

발간등록번호

11-1543000-000153-01

압타머를 이용한 가축질병 진단용 바이오센서 개발

(Development of aptasensor for PRRSV, BVDV)

서울대학교

농림축산식품자료실



0018232

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “압타머를 이용한 가축질병 진단용 바이오센서 개발”의 보고서로 제출합니다.

2013년 6월 30일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 김 기 성

연 구 원 : 강 도 현

연 구 원 : 김 민 성

연 구 원 : 배 원 규

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 구 만 복

협동연구기관명 : (주) 제노텍

협동연구책임자 : 임 시 규

요 약 문

I. 제 목 : aptamer를 이용한 가축질병 진단용 바이오센서 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 산린광입자응집 반응을 이용한 PRRSV, BVDV 진단 미세유체센서 개발 및 평가
- PRRSV, BVDV aptamer 개발
- PRRSV, BVDV aptamer 대량 합성 기술 개발

aptamer는 표적물질에 대해 높은 선택성, 민감성, 결합력을 가지며, 제조 과정이 비교적 간편하고 필요한 변형도 가능하다. 화학적 합성으로 만들어 지므로 순도가 높고 대량생산이 가능하고 상온에서 장기간 보관 할 수 있다. 항체와 같이 특정물질을 인식하여 항원-항체 반응을 이용한 바이오센서 시장에서 항체 시장을 대체 할 수 있을 것으로 판단되며 aptamer를 이용한 동물질병 바이오센서 개발을 위한 aptamer 자원 확보와 대량 생산 기술의 개발이 절실히 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 산린광입자응집 반응을 이용한 PRRSV, BVDV 진단 미세유체센서 개발 및 평가
 - 병원균별 latex particle의 사이즈 결정, aptamer를 이용한 응집반응 실험
 - 모세관 펌프 및 공기생성 억제 유체칩 설계 및 제작
- PRRSV, BVDV aptamer 개발
 - 웹 기반 프로그램을 이용한 aptamer의 2차 구조 분석 및 결합 서열 분석
 - 표면자기공명 장치를 이용한 aptamer의 결합력, 선택성 분석
- PRRSV, BVDV aptamer 대량 합성 기술 개발
 - Aptamer의 상품화를 위해 품질기준 및 보관조건, 안정성의 확보조건을 시험하여 사업화의 기반 구축

IV. 연구개발결과

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- aptamer를 이용한 단백질 및 세포 탐지 기술은 의료 진단용 바이오센서 연구에 있어서 항체 시스템을 대체할 수 있는 새로운 기술 확보
- 관련 분야의 원천기술 확보를 기반으로 바이ורי셉터 라이브러리 콘텐츠 구축 및 high-throughput 분석 시스템을 개발하여 다양한 질병관련 물질 동시 분석을 통한 질병 진단 기술로의 연구 확장
- 동물질병 [PRRSV, BVDV] 진단용 aptamer의 상품화
- Aptamer 대량생산 기술 확보를 통한 신 비즈니스모델 창출

Summary

I. Development of an aptasensor to detect PRRSV and BVDV

II. Study objective and necessity

- To develop a microfluidic biosensor which detect PRRSV and BVDV.
- To development of PRRSV and BVDV aptamer
- To development of mass product aptamer synthesis technology

III. Development content and range

(1) Fabrication of a micro-device to detect virus and development of an virus immuno-agglutination response algorithm

- Fabrication of a microfluidic chip applying a MEMS technology for multiple detection
- Optimization of immuno-agglutination response using latex particle and PDA ribosome
- Development of a method to quantify antibiotics using light scattering and fluorescence measurement

(2) Development of bio/immuno receptor and nano-bioprobe for virus detection

- Standardization of a performance test using commercialized virus
- Development of PRRSV and BVDV aptamer to fix nano particle

(3) Development of an antibiotic detection optical biosensor using immuno-agglutination response

- Design and development of micro processor and signal processing kit for signal extraction
- Miniaturization and integration of an USB module to process optical fiber light source and associated signal
- Development of mass product aptamer synthesis technology

IV. Research & development results

(1) Development of an virus detection method using PRRSV and BVDV aptamer

(2) Development of an virus detection method using PDA ribosome

(3) Development of PRRSV and BVDV aptamer

(4) Development of a nano-bioprobe for immuno-agglutination response

(5) Development of an optical biosensor for measuring light scattering and fluorescent light for the antibiotic detection

V. Anticipated study achievement and application plan

(1) Current existing standards ways to investigate all of the target substance for the detection of antibiotic residues is complex and time-consuming, and difficult to

develop as a portable device. Thus a new biosensor developed based on nano-MEMS technology may allow for easy detection and thus save labor and expense.

- (2) Development of a biosensor that a single sample injection can allow biosensor to detect multiple substances simultaneously can supplement drawbacks of substitute dip stick type rapid kit, which completely depends on imports at present, and simplify detection method allowing for development of desktop or portable detection device. In this way, online monitoring system at a centralized manner can be realized as a new surveillance system for food safety.

CONTENTS

Summary	3
Chapter 1. Overview of Reaserch and development	3
1. The importance of research and development and research and development needs of the target	3
1. The need for research and development	3
2. The goal of research and development	3
Chapter 2. Comparison of Korea and foreign technical developments	4
1. Comparison of Korea and foreign technologies for this study	4
1. Levels of Korea and foreign technology and Research Status	4
2. Status both Korea and foreign research	4
3. The team technical level and domestic level	4
Chapter 3. Contents and results of research performed	7
1. Design and production of biosensor for livestock disease detection	7
1. Manufacturing of microfluic device for experimental	7
2. Micro-devices for detection of high-volume production of livestock disease	7
3. Scattering particle immunoagglutination methods of laboratory measurement.	8
4. Detection result of livestock disease used aptamer	12
2. Development of PRRSV and BVDV aptamer	16
1. Development of PRRSV aptamer	16
2. Development of BVDV aptamer	18
3. Development of sandwich method for livestock disease detection	24
3. Development of mass product aptamer synthesis technology	30
Chapter 4. The goal of achieving and contribution of related fields	50
1. Design and production of biosensor for antibiotic detection in raw milk	50
2. Development of Bio/Immunoreceptor and nano-bioprobe for antibiotic detection	50
3. Development of scattered light and fluorescence detection measurement optical fiber device for immune agglutination	50
Chapter 5. Utilization of research and development plan	53
1. Accomplishment of this project	53
1. Accomplishment of manuscript	53

2. Accomplishment of patent	53
3. Additional research and plant to take advantage other research	53
Chapter 6. Collection of international scientific and technical information	63
1. Patent analysis	63
2. Manuscript analysis	64
Chapter 7. Reference	66

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	3
제 1 절	연구개발의 필요성.....	3
제 2 절	연구개발 목표	3
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	4
제 1 절	본 연구관련 국내외 기술수준 비교.....	4
제 2 절	특허분석을 통한 국내외 기술개발 현황.....	4
1.	특허분석 범위.....	4
2.	특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성.....	5
제 3 절	논문분석을 통한 국내외 기술개발 현황.....	6
1.	논문분석 범위.....	6
2.	논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성.....	6
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	7
제 1 절	압타머를 이용한 가축질병 진단용 바이오센서 개발.....	7
1.	압타머를 이용한 산란광 입자응집반응의 병원체 특성 분석.....	7
2.	산란광입자면역응집반응용 미세유체센서 개발.....	8
3.	PRRSV, BVDV 압타머를 이용한 산란광입자면역응집반응 검출 결과.....	12
4.	PDA 센서와 PRRSV aptamer를 이용한 PRRSV antigen 검출.....	14
제 2 절	PRRSV, BVDV 특이 압타머 개발.....	16
1.	PRRSV NP 단백질 발현을 위한 유전자 클로닝.....	16
2.	PRRSV 바이러스 증식 및 농축.....	17
3.	PRRSV DNA 압타머 개발.....	18
4.	BVDV 결합 특이적 DNA 앵타머 개발.....	22
5.	샌드위치 타입의 앵타머 기반 PRRSV 검출용 바이오센서 개발.....	24
제 3 절	PRRSV, BVDV 특이 압타머 대량 합성 기술 개발.....	30
1.	Aptamer target 단백질(peptide) 확보 및 공급.....	30
2.	ss DNA aptamer library의 합성 및 공급.....	36
3.	ssDNA aptamer의 대량 생산 공정 control 및 품질 평가 방법 설정.....	38
4.	대용량 합성을 위한 기술 개발.....	42
5.	Aptamer 품질 검사 법 확립.....	44
6.	Aptamer의 보관 및 유효기간(안정성).....	47
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	50
1.	연차별 연구개발의 목표 및 내용.....	50
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	53

제 1 절 연구개발 성과.....	53
1. 대표 논문 게재 성과.....	53
2. 특허 성과.....	58
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	63
제 1 절 유해미생물 검출 바이오센서 국내 연구 현황.....	63
제 2 절 유해미생물 검출 바이오센서 국외 연구 현황.....	64
제 3 절 국내외 연구현황 비교 및 필요 연구 분야.....	64
제 7 장 참고문헌.....	66

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

2000년대 접어들어 가축질병으로 인한 정부의 가축질병 방역과 살처분 보상비용이 수천억원의 예산을 소비 하였다. 이러한 가축질병을 관리하기 위해서는 현장에서 신속 정확하게 진단을 할 수 있는 장비가 필요하다. 현재 질병의 의심되는 농가로부터 시료를 채취 하여 실험실에서 분석하는 방법은 초기 확진 판정까지 시간이 가장 중요한 가축방역 현장에서는 많은 어려움을 야기 시킨다. 이러한 문제점을 개선하기 위한 방법으로 실험실 수준의 정확도를 갖고 측정 시간도 수분 내에 검출 가능한 바이오센서에 관한 연구가 많이 진행되어 실용화를 앞두고 있다. 이러한 바이오센서는 항체를 마커로 사용하여 binding-based assay를 기본 원리로 하고 있다. 그러나 항체는 분자 구조가 크기 때문에 생산하는데 어려움이 있고 변형 또한 용이 하지 못하고, 동물이나 세포를 이용하여 만들기 때문에 대량 생산에 많은 시간과 비용이 들고, 만든 시기에 따라 기능성이 달라질 수 있다 항체 기반의 바이오센서의 정확도에 많은 영향을 미친다. 항체는 실온에서 보관이나 운반이 어려워 장시간 또는 반복 사용이 요구되는 진단용 바이오센서로 사용하는데 문제가 있다.

압타머(aptamer)는 표적물질에 대해 높은 선택성, 민감성, 결합력을 가지며, 제조 과정이 비교적 간편하고 필요한 변형도 가능하다. 화학적 합성으로 만들어 지므로 순도가 높고 대량생산이 가능하고 상온에서 장기간 보관 할 수 있다. 이러한 압타머는 2004년 처음 시장에 진출 하였으며, 항체와 같이 특정물질을 인식하여 항원-항체 반응을 이용한 바이오센서 시장에서 항체 시장을 대체 할 수 있을 것으로 판단된다.

압타머를 이용한 동물질병 바이오센서 개발을 위한 압타머 자원 확보와 대량 생산 기술의 개발이 절실히 필요하다.

제 2 절 연구개발 목표

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

본 연구의 최종 목표는 PRRSV, BVDV의 압타머를 개발하여 대량생산 기술을 갖추고 이를 이용한 미세유체칩 센서의 개발 및 평가이다.

■ 산린광입자응집 반응을 이용한 PRRSV, BVDV, 진단 미세유체센서 개발 및 평가

■ PRRSV, BVDV 압타머 개발

■ PRRSV, BVDV 압타머 대량 합성 기술 개발

- Aptamer의 target이 되는 가축질병 3종 원인체[PRRV, BVDV]의 6종의 단백질 (펩타이드)을 확보하여 aptamer 선별 및 선별된 여러 aptamer의 평가에 활용.

- 또한 무작위성이 높은 aptamer library의 원활한 공급으로 선별의 효율을 높이고, 선별된 ssDNA aptamer의 modification 과정의 수행 및 대량 합성하여 주관 및 세부기관에 제공한다. 또한 본 과제로 개발되는 우수한 질병검출 aptamer의 합성 효율 증대 기술 개발 및 보관, 유통 등의 산업화 기술 개발을 통해 aptamer의 상용화 기술을 완성.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
바이러스 결합 특이적 애타머 개발	미국	70%	70%	100%	
애타머 이용 진단 센서	미국	60%	60%	100%	

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

제 2 절 특허분석을 통한 국내외 기술개발 현황

1. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

2. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		<i>aptamer screening</i>	<i>virus detection using aptamer</i>
Keyword		aptamer, virus, pathogen, detect	aptasensor, PRRSV, BVDV, Inflenza virus, sensor
검색건수		미국등록(183)	1,604
유효특허건수		3	20
핵심특허 및 관련성	특허명	Method for detecting acid-resistant microorganisms in the stool	Identification and applications of porcine resproductive and respiratory syndrome virus host susceptibility factor(s)
	보유국	미국	미국
	관련성(%)	80%	70%
	등록년도	07122320 (2006.10.17)	2002
	유사점 차이점	포유동물의 감염성 내산성 미생물 애타머 탐지 항원 및 항체 이용	혈소판에 존재하는 CD15 세포막 물질을 이용하여 RNA aptamer 탐지 세포막 물질 재료를 이용
핵심특허 및 관련성	특허명	Methods and compositions for treatment of tumors using nucleic acid ligands to platelet-derived growth factor	Anti-viral uses of metal nanometerial compositions
	보유국	미국	미국
	관련성(%)	70%	60%
	등록년도	07141375 (2006.11.28)	2005
	유사점 차이점	PDGF 애타머를 이용한 독성물질 제거 종양세포 이용	나노입자를 이용한 응집반응 금속나노 composition 이용
핵심특허 및 관련성	특허명	Thio-modified aptamer synthetic methods and compositions	Electrochemical analyte detection apparatus and method
	보유국	미국	미국
	관련성(%)	50%	60%
	등록년도	06867289 (2005.03.15)	2008
	유사점 차이점	일반적인 진단 및 치료 목적의 애타머 합성 개발 기술 DNA 애타머와 RNA 애타머 동시에 이용	애타머를 센싱 probe로 이용하여 검출하는 방법 Potential을 측정하는 전기화학적 방법을 이용
핵심특허 및 관련성	특허명	조류인플루엔자 바이러스 H9N2 감염예방 및 검출에유용한 DNA 애타머 및 그 혼합물	Method and apparatus for detecting estradiol and metabolites thereof using an acoustic device
	보유국	한국	미국
	관련성(%)	80%	50%
	출원년도	2008	2007
	유사점 차이점	질병 유발 바이러스 검출용 애타머 개발 타겟으로 하는 바이러스가 다름	마이크로 파티클을 이용하여 바이러스 검출 표면진동파를 이용하여 바이러스 검출시스템

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

제 3 절 논문분석을 통한 국내외 기술개발 현황

1. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	web of science
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

2. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		aptamer screening	Virus detection using aptamer
Keyword		aptamer, virus, detection	aptasensor, PRRSV, BVDV, Influenza virus, Biosensor
검색건수		14	31
유효논문건수		5	14
핵심논문 및 관련성	논문명	CE-SELEX Generates High-Affinity ssDNA Aptamers as Molecular Probes for Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2	Determination of urinary adenosine using resonance light scattering of gold nanoparticles modified structure-switching aptamer
	학술지명	PLOS ONE	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY
	저 자	Chen, Fang; Hu, Yilan; Li, Dongqing; Chen, Haidan; Zhang, Xiao-Lian	Zhang JQ, Wang YS, He Y, et al.
	게재년도	2009	2010
	관련성(%)	60%	70%
	유사점	Virus의 표면 단백질을 타겟하여 aptamer를 개발함	산란광을 이용하여 adenosine을 검출하는 방법
	차이점	Capillary Electrophoresis 방법을 이용한 SELEX 기법 사용	Au 나노입자에 aptamer를 화학결합을 이용하여 고정화 시킴
핵심논문 및 관련성	논문명	Reduction-Triggered Fluorescence Probe for Peptide-Templated Reactions	Development of an optical biosensor using gold nanoparticles and quantum dots for the detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
	학술지명	CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN	SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL
	저 자	Shibata A , Abe H , Furukawa K , Tsuneda S , Ito Y	Stringer RC, Schommer S, Hoehn D, et al.
	게재년도	2009	2008
	관련성(%)	20%	40%
	유사점	Aptamer를 이용한 virus	나노입자 및 quantum dot을 이용하여

		detection이라는점	광학적으로 검출하는 기술
	차이점	single aptamer가 아닌 두 개의 segments를 probe로 이용함.	FRET기술을 이용하여 PRRSV virus 검출
핵심논문 및 관련성	논문명	RNA aptamer-based sensitive detection of SARS coronavirus nucleocapsid protein	Microfluidic immunosensor for rapid and sensitive detection of bovine viral diarrhea virus
	학술지명	ANALYST	SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL
	저자	Ahn DG , Jeon IJ , Kim JD , Song MS , Han SR , Lee SW , Jung H , Oh JW	Heinze BC, Song JY, Lee CH, et al.
	게재년도	2009	2009
	관련성(%)	50%	50%
	유사점	Aptamer를 이용한 virus nucleocapsid protein detection.	마이크로 입자를 이용한 산란광 측정방법을 사용하는 기술
	차이점	Aptamer와 antibody를 동시에 이용한 immunoassay 기법 이용.	항체를 이용한 면역응집반응 이용

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 압타머를 이용한 가축질병 진단용 바이오센서 개발

1. 압타머를 이용한 산란광 입자응집반응의 병원체 특성 분석

산란광 입자응집반응은 항원-항체 반응을 기본 원리로 하여 마이크로 혹은 나노 사이즈의 Polystyrene latex microsphere에 타겟 병원균의 항체를 부착하고, 검출 시료와 혼합하면 antibody-antigen interaction에 의한 응집이 발생한다. 이 때 응집하는 입자는 응집하기 전 원래 입자 보다 사이즈가 그 크기가 커지게 되고 있다 광섬유를 이용하여 그 입자에서 산란되는 산란광을 측정 함으로써 병원체의 유무 및 농도를 측정 할 수 있는 방법으로 그 검출 정밀도가 높고 수분내에 검출 할 수 있는 방법이다. 본 연구에서는 항체 대신 압타머를 이용하여 산란광 입자응집 반응 기반의 병원체 검출 센서를 개발 하고 실험실에서 검출한 값과 비교 평가 한다.

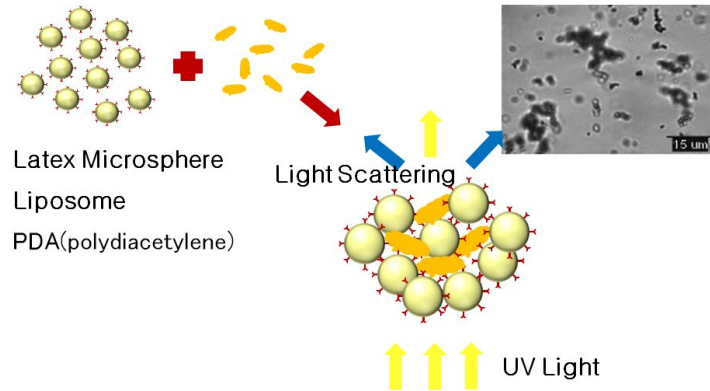


그림 1 산란광 입자면역응집 반응의 기본 원리

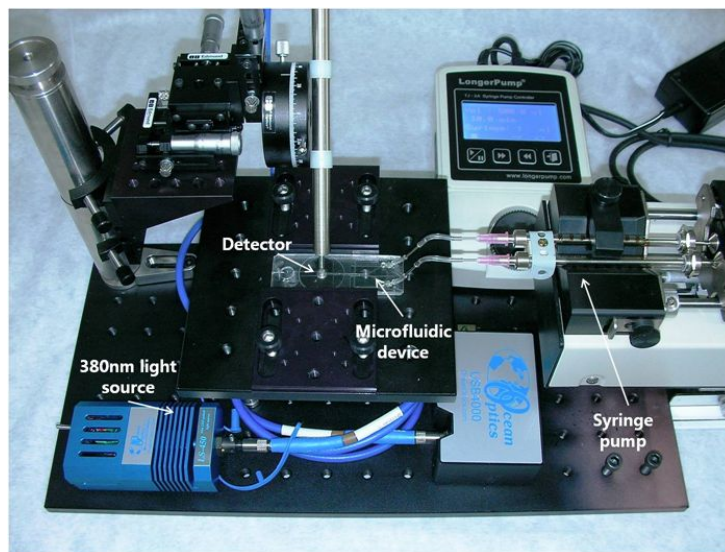


그림 2 면역응집반응에 의한 산란광 측정 장치

2. 산란광입자면역응집반응용 미세유체센서 개발

면역응집반응의 산란광특성을 측정하기 위해서 제작된 마이크로 디바이스 1세대의 경우 Inlet으로부터 유입된 샘플이 바닥면을 통하여 산란광을 측정하는 view cell에서 완벽하게 공간을 채워주지 못하고 outlet으로 빠져 나가는 현상이 종종 발생하여 산란광의 강도에 영향을 주었다. view cell 내부의 미세 공기방울은 산란광의 강도를 증가 시키는 요인으로 반드시 제거되어야 하는 요인이다.

이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 그림 3과 같은 미세공기방울 제거용 T형 마이트로 디바이스를 설계 제작 하였다. inlet부분을 개선하여 inlet에서 유입될수 있는 미세공기방울이 채널 내부로 유입되지 못하게 설계 하였고, inlet으로부터 유입되는 샘플이 view cell 부분을 완벽하게 채우고 배출 될 수 있도록 채널을 2단으로 설계 하였다. 그림 1은 마이크로플루이드 디바이스의 1차 설계도면이다. 이 디바이스의 경우 유입구쪽 Y 채널에서 샘플과 진단용 시약이 동시에 섞이지 않는 문제 점이 발견되었고, view cell 부분도 샘플과 진단용 시약이 완전히 채워지지 않는 문제점이 간혹 발견되었다. 이러한 문제점을 해결 하기 위하여 그림 4와 같이 설계를 변경 하였다.

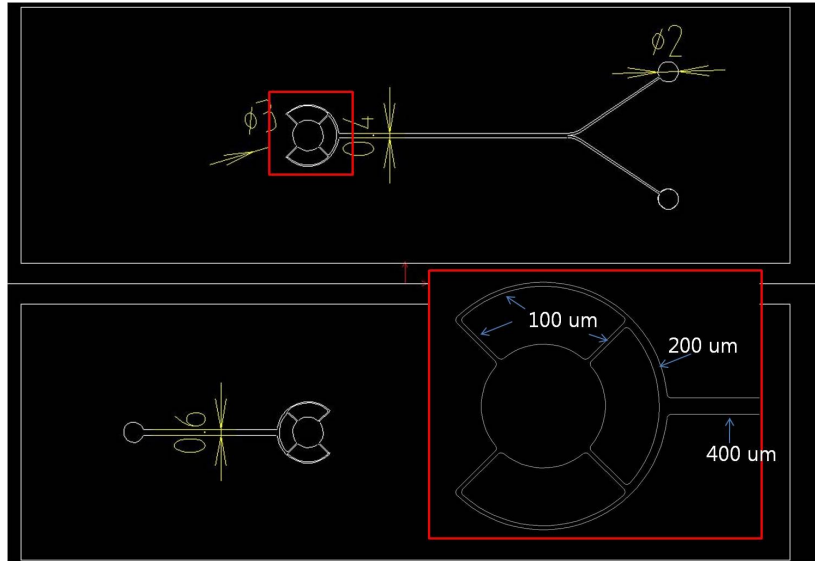


그림 3 미세공기 미발생 마이크로 플루이딕 센서 설계 I

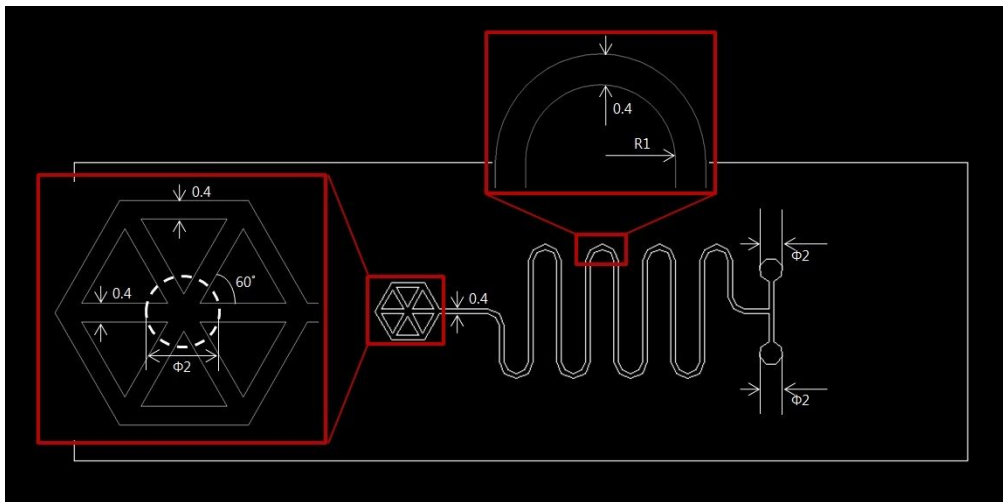


그림 4 미세공기 미발생 마이크로 플루이딕 센서 설계 II

그림 4는 유입구쪽의 채널길이를 짧게 하고 형태도 Y형에서 T형으로 변경하고 샘플과 진단용 시약이 충분히 믹싱 될 수 있도록 유로의 길이를 길게 하였다. 또한 view cell 부분에도 공기가 신속하게 빠져 나갈수 있도록 유로의 개수를 늘려서 제작 하였다. 이 경우 유입구쪽에서 발생 하던 문제는 해결이 되었으나 view cell에서 샘플이 완전히 채워지지 않는 문제는 간혹 발생 하였다. 그림 5는 view cell 부분의 문제를 해결 하기 위하여 view cell 주위에 모세관 현상을 일으키는 육각형 모양을 이용한 미세유로를 상 하 부분에 설치하여 샘플이 view cell에 도달하게 되면 사방으로 확산되게 하였다.

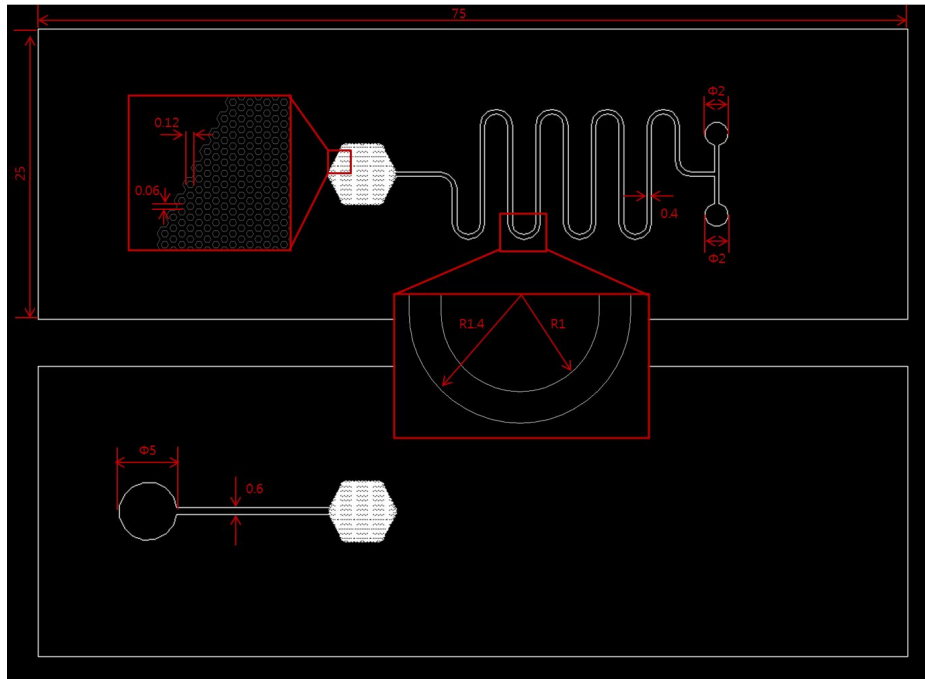


그림 5 마이크로 플루이딕 3차 설계 변경

그림 6은 그림 3의 마스터 몰드를 이용한 PDMS 재질을 이용한 마이크로 플루이딕 디바이스 제작 공정을 표시한 것이다. 그림 7는 PMMA를 이용한 대량생산용 미세유체소자의 설계 이다.

