 차이가 경쟁반응 3회에서 10000 ~ 15000 사이에 나타나 0인 경우와 구분이 확실하여 1ng/ml 수준까지의 SDM 분석의 가능성을 보여주는 결과이다. 경쟁반응시 SDM 농도 및 시간에 따른 결과가 아래에 나타나있는데 경쟁반응에 포함되는 SDM의 농도를 0부터 200pg/ml, 2ng/ml, 20ng/ml, 200ng/ml, 2ug/ml 수준으로 하여 10min, 20min, 40min 동안 경쟁반응을 진행하여 형광강도를 측정하였다. SDM의 농도를 각각 200pg/ml, 2ng/ml, 20ng/ml, 200ng/ml, 2ug/ml 로 anti SDM-Cy5 와 혼합하여 칩상 SDM 과 10min, 20min, 80min 동안 각각 경쟁반응하여 나타난 결과 그래프 및 형광이미지와 형광강도 수치가 아래에 나타나 있다.

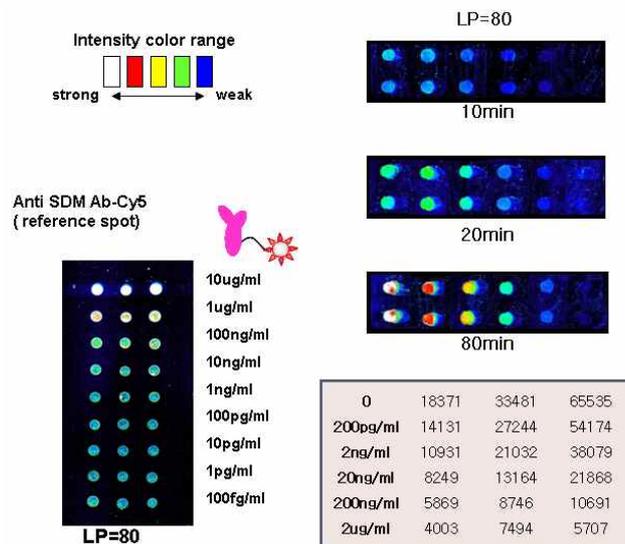


그림 78. 경쟁반응에 의한 SDM 분석 결과 스캔이미지.

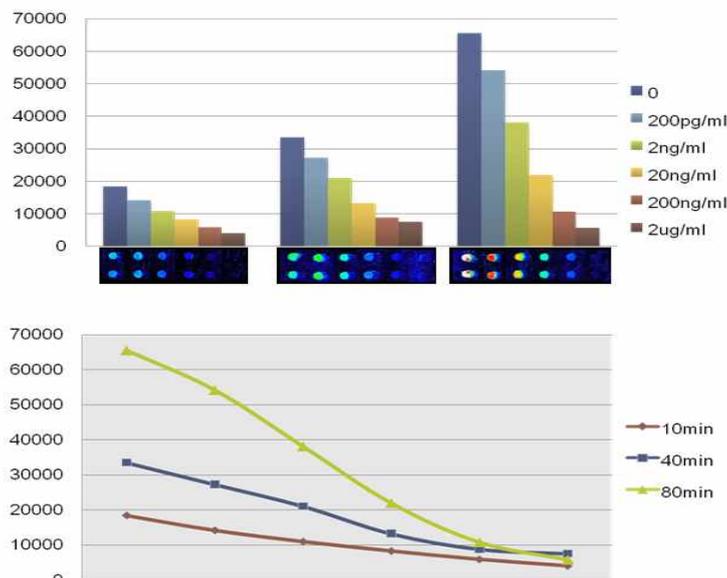


그림 79. 경쟁반응에 의한 SDM 분석 그래프.

위 결과를 보면 free SDM 의 농도가 가장 적게 포함되는 200pg/ml 수준에서 반응 시간에 따라서 형광감도의 차이가 10분(4200), 20분(6237), 80분(11361)으로 나타나는데 반응시간이 늘어감에 따라 형광 감도 차이는 증가하는 추세로 나타났으며 형광스캔 이미지 결과에서 볼 수 있듯이 반응시간이 80분 정도에서는 free SDM 이 없는 경우와 비교하였을 때 감도차이가 확실하게 나타나서 free SDM이 미량인 200pg/ml 수준인 경우에도 분석이 가능하다는 결과를 확보하였다. 이러한 단백질이 고정화 된 항체 칩과 동일하게 기질 변성기술을 가공성이 뛰어난 유리섬유에 적용하여 단백질의 고정화가 가능하게 하도록 하기 위해서 먼저 초분자의 고정화를 진행하였으며 여기에 항체 단백질 고정화를 진행하여 나타나는 형광감도를 측정하여 결과를 분석하였으며 sulfadimethoxine이 결합된 BSA 의 고정화를 진행하여 스트립 형태로 경쟁반응에 의한 SDM의 분석이 가능한 시스템을 확보하였다.

다. 유리섬유를 이용한 선형 단백질 칩 제조.

유리슬라이드 형태의 칩 제조 조건을 바탕으로 선형 유리섬유를 이용하여 멤베레인 형태의 칩 제조를 시도하였다.

(1) 변성 유리섬유상 단백질 고정화

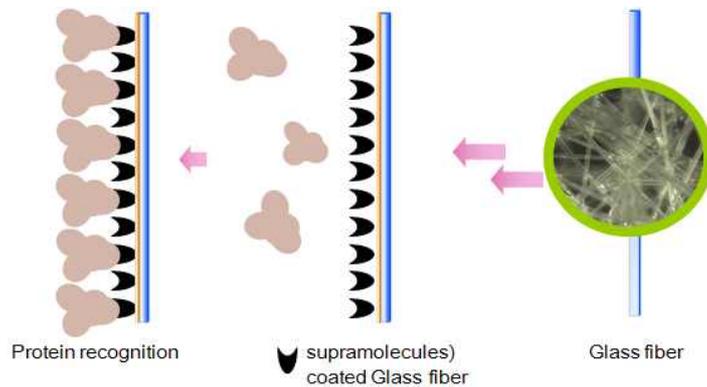


그림 80. 변성유리섬유를 이용한 단백질 고정화 모식도.

유리섬유의 변성과정을 통한 단백질이 고정화되는 모식도가 위에 나타나 있다. 초기의 유리섬유의 (-OH)표면을 처리하여 -NH₂ 유리섬유로 변성과정을 거친 후 초분자 물질과 -NH₂ 작용기의 화학결합을 통하여 초분자로 변성된 유리섬유가 제조된다. 이 후에 초분자와 단백질의 FC 부분의 존재하는 -NH₂ 과 분자인식을 통한 고정화가 진행된다.

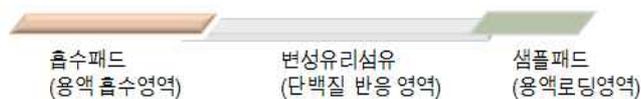


그림 81. 간단한 선형바이오 칩 형태의 스트립.

(2) 유리섬유상 분주기를 이용한 고정화 조건 확립

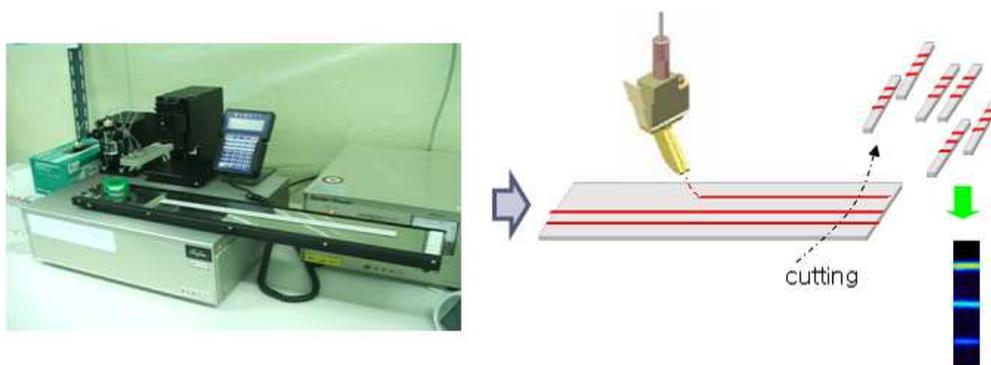
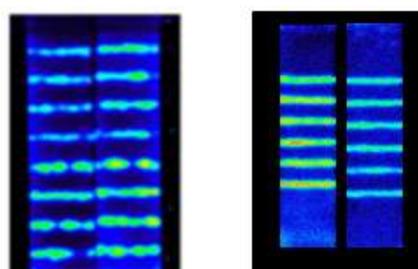


그림 82. 분주기에 의한 단백질 고정화.

분주기로 분주(lining)시에 항체 단백질 용액이 유리섬유로 고르게 흡수되어 lining 되어야만 단백질의 고정화가 균일한 밀도와 농도로 진행되기 때문에 분주하기 전에 분주기의 펌프압력 및 단백질 용액 내의 불순물 제거를 위한 필터, 그리고 변성된 유리섬유의 수분흡수 방지 및 제거하여 최적 조건의 분주상태를 확립해야한다.



Cy5-streptavidine 분주 후에 스캔

그림 83. 분주기에 의한 lining 조건에 따른 형광이미지.

위에 보이는 그림은 초분자 유리섬유 위에 형광(Cy5-dye)이 부착된 항체 단백질을 분주기로 분주 후에 스캔하여 나타난 이미지이다. 오른쪽에 보이는 결과처럼 분주가 잘 진행된 경우에는 선들의 형광강도가 균일하게 나타나는 것을 확인하여 단백질의 고정화시 균일성을 확인할 수 있었으며 왼쪽에 보이는 결과처럼 는 검출선의 형광 강도가 불균일하게 나타나는 것은 분주가 제대로 진행되지 않아서 유리섬유상 단백질의 고정화가 균일하게 이루어지지 않은 것을 보여주는 결과이다. 이렇게 선들이 불균일하거나 끊김, 선두께의 차이 등에 의하여 단백질 분석에 있어서 많은 오차가 있을 가능성이 있다. 오른쪽에 결과처럼 분주한 선의 두께가 일정한 것과 달리 분주한 선의 두께가 불균일한 경우에는 선의 두께의 차이에 따라서 형광강도가 차이가 날 수 있는데 같은 양의 단백질을 유리섬유상에 도포하였을 때 선이 두껍게 나타나면 그만큼 단백질이 많이 퍼져 있는 형태로 고정화가 진행되어 고정화 밀도가 감소하게 되는 것이며, 본 과제기간 동안에 개발된 분주기술은 최대한 좁은 공간 안에 단백질을 분주하는 기술을 확보하여 최고 밀도의 단백질 고정화가 진행된 선형 단백질칩을 제조하였다.

(3) 선형 멤버레인 디바이스 칩상 경쟁반응에 의한 SDM 분석

유리섬유상 항체 고정화 방법 및 결과에 기반하여 경쟁반응에 의한 설파메톡신 분석을 위

하여 우선 BSA-SDM 단백질 결합체를 분주기를 이용하여 변성 유리섬유상에 line 형태로 상온에서 2시간 고정화를 진행한 뒤에 blocking 용액에서 후처리하여 준비하여 선형 SDM chip 을 제조하였으며, 여기에 anti SDM-Cy5 결합체의 농도는 일정하게 유지시키면서 free 한 SDM 의 농도만 변화시켜 항체와 결합반응을 수행한 뒤 각각의 스트립상에서 나타난 형광감도를 확인하였다. anti SDM Ab-Cy5 단백질을 선형 SDM chip 에 경쟁반응을 진행하면 용액이 모세관 현상에 의해 흘러가면서 고정화된 BSA-SDM 의 SDM 과 반응하게 되는 것이 특징이며 이것은 슬라이드형태의 칩과는 다르게 용액이 흘러가면서 반응이 이루어지기 때문에 용액의 전개 속도 및 용액의 균일한 전개, 그리고 세척용액으로 전해하여 배경형광이 남지 않도록 주의해야 되기 때문에 재현성 있는 시스템을 확보하는 것이 매우 중요한 부분으로 사료되어진다.

