

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001076-01

보안과제( ), 일반과제(○)

# 신선편이채소 중 식중독균의 다중정량검출을 위한 랩온어칩 기반 real-time PCR 기술 개발

Development of multiplex real-time PCR based on lab-on-a-chip  
to detect foodborne pathogens in fresh-cut vegetables

## 식중독균 검출을 위한 시료 전처리 및 유전자 정량 기술 개발 (세부)

Establishment of sample preparation and quantitative gene analysis  
using real-time PCR for the detection of food-borne pathogens

## 식중독균의 유전자 다중진단을 위한 랩온어칩 개발 (협동)

Development of lab-on-a-chip based real-time PCR system  
for the multi-detection of food-borne pathogens

연 구 기 관  
한 국 식 품 연 구 원

농 립 수 산 식 품 부



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “신선편이채소 중 식중독균의 다중정량검출을 위한 랩온어칩 기반 real-time PCR 기술 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 6월 24일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 전 향 숙

연 구 원 : 최 성 욱

연 구 원 : 이 나 리

연 구 원 : 장 현 주

연 구 원 : 김 현 정

연 구 원 : 구 민 선

연 구 원 : 권 경 윤

연 구 원 : 최 은 혜

협동연구기관명 : 나노바이오시스(주)

협동연구책임자 : 김 성 우

연 구 원 : 구 영 기

연 구 원 : 김 덕 중

연 구 원 : 김 선 진

연 구 원 : 이 동 훈

연 구 원 : 류 호 선

연 구 원 : 신 수 정

연 구 원 : 이 영



# 요 약 문

## I. 제 목

신선편이채소 중 식중독균의 다중정량검출을 위한 랩온어칩 기반 real-time PCR 기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

- 신선편이채소 등 식품 오염 식중독균 (총 4종 이상: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7)의 유전자를 현장에서 동시에  $10^2$  cells/mL 수준 이하의 고감도로 4시간 이내에 속성 탐지하는 랩온어칩 기반의 검출기술 및 시스템 개발
- 나노자성-면역 분리 기반 시료전처리 기술 및 시스템 개발

### 2. 연구개발의 필요성

#### 가. 식중독균 검사방법의 개선 필요성

일반적인 식중독균의 검사는 미생물학적 검사방법을 이용하고 있으며, 한천평판법에 의해 배지에 섞어 놓은 세균을 증식시켜 판단하기 때문에 3~9일 정도의 긴 검사시간이 소요되는 문제점은 있으나 생균만을 판단할 수 있다. 그러나 신선편이채소류의 짧은 유통기간을 고려한다면 시료전처리에서 검출까지 최소 4시간 이내 신속히 식중독균을 분석할 수 있는 검사장비 및 검사방법이 필요하다. 특히 생식채소류 소비증가에 따른 분석물량의 증가로 인해 많은 수의 전문분석인력이 요구되고 있는 실정이다. 따라서 현장에서 신속하게 비전문가 수준에서 검사할 수 있는 센서수준의 검출기 개발이 필요하다.

식중독균의 신속한 검사를 위한 면역학적 검사방법은 수동 검사법으로 Lateral flow 또는 Dip-stick 검사법이 사용되고 대량의 시료를 자동화 방법으로 검사하는 Automated ELISA를 사용하며 최근에는 항원항체의 선택적 반응을 이용하는 면역센서가 연구/개발되고 있다. 현재 항원항체를 이용하는 검사법들은 친화성과 특이성이 높은 항체를 근간으로 하고 있어 이들 미생물을 효율적으로 탐색할 수 있는 마커단백질의 탐색과 단백질의 구조 항원결정부위(Epitope)에 대한 항체뱅크의 구축이 선행되어야 한다. 더욱이 수천 cell 이하를 검출하기 위해서는 높은 감도를 가지는 분석기가 필요하기 때문에 검출 주변 환경에 영향을 받는다. 따라서 생산현장이나 야외 등과 같이 멸균되어 있지 않거나 감도에 영향을 줄 수 있는 장소에서는 사용하기 어려운 실정이다. 최근, 검출감도의 문제를 해결하기 위해 유전자 증폭을 이용하는 PCR 방법이 정확성과 편리성 면에서 유용하게 사용되고 있다. 기존에 알려진 PCR에 의한 식중독균의 검사방법은 미생물 전배양 과정이 필수적으로 요구되며, 전체 식중독균의 검사가 24시간 정도 소요되기 때문에 면역학적 방법보다는 효율적이나, 식품의 식중독균 오염여부를 신속하게 판단하기 위해서는 검사시간의 단축이 더욱 필요하다. PCR에 의한 검사

단계는 배양, 유전자의 추출, PCR에 의한 확인의 단계로 이루어진다. 따라서 어느 단계를 없애거나, 소요시간을 단축하여 전체 검사시간을 4시간 이내로 할 수 있다면, 현재 신속성, 정확성, 편리성, 동시성 (여러 식중독균의 검출)이 겸비된 식중독균의 신속검사 시스템이 없는 상황에서 식품산업 현장 및 검사, 의료기관에서의 적용성은 매우 크다고 할 수 있다.

나. 식중독균 검출을 위한 시료전처리기술 자동화 기술개발 필요성

현재 식중독균을 검출하는데 있어 가장 많은 시간을 필요로 하며 검출 재현성에 있어 전문성을 요구하는 부분이 시료전처리 단계이다. 식중독균 시료 전처리방법은 식품공전에 등록된 표준절차에 의해 처리되지만 검사의 재현성과 정확성을 위해 숙련된 검사자에 의해 수행되어야 한다. 농식품 중 식중독균 검사는 시료전처리를 통한 식중독균 농축 및 추출과정과 식중독균 정성/정량 분석과정으로 2 단계로 구분할 수 있으며 대부분의 검사시간은 시료전처리 시간이다. 농식품에 대한 식중독균 검출을 위해 시료전처리를 자동화할 수 있다면 현재 3~9일 정도 소요되는 검출시간을 4시간 이내로 단축시킬 수 있으며, 검출기술과 함께 연동하여 자동화한다면 비전문가 수준에서 검사할 수 있다. 특히, 신선편이채소류 소비증가로 인해 분석량이 증가하고 전문가인력 부족 현상을 해결할 수 있다.

다. 식중독균 검출을 위한 랩온어칩을 이용한 PCR 장치의 개발 필요성

랩온어칩은 다양한 샘플을 아주 적은 양만으로 분리, 정제, 혼합, 반응, 세척, 및 검출 등의 다양한 반응들이 연속적으로 일어나 시료를 신속하게 분석할 수 있는 방법을 제공한다. 이러한 특성으로 인해 진단용 의료기기의 경우도 기존 NC막 기반의 Rapid Kit 중심에서 보다 정밀하고 복합적인 분석이 가능한 랩온어칩과 바이오센서를 이용한 진단 시장으로 발전하고 있다. 또한 바이오칩 분야 중 DNA칩이나 단백질칩 그리고 셀칩의 경우 고가의 외부 분석기와 실험을 위한 전문 인력을 필요로 하기 때문에 생산지나 마트와 같은 현장에서 POCT (point of care testing) 개념의 진단을 할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 그러므로 비전문가 수준에서 손쉽게 사용할 수 있는 POCT 개념의 식중독검출용 랩온어칩 기술이 개발 되어야 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

연구개발의 내용	연구범위
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 식중독균 검출을 위한 PCR primer 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 사전조사/모델정립               <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 그람양성균 (<i>S. aureus</i> 등)</li> <li>▪ 그람음성균 (<i>L. monocytogenes</i>, <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7)</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Real-time PCR에 의한 식중독균별 분석조건 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 모델정립               <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 균 특이 primer 선별</li> <li>▪ Real-time PCR에 의한 분석조건 최적화</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 유전자 검출용 랩온어칩의 설계 및 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시스템 구축               <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 3D CAD 이용 칩 설계</li> <li>▪ 칩제작용 코어금형 제작</li> <li>▪ 랩온어칩의 성형사출</li> <li>▪ PCR 증폭/검출용 칩 시제품 제작</li> </ul> </li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 랩온어칩에서의 PCR증폭 성능 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PCR 칩 구동을 위한 시스템 구축</li> <li>▪ 랩온어칩에서 유전자 증폭 검증</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 다중 식중독균 검출을 위한 real-time PCR 조건 최적화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 모델정립 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Primer의 다중증폭 검증</li> <li>▪ 다른 균주를 이용한 균 특이도 검증</li> <li>▪ 검출감도 조사</li> <li>▪ 식품 matrix 효과 조사</li> <li>▪ 기존 타 검출법과의 비교</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 나노자성-면역 분리 기반 시료전처리 기술 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 사전조사/모델정립 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 나노자성입자의 제조</li> <li>▪ 식중독균 특이 항체-나노자성입자 중합체 제조</li> <li>▪ 최적 특이항체-나노자성 입자 중합체 선별 및 특성평가</li> <li>▪ 모델 식품검체로부터 균 특이 분리 최적 조건 조사</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 다중검출용 랩온어칩의 설계 및 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시작품 제작 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 3D CAD 이용 칩 설계</li> <li>▪ PCR 증폭/계측부위 설계</li> <li>▪ 칩제작용 코어금형 제작</li> <li>▪ 랩온어칩의 성형사출</li> <li>▪ PCR 증폭/검출용 칩 시제품 제작</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 다중검출용 광학계 시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 다중검출용 형광광학계 설계 및 제작</li> <li>▪ 형광광학계의 성능 평가</li> <li>▪ 검출용 probe 의 형광특성 평가</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 나노자성-면역 분리기반 시료 전처리 기술을 이용한 식중독균 농축 및 전처리</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 모델정립 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 신선편이채소 대상 균 특이 분리능 조사</li> <li>▪ 기존 시료전처리법과의 비교</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시료 전처리 기술이 적용된 랩온어칩 검출 시스템 특성 평가 및 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시작품 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 신선편이채소 대상 <i>L. monocytogenes</i>, <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i>, <i>E. coli</i> O157:H7 검출감도 조사</li> <li>▪ 검출 특이성 조사</li> <li>▪ 공전법과의 비교</li> <li>▪ 모델시료를 이용한 식중독균 검출 재현성 확인</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시료전처리를 위한 하드웨어 시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 시료전처리 프로토콜 개발</li> <li>▪ 시료전처리를 위한 하드웨어 시스템 구축</li> <li>▪ 모델식품 대상 하드웨어 시스템 성능 검증</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 식중독균 검출용 다중검출 랩온어칩 시스템의 시작품 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시작품 제작 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 랩온어칩 구조 최적화 및 시작품 제작</li> <li>▪ 랩온어칩 검출용 시스템의 시작품 제작</li> <li>▪ 식중독균 다중검출 재현성 확인</li> <li>▪ 기기 문제점 보완</li> </ul> </li> </ul>

## IV. 연구개발결과

### 1. 신선편이채소 중 주요 오염 식중독균 검출을 위한 PCR primer 제작

*S. aureus*는 16s rRNA, *coa* (coagulase), *can* (collagen adhesion), *nuc* (*S. aureus* specific gene)의 4개 유전자를 선택하였고, *L. monocytogenes*는 *iap* (invasion associated protein), *hly* (hemolysin), *inlA* (internalin), 16s rRNA 4개 유전자, *Salmonella enterica*에서는 *inv* (*Salmonella* specific invasion), *fliC* (flagella), 16s rRNA의 3개 유전자, *E. coli* O157:H7는 16s rRNA, *eae* (intimin), *fliC* (flagella), *rfb* (O157 specific gene)를 목표 유전자로 하여 유전자별 균 특이 프라이머 2-3종을 선택하여 제작하였다.

### 2. Real-time PCR에 의한 개별 식중독균별 분석조건 확립

식중독균 추적을 위해 국제적으로 정보공유가 가능한 검출용 primer를 1차 선정한 후 PCR을 수행하여 최적 primer를 선정하였다. 결정된 primer를 사용한 검출감도 확인을 위해 Ct값 결정용 real-time PCR을 수행하였다. 각 식중독균의 DNA를 추출하여 이 template를 10배씩  $5.2 \pm 0.4$ 에서  $1.2 \pm 0.3$  log cfu/mL 세포수가 되도록 단계별로 희석하여 real-time PCR을 수행한 다음 기본 log curve 및 정량 분석을 위한 standard curve를 도출하였다.

### 3. 유전자 검출용 랩온어칩의 설계 및 제작

랩온어칩은 3D CAD를 이용하여 positive, negative 및 real sample channel과 같이 3채널 구조로 설계하였으며 열 전달 효율을 극대화 할 수 있게 구조 설계되었다. 이러한 설계를 바탕으로 코어금형을 제작 완료하였으며 이를 이용하여 Cyclo Olefin Copolymer (COC) 재질로 랩온어칩을 성형 사출하여 실제 유전자 증폭 및 검출이 가능한 유전자 검출용 칩의 시제품을 제작하였다.

### 4. 랩온어칩에서의 PCR증폭 성능 검증

유전자 증폭이 가능하도록 온도변화가 원활이 이루어지는 시스템과 실시간으로 증폭결과를 확인 할 수 있는 광학 시스템을 구축하였고, 구축된 시스템을 이용하여 유전자 증폭 및 실시간 검출을 검증하였다.

### 5. 다중 식중독균 검출을 위한 real-time PCR 조건 최적화

4종 식중독균의 용해곡선 분석을 통해  $T_m$ 값이 5°C이상 차이가 나는 *E. coli* O157:H7 (87°C)과 *S. aureus* (80°C), *Salmonella* spp. (88°C)와 *L. monocytogenes*(80°C)를 동시 검출할 수 있는 프라이머를 선정한 후, 단일 real-time PCR 용해곡선 분석을 실시하였다. 선별된 프라이머의 검출감도는 *S. aureus* (Ct;26)와 *L. monocytogenes* (Ct;26)는  $10^2$  cfu/mL까지 *E. coli* O157 (Ct;26)과 *Salmonella* spp. (Ct;27)는 10 cfu/mL까지 검출 가능하였다. 4종 균에 각각 오염된 양상추에서 실험한 결과 *S. aureus*와 *Salmonella* spp.는  $10^3$  cfu/mL까지 *E. coli* O157과 *L. monocytogenes*는  $10^2$  cfu/mL까지 검출되어 식품시료에 오염된 경우 검출감도가 1 log cfu/mL 더 낮음을 확인하였다. DNA 추출 없이 colony real-time PCR 수행 결과,  $10^5$  cfu/mL에서 Ct 25 이상으로 검출됨을 확인하였다. 양상추에서 다중 검출을 수행한



결과 *E. coli* O157:H7과 *S. aureus* (Ct;26)는  $10^4$  cfu/mL, *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes* (Ct;25)는  $10^3$  cfu/mL까지 검출되었다. Applied Biosystems 7500 system 과 본 과제에서 개발한 랩온어칩 시스템 NBS-100을 동일조건에서 4종 식중독균의 DNA 샘플로 비교한 결과 *L. monocytogenes* (Ct;16과 17)은 검출 감도가 유사하였으며, *E. coli* O157:H7과 *S. aureus*, *Salmonella* spp.는 ABI 시스템이 10 cfu/mL 수준으로 감도가 더 높았다.

#### 6. 나노자성-면역 분리 기반 시료 전처리 기술 확립

5 nm 크기를 갖는 자성 입자의 제작을 통해 자성체 입자 표면에 Au가 환원되어 core/shell 형태의 자성/금 나노입자를 제작하였고 XRD, SEM 및 TEM을 통해 제작된 입자의 특성을 평가하였다. 제작된 입자는 평균 10 nm 크기를 가졌으며  $Fe_3O_4$ 와 Au의 결정이 만들어졌음을 알 수 있었다. 또한 SPR을 이용한 항체고정화 조건을 확인하였다. 모델 식품검체로부터 균 특이 분리 최적 조건을 조사하여  $10^3$  cell/mL 분리 및 검출을 확인하였으며 TEM을 통해 미생물 검체 표면에 흡착된 입자를 확인하였다.

#### 7. 다중검출용 랩온어칩의 설계 및 제작

다중검출용 랩온어칩은 단일칩과 동일한 설계 틀인 3D CAD를 이용하여 inlet, outlet, PCR 증폭 및 계측부위로 구성하여 25 X 60 X 0.7 mm 크기로 3채널로 설계되었다. PCR 시스템 기관 내 PCR 증폭부위는 2 X 5 X 0.2 mm로 설계하였으며 이를 기준으로 PCR 계측부위 (1 X 3 X 0.1 mm) 또한 설계하였다. 다중검출을 위한 랩온어칩에 대한 코어금형을 제작 성형사출을 통해 칩 시제품을 제작하였다. 제작한 칩의 시제품은 Polycarbonate (PC)재질의 3 채널을 가지며 각각의 채널은 5 ~ 10  $\mu$ L 부피를 가진다. 제작한 칩은 120°C 이상의 고온에서도 형상의 변화가 없었으며 90% 이상의 광투과 특성을 확인하였다.

#### 8. 다중검출용 광학계 시스템 구축

다중검출을 위한 형광광학계를 설계하고 제작하였으며 열원부분과 결합시켜 real-time PCR 장비를 구축하였으며 구축된 장비의 광학부분의 성능평가를 실시한 결과 DNA 70pg ~ 800 ng에서 형광 측정을 확인하였다. 또한 *L. monocytogenes* ATCC153131을 선택하여 DNA 50 ng에서 30 cycles을 기준으로 Roche사의 LightCycle 1.5 모델과 제작한 real-time PCR (NBS-100, 나노바이오시스(주))을 비교 평가한 결과 유사한 PCR 효율과 진행시간을 확인하였다.

#### 9. 나노자성-면역 분리기반 시료 전처리 기술을 이용한 식중독균 농축 및 전처리

식중독균 특이항체와 나노자성 중합체를 이용한 시료전처리 방법으로 NBS-100에 의한 real-time PCR 결과 전통적인 배지법으로 검출하지 못한 10 cfu/mL에서도 식중독균을 검출할 수 있었다. 기존 시료전처리법과 비교한 결과, 나노자성 중합체를 이용한 시료전처리 방법은 10 cfu/mL의 적은 수의 세균이 존재하는 실험군에서 기존의 전처리법보다 더 좋은 검출능을 나타내었다. 따라서 실제 식품에서 아주 적은 수로 존재하는 식중독균의 검출에 효과적일 수 있을 것으로 사료된다.

#### 10. 시료 전처리 기술이 적용된 랩온어칩 검출 시스템 특성 평가 및 검증

신선편이채소 중 양상추, 치커리, 베이비채소를 대상으로 하여 *E. coli* O157:H7 NCCP11091, *S. aureus* ATCC6538, *Salmonella* spp. ATCC13076, *L. monocytogenes* ATCC15313의  $10^{-10}$  cfu/mL 세포수에서 검출감도 조사 결과, *E. coli* O157:H7은 모든 시료에서 10 cfu/mL 세포수까지 검출되었으며, 시료에 따른 검출감도의 큰 차이는 없었다. 주요 식중독균의 검출에 사용된 4쌍의 검출 프라이머가 각 식중독균에 특이적인지 확인하기 위하여 *E. coli* O157:H7 2종, *Salmonella* spp. 3종, *L. monocytogenes* 2종, *S. aureus* 2종, *S. epidermidis* 1종, *B. cereus* 1종에 대한 특이성을 검증하였다. 각 균 특이적인 프라이머 의해 다른 식중독균은 검출되지 않았다. 본 연구팀에서 개발한 NBS-100과 공전법, NBS-100과 기존에 사용해 왔던 ABI7500와의 성능을 비교한 결과, 모든 경우에 공전법으로  $10^2$  cfu/mL까지 검출되었으며, 공전법으로 검출되지 않았던 10 cfu/mL에서 NBS-100으로 *E. coli* O157:H7 등의 검출이 가능하였다. ABI7500에 의한 분석법과 비교한 경우에도 큰 차이는 없으나 조금 더 좋은 검출능을 나타내었다. 그러나 기존 공전법으로 최소 24시간 소모되는 검출 시간이 개발된 시스템에서 2-4시간으로 현장에서 실시간 검출이 가능할 것으로 사료된다. 본 시스템에서 2종의 모델시료에서 4종의 식중독균의 검출에 대한 real-time PCR의  $C_T$ 에 대한 RSD 값이 베이비채소에서 0.1-1.9%, 양배추에서 0.1-2.5%로 나타내므로 재현성 실험에서 요구되는 0.1-5%의 RSD 값에 포함되므로 NRS-100시스템과 관련 프라이머들의 실험 재현성을 확인하였다.

#### 11. 시료 전처리를 하드웨어 시스템 구축과 시스템 특성 평가 및 검증

주관기관에서 연구한 시료전처리 프로토콜과 상용 프로토콜을 분석하여 시료전처리 장치 외부 및 내부 공정용 공정을 개발하였으며, 용액주입부, Lysis 모듈부, membrane filter, 3 way 밸브 및 용액 배출부로 각 모듈별로 설계하고 그 성능을 평가하였다. 이를 바탕으로 300(가로) X 150(세로) X 300(높이) mm의 외각 크기와 총 5 kg 정도 무게를 가지는 시료전처리용 하드웨어 시스템을 설계하고 제작하였다. 이를 이용하여 상추, 양배추 및 치커리 등의 신선편이채소로 시료전처리용 하드웨어 시스템을 이용하여 식품오염균 (*E. coli* O157, *Samonella* spp., *L. monocytogenes* ATCC15313)이 3시간이내로 분리됨을 검증하였다.

#### 12. 식중독균 검출용 다중검출 랩온어칩 시스템의 시작품 제작

균일성과 효율적인 온도제어 알고리즘을 통하여 펠티어 열원소자를 이용한  $\pm 1^\circ\text{C}$  이내편차를 가지면서 30 cycle 기준 40분 이내 수행할 수 있는 다중검출용 온도제어 모듈을 설계/제작하였으며 LED 광원 (470 nm, SYBR green), 렌즈 및 필터 (520 nm), photo diode를 이용한 다채널 (3채널) 광학 검출 모듈을 설계/제작하였다. 이를 바탕으로 20 X 20 X 30 cm의 외각 크기 정도의 소형 고속 real-time PCR에 대한 시작품을 제작 완료하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

- Real-time PCR에 의한 식중독균 분석조건 확립에 따른 농식품 안전 검출 기술 및 기기 분야에서 자체적 핵심 기술기반 확립
- 랩온어칩 기반 real-time PCR 개발에 따라 HACCP의 주요 tool로 사용함으로써 신선편 이채소 등 농식품의 출고 전에 오염상태를 파악하여 식중독을 사전에 방지
- 식중독 사고 수준의 감소로 인한 사회·경제적 비용 감소
- 개발된 식중독균 검출용 다중검출 랩온어칩 시스템과 나노자성-면역 분리 기반 시료전처리 시스템은 연구 종료 시점에 시작품 제작이 가능하며 종료 1-2년 이후 기술이전을 통해 참여업체에서 자체사업화 할 예정임

### 2. 연구개발결과의 활용방안

- 가. 식중독균 검출용 유전자 키트 상용화 가능 : 식중독의 원인이 되는 유해 미생물을 유전자 기반의 PCR증폭을 통해 고감도로 검출할 수 있는 진단시약을 상품으로 만들어 사업화 예정
- 나. 다중증폭 및 다중검출이 가능한 유전자 검출 시스템 상용화 가능 : 기존에 개별 유전자를 진단하는 키트들은 이미 상용화되어 있으나, 여러 가지 식중독 원인균들을 한 번에 증폭 및 동시검출하는 진단키트 및 시스템은 개발되어 있지 않음. 따라서 본 과제를 통해 개발 및 확립되는 다중증폭 및 검출시스템은 식중독균과 같이 다양한 원인균들이 작용하는 경우에 있어 매우 효과적인 진단 제품이 될 것으로 판단됨
- 다. 식품안전 진단용 시료전처리 시스템 산업화 : 현재 사후 역학조사에만 의존하고 있는 식중독관리를 표준화된 전처리 시스템과 빠른 유전자 진단 시스템을 이용해 사전검사 및 예방관리 시스템으로 변화시킬 수 있으며 이는 식품안전 분야에 있어 새로운 시장을 개척하는 효과를 창출함

### 3. 기대성과

#### 가. 기술적 측면

- 장시간 요구되었던 기존 식중독균 검출방법의 기술적 한계를 극복하여, 랩온어칩을 이용한 4종 이상 식중독균 동시 검사시스템 개발의 쾌거를 이룩할 수 있음
- 본 과제를 통해서 개발되는 랩온어칩을 이용한 on-step 유전자 증폭 및 검출 기술은 실험실에서 여러 과정을 거쳐 진행되는 유전자의 다중 증폭 및 다중검출을 하나의 칩 안에서 가능하게 하므로 식중독균의 유전자 검출 및 진단과정을 one-step 과정으로 단순화시킴으로서 식품 진단 분야에서 기술적 진보 및 산업적 파급효과가 클 것으로 기대됨
- 본 연구과제 수행을 통한 독자적인 기술 확보로 농식품 중 위해요소 검출분야에서의 신기술 영역을 선점하고 이 분야에서의 기술 수준을 향상시킴

- 확보된 신속 고감도 식품오염 식중독균의 검출 및 시료 전처리 시스템은 신선편이채소 뿐만 아니라 다른 영역의 요구에도 편승할 수 있는 기술적 파급효과를 이룰 수 있음
- 비전문가들도 현장에서 간편하게 사용할 수 있는 검사시스템을 확보하게 됨으로써 병원 체 확산 방지를 통해 국민 보건위생을 국가적 차원에서 관리하는 체계를 구축할 수 있음

#### 나. 경제적·산업적 측면

- 식중독 균의 현장 신속탐지를 통해 그 확산을 조기에 차단함으로써 식중독으로 인한 연 1조3천억 원 (2002년 보건산업진흥원 자료)의 경제손실을 최소화할 수 있음
- 해외제품에 대부분 의존적이었던 검출센서/기기 분야에 독자적으로 상용화 가능한 신기술을 개발하여 국내 시장 뿐만 아니라 약 10조원 규모의 세계시장에서의 바이오센서 제품 경쟁력을 제고
- 신속 고감도 식품오염 식중독균의 검출 및 시료 전처리 시스템의 국산화로 검사장비나 시약 등에 대한 수입대체 효과를 통하여 외화낭비 등의 비용을 절감할 수 있음
- 특히 신선편이채소의 최소가공처리장에서도 현장의 신속검사를 통해 식중독 균의 조기 확산을 방지하며 식품위생, 환경 등을 체계적 관리가 가능하게 되어 국민보건위생에 지대한 공헌을 하여 국가 경쟁력 발전에도 기여할 것으로 전망
- 최근 한미 FTA 체결 및 중국과의 대규모 수산물 거래를 통해 제기되어지는 검역상의 취약점을 보완할 수 있는 대안의 하나로 활용가능

# SUMMARY

## I. Title

Development of multiplex real-time PCR based on lab-on-a-chip to detect foodborne pathogens in fresh-cut vegetables

## II. Objective and Significance of Research

### 1. Objective of Research

- The purpose of this research is to develop a lab-on-a-chip based real-time PCR technique and system that detect foodborne pathogens in fresh-cut vegetables within 4 hr.
- The purpose of this research is to develop a sample preparation technique and system using immunomagnetic particles.

### 2. Significance of Research

Rapid detection and identification methods for bacterial foodborne infections have increased over the past ten years because of growing concerns among researchers worldwide regarding this important public safety problem. Several schemes are available for modern microbiological validation, including Association of Analytical Communities (AOAC) International, International Dairy Federation (IDF) procedures, European Microbiological Method Assessment Scheme (EMMAS), and Microval. The most widely known modern detection methods include enzyme immunoassays, nucleic acid probes, polymerase chain reaction (PCR), electrochemical techniques, and micro/nano-sized immunoparticle tests. These methods must follow an initial cultural enrichment step, which increases the low levels of the target microorganism over a period of approximately 24 to 72 h. Despite continuous improvements, modern techniques for microbiological food testing are still laborious and time-consuming. Thus, it is highly desirable to develop automatic analytical methods that reduce the test time between sample preparation and detection, and improve the repeatability of microorganism detection in food.

Several methods report the combination of sample preparation and detection to reduce the culture time required by rapid detection methods using immunomagnetic particles. One method combined immunomagnetic beads with flow cytometry to detect *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7) in ground beef with a sensitivity of  $10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> in 1 h and 10 CFU g<sup>-1</sup> in 5 to 7 h. A combination of immunomagnetic particles with an electrical conductance technique reduced the detection time for *Salmonella* by several hours. Docherty et al. reported the detection of *Campylobacter* in chicken using a combination of immunomagnetic particles and PCR with a sensitivity

of 420 CFU g<sup>-1</sup> after 18 h. Thus, methods that combine immunomagnetic particles with a detection technique can more rapidly detect microorganisms in food than alternative modern detection methods.

### III. Scope and Research field

- PCR primer fabrication for detection of food-borne pathogens in fresh-cut vegetables
- Establishment of food-borne pathogene analysis condition using real-time PCR
- Design and fabrication of LOC for gene detection
- Evaluation of PCR amplification using LOC and PCR amplification with gene marker of food-borne pathogene
- Real-time PCR optimization for multi-detection of food-borne pathogens
- Establishment of immunomagnetic separation based sample preparation method
- Design and fabrication of LOC for multi-detection
- Optic system setup for multi-detection
- Application of immunomagnetic separation based sample preparation to fresh-cut vegetables
- Performance test for the combined immunomagnetic separation based sample preparation and LOC based real-time PCR
- Fabrication and evaluation of sample preparation H/W system
- Prototype fabrication of multi-detection LOC based real-time PCR

### IV. Results and Recommendation

1. **PCR primer fabrication for detection of food-borne pathogens in fresh-cut vegetables:** Primers used in this study were targeted to genes encoding for the 16s rRNA, *coa* (coagulase), *can* (collagen adhesion), and *nuc* (*S. aureus* specific gene) in *S. aureus*, *iap* (invasion associated protein), *hly* (hemolysin), *inlA* (internalin), and 16s rRNA in *L. monocytogenes*, *inv* (*Salmonella* specific invasion), *fliC* (flagella), 16s rRNA in *Salmonella* spp., and 16s rRNA, *eae* (intimin), *fliC* (flagella), *rfb* (O157 specific gene) in *E. coli* O157:H7. These primers were selected based on their specificity, and synthesized for use.
2. **Establishment of food-borne pathogene analysis condition using real-time PCR:** In order to establish detection limits of the real-Time PCR, 10-fold serial dilutions of the four reference strains were analyzed covering a range from 5.2±0.4 to 1.2±0.3 log cfu/mL. Reaction conditions for each pathogen using SYBR Green were optimized to develop efficient real-time PCR, and standard curve was generated from the real-time PCR cycle threshold values for quantitative analysis.
3. **Design and fabrication of LOC for gene detection:** Disposable plastic LabChip for

real-time PCR was designed and fabricated using 3D CAD. The LabChip based on a Cyclo Olefin Copolymer (COC) had three channels comprising positive, negative and sample channels, and was generated using core-mold. Consequently, a disposable plastic three channel real-time PCR system to detect food pathogens within 90 min was developed.

4. **Evaluation of performance for LOC-based real-time PCR amplification:** We designed a prototype of fluorescence optics for real-time PCR system, and tested the performance of optic part from measuring the fluorescence intensity at 488 nm and 520 nm. In addition, we checked the accuracy of temperature control.
5. **Real-time PCR optimization for multi-detection of food-borne pathogens:** Selected oligonucleotide primers for food pathogens were tested for PCR amplification of a DNA fragment with a melting temperature for *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *S. aureus*. The limits of detection (LOD) of the selected primers were  $10^2$  cfu/mL for *S. aureus* (Ct;26) and *L. monocytogenes* (Ct;26), and were 10 cfu/mL for *E. coli* O157:H7 (Ct;26), and *Salmonella* spp. (Ct;27). In colony real-time PCR without extracting DNA, the LOD was decreased to  $10^5$ cfu/mL. When the lettuce artificially inoculated with four strains was analyzed using real-time PCR, the LOD was  $10^4$  cfu/mL for *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* (Ct;26), and was  $10^3$  cfu/mL for *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* (Ct;25).
6. **Establishment of immunomagnetic separation based sample preparation method:** The gold-coated iron magnetic nanoparticles were synthesized and characterized. *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *S. aureus* were simultaneously separated and detected using nanoparticles as magnets and for absorbance measurement. Core-shell structured Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au particles were prepared from iron core particles by reduction of Fe ions and nucleation of gold ions on core particle surfaces. The Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au particles were purified and modified using 16-mercaptohexadecanoic acid as a coupling agent for anti-*E. coli* O157:H7 antibodies, anti-*L. monocytogenes* antibodies, anti-*Salmonella* spp. antibodies, anti-*S. aureus* antibodies under optimized immobilization conditions. The Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au particles produced were comprised of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> core particles with a diameter of less than 5 nm and coated in a gold shell approximately 5 nm thick. These Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au particles were used to demonstrate the feasibility of high-sensitvie detection, and the specificity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au particle binding with *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus* were confirmed.
7. **Design and fabrication of LOC for mult-detection:** Multi-detecting LOCs was

designed using the same tool and comprised with inlet, outlet, PCR amplification and detection part including 3 channels as 25 X 60 X 0.7 mm size. The PCR amplification part in the system was designed as 2 X 5 X 0.2 mm size. And from the amplification design, the PCR detection part was also designed as 1 X 3 X 0.1 mm size. The Labchip for prototype fabricated from the molding injection and had 3 channels and 5 ~ 10  $\mu$ L volume with polycarbonate (PC). The fabricated chips didn't any change the shape even high temperature at 120°C and had the good optical transparent property over 90%.

8. **Optic system setup for multi-detection:** We designed the fluorescence optics for multi-detection and set up the real-time PCR system. And then we confirmed the performance of optic part from measuring the fluorescence intensity at DNA 70pg ~ 800ng. When the fabricated real-time PCR (NBS-100) was compared with LightCycle 1.5 (Roche) from resulting DNA 50 ng with 30 cycles of *L. monocytogenes* ATCC153131, we knew that the PCR efficiency and consuming time was similar.
9. **Application of immunomagnetic separation based sample preparation to fresh-cut vegetables:** Two procedures for sample preparation prior to real-time PCR (NBS-100) were compared in this study: one was based on immunomagnetic separation of the target bacteria from the sample, using magnetic particles coated with immunoglobulin antibodies to *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *S. aureus*. The other was conventional plating method based on the serial dilution of sample. As a result, immunomagnetic separation using real-time PCR (NBS-100) assay was capable of detecting 10 cfu/g of sample. In contrast, conventional cultural method based on the serial dilution of sample gave negative result at 10 cfu/g of sample. Thus, the combination of immunomagnetic separation and real-time PCR (NBS-100) makes possible the development of a automated detection process with high sensitivity, which require a minimum of manual work.
10. **Performance test for the combined immunomagnetic separation based sample preparation and LOC based real-time PCR:** The performance of the combined LOC based real-time PCR and immunomagnetic separation based sample preparation was evaluated in vegetables including as lettuce, chikory and baby vegetables artificially inoculated with  $10-10^6$  cfu/mL of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *S. aureus*. Regardless of the sample used, *E. coli* O157:H7 was detected at 10 cfu/g of sample. The optimized multiplex PCR based on immunomagnetic separation showed that the selected primers were specific to the detection of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *S. aureus*. When our NBS-100 based on immunomagnetic



separation was compared with ABI7500 and conventional plating method (KFDA code), NBS-100 was capable of detecting 10 cfu/g of sample at which yielded negative result by conventional cultural method. As compared with ABI7500, NBS-100 gave the same or better results. In addition, RSD for  $C_T$  of NBS-100 based on immunomagnetic separation was 0.1–1.9% in baby vegetable and 0.1–2.5% in lettuce, indicating that reproducibility of our NBS-100 based on immunomagnetic separation was good. These results from this study showed that the developed real-time PCR combined with immunomagnetic separation is promising in terms of sensitivity, specificity and reproducibility.

11. **Fabrication and evaluation of sample preparation H/W system:** The sample preparation system and its internal process was developed from the research results of competent authorities and analysis of conventional protocol. And the system was designed according each module with solution inlet, Lysis, membrane filter, 3-way valve and solution outlet and evaluated the performance. From the results, we fabricated the H/W system for sample preparation with 300 X 150 X 300 mm as size and 5 kg as weight. Using the fabricated system, we confirmed that the pathogens (*E.coli* O157, *Samonella* spp., *L. monocytogenes* ATCC15313) was separated from fresh-cut foods (lettuce, cabbage and chicory).
12. **Prototype fabrication of multi-detection LOC based real-time PCR:** We completed a portable rapid sample preparation system to isolate food pathogens from fresh vegetables within 3 hours and made an efficient 3 channel LabChip-based real-time PCR system to detect food pathogens within 40 min.

In conclusion, we have developed an efficient and rapid molecular diagnostic system consisting of a sample preparation system, a 3 channel real-time PCR LabChip. The entire detection method, including sample processing and real-time PCR amplification, was completed within 4 h, making it a rapid single-day assay.

## V. Results Achievements and Their Application Plans

Establishing HACCP regulation-based molecular diagnosis core technologies to detect agricultural and food pathogens. Preventing the spread of contaminated fresh vegetables before sales. Reducing recovering expenses by food pathogen accidents. Providing a convenient rapid point-of-care test system to detect food pathogens for both experienced and inexperienced persons.



# CONTENTS

<b>Chapter 1. Outlines of the Research</b> .....	<b>21</b>
Part 1. Objectives of the Research .....	21
Part 2. Necessities of the Research .....	21
1. Economical and Industrial Necessities .....	21
2. Technological Necessities .....	23
Part 3. Scopes of the Research .....	25
<b>Chapter 2. R&amp;D Status in Domestic and Overseas</b> .....	<b>27</b>
Part 1. Status of the Related R&D Area in Domestic and Overseas .....	27
1. Status of the Related R&D Area in Overseas .....	27
2. Status of the Related R&D Area in Domestic .....	29
Part 2. Positioning of the Results in Domestic and Overseas's R&D Status .....	30
<b>Chapter 3. Contents and Results of the Research</b> .....	<b>32</b>
Part 1. Materials and Methods .....	32
Part 2. Contents of the Research .....	38
Part 3. Results and Discussion .....	40
<b>Chapter 4. Goal Accomplishments and Contribution to the Related Fields</b> .....	<b>104</b>
Part 1. Goal Accomplishments .....	104
Part 2. Contribution to the Related Fields .....	109
<b>Chapter 5. Result Achievements and Their Application Plan</b> .....	<b>110</b>
Part 1. Result Achievements .....	110
1. Papers .....	110
2. Patents .....	110
3. Technology Transfer .....	111
4. Seminar .....	111
Part 2. Technology Commercialization .....	111
Part 3. Technology diffusion and Plan for Intellectual Property Rights .....	112
1. Technology diffusion .....	112
2. Plan for Intellectual Property Rights .....	113
Part 4. Plan for Further Research and Application of Result .....	113
<b>Chapter 6. Foreign Scientific Information Acquired</b> .....	<b>114</b>
<b>Chapter 7. References</b> .....	<b>118</b>



# 목 차

<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b> .....	<b>21</b>
제 1절 연구개발의 목적 .....	21
제 2절 연구개발의 필요성 .....	21
1. 경제적·산업적 필요성 .....	21
2. 기술적 연구개발의 필요성 .....	23
제 3절 연구개발의 범위 .....	25
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b> .....	<b>27</b>
제 1절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발 현황 .....	27
1. 세계적 수준 .....	27
2. 국내수준 .....	29
제 2절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 .....	30
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	<b>32</b>
제 1절 이론적, 실험적 접근방법 .....	32
제 2절 연구내용 .....	38
제 3절 연구결과 .....	40
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> .....	<b>104</b>
제 1절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 .....	104
제 2절 관련분야의 기술발전예의 기여도 .....	109
<b>제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획</b> .....	<b>110</b>
제 1절 연구개발 성과 .....	110
1. 논문 게재 성과 .....	110
2. 특허 성과 .....	110
3. 기술 이전 .....	111
4. 세미나 발표 .....	111
제 2절 연구개발 상용화 및 산업화 계획 .....	111
제 3절 기술 확산 및 지식재산권 확보계획 .....	112
1. 기술 확산 .....	112
2. 지식재산권 확보계획 .....	113
제 4절 추가연구, 타연구에 활용계획 .....	113
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b> .....	<b>114</b>
<b>제 7 장 참고문헌</b> .....	<b>118</b>



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

- 신선편이채소 등 식품 오염 식중독균 (총 4종 이상: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7)의 유전자를 현장에서 동시에  $10^2$  cells/mL 수준 이하의 고감도로 4 시간 이내에 속성 탐지하는 랩온어칩 기반의 검출 기술 및 시스템 개발
- 나노자성-면역 분리 기반 시료전처리 기술 및 시스템 개발



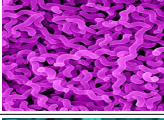


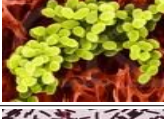


## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 경제적 · 산업적 필요성

산업혁명이 도화선이 되어 비교적 짧은 시간 안에 지구전체에 산업화가 진전되었다. 이러한 산업화 사회에서 식품 수요보다 공급이 증가하면서 식품의 양보다 맛과 질을 더욱 중요시 하게 되었다. 현재, 산업화 사회에서 정보화 사회로의 빠른 진전에 따라 식품의 위해정보에 대해 관심이 급증하고 있다. 특히 국무조정실 및 농경영보고서 등의 통계자료에 따르면 가격보다 안전에 비중을 두면서 소비하는 것으로 나타나 안전위주의 소비패턴으로 변화하고 있다. WTO/DDA 등의 다자간 협상 또는 FTA와 같은 양자간 협상 등을 통해 형성된 국제시장 개방화 이후 수입식품의 교역량의 증대는 우리나라 식품업계의 세계시장 진출이라는 이점도 있으나 수입식품의 안전성 문제에 대한 논란을 불러일으키고 있다. 또한 웰빙과 같이 소비자의 건강에 대한 관심이 증가하면서 신선편이채소의 소비가 증가하고 있다. 이에 샐러드, 새싹채소 등의 신선편이식품 (fresh-cut)에 대한 안전관리기준을 신설하기위하여 식중독균 등 병원성미생물의 관리기준이 마련되고 있다 (식품의약품안전청, 1월29일 입안예고). 그러나 현재의 규제중심에 의한 수동적 식품안전관리는 농식품 생산활동 및 소비촉진에 있어 부정적 요소로 작용하고 있다. 따라서 생산자 중심의 능동적 안전관리 제고가 이루어지기 위해서는 비전문가 수준에서 식품안전을 검사할 수 있는 기술개발이 필요한 실정이다.

식품을 통한 건강상의 위해는 만성적 질환을 수반하는 곰팡이독소와 미생물이 원인이 되는 급성적 형태인 세균성 식중독으로 대별할 수 있다. 음식을 통해서 인체 내로 들어간 병원 미생물이나 유독·유해한 물질에 의해 발열, 구토, 설사, 복통 등을 동반하는 급성위장염 및 신경장애 등의 중독증상을 나타내는 총체적 개념으로 세균, 화학물질, 동·식물의 자연독 등에 의하여 오염된 식품을 섭취함으로써 집단적으로 발생한다. 세균성 식중독은 식품에 포함된 다수의 병원성세균을 섭취하여 장관내 점막에 침입하여 발생하는 감염형 식중독과 세균에 의해 분비된 독소를 섭취함으로써 발생하는 독소형 식중독으로 구분된다 (Table 1).

Table 1. Kinds of pathogenic microorganisms that cause food poisoning

Category	Pathogenic microorganisms		No. of cells that cause illness	Toxin that cause illness
Infection type	<i>Salmonella</i> spp.		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <math>10^5</math>-<math>10^7</math> cell/g for human</li> <li>■ ~10 cell/g for infant</li> </ul>	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <math>10^4</math>-<math>10^7</math> cell/g for human</li> </ul>	
	<i>Campylobacter jejuni</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <math>10^2</math> cell/g for human</li> <li>■ <math>10^6</math> cell/g for human</li> </ul>	
	<i>Listeria monocytogenes</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ a few cell</li> </ul>	
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 10-100 cell</li> </ul>	
Food-borne intoxication	<i>Staphylococcus aureus</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <math>10^6</math>-<math>10^7</math> cell/g in foods</li> </ul>	1.0 µg/person
Others	<i>Clostridium perfringens</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <math>10^8</math>-<math>10^9</math> cell/g for human</li> </ul>	
	<i>Bacillus cereus</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ (Emetic) <math>10^6</math>-<math>10^7</math> cell/g in foods</li> <li>■ (Diarrheal) <math>10^7</math>-<math>10^8</math> cell/g for human</li> </ul>	Enterotoxin, heat-resistant endospore

1997년 미국에서 발병한 병원성 대장균 O157에 의한 식중독사고 및 해마다 발생하는 학교 급식에 의한 집단 식중독 사고는 사회적문제로 이슈가 되었으며 실제로 건강상의 피해를 본 사례이다. 최근 식품의 대단위 생산규모, 무역의 국제화, 국가간·지역간 활발한 인구이동, 기후 변화 그리고 집단급식의 증가에 따라 식중독발생이 증가하고 대형화하는 추세이므로 대비책이 시급한 국가적 과제로 부상하고 있다. 우리나라에서는 2000~2005년 동안 연평균 100건, 7000명 정도 세균성 식중독 환자 (Fig. 1)가 발생하였다. 특히 2003년에는 장출혈성 대장균과 보툴리누스 식중독과 같이 국내에서 산발적으로 또는 전혀 보고된 바 없는 식중독 형태가 연이어 발생하였다. 1999년 미국의 통계에 의하면 대장균 62,458건 (사망 52명), 캄필로박터 1,963,141건 (사망 99명), 살모넬라 1,342,532건 (사망 556명), 리스테리아 2,498건 (사망 499명)의 발생이 보고되었으며, 미국 질병통제센터는 이들 4종의 균에 의하여 연간 5,000명의 사망자가 발생하였다고 보고하였다. 이에 미국은 1999년에 식품의 식중독 원인균을 검사하기 위하여 53백만달러의 비용을 지불하였으며 연간 24백만 테스트의 검사를 실시하였다.