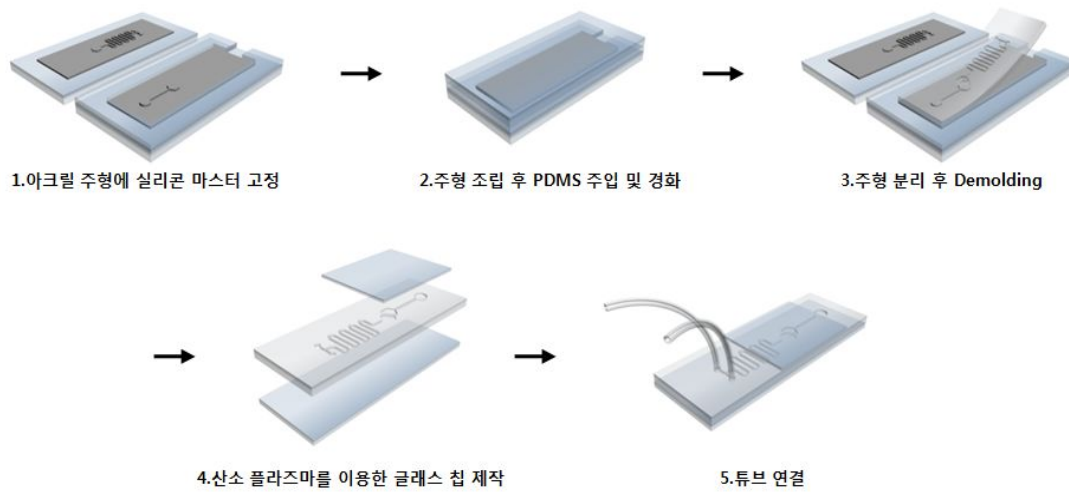


그림 6 마이크로 디바이스 제조 공정

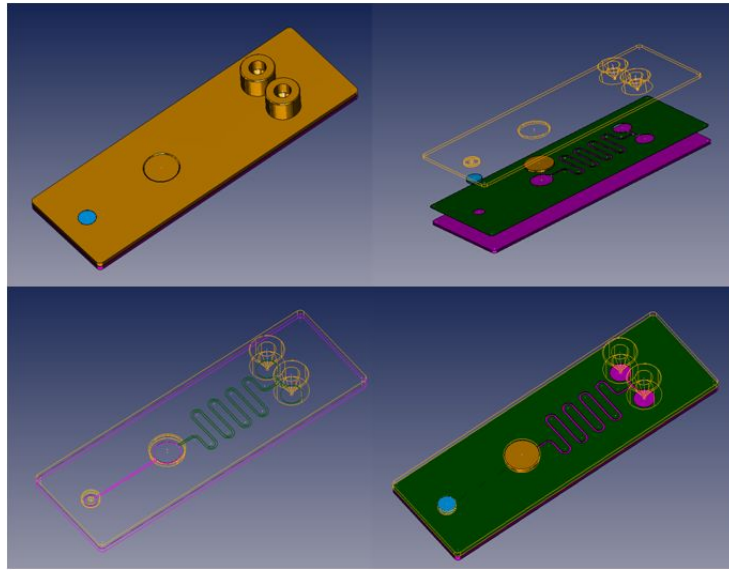


그림 7 PMMA를 이용한 대량 생산용 미세유체소자 설계

기초실험설계를 바탕으로 양산형 마이크로 디바이스의 프로토타입을 제작 하였다. 실험에 사용된 마이크로 디바이스는 PDMS(polydimethylsiloxane)을 이용하여 제작 하였으나, 양산의 경우 PDMS로는 대량생산에 적합하지 않아, 광투과성이 좋고 대량생산 공정에 적합한 재료인 PMMA (polymethymethacrylat)를 이용하여 마이크로 디바이스를 제작 하였다 (그림 1). 그림 1에서 보는 것과 같이 양산형 마이크로 디바이스는 총 5개의 파트로 나누어 제작하여 조립하였다. ①은 샘플과 검출시약을 로딩하기 위한 탱크, ②는 View cell 부분을 덮기 위한 유리 기판, ③과 ⑤는 PMMA로 제작된 두께 1mm의 기판, ④는 미세유체가 흐를수 있게 특수 제작된 필름으로 구성되어 있다.

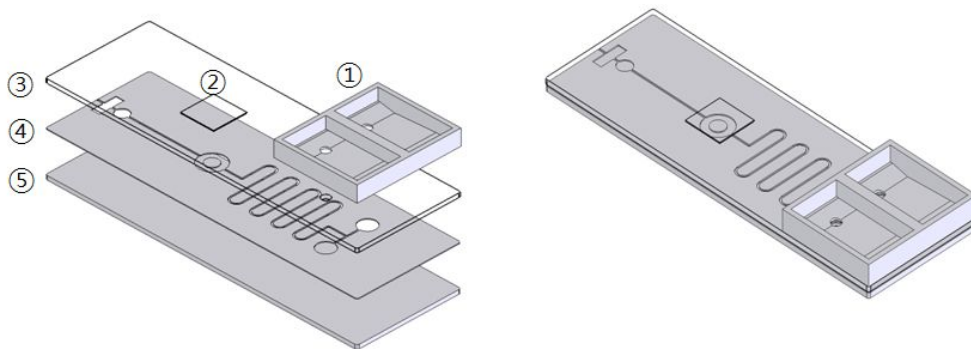


그림 8 PMMA를 이용한 양산형 마이크로 디바이스

그림 8의 PMMA를 이용한 마이크로 디바이스는 실험에 사용한 마이크로 디바이스와 가장 유사한 형태와 성능을 갖고 있으나 대량 생산을 한다고 해도 제품 단가는 상당히 높아진다. 이러한 단점을 보완 하기 위하여 그림 9와 같은 저가형 마이크로 디바이스를 설계 하였다. 먼저 ①의 기본 골격을 설계 하여 3D프린터를 사용하여 제작하고, 이 골격에 유체가 흐를 수 있도록 마이크로 튜브(내경 270 μ m)의 튜브(②)를 이용하여 연결하고, ③의 뷰셀 부분은 커버슬라이드 글라스를 이용하여 밀폐 하였다. 마지막으로 샘플과 진단시약을 주입하는 탱크(④)를 부착

하였다.

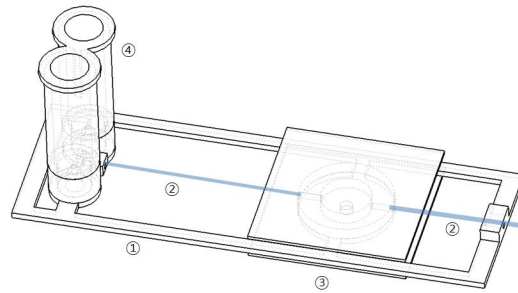


그림 9 3D 프린터와 마이크로 튜브를 이용한 양산형 마이크로 디바이스

3. PRRSV, BVDV 압타머를 이용한 산란광입자면역응집반응 검출 결과

개발된 PRRSV, BVDV 압타머를 이용하여 항체를 이용하던 시스템에 적용하여 그 적용성을 검토 하였다. 실험에는 370nm polystyrene particle에 carboxyl 그룹이 있는 입자를 이용하여 입자 표면에 PRRSV, BVDV 압타머를 100% 부착 하였다.

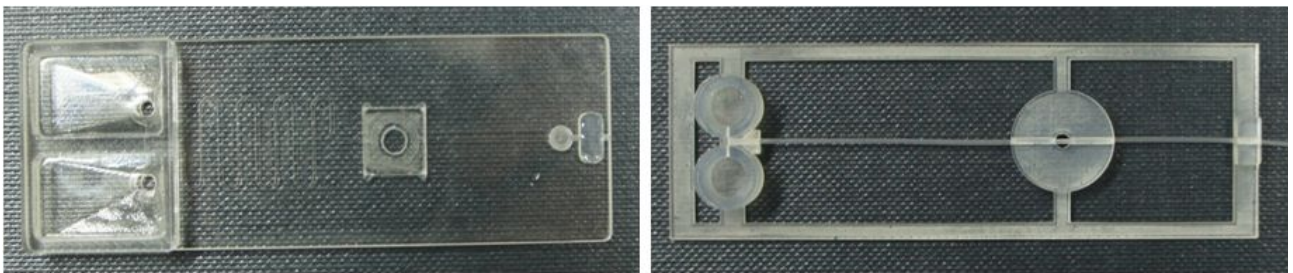


그림 10 양산형 미세유동칩(좌: PMMA 소재 미세유동칩, 우: 3D프린터와 마이크로 튜브 이용)

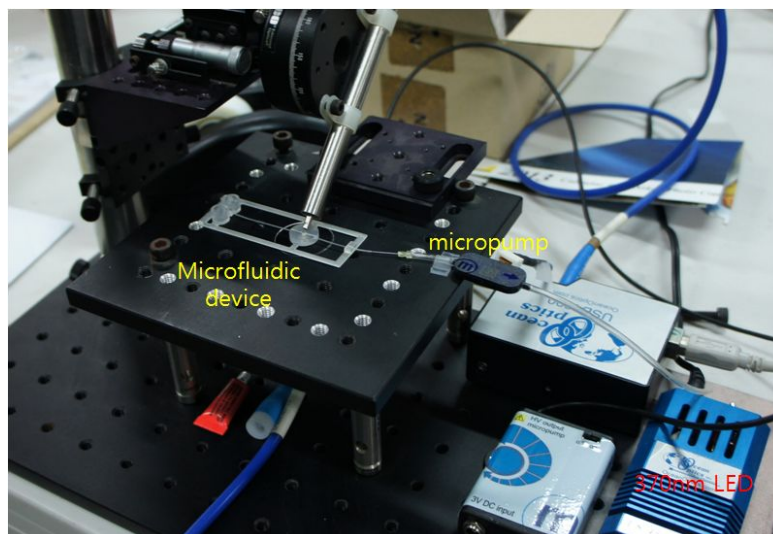


그림 11 산란광입자면역응집반응 측정 장치

실험에 사용된 미세유동칩은 그림 10에 있는 2가지 종류를 사용 하였다. 산란광을 측정하기 위한 장치는 그림 11과 같고 370nm LED를 이용하였고 스펙트로메터와 광섬유를 이용하여 산란광을 측정 하였다. 실험에 사용된 PRRSV($10^{8.5}$ TCID₅₀) 및 BVDV(10^6 TCID₅₀) 항원은 농림축산검역본부에서 제공 받았다.

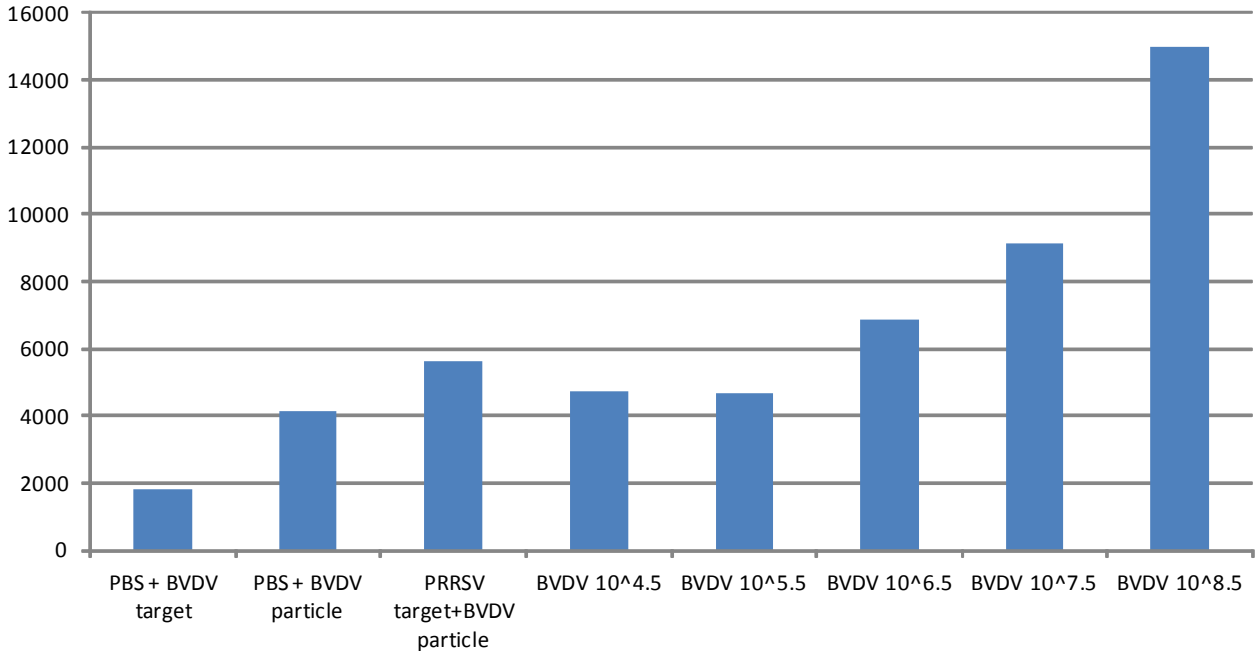


그림 12 BVDV aptamer를 이용한 BVDV 검출 실험 결과

그림 12는 BVDV aptamer를 고정 한 나노입자를 이용한 항원 검출 실험 결과 이다. 먼저 사용 된 나노입자의 크기가 370nm 이므로 실험에 사용된 BVDV 항원 검출용 샘플에 실험 결과에 영향을 줄 수 있는 크기의 입자가 석여 있는지 확인하기 위하여 값을 측정하였다(그림12 PBS+BVDV target). 2000 이하의 값을 보여 BVDV aptamer가 부착된 나노입자(그림 12 PBS+BVDV particle)의 값 4000 이하이므로 실험에 영향을 줄 만한 입자는 샘플용액에 섞여 있지 않을 것으로 판단하였다. 개발된 BVDV aptamer가 다른 종류의 바이러스 혹은 단백질에 대한 특이성이 있는지 확인하기 위하여 PRRSV 항원 샘플과 혼합하여 산란광의 강도를 측정 하였다(그림 12 PRRSV target+BVDV particle). 그 결과 5800 정도의 산란광 강도가 측정되어 PBS+BVDV particle의 값 4000 보다 높게 측정되었다. 항원샘플용액에 포함되어 있는 다른 단백질들이 입자의 응집에 영향을 주는 것으로 판단된다. 항원이 농도가 높아 질수록 산란광의 강도도 커지는 것을 확인 할 수 있었으나 검출 한계를 정확하게 구하기 위해서는 최적화 연구가 더 필요할 것으로 판단된다. PRRSV도 같은 방법으로 측정 하였으며 측정 결과는 그림 13 과 같다. PRRSV도 항원의 농도가 높으면 강한 강도의 산란광이 측정 되었으나 낮은 농도에서 는 산란광의 강도가 큰 차이를 보이지 못했다. PRRSV aptamer 부착 나노입자와 PRRSV 항원 과의 응집반응이 원활히 일어나지 못하는 것으로 판단되며 최적화 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

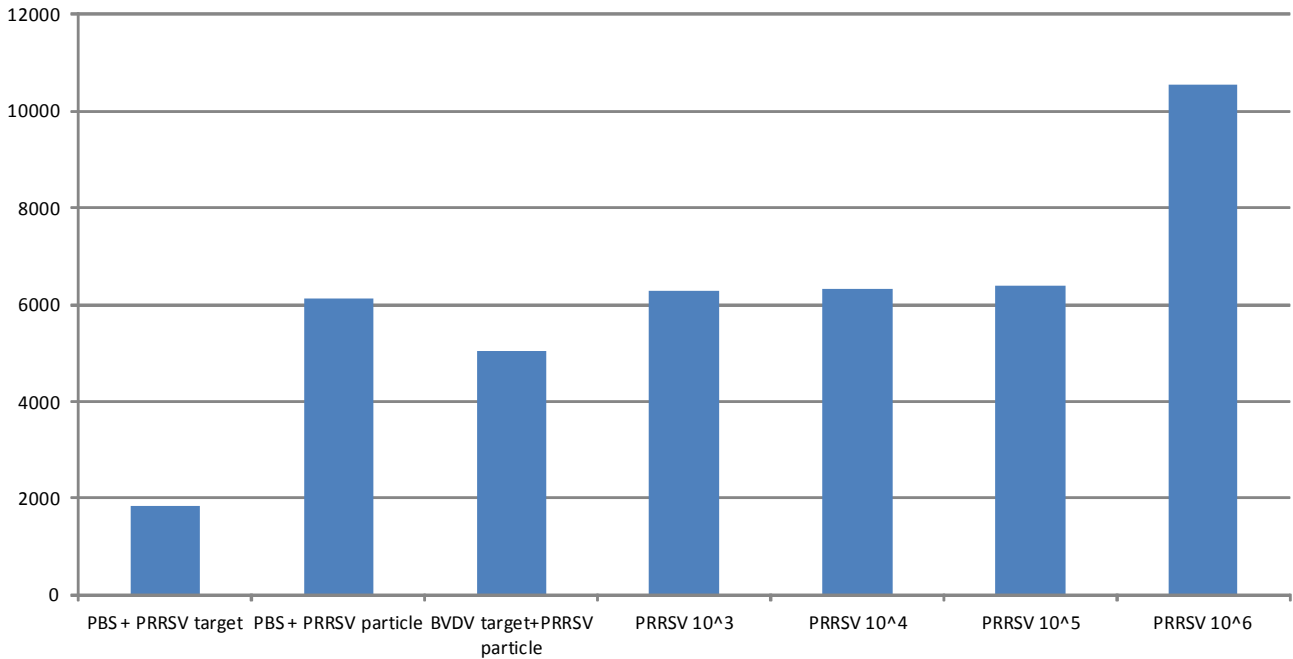


그림 13 PRRSV aptamer를 이용한 BVDV 검출 실험 결과

4. PDA 센서와 PRRSV aptamer를 이용한 PRRSV antigen 검출

PDA liposome (PCDA-epoxy:PCDA=4:1, molar ratio)를 amine이 코팅 된 glass 표면에 고정 한 뒤, 그 liposome 표면에 각각 유럽형과 미국형 두종류의 aptamer를 probe로 고정하여, antigen 검출이 가능한 지를 아래와 같이 확인하였다.

유럽형 aptamer 사용 결과

아래 그림과 같이 유럽형 aptamer에 대해서 PRRSV antigen 이 결합하여 형광을 만들어 냄을 확인하였다.

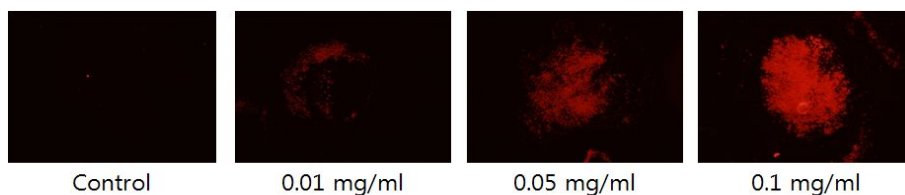


그림 14 유럽형 PRRSV aptamer를 이용한 PRRSV 정제 단백질 검출 결과

미국형 aptamer 사용 결과

아래 그림과 같이 미국형 aptamer에 대해서 PRRSV antigen 이 결합하여 형광을 만들어 냄을 확인하였다.

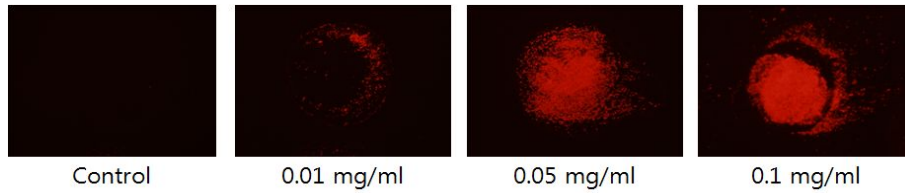


그림 15 미국형 PRRSV 압타머를 이용한 PRRSV 정제 단백질 검출 결과

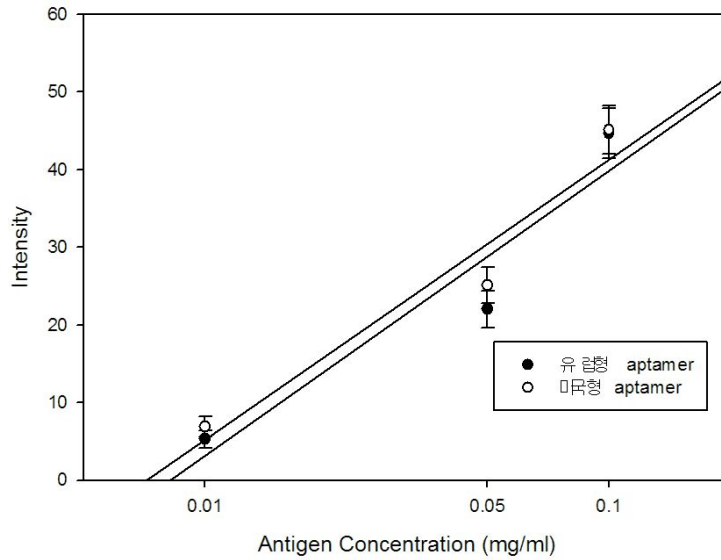


그림 16 유럽형, 미국형 PRRSV 압타머를 이용한 항원검출결과

검출 실험 결과, aptamer에 antigen이 결합하여 PDA liposome의 형광을 만들어 냈을 확인할 수 있었다. 아울러 유럽형과 미국형 aptamer는 그 Sequence는 다르나, 비슷한 검출 감도를 보였다.

제 2 절 PRRSV, BVDV 특이 압타머 개발

1. PRRSV NP 단백질 발현을 위한 유전자 클로닝

- PRRSV 유럽형과 북미형 국내분리주로서 각 유전형별 대표성 strain인 E38과 LMY를 선정하였다.
- 각 유전자형별로 그림17과 같은 primer set를 작성하여 NP를 암호화하고 있는 ORF7 유전자를 포함하여 증폭될 수 있도록 RT-PCR법을 실시하였다. 증폭된 유전자 크기는 유럽형(E38)-638bp, 북미형(LMY)-661bp 산물이고 ORF7 유전자 크기는 유럽형(E38)-387bp, 북미형(LMY)-372bp 이다.

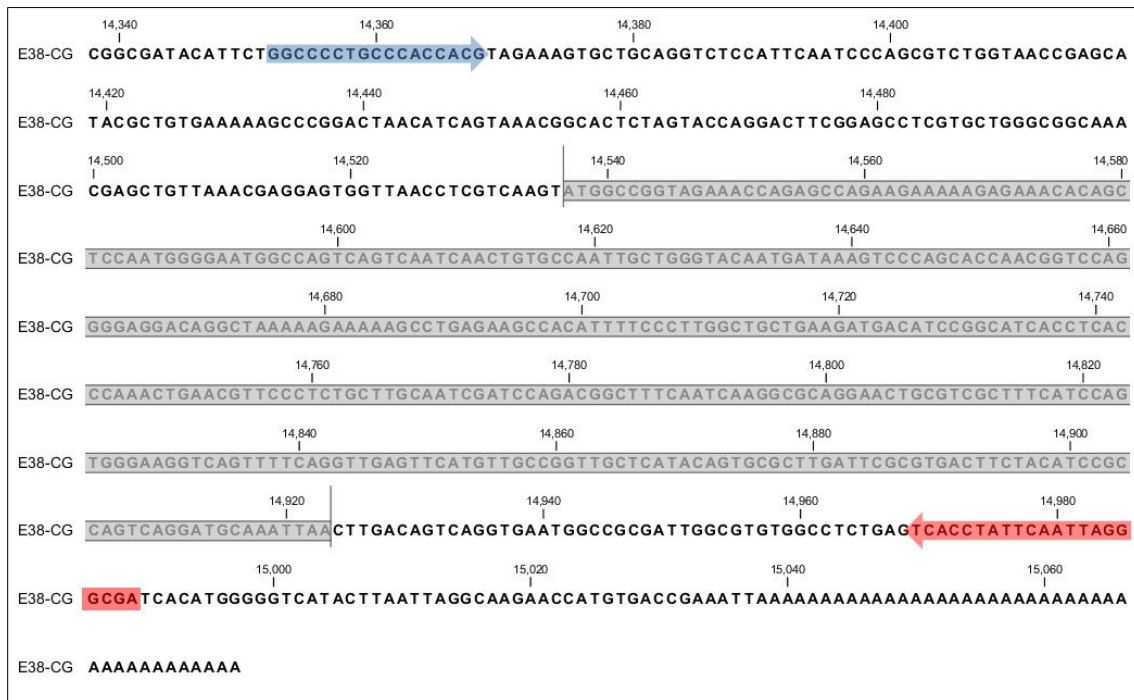


그림 17. PRRSV 유럽형(E38) 클로닝 유전자

파란색 화살표에서 빨간색 화살표까지 PCR 증폭산물의 염기서열이며, 회색부분이 유럽형 NP를 암호화하는 ORF7 염기서열 이다

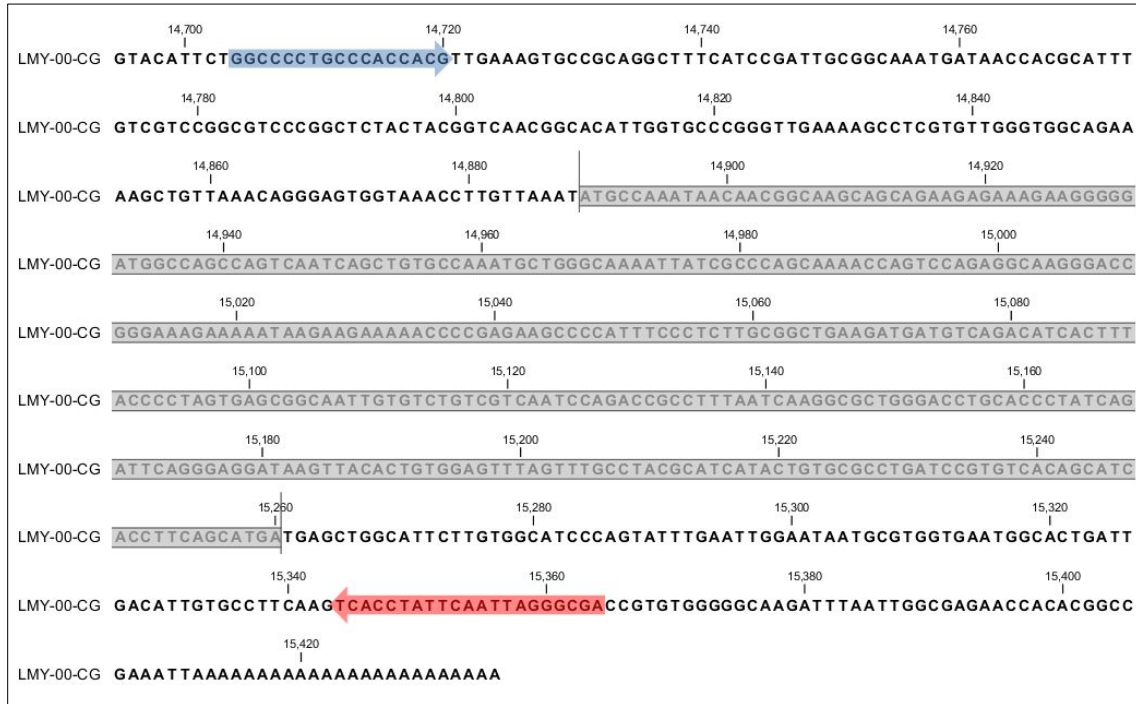


그림 18. PRRSV 북미형(LMY) 클로닝 유전자

파란색 화살표에서 빨간색 화살표까지 PCR 증폭산물의 염기서열이며, 회색부분이 북미형 NP를 암호화하는 ORF7 염기서열임

- 증폭된 각각의 산물을 pGEM-T easy kit(Promega)를 이용하여 vector에 클로닝하여 제한 효소 처리와 염기서열 분석을 통해 PRRSV임을 확인한 다음 클로닝된 유전자를 다음 실험에 이용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

2. PRRSV 바이러스 증식 및 농축

가. 바이러스 접종 하루 전 단층세포로 준비해 놓은 MARC-145 세포에 PRRS 바이러스 E38(유럽형)과 LMY strain(북미형)를 접종하여 80-90%이상 세포변성효과(cytopathic effect)가 관찰될 때까지 5-6일간 배양하였다(그림 19).