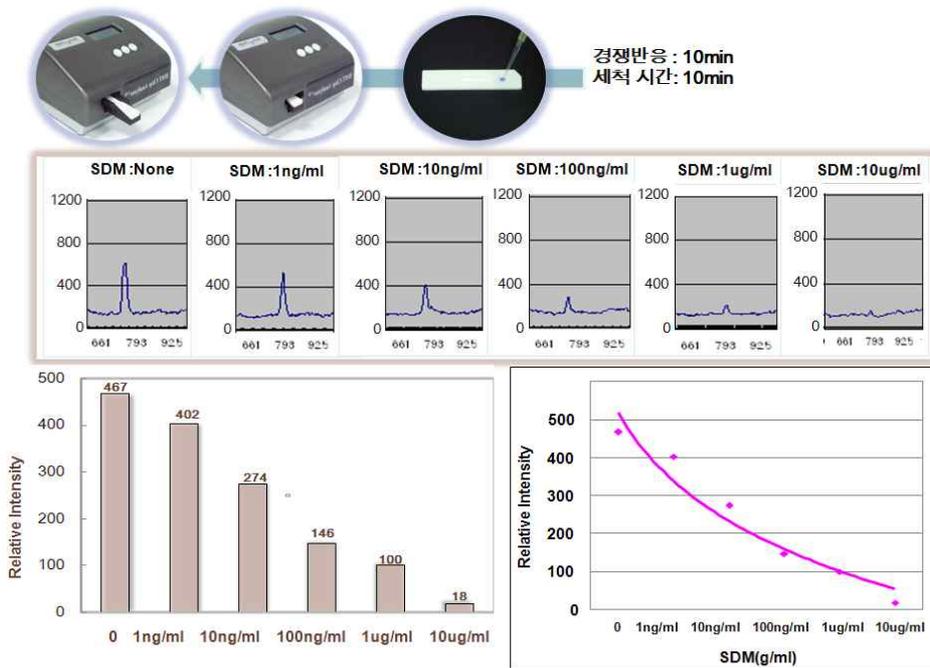


그림 84. 멤버레인상 SDM-BSA 를 이용한 SDM검출 결과.

위에 보이는 결과는 선형 SDM chip 위에서 anti SDM Ab-Cy5 와 SDM 의 경쟁적인 반응에 의한 결과이다. free 한 SDM 의 농도를 0, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1ug/ml, 10ug/ml 수준에서 anti SDM-Cy5 와 혼합하여 스트립에 전개하여 경쟁반응을 진행하여 10분 동안 반응시킨 뒤 portable 한 기기에서 측정하여 얻은 결과이다. free한 SDM 의 농도가 0에서부터 점차 증가함에 따라서 경쟁반응이 비율적으로 일어나서 형광감도 차이가 농도에 따라서 확실히 나타나는 결과를 확인할 수 있었으며, 특히 저농도의 SDM 1ng/ml 수준에서는 anti SDM-Cy5 가 결합되는데 영향을 미치지 못하는 저농도에서는 거의 402 정도의 형광감도가 나타나 경쟁이 없는 0 일 때와 비교해 보면 65정도의 형광감도 차이가 나타나서 제조된 분석용 칩 상의 단백질이 균일하게 고정화되고 재현성 있는 활성을 보이는 결과를 확보하였다. 이러한 스트립 형태의 선형 단백질 칩은 유리 슬라이드 형태의 칩과 비교하였을 때 슬라이드 칩에서의 반응시간(60분)에 비하여 반응시간이 10분 내에 매우 빠르게 진행되어지며, 짧은 반응시간에 비하여 매우 높은 형광감도를 나타내는 결과를 확보하였으며 선형 바이오칩을 이용한 SDM 의 분석은 조작이 간단하여 사용상 편의성이 매우 높다.

라. 설파디메톡신-유전자(SDM-DNA)결합체를 이용한 유해물질(SDM) 농도분석

본 과제기간 동안에 앞서 진행된 SDM 검출을 위한 SDM-BSA conjugate 를 이용한 방법에는 몇 가지 문제점이 있는 것을 확인하였다. 우선 SDM-BSA conjugate 제조할 때 마다 결합체의 활성이 조금씩 차이가 난다는 문제 그리고 이 러한 결합체를 이용하여 멤베레인형 칩상에 고정화를 진행하게 되면 고정화 되는 결합체의 활성이 조금씩 차이가 나기 때문에 정확한 SDM 에 대한 농도 대비 결과를 분석하기에 어려움이 있다는 것이다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 3차년도에 진행된 연구는 SDM-DNA 결합체를 이용하여 동일한 활성 및 고정화 수준을 확보하여 SDM 검출시 정확한 농도 분석이 가능한 형태의 멤베레인 형 바이오 칩 개발을 진행하였다. SDM-DNA 결합체를 이용하게 되면 고정화시에 이용되는 방식이 유전자-유전자 결합방식을 기본으로 하기 때문에 단백질 등에서 나타나는 활성 문제 그리고 높은 재현성을 유지할 수 있다는 장점이 있다.

(1) SDM-DNA conjugate 제조 기술 확보

SDM 의 아민 작용기를 이용하여 유전자와의 결합을 진행하였으며 사용된 유전자의 염기서열 및 모식도는 아래와 같이 나타나있다.

유전자 염기서열 : 5'-NH₂-TTT TTT TTT TTT CCT CCC CAA GTC GTA GG-3'

SDM-DNA 제조를 위한 반응은 3단계로 진행하였으며 1단계 반응은 SDM-NH₂ 과 2-iminothiolane 의 반응으로 SDM의 -NH₂ 작용기를 -SH 작용기로 치환하는 반응을 수행하였다. 2단계 반응에서는 NH₂-DNA 와 SMCC 와의 반응을 진행하여 SMCC-DNA 결합체를 제조한 후에 1단계 반응에서 제조된 SH-SDM 과의 반응을 진행하여 SMCC-DNA 의 SMCC 부분의 maleimide 이중결합 부분에 SH-SDM 과의 결합반응이 이루어진 형태로 최종 결과물 인 SDM-DNA 결합체를 제조하였다.

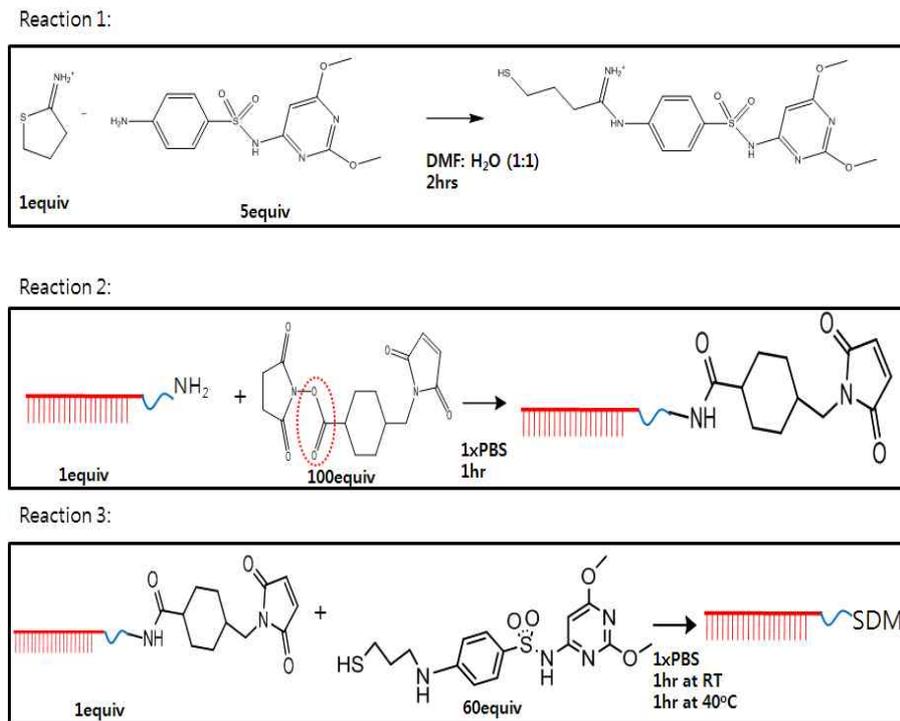


그림 85. SDM-DNA conjugate 반응 모식도.

(2) SDM 검출용 멤베레인형 스트립 제조 및 유전자 유전자 결합을 이용한 SDM 고정화 기술
 본 연구기간 동안에 개발된 멤베레인형 스트립 제조 기술을 이용하여 고정화를 진행하는 연구에 있어서 항생제-단백질 결합체등과 같은 결합체를 이용하여 고정화 하는 방식은 단백질 부분의 활성 및 변성의 문제가 나타나기 때문에 이러한 활성 유지 문제가 없는 새로운 형태인 유전자를 이용한 방식인 SDM-DNA 결합체를 이용하여 결합체의 유전자와 멤베레인상 고정화 된 유전자와의 결합을 이용하여 멤베레인형 칩상 SDM 고정화를 수행하였다.

이 방법은 유전자-유전자 결합을 이용한 방식으로 단백질 및 효소 등과 같이 활성감소 및 변성의 문제가 없기 때문에 제조된 물질에 대하여 재현성 있는 고정화 수율을 확보할 수 있다. 또한 유전자-유전자 결합은 매우 빠르게 진행되기 때문에 Lateral flow 방식의 멤베레인 형 칩, 즉 용액이 흐르는 동안에 유전자-유전자 결합반응은 충분히 수행될 수 있다.

(3) 9G 멤베레인 칩 및 SDM 검출용 칩 제조를 위한 유전자 고정화 기술

SDM-DNA 의 고정화를 위하여 먼저 멤베레인 칩 상에 SDM-DNA 의 염기서열과 상보적인 유전자의 고정화를 진행하여 유전자 칩을 제조한 후에 SDM-DNA 와의 결합을 시도하였다. 사용된 칩상 유전자의 염기서열 및 SDM-DNA 의 염기서열은 아래에 나타나있다.

5'-GGG GGG GGG CCT TAT CCT ACG ACT TGG GGA GG-3' 고정화 유전자 염기서열
 SDM-TTT TTT TTT TTT CCT CCC CAA GTC GTA GG SDM-DNA(염기서열)

멤베레인상 고정화에 사용되는 유전자는 위에 나타난 것처럼 연속된 9개의 Guanine 염기를 포함하게 되도록 합성하였는데 이것은 구아닌 인식용 단분자층으로 변성된 멤베레인상에 9개의 연속된 구아닌 염기가 자발적으로 분자인식되어 고정화가 이루어지게 되며 9G 에 의한 유전자가 고정화된 9G 멤베레인 유전자 칩이 제조되어진다.

유전자의 고정화된 9G 멤베레인 칩 상에 SDM-DNA 결합체의 유전자 부분과 칩상 고정화 된 유전자간의 교잡반응을 통하여 SDM-DNA 가 결합되어 SDM 단분자층, 즉 SDM 칩이 제조되어진다.

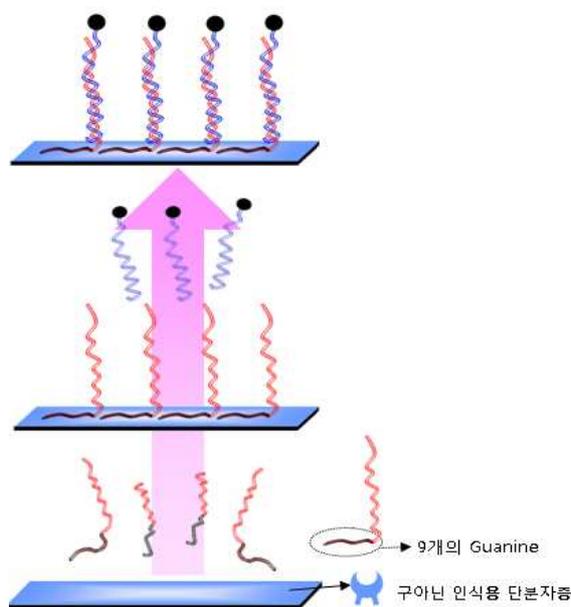


그림 86. 유전자 고정화 및 SDM-DNA 유전자-유전자 결합 모식도.

(4) 농축산물 주요항생제 검출용 감도 최적화 기술개발

본 3차년도에 진행된 유리섬유를 사용한 항생/항균제 인식 멤베레인형 디바이스 칩의 검출 감도를 최적화 하기 위하여 기존에 연구된 항생/항균제-단백질 결합체에 비해 온도, 습도 등의 외부 조건 및 용액조성에 비교적 안정적인 DNA를 사용하여 고정화시 이온조성, 농도 및 시간 등을 다양하게 변화시켜 고정화 조건을 확립하였다. 또한 연속적인 구아닌기의 배열로 고정화시 일정한 간격을 유지한 형태로 고정화가 진행되기 때문에 고정화된 유전자와 유전자 사이의 공간확보가 가능하게 된다. 이렇게 고정화된 유전자간의 공간이 확보되어 이 후에 결합되는 SDM-DNA 결합체와 교잡반응시에 공간적으로 자유롭게 결합이 이루어질 수 있게 되며 짧은 시간내에 결합반응이 가능하게 된다. 유전자의 칩상 고정화시에 유전자의 고정화가 빈공간 없이 최고밀도로 진행되어야 하는데 이러한 최고밀도 고정화를 위하여 고정화 유전자의 최적 농도 및 이온조성, 그리고 고정화 시간 및 온도등의 다양한 조건을 변화시켜 유전자의 최고밀도 고정화 조건을 확립하여 고정화 작업을 진행하였다.