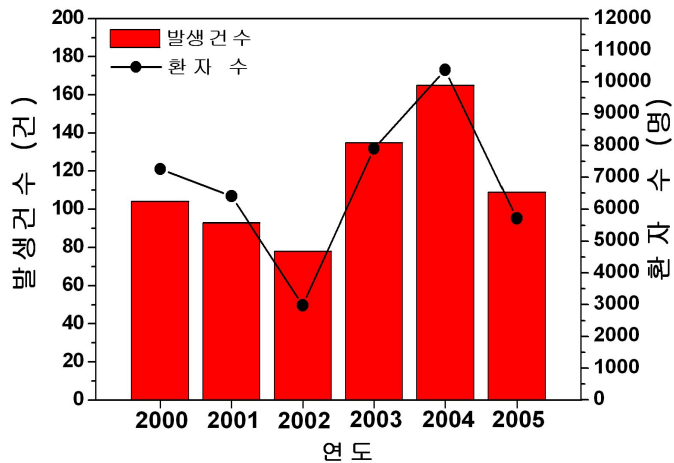


Fig 1. Incidence of food poisoning and patients in Korea (2000-2005), Data : KFDA

## 2. 기술적 연구개발의 필요성

### 가. 식중독균 검사방법의 개선 필요성

일반적인 식중독균의 검사는 미생물학적 검사방법을 이용하고 있으며, 한천평판법에 의해 배지에 섞어 놓은 세균을 증식시켜 판단하기 때문에 3~9일 정도의 긴 검사시간이 소요되는 문제점은 있으나 생균만을 판단할 수 있다. 그러나 신선편이채소류의 짧은 유통기간을 고려한다면 시료전처리에서 검출까지 최소 4시간 이내 신속히 식중독균을 분석할 수 있는 검사장비 및 검사방법이 필요하다. 특히, 생식채소류 소비증가에 따른 분석물량의 증가로 인해 많은 수의 전문분석인력이 요구되고 있는 실정이다. 따라서 현장에서 신속하게 비전문가 수준에서 검사할 수 있는 센서수준의 검출기 개발이 필요하다.

식중독균의 신속한 검사를 위한 면역학적 검사방법은 수동 검사법으로 Lateral flow 또는 Dip-stick 검사법이 사용되며 대량의 시료를 자동화 방법으로 검사하는 Automated ELISA를 사용하며 최근에는 항원항체의 선택적 반응을 이용하는 면역센서가 연구/개발되고 있다 (Table 2). 현재 항원항체를 이용하는 검사법들은 친화성과 특이성이 높은 항체를 근간으로 하고 있어 이들 미생물을 효율적으로 탐색할 수 있는 마커단백질의 탐색과 단백질의 구조 항원결정부위 (Epitope)에 대한 항체뱅크의 구축이 선행되어야 한다. 더욱이 수천 cell이하를 검출하기 위해서는 높은 감도를 가지는 분석기가 필요하기 때문에 검출 주변 환경에 영향을 받는다. 따라서 생산현장이나 야외 등과 같이 멸균되어 있지 않거나 감도에 영향을 줄 수 있는 장소에서는 사용하기 어려운 실정이다. 최근, 검출감도의 문제를 해결하기 위해 유전자 증폭을 이용하는 PCR 방법이 정확성과 편리성 면에서 유용하게 사용되고 있다. 기존에 알려진 PCR에 의한 식중독균의 검사방법은 미생물 전배양 과정이 필수적으로 요구되며, 전체 식중독균의 검사가 24시간 정도 소요되기 때문에 면역학적 방법보다는 효율적이나, 식품의 식중독균 오염여부를 신속하게 판단하기 위해서는 검사시간의 단축이 더욱 필요하다. PCR에 의한 검사단계는 배양, 유전자의 추출, PCR에 의한 확인의 단계로 이루어진다. 따라서 어느 단계를 없애거나, 소요시간을 단축하여, 전체 검사시간을 4시간 이내로 할 수 있다면, 현재 신속성, 정확성, 편리성, 동시성 (여러 식중독균 검출)이 겸비된 식중독균 신속검사 시스템이 없는 상황에서, 식품산업 현장 및 검사, 의료기관에서의 적용성은 매우 크다고 할 수 있다.

#### 나. 식중독균 검출을 위한 시료전처리기술 자동화 기술개발 필요성

현재 식중독균을 검출하는데 있어 가장 많은 시간을 필요로 하며 검출 재현성에 있어 전문성을 요구하는 부분이 시료전처리 단계이다. 식중독균 시료 전처리방법은 식품공전에 등록된 표준절차에 의해 처리되지만 검사의 재현성과 정확성을 위해 숙련된 검사자에 의해 수행되어야 한다. 농식품 중 식중독균 검사는 시료전처리를 통한 식중독균 농축 및 추출과정과 식중독균 정성/정량 분석과정으로 2 단계로 구분할 수 있으며 대부분의 검사시간은 시료전처리 시간이다. 농식품에 대한 식중독균 검출을 위해 시료전처리를 자동화할 수 있다면 현재 3~9일 정도 소요되는 검출시간을 4시간 이내로 단축시킬 수 있으며, 검출기술과 함께 연동하여 자동화한다면 비전문가 수준에서 검사할 수 있다. 특히, 신선편이채소류 소비증가로 인해 분석량이 증가하고 전문가인력 부족 현상을 해결할 수 있다.

#### 다. 식중독균 검출을 위한 랩온어칩을 이용한 PCR 장치의 개발 필요성

랩온어칩은 다양한 샘플을 아주 적은 양만으로 분리, 정제, 혼합, 반응, 세척, 및 검출 등의 다양한 반응들이 연속적으로 일어나 시료를 신속하게 분석할 수 있는 방법을 제공한다. 이러한 특성으로 인해 진단용 의료기기의 경우도 기존 NC막 기반의 Rapid Kit 중심에서 보다 정밀하고 복합적인 분석이 가능한 랩온어칩과 바이오센서를 이용한 진단 시장으로 발전하고 있다. 또한 바이오칩 분야 중 DNA칩이나 단백질칩 그리고 셀칩의 경우 고가의 외부 분석기와 실험을 위한 전문 인력을 필요로 하기 때문에 생산현장이나 마트와 같은 현장에서 POCT (point of care testing) 개념의 진단을 할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 그러므로 비전문가수준에서 손쉽게 사용할 수 있는 POCT 개념의 식중독검출용 랩온어칩 기술이 개발되어야 한다.

#### 라. 선진국 중심으로 POCT 진단기기의 수요증대

POCT에 대한 실질적인 요구가 주요 선진국 (미국, 일본, 유럽 등)을 중심으로 확대되면서 점차 새로운 시장을 창출 할 것으로 예측되고 있다. 국내에서도 삼성종합기술원, LG 전자기술원 및 KIST 등 기업체 및 많은 연구소에서 POCT 개념의 분석시스템연구에 집중하고 있다. 그러나 시장을 선점하기 위해서는 IT분야의 소형화, 집적화 기술과 랩온어칩 가공기술 그리고, 바이오마커 및 바이오센서를 포함하는 BIO (융합) 기술이 유기적으로 연계해서 연구될 때 그 가시적인 결과물의 도출이 가능할 것으로 기대된다.

#### 마. 차세대 유전자검사 기술로서의 랩온어칩

핵산 나노기술 (nanotechnology), 초소형 전자기계시스템 (MEMS, microelectromechanical system), 미세유체 (microfluidics), 미세배열 (microarray), 바이오센서 (biosensor) 기술 등이 융합되면서 유전자검사는 랩온어칩 또는 미세유체종합분석시스템 ( $\mu$ TAS, micro total analysis system) 등 새로운 방향으로 진화하고 있다. 랩온어칩 기술은 시료에서 결과까지 분석수행자 없이 진행되어야 하는 현장현시검사에 적합한 방법으로 현장 실시간검사를 위한 유전자 검사는 위험성 조기경보 및 농식품 생산활동에 매우 중요한 역할을 할 것으로 인식되고 있다.

Table 2. Advantages and disadvantages of detection method

	Rapid Kit	Western Blot	Viral Load Assay	LOC
Sampling Method	+++	+	+	+++++
Dimension	+++++	+	+	+++++
Cost	+++++	+	++	++++
Time to Detection	+++++	+	+	+++++
Easy of Use	+++++	+	+	+++++
Rapid Detection	+	+	+++++	+++++
RNA Detection	+	+	+++++	+++++
Diagnostic Marker	++	+++	+++	+++++
Novelty of Method	+	+	+++	+++++

### 제 3 절 연구개발의 범위

연구개발의 내용	연구범위
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 식중독균 검출을 위한 PCR primer 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 사전조사/모델정립                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 그람양성균 (<i>S. aureus</i> 등)</li> <li>▪ 그람음성균 (<i>L. monocytogenes</i>, <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7)</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Real-time PCR에 의한 식중독균별 분석조건 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 모델정립                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 균 특이 primer 선별</li> <li>▪ Real-time PCR에 의한 분석조건 최적화</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 유전자 검출용 랩온어칩의 설계 및 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시스템 구축                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 3D CAD 이용 칩 설계</li> <li>▪ 칩제작용 코어금형 제작</li> <li>▪ 랩온어칩의 성형사출</li> <li>▪ PCR 증폭/검출용 칩 시제품 제작</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 랩온어칩에서의 PCR증폭 성능 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시스템 구축                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PCR 칩 구동을 위한 시스템 구축</li> <li>▪ 랩온어칩에서 유전자 증폭 검증</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 다중 식중독균 검출을 위한 real-time PCR 조건 최적화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 모델정립                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Primer의 다중증폭 검증</li> <li>▪ 다른 균주를 이용한 균 특이도 검증</li> <li>▪ 검출감도 조사</li> <li>▪ 식품 matrix 효과 조사</li> <li>▪ 기존 타 검출법과의 비교</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 나노자성-면역 분리 기반 시료전처리 기술 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 사전조사/모델정립                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 나노자성입자의 제조</li> <li>▪ 식중독균 특이 항체-나노자성입자 중합체 제조</li> <li>▪ 최적 특이항체-나노자성 입자 중합체 선별 및 특성평가</li> <li>▪ 모델 식품검체로부터 균 특이 분리 최적 조건 조사</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 다중검출용 랩온어칩의 설계 및 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시제품 제작                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 3D CAD 이용 칩 설계</li> <li>▪ PCR 증폭/계측부위 설계</li> <li>▪ 칩제작용 코어금형 제작</li> <li>▪ 랩온어칩의 성형사출</li> </ul> </li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 다중검출용 광학계 시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PCR 증폭/검출용 칩 시제품 제작</li> <li>■ 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 다중검출용 형광광학계 설계 및 제작</li> <li>▪ 형광광학계의 성능 평가</li> <li>▪ 검출용 probe 의 형광특성 평가</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 나노자성-면역 분리기반 시료 전처리 기술을 이용한 식중독균 농축 및 전처리</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 모델정립 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 신선편이채소 대상 균 특이 분리능 조사</li> <li>▪ 기존 시료전처리법과의 비교</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시료 전처리 기술이 적용된 랩온어칩 검출 시스템 특성 평가 및 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시작품 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 신선편이채소 대상 <i>L. monocytogenes</i>, <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i>, <i>E. coli</i> O157:H7 검출감도 조사</li> <li>▪ 검출 특이성 조사</li> <li>▪ 공진법과의 비교</li> <li>▪ 모델시료를 이용한 식중독균 검출 재현성 확인</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시료전처리용 하드웨어 시스템 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 시료전처리 프로토콜 개발</li> <li>▪ 시료전처리용 하드웨어 시스템 구축</li> <li>▪ 모델식품 대상 하드웨어 시스템 성능 검증</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 식중독균 검출용 다중검출 랩온어칩 시스템의 시작품 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 시작품 제작 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 랩온어칩 구조 최적화 및 시작품 제작</li> <li>▪ 랩온어칩 검출용 시스템의 시작품 제작</li> <li>▪ 식중독균 다중검출 재현성 확인</li> <li>▪ 기기 문제점 보완</li> </ul> </li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

#### 1. 세계적 수준

##### 가. PCR 분석기

- (1) PCR 분석기는 thermo-cycling과정을 통하여 PCR (polymerase chain reaction) 증폭이 가능하게 되므로 분석기 내부에 Thermal cycler가 내장되어 있다.
- (2) 현재 많이 사용되는 방법으로는 Peltier 소자와 같은 열전 소자를 사용하는 방법과 air 를 heating하여 대류로 가열하는 방법, 원적외선을 직접 조사하여 가열하는 방법, 분석기에 열저항체를 삽입시켜서 가열하는 방법이 있다.
- (3) 현재 PCR 분석기 시장에서 높은 점유율을 가지는 기업으로는 Applied BioSystems, Bio-Rad, Takara, Roche, Corbett 등의 회사가 연구용 분석기를 생산하고 있다.

	Light Source	Detection Channel	Sample format	No. of samples	Sample Volume(μL)	Speed (50cycle, h)
Lightcycler (Roche)	LED(450-490nm)	3 Filters (530/640/710nm)	Capillary	32	20	<1
Smartcycler (Cepheid)	LED(450-490nm)	4 Filters (520/550/585/710nm)	Tubes	16-96	25-100	<1
Abi prism 7000 (Appl. Biosyst.)	Tungsten-Halogen	4 Filters (500-660nm)	96well	96	25-100	2-3
Abi prism 7700 (Appl. Biosyst.)	Argon laser(488nm)	500-660nm	96well	96	25-100	2-3
Abi prism 7900 (Appl. Biosyst.)	Argon laser(488nm)	500-660nm	96/384well	96/384	5-100	2-3
i-Cycler (Biorad)	Tungsten-Halogen	5 Filters (Flexible)	96well	96	25-100	2-3
MX-4000 (Stratagene)	Tungsten-Halogen	4 Filters (350-830nm)	96well	96	10-50	2-3

- (4) 최근 Roche와 같은 거대 제약업체에서 유전자 진단시장을 선점하기 위하여 실험실용 유전자 분석장비를 범용성 PCR 분석장치로 상용화를 시도하고 있으며, 그 외에도 전통적으로 실험실용 유전자 분석장비를 개발 및 보급하고 있는 Bio-Rad와 ABI, TaKaRa, Biomed 사 등이 기존 유전자 증폭용 분석장치의 고속화 모델을 개발하기 위해 연구를 진행하고 있는 중이다.

##### 나. 랩온어칩

- (1) 국내는 물론 선진 외국의 경우 임상 진단용칩에 랩온어칩 기술이 적용되어 상용화된 예는 없다.
- (2) 선진국의 경우 기술발전 속도가 다소 앞서 있기는 하지만 바이오, 전자, 화학, 물리 등의 다양한 분야의 융합기술인 랩온어칩 기반의 임상 진단기 개발까지는 아직 미치지 못하고 있는 실정이다.

(3) 최근, 단백질 표지인자들을 이용해 암을 포함하는 대표적 질환들에 대한 진단기기 개발을 시도하고 있으나 농식품 안전진단을 위한 개발 시도는 없다.

다. 시료전처리 자동화기술

- (1) 농식품의 시료전처리를 위한 자성입자의 이용은 분리능이나 감도향상을 목적으로 문헌을 통해 보고되고 있다. 식중독균 농축및 분리를 위한 자성입자는 Dynabeads® (Invitrogen) 사에서 판매하고 있고 있지만 시료전처리 자동화를 위한 시스템에 적용할 수 없으며 마이크로 수준의 크기로 인해서 균과의 흡착효율이 나노크기 입자에 비해 떨어진다. 흡착효율을 증가시키기 위해 자성 복합체나노입자 제작에 대한 많은 연구가 수행되고 있다 (Kauzlarich, 2006, Laibinis, 2003).
- (2) 시료전처리 자동화는 미국 Matrix사에서 개발한 Pathatrix는 식품에 포함된 식중독균을 농축 및 분리할 수 있는 장치이지만 공정법으로 수행한 방법과 비교하여 그 분리효율이 떨어지며, 미반응된 자성체와 균이 흡착된 자성체를 시료로부터 자동으로 분리하기 어려운 문제점을 가지고 있다.

라. 국외 연구수행 내용 및 활용 현황은 다음과 같다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
TaKaRa	식중독 유발 미생물 유전자 검출을 위한 PCR법 연구	식중독 유발 미생물 유전자 검출용 Rapid kit 상용화 <랩온어칩 형태가 아니며, 시료전처리 기술 미개발>
Roche	specific fluorescent probe를 사용한 real-time PCR법 연구	식품 위해 미생물 유전자 검출용 Rapid kit 상용화 <랩온어칩 형태가 아니며, 시료전처리 기술 미개발>
Roche	Hot start PCR을 기반으로 다중검출 kit 연구	LightCycler® Multiplex DNA Master HybProbe <생체물질/질병진단용>
Bayer	Branched DNA (bDNA) 기술을 이용한 유전자 진단기술 연구	Branched DNA (bDNA) 기술을 이용한 DNA 진단용 kit 상용화 <생체물질 대상>
QIAGEN	하나의 tube 에서 다중 증폭 가능한 Genotypeing 이나 DNA testing 기술	QIAGEN® Multiplex PCR Kit <생체물질 대상>
Invitrogen	인간배아줄기세포나 인간태생암세포의 분화 상태를 관찰할 수 있는 kit 연구	StemPro® EZChek™ Human Tri-Lineage Multiplex PCR Kit <질병진단용>
Seegene	서로 다른 12개의 호흡기질환 바이러스를 다중검출할 수 있는 kit 연구	Multiplex-PCR detection kit for 12 different respiratory viruses <호흡기계 바이러스 진단용>
Caliper Technologies	랩온어칩 기술을 이용한 LabChip 시스템 개발	DNA, RNA 및 단백질 LabChip kit 상용화 <생체물질 대상>
Affymetrix	병의 진단, 모니터링 및 치료의 개선에 관한 유전적 정보를 제공하는 유전자 진단용 GeneChip과 시스템을 연구 개발	DNA 탐침 어레이, 시약, 스캐너 및 기타장비, 소프트웨어로 구성된 GeneChip 시스템 상용화 <질병진단용>
Nanogen	99사이트 전기동력형 마이크로 병열 NanoChip 개발	NanoChip Molecular Biology Workstation, SNP 및 Short Tandem Repeats(STR)를 분석하는데 사용 <생체물질 대상>
Packard BioSciences	DNA 및 단백질을 포함한 생분자의 고밀도 어레이와 잉크젯 프린팅 기술 연구	Piezoelectric 바이오칩 마이크로어레이 및 Packard BioChip 제조 <생체물질 대상>

## 2. 국내수준

### 가. PCR장비의 국내 기술개발 현황

- (1) PCR 증폭이 가능한 이동형 분석장치 개발과 관련하여 국내에서는 유전자 증폭기능만 가능한 실험실용 분석기기로서 제품화가 이루어지고 있으며, 이와 관련한 기술수준은 현재 3-5개 기업에서 보유하고 있는 것으로 알려져 있다.
- (2) 그러나 이들 업체들은 실험실용 유전자 증폭 분석장치에 집중하여 기술개발이 이루어지고 있으며, 이동형이나 저전력화를 통한 소형화는 아직 진행되지 않고 있는 상황이다.

### 나. 랩온어칩의 국내 기술개발 현황

- (1) 랩온어칩 기반의 진단칩은 국내에서 아직 상용화되고 있지 않으며, 일부 대학 및 연구기관에서 연구개발 단계에 있다. 랩온어칩 관련 국내특허는 2000년 처음으로 1건이 보고된 이래, 2002-2003년 30여건, 2004-2005년 90여건이 출원되는 등 최근 들어 급격한 증가세를 이루고 있다. 그러나 대부분의 특허들이 아직은 미세구조 및 유체 제어구조 기술 (전체 특허의 60%) 쪽에 치중되어 있어서 종합적인 통합시스템 기술이 요구되는 바이오 진단칩 기술 개발에는 미치지 못하고 있는 실정이다.

### 다. 시료전처리 자동화기술

- (1) 자성 나노복합체에 대한 연구는 세계적 추세에 맞춰 많은 대학과 연구소에서 개발하고 있으나 식품 중 시료전처리에 대한 연구는 없으며 자성 면역분리에 대해 2006-2007년에 2건이 특허 출원되었다.
- (2) 미국의 Matrix사와 같이 구체적으로 식품시료 전처리를 위한 자동화 기술개발에 대해 보고된 바는 없으며 농식품 위생안전의 신속검출을 위해 조기 개발 및 표준화가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

라. 국내 연구수행 내용 및 활용 현황은 다음과 같다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
한국식품연구원	식품 위해 미생물 유전자 검출을 위한 PCR 또는 real-time PCR 연구 및 시료 전처리 기술 기초연구	기초연구결과를 실용화시키기 위해 국가연구개발사업에 응모
삼성에버랜드	식품 위해 미생물 유전자 검출을 위한 PCR 또는 real-time PCR 연구	식품 위해 미생물 유전자 검출용 Rapid kit 상용화 <랩온어칩 형태가 아니며, 시료전처리 기술 미개발>
코젠바이오텍	식품 위해 미생물 유전자 검출을 위한 PCR 또는 real-time PCR 연구	식품 위해 미생물 유전자 검출용 Rapid kit 상용화 <랩온어칩 형태가 아니며, 시료전처리 기술 미개발>

## 제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

1. McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology에서 비록 2003년 자료이나 현재의 식중독균 검출 기술의 발전과 방향을 잘 나타내 주고 있다. 이 자료에서 2003년을 기준으로 실현가능한 방법은 굵은 실선으로 표시하였으며 향후 접근해야 될 기술로써 점선으로 표시하였다.
2. 현재 식품에서 식중독균을 검출하기 위해서는 2번 이상의 배양과정을 거쳐 ELISA, 바이오센서, 도말법, PCR 등에 의해 검출하게 되며 Fig. 2에서 나타낸바와 같이 3일 이상의 시간이 소요되고 있음을 알 수 있다. 그 중 바이오센서나 ELISA를 이용하게 되면 24 시간 이내 가능하다. 하지만 신선편이 식품에 적용하기에는 어려움이 있다.

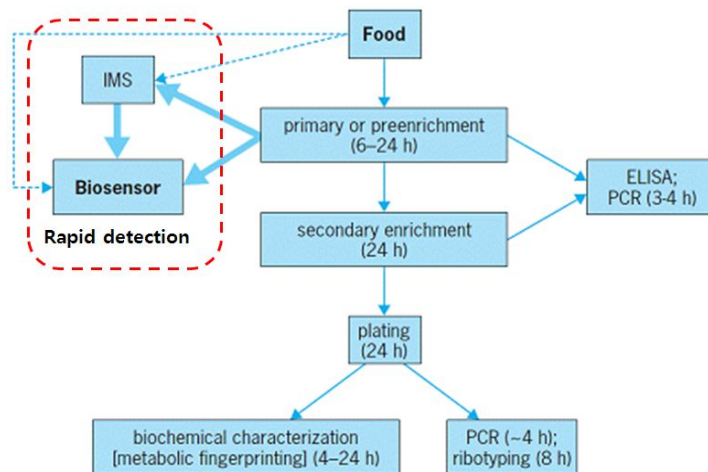


Fig 2. Flow diagram showing the steps in food-borne pathogen detection. A heavy arrow indicates a realistic step for biosensor application, and a dotted arrow is a desirable step. IMS = immunomagnetic separation; PCR = polymerase chain reaction; ELISA = enzymelinked immunosorbent assay.

3. 본 과제에서 개발한 기술은 다기능성 면역자성체를 이용한 시료전처리 (IMS)와 고속 real-time PCR을 이용한 바이오센서를 식품 중 식중독균 검출에 이용하고 전 과정을  $10^2$  cell/mL 수준으로 4시간 이내 가능한 시스템을 제작한 것으로, 식품의 식중독균 검출기술 중 신속검출 기술 발전에 기여하였다고 판단된다.
4. 국내외 유전자 분자진단 기술에 있어 시료전처리와 PCR은 상당히 중요한 부분을 차지한다. 2007년 Munoz에 의하면 과거 20년 동안 보고된 2500여 문헌을 분석한 결과 PCR과 바이오센서는 향후 지속적인 주요 연구부분으로 차지할 것이며 향후 바이오센서로서의 PCR 응용도 주 관심 분야로 전망된다 (Lazcka, 2007). 또한 2006년 Frost & Sullivan에서 조사한 미국 유전자 시장의 전략분석 보고서에 따르면 유전자 진단 기술의 분류를 크게 5가지로 하고 있으며 그 중 시료전처리와 PCR에 대해 자세히 분류하고 있을 정도로 관련 기술개발을 중요시 하고 있다 (Forst & Sullivan, 2006).



5. 현재 제품으로 개발되어 있는 PCR은 2009년을 기준으로 Table 3 (R.F. Louleg, 2009)에서 정리한 것과 같이 2시간에서 최소 30분 이내 까지 증폭 또는 검출할 수 있는 것으로 알려져 있으며 이를 기준으로 본 연구에서 개발한 기술은 RT-PCR 수준에서 비교한다면 유전자 증폭 속도면에서 현재 가장 빠른 것으로 알려진 Idaho Technologies 기술수준과 유사한 것으로 판단된다. 또한 시료전처리 기술까지 포함된다면 식품에서 검출까지 현재 알려진 RT-PCR 제품보다 속도 및 감도면에서 가장 우수한 것으로 판단된다.

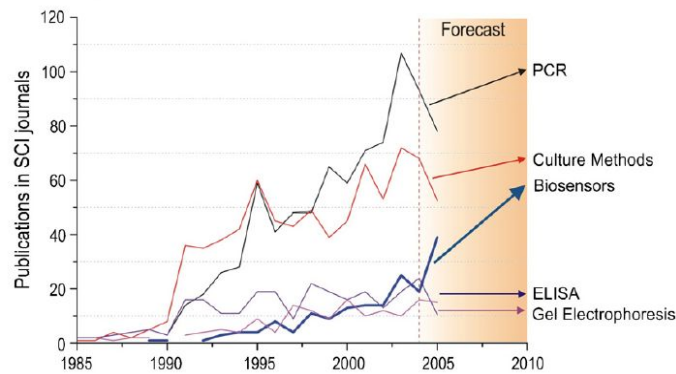


Fig 3. Time series of the number of works published on detection of pathogen bacteria over the last 20 years.

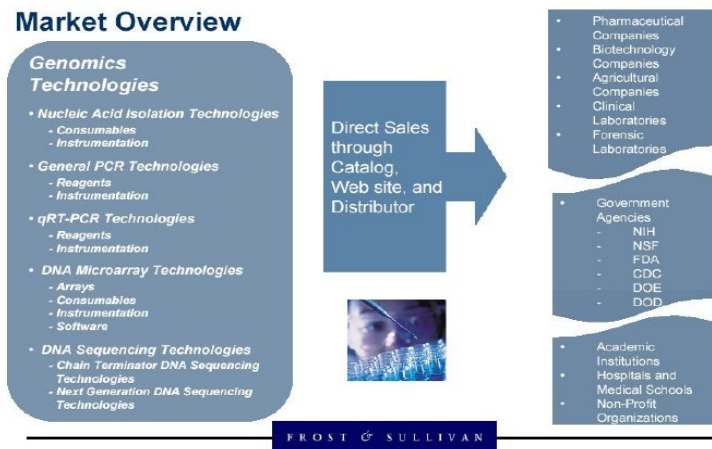


Fig 4. Strategic Analysis of U.S. Genomics Markets.

Table 3. Current commercially available PCR products

Detection Method	Instrument	Manufacturer	Analysis Time
LATE-PCR	Bio-Seq PLUS	Smiths Detection	< 40 min
PCR	Evocycler HD12	Evogen	< 30 min
	LightCycler 2.0	Roche Diagnostics	2.5 h
Real-time PCR	GeneXpert 3-Agent	Cepheid	35-45 min
Multiplex PCR	Autonomous Pathogen Detection system	Northrup Grumman	2 h
Rapid PCR	R.A.P.I.D System	Idaho Technologies	< 30 min
	RAZOR EX	Idaho Technologies	30 min

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 이론적, 실험적 접근방법

#### 1. 신선편이채소 중 주요 오염 식중독균 검출을 위한 PCR primer 제작

문헌검색을 통해 *S. aureus*는 16s rRNA, *coa* (coagulase), *can* (collagen adhesion), *nuc* (*S. aureus* specific gene)의 4개 유전자를 선택하였고, *L. monocytogenes*는 *iap* (invasion associated protein), *hly* (hemolysin), *inlA* (internalin), 16s rRNA 4개 유전자, *Salmonella enterica*에서는 *inv* (*Salmonella* specific invasion), *fliC* (flagella), 16s rRNA의 3개 유전자, *E. coli* O157:H7는 16s rRNA, *eae* (intimin), *fliC* (flagella), *rfb* (O157 specific gene)를 목표 유전자로 하여 유전자별 균 특이 프라이머 2-3종을 선택하였다.

#### 2. Real-time PCR에 의한 개별 식중독균별 분석조건 확립

균 특이 primer 선별하기 위해 검출감도에 근거하여 *S. aureus nuc* (Ct;12.38), *L. monocytogenes hly* (Ct;12.95), *Salmonella spp. inv* (Ct;11.9), *E. coli* O157:H7 *eae* (Ct;12.21) 유전자를 각 식중독균 특이 유전자로 선별하였다. Real-time PCR에 의한 분석조건 최적화를 위해 SYBR green법을 이용하여 95°C 5분 denature, 95°C 15초, 60°C 15초, 72°C 33초 40 cycle을 진행 후, melting curve를 얻기 위하여 95°C 10초, 60°C 30초를 수행 (3개의 replica를 3번 이상 반복)하여 분석조건을 최적화하였다.

#### 3. 유전자 검출용 랩온어칩의 설계 및 제작

연구개발 초기, 시드바이오칩(주)는 3D CAD 프로그램을 이용하여 상판, 하판 및 클립 3가지로 구성된 유전자 검출용 랩온어칩 설계를 하였으며 칩 설계시 주안점은 다중검출(3채널) 구조, 시료 볼륨(10 µL 이하), 채널 폭, 채널 깊이, 칩 규격 등 항목을 선정하여 칩을 설계하였다. 연구개발 초기 이후, 완성된 칩 설계 도면은 금형 및 사출 성형 업체에 제공하고, 도면을 토대로 유전자 검출용 랩온어칩 상판, 하판 및 클립에 대한 금형을 제작, 제작된 금형은 사출 성형 업체에 제공되어 COC (cyclo olefin copolymer)재료로 유전자 검출용 랩온어칩 상판, 하판 및 클립을 각각 제작하였다. 납품된 유전자 검출용 랩온어칩의 상판, 하판 및 클립은 시드바이오칩스(주)의 열 접합기 장비를 이용하여 상판 및 하판을 접합하고, 클립을 결합하여 유전자 증폭 및 검출이 가능한 유전자 검출용 랩온어칩 시제품을 제작하였다.

#### 4. 랩온어칩에서의 PCR증폭 성능 검증

연구개발 초기, 시드바이오칩스(주)는 랩온어칩 PCR 증폭 및 성능 검증을 위하여 온도블록, 광학, 소프트웨어, 외형디자인 등 시스템 구축에 필요한 요소 기술들을 확인 및 검토하였다. 연구 개발 초기 이후, 요소 기술들은 외부 업체를 통하여 각각 제작하여 납품 받았으며 납품된 요소 기술들을 조합 및 제어를 통하여 랩온어칩 구동을 위한 시스템을 완성하였다. 시스템 구축이후, 랩온어칩 유전자 증폭 검증을 위하여 시드바이오칩스(주)는 칩 오염도, PCR 시약조성 및 재현성의 검증 항목을 선정하였으며 DNase activity 안정성 검증을 통한 칩 오염도 분석, taq polymerase 별 및 농도별 검사를 이용한 최적화된 시약 조성 확립 및 재현성 테

스트를 통하여 랩온어칩에서 유전자 증폭 검증을 마무리하였다.

## 5. 다중 식중독균 검출을 위한 real-time PCR 조건 최적화

- 가. 다중 식중독균 검출용 프라이머 선택 및 특이성 검증 (SYBR green 95°C 15초, 60°C 15초, 72°C 30초 30 cycle, melting curve 분석; 95°C 10초, 60°C 30초 3 replica 3번 반복 분석 조건) : Oligo@V6.5 소프트웨어를 이용하여 프라이머 선정 후, 단일 real-time PCR 용해곡선 분석을 실시하였다. 2종이상의 균으로 다중 real-time PCR 용해곡선 분석 후,  $T_m$  값이 5도 이상 차이가 나도록 동시분석용 프라이머를 결정하였다. 각 프라이머를 *B. cereus*에 대한 real-time PCR 실시 후, 전기영동하여 균주 특이성 검증을 하였다.
- 나. 검출감도 조사 : 4종의 식중독균을 10배씩 단계별로  $10^5$  에서 1 cfu/mL 세포수가 되도록 희석한 후, DNA 추출하여 real-time PCR을 수행하였다. 최소역가(threshold) 선을 통과하는 cycle 값인 Ct 값을 기준으로 검출한계를 결정하였다.
- 다. 식품 matrix 효과 조사 : 4종의 식중독균을 10배씩 단계별로 희석하여 펩톤 수 225 mL가 들어있는 멸균배에 분주한 후 양상추 25 g을 채취하여 균질기로 30초 균질화하였다. 1 mL는 DNA 추출 후, real-time PCR을 수행하였고, 1 mL는 세포수 결정을 위해 고체배지에 도말 후 배양하여 세포수를 결정하였다. 다중 real-time PCR 검출을 위해 동일한 방법으로 수행한 후 real-time PCR시 용해곡선 분석을 하였다.
- 라. 기존 검출법과의 비교 : Applied Biosystems 7500 system과 본 과제에서 개발한 랩온어칩 시스템 NBS-100을 동일조건에서 4종 식중독균의 DNA 샘플로 비교하였다.

## 6. 나노자성-면역 분리 기반 시료전처리 기술 확립

### 가. 나노자성입자의 제조

- (1)  $Fe_3O_4$  자성나노입자의 제작: 3-neck round flask (500mL)에 0.5 M의 NaOH 250 mL를 채운 후 0.1 M  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ , 0.2 M  $Fe_3Cl_6 \cdot 4H_2O$ , 0.4 M HCl 25 mL 수용액을 제작한 후 주입하고 mechanical stirrer를 이용하여 1500 rpm의 속도로 교반하며 용액의 온도는 80°C로 30분간 유지하였다. 자연 냉각 후 영구자석을 이용하여 상층액을 제거하고 pH 2 정도의 HCl 수용액을 이용하여 중화시킨 후 증류수, 에탄올을 사용하여 세척한 후 100 mL 증류수에 분산시켜 상온 보관하였다. 입자의 특성평가는 투과전자현미경 (FE-TEM, Tecani G2 F30 S-Twin), 주사전자현미경 (FE-SEM, LEO SUPRA 55, Carl Zeiss NTS G mgH)을 사용하였으며 TEM 시료는 copper 또는 nickel grid를 사용하여 필요에 따라 phosphotungstic acid를 사용하여 negative staining 처리하였으며 SEM 시료는 Si wafer 상에 고정시켜 확인하였다. XRD 스펙트럼은 30 KV와 30 mA에서 Cu-K $\alpha$  radiation (= 1.54056 Å)를 사용한 Shimadzu XD X-ray diffractometer를 이용하여 측정하였으며 입자의 흡착에 따른 흡광도 변화의 확인은 Vis. spectrometer (USB2000 fiber optic spectrometer, Oceanoptics)를 사용하여 측정하였다.
- (2) 자성-금 입자 제작 : 상기 제작한 자성나노입자를 사용하여 0.5 mM Mag 8 mL를 원심분리 후 에탄올 용액 10 mL에 분산시키고 1 M APTMS와 24시간 반응시켰다. 원심분리 후 에탄올로 5회 세척하고 50 mL 증류수에 분산시켰다. 2 mM gold (III) chloride ( $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ , 99.9%, Aldrich)를 70 mL 증류수에 녹인 후 50 mL 증류수에 분산된 자성입자와 혼합 후 환류 교반시켜 1% sodium citrate (99%, Aldrich) 33 mL를 첨가한 후 2시간 반응시

켰다. 냉각 후 자석을 이용하여 자성 입자만을 포집하면서 증류수로 세척하고 10 mL 증류수에 분산시켜 냉장보관하였다.

나. 식중독균 특이 항체-나노자성입자 중합체 제조

(1) 제작한 Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자를 이용하여 시료전처리를 위한 항체 고정화는 Fig. 5와 같은 방법으로 진행되었다. 0.5 nM Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10 mL 수용액은 자석을 사용하여 에탄올 10 mL로 분산시키고 1.0 mM MHDA (16-Mercaptohexadecanoic acid, 99%, Aldrich)를 첨가하여 2시간 반응시켰다. 자석을 이용하여 세척하고 최종 10 mL 수용액에 분산시켰다. 0.4 M EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, 97%, Aldrich)와 0.1 M NHS (N-Hydroxysuccinimide, 98%, Aldrich)를 나노입자 용액에 첨가 한 후 2분 동안 반응시키고 자석을 이용하여 신속히 세척하여 5 mL PBS (pH 7.4) 완충용액에 재분산 시켰다. Protein G (Pro.G) 0.5 mg을 첨가한 후 4시간 반응시키고 자석을 이용하여 세척한 후 1 mL PBS에 분산시킴. 10 µg/mL 농도의 antibody를 첨가한 후 2시간 반응시킨 후 자석을 이용하여 세척하고 30 mg/mL BSA 5 mL를 제작 한 후 antibody가 결합된 자성입자와 1시간 반응시켰다. 자석을 이용하여 세척 한 후 PBS 30 mL에 분산시켜 냉장보관하였다. 입자의 흡착에 따른 흡광도 변화의 확인은 Vis. spectrometer (USB2000 fiber optic spectrometer, Oceanoptics)를 사용하여 측정하였다.

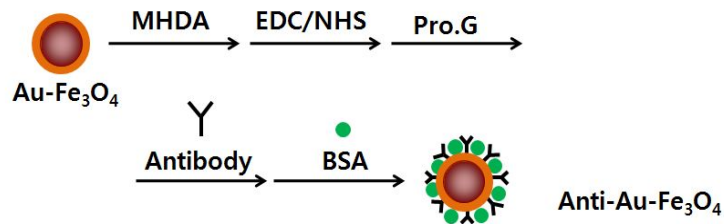


Fig. 5. Schematic diagram for immobilizing antibodies on Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles.

(2) 자성입자를 이용한 시료 중 특정 미생물을 분리/농축하기 위하여 자성입자 표면상에 표적 항체를 고정시켜야 한다. 미생물로서 *E. coli* O157:H7을 표적으로 하였으며 그 항체 (antibody *E. coli* 157:H7, Bac Trace, Kerkegaard & Perry Laboratories Inc.)를 고정시키기 위해 자성입자 표면을 개활하였다. 제작한 수용액 중에 분산된 0.5 mM 자성입자 10 mL를 원심분리기를 이용하여 에탄올 10 mL에 재 분산시킨 후, 1 mL APTMS (3-Aminopropyltrimethoxysilane, 97%, Aldrich)를 첨가하여 2시간 반응시켰다. 반응 후 에탄올로 5회 세척한 후 10 mL에 분산시켰다. 0.1 M G.A (Glutaric anhydride, 95%, Aldrich)를 자성입자 에탄올 용액에 첨가 한 후 2시간 반응시켜 말단 -COOH를 형성시켰다. 반응 후 에탄올로 5회 세척, 수용액으로 3회 세척 후 수용액 8 mL에 분산시켰다. 0.4 M EDC와 0.1 M NHS를 혼합한 2 mL 수용액을 제작한 후 8 mL 자성입자 수용액에 첨가하여 5분간 반응시켜 자석으로 세척하고, 세척 후 5 mL PBS (pH 7.4) 버퍼에 분산시켰다. *E. coli* 157:H7의 항체의 배향특성을 고려하기 위하여 Protein G (Pro.G, Sigma)를 0.5 mg 첨가한 후 4시간 반응시켜 자석을 이용하여 세척 후 1 mL PBS에 분산시킴. 10 µg/mL 농도의 antibody를 첨가하여 2시간 반응시킨 후 자석을 이용하여 세척하고 30 mg/mL BSA (98%, Sigma-Aldrich) 5 mL를 antibody가 결합된 자성입자와 1시간 반응시켰다. 자석을

이용하여 세척 한 후 PBS 10 mL에 분산시켜 냉장보관하였다 (Fig. 6). 입자의 특성평가는 투과전자현미경 (FE-TEM, Tecani G2 F30 S-Twin), 주사전자현미경 (FE-SEM, LEO SUPRA 55, Carl Zeiss NTS G mgH)을 사용하였고 TEM 시료는 copper 또는 nickel grid를 사용하였으며, SEM 시료는 Si wafer 상에 고정시켜 확인하였다. 입자의 흡착에 따른 흡광도 변화의 확인은 Vis. spectrometer (USB2000 fiber optic spectrometer, Oceanoptics)를 사용하여 측정하였다.

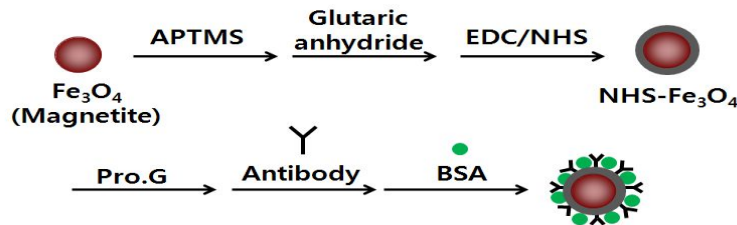


Fig. 6. Schematic diagram for immobilizing antibodies on the nanomagnetic particles.

다. 최적 특이항체-나노자성 입자 중합체 선별 및 특성평가

제조한 자성-금 나노입자를 1 mM MHDA가 용해된 에탄올과 12시간 반응시킨 다음, 영구자석을 이용하여 MHDA가 고정된 자성-금 나노입자를 분리 및 정제하고, 0.4 M EDC와 0.1 M NHS의 용액에서 1분 동안 반응시켰다. *E. coli* O157:H7 항체 10 µg/mL가 용해된 PBS (pH 7.4) 용액에서 2시간 동안 반응시켜 자성-금 나노입자 표면에 항체를 고정화시켰다. 비특이적 반응을 제거하기 위해 0.1 M ethanolamine과 30분 동안 반응시킨 후 영구자석을 이용하여 정제한 다음, *E. coli* O157:H7이 포함된 PBS 완충용액에 항체가 고정된 자성-금 나노입자를 첨가하여 1시간 반응시킨 후 영구자석을 이용하여 분리하였다. 이상의 항체 고정화 조건을 확인하기 위하여 항체를 고정화시키는 표면과 동일한 재질의 SPR bare Au 칩을 이용, 각 단계별 반응조건을 결정하는데 사용하였다. Fig. 7는 Au 칩상에 MHDA, EDC/NHS, 항체, ethanolamine, *E. coli* O157:H7을 각각 반응시켰을 때 나타나는 공명각 변화를 시간에 따라 도시하였으며 자성-금 나노입자에 항체 고정화 조건으로 사용하였다. 제작한 Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자는 XRD, SEM, TEM 및 UV-vis. spectrum을 통해 특성평가를 하였다.

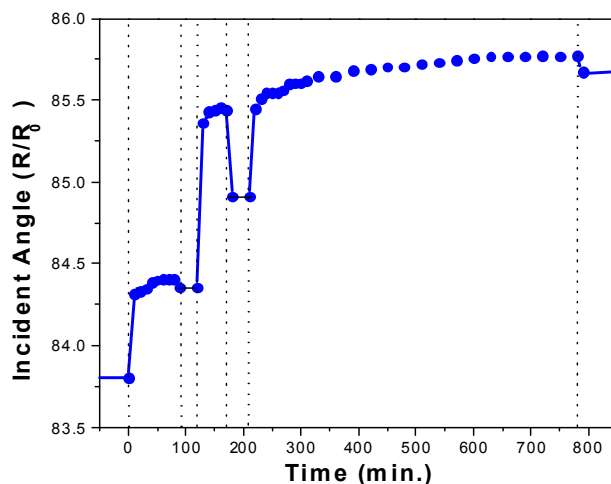


Fig. 7. Resonance angle shifts of SPR at each reaction step.

#### 라. 모델 식품검체로부터 균 특이 분리 최적 조건 조사

식품 중 *E. coli* O157:H7의 분리/농축과 동시에 screening 수준의 검출가능성을 확인하기 위하여 *E. coli* O157:H7 농도에 따른 자성-금 나노입자에 의한 광 흡수 변화를 조사하였다. 식품의 모델로써 250 mL PBS 완충용액에 각 농도별 *E. coli* O157:H7 ( $10$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  cell/mL)을 오염시켜 사용하였으며 400  $\mu$ L의 자성-금 나노입자를 식품 모델에 첨가하고 30분간 방치한 후 필터와 자석으로 나노입자를 포집하였다. 포집된 나노입자는 5분정도 sonication을 이용하여 분산시킨 후 스펙트럼을 측정하였다. 특정 미생물에 대한 시료전처리 특성을 조사하기 위해 사용된 각각의 Anti-Au- $Fe_3O_4$  나노입자 제작은 상기 입자 제작과 표면고정화 프로토콜에 따라 진행되었으며 사용된 항체는 리스테리아는 ABCAM사, 살모넬라는 KPL사, 황색포도상구균은 Chemicon사에서 각각 구입하여 회사 별 stock solution 제조법에 따라 제조 후 사용하였다. 각각의 실험은 앞서 제작한 시료전처리 프로토콜에 따라 모델 식품시료를 제작한 후 미생물을 오염시켜 실험하였으며 각 3회 반복하였다. 입자의 흡착특성은 투과전자현미경 (FE-TEM, Tecani G2 F30 S-Twin)을 사용하였으며 copper 또는 nickel grid를 사용하여 필요에 따라 phosphotungstic acid를 사용하여 negative staining 처리하였다. 입자의 흡착에 따른 흡광도 변화의 확인은 Vis. spectrometer (USB2000 fiber optic spectrometer, Oceanoptics)를 사용하였다.

#### 7. 다중검출용 랩온어칩의 설계 및 제작

연구개발 초기, 나노바이오시스(주)는 3D 상용프로그램을 이용하여 상판, 중간판 및 하판 3가지로 구성된 다중검출용 랩온어칩을 설계하였으며 칩 설계시 주안점은 다중검출(3채널) 구조, 시료 볼륨 (10  $\mu$ L)이하, 채널 폭, 채널 깊이, 칩 규격 등 항목을 선정하여 칩 설계를 하였다. 연구개발 초기 이후, 완성된 칩 설계도면은 일반 및 사출 금형, 기계가공업체 및 사출 성형 업체에 제공, 도면을 토대로 유전자 검출용 랩온어칩 상판, 중간판 및 하판을 각각 제작하였다. 제작된 다중검출용 랩온어칩의 상판, 중간판 및 하판은 나노바이오시스(주)의 열 접합장비를 이용하여 상판, 중간판 및 하판을 접합하여 유전자 증폭 및 검출이 가능한 다중검출용 랩온어칩을 제작하였다. 다중검출용 유전자 증폭 성능평가는 온도블록의 FAN을 이용한 열방출 효과로 온도블록의 균일한 표면 (9포인트)온도 분포 검증, 온도제어, 기포 및 누수, 시약을 이용한 PCR 효율 검증을 타사 및 자사 장비를 이용하여 비교 실험하여 검증하였다.

#### 8. 다중검출용 광학계 시스템 구축

연구개발 초기, 나노바이오시스(주)는 SYBR green 광원에 맞는 파장 및 필터를 선정 및 주문하고, LED 광원에서 Photo-diode 광 검출기까지 광 경로 분석 및 점검, 외부업체에 의해 다중검출용 광학계를 제작하였다. 제작된 다중검출용 광학계는 DNA 농도별/식중독 균(1종)을 다중검출용 랩온어칩에 주입하여 자사 및 타사 장비를 이용하여 농도에 따른 형광값 측정 및 비교 검증 하여 성능 평가하였다.