나. 감염된 세포와 상층액을 모두 수확하여 -70°C에서 얼렸다 녹이는 과정을 3회 반복하였다.

다. 3,000 rpm, 15분간 원심을 하여 상층액만을 수확하였다.

라. 1차 원심한 상층액을 10,000 rpm으로 20분간 원심하여 다시 상층액을 수확하였다.

마. 0.5M sucrose cushion 방법으로 23,000rpm으로 3시간 원심하였다(Beckman Coulter, SW28Ti).

* Sucrose cushion : 0.5ml 0.5M sucrose solution 5ml 위에 섞이지 않도록 바이러스 상층액 23-25ml 정도를 중층시켜 원심하는 방법임

바. 상층액을 모두 제거하고 바이러스 pellet만 PBS로 잘 부유시켜 다음 실험에 이용될 때까지 -70°C에 보관하였다.

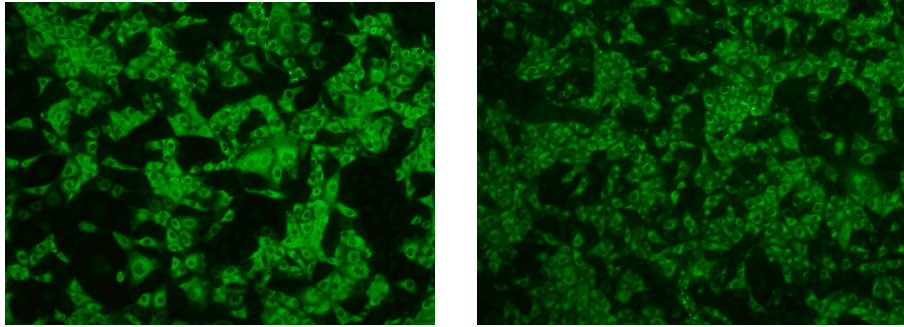


그림 19. 간접형광항체법을 이용한 PRRSV 2종 증식 형광사진
(좌: 유럽형 E38 strain, 우: 북미형 LMY strain)

3. PRRSV DNA 압타머 개발

PRRSV(북미형 & 유럽형), Influenza virus(new H1N1), BVDV(type 1 & 2) 바이러스 검출용 DNA 압타머를 개발 하는 방법은 다음과 같다. 핵산 압타머의 경우 저분자 유기물질, 단백질, 바이러스, 세포 등 다양한 표적에 대해 그 활용성이 보고되고 있으며, 열안정성 및 선택성이 높고 화학적 합성이 가능하여 고감도 질병 진단용 바이러스 검출 센서를 위한 리셉터로서의 활용 가능성이 매우 높다. 질병 유발 바이러스의 특정 단백질을 표준 타겟물질로 선정하여, 타겟 표준 단백질에 대한 DNA 압타머를 개발함으로써 바이러스 자체를 검출할 수 있고, 2개 이상의 유사 단백질을 이용한 counter selection step을 활용하여 선택성이 높은 압타머를 개발한다. 압타머를 개발하는 과정은 다음 그림 20과 같다.

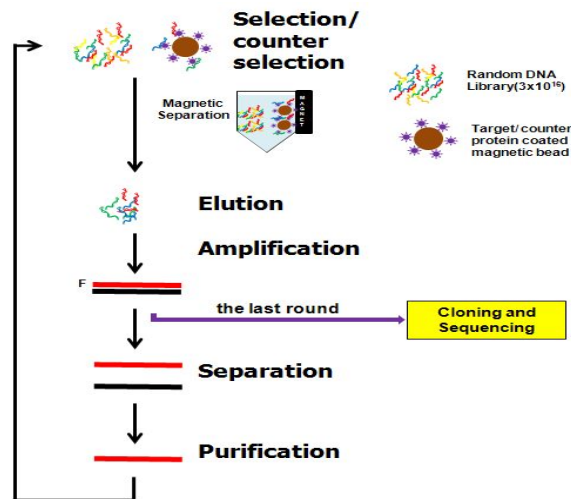


그림 20 FluMag-SELEX (Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment) 개략도

- ① Random DNA library를 바이러스 표준 단백질이 고정화되어 있는 비드와 반응시키고 랜덤 DNA library중에서 타겟 표준 단백질과 특이적으로 결합하는 ssDNA를 분리함
- ② 타겟 표준 단백질에 강하게 결합하는 성질을 가진 ssDNA 들은 PCR을 통해 증폭된 후 다시 ssDNA로 분리되어 선별과 분리과정을 반복

③ 타겟 바이러스에만 특이적으로 결합하는 앵타머를 선별하기 위해 다수의 counter selection step 을 적용하며, 이를 통해 선택성이 높은 ssDNA 앵타머를 얻을 수 있음

④ 최종적으로 선별된 ssDNA의 염기 서열을 분석하기 위해 서로 다른 염기서열을 가진 ssDNA는 cloning되고 염기서열을 분석

⑤ 염기서열의 분석이 끝나면 각각의 핵산 앵타머의 구조를 웹기반 컴퓨터 프로그램 (mfold)을 통해 분석하고 타겟 표준 단백질에 대한 결합력과 결합 특이성을 표면자기공명 (SPR) 장치를 이용해 분석

⑥ 선별된 ssDNA aptamers는 분석이 끝난 후 질병 진단용 바이러스 검출용 바이오센서 system에 도입

PRRSV (북미형 & 유럽형) 결합 특이적 앵타머 개발

1) selection round 가 진행될수록 input ssDNA library 에 대한 각각의 타겟 물질에 결합하는 ssDNA 양(eluted ssDNA)이 증가하였음.

2) 최종적으로 얻어진 ssDNA pool을 cloning 한 결과, PRRSV 북미형 에 결합하는 aptamer 33 개와 유럽형에 결합하는 aptamer 38개를 개발함.

3) 개발된 aptamer 중 일부의 2차구조 prediction

4) 개발된 aptamer의 염기서열

E1	CGTACGGAATTCGCTAGCTGTGTACAAGGGTGGTGGGGAGGGGATGTGGATAGGTGATGGATCCGAGCTCCACGTG
E2	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGGGGCCTGGGGCGGGCCGCGCATGGGATCCGAGCTCCACGTG
E3	CGTACGGAATTCGCTAGCTAGTGGTGGATGGGGGCAGGGGGGGCGGGCGTTGGCTGCATGGGATCCGAGCTCCACGTG
E4	CGTACGGAATTCGCTAGCCGTGAAGGGGGGGGGTGGTACTGTCTGACCCACTAGATACAGGATCCGAGCTCCACGTG
E5	CGTACGGAATTCGCTAGCAGGCAGATAGGTGCTGGGGGAAGATGAGAATGGGGTGGCGGGATCCGAGCTCCACGTG
E7	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGTGGGGGGGGGGGGCGCAAAGTAGCACCTGTGTCGGATCCGAGCTCCACGTG
E8	CGTACGGAATTCGCTAGCTCTCGGGTGGGGGGGGGGGCATGAGATGATGCCTCTTAGAGGATCCGAGCTCCACGTG
E9	CGTACGGAATTCGCTAGCCATGGGTGGGATGGGATGGGTACGAGGTAGAGCATGCTGGGGATCCGAGCTCCACGTG
E11	CGTACGGAATTCGCTAGCTTAGGGCGGGACTGGGTGGGACATAGGTAATACGGGCATCGGATCCGAGCTCCACGTG
E14	CGTACGGAATTCGCTAGCTGTGAGTGGGGTGGCGGTGCGTGATCTATTGGGAAGTAGTCAGGATCCGAGCTCCACGTG
E16	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGGGTGGGGGGGAGGCCGTCATGGGGACATGGATGCACGGGATCCGAGCTCCACGTG
E17	CGTACGGAATTCGCTAGCATACTAGGGTGGGGACTTATAGTGCCGGGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
E21	CGTACGGAATTCGCTAGCGAACTAAGTCCGGGCGGGTGGGACAATCAGGATATGGGGTCCGATCCGAGCTCCACGTG
E22	CGTACGGAATTCGCTAGCGCAAGGATGGTGCGGTGGGGGTGCTGGGGTGGTATAACTGGGATCCGAGCTCCACGTG
E24	CGTACGGAATTCGCTAGCGACTATGGGGCCAGGGATGGGGGACTAGGATAGTGGGGGGGGATCCGAGCTCCACGTG
EB2	CGTACGGAATTCGCTAGCAGTGTGGGGGGTGGGTGGCCGGCGTGCACAATGGAGTATGGATCCGAGCTCCACGTG
EB3	CGTACGGAATTCGCTAGCTGAAGTGGCCTAGATGAGACCAGTGGTATACACCCGTACCTCGGATCCGAGCTCCACGTG
EB5	CGTACGGAATTCGCTAGCGTGGGTGGGTGGTGGGTAGTTGTGGGTATCTGATGGTGAGGATCCGAGCTCCACGG
EB6	CGTACGGAATTCGCTAGCACTAGGGTGGGTCGGATGGTGCCTGTGGTTGGGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
EB7	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGGCAGGGCTGGGGGGGGGGTGTAGAAAATGTATGATGGATCCGAGCTCCACGTG
EB8	CGTACGGAATTCGCTAGCGTGTGGTGGCTGTGGGTGGTGGGTGGGTGCGGTTATCGGATCCGAGCTCCACGTG
EB10	CGTACGGAATTCGCTAGCCTACACCCCTACCCCTATACATGACTGCCAATGCGCTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
EB12	CGTACGGAATTCGCTAGCACTACGGGGGGGGGCAGCAGGCAGGTAATGGTGAGGGGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
EB13	CGTACGGAATTCGCTAGCTGACTGTGTAGGGTGGGTGGGGGGCTTCTCTCGGTGTACAGGATCCGAGCTCCACGTG
EB14	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGAAGGGTGGGTGGGAGGTTATATGTCGACGGCAAATAGGGATCCGAGCTCCACGTG
EB15	CGTACGGAATTCGCTAGCACAGGGGAGGGGAAAATGGGGGGGGTGTACATCGCTCGAGGATCCGAGCTCCACGTG
EB16	CGTACGGAATTCGCTAGCCAGGGATGGGTGGTGGTATACGGAGTGTCTGTTGCATAGGATCCGAGCTCCACGTG
EB17	CGTACGGAATTCGCTAGCAATGGGTGGGTGGGGGGAAAGTAGAGTGGTGGTGGCGCTGGATCCGAGCTCCACGTG
EB18	CGTACGGAATTCGCTAGCATATGAGGGTGGGTGGGTGGTCAATGTTAGAATACGGTCAGGATCCGAGCTCCACGTG
EB19	CGTACGGAATTCGCTAGCGCAGGGGGGGTGGGTAGGGAATAGCGCGACTACTCTGTTGGGATCCGAGCTCCACGTG
EB21	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGCGTGGCCTGGGTGGGTGGTGGGGATGACGGGGCCAGGGATCCGAGCTCCACGTG
EB24	CGTACGGAATTCGCTAGCCTGGGAGGGTGGGGTGGGGATAACAGTCTCGCGGTACAGGATCCGAGCTCCACGTG
EB26	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGTATAATGGGTTGGTTGGGTGGGGTGGAAAATGGGATGGGATCCGAGCTCCACGTG

EB28	CGTACGGAATTCGCTAGCATAGGGTGGGTGGGTGGCGGGCTGAATGCGATGTGTCTGGGATCCGAGCTCCACGG
EB29	CGTACGGAATTCGCTAGCATGGGTGGGTGGGTGGTGGTATATATGCGATGTAGGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
EB30	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGGGTGGGCCTGTGGGTGGGATAGACAGAAATGCGACCAGGATCCGAGCTCCACGTG
EB32	CGTACGGAATTCGCTAGCAGTGTGTGGTGGGTGGGGTGGGTGAGTCTGCGTGTGTGTAGGATCCGAGCTCCACGTG
EB33	CGTACGGAATTCGCTAGCCACAGACCATACCGTCCATGCCAACCATATATCACTACTCGGATCCGAGCTCCACGTG
L3	CGTACGGAATTCGCTAGCCCGACGAGGCCTACTTGACACCACTGAACCCCTCCTGTGAGGATCCGAGCTCCACGTG
L4	CGTACGGAATTCGCTAGCTATGGGAAGACAACGGGTGTGCCGGAGGTGGATGTGGAACCTGGGATCCGAGCTCCACGTG
L6	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGCCAGTGTCCGTGTATATGTAGGTGCGCATCTACGATGGATCCGAGCTCCACGTG
L7	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATCAGGGGTAGGGAAATAGGGTGGGGGAAAGGTGTGGTGGATCCGAGCTCCACGTG
L8	CGTACGGAATTCGCTAGCCGGGGGTGCGTCACCATGTTGGGGATGGGGGCGGGAGGTGGATCCGAGCTCCACGTG
L10	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTCTGTTGGGGTGTGCGATGTACTGGGGTGGGTAGGGATCCGAGCTCCACGTG
L11	CGTACGGAATTCGCTAGCTAAGCGCATATACCCCTAACAAAGGCTGCATACTGAACAATGGGATCCGAGCTCCAATC
L12	CGTACGGAATTCGCTAGCCGGGGAGATAAGACGGATGATGGGGATATCTAGTGGGGCGAGGATCCGAGCTCCACGTG
L13	CGTACGGAATTCGCTAGCATATCGTGGGAGAGGTGGGTGGGTGAGTTCACAAGACGGAGGATCCGAGCTCCACGTG
L16	CGTACGGAATTCGCTAGCTGAGGTGGGGTGTGCGGGCGGGGTGGAAAGCGCTCAGGGATCCGAGCTCCACGTG
L18	CGTACGGAATTCGCTAGCAGGGACTGTTGGGGTGGGTAGGGGATGACCGGCCATCCGGGATCCGAGCTCCACGTG
L19	CGTACGGAATTCGCTAGCGTGGGGAGGAGGGGTGGGGAAGTGTATGTGGTAGGGTAATGGATCCGAGCTCCACGTG
L22	CGTACGGAATTCGCTAGCACATGATGGGATGGTGGGGAGCATGAGGGCTTGGTATGGGGGATCCGAGCTCCACGTG
L25	CGTACGGAATTCGCTAGCAATGGGGGTGGGGTGTCTCGAATGTGTGCGGGTAGGGGGGATCCGAGCTCCACGTG
LB2	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGGTGGGAGGGGTACGGGAATGTAATAGGATGGGTAAAGGGATCCGAGCTCCACGTG
LB3	CGTACGGAATTCGCTAGCTACCACATCCATCCCCACCATGCAGCAGCTGTCAGTCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
LB5	CGTACGGAATTCGCTAGCATACATCCATACTACCACCACAGACGCTGACCGAAGCGATGGATCCGAGCTCCACGTG
LB6	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGCGGGGTGCACTCTGTGTTGTATATATGTATCGTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
LB8	CGTACGGAATTCGCTAGCCGGGGTACACGGCCTGGGAAGGGTGTGTGCCCTGAAGTGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
LB9	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCATATAATATATTGCACCAACCCAGCATACGTCAGTCCGGATCCGAGCTCCACGTG
LB12	CGTACGGAATTCGCTAGCACACATCAACACACCACATCGAGATATATATAGAAGCCGGATCCGAGCTCCACGTG
LB20	CGTACGGAATTCGCTAGCCAATAACCGCGCCCGATCTACACCACTCGTACTGACTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
LB21	CGTACGGAATTCGCTAGCATGCACACACTACATATCGCACACATATCGAACAAAGACCCGGATCCGAGCTCCACGTG
LB22	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGGGGAAATAGGGTGGGATGTGTGTATGTATGGGTATGGGATCCGAGCTCCACGTG
LB23	CGTACGGAATTCGCTAGCCACCCCTACCAGCGAGCACACATGCATCTAACCCACCCCTGGATCCGAGCTCCACGTG
LB24	CGTACGGAATTCGCTAGCCACCACACAGATAATAGTATCACCCCCCGCACAAAGCCATGGATCCGAGCTCCACGTG
LB26	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGTGTGTAATGGGTGATTATCAGGATGCCGGCGGATATGGATCCGAGCTCCACGTG
LB27	CGTACGGAATTCGCTAGCCGGAGAGTGTGCCATGCGTGTGCCGCCACACCATACCCGCCGGATCCGAGCTCCACGTG
LB29	CGTACGGAATTCGCTAGCAGATAATCGGTCAACGCCTGCAACCATCATATACTCCTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
LB30	CGTACGGAATTCGCTAGCATCTGGGGGTGAAAGAATGGCAGGGTAGGTACCAAGTATGGATCCGAGCTCCACGTG
LB32	CGTACGGAATTCGCTAGCCATATCCGCGTCTGCTGCGCTCAGACCCACCACCACGCACCCGGATCCGAGCTCCACGTG
LB33	CGTACGGAATTCGCTAGCTACGGGGGAGGCGGGTGGGTGGAAATGTGACCATGGCTGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
LB35	CGTACGGAATTCGCTAGCAAGGGTATGGGGTGGTGTGGGTGGGGTACGACATATGCCTGGATCCGAGCTCCACGTG

5) 개발된 aptamer 중 우선 선정된 20개 aptamer 의 결합력 테스트- 진행중임.

유럽형 PRRSV aptamer 후보군	E2	EB3	미국형 PRRSV aptamer 후보군	L6	LB8
	E4	EB8		L8	LB23
	E9	EB13		L12	LB27
	E16	EB16		L13	LB32
	E22	EB21		L18	LB33

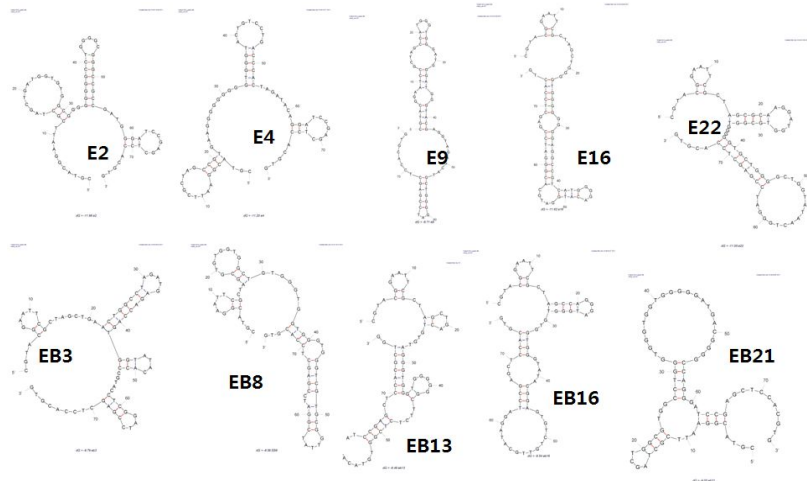


그림 21 유럽형 PRRSV aptamer 후보군의 2차 모델 구조

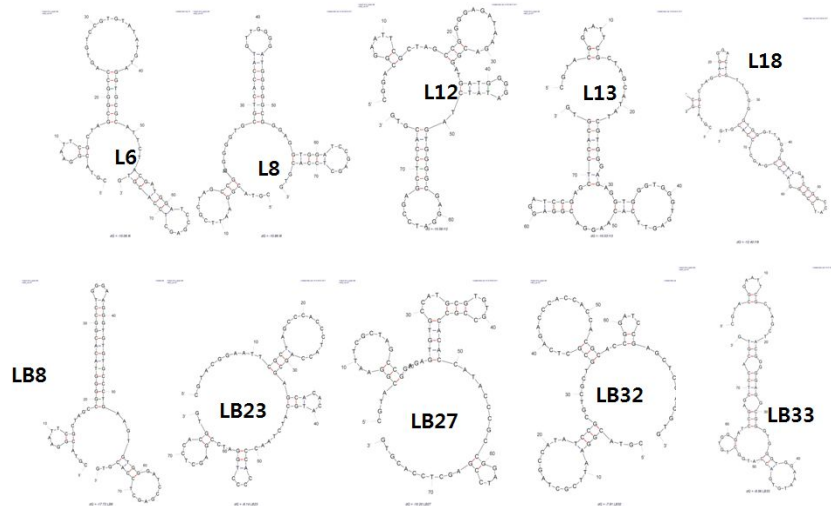


그림 22 미국형 PRRSV aptamer 후보군의 2차 모델 구조

4. BVDV 결합 특이적 DNA 애포머 개발

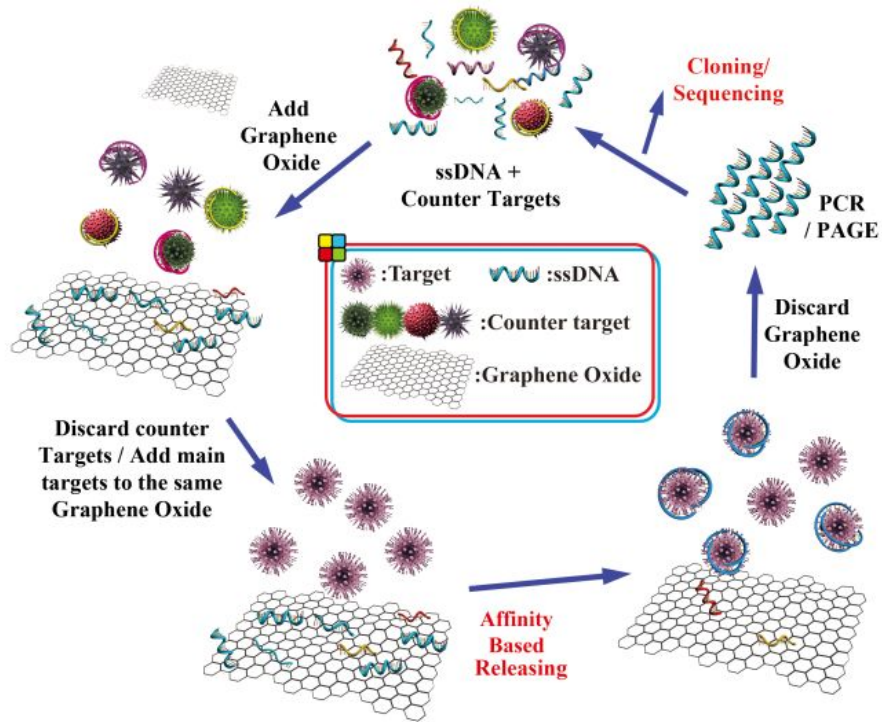


그림 23 BVDV 결합 애포머 개발을 위한 GO-SELEX 모식도

가. selection round 가 진행될수록 input ssDNA library 에 대한 타겟 BVDV에 결합하는 ssDNA 양(released ssDNA)이 증가하였음.

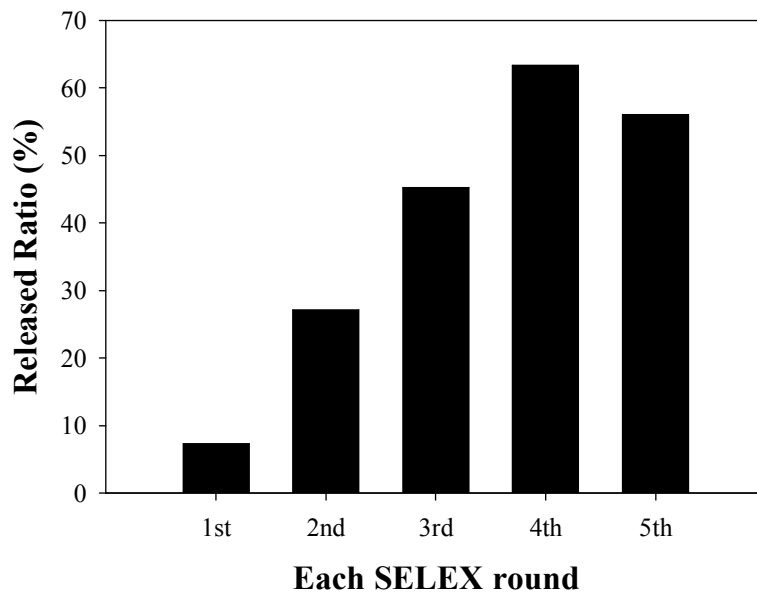


그림 24 Input ssDNA library에 대한 타겟 BVDV 결합 ssDNA양

나. 최종적으로 얻어진 ssDNA pool을 cloning 한 결과, BVDV에 결합하는 aptamer 후보군

42 개를 개발함.