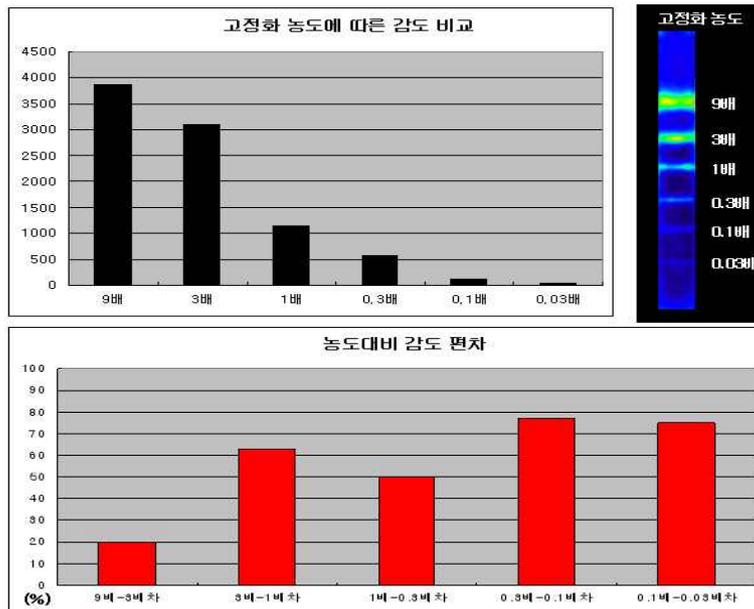
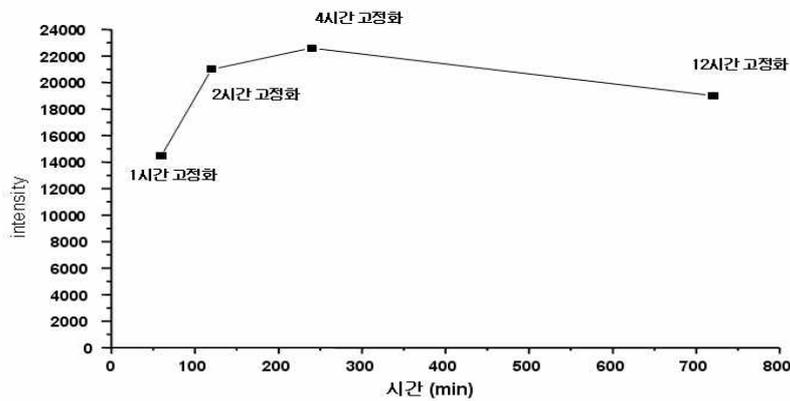


그림 87. 유전자 고정화 시간 및 농도에 따른 결과.

위에 나타난 결과는 멤베리인상 고정화되는 유전자의 양을 다양하게 변화시켜 고정화를 진행하여 최적의 고정화 농도를 확인하기 위한 테스트 결과이며 실제 표면적의 3배되는 지

점부터는 이론적인 값과 비교하였을 때 동일한 수준의 형광감도를 나타내는 결과를 얻어 멤버레인상 유전자의 고정화 농도는 표면적의 3배 농도로 진행하였다.

(5) SDM 검출용 멤버레인 형 디바이스 칩 유효성 평가

SDM 검출용 멤버레인형 디바이스 칩을 이용한 SDM 검출 모식도가 아래와 같이 나타나있다. 9G 멤버레인상에 고정화된 유전자는 SDM-DNA 의 상보적인 염기서열을 갖는 SDM 유전자 line 과 교잡반응성을 확인하는 HC(hybridization control) line 으로 구성되어져있다.

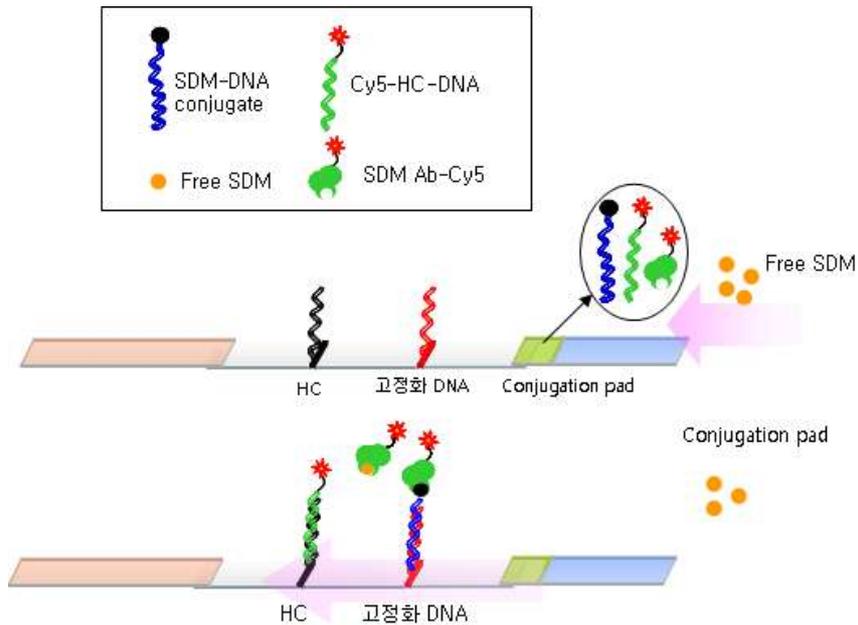


그림 88. 멤버레인상 유전자간 결합을 이용한 SDM 고정화 및 반응 모식도.

멤버레인 스트립의 conjugation pad 에는 SDM-DNA 결합체 와 Cy5-HC-DNA 그리고 SDM Ab-Cy5 가 흡착되어 건조되어 있으며 free SDM 이 포함된 시료샘플을 전개하여 용액이 flow 가 진행되면 우선 SDM Ab-Cy5 와 결합이 가능한 SDM-DNA 와 free SDM 이 경쟁적으로 SDM Ab-Cy5와 결합하게 되고 SDM-DNA 는 고정화된 유전자와 결합하게 된다.

그리고 Cy5-HC-DNA 는 유전자와 유전자간의 결합여부를 확인할 수 있는 reference line 이며 멤버레인상 고정화된 HC-DNA와 상보적인 염기서열을 갖는 유전자와 결합하게 되어 결합 유전자간의 결합 효율성을 형광감도로 확인하였다. 실제 멤버레인형 디바이스 칩을 이용한 SDM 검출 테스트의 진행 및 실험 결과가 아래에 나타나있다. 처음 샘플용액의 로딩 후 전개가 시작되어 20분 동안 반응이 진행된 후에 세척용액을 한 번 더 전개하여 세척단계를 거친 후 1D 판독기에서 스캔하여 결과가 분석되는 시스템이다.



그림 89. 멤버레인 바이오칩 단계별 진행 과정.

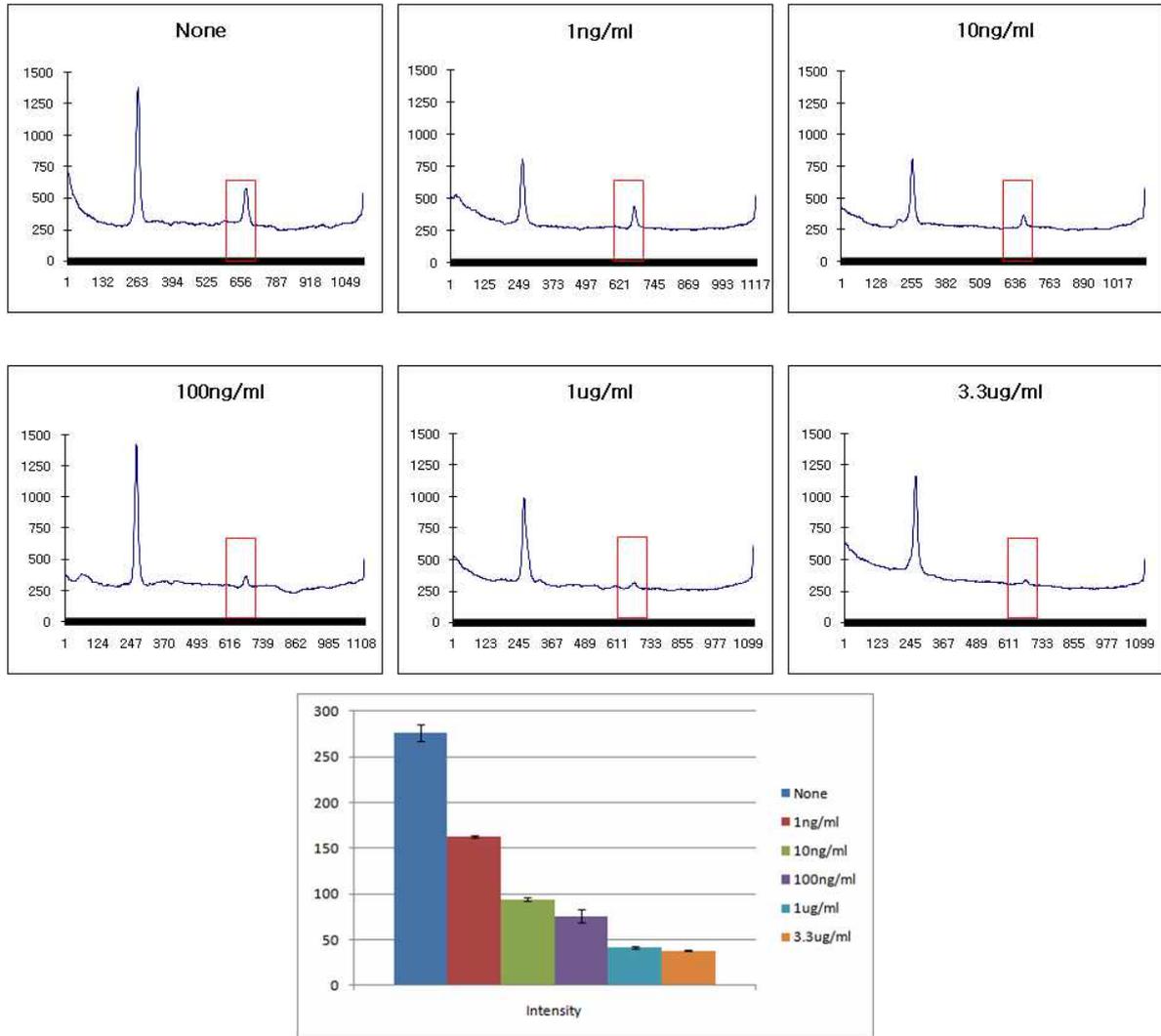


그림 90. free SDM 이 농도별로 포함된 시료 용액의 경쟁반응에 의한 테스트 결과.

위 결과에 나타난 것처럼 free SDM 이 없는 경우를 기준으로 하여 free SDM 이 농도에 따라서 1ng/ml ~ 3.3ng/ml 수준으로 포함된 시료를 테스트하여 나타난 결과를 비교해 보면 SDM 이 포함되지 않은 None인 경우와 가장 적게 포함된 1ng/ml 의 형광 감도(intensity) 수치가 200 정도 차이가 나는 결과를 확인하여 저농도의 시료샘플인 경우에도 민감도가 높게 나타나는 결과를 확인하였다. 이것은 기 개발되어 진행된 SDM-BSA conjugate 를 이용한 검출 시스템과 비교해 보면 민감도가 None, 과 1ng/ml 의 수치 차이가 50정도인 것에 비하여 SDM-DNA 시스템인 경우 형광감도가 200 수준으로 약 150 정도 증가된 결과를 얻었으며 저농도의 시료에서의 분석이 가능한 결과를 확보하였다. 이러한 멤베레인 형태의 바이오칩은 유리 슬라이드 형태의 칩과 비교하였을 때 슬라이드 칩에서의 반응시간(60분)에 비하여 반응시간이 20분 내에 매우 빠르게 진행되어지며, 짧은 반응시간에 비하여 매우 높은 형광감도를 나타내는 결과를 확보하였으며 분석을 위한 사용방법이 간단 로딩 및 세척 후 스캔하여 결과를 판독하는 시스템이기 때문에 사용상 편의성이 높다고 사료되어진다.

(6) 자동화 관련 소프트웨어 기초기술 확립

상업적으로 판매되는 멤베레인 형 키트들은 대부분 콜로이드성 금 입자를 사용하여 육안으

로 확인하거나 형광물질을 사용하여 형광스캐너로 분석하게 된다. 육안으로 확인하는 방식에 비해 형광스캐너를 이용하게 되면 극미량의 시료까지 분석할 수 있으며, 분석용 소프트웨어를 이용하는 경우 데이터의 분석 및 처리가 더욱 정확하고 정교하게 기기적으로 산출 가능하다는 장점이 있다. 그러나 스캐너의 제작방식에 따라 제작에 따른 비용이 천차만별이므로 멤베레인형 디바이스 키트의 특성상 현장에서 널리 사용되기 위해서는 저가형의 1D 스캐너의 개발이 필수적이며 실제로도 1D형태의 스캐너가 제품시장을 장악하고 있다. 본 과제에서 사용한 스캐너 또한 저가형의 1D 스캐너로 SDM 스트립형태에 맞춰 사용될 수 있도록 스트립과 스캐너사이의 판독오차를 최소화 하였으며, 현장에서도 비교적 저렴한 형태로 공급받을 수 있도록 하였으며 판독결과의 분석이 소프트웨어에 의한 자동화된 분석 시스템의 기초 기술을 확립하였다.

