

(옆면)

(앞면)

116128-3

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(), 비공개(), 발간등록번호(○)

발간등록번호
11-1543000-003009-01

사출성형
미세유체
칩을이용
한압타머
기반조류
인플루엔
자휴대용
진단기
개발

사출성형 미세유체칩을 이용한 압타머기반 조류인플루엔자 휴대용 진단기 개발 최종보고서

최
종
보
고
서

2020.02.18.

2019

주관연구기관 / 성산ENG
협동연구기관 / 서울대학교
협동연구기관 / 한양대학교

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림식품기술평가원장 귀하

‘사출성형 미세유체칩을 이용한 압타머기반 조류인플루엔자 휴대용 진단기 개발’(연구개발 기간 : 2016.11.29. ~ 2019.11.28.) 과제의 최종보고서 000부를 제출합니다.

2020. 2. 18.

주관연구기관명 : 성산ENG (대표자) (인)
협동연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (대표자) (인)
협동연구기관명 : 한양대학교 산학협력단 (대표자) (인)

주관연구기관책임자: 고재호
협동연구기관책임자: 김기성
협동연구기관책임자: 윤문영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116128-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.11.29. ~ 2019.11.28	단 계 구 분	(3단계)/ (총 3 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	사출성형 미세유체칩을 이용한 압타머기반 조류인플루엔자 휴대용 진단기 개발			
연구책임자	고재호	해당단계 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:810,000천원 민간:270,000천원 계:1,080,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 명	총 연구개발비	정부:810,000천원 민간:270,000천원 계:1,080,000천원
연구기관명 및 소속부서명	성산ENG			참여기업명 서울대학교, 서울대학교(수의대) 한양대학교	
국제공동연구 위탁연구	상대국명: 연구기관명:			상대국 연구기관명: 연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> * 조류인플루엔자를 현장에서 신속 정확하게 진단 할 수 있는 센서 시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> - aptamer를 이용한 조류인플루엔자 검출 시스템 개발 - 사출성형으로 생산 가능한 마이크로 유체 소자 개발 - 면역응집반응의 산란광을 측정 할 수 있는 휴대형 측정기기 개발 - 샘플 전처리 및 검출 시스템 개발 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> * 조류인플루엔자를 현장에서 신속 정확하게 진단할 수 있는 aptamer 발굴 * aptamer를 이용한 고감도 센싱기술 개발 * 면역입자응집반응용 진단입자 제조기술을 확보하여 고감도 바이러스 검출이 신속하게 확인됨 * 스마트 나노 센서 입자의 보관 및 로딩 장치 개발 * 사출성형으로 마이크로 유체 소자를 대량 생산 기술 확보 * 조류인플루엔자 유무 판정을 위한 정성 분석용 휴대형 검출 시스템 개발 * 블루투스 통신 환경을 구축해서 디바이스와 안드로이드 앱으로 무선통신이 가능한 시스템 개발 * 검출 데이터를 데이터베이스화 하여 이력 관리가 가능한 스마트폰 앱 개발 * 작동이 간편하고 휴대가 용이한 측정기 보급으로 신속한 대응 가능 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> * 사출성형으로 마이크로 유체 소자를 대량 생산 기술 확보를 통한 다른 질병 진단 기술에 적용 가능 * aptamer를 이용한 단백질 및 세포 탐지 기술은 의료 진단용 바이오센서 연구에 있어서 항체 시스템을 대체할 수 있는 새로운 기술 확보 * 관련 분야의 원천기술 확보를 기반으로 바이오리셉터 라이브러리 콘텐츠 구축 및 high-throughput 분석 시스템을 개발하여 다양한 질병관련 물질 동시 분석을 통한 질병 진단 기술로의 연구 확장 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	휴대용센서	조류인플루엔자	사출성형 마이크로유체소 자	aptamer	광학센서
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	portable sensor	avian influenza	injection molding microfluidic device	aptamer	optical sensors

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
1절. 연구개발의 목적	1
2절. 연구개발의 필요성	1
3절. 연구개발의 범위	2
4절. 연구개발 대상의 국내외 현황	4
5절. 연구개발의 중요성	8
제 2 장 연구수행 내용	10
1절. 수행연도별 연구개발 목표 및 결과	10
2절. 연구범위 및 연구수행 방법	15
3절. 기관별 연구 수행 내용 및 결과	17
제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	119
1절 목표	119
2절 목표 달성여부	119
제 4 장 연구결과의 활용 계획	121

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

고병원성조류인플루엔자 (HPAI, Highly pathogenic avian influenza)는 국내 제 1 종 법정가축전염병으로 전파 속도가 매우 빠르고 병원성이 다양하며 변이가 빠르기 때문에 높은 폐사율과 산란율 저하로 인하여 막대한 경제적인 피해를 초래한다. 따라서 발생 초기에 적절한 방역조치를 통한 효과적인 대책 마련이 필요하다. 국내에서는 2000년 이후 총 4차례 HPAI가 발생하였다. 각 발생 시기마다 방역비, 농가손실 보전비는 물론 직간접적인 관련 업종에 대하여 천문학적인 경제적 손실이 발생한다. HPAI의 초기 발생은 다양한 원인이 추정되고 있으나 가장 유력한 것은 HPAI가 상재하고 있는 인근 국가(몽골, 중국, 동남아 등지)에서 날아오는 철새로부터 발생하거나 또는 HPAI 발생 국가를 여행한 농장주 또는 노동자에 의하여 발생하는 것으로 알려져 있다. HPAI는 일반적으로 비말, 공기, 물 등으로 전파될 수 있으며 사람, 관련차량(농기구 등), 기구, 장비 등에 묻어 전파될 수 있다. 하지만 이러한 발생 및 전파는 요인이 복합적이고 다양하며 철새, 유통시장, 공기 중 전파 등에 대한 기초자료가 부족할 뿐 아니라 잠복기, 검출의 어려움, 자연 신고 등으로 인하여 동향을 파악하는 것이 매우 어렵다.

2000년대 접어들어 가축질병으로 인한 정부의 가축질병 방역과 살처분 보상비용이 수천억 원의 예산을 소비 하였다. 이러한 가축질병을 관리하기 위해서는 현장에서 신속 정확하게 진단을 할 수 있는 장비가 필요하다. 현재 질병의 의심되는 농가로부터 시료를 채취 하여 실험실에서 분석하는 방법은 초기 확진 판정까지 시간이 가장 중요한 가축방역 현장에서는 많은 어려움을 야기시킨다. 이러한 문제점을 개선하기 위한 방법으로 실험실 수준의 정확도를 갖고 측정 시간도 수분 내에 검출 가능한 바이오센서에 관한 연구가 많이 진행되어 실용화를 앞두고 있다.

2절. 연구 개발의 필요성

일반적인 가축질병 검사법으로는 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Polymerase chain reaction (PCR) 법이 국제적인 인증 검사법으로 널리 사용 되고 있다. 이러한 면역분석 방법은 민감도 및 정확도가 높고 정량분석이 가능하여 그 신뢰도가 높은 반면, 여러 단계의 분석과정을 거쳐야 하므로 전문적인 교육을 받은 사람만 사용 할 수 있고 분석시간이 길어진다. 분석 장비 또한 고가여서 쉽게 접근하기 어려운 분석 방법이다. 면역 크로마토그래피를 이용한 간이 진단 키트의 경우 사용이 쉽고 신속하게 결과를 분석할 수 있는 장점이 때문에 현장 검사용 목적으로 널리 보급되고 있다. 그러나 감도와 정확도가 낮은 단점으로 인해 검사결과를 100% 신뢰 할 수 없는 문제점이 있다. 따라서 높은 민감도, 특이성, 선택성을 가지면서 간편성, 편리성, 다중동시분석, 실시간 검출 및 경제성을 고려한 가축질병 진단 시스템 개발이 필요하다.

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

을 대체 할 수 있을 것으로 판단된다.

마이크로 유체 소자를 이용한 질병진단 및 유해물질 검출에 관한 연구는 활발하게 진행 되어 신속 정확하게 바이러스 및 박테리아 검출이 가능한 기술이 개발 되었으나, 마이크로 유체 소자의 대량생산 기술이 개발 되지 못해 몇 몇 분야에서 사용 되고는 있으나 시장이 확대 되지 못하고 있는 실정이다.

조류인플루엔자와 같이 전염성이 강하고 사회적 경제적 피해 규모가 큰 가축질병의 경우 전문가가 아닌 일반인들이 쉽게 사용 할 수 있는 현장형 진단 센서 기술 개발이 절실 하다. 몇 몇 제품의 경우 현장에서 사용이 간편한 제품이 상업화 되었으나 센서의 감도가 신뢰 할 수 없을 정도로 낮아 실제 현장에서는 신뢰를 잃고 있다.

현재 우리나라 국민들은 선진국을 향해 경제가 성장함에 따라 복지 및 건강에 대한 관심이 증대 하고 있다. 특히 다양한 농/축산물이 생산되고 있으며. 여러 가지 식생활 재료의 수입이 폭발적으로 증대함으로써 각종 식품에 대한 안전 관리를 위한 검사가 강화되고 있다. 특히, 농/축산물의 경우, 국민 건강과 직결되는 문제로 생산단계에서부터 유통과정까지 철저한 관리 감독이 요구되고 있다.

농축산물내의 바이러스, 박테리아 및 잔류농약 물질에 대한 소비자의 관심이 높아져 식품의 안전성을 확보 하여야 하며, 자유무역 협정에 의한 수입 농산물이 급속하게 증가하여 철저한 검역 또한 필요한 실정이다. 특히 국내 축산산업이 규모화, 집단화로 인하여 종래 거의 문제가 되지 않았던 만성적이고 소모성 질병을 유발하여 생산성 저하를 초래하고 있다. 최근에는 이러한 병원균 예방을 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

최근에는 국제교류의 증가로 조류독감, 돼지 콜레라와 같은 다양한 병원균에 의해 축산 현상이 위협 받고 있으며, 발병 시 막대한 피해가 예상되므로 이를 사전에 감지하고 예방할 수 있는 무인감시체계, 정보전달시스템이 요구되고 있다.

하지만 고가의 검사 장비를 구비하기가 쉽지 않으며, 검사 수단도 복잡하여 간편하게 농/축산물의 오염을 검출하기 위한 키트가 다양하게 개발이 이루어지고 있지만 아직 연구 단계에 머물고 있다. 따라서 본 연구를 통해 복잡하고 고속련의 노동력이 필요한 고가의 검사 장비를 대신하여, 간편하고 정확하게 다양한 병원체를 검출할 수 있는 장치를 개발함으로써, 현재 선진국에 의존하고 있는 검사 키트의 수입 문제뿐만 아니라 고가의 장비 수입 대체 효과도 가져올 수 있다고 생각된다.

또한, 나노 MEMS 기술을 활용한 광 바이오센서는 신속, 정확, 휴대용 검사 장치로 농산물의 세척과정에서 오염되는 병원균 및 축산 농가에서 발생하는 다양한 병원체 검출이 가능할 뿐만 아니라 농산물의 잔류 농약 검사, 환경오염의 검출도 가능하여 산업적 파급 효과가 클 것으로 기대된다.

3절. 연구개발의 범위

가. 면역입자응집반응을 이용한 조류인플루엔자 진단

면역입자응집반응은 항원-항체 결합을 기본으로 하는 분석 방법이다. 조류인플루엔자 항원과 조류인플루엔자 압타머가 부착된 나노 마이크로 입자가 만나게 되면 서로 응집반응이 발생하게 되고, 이 때 응집하는 입자는 응집하기 전 원래 입자 보다 사이즈가 더 커지게 된다. 이때 응집

된 입자에서 산란되는 산란광을 측정함으로써 조류인플루엔자를 정성적 정량적으로 측정 할 수 있다.

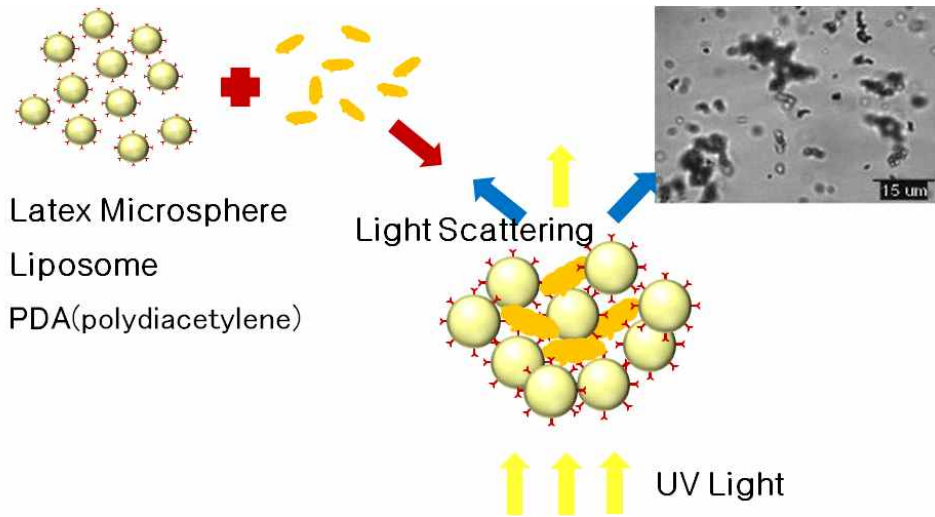


그림1. 입자면역응집 반응의 기본 원리

나. 사출성형 마이크로유체 소자 개발

기존 실험실에서 진행된 분석방법을 마이크로유체 소자에 적용하여 신속하고 정확하게 유해물질을 검출하는 연구결과가 보고되고 있으나 상용화 되어 시장에 진출한 경우는 많지 않다. 이러한 마이크로유체 소자를 이용한 분석법이 상용화되지 못하고 있는 첫 번째 요소는 저가로 대량 생산이 어렵기 때문이다. 본 연구에서는 사출성형을 이용한 조류인플루엔자 진단용 마이크로 유체 소자를 개발 한다.

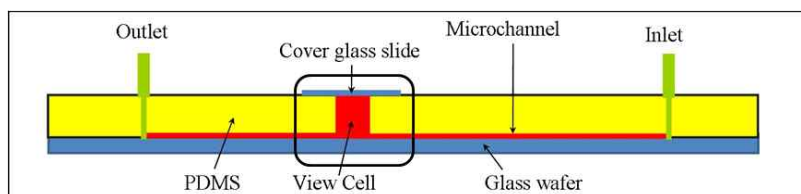


그림 2. 면연응집반응 산란광 강도 측정을 위한 Y형 마이크로 디바이스

다. 조류인플루엔자 특이적 결합 저분자 프로브 개발

압타머(Aptamer)는 저분자 화합물로부터 단백질까지 다양한 종류의 표적 리간드에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특성을 가지는 짧은 길이(20~60 뉴클레오티드)의 단일가닥 핵산 (DNA 혹은 RNA) 조각을 의미 한다. 압타머는 진단 프로브로서 항체 대비 많은 장점을 보유하여 차세대 진단 탐침으로 주목받고 있다. SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)는 표적 리간드에 특이적으로 결합하는 압타머를 선별하는 스크리닝 방법이다. 타겟이 되는 진단 대상물질을 특정 표면위에 고정 후, $10^{14} \sim 10^{15}$ 정도의 서로 다른 서열, 즉 다양성을 가지는 라이브러리와 반응이 진행된다.

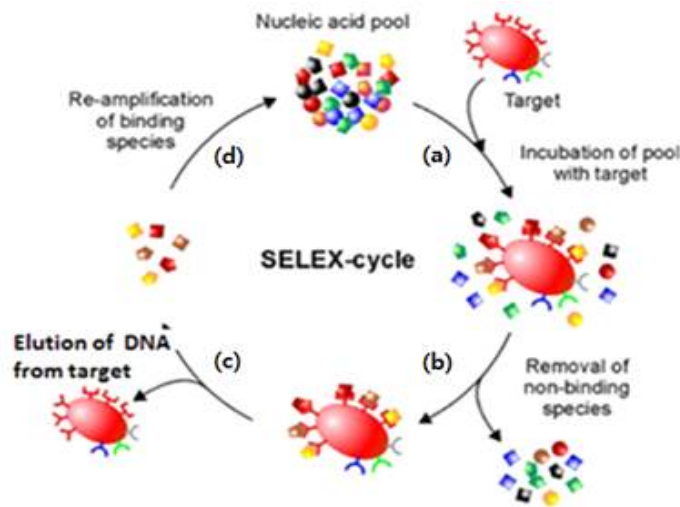


그림 3. 압타머 발굴을 위한 SELEX 모식도

라. 휴대형 산란광 측정 장치 개발

입자면역응집반응의 산란광을 측정하기 위해서는 산란을 유도하기 위한 단파장 광원과 마이크로유체 소자에서 응집반응 후 발생하는 산란광을 측정 할 수 있는 광학센서가 필요 하다. 아래 그림과 같은 실험실용 분석 장치를 휴대형으로 개발한다.

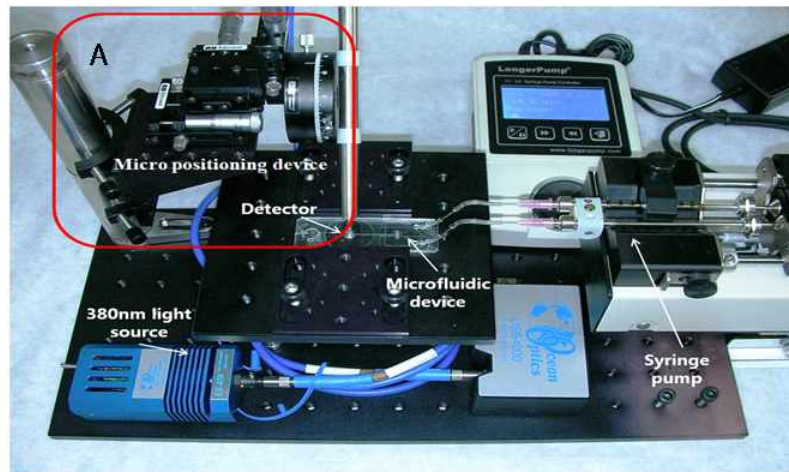


그림 4. 면역입자응집반응의 산란광 측정기기

4절. 연구개발 대상의 국내외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

① 센서 관련 기술

- 현재 키트를 활용한 조류인플루엔자 검출 현황
- 고 단가의 검출 비용과 시간이 소요되며 현장에서 정량적 분석이 불가능함
- 면역 크로마토그래피를 기본 원리로 한 진단키트 사용화

- 바이오센서 연구는 1999년부터 2013년까지 총 752건이며 그 중 시스템 측면에서 접근한 종합적 성격의 연구는 71건으로 10%의 수준임
- 바이오센서 시스템 연구는 2001년부터 시작되었으나 바이오센서를 구성하는 시스템에 관한 연구로 이것이 실제 제품화하는 측면까지 고려되지 않았으며, 현재까지도 기술 개발 중.
- 주로 소규모 단년도 과제(최대 20억 이내, 2~3년이내)로써 특정기술이 제품화하기 까지 중장기적 기획 및 사업이 없는 실정으로 보임.

② 시장현황

- 현재 신속항원진단검사 국내 시장 규모는 70억~100억 규모
- 센서 내수시장은 2012년 약 54억 달러 규모에서 2020년 99억 달러 규모로 연평균 10.4% 성장할 것으로 전망 (센서 산업과 주요 유망센서 시장 및 기술 동향, 한국전자통신연구원, 2015)
- 센서의 중요성이 강조되면서 관련 시장은 급성장하고 있다. 산업통상자원부에 따르면 세계 센서 시장 규모는 올해 1050억 달러(약 115조7000억 원)에서 2020년 1417억 달러(약 156조1500억 원)까지 성장할 전망이다. 한국 내수 시장 역시 2020년 11조원대로 커질 것으로 추산
- 하지만 한국의 센서 기술은 초보 단계에 그치고 있음. 국내 부품업체들이 스마트폰에 들어가는 이미지 센서는 대거 생산하지만, 나머지 분야에서는 이렇다 할 제조 기술조차 갖추지 못했기 때문임. 특히 환경 센서 및 사물인터넷 환경 구축을 위해 꼭 필요한 압력·가속도·영상센서 등은 100% 수입에 의존하는 실정임
- 산업통상자원부(이하 산업부)의 보도에 따르면, 국내 센서 내수시장은 '12년 약 54억 달러 규모에서 '20년 99억 달러 규모로 연평균 10.4% 성장할 것으로 전망.
- 국내 내수시장은 세계 시장보다 높은 성장률이 예상되나 국내 기업의 내수시장 점유율은 10.5% 수준으로 매우 낮은 상황.
- 국내 기업의 생산액은 '12년 기준 13.3억 달러 규모로 세계 시장에서 차지하는 비중은 1.9%로 매우 낮은 수준.

③ 경쟁기관현황

- 녹십자 외 국내 업체에서 면역 크로마토그래피를 기본으로 한 진단키트 상용화
- 국립수의과학검역원에서 2008년 소 바이러스성 설사 바이러스에 대한 Antibody를 이용한 Microfluidic sensor 개발.
- 2009년 연세대 생명공학과 연구팀이 SARS 바이러스의 nucleocapsid 단백질에 대한 RNA 압타머 발굴. 이를 이용 2pg/ml의 농도까지 capsid 단백질을 진단할 수 있음 확인.

④ 지식재산권현황

- 센서 분야별로는 화학, 자기, 관성 센서 순으로 특허 출원이 활발한 것으로 조사. 압력센서를 제외한 대부분의 센서 분야 성장기
- 식물바이러스 고감도 휴대형 센서로 등록된 국내 특허는 10건 미만으로 검색 됨
- 바이러스 측정과 관련해서는 주로 간이 검출을 위한 키트 중심으로 센서 및 관리시스템을 결합한 특허는 검색 되지 않음

- 2008년 한림대학교에서 조류인플루엔자 바이러스 H9N2 감염예방 및 검출에 유용한 DNA 압타머 및 그 혼합물에 대한 특허 출원.
- 2014년 건국대학교에서 HA1에 특이적으로 결합하는 RNA 압타머 및 조류인플루엔자 바이러스에 대한 응용이라는 특허 등록.
- 2016년 건국대학교에서 gHA1 단백질에 특이적으로 결합하는 RNA 압타머 및 그를 포함하는 약학 조성물에 대한 특허 등록.

④ 기타현황

- 바이러스 저항성을 가지는 종을 개발한다고 해도 결국 바이러스를 검출할 수 있는 진단시스템이 필요
- 따라서 항체와 특이 primer를 이용한 PCR을 통한 검출방법은 재현성이 높으며 일반적인 기술을 이용하기 때문에 사용이 용이하고, 민감도와 특이성 역시 높다. 이러한 점을 바탕으로 수입 식물의 잎, 과일, 종자 및 뿌리에서 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있는 진단시스템을 구축할 필요가 있음
- 대상 바이러스가 국내에는 보고된 바가 없기 때문에 순수 분리한 바이러스로 항체제작 등을 할 수 없어 이미 genome sequence가 알려진 검역용 바이러스 10종의 바이러스 coat protein sequence를 이용하여 리간드인 압타머 합성이 필요
- 유전자를 표적으로 하는 특이 primer를 제작함으로써 바이러스 입자를 검출해낼 수 있는 진단 시스템을 구축

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- 2006년에 일본에서 network quarantine system이라는 특허명으로 검역 시스템을 개발한 바 있다. 본 특허는 직접적인 검역 과정 및 분석보다는 검역에 연관된 시스템이라는 측면에 초점을 맞추었으며, 본 과제에서 수행한 QIMS 개발에 포함되어 있는 검역 관련 염기서열정보를 제공하는 등의 내용은 누락되어 있다. (Naoto et al., 2006) 앞서 언급했듯이, 염기서열 정보를 활용한 검역 관리중 및 금지중의 동정 자료는 검역 과정에서 결정적인 근거로 작용할 수 있기 때문에, 새로운 검역체계에 일조할 수 있을 것으로 본다.
- 곰팡이 종 분류 분류는 전통적으로 배양체의 특성, 균사와 무성/유성포자의 형태적 특징과 종 내 균주 사이의 유성교배의 여부에 의존하였음. 이러한 특징에 따른 분류는 생물학적 종 (biological species) 개념에 바탕을 둬
- 최근의 연구 추세는 곰팡이 균주의 유전체에 공통적으로 존재하는 특정 부위 또는 유전자 (예: ITS, TEF1, RPB2, TUB1, GPD 등) 의 염기서열을 비교·분석하여 통계적으로 유의한 계통수 (phylogenetic tree)를 작성하는 계통발생학적 연구를 통해 종 동정을 최종 검정함. 이러한 접근방법은 계통발생학적 종 (phylogenetic species) 의 개념에 바탕을 둬
- MIT 드류 앤드류 교수팀: TNT 폭약과 반응하는 미생물에 형광물질 유전자를 삽입하여 TNT 검출 센서로 이용
- 나노바이오센서 소재 및 소자 분야 모두에서 활발하게 진행되고 있으며, 생물학적 수용체 소재의 경우에도 세계 최고의 경쟁력을 가지고 있음.
- 생물학적 수용체 중 항체의 경우, 최근 나노바이오센서뿐만 아니라, 질병치료제로 개발하

려는 연구가 활발히 진행되고 있음.

- DNA칩, microarray 기술이 처음 개발된 곳도 미국이며, 최근 각광받고 있는 next generation sequencing (NGS) 기술을 포함하여 단백질 어레이 기술, 펩타이드 라이브러리 스크리닝 기술 등에서도 앞선 기술력을 보유함.

(2) 시장현황

- 세계 센서 시장은 IT융합기술의 발달로 센서 사용이 급증하고 센서의 첨단화 추세에 따라 시장이 급성장하고 있으나, 국내 산업의 경쟁력은 매우 취약하다. 센서 기술은 미국, 독일 등 일부 선진국을 중심으로 디지털 센서 단계를 지나 스마트 센서에 대한 연구가 활발하게 진행 됨
- 지역별로 센서 시장의 규모를 살펴보면 ' 12년 기준으로 북미지역이 224억 달러 규모, 점유율 33%로 가장 시장이 크고, 유럽, 아시아, 태평양 지역이 그 뒤를 잇고 있음(센서 산업과 주요 유망센서 시장 및 기술 동향, 한국전자통신연구원, 2015).
- 전 세계 환경 시장은 지구환경 보호를 위한 국제적 노력 강화 및 각국의 환경규제 강화로 향후 10~15년간 급성장할 것으로 전망되고 미국이 세계 환경시장의 약 40%를 점유하고 있으며 일본, 독일 등 소수의 선진국가들이 분점하고 있는 상태임
- 지역별 환경시장을 비교해 보면 유럽이 미국에서 차지하는 비중은 줄어든 반면 아시아, 일본 등이 차지하는 비율은 상승하고 있다. 개발도상국들의 환경시장이 점점 확대되고 있으며 특히 동남아 시장은 연간 10~15%씩의 성장을 2020년까지 계속할 것으로 전망임
- EBI(Environmental Business International)는, 세계 환경산업 시장이 2014년 9,056억 달러에서 2020년 1조 865억 달러로 증가할 것으로 예측 하였다. 반면에 국내 환경산업의 규모는 세계시장의 1~2%를 점유하는 것으로 판단하고 있음
- 세계 센서시장은 ' 14년 795억 달러에서 연평균 7.9%의 성장률을 보이며 ' 19년에는 1,161억달러로 성장할 전망.
- 센서 유형별 시장점유율을 ' 12년과 ' 19년도를 비교해 살펴보면, 가장 큰 비중은 역시 이미지 센서가 차지하고 있으며, ' 12년 기준 13%의 비중인 바이오센서는 ' 19년에는 압력센서를 제치고 15%의 비중을 차지할 것으로 전망되고 있음.
- 센서 유형별로 시장성장률을 살펴보면, 바이오센서가 10.4%로 가장 급속히 성장하고, 이미지 센서(9.6%), 화학센서(8.3%), 압력센서(7.2%)가 그 뒤를 따르고 있음.

(3) 경쟁기관현황

- 현재 센서 관련 한국의 기술은 미국 독일 일본 등이 최고 수준을 보유하고 있으며 대한민국의 기술 수준은 최고수준 대비 65% 수준이다.
- 2010년 미국 MIT에서 전도성 폴리머인 Carbon Nano Tube를 이용한 FET 바이오센서 개발
- 2008년 미국 University of Missouri 생명공학과에서 Quantum dot과 골드 나노파티클을 활용한 돼지 생식기 호흡증후군 바이러스의 광학 바이오센서 개발.
- 2009년 중국 Wuhan University School of Medicine에서 capillary electrophoresis를 이용한 SELEX를 통하여 Hepatitis C 바이러스의 표면 단백질에 결합하는 압타머 발굴.

(4) 지식재산권현황

- 센서 분야별로 특허 출원은 모든 분야에서 지속적으로 증가 추세임
- 센서 분야별로 화학, 자기, 관성 센서 순으로 특허 출원이 증가 함.
- 첨단센서 기술 분야는 특허출원건수와 출원인 수가 대체로 증가
- 특허 Apparatus and methods for the volumetric and dimensional measurement of livestock (US10/211792)
- Cleaning arrangement including filters and ultraviolet radiation (US08/666342)
- Air filtering within clean environments (US08/317315)
- 2007년 미국 Bioscale, Inc에서 마이크로 파티클을 이용 표면진동과 기반 바이러스 검출 시스템 특허 등록.
- 2009년 미국 Agamatrix, Inc에서 압타머를 기반으로 Potential을 측정하는 전기화학적 검출 시스템 개발 특허 등록.

5절. 연구개발의 중요성

가) 국내 조류인플루엔자 발생현황

- (1) '03/'04년 최초 발생이후 '06/'07년, '08년, '10/'11년 4차례 발생
- (2) 발생경향은 발생기간, 발생지역, 발생축종이 다양화 되는 추세임
- (3) 유입요인은 모두 야생조류로 추정



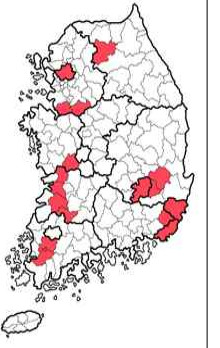
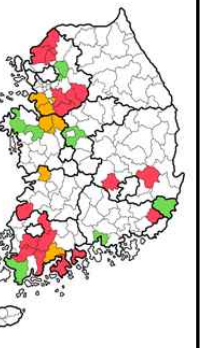
- 2008년에 발생한 고병원성 조류인플루엔자 발생에 따른 국내 사육농가들의 피해보상을 위해 지급된 금액은 살처분 보상금, 수매자금, 입식 및 경영안정자금, 종계도태·종란폐기 보상금 등을 합하여 2,883억원이 소요 되었고, 간접피해와 정부 재정지출을 포함한 총 경제적 피해액은 3,288억원으로 추정되었다.

- 조류인플루엔자는 주로 직접접촉에 의해서 전파되며, 감염된 닭의 분변 1그램에는 십만 내지 백만 마리의 닭을 감염시킬 수 있는 고농도의 바이러스가 들어있다. 이러한 분변이 오염된 차량(특히 분뇨차량)이나 사람, 사료, 사양 관리기구 등을 통해 전염이 일어나며, 가까운 거리는 오염된 쥐나 야생조류에 의하여도 전파될 수 있다. 계사 내의 아주 근접한 거리에서는 오염된 물·사료, 기침시의 비말 등에 의해서도 전염될 수 있으며, 바로 인접한 농가 간에는 바이러스에 오염된 공기 중의 부유물이 바람에 의해 이동됨으로써 전파가 일어나는 것도 가능하다. 장거리 전파는 주로 야생철새의 이동에 따라 일어나는 것으로 보고된 바 있으며, 또한 중국, 동남아 등 HPAI 발생국으로부터 오염된 냉동 닭고기나 오리고기, 생계란 등에 의해서 유입될 수도 있으며, 해외방문자 등 사람에 의하여 유입될 위험성도 간과할 수 없는 중요한 요인 중 하나다. 그러므로 발생 현장에서 조류인플루엔자 감염여부를 즉시 판단하여 방역조치를 취할 수 있는 실험실 수준의 검출 시스템이 필요하다.

- 압타머 (Aptamer)는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산 (DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 저분자 유기물, 펩타이드, 막 단백질까지 다양한 표적분자에 결합할 수 있는 많은 압타머들이 계속해서 발굴되어 왔다. 압타머는 고유의 높은 친화성 (보통 pM 수준)과 특이성으로 표적

분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 자주 단일 항체와 비교가 되고, 특별히 “chemical antibody” 라고도 불리는 만큼 대체항체로서의 가능성도 매우 높다. 먼저 압타머의 장점들을 살펴보면 다음과 같다.

표 1. 연도별 조류독감 발생 지역별 현황

구분	'03/'04년	'06/'07년	'08년	'10/'11년
발생 시기	겨울철(102일간) [03.12.10~'04.3.2]	겨울철(104일간) [06.11.22~'07.3.]	봄철(42일간) [08.4.1~5.12]	겨울철(139일간) [10.12.29~5.1]
발생 지역	10개 시·군 19건 [닭10, 오리9]	5개 시·군 7건 [닭4, 오리2, 메추리1]	19개 시·군·구 33건 [닭25, 오리7, 기타1]	25개 시·군·구 53건 [닭18, 오리33, 메추리1, 꿩1]
발생 지도				
형질	H5N1 (유전형 2.5)	H5N1 (유전형 2.2)	H5N1 (유전형 2.3.2)	H5N1 (유전형 2.3.2)
유입 추정	야생 조류	야생 조류	야생 조류	야생 조류
방역 조치	392농가 5,285천수	46농가 2,800천수	1,500농가 10,204천수	286농가 6,473천수
피해액 (살처분 보상금)	1,531억원	582억원	3,070억원	804억원(추정)
청정국 회복 일	'04.9.21 (6개월 후)	'07.6.18 (3개월 후)	'08.8.15 (3개월 경과 후)	'11.9.5 (약 3.5개월 후)

① 항체는 분자 구조가 크기 때문에 (~150 kDa) 생산하는데 어려움이 있고 변형(modification) 또한 용이하지 못한 반면, 압타머는 약 20~60 mer 정도 길이의 핵산으로 구성되어 있는 작은 분자 구조이고, 여러 필요한 변형이 용이한 장점을 가지고 있다.

② 압타머는 항체에 비해 안정성이 매우 높다. 단백질이나 항체 의약품의 경우 실온에서 보관이나 운반이 불가능하지만 압타머는 가능하고, 심지어 멸균 후에도 기능을 유지할 수 있으며, 만약 변성(denaturation)이 되더라도 다시 짧은 시간에 재생(regeneration)이 가능하다.

기 때문에 특히 장시간 또 반복사용이 요구되는 진단용으로의 응용이 매우 용이하다.

- ③ 항체의 경우 동물이나 세포를 이용하여 만들기 때문에 생산하는데 많은 시간과 비용이 요구되며, 또한 만든 시기에 따라 기능성이 달라질 가능성도 있다 (batch to batch variation). 하지만 압타머는 특성 때문에 자주 단일 항체와 비교가 되고, 특별히 “chemical antibody” 라고도 불리는 압타머는 화학적 합성방법을 이용하기 때문에 단시간에 적은 비용으로 생산이 가능하고, batch to batch variation이 거의 없으며 또한 고순도의 정제과정이 매우 용이하여 생산적인 측면에서 탁월한 장점을 갖고 있다.
- ④ 항체나 다른 의약품 단백질의 경우에 쉽게 나타나는 생체 내 면역거부반응이 거의 일어나지 않는 것으로 알려져 있으며, 이는 치료용으로의 개발연구에 매우 중요한 장점이 될 수 있다.
- ⑤ 항체를 만들기 어려운 독소 (toxin), 복잡한 단백질 복합체 또는 당과 단백질 복합체에 대한 압타머를 만들 수 있으며, 또한 새로운 물질에 대한 결합 물질로의 변형이 용이하여 (flexibility) 새로운 압타머 발굴과 바이오센서 개발에 활발히 응용될 수 있다.

(4) 농림축산검역본부에서 제한한 현장 진단기기 요건

전문가가 아닌 일반인도 쉽게 사용 할 수 있고, 실험실 수준(PCR)의 정밀도를 확보하고 가능한 가격이 저렴한 현장 진단기기 필요

제 2 장 연구수행 내용 및 결과

1절. 수행연도별 연구개발 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2017)	사출성형 미세유체칩을 이용한 압타머 기반 조류인플루엔 자 휴대용 진단기 개발	압타머 기반 조류독감 병원균 응집인자의 산 란광 측정 기구 및 회 로 프로토타입 제작 (생산 ENG)	산란광을 측정할 수 있는 광원과 산란광 을 측정할 수 있는 수광센서 탐색 및 선 정	산란광을 측정하기 위 한 광원과 수광센서 선정 완료
		산란광 측정 가능 광원 과 수광 센서 기반 프 로토타입 테스트 장비 개발 (생산 ENG)	* 470nm LED 집광 부 설계 제작 * 광 케 이 블 과 Photodiode 를 이용 하여 응집인자의 산 란광 수광부 설계 제 작 *집광부, 수광부, 마 이크로칩, 회로 로 구 성된 프로토 타입 테 스트 장비 개발 -1차 : 마이크로칩	* 산란광을 측정 가능 한 프로토타입 테스트 장비 개발 완료 -1차 : 마이크로칩 완 성 전에 반투명 필름 등을 활용하여 측정여 부를 검사할 수 있는 테스트장비 개발 완료 -2차 : 개발된 마이크 로칩을 활용하여 투명

		<p>완성 전에 반투명 필름 등을 활용하여 측정여부를 검사할 수 있는 테스트장비 개발</p> <p>-2차 : 개발된 마이크로칩을 활용하여 투명비드 등으로 산란광 측정하기 위한 테스트 장비 개발</p>	<p>비드 등으로 산란광 측정하기 위한 테스트 장비 개발 완료</p>
	<p>사출성형이 가능한 면역입자응집반응용 마이크로 유체 소자 설계 및 제작 (서울대학교)</p>	<p>사출성형이 가능한 면역입자응집반응용 마이크로 유체소자 설계</p>	<p>사출성형기술을 이용한 면역입자응집반응용 마이크로 유체소자 제작 완료</p>
	<p>면역응집반응용 자가응집 방지 진단 입자 개발 (서울대학교)</p>	<p>입자의 자가응집 여부를 확인하고, 이를 방지하기 위해 멤브레인에 보관하는 방법 확인</p>	<p>입자간 자가응집을 막기 위해 glass fiber 막을 이용하여 응집을 방지하고 장기간 보존 가능 하였 으 며 , release buffer를 이용 면역응집 반응 진단이 가능한 충분한 양의 방출을 확인</p>
	<p>고병원성 조류독감 (H5N1) 항원의 클로닝 및 정제 (한양대학교)</p>	<p>바이러스 표면의 항원성 당단백질 (Hemagglutinin, HA) 의 유전자 재조합 및 DNA 확보 및 크로마토그래피 이용 HA 분리, 정제 및 활성 분석</p>	<p>* 위탁연구기관으로부터 확보한 Plasmid에서 유전자 벡터를 바꿔 과발현 가능한 재조합 DNA 확보 * Ni²⁺-sepharose resin을 이용한 친화성 크로마토그래피를 이용한 재조합 단백질 확보.</p>
	<p>다양한 고병원성 조류독감 항원 인식용 저분자 프로브 (압타머/웹타이드) 개발 (한양대학교)</p>	<p>약독화 된 항원에 대한 저분자 프로브 개발 및 특성 분석</p>	<p>* Filtration방법을 이용한 SELEX를 통하여 16중 압타머 서열 확보 * rGO 및 AuNP를 이용한 결합특성 분석 결과 2종의 압타머가 강한 결합력 및 특이도 나타냄 확인.</p>
	<p>H9N2 조류인플루엔자 바이러스 항원제공 (서울대 수의대)</p>	<p>인플루엔자 바이러스 백신주인 01310 바이러스 항원 제공</p>	<p>불활화한 01310 바이러스의 제공 완료</p>
	<p>H5N1 조류 인플루엔자 바이러스 항원제공 (서울대 수의대)</p>	<p>국내 분리된 저병원성 H5N1 인플루엔자 바이러스 인 SNU50-5 바이러스</p>	<p>* SNU50-5바이러스의 HA 유전자 제공 * 불활화한 SNU50-5 바이러스 항원 제공</p>

			항원 제공	
2차 년도 (2018)	사출성형 미세유체칩을 이용한 압타 머기반 조류인플루엔 자 휴대용 진단기 개발	조류독감 바이러스 응집인자 측정용 기구/회로 설계 및 시스템 제작 (성산 ENG)	<p>*고민감도와 안정성 기 반 산란광 측정용 2종 의 광원 파장과 수광 센서 재검토 및 선정</p> <p>* 미세 유체칩 연동 프 로토 타입(Pilot) 시스 템 제작 및 시험 평가</p> <p>-1차: 광원 470nm, 광 케이블, Photodiode 구성 시스템의 개별 입자 및 항원 응집 입 자 산란광 테스트</p> <ul style="list-style-type: none"> · 기구,회로 개선 확인 <p>-2차: 광원 380 nm 및 Direct Photodiode 구성 시스템의 개별 입자 및 항원 응집 입 자 산란광 테스트</p> <ul style="list-style-type: none"> ·기구/회로 설계 수정 유체 이동 가능 개선 ·칩 삽입 $\angle 90^\circ$ 개선 ·수광부 최적 위치로 미세 조정 가능 개선 ·디자인/목업 제작 ·수광 효율 향상 380 nm 및 회로 이득 최 적화 ·소스 파장/수광 집광 력 최적 포커스 얼라 인 메카니즘 설계 ·신호 검출력 최적화 및 증폭회로 보드제작 	<p>*응집 입자의 산란광 측정용 2종의 광원 파 장 및 수광부 센서 타 입 평가 후 재선정 완 료.</p> <p>* 유체칩이 장착 가능한 산란광 검출용 프로토 타입 시스템개발 완료</p> <p>-1차: 유체칩 주입 유 체의 정지 상태 기준, 입자 종류별/항원 응 집 입자 산란광 검출 가능한 프로토타입 시스템 제작 완료.</p> <p>-2차: 유체칩 주입 유 체의 흐름 상태 기준, 입자종류별/항원 응집 입자 산란광 검출 가 능한 프로토타입 시 스템 제작 완료</p> <ul style="list-style-type: none"> ·기구/회로 설계 변경 및 수정 후 시스템 제 작
		회로시스템 연계 스마트폰 앱 개발 (성산 ENG)	측정 결과를 사용자의 스마트 폰에서 확인 가 능한 앱 개발 추진	사용자 스마트 폰 내에 서 양성/음성 진단 결과 및 과거 진단 이력 확인 가능
		압타머를 이용한 고감도	Polystyrene particle의	Thrombin Aptamer가

2차 년도 (2018)		센싱 기술개발 (서울대학교)	표면에 Thrombin Aptamer를 부착하여 면역입자반응을 통해 Thrombin을 검출 할 수 있는 사전 테스트 진행	표면에 부착된 Polystyrene particle의 면역응집반응을 확인
		조류인플루엔자 검출용 압타머 기반 나노진단 입자 개발 (서울대학교)	조류인플루엔자와 특이적인 결합을 하는 압타머를 나노진단 입자 표면에 고르게 부착	Polystyrene particle의 표면적을 H5N1 aptamer 면적으로 나눠 100 % coverage를 확인하고, 그 중 30 % coverage로 aptamer 양을 계산 하여 나노진단 입자 개발
		스마트 나노 센서 입자의 보관 및 로딩 장치 개발 (서울대학교)	현장사용 및 보관이 용이한 1회 측정용 조류인플루엔자진단입자 개발	현장에서 샘플링 후 손쉽게 진단 장치에 로딩 가능한 진단입자 보관 및 릴리즈 소자 개발 완료
		병원체 검출의 효율 증진 위한 다중인식 프로브 폴리머(Polyvalent Directed Aptamer Polymer, PDAP) 개발 (한양대학교)	* 고분자 사슬화 반응을 통한 PDAP 합성 및 특성 분석 * 약독화된 항원에 대한 저분자 프로브 특성 분석	* SPDP linker를 이용하여 poly-D-lysine(PDL) backbone에 압타머를 결합하여 PDAP 합성 * 기존의 압타머에 크기 변화를 준 새로운 서열의 결합특성 분석 결과 기존 대비 강한 결합력 및 특이도 나타냄 확인
		H1N1 인플루엔자 바이러스 항원제공 (서울대 수의대)	인플루엔자 바이러스 백신주인 A/Puerto rico/8/1934 (PR8)	불활화한 PR8 (H1N1) 바이러스의 항원 제공 완료

			(H1N1) 바이러스 제공	
		H9N2 조류인플루엔자 바이러스 항원제공 (서울대 수의대)	인플루엔자 바이러스 백신주인 01310 바이러스 항원 제공	불활화한 01310 바이러스의 항원 제공 완료
		H5N1 조류 인플루엔자 바이러스 항원제공 (서울대 수의대)	Clade 2.3.2.1 H5N1 A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010(H5N1) 바이러스의 저병원성 치환 재조합 바이러스 항원 제공	불활화한 K10-483 (H5N1) 바이러스의 항원 제공 완료
		H5N6 조류 인플루엔자 바이러스 항원제공 (서울대 수의대)	Clade 2.3.4.4 국내 발생 H5N6 바이러스의 consensus HA, NA 유전자를 가지는 H5N6 재조합 바이러스 항원 제공	불활화한 H5N6 바이러스의 항원 제공 완료
3차 년도 (2019)		하드웨어 성능개선 (성산 ENG)	*신호 검출 정확성 확보 용 MCU 성능 업그레이드, 고성능ADC 적용 *측정 파라미터 저장 및 Time-Stamp 회로 적용	*MCU 성능 업그레이드 통한 센서 신호 수집량 증대 *측정 파라미터 저장 및 Time-stemp 저장 가능
		시스템(기구) 디자인 최적화 및 시험 평가 (성산 ENG)	산란광 포집 극대화를 위한 집광/센서 장치 및 광 손실 방지부등 기구 최적화 개발	비구면 볼록 렌즈, 광 fiber rod부 및 포토센서 위치 조절 장치 적용 등 최적 기구부 개발 완료
		휴대용 조류 독감 진단 시스템 및 스마트 폰 앱 최적화 (성산 ENG)	서울대 개발 프로토콜 기반 산란광 ADC 값 기준 양성/음성 판정 측정 및 앱/통신 프로토콜 개발 최적화	*산란광 측정 양성/음성 판정이 가능한 휴대형 진단 시스템 개발 완료 *스마트폰 앱 (안드로이드), 시스템/스마트폰 통신프로토콜 개발완료
		조류인플루엔자 압타머	* 진단액의 보관 및 로	*현장에서 쉽게 사용

	부착 나노진단입자를 이용한 검출 실험 및 샘플 처리 키트 개발 (서울대학교)	딩 할 수 있는 장치를 3D 프린팅 기술을 이용하여 디바이스 개발 * 한양대에서 개발된 압타머를 이용한 산란광 반복 측정을 통해 AI 항원 농도에 따른 데이터 수집	할 수 있도록 압타머가 수식된 PS입자의 보관 및 로딩 장치 최적화 * AI 항원 농도에 따른 산란광 측정 데이터를 수집하여 최적 산란광 측정 조건의 확립
	다양한 고병원성 조류 독감 항원 인식용 저분자 프로브 (압타머/웹타이드) 개발 (한양대학교)	약독화 된 항원에 대한 저분자 프로브 개발 및 특성 분석	* rGO 방법을 이용한 SELEX를 통하여 28종 압타머 서열 확보 * rGO를 이용한 결합 특성 분석 결과 1종의 압타머가 강한 결합력 및 특이도 나타냄 확인.
	H5N1 조류 인플루엔자 바이러스 항원제공 (서울대 수의대)	Clade 2.3.2.1 H5N1 A/mandarin duck/Korea/K10-483/2010(H5N1) 바이러스의 저병원성 치환 재조합 바이러스 항원 제공 국내 분리된 저병원성 H5N1 인플루엔자 바이러스인 SNU50-5 바이러스 항원 제공	불활화한 K10-483 (H5N1) 바이러스의 항원 제공 완료
	H5N6 조류 인플루엔자 바이러스 항원제공 (서울대 수의대)	Clade 2.3.4.4 국내 발생 H5N6 바이러스의 consensus HA, NA 유전자를 가지는 H5N6 재조합 바이러스 항원 제공	불활화한 H5N6 바이러스의 항원 제공 완료

2절. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
산란광을 측정할 수 있는 기구 및 회로를 제작 (성산 ENG)	산란광을 측정할 수 있는 광원과 산란광을 측정 할 수 있는 수광센서 탐색 및 선정 선정된 LED 광원에서 나오는 빛을 모으는 집광렌즈 검토 및 선정	조류 인플루엔자 면역응집반응의 산란광을 측정하기 위한 광원과 응집크기에 따라 달라지는 산란광의 크기를 측정 할 수 있는 광학센서를 탐색하여 구입 함 적용가능성 여부를 테스트하여 선정함
산란광 측정이 가능한 광	선정된 광원과 수광센서를 적용하여	1차로 발광부와 수광부의 부품들

학센서를 사용하여 프로토타입 테스트 장비 개발 (성산 ENG)	산란광을 측정할 수 있는 테스트 장비 개발	을 설계하여 제작, 테스트 합 1차에서 개발된 부품을 적용하여 산란광 측정 테스트 장비를 설계, 제작하여 테스트 실시하고, 문제점을 보완하여 보완설계 및 제작 테스트 합
산란광 측정이 가능한 장비 및 앱 개발 (성산 ENG)	기구 디자인 최적화를 통한 시스템 제작 및 스마트폰 앱 개발	산란광 검출력 최적화를 위하여 광원 기구부, 집광 장치부, 포토 센서부에 미세 조절 장치를 적용하여 최적화된 디바이스 개발 블루투스 기반 디바이스와 연동하여 양성/음성 표시가 가능한 안드로이드용 스마트폰 앱 개발
사출성형 미세유체칩 설계 (서울대학교)	사출성형 미세유체칩의 유동 특성을 파악하기 위한 기초 설계	대량생산을 위한 사출성형 미세유체칩의 기본 설계 데이터를 위해 실험실에서 제작 가능한 간이 미세유체칩을 통한 유동특성 분석
조류인플루엔자 검출용 압타머 기반 나노진단 입자 개발 (서울대학교)	면역응집반응에 최적 압타머 농도 조건 및 감도 상향을 위한 검출 프로토콜 확립	380nm 폴리스티렌 파티클의 표면적을 압타머의 면적으로 나눠 100 % coverage를 확인하고, 그 중 30 % coverage로 aptamer 양을 계산 하여 나노진단 입자 개발
조류인플루엔자 진단을 위한 진단 입자 방출 특성 분석 (서울대학교)	진단입자의 원활한 공급과 보관 성능 향상을 위한 멤브레인 방출 특성 및 보관 성능 분석	압타머 부착 진단 입자의 방출성능을 확인하기 위한 멤브레인 공극 크기 및 진단입자의 탑재량 최적화 및 보관 성능 비교
조류인플루엔자 검출용 진단액의 보관 및 검출 시스템 개발 (서울대학교)	현장에서 손쉽게 교체 가능한 1회용 진단입자 보관 및 주입 장치 개발	입자간 자가응집을 막기 위해 glass fiber막을 이용하여 응집을 방지하고 장기간 보존 가능하였으며, release buffer를 이용 면역응집 반응 진단이 가능한 충분한 양의 방출을 확인 샘플의 혼합, 방출에 용이한 디바이스 개발
압타머 스크리닝을 위한 단일가닥 DNA library 제작 (한양대학교)	Asymmetric PCR & Crush and Soak Method	프라이머 농도를 조절하여, 단일 가닥을 많이 증폭하는 Asymmetric PCR (비대칭 중합효소연쇄반응) 진행과 전기영동 및 Crush & Soak 방법을 통한 단일가닥 DNA library 확보.
항원 특이적 결합 압타머 스크리닝 (한양대학교)	SELEX	조류독감 바이러스와 단일가닥 DNA library 결합, 세척, 용출의 3단계를 반복 후 타겟에 특이적으로 결합하는 압타머 후보군 최종 선별
압타머의 결합 특성 분석 (한양대학교)	FRET effect	형광물질이 라벨된 압타머와 rGO사이의 FRET 효과 이용, 타겟 존재시의 형광 세기 회복을

		통한 타겟 검출 그래핀 기반 형광 apta센서의 민감도와 특이도 결정 및 다양한 샘플 내에서의 적용성 확인
아пта머의 결합 특성 분석 (한양대학교)	AuNP aggregation	아пта머의 AuNP aggregation blocking 효과 이용, 타겟 존재 시 흡광도 변화를 통한 타겟 검출 AuNP 기반 apta센서의 민감도와 특이도 결정 및 다양한 샘플 내에서의 적용성 확인
H9N2 조류인플루엔자 바이러스 항원제공 (서울대학교 수의과대학)	국내에서 사용되는 H9N2 백신주인 01310바이러스의 불활화	바이러스를 계태아에서 증식 증식시킨 바이러스를 BEI를 통한 불활화 진행
H5N1 조류 인플루엔자 바이러스 항원제공 (서울대학교 수의과대학)	국내 분리된 저병원성 H5N1 바이러스인 SNU50-5 바이러스의 불활화, 유전자 cloning 평가용 H1N1 불활화 바이러스 제공	SNU50-5를 계태아에서 증식 증식시킨 바이러스를 BEI를 통하여 불활화 진행 SNU50-5의 HA유전자를 cloning하여 plasmid 제공 apta머의 민감도 평가용 H1N1 바이러스를 BEI를 통한 불활화 후 제공

3절. 기관별 연구 수행 내용 및 결과

○ 기관별 수행 내역 (주관기관 : 성산 ENG)

1. 시스템 회로 설계 및 제작

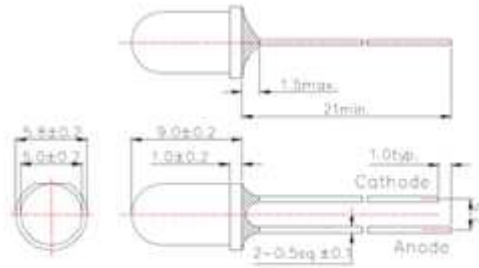
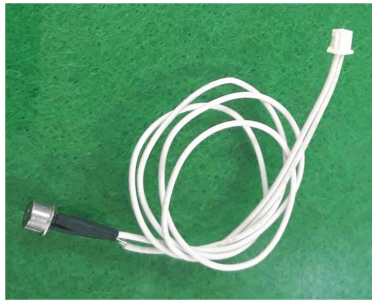
가. 광원 소자 선정

(1) 광원소자의 선정은 서울대학교에서 선행 연구한 산란광 검출특성 내용을 바탕으로 검색한 가운데 일본의 USHIO사의 모델 “L470-01” 을 선정함.