다. 개발된 aptamer의 염기서열

No.	Sequence
13	CGTACGGAATTCGCTAGCTTGGGTATAACGTTCTGAGTCAGAACGCCGGGATCCGAGCTCCACGTG
38	CGTACGGAATTCGCTAGCACGGCGGGTCGCCCCACTTTGGGCCGACTGGGATCCGAGCTCCACGTG
34	CGTACGGAATTCGCTAGCCGCTCGGGGCGCTGCACGTAGGGTGGGGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
17	CGTACGGAATTCGCTAGCGTGGGGCAGTTGCTTGATGATCTGTAGCGCGGATCCGAGCTCCACGTG
11	CGTACGGAATTCGCTAGCTGCGCATCCACAAATGTATTGTCGGGGGATGGATCCGAGCTCCACGTG
39	CGTACGGAATTCGCTAGCCGGTCTAGTCAGGAGGTTCTGTGGTGCTGGATCCGAGCTCCACGTG
8	CGTACGGAATTCGCTAGCGAGGGCGCCAAACAGGGTGTCTGGCGTTGGGATCCGAGCTCCACGTG
43	CGTACGGAATTCGCTAGCTGCGGACTCGCGATGCTACTTCTGATGATAGGATCCGAGCTCCACGTG
27	CGTACGGAATTCGCTAGCTAAGGGTAGCACAGGTCACCTCGCCACTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
40	CGTACGGAATTCGCTAGCCGAACGTTGCGGTGTGGAATTCGCGAGCAGGATCCGAGCTCCACGTG
20	CGTACGGAATTCGCTAGCGGCGCCGGACGTCCTGTATGTTGCGCTTGGATCCGAGCTCCACGTG
1	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCGGATCCTATACAGGGTGGGTAGGTGGGGATCCGAGCTCCACGTG
58	CGTACGGAATTCGCTAGCGCTCTTGTGGGATACATGTAGCGGTGGCTGGATCCGAGCTCCACGTG
56	CGTACGGAATTCGCTAGCTCAAGCTGCCTTGTGTTGGTTGTCACTCGGATCCGAGCTCCACGTG
61	CGTACGGAATTCGCTAGCGGCACGGTTATGCTGTGGCCGATGTCTCAGGATCCGAGCTCCACGTG
24	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGGATCGGTTAACTGGCACCTTGAGGACGGATCCGAGCTCCACGTG
10	CGTACGGAATTCGCTAGCTGCATTGAGCTGCGCGCGCTCTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
41	CGTACGGAATTCGCTAGCTCACGGTGGCTTGTATGGTGTCTCCGCTGGGATCCGAGCTCCACGTG
57	CGTACGGAATTCGCTAGCTACTTTGTCGGGGCGGTACGAAGTCGGTTGGATCCGAGCTCCACGTG
55	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGCGGTATATGGGCGTCCACTATGATGGATCCGAGCTCCACGTG
31	CGTACGGAATTCGCTAGCTCATGTTTTGTAGGTAGTTCTTGCATCGGGGATCCGAGCTCCACGTG
64	CGTACGGAATTCGCTAGCATAGGGCAGATAGAGTCAGGTGCCTGCACTGGATCCGAGCTCCACGTG
53	CGTACGGAATTCGCTAGCTAATAACCAGACGTGGTTGTATGTTCCCTGGGATCCGAGCTCCACGTG
33	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGTATGTGCCTTGCACAGTGTGAAGTTTGGATCCGAGCTCCACGTG
47	CGTTCGGAATTCGCTAGCGTACCGGTATGCCCGTTAGCAGTGCTATGGGATCCGAGCTCCACGTG
6	CGTACGGAATTCGCTAGCTGAGGGGCGGCTGCATACTGTGTGTTGGGATCCGAGCTCCACGTG
21	CGTACGGAATTCGCTAGCTGCCTGTCGTATCTGACGGTTATGGGTACGGGATCCGAGCTCCACGTG
48	CGTACGGAATTCGCTAGCATGACTATGGGTCCTGGATTACTACCTGTTGGATCCGAGCTCCACGTG
36	CGTACGGAATTCGCTAGCGGTATGGGGGGTCTGAGCTTCGTCATGCCGGATCCGAGCTCCACGTG
32	CGTACGGAATTCGCTAGCGTGGTGAATTTTACCCTTAGAGTGTGCGTTGGATCCGAGCTCCACGTG
46	CGTACGGAATTCGCTAGCTGCTGGGGTGGTTCGGGGTAAACGAATGGGGGATCCGAGCTCCACGTG
50	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGGTGGCTGTGTCTGCGTTTGGTCGTAAGGGATCCGAGCTCCACGTG
18	CGTACGGAATTCGCTAGCGGTGGGGAGTGGGGGCTGTACTTGATGGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
15	CGTACGGAATTCGCTAGCTAGTATGTGTATGGTGGTTAGGGGCTGGTCGGATCCGAGCTCCACGTG
3	CGTACGGAATTCGCTAGCCTCCACAGTGTCTCGTGCAGTGCCTTGGTTGGATCCGAGCTCCACGTG
68	CGTACGGAATTCGCTAGCGTCGGGGTGTGTGTGCATGGGGTGGCATTGGATCCGAGCTCCACGTG
2	CGTACGGAATTCGCTAGCATGACCGGTGGGTTGTGTTGTGTGTGCCTGGATCCGAGCTCCACGTG
29	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGTGGTCACAATTTTGCATTTGGTCTTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
35	CGTACGGAATTCGCTAGCTGTGTCGTGTGTTTAGGGGTGCATTAGAAGGGATCCGAGCTCCACGTG
5	CGTACGGAATTCGCTAGCCGCTTCCGTGGCCTGTTAACACGTGCTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
54	CGTACGGAATTCGCTAGCCATGCGATGGCGCTGCTGACATGTGGCGCGGATCCGAGCTCCACGTG
65	CGTACGGAATTCGCTAGCTCCGTGGGCTTGAGCTTGCCGGGTCAACCTGGATCCGAGCTCCACGTG

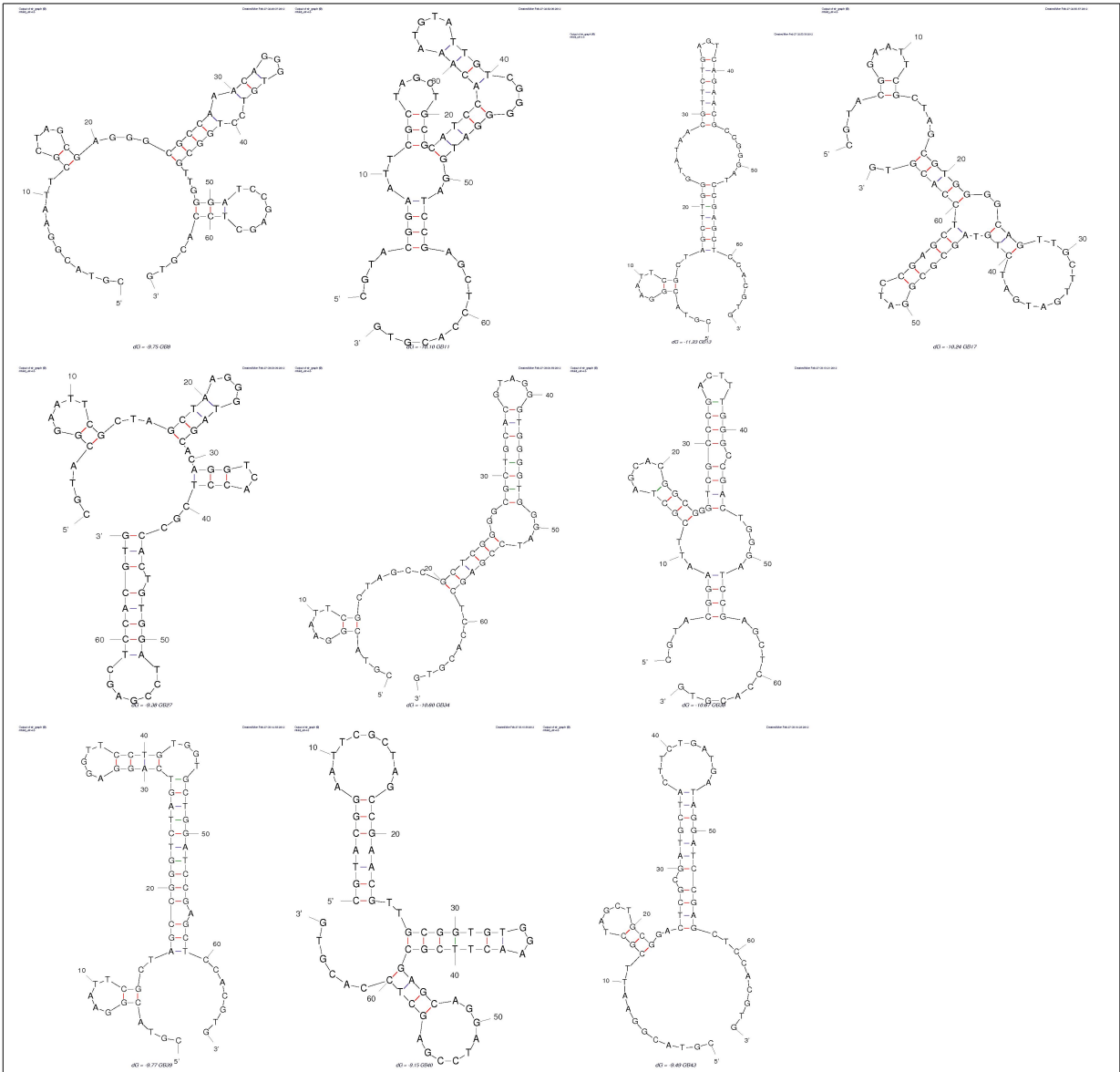


그림 25 개발된 aptamer 중 일부의 2차구조 prediction

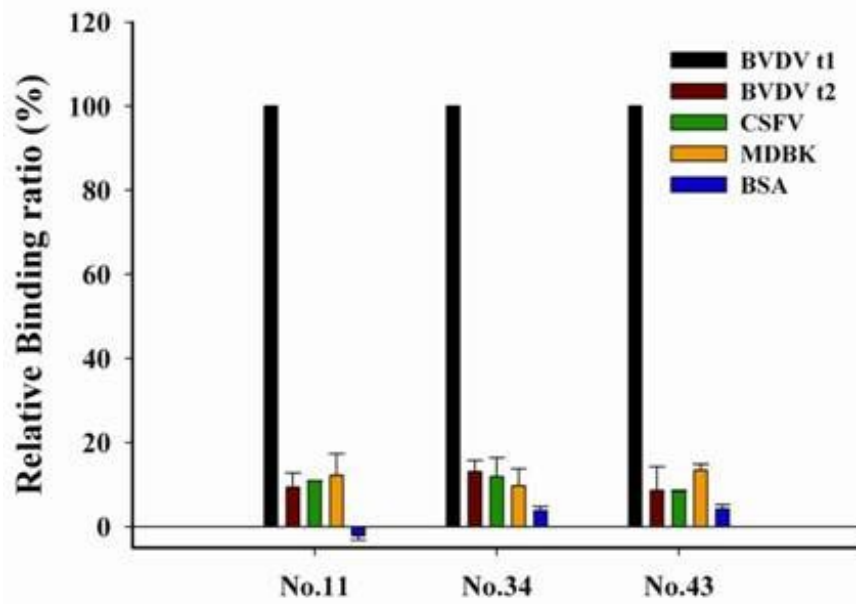


그림 26 표면자기공명 장치를 이용한 개발된 aptamer와 타겟, 또는 유사 바이러스와의 결합 분석 (결합 특이성 test)

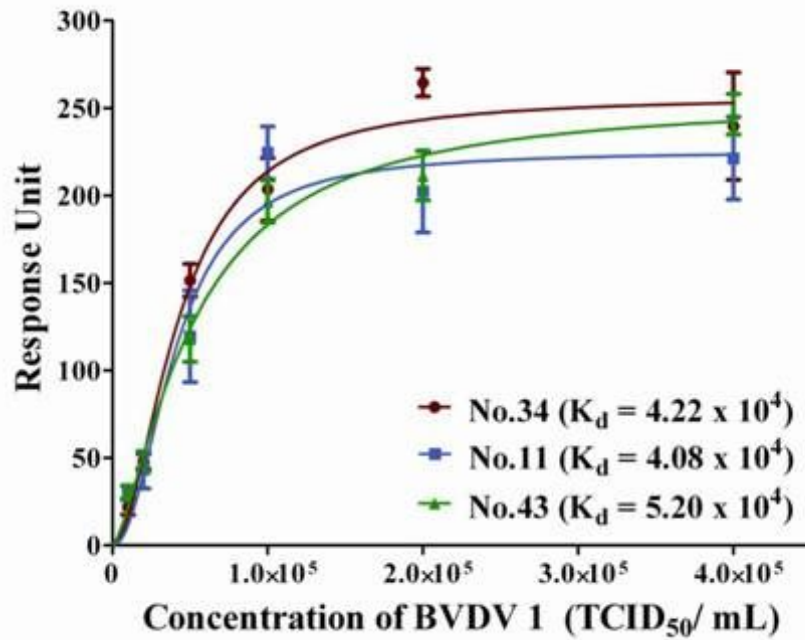


그림 27 표면자기공명 장치를 이용한 개발된 aptamer와 타겟 간의 결합력 분석

5. 샌드위치 타입의 앵타머 기반 PRRSV 검출용 바이오센서 개발

가. 표면자기공명 장치를 이용한 1차년도에 개발된 PRRSV 결합 aptamer와 타겟, 또는 control sample 과의 결합 분석 (결합 특이성 test)

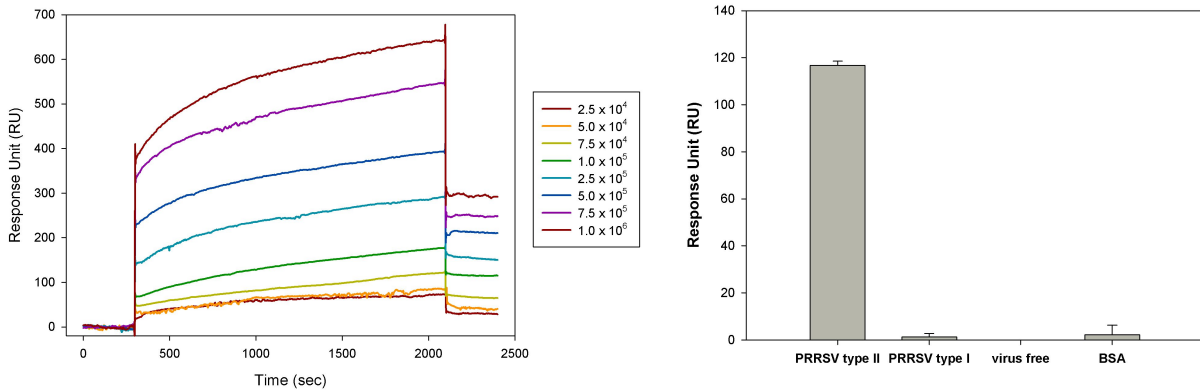


그림 28 표면자기공명 장치를 이용한 PRRSV 검출 한계: 2.5×10^4 TCID₅₀/ml

나. DNA 앵타머와 항체를 동시에 이용한 enzyme-linked antibody-aptamer sandwich (ELAAS) 기반 PRRSV 검출용 바이오센서 개발

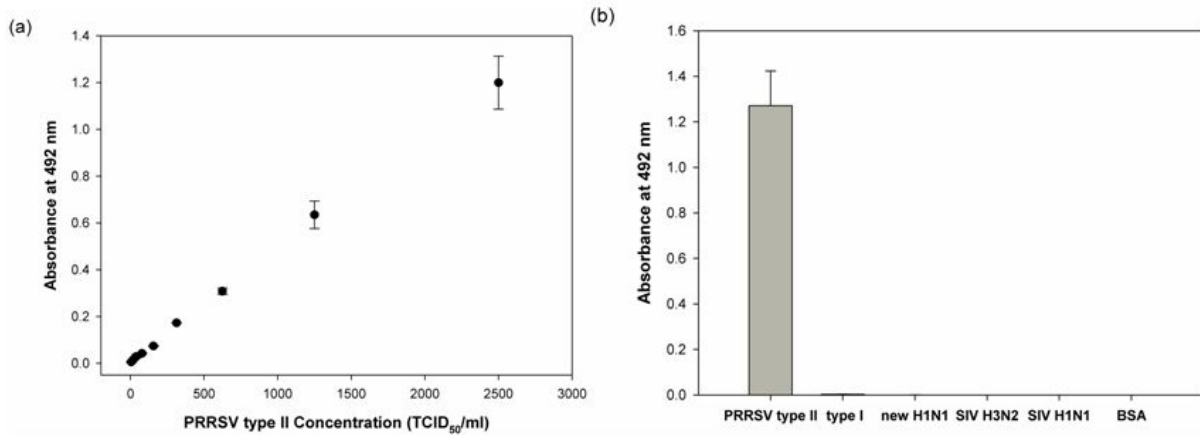


그림 29 ELAAS 기법을 이용한 PRRSV 검출 한계: 4.8×10^0 TCID₅₀/ml, 다른 바이러스에는 결합하지 않는 특이성을 보임.

다. ELAAS 기반 PRRSV 검출용 바이오센서의 응용 가능성 테스트
diluted swine serum sample 내에서의 binding 및 결합 특이성 확인

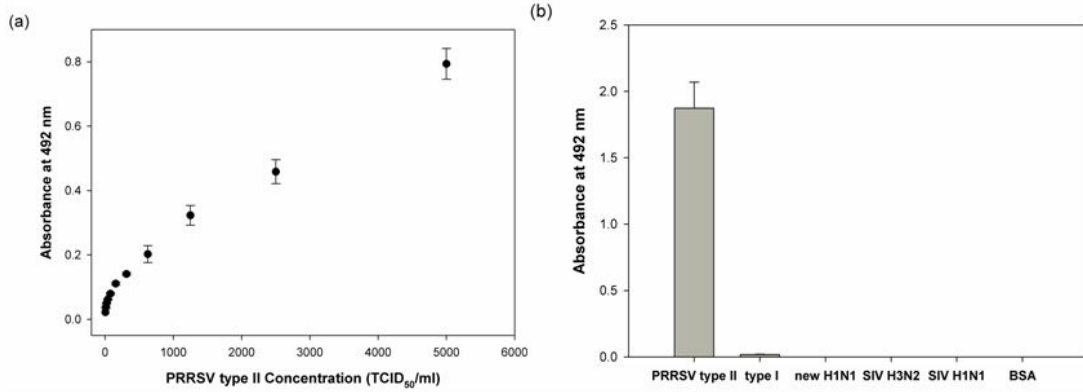


그림 30 buffer 에서의 민감도와 같음: 검출 한계 4.8×10^0 TCID₅₀/ml, 다른 바이러스에는 결합하지 않는 특이성을 보임, 기존의 PRRS 진단법과 거의 비슷한 검출 민감도를 보임.

라. BVDV 검출용 바이오센서 개발

새롭게 개발된 비고정화 방식의 GO-SELEX를 이용하여 앵타머를 개발하면 결합부위에 제한이 없으므로 서로 다른 결합부위를 가지는 앵타머를 개발 할 수 있음. 이를 통해 새로운 앵타머 바이러스 센서 플랫폼인 앵타머-앵타머 sandwich aptasensor가 개발하였다. 개발된 BVDV용 앵타머를 기반으로 표면자기공명 기반 앵타머-앵타머 sandwich aptasensor 개발하여 검출 실험을 진행 하였다. 두 번째 앵타머가 로딩이 되면 앵타머의 농도에 따라 신호가 증가하는 것을 확인 하였다.

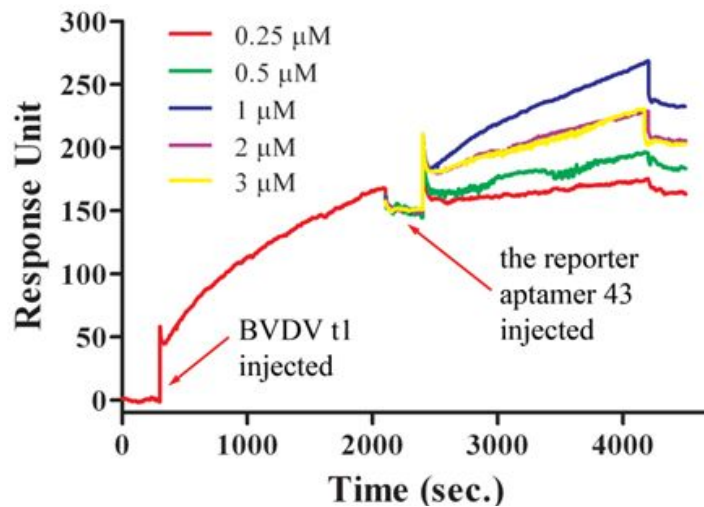


그림 31 표면자기공명 기반 앵타머 앵타머 sandwich aptasensor 검출 결과 (secondary 앵타머 (앵타머43) 실험)

라. 금나노입자 기반의 신호증폭 시스템 개발

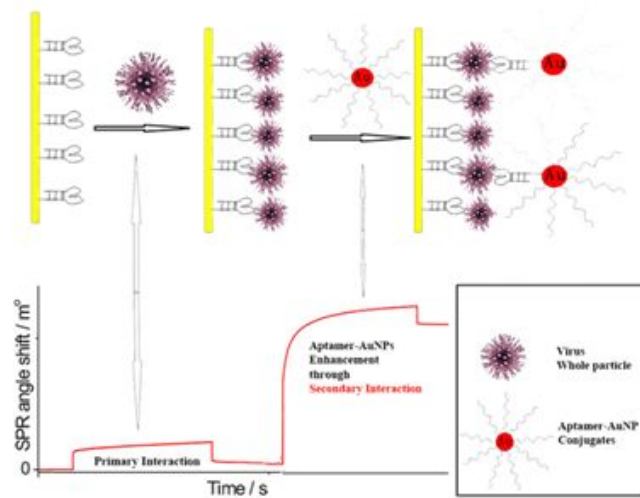


그림 32 금나노 입자를 이용한 신호 증폭 효과
 금나노 입자에 두 번째 앵타머를 고정화하여, 표면자기공명장치의 신호를 증폭시킴

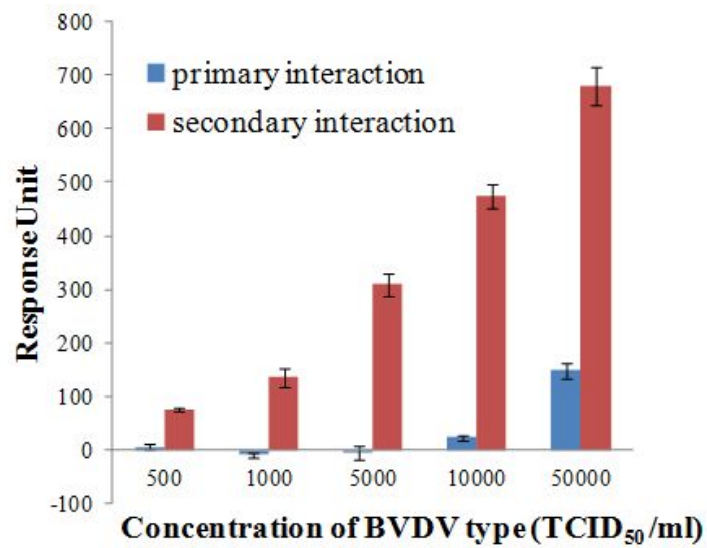


그림 33 금나노 입자를 이용한 BVDV 검출 결과
 두 번째 앵타머가 고정화된 금나노입자를 사용한 플랫폼에서 10배 이상의 신호 증폭효과를 보임.

새로운 앵타머 스크리닝 기술인 GO-SELEX 프로토콜 완성

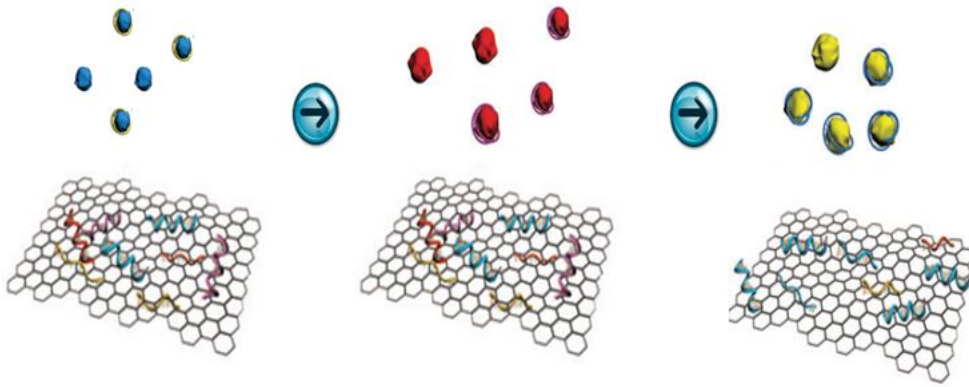


그림 34 GO-SELEX 기본 원리

- 가) 다중 타겟에 결합하는 각각의 앵타머를 스크리닝 하기 위하여 타겟과 유사한 카운터 타겟과 랜덤 DNA 라이브러리를 반응시킨 후 그래핀을 첨가하여 카운터 타겟과 결합하지 않은 DNA 라이브러리를 그래핀 복합체에 흡착시킴.
- 나) 세 종의 타겟 물질을 각각 순차적으로 결합시켜 각각 타겟 물질에 결합하는 단일 가닥 DNA를 확보하여 PCR을 통해 증폭시킨 후 dsDNA를 다시 ssDNA로 분리하여 선별과 분리과정을 반복
- 다) 최종적으로 얻어진 DNA pool을 cloning 하고 염기분석을 시행하여 각각의 타겟 A,B,C에 결합하는 특이적인 앵타머를 확보함.
- 라) 염기서열의 분석이 끝나면 각각의 핵산 앵타머의 구조를 웹기반 컴퓨터 프로그램(mfold)을 통해 분석하고 각각의 타겟물질에 대한 결합력과 특이도 분석

제 3 절 PRRSV, BVDV 특이 압타머 대량 합성 기술 개발

1. Aptamer target 단백질(peptide) 확보 및 공급

가. PRRSV Aptamer target 단백질, peptides

PRRSV (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, 돼지생식기호흡기증후군 바이러스)를 검출할 수 있는 aptamer를 SELEX로 선별하고 또한 선별된 aptamer의 특이성을 평가하기 위해 viral protein과 peptides을 확보하고자 하였다.

PRRSV는 모두 7개의 orf를 함유하고 있는 약 15 kb genome으로 구성된 *Arteriviridae*에 속하는 RNA virus이다. Aptamer 선별을 위한 target 단백질은 7개의 Orf 중에서 선택하고자 하였다. Non structural proteins 이외 ORFs 2-5에는 glycosylated membrane proteins (GP2-GP5), ORF6 에는 nonglycosylated membrane protein (M), 그리고 ORF7에 nucleocapsid protein (N)이 coding 되어있다. 그중 N protein은 감염세포에서 가장 많이 발현되며 (단백질 중 약 40%에 해당), virus의 단백질 중에 가장 잘 immunization되는 면역원성 단백질이다. 그러므로 본 연구에서는 ORF7 (N) protein영역을 선택하여 합성 peptides을 확보하거나 대장균에서 발현 정제 하여 공급하고자 하였다.

(1) PRRSV N-protein Peptides 합성

농림축산검역본부에서 확보한 PRRSV E38 strain과 LMY strain의 NP 유전자를 공여 받았다 (pGEX-E38-ORF7 및 pGEX-LMY-ORF7). 이들의 유전자 서열을 확인하여 비교한 결과 E38은 유럽형이었으며, LMY strain은 북미형이었다(그림 2).