아래에 나타나 그림은 실제 제작된 BMT-1D scanner 및 분석결과의 소프트웨어에 의한 자동 분석 시스템을 보여주고 있다.

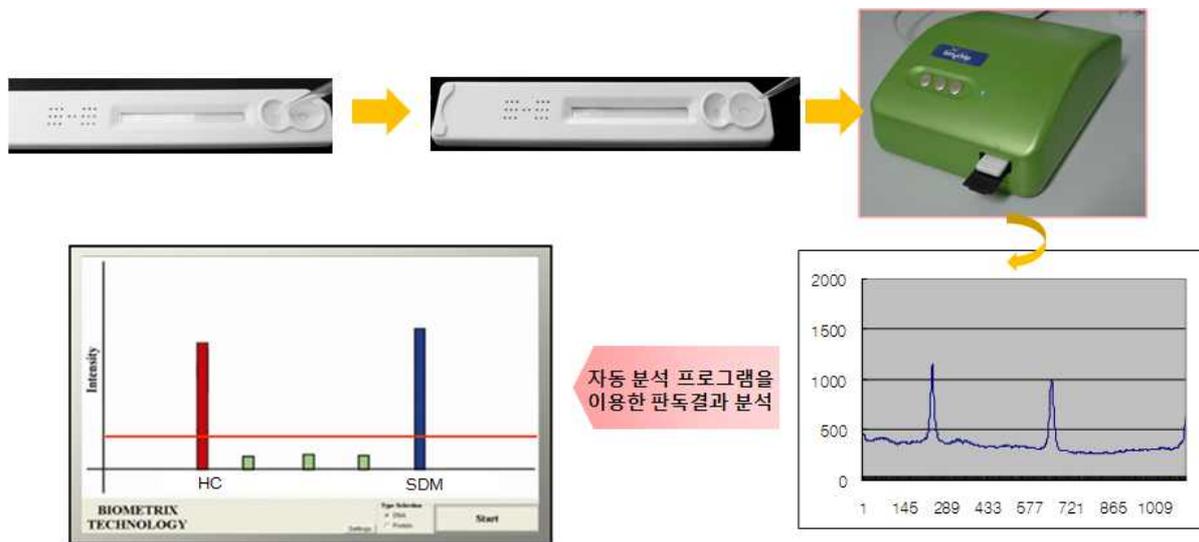


그림 91. 소프트웨어에 의한 자동분석 시스템 과정.

마. 항생제 특이 앵타머의 발굴[11]

(1) 테트라사이클린-특이 앵타머의 발굴

(가) 테트라사이클린과 작용하는 앵타머의 스크리닝

- 항생제-특이 앵타머의 발굴을 위하여 다음과 같은 30 μ mole의 앵타머 N(30) 라이브러리를 제조하였음



- 이 라이브러리의 양쪽 말단은 PCR을 통한 증폭을 위한 공통된 염기서열을 부착하였음
- 테트라사이클린에 결합하는 항체를 protein A 아가로즈와 결합시킨 후, 여기에 테트라사이클린을 첨가하여 복합체를 형성하였음
- 앵타머 라이브러리를 위 복합체와 결합시킨 후, 원심분리하여 테트라사이클린에 선택적으로 결합된 앵타머를 분리하였음
- 이렇게 분리한 앵타머는 PCR을 통해 증폭시킨 후 다시 스크린하였음
- 앵타머의 스크리닝은 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 방법을이용하였음

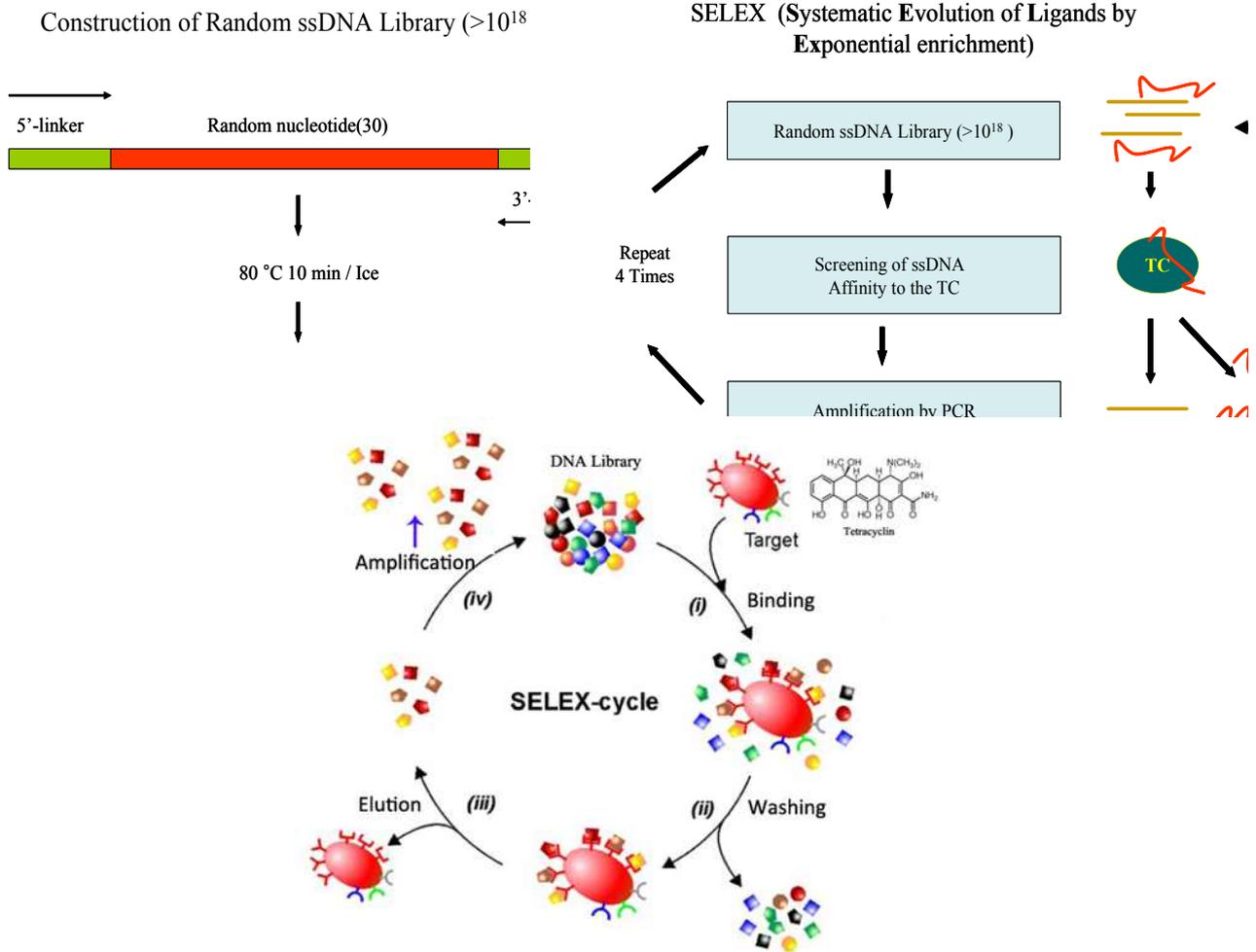


그림 92. TC에 대한 애타머 SELEX 과정.

(나) 테트라사이클린-특이 애타머의 결합력 확인[12]

- SELEX법을 이용하여 선별된 테트라사이클린과 결합하는 애타머를 T 벡터에 클로닝 한 후, 재조합 플라스미드를 얻은 후, 염기서열을 분석하였음
- DNA 염기서열 분석으로 통해 얻은 결과를 바탕으로 바이오틴과 결합된 애타머를 합성하고, 2차 스크리닝을 수행하였음
- 96well 플레이트에 코팅된 항-테트라사이클린 항체에 테트라사이클린을 결합시킨 후, 가장 높은 결합력을 보이면서, 다른 테트라사이클린계 물질과 cross-activity를 보이지 않는 애타머를 ELISA를 통해 분리해 내었음
- 검출은 바이오틴과 결합하는 스트렙토아비딘-HRP 효소와 기질을 이용하였음
- 그 결과, 두 개의 테트라사이클린 특이 애타머를 발굴하였음

애타머	염기서열
anti-Tc-i	CGACAGGGATGCATTTGGGGGGCTGCC
anti-Tc-ii	CGGGGTGGTGGGGGGGCCCGATGCTGGC

- 이 두 앵타머는 테트라사이클린에 대해 특이적인 결합력을 나타내었지만, 같은 면역원 (Tc-BSA conjugate)를 사용하여 생쥐에서 만든 항체(positive)보다 낮은 결합력을 나타내었음

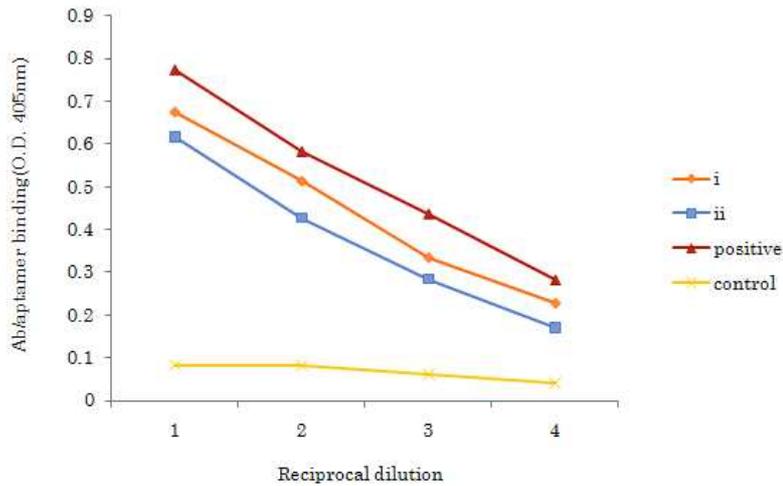


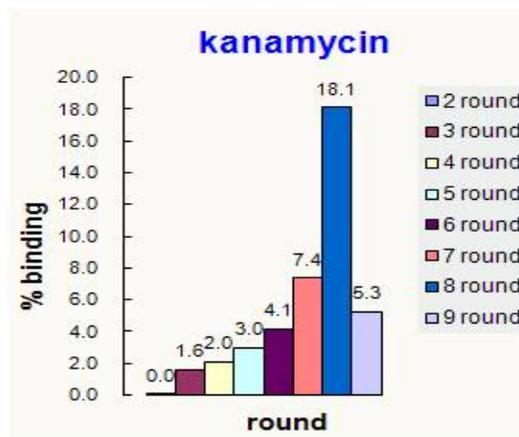
그림 93. TC에 대한 앵타머-i 와 앵타머-ii 의 결합력 테스트 비교.

- 따라서, 이번 연구에서 발굴된 앵타머를 가지고 기존의 항체를 대신하기에는 너무 결합력이 낮아 좋은 탐침이 되기는 어려울 것이라 여겨짐

(2) 카나마이신-특이 앵타머의 발굴[13]

(가) 카나마이신-특이 앵타머의 염기서열 분석

- 카나마이신-특이 앵타머는 본 연구실 및 제 3세부과제의 반창일 교수 실험실에서 스크리닝한 앵타머들을 바탕으로 그 염기서열을 분석하였음
- 위와 같이 8번의 SELEX법을 통해 얻은 16종의 카나마이신-특이 앵타머들의 염기서열을 분석한 결과, 이들에게서 공통으로 나타나는 줄기-고리(stem-loop) 구조를 발견하였음



TGTCC**AA**GT**GG**TCT**TG**AGGTTATAAGCGGCGCCGATCA
 AGATGGGG**TTGAGGCTAAGCCG**ACCCTAAGTTGGGCCGT
 CATGTGCTGTGTC**ACCTGGCGGTTGAACTGAGCGG**TGGT
 TGGTAATCGAAGTA**AA**GA**GGCTT**GAGGGGTGTATCGCC
 TGCAGTGGTCTAGTCC**TTATGGTACTTTGAAGG**TTGTTA
 CTGTAGGG**TGGCAGGGGCTTAAGCCTTCGTGGT**CGGGTA
 ACTATTAAGAAGTTGCG**TTGGAAGGCACGAATTCGCC**CGG
 CGAGATGGAGTACGT**GATTTGGAGGTCGAAGTACTT**GGGG
 AGCGCCGAGCGTGC**GGGATCTAGGGGGAGGATAGG**TTG
 GTTACTAAAAAAGTTCAGG**TCCGGCAATAGCACT**CGAAGA
 ACGTTGTGGCAGT**GAGTGCAGGCATGGCGCGACC**ACTTGA
 GTTGATAGATATAG**AAGCTCCTCGCCGTCAGCGCTT**GGA
 GAGATGGG**AGGGT**GATTTCCCTGTTGCCATCTGGGACAGC

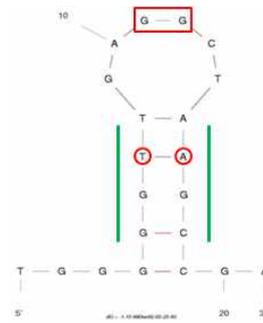


그림 94. 카나마이신 특이적인 염기서열의 배열 및 분석.