#### 9. 나노자성-면역 분리기반 시료 전처리 기술을 이용한 식중독균 농축 및 전처리

신선편이채소를 대상으로 표준균주 1개의 콜로니를 TSB 10 mL에 접종하여 37°C에서 24시간동안 배양한 후 이를 시험 균액으로 하였다. 배양된 각 균은  $10$ - $10^6$  cfu/mL 까지 10배씩 단계별로 희석하여 동일 희석배율에 해당하는 4종의 식중독균을 동량으로 혼합하여 25 g의 신선

채소에 접종하고 1시간동안 방치한 후, 단계별 실험에 사용함으로써 균 특이 분리능을 조사하였다. 모든 시료는 clean bench에서 무균적으로 처리되었으며, 모든 시료를 다룰 때에는 멸균한 시약스푼, 가위, 칼 등을 이용하였다. KFDA의 식품공전법에 근거한 시료전처리 방법은 멸균백에 검체 25 g 또는 25 mL취하여 225 mL의 펩톤수를 넣고 1분간 스토마커한 후, 증균 또는 적정량 희석하여 고체배지에 도말하고 24시간 배양 후 분리배양을 수행하여 세포수를 결정하였다. *E. coli* O157:H7을 분리하기 위해서는 전처리 끝난 시료가 들어있는 멸균백에서 1 mL를 채취하여 EMB 고체배지에 접종하고 35°C에서 24시간 배양한 후, 녹색의 금속성 광택을 갖는 콜로니만을 선택한다. 확인시험은 TSA에 계대하여 24시간 배양하여 그람음성간균임을 확인한 후, API kit 등으로 결정한다. *Salmonella* spp. 의 분리는 증균배양액을 XLD 고체배지에 접종하여 35°C에서 24시간 배양 후, 검정색 콜로니를 의심나는 집락으로 선택하여 TSYE에 접종 후, 30°C에서 24-48 시간 배양하여 그람음성, urase 음성, lysine decarboxylase 양성인 콜로니에 대해 API kit 등을 사용하여 확인 결정한다. *L. monocytogenes*는 증균배양후, Oxford 고체배지에 접종하여 30°C에서 24-48 시간 배양하여 배지를 검게 만들고 투명한 콜로니를 선택하여 TSYE에 접종 후, 30°C에서 24-48 시간 배양하여 그람양성, β-hemolysis를 나타내고 motility양성, catalase 양성, mannitol 비분해, rhamnose 분해, xylose 비분해 등의 확인시험으로 결정한다. *S. aureus* 는 1 mL의 시료액을 egg yolk tellurite가 함유된 baird-parker 고체배지에 도말하여 35°C에서 45-48시간 배양 후, 투명한 띠로 둘러싸인 광택이 있는 볼록한 검은색 콜로니를 선택하여 BHI에 계대하여 배양 후, coagulase test 등을 거치고 API kit 등으로 판정한다.

#### 10. 시료 전처리 기술이 적용된 랩온어칩 검출 시스템 특성 평가 및 검증

Real-time PCR을 위한 주형으로 사용된 모든 식중독균의 염색체 DNA는 시료 전처리가 끝난 멸균백으로 부터 1 또는 2 mL를 채취하여 Qiagen의 Tissue/blood genomic DNA extraction kit를 사용하여 분리하고 세포수에 따라 적정량의 멸균 증류수로 일정농도로 추출하여 사용하였다. ABI7500을 이용한 real-time PCR 분석조건은 형광염료로 Toyobo의 SYBR green을 사용하였고, 95°C 5분 denature 후, 95°C 15초, 62°C 15초, 72°C 30초 30 cycle을 진행하였고, melting curve를 얻기 위하여 95°C 10초, 60°C 30초를 추가로 수행하였다. 자동 설정된 최소 역가에 따라 각 곡선별 C<sub>T</sub> (Threshold Cycle)가 산출되었다. 랩온어 칩 시스템 NBS-100에서 real-time PCR 분석을 위해서는 본 실험팀에서 시스템 특이적으로 제조한 SYBR green master mix를 사용하였고 분석조건은 95°C 2분 denature 후, 95°C 10초, 72°C 10초 30 cycle을 수행하여 각 증폭곡선별 C<sub>T</sub> 값을 산출하였다. 모든 실험은 3개의 replica를 가지고 3번 이상 반복하여 수행되었다. 공동연구기관에서 개발한 다중랩온어칩 검출기를 이용하여 신선편이채소를 대상으로 리스테리아, 살모넬라, 황색포도상구균 및 *E. coli* O157:H7의 검출감도 및 검출 특이성을 조사하고 기존 공정법과 비교하여 성능을 평가하였다.

#### 11. 시료전처리용 하드웨어 시스템 구축과 시스템 특성 평가 및 검증

연구 초기, 나노바이오시스(주)는 식품공전의 검체 기준과 주관기관의 나노자성-면역 기반 기술을 이용하여 시료전처리 프로토콜을 확립하였다. 시료전처리 프로토콜의 장치 내부/외부 공정을 분리 확립하여 공정별 단위 부품 주문 (시료주입부 러버, lysis 모듈, membrane filter, 3 way 등) 및 시료전처리용 하드웨어 시스템을 설계하였다. 또한 설계 도면은 외부 업체에 제

공하고 장치를 공급받아 제작하고, 제작된 시료전처리용 하드웨어 시스템은 모델식품으로부터 3시간 이내 식품 오염균 분리 추출 실험을 수행하여 성능 평가하였다.

## 12. 식중독균 검출용 다중검출 랩온어칩 시스템의 시제품 제작

연구 개발 초기, 나노바이오시스(주)는 2차년도 칩 구조를 바탕으로 최적화 설계를 위하여 PCR 증폭 및 측정 영역, 칩 양산성 및 성능 안정성을 주안점으로하여 칩을 설계 및 제작하였다. 또한, 다중검출용 랩온어칩 시스템의 3 step에서 2 step 온도조건 제어를 최적화하는 연구 개발을 수행하여 랩온어칩 검출용 시스템 시제품을 제작하였다. 모델식품에서 시료전처리 하드웨어 시스템과 다중검출용 랩온어칩 시스템을 이용하여 4시간 이내 식중독균 다중 검출 재현성을 확인하였다.

## 제 2 절 연구내용

### 1. 신선편이채소 중 주요 오염 식중독균 검출을 위한 PCR primer 제작

가. 그람양성균 (*S. aureus*)

나. 그람음성균 (*L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7)

### 2. Real-time PCR에 의한 개별 식중독균별 분석조건 확립

가. 균 특이 primer 선별

나. Real-time PCR에 의한 분석조건 최적화

### 3. 유전자 검출용 랩온어칩의 설계 및 제작

가. 3D CAD를 이용한 칩 설계

나. 칩제작용 코어금형 제작

다. 랩온어칩의 성형사출

라. PCR 증폭/검출용 칩 시제품 제작

### 4. 랩온어칩에서의 PCR증폭 성능 검증

가. PCR 칩 구동을 위한 시스템 구축

나. 랩온어칩에서 유전자 증폭 검증

### 5. 다중 식중독균 검출을 위한 real-time PCR 조건 최적화

가. Primer의 다중증폭 검증

나. 다른 균주를 이용한 균 특이도 검증

다. 검출감도 조사

라. 식품 matrix 효과 조사

마. 기존 검출법과의 비교

### 6. 나노자성-면역 분리 기반 시료전처리 기술 확립

가. 나노자성입자의 제조

나. 식중독균 특이 항체-나노자성입자 중합체 제조



다. 최적 특이항체-나노자성 입자 중합체 제조 선별 및 특성 평가  
라. 모델 식품 검체로부터 균 특이 분리 최적 조건 조사

7. 다중검출용 랩온어칩의 설계 및 제작

- 가. 3D CAD 이용 칩 설계
- 나. PCR 증폭/계측부위 설계
- 다. 칩제작용 코어금형 제작
- 라. 랩온어칩의 성형사출
- 마. PCR 증폭/검출용 칩 시제품 제작

8. 다중검출용 광학계 시스템 구축

- 가. 다중검출용 형광광학계 설계 및 제작
- 나. 형광광학계의 성능 평가
- 다. 검출용 probe의 형광특성 평가

9. 나노자성-면역 분리기반 시료 전처리 기술을 이용한 식중독균 농축 및 전처리

- 가. 신선편이채소 대상 균 특이 분리능 조사
- 나. 기존 시료전처리법과의 비교

10. 시료 전처리 기술이 적용된 랩온어칩 검출 시스템 특성 평가 및 검증

- 가. 신선편이채소 대상 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 검출 감도 조사
- 나. 검출 특이성 조사
- 다. 공전법과의 비교
- 라. 모델시료를 이용한 식중독균 검출 재현성 확인

11. 시료전처리를 하드웨어 시스템 구축과 시스템 특성 평가 및 검증

- 가. 시료전처리 프로토콜 개발
- 나. 시료전처리를 하드웨어 시스템 구축
- 다. 모델식품 대상 하드웨어 시스템 성능 검증

12. 식중독균 검출용 다중검출 랩온어칩 시스템의 시제품 제작

- 가. 랩온어칩 구조 최적화 및 시제품 제작
- 나. 랩온어칩 검출용 시스템의 시제품 제작
- 다. 식중독균 다중검출 재현성 확인

### 제 3 절 연구결과

#### 1. 신선편이채소류 식품의 주 오염 식중독균 검출을 위한 Primer 제작

신선편이채소류 식품의 주 오염 식중독균의 검출을 위해 여러 가지 문헌 DB (Pubmed, Sciencedirect 등)를 이용하여 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* Typhimurium, *E. coli* O157:H7을 대상으로 PCR용 primer들을 검색하였다. 목적하는 각 식중독 세균별로 *E. coli* O157:H7는 99 set, *L. monocytogenes*는 61 set, *Salmonella enterica* Typhimurium은 72 set, *S. aureus*는 54 set의 primer set을 검색 조사하였다. 문헌 조사를 통해 *S. aureus* 에서는 16s rRNA와 *coa* (coagulase), *can* (collagen adhesion), *nuc* (*S. aureus* specific gene)의 4개 유전자, *L. monocytogenes*는 *iap* (invasion associated protein), *hly* (hemolysin), *inlA* (internalin), 16s rRNA 4개 유전자, *Salmonella enterica* 에서는 *inv* (*Salmonella* specific invasion), *fliC* (flagella), 16s rRNA의 3개 유전자, *E. coli* O157:H7에서는 16s rRNA, *eae* (intimin), *fliC* (flagella), *rfb* (O157 specific gene)의 유전자 4종을 목표 유전자로 결정하였고 각 목표 유전자별 균 특이 프라이머 2-3종을 선택하였다 (Table 4).

Table 4. Major primers for detection of target food-borne bacteria

Target gene in food pathogens	Sequence(5'-3')	Product(bp)	Reference
<b><i>E. coli</i> O157:H7</b>			
<i>eae</i> gene	GTAAGTTACACTATAAAAAGCACCGTCG TCTGTGGATGGTAATAAATTTTGTG	106	Spano et al.
	ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG GCCTTCATCATTTTCGCTTTC	248	Tarr and Whittam
	CACAGCTTACAATTGATAACA CTCACTATAAGTCATACGACT	311	Blanco et al.
<i>rfb</i> gene	TGAAGGTGGAATGGTTGTCA AGCAGCGCAGATATTTGTCA	142	Yu et al.
	TTTCACACTTATTGGATGGTCTCA TGAGTTTATCTGCAAGGTGATTCC	346	Desmarchelier et al.
	CTACAGGTGAAGGTGGAATGG ATTCTCTCTTTCTCTGCGG	327	Wang et al.
<i>fliC</i> gene	CCACGACAGGTCTTTATGATCTGA CAACTGTGACTTTATCGCCATTCC	96	Perelle et al.
	TACCATCGAAAAGCAACTCC GTCGGCAACGTTAGTGATAACC	247	Paton et al.
	TGTCATTGCAACCAGATTTA GTCGGCAACGTTAGTGATAACC	269	Medellin et al.
16s rRNA	CATTGACGTTACCCGCAGAA CGCTTTACGCCAGTAATTCC	100	Spano et al.
	CCCCCTGGACGAAGACTGAC ACCGCTGGCAACAAAGGATA	401	Wang et al.
	CGACCCCTCTTGAACATATATCTC GCTCTGGATGCATCTCTGGT	397	Wadsworth Center
<b><i>L. monocytogenes</i></b>			
<i>iap</i> gene	ACAAGCTGCACCTGTTGCAG TGACAGCGTGTGTAGTAGCA	131	Furrer et al.
	AATCTGTTAGCGCAACTTGGTTAA CACCTTTGATGGACGTAATAACTGTT	349	Rodriguez-Lazaro et al
	AGGTTCTTCCAACAATAACAGC ATTTAACGCCATTGTCTTGC	330	Koo and Jaykus
<i>hly</i> gene	TGCAAGTCCTAAGACGCCA CACTGCATCTCCGTGGTATACTAA	113	Nogva et al.
	GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	456	Paziak-Domanska et al.

	CCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAA TAGTTCTACATCACCTGAGACAGA	858	Norton et al.
<i>inlA</i> gene	ACTATCTAGTAACACGATTAGTGA CAAAATTTGTTAAAAATCCCAAGTGG	250	Ingianni et al.
	AATCTAGCACCACCTGTCCGGG TTCTGCAAAAAGCATCATCTG	457	Werbrouck et al.
	GAACCAGCTAAGCCIGTAAAAG CGCCIGTTTGGGCATCA	312	Coillie et al.
16s rRNA	GGCTAATACCGAATGATGAA AAGCAGTTACTCTTATCCT	287	Isonhood et al.
	AGTAACACGTGGGYAACCTG CAGCAGCCGCGGTAATAC	365	Werbrouck et al.
	CTTCCGCAATGGACGAAAGT ACGATCCGAAAACCTTCTTCATAC	468	Coillie et al.
<b><i>S. aureus</i></b>			
coagulase	CCGCTTCAACTTCAGCCTAC TTAGGTGCTACAGGGGCAAT	204	Cremonesi et al.
	ACCACAAGGTACTGAATCAACG TGCTTTCGATTGTTTCGATGC	986	Aarestrup et al.
	TGCTGGTACAGGTATCCGTGAAT AGAAGCACATAGAATGCATGA	468	Shopsin et al.
<i>nuc</i> gene	GATTGATGGTGATACGGT CAAGCCTTGACGAACTA	274	Costa et al.
	GCGATTGATGGTGATACGGTT AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	279	Zhang et al.
	GCGATTGATGGTGATACGGT AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	447	Brakstad et al.
collagen adhesin	AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA AGTGCCTTCCCAAACCTTTT	192	Montanaro
	AGTGGTTACTAATACTG CAGGATAGATTGGTTTA	568	Projan et al.
	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	423	Tristan et al.
16s rRNA	CAGCTCGTGTCTGAGATGT AATCATTGTCCACCTTCG	420	Strommenger et al.
	AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA CCACCTTCCTCCGGTTTGTCAAC	756	Zhang et al.
	ACGGTCTTGCTGTCACTTATA TACACATATGTTCTTCCCTAATAA	257	Masuda et al.
<b><i>Salmonella enterica</i> Typhimurium</b>			
<i>inv</i> gene	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284	Arnold et al.
	GCTGCGCGGAACGGCGAAG TCCCGGCAGAGTTTCCATT	389	Manzano et al.
<i>fliC</i> gene	ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT GATGCTGTGCCGGTAACACC	146	van Hoek et al.
	ATAGCCATCTTTACCAGTTCCCCC GCTGCAACTGTTACAGGATATGCC	183	Lim et al.
	CGGCGTGAAAGTCTTGCGG GAATCTTCGATACGGCTACG	388	Touron et al.
16s rRNA	AGTTTGATCATGGCTCAG TTACCGCGGCTGGCA	350	Kotetishvili et al.
	GTTTTCTTCGGTATCCTATTCCG GATGCATCTCTGGTCAATTGTATTAC	484	Masuda et al.

## 2. Real-time PCR에 의한 개별 식중독균별 분석조건 확립

### 가. 균 특이 Primer 선별

4종 식중독균에 대한 각 목표 유전자별 primer는 앞서 선택된 균 특이 primer를 대상으로 식중독균 추적에 위한 국제적인 정보공유가 가능한 검출용 primer를 중심으로 PCR 수행결과를 참고하여 결정하였다 (Fig. 8). 초기 DNA 양이 많을수록 증폭 산물량은 빠르게 검출 가능한 양에 다다르게 되므로, 증폭 곡선이 가파르게 상승한다. 따라서, 단계적으로 희석한 standard sample을 이용해 real-time PCR을 실시하면, 초기 DNA 양에 비례하는 증폭 곡선을 얻을 수 있다. 여기서, 적당한 곳에 반응을 일으키는 최소의 역가 (Threshold)를 설정하면, 반응을 일으키는 최소의 역가와 증폭 곡선이 만나는 점인 Ct값 (Threshold Cycle)이 산출된다. Ct값과 초기의 주형량 사이에는 직선 관계가 있어 standard curve를 작성할 수 있으며 미지의 샘플에 대해서도 standard sample과 같게 Ct값을 산출하여 여기에 적용시키면 초기 주형량을 구할 수 있다.

결정된 primer를 사용하여 4종의 식중독균을 대상으로 각 유전자의 민감도 (sensitivity)를 확인하기 위해 real-time PCR을 수행한 결과 *S. aureus*는 *nuc* 유전자가 12.38로 Ct 값이 가장 낮았고, *coa* 15.19, *cna* 15.43, 16s rRNA 14.92로 확인되었다 (Fig. 9). *L. monocytogenes*는 *hly* 유전자가 12.95로 Ct 값이 가장 낮았고, *iap* 14.94, *inlA* 15.16, 16s rRNA 15.23이었다. *Salmonella* spp.는 *inv* 11.9, *fliC* 12.98, 16s rRNA 13.94이었으며, *E. coli* O157:H7 최저 Ct 값은 *eae*로 12.21이었으며, *fliC* 14.64, *rfb* 13.14, 16s rRNA 13.91로 확인되었으며, *nuc*, *hly*, *inv*, *eae* 등이 각 식중독균의 특이 유전자로서 신선편이 채소류 식품에 오염된 식중독균 검출을 위한 주 목표 유전자 primer로 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 이 외에 제작된 식중독균별 각 유전자별 프라이머를 사용한 real-time PCR 결과에 따르면 모두 우수한 민감도 (sensitivity)를 보이는 것으로 나타나 같이 사용하기에 적절할 것으로 생각된다.

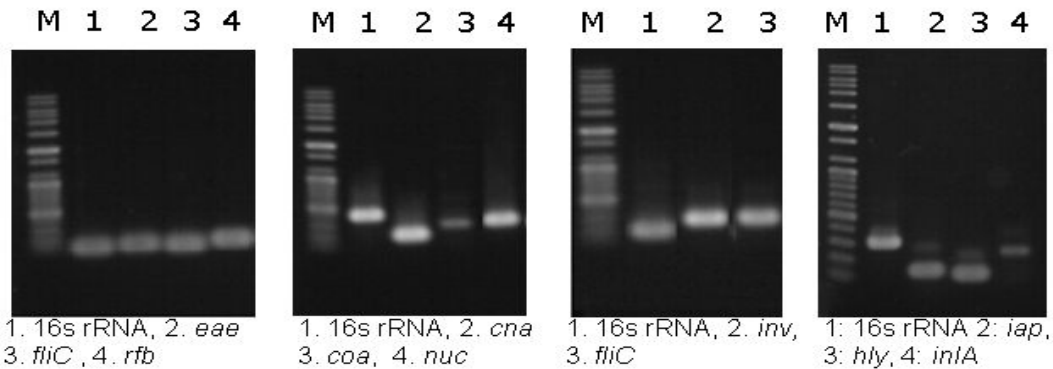


Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified DNA from the target gene of food-borne bacteria. A; *E. coli* O157:H7, B; *S. aureus*, C; *Salmonella enterica* Typhimurium D; *L. monocytogenes*.

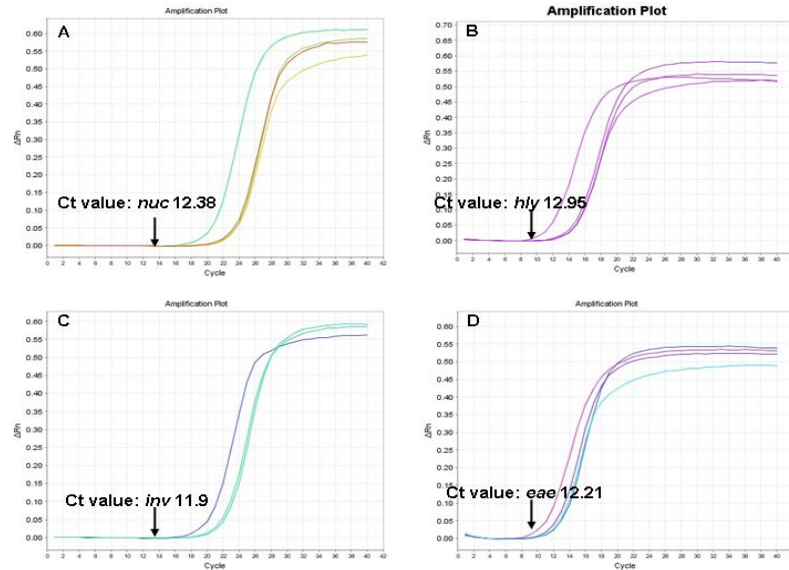


Fig. 9. Sensitivities of target genes from food-borne bacteria by real-time PCR. A; *S. aureus*, B; *L. monocytogenes*, C; *Salmonella* spp. D; *E. coli* O157:H7.

#### 나. Real-time PCR에 의한 분석조건 최적화

식중독균 특이 유전자로 선정된 프라이머를 포함한 각 식중독균별 유전자에 대한 분석조건을 최적화하기 위하여 각 식중독균의 DNA를 추출한 다음  $1.2 \pm 0.3 - 5.2 \pm 0.4 \log \text{ cfu/mL}$  세포수가 되도록 이 template를 10배씩 단계별로 희석하여 real-time PCR을 수행하였다. 이때의 분석조건은 형광염료로 SYBR green을 사용하였고, 95°C 5분 denature, 95°C 15초, 60°C 15초, 72°C 33초 40 cycle을 진행한 다음, melting curve를 얻기 위하여 95°C 10초, 60°C 30초를 수행하여 각 마지막 단계에서 결과를 수집하여 나타내었다. 모든 실험은 3개의 replica를 가지고 3번 이상 반복하여 수행되었고, 정상적인 농도로 세포수가 감소하는 기본 log curve를 얻을 수 있었으며, 이를 기초로 정량분석을 위한 standard curve를 얻었다 (Fig. 10, 11, 12 and 13).

최적화 된 조건으로 동량의 *L. monocytogenes*가 오염된 우유와 오렌지주스에서 여러 가지 전처리 방법을 사용하여 정량검출을 시도한 결과 Fig. 14에서 보는바와 같이 산도가 있는 오렌지 주스보다 우유에서 검출율이 높음을 확인할 수 있었다.

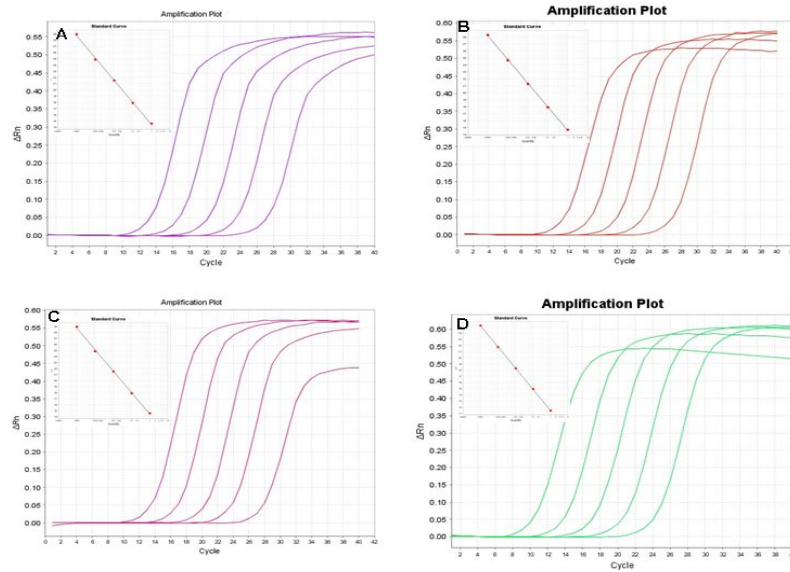


Fig. 10. Real-time RT PCR amplification profiles and standard curve of *S. aureus* targeting the each gene. A; *coa*, B; *nus*, C; *cna*, D; 16s rRNA.

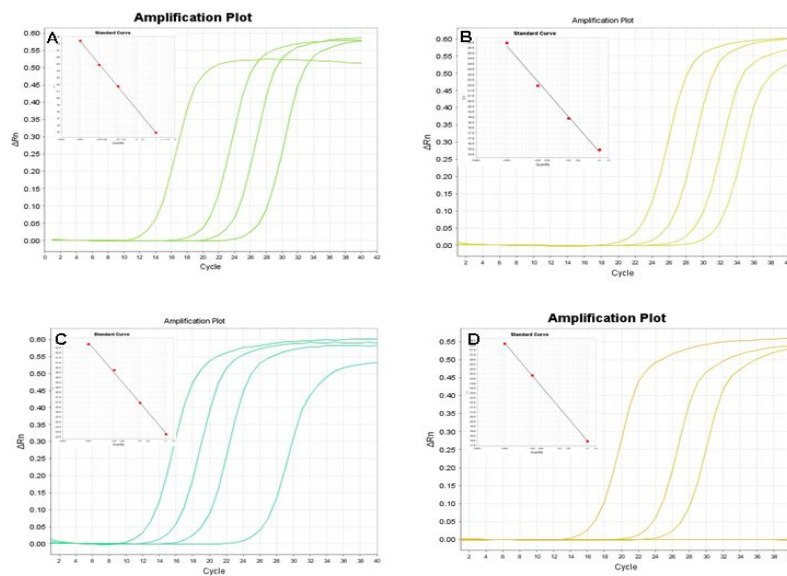


Fig. 11. Real-time RT PCR amplification profiles and standard curve of *L. monocytogenes* targeting the each gene. A; *hly*, B; *iap*, C; *inlA*, D; 16s rRNA.

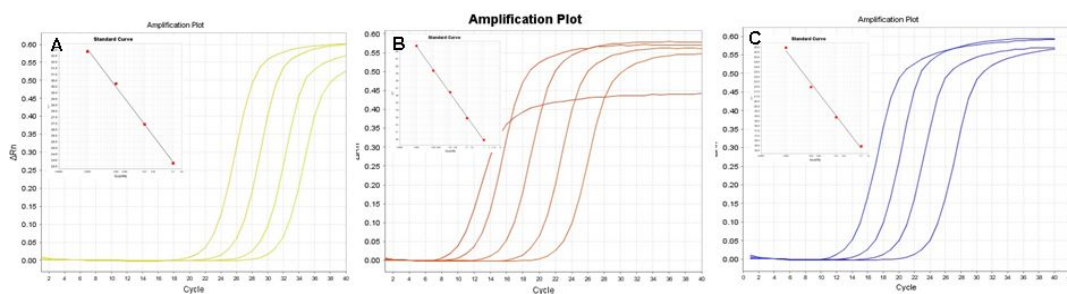


Fig. 12. Real-time RT PCR amplification profiles and standard curve of *Salmonella* spp. targeting the each gene. A; *fliC*, B; *inv*, C; 16s rRNA.

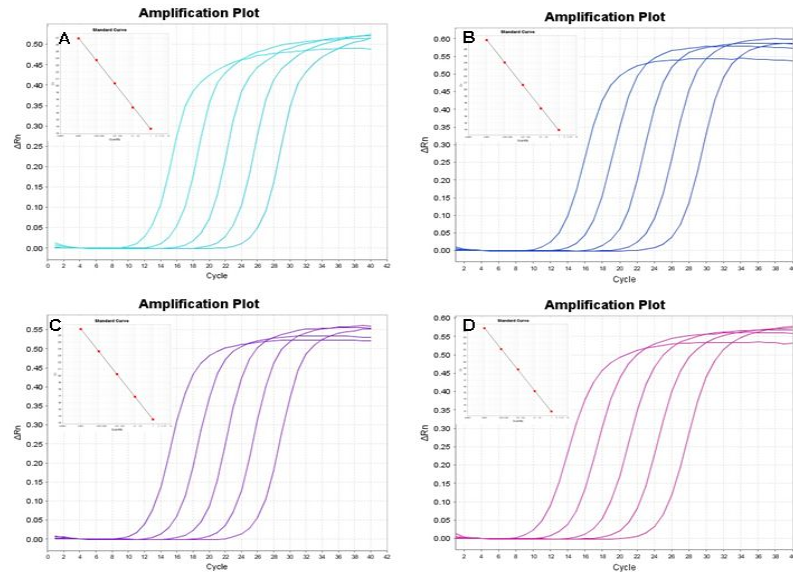


Fig. 13. Real-time RT PCR amplification profiles and standard curve of *E. coli* O157:H7 targeting the each gene. A; *eae*, B; *fliC*, C; *rfb*, D; 16s rRNA.

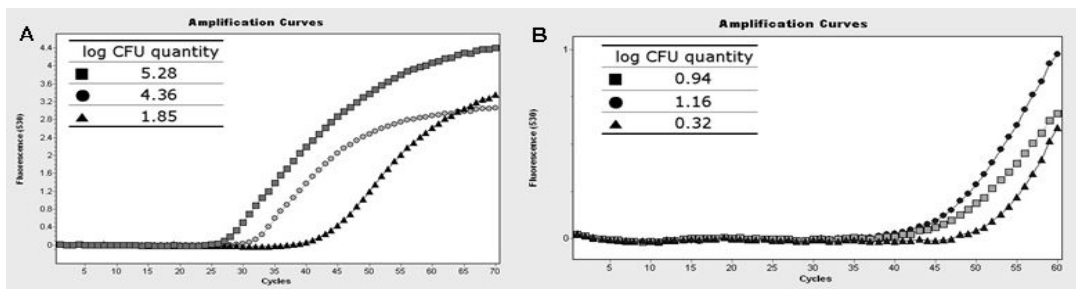


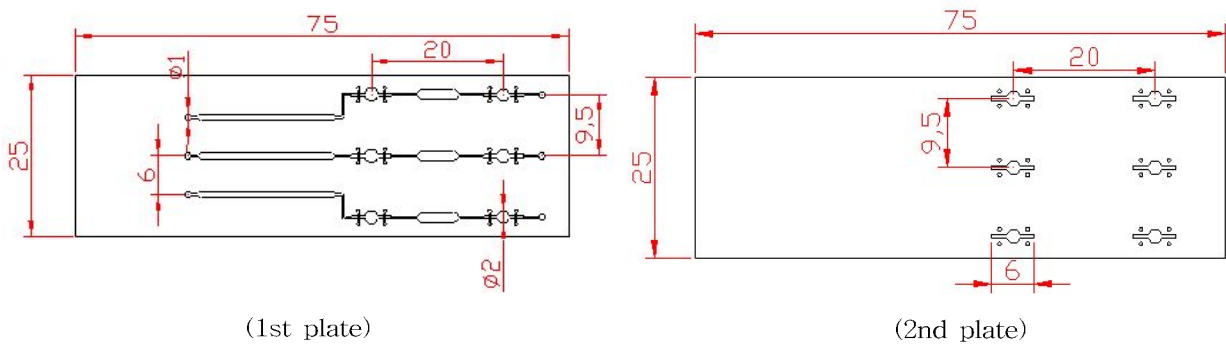
Fig. 14. Detection for *L. monocytogenes* according to isolation methods milk (A) and juice (B). ■ : Thin overlay agar, ● : Direct PCR, ▲ : Immunomagnetic bead added in contaminated milk.

### 3. 유전자 검출용 랩온어칩의 설계 및 제작

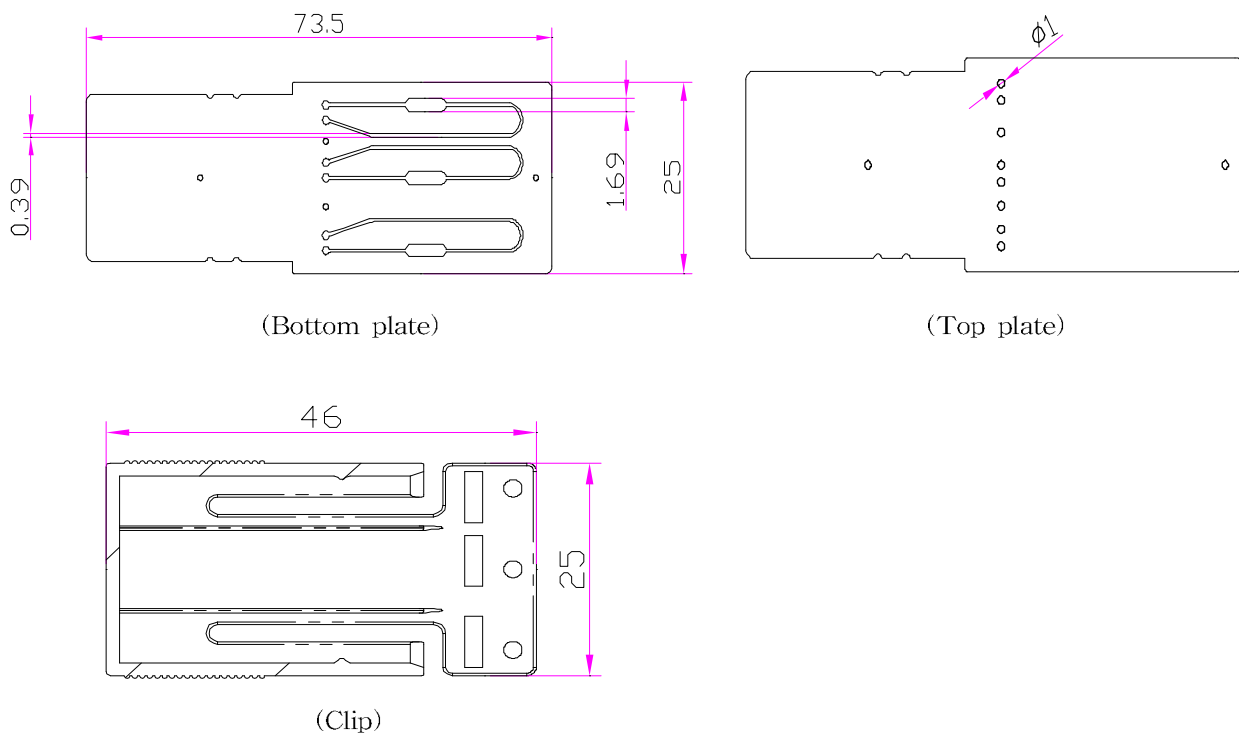
#### 가. 3D CAD를 이용한 랩온어칩 (Lab-on-a-chip) 설계

Positive, negative, real sample의 유전자 증폭 반응을 위해 3 channel을 갖는 기본 구조로 설계하였다. 또한 유전자 증폭 및 검출에 필요한 reagent의 조성을 고려하여 10  $\mu$ L 이내의 부피로 결정하였다. 유체의 단속을 위해 1차 랩온어칩에서는 밸브 형태로 고안하였으나 튜브의 접합 및 유체의 누수현상이 개선이 어려워 2차 랩온어칩을 새로 디자인하게 되었다 (아래 1차 랩온어칩 디자인 참고). 2차 랩온어칩은 1차 디자인에서 문제시 되었던 튜브를 제거하였으며 유체의 단속을 위해 클립을 새로이 추가하여 설계하였다. 클립의 사용을 위해 inlet과 outlet의 위치를 같은 방향으로 설계하였으며 클립에 연결의 고무를 사용하여 유체의 누수 현상을 해결하였다 (아래 2차 랩온어칩 디자인 참고). 상판에는 시료를 주입할 수 있는 inlet 부분과 outlet 부분을 설계하였으며 하판에는 유체가 이동할 수 있는 유로를 설계하였으며 그 결과 2차 디자인을 통해 시스템의 구조, 칩의 생산성 개선 및 사용자 편의를 향상시킬 수 있었다.

(a) 1st Lab-on-a-chip design (mm)



(b) 2nd Lab-on-a-chip design (mm)





나. 랩온어칩의 성형사출

열에 대한 변성이 적으며 실시간 검출을 위한 광학적 간섭이 적은 COC (Cyclo Olefin Copolymer)를 재료로 사용하여 사출하였다. 상판의 두께는 1 mm이며 하판은 0.5 mm으로 사출하였는데, 이는 하판에서 열변화가 있으므로 열교환이 빠르게 이루어질 수 있도록 두께를 조절하였다.



(Bottom plate)



(Top plate)



(Clip)

다. PCR 증폭/검출용 칩 시제품 제작

(1) 칩의 특성

- (가) Material : COC (Cyclo Olefin Copolymer)
- (나) Channel Number : 3 Channels
- (다) Channel Volume (Total) : 9  $\mu$ L
- (라) Heat Stability : <120 $^{\circ}$ C
- (마) Optical Spec. : Transparent



(Before sample injection (left) & After sample injection image)



(PCR Lab-on-a-chip prototype)



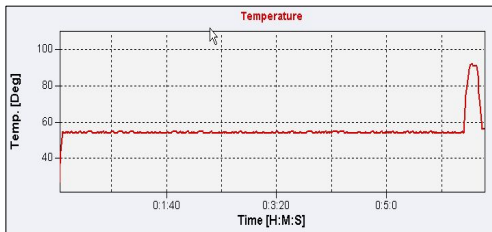
(PCR Lab-on-a-chip packing)

#### 4. 랩온어칩에서의 PCR증폭 성능 검증

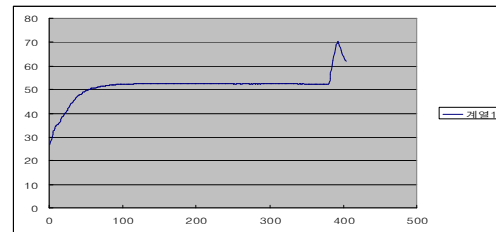
##### 가. PCR 칩 구동을 위한 시스템 구축

##### (1) 온도제어부의 기능 검증

(가) 온도제어 정확도 : 소프트웨어에서 설정한 온도와 시스템에서의 온도편차를 검증하기 위해 펠티어 위의 온도를 측정하여 비교하였다. 그 결과 설정온도 대비  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  이내의 편차를 나타내었다. 또한 실제 칩에서의 온도의 편차를 알아보기 위하여 칩내부의 온도를 측정할 수 있는 칩을 제작하여 온도를 비교한 결과 동일한 결과값을 얻을 수 있었다.

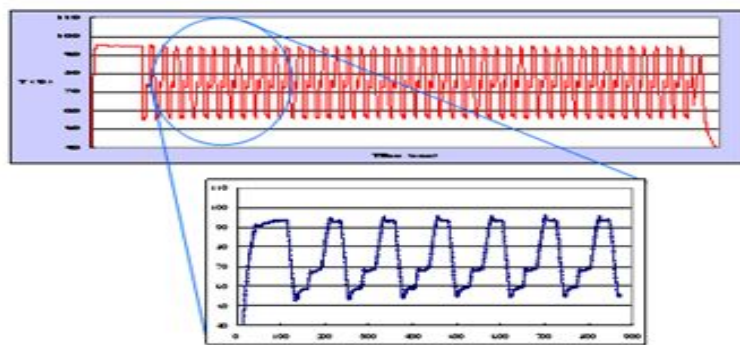


(Control temperature)



(Real detection temperature)

(나) 온도제어부의 기능 : 온도 제어의 반복성을 재현하기 위해 PCR cycle의 수를 45 cycle 기준으로 확인하였다. 그 결과 기준 설정온도  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  이내의 편차를 보였으며 반복 실험을 수행하였을 경우에도 동일한 결과를 얻을 수 있었다.



Thermo-cycling Graph in Three Step PCR

(다) 채널간 온도편차 : 본 연구에서 디자인한 유전자 증폭용 랩온어칩은 향후 다중 진단에 사용하기 위하여 3 채널 구조로 설계/제작되었기 때문에 채널간의 온도 편차를 검증하기 위해 온도 측정용 칩을 제작하였다. 온도편차의 측정을 위해 반응 챔버에 온도센서를 삽입하여 설정 온도와 실제 측정온도를 비교할 수 있도록 설계하였다. 실험 결과 채널 간의 온도편차를 확인하였으며 그 차이를  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  이내로 보정하였다.

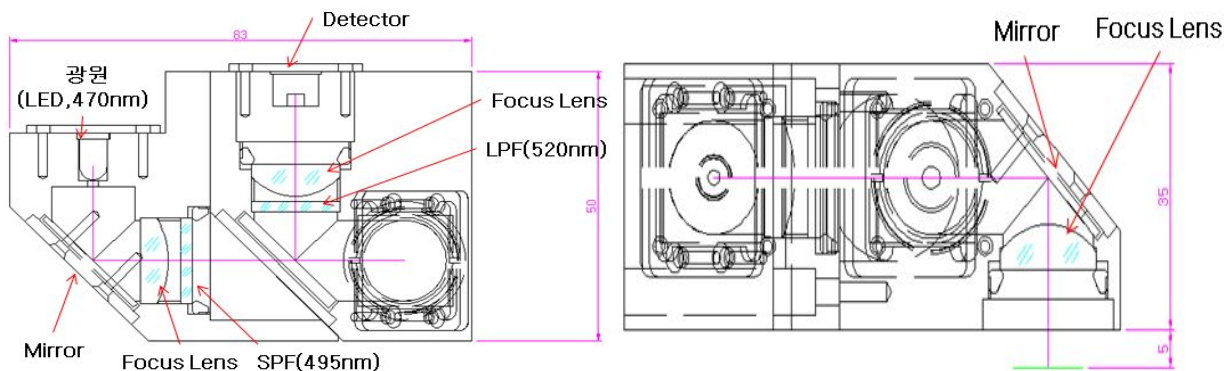
(2) 형광신호 계측 기능 확인

(가) 4개의 서로 다른 형광과장에 대해 여기특성을 갖는 상용 solid chip을 확보하였다.

(나) GeneSys (RT-101)의 광학계 파장특성 (488/520 nm)에 맞는 표준칩을 이용해 광학계의 신호특성 확인할 수 있었다.



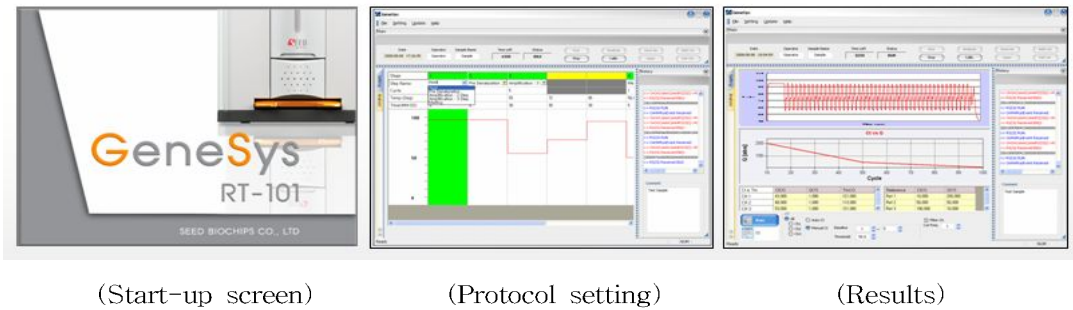
(다) 소형 광학계 제작 : 1차년도에 적용되었던 3채널만 검출 가능했던 광학계의 단점을 보완하기 위해 소형의 광학계를 제작하였다. 이는 다중 검출을 위한 유전자증폭용 칩과 시스템에 적용하기 위해서 개선되었으며 6 채널을 검출 가능할 수 있도록 설계하였다. 광원은 LED (470 nm)를 사용하였고, 발산하는 광원을 렌즈로 집광하였다. SPF (short pass filter)를 이용하여 500 nm 이하만 투과시켰으며, Dichroic Mirror에서 500 nm이하에서 투과되고 500 nm이상은 반사되도록 설계하였다. 광원에서 출력된 빛은 검출부에 도달하여 시료와 반응하여 반사되고 이러한 형광은 Dichroic Mirror에서 반사되고 LPF (long pass filter)에서 520 nm이상만 투과되어 Photo-Diode에 도달하고 형광 신호를 전기신호로 변환되도록 설계하였다.



(3) S/W 구동기능 확인

(가) S/W 버전업 개발을 진행하여 신규 프로그램과 시스템의 매칭 작업을 완료하였다.

(나) S/W 버전명 - GeneSys Version 2.0.0.0



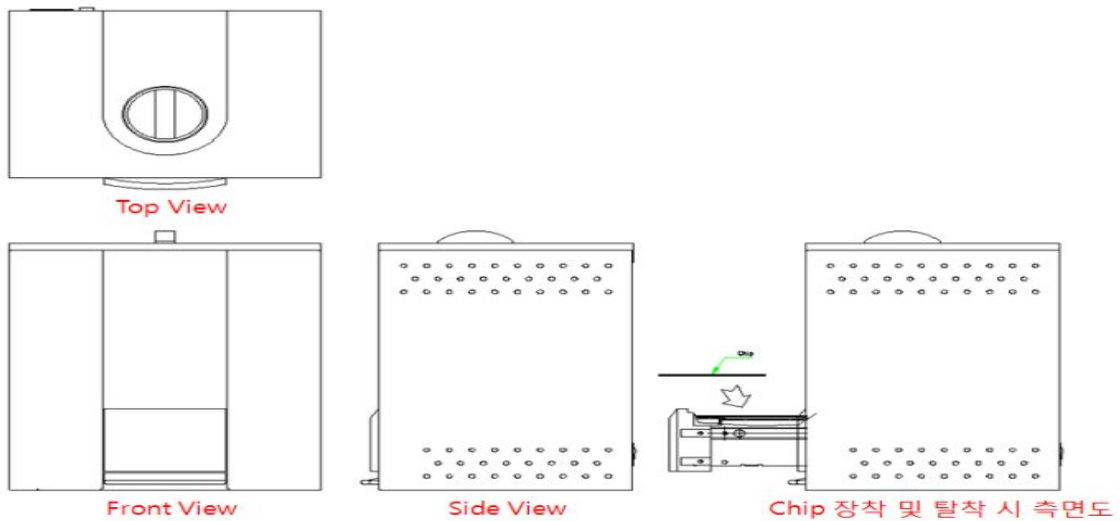
(Start-up screen)

(Protocol setting)

(Results)

(4) PCR 랩온어칩 분석기

(가) 외관도



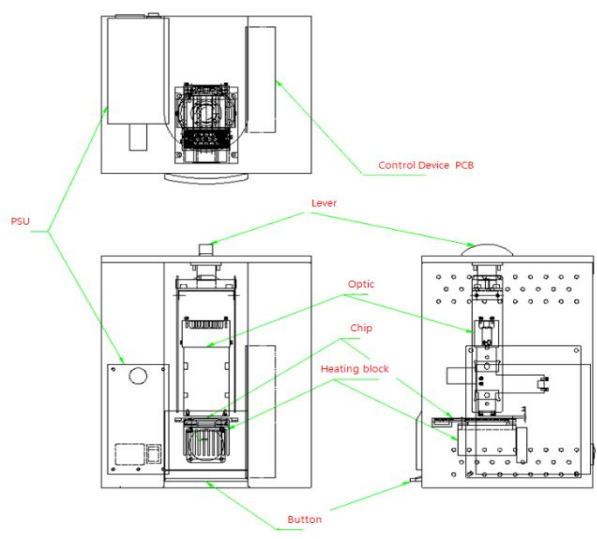
Top View

Front View

Side View

Chip 장착 및 탈착 시 측면도

(나) 주요부품 배치도



(다) 분석기 디자인



(1st Design)



(2nd Design)



(Prototype Design)

(라) PCR 랩온어칩 분석기 사양

- ① 크기 : 255(가로) X 213(세로) X 296(높이) mm
- ② 중량 : 5.85 kg
- ③ 전원 : AC 220 V / 60 Hz, 350 W
- ④ 가열부 : Peltier heater
- ⑤ 사용온도 : 0 - 99 °C
- ⑥ 가열속도 : 최대 3°C/sec
- ⑦ 온도 정확도 : ± 0.5°C
- ⑧ 광학측정 : SYBR(488/520 nm)



(Genesys (RT-101))



(Chip Holding Lever and LED image)



(Chip Loading and Process Lamp Image)

나. 랩온어칩에서 유전자 증폭 검증

(1) 칩의 오염도를 확인하기 위한 DNase activity 검증

(가) 1 mg의 pACTB DNA (beta actin, pCMV-SPORT6/ACTB, clone # hMU000729), 10 X buffer (500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1M NaCl), ddH<sub>2</sub>O를 혼합하여 10 μL를 칩상에 탑재한 후 37°C에서 16시간 보관. 2 μL의 loading dye를 넣어 8% 아가로스 젤에서 전기영동 하였다.