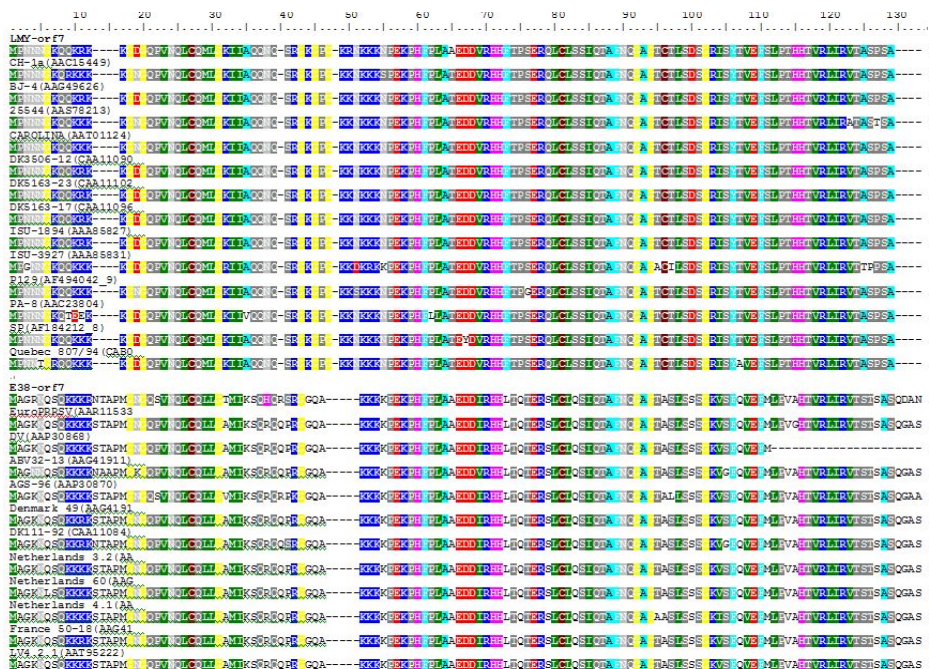


그림 35. LMY strain 과 E38 strain의 N protein(Orf7) 의 sequence alignment

단백질의 표면으로 노출되고 또한 aptamer가 결합하기 쉬운 영역을 선별하기 위해 기존에 보고된 epitope 영역을 우선대상으로 삼고자 하였다. 또한 북미형과, 유럽형을 구분할 수 있는 혹은 공통적으로 검출이 가능한 영역을 peptides 합성 영역으로 설정하고자하였다. N protein중에 B cell epitope로 될 수 있는 영역은 그림 36의 3 영역 (I, III, IV)이 보고되었다 (M, Lima et al,

Virology, 2006, 353, 410-421 & T.-Q. An et al, Virus Gene, 2005, 31, 81-87).

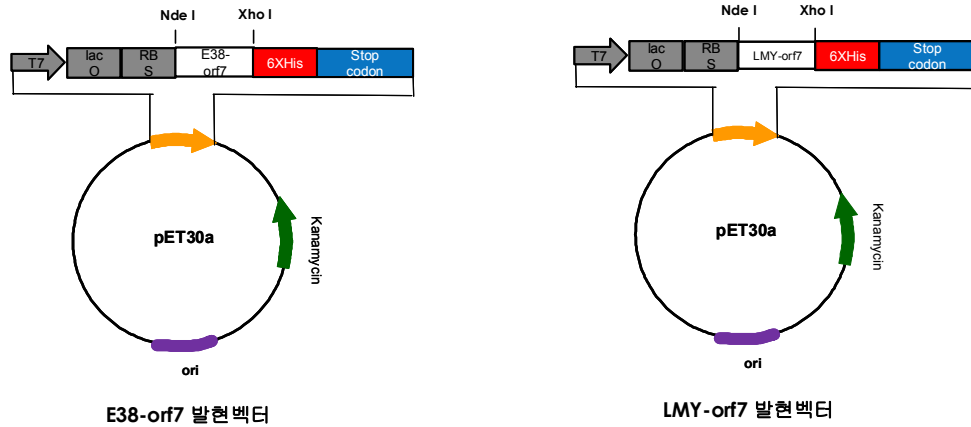


그림 36. 합성 peptides의 선별, 북미 및 유럽형 PRRSV N protein epitope (I), (III), (IV); B cell epitope 로 보고된 영역 (II); 유럽형 특이 영역으로 선별

이들 부위의 peptides를 북미 및 유럽형 공통영역으로 IV 영역 (sequence; IQTAFNQGA), 과 북미형 특이영역(I, KKGDGQPVNQLCQM), 유럽형 특이적인 epitope은 보고된 바 없어서 북미형 특이 epitope 과 동일위치이지만 그 서열이 상이한 영역을 선택하여 유럽형 특이영역 (II, KRNTAPMGNGQSVNQLCQL)으로 선정하였다. 이들 3 영역의 peptides를 aptamer 연구를 위해 합성하였다.

(2) PRRSV N-protein 발현 vector 구축

Viral N protein은 당 수식이 이루어지지 않고 표면에 노출되기 쉬워 aptamer의 좋은 target이 될 수 있다. 또한 *E. coli*에서 제조된 recombinant N protein 또한 epitope로 작용한 보고가 있으며, crystal 구조로 만들어 그 구조를 해명한바 있다(N. P. Danny, Structure, 2003, 11, 1445-1451). 그러므로 본 연구에서 사용될 *E. coli* 발현 recombinant N protein은 SELEX 수행 및 선별된 aptamer의 특이성 검증에 이용될 수도 있다. 전체 Orf7 단백질을 포함하는 발현계를 구축하여 사용하였다. 우선 발현 vector (pET30a, Novagen)에 cloning 하기위해 Forward primer에 *NdeI* 과 Reverse primer에 *XhoI*이 포함된 primer 쌍인 E38_5Nd (5'-ggaattc catatggccggtagaaaccagagccag-3')/E38_3Xh (5'-ccgctcgagatttgcacatcctgactggcggatg-3') 와 LMY_5Nd (5'-ggaattc catatgccaaataacaacggcaagcag-3') /LMY_3Xh(5'-ccgctcgagtgtgctgaaggtgatgctgtgac-3')을 이용하여 각각 PRRSV E38 과 LMY strain 의 *orf7* 유전자를 template로 PCR하였다. PCR products를 pGEM-T easy vector에 cloning한 후 염기서열을 분석하여 PCR과정에서 있을 수 있는 변이가 없음을 확인하였다. 이를 각각 제한효소 *NdeI/XhoI*으로 절단한후 동일한 효소로 절단된 pET30a vecotor에 ligation 하여 발현vector를 구축하였다(그림 37). 구축된 각 발현 vector를 *Escherichia coli* BL21(pLys)와 도입하였다. 도입된 균주를 각각 *E. coli* BL21(pLys)-E38, *E. coli* BL21(pLys)-LMY로 명명하였다. 발현되는 재조합 N protein은 아래와 같은 서열과 분자량을 가지며Ni-NDA resin으로 정제가 용이하도록 C-말단에 6×His tag이 부착된 형태이다.



<E38-orf7 SEQUENCE 136 AA (15.05 KDa)>

MAGRNSQKK KRNTAPMGNG QSVNQLCQLL GTMIKSQHQR SRGGQAKKKK PEKPHFPLAA
 EDDIRHHLTQ TERSLCLQSI QTAFNQGAGT ASLSSSGKVS FQVEFMLPVA HTVRLIRVTS
 TSASQDANLE HHHHHH

< LMY-orf7 SEQUENCE 131 AA (14.62 KDa)>

MPNNGKQK RKKGDGQPVN QLCQMLGKII AQQNQRGKG PGKKNKKKNP EKPHFPLAAE
 DDVRHHFTPS ERQLCLSSIQ TAFNQGAGTC TLDSDGRISY TVEFSLPHTH TVRLIRVTAS
 PSALEHHHHH H

그림 37. 구축된 E38-Orf7 과 LMY-Orf7 발현vector의 구조

(3) PRRSV N-protein 발현 및 정제

각 발현벡터가 도입된 *E. coli* BL21(pLys) 형질전환체를 chloramphenicol(25µg/ml), kanamycin(25µg/ml)이 첨가된 LB 배지에 접종하였고 37°C에서 overnight 배양하였다. 다음 날, Chloramphenicol(25µg/ml), kanamycin(25µg/ml)이 첨가된 LB 배지 50ml 에 5% 되도록 접종하고 OD₆₀₀ 값이 0.5~0.7까지 배양한 후 농도가 0.01~1 mM 되도록 IPTG 를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 단백질 발현 유도 후 10, 15, 30°C 의 조건으로 6 ~24 시간 배양하여 발현 유무를 관찰하였다.

발현 된 단백질을 확인하기 위해 cell을 원심분리후 회수하여 Native 조건에서는 Lysis buffer(0.5M NaCl, 5mM imidazole, 20mM Tris-HCl)를 사용하여 단백질을 추출하였고 denature 조건에서는 8 M Urea를 사용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 SDS-PAGE를 실시하여 분석하였다. E38-ORF7 단백질의 molecular weight는 15.05 KDa 이며 LMY-ORF7 단백질의 molecular weight는 14.62 KDa 으로 예측되었다.

30°C에서 6시간 발현 배양한 조건에서 *E. coli* BL21(pLys)-E38, *E. coli* BL21(pLys)-LMY 균체를 원심분리 회수한 후 단백질을 발현을 조사하였다.

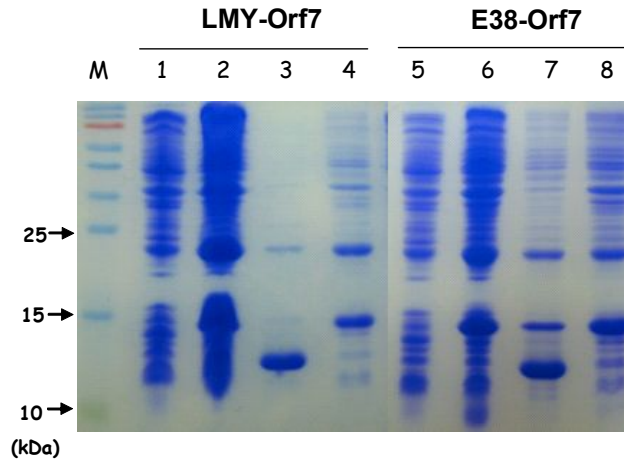


그림 38. SDS-PAGE analysis of Orf7 (N) proteins expressed by the condition of 30℃, 6hr cultivation after 1 mM IPTG induction. M, Size marker; 1&5, total protein (non-induction) ; 2 & 6, total protein (induction), 3 & 7, soluble protein fraction; 4 & 8, insoluble protein fraction

그 결과 그림 38과 같이 E-38 Orf7 단백질은 일부 soluble form으로 회수 되었으나, LMY-Orf7 단백질은 대부분 insoluble form 의 단백질로 발현 되었다.

그러므로 IPTG에 의한 단백질의 과량의 발현과 빠른 발현 속도에 의한 folding의 방해로 인한 inclusion body 형성을 방지하기위해 IPTG 농도와 배양 시간을 변형하여 soluble form 의 단백질 발현이 이루어지도록 유도하였다.

그 결과 LMY-ORF7 단백질의 경우에 IPTG 농도는 0.1 mM 되도록 첨가하고 15℃에서 24 시간 배양 했을 때, 일부 soluble protein이 형성될 수 있음을 확인하였다(그림 39). 그러나 E38-ORF7 단백질의 경우는 soluble protein의 형성에 크게 영향을 주지는 않았다. 그러므로 LMY-Orf7 soluble form의 단백질을 얻기 위해 0.1 mM IPTG induction, 15℃ 배양조건으로 하였으며, E38-ORF7 단백질의 soluble form 을 얻기 위해 IPTG 농도는 1 mM 되도록 첨가 하고 30℃에서 6시간 배양의 조건으로 단백질 정제를 시도하였다.

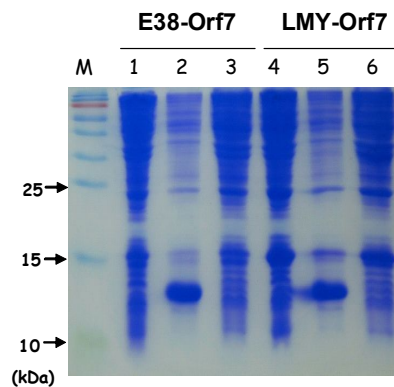


그림 39. SDS-PAGE analysis of Orf7 (N) proteins obtained the cell cultivated under condition of 15℃, 24 hr after 0.1 mM IPTG induction. 1 & 4, total protein (induction); 2 & 5; Soluble protein fraction, 3 & 6, insoluble protein fraction

(4) E38 strain 유래 recombinant N protein 단백질 발현 및 정제

E38strain유래 N protein의 Soluble form의 단백질을 발현시키기 위하여 상기 확립된 조건인

1 mM IPTG induction 후에 배양온도는 30℃, 배양시간은 6시간으로 배양을 했을 때에 어느 정도 soluble form으로 단백질이 발현되었다. 3L 배양하였고 단백질을 추출한 후 Ni-NDA resin을 사용하여 정제하였다. 그 결과 단일 band로 보이는 E-38 N protein을 확인할 수 있었다(그림 40).

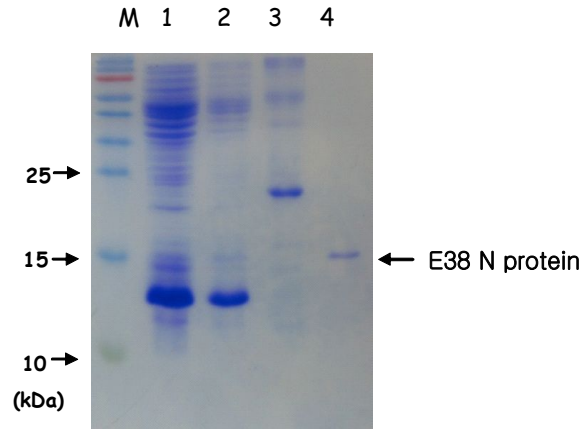


그림 40. Purification of recombinant N protein of E-38 strain by FPLC with Ni-NDA resin. M, Protein size marker; 1, Total solublized protein; 2, Washing with 5 mM Imidazole solution; 3, Washing with 60 mM imidazole solution; 4, Elution with 150 mM imidazol solution

(5) LMYstrain 유래 recombinant N protein 단백질 발현 및 정제

LMYstrain 유래 N protein의 Soluble form의 단백질을 발현시키기 위하여 IPTG 농도는 0.1 mM, 배양온도는 15℃, 배양시간은 24시간일 때 soluble form으로 발현은 되지만 양은 많지 않은 것으로 보였고, 4L를 배양한 후 단백질을 추출하고 Ni-NDA resin을 사용하여 정제하였다. 하지만 soluble form으로 발현되는 단백질의 양은 그리 많지 않았다. 그래서 많은 양의 단백질을 얻기 위하여 insoluble form으로 단백질을 발현 및 정제도 일부 하였다. Insoluble form의 단백질은 1mM IPTG 유도 조건에서 30℃에서 6시간 배양 정제한 것이다(그림 41).

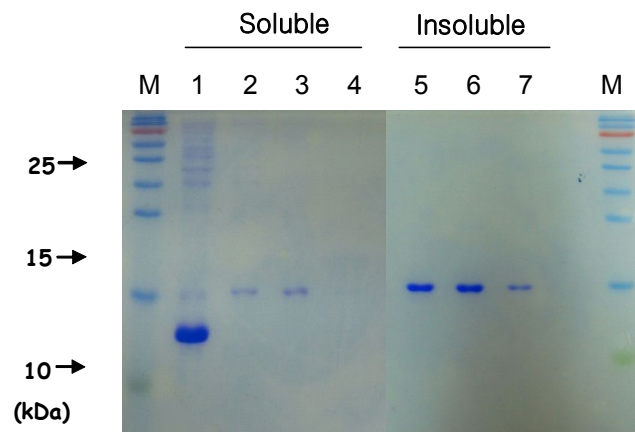


그림 41. Purification of recombinant N protein of LMY strain by FPLC with Ni-NDA resin. M, Protein size marker; 1, Total solublized protein; 2, 3 & 4 Purified solublized N protein ; 5, 6 & 7, Purified insolublized N protein.

나. 소 바이러스성 설사증 바이러스(BVDV) 진단용 aptamer 개발용 단백질 합성

(1) BVDV E2 단백질 발현 벡터 제작

소바이러스성설사증바이러스 (BVDV)는 H1N1과 유사한 전략으로 단백질을 확보하고자 하였다. BVDV 유래 단백질로는 Envelope 단백질 (E2)의 단편을 발현 정제하고자 하였다. 수의 과학검역원이 확보한 BVDV의 E2 단백질을 coding하는 유전자가 함유된 vector인 pGEMT-e-KD-26-1-F2-11을 확보하고, 이의 서열을 분석하여 이사유무를 확인하였다. 분석된 염기서열을 바탕으로 5'말단에 *Bam*HI, 3'말단에 *Xho*I 제한효소 서열을 부가하도록 증폭용 primer를 (F2-11-5B; 5'-cgggatccatggtacagggcattctg-3' , F2-11-R; 5'-ccgctcgaggttgggagctctccata-3') 제작하였다. 증폭용 primer로 pGEMT-e-KD26-1-F2-11 벡터를 주형으로하여 유전자를 증폭 및 확보하였다. 증폭 산물은 *Bam*HI과 *Xho*I으로 절단하여 약 1.7kb의 DNA 단편을 확보하였으며, 이를 pUC118벡터에 subcloning하였다. M13F와 M13R primer를 사용하여 염기서열분석을 실시하여 염기서열을 확인하고, *Bam*HI과 *Xho*I으로 절단하여 pET30a(+) 벡터에 cloning하여 pET30a(+)-F2-11 벡터(그림 42)를 제작하였다.

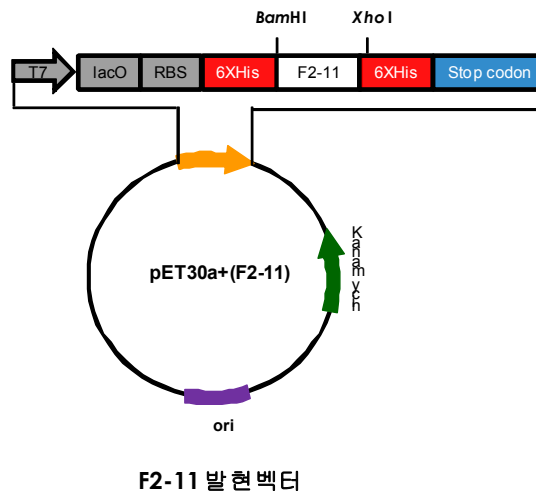


그림 42. 소바이러스성설사증바이러스 (BVDV)의 envelope protein(E2) 발현용 vector

(2) BVDV E2 단백질 발현 및 정제

제조 완료된 pET30a(+)-F2-11 벡터를 *E.coli* BL21(pLys) 균주에 형질전환하여 단백질 발현을 실시하였다. pET30a(+)-F2-11에 의해 발현되는 BVDV 유래 단백질로는 Envelope 단백질 (E2)의 단편의 서열은 하기와 같으며 628 residues 잔기의 단백질이다.

```
MHHHHHHSSGLVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTD DDDKAMADIGSMVQGILWLL
LITGVQGDLDCKPEFSYAIARDERIGQLGAEGLT TTTWKDYSPEMKLED TMVIAWCKDGF
TYLPRCTRETRYLAILHTRALPTSVVFKKLF DGRKQEDV VEMDDNF EFGLCPCDAKPIVRG
KFNTTLLSGSAFQMVCPIGWGTGTVSCMSFNMDTLATTVIRTYRRSKPFPHRQGCITQKTL
GEDLHNCILGGNWTCVPGDMLLYEGGSIESCKWCGYQFK ESEGLPHYPIGKCRLENETGYR
LVDDTSCNREGVAIVPQGTLRCKIGKTTIQVIAMDTKLGPMPCRPYEISSEGPVERTACTFN
YTKTLKNKYFEP RDSYFQQYMLKGYQYWF DLEVTDHHRDYFAESILVVVVALLGGRYV
```

LWLLVTYMLVSEQKASGTQYGAGEVMMGNLLTHNDIEVVTYFLLLYLLLREESVKKWV
 LLLYHILVSHPIKSVTVILLMIGDVVKADSGGQGYFGQIDLCFTIVVLIIGLIARRDPTIVPLV
 TMAALRVTGLTYQPGVDVAMAVMTITLLMISYVTDYFRYKRWLQCILSLVSESLVNSRPP
 AGRPYGRAPNLEHHHHHHH*

단백질의 발현 및 정제는 H1N1과 유사하게 진행 하고있다. 단 목적 단백질은 발현을 확인하였으나(그림 43). 그 생산량이 매우 적어 적절한 정제를 수행하지 못하고 있다. 이는 단백질의 발현은 대장균 세포의 생육에 영향을 미치기 때문으로 추정되고 있다.

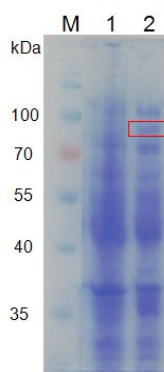


그림 43. 소바이러스성설사증바이러스 (BVDV)의 envelope protein(E2) 발현
 M : protein size marker, Lane 1: IPTG non induction, Lane 2: IPTG induction,

2. ss DNA aptamer library의 합성 및 공급

3종 병원체의 6종 target에 적합한 high quality의 aptamer library를 제공하고자 하였다. Target에 높은 selectivity를 보이는 aptamer 선별을 용이하게 하기 위해 library의 randomization과 고차구조의 형성이 쉽게 하기 위해 퓨린계열의 Guanine이 일부 편재될 수 있도록 모색하였다.

가. Aptamer library 합성 공급/품질 향상

DNA aptamer library는 일반적으로 30-100개의 randomized nucleotides가 포함되어 있으며, PCR amplification 이 가능하도록 양 말단에 약 20 nucleotides가 붙어 있는 총 70-140 nucleotides로 구성된 ssDNA oligonucleotides pool이다. Aptamer는 oligonucleotide synthesizer (예 PolyPlex DNA/RNA synthesizer)를 활용하여 automatization protocol에 따라 chemical 합성을 하였다. 합성은 크게 ①합성단계, ② 탈 보호(Cleavage and Deprotection) 단계, ③ 정제 (Purification) 단계로 나누어 진행 하였다. 각 단계별로 합성의 효율, 순도 등을 평가하였다. 합성단계는 Detritylation 단계, Coupling 단계, Capping 단계, Oxidation 단계를 반복 하고 전체적인 과정은 solid 지지체 상에서 수행하였다. 마지막 nucleotide가 부착되고 난 뒤에 solid 지지체로 부터 분리(cleavage)하고 염기 (Base) protection group을 화학적으로 제거하여 합성을 완료하였다.

SELEX를 위해 Aptamer library는 최대한의 다양성(10^{14-15})을 확보하도록 합성하였다. randomized nucleotides가 고른 편재성을 가지도록 합성하고자 coupling 단계의 염기 즉, A, T, G, C 비율을 고정하여 library의 합성의 다양성을 평가하였다. 이를 통해 최대한의 다양성이

확보된 양질의 aptamer library의 합성기술을 확보하고자 하였다.

기본적인 ssDNA aptamer 구성 (예)

5' AATTAACCCTCACTAAAGGG-(N)₃₀₋₁₀₀-TATGGTCGAATAAGTTA-3'
 (flanking common primer - randomized nucleotides- flanking common primer)

합성된 aptamer는 40 개의 N nucleotides가 포함되도록 합성하였다. 품질 평가를 위해 Primer 쌍을 활용하여 5회 PCR로 amplified 하여 clone을 T-vector에 cloning 하였다. Clone을 random하기 선별하여 약100여개를 선별하여 2회에 걸쳐 서열을 분석하여 aptamer library의 randomization을 평가하였다. 표 1,과 2에서 볼 수 있듯이 반적으로 ATGC가 고루 편재 되어 있었으나 guanine이 전반적으로 rich 하였다. 일반적으로 aptamer에 guanine이 rich 할 경우 quadruplex-forming를 형성하여 안정한 3차 구조를 형성할 수 있다. active G-rich oligonucleotides는 aptamers로 작용이 용이하고 3차구조를 형성한 것은 cell내로의 이동이 일반적인 oligonucleotides 보다 매우 잘 일어나는 것으로 보고되고 있다. 또한 이러한 구조의 aptamer는 열에 안정하며, 비 면역원성을 보이고 또한 serum nuclease에 내성을 보이기도 한다. 그러므로 본 과제에서 합성된 aptamer library는 aptamer screening에 적절 할 것으로 예상 되었다.

표 1 Random ratio of nucleotides position

position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
A(%)	13	18	21	13	9	12	18	21	15	12	7	13	15	7	15	14	18	15	13	21	8	13	21	13	12	7	19	13	13
C(%)	16	15	15	13	15	15	9	19	18	10	19	10	6	22	7	11	9	15	21	12	12	15	15	15	18	15	12	16	18
G(%)	42	39	40	45	45	43	37	31	40	42	42	39	49	37	46	41	46	36	42	46	53	43	39	45	39	45	37	43	37
T(%)	28	27	24	28	31	30	36	28	27	36	31	37	30	33	31	35	27	34	24	21	27	28	25	27	30	33	31	27	31

표 2 1st nucleotide 후에 2nd nucleotide 빈도

1st nt	count	Percent(%)	2nd nt	Count	Percent
A	299	14.42354	A	46	1.7692
			C	60	2.3077
			G	150	5.7692
			T	106	4.0769
C	301	14.52002	A	64	2.4615
			C	68	2.6154
			G	161	6.1923
			T	122	4.6923
G	856	41.29281	A	131	5.0385
			C	176	6.7692
			G	401	15.4231
			T	331	12.7308
T	617	29.76363	A	116	4.4615
			C	111	4.2692
			G	326	12.5385
			T	231	8.8846
Total	2073	100.00000		2600	100

나. 1st selected Aptamers 서열 분석 및 candidate aptamer의 수식 공급

PRRSV에 특이적인 aptamer를 확보하기 위해 SELEX를 수행한 서열 clone을 제공받아 서열을 분석하였다. 약 200개의 서열을 분석하였다. 전반적으로 서열분석이 용이하였으나, 선별된 aptamer 중에는 서열분석이 매우 어려운 서열이 존재하기도 하였다. 이는 아마 aptamer의 특성상 고차구조를 형성하여 발생하는 문제일 것으로 추정되었다. 어려운 서열분석 clone의 경우 반대방향으로 서열분석을 하거나 혹은 당사의 고차구조 해리 후 분석하는 기술을 활용하여 분석을 하여 제공하였다.

분석된 서열을 토대로 선별된 약 20개의 clone을 candidates aptamer로 설정하고 이의 특이성을 평가하기 위해 modified oligo로 합성하였다. Modification은 biotinylation, amino, C18 등 다양하게 부착하여 공급하였다.

3. ssDNA aptamer의 대량 생산 공정 control 및 품질 평가 방법 설정

Aptamer의 진단용 소재의 생산을 위해서는 GMP 수준의 공정 control이 필요하다. 이를 위한 공정의 정확한 제어를 시스템 및 document를 확립해야 한다. 이를 위해 합성공정의 준비단계에서부터 합성공정 단계, 그리고 최종 Aptamer 품질의 평가를 위한 적절한 평가 시스템의 확립 할 필요가 있다. 이에 따라 관련된 평가요소를 점검하고 평가를 위한 요소와 기법을 확인하였다.

가. Aptamer 합성 작업 공정

Aptamer의 합성 공정은 일반적인 올리고 뉴클레오타이드 합성과정에 따라 아래의 4 단계로 크게 나눌 수 있다. 합성은 생물학적 합성과 반대 방향으로 합성되어 3'방향에서 5'방향으로 단일염기가 하나씩 차례로 붙으면서 염기사슬(올리고뉴클레오타이드)을 신장시키는 자동화된 합성기를 이용하여 합성한다. 4단계의 공정이 한번 순환하여 한개의 염기가 부가되어 합성되어진다(그림 44). 각 단계는 DNA 합성의 첫 단계로 결합된 염기의 5'-OH를 보호하고 있는 DMTr기가 제거되어 다음의 염기가 결합할 수 있도록 준비되는 Detritylation 단계, 새로운 염기가 신장되는 DNA 사슬의 5'말단에 붙는 단계이며, 염기가 붙을 수 있는 모든 위치의 약 98%에서 반응이 수행되는 Coupling 단계, 새로운 염기가 결합되지 못한 DNA 사슬을(0~2%) 다음 부가반응에서 신장되지 못하도록 잔존 유리 5'-OH를 불활성시키는 단계인 Capping 단계, 마지막으로 새로운 염기의 결합을 산화과정에 의해 안정화 시키는 단계인 Oxidation 단계를 거쳐 합성한다. 주로 합성의 quality에 결정적인 영향을 미치는 단계는 capping 단계이며 이의 단계에서 문제가 생기면 중간위치의 염기가 결실된 형태의 올리고가 생성될 수도 있다. 많은 올리고 뉴클레오타이드는 이단계에서 결실 등의 현상의 발생의 원인이 된다. 특히 긴 사이즈의 Aptamer는 이러한 문제의 발생 가능성이 매우 높다. 그러므로 정확한 진단을 위한 소재인 aptamer의 합성에 정확한 quality control이 필요하다.