- 이 구조는 가운데 GG를 포함하는 고리구조를 가지고 있으며, 이 부분을 다른 염기로 치환할 경우 카나마이신에 대한 결합력이 없어지는 것으로 보아 카나마이신과 직접적으로 결합하는 부위라 판단됨
- 반면 줄기 부위의 서열은 다른 염기로 치환하여도 결합력에 커다란 영향을 미치지 않았으며, 전체적인 앵타머 구조의 안정화에 기여할 것이라 판단됨

(나) 카나마이신-특이 앵타머의 결합력 분석

- 카나마이신-특이 앵타머의 줄기-고리 부위를 포함하는 TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA (aptamer 1.15)와 그 변형체 (5.58 및 8.82)의 카나마이신에 대한 결합력을 분석한 결과, 세 종류의 앵타머 모두 항체보다 높은 결합력을 나타내었음

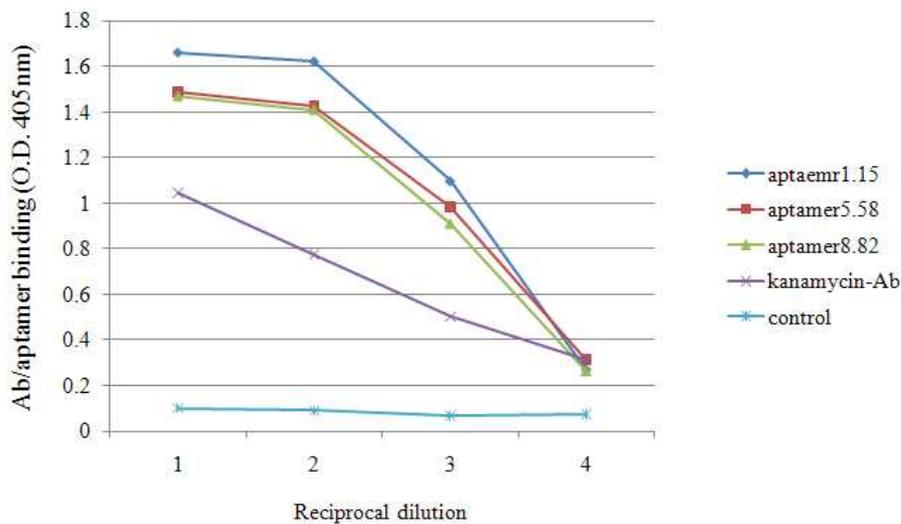


그림 95. 카나마이신 앵타머(1.15),(5.58),(8.82)의 결합력 테스트 비교.

- 이 중 원래의 앵타머(1.15)가 가장 높은 결합력을 나타내었음
- 변형체인 5.58 및 8.82는 앵타머 구조의 줄기 부위의 염기서열 치환을 통해 열역학적으로 더욱 안정된 구조를 갖도록 한 것으로 이는 향후 칩에 고정화시켰을 때 안정적으로 그 구조를 유지토록 하기 위해 디자인 한 것임

- 변형체의 경우에도 항체보다 높은 수준의 결합력을 나타내는 것을 확인하였고, 이는 고리 부위의 GG가 중요하다는 또 다른 간접적 증거임

(3) 카나마이신-특이 앵타머 고정화 칩의 제조

- 위에서 얻은 카나마이신-특이 앵타머를 DNA 칩상에 고정화시키고 실제로 카나마이신을 검출할 수 있는 지 여부를 조사하였음

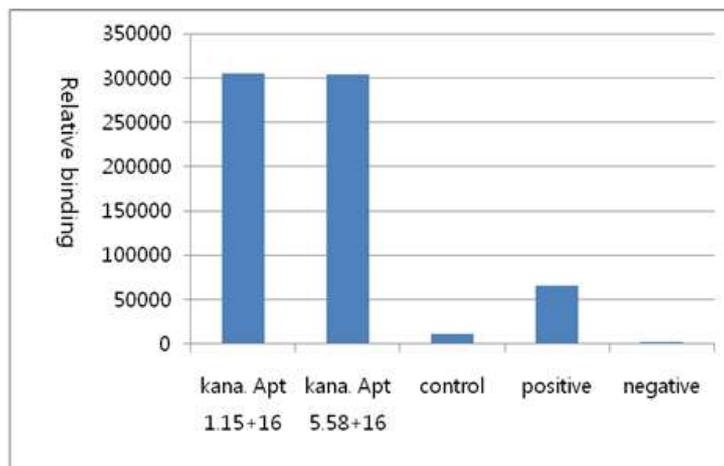


그림 96. 앵타머 칩을 이용한 카나마이신 앵타머 1.15 및 5.58 결합력 비교.

- 고정화된 DNA 칩 상에 먼저 앵타머를 붙이고 카나마이신을 처리한 결과 앵타머는 카나마이신에 대해 상당한 결합력을 나타내었으며(stepwise form), 혼합된 형태로 처리해도 비슷한 결과를 확인하였음
- 이상의 결과들로부터 칩에 고정된 앵타머는 다양한 농도의 카나마이신을 정량적으로 검출할 수 있음을 확인하였음
- 이러한 현상은 앵타머의 변형체인 5.58에 대해서도 작용하였으나, 민감도는 원래의 앵타머(1.25)가 더 높은 결과를 보였음

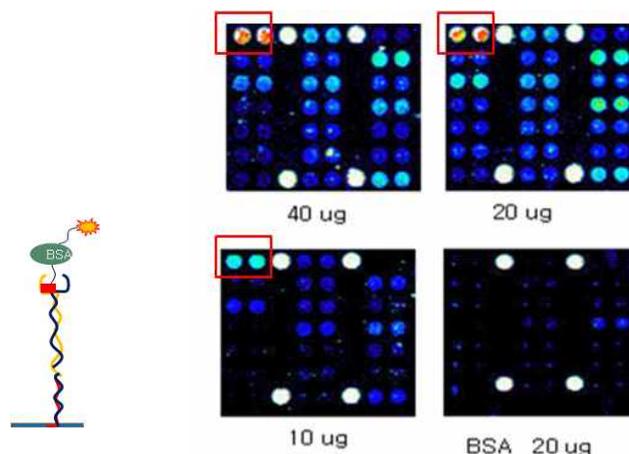


그림 97. 앵타머 칩상 나타나는 5.58과 1.15 의 형광감도 비교.

(1.25) 압타머 시퀀스를 이용하여 칩상에서 카나마신에 대한 압타머의 결합력을 테스트하였다. 칩상 고정화된 유전자 및 압타머의 염기서열은 아래와 같으며 고정화 모식도 및 칩상 고정화된 위치가 나타나 있다.

칩상 고정화된 probe: 5'-GGGGGGGGG CTT TAT CC TAC GAC TTG GGG AGG-3'

압타머 : 5'-GG ATG CTG AAC CCC TCC TTTTTT AGC CGA ATC GGA GTT GGG GGT-3'

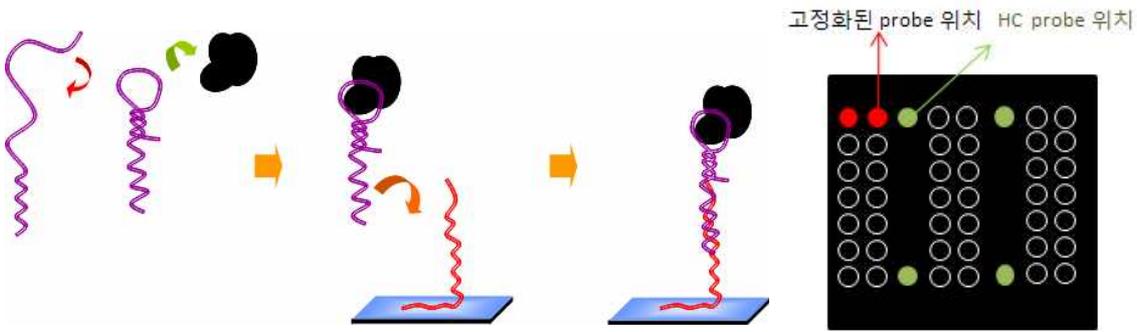


그림 98. 카나마이신-특이 압타머 고정화 및 칩상 Probe 위치.

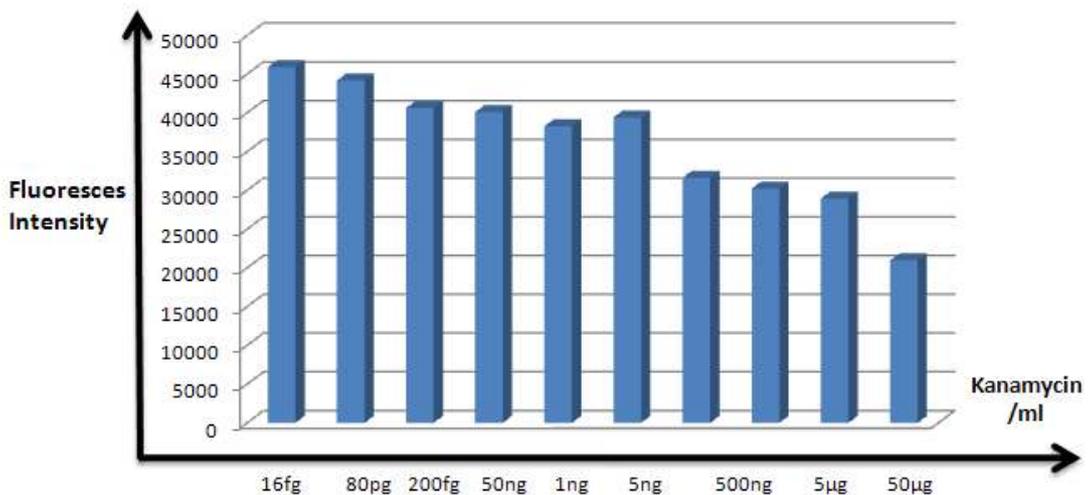
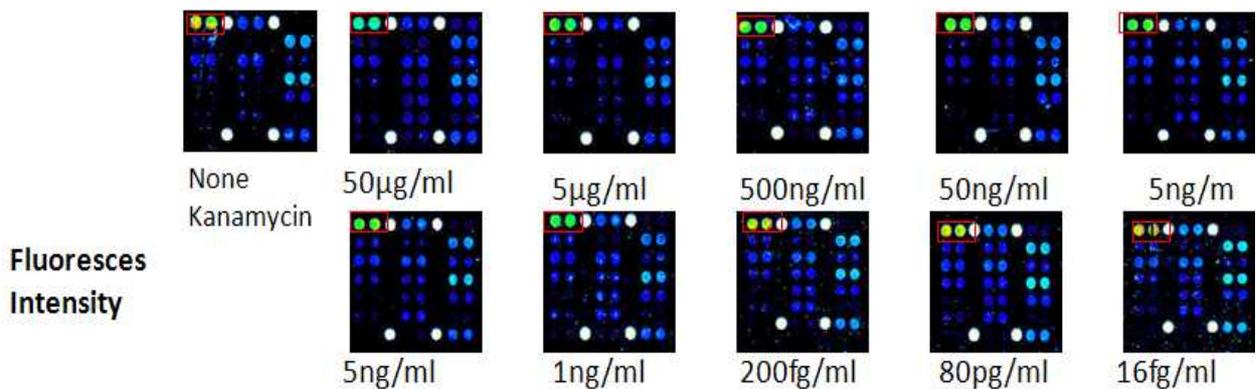


그림 99. 카나마이신 농도에 따른 압타머 결합력 테스트.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연구개발목표의 달성도