(나) 그 결과 멸균된 튜브와 칩에서 DNA가 잘리는 현상은 보이지 않았다. 따라서 칩이 DNase와 같이 주형 유전자의 손실에 영향을 주는 물질에 오염되지 않았으며 칩의 멸균 방법이 적절하다는 결과를 얻을 수 있었음. 또한 칩에서 RNA의 잘리는 현상은 보이지 않았다 (Fig. 15).

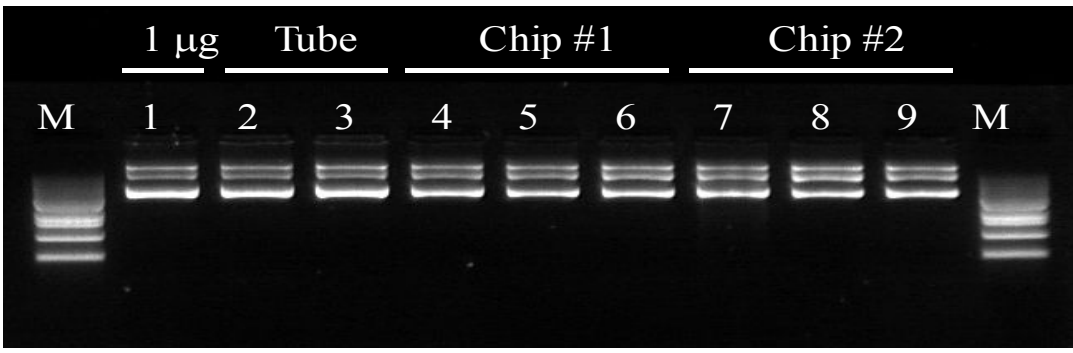


Fig. 15. DNase activity test. Lane 1, intact ACTB DNA; 2, 3, DNase activity test on tube; 4, 5, 6, DNase activity test on chip #1, 7, 8, 9, DNase activity test on chip #2.

(2) 칩상에 탑재된 PCR reagent의 조성 및 볼륨 최적화

(가) Taq polymerase의 PCR 효율성 비교 : Roche의 Fast start Taq polymerase와 Takara의 ExTaq polymerase로 조성된 PCR 반응액을 본 연구에서 개발한 SEEDBiochip의 GeneSys (RT-101)와 Roche의 LightCycler에서 각각의 PCR을 수행하였다. 그 결과 본 연구에서 개발한 GeneSys (RT-101)에서는 Takara의 ExTaq polymerase가 유전자를 효율적으로 증폭한다는 사실을 알 수 있었다 (Fig. 16).

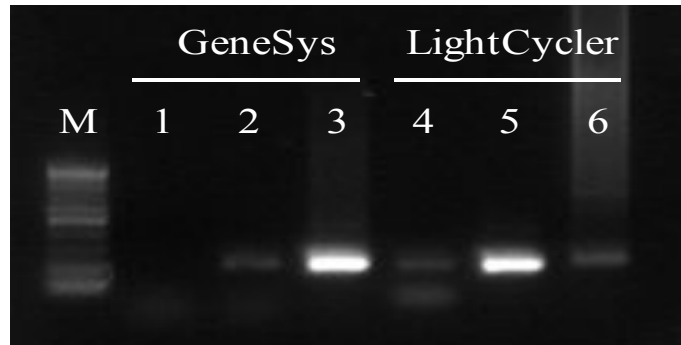


Fig. 16. The optimization of PCR reaction condition on chip using GeneSys. 1, 4, Negative control; 2, 5, Roche reagent; 3, 6, ExTaq. Template, pRPL DNA (ribosomal binding protein, CMV-SPORT6/RPL, hMU001233) was used.

(나) ExTaq polymerase (TaKaRa) 농도의 titration : 최적의 PCR 효율성을 찾기 위해 0.5 U, 1 U, 2.5 U, 5 U, 10 U의 ExTaq polymerase (TaKaRa)를 이용하여 polymerase의 unit 별로 PCR을 수행하였다. 그 결과 ExTaq polymerase (TaKaRa) 2.5 U 이상에서 원하는 PCR 결과를 획득할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 제작한 유전자 증폭용 랩온어칩에서 시료내의 polymerase는 2.5 U로 확정하였으며, 시료의 가격적인 경쟁력을 고려한다면 2.5 U 이상의 polymerase를 사용하는 것은 소모적이라고 판단된다 (Fig. 17).

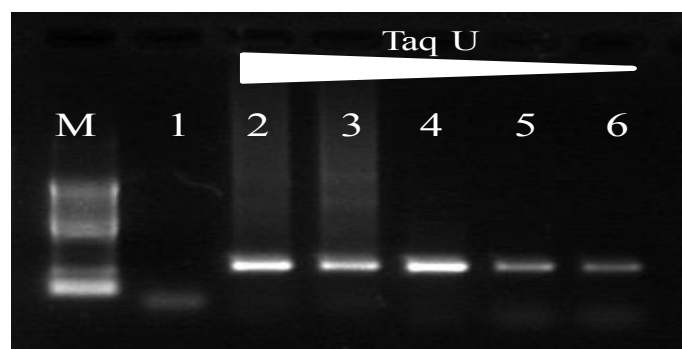


Fig. 17. Taq polymerase titration on chip using GeneSys. Lane 1, negative control; 2, 10 U; 3, 5 U; 4, 2.5 U; 5, 1 U; 6, 0.5 U.

(다) 최적화된 조건하에서 PCR 재현성 검증 : GeneSys (RT-101)에서 ExTaq polymerase (TaKaRa) 2.5 U을 사용하여 PCR 반응을 수 회 수행한 결과, 동일한 결과들을 얻을 수 있었다. 이는 GeneSys와 유전자 증폭용 랩온어칩의 유전자 증폭에 대한 재현성 결과를 획득할 수 있었다 (아래 Fig. 18은 2차례 반복된 실험 결과를 보여줌).

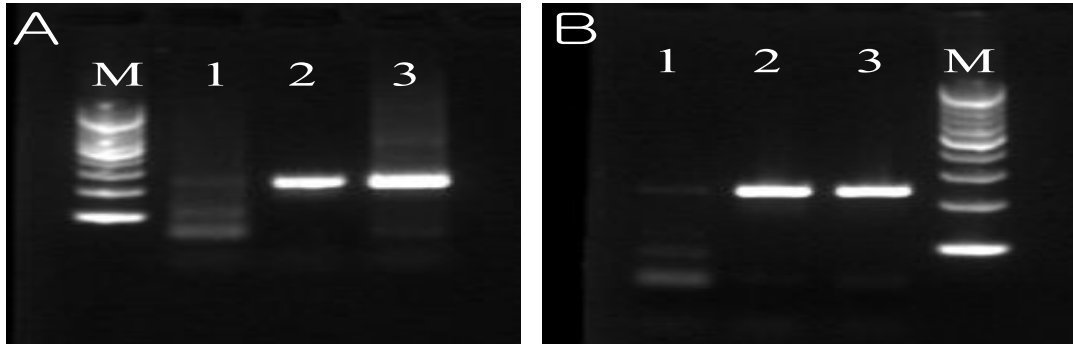


Fig. 18. PCR reproducibility test on chip using GeneSys. A. 1, negative control; 2, 3, PCR with ExTaq premix. B. 1, negative control; 2, 3, PCR with ExTaq premix.

#### 5. 다중 식중독균 검출을 위한 real-time PCR 조건 최적화

##### 가. 다중 식중독균 검출용 프라이머 선택 및 특이도 검증

주요 식중독 원인균인 *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*의 검출을 위해 1차년도에 검증되고 선택된 primer 들 중 용해곡선 분석 (melting curve analysis) 을 이용한 다중 실시간 PCR (multiplex real-time PCR)을 위해 필요한  $T_m$  값의 차이가 있는 프라이머로 재 선별하기 위하여 Oligo @ V6.5 소프트웨어를 이용하여 1차로 4종의 식중독균을 동시 검출할 수 있는 프라이머를 대상으로 실험을 실시하였다. 그 결과 이들의 온도차가  $1.5^\circ\text{C} \pm 0.2$ 로서 증폭산물간의  $T_m$ 의 차이가 적어 각 곡선의 peak 구분이 어려우므로 증폭산물간 온도가  $5^\circ\text{C}$  이상 차이가 나는 2개의 균을 다중 검출할 수 있을 것으로 추측되는 4종 식중독균의 특이적인 프라이머를 결정하였다 (Table 5).

Table 5. Primers used in this study

Organism (Targeted gene)	Sequence (5'-3')	Product (bp)	Reference
<i>E. coli</i> O157:H7 ( <i>uidA</i> , $\beta$ -glucuronidase)	CAGTCTGGATCGCGAAAACCTG ACCAGACGTTGCCACATAATT	141	Jinneman et al.
<i>S. aureus</i> ( <i>nuc</i> , Thermonuclease)	CGCTACTAGTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTTG TGCACTATATACGTGGATCTTCAGAA	121	Alarcon et al.
<i>L. monocytogenes</i> ( <i>hly</i> , hemolysin)	ACTTCGGCGCAATCAGTGA TTGCAACTGCTCTTAGTAACAGCTT	137	Amagliani et al.
<i>Salmonella</i> spp. ( <i>ttr</i> , tetrathionate reductase)	TTTATACGGCCGCGAAGT CCTGTAAGGCGCTAAGAAACATC	93	Omiccioli et al.

4종 식중독균에 대한 각각의 프라이머를 사용한 단일 real-time PCR과 용해 곡선 분석을 세 번 반복 실시하여 *E. coli* O157:H7은  $87.4^\circ\text{C}$ , *L. monocytogenes*는  $81.49^\circ\text{C}$ , *Salmonella* spp.는  $88.22^\circ\text{C}$ , *S. aureus*는  $81.49^\circ\text{C}$ 의 평균  $T_m$  값을 얻었다 (Fig. 19). 이때의 분석조건은



형광염료로 SYBR green을 사용하였고, 95℃ 5분 denature 후, 95℃ 15초, 62℃ 15초, 72℃ 30초 30 cycle을 진행 후, melting curve를 얻기 위하여 95℃ 10초, 60℃ 30초를 수행하였다. 평균  $T_m$ 의 차이가 큰 *E. coli* O157:H7과 *S. aureus*를 1그룹으로 *Salmonella* spp. 와 *L. monocytogenes* 를 2그룹으로 다중 실시간 PCR을 위하여 구분하였다. 2개의 그룹에 대한 다중 실시간 PCR 용해 곡선 분석을 수행한 결과 *E. coli* O157:H7과 *S. aureus*는 각각 86.99℃와 80℃의  $T_m$ 을 나타내었고 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*는 88.11℃와 80.45℃의  $T_m$ 을 나타내었다 (Fig. 19). 이 결과는 단일 real-time PCR의 결과로 측정된  $T_m$  들로부터 약간 (0.1℃~1℃) 벗어났으나 용해곡선의 peak 분리에 영향을 주지 않으므로 4종 식중독균의 각각의 primer들을 다중 real-time PCR용 primer로 결정하였다.

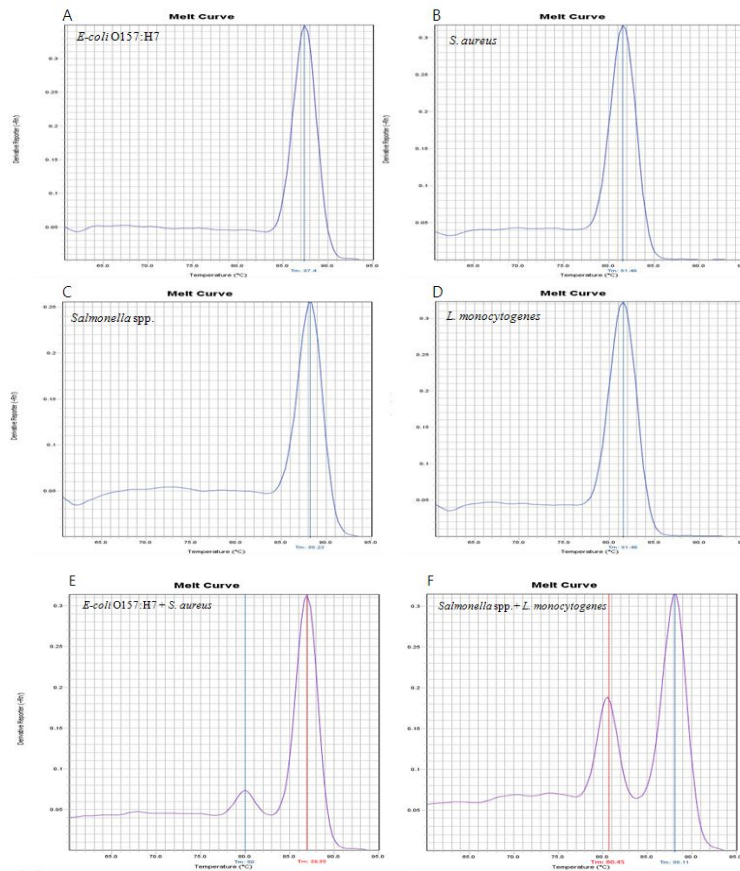


Fig. 19. Melting-curve analysis corresponding to the amplicons generated by SYBR Green simplex (A-D) and multiplex(D and E) real-time PCR showing the peaks and  $T_m$  values of *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*.

또한 4종의 식중독균의 실시간 검출을 위해 선택된 primer가 어떤 균에 적용하여도 양성 과 음성을 구분할 수 있는지 특이성을 검증하기 위하여 *B. cereus*를 주형으로 하여 real-time PCR을 수행한 결과 threshold 인 0.0001을 통과하는 것이 없어 정상적인 증폭곡선을 얻을 수 없었으며, 그 증폭산물을 전기영동하여 사진을 확인하여 보니 어떤 산물도 발견할 수 없어 본 실험에서 사용된 4쌍의 검출 프라이머는 균주 특이적임을 확인 할 수 있었다 (Fig. 20).

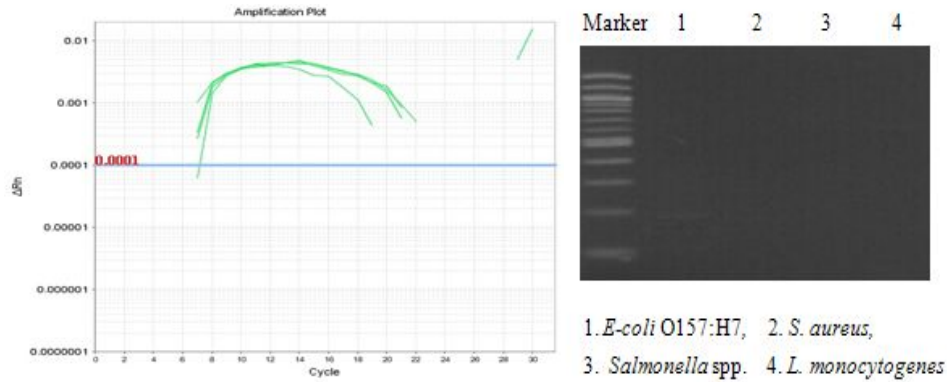


Fig. 20. Specificity test of the four primer pairs in *B. cereus*.

#### 나. 검출감도 조사

4종 식중독균의 실시간 검출용 프라이머가 검출할 수 있는 한계를 확인하기 위하여 각 균을 배양하여 10배씩 단계별로 1-10<sup>5</sup> cfu/mL 세포수가 되도록 희석하여 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행하였다. 각 균별 세포수가 많은 순서로 일정한 간격의 증폭 곡선을 얻었으며, 자동 설정된 최소 역가에 따라 각 곡선별 세포수별 Ct (threshold cycle)가 산출되었다 (Table 6). 그 결과, *S. aureus* 와 *L. monocytogenes* 는 26의 Ct 값을 나타내어 10<sup>2</sup> cfu/mL 세포수 까지 검출이 가능하였으며 *E. coli* O157:H7 는 10 cfu/mL 세포수에서 Ct 26, *Salmonella* spp. 는 10 cfu/mL 세포수에서 Ct 27 값을 보이며 검출되었다. 그 이하의 희석배수에서 각 균의 real-time PCR 결과는 Ct 값이 너무 커서 유의성이 없었으며, 그람음성균이 그람양성균보다 더 적은 세포수에서도 검출이 가능하였다.

Table 6. Mean Ct values obtained by real-time PCR using as template purified DNA of food-borne bacteria from 10<sup>5</sup> to 1 cfu/mL

No. of cells (cfu/mL)	Threshold cycle (Ct)			
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
10 <sup>5</sup>	14	18	15	17
10 <sup>4</sup>	17	20	18	20
10 <sup>3</sup>	20	23	21	23
10 <sup>2</sup>	23	26	24	26
10	26	29	27	29
1	29	-	29	-

다. 식품 matrix 효과 조사

신선편이 식품 4종의 식중독균이 오염되어 있을 때 검출용 프라이머를 사용하여 실시간으로 검출할 수 있는 최소한의 세포수를 알기 위하여 각 균을 배양하여 10배씩 단계별로 희석하여 25 g의 양상추가 들어있는 멸균백에 각각 접종하여 펩톤 수 225 g을 넣고 30초간 스토마커한 후, 1 mL를 채취하여 DNA를 추출한 후, real-time PCR을 수행하였다. 또한 각 멸균백에서 동량을 채취하여 세포수를 구하기 위해 적정량 희석하여 고체배지에 도말한 후, 24시간 배양하여 세포수를 결정하였다. 모든 실험은 3개의 replica를 가지고 3번 이상 반복하여 수행되었다 (Fig. 21).

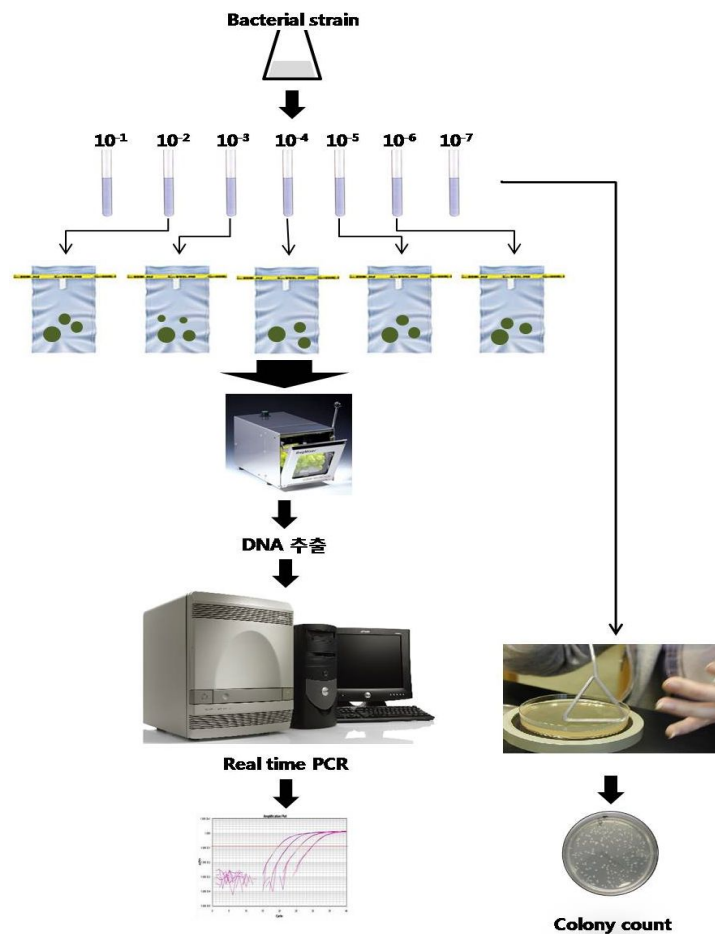


Fig. 21. Overview of the entire method.

각 균별 초기의 세포수가 많은 차례로 일정한 간격으로 나란해진 증폭 곡선을 얻을 수 있었으며 (Fig. 22), 최소 역가 (threshold)가 설정되어 Ct 값이 산출되었다 (Table 7). *S. aureus* 와 *Salmonella* spp. 는  $10^3$  cfu/mL 세포수 까지 검출이 되었고, *E. coli* O157:H7와 *L. monocytogenes* 는  $10^2$  cfu/mL 세포수에서도 검출이 가능하였다. 이 값은 앞서 각 식중독균에서 그대로 DNA를 추출하여 실험하였던 결과보다 1 log cfu/mL 정도 감도가 낮은 것으로 확인되었다. 또한 오염된 시료를 그대로 사용한 colony real-time PCR을 수행하여 보았으나  $10^5$  cfu/mL에서도 Ct 값이 25이상으로 검출되었다.

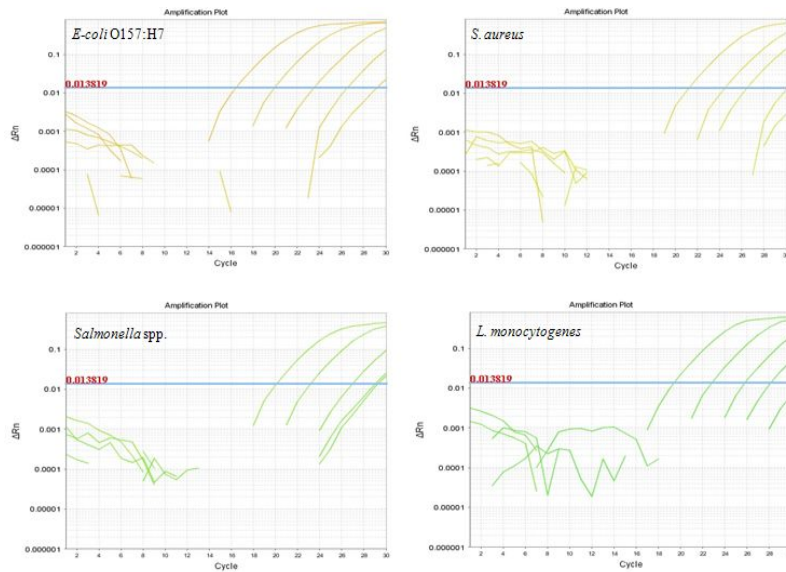


Fig. 22. Real-time amplification plots obtained using DNA purified from different amounts ( $10^5$  to 10 cfu/mL) of artificially inoculated vegetables with food-borne bacteria. Blue line is threshold line.

Table 7. Mean Ct values obtained by real-time PCR using different amounts ( $10^5$  to 10 cfu/mL) of artificially inoculated vegetables

No. of cells (cfu/mL)	Threshold cycle (Ct)			
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
$10^5$	16	21	20	19
$10^4$	19	24	23	22
$10^3$	23	26	27	25
$10^2$	26	-	29	28
10	29	-	29	-

앞서 다중 real-time PCR 검출용 프라이머로 결정된 *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes* 중 2그룹의 프라이머를 사용한 식품에서 검출을 확인하는 실험을 수행하였다. 각 그룹의 다중 실시간 PCR 용해 곡선 분석 결과, 용해곡선의 peak가 균주별 정확히 분리되어 검출을 확인할 수 있었으며, *E. coli* O157:H7과 *S. aureus*는  $10^4$  cfu/mL 에서 Ct 26, *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes* 는  $10^3$  cfu/mL에서 Ct 25값을 보이면서 검출됨을 확인하였다 (Table 8)(Fig. 23).

Table 8. Mean Ct values obtained by real-time PCR using different amounts ( $10^5$  to  $10^7$  cfu/mL) of artificially inoculated vegetables

No. of cells (cfu/mL)	Threshold cycle (Ct)	
	<i>E. coli</i> O157:H7 + <i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp. + <i>L. monocytogenes</i>
$10^7$	16	-
$10^6$	20	13
$10^5$	24	17
$10^4$	26	21
$10^3$	-	25

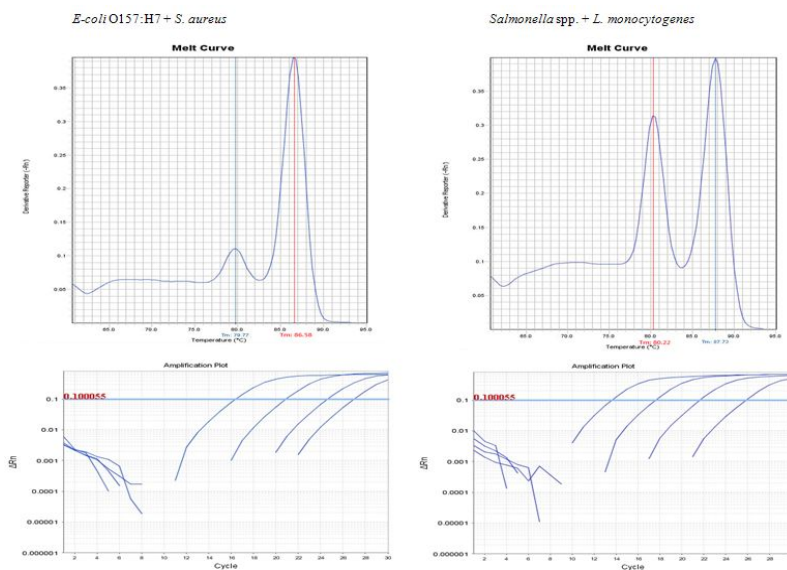


Fig. 23. Real-time melting curve peaks, amplification plots and mean Ct values obtained by real-time PCR using different amounts ( $10^7$  to  $10^3$  cfu/mL) of artificially inoculated vegetables with combination group the two pathogens.

라. 기존 타 검출법과의 비교

본 연구팀에서 개발한 랩온어칩 시스템 NBS-100의 성능을 확인하기 위하여 기존에 보유하고 있던 Applied Biosystems 7500 real-time PCR system을 사용하여 4종의 식중독균에서 추출된 동일한 DNA 샘플을 대상으로 동시에 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, *L. monocytogenes*의 경우 두 시스템에서 16과 17의 Ct 값을 나타내어 거의 같은 검출감도를 나타냈으며, *E. coli* O157:H7은 15와 18, *S. aureus*는 19와 22, *Salmonella* spp.는 16과 21로 ABI7500의 감도가 조금 더 높았으나, 세포수로는 10 cfu/mL 차이로 차년도의 시스템 개선을 위한 연구가 진행된다면 거의 같은 감도로 검출이 가능할 것으로 생각되었다 (Table 9)(Fig. 24).

Table 9. Comparison of Ct values obtained by real-time PCR using ABI7500 system and nanobiosys system

Strain	No. of cells (cfu/mL)	Threshold cycle (Ct)	
		ABI7500	NBS-100
<i>E. coli</i> O157:H7	10 <sup>8</sup>	15	18
<i>S. aureus</i>	10 <sup>7</sup>	19	22
<i>Salmonella</i> spp.	10 <sup>8</sup>	16	21
<i>L. monocytogenes</i>	10 <sup>6</sup>	16	17

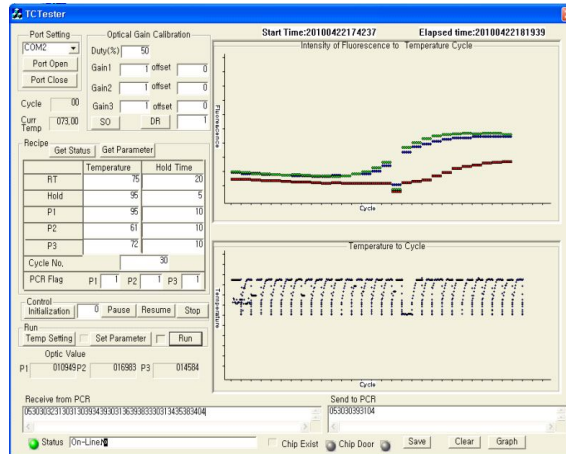


Fig. 24. Real-time PCR amplification profiles in NBS-100 real-time PCR.

## 6. 나노자성-면역 분리 기반 시료전처리 기술 확립

### 가. 나노자성입자의 제조

#### (1) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 자성나노입자

자기적 특성은 물질 내 전하의 움직임에 의해서 나타나는 현상으로 전체 자기특성은 주로 전자의 궤도운동과 스핀운동에 의해서 나타나고 전자의 운동이 입자 크기에 의존하기 때문에 자성입자는 그 크기에 영향을 받는다. 물질에 자기장을 가하면 자화되며 이때 인력이 작용하는 물질을 강자성 (ferromagnetic), 준 강자성 (ferrimagnetic) 및 상자성 (paramagnetic)으로 분류되며 척력이 작용하는 반자성 (antiferromagnetic)으로 분류된다. 강자성은 원자들의 스핀간의 상호작용이 평행한 경우로 물질 고유의 영구자력을 가지며, 상자성은 외부 인가된 자기장에 의해서만 일시적으로 자화되며 외부 자기장이 존재하지 않을 때 열적요동 (thermal fluctuation)에 의해 스핀이 임의 배향되어 자력을 잃게 된다. 또한 반자성체는 자기장 방향과 자화방향이 반대인 것으로 원자에 가해진 외부자기장에 의한 유도기전력으로 발생한다.

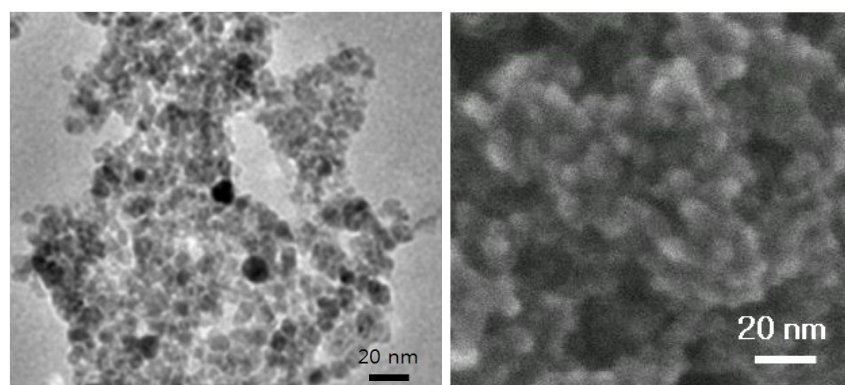
본 연구에서는 면역자성법에 적용될 수 있는 자성체를 제작하기 위해서 상자성 특성을 이용하였으며 강자성 물질 중 그 입자 크기가 나노미터 크기로 작아지게 되면 외부 자장이 존재하지 않을 경우 나노입자의 자화방향이 에너지장벽을 넘어설 수 있게 되어 열적요동에 의한 무작위 회전이 가능하여 상자성이 된다. 즉,  $\Delta E = KV$ 에서 에너지장벽( $\Delta E$ )은 입자의 부피( $V$ )에 비례하게 되고 그 입자 크기가 나노 수준으로 무시할 수 있을 만큼 작아지게 되면 에너지장벽은 상수 ( $K$ , Boltzman constant)로 근접하게 되어 회전이 가능하다. 이러한 상태를 초상자성 (superparamagnetic)이라 하며 자성나노입자 중 magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)가 가지는 주요 특성으로

알려져 있다 (Mikhaylova, 2004). 상자성을 가지는 자성나노입자들은 주로 MRI 영상을 위한 조영제 (contrast agent)로 개발되어 이용되고 있으며 주요 자성나노입자들의 특성은 1999년 Coroiu에 의해 발표되었다 (Table 10). Coroiu에 의하면 magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )와 SPIO (superparamagnetic iron oxide,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )는 크기와 분포에 의해 분류되었으며 magnetite는 1 - 50 nm 크기, SPIO는 4 - 6 nm 크기의  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 를 의미한다. 본 연구에서는 시료전처리에 응용하기 위하여 외부자장에 강하게 작용하고 외부자장 제거 시 이완시간을 최소화 할 수 있는 SPIO 특성을 갖는  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  자성나노입자를 사용하였다. SPIO 특성을 가지는 4 - 6 nm 크기의  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  자성나노입자는 Muhammad가 발표한 논문을 기반으로 제작되었으며 대량생산을 위해 최적화하였다. 제작한  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  자성나노입자는 TEM 및 SEM을 통해 입자의 크기 및 분포를 확인하였으며 평균 5 nm 정도, 일부 10 nm 이상 크기도 존재하나 80%이상 4 - 6 nm 내에 존재하였다 (Fig. 25). 또한 XRD를 통해  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  재질 (PDF#19-0629)의 자성입자임을 확인하였다 (Fig. 26). 제작한  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  자성나노입자의 농도를 구하기 위해 평균 5 nm 완전구체라는 조건으로 계산한 결과 약 5 mM 임을 확인하였다.

Table 10. Relaxivities of ferro-, ferri- and super paramagnetic nanoparticles (R: relaxivity,  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )\*

Compound	$R_1$	$R_2$	$R_2/R_1$
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	0.21	8.86	42.2
$5\text{Fe}_2\text{O}_3 \times 3\text{Gd}_2\text{O}_3$	2.54	207.83	81.82
$(5\text{Fe}_2\text{O}_3 \times 3\text{Gd}_2\text{O}_3)$ -dextran	61.78	201.4	3.26
Magnetite	3.02	55.29	18.31
SPIO	30	100	3.33
$\text{Gd}(\text{OH})_3$	4.83	9.63	1.99
$\text{GdPO}_4$	1.68	48.34	28.77
$\text{PyPO}_4$	12.81	26.77	2.09

\* I. Coroiu, 1999



<투과전자현미경>

<주사전자현미경>

Fig. 25. Electron microscopic images of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanomagnetic particles.

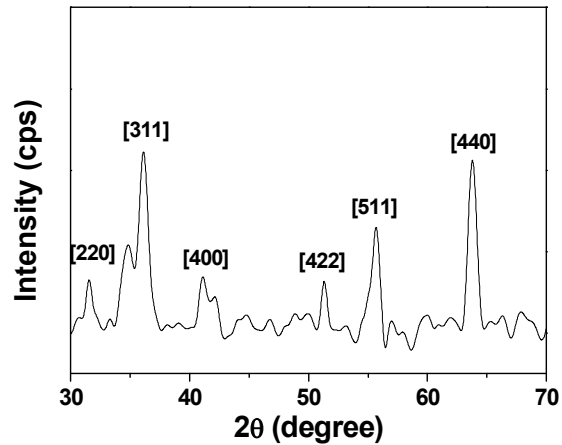


Fig. 26. X-ray diffraction pattern of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanomagnetic particle.

각 과정에 대한 단계 반응은 SPR 결과를 통해 확인하였다. 자성나노입자를 이용한 시료전 처리에 대한 자석 포집시간을 결정하기 위하여 시료셀 (2 mL)에 UV-Vis. spectrometer를 이용하여 자성나노입자의 산란에 의한 흡광도 세기 변화를 조사하였다. 자석은 5 mm 직경의 Nb 자석을 이용하였으며 450 nm 파장에서 자석에 포집되는 자성입자의 상태를 확인하였다. 그 결과, 다음 사진과 같이 시료주입과 동시에 자석에 끌려 포집되는 것을 알 수 있으며 2분 이내 포집되는 것을 확인하였다. 이로부터 자석에 의한 포집시간을 10분으로 고정한 후 시료에 대한 시료전처리 시간을 결정하였다 (Fig. 27).

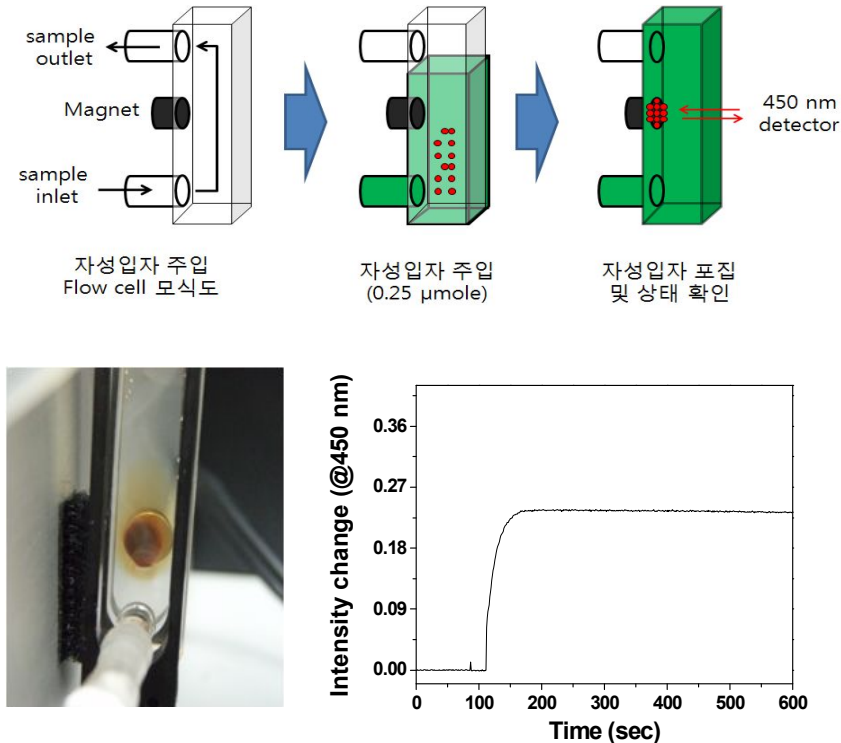


Fig. 27. Collection of nanomagnetic particles and intensity change.



제작한 Anti *E. coli*-Mag. 나노자성입자를 이용하여 *E. coli* O157:H7에 대한 시료전처리와 자성입자의 450 nm 파장 흡수세기 변화를 조사하였다. 모델시료로써 25 g의 PBS 완충용액에 각각  $10 - 10^5$  cell/mL *E. coli* O157:H7을 오염시켜 제작한 후 225 mL PBS 완충용액에 희석시켜 시료를 준비하였다. Anti *E. coli*-Mag. 입자 0.5 mL를 첨가한 후 균질기를 이용하여 균질시킨 후 1시간 대기하였다. 이 시간은 자성나노입자와 미생물간의 반응을 위한 시간으로 SPR 결과에 의해 시간을 결정하였다. 반응이 끝난 시료는 0.45  $\mu$ m nylon membrane filter를 이용하여 필터하고 PBS 1 mL에 분산시켰다. 1 mL에 분산된 *E. coli* O157:H7에 흡착된 자성 입자는 자석을 이용하여 농축시켰으며 농축과정을 450 nm 파장에서 그 흡수 세기 변화를 통해 조사하였다. 변화를 보면 포집시간에 따른 기울기 변화가 농도에 따라 달리 나타난 것을 알 수 있었다. 시료 주입 2 분 후 450 nm 파장에서의 그 흡수 세기 변화를 조사하였을 때  $10^1 - 10^2$  cell/mL 까지 확인 할 수 있었으나 반복실험 결과  $10^3$  cell/mL 정도까지 확인 할 수 있음을 알 수 있었다. 이상의 자성입자를 이용한 시료전처리 관련 프로토콜을 정리하였다 (Fig. 29).

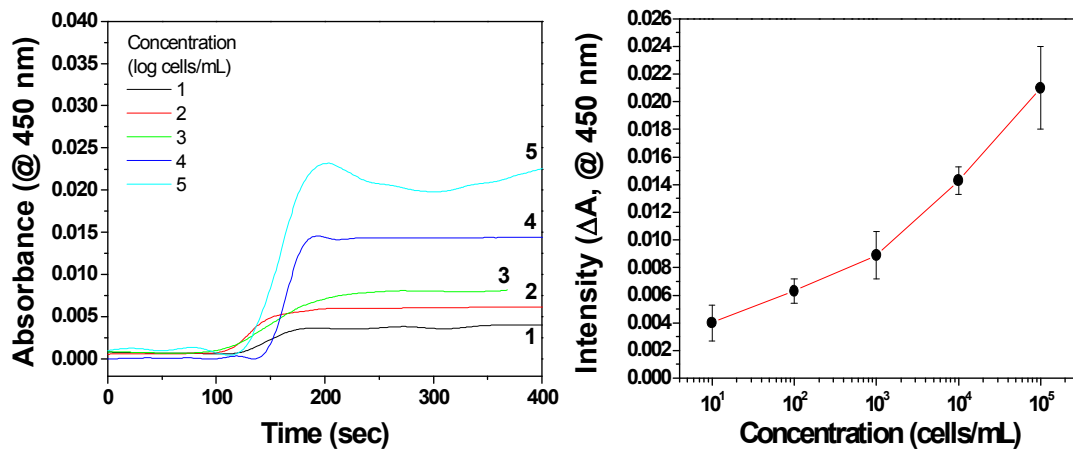


Fig. 28. Visible spectra of gold nanomagnetic particle according with the concentration of *E. coli* O157:H7 (left) and absorption change at 450 nm (right).

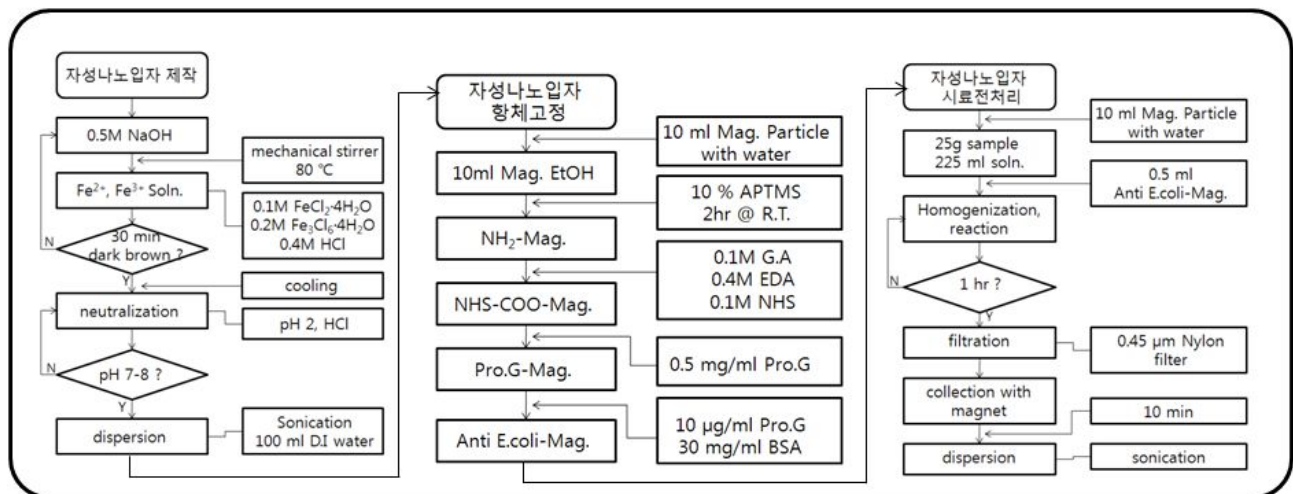


Fig. 29. Summary of sample preparation protocol using nanomagnetic particle.

## (2) 자성-금 입자 특성평가

제작한 자성-금 나노입자는 X-ray 회절패턴을 이용해 기존 나노입자들과 비교를 통해 확인하였다. Fig. 30은 X-ray 회절 스펙트럼의 peak assign은 PDF#19-0629 ( $\text{Fe}+2\text{Fe}_2+3\text{O}_4$ ), PDF#04-0784 (Au)를 참고로 작성되었으며, Au (111)에 해당하는  $2\theta$ 값의 38.1도,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (311)에 해당하는  $2\theta$ 값의 35.4도로부터 자성-금 나노입자가 잘 제작되었음을 확인하였다.

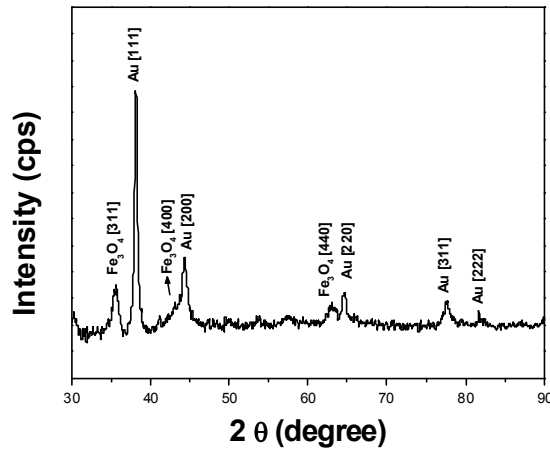


Fig. 30. X-ray diffraction pattern of Au-Mag nanoparticles.

또한, 제작한 자성-금 나노입자의 크기 및 균일도를 전자현미경을 통해 확인하였다. Fig. 31에서 알 수 있듯이 코어인  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 의 평균 입자크기는 3 - 5 nm 수준으로 에탄올 및 수용액상에서는 잘 분산되어 있으나 전자현미경 측정을 위해 용매를 제거하는 과정에서 서로 엉겨 붙은 모양으로 측정되었으며 (Fig. 31(a)) 자성-금 나노입자는 10 - 20 nm 정도의 평균 크기를 가지면서 코어로 사용된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  입자보다 분산도가 높음을 알 수 있었다 (Fig. 31(b)). 자성-금 나노입자의 자세한 형상을 확인하기 위해 투과전자현미경으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 32에 나타난 바와 같이 원형에서 사각형 등과 같이 다양한 형태로 구성되어 있었으며 대부분 10 nm 정도의 크기를 가지면서 20 nm까지 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 32로부터 표면을 둘러싸고 있는 금층은 1 - 1.5 nm 정도 두께로 형성되어 있음을 확인할 수 있었다.