① 광 에너지 시험을 실시한 결과 광원 특성은 순방향 전압 2.9V, 광출력 23mW 특성을 갖고 중심파장 $\lambda = 470\text{nm}$, FWHM(full width half maximum)값이 $\Delta\lambda = 24\text{nm}$ 인 것으로 가시광반각도(viewing half angle)는 $\pm 9^\circ$ 인 것으로 방사광 출력이 180mW/sr정도의 광도를 가지고 있음.

② 직사 협광도 광속 축이 2mm 가 되는 특성을 갖추는 광원구조 환경을 갖추어 광속을 형성하여 시험한 결과 2mm 광속 다발이 약간 흐트러지는 것을 확인하고 콜리메이션 렌즈를 조합하여 직사광 특성을 갖도록 집광 구조 설계함.

③ 광원을 구동하여 산란광 특성을 시험한 결과 광원의 세기가 약하여 산란광 검출이 쉽지 않고 신호출력에 대해 낮은 값의 신호가 검출되기는 하나 변별력이 너무 낮아 판별이 어려운 것으로 결과 확인하였음.



Parameter	Symbol	Min	Typ	Max	Unit	Test Condition
Forward Voltage	VF		2.9	4.0	V	IF=20mA
	VFP		3.7			IFP=100mA
Total Radiated Power	PO		23		mW	IF=20mA
			83			IFP=100mA
Radiant Intensity	IE		180		mW/sr	IF=20mA
			650			IFP=100mA
Luminous Flux	ΦV		2000		lm	IF=20mA
Peak Wavelength	λp	460		480	nm	IF=20mA
Dominant Wavelength	λD		474		nm	IF=20mA
Half Width	Δλ		24		nm	IF=20mA
Viewing Half Angle	θ1/2		±9		deg.	IF=20mA

그림 5. LED L470-01 전기적 특성

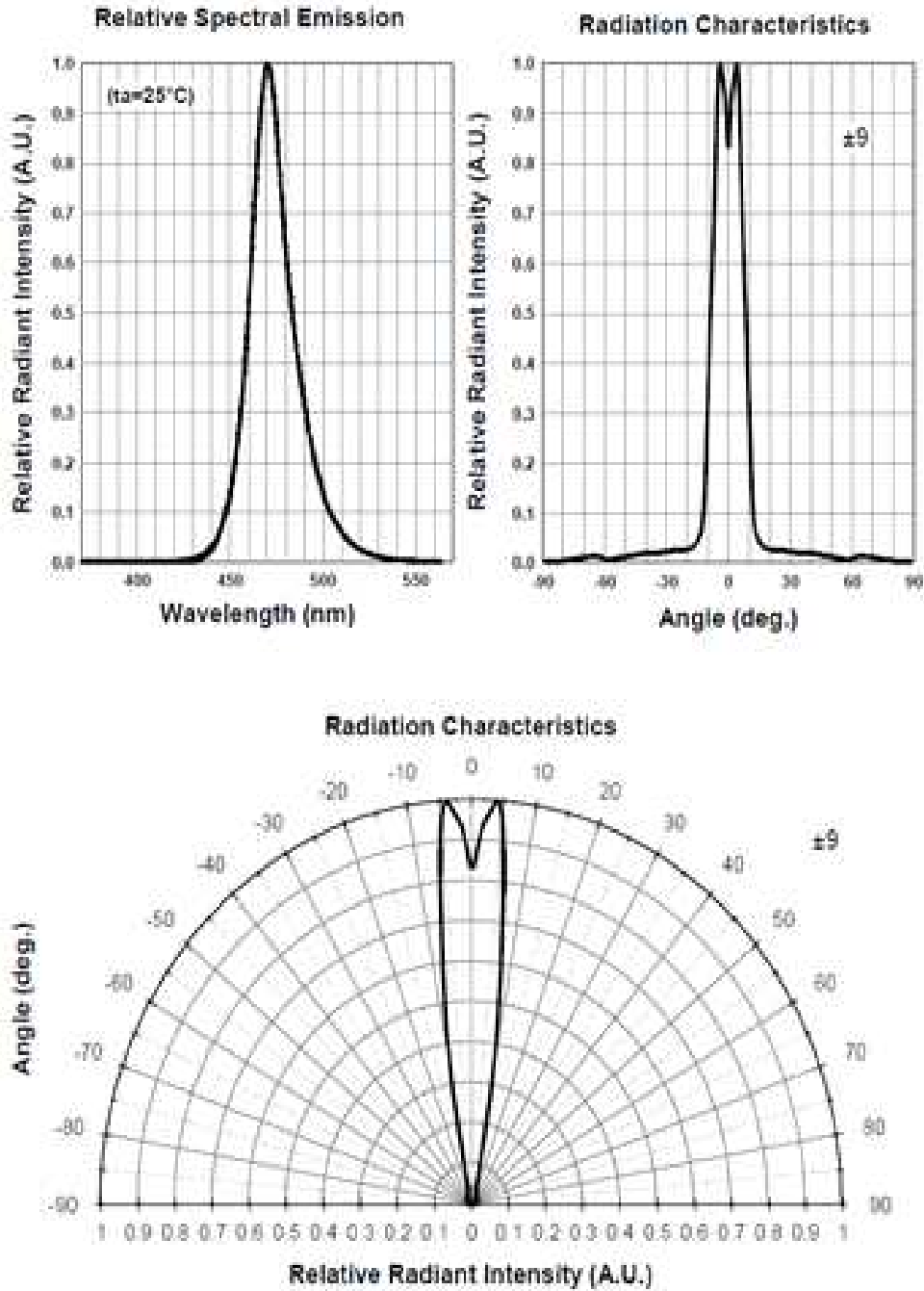
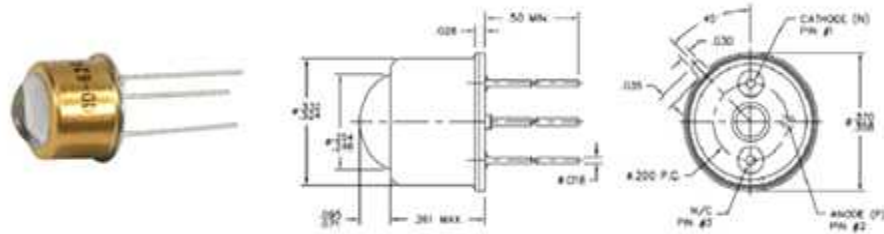


그림 6. L470-01의 배광특성도

(2) 두 번째, 광원 소자의 선정은 동일 파장의 $\lambda = 470\text{nm}$ 인 LED로 출력이 높아진 “THORLABS” 사의 LED470L 모델을 검색하여 광학 구조를 구축하고, 재시험을 시도하여 광 출력이 두 배 이상 향상된 결과보임.

- ① 순방향 전압 3.2V 350mA, 중심파장 470nm, FWHM 22nm, half viewing angle 7° 의 특성을 가지면서 광의 방사출력 80mW/ 170mW 로 광축의 방사광량이 L470-01의 약 3배에 달하는 540mW/sr의 특성 갖고 있음을 확인하였음.



Electrical Specifications		
	Typical	Maximum Ratings
Power Dissipation		500 mW
DC Forward Current	-	350 mA
Forward Voltage @ 350 mA	3.2 V	3.8 V
Pulsed Current (1/10 Duty Cycle at 1kHz)	-	2.0 A
Reverse Voltage		10.0 V
Operating Temperature	-	-50 to 100° C
Storage Temperature	-	-50 to 100° C
*Note: All maximum measurements specified are at 25° C.		
Optical Specifications		
	Typical	
Center Wavelength @ 350 mA	470 ±5 nm	
FWHM	22 nm	
Half Viewing Angle	7°	
Optical Power (Minimum/Typical) @ 350 mA	80 mW / 170 mW	
Soldering Specifications		
	Conditions	
Lead Soldering Temperature	260° C maximum, 1/16 inch (1.6 mm) from case for 5 seconds with soldering iron	

그림 7. LED470L 광학 특성

나. 광학 신호검출 회로 개발

- (1) 광학신호 검출 회로는 신호검출 센서로 포토센서인 S1336계열의 고감도, UV 대역광원 검출력을 가진 모델로 선정하였고 전원공급은 증배없이 기기의 전원 전압을 안정화시킨 5V를 공급하고 잡음 유입을 차단하기 위하여 고주파대역을 감쇄형 수동식 필터회로를 구비함.
- (2) 광원회로는 UV 광원을 방사할 수 있도록 광원소자로 LED470L 모델을 선정하였고 광출력은 500mW/sr 정도의 radiant intensity를 갖는 광출력이 높은 소자로 선택하였고 전원 공급은 광원소자의 장시간 동작에 발생 가능한 전기적 열화 현상을 예방하기 위하여 정전류 공급원을 구비함.
- (3) 신호증폭회로는 비교적 증폭 대역이 넓고 자체 잡음발생이 적으며 입력임피던스가 높은 안정된 소자로 LM6714 IC를 회로의 초단에 두어 검출된 미약한 신호는 트랜스임피던스 증폭방식을 활용하여 신호검출 센서에 도통하는 전류 값과 피드백 저항의 곱으로 증폭할 수 있도록 반전형식의 연산증폭 소자로 구성함.
- (4) 두 번째 단의 증폭회로는 검출된 신호의 반전상태를 비 반전상태로 변환하고 뒷단의 마이 크로프로세스에서 디지털 신호로 변환할 수 있는 ADC회로의 필요 신호레벨에 도달할

수 있도록 적정한 크기로 신호를 증폭하였고 두 번째 증폭기는 드레스홀드 전압을 조절하여 출력신호의 무신호증폭 범위를 제한하도록 하여 신호의 변별력을 확보할 수 있도록 제어 기능을 첨가.

Type no.	Dimensional outline/ Window material ¹⁾	Package	Photosensitive area size (mm)	Absolute maximum ratings			
				Reverse voltage V _r max (V)	Operating temperature T _{opr} (°C)	Storage temperature T _{stg} (°C)	
S1336-18BQ ²⁾	(1)/Q	TO-18	1.1 × 1.1	5	-20 to +60	-55 to +80	
S1336-18BK	(2)/K				-40 to +100	-55 to +125	
S1336-5BQ ²⁾	(3)/Q	TO-5	2.4 × 2.4		-20 to +60	-55 to +80	
S1336-5BK	(4)/K				-40 to +100	-55 to +125	
S1336-44BQ ²⁾	(5)/Q				3.6 × 3.6	-20 to +60	-55 to +80
S1336-44BK	(6)/K					-40 to +100	-55 to +125
S1336-8BQ ²⁾	(7)/Q	TO-8	5.8 × 5.8		-20 to +60	-55 to +80	
S1336-8BK	(8)/K				-40 to +100	-55 to +125	

그림 8. 포토 센서 구조 및 최대 정격

Type no.	Spectral response range λ (nm)	Peak sensitivity wavelength λ_p (nm)	Photosensitivity S (A/W)			Short circuit current I _{sc} 100 μ s (μ A)	Dark current I _o V _r =10 mV max. (pA)	Temp. coefficient of I _o T _{co} (times/°C)	Rise time t _r V _r =0 V R _L =1 k Ω (μ s)	Terminal capacitance C _t V _r =0 V f=10 kHz (pF)	Shunt resistance R _{sh} V _r =10 mV		Noise equivalent power NEP (W/Hz ^{1/2})							
			λ_p	200 nm He-Ne laser 633 nm							Min. (μ A)	Typ. (μ A)		Min. (G Ω)	Typ. (G Ω)					
				Min.	Typ.															
S1336-18BQ	190 to 1100	960	0.5	0.33	1	1.2	1.15	0.1	20	0.5	2	5.7×10^{-15}								
S1336-18BK	320 to 1100				-	-							0.9	1.0						
S1336-5BQ	190 to 1100				0.10	0.12							4	5	30	0.2	65	0.3	1	8.1×10^{-15}
S1336-5BK	320 to 1100				-	-							-	-	-	-	-	-	-	-
S1336-44BQ	190 to 1100				0.10	0.12							8	10	50	0.5	150	0.2	0.6	1.0×10^{-14}
S1336-44BK	320 to 1100				-	-							-	-	-	-	-	-	-	-
S1336-8BQ	190 to 1100				0.10	0.12							22	28	100	1	380	0.1	0.4	1.3×10^{-14}
S1336-8BK	320 to 1100				-	-							-	-	-	-	-	-	-	-

그림 9. 포토 센서 전기/광학 특성

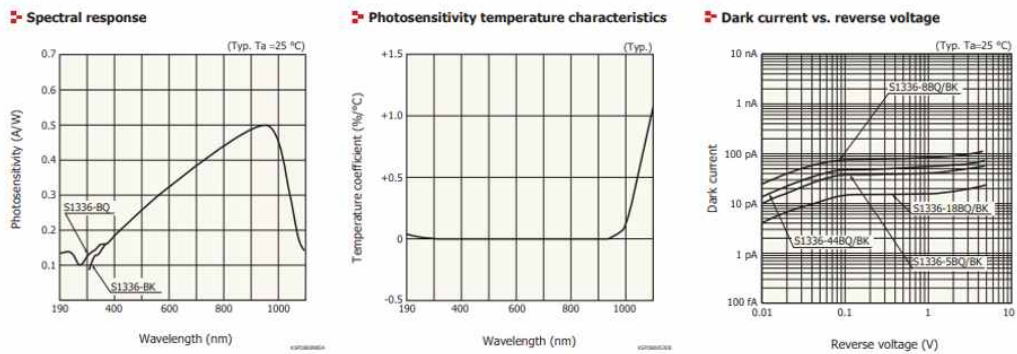


그림 10. 포토 센서 광학민감도 및 암전류

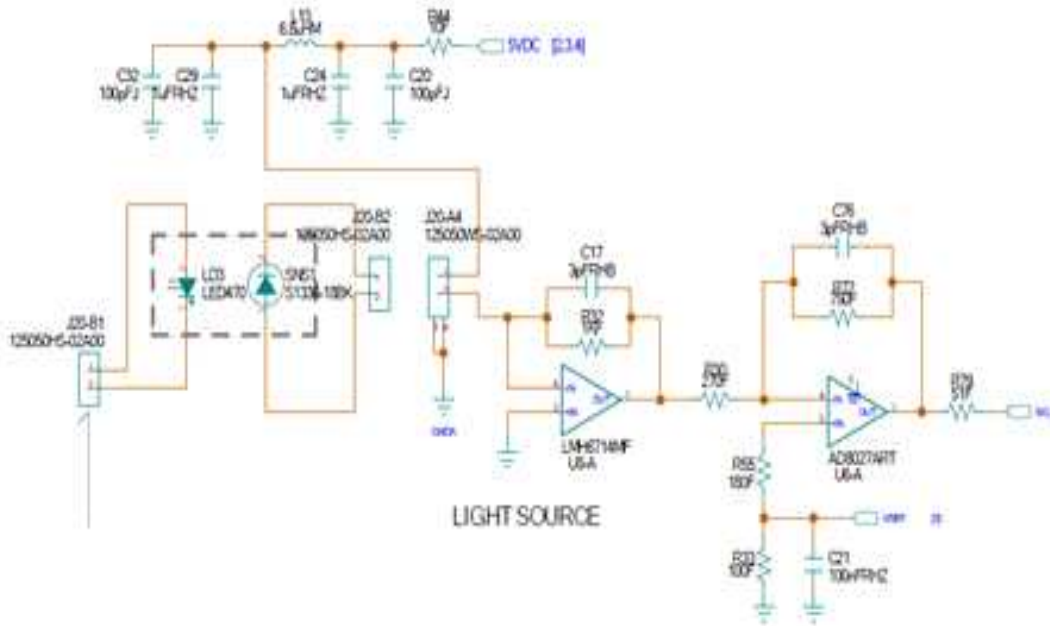


그림 11. 광검출 신호 증폭 회로

다. 프로세싱 회로

- (1) 시스템 제어를 위한 제어회로는 내장저장 공간 32K바이트를 가진 8비트 CPU인 ATmega 32U4를 사용하였고 기본 발진 신호 주파수는 16MHz의 자체 발진회로를 내장 시켰으며, 신호검출 증폭기의 출력신호를 디지털 신호로 변환할 수 있도록 ADC회로를 내장하고 광원의 안정화 전원을 공급하기 위한 PWM 제어 기능을 내장한 소자로 선정함.
- (2) 프로세스의 동작 시 시스템 동기화를 위한 리셋회로를 두었으며 각종 표시기능을 수행할 수 있도록 색상구분이 가능한 LED 소자를 구도할 수 있는 포트를 배치하고 측정동작 상태를 실시간으로 모니터링 함.
- (3) 작동 스위치는 측정기기의 전원을 공급하기 위한 전원 ON/OFF스위치와 측정을 시작할 수 있도록 지시하는 스타트 스위치를 별도로 가짐.
- (4) 신호 검출 결과의 판정에 대한 표시는 야전에서 간이식으로 사용의 편리성을 우선 목표로 하여 계량적 수치의 표시방식을 채택하지 않고 병원균의 감염상태를 기준치 이상으로 검출되었을 경우 검출정도를 단순히 표시할 수 있는 단색 LED 표시로 알람을 인식하도록 간편화하였음.

Battery Charger-8.4VDC

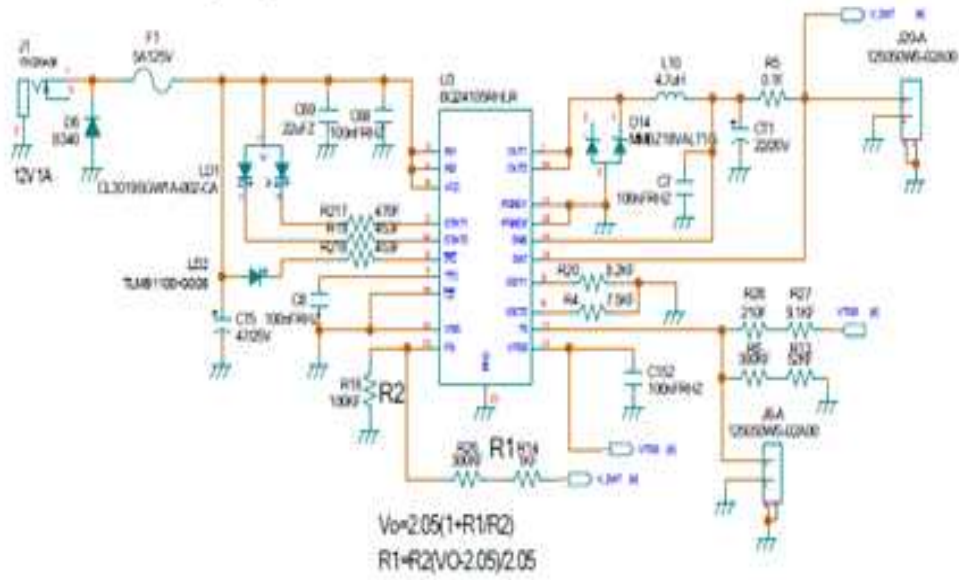


그림 13. 배터리 충전회로

마. 미세 유체칩 연동 시스템 회로부

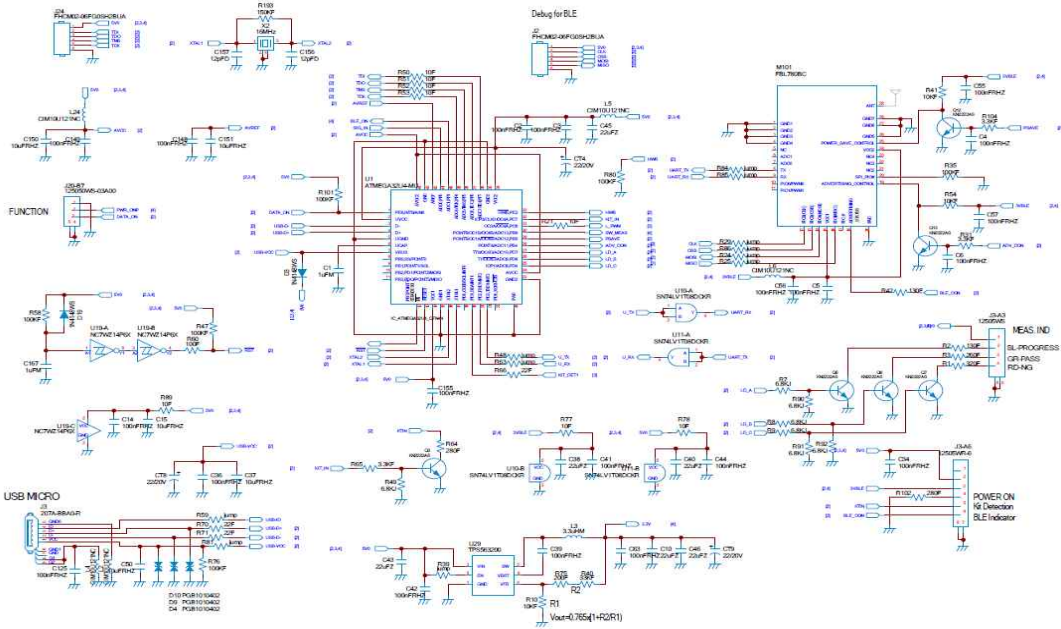


그림 14. 2.4 GHz 무선통신 APP 기능 탑재 회로

- (1) 조류독감 바이러스 항원 응집반응 검출을 위한 산란광 신호를 포토다이오드 집광소자를 활용하여 미세광량의 변화를 변별력 있게 검출하고 필요한 레벨의 전압신호로 증폭하고 변환하여 신호 분석 결과 값의 정량화를 위한 디지털 신호처리 과정을 통하여 검출신호의 스펙트럼으로 해당 신호 값의 크기와 광과장에 대한 정확도를 검량할 수 있는 회로를 개발함.

(2) 검출된 신호 값의 전송 또는 데이터 자료 전송 방식으로 USB 기능을 활성화 하고 또한 각지의 다른 방식의 자료 전송 방법으로 2.4GHz 무선통신 APP 프로그램을 적용하여 검출된 조류독감 바이러스 응집 반응에서 검출되는 산란광 정보 자료를 전송하는 기능을 탑재하고 있음.

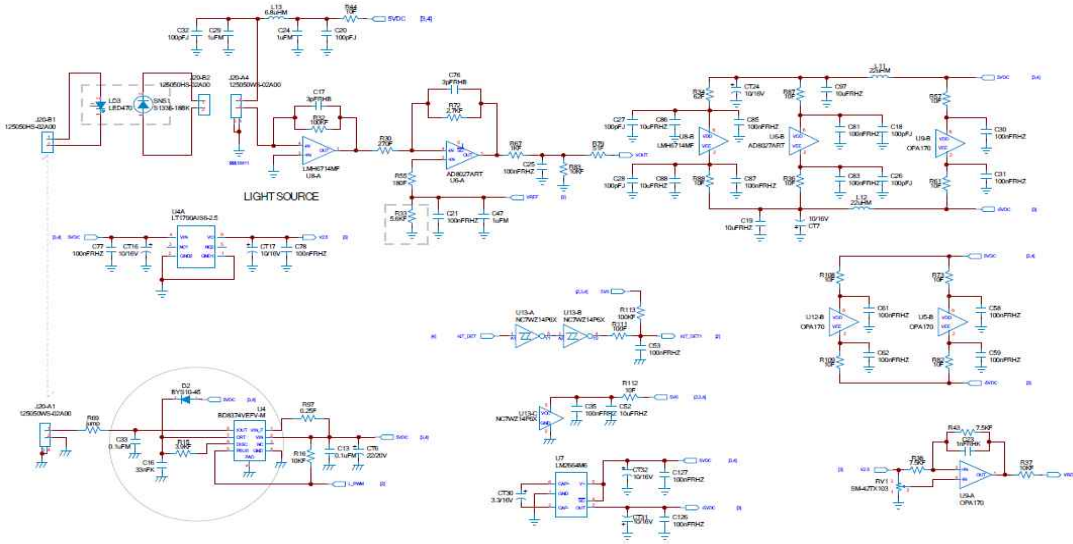


그림 15. 조류독감 응집반응 신호 검출 회로

(3) 개발 장비에서 민감도와 안정성을 고려하여 압타머와 조류독감 바이러스(항원)의 응집 반응의 검출 최적화를 위하여 광원의 파장을 470nm에서 380nm으로 변경 하였다. 신호 검출회로에서는 유체칩에 로딩 된 조류독감 바이러스 항원의 응집 반응에서 나타나는 산란광의 광원에너지 포집을 위해 380nm 광원에서 공급되는 직사광 에너지에 의해 유도 되는 난반사 산란광에 대하여 최적의 발산 각도로 전파되는 포톤(photon)선량을 적용해서 일광 상태에서 신호검출이 가능하도록 특화된 포토다이오드 수광 소자로 구성 하였다.

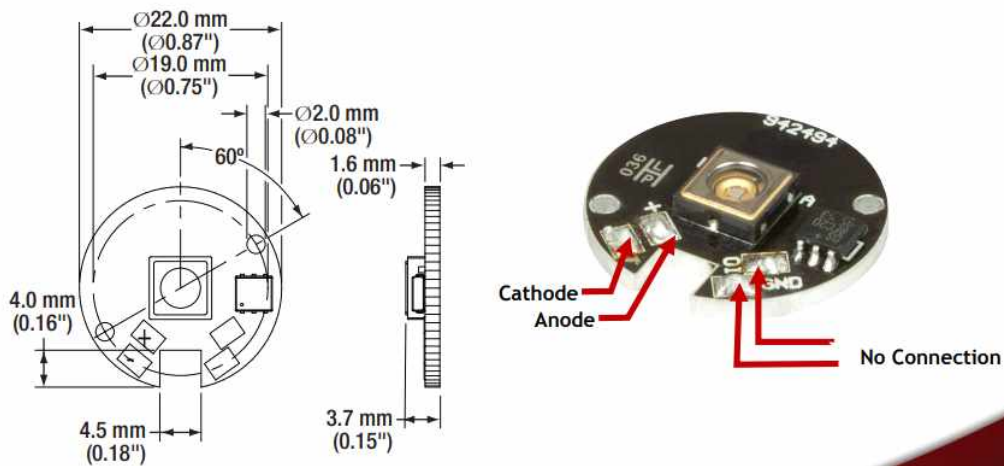


그림 16. LED 380nm 치수 및 실물 사진

Specifications	
Color	UV
Nominal Wavelength	385 nm
Bandwidth (FWHM)	10 nm
Viewing Angle (Full Angle)	120°
Test Current for Typical Power	700 mA
Maximum Current (CW)	700 mA
Electrical Power (Max)	3010 mW
Typical Lifetime	>10 000 h
Chip Size	1 mm x 1 mm
MCPCB Thickness	1.6 mm
Operating Temperature (Non-Condensing)	0 to 40 °C
Storage Temperature	-40 to 70 °C
Risk Group ^a	RG0 - Exempt Group

a. According to IEC Standard 62471:2006, Photobiological Safety of Lamps and Lamp Systems

M385D1				
	Symbol	Min	Typical	Max
Peak Wavelength ^a	λ_p	380 nm	385 nm	390 nm
LED Output Power ^b	P_{out}	270 mW	430 mW	-
Forward Voltage	V_F	-	4.3 V	-
Maximum Irradiance ^c	E_e	-	11.8 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$	-

a. When Driven with a Current of 500 mA

b. When Driven with the Test Current

c. Measured at a Distance of 200 mm

그림 17. LED 380nm 전기/광학 특성

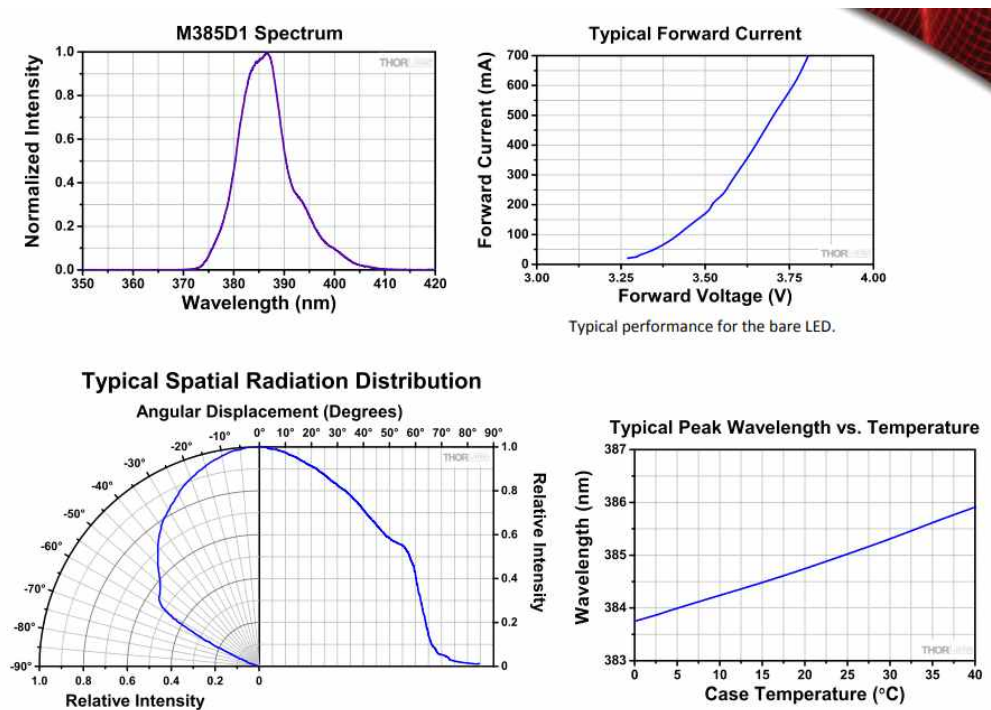


그림 18. LED 380nm 배광 특성

(4) 포집된 광원신호는 I-V변환 증폭회로에서(TIA 증폭회로) 전류신호를 전압신호로 변환하고 문지방 레벨(Threshold level)을 조절함으로써 검량 값의 기준을 정확히 조절할 수 있고, 검출된 아날로그 신호는 CPU를 거쳐 디지털화 된 신호처리 후 조류독감 바이러스 항원 응집도를 검량할 수 있도록 프로그램 알고리즘을 개발하여 적용하였음.

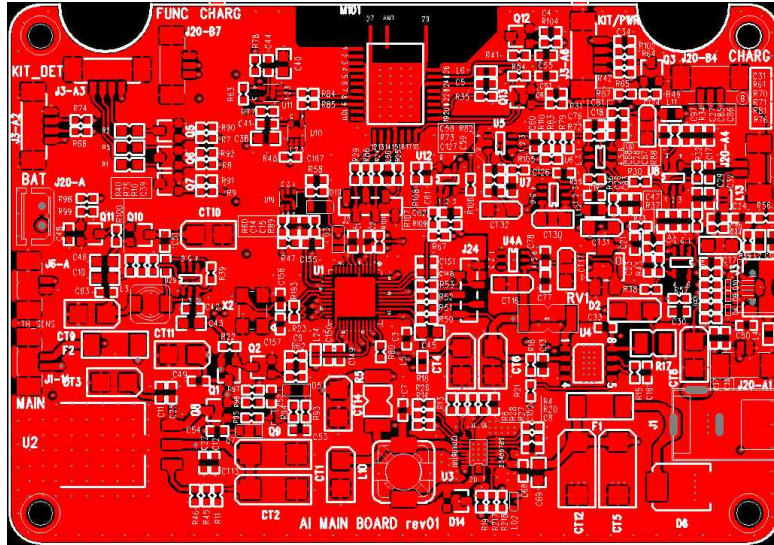


그림 19. 조류독감 신호 검출 회로 보드

- (5) 위에 제시된 산란광 검출회로를 적용하여 신호 검출용 보드를 설계하고 380nm의 LED 광원 전원 공급과 포트다이오드 수광소자를 탑재 시킨 증폭회로와 디지털 신호처리를 위한 CPU를 구동 시킬 수 있도록 시스템 보드를 제작함.
- (6) 검출된 신호는 USB 유선 전송과 2.4GHz bluetooth 무선통신 App을 통하여 스마트폰으로 검출 정보데이터를 전송할 수 있도록 구비하고 충전용 전원회로를 장착하여 휴대하기 간편하도록 경량화 시작품을 제작하였음.
- (7) 마이크로 플루이딕 센서 칩 키트를 검사구에 삽입하면 자동으로 센서 키트를 감지하여 응집 반응이 일어나도록 일정 시간의 동적기전을 유도한 후, 검측회로를 통하여 조류독감 바이러스 항원의 응집 전·후의 산란광량을 측정, 비교하여 선량변화 값의 크기로 음성, 양성의 정도를 판별하도록 하였음.
- (8) 유체칩 키트에 주입된 압타머. 항원이 정지된 상태에서 반응하는 산란광 발산량과 유동상태의 산란광 발산량의 상관관계를 분석하고 광량 수준이 극대화 되는 포인트를 찾아 민감도와 정확도의 변별력이 가장 크게 나타나는 상태를 고착 시키는 방안을 채택하였음.

바. 시스템 디자인 최적화 및 제작 (회로/Firm Ware)

(1) 회로 최적화

① 휴대용 고려 MCU 변경 건

2차년도 회로에 적용된 MCU를 휴대용을 고려한 저전력 MCU로 변경하여 배터리 방전을 최소화시키기 위해 적용함. 센서 신호 수집을 보다 조밀하게 하기 위하여 MCU를 변경 적용 함.

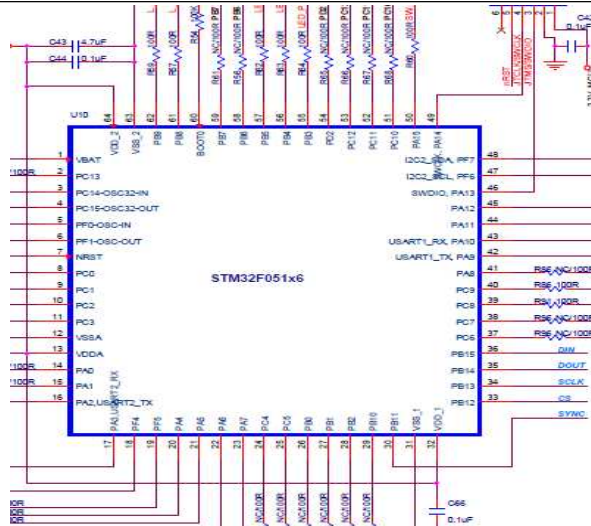


그림 20. MCU 업그레이드 회로

② 센서 데이터 측정을 위한 고 분해능 ADC 변경

2차년도 회로에 적용된 센서 데이터의 분석을 위한 ADC는 MCU 내부에 포함된 12 bits 분해능을 적용하였으나, 센서 신호의 품질을 향상시키기 위해 회로에 24 bits 고 분해능 ADC를 변경하여 보드에 반영하였음.

③ 센서 측정 조건 데이터 저장을 위한 외부 메모리 부착

센서 측정 시 측정 조건, 센서의 기본 파라미터 정보를 저장하기 위하여 MCU 외부에 EEPROM을 부착하였음. 이를 통하여 측정 시 필요한 파라미터를 관리하고, 동일 측정 시 파라미터를 다시 로딩하지 않도록 기능을 추가 함.

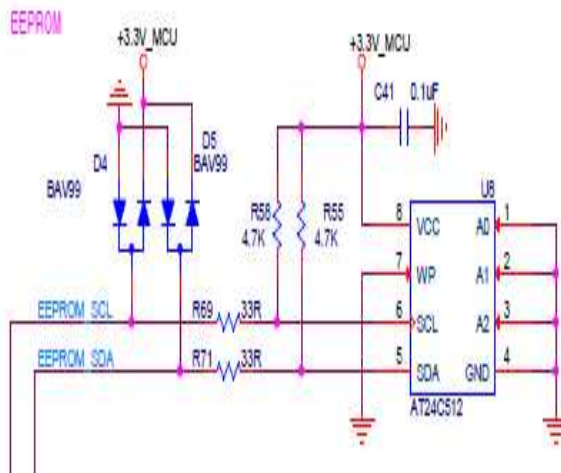


그림 21. 외부 EEPROM 회로

④ MCU에서 Real Time Clock(RTC)을 위한 크리스탈 채용

2차년도 MCU에 적용되지 않았던 RTC 기능을 위해 MCU의 Vbat 부분에 외부 전원 및 32.767 Khz 크리스탈을 추가하여 측정 데이터에 RTC 값이 포함되도록 기능을 추가 함.

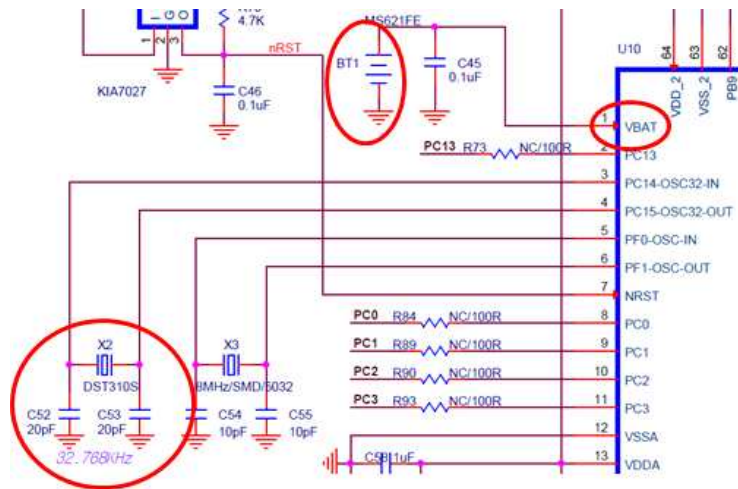


그림 22. RTC 및 크리스탈 회로

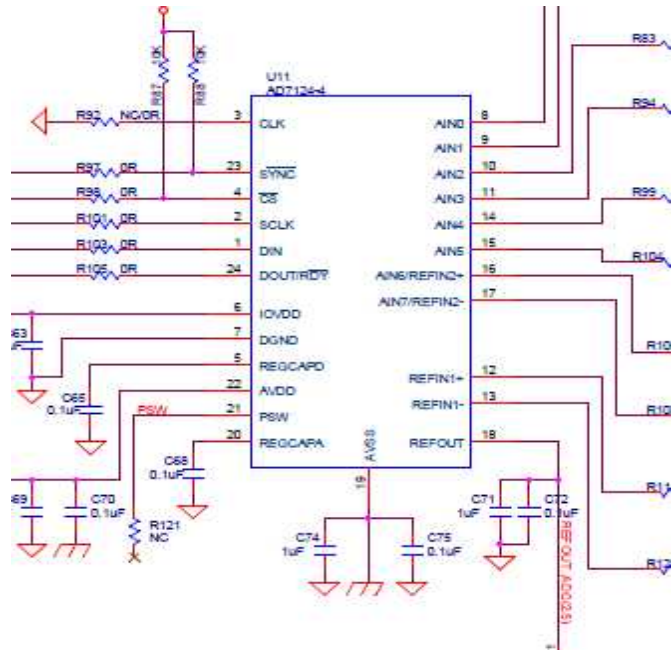


그림 23. 고정밀 ADC 회로

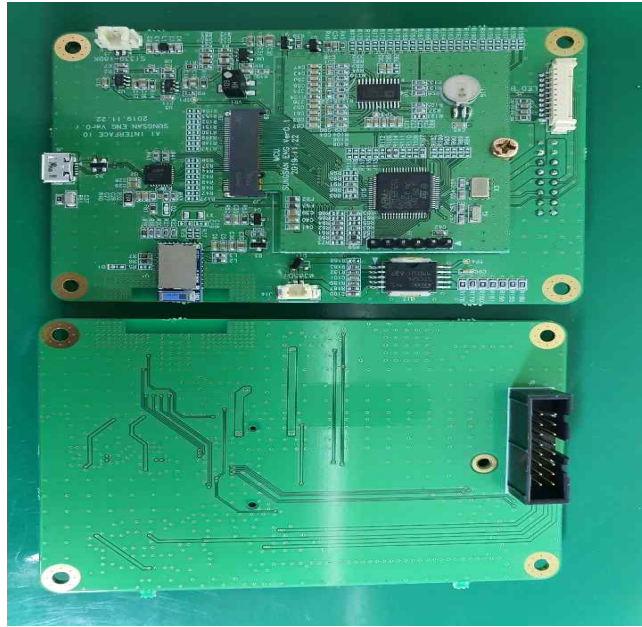


그림 24. AI 업그레이드된 MCU 메인보드 전후면

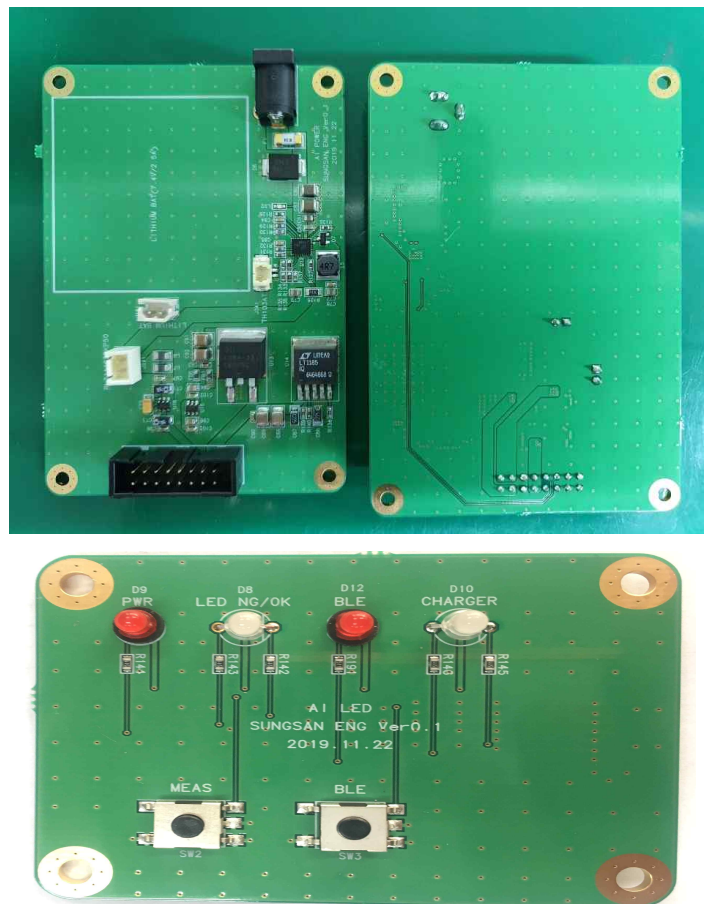


그림 25. 스위치, 인디케이터 보드

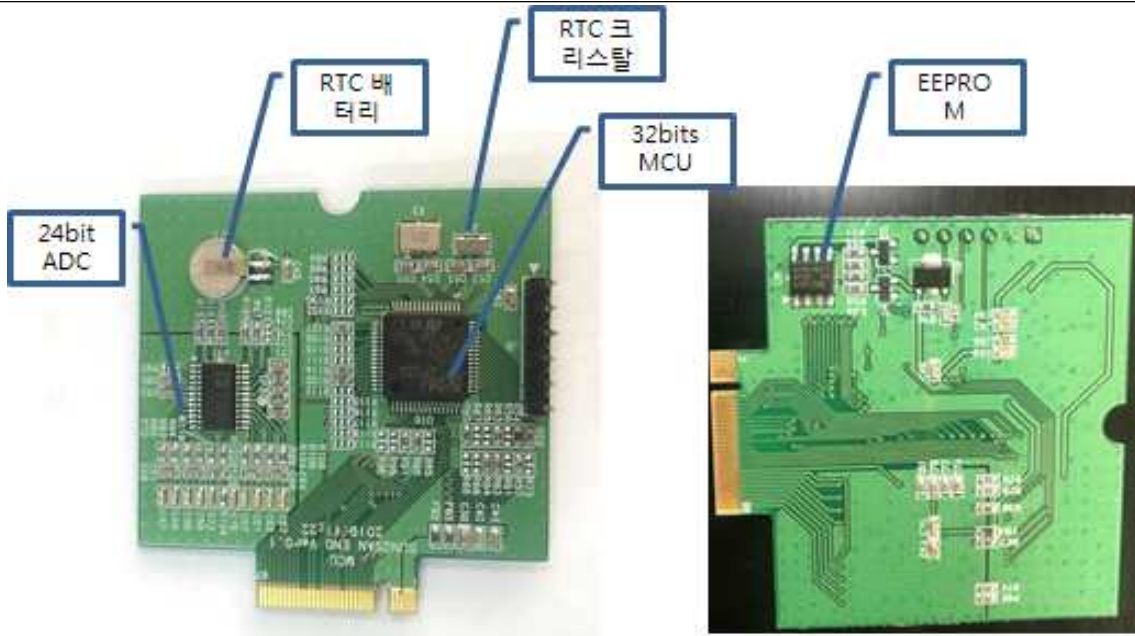


그림 26. 업그레이드된 MCU 보드

(2) Firmware 최적화 및 기능 구현

① 신호 검출 정확성 확보를 위한 S/W 필터 적용

- 신호 잡음을 없애는 동시에 시스템의 동적인 변화를 제대로 반영하기 위해 평균 대신 이동 평균 필터를 적용하였음.
- 이동 평균 필터 적용 시 신호가 순간적으로 변동하는 것에 크게 영향을 받지 않고 좀 더 안정적인 데이터 검출이 가능하였음.