1. 세부연구 (주)아이센스

	목 표	평가의 착안점	자체평가	달성도 (%)
1 차 년 도	미세유로흐름계 Lab-on-a-film 칩 디자인	한 번의 시료주입으로 효소면역분석법이 가능한 미세유로 채널의 디자인	<ul style="list-style-type: none"> • 임의의 세척 단계 없이 효소면역분석법이 가능한 Lab-on-a-film 칩 구현-유체 테스트 및 제재의 수화 정도를 파악하여 칩을 완성한 상태이나 항생제의 종류에 따라 디자인 변경은 이루어질 수 있음 • 간단한 제작 방법 및 재현성으로 대량생산으로의 가능성 확보-기본의 래피드 테스트 키트를 대체할 수 있는 일회용 칩으로 정량분석이 가능한 독자적 기술 	100
	센서 시스템으로 적용될 다양한 전극 시스템 개발 및 검출기술개발	미세유로에 적용하기 적절한 소형 일회용 전극들의 대량 생산성과 센서의 작동 여부 및 실용적 신호 검출 여부	<ul style="list-style-type: none"> • 스크린 프린팅 기술로 간단하게 제작할 수 있는 전극 형성(전극의 사이즈 및 디자인 쉽게 변경 가능)-가격 및 전기화학센서로서 성능이 우수하여 일회용 전극으로 적합함 • 전류법을 통해 센서 신호를 전기 신호로 검출할 수 있음-Tetracycline 신호 검출 	100
2 차 년 도	잔류 항생제 검출을 위한 Lab-on-a-film 칩 최적화를 통한 성능 테스트	<ul style="list-style-type: none"> • 버퍼 및 실제 시료 내에 존재하는 TC, CAP, SDM 적용하여 정량 곡선 확보 • Lab-on-a-film 칩 케이스 제작 	<ul style="list-style-type: none"> • Lab-on-a-film 칩의 다양한 조건 최적화를 통해 버퍼 표준 용액내에 존재하는 Tetracycline(TC), Chloramphenicol(CAP), Sulfadimethoxine(SDM) 농도별 정량 곡선 확보 • 실제 시료 적용을 통해 항생제 농도별 정량곡선 확보-제품화 가능성 확보 • Lab-on-a-film 칩 케이스 제작 완료-제품화 가능성 확보 	100
	Lab-on-a-film 칩 제작 가능한 pilot plant 시스템 확립	Pilot plant 시스템 확립을 위한 칩 제작용 기자재 및 시설 확보	<ul style="list-style-type: none"> • Lab-on-film 칩 제작을 위한 노광기/에칭기/분주기/조립기/타발용커팅기 등을 항온항습실에 확보함-실험실 수준에서는 벗어난 상태로 다량 제작이 가능함 	100
3 차 년 도	농·축산품에 잔류하는 항생제 검출을 위한 Lab-on-a-film 칩 개발 완료	실제 시료 내에 존재하는 TC, CAP, SDM 적용하여 정량 곡선 확보 및 기존 측정방법과 비교 데이터 확보	<ul style="list-style-type: none"> • Pilot plant 시스템에서 제작한 Lab-on-a-film 칩을 통해 소고기, 돼지고기, 닭고기 내에 존재하는 TC, CAP, SDM 농도별 정량 곡선 확보 • 기본 방법을 통해 추출한 항생제의 농도와 칩 내에서 측정된 항생제의 농도 비교 분석 및 recovery 테스트 데이터 확보 	100
	Lab-on-a-film 칩 측정용 계측기 개발 완료	프로토타입 성능 평가 디바이스 확보	<ul style="list-style-type: none"> • Lab-on-a-film 칩 성능 평가를 위한 프로토타입 계측기 확보-현장에서 바로 측정 가능 	100

2. 협동연구 한경대학교

	목 표	평가의 착안점	자체평가	달성도 (%)
1 차 년 도	축산품에 잔류한 축산용 항생제 (tetracycline, ampicillin) 검사용 시료전처리 기술 개발	기존 시료전처리 기술 탐색	<ul style="list-style-type: none"> 항생제 기존 시료전처리 기술 탐색 완료 기존 전처리 방법의 회수율 실험 완료 	100
		새로운 시료전처리 기술 센서와의 적합성	<ul style="list-style-type: none"> on site에서 사용할 수 있게 sonicate 대신 손으로 흔들어 줌 원심분리 대신 filter함으로서, 농축 대신 2번 연속 추출하는 것으로 개발되었음. 	100
	축산품에 잔류한 축산용 항생제 (tetracycline, ampicillin) 기기분석 및 정량기준 설정	tetracycline 및 ampicillin의 method validation 확립	<ul style="list-style-type: none"> 축산품에 첨가한 항생제의 경우 0.1ppm(2ng)을 최소검출한계로 설정 검량선을 작성하였을 때 0.99이상의 상관계수를 지닌 직선성을 나타냄 분석의 정확도와 정밀도를 확인을 위하여 반복 분석한 결과 accuracy는 모두 10% 이하였고 precision은 5% 이하로 분석에 적합함 	100
		시료 분석	잔류 항생제 회수율이 약 80~110%로 추출로서 잔류된 모든 항생제를 추출할 수 있었음.	100
2 차 년 도	축산품에 잔류한 축산용 항생제 (sulfadimethoxin, chloramphenicol) 및 축산품 농약 (fenitrothion)의 검사용 시료전처리 기술 개발	기존 시료전처리 기술 탐색	<ul style="list-style-type: none"> 항생제 기존 시료전처리 기술 탐색 완료 기존 전처리 방법의 회수율이 80~110%로 실험 결과 적합함. 	100
		새로운 시료전처리 기술 센서와의 적합성	<ul style="list-style-type: none"> 원심분리 대신 syringe filter를 사용 SPE 정제 대신 액-액분리를 하여 농축을 생략하였음 	100
	축산품에 잔류한 축산용 항생제(sulfadimet hoxin, chloramphenicol) 및 축산품 농약(fenitrothion) 의 기기분석 및 정량기준 설정	sulfadimethoxin, fenitrothion 및 chloramphenicol의 method validation 확립	<ul style="list-style-type: none"> 소고기, 돼지고기, 닭고기, 우유, 계란에 첨가한 sulfadimethoxine과 fenitrothion의 경우 0.05ppm, chloramphenicol의 경우 0.01ppm을 최소검출한계로 설정 검량선을 작성하였을 때 0.99이상의 상관계수를 지닌 직선성을 나타냄 분석의 정확도와 정밀도를 확인을 위하여 반복 분석한 결과 accuracy는 모두 10% 이하였고 precision은 5% 이하로 분석에 적합함 	100
		시료 분석	잔류 항생제 회수율이 약 80~110%로 추출로서 잔류된 모든 항생제를 추출할 수 있었음	100
3 차 년 도	고기류에 잔류한 축산용 항생제 Tetracycline, sulfadimethoxine, chloramphenicol, 속성 전처리 기술 개발	새로운 시료전처리 기술의 센서와의 적합성	추출 용매 및 마지막 용매를 PBS buffer와 혼합하여 실험한 결과 센서와의 적합성을 알수 있었음	100
		시료 분석	속성 분석법의 추출 회수율 결과 항생제 모두 80~110%의 적합함을 알 수 있었음	100
	고기류에 잔류한 항생제 시료전처리 및 키트화 기술개발	현장 적용가능	추출(handy shaking)→filter(1)→SPE clean up(syringe+connector사용)→분석(2)의 과정으로 two step으로 kit화시켜 전처리 시간을 10분내외로 단축시켰음	100

3. 협동연구 부산대학교

	목 표	평가의 착안점	자체평가	달성도 (%)
1 차 년 도	바이오센서 전극개발 및 검출 분석 조건 연구	<ul style="list-style-type: none"> 안정성 및 감도 감도 및 회수율 	<ul style="list-style-type: none"> ds-cellulose DNA 탄소반죽전극 제작 전기전도성고분자, dendrimer, 금나노입자 및 quantum dot 및 CAP 항체로 이루어진 고감도 면역센서 개발 간이전처리법 및 식품공전법 전처리법의 회수율 비교 실제시료(쇠고기, 돼지고기, 닭고기) 분석 조건 확보 	100
	단일채널 microfluidics 모듈 설계 및 분리 농축 특성연구	분리, 검출 시간	<ul style="list-style-type: none"> 유리 애칭법을 이용하여 T-형의 microfluidic chip 설계 및 제작 전기영동법을 이용하여 항생제와 유사한 구조를 가지는 8종의 혼합물들의 분리 조건 및 전기화학적 검출조건 연구 	100
	소형 전처리 모 듈설계	휴대성 및 전처리 시간	<ul style="list-style-type: none"> 소형의 sonicator가 내장 휴대화 실현 	100
	위 탁 과 제	대상항생제 선정 및 핵산 라이브리리 제 분리방법 개발	<ul style="list-style-type: none"> 고체 표면에 항생제의 고정화 저분자인 항생제를 SELEX에 적용하기 위한 분리 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> Sepharose 비드 및 자성 비드에 항생제의 고정화 성공 친화성 크로마토그래피법, 자성비드, CE 등을 응용한 SELEX 수행
2 차 년 도	바이오센서 및 면역센서를 이용한 항생제의 전기화학적 분석법 개발	바이오센서를 이용한 전기화학적 항생제 분석 및 면역센서 성능향상	<ul style="list-style-type: none"> 나노입자 및 전도성고분자를 이용하여 감도 향상 전류법을 이용하여 센서의 전기화학적 신호 검출 축산시료(쇠고기, 돼지고기, 닭고기)의 항생제 검출 클로르암페니콜: 검출한계 45 pg/mL 테트라사이클린: 1 ng/mL 	100
	유리에칭을 이용하여 다중채널 마이크로플루이 딕 칩 제작	다중채널 마이크로플루이딕 칩 개발 및 농축효율 개선	<ul style="list-style-type: none"> 농축 및 분리가 하나의 칩 위에서 수행 소량의 시료(100µL) 사용 10,900배 농축효과 실현 4종의 테트라사이클린계 분리시간 단축(200초 이내 분리) 	100
	sonicator를 내장한 휴대형 전처리기 제작	휴대형 전처리기 제작 및 간이전처리법 개발	<ul style="list-style-type: none"> 무게 100 g 전처리 시간 5분 	100
	위 탁 과 제	항생제의 압타머 개발	<ul style="list-style-type: none"> 항생제의 압타머 개발을 위한 SELEX 방법 구축 분리된 압타머의 최적화 개발된 압타머의 특성 연구 및 항생제와의 결합력 측정 	<ul style="list-style-type: none"> SELEX를 수행하여 압타머 분리 분리된 압타머의 2차 구조를 통한 결합 motif 예측 및 이를 이용한 압타머 개발 Tm 측정으로 개발된 압타머와 항생제간의 결합 확인

3 차 년 도	센싱시스템을 결합 및 표준분석법 확보	시료주입/농축/분리 효율 향상	<ul style="list-style-type: none"> • Lab-on-a-chip 센서 시스템 개발 • 전기화학적 센서 시스템 검출 및 분석법 최적화 	100
	간이전처리법 기능 향상	전처리시간 및 시료주입 편의성	전처리된 시료를 필터가 부착된 주사기로 센싱시스템에 바로 주입	100
	시스템 검증 (validation)	기존 표준분석법과의 결과값 비교	<ul style="list-style-type: none"> • 실제 시료의 표준분석법 개발 • 기존의 항생제 표준분석법과의 비교실험 및 시스템 검증 	100
	위 탁 과 제	항생제 압타머 라이브리리 구축 및 압타머를 이용한 바이오 센서 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 여러 가지 항생제의 압타머를 이용한 라이브러리 구축 • 전기화학/ 형광 분석법 등을 기초로한 항생제 검출 방법 모색 • 압타머를 이용한 항생제의 검출 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • kanamycin, ampicillin, sulfadimethoxine 등 여러 항생제의 압타머 개발 • 압타머를 이용한 항생제 검출에 대한 여러 가지 방법 모색 • 금나노입자를 이용한 항생제 검출 시스템 개발

4. 협동연구 한림대학교

	목 표	평가의 착안점	자체평가	달성도 (%)
1 차 년 도	테트라사이클린 특이 항체의 발굴 및 압타머 발굴	테트라사이클린 특이적 항체 및 압타머 확보	테트라사이클린 특이적 항체 및 압타머 발굴 및 확보	100
	테트라사이클린 검출용 칩 기판 제조	테트라사이클린 검출용 칩 기판 제조 기술	테트라사이클린 검출용 칩 기판 제조 기술 확보	100
2 차 년 도	설폰아미드계 항생제에 특이적으로 결합하는 항체 및 압타머 발굴	<ul style="list-style-type: none"> • 설폰아미드계 항생제에 특이적으로 결합하는 항체 및 압타머 발굴 • 압타머 칩 제조기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • Kanamycine 에 특이적으로 결합하는 항체 및 압타머 발굴 및 확보 • 압타머 칩을 이용한 결합력 테스트 완료 	100
	잔류항생제 검출용 칩 제조기술 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 잔류항생제 검출용 칩 제조기술 • 항생제-단백질 결합체 제조 기술 • 잔류 항생제 검출용 칩 상 고정화 기술 	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오 리셉터를 이용한 잔류항생제 검출용 칩 제조 • 항생제와 단백질의 결합반응을 통한 결합체 유효성 테스트 및 재현성 있는 제조 기술 확보 • 칩상 단백질 고정화를 이용한 항생제-단백질 결합체의 고정화 기술 확보 	100
3 차 년 도	설파디메톡신 분석을 위한 멤베레인형 바이오 칩 개발 및 Kanamycine 압타머 칩 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 항생제-유전자 결합체 제조기술 • 유전자-유전자 결합을 이용한 고정화 기술 • SDM 검출용 멤베레인형 바이오 칩 개발 • 압타머 고정화 기술을 이용한 압타머 칩 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 항생제-유전자 결합체 제조 기술 확보 • 유전자-유전자 결합을 이용한 고정화 기술 개발 및 이를 이용한 SDM 검출용 칩 개발 • SDM 분석용 멤베레인형 칩 개발 및 유효성 테스트 • 압타머 고정화 및 칩상 결합력 및 특이도 테스트 	100

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 세부연구 (주)아이센스

현재 시장에서는 저렴하면서도 정확도가 높은 농·축산품용 항생제 측정 키트가 개발되지 못한 상태이다. 농·축산품을 비롯한 대부분의 식료품을 현장에서 분석하고 판별하는 시스템이 개발되고 이 제품이 전문가들 뿐만 아니라 일반 소비자 수준에서도 검사를 쉽게 행할 수 있다면 안전하고 신뢰받는 식료품들이 유통될 것이며 이를 통해 국민의 건강 또한 보호받을 수 있을 것이다. 게다가 (주)아이센스가 개발하고자 하는 Lab-on-a-film 칩은 항생제 측정뿐만 아니라 질병 진단에도 응용이 가능하며 기술 수준은 재래식 방법인 nitrocellulose membrane을 이용한 lateral flow 면역 진단 기법에서 한 단계 진화된 수준으로서 제품 개발이 완료된다면 세

계적인 기업들과 비교했을 때도 전혀 손색없는 기반 기술을 확보할 수 있을 거라 생각된다. Lab-on-a-film 칩 개발은 새로운 진단 기반 기술로 POCT 시장에서의 선도적 역할을 담당하면서 lateral flow 면역 진단 기법을 대체할 수 있을거라 생각한다.