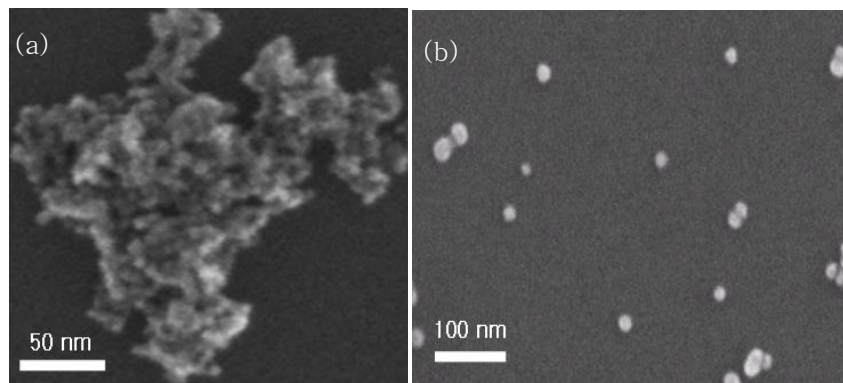


Fig. 31. SEM images of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (a) and Au- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (b) nanoparticles.

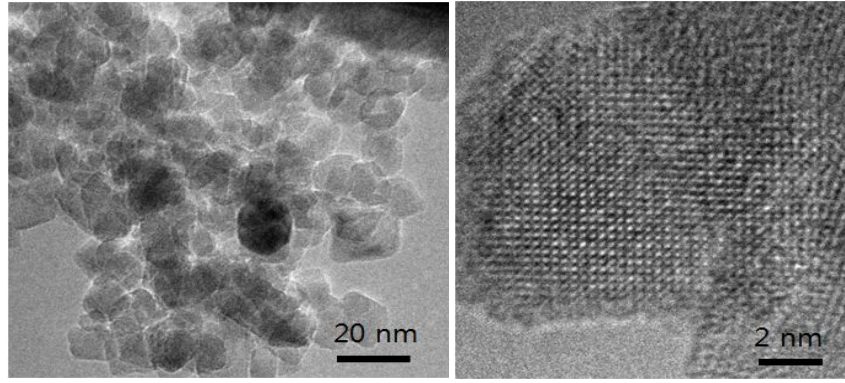


Fig. 32. Bright-field TEM micrograph of Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles on Cu grid.

이 결과를 바탕으로 제작한 Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자의 농도 ( $C_{\text{Au-Fe}_3\text{O}_4}$ )를 계산할 수 있었다. 농도의 계산은 다음의 2가지 방법으로 진행되었으며 0.5 nM 수준으로 제작됨을 알 수 있었다.

- ① 순수한 Au 나노입자와 동일한 몰 흡광계수 (535 nm 흡수 시  $1.57 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (D.J. Lockwood, 2004)라고 가정한 후 흡광도 결과를 바탕으로 계산한 농도

$$C_{\text{Au-Fe}_3\text{O}_4} = 0.4 \text{ nM}$$

- ② Au의 평균 원자 수 ( $n$ )를 계산하는 수식 (A. Heuglein, 1999)을 응용하여 중심 코어인 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>가 차지하는 부피를 고려하여 계산

$$n = \frac{0.5\pi N_A (d_{\text{Au}})^3}{3V_{\text{Au}}} - \frac{0.5\pi N_A (d_{\text{Fe}_3\text{O}_4})^3}{3V_{\text{Fe}_3\text{O}_4}} \quad (1)$$

$$(n/N_A) = 0.52 \left( \frac{d_{\text{Au}}^3}{V_{\text{Au}}} - \frac{d_{\text{Fe}_3\text{O}_4}^3}{V_{\text{Fe}_3\text{O}_4}} \right) \quad (2)$$

상기 수식에서  $N_A$ 는 avogadro number를,  $d_{\text{Au}}$ 와  $d_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ 는 입자의 평균 직경,  $V$ 는 molar volume을 나타낸다. 계산에 사용된 각 입자의 평균 직경은 Au는 10 (TEM 결과), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>는 5 nm (TEM 결과)를, molar volume은 Au는 10.2 cm<sup>3</sup>/mol, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>는 44.6 cm<sup>3</sup>/mol을 사용하였다. 수식(2)는 하나의 Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자에 Au 원자의 몰수를 표현한 것으로 초기 반응에 사용한 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>는 8 mL이므로 총 0.16 g의 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>가 사용되었으며 제작 후 총 Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>의 무게는 0.19 g으로 0.03 g의 무게 변화가 나타났고 이를 모두 Au 무게로 가정한다면 Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>의 농도는 0.5 nM 수준이다.

$$C_{\text{Au-Fe}_3\text{O}_4} = 0.5 \text{ nM}$$

제작한 자성-금 나노입자의 자기장의 영향을 확인하였다. Fig. 33과 같이 자성-금 나노입자의 코어로 이용된 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 자성체 나노입자와 자성-금 나노입자 모두 자석쪽으로 끌려옴을 확인함으로써 자성-금 나노입자의 자성 특성을 확인하였다.

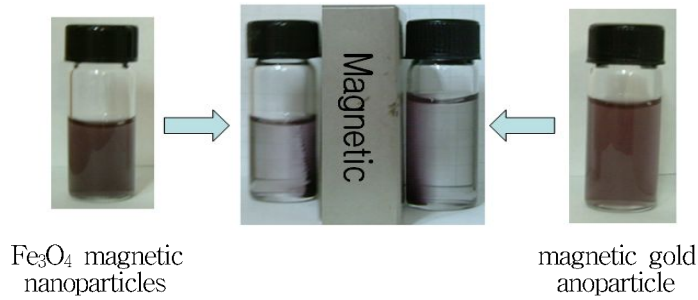


Fig. 33. Magnetic field character of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles and magnetic gold nanoparticles. It shows that the left is  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticle solution and the right is magnetic gold nanoparticle solution against the magnet.

제작한 자성-금 나노입자의 분광학적 특성은 Fig. 34에 나타내었다. 순수한 금 나노입자는 크기에 따라 가시선 흡수영역에 차이는 있지만 본 연구에서 비교를 위해 사용한 20 nm 크기의 금 나노입자는 Fig. 34과 같이 530 nm 그대로 최대 흡수파장을 가지는 반면, 자성-금 나노입자는 535 nm에서 최대 흡수를 보인다는 것을 확인하였다. 순수한 금 나노입자의 가시선 흡수는 금 나노입자 표면 전자에 의한 localized Surface Plasmon (LSP)에 의해 나타나는 고유 특성으로 자성-금 나노입자 또한 LSP 특성을 확인함으로써 표면에 금이 형성되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 순수한 금 나노입자의 LSP 특성의 발색성을 이용하여 단백질 및 핵산 표지에 이용하였고, 제작한 자성-금 나노입자 또한 표지물질로 이용가능함을 확인하였다. 반면 자성-금 나노입자 코어로 이용된  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  자성체는 가시선 영역에 흡수가 나타나지 않았다.

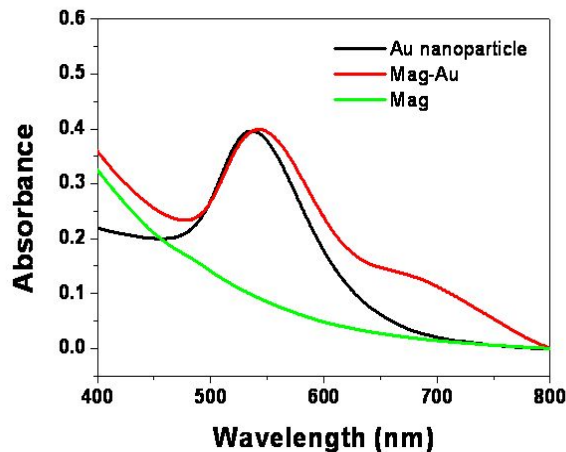


Fig. 34. Visible absorbance spectra of the nanoparticles, Au (black line), magnetic gold (Mag-Au, red line) and magnetic (Mag, yellow green line) particles.

첨가한  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 의 농도에 따라 제작되는  $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4$  나노입자 특성을 파악하기 위하여 2.5, 4, 5  $\mu\text{mole}$ 의  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자를 사용하여 제작하고 그 결과를 주사전자 현미경으로 특성을 파악하였다. 2와 4  $\mu\text{mole}$ 의  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 를 사용하였을 경우 크기에 있어 차이가 나타나지 않았지만 5  $\mu\text{mole}$ 의  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 를 사용하였을 경우 1 - 5  $\mu\text{m}$  크기까지 불균일하고 다양하게 나타났다. 이로부터 최대 포함시킬 수 있는  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자는 4  $\mu\text{mole}$  임을 알 수 있었다 (Fig. 35).

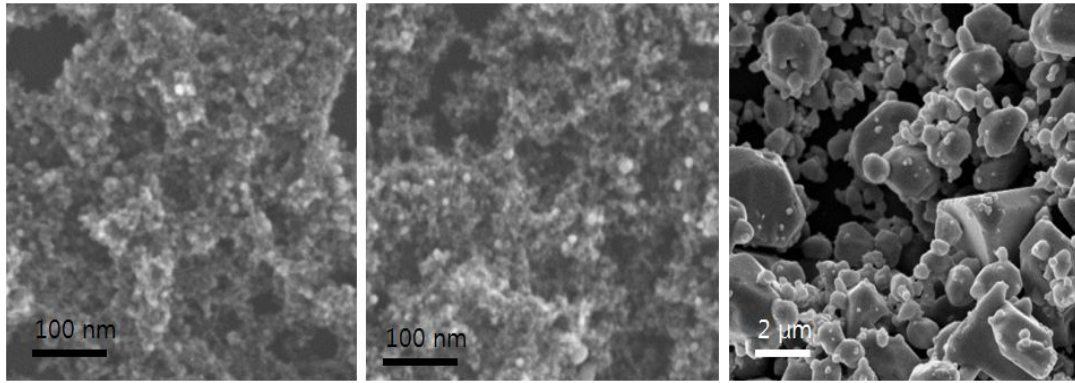


Fig. 35. SEM images of Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles fabricated with various concentrations of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (2.5, 4, 5 μmole Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).

#### 나. 식중독균 특이 항체-나노자성입자 중합체 제조

항체를 고정시키기 전 Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자는 535 nm (Fig. 34)에서 최대 흡광도를 보인 반면 항체 고정 후 550 nm로 red shift하였다. 이는 LSP 현상으로 설명될 수 있으며 Au 표면의 굴절을 변화로 발생하였다. 자석에 포집되는 시간을 결정하기 위하여 자성입자와 동일한 방법으로 실험하였으며 그 결과를 Fig. 36에 나타내었다. Fig. 36에서 알 수 있듯이, 입자주입 후 60초 이내에 99% 이상 포집되는 것을 알 수 있었으며 실제 식품시료를 사용할 경우 매트릭스를 고려하여 10분을 포집시간으로 결정하였다.

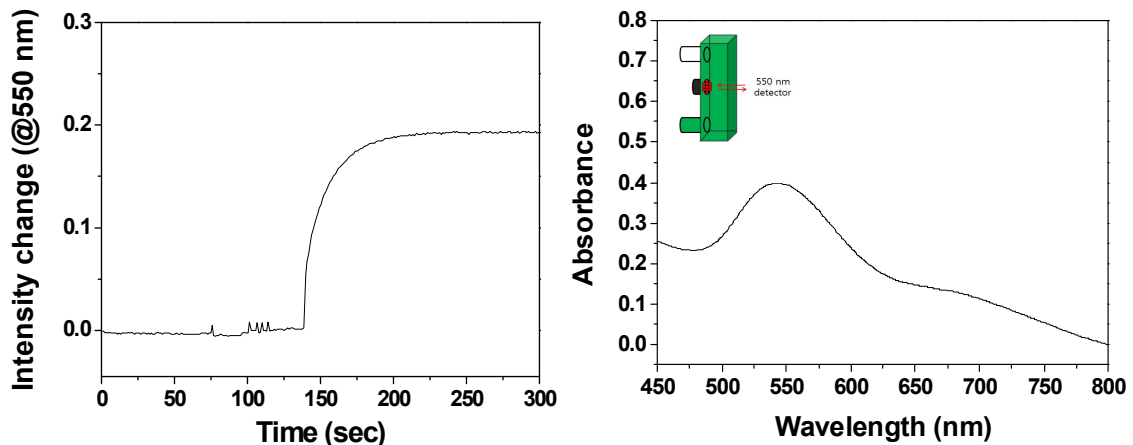


Fig. 36. Vis. spectrum and absorption intensity change according to collecting Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles.

#### 다. 최적 특이항체-나노자성 입자 중합체 선별 및 특성평가

*E. coli* O157:H7에 항체가 고정된 자성-금 나노입자를 첨가하기 전 (a)과 첨가한 후 (b)의 투과전자 현미경 이미지를 Fig. 37에 나타내었다. Fig. 37(a)에서와 같이 *E. coli* O157:H7은 400 × 1000 nm 크기정도이며 표면에 어떠한 것도 흡착되어 있지 않은 반면 Fig. 37(b)에는 자성-금 나노입자를 첨가하여 *E. coli* O157:H7 표면에 흡착시켰을 때 그 표면에 자성-금 나노입자들이 흡착되어 있음을 확인하였다. 따라서 자성-금 나노입자 표면에 고정화된 항체는 활성을 유지하고 있으며 항원인 *E. coli* O157:H7의 표면에 흡착되어 자석으로 분리할 수 있음을 확인하였다.

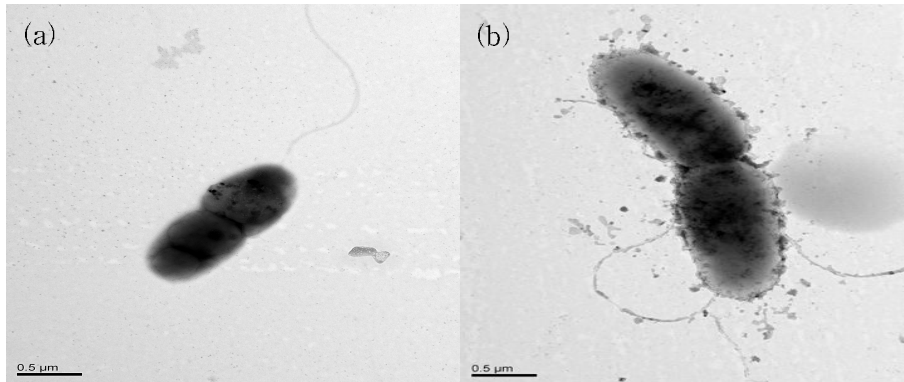


Fig. 37. TEM images of *E. coli* O157:H7 before (a) and after (b) adsorption with the antibodies immobilized magnetic gold nanoparticles.

라. 모델 식품검체로부터 균 특이 분리 최적 조건 조사

시료의 분리/농축과 동시에 검출까지 가능한 시스템을 제작하기 위해서는 자성-금 나노입자와 같은 다기능성 입자의 제작과 동시에 식중독균과 반응하지 않고 남아 있는 과량의 자성-금 나노입자의 제거가 중요하다. 이를 해결하기 위하여 0.45 μm의 nylon 막 필터를 이용, 과량의 자성-금 나노입자와 식중독균의 크기와 필터에 대한 흡착력 차이에 의해 분리하였다. 자성-금 나노입자는 평균 10 nm 수준으로 필터를 통과하거나 필터 표면에 흡착되는 반면 400 nm 이상 크기를 갖는 *E. coli* O157:H7은 필터를 통과하지 못했다. 필터를 이용하여 자성-금 나노입자와 *E. coli* O157:H7을 분리한 후 측정된 필터의 전자현미경 이미지를 Fig. 38에 나타내었다. Fig. 38에서 알 수 있듯이 필터 표면에 다량의 자성-금 나노입자들이 흡착되어 엉겨 붙어 있음을 알 수 있으며 *E. coli* O157:H7은 분리되어 존재하지 않았다. 따라서 시료를 필터에 통과시킴으로 과량의 자성-금 나노입자와 *E. coli* O157:H7 표면에 흡착된 나노입자를 분리시킬 수 있었다. 이러한 간단한 분리방법에 의해 *E. coli* O157:H7 표면에 흡착된 나노입자에서 발생하는 빛의 흡수 세기 변화로부터 분리/농축 파악 뿐만 아니라 *E. coli* O157:H7의 농도까지 확인 가능할 것으로 판단하였다. Fig. 39은 자성-금 나노입자와 *E. coli* O157:H7을 반응시킨 후 필터를 사용하여 과량의 자성-금 나노입자를 제거한 후 측정된 현미경 이미지 (a)와 필터를 사용하지 않고 과량의 자성-금 나노입자와 *E. coli* O157:H7이 존재하는 상태에서 측정된 현미경 이미지 (b)를 나타낸 것으로 필터의 효능을 확인할 수 있었다.

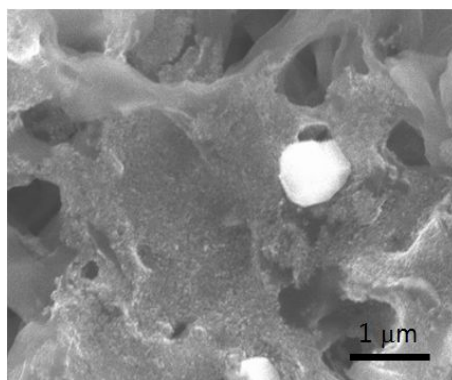


Fig. 38. SEM image of membrane after filtering sample solution with the excess magnetic gold nanoparticles and the nanoparticle adsorbed *E. coli* O157:H7.

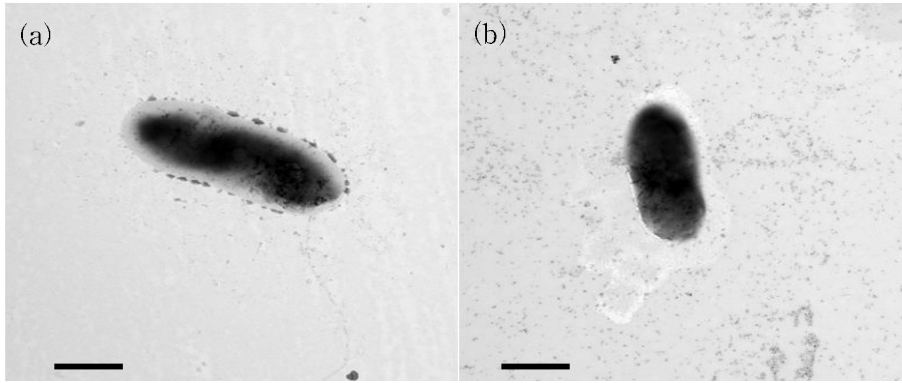


Fig. 39. TEM images of the magnetic gold nanoparticle adsorbed *E. coli* O157:H7 with (a) and without filter.

분광용 flow cell에서 제작한 자성-금 나노입자가 자석으로 농축되는지 visible spectrometer를 이용하여 측정하였다. Fig. 40 (a) 와 같이 장착된 flow cell에 자성-금 나노입자 400  $\mu\text{L}$ 를 흘렸을 때 2분 이내 90% 이상 포집됨을 확인하였다. Fig. 40 (b) 는 541 nm의 광을 조사하였을 경우 자성-금 나노입자가 cell상에 주입되었을 초기 용액상에 존재하다가 주입 15분 후 자석을 접근시키게 되면 자석으로 나노입자가 농축되어 광이 지나가는 용액상에 존재하지 않아 541 nm 광에 대한 흡수가 사라지는 것을 나타낸 그래프로써 100% 자석으로 농축시킬 수 없지만 2분 이내 90%이상, 10분 이내 95% 이상 농축시킬 수 있음을 확인하였다.

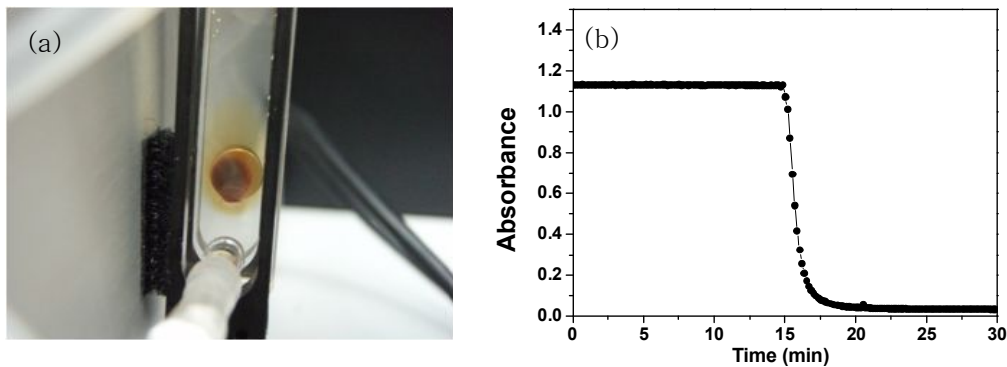


Fig. 40. Photograph of the concentrated magnetic gold nanoparticles with magnet in flow cell (a) and absorbance change at 541 nm wavelength.

Fig. 41에서 알 수 있듯이 *E. coli* O157:H7와 결합하지 않은 순수한 자성-금 나노입자는 541 nm에서 흡수되었지만 *E. coli* O157:H7과 결합한 자성-금 나노입자는 550 nm 정도에서 흡수하여 파장이동하였고, *E. coli* O157:H7 농도에 따른 파장이동은 나타나지 않았으며 흡광도 변화만 발생하였다. 이를 550 nm에서 흡수하는 파장의 세기로 정리하였을 때 *E. coli* O157:H7이 없을 경우의 표준편차를 노이즈 수준으로 생각하였을 때, 이보다 10배 정도 큰 세기를 보이는  $10^3$  cell/mL 수준의 *E. coli* O157:H7를 확인할 수 있었다. 따라서 real-time PCR로 들어가기 전 시료의 농축과정에서 screening 수준으로 *E. coli* O157:H7의 농도를 확인 가능함을 알았으며 real-time PCR을 통해 보다 미량의 정확한 검출이 가능할 것으로 판단하였다.

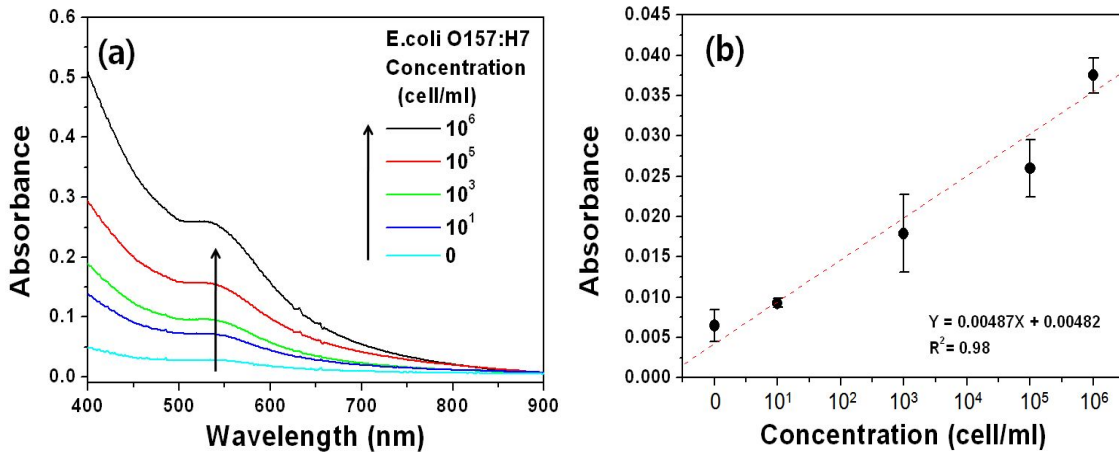


Fig. 41. Visible spectra of magnetic gold nanoparticle according with the concentration of *E. coli* O157:H7 (a) and absorption change at 550 nm (b).

또한 앞서 계산한 Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 농도와 Fig. 41의 흡광도를 이용하여 하나의 *E. coli*에 흡착되는 Anti-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 입자의 수를 계산하였다. Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>의 몰흡광계수는  $1.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이며 Anti-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 입자에서도 몰흡광계수가 변화하지 않는다는 가정으로  $10^6 \text{ cell/mL}$ 의 *E. coli* O157:H7인 경우 하나의 *E. coli* O157:H7에  $10^7$  개의 Anti-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 입자가 흡착됨을 알 수 있었다. Anti-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자를 사용하여 0에서  $10^5 \text{ cell/mL}$  *L. monocytogenes* 농도별 시료 전처리에 따른 입자 흡착특성 및 검출감도를 조사하였다. Fig. 42에서 투과전자현미경을 통해 *L. monocytogenes* 표면에 흡착된 Anti-*Listeria*-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자를 확인하였다. 나노입자를 흡착시키기 전과 후 *L. monocytogenes* 표면 상태가 달라져 있음을 알 수 있으며 미생물 주변에 미 반응된 나노입자가 거의 존재하지 않을 정도로 미 반응 나노입자 또한 잘 제거 되었음을 확인하였다.

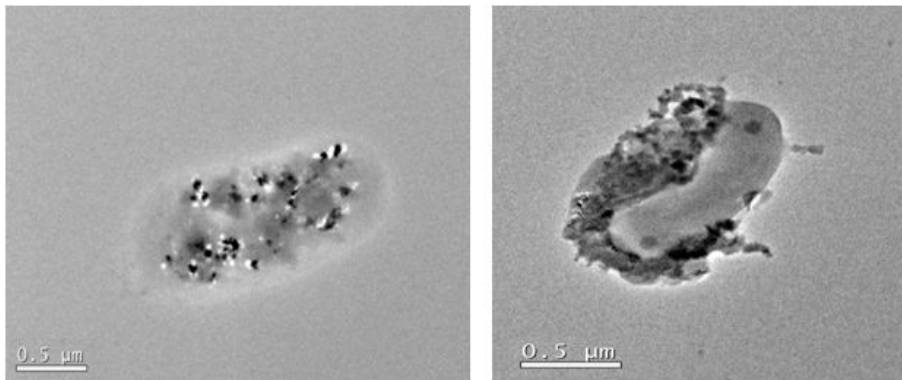


Fig. 42. TEM images of *Listeria* before (left) and after (right) adsorption with the antibodies immobilized gold nanomagnetic particles.

Fig. 43은 *L. monocytogenes* 각 농도별 모델시료에서 나노입자 결합에 따른 시료전처리 동시 검출에 대한 결과이며 550 nm 부근에서 최대 흡광도를 확인 할 수 있었다. 결과에서 0 cell/mL는 *L. monocytogenes*가 존재하지 않는 시료에 대한 control test로써  $10^2 \text{ cell/mL}$  까지 유사한 결과를 나타내었지만  $10^3 \text{ cell/mL}$  에서는 확실한 흡광도 차이를 볼 수 있었다. *L. monocytogenes*의 경우 모델시료에서  $10^3 \text{ cell/mL}$ 까지 검출할 수 있음을 확인하였다.



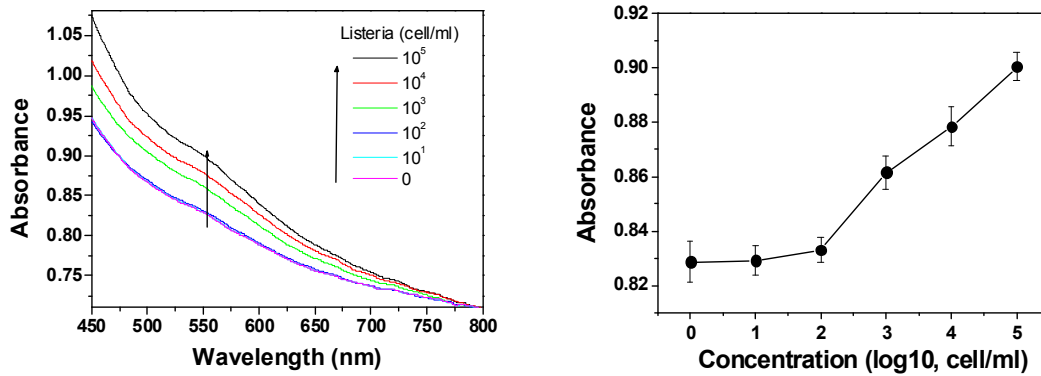


Fig. 43. Visible spectra of Anti *Listeria*-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles according with the concentration of *Listeria* (left) and absorption change at 550 nm (right).

Anti-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자를 사용하여 0에서 10<sup>5</sup> cell/mL *Salmonella* spp. 농도별 시료전처리에 따른 입자 흡착특성 및 검출감도를 조사하였다. Fig. 44에서 투과전자현미경을 통해 살모넬라 표면에 흡착된 Anti-*Salmonella*-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자를 확인하였다. 나노입자를 흡착시키기 전과 후 살모넬라 표면 상태가 달라져 있음을 알 수 있었다.

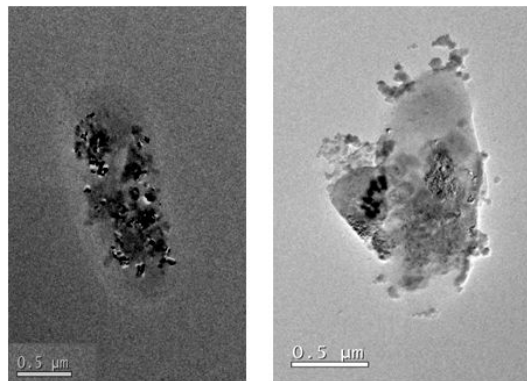


Fig. 44. TEM images of *Salmonella* before (left) and after (right) adsorption with the antibodies immobilized gold nanomagnetic particles.

Fig. 45은 *Salmonella* spp. 각 농도별 모델시료에서 나노입자 결합에 따른 시료전처리 동시 검출에 대한 결과이며 550 nm 부근에서 최대 흡광도를 확인 할 수 있었다. 결과에서 0 cell/mL 는 살모넬라가 존재하지 않는 시료에 대한 control test로써 10<sup>1</sup> cell/mL 까지 유사한 결과를 나타내었지만 10<sup>2</sup> cell/mL 에서는 확실한 흡광도 차이를 볼 수 있었다. *Salmonella* spp. 의 경우 모델시료에서 10<sup>2</sup> cell/mL 까지 검출할 수 있음을 확인하였다.

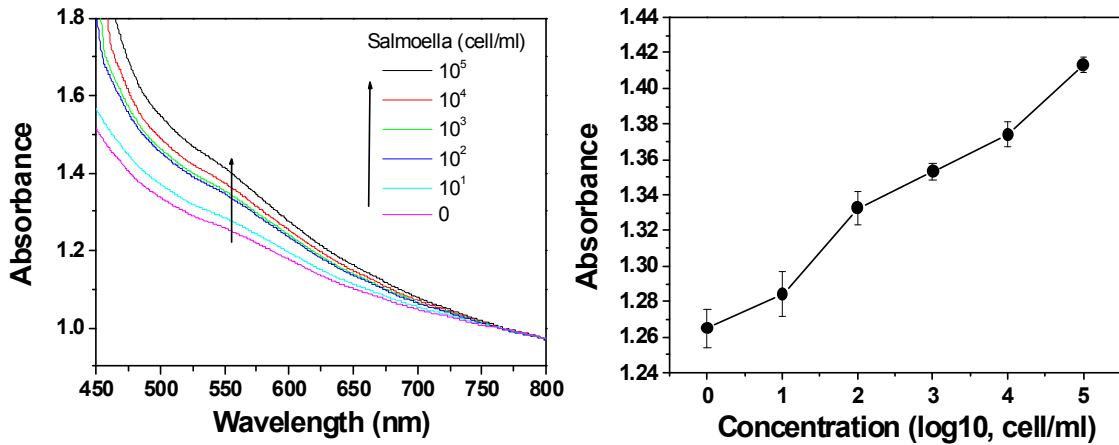


Fig. 45. Visible spectra of Anti *Salmonella*-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles according with the concentration of *Salmonella* (left) and absorption change at 550 nm (right).

Anti-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자를 사용하여 0에서 10<sup>5</sup> cell/mL *S. aureus* 농도별 시료전처리에 따른 입자 흡착특성 및 검출감도를 조사하였다. Fig. 46에서 투과전자현미경을 통해 *S. aureus* 표면에 흡착된 Anti-*S.aureus*-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 나노입자를 확인하였다. 나노입자를 흡착시키기 전과 후 *S. aureus* 표면 상태가 달라져 있음을 알 수 있었다. 또한 *S. aureus* 자체는 100 - 200 nm 정도 크기이며 나노입자가 흡착되면 서로 엉겨있는 형태로 존재한다는 것을 알 수 있었다.

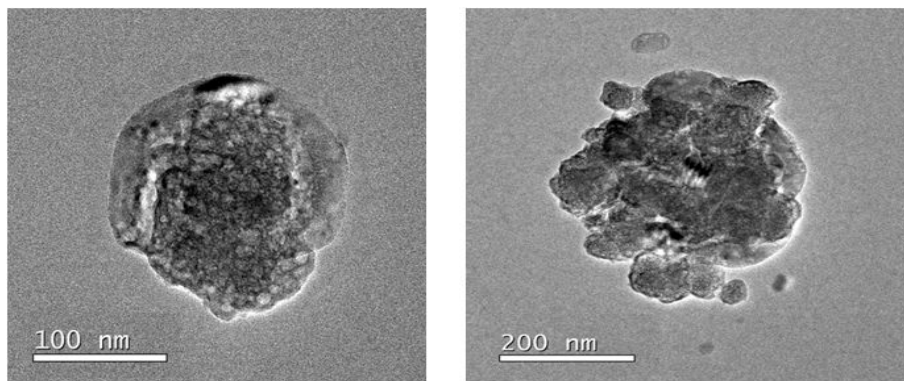


Fig. 46. TEM images of *S. aureus* before (left) and after (right) adsorption with the antibodies immobilized gold nanomagnetic particles.

Fig. 47은 *S. aureus* 각 농도별 모델시료에서 나노입자 결합에 따른 시료전처리 동시 검출에 대한 결과이며 550 nm 부근에서 최대 흡광도를 확인 할 수 있었다. 결과에서 control test의 흡광도와 10<sup>1</sup> 및 10<sup>2</sup> cell/mL 은 유사한 세기의 흡광도 결과를 나타내었지만 10<sup>3</sup> cell/mL 에서는 확실한 흡광도 차이를 볼 수 있었다. *S. aureus*의 경우 모델시료에서 10<sup>3</sup> cell/mL까지 검출할 수 있음을 확인하였다.

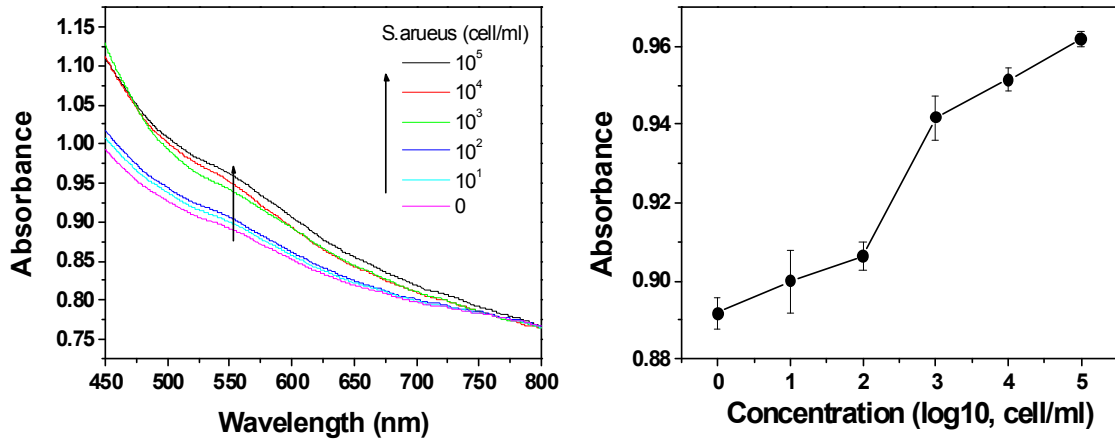


Fig. 47. Visible spectra of Anti *S.aureus*-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles according with the concentration of *S. aureus* (left) and absorption change at 550 nm (right).

이상의 Anti-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 입자를 이용한 시료전처리 관련 프로토콜을 정리하였다 (Fig. 48).

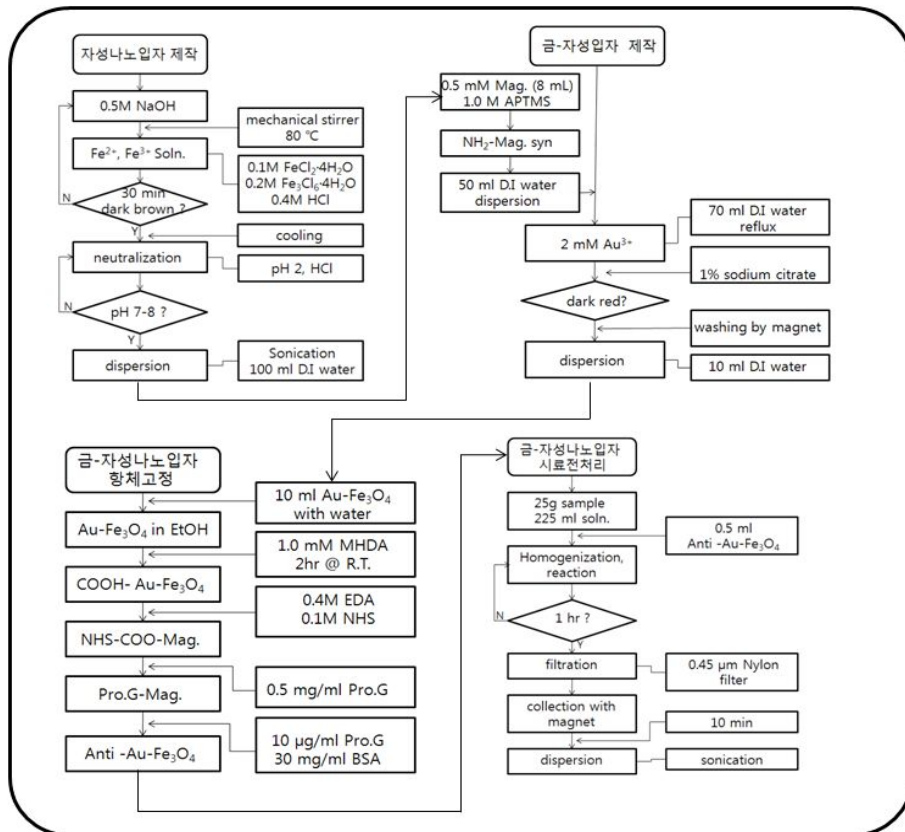


Fig. 48. Summary of sample preparation protocol using Anti-Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles.

## 7. 다중검출용 랩온어칩(Lab-on-a-chip)의 설계 및 제작

### 가. 3D CAD를 이용한 랩온어칩 설계 및 PCR 증폭/계측부위 설계

다중검출용 랩온어칩은 4개의 Layer가 적층된 칩이며, Inlet/Outlet/PCR 증폭 및 계측부위 구성과 유전자 증폭 반응을 위해 3 channel을 갖는 기본 구조로 설계하였다. 기관은 시료 주입 Inlet과 Outlet, 유체가 이동할 수 있는 채널과 Inlet/Outlet/PCR 증폭 및 계측부위로 구성되고, 바닥면을 형성시켜주었으며 친수성 표면 개질되었다. 기관은 90% 이상의 광투과성과 120°C 이

상의 내열도를 지니며, 특히 기판은 열전달 효율을 높이기 위하여 0.2 mm 이내로 두께를 정리하였다. 또한 기판은 reagent 부피를 최소화하여 5  $\mu$ L-10  $\mu$ L이내의 부피를 갖도록 설계하였으며, 기판은 투과나 반사에 의한 빛을 차단시켜 노이즈 값을 최소화하기 위하여 적용하였다. 기판 내에 길이 5 mm/폭 2 mm인 PCR 증폭 부위를 설계하였으며, 실시간 측정 과정에서 발생될 수 있는 기포 등의 문제는 채널 기벽을 따라 형성되기 때문에 PCR 증폭 부위를 바탕으로 기판 내에 길이 3 mm/폭 1 mm 계측 부위를 설계하여 실시간 측정 과정에서 발생될 수 있는 문제를 최소화하여 안정적인 계측값을 얻도록 설계하였다. 따라서, 본 연구과제의 다중검출용 랩온어칩 설계특징은 a) 실시간 계측과정에 발생하는 문제점 최소화 및 안정적인 계측 신호 확보를 위한 PCR 계측 부위 설계 및 재료선정, b) 개선된 칩 제조 방법을 통하여 대량 생산의 안정성 확보 및 c) 5  $\mu$ L-10  $\mu$ L 이내의 적은 시료 부피 등의 특징을 지닌다.

#### 나. 칩 제작용 코어금형 제작 및 성형사출

PC (Polycarbonate) 재료는 90% 이상의 광투과성과 120 $^{\circ}$ C 이상에서 내열도를 갖는 재료이며 광학적 간섭 및 열 변형이 없고, COC (Cyclo Olefin Copolymer) 재료보다 저가이다 (PC: 4,800원/kg, COC 25,000원/kg). 코어금형을 제작하여 다중검출용 랩온어칩을 제작하였다. 특히, 기판은 빠른 열전달효율을 위하여 두께 0.2 mm이내로 최소화 하여 제작하였으며, 전체 칩 두께는 0.7 mm 이내로 제작하였다.

#### 다. PCR 증폭/검출용 칩 시제품 제작 (Fig. 49)

- (1) Material : PC (Polycarbonate)
- (2) Channel Number : 3 Channels
- (3) Channel Volume (Total) : 5  $\mu$ L-10  $\mu$ L
- (4) Heat Stability : <120 $^{\circ}$ C
- (5) Optical Spec. : Transparent (<90%)



Fig. 49. Multidetetection Lab-on-a-chip Prototype.

#### (6) 다중검출용 랩온어칩에서의 PCR 증폭 성능평가

##### (가) 온도블록 최적화

##### ① 열 방출 효율 극대화

온도블록은 Heating과 Cooling을 동시에 수행할 수 있는 펠티어 소자를 사용하였다. Fig. 50과 같이, 온도블록 아래 열을 방출 해주는 heat sink를 배치하고, heat sink 앞과 뒤쪽에 fan을 장착하여 단일 fan보다 높은 열방출 효율을 얻었다 (Fig. 50).

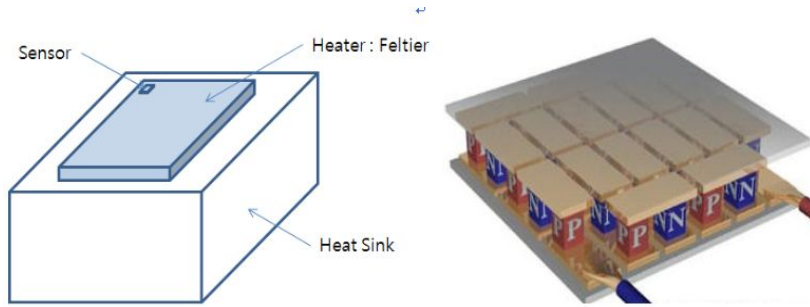


Fig. 50. Heating block and Peltier device.

② 온도블록의 균일한 표면 온도 분포

온도블록의 균일한 표면 온도 분포는 다중검출용 랩온어칩을 이용한 PCR 과정에서 가장 중요한 요소이다. 온도블록의 표면온도 분포를 알아보기 위하여 다중검출용 랩온어칩과 접촉하는 온도블록 표면을 9포인트로 나누고 각 포인트 별로 온도를 측정하였다. 목표온도를 56°C로 설정하고, 온도블록의 표면온도 분포를 측정한 결과 Fig. 52과 같으며,  $\pm 1^\circ\text{C}$  이내 들어오는 것을 확인할 수 있었다. 이는, 온도블록의 균일한 표면온도 분포는 온도제어 정확성과 다채널로 이루어진 다중검출용 랩온어칩에서 효율적인 PCR과정이 일어남을 간접적으로 보여주는 결과이다.

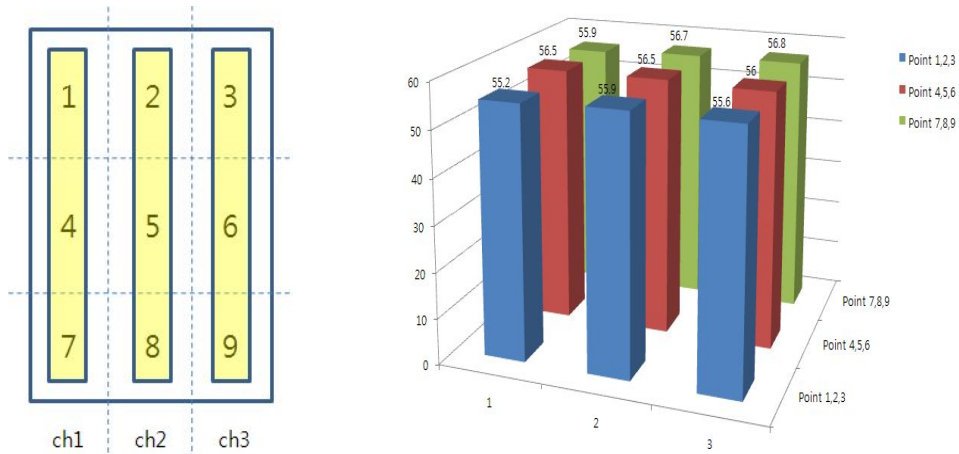


Fig. 51. 9 point of heating block. Fig. 52. Heating block temperature profile result.

① 온도블록의 온도 제어 (30 cycles)

PCR과정에서 온도블록의 온도 제어는 30 cycles기준으로 수행하였으며, pre\_denaturation 95°C (5분), denaturation 95°C (10초), annealing 55°C (10초), extension 72°C (10초)로 설정하여 온도블록에 접촉된 칩 내부 온도를 측정하였다. 30cycles 수행하는 동안 Fig. 53과 같이 동일하게 반복적으로 재현되는 온도 사이클 결과 그래프를 얻었으며, 전체 사이클 동안에 각 사이클 별로 동등한 온도제어가 이루어지고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 53).

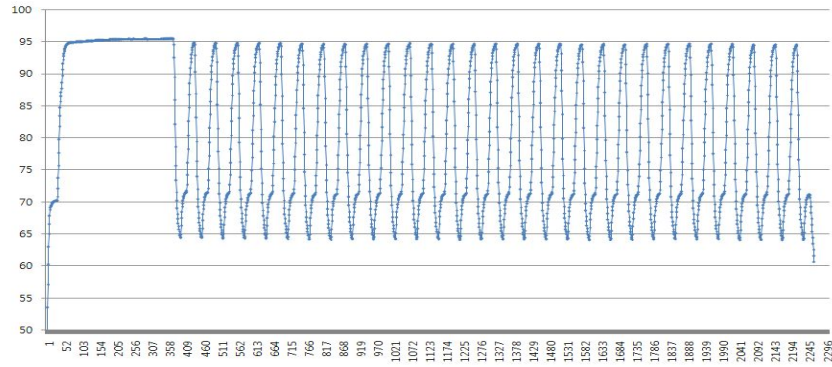


Fig. 53. 30cycles, Heating block temperature graph.