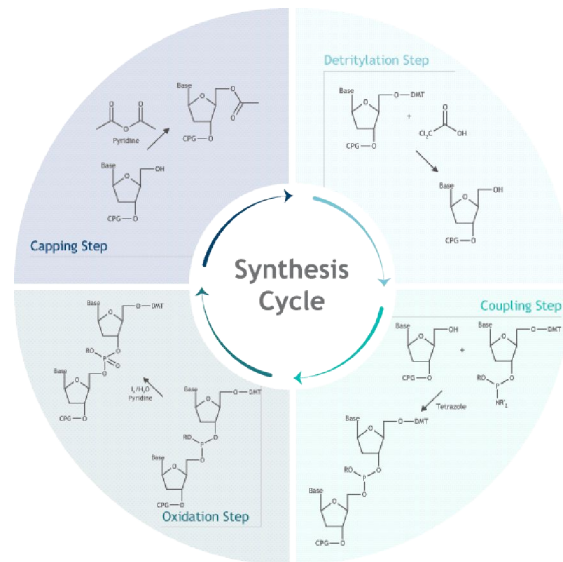


그림 44. Aptamer용 올리고 합성 (Aptamer-Oligo Synthesis Cycle)

나. Aptamer 합성 작업 공정의 관리

정확한 quality control을 위한 아래의 각 단계별 control 시스템과 작업 요령을 확립하고 작업자 및 기기 시약에 의한 합성 error를 최소화 하고자 하였다. 또한 전체 합성 과정 및 최종 제품의 품질을 모니터링하는 방법을 고안하고자 하였다.

Aptamer와 같은 long size oligomeric SSDNA를 위해 별도의 합성작업을 위해 몇 가지 공정의 개선을 수행하였다.

(1) 정확한 합성을 위한 공정 합성 공정전 check list를 확립

- 적합한 합성을 위한 합성기의 선택
 - 동시 합성을 위한 유사한 서열 길이의 선별 (서열 확인)
 - 동시 합성을 위한 동일 농도 합성 (농도 확인)
 - 합성 량에 따른 정확한 시약의 양 결정 및 확인
 - Aptamer 합성을 위한 automatic synthesizer의 parameter의 설정(optimized log file의 확립)
 - 정확한 fraction collector의 설정 (과장, volume, cutting-in & out parameter 설정)
 - 해리되는 chromophoric trityl cation 량의 설정을 통한 합성의 monitoring
 - Automatic synthesizer의 initialize화 및 오작동 유무의 확인
(잔류 용매, 시약 및 수분의 제거, 신규 합성 시약의 주입)
 - 적절하게 합성 시약의 공급을 위한 flow rates가 보장되는가를 확인
 - 합성기 연결 gas의 flow 확인 및 용량 확인
- 약 20여 항목의 check list 항목을 정하고 이를 document화 함.

(2) Aptamer 합성을 위한 작업 공정의 개선

- 합성 시스템 및 장소의 수분의 배제
- 기 사용시약을 시스템에서 제거하고 합성개시전 미개봉 신규시약을 개봉하여 사용

(phosphoramidites, 특히 guanosine phosphoramidite)

- 예비 합성을 통해 단계별 효율이 99% 이상이 보장됨을 확인 하고 신규 합성 개시
 - Deblocking 시약으로 TCA의 사용을 DCA (2% v/v DCA/1,2 dichloroethane)사용으로 대체 함
 - Phosphoramidite의 coupling time을 1.5배 증가함.
 - Coupling 효율 증대를 위한 phosphoramidite 농도를 증가시킴
 - Support matrix인 CPG를 40 mmol/g이하의 loading capacity를 가진 것이 유용함.
- 일반 올리고의 합성 parameter와 달리 aptamer의 합성을 위해 상기와 같이 parameter를 개선하여 합성 하였다.

(3) 합성 작업중 공정 관리

- 합성 상태의 검사 (DMT monitoring 에 의한 검사)

Coupling 반응의 trityl-monitoring(DMT monitoring)을 통한 합성 공정의 확인 (그림 45)

- 합성 공정 기기 및 line의 이상 유무 관찰

작업 방법 및 요령의 확립하고 합성의 개시 후 작업 중의 기기 및 기타 작업의 이상 유무를 monitoring 하며, 이를 통해 합성 과정의 이상이 발생할 경우(예, DMT-monitoring 중 합성 반응의 중단 신호 검출) 이상 발생batch로 확정하고 폐기처분하며, 작업공정을 재점검한 후 다시 합성 한다.

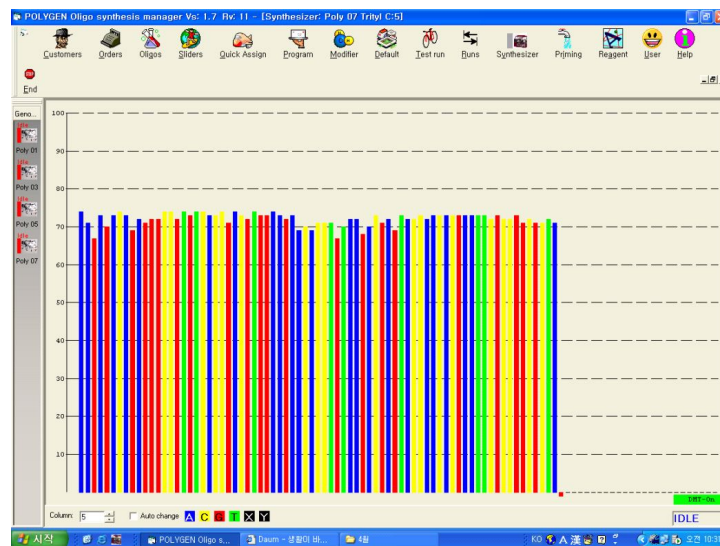


그림 45. Aptamer 합성 과정의 공정 관리 (DMT monitoring)

다. Un-modified aptamer의 정제법의 확립

합성된 올리고의 불순물을 제거하여 순도를 향상시키는 단계가 필요하다.

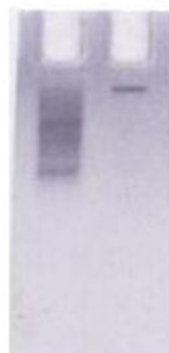
이를 위해서는 침전법, sizing column 법, reverse-phase cartridge column 법, denaturing PAGE법 및 HPLC 법을 고려하였다.

적절한 순도의 aptamer 합성을 위해서는 이들의 단독 사용보다, 목적에 맞게 복합사용이 더욱 적절 할 것이다. 즉 직접적인 precipitation - 직접 핵산 침전법으로 회수 하는 방법으로 일반적인 oligo의 간편한 회수법으로는 높은 quality의 aptamer의 생산에는 적절하지 않으며 (순도 60-80% 내외), PAGE법과 cartridge 법의 병행 (순도 98% 이상) 혹은 HPLC 정제(순도 98% 이상) 가 적절하였다.

소량의 합성을 위해서는 denaturing PAGE법과, reverse-phase cartridge column 법을 병행 하는 것이 적절하였다. 그러나 대용량을 위한 기법으로 이들의 사용은 한계가 있었다. 그러므로 HPLC 법을 통한 정제법으로 수행하였다.

(1) PAGE 및 Cartridge 정제

약 80 mer 이상의 un-modified aptamer의 경우 polyacrylamide의 사용 농도 6%가 적절하였으며, TBE buffer 및 loading dye 로 XC (70 bp) 와 BPB(18 bp)의 혼합용액을 사용하여도 무방하였고 적절한 aptamer 정제를 위한 un-time은 3~4시간 이었다. 전개 후에 목적 aptamer의 추출은 UV 245 nm에서 major-band를 확인하여 band의 중심으로부터 80%를 (n-1 mer 등을 제거하기위해) 잘라서 회수하고 이를 0.5M TEAA buffer에 녹여 회수할 경우 좋은 품질을 기대할 수 있었다. 이를 하기의 간략한 SEP-PAK column (C18 cartridge)로 정제 할 수 있었다 (그림 46). 이들 공정은 주로 수작업으로 이루어 짐으로 본격적인 aptamer 생산을 위한 적절한 quality의 안정적 생산을 위해서 정확한 SOP에 따른 작업이 이루어 져야 함으로 이를 위한 SOP를 마련하였다. SOP의 항목으로 column의 준비와 장착, 용매 (0.5M TEAA의 조제, elution solvent의 조제 등)의 준비에 관한 사항, 및 작업 절차에 관한 것을 포함 하였다.

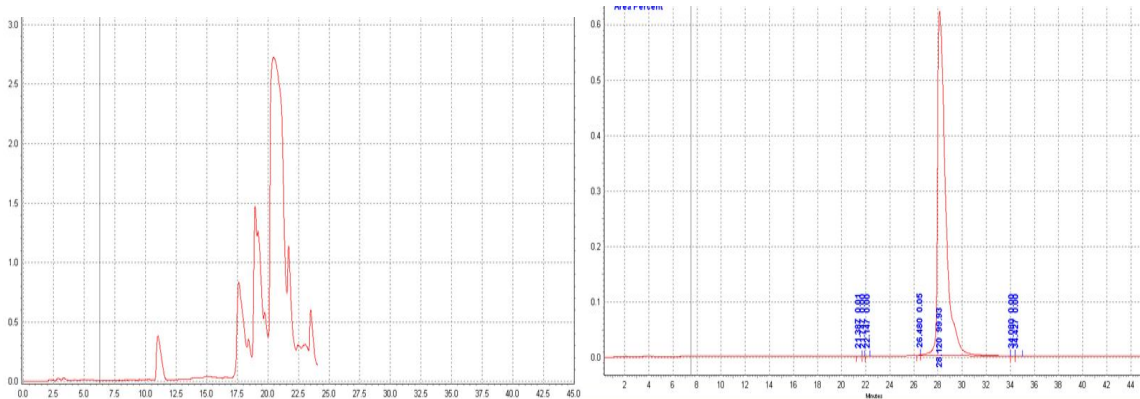


Lane 1 : Crude aptamer
Lane 2 : PAGE Purified aptamer

그림 46. Aptamer 합성과 정제품의 gel-photo

(2) HPLC 정제

또 다른 고순도 정제를 위해 HPLC 정제(Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography)를 공정을 확립하고자 하였다 (그림 47). 이는 주로 대량의 정제를 위한 방법으로 선택하였다. HPLC의 조건은 aptamer의 종류 및 modificatio에 따라 일부 조건의 변형이 이루어 질 수 있다. 이의 방법 또한 PAGE 및 Cartridge 법과 마찬가지로 적절한 SOP를 마련하였다. 단, 향후 최종 선별되는 aptamer의 대용량의 합성을 위해 보다 경제적이고 효율적인 정제법으로 개선하고자 하였다.



<합성 aptamer 정제 전>

<합성 aptamer 정제 후>

그림 47. Aptamer의 HPLC 정제 전 후의 순도 비교 HPLC 정제 후

라. 정량법

일반적인 nucleotide 정량법을 따랐다.

Optical Density Unit(O.D): 파장 260 nm에서 경로거리 1 Cm에서 흡광량
Oligonucleotide 1 O.D : 30 ~ 37 ug/ml (= 33 ug/ml)

4. 대용량 합성을 위한 기술 개발

향후 개발된 Aptamer의 산업적인 생산을 위해서는 대용량 (g 수준) 의 합성이 가능한 시스템을 구축할 필요성이 있다. 이를 위해 본 기관은 풍부한 합성경험과 기술을 바탕으로 이를 응용하여 대량 생산 체제 구축을 위한 대용량 합성 생산 시스템을 개발하고자 하였다. 대용량 합성을 위한 반응기의 설계 그리고 대용량 합성을 위한 정제 시스템 확립이 필요하였다. 이를 위해 대용량 합성용 반응기를 개발 하고자 하였다.

가. 대용량 올리고 합성용 반응기(Reaction Plate) 개발

대용량 합성(g 이상)에는 일반합성 형태(수백 μg 이하)에서 보다 많은 량의 시약과 고용체(Support)가 요구됨으로 이에 적합한 대용량 올리고 합성용 반응기(Reaction Plate)를 Multi-simultaneous 합성 방법에 기초하여 설계하였다(그림 48). 설계된 plate로부터 1회 수 십에서 수백 mg의 합성이 가능하도록 설계하였으며 1일 약 135 mg의 합성이 가능한 시스템을 확보하였다.

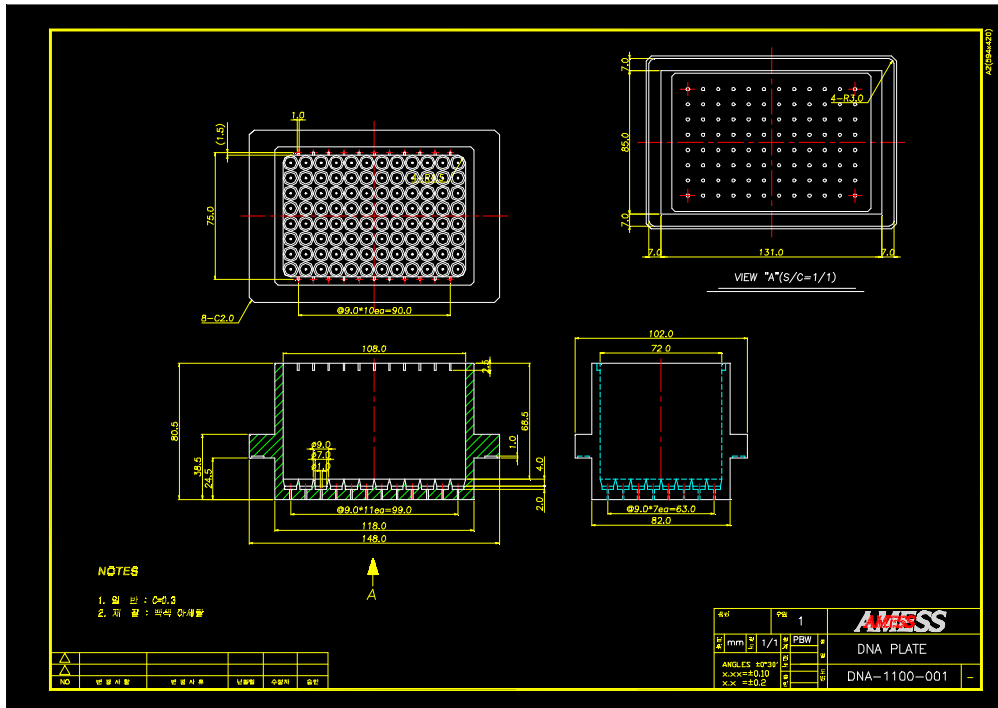
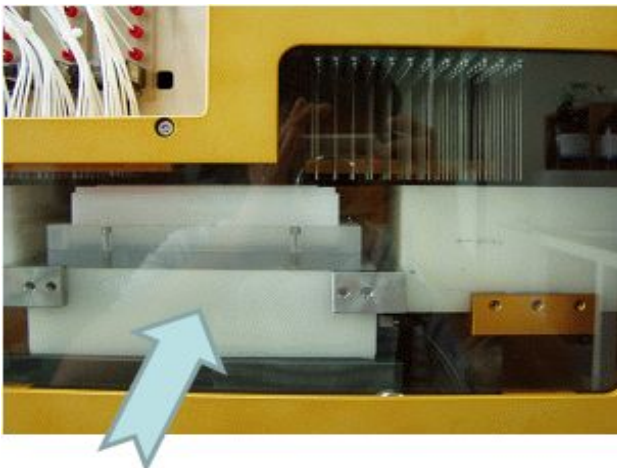


그림 48. 대용량 aptamer 합성 반응기 palte의 모식도

나. 대용량용 기기의 개선 및 정제 장치 개발

또한 대용량 합성에는 많은 량의 고용체(Support)를 이용하여 합성하기 때문에 합성 효율이 떨어진다. 이를 극복하기 위하여 합성기에서 합성 효율을 향상시키기 위하여 각 단계(Coupling 단계)에 추가적인 Blow 기능을 추가하여 흡착능력을 개선하였다(그림 49).



(A)



(B)

그림 50. 대용량 합성을 위한 합성기의 Blow 기능의 추가 및 lyophilizer unit

다. 대용량 정제를 위한 정제법의 개선

COP 정제는 대용량 정제를 위해 적합한 방법이다. 단지 COP 정제는 PAGE 정제에 비해 순도가 일부 떨어진다는. 본 개발 과제에서 대용량정제를 COP 정제 순도 개선을 위해 용매 조건을 하기와 같이 변경하였다. COP column에 100% acetonitrile로 washing, 2M TEAA로 washing 후 aptamer 시료를 loading 하여 흡착시키고 이를 10% ammonia 수로 washing 한 다음, 일반적인 D.W. washing 공정을 5% Acetonitrile, 10% NaCl solution으로 washing 대체하였다. 이때 impurities가 소실되었으며, 이후 2% TFA, D.W. 순으로 washing solution을 씻고 20% acetonitrile 로 elution step을 50% acetonitrile, 0.5% ammonium hydroxide 용액으로 변경하여 흡착된 aptamer를 용리하였다. 이는 2% TFA washing step에서의 acid의 영향을 ammonium hydroxide로 중화시켜 purine amidite의 depurination을 방지하면서 용리하는 조건을 확립하였다. 이를 통해 정제의 순도를 75% 수준에서 80% 이상으로 증진할 수 있었다(그림 51).

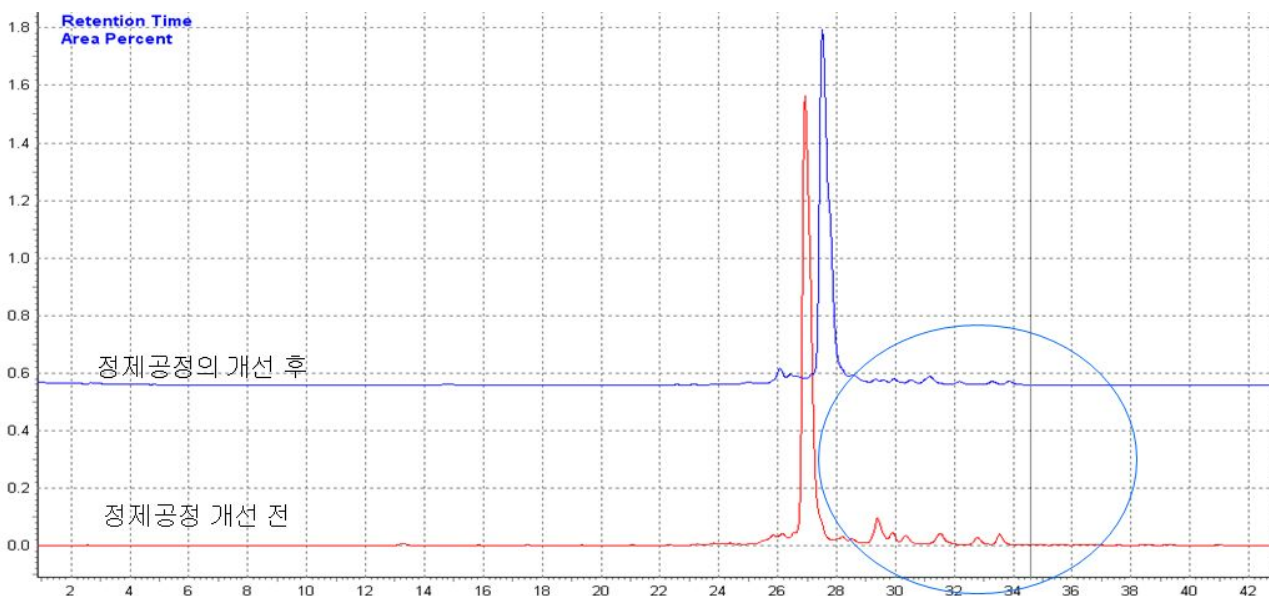


그림 51 정제 공정 개선을 통한 순도 개선

5. Aptamer 품질 검사 법 확립

의료 진단용 aptamer 의 생산을 위한 <공정 관리용 분석법>과 적절한<최종 제품의 품질 평가법>의 개발이 필요하다. 진단용 중요 소재인 aptamer의 생산품의 적절한 품질 검사는 한 가지 방법으로 택하기 보다는 다양한 방법으로 평가함이 보다 정확할 것으로 판단되어 적절한 검사법을 일반적인 핵산 품질 평가법에 준하여 평가해 보았다.

가. 전기영동법의 의한 검사

일정량의 올리고를 전기영동(PAGE gel)하여 Band Pattern을 분석함으로써 올리고의 합성 상태와 순도를 간접적으로 검사가 가능하였다(그림 52). 또한 정제의 적절한 진행유무(공정

관리) 및 개략적 순도를 확인하기에는 간편한 방법으로 도입이 가능하였다(적절한 공정관리 평가법).

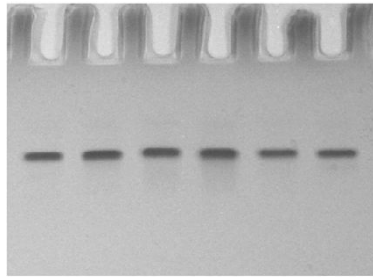


그림 52. Aptamer 정제품의 PAGE gel Photo

그러나 이 방법은 정확한 n-1 mer 등의 정량에 한계가 있어 적절한 aptamer의 quality 평가 기법으로 선택 하기는 미흡하나 현재의 품질 평가 방법으로는 대안 모색이 어려운 실정이다. 단 진단용으로의 aptamer의 질적 평가로는 적절할 것으로 평가된다.

나. Aptamer의 서열 분석과 분자량 및 크기 확인

(1) Base composition analysis

하기와 같은 방법으로 올리고의 base composition을 확인하면 보다 정밀하게 합성품의 품질을 측정하기가 용이하였다.

품질 측정을 위해 aptamer 올리고를 S1 nuclease와 Alkaline Phosphatase로 분해하고 이에 의해 생성되는 nucleotide composition을 HPLC (Detector uv. 254 nm)로 정확하게 측정하여 예상값과 실측값을 대조하여 품질을 간접 평가 할 수 있다.

먼저 GATC control (5'-GATC-3')를 사용하여 molecular(base) extinction coefficient factor (K)를 구하였다. 그 값은 아래 표 3과 같다.

표 3. 표준 GATC nucleotide를 사용한 molecular(base) extinction coefficient factor (K)

Name	Rection Time	Area Percent	Molecular extinction coefficient factor (K)
[C]	9.350	15.79	2.1552
[G]	12.825	32.79	1.0378
[T]	15.600	17.39	1.9574
[A]	17.883	34.03	1.0000
Totals		100.00	

이를 이용하여 Aptamer의 base composition을 측정해 보았다. 분석의 방법의 상관성 시험을 위해 분석한 시료는 [C] = 9 , [G] = 10, [T] = 9, [A] = 2의 올리고이었다. 이의 base composition을 시험한 결과 (그림 54) 측정값(C=9.045, G=10.097, T=8.999, A=1.859로 예측 값과 매우 유사하게 측정되었다(표 4).

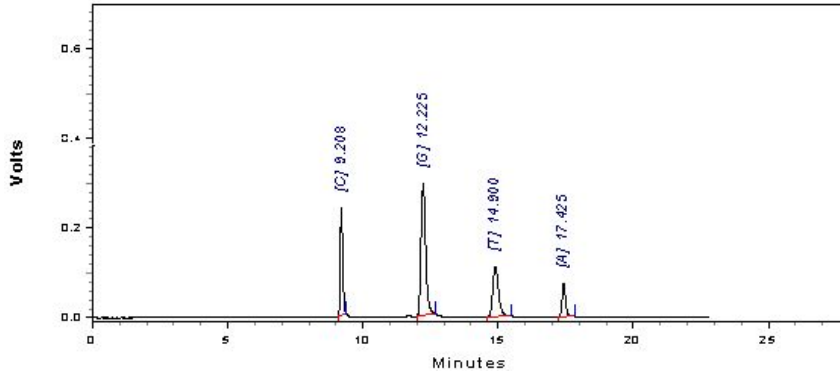


그림 54 시료의 Base composition 분석 chromatogram.

표 4. Oligomer의 base composition 분석

Name	Area Percent	Peak area	Molecular extinction coefficient factor (K)	Peak are of chromatogram x K	Mathematical base composition
[C]	20.59	1532634	2.1552	3303080	1.859
[G]	47.73	3552672	1.0378	3687034	9.045
[T]	22.56	1678807	1.9574	3286089	8.999
[A]	9.12	678865	1.0000	678865	10.097
Totals	100.00	7,442,978			

이 방법은 순도 즉, impurity (1% 미만의 n-1 mer)를 적절히 평가하기에는 부적절하다. 그러나 상기와 결과와 같이 base composition 측정법은 합성된 aptamer를 정확한 identification은 가능하다.

(2) MALDI-TOF 을 이용한 품질 검사

일반적으로 핵산 올리고는 MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of Flight mass spectrometry)을 이용하여 분자량을 측정하여 합성된 시료가 정상적으로 합성됨을 확인 할 수 있다. 즉 MOLDI-TOF는 DNA의 염기배열에 따라 달라지는 분자량을 측정 하여 측정값과 예측값의 분자량을 비교하여 제품의 상태를 확인할 수 있다. 이는 정성반응에 적합하나 보다 엄밀한 정성법으로는 부적절 하다 할 수 있다. 합성 시료(예상값 MW 8286.4)의 측정값은 MW은 8286.1로 정밀하게 측정되었다.

그러나 약 80 mer 이상의 aptamer (5' - C G T A C G G A A T T C G C T A G C T G A C T G T G T A G G G T G G G T G G G G G C T T C T C T C G G T G T A C A G G A T C C G A G C T C C A C G T G - 3' MW 23626.3)의 경우 MALDI-TOF으로 분자량이 정확히 측정되지 않았다. 그 이유는 분자량이 10000 이상의 경우 MALDI-TOF으로 분자량 측정값의 유효 범위에 포함되지 않았기 때문으로 추정되었다. 그러므로 Aptamer의 경우 단편화 하거나 혹은 서열 분석법으로 확인하는 것이 보다 정확할 것으

로 판단되었다. 또한 MALDI-TOF으로의 측정은 정확한 impurity의 양을 정확히 하는 정량 평가에는 적절하지 못한 방법으로 확인 되었다.

(3) 서열 분석을 통한 품질 확인

Aptamer의 품질을 확인하기 위한 원리상 가장 정확한 방법은 다량의 시료를 활용한 서열 분석법이 가장 적절 할 것으로 판단되었다. 즉 Base composition과 MALDI-TOF은 적절한 품질 평가 n-1 mer등의 불순물의 양을 적절하게 평가하기는 매우 곤란하였다. 즉 긴 aptamer의 경우 직접적인 염기서열 분석이 품질분석방법으로 더욱 유효할 것으로 추정된다. 단지 통상적인 Sanger sequencing의 경우 품질의 확인을 위해 개별 서열의 cloning 과 이들 100개 이상의 clone을 직접적으로 서열 분석해야 함으로 그 많은 비용과 시간이 필요할 것이다. 그러므로 NGS(예, Ion PGM)를 활용한 방법이 대안이 될 수 있을 것으로 생각된다.