2. 협동연구 한경대학교

축산물에서 잔류 항생물질(tetracycline, sulfadimethoxin 및 chloramphenicol)들의 추출은 실온 및 buffer에서 균질화한 다음 상층액을 각종 SPE cartridge에 메탄올과 증류수로 활성화/흡착/세척한 후, 휴대용 센서에 적용할 수 있는 유기용매 시스템(메탄올성 수산용액, 아세토나이트릴, 아세톤등) 및 분석의 최적화를 통해 시료 전처리 기술을 확립하고, 전처리 기술이 확립된 시료를 HPLC, LC/MS로 분석하여 센서 분석에 대한 기준을 확립하였다.

현장에서 도입가능한 일회용 전처리기 개발(추출-filter 및 액-액추출 or SPE cartridge의 two step)로 복잡했던 기존 전처리 과정에서 10분이내의 신속 전처리를 가능하게 되었다

바이오센서에 적용하기에 적합한 시료전처리 기술 개발 및 이의 키트화 개발로 현장검출(on-site-detection)이 가능하게 되었다.

3. 협동연구 부산대학교

축산시료에 대한 간이전처리법과 고감도 바이오센서 및 다중채널 마이크로플루이딕칩을 결합하여 항생제를 신속정확하게 분리 검출하는 전기화학적 분석법을 개발하였다. 개발된 기술들은 고정밀 바이오센서를 이용한 새로운 항생제의 신속분석법 및 현장분석법 개발에 적용할 수 있으며, 축산분야 이외에 환경, 식품, 에너지, 의료 등 관련분야의 특정물질 모니터링과 정확한 평가기술 확보에도 기여할 것으로 판단된다. 또한 항생제 압타머 개발은 항생제 뿐 아니라 항체를 만들 수 없는 다른 저분자에 있어서도 새로운 예시를 보여준 것이라 할 수 있다. 또한 본 과제의 연구 결과로 개발된 항생제의 압타머와 이를 이용한 검출 시스템은 농, 축산품에 함유되어 있는 항생제의 유무 및 기준치 이상의 항생제 검출뿐 아니라 다른 물질을 검출할 수 있는 바이오센서로 적용될 것이다.

4. 협동연구 한림대학교

본 기술은 기존의 래피드 키트 스트립으로 주로 사용해 오던 NC-멤버레인을 대체할 수 있는 최적의 변성 유리섬유를 이용한 멤버레인 바이오 칩으로서 다양한 항생제 등의 유해물질 분석을 간편하게 제작하는 기반기술로 적용될 수 있을 것이다. 그리고 상업적으로 판매되는 멤버레인 형 키트들은 대부분 콜로이드성 금 입자를 사용하여 육안으로 확인하거나 형광물질을 사용하여 형광스캐너로 분석하게 된다. 육안으로 확인하는 방식에 비해 형광스캐너를 이용하게 되면 극미량의 시료까지 분석할 수 있으며, 분석용 소프트웨어를 이용하는 경우 데이터의 분석 및 처리가 더욱 정확하고 정교하게 기기적으로 산출 가능하다는 장점이 있다. 그러나 스캐너의 제작방식에 따라 제작에 따른 비용이 천차만별이므로 멤버레인형 디바이스 키트의 특성상 현장에서 널리 사용되기 위해서는 저가형의 1D 스캐너의 개발이 필수적이며 실제로도 1D형태의 스캐너가 제품시장을 장악하고 있다. 본 과제에서 사용한 스캐너 또한 저가형의 1D 스캐너로 SDM 스트립형태에 맞춰 사용될 수 있도록 스트립과 스캐너사이의 판독오차를 최소화 하였으며, 현장에서도 비교적 저렴한 형태로 공급받을 수 있도록 하였으며 판독결과의 분석이 소프트웨어에 의한 자동화된 분석 시스템의 기초 기술을 확립하였다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구 개발 성과

1. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자	학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분	비고
2007	-	-	-	-	-	-	-
2008	Electrophoretic analysis of food dyes using a miniaturized microfluidic system	심윤보, 박덕수 외 3명	Electrophoresis	29 (9)	국외	SCI	부산대
2009	Development of Extraction and Analytical Methods of Nitrite Ion from Food Samples: Microchip Electrophoresis with a Modified Electrode	심윤보, 박덕수 외 3명	Journal of Agricultural and food chemistry	57 (10)	국외	SCI	부산대
	Electrophoretic total analysis of trace tetracycline antibiotics in a microchip with amperometry	심윤보 외 3명	Electrophoresis	30 (18)	국외	SCI	부산대
	Molecular Recognition of Neutral Substrates by New Tetraaminocalix[4]arene Derivative	김태선 외 4명	Bull. Korean Chem. Soc	30	국내	SCI	한림대
	Water-soluble aminocalix[4]arene receptors with hydrophobic and hydrophilic mouths	김태선 외 9명	Tetrahedron Letters	51	국외	SCI	한림대
2010	An amperometric chloramphenicol immunosensor based on cadmium sulfide nanoparticles modified-dendrimer bonded conducting polymer	심윤보, 반창일 외 3명	Biosensors & Bioelectronics	25 (7)	국외	SCI	부산대 /포항 공대

2. 특허 성과

등록/출원 연도	특허명	등록인/출원인	등록국/출원국	등록번호/출원번호	등록/출원	비고
2008	Microfluidic Sensor Complex Structure	(주)아이센스	전세계	PCT/KR2008/004336	출원	-
2010	Microfluidic Sensor Complex Structure	(주)아이센스	미국	12/670,817	출원	-
	축산시료 간이전처리기	부산대학교 산학협력단(심윤보)	한국	-	출원	예정

3. 인력 지원 성과

년도	지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별	
		박사	석사	학사	기타	남	여
2008	(주)아이센스	0	-	-	-	-	-
	한경대	6	-	2	2	3	3
	부산대	9	5	4	-	4	5
	포항공대	6	-	2	4	2	4
	한림대	11	3	6	2	8	3
2009	(주)아이센스	2	-	1	1	1	1
	한경대	10	-	3	5	5	4
	부산대	7	6	1	-	5	2
	포항공대	6	-	1	5	2	4
	한림대	6	3	2	1	4	2
2010	(주)아이센스	3	-	3	-	3	-
	한경대	7	-	3	2	3	4
	부산대	8	6	2	-	4	4
	포항공대	6	-	1	5	2	4
	한림대	5	3	1	1	4	1

제 2 절 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획

본 과제를 통하여 상업화가 가능한 수준까지 개발된 내용은 아래와 같다.

- Lab-on-a-film 칩형 항생제 검출용 전기화학적 면역센서 및 이의 전기화학적 측정기기
- 현장 적용이 가능한 시료전처리 방법 및 시작품
- 래피드 테스트형 항생제 형광검출 키트 및 휴대형 측정기기
- 항생제 압타머 제조방법 및 이를 이용한 센서 시작품
- 무표식자형 전기화학적 항생제 검출용 칩 및 간이시료전처리기

위에 열거한 항목 중 Lab-on-a-film 칩형 항생제 검출센서 및 측정기기는 개발 과정에서 이미 파일럿 생산시설을 갖추었고, 대량생산의 가능성까지 연구된 상태이다. 시료전처리 시작 제품은 상업용으로 값싸게 제작하는 것이 용이하며, 본 과제에서 개발한 센서 외에도 다른 방식의 측정기기(예를 들어 HPLC)에도 같이 실용적으로 사용하는 것이 가능하다. 래피드 테스트형 항생제 형광검출키트 또한 즉시 생산이 가능한 수준으로 개발되었다. 압타머를 사용한 센서 시작품은 항체를 사용한 것과 유사한 성능을 보이기는 하지만 센서로서의 안정성이나 재현성은 좀 더 살펴 볼 일들이 남아 있다. 무표식자형 전기화학적 항생제 검출용 칩은 휴대용으로 현장에서 사용하는 용도보다는 복잡한 실험실 장비를 간편화하는데 높은 상업성이 있을 것으로

로 판단한다.

(주)아이센스 및 연구진 모두 개발한 시작제품들은 이제 충분히 상업화할 수 있다는 확신을 가지고 있다. 다만 아직 부족한 내용은 실제 상업화를 하는데 있어서의 기기, 센서, 전처리 키트의 대량 제조 및 제품 안정성 확보, 사용의 편리성을 더한 디자인, 이에 맞는 사용자 매뉴얼, 포장 및 각종 인증을 받는데 필요한 밸리데이션 데이터 등이 있다. 이러한 다양한 일들을 추진할 동력은 단연 시장진입에 대한 확신과 시장의 규모에 맞춘 이익 창출 모델의 설정이다. 특히, 시장 진입 후 마케팅 비용에 대한 산정에 있어서 이익창출 모델은 기업으로서 반드시 검토해야 할 내용으로 일정한 연구 시간이 필요할 것으로 판단된다. 이러한 마케팅 모델 설정 및 투자 결정에 대한 일을 하는 동안 (주)아이센스는 개발된 제품들의 안정성을 확보하는데 필요한 여러 가지 필드 실험을 지속할 예정이다. 현재의 계획으로는 2010년 6월까지 본 과제에 대한 평가를 마치고 난 후 2010년 말까지 위에 서술한 시작제품의 안정성 평가 연구 및 세계시장에 대한 철저한 분석을 병행할 예정이며, 2011년 분석 평가한 내용을 기반으로 사업화를 계획하고 있다.

2. 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- 간이전처리기 및 바이오센서에 대한 국내특허 출원 예정
- 항생제 압타머 특허 출원 및 논문 게재 계획

3. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- 대상항생제의 확대를 통한 항생제 간편 분석 솔루션 제공 및 추가연구 필요
- 환경, 보건, 식품 등 인체유해 물질들의 현장분석시스템 개발에 활용
- 연구기간 중 수행하였던 여러 가지의 SELEX 방법들과 노하우는 또 다른 다양한 분자를 표적 물질로 하여 압타머를 개발하는데 활용할 것임

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 본 과제를 시작한 이후 본 연구진은 꾸준히 경쟁동향에 대한 기술적 상업적 내용을 수집하여 왔으나 아직까지 과제를 시작할 당시에 비해 특별히 달라진 동향을 파악하지는 못하였다. 학술지를 통하여 발표되는 내용은 본 연구진이 시도한 방법들과 유사하게 그러나 이미 잘 알려진 방법들을 결합하여 다중검출키트의 개발에 대한 내용이 눈에 띄는 정도이고, 전체적인 연구동향도 아주 활발하다고 말하기는 어려운 수준이다. 다만 각국이 잔류 항생제에 대한 관심이 점차 증대하는 움직임을 보이고 있고, 일부 유럽국가들에서는 규제의 한계 및 강도가 더 강화되는 추세가 있어 조만간 현장적용이 가능한 항생제 검출키트에 대한 요구가 높아질 것으로 판단하고 있다. 현재 시판되고 있는 제품들은 모두 본 과제를 시작할 당시의 수준인 래피드 테스트 키트 형태의 것들이며, 이에 대한 마켓 수요는 아직 뚜렷한 시장조사 통계가 없는 상황이다. 다만 각국의 규제 움직임 강화에 따라 좀 더 시장이 확대되지 않을까 하는 기대감만 있을 뿐이어서 실질적인 시장 진입을 위해서는 어느 정도의 모험을 수반한 결정이 필요할 것으로 판단된다.