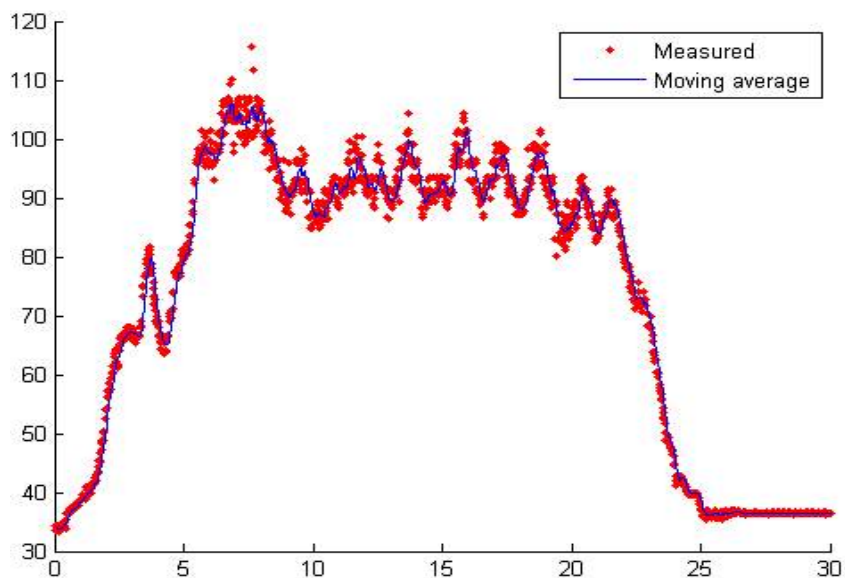


그림 27. 측정값에 대한 이동 평균 필터 적용 전/후

② 진단기기에 음성/양성 판정 기능 구현

- 정성적 평가가 아닌 정량적 평가 방법을 채택하여 항원 투입 전/후 이동 평균 측정

- 결과의 차이 값과 미리 설정된 threshold값보다 크면 양성, 작으면 음성으로 판정하였음.
- 진단기기 상에 음성과 양성을 표시하기 위해 2색 LED를 적용하여 양성인 경우는 Blue LED를 켜고 음성인 경우는 Green LED를 켜.



그림 28. 진단기기 음성/양성 판정 표시 화면

2. 시스템 기구 설계 및 제작

가. 광학 검출 구조 설계

광학적 신호 검출을 위해서는 광학검출 장치에 대한 설계가 우선되어야 하므로 여러 가지 광학검출 환경을 고려하여 암실구조 환경이 완전하지 않는 외부환경에서도 조류 독감 병원균의 존재여부를 검출하는데 충분한 정도의 광학구조의 설계가 선행 되어야 함.

- (1) 광학구조는 광원 소자로서는 저 전압에서도 발광량이 충분한 특성을 갖는 LED 광원소자를 기반으로 발광구조를 구축하였음.
- (2) 광원과 병원체 검출을 위한 시험플레이트로 경량으로 무게감이 적고 외형의 크기를 최소화할 수 있도록 서울대학교에서 선행 개발한 병원균 검출판이 마이크로 플루이딕 키트를 손쉽게 착, 탈 시킬 수 있도록 하는 구조로 개발함.
- (3) 검출판이 탈착되는 현상을 인터럽트 센서를 통하여 착, 탈할 때 자동으로 착, 탈상태를 감지하여 측정에 필요한 회로 동작을 할 수 있도록 자동 스위치 센싱 장치를 구비하였음.
- (4) 광원과 검출판의 착, 탈을 자동으로 센싱하는 구조설계가 된 상태에서 산란광을 검출하는 센싱 장치를 구성하는 핵심 기술을 설계하는 것으로 포토센서를 활용하여 미약 신호에 대한 검출이 확실하고 변별력이 갖춰질 수 있도록 적절한 증폭도를 가진 증폭회로와 신호 검출을 위한 광원에 전원을 안정하게 정 전류를 공급하도록 하는 안정화 전원장치를 구축함.
- (5) 광원장치에서 산란광을 검출해 내기 위해서는 검출센서가 최적의 신호를 검출하기 위한 구조설계가 선행되어야 한다. 설계에서 갖추어야 되는 조건은 센서의 감도를 최대로 하기 위해서는 검출각도 조절이 가능한 구조가 되어야 하고, 광원으로부터 발생하는 방사광이 파티클을 통하여 산란을 일으킬 때 최적의 위치에서 광 신호를 검출하도록 센서의 위치를 설정하였음.
- (6) 광원으로부터 발생하는 산란광을 최대의 민감도를 갖고 검출할 수 있도록 고감도의 센싱

구조를 설계하고 신호의 세기에 따른 변별력을 분명히 할 수 있도록 하기 위해서는 검출된 신호가 잡음신호를 배제하고 해석이 가능한 신호로 가공해 낼 수 있는 증폭소자가 필요함.

나. 광학 구조의 설계 및 개발

(1) 광학 전달 체계

- ① 광원 전달 기구는 전달손실을 최소화하고 반사 또는 흡수광의 변화가 최소로 유지할 수 있는 소재로 1차로 굴절 반사의 임계각이 470nm에 적정하며 광량을 충분히 전달할 수 있도록 옵티컬 화이버 1,000nm 직경을 가진 플라스틱 화이버를 내측으로 하는 전달체와 외부 광의 유입을 차단하기 위한 클레드가 입혀진 전문 메이커 제품으로 선정함.
- ② 광학 화이버를 산란광 측에 접근이 용이하도록 직경이 3mm 정도의 얇은 관형으로 구성하고 수광센서와의 결합을 위해서는 기성상품인 SMA-905 커플링을 활용함.
- ③ 기계적인 구조에서 광학적인 구조로 전환하는 마지막 단계에서는 오션옵틱사의 201-01 커플링 부품을 사이에 두고 옵티컬 화이버와 수광 소자를 결합하는 형식을 취하여 전달 체계를 거치는 동안의 광학손실을 최소화 하여 검출신호의 세기를 확보하고 미세광량의 변화를 변별력 있게 센싱 할 수 있는 구조로 제작하였음.



그림 29. 산란광 검출 신호전달 기구

(2) 광원구조와 산란광 검출 블록

- ① 광원발생을 위한 광원소자를 아래 블록의 하부에 장착하고 광축관을 통하여 방사되는 2mm 직경의 광축을 형성하고 광축의 직선성을 강화하기 위하여 콜리메이션 렌즈를 부착하여 광축을 피검물의 키트에 산란광 반응구에 모이도록 유도함.
- ② 반응구에 모인 광축은 항원체 반응에 따라 빛이 산란되는 현상을 보이게 되며 그 결과 산란광이 분산되는 정도에 따라 반응의 깊이를 달리하는 특성을 나타내게 됨.
- ③ 이러한 변화하는 정도를 광검출 센서를 통하여 센싱하면 병원체 유증에 대한 신호의 세기로 변환이 가능해 지며 이 신호를 이용하여 조류독감 감염정도를 판별함.

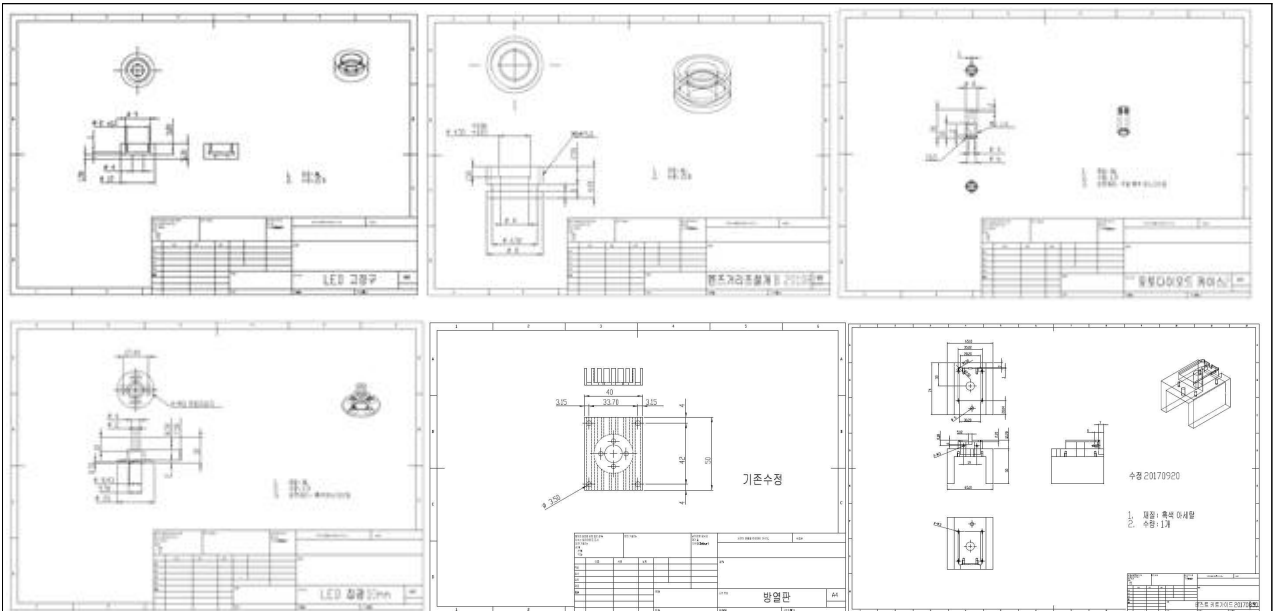


그림 30. 광학 검출 장비 설계 도면

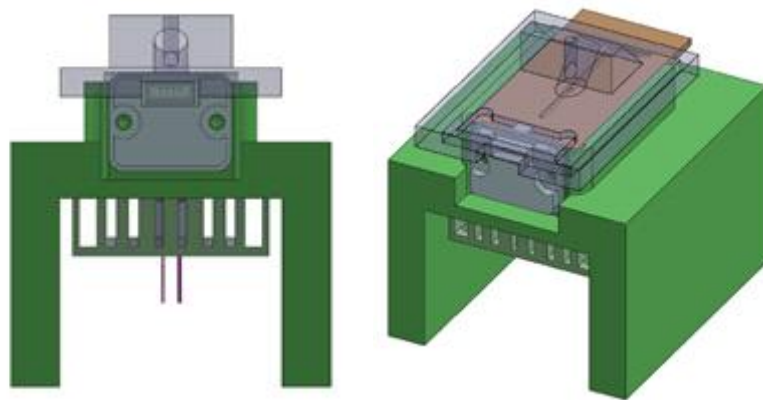


그림 31. 광학 검출 모듈 블록

다. 미세 유체칩 연동 시스템 기구부

(1) 민감성 고려 검출 구조 개선

1차년도 개발 추진한 테스트 장비에서 고민감도와 고안정성 확보를 위하여 입자에 연결된 압타머와 조류독감 바이러스(항원)의 응집반응 검출을 위하여 광원의 파장을 470nm에서 380nm으로 변경 하였고 광원 검출부에서 광케이블 연결부를 제거하고 직접 포토다이오드에서 응집반응에 의한 LED 산란 광원을 검출 가능하도록 시스템의 기구 설계를 변경함.

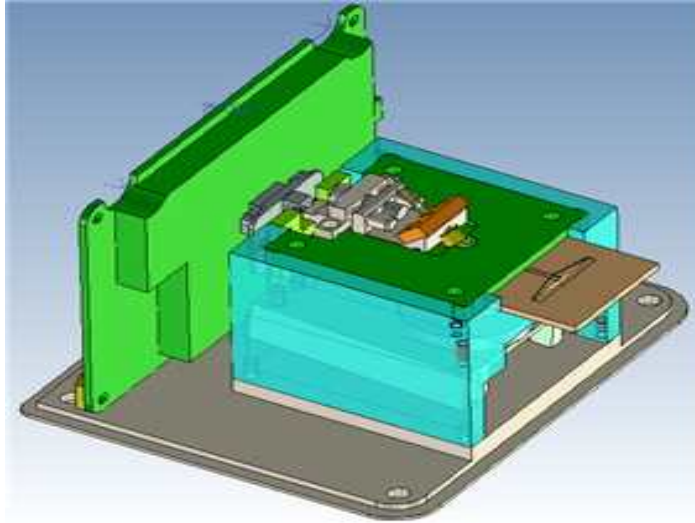


그림 32. 시스템 내부 3D 설계도면

(2) 유체칩 삽입부 구조 개선

시스템에 삽입한 미세 유체칩 내부로 주입된 반응 유체의 이송이 가능 하도록 유체칩 삽입 부분의 기구 구조를 개선하여 유체 이송 동안에 발생 하는 응집반응 기반 LED 광원 소스 대비 응집인자에 의한 산란광 측정이 가능 하도록 수정함. 산란광 반사효과 극대화를 위하여 유체칩 삽입부의 삽입 방향을 $\angle 90^\circ$ 로 변경 개선하여 유체칩에 주입된 유체가 펌핑 가능하도록 Chamber가 열린 구조로 시스템 수정하였고



그림 33. 시스템 미세 유체칩 삽입부 및 미세 조정 가능 검출부 (Photodiode) 사진

(3) 검출부 미세조정 나사 적용

유체칩 내부의 응집인자로 부터 발생하는 산란광원을 검출시 정확도 및 정밀성 향상을 위하여 검출부 (포토다이오드)의 위치를 상하 좌우 각각의 방향으로 미세 조정 나사를 이용하여 조정이 가능하도록 수정하여 View Cell 로 이동시키면서 정확히 산란광을 검출 할 수 있도록 광학 기구 구조를 보완함.

(4) Mock 제작 (1차)

개발된 2차 Pilot 시스템의 설계 변경한 기구 구조를 반영하여 ABS 및 투명 아크릴 재질을 사용하여 시스템 1차 Mock up 제작함.



그림 34. 시스템 1차 Mock up 사진

라. 시스템 디자인 최적화 및 제작 (기구)

(1) 시스템 광원 구조

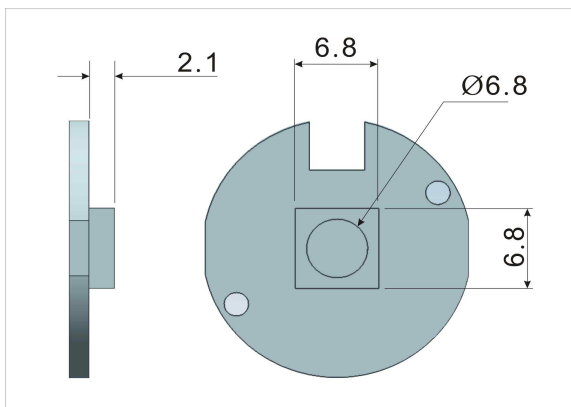


그림 35. 광원부 기구 구조 (단위: mm)

(2) 집광 장치 기구 구조

① AI 산란광 테스트 시스템 (프로토타입)

- 광원으로부터 유체 칩의 측정 부분 까지 광을 조사하여 유체 칩 View Cell부에 광을 집중시키기 위하여 그림 36과 같은 구조로 설계함.
- 광 전달 매체로 광 Fiber Cable 사용함.
- 유체 칩에 광 초점을 정확하게 맺히게 하기 위해서 유체 칩과 광원 사이에 비구면 볼록 렌즈를 사용함.
- 렌즈와 광원 사이의 거리 조절은 나사를 돌려서 조정 가능함.

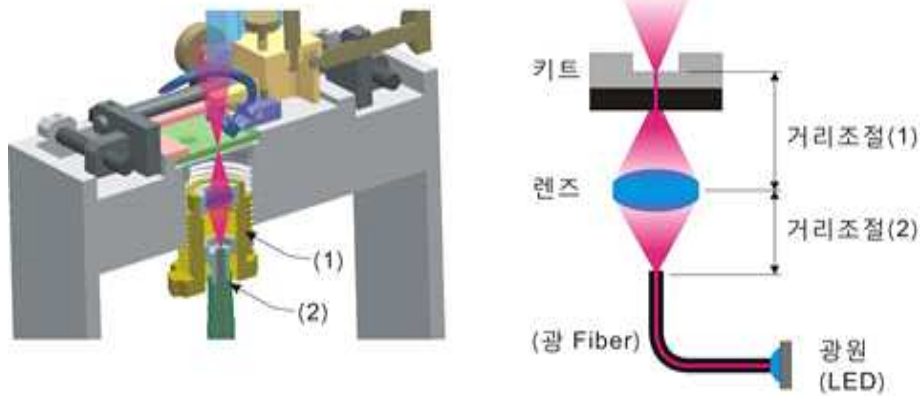


그림 36. 프로토타입 광원 집광 장치 구조

② 진단 시스템 (최종)

- 집광 장치의 기본 설계 및 원리는 프로토타입과 동일함.
- 광 전달 매체는 1차에서 사용된 Fiber Cable의 길이에 의하여 발생하는 광 손실을 줄이기 위하여 짧은 Fiber Rod 형태로 개선하여 제작함.
- 비구면 볼록렌즈 동일하게 적용함.
- 렌즈와 광원 사이의 거리는 1차 기구에서 파악하여 고정하고 조절을 위한 나사는 없음.

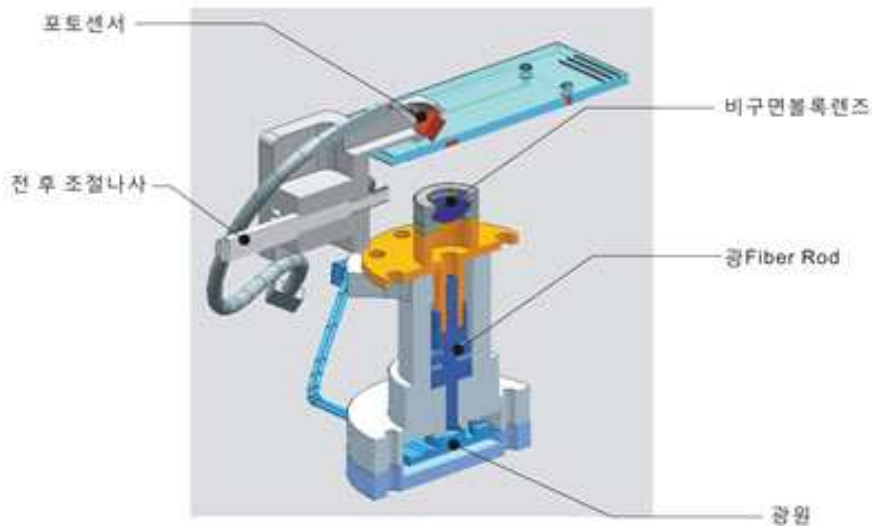


그림 37. 최종 시스템 광원 집광 장치 구조

(3) 포토센서부 기구 구조

① AI 산란광 테스트 시스템 (프로토 타입)

- 포토센서를 전, 후, 좌, 우, 상, 하 및 각도를 조정하는 기구 장치로 유체 칩 측정부에 맺힌 광을 센싱하는 포토센서의 미세조정으로 산란광이 존재하는 위치를 정확히 파악함.
- 렌즈와 광원 사이의 거리 조절은 나사를 돌려서 조정 가능함.
- 상기 기구를 제작하여 테스트를 하면서 테스트 최적 조건의 조정 상태를 파악하여 포터블 타입의 기구를 제작하는 자료로 사용하기 위함.

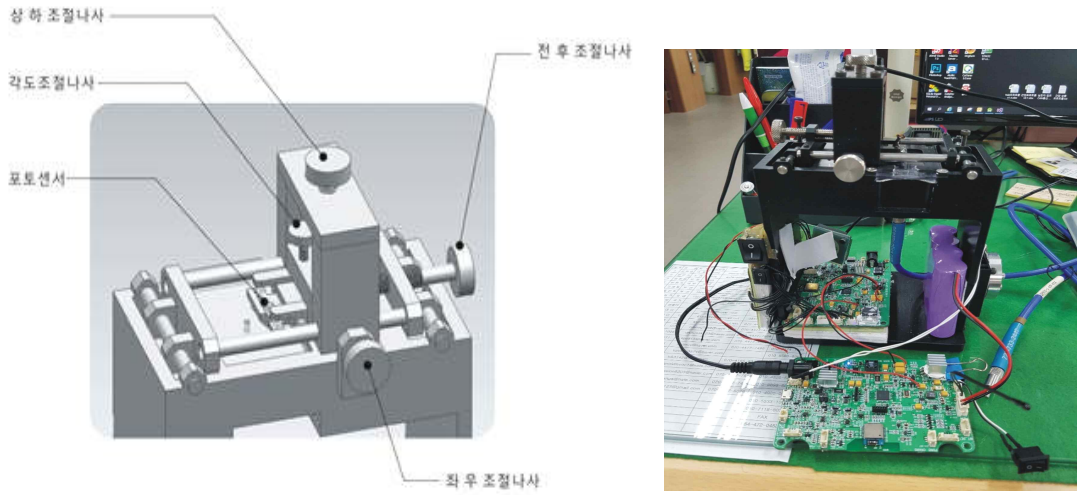


그림 38. 프로토타입 포토센서부 기구 장치 구조

② AI 산란광 진단 시스템 (최종)

- 포토 유체 칩에 시료를 Flow 하기 위한 In & Outlet 기구 추가 개발 적용함.
- 유체 칩에 시료를 Inlet 또는 Outlet시 편의성을 제고하기 위해서 In & Outlet 니플과 실리콘 챔버를 을 추가하였고 Flow 음압 발생을 위한 시린지 전진, 후퇴 장치 개발 적용함.

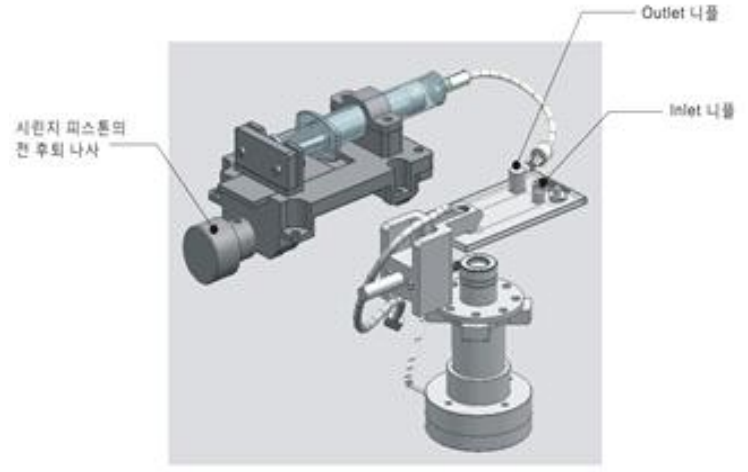
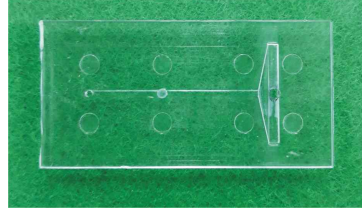
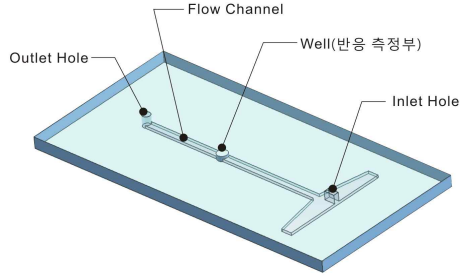


그림 39. 프로토타입 포토 센서부 기구 장치 구조

(4) 유체 칩

① AI 산란광 프로토타입 장비용 유체 칩 (1차)



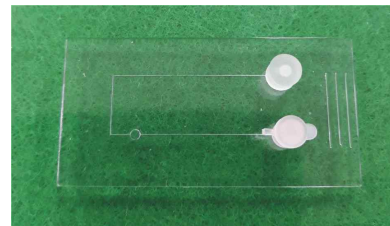
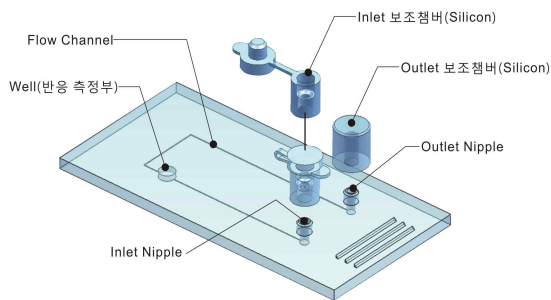
유체칩 사이즈	60X30X2.0
Channel 사이즈	1.4X0.5
Inlet Hole 사이즈	2.0X1.0(사각)
Outlet Hole 사이즈	∅ 1.5
Well 사이즈	∅ 2.0X1.0

그림 40. 1차 유체칩 구조 및 사양(단위: mm)

- Inlet & Outlet 홀에 보조 장치가 없어서 샘플 및 시약 주입을 위한 호스 및 주사기 등을 연결이 어려움.
- 유체 칩을 기기에 삽입 및 탈착 시 미끄러움.
- 유로가 일직선으로 짧고 넓고 깊어서 흡입저항이 거의 없어 응집 반응시간이 짧음.

② AI 산란광 진단 시스템용 유체 칩 (2차)

- 유체 칩에 시료를 Flow 하기 위한 In & Outlet 기구 추가 개발 적용함.
- 유체 칩에 시료를 Inlet 또는 Outlet시 편의성을 제고하기 위해서 In & Outlet 니플과 실리콘 챔버를 추가 개발 적용함.
- 유체칩에 시약 및 샘플 주입시 뷰셀(View Cell) 기포 발생.



유체칩 사이즈	60X30X2.0
Channel 사이즈	0.07X0.07
Inlet Hole 사이즈	∅ 1.6
Outlet 사이즈	∅ 1.5
Well 사이즈	3.0X1.0



그림 41. 2차 유체칩 구조, 사양 및 뷰셀 사진(단위: mm)

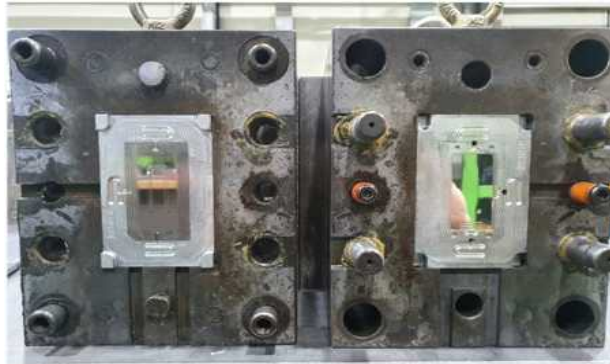
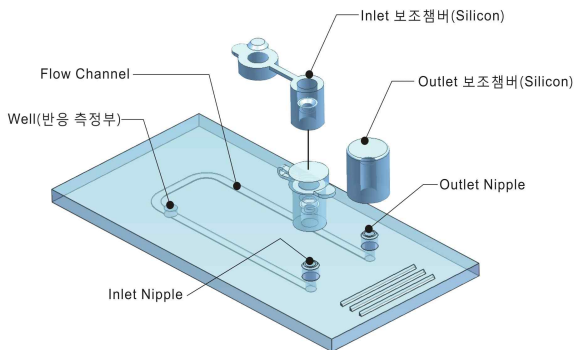


그림 42. 유체칩 사출 금형 사진

- 1차 칩에 비하여 유로를 길고 좁게 하여 응집 반응시간을 길게 함.
- Inlet 보조 챔버를 추가하여 시료 주입 시 시료가 밖으로 흘러서 칩이 오염 방지 유도.
- Outlet 챔버에 음압 발생용 주사기를 쉽게 꽂을 수 있음.
- 칩 손잡이 부분에 미끄럼 방지라인을 추가함.

③ AI 산란광 진단 시스템용 유체 칩 (3차-최종)



유체칩 사이즈	60X30X2.0
Channel 사이즈	1.4X0.1
Inlet Hole 사이즈	∅ 1.6
Outlet 사이즈	∅ 1.5
Well 사이즈	2.0X1.0

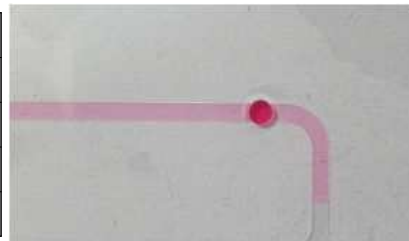


그림 43. 3차 유체칩 구조, 사양 및 뷰셀 사진 (단위: mm)

- 1차 칩이 유로가 너무 좁아서 미세한 불순물이나 먼지에 의하여 쉽게 유로가 막히고 흡입 저항이 커서 이를 개선하고자 유로를 넓게 하여 음압 흡입 저항을 줄임.
- 채널 경로의 꺾이는 부분의 직각 부분을 라운드 처리하여 유체 흐름성을 좋게 함.

(5) 기구 구성요소 비교 (프로토 타입 VS. 최종 시스템)

구분(구성요소)	프로토 타입	최종
광원 LED	동일	
집광거리조절 장치	있음	고정
센서 이동장치	전, 후, 좌, 우, 각도	전,후
광전달 매체	광Fiber 케이블	광 Fiber Rod
비구면 렌즈	동일	
시린지 피스톤 전,퇴 장치	없음	있음
유체 칩 In & Outlet 니플 & 보조 챔버	없음	있음

표 2. 프로토 타입 및 최종 AI 진단 시스템 기구 구성 요소 비교표

마. 시스템 디자인 및 시스템 제작

(1) 디자인 시안

구분	디자인
A	
B	
C	

표 3. AI 진단 시스템 디자인 시안 비교표

- 최종 디자인 C 안으로 선정 후 AI 진단 시스템 제작함.

(2) 시스템 제작 (최종)



그림 44. 최종 개발된 AI 산란광 진단 시스템 사진

구분	시스템 부품 사진
집광장치 (상부)	 <p>집광장치 상부구조</p> <p>Chip Cover 집광장치Body 센서 이동장치</p>
집광장치 (하부)	 <p>집광장치 하부구조</p> <p>렌즈홀더 광원 LED홀더 광 Fiber Tube 광 Fiber 홀더 광 Fiber</p>
시린지 전진, 후퇴장치	 <p>시린지 전진, 후퇴 장치-Top</p> <p>메인Body 시린지홀더</p> <p>시린지 전진, 후퇴 장치-Bottom</p> <p>전후진 Knob 전후진 볼트기구</p>

표 4. 시스템 구성 주요 부품 현황

3. 시스템 S/W 및 App 제작

가. 프로토타입 테스트 장비용 S/W 개발

(1) S/W에서 지원하는 기능 리스트

- ① 판정을 위한 LED 표시 기능
- ② KIT 탈부착 감지 기능
- ③ 배터리 소모 최소화를 위한 MCU Sleep 기능
- ④ 산란광 측정을 위한 ADC 처리 기능

(2) 프로토타입 테스트 장비용 S/W 개발 내용

- ① 순서도 및 상태도 작성
- ② 소스 코드 작성 (개발툴 : AtmelStudio7.0)

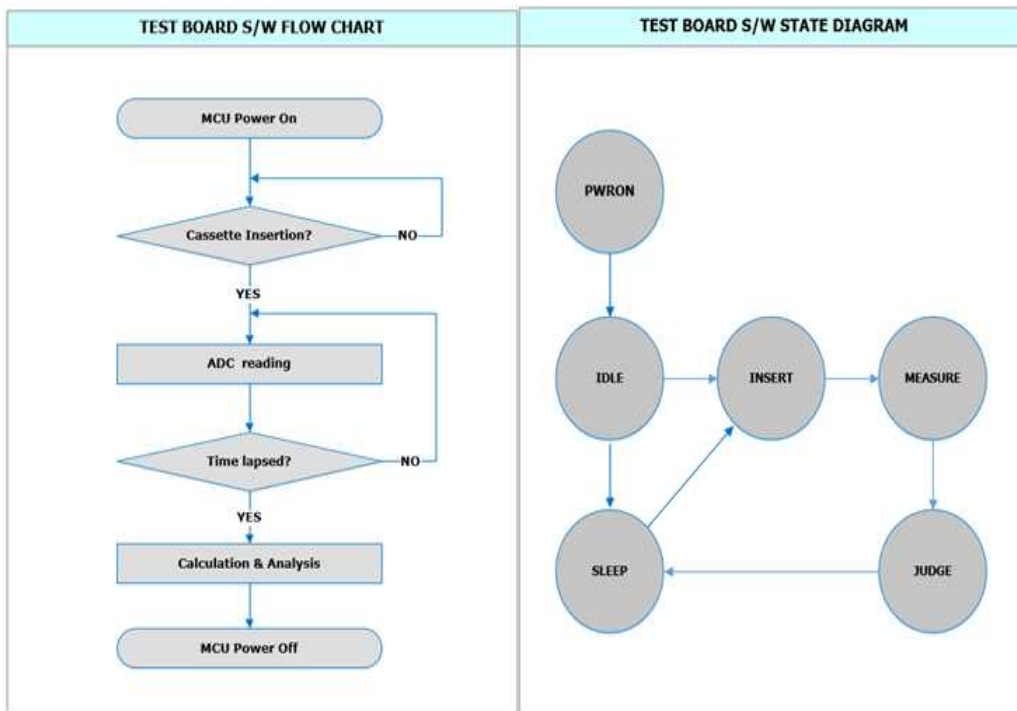


그림 45. 테스트 장비용 S/W 알고리즘

나. 최종 조류독감 진단 시스템 S/W 개발

(1) S/W 추가 개발 내용

- ① BLE 전원 On/Off 기능
 - BLE 모듈의 전원 On/Off 기능 추가하여 진단 시에만 BLE 모듈을 켜기 때문에 배터리 소모를 최소화할 수 있음.
 - 스마트폰 앱과 연동을 통한 진단을 위해 BLE 전원을 켜 후 진단이 완료되면 BLE 전원을 끄는 동작 시나리오를 구현하였음.
- ② 블루투스 진단 기능
 - BLE 모듈의 전원을 켜면 스마트폰 앱을 통해 스마트폰의 블루투스와 연결되고 앱으로

부터 진단 명령을 진단 시스템의 BLE 모듈로 전달하고, 진단 시스템은 진단 결과를 앱으로 BLE 모듈을 통해 전달하도록 처리하였음.

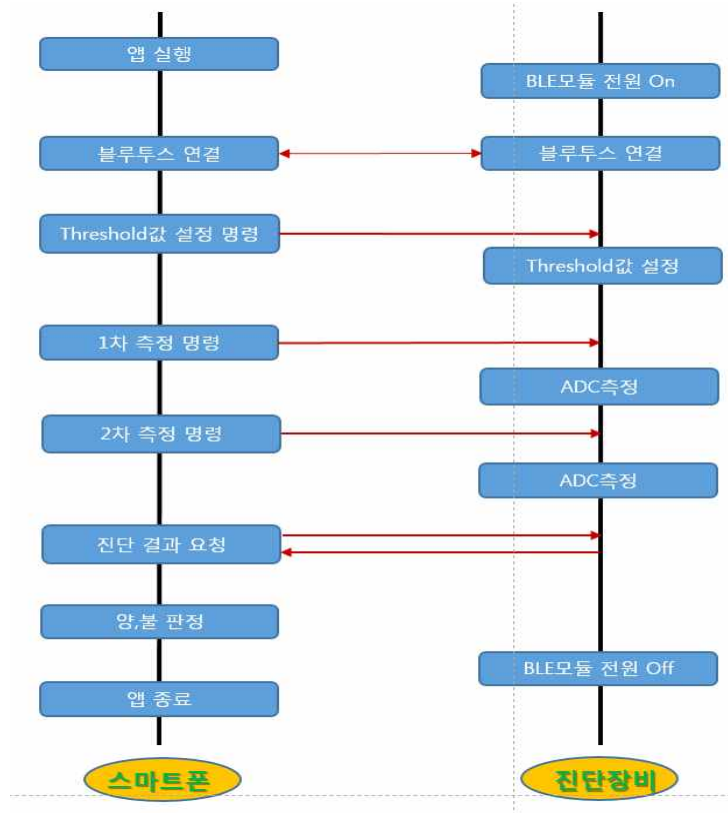


그림 46. 블루투스 진단 기능 동작 시나리오

③ Stand-Alone 진단 기능

- 스마트폰 앱을 이용하지 않고 진단 장비만으로 진단이 가능하도록 구현

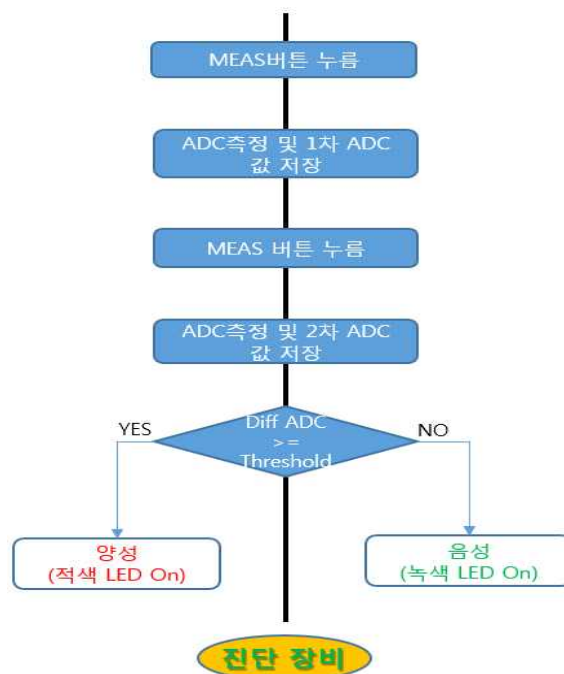


그림 47. Stand_Alone 진단 기능 동작 시나리오

(2) S/W 개선 및 업데이트 내용

- ① 양불 판정 알고리즘 업데이트
- ② ADC값 이동 평균 필터 적용을 통한 ADC값 정확도 개선

나. 회로 시스템 연계 앱 개발

(1) 스마트폰 앱 개발

- ① 사용자 스마트폰의 블루투스를 활용해 조류독감 진단모듈과 통신을 하여 스마트폰 앱에서 측정된 결과를 확인이 가능하도록 개발함.
- ② 앱의 진단화면에서 측정버튼을 누르면 조류독감 진단모듈에서 측정을 시작하고 진행상황이 BAR 그래프형태로 표시가 됨.
- ③ 조류독감 진단모듈에서 측정이 완료되면 측정 결과(양성/음성)을 앱 화면에 표시를 한다. 사용자가 과거 진단이력을 확인하고 싶다면 앱의 이력화면에서 확인이 가능함.
- ④ 이력 화면에서 날짜, 시간 순서로 과거 진단이력이 스마트 폰 앱에 표시가 됨.

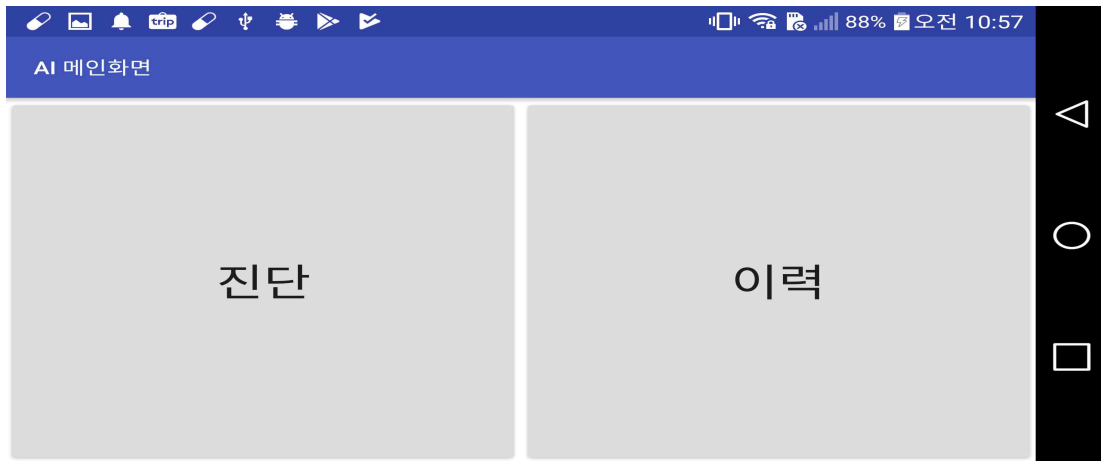


그림 48. 메인화면 GUI

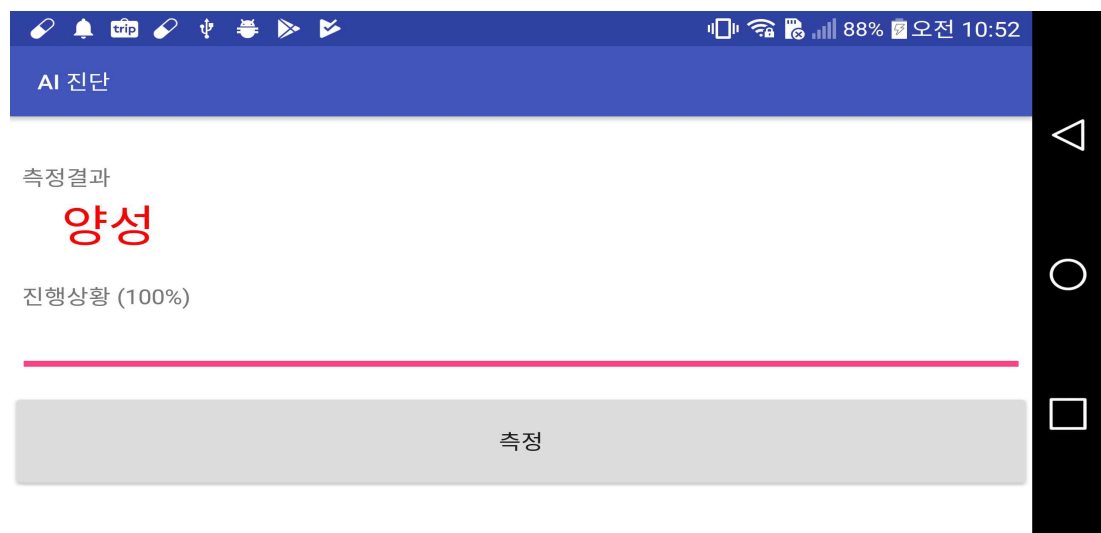


그림 49. 진단화면 GUI

AI 이력		
2018년 09월 20일	오전 10시 21분	양성
2018년 09월 20일	오전 10시 25분	음성
2018년 09월 20일	오전 11시 50분	음성
2018년 09월 21일	오후 02시 50분	양성
2018년 09월 21일	오후 04시 22분	음성

그림 50. 이력화면 GUI

다. 모니터링 툴 개발

(1) 산란광 측정 Detector에서 측정한 광의 세기를 USB포트를 통해 raw데이터를 받아 실시간으로 모니터링 할 수 있는 프로그램 개발. 실시간으로 raw데이터를 그래프 형태로 볼 수 있기 때문에 각종 실험에서 유용하게 사용가능 함.

* X축 : raw데이터 수신 시간(초)

* Y축 : 측정된 ADC값 (광의 세기가 셀수록 ADC값이 높게 나옴)

(2) 1초 동안 수집한 raw데이터의 평균값, 최댓값, 최솟값을 1초마다 한번 씩 점으로 찍어 그래프로 표시함.

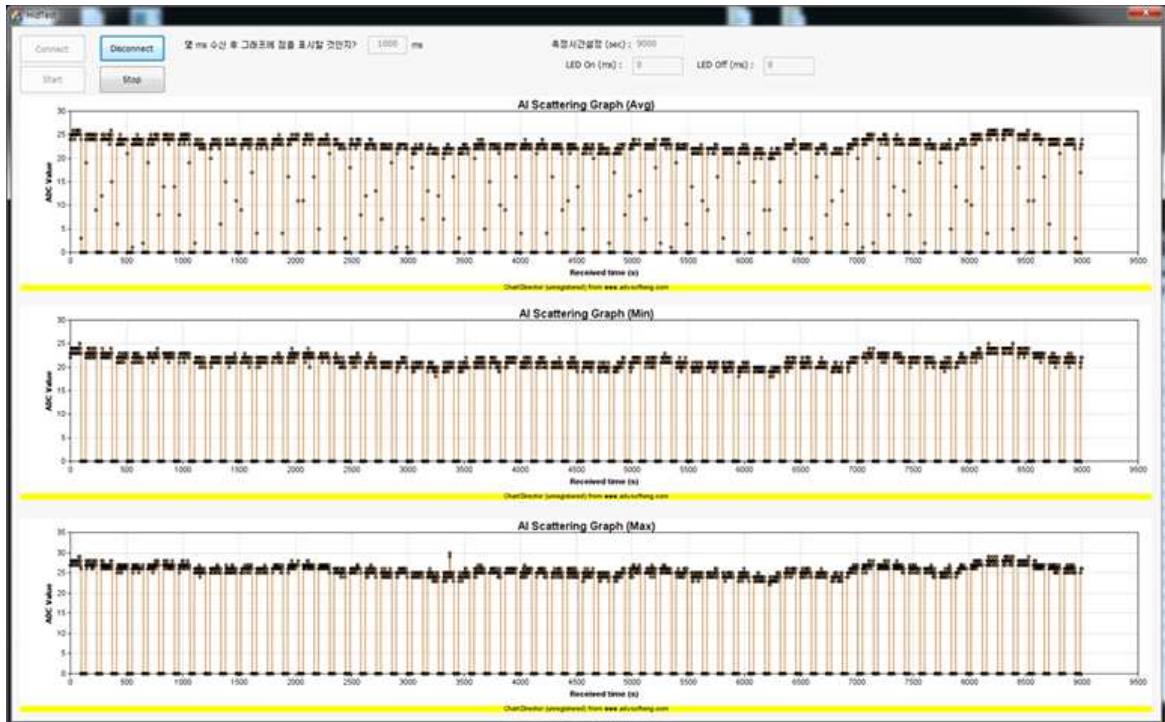


그림 51. 개발 프로그램 기준 실시간 모니터링 Raw 데이터 그래프

라. 스마트 폰 앱 최적화

(1) 안드로이드용 AI 진단 앱과 Device간 프로토콜 설계

- ① 안드로이드 App과 Device간 연동을 하기 위해서는 서로 주고받을 packet에 대한 통신 프로토콜 설계가 필요함.
- ② 그림 40과 같이 양볼 판정 Threshold값 세팅, 양볼 판정 Threshold 값 읽기, 측정시간 세팅, 측정시간 읽기, 측정 결과 값 요청, Firmware Version 읽기 기능에 대한 통신 프로토콜을 설계함.

AI 프로토콜 상세 설명											
메시지 Format	진단기 요청 필되어 응답	Header(0x55) + FunctionID(1Byte) + 데이터길이(2Byte) + 파라미터(n Byte) + CheckSum(1Byte) Header(0xAA) + FunctionID(1Byte) + 데이터길이(2Byte) + 파라미터(n Byte) + CheckSum(1Byte) 데이터길이 = 파라미터 총 길이									
메시지 총 길이 제한	BLE 통신이라 메시지 1개가 20byte로 제한										
Checksum	Header부터 파라미터까지의 총 합에서 최하위 1Byte										
정상응답 (Ack)	정상응답시 FunctionID + 0x40해서 응답										
비정상응답 (Nack)	비정상응답시 FunctionID를 0xFF로 응답										
	FunctionID										
환경세팅	0x10대역										
데이터 요청 관련	0x20대역										
진단기 진단장치 정보	0x80대역										
	FunctionID	파라미터1	파라미터2	파라미터3	파라미터4	파라미터5	파라미터6	파라미터7	파라미터8	파라미터9	파라미터10
양볼판정 Threshold값 세팅	0x10 0x50	Threshold 값									
양볼판정 Threshold값 읽기	0x11 0x51	Threshold 값									
측정시간 세팅	0x12 0x52	측정 시간 (초)									
측정시간 읽기	0x13 0x53	측정 시간 (초)									
측정 시작 요청	0x20 0x60										
측정 결과 값 요청	0x21 0x61	측정 결과 값									
Firmware Version (최대 99.99)	0x80 0xC0	Major(0~99)	Minor(0~99)								

그림 52. App과 디바이스 간의 개발 통신 packet 프로토콜

마. 안드로이드용 AI 진단 App 개발

- (1) 사용자가 BLE 연결을 통한 안드로이드 App을 사용하여 보다 쉽게 AI 진단 작업을 진행 할 수 있도록 도와줌.
- (2) AI 아이콘을 눌러 AI App을 실행하면 Splash화면에서 주변에 AI 진단장치가 있는지 BLE Search를 시작함.
- (3) 주변에 AI 진단장치를 발견하면 Connection 을 시도하여 정상적으로 Connection이 되면 Main 화면으로 넘어감.
- (4) Main 화면은 측정, 이력, 설정의 3가지 Sub Menu로 구성. 측정화면에서는 실제 AI진단 위해 몇 가지 Step을 거쳐 최종 측정결과를 얻을 수 있는 화면임.
- (5) 측정방법은 첫 번째 항원이 없는 시약을 사용해 측정을 하고 두 번째 실제 채취한 샘플로 측정을 하여 두 값의 차이를 보고 양성/음성 판단을 하게 됨.
- (6) 이력화면 은 과거에 측정했던 이력내역을 확인할 수 있는 화면임.
- (7) 설정 화면에서는 측정시간 및 Threshold(음성/양성 판단 기준값)를 설정할 수가 있음. 전체적인 구조와 세부기능에 대해서는 그림 41~45 참조.

전체 구조



그림 53. 스마트폰 App 전체 구조 사진

Splash 화면



주요 기능

1. AI 진단 Device와 BLE와 연결시도
2. BLE연결 성공시 [측정화면]으로 이동

그림 54. 스마트폰 App Splash 화면 사진

측정 화면

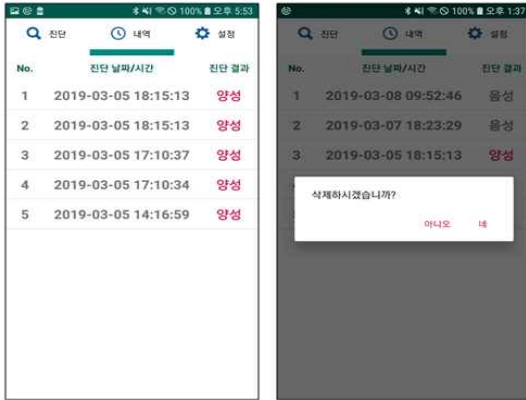


측정 절차

1. 칩 삽입 후 항원이 없는 시약의 ADC값을 읽음
2. 칩 삽입 후 샘플 시약의 ADC값을 읽음
3. 최종적으로 전/후 ADC차이값과 Threshold값을 가지고 양성/음성을 판단하여 표시함.