또한, Bio-Rad사의 DNA Engine Peltier Thermal Cycler와 나노바이오시스(주)의 NBS-100 온도블록 성능을 평가하기 위하여 denaturation 95°C (10초), annealing 55°C (10초) 그리고 extension 72°C (10초) 조건으로 PCR 하여, 온도 블록의 칩 내부 온도를 비교 측정하였다. 30 cycles을 수행하는데 걸리는 시간은 Bio-Rad사 장비 경우 47분, NBS-100 장비는 총 30분으로 나타나 Bio-Rad사의 장비보다 17분 빠르게 결과를 얻을 수 있었다. Bio-Rad사의 Heating & Cooling rate은 1.5°C & -1.3°C/sec이며, 나노바이오시스(주)의 NBS-100은 4°C & -5.3°C/sec임을 알 수 있었다. 이는 온도 블록 제어 성능에 있어서 Bio-Rad사의 제품보다 훨씬 우수하였다.

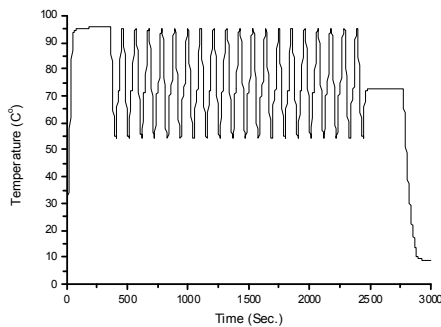


Fig. 54. Temperature detection of Bio-Rad (20 cycles).

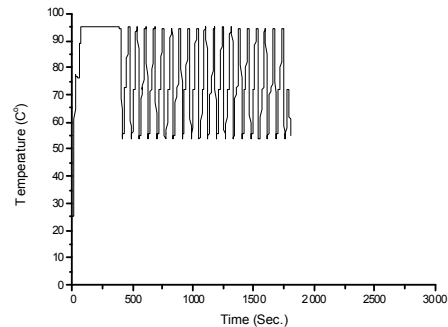


Fig. 55. Temperature detection of NBS-100 (20 cycles).

(나) 다중검출용 랩온어칩 기포 및 Leaking 테스트

다중 검출용 랩온어칩 내에 Red 염료를 5 μL 주입하여 나노바이오시스(주)의 NBS-100 장비를 30 cycles 구동 후 칩내 발생되는 기포 및 leaking 테스트를 수행하였다. 결과는 Fig. 56과

같이 PCR 증폭/계측 부위내에 기포 발생이 없었으며, Inlet 및 Outlet부위에는 leaking이 발생하지 않았다.

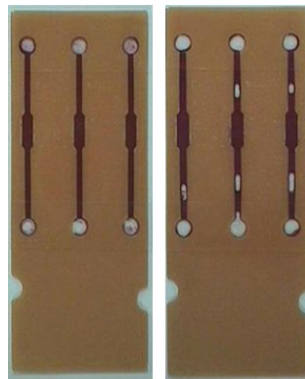


Fig. 56. PCR images using NBS-100 (Before and After).

(다) 다중검출용 랩온어칩에서 PCR 검증 (Roche사의 LightCycler 1.5, Capillary Tube/나노바이오시스(주)의 NBS-100, 다중검출용 랩온어칩)

2X TaKaRa SYBR Green Kit에 pK7CAT Template DNA (50ng/20 $\mu$ L), Primer Forward, Primer Reverse (Final Concentration: 1 $\mu$ mole), BSA, Hot start taq polymerase 첨가하여 칩(3 채널)에 각 8  $\mu$ L와 Roche사의 capillary tube에 25  $\mu$ L를 주입하고, 자사의 real-time PCR기기 (35분)와 Roche사의 Light Cycler (30분)에서 30 cycles을 진행하였다. 결과는 Fig. 57과 같으며, 시료량은 Roche사의 capillary tube 보다 1/3 감소하였고 PCR 효율과 진행시간에 있어서 동등 및 유사한 성능을 보여주었다. NBS-100 장비와 다중검출용 랩온어칩에서 동일한 조건으로 PCR 반복 수행한 결과, Fig. 57과 같이 동일한 결과를 얻었다. PCR 재현성을 확인한 결과, 나노바이오시스(주)에서 개발한 NBS-100은 탑재된 온도블록의 균일한 온도 분포 및 PCR 증폭에 필요한 온도 안정성을 보여주고 있으며, 다중검출용 랩온어칩에서 효율적인 PCR 반응이 일어남을 보여주었다. 결론적으로, 본 연구과제를 통해 개발된 나노바이오시스(주)의 다중검출용 랩온어칩을 사용한 NBS-100 유전자 증폭 정량 시스템은, PCR tube를 사용한 타사의 real-time PCR 시스템과 동등하거나 더 좋은 성능을 보여주었다.

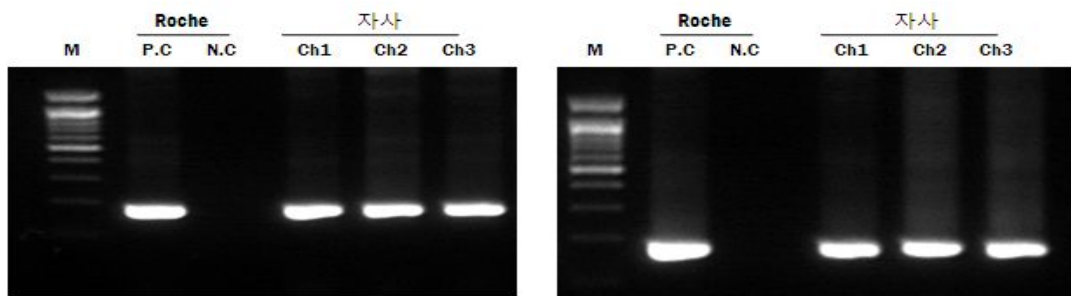


Fig. 57. Multidetecion Lab-on-a-chip PCR gel image (Roche vs. Nanobiosys.INC).

## 8. 다중검출용 광학계 시스템 구축

### 가. 다중검출용 형광광학계 설계 및 제작

#### (1) 형광광학계 설계 및 제작

2차년도에 다중검출용 광학 시스템 구축은 소형 및 다중 검출이 용이한 형광광학계를 구현하는데 있으며, 형광물질은 일반적으로 사용되어지는 SYBR Green으로 선정하였다. SYBR Green은 490 nm에서 excitation하고 530 nm에서 emission하기 때문에 이에 맞는 파장과 필터를 선정하여 형광광학계 구축하였다. 광원은 고휘도 LED (470 nm)를 사용하였으며, 고휘도 LED의 경우 광량이 적기 때문에 여러 개의 LED를 일정한 간격으로 배치하고, 발산하는 광원을 렌즈를 통해 빛을 모아줌으로서 광량을 증가시키는 효과를 얻었다. SYBR Green의 excitation 파장을 분리하기 위하여 495nm의 excitation(short pass) filter를 사용하였으며, 이를 통과한 빛은 dichroic filter를 지나 렌즈를 통해 다중검출용 랩온어칩에 focusing되도록 설계 및 제작하였다. 이때, 다중검출용 랩온어칩 내부의 SYBR Green은 광원에 의해 530 nm 빛을 방출하게 되며, 렌즈와 dichroic filter를 지나 emission (Long pass) filter에서 520 nm를 투과시켜 photo-diode에 수신되도록 설계 및 제작함으로써 다중검출용 소형광학계를 구축하였다. 이때 photo-diode는 형광신호를 전기신호로 변환시켜주는 장치이다. 또한, 다중검출용 랩온어칩은 3개의 채널로 구성되며, 3개 채널에서 동시에 검출하기 위해서는 광학경로를 고려한 설계가 중요하기 때문에 Fig. 60과 같이 3개 채널에서 photo-diode에 결상되도록 초점거리를 고려하여 렌즈를 최적화로 설계 및 제작하였다.

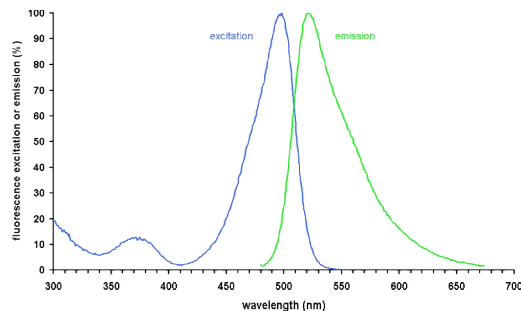


Fig. 58. SYBR Green Spectrogram.

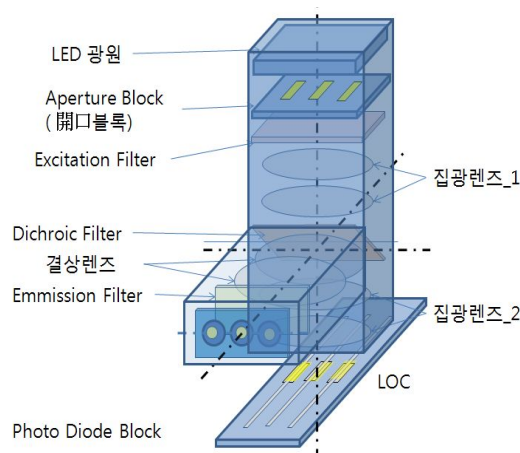


Fig. 59. Configuration of fluorescence optics.



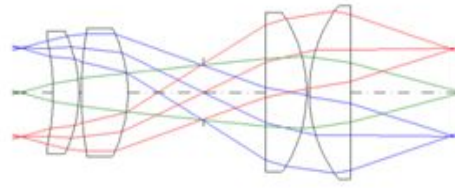


Fig. 60. Multidetection optical path design.

(2) Real-time PCR 장비 (나노바이오시스(주)의 NBS-100)

Fig. 61과 같으며, 온도블록의 효율적 온도 제어, 온도 제어 시간 단축 ( 80분 → 35분, 30 cycles 기준), 실시간 형광검출 및 정량이 가능한 real-time PCR 기능 탑재, 일회용 플라스틱 다중 유전자 검출 진단칩 개발과 같이 개선되었다.



Fig. 61. Nanobiosys.INC real-time PCR (NBS-100).

나. 형광광학계의 성능 평가

형광광학계 성능을 평가하기 위하여 DNA 농도를 70 pg - 800 ng 제조하였으며, 다중검출용 랩온어칩의 채널 1, 2, 3에 8  $\mu$ L 주입하여 농도에 따른 형광값을 측정하였다. 아래 결과 Fig. 62와 같이 농도가 증가함에 따라 다중검출용 랩온어칩의 채널 1, 2, 3에서 형광값이 증가됨을 보여주고 있으며, 재현성 평가 결과 동등한 성능을 보여주었다.

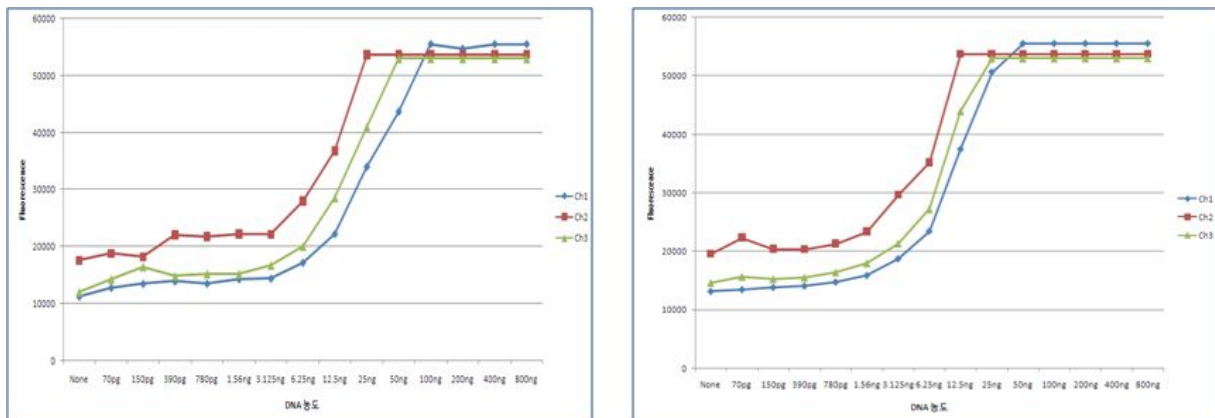


Fig. 62. Chip (1, 2, 3) optical detection result of multidetection Lab-on-a-chip.

다. 검출용 probe의 형광특성 평가

식중독 균인 *L. monocyogenes*, ATCC153131을 선택하여 DNA 50 ng과 30 cycles을 기준으로 Roche사의 LightCycler 1.5와 나노바이오시스(주)의 NBS-100 장비에서 검출용 probe의 형광특성을 실시간으로 평가하였으며, Fig. 63과 같이 유사한 PCR 효율과 진행시간을 보여주었다.

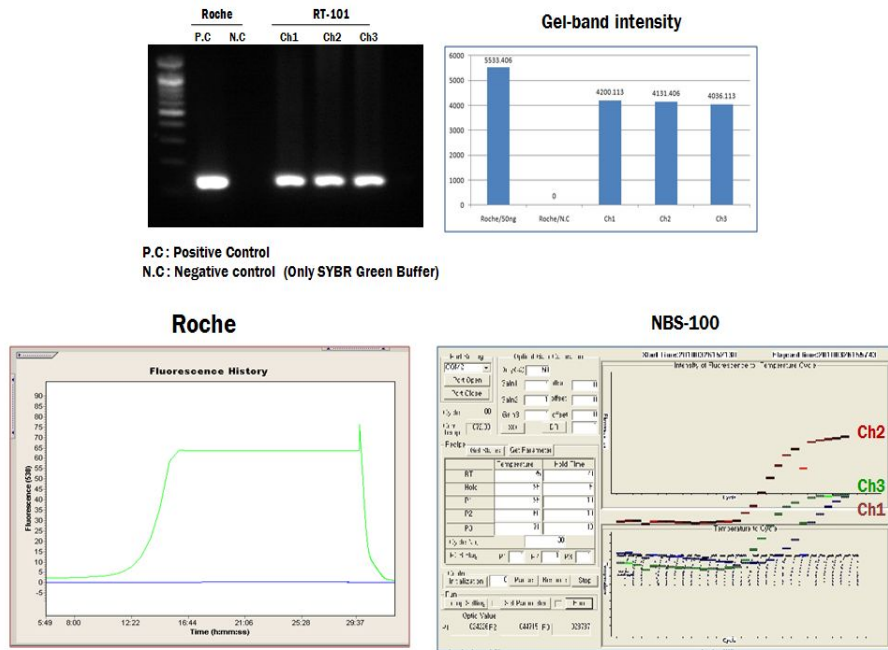


Fig. 63. Data of real-time PCR amplification (30 cycles) using NBS-100 (Nabobiosys) and LightCycler 1.5 (Roche).

9. 나노자성-면역 분리기반 시료 전처리 기술을 이용한 식중독균 농축 및 전처리  
가. 신선편이채소 대상 균 특이 분리능 조사

2차년도 연구결과로 얻어진 *E. coli* O157:H7에 특이적인 항체와 나노자성입자의 중합체를 사용하여 주요 식중독 원인균인 *E. coli* O157:H7만을 신선편이 채소로부터 분리하여 검출을 하였고, 본 과제에서 제작한 랩온어칩 시스템 NBS-100을 사용하여 real-time PCR법으로 확인하였으며, 또한 실제 식품의 matrix에 영향을 받지 않고 실시간으로 검출될 수 있는 검출한도를 조사하였다. 각 균은 배양하여  $10 - 10^6$  cfu/mL 까지 10배씩 단계별로 희석하여 25 g의 양상추가 들어있는 멸균백에 각각 접종하여 펄프 수 225 g을 넣고 30초간 스토마커한 후, 나노자성중합체를 이용하여 각 멸균백에 해당되는 모든 균을 포획한 후, PBS 용액으로 식중독균만을 분리하였다. 이중 일부는 DNA를 추출한 후, real-time PCR을 수행하였으며, 일부는 각 희석 배율에 따른 실제로 포획된 식중독균수를 구하기 위해 적정량 희석하여 식품공전을 기반으로 한 균 특이적인 분리선택 고체배지에 도말하고 24시간 배양하여 세포수를 결정하였다. 모든 real-time PCR 결과는 본 과제에서 제작한 랩온어칩 시스템 NBS-100을 사용하여 나노바이오시스(주)에서 특이적으로 제작한 4종의 식중독균 특이 프라이머를 사용하였으며, 분석조건은 95°C 2분 denature 후, 95°C 10초, 72°C 10초 30 cycles을 수행하였고, 모든 실험은 3개의 replica를 가지고 3번 이상 반복하여 수행하였다. 그 결과 식중독균 특이항체와 나노자성 중합체를 이용한

시료전처리 방법을 사용하여 10 cfu/mL 세포수로 접종된 개체군의 고체배지에서는 *E. coli* O157:H7가 검출되지 않았지만 real-time PCR에 의한  $C_T$  (Threshold Cycle)가 29로 확인됨에 따라 세포수가 많을수록 항체-나노자성 중합체에 의한 세포의 검출효과가 좋음을 확인할 수 있었다 (Fig. 64).

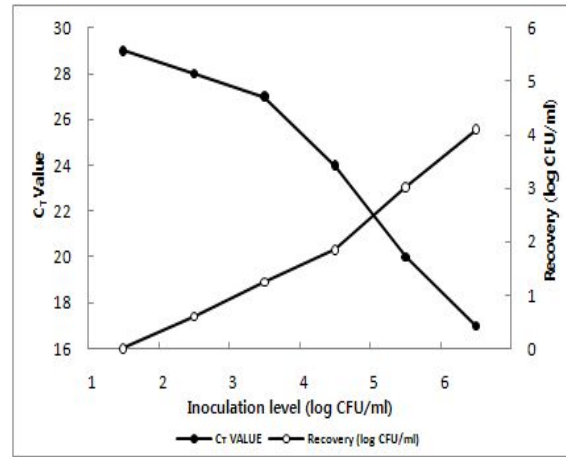


Fig. 64.  $C_T$  values obtained by real-time PCR assay and recovery of *E. coli* O157:H7 obtained by preparation method using nanomagnetic-antibody in artificially inoculated vegetables.

#### 나. 기존 시료전처리법과의 비교

본 과제에서 연구개발한 식중독균 특이항체와 나노자성 중합체 기반의 시료전처리 방법의 분리능을 확인하기 위하여 식품공전법 기반의 기존 시료전처리법과 비교실험을 수행하였다. 각 균은 배양하여  $10^6$ 에서 10 cfu/mL 까지 10배씩 단계별로 희석하여 25 g의 양상추가 들어있는 멸균백에 각각 접종하여 펄톤 수 225 g을 넣고 30초간 스토마커하여 두 개의 실험군을 준비하였다. 공전법 기반 실험군은 각 멸균백에서 1 mL을 채취하여 DNA를 추출하였고, 또 다른 실험군은 나노자성중합체를 사용하여 공전법과 동일량의 균을 포획한 후 DNA를 추출하였다. 두 개의 실험군에 대한 real-time PCR 수행 결과 (Fig. 65), 나노자성 중합체를 이용한 시료전처리 방법이  $10^5$ cfu/mL 보다 많은 세균수가 있을 때 기존의 전처리법보다 검출능이 떨어지지만, 10 cfu/mL의 적은 수의 세균이 존재하는 실험군에서 기존의 전처리법보다 더 좋은 검출능을 나타내어 실제 식품에서 아주 적은 수로 존재하는 식중독균의 검출에는 오히려 효과적인 방법일 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

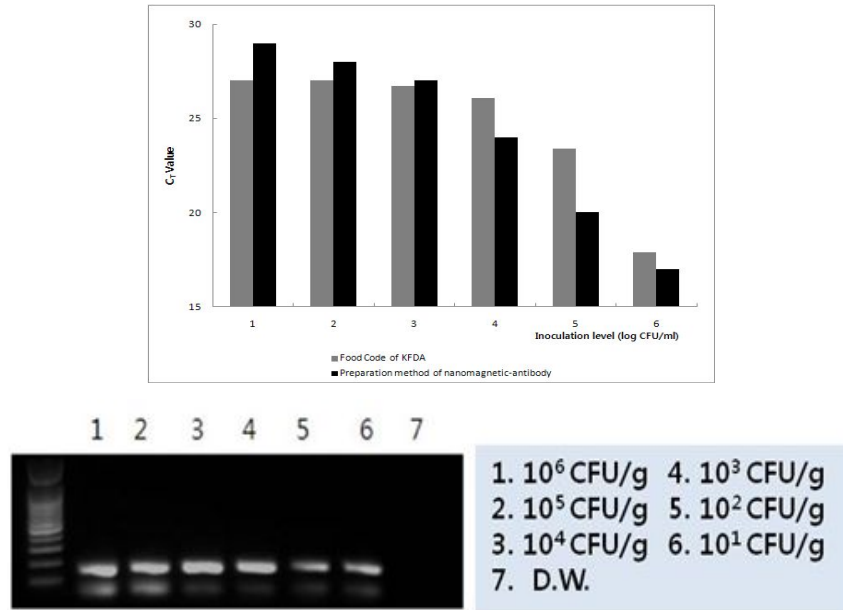


Fig. 65. Comparison of  $C_T$  values obtained by real-time PCR assay using preparation method based on nanomagnetic-antibody and Food Code of KFDA in artificially inoculated vegetables with *E. coli* O157:H7 NCCP11091.

#### 10. 시료 전처리 기술이 적용된 랩온어칩 검출 시스템 특성 평가 및 검증

##### 가. 신선편이채소 대상 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 검출 감도 조사

신선편이채소에서 4종의 식중독균에 오염되어 있을 때 신선편이채소의 종류에 따라 식중독균에 따라 실시간으로 검출할 수 있는 최소한의 세포수를 알기 위한 실험을 수행하였다. 신선편이채소 중 양상추, 치커리, 베이비채소를 대상으로 하여 *E. coli* O157:H7 NCCP11091, *S. aureus* ATCC6538, *Salmonella* spp. ATCC13076, *L. monocytogenes* ATCC15313의 각 균을 배양하여 10배씩 단계별로 10<sup>6</sup>에서 10 cfu/mL 세포수가 되도록 희석하여 희석배율별로 4종의 균을 동량으로 섞은 후, 25 g 씩 시료가 들어있는 멸균백에 각각 희석단계별로 접종하여 펄슨 수 225 g을 넣고 시료 전처리 후, 1 mL를 채취하여 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행하였다.

자동 설정된 최소 역가에 따라 각 균별 시료별  $C_T$  값이 산출되었다 (Table 11). *E. coli* O157:H7는 모든 시료에서 27의  $C_T$  값을 나타내어 10 cfu/mL 세포수까지 검출이 가능하였으며, *Salmonella* spp.는 치커리에서만 10<sup>3</sup> cfu/mL 세포수까지 검출되었고 치커리와 양상추에서는 *E. coli* O157:H7과 마찬가지로 10 cfu/mL 세포수까지 검출할 수 있었다. *L. monocytogenes*는 27의  $C_T$  값으로 치커리와 양상추에서 10<sup>3</sup> cfu/mL 세포수까지 검출이 가능하였으며, 베이비채소에서는 10 cfu/mL 세포수까지 검출되었다. *S. aureus*는 치커리와 양상추에서 10<sup>4</sup> cfu/mL 까지 베이비채소에서는 10<sup>3</sup> cfu/mL 세포수까지 검출되었다. 이 결과는 시료에 따라 큰 차이는 없지만 대체적으로 베이비채소에서 검출감도가 더 좋았으며, 그람음성균이 그람양성균보다 더 적은 세포수에서도 검출이 가능하였다. 또한 4종의 식중독균을 혼합하여 접종하여 검출 한 결과로 4종의 식중독균간의 간섭이 있을 것으로 생각되므로 단독으로 존재한다면 검출감도는 더 높아질 수 있을 것이다.

Table 11. Mean C<sub>T</sub> values obtained by real-time PCR (NBS-100) using different amounts (10<sup>6</sup> to 10<sup>1</sup> cfu/mL) of artificially inoculated vegetables

Strain	No. of cell (cfu/g)	C <sub>T</sub> value		
		Chicory	Sprout	Lettuce
<i>E. coli</i> O157:H7 NCCP11091	10 <sup>6</sup>	15.8	16.1	17.9
	10 <sup>5</sup>	19.7	19.7	23.4
	10 <sup>4</sup>	23.3	24.1	26.1
	10 <sup>3</sup>	25.7	26.1	26.7
	10 <sup>2</sup>	27.0	26.8	27.0
	10	27.9	27.0	27.4
<i>Salmonella</i> spp. ATCC13076	10 <sup>6</sup>	16.5	16.2	17.7
	10 <sup>5</sup>	20.2	19.6	23.0
	10 <sup>4</sup>	24.0	24.4	27.1
	10 <sup>3</sup>	27.0	27.0	28.4
	10 <sup>2</sup>	ND	28.7	29.4
	10	ND	29.7	29.7
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	10 <sup>6</sup>	17.1	14.2	16.2
	10 <sup>5</sup>	20.3	17.4	21.3
	10 <sup>4</sup>	24.0	20.9	24.3
	10 <sup>3</sup>	27.0	24.1	27.0
	10 <sup>2</sup>	ND	27.1	ND
	10	ND	28.6	ND
<i>S. aureus</i> ATCC6538	10 <sup>6</sup>	19.1	18.6	17.7
	10 <sup>5</sup>	23.1	22.7	23.0
	10 <sup>4</sup>	27.0	27.0	26.9
	10 <sup>3</sup>	ND	29.8	ND
	10 <sup>2</sup>	ND	ND	ND
	10	ND	ND	ND

#### 나. 검출 특이성 조사

주요 식중독 원인균인 *E. coli* O157:H7 NCCP11091, *S. aureus* ATCC6538, *Salmonella* spp. ATCC13076, *L. monocytogenes* ATCC15313 의 검출에 사용된 프라이머들이 각 식중독균을 특이적으로 검출할 수 있는지를 확인하기 위해 지금까지 실험에 사용된 균주 이외에 또다른 *E. coli* O157:H7인 932 균주, *Salmonella* spp. ATCC14028, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC43971, *L. monocytogenes* ATCC19111, *S. aureus* ATCC25923, *S. epidermidis* ATCC12228 와 이들 프라이머로 검출될 수 없는 절대 음성대조균으로 *B. cereus* ATCC14579 를 대상으로 각 검출 프라이머에 대한 검출 특이성을 검증하였다.

각 균주를 단일 혹은 혼합배양하여 각 실험군 균주의 DNA를 추출하여 이를 주형으로 하여 real-time PCR을 수행한 결과 *E. coli* O157 프라이머는 *E. coli* O157:H7 NCCP11091 뿐 만 아니라 932 균주도 검출할 수 있었으며, 이들과 함께 *B. cereus* ATCC14579를 혼합배양 하였을 경우에도 한 개의 증폭곡선을 나타내었고, *E. coli* O157 프라이머 이외의 3쌍의 프라이머를 동일한 실험군에 적용 시 어떤 실험군에서도 증폭이 검출되지 않았다 (Table 12). 또한, *Salmonella* 프라이머는 검출 실험결과 ATCC13076, ATCC14028 뿐 아니라 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC43971도 검출할 수 있어 *Salmonella* spp. 모두를 검출할 수 있는 프라이머임을 확인하였으며, *L. monocytogenes* 프라이머도 ATCC15313와 ATCC19111등 *L. monocytogenes* 만을 검출할 수 있었다. *S. aureus* 프라이머 또한 ATCC6538 이외에 또 다

른 *S. aureus*인 ATCC25923을 검출할 수 있었으며, *S. epidermidis* ATCC12228는 검출되지 않아 *S. aureus* 특이적인 프라이머임을 확인 할 수 있었다 (Table 12). 또한 4쌍의 프라이머들을 동시에 *E. coli* O157:H7 2개 균과 *B. cereus* ATCC14579 혼합균주, *Salmonella* spp. 3개 균과 *B. cereus* ATCC14579 혼합균주, *L. monocytogenes* 2개 균과 *B. cereus* ATCC14579 혼합균주, *S. aureus* 2개균, *S. epidermidis* 와 *B. cereus* ATCC14579 혼합균주들에 적용하였을 때도 각 균주 특이적인 *Tm* 값에서 전형적인 melting curve를 나타내고 있음을 확인하였다 (Fig. 66).

Table 12. Specificity of the four primer pairs in various food-borne bacteria

Strain	Primer			
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
<i>E. coli</i> O157:H7 NCCP11091	+	-	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7 932	+	-	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7 NCCP11091/ <i>E. coli</i> O157:H7 932	+	-	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7 NCCP11091/ <i>E. coli</i> O157:H7 932/ <i>B. cereus</i> ATCC14579	+	-	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC14579	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.ATCC13076	-	+	-	-
<i>Salmonella</i> spp.ATCC14028	-	+	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica ATCC43971	-	+	-	-
<i>Salmonella</i> spp.ATCC13076/ <i>Salmonella</i> spp.ATCC14028/ <i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica ATCC43971	-	+	-	-
<i>Salmonella</i> spp.ATCC13076/ <i>Salmonella</i> spp.ATCC14028/ <i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica ATCC43971/ <i>B. cereus</i> ATCC14579	-	+	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC14579	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	-	-	+	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19111	-	-	+	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313/ <i>L. monocytogenes</i> ATCC19111	-	-	+	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313/ <i>L. monocytogenes</i> ATCC19111/ <i>B. cereus</i> ATCC14579	-	-	+	-
<i>B. cereus</i> ATCC14579	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC6538	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> ATCC25923	-	-	-	+
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538/ <i>S. aureus</i> ATCC25923/ <i>S. epidermidis</i> ATCC12228	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> ATCC 6538/ <i>S. aureus</i> ATCC25923/ <i>S. epidermidis</i> ATCC12228/ <i>B. cereus</i> ATCC14579	-	-	-	+
<i>B. cereus</i> ATCC14579	-	-	-	-

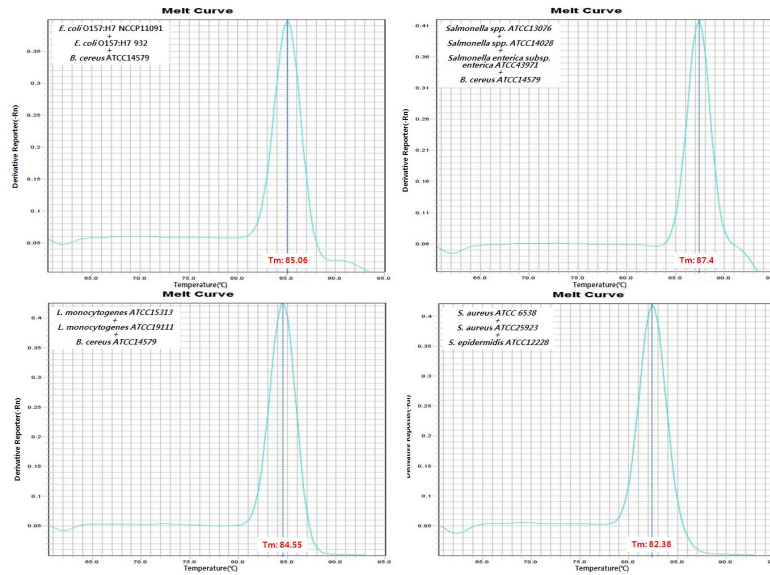


Fig. 66. Melting-curve analysis generated by real-time PCR assay using the four primer pairs in combinations of 11 food-borne bacteria (*E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* and *B. cereus*).

검출 특이성과 함께 정확성을 확인하기 위하여 real-time PCR을 수행하는 실험자가 전혀 알 수 없도록 양배추에 4종의 식중독균을 조합하여 접종한 5가지 실험균을 제시하여 DNA를 추출한 후 real-time PCR을 수행하여 각 식중독균을 정확하게 특이적으로 검출해 낼 수 있는지 확인하였다. Table 13의 결과처럼 실험자는 각 실험균에 대하여 각각 4쌍의 프라이머를 적용하여 실험하여 제시한 5가지 실험균에 접종된 각 식중독균을 정확하게 검출해 낼 수 있었으므로 본 연구에서 사용된 프라이머가 균주 특이적인 프라이머임을 확인 할 수 있었다.

Table 13. Validation of the four primer pairs by blind test in combination of food-borne bacteria

Group	Primer			
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
A	+	+	+	+
B	-	-	-	-
C	+	+	-	-
D	-	-	+	+
E	-	+	+	-

A : *E. coli* O157:H7 NCCP11091, *Salmonella* spp. ATCC13076, *L. monocytogenes* ATCC15313, *S. aureus* ATCC6538

B : Blank

C : *E. coli* O157:H7 NCCP11091, *Salmonella* spp. ATCC13076

D : *L. monocytogenes* ATCC15313, *S. aureus* ATCC6538

E : *Salmonella* spp. ATCC13076, *L. monocytogenes* ATCC15313

#### 다. 공전법과의 비교

본 연구팀에서 개발한 랩온어 칩 시스템 NBS-100과 공전법으로 시료전처리후의 검출능을 비교하기 위하여 양상추, 치커리, 베이비채소를 대상으로 하여 *E. coli* O157:H7, *S. aureus*,

*Salmonella*, *L. monocytogenes*의 각 균을 배양하여  $10 - 10^6$  cfu/mL 세포수가 되도록 희석하여 각 희석배수별로 4종의 균을 혼합하여 각 시료가 들어있는 멸균백에 접종한 후, 2개 균으로 나누었다. 1개 균은 공전법으로 시료 전처리 후, 각 식중독균을 분리할 수 있는 선택배지에 각각 희석 도말하여 24시간 배양하여 세포수를 결정하였고, 다른 균은 멸균백에서 1 mL를 채취하여 DNA를 추출한 후, 랩온어 칩 시스템 NBS-100에서 real-time PCR을 수행하였다 (Table 14). *E. coli* O157:H7은 공전법으로  $10^2$  cfu/mL까지만 검출되었으나 real-time PCR법으로 10 cfu/mL 세포수에서  $C_T$  24~28 값을 나타내므로 1 cfu/mL에서도 검출이 가능할 것이다. 또한 *S. aureus*, *Salmonella*, *L. monocytogenes*의 경우에도 모든 시료와 모든 균주에서 공전법에 의한 검출결과는  $10^2$  cfu/mL 세포수 까지만 검출 되었으며, 치커리의 경우, *Salmonella*는 10 cfu/mL로 공전법과 마찬가지로 검출되었으나 *S. aureus*와 *L. monocytogenes*는 각각  $10^2$ cfu/mL,  $10^3$  cfu/mL까지만 검출이 가능하였다. 베이비채소에서는 *Salmonella*와 *L. monocytogenes*만  $10^2$  cfu/mL 까지 검출되었다. 양상추의 경우, *Salmonella*는 10 cfu/mL, *L. monocytogenes*와 *S. aureus*는  $10^2$  cfu/mL 세포수까지 검출 되어 같은 신선편이채소에서도 검출되는 균에 따라 각기 다른 검출감도를 나타내기는 하지만 전체적으로 각 시료간 또는 랩온어 칩 시스템과 공전법간의 검출능은 대략  $10^2$  cfu/mL 에서 10 cfu/mL 세포수로 거의 차이가 없었다 (Table 14. and Fig. 67). 그러나, 공전법으로는 검출시간이 최소 24 시간 이상이 소모 되는것과 비교하여 랩온어 칩 시스템을 사용하였을 때는 배양하는 과정없이 시료전처리에 걸리는 시간을 포함하여 3~4시간 이내에 검출이 가능함으로 현장에서 실시간 검출을 가능하게 한다.

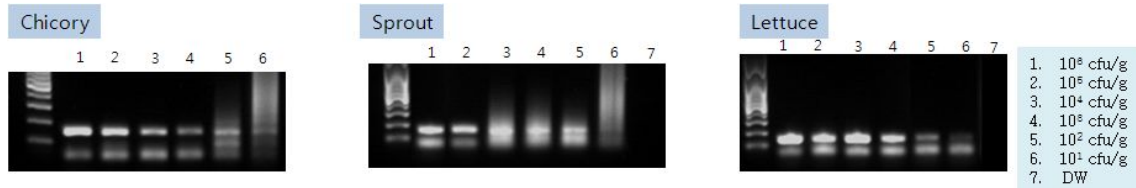
Table 14. Comparison of lab-on-a chip NBS-100 system and food code of KFDA in detection of food-borne bacteria

Strain	No. of cell (cfu/g)	Chicory		Sprout		Lettuce	
		NBS100 ( $C_T$ )	KFDA (log CFU/mL)	NBS100 ( $C_T$ )	KFDA (log CFU/mL)	NBS100 ( $C_T$ )	KFDA (log CFU/mL)
<i>E. coli</i> O157:H7 NCCP11091	$10^0$	15	5.9	17	5.7	11	6.0
	$10^1$	16	4.8	20	4.5	13	4.6
	$10^2$	18	3.9	22	3.8	16	3.7
	$10^3$	21	4.2	24	3.6	18	2.9
	$10^4$	27	2.6	27	2.5	20	2.3
	10	28	ND <sup>1)</sup>	28	ND	24	ND
<i>Salmonella</i> spp. ATCC13076	$10^0$	19	5.8	22	5.2	19	5.9
	$10^1$	21	4.7	24	4.4	22	4.5
	$10^2$	23	3.9	26	3.7	25	3.6
	$10^3$	25	3.2	28	2.7	27	2.8
	$10^4$	28	2.1	ND	2.0	28	2.0
	10	29	ND	ND	ND	29	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	$10^0$	19	6.1	16	6.1	21	6.2
	$10^1$	24	5.1	18	5.0	24	5.0
	$10^2$	27	4.2	21	4.1	26	4.1
	$10^3$	28	3.1	23	3.0	28	3.1
	$10^4$	ND	2.4	26	2.3	29	2.2
	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> ATCC6538	$10^0$	23	6.0	19	6.0	17	6.2
	$10^1$	25	5.5	21	5.1	20	4.7
	$10^2$	26	3.9	23	3.8	22	3.7
	$10^3$	27	3.3	25	2.9	26	3.0
	$10^4$	28	2.6	27	2.1	28	1.9
	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND : Not Detected



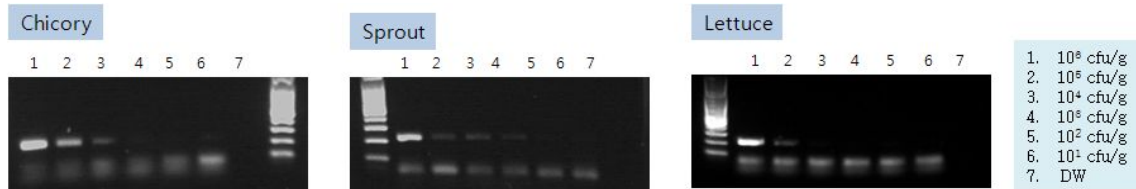
*E. coli* O157:H7 NCCP11091



*Salmonella* spp. ATCC13076



*L. monocytogenes* ATCC15313



*S. aureus* ATCC6538



Fig. 67. Electrophoresis of real-time PCR products by lab-on-a chip NBS-100 system in artificially inoculated vegetables.

본 연구팀에서 개발한 랩온어 칩 시스템 NBS-100과 기존 실험실에서 사용해 왔던 ABI7500과 성능을 비교하기 위하여 동일한 시료와 동일조건에서 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과 *E. coli* O157:H7에서는 두 시스템 모두에서 10 cfu/mL 세포수까지 깨끗이 검출되었으며, 대부분의 시료와 균주에서 두 시스템 모두 거의 동일한 검출능을 가지고 있었으나, 베이비 채소에서 *Salmonella*에 대한 실험결과를 제외하고는 NBS-100이 조금 더 좋은 검출능력을 보여주고 있었다 (Table 15).

Table 15. Comparison of lab-on-a chip NBS-100 system and ABI7500 in detection of food-borne bacteria

Strain	No. of cell (cfu/g)	Chicory		Sprout		Lettuce	
		NBS100 (C <sub>T</sub> )	ABI7500 (C <sub>T</sub> )	NBS100 (C <sub>T</sub> )	ABI7500 (C <sub>T</sub> )	NBS100 (C <sub>T</sub> )	ABI7500 (C <sub>T</sub> )
<i>E. coli</i> O157:H7 NCCP11091	10 <sup>9</sup>	15	15.8	17	16.1	11	17.9
	10 <sup>8</sup>	16	19.7	20	19.7	13	23.4
	10 <sup>4</sup>	18	23.3	22	24.1	16	26.1
	10 <sup>3</sup>	21	25.7	24	26.1	18	26.7
	10 <sup>2</sup>	27	27.0	27	26.8	20	27.0
<i>Salmonella</i> spp. ATCC13076	10	28	26.9	28	27.0	24	27.0
	10 <sup>9</sup>	19	16.5	22	16.2	19	17.7
	10 <sup>8</sup>	21	20.2	24	19.6	22	23.0
	10 <sup>4</sup>	23	24.0	26	24.4	25	27.1
	10 <sup>3</sup>	25	27.0	28	27.0	27	28.4
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	10 <sup>2</sup>	28	ND	ND	28.7	28	29.4
	10	29	ND	ND	29.7	29	29.7
	10 <sup>9</sup>	19	17.1	16	14.2	21	16.2
	10 <sup>8</sup>	24	20.3	18	17.4	24	21.3
	10 <sup>4</sup>	27	24.0	21	20.9	26	24.3
<i>S. aureus</i> ATCC6538	10 <sup>3</sup>	28	27.0	23	24.1	28	27.0
	10 <sup>2</sup>	ND	ND	26	27.1	29	ND
	10	ND	ND	ND	28.6	ND	ND
	10 <sup>9</sup>	23	19.1	19	18.6	17	17.7
	10 <sup>8</sup>	25	23.1	21	22.7	20	23.0
	10 <sup>4</sup>	26	27.0	23	27.0	22	26.9
	10 <sup>3</sup>	27	ND	25	29.8	26	ND
	10 <sup>2</sup>	28	ND	27	ND	28	ND
	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND

라. 모델시료를 이용한 식중독균 검출 재현성 확인

랩온어칩 시스템의 최적화를 위하여 4종의 식중독균에 대한 검출의 재현성 확인을 위하여 양배추와 베이비채소를 모델시료로 하여 4종의 식중독균이 모두 일정하게 검출되는 10<sup>3</sup> cfu/mL 와 10<sup>4</sup> cfu/mL 세포수가 존재하도록 접종하여 시료전처리 후, DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행하였다. 각 균당, 세포수 당 모델시료에서 5회 반복 시행하여 표준편차 (SD)와 상대표준편차(RSD)를 구하였다 (Table 16). 베이비채소에서 NRS-100으로 수행된 real-time PCR의 C<sub>T</sub>에 대한 RSD 값이 0.1-1.9%, 양배추에서의 RSD 값은 0.1-2.5%로 재현성 실험에서 일반적으로 요구되는 0.1 - 5%의 상대표준편차값에 포함되므로 본 연구과제에서 개발된 Lab-on-a chip NRS-100 시스템과 관련 프라이머들은 식품에 존재하는 식중독균 검출에 효과적인 것으로 생각된다.

Table 16. Repeatability of real-time PCR assay using lab-on-a chip NBS-100 system

Target strains		Mean C <sub>T</sub>	SD <sup>1)</sup>	RSD <sup>2)</sup>	
Sprout	<i>E. coli</i> O157:H7 NCCP11091	10 <sup>4</sup>	23.5	0.3	1.5
		10 <sup>3</sup>	26.8	0.1	0.4
	<i>Salmonella</i> spp. ATCC13076	10 <sup>4</sup>	24.5	0.4	1.5
		10 <sup>3</sup>	26.8	0.1	0.5
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	10 <sup>4</sup>	23.6	0.4	1.9
		10 <sup>3</sup>	27.3	0.5	0.1
	<i>S. aureus</i> ATCC6538	10 <sup>4</sup>	26.7	0.4	1.3
		10 <sup>3</sup>	26.8	0.5	1.9
Lettuce	<i>E. coli</i> O157:H7 NCCP11091	10 <sup>4</sup>	23.7	0.6	2.5
		10 <sup>3</sup>	26.7	0.2	0.7
	<i>Salmonella</i> spp. ATCC13076	10 <sup>4</sup>	24.8	0.4	1.8
		10 <sup>3</sup>	26.7	0.2	0.9
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	10 <sup>4</sup>	24.7	0.2	0.9
		10 <sup>3</sup>	27.2	0.5	0.1
	<i>S. aureus</i> ATCC6538	10 <sup>4</sup>	26.6	0.2	0.9
		10 <sup>3</sup>	27.0	0.6	2.3

<sup>1)</sup> Standard deviation

<sup>2)</sup> Relative standard deviation was calculated by dividing the SD by the mean value and given in percent.

11. 시료전처리용 하드웨어 시스템 구축과 시스템 특성 평가 및 검증

가. 시료전처리 프로토콜 개발

(1) 식품공전의 검출 공정 및 방법 (Table 17), 주관기관인 한국식품연구원의 나노자성 먼역 반응을 이용한 시료전처리 개념도를 참조하여 시료전처리 프로토콜을 개발하였다.

Table 17. Detection process and method for *Samonella* spp. in Food Code

공정	세부공정	식품공전 시료전처리 (검출 공정 및 방법)
증균 배양	증균배양 1.	○ 검체 25 g (or 25 mL) + Peptone water (7365) 225 mL 첨가하여 배양(35 ℃, 18 ± 2 시간)
	증균배양 2.	○ 증균배양 1.의 증균 배양액 0.1 mL + Rappaport-Vassiliadis Broth (7512) 10mL 첨가하여 배양 (42℃, 24 ± 2 시간)
분리 배양	분리배양	○ 증균 배양액 Macconkey Agar (7102) 또는 Deoxycholate Citrate Agar (7186) 또는 XLD Agar (7166) 첨가하여 배양 (35℃, 24 시간)
확인 시험	생화학적	○ 보통한천배지 (Nutrient Agar, 7145); 35℃, 18 ~ 24 시간 ○ TSI 사면배지 (7162); 35℃, 18 ~ 24 시간 → 생물학적 성장 검사 ○ 그람염색, Urease 음성, Lysine decarboxylase 양성 등
	응집	○ 응집반응 확인 - H 혼합혈청과 O 혼합혈청

(2) 전처리 공정과정에서 발생될 수 있는 오염문제를 해결하기 위하여, 전처리 공정도는 장치 외부/내부과정으로 구분하여 프로토콜을 개발하였다 (Fig. 68).