6. Aptamer의 보관 및 유효기간(안정성)

Aptamer는 일반적인 핵산올리고의 화학적 안정성과 보관방법 및 취급 요령에 따라 보관 방법을 모색하였다. 통상의 올리고는 화학적으로 안정하며, -20℃에서 6개월 이상 안정하다. 특히, 동결 건조한 상태에서는 매우 안정적이며 수년간 보관이 가능하다. 그러나, 용액상에 작업자 및 환경(미생물)으로부터 오염되는 핵산분해효소에 의해 쉽게 분해된다. 또한 냉동 보관된 시료를 반복하여 사용할 경우 분해를 촉진시켜 품질의 이상이 발생할 수 있다. 또한 산성 조건에서 depurination이 일어 날 수 있으므로 보관에 있어 pH 조건을 설정 할 필요가 있다. Modified Aptamer가 확정되고 분석조건이 설정되면 이에 따라 유통 및 보관 온도로 실온으로 설정 하고 안정성을 시험하였다.

분석은 HPLC <Buffer A (0.1M TEAA[pH7.0] (70%), Buffer B Acetonitrile (30%) 40 min.> 로 검사하였다. 시험에 사용한 Aptamer는 BVDV-C18 (5'-C18-CGT ACG GAA TTC GCT AGC TGC GCA TCC ACA AAT GTA TTG TCG GGG GAT GGA TCC GAG CTC CAC GTG-3') 및 BVDV-Amino (5'-Amino(C6)-CGT ACG GAA TTC GCT AGC TGC GCA TCC ACA AAT GTA TTG TCG GGG GAT GGA TCC GAG CTC CAC GTG-3') 이었다. 한달 (30일)간 실온에 보관하며 분석한 결과 두 aptamer 모두 매우 안정함을 확인 할 수 있었다(표 5). 이를 미루어 aptamer의 생산후에 진단까지 유통 및 보관에 큰 영향이 없을 것이다. 단 수용액화 할 경우 미생물의 오염 등의 방지를 위해서는 사용전까지 냉동 보관 하여야 사용하며 가급적 사용전에 녹여 사용하는 것이 좋을 것이다.

표 5. aptamer의 안정성 시험
(BVDV-C18)

day	Purity	Area	변화
0	100	37902400	100
10	100	38002210	100.3
17	100	37831212	99.8
30	100	38703231	102.1

(BVDV-Amino)

day	Purity	Area	변화
0	93.1	24325010	100
10	92.6	23485901	96.6
17	93.8	24312915	100.0
30	92.9	23432987	96.3

7. Aptamer library 합성 및 공급

주관기관 및 제 1세부 기관에 필요한 aptamer library용 및 선별된 aptamer를 합성하여 제 공하였다. 약 76-87 mer 길이의 다수의 aptamer를 (약 300건) 공급하였다. Aptamer는 5' -biotinylation 혹은 3' -amino기, 혹은 C18을 부착하여 공급하였다. 공급된 종류는 하기 PRRSV, BVDV 진단용 소재 및 기타 aptamer library construction 용 등이다.

표 6. 합성 공급된 Selected aptamer 서열 list 예

유럽형 PRRSV aptamer 후보군	E2	EB3	미국형 PRRSV aptamer 후보군	L6	LB8
	E4	EB8		L8	LB23
	E9	EB13		L12	LB27
	E16	EB16		L13	LB32
	E22	EB21		L18	LB33

대표적인 공급된 진단용 selected aptamer (5' -biotinylation 혹은 3' -amino기, C18 부착 공급)

(PRRSV 유럽형 진단용 합성 aptamer)

5'-CGTACGGAATTCGCTAGCTGACTGTGTAGGGTGGGTGGGGGGCTTCTCTCGGTGTA
CAGGATCCGAGCTCCACGTG-3'

(PRRSV 미국형 진단용 합성 aptamer)

5'-CGTACGGAATTCGCTAGCCATATCCGCGTCGCTGCGCTCAGACCCACCACCACGCAC
CGGATCCGAGCTCCACGTG-3'

(BVDV 진단용 aptamer)

5'-CGTACGGAATTCGCTAGCTGCGCATCCACAAATGTATTGTCGGGGGATGGATCCGA
GCTCCACGTG-3'

7. 압타머의 생산능력

본 과제로 개발된 기술을 토대로 압타머의 합성 능력은 5'-Amino(C6)-CGT ACG GAA TTC GCT AGC TGC GCA TCC ACA AAT GTA TTG TCG GGG GAT GGA TCC GAG CTC CAC GTG-3' 기준으로 아래와 같은 용량으로 합성이 가능하다.

압타머는 일반 올리고보다 매우 길고 또한 modification 됨으로 인해 그 합성량이 매우 제

한적이었다. 또한 고 품질을 위해서는 PAGE 정제를 수행하여야 하나, 대량 정제를 위해서는 COP 정제가 효율적이었다. 따라서 COP 정제를 기준으로 한 합성 용량의 추정치는 1일 1batch 합성용량으로 4500 OD, 135,910.1 ug, 6289.3 nmol 이며, 월간 합성용량 135,000 OD, 4,077,303 ug 188,679 nmol 이다. 이는 앵타머의 높은 Sensitivity 로 약 10 pmol 수준으로 1회 진단이 가능한 것으로 고려하면, 1 batch 합성으로 6,000,000 test가 가능한 수준이다. 그러므로 우리나라 가축 두수 (소 250만 ~ 300만마리, 돼지 900만 ~ 1000만 마리) 를 고려할 경우 충분한 양으로 제조가 가능한 수준이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2010	<ul style="list-style-type: none"> ● 앵타머를 이용한 입자응집 반응 실험 ● 미세유체칩 설계 및 제작 ● PRRSV(북미형 NP, 유럽형 NP), Influenza virus(HA, NP), BVDV(type1 E2, type2 E2) 앵타머 제작을 위한 유전자 클로닝 및 확보 	<ul style="list-style-type: none"> • 병원균별 latex particle의 사이즈 결정 • 앵타머를 이용한 응집반응 실험 • 모세관 펌프 및 공기생성 억제 유체칩 설계 및 제작 • PRRSV(북미형 & 유럽형, Influenza virus(new H1N1), BVDV(type 1 & 2) 고감도 진단용 주요 목적 부위 선정 • 대상 3종 원인체 target (중)에 대한 유전자 클로닝 및 정제 (PRRSV: 북미형 NP, 유럽형 NP), (Influenza virus: HA, NP), BVDV (type1 E2, type2 E2)
		<ul style="list-style-type: none"> ● PRRSV(북미형 & 유럽형) 결합 DNA 앵타머 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • PRRSV(북미형 & 유럽형) 타겟의 표준 단백질에 대한 앵타머 2개 개발 • 웹 기반 프로그램을 이용한 앵타머의 2차 구조 분석 및 결합 서열 분석 • 표면자기공명 장치를 이용한 앵타머의 결합력, 선택성 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ● Aptamer library의 randomization 효율 증가 방안 검토 ● Aptamer library의 합성 및 공급 ● PRRSV 단백질 발현 정제 공급 	<ul style="list-style-type: none"> • 30-50개의 nucleotides의 무작위적인 첨가를 통해 Randomization 의 효율을 높여 library의 diversity를 (10^{14-15})까지 증대시켜 SELEX로 인한 고효율 특이적 aptamer 선별 • Aptamer library를 합성하여 주관 혹은 세부기관에 제공 • PRRSV 유전자를 확보하여 2개 이상의 단백질을 대장균에서 발현하여 95% 이상의 순도로 각 주관 및 세부기관에게 공급

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차년도	2011	<ul style="list-style-type: none"> ● PRRSV, Influenza virus 앵타머 및 미세유체칩을 이용한 검출 실험 ● PRRSV 앵타머 반응 특이도 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • PDMS 및 PMMA로 제작된 미세유체칩을 이용한 PRRSV 검출 실험 분석 • 대상 3종 원인체 표준시험물질 (양성 및 음성) 구축 • PRRSV 앵타머의 target에 대한 반응 특이성 조사
		<ul style="list-style-type: none"> ● Influenza virus 결합 DNA 앵타머 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • new H1N1타겟의 표준 단백질에 대한 앵타머 2개 개발 • 웹 기반 프로그램을 이용한 앵타머의 2차 구조 분석 및 결합 서열 분석 • 표면자기공명 장치를 이용한 앵타머의 결합력, 선택성 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ● Aptamer library 합성 및 공급 ● Selected ssDNA aptamer의 합성 공급 및 QC/QA 방법 확립 ● 가축질병 원인체 유래의 단백질 발현 정제 공급 	<ul style="list-style-type: none"> • Aptamer library를 합성하여 주관 혹은 세부기관에 적절히 제공 • 또한 1차 년도에서 선별된 ssDNA aptamer를 다량 합성하여 HPLC 혹은 PAGE등으로 고순도로 정제하여 각 기관에게 공급 • 이때 제공되어지는 aptamer의 품질은 확립된 QC법을 통해 평가 및 공급 • 또 다른 2종의 가축질병원인 virus 유래 유전자를 확보하여 4개 이상의 단백질을 대장균에서 발현하여 95% 이상의 순도로 각 기관에게 공급

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도	2012	<ul style="list-style-type: none"> ● PRRSV, Influenza virus, BVDV 앵타머 및 미세유체 칩을 이용한 검출 실험 ● PRRSV 앵타머 및 미세유체 칩을 이용한 검출 실험 ● 앵타머칩의 유효성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • PDMS 및 PMMA로 제작된 미세유체 칩을 이용한 PRRSV 검출 실험 분석 • 미세유체칩의 작동 성능 평가 • 대량생산용 미세유체칩 공정 개발 • 대상 3종 원인체 표준시험물질 (양성 및 음성) 구축 • 6종 target 단백질에 대한 앵타머칩의 반응 특이도 평가 • 대상 원인체 표준 시험물질에 대한 앵타머 칩의 유효성 평가
		<ul style="list-style-type: none"> ● BVDV 결합 DNA 앵타머 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • BVDV타겟의 표준 단백질에 대한 앵타머 2개 개발 • 웹 기반 프로그램을 이용한 앵타머의 2차 구조 분석 및 결합 서열 분석 • 표면자기공명 장치를 이용한 앵타머의 결합력, 선택성 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ● Selected ssDNA aptamer 대량 생산 기술 검토 ● Aptamer의 사업화 검토 ● 가축질병 원인체 유래의 단백질 발현 정제 공급 	<ul style="list-style-type: none"> • 선별된 ssDNA aptamer의 대량생산을 위한 기술을 개발, 특히 소량동시생산과, 일시대량생산의 효율을 검토 및 경제성을 평가 • Aptamer의 사업화를 위해 품질기준 및 보관조건, 안정성의 확보조건을 시험하여 사업화의 기반 구축 • 효율적인 aptamer의 선별과 평가를 위해 aptamer library 및 선별된 aptamer들과 1차 년도와 2차년도에서 확립된 단백질 발현 및 정제 시스템을 통해 target 단백질을 확보하여 지속적으로 공급

* 연차별 1 페이지 이내 작성

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

구분	특허		신제품				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입관 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
목표	2	2						2		
달성	4	0						5		

1. 대표 논문 게재 성과

Biomimetic detection of aminoglycosidic antibiotics using polydiacetylene-phospholipids supramolecules Chem. Commun., 2012,48,5313-5315 IF : 6.169

Design of polydiacetylene-phospholipid supramolecules for enhanced stability and sensitivity Langmuir., 2012,28,7551-7556 IF : 4.187

Detection of VR-2332 strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type II using an aptamer-based sandwich-type assay. Analytical chemistry. 2013,85,66-74 IF : 5.695

Sensitive detection of adipokines for early diagnosis type 2 diabetes using enzyme-linked antibody-aptamer sandwich(ELAAS) assay. Sensors and Actuators B: Chemical. 2012,168,243-248. IF 3.535

An ultra-sensitive detection of a whole virus using dual aptamers developed by immobilization-free screening. Biosensors and Bioelectronics. 2014,51, 324-329. IF : 5.389

Cite this: *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 5313–5315

www.rsc.org/chemcomm

COMMUNICATION

Biomimetic detection of aminoglycosidic antibiotics using polydiacetylene–phospholipids supramolecules†

Do Hyun Kang,^{‡ab} Ho-Sup Jung,^{‡a} Namyong Ahn,^a Jiseok Lee,^c Sungbaek Seo,^c Kaph-Yang Suh,^{abd} Jinsang Kim^{*ce} and Keesung Kim^{*ad}

Received 27th February 2012, Accepted 28th March 2012

DOI: 10.1039/c2cc31466e

We rationally designed highly sensitive and selective polydiacetylene (PDA)–phospholipids liposomes for the facile detection of aminoglycosidic antibiotics. The detecting mechanism mimics the cellular membrane interactions between neomycin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) phospholipids. The developed PDA–PIP₂ sensory system showed a detection limit of 61 ppb for neomycin and was very specific to aminoglycosidic antibiotics only.

Neomycin is a representative aminoglycosidic antibiotic prevalently used in hospitals and the livestock industry. The antibiotic mechanism of neomycin is based on the inhibition of protein synthesis by binding to a ribosomal RNA¹ and is very effective against most clinically harmful bacteria. However, neomycin is much more nephrotoxic compared to other aminoglycosides. Therefore, the abuse and misuse of neomycin can cause an allergic response,² organ damage (such as ear and kidney), and nerve system malfunction,³ as well as the emerging super bacteria having a tolerance to antibiotics.¹ Consequently, many agriculture, food, and drug regulatory authorities such as World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) have set a tolerance limit of neomycin in meat and dairy products including milk and eggs. Accordingly, various detection strategies have been developed to detect neomycin including high performance liquid chromatography (HPLC),⁴ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),⁵ aggregation based sensors,⁶ and competitive impedimetric assay.⁷ However, these techniques are complex, expensive, and often require highly sophisticated heavy equipment and skillful operation.

Polydiacetylene (PDA), a unique conjugated polymer, has been applied to various label-free and colorimetric sensory systems since PDA changes its color from blue to red upon exposure to various external stimuli such as heat,⁸ mechanical stress,⁹ ions,¹⁰ chemicals,¹¹ bio-molecules,¹² and bacteria.¹³ In addition to this convenient colorimetric self-signaling property, the transformed red phase PDA also emits red fluorescence, enabling the convenient and sensitive dual detection capability. The most commonly used and convenient form of PDA is liposome because amphiphilic PDA monomers can be easily designed and self-assembled into a liposome shape. After the self-assembly, PDA monomers in the liposomes are photopolymerized by 254 nm UV irradiation to become conjugated PDA having blue color.¹⁴ Distortion of the conjugated π - π backbone of PDA by external stimuli is believed to cause the color change and the red fluorescence development.

PDA liposomes can accommodate various natural and/or synthetic lipids such as phospholipids. Molecular interactions *via* such a lipid inserted into a PDA liposome, for example, enzymes–lipids interactions,^{12b} membrane permeabilization by antimicrobial peptides^{12a,c} or bacterial toxin,^{13c} and receptor–ligand interaction,^{13b} have been investigated in various colorimetric biosensor development. We coined such a molecular interaction into a PDA sensory system design to selectively and sensitively detect possible residual neomycin in dairy products or meat. Neomycin is known to bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) lipids in the cellular membrane.¹⁵ Molecular and cellular biology research revealed that PIP₂ decomposes into diacylglycerol (DAG) and 1,4,5-triphosphate (IP₃) by phospholipase C (PLC) through stimulating various hormones and growth factors.¹⁶ As shown in Scheme 1A, neomycin binds to PIP₂, inhibiting the PIP₂ degradation by PLC and thus inhibiting the IP₃-related signal cascade, which is a known side effect of neomycin.¹⁵ In our convenient colorimetric PDA sensor design, as schematically described in Scheme 1C PIP₂ was used as a selective receptor to detect neomycin and co-assembled into a PDA liposome (PDA–PIP₂). As designed and anticipated, the interaction between neomycin and PIP₂ exerted stress on the conjugated backbone of PDA–PIP₂ and consequently produced a sharp color change and fluorescence development as dual sensory signals.

The PDA–PIP₂ liposome containing PIP₂ showed a sharp color change upon exposure to a neomycin solution as shown

^a School of Mechanical and Aerospace Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

^b Division of WCU Multiscale Mechanical Design, School of Mechanical and Aerospace Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

^c Macromolecular Science and Engineering, University of Michigan, 2300 Hayward St., Ann Arbor, MI 48109-2136, USA

^d Institute of Advanced Machinery and Design, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea. E-mail: keesung@smi.ac.kr; Fax: +82-2-889-6205; Tel: +82-2-883-7301

^e Materials Science and Engineering, Chemical Engineering, Biomedical Engineering, University of Michigan, 2300 Hayward St., Ann Arbor, MI 48109-2136, USA. E-mail: jinsang@umich.edu

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental details for biosensor preparation protocols and PL spectra. See DOI: 10.1039/c2cc31466e

‡ These authors equally contributed to this work.

Design of Polydiacetylene-Phospholipid Supramolecules for Enhanced Stability and Sensitivity

Do Hyun Kang,^{†,‡} Ho-Sup Jung,[†] Jiseok Lee,[§] Sungbaek Seo,[§] Jinsang Kim,^{§,⊥} Keesung Kim,^{*,†,||} and Kahp-Yang Suh^{*,†,‡,||}

[†]School of Mechanical and Aerospace Engineering, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

[‡]Division of WCU Multiscale Mechanical Design, School of Mechanical and Aerospace Engineering, Seoul National University

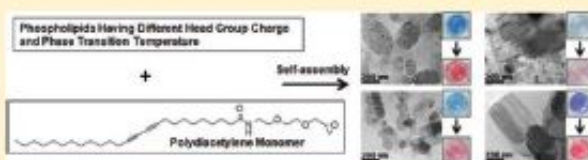
[§]Macromolecular Science and Engineering, University of Michigan, 2300 Hayward St., Ann Arbor, Michigan 48109-2136, United States

[⊥]Materials Science and Engineering, Chemical Engineering, Biomedical Engineering, University of Michigan

^{||}Institute of Advanced Machinery and Design, School of Mechanical and Aerospace Engineering, Seoul National University

Supporting Information

ABSTRACT: We present polydiacetylene (PDA) liposome assemblies with various phospholipids that have different head-group charges and phase transition temperatures (T_m). 10,12-Pentacosadiynoic acid (PCDA)-epoxy was used as a base PDA monomer and the insertion of highly charged phospholipids resulted in notable changes in the size of liposome and reduction of the aggregation of PDA liposome. Among the various phospholipids, the phospholipid with a moderate T_m demonstrated



enhanced stability and sensitivity, as measured by the size and zeta potential over storage time, thermochromic response, and transmission electron microscopy images. By combining these results, we were able to detect immunologically an antibody of bovine viral diarrhea virus over a wide dynamic range of 0.001 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

1. INTRODUCTION

A conjugated polymer, polydiacetylene (PDA) has a special optical property, which changes its color, for example, from blue to red and emits weak red fluorescent light in response to various external stimuli such as heat,^{1,2} light,³ ions,^{4–6} chemicals,^{7–10} biomolecules,^{11–15} and bacteria.^{16–19} The color change is originated from distortion of π -conjugated backbone of PDA by external stimuli, which makes PDA an efficient component for self-signaling (label-free) and signal amplifying biosensor.^{20–22}

The commonly used method for PDA biosensor is mediated by a liposome assembly. The monomers of PDA are generally amphiphilic in water; this lipidic property leads to self-assembly of the monomers that is analogous to liposome. After assembly and ordering of lipidic monomers by cooling (5 $^{\circ}\text{C}$), UV (254 nm) polymerization makes sensory PDA liposome. The lipidic property of PDA monomer may also accommodate various natural or synthetic lipids, which has been extensively utilized for colorimetric detection of biointerfacial interactions such as receptor–ligand interaction,^{10,23} membrane permeabilization by bacterial toxin¹⁶ or antimicrobial peptides,²⁴ and enzymes–lipids interactions.²⁵

In general, the insertion of lipids into PDA liposome has a merit to modify the physical properties of PDA liposome such as size,²⁶ surface charge, and packing of lipids,¹⁹ which, in turn, affect the sensitivity and stability of PDA liposome biosensor.^{7,12,14,15,19,27,28} It has been revealed that a PDA liposome of small size appears to improve sensitivity by compartmentalization of receptor sites. Namely, a smaller liposome can generate an

equivalent signal to a larger liposome in spite of less binding of target molecule on the liposome surface.^{15,29} An appropriate level of surface charge of liposome can also introduce electrostatic repulsion providing resistivity against aggregation and fusion.²⁷ In parallel, weak packing of lipids (or high membrane fluidity) in PDA liposome enhances sensitivity by making easy distortion of π -conjugated chain of PDA.^{7,12,14,19} However, ironically, the weak packing interrupts polymerization into a stable conjugated chain² and deteriorates the degree of fusion.²⁸

Recently, there have been some trials to increase the sensitivity of PDA liposome biosensor by controlling the degree of packing between lipids.^{12,14,18,19} Despite these efforts, there is lack of comprehensive studies incorporating various effects of the inserted lipids. Herein, we choose 10,12-pentacosadiynoic acid (PCDA)-epoxy as a base PDA monomer because (i) epoxy group has good reactivity with amine group, which is abundant in biological molecules like DNA, protein, and antibody, and (ii) it is stable over long-term storage for biosensor applications.⁶ Various PDA-phospholipid liposomes were formed by assembling PCDA-epoxy with three types of phospholipids, 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DMPA), and 1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium-propane (DMTAP), which have different

Received: November 9, 2011

Revised: April 18, 2012

Published: April 19, 2012

Detection of VR-2332 Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Type II Using an Aptamer-Based Sandwich-Type Assay

Su Jin Lee,[†] Young Seop Kwon,[†] Ji-eun Lee,[†] Eun-Jin Choi,[‡] Chang-Hee Lee,[‡] Jae-Young Song,[‡] and Man Bock Gu^{*,†}

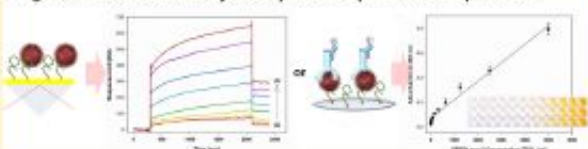
[†]College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Anam-Dong, Seongbuk-Gu, Seoul 136-701, Republic of Korea

[‡]Viral Disease Division, Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, 175 Anyangro, Anyang City, Gyeonggi-do 430-757, Republic of Korea

Supporting Information

ABSTRACT: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes porcine reproductive and respiratory syndrome disease (PRRS), a disease that has a significant and economic impact on the swine industry. In this study, single-stranded DNA (ssDNA) aptamers with high specificity and affinity against VR-2332 strain of PRRSV type II were successfully obtained. Of 19 candidates, the LB32 aptamer was found to be the most specific and sensitive to VR-2332 strain according to an aptamer-based surface plasmon resonance (SPR) analysis. The detection of VR-2332 of PRRSV type II was successfully accomplished using the enzyme-linked antibody-aptamer sandwich (ELAAS) method. The detection limit of ELAAS was 4.8×10^0 TCID₅₀/mL that is comparable to some of the previous reports of the PCR-based detection but does not require any complicated equipment or extra costs. Moreover, this ELAAS-based PRRSV detection showed similar sensitivity for both the VR-2332 samples spiked in diluted swine serum and in buffer. Therefore, this VR-2332 strain-specific aptamer and its assay method with high specificity can be used as an alternative method for the fast and precise detection of PRRSV.

Diagnosis of PRRSV with Newly Developed LB32 Aptamer based Aptasensors



Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is an important swine disease characterized by respiratory distress in young pigs and severe reproductive failure in sows, including late term abortion and stillbirths.^{1,2} PRRS is caused by the PRRS virus (PRRSV), which is a small, enveloped virus with a diameter of 50–60 nm that contains an RNA genome approximately 15 kb in length.³ On the basis of antigenic and genetic differences, PRRSV isolates are divided into two distinct genotypes: type I (European; EU) and type II (North American; NA). The genetic similarity between two groups is approximately 63%.⁴ The two genotypic PRRSVs have similar morphological and physicochemical properties; however, preliminary results indicate that two types are antigenically different, and various strains could be generated due to the genetic variations of the virus.⁵ The genetic variation of PRRSV decreases the effectiveness of current vaccinations; thus, early detection has been emphasized for the prevention of PRRSV transfection among herds.⁶ Moreover, because pigs are easily infected by small doses of PRRSV (less than 10 virus particles), this disease has emerged and spread rapidly.⁷ In addition, the disease causes significant economic problems in the hog farming industry, and it is now considered to be one of the most important infectious animal diseases in the world.⁸ Therefore, its detection has been a serious issue worldwide, and so, the development of sensitive and easy diagnostic methods is necessary for the early control of PRRSV.

Detection of PRRSV was typically performed by genetic sequence analysis; these methods employ a variety of techniques, such as reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays, restriction fragment length polymorphism (RFLP), reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP), or sequence analysis (sequencing or dendrograms).^{9,10} However, most of existing genome-based detection methods are limited by their high cost, time-consuming procedures, and reliance on expensive and complicated equipments. Other methods have been developed on the basis of detection and quantitative analysis of antibodies against PRRSV using serological tests, including the indirect fluorescent antibody (IFA) test, the indirect enzyme immunoassay (EIA), and the serum virus neutralization (SVN) test.¹¹ However, the aforementioned tests detect antibodies, and thus, they are unable to detect the PRRSV antigen itself. It means that these tests are not a direct measure of the infection level, because immunity to make antibodies against PRRSV infection typically takes several weeks and is undistinguishable from vaccination. In addition, the SVN test is generally more expensive and time-consuming to perform.¹² Therefore, such

Received: June 3, 2012

Accepted: November 29, 2012

Published: November 29, 2012



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Sensors and Actuators B: Chemical

journal homepage: www.elsevier.com/locate/snb

Sensitive detection of adipokines for early diagnosis of type 2 diabetes using enzyme-linked antibody-aptamer sandwich (ELAAS) assays

Su Jin Lee^a, Jee-Woong Park^a, In-Ae Kim^a, Byung-Soo Youn^b, Man Bock Gu^{a,*}

^a College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University Anam-Dong, Seongbuk-Gu, Seoul 136-701, Republic of Korea

^b Adipogen, Inc., Room 401, Venture Building B, Songdo TechnoPark, 7-50 Songdo-Dong, Yeonsu-Gu, Incheon 406-840, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2012

Received in revised form 2 April 2012

Accepted 5 April 2012

Available online 12 April 2012

Keywords:

Aptamers

Adipokines

Antibodies

ELAAS biosensor

Type 2 diabetes

ABSTRACT

We developed an enzyme-linked antibody-ssDNA aptamer sandwich (ELAAS) method to detect three adipokines for diagnosing type 2 diabetes. For this application, three different aptamers for retinol-binding protein-4 (RBP4), visceral adipose tissue-derived serpin (Vaspin), and nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt/visfatin) were used as capturing probes, and enzyme-linked polyclonal antibodies were used for signal generation. The sensitivities of this method for all three proteins were enhanced by at least 20-fold to up to 68-fold higher than that of the surface plasmon resonance (SPR) system, which only uses aptamers as capturing probes. In addition, this assay method exhibited equal sensitivity in the detection of each adipokine spiked in diluted human serum. In particular, the detection limit for RBP4 was similar to that obtained by western blotting, as reported previously. The simplicity, reproducibility, and high sensitivity of the ELAAS method could allow it to be extensively utilized in field.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The number of cases of obesity associated with metabolic syndrome has dramatically increased, and millions of potential patients have been identified worldwide [1,2]. Many studies have shown a relationship between increased adiposity and insulin resistance; adipokines, primarily secreted from adipose tissues, modulate insulin sensitivity by activating or deactivating multiple signaling events involving the insulin receptor [3,4]. Thus, adipokines are considered to play important roles in insulin action or fat metabolism and are related to obesity and type 2 diabetes [5]. Among the important adipokines, visceral adipose tissue-derived serpin (Vaspin), nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt), also known as visfatin or pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF), and retinol-binding protein-4 (RBP4) have been considered as insulin-resistance related hormones [6–8]. Additionally, many studies have evidenced that serum or plasma levels of RBP4, Vaspin, and Nampt were elevated in obese and insulin resistance states, indicating that they may be useful biomarkers for diagnosing type 2 diabetes [9–13]. Therefore, early detection of the serum levels of these adipokines is important for prevention of disease progression and for appropriate treatment of existing type 2 diabetes.