그림 55. 스마트폰 App 측정 화면 사진

이력 화면



주요 기능

1. [측정 화면]에서 측정했던 과거 이력을 조회
2. 리스트에서 특정 이력의 삭제를 원할 경우 LongClick으로 특정 이력 삭제 가능

그림 56. 스마트폰 App 이력 화면 사진

세팅 화면



주요 기능

1. [측정 시작] 후 산란광 수집하는 측정 시간 설정 가능
2. 판단기준 Threshold값을 설정 가능

그림 57. 스마트폰 App 세팅 화면 사진

4. 조류독감 진단 시스템 시험 결과

가. 프로토타입 시스템 시험 결과

(1) Thin film 시험

- ① 본 시험은 광학장치의 동작상태 만을 확인하기 위한 선행시험 과정으로 광원장치로부터 발생하는 반사 또는 차광에 의한 광원 출력의 변화를 어느 정도 변별력 있게 검출할 수 있는가에 대한 시험으로 시험 진행과정과 시험을 통하여 얻어지는 측정값을 기준으로 광원 검출 센서의 사양과 뒷단의 트랜스임피던스 변환 증폭회로의 증폭도를 결정하는 자료로 활용하고자 함.
- ② 선행시험 단계, 구비된 광학장치를 활용하여 산란광 검출여부를 시험하는 단계로 bio bead가 준비되지 않은 단계에서 먼저 할 수 있는 방법으로는 투명한 얇은 필름(thin film)을 이용하여 film 특성에 따른 방사광의 광량에 대한 미세변화 상태를 검출하는 단계임.
- ③ Thin film의 투명도에 따라 투과되는 광량의 미세한 변화는 반사광과 투명도에 따른 차광현상으로 구분되는데 반사광의 양은 무시하고 투명도의 변화에 대한 차광효과 만을 검출하는 시험을 시도함. 미세광량의 차광현상을 확인하는 방법으로 필름을 광학장치에 삽입하고 필름의 측면을 통하여 확산되는 광량을 측정한 결과 238 mV 정도의 미세한 플러스 값의 차이를 검출할 수 있었고 실질적인 광량 변화 검출 단계에서 기대하였던 결과를 도출해 내는 데는 미흡한 것으로 보임
- ④ <그림 10>은 같이 thin film을 광학장치에 삽입하여 광량의 변화를 검출한 것으로 측정 결과가 각 광량의 변화에 대한 검출이 가능함을 확인할 수 있음.
- ⑤ <그림 10>과 같이 변화량이 양(+)의 값으로 변하는 것은 검출된 광량의 변화가 필름이 삽입되었을 경우 낮아지는 특성이 있으나 프로세싱과정에서 data 값을 정확하고 쉬운 방법으로 처리하기 위하여 역수변환을 취하였기 때문에 양(+)의 값을 가지도록 함.

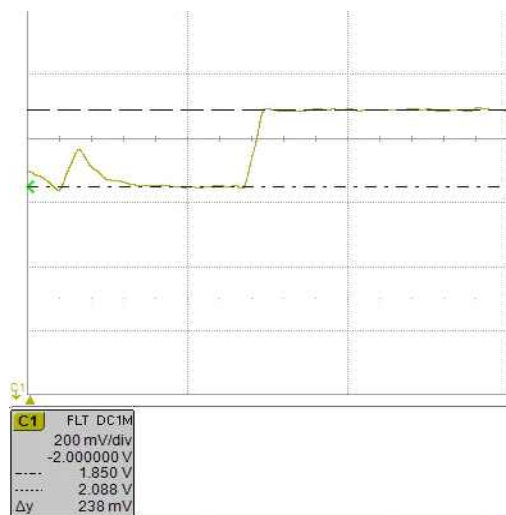


그림 58. Thin film 투명도 시험 전압 파형 (Lecroy 4034)

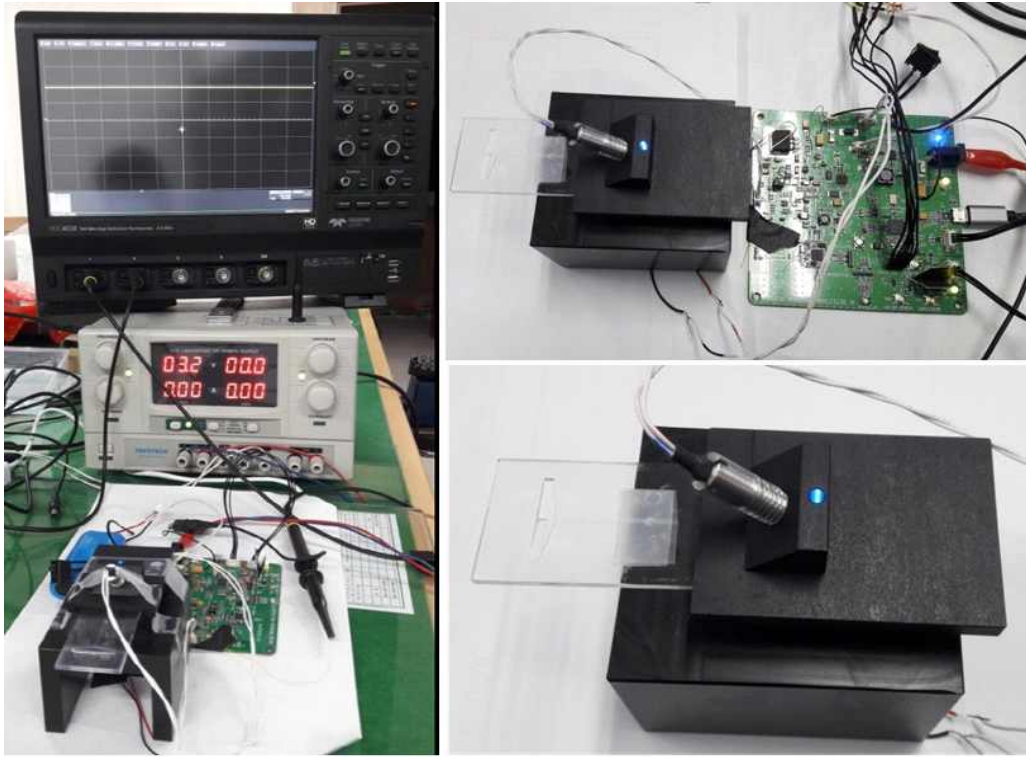


그림 59. 프로토타입 광 측정 장치 민감도 테스트 사진

- ⑥ 사전 장비의 광량 검출 가능 여부를 확인하기 위하여 표5와 같이 2차로 40 μm 반 투명 Tape (3M)를 이용하여 플라스틱 kit위에 1층에서 5층까지 테이핑 적층하여 각 두께 별 광량 (전압)의 변화를 측정함.
- ⑦ 측정 장비는 Lecroy사 Oscilloscope 4034를 사용 하였고, No signal 조건(Output Volotag1.82V) 에서 측정 하였으며, 표 1과 같이 층의 두께 변화(40, 80, 120, 160, 200 μm)에 의한 광량 (전압) 변화를 집계함. 그림 60 는 상관 분석한 결과로 그 결정 계수 (R^2) 값이 약 90% 정도를 나타내고 있어 광학 장치가 반투명 Tape 두께에 의한 광량 변화를 어느 정도 검출해 내고 있음을 확인 할 수 있음.

(단위:V)

시료수 \ 두께	Blank	40 μm	80 μm	120 μm	160 μm	200 μm
1	2.06	2.438	2.756	2.938	3.09	3.174
2	2.08	2.444	2.74	2.948	3.09	3.18
3	2.078	2.48	2.748	2.948	3.092	3.176
4	2.072	2.49	2.748	2.964	3.1	3.174
5	2.078	2.48	2.754	2.96	3.094	3.178
6	2.068	2.498	2.74	2.978	3.098	3.182
7	2.056	2.496	2.748	2.97	3.094	3.188
8	2.058	2.504	2.754	2.964	3.094	3.182
9	2.066	2.494	2.76	2.972	3.1	3.184
10	2.06	2.492	2.754	2.982	3.102	3.18
11	2.056	2.5	2.748	2.974	3.108	3.174
평균	2.067	2.483	2.750	2.963	3.097	3.179
표준편차	0.009256	0.0222	0.006325	0.013859	0.005592	0.004585

표 5. 반투명 3M 테이프 두께별 광량 (전압) 변화 수치 결과

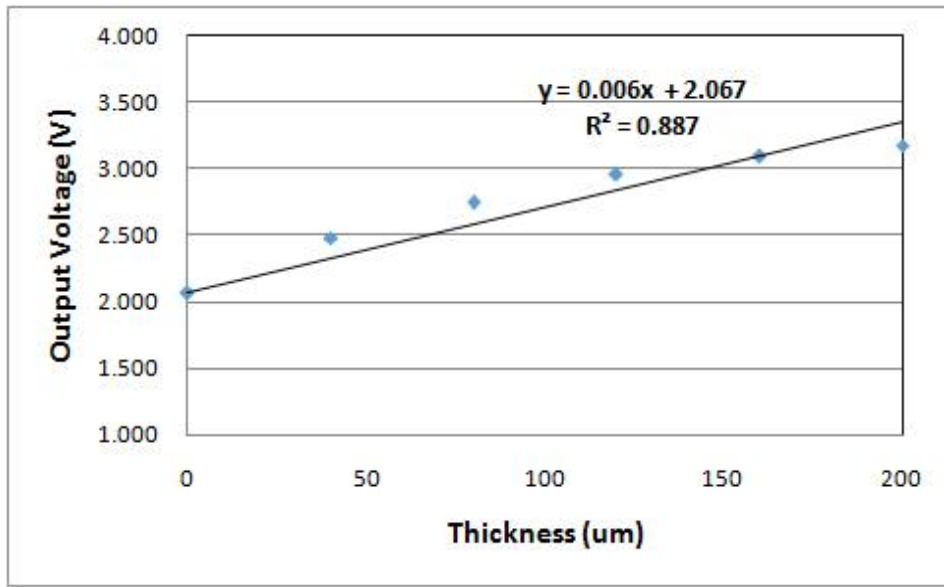


그림 60. 반투명 3M 테이프 두께별 광량 (전압) 상관성 분석 결과

(2) 상용 비드 시험

- ① 광학장치 자체의 광 검출 가능성을 확인하기 위하여 시중에 판매중인 Magsphere사 420nm Carboxylated PS superparamagnetic particle을 이용하여 그림 11과 같이 2 ϕ *2T 주입구를 가진 플라스틱 키트에 PBS(1X*7.4)에 희석한 농도(0,0.01,0.03, 0.06,0.125,0.25%) 입자 2 μl 씩을 주입하여 광세기 변화 측정을 위한 광량(전압)을 측정함.
- ② 그 결과, 그림 13과 같이 입자 농도별 출력 전압이 직선성을 보이며 입자 농도 변화에 의한 광량(전압) 변화를 상관 분석한 결과 결정 계수가 약 96%를 보이고 있어 장비가 입자 농도 변화에 의한 광량(전압) 값을 잘 검출하고 있는 것으로 확인할 수 있었다.

실제 면역 입자 생성에 의한 산란광의 측정은 반응 입자의 크기, 광 파장 조건, 광 연결 기구물, 발광소자와 포토센서의 거리 및 센싱 위치 등 다양한 변수로 인하여 측정 결과가 변화될 수 있을 것으로 예상 되는바 추후 최적화 작업이 필요할 것으로 보임.

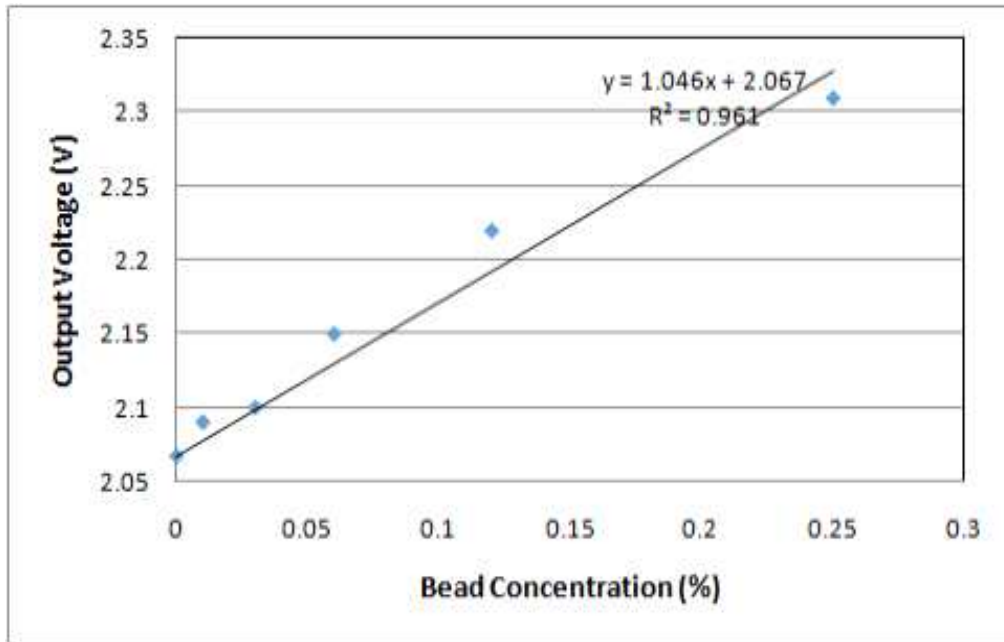


그림 61. 입자 농도별 광량(전압) 상관성 분석 결과

- ③ <그림 14>는 410 mV 정도의 광량의 변화가 검출 되었으나 기대하였던 검출 광량의 변화가 투명필름에 비하여 차광효과가 크게 나타났음을 확인할 수 있음.
- ④ 이와 같은 방법으로 광학장치의 광원 변화량의 검출이 가능함을 확인하였으며 검출 광원량의 변화량 정도에 대한 기구 및 회로 개선을 통한 그 변별력을 향상시킨 후 보다 안정하고 최적화된 광학장치를 개발하여 산란 광량을 실측할 때와의 차이점을 적절히 접목할 경우, 보다 정확한 광원변화량의 검출이 가능한 광학장치의 설계진행에 반영할 수 있을 것으로 예상됨.

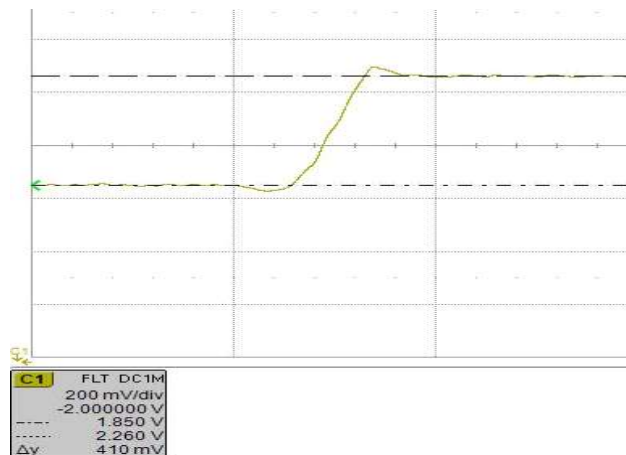


그림 62. Magnetic particle 광 변화 시험 전압 파형

(3) 수광부 검출력 시험

- ① 광케이블과 포토다이오드 센서를 동시에 적용한 수광부와 포토다이오드만을 이용하는 수광부의 검출력을 비교 검증하여 보다 우수한 검출 센서를 선정하기 위하여 시험함.
- ② 사전에 준비한 383 nm 입자 (Carboxylated PS/Aptamer H5N1 1-28)와 일정 항원 농도(106 EID50/ml)의 용액을 사용하여 유체칩에 주입 후 응집반응에 의한 산란광의 전압 양을 측정함. 이때 용액의 혼합비는 입자의 경우 25 μl 와 상기 항원 25 μl 를 혼합한 후, 유체칩에 로딩하여 응집 반응에 대한 각각 적용 센서들의 전압 크기를 비교 평가함.
- ③ 응집반응에 의한 산란치 전압을 확인한 결과, 시스템에서 포토다이오드 센서만을 사용한 수광부는 약 227 mV의 검출 전압을 보이고 광케이블과 포토다이오드를 모두 사용한 수광부는 약 144 mV의 검출 전압을 나타내고 있어서 포토다이오드만 사용한 것이 약 37% 이상의 검출력 향상 결과를 나타내어 당사의 조류독감 응집 인자의 산란광 측정용 프로토타입 시스템에서는 포토다이오드를 직접 검출 수광부로 선정 적용키로 결정함.

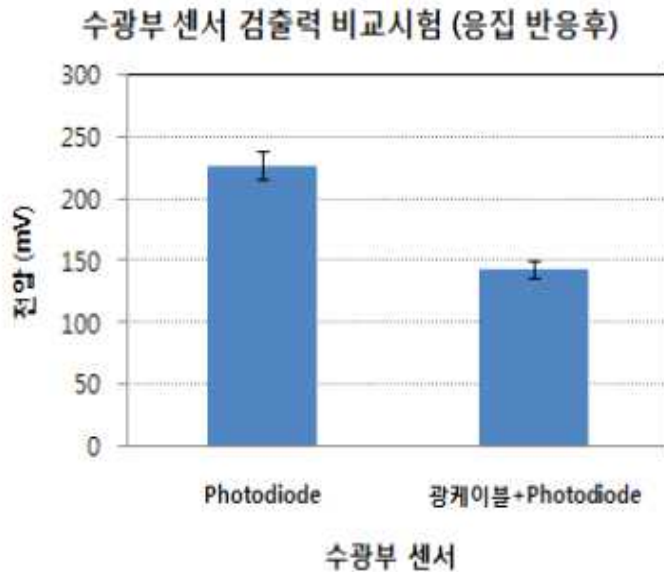


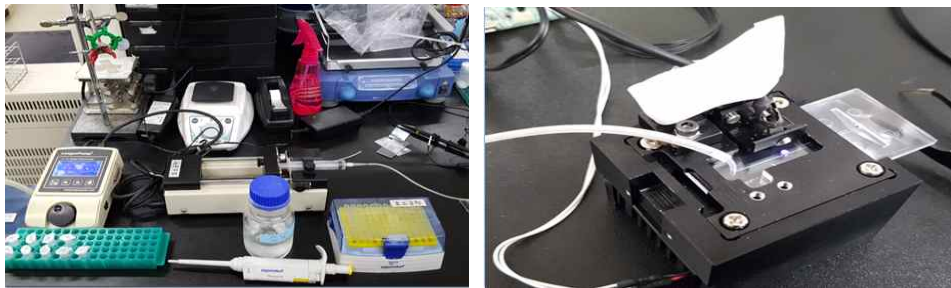
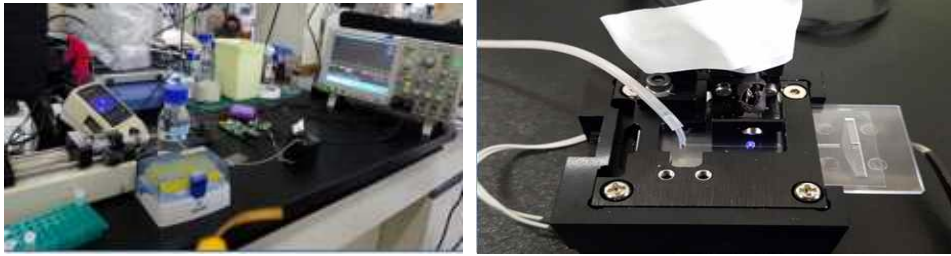
그림 63. 시스템 수광부 센서별 검출력 비교 시험 결과

(4) 입자별 검출력 시험

- ① 당사에서 개발 제작한 산란광 검출용 pilot 시스템을 사용하여 입자 크기별 산란 광량을 측정함.
- ② 유체칩을 당사 시스템에 삽입 후, 380nm LED 광원이 유체칩의 뷰셀 정중앙을 통과 하도록 조정 하였고 수광부는 상하좌우 미세 조정 조리개를 사용하여 45도 각도로 측정 할 수 있도록 고정함.
- ③ 시험에 적용한 입자의 크기는 0, 0.3, 0.38, 0.5, 0.6, 0.8, 0.9, 1.1, 2, 3 μm 이고 각 입자의 농도는 0.011% 를 사용하여 측정함.
- ④ 입자 크기별 산란광을 측정한 결과 입자 크기가 0.5 μm 까지는 산란 광량이 상승하였고 0.6 μm 에서 0.8 μm 까지는 파동 현상을 보이다 그 이후 입자가 커짐에 따라 산란 광량이 감소하는 경향을 보임.

⑤ 따라서, 서울대 연구 결과와 같이 당사 시스템은 낮은 농도의 조류독감 항원과 정성 분석 용으로 측정하기 위한 용도에는 부합 할 것으로 생각됨.

(a)



(b)

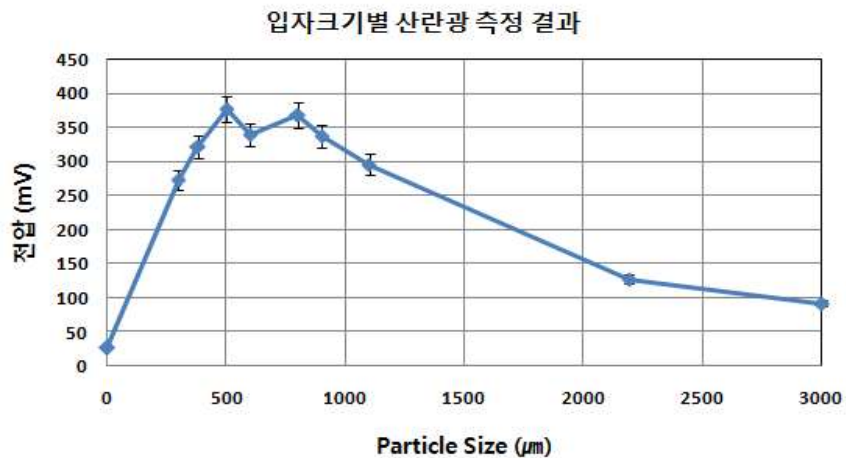


그림 64. (a) 산란광 측정 시스템 (b) 입자크기별 유체칩 산란광 측정 결과

나. 최종 시스템 조류인플루엔자 검출 시험 결과

: 서울대 프로토콜 기준으로 H5N1 항원과 PBS를 입자 시약과 혼합 후 산란광 측정함.

(1) 1차 농도별 검출력 시험 준비

① 한양대에서 개발한 H5N1(2-25) 서열 기준으로 제조한 aptamer(Aptamer:APT)를 준비 한다.

* H5N1 (2-25): [C6 Amine] CCGCGCGGGTCTGAGGAGTGCGCGG - 100uM

② 서울대 수의과 대학에서 약독화 시켜 제공한 H5N1 항원 용액(5~8도 보관)을 준비 한다.

* H5N1 (2-25): 항원 농도 - 10^8 (EID₅₀/ml) (SNU50-5)

③ 입자 크기가 383 nm인 PS(Polystyrene) 나노 입자를 준비한다.

* PS : BangsLab-10% PS nano particle

- ④ 30 ml Vial에 압타머(100 uM) 3 μ l, PS 나노 입자(10%) 12 μ l 와 PBS(pH 7.4) 2,986.5 μ l를 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C Incubator 에서 2시간 동안 3D Rotor를 이용하여 shaking 하면서 압타머를 PS 입자에 결합(APT/PS)시킨다.
- ⑤ 합성 후 원심분리기를 이용 하여 4,600 rpm에서 5분간 원심 분리 후 상층액을 제거 하여 PS 입자 표면에 결합되지 않은 압타머를 제거한다. 이 과정을 3회 반복한다.
- ⑥ 항원 농도 10⁸ EID₅₀/ml를 1 ml 취하여 PBS(1X, pH7.4)를 사용하여 10배씩 희석 하여 PBS Base line 과 H5N1항원 농도, PBS(1X, pH7.4) (0), 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ (EID₅₀/ml) 총 14종을 준비 한다.
- ⑦ 면역입자 응집반응의 산란광 측정
 - 유체칩에 PBS(1X, pH7.4) (0) 25 μ l와 APT/PS 25 μ l를 혼합하여 혼합액 50 μ l를 칩 Inlet 부에 주입 후 유속 25 μ l/min 속도로 시린지 펌프를 이용하여 흘리면서 산란광을 측정한다. (PBS (0) - Base Line)
 - 항원 농도는 낮은 농도부터 상기 PBS(0)와 동일한 양과 방법으로 혼합하여 칩에 주입 하여 산란광을 측정 한다. (항원 13종 - 측정 샘플)
 - 준비해야할 시약의 양을 증가해야 할 경우, 항원 혹은 PBS 대비 APT/PS의 비율은 1:1의 양으로 혼합하여 주입 후 산란광을 측정한다.
 - 각각의 PBS base line과 항원 농도별로 1초 단위로 2분간 측정 하여 그 ADC(Analog Digital Converter) 값을 측정하여 농도별 120개 데이터의 평균값과 표준편차 값을 계산한다.

(2) 1차 농도별 검출력 시험 결과

① 산란광 측정 결과

표 6은 PBS base line과 H5N1 항원 샘플 13종(0 & 10⁻⁴ - 10⁸ EID₅₀/ml) 각각의 농도에 대하여 측정한 120개 데이터의 평균값과 표준편차 값을 나타내고 있는데 각 농도별 평균값 대비 표준편차 값이 1이하로 매우 낮은 편차 값을 보였다. 그림 65는 H5N1 항원 농도별 APT/PS 입자와의 응집 반응에 대하여 380 nm LED Light Source 에 대한 그 산란광의 변화를 나타내고 있다. 그 결과 ADC 값이 Base line PBS(0) 대비하여 항원 10⁻⁴~10⁻³ EID₅₀/ml의 경우, 평균 약 2~6의 차이를 보이고 Slope가 급격히 상승하는 모양을 나타나고 있는데 이것은 항원과 APT/PS 사이의 높은 생물학적 면역 반응에 의한 응집 입자의 발생으로 인한 것으로 생각된다. 10⁻²~10⁻¹ EID₅₀/ml은 약 3~5의 차이를 보여 항원 10⁻³ EID₅₀/ml 대비 ADC 값이 약간 감소하는 경향을 보였다. 특이하게 10¹ EID₅₀/ml은 Base line과 비슷한 수준의 ADC 값을 나타내면서 떨어지는 현상이 발생하였는데 이것은 항원이 APT/PS와 응집 시 2개, 3개등 다량의 응집 입자가 형성됨으로 인하여 산란이 감소됨으로서 그 값이 떨어지는 것으로 예상된다. 항원농도 10²의 경우 다시 상승하여 약의 3의 차이를 보였고 10³~10⁷ EID₅₀/ml 범위에서는 Base line 대비 다시 크게 상승하여 ADC 값이 최대 약 9정도 상승함을 확인하였다. 항원농도 10⁸ EID₅₀/ml의 경우 Base line보다 ADC 값이 떨어지는 경향을 보였는데 이것은 입자와 항원간의 비특이적 응집 반응에 의해 다량의 항원이 입자에 결합함으

로서 Light Source가 그 입자들로 인하여 검출부(포토센서)로 산란되지 못하여 발생한 것으로 생각된다. 따라서 이 결과를 바탕으로 본 연구에서 개발된 휴대형 조류인플루엔자 시스템의 상기 시험 조건의 H5N1 항원농도에서 대하여 항원을 정성적으로 검출할 수 있을 것으로 판단한다.

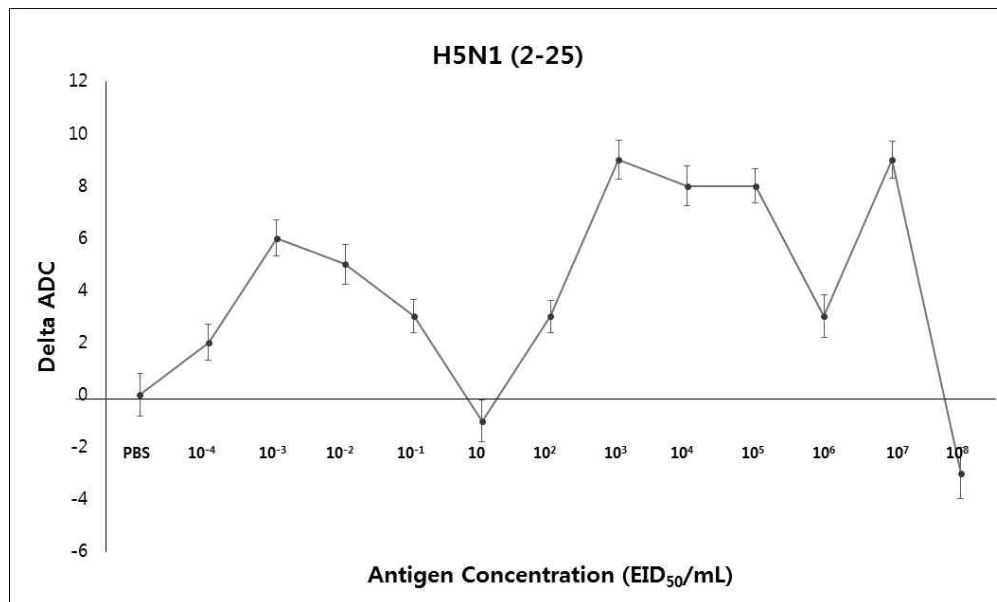


그림 65. H5N1 항원 농도별 응집 산란광에 의한 ADC 값의 변화 그래프(1차)

(3) 2차 농도별 검출력 시험 준비

① 2차 시험은 1차 농도별 검출력 시험 준비의 ①~⑥과 동일한 방법으로 준비 한다.

② 면역입자 응집반응의 산란광 측정

- 유체칩에 PBS(1X, pH7.4) (0) 25 μ l와 APT/PS 25 μ l를 혼합하여 혼합액 50 μ l를 칩 Inlet 부에 주입 후 시린지를 이용하여 View Cell 위치로 이동시킨 후 산란광을 측정한다. (PBS (0) - Base Line)
- 항원 농도는 낮은 농도부터 상기 PBS(0)와 동일한 양과 방법으로 혼합하여 칩에 주입 하여 산란광을 측정 한다. (항원 13종 - 측정 샘플)
- 준비해야할 시약의 양을 증가해야 할 경우, 항원 혹은 PBS 대비 APT/PS의 비율은 1:1의 양으로 혼합하여 주입 후 산란광을 측정한다.
- 각각의 PBS base line과 항원 농도별로 1초 단위로 2분간 측정 하여 그 ADC(Analog Digital Converter) 값을 측정하여 농도별 120개 데이터의 평균값과 표준편차 값을 계산한다.

(4) 2차 농도별 검출력 시험 결과

① 산란광 측정 결과

표 7은 1차 검출 시험과 동일한 방법과 상기 2차 산란광 측정 조건에서 측정한 ADC 120개 데이터의 평균값과 표준편차 값을 보이고 있는데 항원 농도 10⁵ EID₅₀/ml 이외의

각 항원 농도별 ADC의 표준편차 값이 0.6~3.0 이하로 매우 낮은 편차 값을 보였다. 그림 66은 H5N1 항원 농도별 APT/PS 입자와의 응집 반응에 대하여 광원에 대한 산란광의 변화를 ADC 값으로 나타내었다. 1차 결과와 유사하게 항원 농도 10^{-4} ~ 10^{-3} EID₅₀/ml에서 ADC 값이 Base line 대비하여 각각 약 11~17로 상승 하였는데 이 값은 1차 검출 시험 결과 대비 약 2배 정도 상승한 결과를 보였다. 항원 농도 10^{-2} ~ 10^5 범위의 경우 약 10~17의 ADC 값의 변화를 나타내었고 10^6 ~ 10^8 EID₅₀/ml 은 Base line 보다 낮은 결과를 나타내었다. 따라서 이 결과를 기초로 Base line PBS(0) 대비하여 항원농도 10^{-4} ~ 10^5 EID₅₀/ml 범위에서 ADC 값이 약 10~17 정도의 차이를 보이고 있어 개발된 휴대형 시스템이 상기 범위에서 충분히 조류독감 항원을 정성적으로 구분해 내고 있음을 확인 할 수 있었다.

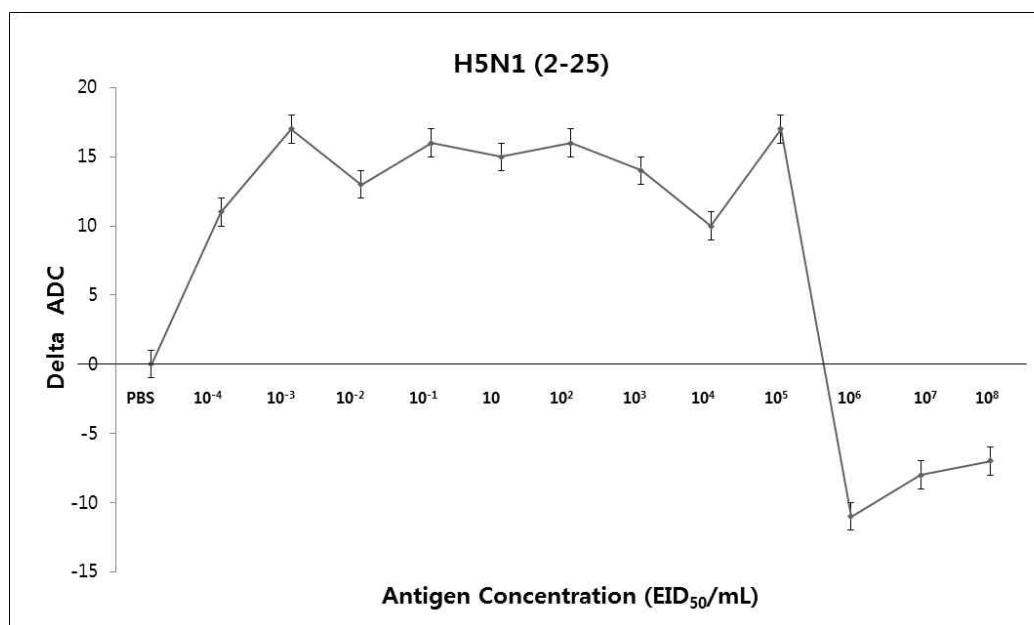


그림 66. H5N1 항원 농도별 응집 산란광에 의한 ADC 값의 변화 그래프(2차)

(5) 3차 농도별 검출력 시험 준비

- ① 3차 시험은 2차 농도별 검출력 시험 준비의 ①~⑥과 동일한 방법으로 준비 한다.
- ② 면역입자 응집반응의 산란광 측정은 2차의 측정법과 동일한 방법으로 수행 한다.

(6) 3차 농도별 검출력 시험 결과

표 8은 상기의 2차 검출 시험과 동일한 방법 및 측정 조건에서 측정한 ADC 120개 데이터의 평균값과 표준편차 값을 보이고 있는데 각 항원 농도별 ADC의 표준편차 값이 1.4 이하로 매우 낮은 편차 값을 나타냈다. 그림 66은 항원 응집에 의한 광원의 산란광 변화를 낸 것으로 2차 결과와 비슷하게 항원 농도 10^{-4} 과 10^{-3} EID₅₀/ml 두 가지 농도에서 모두 ADC 값이 Base line 대비하여 약 8 상승한 결과를 보였고 항원 농도 10^{-2} ~ 10^8 EID₅₀/ml 범위에서는 ADC 값이 약 4~12 정도 상승한 결과를 나타냈다. 따라서 2, 3차 결과를 기준으로 해서 생산 ENG에서 개발한 휴대형 조류독감 시스템은 측정시의 Base line PBS(0) 대비하여 10^{-4} ~ 10^5 범위 혹은 10^{-4} ~ 10^8 항원농도 범위에서 충분

히 조류독감 H5N1 항원을 정성적으로 구분할 수 있음을 확인 하였다. 따라서 1~3차 농도별 검출력 시험 결과를 바탕으로 검출 한계는 Delta ADC 값(Threshold) 3을 기준으로 약 10^{-3} EID₅₀/ml 으로 확인 되었고 정성 분석을 위한 그 Threshold 값을 3 으로 결정하여 스마트 폰 앱 기반 조류독감 정성 분석을 수행 하였다.

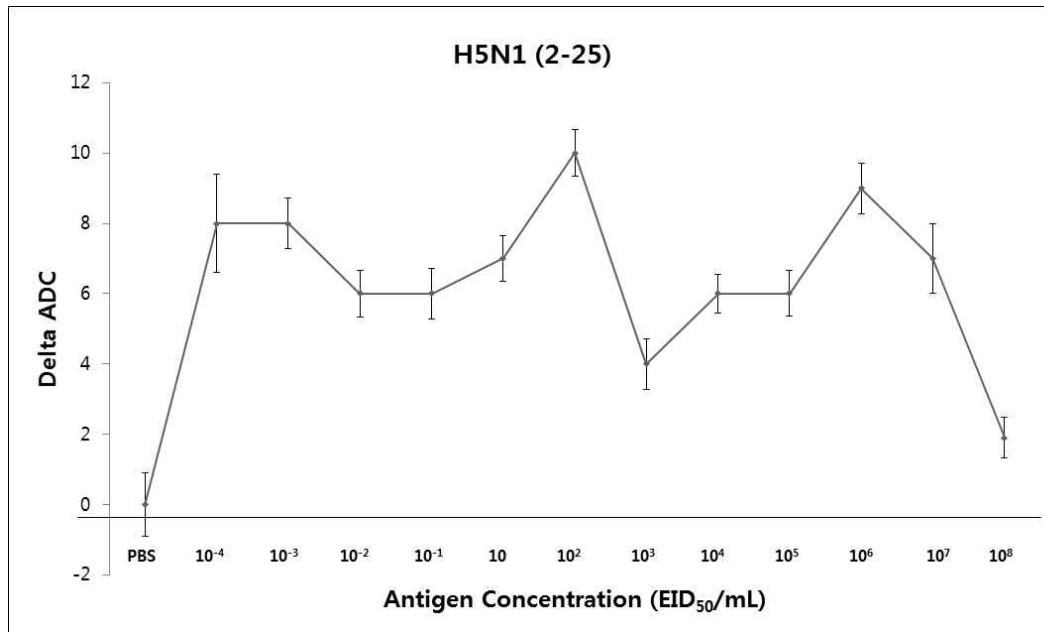


그림 67. H5N1 항원 농도별 응집 산란광에 의한 ADC 값의 변화 그래프(3차)

(7) 스마트폰 앱(App) 기반 조류독감 진단 시스템 시험

① 휴대형 진단 시스템 내부 모형



그림 68. 개발된 스마트폰 앱과 진단 시스템 내부 사진

② 항원 농도별 양성/음성 검출 시험 프로세스

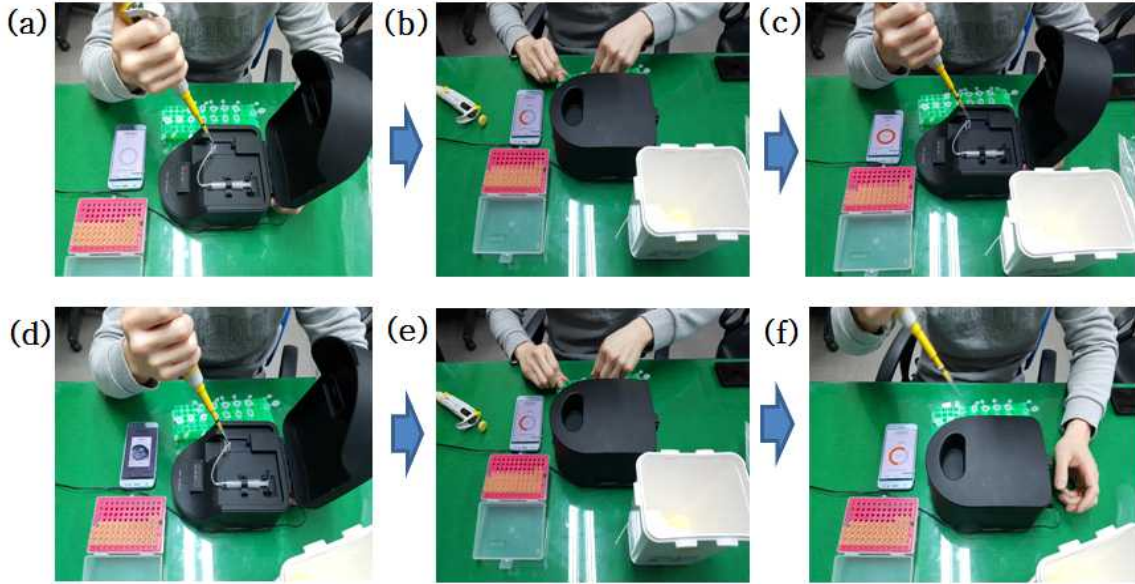


그림 69. 개발된 스마트폰 앱과 디바이스 간의 통신 기반 항원 검출 사진 :

(a) PBS(0)주입 (b)시스템 커버 닫고 측정 (c) 양성/음성 결과 확인 (d) 항원 샘플 주입
 (e) 시스템 커버 닫고 측정 (f) 양성/음성 결과 확인

㉞ 3차 농도별 검출력 시험과 동일한 방법으로 APT/PS 시약 및 농도별 항원을 준비한 후, 스마트폰 앱(App)에서 산란광을 측정 한다.

㉟ 스마트폰 App 산란광 측정 순서

- 스마트폰에서 앱을 실행 한 후, 앱 상에서 진단 시작을 누른다.
- 앱 상의 칩 삽입 문구가 나오면 유체칩을 측정 장비에 장착 한다.
- PBS(항원 0: PBS 25 μ l+APT/PS 25 μ l) 50 μ l을 실린지를 이용하여 유체칩의 View Cell 까지 이동 시킨다.
- 시스템의 커버를 닫고 앱 상의 시작 버튼을 눌러 Base Line PBS(항원 0)의 ADC 값을 읽는다.
- 1차 종료 후 앱 상에 시작 화면이 다시 화면이 나온다.
- 실린지를 이용하여 유체칩 내부에 채워진 PBS (항원: 0)의 액을 제거 시킨다.
- 항원(항원 10^{-4} 25 μ l+APT/PS 25 μ l) 50 μ l을 실린지를 이용하여 유체칩의 View Cell 까지 이동 시킨다.
- 앱 상의 시작 버튼을 눌러 항원의 ADC 값을 읽는다.
- 앱 상의 ADC 값 및 양성/음성 유무를 확인한다.
- 상기와 동일한 양과 방법으로 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 (EID₅₀/ml)의 항원 농도를 측정한다.

㊱ 항원 농도별 양성/음성 검출 시험 결과

그림 69는 유체칩을 상기와 같이 시스템 내 부에 장착하고 혼합 시약을 주입 한 후 면역 반응 응집 산란광을 본 연구에서 개발된 스마트폰 앱을 활용하여 측정하여 조류독감 항원의 존재 유무를 확인한 사진이다. 스마트폰 블루투스 통신으로 측정한 PBS (항원: 0)

와 항원 농도(10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 EID50/ml)별 양성 및 음성 결과를 나타내고 있다. 따라서 스마트폰 앱은 항원이 0 인 상태(음성) 대비해서 상기 농도별 항원 농도에 대해 양성과 음성으로 잘 구분하여 표시하고 있어 성산 ENG에서 개발한 시스템과 스마트폰 앱을 이용하여 시험자가 정성적으로 조류 독감의 유무 판단을 할 수 있을 것으로 사료된다.

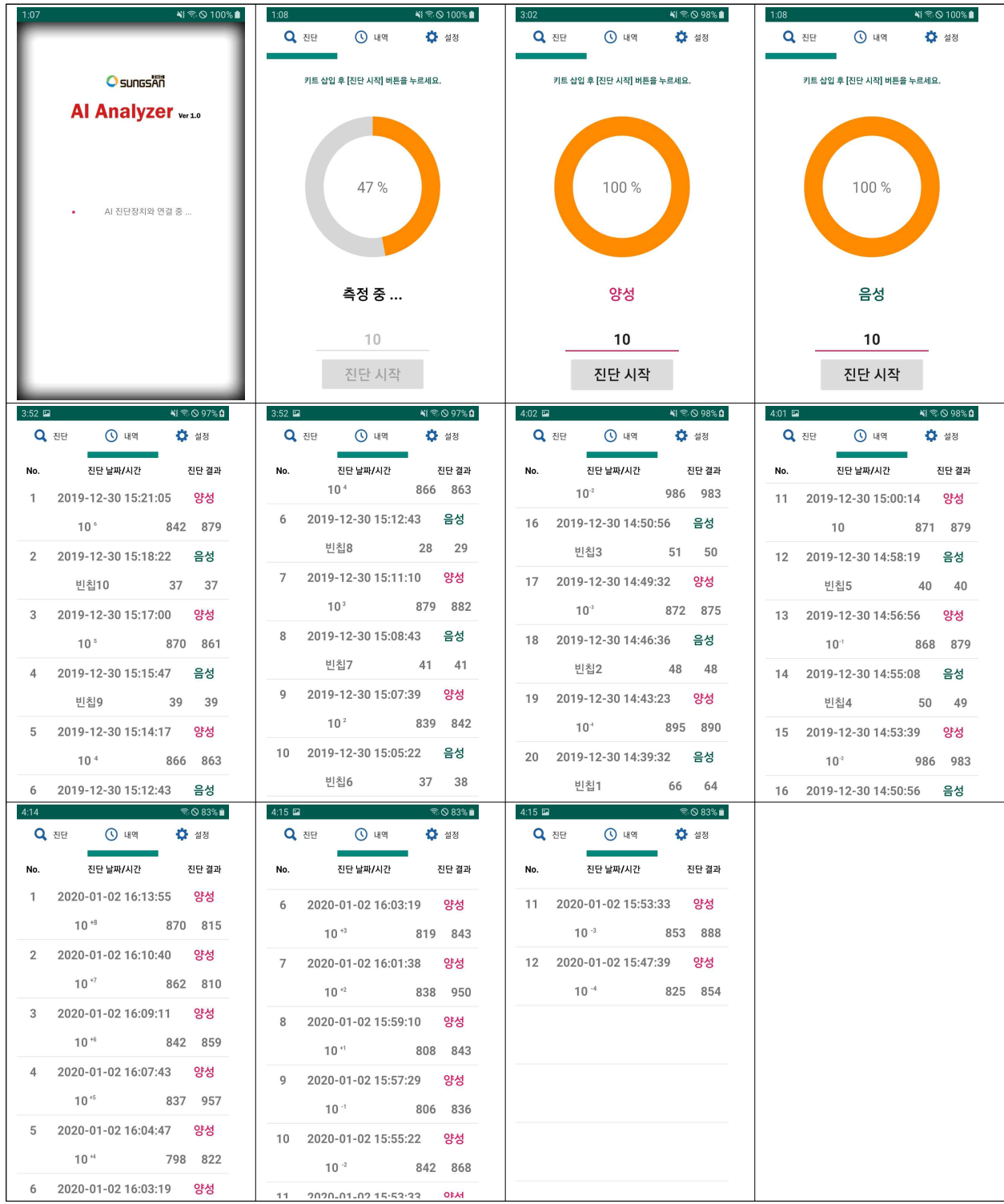


그림 70. 개발된 스마트폰 앱과 디바이스 간의 통신 기반 항원 유무 검출 결과

○ 기관별 수행 내역 (협동연구기관 : 서울대학교)

1. 면역응집 반응 측정을 위한 시스템 구성

가. 입자면역응집반응 산란광 측정에 사용가능한 LED 광원 및 응집입자 검토

(1) 호환 가능한 LED 광원 종류 및 파장

① LS-450 light source 호환 LED bulb 조사

② 표 1을 참고하여, LED Bulb : 380, 395, 470, 518, 590, 640 nm 광원들은 호환이 가능

표 6. LED광원 스펙 및 파장과 호환성 조사

Bulb	Bulb type	compatible light source model(s)
LED-380	LED, 380 nm	LS-450 series, LS-LED
MLA-LED-380	LED, 380 nm	LLS, MCLS
LED-395	LED, 395 nm	LS-450 series, LS-LED
MLA-LED-395	LED, 395 nm	LLS, MCLS
LED-470	LED, 470 nm	LS-450 series, LS-LED
MLA-LED-470	LED, 470 nm	LLS, MCLS
LED-518	LED, 518 nm	LS-450 series, LS-LED
MLA-LED-518	LED, 518 nm	LLS, MCLS
LED-590	LED, 590 nm	LS-450 series, LS-LED
MLA-LED-590	LED, 590 nm	LLS, MCLS
LED-640	LED, 640 nm	LS-450 series, LS-LED
MLA-LED-640	LED, 640 nm	LLS, MCLS
LED-WHITE	LED, broadband white	LS-450 series, LS-LED
LED-KIT	LED, Kit of 380, 430, 518, 590, & 640 nm	LS-450 series, LS-LED

(2) 산란광 측정용 magnetic Particles size 조사

① 최적 산란광 측정을 위해 다양한 크기의 자성 입자를 검토 구입

제조사	파티클 크기 (nm)	홈페이지
chemicell	50, 100, 200, 500, 750, 1000	www.chemicell.com
bangs laboratories	1000	www.bangslabs.com
spherotech	100-390, 400-690	www.spherotech.com
sigma-aldrich	1000	www.sigmaaldrich.com
creative diagnostics	50, 75, 100, 150, 200, 500, 1000	www.cd-bioparticles.com

나. 입자면역응집반응 측정을 위한 미세 유체칩 설계 및 제조

(1) 산란광 측정용 미세유체칩 기본 설계

① 면역응집 반응 입자 및 샘플을 흘려보낼 수 있는 미세유체칩을 설계하기 위해 최적의 채널 사이즈를 검토하기 위해 양면테이프를 이용하여 간이 칩을 제작하고 슬라이드글라스를 접합하여 채널을 다음 그림과 같이 제작하였다. 기본적인 채널 폭은 0.5~1mm,

채널 높이는 0.10~0.16mm이다.