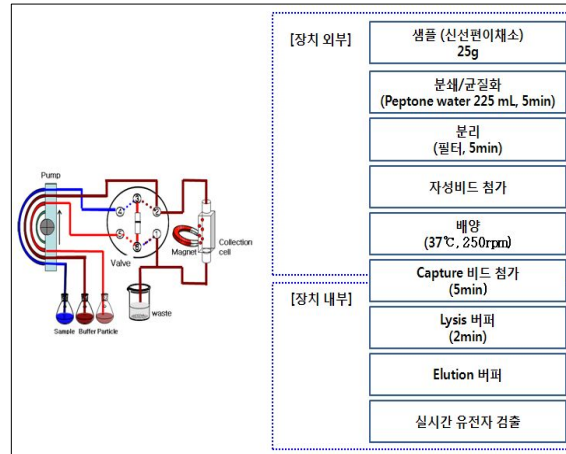


Fig. 68. Schematic diagram of sample preparation system and Nanobiosys.INC sample preparation process.

나. 시료전처리용 하드웨어 시스템 구축

- (1) 시료전처리용 하드웨어 시스템은 시료전처리 공정도의 장치 내부과정이며, Capture bead 용액 주입부, Lysis 모듈부, Membrane filter부, 밸브 및 시료 배출부로 구성되며 모든 부품은 일회용으로 사용하였다. 또한, 시료전처리 공정도의 장치 외부과정은 오염 및 샘플 용량으로 인하여 단위 공정으로 별도 진행하였다.
- (2) 시료전처리용 하드웨어 시스템의 용액 주입부는 고무재질의 라텍스고무를 선정하였으며, 용액 주입 및 압력을 고정할 수 있는 기능을 지닌다.



Fig. 69. Latex rubber of solution injection part.

- (3) Lysis 모듈부 (ClaremontBio Lyse module)는 모듈 내부에 모터 및 실리카 비드 (60 - 100  $\mu\text{m}$ )가 내장되어 있으며, 모터 구동후 Lysis 용액과 실리카 비드에 의하여 Cell Lysis가 이루어졌다.

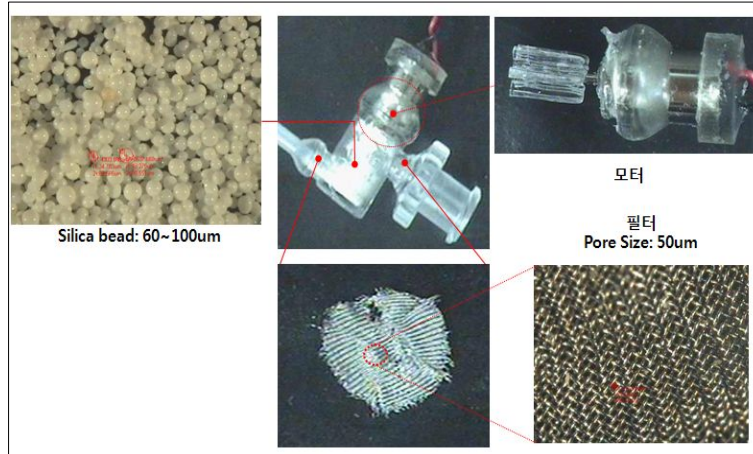


Fig. 70. Lysis Module.

(4) Membrane filter, 3 way 밸브 및 용액 배출부는 각각의 pitting 종류들을 구매하여 제작하였다. membrane filter는 플라스틱 재질로 pore size 0.45  $\mu\text{m}$ 로 Lysis 모듈부에서 capture magnetic bead의 누수를 방지하였다. 또한 3 way 밸브에 의해 용액 배출 및 저장 공간으로 이동되었다.



Fig. 71. Membrane filter, 3 way valve and solution outlet parts.

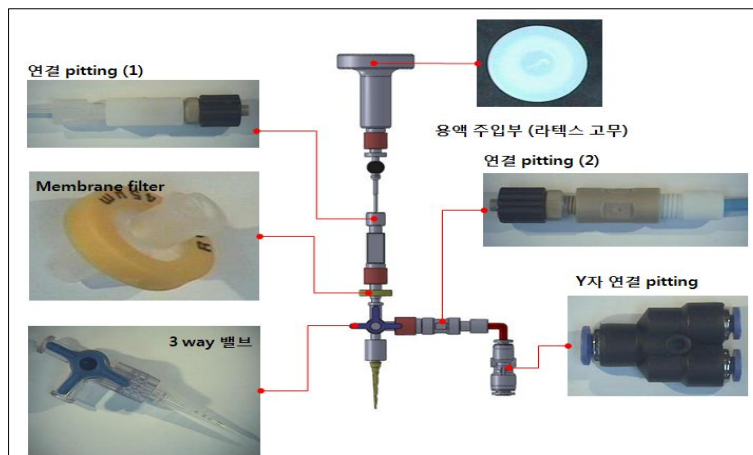


Fig. 72. Unit module and parts of sample preparation hardware system.

(5) 시료전처리용 하드웨어 시스템 제작

(가) 시료전처리용 하드웨어 시스템 사양

- ① 크기: 300 (가로) X 150 (세로) X 300 (높이) mm
- ② 중량: 5 kg
- ③ 전원: AC 220 V/ 24 V

(나) 시료전처리용 하드웨어 시스템 설계 및 제작

① 시료전처리용 하드웨어 시스템은 Capture된 bead를 주입하여 gDNA 획득할 수 있는 시스템이며, 각각의 단위 부품 및 모듈은 오염 방지를 위하여 일회용으로 활용되었다.

② 시료전처리용 하드웨어 시스템은 전처리 프로토콜을 토대로 단위부품 및 모듈을 3D 프로그램을 이용하여 설계하여 제작하였다.

③ Fig. 73과 같이 시료전처리용 하드웨어 시스템은 정면도에 전원 및 구동스위치, 3 way 밸브 조절이 가능하였다. 또한 Elution된 용액은 샘플을 확보할 수 있는 슬라이딩 구조로 설계 및 제작되었다.

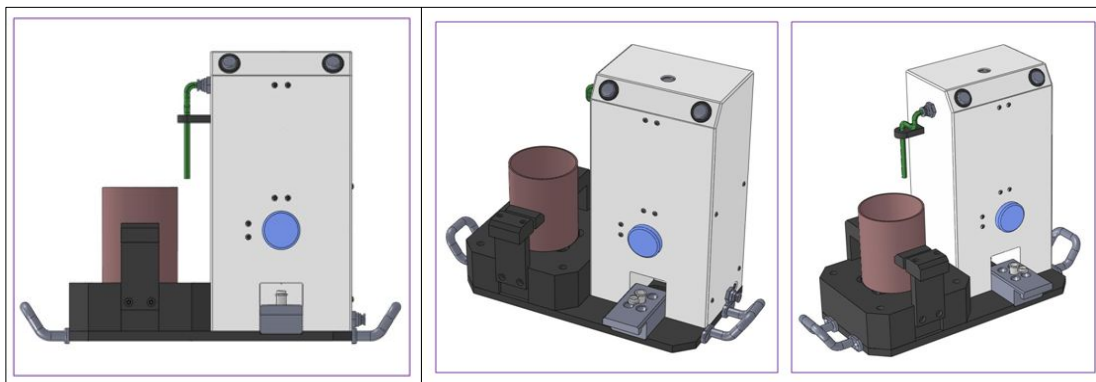


Fig. 73. A Front view and Left/Right a side view of sample preparation hardware system.

④ Fig. 74와 Fig. 75와 같이 시료전처리용 하드웨어 시스템 내부 도면은 각각의 부품 및 모듈을 적시하였다. Neodium magnetic에 의해 waste line (1차)에 의해 배출 되며, capture된 bead는 파이펫 도구를 이용하여 용액 주입부에 주입되는 구조이다. 또한 용액 주입부를 통해 주입된 capture된 bead는 Lysis module, membrane filter 및 3 way 밸브를 통하여 gDNA 함유된 샘플을 확보 할 수 있는 구조로 설계 및 제작되었다.

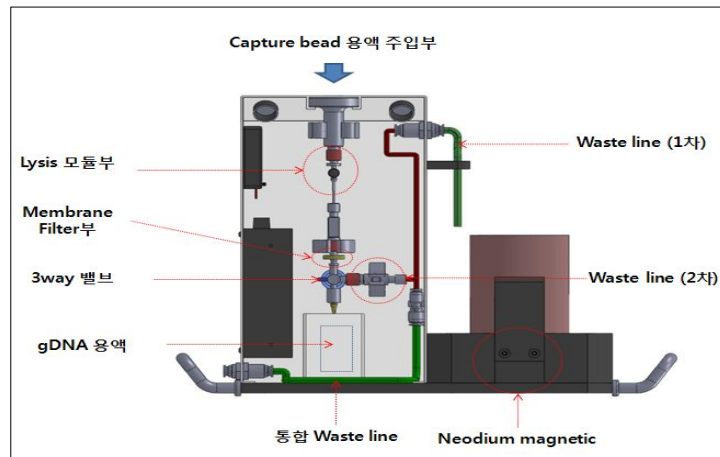


Fig. 74. The inner structure of sample preparation hardware system.

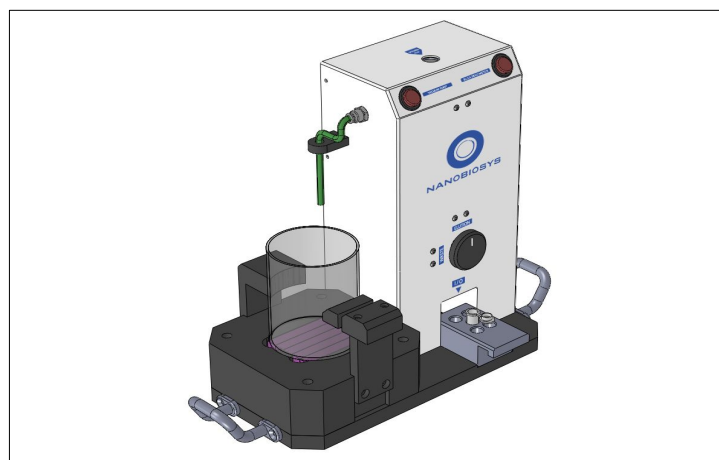


Fig. 75. Sample preparation hardware system prototype.

다. 모델식품 대상 하드웨어 시스템 성능 검증

(1) 장치 외부 및 내부 공정을 통하여 시료전처리용 하드웨어 시스템의 성능을 검증하였다.

(2) Fig. 76과 같이 시료의 분쇄 및 균질화, 오염균의 분리, magnetic bead 첨가 및 배양, capture bead 첨가하는 과정을 통하여 모델식품의 성능을 검증하였다.

(3) *E. coli* O157 ( $1 \times 10^7$  copy/LB250 mL (상추 250g))와 200  $\mu$ L bead를 첨가하여 Fig. 76의 6번 과정 후, 20  $\mu$ L D.W를 첨가하였다. 그리고 5분간 boiling하여 DNA 3  $\mu$ L를 추출한 후 real-time PCR의 Roche (Light Cycler 1.5) 장비와 나노바이오시스(주) NBS-100장비에서 성능을 비교하였다.

(4) Table 18과 Table 19의 조건으로 real-time PCR을 수행하였고, Fig. 76과 같이 동일 조건에서 동등한 결과 값을 확보하였다. Fig. 77과 같이 장치 외부 공정을 이용하여 신선편이채소 (=상추)로부터 오염균이 분리되어 검출되었음을 확인하였다.

Table 18. Reagent

조성	용량
2X SYBR Green Master Mix	10 $\mu$ l
Primer	4 $\mu$ l
DNA	3 $\mu$ l
DW	3 $\mu$ l
Total volume	20 $\mu$ l

Table 19. Temperature

Step	Tm	Time
Reaction Cycle		40 cycles
Pre Denaturation	95	60 sec
Denaturation	95	10sec
Annealing & Extension	72	10sec

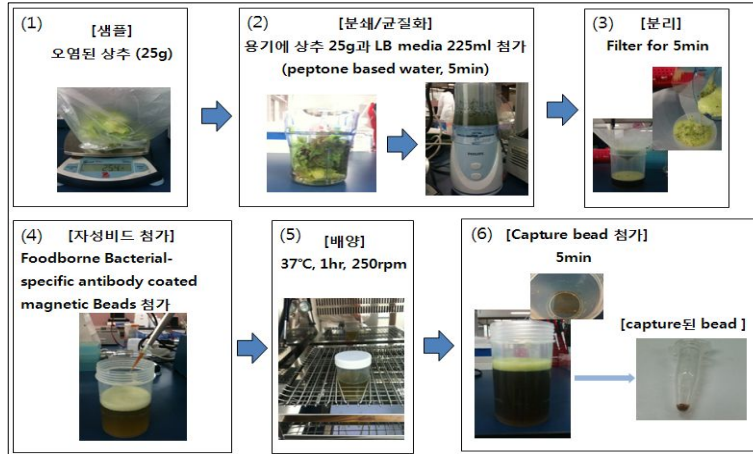
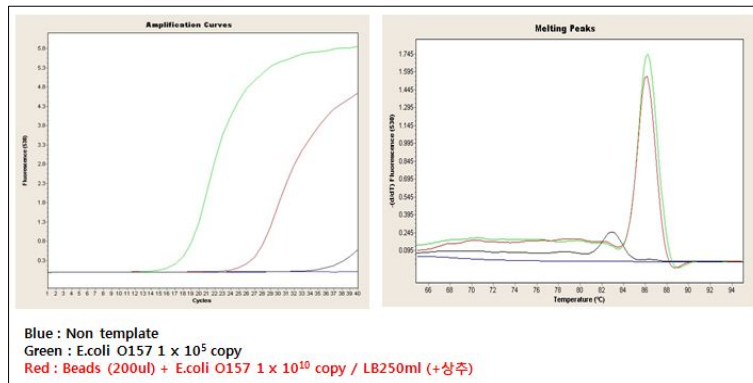
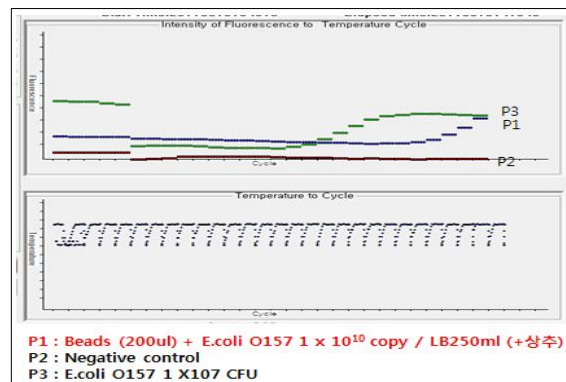


Fig. 76. Sample preparation process.

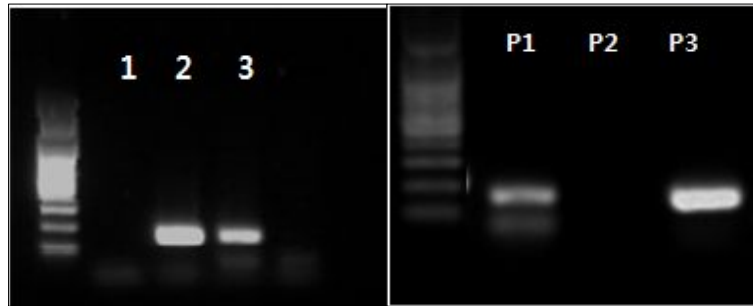


(a) Roche' Light Cycler 1.5 result.



(b) Nanobiosys.INC NBS-100 result.

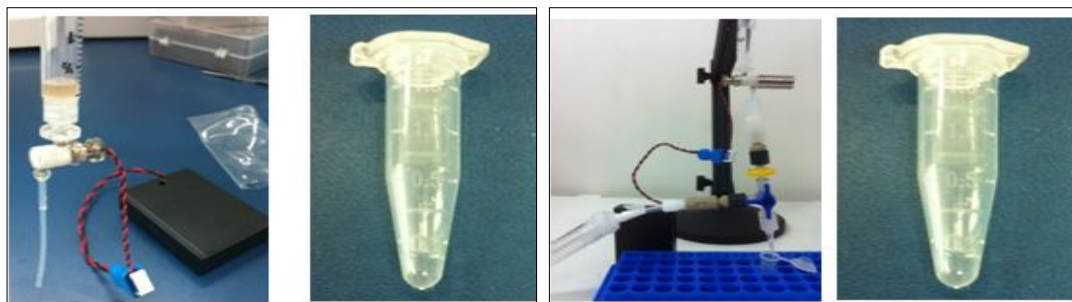




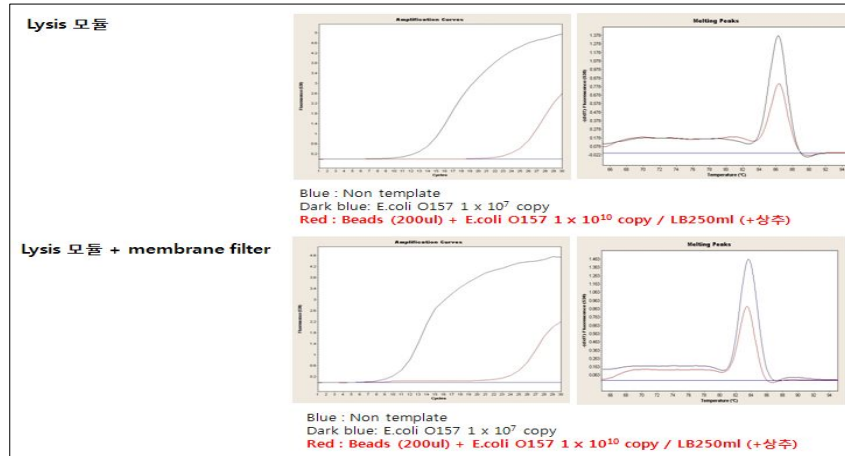
(c) Gel image of Roche & Nanobiosys. INC.

Fig. 77. Roche & Nanobiosys. INC real-time PCR result.

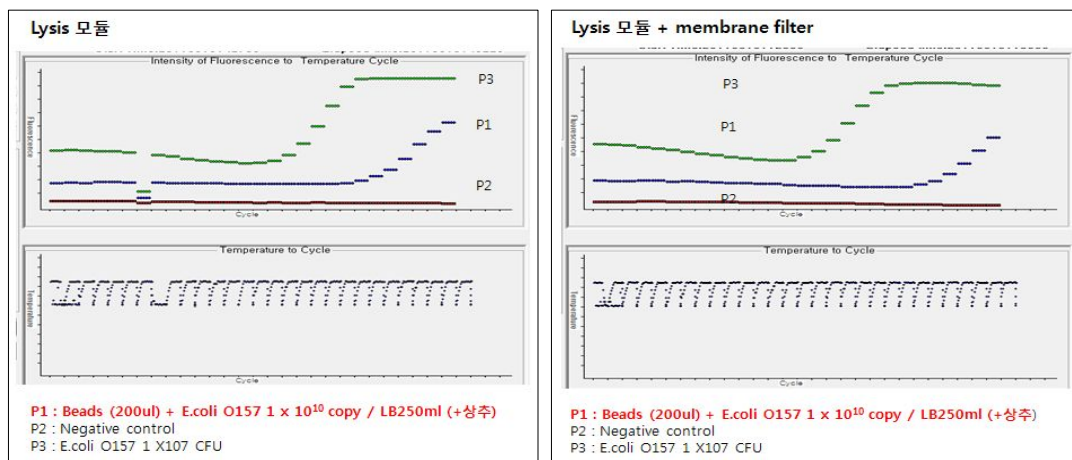
- (5) 시료전처리용 하드웨어 시스템의 Lysis 모듈과 결합된 membrane filter의 성능을 검증하기 위하여 모듈에서 Lysis 및 Elution 단계를 거쳐 real-time PCR의 Roche (Light Cyclor 1.5) 장비와 나노바이오시스(주) NBS-100장비에서 성능을 비교하였다.
- (6) 시약 및 온도 조건은 Table 18과 Table 19와 같으며, 동일한 *E. coli* O157 농도 및 비드 양에서 real-time PCR을 수행하였다.
- (7) Lysis 모듈의 구동 방법은 아래 순서와 같이 진행되며, Fig. 78과 같이 Roche사의 Lightcycler 1.5 장비와 나노바이오시스(주) NBS-100 장비에서 real-time PCR을 수행하였다.
  - (가) 신선편이채소로부터 확보된 오염균을 Lysis 모듈에 주입
  - (나) Lysis buffer 500  $\mu$ L 주입
  - (다) Lysis 모듈의 모터 구동 (2 min)
  - (라) Lysis 모듈의 모터 정지
  - (마) Elution buffer 100  $\mu$ L 주입
  - (사) Lysis 모듈의 모터 구동
  - (아) Elution된 gDNA 확보
- (8) Lysis 모듈과 Lysis 모듈에 결합된 membrane filter 2가지 종류를 가지고 본 과제 연구를 수행하였다. Lysis 모듈에 결합된 membrane filter가 Lysis 모듈만 사용한 것보다 효율이 높았으며, 이는 capture된 bead가 elution 과정에서 membrane filter에 의해 bead 유출이 방지됨으로써 lysis 효율이 높기 때문으로 판단하였다. 따라서, 전처리용 하드웨어 시스템은 lysis 모듈에 결합된 membrane filter를 사용하여 장치를 개발하였다.



(a) Lysis module, (b) Lysis module and membrane filter.



(c) Roche Lightcycler 1.5 result.



(d) Nanobiosys.INC NBS-100 result.

Fig. 78. Lysis performance evaluation of Sample preparation hardware system.

## 12. 식중독균 검출용 다중검출 랩온어칩 시스템의 시작품 제작

### 가. 랩온어칩 구조 최적화 및 시작품 제작

- (1) 칩 생산 및 재현성을 위해 2차년도 칩을 기준으로 구조를 최적화하였다. 채널 폭은 1.0 mm, 채널 길이는 30 mm 이하, 칩 크기는 25 X 60 mm 이하였다.
- (2) 랩온어칩은 입구/출구/PCR 증폭 및 측정 부위, 3채널을 갖는 구조로 시료량은 5 - 10  $\mu$ L 이었다.
- (3) PCR 증폭 및 측정 부위는 길이 5 mm X 폭 2 mm로 설계하였으며, PCR 과정중에 발생 되는 기포등의 문제를 해결하기 위하여 길이 3 mm X 폭 1 mm 이내의 별도 광 측정 홀을 제작하였다.
- (4) 5개의 Layer가 적층된 구조로 layer 1 - 3은 칩 형성, layer 4는 광 차단, layer 5는 입구 및 출구의 누수 방지 기능을 가진 최적화된 구조이다.
- (5) Layer 1과 3은 PC (polycarbonate) 재료, layer 2는 열 경화성 재료를 선정하여 광 투과도 (90%이상) 및 내열도(130 $^{\circ}$ C - 135 $^{\circ}$ C)를 측정하여 본 시스템에 적합한 재료를 선정하였다.
- (6) 빠른 열전달 효율을 위하여 두께 0.2 mm 이내로 최소화하여 제작하였다.
- (7) 랩온어칩 시작품은 다음과 같다.

- (가) 재료 : Polycarbonate (PC)
- (나) 채널수 : 3채널
- (다) 시료량 : 5 - 10  $\mu\text{L}$
- (라) 열안정성 : 135 $^{\circ}\text{C}$  이하
- (마) 광 투과율 : 90% 이상 (350 nm 이상)

(8) 따라서, 본 연구과제의 다중검출용 랩온어칩 구조의 특징은 칩 생산성을 위한 재료 선정 및 간단한 제조 방법을 이용하여 대량 생산의 안전성을 확보하고, PCR 증폭 및 측정시 발생하는 문제점 (기포, 광 산란 등)을 억제하기 위하여 layer 4의 광 차단 필름 선정 및 광 차단 필름의 광 측정 부위 (두께 50  $\mu\text{m}$ )와 입구/출구 부위 (두께 200  $\mu\text{m}$ )의 두께를 변화시켜 제작함으로써 최적화시켰다.

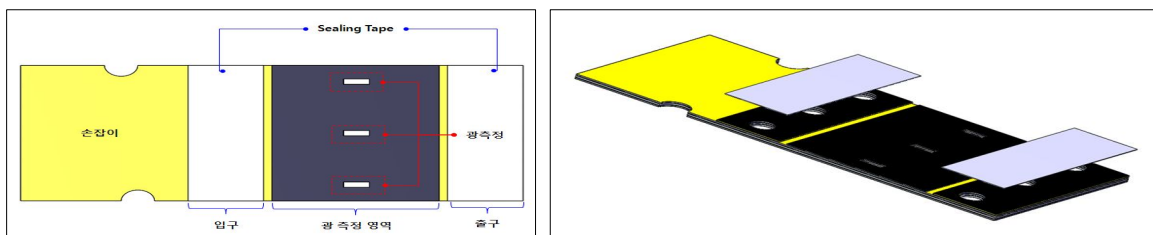


Fig. 79. Multidetetection Lab-on-a-chip 3D design.

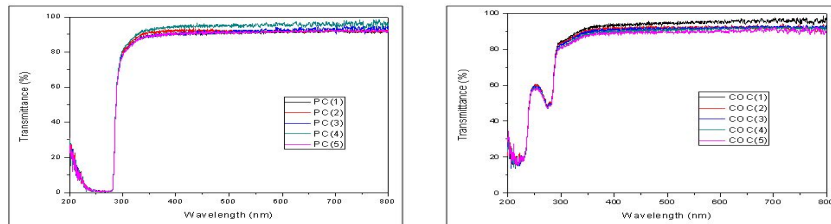


Fig. 80. Transmittance of PC/COC materials.

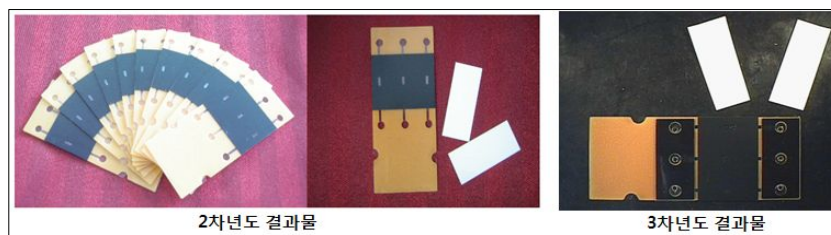


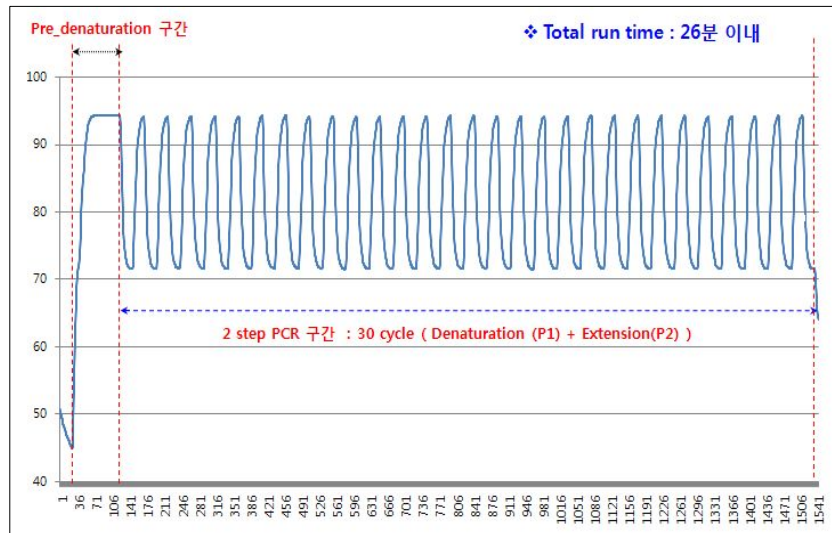
Fig. 81. Lab-on-a-chip product.



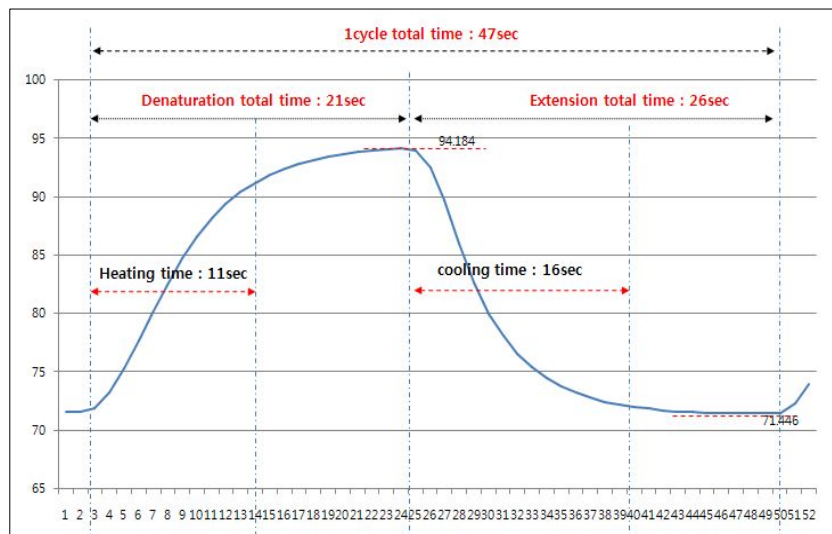
Fig. 82. Lab-on-a-chip packing image.

나. 랩온어칩 검출용 시스템의 시작품 제작

- (1) 2차년도에서는 온도블록 ( $\pm 1^\circ\text{C}$  이내의 온도 균일성) 및 광학 시스템을 최적화하였으며, 이를 바탕으로 3차년도에서는 최적의 온도제어를 통하여 3 step의 구동 방식에서 2 step 구동에 의한 랩온어칩 검출용 시스템 시작품을 제작하고자 하였다.
- (2) 2차년도 온도블록의 온도제어는 3 step, 30 cycles 기준으로 pre\_denaturation  $95^\circ\text{C}$  (5분), denaturation  $95^\circ\text{C}$  (10초), annealing  $55^\circ\text{C}$  (10초), extension  $72^\circ\text{C}$  (10초)로 설정하여 38분 이내 결과 값을 얻을 수 있었다.
- (3) 3차년도 온도블록의 온도제어는 2 step, 30 cycles 기준으로 pre\_denaturation  $95^\circ\text{C}$  (1분), denaturation  $95^\circ\text{C}$  (10초), annealing & extension  $72^\circ\text{C}$  (10초)로 설정하여 40분 이내 결과 값을 얻었다. 또한 2 step 온도 제어 방식은 Fig. 83과 같으며, Denaturation 10 sec, Annealing & Extension 10 sec로 설정 및 1 cycle당 47 sec 이내로 온도블록의 온도를 제어하여 PCR 구동이 가능한 조건을 확립하여 결과 값을 얻었다.



(a). 2 step, Heating block temperature control result.



(b) 1cycle, Heating block temperature control result.

Fig. 83. Heating block temperature control result.

- (4) 따라서, 나노바이오시스(주) 랩온어칩 검출용 시스템은 Fig. 84과 같이 시작품을 제작하여 성능 평가를 수행하였으며, 2차년도보다 아래와 같이 개선되었다.
- (가) 온도블록의 효율적인 온도 제어를 통하여 3 step에서 2 step 구동 및 광 측정이 가능하다.
  - (나) 30 cycle PCR을 40분 이내로 온도제어 및 시간을 단축할 수 있다.
  - (다) 일회용 플라스틱 다중검출용 랩온어칩 구조 최적화하였다.
  - (라) 외형 디자인 변경을 통하여 랩온어칩 검출용 시스템 상품성을 높였다.



Fig. 84. Lab-on-a-chip Detection System Prototype.

- (5) Real-time PCR에 적용될 자성/금 나노입자는 현재 상용적으로 시판되는 제품이 없어 사용된 재료비를 고려하여 경제성을 판단하였다. 본 과제를 통해 자성입자에서 자성/금 나노입자의 10 mL 제작 조건을 최적화 시켰으며 제작에 소요되는 총 재료비 2,000 원 수준과 1 회 사용에 필요한 나노입자의 부피 (0.5 mL)를 고려한 재료비는 100 원 수준이었다 (모든 재료는 Sigma-Aldrich사 시약등급 기준). 향후 1 L 이상 대량생산에 대한 조건과 제작에 필요한 자동화를 고려한다면 그 생산 비용 또한 수 십원 수준으로 낮아질 것으로 판단되기 때문에 칩을 포함한 real-time PCR의 키트 소모품 단가인 1 만원에 충분히 맞춰 제작할 수 있을 것으로 판단된다.
- (6) Real-time PCR에 사용될 칩은 polycarbonate 재질의 칩으로 금형을 이용하여 성형사출을 통해 제작하기 때문에 금형 제작비용이 대부분을 차지한다. 칩 제작은 금형을 이용해 대량 제작하기 때문에 현재 칩 만개 수준을 제작할 때 소요되는 비용이 칩당 수 백원 수준이다. 칩 판매가인 5,000원 수준을 고려한다면 6,000 키트 수준이 칩에 대한 손익분기점으로 판단된다.

(7) 본 연구에서 개발한 Real-time PCR 시스템을 기존 생산된 국내외 제품과 비교한 것은 Table 20과 같다. Roche, Applied Biosystems, Bio-Rad 등 대부분의 외국회사에서 생산된 제품과 국내 생산된 제품과 비교하여 본 연구에서 개발된 제품은 칩을 기반으로 하기 때문에 다중검출이 가능하고, 요구하는 시료량이 적으며, 측정시간이 빠를 뿐만 아니라 제품 크기가 작으며 가격이 20-30% 정도 저가인 장점이 있다고 하겠다.

Table 20. Comparison of real-time PCR systems between commercial products and newly developed product in this study

	국외			국내	
회사명	ROCHE	Applied Biosystems	Bio-Rad	바이오니아	본 연구
제품명	Lightcycler 1.5	ABI7500	CFX96	ExiCycler™ 96	NBS-100
크기 (cm) (W X D X H)	30 X 40 X 45	34 X 49 X 45	33 X 46 X 36	35 X 54 X 47	20 X 20 X 30
무게 (Kg)	20	23.5	21	30	5.9
측정시간 (min)	60	60	60	60	40
형태	Capillary Tube	Tube	Tube	Tube	Micro-fluidic chip
측정 개수		1개의 Tube에서 1개 검출			1개의 chip 에서 3개 검출
시료량 (uL)	20	10 ~ 30	10 ~ 25	50	5 ~ 10
제품 사진					
특징	❖ Tube 기반 (1개의 Tube에서는 단일검출) ❖ 대형화 ❖ 고가의 real-time PCR				❖ 칩 기반 (다중검출) ❖ 소형화 ❖ 저가의 real-time PCR

#### 다. 식중독균 다중검출 재현성 확인

- (1) 신선편이채소에서 시료전처리 하드웨어 시스템을 이용하여 gDNA를 추출, 다중검출용 랩온어칩에 10 uL 주입 및 다중검출용 랩온어칩 시스템에서 2 step, 30 cycle PCR을 구동하여 *E. coli* O157 검출 재현성을 확인하였다.
- (2) *E. coli* O157의 PCR 시약 조성 및 다중검출용 랩온어칩 시스템의 온도 조건은 Table 18과 Table 19와 같으며, 시료전처리를 하드웨어 시스템 (3시간 이내) 및 다중검출용 랩온어칩 시스템 (40분 이내)을 통하여 *E. coli* O157 (P1=10<sup>10</sup>, P3=10<sup>7</sup> cfu/g) 10회 이상 측정하였으며, Fig. 85와 Table 20과 같이 P1은 C<sub>T</sub> 25, P3는 C<sub>T</sub> 15의 평균 결과 값을 얻었다.

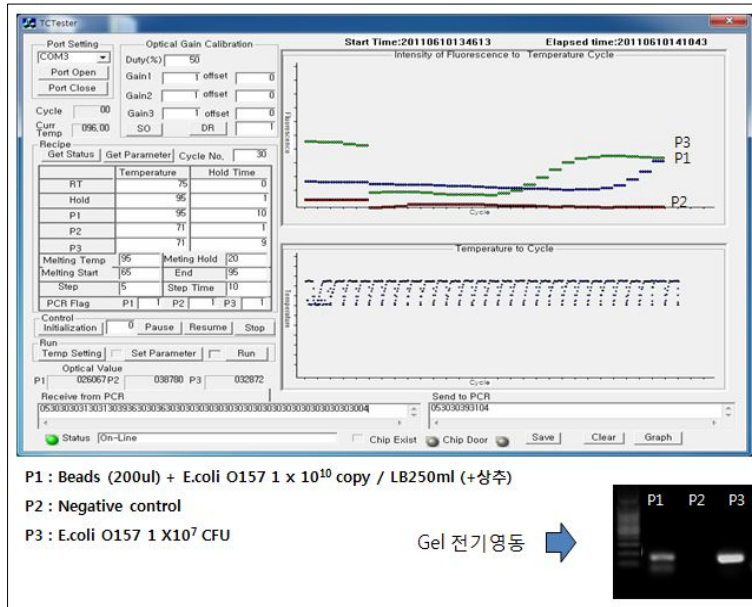


Fig. 85. *E. coli* O157 concentration result.

- (3) *Salmonella* spp.균에서 gDNA를 추출, 다중검출용 랩온어칩에 10 uL 주입 및 다중검출용 랩온어칩 시스템에서 2 step, 30 cycle PCR을 구동하여 *Salmonella* spp. 검출 재현성을 확인하였다.
- (4) *Salmonella* spp.의 PCR 시약 조성 및 다중검출용 랩온어칩 시스템의 온도 조건은 Table 18과 Table 19와 같으며, 다중검출용 랩온어칩 시스템 (40분 이내)을 통하여 *Salmonella* spp. (P1=10<sup>4</sup>, P3=10<sup>7</sup> cfu/g) 10회 이상 측정하였으며, Fig. 86과 Table 20 같이 P1은 C<sub>T</sub> 24, P3는 C<sub>T</sub> 15의 평균 결과 값을 얻었다.

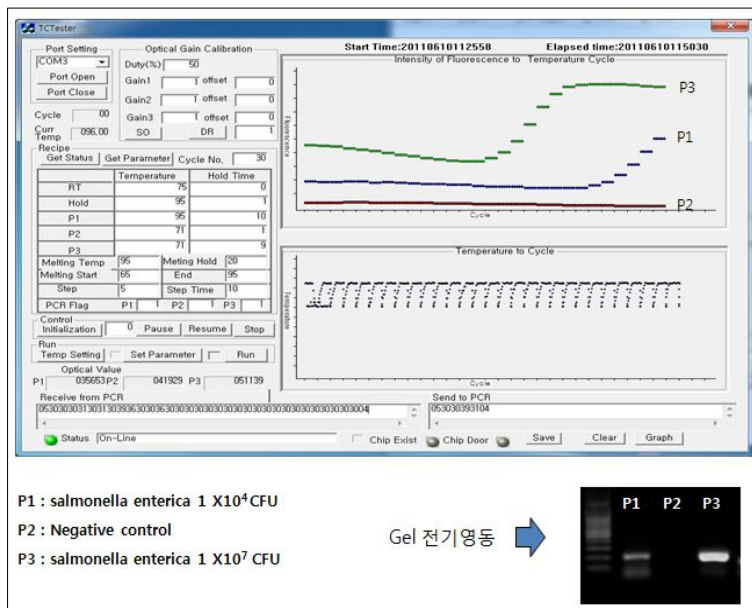


Fig. 86. *Samonella* spp. concentration result.

- (5) *L. monocytogenes*균에서 gDNA를 추출, 다중검출용 랩온어칩에 10 uL 주입 및 다중검출용 랩온어칩 시스템에서 2 step, 30 cycle PCR을 구동하여 *L. monocytogenes* 검출 재현성을 확인하였다.
- (6) *L. monocytogenes*의 PCR 시약 조성 및 다중검출용 랩온어칩 시스템의 온도 조건은 Table 18과 Table 19와 같으며, 다중검출용 랩온어칩 시스템 (40분 이내)을 통하여 *L. monocytogenes* ( $P1=10^4$ ,  $P3=10^7$  cfu/g) 10회 이상 측정하였으며, Fig. 87 및 Table 20과 같이  $P1$ 은  $C_T$  21,  $P3$ 는  $C_T$  15의 평균 결과 값을 얻었다.

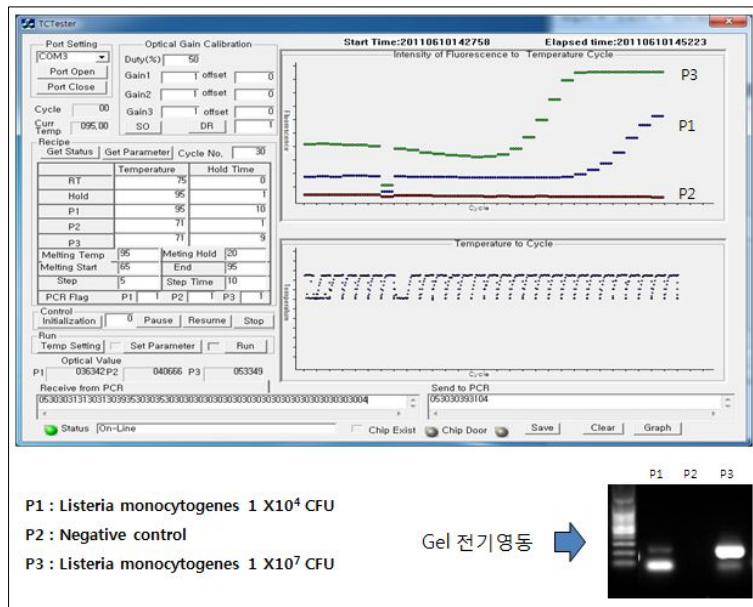


Fig. 87. *L. monocytogenes* concentration result and Gel image.

- (7) *S. aureus*균에서 gDNA를 추출, 다중검출용 랩온어칩에 10 uL 주입 및 다중검출용 랩온어칩 시스템에서 2 step, 30 cycle PCR을 구동하여 *S. aureus* 검출 재현성을 확인하였다.
- (8) *S. aureus*의 PCR 시약 조성 및 다중검출용 랩온어칩 시스템의 온도 조건은 Table 18과 Table 19와 같으며, 다중검출용 랩온어칩 시스템 (40분 이내)을 통하여 *S. aureus* ( $P1=10^4$ ,  $P3=10^7$  cfu/g) 10회 이상 측정하였으며, Fig. 88 및 Table 21과 같이  $P1$ 은  $C_T$  24,  $P3$ 는  $C_T$  15의 평균 결과 값을 얻었다.



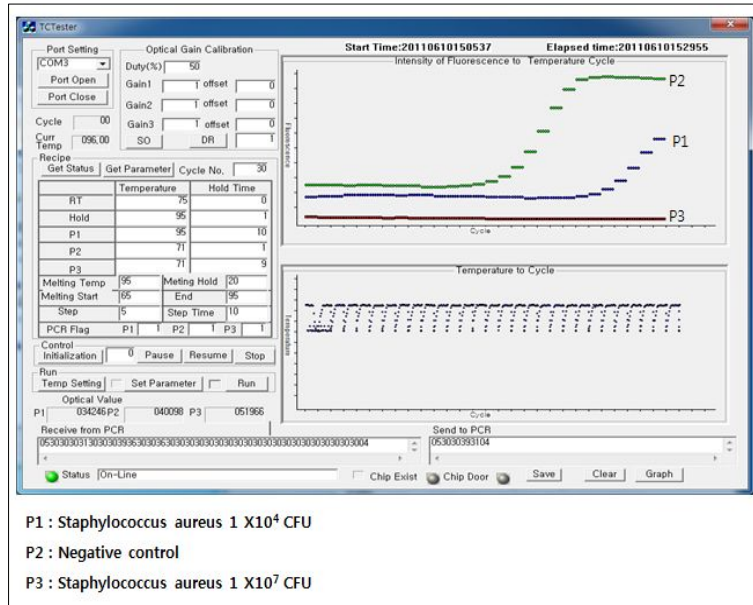


Fig. 88. *S. aureus* concentration result.