Antibody-based competitive/sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blotting have been developed and widely used for detecting adipokines, including RBP4, Vaspin, and Nampt [14,15]. However, production of monoclonal antibodies (mAbs) is time consuming, costly, and shows fluctuations in reproducibility [16,17]. Furthermore, production of mAbs against species-conserved proteins such as kinases, transcription factors, and key soluble factors is very difficult because of immune tolerance in mice or rats. Therefore, different means of detection are required for ensuring a real diagnosis.

For the last 2 decades, oligonucleotide-based recognition elements, referred to as “aptamers”, have been used as capturing reagents. Aptamers are generally developed through *in vitro* selection processes, such as systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), which enables the isolation of nucleic acid aptamers from combinatorial libraries [18]. Aptamers can be isolated for a wide range of targets, including proteins [19,20], antibiotics [21], viruses [22], and organic/inorganic compounds [23], and used in therapeutic, analytical, medical diagnosis, and biosensor applications [24–26].

Here, we used ssDNA aptamers for three different adipokines, namely, RBP4 [20], Vaspin [27], and Nampt (unpublished result) and developed an assay system called the enzyme-linked antibody-aptamer sandwich (ELAAS) method for more convenient and sensitive detection of these adipokines. In the ELAAS method, ssDNA aptamers were used as capturing probes to bind target, and polyclonal antibodies and enzyme-conjugated secondary

* Corresponding author. Tel.: +82 2 3290 3555; fax: +82 2 928 6050.
E-mail address: mbgu@korea.ac.kr (M.B. Gu).



An ultra-sensitive detection of a whole virus using dual aptamers developed by immobilization-free screening



Jee-Woong Park^a, Su Jin Lee^a, Eun-Jin Choi^b, Jaejo Kim^b, Jae-Young Song^b, Man Bock Gu^{a,*}

^a College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-713, South Korea

^b Viral Disease Division, Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency (QIA), 175 Anyang-ro, Anyang, Gyeonggi-do 430-757, South Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2013

Received in revised form

26 July 2013

Accepted 26 July 2013

Available online 3 August 2013

Keywords:

Dual aptamers

Bovine viral diarrhea virus (BVDV)

SELEX

SPR

Sandwich

ABSTRACT

In this study, we successfully developed a ssDNA aptamer pairs by using an advanced immobilization-free SELEX method with affinity-based selection and counter-screening process at every round. By implementing this method, two different aptamers specifically binding to bovine viral diarrhea virus type 1 (BVDV type 1) with high affinity were successfully screened. This aptamer pair was applied to ultrasensitive detection platform for BVDV type 1 in a sandwich manner. The ultrasensitive detection of BVDV type 1 using one of aptamers conjugated with gold nanoparticles was obtained in aptamer-aptamer sandwich type sensing format, with the limit of detection of 800 copies/ml, which is comparable to a real-time PCR method.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aptamer, as a recognition molecule, is a ssDNA or RNA oligonucleotide that binds to various targets, including bacteria, small molecules and so forth, with high specificity and affinity (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990). Aptamers can specifically bind and discriminate their targets in a heterogeneous environment and can be applied in many fields, including biosensors, pharmaceuticals, drug delivery, imaging and purification (Bagalkot et al., 2006; Kim et al., 2010; Lin et al., 2011; Said et al., 2009). For obtaining the aptamers, many different forms of the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990), in which binding, separation, and amplification can be altered to accommodate the various needs, have been modified and developed. Significant technological progress has been made in improving the methodologies for the efficient separation of target-bound ssDNAs from the unbound ssDNAs (Berezovski et al., 2005; Mendonça and Bowser, 2004; Miyachi et al., 2009; Mosing et al., 2005; Oh et al., 2011; Park et al., 2009) in SELEX. However, the most SELEX processes still require complicated immobilization steps for the targets, especially for the small molecules which need different chemistry to be immobilized, in addition to its labor intensive feature.

Hence, a new immobilization-free SELEX method without target immobilization step by using graphene oxide (GO) was

established in our previous study (Park et al., 2012) based on many extensive studies regarding interaction between oligonucleotides and graphene (Liu et al., 2010b; Patil et al., 2009; Wang et al., 2010; Wu et al., 2011). Here, we successfully applied the advanced GO based immobilization-free SELEX method and obtained ssDNA aptamers including the aptamers having different binding sites, which enable sensitive detection of the target in a sandwich fashion using a aptamer pair obtained in this method. In this advanced SELEX, every round begins from the counter-screening step followed by the target-induced screening step based on affinity-based release. The counter-screening step refers to the screening process, which is intended for removing of ssDNAs that are bound to the counter targets, which are unwanted to be bound or similar to the target in terms of molecular structure. The counter step at every round enables screening the aptamer candidates highly specific to only the target and the affinity-based release method at every round enable considerably more stringent selection conditions for high affinity aptamer screening.

We used this advanced SELEX method for obtaining aptamers that bind to a whole bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1 specifically. The BVDV is world-widely distributed and an important cattle pathogen causing variety of syndromes including abortions, respiratory disease, congenital abnormalities, persistently infected (PI) cattle, mucosal disease, and acute infections (Baker, 1995; Houe, 1995), and infection with this virus results in reduced productivity and increased mortality (Kampa et al., 2009). Hence, there have been many different sensitive detection methods for the of BVDV reported, including reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Drew et al., 1999; Karaoglu et al., 2003; Moussa, 1995; Pfeffer et al., 2000; Young et al., 2006;

* Corresponding author. Tel.: +82 2 3290 3417; fax: +82 2 928 6050.
E-mail address: mhgu@korea.ac.kr (M. Bock Gu).

2. 특허 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2012	인지질 및 아세킬렌기를 포함하는 리포솜 및 그의 용도	김기성 강도현 정유섭 정호섭	대한민국	10-2012-0087988
2012	소바이러스성 설사 바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도	구만복 박지웅	대한민국	10-2012-0043230
2012	핵산 앵타머 및 항체를 이용한 에디포카인의 검출 방법	구만복 이수진 박지웅 김인애	대한민국	10-2012-0108106
2011	돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 특이적인 DNA 앵타머	구만복 이수진 권영섭 이지은	대한민국	10-2011-0095849

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2012.08.10
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1)
 출원번호 10-2012-0087988 (접수번호 1-1-2012-0642936-07)
 출원인명칭 서울대학교산학협력단(1-2007-050924-2)
 대리인성명 리앤록 특허법인(9-2005-100002-8)
 발명자성명 김기성 강도현 정호섭 정유섭
 발명의명칭 인지질 및 아세틸렌기를 포함하는 리포좀 및 그의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 * 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 * 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 * 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 * 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 * 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2011.09.22
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2011-0095849 (접수번호 1-1-2011-0739960-00)
출원인명칭 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0)
대리인성명 특허법인 다나(9-2008-100121-8)
발명자성명 구만복 이수진 권영섭 이지은
발명의명칭 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 특이적인 DNA 엘타머

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2012.04.25
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2012-0043230 (접수번호 1-1-2012-0330545-74)
출원인명칭 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0)
대리인성명 이처영(9-2003-000118-9)
발명자성명 구만복 박지웅
발명의명칭 소바이러스성 설사 바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 애타머 및 그 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원 건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

출원 번호 통지서

출원 일자 2012.09.27
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2012-0108106 (접수번호 1-1-2012-0790600-54)
출원인명칭 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0)
대리인성명 이처영(9-2003-000118-9)
발명자성명 구만복 이수진 박지웅 김인애
발명의명칭 핵산 애플타머 및 항체를 이용한 에디포카인의 걸출방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 유해미생물 검출 바이오센서 국내 연구 현황

- 국내의 바이오센서칩 기술은 부분적으로는 세계적인 수준을 확보하고 있음에도 불구하고 그 원천 기술을 해외에서 도입해야 하기 때문에 치명적 취약점을 안고 있음
- 최근 국내 생명공학기술에 대한 인식의 전환과 기초생명과학의 성장에 힘입어, 기업, 국가출연연구소, 대학연구실 등을 중심으로 DNA 칩과 단백질칩 및 관련 시제품개발에 대한 노력이 전개
- 현재, 다양한 식중독균을 검사하는 방법은 식재료로부터 검사에 필요한 세균을 추출하고 배양하여, PCR을 이용한 유전자 증폭과정을 거친 PCR법, LAMP법과 면역반응을 이용하는 ELISA, 법을 이용한 검출을 행하고 있다. 또한 스트립 타입의 금 미립자에 항체를 고정시킨 Rapid kit를 이용하여 육안으로 색변이를 검출하는 센서등이 활용
- 나노입자를 이용하여 항체를 고정하고, SPR을 이용하여 O157, salmonella 등의 검출은 농업공학연구소, (주)케이맥, 그리고 농업진흥청에서 연구 개발함
- AChE 효소를 이용한 전기화학센서를 개발한 KAIST 박태정 교수 연구팀, 나노효소 복합체를 이용한 KAIST의 김수현 교수 연구팀, ELISA-on-a-chip을 이용한 효소면역분석 칩을 개발한 고려대학교 백세환 교수 연구팀이 식중독 검출 센서를 활발히 연구
- Paper type 미세유체칩의 경우 국내의 연구팀에서는 의료 진단용이나 간단한 칩 제작을 위해 연구는 하고 있으나, 분리, 정제 및 식중독균 검사와 같은 농업분야에 적용한 예는 전무한 상태임

<표 1> 현행 대표적인 식중독 검사법의 특징

ELISA 법	PCR 법	LAMP 법
 <p>3M 제품, 미국</p>	 <p>Norgen 제품, 캐나다</p>	 <p>Eiken 제품, 일본</p>
<ul style="list-style-type: none"> • 검출원리 : 면역반응 • 검출시간 : 20~26 hr • 검출한계 : 1~5 cfu/25 g sample 	<ul style="list-style-type: none"> • 검출원리 : RT-PCR법 이용 • 검출시간 : 20~25hr • 검출한계 : 10⁴~10⁵ cfu/g sample 	<ul style="list-style-type: none"> • 검출원리 : 유전자 증폭 • 검출시간 : 30 hr • 검출한계 : 60cfu/test

제 2 절 유해미생물 검출 바이오센서 국외 연구 현황

- DuPont Qualicon에서 개발한 Real-time PCR을 이용한 신속검출 장치인 BAX system은 동시에 여러 가지 균들을 검출할 수 있다는 장점을 갖는 반면에, 고가의 분석 장비가 필요하기 때문에 현장에서 바로 사용할 수 없음
- 선진국에서 식중독균을 검출할 수 있는 기술이 개발되었으나 대부분 의료용으로 사용되고 있으며, 아직 농산물에 적용하지 못하고 있는 실정임
- 미국 Harvard 대학 Whitside교수 연구팀과 Diagnostics for All(DFA)사는 우표만한 크기로 미세채널과 화학물질이 패터닝된 종이기반의 신속 검출기술을 의료 진단용으로 상용화
- 일본은 Sony가 인수한 Micronics사도 감염성 질병진단용 PanNAT[®] Molecular Diagnostic System과 미세유체기술을 이용한 플라스틱칩을 상용화와 Keio대학의 Daniel Citterio교수 연구팀에서 paper 미세유체기술을 이용 다중 화학센서 칩 개발
- 3M[™] Tecra[™]은 Luciferase라는 효소를 응용하여 ATP 양에 비례한 발광도 증가 원리를 적용하여 오염도를 측정하는 장치이지만 농산물에 존재하는 ATP 때문에 농산물에 적용하기 어려운 단점이 있음.

제 3 절 국내외 연구현황 비교 및 필요 연구 분야

위에서 살펴 본 바와 같이 국내외 연구 현황을 비교해 보면, 기존의 전기화학 측정방식, 및 SPR과 같은 광학 장비의 소형화 위주로 연구가 진행되었으며, 아직까지 의료용 센서 중심으로 연구가 진행되고 있다. 하지만 식품의 안정성 확보와 국민 건강 증진을 위해 다양한 형태의 식중독균 간이 검사 키트 및 센서가 개발되고 있지만, 신뢰성의 확보의 어려움으로 인해 아직 배양과 같은 방법으로 검사를 진행하고 있는 실정이다.

특히, paper를 이용한 미세유체칩의 경우 손쉽게 제작가능하고, 경제적인 면에서는 매력적이지만, 매우 한정된 분야에서만 일부 활용이 가능하고 샘플 용액의 분리 및 정제는 capillary force만을 이용하기 때문에 많은 제약이 존재한다. 따라서 본 과제에서는 다양한 재료를 이용, 종이에 코팅하거나 Disc타입의 초소영 원심 분리기를 이용하여 샘플을 분리 정제하는 연구가 필요하며, 기존의 항체를 붙이는 방법에 발색을 일으키는 vesicle구조의 발색 폴리머를 이용할 필요가 있다.

나노·마이크로 스케일 기반 microfluidic chip 연구의 국내·외 연구현황

연구팀 및 연구집단	연구 내용 및 현황	
<p>George M. Whitesides Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, USA</p>	<p>질병진단을 위한 microfluidic paper based analytical 장치인 μPAD를 연구, 저렴한 가격으로 고가의 장비없이 육안으로 관찰 가능한 색변이 센서를 디자인하여 당 및 단백질의 측정에 관한 연구.</p>	
<p>Daniel Citterio Department of Applied Chemistry, Keio University</p>	<p>Inkjet printing 방법을 이용하여 3차원 구조의 친수성 패턴과, 센싱부분을 제작하여 다중의 화학물질을 동시에 검출할 수 있는 센서칩 연구</p>	
<p>Donald E. Ingber, Division of Health Sciences and Technology, University of Harvard, USA</p>	<p>마이크로 유체역학 기술과 조직공학 기술을 성공적으로 접목시킨 연구를 진행하고 있다. 3차원 MEMS 기술을 이용한 인공 폐 기능 연구 및 약물전달 기술 연구와 새로운 재료를 이용한 마이크로 유체 채널을 제작.</p>	
<p>Cell Programming by Nanoscaled Devices, A European Integrated Project, Europe</p>	<p>유럽 EU 소속의 다양한 국가에서 시작된 프로젝트로 나노소자를 이용하여 세포를 맞춤형으로 프로그래밍하는 연구 수행. 세포 기반 분석이 가능한 다양한 마이크로 소자의 조립 및 융합을 목표로 하고 있다.</p>	
<p>Shoji Takeuchi, ISIR, Osaka University, Japan,</p>	<p>MEMS 기술과 생체 지질막을 이용한 막단백질 및 이온채널을 만든 다음 단분자 수준의 생체 정보를 전기화학적으로 수집할 수 있는 LOC 칩 연구</p>	
<p>조운경, School of Nano-Bioscience and Chemical Engineering, 울산과기대</p>	<p>디스크에 paper strip을 이용 미세유체칩에 있어서 원심력에 의한 capillary driven flow를 연구, 분리 및 대상물질간의 반응성 향상 연구</p>	

제 7 장 참고문헌

- [1] Cobo, F., Luis, J., Cabrea, C., Nieto, A., Concha, Á., *Cell Biology International* 2007, 31, 991-995.
- [2] Uphoff, C. C., Drexler, H. G., *Methods Mol. Biol.* 2005, 290, 13-23.
- [3] Drexler, H. G., Uphoff, C. C., *Cytotechnology* 2002, 39(2), 75-90.
- [4] Mirjalili, A., Parmoor, E., Moradi Bildhendi S., Sarkari, B., *Biologicals* 2005, 33, 81-85.
- [5] Brinz, D., Holzgrabe, U. *Electrophoresis* 2008, 29, 3605-3611.
- [6] Kremser, L., Blaas, D., Kenndler, E. *Electrophoresis* 2009, 30, 133-140.
- [7] Mariotti, E., Mirabelli, P., Di Noto, R., Fortunato, G., Salvatore, F., *Leukemia Research* 2008, 32, 323-326.
- [8] Lu, Y., Shi, W., Qin, J., Lin, b., *Electrophoresis* 2009, 30, 1-4.
- [9] Lucas, L. J., Han, J.-H., Yoon, J.-Y., *Colloids and Surface* 2006, 46, 106-111.
- [10] Sia, S. K., Whitesides, G. M., *Electrophoresis* 2003, 24, 3563-3576.
- [11] Yeon, J. H., Park, J. K., *Biochip J.* 2007, 1, 17-27.
- [12] Fu, L. M., Yang, R. J., Lin, C. H., Chien, Y. S., *Electrophoresis* 2005, 25, 1814-1824.
- [13] Bonneil, E., Tessier, S., Carrier, A., Thibault, P., *Electrophoresis* 2005, 26, 4575-4589.
- [14] Kim, S. M. Lee, S. H., Suh, K. Y., *Lab. Chip.* 2008, 8, 1015-1023.
- [15] Han, J. H., Kim, K. S., Yoon, J.Y., *Analytica Chimica Acta* 2007, 584, 252-259.
- [16] Han, J. H., Brian, C. H., Yoon, J.Y., *Biosens. Bioelectron.* 2008, 23, 1303-1306.
- [17] Karlos, W., Coltro, T., Lunte, S. M., Carrilho, E., *Electrophoresis* 2008, 29, 4928-4937.
- [18] Yoon, J. Y., Kim, J. H., Kim, W. S., *Colloids Surf. B.*1998, 12, 15-22.
- [19] Yoon, J. Y., Kim, K. H., Choi, S. W., Kim, J. H., Kim, W. S., *Colloids Surf. B* 2003, 27, 3-9.
- [20] Xia, Y., Whiteside, G., *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998, 28, 153-184
- [21] Kim, P., Kwon, K. W., Park, M. C., Lee, S. H., Kim, S. M., Suh, K. Y., *Biochip J.* 2008, 2, 1-11.
- [22] Stevens, M. K., Krause, D. C., *Infect. Immun.* 1990, 58, 3430-3433.
- [23] Domachuk, P., Grillet, C., Ta'eed, V., Mägi, E., Bologer, J., Eggleton, B. J., *Appl. Phys. Lett.* 2005, 86, 1031-1033.
- [24] Jin, F., Hickman, J. J., Lenghaus, K., Maeda, R. K., *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 380, 204-211.
- [25] Liu, G., L., Lee, L. P., *Appl. Phys. Lett.* 2005, 87, 4101-4104.
- [26] Lucas, L. J., Han, J.-H., Chesler, J., Yoon, J.-Y., *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 2216-2222.
- [27] Takagi, T., *Electrophoresis* 1993, 14, 1255-1256
- [28] Pyo, H. B., Jung, M. Y., Park, S. H., *Biochip J.* 2007, 1, 281-287.
- [29] Meyer-Arendt, J. R., *Introduction to Classical and Modern Optics, 4thed.*, Prentice-Hall, New Jersey 1989.
- [30] Yoon, J. Y., Yoo, D. J., *Journal of Biological Engineering* 2008, 2, 1-12.
- [31] Cox, A. J., DeWeerd A. J., Linden, J., *Am. J. Phys.* 2001, 70, 620-625.
- [32] Price, C.P., Newman, D. J., *Principles and practice of immunoassay.* Stockton Press, New York 1997, 445-472.
- [33] Aristov, Y. I., Glaznev, I. S., Frenni, A., Restuccia, G., *Chem. Eng. Sci.* 2006, 61, 1453-1458.
- [34] Wei, Y., Shen, J., Yu, H., *Particuology* 2009, 7, 76-82.
- [35] Kim, H. -J., Lee, J., Kim, T. -H., Lee, T. S., Kim, J. *Adv. Mater.* 2008, 20,

1117-1121

- [36] Cheryl, L. F., *Electrophoresis* 1997, 18, 2427-2437.
- [37] María, C-P., Antonio, L. C., María, L. M., *Electrophoresis* 2010, 31, 229-250.
- [38] Johnathan, W. F., Yuegang, Z., *Food Chemistry* 2007, 105, 1297-1301.
- [39] Papadoyannis, I.N., Samanidou, L.A., Kovatsi, L.A., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000, 23, 275-280.
- [40] Fletouris, D., Psomas, J., Botsoglou, N., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1990, 38, 1913-1917.
- [41] Dihuidi, B., Kuchatogr, M. J., Roets, E., Hoodmartens, J., Vanderghe, H., *Journal of Chromatography* 1985, 413-424.
- [42] Tombelli, S., Miunni, M., Maxcini, M., *Biomolecular Engineering* 2007, 24, 191-200.
- [43] Jayasena S. D., *Clinical Chemistry* 1999, 45:9, 1628-1650.
- [44] Domachuk, P., Grillet, C., Ta'eed, V., Mägi, E., Bologer, J., Eggleton, B. J., *Appl. Phys. Lett.* 2005, 86, 1031-1033.
- [45] Jin, F., Hickman, J. J., Lenghaus, K., Maeda, R. K., *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 380, 204-211.
- [46] Liu, G., L., Lee, L. P., *Appl. Phys. Lett.* 2005, 87, 4101-4104.
- [47] Han, J. H., Brian, C. H., Yoon, J.Y., *Biosens. Bioelectron.* 2008, 23, 1303-1306.
- [48] Lucas, L. J., Han, J.-H., Chesler, J., Yoon, J.-Y., *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 2216-2222.
- [49] Takagi, T., *Electrophoresis* 1993, 14, 1255-1256
- [50] Pyo, H. B., Jung, M. Y., Park, S. H., *Biochip J.* 2007, 1, 281-287.
- [51] Kim, K., Jung, H.S., Song, J.Y., Lee, M.Y., Kim, K.S., Suh, K.Y., *Electrophoresis* 2009, 30, 3206-3211.
- [52] Yoon, J. Y., Yoo, D. J., *Journal of Biological Engineering* 2008, 2, 1-12.
- [53] Han, J. H., Brian, C. H., Yoon, J.Y., *Biosens. Bioelectron.* 2008, 23, 1303-1306.
- [54] Javed, H. N., Lee, S.J., Kim, Y.S., Gu, M.B., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008, 16, 1254-1261.
- [55] Kim, P., Kwon, K. W., Park, M. C., Lee, S. H., Kim, S. M., Suh, K. Y., *Biochip J.* 2008, 2, 1 - 11.
- [56] Stevens, M. K., Krause, D. C., *Infect. Immun.* 1990, 58, 3430 - 3433.
- [57] Brian C. H., Song J. Y., Lee C. H., Najam A., Yoon J. Y., *Sensors and Actuators B : chemical* 2008, 138(2), 491-496.
- [58] Lee J. F., Stovall G. M., Ellington A. D., *Current Opinion in Chemical Biology* 2006, 10, 282-289.
- [59] Johanna P., Ursula S., Patrick D., Claudia P., *Biosensors and Bioelectronics* 2008, 24, 1456-1461.
- [60] Haugh R., *Hospitals & Health Networks* 2006, 80, 46 - 51.
- [61] Price, C.P., Newman, D. J., *Principles and practice of immunoassay.* Stockton Press, New York 1997, 445-472.
- [62] S. Okada, S. Peng, W. Spevak and D. Charych, *Accounts Chem Res*, 1998, **31**, 229-239.
- [63] J. Lee, H. J. Kim and J. Kim, *J Am Chem Soc*, 2008, **130**, 5010-5011.
- [64] J. Lee, H. Jun and J. Kim, *Adv Mater*, 2009, **21**, 1-4.

- [65] J. Lee, E. J. Jeong and J. Kim, *Chem Commun*, 2011, **47**, 358–360.
- [66] D. Seo and J. Kim, *Adv Funct Mater*, 2010, **20**, 1397–1403.
- [67] S. W. Lee, C. D. Kang, D. H. Yang, J. S. Lee, J. M. Kim, D. J. Ahn and S. J. Sim, *Adv Funct Mater*, 2007, **17**, 2038–2044.
- [68] K. W. Kim, H. Choi, G. S. Lee, M. K. Oh, J. M. Kim and D. J. Ahn, *Macromol Res*, 2006, **14**, 483–485.
- [69] Y. L. Su, J. R. Li and L. Jiang, *Colloid Surface B*, 2004, **38**, 29–33.
- [70] C. X. Guo, P. Boullanger, T. Liu and L. Jiang, *J Phys Chem B*, 2005, **109**, 18765–18771.
- [71] B. A. Pindzola, A. T. Nguyen and M. A. Reppy, *Chem Commun*, 2006, 906–908.
- [72] C. H. Park, J. P. Kim, S. W. Lee, N. L. Jeon, P. J. Yoo and S. J. Sim, *Adv Funct Mater*, 2009, **19**, 3703–3710.
- [73] K. W. Kim, H. Choi, G. S. Lee, D. J. Ahn and M. K. Oh, *Colloid Surface B*, 2008, **66**, 213–217.
- [74] M. A. Reppy and B. A. Pindzola, *Chem Commun*, 2007, 4317–4338.
- [75] K. Lee, L. K. Povlich and J. Kim, *Analyst*, 2010, **135**, 2179–2189.
- [76] B. Yoon, S. Lee and J. M. Kim, *Chem Soc Rev*, 2009, **38**, 1958–1968.
- [77] Z. F. Ma, J. R. Li, M. H. Liu, J. Cao, Z. Y. Zou, J. Tu and L. Jiang, *J Am Chem Soc*, 1998, **120**, 12678–12679.
- [78] S. Kolusheva, L. Boyer and R. Jelinek, *Nat Biotechnol*, 2000, **18**, 225–227.
- [79] S. Y. Okada, R. Jelinek and D. Charych, *Angew Chem Int Edit*, 1999, **38**, 655–659.
- [80] S. Kolusheva, E. Wachtel and R. Jelinek, *J Lipid Res*, 2003, **44**, 65–71.
- [81] C. Cametti, F. Bordi, S. Sennato and D. Truzzolillo, *Phys Rev E*, 2007, **76**.
- [82] A. A. Yaroslavov, A. V. Sybachin, E. Kesselman, J. Schmidt, Y. Talmon, S. A. A. Rizvi and F. M. Menger, *J Am Chem Soc*, 2011, **133**, 2881–2883.
- [83] J. Wilschut, N. Duzgunes, D. Hoekstra and D. Papahadjopoulos, *Biochemistry–Us*, 1985, **24**, 8–14.
- [84] T. Lian and R. J. Y. Ho, *J Pharm Sci*, 2001, **90**, 667–680.
- [85] D. L. Sparks, W. S. Davidson, S. Lundkatz and M. C. Phillips, *J Biol Chem*, 1993, **268**, 23250–23257.
- [86] G. Y. Bai, M. Nichifor, A. Lopes and M. Bastos, *J Phys Chem B*, 2005, **109**, 518–525.