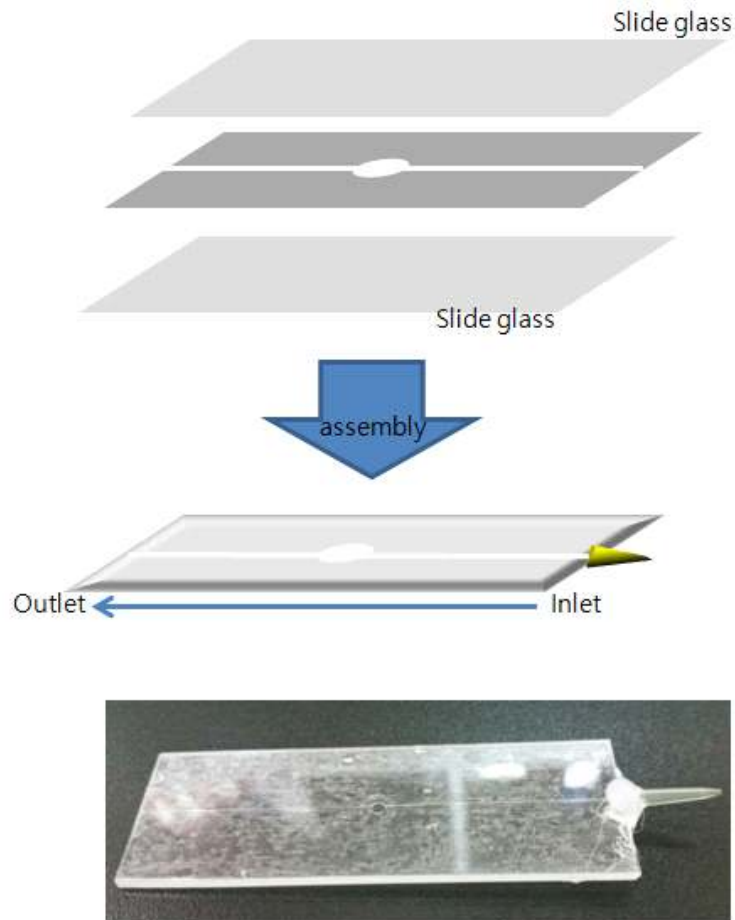


그림 71. 사출성형 설계용 미세 유체 칩 제조과정 및 완성품

(2) 사출성형 칩 설계용 간이 미세유체 칩 성능

- ① 제작한 간이 미세유체칩을 syringe pump에 연결하고, 산란광을 측정을 위한 입자 및 샘플의 이동을 위한 최적 유량을 선택하기 위해 다양한 유속으로 최적 유량을 검토 하였다. (유속; 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 ml/min)
- ② Leaking과 산란광 측정에 영향을 미치는 버블의 발생 유무를 검토하기 위해 calcein 용액을 이용하여 각각의 유속에서 버블의 발생정도를 조사하였다. 유속별로 조금씩 차이는 있지만, 다음 그림 2의 결과와 같이 샘플 용액이 흐르기 시작 후 3~4초 사이에 버블이 발생하였지만, 산란광 측정 채널을 지나면서 버블이 모두 제거 되었다.
- ③ 버블 제거를 위해 원형으로 설계한 측정 창으로 인해 사출성형용 미세유체칩 설계에 반영이 가능함.

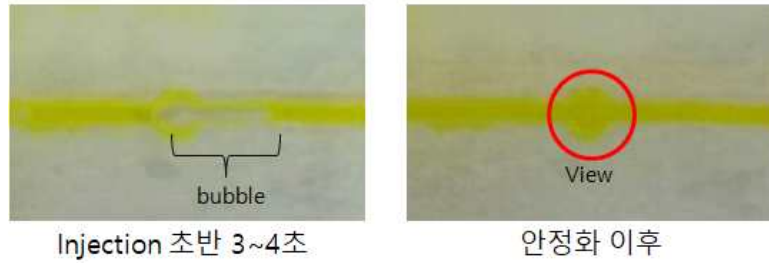


그림 72. 설계용 미세유체칩 leaking and bubble 발생결과

2. 면역응집반응용 자가응집 방지 진단 입자 개발

가. 마이크로 자성 입자의 자가응집현상

(1) 기존 자성 입자를 이용한 O157대장균 검출 결과

- ① O157 특이 압타머를 부착한 면역 입자의 경우, 압타머와 O157대장균과 특이적으로 결합하여 이들 입자들이 뭉치는 현상이 발생한다. 이 때 산란광을 측정하면, 단일 입자에서 응집된 여러 개의 입자로 인해 증가하는 산란광을 측정함으로써 검출대상의 유무를 판단함
- ② 하지만, 실제 검체와 반응과 무관하게 입자간 자가응집이 일어나는 경우로 인해 검출 대상 샘플이 없는 경우에도 오류 신호를 감지 할 수 있어, 자가 반응을 최대한 억제할 필요가 있음.
- ③ 다음은 O157 압타머 수식 자성입자를 이용한 입자간 응집현상을 관찰한 결과로, 30분 이상 경과 하면 입자간 응집현상이 급격히 증가함을 알 수 있다.

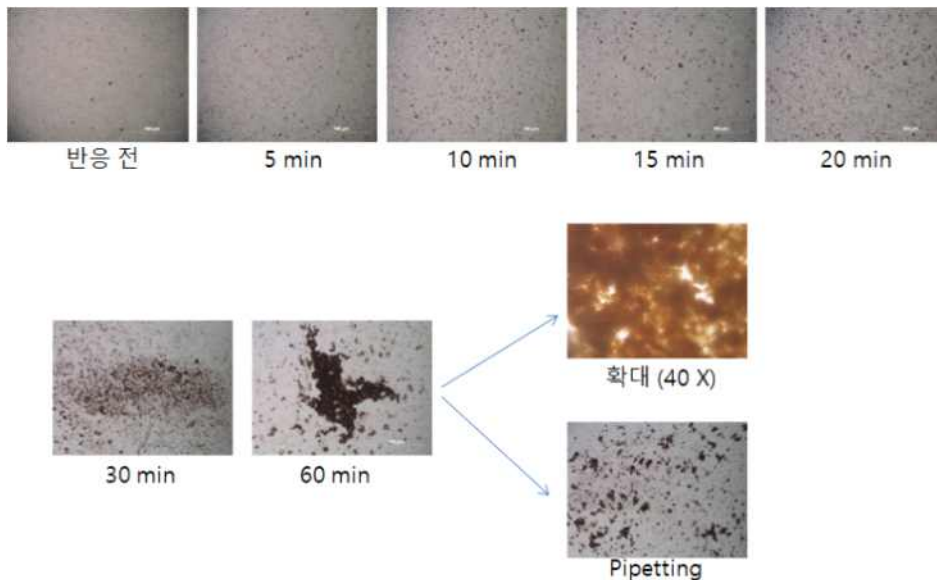


그림 73. O157 압타머를 부착한 마그네틱 파티클의 타겟 반응 시 현미경 결과

- ④ 500 nm 크기의 입자도 응집반응이 일어나면 일반 광학 현미경(10X 대물렌즈)으로도

확인이 가능함

(2) 마이크로 자성 입자의 자가응집 현상 검토

- ① 마이크로 입자에 압타머 결합 후, 타겟 반응여부에 따라 응집되는 결과를 현미경으로 확인한다. 실험의 오차를 고려해 3회 반복하여 실험진행
- ② 같은 방법으로 마이크로 입자에 압타머 결합 후, 타겟 반응하지 않은 샘플을 일정기간 동안 (~ 3days) 보관하여, 자가응집 여부를 확인

(3) 압타머 부착 자성 입자의 자가응집 현상 검토

- ① 자성 입자 (크기; 500 nm)에 thrombin aptamer (100 μ M)을 결합
- ② 증류수 990 μ l에 자성입자 첨가 후, 초음파 분쇄장치를 이용 균질하게 분산시킨 다음 트롬빈 압타머 넣고 반응을 시킴 (Incubation 2 hr at 37 $^{\circ}$ C)
- ③ 자석을 이용해 마그네틱 파티클을 한쪽으로 모은 다음, 기우려 증류수를 제거, 다시 증류수 1 ml를 넣고 피펫으로 재 분산 시키는 과정을 반복하여 결합되지 않은 압타머나 불순물을 제거함
- ④ 증류수를 이용 재 분산 시킨 샘플을 냉장보관 하며, 시간에 따라 현미경으로 자가응집 여부를 확인
- ⑤ 압타머의 유무에 따라 응집반응 현상을 조사하기 위해 순수한 자성입자 샘플도 같은 조건으로 조사함

(4) 시간경과에 따른 압타머 부착 자성 입자의 자가응집 확인

- ① 다음 그림에서와 같이 자성입자 단독으로 존재할 경우 3일 동안 자가응집 현상은 없는 것으로 보임
- ② 자성입자에 압타머를 수식한 입자의 경우 하루 만에 응집 된 입자들이 관찰 되며, 3일이 되면 단독으로 존재하는 입자의 수가 크게 줄어들음을 알 수 있다.
- ③ 특히, 3일차에 자가 응집된 압타머 수식 자성입자의 경우 타겟 물질인 트롬빈이 존재하지 않음에도 불구하고 존재한 반응(60분간 반응시킨 결과)과 비슷할 정도의 자가응집 및 산란광을 확인 할 수 있다.
- ④ Vortex mixing 또는 sonication 방법으로 이와 같이 자가 응집이 일어난 입자들을 분산 시킬 수 있는지 확인하고자 함.

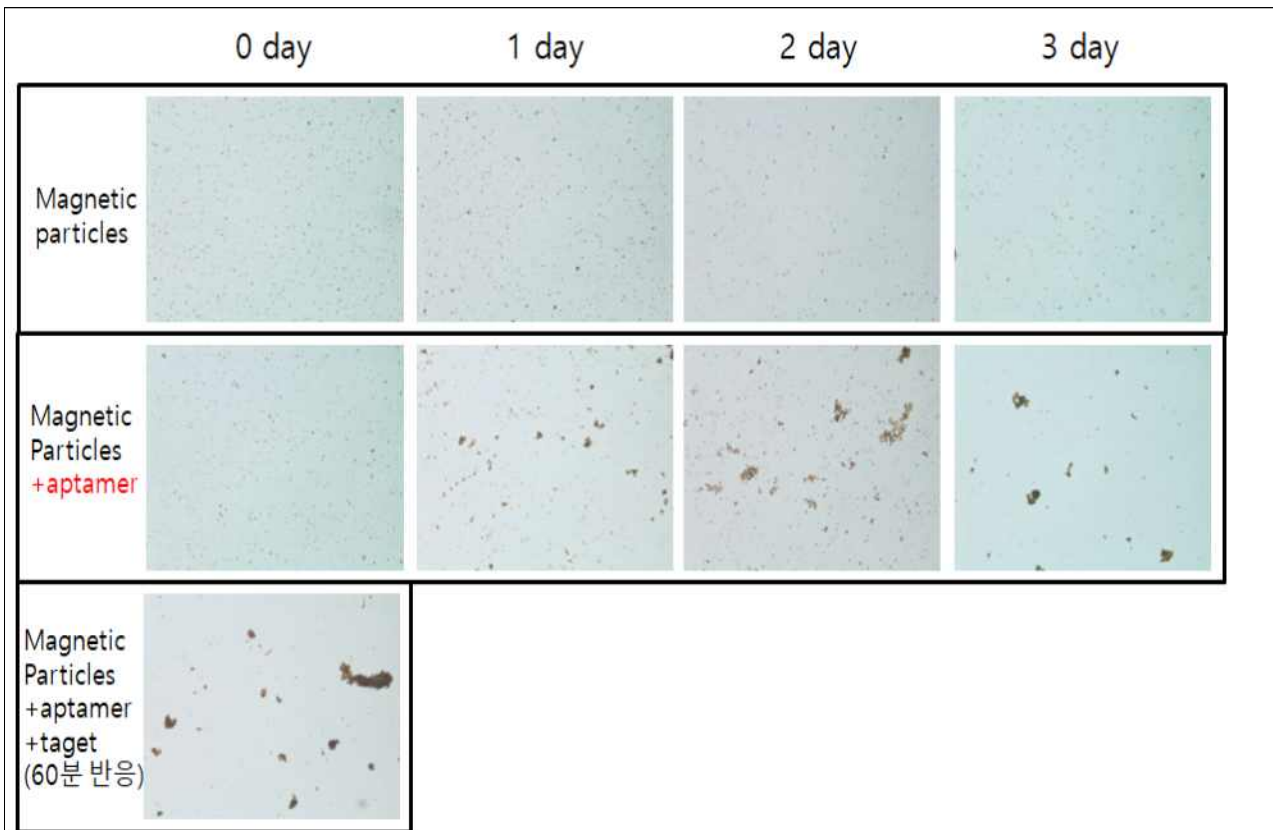


그림 74. 마그네틱 파티클 자가응집 현미경 결과

(5) 자가응집 되었던 샘플을 vortex mixing 과 bath sonication을 이용, 입자가 다시 분산 된 상태로 돌아가는지 확인 하였다. Vortex mixing 은 max speed로 10분간, bath sonication은 150W, 60%로 30분간 진행하였으나, 약간의 입자들이 분산되기는 하지만, 응집 된 입자들은 처음 상태로 되돌아가지 않고 자가응집된 입자들이 다수 존재함



그림 75. 응집 된 마그네틱 파티클 재 분산 여부 확인

나. 멤브레인을 이용한 산란광 측정용 입자의 장기 보존

(1) 유리섬유막을 이용한 자성 입자의 보관

- ① 검출 대상이 없이도 시간에 따라 입자들이 자발적으로 응집되는 현상을 확인
- ② 장기간 입자들을 보관하고 정량적으로 산란광 변화를 측정하기 위해서는 이러한 자가 응집 현상을 막을 방법이 필요
- ③ 압타머 수식 자성입자를 용액상으로 보관하지 않고, 유리섬유 막과 같은 멤브레인에 보관하여 자가응집을 방지하고자 함
- ④ 멤브레인에 보관된 자성입자들이 런닝 버퍼를 흘렸을 때, 방출되어 나오는 양을 측정 산란광 측정에 이용가능성을 확인 하고자 함
- ⑤ 실험조건은 다음과 같음
 - Pad 정보 : glass fiber (GFDX000800, Millipore)
 - Pad 전처리 : 0.25% triton x-100, 0.05M tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 8.0)
 - Running buffer : 1% BSA solution 100ul
 - Pump flow : 0.1ml/min
 - Magnetic particles : chemicell SiMAG-Amine 0.5um / 0.04% / 100ul

(2) 유리섬유 멤브레인을 이용한 자성입자 보존성 검토

- ① Lateral flow assays(LFA)타입으로 다음과 같은 스트립을 제조함
- ② 유리섬유 멤브레인에 자성입자용액을 drooping한 다음 자연적으로 건조함
- ③ 1% BSA가 포함된 PBS 런닝버퍼를 흘렸을 때, test pad로 자성입자가 전개되는 여부를 확인
- ④ 멤브레인 포어가 크기 때문에 충분히 자성입자가 전개될 것으로 예상하였으나 다음 그림과 같이 제자리에 멈춰 있음을 확인
- ⑤ 멤브레인 형태를 변경해서 재 실험 예정

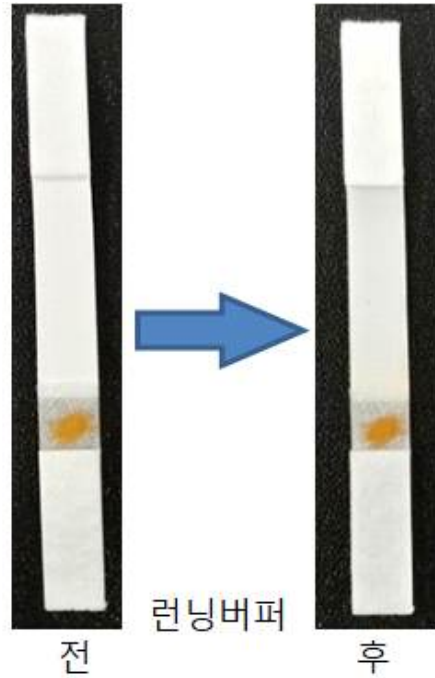


그림 76. LFA 참고 파티클
멤브레인 보관 사전 실험 결과

3. 면역응집반응용 자가응집 방지 진단 입자의 보존성

가. 유리섬유 멤브레인이 장착된 간이 칩을 이용한 보존성 검토

(1) 유리섬유 멤브레인이 장착된 간이 칩 제조 공정

① Slide glass에 고무판은 NOA73 접착제를 이용하여 접합

② 그림7 (사진 위쪽)에 표시된 미세유체 채널이 시작하는 부분에서 유체가 원활하게 흐르지 않아, 이 부분을 둥근 형태로 제작하여 유체의 흐름이 방해 받지 않도록 함

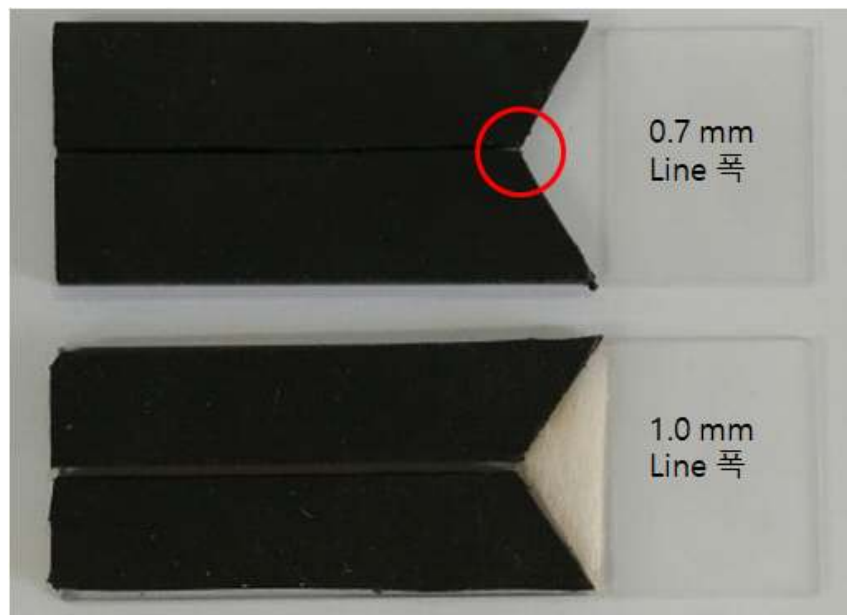


그림 77. 파티클 멤브레인 보관 실험을 위한 간이 칩 제조

③ 자연적인 유체 흐름이 원활하지 못해 간이 칩 위에 필름을 덮고 끝 부분에 팁을 장착한 후 pump에 연결하여 용액을 흘리기로 함 (채널 0.7 mm 폭 적용)

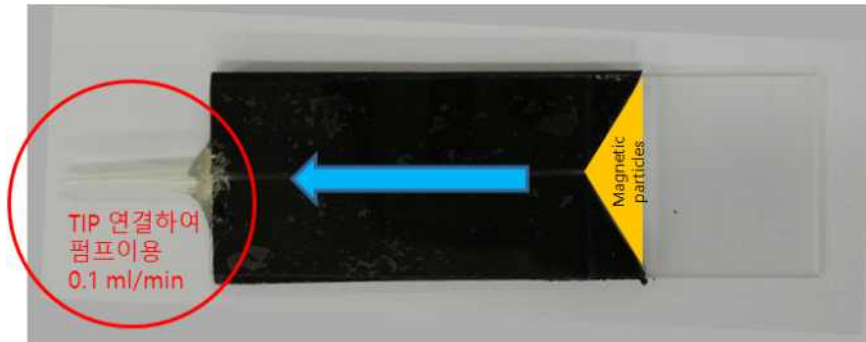


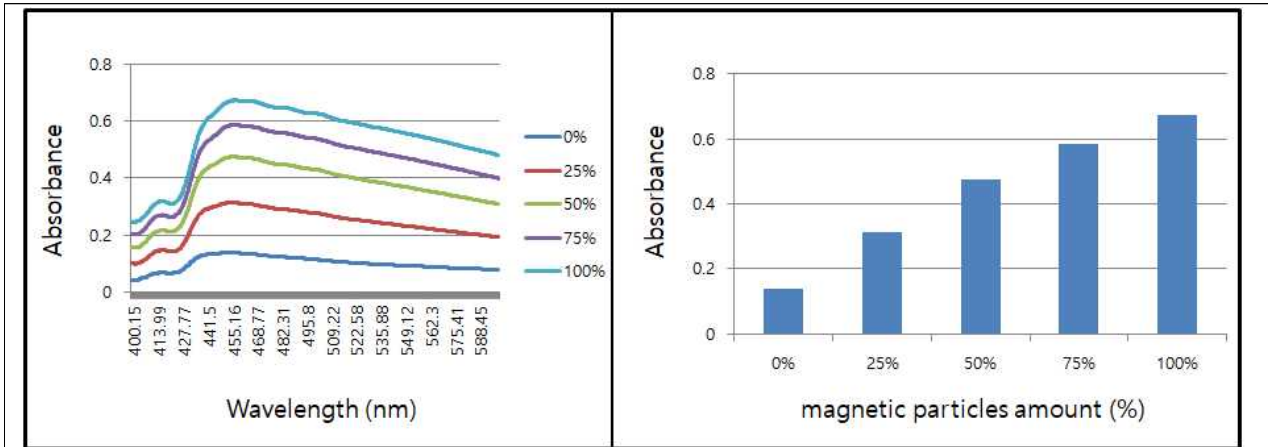
그림 78. 간이 칩에 커버와 팁 추가

④ 실험조건은 다음과 같다

- Pad 정보 : glass fiber (GFDX000800, Millipore)
- Pad 전처리 : 0.25% triton x-100, 0.05M tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 8.0)
- Running buffer : 1% BSA solution
- Pump flow : 0.1ml/min

(2) 흡광도를 이용한 자성입자의 방출효율성 검토

- ① 마그네틱 파티클 농도는 0.04%로 준비하고, 최종적으로 타겟과 1:1(v/v) 반응 시 0.02%가 되도록 유리섬유 멤브레인에 dropping함. (산란광 측정 최적 농도)
- ② 유리섬유 막에 고정된 자성입자가 멤브레인으로부터 방출되는 양을 확인하기 위해 UV-vis 흡광도 측정방법으로 검토 (파장 458nm)
- ③ 0.04% 농도를 100%로 기준, 자성입자의 양을 조절하여 다음과 같이 농도별로 제조한 다음 (0, 25, 50, 75, 100%) 흡광도 측정



* Maximum peak 458 nm

그림 79. 마그네틱 파티클 농도별 흡광도 차이 비교

④ 최대 흡광도 피크에서 농도별 자성입자에 따라 방출되는 양이 비례적으로 증가함을 알 수 있었다. 따라서 흡광도 측정을 통해 방출되는 자성 입자의 양을 정량적으로 계산할 수 있을 것으로 판단됨.

나. 성질이 다른 입자의 멤브레인 보관기관에 따른 방출량 변화

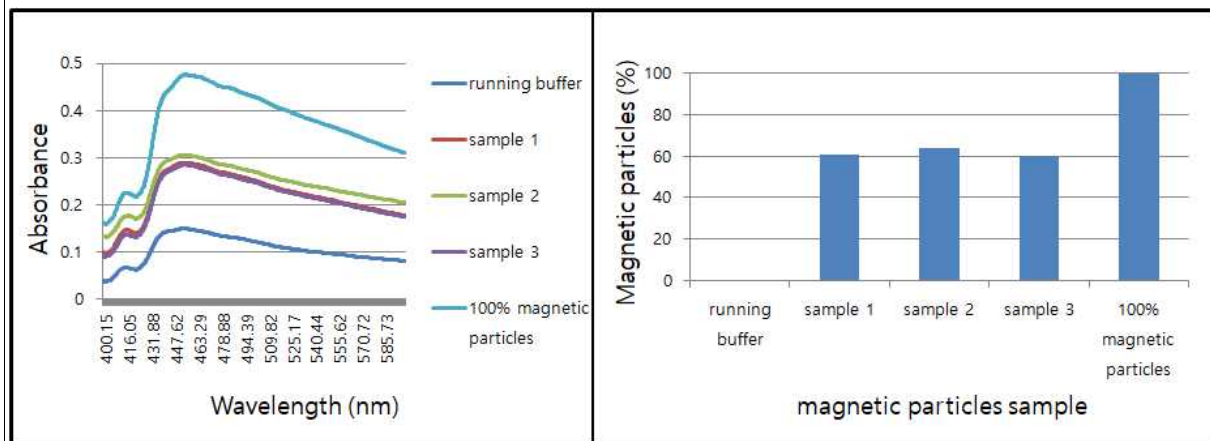
(1) 자성입자의 방출 거동 (1day 보관 후)

① 런닝버퍼와 100%에 해당하는 마그네틱 파티클의 흡광도를 측정

② 임시 칩을 통과한 양을 측정하여 비교

③ %값으로 환산하여 얼마나 통과해 나오는지 측정 (3회 반복)한 평균값은 약 60% 정도 통과해 나오는 것을 확인

④ 사용한 자성입자 : chemicell Simag-Amine 0.5um



* Maximum peak 458 nm

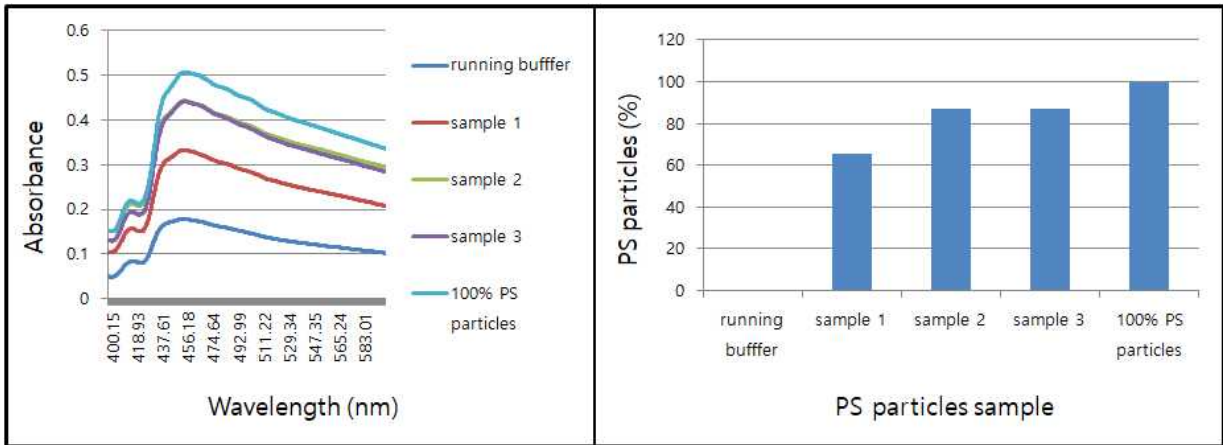
그림 80. 마그네틱 파티클 멤브레인 보관 결과 (하루)

(2) PS고분자 마이크로 입자의 방출거동 (1day 보관 후)

① 마그네틱 파티클과 동일한 방법으로 PS 파티클 흡광도 측정

② 3회 반복한 흡광도 측정 결과 약 80% 정도가 통과해 나오는 것을 확인

③ Particles 정보 : Bangs lab P(S/R-NH2) 0.53 μm



* Maximum peak 458 nm

그림 81. PS파티클 멤브레인 보관 결과 (하루)

(3) 자성입자의 방출 거동 (28 days 보관 후)

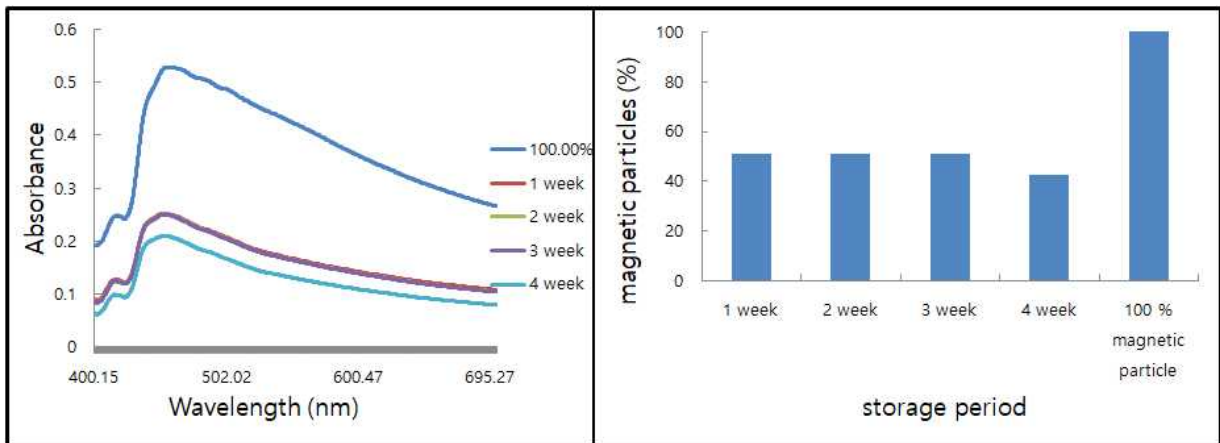
① 장기 보관의 가능성을 검토하기 위해 1주일 단위로 4주간 보관, 방출하는 실험 진행

② 런닝버퍼와 100%에 해당하는 마그네틱 파티클의 흡광도를 측정하고, 매주 단위로 보관 된 자성입자의 방출량을 흡광도를 이용하여 측정함

③ 1day 보관 후 방출량 측정 시 약 60% 정도 되었으나, 이번 결과에서는 1~3주까지는 약 50%, 4주간 보관한 경우 40%정도 입자가 방출함.

⑤ 4주 이상 보관 후 방출량은 추후 확인하고자 함

⑥ Particles 정보 : chemicell Simag-Amine 0.5 μm



* Maximum peak 458 nm

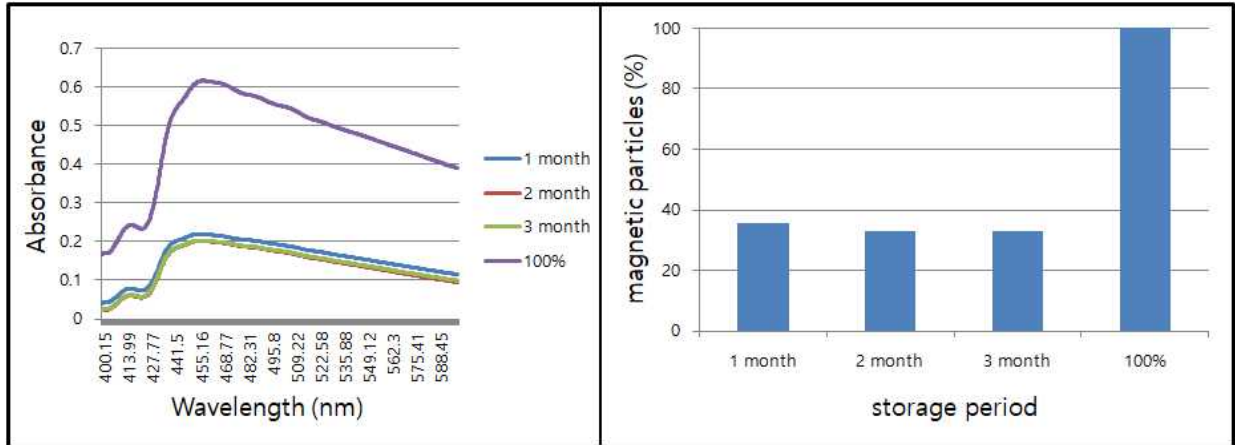
그림 82. 마그네틱 파티클 보관 결과 (4 주)

(4) 자성입자의 방출 거동 (3 months 보관 후)

① 4주 보관 실험 때 보다 다소 낮은 방출량을 보임

② 1달 짜 약 35%, 이후 2~3달째는 약 32% 정도로 거의 30%정도 방출되는 것으로 보임

③ Particles 정보 : chemicell Simag-Amine 0.5 μ m



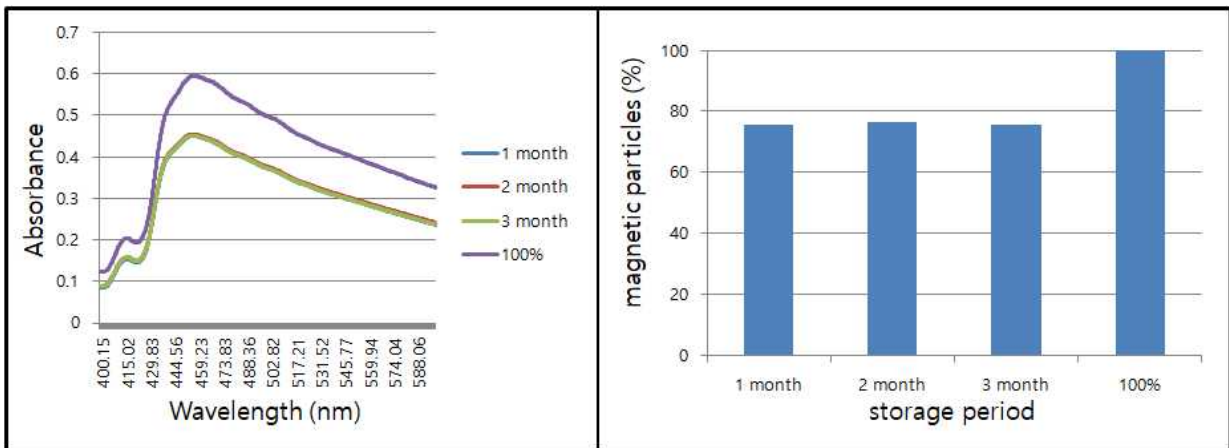
* Maximum peak 458 nm

그림 83. 마그네틱 파티클 보관 결과 (3 달)

(5) PS고분자 마이크로 입자의 방출 거동 (3 months 보관 후)

① PS 파티클의 경우 3달 동안 비슷하게 약 75%정도 방출량을 유지함

② Particles 정보 : chemicell Simag-Amine 0.5 μ m



* Maximum peak 458 nm

그림 84. PS 파티클 보관 결과 (3 달)

다. 사출성형 기법을 이용한 산란광 측정용 미세유체칩 제작

(1) 사출성형 미세 유체 칩 설계 및 제작

① 그림 하단에 흠이 글래스 파이버 멤브레인을 삽입할 수 있도록 만든 부분이다.

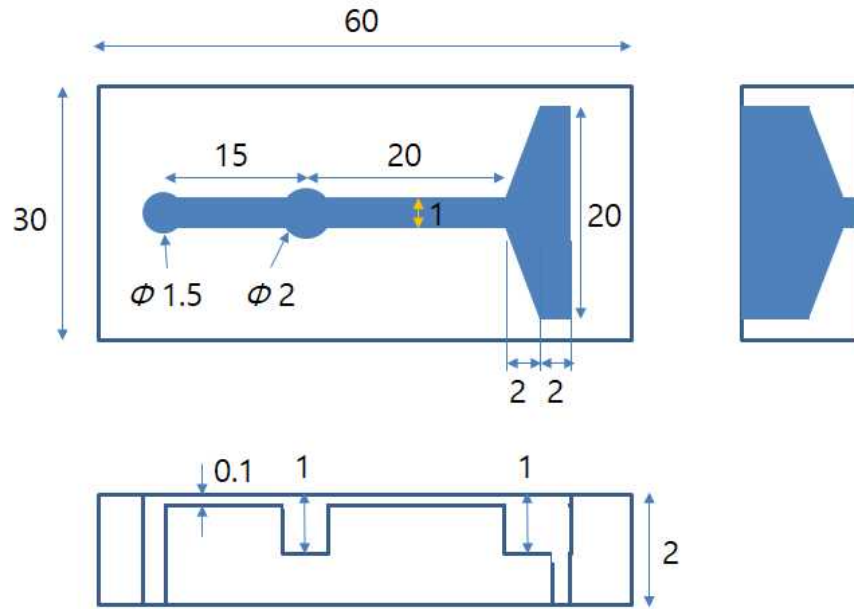


그림 85. 사출성형 미세 유체 칩 설계도

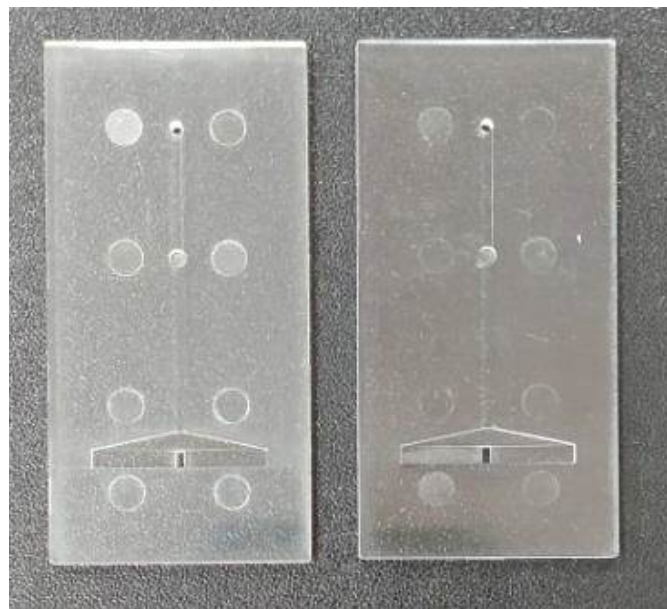


그림 86. 사출성형 미세 유체 칩

4. 압타머를 이용한 조류인플루엔자 고감도 검출을 위한 기초 데이터 확보

가. 압타머를 이용한 면역입자응집반응용 진단 입자 최적화를 위한 기초 자료 확보
 조류인플루엔자 검출용 Aptamer기반 진단입자 개발을 위해 이미 성능이 입증된 Thrombin과 Thrombin Aptamer를 이용하여 응집반응이 최적으로 발생 할 수 있는 조건에 대한 테스트 진행. 기본적으로 면역입자반응은 항원-항체 반응을 주로 사용하였으나 본 연구에서는 보관이 용이하고 가공성이 높은 압타머를 이용하여 면역입자응집반응을 유도 하려 한다.

(1) 380 nm PS입자에 human alpha thrombin aptamer를 부착하고 thrombin 21.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 샘플을 이용하여 실온에서 30분간 반응 시킨 후 사출성형으로 제작된 미세유체칩을 이용하여 응집반응이 일어나기 전 후의 산란광을 측정하였다. 측정 장치에서 확인한 결과 응집반응이 일어나지 않은 상태와 항원과 반응하여 응집된 입자 간에 산란광의 절대값 차이는 약 1000정도로 aptamer를 이용한 면역응집반응의 산란광 변화로 항원의 유 무 판단이 가능함을 확인 하였다.

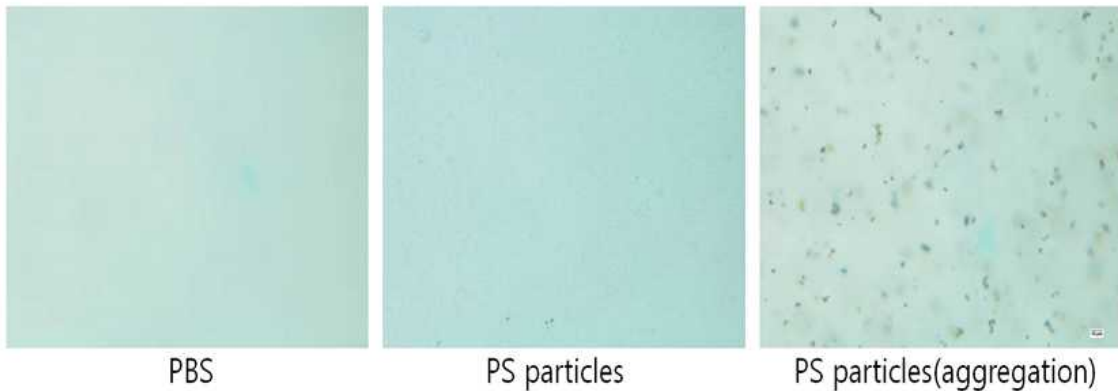
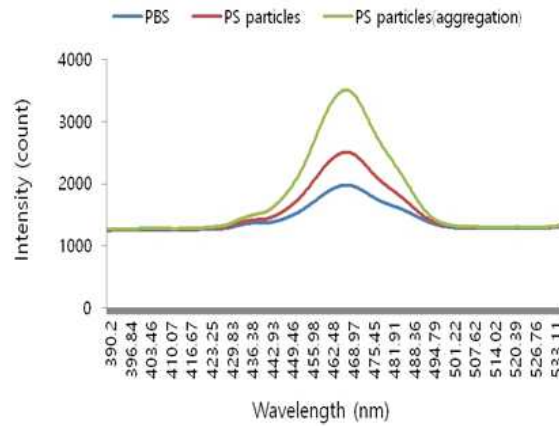


그림 87. 380nm 크지 입자에 Thrombin Aptamer를 부착하고 미세유체칩을 통과 시켜 산란광을 측정 하고 반응 전 후의 상태를 현미경으로 확인

나. 면역응집반응 시간별 응집크기 변화 확인

면역응집반응은 aptamer의 성능, 항원의 농도 등의 조건에 따라 응집이 발생하는 시간의 차이가 있다. 이러한 차이를 확인하여 현장에서 조류인플루엔자 진단에 필요한 반응 시간을 판단하기 위하여 시간별 응집반응의 변화를 확인 하였다.

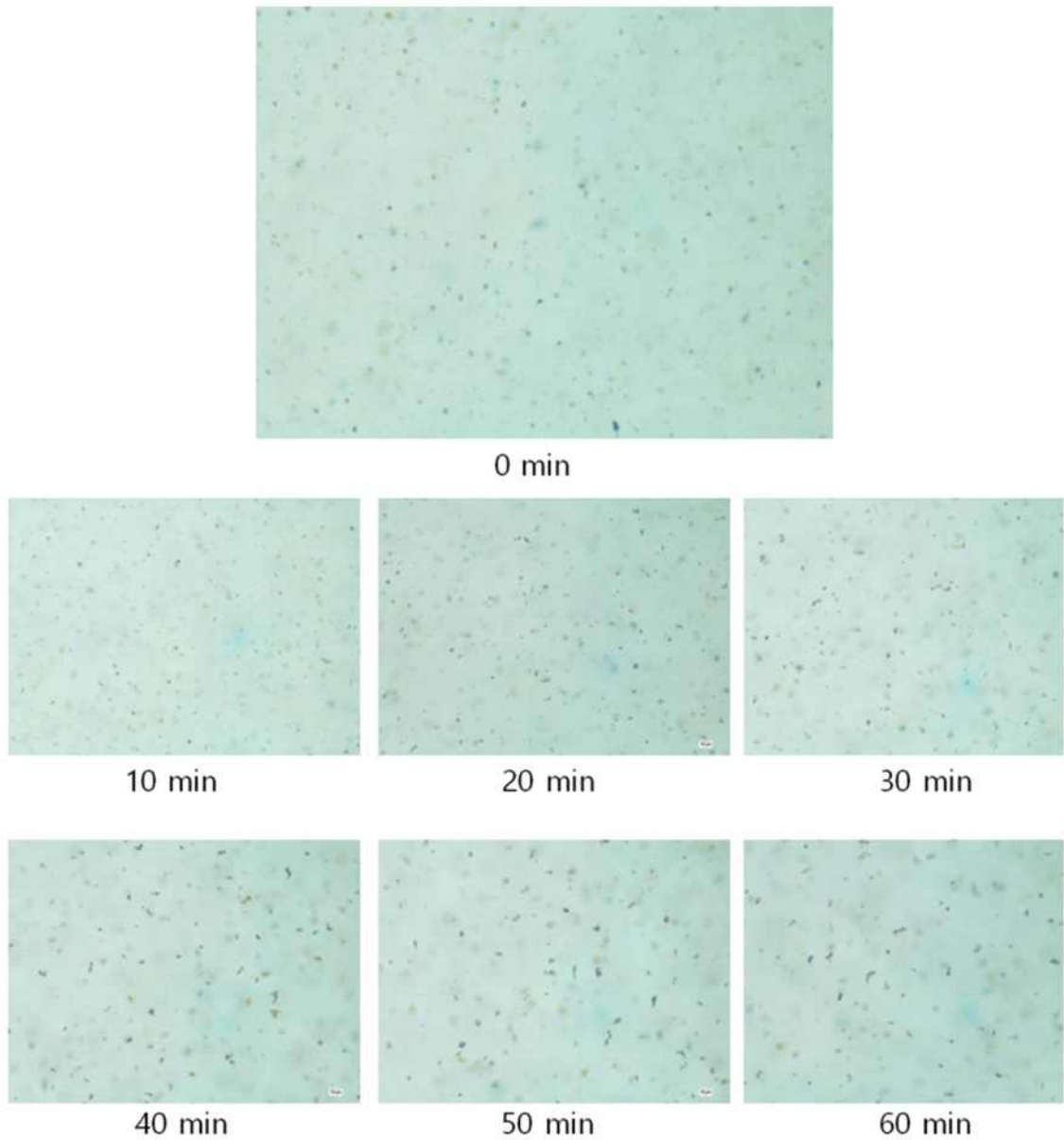


그림 88. Thrombin Aptamer를 이용한 응집 반응 시간별 입자의 변화 현미경 이미지 (human alpha thrombin 농도 : $21.3 \mu\text{g/ml}$)

(1) 380 nm PS 입자에 human alpha thrombin 압타머를 부착하고 thrombin $21.3 \mu\text{g/ml}$ 농도의 샘플을 이용하여 실온에서 반응 시키고 10분 간격으로 그 변화를 확인 하였다. 위 그림에서와 같이 반응 직후 응집이 발생 하여 크기 약 $5 \mu\text{m}$ 크기로 응집하는 것을 확인 할 수 있었다. 시간이 지나도 응집된 입자의 크기는 크게 변화가 없었으므로 현장에서 면역입자의 반응 시간은 10분 이내로 하여도 충분할 것으로 판단된다.

다. 사출성형 미세유체칩 산란광 측특성 평가

기존 실험실에서 제작한 PDMS(Polydimethylsiloxane) 유체칩은 대량생산에 문제가 있어 사출성형으로 제작한 폴리카보네이트 소재의 유체칩의 산란광 특성을 파악하기 위하여 항원 농도에 따라 응집의 크기가 커지는 현상을 모사하기 위해 380 nm에서 최대 3 μm 크기의 입자를 사용하여 크기에 따른 산란광의 변화를 측정 하였다. 실험 조건은 다음과 같다.

(1) 광원 : LED (380 nm)

(2) 입자 크기 : 0.38 μm , 0.41 μm , 0.51 μm , 0.60 μm , 0.82 μm , 0.93 μm , 1.16 μm , 2.19 μm , 3 μm

(3) 농도 : 0.011%

(4) 측정 횟수 : 5회 평균

(5) 산란광 측정 설정

- ① 광원(LED bulb 380 nm)은 장치 아래에 수직으로 장착, 칩의 뷰셀 중앙으로 직사광이 들어오도록 하고, detector는 위쪽에서 뷰셀과 45도 각도로 장착한다.
- ② Detector는 직사광이 나오는 지점부터, 사라질 때 까지 미세조정으로 뒤로 물리도록 한다.
- ③ 칩의 Outlet을 튜브로 시린지 펌프와 연결하고, 정량펌프는 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 유량으로 설정 하였다.

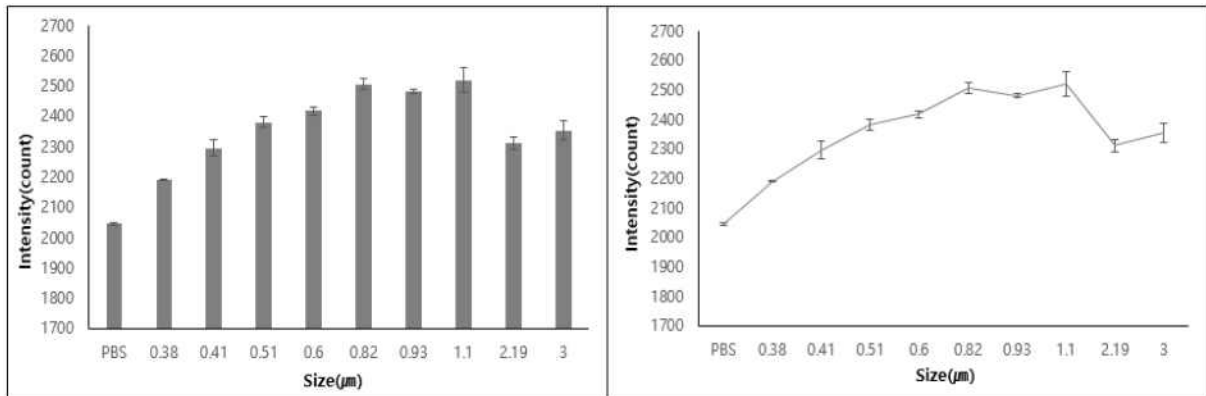


그림 89. 입자 크기별 미세유체칩에서 측정된 산란광의 측정값 (실제 응집반응과 달리 일정한 크기의 입자를 사용하여 표준편차는 균일하게 나타남)

(6) 미세유체칩을 통과 하는 입자의 크기별 산란광의 변화를 살펴보면 입자가 없는 조건보다 380 nm 입자에서 산란광의 크기가 조금 증가하였고 크기가 커짐에 따라 산란광의 강도는 계속 증가 하는 것으로 측정되었다. 그러나 입자 크기 1.16 μm 부터 3 μm 크기 까지는 오히려 산란광의 강도가 줄어드는 현상이 발생 하였다. 본 연구에서는 낮은 항원 농도를 측정하는 것이 목적이므로 조류인플루엔자 바이러스의 유·무 판단에 사용하기에는 적합하다고 판단하였다. 그러나 향후 실험과정에서 조류인플루엔자 검출에서 동일한 문제가 발생 하는지, 사출성형 미세유체칩의 물리적 문제가 있는지에 대한 검토를 함께 진행 할 것이다.

5. 조류인플루엔자 검출용 압타머 기반 나노진단 입자 개발

가. 조류인플루엔자 압타머를 이용한 진단입자 개발

면역응집반응은 압타머의 성능, 조류인플루엔자 항원의 크기, 진단입자의 크기와 농도에 따라 응집반응에 차이가 발생 한다. 응집반응의 최적 조건을 알아보기 위해 트롬빈 압타머를 이용한 실험 결과를 기초로 하여 본 과제를 통해 한양대학교에서 개발한 2 종류의 압타머와 크기가 다른 2개의 나노입자, 산란광 측정을 위한 광원을 변경하여 최적의 응집 조건을 확인하기 위한 실험을 진행 하였다.