2. 압타머를 이용한 진단 및 센서

[압타머를 이용한 진단 및 센서]

항체에 버금가는 표적 친화력을 가지고 있고 항체에 비해 크기가 월등히 작고 또한 다양한 표적분자들과 높은 결합력으로 결합할 수 있는 능력을 가지고 있는 압타머의 진단 및 분석으로의 응용은 어찌 보면 매우 당연하다 볼 수 있다. 1997년 형광 표지된 압타머를 이용한 Human-neutrophil elastase 를 광학적으로 검출하는 압타머 센서(aptasensor)가 처음 개발된 이후 크게 (i) 압타머와 표적분자간의 결합 전후에 나타나는 전자 전달정도를 감응하여 반응하는 전기화학적 (electrochemical) 방식의 센서, (ii) 형광물질등의 형광측정을 통한 광학적 (optical) 방식의 센서, 그리고 (iii) 표적 물질과의 결합 전후에 나타나는 질량의 차이를 분석하여 측정하는 질량 분석 (mass-sensitive) 방식의 압타머 센서 등이 주로 개발되고 있다.[1],[2] 전기화학적 방식의 예로서 Methylene blue (MB)로 표지된 압타머를 전극에 고정화 하고 나서 표적물질과 결합을 하게 되면 압타머의 구조 변화를 유발하면서 압타머에 표지된 MB가 전극으로부터 멀어지게 되고 결과적으로 MB로부터의 전기화학적 신호가 줄어들게 되어 표적물질 결합 전후의 전기화학적 신호를 감지하면서 압타머와의 결합여부를 진단할 수 있게 된다. 또한 압타머의 hairpin-loop 구조에 chelating 되어 있던 MB가 표적물질 결합 후 나타나는 변형 구조로 인해 MB가 압타머로부터 빠져나가면서 신호의 감소를 주는 label-free 방식도 있다. 또한 전극대신 탄소 나노튜브(CNT-FET)를 사용하는 방식은 표적물질 결합 전후에 나타나는 전기전도도 (conductance)의 변화를 감응함으로써 신호를 얻을 수 있는 방식이다(그림 1).

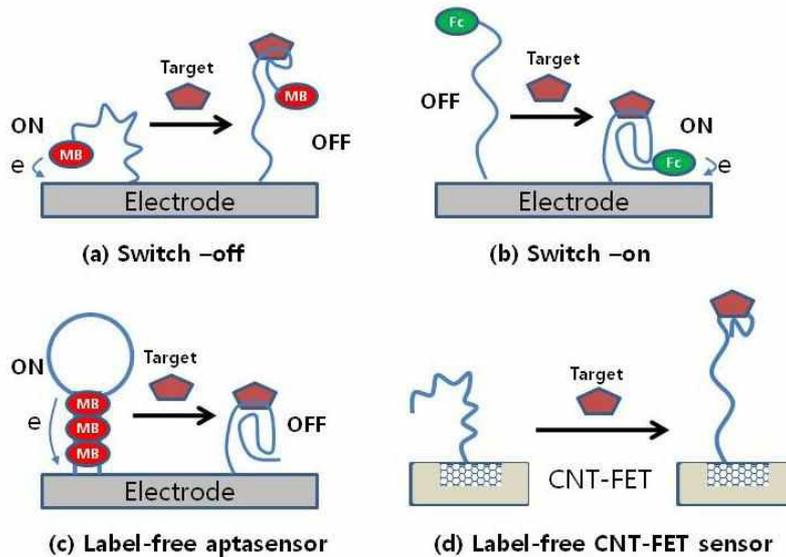


그림 1. 전기화학적 방식을 이용한 다양한 형태의 바이오센서.

광학적 방식의 센서는 특히 fluorescent dye의 aptamer 분자에 연결이 용이하기 때문에 서로 다른 파장을 갖는 두개의 형광염료(fluorescent dye)의 Quenching 및 FRET 효과를 이용한 센서들이 최근 개발되어 주목을 받고 있다(그림 2).[3],[4] 그리고 질량분석 방식에는 evanescent wave 방식을 이용한 Surface plasmon resonance (SPR), acoustic wave 방식의 Quartz crystal microbalance (QCM), surface acoustic wave (SAW), 그리고 micromechanical cantilever 방식 등의 바이오센서들이 이용되고 있다.

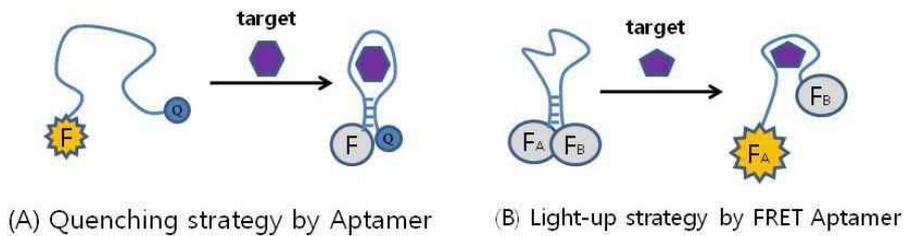


그림 2. Quenching 및 FRET 시스템의 응용을 통한 aptamer 센서.

현재 aptamer 센서 개발을 진행하고 있는 회사들을 살펴보면 미국의 SomaLogic사가 변형 핵산을 이용한 고효율 SELEX 기술을 이용하여 진단용 aptamer를 개발하고자 연구하고 있고, LC Science사는 aptamer를 이용한 단백질 측정용 microarray 기술을 개발하고 있다. Promega사에는 광우병 진단에 이용될 수 있는 prion detection aptamer 기술개발을 수행 중이다. 또한 말라카이트, ATP, 에스트라다이올 등의 저분자 대사물질, 환경 또는 식품 유해물질들에 대한 aptamer 개발 연구가 현재 진행되고 있고 특히 코카인과 같은 마약류를 검출하기 위한 aptamer 센서에 대한 연구도 보고되고 있다. 현재까지 aptamer를 어떤 방법으로든 칩 상에 결합하여 결과를 확보한 연구내용이 현재까지 발표된 적이 없습니다. 일부 gold substrates 상에서 aptamer를 horizontal spacing 이 존재하는 유전자와 짧은 분자의 혼합 단분자층을 만들어 이들이 island formation 을 하기 전에 유지된 horizontal spacing 을 이용하여 유전자-유전자 결합을 진행하여 aptamer가 결합되게 하여 aptamer와 선별적인 결합을 확인하는 (1-2개의 aptamer) 기술은 극히

최근에야 발표되고 있다.[5],[6]

[압타머 개발 최근 연구 동향]

국내 압타머 개발은 아직 초기 단계이긴 하지만 주로 대학 연구소를 중심으로 새로운 압타머의 개발 및 응용을 위한 연구들을 활발히 진행해 가고 있다. 압타머 발굴, 암 및 면역질환 치료제로서의 신약개발, 변형 압타머를 이용한 multiplex aptamer assay 기술등을 포함한 체외진단 (IVC) 방법의 개발, 분자 imaging, 조영제 개발 등의 연구들을 학교 및 연구소등과의 교류를 통해 활발하게 진행하고 있다. 또한 단국대학교 BK21 RNA 전문인력 사업팀에서 (<http://www.bk21rna.net>) 항바이러스 압타머와 암세포 신호전달을 방해하는 압타머에 관하여 연구중이고, 이를 통합 새로운 (대장암) 항암제의 개발에 주력하고 있다. 고려대학교 구만복 교수팀은 압타머를 이용한 바이오센서 연구를 진행하고 있으며 최근 압타머를 금표면에 부착하고 SPR로 표적물질의 감지능력을 조사할 수 있는 압타머 센서를 개발하였다. 광주과학기술원에서는 양자점-압타머 접합체 (Quantum Dot-aptamer conjugate)를 이용하여 암 전립선 암과 진단이 가능한 압타머를 연구 중에 있다. 또한 동국대학교 나노바이오진단 연구실에서는 질병 진단과 환경유해물질 측정에 활용되는 압타머에 대해 연구하고 있다. 한국 화학연구원 이정오 박사팀에서는 압타머를 분자 인식물질로 사용한 탄소나노튜브 기반 전계효과 트랜지스터 센서 (single-walled carbon nanotube field effect transistor, SWCNT-FET)를 개발하였다. 기관에 직접 성장된 탄소나노튜브에 CDI-Tween 20이란 링커로 트롬빈 압타머를 고정시켜 센서를 구성하였으며, 압타머 자체의 음전하가 표적 물질 (트롬빈)과 결합하였을 때 사라지면서 탄소 나노튜브를 통한 전기전도도가 감소하는 특징을 이용하고 있다. 검출한도는 약 10 nM정도이고, 5 회이상 반복사용해도 전혀 문제가 없을 정도로 높은 안정성을 보여주었다.[7]

[결론 및 전망]

압타머가 20년 전 처음 개발되고 난 이후 치료, 진단 및 센서 분야에서 새롭게 이용할 수 있는 차세대 생체분자로 여겨져 많이 연구되어 왔고 그 결과 비교적 짧은 기간에 FDA 승인을 받은 첫 번째 압타머 치료제가 나올 수 있었다. 지금도 전 세계, 다양한 연구 기관에서 압타머 발굴 기술 (SELEX)을 좀 더 효과적으로 향상시키기 위해 연구 중이고 다양한 분야에 이용 가능한 압타머를 발굴 하기 위해 노력하고 있기 때문에 앞으로 다양한 종류의 압타머가 개발되어 상용화 될 것이라 기대한다. 앞에서 기술한 것처럼 지금까지 여러가지 응용기술들이 개발되어 왔지만 압타머 기술은 아직 태동기의 기술이라고 말할 수 있고 앞으로 해야 할 응용연구들이 무궁무진하다고 생각한다. 특히 기존의 진단 및 치료용의 주 용도를 벗어나 생물학적 연구의 중요한 tool로서 개발 연구 등이 최근 주목을 받고 있는데, 예를 들어 압타머를 PCR과 같은 유전자 증폭 (sequence amplification)등에 응용하여 DNA detection등이 가능하고 또한 Sensor 시스템과 병행하여 Real-time PCR로의 응용 연구도 보고가 되었다.[8] 또한 siRNA와 압타머를 융합하여 drug delivery에 응용도 가능하며[9] 나노입자 (nanoparticle)에 많은 양의 압타머를 결합시켜 높은 약물효과 등을 보여준 나노입자-압타머 복합체의 개발도 보고 되었으며 이와 같이 앞으로 새로운 영역으로의 응용 사례는 더욱더 증가할 것이라 본다. 따라서 우리나라의 바이오 연구진들이 좀 더 많은 관심과 노력을 기울여 압타머 기술과 같은 바이오 원천기술을 잘

이용할 수 있는 능력을 갖춘다면, 세계 바이오 분야에서 우리나라의 국가경쟁력을 향상시키는 데 이바지 할 수 있을 것으로 생각된다.

[참고문헌]

- [1] Song S et al. Aptamer-based biosensors. *Trends Anal. Chem.*, 2008, *27*, 108-117.
- [2] Cho EJ et al. Applications of aptamers as sensors. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2009, *3*, 241-264.
- [3] Cho EJ et al. Applications of aptamers as sensors. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2009, *2*, 241-264.
- [4] Stojanovic MN et al. Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, *123*, 4928-4931.
- [5] Aptamer-Functionalized Nano-Biosensors. *Sensors*, 2009, *9*.
- [6] *Anal. Chem.* 2009, *81*, 10013-10018.
- [7] So HM et al. Single-walled carbon nanotube biosensors using aptamers as molecular recognition elements. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, *127*, 11906-11907.
- [8] Zhao W. et al. Rolling Circle Amplification: Applications in Nanotechnology and Biodetection with Functional Nucleic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, *47*, 6330-6337.
- [9] Zhou J et al., Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 Therapy. *Mol. Ther.* 2008, *16*, 1481-1489.

제 7 장 참고문헌

- [1] 항생제 내성 인식도 조사 및 소비자 홍보·교육에 관한 최종보고서, (사)한국소비생활연구원, 2007. 11. 30. (지원기관 식품의약품안전청)
- [2] 식품 중 클로람페니콜이란, 식품의약품안전청 위해예방정책과, 2008. 12.
- [3] 바이오 칩 최근 기술 이슈 및 시장 동향, 한국보건산업진흥원, 2005. 2.
- [4] C. Tuerk; L. Gold, *Science*, 1990, *249*, 505–510.
- [5] A.L. Cinquina; F. Longo; G. Anastasi; L. Giannetti; R. Cozzani, *J. Chromatogr. A*, 2003, *987*, 227–233
- [6] 의약품 중 분석법의 벨리데이션에 대한 가이드라인, 식품의약품안전청, 2004. 11.
- [7] G.Stoev; A.Michailova, *J. Chromatogr. A*, 2000, *871*, 37–42.
- [8] L.Verzegnassi; M.C.Savoy–Perroud; R.H.Stadler, *J. Chromatogr. A*, 2002, *977*, 77–87.
- [9] M. Bononi; F. Tateo, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, *21*, 84–89.
- [10] Chu, K. S., U. P. Oh, I. Y. Choi, H. J. Song, and H. S. Chai. *Kor. J. Vet. Serv.* 1997, *20*, 161–168.
- [11] Meulenberg E., Koopal K., and Rhemrev R. *Int. J. Env. Anal. Chem.* 2005, *85*, 871.
- [12] Zhang Y., Lu S., Liu W. Zhao C., and Xi R., *J. Agric. Food Chem.* 2007, *55*, 211–218.
- [13] Niazi JH., Lee, S.J., Gu M.B. *Bioorg Med Chem.* 2008, *16*, 7245–7253.