Table 21. *E. coli* O157, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* & *S. aureus* concentration Ct value

No. of Cell (cfu/g)	C <sub>T</sub> Value			
	<i>E. coli</i> O157	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>
10 <sup>10</sup>	15	-	-	-
10 <sup>7</sup>	25	15	15	15
10 <sup>4</sup>	-	24	21	24

따라서, 나노바이오시스(주)는 신선편이채소(상추) 및 식중독 균에서 시료전처리용 하드웨어 시스템을 이용하여 3시간 이내의 식품 오염균을 추출하였으며, 다중검출용 랩온어칩 시스템을 이용하여 40분 이내 식품오염균 (*E. coli* O157, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* & *S. aureus*)를 농도별 검출 및 재현성을 확인하였다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

세부연구목표	달성도(%)	연구개발 달성내용
<p>신선편이채소류 식품의 주 오염 식중독균 검출을 위한 primer 개발 (개발목표 최소 4종 이상)</p> <p>Real-time PCR에 의한 개별 식중독균 검출법 확립 (성능목표 : 10<sup>2</sup> cells/mL)</p>	100	<p>1. 식중독균 검출을 위한 PCR primer 제작                      그램양성균 (<i>S. aureus</i>): 문헌 검색을 통하여 16s rRNA, <i>coa</i> (coagulase), <i>can</i> (collagen adhesion), <i>nuc</i> (<i>S. aureus</i> specific gene)의 4개 유전자 선택                      그램음성균 (<i>L. monocytogenes</i>, <i>Salmonella enterica</i>, <i>E. coli</i> O157:H7): <i>L. monocytogenes</i>는 <i>iap</i> (invasion associated protein), <i>hly</i> (hemolysin), <i>inlA</i> (internalin), 16s rRNA 4개 유전자, <i>Salmonella enterica</i>에서는 <i>inv</i> (<i>Salmonella</i> specific invasion), <i>fliC</i> (flagella), 16s rRNA의 3개 유전자, <i>E. coli</i> O157:H7는 16s rRNA, <i>eae</i> (intimin), <i>fliC</i> (flagella), <i>rfb</i> (O157 specific gene)를 목표 유전자로 하여 유전자별 균 특이 프라이머 2-3종 선택</p> <p>2. Real-time PCR에 의한 식중독균별 분석조건 확립                      균 특이 primer 선별: 검출감도에 근거하여 <i>S. aureus nuc</i> (Ct;12.38), <i>L. monocytogenes hly</i> (Ct;12.95), <i>Salmonella spp. inv</i>(Ct;11.9), <i>E. coli</i> O157:H7 <i>eae</i> (Ct;12.21) 유전자를 각 식중독균 특이 유전자로 선별                      Real-time PCR에 의한 분석조건 최적화 SYBR green 법을 이용하여 95℃ 5분 denature, 95℃ 15초, 60℃ 15초, 72℃ 33초 40 cycle을 진행 후, melting curve를 얻기 위하여 95℃ 10초, 60℃ 30초를 수행 (3개의 replicat를 3번 이상 반복)하여 분석조건 최적화</p>
<p>식중독균의 유전자 검출을 위한 랩온어칩 개발 (개발목표: 10 µL 용량으로, 60 min 이내 PCR 증폭)</p>	100	<p>3. 유전자 검출용 랩온어칩의 설계 및 제작                      3D CAD를 이용한 칩 설계 완료 : 칩 상판은 시료 주입 및 배출이며, 25 X 75 X 1 mm 규격과 직경 1 mm의 시료 주입 및 배출. 칩 하판은 온도블록 열접촉과 PCR 검출 채널이며 25 X 75 X 0.5 mm의 칩 규격을 가짐. 열접촉에 따른 열교환을 빠르게 진행하기 위하여 칩 두께는 0.5mm이며 3개의 채널 (positive, negative, sample)을 지니며 칩 하판의 유체 이송의 채널 폭은 0.4 mm, 채널 길이는 70 mm이며 PCR 증폭 및 검출 채널의 폭은 1.7 mm, 길이는 5 mm, 각각의 채널 깊이는 0.25 mm로 설계됨. 또한 칩 클립은 PCR 구동 과정에서 발생하는 누수를 방지하며 46 X 25 X 2 mm로 칩 상판 및 하판이 접합된 유전자 검출용 랩온어칩이 결합되도록 설계됨</p> <p>유전자 검출용 랩온어칩 금형 및 사출성형 : 칩의 금형 제작은 몰드베이스 1개와 코어 금형 2개이며 몰드베이스 금형은 사출 성형 장치에 안착될 수 있는 금형이며 몰드베이스 금형 내에 삽입되는 코어 금형은 유전자 검출용 랩온어칩 제작할 수 있는 실질적인 금형으로 코어 금형 1개는 칩 상판 및 하판, 다른 코어 금형 1개는 칩 클립 금형으로 각각 제작됨. 각각의 금형은 사출 성형 업체에 제공, 광투과성 및 내열도가 높은 COC 재료를 넣고 사출성형기 장치를 이용하여 칩 상판, 하판 및 클립을 제작함</p>

		<p>PCR 증폭/검출용 칩 시제품 제작 :시드바이오칩스 (주) 열 접합기를 이용하여 칩 시제품을 제작하며 열 접합기 금속 지그 내에 칩 상판 및 하판을 안착하고, 안착된 상태에서 120℃, 2분간, 10ton으로 가압하여 칩을 접합시킴. 접합된 칩에 클립을 결합하여 칩을 완성함</p> <p>4. 랩온어칩에서의 PCR 증폭 성능 검증</p> <p>PCR 칩 구동을 위한 시스템 구축 : 펠티어 온도 소자를 이용한 온도블록은 별도의 온도센서 칩을 제작하여 설정 온도블록에서의 온도값 (95℃) 대비 ± 0.5℃ 이내의 편차값 제어를 하였으며 칩상에서는 45 cycle 기준 3채널에서 ± 1℃ 이내 편차를 갖는 온도제어 기술을 확립. LED 광원과 photo-diode 검출기, Short/Long pass filter 및 Dichroic mirror기반의 광학계는 광학 표준칩 (488/520 nm을 이용하여 3채널에서 신호 확인 및 검증함. 또한 소프트웨어 및 외형 디자인을 통하여 255(가로)mm X 213(세로) X 296(높이)mm, 5.85 kg, 350W의 AC220V/60Hz인 PCR 칩 구동 시스템을 제작함</p> <p>랩온어칩에서 유전자 증폭 검증 : 칩의 오염도를 확인하기 위한 DNase activity 검증은 1 mg 의 pACTB DNA (beta actin, pCMV-SPORT6/ACTB, clone # hMU000729), 10 X buffer (500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl2, 10mMDTT, 1MNaCl), ddH2O를 혼합하여 10 µl를 칩상에 주입한 후 37℃에서 16시간 보관, 2 µl의 loading dye를 넣어 8% 아가로스 겔에서 전기영동 하여 칩 오염도를 분석함. PCR 시약 조성은 Roche의 Fast start Taq polymerase와 Takara의 ExTaq polymerase, 농도별 (0.5 U, 1 U, 2.5 U, 5 U, 10 U) 자사 및 타사 장비를 이용하여 PCR 비교 수행하였으며, 그 결과 ExTaq polymerase (TaKaRa) 2.5 U 이상에서 유전자 증폭 재현성 결과를 얻음</p>
<p>다중 식중독균 검출을 위한 real-time PCR법 확립 및 랩온어칩 성능 검증</p>	<p>100</p>	<p>5. 다중식중독균 검출을 위한 real-time PCR 조건 최적화</p> <p>Primer의 다중증폭 검증 : 4종 식중독균의 용해곡선 분석을 통해 <math>T_m</math>값이 5℃ 이상 차이가 나는 <i>E. coli</i> O157:H7 (87℃)과 <i>S. aureus</i> (80℃), <i>Salmonella</i> spp. (88℃)와 <i>L. monocytogenes</i> (80℃)를 동시 검출할 수 있는 프라이머 결정</p> <p>다른 균주를 이용한 균 특이도 검증 : 다중 검출용 프라이머를 <i>B. cereus</i>에 대해 real-time PCR한 결과 증폭되지 않아 균주특이성 확인. 다른 균에 대해서도 특이성을 검증하고 검출감도를 조사함. 선별된 프라이머의 검출감도는 <i>S. aureus</i> (Ct;26)와 <i>L. monocytogenes</i> (Ct;26)는 10<sup>2</sup> cfu/mL 까지 <i>E. coli</i> O157 (Ct;26)과 <i>Salmonella</i> spp. (Ct;27)는 10 cfu/mL까지 검출. 4종 균에 각각 오염된 양상추에서 실험한 결과 <i>S. aureus</i>와 <i>Salmonella</i> spp.는 10<sup>3</sup> cfu/mL까지 <i>E. coli</i> O157과 <i>L. monocytogenes</i>는 10<sup>2</sup> cfu/mL까지 검출되어 식품시료에 오염된 경우 검출감도가 1 log cfu/mL 더 낮음. DNA 추출 없이 colony real-time PCR 수행 결과, 10<sup>5</sup> cfu/mL에서 Ct 25 이상으로 검출</p> <p>식품 matrix 효과 조사 : 양상추에서 다중 검출을 수행한 결과 <i>E. coli</i> O157:H7과 <i>S. aureus</i> (Ct;26)는 10<sup>4</sup> cfu/mL, <i>Salmonella</i> spp.와 <i>L. monocytogenes</i> (Ct;25)는 10<sup>3</sup> cfu/mL까지 검출</p> <p>기존 타 검출법과의 비교 : Applied Biosystems 7500 system과 본 과제에서 개발한 랩온어칩 시스템 NBS-100</p>

<p>나노자성-면역 분리 기반 시료 전처리 기술개발 (시료처리시간 : 3h 이내)</p>		<p>을 동일조건에서 4종 식중독균의 DNA 샘플로 비교한 결과 <i>L. monocytogenes</i>(Ct;16과 17)은 검출 감도가 유사하였으며, <i>E. coli</i> O157:H7과 <i>S. aureus</i>, <i>Salmonella</i> spp.는 ABI 시스템이 10 cfu/mL 수준으로 감도가 더 높음</p> <p>6. 나노자성-면역 분리 기반 시료전처리 기술  나노자성입자의 제조 : 10-20 nm 크기 수준의 core/shell 형태의 자성/금 나노입자 제작  식중독균 특이 항체-나노자성입자 중합체 제조 : 항체 고정화된 <i>E. coli</i> O157:H7의 TEM 이미지를 통한 항체고정화 확인  최적 특이항체-나노자성 입자 중합체 선별 및 특성평가: XRD, SEM 및 TEM을 통해 제작된 입자 특성평가. SPR을 이용한 항체고정화 조건 확인  모델 식품검체로부터 균 특이 분리 최적 조건 조사 : 필터를 이용한 미반응 나노입자 분리 조건 확인. 10<sup>3</sup> cell/mL 분리 및 검출 확인</p>
<p>식중독균 유전자 다중검출을 위한 랩온어칩 시스템 구축</p>	<p>100</p>	<p>7. 다중검출용 랩온어칩의 설계 및 제작  3D CAD 이용 칩 설계  PCR 증폭/계측부위 설계 : 실시간 계측과정에 발생하는 문제점 최소화 및 안정적인 계측 신호 확보를 위한 PCR 계측 부위 설계 및 재료선정, 개선된 칩 제조 방법을 통하여 대량 생산의 안정성 확보 및 5 µL - 10 µL 이내의 적은 시료 볼륨 등의 특징을 지니도록 설계함  칩제작용 코어금형 제작  랩온어칩의 성형사출  PCR 증폭/검출용 칩 시제품 제작  - Material : PC (Polycarbonate)  - Channel Number : 3 Channels  - Channel Volume (Total) : 5 µL - 10 µL  - Heat Stability : &lt;120°C  - Optical Spec.: Transparent (&lt;90%)</p> <p>8. 다중검출용 광학계 시스템 구축  다중검출용 형광광학계 설계 및 제작 : 1차년도와 비교하여 a) 온도블록의 효율적 온도 제어 b) PCR 30cycles 을 80분에서 35분으로 온도 제어 시간 단축, c) 실시간 형광검출 및 정량이 가능한 real-time PCR 기능 탑재, d) 일회용 플라스틱 다중 유전자 검출 진단칩 개발 측면에서 개선됨  형광광학계의 성능평가  검출용 probe의 형광특성 평가 : <i>L. monocytogenes</i> ATCC153131을 선택하여 DNA 50ng과 30 cycles을 기준으로 Roche사의 LightCycler 1.5와 나노바이오시스 쥘 휘 NBS-100 장비에서 검출용 probe의 형광특성을 실시간으로 평가한 결과, 유사한 PCR 효율과 진행시간을 보여줌</p>
<p>식품시료 전처리 기술의 현장 검증 및 표준화</p>	<p>100</p>	<p>9. 나노자성-면역 분리기반 시료 전처리 기술을 이용한 식중독균 농축 및 전처리  신선편이 채소 대상 균 분리능 조사: 신선편이채소 중 양상추를 대상으로 하여식중독균 특이항체와 나노자성 중합체를 이용한 시료전처리 방법으로 NBS-100에 의한 real-time PCR 결과 전통적인 배지법으로 검출하지 못한 10 cfu/mL에서도 식중독균을 검출할 수 있었음.  기존 시료전처리법과 비교: 나노자성 중합체를 이용한 시료전처리 방법은 10 cfu/mL의 적은 수의 세균이 존재하는 실험군에서 기존의 전처리법보다 더 좋은 검출능을 나타내</p>

<p>모델시료를 이용한 랩온어칩 다중 검출기술의 검증 (성능목표: <math>10^2</math> cells/mL, 4h 이내)</p>		<p>있음.</p> <p>따라서 실제 식품에서 아주 적은 수로 존재하는 식중독균의 검출에 효과적일 수 있을 것으로 사료됨.</p> <p>10. 시료 전처리 기술이 적용된 랩온어칩 검출 시스템 특성 평가 및 검증</p> <p>검출감도 조사: 신선편이채소 중 양상추, 치커리, 베이비채소를 대상으로 하여 <i>E. coli</i> O157:H7 NCCP11091, <i>S. aureus</i> ATCC6538, <i>Salmonella</i> spp. ATCC13076, <i>L. monocytogenes</i> ATCC15313의 <math>10^1</math>-<math>10^6</math> cfu/mL 세포수에서 검출감도 조사 결과, <i>E. coli</i> O157:H7은 모든 시료에서 10 cfu/mL 세포수까지 검출되었으며, 시료에 따른 검출감도의 큰 차이는 없었음.</p> <p>검출 특이성 조사 : 주요 식중독균의 검출에 사용된 4쌍의 검출 프라이머가 각 식중독균에 특이적인지 확인하기 위하여 <i>E. coli</i> O157:H7 2종, <i>Salmonella</i> spp. 3종, <i>L. monocytogenes</i> 2종, <i>S. aureus</i> 2종, <i>S. epidermidis</i> 1종, <i>B. cereus</i> 1종에 대한 특이성을 검증함. 그 결과, 각 균 특이적인 프라이머 의해 다른 식중독균은 검출되지 않았음. 공전법 등 다른 방법과의 비교 : 본 연구팀에서 개발한 NBS-100과 공전법, NBS-100과 기존에 사용해 왔던 ABI7500와의 성능을 비교한 결과, 모든 경우에 공전법으로 <math>10^2</math> cfu/mL까지 검출되었으며, 공전법으로 검출되지 않았던 10 cfu/mL에서 NBS-100으로 <i>E. coli</i> O157:H7 등의 검출이 가능하였음. ABI7500에 의한 분석법과 비교한 경우에도 큰 차이는 없으나 조금 더 좋은 검출능을 나타내었음. 기존 공전법으로 최소 24시간 소모되는 검출시간이 개발된 시스템에서 2-4시간으로 단축되어 현장에서 실시간 검출이 가능할 것으로 사료됨.</p> <p>재현성 조사 : 본 시스템에서 2종의 모델시료에서 4종의 식중독균의 검출에 대한 real-time PCR의 <math>C_T</math>에 대한 RSD 값이 베이비채소에서 0.1-1.9%, 양배추에서 0.1-2.5%로 재현성 실험에서 요구되는 0.1-5%의 RSD 값을 만족시켰음.</p>
<p>시료전처리용 하드웨어 시스템 구축</p>	<p>100</p>	<p>11. 시료전처리용 하드웨어 시스템 구축</p> <p>시료전처리 프로토콜 개발 : 식품공전의 검체 25 g, peptone water 225 mL, 주관기관에서 <i>E. coli</i> O157 나노입자를 공급 받아 분쇄 및 균질화, 분리, 자성비드 첨가 및 배양, capture 비드 첨가, Lysis, Eution 과정을 거치는 시료전처리 프로토콜을 확립함</p> <p>시료전처리용 하드웨어 시스템 구축 : 검체에서 배양은 장치 외부과정이며 capture 비드 첨가에서 elution 과정은 장치 내부과정으로 분리 확정함. 또한 장치 내부과정의 시료주입부는 파이펫 주입용으로 기구 설계하였으며 lysis모듈, membrane filter, 3 way 밸브 및 용액 배출부를 통합 설계하여 300(가로) x 150(세로) x 300(높이) mm, 5 kg, AC220V/24V 하드웨어 시스템을 제작함</p> <p>모델식품 대상 하드웨어 시스템 성능 검증 : 시료전처리용 하드웨어 시스템 성능 평가를 위해서 <i>E. coli</i> O157 (<math>1 \times 10^7</math> copy/LB250 mL (상추 250 g))와 200 <math>\mu</math>L beads를 첨가하여 외부 공정 과정을 거친 후, 20 <math>\mu</math>L D.W 첨가 및 5분간 boiling하여 DNA 3 <math>\mu</math>L 추출하여 2x SYBR green master mix 10 <math>\mu</math>L, primer 4 <math>\mu</math>L, D.W 3 <math>\mu</math>L의 시약조성과 pre-denaturation 95 <math>^{\circ}</math>C 60 초, denaturation 95 <math>^{\circ}</math>C 10 초,</p>

<p>식중독균 검출용 다중검출 랩온어칩 시스템의 시작품 제작 (개발목표 60 min 이내 PCR 증폭, 3종이상 다중검출)</p>		<p>Annealing &amp; Extension 72℃ 10초인 2 step 온도 조건으로 Roche (Light Cycler 1.5) 장비와 자사 장비를 이용하여 PCR 효율을 비교 검증함</p> <p>12. 식중독균 검출용 다중검출 랩온어칩 시스템의 시작품 제작  랩온어칩 구조 최적화 및 시작품 제작 : 2차년도 칩 구조를 기반으로 PCR 증폭 및 측정 부위의 기포 문제로 인하여 5 x 2 mm에서 3 x 1 mm 이내의 광측정 홀을 설계하였으며 4개 기관에서 5개 기관을 갖는 칩을 설계함. 또한 제작 방법은 2차년도 제작 방법과 동일하게 수행하여 칩 양산성을 확인함</p> <p>랩온어칩 검출용 시스템의 시작품 제작 : 2차년도 랩온어칩 시스템을 기반으로 3 step (pre_denaturation 95℃ (5분), denaturation 95℃ (10초), annealing 55℃ (10초), extension 72℃ (10초)) 온도제어를 2 step (pre_denaturation 95℃ (1분), denaturation 95℃ (10초), annealing &amp; extension 72℃ (10초))으로 온도제어를 수행하였으며 이로 인해 시간은 38분에서 26분으로 단축됨. 또한, 랩온어칩 검출용 시스템 설계하여 시작품을 제작함</p> <p>식중독균 다중검출 재현성 확인 : 신선편이채소 (상추 표) 부터 <i>E. coli</i> O157, <i>Salmonella</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>, <i>S. aureus</i> 배양균으로부터 3시간 이내의 시료전처리용 하드웨어 시스템을 이용하여 gDNA를 3 μL 추출하여 2x SYBR green master mix 10 μL, primer 4 μL, D.W 3 μL의 시약조성과 pre-denaturation 95℃ 60초, denaturation 95℃ 10초, Annealing &amp; Extension 72℃ 10초인 2 step 온도 조건으로 30cycle 30min 이내의 자사 및 타사 장비를 이용하여 비교 검증함</p>
--	--	---

## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

세부연구목표	기여도
신선편이채소류 식품의 주 오염 식중독균 검출을 위한 primer 개발 (개발목표 : 최소 5종 이상)	우선 순위분석을 이용하여 4종 식중독균을 선택하였으며 이들의 primer를 개발하고 원천기술을 확보하였음
Real-time PCR에 의한 개별 식중독균 검출법 확립 (성능목표 : $10^2$ cells/mL)	식품 중 포함된 대상 식중독균에 대해 real-time PCR의 의한 검출법을 확보하여 나노바이오시스에서 개발한 시스템과의 비교검증에 응용함
식중독균의 유전자 검출을 위한 랩온어칩 개발 (개발목표: 10 $\mu$ L 용량으로, 60 min 이내 PCR 증폭)	유전자 검출용 도구는 튜브이며, 칩 기반의 유전자 검출용 도구는 전 세계적으로 판매하고 있지 않음. 따라서, 국내/국의 기술을 선도하는 기술임
다중 식중독균 검출을 위한 real-time PCR법 확립 및 랩온어칩 성능 검증	4종 식중독균에 대해 다중 real-time PCR조건을 확립하였으며 나노바이오시스에서 개발한 랩온어칩을 사용하여 기존 제품 대비 유사 성능이 나옴을 검증함
나노자성-면역 분리 기반 시료 전처리 기술개발 (시료처리시간 : 3h 이내)	나노입자를 이용한 시료전처리는 실험실 수준에서 분리/농축을 위해 사용되고 있지만 나노입자의 분산도 및 재현성 문제로 인해 표준화되기 어려운 실정이었음. 나노입자 제작에서 시료전처리까지 표준화시켜 그 재현성을 높였으며 3시간 이내 식품 중 미생물을 농축시킬 수 있었으며 농축과정의 정도를 가시선 영역에서 확인함으로써 정성에서 정량적 정보까지 시료전처리과정에서 확인 가능하게 하였음
식중독균 유전자 다중검출을 위한 랩온어칩 시스템 구축	유전자 검출용 랩온어칩 (플라스틱 기판 외 접합 방식은 접합 공정의 획기적인 기술개발로 이를 응용할 경우, 10 $\mu$ L이하의 시료량으로 유전자 검출이 가능함. 또한, 현재 판매중인 튜브형 real-time PCR 기기 및 도구를 대체 가능함 다중검출용 광학계는 소형 및 다중 검출이 용이하도록 설계 및 제작됨. 따라서, 지속적인 기술 개발을 통하여 휴대용 real-time PCR장비 개발이 가능할 것으로 예상됨
식품시료 전처리 기술의 현장 검증 및 표준화	자성입자 및 금-자성입자의 제작에서 미생물 농축과정까지 일반 신선식품을 대상으로 개발한 프로토콜에 의해 현장 검증하였고 이를 표준화하여 미생물검출에 대한 재현성을 높였으며 향후 제품개발에 활용할 수 있도록 하였음
모델시료를 이용한 랩온어칩 다중 검출기술의 검증 (성능목표: $10^2$ cells/mL, 4h 이내)	모델시료를 사용하여 4시간 이내 100 cells/mL 수준까지 확인 가능한 기술을 개발함. 이는 유사 시스템과 비교하였을 경우 같은 감도에서 최단 시간 검출로써 국내외 적으로 우수한 기술임
시료전처리용 하드웨어 시스템 구축	신선편이채소 시료전처리용 하드웨어 시스템은 국내 자체 기술 개발을 통하여 설계 및 제작함. 국내 기술력 향상뿐만 아니라 국외 시장에서 적극적인 대응할 수 있음
식중독균 검출용 다중검출 랩온어칩 시스템의 시제품 제작 (개발목표: 60 min 이내 PCR 증폭, 3종이상 다중검출)	국내/국의 다중검출용 랩온어칩 시스템을 개발한 업체는 없으며, 이를 기반으로 우수한 기술력을 바탕으로 국내/국의 시장 진입 및 선점 가능 할 것으로 예상됨

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구개발 성과

#### 1. 논문게제 성과

게제연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011년	Detection of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp. and <i>Staphylococcus aureus</i> using duplex real-time PCR assay with melting curve analysis on fresh lettuce.	Lee, N.	Lee, N.	K. Y. Kwon, S.-W. Choi, M. S. Koo, H. S. Chun	J. Fd Hyg. Safety	26(2)	국내	
submitted	A combined separation and colorimetric detection of <i>E. coli</i> O157:H7 using gold-coated magnetic particles	Sung-Wook Choi	Hyang Sook Chun	Young-Ki Lee, Nari Lee, Hyun-Joo Chang, Sung-Woo Kim	J. Food Protection		국외	SCI

#### 2. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2009년	병원성 미생물 검출용 프라이머, 이를 이용한 병원성 미생물의 검출방법 및 검출키트	나노바이오시스(주)	한국	10-2009-0033798	2010년	식중독균 검출을 위한 자성 코어 금 나노입자 및 그 제조방법, 상기 나노입자를 이용한 식중독균 검출방법	한국식품연구원	한국	10-0962286
2011년	박막형 열블록 및 박막형 PCR칩을 포함하는 휴대용 실시간 PCR 장치	나노바이오시스(주)	한국	10-2011-0058873					
2011년	타겟팅-금 자성 나노입자-기반된 미생물의 원 스텝 분리, 농축 및 검출 방법	한국식품연구원	한국	10-2011-0042826					



### 3. 기술 이전

업체명	기술 내용 및 범위	주요 생산품목	이전금액	기술 관련 주요 연구결과
(주)나노바이오시스	식품 중 위해미생물의 선택적 선별을 위한 골드 입자 제조 기술	Real-time PCR, LOC chip, FPIA system, 바이오시약	1,000만원	나노자성 제작 및 나노자성-면역 분리기반 시료전처리 기술

### 4. 세미나 발표

일시	발표 제목	학술대회명	장소
2009	Separation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Using Gold-coated Immunomagnetic Particles for Rapid Detection	IAFP	한국
2010	나노입자를 이용한 식품 위해물질 신속검출	한국산업식품공학회	한국
2011	진단용 Microfluidic Chip-based Real-time PCR 개발	식약청 세미나	식약청

## 제 2 절 연구개발 상용화 및 산업화 계획

- 식중독균 검출용 유전자 키트 상용화 가능 : 칩제조에 필요한 원부원료의 대량구매처에 대한 조사 및 수배를 통해 가격경쟁력을 확보하고, 이를 토대로 식중독의 원인이 되는 유해미생물을 유전자 기반의 PCR증폭을 통해 고감도로 검출할 수 있는 진단시약을 상품으로 만들어 사업화 할 예정이다.
- 다중증폭 및 다중검출이 가능한 유전자 검출 시스템 상용화 가능 : 기존에 개별 유전자를 진단하는 키트들은 이미 상용화되어 있으나, 여러 가지 식중독 원인균들을 한 번에 증폭 및 동시검출하는 진단키트 및 시스템은 개발되어 있지 않다. 따라서 본 과제를 통해 개발 및 확립되는 다중증폭 및 검출시스템은 식중독균과 같이 다양한 원인균들이 작용하는 경우에 있어 매우 효과적인 진단 제품이 될 것으로 판단된다.
- 식품안전 진단용 시료전처리 시스템 산업화 : 현재 사후 역학조사에만 의존하고 있는 식중독관리를 표준화된 전처리 시스템과 빠른 유전자 진단 시스템을 이용해 사전검사 및 예방관리 시스템으로 변화시킬 수 있으며 이는 식품안전 분야에 있어 새로운 시장을 개척하는 효과를 창출할 것이다.
- 나노바이오시스(주)의 사업 목표는 랩온어칩 기반의 휴대용 실시간 유전자 진단 시스템 개발이다. 따라서, 1년간 집중적인 연구 및 자금 투자를 통하여 제품을 완성하고자 할 것이며, 1년 이후 제품 판매 및 홍보할 예정이다.
- 홍보 및 마케팅 : 칩 제조가격 등 제조원가에 대한 상세분석을 통하여 가격측면에서 경쟁력을 확보함과 동시에 정부 및 일반인에 대해 이원화한 사전 홍보 계획을 수립한 다음 체계적으로 홍보할 예정이다.

## 제 3 절 기술혁신 및 지식재산권 확보 계획

### 1. 기술혁신

#### 국방-IT융합기술로드쇼 (국방부주관 전시회-양재동 엘타워)

- 34개 IT기업이 참가하여 국방-IT 융합기술 발표 및 기술 시현을 위한 전시회
- 주 수요처인 방위사업청, 합동참모본부, 각 국, 국방과학 연구소, 국방기술품질원 등 군 관계자 300여명 참석



#### 생명산업DNA전 (농림수산식품부주관 전시회-양재동 AT센터)

- 미생물, 동식물, 자연자원 등 생명자원을 활용하여 고부가 가치를 창출할 수 있는 산업 소개 및 육성
- 89개의 기업 및 기관 등이 참여



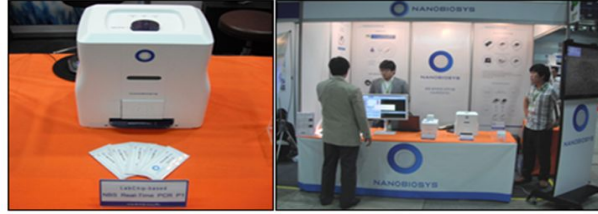
#### BIO KOREA2010 (바이오코리아 2010 전시회 참가-삼성동 코엑스 : 산업뉴스방영)

- 바이오장기, GMO 및 건강기능식품, 산업공정 및 바이오에너지, Bio-IT융합 기술, 바이오 진단 및 분석기기 등 국내/국외 254개 업체 및 기관 참여, 12,000명의 전시회 참관



### 2011 생명과학 기기전시회 (생화학분자생물학회-코엑스)

- 대학원생 및 임상의, 연구원을 대상으로 기초 의생명과학 및 임상 분야의 다양한 주제 발표 및 교류의 장
- 제 2회 생화학분자생물학회 내 생명과학 기기전시회로서 생명과학분야 전문 전시회임



### 2011 한국바이오칩학회 (바이오칩학회-양재 교육 문화회관)

- 단백질체학, 기능유전체학, 바이오멤스, 나노기술, 바이오센서 및 생물정보학 전문 연구 모임
- 학계와 기업 연계 구축 및 외국과의 기술교류의 장임



## 2. 지식재산권 확보 계획

본 연구를 통하여 3건의 지식재산권(특허)을 출원하였으며 1건은 등록하였다. 따라서 추가로 지식재산권 확보 계획은 없으며 실시예로서 실험한 연구 결과들에 대한 저명 학술지지에 논문으로 발표할 예정이다.

## 제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

- 나노바이오시스(주)의 사업 목표는 랩온어칩 기반의 휴대용 실시간 유전자 진단 시스템 개발이기 때문에 지속적으로 연구 개발할 예정이며, 식품 이외에 의료/환경/국방 등 다양한 사업 분야에 접목하여 현장 진단용 실시간 유전자 진단시스템을 활용할 예정이다.
- 시료 전처리 시스템과 실시간 유전자 진단 시스템이 융합된 하나의 LOC로 구성시켜 통합 시스템으로 개발하고 생산 현장에서 비전문가 수준으로 검출할 수 있게 할 계획이다.
- 4종 미생물 외 미생물에 대해 추가적으로 PCR primer를 확보하여 식품 식중독균에 대한 real-time PCR의 원천기술을 지속적으로 확보할 계획이다.
- 개발된 고속 유전자 증폭 기술을 바탕으로 형광검출부 대신 전기 화학적 방법이나 전기적 방법(FET) 등의 biosensor를 접목시켜 새로운 방식의 유전자 검출 시스템 제작에 활용할 계획이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 시료 전처리 (Sample Prep)

가. Sample Prep 2011은 “Sample preparation for Virus, Toxin & Pathogen Detection & Identification” 주제로 2011년 4월 4 - 5일(미국 샌디에고) 개최하였다.

나. Sample prep은 국제적으로 중요한 관심 사항이며 Sample collection, (Pre-) concentration, Lysis, Target extraction, Transfer to analysis module에 대해서 기술 및 시스템에 적극적으로 활용하고자 노력하고 있다. 또한 정부, 학교, 기관 및 산업체에 전문가 그룹들은 아래 항목에 대해서 집중적으로 논의 하고 있는 상황이다.

- Alternative sample prep technologies
- Sample prep as separate vs. integrated module approach
- Sample prep with micro- and nanofluidics
- Nanotechnology challenges for sample preparation
- Robust sampling methodologies
- Food, water, air, and environmental sampling
- Novel methods of extraction from tough (non-filterable) matrices
- Single use sample concentration modules
- Advanced lateral flow assays for sample prep
- Nucleic acid or protein based sample prep for next generation sequencing
- Sample prep technologies for detection/diagnostics vs. pharma

따라서, 국내/국외 sample prep의 중요성은 시장에서 더욱 필요로 하는 기술이다.

### 2. 해외 진단 시장 전망 및 허가 지침

진단 검사 (Diagnostics)는 체내 진단 검사 (in vivo diagnostics)와 체외 진단 검사 (in vitro diagnostics, IVD)로 대별되고, 체외 진단 검사는 일반 체외 진단 검사 (Routine IVD)와 전문 체외 진단 검사 (Esoteric IVD, Specialized IVD)로 구분된다. 전문 체외 진단 검사는 일반 진단 검사 (General chemistry), 혈액 진단 검사 (Hematology), 세포 진단 검사 (Cytology), 미생물 진단 검사 (Microbiology), 면역화학적 진단 검사 (Immunochemistry), 유전자 진단 검사 (Genomics, proteomics, metabolomics)로 나뉜다. 일반적으로 면역화학적 진단 검사 및 유전자 진단 검사를 분자 진단 검사 (Molecular diagnostics, MDx)라고 한다.

#### 가. 세계 체외 진단 검사 시장 현황 및 전망

세계 체외 진단 검사 시장은 2001년부터 2007년까지 연평균 9.4% 성장하여 2007년 390억불 규모를 형성하였다. 지멘스 (Siemens), 로슈 진단사업부 (Roche Diagnostics), 애보트 진단사업부 (Abbott Diagnostics)가 2007년 세계 체외 진단 검사 시장의 3분의 2를 차지하였다. 그 뒤를 이어 베크만 (Beckman Coulter), 존슨앤존슨 (Johnson & Johnson), 벡튼 디킨슨 (Becton

Dickinson), 비오메리외 (bioMerieux)가 세계 체외 진단 검사 시장을 주도하였다. 지멘스는 130억불을 투자하여 바이엘 진단사업부 (Bayer Diagnostics), 데이드 베링 (Dade Behring·Diagnostic Products Corporation)를 합병하여 세계 체외 진단 검사 시장의 36.0%를 점유하였다. 진단 사업 전문 기업인 로슈 진단사업부는 세계 체외 진단 검사 시장의 20.0%를 점유하였다. 세계 체외 진단 검사 시장은 2007년부터 2013년까지 연평균 5.0% 성장하여 2013년 520억불 규모로 성장할 전망이다.

#### 나. 세계 분자 진단 검사 시장 현황 및 전망

세계 분자 진단 검사 시장은 2001년부터 2007년까지 연평균 16.9% 성장하여 2007년 27억불 규모를 형성하였다. 로슈 진단사업부가 코바스 (Cobas Ampliprep, Cobas TaqMan HIV, HBV, HCV), 앰플리칩 (Amplichip CYP2D6, CYP2C19)을 통해 세계 분자 진단 검사 시장의 37.0%를 차지하였다. 로슈 진단사업부를 포함하여 진프로브 (Gene Probe), 애보트 진단사업부, 미리어드 (Myriad), 지멘스, 벡튼 디킨슨, 비오메리외, 퀴아젠 (Qiagen), 써드웨이브테크놀로지 (Third Wave Technologies)가 세계 분자 진단 검사 시장의 95%를 차지하였다. 애보트 진단사업부는 2001년 바이시스 (Vysis)를 합병하여 패트비전 (PathVysion), 유로비전 (UroVysion), CEP8/12, CEPX/Y 등을 확보하여 분자 진단 검사 시장에 합류하였다. 세계 분자 진단 검사 시장은 2007년부터 2013년까지 연평균 14.0% 성장하여 2013년 58억불 규모로 성장할 전망이다.

#### 다. 분자 진단 시장 기회 요인 및 위험 요인

진단 검사 장비 개발은 의약품 개발과 달리 개발 비용과 개발 시간이 적게 소요된다는 장점을 갖는다. 또한 진단 검사 장비 허가를 위한 경로가 여러 개 존재하는 것도 장점이다. 다만 진단 검사 장비는 보험 급여 범위가 작고, 제품 수명이 짧다는 단점을 지닌다. 진단 검사 장비 개발의 불확실성은 특허에서 비롯된다. 진단 검사 장비 산업에서 가장 일반적인 특허 형태는 유전자 특허 (Gene patent)이다. 유전자 특허는 천연 유전자 서열, 재조합 유전자 서열, 변이 유전자 서열, 박테리아 유전자 서열, 바이러스 유전자 서열, 벡터, 세포주 등을 포함한다. 유전자 특허는 진단 검사 장비 개발 회사에게 기회 요인이거나, 경쟁 개발 회사에게는 위협이 된다. 따라서 진단 검사 장비 개발을 하고자 하는 회사는 특허권 확보 및 경쟁사 특허권 회피를 위하여 면밀한 특허 전략을 수립해야 한다.

#### 라. 진단검사 장비 허가 지침

##### (1) 미국 진단 검사 장비 허가 지침

미국에서 체외 진단 검사 장비 허가 지침은 510(K) (Premarket notification), PMA (Premarketing approval), ASR (Analyte specific reagent), RUO (Research use only) 등 4가지로 분류된다.

510(K)는 Class I, Class II 및 일부 Class III로 분류된 진단 검사 장비에 대한 허가절차이다. 대상 진단 검사 장비 개발업체는 최소한 시판 90일전 510(K)를 제출해야 한다. 공중 보건상 중요한 진단 검사 장비는 신속 심사 지정 (Fast Track Designation)으로 30일 이내 허가 가능하다. 510(K)는 기발매 진단 검사 장비와 동등성 입증 시 부여된다. FDA 허가 담당자는 진단 검사 장비의 기능, 임상적 효용성, 라벨정보를 심사한다. 510(K) 최종 허가 여부는 분석 민감도, 임상 민감도, 특이성, 편차, 재현성, 농도 의존성, 검출 한계 등에 의해 결정된다.

PMA는 Class III로 분류된 진단 검사 장비에 대한 허가 절차이다. PMA는 위양성 (False positive, 음성을 양성으로 판정), 위음성 (False negative, 양성을 음성으로 판정) 등 진단 결과가 환자 처치에 미치는 위험 가능성에 주안점을 둔다. PMA 허가는 전문가로 구성된 외부 패널 심사, 제조 공정 심사, 제조 설비 실사, 임상 시험 거점 감사, 시판전 자료 심사를 포함한다. 일반적으로 PMA 허가를 위해 180일이 소요된다. ASR은 샘플 내 특정 인자의 확인 및 정량을 위해 이용되는 항체 (Antibody), 수용체 (Receptor), 핵산 (Nucleic acid), 시약 (Reagent)을 의미한다. FDA는 난이도 높은 연구를 수행하는 연구소에서 자체적으로 제조, 이용하는 ASR에 대해 제한적으로 허가를 해주고 있다.

RUO는 임상적 유용성을 입증하지 않은 채 연구 목적으로 제조한 진단 검사 장비에 대한 허가 절차이다. RUO 허가시 제한적인 시판이 가능하다.

한편 FDA 허가 없이 진단 검사 장비를 시판하는 절차도 있다. 진단 검사 장비 제조 회사가 자체 연구소를 설립하거나 CLIA (Clinical laboratory improvement amendments of 1988)에 부합하는 연구소와 공동으로 진단 검사 장비를 제조하면 FDA 허가 없이 시판할 수 있다.

## (2) 유럽 진단 검사 장비 허가 지침

1998년 유럽 체외 진단 검사 장비 지침 (European IVD Directive)가 마련되어 2000년 시행되기 시작하였다. 유럽 체외 진단 검사 장비 지침은 안전한 진단 검사 장비의 제조·공급·사용을 위한 규제안이다. 2003년 12월 이후 EU 소속 국가에서 시판되는 진단 검사 장비는 유럽 체외 진단 검사 장비 지침에 부합하고, CE (Conformité Européenne) 인증을 획득해야 시판이 가능하다. 다양한 허가 경로를 갖는 미국과 비교시 유럽은 단일 허가 경로를 갖는 차이를 갖는다. 또한 미국 허가 지침과 비교시 유럽 허가 지침은 위험성 분석에 더욱 중점을 두는 특징을 갖는다.

## 3. NGS (Next-generation sequencing) 기술

염기서열 분석기술(Sequencing technology)의 경우 1977년 Sanger 등의 보고 이후 이른바 Sanger sequencing 방법이 계속 사용되어 오다가, 이를 모세관 전기영동 (capillary electrophoresis)과 결합한 형태의 자동화된 기기가 1990년대 보급되기 시작하였다. 이러한 상황 속에서 최근 sequencing technology 분야에서 새로운 혁신적인 발전이 이루어지고 있는데, 현재 가장 주목받고 있어 차세대 염기서열 분석 기술(next-generation sequencing technology)이다.

### 가. Clonal Amplification Techniques

기존의 sequencing 방법은 DNA fragment library를 분리, 증폭하기 위해 bacterial clone을 만드는 과정을 필요로 한다. 각각의 single DNA fragment는 Bacterial artificial chromosome(BAC)이라고 불리는 수백 kbp의 insert size를 가지는 vector에 의해 E. coli에 transforming되고, transformant를 plating으로 selection 및 separation하여, single DNA fragment로부터 유래된 bacterial clone을 cell growth를 통해 증폭시키게 된다. 이러한 bacterial clone을 만들기 위한 과정은 2~3주 가량 소요되기 때문에 새로운 organism 혹은 개체를 sequencing하는데 가장 결정적인 rate-limiting step이다. 따라서 이 과정에 드는 시간, 노

동력, 비용을 획기적으로 줄이기 위한 새로운 기술에 대한 요구가 있어 왔고, 최근에 개발된 emulsion PCR과 polony PCR 등이 이러한 bacterial clone-free한 clonal amplification을 가능하게 해주었다.

#### 나. Emulsion PCR

Emulsion PCR은 genome DNA를 fragmentation하여 얻은 DNA library를 공간적으로 separation하여 emulsion 안에서 증폭하게 함으로써 각각의 single fragment에 대한 clonal amplification을 가능하게 한 것이다. 기름 성분에 continuous stirring이 이루어지는 가운데, PCR reagent, 한쪽 PCR primer가 표면에 수식된 microbead, DNA library 등이 포함된 aqueous phase를 dropwise로 떨어뜨려주게 되면 single DNA fragment와 single microbead 및 PCR reagent가 포함된 emulsion이 만들어 지게 되고, thermocycling을 통해 PCR을 진행하게 된다. 그렇게 되면 bead에 한쪽 primer가 고정된 상태이기 때문에 bead의 surface에 증폭된 DNA fragment가 PCR을 통해 수식되게 된다. 이때 하나의 bead에는 single DNA fragment에서 유래한 DNA만이 수식된다. 이렇게 증폭된 signal을 포함한 microbead는 microfabricated well이나 sequencing을 위한 기판 위에 고정되어 sequencing reaction에 이용될 수 있다.

#### 다. Polony PCR

Polony PCR은 oil-water phase separation 대신 polyacrylamide gel을 이용하여 single DNA fragment를 separation하고 그 자리에서 PCR을 하는 기술이다. Gel 내에서 PCR reaction이 in situ로 진행되며, polyacrylamide gel이 DNA fragment의 diffusion을 막아 주기 때문에 각각의 single DNA fragment가 micron-scale의 colony를 만들게 되고(polony), 이 polony들이 개별적으로 동시에 sequencing에 활용될 수 있다.

#### 라. Commercialized Platforms

Emulsion PCR과 polony PCR 등과 같은 bacterial clone-free 방법의 도입과 이러한 amplified된 clone을 효과적으로 동시에 sequencing하는 기술의 급속한 발전으로 인해 최근의 학문적 사회적 요구에 부응하며 3개의 major 회사에서 next-generation sequencing technology를 활용한 system을 개발하여 출시하였다. 첫 번째로는 2004년 Roche사에서 454 Cooperation사와 손잡고, 454 GS FLS sequencer를 출시하였고, 2006년과 2007년에 각각 Illumina사의 Genome Analyzer와, Applied Biosystems사의 SOLiD가 차례로 출시되었다. 세 가지의 platform 모두 공통적으로 bacterium free한 clonal amplification 기술과 cyclic한 massively parallel sequencing 기술을 이용한다는 공통점이 있다.

## 제 7 장 참고문헌

1. Amagliani, G., Omiccioli, E., Del Campo, A., Bruce, I.J., Brandi, G., Magnani, M.: Development of a magnetic capture hybridization-PCR assay for *Listeria monocytogenes* direct detection in milk samples. *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 375-383 (2006)
2. Giglio, S., Monis, P. T., Saint, C. P.: Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e136 (2003)
3. Aslam, M., Hogan, J., Smith, K. L.: Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in milk. *Food Microbiol.*, **20**, 345-350 (2003)
4. Rossmannith, P., Krassnig, M., Wagner, M., Hein, I.: Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Res. Microbiol.*, **157**, 763-771 (2006)
5. Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E., McFall, M. E., King, R. K., Render, D. G.: A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food-animal matrices. *J. Food Prot.*, **70**, 1080-1087 (2007)
6. Fujikawa, H., Shimojima, Y.: Estimation of viable *Salmonella* cell numbers in meat and meat product using real-time PCR. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **49**, 261-265 (2008)
7. Jothikumar, N., Wang, X., Griffiths, M. W.: Real-time multiplex SYBR green I-based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, **66**, 2141-2145 (2003)
8. Alarcón, B., García-Cañas, V., Cifuentes, A., González, R., Aznar, R.: Simultaneous and sensitive detection of three food-borne pathogens by multiplex PCR, capillary gel electrophoresis and laser induced fluorescence. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7180-7186 (2004)
9. Jinneman, K. C., Yoshitomi, K. J., Weagant, S. D.: Multiplex real-time PCR method to identify shiga toxin genes *stx1* and *stx2* and *Escherichia coli* O157:H7/H<sup>-</sup> serotype. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6327-6333 (2003)
10. Elizaquível, P., Aznar, R.: A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiol.*, **25**, 705-713 (2008)
11. Yoshitomi, K. J., Jinneman, K. C., Weagant, S. D.: Detection of shiga toxin genes *stx1*, *stx2*, and the +93 *uidA* mutant of *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> using SYBR Green I in a real-time multiplex PCR. *Mol. Cell. Probes*, **20**, 31-41 (2006)
12. Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Witter, C. T.: Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, **65**, 1370-1372 (1997)
13. Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M.: Multiplex polymerase chain reaction: a



- practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.*, **16**, 47-51 (2002)
14. Fu, Z., Rogelj, S., Kieft, T. L.: Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, **99**, 47-57 (2005)
  15. Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, Bruce, I. J., Magnani, M.: Simultaneous direct detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk samples by magnetic extraction and multiplex PCR. *J. Rapid Methods Automat. Microbiol.*, **17**, 195-213 (2009)
  16. 자성나노입자의 합성 및 기술동향, 한국과학기술정보연구원, **10**, (2006)
  17. Mikhaylova, M., Kim, D.K., Bobrysheva, N., Osmolowsky, M., Semenov, V., Tsakalacos, T., Muhammed, M.: Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: Dependence on surface modification. *Langmuir.*, **20**, 2472-2477 (2004)
  18. Coroiu, I.: Relaxivities of different superparamagnetic particles for application in NMR tomography. *J. Magn. Magn. Mater.*, **201**, 449-452 (1999)
  19. Lockwood, D.J.: Nanoparticles: Building blocks for nanotechnology. Chapter 7, pp 173-200, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York (2004)
  20. Henglein, A., Giersig, M.: Formation of colloidal silver nanoparticles: capping action of citrate., *J. Phys. Chem. B.*, **103**, 9533-9539 (1999)
  21. 식중독예방 표준교재 - 식품안전관리대책, 경기도.
  22. 식품의약품 통계연보, 한국식품의약품안전청 (2008)
  23. 신선편이농산물 시장의 실태와 활성화 방안, 한국농촌경제연구원 (2009)
  24. 제 10장 신선편이농산물 시장의 기회와 과제, 한국농촌경제연구원.
  25. 대형 할인점의 신선편이 농산물 취급 동향과 농협의 대응 방향, 농협경제연구소 (2009)
  26. 분자진단검사 시장 성장성 주목, HI Research Center (2010)
  27. 유전체 연구 및 활용기술 - BT기술동향 보고서, 국가생명공학정책연구센터 (2007)
  28. U-헬스케어 확산의 도화선 바이오센서, KT (2010)
  29. Strategic Analysis of Global In Vitro Diagnostics Market, Frost & Sullivan (2010)
  30. Paek, S.H. *Biochip Journal.*, **1**, 1-16 (2007)
  31. Kauzlarich, S.M. *Nanotechnology.*, **117**, 640-644 (2006)
  32. Laibinis, P.E. *Biotechnol. Prog.*, **19**, 477-484 (2003)
  33. Pathatrix™ *E. coli* O157 Test AOAC Performance Tested Methodsm Validation Study, AOAC Validation Study Report 9th April.
  34. Pathatrix™ *Listeria* species Test AOAC Performance Tested Methodsm Validation Study, Final AOAC Validation Study Report Version 1.2 3rd September (2002)
  35. Pathatrix™ *Salmonella* Test AOAC Performance Tested Methodsm Validation Study, Final AOAC Validation Study Report Version 1.4 6th September (2002)
  36. Pathogen detection, food-borne, Reprinted from the McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology (2003)
  37. Lazcka, O., Campo, F.J.D., Munoz, F.X.: Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics.*, **22**, 1205-1217 (2007)

38. Strategic Analysis of U.S. Genomics Markets, Frost & Sullivan (2006)
39. Louie, R.F., Kitano, T., Brock, T.K., Derlet, R., Kost, G.J.: Point-of-Care Testing for Pandemic Influenza and Biothreats. *Disaster Med Public Health Prep.*, **3**, S193-S202 (2009)