(1) 압타머 정보

- ① H5N1 (1-28) : [C6 Amine] CGGATCCCGCGCGCAGTGCCGGGTGCCG
- ② H5N1 (2-25) : [C6 Amine] CCGCGCGGGTCTGAGGAGTGCGCGG

표 7. 조류인플루엔자 최적 응집반응 실험에 사용된 입자 및 압타머 정보

	Aptamer	입자(농도)	PBS
301nm PS Particles	H5N1 (1-28): 3 μ H5N1 (2-25): 3 μ	8 μ l (0.4%)	1989 μ l
383nm PS Particles	H5N1 (1-28): 4 μ H5N1 (2-25): 4 μ	8 μ l (0.4%)	1986 μ l

(2) 조류인플루엔자 바이러스 검출을 위한 실험 준비 과정은 다음과 같다.

- ① 조류인플루엔자 압타머와 나노입자를 위 표의 정보를 바탕으로 혼합하여 37 °C에서 2시간 동안 3D shaker를 이용하여 결합시켰다.
- ② 입자 표면에 붙지 않은 압타머는 실제 검출에서 잘못된 신호를 유발 할 수 있으므로 세척하여 제거한다. (원심분리 4600 rpm, 5 분씩 3회 반복하여 상층액은 제거)
- ③ 조류인플루엔자 항원 준비 (SNU50-5 : 서울대학교 수의과대학)
실험에 사용된 조류인플루엔자 항원 농도 (총 13가지)
No target, 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 EID50/ml)
- ④ 미세유체칩을 이용한 실험 전 응집반응 확인
진단액 5 μ l와 농도별 항원(SNU50-5) 5 μ l를 섞어 현미경(배율 40X)으로 관찰

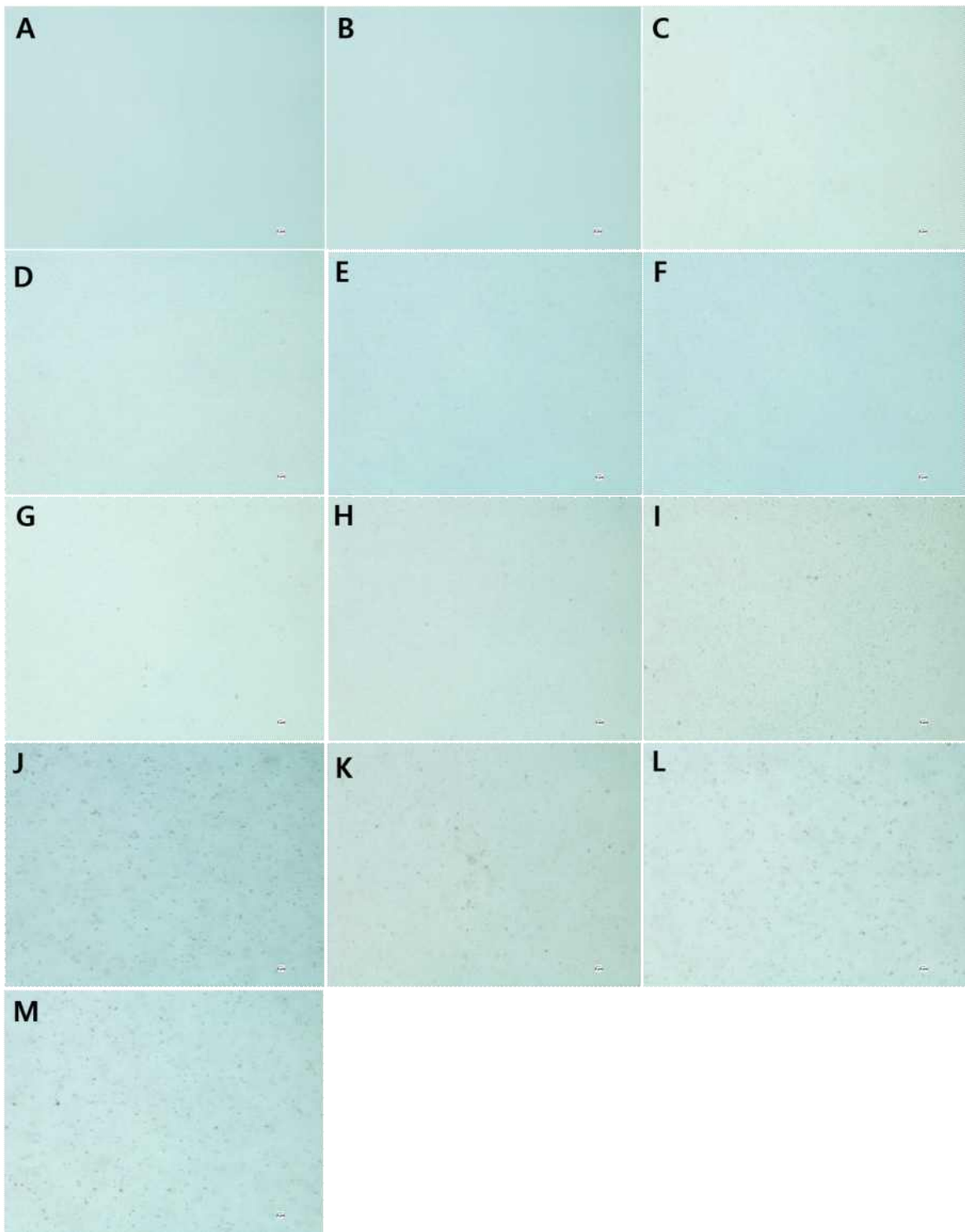


그림 90. 진단 입자/압타머-항원 농도별 응집반응

[PS 380 nm/H5N1(1-28) - SNU50-5]

(A) 0 <No target>, (B) 10^{-4} , (C) 10^{-3} , (D) 10^{-2} , (E) 10^{-1} , (F) 10, (G) 10^2 , (H) 10^3 , (I) 10^4 , (J) 10^5 , (K) 10^6 , (L) 10^7 , (M) 10^8 (EID₅₀/ml) (40X)

- ⑤ 조류인플루엔자 항원 농도 (C) 10^{-3} 부터 입자가 응집이 진행되는 것으로 확인되며, (I) 10^4 부터 입자 응집 크기가 $5 \mu\text{m}$ 이상으로 커지는 것을 확인 하였고, $10^6 \sim 10^8$ 은

응집된 입자의 크기가 10~15 μm 로 더 크게 응집되어 미세유체칩을 이용한 산란광측정으로 조류인플루엔자 항원 검출이 가능할 것으로 판단된다.

나. 미세유체칩과 산란광 측정 장치 설정

조류인플루엔자 항원 검출을 위한 실험 장비는 Ocean Optics에서 제조한 분광분석기(모델명 : Ocean optics USB 4000) 와 광원(모델명 : Ocean optics LS 450)을 사용 하였고 실험에 필요한 스테이지는 산란광 측정을 위해서 서울대학교에서 제작 하였다.

- (1) 조류인플산란광 측정을 위해, 광원(LED bulb 380 nm)은 아래 그림A와 같이 미세유체칩의 뷰셀 아래에 수직으로 장착하여 미세유체칩의 뷰셀 중앙으로 직사광이 들어오도록 설정하고 미세유체칩은 아래 그림과 같이 제작된 고정장치를 사용하여 고정하고 산란광은 그림과 같이 45도 각도로 설정하여 측정한다. 산란광 측정부는 미세조정나사를 이용하여 조정가능하다.
- (2) 조류인플루엔자 항원(SNU50-5)과 압타머 부착 진단액은 각 각 25 μl 혼합하여 10 초후 미세유체칩에 로딩하고 반대편에서 시린지펌프의 속도를 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 설정하여 음압을 통하여 미세유체칩을 통과 시킨다.
- (3) 샘플이 미세유체칩의 뷰셀까지 도달하여 안정화 될 때 까지 15초의 시간이 소요 되며 그 이후의 데이터만 분석에 사용하였다.

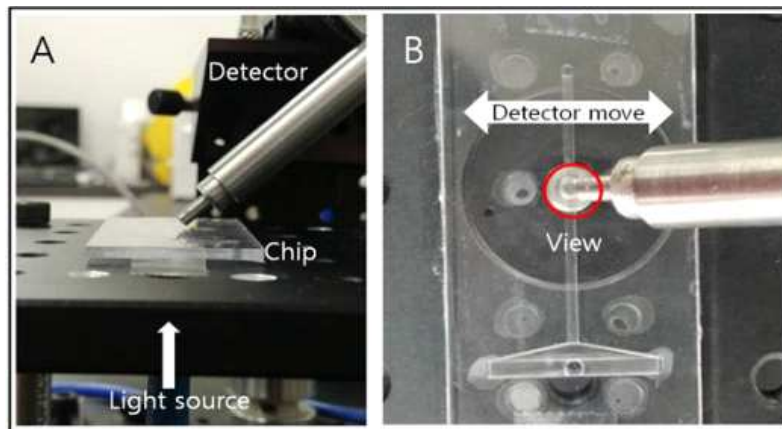


그림 91. 미세유체칩의 산란광 측정을 위한 기본 구성

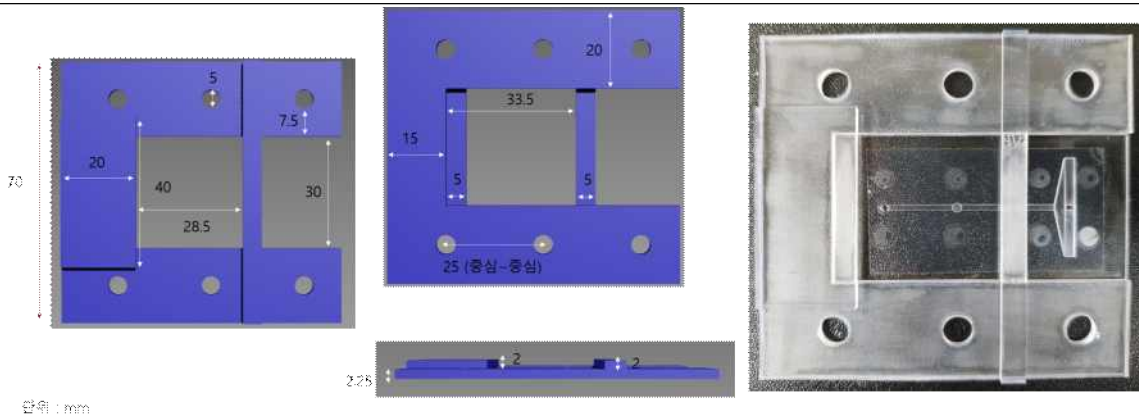


그림 92. 3D 프린터를 이용한 산란광 측정용 미세유체칩 고정 장치

6. 조류인플루엔자 검출용 압타머와 항원을 이용한 면역입자응집반응 산란광 측정

가. 입자크기 : 301 nm , 압타머 : H5N1 (1-28)

면역입자응집반응의 산란광 변화를 보면 아래 그래프와 같이 조류인플루엔자 항원농도 10에서 강도가 증가하기 시작하고 10^4 에서 가장 높은 값이 측정되며 그 이상 고농도에서 강도는 다시 감소한다. 고농도의 항원 조건에서 강도가 약해지는 이유는 항원농도에 비해 진단액의 농도가 낮아 항원들이 입자가 응집하는 것을 방해하기 때문이다. 본 연구의 목적은 고농도의 조류인플루엔자 항원 정량이 아닌 검출 한계 농도를 낮추는 것을 목적으로 한다. 따라서 항원 농도 10 (EID_{50}/ml)을 검출 한계로 진단에 활용하는 것이 가능하다고 판단된다. 실험에 사용된 10^4 이상 고농도의 항원은 조류인플루엔자로부터 추출 후 농축한 것으로 실제 자연환경에서는 존재할 수 없는 농도이다. 따라서 해당 농도에서의 감도 저하는 민감도에 영향을 주지 않기 때문에 무시할 수 있다.

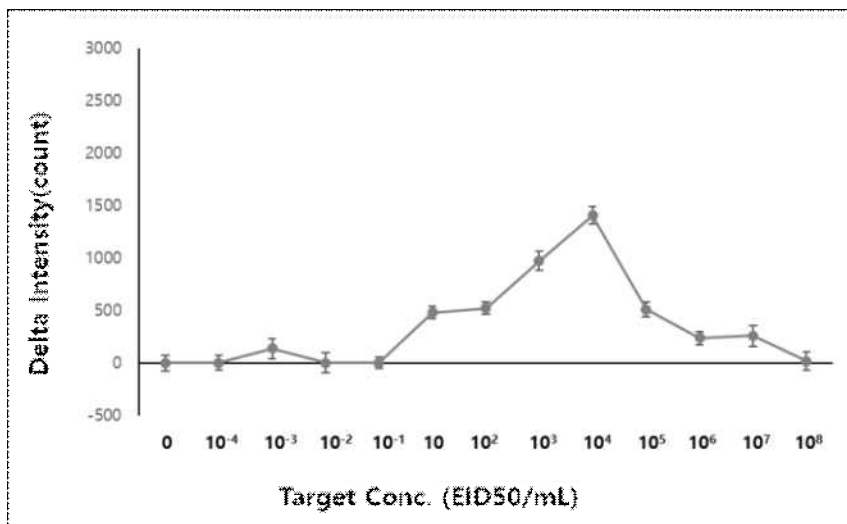


그림 93. 301nm 입자와 H5N1 (1-28) 항원을 사용한 면역 응집반응에 따른 산란광 변화량의 절대값

나. 입자크기 : 301 nm , 압타머 : H5N1 (2-25)

면역입자응집반응의 산란광 변화를 보면 아래 그림과 같이 10^{-1} 에서 산란광의 강도가 증가하기 시작하고 10^5 까지 결과 (1) 보다 완만한 기울기가 증가 하고 그 보다 높은 농도에서는 감소하기 시작한다. 낮은 농도와 높은 농도의 산란광의 변화량의 절대치의 차가 크지 않은 것으로 보아 응집반응이 일어나는 결합력이 조건 (1) 보다는 낮은 것으로 판단된다.

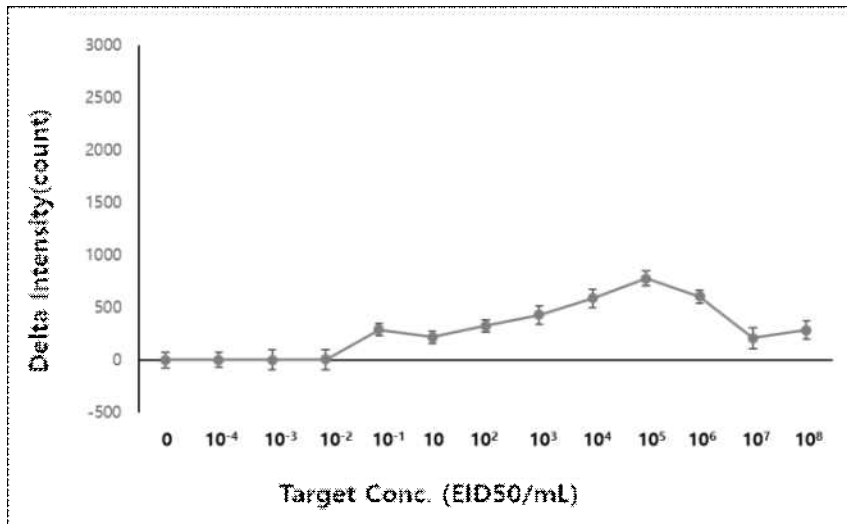


그림 94. 301 nm 입자와 H5N1 (2-25) 항원을 사용한 면역 응집반응에 따른 산란광 변화량의 절대값

다. 입자크기 : 383 nm , 압타머 : H5N1 (1-28)

면역입자응집반응의 산란광 변화를 보면 아래 그림과 같이 10^3 에서 산란광의 강도가 증가하기 시작하고 10^7 까지 상승하나 앞의 결과 (1),(2) 와 비교하여 산란광의 변화가 불규칙적인 것으로 보아 응집반응 일으키는 결합력이 떨어지는 것으로 판단된다.

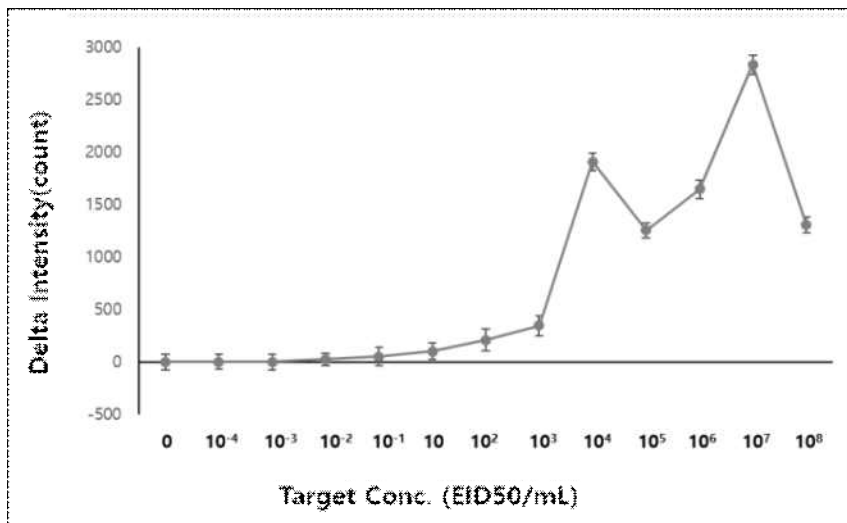


그림 95. 383 nm 입자와 H5N1 (1-28) 항원을 사용한 면역 응집반응에 따른 산란광 변화량의 절대값

라. 입자크기 : 383 nm , 압타머 : H5N1 (2-25)

면역입자응집반응의 산란광 변화를 보면 아래 그림과 같이 10^0 에서 산란광의 강도가 증가하기 시작하고 10^5 까지 비교적 큰 기울기로 산란광의 변화량이 상승하고 있다. 산란광의 절대변화량이 급격하게 늘어나는 것은 농도별로 응집반응이 고루 발생하고 응집의 크기도 크게 일어나는 것으로 판단 할 수 있다.

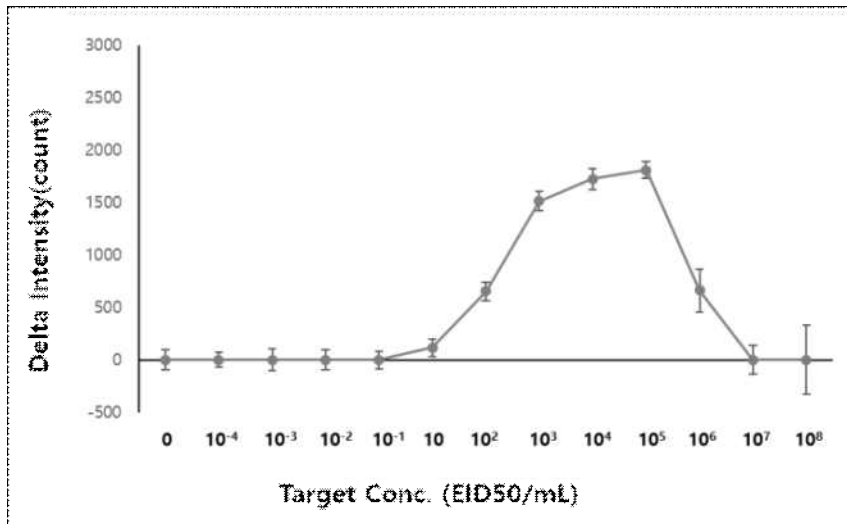


그림 96. 383 nm 입자와 H5N1 (2-25) 항원을 사용한 면역 응집반응에 따른 산란광 변화량의 절대값

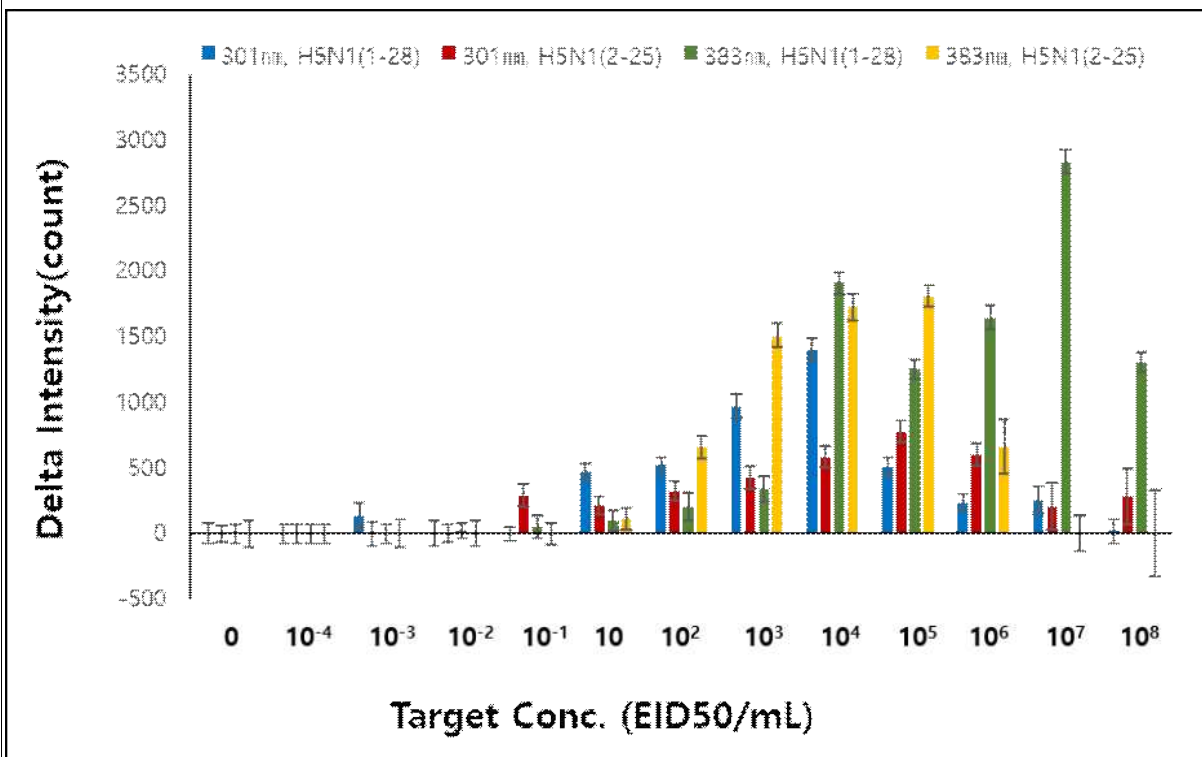


그림 97. 4가지 조건의 응집반응에 의한 산란광의 절대량 비교

마. 4가지 조건의 경우를 분석한 결과 입자크기는 301 nm 보다 383 nm의 경우가 신호의 민감도와 검출 한계에서 더 좋은 결과를 보이고 있으나 압타머의 경우는 H5N1 (1-28)와 H5N1 (2-25)에서 크게 차이는 안 보이는 것으로 판단되어 입자 크기는 383 nm를 사용하고 두 가지 압타머를 사용하여 좀 더 검증 실험을 하고 새로 개발 되고 있는 압타머를 한양대학교로부터 확보 하여 비교 평가 하겠다.

7. 스마트 나노 센서 입자의 보관·로딩 장치 개발

면역입자응집반응은 나노입자의 항원-항체 반응을 통한 응집반응을 이용한 방법이다. 본 연구에서는 미세유체칩을 이용하여 액체상태의 샘플을 측정해야 하므로 진단액의 보관 및 현장 사용상 편의성이 매우 중요하다. 그러나 압타머와 같은 단백질이 부착된 진단입자의 경우 액체 상태로 보관할 경우 단백질과 단백질이 달라붙는 성질이 있어 항원이 없어도 응집이 되는 현상이 발생 할 수 있다. 이러한 문제점을 해결하고 현장에서 좀 더 간편하게 사용하기 위하여 측면유동면역분석법(lateral flow immunoassay)의 금 나노입자 로딩과 유사한 방법으로 미세유체칩 내부에 유리섬유로 만들어진 멤브레인을 이용하여 진단입자를 보관하는 방법을 설계 하였다.

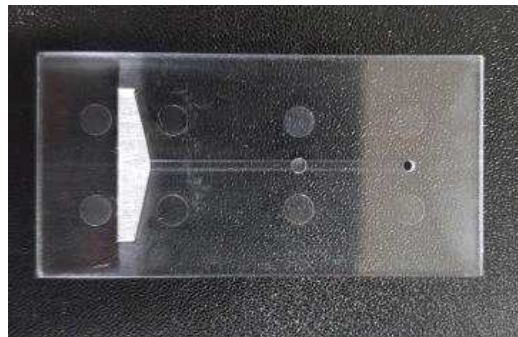


그림 98. 미세유체칩 내부진단입자 보관용 멤브레인 삽입

위 그림 와 같이 진단액이 흡수된 멤브레인을 미세유체칩에 삽입하였고, 가상의 검체를 멤브레인에 통과시켜 흘러나온 진단액의 면역응집반응을 관찰하였다. 진단액은 채널을 원활히 통과하였음에도 불구하고 현미경상 충분한 면역응집반응을 보이지는 않았다. 진단입자와 조류인플루엔자 항원간의 반응에 있어서 멤브레인의 위상과 유체 흐름이 충분한 반응을 유도하지 못한 것으로 판단되었다. 따라서 현장에서 채취된 조류인플루엔자 검체를 즉시 로딩 함과 동시에 진단액과의 원활한 반응을 유도할 수 있도록 새로운 진단액 보관·로딩 장치를 설계하였다. 진단액 멤브레인에 흡수되어 보관 장치 속에 밀봉되며 샘플러(일회용 주사기)에 바로 장착 할 수 있도록 설계되었으며, 제작에는 3D프린터를 사용하였다. 1회용 진단액 보관·로딩 장치에 사용될 적정 진단액의 양을 결정하기 위하여 기존 실험에 사용했던 진단입자의 양을 기준으로 하여 실험하였다.

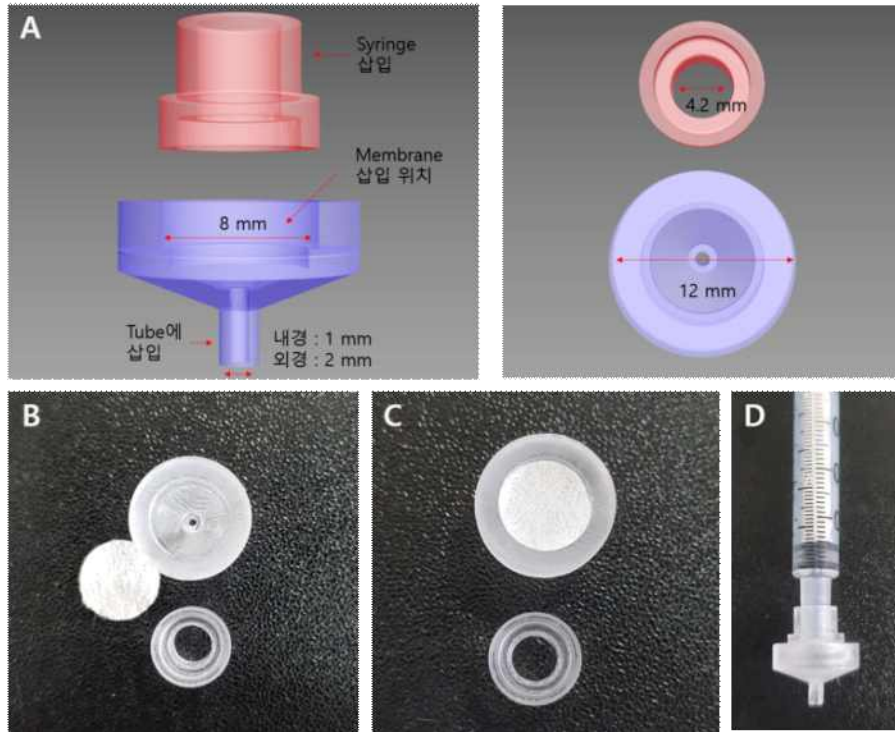


그림 99. 진단입자 보관·로딩 장치 설계 (A) 및 실사 (B, C, D)

가. 결합 장치에 삽입된 진단입자가 통과하는 비율을 확인하는 방법은 다음과 같다.

- (1) 입자농도 0.04%와 버퍼를 혼합, 총 500 μl 용액을 분광광도계를 통해 흡광도 측정
- (2) 입자농도 0.04%의 용액을 장치 내부 멤브레인에 삽입하고 일회용 주사 시에 500 μl 의 버퍼를 밀어내어 수집된 용액의 흡광도 측정
- (3) 입자농도 0.04%와 버퍼를 혼합하여 총 500 μl 용액을 미세유체칩을 통과 하여 수집한 용액의 흡광도 측정

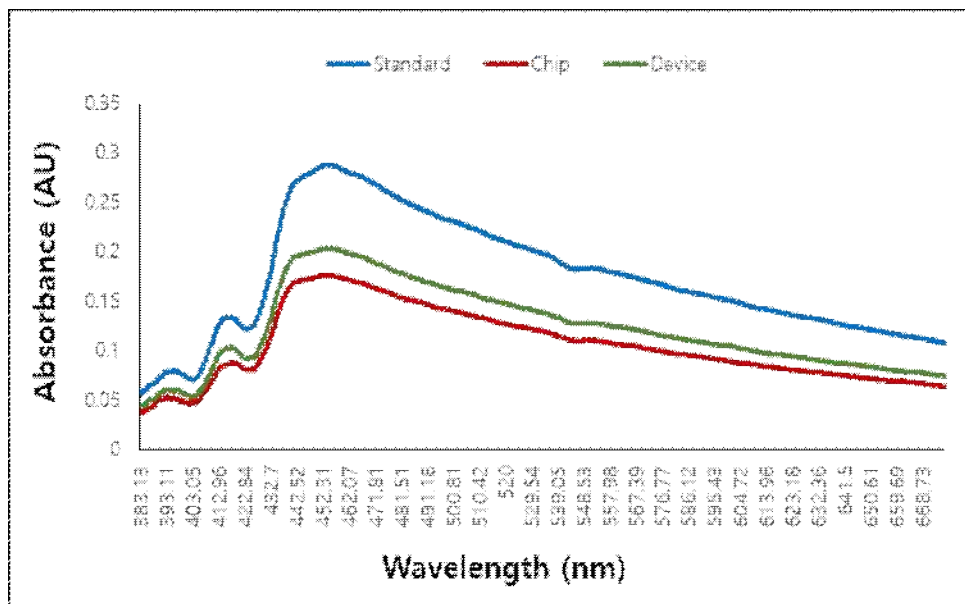


그림 100. 3가지 조건 흡광도 분석 결과

(4) 흡광도 측정 결과, 미세유체칩의 멤브레인에서 빠져나온 입자는 0.04%의 진단입자 500 μl 의 흡광도 기준 대비 63%, 새로 만든 현장 진단용 장치를 통과한 경우는 70%로 확인 되었다. 따라서 현장진단용 진단입자 보관·로딩 장치의 진단입자 적정 농도는 기존 양 대비 30% 증가시킨 값으로 설정하였다.

나. 현장진단용 진단입자 분사 장치를 이용한 조류인플루엔자 검출

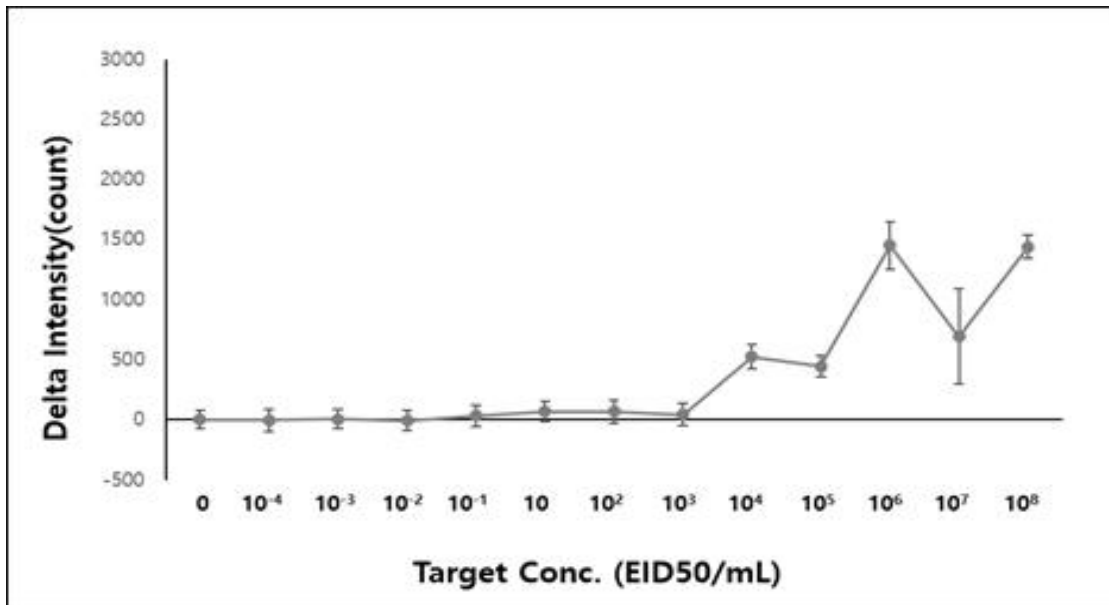


그림 101. 현장 진단입자 보관·로딩 장치를 사용한 진단입자(383nm)와 농도별 H5N1 (1-28) 항원의 면역응집반응에 따른 산란광 변화량

앞서 실험한 4가지 다른 조건의 조류인플루엔자 검출 결과로부터 우선 입자크기 383 nm, 압타머 H5N1 (1-28)를 사용하여 진단입자를 제작하였다. 진단입자 보관·로딩 장치에 사용된 멤브레인(GFDX000800, Millipore)에 25 μl 를 진단입자를 삽입한 멤브레인을 제작 하여 반복하여 산란광의 변화량을 측정하였다. <위 그래프> 면역입자응집 반응의 산란광 변화를 보면 10⁴에서 산란광의 강도가 증가하기 시작하고 10⁸까지 유의미한 산란광의 변화량이 측정되었다. 본 실험 결과를 통해 진단입자 보관·로딩 장치를 사용하여 진단입자를 안전하게 보관함과 동시에 현장 진단 시 사용성을 충분히 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

8. 멤브레인 보관방법에 따른 파티클 수율 확인을 위한 흡광도 측정.

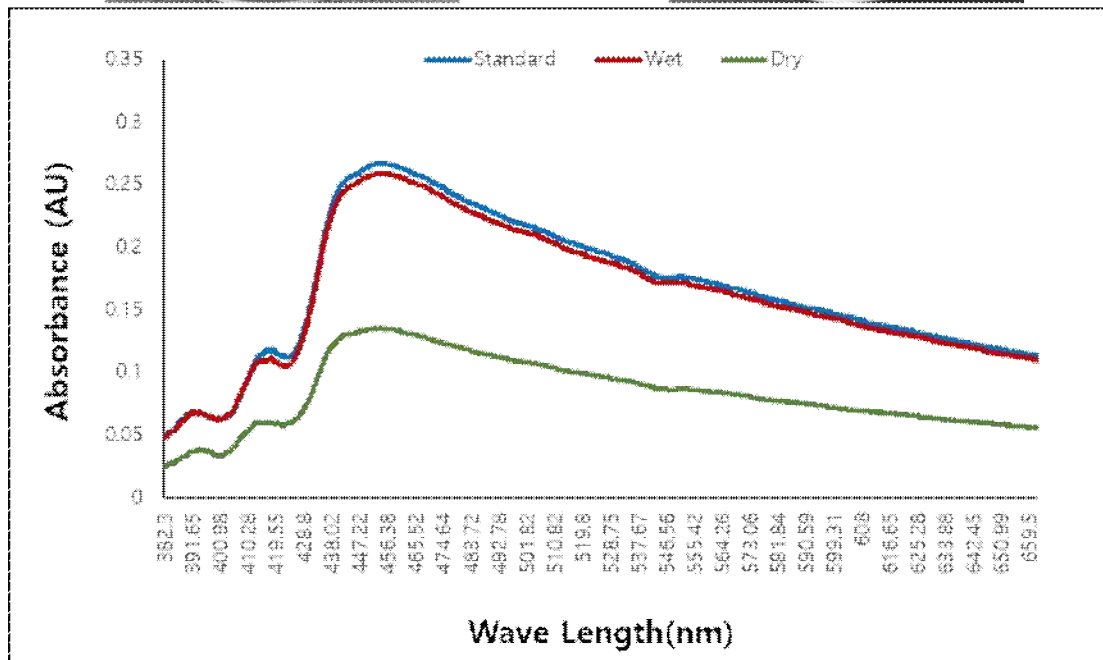
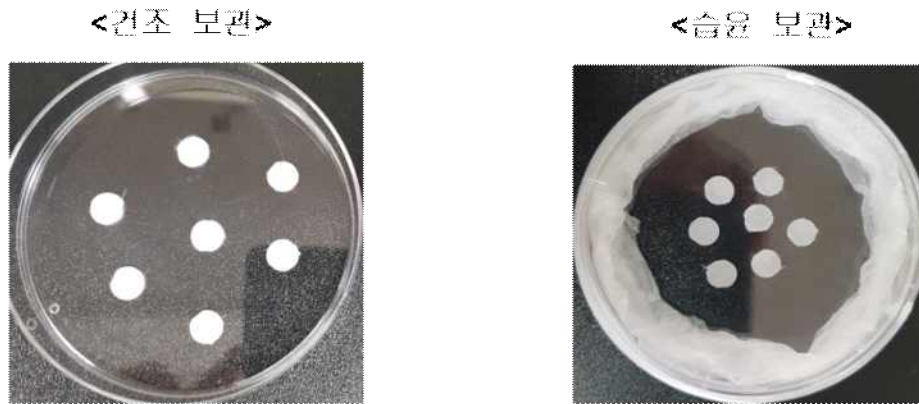


그림 102. 멤브레인 보관 방법에 따른 3가지 조건 비교 <진단 원액(Blue), 습윤 보관(Red), 건조 보관(Green)>

본 연구에 적용되는 바이러스 검출 방법에는 액상에서 항원 없이 발생하는 자가응집 문제를 해결하기 위하여 멤브레인 지지체를 도입하였다. 이후 진단 키트를 보관하는 경우 시약 보존율을 알아보기 위하여 진단액을 멤브레인에 습윤시키는 경우와 건조시키는 경우를 나누어 분광광도계를 통해 흡광도를 비교하였다. 실험 결과 건조 보관의 경우 진단 원액 대비 흡광도가 50% 감소하였으며, 습윤 보관의 경우는 2% 감소하는 결과를 보였다. 본 실험을 통해 진단 키트의 보관에는 시약 보존율이 월등히 높은 멤브레인 습윤 보관법이 더 적합한 것을 확인하였다.

9. 추가 개발한 H5N1 (1-60), H5N1 (2-60) 압타머-항원 응집반응 산란광 측정 한양대에서 추가로 개발한 두 가지 압타머와 항원간의 응집반응도를 이전에 개발한 H5N1 (1-28), H5N1 (2-25)와 비교하기 위해 산란광 측정을 진행하였다.

***압타머 정보**

<2차년도 한양대에서 개발한 압타머>

H5N1 (1-28) : [C6 Amine] CGGATCCCGCGCGCAGTGCCGGGTGCCG

H5N1 (2-25) : [C6 Amine] CCGCGCGGGTCTGAGGAGTGCGCGG

<3차년도 한양대에서 개발한 압타머>

H5N1(1-60)

[C6Amine]ATGCGGATCCCGCGCGCGACCGTGTGTCAGCGGGGACTAGCGGTGTAGCGCG
AAGCTTGCGC

H5N1(2-60)

[C6Amine] ATGCGGATCCCGCGCGGGTCTGAGGAGTGCGCGGTGCCAGTGA
GTGCGCGAAGCTTGCGC

표 8. 조류인플루엔자 응집반응 실험에 사용된 입자 및 압타머 양

PS Particles 입자	Aptamer	PBS
383nm 8 μ l (0.4%)	H5N1 (1-28) : 4 μ l H5N1 (2-25) : 4 μ l H5N1 (1-60) : 3 μ l H5N1 (2-60) : 3 μ l	1989 μ l

가. 실험 준비 과정

- (1) 조류인플루엔자 압타머와 나노입자를 위 표의 정보를 바탕으로 혼합하여 37℃에서 2시간 동안 3D shaker를 이용하여 결합시킨다.
- (2) 입자 표면에 붙지 않은 압타머는 실제 검출에서 잘못된 신호를 유발 할 수 있으므로 세척하여 제거한다. (원심분리 4600 rpm 5분 후 상층액 제거 - 3회 반복)
- (3) 조류인플루엔자 항원 준비 (SNU50-5 : 서울대학교 수의과대학)
실험에 사용된 조류인플루엔자 항원 농도 (총 13가지) -> No target, 10⁻⁴ , 10⁻³ , 10⁻² , 10⁻¹ , 10¹ , 10² , 10³ , 10⁴ , 10⁵ , 10⁶ , 10⁷ , 10⁸ (EID50/ml)

$$\frac{\text{변환 할 항원 농도 Intensity} - \text{한단계 낮은 항원 농도 Intensity}}{\text{한단계 낮은 항원 농도 Intensity}} \times 100$$

그림 145 증가율 계산식

나. 입자크기 : 383nm , 압타머 : H5N1 (1-28)

H5N1 (1-28) 압타머를 사용한 면역입자응집반응의 산란광 변화를 보면 아래 그림과 같이 항원 농도 10에서 산란광의 강도가 증가하기 시작하고 10⁴에서 가장 높은 증가율을 보였으며 10⁷까지 증가하다 10⁸에서는 다시 감소하는 모습을 보였다.

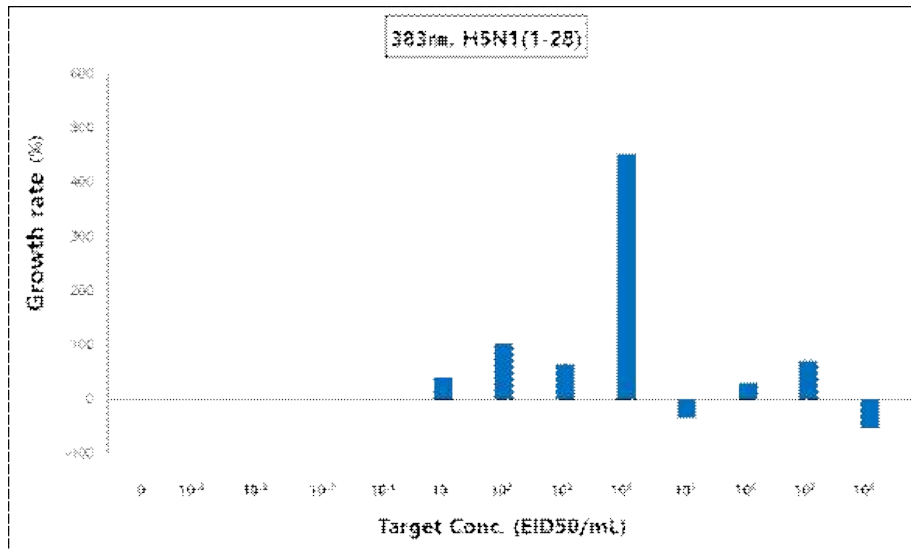


그림 103. H5N1(1-28) 압타머의 항원농도별 산란광 증가율 데이터

다. 입자크기 : 383nm , 압타머 : H5N1 (2-25)

H5N1 (2-28) 압타머를 사용한 면역입자응집반응의 산란광 변화를 보면 아래 그림과 같이 항원 농도 10에서 산란광의 강도가 증가하기 시작하고 10²에서 가장 높은 증가율을 보였으며 10⁶에서 감소 후 산란광 값의 변화가 없었다.

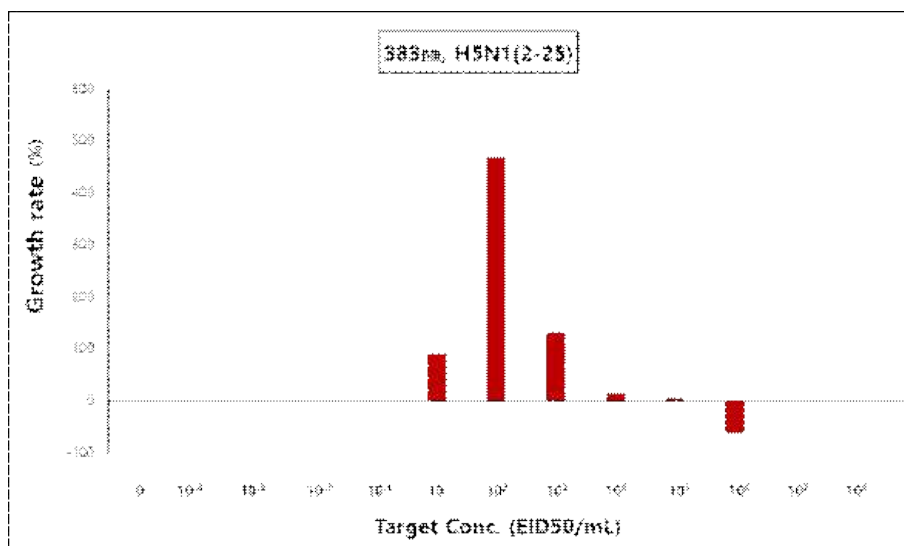


그림 104. H5N1(2-25) 압타머의 항원농도별 산란광 증가율 데이터

라. 입자크기 : 383nm , 압타머 : H5N1 (1-60)

한양대에서 추가로 개발한 H5N1 (1-60) 압타머를 이용하여 면역응집반응 산란광을 측정 한 결과 아래의 그림을 보면 H5N1 (1-28), H5N1 (2-25) 압타머와 같이 항원농도 10에서부터 산란광 강도가 증가하는 모습을 보였고, 10³에서 가장 크게 증가하였으며 10⁶에서 감소하였다가 10⁷에서 다시 증가하였다.

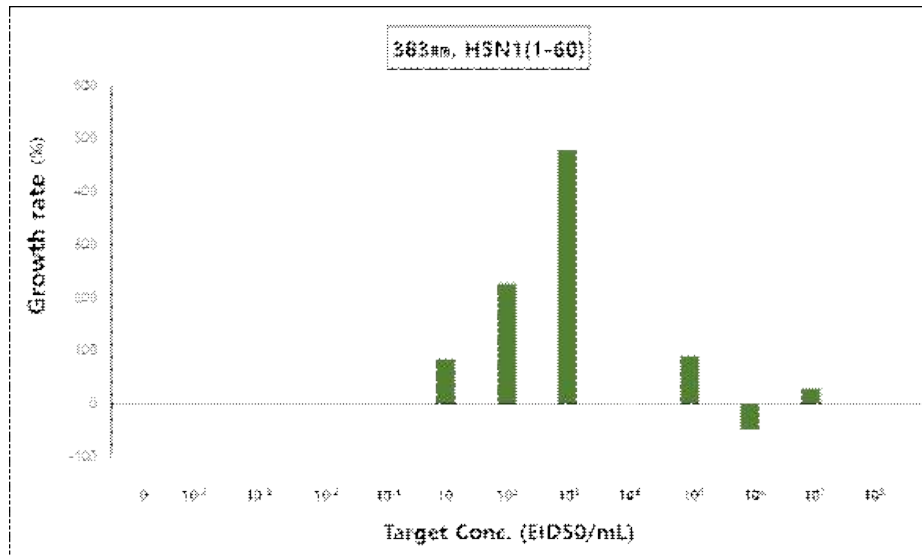


그림 105. H5N1 (1-60) 압타머의 항원농도별 산란광 증가율 데이터

마. 입자크기 : 383 nm , 압타머 : H5N1 (2-60)

H5N1 (2-60) 압타머를 이용하여 면역응집반응 산란광을 측정 한 결과 아래의 그림을 보면 앞서 실험한 (1),(2),(3) 샘플과 다르게 항원농도 10에서 산란광 강도가 매우 미미하게 증가하였으며, 10²을 제외한 다른 농도에서도 증가율이 매우 낮았다.

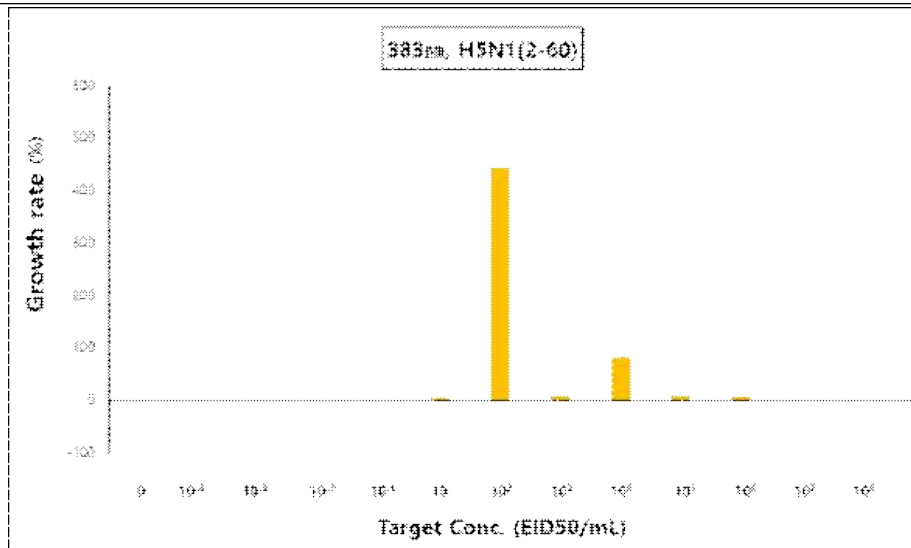


그림 106. H5N1 (2-60) 압타머의 항원농도별 산란광 증가율 데이터

바. (1)~(4) 실험을 통해 얻은 H5N1 압타머의 항원농도별 산란광 증가율 데이터를 종합하면, 먼저 개발된 H5N1 (1-28), H5N1 (2-25) <파란색, 빨간색>의 산란광 강도는 새로 개발된 H5N1 (1-60), H5N1 (2-60) <초록색, 노란색>에 비해 더 높은 것을 확인할 수 있다. 낮은 항원 농도인 $10^0 \sim 10^2$ 에서는 H5N1 (2-25) <빨간색>의 증가율이 가장 높았고 높은 항원 농도인 $10^4 \sim 10^7$ 에서는 H5N1 (1-28) <파란색>의 증가율이 가장 높았다. 이를 토대로 각각 저농도와 고농도의 항원에서 높은 산란광 강도를 보인 H5N1 (2-25), H5N1 (1-28) 압타머를 1:1 비율로 혼합하여 항원과 반응시킨다면 저농도부터 고농도까지 모두 높은 산란광 강도를 보일 수 있을 것으로 추정하여 후속 실험을 진행하였다.

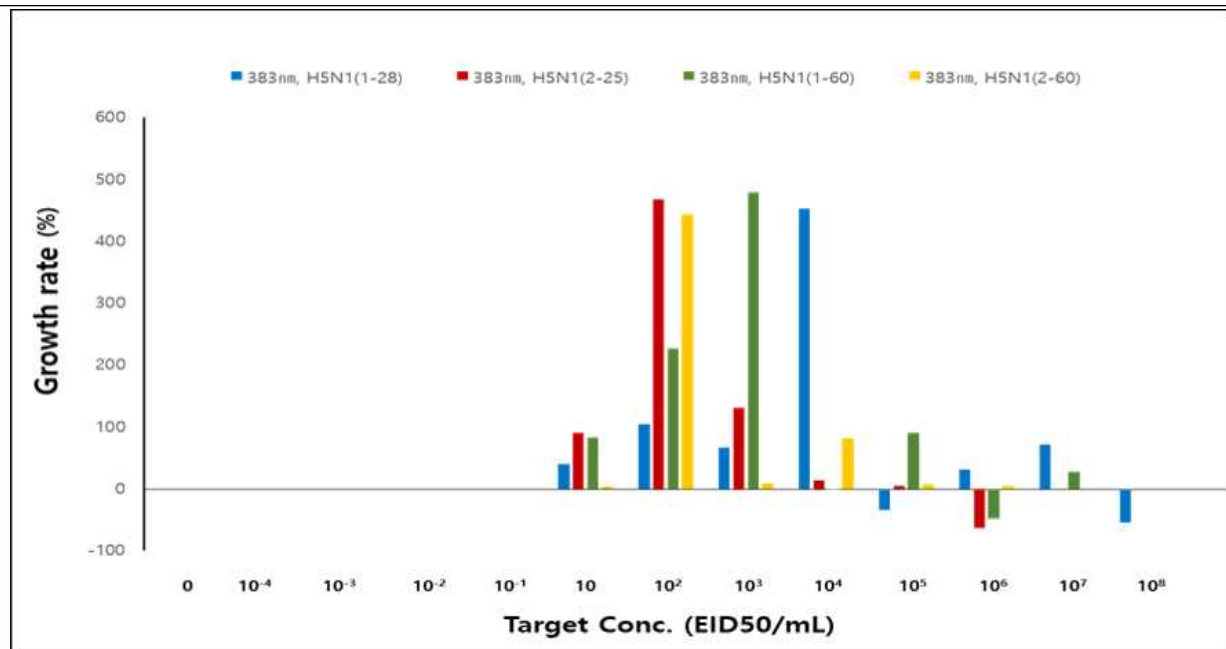


그림 107. H5N1 압타머 4종의 항원농도별 산란광 증가율 비교 그래프

10. H5N1 (1-28), H5N1 (2-25) mix 산란광 측정

고농도 항원에서 민감한 H5N1 (1-28)와 저농도 항원에서 민감한 H5N1 (2-25) 압타머를 2가지 방식으로 혼합한 후 결과를 비교하였다. 파티클과 2종의 압타머를 동시에 결합시킨 샘플(Before Mix)과 파티클과 2종의 압타머를 별도로 결합시킨 후 혼합한 샘플(After Mix)의 항원농도별 면역응집반응을 측정하였다.

가. 입자크기 : 383 nm , 압타머 : H5N1 (1-28 & 2-25) 동시 결합 (Before Mix)
 파티클과 2가지 압타머를 동시에 결합시킨 샘플로 측정한 아래 그래프를 보면 항원 농도 10²부터 산란광 강도가 증가하는 모습을 보여, 단일 압타머를 사용한 경우의 검출한계 (항원농도 10) 보다 더 낮은 감도를 보였다.

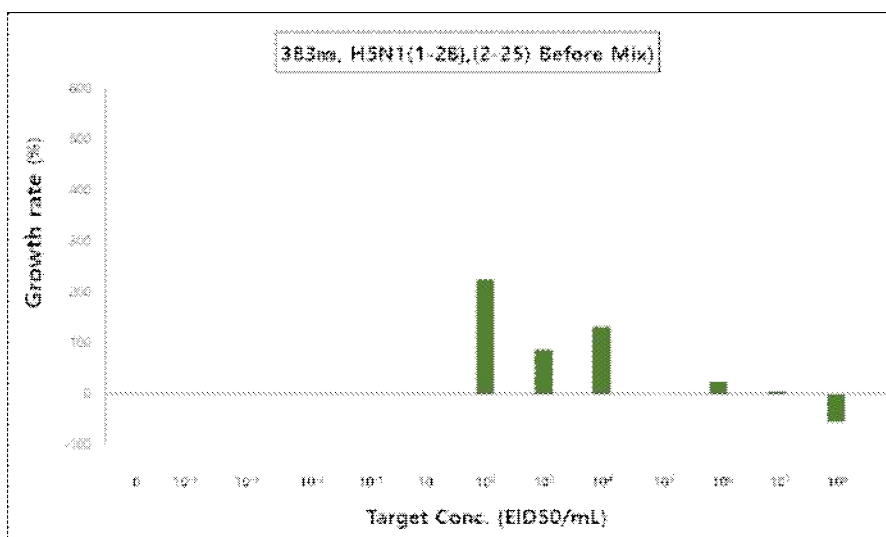


그림 108. 2가지 압타머를 혼합하여 파티클과 결합시킨 진단액의 산란광 증가율 그래프

나. 입자크기 : 383 nm , 압타머 : H5N1 (1-28), H5N1 (2-25) 각각 결합 후 혼합 (After Mix)

2가지 압타머를 각각 파티클과 결합 시켜 1:1로 혼합한 경우에는 항원농도 10에서 증가추세를 보여, 이번 결과 역시 단일 압타머를 사용한 경우와 큰 차이는 없었다.

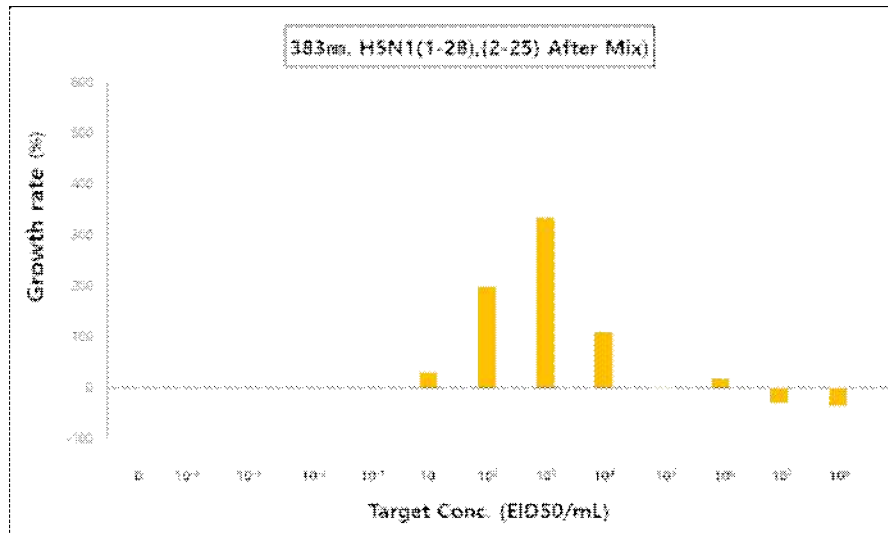


그림 109. 2가지 압타머를 각각 파티클에 결합시킨 후 혼합한 진단액의 산란광 증가율 그래프

다. H5N1 (1-28), H5N1 (2-25) 각각 단일 압타머를 사용하는 것이 혼합된 압타머로 사용한 결과 보다 더 낮은 검출한계 및 높은 산란광 강도를 보였고, 그 중 민감도가 가장 좋았던 H5N1 (2-25)를 단일 압타머로 사용 하는 것이 가장 적합한 것을 확인하였다.

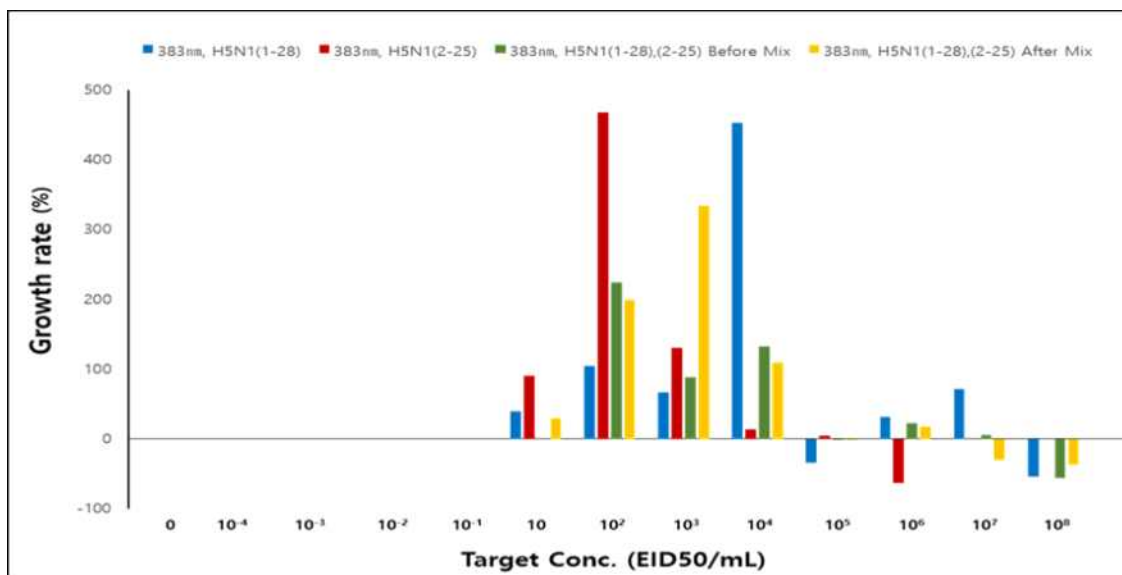


그림 110. H5N1 (1-28) 단일, H5N1 (2-25) 단일, 결합 전 혼합, 결합 후 혼합 4가지 Sample 증가율 비교 그래프

11. 샘플 주입 방법 현장적용 시스템 개발

가. 현장적용 Sample 주입 사전 테스트

현장에서는 Syringe pump의 사용이 어렵기 때문에 이를 대체하기 위한 시스템을 개발을 목표로 하고 있다. 우선 현장 검사법의 민감도를 확인하기 위해, 주사기를 통해 검체를 2분간 수동으로 흡입하며 측정된 산란강도를 Syringe pump를 사용하여 측정된 결과와 비교하였다.

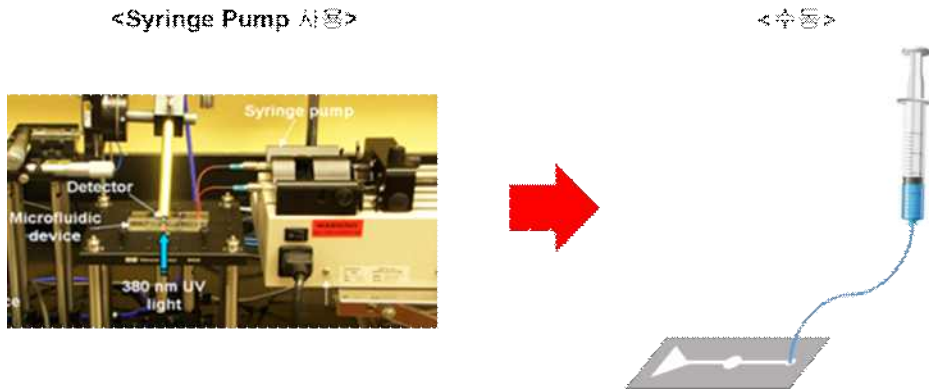


그림 111. Syringe pump와 수동으로 흡입 측정법

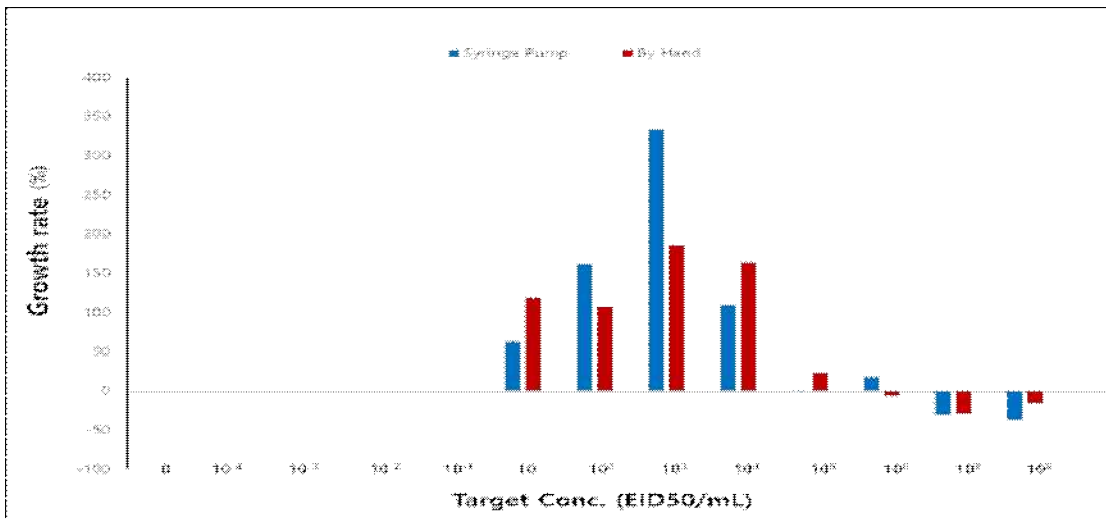


그림 112. Syringe pump(25uL/min)를 이용하여 측정된 결과와 수동으로 흡입하여 측정된 결과 증가율 비교

두 방법의 산란강도 증가율을 비교한 결과 항원 농도 증가에 따른 일부 경향성의 차이를 보였으나, 동일 농도에서는 두 결과간 차이가 크지 않고 산란강도의 증가를 보이는 최소 농도 역시 모두 10으로 두 방법의 검출한계는 동일하였다. 이를 통해 개발된 수동 흡입 방법은 Syringe pump를 대체하여 현장 적용이 가능할 것으로 판단되었다.

나. 유량 조절 방법 개발

수동으로 검체를 흡입하는 방법은 사람마다 흡입속도가 다르기 때문에 유량이 일정하지 못하여 검사의 재현성이 떨어질 가능성이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 수동으로

검체를 흡입하여도 동일한 유량이 유지될 수 있는 시스템의 개발하였다.

(1) 유량 조절 셋팅

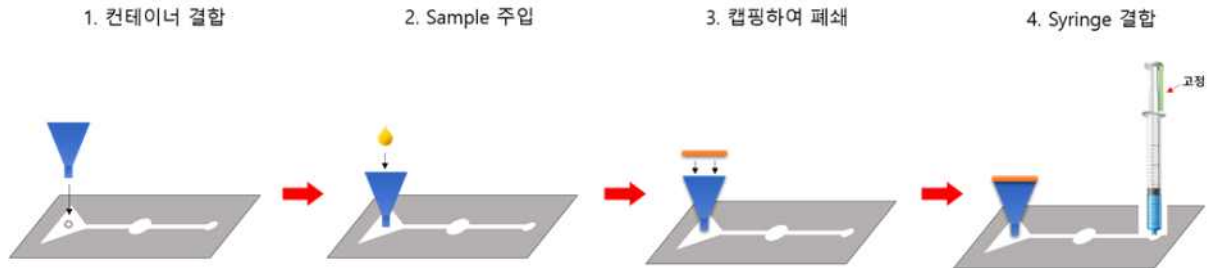


그림 113. 유량 조절 셋팅 순서

위 그림과 같이 우선 컨테이너를 검체 주입부에 결합을 하여 검체를 주입한 후 컨테이너를 캡핑하여 폐쇄한다. 출구부에는 주사기를 장착하고 밀대(plunger)를 당겨준다. 매 회마다 밀대가 일정하게 당겨질 수 있도록 주사기의 손잡이와 밀대 사이를 고정한다.

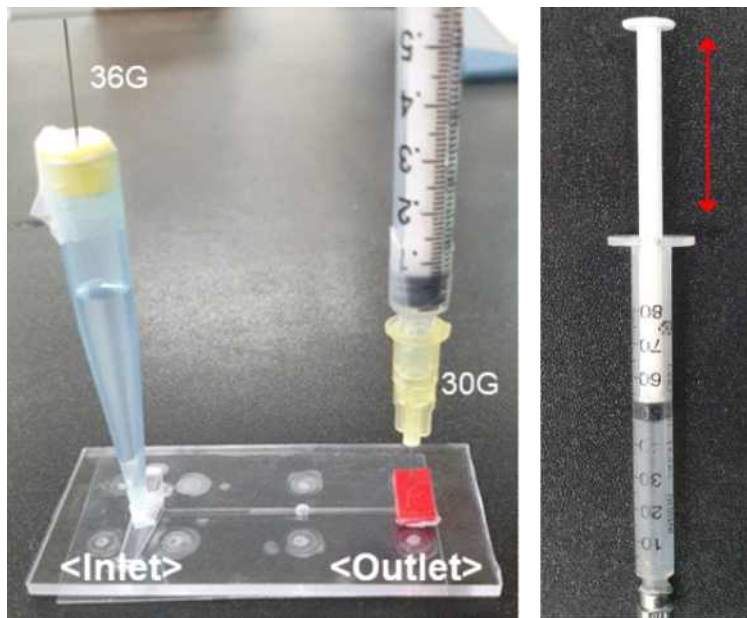


그림 114. 유량 조절을 위한 실제 셋팅

위 그림 (좌)와 같이 주입부와 출구부에 바늘(각각 36G, 30G)을 결합하여 입구의 폭을 줄였고, 이를 통해 유입되는 공기의 속도를 제한시켜 유량을 감소시키는 효과를 얻을 수 있었다. 또한 주사기 내부에는 멤브레인(지름 4mm, 공극 0.45 μ m, 10ea)을 삽입하여 주사기를 통해 발생하는 추가적인 압력을 감소시켰다.

(2) 유량 조절 테스트

수동 검체 흡입으로 발생하는 검체의 유량을 감소시키기 위해 위 그림 (우)와 같이 주사기의 밀대를 당긴 길이에 따른 유량을 측정하였다. 실험은 샘플이 뷰셀에 도달 한 시

점부터, 샘플 (300 uL)이 모두 빠져나오는 시간을 측정하여 초당 유량으로 환산하였다. (검체당 5회 측정)

표 9. 피스톤 길이에 따른 유량 조절 변화

5 cm	4.5 cm	4 cm	3.5 cm
15.5 ~ 19 $\mu\text{l}/\text{sec}$	15.5 ~ 19 $\mu\text{l}/\text{sec}$	14.6 ~ 17 $\mu\text{l}/\text{sec}$	13 ~ 16.09 $\mu\text{l}/\text{sec}$
3 cm	2.5 cm	2 cm	1.5 cm
12.4 ~ 15.2 $\mu\text{l}/\text{sec}$	8 ~ 10.2 $\mu\text{l}/\text{sec}$	6.8 ~ 8.3 $\mu\text{l}/\text{sec}$	4.9 ~ 5.2 $\mu\text{l}/\text{sec}$

수동 검체 흡입 방법으로 가능한 최소 유량은 $5\mu\text{l}/\text{sec}$ 로 Syringe pump를 사용한 유량 ($0.461\mu\text{l}/\text{sec}$)에 비해 몇 배 이상을 보였다. 따라서 해당 유량을 적용한 경우의 신뢰도를 판별하기 위한 추가 실험이 필요하였다.

(3) 최적 유량 조절 시스템 산란광 측정

앞선 실험에서 얻은 조건이 현장 적용에 적합한지 판단하기 위하여 항원 농도별 산란광 측정을 진행하였다. 면역응집반응 진단액 최적 실험에서 결정한 H5N1(2-25) 압타머와 서울대학교 수의대로부터 제공받은 SNU50항원을 사용하여 항원 농도 0부터 10^4 까지만 산란광을 측정하였다. 아래 그래프와 같이 Syringe Pump를 사용한 기존 유량 ($0.416\mu\text{l}/\text{sec}$) <파란색>, Syringe Pump를 사용한 수동 흡입법에 맞춘 유량 ($5\mu\text{l}/\text{sec}$) <빨간색>, 주사기를 사용한 수동 흡입 유량 ($5\mu\text{l}/\text{sec}$) <녹색>, 이렇게 총 3가지 조건의 샘플을 산란광 측정 하였다. 실험결과 Syringe Pump ($5\mu\text{l}/\text{sec}$) <빨간색>에서 만 10^4 에서 약 10% 감소된 부분을 제외 하면, 세 가지 조건 모두 항원 농도 10에서 산란광 강도가 증가하기 시작하였고 그 이상의 항원 농도에서는 산란광의 증가율 값은 >0 으로 항원 농도에 따라 산란광 강도가 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 검출 한계는 항원 농도 10 ($\text{EID}_{50}/\text{ml}$)로 현장 적용 시스템을 적용하여 조류독감 바이러스 진단에 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

(4) PCR과 동등성 시험 비교

센서	검출 한계 ($\text{EID}_{50}/\text{mL}$)
PCR	$10^{-1}\sim 10$
ELISA	10
LFA	$10^3\sim 10^4$
SPR	2×10^2
본 과제 센서	$10 \sim 10^2$

진단키트의 validation 및 진단 키트의 성능은 상용화 단계에서 최종 제시할 예정임.

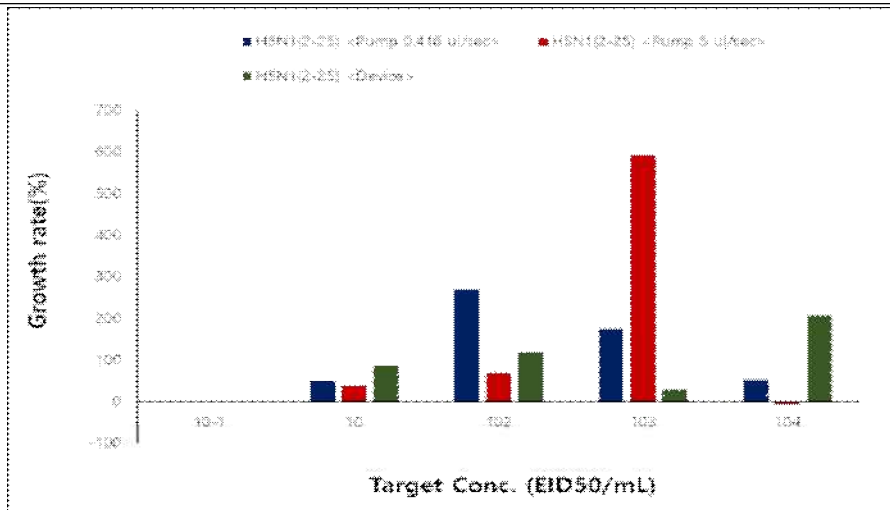


그림 115. Syringe Pump <실험실 유량(0.416 $\mu\text{l}/\text{sec}$)>, Syringe Pump <현장적용 유량(5 $\mu\text{l}/\text{sec}$)>, 유량조절 시스템을 적용, 3가지 샘플의 산란광 절대값 그래프

○ 기관별 수행 내역 (협동연구기관 : 한양대학교)

1. 고 병원성 조류독감(H5N1) 항원의 클로닝 및 정제

가. 고 병원성 조류독감(H5N1) 항원의 클로닝

- ① PCR과정을 통해 조류독감 항원서열을 증폭하였음. (그림 116)
- ② 발현을 위해 T7 Promoter를 갖고 있는 박테리아 발현용 벡터인 pET 28a 플라스미드 벡터에 삽입하기 위해 BamHI 과 HindIII 제한효소를 사용하여 발현 벡터에 DNA ligase를 통한 ligation을 통해 클로닝을 함. (그림 117)

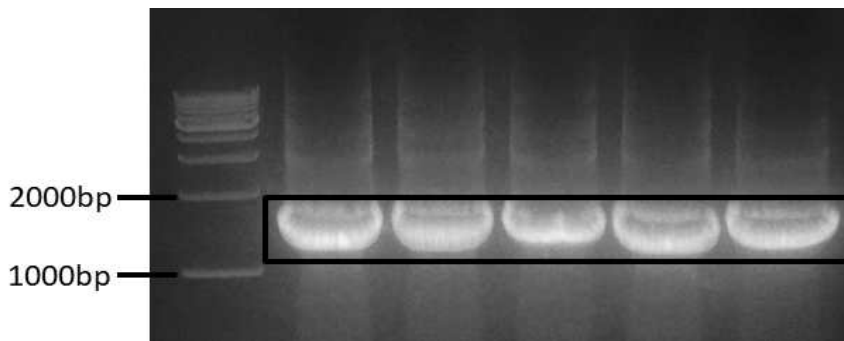


그림 116. PCR을 통한 고 병원성 조류독감(H5N1) 항원서열 증폭 :조류독감 항원의 크기인 1700bp의 크기를 확인하였음.

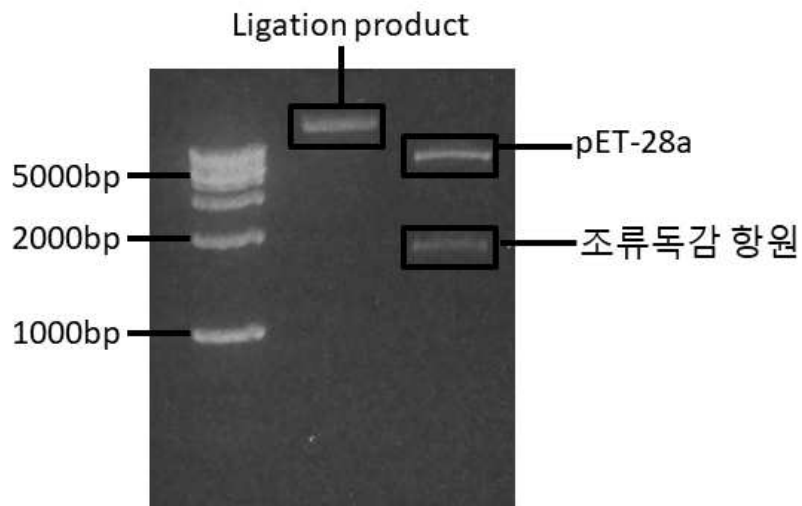


그림 117.. 조류독감 항원클로닝 확인
조류독감 항원의 크기인 1700bp와 발현 벡터인 pET 28a 플라스미드벡터의 크기인 5700bp의 크기를 확인 하였음.

나. 고 병원성 조류독감(H5N1) 항원의 정제

- ① 클로닝한 조류독감 항원 발현 플라스미드를 발현숙주인 BL21 (DE3)에 형질전환 시킨 후, 0.5 mM IPTG, 37°C 조건하에서 약 24시간동안 대장균을 배양하여 조류독감 항원 대량생산을 유도하고 SDS-PAGE 전기영동을 통하여 발현된 단백질을 확인하였음(그림 118).

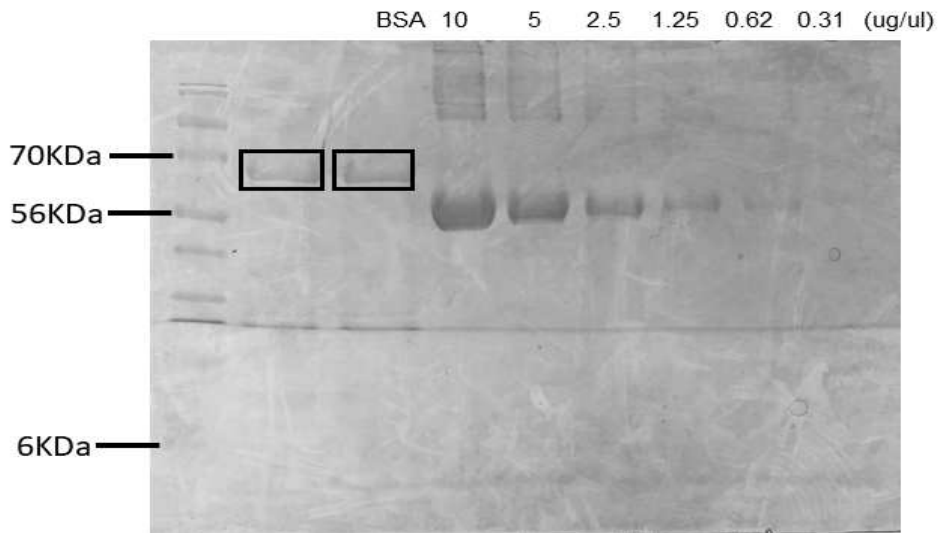


그림 118. affinity chromatography를 이용하여 조류독감 항원을 분리, 정제.
: 발견된 조류독감 항원의 N-말단 지역에 위치한 6-his tag을 이용하여 금속 이온(Ni^{2+})이 결합되어있는 sepharose resin과의 affinity를 이용하여 분리, 정제하였음.

- ② 단백질 생산량은 BSA의 양을 희석하여 비교 분석한 결과 약 $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 단백질을 확보하였음.

2. SELEX 기반 조류독감 항원 특이적 결합 압타머 스크리닝

가. 조류독감 항원 특이적 결합 압타머 스크리닝을 위한 단일가닥 DNA library 제작

- ① PCR(중합효소 연쇄반응) 방법을 이용 library 확보를 위한 주형서열 및 이에 특이적인 프라이머 서열 합성.
- ② 다양한 프라이머 농도 조건에서 PCR 진행 후, agarose gel 과 native PAGE gel 전기영동법을 이용하여 증폭 산물 확인.
- ③ 60 bp 와 30 bp 위치에서 dsDNA(이중가닥 DNA)와 단일가닥 DNA(단일가닥 DNA)로 분리된 밴드 확인 (그림 119, 120). Native PAGE gel에서 분리된 단일가닥 DNA를 crush and soak 방법 및 에탄올 침전법을 이용하여 단일가닥 DNA library를 확보함.

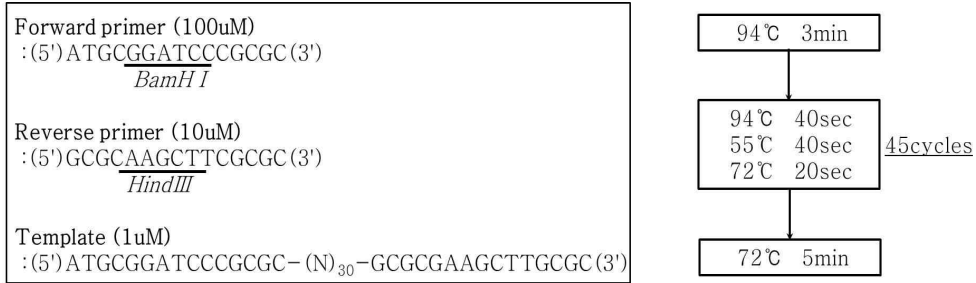


그림 119. 단일가닥 DNA Library 제작 위한 Template, 프라이머 서열 및 PCR 조건.

: 단일가닥 DNA library 확보를 위하여 주형가닥으로 이용할 서열과 그 서열에 특이적인 프라이머를 각각 합성하여 PCR을 진행함. 단일가닥의 DNA 서열을 얻기 위하여 프라이머 농도를 100 μ M과 10 μ M로 달리하였음.

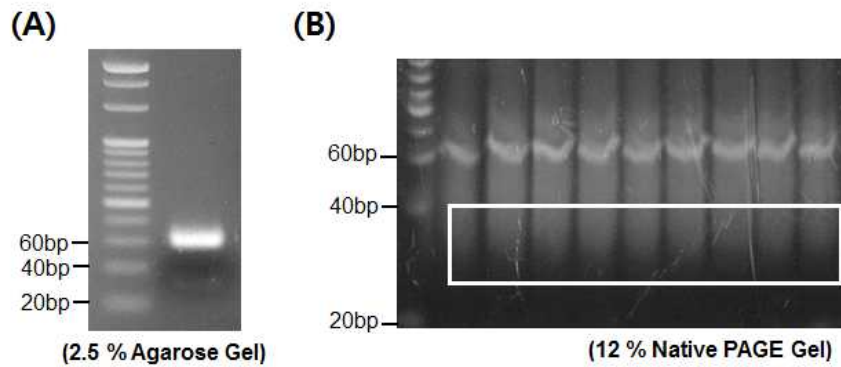


그림 120. 단일가닥 DNA Library 제작을 위한 PCR 산물.

: (A) 2.5 % agarose gel 전기영동 결과. (B) 12 % native PAGE gel 전기영동 결과. 60 bp 에서 dsDNA(이중가닥 DNA), 30 bp 부근에서 단일가닥 DNA(단일가닥 DNA)로 각각 나뉘어진 밴드를 얻음.

나. 고 병원성 조류독감 항원(H5N1) 결합 압타머 스크리닝

(1) SELEX

- ① SELEX 기법은 크게 결합, 세척, 용출의 3단계로 이루어짐. Nucleic acid pool(단일가닥 DNA library)와 타겟 물질(Dihydrostreptomycin)을 결합시킨 후, 결합하지 않은 단일가닥 DNA는 제거하며, 결합된 단일가닥 DNA를 용출하여 비대칭 PCR(Asymmetric PCR) 과정으로 증폭시킨 후 다음 round를 위한 단일가닥 DNA library pool을 준비함 (그림 121).

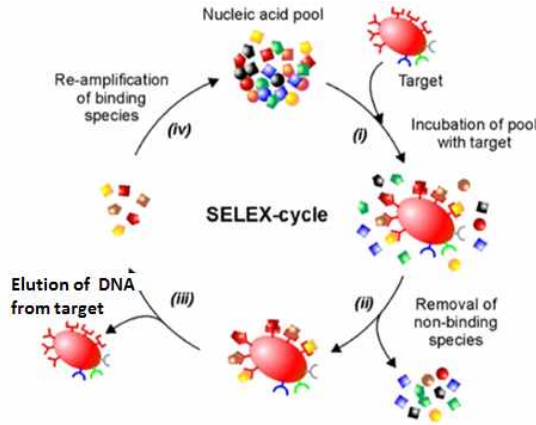


그림 121. SELEX 모식도.

- ② 조류독감 항원과 반응하는 단일가닥 DNA library의 경우 서열 분석을 위한 제한효소 자리 및 random 30 mer의 핵산(nucleic acid) 포함 총 60 mer 형태로 제작, PCR 과정을 통해 $10^{14} \sim 10^{15}$ 개의 서로 다른 핵산 서열을 가진 단일가닥 DNA library를 구성하고 있음.
- ③ 단일가닥 DNA를 이용하여 H5N1에 특이적으로 결합하는 압타머를 스크리닝하기 위하여 올리고뉴클레오타이드의 인비트로 셀렉션(In Vitro selection of oligonucleotide)인 SELEX를 수행하였다. 기존의 SELEX 방법에서 변형된 방법으로 농축 필터를 이용하였다.
- ④ 바이러스와 압타머가 결합하면 멤브레인의 크기보다 커지므로 멤브레인을 통과하기 못하고 멤브레인 상부에 남아 있게 되며 결합하지 않은 단일가닥 DNA는 멤브레인을 통과하여 분리할 수 있게 되는 원리를 이용하였다.

Round	결합버퍼	H5N1	결합시간 (분)
1	20 mM Tris	10 HAU	60
2	20 mM Tris	10 HAU	60
3	20 mM Tris, 50 mM NaCl	5 HAU	45
4	20 mM Tris, 50 mM NaCl	5 HAU	45
5	20 mM Tris	BSA (for negative round)	30
6	20 mM Tris, 100 mM NaCl	2 HAU	15
7	20 mM Tris, 100 mM NaCl	2 HAU	15

표 10. H5N1 결합 압타머 스크리닝 조건.

: SELEX 반응의 각 라운드별 단일가닥 압타머 선별 조건. 라운드가 반복 진행될수록 반응 완충용액의 농도를 증가시키고, 반응 시간을 줄여 결합력이 좋은 압타머를 선별하고자 함.

- ⑤ 이 때 H5N1와 단일가닥 DNA를 결합시킬 때 buffer조건에 따른 단백질과 단일가닥 DNA의 농도, 결합 시간, 결합조건을 통하여(표 10) 극한 조건에서도 높은 결합력으로 결합할 것으로 예상되는 단일가닥 DNA를 확보하였다.
- ⑥ 이를 위해 초여과(Ultrafiltration) (30 kDa 커팅 멤브레인 포함, Millipore)을 이용하여 H5N1과 단일가닥 DNA를 각 라운드의 반응시간만큼 상온에서 반응시키고, 원심분리를 통해 H5N1과 결합하지 않은 단일가닥 DNA는 멤브레인 밑으로 통과시켜 분리하고, 멤브레인을 통과하지 못하고 상부에 남아 있는 잔여물을 PCR을 통해 증폭하여 12% 네이티브 DNA 전기영동을 통하여 H5N1에 결합하는 DNA 서열만을 확보 (그림 122).
- ⑦ Crush and soak과 에탄올 침전법을 이용하여 증폭된 단일가닥 DNA를 확보하였고 이를 다음 round에서 사용함.
- ⑧ 비특이적 단일가닥 DNA 제거를 위해, BSA를 사용하여 단일가닥 DNA 압타머를 negative selection 과정 진행.

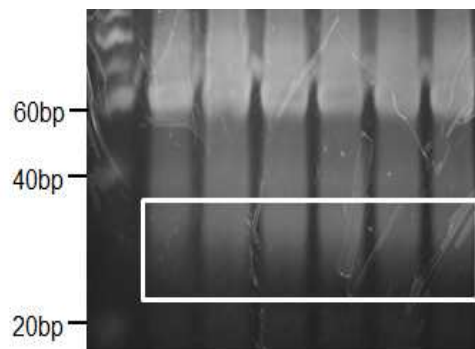


그림 122. 용출된 산물의 비대칭 PCR을 통한 증폭.

: 각 round 진행 후 용출된 단일가닥 DNA를 비대칭 PCR을 통해 증폭시킨 후, 12 % Native PAGE gel 전기영동을 통해 확인함. 이후 crush and soak/에탄올 침전법을 이용하여 단일가닥 DNA를 분리하여 다음 round에서 사용함.

(2) H5N1과 결합하는 단일가닥 DNA 압타머 서열 분석

- ① 최종 7라운드의 SELEX 과정을 통해 얻은 단일가닥 DNA의 서열 분석을 위해 유전자 클로닝 과정을 진행하였음.
- ② 이를 위해 각 같은 농도의 프라이머(10 μ M)을 이용하여 단일가닥 DNA를 dsDNA로 증폭하였음. 서열 분석을 위해 T7 Promoter를 갖고 있는 박테리아 발현용 벡터인 pET 28a 플라스미드 벡터에 dsDNA를 삽입하였음 (그림 123). BamHI 과 HindIII 제한효소를 사용하여 발현 벡터에 DNA ligase를 통한 ligation을 통해 클로닝을 함.

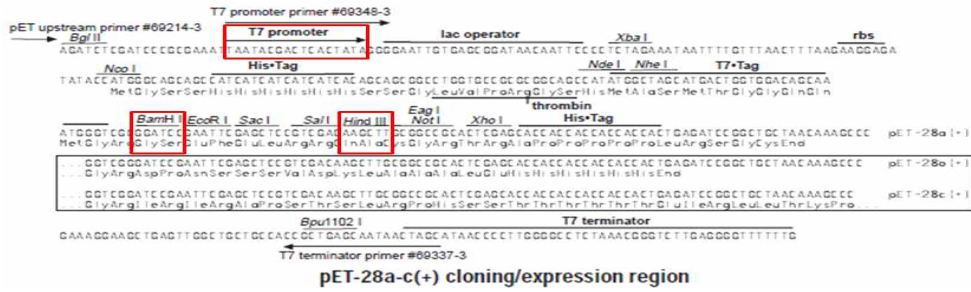


그림 123. pET 28a(+) vector.

: 박테리아 발현용 벡터인 pET 28a vector는 T7 Promoter를 비롯하여 클로닝을 위한 여러 제한효소 자리를 갖고 있음. BamHI 과 HindIII 제한효소를 사용하여 발현 벡터에 DNA ligase를 통한 ligation을 통해 클로닝 하였고 이를 T7 Promoter 프라이머를 이용하여 서열 분석을 의뢰함.

- ③ 클로닝 된 pET 28a-dsDNA 산물을 추출하여 각 염기서열을 분석하였으며, 각각의 서열을 분석한 결과 60 mer의 서로 다른 서열을 갖는 단일가닥 DNA 압타머 16종을 얻음. 그중 빈도수가 높은 1,2번의 압타머를 사용함 (표 11).

No.	Sequence	Frequency
1	ATGCGGATCCCGCGC GCGACCGTGTGACGGGGACTAGCGGTGTA GCGCGAAGCTTGCGC	3
2	ATGCGGATCCCGCGC GGGTCTGAGGAGTGC CGGGTGCCAGTGAGT GCGCGAAGCTTGCGC	2
3	ATGCGGATCCCGCGC GGGGGCTTGGACCGAGCGGTGTACGGCGCG GCGCGAAGCTTGCGC	1
4	ATGCGGATCCCGCGC CGATCCACGAGAGTGC GCCCTGCATCCGAC GCGCGAAGCTTGCGC	1
5	ATGCGGATCCCGCGC CGACGGCAGAGAGGCGCGGCTCCCTTCGGTCC GCGCGGATCCGCATA	1
6	ATGCGGATCCCGCGC GCCGTCAAGGGGTACGTCACGGAAGCAAAG GCGCGAAGCTTGCGC	1
7	ATGCGGATCCCGCGC GGTGTGGTTACACAGCCCGACCGCCATGC GCGCGAAGCTTGCGC	1
8	ATGGGATCCCGCCA TCCCGGAGCAGCGGCAGCGTCCGGCTCT GCGCGAAGCTTGCGC	1
9	ATGCGGATCCCGCGC GCATCGCAGTACGCATGCGGAGTACGCCT GCGCGAAGCTTGCGC	1
10	ATGCGGATCCCGCGC CCAGTGGATGGGGCGTGGGTTAGCTGCCGGAGG GCGCGAAGCTTGCGC	1
11	ATGCGGATCCCGCGC TAGTCAGCAAGGTTCCGGGACCGCGGGGT GCGCGAAGCTTGCGC	1
12	ATGCGGATCCCGGCC GACGAAACGGAGGTGCGGCCCTGCTGCC GCGCGGATCCGC	1
13	ATGCGGATCCCGCGC GCGACCGTGTGACGGGGACTAGCGGTGTA GCGCGAAGCTTGCGC	1
14	ATGCGGATCCCGCGC ACGTGAGCTTGTGCTGGACCTTGCCACCC GCGCGAAGCTTGCGC	1
15	ATGCGGATCCCGCGC GATGGCGGGCTTCGCAGGGATCTGGCTGT GCGCGAAGCTTGCG	1
16	ATGCGGATCCCGCGC CAGGCACGACGTCGGGTTCATGCAGCTCG GCGCGAAGCTTGCG	1

표 11. H5N1 결합 압타머 서열.

: 클로닝 과정 후 서열 분석을 진행하여, 총 16종의 서로 다른 압타머 서열 발굴함.

- ④ 압타머 1,2의 2차 구조는 M-fold 프로그램을 통하여 예측하였음 (그림 124).

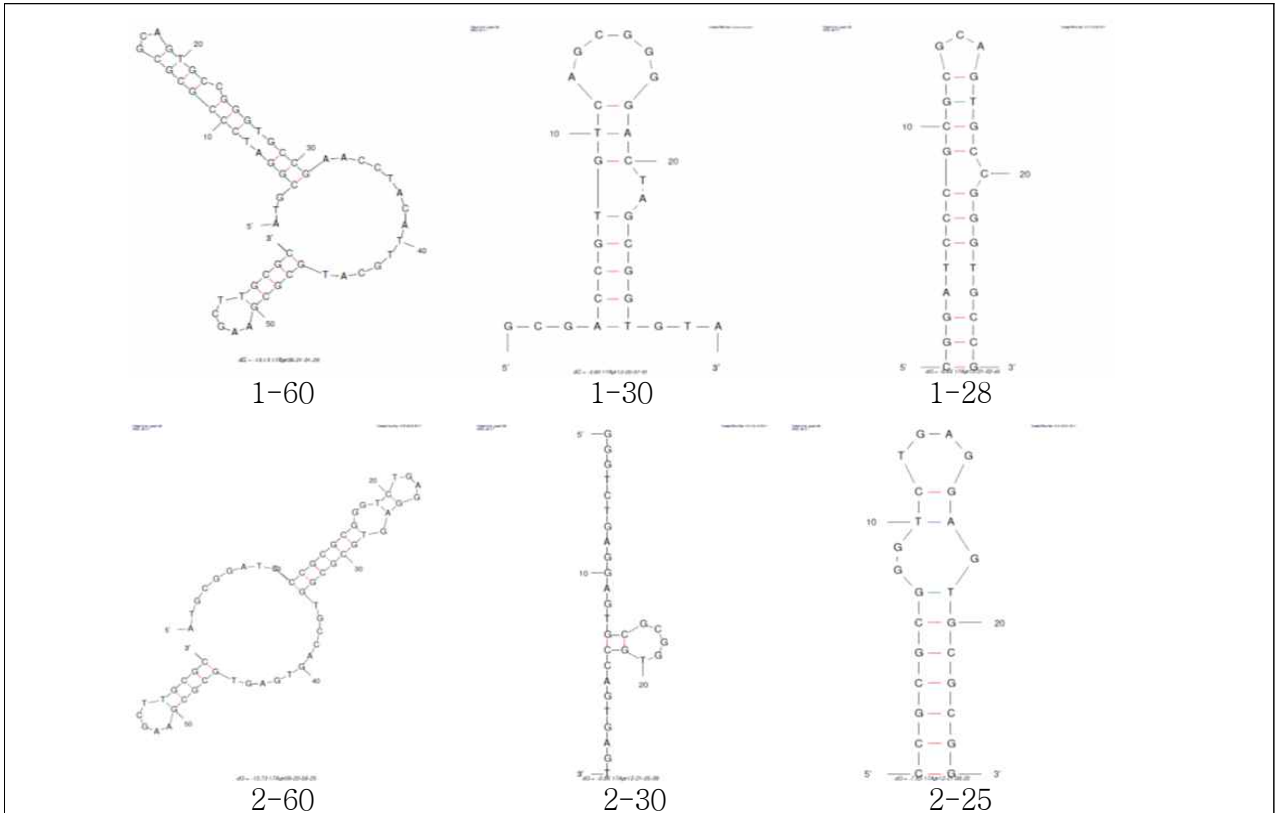


그림 124. 발굴한 압타머의 2차 구조 예측.

:압타머 2차 구조 및 서열 최적화를 통한 압타머 서열 축소. 2차 구조 분석을 통해 Stem-loop 구조를 가지는 부분을 확인 하였으며, 이 구조의 서열을 다시 2차구조 확인 시 Stem-loop구조를 유지하는 것을 확인함.

3. 발굴한 압타머의 물리, 화학적 특성 분석

가. 압타머 및 유도체의 구조 분석

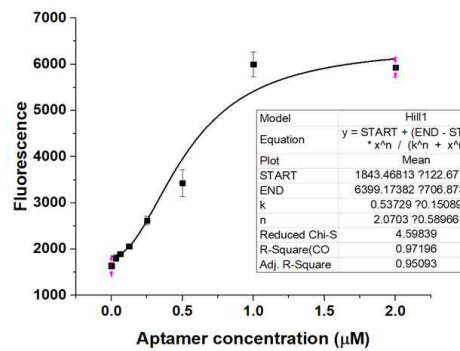
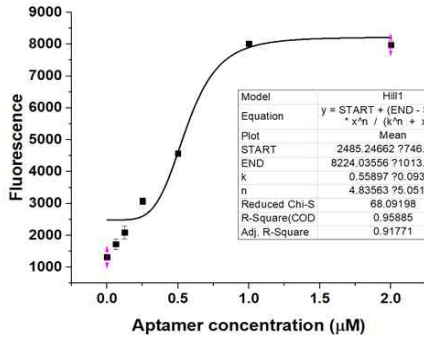
- ① 선별된 압타머의 서열 최적화를 위하여 2차 구조를 분석하였다. 2차 구조는 M-fold web server를 통하여 분석되었으며, 이러한 서열의 구조는 그림 9에 나타내었음..
- ② 이러한 구조를 통하여, 2가지 서열 HBA1 과 HBA2가 각각 primer 부분을 제외한 stem-loop구조를 하나씩 가지는 것을 확인 하였으며, 이러한 Stem-loop구조의 서열을 이용한 2차 구조 분석 시 Stem-loop구조를 유지하는 것 확인. (그림 124) 이러한 Stem-loop구조를 가지는 서열을 HBA의 최적화 서열로 설정하여 후의 결합력 및 특이도 등의 특성 분석을 실시하였다. 이러한 최적화 서열은 각각 HBA1' , HBA2' 로 나타냄.

나. 합성된 압타머 서열과 약독화된 H5N1 바이러스의 결합력 분석

- ① 선별된 압타머의 특성 분석을 위하여 FAM(6-Carboxyfluorescein)이 연결된 압타머 서열을 주문, 합성하였다. FRET 현상에 의해 형광을 소광시키는 그라핀 산화물의 특성을 이용하여 결합력 측정.
- ② 구체적으로 환원 그라핀 산화물 4 mg/ml 의 농도를 이용 선별된 압타머 (0 - 2 μ M)를 15분 동안 결합시켜 형광을 소광 시켰다. 다음으로 2 HAU 의 바이러스를 처리 후 30분 동안 상온에서 반응시킨 후 원심분리 후 상층액에 남아있는 용액을 이용 형광을 분석하여

결합력 측정.

- ③ aptamer의 농도가 높아짐에 따라 2 HAU의 H5N1 바이러스에 의해 회복되는 형광의 세기가 증가하였으며, 2 μM 에서 포화가 되는 것 확인. 이를 Origin을 이용 non-linear fitting을 이용 해리 상수를 계산한 결과 각각 558, 537 nM 의 결합력을 나타냄. (그림 125)



HBA1'

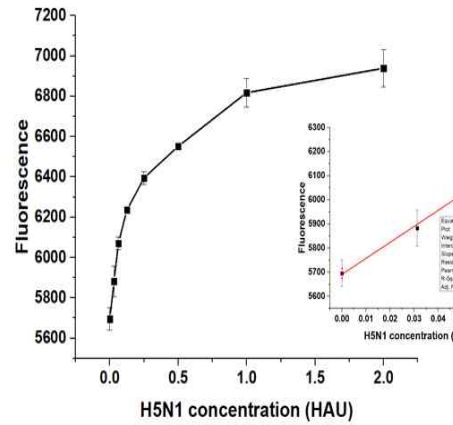
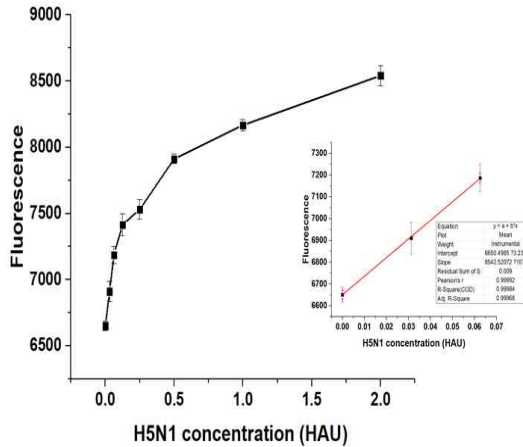
HBA2'

그림 125. HBA1', HBA2' 과 약독화된 H5N1에 결합력 분석.

: aptamer 농도에 따른 신호 회복 경향. FAM 라벨링된 aptamer의 그래핀으로부터 회복된 신호를 통해 결합력의 지표인 해리 상수(K_d)를 도출함.

다. 합성된 aptamer 서열의 검출 한계 분석

- ① 4 mg/ml 농도의 환원 그래핀 산화물과 2 μM aptamer를 반응시킨 후, 각 튜브에 H5N1 바이러스의 농도를 0 - 2 HAU로 다르게 처리하여 회복된 aptamer의 형광 세기를 측정함으로써 aptamer 서열의 H5N1 바이러스에 대한 검출 한계 분석.
- ② H5N1 바이러스의 농도가 증가함에 따라 포화되는 형광 신호를 나타내었고 적은 농도 범위에서 세부적으로 회복된 형광 세기를 측정한 결과, HBA1' 은 0 - 0.0625 HAU의 농도 범위에서 HBA2' 는 0 - 0.0625 HAU의 농도 범위에서 직선 그래프 확인.
- ③ 이 그래프를 통해 해당 aptamer가 각각 0.0123, 0.0254 HAU의 검출 한계 나타냄. (그림 126)



HBA1`

HBA2`

그림 126. HBA1`, HBA2`에 대한 검출한계 분석.

: H5N1 바이러스 농도에 따른 형광 회복 신호 및 검출한계 산정. 농도가 증가함에 따라 회복되는 형광 세기가 포화되었고, 2 HAU까지의 농도 범위에서 포화 되는 것을 확인함. 각각 압타머의 검출한계는 정량적으로 증가하는 농도 범위에서 선형 그래프를 산정 후 농도 0 HAU에서의 형광세기에 표준편차의 3배를 더하여 그 형광 세기를 보이는 농도를 검출한계로 나타냄.

라. 합성된 압타머 서열의 특이도 분석

- ① 해당 압타머의 특이도를 분석하기 위해 H5N1 바이러스 검출 한계의 20배인 0.5 HAU의 바이러스를 기준으로 정하여 다른 바이러스들과 압타머와의 결합력 비교.
- ② 실험 방법은 동일하게 환원 그래핀 산화물과 압타머를 상온에서의 교반을 통해 흡착시키고, 다른 종류의 바이러스를 처리함에 따라 회복되는 압타머의 형광 신호를 측정하는 방식으로 진행.
- ③ Haemagglutinin만이 다른 바이러스 H1N1과 Haemagglutinin, Neuraminidase 모두 다른 H9N2 바이러스 두 가지에 대하여 특이도 분석을 진행하였을 때, H5N1에 대한 형광 회복되는 정도에 비하여 굉장히 낮은 형광 신호의 회복을 보였으며, H5N1을 100% 기준으로 분석결과 HBA1`은 거의 0%의 낮은 결합력을 나타내었으며, HBA2`는 아무 것도 넣지 않은 Blank 보다도 낮은 형광세기를 보여 해당 압타머들이 H5N1 바이러스에 대한 결합특이도를 보유함. (그림 127)

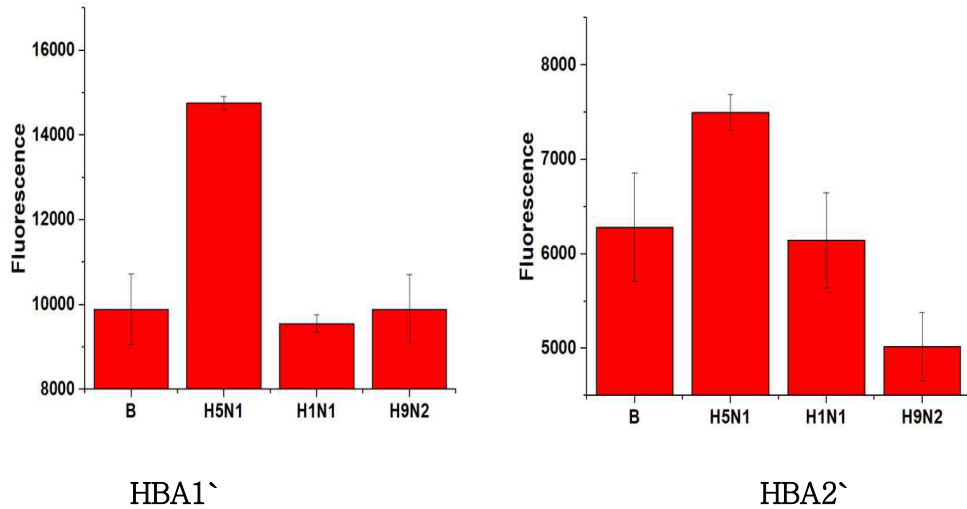


그림 127. 압타머의 특이도 분석.

: H5N1를 기준으로 다른 바이러스 (H9N2, H1N1)에 대한 형광 회복 신호와 비교한 결과 90% 이상의 결합 차이를 보이며 해당 서열이 다른 바이러스에 대해 결합을 보이지 않으며, H5N1에 대한 결합 특이도를 가지는 것을 확인함.

4. 고 병원성 조류독감 바이러스(H5N1) 검출을 위한 PDAP 합성

가. PDL backbone과 SPDP linker 결합

- ① PDL에 압타머를 연결시키기 위해 각 크기별 PDL 0.16M에 SPDP linker 3.2 μ M 를 처리하여 1시간 동안 반응. (그림 128)

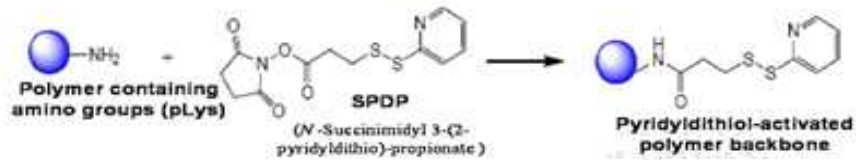


그림 128. PDL과 SPDP의 반응 모식도

- ② Gel filtration을 이용하여 PDL-SPDP 중합체 분리. (그림 129)

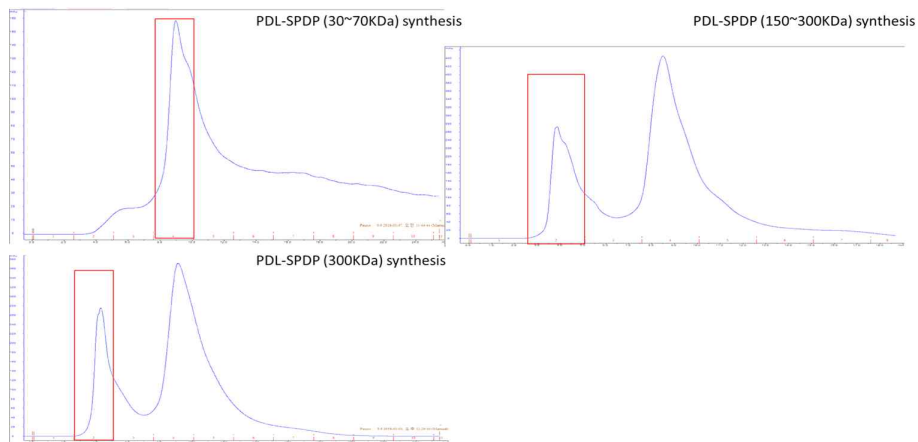


그림 129. Gel filtration을 이용한 PDL-SPDP 분리

③ PDL-SPDP 중합체가 있는 fraction에서 396 μl 를 1.5ml 튜브에 옮긴 후 DTT 1 M, 4 μl 처리하여 차광된 조건에서 30분 동안 반응시킨 후 343 nm 파장으로 자외선 흡광도 측정하여 결합유무 및 결합정도 확인. (그림 130, 표 12)

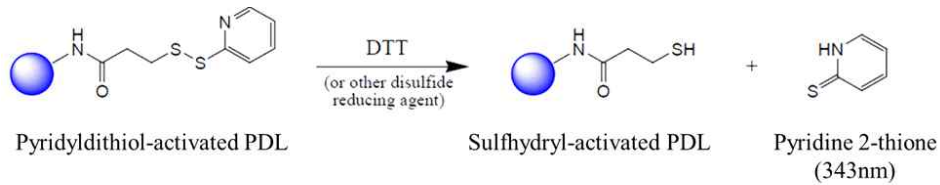


그림 130. PDL과 반응한 SPDP 농도 측정 모식도
PDL에 결합된 SPDP로부터 DTT로 인해 떨어져 나온 Pyridine 2-thione의 자외선 흡광도를 측정하여 PDL과 SPDP 결합유무 및 결합정도 확인.

PDL size	Fraction	DTT X (343nm)	DTT O (343nm)	Concentration (nM)
150~300KDa	2	0.023	1.034	503
	4	0.041	0.728	342
300KDa 이상	2	0.056	1.104	393
	4	0.032	0.610	216
30~70KDa	3	0.019	0.361	700
	4	0.041	0.728	1450

표 12. PDL과 반응한 SPDP 농도

나. PDL-SPDP 중합체에 압타머 결합

- ① SPDP의 pyridine-2-thiol 그룹과 반응시키기 위해 thiol 그룹을 추가한 압타머를 합성 (바이오니아에 합성 주문).
- ② 각 크기별 PDL-SPDP 중합체에 thiol 그룹이 추가된 압타머 100 μM , 50 μl 를 넣고 1 시간 동안 반응시킴. (그림 16)

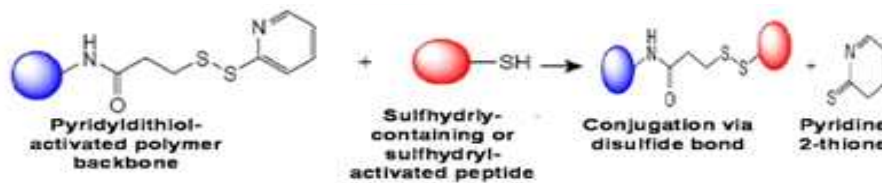


그림 131. PDL-SPDP와 압타머의 반응 모식도

③ 합성된 PDAP에 결합한 압타머의 농도 측정을 위해 단일 압타머의 농도 대비 형광 신호 측정. (그림 132)

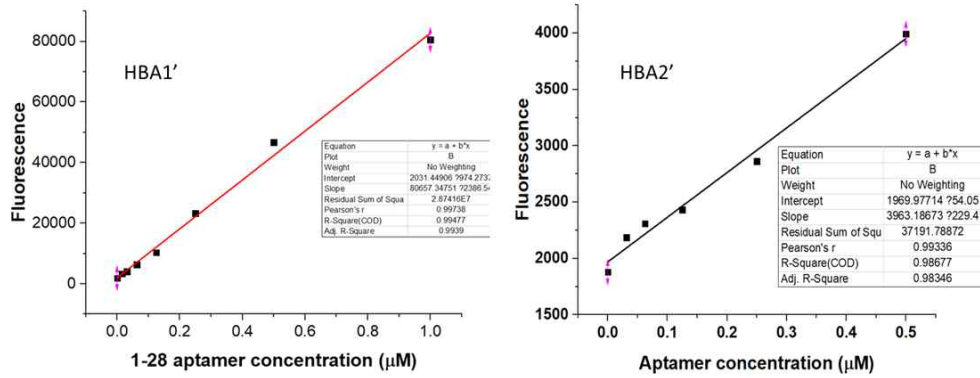


그림 132. 각 aptamer의 농도 대비 형광 신호 측정 결과

④ 합성된 PDAP의 형광 측정 결과 150kDa~300kDa 크기의 PDL을 이용한 경우가 가장 좋은 효율로 aptamer와 결합함을 보임. (그림 133)

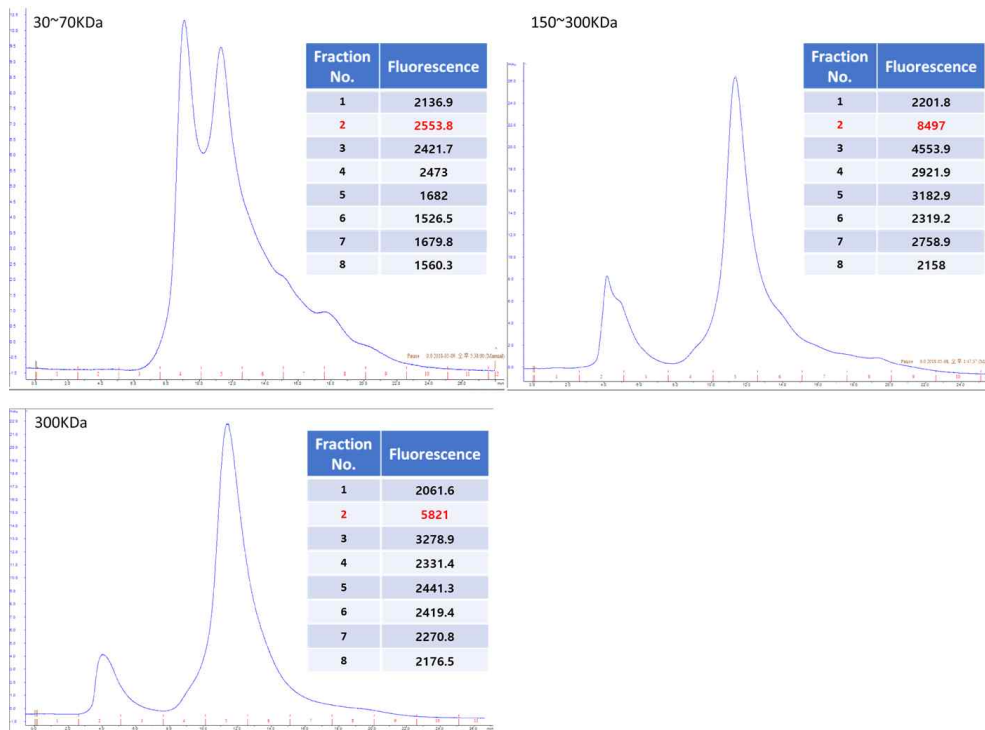


그림 133. 각 크기별 PDAP (PDL + HBA1') 의 형광 신호 측정 결과

⑤ 이후 진행한 특성분석에 있어서 PDAP로는 기존 단일 aptamer와 동일하게 rGO를 이용한 FRET effect 기반의 특성분석이 어려워 제대로 된 결과를 얻을 수 없어서 다른 방법을 시도하려함.

5. 기존과 다른 크기의 aptamer의 물리, 화학적 특성 분석

가. aptamer 및 유도체의 구조 분석

- ① 선별된 aptamer의 서열 최적화를 위하여 2차 구조를 분석하였다. 2차 구조는 M-fold web server를 통하여 분석되었으며, 이러한 서열의 구조는 그림 134에 나타내었음.
- ② 이러한 구조를 통하여, 2가지 서열 HBA1 과 HBA2가 각각 primer 부분을 제외한 stem-loop구조를 하나씩 가지는 것을 확인 하였으며, 이러한 Stem-loop구조의 서열을

이용한 2차 구조 분석 시 Stem-loop구조를 유지하는 것 확인. (그림 134) 이러한 Stem-loop구조를 가지는 서열을 HBA의 최적화 서열로 설정하여 후의 결합력 및 특이도 등의 특성 분석을 실시함. 이러한 최적화 서열은 각각 HBA1' , HBA2' 로 나타냄.

- ③ 기존의 연구결과에 따르면 압타머는 binding site와 그 외로 나누어지는 것이 아니라 binding assistant site가 존재하는 경우 또한 있어 초기에 발굴한 60 mer 크기의 압타머에 대해서도 결합력 및 특이도 등의 특성 분석을 실시함.

2-60

2-30

2-25

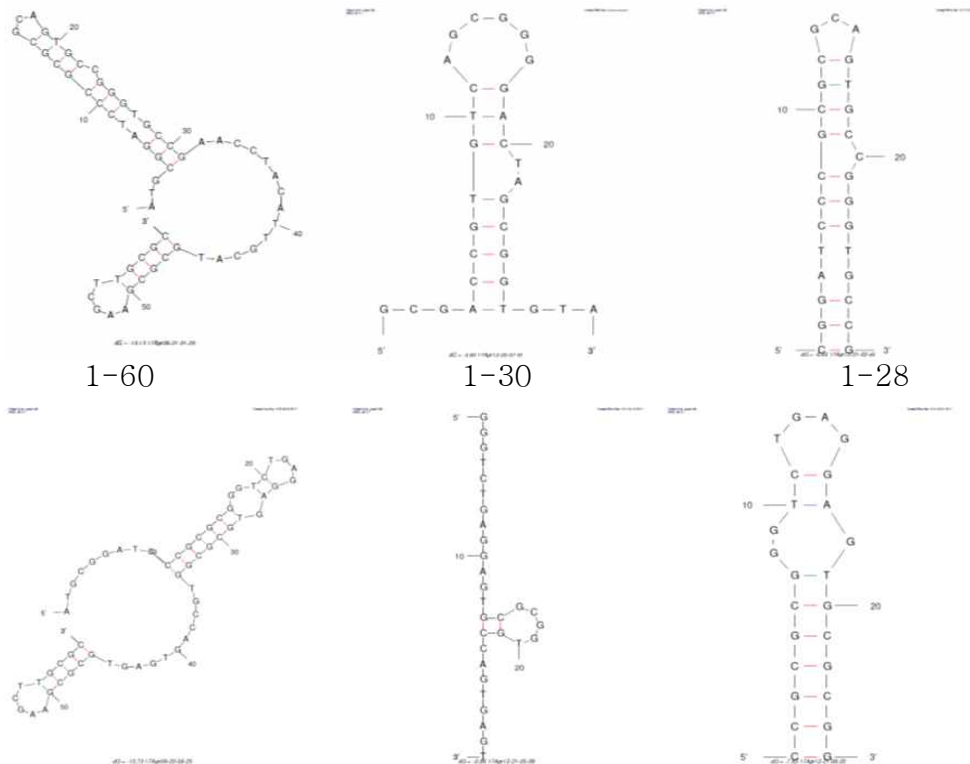


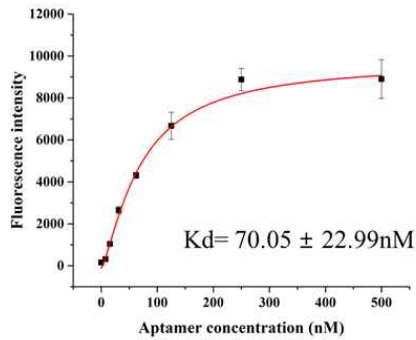
그림 134. 발굴한 압타머의 2차 구조 예측.

:압타머 2차 구조 및 서열 최적화를 통한 압타머 서열 축소. 2차 구조 분석을 통해 Stem-loop 구조를 가지는 부분을 확인 하였으며, 이 구조의 서열을 다시 2차구조 확인 시 Stem-loop구조를 유지하는 것을 확인함.

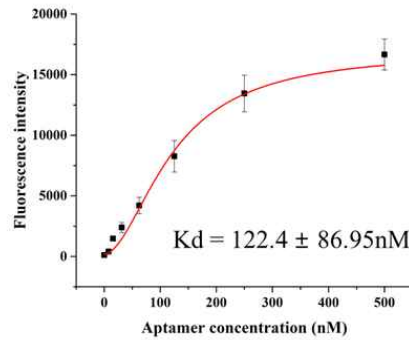
나. 합성된 압타머 서열과 약독화된 H5N1 바이러스의 결합력 분석

- ① 선별된 압타머의 특성 분석을 위하여 FAM(6-Carboxyfluorescein)이 연결된 압타머 서열을 주문, 합성하였다. FRET 현상에 의해 형광을 소광시키는 그래핀 산화물의 특성을 이용하여 결합력 측정.
- ② 구체적으로 그래핀 산화물 0.25 mg/ml 의 농도를 이용 선별된 압타머 (0 - 0.5 μ M)를 60분 동안 결합시켜 형광을 소광 시켰다. 다음으로 0.8 HAU 의 바이러스를 처리 후 30분 동안 상온에서 반응시킨 후 원심분리 후 상층액에 남아있는 용액을 이용 형광을 분석하여 결합력 측정.
- ③ 압타머의 농도가 높아 짐에 따라 0.8 HAU의 H5N1 바이러스에 의해 회복되는 형광의 세

기가 증가하였으며, 0.25 μM 에서 포화가 되는 것 확인. 이를 Origin을 이용 non-linear fitting을 이용 해리 상수를 계산한 결과 각각 70.05, 122.4 nM 의 결합력을 나타냄. (그림 135)



HBA1



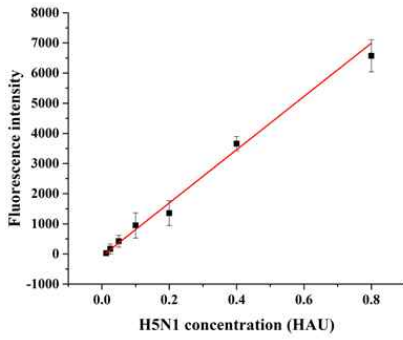
HBA2

그림 135. HBA1, HBA2와 약독화된 H5N1에 결합력 분석.

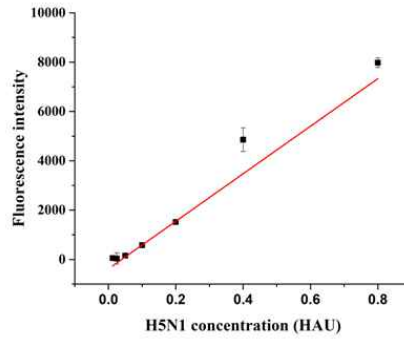
: aptamer 농도에 따른 신호 회복 경향. FAM 라벨링된 aptamer의 그래프으로부터 회복된 신호를 통해 결합력의 지표인 해리 상수(K_d)를 도출함.

다. 합성된 aptamer 서열의 검출 한계 분석

- ① 0.25 mg/ml 농도의 환원 그래핀 산화물과 0.5 μM aptamer를 반응시킨 후, 각 튜브에 H5N1 바이러스의 농도를 0 - 0.8 HAU로 다르게 처리하여 회복된 aptamer의 형광 세기를 측정함으로써 aptamer 서열의 H5N1 바이러스에 대한 검출 한계 분석.
- ② H5N1 바이러스의 농도가 증가함에 따라 포화되는 형광 신호를 나타내었고 적은 농도 범위에서 세부적으로 회복된 형광 세기를 측정한 결과, HBA1, HBA2는 0 - 0.8 HAU의 농도 범위에서 직선 그래프 확인.
- ③ 그래프를 통해 해당 aptamer가 각각 0.08, 0.1 HAU의 검출 한계 나타냄. (그림 136)



HBA1



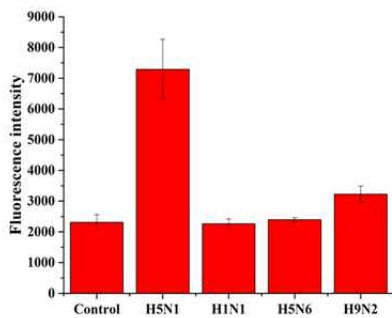
HBA2

그림 136. HBA1, HBA2에 대한 검출한계 분석.

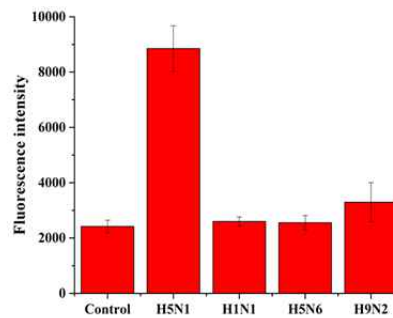
각각 압타머의 검출한계는 정량적으로 증가하는 농도 범위에서 선형 그래프를 산정 후 농도 0 HAU에서의 형광세기에 표준편차의 3배를 더하여 그 형광세기를 보이는 농도를 검출한계로 나타냄.

라. 합성된 압타머 서열의 특이도 분석

- ① 해당 압타머의 특이도를 분석하기 위해 H5N1 바이러스 0.25 HAU의 바이러스를 기준으로 정하여 다른 바이러스들과 압타머와의 결합력 비교.
- ② 실험 방법은 동일하게 환원 그래핀 산화물과 압타머를 상온에서의 교반을 통해 흡착시키고, 다른 종류의 바이러스를 처리함에 따라 회복되는 압타머의 형광 신호를 측정하는 방식으로 진행.
- ③ Haemagglutinin만이 다른 바이러스 H1N1과 Neuraminidase만이 다른 바이러스 H5N6, 그리고 Haemagglutinin, Neuraminidase 모두 다른 H9N2 바이러스 세 가지에 대하여 특이도 분석을 진행하였을 때, H5N1에 대한 형광 회복되는 정도에 비하여 굉장히 낮은 형광 신호의 회복을 보였으며, H5N1을 100% 기준으로 분석결과 두 압타머 모두 H9N2에서 10~20% 정도의 증가폭을 보일 뿐 그 밖의 표적에 대해서는 control과 유사한 결과를 보여 매우 높은 특이도를 갖는 것으로 확인됨. (그림 137)



HBA1



HBA2

그림 137. 압타머의 특이도 분석.

H5N1를 기준으로 다른 바이러스 (H9N2, H1N1)에 대한 형광 회복 신호와 비교한 결과 80% 이상의 결합 차이를 보이며 해당 서열이 다른 바이러스에 대해 결합을 보이지 않으며, H5N1에 대한 결합 특이도를 가지는 것을 확인함.

6. 추가 서열 확보 및 H5 단백질과 특이적으로 결합하는 압타머 획득 위한 스크리닝 진행

가. 항원 특이적 결합 압타머 스크리닝을 위한 단일가닥 DNA library 제작

- ① 기존에는 소량의 주형서열로부터 PCR을 통하여 스크리닝 진행을 위한 단일가닥 DNA를 제작을 하였으나 본 연구를 진행하면서 잦은 PCR이 서열의 편향성을 가져올 수 있다는 연구 결과를 접함에 따라 본 실험에서는 library로 사용할 대량의 임의 서열을 포함하는 단일가닥 DNA를 주문 제작함.
- ② 본 실험과정에서 사용한 library의 구조는 기존의 것과 같음.(그림 119)

나. 환원 그래핀 산화물을 이용한 고 병원성 조류독감 항원 결합 압타머 스크리닝

(1) SELEX

- ① 단일가닥 DNA를 이용하여 H5에 특이적으로 결합하는 압타머를 스크리닝하기 위하여 올리고뉴클레오타이드의 인 비트로 선택(In Vitro selection of oligonucleotide)인 SELEX를 수행하였음. 기존의 SELEX 방법에서 변형된 방법으로 환원 그래핀 산화물을 이용하였음. 본 실험을 진행함에 있어 표적물질로 H5 단백질을 발현하는 3종의 샘플을 섞어서 이용함.
- ② 단일가닥 DNA의 뉴클레오사이드는 환원 그래핀 산화물의 탄소 시트와 $\pi-\pi$ 상호작용을 통하여 결합하는 성질이 있음. 이러한 원리를 이용하여 library를 환원 그래핀 산화물 시트에 흡착시킴.
- ③ 이를 분리하는 방법으로는 1) 상보서열을 첨가하거나 2) 고농도의 염을 이용하여 단일가닥 DNA의 구조변화를 이용하여 떨어트리거나 3) 상호작용하는 물질을 첨가하여 마찬가지로 구조변화를 유도하여 떨어트리는 등의 방법을 이용함. 본 과정에서는 3)의 성질을 이용하여 표적물질과 빠르고 특이적으로 작용하는 서열만 library로부터 선별함
- ④ 이 때 H5N1와 단일가닥 DNA를 결합시킬 때 buffer조건에 따른 단백질과 단일가닥 DNA의 농도, 결합 시간, 결합조건을 통하여 (표 13) 극한 조건에서도 높은 결합력으로 결합할 것으로 예상되는 단일가닥 DNA를 확보하였음. 또한, 별도로 negative selection 과정을 진행하지 않고 매 라운드를 진행함에 있어 표적물질 외에 카운터 물질도 이용하여 특이도를 더 높일 수 있도록 하였음. 카운터 물질로는 이중의 헤마글루티닌 단백질을 발현하는 조류독감 바이러스 2종과 단일 바이러스에 잘 붙는 것을 방지하기 위해 H5 단백질을 발현하는 바이러스를 각각 1종씩 사용함

Round	ssDNA (pmol)	Counter Binding Condition	Binding time (min.)	Elution Condition	Target	Elution time (min.)
1	200	H1N1, H9N2 mixture	60	1X Binding Buffer	H5 virus mixture	60
2						45
3				45		
4		H5N6		1.5X Binding buffer		30
5		H5N1 (s)		2x Binding buffer		30
6		H5N1 (p)				20

표 13. H5 단백질 결합 압타머 스크리닝 조건.

: SELEX 반응의 각 라운드별 단일가닥 압타머 선별 조건. 라운드가 반복 진행될수록 반응 완충용액의 농도를 증가시키고, 반응 시간을 줄여 결합력이 좋은 압타머를 선별하고자 함.

⑤ 우선 단일가닥 DNA library를 환원 그래핀 산화물 및 카운터 물질과 함께 넣어 반응을 진행한 뒤 카운터 물질과 결합한 단일가닥 DNA 서열을 원심 분리기를 이용하여 제거해 줌. 바닥에 가라앉은 환원 그래핀 산화물에는 카운터 물질과는 결합을 잘 하지 않는 단일가닥 DNA만 흡착되어 있음. 이후 남아 있는 환원 그래핀 산화물에 표적물질을 넣어 반응시키면 표적물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 DNA 서열이 환원 그래핀 산화물로부터 용출되어 나옴. 용출되어 나온 서열들은 PCR을 통해 증폭하여 앞서 진행한 방식대로 네이티브 DNA 전기영동을 통해 확보.

⑥ Crush and soak과 에탄올 침전법을 이용하여 증폭된 단일가닥 DNA를 확보하였고 이를 다음 round에서 사용함.

(2) H5 단백질 발현하는 조류독감 바이러스와 결합하는 단일가닥 DNA 압타머 서열 분석

① 최종 5 라운드의 SELEX 과정을 통해 얻은 단일가닥 DNA의 서열 분석을 위해 Next Generation Sequence (NGS)를 진행. 분석한 결과 후보군이라 여겨지는 서로 다른 서열을 갖는 단일가닥 압타머 28종을 선별하였고 그 중 빈도수가 가장 높은 1개의 서열을 선정함 (표 14).

Sequence (random sequence only)	Frequency	Size
GGGTCTGAGGAGTGC GCGGTGCCAGTGAGT	206	30nt
TGGTCTGAGGAGTGC GCGGTGCCAGTGAGT	10	30nt
TGACCGGAGGGAGGCGCGCCACACTGCGTGTC	9	32nt
GGACCGAAGGGACGCGCGCCTTGCCTTC	9	29nt
CGACAGAAGAGAGGCGCGCGTCCCTTCGGTCC	8	33nt
GACACGCAGTGTGGCGCGCCTCCCTCCGGTCA	6	32nt
GACACCCAGTGGTGGCGCGCCTCACTGT	6	28nt
GGACCGAAGGGACGCGCGCCTCTCTTCTGTGCG	4	33nt
ACGGTGTGACCGGGCGCGCCTCCCTCCGTGCG	4	32nt
CGCCGATCGGGTGGCGCGCTTCCCGTTGGTC	4	31nt
GACACAAAGTGTGGCGCGCCTCACCTT	4	27nt
CGAGCAAAGTGAGGCGCGCCACACTGTGTGTC	3	32nt
CGAGCACAGTGTGGCGCGCCACACTGGGTGTC	2	33nt
CGAACAGCATGGAGGCGCGCTCCCTGACGTCC	2	32nt
CGACGGAGGGAGGCGCGCCCGGTGACACCGT	2	32nt
GGACCGAAGGGACGCGCGCCTCTCTTCTGTC	2	32nt
GGACGTCAGGGAGCGCGCCTCCATGCTGTTGCG	2	32nt
AGGTCTGAGGAGTGC GCGGTGCCAGTGAGT	2	30nt
GGGTCTGAGGAGTGC GCGGTGCCAGTTAGT	2	30nt
GGGTCTGAGGAGTGC GCGGTGCAGTGAGT	2	29nt
GGTCTGAGGAGTGC GCGGTGCCAGTGAGT	2	29nt
GCACGGAACAACGGGCGCGCCTCCTTGT	2	28nt
GCACGTCACAACGGGCGCGCCTCCTTGT	2	28nt
GTCTGAGGAGTGC GCGGTGCCAGTGAGT	2	28nt
GACACACAGTGTGGCGCGCCTCACTCT	2	27nt
GACACACAGTGTGGCGCGCCTCACTTT	2	27nt
GACACGCAGTGTGGCGCGCCTCACTTT	2	27nt
GACATCAGGAGCGCGCCCTTACGGT	2	27nt

표 14. H5 발현 조류독감 바이러스 결합 압타머 서열.

: NGS 방식으로 서열 분석을 진행하여, 총 28종의 서로 다른 압타머 서열 발굴함.

7. 발굴한 압타머의 물리, 화학적 특성 분석

가. 합성된 압타머 서열과 약독화된 표적물질과의 결합력 분석

- ① 선별된 압타머의 특성 분석을 위하여 FAM(6-Carboxyfluorescein)이 연결된 압타머 서열을 주문, 합성하였다. FRET 현상에 의해 형광을 소광시키는 그래핀 산화물의 특성을 이용하여 결합력 측정.
- ② 구체적으로 그래핀 산화물 0.25 mg/ml 의 농도를 이용 선별된 압타머 (0 - 1 μ M)를 60 분 동안 결합시켜 형광을 소광 시켰다. 다음으로 0.8 HAU 의 바이러스를 처리 후 30분 동안 상온에서 반응시킨 후 원심분리 후 상층액에 남아있는 용액을 이용 형광을 분석하여 결합력 측정.

③ 압타머의 농도가 높아짐에 따라 0.8 HAU의 H5 단백질 발현하는 조류독감 바이러스에 의해 회복되는 형광의 세기가 증가하였으며, 1 μ M에서 포화가 되는 것 확인. 이를 Origin을 이용 non-linear fitting을 이용 해리 상수를 계산한 결과 453.1 nM의 결합력을 나타냄. (그림 138)

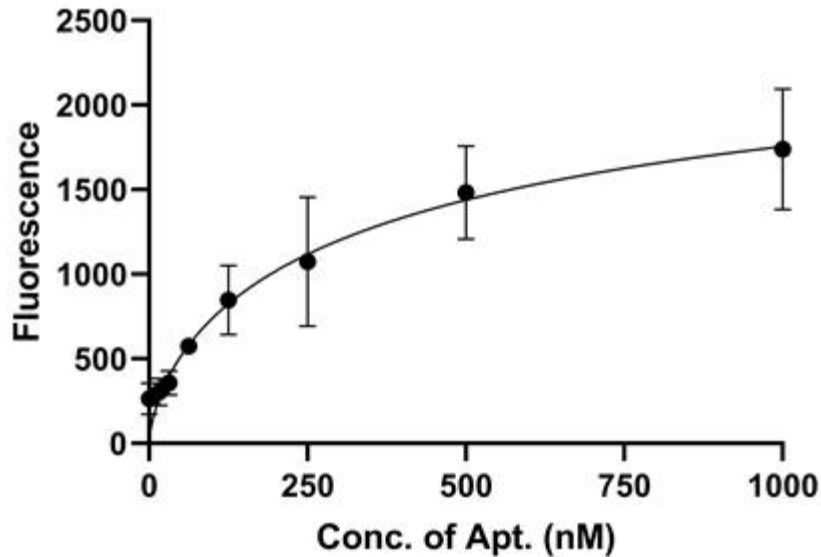


그림 138. 약독화된 H5N1에 결합력 분석.

: 압타머 농도에 따른 신호 회복 경향. FAM 라벨링된 압타머의 그래핀으로부터 회복된 신호를 통해 결합력의 지표인 해리 상수(Kd)를 도출함.

나. 합성된 압타머 서열의 특이도 분석

- ① 해당 압타머의 특이도를 분석하기 위해 H5 단백질 발현하는 조류독감 바이러스 0.25 HAU의 바이러스를 기준으로 정하여 다른 바이러스들과 압타머와의 결합력 비교.
- ② 실험 방법은 동일하게 환원 그래핀 산화물과 압타머를 상온에서의 교반을 통해 흡착시키고, 다른 종류의 바이러스를 처리함에 따라 회복되는 압타머의 형광 신호를 측정하는 방식으로 진행.
- ③ Haemagglutinin이 다른 바이러스 H1N1과 H9N2 그리고 각각의 H5 단백질을 발현하는 H5N1-S (snu50-5), H5N1-P (rH5N1(p)), H5N6 (rH5N6(p)-PB2(310)) 각각의 샘플 및 이를 혼합한 샘플 (SELEX 과정 중 표적물질)로 총 여섯 가지에 대하여 특이도 분석을 진행.
- ④ 하였을 때, H5N1에 대한 형광 회복되는 정도에 비하여 굉장히 낮은 형광 신호의 회복을 보였으며, H5N1을 100% 기준으로 분석결과 두 압타머 모두 H9N2에서 10~20% 정도의 증가폭을 보일 뿐 그 밖의 표적에 대해서는 control과 유사한 결과를 보여 매우 높은 특이도를 갖는 것으로 확인됨. (그림 139)

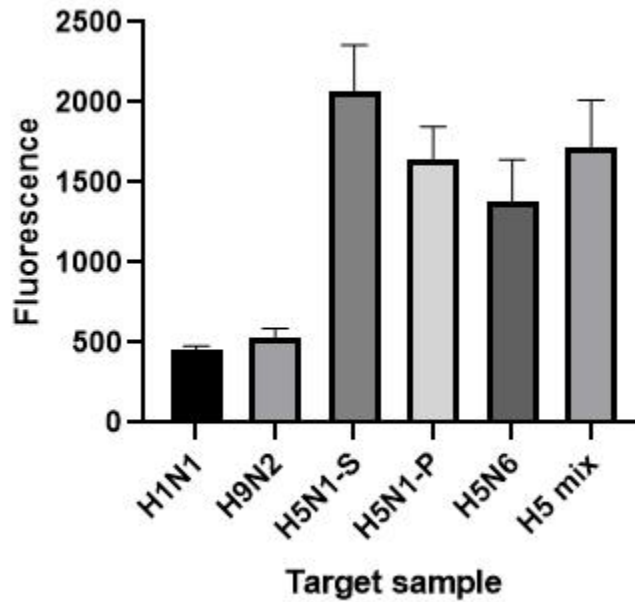


그림 139. 압타머의 특이도 분석.

형광 회복 신호와 비교한 결과 큰 결합 차이를 보이며 해당 서열이 다른 바이러스에 대해 매우 적게 결합을 보이며, H5 계열 바이러스에 대한 결합 특이도를 가지는 것을 확인함.

○ 기관별 수행 내역 (협동연구기관 : 서울대학교 수의대)

: 테스트용 조류 인플루엔자 바이러스 선정 및 항원 제공

1. H9N2 조류인플루엔자 최신 분리주 테스트용 패널 구축 및 바이러스 제공
 - 국내 백신주로 사용되는 A/chicken/Korea/01310/2001(H9N2) (01310) 바이러스를 10일령 발육란에 증식 후, BEI를 이용하여 바이러스 불활화함. 불활화 여부 확인을 위해 발육란에 불활화한 바이러스 재접종하여 3일간 배양 후 1% chicken RBC를 이용한 HA test로 확인.
2. H5N1 조류인플루엔자 바이러스 항원 제공
 - 국내 저병원성 H5N1 조류인플루엔자 바이러스 분리주인 A/wild duck/Korea/SNU50-5/2009(H5N1) (snu50-5) 바이러스와 A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) 바이러스를 사용하여 재조합한 clade 2,3,2,1c H5N1 바이러스를 10일령 발육란에 증식 후, BEI로 불활화하여 항원으로 제공함.
3. H1N1 조류인플루엔자 바이러스 항원 제공
 - PR8 바이러스를 위와 동일하게 10일령 발육란에 증식 후, BEI로 불활화하여 항원 제공.

4. H5N8, H5N6 조류인플루엔자 바이러스 항원 제공

- 국내에서 2014~2017년 분리된 clade 2.3.4.4 H5N8 바이러스의 유전자를 모아서 consensus한 서열로 합성한 HA, NA 유전자를 이용함.
- 역유전학시스템을 사용하여 PR8의 내부 유전자와 01310 바이러스의 PB2 유전자를 가지고 있는 재조합 clade2,3,4,4 H5N8, H5N6 바이러스를 제작하여 발육란에서 증식시킴.
- BEI로 불활화 후, 불활화 여부 확인 후 항원으로 제공.

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절. 목표

1. 고병원성 조류독감(H5N1) 항원의 클로닝 및 정제
1. 다양한 고병원성 조류독감 항원 인식용 저분자 프로브(압타머/웹타이드) 개발
1. 병원체 검출의 효율 증진 위한 다중인식 프로브 폴리머 (Polyvalent Directed Aptamer Polymer, PDAP) 개발
1. 사출성형이 가능한 면역입자응집반응용 마이크로 유체 소자 설계 및 제작
5. 압타머를 이용한 조류인플루엔자 검출 시스템 개발
6. 샘플 전처리 및 검출 시스템 개발
7. 압타머 기반 조류독감 병원균 응집입자의 산란광측정 기구, 회로 프로토타입 제작 및 휴대용 조류독감 진단용 테스트 장비 개발
8. 조류독감 바이러스 응집인자 측정용 기구/회로 설계 및 시스템 제작 회로시스템 연계 스마트폰 앱 개발
9. 휴대용 조류독감 진단 시스템(성능), 스마트폰 앱, 시스템(기구) 디자인 최적화 및 시험 평가
10. 테스트용 조류 인플루엔자 바이러스 항원제공

2절. 목표 달성여부

목 표	달 성 도(%)	내 용
고병원성 조류독감(H5N1) 항원의 클로닝 및 정제	100%	- 위탁연구기관으로부터 확보한 Plasmid에서 유전자 벡터를 바꿔 과발현 가능한 재조합 DNA 확보 - Ni ²⁺ -sepharose resin을 이용한 친화성 크로마토그래피를 이용한 재조합 단백질 확보.
다양한 고병원성 조류독감 항원 인식용 저분자 프로브 (압타머/웹타이드) 개발	100%	- Filtration방법을 이용한 SELEX를 통하여 16종 압타머 서열 확보 - 구조분석 후 결합자리로 여겨지는 부분만 합성하여 rGO 및 AuNP를 이용한 결합특성 분석 결과 2종의 압타머가 강한 결합력 및 특이도 나타냄 확인. - 전체서열을 합성하여 rGO 및 AuNP를 이용한 결합특성 분석 결과 기존 2종의 압타머가 종전의 결합자리만 합성한 경우보다 강한 결합력 및 특이도 나타냄 확인.

		<ul style="list-style-type: none"> - rGO 방법을 이용한 SELEX를 통하여 28종 압타머 서열 확보. 그중 최빈출 서열 1종을 합성하여 실험 진행 - 전체서열을 합성하여 rGO를 이용한 결합특성 분석 결과 강한 결합력 및 특이도 나타냄 확인.
병원체 검출의 효율 증진 위한 다중인식 프로브 폴리머 (Polyvalent Directed Aptamer Polymer, PDAP) 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> - SPDP linker를 이용하여 poly-D-lysine(PDL) backbone에 압타머를 결합하여 PDAP 합성
사출성형이 가능한 면역입자응집반응용 마이크로 유체 소자 설계 및 제작	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 사출성형기술을 이용한 면역입자응집반응용 마이크로 유체소자 설계 및 제작 완료
압타머를 이용한 조류인플루엔자 검출 시스템 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 압타머가 표면에 부착된 폴리스티렌 파티클의 면역응집반응을 확인 최적화된 압타머와 폴리스티렌 파티클의 농도로 조류인플루엔자 농도에 따른 산란광 강도 측정 데이터 확보
샘플 전처리 및 검출 시스템 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 입자의 자가응집 여부를 확인하고, 이를 방지하기 위해 멤브레인에 보관하는 방법 확인 - 입자간 자가응집을 막기 위해 glass fiber막을 이용하여 응집을 방지하고 장기간 보존 가능하였으며, release buffer를 이용 면역응집 반응 진단이 가능한 충분한 양의 방출을 확인 - 현장에서 샘플링후 손쉽게 진단장치에 로딩 가능한 진단입자 보관 및 릴리즈 소자 개발 완료
압타머 기반 조류독감 병원균 응집입자의 산란광측정 기구, 회로 프로토타입 제작 및 휴대용 조류독감 진단용 테스트 장비 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 광원소자 선정(LED 380 nm) 및 수광 센서(포토다이오드)선정 완료 - 광학 신호 검출 회로/기구 설계 및 개발 완료 - 집광부, 수광부, 마이크로칩, 및 회로로 구성된 프로토타입 테스트 장비 개발 완료
조류독감 바이러스 응집인자 측정용 기구/회로 설계 및 시스템 제작 회로시스템 연계 스마트폰 앱 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 프로세싱 및 전원공급 회로 설계 및 개발 완료 - 시스템 기능 구현 (양성/음성 구분) S/W 및 Firmware 개발 완료 - 광학 검출 개선 구조 기구(미세 조절부등)부 설계 및 개발 완료 - 스마트폰에서 진단 결과(양성/음성) 확인 가능한 앱 1차 개발 완료
휴대용 조류독감 진단 시스템(성능), 스마트폰 앱, 시스템(기구) 디자인 최적화 및 시험 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 민감도를 고려한 집광장치와 포토센서 기구부 및 시린지 전후 장치 개발 완료 - 미세 유체칩 연동 산란광 시스템 개발 완료 - 안드로이드 스마트폰 앱(App) 최적화 기반 시스템과 폰 양자간의 블루투스 통신에 의한 양성/음성 판정 가능 휴대형 시스템 구현 완료
테스트용 조류 인플루엔자 바이러스 항원제공	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 조류인플루엔자 바이러스를 다양한 subtype으로

		제작 후 항원으로 제공하였음, (H9N2, H1N1, H5N1, H5N6, H5N8)
--	--	---

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

1. 사출성형으로 마이크로 유체 소자를 대량 생산 기술 확보를 통한 다른 질병 진단 기술에 적용 가능
2. 압타머를 이용한 단백질 및 세포 탐지 기술은 의료 진단용 바이오센서 연구에 있어서 항체 시스템을 대체할 수 있는 새로운 기술 확보 및 응용 가능
3. 관련 분야의 원천기술 확보를 기반으로 바이오투입 라이브러리 콘텐츠 구축 및 high-throughput 분석 시스템을 개발하여 다양한 질병관련 물질 동시 분석을 통한 질병 진단 기술로의 연구 확장
4. 새로운 압타머 기반 초 민감도 조류독감 바이러스 검출 시스템 개발 연구에 기여 압타머를 기반으로 한 높은 안정성 및 검출 민감도를 가진 다양한 병원(病原) 검출 시스템 개발 가능
5. 개발된 검출 시스템을 통한 질병 안전 관리 시스템 구축 기반 주기적인 안정성 검사를 통한 질병으로부터 안전 확보 및 관리 시스템 구축에 기여
6. 조류독감 외 가축 질병 진단 시스템 구축 및 POCT 진단에 확대 적용 가능
7. 개발된 키트와 시스템의 목표 시장은 국내의 질병관리본부, 국립수의과학 검역원, 국립 환경과학원등 국가 기관을 1차 목표로 하고 추후 세계 시장으로 확대하여 진출할 계획임.
8. 압타머 기반의 신규 약물 개발 가능성 확인으로 압타머의 추가적인 in-vivo 실험 등을 진행하여 안정성 확보 및 이를 바탕으로 친환경약용 물질로 활용 가능
9. 동물질병이 발생 했을 때 현장에서 신속한 조치가 가능하여 질병 방역을 신속하게 대처 할 수 있을 것으로 기대된다.
10. 식중독균을 신속하고 간단하게 검출 할 수 있어 식품안전관리에 활용 가능할 것을 판단된다.
11. 기존 센서로 검출이 어려운 화학물질에 의한 환경오염 모니터링에 활용
12. 가정용 정수기나 가전제품에 내장시켜 실시간 세균오염 모니터링 기능에 활용
13. 특수한 항체를 제작함으로써 새로운 독성물질에 대한 특이 항체의 개발에 활용
14. IT 기술과 결합하여 중앙 집중적 모니터링 시스템으로 활용
15. 본 연구결과에서 개발한 바이오센서 시스템은 현재 외국에서 전량 수입되고 있는 Dip stick type의 Rapid kit를 대신하여 동시에 다중 잔류 항생제 검출용으로 상품화를 계획하고 있음.

뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

210mm×297mm[백상지(80g/㎡) 또는 중질지(80g/㎡)]